



## โครงการ

# การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ	การพัฒนาอนุภาคแม่เหล็กนาโนสำหรับการตรวจวัดเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์  Development of magnetic nanoparticles for detection of <i>Streptococcus mutans</i>
ชื่อนิสิต	นางสาวสุทธาวลัย ใส้เพ็ญ
ภาควิชา	เคมี
ปีการศึกษา	2559

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การพัฒนาอนุภาคแม่เหล็กนาโนสำหรับการตรวจวัดเชื้อสเตรปโตคอคคัสมิวแทนส์

Development of magnetic nanoparticles for detection of  
*Streptococcus mutans*

โดย

นางสาวสุทธาวัลย์ ใส้เพี้ย

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2559

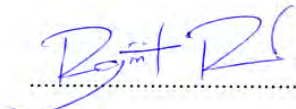
โครงการ การพัฒนาอนุภาคแม่เหล็กนาโนสำหรับการตรวจวัดเชื้อสเตรปโตคอคคัสมีวแทนส์


โดย นางสาวสุทธาวลัย ใสเพ็ญ


ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

  
..... ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โรจน์ฤทธิ โรจนธเนศ)

  
..... อาจารย์ที่ปรึกษา  
(รองศาสตราจารย์ ดร.วรวิทย์ โฮเว่น)

  
..... กรรมการ  
(อาจารย์ ดร.มนพิชา ศรีสะอาด)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

..... หัวหน้าภาควิชาเคมี  
(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย พาราสุข)

วันที่ ..... เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2560

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ  ดีมาก  ดี  พอใช้



Project Title Development of magnetic nanoparticles for detection of *Streptococcus mutans*

Student Name Miss Suttawan Saipia Student ID 5633157323

Advisor Name Associate Professor Voravee P. Hoven, Ph.D.

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

### Abstract

This research aims to develop magnetic nanoparticle clusters (MNCs) for separation and detection of *Streptococcus mutans* (*S. mutans*). The MNCs were synthesized by a solvothermal method. Poly(acrylic acid) (PAA) was grafted on MNCs by surface-initiated polymerization of acrylic acid *via* reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) mechanism. Readily available carboxyl groups on the PAA-grafted MNCs can bind with the cell wall binding domain (CWBD) of automutanolysin, the enzyme that is specific to mutans streptococci using EDC/NHS as coupling reagents. The MNCs both before and after PAA grafting and CWBD conjugation were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), dynamic light scattering (DLS), and transmission electron microscopy (TEM). The CWBD-conjugated MNCs were tested for their ability to separate and detect *S. mutans* by magnetic separation and selective filtration using cellulose acetate membrane with a diameter of 0.8  $\mu\text{m}$ . Because the size of the CWBD-conjugated MNCs was larger than the pore diameter of the membrane, the CWBD-conjugated MNCs failed to quantitatively distinguish the *S. mutans* having different concentrations although the counting method confirmed that they can capture the bacteria.

Keywords: magnetic nanoparticle clusters, poly(acrylic acid), *Streptococcus mutans*, selective filtration

## กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์จากบุคคลหลายท่าน ซึ่งผู้มีพระคุณท่านแรกและผู้วิจัยขอขอบคุณคือ รองศาสตราจารย์ ดร.วรวิทย์ โฮเว่น อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่ให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ ในการทำวิจัย ทำให้การดำเนินการวิจัย สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบคุณอาจารย์ ทญ.ดร.พนิดา ธัญญศรีสังข์ ตลอดจนนิสิตปริญญาโทและเอกในกลุ่มงานวิจัยของอาจารย์ ทญ.ดร.พนิดา ธัญญศรีสังข์ ที่ให้ความรู้ทางด้านจุลชีววิทยาเกี่ยวกับการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ขอขอบคุณนางสาวพรเพ็ญ แซ่อึ้ง นางสาวเอมวิภา วิทยาประสิทธิ์ ตลอดจนนิสิตปริญญาโทและเอกในกลุ่มงานวิจัยของรองศาสตราจารย์ ดร.วรวิทย์ โฮเว่น ที่ให้ความรู้ในการใช้เครื่องมือตลอดจนแนะนำเทคนิคการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาเคมีที่ให้ทุนการทำโครงการวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณเพื่อนๆ คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาเคมี รุ่น 82 ที่ให้กำลังใจในการทำงานวิจัย ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้กำลังใจและอยู่เคียงข้างเสมอมา

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณคณะอาจารย์ทุกท่านในคณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาเคมี ที่อบรมสั่งสอนให้มีความรู้ คู่คุณธรรมและสร้างแรงผลักดันให้เดินทางมาถึงจุดหมายวันนี้ ขอขอบคุณเป็นอย่างยิ่ง

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญรูปประกอบ	ช
สารบัญตารางประกอบ	ญ
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	<b>1</b>
1.1 มุลเหตุจูงใจ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	7
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	8
<b>บทที่ 2 การทดลอง</b>	<b>9</b>
2.1 เครื่องมือ	9
2.2 วัสดุและสารเคมี	9
2.3 วิธีการทดลอง	11
2.3.1 การสังเคราะห์ magnetic nanoparticle clusters (MNCs)	11
2.3.2 การกราฟต์พอลิแอกริลิกแอซิดบน MNCs	11
2.3.2.1 การติด 3-Aminopropyltriethoxysilane (APTES) บนพื้นผิวของ MNCs	11
2.3.2.2 การติด Initiator ลงบน MNCs	12
2.3.2.3 การทำปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันของแอกริลิกแอซิด	12
2.3.3 การเตรียมโปรตีน Cell wall binding domain (CWBD)	13
2.3.4 การติดโปรตีน CWBD บน MNCs ที่กราฟต์ด้วยพอลิแอกริลิกแอซิด	14
2.3.5 การนับจำนวน <i>Streptococcus mutans</i> ( <i>S. mutans</i> )	14
2.3.6 การจับเชื้อ <i>S. mutans</i> ด้วย CWBD-conjugated MNCs	15
<b>บทที่ 3 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง</b>	<b>17</b>
3.1 การสังเคราะห์ MNCs, การเตรียม PAA-grafted MNCs และ CWBD-conjugated MNCs	17
3.2 การสังเคราะห์พอลิแอกริลิกแอซิดผ่านปฏิกิริยา RAFT polymerization	22
3.3 การจับเชื้อ <i>S. mutans</i> ด้วย CWBD-conjugated MNCs	24

บทที่ 4 สรุปลการทดลองและข้อเสนอแนะ

27

เอกสารอ้างอิง

29

ประวัติผู้วิจัย

31





## สารบัญรูปประกอบ

รูปที่	หน้า
1.1 โครงสร้างของ peptidoglycan	1
1.2 ขั้นตอนการแยกอนุภาคที่จับกับเชื้อออกจากอนุภาคที่ไม่จับกับเชื้อด้วยกระบวนการ magnetophoretic Chromatography	2
1.3 ขั้นตอนการแยกอนุภาคที่จับกับเชื้อออกจากอนุภาคที่ไม่จับกับเชื้อด้วยกระบวนการ magnetophoretic chromatography และขยายสัญญาณการจับเชื้อโดยอาศัยแพลทินัมที่เคลือบอยู่บนกลุ่มอนุภาคแม่เหล็กนาโน เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ tetramethylbenzidine (TMB)	3
1.4 ขั้นตอนการตรวจวัดเชื้อ <i>S. typhimurium</i> ด้วยอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ตรึง anti- <i>S. typhimurium</i>	4
1.5 ขั้นตอนการตรวจวัดเชื้อ <i>L. monocytogenes</i> ด้วยอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ตรึงด้วย anti- <i>L.monocytogenes</i>	5
1.6 กลไกการเกิดปฏิกิริยา RAFT polymerization	5
1.7 การกราฟต์ PNIAAM-b-PAA บน MNPs	6
1.8 การกราฟต์ P(NIPA-r-PEGMEA)-b-PAA บน MNP	7
2.1 สมการแสดงการสังเคราะห์ magnetic nanoparticle clusters (MNCs)	11
2.2 สมการแสดงการติด APTES บนพื้นผิวของ MNCs	11
2.3 สมการแสดงการติดสารริเริ่มบนพื้นผิวของ MNCs	12
2.4 สมการแสดงการทำปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันของแอคริลิกแอซิดบนพื้นผิวของ MNCs	12
2.5 ขั้นตอนการแยก CWBD-conjugated MNCs ที่จับเชื้อ ด้วย magnetic separation และ selective filtration	15
3.1 XRD pattern ของ MNCs	17
3.2 สมการแสดงการเตรียม PAA-grafted MNCs	18
3.3 FT-IR สเปกตรัมของอนุภาค a) MNCs, b) MNCs-APTES, c) MNCs-initiator d) PAA-grafted MNCs- และ e) CWBD-conjugated MNCs	19
3.4 TEM ไมโครกราฟต์ของ a,b,c) MNCs, d,e,f) PAA-grafted MNCs-, และ g,h,i) CWBD-conjugated MNCs	20
3.5 การแตกตัวของ EDTA 2Na ใน milli-Q water	21
3.6 การลดลงของน้ำหนัก a) MNCs, b) PAA-grafted MNCs- และ c) CWBD-conjugated MNCs ที่อุณหภูมิต่างๆ ภายใต้สภาวะแก๊สไนโตรเจนด้วยเทคนิค TGA	22

รูปที่	หน้า
3.7 สมการแสดงการสังเคราะห์ PAA ในสารละลายด้วย RAFT polymerization	22
3.8 <sup>1</sup> H-NMR สเปกตรัมของ PAA ก่อน (crude) และหลัง (pure) การทำให้บริสุทธิ์โดย dialysis	23
3.9 อนุภาคที่จับกับเชื้อ <i>S. mutans</i> หลังจากกรองผ่านแผ่นเซลลูโลสแอซิติเตดเมมเบรน	25
3.10 ความเข้มสี (intensity) ของกระดาษเซลลูโลสแอซิติเตดเมมเบรนหลังจับเชื้อ <i>S. mutans</i>	25
3.11 จำนวนโคโลนีของ <i>S. mutans</i> ก่อนและหลังจับเชื้อด้วย CWBD conjugated MNCs	26



## สารบัญตารางประกอบ

ตารางที่	หน้า
3.1 ขนาดเฉลี่ยและประจุของอนุภาคด้วยเทคนิค DLS	20
3.2 Chemical shift ของ PAA จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy	23
3.3 ค่า OD ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของสารละลายก่อนและหลังจับเชื้อ <i>S. mutans</i> ด้วยอนุภาค	26

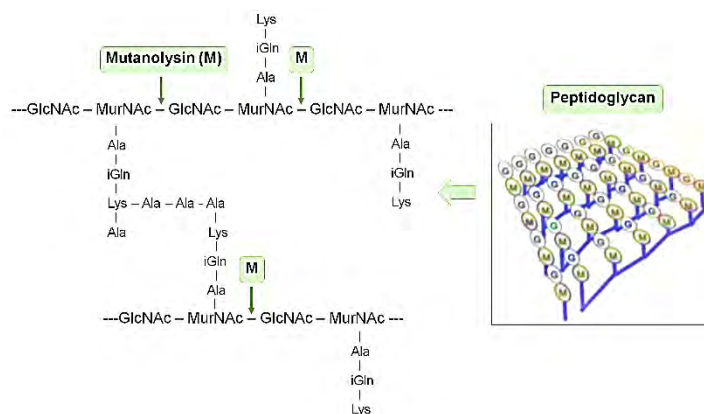


# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 มุลเหตุจูงใจ

จุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคฟันผุคือ สเตรปโตคอคคัสมิวแทนส์ (Streptococcus mutans) ที่อยู่ในช่องปาก [1] การตรวจวัดปริมาณของเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวสามารถใช้เป็นตัวชี้วัดหนึ่งสำหรับประกอบการประเมินความเสี่ยงของการเกิดโรคฟันผุ และนำไปสู่การป้องกันและรักษาที่เหมาะสมกับระดับความเสี่ยงได้ เอนไซม์เปปทิโดไกลแคนไฮโดรเลส (peptidoglycan hydrolase) เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในแบคทีเรียเกือบทุกชนิด มีหน้าที่ในการย่อยสลายเปปทิโดไกลแคนซึ่งเป็นโครงสร้างหลักที่พบได้ในผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (รูปที่ 1.1) มีบทบาทสำคัญต่อการแบ่งตัวและแยกตัวของเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าออโตมิวตาโนไลซิน (automutanolysin) เป็นเอนไซม์เปปทิโดไกลแคนไฮโดรเลสที่ผลิตโดยเชื้อสเตรปโตคอคคัสมิวแทนส์ สามารถเลือกย่อยสลายเฉพาะเชื้อสเตรปโตคอคคัสมิวแทนส์ และเชื้อสเตรปโตคอคคัส ซอบรีนัส โดยไม่กระทบกับเชื้อสเตรปโตคอคคัสสปีชีส์อื่นๆ ในช่องปาก เอนไซม์ดังกล่าวประกอบไปด้วยสองโดเมนหลักได้แก่ คาตาไลติกโดเมน อยู่ทางฝั่งปลายด้านหมู่คาร์บอกซิล (C-terminal catalytic domain) ซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลายเปปทิโดไกลแคน และอีกโดเมนอยู่ฝั่งปลายด้านหมู่อะมิโนทำหน้าที่ในการจับกับผนังเซลล์ (cell wall binding domain) ของเชื้อมิวแทนส์ สเตรปโตคอคคัส ได้อย่างจำเพาะ ด้วยความจำเพาะของโดเมนนี้ หากตัดต่อยีนส์โดยเอาส่วนคาตาไลติกโดเมนที่ใช้ในการย่อยสลายเปปทิโดไกลแคนออกไป ก็จะสามารถใช้เอนไซม์ดังกล่าวนี้จับกับผนังเซลล์ของมิวแทนส์ สเตรปโตคอคคัส เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณของเชื้อได้ [2,3]

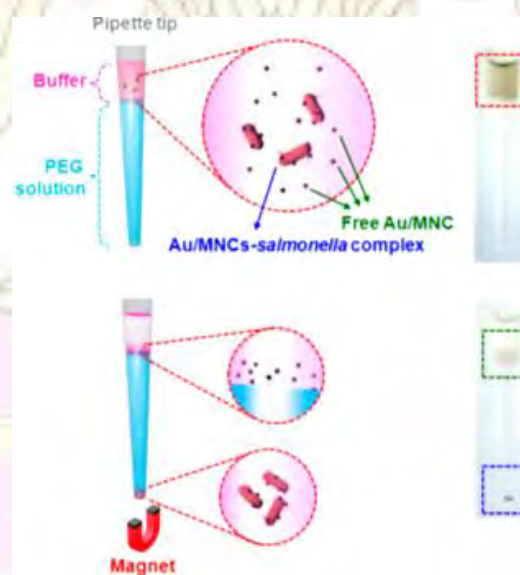


รูปที่ 1.1 โครงสร้างของ peptidoglycan

การตรวจวัดปริมาณของเชื้อแบคทีเรียในงานวิจัยที่ผ่านมาหลายวิธี เช่น การตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยวิธีพอร์เพลท และสเปรดเพลท อิมมูโนวิทยา ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอร์ เซอร์เฟซพลาสมอนเรโซแนนซ์ วิธีการทางเคมีไฟฟ้า ฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรโฟโตเมทรี เป็นต้น วิธีการดังกล่าวบางวิธีต้องใช้เวลาในการ

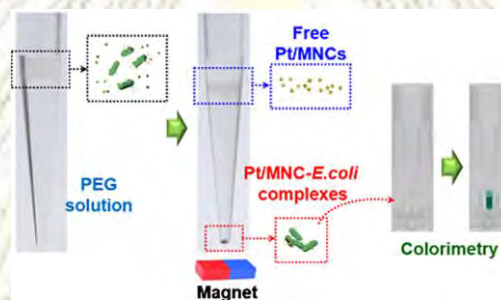
วิเคราะห์นาน เครื่องมืออุปกรณ์มีราคาแพง ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการทดสอบ และในงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการนำอนุภาคระดับนาโนเมตรของแม่เหล็ก (magnetic nanoparticle, MNPs) ตรึง cell wall binding domain ของ automutanolysin เพื่อนำไปประยุกต์ใช้กับการตรวจวัดเชื้อสเตรปโตคอคคัสมิวแทนส์ ทำให้งานวิจัยนี้สนใจที่จะพัฒนาการตรวจวัดปริมาณของแบคทีเรีย โดยใช้กลุ่มอนุภาคระดับนาโนเมตรของแม่เหล็ก (magnetic nanoparticle clusters, MNCs) เป็นวัสดุสำหรับจับกับเชื้อ โดยทั่วไปนิยมใช้อนุภาคแบบแมกนีไทต์ ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) หรือแมกฮีไมต์ ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) ซึ่งมีสมบัติในการตอบสนองต่อสนามแม่เหล็กภายนอกได้อย่างรวดเร็ว มีขนาดอยู่ในช่วง 5-500 นาโนเมตร อนุภาคมีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูงทำให้ตรึงหมู่ฟังก์ชันต่างๆได้ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้กับงานที่สนใจ และมีความเสถียรมากกว่าเมื่อเทียบกับอนุภาคแม่เหล็กนาโน magnetic nanoparticles (MNPs) ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการนำอนุภาคแม่เหล็กนาโนมาใช้ในการตรวจวัดแบคทีเรีย ได้แก่

ในปี ค.ศ. 2013 Kwon และคณะ [4] ได้ทำการเคลือบอนุภาคทองคำนาโนบนพื้นผิวกลุ่มอนุภาคแม่เหล็กนาโน (Au/MNCs) เพื่อตรวจวัดเชื้อ *Salmonella* ในน้ำนม โดยตรึง anti-*Salmonella* ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ *Salmonella* บนพื้นผิวของอนุภาคทองคำนาโน โดยใช้ EDC/NHS เป็นรีเอเจนต์คู่ควบ จากนั้นจึงแยกแบคทีเรียที่ต้องการตรวจวัดออกจากน้ำนมตัวอย่าง โดยอาศัยสนามแม่เหล็กภายนอก ตามด้วยการดูดสารละลายที่จับเชื้อไว้ในปลายปิเปต ที่มีการเติม poly(ethylene glycol) (PEG) ซึ่งเป็นสารละลายโพลิเมอร์ที่มีความหนืด แยกอนุภาคที่จับกับเชื้อออกจากอนุภาคที่จับกับเชื้อด้วยกระบวนการ magnetophoretic chromatography เป็นเวลา 10 นาที สามารถตรวจพบอนุภาคที่จับกับเชื้อ *Salmonella* ได้ตั้งแต่ความเข้มข้น 100 colony forming unit per milliliter (CFU/mL) ด้วยตาเปล่า เนื่องจากแบคทีเรียมีความเข้มข้นที่ปลายท้ายแคบของปิเปต และวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโดยใช้เทคนิค UV-vis spectroscopy (รูปที่ 1.2)



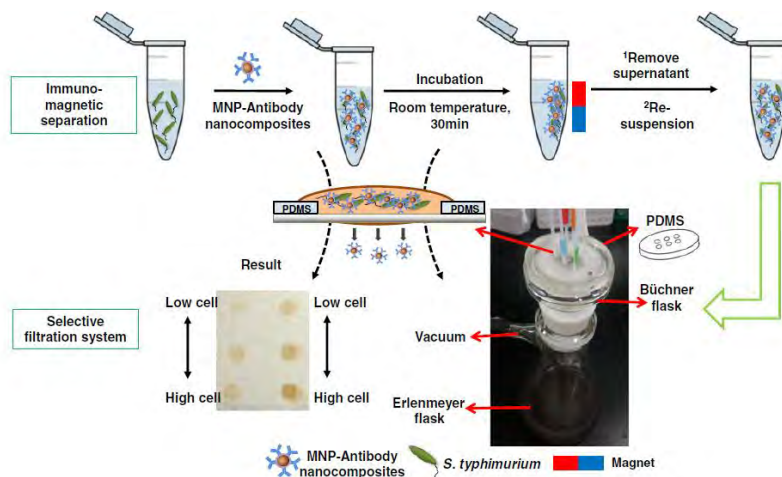
รูปที่ 1.2 ขั้นตอนการแยกอนุภาคที่จับกับเชื้อออกจากอนุภาคที่ไม่จับกับเชื้อด้วยกระบวนการ magnetophoretic chromatography [4]

ในปี ค.ศ. 2015 Kwon และคณะ [5] ได้เคลือบอนุภาคแพลตินัมนาโนบนพื้นผิวของกลุ่มอนุภาคแม่เหล็กนาโน (Pt/MNCs) เพื่อตรวจวัดเชื้อ *Escherichia coli* O157:H7 (*E. coli*) ในน้ำนมตัวอย่าง โดยตรง anti-*E. coli* ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ *E. coli* โดยใช้ 2-mercaptoethylamine เพื่อตัดพันธะไดซัลไฟด์ จะได้ half antibody fragments แล้วตรึงผ่านพันธะซัลไฟด์-โลหะ บนพื้นผิวของอนุภาคแพลตินัม แยกแบคทีเรียที่ต้องการตรวจวัดออกจากน้ำนมตัวอย่าง โดยอาศัยสนามแม่เหล็กภายนอก ตามด้วยการดูดสารละลายที่จับเชื้อไว้ในปลายปิเปตที่เติม poly(ethylene glycol) (PEG) ซึ่งเป็นสารละลายโพลิเมอร์ที่มีความหนืด แยกอนุภาคที่จับกับเชื้อออกจากอนุภาคที่ไม่จับกับเชื้อด้วยกระบวนการ magnetophoretic chromatography เป็นเวลา 10 นาที ขยายสัญญาณการจับเชื้อด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชันของ tetramethylbenzidine (TMB) โดยมีอนุภาคแพลตินัมนาโนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการแตกตัวของ hydrogen peroxide ให้เป็น OH radical ซึ่งเป็นตัวออกซิไดซ์ TMB ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย และความเข้มสีแปรผันตามปริมาณของเชื้อ *E. coli* สามารถวัดปริมาณเชื้อ *E. coli* ได้ตั้งแต่ความเข้มข้น 10 CFU/mL ด้วยเทคนิค UV-vis spectroscopy (รูปที่ 1.3)



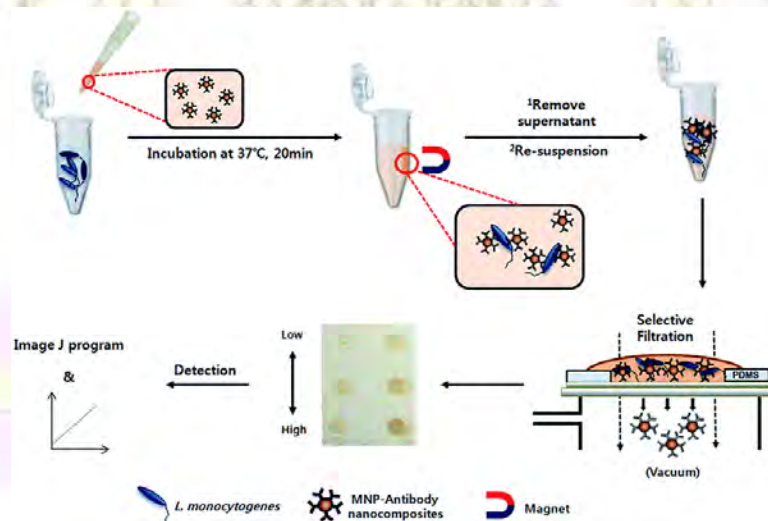
**รูปที่ 1.3** ขั้นตอนการแยกอนุภาคที่จับกับเชื้อออกจากอนุภาคที่ไม่จับกับเชื้อด้วยกระบวนการ magnetophoretic chromatography และขยายสัญญาณการจับเชื้อโดยอาศัยแพลตินัมที่เคลือบอยู่บนกลุ่มอนุภาคแม่เหล็กนาโนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ tetramethylbenzidine (TMB) [5]

ในปี ค.ศ. 2014 Shim และคณะ [6] ได้สังเคราะห์ MNPs เพื่อทดสอบการจับกับเชื้อ *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) โดยตรง anti-*S. typhimurium* ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ *S. typhimurium* บนพื้นผิวของอนุภาค ผ่านการสร้างพันธะระหว่างหมู่คาร์บอกซิลบนพื้นผิว MNPs และ หมู่เอมีนของ anti-*S. typhimurium* โดยใช้ EDC เป็นรีเอเจนต์คู่ควบ จากนั้นจึงแยกแบคทีเรียที่ต้องการตรวจวัดออกจากสารเจือปนอื่นๆ โดยอาศัยสนามแม่เหล็กภายนอก ตามด้วยการกรองด้วยกระดาษกรองแบบเลือกผ่าน (selective filtration) โดยใช้เมมเบรนเซลลูโลสแอซิดที่รูพรุนมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8 ไมโครเมตร เพื่อแยกเชื้อที่ถูกจับด้วยอนุภาคและวิเคราะห์ปริมาณของเชื้อจากความเข้มสีที่ปรากฏบนแผ่นเมมเบรน โดยพบว่าความเข้มของสีบนแผ่นเมมเบรนแปรผันตรงกับปริมาณของแบคทีเรีย ทั้งนี้สามารถตรวจวัดปริมาณแบคทีเรียได้ความเข้มข้นต่ำสุดที่  $2 \times 10^1$  CFU/mL (รูปที่ 1.4)



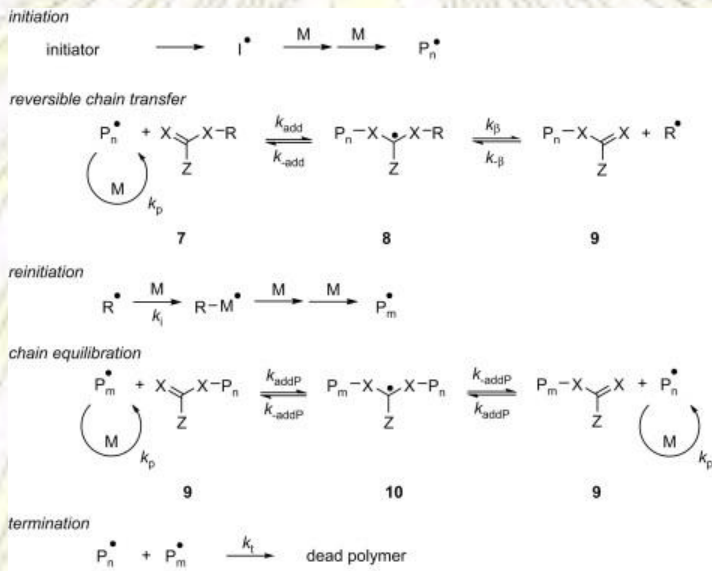
รูปที่ 1.4 ขั้นตอนการตรวจวัดเชื้อ *S. typhimurium* ด้วยอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ตรึง anti-*S. typhimurium* [6]

ในปี ค.ศ. 2014 Shim และคณะ [7] ได้สังเคราะห์ MNPs เพื่อทดสอบการจับกับเชื้อ *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) โดยตรึง anti-*L. monocytogenes* ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ *L. monocytogenes* บนพื้นผิวของอนุภาค ผ่านการสร้างพันธะระหว่างหมู่คาร์บอกซิลบนพื้นผิว MNPs และ หมู่อะมิโนของ anti-*L. monocytogenes* โดยใช้ EDC เป็นรีเอเจนต์คู่ควบ จากนั้นจึงแยกแบคทีเรียที่ต้องการตรวจวัดออกจากสารเจือปนอื่นๆ โดยอาศัยสนามแม่เหล็กภายนอก ตามด้วยการกรองด้วยกระดาษกรองแบบเลือกผ่าน โดยใช้เมมเบรนไนโตรเซลลูโลสที่รูพรุนมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.2 ไมโครเมตร เพื่อแยกเชื้อที่ถูกจับด้วยอนุภาค และวิเคราะห์ปริมาณของเชื้อจากความเข้มสีที่ปรากฏบนแผ่นเมมเบรน โดยพบว่าความเข้มของสีบนแผ่นเมมเบรนแปรผันตรงกับปริมาณของแบคทีเรีย ทั้งนี้สามารถตรวจวัดปริมาณแบคทีเรียที่อยู่ในสารละลายและผักได้ความเข้มข้นต่ำสุดที่  $2 \times 10^1$  cell/mL และ  $1 \times 10^2$  cell/g ตามลำดับ (รูปที่ 1.5)



รูปที่ 1.5 ขั้นตอนการตรวจวัดเชื้อ *L. monocytogenes* ด้วยอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ตรึงด้วย anti-*L. monocytogenes* [7]

ในงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการนำพอลิเมอร์กราฟต์บนพื้นผิวอนุภาคนาโน และนำมาประยุกต์ในการตรึงสารชีวโมเลกุลหรือโปรตีนบนพอลิเมอร์ เนื่องจากพอลิเมอร์มีปริมาณหมู่ฟังก์ชันเป็นจำนวนมากต่อพื้นที่ มีความสามารถในการบวมตัว และความยืดหยุ่นของโซ่พอลิเมอร์ ทำให้สารชีวโมเลกุลหรือโปรตีนสามารถเข้าถึงโมเลกุลพอลิเมอร์ได้ง่าย ส่งผลให้การตรึงสารชีวโมเลกุลบนพอลิเมอร์ที่กราฟต์บนอนุภาคนาโนมีประสิทธิภาพมากขึ้น นอกจากนี้การกราฟต์พอลิเมอร์ที่เหมาะสมยังช่วยทำให้อนุภาคนาโนมีเสถียรภาพในการกระจายตัวในตัวกลางตามต้องการหากเลือกพอลิเมอร์ที่เหมาะสมได้ การตรึงพอลิเมอร์ บนอนุภาคนาโนเพื่อให้ได้ความหนาแน่นในการกราฟต์สูงมักนิยมทำผ่านปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันริเริ่มบนพื้นผิว (surface-initiated polymerization) โดยในงานวิจัยนี้สนใจการทำปฏิกิริยาผ่านกลไกแบบ reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) ซึ่งเหมาะสำหรับใช้ในการตรึงพอลิเมอร์ที่มีความสามารถละลายน้ำได้ดี เหมาะแก่การประยุกต์ใช้ในการตรึงสารชีวโมเลกุล (รูปที่ 1.6)



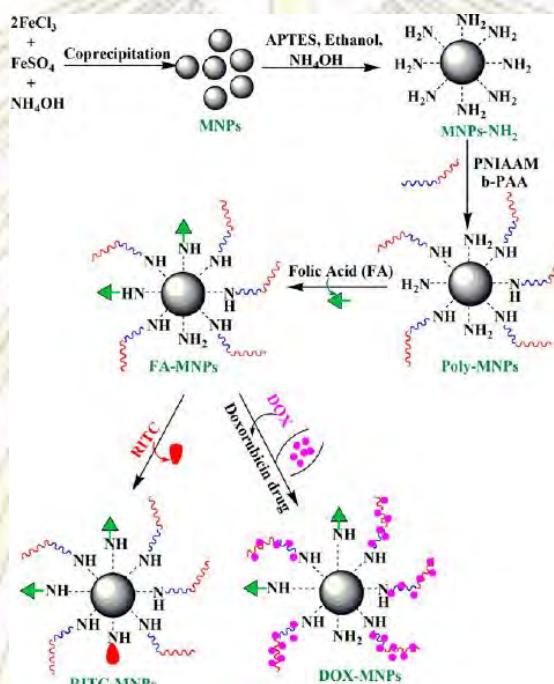
รูปที่ 1.6 กลไกการเกิดปฏิกิริยา RAFT polymerization [8]

ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการกราฟต์พอลิเมอร์บนอนุภาคแม่เหล็กนาโน ด้วยปฏิกิริยา RAFT polymerization ได้แก่

ในปี ค.ศ. 2006 Wang และคณะ [9] ได้สังเคราะห์ MNPs ที่บนพื้นผิวตรึงด้วยพอลิเมอร์ โดยได้ทดลองทำการตรึง poly(acrylic acid) หรือ polystyrene ลงบนพื้นผิว ซึ่งเริ่มจากนำ MNPs มาผ่านปฏิกิริยา ozone treatment เพื่อเกิดหมู่ peroxide บนพื้นผิว MNPs ที่จะทำหน้าที่เป็นสารริเริ่มปฏิกิริยาและใช้ 1-phenylethyl dithiobenzoate (PVB) ทำหน้าที่เป็นสารถ่ายโอนโซ่ แล้วนำไปทำปฏิกิริยา RAFT polymerization เพื่อตรึงพอลิเมอร์ลงบนพื้นผิว จากการทดลองพบว่า MNPs ที่ตรึงพอลิเมอร์ลงบนพื้นผิวสามารถกระจายตัวและมีความเสถียรดีกว่า MNPs ที่ไม่ได้ตรึงพอลิเมอร์ลงบนพื้นผิว

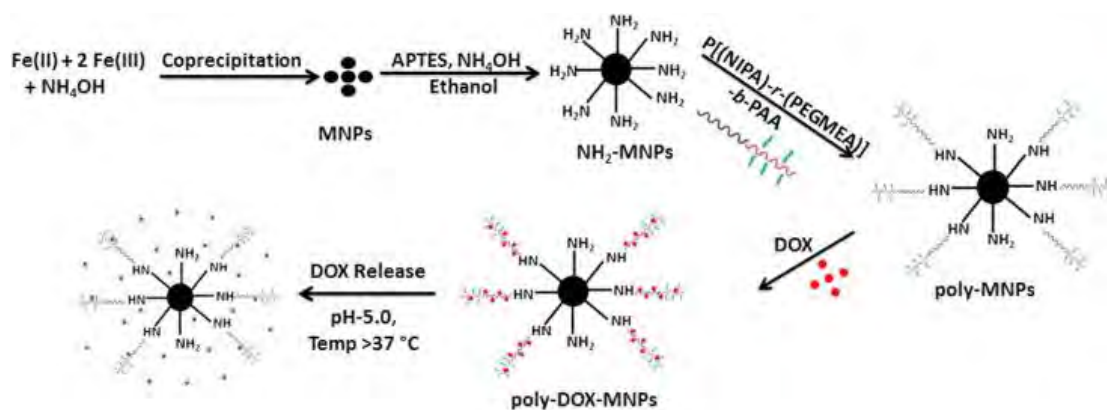


ในปี ค.ศ. 2013 Sahoo และคณะ [10] ได้สังเคราะห์ MNPs ด้วยวิธีการตกตะกอนร่วม จากนั้นทำปฏิกิริยากับ 3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) เพื่อทำให้พื้นผิวของอนุภาคมีหมู่แอมิโน จากนั้นกราฟต์พื้นผิว MNPs ด้วย poly(N-isopropylacrylamide)-block-poly(acrylic acid) (PNIAAM-b-PAA) ด้วยปฏิกิริยา RAFT polymerization โดยใช้ EDC/NHS เป็นรีเอเจนต์คู่ควบ ตรึงหมู่แอมิโนบางส่วนที่ไม่ได้ติดโคพอลิเมอร์ด้วย folic acid (FA) ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับผนังเซลล์ที่มี folate receptor แล้วตรึง doxorubicin (DOX) และ rhodamine B isothiocyanate (RITC) เพื่อเป็นสารนำส่งยาต้านมะเร็ง จากการทดสอบการนำส่งยาเข้าไปในเซลล์มะเร็ง พบว่าสามารถนำส่งยาไปยังเซลล์เป้าหมายได้และทำลายเซลล์มะเร็งได้สำเร็จที่พีเอช 5.0 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (รูปที่ 1.7)



รูปที่ 1.7 การกราฟต์ PNIAAM-b-PAA บน MNPs [10]

ในปี ค.ศ. 2016 Dutta และคณะ [11] ได้สังเคราะห์ MNPs ด้วยวิธีการตกตะกอนร่วม ทำพื้นผิวของ MNPs ให้มีหมู่แอมิโนโดยการทำปฏิกิริยากับ APTES จากนั้นกราฟต์ด้วย poly(N-isopropylacrylamide-*ran*-poly(ethylene glycol) methyl ether acrylate)-*block*-poly(acrylic acid) (P(NIPA-*r*-PEGMEA)-*b*-PAA) ผ่านปฏิกิริยา RAFT polymerization โดยใช้ EDC/NHS เป็นรีเอเจนต์คู่ควบ แล้วตรึง doxorubicin (DOX) เพื่อเป็นสารนำส่งยาต้านมะเร็ง จากการทดสอบการนำส่งยาเข้าไปในเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่พีเอช และอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ประเมินการทดสอบด้วย MTT assay พบว่าสามารถปลดปล่อยยาที่ไลโซโซมของเซลล์มะเร็งได้ที่พีเอช 5.0 และอุณหภูมิมากกว่า 37 องศาเซลเซียส (รูปที่ 1.8)



รูปที่ 1.8 การกราฟต์ P(NIPA)-*r*-(PEGMEA)-*b*-PAA บน MNP [11]

งานวิจัยนี้สนใจที่จะพัฒนาการตรวจวัดปริมาณของแบคทีเรียโดยใช้ MNCs เตรียมผ่านกระบวนการ solvothermal method [12] ซึ่งจะทำให้ได้อนุภาคที่มีขนาดและรูปร่างสม่ำเสมอ จากนั้นจึงนำไปกราฟต์ด้วยพอลิแอคริลิกแอซิด (poly(acrylic acid), PAA) [9] ผ่านปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันริเริ่มจากพื้นผิว (surface-initiated polymerization) ที่มีกลไกแบบ reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) ซึ่งนอกจากจะช่วยเพิ่มเสถียรภาพการกระจายตัวในน้ำของ MNCs แล้ว ยังทำให้พื้นผิวนุภาคมีหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group) เป็นจำนวนมาก พร้อมทั้งทำปฏิกิริยากับหมู่เอมิโนของเอนไซม์เพปติโดไกลแคนไฮโดรเลสที่มีเฉพาะส่วนที่จับกับผนังเซลล์ (cell wall binding domain) ที่จำเพาะเจาะจงในการจับยึดกับสเตรปโตคอคคัสมีวแทนส์ ซึ่งจะสามารถใช้ MNCs ที่ทำให้เสถียรด้วยพอลิแอคริลิกแอซิดและคอนจูเกตกับเพปติโดไกลแคนไฮโดรเลสนี้ในการแยกและการตรวจวัดสเตรปโตคอคคัสมีวแทนส์ ซึ่งประกอบด้วยสองขั้นตอนหลัก โดยขั้นแรกเป็นการแยกแบคทีเรียที่ต้องการตรวจวัดออกจากสารตัวอย่าง อาศัยหลักการแยกเชื้อด้วยสนามแม่เหล็ก (magnetic separation) [13] โดยใช้ MNCs เป็นวัสดุสำหรับจับกับเชื้อ ขั้นที่สองเป็นการนำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกแล้วมากรองแบบเลือกผ่าน (selective filtration) [6] บนเมมเบรน ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของรูพรุนใหญ่กว่า MNCs เริ่มต้น แต่เล็กกว่า MNCs ที่จับกับเชื้อแบคทีเรียแล้ว ความเข้มข้นของสีบนแผ่นเมมเบรนจะแปรผันตามปริมาณของ MNCs ที่จับกับเชื้อแบคทีเรียและติดค้างอยู่บนเมมเบรน ทำให้สามารถวิเคราะห์หาปริมาณของเชื้อแบคทีเรียได้จากการดูสีที่ปรากฏ (colorimetric method) บนแผ่นเมมเบรนที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. สังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของกลุ่มอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ทำให้เสถียรด้วยพอลิแอคริลิกแอซิดคอนจูเกตกับเอนไซม์เพปติโดไกลแคนไฮโดรเลส
2. ศึกษาการใช้กลุ่มอนุภาคแม่เหล็กนาโนที่ได้ในการแยกและการตรวจวัดสเตรปโตคอคคัสมีวแทนส์

### 1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้กลุ่มอนุภาคแม่เหล็กนาโนทำให้เสถียรด้วยพอลิเอคริลิกแอซิดคอนจูเกตกับเพปไทด์ไกลแคนไฮโดรเลส เพื่อใช้เป็นวัสดุในการแยกและตรวจวัดสเตรปโตคอคคัสมีวแทนส์แบบการวัดสีที่สังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า



## บทที่ 2

### การทดลอง

#### 2.1 เครื่องมือ

1. Hot plate-stirrer (PC-420D, CORNING)
2. X-ray Diffraction (XRD) (D8 Discover, Bruker)
3. Fourier Transform-Infrared Spectroscopy (FT-IR) (Thermo Scientific Nicolet 6700 FT-IR)
4. Transmission Electron Microscopy (TEM) (JEM-2010, JEOL)
5. Dynamic Light Scattering (DLS) (Malvern Nano ZS90)
6. Thermogravimetric Analysis (TGA) (TGA-8000, PerkinElmer)
7. Nuclear Magnetic Resonance ( $^1\text{H-NMR}$ ) Spectrometer (Model Mercury-400, Varian)
8. Epson Perfection V33 scanner
9. Spectrophotometer (GENESYS 20, Thermo Scientific)
10. Gel electrophoresis (Mini-PROBEAN<sup>®</sup> Tetra Cell Systems, BIO-RAD)
11. Teflon-lined stainless-steel autoclave 100 mL

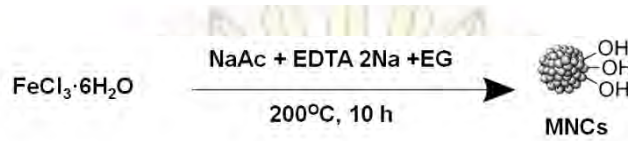
#### 2.2 วัสดุและสารเคมี

1. Iron(III) chloride hexahydrate ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )
2. Sodium acetate (NaAc)
3. Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA 2Na)
4. Ethylene glycol (EG)
5. Ethanol
6. Milli-Q water
7. Ammonium solution
8. 3-Aminopropyltriethoxysilane (APTES)
9. 4,4'-Azobis(4-cyanopentanoic acid) (ACVA)
10. N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC)
11. 4-Dimethylaminopyridine (DMAP)
12. Dimethylformamide (DMF)

13. 4-Cyano-4-(phenylcarbonothioylthio)pentanoic acid
14. Sterile phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4
15. Deionized water
16. Acrylic acid (AA)
17. Cell wall binding domain (CWBD)
18. *Escherichia coli* (*E. coli*) BL-21
19. Luria-Bertani (LB) agar
20. Luria-Bertani (LB) broth
21. Ampicillin
22. Isopentenyltransferases (IPTs)
23. Lysis buffer pH 8.0
24. Wash buffer pH 8.0
25. Elution buffer pH 8.0
26. Protease inhibitors
27. Lysozyme
28. HIS-Select® Nickel Affinity Gel
29. *N*-hydroxysuccinimide (NHS)
30. 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (*EDC*)
31. *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)
32. Brain heart infusion (BHI) agar
33. Brain heart infusion (BHI) broth
34. Cellulose acetate membrane pore size 0.8  $\mu\text{m}$
35. Filter membrane pore size 125  $\mu\text{m}$
36. PS-screen printed paper

## 2.3 วิธีการทดลอง

### 2.3.1 การสังเคราะห์ magnetic nanoparticle clusters (MNCs)

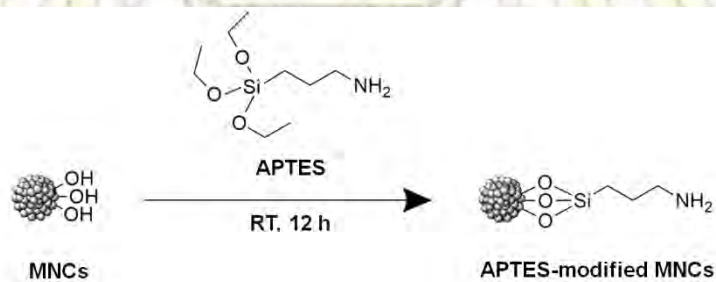


#### รูปที่ 2.1 สมการแสดงการสังเคราะห์ magnetic nanoparticle clusters (MNCs)

สังเคราะห์ MNCs ด้วยกระบวนการ solvothermal method เริ่มจากซึ่ง iron(III) chloride hexahydrate ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 0.68 กรัม (2.5 มิลลิโมล) ที่เป็นสารตั้งต้น ซึ่ง sodium acetate (NaAc) 1.2 กรัม (0.015 โมล) ซึ่ง ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA 2Na) 0.034 กรัม (0.01 มิลลิโมล) เพื่อให้ผลิตภัณฑ์มีความคงตัว เติม ethylene glycol (EG) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เพื่อละลายสาร นำไปเขย่าด้วยการสั่นสะเทือนที่คลื่นความถี่ 50 เฮิรซ์ เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน สารที่ได้มีลักษณะเป็นคอลลอยด์สีดำอมเหลือง เทสารละลายลงใน teflon-lined stainless-steel autoclave ขนาด 100 มิลลิลิตร ให้สารทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง ภายในเครื่อง stirred reactor หลังจากสารเย็นตัวลงที่อุณหภูมิห้อง ล้างตะกอนสีดำที่ได้ด้วยน้ำและเอทานอลอย่างละ 3 รอบ ตามลำดับ ทำให้แห้งด้วยการอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ได้สารเป็นของแข็งเม็ดละเอียดสีน้ำตาลเข้มเป็นผลิตภัณฑ์

### 2.3.2 การกราฟต์พอลิเอคริลิกแอซิดบน MNCs

#### 2.3.2.1 การติด 3-Aminopropyltriethoxysilane (APTES) บนพื้นผิวของ MNCs

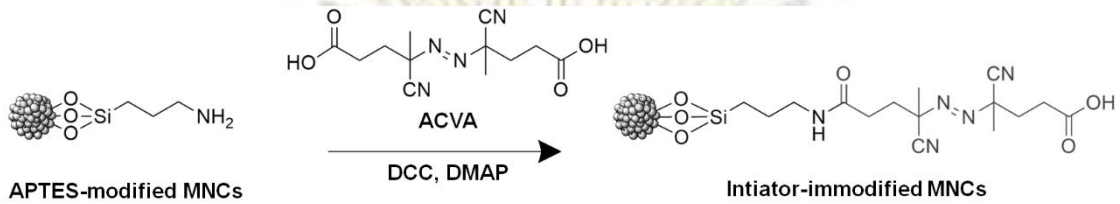


#### รูปที่ 2.2 สมการแสดงการติด APTES บนพื้นผิวของ MNCs

ซึ่ง MNCs 0.05 กรัม เติมสารละลายผสมปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในอัตราส่วนโดยปริมาตรของ ethanol : milli-Q water = 9:1 ใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายแอมโมเนียปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ด้วยไมโครปิเปต นำไปเขย่าด้วยการสั่นสะเทือนที่คลื่นความถี่ 50 เฮิรซ์ เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ MNCs กระจายตัวในสารละลาย เติม APTES ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ด้วยไมโครปิเปต เขย่าให้สารเข้ากันด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา

12 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้าง MNCs ที่ติด APTES ด้วย ethanol 5 รอบ ทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

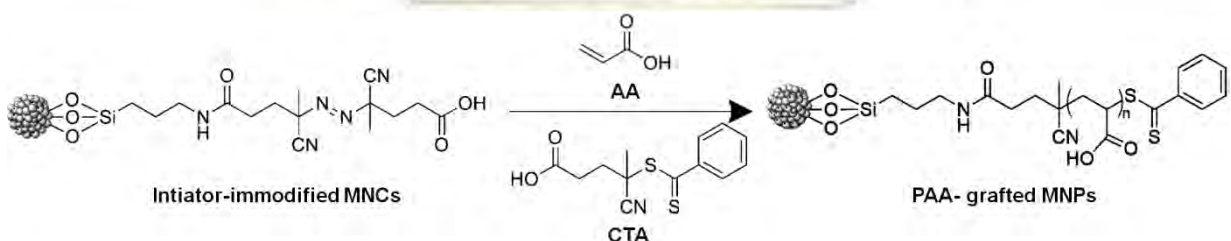
### 2.3.2.2 การติดสารริเริ่มลงบน MNCs



### รูปที่ 2.3 สมการแสดงการติดสารริเริ่มบนพื้นผิวของ MNCs

ซึ่ง 4,4'-Azobis(4-cyanopentanoic acid) (ACVA) (สารริเริ่ม) 0.2114 กรัม (37.5 มิลลิโมล) เป็นสารริเริ่มสำหรับปฏิกิริยา RAFT polymerization ซึ่ง N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) 1.943 กรัม (37.5 มิลลิโมล) เพื่อเป็นรีเอเจนต์คู่ควบ และ 4-dimethylaminopyridine (DMAP) 9.143 กรัม (3.74 มิลลิโมล) เพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในอัตราส่วนโดยโมลของ ACVA : DCC : DMAP = 1 : 1 : 0.1 ลงในขวดแก้วขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีแท่งแม่เหล็กอยู่ ปิดด้วยจุกยางและรัดด้วยลวดทองแดง เติม dimethylformamide (DMF) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ด้วย syringe ลงในขวดแก้วเพื่อละลายสาร นำไปผ่านแก๊สไนโตรเจนพร้อมคนสารละลายด้วยแท่งแม่เหล็ก เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำ MNCs ที่ได้จากขั้นตอนที่ 2.3.2.1 เทใส่ลงขวดแก้วขนาด 50 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกยางและรัดด้วยลวดทองแดง นำไปผ่านแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นถ่ายเทสารละลายที่เตรียมไว้ด้วย syringe ลงในขวดแก้ว นำไปเขย่าด้วยการสั่นสะเทือนที่ความถี่ 50 เฮิรซ์ เป็นเวลา 30 นาที ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน เพื่อให้สารกระจายตัวในสารละลาย แล้วเขย่าด้วยเครื่องเขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างสารด้วย DMF และ ethanol อย่างละ 4 รอบ ตามลำดับ ทำ MNCs ให้แห้งภายใต้สุญญากาศ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

### 2.3.2.3 การทำปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันของแอคริลิกแอซิด



### รูปที่ 2.4 สมการแสดงการทำปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันของแอคริลิกแอซิดบนพื้นผิวของ MNCs

ซึ่ง ACVA 7.00 มิลลิกรัม (0.5 มิลลิโมล) เป็นสารริเริ่มทำปฏิกิริยาและ 4-cyano-4-(phenylcarbonothioylthio) pentanoic acid 27.9 มิลลิกรัม (5 มิลลิโมล) เป็นสารถ่ายโอนโซ่หรือ chain Transfer Agent (CTA) ในอัตราส่วนโดยโมล CTA : ACVA = 10 : 1 ลงในขวดแก้วขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีแท่ง

แม่เหล็กอยู่ เติม milli-Q water ที่ต้มจนเดือดแล้วทำให้เย็นโดยผ่านแก๊สไนโตรเจนปริมาตร 9 มิลลิลิตร เติม phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในอัตราส่วนโดยปริมาตร milli-Q water : PBS = 9 : 1 เติมสารละลายแอสทริกซ์ปริมาตร 685.6 ไมโครลิตร (0.8 โมล) ด้วยไมโครปิเปต เติมน้ำที่เตรียมไว้จากขั้นตอนที่ 2.3.2.2 ปิดด้วยจุกยางและรัดด้วยลวดทองแดง นำไปเขย่าด้วยการสั่นสะเทือนที่ความถี่ 50 เฮิรซ์ พร้อมผ่านแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 30 นาที นำขวดแก้วที่บรรจุสารใส่ลงในอ่างน้ำมันที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส พร้อมคนสารด้วยแท่งแม่เหล็ก เป็นเวลา 20 ชั่วโมง หลังจากทำปฏิกิริยาเสร็จแล้วแบ่งสารละลายสี่ส่วน 300 ไมโครลิตร ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy เพื่อหาองค์ประกอบของพอลิแอสทริกซ์ที่เกิดขึ้นในสารละลายก่อนทำให้บริสุทธิ์และหา % conversion ของการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน นำสารละลายส่วนที่เหลือผ่านกระบวนการไดอะไลซิสเป็นเวลา 3 วัน โดยใช้ถุงไดอะไลซิส (molecular weight cut off 3500) ทำให้แห้งด้วยกระบวนการ freeze dry แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy เพื่อหา degree of polymerization (DP) และน้ำหนักโมเลกุล ล้างสารที่เป็นของแข็งสีน้ำตาลเข้มด้วย ethanol 3 รอบ และ deionized water 2 รอบ ทำให้แห้งด้วยกระบวนการ freeze dry

### 2.3.3 การเตรียมโปรตีน Cell wall binding domain (CWBD)

เกลี่ยเชื้อ *Escherichia coli* (*E. coli*) BL-21 ที่อยู่ในสารละลาย ใส่ลงในเพลตอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB) agar เพื่อทำให้เซลล์แยกออกจากกันเป็นโคโลนีเดี่ยว นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อโคโลนีเดี่ยว 2-3 โคโลนี ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลาย LB broth 5 มิลลิลิตร และ ampicillin เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร นำไปบ่มเชื้อและเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดสารละลาย 1 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุ LB broth 100 มิลลิลิตร และ ampicillin เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มเชื้อและเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4.5 ชั่วโมง สารละลายที่ได้มีค่า optical density (OD) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ประมาณ 0.4-0.5 นำไปบ่มเชื้อและเขย่าที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติม isopentenyltransferases (IPTs) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ 100 ไมโครลิตร ลงในสารละลาย นำไปบ่มเชื้อต่อและเขย่าที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงสารละลายที่ได้จนตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนสีเหลืองด้วย lysis buffer pH 8.0 ปริมาตร 38.84 มิลลิลิตร เติม lysozyme ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และ protease inhibitors 764 ไมโครลิตร นำสารผสมไปเขย่าด้วยการสั่นสะเทือนที่คลื่นความถี่สูงจนเห็นเป็นสารละลายใสสี่ส่วน นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายใสสี่ส่วนเก็บไว้สกัดโปรตีน ใช้การกรองแยกขนาดโปรตีนที่ต้องการโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ HIS-Select® Nickel Affinity Gel เป็นวัสดุภาคหนึ่ง ล้างคอลัมน์ด้วย deionized water 10



มิลลิลิตร และ lysis buffer 5 มิลลิลิตร เสาละลายที่เก็บไว้ทั้งหมดลงในคอลัมน์และบ่มสารเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อสารละลายที่มีโปรตีนให้จับกับวุ้นภาคนิ่ง ล้างคอลัมน์ด้วย wash buffer pH 8.0 ปริมาตร 90 มิลลิลิตร แล้วชะล้างโปรตีนด้วย elution buffer pH 8.0 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำสารละลายโปรตีนผ่านกระบวนการไดอะไลซิสใน PBS pH 6.8 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดขนาดโปรตีนที่ได้ด้วยเทคนิค gel electrophoresis และหาความเข้มข้นของโปรตีนด้วย Bradford protein assay

### 2.3.4 การติดโปรตีน CWBD บน MNCs ที่กราฟต์ด้วยพอลิเอคริลิกแอซิด

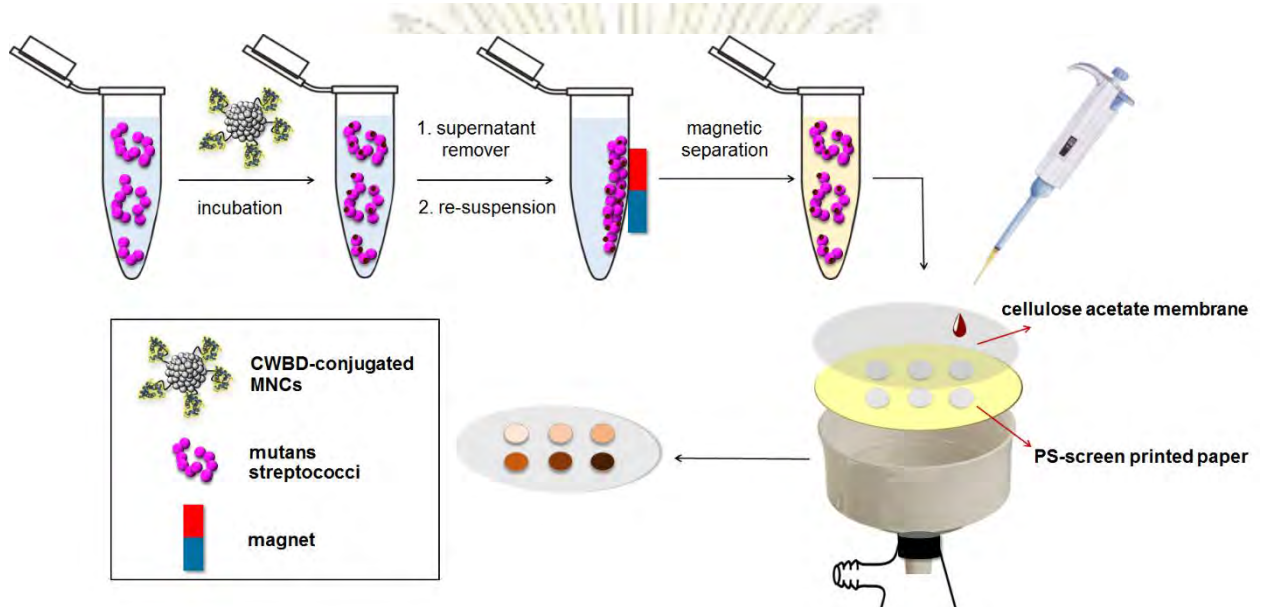
ชั่ง MNCs ที่กราฟต์ด้วยพอลิเอคริลิกแอซิด 0.005 กรัม ลงในขวดแก้วขนาดเล็ก เติม PBS pH 7.4 ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยการสั่นสะเทือนที่คลื่นความถี่ 50 เฮิรซ์ เป็นเวลา 30 นาที ชั่ง 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) 0.0383 กรัม (0.2 มิลลิโมล) และชั่ง *N*-hydroxysuccinimide (NHS) 0.0058 กรัม (0.05 มิลลิโมล) ใส่ลงในขวดแก้วขนาดเล็ก นำไปเขย่าด้วยการสั่นสะเทือนที่คลื่นความถี่ 50 เฮิรซ์ เป็นเวลา 30 นาที หุ้มรอบขวดแก้วด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ เติม CWBD ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิน้อยกว่า 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ให้สารทำปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้าง MNCs ด้วย PBS เย็น pH 7.4 ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ และ milli-Q water เย็น 5 รอบ รอบละ 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ ใส่สารในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์สีขาวขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทำให้แห้งด้วยกระบวนการ freeze dry จะได้ CWBD-conjugated MNCs เป็นผลิตภัณฑ์ เก็บสารที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### 2.3.5 การนับจำนวน *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)

เกลี่ยเชื้อ *S. mutans* UA 159 ที่อยู่ในสารละลาย (stock solution) ใส่บนเพลตอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain heart infusion (BHI) agar เพื่อทำให้เซลล์แยกออกจากกันเป็นโคโลนีเดี่ยว นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อโคโลนีเดี่ยว 2-3 โคโลนีลงในหลอดทดลองที่มีสารละลาย BHI broth 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายไปวัดค่า OD ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทำการเจือจางสารละลายด้วย BHI broth ให้มีค่า OD เริ่มต้นที่ 0.1 นำสารละลายเจือจางไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง ค่า OD ที่ได้ประมาณ 0.5 แสดงถึงปริมาณเชื้อ *S. mutans* ที่พบในสารละลายประมาณ  $10^{10}$  colony forming unit per milliliter (CFU/mL) เจือจางสารละลาย BHI broth ที่มีเชื้อด้วย sterile PBS pH 7.4 ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ให้อยู่ในช่วงความเข้มข้น  $10^9$ - $10^4$  CFU/mL แล้วดูดสารละลายปริมาตร 10 ไมโครลิตร ด้วยไมโครปิเปตใส่บนเพลตอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จะได้จำนวนเชื้อในเพลตตั้งแต่ในช่วงความเข้มข้น  $10^7$  -  $10^2$  CFU/mL นับจำนวนเชื้อ *S. mutans* ก่อนจับเชื้อด้วย CWBD-conjugated MNCs และวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

### 2.3.6 การจับเชื้อ *S. mutans* ด้วย CWBD-conjugated MNCs



**รูปที่ 2.5** ขั้นตอนการแยก CWBD-conjugated MNCs ที่จับเชื้อด้วย magnetic separation และ selective filtration

ซึ่ง CWBD-conjugated MNCs 0.15 มิลลิกรัม ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ดูด sterile PBS pH 7.4 ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ลงไปในหลอด นำไปเขย่าด้วยการสั่นสะเทือนที่คลื่นความถี่ 50 เฮิรซ์ เป็นเวลา 30 นาที ดูดสารละลายที่ได้ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม sterile PBS pH 7.4 ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ปริมาตร 0.7 มิลลิลิตร ดูดสารละลาย PBS ที่มีเชื้อ *S. mutans* ในช่วงความเข้มข้น  $10^4$ - $10^9$  CFU/mL จากขั้นตอนที่ 2.3.5 หลอดละ 0.1 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของเชื้อ *S. mutans* ตั้งแต่  $10^2$ - $10^7$  CFU/mL ทำการจับเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ใช้สนามแม่เหล็กภายนอกแยกอนุภาคที่จับกับเชื้อและไม่จับกับเชื้อออกจากสารละลายเป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดสารละลายปริมาตร 10 ไมโครลิตร ด้วยไมโครปิเปตใส่บนเพลตอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เหลือหลังจากจับเชื้อด้วย CWBD-conjugated MNCs ดูดสารละลายที่เหลือมาวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ล้างอนุภาคผสมด้วย sterile PBS pH 7.4 ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จำนวน 2 รอบ กรองอนุภาคที่จับกับเชื้อด้วยการกรองผ่านสุญญากาศ โดยวางกระดาษกรอง (Filter membrane) ที่รูพรุนมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 125 มิลลิเมตร ลงไปก่อนเพื่อปิดรูของ Büchner funnel ใส่กระดาษ PS-screen printed มีรูที่ไม่ปิดด้วย PS ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง

5 มิลลิเมตร และตามด้วย cellulose acetate membrane ที่รูพรุนมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8 ไมโครเมตร ตามลำดับ ดูด sterile PBS pH 7.4 ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ลงบนกระดาษกรองจนกระดาษกรองเปียก ดูดสารละลายที่ CWBD-conjugated MNCs จับเชื้อปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ลงบนกระดาษกรอง รอให้กระดาษกรองแห้ง สแกนกระดาษกรองด้วย Epson Perfection V33 scanner เลือกโหมดสแกน 24 bits Professional นำภาพกระดาษกรองที่ได้วัดความเข้มสีด้วยโปรแกรม Scion image



### บทที่ 3

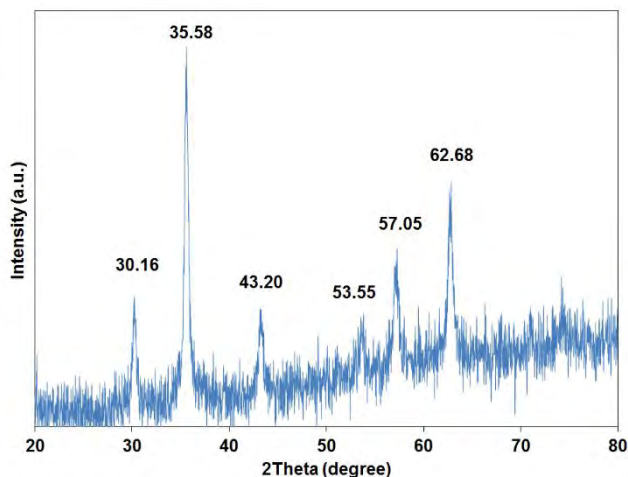
#### ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

##### 3.1 การสังเคราะห์ MNCs, การเตรียม PAA-grafted MNCs และ CWBD-conjugated MNCs

การสังเคราะห์ MNCs ทำโดยผ่านกระบวนการ solvothermal method พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค XRD แสดงผลดังรูปที่ 3.1 พบว่าเกิดพีกในช่วง  $2\theta$  ระหว่าง 30-70 องศา จำนวน 6 สัญญาณ ได้แก่  $2\theta$  เท่ากับ 30.16, 35.58, 43.20, 53.55, 57.05 และ 62.68 องศา ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับระนาบผลึกของธาตุเหล็กออกไซด์ ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  หรือ  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) ได้แก่ (220), (311), (400), (422), (511), และ (440) ตามลำดับ [14,15] แสดงว่าผลึกที่ได้มีโครงสร้างเป็น Face-centered cubic (FCC) ขนาดผลึกเฉลี่ยที่ได้จากการขยายสูงสุด 189.28 นาโนเมตร คำนวณได้จากตามสมการ Scherrer

$$D = \frac{0.9\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (3.1)$$

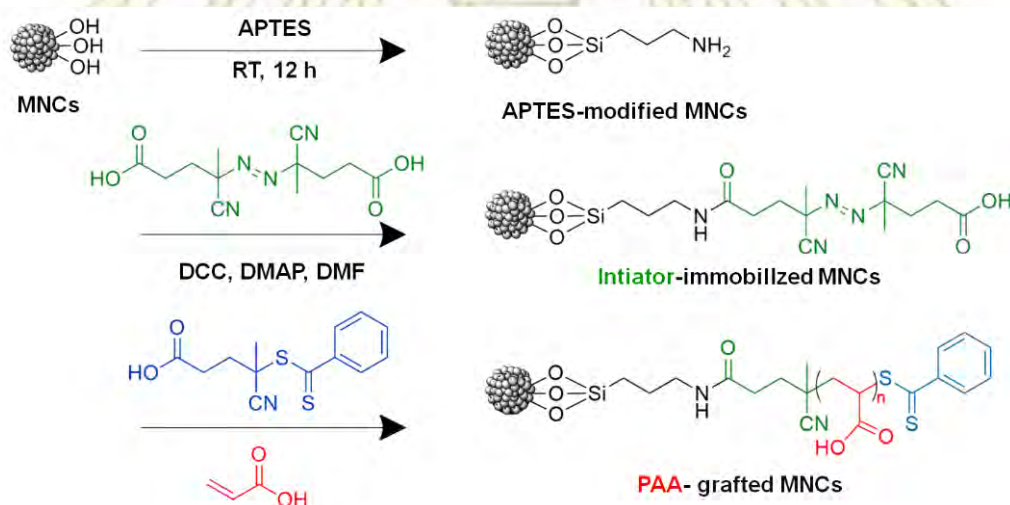
D คือ ขนาดอนุภาคเฉลี่ย(นาโนเมตร)  $\lambda$  คือ ค่าความยาวคลื่นของแหล่งกำเนิดรังสีเอกซ์ ( $\text{CuK}\alpha = 0.1540$  นาโนเมตร)  $\beta$  คือ ความกว้างที่ความสูงเป็นครึ่งหนึ่งของความสูงสูงสุดของกราฟระฆัง หรือ full width half maximum (FWHM)  $\theta$  คือ มุมของแบรกก (Bragg's angle)



รูปที่ 3.1 XRD pattern ของ MNCs

การกราฟต์พอลิแอคริลิกแอซิด (PAA) บน MNCs เริ่มจากการติดหมู่ริเริ่มปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันลงบนพื้นผิว ในงานวิจัยนี้เลือกใช้ 4,4'-azobis(4-cyanopentanoic acid) (ACVA) แต่การเกิดปฏิกิริยาระหว่างพื้นผิวของ MNCs ซึ่งเป็นสารอนินทรีย์กับตัวริเริ่มซึ่งเป็นสารอินทรีย์ทำให้พันธะที่เกิดขึ้นไม่เสถียร จำจึงเป็นต้องทำปฏิกิริยาผ่านสารประกอบ silane งานวิจัยนี้เลือกใช้ 3-aminopropyl triethoxysilane (APTES) เนื่องจากมีหมู่

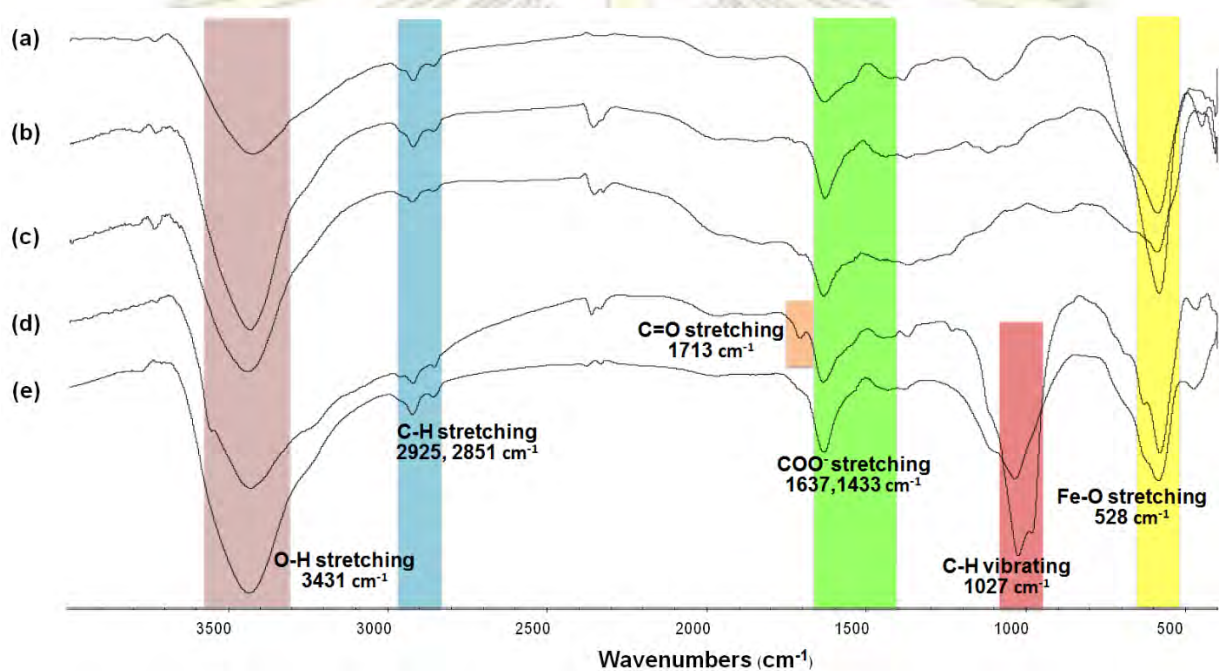
ปลายอะมิโนที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอกซิลของตัวริเริ่มได้เกิดเป็นพันธะเอไมด์ เริ่มจากการนำ MNCs มาติด APTES ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำอนุภาคล้างด้วย ethanol และทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำ MNCs ที่ติด APTES ไปติดตัวริเริ่มโดยใช้ N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) และ 4-dimethylaminopyridine (DMAP) เป็นรีเอเจนต์คู่ควบเพื่อเชื่อมระหว่างหมู่คาร์บอกซิลของตัวริเริ่มและหมู่อะมิโนของ APTES เมื่อติดตัวริเริ่มบน MNCs เป็นเวลา 20 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย DMF และ ethanol ทำให้แห้งด้วยสุญญากาศเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำอนุภาคไปกราฟต์ด้วย พอลิแอคริลิกแอซิด (PAA) บนพื้นผิวของ MNCs ด้วยปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันริเริ่มจากพื้นผิวของแอคริลิกแอซิดผ่านกลไกแบบ reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง เมื่อปฏิกิริยาลิ้นสุดลงล้างอนุภาคด้วย ethanol และ deionized water ทำให้แห้งด้วยกระบวนการ freeze dry (รูปที่ 3.2) จากการที่พื้นผิวของ MNCs ที่กราฟต์ด้วย PAA มีหมู่คาร์บอกซิลจำนวนมาก ทำให้สามารถตรึง cell wall binding domain (CWBD) ของ automutanolysin เอนไซม์ซึ่งจำเพาะเจาะจงกับเชื้อสเตรปโตคอคคัสมีแทนส์คอคโค บนพื้นผิว MNCs ที่กราฟต์ด้วย PAA โดยใช้ EDC/NHS เป็นรีเอเจนต์คู่ควบได้



รูปที่ 3.2 สมการแสดงการเตรียม PAA-grafted MNCs

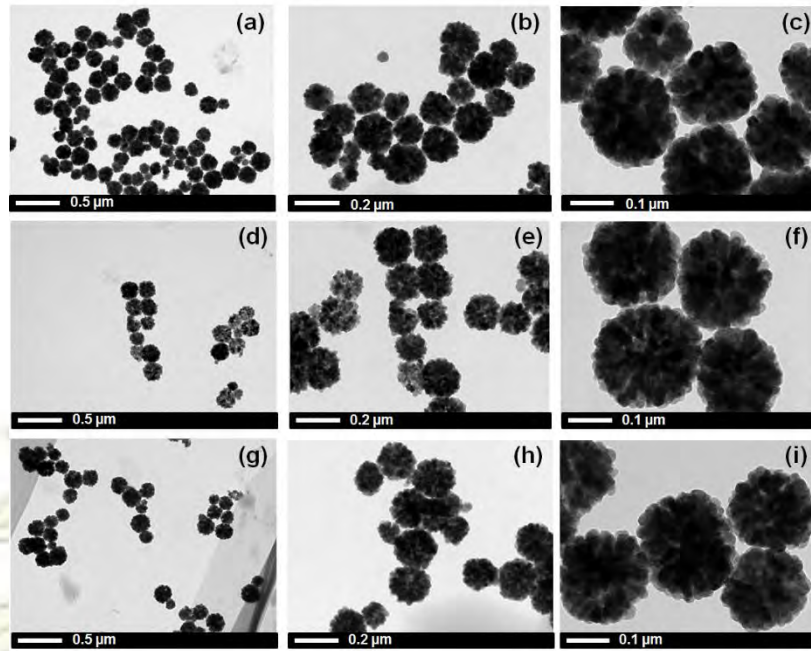
จากนั้นนำ MNCs, MNC ที่ติด APTES, MNCs ที่ติด initiator, PAA-grafted MNCs และ CWBD-conjugated MNCs ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค FT-IR ดังแสดงผลในรูปที่ 3.3 พิจารณาสเปกตรัม a ถึง e พบสัญญาณของ Fe-O stretching ที่  $528\text{ cm}^{-1}$  เป็นของสารประกอบเหล็กออกไซด์ ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) พบ  $\text{COO}^-$  stretching ที่  $1433$  และ  $1637\text{ cm}^{-1}$  เป็น symmetric และ asymmetric ( $\nu_{\text{as}}$ ) stretching ของหมู่คาร์บอกซิเลตที่มีองค์ประกอบของ EDTA 2Na พบ  $\text{sp}^3$  C-H stretching ที่  $2851$  และ  $2925\text{ cm}^{-1}$  เป็นของหมู่ไฮโดรคาร์บอนที่มีอยู่ใน EDTA 2Na และพบ O-H stretching ที่  $3431\text{ cm}^{-1}$  เป็นของหมู่ไฮดรอกซิล แสดงว่าอนุภาคที่สังเคราะห์

ได้มีเหล็กออกไซด์เป็นองค์ประกอบที่ถูกทำให้เสถียรด้วย EDTA 2Na และมีหมู่ไฮดรอกไซด์ล้อมรอบ MNCs พิจารณาสเปกตรัม d พบสัญญาณของ C=O stretching ที่  $1713\text{ cm}^{-1}$  เป็นของหมู่คาร์บอกซิลของ PAA แสดงว่าสามารถกราฟต์ PAA บนพื้นผิวของ MNCs ได้จริง พิจารณาสเปกตรัม d และ e พบสัญญาณของ C-H vibrating ที่  $1027\text{ cm}^{-1}$  เป็นของหมู่ไฮโดรคาร์บอนที่เป็นสายโซ่หลักของ PAA พิจารณาสเปกตรัม e ไม่พบสัญญาณของ C=O stretching ที่  $1713\text{ cm}^{-1}$  เนื่องจากเกิดพันธะเอไมด์ แสดงว่าสามารถติด CWBD บนพื้นผิวของ MNCs ที่กราฟต์ PAA ได้จริง ทั้งนี้ C=O stretching ของหมู่เอไมด์จะขึ้นในช่วงเลขคลื่นเดียวกับของหมู่คาร์บอกซิเลตของ EDTA คือ  $1637\text{-}1433\text{ cm}^{-1}$  โดยจะเห็นความเข้มของพีกในช่วงดังกล่าวเพิ่มมากขึ้นในสเปกตรัม e หากเทียบกับสเปกตรัมอื่นๆ



รูปที่ 3.3 FT-IR สเปกตรัมของอนุภาค a) MNCs, b) MNCs-APTES, c) MNCs-initiator d) PAA-grafted MNCs- และ e) CWBD-conjugated MNCs

เมื่อพิจารณาสัญญาณวิทยาของอนุภาคด้วยเทคนิค TEM ดังแสดงผลในรูปที่ 3.4 พบว่า MNCs ที่สังเคราะห์ได้มีขนาดเฉลี่ย  $179\pm 30$  นาโนเมตร มีลักษณะเป็นกลุ่มของอนุภาคแม่เหล็กขนาดนาโนเมตรเล็กๆ รวมตัวกัน หรือเรียกว่าคลัสเตอร์ (cluster) ทำให้ยืนยันได้ว่าอนุภาคที่สังเคราะห์ได้มีรูปร่างเป็นคลัสเตอร์ ดังรูป 3.4c พิจารณารูปที่ 3.4 d,e,f พบว่า MNCs ที่กราฟต์ด้วย PAA มีขนาดเฉลี่ย  $184\pm 28$  นาโนเมตร พิจารณารูปที่ 3.4 g,h,i พบว่า MNCs ที่คอนจูเกตด้วย CWBD มีขนาดเฉลี่ย  $207\pm 25$  นาโนเมตร เห็นได้ว่า MNCs ที่กราฟต์ด้วย PAA และ MNCs ที่คอนจูเกตด้วย CWBD มีขนาดใหญ่มากขึ้นตามลำดับ เนื่องจากการเพิ่มจำนวนของโมเลกุลขนาดใหญ่ (PAA และ CWBD) บนพื้นผิวของ MNCs



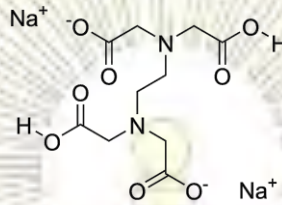
รูปที่ 3.4 TEM ไมโครกราฟต์ของ a,b,c) MNCs, d,e,f) PAA-grafted MNCs-, และ g,h,i) CWBD-conjugated MNCs

ตารางที่ 3.1 ขนาดเฉลี่ยและประจุของอนุภาคด้วยเทคนิค DLS

Sample	Diameter (nm)	PDI	Zeta potential (mV)
MNCs	220±2.5	0.10	19.80
PAA-grafted MNCs	283±5.6	0.23	-24.03
CWBD-conjugated MNCs	1087±63	0.37	-1.21

นำอนุภาคมาวัดขนาดและประจุของอนุภาคด้วยเทคนิค DLS แสดงค่าดังตารางที่ 3.1 โดยใช้ milli-Q water เป็นของเหลวที่อนุภาคกระจายตัว พบว่า MNCs, MNCs-PAA และ CWBD-conjugated MNCs มีขนาดใหญ่ขึ้นตามลำดับ เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของหมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวของ MNCs แต่ขนาดของ CWBD-conjugated MNCs ที่ได้มีขนาดใหญ่่มาก เพราะเอนไซม์ที่จำเพาะในการจับเชื้อ *S. mutans* เกิดการเสื่อมสภาพ ทำให้ CWBD-conjugated MNCs เกิดการจับตัวเป็นกลุ่มก้อน (aggregation) อนุภาคมีค่า PDI เพิ่มขึ้นตามลำดับดังนี้ 0.10, 0.23, และ 0.37 แสดงให้เห็นว่าความสม่ำเสมอของการกระจายตัวขนาดอนุภาคในของเหลวลดลง เมื่อวัดค่าประจุของอนุภาคพบว่า MNCs มีประจุเป็นบวก (19.80 มิลลิโวลต์) เนื่องจาก EDTA 2Na เป็นตัวทำให้ MNCs มีความคงตัว เมื่อ MNCs กระจายตัวใน milli-Q จะเกิดการแตกตัวของโซเดียมแคตไอออน ( $\text{Na}^+$ ) มาล้อมรอบ

MNCs ดังรูปที่ 3.5 ค่าประจุของ PAA-grafted MNCs- มีค่าเป็นลบ (-24.03 มิลลิโวลต์) เนื่องจากการแตกตัวของ หมู่คาร์บอกซิลของ PAA เป็นหมู่คาร์บอกซิเลตแสดงว่าสามารถกราฟต์ PAA บน MNCs ได้จริง และค่าประจุของ CWBD-conjugated MNCs มีค่าเป็นลบน้อยลง (-1.21 มิลลิโวลต์) เนื่องจากเกิดพันธะเอไมด์ทำให้เกิดการลดลงของจำนวนหมู่คาร์บอกซิล แสดงว่าสามารถติด CWBD บน MNC ที่กราฟต์ด้วย PAA ได้

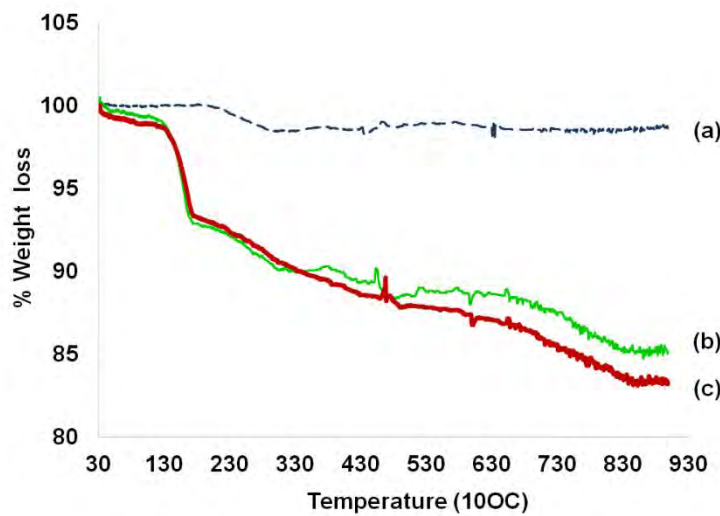


Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA 2Na)

### รูปที่ 3.5 การแตกตัวของ EDTA 2Na ใน milli-Q water

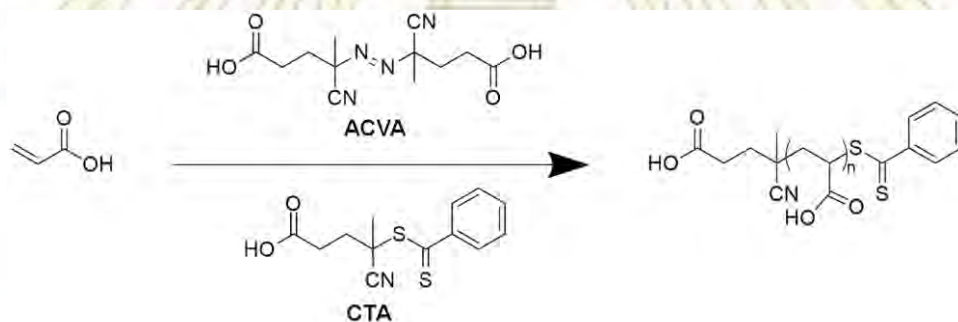
การวัดการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักโดยให้ความร้อนจากอุณหภูมิห้องจนถึง 900 องศาเซลเซียส ด้วย อัตราการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสต่อนาที ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจนของสารประกอบ อินทรีย์ของ MNCs, PAA-grafted MNC- และ CWBD-conjugated MNCs ด้วยเทคนิค TGA ดังรูปที่ 3.6 พบว่า เกิดการสูญเสียน้ำหนักครั้งแรกในช่วงที่อุณหภูมิต่ำกว่า 300 องศาเซลเซียส ส่วนใหญ่เกิดจากการสลายตัวของ ความชื้นและสารที่ระเหยได้ของ PAA-grafted MNCs- และ CWBD-conjugated MNCs ประมาณ 6.2 และ 5.9 % ตามลำดับ สำหรับน้ำหนักที่สูญเสียไปในระหว่างช่วงอุณหภูมิจาก 300 ถึง 600 องศาเซลเซียส ส่วนใหญ่เกิด จากการสลายตัวของ PAA ในกรณีของ PAA-grafted MNCs และ CWBD รวมกับ PAA ในกรณีของ CWBD-conjugated MNCs ประมาณ 11.0 และ 14.1 % ตามลำดับ มากกว่าของ MNCs (1.35%) ยืนยันได้ว่าสามารถ กราฟต์ PAA และติด CWBD บน MNCs ได้จริง ส่วนน้ำหนักที่สูญเสียไปในช่วงอุณหภูมิสูงกว่า 600 องศาเซลเซียส นั้นเกิดจากการสลายตัวของผงเขม่าดำหรือเกิดการสลายตัวของสารมหโมเลกุลขนาดใหญ่ที่เป็นสารอินทรีย์ของ PAA-grafted MNCs- และ CWBD-conjugated MNCs เพราะไม่ปรากฏการหายไปของน้ำหนัก MNCs





รูปที่ 3.6 การลดลงของน้ำหนัก a) MNCs, b) PAA-grafted MNCs- และ c) CWBD-conjugated MNCs ที่อุณหภูมิต่างๆ ภายใต้สภาวะแก๊สไนโตรเจนด้วยเทคนิค TGA

### 3.2 การสังเคราะห์พอลิแอกริลิกแอซิดผ่านปฏิกิริยา RAFT polymerization

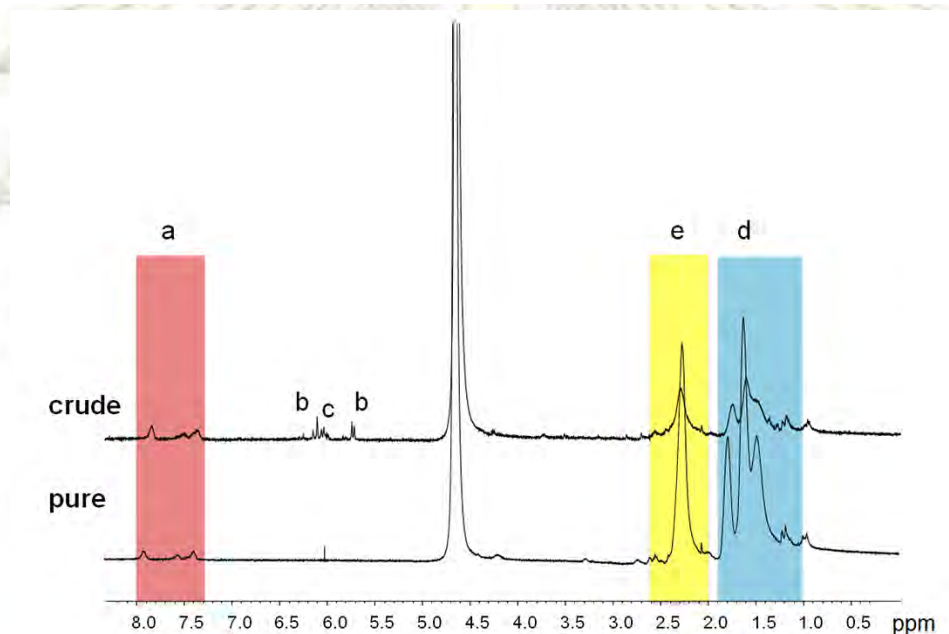
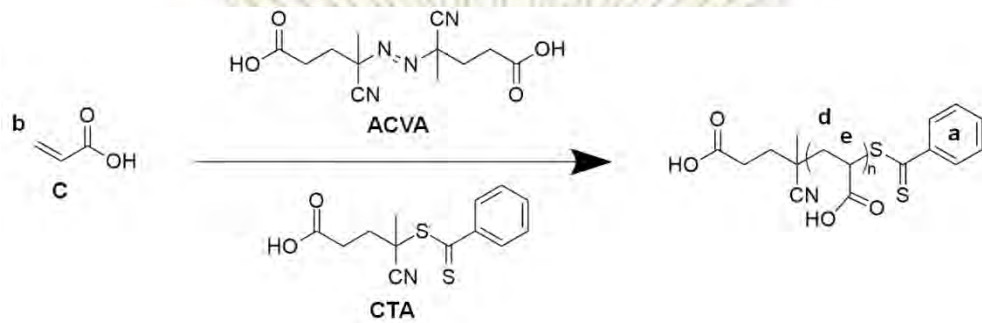


รูปที่ 3.7 สมการแสดงการสังเคราะห์ PAA ในสารละลายด้วย RAFT polymerization

จากรูปที่ 3.7 ทำปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันของแอกริลิกแอซิด (AA) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาพบว่าได้สารละลายใสสีส้ม จากนั้นแบ่งพอลิแอกริลิกแอซิด (PAA) ที่สังเคราะห์ได้ (crude) ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy เพื่อหาค่า % conversion (พิจารณา  $^1\text{H-NMR}$  สเปกตรัมของ crude ในรูปที่ 3.8) และส่วนที่เหลือทำให้บริสุทธิ์โดยการทำให้ dialysis ใน dionized water เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำพอลิเมอร์ที่ได้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค  $^1\text{H-NMR}$  เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ (พิจารณา  $^1\text{H-NMR}$  สเปกตรัมของ pure ในรูปที่ 3.8) จะพบสัญญาณ chemical shift ของโปรตอนในโครงสร้างของพอลิเมอร์ ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 3.2

เมื่อพิจารณา  $^1\text{H-NMR}$  สเปกตรัมของ pure จะพบสัญญาณที่ค่า chemical shift 2.2 และ 1.0 – 1.8 ppm ของโปรตอนที่ตำแหน่ง e และ d ในโครงสร้าง PAA ที่อยู่ในสายโซ่พอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้จึงสามารถ

ยืนยันการเกิด PAA นอกจากนี้ยังสามารถยืนยันได้ว่าพอลิเมอร์ดังกล่าวถูกทำให้บริสุทธิ์โดยการทำให้ dialysis เนื่องจากไม่พบสัญญาณโปรตอนของมอนอเมอร์ (โปรตอน b และ c) ในสเปกตรัมของ pure PAA ทั้งนี้จะพบสัญญาณโปรตอนของวงแอมโรมาติกที่ตำแหน่ง a ใน  $^1\text{H-NMR}$  ทั้งของ crude และ pure แสดงให้เห็นถึงการมีอยู่ของหมู่ปลายที่เป็นไดไทโอเบนโซเอตที่มาจากสารถ่ายโอนโซ่หรือ CTA



รูปที่ 3.8  $^1\text{H-NMR}$  สเปกตรัมของ PAA ก่อน (crude) และหลัง (pure) การทำให้บริสุทธิ์โดย dialysis

ตารางที่ 3.2 Chemical shift ของ PAA จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy

Chemical shift (ppm)	ตำแหน่ง $^1\text{H}$
1.0 - 1.8	d
2.2	e
5.8 - 6.3	b
6.0	c
7.3 - 8.0	a

สามารถใช้ข้อมูลจากสเปกตรัมของ crude ในการคำนวณ % conversion โดยอาศัยสัญญาณโปรตอนของมอนอเมอร์ตำแหน่ง b และ c ที่ค่า chemical shift 5.8 – 6.3 ppm และอาศัยสัญญาณโปรตอนของพอลิเมอร์ตำแหน่ง d และ e ที่ค่า chemical shift 1.0 – 2.2 ppm สามารถคำนวณได้จากสมการ

$$\% \text{ conversion} = \frac{\int H_{(e,d)}}{\int H_{(e,d)} + \int H_{(b,c)}} \times 100\% \quad (3.2)$$

ซึ่งพบว่าเมื่อทำปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้ % conversion ที่ได้จากการคำนวณเท่ากับ 97.0 % ซึ่งมีค่าที่สูง

นอกจากนั้นผู้วิจัยยังสามารถคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของ PAA ที่สังเคราะห์ได้โดยสามารถคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของ PAA ได้จากสมการ

$$M_n = [(M_w \text{ acrylic acid} \times \text{Degree of polymerization (DP)}) - (M_w \text{ CTA})] \times \% \text{ conversion} \quad (3.3)$$

ซึ่ง  $M_w(\text{acrylic acid}) = 72.06 \text{ g/mol}$ ,  $M_w(\text{CTA}) = 279.38 \text{ g/mol}$

ทั้งนี้สามารถคำนวณ Degree of polymerization (DP) ได้จากสเปกตรัม  $^1\text{H-NMR}$  ของ pure โดยสามารถหาได้จากสมการ

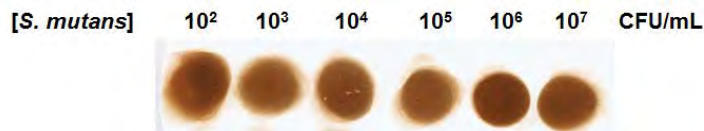
$$\text{Degree of polymerization (DP)} = \frac{\int H_{(e,d)}}{\frac{\int H_{(a)}}{5}} \quad (3.4)$$

จากสมการ 3.4 สามารถคำนวณหาค่า DP ได้เท่ากับ 97.8 และสามารถคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของ PAA ตามสมการ 3.3 ได้เท่ากับ 6,565 ซึ่งในการสังเคราะห์ PAA ตามทฤษฎีใช้ DP เท่ากับ 100 และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 7,268 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับทฤษฎี แสดงว่า สามารถควบคุมค่า DP และน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์จากปฏิกิริยา RAFT polymerization ได้ดี

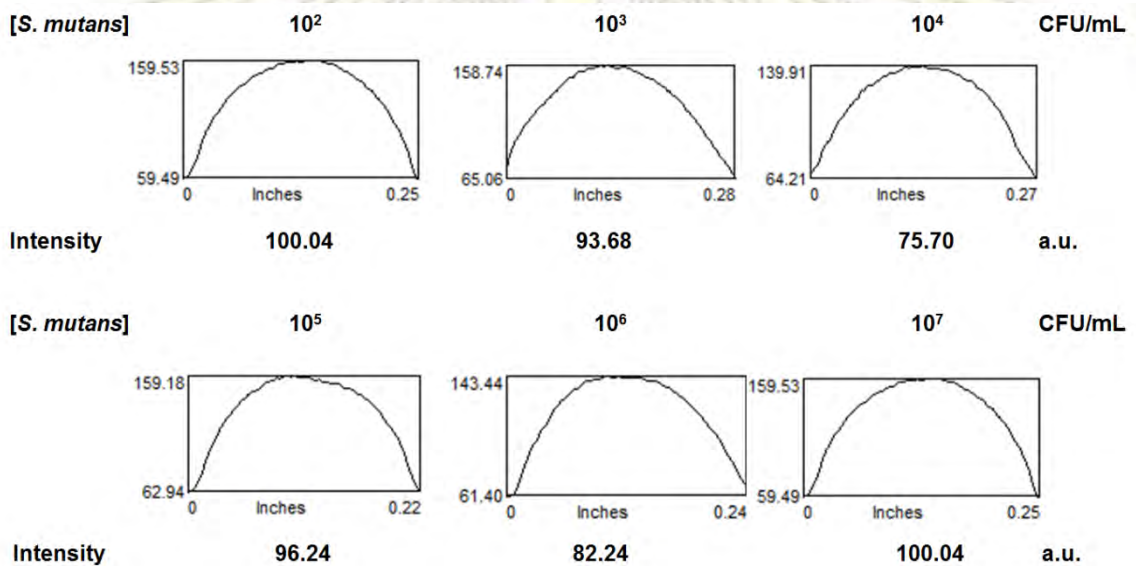
### 3.3 การจับเชื้อ *S. mutans* ด้วย CWBD-conjugated MNCs

การตรวจวัดปริมาณเชื้อ *S. mutans* แบ่งเป็น 2 ขั้นตอนหลัก เริ่มจากขั้นการใช้ CWBD-conjugated MNCs จับกับเชื้อ *S. mutans* ทำการแยก MNCs ที่จับกับเชื้อและไม่จับกับเชื้อออกจากสารละลายตัวอย่างโดยใช้สนามแม่เหล็กภายนอก (magnetic separation) เป็นเวลา 10 นาที ขั้นที่สองเป็นการแยกอนุภาคที่จับกับเชื้อออกจากอนุภาคที่ไม่จับกับเชื้อ โดยการกรองแบบเลือกผ่าน (selective filtration) บนแผ่นเซลลูโลสแอสซิเตดเมมเบรนที่รูพรุนมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8 ไมโครเมตร อนุภาคที่จับกับเชื้อจะติดบนแผ่นเมมเบรนดังแสดงในรูปที่ 3.9 และวัดความเข้มสีบนแผ่นเมมเบรนด้วยโปรแกรม scion image ดังแสดงในรูปที่ 3.10 พบว่าความเข้มสีบน

แผ่นเมมเบรนที่ได้ไม่แปรผันตามจำนวนปริมาณเชื้อ *S. mutans* เนื่องจากเอนไซม์ที่มาจับเชื้อเกิดการเสื่อมสภาพจับตัวกันเป็นก้อน ขนาดของ MNCs ที่คอนจูเกตกับเอนไซม์มีขนาดมากกว่า 0.8 ไมโครเมตร ทำให้ไม่สามารถกรองผ่านแผ่นเมมเบรนได้ แต่สามารถยืนยันกันจับเชื้อ *S. mutans* ได้จากการลดลงของค่า OD ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ดังแสดงในตารางที่ 3.3 และการลดลงของเชื้อบนเพลตอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar ดังแสดงในรูปที่ 3.11



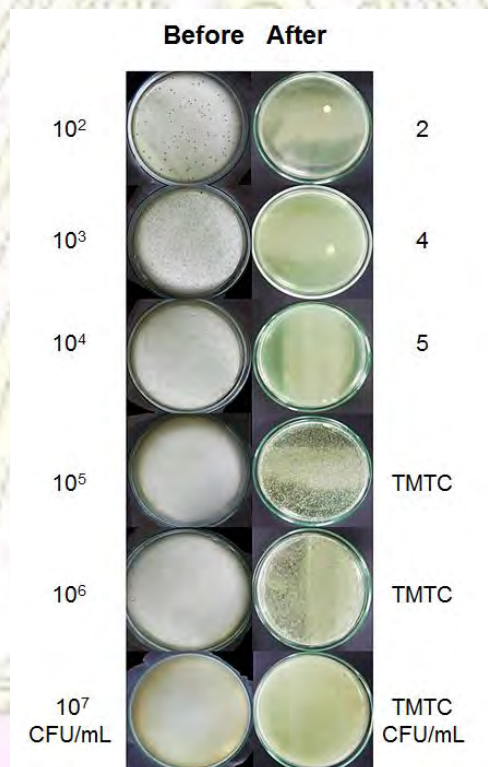
รูปที่ 3.9 อนุภาคที่จับกับเชื้อ *S. mutans* หลังจากกรองผ่านแผ่นเซลลูโลสแอสซิเตดเมมเบรน



รูปที่ 3.10 ความเข้มสี (intensity) ของกระดาษเซลลูโลสแอสซิเตดเมมเบรนหลังจับเชื้อ *S. mutans*

ตารางที่ 3.3 ค่า OD ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของสารละลายก่อนและหลังจับเชื้อ *S. mutans* ด้วยอนุภาค

<i>S. mutans</i> (CFU/mL)	OD <sub>Before</sub>	OD <sub>After</sub>
PBS (blank)	0.000	0.000
10 <sup>2</sup>	0.002	0.001
10 <sup>3</sup>	0.002	0.001
10 <sup>4</sup>	0.002	0.002
10 <sup>5</sup>	0.010	0.000
10 <sup>6</sup>	0.013	0.001
10 <sup>7</sup>	0.140	0.002



รูปที่ 3.11 จำนวนโคโลนีของ *S. mutans* ก่อนและหลังจับเชื้อด้วย CWBD conjugated MNCs

## บทที่ 4

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

MNCs ที่สังเคราะห์ผ่านกระบวนการ solvothermal method พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค XRD อนุภาคที่ได้เป็นเหล็กออกไซด์ ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) และผลึกที่ได้มีโครงสร้างเป็น Face-centered cubic (FCC) จากเทคนิค TEM ได้อนุภาคมีลักษณะรูปร่างเป็น cluster ขนาดเฉลี่ย  $179 \pm 30$  นาโนเมตร สามารถยับยั้งการกราฟต์ PAA และ ติด CWBD บน MNCs ได้ด้วยเทคนิค FT-IR พบสัญญาณของ Fe-O stretching ที่  $528 \text{ cm}^{-1}$  เป็นของธาตุเหล็กออกไซด์ พบสัญญาณ C=O stretching ที่  $1713 \text{ cm}^{-1}$  เป็นของหมู่คาร์บอกซิลของ PAA ที่กราฟต์บน MNCs และเมื่อติด CWBD บน MNCs เกิดการหายไปของสัญญาณดังกล่าว ทดสอบหาขนาดและประจุของอนุภาคในการกระจายตัวของ mill-Q water ด้วยเทคนิค DLS จะได้ขนาดอนุภาคที่เพิ่มขึ้นเมื่อทำการกราฟต์ PAA และติด CWBD บนพื้นผิว MNCs ตามลำดับ และประจุของ MNCs, PAA-grafted MNCs- และ CWBD-conjugated MNCs จะมีค่าเป็นบวก, ลบและติดลบน้อยลง เนื่องจากการแตกตัวของหมู่ฟังก์ชันที่ล้อมรอบ MNCs และยับยั้งการกราฟต์ PAA และติด CWBD ด้วยเทคนิค TGA พบการสลายไปของสารประกอบอินทรีย์ในช่วงอุณหภูมิ 300-600 องศาเซลเซียส

สามารถกราฟต์ PAA บนพื้นผิว MNCs ผ่านปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันริเริ่มจากพื้นผิวผ่านกลไกแบบ RAFT polymerization เมื่อนำพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้ในสารละลายพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค  $^1\text{H-NMR}$  คำนวณ  $\text{DP} = 97.8$  มี % conversion = 97% คำนวณน้ำหนักโมเลกุลของ PAA = 6,565 ซึ่งในการสังเคราะห์ PAA ตามทฤษฎีใช้ DP เท่ากับ 100 และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 7,268 ค่าที่ได้ใกล้เคียงกับทฤษฎี

ตรวจวัดปริมาณเชื้อ *S.mutans* โดยแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนหลัก เริ่มจากใช้ CWBD-conjugated MNCs จับกับเชื้อ *S.mutans* ทำการแยก MNCs ที่จับกับเชื้อและไม่จับกับเชื้อออกจากสารละลายตัวอย่างโดยใช้สนามแม่เหล็กภายนอก (magnetic separation) ขั้นที่สองเป็นการแยกอนุภาคที่จับกับเชื้อออกจากอนุภาคที่จับกับเชื้อ โดยการกรองแบบเลือกผ่าน (selective filtration) บนแผ่นเซลลูโลสแอสซิเตดเมมเบรนที่รูพรุนมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 ไมโครเมตร อนุภาคที่จับกับเชื้อจะติดบนแผ่นเมมเบรน แต่ความเข้มข้นเมมเบรนที่ไม่แปรผันตามจำนวนปริมาณเชื้อ *S.mutans* เนื่องจากเอนไซม์ที่มาจับเชื้อเกิดการเสื่อมสภาพจับตัวกันเป็นก้อนขนาดของ MNCs ที่คอนจูเกตกับเอนไซม์มีขนาดมากกว่า 0.8 ไมโครเมตร ทำให้ไม่สามารถกรองผ่านแผ่นเมมเบรนได้ แต่สามารถยับยั้งกันจับเชื้อได้จากการลดลงของเชื้อหลังใช้อนุภาคจับเทียบกับก่อนจับเชื้อ

หากได้ผลการศึกษาที่เหมาะสมจากการตรวจวัดเชื้อ *S.mutans* ด้วย CWBD-conjugated MNCs และทำการแยกอนุภาคที่จับกับเชื้อโดยการกรองเลือกผ่านแล้ว งานวิจัยที่จะดำเนินการต่อไปในอนาคตจะเป็นการนำกระบวนการ magnetophoretic chromatography มาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อ *S.mutans* ที่จับด้วย

CWBD-conjugated MNCs และทำการขยายสัญญาณการจับเชื้อ *S.mutans* ด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชันของ tetramethylbenzidine (TMB)



## เอกสารอ้างอิง

1. Espinosa-Cristóbal, L. F.; Martínez-Castañón, G. A.; Martínez-Martínez, R. E.; Loyola-Rodríguez, J. P.; Patiño-Marín, N.; Reyes-Macías, J. F.; Ruiz, F. Antibacterial Effect of Silver Nanoparticles Against *Streptococcus Mutans*. *Mater. Lett.* **2009**, *63*, 2603–2606.
2. Thanyasrisung, P.; Komatsuzawa, H.; Yoshimura, G.; Fujiwara, T.; Yamada, S.; Kozai, K. Automutanolysin Disrupts Clinical Isolates of Cariogenic Streptococci in Biofilm and Planktonic Cells. *Oral. Microbiol. Immun.* **2009**, *24*, 451-455.
3. Yoshimura, G.; Komatsuzawa, H.; Hayashi, I.; Fujiwara, T.; Yamada, S.; Nakano, Y. Identification and Molecular Characterization of an *N*-Acetylmuraminidase, AML, Involved in *Streptococcus Mutans* Cell Separation. *Oral. Microbiol. Immun.* **2006**, *50*, 729-742.
4. Kwon, D.; Joo, J.; Lee, J.; Park, K. H.; Jeon, S. Magnetophoretic Chromatography for the Detection of Pathogenic Bacteria with the Naked Eye. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 7594–7598.
5. Kwon, D.; Lee, S.; Ahn, M.; Kang, I.; Park, K.; Jeon, S., Colorimetric Detection of Pathogenic Bacteria Using Platinum-Coated Magnetic Nanoparticle Clusters and Magnetophoretic Chromatography. *Anal. Chim. Acta.* **2015**, *883*, 61-66.
6. Shim, W. B.; Song, J. E.; Mun, H.; Chung, H. W.; Kim, M. G. Rapid Colorimetric Detection of *Salmonella Typhimurium* Using a Selective Filtration Technique Combined with Antibody–Magnetic Nanoparticle Nanocomposites. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406*, 859–866.
7. Shim, W. B.; Lee, C. W.; Kim, M. G.; Chung, D. H. An Antibody–Magnetic Nanoparticle Conjugate based Selective Filtration Method for the Rapid Colorimetric Detection of *Listeria Monocytogenes*. *Anal. Method.* **2014**, *6*, 9129–9135.
8. Moad, G., Rizzardo, E., Thang, S. H. Radical addition–fragmentation chemistry in polymer synthesis. *Polymer.* **2008**, *49*, 1079 –1131.
9. Wang, W. C.; Neoh, K. G.; Kang, E. T. Surface Functionalization of  $Fe_3O_4$  Magnetic Nanoparticles via RAFT-mediated Graft Polymerization. *Macromol. Rapid Comm.* **2006**, *27*, 1665-1669.
10. Sahoo, B.; Devi, K. S.; Banerjee, R.; Maiti, T. K.; Pramanik, P.; Dhara, D. Thermal and pH Responsive Polymer-Tethered Multifunctional Magnetic Nanoparticles for Targeted Delivery of Anticancer Drug *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **2013**, *5*, 3884–3893.



11. Dutta, S.; Parida, S.; Maiti, C.; Banerjee, R.; Mandal, M.; Dhara, D. Polymer Grafted Magnetic Nanoparticles for Delivery of Anticancer Drug at Lower pH and Elevated Temperature. *J. Colloid Interface Sci.* **2016**, *467*, 70–80.
12. Lin, M.; Huang, H.; Liu, Z.; Liu, Y.; Ge, J.; Fang, Y. Growth–Dissolution–Regrowth Transitions of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles as Building Blocks for 3D Magnetic Nanoparticle Clusters under Hydrothermal Conditions. *Langmuir.* **2013**, *29*, 15433–15441.
13. Sung, Y. J.; Suk, H. J.; Sung, H. W.; Li, T.; Poo, H.; Kim, M. G. Novel Antibody/Gold Nanoparticle/Magnetic Nanoparticle Nanocomposites for Immunomagnetic Separation and Rapid Colorimetric Detection of *Staphylococcus aureus* in Milk. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *43*, 432–439.
14. Dorniani, D.; Hussein, M. Z.; Kura, A. U.; Fakurazi, S.; Shaari, A. H.; Ahmad, Z. Preparation of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Magnetic Nanoparticles Coated With Gallic Acid for Drug Delivery. *Int. J. Nanomedicine.* **2012**, *7*, 5745–5756.
15. Alzaidi, J.; Alzahrani, E.; Mouhty, E. Chemical Studies on the Preparation of Magnetic Nanoparticles Coated with Glycine and Its Application for Removal of Heavy Metals. *Orient. J. Chem.* **2016**, *32*, 1503–1513.

### ประวัติผู้วิจัย

นางสาวสุทธาวลัย ไส้เพี้ย เกิดเมื่อวันที่ 26 กรกฎาคม 2537 ที่ตราง สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย สายสามัญ แผนกวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์ จากโรงเรียนห้วยยอด เมื่อปีการศึกษา 2555 เข้าศึกษาในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2556 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้หลังจากจบการศึกษาคือ 99/154 ม.6 ซอย 11 แขวงลำปลาทิว เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10250

