

การสังเคราะห์และความเข้ากันได้กับเลือดของ
พอลิ(2-เมทอะคริโลอิลออกซีเอทิลฟอสฟอริลโคลีน) บริษัท



นางสาวปิยะวรรณ สุขอินทร์

ศูนย์วิจัยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์


คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-5196-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SYNTHESIS AND BLOOD COMPATIBILITY OF
POLY(2-METHACRYLOYLOXYETHYL PHOSPHORYLCHOLINE)
BRUSH



Miss Piyawan Suk-in

ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

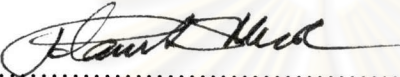
Faculty of Science
Chulalongkorn University

Academic Year 2003

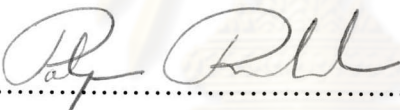
ISBN 974-17-5196-6

Thesis Title Synthesis and Blood Compatibility of Poly(2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine) Brush
By Miss Piyawan Suk-in
Field of Study Petrochemistry and Polymer Science
Thesis Advisor Vipavee P. Hoven, Ph.D.

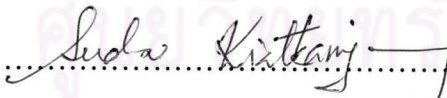
Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

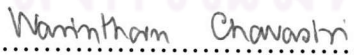

.....Dean of Faculty of Science
(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

Thesis Committee


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


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


.....Member
(Professor Suda Kiatkamjornwong, Ph.D.)


.....Member
(Assistant Professor Warinthorn Chavasiri, Ph.D.)

ปิยะวรรณ สุขอินทร์: การสังเคราะห์และความเข้ากันได้กับเลือดของพอลิ(2-เมทาอะคริ
 โลอิลออกซิเอทิลฟอสฟอริลโคลีน) บริษัท [SYNTHESIS AND BLOOD
 COMPATIBILITY OF POLY(2-METHACRYLOYLOXYETHYL
 PHOSPHORYLCHOLINE) BRUSH] อาจารย์ที่ปรึกษา: ดร. วิภาวี ไฮเว่น; 91 หน้า
 ISBN 974-17-5196-6

พอลิเมอร์บริษัทที่มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพสามารถเตรียมได้จากปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันที่ริเริ่มจากพื้นผิวโดยผ่านกลไกแบบอะตอมทรานส์เฟอร์เรดิคัลพอลิเมอไรเซชันของ 2-เมทาอะคริโลอิลออกซิเอทิลฟอสฟอริลโคลีน (เอ็มพีซี) จากพื้นผิวที่ยึดติดด้วยหมู่ริเริ่มที่ประกอบด้วยแอลฟาโบรมโอเอสเทอร์ในภาวะที่มีคอปเปอร์โบรไมด์และไบไพรีดีล ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันที่ริเริ่มจากพื้นผิวสามารถเกิดได้อย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิห้องในน้ำซึ่งต่างจากในแอลกอฮอล์ จากการทดลองพบว่า ความหนาของพอลิเมอร์บริษัทมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในลักษณะคล้ายเส้นตรงตามเวลาในการดำเนินไปของปฏิกิริยา จากการวิเคราะห์โดยเทคนิคเอ็กซ์เรย์โฟโตอิเล็กตรอนสเปกโทรสโกปีพบว่า มีหมู่ฟอสฟอริลโคลีนบนพื้นผิวที่มีพอลิเอ็มพีซีบริษัท และจากการวัดมุมสัมผัสของน้ำพบว่า พื้นผิวที่มีพอลิเอ็มพีซีบริษัทมีความชอบน้ำเพิ่มขึ้น จากการศึกษาความเข้ากันได้กับเลือดของพอลิเอ็มพีซีบริษัทโดยการวิเคราะห์การดูดซับโปรตีนและการยึดเกาะของเกล็ดเลือดบนพื้นผิวพอลิเอ็มพีซีบริษัทพบว่า มีปริมาณการดูดซับของโปรตีนต่ำมากและปราศจากการยึดติดของเกล็ดเลือดบนพื้นผิวพอลิเอ็มพีซีบริษัท ผลการทดลองดังกล่าวสนับสนุนสมมุติฐานที่ว่า พอลิเอ็มพีซีบริษัทสามารถเข้ากันได้กับเลือดโดยไม่ขึ้นกับความหนาของพอลิเมอร์บริษัทในช่วง 10-50 อังสตรอม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาขาวิชา ปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ ลายมือชื่อนิสิต ปิยะวรรณ สุขอินทร์

ปีการศึกษา 2546 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

447233323: MAJOR PETROCHEMISTRY AND POLYMER SCIENCE

KEYWORD: POLYMER BRUSH/ PHOSPHOLIPID POLYMER/ SURFACE-INITIATED POLYMERIZATION/ ATOM TRANSFER RADICAL POLYMERIZATION/ BLOOD COMPATIBILITY

PIYAWAN SUK-IN: SYNTHESIS AND BLOOD COMPATIBILITY OF POLY(2-METHACRYLOYLOXYETHYL PHOSPHORYLCHOLINE)BRUSH. THESIS ADVISOR: VIPAVEE P. HOVEN, Ph.D. 91 pp ISBN 974-17-5196-6

Preparation of biocompatible polymer brush was accomplished by surface-initiated atom transfer radical polymerization of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) from surface-tethered α -bromoester in the presence of CuBr/bpy. Polymerization from surface occurred rapidly at room temperature in aqueous media as opposed to in alcoholic media. We found that the thickness of polymer brushes increased almost linearly with reaction time. The existence of phosphorylcholine groups on the surface bearing PMPC brushes was revealed by X-ray photoelectron spectroscopy. As demonstrated by water contact angle measurements, the surfaces having PMPC brushes showed an increase in hydrophilicity. The blood compatibility of PMPC brushes was evaluated by protein adsorption and platelet adhesion. The facts that there is such a small amount of protein adsorption and the platelet adhesion is absent on PMPC brushes supported the assumption that the polymer brushes are blood-compatible independent of the thickness in the range of 10-50 Å.

Field of study Petrochemistry and Polymer Science Student's signature Piyawan Suk-in

Academic year 2003 Advisor's signature Vp. Hoven

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my heartfelt gratitude and appreciation to my advisor, Dr. Vipavee P. Hoven, for supporting me both in science and in life, and encouraging me throughout the course of my study. I am sincerely grateful to the members of the thesis committee, Prof. Dr. Pattarapan Prasassarakich, Prof. Dr. Suda Kiatkamjornwong, Asst. Prof. Dr. Warinthorn Chavasiri for their comments, suggestions and time to read the thesis.

Many thanks go to Prof. Dr. Kazuhiko Ishihara for his support in MPC monomer, Asst. Prof. Dr. Junji Watanabe for GPC analysis, Assoc. Prof. Dr. Yasuhiko Iwasaki for his patient support in materials, XPS and GPC analyses as well as fruitful suggestions on solving the research problems.

Special thanks go to Electronic Research Center, Faculty of Engineering, King Mongkut's Institute of Technology, Ladkrabang for ellipsometry facility, Department of Imaging and Printing Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University for contact angle goniometer and Capability Building Unit in Nanoscience and Nanotechnology, Department of Physics, Faculty of Science, Mahidol University for AFM facility. A grateful acknowledgment to the Thailand Research Fund, the research funding for graduate students from Ministry of University Affairs, and the teaching assistant fund from Chulalongkorn University for financial support.

Many thanks go to all OSRU members for their assistance, suggestions concerning experimental techniques and their kind helps during my thesis work.

Finally, I would like to especially thank my family members: father, mother, grandmother, two young sisters and relatives for their love, kindness and support throughout my entire study.

CONTENTS

	Pages
ABSTRACT IN THAI.....	iv
ABSTRACT IN ENGLISH.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
LIST OF FIGURES.....	xi
LIST OF TABLES.....	xiii
LIST OF SCHEMES.....	xiv
LIST OF ABBREVIATIONS	xv
CHAPTER I : INTRODUCTION.....	1
1.1 Statement of Problem.....	1
1.2 Objectives.....	2
1.3 Scope of the Investigation.....	3
CHAPTER II : THEORY AND LITERATURE REVIEW.....	4
2.1 Development of Phosphorylcholine-containing Momomer.....	4
2.2 Living Polymerization.....	8
2.3 Polymer Brush.....	17
2.4 Blood Compatibility.....	23
2.4.1 Human Plasma.....	24
2.4.2 Mechanism of Thrombus Formation on Polymer Surface.....	25
2.5 Characterization Techniques.....	27
2.5.1 Gel Permeation Chromatography (GPC)	27
2.5.2 Ellipsometry.....	29
2.5.3 Contact Angle Measurement.....	30
2.5.4 X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS).....	31

CONTENTS (Continued)

		Pages
	2.5.5 Atomic Force Microscopy (AFM).....	34
CHAPTER III : EXPERIMENTAL.....		37
3.1	Materials.....	37
3.2	Equipment.....	39
	3.2.1 Ellipsometry.....	39
	3.2.2 X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS).....	39
	3.2.3 Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (NMR).....	39
	3.2.4 Gel Permeation Chromatography (GPC)	40
	3.2.5 Freeze Dryer.....	40
	3.2.6 Contact Angle Measurement.....	40
	3.2.7 UV-Spectroscopy.....	40
	3.2.8 Scanning Electron Microscopy (SEM)....	41
	3.2.9 Atomic Force Microscopy (AFM).....	41
	3.2.10 Atomic Absorption (AA).....	41
3.3	Synthesis of PMPC in solution.....	41
	3.3.1 Synthesis of Methoxy-capped Oligo (ethylene glycol)-2-bromoisobutylrate initiator: OEGBr.....	41
	3.3.2 Synthesis of PMPC.....	42
3.4	Preparation of Surface Grafted α -bromoester Initiators.....	43
	3.4.1 Synthesis of Prop-2'-enyl 2-bromo-2- methylpropinoate.....	43
	3.4.2 Synthesis of 3-(Dimethylethoxysilyl) propyl-2-bromoisobutylrate.....	43

CONTENTS (Continued)

	Pages
3.4.3 Preparation of Silicon Oxide Substrates..	44
3.4.4 Preparation of Surface Grafted α -bromo ester Initiators.....	44
3.4.5 Synthesis of Prop-2-bromo-2-methylpropinoate.....	45
3.5 Preparation of PMPC Brushes.....	46
3.6 Protocol for Blood Compatibility Test.....	47
3.6.1 Determination of Total Amount of Adsorbed Human Plasma Protein.....	47
3.5.2 Evaluation of Platelet Adhesion.....	47
CHAPTER IV : RESULTS AND DISCUSSION.....	49
4.1 Synthesis of PMPC in Solution.....	49
4.1.1 Synthesis of Methoxy-capped Oligo (ethylene glycol)-2-bromoisobutyrate initiator: OEGBr.....	49
4.1.2 Synthesis of PMPC.....	50
4.2 Preparation of Surface Grafted α -bromoester Initiators.....	53
4.2.1 Synthesis of Prop-2'-enyl 2-bromo-2-methylpropinoate.....	53
4.2.2 Synthesis of 3-(Dimethylethoxysilyl) propyl-2-bromoisobutyrate.....	54
4.2.3 Preparation of Surface Grafted α -bromo ester Initiators.....	55
4.2.4 Synthesis of Prop-2-bromo-2-methylpropinoate.....	57

CONTENTS (Continued)

	Pages
4.3 Preparation of PMPC Brushes.....	58
4.3.1 Effect of Solvent on Thickness.....	58
4.3.2 Molecular Weight and Graft Density of PMPC Brushes.....	59
4.3.3 Confirmation of PMPC Brushes Formation by XPS.....	60
4.3.4 Surface Topography of PMPC Brushes.....	61
4.4 Blood Compatibility of PMPC Brushes.....	62
4.4.1 Plasma Protein Adsorption.....	63
4.4.2 Human Platelet Adhesion.....	65
 CHAPTER V : CONCLUSIONS	 67
REFERENCES.....	69
APPENDICES.....	79
APPENDIX A.....	80
APPENDIX B.....	84
APPENDIX C.....	88
VITAE.....	91

ศูนย์วิจัยทันตวิทยา
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figures	Pages
2.1 Molecular weight conversion curves for various kinds of polymerization methods: (A) living polymerization; (B) free radical polymerization; and (C) condensation polymerization.....	10
2.2 Architectural forms of polymers available by living polymerization technique.....	11
2.3 Examples of polymer systems comprising polymer brushes.....	18
2.4 Classification of linear polymer brushes, (a ₁ -a ₄) homopolymer brushes; (b) mixed homopolymer brush; (c) random copolymer brush; (d) block copolymer brush.....	20
2.5 Preparation of polymer brushes by “physisorption”, “grafting to” and “grafting from”.....	22
2.6 Pictorial representation of human blood.....	24
2.7 Schematic representation of blood coagulation system.....	26
2.8 Schematic representation of the gel permeation chromatography.....	28
2.9 Schematic of the geometry of an ellipsometry experiment.....	30
2.10 Schematic representation of the Young’s equation.....	30
2.11 Schematic representation of wettability.....	31
2.12 Schematic diagram of the X-ray photoelectron emission process.....	32
2.13 General schematic drawing of the XPS instrument.....	33
2.14 Schematic diagram of an atomic force microscope.....	36
4.1 ¹ H NMR spectra of (a) MPC and (b) PMPC mixed with the unreacted MPC synthesized by ATRP using [OGBr]:[MPC] = 1:20.....	51
4.2 % Monomer conversion as a function of reaction time: water (○), 50%MeOH/water (●), and 80%MeOH/water (□).....	53
4.3 Advancing (○) and receding (●) contact angle data of silicon oxide surface after a reaction with 4 as a function of reaction time.....	56
4.4 The thickness of the surface grafted α-bromoester initiator as a function of reaction time.....	57

LIST OF FIGURES (Continued)

Figures	Pages
4.5 Ellipsometric thickness of PMPC brushes prepared in H ₂ O (○), 50%IPA/H ₂ O (●), and IPA (□).....	59
4.6 AFM micrographes of silicon oxide and PMPC brushes.....	62
4.7 A calibration curve of the amount of albumin adsorbed and the absorbance obtained from BCA microassay.....	63
4.8 SEM micrographs of surfaces after contacting with human PRP.....	65
A-1 The ¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃) of methoxy-capped oligo(ethylene glycol)-2-bromoisobutylrate initiator: OEGBr.....	81
A-2 The ¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃) of prop-2'-enyl 2-bromo-2-methylpropinoate.....	81
A-3 The ¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃) of 3-(dimethylethoxysilyl)propyl-2-bromoisobutyrate.....	82
A-4 The ¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃) of prop-2-bromo-2-methyl propinoate.....	82
A-5 The ¹ H-NMR (400 MHz, D ₂ O) of MPC monomer.....	83
A-6 The ¹ H-NMR (400 MHz, D ₂ O) of PMPC.....	83
C-1 Formation of purple complex between BCA and cuprous ion generated from the biuret reaction.....	89

LIST OF TABLES

Tables	Pages
4.1 XPS elemental surface composition (%) and water contact angle of PMPC brushes.....	61
4.2 The amount of plasma protein adsorbed on the surfaces bearing PMPC brushes having various thickness.....	64
B-1 % Monomer conversion as a function of reaction time.....	85
B-2 The average thickness of surface grafted α -bromoester initiator calculated from ellipsometric data and advancing and receding water contact angles as a function of time.....	86
B-3 The average thickness of PMPC brushes without “added” initiator calculated from ellipsometric data as a function of time.....	86
B-4 The average molecular weight and molecular weight distribution of PMPC brushes analyzed by GPC and the graft layer thickness of PMPC brushes calculated from ellipsometric data as a function of time (Solvent: water).....	87

ศูนย์วิจัยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF SCHEMES

Schemes	Pages
2.1 The synthetic route of MPC: (a) Nakabsyashi et al. ; (b) Ishihara et al..	5
2.2 The synthetic route of MPCE.....	8
2.3 The mechanism of ATRP.....	12
2.4 Equilibrium reaction in ATRP.....	13
2.5 The rotation of the bpy ligands from the tetrahedral and co-ordination of halide at the Cu center.....	14
2.6 Complex formation equilibrium in polar and nonpolar solvents.....	15
4.1 The mechanism of the nucleophilic acyl substitution reaction between poly(ethylene glycol) 350 monoethyl ether with 2-bromoisobutyryl bromide	50
4.2 The mechanism of the hydrosilylation reaction between dimethyl-ethoxysilane with 2.....	55


 ศูนย์วิจัยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ABBREVIATIONS

AFM	: Atomic force microscopy
Alb	: Albumin
ATRP	: Atom transfer radical polymerization
Å	: Ångström = 0.1 nm.
BCA	: Bicinchoninic acid
bpy	: 2,2'-Bipyridyl
BSA	: Bovin serum albumin
CDCl ₃	: Deuteriochloroform
CD ₃ OD	: Tetradeuteromethanol
CuBr	: Copper (I) bromide
DEA	: 2-(Diethylamino)ethyl methacrylate
ESCA	: Electron Spectroscopy for Chemical Analysis
GPC	: Gel permeation chromatography
IPA	: Isopropanol
LiBr	: Lithium bromide
MgSO ₄	: Magnesium sulfate
MHz	: Megahertz
MMA	: Methyl methacrylate

NMR	: Nuclear magnetic resonance spectroscopy
OEG	: Oligo(ethylene glycol)
OEGBr	: Methoxy-capped oligo(ethylene glycol)-2-bromoisobutyrate
PBS	: Phosphate buffer saline
PDI	: Polydispersity Index
PMMA	: Poly(methyl methacrylate)
PMPC	: Poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)
PPP	: Platelet-poor plasma
PRP	: Platelet-rich plasma
XPS	: X-ray photoelectron spectroscopy
θ_A	: Advancing contact angle
θ_R	: Receding contact angle

ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย