

การเตรียมฟิล์มพอลิเมอร์บางที่เข้ากันได้ทางชีวภาพโดยการประกอบชั้นต่อชั้น
ของโคโตซานและพอลิ(สไตรีน ซัลโฟเนต)



นางสาว ชไมภรณ์ มัชปาโต

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ หลักสูตรปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-2430-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PREPARATION OF BIOCOMPATIBLE POLYMERIC THIN FILMS BY
LAYER-BY-LAYER ASSEMBLIES
OF CHITOSAN AND POLY(STYRENE SULFONATE)



Miss Chamaiporn Mutchapato

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Petrochemistry and Polymer Science

Program of Petrochemistry and Polymer Science

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2002

ISBN 974-17-2430-6

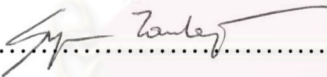
Thesis Title Preparation of Biocompatible Polymeric Thin Films by Layer-by-Layer Assemblies of Chitosan and Poly(styrene sulfonate)
By Miss Chamaiporn Mutchapato
Field of Study Petrochemistry and Polymer Science
Thesis Advisor Vipavee P. Hoven, Ph.D.
Thesis Co-Advisor Asst. Prof. Orawon Chailapakul, Ph.D.

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



.....Dean of Faculty of Science

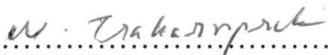
(Associate Professor Wanchai Phothiphichitr, Ph.D.)

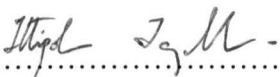
Thesis committee


.....Chairman
(Associate Professor Supawan Tantayanon, Ph.D.)


.....Thesis Advisor
(Vipavee P. Hoven, Ph.D.)


.....Thesis Co-Advisor
(Assistant Professor Orawon Chailapakul, Ph.D.)


.....Member
(Associate Professor Wimonrat Trakarnpruk, Ph.D.)


.....Member
(Assistant Professor Ittipol Jangchud, Ph.D.)

ชไมภรณ์ มัชปาโต: การเตรียมฟิล์มพอลิเมอร์บางที่เข้ากันได้ทางชีวภาพโดยการประกอบ
ชั้นต่อชั้นของไคโตซานและพอลิ(สไตรีนซัลโฟเนต) (PREPARATION OF
BIOCOMPATIBLE POLYMERIC THIN FILMS BY LAYER-BY-LAYER
ASSEMBLIES OF CHITOSAN AND POLY(STYRENE SULFONATE) อ า จ า ร ย ์ ที่
ปรีกษา: ดร. วิภาวี ไฮเว่น; อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร. อรรวรรณ ชัยลภากุล; 68 หน้า.
ISBN 974-17-2430-6

ฟิล์มบางมากของพอลิเมอร์เตรียมโดยการดูดซับแบบสลับระหว่างพอลิ(สไตรีนซัลโฟเนต)(PSS) ซึ่งมีประจุลบและไคโตซาน(CHI) ซึ่งมีประจุบวกบนพื้นผิวซิลิกอนที่มีหมู่เอมีน ที่พีเอช 4 สามารถติดตามกระบวนการประกอบชั้นได้ด้วยกาววิเคราะห์โดยเทคนิคอิลิปโซเมตรี จากการทดลองพบว่าความหนาของฟิล์มขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เติมลงในสารละลายพอลิเมอร์ เมื่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นความหนาของฟิล์มเพิ่มขึ้น ข้อมูลจากเซต้าโพเทนเชียลและมุมสัมผัสของน้ำแสดงให้เห็นว่าฟิล์มที่เกิดจากการดูดซับนี้แยกกันอยู่เป็นชั้นและเกิดการสลับกันของประจุหลังจากการดูดซับแต่ละชั้น โดยแต่ละชั้นมีความหนาอย่างมากเพียงพอจึงส่งผลให้สมบัติเชิงพื้นผิวของฟิล์มพอลิเมอร์ขึ้นอยู่กับชั้นสุดท้ายที่ถูกดูดซับ ผลจากการวิเคราะห์โดยเทคนิคเอ็กซ์เรย์โฟโตอิเล็กตรอนสเปกโตรสโกปี (เอ็กซ์พีเอส) และ อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (เอทีอาร์-ไออาร์) ช่วยในการยืนยันการเกิดการประกอบชั้นอีกด้วย จากการพิจารณาความขรุขระของผิวฟิล์มจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะตอมมิกฟอสไมโครสโกปีพบว่าเมื่อความหนาของฟิล์มเพิ่มขึ้นความขรุขระบนพื้นผิวฟิล์มเพิ่มมากขึ้นด้วย ผลการศึกษาการเข้ากันได้ของเลือดกับพอลิเมอร์บางหลายชั้น พบว่าความขรุขระบนพื้นผิวส่งผลกระทบต่อการดูดซับโปรตีนและการยึดเกาะของเกล็ดเลือด นอกจากนี้ยังพบว่าการตอบสนองของเกล็ดเลือดไม่ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณของโปรตีนที่ถูกดูดซับเท่านั้น แต่จะขึ้นอยู่กับลักษณะของพื้นผิวอีกด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่พื้นผิวฟิล์มมีความขรุขระมาก

หลักสูตร ปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์.....ลายมือชื่ออนิสิต.....ชไมภรณ์ มัชปาโต
สาขาวิชา ปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา.....2545.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....อรรรวรรณ ชัยลภากุล

4372242823: MAJOR PETROCHEMISTRY AND POLYMER SCIENCE

KEYWORD: LAYER-BY-LAYER ASSEMBLY/ CHITOSAN/ POLY(STYRENE SULFONATE)/BLOOD COMPATIBILITY

CHAMAIPORN MUTCHAPATO: PREPARATION OF BIOCOMPATIBLE POLYMERIC THIN FILMS BY LAYER-BY-LAYER ASSEMBLIES OF CHITOSAN AND POLY(STYRENE SULFONATE). THESIS ADVISOR: VIPAVEE P. HOVEN, Ph.D.; THESIS CO-ADVISOR: ASST. PROF. ORAWON CHAILAPAKUL, Ph.D.; 68 pp. ISBN 974-17-2430-6.

Ultrathin polymer films were prepared by an alternate adsorption between anionic poly(styrene sulfonate) (PSS) and cationic chitosan (CHI) on the amine-functionalized silicon substrate (Si-NH₂) at pH 4. The assembly process was monitored by ellipsometric measurement. Thickness of film was strongly dependent on NaCl concentration in polymer solution. The film thickness increased upon increasing the NaCl concentration. Zeta-potential and water contact angle data indicated that the multilayers were stratified and the charge was reversed after each deposition. The results indicated that each individual layer was sufficiently thick so that surface properties depended upon the last deposited layer. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and Attenuated total reflectance infrared spectroscopy (ATR-IR) were also used to confirm the layer formation. As determined by atomic force microscopy, it was found that the thicker the assembled film, the rougher the surface. The results of blood compatibility suggested that the roughness played a dominant role in controlling the protein adsorption and platelet adhesion. This observation also implied that the platelet response was dictated not only by the amount of adsorbed protein but also by the topography of the surface, especially when the surface became really rough.

Program Petrochemistry and Polymer Science Student's signature Chamaiporn Mutchapato

Field of study Petrochemistry and Polymer Science Advisor's signature Vp. Hoven

Academic year 2002 Co-advisor's signature Orawon Chailapakul

ACKNOWLEDGEMENTS

This research would have never been finished in a timely manner if not for endless efforts of my thesis advisor, Dr. Vipavee P. Hoven who always provides me the suggestion and encouragement throughout the course of this work.

I am sincerely grateful to Associate Professor Dr. Supawan Tantayanon; Assistant Professor Dr. Orawon Chailapakul; Associate Professor Dr. Wimonrat Trakarnpruk and Assistant Professor Dr. Ittipol Jangchud for their invaluable suggestion as committee members.

Special thanks go to Spectroscopy Research Group and Assistant Professor Dr. Sanong Egkasit for ATR-FTIR facility, Ms. Tomomi Ito and Associate Professor Yasuhiko Iwasaki from Tokyo Medical and Dental University for their assistances with zeta potential measurements and AFM analysis, National Synchrotron Research Center for XPS facility; Electronic Research Center, Faculty of Engineering, King Mongkut's Institute of Technology, Ladkrabang for ellipsometry facility. I also would like to thank Thai Red Cross Society for providing human PPP and PRP. I gratefully acknowledge a research funding for graduate students from Ministry of University Affairs for financial support. I appreciate suggestions, comments and encouragement from all members of Organic Synthesis Research Unit.

Finally, I would like to affectionately give all gratitude to my family for patient support throughout my entire study.

ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

	Page
ABSTRACT IN THAI.....	iv
ABSTRACT IN ENGLISH.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
LIST OF FIGURES.....	x
LIST OF TABLES.....	xiii
LIST OF SCHEMES.....	xiv
LIST OF ABBREVIATIONS	xv
CHAPTER I : INTRODUCTION.....	1
1.1 Statement of Problems.....	1
1.2 Objectives.....	2
1.3 Scope of the Investigation.....	2
CHAPTER II : THEORY AND LITERATURE REVIEW.....	3
2.1 Chitosan.....	3
2.2 Polyelectrolyte Adsorption.....	8
2.3 Layer-by-layer Adsorption.....	10
2.4 Blood Compatibility.....	16
2.4.1 Human Plasma.....	16
2.4.2 Mechanism of Thrombus Formation on Polymer Surface.....	18
2.5 Surface Characterization Techniques.....	20
2.5.1 Ellipsometry.....	20
2.5.2 Attenuated Total Reflectance Infrared Spectroscopy (ATR-IR).....	21

CONTENTS (Continued)

	Page
2.5.3 X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS).....	22
2.5.4 Contact Angle Measurement.....	24
2.5.5 Atomic Force Microscopy (AFM).....	25
 CHAPTER III : EXPERIMENTAL.....	 26
3.1 Materials.....	26
3.2 Equipments.....	27
3.2.1 Ellipsometry.....	27
3.2.2 X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS).....	27
3.2.3 Attenuated Total Reflectance Infrared Spectroscopy (ATR-IR).....	27
3.2.4 Contact Angle Measurement.....	28
3.2.5 Zeta-Potential.....	28
3.2.6 UV-Spectroscopy.....	28
3.2.7 Scanning Electron Microscopy (SEM).....	28
3.2.8 Atomic Force Microscopy (AFM).....	29
3.3 Preparation of Amino-containing Substrate.....	29
3.4 Polyelectrolyte Self-assembly.....	29
3.5 Photocol for Blood Compatibility Test.....	30
3.5.1 Determination of Total Amount of Adsorbed Human Plasma Protein.....	30
3.5.2 Evaluation of Platelet Adhesion.....	31
 CHAPTER IV : RESULTS AND DISCUSSION.....	 32
4.1 Alternative Layer-by-layer Adsorption of Poly(styrene sulfonate) and Chitosan.....	32
4.1.1 Preparation of Amino-containing Substrate.....	32

CONTENTS (Continued)

	Page
4.1.2 Multilayer Formation.....	33
4.1.2.1 Effect of Chitosan Concentration.....	33
4.1.2.2 Effect of Ionic Strength.....	34
4.1.3 Confirmation of Layer Formation by ATR-IR and XPS.....	36
4.1.4 Stratification of Multilayered Film.....	40
4.1.4.1 Zeta-Potential.....	40
4.1.4.2 Water Contact Angle.....	41
4.1.5 Surface Topography of Multilayer Films.....	42
4.1.6 Blood Compatibility.....	46
CHAPTER V : CONCLUSIONS AND SUGGESTION.....	54
REFERENCES.....	56
APPENDICES.....	60
APPENDIX A.....	61
APPENDIX B.....	63
APPENDIX C.....	65
APPENDIX D.....	66
VITAE.....	68

LIST OF FIGURES

Figure	Page
2.1 Structure of chitin and chitosan.....	3
2.2 Reaction scheme for the synthesis of sulfonate derivatives of chitosan	6
2.3 Reaction scheme for the synthesis of N-sulfofurfuryl chitosan	7
2.4 Reaction scheme for the synthesis of sulfated chitosan.....	8
2.5 Pictorial representation of an adsorbed polymer layer, loops, tails and trains are indicated (L : thickness of chain).....	10
2.6 Schematic illustration of alternate layer-by-layer adsorption of polyanion and polycation onto a positively charged substrate.....	12
2.7 Examples of polycation and polyanion used for multilayer assembly...	14
2.8 Pictorial representation of human blood.....	17
2.9 Schematic representation of blood coagulation system.....	19
2.10 Schematic of the geometry of an ellipsometry experiment.....	21
2.11 Diagram of ATR-IR.....	21
2.12 Photoemission of a core electron.....	23
2.13 Effect of take-off angle to the depth profile.....	23
2.14 Equilibrium of the three-phase boundary on solid surface.....	24
2.15 Schematic diagram of an atomic force microscope.....	25
4.1 The average thickness of PSS-CHI bilayer calculated from ellipsometric data of Si-NH ₂ -(PSS-CHI) ₅ assemblies as a function of chitosan concentration in the presence of 0.25 M NaCl.....	34
4.2 The average thickness of PSS-CHI bilayer calculated from ellipsometric data of Si-NH ₂ -(PSS-CHI) ₁₀ assemblies as a function of NaCl concentration.....	35

LIST OF FIGURES(Continued)

Figure	Page
4.3 Ellipsometric thickness of Si-NH ₂ -(PSS-CHI) _n assemblies as a function of the number of layer; no NaCl (○), 0.25 M NaCl in CHI solution (●), 0.25 M NaCl in PSS solution (Δ), 0.25 M NaCl in both CHI and PSS solutions (▲).....	36
4.4 XPS survey spectrum of Si-NH ₂ substrate.....	37
4.5 XPS survey spectrum of Si-NH ₂ -(PSS-CHI) ₁₀	37
4.6 ATR-IR spectra of PET and PET-(CHI-PSS) ₁₄ -CHI assemblies; (a) O-H and N-H stretching (b) S=O stretching.....	39
4.7 ATR-IR spectra of PET and PET-(CHI-PSS) ₁₄ -CHI assemblies; (a) O-H and N-H stretching (b) S=O stretching.....	39
4.8 Zeta-potential of Si-NH ₂ -(PSS-CHI) _n assemblies, 0.25 M NaCl was added to chitosan solution.....	40
4.9 Water contact angle of Si-NH ₂ -(PSS-CHI) _n assemblies, 0.25 M NaCl was added to chitosan solution; Si-NH ₂ (■), odd layer (●), even layer (○).....	41
4.10 An AFM image of Si-NH ₂	42
4.11 AFM images of Si-NH ₂ -(PSS-CHI) _n prepared without 1M NaCl; (a) 1 layer, (b) 2 layers, (c) 10 layers ,(d) 15 layers ,(e) 16 layers and (f) 20 layers.....	43
4.12 AFM images of Si-NH ₂ -(PSS-CHI) _n prepared with 1M NaCl; (a) 1 layer, (b) 2 layers, (c) 10 layers, (d) 15 layers ,(e) 16 layers and (f) 20 layers.....	44
4.13 The surface roughness (R _a) of Si-NH ₂ -(PSS-CHI) _n as a function of number of layer ; with 1M NaCl (●), without 1M NaCl (○) and Si-NH ₂ layer (■).....	45

LIST OF FIGURES(Continued)

Figure	Page
4.14 R_z value of Si-NH ₂ -(PSS-CHI) _n as a function of number of layer ; with 1M NaCl (●), without 1M NaCl (O) and Si-NH ₂ layer (■).....	45
4.15 A calibration curve of the amount of albumin adsorbed and the absorbance obtained from BCA microassay.....	46
4.16 The amount of plasma protein adsorption per surface area ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) of Si-NH ₂ -(PSS-CHI) _n assemblies prepared in the absence of NaCl.....	47
4.17 The amount of plasma protein adsorption per surface area ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) of Si-NH ₂ -(PSS-CHI) _n assemblies prepared in the presence of 1 M NaCl.....	48
4.18 SEM picture of Si-NH ₂ -(PSS-CHI) _n assemblies were prepared in the absence of NaCl after contact with PRP.....	50
4.19 SEM picture of Si-NH ₂ -(PSS-CHI) _n assemblies were prepared in the presence of 1 M NaCl after contact with PRP.....	52

ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table	Page
4.1 Atomic composition of Si-NH ₂ substrate and Si-NH ₂ -(PSS-CHI) ₁₀ ...	38
A-1 The average thickness of PSS-CHI bilayer calculated from ellipsometric data of Si-NH ₂ -(PSS-CHI) ₅ assemblies as a function of chitosan concentration in the presence of 0.25 M NaCl.....	61
A-2 The average thickness of PSS-CHI bilayer calculated from ellipsometric data of Si-NH ₂ -(PSS-CHI) ₁₀ assemblies as a function of NaCl concentration.....	61
A-3 Ellipsometric thickness of Si-NH ₂ -(PSS-CHI) ₁₀ assemblies as a function of the number of layer.....	62
B-1 Zeta-potential of Si-NH ₂ -(PSS-CHI) _n assemblies, 0.25 M NaCl was added to chitosan solution.....	63
B-2 Water contact angle of Si-NH ₂ -(PSS-CHI) _n assemblies, 0.25 M NaCl was added to chitosan solution.....	64
C-1 The surface roughness of Si-NH ₂ -(PSS-CHI) _n prepared in the absence of NaCl and in the presence of 1 M NaCl.....	65
D-2 The amount of plasma protein adsorption per surface area (μg/cm ²) of Si- NH ₂ -(PSS-CHI) _n assemblies prepared in the absence of NaCl and presence of 1 M NaCl.....	67

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF SCHEMES

Scheme	Page
4.1 Reaction between a silicon oxide substrate and APTES.....	32



ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ABBREVIATIONS

ATR-IR	: Attenuated total reflectance infrared spectroscopy
BCA	: Bicinchoninic acid
BSA	: Bovin serum albumin
CHI	: Chitosan
PSS	: Poly(styrene sulfonate)
% DD	: Percent degree of deacetylation
h	: Hour
PBS	: Phosphate buffer saline
ATPES	: (3-Aminopropyl) triethoxysilane
RT	: Room temperature
XPS	: X-ray photoelectron spectroscopy
PPP	: Platelet-poor plasma
PRP	: Platelet-rich plasma
SEM	: Scanning electron microscopy
SDS	: Sodium dedecyl sulfate
Min	: Minute
AFM	: Atomic force microscopy
QCM	: Quartz crystal microbalance

SAXS : Small-angle X-ray scattering

FTIR-RAS : Fourier transform infrared inflection-absorption spectroscopy



ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย