การเตรียมและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของผิวไคโตซานที่มีหมู่ควอเทอร์นารีแอมโมเนียม

นางสาว นพรรณภรณ์ วัลลภา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549

PREPARATION AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF QUATERNARY AMMONIUM-CONTAINING CHITOSAN SURFACE

Miss Napanporn Vallapa

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Petrochemistry and Polymer Science
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2006

Thesis Title	Preparation and Antibacterial Activity of Quaternary Ammonium-Containing Chitosan Surface
By	Miss Napanporn Vallapa
Field of Study	Petrochemistry and Polymer Science
Thesis Advisor	Assistant Professor Voravee P. Hoven, Ph.D.
Thesis Co-Advisor	Assistant Professor Varawut Tangpasuthadol, Ph.D.
Thesis Co-Advisor	Professor Suda Kiatkamjornwong, Ph.D.

Accepted by Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

.....Dean of the Faculty of Science
(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

Thesis committee

..... Chairman
(Professor Pattarapan Prasassarakich, Ph.D.)

..... Thesis Advisor
(Assistant Professor Voravee P. Hoven, Ph.D.)

..... Thesis Co-Advisor
(Assistant Professor Varawut Tangpasuthadol, Ph.D.)

..... Thesis Co-Advisor
(Professor Suda Kiatkamjornwong, Ph.D.)

..... Member
(Nuttha Thongchul, Ph.D.)

นพรรณภรณ์ วัลลภา : การเตรียมและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของผิวไคโตซานที่มีหมู่ควอเทอร์นารีแอมโมเนียม (PREPARATION AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF QUATERNARY AMMONIUM-CONTAINING CHITOSAN SURFACE) อ. ที่ปรึกษา: ผศ.ดร. วรวีร์ โฮเว่น, อ. ที่ปรึกษาร่วม: ผศ.ดร. วราวุฒิ ตั้งพสุธาดล, ศ.ดร. สุดา เกียรติกำจรวงศ์, 74 หน้า.

การทำปฏิกิริยาควอเทอร์ไนเซชันของหมู่อะมิโนของไคโตซานเป็นแนวทางที่ได้รับการยอมรับว่ามีประสิทธิภาพในการเพิ่มฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของไคโตซานในช่วงความเป็นกรด-เบสที่กว้างขึ้น ปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถเพิ่มประจุบวกและความไม่ชอบน้ำซึ่งเป็น 2 ตัวแปรที่เชื่อว่ามีผลต่อการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย งานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายที่จะเพิ่มฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของพื้นผิวไคโตซานโดยการติดหมู่ควอเทอร์นารีแอมโมเนียมผ่านปฏิกิริยาแบบวิวิธพันธ์ ที่แบ่งเป็น 2 ขั้น คือ ปฏิกิริยารีดักทีฟอัลคิลเลชันโดยแปรเปลี่ยนชนิดของอัลดีไฮด์ตามด้วย ปฏิกิริยาเมทิลเลชันด้วยเมทิลไอโอไดด์ ผลจากการวิเคราะห์ด้วยเอทีอาร์-เอฟทีไออาร์, การวัดมุมสัมผัสของน้ำ และ การหาค่าประจุบนพื้นผิว แสดงให้เห็นถึงความสำเร็จในการทำปฏิกิริยาควอเทอไนเซชันของผิวไคโตซาน จากผลการศึกษาและเปรียบเทียบฤทธิ์ต้าน *Staphylococcus aureus* (แบคทีเรียแกรมบวก) และ *Escherichia coli* (แบคทีเรียแกรมบวก) ซึ่งพิจารณาจากการวัดค่าออปติคัลเดนซิตีที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}), ภาพถ่ายสแกนนิงอิเล็คตรอนไมโครสโกปี และ การนับจำนวนแบคทีเรียที่ยังคงมีชีวิต พบว่าผิวฟิล์มไคโตซานที่ผ่านการดัดแปรแล้วมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่เหนือกว่าผิวฟิล์มไคโตซานธรรมชาติ แสดงให้เห็นว่าประจุบวกและหมู่อัลคิลที่เพิ่มขึ้นบนผิวฟิล์มไคโตซานหลังจากการทำปฏิกิริยาควอเทอร์ไนเซชันของพื้นผิวทำให้เกิดหมู่ควอเทอร์นารีแอมโมเนียมบนผิวไคโตซานที่สามารถเกิดอันตรกิริยากับประจุลบของผนังเซลล์แบคทีเรีย

สาขาวิชา ปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ ลายมือชื่อนิสิต นพรรณภรณ์ วัลลภา

ปีการศึกษา 2549 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

4772332023: MAJOR PETROCHEMISTRY AND POLYMER SCIENCE
KEYWORD: ANTIBACTERIAL ACTIVITY/ QUATERNARY AMMONIUM GROUP

NAPANPORN VALLAPA: PREPERATION AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF QUATERNARY AMMONIUM-CONTANINIG CHITOSAN SURFACE. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. VORAVEE P. HOVEN, Ph.D., THESIS CO-ADVISORS: ASST. PROF. VARAWUT TANGPASUTHADOL, Ph.D., PROF. SUDA KIATKAMJORNWONG, Ph.D., 74 pp.

Quaternization of amino groups of chitosan has been recognized as a potential way to enhance the antibacterial activity of chitosan in a broader pH range. The reaction can simultaneously introduce both positive charge and hydrophobicity, the two parameters that are believed to affect the antibacterial activity. This research aims to increase the antibacterial activity of chitosan surface by introducing quaternary ammonium groups via a heterogeneous two-step process: reductive alkylation using selected aldehydes followed by methylation with methyl iodide. Results from ATR-FTIR analysis, water contact angle and zeta potential measurements confirmed the success of surface quaternization. As determined from an optical density (OD_{600}), scanning electron microscopy (SEM) image and viable cell counting method, the antibacterial activity of the surface-modified chitosan film against *Staphylococcus aureus* (gram positive bacteria) and *Escherichia coli* (gram negative bacteria) were superior to that of the virgin chitosan film. The additional positive charge and hydrophobicity introduced to the chitosan film after surface quaternization apparently make the quaternary ammonium-containing chitosan film a more favorable substrate for interacting with the negatively-charged membrane of the bacteria.

Field of study Petrochemistry and Polymer Science Student's signature Napanporn Vallapa

Academic year 2006 Advisor's signature V. Hoveen

Co-advisor's signature

Co-advisor's signature Suda Kiatkamjornwong

ACKNOWLEDGEMENTS

First of all, I would like to express my heartfelt gratitude and appreciation to my advisor, Assistant Professor Dr. Voravee P. Hoven and my co-advisors, Assistant Professor Dr. Varawut Tangpasuthadol and Professor Dr. Suda Kiatkamjornwong for supporting me both in work and in life, and encouraging me throughout the course of my study. I am sincerely grateful to the members of the thesis committee, Professor Dr. Pattarapan Prasassarakich and Dr. Nuttha Thongchul for reviewing my work on paper and making valuable suggestion and critical comments.

I gratefully acknowledge a research funding for Research Team Promotion Grant, Thailand Research Fund (Principal Investigator: Professor Dr. Suda Kiatkamjornwong) for financial support.

Special thanks are extended to Sensor Research Unit and Associate Professor Dr. Sanong Egkasit for ATR-FTIR facility, National Metal and Materials Technology Center (MTEC) for contact angle goniometer and the Institute of Biotechnology and Genetic Engineering, Chulalongkorn University for bacteria studies.

Many thanks go to all members of Organic Synthesis Research Unit (OSRU), and all my friends, for their assistance, suggestions, comment, concerning experimental techniques during my thesis work.

Finally, I would like to especially thank my family members for their love, kindness and support throughout my entire study.

CONTENTS

Page

Page

Page

LIST OF FIGURES

Figure Page

LIST OF TABLES

Table Page

LIST OF SCHEMES

LIST OF ABBREVIATION

ATR-FTIR	: Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy
BuI	: Butyl iodide
DBuM	: *N*- methyl-*N,N*-dibutyl chitosan
DEM	: *N*-methyl-*N,N*-diethyl chitosan
DOM	: *N*-methyl-*N,N*-dioctyl chitosan
DMBu	: *N*-butyl-*N,N*-dimethyl chitosan
DMBz	: *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl chitosan
DME	: *N*-ethyl-*N,N*-dimethyl chitosan
DMP	: *N*-propyl-*N,N*-dimethyl chitosan
E.coli	: *Escherichia coli*
EtI	: Ethyl iodide
MeI	: Methyl iodide
OcI	: Octyl iodide
OD	: Optical Density
PBS	: Phosphate buffer saline
S.aureus	: *Staphylococcus aureus*
SEM	: Scanning Electron Microscopy