

การพัฒนากระดาษยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

Development of Antibacterial Paper



โดย

นายศิวกร วจิศักดิ์สิทธิ์

นายฐิติกร สุทัศน์

ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

เรื่อง การพัฒนากระต่ายขี้ยังเชื้อแบคทีเรีย

โดย นายศิวกร วรกิจดิ์สิทธิ์ และ นายฐิติกร สุทัศน์

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการการสอบโครงการ

P. Padonpras

ประธานกรรมการ

(อาจารย์ ดร.ภาณุวัฒน์ ผดุงรส)

ธนิต วัฒนสาร

อาจารย์ที่ปรึกษา

(อาจารย์ ดร.ธนิตส์ ปราณินรัตน์)

เจนจิรา ปานชมพู่

กรรมการ

(อาจารย์ ดร.เจนจิรา ปานชมพู่)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชา

Dr.

(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย พาราสุข)

หัวหน้าภาควิชาเคมี

วันที่ 22 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2558

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ  ดีมาก  ดี  พอใช้



Title Development of Antibacterial Paper

Student Name 1. Mr.Sivakorn Wajeeksakrit ID 5433145623

2. Mr.Thitikorn Suthat ID 5433080423

Advisor Dr.Thanit Praneenararat

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University,

Academic year 2014

### Abstract

One of the current global health concerns is bacterial infection, which can cause resistance if treated incorrectly. This results in urgent needs for prevention methods such as the use of antibacterial material that can inhibit bacterial growth. Antimicrobial peptides, a group of short peptides, are among the known bioactive scaffolds that can be immobilized onto surfaces to make them antimicrobial. An example includes a polyethylene glycol hydrogel containing the immobilized peptide HHC10 (H-KRWWKWIRW-NH<sub>2</sub>) coated on PET surface which showed antibacterial activities against *S.aureus* and *S.epidermidis*. In addition, previous results suggested that the amount of positive charges on surface and length of antimicrobial peptide also affect the antimicrobial activity. Herein, HHC10 antimicrobial peptides with different lengths were synthesized on cellulose support, which is inexpensive, organic-solvent resistant, and non-toxic. Thereafter, the antibacterial activities against *S.aureus* and *E.coli* were studied. The results showed that peptides with different length have varying antibacterial activities – the longer the length, the higher the antibacterial activity.

Furthermore, a nucleophilic fluorescent dye, 4-(1,3-diaminopropyl)-7-nitrobenz-[2,1,3-d]-oxadiazole was synthesized. This small and water-soluble molecule was used to indicate the efficiency of immobilization of organic compounds on paper via a variety of chemical reactions. As expected, the results showed that the compound can be used to indicate the efficiency of immobilization by observing the fluorescence intensity when subjected to a light source with an appropriate wavelength. That is, the fluorescence intensity is directly proportional to the concentration of the retained compound after washing, thus indirectly indicating the efficiency of covalent immobilization.

Keywords: antimicrobial peptide, cellulose, oxadiazole

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องการพัฒนากระดาศษย์บั้งเชื้อแบคทีเรีย สำเร็จลุล่วงได้ด้วยคามอนุเคราะห์จากอาจารย์ ดร.ธนัชฐ์ ปรานีนรารัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ และสละเวลาอันมีค่าในการให้ความช่วยเหลือตลอดการวิจัย เอื้อเพื่อสถานที่และสารเคมีในการทำการทดลอง และช่วยแก้ไขปรับปรุงรายงานฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ผู้ทำวิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง และขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ภาณุวัฒน์ ผดุงรส และ อาจารย์ ดร.เจนจิรา ปานชมพู ที่สละเวลาให้เกียรติมาเป็นกรรมการในการสอบงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้วิชาการต่าง ๆ อันเป็นพื้นฐานสำคัญที่สามารถทำให้ งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบคุณภาควิชาเคมีที่สนับสนุนการใช้ห้องปฏิบัติการ และเครื่องมือวิจัยต่าง ๆ ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รุ่งอรุณ วาติถิ สิริศรัทธา อาจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คุณมนรวัส รวยธนพานิช คุณอภิรติ โอภิชากรณ และคุณณัฐพล จิระกิติวุฒิ นิสิตปริญญาโทในกลุ่มวิจัยของ อาจารย์ ดร.ธนัชฐ์ ปรานีนรารัตน์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานและให้คำแนะนำในการทำงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย ประจำปี 2557 ที่ให้ทุนสนับสนุนสำหรับการทำงานวิจัย ผู้วิจัยขอระลึกถึงในความกรุณาช่วยเหลือและห่วงใยเสมอของทุกท่านที่ได้กล่าวมาข้างต้นและบุคคลที่ไม่ได้เอ่ยนามไว้ ณ ที่นี้

ภาควิชาเคมี  
คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ค
Abstract	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญรูปประกอบ	ช
สารบัญตารางประกอบ	ญ
สารบัญคำย่อ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วิธีการทดลอง	11
2.1 วิธีการทดลองทั่วไป	11
2.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์	11
2.1.2 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์	11
2.1.3 สารเคมี	12
2.2 การสังเคราะห์พื้นผิวดัดแปรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เพื่อพิสูจน์ทราบโครงสร้างด้วยเทคนิค MALDI-TOF Mass Spectrometry	16
2.2.1 การเตรียมพื้นผิวกระดาษเซลลูโลส	16
2.2.2 การทำ Tosylation ลงบนพื้นผิว	18
2.2.3 การติด Spacer ลงบนพื้นผิว	18
2.2.4 การติด Linker ลงบนพื้นผิว	18
2.2.5 การปิดหมู่ฟังก์ชันอะมิโนบนพื้นผิว	19
2.2.6 การปลดหมู่ Fmoc ออก เพื่อนำไปวัดค่า loading จาก Fluorenyl group	19
2.2.7 การปลดหมู่ปกป้อง Fmoc ออก เพื่อนำไปต่อกรดอะมิโนตัวถัดไป	21
2.2.8 การสังเคราะห์กรดอะมิโนลงบนพื้นผิวดัดแปร	22
2.2.9 การปลดหมู่ปกป้อง Boc และ Pbf ออก และการตัดสายเพปไทด์ออกจาก กระดาษเพื่อนำไปตรวจสอบด้วย MALDI-TOF Mass Spectrometer	22
2.3 การสังเคราะห์พื้นผิวดัดแปรเพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย	23

2.4 การศึกษาผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียบนพื้นผิวตัดแปรร	24
2.5 การศึกษาการย้อมสีฟลูออเรสเซนต์ 4-(1,3-diaminopropyl)-7-nitrobenz-[2,1,3-d]-oxadiazole หรือ NBD-Diamine	24
2.5.1 การเติมหมู่ปกป้อง Boc ให้กับ 1,3-Diaminopropane	24
2.5.2 การสังเคราะห์ 4-(N-Boc1,3-diaminopropyl)-7-nitrobenz-[2,1,3-d]-oxadiazole	25
2.5.3 การปลดหมู่ปกป้อง Boc ออก	25
2.6 การศึกษาการย้อมสีฟลูออเรสเซนต์ NBD-diamine	26
2.6.1 พื้นผิวเซลลูโลสที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับ Divinyl Sulfone	26
2.6.2 พื้นผิวเซลลูโลสที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับ Sodium periodate	26
2.6.3 พื้นผิวเซลลูโลสที่ผ่านการทำปฏิกิริยา Tosylation	27
2.6.4 พื้นผิวเซลลูโลสที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับ TEMPO	27
บทที่ 3 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	29
3.1 การสังเคราะห์พื้นผิวตัดแปรรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและพิสูจน์ทราบโครงสร้างด้วยเทคนิค MALDI-TOF Mass Spectrometry	29
3.2 การสังเคราะห์พื้นผิวตัดแปรรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย	33
3.3 การสังเคราะห์สีย้อมฟลูออเรสเซนต์ 4-(1,3-diaminopropyl)-7-nitrobenz-[2,1,3-d]-oxadiazole หรือ NBD-diamine	37
3.3.1 การเติมหมู่ปกป้อง Boc ให้กับ 1,3-diaminopropane	37
3.3.2 การสังเคราะห์ NBD-(Boc)-diamine	38
3.3.3 การปลดหมู่ปกป้อง Boc ออก	39
3.4 การศึกษาการย้อมสีฟลูออเรสเซนต์ NBD-diamine	41
3.4.1 พื้นผิวเซลลูโลสที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับ divinyl sulfone	41
3.4.2 พื้นผิวเซลลูโลสที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับ sodium periodate	42
3.4.3 พื้นผิวเซลลูโลสที่ผ่านการทำปฏิกิริยา Tosylation	43
3.4.4 พื้นผิวเซลลูโลสที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับ TEMPO	43
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	47
เอกสารอ้างอิง	48
ภาคผนวก	50
ประวัติผู้วิจัย	63

## สารบัญรูปประกอบ

รูปที่		หน้า
1.1	การสร้างไปโอฟิล์มของแบคทีเรีย	1
1.2	การทำงานของ biocide-releasing polymer, polymeric biocide และ biocidal polymer	2
1.3	ลักษณะของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ และตัวอย่างของ biocidal polymer ที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็น quaternary ammonium	3
1.4	โครงสร้างของพอลิเมอร์ที่ปลายทั้งสองเป็น biocidal end group และ satellite group และหลักการทำงานของพอลิเมอร์	4
1.5	หลักการทำงานของ antimicrobial surface	5
1.6	กลไกการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแบบ barrel-stave, carpet และ toroid	7
1.7	แผนภาพตัวอย่างการเกิดปฏิกิริยาของโมเลกุลฟลูออเรสเซนต์กับหมู่ฟังก์ชันที่จำเพาะ	9
1.8	โมเลกุลของ fluorescein, rhodamine และ nitrobenzoxadiazole	10
2.1	แผนภาพการสังเคราะห์พื้นผิวตัดแปรโดยสังเขป	17
2.2	โครงสร้างของเพปไทด์ 9 หน่วย ตามลำดับการสังเคราะห์	23
3.1	กลไกการเกิดพันธะเพปไทด์โดย DIC และ HOBt	30
3.2	กลไกการเกิดปฏิกิริยาการปลดหมู่ปกป้องออก	31
3.3	โครงสร้างของกรดอะมิโน ทริปโตฟาน, อาร์จินีน, ไอโซลิวซีน และ ไลซีน	32
3.4	MALDI-TOF MS spectrum ของเพปไทด์ 9 หน่วยที่สังเคราะห์ขึ้น	32
3.5	แผนภูมิแสดง %inhibition ของ <i>S.aureus</i> และ <i>E.coli</i>	35
3.6	ขั้นตอนการสังเคราะห์ NBD-diamine	37
3.7	กลไกการเกิดปฏิกิริยาเติมหมู่ปกป้อง Boc	37
3.8	<sup>1</sup> H-NMR spectrum ของ N-Boc-1,3-Diaminopropane	38
3.9	กลไกการเกิดปฏิกิริยา addition - elimination	38
3.10	<sup>1</sup> H-NMR spectrum ของ 4-(N-Boc-1,3-diaminopropyl)-7-nitrobenz-[2,1,3-d]-oxadiazole	39
3.11	กลไกการเกิดปฏิกิริยาปลดหมู่ Boc	40
3.12	<sup>1</sup> H-NMR spectrum ของ 4-(1,3-diaminopropyl)-7-nitrobenz-[2,1,3-d]-oxadiazole	40
3.13	กลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่างพื้นผิวเซลลูโลส กับ divinyl sulfone และการย้อมสี NBD-diamine	41
3.14	กลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่างพื้นผิวเซลลูโลส กับ sodium periodate	42
3.15	กลไกการเกิดปฏิกิริยาย้อมสี NBD-diamine	42



3.16	กลไกการเกิดปฏิกิริยา Tosylation บนพื้นผิวเซลลูโลส	43
3.17	กลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่างพื้นผิวเซลลูโลส กับ TEMPO	44
3.18	ภาพพื้นผิวดัดแปรหลังจากย้อมด้วยสีย้อมฟลูออเรสเซนต์ ที่ความยาวคลื่น 254 nm และ 365 nm	45
3.19	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสีย้อมค่าจากโปรแกรม ImageJ โดยแยกแต่ละวิธี (254 nm)	46
3.20	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสีย้อมค่าจากโปรแกรม ImageJ โดยแยกแต่ละวิธี (254 nm)	46
ผ-1	MALDI-TOF MS spectrum ของเพปไทด์ 9 หน่วยที่สังเคราะห์ขึ้น	51
ผ-2	<sup>1</sup> H-NMR spectrum ของ N-Boc-1,3-Diaminopropane	52
ผ-3	<sup>1</sup> H-NMR spectrum ของ 4-(N-Boc-1,3-diaminopropyl)-7-nitrobenz -[2,1,3-d]-oxadiazole	53
ผ-4	<sup>1</sup> H-NMR spectrum ของ 4-(1,3-diaminopropyl)-7-nitrobenz-[2,1,3-d]-oxadiazole	54

## สารบัญตารางประกอบ

ตารางที่		หน้า
2.1	แสดงค่าต่าง ๆ ที่ใช้ในการวัดค่าการดูดกลืนแสงของ Fmoc เพื่อคำนวณหา loading	21
2.2	แสดงน้ำหนักของกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการสังเคราะห์ลงบนพื้นผิวตัดแปร สำหรับใช้ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย	25
3.1	แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 296 nm ของ Fmoc จาก Rink linker และ Lysine ตัวที่ 9 และค่า loading	31
3.2	แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 296 nm ของ Fmoc จากกรดอะมิโน ลำดับต่าง ๆ และค่า loading	33
3.3	แสดงผลที่ได้จากการทดสอบวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย <i>S.aureus</i> กับพื้นผิวตัดแปร	34
3.4	แสดงผลที่ได้จากการทดสอบวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย <i>E.coli</i> กับพื้นผิวตัดแปร	35
ผ-1	ข้อมูลผลการทดสอบยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย <i>S.aureus</i> ด้วยพื้นผิวตัดแปร	55
ผ-2	ข้อมูลผลการทดสอบยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย <i>E.coli</i> ด้วยพื้นผิวตัดแปร	57
ผ-3	ข้อมูลจากโปรแกรม ImageJ ของพื้นผิวตัดแปรที่ทำปฏิกิริยากับ divinyl sulfone ที่ความยาวคลื่น 254 nm	59
ผ-4	ข้อมูลจากโปรแกรม ImageJ ของพื้นผิวตัดแปรที่ทำปฏิกิริยากับ divinyl sulfone ที่ความยาวคลื่น 365 nm	59
ผ-5	ข้อมูลจากโปรแกรม ImageJ ของพื้นผิวตัดแปรที่ทำปฏิกิริยากับ sodium periodate ที่ความยาวคลื่น 254 nm	60
ผ-6	ข้อมูลจากโปรแกรม ImageJ ของพื้นผิวตัดแปรที่ทำปฏิกิริยากับ sodium periodate ที่ความยาวคลื่น 365 nm	60
ผ-7	ข้อมูลจากโปรแกรม ImageJ ของพื้นผิวตัดแปรที่ทำปฏิกิริยา Tosylation ที่ความยาวคลื่น 254 nm	61
ผ-8	ข้อมูลจากโปรแกรม ImageJ ของพื้นผิวตัดแปรที่ทำปฏิกิริยา Tosylation ที่ความยาวคลื่น 365 nm	61
ผ-9	ข้อมูลจากโปรแกรม ImageJ ของพื้นผิวตัดแปรที่ทำปฏิกิริยากับ TEMPO ที่ความยาวคลื่น 254 nm	62
ผ-10	ข้อมูลจากโปรแกรม ImageJ ของพื้นผิวตัดแปรที่ทำปฏิกิริยากับ TEMPO ที่ความยาวคลื่น 365 nm	62

## สารบัญคำย่อ

$\delta$	chemical shift
$\mu\text{L}$	microliter
$\mu\text{mol}$	micromole
Abs	absorbance
Arg, R	arginine
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyl
Boc <sub>2</sub> O	di- <i>tert</i> -butyl dicarbonate
calcd	calculated
CFU	colony-forming unit
cm	centimeter
conc.	concentration
DI	deionized
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimide
DMF	dimethylformamide
DMSO	dimethylsulfoxide
DVS	divinyl sulfone
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide
equiv	equivalent (s)
Fmoc	fluorenylmethyloxycarbonyl
g	gram
HOBt	1-hydroxybenzotriazole hydrate
HPLC	high performance liquid chromatography
Ile, I	isoleucine
inh.	inhibition
Lys, K	lysine
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight
M	molar
MHz	megahertz
mmol	millimole
MS	mass spectroscopy
NBD-Cl	4-Chloro-7-nitrobenz-[2,1,3-d]-oxadiazole
nm	nanometer

NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimide
NMR	nuclear magnetic resonance
Pbf	2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl chloride
SCPG	Sidechain protecting group
TEMPO	2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy
TFA	trifluoroacetic acid
TIPS	triisopropylsilane
TLC	thin layer chromatography
Trp, W	tryptophan
TsCl	4-toluenesulfonyl chloride
UV	ultra violet
Val	valine
°C	degree Celsius



ภาควิชาเคมี  
คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 1

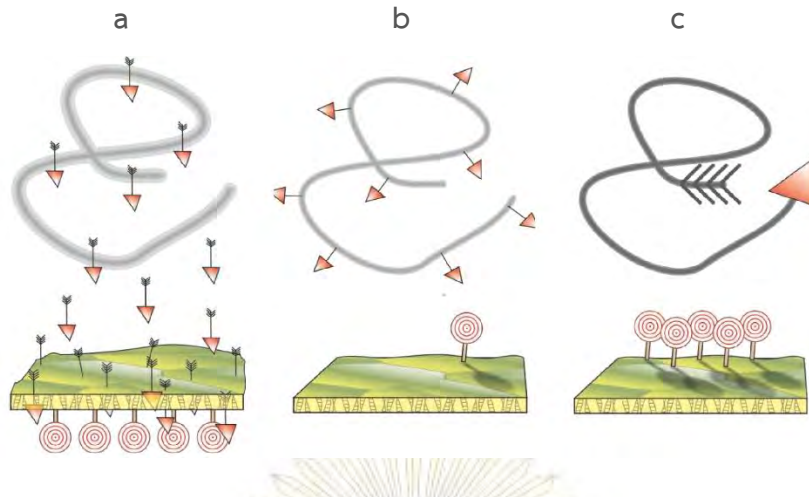
## บทนำ

การเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องของการดื้อยาปฏิชีวนะในแบคทีเรียเป็นปัญหาที่สำคัญต่อสุขภาพมนุษย์ แบคทีเรียจึงเป็นสาเหตุอันดับต้น ๆ ของการติดเชื้อในมนุษย์ซึ่งนำไปสู่การเสียชีวิต ตัวอย่างของแบคทีเรียดื้อยา เช่น *Staphylococcus aureus* ซึ่งดื้อต่อยาในกลุ่ม beta-lactam (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* หรือ MRSA) และแม้ว่าจะมีการคิดค้นยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ที่มีกลไกการออกฤทธิ์ต่างจากเดิม แบคทีเรียก็ยังสามารถเกิดการดื้อยาขึ้นได้อีก ยิ่งกว่านั้น เมื่อแบคทีเรียเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนมากขึ้น จะอาศัยอยู่รวมกันในรูปไบโอฟิล์ม (biofilm) ซึ่งเกิดจากแบคทีเรียหลังสารจำพวกพอลิแซ็กคาไรด์และปล่อยออกมา นอกเซลล์ ยึดเกาะพื้นผิวเพื่อทำหน้าที่เป็นชั้นปกป้องแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ด้านในดังแสดงในรูปที่ 1.1 ทำให้แบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ดีขึ้น และไบโอฟิล์มยังสามารถต้านสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าเซลล์แบคทีเรียที่ไม่ได้อยู่รวมกันถึง 1000 เท่า<sup>1</sup> การพัฒนาวัสดุที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย จึงเป็นวิธีที่จะช่วยป้องกันไม่ให้เกิดการติดเชื้อและการเกิดไบโอฟิล์มได้ อันจะนำไปสู่การรักษาที่ยุ่งยาก



รูปที่ 1.1 แสดงการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย<sup>2</sup>

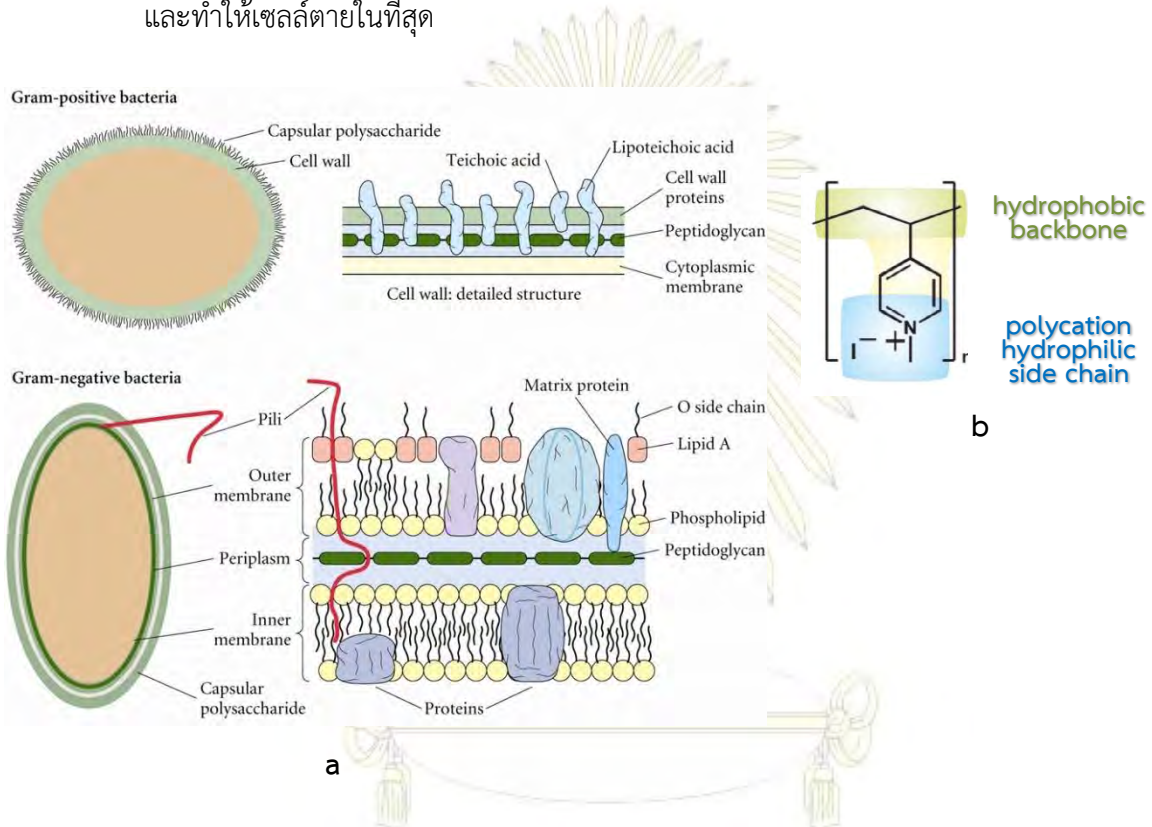
antimicrobial polymer สามารถแบ่งออกเป็นประเภทย่อย ๆ ได้ 3 ประเภท<sup>3</sup> คือ (a) biocide-releasing polymer คือพอลิเมอร์ที่สามารถปลดปล่อยสารออกฤทธิ์เพื่อฆ่าแบคทีเรียโดยตรง มีประสิทธิภาพสูงในช่วงระยะเวลาหนึ่ง (b) polymeric biocide คือพอลิเมอร์ที่เกิดจากมอนอเมอร์ที่เป็นสารออกฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรีย และ (c) biocidal polymer คือพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมเลกุลของสารชนิดต่าง ๆ ที่มีหมู่ฟังก์ชันที่เหมาะสมมาต่อกันแล้วเกิดเป็นพอลิเมอร์ที่สามารถออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย โครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 1.2



รูปที่ 1.2 แสดงการทำงานของ (a) biocide-releasing polymer, (b) polymeric biocide และ (c) biocidal polymer<sup>3</sup>

1. biocide-releasing polymer คือพอลิเมอร์ที่เป็นตัวบรรจุสารฆ่าเชื้อแบคทีเรีย และสามารถปลดปล่อยสารเหล่านั้นเพื่อทำลายเซลล์แบคทีเรียโดยตรง จัดเป็นประเภทที่ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ดีที่สุด แต่มีข้อเสียคือ สารฆ่าเชื้อแบคทีเรียจะมีจำนวนลดลงเรื่อย ๆ และหมดลงในที่สุด ตัวอย่างเช่น N-halamine group ต่อกับพอลิเมอร์ชนิดต่าง ๆ โดย N-halamine จะเป็นแหล่งของ chlorine หรือ hypochlorite ซึ่งจะเข้าทำลายเซลล์แบคทีเรียโดยตรง โดยการออกซิไดซ์ฟอสโฟลิพิด (phospholipid) ของเยื่อหุ้มเซลล์<sup>4</sup> หรืออีกตัวอย่างหนึ่ง คือพอลิเอสเทอร์ที่ทำปฏิกิริยากับ NHS/EDC สามารถปลดปล่อย nitric oxide ฆ่าเซลล์แบคทีเรียได้เช่นกัน<sup>5</sup>
2. polymeric biocide เป็นพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์มาจากมอนอเมอร์ซึ่งมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย โดยคาดว่ามอนอเมอร์ดังกล่าวจะยังคงฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียอยู่เมื่อนำมาต่อกันเป็นพอลิเมอร์ แต่พบว่าไม่เป็นเช่นนั้นเสมอไป เช่น ในงานวิจัยของ Nathan และคณะ ได้ใช้ Penicillin V และ Cephadrine ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะ ต่อเป็นโซ่ข้างของพอลิเมอร์ PEG-lysine และพบว่าพอลิเมอร์ดังกล่าวไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเลย<sup>6</sup> ซึ่งน่าจะมีสาเหตุจากการไม่ละลายน้ำของพอลิเมอร์ ในขณะที่งานวิจัยของ Dizman และคณะ ได้ใช้โคพอลิเมอร์ของ methacrylate ดัดแปรด้วย Norfloxacin กับ PEG-methacrylate พบว่าพอลิเมอร์ดังกล่าวยังมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้<sup>7</sup> การใช้พอลิเมอร์ประเภทนี้จึงสามารถคาดการณ์ได้ยากว่าฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจะเป็นไปในทิศทางใด เนื่องจากกลไกการออกฤทธิ์ไม่ได้ขึ้นอยู่กับตัวสารที่ออกฤทธิ์เพียงอย่างเดียว ยังขึ้นอยู่กับส่วนอื่น ๆ ที่ประกอบกันเป็นพอลิเมอร์อีกด้วย

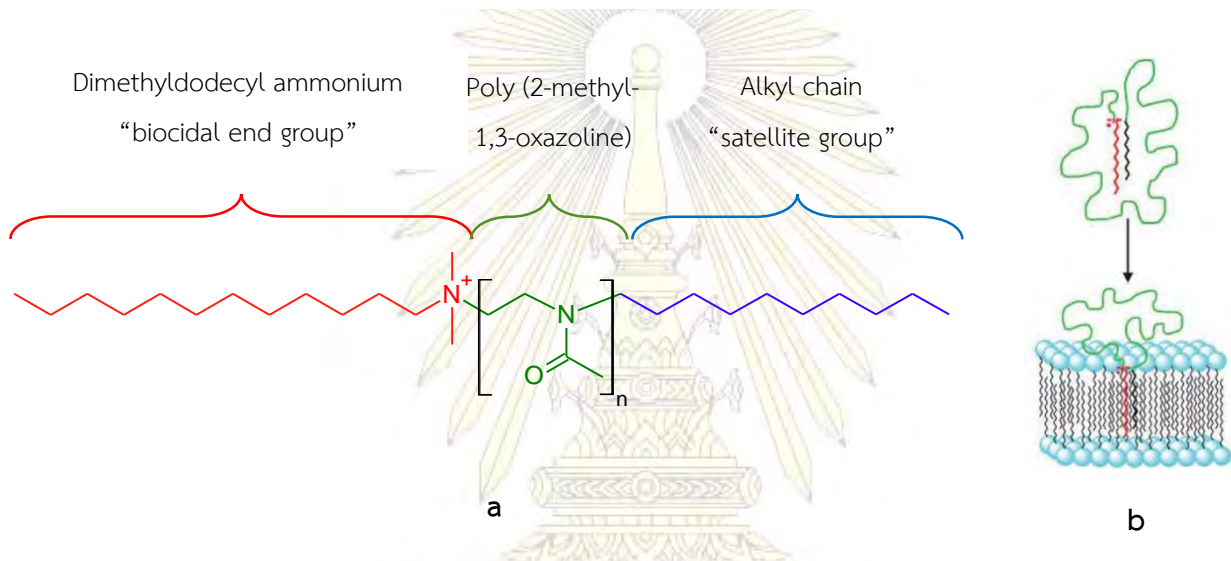
3. biocidal polymer เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยส่วนที่เป็นประจุบวก (polycation) และส่วนที่ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย ซึ่งมีสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) โดยส่วนที่เป็นประจุบวกจะทำหน้าที่ดึงดูดเซลล์แบคทีเรียให้เข้ามาใกล้พื้นผิว เนื่องด้วยประจุสุทธิเป็นลบของแบคทีเรีย โดยเกิดจาก teichoic acid บนเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียชนิดแกรมบวก และฟอสโฟลิพิดของเยื่อหุ้มเซลล์ด้านนอกของแบคทีเรียแกรมลบ ดังแสดงในรูปที่ 1.3a และส่วนที่ไม่ชอบน้ำจึงทำหน้าที่แทรกตัวเข้าไปภายในเซลล์แบคทีเรียและรบกวนการทำงาน เช่นการทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์และทำให้เซลล์ตายในที่สุด



รูปที่ 1.3 แสดง (a) ลักษณะของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ<sup>8</sup> และ (b) ตัวอย่างของ biocidal polymer ที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็น quaternary ammonium<sup>3</sup>

หมู่ฟังก์ชันที่เป็นประจุบวกของ biocidal polymer ได้แก่ quaternary ammonium, phosphonium, tertiary sulfonium และ guanidinium ตัวอย่างของ biocidal polymer เช่น พอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยวง pyridinium ดังแสดงในภาพที่ 1.3 (b) มีโครงสร้างส่วนที่ไม่ชอบน้ำ คือสายไฮโดรคาร์บอน และส่วนที่เป็นประจุบวก คือ quaternary ammonium อย่างไรก็ตาม โครงสร้างพอลิเมอร์ดังกล่าวอาจมีฤทธิ์ที่ต่ำลง เนื่องจากโครงสร้างแกน (backbone) ของพอลิเมอร์มีลักษณะที่แข็ง ไม่ยืดหยุ่น ทำให้ส่วนที่ไม่ชอบน้ำแยกออกจากส่วนที่เป็นประจุบวกได้ไม่สมบูรณ์ กลไกการแทรกตัวของพอลิเมอร์จึงเกิดได้ยาก ส่งผลให้พอลิเมอร์มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียต่ำ จึงนำไปสู่การสังเคราะห์ biocidal polymer อีกรูปแบบหนึ่ง

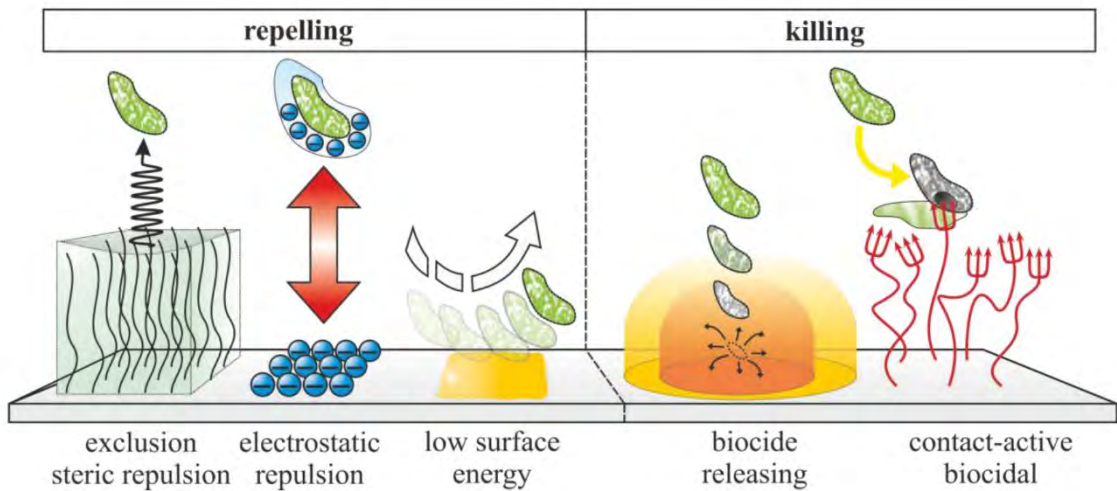
โดยอาศัยพอลิเมอร์ที่มีสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ส่วนปลาย (biocidal end group) ด้านหนึ่ง และหมู่ที่ควบคุมกลไกการทำงานของพอลิเมอร์ หรือ satellite group อยู่ปลายอีกด้านหนึ่ง ตัวอย่างเช่นในงานวิจัยของ Christian และคณะ ได้ใช้ 2-methyl-1,3-oxazoline (PMOx) ที่มี biocidal end group เป็น dimethyldodecyl ammonium และ ส่วน satellite group เป็น alkyl group<sup>9</sup> โดยใช้ alkyl ที่ความยาวต่าง ๆ พบว่าเมื่อพิจารณาจากค่า minimum inhibitory concentration หรือ MIC พอลิเมอร์จะมีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดีที่สุดเมื่อใช้หมู่ alkyl C<sub>8</sub> - C<sub>10</sub> และมีฤทธิ์ลดลงอย่างมากเมื่อเพิ่มความยาวหมู่ alkyl เป็น C<sub>12</sub> - C<sub>16</sub> แสดงให้เห็นว่า satellite group ส่งผลต่อฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยจะควบคุมการเกิด micelle และการแทรกตัวของ biocidal group เข้าไปในเซลล์แบคทีเรีย ดังแสดงในรูป 1.4



รูปที่ 1.4 แสดง (a) โครงสร้างของพอลิเมอร์ที่ปลายทั้งสองเป็น biocidal end group และ satellite group และ (b) หลักการทำงานของพอลิเมอร์ดังกล่าว<sup>9</sup>

นอกจากนี้ การแบ่งประเภทพื้นผิวที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ยังสามารถแบ่งได้อีกวิธี ได้แก่ พื้นผิวที่ขับไล่ไม่ให้แบคทีเรียเข้าใกล้พื้นผิว (repelling) และพื้นผิวที่ฆ่าเซลล์แบคทีเรียที่มาเกาะพื้นผิว (killing)<sup>3</sup> โดยที่ repelling จะใช้การเคลือบพื้นผิวด้วยสารที่ไม่ชอบน้ำหรือสารที่มีประจุลบ เพื่อให้เกิดแรงผลักรับเซลล์แบคทีเรียที่มีประจุลบเช่นกัน ส่วน killing จะมีทั้งแบบ biocide-releasing ซึ่งมีการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์เพื่อฆ่าเซลล์แบคทีเรียโดยตรง และแบบ contact-active biocidal ซึ่งสามารถฆ่าแบคทีเรียที่เข้ามาใกล้พื้นผิวโดยไม่สูญเสียสารออกฤทธิ์ ดังแสดงในรูปที่ 1.5





รูปที่ 1.5 แสดงหลักการทำงานของ antimicrobial surface<sup>3</sup>

การติดพอลิเมอร์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยพันธะโคเวเลนต์ลงบนพื้นผิว ทำได้โดยตัดแปรรูปร่างฟังก์ชันบนพื้นผิวให้มีความเหมาะสมกับรูปร่างฟังก์ชันของพอลิเมอร์ที่จะเกิดปฏิกิริยา เช่นการติด poly-4-vinyl-N-alkylpyridinium ลงบนสไลด์แก้ว ทำได้โดยการตัดแปรรสไลด์แก้วด้วย aminosilane และ acryloyl chloride จากนั้นจึงนำมาทำปฏิกิริยากับ 4-vinylpyridine แล้วจึงทำ alkylation ด้วย alkylbromide<sup>10</sup> บนพื้นผิวกระดาษกรอง ตัวอย่างเช่น การใช้ 2-bromoisobutyryl bromide ทำปฏิกิริยากับ หมูไฮดรอกซิลของเซลลูโลสด้วยปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน แล้วหมูอะมิโนจึงทำปฏิกิริยากับ 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate และ quaternize ด้วย alkyl halide<sup>11</sup> ได้พื้นผิวดัดแปรที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* และ *B.subtilis* อีกรูปแบบหนึ่งของการติดพอลิเมอร์ คือการเคลือบบนพื้นผิวแบบ layer-by-layer ซึ่งอาศัยหลักการดึงดูดระหว่างประจุตรงกันข้ามของพอลิเมอร์กับพื้นผิว เช่น การใช้ antimicrobial peptide ที่มีชื่อว่า gramicidin A ซึ่งมีส่วนที่เป็นประจุบวกและและมีส่วนที่ไม่ชอบน้ำ มาละลายใน amphiphilic anionic polysaccharide แล้วนำมารวมกับพื้นผิวดัดแปรที่เป็น polycation จะได้ชั้นฟิล์มบางที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย<sup>12</sup> โดยอาศัยกลไก 2 แบบ คือการฆ่าเซลล์แบคทีเรียที่เข้ามาใกล้พื้นผิว และการปลดปล่อยเพปไทด์ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์สู่สารละลายภายนอก ซึ่งชั้นฟิล์มดังกล่าวยังสามารถกักเก็บเพปไทด์ส่วนหนึ่งได้แม้ทำการล้างหลายครั้ง อีกตัวอย่างหนึ่งของการเคลือบสารออกฤทธิ์บนพื้นผิว คือการเคลือบบนพื้นผิว PET ด้วยอนุพันธ์ของเพปไทด์ HHC10 ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเป็น H-KRWWKWIRW-NH<sub>2</sub> ที่ crosslink กับ PTMP และ PEGDA 700 เคลือบด้วยไฮโดรเจล<sup>13</sup> ซึ่งอาศัยปฏิกิริยา Thiol-ene photopolymerization โดยมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis*

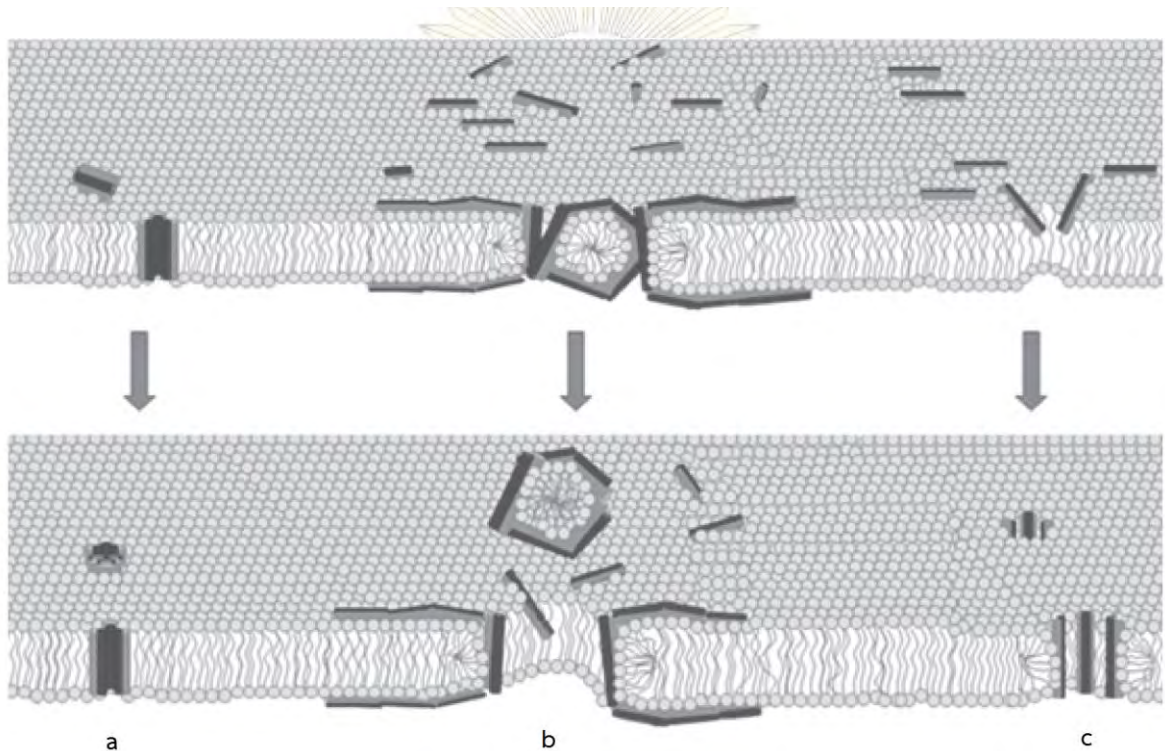
การเลือกใช้การสังเคราะห์พื้นผิววัสดุด้านเชื้อแบคทีเรียแบบ contact-active โดยใช้พอลิเมอร์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและไบโอฟิล์มบนพื้นผิว เพราะทำได้กับทุกพื้นผิววัสดุ และสามารถออกฤทธิ์ได้ยาวนาน เพราะไม่มีการปลดปล่อยสารเคมีออกมา อีกทั้งมีโอกาสดี้อย่างยิ่งที่ต่ำกว่าใช้ยาปฏิชีวนะในทางทฤษฎี โดยการใช้พอลิเมอร์ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเป็นเพปไทด์ เป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากมีกลไกการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพ และเป็นสารชีวโมเลกุลจึงสามารถเข้ากับสิ่งมีชีวิตได้ดี

เพปไทด์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptides หรือ host-defense peptides) นั้นเป็นสารชีวโมเลกุลขนาดเล็ก สามารถพบได้ ในทั้งสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก เช่น แบคทีเรีย รา พืช สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ไปจนถึงเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม<sup>14</sup> เช่น Cathelicidins เป็นกลุ่มของเพปไทด์ต้านจุลชีพที่พบได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด, Defensins เป็นกลุ่มเพปไทด์ต้านจุลชีพที่พบได้ทั้งในพืช แมลง สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง และสัตว์มีกระดูกสันหลัง และ Histatins เป็นเพปไทด์ต้านจุลชีพซึ่งสร้างจากเซลล์หลายชนิดภายในร่างกายของมนุษย์ เช่น เม็ดเลือดขาว อ้วนตะ และต่อมน้ำลาย โดยพบว่าเพปไทด์ต้านจุลชีพมักเป็นสารในระบบภูมิคุ้มกันแบบกำเนิด (innate immunity) มีความสามารถในการเลือกจับ (selectivity) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้กว้าง (broad-spectrum) ซึ่งบางชนิดอาจมีฤทธิ์ครอบคลุมถึงการทำลายเชื้อรา ไวรัสชนิดมีเปลือก (enveloped viruses) ปรสิต และอาจมีผลในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งได้อีกด้วย และมีความเป็นพิษน้อยกว่าสารต้านเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น เช่น silver, salicylic acid, quaternary ammonium compounds, phenol derivatives, chlorhexidine และ nitric oxide

ลักษณะโดยทั่วไปของเพปไทด์ต้านจุลชีพจึงประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีประจุบวก (positively charged amino acids) เช่น อาร์จินีน (arginine) ไลซีน (lysine) รวมถึงฮิสติดีน (histidine) ในสถานะเป็นกรด และกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้ว (hydrophobic amino acids) เช่น อะลานีน (alanine) ฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) ทริปโตฟาน (tryptophan) และ ไทโรซีน (tyrosine) โดยหลักการทำงานของเพปไทด์ต้านจุลชีพ เป็นการรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย เช่นเดียวกับ biocidal polymer ที่กล่าวข้างต้น โดยเพปไทด์ต้านจุลชีพมักจะมีโครงสร้างแบบทุติยภูมิ คือเกิดแรงภายในโมเลกุล เช่นพันธะไฮโดรเจน เกิดเป็นรูปร่างต่าง ๆ เช่น โครงสร้าง alpha helix, โครงสร้าง beta-sheet, โครงสร้าง hairpin หรือโครงสร้าง extended โดยมีเป้าหมายหลักอยู่ที่การรบกวนชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งมีแบบจำลองกลไกการทำลายเซลล์ของเพปไทด์ต้านจุลชีพ 3 รูปแบบ<sup>14</sup> ดังแสดงในรูปที่ 1.6 คือ

1. แบบจำลอง barrel-stave มีหลักการคือ เพปไทด์จะใช้ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ จับกับด้านนอกของส่วนหัวของลิพิดไบเลเยอร์ จากนั้นใช้ส่วนที่มีประจุบวกแทรกตัวผ่านชั้นลิพิดไบเลเยอร์ของเซลล์แบคทีเรีย การจำลองตัวดังกล่าวอาศัยโครงสร้างเพปไทด์หลาย ๆ แห่งเรียงต่อกันเป็นวงกลมคล้ายถังไม้ นำไปสู่การเกิดรู และเกิดการรั่วไหลของสารต่าง ๆ ออกสู่ภายนอก ทำให้เซลล์ตายในที่สุด

2. แบบจำลอง carpet เป็นแบบจำลองที่อาศัยการสะสมของเพปไทด์จำนวนมากบนชั้นลิพิดไบเลเยอร์ของเซลล์แบคทีเรีย การสะสมเพปไทด์ดังกล่าวทำให้มีรูปร่างคล้ายกับผืนพรม จากนั้นทำให้เกิดการห่อหุ้มโครงสร้างของลิพิดไบเลเยอร์ของเซลล์แบคทีเรีย จนมีลักษณะคล้ายกับไมเซลล์ (micelles) และหลุดออกจากเยื่อหุ้มเซลล์เซลล์ ซึ่งผลดังกล่าวทำให้เกิดรูที่ผิวเซลล์แบคทีเรียเช่นเดียวกัน
3. แบบจำลอง toroid หรือ wormhole มีลักษณะคล้ายกับแบบจำลอง barrel stave คือ เพปไทด์จับที่ผิวของเยื่อหุ้มเซลล์โดยอาศัยส่วนที่ไม่ชอบน้ำ จากนั้นสอดแทรกส่วนที่มีประจุบวกเข้าไป แล้วกระตุ้นให้เกิดโครงสร้างลิพิดมอนอเลเยอร์ (lipid monolayer) ขึ้น เกิดเป็นรูเช่นเดียวกัน



รูปที่ 1.6 แสดงกลไกการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแบบต่าง ๆ (a) barrel-stave, (b) carpet และ (c) toroid<sup>14</sup>

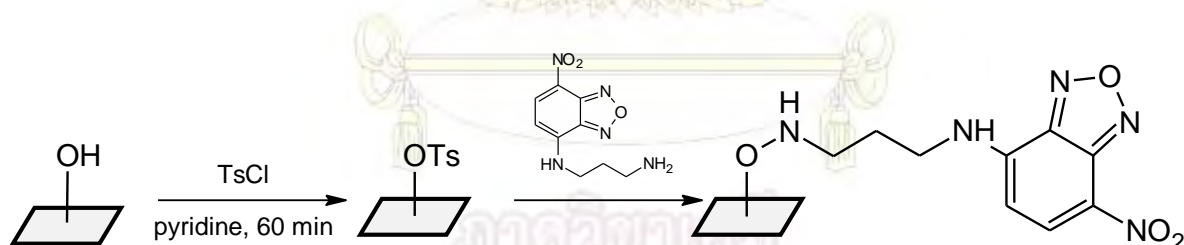
นอกจากนี้ เพปไทด์ต้านจุลชีพบางชนิดอาจจะมีกลไกการทำงานอื่น ๆ ร่วมด้วย ตัวอย่าง เช่น เพปไทด์ต้านจุลชีพ indolicidin มีฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรีย *E. coli* โดยการรบกวนเยื่อหุ้มเซลล์ และยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ DNA<sup>15</sup> โครงสร้างและการทำงานดังกล่าว จึงทำให้เพปไทด์ต้านจุลชีพมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้กว้าง และมีความสามารถในการเลือกจับกับเซลล์แบคทีเรีย เนื่องจากเพปไทด์ส่วนที่เป็นประจุบวก สามารถดึงดูดกับประจุสุทธิที่เป็นลบ ซึ่งเป็นสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียทั้งในชนิดแกรมบวกและแกรมลบ แตกต่างกับเยื่อหุ้มเซลล์ของสิ่งมีชีวิตพวกายูคาริโอต ที่มีความเป็นประจุลบต่ำกว่า และมีคอเลสเตอรอลเป็นองค์ประกอบ ซึ่งทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีความเสถียรมากกว่า<sup>16</sup>

เพปไทด์ด้านจุลชีพที่ได้จากแหล่งธรรมชาติ มักจะเป็นเพปไทด์สายยาวของกรดอะมิโนจำนวนมาก เช่น เพปไทด์ด้านจุลชีพกลุ่ม beta-defensin ประกอบด้วยกรดอะมิโนตั้งแต่ 35 – 100 ตัว ดังนั้นการสังเคราะห์สายเพปไทด์เลียนแบบธรรมชาติจึงทำได้ยาก จึงได้มีการพัฒนาสังเคราะห์เพปไทด์ด้านจุลชีพที่มีขนาดสั้นลง และมีฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียที่ดี นอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเช่น ขนาด ประจุรวม ความไม่ชอบน้ำ และความสามารถในการละลายน้ำ (solubility)<sup>17</sup> ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงสมบัติเหล่านี้ก็จะทำให้ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเปลี่ยนแปลงด้วย เช่น ในงานวิจัยของ Liu และคณะ ได้ทำการศึกษาผลของความยาวของสายเพปไทด์ด้านจุลชีพต่อประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรีย<sup>18</sup> โดยสังเคราะห์เพปไทด์ที่ประกอบด้วยชุดของกรดอะมิโนอาร์จินีนและทริปโตฟานซ้ำกัน คือ  $(RW)_n-NH_2$  โดยที่  $n$  มีค่าเท่ากับ 1, 2, 3, 4 และ 5 พบว่า ความยาวเพปไทด์ที่เพิ่มขึ้นมากขึ้น ส่งผลให้ฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้น

เทคนิคการตัดแปรพื้นผิวที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย สามารถทำบนพื้นผิวหลากหลายชนิด เช่น พอลิस्टาโรลีน พอลิอะคริลาไมด์ ซิลิกา ทองคำ เซลลูโลส โดยอาศัยปฏิกิริยาที่เหมาะสม โดยในงานวิจัยนี้จะเลือกใช้พื้นผิวเซลลูโลสหรือกระดาษกรอง ซึ่งมีข้อดีเหนือกว่าวัสดุอื่น ๆ คือ เป็นวัสดุที่หาได้ง่าย มีราคาถูก ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ และเข้ากับเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิตได้จึงไม่เป็นพิษ การสังเคราะห์เพปไทด์ด้านจุลชีพลงบนพื้นผิวดัดแปรดังกล่าวจะใช้เทคนิค SPOT synthesis ซึ่งเป็นวิธีการสังเคราะห์เพปไทด์บนพื้นผิวเซลลูโลส มีข้อดี คือเป็นเทคนิคที่ใช้สารปริมาณน้อย และสามารถสังเคราะห์เพปไทด์ที่มีความหลากหลายได้ในเวลาเดียวกัน<sup>19</sup> ประกอบกับ Fmoc protection strategy ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สายเพปไทด์ด้วยการต่อกรดอะมิโนครั้งละหนึ่งตัว โดยต่อกรดอะมิโนที่มีหมู่ปกป้อง Fmoc (9-fluorenyl-methoxycarbonyl group) กับโมเลกุลที่ตรึงบนพื้นผิวซึ่งมีปลายด้านหมู่อะมิโนอิสระด้วยพันธะเอไมด์ จากนั้นจึงทำการปลดหมู่ปกป้อง Fmoc ออกด้วยสารละลายเบส piperidine จะได้หมู่อะมิโนอิสระที่พร้อมจะทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนตัวถัดไปในลักษณะเดียวกัน ด้วยวิธีดังกล่าวนี้ จะสามารถป้องกันการเกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการได้ และสามารถกำจัดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงของการเกิดปฏิกิริยาได้ในแต่ละรอบของการทำปฏิกิริยาด้วยการล้าง นอกจากนี้ สภาวะของสารละลายที่ใช้ในการปลดหมู่ปกป้อง Fmoc จะแตกต่างกับสภาวะของสารละลายที่ใช้ในการปลดหมู่ปกป้องชนิดอื่น ๆ เช่น หมู่ปกป้อง Boc (*tert*-Butyloxycarbonyl group) ซึ่งจะใช้สภาวะกรดในการปลด เทคนิคดังกล่าวจึงเป็นการป้องกันการเกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ ที่เกิดจากโซ่ข้างของกรดอะมิโนที่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ อีกทั้งการเกิดปฏิกิริยาการสร้างสายเพปไทด์ จะต้องอาศัยการสร้างพันธะเอไมด์ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนตัวหนึ่ง กับหมู่อะมิโนของกรดอะมิโนอีกตัวหนึ่ง ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวไม่สามารเกิดเองได้ในสภาวะปกติ จึงต้องมีการ activate หมู่คาร์บอกซิลให้มีความว่องไวมากขึ้นก่อน โดยใช้สารในกลุ่มของ carbodiimide

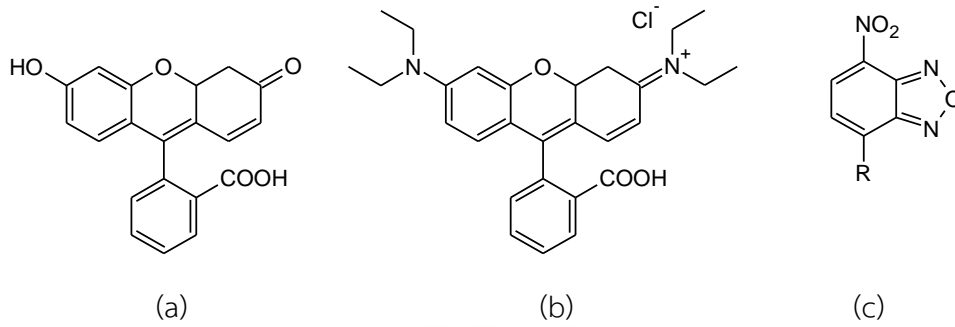
ดังนั้น งานวิจัยนี้ จึงสนใจศึกษาการสังเคราะห์และตรึงเปปไทด์ด้านจุลชีพที่มีลำดับ H-KRWWKWIRW-NH<sub>2</sub> รวมถึงอนุพันธ์ของเปปไทด์ดังกล่าวที่มีจำนวนกรดอะมิโนแตกต่างกัน ด้วยเทคนิค SPOT synthesis ร่วมกับ Fmoc protection strategy โดยใช้กระดาษเป็นพื้นผิวรองรับ และทำการทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียบนกระดาษ รวมถึงศึกษาผลของลำดับของกรดอะมิโนต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย แล้วนำไปประยุกต์ใช้เป็นวัสดุด้านเชื้อแบคทีเรีย

นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยยังสนใจการหาประสิทธิภาพของปฏิกิริยาที่ใช้ตรึงสารประกอบต่าง ๆ ลงบนพื้นผิวเซลลูโลส เพื่อเป็นข้อมูลในการหาปฏิกิริยาที่เหมาะสมในการใช้งานอื่น ๆ ในอนาคต โดยเทคนิคการวัดปริมาณสารที่ติดอยู่บนพื้นผิวดัดแปรในที่นี้ คือการวิเคราะห์ความเข้มของการเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์ โดยหลักการของการเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์ คือเมื่อโมเลกุลที่มีสมบัติดังกล่าวดูดกลืนแสงความยาวคลื่นค่าหนึ่งซึ่งเป็นค่าเฉพาะตัวของแต่ละสาร โมเลกุลดังกล่าวจะคายแสงที่มีความยาวคลื่นที่ยาวกว่าออกมา โดยในบางกรณีหากการดูดกลืนอยู่ในช่วงที่เหมาะสมที่หาแหล่งกำเนิดแสงราคาถูก และคายแสงที่มีความยาวคลื่นที่ตาเปล่ามองเห็นได้ โมเลกุลดังกล่าวก็จะถือว่ามีประโยชน์ในการประยุกต์ใช้ในลักษณะที่ตั้งสมมติฐานไว้ได้ หากนำโมเลกุลชนิดดังกล่าวมาติดหมู่ฟังก์ชันที่ว่องไวกับพื้นผิวดัดแปร ก็จะสามารถนำไปใช้เป็นโมเลกุลที่ทำหน้าที่ตรวจวัดประสิทธิภาพการตรึงสารบนพื้นผิวได้ทางอ้อม เนื่องจากความเข้มของการเรืองแสงจะแปรผันตรงกับปริมาณสารที่ติดอยู่ ตัวอย่างการติดหมู่ฟังก์ชันเพื่อใช้เป็น nucleophile และทำปฏิกิริยากับพื้นผิวดัดแปรที่มีความเป็น electrophile แสดงดังในแผนภาพที่ 1.7 หรือในงานวิจัยของ Hoffmann และคณะใช้สีย้อมฟลูออเรสเซนส์ dansyl fluorophore ในการติดหมู่ฟังก์ชันไฮดรอกซิล และใช้ blue Py-1 chromophore ในการติดหมู่ฟังก์ชันอะมิโนที่ดัดแปรบนพื้นผิวของพอลิโพลพิลีน<sup>20</sup>



แผนภาพที่ 1.7 แสดงตัวอย่างการเกิดปฏิกิริยาของโมเลกุลฟลูออเรสเซนส์กับหมู่ฟังก์ชันที่จำเพาะ

สำหรับสีย้อมฟลูออเรสเซนส์ที่นิยมใช้กันทั่วไป (รูปที่ 1.8) ได้แก่ ฟลูออเรสซิน (fluorescein) และโรดามีน (rhodamine) ซึ่งจัดเป็นโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่และไม่มีขั้ว ส่งผลให้เมื่อนำไปแช่ในกระดาษแล้วจะชะออกได้ยากแม้จะยังไม่เกิดปฏิกิริยาเคมีใด ๆ ซึ่งเป็นผลมาจาก hydrophobic interaction ทำให้เกิดผลบวกปลอม (false-positive result) ซึ่งนำไปใช้วิเคราะห์ตามที่ต้องการไม่ได้ การใช้สีย้อมฟลูออเรสเซนส์ที่มีขนาดเล็กจึงเป็นทางเลือกที่คาดว่าจะสามารถลดปัญหาดังกล่าวลงได้ ตัวอย่างเช่น สารประกอบประเภท oxadiazole ที่สามารถดัดแปรเพิ่มหมู่ฟังก์ชันต่าง ๆ ได้ง่าย มีขนาดเล็ก และบางชนิดละลายน้ำได้ นอกจากนี้ สารกลุ่มดังกล่าวยังมีข้อดีคือ มี quantum yield ที่สูง มีความว่องไวต่อปฏิกิริยากับสารที่จะวิเคราะห์ และมีช่วงความยาวคลื่นของ excitation และ emission ที่กว้าง<sup>21</sup>



รูปที่ 1.8 แสดงโมเลกุลของ (a) fluorescein (b) rhodamine และ (c) nitrobenzoxadiazole

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สีย้อมฟลูออเรสเซนต์ในกลุ่ม oxadiazole เช่นในงานวิจัยของ Jessie และคณะ ได้สังเคราะห์สีย้อมฟลูออเรสเซนต์ 4-aminooxy-7-nitro-benz-[2,1,3-d]-oxadiazole (NBDAO) เปรียบเทียบกับสีย้อมฟลูออเรสเซนต์ที่ใช้ทั่วไปคือ 4-hydrazino-7-nitro-benz-[2,1,3-d]-oxadiazole (NBDH) สำหรับการตรวจวัดกรดเซียลิก (sialic acid)<sup>22</sup> ซึ่งมีโครงสร้างเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่มีคาร์บอนเก้าอะตอมเป็นแกนหลัก โดยทำปฏิกิริยากับ sodium periodate ทำให้โครงสร้างส่วนที่เป็น diol ของกรดเซียลิกเปลี่ยนเป็น aldehyde ซึ่งมีความจำเพาะในการทำปฏิกิริยากับสีย้อมฟลูออเรสเซนต์ข้างต้น อย่างไรก็ตาม การสังเคราะห์โมเลกุล NBDH ต้องใช้ hydrazine เป็นสารตั้งต้นซึ่งมีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยามากเกินไป ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่ไม่ต้องการ การลดความว่องไวของ hydrazine ลง โดยการเพิ่มสายโซ่คาร์บอนคั่นระหว่างหมู่อะมิโนทั้งสองประกอบกับการใช้หมู่ปกป้อง *tert*-butyloxycarbonyl protecting group (Boc group) น่าจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้น

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการสังเคราะห์สารในกลุ่ม oxadiazole ดังกล่าว (รูป 1.8 (c)) เพื่อใช้เป็นตัวทดสอบประสิทธิภาพการตรึงโมเลกุลบนกระดาษด้วยปฏิกิริยาต่าง ๆ ที่ต้องการนิวคลีโอไฟล์ในการตรึง

### วัตถุประสงค์ของโครงการ

- สังเคราะห์พื้นผิวตัดแปรที่มีเพปไทด์ที่มีลำดับ H-KRWWKWIRW-NH<sub>2</sub> รวมถึงอนุพันธ์ของเพปไทด์ดังกล่าวที่มีจำนวนกรดอะมิโนแตกต่างกัน เพื่อทดสอบการออกฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียบนกระดาษ
- สังเคราะห์สารในกลุ่ม oxadiazole เพื่อใช้เป็นตัวทดสอบประสิทธิภาพการตรึงโมเลกุลบนกระดาษด้วยปฏิกิริยาต่าง ๆ

## บทที่ 2

### วิธีการทดลอง

#### 2.1 วิธีการทดลองทั่วไป

##### 2.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

การชั่งน้ำหนักสาร :	เครื่องชั่งยี่ห้อ DENVER Instrument
การปิเปตสาร :	Micropipette ขนาด 0.5-10 $\mu$ L, 2-20 $\mu$ L, 20-200 $\mu$ L ยี่ห้อ RAININ และขนาด 100-1000 $\mu$ L ยี่ห้อ BOECO
การให้ความร้อนและ การคนสารละลาย :	เครื่อง Hot plate stirrer ยี่ห้อ HL Instrument รุ่น HS-115
การระเหยตัวทำละลาย :	เครื่อง Rotary Evaporator ยี่ห้อ EYELA รุ่น N-1000 ต่อกับ เครื่องสุบลมสุญญากาศ ยี่ห้อ Tokyo Rikakikai
การตรวจสอบ การเกิดปฏิกิริยาของสาร :	เทคนิคThin layer chromatography (TLC) โดยสังเกตการเคลื่อนที่ ของสารบนแผ่น TLC (ซิลิกาเจล 60 F <sub>254</sub> ) ของ MERCK ด้วยเครื่องกำเนิดแสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm
การแยกสาร :	เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้ซิลิกาเจลขนาด 230 – 400 mesh ยี่ห้อ SILICYCLE เป็นเฟสคงที่
การถ่ายภาพ :	กล้องถ่ายรูป ยี่ห้อ Olympus รุ่น PEN E-PL7
การฉายแสงฟลูออเรสเซนส์ :	เครื่องกำเนิดแสงฟลูออเรสเซนส์ยี่ห้อ VILBER LOURMAT

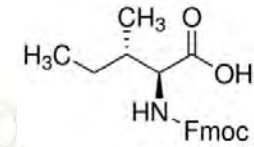
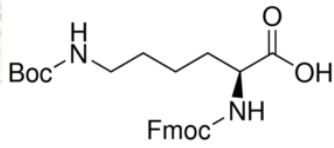
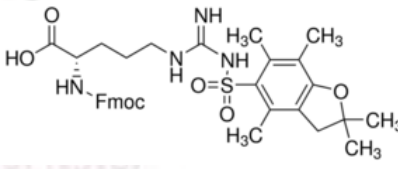
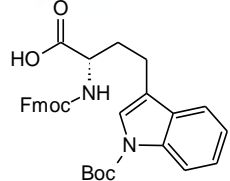
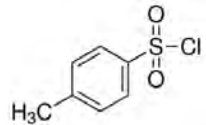
##### 2.1.2 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์

เทคนิค MALDI-TOF Mass Spectrometry :	เตรียมตัวอย่างโดยละลายสารตัวอย่างเล็กน้อยในน้ำ 10 $\mu$ L นำสารละลายตัวอย่าง 2 $\mu$ L ผสมกับสารละลายอิมมัตของ เมทริกซ์ คือ $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CCA) อิมมัตใน 0.1% TFA ใน MeCN : H <sub>2</sub> O ปริมาตร 10 $\mu$ L และ นำไปหยดบนแผ่นโลหะสำหรับเตรียมตัวอย่าง ทิ้งให้แห้ง แล้วนำไปวิเคราะห์มวลโมเลกุลด้วยเครื่อง Microflex MALDI-TOF mass spectrometry (Bruker Daltonics)
---	--


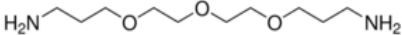
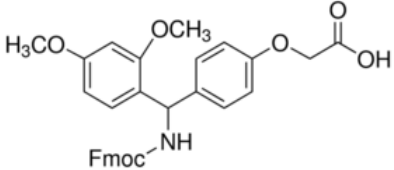
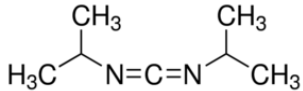
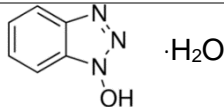
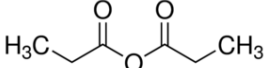
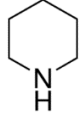
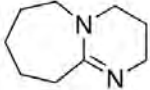
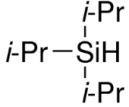
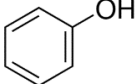
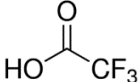
เทคนิค $^1\text{H-NMR}$ :	เครื่อง Varian Mercury 400 Plus ทำงานที่ความถี่ 400 MHz สำหรับโปรตอน โดยรายงานค่า chemical shift ในหน่วย part per million (ppm) โดยอ้างอิงเทียบกับ tetramethylsilane (TMS) การแสดงผล multiplicities ใช้ตัวย่อ s แทน singlet, d แทน doublet, t แทน triplet, q แทน quartet โดยส่วนที่มีสัญญาณทับซ้อนไม่สามารถสังเกตได้ชัดเจนจะใช้สัญลักษณ์ m (multiplet)
การวิเคราะห์หาค่า	เครื่อง UV-Visible spectrophotometer ยี่ห้อ Agilent
การดูดกลืนแสง :	Technologies รุ่น CARY Eclipse

### 2.1.3 สารเคมี

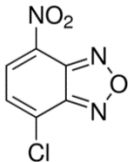
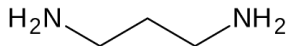
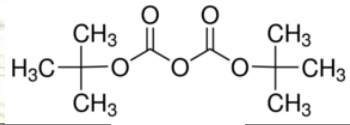
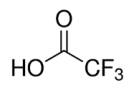
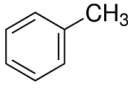
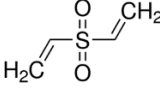
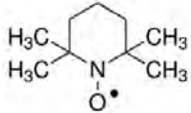
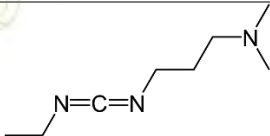
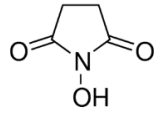
การสังเคราะห์พื้นผิวตัดแปรและสายเพปไทด์ :

ชื่อสาร	มวลโมเลกุล	โครงสร้าง
<i>N</i> -(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L- isoleucine (Fmoc-Ile-OH)	353.41	
<i>N</i> $\alpha$ -(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)- <i>N</i> $\epsilon$ - butoxycarbonyl-L-Lysine (Fmoc-Lys(Boc)-OH)	468.54	
<i>N</i> $\alpha$ -Fmoc- <i>N</i> $\omega$ -(2,2,4,6,7-pentamethyl dihydrobenzofuran-5-sulfonyl)-L- arginine (Fmoc-Arg(Pbf)-OH)	648.77	
<i>N</i> $\alpha$ -(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)- <i>N</i> 1- tert-butoxycarbonyl-L-tryptophan (Fmoc-Trp(Boc)-OH)	526.58	
4-Toluenesulfonyl chloride (TsCl)	190.65	



Pyridine	79.10	
4,7,10-Trioxa-1,13-tridecanediamine	220.31	
4-[(2,4-Dimethoxyphenyl)(Fmoc-amino)methyl]phenoxyacetic acid (Rink amide linker)	539.58	
<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimide (DIC)	126.20	
1-Hydroxybenzotriazole hydrate (HOBT)	153.12	
Propanoic Anhydride	130.14	
Piperidine	85.15	
1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU)	152.24	
Triisopropylsilane (TIPS)	158.36	
Phenol	94.11	
Trifluoroacetic acid (TFA)	114.02	
Dimethylformamide (DMF)	73.09	
Methanol	32.04	
Dichloromethane	84.94	

การสังเคราะห์สีย้อมฟลูออเรสเซนต์ NBD-diamine :

ชื่อสาร	มวล โมเลกุล	โครงสร้าง
4-Chloro-7-nitrobenz-[2,1,3-d]- oxadiazole (NBD-Cl)	199.55	
1,3-Diaminopropane	74.12	
Di-tert-butyl dicarbonate (Boc <sub>2</sub> O)	218.25	
Trifluoroacetic acid (TFA)	114.02	
Toluene	92.14	
Divinyl sulfone (DVS)	118.15	
2,2,6,6-Tetramethyl-1-piperidinyloxy (TEMPO)	156.25	
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)	155.24	
N-Hydroxysuccinimide (NHS)	115.09	
Sodium sulfate	142.04	
Sodium bicarbonate	84.01	
Sodium periodate	213.89	
Sodium bromide	102.89	
Sodium hypochlorite	74.44	
Lithium Chloride	42.39	

Methyl sulfoxide (DMSO)	78.13
Chloroform-d	120.38
Ethylacetate	88.11
Hexane	86.18

กระบวนการทำให้สารบริสุทธิ์ ใช้ตัวทำละลายที่เป็นรีเอเจนต์เกรดตามที่ได้รับจากบริษัทผู้ผลิต  
ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี : โดยนำมากลั่นทำให้บริสุทธิ์เพิ่มเติม

น้ำที่ใช้ในการทดลองต่าง ๆ : น้ำ Milli-Q จากเครื่อง Millipak R 40 filterunit 0.22 µm  
Millipore

น้ำ Deionized (DI) จากภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาควิชาเคมี  
คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

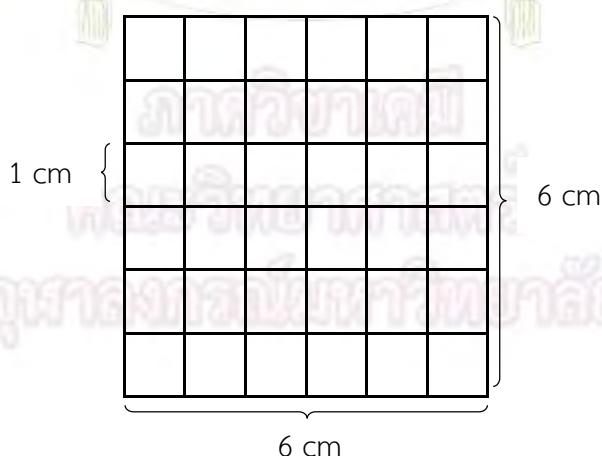
## 2.2 การสังเคราะห์พื้นผิวตัดแปรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เพื่อพิสูจน์ทราบโครงสร้างด้วยเทคนิค MALDI-TOF Mass Spectrometry

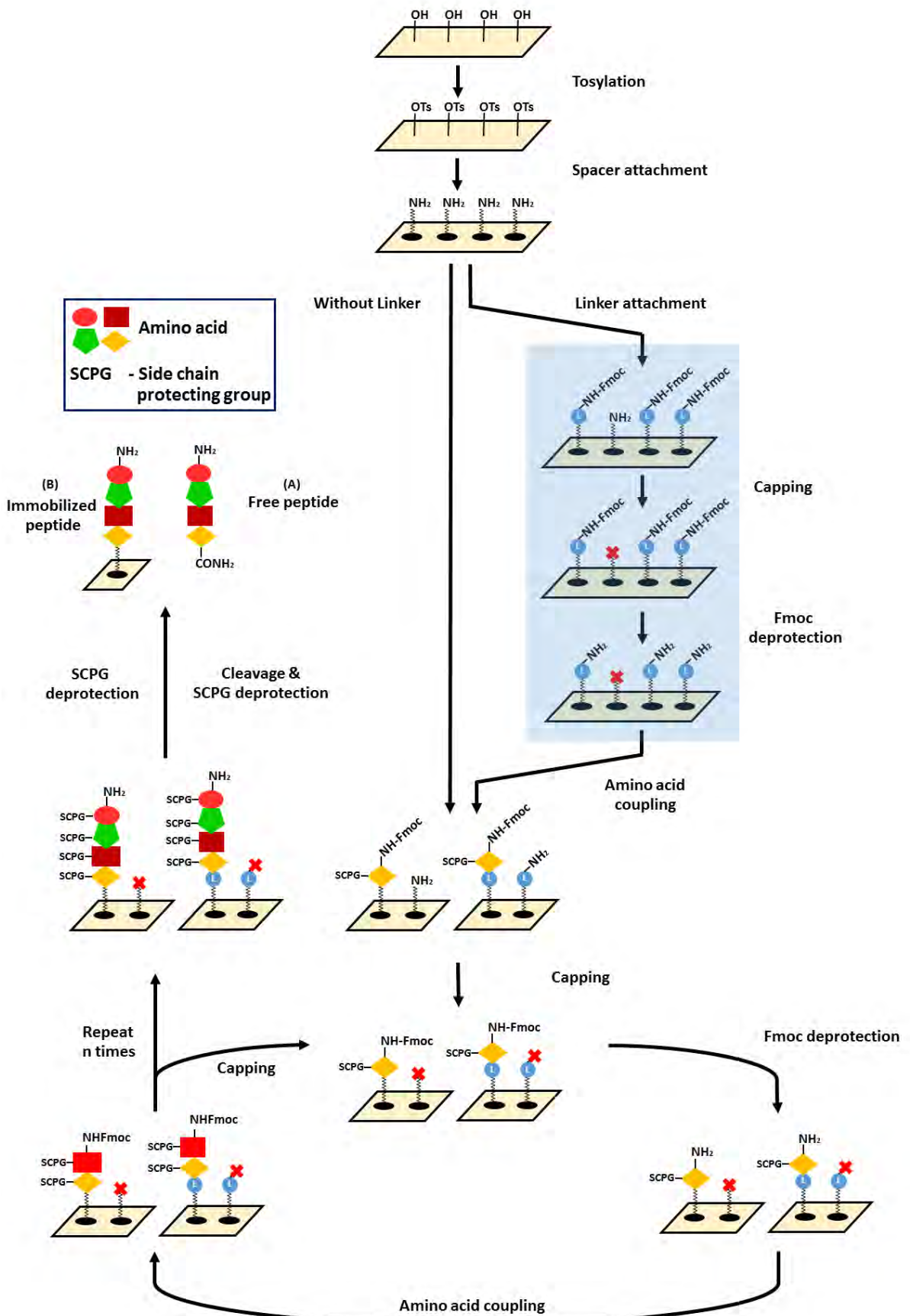
การสังเคราะห์พื้นผิวตัดแปรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย นั้น ในงานวิจัยนี้ทางผู้วิจัยได้แบ่งออกเป็นสองส่วนหลักๆ ได้แก่ การสังเคราะห์พื้นผิวตัดแปรเพื่อพิสูจน์ทราบโครงสร้างด้วยเทคนิค MALDI-TOF Mass Spectrometry และการสังเคราะห์พื้นผิวตัดแปรเพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยมีขั้นตอนการสังเคราะห์โดยสังเขปดังแผนภาพที่ 2.1

จากแผนภาพที่ 2.1 นั้นจะได้ผลิตภัณฑ์ออกเป็นสองชนิด ได้แก่ สายเพปไทด์ที่ถูกตัดออกจากพื้นผิวตัดแปร (A) เป็นการสังเคราะห์ผ่าน linker ซึ่งจะนำไปพิสูจน์ทราบโครงสร้างด้วยเทคนิค MALDI-TOF Mass Spectrometry และอีกส่วนคือ พื้นผิวตัดแปรที่มีสายเพปไทด์ติดอยู่ (B) เป็นการสังเคราะห์โดยไม่ผ่าน linker ในส่วนนี้ทางผู้วิจัยจะนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

### 2.2.1 การเตรียมพื้นผิวกระดาษเซลลูโลส

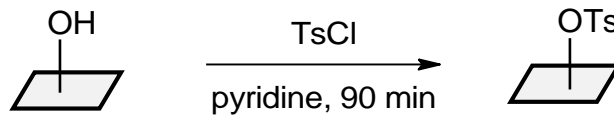
ตัดกระดาษทรงขนาด 6 cm X 6 cm จากนั้นนำมาวาดตารางด้วยดินสอขนาดความกว้าง 1 cm X 1 cm แล้วนำกระดาษมาทำความสะอาด โดยนำมาล้างด้วย DMF เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นแช่ใน methanol เป็นเวลา 3 นาที และ dichloromethane เป็นเวลา 3 นาที ตามลำดับ





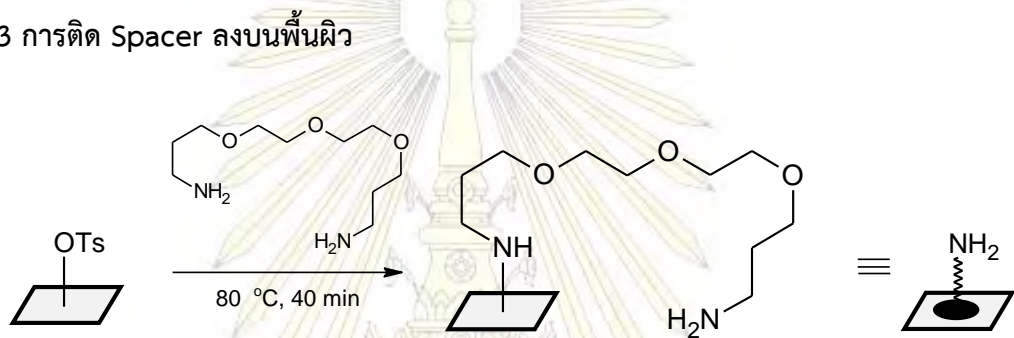
แผนภาพที่ 2.1 แสดงการสังเคราะห์พื้นผิวด้วยวิธีสังเคราะห์

### 2.2.2 การทำปฏิกิริยา Tosylation ลงบนพื้นผิว



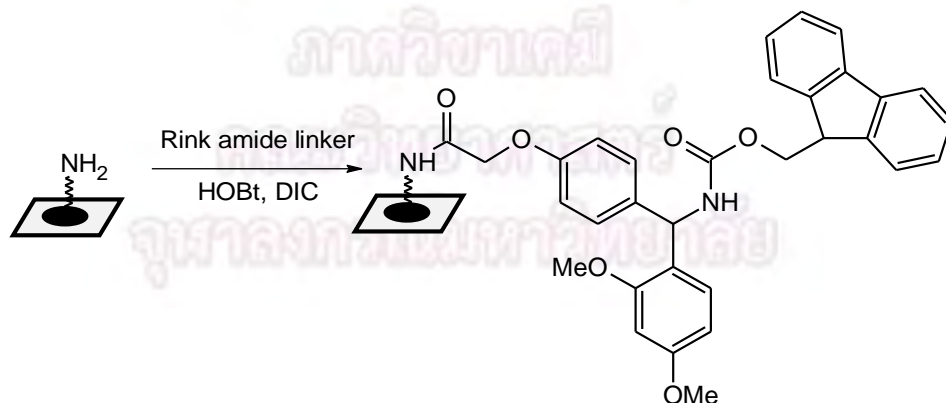
ละลาย 4-toluenesulfonyl chloride (5.72 g, 30 mmol) ใน pyridine 15 mL นำกระดาษที่ผ่านการทำความสะอาดแล้ว แช่ในสารละลายเป็นเวลา 90 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำกระดาษมาล้างด้วย DMF เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 2 รอบ methanol เป็นเวลา 3 นาที และ dichloromethane เป็นเวลา 3 นาที ตามลำดับ

### 2.2.3 การติด Spacer ลงบนพื้นผิว



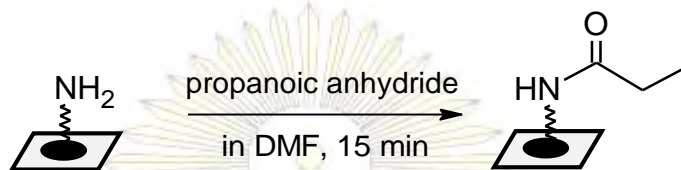
เตรียม 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecanediamine 10 mL แช่กระดาษในสารละลายที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำกระดาษมาล้างด้วย DMF เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 2 รอบ methanol เป็นเวลา 3 นาที และ dichloromethane เป็นเวลา 3 นาที ตามลำดับ

### 2.2.4 การติด Linker ลงบนพื้นผิว



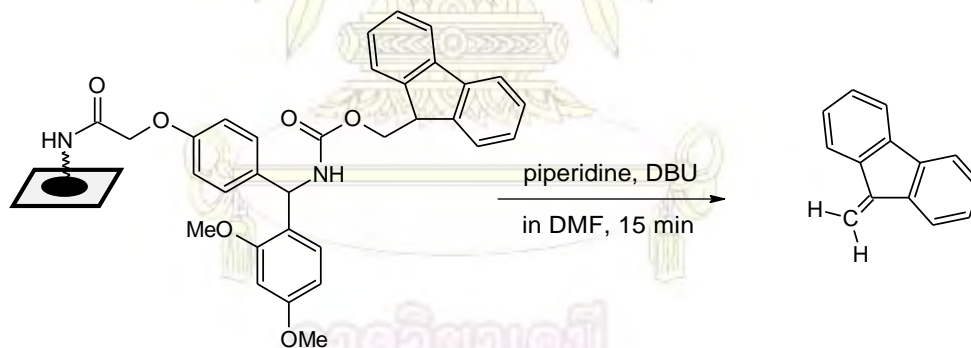
เตรียมสารละลายผสมของ Rink amide linker 0.45 M (0.0486 g, 0.09 mmol), HOBt 0.90 M (0.0243 g, 0.18 mmol) ใน DMF 166  $\mu$ L จากนั้นเติม DIC 1.35 M (34  $\mu$ L, 0.27 mmol) ทำให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเปิดสารละลายด้วยไมโครปิเปตปริมาตร 2  $\mu$ L ลงในตำแหน่งจุดตัดตารางบนพื้นผิวกระดาษทุกจุด จำนวน 3 รอบ โดยแต่ละรอบห่างกันเป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างกระดาษด้วย DMF เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 2 รอบ

## 2.2.5 การปิดหมู่ฟังก์ชันอะมิโนบนพื้นผิว (Capping)



ละลาย propanoic anhydride 0.5 mL ใน DMF 9.5 mL แช่กระดาษในสารละลายเป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างกระดาษโดยแช่ใน DMF เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 2 รอบ methanol เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ

## 2.2.6 การปลดหมู่ Fmoc ออก เพื่อนำไปวัดค่า loading จาก Fluorenyl group



หลังจากทำการ capping ในแต่ละรอบของการทำปฏิกิริยาการต่อกรดอะมิโนแล้ว กระดาษส่วนหนึ่งจะถูกแบ่งออกมาเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณของกรดอะมิโนที่ติดอยู่บนกระดาษหรือค่า loading โดยเจาะกระดาษจำนวน 3 จุดลงใน microtube จากนั้นเติม DMF 390  $\mu$ L, DBU 10  $\mu$ L และ piperidine 100  $\mu$ L แล้วทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที แบ่งสารละลายที่ได้มา 200  $\mu$ L จากนั้นเติม DMF จนได้ปริมาตรสารละลายรวม 1500  $\mu$ L แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 296 nm

## การคำนวณค่า Loading

ตัวอย่างการคำนวณค่า loading จากตัวอย่าง rink amide linker 3 ซ้ำ จากการเตรียมสารละลายในข้างต้น แล้วแบ่งออกมา 250  $\mu\text{L}$  จากนั้นเจือจางด้วย DMF 1250  $\mu\text{L}$  จนได้ปริมาตร 1500  $\mu\text{L}$  (เจือจาง 6 เท่า) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 296 nm ได้ข้อมูลดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงค่าต่างๆ ที่ใช้ในการวัดค่าการดูดกลืนแสงของ Fmoc เพื่อคำนวณหา loading

sample	Abs (296 nm)	conc. (mM)	dil. Ratio	soln. vol. (mL)	mmol Fmoc	Initial mmol Fmoc	spot area	loading ( $\mu\text{moles}/\text{cm}^2$ )	Avg.
rink-1	0.540197	0.1211	6.00	0.250	$1.82 \times 10^{-4}$	$3.63 \times 10^{-4}$	0.283	1.29	1.14
rink-2	0.448184	0.1005	6.00	0.250	$1.50 \times 10^{-4}$	$3.01 \times 10^{-4}$	0.283	1.07	
rink-3	0.454866	0.1020	6.00	0.250	$1.53 \times 10^{-4}$	$3.06 \times 10^{-4}$	0.283	1.08	

หมายเหตุ: **Abs**-absorbance, **conc.**-concentration, **dil. ratio**-dilution ratio, **soln. vol.**-solution volume, **Avg** - average

ค่าการดูดกลืนแสงที่ 296 nm ของตัวอย่าง rink ครั้งที่ 1 = 0.540197  
(จากสารละลายที่แบ่งมา 250  $\mu\text{L}$ )

คำนวณความเข้มข้นของ Fmoc ได้จากสมการการของ Beer's law:

$$A = \epsilon LC$$

โดยที่ **A** คือ ค่าการดูดกลืนแสง  
 **$\epsilon$**  คือ molar absorptivity  $4.4611 \text{ m}^2/\text{mol}$   
 ได้จาก calibration curve  
**L** คือ path length ของเซลล์  
**C** คือ ค่าความเข้มข้นในหน่วย mM  
 จะได้  $C = \frac{A}{\epsilon L} = \frac{0.540197}{4.461 \times 1} = 0.1211$

ดังนั้น **C** = 0.1211 mM Fmoc



จากนั้นสามารถคำนวณเป็นจำนวนโมลของ Fmoc ได้ จากสารละลายที่ใช้วัดคือ 0.25 mL และ dilution ratio = 6

$$\text{จะได้ จำนวนโมลของ Fmoc} = \frac{0.1211 \times 0.250 \times 6}{1000} = 1.82 \times 10^{-4} \text{ mmol Fmoc}$$

$$\begin{aligned} \text{และจำนวนโมลของ Fmoc (จากสารละลายเริ่มต้น 500 } \mu\text{L)} &= 1.82 \times 10^{-4} \times 2 \\ &= 3.63 \times 10^{-4} \text{ mmol Fmoc} \end{aligned}$$

นำมาคำนวณกับพื้นที่ของพื้นผิวตัดแปรที่ใช้คือ  $0.283 \text{ mm}^2$

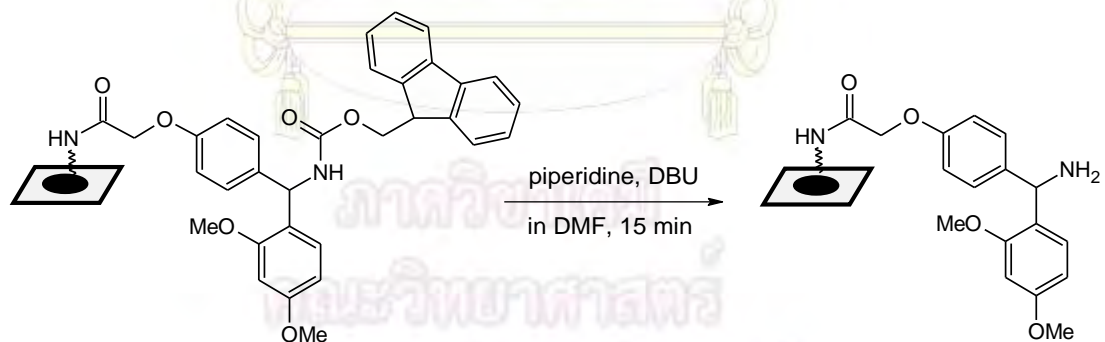
$$\text{จะได้ loading ของ linker} = \frac{3.63 \times 10^{-4}}{(0.283 \times 10^{-3})} = 1.29 \text{ } \mu\text{moles/cm}^2$$

สำหรับการทดลองครั้งที่ 2 และ 3 เมื่อใช้วิธีการคำนวณแบบเดียวกันกับการทดลองครั้งที่ 1

จะได้ loading = 1.07 และ 1.08  $\mu\text{moles/cm}^2$  ตามลำดับ

เมื่อหาค่าเฉลี่ย จากข้อมูลการทดลองทั้ง 3 ครั้ง จะได้ loading เฉลี่ย = 1.14  $\mu\text{moles/cm}^2$

## 2.2.7 การปลดหมู่ปกป้อง Fmoc ออก เพื่อนำไปต่อกรดอะมิโนตัวถัดไป



เตรียม DBU 0.2 mL และ piperidine 0.5 mL ละลายใน DMF 9.3 mL แช่กระดาษในสารละลาย เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างกระดาษด้วย DMF เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 2 รอบ และ methanol เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ

### 2.2.8 การสังเคราะห์กรดอะมิโนลงบนพื้นผิวตัดแปร

ลำดับของกรดอะมิโนที่จะสังเคราะห์ คือ H-Lys-Arg-Trp-Trp-Lys-Trp-Ile-Arg-Trp-NH<sub>2</sub> โดยเริ่มสังเคราะห์จากด้านปลาย C-terminal (ด้านทริปโตฟาน) การสังเคราะห์สายเพปไทด์ดังกล่าว จะอาศัยปฏิกิริยาการต่อกรดอะมิโนทีละตัวเป็นรอบ โดยอาศัย Fmoc protection strategy เริ่มจาก เตรียมสารละลายผสมของกรดอะมิโน 0.45 M, HOBt 0.90 M และ DIC 1.35 M โดยใช้กรดอะมิโน แต่ละชนิด (0.067 mmol) ตามตารางที่ 2.1 และ HOBt 0.0182 g (0.134 mmol) ใน DMF 120  $\mu$ L จากนั้นเติม DIC 30  $\mu$ L (0.201 mmol) ทำให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเปิด สารละลายด้วยไมโครปิเปตปริมาตร 2  $\mu$ L ลงในตำแหน่งจุดตัดตารางบนพื้นผิวกระดาษทุกจุด จำนวน 3 รอบ โดยที่แต่ละรอบห่างกันเป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างกระดาษโดยแช่ใน DMF เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 2 รอบ

ตารางที่ 2.2 น้ำหนักของกรดอะมิโนชนิดต่างๆที่ใช้ในการสังเคราะห์ลงบนพื้นผิวตัดแปร สำหรับพิสูจน์โครงสร้าง

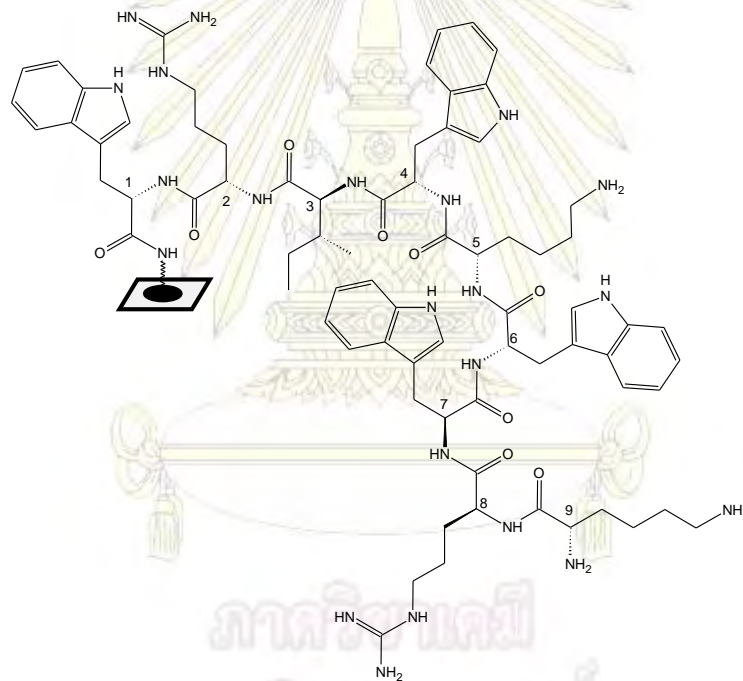
ชนิดของกรดอะมิโน	มวลโมเลกุล (g/mol)	น้ำหนักที่ใช้ (0.09 mmol) (g)
Fmoc-Trp(Boc)-OH	526.60	0.0355
Fmoc-Lys-OH	468.60	0.0316
Fmoc-Arg-OH	648.77	0.0438
Fmoc-Ile-OH	353.41	0.0239

### 2.2.9 การปลดหุ้มปกป้อง Boc และ Pbf ออก และการตัดสายเพปไทด์ออกจากกระดาษ เพื่อนำไปตรวจสอบด้วย MALDI-TOF Mass Spectrometer

เตรียมสารละลายผสมของ TFA 880  $\mu$ L phenol 5  $\mu$ L น้ำ DI 5  $\mu$ L และ TIPS 2  $\mu$ L จะได้สารละลายผสมปริมาตร 1 mL จากนั้นนำกระดาษเฉพาะส่วนที่เกิดปฏิกิริยามาแช่ลงใน สารละลายผสมบรรจุในขวดแก้วเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นระเหยตัวทำละลายให้แห้งโดยการเป่าลม ด้วยปั๊มอากาศ ชะเพปไทด์ที่ยังติดอยู่บนกระดาษที่แห้งด้วย methanol ลงในขวดแก้วเติม คีบกระดาษออกจากขวดแก้ว ระเหยตัวทำละลายอีกครั้ง เมื่อได้เพปไทด์ที่แห้งแล้วจึงนำมาละลายด้วย methanol ปริมาตร 1 mL จะได้สารละลายที่พร้อมสำหรับการวิเคราะห์มวลโมเลกุลต่อไป

## 2.3 การสังเคราะห์พื้นผิวตัดแปรเพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

การสังเคราะห์พื้นผิวตัดแปรเพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรานั้น มีขั้นตอนเหมือนกับการสังเคราะห์พื้นผิวตัดแปรเพื่อพิสูจน์ทราบโครงสร้าง แต่แตกต่างกันที่การสังเคราะห์เพื่อทดสอบฤทธิ์จะไม่ทำผ่าน linker กล่าวคือกรดอะมิโนตัวแรกจะต่อกับ spacer โดยตรง โดยไม่ใช้ linker เนื่องจากอาจส่งผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรานั้น ไม่มีความจำเป็น ต้องตัดสายเพปไทด์ออก การสังเคราะห์กรดอะมิโนเรียงตามลำดับจาก C-terminal ไปยัง N-terminal จะได้ลำดับการสังเคราะห์ดังนี้ Trp-Arg-Ile-Trp-Lys-Trp-Trp-Arg-Lys และหลังจากต่อกรดอะมิโนตัวแต่ละตัวเสร็จสิ้น จะทำการตัดแบ่งกระดาษไว้ส่วนหนึ่ง เพื่อนำไปหา loading และวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ปริมาณกรดอะมิโนแต่ละลำดับที่ใช้ ดังแสดงในตารางที่ 2.2



รูปที่ 2.2 แสดงโครงสร้างของเพปไทด์ 9 หน่วย ตามลำดับการสังเคราะห์

ตารางที่ 2.2 น้ำหนักของกรดอะมิโนชนิดต่างๆที่ใช้ในการสังเคราะห์ลงบนพื้นผิวตัดแปร สำหรับใช้ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

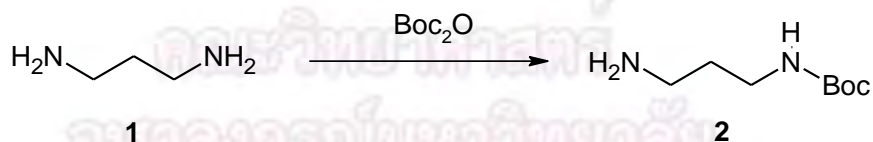
ลำดับที่ กรดอะมิโน	กรดอะมิโน	มวล โมเลกุล (g/mol)	กรดอะมิโนที่ใช้ (0.45 M) (g)	HOBt ที่ใช้ (0.90 M) (g)	DIC ที่ใช้ (1.35 M) (μL)	ปริมาตรDMF (μL)	ปริมาตร สารละลายรวม (μL)
1	Fmoc-Trp(Boc)-OH	526.60	0.1280	0.0657	113	427	540
2	Fmoc-Arg-OH	648.77	0.1401	0.0584	100	380	480
3	Fmoc-Ile-OH	353.41	0.0684	0.0523	90	340	430
4	Fmoc-Trp(Boc)-OH	526.60	0.0900	0.0462	79	301	380
5	Fmoc-Lys-OH	468.60	0.0675	0.0389	67	253	320
6	Fmoc-Trp(Boc)-OH	526.60	0.0640	0.0328	56	214	270
7	Fmoc-Trp(Boc)-OH	526.60	0.0521	0.0268	46	174	220
8	Fmoc-Arg-OH	648.77	0.0467	0.0195	33	127	160
9	Fmoc-Lys-OH	468.60	0.0232	0.0134	23	87	110

## 2.4 การศึกษาผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียบนพื้นผิวตัดแปร

กระดาษที่ตรึงเพปไทด์เรียบร้อยแล้ว คณะผู้วิจัยได้ส่งไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยา โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รุ่งอรุณ วาดีถิ์ สิริศรัทธา และนางสาวอภิรดี โอภิธากรณ์

## 2.5 การสังเคราะห์สี่ย้อมฟลูออเรสเซนต์ 4-(1,3-diaminopropyl)-7-nitrobenz-[2,1,3-d]-oxadiazole หรือ NBD-Diamine

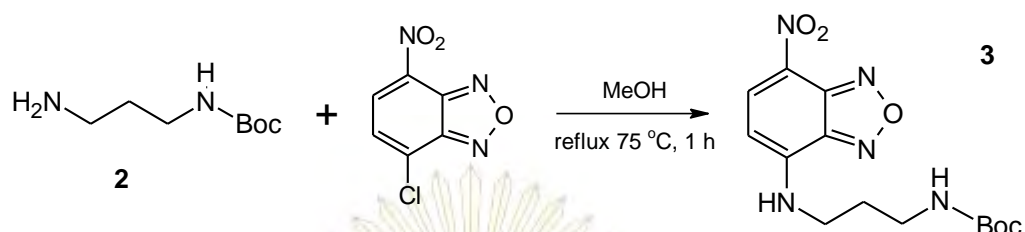
### 2.5.1 การเติมหมู่ปกป้อง Boc ให้กับ 1,3-diaminopropane



ซึ่ง 1,3-Diaminopropane **1** (2.7890 g, 37.6 mmol, 8 equiv) เติม dichloromethane 50 mL จากนั้นค่อยๆเติม di-*tert*-butyl dicarbonate (1.0267 g, 4.7 mmol, 1 equiv) แล้วคนสารละลายเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นเติมน้ำ DI 30 mL กรองสารส่วนที่ไม่ละลายน้ำออกด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ แล้วสกัดสารด้วย dichloromethane 3 ครั้ง กำจัดน้ำที่เหลือด้วย Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จะได้ของเหลวใส **2** (0.3970 g, 2.3 mmol, 49% yield จาก **1**)

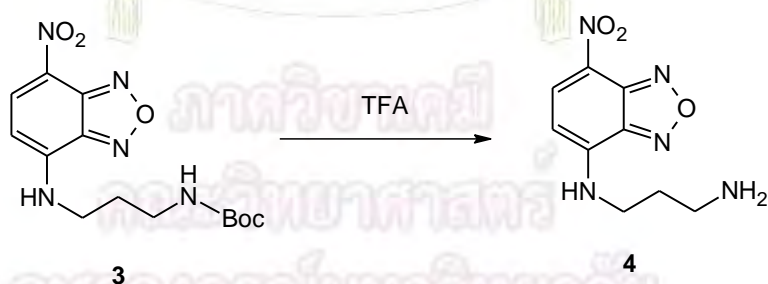
พิสูจน์ทราบโครงสร้างด้วยเทคนิค  $^1\text{H-NMR}$  (รูปที่ ผ-2 ) (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3.19 (t, 2H), 2.74 (t, 2H), 1.59 (q, 2H), 1.42 (s, 9H)

### 2.5.2 การสังเคราะห์ 4-(*N*-Boc-1,3-diaminopropyl)-7-nitrobenz-[2,1,3-d]-oxadiazole



ละลาย 4-Chloro-7-nitrobenz-[2,1,3-d]-oxadiazole (0.3010 g, 1.51 mmol, 1 equiv) ใน methanol (12 mL) จากนั้นเติม *N*-Boc-1,3-diaminopropane **2** (0.3970 g, 2.28 mmol, 1.5 equiv) แล้วรีฟลักซ์สารที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ภายใต้แก๊สไนโตรเจน จากนั้นเติม  $\text{NaHCO}_3$  (0.3903 g ละลายในน้ำ DI 12 mL) รอให้ของแข็งสีน้ำตาลแดงตกตะกอน กรองเก็บของแข็งด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ ทำสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ด้วยระบบ Hexane : EtOAc (1:9) ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จะได้ของแข็งสีเหลืองเข้ม **3** (0.0947 g, 0.28 mmol, 18% yield จาก **2**) พิสูจน์ทราบโครงสร้างด้วยเทคนิค  $^1\text{H-NMR}$  (รูปที่ ผ-3 ) (400 MHz, DMSO)  $\delta$ : 8.49 (d, 1H), 6.38 (d, 1H), 3.45 (d, 2H), 3.0 (d, 1H), 1.77 (m, 2H), 1.34 (s, 9H)

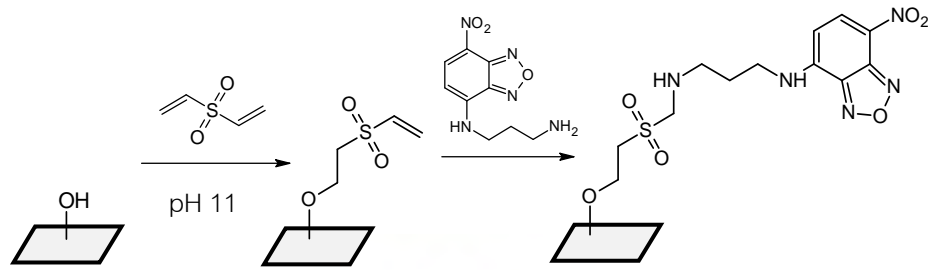
### 2.5.3 การปลดหมู่ปกป้อง Boc ออก



ละลาย **3** ใน dichloromethane 5 mL จากนั้นเติม trifluoroacetic acid 1.2 mL คนสารละลายเป็นเวลา 90 นาทีแล้วเจือจางสารโดยการเติม toluene 5 mL ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศจะได้ของแข็งสีน้ำตาล (0.0614 g, 0.26 mmol, 93% yield จาก **3**, 6% yield จาก **1**) พิสูจน์ทราบโครงสร้างด้วยเทคนิค  $^1\text{H NMR}$  (รูปที่ ผ-4 ) (400 MHz, DMSO) :  $\delta$  9.50 (t, 1H), 8.52 (d, 1H), 7.77 (t,2H), 6.41 (d, 1H), 3.53 (d, 2H), 2.91 (d, 2H), 1.92 (m, 2H)

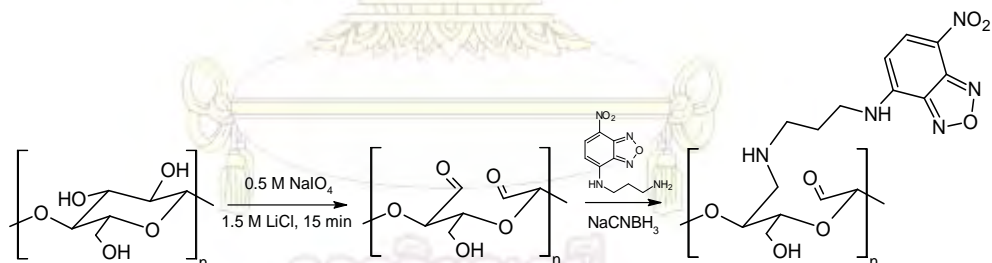
## 2.6 การศึกษาการย้อมสีฟลูออเรสเซนส์ NBD-diamine

### 2.6.1 การทดสอบกับพื้นผิวเซลลูโลสที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับ divinyl sulfone



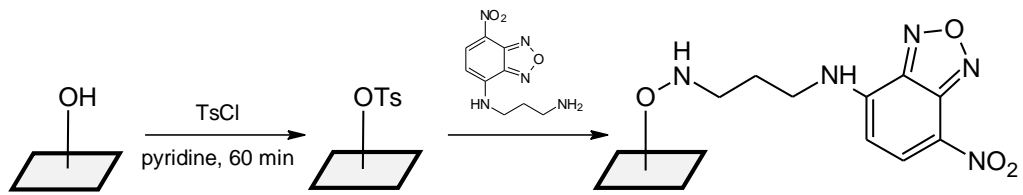
เตรียมสารละลาย 10% divinyl sulfone โดยใช้ sodium carbonate – sodium bicarbonate buffer solution (pH 11) เป็นตัวทำละลาย หยดสารละลาย 10% divinyl sulfone ลงบนกระดาษกรองตามตำแหน่งที่ทำเครื่องหมายไว้ ตำแหน่งละ 2  $\mu\text{L}$  ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วหยดซ้ำตำแหน่งเดิมอีก ทำทั้งหมด 4 ครั้งล้างกระดาษด้วยน้ำ DI 2 ครั้ง และ methanol 1 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ปล่อยกระดาษให้แห้ง แล้วหยดสารละลายของสีย้อมความเข้มข้น  $1 \times 10^{-5}$  -  $1 \times 10^{-3}$  M ความเข้มข้นละ 3 ตำแหน่ง ตำแหน่งละ 2  $\mu\text{L}$  และรอให้แห้งเป็นเวลา 5 นาที ล้างกระดาษอีกครั้งด้วยน้ำ DI 2 ครั้ง และ methanol 1 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ปล่อยกระดาษให้แห้ง นำกระดาษที่ล้างแล้วไปส่องด้วยแสงฟลูออเรสเซนส์ความยาวคลื่น 254 nm และ 365 nm แล้วบันทึกภาพ และนำภาพไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageJ

### 2.6.2 การทดสอบกับพื้นผิวเซลลูโลสที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับ sodium periodate



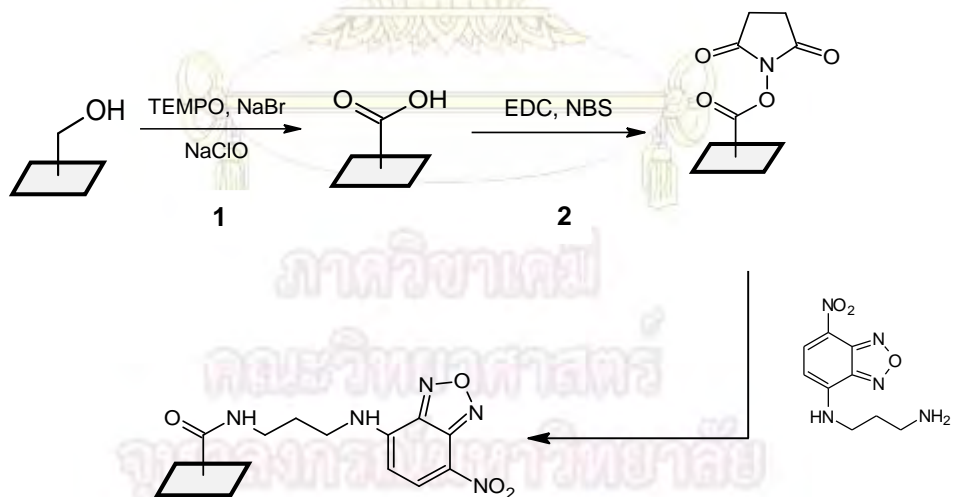
เตรียมสารละลายผสมของ sodium periodate 0.5 M (0.0214 g) และ lithium chloride 1.5 M (0.0127g) ละลายในน้ำ Milli Q 0.2 mL หยดสารละลายผสมที่เตรียมไว้ลงบนกระดาษกรองตามตำแหน่งที่ทำเครื่องหมายไว้ ตำแหน่งละ 2  $\mu\text{L}$  แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50  $^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 15 นาทีล้างกระดาษด้วยน้ำ DI 2 ครั้ง และ methanol 1 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ปล่อยกระดาษให้แห้ง หยดสารละลายของสีย้อมความเข้มข้น  $1 \times 10^{-5}$  -  $1 \times 10^{-3}$  M ความเข้มข้นละ 3 ตำแหน่ง ตำแหน่งละ 2  $\mu\text{L}$  และรอให้แห้งเป็นเวลา 5 นาที ล้างกระดาษอีกครั้งด้วยน้ำ DI 2 ครั้ง และ methanol 1 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ปล่อยกระดาษให้แห้ง นำกระดาษที่ล้างแล้วไปส่องด้วยแสงฟลูออเรสเซนส์ความยาวคลื่น 254 nm และ 365 nm แล้วบันทึกภาพ และนำภาพไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageJ

### 2.6.3 การทดสอบกับพื้นผิวเซลลูโลสที่ผ่านการทำปฏิกิริยา Tosylation



ละลาย 4-toluenesulfonyl chloride (0.0763 g, 4 mmol) ใน pyridine 15 mL หยดสารละลายผสมที่เตรียมไว้ลงบนกระดาษกรอง ในตำแหน่งที่ทำเครื่องหมายไว้ ตำแหน่งละ 2  $\mu\text{L}$  แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80  $^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาจึงหยดซ้ำที่ตำแหน่งเดิม ทำทั้งหมด 4 ครั้ง จากนั้นนำกระดาษมาล้างด้วย DMF เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 2 รอบ methanol เป็นเวลา 3 นาที และ dichloromethane เป็นเวลา 3 นาที ตามลำดับ หยดสารละลายของสีย้อมความเข้มข้น  $1 \times 10^{-5}$  -  $1 \times 10^{-3}$  M ความเข้มข้นละ 3 ตำแหน่ง ตำแหน่งละ 2  $\mu\text{L}$  และรอให้แห้งเป็นเวลา 5 นาที ล้างกระดาษอีกครั้งด้วยน้ำ DI 2 ครั้งและ methanol 1 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ปล่อยกระดาษให้แห้ง นำกระดาษที่ล้างแล้วไปส่องด้วยแสงฟลูออเรสเซนส์ความยาวคลื่น 254 nm และ 365 nm แล้วบันทึกภาพ และนำภาพไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageJ

### 2.6.4 การทดสอบกับพื้นผิวเซลลูโลสที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับ TEMPO



เตรียมสารละลายผสม 1 ของ TEMPO 0.0025 M, NaBr 0.1 M และ NaClO 1 M ปริมาตร 5 mL โดยชั่ง TEMPO 0.0020 g, NaBr 0.0544 g และ NaClO 0.3722 g ละลายในน้ำ milli Q 5 mL

เตรียมสารละลายผสม 2 ของ EDC 0.1 M และ NHS 0.4 M ปริมาตร 0.5 mL โดยชั่ง EDC 0.0096 g และ NHS 0.0230 g ละลายในน้ำ Milli Q 0.5 mL

หยดสารละลายผสม 1 ลงบนกระดาษตามตำแหน่งที่ทำเครื่องหมายไว้ ตำแหน่งละ 2  $\mu\text{L}$  ที่อุณหภูมิห้อง แล้วรอให้แห้งเป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างกระดาษด้วยน้ำ DI 2 ครั้ง และ methanol 1 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ปลอยกระดาษให้แห้ง จากนั้นหยดสารละลายผสม 2 ลงบนตำแหน่งเดิม ตำแหน่งละ 2  $\mu\text{L}$  แล้วรอให้แห้งเป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงหยดสารละลายของสีย้อม ความเข้มข้น  $1 \times 10^{-5}$  -  $1 \times 10^{-3}$  M ความเข้มข้นละ 3 ตำแหน่ง ตำแหน่งละ 2  $\mu\text{L}$  และรอให้แห้งเป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างกระดาษด้วยน้ำ DI ปลอยกระดาษให้แห้ง นำกระดาษที่ล้างแล้วไปส่องด้วยแสงฟลูออเรสเซนส์ที่ความยาวคลื่น 254 nm และ 365 nm บันทึกภาพ และนำภาพไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageJ





## บทที่ 3

### ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

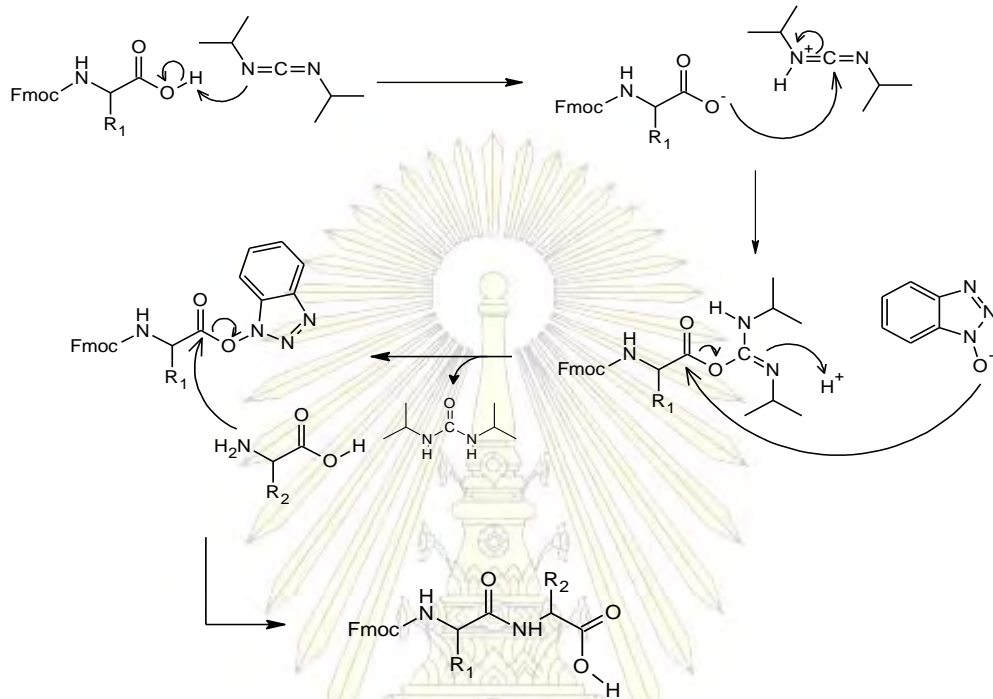
ในงานวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการสังเคราะห์เพปไทด์ด้านจุลชีพที่มีลำดับกรดอะมิโน H-KRWWKWIRW-NH<sub>2</sub> ด้วยพันธะโคเวเลนต์บนพื้นผิวของกระดาษ รวมถึงการสังเคราะห์และศึกษาฤทธิ์ของเพปไทด์ลำดับดังกล่าวที่ความยาวของลำดับกรดอะมิโนตั้งแต่ 1 ถึง 9 หน่วย โดยใช้เทคนิค SPOT synthesis ซึ่งเป็นวิธีเทคนิคที่ใช้สารปริมาณน้อย และสามารถสังเคราะห์เพปไทด์ที่มีความหลากหลายได้ในเวลาเดียวกัน เริ่มต้นจากเพปไทด์จะถูกตรึงบนพื้นผิวของกระดาษ ผ่าน spacer และ linker โดยที่ spacer จะทำให้โมเลกุลของกรดอะมิโนต่อกับพื้นผิวของแข็งได้ง่ายขึ้น โดยมีโครงสร้างเป็นโมเลกุลสายยาวซึ่งลดผลความเกาะเกาะในการเกิดปฏิกิริยา ในงานวิจัยนี้เลือกใช้ 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecanediamine ซึ่งเป็นโมเลกุลสายยาวที่มีอะตอมของออกซิเจนแทรกอยู่ ทำให้มีความเป็น hydrophilic ส่งผลให้การละลายน้ำดีขึ้น และ linker เป็นโมเลกุลที่สายเพปไทด์สามารถเชื่อมต่อแบบโคเวเลนต์ และสามารถหลุดออกด้วยสารเคมีอื่น ๆ ได้ โดยในงานวิจัยนี้เลือกใช้ 4-[(R,S)-(2,4-dimethoxyphenyl)(Fmoc-amino)methyl] phenoxyacetic acid หรือ Rink amide linker นอกจากนี้การสังเคราะห์ต้องอาศัยการสร้างพันธะเพปไทด์ระหว่างหมู่ carboxylic และ amino ของสารสองโมเลกุล ซึ่งต้องอาศัยสารในกลุ่ม carbodiimide ช่วยทำให้เกิดปฏิกิริยา เนื่องจากปฏิกิริยาไม่สามารถเกิดขึ้นเองได้ในสภาวะปกติ

### 3.1 การสังเคราะห์พื้นผิวดัดแปรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และพิสูจน์ทราบโครงสร้างด้วยเทคนิค MALDI-TOF Mass Spectrometry

การสังเคราะห์เพปไทด์ลำดับ H-KRWWKWIRW-NH<sub>2</sub> บนพื้นผิวดัดแปรเพื่อพิสูจน์ทราบโครงสร้างจากมวลโมเลกุลด้วยเทคนิค MALDI-TOF Mass Spectrometry มีวิธีการสังเคราะห์ดังแสดงในแผนภาพที่ 2.1

เริ่มต้นจากปฏิกิริยา Tosylation ซึ่งเปลี่ยนหมู่ hydroxyl ในตำแหน่ง primary alcohol ให้เป็นหมู่ tosyl ซึ่งเป็นหมู่หลุดออกที่ดี เพื่อเตรียมการติด spacer โดยการติด spacer นั้น หมู่ amino ที่ปลายข้างหนึ่งของสายโซ่ จะเกิดปฏิกิริยาแทนที่หมู่ tosyl ได้เป็น spacer ที่ตรึงอยู่บนพื้นผิวเซลล์ด้วยพันธะโคเวเลนต์ระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน ขั้นตอนถัดมาคือ การต่อ 4-[(R,S)-(2,4-dimethoxyphenyl)(Fmoc-amino)methyl] phenoxyacetic acid หรือ Rink amide linker ซึ่งมีส่วนของโครงสร้างที่ทำปฏิกิริยากลายกับกรดอะมิโน นั่นคือ มีปลายด้านหนึ่งเป็นหมู่ amino และปลายอีกด้านหนึ่งเป็นหมู่ carboxyl โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นต้องอาศัย coupling reagent ที่มีโครงสร้างเป็น carbodiimide ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้ *N,N'*-diisopropyl-carbodiimide หรือ DIC ซึ่งทำหน้าที่กระตุ้นให้หมู่ carboxyl ของโมเลกุลเป็นอิเล็กโทรไฟล์ที่มีความว่องไวเหมาะสมสำหรับการเกิดปฏิกิริยา โดย DIC จะทำปฏิกิริยากับหมู่ carboxyl ได้เป็น ester และปฏิกิริยานี้จะถูกขับเคลื่อนโดยปฏิกิริยาแทนที่ของผลิตภัณฑ์ ester ดังกล่าวด้วยนิวคลีโอไฟล์ แล้วได้ผลิตภัณฑ์ร่วมเป็น diisopropylurea ซึ่งมีความเสถียรสูง อย่างไรก็ตาม

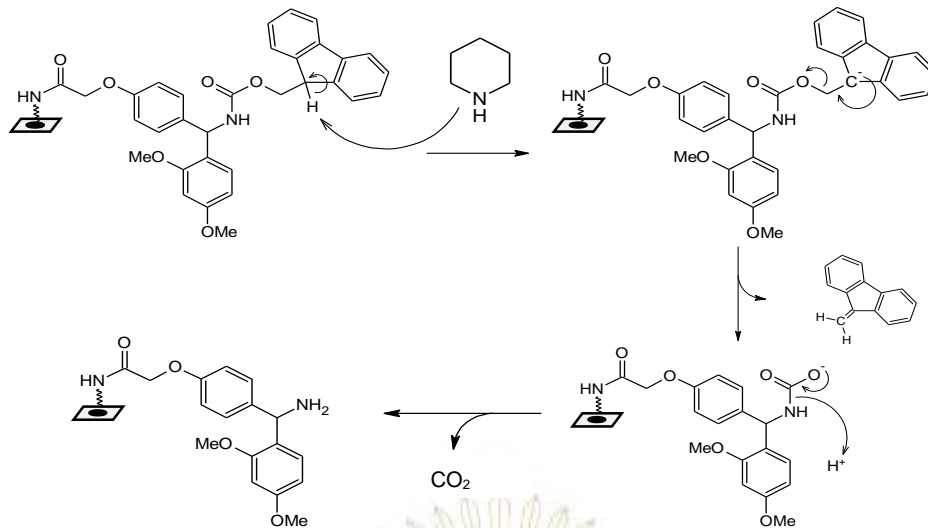
ผลิตภัณฑ์ ester ดังกล่าวจะสามารถเกิด racemization ได้ (เนื่องจากมี chiral carbon ตำแหน่งถัดจาก reactive carbonyl) จึงมีการเติม HOBt ซึ่งจะทำให้เกิดสารมัธยันตร์ชนิดใหม่ขึ้น ส่งผลให้ไม่เกิด racemization และเกิดพันธะเพปไทด์ได้ต่อไป กลไกของการเกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นไปได้ดังแสดงในแผนภาพที่ 3.1



แผนภาพที่ 3.1 แสดงกลไกการเกิดพันธะเพปไทด์โดย DIC และ HOBt

เนื่องจากปฏิกิริยาการต่อ linker กับ spacer ที่เกิดขึ้นนั้น ไม่ได้เกิดกับทุกโมเลกุลบนพื้นผิว จึงต้องมีการ deactivate หมู่ amino ของ spacer ด้วยการปิดหมู่ฟังก์ชันที่เฉื่อยต่อการทำปฏิกิริยา (capping) โดยทำปฏิกิริยากับ propanoic anhydride จากนั้นจึงทำการปลดหมู่ปกป้อง Fmoc ออก (deprotection) เพื่อให้สามารถนำมาทำปฏิกิริยาต่อไป โดยใช้สารละลายเบส (piperidine+DBU+DMF) โดยมีกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังแสดงในแผนภาพที่ 3.2

ในขั้นตอนต่อไป คือการต่อกรดอะมิโนที่ใช้หลักการเดียวกับการทำปฏิกิริยาการต่อ Rink amide linker โดยปลายด้านหมู่ amino ของโมเลกุลที่ติดอยู่กับกระดาษ เป็นนิวคลีโอไฟล์ และปลายด้านหมู่ carbonyl ของกรดอะมิโนที่เข้ามาต่อเป็นอิเล็กโตรไฟล์ และแต่ละรอบของการต่อกรดอะมิโน ต้องผ่านการ capping และการปลดหมู่ปกป้อง Fmoc ก่อนที่จะต่อกรดอะมิโนตัวถัดไป



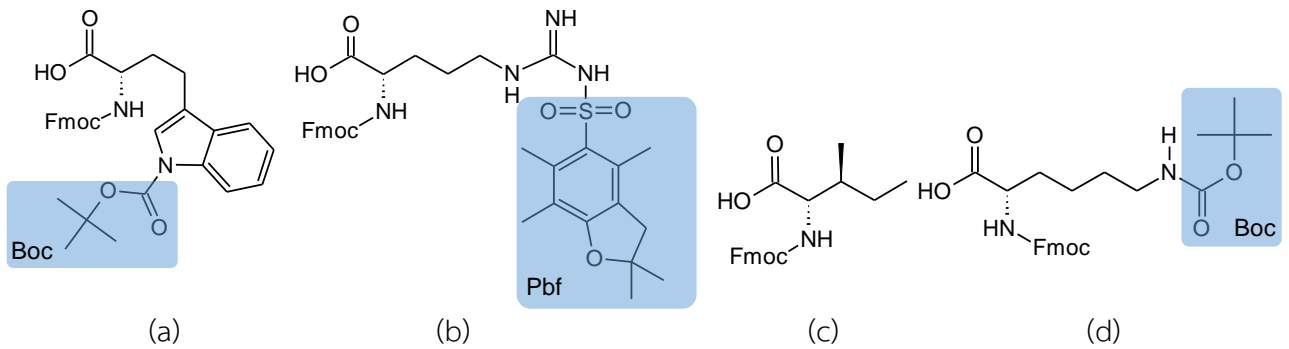
แผนภาพที่ 3.2 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาการปลดหมู่ปกป้องออก (Deprotection of Fmoc)

นอกจากนี้ ผู้วิจัยได้วัดปริมาณการติดของ Rink amide linker และกรดอะมิโนตัวสุดท้ายด้วยการวัดปริมาณ Fmoc ที่หลุดออก โดยหลังจากขั้นตอน capping ได้ตัดแบ่งกระดาษส่วนหนึ่งออกมาเพื่อนำไปปลดหมู่ปกป้อง Fmoc ออกแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 296 nm และคำนวณ (dilution ratio = 6, Volume of solution = 0.250 mL) จะได้ค่า loading ซึ่งบ่งบอกถึง จำนวนโมลของสารที่ติดอยู่บนพื้นผิวเซลลูโลส ต่อหน่วยพื้นที่ ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 296 nm ของ Fmoc จาก Rink linker และ Lysine ตัวที่ 9 และค่า loading

n	sample	abs. (296nm)	conc. (M)	mmole Fmoc	initial mmole Fmoc	loading (umoles/cm <sup>2</sup> )	avg
1	Rink	0.540197	0.1211	$1.82 \times 10^{-4}$	$3.63 \times 10^{-4}$	1.28	1.14
2		0.448184	0.1005	$1.51 \times 10^{-4}$	$3.01 \times 10^{-4}$	1.07	
3		0.454866	0.1020	$1.53 \times 10^{-4}$	$3.06 \times 10^{-4}$	1.08	
1	Lys#9	0.237789	0.0533	$8.00 \times 10^{-5}$	$1.60 \times 10^{-4}$	0.57	0.60
2		0.25158	0.0564	$8.46 \times 10^{-5}$	$1.69 \times 10^{-4}$	0.60	
3		0.271109	0.0608	$9.12 \times 10^{-5}$	$1.82 \times 10^{-4}$	0.65	

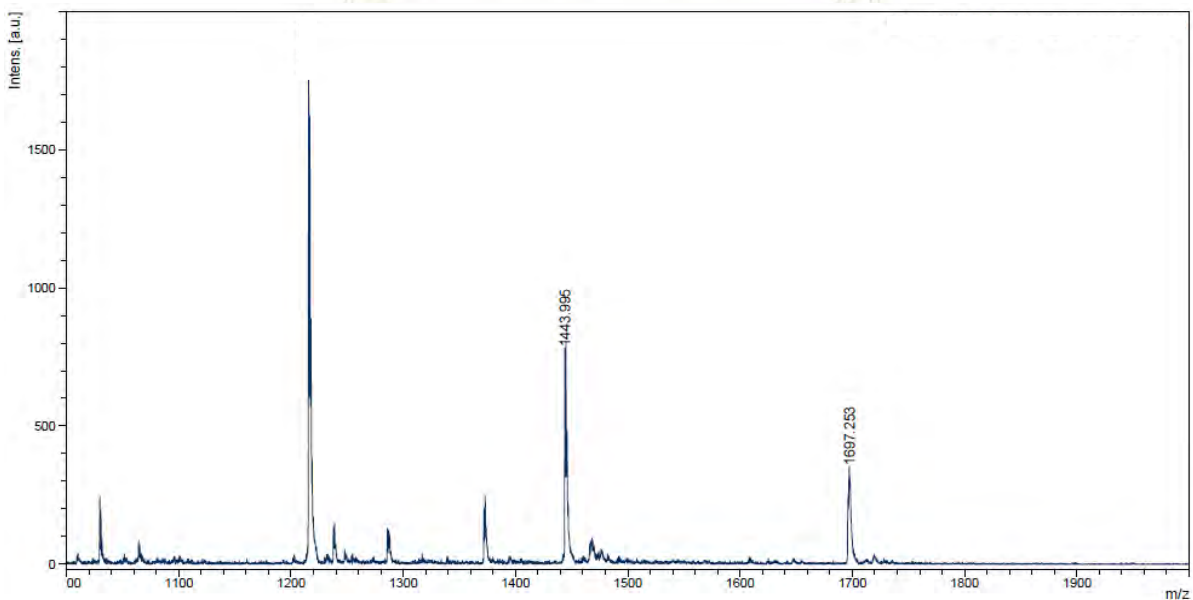
เนื่องจากกรดอะมิโนแต่ละชนิดจะมีหมู่แทนที่ที่แตกต่างกัน จึงต้องมีการปกป้องโซ่ข้างของกรดอะมิโนบางตัวที่มีความว่องไวและอาจเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงได้ โดยใช้หมู่ปกป้องที่นอกเหนือจาก Fmoc เพื่อป้องกันการเกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่ไม่ต้องการ ซึ่งกรดอะมิโนที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือ ทริปโตฟาน (Trp) อาร์จินีน (Arg) ไอโซลิวซีน (Ile) และไลซีน (Lys) ซึ่งมีโครงสร้าง และหมู่ปกป้องดังแสดงในรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 แสดงโครงสร้างของกรดอะมิโน (a) ทริปโตฟาน (b) อาร์จินีน (c) ไอโซลิวซีน และ (d) ไลซีน

ดังนั้นเมื่อเสร็จสิ้นการต่อกรดอะมิโนแล้ว ต้องทำการปลดหมู่ปกป้องที่เหลือออก ซึ่งจะถูกลดออกด้วยสภาวะกรดทั้งหมด พร้อมกับการตัดสายเพปไทด์ออกจากพื้นผิวกระดาษเพื่อนำไปวิเคราะห์ ซึ่งทำได้โดยใช้สารละลายที่มีสภาวะเป็นกรดผสมกับสารอื่น ๆ ที่ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาภายในสายเพปไทด์ที่ไม่ต้องการ โดยใช้สารละลายผสมของ TFA/phenol/water/TIPS

จากนั้นนำสายเพปไทด์ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยเทคนิค MALDI-TOF Mass Spectrometry พบพีคของสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ( $m/z$  calcd. = 1442.83, found = 1443.039) นอกจากนี้จะเห็นได้ว่ายังมีพีคอื่น ๆ ปรากฏอยู่อีกด้วยนั่นคือ  $m/z$  = 1697.169 นั่นคือเพปไทด์ผลิตภัณฑ์ที่ยังมีหมู่ปกป้อง Pbf ติดอยู่ 1 โมเลกุล และที่  $m/z$  ต่ำกว่า 1443.096 คาดว่าเป็นเพปไทด์ที่เกิดปฏิกิริยาภายในโมเลกุล ดังภาพที่ 3.4



ภาพที่ 3.4 แสดงผลที่ได้จากการตรวจสอบเพปไทด์ 9 หน่วยที่สังเคราะห์ขึ้นด้วยเทคนิค MALDI-TOF Mass Spectrometry

### 3.2 การสังเคราะห์พื้นผิวตัดแปรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

การสังเคราะห์เพปไทด์ลำดับ H-KRWWKWRW-NH<sub>2</sub> บนพื้นผิวตัดแปรที่ความยาวลำดับกรดอะมิโนเป็น 1-9 หน่วยเพื่อทดสอบและวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียมีวิธีการสังเคราะห์เช่นเดียวกับการทดลองก่อนหน้า แต่แตกต่างกันที่การสังเคราะห์พื้นผิวตัดแปรเพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย จะไม่ต่อผ่าน linker เนื่องจากไม่มีความจำเป็นต้องตัดสายเพปไทด์ออกจากพื้นผิวเซลล์โลส ดังแสดงในแผนภาพที่ 2.1

นอกจากนี้ ผู้วิจัยได้ทำการวัดปริมาณการติดของกรดอะมิโนในแต่ละรอบ ด้วยการวัดปริมาณ Fmoc โดยหลังจากขั้น capping จะตัดแบ่งกระดาษส่วนหนึ่งไว้ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และอีกส่วนหนึ่งสำหรับนำไปปลดหมู่ปกป้อง Fmoc ออกแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 296 nm และคำนวณ จะได้เป็นค่า loading บ่งบอกถึงจำนวนโมลของสารที่ติดอยู่บนพื้นผิวเซลล์โลส ต่อหน่วยพื้นที่ ดังแสดงในตารางที่ 3.2 ซึ่งจะเห็นได้ว่าค่า loading จะค่อย ๆ ลดลงตามความยาวของสายเพปไทด์ที่เพิ่มขึ้น

ตารางที่ 3.2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 296 nm ของ Fmoc จากกรดอะมิโนลำดับต่าง ๆ และค่า loading

n	sample	abs. (296nm)	conc. (M)	mmole Fmoc	initial mmole Fmoc	loading ( $\mu\text{moles,cm}^2$ )	avg
1		0.608851	0.136480	$2.05 \times 10^{-4}$	$5.12 \times 10^{-4}$	1.81	
2	Trp#1	0.586018	0.131362	$1.97 \times 10^{-4}$	$4.93 \times 10^{-4}$	1.74	1.81
3		0.623160	0.139688	$2.10 \times 10^{-4}$	$5.24 \times 10^{-4}$	1.85	
1		0.539569	0.120950	$1.81 \times 10^{-4}$	$4.54 \times 10^{-4}$	1.60	
2	Arg#2	0.514162	0.115255	$1.73 \times 10^{-4}$	$4.32 \times 10^{-4}$	1.53	1.55
3		0.512259	0.114828	$1.72 \times 10^{-4}$	$4.31 \times 10^{-4}$	1.52	
1		0.454682	0.101921	$1.53 \times 10^{-4}$	$3.82 \times 10^{-4}$	1.35	
2	Ile#3	0.523688	0.117390	$1.76 \times 10^{-4}$	$4.40 \times 10^{-4}$	1.56	1.44
3		0.474269	0.106312	$1.60 \times 10^{-4}$	$3.99 \times 10^{-4}$	1.41	
1		0.528829	0.118542	$1.78 \times 10^{-4}$	$4.44 \times 10^{-4}$	1.57	
2	Trp#4	0.495639	0.111102	$1.67 \times 10^{-4}$	$4.167 \times 10^{-4}$	1.47	1.52
1		0.487997	0.109389	$1.64 \times 10^{-4}$	$4.10 \times 10^{-4}$	1.45	
2	Lys#5	0.486021	0.108946	$1.63 \times 10^{-4}$	$4.08 \times 10^{-4}$	1.44	1.45
1		0.476870	0.106895	$1.60 \times 10^{-4}$	$4.01 \times 10^{-4}$	1.42	
2	Trp#6	0.493612	0.110648	$1.66 \times 10^{-4}$	$4.15 \times 10^{-4}$	1.47	1.43
3		0.469032	0.105138	$1.58 \times 10^{-4}$	$3.94 \times 10^{-4}$	1.39	
1		0.442918	0.099284	$1.49 \times 10^{-4}$	$3.72 \times 10^{-4}$	1.32	
2	Trp#7	0.462026	0.103568	$1.55 \times 10^{-4}$	$3.88 \times 10^{-4}$	1.37	1.41
3		0.515495	0.115553	$1.73 \times 10^{-4}$	$4.33 \times 10^{-4}$	1.53	
1		0.366085	0.082062	$1.23 \times 10^{-4}$	$3.08 \times 10^{-4}$	1.09	
2	Arg#8	0.406961	0.091224	$1.37 \times 10^{-4}$	$3.42 \times 10^{-4}$	1.21	1.19
1		0.192017	0.043043	$0.64 \times 10^{-4}$	$1.61 \times 10^{-4}$	0.57	
2	Lys#9	0.209844	0.047040	$0.70 \times 10^{-4}$	$1.76 \times 10^{-4}$	0.62	0.60

เมื่อการสังเคราะห์พื้นผิวดัดแปรที่มีเพปไทด์ความยาวต่าง ๆ เสร็จสิ้น จึงทำการปลดหมู่ปกป้อง Fmoc ออกโดยใช้สารละลายเบส และปลดหมู่ปกป้อง Boc และ Pbf ด้วยสารละลายกรดตามวิธีการทดลองข้างต้น แล้วจึงนำส่งทดสอบวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S.aureus* และ *E.coli* โดยใช้เวลาประมาณ 1 สัปดาห์ จะได้ผลออกมาเป็น CFU/mL นำมาคำนวณเป็น %inhibition และเทียบกับ loading โดยใช้ชุดการทดลองควบคุมเป็นกระดาษที่ไม่ได้ทำการดัดแปร ได้ผลการทดลองที่ทดสอบกับ *S.aureus* ดังแสดงในตารางที่ 3.3 และผลการทดสอบกับ *E.coli* ดังแสดงในตารางที่ 3.4 และนำข้อมูลมาสร้างเป็นแผนภูมิแท่ง %inhibition ของ *S.aureus* และ *E.coli* ดังแสดงในภาพที่ 3.5

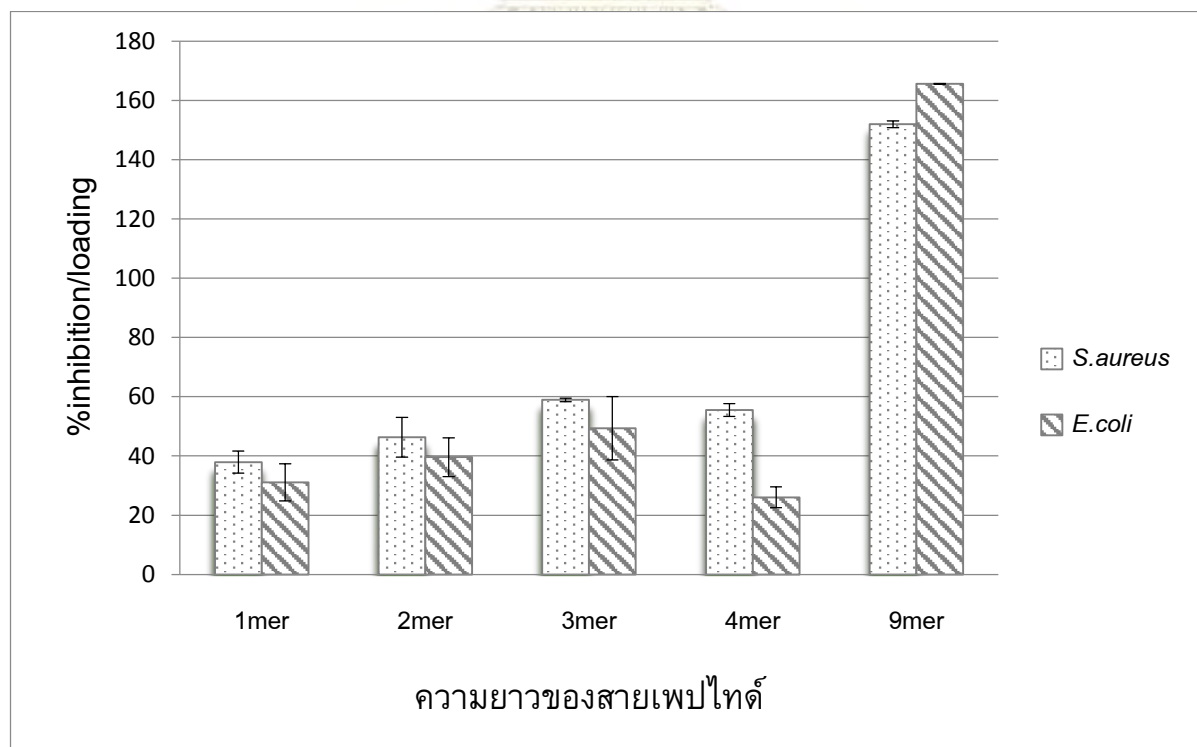
สาเหตุที่นำค่า %inhibition มาคำนวณกับค่า loading ก่อน แล้วจึงนำค่า %inhibition/loading ที่ได้มาสร้างแผนภูมิแท่งเปรียบเทียบ เนื่องจากปริมาณของสายเพปไทด์ในแต่ละความยาวที่ติดลงบนพื้นผิวกระดาษนั้นจะมีค่าลดลงเรื่อย ๆ ซึ่งเกิดจากการทำปฏิกิริยาที่มีประสิทธิภาพต่างกัน ดังนั้นการหารด้วยค่า loading จะเป็นการเปรียบเทียบแต่ละตัวอย่างได้เท่าเทียมมากขึ้น

**ตารางที่ 3.3** แสดงผลที่ได้จากการทดสอบวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S.aureus* กับพื้นผิวดัดแปร

n	sample	the number of amino acid	avg of CFU	avg of avg of CFU	%inh.	avg of %inh.	loading	%inh./loading
1	control		1600000					
2	control	0	1933333	1600000	0.00	0	0	0
3	control		1266667					
1	H-W-NH <sub>2</sub>		396000		75.25			
2	H-W-NH <sub>2</sub>	1	517333	504722	67.67	68.45	1.81	37.9
3	H-W-NH <sub>2</sub>		600833		62.45			
1	H-RW-NH <sub>2</sub>		294000		81.63			
2	H-RW-NH <sub>2</sub>	2	400000	449667	75.00	71.90	1.55	46.3
3	H-RW-NH <sub>2</sub>		655000		59.06			
1	H-IRW-NH <sub>2</sub>		224167		85.99			
2	H-IRW-NH <sub>2</sub>	3	247500	243222	84.53	84.80	1.44	58.9
3	H-IRW-NH <sub>2</sub>		258000		83.88			
1	H-WIRW-NH <sub>2</sub>		225000		85.94			
2	H-WIRW-NH <sub>2</sub>	4	315000	247333	80.31	84.54	1.52	55.5
3	H-WIRW-NH <sub>2</sub>		202000		87.38			
1	H-KRWWKWIRW-NH <sub>2</sub>		65500		93.84			
2	H-KRWWKWIRW-NH <sub>2</sub>	9	98444	89148	90.74	91.62	0.60	152.0
3	H-KRWWKWIRW-NH <sub>2</sub>		103500		90.27			

ตารางที่ 3.4 แสดงผลที่ได้จากการทดสอบวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* กับพื้นผิวดัดแปร

n	sample	the number of amino acid	avg of CFU	avg of avg of CFU	%inh.	avg of %inh.	loading	%inh. /loading
1	control		3325000					
2	control	0	2440000	3194667	0.00	0.00	0.0000	0.00
3	control		3340000					
1	H-W-NH <sub>2</sub>		1700000		46.79			
2	H-W-NH <sub>2</sub>	1	920000	1820000	71.20	43.03	1.81	23.8
3	H-W-NH <sub>2</sub>		2840000		11.10			
1	H-RW-NH <sub>2</sub>		1560000		51.17			
2	H-RW-NH <sub>2</sub>	2	1000000	1146667	68.70	64.11	1.55	41.3
3	H-RW-NH <sub>2</sub>		880000		72.45			
1	H-IRW-NH <sub>2</sub>		920000		71.20			
2	H-IRW-NH <sub>2</sub>	3	720000	906667	77.46	71.62	1.44	49.8
3	H-IRW-NH <sub>2</sub>		1080000		66.19			
1	H-WIRW-NH <sub>2</sub>		1800000		43.66			
2	H-WIRW-NH <sub>2</sub>	4	1200000	1400000	62.44	56.18	1.52	36.9
3	H-WIRW-NH <sub>2</sub>		1200000		62.44			
1	H-KRWWKWIRW-NH <sub>2</sub>		667		99.94			
2	H-KRWWKWIRW-NH <sub>2</sub>	9	0	1576	100.00	99.86	0.60	165.6
3	H-KRWWKWIRW-NH <sub>2</sub>		4060		99.64			



แผนภาพที่ 3.5 แสดง %inhibition ของ *S.aureus* และ *E.coli*

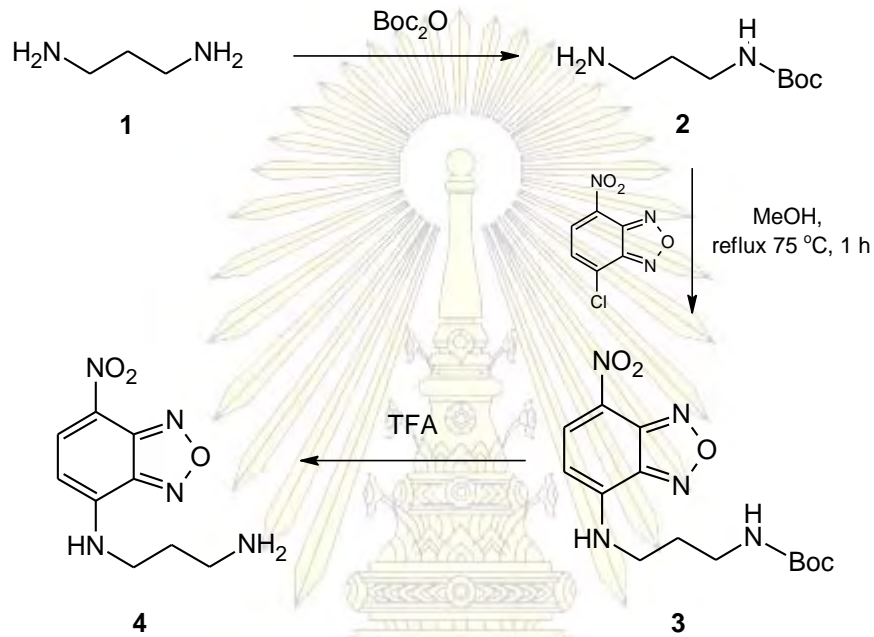
จากแผนภาพที่ 3.5 พบว่า พื้นผิวดัดแปรที่มีเพปไทด์ด้านเชื้อแบคทีเรียติดอยู่ในความยาวของเพปไทด์ที่ต่างกันนั้น จะมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียแตกต่างกัน โดยที่ความยาวของเพปไทด์ตั้งแต่ 1 ถึง 3 หน่วย จะมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียเพิ่มขึ้น ตามความยาวของเพปไทด์ที่เพิ่มขึ้นทั้งในกรณีของ *S.aureus* ซึ่งเป็นตัวแทนของแบคทีเรียชนิดแกรมบวก และ *E.coli* ซึ่งเป็นตัวแทนของแบคทีเรียชนิดแกรมลบ แต่พื้นผิวดัดแปรที่มีเพปไทด์ความยาว 4 หน่วย จะมีฤทธิ์ลดลงกว่าเพปไทด์ความยาว 3 หน่วยเล็กน้อย สำหรับ *S.aureus* และลดลงอย่างมากสำหรับ *E.coli* และพื้นผิวดัดแปรที่มีเพปไทด์ความยาว 9 หน่วย จะมีฤทธิ์ยับยั้งมากที่สุด ในแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด โดยกลไกการยับยั้งแบคทีเรียของพื้นผิวดัดแปรจะอาศัยการทำงานแบบ contact-active biocidal กล่าวคือ เป็นการฆ่าเซลล์แบคทีเรียที่เข้ามาใกล้พื้นผิวดัดแปร ซึ่งมีกลไกการทำงานหลัก ๆ คือการรบกวนเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียให้เกิดรูหรือช่องว่าง ทำให้สารภายในเซลล์รั่วไหลสู่ภายนอกและเซลล์ตายในที่สุด กลไกดังกล่าวเริ่มจากการดึงดูดให้เซลล์แบคทีเรียที่มีประจุสุทธิเป็นลบ ด้วยผลของ teichoic acid ในแบคทีเรียชนิดแกรมบวก และ phospholipid ในแบคทีเรียชนิดแกรมลบ เข้าใกล้พื้นผิวดัดแปร โดยใช้ความเป็นประจุบวกจากหมู่โซ่ข้างของกรดอะมิโน ซึ่งในที่นี้ คือกรดอะมิโนอาร์จินีน และไลซีน ซึ่งมีหมู่โซ่ข้างที่เป็นประจุบวกเนื่องจาก pH ของสภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรียมีค่าต่ำกว่าค่า pKa ของหมู่โซ่ข้าง นั่นคือ guanidinium และ quaternary ammonium ตามลำดับ เมื่อเซลล์แบคทีเรียสัมผัสกับเพปไทด์ส่วนที่เป็นประจุบวกแล้วจะเป็นหน้าที่ของเพปไทด์ส่วน hydrophobic ซึ่งจะทำหน้าที่สอดแทรกผ่านชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียซึ่งในที่นี้ คือกรดอะมิโนทริโตนิน และ ไอโซลิวซีน ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดรูซึ่งทำให้สารภายในเซลล์รั่วไหลสู่สิ่งแวดล้อมภายนอก และทำให้เซลล์ตายในที่สุด จากผลการทดลองพบว่า ที่ความยาวเพปไทด์ 1-4 หน่วยนั้น มีฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียต่ำกว่าเพปไทด์ความยาว 9 หน่วยอยู่มาก อาจเป็นเพราะเพปไทด์เหล่านั้นมีความยาวน้อยเกินไป ทำให้เกิดการแทรกตัวของของส่วนที่ไม่ชอบน้ำได้ไม่ดี ตรงข้ามกับเพปไทด์ที่มีความยาว 9 หน่วยซึ่งยาวเพียงพอที่จะเกิดอันตรกิริยากันภายในสายเพปไทด์ได้เป็นโครงสร้างทุติยภูมิ และมีลักษณะของสายเพปไทด์ที่เหมาะสมที่จะทำงานเป็นส่วนที่มีประจุบวก และส่วน hydrophobic จึงทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ได้ดีกว่า ฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียจึงมากกว่า

การทดลองนี้จะสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ถ้าสามารถเปรียบเทียบผลการทดลองของพื้นผิวดัดแปรที่มีเพปไทด์ความยาว 5-8 หน่วยมาประกอบกัน แต่เนื่องจากการเพาะเชื้อแบคทีเรียใช้เวลานาน จึงไม่สามารถทดสอบฤทธิ์ของพื้นผิวดังกล่าวได้ในระยะเวลาการทำวิจัย



### 3.3 การสังเคราะห์สี่อ้อมฟลูออเรสเซนต์ 4-(1,3-diaminopropyl)-7-nitrobenz-[2,1,3-d]-oxadiazole หรือ NBD-diamine

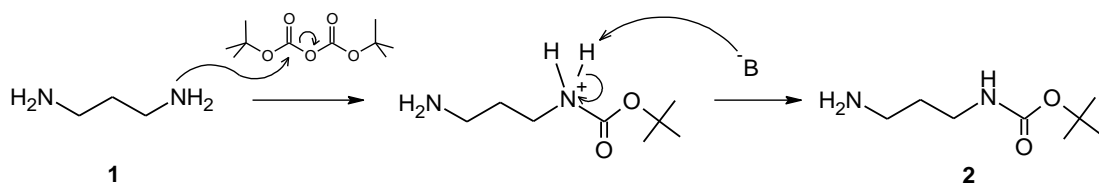
4-(1, 3-diaminopropyl)-7-nitrobenz-[2,1,3-d]-oxadiazole หรือ NBD-diamine เป็นสี่อ้อมในกลุ่ม oxadiazole ซึ่งเป็นสี่อ้อมฟลูออเรสเซนต์ที่มีขนาดเล็ก และมีขั้นตอนการสังเคราะห์ไม่ยุ่งยาก โดยปฏิกิริยาการสังเคราะห์ NBD-diamine เป็นดังแสดงในแผนภาพที่ 3.6



แผนภาพที่ 3.6 แผนภาพแสดงขั้นตอนการสังเคราะห์ NBD-diamine

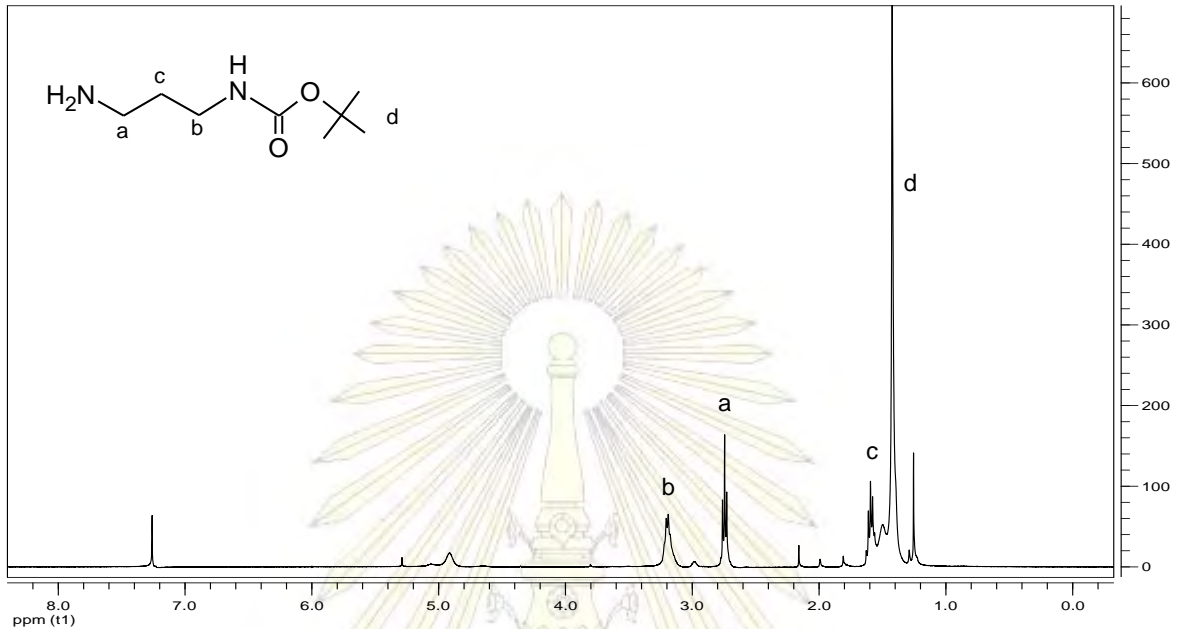
#### 3.3.1 การเติมหมู่ปกป้อง Boc ให้กับ 1,3-diaminopropane

เนื่องจาก 1,3-diaminopropane เป็นสารที่มีปลายเป็นหมู่ amino ทั้งสองข้าง จึงอาจทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงได้ นั่นคือ NBD-Cl อาจจะติดที่ปลายทั้งสองข้างของ 1,3-Diaminopropane ได้ ด้วยเหตุผลข้างต้นจึงต้องเติมหมู่ปกป้อง Boc เพื่อยับยั้งผลิตภัณฑ์ข้างเคียงดังกล่าว โดยมีกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังแสดงในแผนภาพที่ 3.7 จะได้ผลิตภัณฑ์ 2 (0.3970 g, 2.3 mmol, 49% yield จาก 1)



แผนภาพที่ 3.7 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาเติมหมู่ปกป้อง Boc

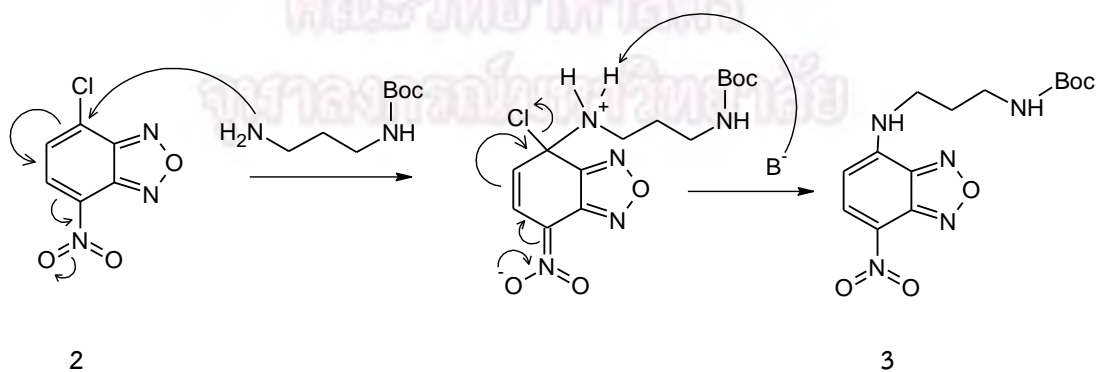
การพิสูจน์โครงสร้าง *N*-Boc-1,3-diaminopropane โดยเทคนิค  $^1\text{H}$  NMR พบพีคที่มีค่า chemical shift, multiplicity และ integration ที่สอดคล้องกับโครงสร้างที่คาดว่าจะเป็น ดังรูปที่ 3.8 โดยมีค่า chemical shift  $\delta$ : 3.19 (t, 2H), 2.74 (t, 2H), 1.59 (m, 2H), 1.42 (s, 9H)



รูปที่ 3.8 แสดง  $^1\text{H}$ -NMR spectrum ของ *N*-Boc-1,3-Diaminopropane

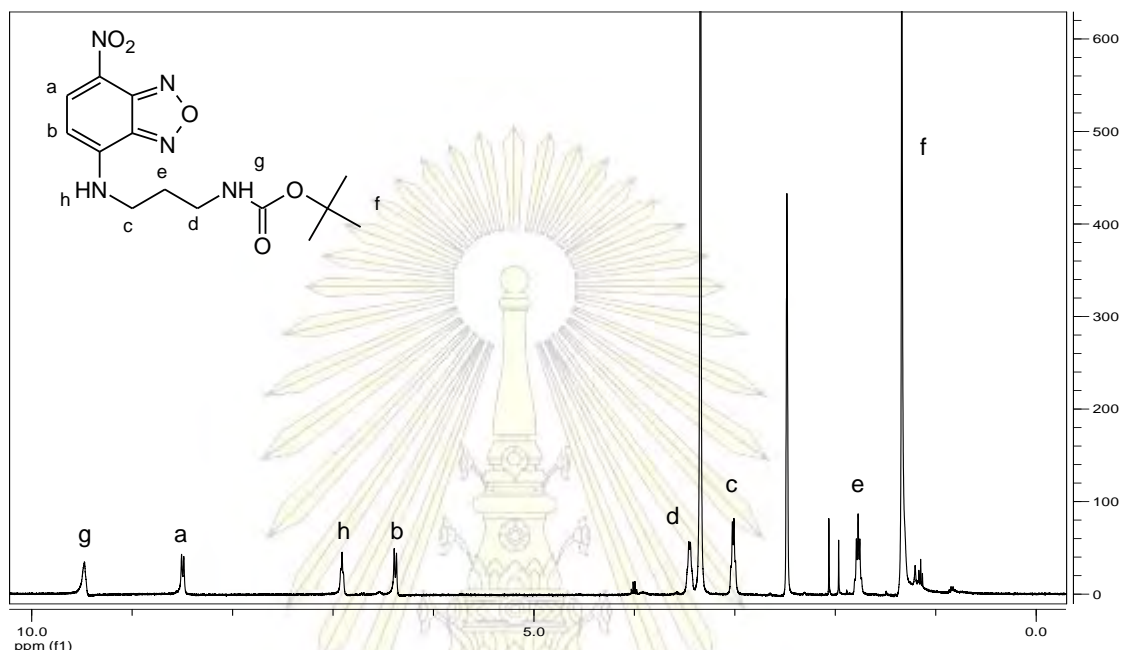
### 3.3.2 การสังเคราะห์ NBD-(Boc)diamine

การสังเคราะห์ 4-(*N*-Boc-1,3-diaminopropyl)-7-nitrobenz-[2,1,3-d]-oxadiazole หรือ NBD-(Boc)diamine เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง NBD-Cl กับ *N*-Boc-1,3-Diaminopropane, 1 โดยอาศัยปฏิกิริยา nucleophilic aromatic substitution ดังแสดงในแผนภาพที่ 3.9 และเมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี จะได้ของแข็งสีน้ำตาลเข้ม (0.0947 g, 0.28 mmol, 18% yield จาก 2)



แผนภาพที่ 3.9 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยา nucleophilic aromatic substitution

การพิสูจน์โครงสร้าง 4-(*N*-Boc-1,3-diaminopropyl)-7-nitrobenz-[2,1,3-d]-oxadiazole (NBD-diamine) ทำได้โดยเทคนิค  $^1\text{H}$  NMR พบพีคที่มีค่า chemical shift, multiplicity และ integration ที่สอดคล้องกับโครงสร้างที่คาดว่าจะเป็น ดังรูปที่ 3.10 โดยมีค่า chemical shift  $\delta$ : 8.49 (d, 1H), 6.38 (d, 1H), 3.45 (d, 2H), 3.0 (d, 1H), 1.77 (m, 2H), 1.34 (s, 9H)



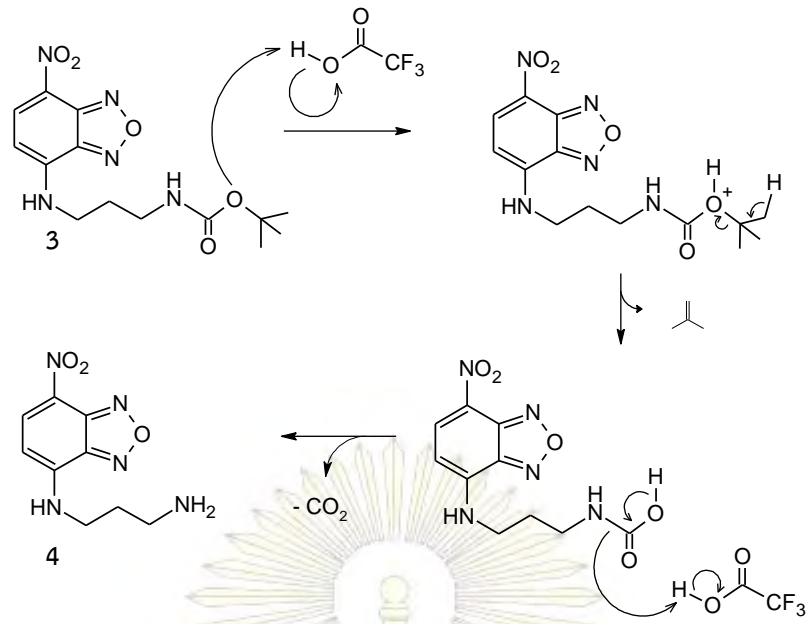
รูปที่ 3.10 แสดง  $^1\text{H}$ -NMR spectrum ของ

4-(*N*-Boc-1,3-diaminopropyl)-7-nitrobenz-[2,1,3-d]-oxadiazole

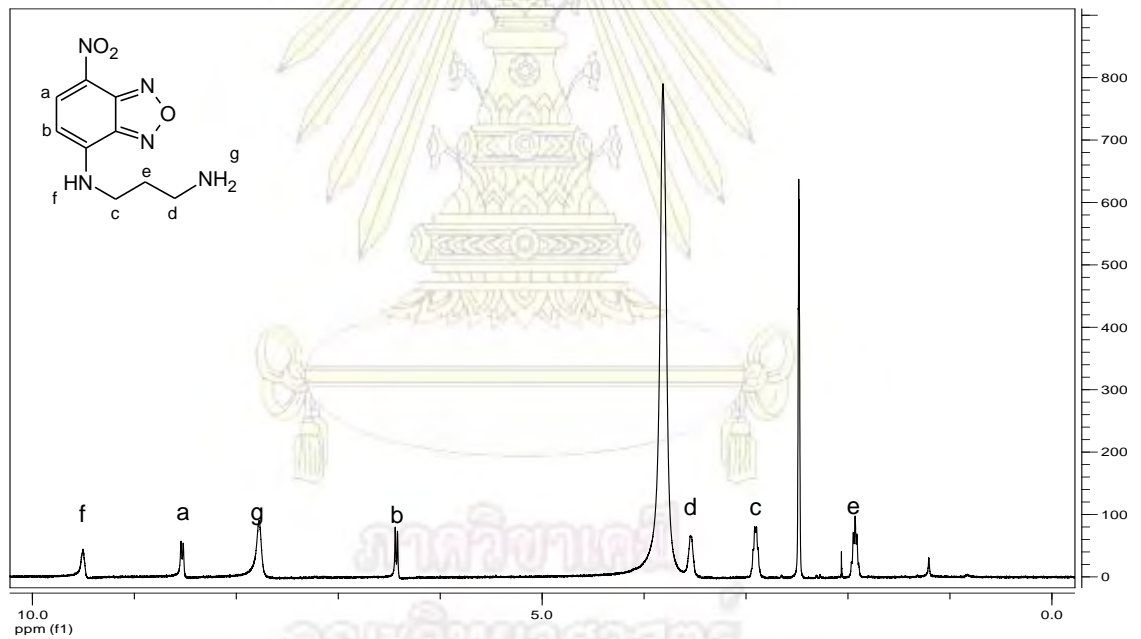
### 3.3.3 การปลดหมู่ปกป้อง Boc ออก

การปลดหมู่ปกป้อง Boc ออกนั้น สามารถทำได้โดยนำ NBD-(Boc)diamine, **2** ทำปฏิกิริยากับ TFA จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีน้ำตาลเข้ม (0.0614 g, 0.26 mmol, 93% yield จาก **3**) โดยกลไกการเกิดปฏิกิริยาเป็นตามผังแผนภาพที่ 3.11

การพิสูจน์โครงสร้าง NBD-diamine ทำได้โดยเทคนิค  $^1\text{H}$  NMR พบพีคที่มีค่า chemical shift, multiplicity และ integration ที่สอดคล้องกับโครงสร้างที่คาดว่าจะเป็น ดังรูปที่ 3.12 โดยมีค่า chemical shift  $\delta$ : 9.50 (t, 1H), 8.52 (d, 1H), 7.77 (t, 2H), 6.41 (d, 1H), 3.53 (d, 2H), 2.91 (d, 2H), 1.92 (m, 2H)



แผนภาพที่ 3.11 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาปลดหมู่ Boc



รูปที่ 3.12 แสดง <sup>1</sup>H-NMR spectrum ของ

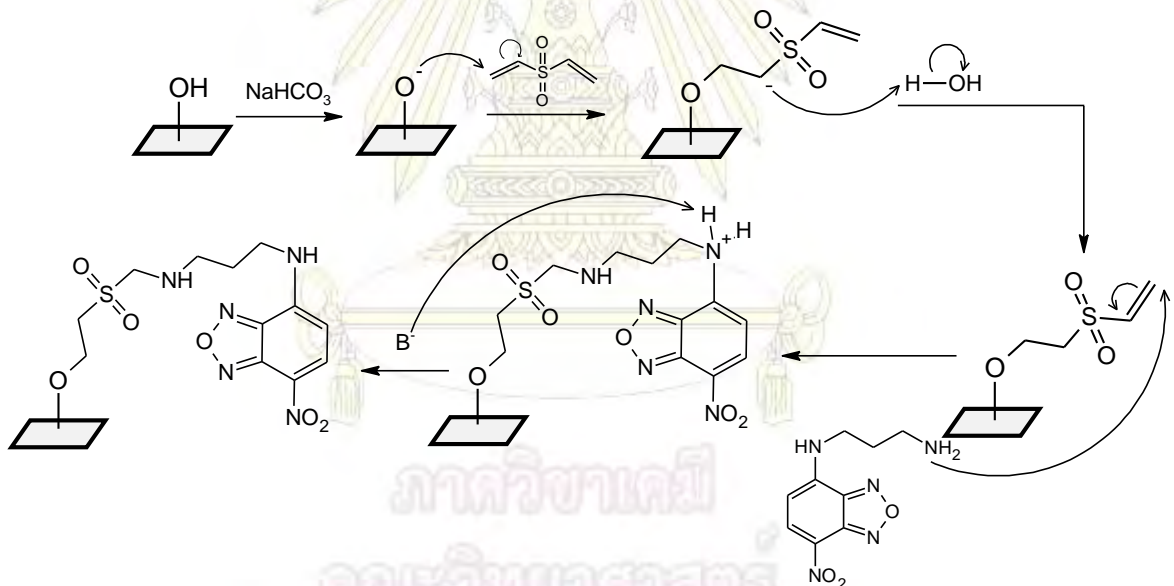
4-(1,3-diaminopropyl)-7-nitrobenz-[2,1,3-d]-oxadiazole

### 3.4 การศึกษาการย้อมสีฟลูออเรสเซนต์ NBD-diamine

การทดลองนี้เป็นการตรึงสีย้อมฟลูออเรสเซนต์ที่ได้จากการทดลองในขั้นตอน 3.3 ลงบนพื้นผิวดัดแปรที่มีหมู่ฟังก์ชันชนิดต่าง ๆ ได้แก่ พื้นผิวเซลลูโลสที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับ divinyl sulfone พื้นผิวเซลลูโลสที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับ sodium periodate พื้นผิวเซลลูโลสที่ผ่านการทำปฏิกิริยา tosylation และพื้นผิวเซลลูโลสที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับ TEMPO ซึ่งพื้นผิวแต่ละชนิดจะเกิดปฏิกิริยากับพื้นผิวเซลลูโลสดังนี้

#### 3.4.1 พื้นผิวเซลลูโลสที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับ Divinyl Sulfone

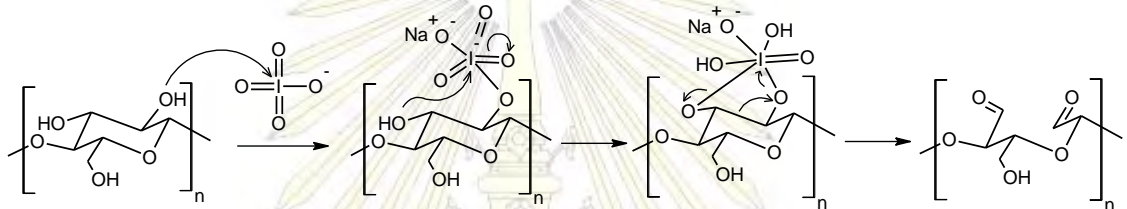
divinyl sulfone จะติดกับพื้นผิวเซลลูโลสโดยพันธะคู่ด้านหนึ่งจะเกิดปฏิกิริยา nucleophilic addition กับ หมู่ hydroxyl ของ primary alcohol จากนั้นเมื่อเชื่อมต่อกับ NBD-diamine พันธะคู่อีกด้านหนึ่งของ vinyl sulfone จะเกิดปฏิกิริยา nucleophilic addition กับหมู่ amino ที่อยู่ปลายสายของ NBD-diamine จะได้สีย้อมฟลูออเรสเซนต์ที่ติดด้วยพันธะโคเวเลนต์อยู่บนหมู่ sulfonyl ที่ตรึงอยู่บนกระดาษ ดังแสดงในแผนภาพที่ 3.13



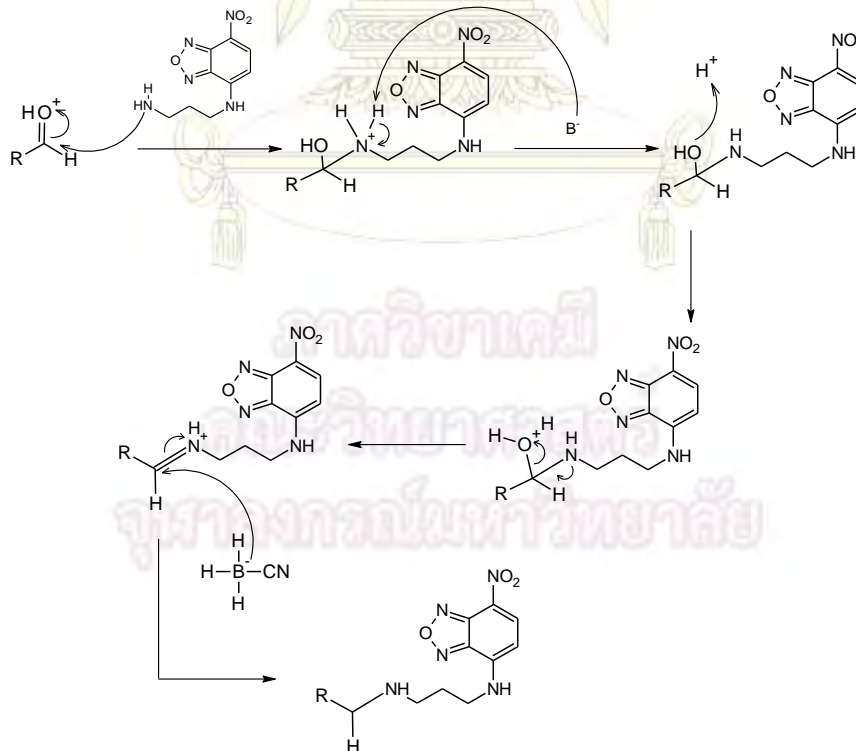
แผนภาพที่ 3.13 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่างพื้นผิวเซลลูโลส กับ divinyl sulfone และการย้อมสี NBD-diamine

### 3.4.2 พันผิวเซลลูโลสที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับ sodium periodate

sodium periodate จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับหมู่ diol ของเซลลูโลส และเกิดการตัดพันธะคาร์บอน-คาร์บอน ได้ผลิตภัณฑ์เป็นหมู่ aldehyde 2 หมู่ โดยมีกลไกการเกิดปฏิกิริยาผ่านสารมัธยันตร์ที่เป็นวงห้าเหลี่ยมดังแผนภาพที่ 3.14 จากนั้นเมื่อย้อมสีกับ NBD-diamine จะเกิดปฏิกิริยา nucleophilic addition-elimination โดยหมู่ amino ที่อยู่ปลายสายของ NBD-diamine จะเข้าชนกับหมู่ carbonyl จากนั้นเกิดการกำจัดไฮโดรเจน และการสร้างพันธะคู่ระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน พร้อมกับกำจัดหมู่ hydroxyl ในรูปของน้ำ ต่อมาเกิดการกำจัดไฮโดรเจนที่ตำแหน่งไนโตรเจน ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็น imine สุดท้ายจะถูกรีดิวซ์ด้วย  $\text{NaCNBH}_3$  ได้เป็น secondary amine ดังแผนภาพที่ 3.15



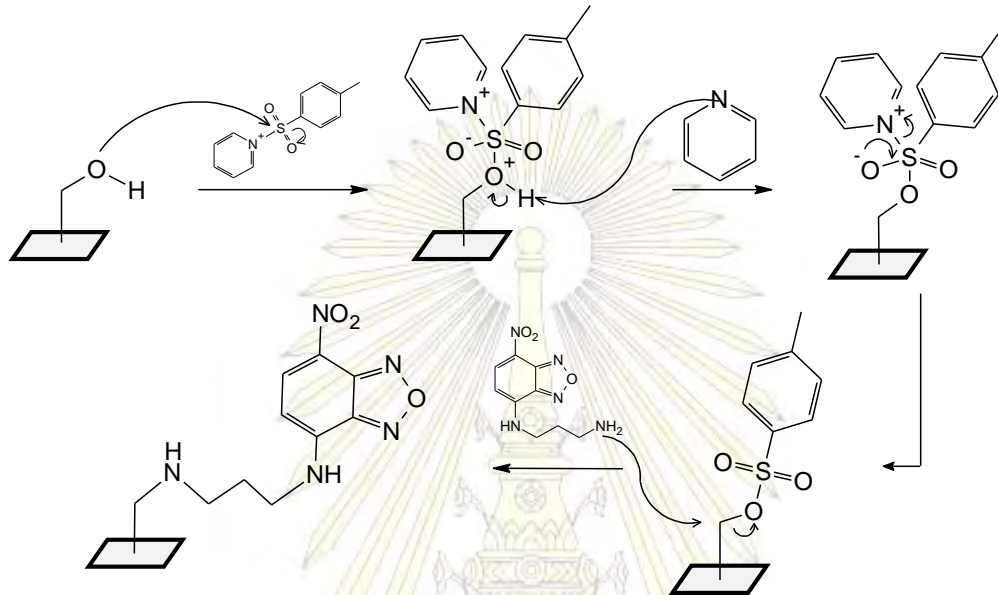
แผนภาพที่ 3.14 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่างพื้นผิวเซลลูโลส กับ sodium periodate



แผนภาพที่ 3.15 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาย้อมสี NBD-diamine

### 3.4.3 พื้นผิวเซลลูโลสที่ผ่านการทำปฏิกิริยา tosylation

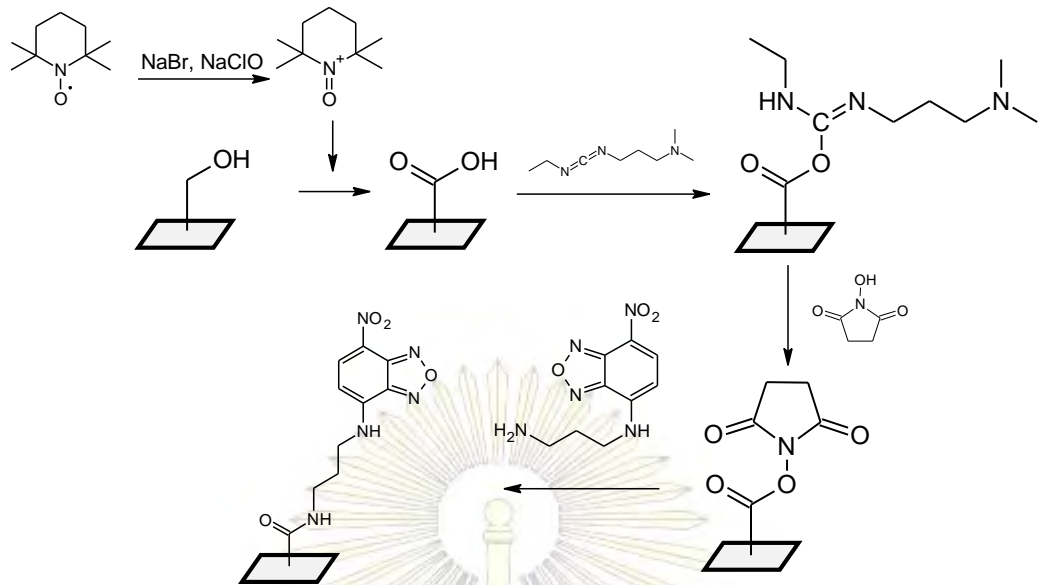
ปฏิกิริยา tosylation เป็นปฏิกิริยาการเปลี่ยนหมู่ hydroxyl ของ primary alcohol เป็นหมู่ tosyl ซึ่งเป็นหมู่หลุดออกที่ดี หมู่ amino ที่ปลายสายของ NBD-diamine จึงสามารถมาแทนที่ได้เป็นสีย้อมที่ติดอยู่บนกระดาษด้วยพันธะโคเวเลนต์ ดังแสดงในแผนภาพที่ 3.16



แผนภาพที่ 3.16 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยา Tosylation บนพื้นผิวเซลลูโลส

### 3.4.4 พื้นผิวเซลลูโลสที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับ TEMPO

ปฏิกิริยาการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันบนกระดาษด้วย TEMPO จะเป็นการเปลี่ยนหมู่ hydroxyl ของ primary alcohol เป็นหมู่ carboxylic โดย TEMPO จะถูก activate ด้วย NaBr และ NaClO จากนั้นจึงทำปฏิกิริยากับพื้นผิวเซลลูโลส ได้เป็น carboxylic ต่อมาจะถูก activate ด้วย EDC และ NHS ตามลำดับ แล้วจึงทำปฏิกิริยากับสีย้อม NBD-diamine โดยเกิดปฏิกิริยาแทนที่ โดย NHS เป็นหมู่หลุดออกที่ดี ได้เป็นสีย้อมที่ติดกระดาษด้วยพันธะโคเวเลนต์ ดังแสดงในแผนภาพที่ 3.17

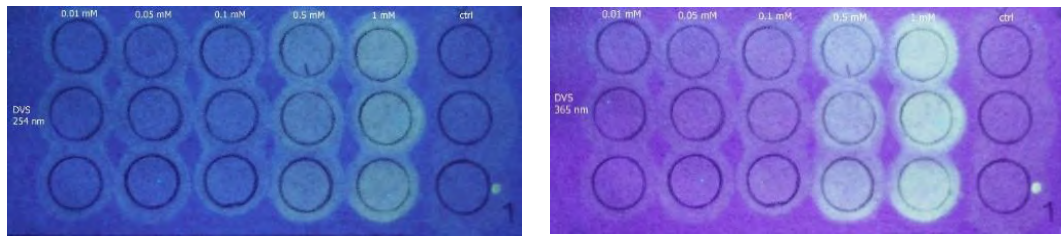


แผนภาพที่ 3.17 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่างพื้นผิวเซลลูโลส กับ TEMPO

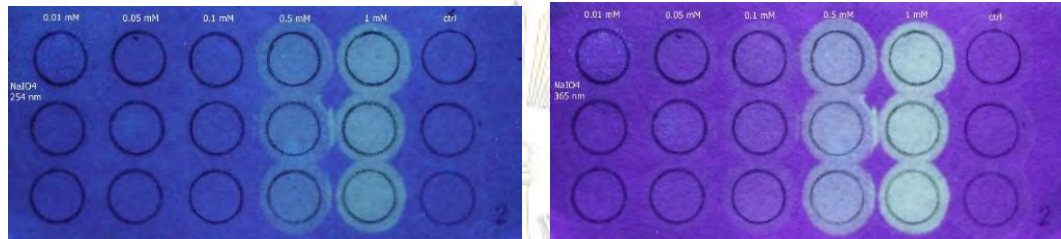
การทดสอบการย้อมสีฟลูออเรสเซนต์ความเข้มข้น 0.01 mM - 1 mM บนกระดาษที่ผ่านการดัดแปรด้วยหมู่ฟังก์ชันต่าง ๆ แล้วนำไปส่องด้วยแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 nm และ 365 nm จากนั้นบันทึกภาพและวิเคราะห์ความเข้มของสีด้วยโปรแกรม ImageJ ได้ข้อมูลดังตาราง (ภาคผนวก) เมื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาสร้างแผนภูมิแท่งเปรียบเทียบ ดังแสดงในแผนภูมิที่ 3.19 และ 3.20 ซึ่งใช้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 nm และ 365 nm ตามลำดับ พบว่ากระดาษที่ติดสีย้อมได้ดีที่สุด คือกระดาษที่ทำปฏิกิริยากับ divinyl sulfone รองลงมาคือ กระดาษที่ทำปฏิกิริยากับ periodate และ กระดาษที่ทำปฏิกิริยากับ TEMPO ตามลำดับ โดยความเข้มของสีจะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารละลายย้อมที่ใช้ ส่วนกระดาษที่ทำปฏิกิริยา tosylation นั้นมีความแตกต่างของสีไม่ชัดเจนในแต่ละความเข้มข้นที่ใช้ อาจจะเป็นเพราะการทำปฏิกิริยา tosylation ไม่สมบูรณ์บนพื้นผิวกระดาษ เนื่องจากปกติปฏิกิริยา tosylation บนพื้นผิวกระดาษต้องทำในสภาวะเบสโดยใช้เวลานาน การใช้การหยดสารลงบนกระดาษจะทำให้สารละลายแห้งอย่างรวดเร็ว ปฏิกิริยาจึงเกิดขึ้นได้น้อย ย้อมจึงติดได้น้อยหรือไม่ติดเลย ดังรูปที่ 3.18



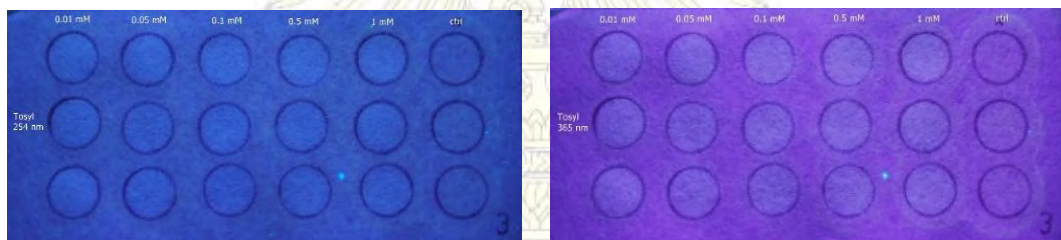
### พื้นผิวเซลลูโลสที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับ Divinyl Sulfone



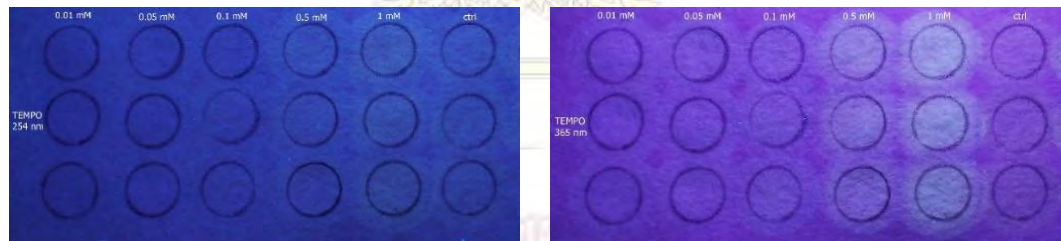
### พื้นผิวเซลลูโลสที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับ sodium periodate



### พื้นผิวเซลลูโลสที่ผ่านการทำปฏิกิริยา tosylation



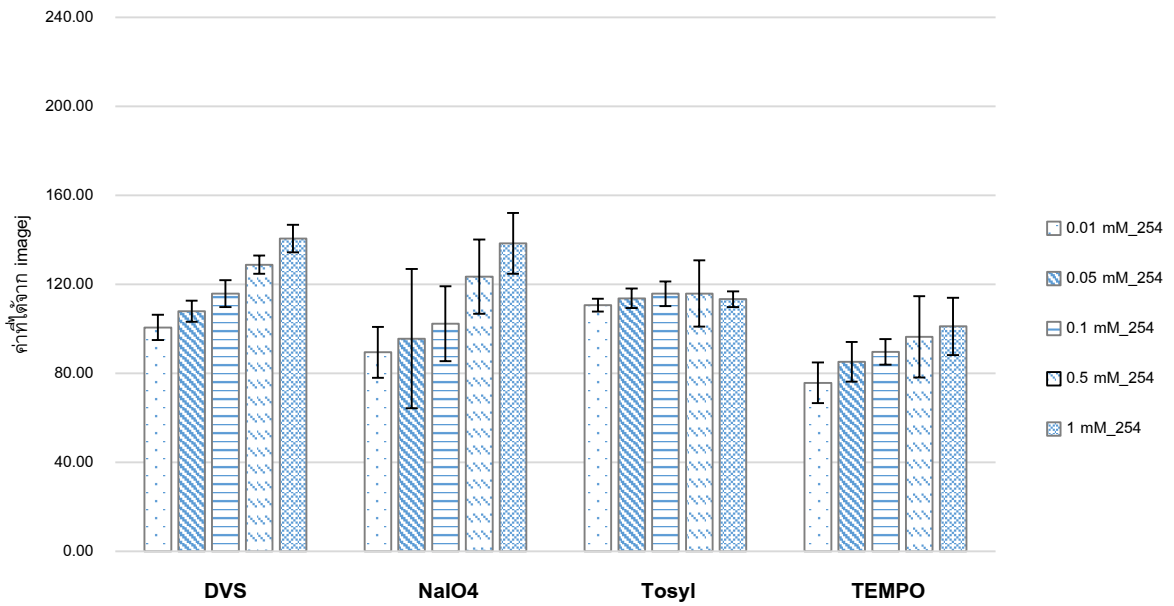
### พื้นผิวเซลลูโลสที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับ TEMPO



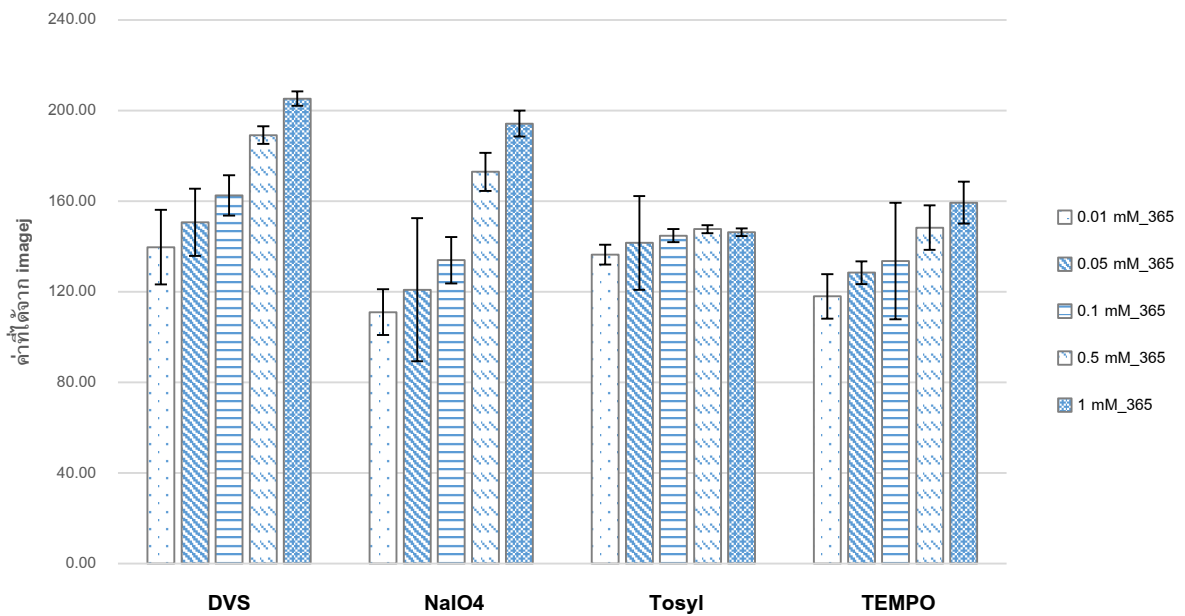
254 nm

365 nm

รูปที่ 3.18 แสดงภาพพื้นผิวดัดแปรหลังจากข้อมด้วยสีย้อมฟลูออเรสเซนต์ ที่ความยาวคลื่น 254 nm และ 365 nm



แผนภูมิที่ 3.19 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสีย้อมค่าจากโปรแกรม ImageJ โดยแยกแต่ละวิธี (254 nm)



แผนภูมิที่ 3.20 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสีย้อมกับค่าจากโปรแกรม ImageJ โดยแยกแต่ละวิธี (365 nm)

## บทที่ 4

### สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้สามารถสังเคราะห์พื้นผิวดัดแปรที่มีเพปไทด์ด้านจุลชีพลำดับ H-KRWWKWIRW-NH<sub>2</sub> ที่มีความยาว 1-9 หน่วย และทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเพปไทด์ที่ตรึงบนพื้นผิวเซลลูโลส ที่มีความยาวของลำดับกรดอะมิโน 1-4 และ 9 หน่วย กับแบคทีเรีย *S.aureus* ซึ่งเป็นตัวแทนของแบคทีเรียชนิดแกรมบวก และ *E.coli* ซึ่งเป็นตัวแทนของแบคทีเรียชนิดแกรมลบ พบว่าพื้นผิวดัดแปรที่มีเพปไทด์ความยาวของกรดอะมิโนแตกต่างกัน มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่แตกต่างกัน โดยความยาวเพปไทด์ที่มากขึ้น มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเพิ่มขึ้น และพื้นผิวดัดแปรดังกล่าวมีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งชนิดแกรมบวกและแกรมลบใกล้เคียงกัน นั่นคือมีคุณสมบัติยับยั้งแบคทีเรียได้กว้าง (broad spectrum) จากผลการทดลองดังกล่าว พื้นผิวเซลลูโลสที่ดัดด้วยเพปไทด์ด้านจุลชีพ สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นวัสดุต้านเชื้อแบคทีเรียได้

นอกจากนี้ ในงานวิจัยนี้ยังสามารถสังเคราะห์สีย้อมฟลูออเรสเซนต์ 4-(1,3-Diaminopropyl)-7-nitrobenz-[2,1,3-d]-oxadiazole ได้ จาก 4-Chloro-7-nitrobenz-[2,1,3-d]-oxadiazole และ 1,3-Diaminopropane (6% yield) และสามารถนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงประสิทธิภาพการตรึงนิวคลีโอไฟล์ลงบนกระดาษได้ โดยความเข้มของแสงที่ติดบนกระดาษจะแปรผันกับความเข้มข้นของสีย้อมที่ถูกตรึงได้หลังการชะล้าง

ภาควิชาเคมี  
คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## เอกสารอ้างอิง

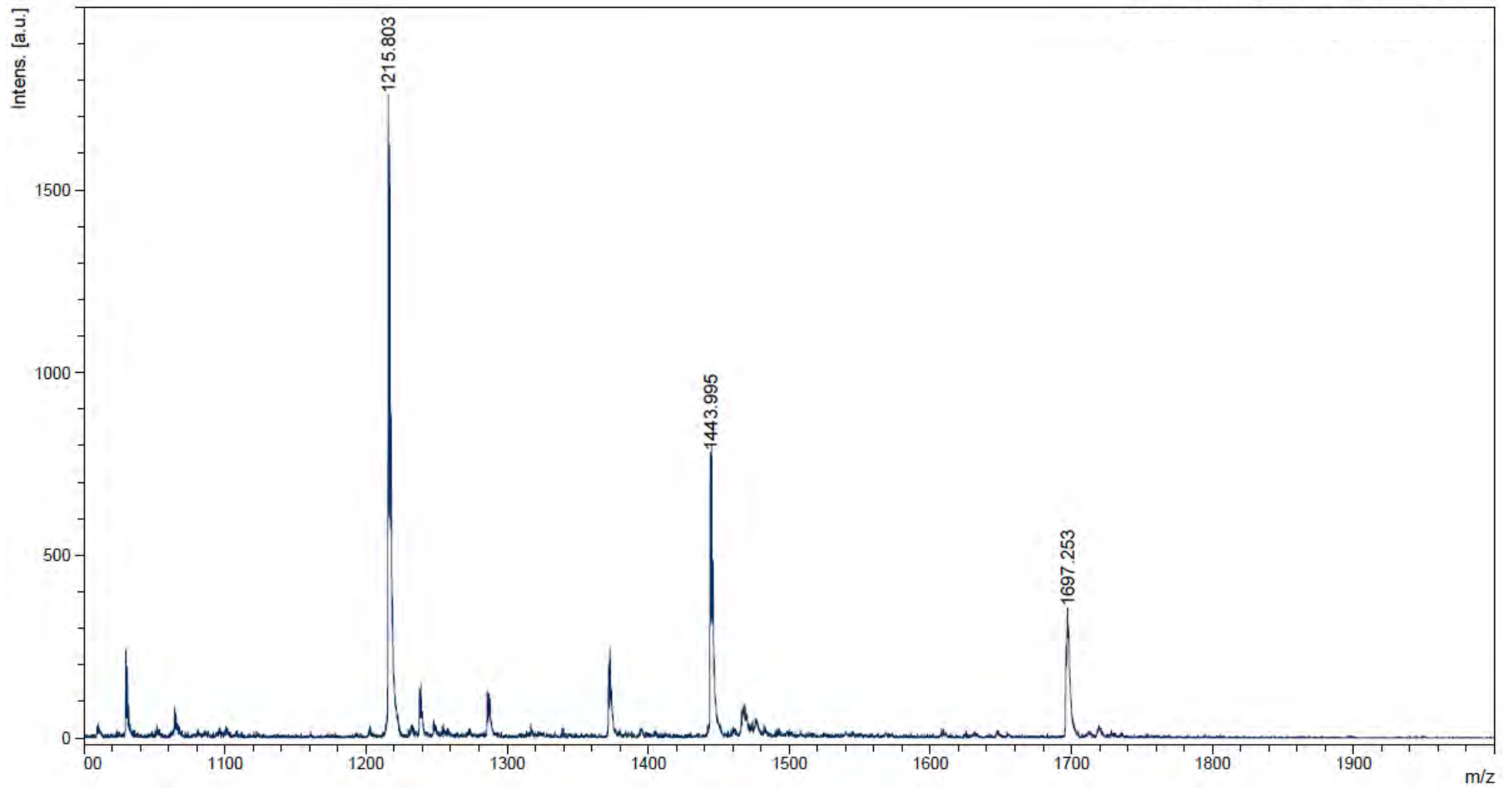
1. Mah, T.-F.; Pitts, B.; Pellock, B.; Walker, G.C.; Stewart, P.S.; O'Toole, G.A. A Genetic Basis for *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilm Antibiotic Resistance. *Nature* **2003**, *426*, 306-310.
2. <https://www.biofilm.montana.edu/node/2390> (accessed April 20, 2015).
3. Siedenbiedel, F.; Tiller, J.C. Antimicrobial Polymers in Solution and on Surfaces: Overview and Functional Principles. *Polymers* **2012**, *4*, 46-41.
4. Liang, J.; Barnes, K.; Akdag, A.; Worley, S.D.; Lee, J.; Broughton, R.M.; Huang, T.-S. Improved Antimicrobial Siloxane. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2007**, *46*, 1861-1866.
5. Coneski, P.N.; Rao, K.S.; Schoenfisch, M.H. Degradable Nitric Oxide-Releasing Biomaterials via Post-Polymerization Functionalization of Cross-Linked Polyesters. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 3208-3215.
6. Nathan, A.; Zalipsky, S.; Ertel, S.I.; Agathos, S.N.; Yarmush, M.L.; Kohn, J. Copolymers of Lysine and Polyethylene Glycol: A New Family of Functionalized Drug Carriers. *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, 54-62.
7. Dizman, B.; Elasri, M.O.; Mathias, L.J. Synthesis, Characterization, and Antibacterial Activities of Novel Methacrylate Polymers Containing Norfloxacin. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 514-520.
8. <http://www.ppdictionary.com/gnbac.htm> (accessed April 20, 2015).
9. Waschinski, C.J.; Herdes, V.; Schueler, F.; Tiller, J.C. Influence of Satellite Groups on Telechelic Antimicrobial Functions of Polyoxazolines. *Macromol. Biosci.* **2005**, *5*, 149-156.
10. Tiller, J.C.; Liao, C.-J.; Lewis, K.; Klibanov, A.M. Designing Surfaces That Kill Bacteria on Contact. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 5981-5985.
11. Lee, S.B.; Koepsel, R.R.; Morley, S.W.; Matyjaszewski, K.; Sun, Y.J.; Russell, A.J. Permanent, Nonleaching Antibacterial Surfaces. 1. Synthesis by Atom Transfer Radical Polymerization. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 877-882.
12. Guyomard, A.; De, E.; Jouenne, T.; Malandain, J.J.; Muller, G.; Glinel, K. Incorporation of a Hydrophobic Antibacterial Peptide into Amphiphilic Polyelectrolyte Multilayers: A Bioinspired Approach to Prepare Biocidal Thin Coatings. *Adv. Funct. Mater.* **2008**, *18*, 758-765.

13. Cleophas, R.T.C.; Riool, M.; Quarles van Ufford, H.C.; Zaat, S.A.J.; Kruijtzter, J.A.W.; Liskamp, R.M.J. Convenient Preparation of Bactericidal Hydrogels by Covalent Attachment of Stabilized Antimicrobial Peptides Using Thiol-ene Click Chemistry. *ACS Macro Lett.* **2014**, *3*, 477-480.
14. Intorasoot, S. Antimicrobial Peptides: The Natural Protein and the Feature Application for Treatment of Infectious Diseases. *Bull Chiang Mai Assoc Med Sci.* **2013**, *46(1)*, 1-19.
15. Subbalakshmi, C.; Sitaram, N. Mechanism of Antimicrobial Action of Indolicidin. *FEMS Microbiol. Lett.* **1998**, *160*, 91-96.
16. Jenssen, H.; Hamill, P.; Hancock, R.E.W. Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, *19*, 491-511.
17. Bahar, A.A.; Ren, D. Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals* **2013**, *6*, 1543-1575.
18. Liu, Z.; Brady, A.; Young, A.; Rasimick, B.; Chen, K.; Zhou, C.; Kallenbach, N.R. Length Effects in Antimicrobial Peptides of the (RW)<sub>n</sub> Series. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 597-603.
19. Hilpert, K.; Winkler, D.F.; Hancock, R.E. Peptide Arrays on Cellulose Support: SPOT Synthesis, a Time and Cost Efficient Method for Synthesis of Large Numbers of Peptides in a Parallel and Addressable Fashion. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 1333-1349.
20. Hoffmann, K.; Mix, R.; Resch-Genger, U.; Friedrich, J.F. Fluorescence Measurements on Functionalized Polymer Surfaces-Problems and Troubleshooting. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**, *1130*, 28-34.
21. Uchiyama, S.; Santa, T.; Okiyama, N.; Fukushima, T.; Imai, K. Fluorogenic and Fluorescent Labeling Reagents with a Benzofurazan Skeleton. *Biomed. Chromatogr.* **2001**, *15*, 295-318.
22. Key, J.A.; Li, C.; Cairo, C.W. Detection of Cellular Sialic Acid Content Using Nitrobenzoxadiazole Carbonyl-Reactive Chromophores. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 363-371.



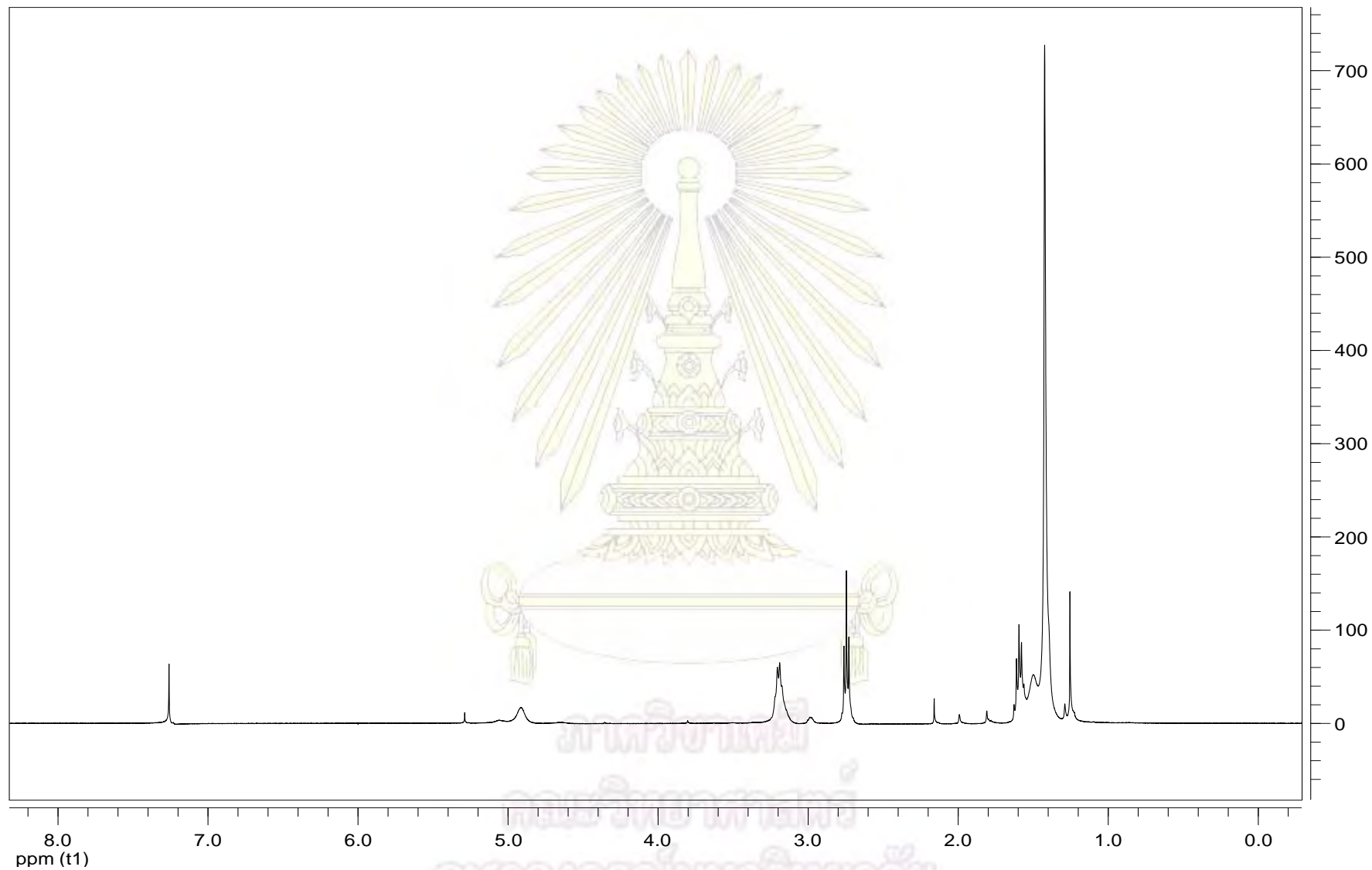
# ภาคผนวก

ภาควิชาเคมี  
คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



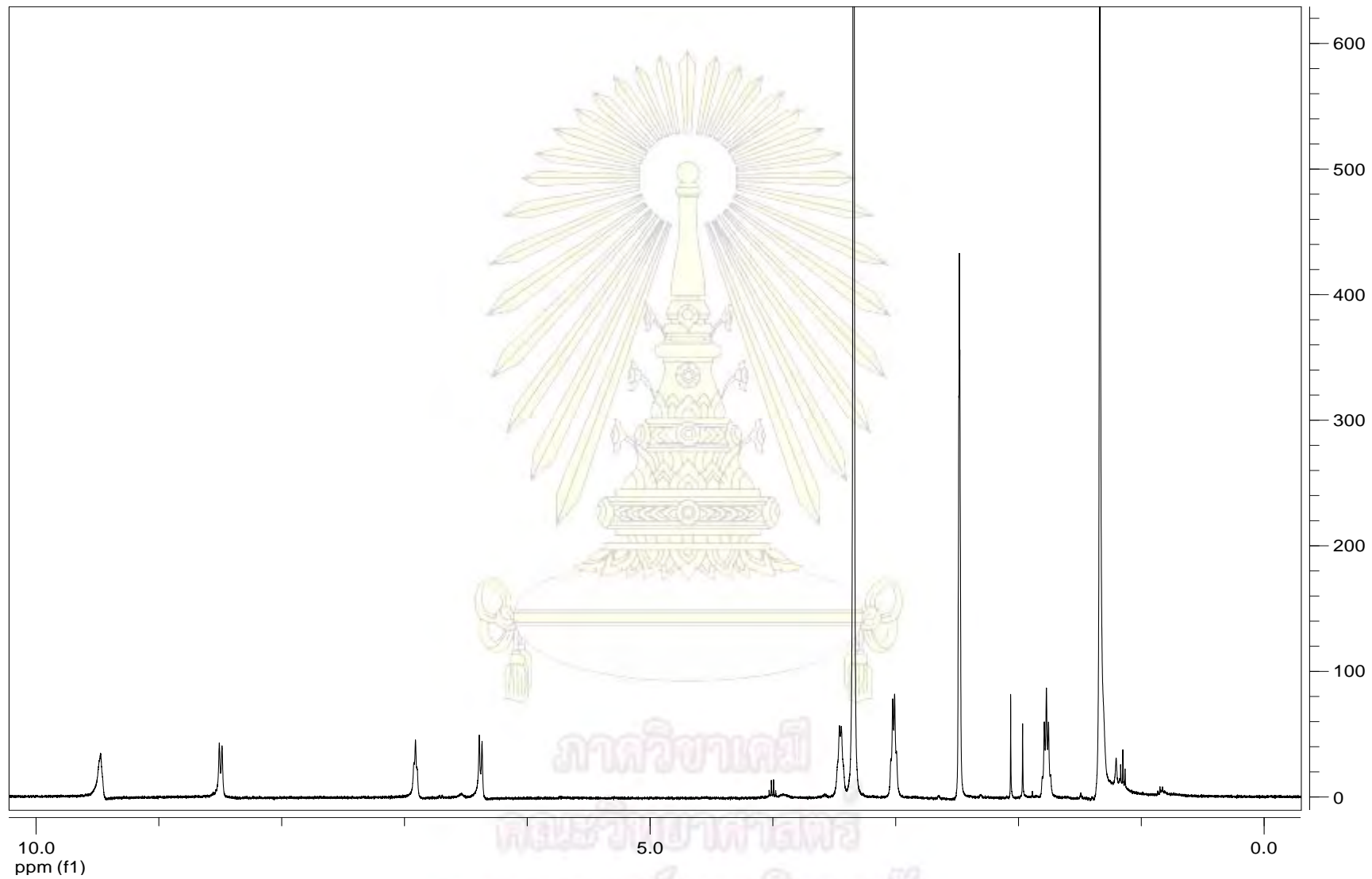
คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ ผ-1 MALDI-TOF MS spectrum ของเพปไทด์ 9 หน่วยที่สังเคราะห์

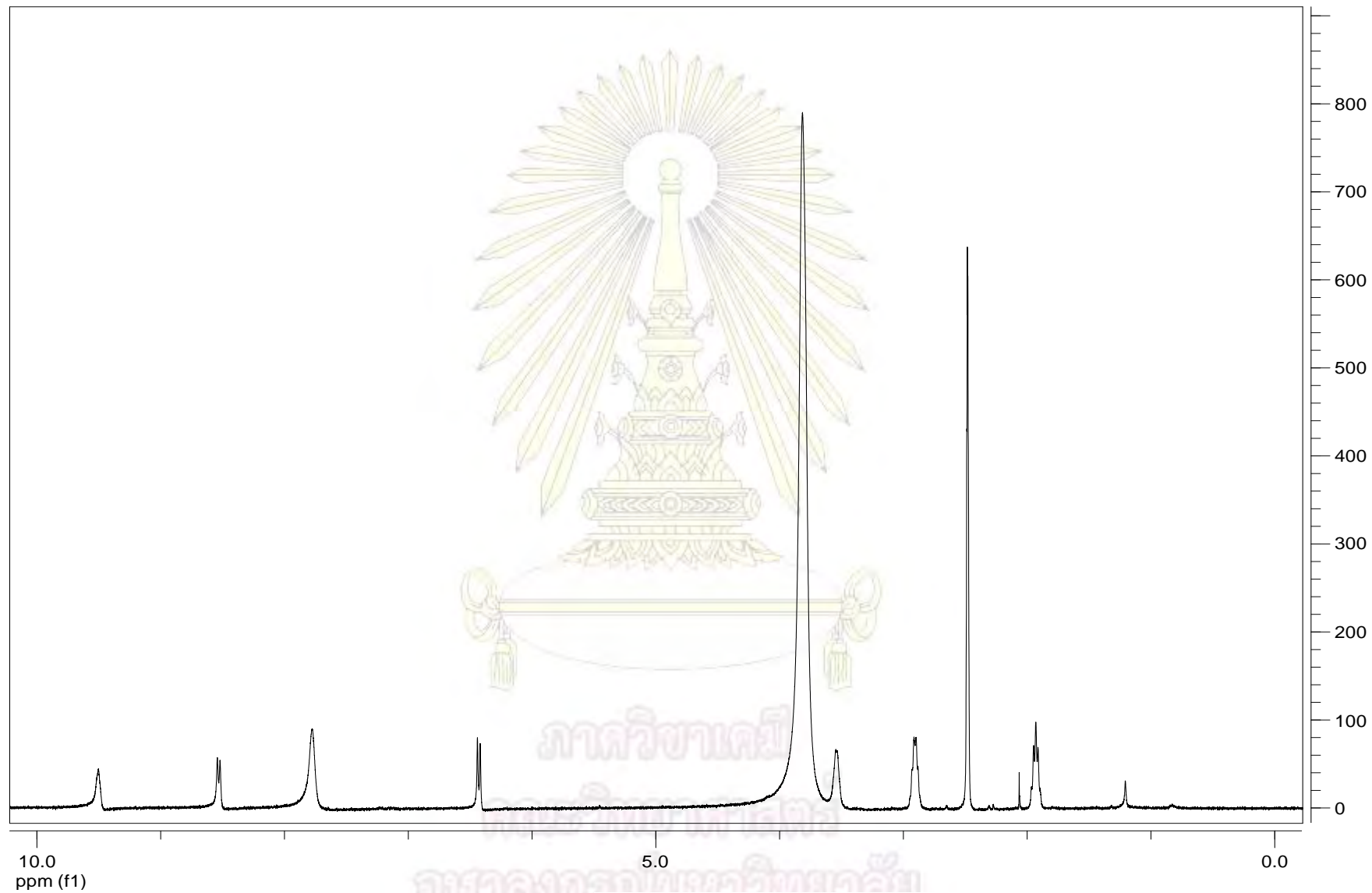


รูปที่ ๗-2  $^1\text{H-NMR}$  spectrum ของ *N*-Boc-1,3-Diaminopropane





รูปที่ ผ-3  $^1\text{H-NMR}$  spectrum ของ 4-(*N*-Boc-1,3-diaminopropyl)-7-nitrobenz-[2,1,3-d]-oxadiazole



รูปที่ ๗-4  $^1\text{H-NMR}$  spectrum ของ 4-(1,3-diaminopropyl)-7-nitrobenz-[2,1,3-d]-oxadiazole

ตารางที่ ผ-1 แสดงข้อมูลผลการทดสอบยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S.aureus* ด้วยพื้นผิวดัดแปร

name	Viable colony CFU/mL	SD	Average of CFU	Average of Average of CFU	percentage of Inhibition	Average of Inhibition	SD of %Inhibition	n	SQRT of n	SE of %Inhibition		
control	1600000	163299.32	1600000.00	1600000								
control	1100000	382970.84	1100000.00									
control	2200000	632455.53	2100000.00									
	2000000	0.00										
control	1866667	416333.20	1933333.33									
	2000000	0.00										
control	1266667	230940.11	1266666.67									
1mer	392000	92303.85	396000.00	504722	75.25	68.45	6.44	3	1.732	3.72		
	400000	0.00										
1mer	568000	64187.23	517333.33									
	466667	115470.05										
1mer	535000	82259.75	600833.33								62.45	
	666667	305505.05										
2mer	288000	33466.40	294000.00	449666.67	81.63	71.90	11.60	3	1.732	6.70		
	300000	115470.05										
2mer	400000	52915.03	400000.00									75.00
	400000	0.00										
2mer	655000	107548.44	655000.00								59.06	
3mer	315000	52599.11	224166.67								243222.22	
	133333	115470.06										
3mer	245000	25166.11	247500.00	84.53								
	250000	100000										
3mer	316000	62289.65	258000.00		83.88							
	200000	0.00										

name	Viable colony CFU/mL	SD	Average of CFU	Average of Average of CFU	percentage of Inhibition	Average of Inhibition	SD of %Inhibition	n	SQRT of n	SE of %Inhibition
4mer	225000	34156.50	225000.00	247333.33	85.94	84.54	3.73	3	1.732	2.15
4mer	380000	67330.03	315000.00		80.31					
	250000	191485.42			87.38					
4mer	204000	71274.12	202000.00	1063333.33						
	กระดาด	1085000								
1200000		200000.00								
กระดาด	2000000	0.00	698333.33							
	กระดาด	530000								
866667		305505.05								
9mer	76500	5744.56	65500.00	89148.15	93.84	91.62	1.9	3	1.732	1.12
	80000	0.00								
	40000	89442.72								
9mer	42000	3162.28	98444.44	89148.15	90.74	91.62	1.9	3	1.732	1.12
	53333	11547.01								
	200000	0.00								
9mer	97000	6000.00	103500.00		90.27					
	110000	34641.02								

ภาควิชาเคมี  
คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ผ-2 แสดงข้อมูลผลการทดสอบยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* ด้วยพื้ผิวัดัดแปร

name	Viable colony CFU/mL	SD	Average of CFU	Average of Average of CFU	percentage of Inhibition	Average of Inhibition	SD of %Inhibition	n	SQRT of n	SE of %Inhibition														
control	2650000.00	412310.56	3325000.00	3194666.67																				
	4000000.00	0.00																						
control	2480000.00	460434.58	2440000.00																					
	2400000.00	894427.19																						
control	1920000.00	228035.09	2210000.00																					
	2500000.00	1000000.00																						
control	2680000.00	389871.77	3340000.00																					
	4000000.00	0.00																						
control	2650000.00	550757.05	4658333.33																					
	6666666.67	1154700.54																						
1mer	1000000.00	400000.00	1700000.00								1820000.00	46.79	43.03	30.23	3	1.732	17.45							
	2400000.00	2190890.23																						
1mer	920000.00	334664.01	920000.00																					
	1680000.00	228035.09																						
1mer	4000000.00	0.00	2840000.00	1146666.67	11.10	64.11	11.36	3	1.732	6.56														
	2mer	1120000.00																109544.51	1560000.00					
2mer	2000000.00	0.00	1000000.00																					
	1000000.00	282842.71																						
2mer	880000.00	363318.04	880000.00															880000.00	72.45					
	2mer																							

name	Viable colony CFU/mL	SD	Average of CFU	Average of Average of CFU	percentage of Inhibition	Average of Inhibition	SD of %Inhibition	n	SQRT of n	SE of %Inhibition
3mer	840000.00	167332.01	920000.00	906666.67	71.20	71.62	5.65	3	1.732	3.26
	1000000.00	1154700.54			77.46					
3mer	720000.00	303315.02	720000.00	1400000.00	66.19	56.18	10.84	3	1.732	6.26
3mer	1080000.00	389871.77	1080000.00		43.66					
4mer	1600000.00	346410.16	1800000.00	1136555.56	62.44	99.86	0.19	3	1.732	0.11
	2000000.00	0.00			62.44					
4mer	1200000.00	616441.40	1200000.00	1575.56	99.94	99.86	0.19	3	1.732	0.11
4mer	400000.00	200000.00	1200000.00		100.00					
control	860000.00	36514.84	763333.33	1136555.56	99.64	99.86	0.19	3	1.732	0.11
	666666.67	115470.05								
control	996000.00	58991.52	1509777.78	1575.56	99.64	99.86	0.19	3	1.732	0.11
	1533333.33	115470.05								
9mer	666.67	115.47	666.67	1575.56	99.64	99.86	0.19	3	1.732	0.11
	0.00	0.00	0.00							
9mer	3120.00	389.87	4060.00	1575.56	99.64	99.86	0.19	3	1.732	0.11
	5000.00	1154.70								

มหาวิทยาลัย  
คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ผ-3 แสดงข้อมูลจากโปรแกรม ImageJ ของพื้นผิวดัดแปรที่ทำ  
ปฏิกิริยากับ DVS ที่ความยาวคลื่น 254 nm

dye Conc.		area	mean of Gray scale	average	sd
$1.00 \times 10^{-5}$	1	41564	100.067	100.66	9.87
	2	41564	98.516		
	3	41564	103.396		
$5.00 \times 10^{-5}$	1	41564	105.726	107.96	8.19
	2	41564	108.525		
	3	41564	109.618		
$1.00 \times 10^{-4}$	1	41564	114.709	115.90	10.54
	2	41564	115.593		
	3	41564	117.400		
$5.00 \times 10^{-4}$	1	41564	130.153	128.85	7.09
	2	41564	128.422		
	3	41564	127.985		
$1.00 \times 10^{-3}$	1	41564	144.215	140.60	10.69
	2	41564	140.652		
	3	41564	136.921		
ctrl	1	41564	106.045	105.15	6.00
	2	41564	106.881		
	3	41564	102.511		

ตารางที่ ผ-4 แสดงข้อมูลจากโปรแกรม ImageJ ของพื้นผิวดัดแปรที่ทำ  
ปฏิกิริยากับ DVS ที่ความยาวคลื่น 365 nm

dye Conc.		area	mean of Gray scale	average	sd
$1.00 \times 10^{-5}$	1	28372	145.399	139.70	28.58
	2	28372	133.391		
	3	28372	140.315		
$5.00 \times 10^{-5}$	1	28372	154.411	150.67	25.72
	2	28372	147.723		
	3	28372	149.870		
$1.00 \times 10^{-4}$	1	28372	166.726	162.57	15.39
	2	28372	159.328		
	3	28372	161.643		
$5.00 \times 10^{-4}$	1	28372	194.398	189.14	6.66
	2	28372	186.330		
	3	28372	186.703		
$1.00 \times 10^{-3}$	1	28372	210.065	205.26	5.51
	2	28372	204.459		
	3	28372	201.258		
ctrl	1	28372	158.432	152.76	6.81
	2	28372	152.625		
	3	28372	147.237		

ตารางที่ ผ-5 แสดงข้อมูลจากโปรแกรม ImageJ ของพื้นผิวดัดแปรที่ทำปฏิกิริยากับ NaIO<sub>4</sub> ที่ความยาวคลื่น 254 nm

dye Conc.		area	mean of Gray scale	average	sd
1.00 × 10 <sup>-5</sup>	1	41564	94.734	89.49	19.86
	2	41564	86.856		
	3	41564	86.894		
5.00 × 10 <sup>-5</sup>	1	41564	95.208	95.62	54.22
	2	41564	98.544		
	3	41564	93.115		
1.00 × 10 <sup>-4</sup>	1	41564	103.615	102.33	29.14
	2	41564	101.574		
	3	41564	101.809		
5.00 × 10 <sup>-4</sup>	1	41564	124.488	123.51	28.93
	2	41564	124.850		
	3	41564	121.189		
1.00 × 10 <sup>-3</sup>	1	41564	140.192	138.46	23.71
	2	41564	138.533		
	3	41564	136.652		
ctrl	1	41564	105.584	101.49	2.65
	2	41564	101.229		
	3	41564	97.669		

ตารางที่ ผ-6 แสดงข้อมูลจากโปรแกรม ImageJ ของพื้นผิวดัดแปรที่ทำปฏิกิริยากับ NaIO<sub>4</sub> ที่ความยาวคลื่น 365 nm

dye Conc.		area	mean of Gray scale	average	sd
1.00 × 10 <sup>-5</sup>	1	45244	116.513	111.01	17.50
	2	45244	106.572		
	3	45244	109.952		
5.00 × 10 <sup>-5</sup>	1	45244	120.127	120.90	54.74
	2	45244	123.384		
	3	45244	119.196		
1.00 × 10 <sup>-4</sup>	1	45244	134.103	133.95	17.69
	2	45244	131.898		
	3	45244	135.852		
5.00 × 10 <sup>-4</sup>	1	45244	172.447	172.95	14.57
	2	45244	173.596		
	3	45244	172.811		
1.00 × 10 <sup>-3</sup>	1	45244	193.681	194.24	10.00
	2	45244	193.562		
	3	45244	195.472		
ctrl	1	45244	129.666	126.05	2.52
	2	45244	124.964		
	3	45244	123.510		



ตารางที่ ผ-7 แสดงข้อมูลจากโปรแกรม ImageJ ของพื้นผิวดัดแปรที่ทำปฏิกิริยา Tosylation ที่ความยาวคลื่น 254 nm

dye Conc.		area	mean of Gray scale	average	sd
$1.00 \times 10^{-5}$	1	45244	112.561	110.67	5.03
	2	45244	109.072		
	3	45244	110.364		
$5.00 \times 10^{-5}$	1	45244	117.491	113.78	7.57
	2	45244	111.756		
	3	45244	112.088		
$1.00 \times 10^{-4}$	1	45244	121.785	115.82	9.61
	2	45244	116.981		
	3	45244	108.685		
$5.00 \times 10^{-4}$	1	45244	120.708	115.92	25.79
	2	45244	116.238		
	3	45244	110.817		
$1.00 \times 10^{-3}$	1	45244	117.088	113.41	6.11
	2	45244	112.392		
	3	45244	110.740		
ctrl	1	45244	105.359	103.38	23.69
	2	45244	104.842		
	3	45244	99.928		

ตารางที่ ผ-8 แสดงข้อมูลจากโปรแกรม ImageJ ของพื้นผิวดัดแปรที่ทำปฏิกิริยา Tosylation ที่ความยาวคลื่น 365 nm

dye Conc.		area	mean of Gray scale	average	sd
$1.00 \times 10^{-5}$	1	41564	137.061	136.37	7.51
	2	41564	133.446		
	3	41564	138.611		
$5.00 \times 10^{-5}$	1	41564	145.498	141.58	35.79
	2	41564	138.383		
	3	41564	140.856		
$1.00 \times 10^{-4}$	1	41564	151.822	144.76	5.03
	2	41564	146.013		
	3	41564	136.450		
$5.00 \times 10^{-4}$	1	41564	152.553	147.67	3.06
	2	41564	147.946		
	3	41564	142.503		
$1.00 \times 10^{-3}$	1	41564	149.843	146.27	2.89
	2	41564	144.190		
	3	41564	144.777		
ctrl	1	41564	138.067	136.43	6.66
	2	41564	137.301		
	3	41564	133.921		

ตารางที่ ๘-9 แสดงข้อมูลจากโปรแกรม ImageJ ของพื้นผิวดัดแปรที่ทำปฏิกิริยากับ TEMPO ที่ความยาวคลื่น 254 nm

dye Conc.		area	mean of Gray scale	average	sd
$1.00 \times 10^{-5}$	1	41564	80.263	75.77	15.87
	2	41564	77.190		
	3	41564	69.871		
$5.00 \times 10^{-5}$	1	41564	90.730	85.21	15.37
	2	41564	84.523		
	3	41564	80.385		
$1.00 \times 10^{-4}$	1	41564	94.797	89.68	10.02
	2	41564	90.393		
	3	41564	83.840		
$5.00 \times 10^{-4}$	1	41564	105.769	96.47	31.72
	2	41564	97.153		
	3	41564	86.499		
$1.00 \times 10^{-3}$	1	41564	112.421	101.17	22.28
	2	41564	101.388		
	3	41564	89.686		
ctrl	1	41564	108.476	97.97	11.02
	2	41564	98.049		
	3	41564	87.371		

ตารางที่ ๘-10 แสดงข้อมูลจากโปรแกรม ImageJ ของพื้นผิวดัดแปรที่ทำปฏิกิริยากับ TEMPO ที่ความยาวคลื่น 365 nm

dye Conc.		area	mean of Gray scale	average	sd
$1.00 \times 10^{-5}$	1	41564	125.832	118.02	17.00
	2	41564	120.044		
	3	41564	108.172		
$5.00 \times 10^{-5}$	1	41564	138.109	128.44	8.66
	2	41564	127.409		
	3	41564	119.809		
$1.00 \times 10^{-4}$	1	41564	143.186	133.59	44.56
	2	41564	133.656		
	3	41564	123.935		
$5.00 \times 10^{-4}$	1	41564	163.519	148.30	17.04
	2	41564	149.502		
	3	41564	131.870		
$1.00 \times 10^{-3}$	1	41564	176.784	159.33	16.09
	2	41564	161.277		
	3	41564	139.920		
ctrl	1	41564	149.938	133.45	15.89
	2	41564	133.553		
	3	41564	116.844		

## ประวัติผู้วิจัย

นายศิวกกร วจิตต์ดีลีทธิ์ เกิดเมื่อวันที่ 8 ตุลาคม พ.ศ.2535 ที่จังหวัดสมุทรสาคร สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย สายสามัญแผนการเรียนวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์ จากโรงเรียนนาคประสิทธิ์จังหวัดนครปฐม เมื่อปีการศึกษา 2553 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต (โปรแกรมเอกเดี่ยว) ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2554 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้หลังจากจบการศึกษาปริญญาตรี บ้านเลขที่ 3 หมู่ 1 ตำบลหนองบัว อำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดสมุทรสาคร อีเมลล์ s.wajeesaksit@gmail.com

นายฐิติกร สุทัศน์ เกิดเมื่อวันที่ 23 กันยายน พ.ศ.2536 ที่จังหวัดพิจิตร สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย สายสามัญแผนการเรียนวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์ จากโรงเรียนพิจิตรพิทยาคม จังหวัดพิจิตร เมื่อปีการศึกษา 2553 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต (โปรแกรมเอกเดี่ยว) ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2554 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้หลังจากจบการศึกษาปริญญาตรี บ้านเลขที่ 118 หมู่ 5 ตำบลกำแพงดิน อำเภอสว่างงาม จังหวัดพิจิตร อีเมลล์ thitikorn.s80@gmail.com



ภาควิชาเคมี  
คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย