

การพัฒนาโครงสร้างสองมิติที่มีการจัดเรียงตัวอย่างมีแบบแผนของจุดขยาย

สัญญาณรามานเพื่อใช้ศึกษาลักษณะการปลดปล่อยของสารเคมีในเซลล์สิ่งมีชีวิต

Fabrication of 2D Patterned Hotspots as SERS Platform for Chemical Mapping of  
Living Cells



โดย

นางสาวจุฑามาศ ปราบพาล

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2556

เรื่อง การพัฒนาโครงสร้างสองมิติที่มีการจัดเรียงตัวอย่างมีแบบแผนของจุดขยายสัญญาณรามาน  
เพื่อใช้ศึกษาลักษณะการปลดปล่อยของสารเคมีในเซลล์สิ่งมีชีวิต

โดย นางสาวจุฑามาศ ปราบพาล

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สัมฤทธิ์ วัชรสินธุ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(อาจารย์ ดร.ธนัชฐ์ ปราณีนรารัตน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ดร.รวีวรรณ เหล่าเจริญสุข) (ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร.พร้อมพงศ์ เพียรพิณิชธรรม)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

.....  
(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย พาราสุข)

หัวหน้าภาควิชาเคมี

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

**ชื่อโครงการ** การพัฒนาโครงสร้างสองมิติที่มีการจัดเรียงตัวอย่างมีแบบแผนของจุดขยายสัญญาณรามาน เพื่อใช้ศึกษาลักษณะการปลดปล่อยของสารเคมีในเซลล์สิ่งมีชีวิต

**ชื่อนิติโครงการ** นางสาวจุฑามาศ ปราบพาล เลขประจำตัว 5333068923  
**อาจารย์ที่ปรึกษา** อาจารย์ ดร.ธนิษฐ์ ปราณีนรรัตน์  
**อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม** ดร.รวีวรรณ เหล่าเจริญสุข (ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ)

**ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2556**

#### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการสังเคราะห์โครงสร้างสองมิติของโลหะทองเพื่อใช้เป็นจุดขยายสัญญาณรามานในเทคนิค Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) ด้วยเทคนิค nanosphere lithography (NSL) โดยใช้อนุภาคพอลิस्टาไทรนที่มีการจัดเรียงตัวชั้นเดียวเป็นแม่แบบ โดยการทดลองปรับสภาวะดังนี้ 1. ความสูงระหว่างแผ่นปาดกับผิวแก้ว 2. ความเร็วในการปาดสารแขวนลอย 3. ปริมาตรของสารแขวนลอย โดยสภาวะที่เหมาะสมที่สุด สามารถเตรียมแม่แบบได้พื้นผิวเฉลี่ย  $38,000 \mu\text{m}^2$  ซึ่งถือว่ามีปริมาณสูง และได้นำไปเคลือบโลหะทองและศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้เคลือบในช่วง 240-600 วินาที กับลักษณะของจุดขยายสัญญาณรามานที่ได้พบว่าโครงสร้างสองมิติของจุดขยายสัญญาณมีลักษณะเป็นวงแหวนที่มีความสูงมากขึ้น เมื่อใช้เวลาในการเคลือบมากขึ้นเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค Atomic Force Microscopy (AFM) จากนั้นได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการขยายสัญญาณของ 4,4'-thiobisbenzenethiol (TBBT) เทียบกับพื้นผิวแบบฟิล์มบางปกติ พบว่าสามารถขยายสัญญาณได้สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อใช้เวลาในการเคลือบโลหะทองมากขึ้น จากนั้นศึกษาประสิทธิภาพในการตรวจวัดสัญญาณรามานของ Quorum Sensing (QS) ชนิด *N*-acyl L-homoserine lactone (สารประกอบ **2a-2c**) และ *N*-(3-oxo-alkanoyl) L-homoserine lactone (สารประกอบ **4a-4c**) ที่สังเคราะห์ขึ้น พบว่า โครงสร้างสองมิติที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ขยายสัญญาณรามานของ QS และสามารถบอกความแตกต่างของสัญญาณจาก QS แต่ละชนิดได้

**คำสำคัญ:** รามาน, Quorum Sensing, SERS, NSL

**Title** Fabrication of 2D Patterned Hotspots as a SERS Platform for Chemical Mapping of Living Cells

**Student name** Jutamat Prabphal ID 5333068923

**Advisor** Dr.Thanit Praneenarat

**Co-advisor** Dr.Rawiwan Laocharoensuk (National Nanotechnology Center)

**Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic year 2013**

### Abstract

This project focuses on fabrication 2D patterned gold structure as Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) substrate via nanosphere lithography technique (NSL) using polystyrene monolayer as an NSL mask. In the experiment, three critical conditions were optimized to obtain the highest monolayer area; (1) distance between spreader and glass substrate (2) deposition rate and (3) volume of polystyrene nanoparticles. Based on the optimum conditions, monolayer area of 38,000  $\mu\text{m}^2$  can be obtained. Following the NSL mask preparation, Au thin film was deposited using ion sputtering technique by varying deposition time in a range of 240-600 seconds. Atomic Force Microscopy (AFM) images showed that the ring shape structures were formed. The ring height increased when using longer coating time. The study of SERS efficiency with Raman probe; 4,4'-thiobisbenzenethiol (TBBT), showed that the 2D structure can enhance Raman intensity significantly compared with the smooth Au film. Higher SERS signal is obtained when using longer coating time. Furthermore, the 2D structure can enhance and identify the differences of Raman signals of Quorum Sensing (QS) molecules including *N*-acyl L-homoserine lactones (**2a-2c**) and *N*-(3-oxo-alkanoyl) L-homoserine lactones (**4a-4c**) that were also synthesized in this project.

**Keywords:** Raman, Quorum Sensing, SERS, NSL

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้สำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดีด้วยความกรุณาจาก อาจารย์ ดร.ธนิชฐ์ ปราณีนรินทร์ อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัย ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ตั้งแต่การเริ่มต้นค้นคว้าทดลอง การทำการทดลอง ตลอดจนวิธีแก้ปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้น ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งและขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ดร.รวิวรรณ เหล่าเจริญสุข นักวิจัยศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ ผู้ซึ่งให้ความรู้ คำแนะนำในการทำวิจัยในด้านการสังเคราะห์จุดขยายสัญญาณรามาน รวมไปถึงคำแนะนำในการแก้ปัญหา แนวทางการปรับปรุงและพัฒนางานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สัมฤทธิ์ วัชรสินธุ์ และ อาจารย์ ดร.พร้อมพงศ์ เพียรพินิจธรรม ที่ให้ความกรุณาสละเวลาอันมีค่า ให้เกียรติมาเป็นประธานและคณะกรรมการการสอบโครงการวิจัย รวมถึงการให้คำแนะนำต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ในการปรับปรุงแก้ไขข้อผิดพลาดที่เกิดขึ้นในงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณโครงการสร้างปัญญาวิทย์ผลิตนักเทคโนโลยี (YSTP) จากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ที่ให้ทุนสนับสนุนการศึกษานี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ได้ให้ความรู้ อบรมสั่งสอนข้าพเจ้า ทั้งด้านวิชาการ และประสบการณ์อันล้ำค่าอื่นๆอีกมากมายด้วย

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณบิดาและมารดาของผู้วิจัยที่ได้ให้คำแนะนำ คำปรึกษา รวมถึงความรัก ความเข้าใจ และเป็นกำลังใจที่สำคัญให้แก่ผู้วิจัยเสมอมา ทำให้ผู้วิจัยสามารถผ่านพ้นอุปสรรคต่างๆ มาได้ด้วยดี จนเสร็จสิ้นงานวิจัย

ภาควิชาเคมี  
คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญรูปประกอบ	ช
สารบัญตารางประกอบ	ฅ
สารบัญแผนภาพประกอบ	ญ
คำอธิบายคำย่อและสัญลักษณ์	ฎ
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	
1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ	1
1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการ	7
<b>บทที่ 2 การทดลอง</b>	
2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์	8
2.2 สารเคมี	8
2.3 วิธีทั่วไปในการสังเคราะห์ <i>N</i> -acyl L-homoserine lactone (AHL)	9
2.4 วิธีทั่วไปในการสังเคราะห์ <i>N</i> -(3-oxo-alkanoyl) L-homoserine lactone	10
2.5 การสังเคราะห์โครงสร้างสองมิติเพื่อขยายสัญญาณรามาน	12
<b>บทที่ 3 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง</b>	
3.1 การสังเคราะห์ <i>N</i> -acyl L-homoserine lactone (AHL)	15
3.2 การสังเคราะห์ <i>N</i> -(3-oxo-alkanoyl) L-homoserine lactone	17
3.3 การสังเคราะห์โครงสร้างสองมิติ โดยใช้เทคนิค nanosphere lithography	21
3.3.1 การปรับระยะระหว่างแผ่นปาด (h) กับแผ่นแก้ว	21
3.3.2 การปรับความเร็วในการปาดสารแขวนลอย	23
3.3.3 การปรับปริมาตรของสารแขวนลอยพอลิस्टาไร์น	25
3.4 การตรวจสอบการพิมพ์ลายโดยใช้ Atomic Force Microscope (AFM)	27

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
<b>บทที่ 3 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง (ต่อ)</b>	
3.5 การทดสอบประสิทธิภาพในการขยายสัญญาณรามาาน ของโครงสร้างสองมิติที่พัฒนาขึ้น	30
3.6 การทดสอบประสิทธิภาพการตรวจวัดสัญญาณรามาานของพื้นผิวที่พัฒนาขึ้น	31
<b>บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง</b>	
4.1 สรุปผลการทดลอง	34
4.2 งานวิจัยในอนาคต	34
<b>เอกสารอ้างอิง</b>	35
<b>ภาคผนวก</b>	37
<b>ประวัติผู้วิจัย</b>	44

ภาควิชาเคมี  
คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญรูปประกอบ

รูปที่	หน้า
1.1 แสดงเทคนิค nanosphere lithography	3
1.2 แสดงลักษณะของสัญญาณรามานเมื่อค่า D/P ต่างกัน	4
1.3 โครงสร้างทั่วไปของ <i>N</i> -acyl L-homoserine lactone (AHL)	4
1.4 แสดงโครงสร้างโมเลกุล a) 3-oxo-C6-HSL b) C8-HSL c) C4-HSL ที่ใช้ในการศึกษาสัญญาณรามาน	6
2.1 แสดงแบบจำลองการจัดอุปกรณ์ในการเตรียม polystyrene monolayer	13
2.2 แสดงตัวอย่างการวัดพื้นที่ โดยใช้โปรแกรม KLONK Image Measurement	13
3.1 แสดงสเปกตรัม <sup>1</sup> H NMR ของสาร <i>N</i> -butanoyl L-homoserine lactone ( <b>2a</b> )	17
3.2 แสดงสเปกตรัม <sup>1</sup> H NMR ของสาร <i>N</i> -(3-oxo-hexanoyl) L-homoserine lactone ( <b>4a</b> )	19
3.3 แสดงรูปพื้นผิวแม่แบบที่เตรียมได้โครงสร้างที่ 1-5 จากการปรับสภาวะในตารางที่ 3.4	22
3.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่เฉลี่ยของ polystyrene monolayer กับความสูงระหว่างแผ่นปาดกับแผ่นแก้ว	22
3.5 แสดงรูปพื้นผิวแม่แบบที่เตรียมได้โครงสร้างที่ 6-10 และโครงสร้างที่ 4 จากการปรับสภาวะในตารางที่ 3.5	24
3.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่เฉลี่ยของ polystyrene monolayer กับความเร็วในการปาดสารแขวนลอย	24
3.7 แสดงรูปพื้นผิวแม่แบบที่เตรียมได้โครงสร้างที่ 7 และโครงสร้างที่ 11-14 จากการปรับสภาวะในตารางที่ 3.6	26
3.8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่เฉลี่ยของ polystyrene monolayer กับปริมาตรของสารแขวนลอยพอลิสไตรีน	26
3.9 แสดงรูป AFM (ซ้าย) และ cross-section profile (ขวา) ของโครงสร้างสองมิติที่พัฒนาขึ้น	28
3.10 แสดงแบบจำลองการวัดค่า W, D, H <sub>a</sub> และ H <sub>b</sub>	29
3.11 กราฟแสดงผลการเปรียบเทียบค่า W, D, H <sub>a</sub> และ H <sub>b</sub>	29
3.12 แสดง Raman shift โครงสร้างที่พัฒนาได้ กับ TBBT	30
3.13 แสดงสัญญาณรามานของโมเลกุล AHL <b>2a-2c</b> ที่สังเคราะห์ได้	31
3.14 แสดงสัญญาณรามานของโมเลกุล AHL <b>4a-4c</b> ที่สังเคราะห์ได้	32



## สารบัญตารางประกอบ

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงข้อมูลสภาวะในการเตรียม monolayer ของพอลิस्टาไดรีน และ พื้นที่เฉลี่ยที่ของพื้นผิวที่สังเคราะห์ได้	14
3.1 แสดงชนิดและ %yield ของสารประกอบ <i>N</i> -acyl L-homoserine lactone	16
3.2 แสดงชนิดและ %yield ของสารประกอบ <i>N</i> -(3-oxo-alkanoyl) L-homoserine lactone	18
3.3 แสดงปริมาณสารที่ใช้ในแต่ละปฏิกิริยา ปริมาณผลิตภัณฑ์และ %yield	20
3.4 แสดงข้อมูลสภาวะในการเตรียม monolayer ของพอลิस्टาไดรีน และ พื้นที่เฉลี่ยที่ของพื้นผิวที่สังเคราะห์ได้	21
3.5 แสดงข้อมูลสภาวะในการเตรียม monolayer ของพอลิस्टาไดรีน และ พื้นที่เฉลี่ยที่ของพื้นผิวที่สังเคราะห์ได้	23
3.6 แสดงข้อมูลสภาวะในการเตรียม monolayer ของพอลิस्टาไดรีน และ พื้นที่เฉลี่ยที่ของพื้นผิวที่สังเคราะห์ได้	25

ภาควิชาเคมี  
คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญแผนภาพประกอบ

แผนภาพที่	หน้า
1.1 แสดงตัวอย่างการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ AHL ที่เป็น non-native side chain	5
1.2 แสดงการสังเคราะห์ อนุพันธ์ ของ <i>N</i> -(3-oxo-dodecanoyl) L-homoserine lactone	5
2.1 แสดงการสังเคราะห์สารประกอบ <i>N</i> -acyl L-homoserine lactone	9
2.2 แสดงการสังเคราะห์สารประกอบ <i>N</i> -(3-oxo-alkanoyl) L-homoserine lactone ใน ขั้นตอนที่ 1	10
2.3 แสดงการสังเคราะห์สารประกอบ <i>N</i> -(3-oxo-alkanoyl) L-homoserine lactone ใน ขั้นตอนที่ 2	11
3.1 แสดงการสังเคราะห์สารประกอบ <i>N</i> -acyl L-homoserine lactone	15
3.2 แสดงการสังเคราะห์สารประกอบ <i>N</i> -(3-oxo-alkanoyl) L-homoserine lactone	18

ภาควิชาเคมี  
คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## คำอธิบายคำย่อและสัญลักษณ์

SERS	Surface Enhanced Raman Scattering
NSL	nanosphere lithography
QS	quorum sensing
AHL	<i>N</i> -acyl L-homoserine lactone
LSPRs	Localized Surface Plasmon Resonance Spectra
LPS	lipopolysaccharide
AFM	Atomic Force Microscopy
DMAP	4-(dimethylamino)pyridine
EDC.HCl	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimide hydrochloride
Meldrum's acid	2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4,6-dione
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	dichloromethane
ACN	acetonitrile
EtOAc	ethyl acetate
Et <sub>3</sub> N	triethylamine
TBBT	4,4'-thiobisbenzenethiol
IPA	isopropyl alcohol
<sup>1</sup> H NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance
s	singlet
d	doublet
t	triplet
m	multiplet

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ

การศึกษาลักษณะการปลดปล่อยหรือการกระจายตัวของสารเคมีต่างๆ ในสิ่งมีชีวิต จัดเป็นองค์ประกอบสำคัญที่นำไปสู่ความเข้าใจในกระบวนการต่างๆ ของสิ่งมีชีวิตได้ดีขึ้น เช่น กระบวนการการส่งสารสื่อประสาทที่เป็นพื้นฐานของระบบประสาท เป็นต้น โดยในปัจจุบันเทคนิคในการวิเคราะห์โดยส่วนใหญ่อาศัยหลักการฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี (fluorescence spectroscopy) ซึ่งสามารถให้ค่าความละเอียดในการตรวจวัดในระดับนาโนเมตร อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้จำเป็นต้องใช้การติดฉลากของสารเรืองแสง ซึ่งในบางกรณีอาจส่งผลกระทบต่อตัวอย่างหรือกระบวนการที่ต้องการวิเคราะห์ ดังนั้นการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ที่ไม่ต้องใช้การติดฉลาก รวมทั้งสามารถแยกแยะชนิดของโมเลกุลได้ในสภาวะเหมือนจริงมากที่สุด ย่อมส่งผลให้เกิดการพัฒนาองค์ความรู้และความเข้าใจในกระบวนการต่างๆ เพิ่มมากขึ้น

เทคนิครามานสเปกโทรสโกปี เป็นเทคนิคที่สามารถตรวจวัดได้สัญญาณที่มีลักษณะเฉพาะตัวขึ้นอยู่กับชั้นพลังงานการสั่นของโมเลกุล ทำให้สามารถนำไปใช้ในการจำแนกสารหรือโมเลกุลที่สนใจได้โดยไม่ต้องมีการติดฉลากโมเลกุล ดังนั้นการตรวจวัดด้วยเทคนิคนี้จึงเหมาะที่จะใช้ในการศึกษากระบวนการทางชีวเคมีของสิ่งมีชีวิต แต่อย่างไรก็ตามสัญญาณรามานที่วัดได้โดยปกติมีค่าต่ำมาก ส่งผลให้การวัดสัญญาณรามานโดยตรงทำได้ยาก จึงมีการพัฒนาโครงสร้างโลหะซึ่งเป็นพื้นผิวที่สามารถขยายสัญญาณรามานของโมเลกุลใดๆ ที่อยู่ใกล้กับพื้นผิวดังกล่าว ในระบบการตรวจวัดการกระเจิงแสงตามหลักของรามาน (Surface Enhanced Raman Scattering, SERS) โดยสามารถขยายสัญญาณรามานได้ในช่วง  $10^6$ - $10^8$  เท่า หรืออาจสูงได้ถึง  $10^{14}$  เท่า<sup>1</sup>ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการตรวจวัดสารปริมาณน้อยได้ โดยการพัฒนาวัสดุดังกล่าวแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ (1) การสังเคราะห์อนุภาคโลหะขนาดนาโน และควบคุมการรวมตัวกันของอนุภาคดังกล่าวเพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างอนุภาค ซึ่งเป็นจุดที่มีการขยายสัญญาณและ (2) การสร้างโครงสร้างสองมิติที่มีลักษณะเป็นฟิล์มบางที่มีพื้นผิวขรุขระหรือมีลักษณะเป็นอนุภาคโลหะกระจายตัวอยู่บนพื้นผิว ซึ่งวัสดุประเภทแรก อาศัยการทำปฏิกิริยาของสารชีวโมเลกุลกับพื้นผิวของอนุภาคแชนนอนลอย ส่งผลให้เกิดการรวมตัวของอนุภาค และเกิดจุดขยายสัญญาณ ทำให้การวิเคราะห์ส่วนใหญ่สามารถทำได้ในระบบสารละลายเท่านั้น ส่วนประเภทที่ 2 มักถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์สารที่ทำปฏิกิริยากับพื้นผิว

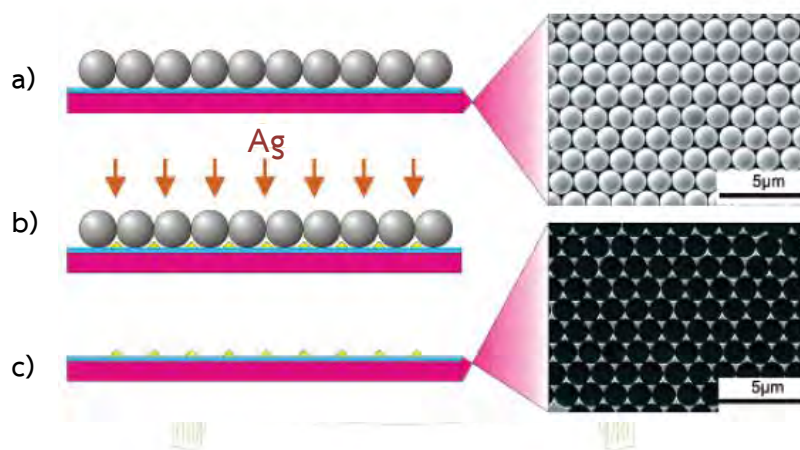
ปัจจุบันมีการพัฒนาและสังเคราะห์วัสดุที่ใช้เป็นตัวขยายสัญญาณรามานอย่างต่อเนื่องแต่มีกพบ ปัญหาเรื่องความไม่แน่นอนในการสังเคราะห์ ทำให้การขยายสัญญาณได้ค่าที่ไม่แน่นอน ทั้งนี้การจัดเรียงตัวที่ไม่แน่นอนของจุดขยายสัญญาณบนพื้นผิว ส่งผลให้โครงสร้างสองมิติที่พัฒนาขึ้นไม่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเปรียบเทียบสัญญาณเชิงปริมาณและการทำแผนภาพของสัญญาณรามาน (SERS mapping) ของสารเคมีบนพื้นผิว ดังนั้นจึงมีการนำเทคนิค nanolithography มาใช้ในการพัฒนาและผลิต โครงสร้างสองมิติที่มีการจัดเรียงตัวของจุดขยายสัญญาณอย่างมีระเบียบ โดยอาศัยการพิมพ์ลายโดยแม่แบบ (template/mask) โดยเทคนิค nanosphere lithography (NSL) สามารถสร้างพื้นผิวขนาดใหญ่ได้และมี ขั้นตอนการจัดเตรียมที่ง่าย

คณะผู้วิจัยเล็งเห็นว่า กระบวนการของสิ่งมีชีวิตที่น่าสนใจในการนำมาทดสอบโดยวัสดุนี้ได้แก่ quorum sensing (QS) ที่เกิดขึ้นในแบคทีเรีย โดยกระบวนการ QS นั้นเป็นการส่งสัญญาณที่เป็น สารประกอบอินทรีย์ขนาดเล็กออกจากเซลล์แบคทีเรีย โดยที่ปริมาณสัญญาณแปรผันตรงกับจำนวนของ แบคทีเรีย โดยเมื่อสัญญาณมีความเข้มข้นสูงพอ สารดังกล่าวจะเกิดอันตรกิริยากับโปรตีนตัวรับ (receptor protein) ที่อยู่ภายในเซลล์ของแบคทีเรียข้างเคียงได้ ซึ่งจะนำไปสู่การแสดงออกของยีนจำนวนหนึ่งได้ในที่สุด<sup>2-4</sup> ซึ่งนักวิทยาศาสตร์ได้ค้นพบว่ามีการแสดงออกของยีนเหล่านี้ มีความเชื่อมโยงกับปรากฏการณ์หรือ กระบวนการที่สำคัญในธรรมชาติหลายประการ เช่น การเกิดฟิล์มชีวภาพ (biofilm) ในแบคทีเรียก่อโรค เป็นต้น

*N*-acyl L-homoserine lactone (AHL) เป็นสัญญาณ Quorum sensing ที่พบได้ในแบคทีเรีย ชนิดกรัมลบ (Gram-negative Bacteria) หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่ง สามารถปลดปล่อยสารที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ และเป็นเหตุให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาล<sup>5</sup> ผู้วิจัยจึงสนใจ การศึกษารูปแบบการปลดปล่อยสัญญาณดังกล่าวออกจากเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งถือเป็นข้อมูลสำคัญที่จะนำไปสู่ ความเข้าใจในกระบวนการนี้ได้ดียิ่งขึ้น โดยอาศัยเทคนิค SERS ที่อาศัยวัสดุหรือซัพสเตรตที่เตรียม ขึ้นมาได้ในโครงการนี้

## 1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

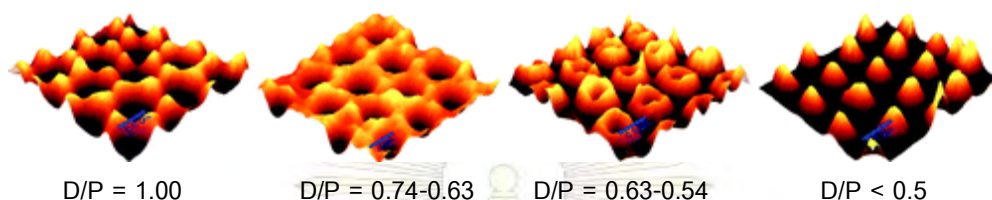
ในปี ค.ศ. 2000 Jensen T.R. และคณะ<sup>6</sup> ศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าความยาวคลื่นที่ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของ localized surface plasmon resonance spectra (LSPRs) ที่ตรวจวัดได้จากโครงสร้างสองมิติของอนุภาคเงินขนาดนาโนแบบต่างๆ ซึ่งโครงสร้างดังกล่าวมีการจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ โดยใช้เทคนิค nanosphere lithography ในการทดลองมีการใช้ออนุภาคพอลิस्टาโรลีนที่มีขนาดต่างกันเป็นแม่แบบในการพิมพ์ลายสองมิติลงบนแผ่นไมกา (mica) จากนั้นทำการเคลือบโลหะเงินที่มีความหนาต่างๆ และทำการกำจัดอนุภาคพอลิस्टาโรลีนแม่แบบออก ทำให้ได้โครงสร้างสองมิติที่มีขนาดและรูปร่างต่างกันไป พบว่าเมื่อความสูงและความกว้าง เปลี่ยนไป 1 นาโนเมตร จะทำให้ค่าความยาวคลื่นที่ค่าการดูดกลืนสูงสุด  $\lambda_{max}$  ของ LSPRs เปลี่ยนแปลงไป 2-5 นาโนเมตร ถ้าเปลี่ยนจุดขยายสัญญาณจากรูปสามเหลี่ยม (triangular) ไปเป็นรูปทรงรี (ellipsoidal) ทำให้  $\lambda_{max}$  ของ LSPRs เปลี่ยนแปลงไป 200 นาโนเมตร



รูปที่ 1.1 แสดงเทคนิค nanosphere lithography<sup>7</sup>

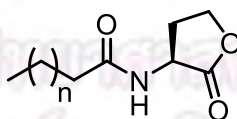
ในปี ค.ศ. 2012 Correia-Ledo D. และคณะ<sup>8</sup> ได้ทำการศึกษาลักษณะการให้สัญญาณรามานของ nanotriangle และ nanohole arrays ที่มีขนาด periodicity ที่ต่างกัน โดยทำการสังเคราะห์โครงสร้างสองมิติของจุดขยายสัญญาณรามาน โดยใช้เทคนิค nanosphere lithography ใช้พอลิस्टาโรลีนแม่แบบที่มีขนาดต่างกัน โดยขนาดของอนุภาคพอลิस्टาโรลีน ผู้วิจัยกำหนดให้เป็น ค่า periodicity หรือ P และทำการลดขนาดของแม่แบบ (etching) ก่อนขั้นตอนการเคลือบโลหะทอง โดยเส้นผ่านศูนย์กลางของโครงสร้าง (D) เปลี่ยนตามเวลาที่ใช้ในการลดขนาดของอนุภาคพอลิस्टาโรลีน พบว่าเมื่อค่า D/P เปลี่ยนไปจะทำให้โครงสร้างมีค่าการ

เพิ่มของสัญญาณที่ต่างกันและมีบริเวณที่เกิดการขยายสัญญาณต่างกัน โดยสามารถจำแนก ลักษณะการให้สัญญาณรามานออกเป็น 4 แบบ คือ ให้สัญญาณที่ triangle มีค่า  $D/P = 1$ , ให้สัญญาณต่อเนื่องเป็นตาข่ายของจุดขยายสัญญาณ  $D/P = 0.74-0.63$ , ให้สัญญาณเป็นลักษณะวงแหวน มีค่า  $D/P = 0.63-0.54$  และเมื่อโครงสร้างมีค่า  $D/P < 0.5$  มีลักษณะการให้สัญญาณเป็นจุด ดังแสดงในรูป 1.2

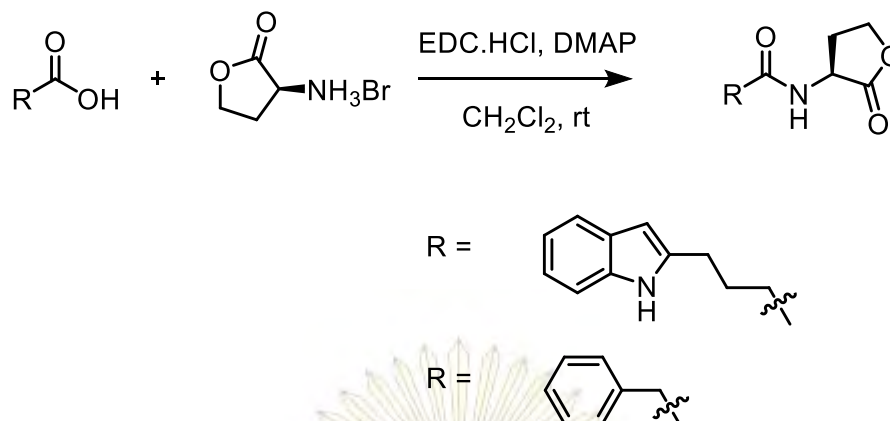


รูปที่ 1.2 แสดงลักษณะของสัญญาณรามานเมื่อค่า  $D/P$  ต่างกัน

ในปี 2012 Morkunas B. และคณะ<sup>5</sup> ได้ทำการสังเคราะห์สารเลียนแบบอนุพันธ์ของสารกลุ่ม *N*-acyl L-homoserine lactone (AHL) (รูปที่ 1.3) ชนิด *N*-(3-oxo-dodecanoyl) L-homoserine lactone (OdDHL) ซึ่งเป็น autoinducer ในการทำให้แบคทีเรียผลิต pyocyanin ในแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งเป็นสารพิษที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ โดยการวิจัยนี้ได้ทำการเลียนแบบอนุพันธ์ของ AHL โดยการเปลี่ยนหมู่โซ่ข้างที่ไม่พบในแบคทีเรีย (non-native side chain) (แผนภาพที่ 1.1) และทำการวัดประสิทธิภาพการยับยั้งการผลิต pyocyanin และเสนอกระบวนการยับยั้งโดยที่ อนุพันธ์ที่สังเคราะห์ขึ้นจะไปทำการแย่งจับ protein receptor จึงไม่ทำให้เกิดการสร้าง pyocyanin ในที่สุด

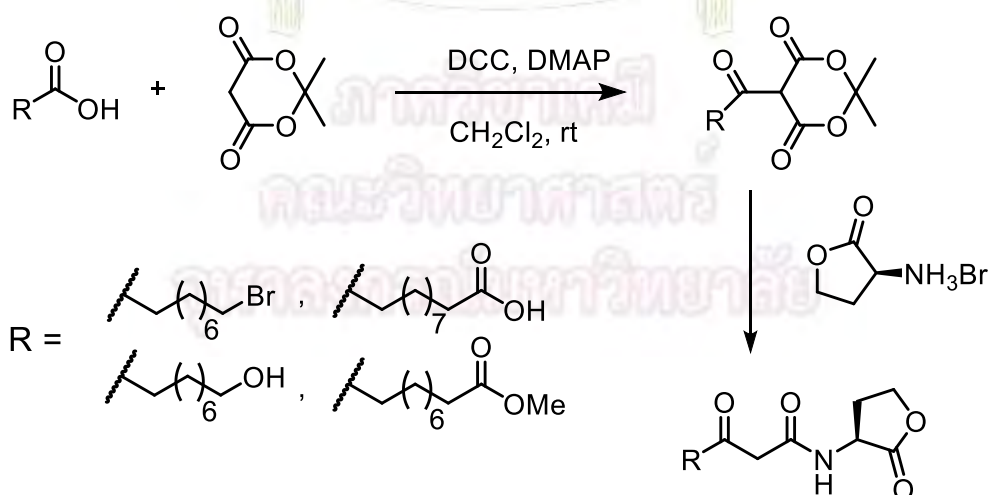


รูปที่ 1.3 โครงสร้างทั่วไปของ *N*-acyl L-homoserine lactone (AHL)



แผนภาพที่ 1.1 แสดงตัวอย่างการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ AHL ที่เป็น non-native side chain

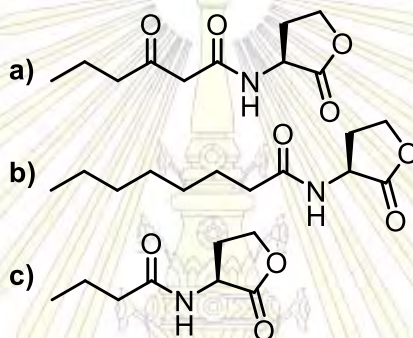
ในปี 2003 Chhabra S.R. และคณะ<sup>9</sup> ได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ *N*-(3-oxo-dodecanoyl) L-homoserine lactone เพื่อศึกษาความสามารถในการก่อกวนภูมิคุ้มกันในกระบวนการปลดปล่อย TNF- $\alpha$  และ IL-2 ของ lipopolysaccharide (LPS) ภายในเม็ดเลือดขาว ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาความสามารถในการยับยั้งการปลดปล่อย TNF- $\alpha$  ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด leucocytes จากคนและหนู โดยสังเคราะห์อนุพันธ์ของ AHL ที่มีความยาวของหมู่ R ที่ 8-14 คาร์บอน และมีการเปลี่ยนแปลงหมู่ R เป็น โบรมไนด์, ไฮดรอกซิล, คาร์บอกซิลิก, เอสเทอร์ (แผนภาพ 1.2) พบว่า เมื่อปลายของหมู่ R เป็น คาร์บอกซิลิกหรือเอสเทอร์ จะมีผลทำให้อนุพันธ์นั้นลดความสามารถในการก่อกวนภูมิคุ้มกันลง แต่การเปลี่ยนแปลงสายเป็นโบรมไนด์หรือไฮดรอกซิล ยังคงความสามารถในการก่อกวนภูมิคุ้มกันไว้ได้



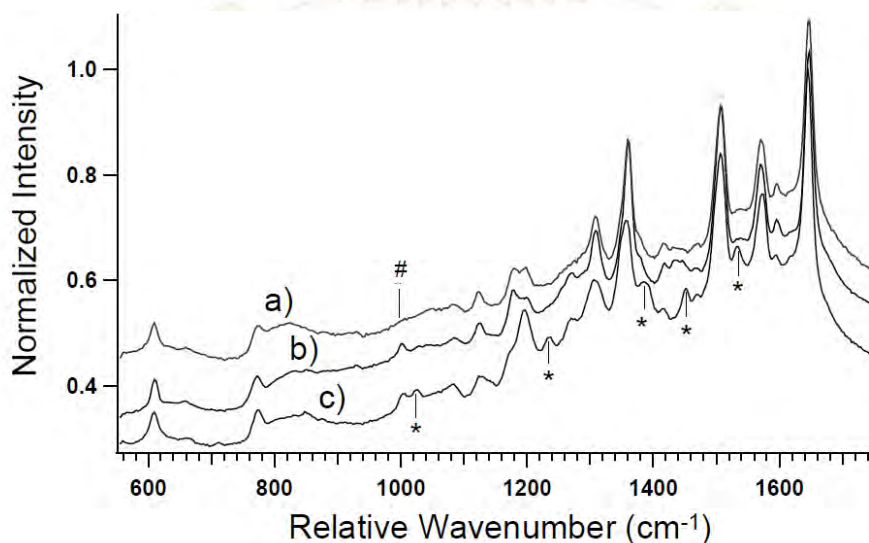
แผนภาพที่ 1.2 แสดงการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ *N*-(3-oxo-dodecanoyl) L-homoserine lactone



ในปี ค.ศ. 2007 Pearman W.F. และคณะ<sup>3</sup> ได้วัดสัญญาณรามานของ quorum sensing แบบ *in-situ* โดยทำการสังเคราะห์ silver nanoparticles เพื่อใช้เพิ่มสัญญาณรามานของ AHL และศึกษาลักษณะ finger print ของ AHL ในช่วงความถี่ 500 - 1800  $\text{cm}^{-1}$  โดยทำการศึกษา *N*-acyl L-homoserine lactone (AHL) ที่มีความยาวของคาร์บอนของ acyl chain ตั้งแต่ 4-12 อะตอม และ 3-oxo-hexanoyl-DL-homoserine lactone (3-oxo-C6-HSL) (รูปที่ 1.4) และระบุลักษณะเด่นของสัญญาณจากโครงสร้าง AHL 3 ชนิด คือ 3-oxo-C6-HSL ไม่มีพีคที่ 1005  $\text{cm}^{-1}$ , C8-HSL จะมีสัญญาณที่เป็นลักษณะทั่วไปของสารในกลุ่ม AHL และ C4-HSL จะปรากฏพีคย่อยๆ ขึ้น และพีคที่เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนคือพีคที่ ประมาณ 1200  $\text{cm}^{-1}$  ดังแสดงในรูปที่ 1.5



รูปที่ 1.4 แสดงโครงสร้างโมเลกุล a) 3-oxo-C6-HSL b) C8-HSL c) C4-HSL ที่ใช้ในการศึกษาสัญญาณรามาน



รูปที่ 1.5 แสดงสัญญาณรามานของโมเลกุล AHL ชนิดต่างๆ

### 1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. พัฒนาโครงสร้างสองมิติที่มีการจัดเรียงตัวของจุดขยายสัญญาณรามานโดยใช้เทคนิค Nanosphere Lithography (NSL) โดยให้มีขนาดการจัดเรียงตัวแบบ hexagonal closed pack มากกว่า  $20 \times 20 \mu\text{m}^2$
2. ทดสอบประสิทธิภาพในการขยายสัญญาณรามานของโครงสร้างสองมิติที่พัฒนาขึ้นโดยเปรียบเทียบกับพื้นผิวโลหะชนิดฟิล์มบางแบบปกติ
3. ทดสอบพื้นผิวที่ผลิตขึ้นกับสารประกอบที่เป็นสัญญาณในกระบวนการ QS ในแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *N*-acyl L-homoserine lactones (AHL)



ภาควิชาเคมี  
คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 2

### การทดลอง

#### 2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

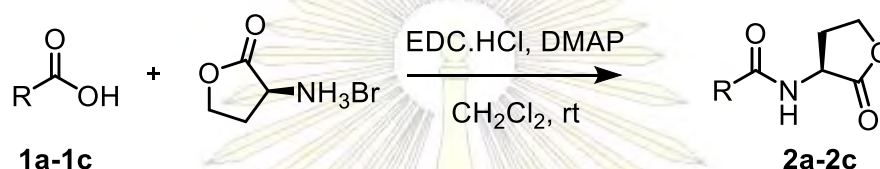
1. เครื่อง syringe pump
2. เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance Spectrophotometer 400 MHz (varian model Mercury +400)
3. เครื่อง Confocal-Raman Spectrometer (NT-MDT integra spectra)
4. เครื่อง Rotary vacuum evaporator
5. เครื่อง ion sputtering (HITACHI)
6. เครื่อง Atomic Force Microscopy (AFM)

#### 2.2 สารเคมี

1. butanoic acid
2. hexanoic acid
3. decanoic acid
4. (S)-(-)-( $\alpha$ )-amino- $\gamma$ -butyrolactone hydrobromide
5. 2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4,6-dione (Meldrum's acid)
6. *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC.HCl)
7. 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP)
8. *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC)
9. สารแขวนลอยของอนุภาคพอลิस्टไตรีน ขนาด 5  $\mu$ m
10. dichloromethane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )
11. acetonitrile (ACN)
12. hydrochloric acid (HCl)
13. hexanes
14. ethyl acetate (EtOAc)
15. sodium hydrogen carbonate ( $\text{NaHCO}_3$ )
16. sodium sulfate ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )

17. triethylamine (Et<sub>3</sub>N)
18. hydrochloric acid (HCl)
19. acetone
20. methanol
21. isopropyl alcohol (IPA)

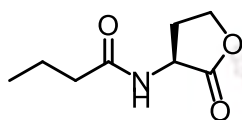
### 2.3 วิธีทั่วไปในการสังเคราะห์ *N*-acyl L-homoserine lactone (AHL)



#### แผนภาพที่ 2.1 แสดงการสังเคราะห์สารประกอบ *N*-acyl L-homoserine lactone

ซึ่ง EDC.HCl 282 mg (1.5 mmol) ซึ่ง DMAP 180 mg (1.5 mmol) และ (S)-(-)-( $\alpha$ )-amino- $\gamma$ -butyrolactone hydrobromide 200 mg (1.1 mmol) ละลายใน CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 10 mL เติมคาร์บอนซิลิกที่สนใจ 1 mmol กวนสารผสมด้วยเครื่อง magnetic stirrer ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจนที่อุณหภูมิห้องต่อไปอีก 18 ชั่วโมง จากนั้นสกัดด้วย 10% HCl เก็บชั้น CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> แล้วทำให้แห้งด้วย Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> แล้วนำไประเหยตัวทำละลาย นำผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และใช้สารละลายผสมระหว่าง EtOAc และ Hexanes เป็นเฟสเคลื่อนที่ และตรวจสอบเอกลักษณ์เฉพาะของสารที่สังเคราะห์ได้โดยใช้เทคนิค <sup>1</sup>H-NMR

ข้อมูล <sup>1</sup>H NMR สเปกตรัม และ %yield ของสาร **2a**



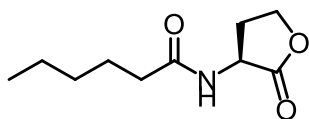
<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 6.24 (1H, s) 4.62-4.56 (1H, ddd,  $J = 4$  Hz)

4.49-4.45 (1H, t,  $J = 8$  Hz) 4.32-4.26 (1H, ddd,  $J = 4$  Hz) 2.87-2.80 (1H, ddd,  $J = 4$  Hz) 2.26-

2.22 (2H, t,  $J = 8$  Hz) 2.18-2.13 (1H, ddd,  $J = 4$  Hz) 1.76-1.64 (2H, m) 0.98-0.94 (3H, t,  $J = 8$

Hz) %yield = 90%

ข้อมูล  $^1\text{H}$  NMR สเปกตรัม %yield ของสาร **2b**



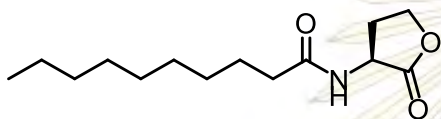
$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 6.73 (1H, s) 4.67-4.60 (1H, m)

4.48-4.44 (1H, t,  $J = 8.8$  Hz) 4.33-4.26 (1H, m) 2.78-2.71 (1H, m) 2.27-2.23 (2H, t,  $J = 8$  Hz)

2.20-2.15 (1H, m) 1.66-1.63 (2H, m) 1.32-1.24 (4H, m) 0.90-0.88 (3H, t,  $J = 4.8$ Hz) %yield =

27%

ข้อมูล  $^1\text{H}$  NMR สเปกตรัม และ %yield ของสาร **2c**

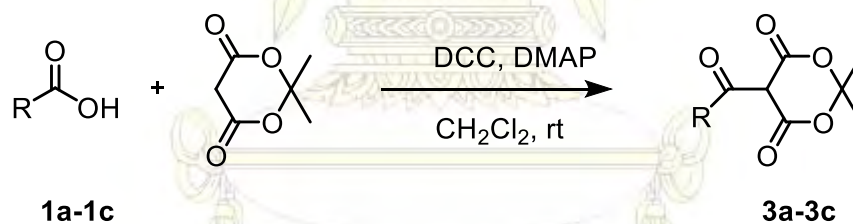


$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 6.49 (1H, s) 4.64-4.56 (1H, m)

4.48-4.44 (1H, m) 4.32-4.26 (1H, m) 2.82-2.75 (1H, m) 2.27-2.23 (2H, t,  $J = 8$  Hz) 2.20-2.15

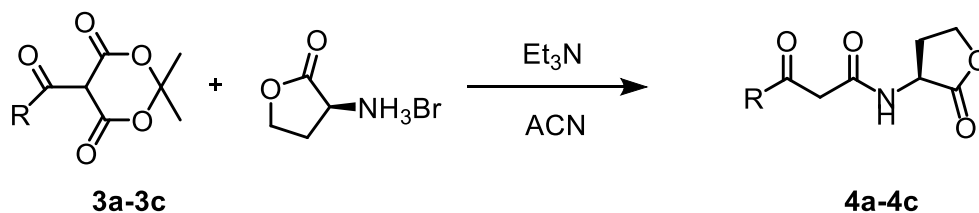
(1H, m) 1.63-1.62 (2H, m) 1.26 (12H, m) 0.89-0.86 (3H, t,  $J = 6$  Hz) %yield = 89%

## 2.4 วิธีทั่วไปในการสังเคราะห์ *N*-(3-oxo-alkanoyl) L-homoserine lactone



แผนภาพที่ 2.2 แสดงการสังเคราะห์สารประกอบ *N*-(3-oxo-alkanoyl) L-homoserine lactone ในขั้นตอนที่ 1

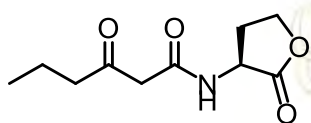
ขั้นตอนที่ 1 เตรียมคาร์บอกซิลิกที่ต้องการจำนวน 2 mmol ซึ่ง DMAP 256 mg (2.1 mmol) DCC 454 mg (2.2 mmol) และ Meldrum's acid 288 mg (2.0 mmol) ลงใน  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  20 mL กวนสารผสมด้วยเครื่องmagnetic stirrer ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นกรองตะกอนออก แล้วนำสารละลายไประเหยตัวทำละลายเพื่อนำมาละลายใหม่ใน EtOAc แล้วสกัดด้วย 10% HCl เก็บชั้น EtOAc แล้วทำให้แห้งด้วย  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  แล้วไปทำปฏิกิริยาต่อในขั้นตอนที่ 2



**แผนภาพที่ 2.3** แสดงการสังเคราะห์สารประกอบ *N*-(3-oxo-alkanoyl) L-homoserine lactone ในขั้นตอนที่ 2

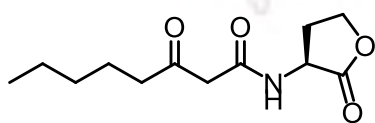
ขั้นตอนที่ 2 นำสารที่สกัดได้ไประเหยตัวทำละลาย แล้วนำมาละลายใหม่ใน ACN ซึ่ง(S)-(-)-( $\alpha$ )-amino- $\gamma$ -butyrolactone hydrobromide 364 mg (2.0 mmol) และ Et<sub>3</sub>N 334  $\mu$ L (2.4 mmol) ใส่ลงไปในสารละลาย กวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไป reflux 3 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลานำสารละลายไประเหยตัวทำละลาย แล้วละลายใหม่ด้วย EtOAc แล้วสกัดด้วยสารละลายอิ่มตัว NaHCO<sub>3</sub> เก็บชั้น EtOAc แล้วทำให้แห้งด้วย MgSO<sub>4</sub> นำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และใช้สารละลายผสมระหว่าง EtOAc และ Hexanes เป็นเฟสเคลื่อนที่ และตรวจสอบเอกลักษณ์เฉพาะของสารที่สังเคราะห์ได้โดยใช้เทคนิค <sup>1</sup>H-NMR

ข้อมูล <sup>1</sup>H NMR สเปกตรัม และ %yield ของสาร **4a**



<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 7.69 (1H, s) 4.64-4.56 (1H, m) 4.50-4.46 (1H, t,  $J$  = 8.8 Hz) 4.32-4.25 (1H, m) 3.47 (2H, s) 2.80-2.73 (1H, m) 2.54-2.50 (2H, t,  $J$  = 7.2 Hz) 2.29-2.18 (1H, m) 1.66-1.60 (2H, m) 0.95-0.92 (3H, t,  $J$  = 6.8 Hz) %yield = 24%

ข้อมูล <sup>1</sup>H NMR สเปกตรัม และ %yield ของสาร **4b**

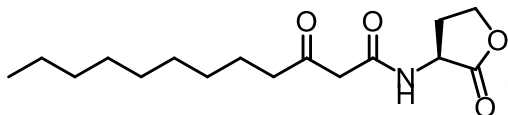


<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 7.72 (1H, s) 4.65-4.57 (1H, m) 4.50-4.46 (1H, t,  $J$  = 9 Hz) 4.32-4.24 (1H, m) 3.48 (2H, s) 2.78-2.72 (1H, m) 2.55-2.52 (2H, t,  $J$  =

5.4 Hz ) 2.30-2.20 (1H, m) 1.61-1.55 (2H, m) 1.32-1.25 (4H, m) 0.90-0.87 (3H, t,  $J = 6.8$  Hz)

%yield = 59%

ข้อมูล  $^1\text{H}$  NMR สเปกตรัม และ %yield ของสาร **4c**



$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 7.76 (1H, s) 4.58-4.51

(1H, m) 4.40-4.36 (1H, t,  $J = 8\text{Hz}$ ) 4.23-4.17 (1H, m) 3.41 (2H, s) 2.62-2.56 (1H, m) 2.48-2.45

(2H, t,  $J = 4$  Hz ) 2.28-2.17 (1H, m) 1.56-1.48 (2H, m) 1.17 (12H, m) 0.84-0.78 (3H, t,  $J = 6$  Hz)

%yield = 50%

## 2.5 การสังเคราะห์โครงสร้างสองมิติเพื่อขยายสัญญาณรามาน

### การเตรียมพื้นผิวสำหรับสังเคราะห์

เตรียมแผ่นแก้วโดยการตัดจากแผ่น cover slip ตามขนาดที่ต้องการ (11x11mm) จากนั้น ทำความสะอาดพื้นผิวโดยการ นำไป sonication ใน acetone, methanol และ IPA ตามลำดับ โดยใช้เวลา 10 นาที ในการสั่นแต่ละขั้นตอน โดยหลังจากทำความสะอาดแล้วสามารถเก็บแผ่นแก้วใน IPA ก่อนนำไปใช้

### การสังเคราะห์โครงสร้างสองมิติ โดยใช้เทคนิค nanosphere lithography (NSL)

นำสารแขวนลอยของอนุภาคพอลิสไตรีน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มาใช้ในการเตรียมและจัดเรียงอนุภาคบนพื้นผิวของกระจกที่ผ่านการทำความสะอาดแล้วตามขั้นตอนข้างต้น โดยใช้การปาดสารแขวนลอยเพื่อให้อนุภาคจัดเรียงตัวแบบ hexagonal close pack<sup>10</sup> โดยมีการตัดแปลงเครื่อง syringe pump เป็นอุปกรณ์ในการปาด ดังรูป 2.1 โดยมีการปรับสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้มีการจัดเรียงตัวของพอลิสไตรีนอย่างต่อเนื่องได้มากที่สุด ดังนี้ 1. ระยะห่างระหว่างแผ่นปาดกับแผ่นแก้ว (height, H) 2. ความเร็วของการปาด (rate, R) 3. ปริมาตรของสารแขวนลอยของอนุภาคพอลิสไตรีน (volume, V) ดังตาราง 2.1 จากนั้นนำไปตรวจสอบการจัดเรียงตัวของอนุภาคพอลิสไตรีนและวัดขนาดของพื้นที่ ที่มีการจัดเรียงตัวอย่างต่อเนื่อง โดยการส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ โดยตัวอย่างการวัดพื้นที่โดยใช้โปรแกรม KLONGK Image Measurement ดังแสดงในรูป 2.2



รูปที่ 2.1 แสดงแบบจำลองการจัดอุปกรณ์ในการเตรียม polystyrene monolayer



รูปที่ 2.2 แสดงตัวอย่างการวัดพื้นที่ โดยใช้โปรแกรม KLNK Image Measurement

นำแม่แบบที่เตรียมได้ไปเคลือบพื้นผิวโลหะทองด้วยเทคนิค sputtering โดยใช้เวลาในการเคลือบ 240 360 480 และ 600 วินาที จากนั้น นำไป sonicate ในไดคลอโรมีเทน เพื่อกำจัดอนุภาคพอลิสไตรีนที่ทำหน้าที่เป็นแม่แบบออกไป และตรวจสอบการพิมพ์ลายโดยใช้ Atomic Force Microscope (AFM)



ตารางที่ 2.1 แสดงข้อมูลสภาวะในการเตรียม monolayer ของพอลิไธรีน และ พื้นที่เฉลี่ยที่ของพื้นผิวที่สังเคราะห์ได้

โครงสร้าง	conditions			
	Hight (mm)	Angle (degree)	Volume ( $\mu\text{L}$ )	Rate (mm/s)
1	0.08	53	4	0.038
2	0.13	53	4	0.038
3	0.18	53	4	0.038
4	0.23	53	4	0.038
5	0.28	53	4	0.038
6	0.23	53	4	0.019
7	0.23	53	4	0.023
8	0.23	53	4	0.026
9	0.23	53	4	0.030
10	0.23	53	4	0.034
11	0.23	53	5	0.023
12	0.23	53	6	0.023
13	0.23	53	7	0.023
14	0.23	53	8	0.023

การทดสอบประสิทธิภาพในการขยายสัญญาณของโครงสร้างสองมิติที่พัฒนาขึ้น

ทดสอบประสิทธิภาพการขยายสัญญาณ โดยทำการวัดสัญญาณรามานของโครงสร้างที่พัฒนาขึ้น กับ ผิวโลหะชนิดฟิล์มบาง โดยทดสอบกับ สาร 4,4'-thiobisbenzenethiol (TBBT)

การทดสอบประสิทธิภาพการตรวจวัดสัญญาณรามานของพื้นผิวที่พัฒนาขึ้น

ทดสอบประสิทธิภาพการตรวจวัดสัญญาณรามานของพื้นผิวที่พัฒนาขึ้น โมเลกุล AHL ที่สังเคราะห์ได้ โดยใช้เครื่องรามานสเปกโตรมิเตอร์ ที่มีค่า excitation ของเลเซอร์เท่ากับ 632.8 นาโนเมตร และอ่านค่าความเข้มของสัญญาณรามานในช่วง  $200\text{-}1900\text{ cm}^{-1}$

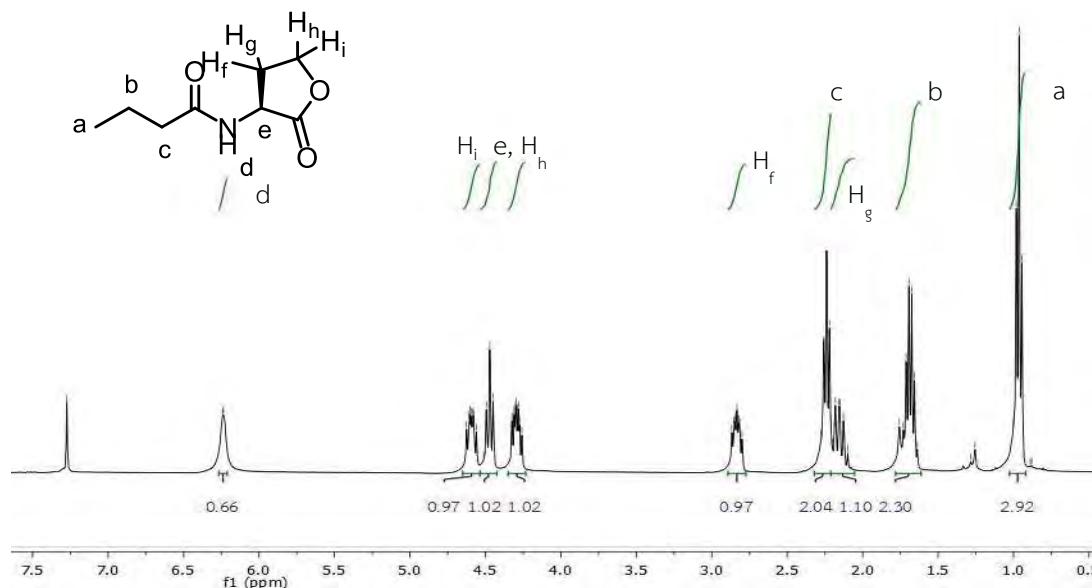


ตารางที่ 3.1 แสดงชนิดและ %yield ของสารประกอบ *N*-acyl L-homoserine lactone

สาร	R	%yield
2a	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	90
2b	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	27
2c	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	89

เมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค <sup>1</sup>H NMR สเปกโทรสโกปีพบว่า <sup>1</sup>H NMR สเปกตรัมของสารที่สังเคราะห์ได้ตรงกับสเปกตรัมของสารกลุ่ม *N*-acyl L-homoserine lactone ที่เคยมีรายงานไว้ โดยจะขอนำเสนอสเปกตรัมของสาร **2a** โดยที่สเปกตรัมของสาร **2b** และ **2c** จะมีความแตกต่างเฉพาะบริเวณ ค่า chemical shift 0.88-1.63 ppm ซึ่งเกิดจากสัญญาณของโปรตอนของหมู่โซ่ข้างที่มีความยาวต่างกัน

สเปกตรัมของสาร *N*-butanoyl L-homoserine lactone (**2a**) แสดงดังรูป 3.1 แสดงให้เห็นว่าพีคบริเวณค่า chemical shift 0.98-0.94 ppm (t) เป็นพีคของเมทิลที่ตำแหน่ง (a) พีคบริเวณค่า chemical shift 1.76-1.64 ppm (m) เป็นพีคของเมทิลีนที่ตำแหน่ง (b) พีคบริเวณค่า chemical shift 2.18-2.13 ppm (ddd) เป็นพีคของโปรตอน (H<sub>γ</sub>) พีคบริเวณค่า chemical shift 2.26-2.22 ppm (t) เป็นพีคของเมทิลีนที่ตำแหน่ง (c) ที่ติดอยู่กับหมู่คีโตน ซึ่งเป็นหมู่ตั้งอิเล็กตรอน จึงทำให้ เมทิลีนกลุ่มนี้ มีค่า chemical shift สูง พีคบริเวณค่า chemical shift 2.87-2.80 ppm (ddd) เป็นพีคของโปรตอน (H<sub>δ</sub>) พีคบริเวณค่า chemical shift 4.32-4.26 ppm (ddd) และ 4.62-4.56 ppm (ddd) เป็นพีคของโปรตอน (H<sub>β</sub>) และ (H<sub>α</sub>) ตามลำดับ เห็นได้ว่า โปรตอนที่ตำแหน่ง H<sub>f</sub> - H<sub>g</sub> และ H<sub>i</sub> - H<sub>h</sub> เป็นโปรตอนที่อยู่บนคาร์บอนเดียวกัน แต่เนื่องจากการบิดวงทำให้โปรตอน มีการวางตัวในระนาบสามมิติต่างกัน ทำให้ได้รับสนามแม่เหล็กต่างกัน จึงสามารถเกิดการ coupling กันได้ เห็นได้จากค่า chemical shift ต่างกันไปด้วย พีคบริเวณค่า 4.49-4.45 ppm (t) เป็นพีคของโปรตอนที่ตำแหน่ง (e) พีคบริเวณค่า chemical shift 6.24 ppm (s) เป็นพีคของโปรตอน (d) ซึ่งติดอยู่กับไนโตรเจน และหมู่คีโตนซึ่งเป็นหมู่ตั้งอิเล็กตรอน จึงทำให้โปรตอนนี้ มีค่า chemical shift สูง

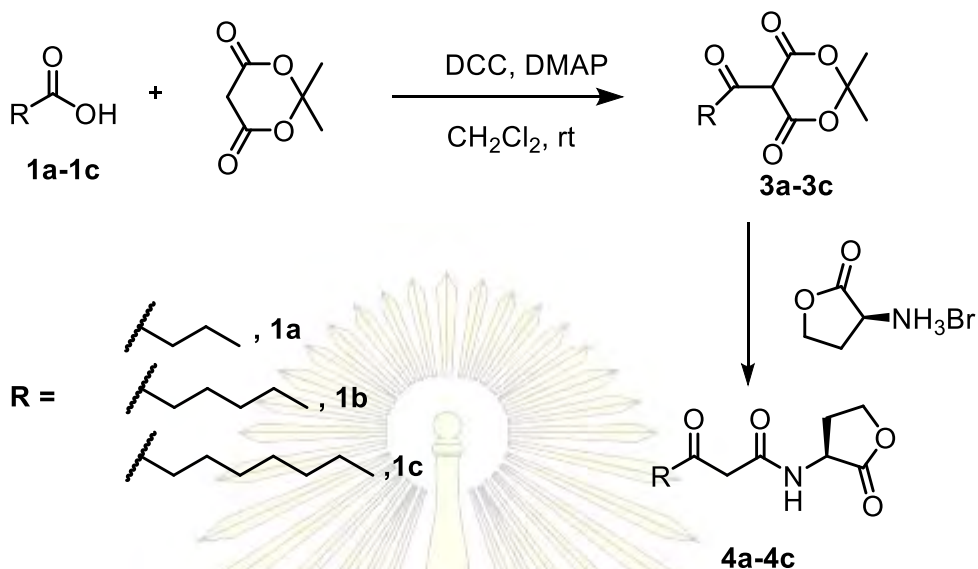


รูปที่ 3.1 แสดงสเปกตรัม <sup>1</sup>H NMR ของสาร *N*-butanoyl L-homoserine lactone (2a)

### 3.2 การสังเคราะห์ *N*-(3-oxo-alkanoyl) L-homoserine lactones

ในขั้นตอนนี้จะทำการสังเคราะห์สารประกอบ *N*-(3-oxo-alkanoyl) L-homoserine lactones (4a-4c) โดยเริ่มต้นการสังเคราะห์โดยใช้สารประกอบคาร์บอกซิลิกทำปฏิกิริยากับ Meldrum's acid, (S)-(-)-( $\alpha$ )-amino- $\gamma$ -butyrolactone hydrobromide, DCC และ DMAP ดังแสดงในแผนภาพที่ 3.2 โดยใช้สารประกอบคาร์บอกซิลิกต่างกัน 3 ชนิดนำมาทำปฏิกิริยาการสังเคราะห์ ได้ผลิตภัณฑ์เป็น *N*-(3-oxo-alkanoyl) L-homoserine lactones 4a-4c มี %yieldของผลิตภัณฑ์ ดังแสดงในตารางที่ 3.2

คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



แผนภาพที่ 3.2 แสดงการสังเคราะห์สารประกอบ *N*-(3-oxo-alkanoyl) L-homoserine lactone

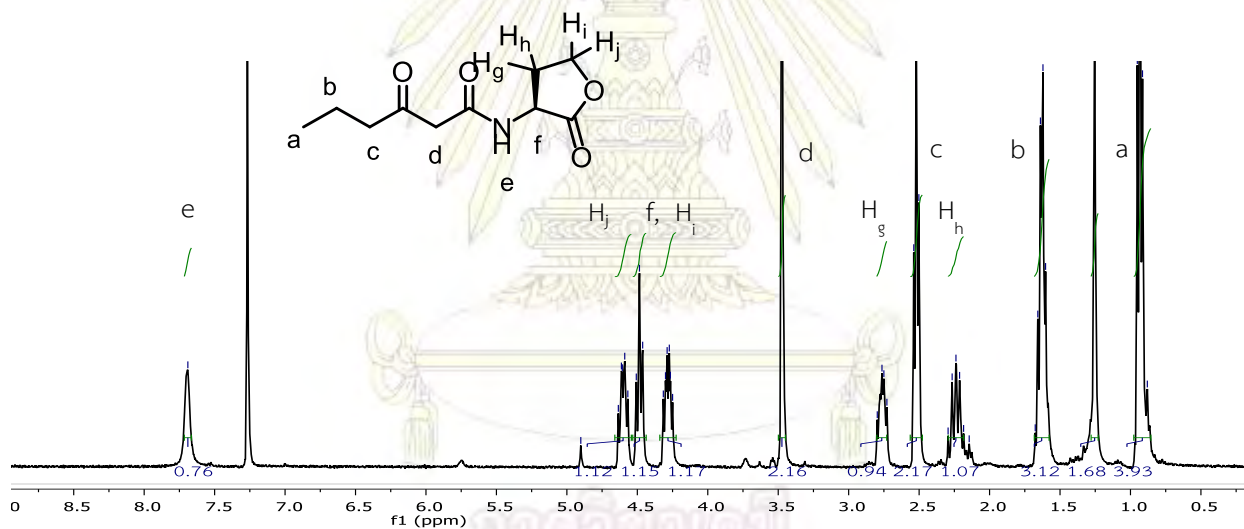
ตารางที่ 3.2 แสดงชนิดและ %yield ของสารประกอบ *N*-(3-oxo-alkanoyl) L-homoserine lactone

สาร	R	%yield
4a	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	24
4b	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	59
4c	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	50

เมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค <sup>1</sup>H NMR สเปกโทรสโกปีพบว่า <sup>1</sup>H NMR สเปกตรัมของสารที่สังเคราะห์ได้ตรงกับสเปกตรัมของสารกลุ่ม *N*-(3-oxo-alkanoyl) L-homoserine lactone ที่เคยมีรายงานไว้ โดยจะขอนำเสนอสเปกตรัมของสาร 4a โดยที่สเปกตรัมของสาร 4b และ 4c จะมีความแตกต่างเฉพาะบริเวณค่า chemical shift 0.80-1.64 ppm ซึ่งเกิดจากสัญญาณของโปรตอนของหมู่โซ่ข้างที่มีความยาวต่างกัน

สเปกตรัมของสาร *N*-(3-oxo-hexanoyl) L-homoserine lactone (4a) แสดงดังรูป 3.2 แสดงให้เห็นว่าพีคบริเวณค่า chemical shift 0.95-0.92 ppm (t) เป็นพีคของเมทิลที่ตำแหน่ง (a) พีคบริเวณค่า chemical

shift 1.66-1.60 ppm (m) เป็นพีคของเมทิลีนที่ตำแหน่ง (b) พีคบริเวณค่า chemical shift 2.29-2.18 ppm (m) เป็นพีคของโปรตอน ( $H_h$ ) พีคบริเวณค่า chemical shift 2.54-2.50 ppm (t) เป็นพีคของเมทิลีนที่ตำแหน่ง (c) พีคบริเวณค่า chemical shift 2.80-2.73 ppm (m) เป็นพีคของโปรตอน ( $H_g$ ) พีคบริเวณค่า chemical shift 3.47 ppm (s) เป็นพีคของเมทิลีนที่ตำแหน่ง (d) โปรตอนกลุ่มนี้ chemical shift สูงเนื่องจาก อยู่ติดกับ หมู่ carbonyl ที่เป็นหมู่ดึงอิเล็กตรอน ถึงสองหมู่ พีคบริเวณค่า chemical shift 4.32-4.25 ppm (m) และ 4.64-4.56 ppm (m) เป็นพีคของโปรตอน ( $H_j$ ) และ ( $H_i$ ) ตามลำดับ เห็นได้ว่า โปรตอนที่ตำแหน่ง  $H_f$ -  $H_g$  และ  $H_i$  -  $H_h$  เป็นโปรตอนที่อยู่บนคาร์บอนเดียวกัน แต่เนื่องจากการบิดวงทำให้โปรตอนมีการวางตัวในระนาบสามมิติ ต่างกัน ทำให้ได้รับสนามแม่เหล็กต่างกัน จึงเห็นได้จากค่า chemical shift ต่างกันไปด้วย พีคบริเวณค่า 4.50-4.46 ppm (t) เป็นพีคของโปรตอนที่ตำแหน่ง (f) พีคบริเวณค่า 7.69 ppm (s) เป็นพีคของโปรตอน (e) ซึ่งติดอยู่กับไนโตรเจน และหมู่คีโตนซึ่งเป็นหมู่ดึงอิเล็กตรอน จึงทำให้โปรตอนนี้ มีค่า chemical shift สูง



รูปที่ 3.2 แสดงสเปกตรัม  $^1\text{H}$  NMR ของสาร *N*-(3-oxo-hexanoyl) L-homoserine lactone (4a)

ตารางที่ 3.3 แสดงปริมาณสารที่ใช้ในแต่ละปฏิกิริยา ปริมาณผลิตภัณฑ์ และ %yield

สารที่ต้องการสังเคราะห์	ปริมาณสารตั้งต้น															ผลิตภัณฑ์		%yield
	กรดคาร์บอกซิลิก			(S)-(-)-(α)- amino-γ- butyrolactone hydrobromide		Meldrum's acid		EDC.HCl		DCC		DMAP		Et <sub>3</sub> N				
	ชนิด	น้ำหนัก/ ปริมาตร	โมล (mmol)	น้ำหนัก (mg)	โมล (mmol)	น้ำหนัก (mg)	โมล (mmol)	น้ำหนัก (mg)	โมล (mmol)	น้ำหนัก (mg)	โมล (mmol)	น้ำหนัก (mg)	โมล (mmol)	ปริมาตร ( μL)	โมล (mmol)	น้ำหนัก (mg)	โมล (mmol)	
2a	1a	100 μL	1.09	199	1.09	-	-	295	1.54	-	-	180	1.47	-	-	170	0.99	90
2b	1b	125 μL	1.00	199	1.09	-	-	290	1.51	-	-	188	1.54	-	-	55	0.27	27
2c	1c	184 mg	1.07	197	1.08	-	-	290	1.51	-	-	183	1.50	-	-	243	0.95	89
4a	1a	182 μL	2.0	361	1.98	299	2.07	-	-	459	2.22	259	2.12	334	2.40	103	0.48	24
4b	2b	250 μL	2.0	363	2.0	300	2.08	-	-	469	2.27	264	2.16	334	2.40	285	1.18	59
4c	1c	349 mg	2.03	363	2.0	290	2.01	-	-	458	2.22	259	2.12	334	2.40	299	1.00	50

หมายเหตุ ไม่ใช้สารนั้นในการสังเคราะห์ ให้สัญลักษณ์ -

จาก %yield ของผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้นั้นมีค่าที่ไม่แน่นอน ซึ่งผลิตภัณฑ์ **2a -2c** ได้ %yield ที่สูงมาก ซึ่งอาจเป็นผลมาจากปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นการทำการสังเคราะห์เพียงขั้นตอนเดียว จึงไม่มีการสูญเสียสารระหว่างทำปฏิกิริยาเหมือนปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ สาร **4b-4c** ซึ่งเป็นการสังเคราะห์ 2 ขั้นตอนอีกทั้งยังมีการสกัดสารหลายครั้ง จึงอาจทำให้มีการสูญเสียสารไป ส่วน สาร **2b** และ **4a** มี %yield ที่ต่ำผิดปกตินั้น อาจเกิดจากการไม่ได้ควบคุมความชื้นระหว่างการทำปฏิกิริยา จึงทำให้ปฏิกิริยาเกิดได้ไม่สมบูรณ์

### 3.3 การสังเคราะห์โครงสร้างสองมิติ โดยใช้เทคนิค nanosphere lithography

ขั้นตอนการเตรียมพอลิสไตรีนเพื่อใช้เป็นแม่แบบในการเคลือบทองเพื่อให้เกิดเป็นโครงสร้างสองมิติของจุดขยายสัญญาณรามานได้มีการทดลองเพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ได้พื้นที่ที่มากที่สุด โดยมีการปรับสภาวะต่อไปนี้

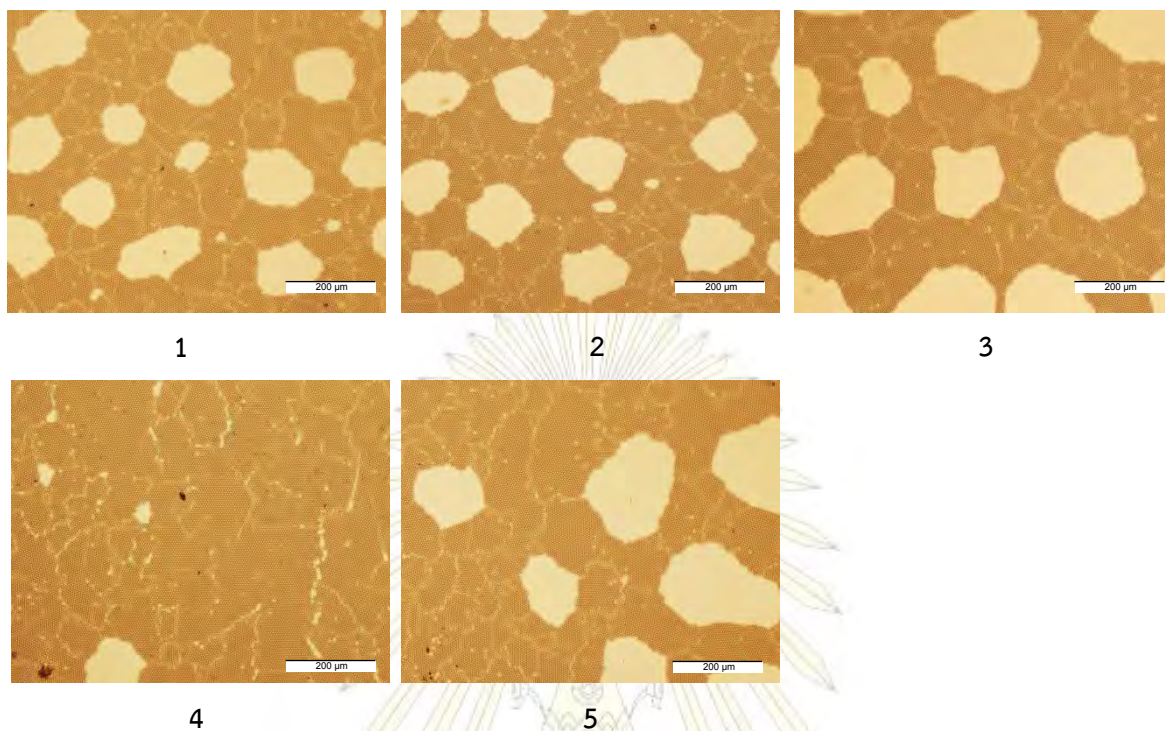
#### 3.3.1 การปรับระยะระหว่างแผ่นปาด (h) กับแผ่นแก้ว

การหาระยะความสูงจากแผ่นปาดกับแผ่นแก้วที่เหมาะสมเพื่อให้ได้พื้นที่การจัดเรียงตัวเป็นชั้นเดียวของอนุภาคพอลิสไตรีนมากที่สุดโดยการที่มีสภาวะคงที่คือ ความเร็วของการปาด ปริมาตรของสารแขวนลอยโพลิสไตรีน และมุมระหว่างแผ่นปาดคงที่ ดังแสดงในตารางที่ 3.4 จากนั้นทำการวัดพื้นที่การจัดเรียงตัวและเปรียบเทียบกับพื้นที่การจัดเรียงตัว ดังรูปที่ 3.4

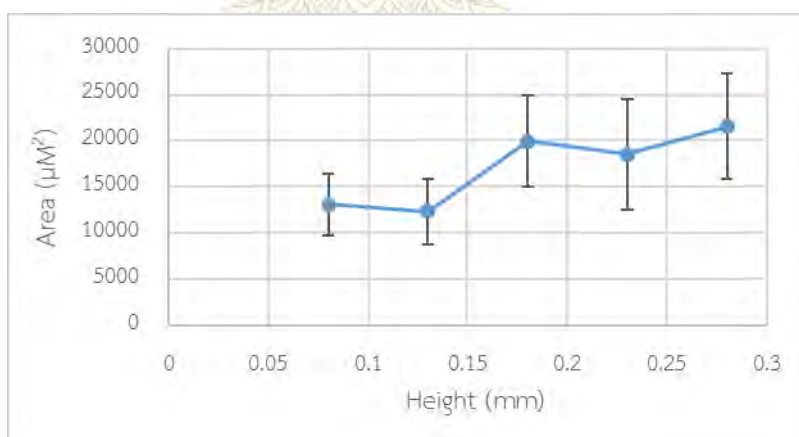
ตารางที่ 3.4 แสดงข้อมูลสภาวะในการเตรียม monolayer ของพอลิสไตรีน และ พื้นที่เฉลี่ยที่ของพื้นผิวที่สังเคราะห์ได้

โครงสร้าง	conditions				พื้นที่เฉลี่ย ( $\mu\text{m}^2$ )
	Height (mm)	Angle (degree)	Volume ( $\mu\text{L}$ )	Rate (mm/s)	
1	0.08	53	4	0.038	13081.79
2	0.13	53	4	0.038	12311.64
3	0.18	53	4	0.038	19948.06
4	0.23	53	4	0.038	18547.70
5	0.28	53	4	0.038	21573.53





รูปที่ 3.3 แสดงรูปพื้นผิวแม่แบบที่เตรียมได้โครงสร้างที่ 1-5 จากการปรับสภาวะในตารางที่ 3.4



รูปที่ 3.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่เฉลี่ยของ polystyrene monolayer กับความสูงระหว่างแผ่นปาดกับแผ่นแก้ว

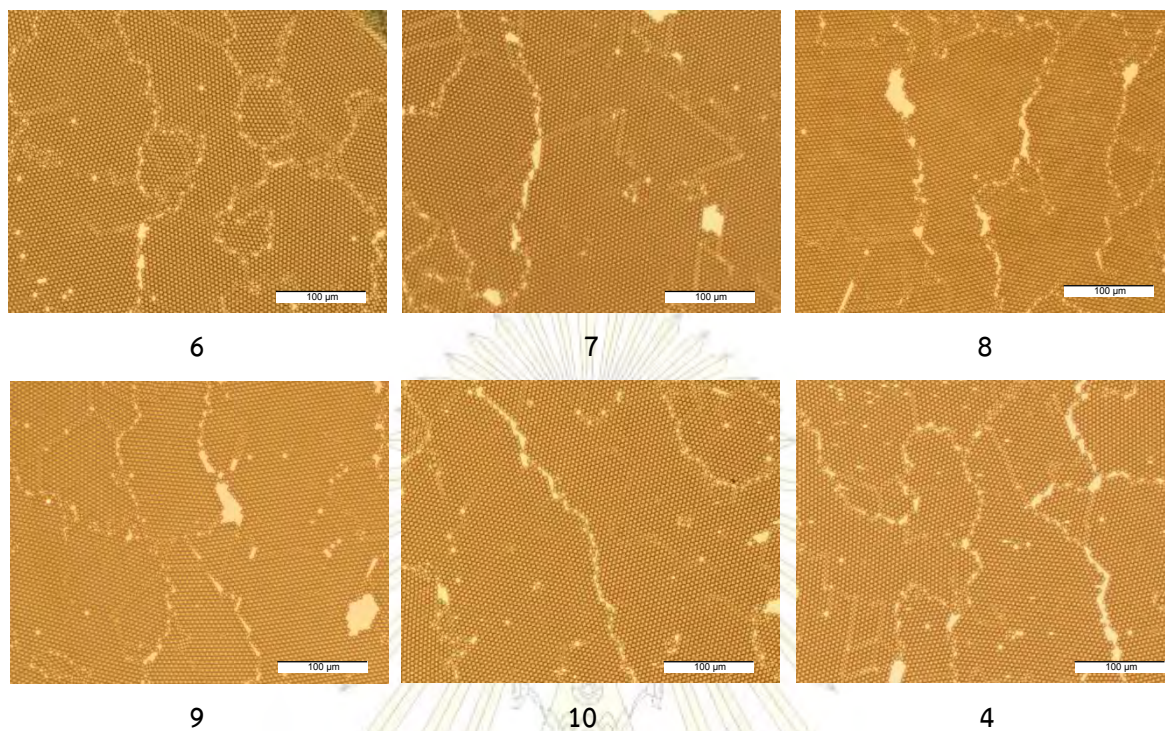
จากการทดลองพบว่า เมื่อทำการทดลองใช้สภาวะของโครงสร้างที่ 1 นั้นมีสารแขวนลอยจัดเรียงตัวกันบนแผ่นแก้วปริมาณน้อยมาก ผู้วิจัยจึงปรับความสูงโดยเพิ่มความสูงครั้งละ 0.05 mm พบว่า ความสูงที่ทำให้อนุภาคของพอลิสไตรีนจัดเรียงตัวเป็นmonolayerมากที่สุดสำหรับการปรับสภาวะนี้ คือ ที่ความสูง 0.18 0.23 และ 0.28 mm แต่เมื่อพิจารณาลักษณะของพื้นผิวที่ได้ พบว่าโครงสร้างที่ 4 ซึ่งใช้ความสูง 0.23 mm มีการจัดเรียงตัวกันอย่างต่อเนื่องไม่มีช่องว่างเหมือนกับโครงสร้างที่ 3 และโครงสร้างที่ 5 ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการตรวจวัดอื่นๆต่อไป ดังนั้นผู้วิจัยจึงใช้ความสูงนี้และปรับเปลี่ยนสภาวะอื่นเพื่อให้ได้พื้นที่การจัดเรียงตัวของพอลิสไตรีนมากที่สุดต่อไป

### 3.3.2 การปรับความเร็วในการปาดสารแขวนลอย

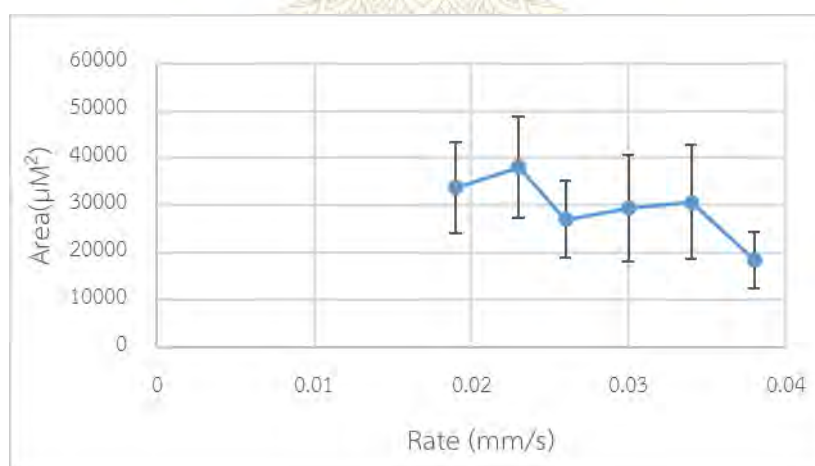
การปรับความเร็วในการปาดสารแขวนลอยของอนุภาคพอลิสไตรีนเพื่อให้ได้พื้นที่การจัดเรียงตัวเป็นชั้นเดียวของอนุภาคพอลิสไตรีนมากที่สุดโดยการที่มีสภาวะคงที่คือ ความสูงระหว่างแผ่นปาด ปริมาตรของสารแขวนลอย และ มุมที่ใช้ ดังแสดงในตาราง 3.5 จากนั้นทำการวัดพื้นที่การจัดเรียงตัวและเปรียบเทียบพื้นที่การจัดเรียงตัว ดังรูปที่ 3.6

ตาราง 3.5 แสดงข้อมูลสภาวะในการเตรียม monolayer ของพอลิสไตรีน และ พื้นที่เฉลี่ยที่ของพื้นผิวที่สังเคราะห์ได้

โครงสร้าง	conditions				พื้นที่เฉลี่ย ( $\mu\text{m}^2$ )
	Height (mm)	Angle (degree)	Volume ( $\mu\text{L}$ )	Rate (mm/s)	
6	0.23	53	4	0.019	33795.12
7	0.23	53	4	0.023	38131.51
8	0.23	53	4	0.026	27003.54
9	0.23	53	4	0.030	29438.24
10	0.23	53	4	0.034	30708.21
4	0.23	53	4	0.038	18547.70



รูปที่ 3.5 แสดงรูปพื้นผิวแม่แบบที่เตรียมได้โครงสร้างที่ 6-10 และโครงสร้างที่ 4 จากการปรับสภาวะในตารางที่ 3.5



รูปที่ 3.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่เฉลี่ยของ polystyrene monolayer กับความเร็วในการปาดสารแขนลอย

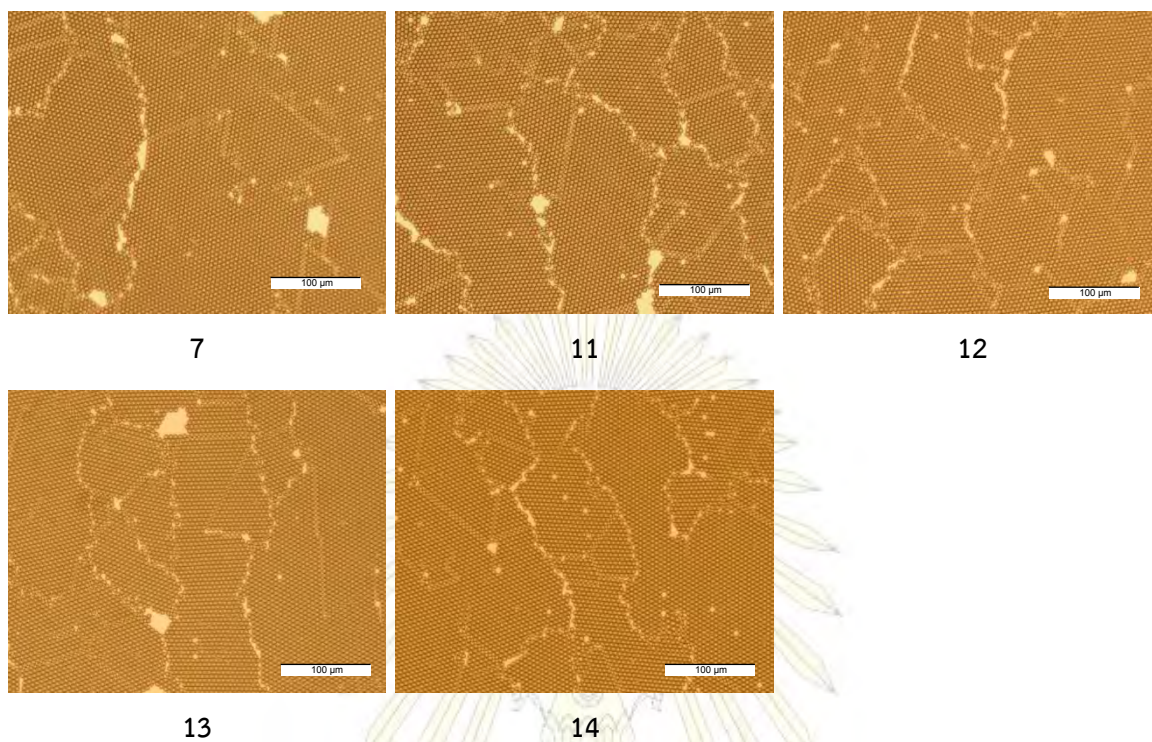
จากการปรับความสูงระหว่างแผ่นปาดกับแผ่นแก้วข้างต้นได้ใช้ ความเร็วในการปาดอนุภาคของสารแขวนลอยพอลิस्टาไรีนที่ 0.038 mm/s ดังนั้นในการปรับสภาวะของความเร็ว ผู้ทดลองจึงทำการลดความเร็วลงพบว่า เมื่อลดความเร็วของการปาดทำให้อนุภาคมีการเวลาในการจัดเรียงตัวมากขึ้น ส่งผลให้พื้นที่ที่มีการจัดเรียงตัวมากขึ้นตามไปด้วย และเมื่อลดความเร็วไปถึง 0.019 mm/s พบสภาวะที่ทำให้ได้พื้นที่เฉลี่ยมากที่สุด ที่ความเร็ว 0.023 mm/s ผู้วิจัยจึงเลือก ความเร็วที่ 0.023 mm/s และความสูง (h) ที่ 0.23 mm นำไปปรับปริมาตรของอนุภาคพอลิस्टาไรีนต่อไป

### 3.3.3 การปรับปริมาตรของสารแขวนลอยพอลิस्टาไรีน

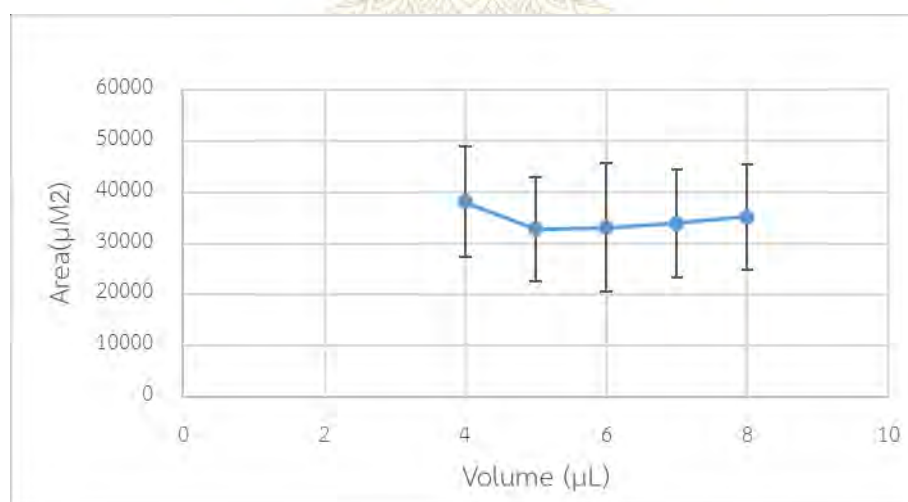
การปรับปริมาตรของสารแขวนลอยพอลิस्टาไรีนเป็นการปรับเพื่อให้ได้ปริมาตรที่เหมาะสมที่สามารถทำให้เกิดการจัดเรียงตัวเป็นชั้นเดียว ของ อนุภาคพอลิस्टาไรีน โดยการที่มีสภาวะคงที่คือ ความเร็วของการปาด ความสูงระหว่างแผ่นปาด และ มุมที่ใช้คงที่ ดังแสดงในตาราง 3.6 จากนั้นทำการวัดพื้นที่การจัดเรียงตัวและเปรียบเทียบพื้นที่การจัดเรียงตัว ดังรูปที่ 3.8

**ตาราง 3.6** แสดงข้อมูลสภาวะในการเตรียม monolayer ของพอลิस्टาไรีน และ พื้นที่เฉลี่ยที่ของพื้นผิวที่สังเคราะห์ได้

โครงสร้าง	condition				พื้นที่เฉลี่ย ( $\mu\text{m}^2$ )
	Height (mm)	Angle (degree)	Volume ( $\mu\text{L}$ )	Rate (mm/s)	
7	0.23	53	4	0.023	38131.51
11	0.23	53	5	0.023	32869.93
12	0.23	53	6	0.023	33141.57
13	0.23	53	7	0.023	34000.95
14	0.23	53	8	0.023	35190.22



รูปที่ 3.7 แสดงรูปพื้นผิวแม่แบบที่เตรียมได้โครงสร้างที่ 7 และโครงสร้างที่ 11-14 จากการปรับสภาวะในตารางที่ 3.6



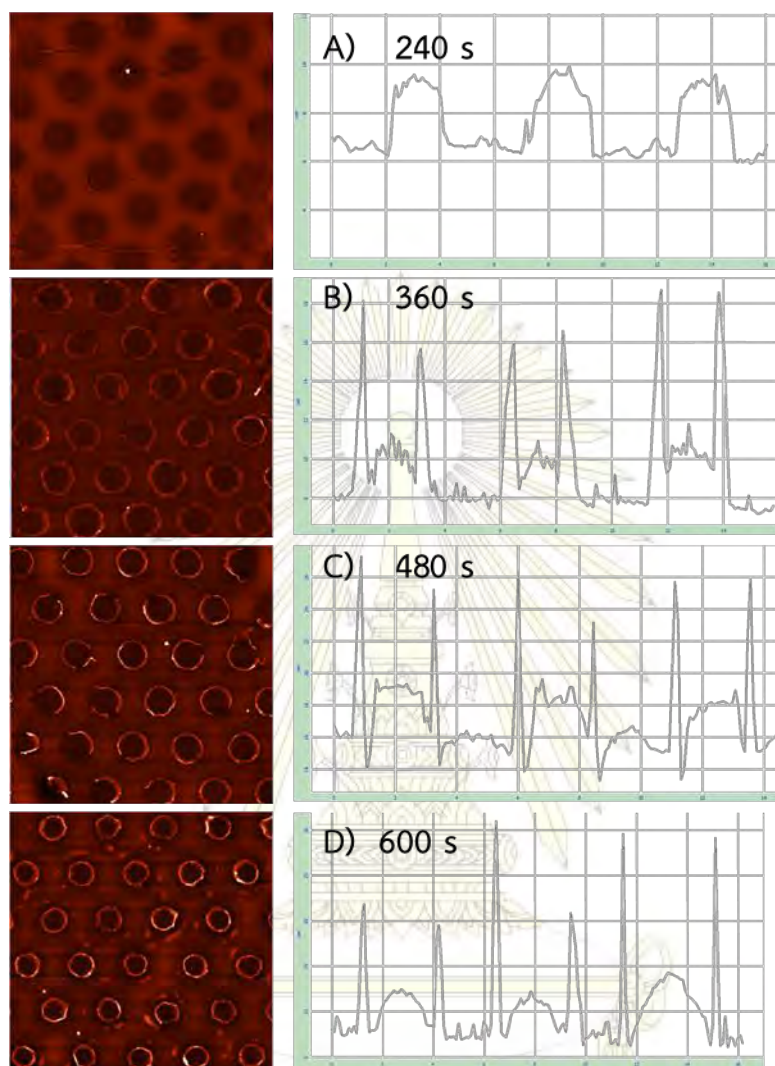
รูปที่ 3.8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่เฉลี่ยของ polystyrene monolayer กับปริมาตรของสารแขวนลอยพอลิสไตรีน

จากการทดลองปรับปริมาตรของสารแขวนลอยพอลิสไตรีน ในช่วง 4 - 8  $\mu\text{L}$  พบว่า พื้นที่เฉลี่ย ของโครงสร้างที่สังเคราะห์ขึ้น มีพื้นที่เฉลี่ยต่างกันเพียงเล็กน้อย ดังนั้น ผู้วิจัยจึงใช้โครงสร้างที่ 7 ซึ่งมีสภาพดังนี้ คือ ความสูงระหว่างแผ่นปาดกับผิวแก้ว เท่ากับ 0.23 mm ความเร็วของการปาดที่ 0.023 mm/s และใช้ปริมาตร 4  $\mu\text{L}$  ซึ่งเป็นสถานะที่ทำให้ได้พื้นผิวเฉลี่ยที่ดีที่สุด นำไปทำการเคลือบพื้นผิวทองต่อไป

### 3.4 การตรวจสอบการพิมพ์ลายโดยใช้ Atomic Force Microscope (AFM)

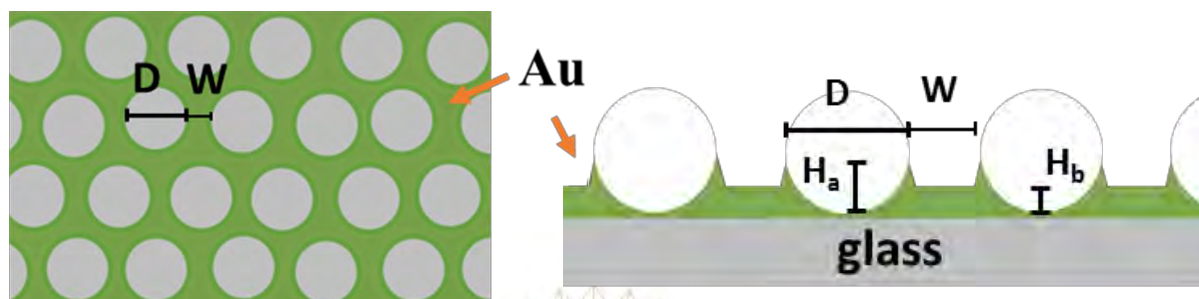
เมื่อนำ polystyrene monolayer แม่แบบ นำไปเคลือบโลหะทองโดยเทคนิค sputtering ที่ความหนาต่างกัน โดยการเปลี่ยนเวลาที่ใช้ในการเคลือบ ดังนี้ 240 360 480 และ 600 วินาที หลังจากนำแม่แบบออกไปแล้วทำการตรวจสอบการพิมพ์ลายด้วย AFM ได้ผลการพิมพ์ลายที่มีลักษณะต่างกัันดังรูป 3.9



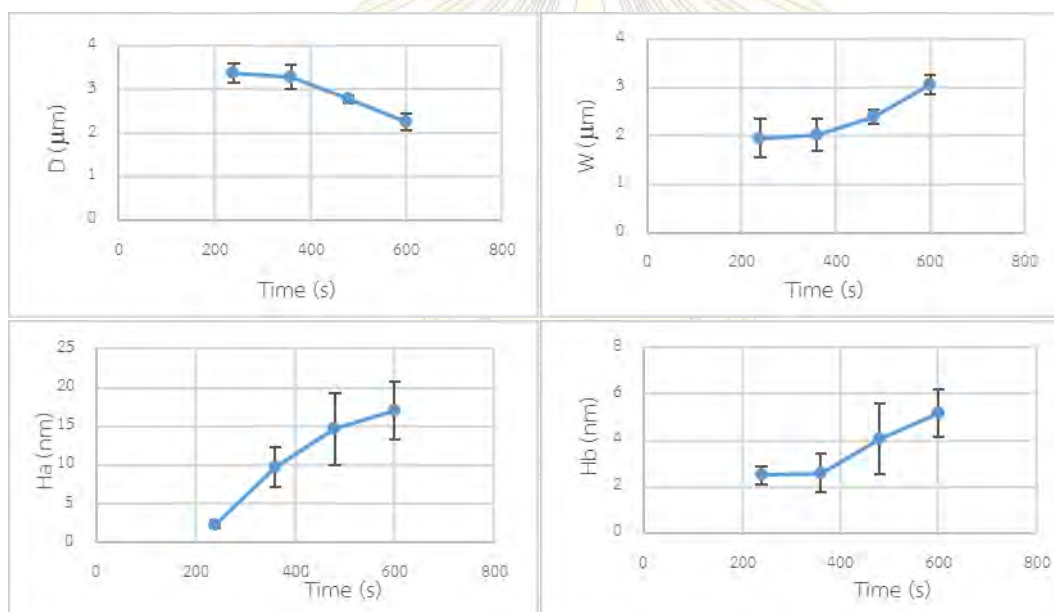


รูปที่ 3.9 แสดงรูป AFM (ซ้าย) และ cross-section profile (ขวา) ของโครงสร้างสองมิติที่พัฒนาขึ้น

เมื่อวัดค่า diameter (D) width (W) ความสูง  $H_a$  และ  $H_b$  ทำให้เห็นความแตกต่างของพื้นผิว เมื่อใช้ เวลาในการเคลือบโลหะทองต่างกันดังแสดงในรูป



รูปที่ 3.10 แสดงแบบจำลองการวัดค่า  $W$ ,  $D$ ,  $H_a$  และ  $H_b$



รูปที่ 3.11 กราฟแสดงผลการเปรียบเทียบค่า  $W$ ,  $D$ ,  $H_a$  และ  $H_b$

จากการทดลองใช้เวลาในการเคลือบโลหะทองต่างๆ กันพบว่า เมื่อใช้เวลาเพิ่มขึ้น ทำให้ค่า  $D$  ลดลง เกิดจากการที่โลหะทองสามารถ เคลือบลงบนแผ่นแก้วที่อยู่ใต้อนุภาคพอลิस्टาไทรินซึ่งเป็นทรงกลมได้มากขึ้น (รูปที่ 3.9, 3.11) โดยค่า  $D$  มีความสัมพันธ์กับค่า  $W$  โดยที่เมื่อใช้เวลาในการเคลือบโลหะทองนานขึ้น ทำให้โลหะทองสามารถเคลือบลงไปใต้อนุภาคพอลิस्टาไทรินได้มากขึ้น ค่า  $W$  ซึ่งเป็นค่าระยะห่างระหว่างพื้นผิวที่ถูกเคลือบก็จะมากขึ้นเช่นกัน ความหนา  $H_a$  ซึ่งเป็นความหนาของโลหะทองที่อยู่ติดกับช่องว่างซึ่งเดิมเป็นพอลิस्टาไทริน และ



ความหนา  $H_b$  ที่เป็นความหนาบริเวณช่องว่างของ hexagonal closed pack มีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อใช้เวลาในการเคลือบมากขึ้นเช่นกัน

### 3.5 การทดสอบประสิทธิภาพในการขยายสัญญาณรามาน ของโครงสร้างสองมิติที่พัฒนาขึ้น

จากผลการทดลองการทดสอบ ประสิทธิภาพการขยายสัญญาณของโครงสร้างสองมิติที่พัฒนาขึ้น จากการใช้เวลาในการเคลือบโลหะทองในเวลาที่ต่างกัน โดยเปรียบเทียบกับผิวโลหะชนิดฟิล์มบาง กับ สาร 4,4'-thiobisbenzenethiol (TBBT) ดังแสดงในรูป 3.12

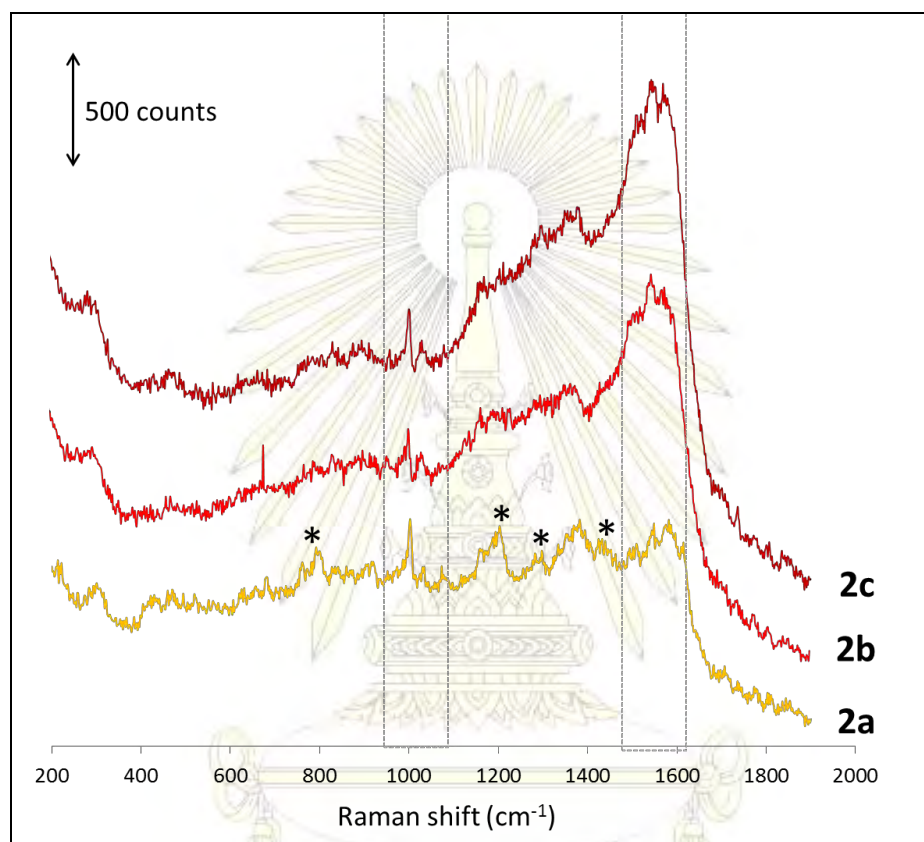


รูปที่ 3.12 แสดง Raman shift โครงสร้างที่พัฒนาได้ กับ TBBT

ผลการทดลองจากรูปที่ 3.12 แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างที่พัฒนาขึ้นสามารถขยายสัญญาณรามานได้ดีกว่า โครงสร้างที่เป็นโลหะทองชนิดฟิล์มบางจริง และ มีความแตกต่างของโครงสร้างที่มีเวลาของการเคลือบโลหะทองต่างกัน โดยที่โครงสร้างที่ใช้เวลาในการเคลือบ 600 วินาทีให้ประสิทธิภาพสูงสุดในการขยายสัญญาณรามานของสาร TBBT

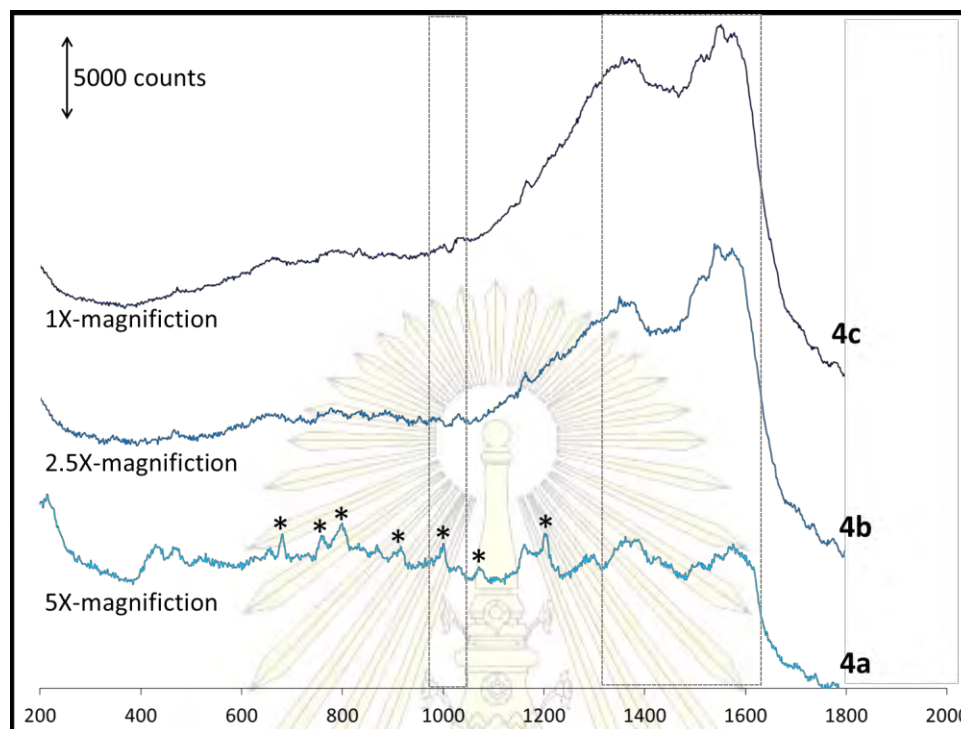
### 3.6 การทดสอบประสิทธิภาพการตรวจวัดสัญญาณรามานของพื้นผิวที่พัฒนาขึ้น

ทดสอบประสิทธิภาพการตรวจวัดสัญญาณรามานของพื้นผิวที่พัฒนาขึ้น โมเลกุล AHL ที่สังเคราะห์ได้



รูปที่ 3.13 แสดงสัญญาณรามานของโมเลกุล AHL 2a-2c ที่สังเคราะห์ได้

จากสัญญาณรามานของสาร 2a-2c ซึ่งอยู่ในกลุ่ม *N*-acyl L-homoserine lactone ในรูปที่ 3.13 พบว่าสัญญาณที่ได้ไม่มีความต่างกันมากนัก โดยสัญญาณรามานของสารกลุ่มนี้ มีพีคลักษณะเด่นที่  $1006\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งเป็นพีคของ C-C symmetric stretching และพีคที่  $1571\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งเป็นพีค C-N stretching แต่อย่างไรก็ตาม จะการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วนพีค ช่วง  $1500\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$  โดยที่จะมีความเข้มของสัญญาณรามานมากขึ้น เมื่อสายโซ่คาร์บอนยาวขึ้น นอกจากนี้ สัญญาณรามานของ 2a ซึ่งมีสายโซ่ข้างสั้นที่สุดคือ 4 คาร์บอน สัญญาณที่ได้จะเห็นพีคย่อยๆเพิ่มขึ้นมาอย่างชัดเจนคือพีค  $771\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งเป็นพีคที่เกิดจาก C-O deformation, พีค  $1200\text{ cm}^{-1}$  เป็นพีคที่เกิดจาก C-N-C blending, พีค C-O stretching ที่  $1360\text{ cm}^{-1}$  และพีคที่เกิดจาก  $\text{CH}_2$  deformation ที่  $1470\text{ cm}^{-1}$



รูปที่ 3.14 แสดงสัญญาณรามานของโมเลกุล AHL 4a-4c ที่สังเคราะห์ได้

จากสัญญาณรามานของสาร 4a-4c ซึ่งเป็นสารกลุ่ม *N*-(3-oxo-alkanoyl) L-homoserine lactone ในรูปที่ 3.14 พบว่า สัญญาณที่ได้ ไม่มีความแตกต่างกันมากนักในสาร 4b และ 4c อาจมีความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดคืออัตราส่วนความเข้มของสัญญาณรามาน ที่มีความเข้มสูงขึ้นมาเมื่อจำนวนคาร์บอนมากขึ้น โดยเฉพาะช่วงสัญญาณ 1500-1600  $\text{cm}^{-1}$  ซึ่งเกิดจาก NH blending และ C-H stretching นอกจากนี้ ลักษณะที่เกิดขึ้นเมื่อสายโซ่คาร์บอนสั้นลง จะเกิดพีคย่อยๆเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับสารกลุ่ม *N*-acyl L-homoserine lactone โดยพีคที่เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดคือพีค ช่วง 700-800  $\text{cm}^{-1}$  เกิดจาก NH และ C=O deformation พีคที่ 1006  $\text{cm}^{-1}$  ซึ่งเกิดจาก C-C symmetric stretching, พีคที่ 1086  $\text{cm}^{-1}$  ที่เกิดจาก  $\text{CH}_2$  blending และพีคที่เกิดจาก C-N-C stretching ในช่วง 1200  $\text{cm}^{-1}$  นอกจากนั้นยังสังเกตได้อีกว่า ในสาร 4b และ 4c ไม่ปรากฏพีคที่ 1006  $\text{cm}^{-1}$  ซึ่งเป็นพีคของ C-C symmetric stretching อาจเกิดจากการสั้นของพันธะในช่วง 1500-1600 ที่มีความเข้มสูงมากจึงทำให้ไม่สามารถสังเกตเห็นพีคนี้ได้

จากลักษณะสัญญาณรามานของสาร 2a-2c และ 4a-4c ที่สังเกตได้ข้างต้นนั้น พบว่า ลักษณะสัญญาณมีความคล้ายกับ สัญญาณที่ Pearman W.F. และคณะ<sup>3</sup> ได้ทำการศึกษาการลักษณะสัญญาณของอนุพันธ์ของสารกลุ่มนี้ คือ สัญญาณของพีค ในสารที่มีสายโซ่คาร์บอนสั้นเช่น สาร 2a และ 4a จะปรากฏพีคย่อยๆขึ้น และ

มีการหายไปของบางพีค เมื่อในสารที่มีสายโซ่คาร์บอนสั้นยาวขึ้น เช่นสาร 2b, 2c, 4c และ 4b แต่อย่างไรก็ตาม สัญญาณที่ได้มีความแตกต่างกันของพีคซึ่งมีความชัดเจนกว่าเนื่องจาก การใช้คอลลอยด์ของโลหะเงินขนาดนาโนเป็นตัวขยายสัญญาณซึ่งมีความสามารถในการขยายสัญญาณได้ดีกว่า ทั้งนี้การเห็นพีคช่วง1300-1600 มีความเข้มสูงมากซึ่งคล้ายกับพีค 1530 และ 1580  $\text{cm}^{-1}$  ที่เป็นพีค D และ G band ของคาร์บอน<sup>11</sup> ซึ่งอาจเกิดจากการทำลายพันธะของสารตัวอย่างจนเป็นอนุภาคคาร์บอน โดยอาจเกิดจากการใช้เลเซอร์ที่มีกำลังสูงเกินไป



## บทที่ 4

### สรุปผลการทดลอง

#### 4.1 สรุปผลการทดลอง

ในโครงการวิจัยนี้ได้สังเคราะห์โครงสร้างสองมิติของโลหะทองเพื่อใช้เป็นจุดขยายสัญญาณรามาน โดยใช้เทคนิค nanosphere lithography (NSL) โดยใช้อนุภาคพอลิस्टาไร์นที่มีการจัดเรียงตัวชั้นเดียวเป็นแม่แบบ โดยการปรับสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ได้พื้นที่ของการจัดเรียงตัวชั้นเดียวของอนุภาคพอลิस्टาไร์นมากที่สุด โดยที่สภาวะที่เหมาะสม คือ 1. การใช้ความสูงระหว่างแผ่นปาดกับแผ่นแก้ว เท่ากับ 0.23 mm 2. ความเร็วในการปาดสารแขวนลอยของอนุภาคพอลิस्टาไร์นที่ 0.023 mm/s และ 3. ปริมาตรสารแขวนลอยพอลิस्टาไร์น 4  $\mu\text{L}$  ซึ่งจากสภาวะดังกล่าวสามารถให้พื้นที่การจัดเรียงตัวเฉลี่ย 38,000  $\mu\text{m}^2$  จากนั้นนำไปทำการเคลือบโลหะทอง ที่เวลา 240-600 วินาที แล้วทำการกำจัดแม่แบบออก พบว่าพื้นผิวของโลหะทองที่ใช้เป็นจุดขยายสัญญาณรามานที่สังเคราะห์ได้ มีลักษณะเป็นวงแหวนที่มีความหนาของโลหะทองมากขึ้นและมีเส้นผ่านศูนย์กลางของวงแหวน (D) ลดลงเมื่อใช้เวลาในการเคลือบโลหะทองมากขึ้น จากนั้นได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพในการขยายสัญญาณรามานเทียบกับพื้นผิวแบบโลหะทองแบบฟิล์มบางปกติ โดยศึกษาสัญญาณของ TBBT พบว่า พื้นผิวที่สังเคราะห์ได้สามารถขยายสัญญาณรามานได้สูงขึ้นมาก โดยที่เมื่อใช้เวลาในการเคลือบโลหะทองนานขึ้นสัญญาณรามานที่ได้จะมีความเข้มสูงขึ้นด้วย จากนั้นนำไปทดสอบการขยายสัญญาณของสารประกอบ **2a-2c** และ **4a-4c** ซึ่งเป็นสัญญาณ QS ในกลุ่ม *N*-acyl L-homoserine lactones และ กลุ่ม *N*-(3-oxo-alkanoyl) L-homoserine lactones ตามลำดับ ซึ่งทำการสังเคราะห์โดยใช้กรดคาร์บอกซิลิก และ (S)-(-)-( $\alpha$ )-amino- $\gamma$ -butyrolactone hydrobromide เป็นสารตั้งต้น โดยโครงสร้างสองมิติของจุดขยายสัญญาณรามานที่พัฒนาขึ้น สามารถขยายสัญญาณรามานของสารทั้งสองกลุ่ม และสามารถบอกความแตกต่างของสัญญาณรามานที่ของสารแต่ละกลุ่มได้

#### 4.2 งานวิจัยในอนาคต

สำหรับการพัฒนาโครงสร้างสองมิติเพื่อขยายสัญญาณรามานควรมีการทดลองลดขนาดของอนุภาคพอลิस्टาไร์นลงเพื่อให้มีความสามารถในการขยายสัญญาณรามานได้สูงขึ้นและเหมาะสมกับการศึกษาลักษณะการปลดปล่อยสัญญาณ quorum sensing ชนิด AHL และชนิดอื่นๆในแบคทีเรียได้

## เอกสารอ้างอิง

1. Stiles, P.L.; Dieringer, J.A.; Shah, N.C.; Van Duyne, P.R. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Annual review of analytical chemistry*. **2008**, *1*, 601-626.
2. Claussen, A.; Abdali, S.; Berg, R.W.; Givskov, M.; Sams, T. Detection of the quorum sensing signal molecule *N*-Dodecanoyl-DL-homoserine lactone below 1 nanomolar concentrations using surface enhanced Raman spectroscopy. *Current Physical Chemistry*. **2013**, *3*, 199-214.
3. Pearman, W.F.; Lawrence-Snyder, M.; Angel, S.M.; Decho, A.W. Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) for *in-situ* Measurements of Signaling Molecules (e.g., Autoinducers) Relevant to Bacteria Quorum Sensing. *Applied Spectroscopy*. **2007**, *61*, 1295-3000.
4. Fuqa, C.; Greenberg, E.P. LISTENING IN ON BACTERIA: ACYL-HOMOSERINE LACTONE SIGNALING. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **2002**, *3*, 685-695.
5. Morkunas, B.; Galloway, W.R.J.D.; Wright, M.; Ibbeson, B.M.; Hodgkinson, J.T.; O'Connell, K.M.G.; Bartolucci, N.; Valle, M.D.; Welch, M.; Spring, D.R. Inhibition of the *pseudomonas aeruginosa* virulence factor pyrocyanine in wide type cells by quorum sensing autoinducer-mimics. *Organic & Biomolecular Chemistry*. **2012**, *10*, 8452-8464.
6. Jensen, T.R.; Malinsky, M.D.; Haynes, C.L.; Van Duyne, R.P. Nanosphere Lithography: Tunable Localized Surface Plasmon Resonance Spectra of silver Nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry B*. **2000**, *104*, 1549-1556.
7. Fuhrmann, B.; Leipner, H.S.; Hoche, H.R. Order Arrays of Silicon Nanowires Produced by Nanosphere Lithography and Molecular Beam Epitaxy. *Nano Letters*. **2005**, *5*, 2524-2527.
8. Correia-Ledo, D.; Gibson, K.F.; Dhawan, A.; Couture, M.; Vo-Dinh, T.; Graham, D.; Masson, J.F. Assessing the location of surface plasmons over nanotriangle and nanohole arrays of different size and periodicity. *Journal of physical chemistry C*. **2012**, *116*, 6884-6892.
9. Chhabra, S.R.; Harty, C.; Hooi, D.S.W.; Daykin, M.; Williams, P.; Telford, G.; Pritchard, D.I.; Bycroft, W.B. Synthetic Analogues of the Bacterial Signal (Quorum Sensing) Molecule-*N*-(3-O-dodecanoyl)-L-homoserine lactone Immune Modulators. *Journal of Medical Chemistry*. **2003**, *46*, 97-104.

10. Ormonde, A.D.; Hicks, E.C.M.; Castillo, J.; Van Duyne, P.R. NaNosphere Lithography: Fabrication of Large-Area Ag Nanoparticle Arrays by Convective Self-Assembly and Their Characterization by Scanning UV-Visible Extinction Spectroscopy. *Langmuir*, **2004**, 6927-6931.
11. Calizo, I.; Balandin, A.A.; Bao, W.; Miao, F.; Lau, C.N. Temperature Dependence of the Raman Spectra of Graphene and Graphene Multilayers. *Nano Letters*, **2007**, 7, 2645-2649.

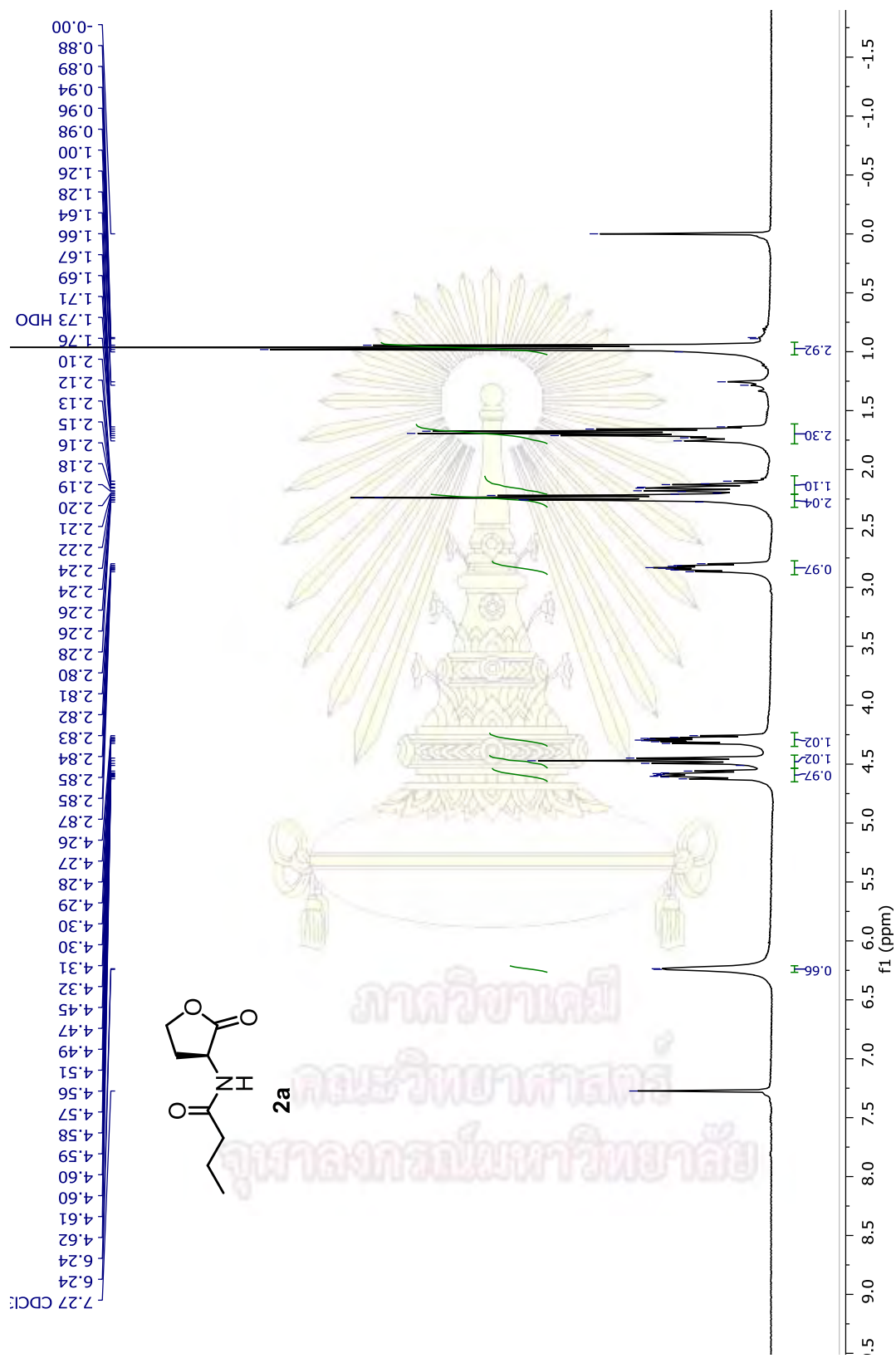


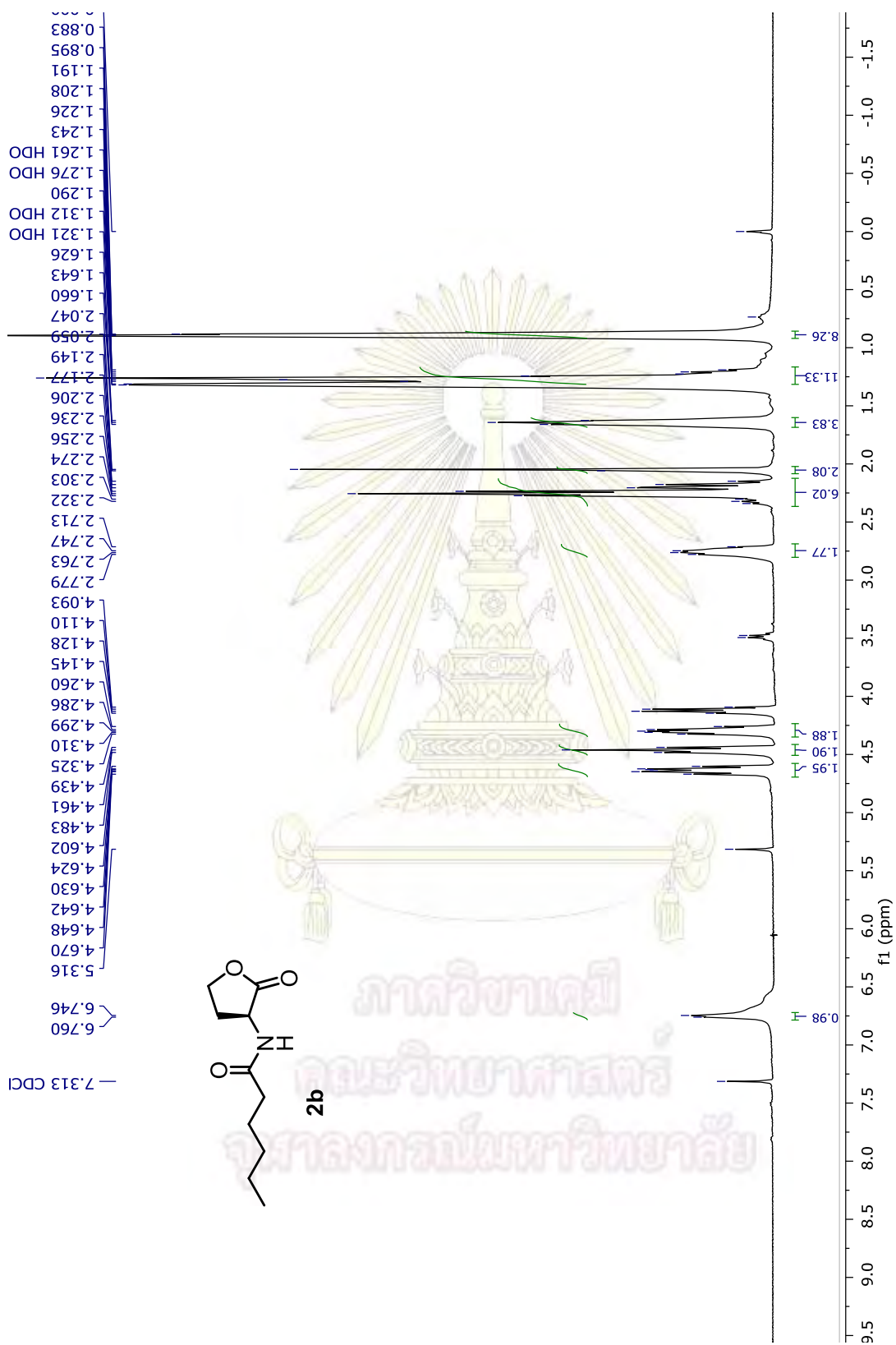


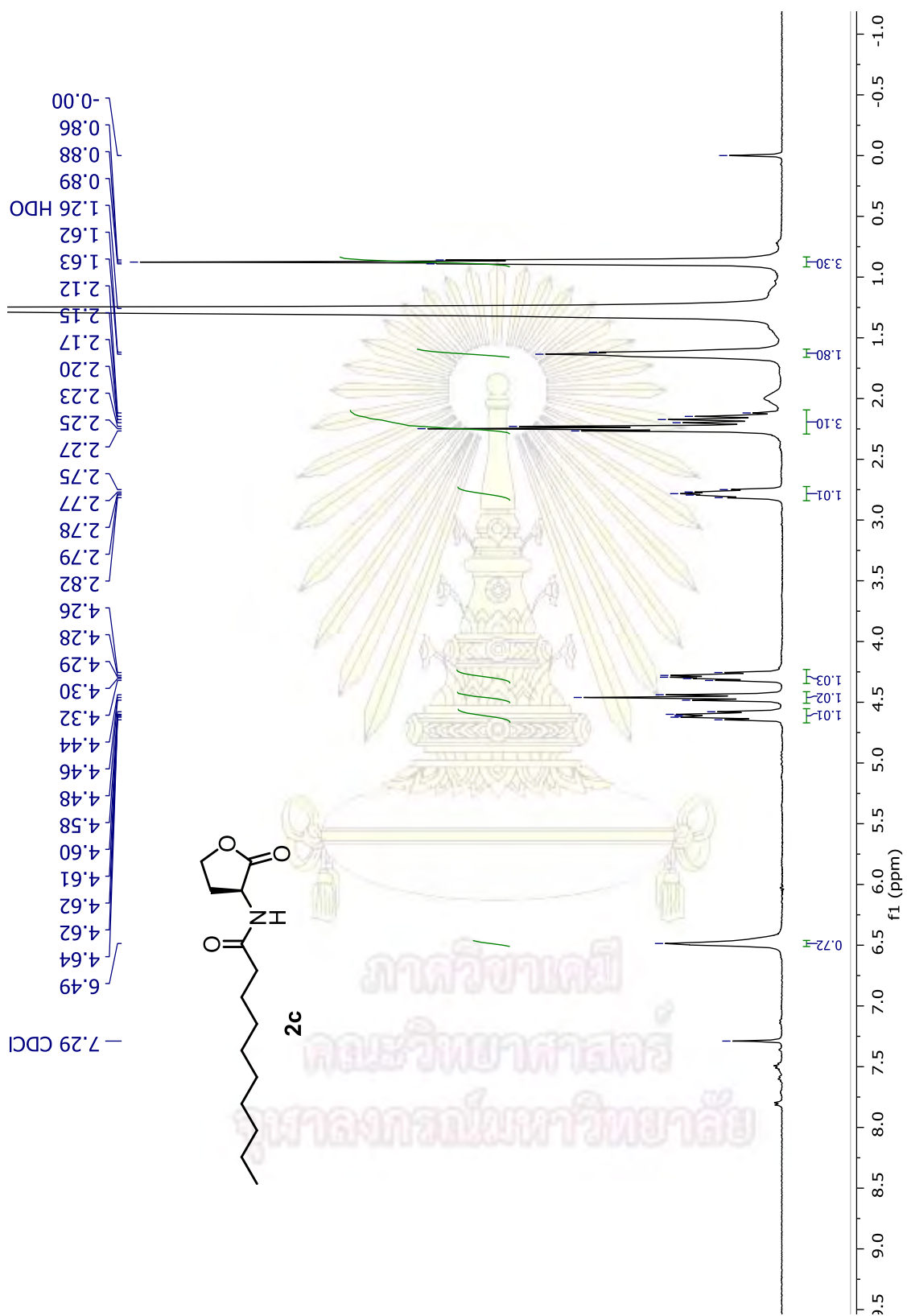
# ภาคผนวก

ภาควิชาเคมี  
คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

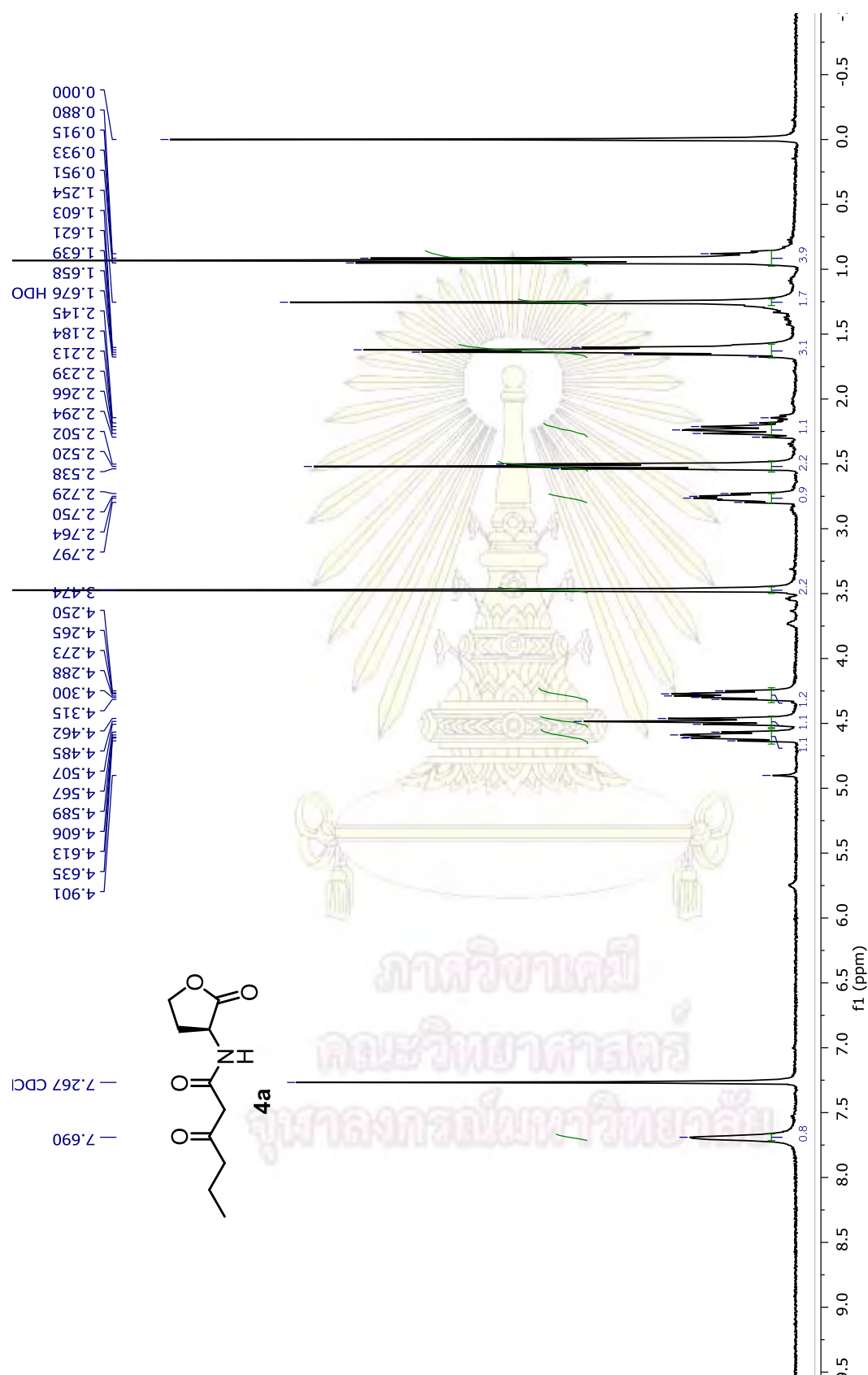


รูปที่ 1 แสดง <sup>1</sup>H NMR สเปกตรัมของสาร **2a**

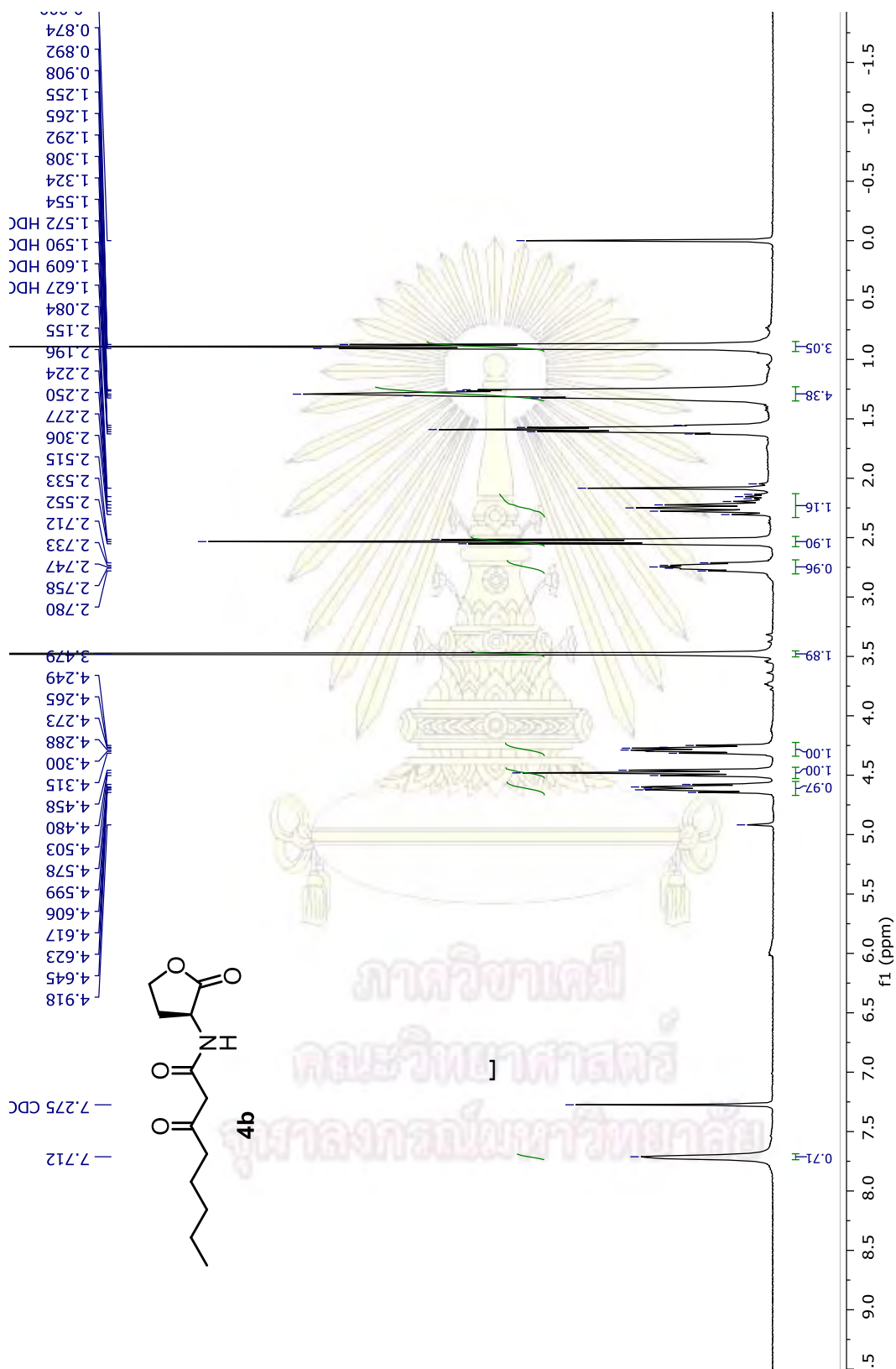
รูปที่ 2 แสดง  $^1\text{H}$  NMR สเปกตรัมของสาร 2b

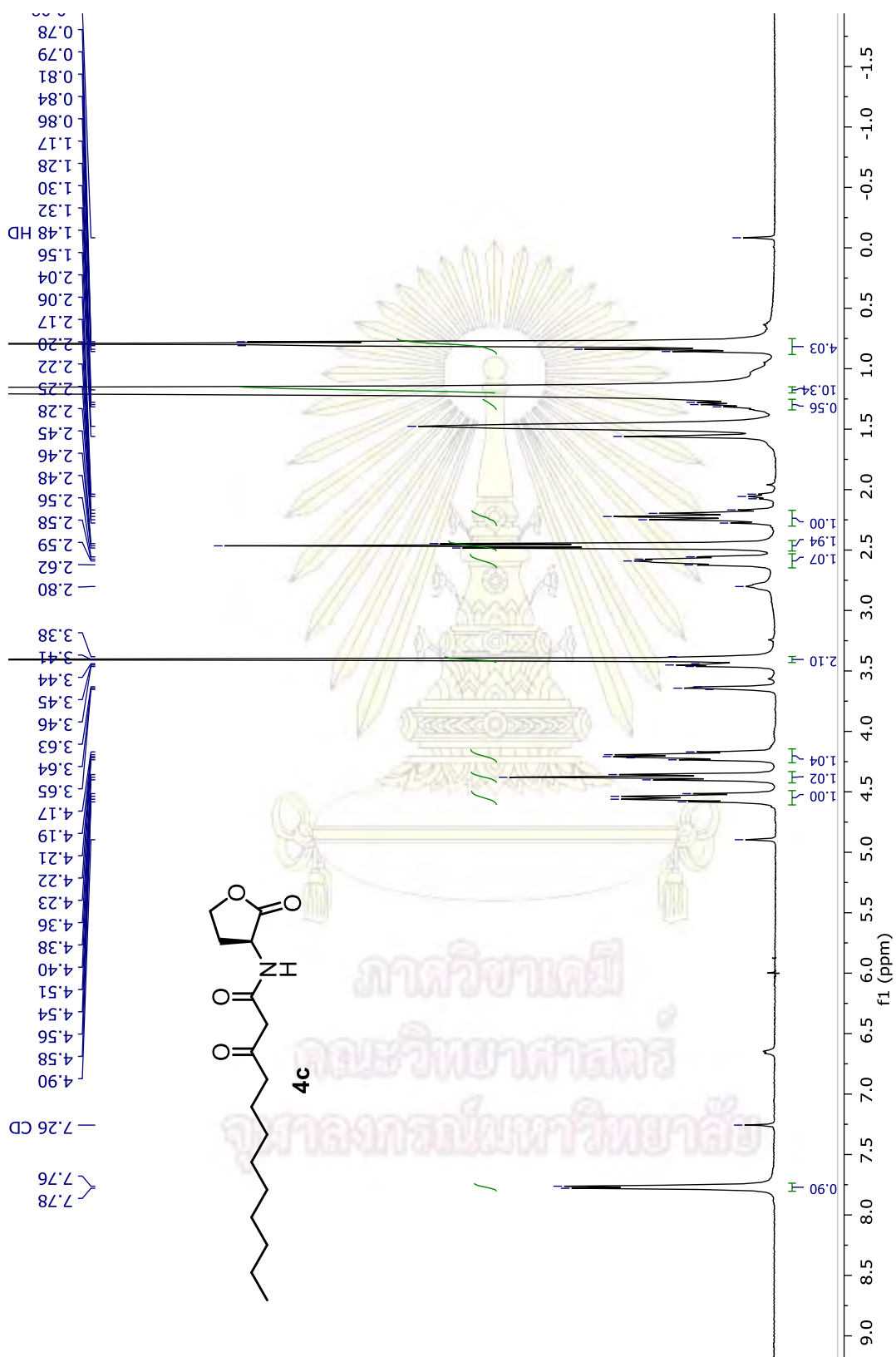


รูปที่ 3 แสดง  $^1\text{H NMR}$  สเปกตรัมของสาร **2c**



รูปที่ 4 แสดง <sup>1</sup>H NMR สเปกตรัมของสาร 4a

รูปที่ 5 แสดง  $^1\text{H}$  NMR สเปกตรัมของสาร 4b

รูปที่ 6 แสดง <sup>1</sup>H NMR สเปกตรัมของสาร 4c

## ประวัติผู้วิจัย

นางสาวจุฑามาศ ปราบพาล รหัสประจำตัวนิสิต 5333068923 เกิดเมื่อวันที่ 12 พฤษภาคม พ.ศ. 2535 ที่จังหวัดนครนายก สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมปลาย แผนการเรียนวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์ จากโรงเรียนนครนายกวิทยาคม จังหวัดนครนายก เมื่อปีการศึกษา 2552 เคยได้รับรางวัลเหรียญทองแดงจากการแข่งขันเคมีโอลิมปิกระดับชาติ ครั้งที่ 5 ณ มหาวิทยาลัยนเรศวร จากนั้นเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2553 และในปี 2556 ได้รับทุนสนับสนุนการศึกษาวิจัยเพื่อจัดทำปริญญาานิพนธ์ ในโครงการสร้างปัญญาวิทย์ผลิตนักเทคโนโลยี (YSTP) จากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้หลังจากจบการศึกษา บ้านเลขที่ 145 หมู่ 1 ตำบลพิบูลย์นอก อำเภอบ้านนา จังหวัดนครนายก 26110



ภาควิชาเคมี  
คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย