

พอลิอะคริลิกแอซิดบรัชแบบแพดเทิร์นที่มีอนุภาคระดับนาโนเมตรของโลหะสำหรับการตรวจวัด
เพปไทด์โดยเซอร์เฟสแอสซิสเตดเลเซอร์ดีซอร์ปชันไอออนเซชัน-แมสสเปกโทรเมตรี



นางสาวอรุณี แสงสุวรรณ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2556
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



5472157523

PATTERNED POLY(ACRYLIC ACID)BRUSHES CONTAINING METAL NANOPARTICLES
FOR PEPTIDE DETECTION BY SURFACE ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION-
MASS SPECTROMETRY

Miss Arunee Sangsuwan

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Petrochemistry and Polymer
Science
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2013
Copyright of Chulalongkorn University

อะรุณี แสงสุวรรณ : พอลิอะคริลิกแอซิดบรัชแบบแพตเทิร์นที่มีอนุภาคระดับนาโนเมตรของโลหะสำหรับการตรวจวัดเปปไทด์โดยเซอร์เฟสแอสซิสเตดเลเซอร์ดีซอร์ปชันไอออไนเซชัน-แมสสเปกโทรเมตรี. (PATTERNED POLY(ACRYLIC ACID)BRUSHES CONTAINING METAL NANOPARTICLES FOR PEPTIDE DETECTION BY SURFACE ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION-MASS SPECTROMETRY) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร. วรวิทย์ โยเว่น, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ดร. นาฏนันทา รอดทองคำ, 45 หน้า.

เตรียมพอลิอะคริลิกแอซิด (พีเอเอ) บรัชแบบแพตเทิร์นโดยใช้เทคนิคโฟโตลิโทกราฟีร่วมกับปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันริเริ่มจากพื้นผิวด้วยกลไกแบบกราฟของอะคริลิกแอซิดซึ่งพิสูจน์ทราบความสำเร็จโดยการวัดมุมสัมผัสและการวิเคราะห์ด้วยเอฟทีไออาร์ หมู่มาร์บอกซิลในพีเอเอสามารถทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์ในการเตรียมอนุภาคทองคำนาโนด้วยวิธีอินซิตูโดยไม่ต้องเติมตัวรีดิวซ์จากภายนอก ภายใต้สภาวะที่ใช้ในการวิจัยทำให้ได้อนุภาคทองคำนาโนทั้งในรูปอนุภาคทรงกลมที่กระจายตัวดี (รัศมี 18.45 ± 2.34 นาโนเมตร) และแบบรวมกลุ่มที่ปกคลุมพื้นผิว 2.46×10^{-9} โมล/ตารางเมตร แผ่นกระจกที่ตัดแปรรูปพื้นผิวด้วยพีเอเอและตรึงด้วยอนุภาคทองคำนาโนสามารถใช้เป็นสับสเตอร์ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเซอร์เฟสแอสซิสเตดเลเซอร์ดีซอร์ปชันไอออไนเซชัน-แมสสเปกโทรเมตรี สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งเปปไทด์ขนาดเล็กที่มีมวล/ประจุ ≤ 600 (กลูตาไทโอน) และเปปไทด์ขนาดใหญ่ที่มีมวล/ประจุ ≥ 1000 (บราดีไคนิน, ICNKQDCPILE) โดยปราศจากสัญญาณรบกวนจากเมทริกซ์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอนุภาคทองคำนาโนถูกกักไว้ภายในพีเอเอบรัชและหมู่มาร์บอกซิลเป็นแหล่งโปรตอนภายในได้ จากการใช้อนุภาคทองคำนาโนเป็นโพรบจับยึดทำให้สามารถเลือกวิเคราะห์เปปไทด์ที่มีหมู่ไทออล จากของผสมของเปปไทด์ด้วยขีดจำกัดการวิเคราะห์ต่ำถึง 0.1 และ 0.05 นาโนโมลาร์ สำหรับกลูตาไทโอนและ ICNKQDCPILE ตามลำดับ รูปแบบที่เป็นแพตเทิร์นประกอบด้วยรูปร่างและความเลือกจำเพาะแสดงให้เห็นว่าสับสเตอร์ที่พัฒนาขึ้นใหม่นี้มีศักยภาพในการวิเคราะห์แบบประสิทธิภาพสูงของสารบ่งชี้ทางชีวภาพชนิดอื่น โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำในสารตัวอย่างทางชีวภาพที่มีความซับซ้อนได้

สาขาวิชา ปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์
ปีการศึกษา 2556

ลายมือชื่อนิสิต อะรุณี แสงสุวรรณ

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก 

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม Natnunda Rodthongkum

5472157523 : MAJOR PETROCHEMISTRY AND POLYMER SCIENCE

KEYWORDS: GOLD NANOPARTICLES; LASER DESORPTION IONIZATION; MASS SPECTROMETRY; SALDI PEPTIDE

ARUNEE SANGSUWAN: PATTERNED POLY(ACRYLIC ACID)BRUSHES CONTAINING METAL NANOPARTICLES FOR PEPTIDE DETECTION BY SURFACE ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION-MASS SPECTROMETRY. ADVISOR: ASSOC. PROF. VORAVEE HOVEN, Ph.D.,NADNUDDA RODTHONGKUM, PH.D., 45 pp.

Patterned poly(acrylic acid) (PAA) brushes was successfully generated via photolithography and surface-initiated reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization of acrylic acid as verified by water contact angle measurements and FT-IR analysis. The carboxyl groups of PAA brushes can act as reducing moieties for in situ synthesis of gold nanoparticles (AuNPs), without the use of additional reducing agent. Under the condition investigated, the AuNPs were both in the well dispersed spherical particles (i.d. 18.45 ± 2.34 nm) and aggregated particles with surface coverage of 2.46×10^{-9} mol/cm². The glass surface-modified PAA brushes immobilized with AuNPs (AuNPs-PAA) can be used as substrate for SALDI-MS analysis which is capable of detecting both small peptide having $m/z \leq 600$ (glutathione) and large peptides having $m/z \geq 1000$ (bradykinin, ICNKQDCPILE) without the interference from matrix signal suggesting that AuNPs were stably trapped within the PAA brushes and the carboxyl groups of PAA can serve as internal proton source. By employing AuNPs as the capture probe, the AuNPs-PAA substrate can selectively identify thiol-containing peptides from the peptide mixtures with LOD as low as 0.1 and 0.05 nM for glutathione and ICNKQDCPILE, respectively. The patterned format together with its high sensitivity and selectivity render this newly developed substrate a potential platform for high throughput analysis of other biomarkers especially those with low molecular weight in complex biological samples.

Field of Study: Petrochemistry and
Polymer Science

Academic Year: 2013

Student's Signature *Arune Sangsuwan*

Advisor's Signature *V. Voravee*

Co-Advisor's Signature *Nadnudda Rodthongkum*

ACKNOWLEDGEMENTS

First and foremost I wish to express my sincere and deep gratitude to my advisor and coadvisor, Associate Professor Dr.Voravee Hoven and Dr.Nadnudda Rodthongkum for their thoughtful guidance, steady encouragement and support, and consistent generosity and consideration. Working with them has been the best course of my study

I sincerely thank Professor Dr.Pattarapan Prasassarakich, Assistant Professor Dr.Varawut Tangpasuthadol and Dr. Piyaporn Na Nongkhai for acting as the chairman and examiner of my thesis committee, respectively and for their valuable constructive comments and suggestions. The authors are grateful to the Department of Chemistry and Materials Engineering, Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University, for providing the X-Ray Photoelectron Spectroscopy facility and the Mass Spectrometry Center, University of Massachusetts Amherst for Mass Spectrometer facility.

Furthermore, I would like to thank members of Organic Synthesis Research Unit (OSRU) Department of Chemistry and all my friends for their friendliness, helpful discussions, and encouragements. Finally, I also wish to especially thank my beloved family for their love, encouragement and support throughout my entire study.

CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	ix
LIST OF FIGURES	x
CHAPTER I	1
INTRODUCTION	1
1.1 Statement of problem	1
1.2 Objectives	3
1.3 Scope of investigation	3
CHAPTER II	4
THEORY AND LITERATURE REVIEW	4
2.1 Surface-assisted Laser Desorption Ionization-Mass Spectrometry (SALDI-MS)	4
2.2 Patterning	5
2.3 Polymer brushes	9
CHAPTER III	16
EXPERIMENTAL	16
3.1 Materials	16
3.2 Equipments	17
3.2.1 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR)	17
3.2.2 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)	17
3.2.3 Transmission Electron Microscopy (TEM)	17
3.2.4 Water Contact Angle Measurement	17
3.2.5 X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS)	18
3.2.6 Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS)	18
3.2.7 Mass Spectrometry Measurements	18

	Page
3.3 Experimental Procedure.....	18
3.3.1 Surface Patterning by Photolithography.....	18
3.3.2 Grafting of PAA Brushes on Patterned Surface.....	20
3.3.3 <i>In situ</i> Synthesis of AuNPs on PAA brushes.....	21
3.3.4 Preparation of Peptide Sample Solutions.....	21
3.3.5 Analysis of Thiol-containing Peptide in a Mixture.....	22
CHAPTER IV	23
RESULTS AND DISCUSSION.....	23
4.1 Preparation and Characterization of Patterned PAA Brushes Having AuNPs.....	23
4.2 SALDI-MS analysis of Peptides on AuNPs-PAA Substrate	31
4.3 Selective Detection of Thiol-containing Peptide on AuNPs-PAA Substrate by SALDI-MS.	33
CHAPTER V	36
CONCLUSION AND SUGGESTIONS.....	36
REFERENCES	37
VITA.....	42



LIST OF TABLES

	Page
Table 4.1 Water contact angles of the glass substrate after stepwise modification....	24
Table 4.2 Percentage of elemental composition of PAA-modified glass surface both before and after AuNPs immobilization.....	31



LIST OF FIGURES

	Page
Figure 2.1 Ionization processes on the substrate of (a) MALDI-MS and (b) SALDI-MS....	5
Figure 2.2 Schematic of the photoresist functionalisation method (a) piranha cleaned glass substrate, (b) UV exposure to the photoresist (PR) spun substrate, (c) patterns transferred to the photoresist, (d) silanising sample with APTES for 1 h, and (e) protein incubation.....	8
Figure 2.3 Diagram of the micropatterning process: (1) glass slides were spun with photoresist and soft baked, (2) photoresist was exposed with the photomask and post exposure baked, (3) photoresist was developed in 0.5% NaOH and hard baked, (4) HMDS was removed, and (5) the bare glass was passivated with PEG-silane.....	9
Figure 4.1 ¹ H NMR spectra of PAA in solution.....	25
Figure 4.2 FT-IR spectra of (a) Si-OH (b) Si-APTES (c) Si Initiator (d) Si-PAA.....	26
Figure 4.3 PAA-modified glass slide containing AuNPs generated by (a) 1 cycle of dipping and (b) 5 cycles of dipping in between 1 mM HAuCl ₄ solution and deionized water.	27
Figure 4.4 Patterned glass slide: covered with (a) positive UV-sensitive resist after photolithography step, (b) PAA brushes holding water droplets demonstrating their higher hydrophilicity than the surrounding area, (c) PAA brushes having <i>in situ</i> generated AuNPs, and (d) pattern used for photolithography.....	28
Figure 4.5 Calibration curve for Au ³⁺ quantification by ICP-MS.....	29
Figure 4.6 TEM images of AuNPs immobilized on PAA-modified glass substrate: (a) well dispersed particles and (b) aggregated particles.....	30

Figure 4.7 XPS spectra of (a) PAA-modified glass substrate and (b) PAA-modified glass substrate containing AuNPs.....	30
Figure 4.8 Mass spectra of (a) AuNPs, (b) bradykinin mixed with citrate-stabilized AuNPs matrix, and (c) bradykinin on AuNPs-PAA substrate.....	32
Figure 4.9 Mass spectra of (a) 500 nM glutathione analyzed by using CHCA matrix and (b) 500 nM glutathione analyzed on AuNPs-PAA substrate.....	33
Figure 4.10 Mass spectra of (a) a mixture of 500 nM glutathione, sucrose, cholesterol and (b) a mixture of 500 nM bradykinin and ICNKQDCPILE analyzed on AuNPs-PAA substrate by SALDI-MS.....	34
Figure 4.11 Mass spectra of (a) 0.1 nM glutathione and (b) 0.05 nM ICNKQDCPILE analyzed on AuNPs-PAA substrate.....	35

