



โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การผลิตเหล็กกล้าที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยการตรึงสารประกอบที่มีหมู่อะมิโนอย่างถาวร

Fabrication of antibacterial stainless steel based on chemical immobilization of amino-containing scaffolds

ชื่อนิสิต นายสุรเศรษฐ์ สุรฤทธิ์เดชาชัย

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2559

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การผลิตเหล็กกล้าที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย
ด้วยการตรึงสารประกอบที่มีหมู่อะมิโนอย่างถาวร

Fabrication of antibacterial stainless steel
based on chemical immobilization of amino-containing scaffolds

โดย
นายสุรเศรษฐ์ สุรฤทธิ์เดชาชัย

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2559

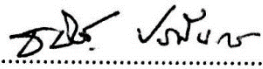
โครงการ การผลิตเหล็กกล้าที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยการตรึงสารประกอบที่มีหมู่อะมิโนอย่าง
ถาวร

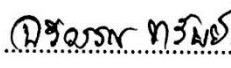
โดย นายสุรเศรษฐ์ สุรฤทธิเดชชาชัย


ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ


..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วราวุฒิ ตั้งพสุชาดล)


..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนิษฐ์ ปราดินนรรัตน์)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ดร.ฉวีวรรณ ทรัพย์เจริญกุล) (ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ)


..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.จิตจูดา อุ่นเรืองศรี)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

..... หัวหน้าภาควิชาเคมี
(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย พาราสุข)
วันที่ เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2560

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ ดีมาก ดี พอใช้

ชื่อโครงการ การผลิตเหล็กกล้าที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยการตรึงสารประกอบที่มีหมู่อะมิโน
อย่างถาวร

ชื่อนิสิตในโครงการ นายสุรเศรษฐ์ สุรฤทธิ์เดชาชัย เลขประจำตัว 5633162423

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนิชฐ์ ปราณีนรารัตน์

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร.ฉวีวรรณ ทริพย์เจริญกุล (ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ)

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2559

บทคัดย่อ

ปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียบนวัสดุในชีวิตประจำวัน จัดเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญ เนื่องจากปัญหาการดื้อยาที่รุนแรง ทำให้การรักษาเป็นไปด้วยความยากลำบาก ดังนั้นมาตรการป้องกัน เช่น การพัฒนาพื้นผิววัสดุให้มีสมบัติต้านเชื้อแบคทีเรียจึงจัดเป็นมาตรการสำคัญรูปแบบหนึ่งที่จะช่วยลดปัญหานี้ลงได้ ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้ทดลองดัดแปรผิวของเหล็กกล้าไร้สนิมซึ่งเป็นวัสดุที่มีความสำคัญในชีวิตประจำวัน ให้มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยอาศัยปฏิกิริยาการเคลือบและพอลิเมอไรเซชันของพอลิโดพามีนบนพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิม ซึ่งจะช่วยให้พื้นผิวมีหมู่ฟังก์ชันอินทรีย์ที่เหมาะสมแก่การตรึงสารประกอบอินทรีย์อื่น โดยผู้วิจัยได้ศึกษาการตรึงสารประกอบ 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine (TTD) และอนุพันธ์ของ TTD ที่มีหมู่ปกป้อง Boc (TTDBoc) ลงบนพื้นผิวด้วยวิธีทางเคมี จากนั้นได้พิสูจน์การตรึงสารบนผิวโดยใช้เทคนิคการวัดมุมสัมผัสและเทคนิค ATR-FTIR spectroscopy และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของวัสดุดัดแปรกับเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ผลการทดลองพบว่า แม้การตรึงสารประกอบน่าจะเกิดได้จริง แต่วัสดุดัดแปรที่ได้ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองที่ได้สามารถเป็นข้อมูลสำคัญที่จะนำไปพัฒนาต่อยอด หรือนำไปทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นที่มีสมบัติแตกต่างกันต่อไป

คำสำคัญ: เหล็กกล้าไร้สนิม, พอลิโดพามีน, พื้นผิวด้านแบคทีเรีย

Project Title Fabrication of antibacterial stainless steel based on chemical immobilization of amino-containing scaffolds

Student Name Mister Surased Suraritdechachai Student ID 5633162423

Advisor Name Assistant Professor Thanit Praneenarat, Ph.D.

Co-advisor Name Chaweewan Sapcharoenkun, Ph. D. (National Nanotechnology Center)

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2016

Abstract

Bacterial contamination on surfaces is considered as a serious issue in the public health due to the high rate of drug resistance, leading to much difficulty for treatments. Therefore, prevention measures such as the development of antibacterial surfaces are essential to solve this problem. In this project, the researcher modified the surface of a stainless steel, an important surface in everyday life, and made it antibacterial by *in situ* coating and polymerization of dopamine. This created organic functional groups on the surface and allowed the attachment of organic molecules. Thereafter, 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine (TTD) and its Boc-protected derivative (TTDBoc) were chemically immobilized onto the surface. These modifications were then confirmed by water contact angle measurement and ATR-FTIR spectroscopy. The antibacterial activity was tested against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The results indicated that the immobilizations were likely to be successful although there was no antibacterial activity. Nevertheless, the results could be used for further development and more testing on other bacterial species with different properties may lead to interesting results.

Keywords: Stainless steel, Polydopamine, Antibacterial surface

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนิษฐ์ ปราณีนรรัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษา และดร.ฉวีวรรณ ทรัพย์เจริญกุล นักวิจัยศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม เป็นอย่างมาก ที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา และวิธีแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นอย่างใกล้ชิด จนสามารถดำเนินโครงการลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วราวุฒิ ตั้งพสุธาตล และอาจารย์ ดร.จัญจดา อุ่นเรืองศรี ที่ให้เกียรติและสละเวลามาเป็นคณะกรรมการประเมินโครงการ รวมถึงให้คำแนะนำต่าง ๆ ในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รุ่งอรุณ วาติถิ สิริศรีธธา อาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้สถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือต่าง ๆ และให้คำแนะนำสำหรับการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

ขอขอบคุณพี่ ๆ ในห้องปฏิบัติการ TP lab และในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ระดับนาโนที่ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่ให้คำแนะนำ คำปรึกษา และช่วยแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นในการทดลองมาโดยตลอด โดยเฉพาะอย่างยิ่งพี่จุฑามาศ ปราบพาล พี่มนรวีส รวยธนพานิช และพี่ศิริพร พรหมมา

ขอขอบคุณหน่วยเครื่องกล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับเครื่องมือ คำแนะนำ และความช่วยเหลือในการตัดแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิม

ขอขอบคุณโครงการสร้างปัญญาวิทย์ ผลิตนักเทคโนโลยี (YSTP) โดยสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่ให้ทุนสนับสนุนการศึกษาวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณครอบครัว รวมถึงเพื่อน ๆ ที่ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจให้อยู่เสมอ เป็นแรงสนับสนุนหนึ่งที่ช่วยให้ผู้วิจัยสามารถดำเนินโครงการนี้สำเร็จได้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญรูป	ช
สัญลักษณ์และคำย่อ	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 พื้นผิวต้านแบคทีเรีย (antibacterial surface)	1
1.2 เหล็กกล้าไร้สนิม (stainless steel) และการดัดแปรผิวโลหะ	5
1.3 พอลิโดพามีน (polydopamine)	5
บทที่ 2 การทดลอง	11
2.1 สารเคมี	11
2.2 วัสดุและเครื่องมือ	12
2.3 การสังเคราะห์ <i>N</i> -tert-butoxycarbonyl-4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine (TTDBoc)	13
2.4 การสังเคราะห์ glycidyl tosylate	13
2.5 การหาค่า pH ที่เหมาะสมกับการเกิดพอลิเมอไรเซชันของโดพามีน	14
2.6 การเตรียมพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิม	14
2.7 การเคลือบโดพามีนบนพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิม	14
2.8 การตรึงสารประกอบที่มีหมู่อะมิโนลงบนพื้นผิว	15
2.9 การวัดมุมสัมผัสน้ำ (water contact angle)	15
2.10 การพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค ATR-FTIR spectroscopy	15
2.11 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย	15

บทที่ 3 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง	17
3.1 การหาค่า pH ที่เหมาะสมกับการเกิดพอลิเมอไรเซชันของโดพามีน	17
3.2 การสังเคราะห์ glycidyl tosylate	19
3.3 การสังเคราะห์ TTDBoc	22
3.4 การดัดแปรพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิมด้วยพอลิโดพามีน	26
3.5 การตรึงสารประกอบลงบนพื้นผิว	27
3.6 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของพื้นผิวโดยเทคนิคการวัดมุมสัมผัสน้ำและ ATR-FTIR spectroscopy	28
3.7 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย	32
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	34
เอกสารอ้างอิง	35
ประวัติผู้วิจัย	38



สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1.1 การเกิดไบโอฟิล์มของแบคทีเรียบนพื้นผิว ¹ เริ่มต้นจากการยึดเกาะและการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย การหลั่งสารออกมาภายนอกเซลล์กลายเป็นไบโอฟิล์ม จนกระทั่งเกิดการแพร่กระจายของแบคทีเรีย	1
รูปที่ 1.2 พื้นผิวปล่อยสารต้านแบคทีเรีย และพื้นผิวกำจัดแบคทีเรียเมื่อสัมผัส ⁵	2
รูปที่ 1.3 โครงสร้างของ <i>N</i> -alkylated poly(4-vinylpyridine) (ซ้าย) และ <i>N</i> -alkylated polyethyleneimine (ขวา)	3
รูปที่ 1.4 การตรึงหมู่ควอเตอร์นารีแอมโมเนียมบนพื้นผิวตามงานวิจัยของ Poverenov และคณะ ¹¹	4
รูปที่ 1.5 การตรึงหมู่อะมิโนบนเซลล์โลสตามงานวิจัยของ Fernandes และคณะ ¹²	4
รูปที่ 1.6 โครงสร้างของโดพา ไลซีน โดพามีน ไทรามีน และนอร์เอพิเนฟริน	6
รูปที่ 1.7 สารสังเคราะห์ที่มีกรดอะมิโนโดพา 1 – 3 หน่วยต่อกับพอลิเอทิลีนไกลคอล และกลไกการจับของหมู่ คาร์บอกซิลกับผิว TiO ₂ เสนอโดย Dalsin และคณะ ¹⁷	7
รูปที่ 1.8 การจับของโดพามีนกับอะตอมเหล็กของอนุภาคนาโน Fe ₂ O ₃ เสนอโดย Chen และคณะ ¹⁹	7
รูปที่ 1.9 กลไกการเกิดอินเทอร์มีเดียตต่าง ๆ ในการเกิดพอลิโดพามีน	8
รูปที่ 1.10 โครงสร้างของไดเมอร์จากพันธะโควาเลนต์ (ซ้าย) และไตรเมอร์จากการรวมกันทางกายภาพ (กลาง) เสนอโดย Hong และคณะ ²² โครงสร้างจากการรวมตัวกันด้วยแรงระหว่างโมเลกุล (ขวา) เสนอโดย Dreyer และคณะ ²³	8
รูปที่ 1.11 ปฏิกิริยาของหมู่ควิโนนบนผิวกับไทออลและเอมีน	9
รูปที่ 1.12 แผนภาพการดัดแปรพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิมเพื่อตรึงเอนไซม์ไลโซไซม์ โดย Yuan และคณะ ²⁵	9
รูปที่ 1.13 แผนภาพการตรึงไคโตซานโดยใช้ glutaraldehyde เชื่อมหมู่อะมิโนของพอลิโดพามีนกับหมู่อะมิโนของไคโตซาน โดย Yuan และคณะ ²⁶	10
รูปที่ 1.14 โครงสร้างของ 4,7,10-trioxo-1,13-tridecanediamine	10
รูปที่ 3.1 น้ำ DI และสารละลายโดพามีนในบัฟเฟอร์ 5 ชนิด ได้แก่ acetate buffer pH 5.0, HEPES buffer pH 7.0, borate buffer pH 8.5, Tris buffer pH 8.5 และ carbonate buffer pH 11 ตามลำดับ ที่ช่วงเวลาเริ่มต้น และเมื่อเวลาผ่านไป 1, 6 และ 24 ชั่วโมง	18
รูปที่ 3.2 การจับของกรดบอริกกับโดพามีน	19
รูปที่ 3.3 แผนภาพการสังเคราะห์ glycidyl tosylate จาก glycidol	19

รูปที่ 3.4	การทำปฏิกิริยากับนิวคลีโอไฟล์ที่ทั้งสองด้านของ glycidyl tosylate	19
รูปที่ 3.5	กลไกการทำปฏิกิริยาระหว่าง glycidol กับ tosyl chloride โดยมี DMAP เร่งปฏิกิริยา	20
รูปที่ 3.6	สเปกตรัม ¹ H NMR ของ glycidyl tosylate	21
รูปที่ 3.7	แผนภาพการสังเคราะห์ TTDBoc	22
รูปที่ 3.8	กลไกการทำปฏิกิริยาระหว่างเอมีนและ Boc ₂ O	22
รูปที่ 3.9	สเปกตรัม ¹ H NMR ของ TTDBoc	24
รูปที่ 3.10	สเปกตรัม ¹ H NMR ของ BocTTDBoc	25
รูปที่ 3.11	แผนภาพการตัดแปรพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิมด้วยพอลิโดพามีน	26
รูปที่ 3.12	แผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมในสารละลายโดพามีนในบัฟเฟอร์ Tris 0.1 M pH 8.5 ที่เวลา 24 ชั่วโมง	26
รูปที่ 3.13	แผ่นเหล็กกล้าไร้สนิม SS, SS-PD, SS-PD-TTD และ SS-PD-TTDBoc ตามลำดับ	26
รูปที่ 3.14	แผนภาพการตรึงสารลงบนพื้นผิว SS-PD หลังจากไม่พบการเปลี่ยนแปลงของอินฟราเรดสเปกตรัม เมื่อทดลองใช้สารกลุ่มอีพอกไซด์ทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโน จึงอาศัยปฏิกิริยาของหมู่ควิโนนตรึง TTD และ TTDBoc ลงบนพื้นผิว	27
รูปที่ 3.15	ค่ามุมสัมผัสกับน้ำของพื้นผิว SS, SS-PD, SS-PD-Tris, SS-PD-TTD, SS-PD-TTDBoc	28
รูปที่ 3.16	หยดน้ำบนพื้นผิว SS, SS-PD, SS-PD-Tris, SS-PD-TTD, SS-PD-TTDBoc	29
รูปที่ 3.17	อินฟราเรดสเปกตรัมของพื้นผิว SS, SS-PD, SS-PD-Tris, SS-PD-TTD, SS-PD-TTDBoc	31
รูปที่ 3.18	จำนวนแบคทีเรีย <i>S. aureus</i> หลังการสัมผัสบนพื้นผิวตัวอย่างเป็นเวลา 18 ชั่วโมง	33
รูปที่ 3.19	จำนวนแบคทีเรีย <i>E. coli</i> หลังการสัมผัสบนพื้นผิวตัวอย่างเป็นเวลา 18 ชั่วโมง	33

สัญลักษณ์และคำย่อ

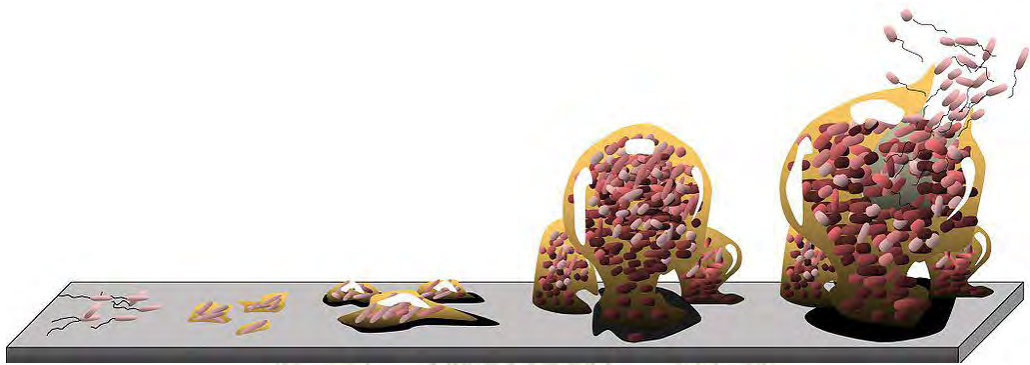
^1H NMR	Proton nuclear magnetic resonance
ATR-FTIR	Attenuated total reflectance Fourier transform infrared
Boc ₂ O	Di- <i>tert</i> -butyl dicarbonate
BocTTDBoc	<i>N,N'</i> -bis(<i>tert</i> -butoxycarbonyl)-4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine
CFU	Colony forming unit
DI	Deionized
DMAP	<i>N,N'</i> -dimethyl-4-aminopyridine
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EtOAc	Ethyl acetate
eq	equivalent
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
NSS	Normal saline solution
OD	Optical density
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PD	Polydopamine
R _f	Retention factor
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SS	Stainless steel
TLC	Thin layer chromatography
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol
TTD	4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine
TTDBoc	<i>N-tert</i> -butoxycarbonyl-4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine
UV	Ultraviolet

บทที่ 1

บทนำ

1.1 พื้นผิวต้านแบคทีเรีย (antibacterial surface)

แบคทีเรียสามารถเติบโตบนพื้นผิววัสดุหลากหลายชนิด หากแบคทีเรียในสารละลายยึดเกาะกับพื้นผิวได้โดยอาศัยโปรตีนและโครงสร้างต่าง ๆ ของเซลล์ แบคทีเรียจะสามารถเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนบนพื้นผิวพร้อมกับหลังสารเคมีต่าง ๆ ที่มีองค์ประกอบหลักเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ออกมาภายนอกเซลล์ สารที่หลั่งออกมาสามารถช่วยในการยึดเกาะบนพื้นผิวและช่วยยึดเซลล์ของแบคทีเรียให้อยู่รวมกัน เกิดเป็นกลุ่มแบคทีเรียขนาดใหญ่เรียกว่า ไบโอฟิล์ม (biofilm)¹⁻² ไบโอฟิล์มที่เติบโตมีขนาดใหญ่ยังช่วยให้เกิดการแพร่กระจายของแบคทีเรียไปยังบริเวณอื่นได้ง่าย (รูปที่ 1.1)



รูปที่ 1.1 การเกิดไบโอฟิล์มของแบคทีเรียบนพื้นผิว¹ เริ่มต้นจากการยึดเกาะและการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย การหลั่งสารออกมาภายนอกเซลล์กลายเป็นไบโอฟิล์ม จนกระทั่งเกิดการแพร่กระจายของแบคทีเรีย

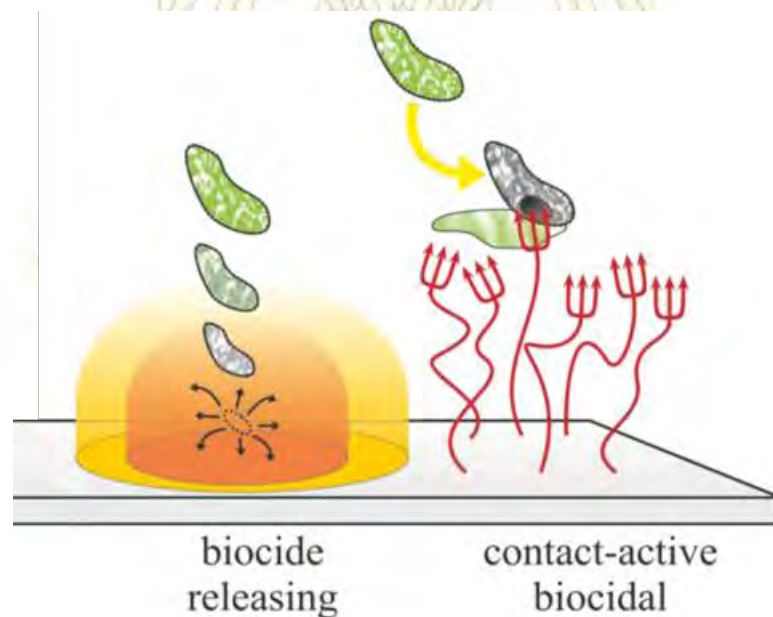
ไบโอฟิล์มช่วยป้องกันแบคทีเรียที่อยู่ภายในจากสิ่งแวดล้อมภายนอก แบคทีเรียในไบโอฟิล์มจะทนต่อยาปฏิชีวนะ สารฆ่าเชื้อ และระบบภูมิคุ้มกันมากขึ้น ทำให้กำจัดแบคทีเรียได้ยากขึ้น เนื่องจากชั้นของพอลิเมอร์ก้ำบังแบคทีเรียจากสารที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อเหล่านี้³ ไบโอฟิล์มเป็นสาเหตุสำคัญทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อในอุตสาหกรรมด้านอาหาร การปนเปื้อนบนวัสดุเนื่องจากไบโอฟิล์มยังทำให้เชื้อแบคทีเรียสามารถแพร่กระจายไปได้โดยง่าย จึงเป็นปัญหาทั้งในด้านสุขภาพและการใช้อุปกรณ์ทางการแพทย์ แม้มีการพัฒนายาปฏิชีวนะเพื่อต้านการติดเชื้อมของแบคทีเรีย แต่การใช้ยาปฏิชีวนะปริมาณมากในระยะยาวเพิ่มความเสี่ยงต่อการดื้อยาของแบคทีเรีย ทำให้การรักษาไม่ได้ผลและไม่สามารถใช้ยาตัวนั้นต่อไปได้⁴ จึงได้มีความพยายามที่จะป้องกันการเติบโตของแบคทีเรียบนพื้นผิวโดยการพัฒนาพื้นผิวด้านแบคทีเรียขึ้น

พื้นผิวด้านแบคทีเรียเป็นพื้นผิวที่สามารถลดการเติบโตของแบคทีเรียบนพื้นผิว สามารถแบ่งตามกลไกในการต้านแบคทีเรียได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ พื้นผิวลดการยึดเกาะ (anti-adhesive) และพื้นผิวฆ่าแบคทีเรีย (bactericidal)⁵

พื้นผิวลดการยึดเกาะคือพื้นผิวที่สามารถลดการยึดเกาะและสะสมของแบคทีเรียได้ สามารถทำได้โดยการทำให้พื้นผิวมีความชอบน้ำ (hydrophilicity) สูงขึ้น เช่น การใช้พอลิเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol)⁶ หรือการใช้สารที่มีหมู่ zwitterion⁷ นอกจากนี้ยังสามารถทำพื้นผิวลดการยึดเกาะได้โดยทำให้พื้นผิวมีประจุเป็นลบ เพื่อให้เกิดแรงผลักกับเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียที่มีประจุลบเช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามพื้นผิวลดการยึดเกาะไม่สามารถฆ่าแบคทีเรีย หากมีแบคทีเรียที่สามารถยึดเกาะได้ก็จะสามารถเติบโตต่อไปได้

ส่วนพื้นผิวฆ่าแบคทีเรียสามารถทำให้เซลล์แบคทีเรียตายและไม่สามารถเพิ่มจำนวนต่อไปได้ พื้นผิวฆ่าแบคทีเรียยังสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ พื้นผิวปล่อยสารต้านแบคทีเรีย (biocide releasing) และพื้นผิวกำจัดแบคทีเรียเมื่อสัมผัส (contact killing)⁵ ดังแสดงในรูปที่ 1.2

พื้นผิวปล่อยสารต้านแบคทีเรียจะปล่อยสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียออกจากพื้นผิว เช่น อนุภาคเงิน ระดับนาโนเมตร ไนตริกออกไซด์ (NO) เป็นต้น⁵ ทำให้ต้องคำนึงถึงผลของสารที่ปล่อยออกมาทั้งในแง่ผลต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียของพื้นผิวจะหมดไปเมื่อปลดปล่อยสารออกไปทั้งหมด ขณะที่พื้นผิวกำจัดแบคทีเรียเมื่อสัมผัสอาศัยการตรึงสารบนพื้นผิวด้วยวิธีการทางเคมี จึงไม่มีการรั่วไหลของสาร และนำไปสู่ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมที่น้อยกว่าพื้นผิวแบบแรก สำหรับสารที่นิยมติดบนพื้นผิว เช่น เพปไทด์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptide) เอนไซม์ สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ รวมถึงพอลิเมอร์ประจุบวก เป็นต้น⁵

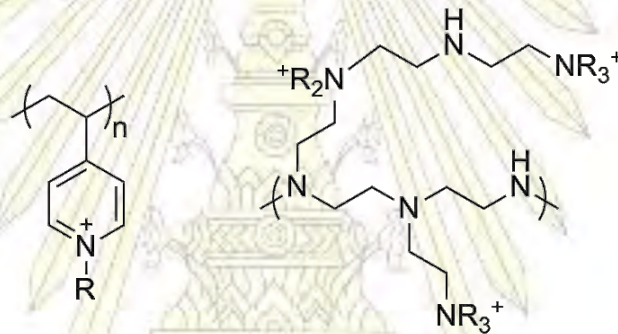


รูปที่ 1.2 พื้นผิวปล่อยสารต้านแบคทีเรีย และพื้นผิวกำจัดแบคทีเรียเมื่อสัมผัส⁵

สารในกลุ่มควอเทอร์นารีแอมโมเนียม (quaternary ammonium) เป็นสารกลุ่มหนึ่งที่มีมานานแล้ว ว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้⁸ ในช่วงแรกพบว่าสารกลุ่มนี้มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียจะมีหมู่ไฮโดรคาร์บอนสายยาวเป็นองค์ประกอบ มีสมบัติเป็นสารซักล้าง และได้มีการนำมาใช้เป็นสารฆ่าเชื้อในภาวะสารละลาย

ในปี 2001 Tiller และคณะ⁹ สามารถสร้างพื้นผิวด้านแบคทีเรียโดยใช้พอลิเมอร์ประจุบวก *N*-alkylated poly(4-vinylpyridine) (รูปที่ 1.3) โดยใช้ทั้งวิธีสังเคราะห์พอลิเมอร์ขึ้นบนพื้นผิวและวิธีสังเคราะห์จากภาวะสารละลายก่อนแล้วนำมาติดบนพื้นผิว พบว่าพื้นผิวแก้วดัดแปรที่ได้จากทั้งสองวิธีสามารถฆ่าแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) และแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

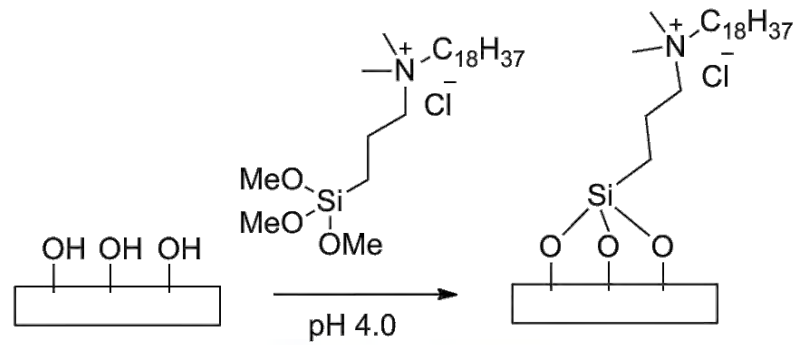
ต่อมานักวิจัยจึงสนใจการใช้พอลิเมอร์ประจุบวกที่มีหมู่ควอเทอร์นารีแอมโมเนียมเพื่อสร้างพื้นผิวกำจัดแบคทีเรีย Milovic และคณะ¹⁰ ได้ตรึงพอลิเมอร์ *N*-alkylated polyethyleneimine บนผิวแก้ว (รูปที่ 1.3) พบว่าสามารถกำจัด *E. coli* และ *S. aureus* ได้ดี และไม่พบว่าเกิดการดีดของแบคทีเรียเมื่อนำแบคทีเรียที่ยังมีชีวิตหลังสัมผัสกับตัวอย่างมาเลี้ยงและทดสอบการฆ่าเชื้อซ้ำ 10 ซ้ำ



รูปที่ 1.3 โครงสร้างของ *N*-alkylated poly(4-vinylpyridine) (ซ้าย) และ *N*-alkylated polyethyleneimine (ขวา)

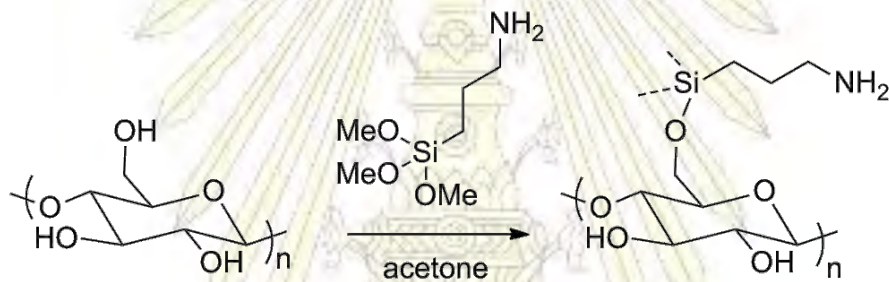
กลุ่มพอลิเมอร์ที่มีประจุบวกนี้สามารถเกิดอันตรกิริยาต่าง ๆ เช่น แรงระหว่างประจุ กับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียที่มีประจุลบ ทำให้เกิดการเสียสมดุลของเยื่อเซลล์แบคทีเรียและนำไปสู่การรั่วไหลของสารเคมีและองค์ประกอบภายในเซลล์ จนทำให้เกิดความเสียหายของเซลล์และทำให้เซลล์ตายในที่สุด

มีงานวิจัยพบว่าสารกลุ่มอะมิโนที่ไม่ได้อยู่ในรูปพอลิเมอร์ก็สามารถนำมาพัฒนาพื้นผิวด้านแบคทีเรียได้ ในปี 2013 Poverenov และคณะ¹¹ ได้ตรึงสารที่มีหมู่ควอเทอร์นารีแอมโมเนียมลงบนพอลิไวนิลแอลกอฮอล์เซลลูโลส และผิวแก้ว โดยใช้ dimethyloctadecyl[3-(trimethoxysilylpropyl)] ammonium chloride ซึ่งเป็นสารกลุ่มซิลาน (silane) ทำปฏิกิริยากับพื้นผิวที่มีหมู่ไฮดรอกซิลเหล่านี้ (รูปที่ 1.4) พบว่าพื้นผิวที่ได้ลดการเติบโตของทั้งแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus cereus*, *Alicyclobacillus acidoterrestris* และแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli*, *P. Aeruginosa*



รูปที่ 1.4 การตรึงหมู่ควอเทอร์นารีแอมโมเนียมบนพื้นผิวตามงานวิจัยของ Poverenov และคณะ¹¹

นอกจากนี้ในปี 2013 Fernandes และคณะ¹² ได้ตรึงสาร 3-aminopropyltrimethoxysilane โดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่างไฮดรอกซิลกับหมู่ไฮดรอกซิลของเซลลูโลส (รูปที่ 1.5) พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *E. coli* และ *S. aureus* ได้ดี จากงานวิจัยของ Fernandes ได้แสดงให้เห็นว่าหมู่อะมิโนบนพื้นผิวอาจไม่จำเป็นต้องอยู่ในรูปของควอเทอร์นารีแอมโมเนียมก็อาจสามารถมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้



รูปที่ 1.5 การตรึงหมู่อะมิโนบนเซลลูโลสตามงานวิจัยของ Fernandes และคณะ¹²

1.2 เหล็กกล้าไร้สนิม (stainless steel) และการดัดแปรผิวโลหะ

เหล็กกล้าไร้สนิมเป็นหนึ่งในวัสดุที่มีความสำคัญในชีวิตประจำวัน มีองค์ประกอบหลักเป็นเหล็ก โครเมียม และคาร์บอนปริมาณเล็กน้อย มีสมบัติสามารถป้องกันการเกิดสนิม และทนต่อการกัดกร่อนได้ดี เนื่องจากโครเมียมสามารถสร้างชั้นของออกไซด์ที่ผิวหน้าของโลหะ ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาของเนื้อเหล็กภายในกับออกซิเจนได้

เนื่องจากความแข็งแรงของตัววัสดุ ความทนทานต่อการกัดกร่อนและการเกิดปฏิกิริยา จึงมีการใช้งานเหล็กกล้าไร้สนิมอย่างแพร่หลาย อาทิ เป็นภาชนะบรรจุอาหาร เครื่องครัว เครื่องสุขภัณฑ์ เป็นส่วนประกอบของเครื่องมือและอุปกรณ์ในทางอุตสาหกรรม รวมถึงใช้เป็นอุปกรณ์การแพทย์ เช่น กระดุกเทียม ข้อต่อเทียม ดังนั้นการยึดเกาะและเติบโตของแบคทีเรียบนผิวเหล็กกล้าไร้สนิมจะเป็นปัญหาสำคัญต่อการใช้งานวัสดุเหล่านี้ทั้งในชีวิตประจำวัน ในเชิงอุตสาหกรรม และในเชิงการแพทย์ จึงมีความจำเป็นที่จะพัฒนาเหล็กกล้าไร้สนิมให้มีความสามารถในการต้านแบคทีเรีย

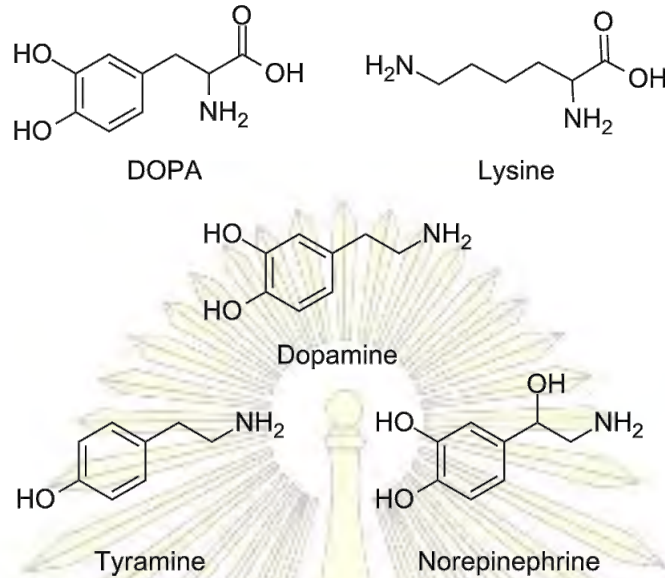
โดยทั่วไปการตรึงสารประกอบอินทรีย์บนผิวของโลหะโดยการสร้างพันธะโควาเลนต์จะต้องดัดแปรผิวของโลหะเพื่อสร้างหมู่ฟังก์ชันที่เหมาะสมสำหรับเชื่อมต่อกับสารที่ต้องการ เนื่องจากผิวของโลหะทั่วไปไม่สามารถเกิดพันธะกับสารอินทรีย์ได้ แม้เทคนิคบางประเภทจะสามารถตรึงสารบนโลหะได้ง่าย เช่น การใช้สารกลุ่มไทออลเกาะบนผิวทอง แต่เทคนิคนี้มีความจำเพาะมาก ไม่สามารถใช้ดัดแปรผิวของวัสดุประเภทอื่นได้

การใช้พลาสมา การฉายรังสี การฉายลำอิเล็กตรอนพลังงานสูง เป็นเทคนิคอีกกลุ่มหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสำหรับทำให้พื้นผิววัสดุต่าง ๆ มีหมู่ฟังก์ชันที่ต้องการ¹³ ตัวอย่างเช่น ในปี 2005 Dong และคณะ⁶ ได้สร้างพื้นผิวลดการยึดเกาะของแบคทีเรีย โดยใช้เทคนิคพลาสมาเพื่อติดพอลิเอทิลีนไกลคอลบนเหล็กกล้าไร้สนิม อย่างไรก็ตามข้อจำกัดหนึ่งของเทคนิคในกลุ่มนี้คือต้องใช้เครื่องมือราคาแพงและมีวิธีการที่ค่อนข้างซับซ้อน

1.3 พอลิโดพามีน (polydopamine)

ในปี 2007 Lee และคณะ¹⁴ ได้รายงานการใช้โดพามีนเป็นสารสำหรับยึดติดบนพื้นผิวชนิดต่าง ๆ โดยมีที่มาจากการศึกษาโปรตีนยึดเกาะของหอยแมลงภู่มิ *Mytilus edulis* ที่พบว่าโปรตีนยึดเกาะประกอบด้วยกรดอะมิโนโดพา (DOPA) และไลซีน (lysine) ปริมาณมาก กรดอะมิโนโดพามีโซ่ข้างเป็นหมู่ 1,2-ไดไฮดรอกซีฟีนิล (1,2-dihydroxyphenyl) หรือเรียกว่าหมู่ catechol (catechol) ส่วนไลซีนมีโซ่ข้างเป็นหมู่อะมิโน จึงได้ทดลองนำโดพามีน (dopamine) ซึ่งมีทั้งหมู่ catechol และหมู่อะมิโนมาใช้เกาะบนผิวของวัสดุ พบว่าโดพามีนสามารถเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันได้เองในสภาวะเบส สารละลายจะเปลี่ยนแปลงจากสารละลายใสไม่มีสี กลายเป็นสารละลายสีน้ำตาล และพื้นผิวที่มีพอลิโดพามีนยึดเกาะจะสามารถสังเกตเห็นสีเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล พอลิโดพามีนที่เกิดขึ้นยึดเกาะบนผิววัสดุได้หลากหลายชนิด เช่น แก้ว ไทเทเนียมออกไซด์ (TiO₂) อะลูมิเนียมออกไซด์ (Al₂O₃) โลหะเงิน ทองคำ พอลิเมอร์สังเคราะห์ต่าง ๆ รวมถึงเหล็กกล้าไร้สนิม¹⁴ ขั้นตอนการดัดแปร

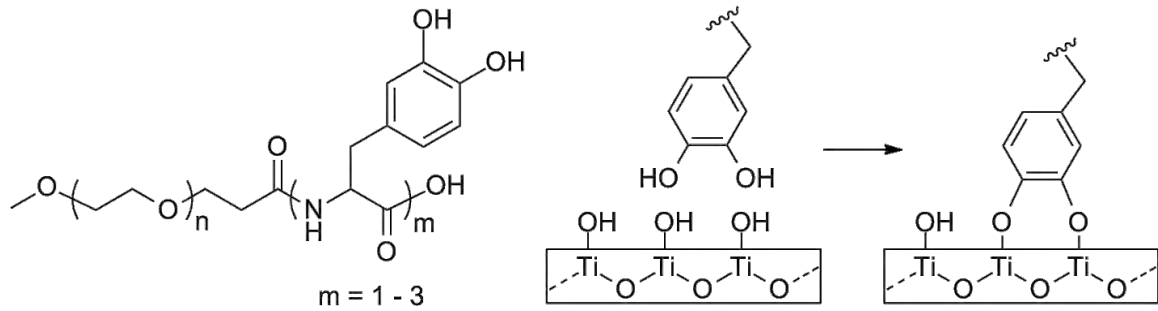
พื้นผิวสามารถทำได้ง่าย คือ กลุ่มวัสดุที่ต้องการในสารละลายโดพามีนในภาวะที่เป็นเบสและมีออกซิเจน ทำได้ในตัวทำละลายที่เป็นน้ำที่อุณหภูมิห้อง จึงไม่ต้องใช้สภาวะที่รุนแรงหรือเครื่องมือซับซ้อนในการดัดแปรให้มีหมู่ฟังก์ชันอินทรีย์บนผิวโลหะ



รูปที่ 1.6 โครงสร้างของโดพา ไลซีน โดพามีน ไทราซีน และนอร์เอพิเนพริน

จากการศึกษาต่าง ๆ พบว่าหมู่ catechol มีบทบาทสำคัญต่อความสามารถในการยึดเกาะบนวัสดุของพอลิโดพามีน เนื่องจากหมู่ catechol สามารถเกิดพันธะที่แข็งแรงและหลากหลายกับพื้นผิวต่าง ๆ เช่น พันธะไฮโดรเจน แรงระหว่างขั้ว อันตรกิริยาแบบไพ-ไพ (π - π interaction) เป็นต้น มีการทดสอบการยึดเกาะโดยใช้สารไทราซีน (tyramine) ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายคลึงกัน แต่ไม่มีหมู่ catechol พบว่าสารนี้ยึดเกาะบนผิวทองได้น้อยมากเมื่อเทียบกับโดพามีน¹⁵ ขณะที่นอร์เอพิเนพริน (norepinephrine) สามารถเกิดการพอลิเมอไรเซชันและยึดเกาะบนวัสดุหลากหลายชนิดได้ดีเช่นเดียวกับโดพามีน¹⁶

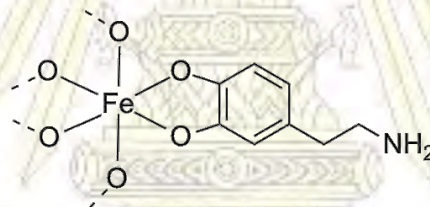
ในปี 2005 Dalsin และคณะ¹⁷ ได้สังเคราะห์เพปไทด์ของโดพา 1 – 3 หน่วย ต่อกับพอลิเอทิลีนไกลคอล (รูปที่ 1.7) แล้วนำมาทดสอบการยึดเกาะบนผิวของ TiO_2 สารสังเคราะห์ที่มีโดพาเพียงหน่วยเดียวยึดเกาะบนผิวได้น้อยมาก แต่เมื่อจำนวนหน่วยของโดพาเพิ่มขึ้น ความหนาและปริมาณสารที่เกาะบนพื้นผิวก็เพิ่มขึ้นตามไปด้วย แสดงให้เห็นว่าโดพามีบทบาทในการเกิดอันตรกิริยากับผิวของ TiO_2 นอกจากนี้ Dalsin และคณะได้เสนอกลไกการจับของหมู่ catechol ว่าเกิดจากพันธะระหว่างอะตอมออกซิเจนกับอะตอมไทเทเนียมที่ผิวของ TiO_2



รูปที่ 1.7 สารสังเคราะห์ที่มีกรดอะมิโนโดพา 1 – 3 หน่วยต่อกับพอลิเอทิลีนไกลคอล และกลไกการจับของหมู่คะทีคอลกับผิว TiO_2 เสนอโดย Dalsin และคณะ¹⁷

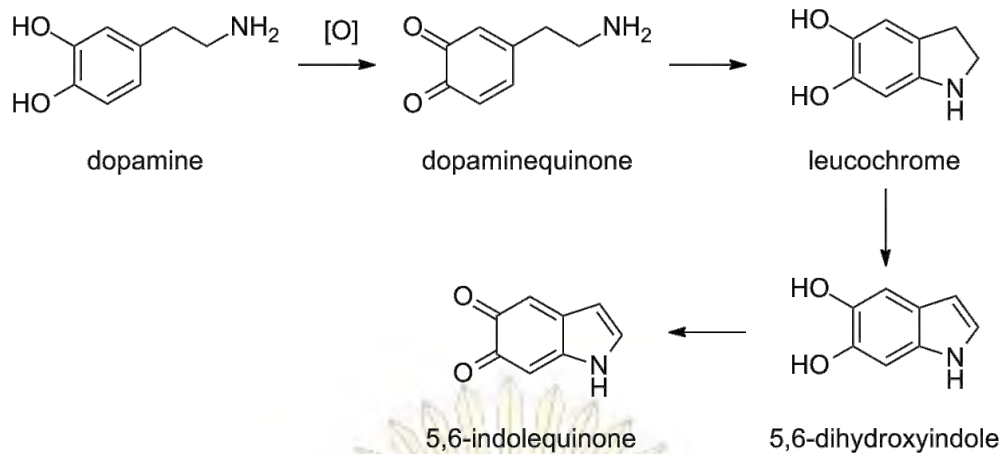
การศึกษาแรงกระทำระหว่างหมู่คะทีคอลกับพื้นผิวโดย Lee และคณะ¹⁸ ในปี 2006 โดยใช้เทคนิค atomic force microscopy พบว่าหมู่คะทีคอลสามารถเกิดอันตรกิริยาที่แข็งแกร่งกับผิว TiO_2 และพบว่าเมื่อออกซิไดซ์หมู่คะทีคอลให้เป็นหมู่ควิโนน (quinone) พบว่าความแข็งแกร่งในการจับกับพื้นผิวจะลดลง

สำหรับพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิม คาดว่าพอลิโดพามีนยึดเกาะบนผิวได้โดยการเกิดพันธะระหว่างอะตอมออกซิเจนของหมู่คะทีคอลกับเหล็กและโครเมียมที่ผิวหน้าของเหล็กกล้าไร้สนิมเช่นเดียวกัน โดยก่อนหน้านี้ Chen และคณะ¹⁹ ได้ศึกษาการยึดเกาะของโดพามีนบนอนุภาคนาโน Fe_2O_3 และได้เสนอรูปแบบการเข้าจับว่าหมู่คะทีคอลเข้าจับกับเหล็กที่ผิวของออกไซด์ในลักษณะไบเดนเทต (bidentate) (รูปที่ 1.8)



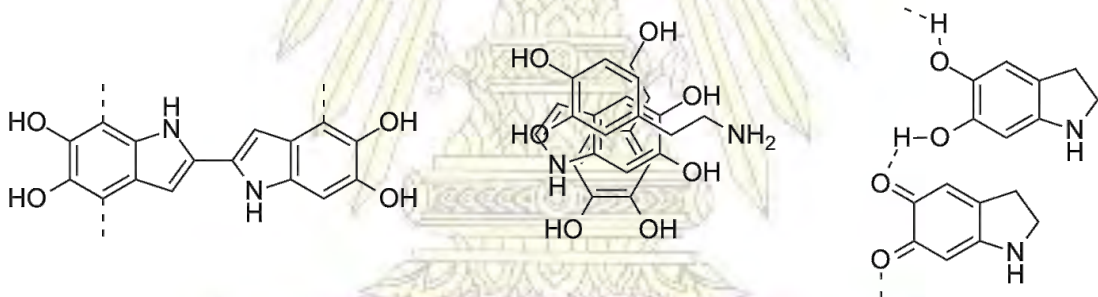
รูปที่ 1.8 การจับของโดพามีนกับอะตอมเหล็กของอนุภาคนาโน Fe_2O_3 เสนอโดย Chen และคณะ¹⁹

สำหรับการเกิดพอลิเมโรไซเคชันของโดพามีนเป็นพอลิโดพามีน การเกิดออกซิเดชันของโดพามีนเป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อปฏิกิริยา Lee และคณะ¹⁴ พบว่าหากทดลองภายใต้บรรยากาศ Ar แทนอากาศ การเกิดพอลิโดพามีนเกาะบนพื้นผิวจะเกิดขึ้นได้น้อย นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าตัวออกซิไดซ์ เช่น แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$) โซเดียมเพอร์ไอโอเดต (NaIO_4) สามารถเพิ่มอัตราการพอลิเมโรไซเคชันได้²⁰ ทั้งนี้การค้นพบดังกล่าวก็สอดคล้องกับการเสนอกฎพอลิเมโรไซเคชันของโดพามีนซึ่งเชื่อว่าคล้ายคลึงกับการเกิดเมลานิน^{14,21} โดยโดพามีนจะเกิดออกซิเดชันเป็นโดพามีนควิโนน (dopaminequinone) จากนั้นหมู่อะมิโนจะทำให้เกิดการปิดวงภายในโมเลกุล เกิดเป็นลิวโคโครม (leucochrome) และเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องจนเกิดสารมัธยันตร์ที่สำคัญ คือ 5,6-dihydroxyindole สารมัธยันตร์นี้ยังสามารถถูกออกซิไดซ์ต่อไปกลายเป็น 5,6-indolequinone ได้ (รูปที่ 1.9)



รูปที่ 1.9 กลไกการเกิดอินเทอร์มีเดียตต่าง ๆ ในการเกิดพอลิโดพามีน

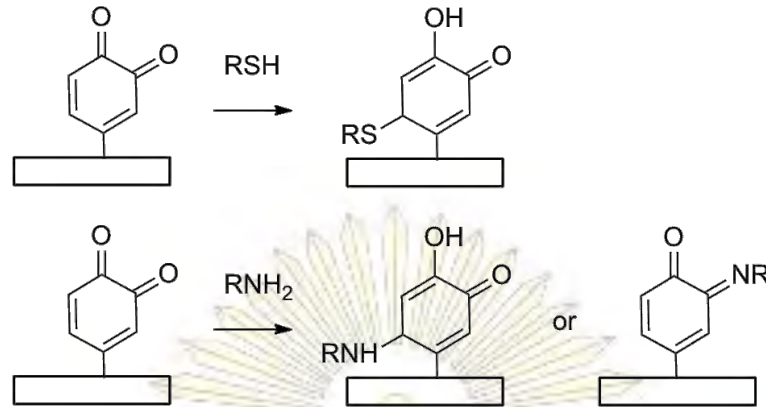
แม้จะมีการเสนอกกลไกการเกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ มากมาย แต่โครงสร้างที่แน่ชัดของพอลิโดพามีนก็ยังคงเป็นที่อภิปรายกันอย่างมากรวมถึงตัวอย่างเช่นโครงสร้างแบบต่าง ๆ ดังแสดงในรูปที่ 1.10 ซึ่งเสนอว่าเกิดขึ้นทั้งผ่านการเกิดพันธะโควาเลนต์เชื่อมระหว่างโมเลกุลเป็นโอลิโกเมอร์ (oligomer) และการรวมตัวกันทางกายภาพ (physical assembly) โดยแรงระหว่างโมเลกุลต่าง ๆ เช่น พันธะไฮโดรเจน อันตรกิริยาแบบไฟ-ไฟ เกิดเป็นกลุ่มของมอนอเมอร์ และกลุ่มของโอลิโกเมอร์ขนาดใหญ่ และรวมกลายเป็นพอลิเมอร์พอลิโดพามีนในที่สุด²²⁻²³



รูปที่ 1.10 โครงสร้างของไดเมอร์จากพันธะโควาเลนต์ (ซ้าย) และไตรเมอร์จากการรวมตัวกันทางกายภาพ (กลาง) เสนอโดย Hong และคณะ²² โครงสร้างจากการรวมตัวกันด้วยแรงระหว่างโมเลกุล (ขวา) เสนอโดย Dreyer และคณะ²³

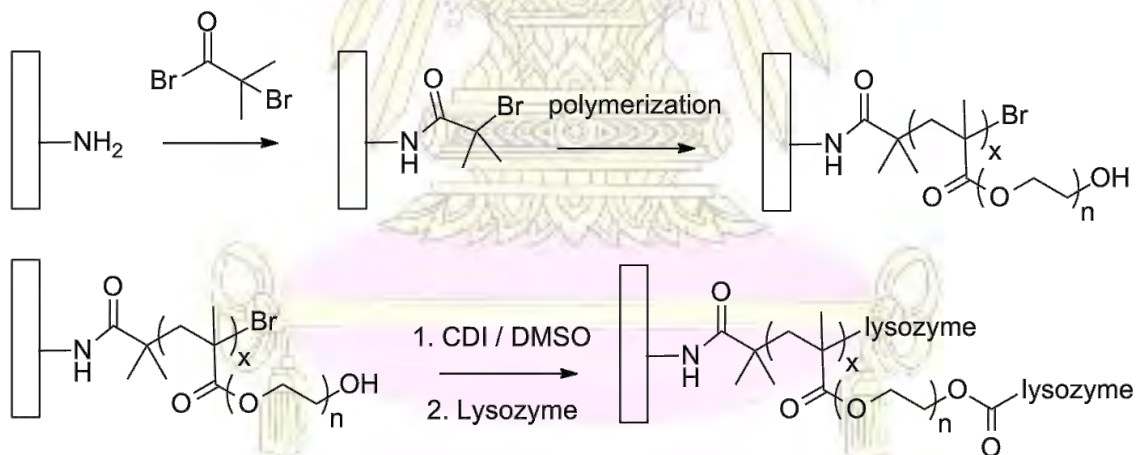
นอกจากความสะดวกในการตัดแปรพื้นผิวแล้ว พื้นผิวที่เคลือบด้วยโดพามีนยังมีหมู่ฟังก์ชันอินทรีย์ เช่น หมู่อะมิโน หมู่คาร์บอกซิล และหมู่ไฮดรอกซิล ที่สามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่นต่อไปได้ เช่น งานวิจัยจาก Lee และคณะ¹⁴ ได้รายงานการใช้พอลิโดพามีนทำปฏิกิริยาเพื่อตรึงสารประกอบต่าง ๆ ลงบนผิวมาตั้งแต่ปี 2007 โดยพบว่าพื้นผิวที่มีโดพามีนยึดเกาะสามารถรีดิวซ์ไอออนของโลหะทำให้เกิดเป็นชั้นของโลหะบนพื้นผิว¹⁴ ส่วนหมู่คาร์บอกซิลบนพื้นผิวสามารถทำปฏิกิริยากับสารประกอบกลุ่มไธออลและเอมีน^{14,24} จึงตรึงสารประกอบต่าง ๆ ลงไปได้ (รูปที่ 1.11) ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Zhang และคณะ²⁴ ได้ตรึงโปรตีนอัลบูมิน (albumin) ลงบน

พื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิมที่มีพอลิโดพามีน พบว่าโปรตีนที่ติดลงไปยังคงอยู่บนผิวแม้ว่าจะจุ่มวัสดุที่ได้ในน้ำ DI เป็นเวลา 30 วัน แสดงให้เห็นความเสถียรของพันธะที่เกิดขึ้น



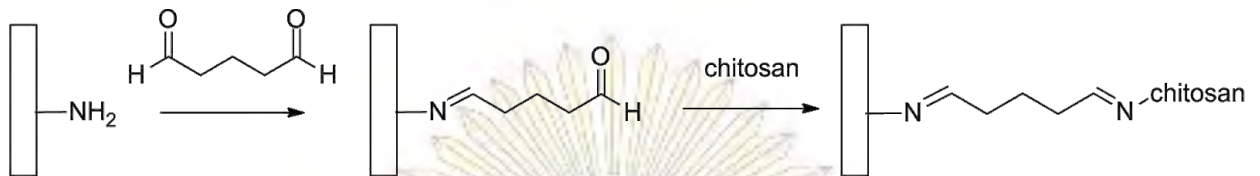
รูปที่ 1.11 ปฏิกิริยาของหมู่ควิโนนบนผิวกับไทออลและเอมีน

ส่วนหมู่อะมิโนของพอลิโดพามีนสามารถทำปฏิกิริยากับอิเล็กโทรไฟล์ต่าง ๆ ได้ ในปี 2011 Yuan และคณะ²⁵ ได้ติดโดพามีนบนพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิม และทำปฏิกิริยากับ bromoisobutyryl bromide สำหรับใช้เป็นสารเริ่มการเกิดพอลิเมอร์บนพื้นผิว แล้วนำไปเชื่อมต่อกับเอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme) (รูปที่ 1.12) สามารถพัฒนาพื้นผิวที่ยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ได้ดี



รูปที่ 1.12 แผนภาพการดัดแปรพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิมเพื่อตรึงเอนไซม์ไลโซไซม์ โดย Yuan และคณะ²⁵

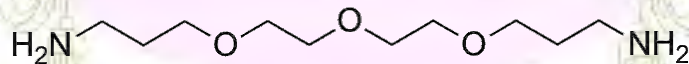
ในปี 2013 Yuan และคณะ²⁶ ได้ใช้ glutaraldehyde สำหรับตรึงไคโตซาน (chitosan) ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียลงบนพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิมที่มีพอลิโดพามีน โดยอาศัยหมู่แอลดีไฮด์ของ glutaraldehyde เป็นอิเล็กโทรไฟล์ทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนเกิดเป็น imine เชื่อมระหว่างพอลิโดพามีนกับไคโตซาน (รูปที่ 1.13) จากนั้นนำเอนไซม์ไลโซไซม์มาเชื่อมต่อกับไคโตซานเพื่อเพิ่มความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียได้พื้นผิวที่สามารถกำจัดเชื้อ *S. aureus* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ



รูปที่ 1.13 แผนภาพการตรึงไคโตซานโดยใช้ glutaraldehyde เชื่อมหมู่อะมิโนของพอลิโดพามีนกับหมู่อะมิโนของไคโตซาน โดย Yuan และคณะ²⁶

จากงานวิจัยต่าง ๆ ข้างต้น แสดงให้เห็นว่าพื้นผิวที่ยึดเกาะด้วยพอลิโดพามีนสามารถเกิดปฏิกิริยาสร้างพันธะโควาเลนต์เพื่อตรึงสารประกอบให้อยู่บนพื้นผิวได้อย่างหลากหลาย สามารถทำปฏิกิริยาทั้งกับนิวคลีโอไฟล์และอิเล็กโทรไฟล์ เพื่อตรึงสารประกอบที่ต้องการลงบนพื้นผิวได้

ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยต้องการจะอาศัยพอลิโดพามีนเป็นตัวสร้างหมู่ฟังก์ชันอินทรีย์บนผิววัสดุ สำหรับสารที่มีหมู่อะมิโนที่สนใจคือสารประกอบ 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine (รูปที่ 1.14) เนื่องจากก่อนหน้านี้ภายในกลุ่มวิจัยได้มีการทดลองตรึงสารประกอบนี้บนผิวของผ้าซึ่งเป็นเซลลูโลส พบว่าผ้าดัดแปรผิวนี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้²⁷ งานวิจัยนี้จึงสนใจจะตรึงสารประกอบ 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine บนพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิมซึ่งเป็นอีกวัสดุที่มีความสำคัญ โดยอาศัยพอลิโดพามีนเป็นตัวสร้างหมู่ฟังก์ชันอินทรีย์บนผิวโลหะเพื่อเป็นจุดเชื่อมต่อกับสารประกอบอินทรีย์ที่มีหมู่อะมิโน โดยมีเป้าหมายเพื่อพัฒนาเหล็กกล้าไร้สนิมที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

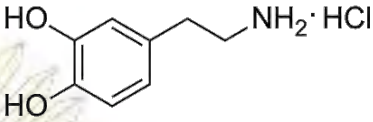
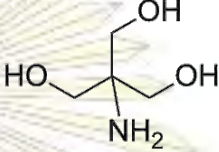
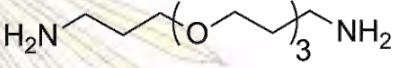
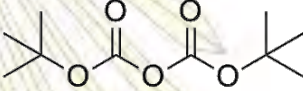
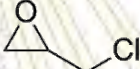

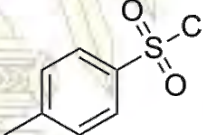
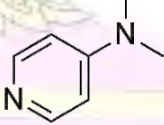
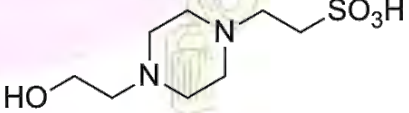


รูปที่ 1.14 โครงสร้างของ 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine

บทที่ 2

การทดลอง

2.1 สารเคมี

Dopamine hydrochloride	
2-Amino-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol (Tris)	
4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine (TTD)	
Di-tert-butyl dicarbonate (Boc ₂ O)	
Epichlorohydrin	
Glycidol	
Tosyl chloride	
<i>N,N'</i> -dimethyl-4-aminopyridine (DMAP)	
4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)	
30 % hydrogenperoxide (H ₂ O ₂)	
Hydrochloric acid (HCl)	
Sulfuric acid (H ₂ SO ₄)	
Sodium Chloride (NaCl)	
Sodium hydroxide (NaOH)	
Sodium sulfate (Na ₂ SO ₄)	

Acetate buffer pH 5.0

Borate buffer pH 8.5

Carbonate buffer pH 11.0

1,4-dioxane

Acetone

Chloroform-D (CDCl_3)

Dichloromethane (CH_2Cl_2)

Ethanol

Ethyl acetate (EtOAc)

Hexanes

Isopropanol

Methanol

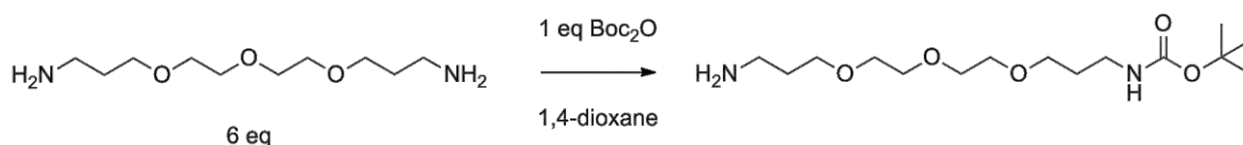
Ninhydrin

Triethylamine (Et_3N)

2.2 วัสดุและเครื่องมือ

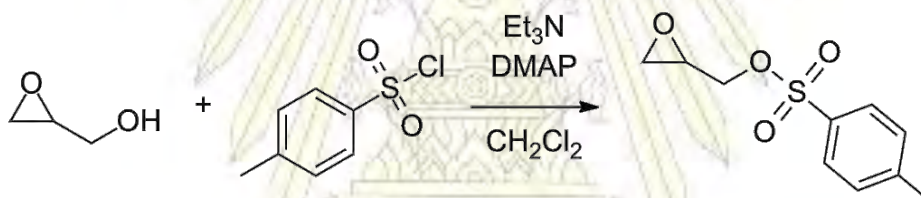
1. แผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 316 หน้า 1 mm ซื้อจากบริษัทไทยแสงเจริญโลหะจำกัด ตัดเป็นแผ่นขนาด $1 \times 1 \text{ cm}^2$ ด้วยเครื่องตัดที่หน่วยเครื่องกล คณะวิทยาศาสตร์
2. แผ่น thin layer chromatography (TLC) แบบซิลิกาเจล 60 F254 จาก Merck
3. ซิลิกาเจล SiliaFlash[®] ขนาด 40-63 μm ยี่ห้อ Silicycle
4. เครื่องเขย่าสารยี่ห้อ IKA รุ่น KS 130 basic ใช้สำหรับเขย่าสารละลายเพื่อทำปฏิกิริยาบนพื้นผิว หรือ ล้างสารออกจากผิวเหล็กกล้าไร้สนิม โดยเขย่าที่ 160 รอบต่อนาที
5. เครื่อง hot plate stirrer ยี่ห้อ HL Instrument รุ่น HS-115 ใช้คนสารละลายขณะสังเคราะห์สาร
6. เครื่อง rotary evaporator ยี่ห้อ EYELA รุ่น N-1000 และเครื่องทำสุญญากาศ WJ-20 ยี่ห้อ Interss Taiwan ใช้ระเหยตัวทำละลาย
7. เครื่อง Varian Mercury 400 Plus NMR spectrometer ใช้พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค ^1H NMR spectroscopy

2.3 การสังเคราะห์ *N*-*tert*-butoxycarbonyl-4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine (TTDBoc)



ละลาย 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine (TTD) 9.0 mL (41 mmol) ด้วย 1,4-dioxane 40 mL ใส่ขวดก้นกลมที่แช่อยู่ในอ่างน้ำที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นละลาย Boc₂O 1.4588 g (6.7 mmol) ใน 1,4-dioxane 30 mL แล้วค่อยๆ หยดสารละลาย Boc₂O ที่ได้ในสารละลายไดเอมีนโดยใช้ addition funnel พร้อมคนสารละลายอย่างสม่ำเสมอ ใช้เวลาหยด 2.5 ชั่วโมง คนสารละลายผสมในขวดก้นกลมต่อไปที่อุณหภูมิห้อง 14 ชั่วโมง ระบายตัวทำละลายออก ละลายสารที่ได้ด้วย EtOAc 60 mL แล้วล้างด้วยสารละลาย NaCl อิ่มตัว 3 ครั้ง ครั้งละ 30 mL ทำชั้นสารอินทรีย์ให้แห้งด้วย Na₂SO₄ แล้วระบายตัวทำละลายออก ได้ผลิตภัณฑ์เป็นของเหลวสีเหลืองอ่อน (1.8104 g, 5.6 mmol, 84 %) TLC ในตัวทำละลาย EtOAc ย้อมด้วย นินไฮดริน มีค่า R_f = 0.61 ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.15 (s, 1H), 3.79 – 3.46 (m, 12H), 3.22 (d, J = 3.2 Hz, 2H), 2.80 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 1.74 (m, 4H), 1.50 (s, 2H), 1.44 (s, 9H)

2.4 การสังเคราะห์ glycidyl tosylate



ละลาย glycidol 1.0 mL (15 mmol) ใน CH₂Cl₂ 15 mL เติม triethylamine 4.2 mL (30 mmol) และ *N,N'*-dimethyl-4-aminopyridine 0.0092 g (0.075 mmol) ทำให้สารละลายผสมเย็นในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นค่อยๆ หยดสารละลาย tosyl chloride 2.9568 g (15.5 mmol) ใน CH₂Cl₂ 15 mL ลงในสารละลายนี้ คนสารละลายผสมที่ได้ภายใต้บรรยากาศ Ar ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายกรด HCl 1 M 20 mL จะเกิดการแยกชั้น นำมาใส่ในกรวยแยกแล้วเก็บชั้นสารอินทรีย์ไว้ จากนั้นนำส่วนชั้นน้ำมาสกัดด้วย CH₂Cl₂ 3 ครั้ง ครั้งละ 20 mL แล้วนำส่วนชั้นสารอินทรีย์ที่ได้ทั้งหมดมารวมกัน ทำให้แห้งด้วย Na₂SO₄ ระบายตัวทำละลายออก แยกสารที่ได้ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้ซิลิกาเป็นวัสดุภาคนี้ และใช้ระบบตัวทำละลาย 10% – 50% EtOAc-hexane ได้ผลิตภัณฑ์เป็นของเหลวใส ไม่มีสี (2.4693 g, 10.8 mmol, 72 %) TLC ในตัวทำละลาย 50 % EtOAc-hexane ส่องด้วยแสง UV 254 nm มีค่า R_f 0.53 ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.80 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.36 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 4.26 (dd, J = 11.4, 3.3 Hz, 1H), 3.95 (dd, J = 11.4, 6.0 Hz, 1H), 3.19 (m, , 1H), 2.81 (t, J = 4.3 Hz, 1H), 2.59 (dd, J = 4.3, 2.6 Hz, 1 H), 2.45 (s, 3H)

2.5 การหาค่า pH ที่เหมาะสมกับการเกิดพอลิเมอร์ของโดพามีน

ละลาย dopamine hydrochloride ในสารละลายบัฟเฟอร์ ให้มีความเข้มข้นของโดพามีนเป็น 1 mg/mL และบัฟเฟอร์ต่างๆ เข้มข้น 0.1 M โดยใช้บัฟเฟอร์ที่แตกต่างกัน 5 ชนิด ได้แก่

1. acetate buffer pH 5.0
2. HEPES buffer pH 7.0
3. borate buffer pH 8.5
4. Tris buffer pH 8.5
5. carbonate buffer pH 11

จากนั้นปิดฝา และเขย่าภาชนะ 160 รอบต่อนาที สังเกตสีของสารละลายเริ่มต้น และที่เวลา 1, 6 และ 24 ชั่วโมง

2.6 การเตรียมพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิม

ขัดแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมขนาด $1 \times 1 \text{ cm}^2$ ด้วยกระดาษทรายน้ำหมายเลข 1200 จากนั้นล้างพื้นผิว โดยนำเหล็กกล้าไร้สนิมที่ขัดแล้วมาแช่และเขย่า 160 รอบต่อนาทีในน้ำ DI อะซิโตน เอทานอล และน้ำ DI ตามลำดับ ครั้งละ 5 นาที เตรียมสารละลายปิรันยา (piranha solution) จากกรดซัลฟิวริกเข้มข้นและสารละลาย 30% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในอัตราส่วน 3:1 โดยปริมาตร โดยภาชนะจุ่มอยู่ในน้ำเพื่อระบายความร้อน จุ่มแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมที่ล้างแล้วในสารละลายปิรันยา 30 นาที นำมาล้างด้วยน้ำ DI ปริมาณมาก 3 ครั้ง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เรียกเหล็กกล้าไร้สนิมที่ได้ว่า SS

2.7 การเคลือบโดพามีนบนพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิม

จุ่มแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมในจาน Petri dish ที่มีสารละลาย dopamine hydrochloride 0.5 mg/mL ในบัฟเฟอร์ Tris 0.1 M pH 8.5 ปิดฝา เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำ DI 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เรียกเหล็กกล้าไร้สนิมดัดแปรที่ได้ว่า SS-PD

2.8 การตรึงสารประกอบที่มีหมู่อะมิโนลงบนพื้นผิว

ตรึงสารประกอบ TTD บนผิว โดยนำแผ่น SS-PD มาจุ่มในสารละลาย TTD 25 mM (5.5 mg/mL) ในบัฟเฟอร์ Tris 0.01 M pH 8.5 เขย่าที่ 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำ DI 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เรียกเหล็กกล้าไร้สนิมดัดแปรที่ได้ว่า **SS-PD-TTD**

ตรึงสารประกอบ TTDBoc บนผิว โดยนำแผ่น SS-PD มาจุ่มในสารละลาย TTDBoc 25 mM (8.0 mg/mL) ในบัฟเฟอร์ Tris 0.01 M pH 8.5 เขย่าที่ 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำ DI 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เรียกเหล็กกล้าไร้สนิมดัดแปรที่ได้ว่า **SS-PD-TTDBoc**

นอกจากนี้ได้เตรียมชุดควบคุม โดยนำแผ่น SS-PD มาจุ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris 0.01 M pH 8.5 เขย่าที่ 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำ DI 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เรียกเหล็กกล้าไร้สนิมดัดแปรที่ได้ว่า **SS-PD-Tris**

2.9 การวัดมุมสัมผัสน้ำ (water contact angle)

ใช้เครื่อง DataPhysics รุ่น OCA40 วัดมุมสัมผัสน้ำด้วยเทคนิค sessile drop หยดน้ำ DI 1.000 μL ลงบนตัวอย่าง ใช้กล้องกำลังขยาย 2.5 เท่าบันทึกภาพ คำนวณมุมสัมผัสของหยดน้ำด้วยโปรแกรม SCA202 Version 3.51.6 build190 ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการหยดน้ำบนตัวอย่าง 3 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 3 จุด

2.10 การพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค ATR-FTIR spectroscopy

ใช้เครื่อง Nicolet 6700 FT-IR Spectrophotometer วิเคราะห์ตัวอย่างเหล็กกล้าไร้สนิมด้วยเทคนิค ATR โดยวิเคราะห์ 256 ซ้ำ วัดสเปกตรัมของตัวอย่าง 3 แผ่น ประมวลผลด้วยโปรแกรม OMNIC รายงานเป็นสเปกตรัมเฉลี่ย

2.11 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยทดสอบกับ *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) และ *Escherichia coli* (ATCC 8739) เตรียมเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น 1 % โดยปริมาตร จาก stock ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (nutrient broth) เขย่าด้วยเครื่อง shaker ที่อุณหภูมิ 37 °C จนกระทั่งมีค่า OD₆₂₀ อยู่ในช่วง 0.3 – 0.7 นำสารแขวนลอยแบคทีเรีย (bacterial suspension) ที่ได้มาเจือจางด้วยสารละลาย 0.85 % normal saline (NSS) ให้มีความเข้มข้น 1×10^7 CFU/mL แล้วนำมาหยดบนพื้นผิวดตัวอย่างใน 12-well plate ตัวอย่างละ 1 mL นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง คีบตัวอย่าง และ

ดูดสารแขวนลอยแบคทีเรียบนพื้นผิวใส่ลงในสารละลาย NSS 9 mL จากนั้นเจือจางสารละลายที่ได้ครั้งละ 10 เท่า โดยดูดสารละลายดังกล่าว 50 μ L ใส่ลงในสารละลาย NSS 450 μ L ทำซ้ำจนได้สารละลายเจือจางตั้งแต่ 1, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} เท่า นำสารละลายทุก ๆ การเจือจาง มาหยดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (nutrient agar) จุดละ 5 μ L แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีแบคทีเรียที่พบ แล้วนำมาคำนวณกลับเป็นค่า CFU (colony forming unit) ของแบคทีเรียที่รอดชีวิตภายหลังการสัมผัสพื้นผิว



บทที่ 3

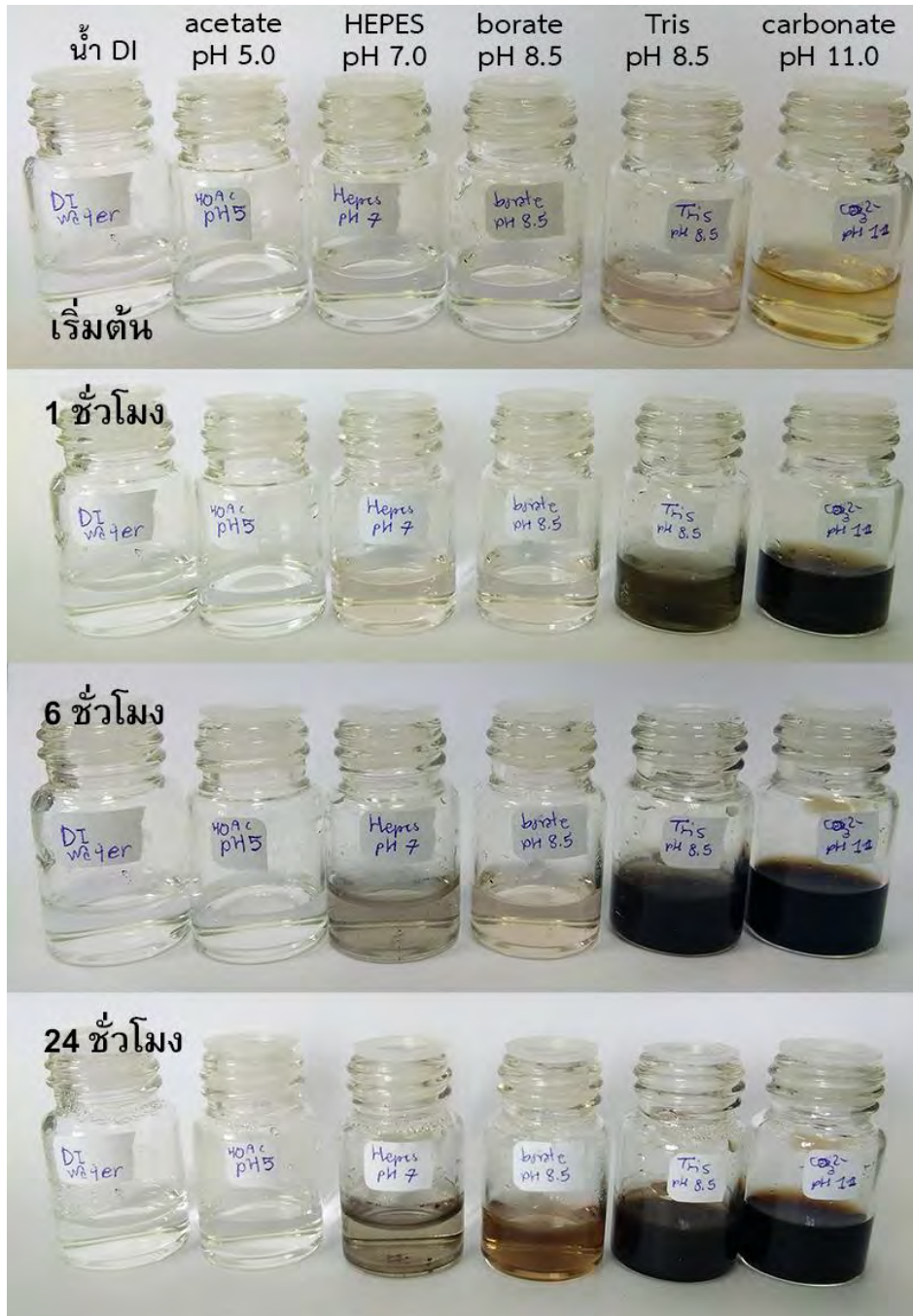
ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

การทดลองประกอบด้วยการทดสอบการพอลิเมอไรเซชันของโดพามีนที่ pH ต่างๆ จากนั้นจะนำแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมมาดัดแปรผิวด้วยพอลิโดพามีน จากนั้นจะทำปฏิกิริยาเพื่อตรึงสารประกอบ 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine (TTD) และอนุพันธ์ที่มีหมู่ปกป้อง Boc (TTDBoc) ลงบนพื้นผิว ติดตามการเปลี่ยนแปลงของพื้นผิวด้วยเทคนิคการวัดมุมสัมผัสน้ำและเทคนิค ATR-FTIR spectroscopy จากนั้นนำพื้นผิวที่ได้มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli*

3.1 การหาค่า pH ที่เหมาะสมกับการเกิดพอลิเมอไรเซชันของโดพามีน

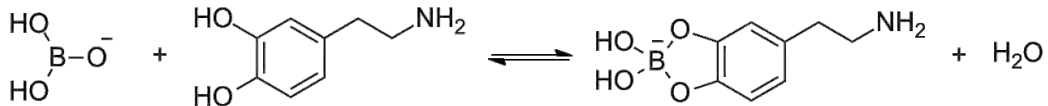
หาค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการเกิดพอลิเมอไรเซชันของโดพามีนโดยเปลี่ยนค่า pH ตั้งแต่ 5 – 11 โดยใช้บัฟเฟอร์ 5 ชนิด ได้แก่ acetate buffer pH 5.0, HEPES buffer pH 7.0, Tris buffer pH 8.5, borate buffer pH 8.5, และ carbonate buffer pH 11.0 และใช้ความเข้มข้นของโดพามีน 1 mg/mL จะเลือกบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมโดยสังเกตการเกิดพอลิเมอไรเซชันของโดพามีน ซึ่งสามารถบอกได้จากการเปลี่ยนสีของสารละลาย หากเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันขึ้น สารละลายจะเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลโดยพบความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับปริมาณที่ติดได้^{14,20,28} ดังนั้น สภาวะที่สนใจจึงเป็นสภาวะที่มีการเปลี่ยนสีได้เข้มที่สุด

จากรูปที่ 3.1 ในสารละลาย Tris buffer pH 8.5 และ carbonate buffer pH 11.0 จะเห็นการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายอย่างรวดเร็วตั้งแต่ช่วงเริ่มต้น โดยเห็นเป็นสีส้มอ่อนและสีเหลืองตามลำดับ ขณะที่สารละลายอื่น ๆ ยังคงไม่มีการเปลี่ยนสี เมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง สารละลายโดพามีนใน Tris buffer และ carbonate buffer เปลี่ยนสีเป็นสีเทา พร้อมกับเกิดตะกอนสีดำขนาดเล็ก แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันของพอลิโดพามีนขึ้น และสารละลายทั้งสองนี้มีสีเข้มขึ้นจนเป็นสีดำเมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง สำหรับสารละลาย HEPES buffer pH 7.0 เปลี่ยนสีเป็นสีส้มอ่อนที่เวลา 1 ชั่วโมง และเมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง เปลี่ยนเป็นสีเทาพร้อมเกิดตะกอน แสดงว่าปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันยังคงเกิดได้ที่ pH 7.0 แต่เกิดช้ากว่าใน Tris buffer และ carbonate buffer ขณะที่ในสารละลาย pH 5 ไม่พบการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายแม้ว่าเวลาจะผ่านไป 24 ชั่วโมง แสดงว่าไม่เกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันของโดพามีน



รูปที่ 3.1 น้ำ DI และสารละลายโศพามีนในบัฟเฟอร์ 5 ชนิด ได้แก่ acetate buffer pH 5.0, HEPES buffer pH 7.0, borate buffer pH 8.5, Tris buffer pH 8.5 และ carbonate buffer pH 11 ตามลำดับ ที่ช่วงเวลาเริ่มต้น และเมื่อเวลาผ่านไป 1, 6 และ 24 ชั่วโมง

โศพามีนใน borate buffer เกิดปฏิกิริยาช้ากว่าในสารละลาย pH 7.0 แม้ว่าสารละลายจะเป็นเบสมากกว่า ที่ 1 ชั่วโมงไม่พบการเปลี่ยนแปลงสีเลย เมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง สังเกตเห็นเป็นเพียงสีส้มอ่อน และเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล การเกิดปฏิกิริยาที่ช้ากว่านี้อธิบายได้ด้วยการจับของ borate กับอะตอมออกซิเจนทั้งสองของโศพามีน²⁹ (รูปที่ 3.2) การเกิดออกซิเดชันของโศพามีนจึงถูกยับยั้ง

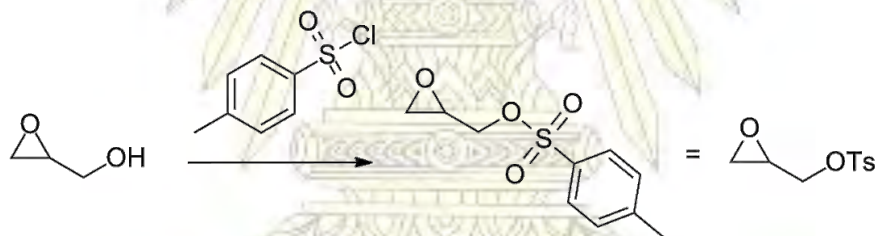


รูปที่ 3.2 การจับของกรดบอริกกับโดพามีน

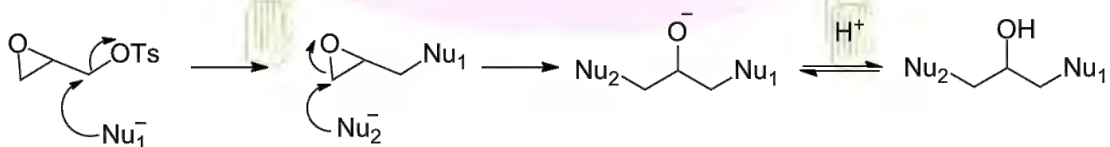
จากผลการทดลองข้างต้น สรุปได้ว่าปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันของโดพามีนเกิดได้ดีในภาวะที่เป็นเบสและไม่เกิดในภาวะกรด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้^{20,28} ส่วน borate buffer สามารถจับกับโดพามีนได้จึงเกิดปฏิกิริยาได้ช้า จึงได้เลือกใช้บัฟเฟอร์ Tris pH 8.5 เป็นบัฟเฟอร์สำหรับการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันของโดพามีน เนื่องจากไม่จำเป็นต้องใช้ค่า pH สูงถึง 11 ก็สามารถเกิดพอลิเมอไรเซชันได้ไม่แตกต่างกันมากนัก

3.2 การสังเคราะห์ glycidyl tosylate

ในช่วงแรกผู้วิจัยวางแผนจะใช้สารกลุ่มอีพอกไซด์ที่สามารถทำปฏิกิริยากับนิวคลีโอไฟล์ได้สองด้านเพื่อเชื่อมระหว่างหมู่อะมิโนบนพื้นผิวกับหมู่อะมิโนของ TTD ผู้วิจัยได้สังเคราะห์ glycidyl tosylate ขึ้นจาก glycidol โดยทำปฏิกิริยากับ tosyl chloride (รูปที่ 3.3) สารประกอบนี้มีหมู่ tosyl เป็นหมู่หลุดออกที่ดี เกิดการแทนที่ด้วยนิวคลีโอไฟล์ได้ ขณะที่อีกด้านหนึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาเปิดวงอีพอกไซด์ทำให้ glycidyl tosylate เป็นสารที่สามารถทำปฏิกิริยากับนิวคลีโอไฟล์ได้สองด้าน (รูปที่ 3.4)

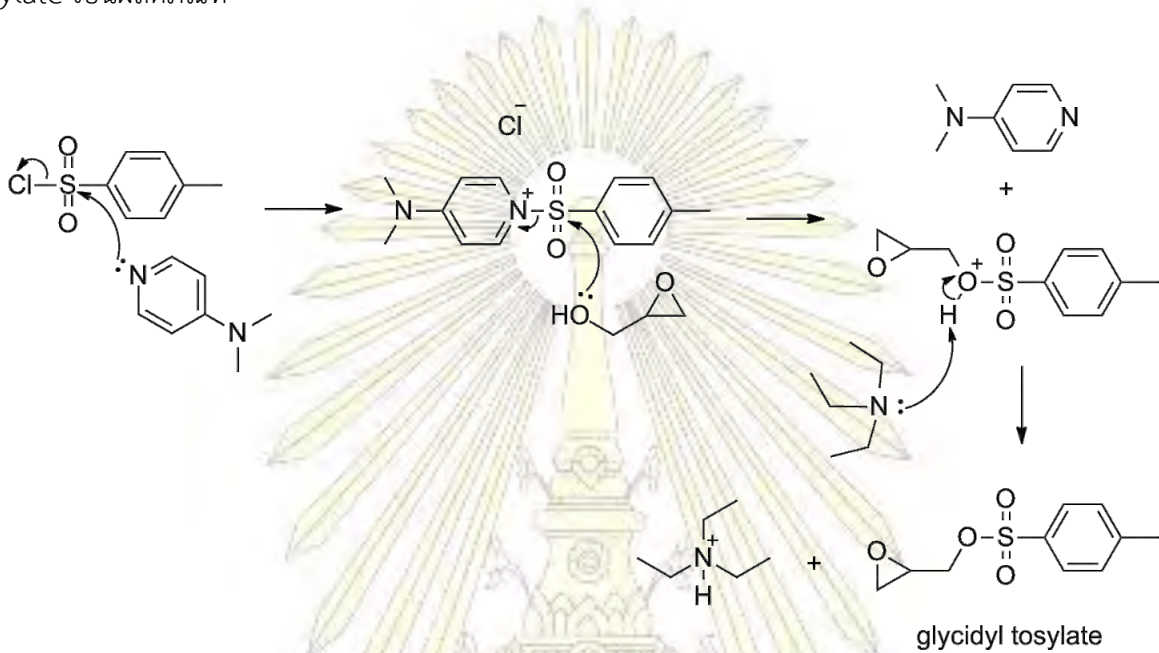


รูปที่ 3.3 แผนภาพการสังเคราะห์ glycidyl tosylate จาก glycidol



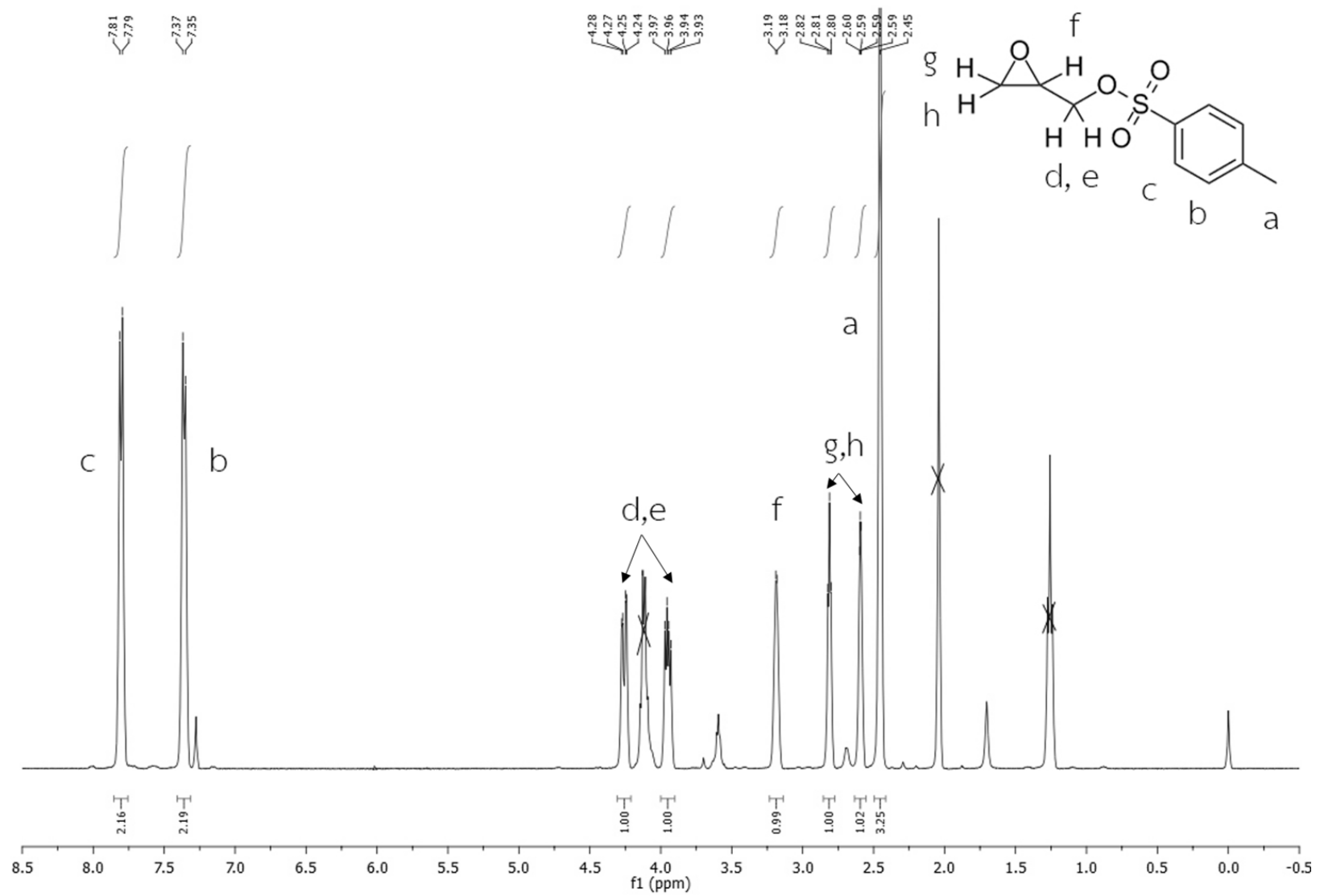
รูปที่ 3.4 การทำปฏิกิริยากับนิวคลีโอไฟล์ที่ทั้งสองด้านของ glycidyl tosylate

ปฏิกิริยา tosylation เป็นปฏิกิริยาการแทนที่ Cl^- ของ tosyl chloride ด้วยออกซิเจนของแอลกอฮอล์ ในการทดลองนี้ใช้ DMAP ช่วยเร่งปฏิกิริยาการแทนที่ของ glycidol เกิดผ่านกลไกดังแสดงในรูปที่ 3.5 ปฏิกิริยาเริ่มต้นจากไนโตรเจนที่วงไพริมิดีนของ DMAP ซึ่งเป็นนิวคลีโอไฟล์ที่ดี เข้าทำปฏิกิริยากับ tosyl chloride เกิดเป็นเกลือไพริดีเนียมที่มีประจุบวก จากนั้นหมู่ไฮดรอกซิลของ glycidol จะเป็นนิวคลีโอไฟล์เข้าแทนที่อีกครั้งโดยมี DMAP เป็นหมู่หลุดออก โมเลกุล DMAP ที่หลุดออกมาจะสามารถกลับไปทำปฏิกิริยากับ tosyl chloride โมเลกุลอื่นได้ใหม่ ส่วน Et_3N ที่อยู่ในระบบจะทำหน้าที่เป็นเบส ดึงโปรตอนออกจากอะตอมออกซิเจน ได้ glycidyl tosylate เป็นผลิตภัณฑ์



รูปที่ 3.5 กลไกการทำปฏิกิริยาระหว่าง glycidol กับ tosyl chloride โดยมี DMAP เร่งปฏิกิริยา

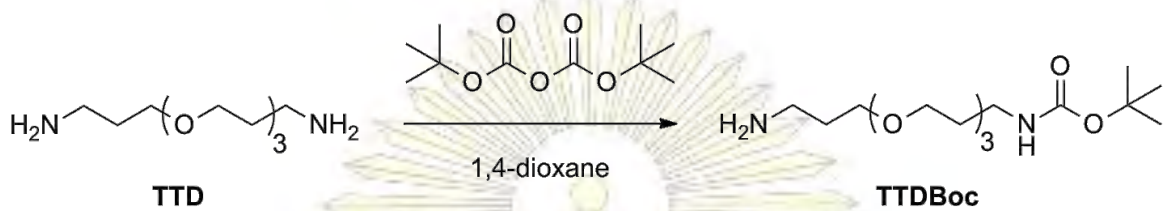
สเปกตรัม ^1H NMR ที่ได้ (รูปที่ 3.6) สอดคล้องกับที่เคยมีรายงานไว้³⁰ มีสัญญาณอะโรมาติกเป็น doublet 2 พีคที่ δ 7.36 และ 7.80 ppm แต่ละสัญญาณสอดคล้องกับโปรตอนจำนวน 2 โปรตอน พีคที่ 7.80 มาจากโปรตอนตำแหน่ง c ซึ่งอยู่ตำแหน่ง ortho กับหมู่ดึงอิเล็กตรอน $\text{S}=\text{O}$ ทำให้ deshield มากกว่าโปรตอนตำแหน่ง b สำหรับพีค doublet of doublet ที่ δ 3.95 และ 4.26 เป็นพีคของโปรตอน d และ e โปรตอนบนคาร์บอนนี้ปรากฏเป็น 2 พีค เนื่องจากทั้งสองโปรตอนเป็น diastereotopic proton กัน ทำให้มีความแตกต่างของสภาพแวดล้อมรอบโปรตอน ส่วนสัญญาณ 3 สัญญาณที่ δ 3.19 2.81 และ 2.59 ppm มาจากโปรตอน 3 โปรตอนของวงอีพอกไซด์ พีคที่ 3.19 ppm มาจากโปรตอน f ซึ่ง downfield เนื่องจากอยู่ใกล้กับอะตอมออกซิเจนของหมู่ tosyl มากกว่า และให้พีคที่ซับซ้อนเนื่องจากเกิดการแยกของสัญญาณเนื่องจากโปรตอนรอบข้างจำนวนมาก (d, e, g, และ h) ส่วนสัญญาณที่ 2.81 และ 2.59 ppm มาจากโปรตอนตำแหน่ง CH_2 ของวงอีพอกไซด์ (g, h) ปรากฏเป็นสองสัญญาณแยกกันเนื่องจากเป็น diastereotopic proton ที่อยู่ในวงสามเหลี่ยม นอกจากนี้ยังมีพีค singlet 3 โปรตอน ที่ 2.45 ppm สอดคล้องกับหมู่ CH_3 ที่ติดกับวงอะโรมาติก



รูปที่ 3.6 สเปกตรัม ^1H NMR ของ glycidyl tosylate

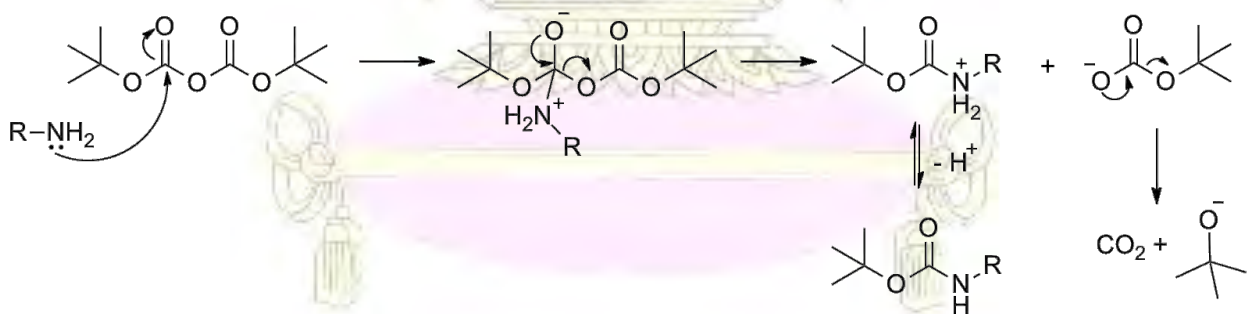
3.3 การสังเคราะห์ TTDBoc

เพื่อศึกษาว่าหมู่เอมีโนอิสระบนพื้นผิว กับหมู่เอมีโนที่ถูกดัดแปรจะมีผลต่อความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียหรือไม่ ผู้วิจัยจึงนำไดเอมีน TTD มาติดหมู่ปกป้อง *tert*-butoxycarbonyl หรือหมู่ Boc ที่ปลายด้านหนึ่ง (รูปที่ 3.7) จะเรียกรวมสารประกอบที่ได้ว่า TTDBoc จากนั้นนำสารที่ได้มาติดบนพื้นผิว และจะนำพื้นผิวที่ตรง TTDBoc มาทดสอบการยับยั้งเชื้อเปรียบเทียบกับพื้นผิวที่ตรง TTD ลงไป



รูปที่ 3.7 แผนภาพการสังเคราะห์ TTDBoc

ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ TTDBoc เป็นปฏิกิริยาติดหมู่ปกป้อง Boc ไปที่หมู่เอมีโนของสารตั้งต้น Boc_2O เป็นสารในกลุ่มแอนไฮไดรด์ (acid anhydride) จึงมีความว่องไวในการทำปฏิกิริยากับนิวคลีโอไฟล์ซึ่งในที่นี้คือหมู่เอมีโนของ TTD เมื่อคาร์บอนิลคาร์บอนของ Boc_2O ถูกชนด้วยไนโตรเจนจากเอมีน เกิดปฏิกิริยาการแทนที่โดยมีหมู่คาร์บอกซิลซึ่งเป็นหมู่หลุดออกที่ดีหลุดออกไป ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะเป็นสารประกอบในรูปคาร์บาเมต (carbamate) ซึ่งมีความว่องไวต่ำ และมีผลิตภัณฑ์ข้างเคียงเป็นไอออน *tert*-butoxide และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (รูปที่ 3.8)



รูปที่ 3.8 กลไกการทำปฏิกิริยาระหว่างเอมีนและ Boc_2O

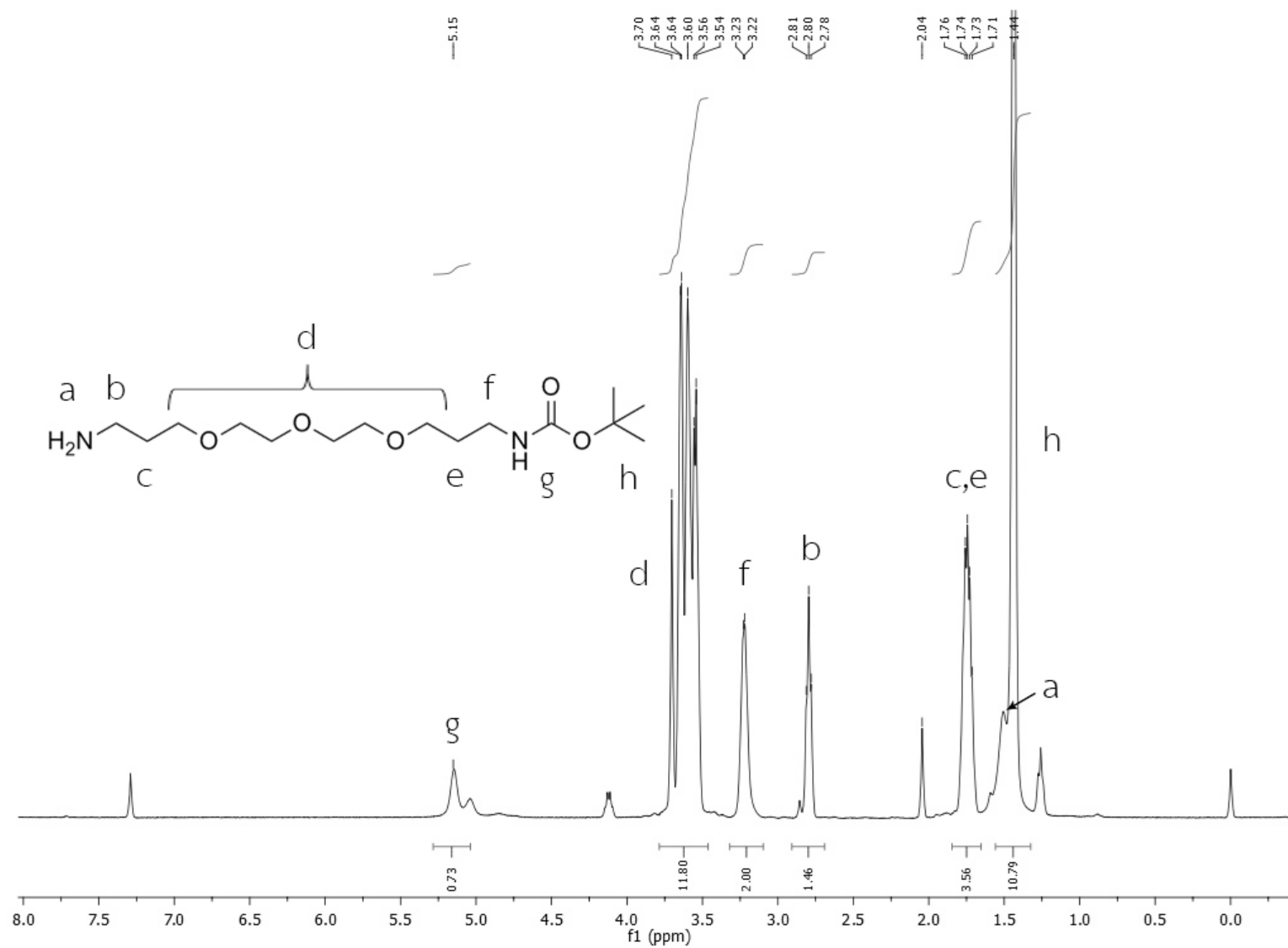
เนื่องจากสารตั้งต้นที่ใช้มีหมู่เอมีโนที่เหมือนกันสองด้าน จึงต้องมีการควบคุมให้เกิดปฏิกิริยาเพียงด้านเดียว โดยใช้ปริมาณของ TTD ให้มีจำนวนโมลมากกว่า Boc_2O มาก และควบคุมให้ในระบบมีความเข้มข้นของ Boc_2O ต่ำ จึงต้องค่อย ๆ เติมสารละลาย Boc_2O ลงในระบบเพื่อป้องกันการทำปฏิกิริยากับหมู่เอมีโนสองด้าน

การทดลองสังเคราะห์สารนี้ครั้งแรก ใช้วิธีค่อย ๆ หยดสารละลาย Boc₂O โดยใช้หลอดหยด พบว่าได้ผลิตภัณฑ์เป็นไดเอมีนที่มีหมู่ Boc ปกป้องที่ปลายอะมิโนทั้งสองด้าน (BocTTDBoc) การทำปฏิกิริยาสองด้านอาจเกิดจากอัตราการหยดสูงเกินไปทำให้มีความเข้มข้นของ Boc₂O ในสารละลายมาก ไดเอมีนที่ทำปฏิกิริยากับ Boc₂O ครั้งหนึ่งแล้วจึงทำปฏิกิริยากับ Boc₂O อีกโมเลกุลที่อยู่ใกล้เคียงด้วย เมื่อแก้ไขโดยปรับลดอัตราการหยดให้ช้าลง ใช้วิธีค่อย ๆ หยดสารละลายของ Boc₂O ด้วย addition funnel เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง สามารถสังเคราะห์สารผลิตภัณฑ์เป็นไดเอมีนที่มีหมู่ Boc ปกป้องเพียงด้านเดียวตามต้องการ

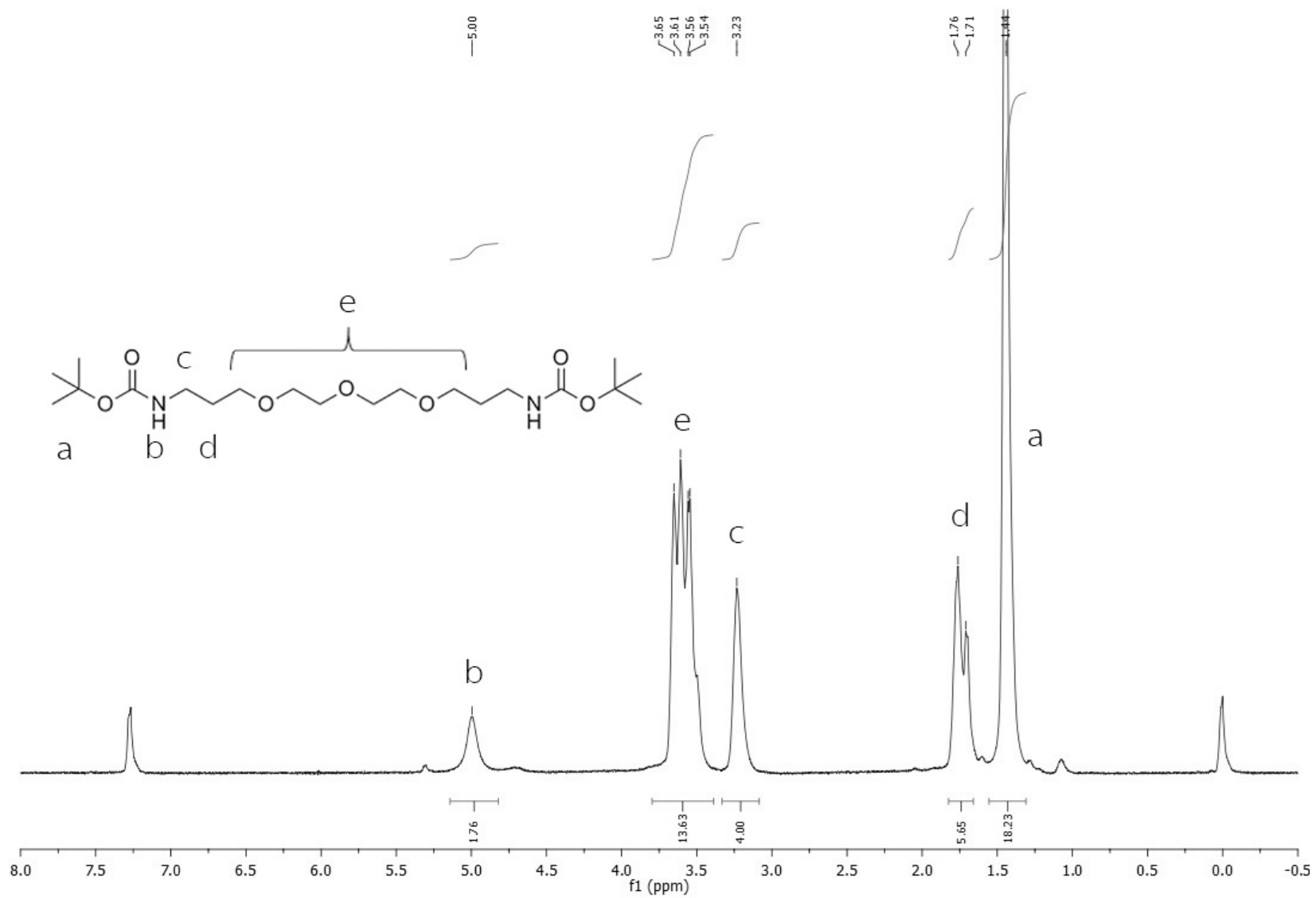
สเปกตรัม ¹H NMR ของ TTDBoc (รูปที่ 3.9) สอดคล้องกับที่เคยมีการรายงานไว้³¹ โดยจะเห็นสัญญาณ singlet 9 โปรตอนจากหมู่ *tert*-butyl ได้ชัดเจนที่ δ 1.44 ppm นอกจากนี้ยังมีสัญญาณ broad ที่ δ 1.50 ppm จากโปรตอนของหมู่อะมิโน ทำให้อินทิเกรชันบริเวณนี้รวมกันเป็น 11 โปรตอน พิค multiplet ที่ δ 1.74 ppm มาจากสัญญาณของโปรตอน c และ e ซึ่งอยู่บนคาร์บอนที่ไม่ติดกับเฮเทอโรอะตอมเลย (-CH₂CH₂CH₂-) สัญญาณตำแหน่งนี้สอดคล้องกับโปรตอน 4 โปรตอน อาจเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมของโปรตอนที่ตำแหน่งนี้ไม่แตกต่างกันมากนักระหว่างปลายสองด้าน พิค triplet 2 โปรตอนที่ δ 2.80 ppm มาจากโปรตอน b บนคาร์บอนที่ติดกับหมู่อะมิโนอิสระ (-CH₂NH₂) ส่วนสัญญาณ 2 โปรตอนที่ δ 3.22 ppm มาจากโปรตอนที่ตำแหน่ง f สัญญาณนี้ downfield มากกว่าโปรตอนกลุ่ม b เนื่องจากโปรตอนตำแหน่งนี้อยู่ใกล้กับหมู่คาร์บอนิลซึ่งเป็นหมู่ดึงอิเล็กตรอน การมีทั้งสองสัญญาณนี้ปรากฏในสเปกตรัมช่วยยืนยันได้ว่าการปกป้องหมู่อะมิโนเพียงด้านเดียว สัญญาณ multiplet ในช่วง δ 3.46 – 3.79 ppm มาจากโปรตอนกลุ่ม d โดยโปรตอนกลุ่มนี้ downfield ไปมากเนื่องจากอยู่ใกล้กับออกซิเจน ซึ่งทั้ง 12 โปรตอนขึ้นพิคในช่วงใกล้เคียงกันเนื่องจากสภาพแวดล้อมของโปรตอนใกล้เคียงกันมาก ส่วนพิค singlet ที่ 5.15 ppm จำนวน 1 โปรตอน เป็นพิคจาก NH ของหมู่เอไมด์ จึงค่อนข้าง broad

ส่วนสารประกอบ BocTTDBoc สามารถระบุโครงสร้างได้จากสเปกตรัม ¹H NMR ดังรูปที่ 3.10 จุดแตกต่างที่สำคัญจาก TTDBoc คือสเปกตรัมของสารนี้จะมีสัญญาณของโปรตอนเพียง 5 กลุ่ม ไม่มีสัญญาณที่ δ 2.80 ppm ของโปรตอนบนคาร์บอนที่ติดกับหมู่อะมิโนอิสระ (-CH₂NH₂) นอกจากนี้พิค singlet ที่ δ 1.44 ppm ให้สัญญาณคิดเป็นจำนวน 18 โปรตอน แสดงว่ามีหมู่ *tert*-butyl ติดอยู่ทั้งสองด้าน

ในการสังเคราะห์ TTDBoc จะมีขั้นตอนการสกัดชั้นสารละลายอินทรีย์ด้วยสารละลาย NaCl อิมัลชัน การสกัดนี้จะช่วยแยกสารตั้งต้น TTD ที่เหลืออยู่ออกจากชั้นสารอินทรีย์ เนื่องจาก TTD สามารถละลายน้ำได้ดี ขณะที่ TTDBoc ละลายในชั้นสารอินทรีย์ได้ดีกว่า จึงสามารถได้สาร TTDBoc ที่ค่อนข้างบริสุทธิ์โดยไม่ต้องใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี



รูปที่ 3.9 สเปกตรัม ^1H NMR ของ TTDBoc

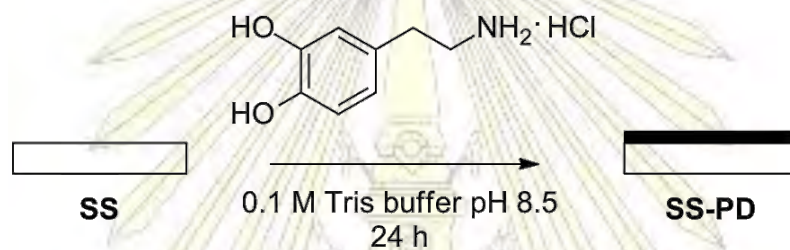


รูปที่ 3.10 สเปกตรัม ^1H NMR ของ BocTTDBoc

3.4 การดัดแปรพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิมด้วยพอลิโดพามีน

ในส่วนของการดัดแปรพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิม จะประกอบด้วยขั้นตอนหลักคือการใช้พอลิโดพามีนยึดเกาะบนพื้นผิว จากนั้นจะเป็นการทำปฏิกิริยาบนพื้นผิวเพื่อตรึงสารประกอบ TTD ลงไป

การเตรียมพื้นผิวจะเริ่มจากการทำความสะอาดแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมขนาด 1×1 cm จากนั้นนำไปจุ่มในสารละลายปิรันยา สารละลายปิรันยาเป็นสารละลายผสมระหว่างกรดซัลฟิวริกเข้มข้น และสารละลาย 30 % ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสัดส่วน 3 : 1 โดยปริมาตร จึงเป็นตัวออกซิไดซ์ที่แรงและมีฤทธิ์กัดกร่อน สามารถกำจัดสิ่งปนเปื้อนที่อาจตกค้างอยู่ที่ผิว และออกซิไดซ์พื้นผิวให้มีหมู่ไฮดรอกซิลปริมาณมาก ซึ่งจะสามารถจับกับหมู่อะมิโนของพอลิโดพามีนได้ดี²⁵ จากนั้นนำพื้นผิวที่ได้มาจุ่มในสารละลายโดพามีน 0.5 mg/mL ที่ปรับสถานะให้เป็นเบสด้วยบัฟเฟอร์ Tris 0.1 M pH 8.5 เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันของโดพามีน (รูปที่ 3.11) เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงสีของสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม (รูปที่ 3.12) ส่วนสีของแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล แสดงว่าเกิดการยึดเกาะของพอลิโดพามีนขึ้น (รูปที่ 3.13)



รูปที่ 3.11 แผนภาพการดัดแปรพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิมด้วยพอลิโดพามีน



รูปที่ 3.12 แผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมในสารละลายโดพามีนในบัฟเฟอร์ Tris 0.1 M pH 8.5 ที่เวลา 24 ชั่วโมง

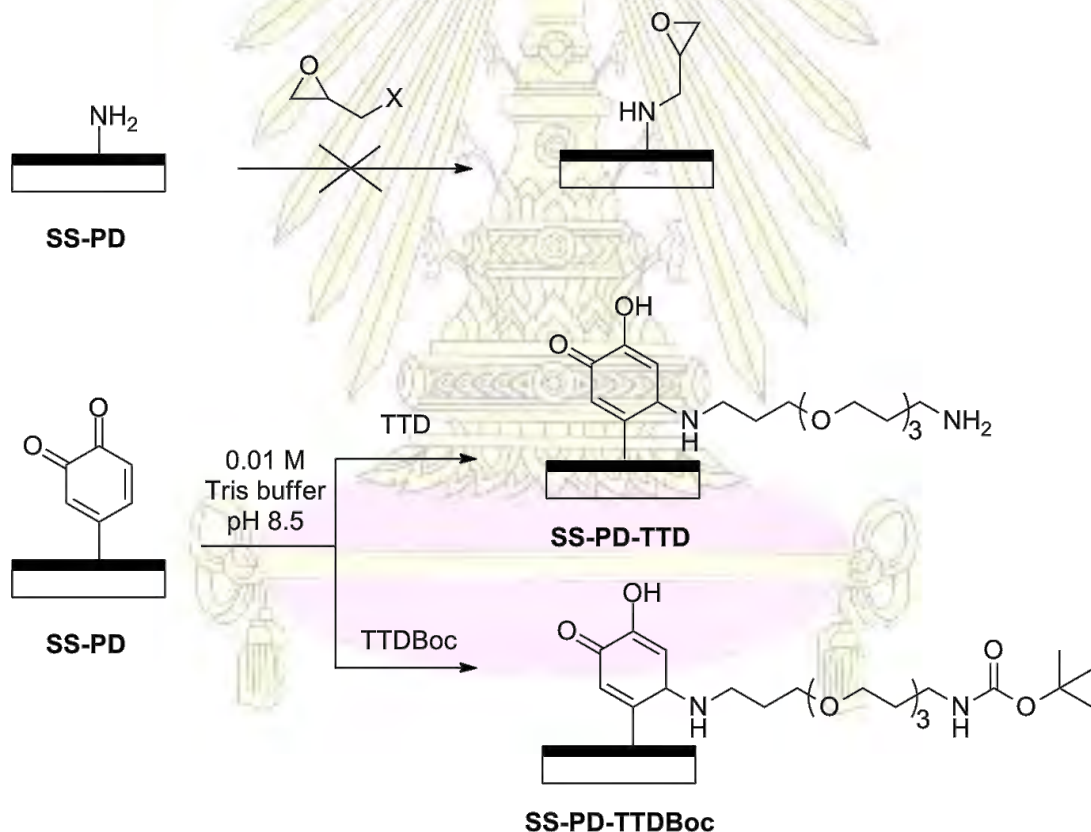


รูปที่ 3.13 แผ่นเหล็กกล้าไร้สนิม SS, SS-PD, SS-PD-TTD และ SS-PD-TTDBoc ตามลำดับ

3.5 การตรึงสารประกอบลงบนพื้นผิว

ในช่วงแรกของการดัดแปรพื้นผิว ผู้วิจัยได้พยายามใช้สารในกลุ่มอีพอกไซด์ทั้ง epichlorohydrin และ glycidyl tosylate มาสังเคราะห์เป็นอนุพันธ์ของ TTD ในสถานะสารละลาย แต่ไม่สามารถสังเคราะห์อนุพันธ์ที่ต้องการได้ ผู้วิจัยจึงทดลองใช้ epichlorohydrin ทำปฏิกิริยากับพื้นผิว SS-PD โดยคาดว่าจะเกิดการเปิดวงอีพอกไซด์ด้วยหมู่เอมีนที่อยู่บนผิวของ SS-PD เพื่อเป็นตัวเชื่อมสำหรับตรึงสารลงบนพื้นผิว แต่พื้นผิวที่ได้จากการทดลองไม่มีการเปลี่ยนแปลงของอินฟราเรดสเปกตรัมเทียบกับ SS-PD ผู้วิจัยจึงได้เปลี่ยนวิธีการมาอาศัยปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบเอมีนกับหมู่ควิโนนบนพอลิโดพามีนเพื่อตรึงสารลงบนพื้นผิวแทนดังรูปที่ 3.14 การตรึงสารประกอบโดยอาศัยปฏิกิริยานี้จะทำให้เกิดพันธะโควาเลนต์ระหว่างไนโตรเจนของเอมีนกับคาร์บอนของพอลิโดพามีน โดยเกิดปฏิกิริยาในกลุ่ม 1,4-addition^{14,24}

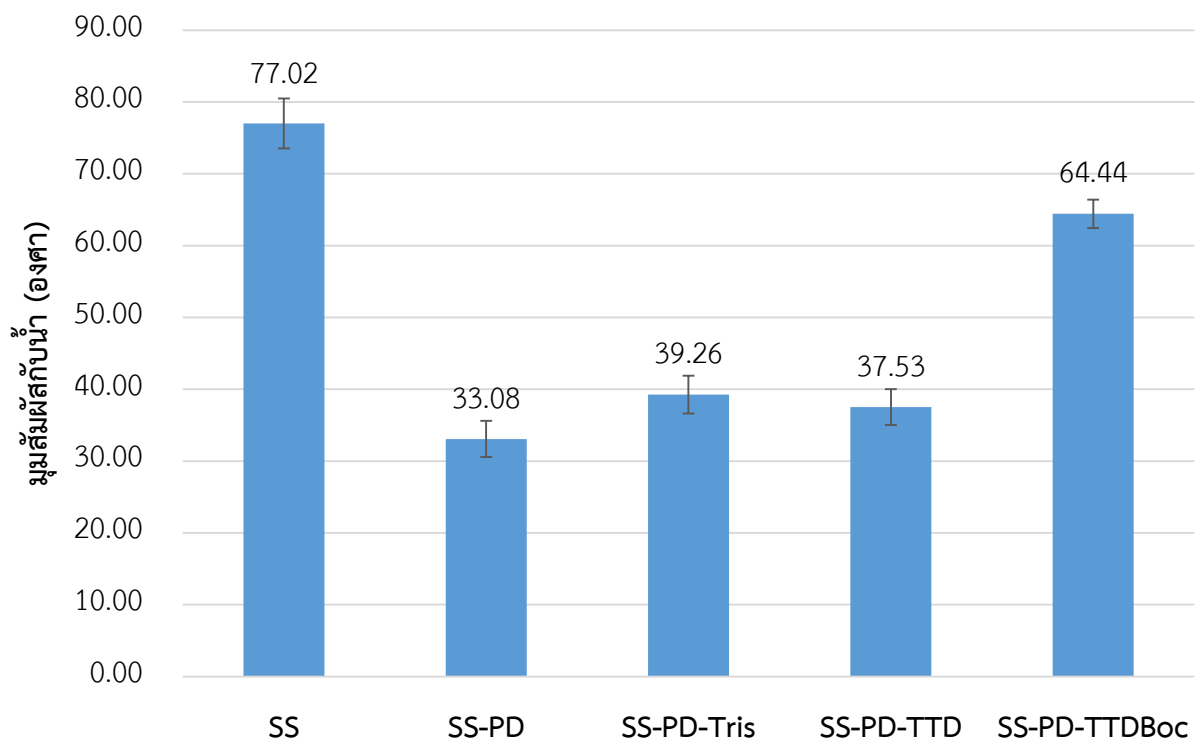
การตรึง TTD และ TTDBoc ลงบนพื้นผิวทำได้โดยจุ่มแผ่น SS-PD ในสารละลายของเอมีนในบัฟเฟอร์ Tris pH 8.5 เลือกใช้สถานะที่เป็นเบสในการทำปฏิกิริยาเพื่ออาศัยการออกซิเดชันของหมู่คะทีคอลที่ผิวของพอลิโดพามีน เพิ่มปริมาณหมู่ควิโนนที่จะสามารถทำปฏิกิริยากับเอมีนให้มากยิ่งขึ้น¹⁴



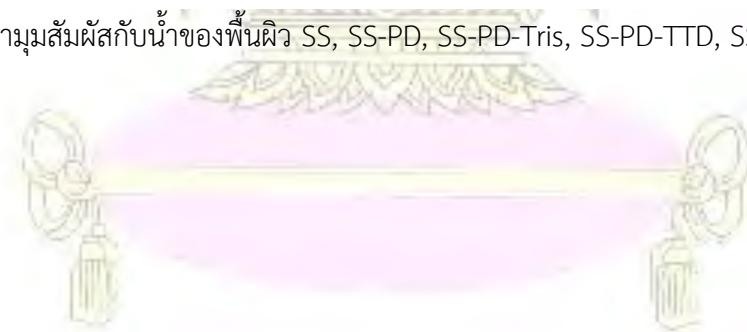
รูปที่ 3.14 แผนภาพการตรึงสารลงบนพื้นผิว SS-PD หลังจากไม่พบการเปลี่ยนแปลงของอินฟราเรดสเปกตรัมเมื่อทดลองใช้สารกลุ่มอีพอกไซด์ทำปฏิกิริยากับหมู่เอมีน จึงอาศัยปฏิกิริยาของหมู่ควิโนนตรึง TTD และ TTDBoc ลงบนพื้นผิว

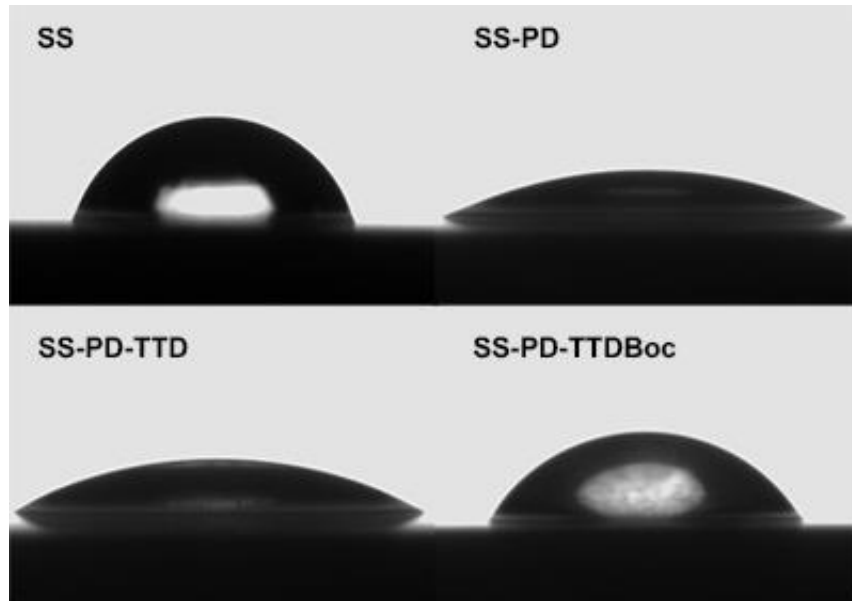
3.6 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของพื้นผิวโดยเทคนิคการวัดมุมสัมผัสน้ำและ ATR-FTIR spectroscopy

การเปลี่ยนแปลงของพื้นผิวจะติดตามด้วยเทคนิคการวัดมุมสัมผัสน้ำและใช้เทคนิค ATR-FTIR spectroscopy พื้นผิว SS มีค่ามุมสัมผัสน้ำ $77.02 \pm 6.06^\circ$ ส่วนค่ามุมสัมผัสน้ำของพื้นผิว SS-PD มีค่า $33.08 \pm 4.37^\circ$ ใกล้เคียงกับงานวิจัยก่อนหน้า²⁸ ค่ามุมสัมผัสน้ำที่เปลี่ยนไปนี้แสดงให้เห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงสมบัติความชอบน้ำของพื้นผิวดังรูปที่ 3.15 และรูปที่ 3.16 ค่ามุมสัมผัสน้ำที่น้อยลงจะแสดงถึงความชอบน้ำที่มากขึ้น



รูปที่ 3.15 ค่ามุมสัมผัสน้ำของพื้นผิว SS, SS-PD, SS-PD-Tris, SS-PD-TTD, SS-PD-TTDBoc





รูปที่ 3.16 หยดน้ำบนพื้นผิว SS, SS-PD, SS-PD-Tris, SS-PD-TTD, SS-PD-TTDBoc

จากรูปที่ 3.17 อินฟราเรดสเปกตรัมของพื้นผิว SS ไม่ปรากฏพีดสำคัญ เนื่องจากองค์ประกอบหลักของพื้นผิวเป็นโลหะ ไม่มีหมู่ฟังก์ชันอินทรีย์ที่ดูดกลืนแสงในช่วงอินฟราเรด สัญญาณในช่วง $2000 - 2300 \text{ cm}^{-1}$ เป็นสัญญาณรบกวนที่ไม่คงที่ เกิดจากความไม่คงที่ของปริมาณ CO_2 ในอากาศขณะทำการวัดแต่ละครั้ง ส่วนสเปกตรัมของพื้นผิว SS-PD มีพีดปรากฏขึ้นชัดเจน ลักษณะของสเปกตรัมสอดคล้องกันกับในงานวิจัยก่อนหน้า³²⁻³³ มีพีดสำคัญที่ชัดเจน ได้แก่ พีด broad ที่ 3270 cm^{-1} กว้างตั้งแต่ช่วง $3000 - 3500 \text{ cm}^{-1}$ เป็นพีด O-H และ N-H stretching พีด C-H stretching ที่ 2917 และ 2850 cm^{-1} และมีพีด C=C ของวงอะโรมาติกที่ 1615 และ 1455 cm^{-1} นอกจากนี้มีพีดอื่น ๆ ในช่วง fingerprint เช่น พีด C=N stretching ที่ 1505 cm^{-1} พีด C-O stretching ที่ 1292 cm^{-1} และพีด C-N stretching ที่ 1056 cm^{-1} เป็นต้น สัญญาณจากอินฟราเรดสเปกตรัมเหล่านี้สามารถยืนยันได้ว่าเกิดพอลิโดพามีนบนพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิมจริง

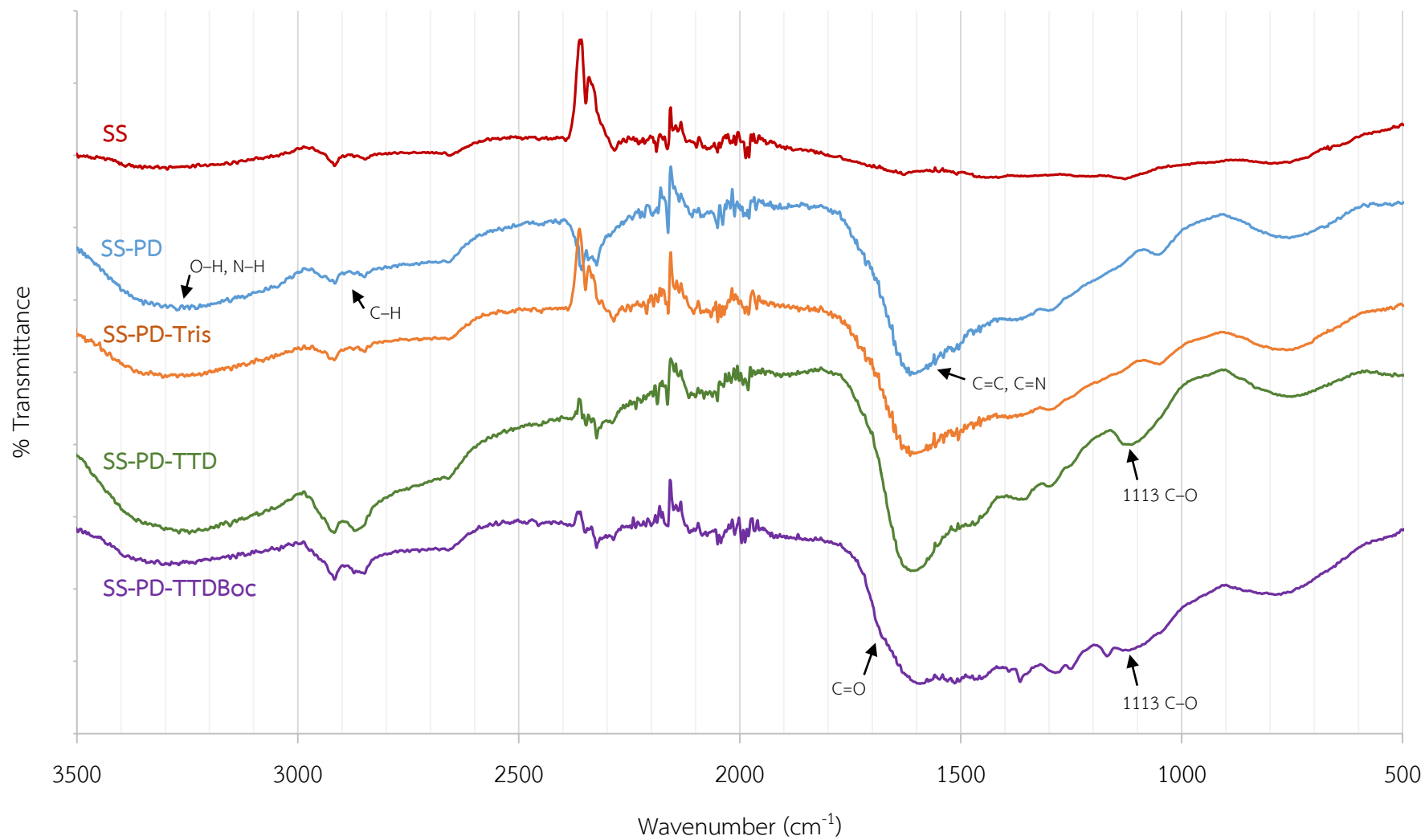
ทั้งพื้นผิว SS-PD-Tris และ SS-PD-TTD มีการเปลี่ยนแปลงมุมสัมผัสน้ำเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับพื้นผิว SS-PD โดยมีค่า $39.26 \pm 4.54^\circ$ และ $37.53 \pm 4.33^\circ$ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามอินฟราเรดสเปกตรัมของ SS-PD-TTD มีการเปลี่ยนแปลงชัดเจน ขณะที่พื้นผิว SS-PD-Tris ซึ่งเป็นชุดควบคุมไม่มีการเปลี่ยนแปลงของอินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 3.17) แสดงว่าการจุ่มแผ่น SS-PD ในบัฟเฟอร์ Tris ไม่ทำให้พื้นผิวมีการเปลี่ยนแปลงมากนัก แต่ในสารละลายที่มี TTD ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของพื้นผิวโดยมีหมู่ฟังก์ชันแตกต่างไปจากเดิม

จากอินฟราเรดสเปกตรัมของพื้นผิว SS-PD-TTD มีสัญญาณเดิมที่มาจากพอลิโดพามีน และมีพีดใหม่อย่างชัดเจนที่ 1113 cm^{-1} เนื่องจากมาจากการสั่นของพันธะ C-O ในโครงสร้างของ TTD³⁴ นอกจากนี้มีสัญญาณของ C-H stretching ที่ $2800 - 2900 \text{ cm}^{-1}$ เพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับ SS-PD ซึ่งสามารถยืนยันการติดของ TTD บนพื้นผิวได้ นอกจากนี้สัญญาณที่ซับซ้อนขึ้นในช่วง $1200 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ ยังอาจเป็นผลจากการมีรูปแบบการสั่นที่เพิ่มมากขึ้น เช่น CH_2 bending ที่ 1469 cm^{-1} เป็นต้น

สำหรับพื้นผิว SS-PD-TTDBoc มีการเปลี่ยนของมุมสัมผัสน้ำและอินฟราเรดสเปกตรัมอย่างชัดเจนหลังทำปฏิกิริยา ค่ามุมสัมผัสน้ำของพื้นผิวเพิ่มขึ้นเป็น $64.44 \pm 1.99^\circ$ ซึ่งแสดงว่าพื้นผิวมีความชอบน้ำลดลง สอดคล้องกับการมีหมู่ *tert-butyl* ที่ปลายของสาร ส่วนอินฟราเรดสเปกตรัมของพื้นผิว SS-PD-TTDBoc (รูปที่ 3.17) มีสัญญาณของ C-H stretching ที่ $2800 - 2900 \text{ cm}^{-1}$ เพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับ SS-PD และมีการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณในช่วง $1200 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ เช่นเดียวกันกับ SS-PD-TTD อย่างไรก็ตามสัญญาณในช่วงนี้ซับซ้อนขึ้นยิ่งกว่าพื้นผิว SS-PD-TTD เพราะหมู่ Boc ที่เพิ่มเข้ามาทำให้มีการสั่นรูปแบบต่าง ๆ มากขึ้น เช่น พีค C=O ของหมู่คาร์บาเมตที่ 1169 cm^{-1} พีค CH_2 bending ที่ 1469 cm^{-1} พีค CH_3 bending ของหมู่ *tert-butyl* ที่ 1366 cm^{-1} เป็นต้น³⁵ นอกจากนี้จะสังเกตเห็นสัญญาณเป็นไหล่พีคที่บริเวณใกล้กับ 1700 cm^{-1} มาจากหมู่ C=O ของหมู่ Boc

จากข้อมูลมุมสัมผัสน้ำและอินฟราเรดสเปกตรัมของพื้นผิว สามารถช่วยยืนยันว่าสามารถดัดแปรพื้นผิวโดยสร้างพันธะระหว่างสารประกอบ TTD และ TTDBoc กับพอลิโดพามีนได้สำเร็จ พื้นผิวที่ได้นี้จะนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียต่อไป





รูปที่ 3.17 อินฟราเรดสเปกตรัมของพื้นผิว SS, SS-PD, SS-PD-Tris, SS-PD-TTD, SS-PD-TTDBoc

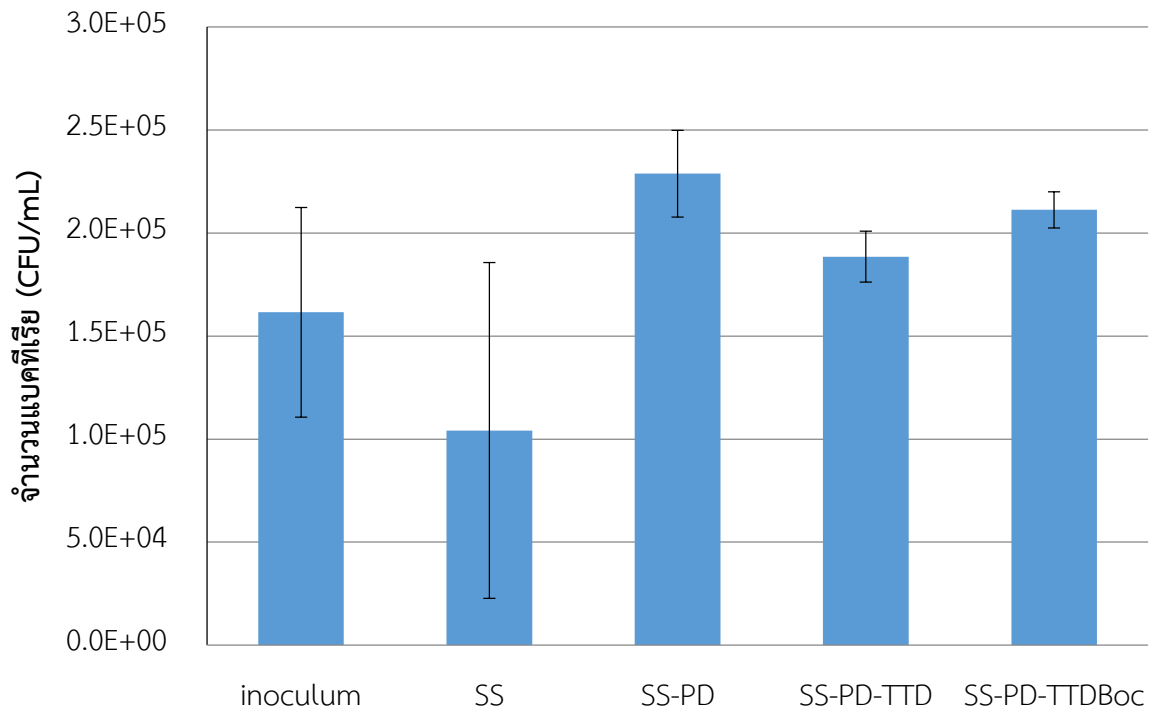
3.7 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอาศัยการนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย (colony forming unit, CFU) ที่รอดชีวิตภายหลังจากสัมผัสพื้นผิวตัวอย่างเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ถ้าหากมีจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตหลังสัมผัสกับพื้นผิวน้อยแสดงว่าพื้นผิวนั้นสามารถยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียได้ และยังมีชุดควบคุมเรียกว่า inoculum คือแบคทีเรียที่ไม่ได้สัมผัสกับพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิม สำหรับแบคทีเรียที่ทดสอบคือ แบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* และแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli*

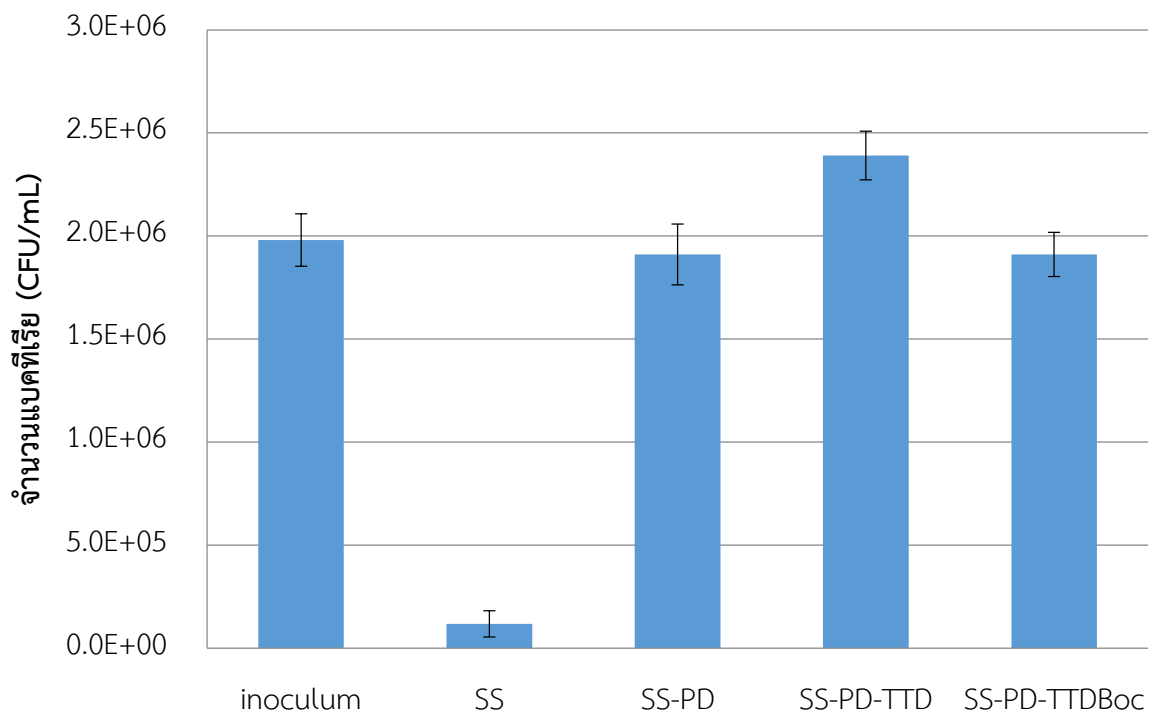
จากผลการทดสอบกับ *S. aureus* (รูปที่ 3.18) พื้นผิว SS-PD, SS-PD-TTD, SS-PD-TTDBoc มีจำนวนแบคทีเรียรอดชีวิตใกล้เคียงกันอยู่ในช่วงประมาณ 2×10^5 CFU/mL ซึ่งไม่แตกต่างจาก inoculum อย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่พื้นผิว SS มีจำนวนแบคทีเรียเฉลี่ยลดลงเหลือเพียง 1.0×10^5 CFU/mL

สำหรับผลการทดสอบกับ *E. coli* (รูปที่ 3.19) พื้นผิว SS-PD, SS-PD-TTD, SS-PD-TTDBoc มีจำนวนแบคทีเรียรอดชีวิตใกล้เคียงกันอยู่ในช่วงประมาณ 2×10^6 CFU/mL และไม่แตกต่างจาก inoculum อย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่พื้นผิว SS มีจำนวนแบคทีเรียลดลงมากอย่างชัดเจน เช่นเดียวกับในการทดสอบกับ *S. aureus* คาดว่าสาเหตุที่ทำให้จำนวนแบคทีเรียลดลงบนผิวเหล็กกล้าไร้สนิมอาจเป็นผลจากการจุ่มในสารละลายปิรันยาทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของพื้นผิว ประเด็นนี้เป็นสิ่งที่ต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

จากผลการทดลอง สามารถกล่าวได้ว่าพื้นผิว SS-PD-TTD และ SS-PD-TTDBoc ไม่มีสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* ผลการทดลองนี้ต่างจากสมมติฐานที่คาดไว้ เนื่องจากก่อนหน้านี้ได้มีรายงานการตรึงสารประกอบ TTD บนผิวของผ้าฝ้ายแล้วพบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ดี²⁷ อย่างไรก็ตามงานวิจัยของ Poverenov และคณะ¹¹ ได้ตีตสารที่มีฤทธิ์กำจัดแบคทีเรียชนิดเดียวกันบนเซลลูโลสและแก้ว และพบว่าผิวแก้วดัดแปรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียน้อยกว่าเซลลูโลสดัดแปร ดังนั้นผู้วิจัยจึงคาดว่าสาเหตุอีกส่วนหนึ่งที่อาจทำให้พื้นผิวมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแตกต่างกันคือความแตกต่างของตัววัสดุ ผิวของผ้าสามารถซึมซับน้ำได้ดี สารแขวนลอยของแบคทีเรียจึงสามารถสัมผัสกับหมู่อะมิโนที่ติดอยู่บนผ้าได้ดีกว่ากรณีผิวของเหล็กกล้าไร้สนิมที่น้ำไม่สามารถซึมผ่านเข้าไปได้



รูปที่ 3.18 จำนวนแบคทีเรีย *S. aureus* หลังการสัมผัสบนพื้นผิวตัวอย่างเป็นเวลา 18 ชั่วโมง



รูปที่ 3.19 จำนวนแบคทีเรีย *E. coli* หลังการสัมผัสบนพื้นผิวตัวอย่างเป็นเวลา 18 ชั่วโมง

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ต้องการตรึงสารประกอบ TTD ลงบนพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิมด้วยวิธีทางเคมี โดยอาศัยพอลิโดพามีนเป็นตัวเชื่อมให้เกิดหมู่ฟังก์ชันอินทรีย์บนผิวโลหะ จากการทดสอบค่า pH ที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันของโดพามีน พบว่าปฏิกิริยานี้จะเกิดได้ดีในสภาวะเบส เกิดได้ไม่ดีในสภาวะกรด และสภาวะที่เกิดออกซิเดชันของโดพามีนถูกยับยั้ง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นก่อนหน้านี้ ผู้วิจัยได้เลือกใช้บัฟเฟอร์ Tris pH 8.5 เพื่อให้เกิดเป็นพอลิโดพามีนยึดเกาะอยู่บนผิวเหล็กกล้าไร้สนิม จากนั้นสามารถตรึงสารประกอบ TTD และอนุพันธ์ TTDBoc ที่สังเคราะห์ขึ้นลงบนพื้นผิวเหล็กกล้าไร้สนิมที่ยึดเกาะด้วยพอลิโดพามีนได้โดยอาศัยปฏิกิริยาซึ่งคาดว่าเป็น 1,4-addition ระหว่างหมู่อะมิโนของสารกับหมู่ควิโนนของพอลิโดพามีน และสามารถยืนยันการติดของสารต่าง ๆ บนพื้นผิวได้ด้วยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงของค่ามุมสัมผัสน้ำและอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี จากนั้นเมื่อนำพื้นผิวที่ได้มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* พบว่าพื้นผิวที่ได้ไม่แสดงสมบัติการยับยั้งแบคทีเรีย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสมบัติที่แตกต่างกันระหว่างเหล็กกล้าไร้สนิมกับผิวเซลลูโลสที่ใช้ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ นอกจากนี้ การทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียอื่นที่มีสมบัติแตกต่างออกไป เช่น การทดสอบกับแบคทีเรียแกรมลบ ก็อาจจะให้ผลที่น่าสนใจ ซึ่งเป็นประเด็นที่จะต้องดำเนินการทดลองต่อไป สำหรับสภาวะและวิธีการตัดแปรพื้นผิวที่ใช้ในงานวิจัยนี้อาจสามารถนำมาปรับใช้เพื่อตรึงสารที่คาดว่าจะมีสมบัติต้านแบคทีเรียอื่น ๆ เพื่อพัฒนาเหล็กกล้าไร้สนิมให้มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียประเภทต่าง ๆ

เอกสารอ้างอิง

1. Monroe, D. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. *PLoS Biol.* **2007**, *5*, 2458-2461.
2. Garrett, T. R.; Bhakoo, M.; Zhang, Z. Bacterial Adhesion and Biofilms on Surfaces. *Prog. Nat. Sci.* **2008**, *18*, 1049-1056.
3. Costerton, J. W.; Stewart, P. S.; Greenberg, E. P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* **1999**, *284*, 1318-1322.
4. Walsh, C. Molecular Mechanisms That Confer Antibacterial Drug Resistance. *Nature* **2000**, *406*, 775-781.
5. Siedenbiedel, F.; Tiller, J. C. Antimicrobial Polymers in Solution and on Surfaces: Overview and Functional Principles. *Polymers* **2012**, *4*, 46-71.
6. Dong, B.; Manolache, S.; Somers, E. B.; Lee Wong, A. C.; Denes, F. S. Generation of Antifouling Layers on Stainless Steel Surfaces by Plasma-Enhanced Crosslinking of Polyethylene Glycol. *J. Appl. Polym. Sci.* **2005**, *97*, 485-497.
7. Yu, B.-Y.; Zheng, J.; Chang, Y.; Sin, M.-C.; Chang, C.-H.; Higuchi, A.; Sun, Y.-M. Surface Zwitterionization of Titanium for a General Bio-Inert Control of Plasma Proteins, Blood Cells, Tissue Cells, and Bacteria. *Langmuir* **2014**, *30*, 7502-7512.
8. Otto Rahn, a.; Eseltine, W. P. V. Quaternary Ammonium Compounds. *Annu. Rev. Microbiol.* **1947**, *1*, 173-192.
9. Tiller, J. C.; Liao, C. J.; Lewis, K.; Klivanov, A. M. Designing Surfaces That Kill Bacteria on Contact. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2001**, *98*, 5981-5985.
10. Milović, N. M.; Wang, J.; Lewis, K.; Klivanov, A. M. Immobilized *N*-Alkylated Polyethylenimine Avidly Kills Bacteria by Rupturing Cell Membranes with No Resistance Developed. *Biotechnol. Bioeng.* **2005**, *90*, 715-722.
11. Poverenov, E.; Shemesh, M.; Gulino, A.; Cristaldi, D. A.; Zakin, V.; Yefremov, T.; Granit, R. Durable Contact Active Antimicrobial Materials Formed by a One-Step Covalent Modification of Polyvinyl Alcohol, Cellulose and Glass Surfaces. *Colloids Surf., B* **2013**, *112*, 356-361.
12. Fernandes, S. C. M.; Sadocco, P.; Alonso-Varona, A.; Palomares, T.; Eceiza, A.; Silvestre, A. J. D.; Mondragon, I.; Freire, C. S. R. Bioinspired Antimicrobial and Biocompatible Bacterial

- Cellulose Membranes Obtained by Surface Functionalization with Aminoalkyl Groups. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5*, 3290-3297.
13. Kugel, A.; Stafslie, S.; Chisholm, B. J. Antimicrobial Coatings Produced by “Tethering” Biocides to the Coating Matrix: A Comprehensive Review. *Prog. Org. Coat.* **2011**, *72*, 222-252.
 14. Lee, H.; Dellatore, S. M.; Miller, W. M.; Messersmith, P. B. Mussel-Inspired Surface Chemistry for Multifunctional Coatings. *Science* **2007**, *318*, 426-430.
 15. Kang, S. M.; Hwang, N. S.; Yeom, J.; Park, S. Y.; Messersmith, P. B.; Choi, I. S.; Langer, R.; Anderson, D. G.; Lee, H. One-Step Multipurpose Surface Functionalization by Adhesive Catecholamine. *Adv. Funct. Mater.* **2012**, *22*, 2949-2955.
 16. Kang, S. M.; Rho, J.; Choi, I. S.; Messersmith, P. B.; Lee, H. Norepinephrine: Material-Independent, Multifunctional Surface Modification Reagent. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13224-13225.
 17. Dalsin, J. L.; Lin, L.; Tosatti, S.; Vörös, J.; Textor, M.; Messersmith, P. B. Protein Resistance of Titanium Oxide Surfaces Modified by Biologically Inspired mPEG–DOPA. *Langmuir* **2005**, *21*, 640-646.
 18. Lee, H.; Scherer, N. F.; Messersmith, P. B. Single-Molecule Mechanics of Mussel Adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 12999-13003.
 19. Chen, L. X.; Liu, T.; Thurnauer, M. C.; Csencsits, R.; Rajh, T. Fe₂O₃ Nanoparticle Structures Investigated by X-Ray Absorption near-Edge Structure, Surface Modifications, and Model Calculations. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 8539-8546.
 20. Wei, Q.; Zhang, F.; Li, J.; Li, B.; Zhao, C. Oxidant-Induced Dopamine Polymerization for Multifunctional Coatings. *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 1430-1433.
 21. Ding, Y.; Weng, L.-T.; Yang, M.; Yang, Z.; Lu, X.; Huang, N.; Leng, Y. Insights into the Aggregation/Deposition and Structure of a Polydopamine Film. *Langmuir* **2014**, *30*, 12258-12269.
 22. Hong, S.; Na, Y. S.; Choi, S.; Song, I. T.; Kim, W. Y.; Lee, H. Non-Covalent Self-Assembly and Covalent Polymerization Co-Contribute to Polydopamine Formation. *Adv. Funct. Mater.* **2012**, *22*, 4711-4717.
 23. Dreyer, D. R.; Miller, D. J.; Freeman, B. D.; Paul, D. R.; Bielawski, C. W. Elucidating the Structure of Poly(Dopamine). *Langmuir* **2012**, *28*, 6428-6435.

24. Zhang, H.; Xie, L.; Deng, J.; Zhuang, W.; Luo, R.; Wang, J.; Huang, N.; Wang, Y. Stability Research on Polydopamine and Immobilized Albumin on 316L Stainless Steel. *Regener. Biomater.* **2016**, *3*, 277-284.
25. Yuan, S.; Wan, D.; Liang, B.; Pehkonen, S. O.; Ting, Y. P.; Neoh, K. G.; Kang, E. T. Lysozyme-Coupled Poly(Poly(Ethylene Glycol) Methacrylate)-Stainless Steel Hybrids and Their Antifouling and Antibacterial Surfaces. *Langmuir* **2011**, *27*, 2761-2774.
26. Yuan, S.; Yin, J.; Jiang, W.; Liang, B.; Pehkonen, S. O.; Choong, C. Enhancing Antibacterial Activity of Surface-Grafted Chitosan with Immobilized Lysozyme on Bioinspired Stainless Steel Substrates. *Colloids Surfs., B* **2013**, *106*, 11-21.
27. Rauytanapanit, M. Synthesis and Antibacterial Activities of Amino-Containing Cellulosic Materials. M.Sc. Dissertation, Chulalongkorn University, Bangkok, 2016.
28. Du, X.; Li, L.; Li, J.; Yang, C.; Frenkel, N.; Welle, A.; Heissler, S.; Nefedov, A.; Grunze, M.; Levkin, P. A. UV-Triggered Dopamine Polymerization: Control of Polymerization, Surface Coating, and Photopatterning. *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 8029-8033.
29. Yasunobu, K. T.; Norris, E. R. Mechanism of Borate Inhibition of Diphenol Oxidation by Tyrosinase. *J. Biol. Chem.* **1957**, *227*, 473-82.
30. Brun, E.; Bellosta, V.; Cossy, J. Diastereo- and Enantioselective Synthesis of 1,3,5,7-Tetraol Structural Units Using a Prins Cyclisation-Reductive Cleavage Sequence. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 6718-6721.
31. Piggott, A. M.; Karuso, P. Synthesis of a New Hydrophilic *O*-Nitrobenzyl Photocleavable Linker Suitable for Use in Chemical Proteomics. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 8241-8244.
32. Zhu, L.; Lu, Y.; Wang, Y.; Zhang, L.; Wang, W. Preparation and Characterization of Dopamine-Decorated Hydrophilic Carbon Black. *Appl. Surf. Sci.* **2012**, *258*, 5387-5393.
33. Zangmeister, R. A.; Morris, T. A.; Tarlov, M. J. Characterization of Polydopamine Thin Films Deposited at Short Times by Autoxidation of Dopamine. *Langmuir* **2013**, *29*, 8619-8628.
34. Peyre, J.; Humblot, V.; Méthivier, C.; Berjeaud, J.-M.; Pradier, C.-M. Co-Grafting of Amino-Poly(Ethylene Glycol) and Magainin I on a TiO₂ Surface: Tests of Antifouling and Antibacterial Activities. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 13839-13847.
35. Pavia, D. L. L., G. M.; Kriz, G. S.; Vyvyan, J. R. *Introduction to Spectroscopy*. 5th ed.; Cengage Learning: Stamford, USA, 2015.

ประวัติผู้วิจัย

นายสุรเศรษฐ์ สุรฤทธิเดชาชัย เกิดเมื่อวันที่ 24 เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2537 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนวัดสุทธิวาราม จังหวัด กรุงเทพมหานคร เมื่อ พ.ศ. 2556 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2559 ได้รับทุนการศึกษาโครงการสร้างปัญญาวิทย์ ผลิตนักเทคโนโลยี (YSTP) จากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 214/3 ซอยเจริญกรุง 43 ถนนเจริญกรุง แขวงสี่พระยา เขตบางรัก จังหวัดกรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10500 อีเมล tsuraminor@gmail.com

