Thesis Title Simple Flow Based Systems for Downscaling of Chemical Analysis of Free Fatty Acids, Glutathione and Cell Neurons' Chemicals

Author Miss Sam-ang Supharoek

Degree Doctor of Philosophy (Chemistry)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Jaroon Jakmunee	Advisor
Prof. Dr. Jonathan V. Sweedler	Co-advisor
Prof. Dr. Kate Grudpan	Co-advisor
Asst. Prof. Dr. Napaporn Youngvises	Co-advisor

ABSTRACT

In this work, three microfluidic systems have been developed for various chemical analysis, *i.e.*, systems for determination of free fatty acid, glutathione and system for culturing and stimulating of neuron cells for the study of neuropeptide release.

A simple flow injection titrimetric system was developed for determination of free fatty acids (FFA) in vegetable oil samples. The method is based on the reaction between free fatty acid and sodium hydroxide which changes the color of phenolphthalein from pink to colorless (pH 10.4 to 8.3). Seventy-five µL of standard/sample diluting in isopropanol solution was injected into the carrier stream and merged with 0.6 mM sodium hydroxide solution containing 1 mM

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

phenolphthalein in the mixing chamber (1.5 mL volume). The decrease in color intensity of the indicator was monitored by a simple home-made colorimeter, employing light emitting diode (LED) as a light source and photodiode (PD) as a light sensor. A linear calibration graph was obtained in a range of 0.1 - 0.9 mM palmitic acid. Relative standard deviation was less than 2%. Thirty three different commercial vegetable oil samples were analyzed, and obtained results were compared with the American Society for Testing and Materials (ASTM) standard method. Good correlation was found (r = 0.9542) between the proposed FI-titrimetric method and the standard ASTM method.

A simple and inexpensive method for fabrication of microfluidic platform based on a polydimethylsiloxane (PDMS) was developed. A printed circuit board (PCB) was used for making a master mold for replicating of PDMS microchannel. The master mold was fabricated by a simple photolithographic method, employing a photoresist dry film. The process did not use hazardous chemicals, clean room and expensive instrument. The PDMS microchannel was clamped with polymethylmethacrylate (PMMA) plates, where a light emitting diode (LED) as a light source and a light dependent resistor (LDR) as a light sensor were attached to form a simple optical sensor. The system was successfully employed as a micro flow injection analysis for determination of glutathione in dietary supplement samples. A linear calibration graph in the range of 5 - 60 mg L^{-1} glutathione was obtained with a detection limit of 0.01 mg L^{-1}. The system provided sample throughput of 48 h^{-1}, with the consumption of microliter amounts of reagent and sample.

A poly(dimethylsiloxane) (PDMS) microfluidic device was fabricated for culturing neurons, chemically stimulating them, and collecting the released

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

neuropeptides. The device consists of a straight channel with a main reservoir for cell loading and culture, and two microvalve-controlled stimulation channels that are functionalized with neat 2-[methoxy (polyethylenxy)propyl]trimethoxysilane (OEG) to minimize the peptide absorption into PDMS. The well characterized of peptidergic of *Aplysia californica* bag cell neurons are cultured within the main reservoir. By temporally controlling the introduction of stimulation solutions to the neurons, the precise time for release to occur can be determined. Bag cell neurons from *Aplysia californica* can obviously culture within OEG-grafted PDMS microfluidic device, which cover with cell culture dish. Specific secretogogues (KCl and insulin) was used for stimulation of cell neuron. It was found that neuropeptide was released after stimulation for at least 5 min and 20 min by KCl and insulin, respectively. Sample solution exited the device through small tubing, sample was collected, then desalted and concentrated using $ZipTip_{C18}$ pipette tips. The collected spot sample was detected by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) that monitoring several known peptides such as acidic peptide (AP) (m/z 2959.7) and α-bag cell peptide (αBCP) (m/z 1122.7). Furthermore, the microfluidic device was also used to study amino acid release from R3-13 cell neuron. Therefore, the OEG-grafted PDMS microfluidic device with two controllable microvalves is an efficient system for investigation of neuronal growth and signaling of cell neuron, which involved minute amounts of chemicals and small numbers of cells.

Simple flow based system is a promising tool for downscaling chemical analyses. It provides fast and efficient analysis with low consumption of chemicals

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

and less generation of waste. Moreover, it makes possible the analysis of minute amounts of sample which could not be performed in conventional methods.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ระบบที่อาศัยการไหลอย่างง่ายเพื่อลดขนาดการวิเคราะห์ทางเคมีของกรดไขมันอิสระ กลูตาไทโอนและสารเคมีจากเซลล์ประสาท

ผู้เขียน นางสาวสำอางค์ ศุภฤกษ์

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รองศาสตราจารย์ ดร. จรูญ จักร์มุณี	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ศาสตราจารย์ ดร. โจนาธาน สวิตเลอร์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ศาสตราจารย์ ดร. เกตุ กรุดพันธ์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นภาพร ยังวิเศษ	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาระบบไมโครฟลูอิดิกสามระบบสำหรับการวิเคราะห์ทางเคมีที่หลากหลาย ได้แก่ ระบบไมโครฟลูอิดิกสำหรับการวิเคราะห์กรดไขมันอิสระ ระบบไมโครฟลูอิดิกสำหรับการวิเคราะห์กลูต้าไธโอน และระบบไมโครฟลูอิดิกสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทและกระตุ้นเซลล์ประสาทเพื่อศึกษาการปลดปล่อยของสารนิวโรเปปไทด์

ได้พัฒนาระบบโฟลอินเจคชันอย่างง่ายสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันอิสระในตัวอย่างน้ำมันพืช วิธีนี้จะอาศัยพื้นฐานปฏิกิริยาระหว่างกรดไขมันอิสระกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ซึ่งจะทำให้สีของฟีนอล์ฟทาลีนเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นใสไม่มีสี (พีเอช 10.4 ถึง 8.3) ปริมาตรสารละลายมาตรฐานหรือสารตัวอย่างจำนวน 75 ไมโครลิตรจะถูกฉีดเข้าไปในกระแสตัวพา จากนั้นจะผสมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน 1 มิลลิโมลาร์ผสมอยู่ด้วย สารละลายจะผสมกันที่บริเวณช่องสำหรับผสม (ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร) ความเข้มสีของอินดิเคเตอร์ที่ลดลงจะถูกตรวจติดตามโดยคัลเลอริมิเตอร์ที่สร้างเองอย่างง่าย โดยใช้ไดโอดเปล่งแสง (แอลอีดี) เป็นแหล่งกำเนิดแสงและใช้โฟโตไดโอด (พีดี) เป็นตัววัดความเข้มแสง ช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานกรดปาล์มมิติกจะอยู่ในช่วง 0.1 ถึง 0.9 มิลลิโมลาร์ ค่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่ได้น้อยกว่า 2 เปอร์เซ็นต์ ตัวอย่างน้ำมันพืช 33 ตัวอย่างที่แตกต่างกันตามท้องตลาดจะถูกนำมาวิเคราะห์และผลที่ได้จะถูกนำเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานของสมาคมทางด้านตรวจสอบและวัสดุอเมริกัน (เอเอสทีเอ็ม) ซึ่งพบว่าผลที่ได้จากวิธีโฟลอินเจคชันไททริเมตรีที่ได้นำเสนอนี้และวิธีมาตรฐานเอเอสทีเอ็มมีแนวโน้มสอดคล้องกันดี ($r = 0.9542$)

ได้พัฒนาวิธีที่ง่ายและราคาถูกสำหรับการสร้างไมโครฟลูอิดิกจากพอลิเมธิลไซลอกเซน (พีดีเอ็มเอส) โดยใช้แผ่นวงจรพิมพ์ (พีซีบี) เป็นแม่พิมพ์ต้นแบบสำหรับการสร้างช่องขนาดเล็กบนพีดีเอ็มเอส ในการสร้างแม่พิมพ์ต้นแบบนี้จะใช้วิธีโฟโตลิโธกราฟีอย่างง่ายทำให้เกิดลวดลายบนฟิล์มที่เคลือบสารไวแสง กระบวนการนี้ไม่ใช้สารเคมีที่เป็นอันตราย ไม่ใช้ห้องปราศจากฝุ่นที่มีคุณภาพสูงและไม่ใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง สำหรับพีดีเอ็มเอสที่มีช่องขนาดเล็กจะถูกประกบด้วยแผ่นพอลิเมธิลเมธาไครเลท (พีเอ็มเอ็มเอ) จะใช้ไดโอดเปล่งแสง (แอลอีดี) เป็นแหล่งกำเนิดแสงและตัวต้านทานแปรค่าตามแสง (แอลดีอา) เป็นตัววัดความเข้มแสงยึดติดกับแผ่นพีเอ็มเอ็มเอเพื่อใช้เป็นตัวตรวจวัดแสงอย่างง่าย ระบบไมโครโฟลอินเจคชันที่พัฒนาขึ้นได้ประสบผลสำเร็จในการวิเคราะห์หาปริมาณกลูต้าไธโอนในตัวอย่างอาหารเสริม ช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานกลูต้าไธโอนที่ได้จะอยู่ในช่วง 5 - 60 ไมโครกรัมต่อลิตร ขีดจำกัดในการตรวจวัดเท่ากับ 0.01 ไมโครกรัมต่อลิตร ความเร็วในการตรวจวัดสารตัวอย่างของระบบนี้เท่ากับ 48 ตัวอย่างต่อชั่วโมง ปริมาณสารรีเอเจนต์และสารตัวอย่างที่ใช้อยู่ในช่วงไมโครลิตร

นอกจากนี้ยังได้สร้างเครื่องมือไมโครฟลูอิดิกจากพีดีเอ็มเอสเพื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาท จากนั้นกระตุ้นเซลล์ประสาทด้วยสารเคมี และทำการเก็บสารนิวโรเปปไทด์ที่ปลดปล่อยออก เครื่องมือนี้ประกอบไปด้วยช่องขนาดเล็ก มีลักษณะเป็นเส้นตรง มีช่องสำหรับใส่เซลล์และเพาะเลี้ยงเซลล์ และมีช่องไมโครวาล์ว 2 ช่องสำหรับควบคุมการไหลของสารตรงช่องสำหรับสารกระตุ้น พื้นผิวของพีดีเอ็มเอสจะถูกปรับให้มีคุณสมบัติพิเศษด้วยสารเมทิลพอลิเอทิลีนซีโพรพิลไตรเมทอกซีไซเลน (โออีจี) เพื่อให้สารเปปไทด์ถูกดูดซับเข้าไปในพีดีเอ็มเอสน้อยที่สุด เซลล์ประสาทที่มีคุณลักษณะที่ดีจากอะพลาชาแคลิฟอร์นิกาจะถูกเพาะเลี้ยงในช่องสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ จากการที่สามารถควบคุมการไหลของสารกระตุ้นไปยังเซลล์ประสาทได้ชั่วคราวนั้นทำให้สามารถหาเวลาที่แน่นอนที่เซลล์ประสาทถูกกระตุ้นด้วยสารกระตุ้นแล้วปลดปล่อยสารเปปไทด์ออกมาได้ เซลล์ประสาทสามารถเจริญเติบโตได้ดีในเครื่องมือไมโครฟูอิดิกที่มีการปรับคุณลักษณะ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

พิเศษของพื้นผิวพีดีเอ็สเอสด้วยสารโออีจี สารกระตุ้นที่มีความจำเพาะ เช่น โพแทสเซียมคลอไรด์และอินซูลินจะถูกนำมาใช้ในการกระตุ้นเซลล์ประสาท จากผลการทดลองพบว่า สารนิวโรเปปไทด์สามารถปลดปล่อยออกมาหลังจากกระตุ้นด้วยสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์เป็นเวลาอย่างน้อย 5 นาที และกระตุ้นด้วยอินซูลินเป็นเวลาอย่างน้อย 20 นาที สารละลายที่ไหลออกมาผ่านท่อขนาดเล็กจะถูกเก็บและนำมากำจัดเกลือและเพิ่มความเข้มข้นโดยใช้ซิบทิปปิเปตที่เคลือบด้วยคาร์บอนสิบแปด สารละลายที่ถูกเปลี่ยนเป็นของแข็งบนแผ่นมัลติเอ็มเอสจะถูกตรวจวัดด้วยโดยใช้เทคนิคเมทริกซ์แอสซิสเทดเลเซอร์ดีซอร์บชันไอออนไนเซชันแมสสเปกโทรเมทรี (มัลดิทอฟแมสสเปกโตรเมตรี) โดยตรวจติดตามสารเปปไทด์ที่เป็นที่รู้จัก ประกอบไปด้วย อะซิดิกเปปไทด์ (มวลต่อประจุเท่ากับ 2959.7) และแอลฟาแบ็กเซลล์ (มวลต่อประจุเท่ากับ 1122.7) นอกจากนี้เครื่องมือนี้ยังสามารถใช้ศึกษากรดอะมิโนที่ปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ประสาทชนิดอาร์ได้ จะเห็นได้ว่าเครื่องมือไมโครฟลูอิดิกที่ปรับคุณลักษณะพิเศษพื้นผิวของพีดีเอ็มเอสและมีช่องไมโครวาล์ว 2 ช่องสำหรับควบคุมการไหลของสารเป็นระบบที่มีประสิทธิภาพสำหรับศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ประสาทและศึกษาสารที่ใช้ส่งสัญญาณจากเซลล์ประสาท ซึ่งเครื่องมือนี้ใช้สารเคมีและจำนวนเซลล์ประสาทในปริมาณน้อย

ดังนั้น ระบบอย่างง่ายที่อาศัยการไหลเป็นเครื่องมือที่สามารถใช้ลดขนาดการวิเคราะห์ทางเคมีได้ เครื่องมือนี้ให้การวิเคราะห์ที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพด้วยการใช้สารเคมีปริมาณน้อยและของเสียที่เกิดขึ้นก็มีปริมาณน้อยด้วย และเครื่องมือนี้ยังสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยมากๆซึ่งระบบการวิเคราะห์แบบทั่วไปไม่สามารถวิเคราะห์ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved