



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การเคลือบโพลีอิลิกโทไรไลต์ มัลติเลเยอร์บนอุปกรณ์ไมโคร
ฟลูอิดิกส์ที่เตรียมจากพีดีเอ็มเอสเพื่อการแยกสารชีวโมเลกุล
(Polyelectrolyte multilayers-adsorbed coating on poly(dimethylsiloxane)
microfluidic devices for biopolymer separation)

โดย ดร. ลักษณะ ดูปาส และคณะ

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การเคลือบโพลีอิลิกโทรไลต์ มัลติเลเยอร์บนอุปกรณ์ไมโครฟลูอิดิกส์
ที่เตรียมจากพีดีเอ็มเอสเพื่อการแยกสารชีวโมเลกุล
(Polyelectrolyte multilayers-adsorbed coating on poly(dimethylsiloxane)
microfluidic devices for biopolymer separation)

โดย

คณะผู้วิจัย

สังกัด

1. ดร. ลักขณา ดุบาส

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย

2. รศ. ดร. ธรรมบุญ หนูจักร

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย

3. Dr. Stephan T. Dubas

สถาบันวิจัยโลหะและวัสดุ จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุน
การวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ	หน้า
สารบัญ	i
สารบัญรูป	iii
สารบัญตาราง	Vii
กิตติกรรมประกาศ	Viii
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	1
บทที่ 1 บทนำ	3
1.1 ที่มาของปัญหาและความสำคัญ	3
1.2 วัตถุประสงค์	4
1.3 Microfluidic device และ polydimethylsiloxane (PDMS)	4
1.4 พอลิอิเล็กโทรไลต์ (polyelectrolyte)	5
1.5 พอลิอิเล็กโทรไลต์มัลติเลเยอร์ (Polyelectrolyte multilayers, PEMs)	6
1.6 Electroosmotic flow (EOF)	7
1.7 Current monitoring method	8
1.8 มุมสัมผัส (Contact Angle)	9
1.9 การดูดซับของโปรตีน (protein adsorption)	9
1.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	10
บทที่ 2 วิธีการทดลอง	13
2.1 สารเคมี	13
2.2 เครื่องมือ	13
2.3 การเตรียมสารละลาย	14
2.4 วิธีการทดลอง	15
Part A การศึกษาผลของการเคลือบชั้นงานของ PDMS ด้วย PEMs ต่อค่า EOF และการดูดซับโปรตีน	17
A.1 การศึกษาผลของการดัดแปรพื้นผิว PDMS ด้วย PDADMAC/PSS ต่อค่า EOF	17
A.2 การศึกษาผลของตัวทำละลายเฮกเซนต่อ PDMS	21
Part B การตรวจวัดปริมาณ albumin ด้วย microelectrode ของ gold nanoparticles	21
บทที่ 3 ผลการทดลอง	25
3.1 การศึกษาการเคลือบฟิล์มบางระหว่าง PDADMAC/PSS	25

	หน้า
3.2 การศึกษาการเคลือบฟิล์มบางระหว่าง chitosan/alginate	26
3.3 ศึกษาการเคลือบฟิล์ม PEMs ระบบ PDADMAC/PSS บน PDMS	27
3.4 ศึกษาการเคลือบฟิล์มบางระหว่าง chitosan/ alginate	28
<i>Part A การศึกษาผลของการเคลือบชิ้นงานของ PDMS ด้วย PEMs ต่อค่า EOF และการดูดซับโปรตีน</i>	29
A.1 ศึกษาผลของการเคลือบ PDMS microfluidic device ด้วย PDADMAC/PSS ต่อค่า electroosmotic flow (EOF)	30
A.2 ศึกษาเสถียรภาพของ EOF ที่ได้จาก channel ที่เคลือบ PEMs ของ PDADMAC/PSS	31
A.3 ศึกษาความชอบน้ำของฟิล์มบาง	32
A.4 ศึกษาการดูดซับโปรตีน BSA บนพื้นผิวของ PDMS และพื้นผิวที่ดัดแปรด้วย PEMs	35
A.5 ศึกษาผลของการสกัด PDMS ด้วยเฮกเซนต่อการคืนกลับของความไม่ชอบน้ำ	47
<i>Part B ประยุกต์ใช้ไฟฟ้าระดับจุลภาคของอนุภาคนาโนทองและการตรวจวัด albumin</i>	48
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	50
เอกสารอ้างอิง	52
ภาคผนวก ก proceeding การนำเสนอผลงาน	ง
ภาคผนวก ข Manuscript	จ

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1.1 องค์ประกอบหลักของอุปกรณ์ไมโครฟลูอิดิก	4
รูปที่ 1.2 ภาพจำลองการเกิด polyelectrolyte multilayer บน PDMS โดย Layer-by-layer method	6
รูปที่ 1.3 Electroosmotic flow	7
รูปที่ 1.4 การเกิด reversed electroosmotic flow	8
รูปที่ 1.5 แสดงการเติมสารละลายในการทำ Current Monitoring Method	9
รูปที่ 1.6 มุมสัมผัสและการเปียก A) แสดงตัวอย่างพื้นผิวที่เกิดการเปียก, B) แสดงตัวอย่างพื้นผิวที่ไม่เกิดการเปียก	9
รูปที่ 1.7 BSA conformation ณ pH ต่างๆ	10
รูปที่ 2.1 ภาพจำลองรูปแบบ microchannel	17
รูปที่ 2.2 แสดงการจัดวางอุปกรณ์สำหรับ current monitoring method	19
รูปที่ 2.3 ต้นแบบของ microchannel	22
รูปที่ 2.4 วิธีการเตรียม microelectrode โดยวิธี flow deposition (a) ขั้นตอนการเตรียมชั้น primer (b) การเตรียม electrode	23
รูปที่ 2.5 แสดงการตรวจวัดอัลบูมินด้วยการวัดการนำไฟฟ้าโดยใช้ขั้วไฟฟ้าระดับจุลภาคของอนุภาคนาโนทอง	24
รูปที่ 3.1 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของฟิล์มบางระหว่าง PDADMAC/PSS ที่จำนวนชั้น 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 และ 16 ชั้น โดยจำนวนชั้นที่เป็นเลขคู่ แสดงถึง PSS เป็นชั้นนอกสุดของ PEMs ฟิล์ม	25
รูปที่ 3.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของฟิล์มบางกับจำนวนชั้นของฟิล์มบาง PDADMAC/PSS	26
รูปที่ 3.3 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของฟิล์มบาง chitosan/alginate ที่จำนวนชั้นต่าง ณ pH ต่างๆ	27
รูปที่ 3.4 สเปกตรัม ATR-FTIR ของ uncoated-PDMS และ PDMS ที่เคลือบด้วยฟิล์มบางของ PDADMAC/PSS ที่จำนวนชั้นตั้งแต่ 2-18 ชั้น (แสดงเฉพาะฟิล์มบางที่มีจำนวนชั้นเป็นเลขคู่) ภาพแทรกเป็นภาพขยายของสัญญาณ IR เมื่อจัดให้ baseline ตรงกันเพื่อแสดงการเพิ่มของสัญญาณของ sulfoante peak ที่ $\sim 1033\text{ cm}^{-1}$	28
รูปที่ 3.5 สเปกตรัม ATR-FTIR ของ uncoated PDMS และ PDMS ที่เคลือบด้วย PEMs ฟิล์มของ chitosan/alginate ที่จำนวนชั้นตั้งแต่ชั้นที่ 2 - ชั้นที่ 18 โดยแสดงเฉพาะฟิล์มบางที่มี alginate อยู่ชั้นนอกสุด (จำนวนชั้นเป็นเลขคู่) ภาพแทรกเป็นภาพขยายของสัญญาณ IR เมื่อจัดให้ baseline ตรงกันเพื่อแสดงการเพิ่มของสัญญาณของ carboxylate peak ที่ ~ 1412 และ $\sim 1601\text{ cm}^{-1}$	29

	หน้า
กราฟที่ 3.6 แสดงค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่า EOF ของ PDMS microfluidic chip ที่เคลือบด้วย PDADMAC (cationic coating, ชั้นคี่) and PSS (anionic coating, ชั้นคู่) กับจำนวนชั้นเคลือบ เมื่อใช้สารละลายเข้มข้น 10 mM (□) และ 1 mM ()	31
รูปที่ 3.7 เสถียรภาพของชั้นเคลือบ PDADMAC/PSS กับจำนวนรอบ และ pH ของ running buffer	32
กราฟที่ 3.8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างมุมสัมผัส (contact angle) ของพื้นผิวที่เคลือบด้วย PDADMAC (cationic coating, ชั้นคี่) and PSS (anionic coating, ชั้นคู่) กับจำนวนชั้นของ PEMs ด้วยความเข้มข้นของสารละลายเท่ากับ 10 mM (◆) และ 1 mM (□)	33
รูปที่ 3.9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างมุมสัมผัสบนพื้นผิวกับจำนวนชั้นของฟิล์มบางของ chitosan/alginate ที่จำนวนชั้น 8-14 ชั้น	34
รูปที่ 3.10 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างมุมสัมผัสบนพื้นผิวของ PDMS ที่ยังไม่ผ่านการเคลือบฟิล์มบาง, PDMS ที่ผ่านการเคลือบด้วย PDADMAC/PSS () และ PDMS ที่ผ่านการเคลือบด้วย chitosan/alginate () ที่จำนวนชั้น 8-14 ชั้น	34
รูปที่ 3.11 ATR-FTIR spectra ของพื้นผิว PDMS ที่มีได้ตัดแปร หลังจากจุ่มในสารละลาย PBS ความเข้มข้น 1 mM () และ 10 mM ()	35
รูปที่ 3.12 ATR-FTIR spectra ของ unmodified PDMS เมื่อจุ่มชิ้นงานในสารละลาย BSA ณ pH ต่างๆ ภาพแทรกแสดง characteristic infrared peak ของ amide I ที่ wavenumber $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$ และ amide II ที่ wavenumber 1560 cm^{-1}	36
รูปที่ 3.13 ผลของ pH ต่อ อัตราส่วนระหว่างสัญญาณของ amide I ($\sim 1650\text{ cm}^{-1}$) และ PDMS peak ($\sim 2960\text{ cm}^{-1}$)	37
รูปที่ 3.14 เสถียรภาพของ PEMs ระบบ PDADMAC/PSS ที่เคลือบบน PDMS ณ pH 3.5 โดยเส้นทึบแสดงข้อมูลของชิ้นงานก่อนจุ่มในสารละลาย buffer และเส้นประแสดงสัญญาณ IR ของชิ้นงานหลังจุ่มในสารละลาย	38
รูปที่ 3.15 เสถียรภาพของ PEMs ระบบ PDADMAC/PSS ที่เคลือบบน PDMS ณ pH 5 โดยเส้นทึบแสดงข้อมูลของชิ้นงานก่อนจุ่มในสารละลาย buffer และเส้นประแสดงสัญญาณ IR ของชิ้นงานหลังจุ่มในสารละลาย	38
รูปที่ 3.16 เสถียรภาพของ PEMs ระบบ PDADMAC/PSS ที่เคลือบบน PDMS ณ pH 7.4 โดยเส้นทึบแสดงข้อมูลของชิ้นงานก่อนจุ่มในสารละลาย buffer และเส้นประแสดงสัญญาณ IR ของชิ้นงานหลังจุ่มในสารละลาย	39

- รูปที่ 3.17** ATR-FTIR spectra ของการดูดซับ BSA ณ pH 3.5 บน PDMS ที่ดัดแปรด้วย PDADMAC/PSS multilayer ที่มีความหนาต่างกัน ได้แก่ชั้นที่สาม (—), ชั้นที่สี่ (—), ชั้นที่เจ็ด (—), ชั้นที่แปด (—), ชั้นที่สิบเอ็ด (—), ชั้นที่สิบสอง (—), ชั้นที่สิบห้า (—) และชั้นที่สิบหก (—) โดยเส้นทึบแสดงข้อมูลของ ซึ้นงานก่อนจุ่มในสารละลาย BSA และเส้นประแสดงสัญญาณ IR ของซึ้นงานหลังจุ่มใน สารละลาย BSA *รูปเล็กแสดงภาพขยายของสัญญาณของหมู่เอไมด์ที่ตำแหน่ง ~1650 และ ~1540 cm^{-1}* 40
- รูปที่ 3.18** ผลต่างของ ATR-FTIR spectrum ระหว่างก่อนจุ่มและหลังจุ่มซึ้นงานในสารละลาย BSA ที่ pH 3.5 โดยเส้นประแสดงสัญญาณ IR ของ unmodified PDMS (— — —) และ เส้นทึบแสดงสัญญาณ IR ของ PDMS ที่ดัดแปรด้วย PDADMAC/PSS multilayer เมื่อ พิล์มชั้นนอกสุดเป็น (a) PDADMAC (positive charge) และ (b) PSS (negative charge) 41
- รูปที่ 3.19** ATR-FTIR spectra ของการดูดซับ BSA ณ pH 5 บน PDMS ที่ดัดแปรด้วย PDADMAC/PSS multilayer ที่มีความหนาต่างกัน ได้แก่ชั้นที่สาม (—), ชั้นที่สี่ (—), ชั้นที่เจ็ด (—), ชั้นที่แปด (—), ชั้นที่สิบเอ็ด (—), ชั้นที่สิบสอง (—), ชั้นที่สิบห้า (—) และชั้นที่สิบหก (—) โดยเส้นทึบแสดงข้อมูลของ ซึ้นงานก่อนจุ่มในสารละลาย BSA และเส้นประแสดงสัญญาณ IR ของซึ้นงานหลังจุ่มใน สารละลาย BSA *รูปเล็กแสดงภาพขยายของสัญญาณของหมู่เอไมด์ที่ตำแหน่ง ~1650 และ ~1540 cm^{-1}* 42
- รูปที่ 3.20** ผลต่างของ ATR-FTIR spectrum ระหว่างก่อนจุ่มและหลังจุ่มซึ้นงานในสารละลาย BSA ที่ pH 5 โดยเส้นประแสดงสัญญาณ IR ของ unmodified PDMS (— — —) และ เส้นทึบแสดงสัญญาณ IR ของ PDMS ที่ดัดแปรด้วย PDADMAC/PSS multilayer เมื่อ พิล์มชั้นนอกสุดเป็น (a) PDADMAC (positive charge) และ (b) PSS (negative charge) 43
- รูปที่ 3.21** ATR-FTIR spectra ของการดูดซับ BSA ณ pH 7.4 บน PDMS ที่ดัดแปรด้วย PDADMAC/PSS multilayer ที่มีความหนาต่างกัน ได้แก่ชั้นที่สาม (—), ชั้นที่สี่ (—), ชั้นที่เจ็ด (—), ชั้นที่แปด (—), ชั้นที่สิบเอ็ด (—), ชั้นที่สิบสอง (—), ชั้นที่สิบห้า (—) และชั้นที่สิบหก (—) โดยเส้นทึบแสดงข้อมูลของ ซึ้นงานก่อนจุ่มในสารละลาย BSA และเส้นประแสดงสัญญาณ IR ของซึ้นงานหลังจุ่มใน สารละลาย BSA *รูปเล็กแสดงภาพขยายของสัญญาณของหมู่เอไมด์ที่ตำแหน่ง ~1650 และ ~1540 cm^{-1}* 44

หน้า

รูปที่ 3.22	ผลต่างของ ATR-FTIR spectrum ระหว่างก่อนจุ่มและหลังจุ่มชิ้นงานในสารละลาย BSA ที่ pH 7.4 โดยเส้นประแสดงสัญญาณ IR ของ unmodified PDMS (— — —) และเส้นทึบแสดงสัญญาณ IR ของ PDMS ที่ดัดแปรด้วย PDADMAC/PSS multilayer เมื่อฟิล์มชั้นนอกสุดเป็น (a) PDADMAC (positive charge) และ (b) PSS (negative charge)	45
รูปที่ 3.23	กราฟ ATR-FTIR ของ PDMS ที่มีได้ดัดแปร และ PDMS ที่ดัดแปรด้วย PEMs ระบบ chitosan/alginate ที่จำนวนชั้นตั้งแต่ 8-17 ชั้น หลังจากแช่ชิ้นงานในสารละลาย BSA ที่ pH 7.4	46
รูปที่ 3.24	ATR-FTIR spectra ของ PDMS ที่ดัดแปรด้วย chitosan/alginate ชั้นที่ 15, 16 และ ชั้นที่ 17 โดยเส้นประแสดงสัญญาณก่อนจุ่มในสารละลาย BSA (— — —) และเส้นจุดแสดงสัญญาณหลังจุ่มในสารละลาย BSA (.....) โดยเส้นทึบแสดงสัญญาณของ uncoated PDMS หลังจากจุ่มในสารละลาย BSA (————) รูปเล็กแสดงภาพขยายของสัญญาณของหมู่เอไมด์ที่ตำแหน่ง ~ 1650 และ $\sim 1540\text{ cm}^{-1}$	47
รูปที่ 3.25	กราฟแท่งแสดงค่ามุมสัมผัสของหยดน้ำกับชิ้นงาน PDMS ที่สภาวะต่างๆ	48
รูปที่ 3.26	กราฟแสดงค่ากระแสที่วัดด้วย microelectrode ที่เตรียมจาก gold nanoparticles เมื่อผ่านสารละลายอัลบูมินที่ ความเข้มข้นต่างๆ	49

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1.1 แสดงตัวอย่างของ polyelectrolyte	5
ตารางที่ 2.1 ค่า pH ของสารละลาย chitosan และสารละลาย alginate สำหรับศึกษาการเคลือบฟิล์มบางจาก chitosan และalginate	16
ตารางที่ 3.1 แสดงสัญญาณ IR ที่เป็น characteristic peak ของ PDMS	27
ตารางที่ 3.2 แสดงสัญญาณ IR ที่เป็น characteristic peak ของ chitosan	29
ตารางที่ 3.3 แสดงสัญญาณ IR ที่เป็น characteristic peak ของ sodium alginate	29

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่สนับสนุนสถานที่และเครื่องมืออุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการทำวิจัย ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร.อรรพณ ชัยลภากุล ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการอนุเคราะห์เครื่อง high voltage และ ดร.อดิสร เตื่อนตรานนท์ ศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ (NECTEC) ในความอนุเคราะห์ทำแม่แบบของ microfluidic device ในงานวิจัยนี้ รวมทั้งนายฉัตร ปณิธิพงษ์วุฒิ นางสาวปรารค์ทอง ทองกร นิสิตระดับปริญญาตรี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และนางสาวเสาวณี เถาว์เพ็ญ นิสิตระดับปริญญาโท หลักสูตรปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และนางสาวผาณิตมาส กำลังดัสนะ นิสิตปริญญาเอก สาขาวิชาวิทยาศาสตร์นาโนและเทคโนโลยี คณะบัณฑิตวิทยาลัย ที่ร่วมทำงานวิจัยเรื่องนี้ให้บรรลุตามเป้าหมายที่ตั้งไว้ สุดท้ายขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยที่ให้เงินสนับสนุนในการทำวิจัยครั้งนี้

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5180309

ชื่อโครงการ: การเคลือบโพลีเอ็กไทโรไลต์ มัลติเลเยอร์บนอุปกรณ์ไมโครฟลูอิดิกส์ที่เตรียมจากพีดีเอ็มเอสเพื่อการแยกสารชีวโมเลกุล

ชื่อนักวิจัย: ดร. ลักษณา คูบาส และคณะ

สถาบัน: ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อีเมล: luxsana.l@chula.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 15 พฤษภาคม 2551 ถึง 30 สิงหาคม 2554

บทคัดย่อ:

งานวิจัยนี้จะประกอบด้วยสองส่วน โดยจุดประสงค์ของส่วนที่หนึ่งคือมุ่งที่จะปรับปรุงสมบัติความชอบน้ำของพื้นผิวไมโครฟลูอิดิกส์หรือไมโครชิพ ที่เตรียมจากพอลิไดเมทิลซิลอกเซน (PDMS) โดยการเคลือบด้วยพอลิเอ็กไทโรไลต์ มัลติเลเยอร์ (PEMs) เพื่อให้ได้ค่าอิเล็กโทรออสโมติกโฟลว์ (EOF) ที่ดีขึ้น พร้อมทั้งสามารถกำหนดทิศทางของค่า EOF และควบคุมการเกาะติดของโปรตีนเซรัมอัลบูมิน (BSA) โดยตัวแปรที่ทำการศึกษาคือ ชนิดของพอลิเอ็กไทโรไลต์ จำนวนชั้นของฟิล์มบาง และค่าพีเอชของสารละลาย BSA ในการศึกษาที่ใช้พอลิเอ็กไทโรไลต์ 2 คู่ คือพอลิไดเอคิลไดเมทิลแอมโมเนียมคลอไรด์ (PDADMAC) กับพอลิสไตรีนซัลโฟเนต (PSS) ซึ่งเป็น strong polyelectrolyte และไคโตซานกับแอลจินตซึ่งเป็น weak polyelectrolyte สมบัติความชอบ/ไม่ชอบน้ำของพื้นผิวฟิล์มบางสามารถติดตามได้จากค่ามุมสัมผัส โดย PDMS ที่เคลือบด้วย PEMs ที่มี PDADMAC เป็นชั้นบนสุดพบว่ามีความไม่ชอบน้ำมากกว่าชั้นงานที่มี PSS เป็นชั้นบนสุด และฟิล์มบางระหว่างไคโตซานกับแอลจินตให้สมบัติความชอบน้ำมากกว่า PDMS ที่เคลือบด้วยฟิล์มบางระบบ PDADMAC/PSS ทั้งนี้ในการเคลือบพื้นผิว PDMS ด้วย PEMs จำเป็นต้องเคลือบอย่างน้อย 8-10 ชั้นเพื่อให้ได้ความชอบน้ำที่ดี ได้มีการศึกษาผลของ PEMs ที่เคลือบในแขนแนลของไมโครชิพต่อค่า EOF เปรียบเทียบกับชิพที่ได้เคลือบพบว่าแขนแนลที่ชั้นเคลือบชั้นบนสุดเป็น PSS ให้ค่า EOF สูงกว่า นอกจากนี้ยังพบว่าค่า EOF ของแขนแนลที่เคลือบด้วย PDADMAC/PSS หนา 10 ชั้นมีเสถียรภาพสูงเมื่อผ่านสารละลาย pH 3, 7 และ 11 จำนวนมากกว่า 100 ครั้ง การดูดซับของโปรตีนบน PDMS ที่มีได้ดัดแปรสามารถควบคุมด้วยพีเอชของสารละลาย BSA และความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ พบว่า ณ pH ใกล้กับจุดไอโซอิเล็กทริกของ BSA (IEP ~4.8) ปริมาณของ BSA ที่ดูดซับบนพื้นผิวนี้มีมากที่สุด โดยผ่านแรง hydrophobic interaction และที่ความเข้มข้น PBS บัฟเฟอร์เท่ากับ 1 mM พบว่าการดูดซับ BSA เกิดขึ้นได้มากกว่า ได้ทำการศึกษาลักษณะของประจุชั้นนอกสุดของฟิล์มบางต่อการดูดซับของ BSA จาก ATR-FTIR ของระบบ PDADMAC/PSS พบว่าเกิดการดูดซับของ BSA บนพื้นผิวที่ดัดแปรนี้โดยผ่านแรงดึงดูดระหว่างประจุ และพบว่าปริมาณ BSA ที่ถูกดูดซับบนฟิล์มบางมีปริมาณมากกว่าบนพื้นผิว PDMS ที่มีได้ผ่านการดัดแปรในทุกค่า pH โดยปริมาณของ BSA ที่ถูกดูดซับนี้จะเพิ่มขึ้นตามจำนวนชั้นของฟิล์มบางที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามการดูดซับของ BSA บนพื้นผิวที่มีประจุเหมือนกันพบว่าปริมาณที่น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ PDMS ที่มีได้ดัดแปร เมื่อทำการเปรียบเทียบกับ strong polyelectrolyte พบว่าโปรตีนสามารถดูดซับบนพื้นผิวที่ดัดแปรด้วยไคโตซานและแอลจินตได้น้อยกว่า ส่วนที่สองของงานวิจัยเป็นการประยุกต์ใช้ไฟฟ้าขนาดจุลภาคที่เตรียมจาก PEMs-อนุภาคทองระดับนาโน เพื่อใช้เป็นตัวตรวจวัดในอุปกรณ์ไมโครฟลูอิดิกส์สำหรับวัดอัลบูมิน

คำหลัก : พอลิเอ็กไทโรไลต์, โปรตีนเซรัมอัลบูมิน, อิเล็กโทรออสโมติก โฟลว์, การดูดซับโปรตีน

Abstract

Project Code : MRG5180309

Project Title : Polyelectrolyte multilayers-adsorbed coating on poly(dimethylsiloxane) microfluidic devices for biopolymer separation

Investigator : Dr. Luxsana Dubas et al

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University

E-mail Address : luxsana.l@chula.ac.th

Project Period : 14 May, 2008- 31 August, 2011

Abstract:

This study consisted of two parts. The objective of the first part is to improve the hydrophilic property of microfluidic device or microchip made of polydimethylsiloxane (PDMS). The surface of microchip channel is modified by polyelectrolyte multilayers (PEMs) to obtain more reproducible and controllable electroosmotic flow (EOF) and to tune the adsorption of bovine serum albumin (BSA). The studied parameters are the types of polyelectrolyte, the numbers of coated layers and pH of the BSA solution. Poly(diallyl dimethyl ammonium chloride) (PDADMAC) and poly(sodium 4-styrenesulfonate) (PSS) as a strong polyelectrolyte pair, and chitosan and alginate as a weak polyelectrolyte pair were chosen in this study. Contact angle measurements were used to monitor the hydrophilic property of the modified PDMS substrate. The hydrophobicity of PDMS coated with PDADMAC as the outestmost layer was found to be higher than the one coated with PSS as a top layer. The hydrophilic property of chitosan/alginate modified PDMS was enhanced comparing to surface modifying with PDADMAC/PSS. Furthermore, the fully coated surface with the PEMs is required more than 8-10 coated layers. The effects of PEMs-coated microchip on EOF were also investigated. In comparison with uncoated device, the EOF obtaining from PSS-coated microchannel was higher than the uncoated channel. In addition, the EOF of (PDADMAC/PSS)₅ layer-coated channel was stable after performing 100 runs at pH 3, 7 and 11. The adsorption of BSA on the unmodified PDMS surface was controlled by the pH values of BSA solution and buffer concentration. At pH around isoelectric point of BSA (IEP ~4.8), the maximum amount of absorbed BSA on unmodified PDMS via hydrophobic interaction was observed. The amount of BSA adsorbed on the PDMS surface was found to be higher for 1 mM PBS buffer. The effect of the different charged surface was studied. Based on the ATR-FTIR results of PDADMAC/PSS systems for all pH conditions, we found that BSA molecule can be adsorbed on oppositely charged surface, via electrostatic interaction. The amount of adsorbed BSA on PDADMAC/PSS was more than amount of BSA on unmodified PMDS at all pH values. Amount of adsorbed BSA increased with the increase in the numbers of coating layer and thickness of the thin film. However, the amount of adsorbed BSA on the

like-charged surface was found to be smaller comparing to unmodified PDMS. Comparison with strong polyelectrolyte system, the little adsorbed BSA was measured on the chitosan/alginate film. For the second part of this study, the measurement of BSA was investigated using microfluidic device employing the PEMs-gold nanoparticles microelectrodes, developed in our laboratory as the detector.

Keywords : Polyelectrolyte multilayer, Bovine serum albumin, Protein adsorption

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

Executive Summary

ไมโครฟลูอิดิกดีไวซ์ (Microfluidic device) หรือไมโครชิป (microchip) เป็นเทคนิคการแยกขนาดเล็กที่มี การพัฒนาอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากสามารถรวมขั้นตอนต่างๆ ไว้ในอุปกรณ์ชิ้นเดียวและมีขนาดเล็ก ใช้สาร ปริมาณน้อย และเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์สั้น พอลิไดเมทิลไซลอกเซน (polydimethylsiloxane, PDMS) เป็น หนึ่งในวัสดุที่ใช้ในการเตรียมเป็น microfluidic device เนื่องจากสามารถเตรียมได้ง่าย ทำได้เอง ราคาถูก ไม่ ดูดกลืนแสงช่วง visible และมีความเป็นพิษน้อย อย่างไรก็ตามแต่ปัญหาหนึ่งที่หลีกเลี่ยงไม่ได้คือ การที่มีค่าอิเล็กโทรออสโมติกโฟลว์ (EOF) ต่ำและไม่คงที่ และการดูดซับของสารชีวโมเลกุลเช่น โปรตีนบนพื้นผิวของ PDMS ด้วย hydrophobic force ซึ่งเป็นส่งผลต่อการวิเคราะห์หรือตรวจสอบโปรตีน ปัญหาทั้งสองข้อนี้ส่งผลต่อ ประสิทธิภาพในการตรวจวัดสารชีวโมเลกุล ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งปรับปรุงพื้นผิว PDMS ให้มีความชอบน้ำ (hydrophilic surface) มากขึ้น เพื่อลดการเกิด hydrophobic force ระหว่างโปรตีนและพื้นผิว และเพื่อเพิ่มค่า EOF ให้สูงขึ้นและคงที่

ในการศึกษาวิจัยใน Part A ของงานวิจัยนี้มีแนวคิดที่จะดัดแปรพื้นผิว PDMS ด้วย polyelectrolyte multilayers (PEMs) โดยใช้เทคนิค layer-by-layer self assembly ซึ่งอาศัยแรงดึงดูดระหว่างประจุบวก และประจุลบที่ปรากฏอยู่บนสายพอลิเมอร์ ชนิดของ polyelectrolyte และความหนาแน่นของประจุของ polyelectrolyte จะส่งผลต่อความชอบน้ำและค่า EOF รวมทั้ง interaction ระหว่างโปรตีนและ modified พื้นผิว ในการศึกษาครั้งนี้เลือกศึกษาฟิล์ม PEMs 2 ระบบ คือ ระบบของ poly(diallyl dimethyl ammonium chloride) (PDADMAC)/poly(sodium 4-styrenesulfonate) (PSS) ซึ่งจัดเป็น strong polyelectrolyte และระบบของ chitosan/alginate ซึ่งเป็น weak polyelectrolyte โดยจากงานวิจัยได้ศึกษาผลของความเข้มข้น จำนวนชั้น เคลือบ และชนิดของประจุที่อยู่ชั้นบนสุดต่อค่า EOF ความชอบน้ำ และการดูดซับของ bovine serum albumin (BSA) ซึ่งการศึกษาส่วนหลังนี้จะทำการศึกษาค่าผลของ pH ของสารละลาย BSA ต่อการดูดซับ BSA ด้วย นอกจากนี้ได้ศึกษาผลของการสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนต่อการคืนกลับของสมบัติไม่ชอบน้ำของพื้นผิว PDMS ที่ดัดแปร

จากงานวิจัยนี้พบว่า PEMs ทั้งสองระบบสามารถเคลือบติดบน PDMS ในการศึกษาความชอบน้ำของ พื้นผิวที่ดัดแปรพบว่า พื้นผิวที่ดัดแปรด้วย chitosan/alginate สามารถปรับปรุงพื้นผิวให้มีความชอบน้ำมากกว่า ระบบ PDADMAC/PSS ในจำนวนชั้นเคลือบที่เท่ากัน แต่ในทั้งสองระบบสามารถเพิ่มความชอบน้ำให้แก่พื้นผิว PDMS ได้ และความชอบน้ำเพิ่มขึ้นเมื่อจำนวนชั้นเคลือบเพิ่มขึ้นในทั้งสองระบบ นอกจากนี้ PEMs ที่มี PSS อยู่ ชั้นนอกสุดพบว่าสามารถเพิ่มความชอบน้ำได้มากกว่า PDADMAC และเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาค่า EOF พบว่า PDMS ที่ดัดแปรด้วย PEMs ระบบ PDADMAC/PSS นั้นให้ค่า EOF ที่สูงและมีความเสถียรต่อจำนวนครั้ง การทดลองดีกว่า PDMS ที่มีได้ดัดแปร โดยเมื่อชั้นนอกสุดเป็น PSS ให้ค่า EOF ที่มากกว่า PDADMAC โดย ทิศทางของ EOF สามารถควบคุมด้วยชนิดของ polyelectrolyte ที่อยู่ชั้นนอกสุด ที่สำคัญในการเคลือบเพื่อให้ได้ พื้นผิวที่มีความชอบน้ำมากที่สุด จำเป็นต้องเคลือบพื้นผิวให้มีความหนาอย่างน้อย 8 ชั้น ซึ่งต่างจากค่า EOF ซึ่ง สามารถเคลือบด้วยชั้นที่น้อยกว่าได้

ในการศึกษาผลของชนิดของ polyelectrolyte ต่อการดูดซับของ BSA บนพื้นผิวที่ดัดแปรพบว่า ณ pH 5 และ 7.4 ระบบ PDADMAC/PSS สามารถควบคุมการดูดซับของโปรตีนได้ โดย BSA สามารถเกาะติดบนพื้นผิวที่ผิวชั้นนอกสุดเป็น PDADMAC ถึงแม้ว่าพื้นผิวนี้จะมีค่าความชอบน้ำที่ต่ำกว่า ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแรงดึงดูดทางประจุ หรือการเกิดแรงผลักระหว่างที่น้อยกว่าสำหรับการศึกษาที่ pH 5 สำหรับพื้นผิวดัดแปรที่มี PSS เป็นชั้นนอกสุดพบว่าสามารถลดการดูดซับของ BSA ได้โดยเฉพาะที่ pH 5 ซึ่ง BSA สามารถถูกดูดซับบนพื้นผิว PDMS ที่มีได้ดัดแปรได้มากที่สุด ผลของ PEMs ระบบ chitosan/alginate ต่อการดูดซับของ BSA ณ pH 7.4 ซึ่งสูงกว่า pKa ของ chitosan ซึ่งพบว่า BSA ไม่สามารถดูดซับอยู่บนพื้นผิวที่มี chitosan อยู่ชั้นนอกสุดได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแรงดึงดูดทางประจุระหว่างที่น้อยลง หรืออาจจะเกิดการหลุดออกของชั้น PEMs นี้ ในการสกัด PDMS ด้วยเฮกเซนพบว่าแนวทางนี้ไม่มีผลต่อการลดการคืนกลับของความไม่ชอบน้ำอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างชิ้นงานที่ผ่านและไม่ผ่านการสกัดด้วยเฮกเซน ผลการวิจัยพบว่าฟิล์ม PEMs ระบบ PDADMAC/PSS เหมาะที่จะนำมาใช้ในการเป็น preconcentration layer ใน microfluidic device เมื่อควบคุมให้ชั้น PDADMAC เป็นชั้นนอกสุด หรือในทางกลับกันเมื่อควบคุมให้พื้นผิวชั้นนอกสุดเป็น PSS สามารถลดการดูดซับของโปรตีนใน microchannel และเพิ่มค่า EOF ได้

นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการตรวจหาปริมาณ albumin โดยใช้ microelectrode ที่เตรียมจาก gold nanoparticles ที่ได้พัฒนาขึ้นโดยคณะผู้วิจัย โดยใช้เทคนิค layer-by-layer และ flow deposition ซึ่งเป็นเทคนิคการเตรียม electrode ขนาดเล็กที่ง่าย ราคาถูก โดยทำการติดตามการเปลี่ยนแปลงการนำไฟฟ้ากับความเข้มข้นของ albumin ซึ่งพบว่าสามารถตรวจหาได้ ในรายงานวิจัย Part B โดยงานวิจัยส่วนนี้ได้ปรับออกจากแผนงานวิจัยเนื่องจากประสบปัญหาเครื่องมือตรวจวัด

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาของปัญหาและความสำคัญ

Microfluidic device, microchip หรือ micro total analysis system (μ TAS) เป็นเทคนิคการแยกหรือระบบปฏิบัติการขนาดเล็กที่มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากเทคนิคการวิเคราะห์ที่ใช้ปริมาณสารน้อยในระดับไมโครสเกล และเวลาในการวิเคราะห์ที่สั้น¹⁻⁴ polydimethylsiloxane (PDMS) เป็นหนึ่งในวัสดุที่นิยมใช้เนื่องจากสามารถเตรียมได้ง่าย ทำได้เอง ราคาถูก ไม่ดูดกลืนแสงช่วง visible และมีความเป็นพิษน้อย²⁻⁴ อย่างไรก็ตามปัญหาที่สำคัญคือการเกิดฟองอากาศขึ้นภายใน channel, ค่า electroosmotic flow (EOF) ที่ต่ำและไม่คงที่⁵ ซึ่งส่งผลกระทบต่อกระบวนการนำพาสารเข้าสู่การแยก และการดูดซับของสารชีวโมเลกุลเช่น โปรตีนบนพื้นผิวที่ไม่ชอบน้ำของ PDMS โดยผ่าน hydrophobic interaction⁶ โดยปัจจัยเหล่านี้ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการตรวจวัดสารชีวโมเลกุลลง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการปรับปรุงพื้นผิวของ microchannel ใน PDMS microfluidic device ให้มีความชอบน้ำมากขึ้น ที่ผ่านมามีการรายงานวิธีการปรับปรุงพื้นผิว PDMS โดยใช้แสงยูวี⁷⁻⁹ พลาสมา¹⁰ และการปรับปรุงทางเคมี^{11, 12} ซึ่งข้อเสียคือความเสถียรภาพของพื้นผิวที่ปรับปรุงด้วยวิธีเหล่านี้มีความเสถียรที่ค่อนข้างสั้น¹³ และต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาแพง หรือมีขั้นตอนในการเตรียมชิ้นงานมาก นอกจากนี้ยังมีรายงานการปรับปรุงพื้นผิวด้วยวิธี dynamic modification โดยเคลือบพื้นผิวด้วยสารลดแรงตึงผิว เช่น n-dodecyl-b-D-maltoside (DDM) เพื่อลดการดูดซับของโปรตีนบนพื้นผิวของ PDMS อย่างไรก็ตามแนวทางการแก้ปัญหาดังกล่าวยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจาก noise สูง

เทคนิค layer-by-layer assembly ของ polyelectrolyte เป็นอีกวิธีที่มีการนำมาใช้ในการดัดแปรพื้นผิว PDMS ให้มีความชอบน้ำมากขึ้น ฟิล์มที่เตรียมได้โดยวิธีนี้เรียกว่า polyelectrolyte multilayer ซึ่งเกิดจากแรงดึงดูดระหว่างประจุบวกและประจุลบที่ปรากฏอยู่บนสายพอลิเมอร์ เทคนิคนี้เป็นวิธีการเตรียมฟิล์มที่ง่าย ฟิล์มที่ได้มีความเสถียร โดยชนิดของ polyelectrolyte และ pH ของบัฟเฟอร์ที่ใช้จะส่งผลต่อประจุบนพื้นผิวที่เคลือบด้วย PEMs และการดูดซับโปรตีนของโปรตีนบนพื้นผิวที่ดัดแปรแล้ว จากการศึกษาพบว่าปัจจัยที่สำคัญในการดูดซับของโปรตีนขึ้นอยู่กับชนิดของประจุของชั้นเคลือบนอก เพื่อควบคุมการเกาะติดของโปรตีน bovine serum albumin (BSA) บนพื้นผิวหลายชนิด¹⁴⁻¹⁶

ในงานวิจัยนี้จึงมุ่งแก้ปัญหาทั้ง 2 ประการ โดยการเพิ่มความชอบน้ำด้วยการเคลือบพื้นผิวของ microchannel ด้วย polyelectrolyte multilayer (PEMs) ที่สามารถควบคุมการดูดซับโปรตีนบนพื้นผิวของฟิล์มบาง และเพิ่มค่า EOF ให้มีค่าสูงขึ้นและคงที่ เป็นแนวทางในการแก้ปัญหาในครั้งนี้ พื้นผิวที่ดัดแปรนี้จะส่งผลให้พื้นผิวของ PDMS มีประจุ และสามารถกำหนดได้ว่าจะให้พื้นผิวชั้นนอกมีประจุบวกหรือลบ

ในงานวิจัยครั้งนี้แบ่งการศึกษาเป็นสองส่วน โดยส่วนที่หนึ่งเป็นการศึกษาผลของการดัดแปรพื้นผิว PDMS ด้วยฟิล์ม polyelectrolyte multilayer (PEMs) ต่อค่า EOF, สมบัติความชอบน้ำของ PDMS microfluidic device และการดูดซับของโปรตีน bovine serum albumin (BSA) บนพื้นผิว PDMS ได้ รวมทั้งศึกษาผลของการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการคืนกลับของสมบัติความชอบน้ำของพื้นผิวที่ดัดแปรไป โดยเลือกใช้คู่ polyelectrolyte สองคู่คือคู่ PDADMAC/PSS ซึ่งเป็นคู่ strong polyelectrolyte^{17, 18} และคู่ chitosan/alginate ซึ่งเป็นคู่ weak polyelectrolyte¹⁹⁻²² ถึงแม้ว่าจะมีการรายงานการใช้คู่ polyelectrolyte ทั้ง

สองนี้ในการสร้างเป็นฟิล์ม PEMS บนพื้นผิวหลายชนิด อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาพื้นผิวทั้งสองชนิดนี้บน PDMS microfluidic device เพื่อพัฒนาค่า EOF และ ควบคุมการดูดซับของโปรตีน

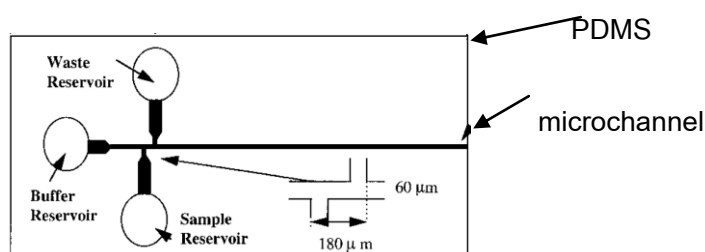
ในส่วนที่สองเป็นการพัฒนา microelectrode เพื่อตรวจวัดความเข้มข้นของ albumin ด้วยการวัดค่าการนำไฟฟ้า โดยขั้วไฟฟ้านี้เตรียมจาก gold nanoparticles และใช้เทคนิค layer by layer ร่วมกับเทคนิค flow deposition ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายต่อการเตรียม และสามารถเตรียมเป็นรูปแบบต่างๆ ได้ ซึ่งงานส่วนนี้ได้ปรับออกจากระเบียบงานวิจัยที่ได้เสนอไว้เนื่องจากทางคณะผู้วิจัยประสบปัญหาในการแยกโปรตีนใน microfluidic device ที่ได้ดัดแปรพื้นผิวด้วย PEMS

1.2 วัตถุประสงค์ (มีการปรับเปลี่ยนไปจากโครงร่างที่ได้เสนอไว้)

1. ศึกษาผลของความเข้มข้นของ polyelectrolyte จำนวนชั้นที่เคลือบ ต่อความชอบน้ำ, ค่า electroosmotic flow (EOF) และเสถียรภาพของ PEMS ที่เคลือบบนพื้นผิว microchannel บน PDMS microchip
2. ศึกษาผลของชนิด polyelectrolyte, จำนวนชั้นเคลือบตลอดจนผลของ pH ต่อ ความชอบน้ำ การดูดซับของ BSA
3. ประยุกต์ microelectrode ที่เตรียมจาก gold nanoparticles เพื่อเป็นตัวตรวจวัดใน microfluidic device ในการวัดปริมาณ BSA

1.3 Microfluidic device และ polydimethylsiloxane (PDMS)

อุปกรณ์ไมโครฟลูอิดิกเป็นอุปกรณ์ที่มีลักษณะเป็นชิปขนาดเล็ก พัฒนาขึ้นเพื่อนำมาทดแทนอุปกรณ์เครื่องมือใหญ่ในการวิเคราะห์ หรือแยกสาร โดยทั่วไปอุปกรณ์ไมโครฟลูอิดิกประกอบด้วยแผ่นวัสดุ 2 แผ่นประกบกันอยู่ ซึ่งแผ่นวัสดุนี้จะเตรียมจากแก้ว หรือพอลิเมอร์ขึ้นอยู่กับจุดประสงค์การใช้งาน โดยปกติแผ่นหนึ่งจะมีส่วนของช่องแยกสารที่มีขนาดเล็กประมาณ 50 ถึง 100 ไมครอน และช่องเก็บสารต่างๆ อยู่ ในขณะที่อีกแผ่นจะเป็นแผ่นที่ไม่มีรูปแบบใดๆ ซึ่งโดยทั่วไปนั้นชิปจะประกอบด้วยองค์ประกอบหลักดังรูปที่ 1.1



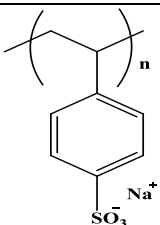
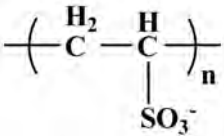
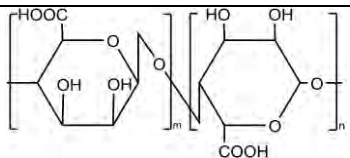
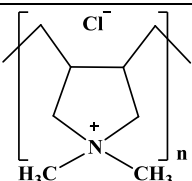
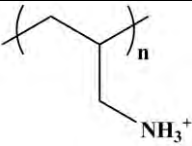
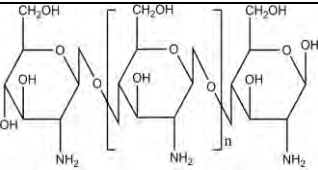
รูปที่ 1.1 องค์ประกอบหลักของอุปกรณ์ไมโครฟลูอิดิก²³

Polydimethylsiloxane (PDMS) เป็นพอลิเมอร์ชนิด organosilicon PDMS เตรียมจากการผสมพอลิ (เมทิลไฮล๊อกเซลไฮโดรเจน) (PHMS, siloxane oligomers) และพอลิ (เมทิลไฮล๊อกเซลไวนิล) (PMVS) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมขวาง (siloxane cross-linkers)²⁴

1.4 พอลิอิเล็กโทรไลต์ (polyelectrolyte)

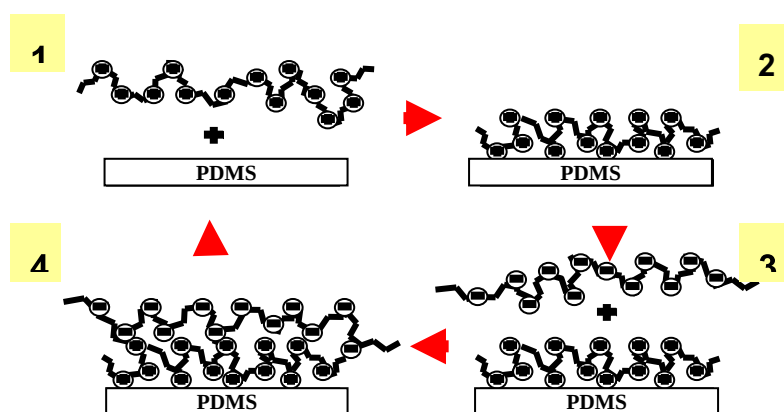
พอลิเมอร์ที่ประกอบขึ้นมาจากโมโนเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันที่มีประจุ เช่น ซัลโฟเนต ($-\text{SO}_3^-$) คาร์บอกซีเลต ($-\text{COO}^-$) หรือ ควอเตอร์นารีแอมโมเนียม ($-\text{NR}_3^+$) เป็นต้น polyelectrolyte นี้สามารถจำแนกเป็นกลุ่มได้หลายลักษณะ เช่น แบ่งตามชนิดประจุบวก หรือลบ หรือเป็น polyelectrolyte ที่ได้จากการสังเคราะห์หรือเกิดตามธรรมชาติ และ strong หรือ weak polyelectrolyte ตัวอย่างเช่น chitosan และ alginate เป็น polyelectrolyte ที่เกิดตามธรรมชาติ เป็น polysaccharide ชนิดหนึ่งที่ใช้ในการสร้าง PEMs และเป็น weak polyelectrolyte โดย chitosan เตรียมมาจากไคติน มีหมู่ amino group ซึ่งมีค่า $pK_a = 6.3$ และ alginate มีค่า $pK_a = 3.5$ ²⁵ ตารางที่ 1.1 แสดงตัวอย่างของ polyelectrolyte

ตารางที่ 1.1 แสดงตัวอย่างของ polyelectrolyte

โครงสร้าง	ชื่อ	Ionic type	Classification
	Poly(sodium 4-styrene sulfonate)	Anionic	strong
	Poly(vinyl sulfonic acid)	Anionic	strong
	Alginate	Anionic	weak
	Poly(diallyldimethyl ammonium chloride)	Cationic	strong
	Poly(allylamine hydrochloride)	Cationic	weak
	Chitosan	Cationic	weak

1.5 พอลิอิเล็กโทรไลต์มัลติเลเยอร์ (Polyelectrolyte multilayers, PEMs)

Polyelectrolyte multilayer เป็นวิธีที่ใช้กันทั่วไปในการปรับเปลี่ยนพื้นผิวหลายชนิด รวมทั้ง PDMS เนื่องจากเป็นวิธีการเตรียมที่ง่าย ค่าใช้จ่ายต่ำ โดยฟิล์มบางหลายชั้นนี้สร้างโดยเคลือบชั้นของพอลิอิเล็กโทรไลต์ประจุลบ (polyanions) และพอลิอิเล็กโทรไลต์ประจุบวก (polycations) สลับกันลงบนพื้นผิวของวัสดุชนิดหนึ่ง โดยแรงที่เกิดขึ้นระหว่างพอลิเมอร์ 2 ชนิดคือ แรงดึงดูดทางไฟฟ้า (electrostatic Interaction) ดึงกันเอาไว้ทำให้เกิดเป็นลักษณะที่เรียกว่า layer-by-layer method ซึ่งอธิบายได้ดังรูปที่ 1.2 โดยขั้นตอนทำการจุ่มวัสดุที่ต้องการเคลือบลงในสารละลาย polyanion ซึ่ง polyanionic จะไปจับกับผิว (ชั้นที่ 1) แล้วทำการล้างพื้นผิวนั้นด้วยน้ำหรือสารละลายบัฟเฟอร์ขึ้นกับชนิดของ polyelectrolyte เพื่อล้างส่วนเกินออกซึ่งขั้นตอนการล้างเป็นขั้นตอนที่สำคัญในกระบวนการสร้าง PEMs หลังจากนั้นทำการจุ่มชิ้นงานลงในสารละลาย polycation เป็นการสร้างฟิล์มชั้นที่สอง แล้วทำการล้างชิ้นงานด้วยน้ำหรือสารละลายบัฟเฟอร์อีกครั้ง โดยสามารถทำซ้ำในขั้นตอนในการจุ่มนี้ได้เรื่อยๆ ขึ้นอยู่กับจำนวนชั้นที่ต้องการสร้าง



รูปที่ 1.2 ภาพจำลองการเกิด polyelectrolyte multilayer บน PDMS โดย Layer-by-layer method

1.5.1 ตัวแปรที่มีผลต่อการเตรียม PEMs^{26, 27}

ตัวแปรที่มีผลต่อการเตรียมชั้นฟิล์มได้แก่ ชนิดของ polyelectrolyte ความเข้มข้นของสารละลาย polyelectrolyte และ sodium chloride, pH ของสารละลาย จำนวนชั้น โดยจำนวนชั้นของ PEMs นี้มีผลต่อความหนาและความสามารถในการเคลือบพื้นผิวให้ทั่วถึง ซึ่งพบว่าจำนวนชั้นที่มากขึ้นทำให้ความหนาของ PEMs เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ สารละลาย polyelectrolyte และ sodium chloride ขึ้น ส่งผลให้ฟิล์มหนาเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อความเข้มข้นของสารละลาย sodium chloride มีค่ามากกว่า 2 M พบว่าเกิดการหลุดออกของชั้น PEMs

ค่า pH สามารถควบคุมการเจริญเติบโตของฟิล์ม PEMs ได้ โดยเฉพาะฟิล์มของระบบที่เตรียมจาก weak polyelectrolyte เนื่องจากค่า pH จะมีผลต่อการแตกตัวเป็นประจุบนพอลิเมอร์ ซึ่งส่งผลกระทบต่อ การดูดซับของ weak polyelectrolyte บนพื้นผิว ความหนา และการเตรียมชั้นฟิล์ม ดังนั้นลักษณะของฟิล์ม PEMs นี้สามารถควบคุมด้วย pH ของสารละลาย weak polyelectrolyte^{26, 28}

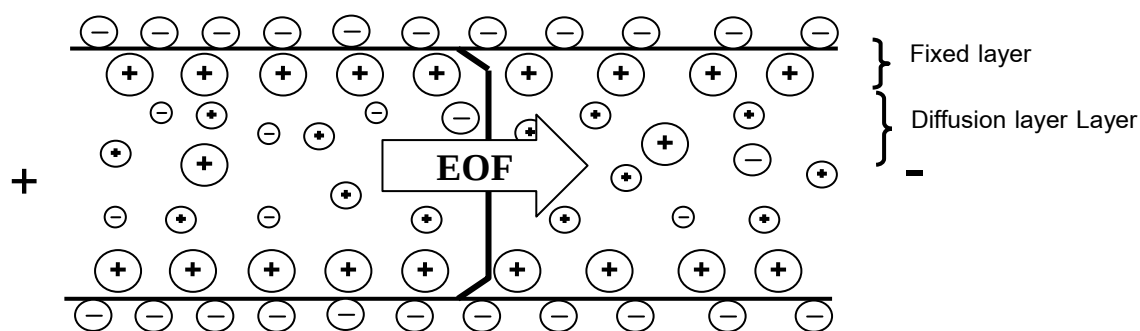
นอกจากนี้เวลาในการจุ่มชิ้นงานกับสารละลาย polyelectrolyte โดยในกระบวนการสร้างชั้น PEMs นั้นจะประกอบด้วยเวลาที่ polyelectrolyte เกิดการแพร่จาก bulk solution เข้าสู่พื้นผิว และเวลาที่สัมผัสและสร้าง

พันธะกับพื้นผิว ดังนั้นเวลาที่จุ่มชิ้นงานลงในสารละลาย polyelectrolyte ซึ่งจะครอบคลุมเวลาทั้งสองชั้นนี้เป็นหนึ่งในตัวแปรที่ควบคุมการสร้าง PEMs อย่างไรก็ดีตามตัวแปรนี้มีผลค่อนข้างน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับตัวแปรอื่นๆ

1.6 Electroosmotic flow (EOF)

Electroosmotic flow นี้เป็นการไหลเฉพาะของเทคนิค electrophoresis โดยเมื่อพื้นผิวด้านในมีประจุลบและสัมผัสกับสารละลายตัวกลางซึ่งจะดึงดูดไอออนบวกจากสารละลายตัวกลางมาเกาะที่ผิวเกิดเป็น 2 ชั้น (double layers) คือชั้นของไอออนที่เกาะติดแน่นกับผิว microchannel ที่เรียกว่า fixed layer หรือ stern layer ซึ่งจะไม่เคลื่อนที่เนื่องจากอิทธิพลของแรงไฟฟ้าสถิต และชั้นของที่เกาะอย่างหลวมๆ ที่เรียกว่า diffuse layer เมื่อให้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ปลายสองข้างของ microchannel ประจุบวกในชั้น diffuse layer ก็เคลื่อนไปยังขั้วแคโทดซึ่งเป็นขั้วลบ และประจุบวกมีน้ำล้อมรอบจึงพาเอาน้ำไปออกไปด้วย เกิดเป็นกระแสของสารละลายตัวกลางเคลื่อนที่จากปลายด้านแอโนดซึ่งเป็นขั้วบวกไปยังปลายขั้วลบ เรียกว่า normal mode ดังแสดงในรูปที่

1.3



รูปที่ 1.3 Electroosmotic flow²⁹

Zeta potential (ζ) เป็นตัวแปรที่มีผลต่อค่าของ EOF ดังสมการที่ 2 โดยค่านี้ขึ้นอยู่กับประจุบนพื้นผิว

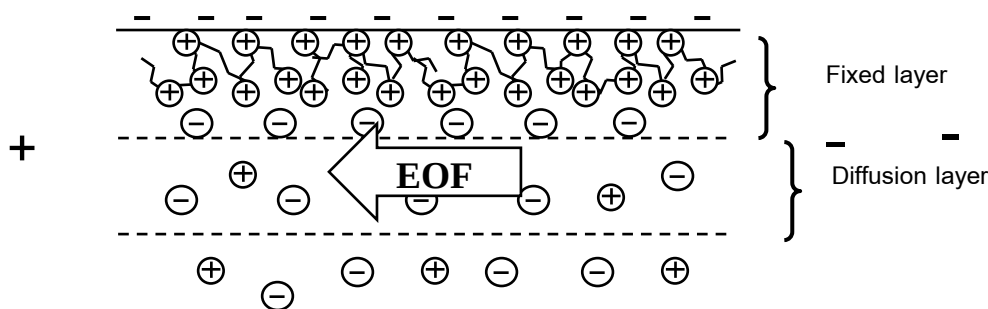
$$\mu_{EOF} = \frac{\zeta \epsilon}{4\pi\eta} \quad (2)$$

η คือ ความหนืดของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ ϵ คือ ค่า Dielectric constant ของสารละลายบัฟเฟอร์

ζ คือ Zeta potential

1.6.1 การกลับทิศทางการไหลของ EOF (Reversed EOF mode)

การเคลื่อนที่ของ EOF ใน mode นี้จะเป็นการเคลื่อนที่จากขั้วลบ ไปขั้วบวกซึ่งเกิดจากประจุบนพื้นผิวภายใน microchannel เป็นประจุบวก ซึ่งสามารถทำได้โดยการเติมสารลดแรงตึงผิวแคทไอออน (cationic surfactant) ลงในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ หรือการเคลือบพื้นผิวภายในด้วย polycationic เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้า ไอออนลบจะเคลื่อนที่ไปทางขั้วบวก ทำให้เกิดการไหลของ EOF ในทิศทางตรงข้ามกับปกติทั่วไป ดังรูปที่ 1.4



รูปที่ 1.4 การเกิด reversed electroosmotic flow

1.6.2 ปัจจัยที่มีผลต่อค่า EOF

1. pH ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์: การลด pH ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์จะมีผลต่อประจุบนพื้นผิวภายใน ส่งผลให้ EOF ลดลง
2. ความแรงไอออนิกของสารละลายอิเล็กโทรไลต์: ถ้าเพิ่มความแรงไอออนิกของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ ทำให้ EOF ลดลง
3. ปัจจัยอื่นๆ เช่น ความหนืด อุณหภูมิ Joule heating ขนาดของ channel และ ความเข้มข้นของสนามไฟฟ้า มีผลต่อ EOF

1.7 Current monitoring method³⁰

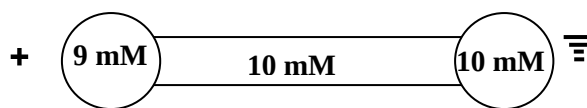
วิธี current monitoring เป็นวิธีวัดค่า EOF โดยวัดเวลาที่สารละลายอิเล็กโทรไลต์ใช้ในการเคลื่อนที่จาก reservoir หนึ่งไปยังอีก reservoir หนึ่ง โดยวัดเวลาที่ศักย์ไฟฟ้าเปลี่ยนจากค่าคงที่ค่าหนึ่งไปยังค่าคงที่อีกค่าหนึ่ง ซึ่งเกิดจากการแทนที่ของสารละลายอิเล็กโทรไลต์ที่มีความเข้มข้นหนึ่งใน channel ด้วยสารละลายอีกความเข้มข้นหนึ่ง ดังนั้นระยะเวลาที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงกระแสไฟฟ้าไปยังค่าใหม่ก็คงที่ถือว่าเป็นเวลาที่สารละลายบัฟเฟอร์เดินทางจากปลายด้านหนึ่งไปยังอีกด้านหนึ่ง สามารถเขียนเป็นสมการการคำนวณได้ ดังนี้

$$\mu_{EOF} = \frac{L^2}{V \cdot t} \quad (1)$$

L = ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (cm)

V = ค่าความต่างศักย์ (volt)

t = เวลาที่สารใช้ในการเคลื่อนที่จากปลาย microchannel ข้างหนึ่งมายังอีกข้างหนึ่ง (sec)

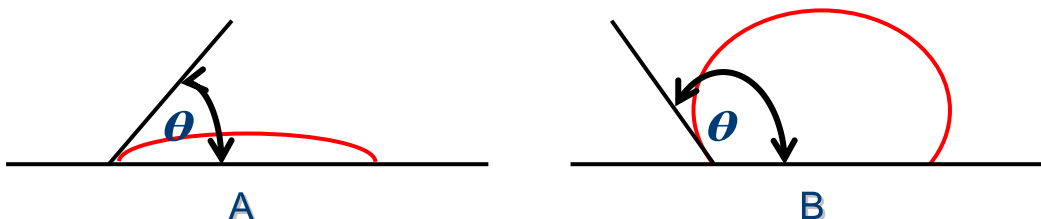


รูปที่ 1.5 แสดงการเติมสารละลายในการทำ Current Monitoring Method

จากรูปที่ 1.5 เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้า สารละลายบัฟเฟอร์ 9 mM จะเคลื่อนที่ไปตาม microchannel แทนที่ความเข้มข้น 10 mM ส่งผลให้กระแสที่ได้มีค่าลดลง เมื่อกระแสมีค่าคงที่แสดงว่า สารละลาย 9 mM ได้เคลื่อนที่ไปยังอีกด้านแล้ว (t)

1.8 มุมสัมผัส (Contact angle)

มุมสัมผัส คือ มุมที่เกิดจากการสัมผัสของของเหลวบนพื้นผิวของของแข็งและอยู่ในสมดุล โดยวัดมุมที่อยู่ในของเหลว ดังรูปที่ 1.6 โดยมุมสัมผัสระหว่างหยดน้ำและพื้นผิวสามารถนำมาระบุความชอบและไม่ชอบน้ำของพื้นผิวได้ (hydrophilicity-hydrophobicity) เมื่อมุมสัมผัส (θ) มีค่าน้อย (ใกล้ 0 องศา) แสดงว่าพื้นผิวนั้นมีความชอบน้ำมากกว่าพื้นผิวที่ให้มุมสัมผัสที่มากกว่า (ใกล้ 180 องศา)



รูปที่ 1.6 มุมสัมผัสและการเปียก A) แสดงตัวอย่างพื้นผิวที่เกิดการเปียก, B) แสดงตัวอย่างพื้นผิวที่ไม่เกิดการเปียก

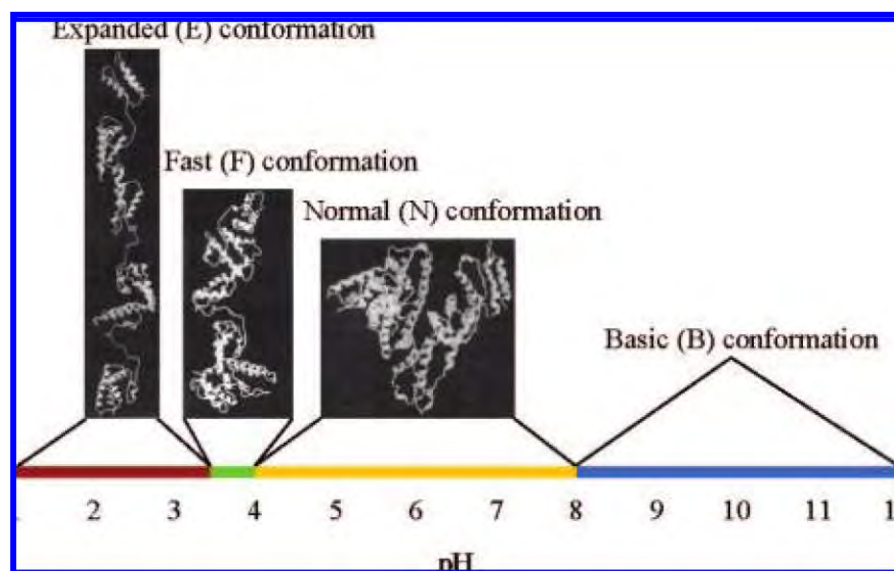
1.9 การดูดซับของโปรตีน (Protein adsorption)

โปรตีนเป็นพอลิเมอร์ของกรดอะมิโนซึ่งยึดเหนี่ยวกันด้วยพันธะเพปไทด์ และสามารถเกิดพันธะภายในสายพอลิเมอร์ผ่านแรงต่างๆ โครงสร้างของโปรตีนมีสี่ระดับ ได้แก่ โครงสร้างปฐมภูมิซึ่งเป็นโครงสร้างที่แสดงถึงลำดับของกรดอะมิโนแต่ละชนิดและจำนวนโมเลกุลของกรดอะมิโน โครงสร้างทุติยภูมิเป็นโครงสร้างที่เกิดจากการขดหรือม้วนตัวของโครงสร้างปฐมภูมิ เช่น α -helices หรือ β -sheets โครงสร้างตติยภูมิจะเกิดจากการรวมตัวกันของโครงสร้างทุติยภูมิด้วยแรงยึดเหนี่ยวอ่อนๆ เป็นรูปร่างสามมิติ โดยโครงสร้างตติยภูมิของโปรตีนแต่ละชนิดมีลักษณะจำเพาะขึ้นอยู่กับลำดับของกรดอะมิโนในสายพอลิเพปไทด์ และโครงสร้างจตุรภูมิ

1.9.1 ตัวแปรที่มีผลต่อการดูดซับของโปรตีน

1. โครงสร้าง (conformation) ของ bovine serum albumin นั้นพบว่ามีผลต่อการดูดซับของโปรตีนบนพื้นผิวเนื่องจากจะมีผลต่อประจุภายนอก และขนาด โดยโครงสร้างของโปรตีนนั้นเปลี่ยนแปลงตามค่า

pH ของสารละลายโดย ณ pH ที่เป็นกรดสูง ($\text{pH} < 2.7$) พบว่าโครงสร้างของโปรตีนจะยืดออก จัดอยู่ในรูปของ expanded conformation (E-form) และเมื่อ pH สูงขึ้นประมาณ 4.3 พบว่าโครงสร้างของโปรตีนจะอยู่ในรูป fast conformation (F-form) ณ pH ที่เป็นกลาง พบว่าโปรตีนจะอยู่ในรูปของ normal form (N-form) โครงสร้างของโปรตีนจะอยู่ในรูปของ basic conformation (B-form) เมื่ออยู่ในสารละลายที่มี pH มากกว่า 8³¹



รูปที่ 1.7 BSA conformation ณ pH ต่างๆ³²

2. ชนิดของแรงกระทำระหว่างโปรตีน และพื้นผิวสัมผัส

แรงดึงดูดที่มีผลต่อการดูดซับของโปรตีน ได้แก่ hydrophobic interaction ซึ่งจัดเป็นแรงหลักที่เกิดขึ้นระหว่างโปรตีนและพื้นผิวที่ไม่มีขั้ว ซึ่งส่งผลให้เกิดการดูดซับบนพื้นผิวของ PDMS ได้ ซึ่งพบว่าแรงนี้ทำให้เกิดการดูดซับของโปรตีนที่ pI ได้^{33, 34} นอกจากนี้ electrostatic interaction แรงนี้จะเกิดขึ้นระหว่างโปรตีนกับพื้นผิวที่มีประจุ การดูดซับของโปรตีนบนพื้นผิวยังสามารถเกิดจาก hydrogen bonding ระหว่าง hydroxyl-carbonyl group, amide-carbonyl radicals หรือ amide-hydroxyl bonds

3. Ionic strength

ค่า ionic strength มีผลต่อแรงกระทำระหว่างโปรตีนกับพื้นผิว³⁵ และแรงกระทำระหว่างโปรตีน-โปรตีน โดยพบว่าแรงดึงดูดทางประจุระหว่างพื้นผิวกับโปรตีนจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือมากขึ้น

1.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การพัฒนาพื้นผิวของ PDMS ด้วยเทคนิค layer by layer ของ polyelectrolyte ได้มีการพัฒนาอย่างมากเพื่อใช้งานต่างกัน ได้มีการรายงานถึงการศึกษาที่ดัดแปรพื้นผิวเพื่อมุ่งปรับปรุงค่า electroosmotic flow หรือ EOF ให้มีค่าที่ดีขึ้นนั้น Liu และคณะ³⁰ ได้ปรับปรุงพื้นผิวบนไมโครชิพแซนเนลให้มีค่า EOF ที่ดีขึ้น โดยใช้การสร้าง PEMs จาก polyelectrolyte 2 ชนิด คือ polybrene และ dextran sulfate (DS) บนไมโครชิพที่ทำจาก

PDMS พบว่าการเคลือบ PB/DS เพียง 2 ชั้นส่งผลให้ค่า EOF มีความคงที่มากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับใน channel เปล่า และการเคลือบ PB/DS นี้ยังช่วยเพิ่มอายุการใช้งานของ microchip ได้มากกว่า 100 รอบ นอกจากนี้ได้มีการเคลือบผิวชั้นในของ microchannel ด้วย คู่ poly(allyl amine hydrochloride, PAH) และ PSS ซึ่งพบว่าค่า EOF สูงขึ้นเช่นกัน³⁶ นอกจากนี้ได้มีการศึกษา PEMs ระบบ PDADMAC/PSS เคลือบใน microchannel เพื่อเพิ่มเสถียรภาพของค่า EOF เช่นกัน ซึ่งสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการแยกของ uric acid และ ascorbic acid³⁷

Makamba และคณะ ได้ทำพัฒนาวิธีการดัดแปรพื้นผิว PDMS ให้มีความชอบน้ำโดยใช้เทคนิค layer by layer และการ crosslinked modified PEMs ของ poly(ethyleneimine) และ poly(acrylic acid) และการทำปฏิกิริยากับ poly(ethylene glycol) โดยพบว่าพื้นผิวนี้นสามารถรักษาความชอบน้ำได้นานถึง 77 วัน ในอากาศและสามารถต้านทานการดูดซับโปรตีนได้เป็นอย่างดี³⁸ Yuan และคณะ ได้รายงานภาวะในการสร้าง PEMs ของ polyelectrolyte คู่ chitosan/alginate โดยสมบัติของพื้นผิว ความหนาของชั้นฟิล์มสามารถควบคุมได้โดยควบคุม pH ของสารละลาย polyelectrolyte ในขั้นตอนการเตรียม โดยพบว่าความหนาลดลงเมื่อ pH ของ alginate เพิ่มขึ้น โดยควบคุมให้ pH ของ chitosan เท่ากับ 3 ที่สำคัญในงานวิจัยนี้พบว่า PEMs ที่มี chitosan เป็นชั้นนอกสุดมีความชอบน้ำมากกว่าชั้นที่มี alginate อยู่ชั้นนอกสุด²¹ Martins และคณะได้รายงานถึงความชอบน้ำของ PEMs ระบบนี้เช่นเดียวกัน¹⁹

การดูดซับโปรตีนบนชั้นฟิล์ม PEMs นั้นสามารถเกิดผ่านแรงหลายชนิด โดยเฉพาะแรงดึงดูดระหว่างประจุ ได้มีการศึกษาดัดแปรพื้นผิว PDMS โดยการสร้างเป็นฟิล์ม PEMs จำนวนมาก ในการศึกษาวิจัยเพื่อเพิ่มการดูดซับของโปรตีนบนพื้นผิวนั้น ส่วนใหญ่ทำการปรับปรุงพื้นผิวให้มีประจุตรงข้ามกับประจุบนโปรตีน Salloum และคณะ ได้รายงานถึงประสิทธิภาพของ PEMs ระบบ PDADMAC/PSS ในการเพิ่มการเกาะติดของ BSA ที่ pH 7.4 โดยอาศัยแรงดึงดูดทางไฟฟ้า ทางคณะผู้วิจัยได้พบว่าปริมาณของโปรตีนขึ้นอยู่กับความหนาของชั้นฟิล์ม ในงานวิจัยนี้ได้รายงานถึงการดูดซับของโปรตีนบนพื้นผิวที่มีประจุเหมือนกันได้สามารถเกิดเช่นกัน แต่ในปริมาณที่น้อยกว่าโดยผ่านแรงอื่นๆ แทน¹⁷ เช่นเดียว กับงานวิจัยนี้ที่ได้การดัดแปรพื้นผิวด้วย poly(L-lysine), PLL และ poly(L-glutamic acid)-g-poly(ethylene glycol), PGA-g-PEG พบว่าโปรตีนสามารถดูดซับบนพื้นผิวที่ดัดแปรด้วย poly-L-lysine มากกว่าพื้นผิวที่เคลือบด้วย poly(L-glutamic acid)-g-poly(ethylene glycol) เนื่องจากความเป็นประจุบวก จึงสามารถจับกับโปรตีนที่ pH 7.4 ได้ดี³⁹

ในการพัฒนาชั้นฟิล์มเพื่อลดการดูดซับของโปรตีนนั้น งานวิจัยส่วนมากมุ่งศึกษาเพื่อเพิ่มความชอบน้ำของพื้นผิวหรือทำให้พื้นผิวมีประจุที่เหมือนกับประจุของโปรตีนที่ต้องการศึกษาเพื่อเพิ่มแรงผลักระหว่างประจุ Liu และคณะ⁴⁰ ได้ปรับปรุงพื้นผิวบนไมโครชิพแพลตฟอร์คที่ทำจากแก้วในการตรวจวัด DNA โดยการเคลือบ PB ลงบนพื้นผิวของไมโครชิพแพลตฟอร์ค ผลที่ได้คือ reversed EOF นอกจากนี้การเคลือบ PB นั้นยังช่วยลดการดูดซับของ non-selective ของ oligonucleotides เมื่อทำการทดลองเปรียบเทียบกับ การดูดซับในแพลตฟอร์คเปล่า นอกจากนี้ฟิล์ม chitosan และ methyl-poly(ethylene glycol) บนพื้นผิวของ PDMS ซึ่งพบว่าพื้นผิวที่เตรียมได้มีความสามารถในการต้านทานการดูดซับโปรตีนได้อย่างดีเยี่ยม ทำให้อุปกรณ์ที่เตรียมได้มีความสามารถในการแยกสารได้อย่างมีประสิทธิภาพ⁴¹ นอกจากนี้ได้มีการพัฒนาพื้นผิวที่ลดการเกาะติดของโปรตีนโดยใช้คู่ polyelectrolyte ของ poly(allylamine hydrochloride) (PAH) และ poly(acrylic acid) (PAA)⁴² chitosan และ

alginate เป็น polyelectrolyte ที่มีการใช้อย่างมากในการพัฒนาเตรียมเป็นชั้นฟิล์มที่ลดการดูดซับของโปรตีนบนพื้นผิว^{43, 44}

จากการค้นคว้ายังไม่มียางงานการศึกษาพัฒนาพื้นผิวโดยการสร้างชั้น PEMs ของ PDADMAC/PSS และ chitosan/alginate เพื่อดัดแปรพื้นผิวของ PDMS ที่สามารถเพิ่มหรือลดปริมาณการดูดซับของโปรตีนบนพื้นผิว และช่วยในการรักษาเสถียรภาพของค่า EOF ของ PDMS microfluidic device ได้ ดังนั้นในการศึกษานี้ จึงมุ่งพัฒนาพื้นผิวที่สามารถเคลือบบน PDMS เพื่อเพิ่มความชอบน้ำด้วยฟิล์ม polyelectrolyte multilayer ของระบบ strong และ weak polyelectrolyte

บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 สารเคมี

Sylgard® 184 silicone elastomer kit (บริษัท Dow Corning, USA) polyelectrolyte ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้แก่ poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDADMAC) ($M_w \sim 200,000-350,000$) ความเข้มข้น 20% ในน้ำ, poly (sodium-4-styrene-sulfonate) sodium salt (PSS) ($M_w \sim 70,000$), alginic acid sodium salt, (viscosity of 20.0-40.0 cps.) จากบริษัท Sigma-Aldrich, chitosan ($M_w 57,000$) was purchased from A.N. Lab, Thailand

Bovine serum albumin ($M_w 66,000$ Da) และ bicinchoninic acid protein assay kit จากบริษัท Sigma-Aldrich; sodium chloride (A.R. grade), sodium hydroxide (A.R. grade), sodium acetate trihydrate (A.R. grade), potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) (A.R. grade), disodium hydrogen phosphate anhydrous (Na_2HPO_4) (A.R. grade), sodium phosphate ($Na_3PO_4 \cdot 12 H_2O$) (A.R. grade), sodium borate ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$) (A.R. grade), potassium chloride (KCl, $M_w = 74.55$) จากบริษัท Carlo Erba; potassium chloride (A.R. Grade), phosphoric acid, glacial acetic acid, hexane (HPLC grade), hydrogen peroxide 30% (for synthesis), sulfuric acid 95-99% (A.R. grade) จากบริษัท Merck สารเคมีทั้งหมดที่ใช้ในการทดลองนี้นำมาใช้โดยไม่ได้มีการทำให้บริสุทธิ์อีกครั้ง สารละลายทุกชนิดเตรียมและเจือจางด้วยโดยใช้น้ำที่ผ่านการกำจัดไอออนแล้ว (น้ำ DI) สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาส่วนที่สอง gold (III) chloride trihydrate, 99.9+% ($HAuCl_4 \cdot 3H_2O$, $M_w = 393.83$) และ sodium citrate dehydrate, 99+% ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$, $M_w = 294.1$) จาก Aldrich; sodium borohydride ($NaBH_4$, $M_w = 37.83$) จากบริษัท Labchem, Australia

2.2 เครื่องมือ

เครื่องมือ	รุ่นของเครื่องมือ
1. UV-visible spectrophotometer	Hewlett Packard 8453
2. Standard Contact Angle Goniometer with DROP image standard	Ramé-hart Model 200
3. Zetasizer	Nano ZS, UK
4. pH meter	Precisa pH900
5. Attenuated Total Reflectance Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR)	Nicolet 6700
6. เครื่องกำเนิดไฟฟ้าศักย์แรงสูง	CZE 1000R บริษัท Spellman
7. ดิจิทัลมัลติมิเตอร์	บริษัท Uni-Trend International Limited รุ่น UT 60F interface with computer (การทดลองตอนที่ A.1) และ Nano voltmeter, Keithley Model

	2182A, USA
8. Vacuum Pump	บริษัท Vacuubrand รุ่น ME2
9. Function Generator	GW INSTEK SFG-2110, Taiwan
10. Microscope	MICROS AUSTRIA LILY MCX500, Australia
11 DC และ AC current source	Keithley Model 6221, USA

2.3 การเตรียมสารละลาย

2.3.1 สารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการศึกษานี้ได้แก่ สารละลาย borate buffer ความเข้มข้น 1 mM ที่ pH 9.2; สารละลาย phosphate buffer pH 3, 7 และ 11 โดยในแต่ละ pH ทำการเตรียมที่ความเข้มข้น 9 และ 10 mM ในน้ำ Milli-Q โดยเตรียมที่ pH 3, 7 และ 11; สารละลาย acetic-acetate buffer ความเข้มข้น 1 mM ที่ pH 3.5 และ 5 ใช้ในการศึกษาการดูดซับของโปรตีนในหัวข้อ A.1.7; สารละลาย acetic-acetate buffer ความเข้มข้น 10 mM ที่ pH 4, 5.5 และ 6 ใช้ในการศึกษาหัวข้อ 2.4.1.2; pH 7.4 phosphate buffer saline (PBS) ความเข้มข้นที่เลือกใช้ในการศึกษาคือ 10 mM และ 1 mM

2.3.1.1 PBS 10 mM

ทำการละลาย NaCl 8.0 ± 0.1 g, KCl 0.20 ± 0.01 g, Na_2HPO_4 1.4 ± 0.1 g, และ KH_2PO_4 0.24 ± 0.01 g ด้วยน้ำ DI 800 mL ปรับค่า pH ของสารละลายเป็น 7.4 ด้วย 0.1 M HCl และ 0.1 M NaOH จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 mL ด้วยน้ำ DI⁴⁵

2.3.1.2 PBS 1 mM

ทำการเจือจางสารละลาย PBS เข้มข้น 10 mM 10 เท่า

2.3.2 สารละลาย polyelectrolyte

2.3.2.1 สารละลาย 1 และ 10 mM PDADMAC และ PSS ใน 1 M NaCl

เตรียมโดยเจือจางสารละลาย 100 mM ของ polyelectrolyte ในอัตราส่วนที่เหมาะสม ในสารละลาย 1 M NaCl

2.3.2.2 สารละลาย 5 mM chitosan ใน 1 M NaCl

ขั้นตอนทำการเตรียมสารละลาย stock solution chitosan โดยละลายผง chitosan 1.6 ± 0.1 g ใน 10 mL glacial acetic acid เป็นเวลา 120 นาที เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรประมาณ 800 mL บั่นกวนให้ผง chitosan ละลายหมดโดยทิ้งไว้ข้ามคืน เมื่อ chitosan ละลายหมดแล้วให้ปรับปริมาตรของสารละลายสุดท้ายเป็น 1000 mL ด้วยน้ำ DI

ในการเตรียมสารละลาย 5 mM chitosan ใน 1 M NaCl นั้นทำการละลาย 5.8 ± 0.1 g NaCl ใน 25 mL ของสารละลาย 10 mM acetic-acetate buffer และ 50 mL ของ 10 mM chitosan บั่นกวนให้สารละลายเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นปรับ pH ของสารละลาย chitosan ด้วย 0.1 M NaOH หรือ 0.1 M HCl จึงปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 mL ด้วย acetic-acetate buffer ณ pH นั้นๆ

2.3.2.3 สารละลาย 5 mM alginate ใน 1 M NaCl

ในขั้นต้นทำการเตรียม stock solution ของ alginate โดยละลาย alginic acid sodium salt 2.0 ± 0.1 g ด้วย 800 mL น้ำ DI ปั่นจนจนละลายหมด ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 mL ด้วยน้ำ DI

ในการเตรียมสารละลาย 5 mM alginate นั้นทำการละลาย 5.8 ± 0.1 g NaCl ใน 50 mL ของ 10 mM alginate และ 25 mL ของ 10 mM acetic-acetate buffer คนให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นปรับ pH ด้วย 0.1 M NaOH หรือ 0.1 M HCl แล้วจึงปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 mL ด้วย acetic-acetate buffer ณ pH นั้นๆ

สารละลายทุกชนิดที่ใช้ในการศึกษาใน microfluidic device จะทำการกรองผ่าน Nylon filter $0.2 \mu\text{m}$ ก่อนนำไปใช้

2.3.3 สารละลาย Bovine Serum Albumin (BSA)

สารละลาย BSA ทุกความเข้มข้นเตรียมใน 1 mM ของ สารละลายบัฟเฟอร์ต่างๆ สำหรับทุกการทดลองยกเว้นการศึกษาหัวข้อ A.1.7.1 ซึ่งสารละลาย BSA ละลายใน 10 mM PBS

2.3.4 สารละลาย sodium citrate ความเข้มข้น 30 mM

สารละลาย sodium citrate ความเข้มข้น 30 mM นี้ เตรียมโดยเจือจาง 0.1 M sodium citrate ในอัตราส่วนที่เหมาะสมด้วยน้ำ DI

2.4 วิธีการทดลอง

2.4.1 ศึกษาการสร้างฟิล์มบางบนแผ่นควอตซ์

2.4.1.1 ศึกษาการเตรียมฟิล์มบาง PDADMAC/PSS

การเคลือบติดของแผ่นฟิล์มบางสามารถติดตามได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของฟิล์มบางบนแผ่นควอตซ์โดยใช้เครื่อง UV-vis spectroscopy โดยในขั้นต้นทำความสะอาดแผ่นควอตซ์สไลด์โดยแช่ในสารละลาย piranha ($\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$, 3:1) เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดให้ล้างแผ่นควอตซ์ด้วยน้ำ DI หลายๆ ครั้ง จากนั้นเป่าจนแผ่นควอตซ์แห้ง นำแผ่นควอตซ์ที่ทำความสะอาดแล้วจุ่มในสารละลาย 10 mM PDADMAC ใน 1 M NaCl เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำ DI นาน 2 นาที จำนวน 3 ครั้ง จะได้ฟิล์มบางของ PDADMAC เคลือบบนแผ่นควอตซ์เป็นชั้นที่ 1 จากนั้นนำไปจุ่มในสารละลาย polyelectrolyte ที่มีประจุเป็นลบ 10 mM PSS ใน 1 M NaCl เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำ DI นาน 2 นาที จำนวน 3 ครั้ง จะได้ฟิล์มบางชั้นที่ 2 เคลือบบนแผ่นควอตซ์ ทำการเคลือบฟิล์มบางซ้ำจนได้จำนวนชั้นตามที่ต้องการ ในการวัดค่าการเคลือบติดของฟิล์มบางจะทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของฟิล์มบางที่ความยาวคลื่น 228 nm

2.4.1.2 ศึกษาการเตรียมฟิล์มบาง chitosan/alginate

ในการศึกษาส่วนนี้ เพื่อหา pH ที่เหมาะสมในการสร้างฟิล์มบางหลายชั้นของ chitosan และ alginate ซึ่งเป็น polyelectrolyte ที่มีการแตกตัวเป็นประจุแตกต่างกันไปตามค่า pH ต่างกัน โดยทำการศึกษา chitosan ที่ pH 4 และ 5.5 ในขณะที่ alginate เตรียมที่ pH 5.5 และ 6 ทำการเคลือบฟิล์มบางบนแผ่นควอตซ์โดยเคลือบชั้นที่ 1 ด้วยสารละลาย 5 mM chitosan ใน 1 M NaCl เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างด้วย acetic-acetate buffer ที่ค่า pH เดียวกับสารละลาย chitosan เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเคลือบฟิล์มบางชั้นที่ 2 ด้วยสารละลาย 5 mM alginate ใน 1 M NaCl เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างด้วย acetic-acetate buffer ที่ค่า pH เดียวกับสารละลาย alginate เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง ทำการเคลือบฟิล์มบางซ้ำจนได้จำนวนชั้นตามที่ต้องการ ในการวัดค่าการเคลือบติดของฟิล์มบางจะทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของฟิล์มบางที่ความยาวคลื่น 201 nm

ตารางที่ 2.1 ค่า pH ของสารละลาย chitosan และสารละลาย alginate สำหรับศึกษาการเคลือบฟิล์มบางจาก chitosan และ alginate

pH of chitosan solution	pH of alginate solution
4	5.5
4	6.5
5.5	5.5
5.5	6.5

2.4.2 การหล่อแผ่น PDMS

ผสม PDMS precursor กับ curing agent ในอัตราส่วน 10:1 โดยน้ำหนัก คนส่วนผสมทั้งสองส่วนและนำไปดูดฟองอากาศออกโดยใช้ปั๊มสุญญากาศ เทสารละลาย PDMS ลงบนแม่แบบ (mold) นำไปอบที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น แล้วลอกแผ่น PDMS ออกจากแม่พิมพ์

2.4.3 ศึกษาภาวะการสร้าง PEMs บนชิ้นงาน PDMS

2.4.3.1 การเตรียมพื้นผิวของ PDMS

แช่ชิ้น PDMS ในเมทานอล 5 นาที จากนั้นทำความสะอาดแผ่น PDMS ด้วย Magic tape จนชิ้นงานสะอาด จากนั้นแช่ใน 1 M NaOH เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างชิ้น PDMS ด้วยน้ำ DI เพื่อกำจัด NaOH จนหมด

2.4.3.2 การเคลือบฟิล์ม PDADMAC/PSS บนชิ้น PDMS

ทำการเตรียมฟิล์ม PDADMAC/PSS บนชิ้นงาน PDMS ที่ทำความสะอาดแล้วในหัวข้อ 2.4.3.1 ตามรายละเอียดในหัวข้อ 2.4.1.1 ทำการติดตามการติดของ PEMs บน PDMS ด้วยเทคนิค ATR-FTIR

2.4.3.3 การเคลือบฟิล์ม chitosan/alginate บนชิ้นงาน PDMS

ทำการเตรียมฟิล์ม chitosan/alginate บนชิ้นงาน PDMS ที่ทำความสะอาดแล้วในหัวข้อ 2.4.3.1 ตามรายละเอียดในหัวข้อ 2.4.1.2 โดยเลือกใช้ pH ที่ได้จากการทดลองตอนที่ 2.4.1.2 ที่เหมาะสม ทำการติดตามการติดของ PEMs บน PDMS ด้วยเทคนิค ATR-FTIR

2.4.3.4 การติดตามการสร้าง PEMs บนพื้นผิว PDMS ด้วยเทคนิค ATR-FTIR

ในการศึกษานี้ใช้เทคนิค ATR-FTIR ในการติดตามการสร้าง PEMs บนพื้นผิว PDMS ในสภาวะต่างๆ นั้น โดยวัดจำนวนตัวอย่าง 2 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างทำการวัดทั้งหมด 3 ครั้งในตำแหน่งที่ต่างกัน

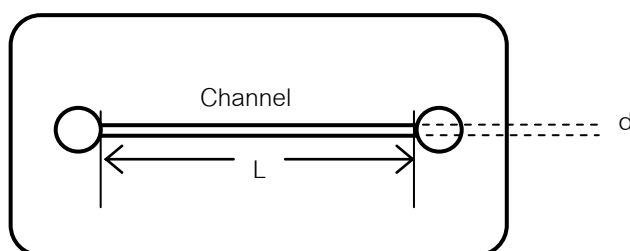
Part A การศึกษาผลของการเคลือบชิ้นงานของ PDMS ด้วย PEMs ต่อค่า EOF และการดูดซับโปรตีน

A.1 การศึกษาผลของการดัดแปรพื้นผิว PDMS ด้วย PDADMAC/PSS ต่อค่า EOF

ในการทดลองนี้ทำการเคลือบพื้นผิวด้วยคู่ PDADMAC/PSS ซึ่งจำนวนประจุต่อสายพอลิเมอร์ไม่ขึ้นอยู่กับ pH ใน microfluidic device เพื่อทำศึกษาค่า EOF และความเสถียรของค่า EOF เปรียบเทียบกับค่าความชอบน้ำและไม่ชอบน้ำของพื้นผิวที่พัฒนาขึ้น โดยศึกษาที่ความเข้มข้นของ polyelectrolyte เท่ากับ 1 และ 10 mM

A.1.1 การหล่อแผ่น PDMS

ในการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับ microfluidic device นั้น mold ที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ silicon wafer ที่ไม่มีแบบใดๆ เพื่อทำเป็น blank สำหรับประกอบเป็น microfluidic device และแบบที่มี microchannel เป็นรูป straight channel ตามที่แสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 ภาพจำลองรูปแบบ microchannel

L คือ ความยาว channel ในการทดลองนี้ใช้ความยาว 3.8 – 3.9 cm

d คือ ความกว้าง channel ในการทดลองนี้ใช้ความกว้าง 50 μm

หมายเหตุ แม่พิมพ์ที่ใช้ในการทดลองนี้ เตรียมโดยเจ้าหน้าที่ศูนย์เทคโนโลยีไมโครอิเล็กทรอนิกส์ (TMEC) แห่งศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ (NECTEC)

A.1.2 การ seal ชิพ ด้วยวิธี reversible

ทำความสะอาดแผ่น PDMS ทั้งแผ่นที่มี channel และแผ่นเปล่าด้วยเมทานอล ทำการประกบแผ่นทั้งสองเข้าด้วยกัน แล้วนำไปอบที่ 65°C เป็นเวลา 15 นาที

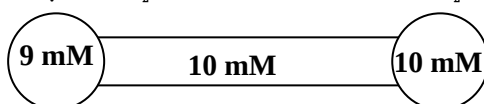
A.1.3 การเคลือบ PEMs ใน microchannel

ในการเคลือบ PEMs ใน microchannel ใช้ปั๊มสุญญากาศในการดูดสารละลายต่างๆ เข้าสู่ microchannel โดยขั้นแรกทำการดูดน้ำ Milli-Q เข้าไปในไมโครชิพที่เตรียมไว้แล้ว หลังจากนั้นผ่าน methanol เพื่อทำความสะอาด channel และผ่านน้ำ Milli-Q อีกครั้ง แล้วทำการบรรจุ 0.1 M NaOH ให้เต็ม channel ทิ้งไว้ 15 นาที แล้วทำการล้างด้วยน้ำ Milli-Q อีกครั้ง หลังจากนั้นทำการเคลือบ PEMs ขั้นที่ 1 โดยบรรจุสารละลาย 100 μL ของ PDADMAC (polycation) เข้าสู่ microchannel จนเต็ม channel ทิ้งไว้ 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำ Milli-Q ปริมาตร 100 μL เพื่อล้าง microchannel เป็นจำนวน 3 ครั้ง แล้วทำการเคลือบขั้นที่สอง โดยบรรจุ microchannel ด้วย 100 μL ของ PSS (polyanion) ทิ้งไว้ 15 นาที ทำการล้างออกด้วยน้ำ Milli-Q อีกครั้งตามที่ได้กล่าวไปแล้ว ทำซ้ำไปจนครบ 10 ชั้น

A.1.4 การวัดค่า EOF ด้วยวิธี current monitoring method

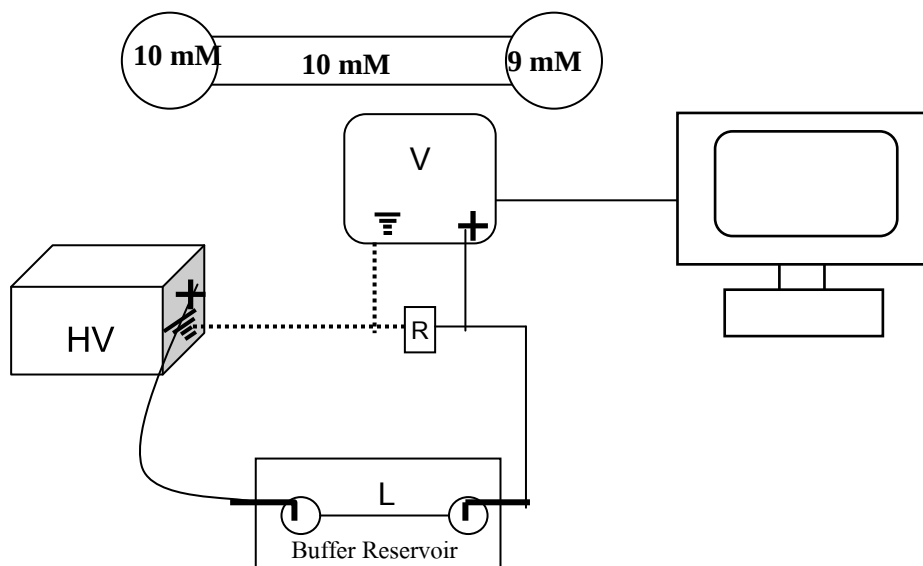
ทำการวัดค่า EOF ของ microchannel ของทุกชั้นเคลือบ โดยทำการศึกษาผลของจำนวนชั้นเคลือบ และความเข้มข้นของ polyelectrolyte โดยความเข้มข้นที่ใช้ในการศึกษาคือ 1 และ 10 mM ใน 1 M NaCl ในการวัดค่า EOF ทำการจัดวางอุปกรณ์ทั้งหมดดังรูป 2.2 โดยใช้ศักย์ไฟฟ้า 600 V และตัวต้านทาน 1.007 $\text{k}\Omega$ และในกรณีที่การเปลี่ยนแปลงของความต่างศักย์มีค่าน้อยกว่า 0.2 mV จะเปลี่ยนขนาดตัวต้านทานเป็น 2 $\text{k}\Omega$

1. บรรจุ phosphate buffer ความเข้มข้น 10 mM ลงไปใน microchannel จนเต็ม แล้วเปิดสารละลายความเข้มข้น 9 mM ของ phosphate buffer ที่ควบคุม pH เท่ากับ 7 บรรจุใน reservoir อื่นหนึ่ง และเปิด phosphate buffer ความเข้มข้น 10 mM ลงใน reservoir อีกอันหนึ่งโดยควบคุมให้มีปริมาตรเท่ากันทั้งสองข้าง โดยใช้ปริมาตร 70-100 μL ขึ้นอยู่กับความหนาของไมโครชิพ ดังรูปข้างล่าง



2. ให้ศักย์ไฟฟ้าแก่อุปกรณ์ และอ่านค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้น และระยะเวลาที่การเปลี่ยนแปลงกระแสไฟฟ้าคงที่ ซึ่งคือเวลาที่ของเหลวใน reservoir ด้านหนึ่งได้เคลื่อนที่ถึงอีกด้านหนึ่ง และคำนวณค่า EOF ตามสมการที่ 1
3. ทำซ้ำขั้นตอนที่ 1 โดยทำการกลับขั้วไฟฟ้า (สารละลายบัฟเฟอร์ 10 mM จะเคลื่อนที่เข้าใน channel แทนที่ความเข้มข้น 9 mM) นับเป็น 1 รอบการทดลอง

4. ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1-3 โดยการทดลองเพื่อศึกษาค่า EOF ณ สภาวะหนึ่งๆ จะทำการทดลองอย่างน้อย 6 ครั้ง (3 รอบไป-กลับ)
5. Microfluidic device ที่ถูกเคลือบด้วย PDADMAC ภายในบริเวณผนังจะเป็นประจุบวก ดังนั้นการวัดค่า EOF จึงต้องทำการจัดการทดลองใหม่ในขั้น 1 เป็นดังรูปข้างล่าง



รูปที่ 2.2 แสดงการจัดวางอุปกรณ์สำหรับ current monitoring method

เมื่อ	HV	คือ	เครื่องกำเนิดไฟฟ้าศักย์สูง (High voltage power supply)
	V	คือ	โวลต์มิเตอร์ (Voltmeter)
	R	คือ	ตัวต้านทาน
	L	คือ	ความยาวของ channel

A.1.5 ศึกษาเสถียรภาพของค่า EOF ของ microchannel ที่เคลือบด้วย PDADMAC/PSS (ความหนา 10 ชั้น)

ในการศึกษาเสถียรภาพของค่า EOF ของ microfluidic device ทั้งที่ผ่านการดัดแปรพื้นผิวด้วย PEMs โดยวัดค่า EOF เมื่อผ่านสารละลาย phosphate buffer ที่ pH 7 จำนวนอย่างน้อย 10 ครั้ง และที่ pH 11 อีกอย่างน้อย 10 ครั้ง หลังจากนั้นวัดค่า EOF ที่ pH 7 อีกอย่างน้อย 10 ครั้ง และวัดค่า EOF ที่ pH 3 ต่อไป กรณีของ channel ที่ไม่ได้เคลือบ PEMs จะทำการวัด EOF ที่ pH 7 เท่านั้น โดยใช้วิธีการเดียวกัน

A.1.6 ศึกษาความชอบ ไม่ชอบน้ำของพื้นผิว PDMS ที่ดัดแปรด้วย PEMs

ในการทดลองนี้จะศึกษาความเข้มข้นของ PDADMAC/PSS ต่อการสร้างเป็นแผ่นฟิล์มบน PDMS และความชอบน้ำ ไม่ชอบน้ำของพื้นผิว โดยทำการวัดค่ามุมสัมผัส (contact angle) ของพื้นผิวที่เคลือบด้วย polyelectrolyte ในแต่ละชั้น

A.1.6.1 ความเข้มข้นของ polyelectrolyte

ในการทดลองตอนนี้จะใช้ homemade robot ในการสร้าง PEMs โดยใช้เวลาในการจุ่มดังกล่าวไว้ในหัวข้อ 2.4.1.1 โดยความเข้มข้นที่ใช้ศึกษาคือ 1 และ 10 mM ทั้งนี้ในการวัด contact angle ในการศึกษาส่วนนี้ทำการหยดน้ำ DI หยดละ 10 μL ลงบนแผ่น PDMS แล้วใช้ Webcam ส่องผ่านเลนส์ของกล้องขยายส่องดูพื้นผิวและหยดน้ำ จากนั้นบันทึกภาพเข้าสู่คอมพิวเตอร์ด้วยโปรแกรม Microsoft Vidcap ทำการวัดมุมสัมผัสจากภาพที่ได้ ด้วยโปรแกรม MB-Ruler 1.52 โดยทำซ้ำ 3 หยด

A.1.6.2 ผลของชนิดของ polyelectrolyte ที่ต่างกัน

ในการทดลองส่วนนี้ทำการศึกษาคูณสมบัติความชอบน้ำของ PDMS ที่เคลือบด้วย PEMs ภายใต้โหมด static โดยหยด 4 μL ของน้ำ DI โดยทำการวัดที่ตำแหน่งต่างๆ กัน 10 ตำแหน่งบนชิ้นงาน โดยใช้โปรแกรม DROP image standard ในการวัดค่ามุมสัมผัส

A.1.7 ศึกษาปริมาณการดูดซับของโปรตีน bovine serum albumin (BSA) บนพื้นผิวที่พัฒนาขึ้นโดยเปรียบเทียบกับพื้นผิว PDMS ที่มีได้ปรับปรุงใดๆ (unmodified PDMS)

ในการทดลองส่วนนี้มุ่งศึกษาผลของชั้นเคลือบ PEMs ที่เป็นระบบ PDADMAC/PSS และ chitosan/alginate ต่อการดูดซับของ bovine serum albumin โดยติดตามด้วย UV Visible spectrophotometer, ATR-FTIR และ ปริมาณ albumin ที่เหลือในสารละลาย

ในการศึกษาการเกาะติดของ BSA นำชิ้นงานแช่ในสารละลาย buffer เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นนำชิ้นงานไปแช่ใน 4 mL ของ 1 mg/mL BSA ในสารละลาย buffer ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง⁴⁶ ทำการล้างชิ้นงานด้วย 10 mL ของสารละลาย buffer นั้นๆ เป่าชิ้นงานให้แห้งนำชิ้นงานไปวัดด้วย ATR-FTIR

A.1.7.1 ศึกษาผลของความเข้มข้นของ buffer ต่อการดูดซับของ BSA บนพื้นผิว unmodified PDMS

ในการเกาะติดของ BSA บนพื้นผิวขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลาย buffer ดังนั้นในการทดลองนี้ทำการศึกษาคูณผลของความเข้มข้นของ PBS ที่สองความเข้มข้น 1 และ 10 mM

A.1.7.2 การวัดปริมาณโปรตีนในสารละลายด้วยสารละลาย Bicinchoninic acid (BCA)

ในการหาความเข้มข้นของ BSA ที่สามารถดูดซับอยู่บนชิ้นงาน ทำตามวิธีการทดลองซึ่งได้รายงานไว้โดย Hoven และคณะ⁴⁷ โดยนำชิ้นงานที่ต้องการหาปริมาณ BSA บนพื้นผิวมา sonicate ใน 2 mL ของ 1% wt SDS นาน 20 นาที เพื่อชะ BSA ที่ติดอยู่บนชิ้นงานออก ปิเปตสารละลาย SDS ดังกล่าว 250 μL ใส่ในหลอดทดลอง ผสมกับ 2000 μL ของ BCA working reagent แล้วทำการ vortex และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นรอให้อุณหภูมิสารผสมเท่าอุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 nm ของสารประกอบเชิงซ้อนสีม่วง

A.2 การศึกษาผลของตัวทำละลายเฮกเซนต่อ PDMS

ในการปรับปรุงพื้นผิวของ PDMS ให้มีความชอบน้ำนั้น ได้มีการรายงานถึงการสูญเสียของสมบัติความชอบน้ำของพื้นผิวดังกล่าวเมื่อเวลาผ่านไป ในการศึกษาส่วนนี้มุ่งที่จะสกัด oligomer ของ PDMS ออกจากชิ้นงาน เพื่อลดการคืนกลับของพื้นผิว

A.2.1 ศึกษาผลของเฮกเซนต่อ PDMS ที่ปรับพื้นผิวด้วย PEMs layer

ในการศึกษาส่วนนี้ทำการเตรียมชิ้นงาน PDMS ขนาด 1x4 cm² ทำความสะอาดชิ้น PDMS ด้วยเมทานอล จากนั้นนำชิ้นงาน PDMS ไปแช่ในเฮกเซนเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบตามกำหนดเวลาให้นำชิ้นงาน PDMS ทิ้งไว้ให้แห้งในอากาศ

ในกรณีที่ต้องการดัดแปรพื้นผิวด้วย PEMs จะนำชิ้นงาน PDMS แช่ใน 1 M NaOH เป็นเวลา 15 นาที เพื่อเตรียมให้พื้นผิว PDMS และล้างด้วยน้ำ DI เพื่อกำจัด NaOH ออกจากพื้นผิว PDMS แล้วดำเนินการเคลือบเช่นเดียวกับวิธีการทดลองในหัวข้อ 2.4.3.2 จากนั้น โดยใช้ PDADMAC/PSS นำชิ้นงานที่ได้ไปวัดค่ามุมสัมผัสในวันที่ 1 และ 3 โดยเก็บชิ้นงานไว้ในเดซิเคเตอร์

Part B การตรวจวัดปริมาณ albumin ด้วย microelectrode ของ gold nanoparticles

ในการศึกษาส่วนนี้ เป็นการปรับจากระเบียบวิจัยที่ได้เสนอไปในการศึกษาการแยกโปรตีน ใน microfluidic device เนื่องจากปัญหาในการตรวจวัด ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยได้ประยุกต์องค์ความรู้เกี่ยวกับการเตรียม microelectrode ที่ได้พัฒนาขึ้นโดยใช้เทคนิค layer by layer และ flow deposition ระหว่าง poly(diallyl dimethyl ammonium chloride), PDADMAC และ gold nanoparticles เพื่อตรวจวัดปริมาณ albumin

B.1 เตรียม gold nanoparticles

ทำการต้มสารละลายผสมของ auric acid (HAuCl_4) ความเข้มข้น 1 mM กับ สารละลาย sodium citrate ที่ความเข้มข้น 30 mM

B.2 การสร้างท่อระดับไมโครเมตรเพื่อใช้เป็นต้นแบบในการสร้างขั้วไฟฟ้าระดับจุลภาคของอนุภาคนาโนทอง

ตามที่ได้กล่าวมาแล้ว ในการสร้างขั้วไฟฟ้านี้จะอาศัยเทคนิค flow deposition ของสารละลาย gold nanoparticles กับสารละลาย PDADMAC ผ่าน mold ของขั้วที่เตรียมด้วย PDMS ในการทำ mold ของ

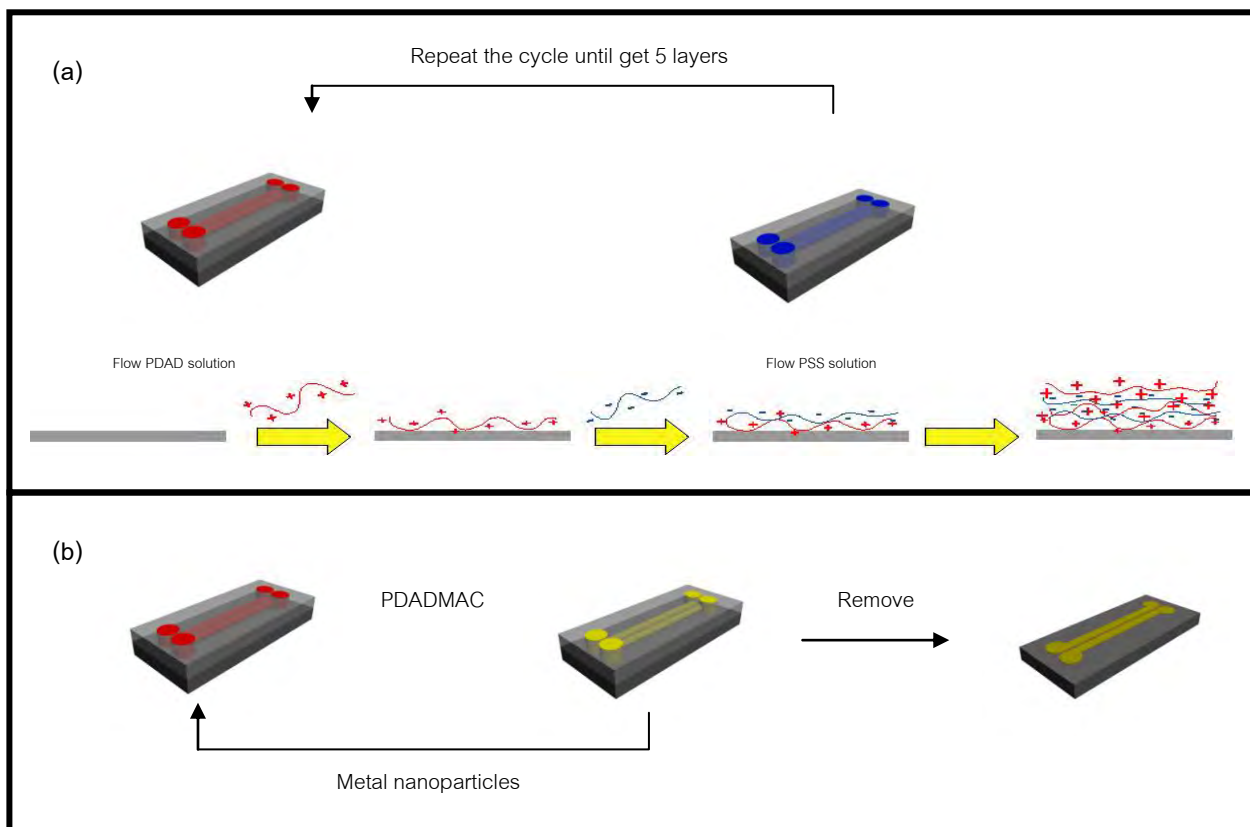
ขั้นนั้น ใช้หลักการเดียวกับการสร้าง microfluidic device โดยขั้นต้นทำการออกแบบรูปแบบขั้ว และสร้างรูปแบบนั้นด้วย SU-8 ซึ่งรูปร่างต้นแบบของท่อระดับไมโครเมตรที่ใช้นี้จะเป็นสองท่อขนานกันมีขนาดกว้าง 200 ไมโครเมตร สูง 200 ไมโครเมตร และระยะห่างระหว่างท่อขนาด 200 ไมโครเมตร ดังแสดงในรูปที่ 2.3 (ได้รับจากศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ) แล้วทำการหล่อ mold โดยเทสารผสม sylgard 184 ลงบนต้นแบบท่อระดับไมโครเมตรแล้วอบที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตามด้วยทำการลอกแผ่น PDMS ที่มีรูปร่างต้นแบบของท่อระดับไมโครเมตรออก



รูปที่ 2.3 ต้นแบบของ microchannel

B.3 การเตรียมขั้วไฟฟ้าระดับจุลภาคของอนุภาคนาโนทอง

ในการสร้าง microelectrode นั้น ทำการเจาะรูแผ่น PDMS ที่เป็นต้นแบบด้วย hole puncher แล้วทำการประกบกับกระจกใสด้วยเมทานอล (reversible sealing) ผ่านสารละลายทางท่อระดับไมโครเมตรทางรูที่เจาะไว้แล้วโดยใช้ปั๊มสุญญากาศ ในขั้นต้นทำการสร้าง primer layer ด้วยฟิล์ม PEMs ระบบ PDADMAC/PSS ที่ความเข้มข้น 10 mM จำนวน 5 ชั้น แล้วจึงทำการไหลผ่านสารละลายอนุภาคนาโนทองที่เตรียมในหัวข้อ B.1 สลับกับสารละลาย 10 mM PDADMAC จนกระทั่งได้จำนวนชั้น 10 ชั้น จะทำการศึกษาประสิทธิภาพในการตรวจวัดของขั้วไฟฟ้าที่เตรียมได้ใช้ vacuum pump ในการพาสารละลาย albumin

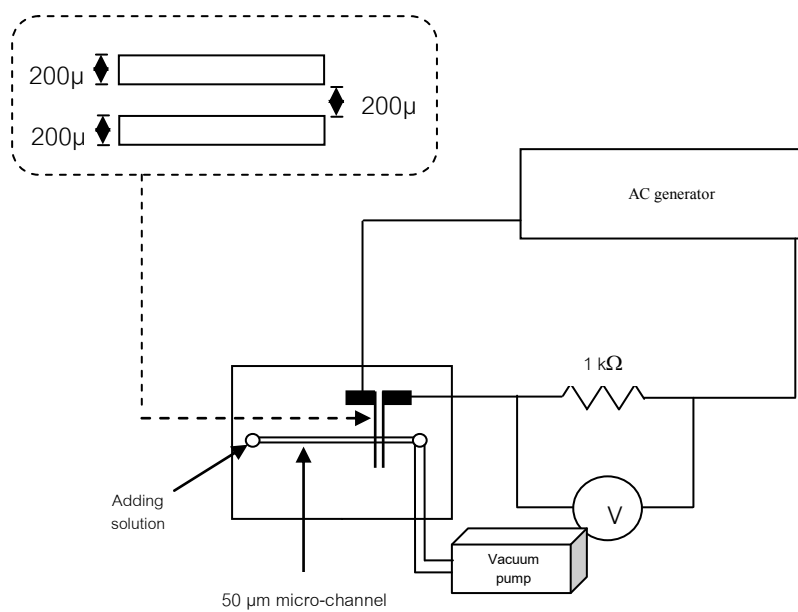


รูปที่ 2.4 วิธีการเตรียม microelectrode โดยวิธี flow deposition (a) ขั้นตอนการเตรียมชั้น primer (b) การเตรียม electrode⁴⁸

B.4 การวัดการนำไฟฟ้าโหมดสัมผัสด้วย microelectrode ของ gold nanoparticles โดยใช้ vacuum pump

สำหรับการตรวจวัดความเข้มข้นของ albumin นั้นจะทำการผ่านสารละลาย albumin ด้วย pump ซึ่ง จะทำการไหลผ่านสารละลายอัลบูมินผ่านทาง microchannel ขนาด 50 ไมโครเมตร และวัดการเปลี่ยนแปลงของการนำไฟฟ้าของสารละลาย albumin ที่ความเข้มข้นในช่วง 0.1 to 10 g/L

ในการวัดการนำไฟฟ้าโดยใช้ขั้วไฟฟ้าของอนุภาคนาโนทองที่เตรียมได้ โดยทำการวงจรดังรูปที่ 2.5 โดยทำการต่อขั้วไฟฟ้าเข้าเครื่องจ่ายไฟฟ้ากระแสสลับ (AC generator) โดยให้สัญญาณปัลสไนส์ ขนาด ศักย์ไฟฟ้า 3 โวลต์ นอกจากนี้ทำการต่อตัวต้านทานแบบอนุกรม (ขนาด 1 กิโลโอมห์) เข้ากับขั้วไฟฟ้าเพื่อ ทำการวัดค่าศักย์ไฟฟ้า และคำนวณหาค่ากระแสไฟฟ้าจากผลคูณระหว่างค่าศักย์ไฟฟ้ากับตัวต้านทาน



รูปที่ 2.5 แสดงการตรวจวัดอิมพีแดนซ์ด้วยการวัดการนำไฟฟ้าโดยใช้หัวไฟฟ้าระดับจุลภาคของอนุภาคนาโนทอง⁴⁸

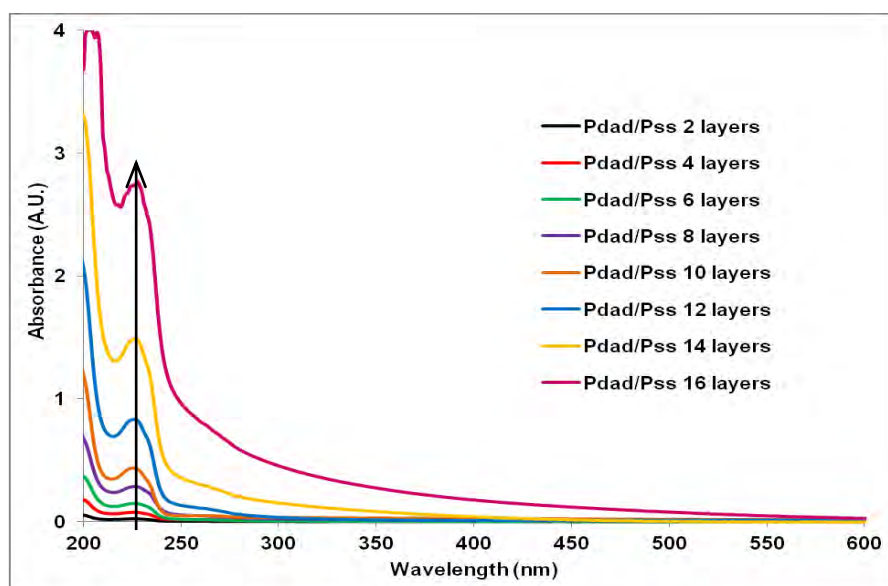
บทที่ 3

ผลการทดลอง

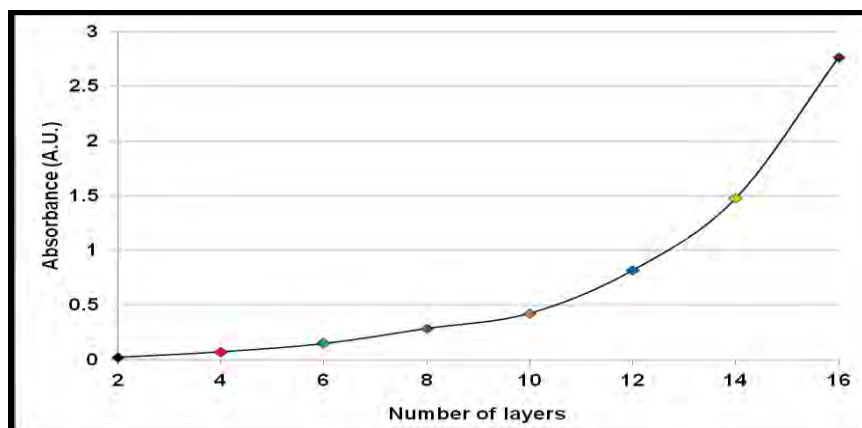
ในงานวิจัยครั้งนี้มุ่งที่พัฒนาพื้นผิวที่เคลือบบน PDMS ที่เพิ่มความชอบน้ำ ค่า EOF และควบคุมการติดของเกาะติดของ bovine serum albumin (BSA) บน PDMS โดยใช้เทคนิค layer-by-layer เพื่อเตรียมเป็น polyelectrolyte multilayer film โดยจะทำการศึกษา PEMs สองระบบคือ ระบบของ PDADMAC/PSS และระบบ chitosan/alginate และทำการศึกษาผลของการสกัด oligomer ของชิ้นงาน PDMS ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน นอกจากนี้ได้ศึกษาประสิทธิภาพของ microfluidic device ที่มีตัวตรวจวัดเป็นขั้วที่เตรียมจากอนุภาคทองระดับนาโน ในการตอบสนองต่อค่าความเข้มข้นของ albumin

3.1 การศึกษาการเคลือบฟิล์มบางระหว่าง PDADMAC/PSS

ขั้นต้นจำเป็นต้องมีการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสร้าง PEMs โดยใช้ quartz slide ก่อน สำหรับฟิล์มบางระบบ PDADMAC/PSS นั้น PDAMAC ทำหน้าที่เป็น polyelectrolyte ที่แสดงประจุเป็นบวกและ PSS เป็นพอลิเล็กไทโรไลต์ที่แสดงประจุเป็นลบ การศึกษาการเคลือบติดของฟิล์มบางบนแผ่นควอตซ์สามารถติดตามโดยใช้การวัดค่าการดูดกลืนแสงของ PSS ที่ตำแหน่งความยาวคลื่น 228 nm^{49, 50} ดังแสดงในรูปที่ 3.1 และ 3.2 พบว่าสามารถเตรียมฟิล์ม PDADMAC/PSS ได้ โดยในช่วงแรกการเคลือบติดของฟิล์มบางเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย แต่เมื่อจำนวนชั้นของฟิล์มบางเพิ่มมากขึ้นพบว่าค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มมากขึ้น แสดงว่ามีปริมาณของ PSS เคลือบติดได้มากขึ้น



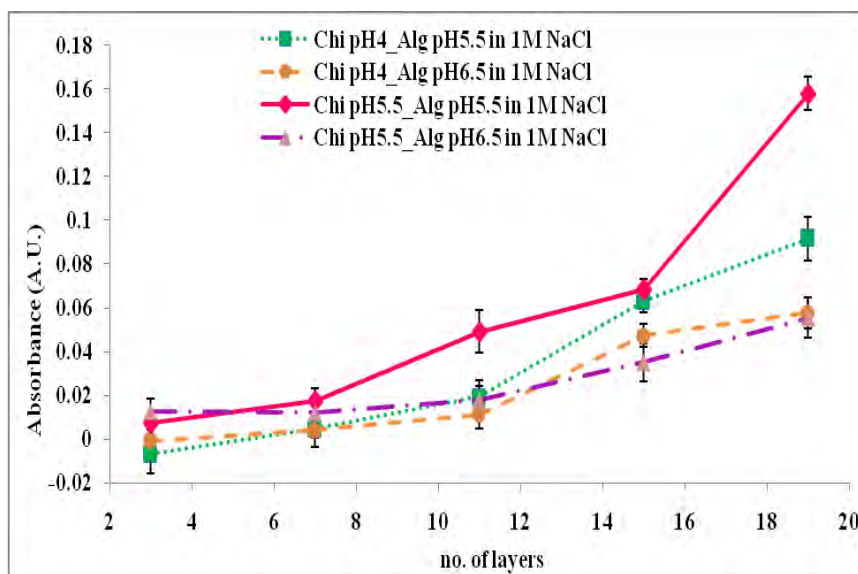
รูปที่ 3.1 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของฟิล์มบางระหว่าง PDADMAC/PSS ที่จำนวนชั้น 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 และ 16 ชั้น โดยจำนวนชั้นที่เป็นเลขคู่ แสดงถึง PSS เป็นชั้นนอกสุดของ PEMs ฟิล์ม



รูปที่ 3.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของฟิล์มบางกับจำนวนชั้นของฟิล์มบาง PDADMAC/PSS

3.2 การศึกษาการเคลือบฟิล์มบางระหว่าง chitosan/alginate

Chitosan และ alginate เป็น polyelectrolyte ที่มีประจุแตกต่างกันไปตามค่า pH ของสารละลาย polyelectrolyte ซึ่งจะส่งผลต่อการสร้างฟิล์มบางหลายชั้น ดังนั้นในงานส่วนนี้จึงทำการศึกษาผลของ pH โดย pH ที่เลือกใช้ในการสร้างฟิล์มบางสำหรับสารละลาย chitosan คือ 4 และ 5.5 โดย ณ pH นี้ chitosan จะแสดงประจุเป็นบวกเนื่องจากค่า pH ที่เลือกใช้มีค่าต่ำกว่าค่า pK_a ของ chitosan ($pK_a = 6.3$) ในขณะที่ค่า pH ของสารละลาย alginate คือ 5.5 และ 6.5 ซึ่ง pH นี้ alginate จะแสดงประจุเป็นลบ ($pK_a = 3.5$)²⁵ การศึกษาการเคลือบติดของฟิล์มบางระหว่าง chitosan กับ alginate บน quartz slide โดยติดตามค่าการดูดกลืนแสงของฟิล์มบางที่มีชั้น chitosan อยู่บนสุดที่ค่าความยาวคลื่น 201 nm⁵¹ โดยเมื่อจำนวนชั้นของฟิล์มบางเพิ่มมากขึ้นค่าการดูดกลืนแสงก็จะเพิ่มขึ้น และจากการสร้างฟิล์มบางที่ pH ต่างๆ ของ chitosan และ alginate พบว่าฟิล์มที่เตรียมได้มีความหนาที่แตกต่างกันตามค่า pH โดยถ้า pH ของสารละลายใกล้เคียงกับ pH ของ polyelectrolyte ทั้งสองชนิดมากเกินไปเป็นภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการสร้างฟิล์ม โดยพบว่า pH ของสารละลายทั้งสองเท่ากับ 5.5 เป็นภาวะที่ดีที่สุดสำหรับการสร้าง PEMs ของ chitosan/alginate



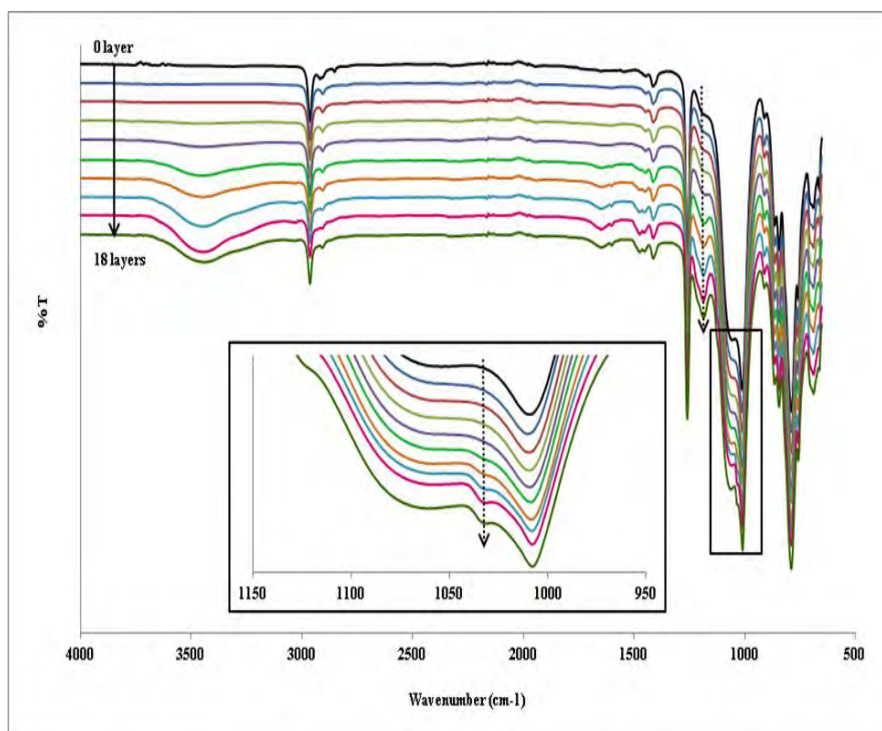
รูปที่ 3.3 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของฟิล์มบาง chitosan/alginate ที่จำนวนชั้นต่าง ๆ ณ pH ต่างๆ

3.3 ศึกษาการเคลือบฟิล์ม PEMs ระบบ PDADMAC/PSS บน PDMS

ในการศึกษาการเคลือบติดของฟิล์ม PEMs ระบบ PDADMAC/PSS บนพื้นผิวของ PDMS นั้นทำการติดตามโดยใช้เทคนิค ATR-FTIR แทนการติดตามด้วย UV เนื่องจากการดูดกลืนแสง UV ของ PDMS โดยสัญญาณ ATR-FTIR ของ PDMS ได้แสดงในตารางที่ 3.1 โดย PDADMAC ให้สัญญาณ IR ที่ตำแหน่ง wavenumber ~ 1450 และ $\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ ซึ่งเป็นสัญญาณของหมู่ amine และสัญญาณที่ตำแหน่ง $\sim 3300 \text{ cm}^{-1}$ ซึ่งเป็นตำแหน่งของ O-H และ N-H^{18, 33} อย่างไรก็ตามสัญญาณ IR ของ PDADMAC นั้นค่อนข้างต่ำ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ทำการติดตามการเตรียมฟิล์มบางในระบบนี้ของหมู่ซัลโฟเนตในสายพอลิเมอร์ PSS ณ wavenumber ~ 1033 และ $\sim 1178 \text{ cm}^{-1}$ ^{21, 52} ดังแสดงในรูปที่ 3.4 ซึ่งจะเห็นความสูงของสัญญาณที่ตำแหน่งของหมู่ซัลโฟเนตนี้สูงขึ้นเมื่อจำนวนชั้นของฟิล์มบางเพิ่มขึ้นแสดงให้เห็นการเคลือบติดของชั้นฟิล์มบางบนพื้นผิวของ PDMS¹⁷

ตารางที่ 3.1 แสดงสัญญาณ IR ที่เป็น characteristic peak ของ PDMS

ตำแหน่งสัญญาณที่ wavenumber (cm^{-1})	พันธะ ^{46, 53}
~ 1027 และ ~ 1072	stretching ของพันธะ Si-O-Si
~ 2906 และ ~ 2962	C-H ₃
~ 1260	deformation vibration ของพันธะ CH ₃



รูปที่ 3.4 สเปกตรัม ATR-FTIR ของ uncoated-PDMS และ PDMS ที่เคลือบด้วยฟิล์มบางของ PDADMAC/PSS ที่จำนวนชั้นตั้งแต่ 2-18 ชั้น (แสดงเฉพาะฟิล์มบางที่มีจำนวนชั้นเป็นเลขคู่) ภาพแทรกเป็นภาพขยายของสัญญาณ IR เมื่อจัดให้ baseline ตรงกันเพื่อแสดงการเพิ่มของสัญญาณของ sulfoante peak ที่ $\sim 1033 \text{ cm}^{-1}$

3.4 ศึกษาการเคลือบฟิล์มบางระหว่าง chitosan/alginate

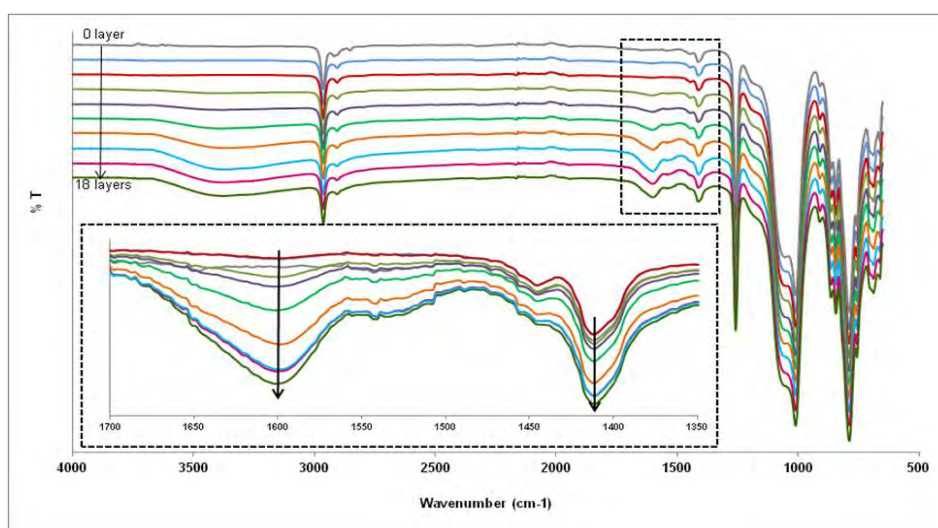
จากผลการทดลองที่ 3.2 พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการเตรียม PEMs film ของระบบนี้ คือภาวะที่ควบคุมให้ pH ของสารละลาย alginate และ chitosan มีค่าเท่ากับ 5.5 ดังนั้นในการทดลองส่วนนี้ทำการเตรียมฟิล์ม PEMs นี้โดยใช้ภาวะดังกล่าว จากรูปที่ 3.5 แสดงสัญญาณ ATR-FTIR ของฟิล์มบางระบบ chitosan/alginate ที่เคลือบอยู่บน PDMS ด้วยจำนวนชั้นต่างๆ กัน โดย chitosan แสดงสัญญาณที่ตำแหน่ง $1420\text{-}1500 \text{ cm}^{-1}$ ซึ่งเป็นตำแหน่งที่เกิดจากหมู่เอมีนภายในโครงสร้างของ chitosan แต่ความเข้มของสัญญาณค่อนข้างต่ำ ดังนั้นในการติดตามการเคลือบติดของฟิล์มบางระบบ chitosan/alginate นั้นทำการติดตามสัญญาณที่ตำแหน่ง ~ 1412 และ $\sim 1601 \text{ cm}^{-1}$ ซึ่งเป็นสัญญาณที่เกิดจาก symmetric และ asymmetric stretch ของหมู่ carboxylate (COO^-) ใน alginate⁵⁴⁻⁵⁶ ซึ่งจากรูปแสดงสัญญาณของ หมู่ carboxylate นี้ เพิ่มขึ้นเมื่อจำนวนชั้นมากขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าภาวะการทดลองนี้สามารถเตรียม PEMs film ของ chitosan/alginate บน PDMS ได้

ตารางที่ 3.2 แสดงสัญญาณ IR ที่เป็น characteristic peak ของ chitosan⁵⁶

Wavenumber (cm ⁻¹)	Assignment
3290	O-H และ N-H stretching
2864	C-H stretching
1645	amide I
1584	N-H bending

ตารางที่ 3.3 แสดงสัญญาณ IR ที่เป็น characteristic peak ของ sodium alginate⁵⁶

Wavenumber (cm ⁻¹)	Assignment
3700 – 3000 (broad)	OH stretching
3000 - 2850	CH stretching
1596	Antisymmetric CO ₂ ⁻
1412	Symmetric CO ₂ ⁻
1081 - 1027	Antisymmetric stretching C-O-C



รูปที่ 3.5 สเปกตรัม ATR-FTIR ของ uncoated PDMS และ PDMS ที่เคลือบด้วย PEMs ฟิล์มของ chitosan/alginate ที่จำนวนชั้นตั้งแต่ชั้นที่ 2 - ชั้นที่ 18 โดยแสดงเฉพาะฟิล์มบางที่มี alginate อยู่ชั้นนอกสุด (จำนวนชั้นเป็นเลขคู่) ภาพแทรกเป็นภาพขยายของสัญญาณ IR เมื่อจัดให้ baseline ตรงกันเพื่อแสดงการเพิ่มของสัญญาณของ carboxylate peak ที่ ~1412 และ ~1601 cm⁻¹

Part A การศึกษาผลของการเคลือบชั้นงานของ PDMS ด้วย PEMs ต่อค่า EOF และการดูดซับโปรตีน

ตามที่ได้กล่าวไว้แล้ว งานวิจัยส่วนนี้เพื่อเพิ่มความชอบน้ำ (hydrophilicity) เพื่อเพิ่มค่า electroosmotic flow (EOF) ของ PDMS microfluidic device ซึ่งมีค่าต่ำและไม่คงที่ และควบคุมการดูด

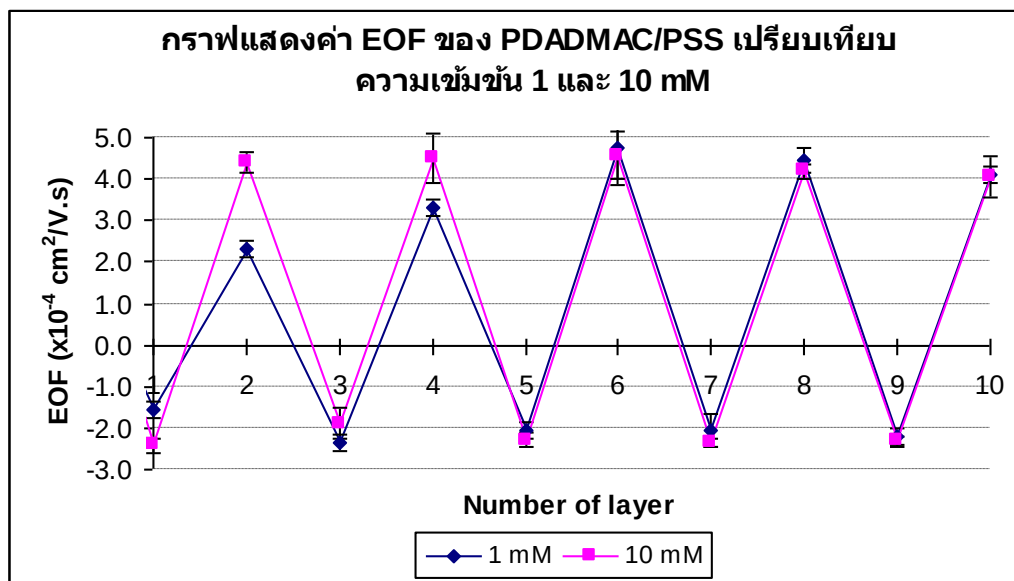
ชั้นของโปรตีนด้วยการเคลือบพื้นผิวของ PDMS ด้วย polyelectrolyte multilayer (PEMs) ซึ่งเตรียมได้จากเทคนิค layer-by-layer self assembly โดยใช้ poly(diallyldimethyl ammonium chloride) (PDADMAC) และ chitosan เป็น cationic polyelectrolyte และ poly(styrene sulfonate) (PSS) และ alginate เป็น anionic polyelectrolyte และทำการศึกษาวิธีการลดการกลับคืนของความไม่ชอบน้ำของพื้นผิว ซึ่งเกิดจาก oligomer

A.1 ศึกษาผลของการเคลือบ PDMS microfluidic device ด้วย PDADMAC/PSS ต่อค่า electroosmotic flow (EOF)

จากผลการทดลองเปรียบเทียบค่า EOF ของ PDMS microfluidic chip ที่ยังมิได้เคลือบและเคลือบด้วย PEMs ระบบ PDADMAC/PSS พบว่าค่าเฉลี่ยของ EOF ของ uncoated microchannel ที่ผ่าน NaOH มีค่าเท่ากับ $3.6 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{V.s}$ ($2.1\text{--}4.8 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{V.s}$) ซึ่งใกล้เคียงกับค่า EOF ที่รายงานโดย Bao และคณะ ($3.0 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{V.s}$)⁵⁷ อย่างไรก็ตามค่า SD ที่ค่อนข้างสูงแสดงถึงความเสถียรของ EOF ที่ค่อนข้างต่ำ ซึ่งจะมีผลต่อการใช้งานครั้งต่อครั้ง

ใน microfluidic device ที่มีการดัดแปร microchannel ด้วย PEMs พบว่าทิศทางของ EOF เปลี่ยนแปลงไปตามชนิดของประจุของ polyelectrolyte ที่อยู่ชั้นนอกสุด (รูปที่ 3.6) ในกรณีที่ PDADMAC (ชั้นคี่) อยู่ชั้นนอกสุดทำให้พื้นผิว PDMS มีประจุบวก จึงให้ค่า EOF ที่มีค่าเป็นลบ โดยเครื่องหมายลบนี้แสดงถึงการกลับกันของทิศทางของ EOF (reversed EOF) และเมื่อเคลือบด้วย PSS (ชั้นคู่) พื้นผิวจะมีประจุลบซึ่งจะให้ค่า positive EOF ทั้งนี้ค่า absolute EOF ในชั้นคี่มีค่าน้อยกว่าค่าที่ได้จากพื้นผิวที่เคลือบด้วย PSS ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก steric effect ของหมู่ ammonium ซึ่งอาจจะลดการเกิด ion interaction ที่บริเวณ double layer บนผนังของ microchannel ได้

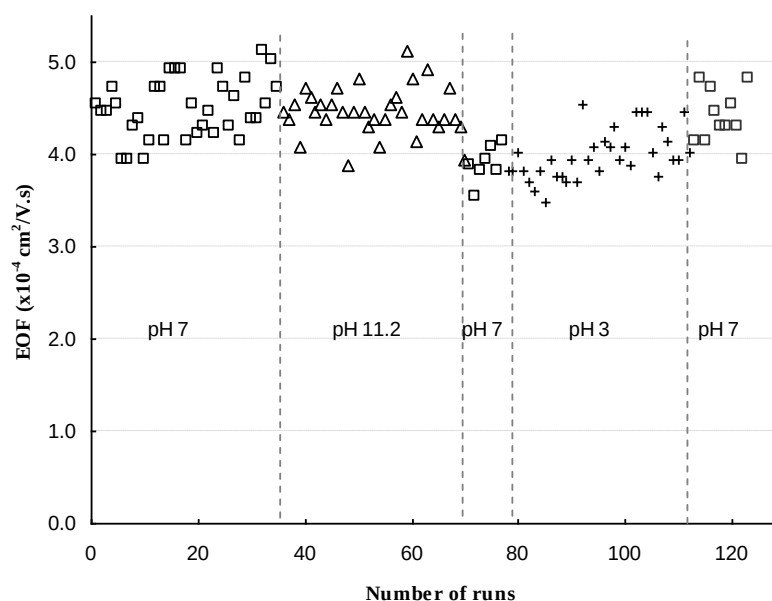
เมื่อจำนวนชั้นเคลือบเพิ่มขึ้น ค่า EOF มีค่าเพิ่มขึ้นสำหรับฟิล์มที่เตรียมมาจากทั้งสองความเข้มข้น และจากการศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลาย polyelectrolyte ต่อค่า EOF นั้นพบว่า microchannel ที่เคลือบด้วยสารละลาย polyelectrolyte เข้มข้น 1 mM ต้องเคลือบอย่างน้อย 4 ชั้นจึงจะได้ค่า EOF ที่สูงสุดและเกือบคงที่ อย่างไรก็ตามค่า EOF ที่ได้จากระบบนี้ยังมีค่าต่ำกว่า microchannel ที่เคลือบด้วยสารละลาย polyelectrolyte เข้มข้น 10 mM ซึ่งให้ค่า EOF สูงที่สุดเมื่อเคลือบด้วยจำนวนชั้นเพียง 2 ชั้น ทั้งนี้เนื่องมาจากความเข้มข้นของสารละลายที่มากกว่าสามารถเคลือบพื้นผิวได้ง่ายกว่า โดยค่าเฉลี่ยสูงสุดของ EOF ที่มี PDADMAC เป็นชั้นนอกสุดเท่ากับ $2.30 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ (%RSD 9.11) และเมื่อ PSS เป็นชั้นนอกสุด ได้ EOF มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $4.40 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ (%RSD 9.27) ทั้งนี้ค่าเฉลี่ยสูงสุดนี้ไม่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ polyelectrolyte



กราฟที่ 3.6 แสดงค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่า EOF ของ PDMS microfluidic chip ที่เคลือบด้วย PDADMAC (cationic coating, ชั้นคี่) และ PSS (anionic coating, ชั้นคู่) กับจำนวนชั้นเคลือบ เมื่อใช้สารละลายเข้มข้น 10 mM ($\square$) และ 1 mM (Δ)

A.2 ศึกษาเสถียรภาพของ EOF ที่ได้จาก channel ที่เคลือบ PEMs ของ PDADMAC/PSS

ในการศึกษาส่วนนี้เพื่อศึกษาเสถียรภาพของฟิล์ม PDADMAC/PSS ที่เคลือบบน microchannel โดยใช้ความเข้มข้นของ polyelectrolyte เท่ากับ 10 mM ที่ความหนา 10 ชั้น คือชั้น PSS เป็นชั้นนอกสุด โดยติดตามค่า EOF ที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อทำการผ่านสารละลายที่ pH ต่างๆ จากรูปที่ 3.7 สามารถสรุปได้ว่าค่า EOF ของพื้นผิวที่ดัดแปรนี้มีค่าคงที่ และไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเปลี่ยนแปลงค่า pH ของสารละลายบัฟเฟอร์ ทั้งนี้เนื่องจากหมู่ sulfonate บน PSS เป็น strong polyelectrolyte โดยค่าเฉลี่ยของ EOF ในแต่ละช่วง pH มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และให้ค่า EOF ที่มีเสถียรภาพที่ดีในการทดลองมากกว่า 100 รอบ เมื่อเปรียบเทียบกับ microchannel ที่มีได้เคลือบด้วย PEMs พบว่าค่า EOF มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมาก (1.2 ถึง $4.4 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{V.s}$) โดยค่าที่วัดได้นี้มีค่าต่ำกว่าค่าที่ได้จาก PEMs coated microchannel ซึ่งอาจเป็นเพราะว่าการเคลือบ PDMS ด้วย PEMs นี้สามารถเพิ่มค่า zeta potential ของพื้นผิวให้สูงขึ้น



รูปที่ 3.7 เกลียวภาพของชั้นเคลือบ PDADMAC/PSS กับจำนวนรอบ และ pH ของ running buffer

A.3 ศึกษาความชอบน้ำของฟิล์มบาง

ในการติดตามความชอบน้ำของพื้นผิว PDMS ทำได้โดยการวัดค่ามุมสัมผัสของชิ้นงาน⁵⁸⁻⁶¹ ถึงแม้ว่าในการศึกษาส่วนนี้จะทำบนชิ้นงาน PDMS ที่ไม่อยู่ในรูป microchannel แต่ลักษณะของฟิล์ม PEMs ในทั้งสองระบบนี้เชื่อว่าเหมือนกัน เนื่องจากเป็นวัสดุชนิดเดียวกัน และ microchannel มีขนาดใหญ่กว่าความหนาของฟิล์ม PEMs มาก และถึงแม้ว่าการดัดแปรชิ้นงาน PDMS ในส่วนนี้ใช้เวลาน้อยกว่าเวลาที่ใช้ในการเคลือบฟิล์มใน microchannel แต่อาศัยการคนสารละลาย polyelectrolyte ซึ่งช่วยในการแพร่ของสารได้ดีขึ้น และลดเวลาในการสร้าง PEMs ได้⁶²

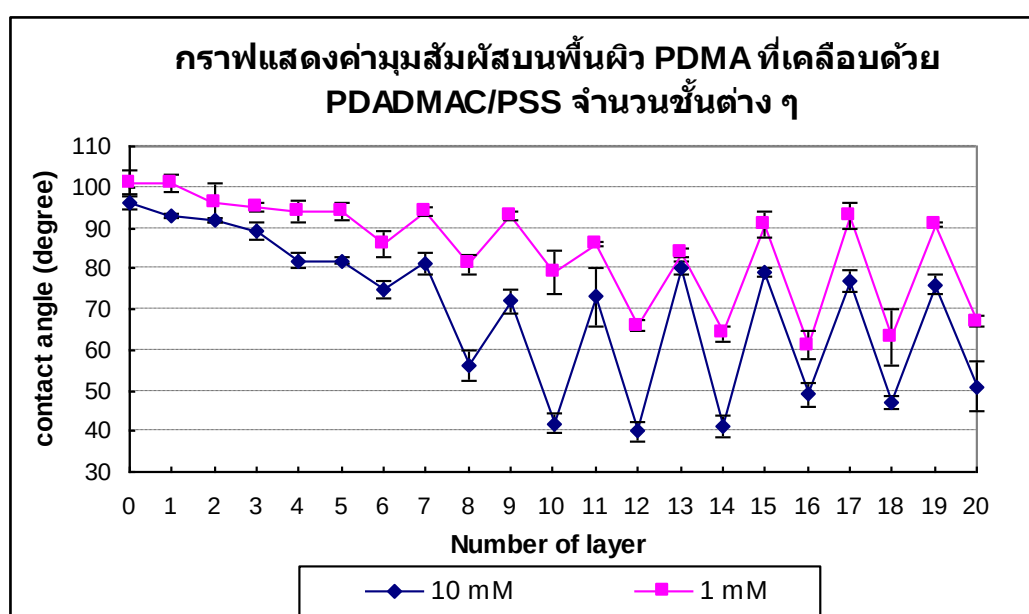
A.3.1 ผลของความเข้มข้นของ polyelectrolyte ต่อความชอบน้ำ ไม่ชอบน้ำของพื้นผิว PDMS ที่ดัดแปรด้วย PDADMAC/PSS

จากรูปที่ 3.8 พบว่าค่าความชอบน้ำ และไม่ชอบน้ำของพื้นผิวขึ้นอยู่กับจำนวนชั้นเคลือบ และความเข้มข้นของสารละลาย polyelectrolyte โดยพื้นผิวของ PDMS ที่มีได้เคลือบ (ชั้นที่ 0) มีค่าความไม่ชอบน้ำค่อนข้างสูง (ค่ามุมสัมผัสมีค่ามากกว่า 100°) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาอื่นๆ^{59, 63, 64} และเมื่อทำการดัดแปรพื้นผิวพบการเปลี่ยนแปลงของค่ามุมสัมผัสเป็นรูปฟันปลา โดยพื้นผิวที่เคลือบด้วย PDADMAC (ชั้นคี่) แสดงความชอบน้ำน้อยกว่าพื้นผิวที่เคลือบด้วย PSS (ชั้นคู่) เนื่องมาจากโครงสร้างของ PDADMAC ที่มีหมู่ methyl ที่ไม่ชอบน้ำมาบดบังแรงดึงดูดระหว่างประจุและหยดน้ำ ในขณะที่ PSS มีหมู่ sulfonate ที่เป็น strong electrolyte และไม่ถูกบดบังด้วยหมู่ใดๆ จึงทำให้มีแรงดึงดูดกับหยดน้ำได้มากกว่า ซึ่งสอดคล้องกับค่า EOF โดยพบว่าที่ความเข้มข้น 10 mM มีค่าความชอบน้ำมากกว่าที่ความเข้มข้น 1 mM สำหรับทุกๆ ชั้นที่ทำการเคลือบ ซึ่งเป็นผลมา

จากความเข้มข้นที่มากกว่าย่อมมีจำนวนของ polyelectrolyte ที่สามารถเคลือบอยู่บนพื้นผิวมากกว่า (ความหนาแน่นของประจุมากกว่า) พื้นผิวจึงมีความชอบน้ำมากกว่า

ความสัมพันธ์ระหว่างความชอบน้ำของพื้นผิวที่เคลือบด้วย polyelectrolyte แต่ละชนิด กับจำนวนชั้นที่เคลือบ พบว่ามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเนื่องจากค่ามุมสัมผัสที่ลดลง และคงที่เมื่อเคลือบตั้งแต่ 9 ชั้นเป็นต้นไป แสดงว่าการเคลือบพื้นผิว PDMS ด้วย polyelectrolyte ให้สมบรูณ์ต้องเคลือบอย่างน้อย 9 ชั้นขึ้นไป

จากผลการทดลอง พบว่าการเตรียมพื้นผิวให้มีความชอบน้ำมากที่สุดต้องเคลือบ PEMs หนาอย่างน้อย 9 ชั้น ซึ่งแตกต่างจากค่า EOF ซึ่งให้ค่าสูงสุดหลังจากเคลือบเพียง 2 ชั้น ดังนั้นในการทดลองส่วนต่อไปจะใช้ความเข้มข้น 10 mM ใน 1 M NaCl

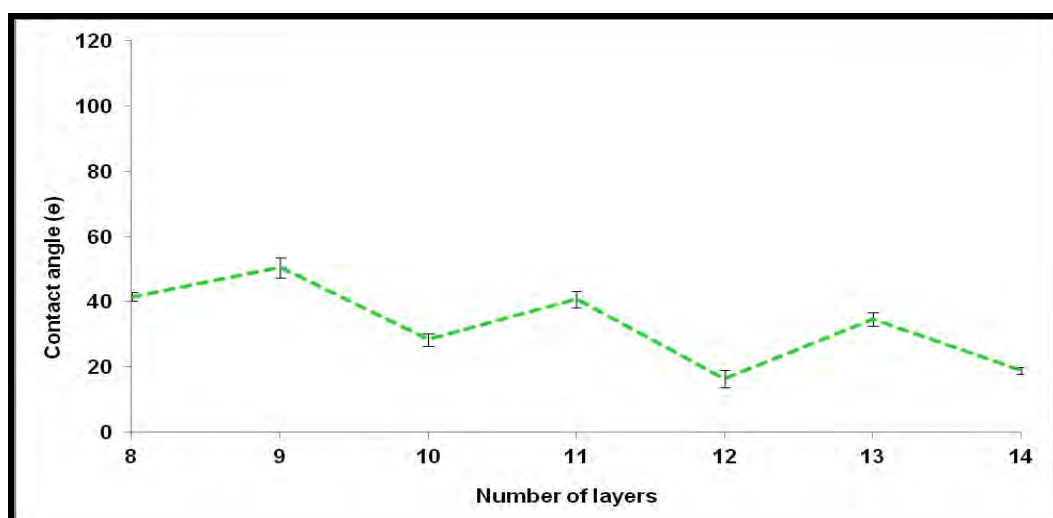


กราฟที่ 3.8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ามุมสัมผัส (contact angle) ของพื้นผิวที่เคลือบด้วย PDADMAC (cationic coating, ชั้นคี่) and PSS (anionic coating, ชั้นคู่) กับจำนวนชั้นของ PEMs ด้วยความเข้มข้นของสารละลายเท่ากับ 10 mM (◆) และ 1 mM (□)

A.3.2 ผลของชนิดของ polyelectrolyte ต่อความชอบน้ำของ PDMS ที่เคลือบด้วย PEMs

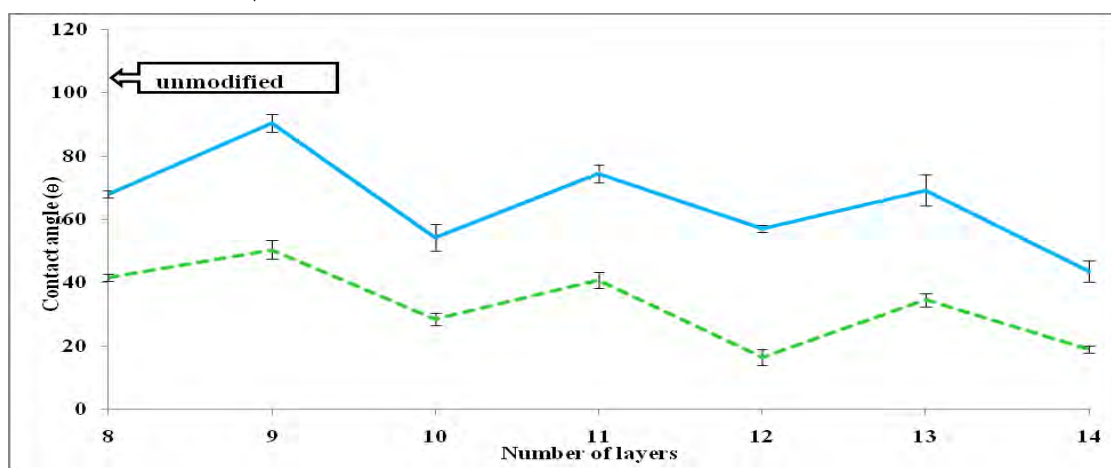
ในการศึกษาส่วนนี้มุ่งศึกษาผลของชนิด polyelectrolyte ต่อความชอบน้ำ โดย polyelectrolyte ที่เลือกมาศึกษาคือ PDADMAC/PSS และ chitosan/alginate จากผลการทดลองในตอนที่ 3.2 ซึ่งพบว่า pH 5.5 เป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้าง PEMs ในระบบ chitosan/alginate จากรูปที่ 3.9 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ามุมสัมผัสและจำนวนชั้นเคลือบ ซึ่งมีลักษณะเป็นฟันปลาโดยค่าของชั้นฟิล์มบางที่มีจำนวนชั้นเป็นเลขคู่ซึ่งมี alginate อยู่ชั้นนอกสุดจะมีค่ามุมสัมผัสต่ำกว่าชั้นฟิล์มบางที่มีจำนวนชั้นเป็นเลขคี่ซึ่งมี chitosan อยู่ชั้นนอกสุด แสดงว่าฟิล์มบางที่มี alginate อยู่ชั้นนอกสุดมีสมบัติการชอบน้ำมากกว่าฟิล์มบางที่มี chitosan อยู่ชั้นนอกสุด โดยพื้นผิวของ PDMS ที่

ทำการเคลือบด้วยชั้นฟิล์มบางของ chitosan/alginate ตั้งแต่ 8-14 ชั้นจะมีค่ามุมสัมผัสลดลงต่ำกว่า 50° และค่ามุมสัมผัสที่น้อยที่สุดมีค่าต่ำกว่า 20° ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Yuan และคณะ²¹



รูปที่ 3.9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างมุมสัมผัสบนพื้นผิวกับจำนวนชั้นของฟิล์มบางของ chitosan/alginate ที่จำนวนชั้น 8-14 ชั้น

เมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติความชอบน้ำของฟิล์มบางที่สร้างขึ้นจาก PDADMAC/PSS และ chitosan และ alginate พบว่าฟิล์มบางที่สร้างขึ้นทั้ง 2 ระบบสามารถเพิ่มความชอบน้ำของ PDMS ได้ จากค่ามุมสัมผัสที่น้อยกว่าค่ามุมสัมผัสของพื้นผิว PDMS ที่ยังไม่ผ่านการเคลือบฟิล์มบางดังแสดงในรูปที่ 3.10 โดยพื้นผิวของ PDMS ที่เคลือบด้วย chitosan และ alginate มีคุณสมบัติความชอบน้ำมากกว่าฟิล์มบางจาก PDADMAC/PSS เนื่องจากโครงสร้างของทั้ง chitosan และ alginate มีคุณสมบัติความชอบน้ำมากกว่าโครงสร้างของ PDADMAC/PSS



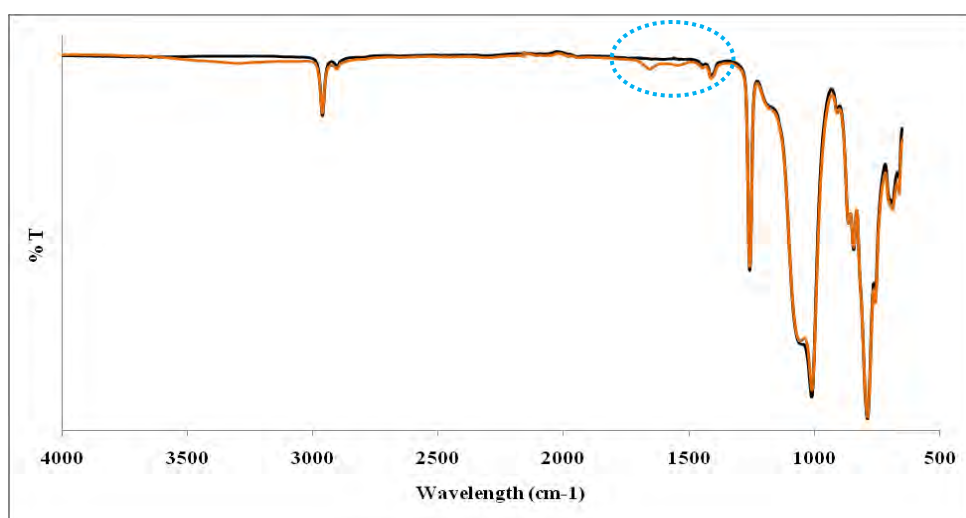
รูปที่ 3.10 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างมุมสัมผัสบนพื้นผิวของ PDMS ที่ยังไม่ผ่านการเคลือบฟิล์มบาง, PDMS ที่ผ่านการเคลือบด้วย PDADMAC/PSS (————) และ PDMS ที่ผ่านการเคลือบด้วย chitosan/alginate (— · — · — ·) ที่จำนวนชั้น 8-14 ชั้น

A.4 ศึกษาการดูดซับโปรตีน BSA บนพื้นผิวของ PDMS และพื้นผิวที่ดัดแปรด้วย PEMS

กระบวนการการดูดซับโปรตีนบนพื้นผิวนั้นเกิดได้จากแรงหลายชนิด เช่น แรงดึงดูดระหว่างประจุ hydrophobic interaction และ hydrogen bonding เป็นต้น โดยแรงดึงดูดระหว่างประจุ และ hydrophobic interaction มีบทบาทที่สำคัญในการดูดซับโปรตีนบนพื้นผิว^{17, 34, 65, 66} ดังนั้นในการศึกษาส่วนนี้จะทำการศึกษาผลความเข้มข้นของ buffer ต่อการดูดซับของโปรตีนบน PDMS ที่มีได้ดัดแปรพื้นผิว เพื่อศึกษาหาความเข้มข้นของ buffer ที่เหมาะสม และผลของ pH ต่อการดูดซับของ BSA บนพื้นผิว PDMS ทั้งที่ดัดแปรและไม่ได้ดัดแปร

A.4.1 ผลของความเข้มข้นของ buffer ต่อการดูดซับโปรตีนบนพื้นผิว PDMS ที่มีได้ดัดแปร

ในการติดตามปริมาณการดูดซับของโปรตีนบนพื้นผิว PDMS ในส่วนนี้จะทำการติดตามด้วยสัญญาณ FTIR บนพื้นผิว PDMS โดยใช้ ATR-FTIR mode และทำการหาปริมาณของ BSA บนชิ้นงานดังรายละเอียดการทดลองในหัวข้อ A.1.7.2 โดยโปรตีน BSA ให้สัญญาณ FTIR ที่ตำแหน่ง 1650 cm^{-1} (amide I) เป็นสัญญาณของการเกิด stretching ของพันธะ C=O และที่ 1540 cm^{-1} (amide II) เป็นสัญญาณของการเกิด CN stretching and NH bending^{18, 46, 66} จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ PBS มีผลต่อปริมาณของ BSA ที่ถูกดูดซับบนพื้นผิว PDMS ณ ความเข้มข้นของ PBS 1 mM ปริมาณ BSA ที่สามารถถูกดูดซับบนพื้นผิว PDMS มีค่าสูงกว่าเมื่อความเข้มข้นของ PBS 10 mM ทั้งนี้เนื่องจากโมเลกุลของโปรตีนอาจเกิดแรงดึงดูดระหว่างกัน และไฮออนต่างๆ ได้มากกว่า ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจะทำการเลือกใช้สารละลาย buffer ที่ความเข้มข้น 1 mM



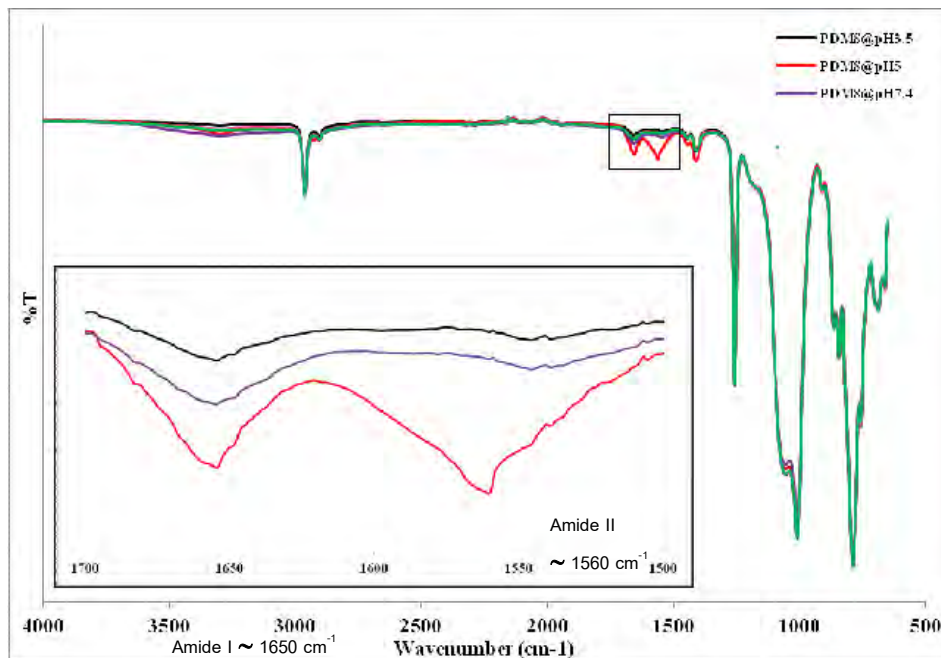
รูปที่ 3.11 ATR-FTIR spectra ของพื้นผิว PDMS ที่มีได้ดัดแปร หลังจากจุ่มในสารละลาย PBS ความเข้มข้น 1 mM (—) และ 10 mM (—)

A.4.2 การดูดซับของ BSA บน unmodified PDMS ณ pH ต่างๆ

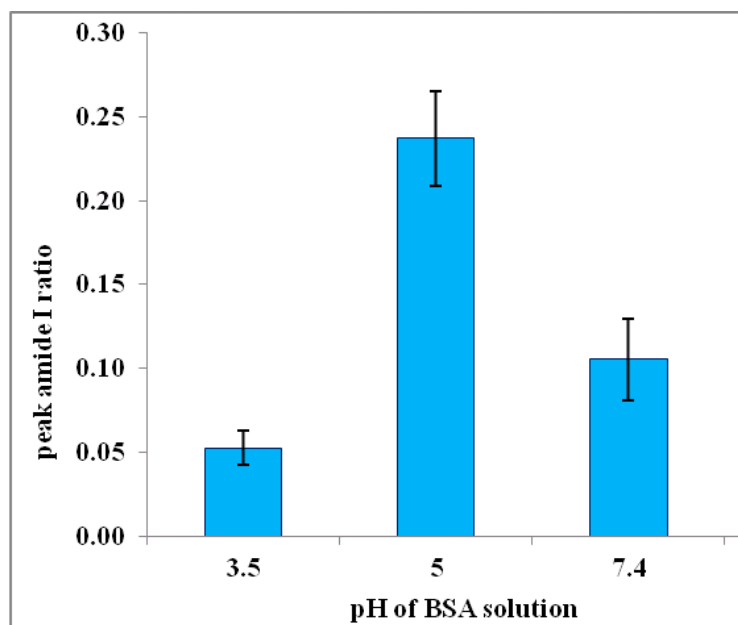
ในการศึกษานี้เพื่อศึกษาผลของ pH ต่อปริมาณการดูดซับของโปรตีนบน unmodified PDMS ซึ่งเป็นพื้นผิวที่ไม่มีประจุ โดย pH จะมีผลต่อโครงสร้างของโปรตีนแตกต่างกัน pH ที่ใช้ในการศึกษานี้คือ pH 3.5 ซึ่ง BSA จะมี net charge เป็นประจุบวก, pH 5 ซึ่งใกล้กับ pI (isoelectric point) ของ BSA (pI = 4.8) และ pH 7.4 มี net charge เป็นประจุลบ

จากรูปที่ 3.12 แสดงการดูดซับ BSA บน unmodified PDMS ณ pH ต่างๆ กัน และรูปที่ 3.13 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนระหว่างความสูงของสัญญาณของ amide I/สัญญาณของ PDMS ที่ wavenumber $\sim 2960\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งความสูงของอัตราส่วนนี้สัมพันธ์กับปริมาณ BSA ที่ถูกดูดซับบนพื้นผิว PDMS ซึ่งจะเห็นได้ว่า ณ pH 5 ปริมาณ BSA ที่สามารถดูดซับบนพื้นผิว unmodified PDMS มีค่ามากที่สุด ซึ่งที่ pH นี้ net charge ใกล้ศูนย์ โปรตีนอยู่ในรูป N form ซึ่งเป็น compact state แรงผลักระหว่างโมเลกุลของ BSA มีค่าน้อยมาก⁶⁷ ดังนั้นการดูดซับของโปรตีนบน unmodified PDMS อาจเกิดจากแรง hydrophobic

ณ pH อื่นๆ ซึ่ง net charge ของ BSA มีค่าเป็นประจุบวก หรือประจุลบพบว่าการดูดซับของโปรตีนมีค่าต่ำลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเพิ่มขึ้นของความหนาแน่นของประจุของโปรตีนส่งผลทำให้ความชอบน้ำของโมเลกุล BSA เพิ่มขึ้น ทำให้การดูดซับของ BSA บนพื้นผิว PDMS ซึ่งจะเกิดจากแรง hydrophobic เป็นส่วนใหญ่นั้นมีแนวโน้มลดลง ส่งผลให้ปริมาณของ BSA ที่จะถูกดูดซับบนพื้นผิว PDMS ลดลง⁶⁸



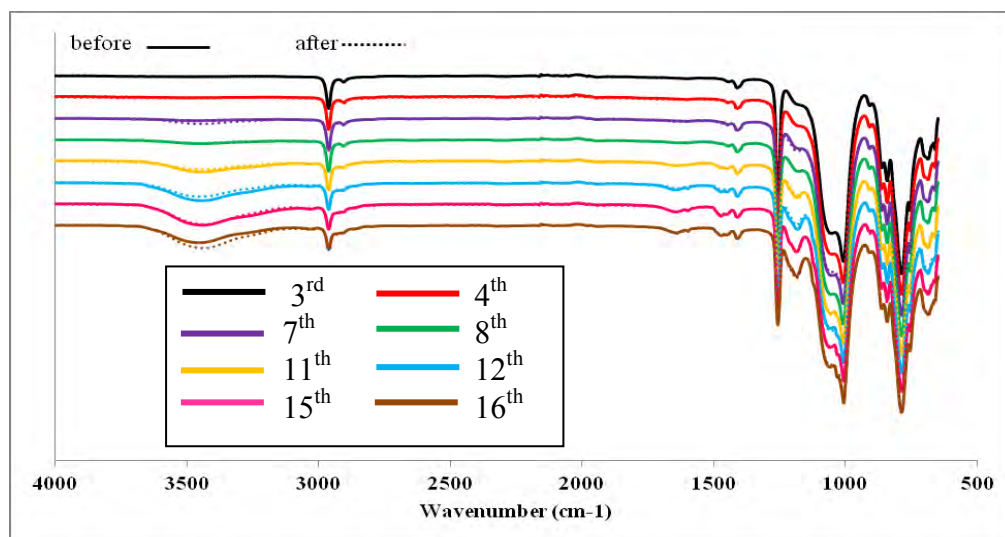
รูปที่ 3.12 ATR-FTIR spectra ของ unmodified PDMS เมื่อจุ่มชิ้นงานในสารละลาย BSA ณ pH ต่างๆ ภาพแทรกแสดง characteristic infrared peak ของ amide I ที่ wavenumber $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$ และ amide II ที่ wavenumber 1560 cm^{-1} .



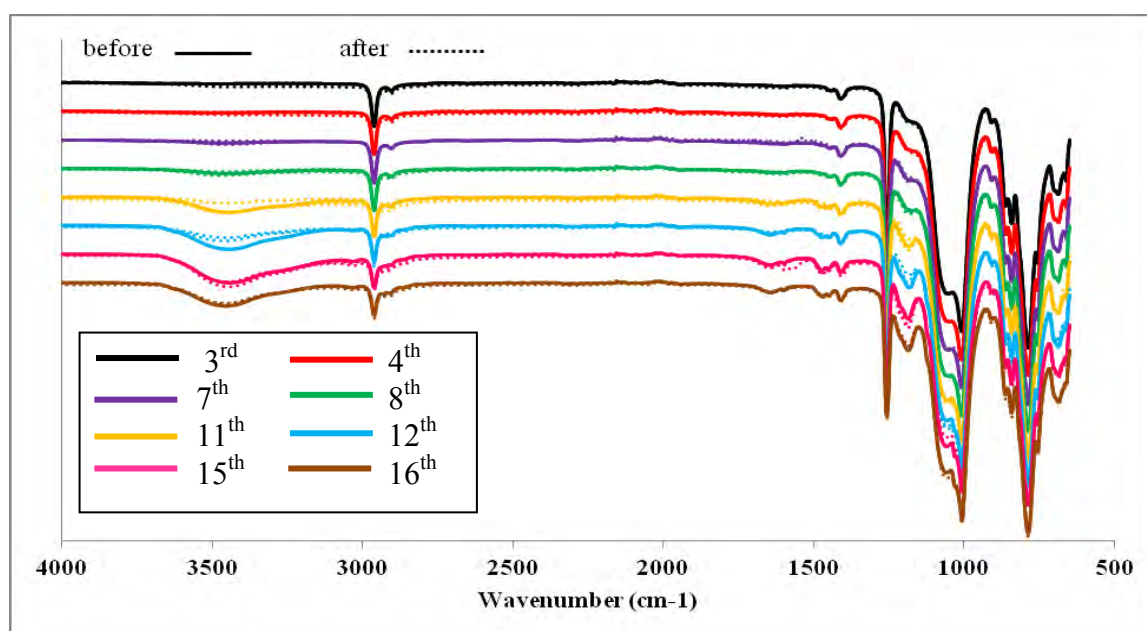
รูปที่ 3.13 ผลของ pH ต่อ อัตราส่วนระหว่างสัญญาณของ amide I ($\sim 1650\text{ cm}^{-1}$) และ PDMS peak ($\sim 2960\text{ cm}^{-1}$)

A.4.3 การดูดซับของ BSA บน PDMS ที่ดัดแปรด้วย PDADMAC/PSS ณ pH ต่างๆ

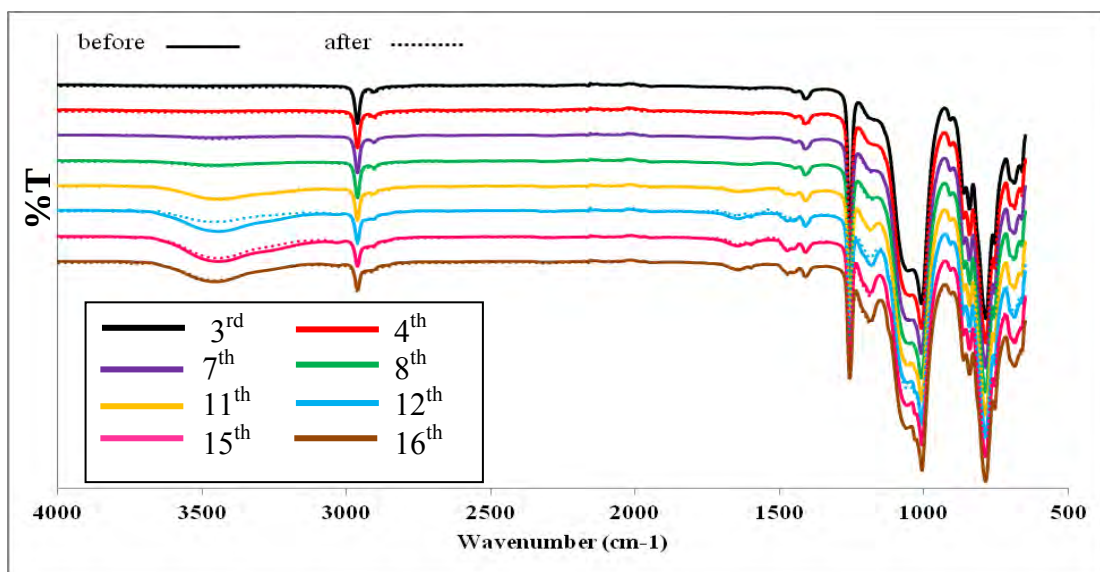
การดูดซับของ BSA บน PDMS ที่ผ่านการดัดแปรด้วย PEMs นั้นจะเกิดจากแรง electrostatic interaction ซึ่งขึ้นอยู่กับจำนวนประจุของ PEMs และ BSA ซึ่งจำนวนประจุดังกล่าวขึ้นอยู่กับ pH ของสารละลาย ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้ศึกษาผลของ pH ต่อการดูดซับของ BSA โดยในขั้นแรกทำการศึกษาความเสถียรของชั้นเคลือบ PEMs นี้เมื่อสัมผัสกับสารละลาย pH ต่างๆ ซึ่งพบว่าชั้น PEMs ที่เคลือบอยู่บนชั้น PDMS มีความเสถียร ไม่เกิดการหลุดออกของ PEMs เมื่อสัมผัสกับสารละลาย pH ต่างๆ (รูปที่ 3.13-3.15)



รูปที่ 3.14 เกลียวภาพของ PEMs ระบบ PDADMAC/PSS ที่เคลือบบน PDMS ณ pH 3.5 โดยเส้นทึบแสดงข้อมูลของชิ้นงานก่อนจุ่มในสารละลาย buffer และเส้นประแสดงสัญญาณ IR ของชิ้นงานหลังจุ่มในสารละลาย



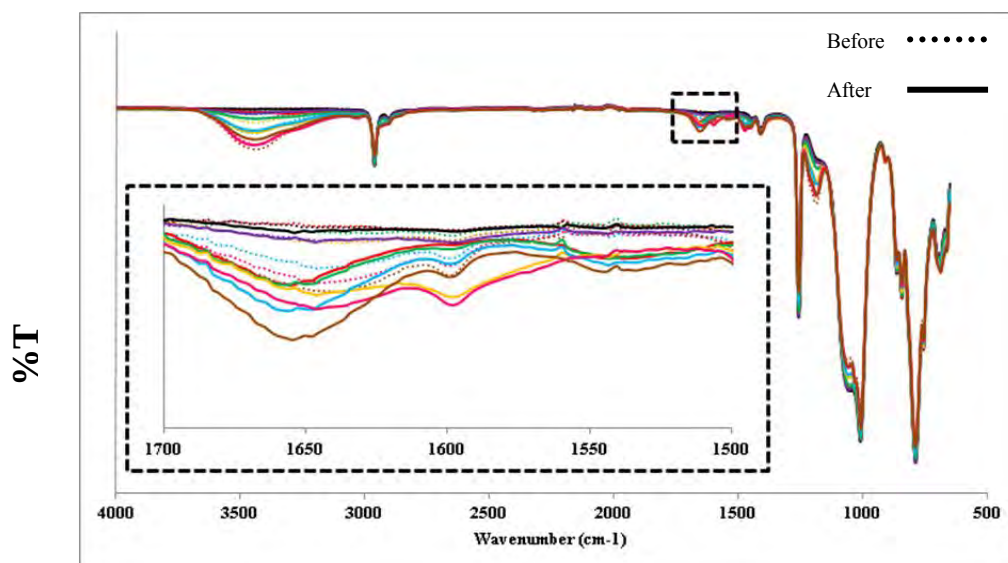
รูปที่ 3.15 เกลียวภาพของ PEMs ระบบ PDADMAC/PSS ที่เคลือบบน PDMS ณ pH 5 โดยเส้นทึบแสดงข้อมูลของชิ้นงานก่อนจุ่มในสารละลาย buffer และเส้นประแสดงสัญญาณ IR ของชิ้นงานหลังจุ่มในสารละลาย



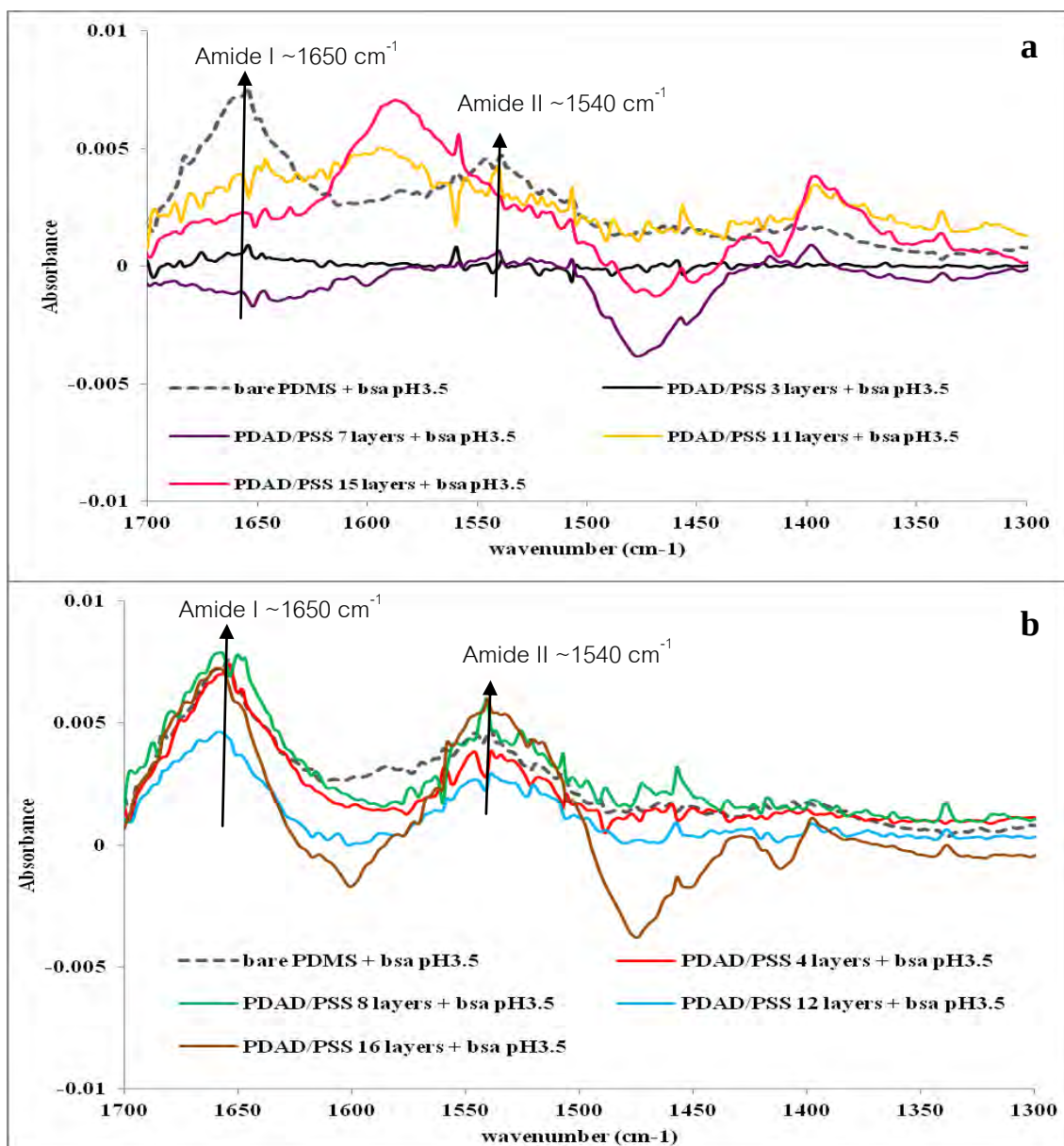
รูปที่ 3.16 เกลียวภาพของ PEMs ระบบ PDADMAC/PSS ที่เคลือบบน PDMS ณ pH 7.4 โดยเส้นทึบแสดงข้อมูลของชิ้นงานก่อนจุ่มในสารละลาย buffer และเส้นประแสดงสัญญาณ IR ของชิ้นงานหลังจุ่มในสารละลาย

A.4.3.1 การดูดซับของโปรตีน ณ pH 3.5

จากรูปที่ 3.16-3.17 ซึ่งแสดง ATR-FTIR spectra และ ผลต่างระหว่าง spectrum ของชิ้นงาน PDMS ที่ดัดแปรด้วย PEMs ระบบ PDADMAC/PSS ระหว่างก่อนและหลังจุ่มในสารละลาย BSA pH 3.5 โดยการเกาะติดของ BSA ทำการติดตามจาก characteristic peaks ที่ตำแหน่ง $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$ (amide I) และที่ตำแหน่ง $\sim 1540\text{ cm}^{-1}$ (amide II) ตามที่ได้กล่าวมาแล้ว ที่ pH 3.5 BSA จะมี net charge เป็นบวกซึ่งไม่สามารถเกาะติดบนพื้นผิว modified PDMS ที่มีชั้นนอกสุดเป็น PDADMAC (เลขคี่) เนื่องจาก PDADMAC มีประจุเป็นบวกเช่นเดียวกับประจุบน BSA จึงเกิดการผลักกัน และเมื่อชั้นนอกสุดเป็น PSS ซึ่งมีประจุเป็นลบ พบว่าเกิดการเกาะติดของ BSA แต่ในปริมาณที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับของ unmodified PDMS ในทุกๆ จำนวนชั้น (รูปที่ 3.17 b)



รูปที่ 3.17 ATR-FTIR spectra ของการดูดซับ BSA ณ pH 3.5 บน PDMS ที่ดัดแปรด้วย PDADMAC/PSS multilayer ที่มีความหนาต่างกัน ได้แก่ชั้นที่สาม (—), ชั้นที่สี่ (—), ชั้นที่เจ็ด (—), ชั้นที่แปด (—), ชั้นที่สิบเอ็ด (—), ชั้นที่สิบสอง (—), ชั้นที่สิบห้า (—) และชั้นที่สิบหก (—) โดยเส้นทึบแสดงข้อมูลของชิ้นงานก่อนจุ่มในสารละลาย BSA และเส้นประแสดงสัญญาณ IR ของชิ้นงานหลังจุ่มในสารละลาย BSA รูปเล็กแสดงภาพขยายของสัญญาณของหมู่เอไมด์ที่ตำแหน่ง ~ 1650 และ $\sim 1540\text{ cm}^{-1}$



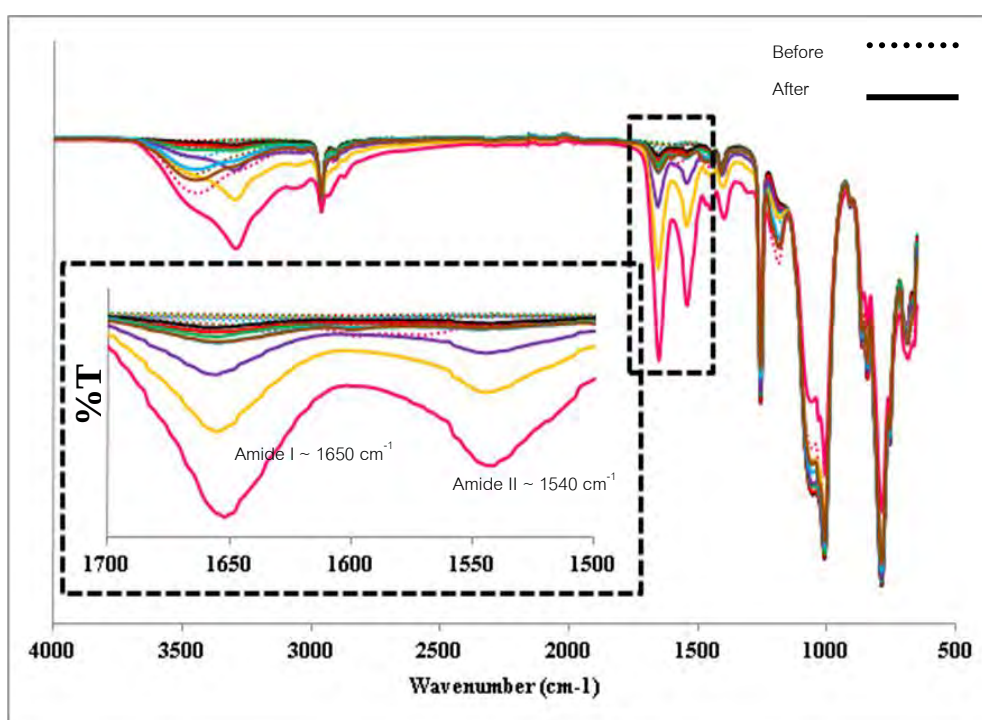
รูปที่ 3.18 ผลต่างของ ATR-FTIR spectrum ระหว่างก่อนจุ่มและหลังจุ่มชิ้นงานในสารละลาย BSA ที่ pH 3.5 โดยเส้นประแสดงสัญญาณ IR ของ unmodified PDMS (— — —) และเส้นทึบแสดงสัญญาณ IR ของ PDMS ที่ดัดแปรด้วย PDADMAC/PSS multilayer เมื่อฟิล์มชั้นนอกสุดเป็น (a) PDADMAC (positive charge) และ (b) PSS (negative charge)

A.4.3.2 การดูดซับของโปรตีน ณ pH 5

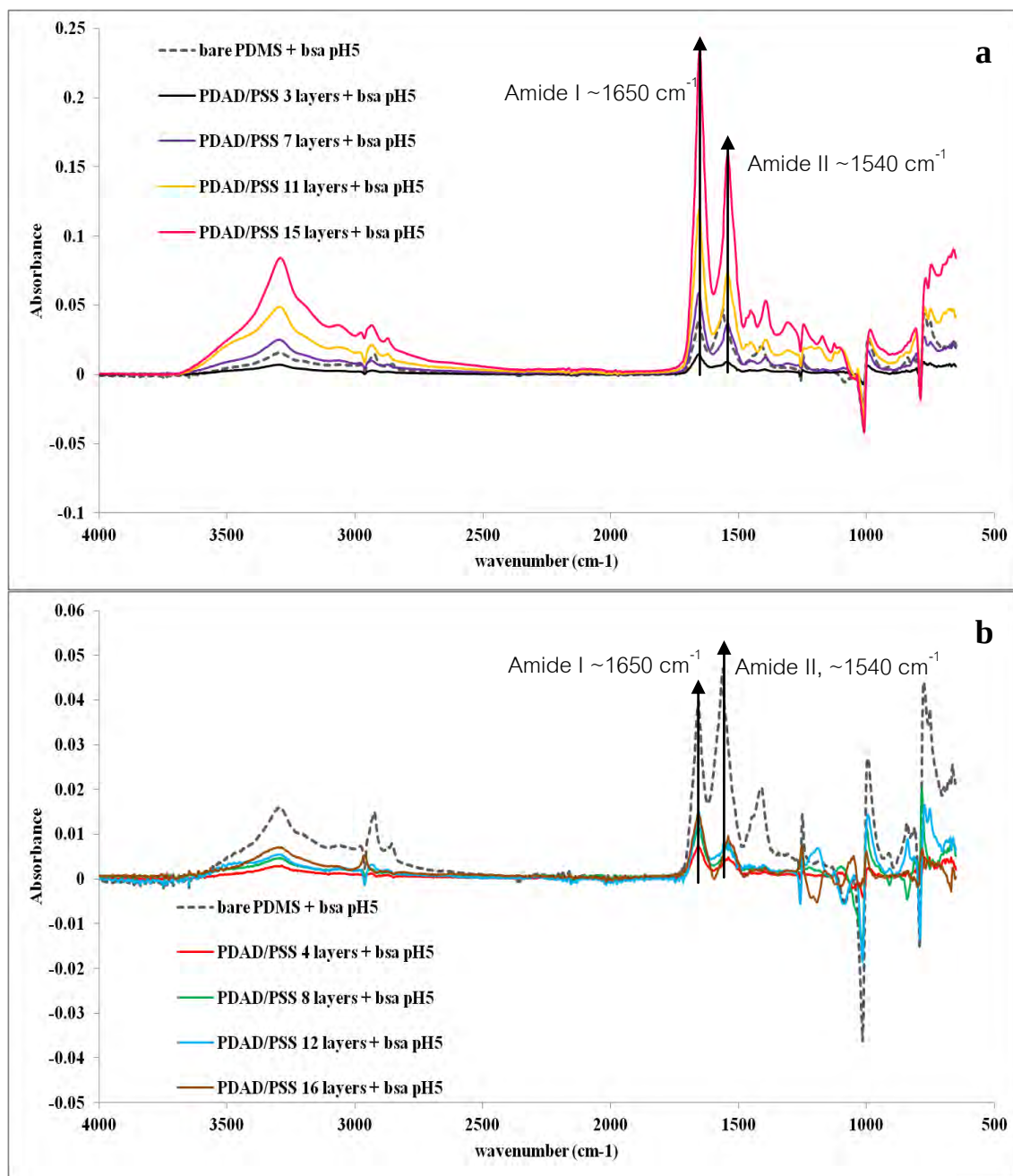
ถึงแม้ว่าคุณสมบัติความชอบน้ำของ PDMS ที่ดัดแปรด้วย PDADMAC/PSS จะมีค่าสูงขึ้น ซึ่งควรลดการดูดซับหรือเกาะติดของ BSA แต่จากการศึกษาพบว่า BSA สามารถเกาะติดบนพื้นผิวของ PDMS ที่ดัดแปรด้วย PDADMAC/PSS ที่มี PDADMAC ซึ่งมีประจุบวกเป็นชั้นบนสุด (ชั้นเลขคี่) ดังแสดงในรูปที่ 3.18-3.19 ซึ่งอาจเป็นเป็นผลจาก pH 5 มีค่ามากกว่าค่า pI ของ BSA เล็กน้อยจึงส่งผลให้โมเลกุล BSA มี net charge เป็นลบเล็กน้อย จึง

สามารถเกาะติดบนพื้นผิวที่ดัดแปรด้วย PEMS นี้ผ่านแรงดึงดูดระหว่างประจุได้ และพบว่า การดูดซับของ BSA เพิ่มขึ้นเมื่อจำนวนชั้นเพิ่มขึ้น แสดงว่า BSA สามารถ penetrate เข้าไปในชั้น PEMS ได้ Salloum และคณะได้รายงานไว้ว่าจำนวนชั้นของฟิล์มบางจะมีผลต่อการดูดซับโปรตีนซึ่งในรายงานดังกล่าวยืนยันโดยใช้เทคนิค Atomic Force Microscope¹⁷

อย่างไรก็ตามพบการเกาะติดของ BSA ปริมาณเล็กน้อยบนพื้นผิวของ PDMS ที่มีชั้น PSS ซึ่งมีประจุลบเป็นชั้นนอกสุดเล็กน้อย ทั้งนี้อาจเป็นเนื่องมาจากแรงอื่นๆ ที่มีใช้แรงดึงดูดระหว่างประจุ เช่น π - π interaction ระหว่าง BSA และ benzene ring บนโมเลกุลของ PSS ซึ่งได้มีการรายงานผลการทดลองเช่นเดียวกันนี้โดย Salloum และคณะ¹⁷ ทั้งนี้ปริมาณ BSA ที่เกาะติดบนพื้นผิวนี้นี้น้อยกว่า unmodified PDMS ค่อนข้างมาก



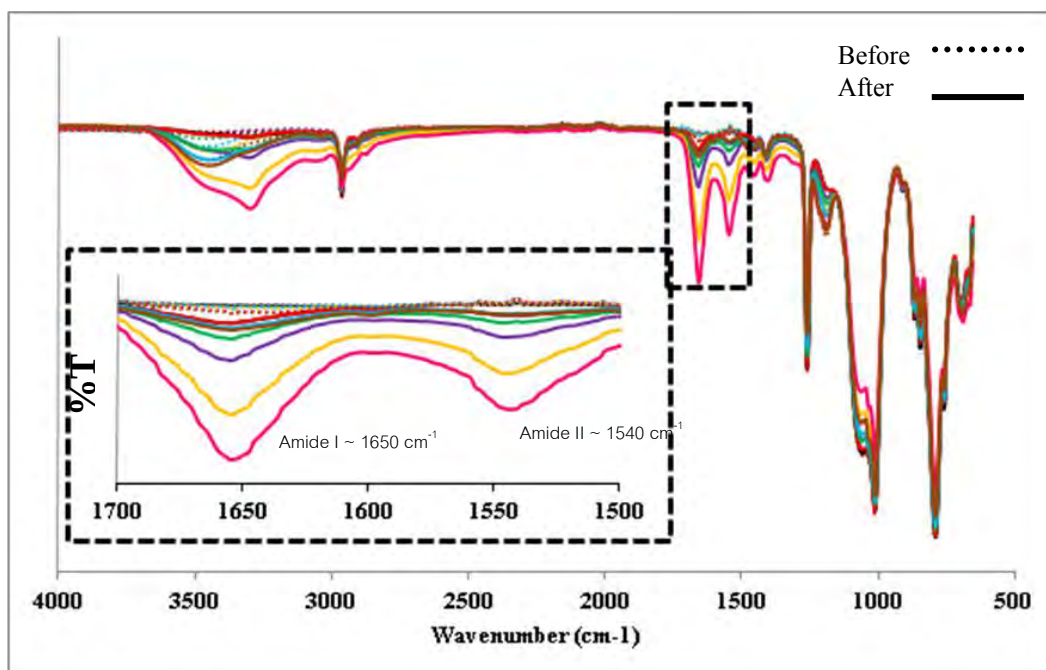
รูปที่ 3.19 ATR-FTIR spectra ของการดูดซับ BSA ณ pH 5 บน PDMS ที่ดัดแปรด้วย PDADMAC/PSS multilayer ที่มีความหนาต่างกัน ได้แก่ชั้นที่สาม (—), ชั้นที่สี่ (—), ชั้นที่เจ็ด (—), ชั้นที่แปด (—), ชั้นที่สิบเอ็ด (—), ชั้นที่สิบสอง (—), ชั้นที่สิบห้า (—) และชั้นที่สิบหก (—) โดยเส้นทึบแสดงข้อมูลของชิ้นงานก่อนจุ่มในสารละลาย BSA และเส้นประแสดงสัญญาณ IR ของชิ้นงานหลังจุ่มในสารละลาย BSA รูปเล็กแสดงภาพขยายของสัญญาณของหมู่เอไมด์ที่ตำแหน่ง ~ 1650 และ ~ 1540 cm^{-1}



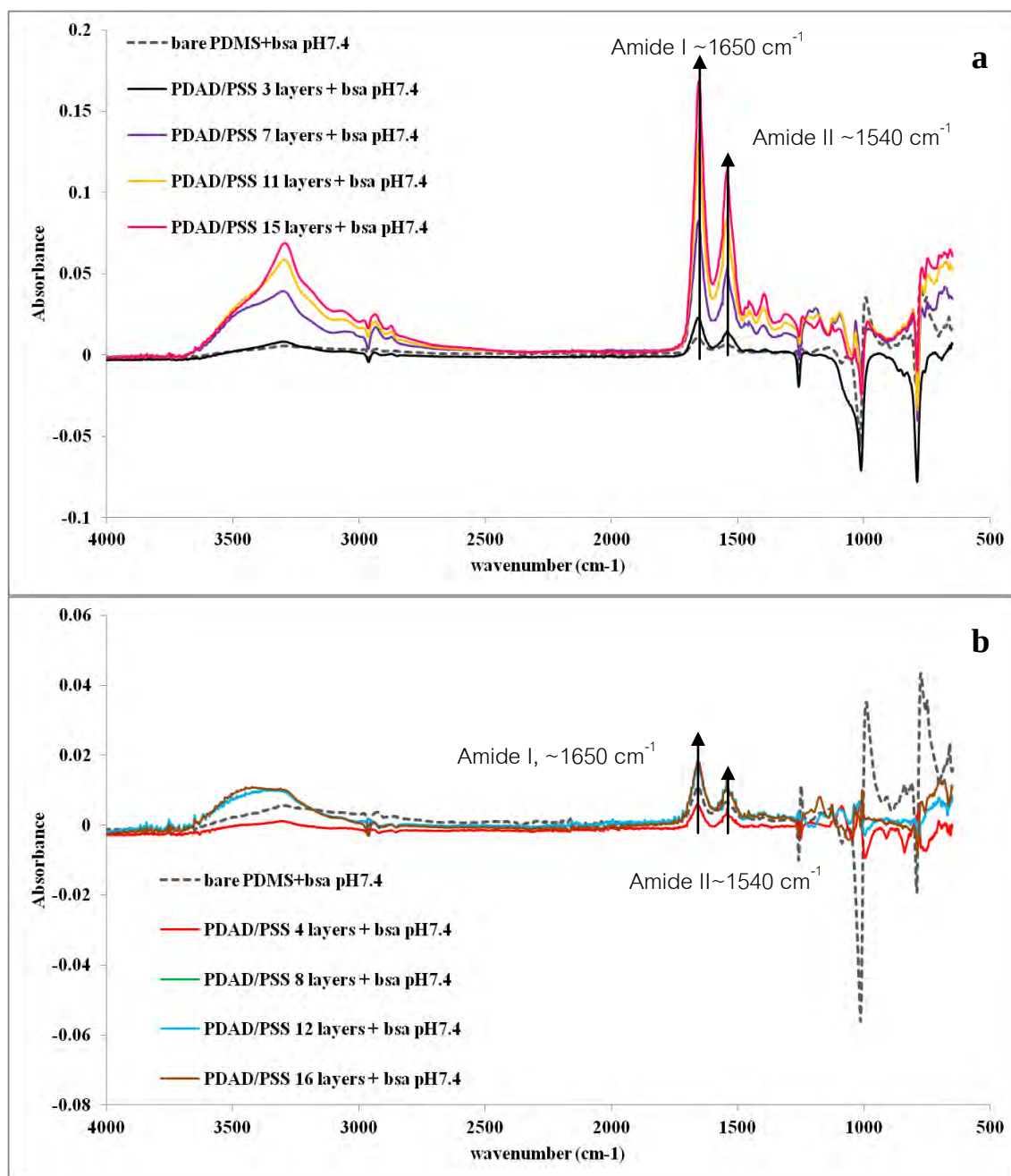
รูปที่ 3.20 ผลต่างของ ATR-FTIR spectrum ระหว่างก่อนจุ่มและหลังจุ่มชิ้นงานในสารละลาย BSA ที่ pH 5 โดยเส้นประแสดงสัญญาณ IR ของ unmodified PDMS (— — —) และเส้นทึบแสดงสัญญาณ IR ของ PDMS ที่ดัดแปรด้วย PDADMAC/PSS multilayer เมื่อฟิล์มชั้นนอกสุดเป็น (a) PDADMAC (positive charge) และ (b) PSS (negative charge)

A.4.3.3 การดูดซับของโปรตีน ณ pH 7.4

ในสารละลาย buffer ที่ pH 7.4 โมเลกุล BSA จะมี net charge เป็นประจุลบ เนื่องจาก pH นี้สูงกว่าค่า pI จึงสามารถเกาะติดบนพื้นผิวที่มีประจุบวกได้สูงผ่าน electrostatic interaction ดังแสดงในรูปที่ 3.20-3.21 (a) และพบว่าปริมาณการเกาะติดมีค่ามากขึ้นเมื่อจำนวนชั้นเคลือบมากขึ้นเช่นเดียวกับผลการทดลองในตอนๆที่ A.4.3.2 และสำหรับการเกาะติดของ BSA บนพื้นผิวของ PDMS ที่มี PSS อยู่ชั้นนอกสุด (รูปที่ 3.21 b) พบว่ามีค่าสูงกว่า unmodified PDMS เมื่อจำนวนชั้นเคลือบมากกว่า 8 ชั้น



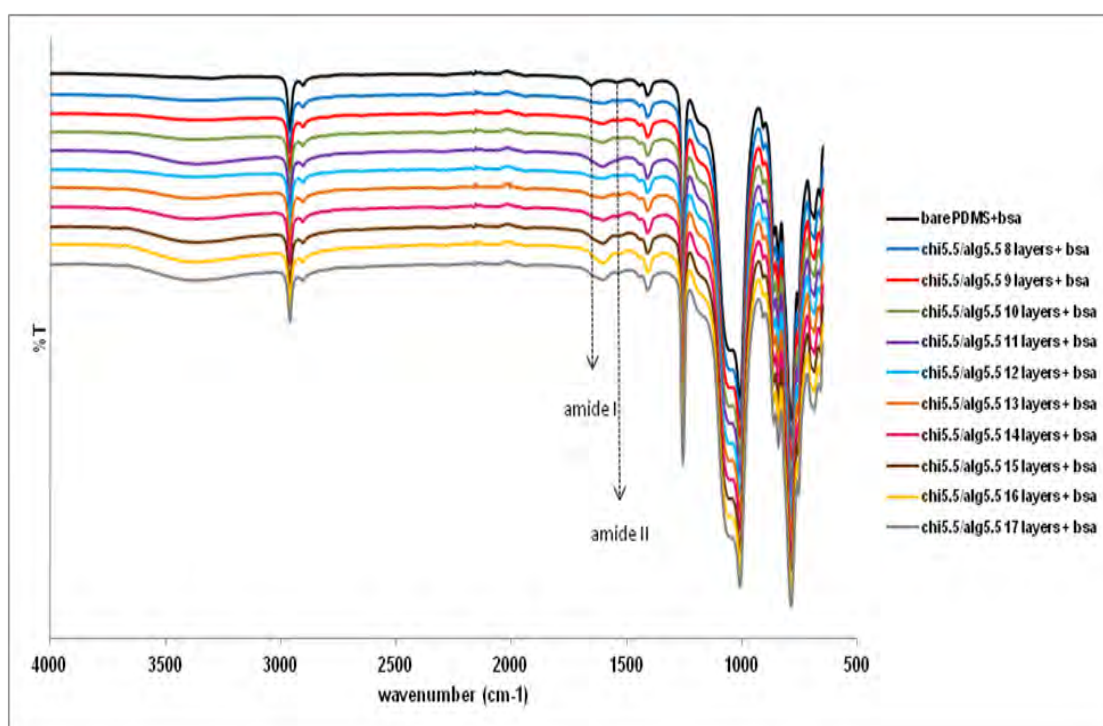
รูปที่ 3.21 ATR-FTIR spectra ของการดูดซับ BSA ณ pH 7.4 บน PDMS ที่ดัดแปรด้วย PDADMAC/PSS multilayer ที่มีความหนาต่างกัน ได้แก่ชั้นที่สาม (—), ชั้นที่สี่ (—), ชั้นที่เจ็ด (—), ชั้นที่แปด (—), ชั้นที่สิบเอ็ด (—), ชั้นที่สิบสอง (—), ชั้นที่สิบห้า (—) และชั้นที่สิบหก (—) โดยเส้นที่บ่งชี้ข้อมูลของชิ้นงานก่อนจุ่มในสารละลาย BSA และเส้นประแสดงสัญญาณ IR ของชิ้นงานหลังจุ่มในสารละลาย BSA รูปเล็กแสดงภาพขยายของสัญญาณของหมู่เอไมด์ที่ตำแหน่ง ~ 1650 และ $\sim 1540\text{ cm}^{-1}$



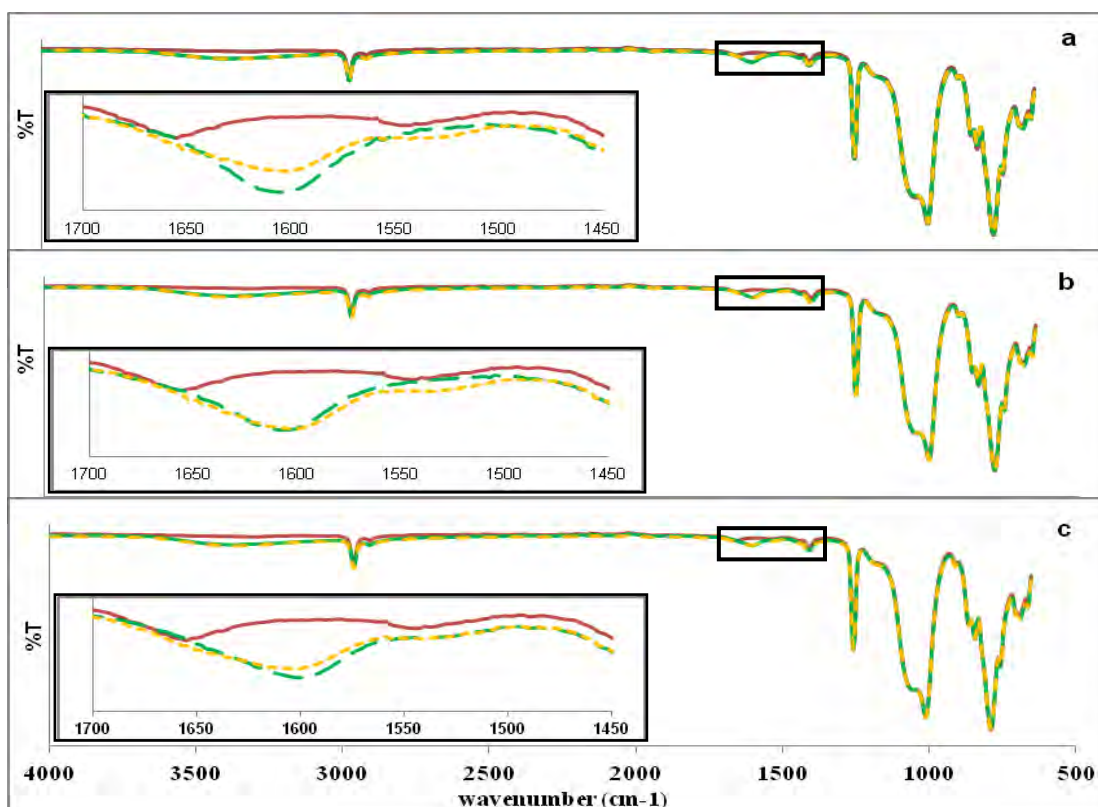
รูปที่ 3.22 ผลต่างของ ATR-FTIR spectrum ระหว่างก่อนจุ่มและหลังจุ่มขึ้นงานในสารละลาย BSA ที่ pH 7.4 โดยเส้นประแสดงสัญญาณ IR ของ unmodified PDMS (— — —) และเส้นทึบแสดงสัญญาณ IR ของ PDMS ที่ดัดแปรด้วย PDADMAC/PSS multilayer เมื่อฟิล์มชั้นนอกสุดเป็น (a) PDADMAC (positive charge) และ (b) PSS (negative charge)

A.4.4 การดูดซับของ BSA บน PDMS ที่ดัดแปรด้วย chitosan/alginate ณ pH 7.4

ในการศึกษานี้ ได้ทำการเตรียมฟิล์ม PEMs ระบบ chitosan และ alginate โดยควบคุมให้ pH ของสารละลาย chitosan และ alginate เท่ากับ 5.5 ซึ่งจากผลการทดลองในหัวข้อ A.3.2 ซึ่งพบว่า การดัดแปรพื้นผิว PDMS ด้วย chitosan/alginate สามารถเพิ่มความชอบน้ำให้แก่พื้นผิวได้ จากรูปที่ 3.22 และ 3.23 พบว่าการเกาะติดของ BSA บน PDMS ที่ดัดแปรด้วย chitosan/alginate นี้ค่อนข้างต่ำ ถึงแม้ว่าชั้นนอกสุดเป็นชั้น chitosan ผลการทดลองเช่นนี้อาจเป็นเพราะว่า ณ pH 7.4 มีค่าสูงกว่า pKa ของ chitosan ดังนั้น amino functional group บนโมเลกุลของ chitosan จะอยู่ใน unprotonated form ซึ่งมีผลต่อการเกิด ionic interaction ระหว่าง BSA กับ ชั้น chitosan ได้ส่งผลให้การดูดซับน้อยลง หรืออาจเกิดการหลุดออกของ chitosan/alginate ฟิล์ม เพราะแรงยึดเหนี่ยวระหว่าง chitosan และ alginate ใน PEMs ลดลง¹⁹ การหลุดออกของ PEMs ในระบบนี้ ณ pH 7.4 ได้มีการรายงานไว้ก่อนหน้านี้เช่นกัน^{69, 70}



รูปที่ 3.23 กราฟ ATR-FTIR ของ PDMS ที่มีได้ดัดแปร และ PDMS ที่ดัดแปรด้วย PEMs ระบบ chitosan/alginate ที่จำนวนชั้นตั้งแต่ 8-17 ชั้น หลังจากแช่ชิ้นงานในสารละลาย BSA ที่ pH 7.4



รูปที่ 3.24 ATR-FTIR spectra ของ PDMS ที่ดัดแปรด้วย chitosan/alginate ชั้นที่ 15, 16 และ ชั้นที่ 17 โดยเส้นประแสดงสัญญาณก่อนจุ่มในสารละลาย BSA (— — —) และเส้นจุดแสดงสัญญาณหลังจุ่มในสารละลาย BSA (.....) โดยเส้นทึบแสดงสัญญาณของ uncoated PDMS หลังจากจุ่มในสารละลาย BSA (——) รูปเล็กแสดงภาพขยายของสัญญาณของหมู่เอไมด์ที่ตำแหน่ง ~ 1650 และ $\sim 1540 \text{ cm}^{-1}$

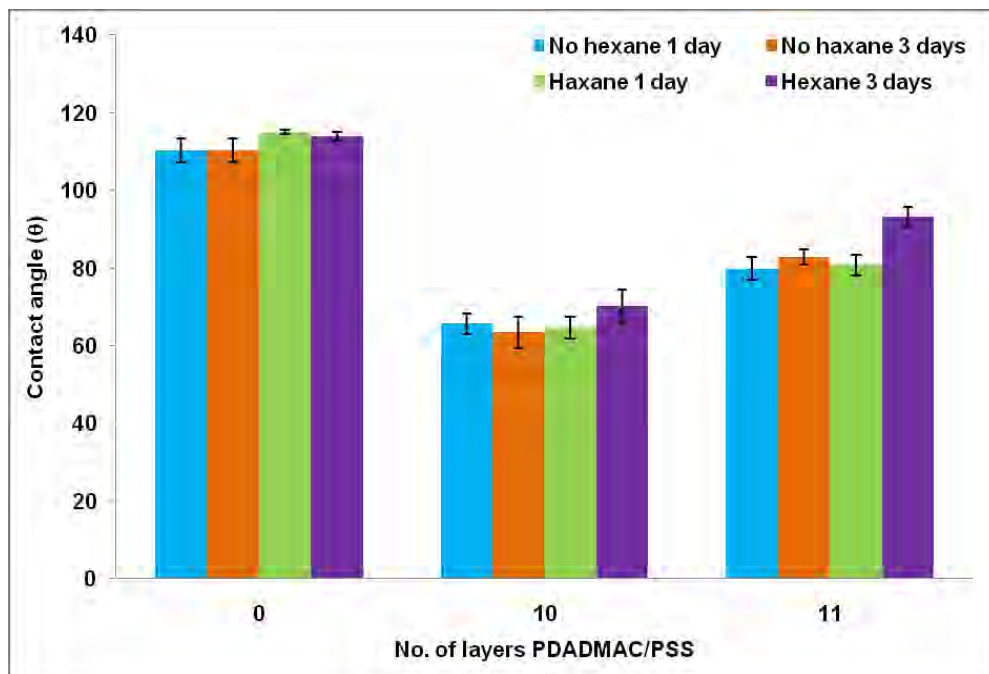
A.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เกาะติด หรือดูดซับบนพื้นผิว PDMS

ในการหาปริมาณ BSA ที่ดูดซับบนพื้นผิวของ PDMS เชิงปริมาณนั้น คณะผู้วิจัยเลือกใช้วิธี bicinchoninic acid ซึ่งได้มีการนำไปใช้ในการหาปริมาณของ BSA บนพื้นผิวที่ผ่านการดัดแปรโดย Hoven และคณะ⁴⁷ ซึ่งในการหาค่า BSA ออกจากชิ้นงานจำเป็นต้องใช้ SDS ซึ่งเกิดการหลุดออกของ PEMs และส่งผลต่อค่าการดูดกลืนแสง ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงไม่สามารถหาปริมาณของ BSA ที่ดูดซับบนพื้นผิวโดยใช้วิธีนี้ได้

A.5 ศึกษาผลของการสกัด PDMS ด้วยเฮกเซนต่อการคืนกลับของความไม่ชอบน้ำ

ตามที่ได้กล่าวไปแล้ว ในการดัดแปรชิ้นงาน PDMS ให้มีความชอบน้ำมากขึ้น ประสบปัญหาการคืนกลับของสมบัติความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเนื่องจากการเคลื่อนที่ของ oligomer ที่มีได้เกิดปฏิกิริยาเชื่อมขวางมาที่พื้นผิวของ PDMS^{60, 61, 71, 72} ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงได้ศึกษาผลของการสกัดโพลิเมอร์ด้วยตัวทำละลายต่อการคืนกลับของสมบัติความไม่ชอบน้ำของชิ้นงาน PDMS ที่มีการดัดแปรพื้นผิว โดยการวัดค่ามุมสัมผัส

จากรูปที่ 3.24 พบว่าการสกัดด้วยเฮกเซนไม่มีผลต่อเสถียรภาพของความชอบน้ำ หรือไม่ชอบน้ำของพื้นผิวอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามพบว่าชิ้นงานที่ผ่านการแช่เฮกเซน และเคลือบด้วย PEMS นั้น เมื่อเก็บไว้นานขึ้นพบว่าค่าความไม่ชอบน้ำเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเป็นผลของเฮกเซนที่กักเก็บไว้ในชิ้นงาน ซึ่งต้องมีการศึกษาต่อไป

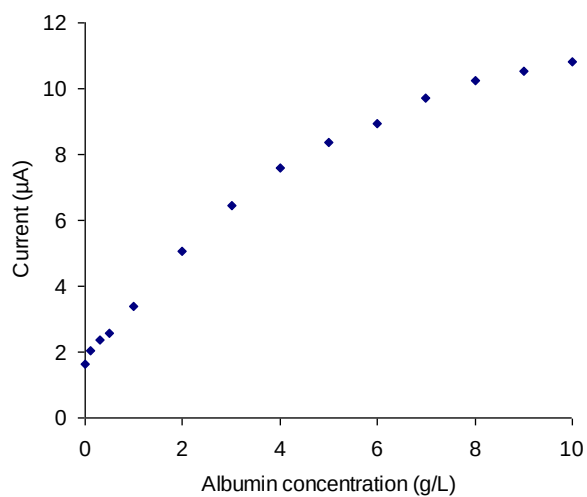


รูปที่ 3.25 กราฟแท่งแสดงค่ามุมสัมผัสของหยดน้ำกับชิ้นงาน PDMS ที่สภาวะต่างๆ

Part B ประยุกต์ใช้ไฟฟ้าระดับจุลภาคของอนุภาคนาโนทองและการวัดความเข้มข้น albumin

ในการศึกษาส่วนนี้เป็นการประยุกต์องค์ความรู้เกี่ยวกับการเตรียม microelectrode อย่างง่ายที่ได้พัฒนาขึ้น ซึ่งสามารถนำไปเป็นตัวตรวจวัดใน microfluidic device เพื่อตรวจวัดปริมาณ BSA ความเข้มข้น 0.1 g/L ไปจนถึง 10 g/L ด้วยการวัดค่าการนำไฟฟ้าที่เปลี่ยนแปลงไปได้ โดยขั้วไฟฟ้านี้เตรียมจาก gold nanoparticles และใช้เทคนิค layer by layer ร่วมกับเทคนิค flow deposition โดยจากการตรวจสอบลักษณะของพื้นผิวและความหนาของ microelectrode ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ความละเอียดสูง (field emission scanning electron microscope) พบว่ามีความหนาที่สม่ำเสมอตลอดตามแนวของการตัดขวางของขั้วไฟฟ้าโดยระดับความหนาที่ได้จากการสร้างขั้วเป็นฟิล์มบางจากอนุภาคนาโน 10 ชั้นนั้นมีขนาด 120 นาโนเมตร⁴⁸

ในการประกอบ microelectrode นี้เพื่อเป็นตัวตรวจวัดสำหรับอุปกรณ์ไมโครฟลูอิดิกส์ ในการติดตามสัญญาณของปริมาณ albumin ดังได้กล่าวไว้ในส่วนของการทดลองซึ่งจะทำการไหลผ่านสารละลายอัลบูมินผ่าน microelectrode โดยพบว่าค่าการเปลี่ยนแปลงของกระแสเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของโปรตีนอัลบูมินที่ไหลผ่านที่ระดับไมโครเมตรดังจะเห็นได้จากผ่านในรูปที่ 3.25 ซึ่งแสดงว่า microelectrode และวิธีการตรวจวัดนี้สามารถพัฒนาต่อเพื่อหาความเข้มข้นของ albumin ได้ แต่อย่างไรก็ตามค่าความเข้มข้นที่ขณะนี้สามารถติดตามได้นั้นมีค่าค่อนข้างสูง ซึ่งจำเป็นต้องมีการปรับเปลี่ยนภาวะการทดสอบต่อไป



รูปที่ 3.26 กราฟแสดงค่ากระแสที่วัดด้วย microelectrode ที่เตรียมจาก gold nanoparticles เมื่อผ่านสารละลายอัลบูมินที่ ความเข้มข้นต่างๆ

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

ในรายงานฉบับนี้แบ่งเป็นสองส่วน โดยส่วนที่หนึ่งมุ่งที่จะเพิ่มสมบัติความชอบน้ำของพื้นผิว PDMS ด้วย polyelectrolyte multilayer film (PEMs) ซึ่งเตรียมด้วยเทคนิค layer by layer deposition ของ polyelectrolyte ได้ศึกษาผลของฟิล์มเคลือบนี้ต่อค่า electroosmotic flow (EOF) และการดูดซับ BSA โดยใช้ คู่ polyelectrolyte 2 คู่คือ PDADMAC/PSS ซึ่งเป็น strong polyelectrolyte และ chitosan/alginate ซึ่งเป็น weak polyelectrolyte และในการสร้างฟิล์มคู่นี้จะควบคุมให้สารละลายมี pH เท่ากับ 5.5 ซึ่งเป็นภาวะที่สามารถสร้างฟิล์มได้ดีที่สุด

ในการศึกษาผลของฟิล์มเคลือบต่อค่า EOF คณะผู้วิจัยเลือกใช้ฟิล์มคู่ PDADMAC/PSS ซึ่งพบว่าค่า EOF ของ microfluidic device ที่เตรียมด้วย PDMS นี้มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อทำการเคลือบด้วยฟิล์ม PDADMAC/PSS การสร้าง PEMs จาก polyelectrolyte ที่ความเข้มข้น 10 mM สามารถเคลือบพื้นผิวได้สมบูรณ์กว่า และมีความชอบน้ำมากกว่าเมื่อใช้ polyelectrolyte ที่มีความเข้มข้น 1 mM โดยพบว่าค่า EOF ของ microchannel ที่ชั้นบนสุดเป็น PSS (ประจุลบ) ให้ค่าสูงกว่าของ microchannel ที่มีได้เคลือบและมีทิศทางเดียวกัน และมีค่าใกล้เคียงกับค่า EOF ของ microchannel ที่ทำด้วยแก้วอีกด้วย นอกจากนี้พบว่าค่า EOF ที่ได้นี้มีเสถียรภาพดีกว่าค่า EOF ของ PDMS microchannel ที่มีได้ดัดแปร และไม่ขึ้นกับค่า pH

พื้นผิวที่ดัดแปรด้วย PEMs ของ PDADMAC/PSS และคู่ chitosan/alginate สามารถเพิ่มสมบัติความชอบน้ำของ PDMS ได้ และพบว่าพื้นผิวของ PDMS ที่เคลือบด้วย chitosan/alginate ให้ความชอบน้ำมากกว่าพื้นผิวที่เคลือบด้วย PDADMAC/PSS โดยมุมสัมผัสต่ำสุดมีค่าเท่ากับ 20° และความชอบน้ำเพิ่มมากขึ้นเมื่อจำนวนชั้นเคลือบมากขึ้น โดยพบว่าต้องเคลือบอย่างน้อย 8 ชั้นเพื่อให้พื้นผิวที่มีความชอบน้ำมากที่สุดที่น่าสนใจคือในการเคลือบพื้นผิวให้มีสมบัติความชอบน้ำ-ไม่ชอบน้ำที่ดี จำเป็นต้องเคลือบด้วยจำนวนชั้นที่มากกว่าจำนวนชั้นที่ต้องเคลือบเพื่อให้ได้ค่า EOF ที่ดี

ในการศึกษาผลของฟิล์ม PEMs ที่เคลือบบน PDMS ต่อการดูดซับของโปรตีนนั้น ทำการติดตามด้วยเทคนิค ATR-FTIR และตัวแปรที่ทำการศึกษาได้แก่ประเภทของ polyelectrolyte จำนวนชั้น ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ และ pH ของสารละลาย BSA ในขั้นต้นพบว่าการดูดซับของ BSA บนพื้นผิวของ PDMS ที่มีได้ผ่านการดัดแปรพบว่าขึ้นอยู่กับ pH ของ BSA ซึ่งมีผลต่อ net charge และโครงสร้างของโมเลกุลที่แตกต่างกัน โดย ณ pH เท่ากับ 5 ซึ่งเป็น pH ที่ใกล้กับ isoelectric point (IEP) ของ BSA ส่งผลให้ net charge ของ BSA นี้ใกล้ศูนย์ หรือมีความเป็นประจุลบเพียงเล็กน้อย จึงสามารถถูกดูดซับบนพื้นผิว PDMS ที่มีได้ผ่านการดัดแปรได้มากที่สุดโดยผ่านแรง hydrophobic interaction

ในการดูดซับของโปรตีนบนพื้นผิวที่ผ่านการดัดแปรด้วย PDADMAC/PSS พบว่าฟิล์มเคลือบที่มี PDADMAC เป็นชั้นนอกสุดสามารถดูดซับโปรตีนได้มากกว่า PDMS ที่มีได้ดัดแปร ถึงแม้ว่าพื้นผิวที่ดัดแปรนี้จะมีสมบัติความชอบน้ำมากกว่า ซึ่งอาจเกิดจากแรงดึงดูดทางไฟฟ้าระหว่างพื้นผิวที่มีประจุบวก และประจุลบของ BSA ซึ่งเห็นได้ชัดเจนในภาวะที่ pH 7.4 อย่างไรก็ตาม ณ pH 5 เป็นภาวะที่ BSA ซึ่งมี net charge เกือบเป็นศูนย์หรืออาจมีประจุลบเล็กน้อย การดูดซับของ BSA ที่ pH นี้ อาจเกิดจากแรงดึงดูดทางไฟฟ้าเสริมกับแรงอื่นๆ

และเมื่อจำนวนของชั้นเคลือบเพิ่มขึ้น ปริมาณ BSA ที่เกาะติดบนพื้นผิวเพิ่มขึ้นเช่นกัน ซึ่งแสดงว่า BSA สามารถ penetrate เข้าไปในชั้น PEMs ได้ ดังนั้นฟิล์ม PDADMAC/PSS ที่มีชั้นนอกเป็น PDADMAC สามารถนำไปพัฒนาเป็นส่วนประกอบเพื่อเพิ่มความเข้มข้นบนอุปกรณ์ microfluidic device ได้สำหรับฟิล์มเคลือบที่มี PSS ซึ่งมีประจุลบเป็นชั้นนอกสุดพบว่าสามารถลดการดูดซับของ BSA ซึ่งอาจเกิดจากการที่ความชอบน้ำของพื้นผิวที่สูงกว่า และแรงผลักระหว่างประจุ ดังนั้นฟิล์มเคลือบนี้สามารถนำไปเคลือบใน microchannel เพื่อเพิ่ม และรักษาค่า EOF และในขณะเดียวกันสามารถควบคุมการดูดซับของโปรตีนได้

ในการดูดซับของ BSA บนฟิล์มระบบ chitosan/alginate ซึ่งสามารถเพิ่มความชอบน้ำของพื้นผิวได้มากกว่าคู่ PDADMAC/PSS ทางคณะผู้วิจัยทำการศึกษา ณ pH 7.4 และพบว่าปริมาณ BSA ถูกดูดซับบนพื้นผิวทั้งสองชนิดในปริมาณที่ค่อนข้างน้อย ซึ่งอาจเกิดจากความชอบน้ำของพื้นผิวที่พัฒนาขึ้นจึงลดการดูดซับได้อย่างมาก หรือเกิดจากการสูญเสียประจุบวกของ chitosan จึงลดความแรงของ electrostatic interaction ระหว่างประจุบวกของ chitosan และประจุลบของ BSA หรืออาจเกิดการหลุดของฟิล์ม chitosan/alginate ได้นอกจากนี้การสกัด PDMS ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เพื่อยึดอายุของพื้นผิวที่ดัดแปรด้วย PEMs layer พบว่าไม่มีผลกระทบอย่างใดต่อความชอบน้ำของพื้นผิวทั้งที่ดัดแปรและไม่ได้ดัดแปรอย่างใด

ในงานวิจัยส่วนที่สองนี้เพื่อประยุกต์ใช้ microelectrode ที่เตรียมจาก gold nanoparticles โดยใช้เทคนิค layer-by-layer และ flow deposition เป็นตัวตรวจวัดใน microfluidic device เพื่อวัด albumin ซึ่งพบว่าสามารถตรวจวัดปริมาณ albumin ในช่วงความเข้มข้น 0.1 g/L ไปจนถึง 10 g/L ได้

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

งานวิจัยที่คาดว่าจะควรดำเนินการพัฒนาต่อไป คือพัฒนาฟิล์ม PEMs ระบบ PDADMAC/PSS ที่มี PDADMAC เป็นชั้นบนสุด เพื่อใช้เป็นฟิล์มบางที่สามารถเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนและมี selectivity ต่อโปรตีนที่สนใจ

เอกสารอ้างอิง

1. deMello, A. J., Control and detection of chemical reactions in microfluidic systems. *Nature* **2006**, 442, (7101), 394-402.
2. Wang, A.-J.; Xu, J.-J.; Chen, H.-Y., Proteins modification of poly(dimethylsiloxane) microfluidic channels for the enhanced microchip electrophoresis. *Journal of ChromatographyA* **2006**, 1107, (1-2), 257-264.
3. Whitesides, G. M., The origins and the future of microfluidics *Nature* **2006**, 442, (7101), 368-373.
4. Wong, I.; Ho, C.-M., Surface molecular property modifications for poly(dimethylsiloxane) (PDMS) based microfluidic devices *Microfluidics and Nanofluidics* **2009**, 7, (3), 291-306.
5. Ocirk, G.; Munroe, M.; Tang, T.; Oleschuk, R.; Westra, K.; Harrison, D., Electrokinetic control of fluid flow in native poly(dimethylsiloxane) capillary electrophoresis devices *Electrophoresis* **2000**, 21, (1), 107-115.
6. Carneiro, L. B.; Ferreirab, J.; Santosc, M. J. L.; Monteiro, J. P.; Girotto, E. M., A new approach to immobilize poly(vinyl alcohol) on poly(dimethylsiloxane) resulting in low protein adsorption *Applied Surface Science* **2011**, 257, (24), 10514-10519.
7. Berdichevsky, Y.; Khandurina, J.; Guttman, A.; Lo, Y. H., UV/ozone modification of poly(dimethylsiloxane) microfluidic channels. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2004**, 97, (2-3), 402-408.
8. Efimenko, K.; Wallace, W. E.; Genzer, J., Surface modification of Sylgard-184 poly(dimethyl siloxane) networks by ultraviolet and ultraviolet/ozone treatment *Journal of colloid and interface science* **2002**, 254, (2), 306-315.
9. Park, H. B.; Han, D. W.; Lee, Y. M., Effect of a UV/ozone treatment on siloxane-containing copolyimides: Surface modification and gas transport characteristics *Chemistry of materials* **2003**, 15, (12), 2346-2353.
10. He, Q.; Liu, Z.; Xiao, P.; Liang, R.; He, N.; Lu, Z., Preparation of hydrophilic poly(dimethylsiloxane) stamps by plasma-induced grafting *Langmuir* **2003**, 19, (17), 6982-6986
11. Papra, A.; Bernard, A.; Juncker, D.; Larsen, N. B.; Michel, B.; Delamarche, E., Microfluidic networks made of poly(dimethylsiloxane), Si, and Au coated with polyethylene glycol for patterning proteins onto surfaces *Langmuir* **2001**, 17, (13), 4090-4095.
12. Xiao, D. Q.; Van, L. T.; Wirth, M. J., Surface modification of the channels of poly(dimethylsiloxane) microfluidic chips with polyacrylamide for fast electrophoretic separations of proteins. *Analytical Chemistry* **2004**, 76, (7), 2055-2061.
13. Duffy, D. C.; McDonald, J. C.; Schueller, O. J. A.; Whitesides, G. M., Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane) *Analytical Chemistry* **1998**, 70, (23), 4974-4984.

14. Cortez, C.; Quinn, J. F.; Hao, X.; Gudipati, C. S.; Stenzel, M. H.; Davis, T. P.; Caruso, F., Multilayer Buildup and biofouling characteristics of PSS-b-PEG containing films *Langmuir* **2010**, 26, (12), 9720-9727.
15. Schmolke, H.; Demming, S.; Edlich, A.; Magdanz, V.; Buettgenbach, S.; Franco-Lara, E.; Krull, R.; Klages, C.-P., Polyelectrolyte multilayer surface functionalization of poly(dimethylsiloxane) (PDMS) for reduction of yeast cell adhesion in microfluidic devices *Biomicrofluidics* **2010**, 4, (4), Article number 044113.
16. Tristan, F.; Palestino, G.; Menchaca, J.-L.; Perez, E.; Atmani, H.; Cuisinier, F.; Ladam, G., Tunable Protein-resistance of polycation-terminated polyelectrolyte multilayers *Biomacromolecules* **2009**, 10, (8), 2275-2283.
17. Salloum, D. S.; Schlenoff, J. B., Protein adsorption modalities on polyelectrolyte multilayers. *Biomacromolecules* **2004**, 5, (3), 1089-1096.
18. Watanabe, J.; Shen, H.; Akashi, M., Polyelectrolyte droplets facilitate versatile layer-by-layer coating for protein loading interface. *Acta Biomaterialia* **2008**, 4, (5), 1255-1262.
19. Martins, G. V.; Merino, E. G.; Mano, J. F.; Alves, N. M., Crosslink effect and albumin Adsorption onto chitosan/alginate multilayered systems: An in situ QCM-D study. *Macromolecular Bioscience* **2010**, 10, (12), 1444-1455.
20. Xie, H.-G.; Li, X.-X.; Lv, G.-J.; Xie, W.-Y.; Zhu, J.; Luxbacher, T.; Ma, R.; Ma, X.-J., Effect of surface wettability and charge on protein adsorption onto implantable alginate-chitosan-alginate microcapsule surfaces *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2010**, 92A, (4), 1357-1365.
21. Yuan, W.; Dong, H.; Li, C. M.; Cui, X.; Yu, L.; Lu, Z.; Zhou, Q., pH-controlled construction of chitosan/alginate multilayer film: characterization and application for antibody immobilization. *Langmuir* **2007**, 23, (26), 13046-13052.
22. Zhou, J.; Romeo, G.; Rojas, E.; Ma, L.; Moya, S.; Gao, C., Layer by layer chitosan/alginate coatings on poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles for antifouling protection and Folic acid binding to achieve selective cell targeting. *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, 345, (2), 241-247.
23. Kameoka, J.; Craighead, H. G.; Zhang, H. W.; Henion, J., A polymeric microfluidic chip for CE/MS determination of small molecules. *Analytical Chemistry* **2001**, 73, (9), 1935-1941.
24. Campbell, D. J.; Beckman, K. J.; Calderon, C. E.; Doolan, P. W.; Ottosen, R. M.; Ellis, A. B.; Lisensky, G. C., Replication and compression of bulk surface structures with polydimethylsiloxane elastomer. *Journal of Chemical Education* **1999**, 76, (4), 537-541.
25. Li, J.; Zhang, J.; Zhao, X.; Yu, Y., Preparation of porcine hemoglobin microcapsules of chitosan-sodium alginate. *Frontiers of Chemistry in China* **2007**, 2, (3), 315-317.

26. Decher, G.; Schlenoff, J. B., *Multilayer thin films: sequential assembly of nanocomposite materials*. 1 ed.; Wiley-VCH: 2002.
27. Dubas, S. T.; Farhat, T. R.; Schlenoff, J. B., Multiple membranes from “true” polyelectrolyte multilayers. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, 123, (22), 5368-5369.
28. Shiratori, S. S.; Rubner, M. F., pH-dependent thickness behavior of sequentially adsorbed layers of weak polyelectrolytes. *Macromolecules* **2000**, 33, (11), 4213-4219.
29. Landers, J. P., *Handbook of Capillary Electrophoresis*. 2nd ed.; CRC Press: Boca Raton, 1997.
30. Liu, Y.; Fanguy, J. C.; Bledsoe, J. M.; Henry, C. S., Dynamic coating using polyelectrolyte multilayers for chemical control of electroosmotic flow in capillary electrophoresis microchips. *Analytical Chemistry* **2000**, 72, (24), 5939-5944.
31. Qiu, W.; Zhang, L.; Okobiah, O.; Yang, Y.; Wang, L.; Zhong, D.; Zewail, A. H., Ultrafast solvation dynamics of human serum albumin: Correlations with conformational transitions and site-selected recognition. *The Journal of Physical Chemistry B* **2006**, 110, (21), 10540-10549.
32. Edri, E.; Regev, O., pH Effects on BSA-dispersed carbon nanotubes studied by Spectroscopy-enhanced composition evaluation techniques. *Analytical Chemistry* **2008**, 80, (11), 4049-4054.
33. Aravind, U. K.; Mathew, J.; Aravindakumar, C. T., Transport studies of BSA, lysozyme and ovalbumin through chitosan/polystyrene sulfonate multilayer membrane. *Journal of Membrane Science* **2007**, 299, (1-2), 146-155.
34. Boributh, S.; Chanachai, A.; Jiratananon, R., Modification of PVDF membrane by chitosan solution for reducing protein fouling. *Journal of Membrane Science* **2009**, 342, (1-2), 97-104.
35. Seyrek, E.; Dubin, P. L.; Tribet, C.; Gamble, E. A., Ionic strength dependence of protein-polyelectrolyte interactions. *Biomacromolecules* **2003**, 4, (2), 273-282.
36. Barker, S. L. R.; Tarlov, M. J.; Canavan, H.; Hickman, J. J.; Locascio, L. E., Plastic microfluidic devices modified with polyelectrolyte multilayers
Analytical Chemistry **2000**, 72, (20), 4899-4903
37. QIU, J.; HU, P.; LIANG, R., Separation and simultaneous determination of uric acid and ascorbic acid on a dynamically modified Poly(dimethylsiloxane) microchip *Analytical Sciences* **2007**, 23, 1409-1414.
38. Makamba, H.; Hsieh, Y.; Sung, W.; Chen, S., Stable permanently hydrophilic protein-resistant thin-film coatings on poly(dimethylsiloxane) substrates by electrostatic self-assembly and chemical cross-linking. *Analytical Chemistry* **2005**, 77, 3971-3978.
39. Boulmedais, F.; Frisch, B.; Etienne, O.; Lavalle, P.; Picart, C.; Ogier, J.; Voegel, J. C.; Schaaf, P.; Egles, C., Polyelectrolyte multilayer films with pegylated polypeptides as a new type of anti-microbial protection for biomaterials. *Biomaterials* **2004**, 25, (11), 2003-2011.

40. Liu, X.; Erickson, D.; Li, D.; Krull, U. J., Cationic polymer coatings for design of electroosmotic flow and control of DNA adsorption. *Analytica Chimica Acta*. **2004**, 507, 55-62.
41. Wang, A.-J.; Xu, J.-J.; Chen, H.-Y., In-situ grafting hydrophilic polymer on chitosan modified poly(dimethylsiloxane) microchip for separation of biomolecules. *Journal of Chromatography A* **2007**, 1147, (1), 120-126.
42. Tristán, F.; Palestino, G.; Menchaca, J. L.; Pérez, E. a.; Atmani, H.; Cuisinier, F. d. r.; Ladam, G., Tunable protein-resistance of polycation-terminated polyelectrolyte multilayers. *Biomacromolecules* **2009**, 10, (8), 2275-2283.
43. Yang, L.; Li, L.; Tu, Q.; Ren, L.; Zhang, Y.; Wang, X.; Zhang, Z.; Liu, W.; Xin, L.; Wang, J., Photocatalyzed surface modification of poly(dimethylsiloxane) with polysaccharides and assay of their protein adsorption and cytocompatibility. *Analytical Chemistry* **2010**, 82, (15), 6430-6439.
44. Xie, H.-G.; Li, X.-X.; Lv, G.-J.; Xie, W.-Y.; Zhu, J.; Luxbacher, T.; Ma, R.; Ma, X.-J., Effect of surface wettability and charge on protein adsorption onto implantable alginate-chitosan-alginate microcapsule surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2010**, 92A, (4), 1357-1365.
45. Page, A. F.; Minocha, S. C., Analysis of gene expression in transgenic plants: methods and protocols. In Peña, L., Ed. Humana Press: 2004; Vol. 286, pp 291-311.
46. Guo, D.-J.; Han, H.-M.; Jing, W.; Xiao, S.-J.; Dai, Z.-D., Surface-hydrophilic and protein-resistant silicone elastomers prepared by hydrosilylation of vinyl poly(ethylene glycol) on hydrosilanes-poly(dimethylsiloxane) surfaces. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2007**, 308, (1-3), 129-135.
47. Hoven, V. P.; Tangpasuthadol, V.; Angkitpaiboon, Y.; Vallapa, N.; Kiatkamjornwong, S., Surface-charged chitosan: preparation and protein adsorption. *Carbohydrate Polymers* **2007**, 68, (1), 44-53.
48. Kumlangdudsana, P. Fabrication of silver and gold nanoparticles microelectrode by flow deposition technique for lab on a chip application. Chulalongkorn University, Bangkok, 2011.
49. Jiang, S. P.; Liu, Z.; Tian, Z. Q., Layer-by-layer self-assembly of composite polyelectrolyte-nafion membranes for direct methanol fuel cells. *Advanced Materials* **2006**, 18, (8), 1068-1072.
50. Wang, G.; Shen, X.; Wang, B.; Yao, J.; Park, J., Synthesis and characterisation of hydrophilic and organophilic graphene nanosheets. *Carbon* **2009**, 47, (5), 1359-1364.
51. Liu, D.; Wei, Y.; Yao, P.; Jiang, L., Determination of the degree of acetylation of chitosan by UV spectrophotometry using dual standards. *Carbohydrate Research* **2006**, 341, (6), 782-785.
52. Aravind, U. K.; Mathew, J.; Aravindakumar, C. T., Transport studies of BSA, lysozyme and ovalbumin through chitosan/polystyrene sulfonate multilayer membrane *Journal of Membrane Science* **2007**, 299, (1-2), 146-155

53. Shimomura, M.; Okumoto, H.; Kaito, A.; Ueno, K.; Shen, J.; Ito, K., Infrared spectroscopic studies on the molecular orientation of vacuum-deposited thin films of Poly(dimethylsilane) and a linear oligosilane. *Macromolecules* **1998**, 31, (21), 7483-7487.
54. Alves, N. M.; Picart, C.; Mano, J. F., Self assembling and crosslinking of polyelectrolyte multilayer films of chitosan and alginate studied by qcm and ir spectroscopy. *Macromolecular Bioscience* **2009**, 9, (8), 776-785.
55. Müller, M.; Torger, B.; Keßler, B., In Situ ATR-FTIR spectroscopy on the deposition and protein interaction of polycation/alginate multilayers. *Advanced Engineering Materials* **2010**, 12, (12), B676-B683.
56. Lawrie, G.; Keen, I.; Drew, B.; Chandler-Temple, A.; Rintoul, L.; Fredericks, P.; Grøndahl, L., interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS. *Biomacromolecules* **2007**, 8, (8), 2533-2541.
57. Bao, N.; Zhang, Q.; Xu, J.-J.; Chen, H.-Y., Fabrication of poly(dimethylsiloxane) microfluidic system based on masters directly printed with an office laser printer. *Journal of Chromatography A* **2005**, (1089), 270-275.
58. Uilk, J. M.; Mera, A. E.; Fox, R. B.; Wynne, K. J., Hydrosilation-cured poly(dimethylsiloxane) networks: intrinsic contact angles via dynamic contact angle analysis. *Macromolecules* **2003**, 36, (10), 3689-3694.
59. Bodas, D.; Khan-Malek, C., Formation of more stable hydrophilic surfaces of PDMS by plasma and chemical treatments. *Microelectronic Engineering* **2006**, 83, (4-9), 1277-1279.
60. Bodas, D.; Khan-Malek, C., Hydrophilization and hydrophobic recovery of PDMS by oxygen plasma and chemical treatment—An SEM investigation. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2007**, 123, (1), 368-373.
61. Eddington, D. T.; Puccinelli, J. P.; Beebe, D. J., Thermal aging and reduced hydrophobic recovery of polydimethylsiloxane. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2006**, 114, (1), 170-172.
62. Dubas, S. T.; Schlenoff, J. B., Factors controlling the growth of polyelectrolyte multilayers. *Macromolecules* **1999**, 32, (24), 8153-8160.
63. Lawton, R. A.; Price, C. R.; Runge, A. F.; Doherty III, W. J.; Saavedra, S. S., Air plasma treatment of submicron thick PDMS polymer films: effect of oxidation time and storage conditions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2005**, 253, (1-3), 213-215.
64. Khorasani, M. T.; Mirzadeh, H.; Kermani, Z., Wettability of porous polydimethylsiloxane surface: morphology study. *Applied Surface Science* **2005**, 242, (3-4), 339-345.
65. Zhao, Z.-P.; Wang, Z.; Wang, S.-C., Formation, charged characteristic and BSA adsorption behavior of carboxymethyl chitosan/PES composite MF membrane. *Journal of Membrane Science* **2003**, 217, (1-2), 151-158.

66. Jeyachandran, Y. L.; Mielczarski, E.; Rai, B.; Mielczarski, J. A., Quantitative and qualitative evaluation of adsorption/desorption of bovine serum albumin on hydrophilic and hydrophobic surfaces. *Langmuir* **2009**, 25, (19), 11614-11620.
67. Mathew, J.; Sreedhanya, S.; Baburaj, M. S.; Aravindakumar, C. T.; Aravind, U. K., Fabrication of switchable protein resistant and adhesive multilayer membranes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2012**, 94, (0), 118-124.
68. Lu, J. R.; Su, T. J.; Thomas, R. K., Structural conformation of bovine serum albumin layers at the air–water interface studied by neutron reflection. *Journal of Colloid and Interface Science* **1999**, 213, (2), 426-437.
69. Croll, T. I.; O'Connor, A. J.; Stevens, G. W.; Cooper-White, J. J., a blank slate? layer-by-layer deposition of hyaluronic acid and chitosan onto various surfaces. *Biomacromolecules* **2006**, 7, (5), 1610-1622.
70. Indest, T.; Laine, J.; Ribitsch, V.; Johansson, L.-S.; Stana-Kleinschek, K.; Strnad, S., Adsorption of chitosan on pet films monitored by quartz crystal microbalance. *Biomacromolecules* **2008**, 9, (8), 2207-2214.
71. Hillborg, H.; Gedde, U. W., Hydrophobicity changes in silicone rubbers. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation* **1999**, 6, (5), 703-717.
72. Hillborg, H.; Tomczak, N.; Oláh, A.; Schönherr, H.; Vancso, G. J., Nanoscale hydrophobic recovery: a chemical force microscopy study of uv/ozone-treated cross-linked poly(dimethylsiloxane). *Langmuir* **2004**, 20, (3), 785-794.

ภาคผนวก ก.

Proceedings การไปเสนอผลงาน (Poster presentation)
การประชุมวิชาการระดับชาติ “วิทยาศาสตร์วิจัย” ครั้งที่ 4
(The 4th Science Research Conference)
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก ระหว่างวันที่ 12-13 มีนาคม 2555

THE EFFECT OF POLYELECTROLYTE MULTILAYER THIN FILM COATED POLY(DIMETHYLSILOXANE) ON THE PROTEIN ADSORPTION

Saowanee TAOPEN^{1, 2}, Apichat IMYIM³, Stephan Thierry DUBAS⁴, Thumnoon NHUJAK¹ and Luxsana DUBAS^{1,*}

¹ Chromatography and Separation Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

² Program of Petrochemistry and Polymer Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

³ Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

⁴ Metallurgy and Materials Science Research Institute, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

Abstract

The layer-by-layer deposition technique (LbL) was used to modify the surface of poly(dimethylsiloxane) (PDMS) to tune the bovine serum albumin (BSA) adsorption. The LbL was done using two different polyelectrolytes pairs of which poly(diallyldimethyl ammonium chloride) (PDADMAC) and poly(sodium 4-styrenesulfonate) (PSS) were selected as strong polyelectrolytes pair, and chitosan and alginate as the weak polyelectrolytes pair. Since weak polyelectrolytes have an ionization that is pH dependant, the pH of the chitosan and alginate solutions used in the film growth was varied and the thickness of the film was measured using UV-Vis spectroscopy. The optimum condition was found to be with a pH of 5.5 in each chitosan and alginate solution as it provided the thickest film. Contact angle measurements were used to monitor the change from hydrophobic to hydrophilic of the PDMS substrate as a function of the number of deposited layers for both strong and weak polyelectrolytes. The chitosan/alginate film was found to be more hydrophilic with a lower contact angle value when compared to PDADMAC/PSS. Films of each polyelectrolytes pair were then constructed with either positive or negative polyelectrolytes on the outermost layer and exposed to BSA protein. ATR-FTIR results showed that the protein adsorbed favorably on the PDADMAC/PSS with little protein adsorption was measured on the chitosan/alginate film. These results are of importance for the development of protein resistant coating to be used in PDMS microfluidic devices.

Keyword: Layer-by-layer/Poly(dimethylsiloxane)/Protein adsorption

1. Introduction

Poly(dimethylsiloxane) is a popular polymeric alternative material for building microfluidic devices instead of silicon, glass

and quartz mainly because of its biocompatibility, optical transparency, ease of molding and bonding with other materials as well as non-toxicity and low manufacturing costs [1-2]. However, surface modification is often required due to the hydrophobic nature of PDMS surface causing protein or analyte adsorption on its surface. This phenomenon tends to decrease the device performance and increase the sample loss [1, 3]. In recent years, the layer-by-layer approach (LbL) to fabricate thin films has attracted great interest because of its simplicity and versatility. The films are fabricated between oppositely charged species by taking advantage of electrostatic and hydrophobic interactions, as well as hydrogen bonding and van der Waals interaction. Several studies have shown that proteins may be adsorbed on either positively or negatively charged polyelectrolyte-terminated film via electrostatic or hydrophobic interactions [4-6]. However, the amount of adsorbed protein depended on the charge difference between the adsorbed protein and the charge of the outermost layer. Various PEM systems comprised of weak/weak or strong/weak polyelectrolytes were fabricated as a film to control the adsorption of protein on various types of substrates including [7-10]. Although PDADMAC/PSS [6, 11-12] and chitosan/alginate [13-16] were previously prepared on various substrates for protein adsorption studies, there is no report of such study on PDMS for microfluidic device application.

Here, we investigated the adsorption of bovine serum albumin on polyelectrolyte multilayer films for two PEM systems that are of PDADMAC/PSS and chitosan/alginate fabricated on the PDMS surface. The influence of the buildup pH when using weak polyelectrolytes and the number of deposited layers on the protein adsorption were investigated using Fourier transformed infrared spectroscopy in the attenuated total reflectance mode

* Corresponding author: E-mail: Luxsana.L@chula.ac.th

(ATR-FTIR), contact angle measurement and UV-Vis spectroscopy.

2. Materials and Methods

2.1 Materials and Reagents

Sylgard 184 silicone elastomer kit (PDMS) was purchased from Dow Corning (Midland, MI, USA). The polyelectrolytes used in this study are shown in Figure 1. Poly(diallyl dimethyl ammonium chloride), PDADMAC (M_w 200,000-350,000, 20 wt% in water); poly(sodium 4-styrenesulfonate), PSS (M_w 70,000); alginic acid, sodium salt (viscosity of 20.0-40.0 cps.); and bovine serum albumin (BSA) (M_w 66,000 Da) were used as received from Sigma-Aldrich (Germany). Chitosan (M_w 57,000) was purchased from A.N. Lab, Thailand. Sodium chloride was from Carlo Erba, sodium acetate trihydrate and glacial acetic acid were from Merck. Phosphate-buffered saline (PBS) was prepared with sodium chloride, di-sodium hydrogen phosphate anhydrous and potassium dihydrogen phosphate obtained from Carlo Erba and potassium chloride obtained from Merck. All chemicals were used as received. The de-ionized water was used throughout this study.

The polyelectrolyte solutions of chitosan and alginate were prepared in 100 mM acetic-acetate buffer. The pH of PDADMAC and PSS solutions were not adjusted.

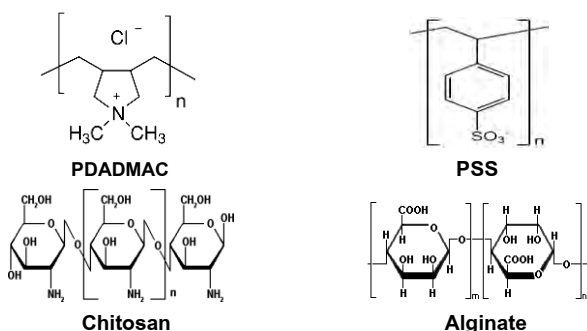


Fig.1 Structures of polyelectrolyte.

PDMS fabrication.

The PDMS oligomer was mixed with curing agent in the ratio 10:1 to form a PDMS prepolymer mixture and degassed under vacuum. The mixture was poured into a Petri dish. After curing at 65°C for 2 hours, the PDMS substrates were peeled off. The PDMS substrates were cut into square shape (size 1x4 cm²). All PDMS pieces were cleaned with magic tape before further usage. Polyelectrolyte multilayer film on PDMS.

The cleaned PDMS was alternatively dipped in either polycationic or polyanionic solution. Sequential adsorption of polyelectrolytes was performed by hand dipping.

PDADMAC/PSS

A PDMS piece was dipped alternately to the 10 mM PDADMAC in 1 M NaCl or 10 mM PSS in 1 M NaCl for 2 min

with three rinsing steps of fresh DI water, 2 min each in between. The dipping cycle was repeated until 2-18 layers achieved.

Chitosan/alginate

First, the suitable pH for chitosan and alginate film fabrication was evaluated using the quartz slide was used as substrate. The growth of PEMs was monitored using UV spectrometer (Hewlett Packard 8453). Each polyelectrolyte solution (5 mM with respect to the monomer repeating unit) was prepared in 1 M NaCl. The studied pH values were 4 and 5.5 for chitosan and 5.5 and 6.5 for alginate. The pH of polyelectrolyte solutions were adjusted using either 1 M HCl or 1 M NaOH. The quartz slide was cleaned with piranha solution (H₂SO₄:H₂O₂ 3:1). The cleaned quartz slide was subsequently dipped in a chitosan solution and an alginate solution alternately for 5 min each followed by three rinsing steps of acetic-acetate buffer at same pH of polyelectrolyte solution, 5 min each, between. The dipping cycle was repeated to build successive PEMs of chitosan/alginate layers. The absorption signal of chitosan/alginate was collected at 3, 7, 11, 15 and 19 deposition layers.

PEMs was fabricated on the PDMS substrate according to the suitable condition found in this study.

Surface characterization.

The hydrophilicity of coated and uncoated PDMS was assessed by static contact angle measurements using Ramé-hart Model 200 (USA). The volume of the DI water droplet was kept constant at 4 μ L. Each data point given was based on ten measurements at different positions on PDMS surface. Attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectra was acquired using a Nicolet 6700 FTIR spectrometer (Thermo scientific) to monitor the buildup of PEMs and the protein adsorption on the PEMs assembled on a PDMS.

Protein adsorption assay.

Protein adsorption assay was performed following the method previously reported [17]. Modified and unmodified PDMS were immersed in 1 mM phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) overnight prior to performing the protein adsorption study. After being immersed in PBS buffer, the PDMS substrates were placed in 4 mL of freshly prepared 3 mg/mL BSA solution in 1 mM PBS, pH 7.4. Adsorption was allowed to proceed at 37°C for 2 hours. After being removed and washed with 10 mL of PBS buffer to remove reversibly adsorbed BSA, the amount of BSA adsorbed onto the substrates was investigated by ATR-FTIR.

3. Results and Discussion

Much interest is given to the growth of PEM films on PDMS since it is used as substrate for microfluidic devices. In these devices, protein adsorption in the PDMS microchannels has been identified as a major problem. Here, the coating of hydrophilic polyelectrolyte multilayer film on PDMS substrate was

investigated using PDADMAC/PSS as strong polyelectrolytes and chitosan/alginate as weak polyelectrolytes.

Fabrication and characterization of polyelectrolyte multilayer film.

The layer-by-layer deposition of the polyelectrolyte multilayer on the PDMS surface was observed by ATR-FTIR. Figure 2 shows the characteristic infrared peaks for the sulfonate group of PSS at 1033 cm^{-1} [18]. It can be seen that the sulfonate peak height increased with the number of deposited layers indicating the growth of PEMs on PDMS surface [6].

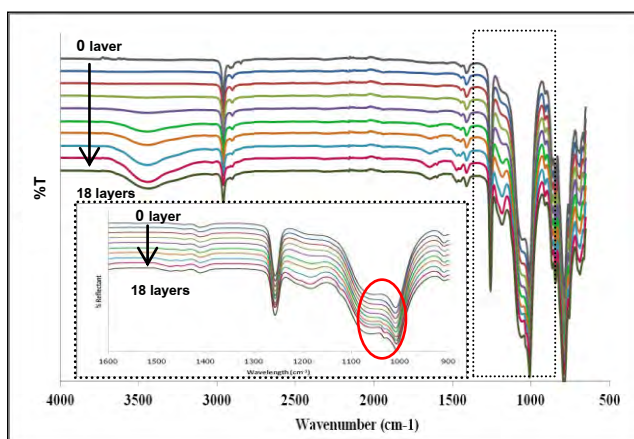


Fig.2 ATR-FTIR spectra of PDMS and PDADMAC/PSS 2-18 layers only even layers of multilayer (top to bottom) on PDMS surface. Inset shows the increase in sulfonate peak at $\sim 1033\text{ cm}^{-1}$.

Because chitosan and alginate are both weak acid and base, the ionization of their functional groups is pH dependant and plays a major role in their layer-by-layer self assembly. The effect of the pH of the solution on the chitosan/alginate multilayer growth on quartz slide was investigated. Chitosan and alginate are both polysaccharide biopolymers with chitosan being the deacetylated form of chitin, consisting of free amino groups ($pK_a = 6.3$) [19] while alginate is a polysaccharide consisting of two repeating carboxylated monosaccharide units ($pK_a = 3.5$) [19]. Due to the difference in pK_a , it can be predicted that both polyelectrolytes will be positively and negatively charged for values comprised between 4.5 and 6.5. By monitoring the UV-Vis absorbance at 201 nm [20], of films built with four different pH combinations, it was found that chitosan peak increased with the number of deposited layers in each conditions for all pH combinations (Figure 3). The regular increase in absorbance suggested film growth and the best condition being when the pH was fixed at 5.5 for both solutions. Such result can be easily understood when considering that it represents the median value between each pK_a suggesting the maximum charged groups available for the film growth.

The pH of chitosan and alginate was adjusted to 5.5 since it provided the best growth for the PEM films. The infrared peak of chitosan/alginate multilayer on PDMS surface is shown in Figure

4 and the characteristic peak at 1412 and 1601 cm^{-1} can be assigned to the COO^- symmetric and asymmetric stretch of alginate, respectively [21]. The peak at $1420\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ can be

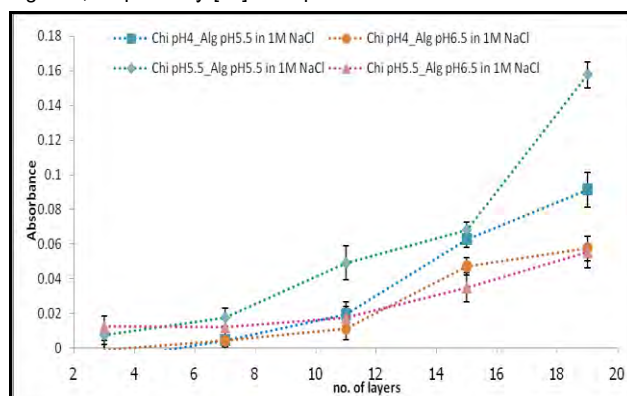


Fig.3 Effect of deposition multilayer at vary pH of chitosan and alginate solutions in 1 M NaCl .

attributed to the amine group in chitosan [21]. In the case of the chitosan/alginate films, also, the peak height was found to increase with numbers of deposited layer confirming that the PEMs system comprised of chitosan/alginate was fabricated under the high ionic strength.

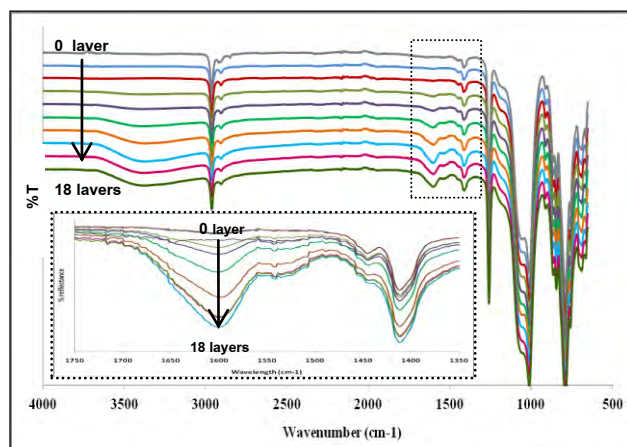


Fig.4 ATR-FTIR spectra of PDMS and chitosan pH 5.5/alginate pH5.5 2-18 layers only even layers (top to bottom) on PDMS surface. Inset shows the increase in carboxylic peak at ~ 1412 and $\sim 1601\text{ cm}^{-1}$.

The outermost layer of PEMs plays a crucial role in the hydrophilic property of the surface. The changes in hydrophilic/hydrophobic property of the modified PDMS surface can be characterized by contact angle (θ) as seen in Figure 5 with the contact angle of the multilayer films for 8-14 layers on PDMS. For PDADMAC/PSS and chitosan/alginate multilayers, the contact angles were found to alternate in a "zigzag" after each layer increment, indicating the change in property at the surface of the PDMS as the function of the polycation and polyanion-terminated layer. The contact angle values for PDADMAC/PSS

were higher than that of chitosan/alginate, probably because the structure of the polysaccharide chitosan and alginate is more polar than that of PDADMAC and PSS. The lowest contact angle for the chitosan/alginate film was 20° [13] indicating that the carbohydrate coating was more hydrophilic than the PDADMAC/PSS. Both types of coatings displayed lower contact angle values than the uncoated PDMS which had an initial contact value around 100°.

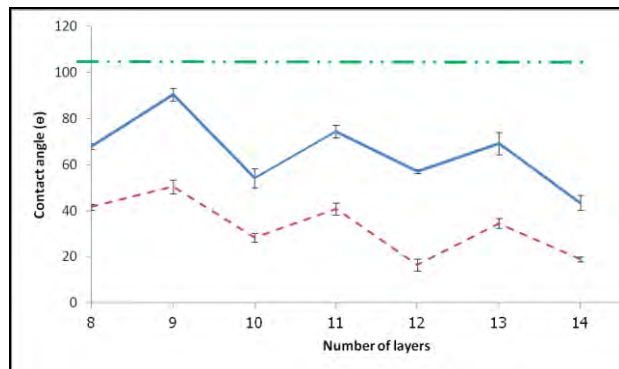


Fig.5 Contact angle of PDADMAC/PSS (—) and chitosan/alginate (---) multilayer film. The PDMS without modification (bare PDMS) (— · — · —) is layer zero.

Protein adsorption assay.

Since proteins contain both hydrophobic and hydrophilic character, electrostatic and hydrophobic interactions between the surface and the proteins play important roles in their adsorption. In this study, the type of polyelectrolyte pair used had a major affect on the protein adsorption onto the PDMS substrate. ATR-FTIR was used to monitor the BSA protein adsorption onto PDADMAC/PSS multilayer. In Figure 6, the characteristic infrared peak for the amide I and amide II group appeared at ~1650 and ~1540 cm^{-1} , respectively [17]. The intensity of the amide peak when the protein was adsorbed onto PDADMAC which is positively charged was much higher than when the protein was adsorbed onto negatively charged PSS as the outermost layer as well as uncoated PDMS. This result is expected since the adsorption was made at pH value above the isoelectric point (pI) of BSA which makes the net charge of protein to be negative. Through electrostatic interaction, the negatively charged protein is expected to adsorb favorably onto the positively charged PDADMAC. Interestingly, the amide I and amide II peaks height was found to increase with the number PDADMAC/PSS layers deposited on PDMS surface. Salloum and Schlenoff also reported a number of layer dependant adsorption which was explained by atomic force microscopic measurement showing that an increase in roughness of the film allowed more protein to be adsorbed [6].

In Figure 7, the spectra of unmodified PDMS and modified PDMS with chitosan/alginate multilayers with and without BSA on surface are compared. The characteristic infrared peaks for BSA

(~1650 and ~1540 cm^{-1}) cannot be clearly observed suggesting that no significant amount of BSA could be adsorbed on the PDMS substrate modified with the 15th to 17th layers of

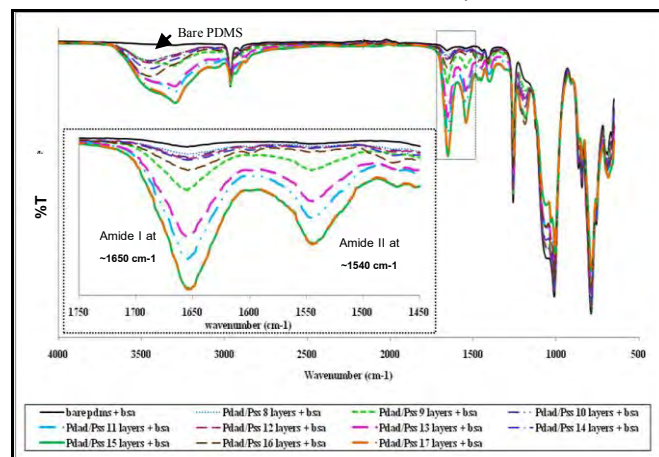


Fig.6 ATR-FTIR spectra of BSA PDMS and PDADMAC/PSS multilayer surface. Inset show the increase in amide I and amide II peak at ~1650 and ~1540 cm^{-1} .

chitosan/alginate comparing to PDADMAC/PSS. The amount of adsorbed protein on PEMs with chitosan as the top layer was found to be smaller probably because the protein adsorption was done at pH 7.4 which is above the pK_a of chitosan, then most of its amine groups should be in the neutral NH_2 form. This might be the result of a less positive charges on the surface reducing the electrostatic interaction or the weakness of polymer interaction leading to a possible desorption of the chitosan layer [14]. When alginate was coated as the outermost layer, BSA which is protein rich in carboxylic acid, could not be adsorbed onto the PEMs modified PDMS, due to electrostatic repulsion between negatively charged BSA and alginate [22].

4. Conclusions

In this study, the PDMS surface was modified with two different polyelectrolyte pairs using the layer-by-layer deposition method to decrease the BSA protein adsorption on its surface. The surface of PDMS was modified using PDADMAC and PSS as strong polyelectrolytes and chitosan and alginate as weak polyelectrolytes. The type of polyelectrolytes was found to play a major role in the protein adsorption mainly through electrostatic interaction. PDMS modified with PDADMAC as terminated layer, cationic polyelectrolyte, were actually found to enhance the BSA adsorption on PDMS, which can be developed as a online preconcentration component on microfluidic device. Surprisingly, the amount of adsorbed BSA on the PSS modified surface was found to be larger than the uncoated PDMS. Regarding the chitosan/alginate modified PDMS after contacting, there is no significant amount of protein was adsorbed comparing to PDADMAC/PSS modified PDMS or uncoated PDMS. These

results provide a very interesting option for the coating of PDMS microchannels for protein analysis.

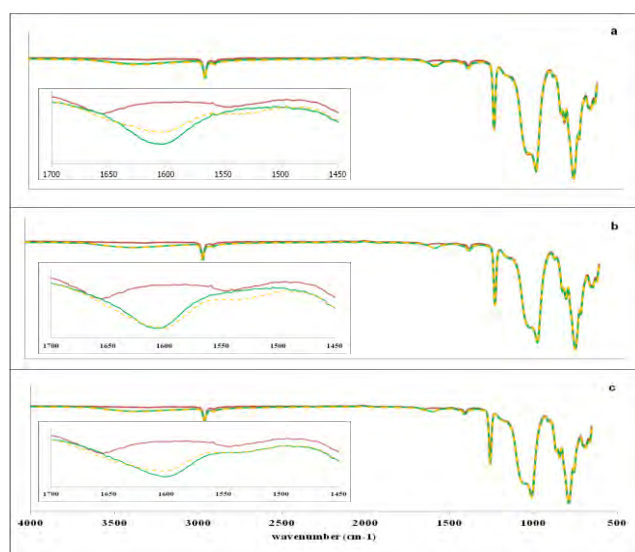


Fig.7 ATR-FTIR spectra of chitosan/alginate at 15 layers (a), 16 layers (b) and 17 layers (c) with (---) and without (—) BSA on surface compare with BSA on bare PDMS (—)

ACKNOWLEDGEMENT

This work was partially supported by the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission (FW648I) and Thailand Research Fund (MRG5180309).

References

- [1] Wong I, Ho CM (2009). Surface molecular property modifications for poly(dimethylsiloxane) (PDMS) based microfluidic devices. *Microfluid. Nanofluid.*, 7(3): 291-306.
- [2] Wang AJ, Xu JJ, Chen HY (2006). Proteins modification of poly(dimethylsiloxane) microfluidic channels for the enhanced microchip electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, 1107(1-2): 257-264.
- [3] Zhou J, Ellis AV, Voelcker NH (2010). Recent developments in PDMS surface modification for microfluidic devices. *Electrophoresis*, 31(1): 2-16.
- [4] Ladam G, Gergely C, Senger B, Decher G, Voegel JC, Schaaf P, Cuisinier FJG (2000). Protein interactions with polyelectrolyte multilayers: Interactions between human serum albumin and polystyrene sulfonate/polyallylamine multilayers. *Biomacromolecules*, 1(4): 674-687.
- [5] Picart C, Ladam G, Senger B, Voegel JC, Schaaf P, Cuisinier FJG, Gergely C (2001). Determination of structural parameters characterizing thin films by optical methods: a comparison between scanning angle reflectometry and optical waveguide lightmode spectroscopy. *J. Chem. Phys.*, 115(2): 1086-1094.
- [6] Salloum DS, Schlenoff JB (2004). Protein adsorption modalities on polyelectrolyte multilayers. *Biomacromolecules*, 5(3): 1089-1096.
- [7] Lucas CA, Fakayode SO, Lowry M, Warner IM (2008). Protein separations using polyelectrolyte multilayer coatings with molecular micelles in open tubular capillary electrochromatography. *Electrophoresis*, 29(4): 889-900.
- [8] Tristan F, Palestino G, Menchaca JL, Perez E, Atman H, Cuisinier F, Ladam G (2009). Tunable protein-resistance of polycation-terminated polyelectrolyte multilayers. *Biomacromolecules*, 10(8): 2275-2283.
- [9] Cortez C, Quint JF, Hao X, Gudipati CS, Stenzel MH, Davis TP, Caruso F (2010). Multilayer buildup and biofouling characteristics of PSS-b-PEG containing films. *Langmuir*, 26(12): 9720-9727.
- [10] Schmolke H, Demming S, Edlich A, Magdanz V, Buttgenbach S, Franco-Lara E, Krull R, Klages CP (2010). Polyelectrolyte multilayer surface functionalization of poly(dimethylsiloxane) (PDMS) for reduction of yeast cell adhesion in microfluidic devices. *Biomicrofluidics*, 4(4): 044113-13.
- [11] Watanabe J, Shen H., Akashi M (2008). Polyelectrolyte droplets facilitate versatile layer-by-layer coating for protein loading interface. *Acta Biomater*, 4(5): 1255-1262.
- [12] Watanabe J, Shen H, Akashi M (2009). Alternate drop coating for forming dual biointerfaces composed of polyelectrolyte multilayers. *J. Mater. Sci-mater. M*, 20(3): 759-765.
- [13] Yuan W, Dong H, Li CM, Cui X, Yu L, Lu Z, Zhou Q (2007). pH-controlled construction of chitosan/alginate multilayer film: characterization and application for antibody immobilization. *Langmuir*, 23(26): 13046-13052.
- [14] Martins GV, Merino EG, Mano JF, Alves NM (2010). Crosslink effect and albumin adsorption onto chitosan/alginate multilayered systems: an in situ QCM-D study. *Macromol. Biosci.*, 10(12): 1444-1455.
- [15] Xie HG, Li XX, Lv GJ, Xie WY, Zhu J, Luxbacher T, Ma R, Ma XJ (2010). Effect of surface wettability and charge on protein adsorption onto implantable alginate-chitosan-alginate microcapsule surfaces. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 92(4): 1357-1365.
- [16] Zhou J, Romeo G, Rojas E, Ma L, Moya S, Gao C (2010). Layer by layer chitosan/alginate coatings on poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles for antifouling protection and Folic acid binding to achieve selective cell targeting. *J. Colloid Interface Sci.*, 345(2): 241-247.
- [17] Guo DJ, Han HM, Wang J, Xiao SJ, Dai ZD (2007). Surface-hydrophilic and protein-resistant silicone elastomers prepared by hydrosilylation of vinyl poly(ethylene glycol) on hydrosilanes-poly(dimethylsiloxane) surfaces. *Colloid. Surface A*, 308(1-3): 129-135.
- [18] Aravind UK, Mathew J, Aravindakumar CT (2007). Transport studies of BSA, lysozyme and ovalbumin through chitosan/polystyrene sulfonate multilayer membrane. *J. Membr. Sci.*, 299(1-2): 146-155.
- [19] Jun L, Zhang J, Zhao X, Yu Y (2007). Preparation of porcine hemoglobin microcapsules of chitosan-alginate. *Front. Chem. China.*, 2(3): 315-317.
- [20] Lawrite G, Keen I, Drew B, Chandler-Temple A, Rintoul L, Fredericks L, Grøndahl L (2007). Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS. *Biomacromolecules*, 8(8): 2533-2541.
- [21] Alves NM, Picart C, Mano JF (2009). Self assembling and crosslinking of polyelectrolyte multilayer films of chitosan and alginate studied by QCM and IR Spectroscopy. *Macromol. Biosci.*, 9(8): 776-785.
- [22] Yang L, Li L, Tu Q, Ren L, Zhang Y, Wang X, Zhang Z, Liu W, Xin L, Wang J (2010). Photocatalyzed surface modification of

poly(dimethylsiloxane) with polysaccharides and assay of their protein adsorption and cytocompatibility. Anal. Chem., 82(15): 6430-6439.

ภาคผนวก ข.

Manuscript

Hydrophilic Coating Using Polyelectrolyte Multilayers

Modified PDMS Microfluidic Channel

Luxsana Dubas^a, Thumnoon Nhujak^a, Stephan T Dubas^b

^a*Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand*

^b*Metallurgy and Materials Science Research Institute, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.*

Abstract

The layer-by-layer technique was used to coat the channels of PDMS microfluidic devices. The coating was based on the sequential deposition of polydiallyldimethylammonium chloride (PDADMAC) and polystyrene sulfonate (PSS) into polyelectrolyte multilayers (PEM). Two experiments were performed to investigate the effect of the different coatings on the properties of the microfluidic device. First, the change in electroosmotic flow direction and magnitude were measured as a function of the number of layers deposited. Second, the change in hydrophobicity and hydrophilicity of the PDMS surface as a function of the coatings was evaluated. The EOF measurements revealed that after the deposition of only 2 layers, the flow direction and intensity reached its maximum value, oscillating between $-2 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ and $+4 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ as a function of the positive or negative top layer of the coating. In contrast, the contact angle measurements revealed that the PDMS surface keeps its very hydrophobic nature up to 10 layers. Only an increase in the number of layers above 10 allows the change from hydrophobic to hydrophilic. Stability tests were also performed to demonstrate the stability of the coating inside the channel.

Introduction

For the preparation of microfluidic devices, many polymers including polydimethylsiloxane (PDMS), poly(methyl methacrylate) (PMMA) and polycarbonate (PC) have been used as substrates. Among all of these materials, PDMS has received the most attention mainly due to its ease of preparation, low cost, good optical transparency and low toxicity. However, PDMS based microfluidic devices show some

defects that need to be overcome including the generation of gas bubbles in the channels and unstable electroosmotic flow (EOF) if this material is to become widely used. Foremost among PDMS's disadvantages are its extreme hydrophobicity and the adsorption and absorption of hydrophobic compounds on the surface during separation. These problems have been recognized as a major challenge toward the development of many applications including protein analysis¹.

A number of efforts have been made to improve the EOF stability, render the surface more hydrophilic and reduce non-specific adsorption. Most of these concerns can be addressed with surface modification strategies. The use of chemical modification procedures including exposure to energy sources such as plasma^{2,3} or UV light⁴⁻⁶, radiation induced graft polymerization⁷, cerium (IV) catalysis⁸, silanization⁹, atom-transfer radical polymerization¹⁰ or the sol-gel methods¹¹ have improved the performance of PDMS microfluidic devices. The dynamic modification of the PDMS surface with surfactants such as tetrabutylammoniumchloride (TABCl), sodium dodecyl sulfate¹², Brij-35¹³, and an amine-containing polymer¹⁴ was used to control EOF and reduce adsorption of the analytes as well but with moderate success. In these examples, better performance was achieved but at the cost of significant modification time and/or complexity of chemical modification. Simpler methods for the generation of hydrophilic surfaces of PDMS would significantly improve the potential for the long term use of PDMS in microfluidic devices.

Adsorbed polyelectrolyte multilayers (PEMs) have previously been demonstrated as a non-covalent method for surface modification of polymer-based microfluidic devices¹⁵⁻¹⁸. Assembled by taking advantage of the electrostatic interaction between oppositely charged polyelectrolytes and deposited in a sequential fashion, Liu et al. employed the PEM technique to modify the surface of PDMS/glass microchannels with a bi-layer film of polybrene (PB) and dextran sulfate (DS). This coating was stable for more than 50 runs and provided a nearly pH-independent EOF between pH 5 and 10¹⁹. Using the same method, the direction of the electroosmotic flow in a microfluidic chip used for DNA hybridization was controlled by coating the channel with a single layer of PB²⁰. The use of PEMs for surface modification in polymer microfluidic devices is attractive because the layers can be easily deposited and generally stable for long periods of time across a wide pH range. Moreover, this technique does not require

the addition of a surfactant to the background electrolyte. The hydrophilic nature of PEMs was also recently used to decrease the absorption of hydrophobic analytes in PDMS microchips²¹. One of the drawbacks of the layer-by-layer deposition method is the lengthy preparation steps required especially if numerous numbers of layers are deposited. Therefore, most of the PEM assemblies in microchannels are limited to only few bi-layers. While the change in EOF direction can be observed even after one bi-layer coating, the highly hydrophobic surface of the PDMS might require more layers to render the surface hydrophilic. Barker and co-workers¹⁵ suggested that the modifications with PEMs might need more than a bilayer coating to obtain a relatively constant EOF in polystyrene (PS)/polydimethylsiloxane (PDMS) and poly(ethylene terephthalate) glycol (PETG)/polydimethylsiloxane (PDMS) microchips.

In the present article, we investigated the effect of PEM thin films on both the EOF and the hydrophilicity of PDMS microchips. EOF was measured using the current monitoring technique while contact angle as a function of the number of deposited layers was measured to determine hydrophilicity. EOF reached stable oscillating values after just two layers but generation of hydrophilic surfaces required the deposition of more than 10 total layers.

2. Experimental

2.1 Chemicals and solutions

Sylgard 184 (PDMS) was from Dow Corning (Midland, MI, USA). Cationic polyelectrolyte (polydiallyldimethylammonium chloride, PDADMAC) (MW of 400,000-500,000) and anionic polyelectrolytes (polystyrene sulfonate, PSS) (MW of 70,000) were purchased from Aldrich (Figure 1). Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, CH_3COONa , $\text{Na}_2\text{B}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$, NaOH and NaCl were purchased from Carlo Erba. Methanol (HPLC grade), phosphoric acid and acetic acid (glacial) were purchased from Merck. All polyelectrolyte solutions were prepared in 1 M NaCl . All solutions were filtered through a 0.2 μm Nylon filter, 1.3 i.d. (Chrome Tech). All chemicals are analytical grade and used without further purification. All solutions were prepared with water purified with a Milli-Q water purification system (Nihon Millipore, Tokyo, Japan) for the EOF studies and with double distilled water for the contact angle studies.

2.2 PDMS preparation

PDMS microfluidic devices were prepared as discussed previously¹⁹. Briefly, the PDMS oligomer was mixed with the curing agent in the ratio of 10:1.1 to form a PDMS prepolymer mixture and degassed in a vacuum. The mixture was cured against either a bare silicon wafer that had been cleaned with the piranha solution ($\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$, 2:1), water and methanol and dried with a nitrogen stream for contact angle measurement or an SU-8 patterned Si wafer (silicon master). The silicon master was cleaned sequentially with water and methanol and air dried. After at least 2 hours of curing at 65°C, PDMS replicas were removed from the mold. The cured PDMS sheets were cleaned with methanol and water, and then dried in air. Buffer reservoirs were then opened with a hole punch. Bare PDMS replicas were formed by casting the PDMS mixture on a clean dry silicon wafer.

2.3 Measurement of hydrophobicity of PDMS surface

Flat PDMS substrates were cut to 2 cm² rectangular pieces and cleaned with methanol. For the PEM thin film buildup, the substrate was first immersed for 5 min in a solution containing 1 mM of PDAD in 1 M sodium chloride. The sample was then rinsed three times in de-ionized water for 1 min. The purpose of the rinse bath is to remove excess and loosely bound polyelectrolytes from the surface. These steps resulted in the deposition of a thin layer of PDAD that reversed the surface charge of the sample from negative to positive. The modified PDMS was then immersed for 5 min in a solution containing 1 mM of PSS and 1 M sodium chloride followed by three rinses with water. These steps resulted in the deposition of a bi-layer of PDAD–PSS. The process was repeated for up to 10 total layers.

2.3.1 Contact angle measurement

The water contact angles were measured on uncoated and coated PDMS for every deposited layer. Contact angle measurements were carried out using a homemade goniometer with each data point representing an average of three 10 μL droplets each measured three times, for a total of nine measurements.

2.4 Coating procedure and electroosmotic flow measurements in microchannels

Straight microchannels were used for all EOF measurements. Reversible sealing was achieved by thoroughly rinsing a PDMS replica and a blank PDMS piece with methanol and bringing the two surfaces into conformal contact with one another prior to drying. The assembled microchip was then dried in an oven at 65 °C for 15 minutes¹⁹. Electroosmotic studies were done on a PDMS/PDMS microchip. The single straight channel (3.6-3.8 cm long, see Figure 2) was used in this study, which the width and the depth of the channel are 50 and 50 μm , respectively.

2.4.1 Channel modification

After sealing, the separation channel was rinsed with methanol and ultrapure water, respectively for 5 min each using a vacuum pump. Then 100 μL of 0.1 M NaOH was pumped through the channel. The solution sat inside the channel for 15 min was then rinsed with water for 5 min. Once preconditioned, the channel was filled with 50 μL of either 1 or 10 mM PDADMAC in 1 M NaCl solution and allowed to set for 15 minute followed by pumping water for 5 min (rinsing step). Coating with PDAD was performed using the same procedure. After each layer coating, the EOF measurements were performed. All filling steps were performed by applying a vacuum to the buffer waste reservoir with the other reservoir filled with the respective rinsing solution. Up to 10 layers were deposited for EOF measurement. 1 mM (with respect to the monomer solution) PDADMAC and PSS solutions were used in the coating optimization study.

2.4.2 Measurement of EOF

The EOF was measured by the current-monitoring method²⁰. The pH 7 phosphate buffer with concentrations of 10 and 9 mM were used as running buffer solutions for current monitoring technique. For the uncoated surface and PSS (anionic) coating microchannel, 10 mM buffer was pumped through the separation channel via a vacuum pump for at least 5 min followed by rinsing with water. After reservoir A (Figure 2) was filled with 70 μL of 9 mM solution, the solution in reservoir B was replaced with a 70 μL of 10 mM buffer solution. Reservoir A was connected to a high-voltage power supply through a platinum electrode, while the reservoir B was grounded. This setup was used for all EOF experiments. In all experiments, 600V was applied to reservoirs A and B while the current was monitored. After the current reached a plateau,

the chip was rotated. Reservoir B was refilled with concentrated buffer, then the potential was reapplied. The time required for the current plateau was indicative of the buffer filling the separation channel. Reservoir A was refilled with 9 mM buffer and the above procedure repeated. Six consecutive measurements were obtained for each experiment. For reversed EOF measurements (PDAD coated surface), reservoir A was first filled with 10 mM, while reservoir B was filled with 9 mM. The value of EOF was calculated using the following equation:

$$\text{EOF} = L/tV \quad (\text{eq 1})$$

where L is the length of the separation channel, t is the time between the stable current values and V is the applied voltage (600 V). Calculate for EOF and %RSD.

3. Results and Discussion

3.1 EOF Measurements

PDMS can adsorb hydrophobic analytes due to its cross-linked hydrophobic chain with a methyl side-chain. Significant work has focused on the resistance to adsorption of solutes on the surface using dynamic coatings and polyelectrolyte multilayers. Cationic PDADMAC and anionic PSS were selected for their stability under a wide range of pH values, which they owe to the quaternary amine and sulfonate functional groups present in PDADMAC and PSS, respectively. As can be seen in Figure 3, the reversal of the EOF as a function of the deposited layers with the odd layers being with PDADMAC on top and even layers with PSS on top was seen as expected¹⁵. Initially, two different polyelectrolytes concentration, 1 mM (commonly used for PEMs coating) and 10 mM were used for the deposition to optimize the suitable concentration for EOF measurements. The benefit of using the 10 mM solution is that it will provide a more efficient coating of the surface but presents the disadvantage of being more difficult to rinse. It can be seen on Figure 3 that when using the 1 mM concentration, the EOF is slower to reach its maximum value and requires the deposition of up to 6 layers whereas only 1 or 2 layers when using the 10 mM solution under the same deposition condition. The average EOF value of the PEM coating with PDADMAC as top layer is $-2.30 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ with % RSD of 9.11, while the PSS as a top layer generates an average EOF of $4.40 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ (%RSD 9.27). The differences in EOF can be rationalized by the lower charge density of the PDADMAC monomer

when compared with the PSS. Moreover, the PDADMAC positive charge is somewhat screened by the two methyl groups from each monomer which tends to reduce the ion interaction in the double layer near the micro-channel wall, therefore reducing its absolute EOF value.

Figure 3 shows that when the PEM is built from 10 mM polyelectrolyte solution only two layers are necessary to obtain a stable EOF. It is interesting to note that the EOF values of the coating with PSS as top layers display a value which is comparable to the value of bare glass under pH 9.2 running buffer, ($4.21 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$)²². This should allow for the exploration on microchips of separations of solutes requiring strongly acidic conditions (for high EOF at low pH) which is difficult to achieve with glass chips.

3.2 Contact Angle

The modification of a hydrophobic PDMS surface with hydrophilic polyelectrolyte multilayers can be easily monitored by following the change in contact angle. In the microchip channel, the successive deposition of the multilayer can be expected to be similar to the deposition on a flat surface since the channel width is much greater than the PEM thickness. Although we used 15 min for the dipping time in the micro-channels, the samples prepared for the contact angle experiments were spun in the polyelectrolyte solution for only 5 minutes. The spinning of the substrate in the polyelectrolyte solution is known enhance the transport of polyelectrolyte to the surface and reduce the time necessary to obtain saturation of the polyelectrolyte layer²⁵.

During the layer-by-layer deposition on the PDMS surface, it is expected that an oscillation in contact angle between each deposited layer would be observed. These oscillations during the PEM deposition are due to the differences in chemistry of the top layer being either the polyanion or the polycation. The oscillation of the contact angle are also function of the differences in linear charge density of each polyelectrolytes^{23,24}. In the present experiment, the successive deposition of PDADMAC and PSS lead to such an oscillation due to the difference in hydrophobicity provided by the dimethyl group of the PDADMAC and the more hydrophilic sulfonate group from the PSS. In Figure 4, the change in contact angles as a function of the number of deposited layers and concentration is shown. One of the major observations

is that the contact angle values are not significantly reduced for the first few layers deposited, regardless of polymer concentrations. This slow change in contact angles is probably due to a slow nucleation growth of the PEM coating on the hydrophobic surface. Nearly 10 coating cycles are required to allow the formation of a thin film at the surface of the PDMS surface leading to steady oscillation in contact angle. These results contrast sharply from the EOF data, which suggested a good coating after only a bi-layer and represent an interesting parameter to consider when coating microfluidics channels with PEMs. Furthermore, if one wishes to coat the microfluidics channels to prevent the non-specific binding of a hydrophobic protein during separation, our results suggest that monitoring the EOF only is not sufficient and does not provide a good insight on the hydrophilic/hydrophobic state of the channel.

3.3 Stability

In order to test the stability of the 10 layer system, where PSS was the outermost layer, a series of EOF experiments were performed and running buffer solutions at pH 3, 7 and 11 were used. After a series of consecutive runs were performed at one pH, the new series of consecutive runs were collected at different pH value immediately.

In Figure 5, the minor effect of the buffer's pH on the EOF value confirms the benefit of the surface modification step. It can be seen that even when varying the pH of the solution, the EOF values remain relatively constant independently of the pH. This stability is in contrast with measurement on the uncoated PDMS channel, which exhibited significant change in EOF values from run to run (ranges of 1.2 to 4.4×10^{-4} $\text{cm}^2/\text{V.s}$). The ability to have a constant EOF regardless of pH is important for many different applications. The stability of PEM coatings is important for achieving run-to-run reproducibility over long operation times without the need to regenerate coatings.

4. Conclusions

The layer-by-layer deposition of polyelectrolytes multilayers was studied to evaluate the formation of hydrophilic coatings inside microfluidic channels. The EOF reversal data and contact angle changes were used to evaluate the effectiveness of this coating for control of EOF and hydrophobicity. The data suggest that while the EOF can easily be stabilized after only a few layers, the hydrophobicity of the surface is reduced

only after the deposition of five polyelectrolytes bi-layers. These results suggest that the monitoring of the surface coverage with the EOF appears somewhat misleading when assuming that it provides good information regarding the hydrophilicity of the channel surface. Contact angle measurements are required to access the exact hydrophilic nature of the modified PDMS chips especially when the objective of the coating is not only to stabilize the EOF, but also prevents the non specific binding of the protein during separation.

5. Acknowledgements

This work was supported by the Office of the Higher Education Commission and Thailand Research Fund (MRG5180309). We are also grateful to Associate Professor Dr. Orawon Chailapakul, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University and Assistant Professor Dr. Duangjai Nacapricha, Faculty of Science, Mahidol University for providing the high voltage supply and Dr. Adisorn Tuantranont from National Electronics and Computer Technology Center (NECTEC), Bangkok, Thailand for fabricating the silicon templates as the mold in this work.

6. References

- (1) Linder, V.; Verpoorte, E.; Thormann, W.; de Rooij, N. F.; Sigrist, H. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 4181-4189.
- (2) Bodas, D.; Khan-Malek, C. *Microelectron. Eng.* **2006**, *83*, 1277-1279.
- (3) He, Q.; Liu, Z.; Xiao, P.; Liang, R.; He, N.; Lu, Z. *Langmuir* **2003**, *19*, 6982-6986.
- (4) Park, H. B.; Han, D. W.; Lee, Y. M. *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 2346-2353.
- (5) Efimenko, K.; Wallance, W. E.; Genzer, J. *J. Colloid Interf. Sci.* **2002**, *254*, 306-315.
- (6) Berdichevsky, Y.; Khandurina, J.; Guttman, A.; Lo, Y.-H. *Sens. Actuators B-Chem.* **2004**, *97*, 402-408.
- (7) Hu, S.; Ren, X.; Bachman, M.; Sims, C. E.; Li, G. P.; Allbritton, N. L. *Langmuir* **2004**, *20*, 5569-5574.

- (8) Slentz, B. E.; Penner, N. A.; Regnier, F. E. *J. Chromatogr A* **2002**, 948, 225-233.
- (9) Papra, A.; Bernard, A.; Juncker, D.; Larsen, N. B.; Michel, B.; Delamarche, E. *Langmuir* **2001**, 17, 4090-4405.
- (10) Xiao, D.; Le, T. V.; Wirth, M. J. *Anal. Chem.* **2004**, 76, 2055-2061.
- (11) Roman, G. T.; Hlaus, T.; Bass, K. J.; Seelhammer, T. G.; Culbertson, C. T. *Anal. Chem.* **2005**, 77, 1414-1422.
- (12) Ocvirk, G.; Munroe, M.; Tang, T.; Oleschuk, R.; Westra, K.; Harrison, J. D. *Electrophoresis* **1999**, 21, 107-115.
- (13) Dou, Y.-H.; Bao, N.; Xu, J.-J.; Meng, F.; Chen, H.-Y. *Electrophoresis* **2004**, 25, 3024-3031.
- (14) Bergström, S. K.; Edenwall, N.; Lavén, M.; Velikyan, I.; Långström, B.; Markides, K. E. *Anal. Chem.* **2005**, 77, 938-942.
- (15) Barker, S. L. R.; Tarlov, M. J.; Canavan, H.; Hickman, J. J.; Locascio, L. E. *Anal. Chem.* **2000**, 72, 4899-4903.
- (16) Barker, S. L. R.; Ross, D.; Tarlov, M. J.; Gaitan, M.; Locascio, L. E. *Anal. Chem.* **2000**, 72, 5925-5929.
- (17) Bai, X.; Roussel, C.; Jensen, H.; Girault, H. H. *Electrophoresis* **2004**, 25, 931-935.
- (18) Tachibana, Y.; Otsuka, K.; Terabe, S.; Arai, A.; Suzuki, K.; Nakamura, S. *J. Chromatogr A* **2004**, 1025, 287-296.
- (19) Liu, Y.; Fanguy, J. C.; Bledsoe, J. M.; Henry, C. S. *Anal. Chem.* **2000**, 72, 5939-5944.
- (20) Liu, X.; Erickson, D.; Li, D.; Krull, U. J. *Anal. Chim. Acta* **2004**, 507, 55-62.
- (21) Ro, K. W.; Chan, W.-J.; Kim, H.; Koo, Y.-M.; Hahn, J. H. *Electrophoresis* **2003**, 24, 3253-3259.
- (22) Shadpour, H.; Musyimi, H.; Chen, J. C.; Soper, S. A. *J. Chromatogr. A* **2006**, 1111, 238-251.
- (23) Chen, J.; Luo, G.; Cao, W. *J. Colloid Interf. Sci.* **2001**, 238, 62-69.
- (24) Yu, D.-G.; Jou, C.-H.; Lin, W.-C.; Yang, M.-C. *Colloid Surface B* **2007**, 54, 222-229.
- (25) Dubas, S. T.; Schlenoff, J. B. *Macromolecules* **1999**, 32, 8153-8160.

Figure 1:

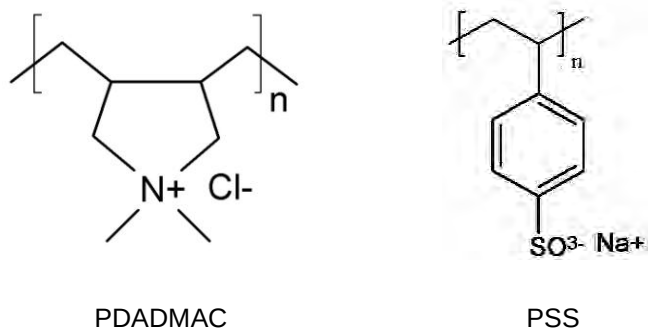


Figure 1: Chemical structure of polydiallyl-dimethylammonium chloride, PDADMAC and poly(4-styrene sulfonate, sodium salt), PSS

Figure 2:

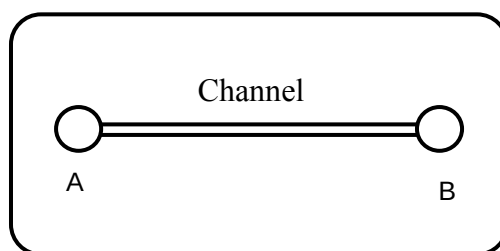


Figure 2: A schematic drawing of the microchip used for the current monitoring experiments. (Channel: 50 μm width, 50 μm deep)

Figure 3:

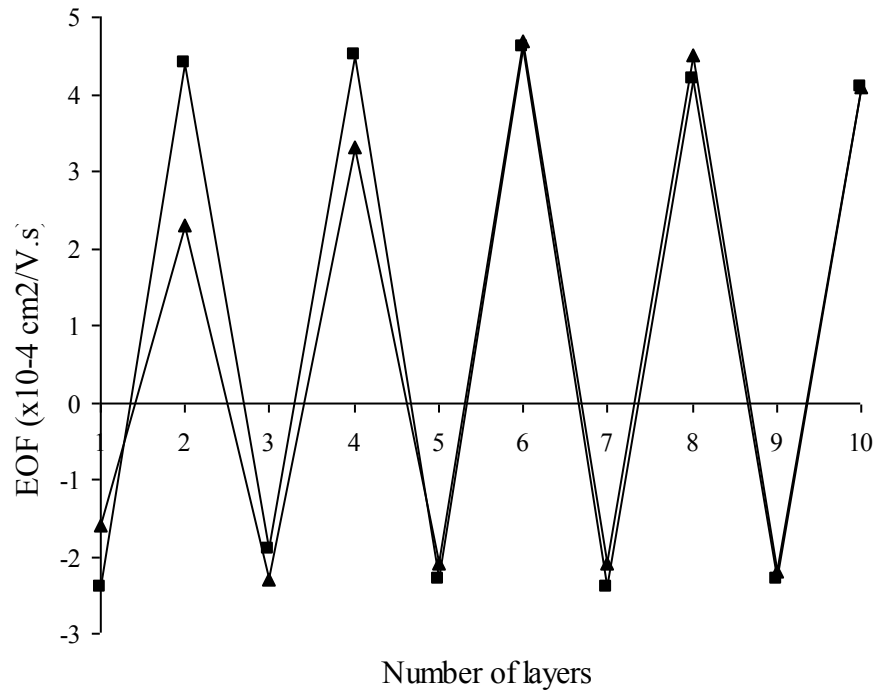


Figure 3: EOF of PDAD (cationic coating) and PSS (anionic coating) as a function of number of layers and polyelectrolyte solution concentration 10 mM (squares) and 1 mM (triangles).

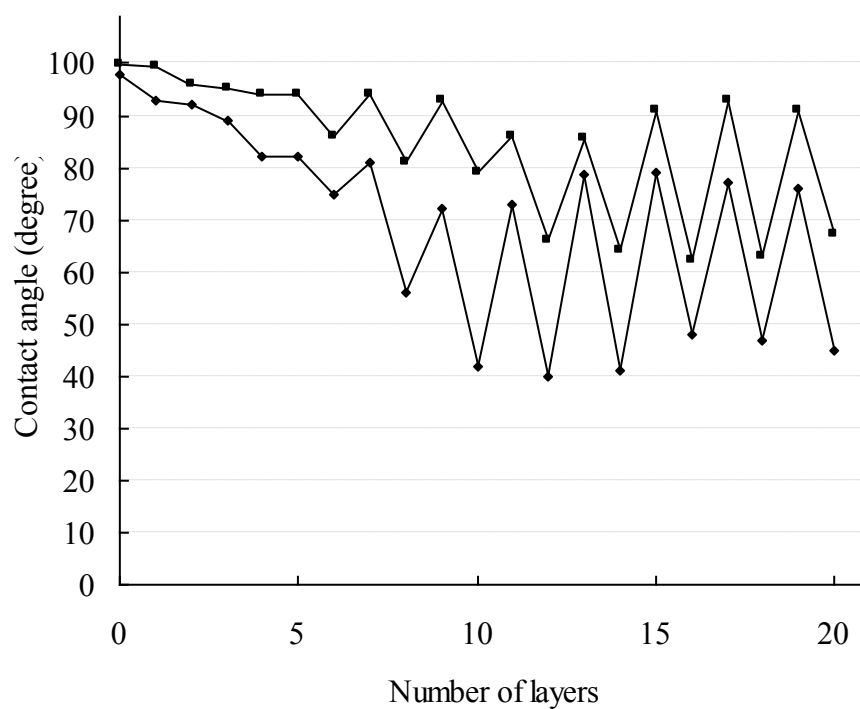


Figure 4 Changes in contact angle at the surface of a PDMS substrate as a function of the number of deposited layers from 10 mM (diamonds) or 1 mM (squares) polyelectrolyte solutions.

Figure 5:

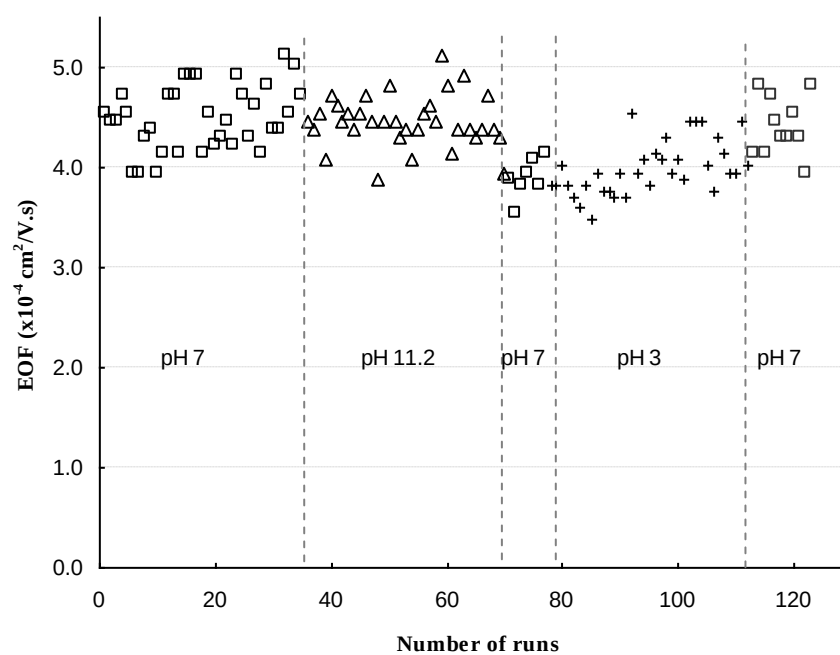


Figure 5: Stability of PDAD/PSS coating layer as a function of the number of runs and pH of running buffer.