โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การเตรียมหมึกชีวภาพจากเซริซินผ่านปฏิกิริยา thiol-ene click reaction

ชื่อนิสิต นายชนวีร์ จำปีเจริญสุข **เลขประจำตัว** 5933020223

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียมหมึกชีวภาพจากเซริซินผ่านปฏิกิริยา thiol-ene click reaction

Preparation of bioink from Sericin by thiol-ene click reaction

โดย

นายชนวีร์ จำปีเจริญสุข

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2562

โครงการ การเตรียมหมึกชีวภาพจากเซริซินผ่านปฏิกิริยา thiol-ene click reaction

โดย นายชนวีร์ จำปีเจริญสุข

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

1. ผศ.ดร.โรจน์ฤทธิ์ โรจนธเนศ ประธานกรรมการ
2. ศ.ดร.นงนุช เหมืองสิน กรรมการ
3. ศ.ดร.ศุภศร วนิชเวชารุ่งเรือง อาจารย์ที่ปรึกษา

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

....

(ศาสตราจารย์ ดร.ศุภศร วนิชเวชารุ่งเรือง)
อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย พาราสุข)
หัวหน้าภาควิชาเคมี

วันที่ 10 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2563

ชื่อโครงการ การเตรียมหมึกชีวภาพจากเซริซินผ่านปฏิกิริยา thiol-ene click reaction

ชื่อนิสิตในโครงการ นายชนวีร์ จำปีเจริญสุข เลขประจำตัว 5933020223

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ศาสตราจารย์ ดร.ศุภศร วนิชเวชารุ่งเรือง

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2562

บทคัดย่อ

เซริซิน (Sericin) เป็นโปรตีนที่สร้างขึ้นโดยตัวไหม (Bombyx mori) ในการผลิตรังไหม เซริซินถูกนำมาใช้อย่างหลากหลายทางด้านยาและเครื่องสำอาง ในงานนี้ผู้วิจัยได้กราฟท์หมู่ methacryloyl ลงไปบนเซริซิน (Ser-MA) ด้วยการนำเซริซินไปละลายในพิริดีนและทำปฏิกิริยากับ methacrylic anhydride ซึ่งจะได้เปอร์เซ็นต์การแทนที่เป็น 0.36% จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ^{1}H NMR การกราฟท์โดยนำเซริซินไปละลายในน้ำและให้ทำปฏิกิริยากับ methacrylic acid และใช้ 1-ethyl-3-(3-dimethylaminoproply)carbodiimide เป็น coupling agent ให้เปอร์เซ็นต์การแทนที่สูงขึ้นเมื่อนำผลิตภัณฑ์ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ^{1}H NMR โดยดูโปรตรอนหมู่ methacryloyl เทียบกับของกรดอะมิโนไทโรซีนซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีวงเบนซีนที่มีอยู่ในโครงสร้างเซริซิน 4.6% พบว่าสามารถสังเคราะห์สารที่มีเปอร์เซ็นต์การแทนที่ของหมู่ methacryloyl เป็น 2.17% เมื่อนำผลิตภัณฑ์ไปทำปฏิกิริยาเชื่อมขวางด้วย dithiothreitol พบว่าเกิดปฏิกิริยา thiol-ene click reaction โดยยืนยันจาก ^{1}H NMR spectrum และน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย (M_n) หลังการเชื่อมขวางที่เปลี่ยนจาก 170854 Da เป็น 350652 Da

คำสำคัญ: เซริซิน; หมึกชีวภาพ; การเชื่อมขวาง

Project Title Preparation of bioink from Sericin by thiol-ene click reaction

Student Name Chanawee Jampeecharoensuk Student ID 5933020223

Advisor Name Professor Supason Wanichwecharungruang, Ph.D.

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2019

Abstract

Sericin is a protein produced by silkworm (Bombyx mori) in the production of silk cocoons. Sericin is used in a widely in pharmaceutical and cosmetic industries. In this work, the researchers grafted the methacryloyl group onto Sericin. The researcher found that the sericin was dissolved in pyridine and methacrylic anhydride gave a 0.36 percentage of substitution. On the contrary, soluted sericin in water using methacrylic acid as the methacryloyl group use 1-ethyl-3- (3-dimethylaminoproply) carbodiimide gave a higher percentage of replacement when analyzed by ^{1}H NMR technique by comparing at the methacryloyl group with the amino acid tyrosine which has 4.6% of amino acid with benzene in the sericin structure result in the substance with 2.17 of substitutional percentage of methacryloyl. Moreover, cross-linking the product by using dithiothreitol as a crosslinking agent result in the thiol-ene click reaction, which is confirmed by ^{1}H NMR spectrum and the Number Average Molecular Weight (M_n) after crosslinking is higher to 350652 from 170854.

Keywords: sericin; bioink; crosslinked; thiol-ene click reaction

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศาสตราจารย์ ดร.ศุภศร วนิชเวชารุ่งเรือง อาจารย์ที่ปรึกษา เป็นอย่างมากที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำคำปรึกษา และวิธีแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นอย่างใกล้ชิด ไม่เพียงเฉพาะเรื่อง ของการทดลองแต่รวมถึงการทำงานแบบเป็นระบบ จนสามารถดำเนินโครงการลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ ผศ.ดร.โรจน์ฤทธิ์ โรจนธเนศ และ ศ.ดร.นงนุช เหมืองสิน ที่ให้เกียรติและสละเวลามาเป็นคณะกรรมการประเมินโครงการ รวมถึงให้คำแนะนำในงานวิจัยนี้ ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้เงินทุนสนับสนุนบางส่วนใน การทำวิจัย

ขอขอบคุณพี่ ๆ ในห้องปฏิบัติการ SW lab ที่ให้คำแนะนำ คำปรึกษา และช่วยแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นในการทดลองมาโดยตลอด โดยเฉพาะอย่างยิ่งพี่ฟ้า พี่เบสท์ พีบี๋และพี่มาร์ค ที่ช่วยสอนเรื่องการทดลองและมีส่วนช่วยในการทำรายงานเล่มนี้

ขอขอบคุณครอบครัวที่คอยเป็นกำลังใจ เข้าใจและคอยสนับสนุนทั้งการเรียน การงานและการใช้ชีวิต เพื่อน ๆ CU-CHEM 85 ที่คอยให้ความช่วยเหลือ เป็นความสุขและเป็นกำลังใจให้ผู้วิจัยอยู่เสมอตลอดระยะเวลา 4 ปี ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า งานวิจัยฉบับนี้จะเป็นประโยชน์แก่บุคลากรทางการศึกษา และ ผู้สนใจทั่วไปไม่มากก็น้อย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ ..... ค

Abstract ..... ง

กิตติกรรมประกาศ ..... จ

สารบัญรูป ..... ซ

บทที่ 1 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย 1

1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 1

1.3.1 ข้อมูลเกี่ยวกับโปรตีนเซริซิน 1

1.3.2 การเกิดปฏิกิริยา thiol-ene click reaction 3

thiol-ene click reaction 3

บทที่ 2 5

2.1 สารเคมีและอุปกรณ์ 5

2.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง 6

2.3 การกราฟท์หมู่ methacryloyl ลงบนโปรตีนเซริซิน (Ser-MA) 6

2.3.1 การกราฟท์หมู่ methacryloyl ลงบนโปรตีนเซริซินในตัวทำละลายพิริดีนทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนในเอทานอล 6

2.3.2 การกราฟท์หมู่ methacryloyl ลงบนโปรตีนเซริซินด้วยปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นกับ methacrylic anhydride ในตัวทำละลายพิริดีน 7

2.3.3 การกราฟท์หมู่ methacryloyl ลงบนโปรตีน Sericin ในตัวทำละลายน้ำด้วย methacrylic acid โดยใช้ 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide เป็น coupling agent....8
2.4 การทำปฏิกิริยาการเชื่อมขวางด้วย thiol-ene click reaction(Ser-MA/DTT)....9
บทที่ 3....10
3.1 การกราฟท์หมู่ methacryloyl ลงบนโปรตีน Sericin....10
3.1.1 การกราฟท์หมู่ methacryloyl ลงบนโปรตีนเซริซินในตัวทำละลายพิริดีน....11
3.1.2 การกราฟท์หมู่ methacryloyl ลงบนโปรตีนเซริซินในตัวทำละลายน้ำโดยปฏิกิริยา esterification โดยใช้ 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbo- diimide....17
3.1.3. การคำนวณเปอร์เซ็นต์การแทนที่....21
3.2 การทำปฏิกิริยาการเชื่อมขวางด้วย thiol-ene click reaction....22
บทที่ 4....26
เอกสารอ้างอิง....27
ประวัติผู้วิจัย....29

สารบัญรูป

รูปที่ 1.1 โครงสร้างภายในของใยไหม....2

รูปที่ 3.1 สมการเคมีแสดงการติดหมู่ methacryloyl ลงบนโปรตีนเซริซิน.... 10

รูปที่ 3.2 สารละลายที่มีตะกอนของ Ser-MA (product 1).... 11

รูปที่ 3.3 FT-IR spectrum ของเซริซินก่อนและหลังติดหมู่ methacryloyl.... 12

รูปที่ 3.4 ^{1}H NMR spectrum ของเซริซินในตัวทำละลาย D_2O และเซริซินที่ติดหมู่ methacryloyl ในตัวทำละลาย DMSO.... 13

รูปที่ 3.5 ผลิตภัณฑ์ Ser-MA ที่ได้หลังจาก freeze dry.... 14

รูปที่ 3.6 FT-IR spectra ของเซริซินก่อนและหลังติดหมู่ methacryloyl.... 15

รูปที่ 3.7 ^{1}H NMR spectrum ของเซริซินก่อนและหลังติดหมู่ methacryloyl.... 16

รูปที่ 3.8 สมการเคมีแสดงการติดหมู่ methacryloyl ลงบนโปรตีนเซริซิน (a) 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, (b) N-hydroxysuccnimide, (c) ภาพขณะตั้งปฏิกิริยา, (d) ภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้, (e) methacrylic acid และ (f) Ser-MA.... 17

รูปที่ 3.9 FT-IR spectra ของเซริซินก่อนและหลังติดหมู่ methacryloyl.... 18

รูปที่ 3.10 ^{1}H NMR spectrum ของเซริซินก่อนและหลังติดหมู่ methacryloyl.... 19

รูปที่ 3.11 GPC chromatogram ของเซริซินและ Ser-MA.... 20

รูปที่ 3.12 ภาพขยาย NMR spectrum ของเซริซินหลังติดหมู่ methacryloyl ช่วง 5-7 ppm.... 21

รูปที่ 3.13 ^{1}H NMR spectrum Ser-MA ก่อนและหลังเชื่อมขวางด้วย DTT(Ser-MA/DTT).... 22

รูปที่ 3.14 ^{1}H NMR spectrum ของเซริซินที่เชื่อมขวางก่อนและหลังเมื่อเติมวิตามินซี Ser-MA/DTT.... 23

รูปที่ 3.15 GPC chromatogram ของ Ser-MA และ Ser-MA/DTT.... 24

รูปที่ 3.16 สมการเชื่อมขวางของเซริซินแต่ละสายด้วย DTT.... 25

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Bioink หรือ หมึกชีวภาพเป็นสารที่ใช้สำหรับพิมพ์โครงสร้าง 3 มิติ ที่เอาไว้ใช้เลี้ยงเซลล์ของอวัยวะที่เราต้องการเป็นวัสดุที่เลียนแบบสภาพแวดล้อมของเมทริกซ์นอกเซลล์เพื่อรองรับการยึดเกาะ การเพิ่มจำนวนเซลล์ ในปัจจุบันการคงรูปโครงสร้าง 3 มิติของเซลล์ที่เลี้ยงนั้นมีการใส่สารพวกเจลาตินเพื่อให้เกิดการแข็งตัวของเจลเป็นรูป 3 มิติโดยใช้ความเย็นช่วย[1] มีงานวิจัยนำเสนอการทำให้หมึกแข็งตัวด้วยการฉายแสงในช่วงความยาวคลื่น UV เพื่อให้เกิดการ crosslink แบบแรดิคัลของพอลิเมอร์ alginate ที่ติด norbornene methylamine กับ peptide ที่ติดหมู่ thiol[2] ซึ่งกระบวนการดังกล่าวจะทำให้มีโอกาสรอดของเซลล์น้อย[3] โครงการนี้จึงสนใจที่จะใช้โปรตีน sericin ซึ่งเป็นโปรตีนใยไหมหาได้ง่ายมีความเข้ากันได้กับเซลล์[4]มาสร้างเป็น bioink โดยนำเซริซินมาติดหมู่ methacryloyl เพื่อเป็นการติดหมู่ alkene ลงบนสายโปรตีนจากนั้นนำสารประกอบที่มีหมู่ thiol มาเชื่อมขวางผ่านปฏิกิริยา thiol-ene click reaction

1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย

ทำปฏิกิริยาการติดหมู่ methacryloyl ลงบนโปรตีน sericin ที่ร้อยละการแทนที่ต่างๆและทำปฏิกิริยาการเชื่อมขวางของ sericin ผ่านปฏิกิริยา thiol-ene click reaction ด้วยสารเชื่อมขวางที่เหมาะสม

1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.3.1 ข้อมูลเกี่ยวกับโปรตีนเซริซิน

โปรตีนเซริซินเกิดจากใยไหมในตัวไหม (ชื่อวิทยาศาสตร์ *Bombyx mori*) อยู่ในสกุล Bombyx ตัวอ่อนเรียกว่า ตัวไหม หรือ หนอนไหม มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในการปลูกหม่อนเลี้ยงไหม เนื่องจากมันสามารถให้เส้นใยเป็นเส้นไหม โดยเส้นไหมประกอบด้วยโปรตีนสองชนิดคือไฟโบรอินและเซริซิน ผ้าไหมประกอบด้วยไฟโบรอิน 70-80% และเซริซิน 20-30%; ไฟโบรอินเป็นศูนย์กลางโครงสร้างของผ้าไหมและเซริซินเป็นเหมือนกาวเคลือบเส้นใย

และช่วยให้ใยไหมติดกันจนเป็นรังไหม [5] โดยเซริซินประกอบด้วยกรดอะมิโน 18 ชนิดโดยเป็นกรดอะมิโน Serine 27.3%, Aspartic acid 18.8%, Glycine 10.7%, Glutamic acid 7.2%, Arginine 4.9%, Threonine 7.5%, Tyrosine 4.6%, Alanine 4.3%, Valine 3.8%, Lysine 2.1%, Histidine 1.7%, Leucine 1.7%, Isoleucine 1.3%, Phenylalanine 1.6%, Proline 1.2%, Methionine 0.5% Tryptophan 0.4% Cystein 0.3%[6]

โดยในปัจจุบันโปรตีนเซริซินถูกนำมาใช้อย่างหลากหลายทางด้านยาและเครื่องสำอางและเนื่องจากเซริซินมีคุณสมบัติที่มีความยืดหยุ่นและความต้านทานแรงดึงจึงถูกนำมาใช้ในทางการแพทย์ในด้านการเย็บแผล[7]และนอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติการต่อต้านเชื้อจากธรรมชาติ เมื่อใช้ในเครื่องสำอางยังมีการค้นพบเซริซินเพื่อปรับปรุงความยืดหยุ่นของผิวและปัจจัยต่อต้านริ้วรอยทำได้โดยลดการสูญเสียน้ำออกจากผิวหนัง[5]

รูปที่ 1. 1 โครงสร้างภายในของใยไหม

โดยในปี ค.ศ.2005, Satoshi และคณะ[8] ได้ศึกษาผลของขนาดมวลโมเลกุลของเซริซินที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมพบว่าเซริซินที่มีมวลโมเลกุลขนาดเล็ก(5-100 kDa) สามารถใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ให้ได้ดีกว่าเซริซินที่มีมวลโมเลกุลขนาดใหญ่ (50-200 kDa)

ในปี ค.ศ.2009, Mandal และคณะ[9] ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยนำเซริซินและเจลาตินมาเชื่อมขวางด้วยกันพบว่าเมื่อนำมาขึ้นรูปเป็น 3 มิติพบว่าอัตราส่วนระหว่างเซริซินกับเจลาตินมีผลทำให้จำนวนเซลล์ที่เลี้ยงเพิ่มขึ้นต่างกันโดยอัตราส่วนเซริซินที่เพิ่มมากขึ้นจะทำให้จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นช้าแต่เมื่อพิจารณาทางด้านโครงสร้างที่ใช้เลี้ยงเซลล์พบว่าอัตราส่วนเซริซินที่เพิ่มมากขึ้นจะทำให้โครงสร้างมีความแข็งแรงมากขึ้น

ในปี ค.ศ.2013, Tippawan และคณะ[10] ได้นำโปรตีนเซริซินมาเชื่อมขวางกับ Genipin แล้วพิมพ์เป็นแผ่นฟิล์ม 2 มิติสำหรับการรักษาบาดแผลในคน เมื่อนำแผ่นฟิล์มดังกล่าวมาใช้เลี้ยงเซลล์พบว่าเซลล์สามารถอยู่รอดในแผ่นฟิล์มได้

1.3.2 การเกิดปฏิกิริยา thiol-ene click reaction

thiol-ene click reaction เป็นปฏิกิริยาเคมีระหว่างหมู่ thiol และ alkene เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้ง่ายให้เปอร์เซ็นต์การเกิดผลิตภัณฑ์ thiol-ene สามารถเกิดปฏิกิริยาในตัวทำละลายที่เป็นมิตรกับเซลล์และเปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ที่สูง[11]และในปี 2020 ยังได้มีการวิจัย bioink โดย Gelatin ที่ติด norbonene และ Gelatin ที่ติด methacrylyol นำมาเชื่อมขวางด้วยปฏิกิริยา thiol-ene click reaction โดยใช้ dithiothreitol เป็นสารเชื่อมขวาง เมื่อนำมาพิมพ์เป็นโครงสร้าง 3 มิติและนำเซลล์มาเลี้ยงในโครงสร้างพบว่าเซลล์สามารถอยู่รอดในโครงสร้างดังกล่าวได้ [12]

ในปี ค.ศ.2019, Bi และคณะ [12] ได้สังเคราะห์ polyamidoamine dendrimer-PEG hydrogel โดยผลิตภัณฑ์ดังกล่าวเป็นการสังเคราะห์ผ่านปฏิกิริยา thiol-ene click reaction ระหว่าง vinyl sulfone functionalized polyamidoamine (PAMAM) dendrimer โดยใช้ multi-armed thiolated polyethylene glycol เป็นสารเชื่อมขวางพบว่าเมื่อนำ hydrogel ดังกล่าวไปใช้เลี้ยงเซลล์พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ถึง 70 เปอร์เซ็นต์

โดยในปี ค.ศ.2020, Lui และคณะ [13] ได้ใช้ปฏิกิริยา thiol-ene click reaction เชื่อมขวางระหว่าง poly (γ-glutamic acid) ที่ติด glycidyl methacryloyl ลงไปในสายโพลิเมอร์โดยใช้ dithiothreitol เป็นสารเชื่อมขวางพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้สามารถใช้เพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนได้

ในปี ค.ศ.2020, Sishi และคณะ [14] ได้เชื่อมขวางระหว่าง sodium alginate โดยติด vinylether ลงไปในสาย จากนั้นเชื่อมขวางโดยใช้ปฏิกิริยา thiol-ene click reaction โดยใช้ dithiothreitol เป็นสารเชื่อมขวางพบว่าผลิตภัณฑ์สามารถนำไปใช้เลี้ยงเซลล์และสามารถใช้รักษาบาดแผลได้

บทที่ 2

การทดลอง

2.1 สารเคมีและอุปกรณ์

1. Sericin (Xian Tonking Biotech Co., Ltd., Xi'An, China)

2. Methacrylic acid (Acros Organics, Geel, Belgium)

3. Methacrylic anhydride (Acros Organics, Geel, Belgium)

4. 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (Acros Organics, Geel, Belgium)

5. N-Hydroxysuccinimide (NHS) (Carlo Erba, Barcelona, Spain)

6.Hydroquinone (Carlo Erba, Barcelona, Spain)

7. Pyridine (Carlo Erba, Barcelona, Spain)

8. Dialysis tubing cellulose membrane avg. flat width 76 mm MWCO 12000-14000 (Sigma-aldrich, USA)

9. Deionized water (DI water)

10. Dimethylformamide (DMF) (Merck, Darmstadt, Germany)

11. Dithiothreitol (DTT) (Tokyo Chemical Industry, Saitama, Japan)

12. Vitamin C (Myskinrecipes, Bangkok, Thailand)

2.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่อง Freeze-drying รุ่น 7753501 (Labconco Corporation, Kansas, MI, USA

2. เครื่องเจลเพอร์มีเอชันโครมาโตกราฟี (Gel Permeation Chromatography, Shimadzu รุ่น Prominence HPLC series, Shodex OHpak SB-803 HQ column ต่อกับ OHpak SB-806 HQ column, diode array detector, SPOM20A)

3. เครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มสเปกโตรมิเตอร์ (FT-IR spectrometer) รุ่น Nicolet 6700 (Thermo Electron Corporation, Madison, WI, USA)

4. เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติคเรโซแนนซ์สเปกโตรมิเตอร์ (^{1}H NMR) Jeol รุ่น JNM-ECZR 400 MHz (JEOL, Japan)

2.3 การกราฟท์หมู่ methacryloyl ลงบนโปรตีนเซริซิน (Ser-MA)

2.3.1 การกราฟท์หมู่ methacryloyl ลงบนโปรตีนเซริซินในตัวทำละลายพิริดีนและทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนในเอทานอล

ชั่งโปรตีนเซริซิน 1000 mg และ hydroquinone 10 mg และ methacrylic anhydride 808.7 mg ลงในขวดก้นกลมขนาด 50 mL และตวงพิริดีน 20 mL และใส่ magnetic bar ลงในขวดก้นกลมดังกล่าว และนำไปประกอบกับเครื่องแก้ว reflux condenser และตั้งปฏิกิริยาที่ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 วัน เสร็จแล้วนำสารละลายไปกรองส่วนที่ไม่ละลายออกด้วยกระดาษกรองและนำส่วนที่เป็นของเหลวไปเติมอะซีโตนประมาณ 10 mL เพื่อให้สารละลายตกตะกอนและนำตะกอนไปกรองสุญญากาศและล้างด้วยอะซีโตน หลังจากนั้นนำตะกอนดังกล่าวไปตรวจโครงสร้างด้วยเทคนิค IR และ ^{1}H NMR

ได้ผลิตภัณฑ์ Ser-MA (I) (0.3472 g, 14.82% yield) เป็นของแข็งสีขาว

IR spectroscopy(cm^{-1}): 3269 (O-H stretching), 3059 (N-H stretching), 2920 (C-H stretching), 2850 (C-H stretching), 1643 (C=O stretching), 1514 (C=C stretching) ,1390 (C-H bending) ,1234 (C-N stretching) และ1061 (C-O stretching) **^{1}H NMR** (DMSO, 400 MHz, **δ** ppm) : 8.39 (H in amide, s), 7.03 และ 6.64 (4H in aromatic tyrosine, d), 5.42 (CH_2=C in methacryloyl), 4.24 (CH_2-O in Serine, d)

2.3.2 การกราฟท์หมู่ methacryloyl ลงบนโปรตีนเซริซินด้วยปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นกับ methacrylic anhydride ในตัวทำละลายพิริดีน

ชั่งโปรตีนเซริซิน 1000 mg และ hydroquinone 10 mg และ methacrylic anhydride 405.6 mg ลงในขวดก้นกลมขนาด 50 mL และตวงพิริดีน 20 mL และใส่ magnetic bar ลงในขวดก้นกลมดังกล่าว และนำไปประกอบกับเครื่องแก้ว reflux condenser และตั้งปฏิกิริยาที่ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 วัน เสร็จแล้วนำสารละลายไปกรองส่วนที่ไม่ละลายออกด้วยกระดาษกรอง และนำส่วนที่เป็นสารละลายไปใส่ถุง Dialysis tubing cellulose membrane avg. flat width 76 mm MWCO 12000-14000 แล้วนำไป dialysis เปลี่ยนทุกชั่วโมงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง และนำสารละลายในถุง dialysis ไป freeze dry เป็นเวลา 1 วัน และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปตรวจโครงสร้างด้วยเทคนิค IR และ ^{1}H NMR

ได้ผลิตภัณฑ์ Ser-MA (II) (0.0184 g, 0.76% yield) เป็นของแข็งสีขาว

IR spectroscopy(cm^{-1}): 3292 (O-H stretching), 3062 (N-H stretching) 2945 (C-H stretching), 2850 (C-H stretching), 1651 (C=O stretching), 1520 (C=C stretching) ,1379 (C-H bending) และ 1074 (C-O stretching) **^{1}H NMR** (D_2O, 400 MHz, **δ** ppm) : 6.89 (2H in aromatic tyrosine, d,) และ 6.59 (2H in aromatic tyrosine, d) 5.95 และ 5.54 (CH_2=C in methacryloyl)

2.3.3 การกราฟท์หมู่ methacryloyl ลงบนโปรตีน Sericin ในตัวทำละลายน้ำด้วย methacrylic acid โดยใช้ 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide เป็น coupling agent

ชั่ง methacrylic acid 230.6 mg และ 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminoproply) carbodiimide 1536.5 mg ลงในขวดก้นกลม 2 หัวขนาด 25 mL จากนั้นตวง dimethylformamide 5 mL และใส่ magnetic bar ลงในขวดก้นกลม 2 หัวดังกล่าว จากนั้นตั้งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นชั่ง N-Hydroxysuccinimide 911.5 mg และ โปรตีนเซริซิน 1000 mg ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมน้ำกลั่น 4 mL ลงในหลอดทดลอง และทำการเขย่าหลอดทดลองเพื่อให้สารทั้งสองละลาย จากนั้นนำสารละลายในหลอดทดลองเทลงในขวดก้นกลม 2 หัว จากนั้นนำขวดก้นกลมไป flush แก๊สไนโตรเจนและตั้งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสารละลายในขวดก้นกลมใส่ในถุง dialysis tubing cellulose membrane avg. flat width 76 mm MWCO 12000-14000 แล้วนำไป dialysis เปลี่ยนทุกชั่วโมงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายในถุง dialysis ไป freeze dry เป็นเวลา 1 วัน และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปตรวจโครงสร้างด้วยเทคนิค IR และ ^{1}H NMR

ได้ผลิตภัณฑ์ Ser-MA (III) (394 mg, 15.73% yield) เป็นของแข็งสีขาว

IR spectroscopy(cm^{-1}): 3278 (O-H stretching), 3070 (N-H stretching), 2937 (C-H stretching), 1645 (C=O stretching), 1516 (C=C stretching) ,1392 (C-H bending), 1238 (C-N stretching), 1066 (C-O stretching) **^{1}H NMR** (D_2O, 400 MHz, **δ** ppm) : 8.48 (H in amide, s), 6.99 (2H in aromatic tyrosine, d, *J*=5.7 Hz) และ 6.69 (2H in aromatic tyrosine, d, *J*=7.2 Hz), 5.91 และ 5.39 (CH_2=C in methacryloyl), 4.24 (CH_2-O in serine, d, *J*=4.2 Hz)

2.4 การทำปฏิกิริยาการเชื่อมขวางด้วย thiol-ene click reaction(Ser-MA/DTT)

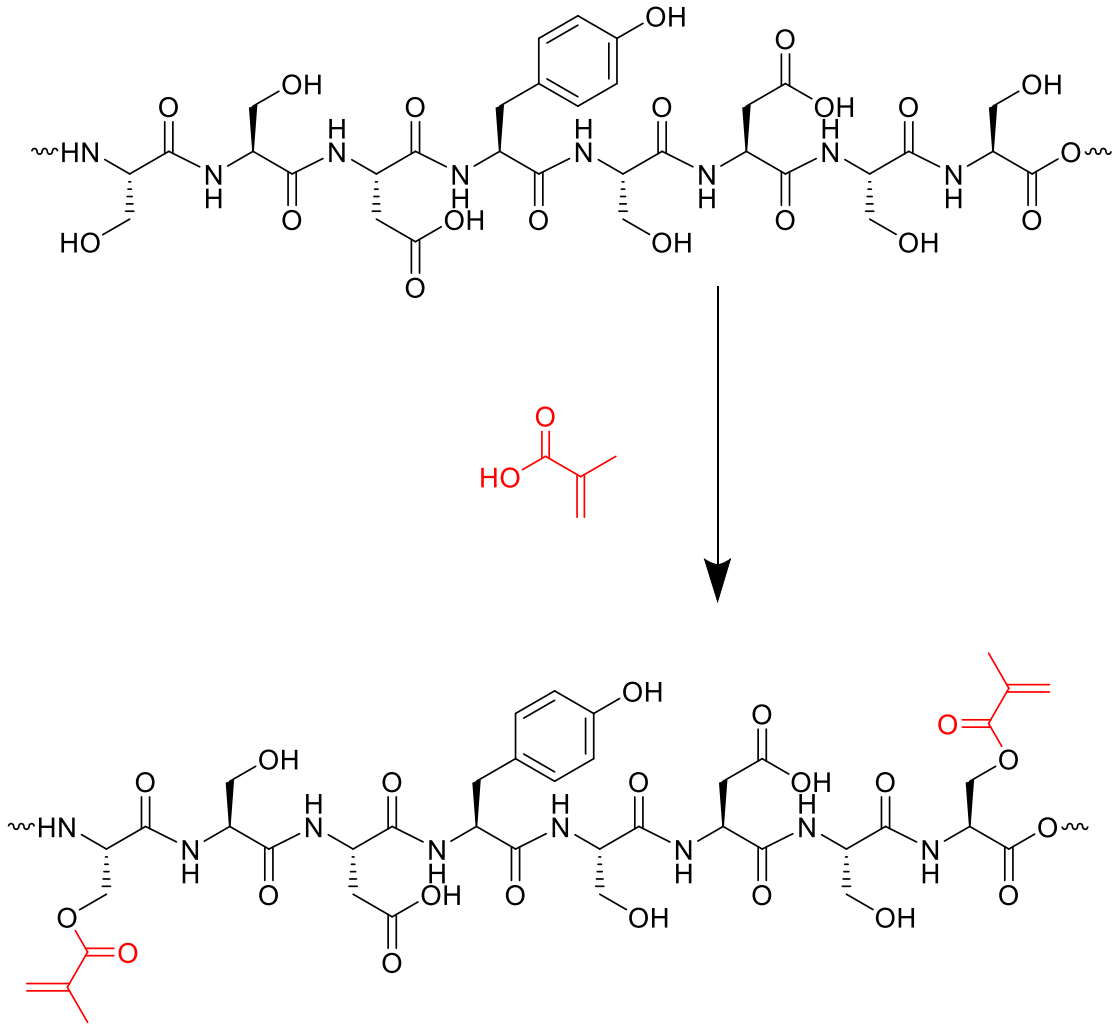
ชั่ง dithiothreitol 150 mg และ vitamin C 56 mg ลงในขวดก้นกลมขนาด 25 mL จากนั้นเติมน้ำกลั่น 1 mL และ magnetic bar ลงไป จากนั้นตั้งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-3 ชั่วโมง หลังจากนั้นชั่งโปรตีนเซริซินที่ติดหมู่ methacryloyl 100 mg ลงในขวดก้นกลมข้างต้น จากนั้นตั้งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-3 ชั่วโมง จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปตรวจโครงสร้างด้วยเทคนิค ^{1}H NMR

ได้ผลิตภัณฑ์ Ser-MA/DTT เป็นสารละลายสีเหลือง ^{1}H NMR (D_2O, 400 MHz, **δ** ppm) : 8.37 (H in amide, s), 6.84 (2H in aromatic tyrosine, d, *J*=7.11 Hz), 6.53 (2H in aromatic tyrosine, d, *J*=7.96 Hz), 2.87 (CH_2-S, d, *J*=8.04 Hz)

บทที่ 3

ผลการทดลอง

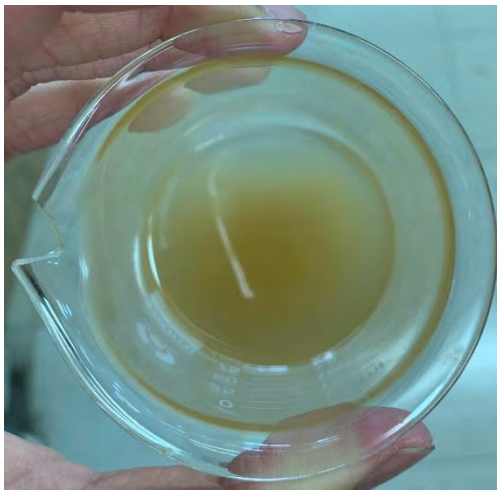
3.1 การกราฟท์หมู่ methacryloyl ลงบนโปรตีน Sericin



รูปที่ 3.1 สมการเคมีแสดงการติดหมู่ methacryloyl ลงบนโปรตีนเซริซิน

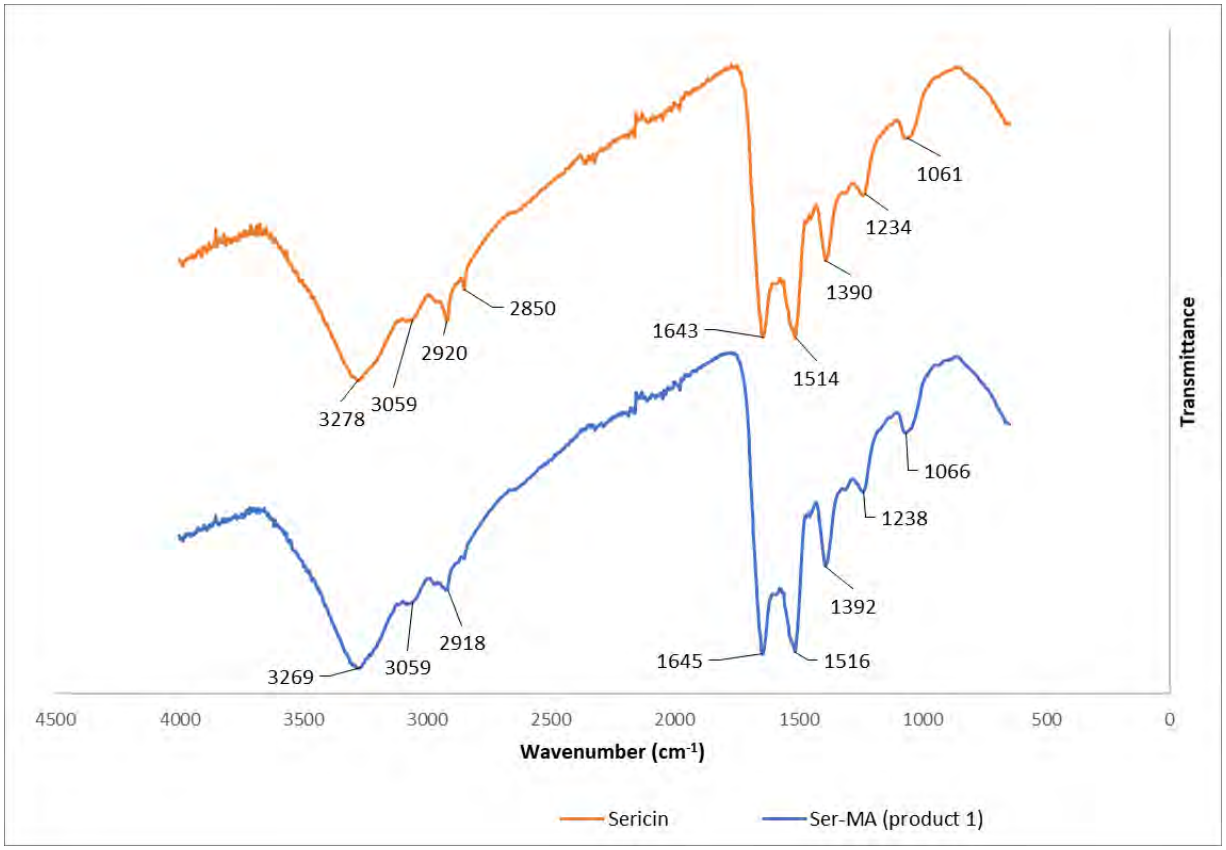
3.1.1 การกราฟท์หมู่ methacryloyl ลงบนโปรตีนเซริซินในตัวทำละลายพิริดีน

เมื่อกราฟท์หมู่ methacryloyl ลงบนโปรตีนเซริซินโดยใช้ methacrylic anhydride เป็นตัวให้หมู่ methacryloyl โดยใช้โปรตีนเซริซินกับ methacrylic anhydride อัตราส่วน 1:700 โดยโมลและใช้ตัวทำละลายเป็นพิริดีนพบว่าเซริซินนั้นละลายได้ไม่ดีในพิริดีน เมื่อตั้งปฏิกิริยาที่ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่าเซริซินนั้นยังละลายได้ไม่หมดเมื่อนำสารละลายไปกรองเอาของแข็งที่ไม่ละลายออกแล้วนำส่วนที่เป็นของเหลวไปเติมเอทานอลเพื่อให้ผลิตภัณฑ์ตกตะกอนออกมาพบว่าเกิดตะกอนสีน้ำตาลขึ้นดังรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 สารละลายที่มีตะกอนของ Ser-MA (product 1)

จากนั้นนำตะกอนที่ได้ไปกรองสุญญากาศแล้วล้างด้วยอะซีโตนจากนั้นนำตะกอนที่ได้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค FT-IR และเทคนิค Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

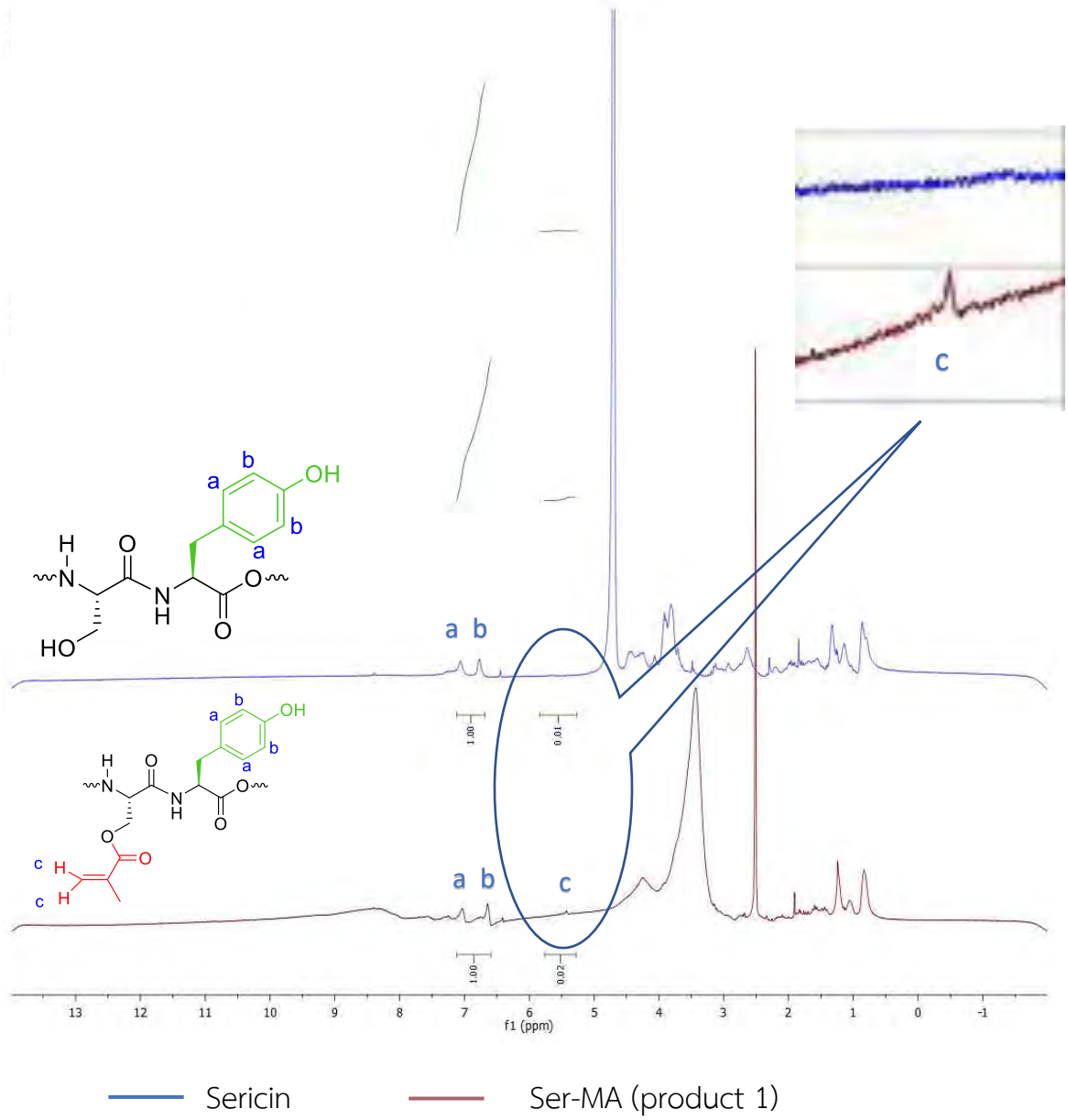


รูปที่ 3.3 FT-IR spectrum ของเซริซินก่อนและหลังติดหมู่ methacryloyl

จากรูปที่ 3.3 เมื่อพิจารณา IR สเปกตรัมของเซริซินพบพีคที่ 3278 เป็นพีคของ O-H stretching พีคที่ 3059 เป็นของ N-H stretching ใน amide พีคที่ 2920 เป็นพีคของ C-H stretching พีคที่ 2850 เป็นพีคของ C-H stretching พีคที่ 1643 เป็นพีคของ C=O stretching ใน amide พีคที่ 1514 เป็นของ C=C stretching พีคที่ 1390 เป็นพีคของ C-H bending พีคที่ 1234 เป็นพีคของ C-N stretching และ 1061 เป็นพีคของ C-O stretching

เมื่อพิจารณา IR สเปกตรัมของเซริซินที่ติดหมู่ methacryloyl พบพีคที่ 3269 เป็นพีคของ O-H stretching พีคที่ 3059 เป็นของ N-H stretching ใน amide พีคที่ 2918 เป็นพีคของ C-H stretching พีคที่ 2848 เป็นพีคของ C-H stretching พีคที่ 1645 เป็นพีคของ C=O stretching ใน amide พีคที่ 1516 เป็นของ C=C stretching พีคที่ 1392 เป็นพีคของ C-H bending พีคที่ 1238 เป็นพีคของ C-N stretching และ 1066 เป็นพีคของ C-O stretching

จากผล FT-IR spectrum จะพบว่าโปรตีนเซริซินก่อนกราฟท์ methacryloyl group กับหลังกราฟท์ methacryloyl group นั้นให้ spectrum ที่คล้ายกันจากนั้นพิสูจน์เอกลักษณ์เพิ่มเติมด้วยเทคนิค ^{1}H NMR

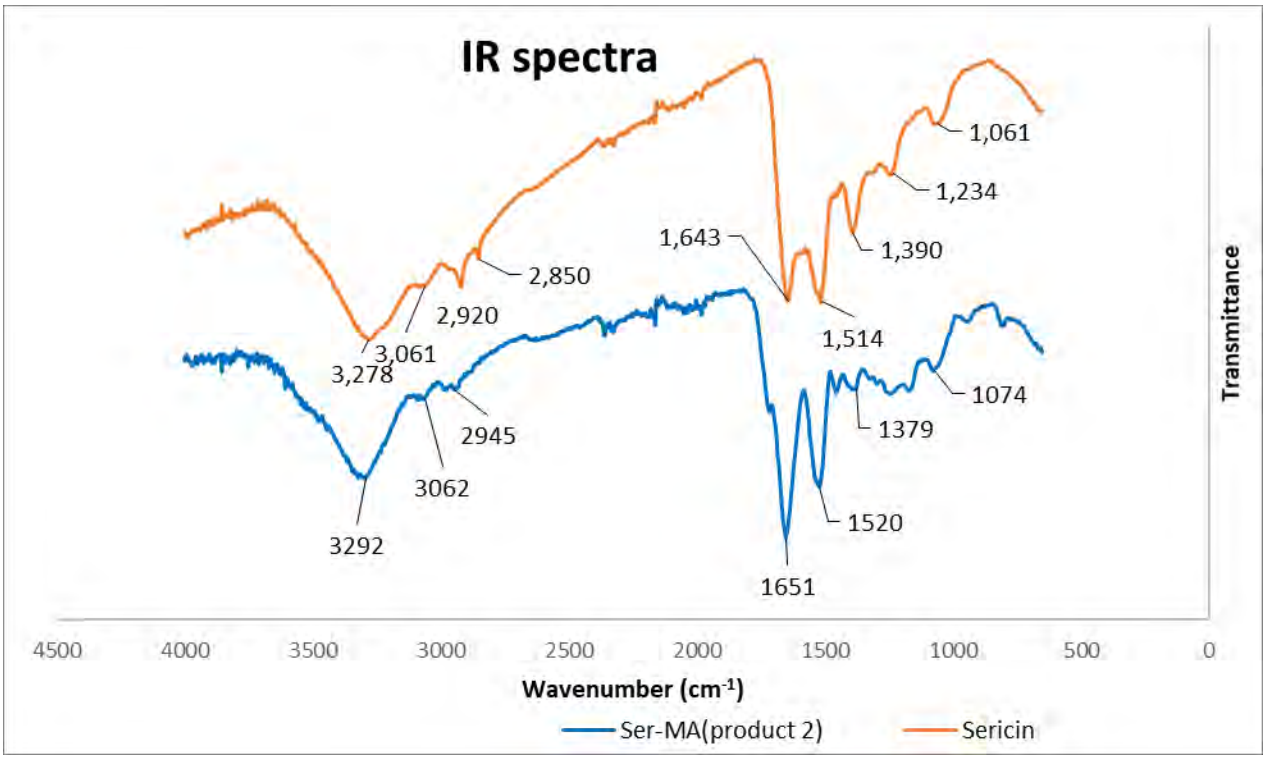


รูปที่ 3.4 ^{1}H NMR spectrum ของเซริซินในตัวทำละลาย D_2O และเซริซินที่ติดหมู่ methacryloyl ในตัวทำละลาย DMSO

จากรูปที่ 3.4 จะเห็นว่า ^{1}H NMR spectrum ของเซริซินให้พีค 2 พีคที่ chemical shift 7.06 และ 6.67 ppm คาดว่าน่าจะเป็นของ H ที่อยู่บนวงอะโรมาติกของกรดอะมิโนไทโรซีนและจาก ^{1}H NMR spectrum ของเซริซินที่ติดหมู่ methacryloyl จะพบ 2 พีคที่ chemical shift 7.03 และ 6.64 ppm เป็นของ H ที่อยู่บนวงอะโรมาติกของกรดอะมิโนไทโรซีนโดยที่ค่า chemical shift ในสารทั้งสองไม่เท่ากันเนื่องจากใช้ตัวทำละลายต่างกัน(ผลิตภัณฑ์ Ser-MA(**I**) ไม่ละลายในน้ำ)และยังพบพีคที่ 5.42 ppm ซึ่งเป็นของ H ที่ติดกับ alkene ที่มาจากหมู่ methacryloyl จึงยืนยันได้ว่าเกิดจากการติดหมู่ methacryloyl ลงไป เมื่อหาพื้นที่ใต้กราฟพบว่าอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของพีคที่ 7.03 และ 6.64 ppm กับ 5.42 ppm โดยพีคของหมู่ไทโรซีนประกอบด้วย 4 โปรตรอนและพีคของหมู่ methacryloyl ประกอบด้วย 2 โปรตรอน พบว่าอัตราส่วนพื้นที่ใต้อยู่ที่ 100:2 แสดงว่าในทุกๆ ไทโรซีน 25 หมู่จะมีmethacryloyl ติดอยู่เพียง 1 หมู่ซึ่งคาดว่ามาจากการที่ methacrylic anhydride บางส่วนเปลี่ยนไปเป็น methacrylic acid เลยทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ไม่ดี ผู้วิจัยจึงทดลองทำปฏิกิริยาอีกโดยกลั่นพิริดีนให้ดีก่อน อย่างไรก็ตามพบว่าเมื่อพิริดีนแห้งดีเซริซินกลับละลายได้ไม่ดีในพิริดีน เมื่อตั้งปฏิกิริยาที่ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่าเซริซินก็ยังละลายได้ไม่หมด จึงนำสารละลายไปกรองเอาของแข็งออกแล้วนำส่วนที่เป็นสารละลายไปเติมเอทานอลพบว่าไม่มีตะกอนเกิดขึ้นจึงนำส่วนสารละลายไปทำ dialysis molecular weight cut off 12000-14000 Da แล้วนำไป freeze dry จะได้ของแข็งที่มีสีขาวดังรูปที่ 3.5

รูปที่ 3.5 ผลิตภัณฑ์ Ser-MA ที่ได้หลังจาก freeze dry

จากนั้นนำของแข็งที่ได้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค FT-IR spectroscopy

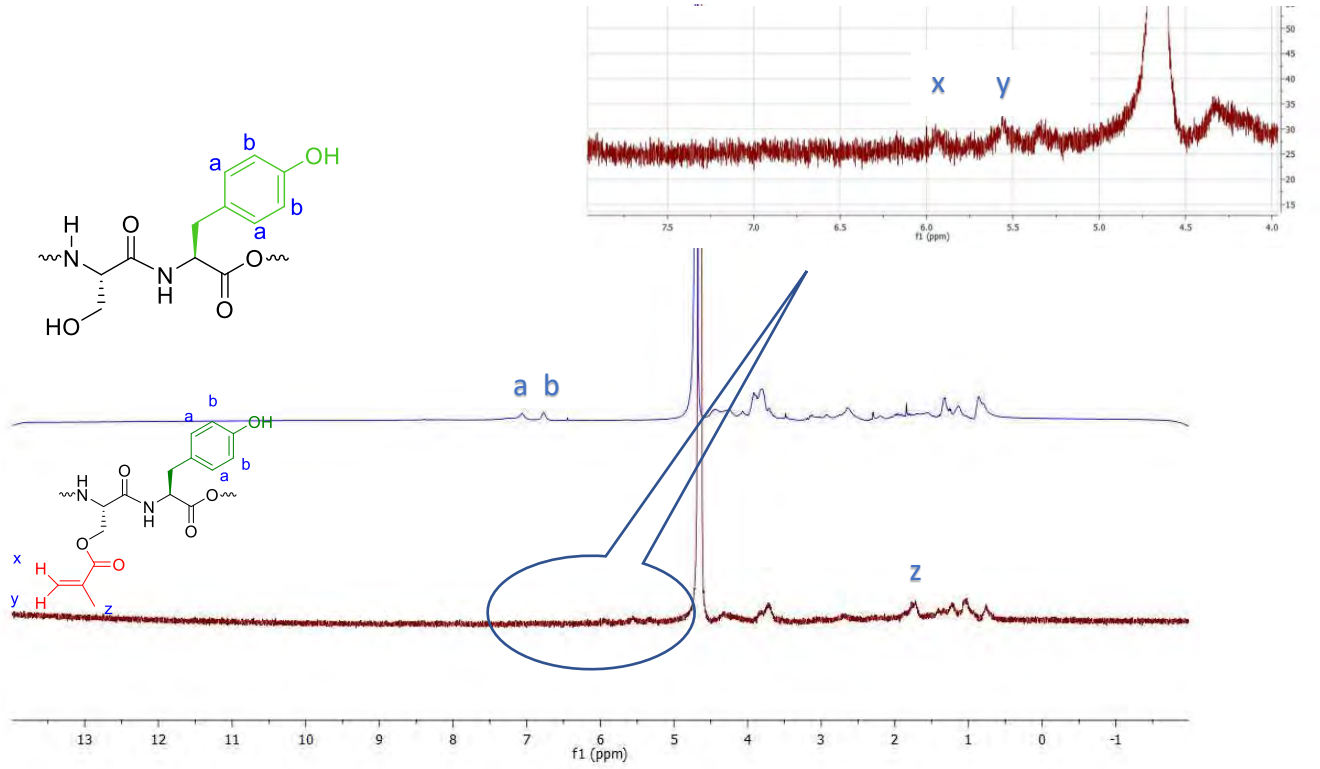


รูปที่ 3.6 FT-IR spectra ของเซริซินก่อนและหลังติดหมู่ methacryloyl

จากรูปที่ 3.6 เมื่อพิจารณา IR สเปกตรัมของเซริซินพบพีคที่ 3278 เป็นพีคของ O-H stretching พีคที่ 3061 เป็นพีคของ N-H stretching ใน amide พีคที่ 2920 เป็นพีคของ C-H stretching พีคที่ 2850 เป็นพีคของ C-H stretching พีคที่ 1643 เป็นพีคของ C=O stretching ใน amide พีคที่ 1514 เป็นของ C=C stretching พีคที่ 1390 เป็นพีคของ C-H bending พีคที่ 1234 เป็นพีคของ C-N stretching และ 1061 เป็นพีคของ C-O stretching

เมื่อพิจารณา IR สเปกตรัมของเซริซินที่ติดหมู่ methacryloyl พบพีคที่ 3292 เป็นพีคของ O-H stretching พีคที่ 3062 เป็นพีคของ N-H stretching ใน amide พีคที่ 2945 เป็นพีคของ C-H พีคที่ 1651 เป็นพีคของ C=O stretching ใน amide พีคที่ 1520 เป็นของ C=C stretching พีคที่ 1379 เป็นพีคของ C-H bending และ พีคที่ 1074 เป็นพีคของ C-O stretching

จากผล FT-IR spectrum จะพบว่าโปรตีนเซริซินก่อนกราฟท์ methacryloyl group กับหลังกราฟท์ methacryloyl group นั้นให้ spectrum ที่ต่างกันแต่ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าหมู่ methacryloyl ได้ติดลงบนสายโปรตีนเซริซินเพื่อยืนยันผลดังกล่าวจึงพิสูจน์เอกลักษณ์เพิ่มเติมด้วยเทคนิค ^{1}H NMR



รูปที่ 3.7 ^{1}H NMR spectrum ของเซริซินก่อนและหลังติดหมู่ methacryloyl

Sericin Ser-MA (product 2)

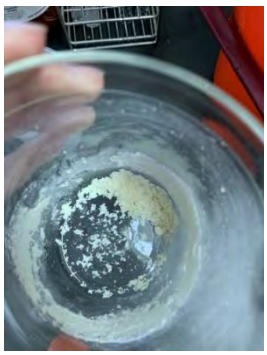
จากรูปที่ 3.7 พบว่า ^{1}H NMR spectrum ของเซริซินให้พีค 2 พีคที่ chemical shift 7.06 และ 6.67 ppm เป็นของ H ที่อยู่บนวงอะโรมาติกของกรดอะมิโนไทโรซีนและจาก ^{1}H NMR spectrum ของ Ser-MA จะพบ 2 พีคที่ chemical shift 5.95, 5.54 ซึ่งเป็นของ H ที่ติดกับ alkene และ 1.74 ซึ่งเป็นโปรตรอนของหมู่ methyl ที่มาจากหมู่ methacryloyl จึงยืนยันได้ว่าเกิดจากการติดหมู่ methacryloyl ลงไปแต่ที่พีค

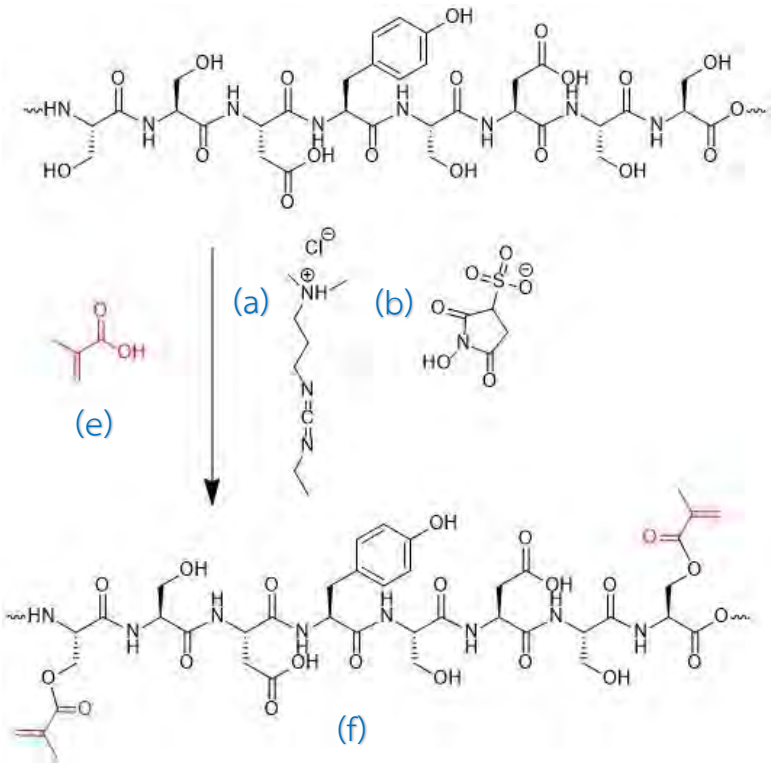
chemical shift ช่วง 7.0-6.5 ppm ที่เป็นของ tyrosine หายไปคาดว่าอาจเกิดจากที่มี methacryloyl ติดบนสายโปรตีนจำนวนมากทำให้จำนวนเปอร์เซ็นต์กรดอะมิโนไทโรซีนในสายโปรตีนลดลงจึงทำให้ intensity ของพีคไทโรซีนลดลงจนเท่า baseline

3.1.2 การกราฟท์หมู่ methacryloyl ลงบนโปรตีนเซริซินในตัวทำละลายน้ำโดยปฏิกิริยา esterification โดยใช้ 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbo-diimide

(c)

(d)

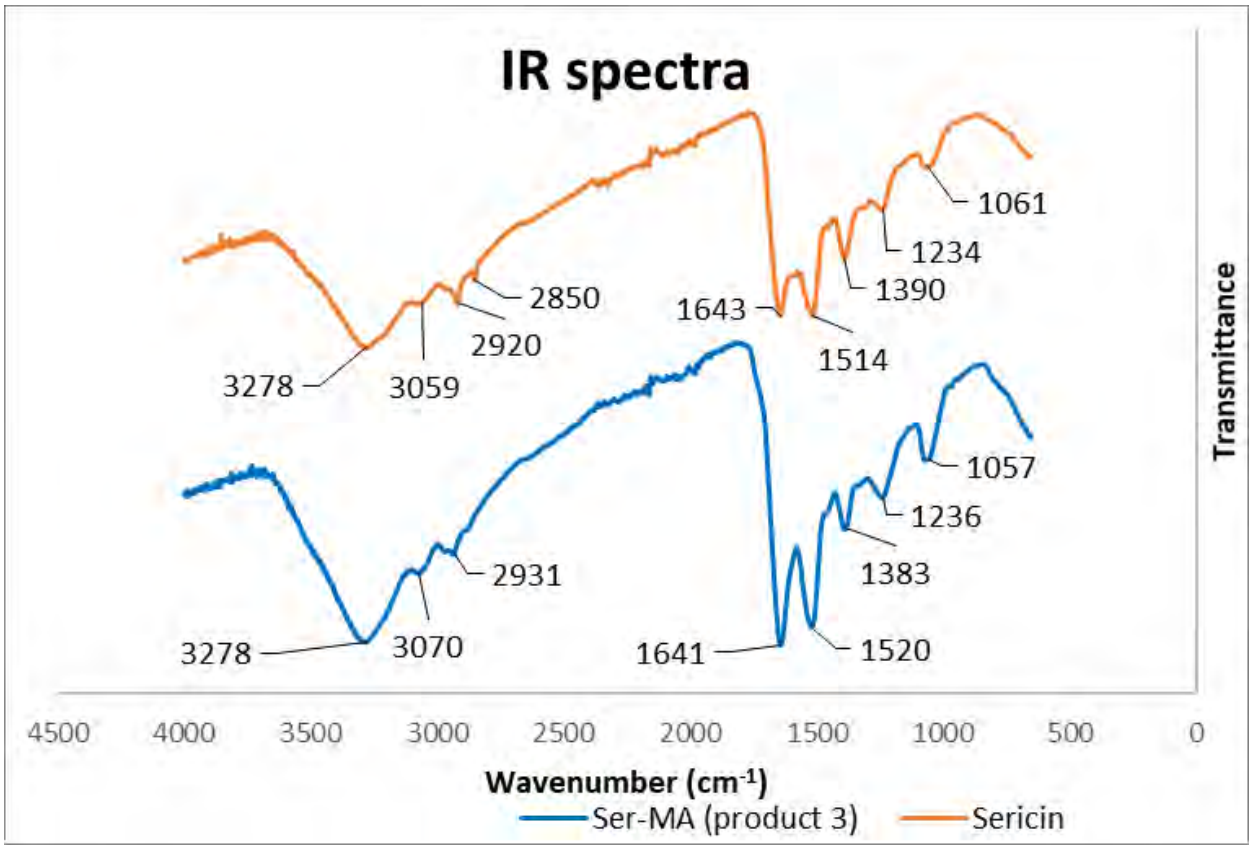




รูปที่ 3.8 สมการเคมีแสดงการติดหมู่ methacryloyl ลงบนโปรตีนเซริซิน (a) 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, (b) N-hydroxysuccnimide, (c) ภาพขณะตั้งปฏิกิริยา, (d) ภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้, (e) methacrylic acid และ (f) Ser-MA

เมื่อกราฟท์ methacryloyl group ลงบนเซริซินโดยใช้เซริซินกับ methacrylic acid และ EDCI couplingในอัตราส่วน 1:4041:2933 โดยโมลและใช้methacrylic acid เป็นตัวให้หมู่ methacryloyl group ใช้ตัวทำละลายเป็นน้ำและใช้ EDCI coupling

agent เมื่อตั้งปฏิกิริยาพบว่าโปรตีนเซริซินสามารถละลายได้ดีในน้ำโดยสารละลายที่ได้ในขณะตั้งปฏิกิริยามีสีเหลืองใสตามสีของโปรตีนเซริซิน เมื่อตั้งปฏิกิริยาครบตาม 3-4 ชั่วโมงแล้วก็นำไปกำจัด methacrylic acid, EDCI coupling, NHS ที่เกิดปฏิกิริยาไม่หมดออกด้วยวิธี dialysis ด้วยเมมเบรนที่มี MWCO 12000-14000 เป็นเวลา 12 ชั่วโมงจากนั้นเมื่อทำ dialysis นำไป freeze dry ได้ผลิตภัณฑ์ออกมาเป็นของแข็งขาวดังรูปที่ 3.8 (d) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค FT-IR



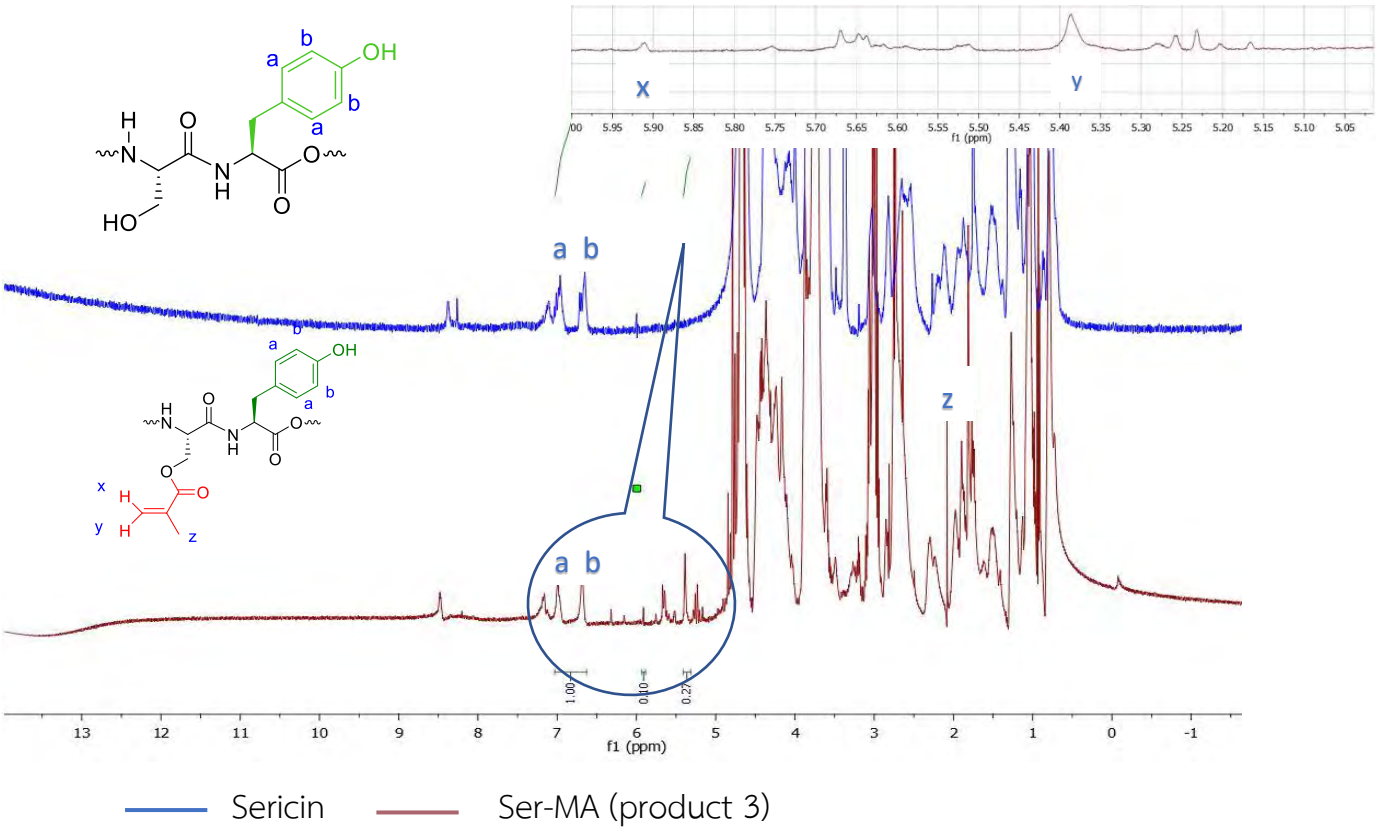
รูปที่ 3.9 FT-IR spectra ของเซริซินก่อนและหลังติดหมู่ methacryloyl

เมื่อพิจารณา IR สเปกตรัมของเซริซินพบพีคที่ 3278 เป็นพีคของ O-H stretching พีคที่ 3059 เป็นพีคของ N-H stretching ใน amide พีคที่ 2920 เป็นพีคของ C-H stretching พีคที่ 2850 เป็นพีคของ C-H stretching พีคที่ 1643 เป็นพีคของ C=O stretching ใน amide

พีคที่ 1514 เป็นของ C=C stretching พีคที่ 1390 เป็นพีคของ C-H bending พีคที่ 1234 เป็นพีคของ C-N stretching และ 1061 เป็นพีคของ C-O stretching

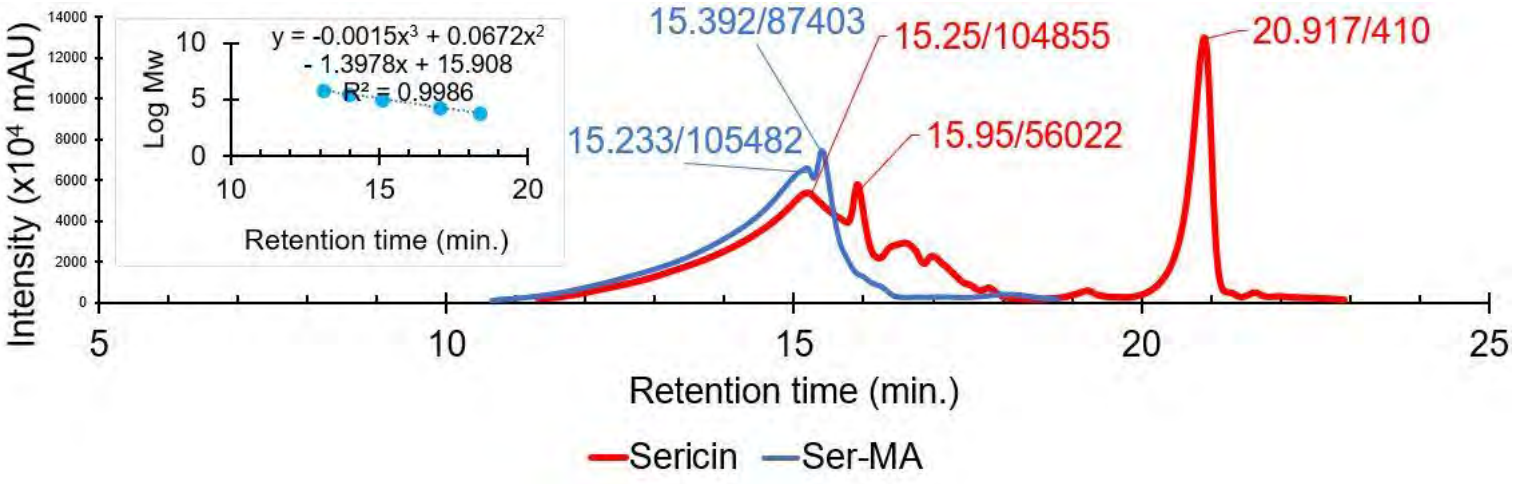
เมื่อพิจารณา IR สเปกตรัมของเซริซินที่ติดหมู่ methacryloyl พบพีคที่ 3278 เป็นพีคของ O-H stretching พีคที่ 3070 เป็นพีคของ N-H stretching ใน amide พีคที่ 3 2937 เป็นพีคของ C-H stretching พีคที่ 1645 เป็นพีคของ C=O stretching ใน amide พีคที่ 1516 เป็นของ C=C stretching พีคที่ 1392 เป็นพีคของ C-H bending พีคที่ 1238 เป็นพีคของ C-N stretching และ 1066 เป็นพีคของ C-O stretching

จากผล FT-IR spectrum จะพบว่าโปรตีนเซริซินก่อนกราฟท์ methacryloyl group กับหลังกราฟท์ methacryloyl group นั้นให้ spectrum ที่ต่างกันแต่ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าหมู่ methacryloyl ได้ติดลงบนสายโปรตีนเซริซินเพื่อยืนยันผลดังกล่าวจึงพิสูจน์เอกลักษณ์เพิ่มเติมด้วยเทคนิค ^{1}H NMR



รูปที่ 3.10 ^{1}H NMR spectrum ของเซริซินก่อนและหลังติดหมู่ methacryloyl

จากรูปที่ 3.10 จะเห็นว่า ^{1}H NMR spectrum ของเซริซินให้พีค 2 พีคที่ chemical shift 7.06 และ 6.67 ppm เป็นของ H ที่อยู่บนวงอะโรมาติกของกรดอะมิโนไทโรซีนและจาก ^{1}H NMR spectrum ของ Ser-MA จะพบพีค 2 พีคที่ chemical shift 7.00 และ 6.69 ppm และหลายพีคที่ช่วง chemical shift 5.95-5.13 ppm ซึ่งเป็นของ H ที่ติดกับ alkene ที่มาจากหมู่ methacryloyl โดยก่อนกราฟท์จะไม่มีพีคที่ช่วง 5.95-5.13 ppm แต่หลังการกราฟท์ methacryloyl พบพีคหลายพีคเกิดขึ้นที่ 5.91 และ 5.39 ppm โดยมีอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟ 1.00 : 0.37 ของพีค a+b เทียบกับ x+y จึงยืนยันได้ว่าเกิดจากการติดหมู่ methacryloyl ลงไป เมื่อนำอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การแทนที่พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การแทนที่อยู่ 1.97% จากนั้นจึงนำไปหามวลโมเลกุลของผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคเจลเพอร์มีเอชันโครมาโตกราฟี

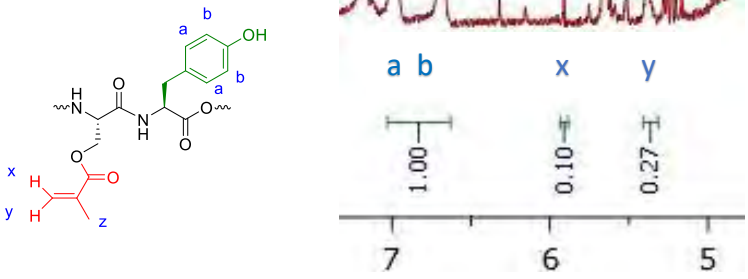


รูปที่ 3.11 GPC chromatogram ของเซริซินและ Ser-MA

จากโครมาโทแกรมเมื่อนำมาคำนวณหามวลโมเลกุลเฉลี่ยพบว่ามวลโมเลกุลเฉลี่ยของผลิตภัณฑ์เป็น 212666 ซึ่งสูงขึ้นจากเดิมคือ 153071 ซึ่งน่าจะเกิดจาก methacryloyl group ได้เข้าไปแทนที่ไฮโดรเจนที่หมู่ hydroxy ในกรดอะมิโนเซอรีนซึ่งตัว methacryloyl มีมวลโมเลกุลมากกว่าไฮโดรเจนจึงทำให้มวลโมเลกุลโปรตีนในสายมีค่าสูงขึ้น

3.1.3. การคำนวณเปอร์เซ็นต์การแทนที่

การคำนวณเปอร์เซ็นต์การแทนที่ทำได้โดยเปรียบเทียบพื้นที่ใต้ กราฟ NMR spectrum ระหว่างวงอะโรมาติก chemical shift ช่วง 7-8 ppm ซึ่งเป็น H ที่ติดบนวงอะโรมาติกในกรดอะมิโนไทโรซีนกับพื้นที่ใต้กราฟช่วง 5-6 ppm ซึ่งเป็นของหมู่ methacryloyl ที่ติดลงไปบนเซริซินโดยในโปรตีนเซริซินนั้นประกอบไปด้วยกรดอะมิโนที่เป็นวงอะโรมาติกหลักๆคือไทโรซีนซึ่งมีอยู่ประมาณ 3.98% (reference) ส่วนหมู่ methacryloyl จะไปติดอยู่บนสายโปรตีนที่ตำแหน่งกรดอะมิโนเซอรีนซึ่งในโปรตีนเซริซินโดยในเซริซินมีเซอรีนอยู่ประมาณ 24.80% โดยในวงอะโรมาติกของไทโรซีนมีโปรตรอนอยู่ 4 ตัวและ methacryloyl มีโปรตรอนอยู่ 2 ตัวที่ปรากฏอยู่ใน chemical shift ในช่วง 5-6 ppm



รูปที่ 3.12 ภาพขยาย NMR spectrum ของเซริซินหลังติดหมู่ methacryloyl ช่วง 5-7 ppm

ดังนั้นสามารถเทียบพื้นที่แบบ 1:1 ได้โดยจะคำนวณดังนี้

4H tyrosine 1.00 : 0.37 2H methacryloyl group

4H tyrosine 1.00 : 0.74 4H methacryloyl group

100 g sericin > tyrosine 0.0188 mol

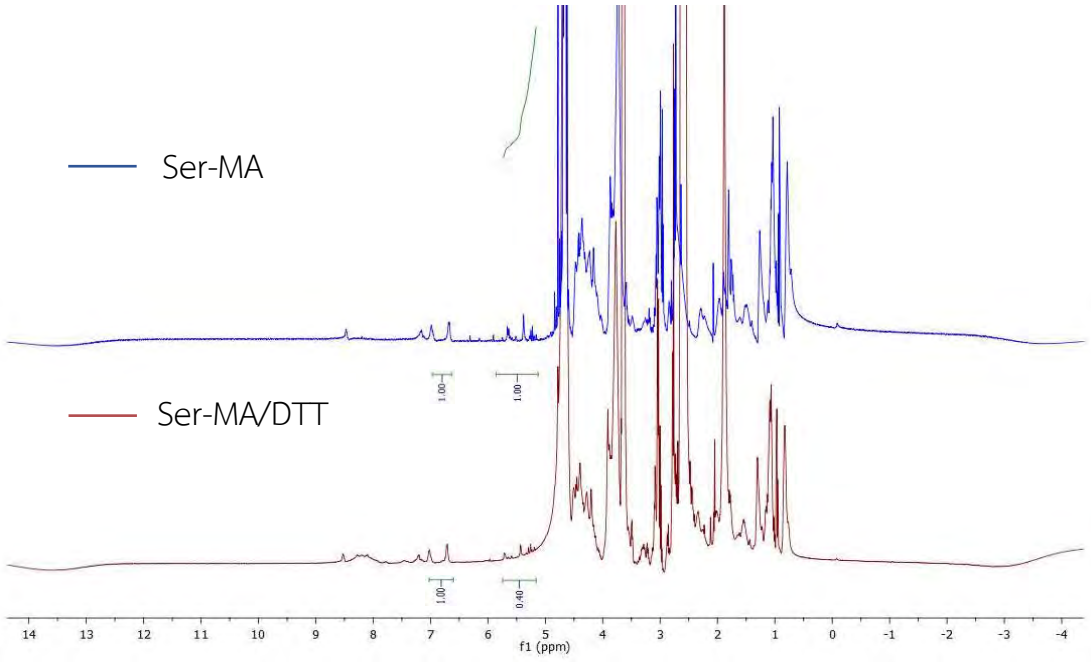
100 g sericin > methacryloyl group 0.74x0.0188 = 0.013912 mol

100 g in sericin have amino acid overall 0.6407 mol

จะได้ว่ามี methacryloyl group อยู่ 2.17%

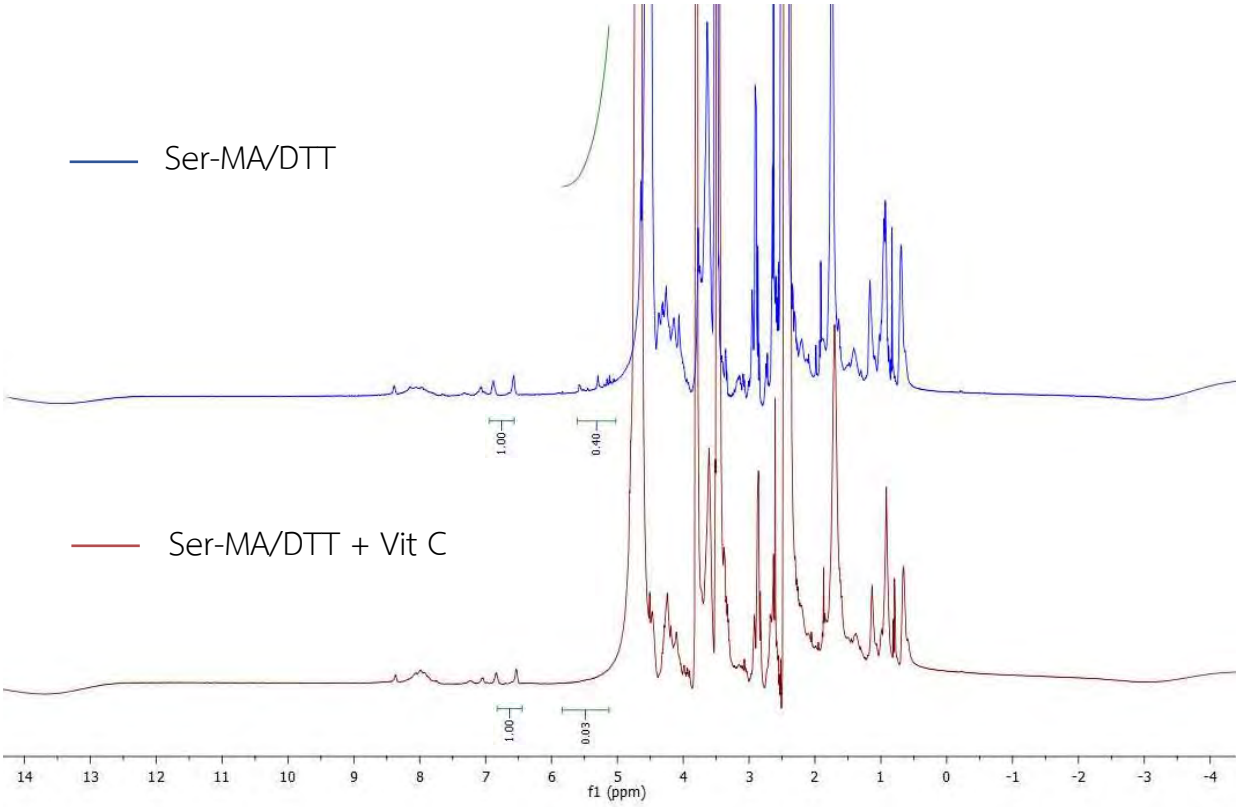
3.2 การทำปฏิกิริยาการเชื่อมขวางด้วย thiol-ene click reaction

เมื่อนำ Ser-MA มาเชื่อมขวางระหว่างกันโดยใช้ dithiolthreitol (DTT) เป็นสารเชื่อมขวาง โดยละลายในน้ำพบว่า Ser-MA และ DTT สามารถละลายในน้ำได้ดีเมื่อละลายแล้วพบว่าสารละลายมีความหนืดเท่าเดิมเมื่อเทียบกับ Ser-MA ที่ละลายน้ำ ผู้วิจัยจึงนำผลิตภัณฑ์ Ser-MA/DTT ไปตรวจสอบว่าเกิดปฏิกิริยา thiol-ene click reaction หรือไม่โดยใช้เทคนิค ^{1}H NMR spectroscopy โดยนำ Ser-MA และ DTT ไปละลายใน D_2O ได้ spectrum ดังรูป 3.13



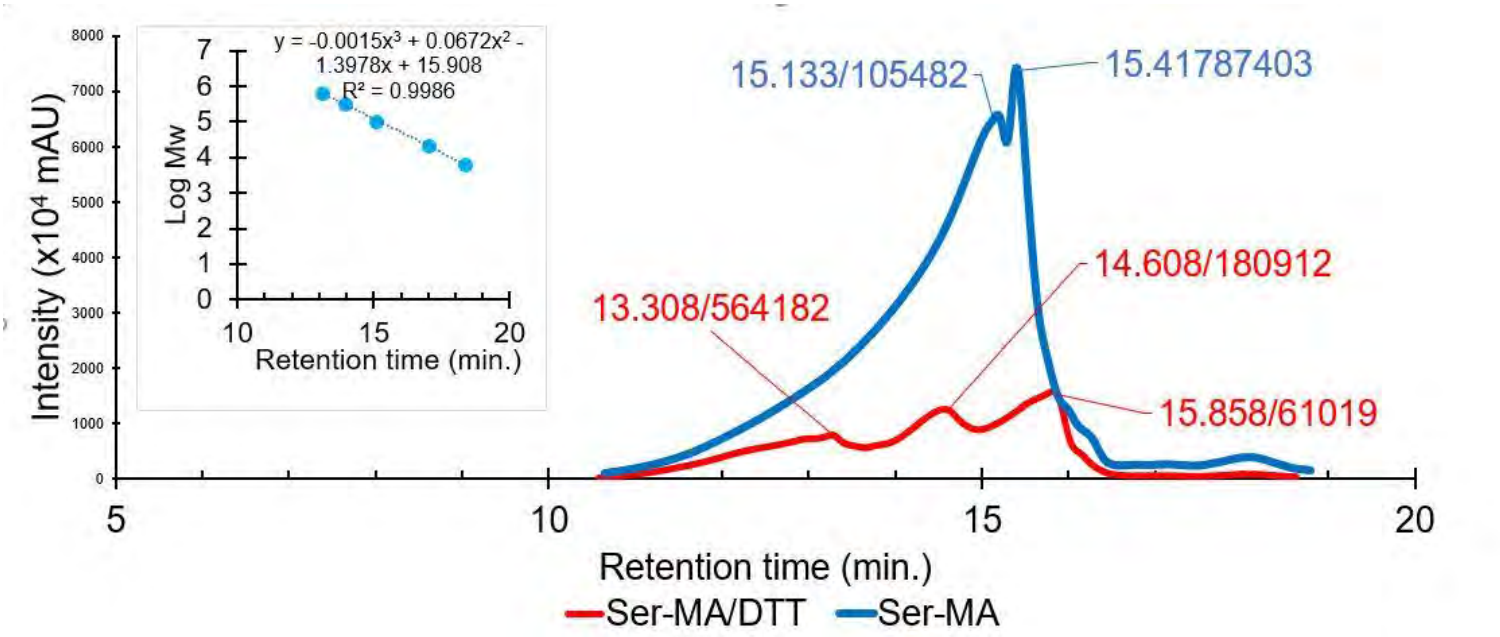
รูปที่ 3.13 ^{1}H NMR spectrum Ser-MA ก่อนและหลังเชื่อมขวางด้วย DTT

จากรูปที่ 3.13 จะเห็นว่า ^{1}H NMR spectrum หลังจากเชื่อมขวางด้วย DTT พบว่าพีคที่ช่วง chemical shift 5-6 ppm มีอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟลดลงเมื่อเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของพีคที่ chemical shift 6.84 และ 6.53 ppm โดยในตอนแรกอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟอยู่ที่ 1:1 แต่เมื่อเชื่อมขวางพบว่าอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟลดลงเป็น 1 : 0.4 เมื่อเทียบกับก่อนเชื่อมขวางแสดงว่าเกิดปฏิกิริยา thiol-ene click reaction จริงแต่ยังมีหมู่ methacryloyl บางส่วนยังไม่เกิดปฏิกิริยาการเชื่อมขวางซึ่งน่าจะเกิดจาก DTT บางส่วนยังไม่อยู่ในรูปรีดิวซ์ผู้วิจัยจึงเติมวิตามินซีลงไปเพื่อรีดิวซ์ DTT จากนั้นตรวจสอบด้วยเทคนิค ^{1}H NMR spectroscopy ได้ spectrum ดังรูปที่ 3.14



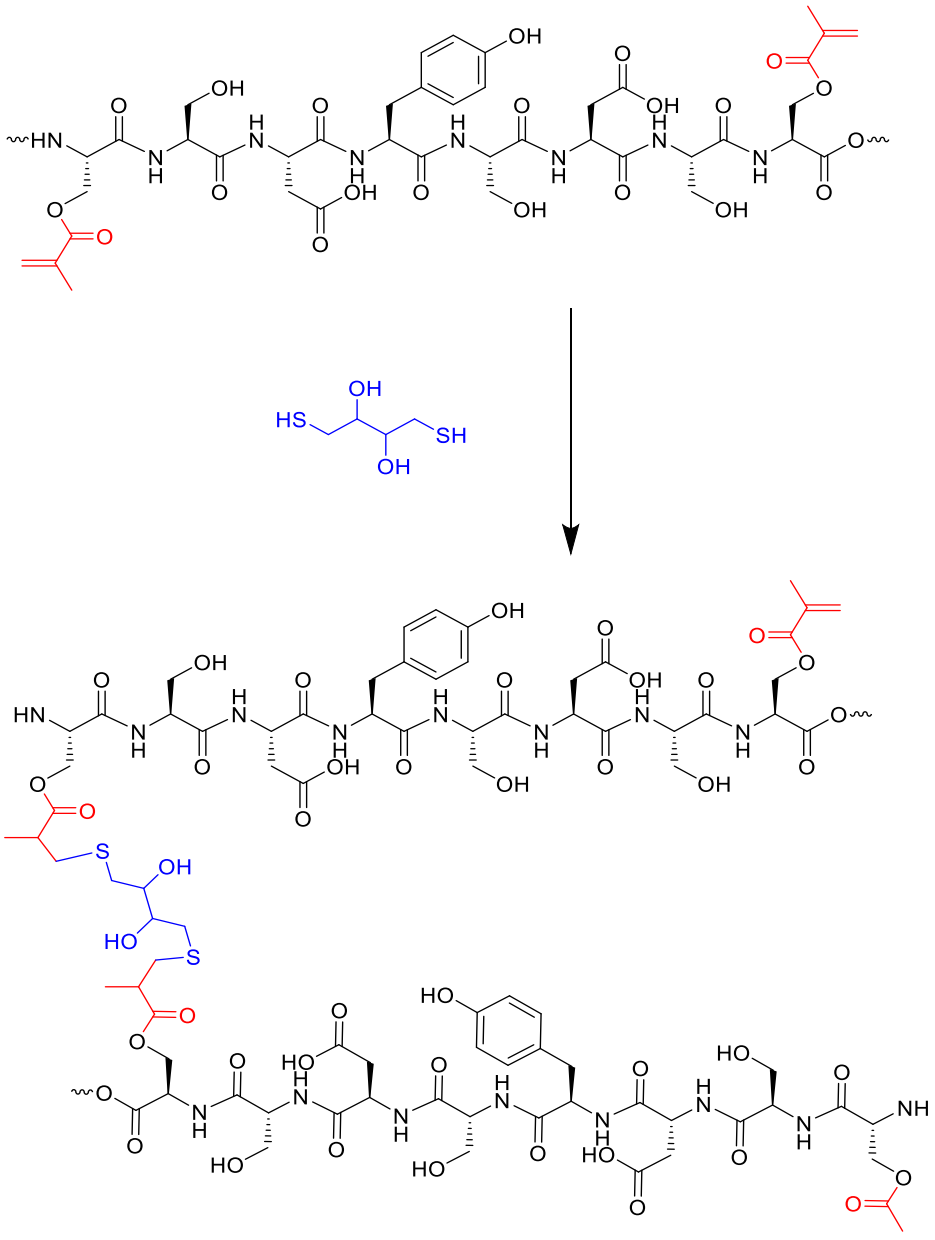
รูปที่ 3.14 ^{1}H NMR spectrum ของเซริซินที่เชื่อมขวางก่อนและหลังเมื่อเติมวิตามินซี

จากรูปที่ 3.14 จะเห็น ^{1}H NMR spectrum หลังจากเติมวิตามินซีพบว่าพีคที่ช่วง chemical shift 5-6 ppm มีอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟลดลงเมื่อเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของพีคที่ chemical shift 6.84 และ 6.53 ppm เมื่อเทียบกับในตอนแรกก่อนเติมวิตามินซีโดยในตอนแรกอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟอยู่ที่ 1 : 0.4 แต่เมื่อเติมวิตามินซีพบว่าอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟลดลงเป็น 1 : 0.3 เมื่อเทียบกับก่อนเชื่อมขวางแสดงว่าเกิดปฏิกิริยา thiol-ene click reaction ได้เพิ่มขึ้นจากตอนก่อนเติมวิตามินซีแสดงว่าวิตามินซีไปริดิวซ์ DTT ทำให้เกิดการเชื่อมขวางได้มากขึ้นโดยพบว่าสารละลายที่ได้มีความหนืดเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับเซริซินที่ติดหมู่ methacryloyl แต่ไม่ได้เชื่อมขวางแต่สารละลายยังไม่สามารถคงรูปเป็นของแข็งได้ซึ่งน่าจะเกิดจากเซริซินที่เตรียมไว้นั้นยังติดหมู่ methacryloyl เข้าไปได้ไม่มากพอเลยทำให้เกิดการเชื่อมขวางได้ไม่มากพอที่จะคงรูปได้ ผู้วิจัยนำ Ser-MA/DTT ไปทดสอบหามวลโมเลกุลด้วยเทคนิคเจลเพอร์มีเอชันโครมาโตกราฟี



รูปที่ 3.15 GPC chromatogram ของ Ser-MA และ Ser-MA/DTT

จากโครมาโทแกรมเมื่อนำมาหามวลโมเลกุลเฉลี่ยพบว่ามวลโมเลกุลเฉลี่ยหลังจากเชื่อมขวางด้วย DTT เป็น 350652 ซึ่งสูงขึ้นจากเดิมคือ 170854 แสดงว่าเกิดการเชื่อมขวางระหว่างสายโปรตีนจึงทำให้มวลโมเลกุลโปรตีนในสายมีค่าสูงขึ้นโดย DTT จะเชื่อมขวางระหว่างโปรตีนแต่ละสายดังรูปที่ 3.16



รูปที่ 3.16 สมการเชื่อมขวางของเซริซินแต่ละสายด้วย DTT

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการติดหมู่ methacryloyl ลงบนสายโปรตีนเซริซินในตัวทำละลายต่างๆ พบว่าในตัวทำละลาย pyridine เกิดการแทนที่ได้ไม่ดีเนื่องจากโปรตีนเซริซินที่ใช้นั้นละลายได้ไม่ดีใน pyridine ในขณะที่การติดหมู่ methacryloyl ลงบนสายโปรตีนเซริซินในตัวทำละลายน้ำพบว่าโปรตีนเซริซินนั้นสามารถละลายได้ดีในน้ำโดยเมื่อทำปฏิกิริยาแล้วพบว่ามีการติดหมู่ methacryloyl ลงบนสายโปรตีนเซริซินเนื่องจากมีพีคสัญญาณของ ^{1}H NMR ในช่วง 5-6 ppm และเมื่อนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การแทนที่พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การแทนที่อยู่ 2.17% และเมื่อนำโปรตีนเซริซินที่ติดหมู่ methacryloyl ไปเชื่อมขวางโดยใช้ปฏิกิริยา thiol-ene click reaction โดยใช้สารเชื่อมขวาง dithiothreitol พบว่าสารละลายที่ได้มีความหนืดเพิ่มมากขึ้นและจากผล ^{1}H NMR ในช่วง 5-6 ppm พบว่าพีคสัญญาณได้หายไปแสดงว่าเกิดปฏิกิริยา thiol-ene click reaction จริงแต่โปรตีนเซริซินที่ติดหมู่ methacryloyl ยังไม่สามารถนำมาใช้เป็น bioink ได้เนื่องจากเมื่อทำปฏิกิริยา thiol-ene click reaction ผลิตภัณฑ์ยังไม่มีความเหนียวจนคงรูปได้ซึ่งเกิดจากการที่มีหมู่ methacryloyl อยู่บนสายโปรตีนเซริซินน้อยเกินไปทำให้ยังเกิดการเชื่อมขวางระหว่างสายโปรตีนไม่มากพอ

เอกสารอ้างอิง

1. Jang, M.; Park, B. K.; Huh, J. S.; Lim, J. O. J. D. P.; Manufacturing, A., Evaluation of Sericin Containing Gel as a Photoinitiator-Free Printable Biomaterial. 2019**,** 6 (5), 238-244.

2. Ooi, H. W.; Mota, C.; Ten Cate, A. T.; Calore, A.; Moroni, L.; Baker, M. B. J. B., Thiol–ene alginate hydrogels as versatile bioinks for bioprinting. 2018**,** 19 (8), 3390-3400.

3. Gungor-Ozkerim, P. S.; Inci, I.; Zhang, Y. S.; Khademhosseini, A.; Dokmeci, M. R. J. B. s., Bioinks for 3D bioprinting: an overview. 2018**,** 6 (5), 915-946.

4. Chollakup, R.; Uttayarat, P.; Chworos, A.; Smitthipong, W. J. I. J. o. M. S., Noncovalent Sericin-Chitosan Scaffold: Physical Properties and Low Cytotoxicity Effect. 2020**,** 21 (3), 775.

5. Padamwar, M.; Pawar, A., Silk sericin and its applications: A review. 2004.

6. Wu, J.-H.; Wang, Z.; Xu, S.-Y. J. F. c., Preparation and characterization of sericin powder extracted from silk industry wastewater. 2007**,** 103 (4), 1255-1262.

7. Ersel, M.; Uyanikgil, Y.; Akarca, F. K.; Ozcete, E.; Altunci, Y. A.; Karabey, F.; Cavusoglu, T.; Meral, A.; Yigitturk, G.; Cetin, E. O. J. M. s. m. i. m. j. o. e.; research, c., Effects of silk sericin on incision wound healing in a dorsal skin flap wound healing rat model. 2016**,** 22, 1064.

8. Terada, S.; Sasaki, M.; Yanagihara, K.; Yamada, H. J. J. o. B.; Bioengineering, Preparation of silk protein sericin as mitogenic factor for better mammalian cell culture. 2005**,** 100 (6), 667-671.

9. Mandal, B. B.; Priya, A. S.; Kundu, S. J. A. B., Novel silk sericin/gelatin 3-D scaffolds and 2-D films: fabrication and characterization for potential tissue engineering applications. 2009**,** 5 (8), 3007-3020.

10. Siritientong, T.; Ratanavaraporn, J.; Srichana, T.; Aramwit, P. J. B. r. i., Preliminary characterization of genipin-cross-linked silk sericin/poly (vinyl alcohol)

films as two-dimensional wound dressings for the healing of superficial wounds. 2013**,** 2013.

11. Killops, K. L.; Campos, L. M.; Hawker, C. J. J. J. o. t. A. C. S., Robust, efficient, and orthogonal synthesis of dendrimers via thiol-ene “click” chemistry. 2008**,** 130 (15), 5062-5064.

12. Tigner, T. J.; Rajput, S.; Gaharwar, A. K.; Alge, D. L. J. B., Comparison of Photo Cross Linkable Gelatin Derivatives and Initiators for Three-Dimensional Extrusion Bioprinting. 2019.

13. Liu, S.; Pu, Y.; Yang, R.; Liu, X.; Wang, P.; Wang, X.; Ren, Y.; Tan, X.; Ye, Z.; Chi, B. J. I. J. o. B. M., Boron-assisted dual-crosslinked poly (**γ**-glutamic acid) hydrogels with high toughness for cartilage regeneration. 2020.

14. Xu, S.; Liang, W.; Xu, G.; Huang, C.; Zhang, J.; Lang, M. J. A. S. S., A fast and dual crosslinking hydrogel based on vinyl ether sodium alginate. 2020, 145811.

ประวัติผู้วิจัย

นายชนวีร์ จำปีเจริญสุข เกิดเมื่อวันที่ 23 สิงหาคม พ.ศ. 2540 ที่จังหวัดนครสวรรค์สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนนครสวรรค์ จังหวัดนครสวรรค์ เมื่อปีการศึกษา 2558 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2559 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 120/73 หมู่ที่ 9 ตำบลบางม่วง อำเภอเมือง จังหวัดนครสวรรค์ รหัสไปรษณีย์ 60000 อีเมล chanawee.jampeecharoensuk@gmail.com