

การพัฒนาเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามานสำหรับวัดตัวอย่างซีรัม จากซับสเตรตอนุภาคซิลเวอร์นาโนต้นทุนต่ำ

Development of a Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) Technique for Blood Serum Using a Cost-Effective Silver Nanoparticle-Based Substrate

ศศิกาญจน์ บวรโมทย์ (Sasikan Borwornmote)* พีรยา สุขสุรทิน (Peeraya Suksuratin)**

ธัญญรัตน์ คณานิตย์ (Thanyarat Kananit)*** อภิญญา อินทร์ตา (Apinya Ainta)***

อรณัฐ ชูชื่น (Oranat Chuchuen)^{1****}

(Received: September 21, 2023; Revised: November 27, 2023; Accepted: November 29, 2023)

บทคัดย่อ

วัสดุซับสเตรตสำหรับนำมาใช้ตรวจวัดตัวอย่างชีวภาพด้วยเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามานมีความต้องการเป็นอย่างมากในปัจจุบัน แต่มักมีขั้นตอนในการผลิตที่ค่อนข้างซับซ้อนจึงทำให้มีราคาที่สูง งานวิจัยนี้ได้ทำการออกแบบและพัฒนาซับสเตรตสำหรับนำมาตรวจวัดตัวอย่างซีรัมคนที่สามารถเตรียมได้ง่ายจากวัสดุที่ผลิตในอุตสาหกรรมทั่วไปและมีต้นทุนต่ำทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ แผ่นกระดาษกรอง แผ่นบลูเรย์ หมึกกราฟีนและเทปอะลูมิเนียม ร่วมกับอนุภาคซิลเวอร์นาโนคอลลอยด์ขนาด 60 นาโนเมตร ในการขยายสัญญาณรามาน โดยทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่นเลเซอร์ 785 นาโนเมตร เป็นเวลา 10 วินาที จากการทดลองพบว่าเทปอะลูมิเนียมมีความเหมาะสมที่สุดสำหรับการนำมาทำเป็นวัสดุซับสเตรต เนื่องจากทำให้เกิดการขยายสัญญาณรามานมากที่สุด สัญญาณ SERS ที่พบมีความถูกต้องสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ รวมถึงสัญญาณซีรัมมีความแปรปรวนน้อยและไม่ถูกรบกวนจากสัญญาณเฉพาะตัวของวัสดุที่นำมาทำซับสเตรต และพบว่าความเข้มข้นของซิลเวอร์นาโนคอลลอยด์ที่เหมาะสมมีค่า 1.85×10^{-2} โมลาร์ นอกจากนี้ยังตรวจพบสารชีวโมเลกุลของตัวอย่างซีรัมที่ตำแหน่งพิก 494 cm^{-1} (แอลาจีนิ) 634 cm^{-1} (ไทโรซีน) 724 cm^{-1} (อะดีนีน) 884 cm^{-1} (ทรีปโตเฟน) 1,004 cm^{-1} (ฟีนิลอะลานีน) และ 1,334 cm^{-1} (กรดนิวคลีอิก) ทั้งนี้ค่ากำลังในการขยายสัญญาณรามานที่ได้จากการใช้พื้นผิวซับสเตรตชนิดนี้ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างคริสตัลไวโอเลตและซีรัมมีค่าสูงสุดเท่ากับ 4,096 (พิก 1,618 cm^{-1}) และ 164 (พิก 634 cm^{-1}) เท่า ตามลำดับ งานวิจัยนี้พัฒนาต้นแบบซับสเตรตราคาถูกซึ่งเหมาะสมสำหรับพื้นที่ที่มีทรัพยากรจำกัด โดยมีประสิทธิภาพที่ดีในการขยายสัญญาณรามานและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างซีรัมด้วยเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามานในการวินิจฉัยโรคต่อไปได้ รวมถึงสามารถนำไปต่อยอดในทางการแพทย์สำหรับตรวจคัดกรองโรคจากตัวอย่างซีรัมและนำมาพัฒนาใช้ร่วมกับวิธีการเรียนรู้ของเครื่องในการวินิจฉัยคัดแยกโรคจากสารชีวโมเลกุล

¹Corresponding author: oranat@kku.ac.th

*นักศึกษา หลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมชีวการแพทย์ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Student, Master of Engineering, Program in Biomedical Engineering, Faculty of Engineering, Khon Kaen University

**สำเร็จการศึกษา หลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมชีวการแพทย์ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Master of Engineering, Program in Biomedical Engineering, Faculty of Engineering, Khon Kaen University

***สำเร็จการศึกษา หลักสูตรวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Bachelor of Engineering, Program in Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Khon Kaen University

****อาจารย์ สาขาวิชาวิศวกรรมเคมีและหลักสูตรวิศวกรรมชีวการแพทย์ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Lecturer, Department of Chemical Engineering and Biomedical Engineering, Faculty of Engineering, Khon Kaen University

ABSTRACT

Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) substrates for the measurement of biological samples are currently in high demand, but their cost is relatively high due to their complex manufacturing processes. This study designed and developed a SERS substrate for measuring human serum samples that can be readily assembled from four common, inexpensive industrial materials: filter paper, Blu-ray disc, graphene ink, and aluminum tape, with 60 nm silver nanoparticles for SERS signal enhancement. The measurements were conducted using a laser wavelength of 785 nm and an acquisition time of 10 seconds. Aluminum tape was found to be the most suitable material for use as a SERS substrate because it caused the greatest amplification of the serum's Raman signal with minimal variation, the detected SERS signal was consistent with prior research and was unaffected by the substrate's intrinsic Raman signal. The optimal concentration of the colloidal silver nanoparticles was found to be 1.85×10^{-2} molar. The biomolecular composition of serum was detected at 494 cm^{-1} (L-arginine), 634 cm^{-1} (tyrosine), 724 cm^{-1} (adenine), 884 cm^{-1} (tryptophan), $1,004 \text{ cm}^{-1}$ (phenylalanine), and $1,334 \text{ cm}^{-1}$ (nucleic acid). This SERS substrate produced enhancement factors of up to 4,096 (at the $1,618 \text{ cm}^{-1}$ peak) and 164 (at the 634 cm^{-1} peak) for the measurement of crystal violet and serum samples, respectively. Thus, this study successfully developed a low-cost but effective SERS substrate that showed good performance for serum sample measurement and holds potential for application as a SERS substrate in disease diagnosis, especially in low-resource settings. Additionally, its potential for application in medicine relates to disease screening using serum sample analysis and integration with machine learning techniques to classify and diagnose diseases based on biomolecules.

คำสำคัญ: เทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามาน เซอร์สซัสเตรต การตรวจซีรัม

Keywords: Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS), SERS substrate, Serum-based detection

บทนำ

เทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามาน (surface-enhance Raman spectroscopy, SERS) ถือเป็นเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี (spectroscopy) ที่ได้รับความนิยมและใช้กันอย่างแพร่หลายเป็นอย่างมากในปัจจุบัน โดยเฉพาะในทางการแพทย์สำหรับตรวจวิเคราะห์สารชีวโมเลกุลในร่างกาย ยกตัวอย่างเช่น การตรวจโรคมะเร็งตับและตับแข็งจากปัสสาวะ [1] และโรคไวรัสตับอักเสบบีจากซีรัม [2] เป็นต้น ซึ่งเทคนิค SERS นั้นสามารถขยายสัญญาณรามานได้ตั้งแต่ 2 เท่า [3] ขึ้นไปจนถึงระดับสูงกว่า 10^2 เท่า [4] โดยการขยายสัญญาณรามานนั้นเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของสนามแม่เหล็กไฟฟ้าจากปรากฏการณ์โพลาไรตัน (polariton) บนพื้นผิวพลาสมอน (surface plasmon) ซึ่งประสิทธิภาพที่ดีที่สุดเกิดจากโมเลกุลของสารที่วิเคราะห์อยู่ในบริเวณจุดร้อน (hot spot) โดยสามารถพบได้ที่ช่องว่างระหว่างอนุภาคนาโน (nanoparticles, NPs) การตรวจด้วยเทคนิค SERS นั้นจำเป็นต้องเลือกวัสดุที่ใช้เป็นซัสเตรตที่มีคุณสมบัติและโครงสร้างที่เหมาะสม ทั้งในเรื่องของปริมาณ คุณภาพและราคา [5] ซึ่งประสิทธิภาพของซัสเตรตนี้ขึ้นอยู่กับหลายองค์ประกอบ เช่น สัณฐานวิทยา ขนาด และรูปร่างของวัสดุพลาสมอนิก รวมถึงตำแหน่งของสารที่ทำการวิเคราะห์บนซัสเตรต [6] แต่กระบวนการผลิตวัสดุและวิธีการที่ได้กล่าวมาข้างต้นนั้นโดยส่วนใหญ่เป็นวิธีการที่ซับซ้อนและมีต้นทุนในการผลิตสูง ดังนั้น SERS ซัสเตรตที่มีราคาประหยัด มีกระบวนการผลิตที่ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่ซับซ้อนและราคาแพง รวมถึงสามารถใช้วัสดุที่หาซื้อได้ตามท้องตลาดจึงเป็นที่ต้องการเป็นอย่างมาก

ในปัจจุบันมีหลายงานวิจัยที่ให้ความสนใจเกี่ยวกับการออกแบบการจัดเรียงระยะของโมเลกุลในรูปแบบนาโนเพื่อให้ได้จุลารันที่มีความสม่ำเสมอทั่วทั้งบริเวณแผ่นซับสเตรต เช่น การออกแบบอาร์เรย์นาโนโฮล หลุมอาร์เรย์นาโน เสาอาร์เรย์นาโน อาร์เรย์รูปสามเหลี่ยม อาร์เรย์นาโนร็อดและดิสก์อาร์เรย์ อย่างไรก็ตามกระบวนการผลิต SERS ซับสเตรตที่ได้กล่าวมานั้นยังมีข้อจำกัดในเรื่องของต้นทุนในการผลิต สำหรับราคาของวัสดุซับสเตรตที่วางขายในท้องตลาดในปัจจุบันพบว่ามีราคาค่อนข้างสูง ซึ่งในประเด็นนี้ถือว่าเป็นข้อจำกัดที่สำคัญอย่างหนึ่งสำหรับการทำงานวิจัยในพื้นที่ที่ขาดแคลนทรัพยากร รวมถึงขั้นตอนการออกแบบและควบคุมคุณภาพของซับสเตรตนั้นจำเป็นต้องใช้ความชำนาญเป็นอย่างมาก จึงจำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีความละเอียดสูงและผู้เชี่ยวชาญที่มีทักษะในการออกแบบวัสดุดังกล่าว ดังนั้นนักวิจัยจึงได้มีความสนใจและให้ความสำคัญกับวัสดุอื่นที่มีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการเป็นซับสเตรตโดยมีราคาไม่แพงและสามารถออกแบบได้ง่าย ยกตัวอย่างเช่น แผ่นดิสก์เอนกประสงค์ (DVD) แผ่นบลูเรย์ดิสก์ (BD) แผ่นโพลีคาร์บอเนต (PC) และแผ่นคอมแพคดิสก์ (CD) เนื่องจากวัสดุเหล่านี้มีพื้นผิวที่สามารถใช้เป็นอิเล็กโทรดและ SERS ซับสเตรตได้เป็นอย่างดี โดยมีงานวิจัยที่ได้นำวัสดุชนิดแผ่นบลูเรย์ (Blu-rays) มาใช้สำหรับเป็น SERS ซับสเตรตในการทดลอง [7–9] เนื่องจากโครงสร้างของแผ่นบลูเรย์มีรูปแบบเป็นลักษณะของร่องนาโนและนาโนพิต (nano pit) ที่ถูกฝังอยู่บนพื้นผิวของแผ่นที่ทำจากวัสดุชนิดพอลีคาร์บอเนต ซึ่งพื้นผิวเหล่านี้สามารถใช้เป็นอิเล็กโทรดและเป็นพื้นผิวรองรับอนุภาคนาโนสำหรับนำมาใช้ในการขยายสัญญาณรามานได้อีกด้วย นอกจากนี้ยังมีการวิจัยที่ได้นำวัสดุที่สามารถย่อยสลายได้เองทางชีวภาพ (biodegradable) มาใช้เป็นซับสเตรต ยกตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Yunyun Mu และ Xinping Zhang [10] ได้นำกระดาษมาเป็นพื้นผิวซับสเตรตสำหรับรองรับอนุภาคโกลด์นาโน (gold nanoparticles) เนื่องจากกระดาษมีลักษณะเด่นหลายประการเมื่อเปรียบเทียบกับซับสเตรตแบบดั้งเดิม คือ เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและพื้นผิวกระดาษส่วนใหญ่ประกอบด้วยเส้นใยเซลลูโลส ในขณะที่เส้นใยกระดาษกรอง (filter paper) มีโครงสร้างแบบสามมิติที่เชื่อมต่อถึงกันและมีพื้นผิวจำเพาะขนาดใหญ่ทำให้มีการซึมผ่านได้ดี [11] รวมถึงมีพื้นผิวที่ไม่เรียบส่งผลให้อนุภาคเกาะตัวได้ดี อีกทั้งยังมีการวิจัยของ Hui Song และ Xin Li [12] ที่ได้นำแผ่นกราฟีน (graphene sheet) ซึ่งเป็นวัสดุที่หาได้ง่ายตามท้องตลาดมาใช้เป็นซับสเตรตสำหรับรองรับอนุภาคซิลเวอร์นาโน เนื่องจากมีการศึกษาพบว่ากราฟีนช่วยป้องกันการเกิดออกซิเดชันที่รวดเร็วเกินไปในโครงสร้างนาโนของโลหะและมีความสามารถในการเก็บอิเล็กตรอนบนพื้นผิวของซับสเตรตได้ดี นอกจากนี้ยังได้มีการวิจัย [13] ที่ออกแบบซับสเตรตชนิดพื้นผิวพรอยส์อะลูมิเนียมร่วมกับอนุภาคโกลด์นาโน (AuNP@AlF) สำหรับตรวจวิเคราะห์สารโพแทสเซียมไนเตรตด้วยเทคนิค SERS เนื่องจากคุณสมบัติเด่นของการมีพื้นผิวเรียบและสัญญาณจำเพาะของวัสดุไม่ก่อให้เกิดการบดบังสารตัวอย่างที่นำมาตรวจวัด รวมถึงได้มีการนำวัสดุชนิดพรอยส์อะลูมิเนียม แผ่นอะลูมิเนียมและเทปอะลูมิเนียมมาใช้เป็นซับสเตรตในทางการแพทย์สำหรับตรวจคัดกรองโรคไวรัสตับอักเสบบี [14] โรคมะเร็งลำไส้ [15] มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ [16] และมะเร็งเต้านม [17] จากตัวอย่างที่เรื้อรัง พร้อมกับวิเคราะห์สารชีวโมเลกุลร่วมกับวิธีการเรียนรู้ของเครื่อง (machine learning)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการออกแบบและพัฒนาวัสดุซับสเตรตต้นทุนต่ำของเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามาน (SERS) ทั้งหมด 4 ชนิดร่วมกับอนุภาคซิลเวอร์นาโน ได้แก่ แผ่นกระดาษกรอง (filter paper) แผ่นบลูเรย์ (Blu-ray) หมึกกราฟีน (graphene) และเทปอะลูมิเนียม (aluminum tape) ซึ่งเป็นวัสดุที่มีราคาถูก หาได้ง่ายตามท้องตลาด และมีขั้นตอนในการผลิตที่ไม่ซับซ้อน จึงส่งผลให้ต้นทุนการผลิตไม่สูงมากนักและเหมาะสมกับการนำไปใช้ในพื้นที่ที่มีข้อจำกัดในเรื่องของทรัพยากรการผลิตอีกด้วย โดยงานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อทำการเปรียบเทียบชนิดของวัสดุซับสเตรตและหาความเข้มข้นของซิลเวอร์นาโนคอลลอยด์ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับนำมาใช้ในการตรวจตัวอย่างซีรัมด้วยเทคนิค SERS โดยได้มีการคำนวณค่ากำลังในการขยายสัญญาณรามาน (enhancement factor, EF) ในการตรวจวัดคริสตัลไวโอเลต (crystal violet, CV) และตัวอย่างซีรัมรวมทั้งศึกษาองค์ประกอบทางชีวโมเลกุลในตัวอย่งซีรัมคนจากสัญญาณ SERS ซึ่ง

วิธีการดังกล่าวสามารถลดต้นทุนและขั้นตอนในการตรวจวัดตัวอย่างและสามารถนำวิธีการเหล่านี้ไปตรวจวิเคราะห์โรคชนิดอื่นจากซีรัมได้ในอนาคตอีกด้วย

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อออกแบบและเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการขยายสัญญาณรามานของ SERS ซับสเตรตที่ทำจากวัสดุ 4 ชนิด ได้แก่ แผ่นกระดาษกรอง แผ่นบลูเรย์ หมึกกราฟีนและเทปอะลูมิเนียม ร่วมกับการหาความเข้มข้นของอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่เหมาะสม
2. เพื่อนำ SERS ซับสเตรตที่เหมาะสมที่สุดมาใช้ในการตรวจวัดและวิเคราะห์ค่ากำลังในการขยายสัญญาณรามานของคริสตัลไวโอเลตและซีรัม รวมทั้งศึกษาองค์ประกอบทางชีวโมเลกุลในตัวอย่างซีรัมคนจากสัญญาณ SERS

วิธีการวิจัย

1. สารเคมีและตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมีและตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ได้แก่ แผ่นบลูเรย์ (Blu-ray disc) ความจุ 25 GB รุ่น BD-R 25GB 6x จากบริษัท Development Company, L.P แผ่นกระดาษกรองทรงวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 125 มิลลิเมตร เกรด 93 ขนาดรูปทรง 10 ไมโครเมตร จากบริษัท M&P IMPEX เทปอะลูมิเนียม (aluminum tape) ความหนา 0.03 มิลลิเมตร จากบริษัท ดัคท์ เอ็กเซล จำกัด ผงกราฟีน (graphene powder) 99 wt% จากบริษัท Tianyuan น้ำบริสุทธิ์ปราศจากไอออน (deionized water, DI) จากบริษัท RCI Labscan อนุภาคซิลเวอร์นาโน (AgNPs) ขนาด 60 นาโนเมตร จากบริษัท Sigma-Aldrich คริสตัลไวโอเลต (crystal violet, CV) ผลิตโดย บริษัท สหการโอสถ จำกัด ตัวอย่างซีรัมของกลุ่มคนสุขภาพดีจำนวน 3 ตัวอย่างจาก Biobank ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ทั้งนี้การดำเนินงานในโครงการวิจัยนี้ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (เลขที่โครงการ HE641114)

2. วิธีการเตรียม SERS ซับสเตรต

การออกแบบและเตรียม SERS ซับสเตรตชนิดเทปอะลูมิเนียม (aluminum tape) มีวิธีการ คือ นำเทปอะลูมิเนียมมาตัดให้มีขนาดความกว้างและยาวเท่ากับแผ่น glass slide (25.4 x 76.2 มิลลิเมตร) จากนั้นทำการเจาะหลุมบนพื้นผิวแผ่นเทปอะลูมิเนียมโดยใช้ก้านเข็มขนาด 0.58 มิลลิเมตร ทั้งหมด 4 หลุม ให้มีระยะห่างเท่ากันสำหรับเป็นพื้นที่หยดสารละลายที่จะใช้ทดสอบ ทั้งนี้สาเหตุที่ใช้ก้านเข็มเนื่องจากบริเวณปลายเข็มมีความแหลมและคมเป็นอย่างมาก อาจทำให้พื้นผิวอะลูมิเนียมทะลุถึงชั้นเทปแก้วได้ ซึ่งจะส่งผลต่อสัญญาณในการวัดตัวอย่าง

การเตรียม SERS ซับสเตรตชนิดแผ่นกระดาษกรอง (filter paper) นั้น มีวิธีการเตรียมโดยนำกระดาษกรองมาวัดเส้นให้เป็นลักษณะรูปวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 มิลลิเมตร สำหรับเป็นพื้นที่หยดสารละลาย จากนั้นทำการเคลือบแว็กซ์ (wax) บริเวณรอบนอกของหลุมหยดสารทั้งผิวส่วนบนและส่วนด้านล่างของกระดาษกรอง เพื่อป้องกันสารละลายซึมออกด้านนอก และเป็นการจำกัดการแพร่กระจายของอนุภาคซิลเวอร์นาโนให้มีการเกาะตัวและมีความหนาแน่นอยู่เฉพาะภายในบริเวณหลุมหยดสารเท่านั้น หลังจากทำการเคลือบแว็กซ์และปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที จึงนำแผ่นกระดาษกรองมาตัดด้วยกรรไกรให้มีขนาด 1 x 1 เซนติเมตร แล้วนำมาติดบนแผ่น glass slide โดยทำการติดทั้งหมดจำนวน 4 หลุมหยดสาร

การเตรียม SERS ซับสเตรตชนิดหมึกกราฟีน (graphene ink) ทำได้โดยการทาแว็กซ์เคลือบบริเวณพื้นผิวด้านบนและด้านล่างของแผ่นของกระดาษกรอง โดยเว้นที่ว่างเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 มิลลิเมตร จากนั้นทำการผสมผงกราฟีน กาวและน้ำอย่างละ 0.15 กรัมให้เข้ากัน (อัตราส่วน 1:1:1) แล้วจึงทำการทาหมึกกราฟีนลงบนบริเวณที่ว่างรูปวงกลมที่เว้น

ไว้สำหรับใช้ในการหยดสารละลาย จากนั้นทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที แล้วนำแผ่นซับสเตรตชนิดกราฟีนมาตัดด้วยกรรไกรให้มีขนาด 1×1 เซนติเมตร แล้วนำมาติดบนแผ่น glass slide โดยทำการติดจำนวนทั้งหมด 4 หลุมหยดสาร

การเตรียม SERS ซับสเตรตชนิดแผ่นบลูเรย์ได้ทำการออกแบบตามขั้นตอนในงานวิจัยของ Jun Dong และคณะ (8) โดยการนำแผ่นบลูเรย์มาชุบด้วยชั้นที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้ชั้นพอลิเมอร์ที่เคลือบบริเวณแผ่นเกิดการแข็งตัวและแห้งสนิททำให้สามารถลอกออกได้ง่ายโดยใช้คัตเตอร์ปลายคม ต่อมาทำการใช้เทปใสลอกบริเวณชั้นป้องกันรอยขีดข่วน (protective layer) แล้วนำไปแช่ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ เพื่อกำจัดชั้นที่มีพื้นผิวสะท้อนแสง (reflective layer) แล้วจึงนำแผ่นบลูเรย์ที่มีลักษณะสีหลังจากการลอกพื้นผิวชั้นต่าง ๆ แล้วมาล้างด้วยน้ำบริสุทธิ์ปราศจากไอออนเพื่อกำจัดไอออนที่มาจากกรดไฮโดรคลอริกและนำไปแช่ในเอทานอลเป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นทำการติดเทปอะลูมิเนียมบนแผ่นบลูเรย์ทั้งหมด 3 ชั้น แล้วจึงเจาะรูบนพื้นผิวเทปอะลูมิเนียมโดยใช้ก้านเข็มขนาด 0.58 มิลลิเมตร จำนวน 3 หลุม สำหรับเป็นหลุมหยดสารและเพื่อจำกัดขอบเขตในการกระจายตัวของอนุภาคซิลเวอร์นาโน เมื่อทำการเตรียมซับสเตรตชนิดแผ่นบลูเรย์เรียบร้อยแล้วจึงนำมาติดบนแผ่น glass slide เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับนำมาตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างต่อไป

สำหรับการเตรียมซิลเวอร์นาโนคอลลอยด์ที่มีความเข้มข้นต่างกัมนั้น ทำได้โดยการนำซิลเวอร์นาโนคอลลอยด์ที่มีความเข้มข้น 1.85×10^{-3} โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 900 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จนเกิดการแยกชั้นเป็นส่วนที่เป็นของเหลวใสและส่วนที่เป็นตะกอนสีเหลือง แล้วดูดส่วนที่เป็นของเหลวใสออกโดยระวังไม่ให้ส่วนที่เป็นตะกอนติดออกไป หลังจากนั้นเติมน้ำบริสุทธิ์ปราศจากไอออนในปริมาตรที่เหมาะสมเพื่อให้ซิลเวอร์นาโนคอลลอยด์มีความเข้มข้น 5 เท่า (9.27×10^{-3} โมลาร์) 10 เท่า (1.85×10^{-2} โมลาร์) และ 20 เท่า (3.71×10^{-2} โมลาร์) ตามลำดับ

สำหรับการเตรียมตัวอย่างซีรัมนั้นได้ดำเนินการตามขั้นตอนงานวิจัยของ Sukuratin และคณะ (18) โดยนำซีรัมออกจากตู้แช่แข็งและทิ้งไว้ให้ละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำซีรัมในหลอดเซนต์ปีฟักไปปั่นด้วยความเร็ว 15,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำการผสมซีรัมปริมาตร 3 ไมโครลิตร และซิลเวอร์นาโนคอลลอยด์ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงในหลอดเซนต์ปีฟัก และบ่มทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เพื่อให้สารละลายมีความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneous) ก่อนนำไปตรวจวัดต่อไป

สำหรับการเตรียมสารละลายคริสตัลไวโอเลต (crystal violet, CV) มาใช้สำหรับเป็นโมเลกุลต้นแบบ (model compound) เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของ SERS ซับสเตรตที่พัฒนาขึ้นในการขยายสัญญาณรามานนั้น เตรียมโดยการนำ CV ความเข้มข้น 0.082 โมลาร์ มาเจือจางด้วยการผสมน้ำบริสุทธิ์ปราศจากไอออนให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-6} โมลาร์ จากนั้นนำ CV และอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่เตรียมเรียบร้อยแล้วมาผสมกันลงในหลอดเซนต์ปีฟัก โดยคิดอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตร 3 ไมโครลิตร) และทำการบ่มทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปตรวจวัดต่อไป

3. การวัดตัวอย่างและวิเคราะห์สัญญาณด้วยเครื่องรามานสเปกโตรมิเตอร์ (Raman spectrometer)

การทดสอบตัวอย่างเริ่มจากการนำตัวอย่างที่ผสมซิลเวอร์นาโนคอลลอยด์และบ่มทิ้งไว้แล้ว 1 ชั่วโมง มาหยดลงบนพื้นผิวซับสเตรตโดยใช้ปริมาตร 1 ไมโครลิตร จำนวน 5 จุด แล้วปล่อยให้แห้งบนแผ่นซับสเตรตที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที โดยดำเนินการวัดในช่วง Raman shift ที่ $0 - 2,000 \text{ cm}^{-1}$ ขนาดเกรตติง (grating) $1,200 \text{ g/mm}$ ขนาดฟิลเตอร์ (filter) 100 % และความยาวคลื่นเลเซอร์ 785 นาโนเมตร ด้วยเครื่องรามานสเปกโตรมิเตอร์รุ่น Horiba XploRA PLUS (Horiba Jobin Yvon, Northampton, UK) ทำการวัดตัวอย่างบริเวณ 5 จุดบนแผ่นซับสเตรตเพื่อหาค่าเฉลี่ยของสัญญาณรามาน โดยแต่ละจุดใช้ระยะเวลาในการวัด (acquisition time) 10 วินาที จากนั้นนำค่าสเปกตรัมที่ได้มาประมวลผลและวิเคราะห์ข้อมูลด้วยซอฟต์แวร์ MATLAB (R2020a, MathWorks, Natick, MA) โดยขั้นตอนแรกทำการเลือกช่วงข้อมูล $350 - 1,800 \text{ cm}^{-1}$ จากนั้นลบ baseline ออกจากสัญญาณด้วยฟังก์ชัน polynomial (ดีกรี 4) และปรับให้เรียบ (smooth) ด้วยฟังก์ชัน Savitzky-

Golay (20 จุด) แล้วจึงทำการนอร์มัลไลซ์ (normalized) โดยการหารสัญญาณด้วยค่าเฉลี่ยสัญญาณสเปกตรัมทั้งหมดของแต่ละตัวอย่าง จากนั้นทำการวิเคราะห์ความสูงของพีค (peak height) โดยการทำการฟิตติ้ง (peak fitting) จากซอฟต์แวร์อริจินแล็บ (OriginLab) ด้วยฟังก์ชันเกาส์เซียน (Gaussian) สำหรับค่ากำลังในการขยายสัญญาณรามาน (enhancement factor, EF) นั้นทำการคำนวณโดยใช้สมการที่ 1 [8] ดังนี้

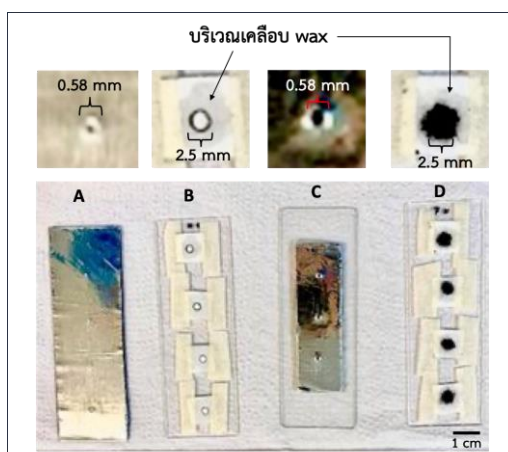
$$EF = \frac{I_{SERS}}{I_{Raman}} \times \frac{N_{Raman}}{N_{SERS}} \quad (1)$$

โดย I_{SERS} และ I_{Raman} คือ ความเข้มของสัญญาณรามานที่วัดได้จากกรณีที่มีการเติมและไม่มีการเติมอนุภาคซิลเวอร์นาโนตามลำดับ

N_{SERS} และ N_{Raman} คือ จำนวนโมเลกุลของสารตัวอย่างที่อยู่ภายในบริเวณจุดโฟกัสของเลเซอร์ (laser spot) ในกรณีที่มีและไม่มีการเติมอนุภาคซิลเวอร์นาโน ตามลำดับ

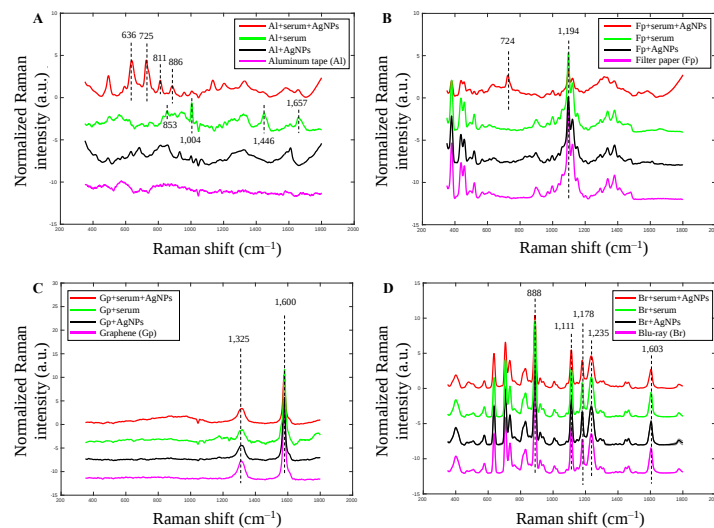
ผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ทำการออกแบบและพัฒนาขั้นตอนต้นทุ่นต่ำของเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามาน (SERS) จากวัสดุที่มีราคาถูก หาได้ง่ายตามท้องตลาด มีขั้นตอนในการผลิตที่ไม่ซับซ้อนและไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือขั้นสูงในการผลิต โดยมีการหาความเข้มข้นของซิลเวอร์นาโนคอลลอยด์ที่เหมาะสมสำหรับการขยายสัญญาณรามานบนพื้นผิวซับสเตรต เพื่อให้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดตัวอย่างชีวภาพ เช่น ซีรัมต่อไปได้ ทั้งนี้ในการทดสอบได้มีการนำ SERS ซับสเตรตมาตรวจวัดตัวอย่างคริสตัลไวโอเล็ตและซีรัมคนและวิเคราะห์หาค่ากำลังในการขยายสัญญาณ (EF) รวมทั้งศึกษาองค์ประกอบทางชีวโมเลกุลในซีรัมจากสัญญาณ SERS ซึ่งตัวอย่างภาพถ่ายของ SERS ซับสเตรตทั้ง 4 ชนิดที่ทำการเตรียมเรียบร้อยแล้วได้แสดงไว้ในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ตัวอย่าง SERS ซับสเตรตที่ออกแบบขึ้นจากวัสดุ 4 ชนิด ได้แก่ A) เทปอะลูมิเนียม B) กระดาษกรอง C) แผ่นบลูเรย์ และ D) หมึกกราฟีน โดยแถบแสดงภาพขยายของลักษณะของหลุมหยดสารและแถวร่องแสดงภาพจริงของตัวอย่าง SERS ซับสเตรตแต่ละชนิดที่เตรียมบนแผ่น glass slide ก่อนที่จะทำการหยดสารตัวอย่าง

จากผลการทดลอง SERS ขั้วสเตรตทั้ง 4 ชนิดพบว่าเทปอะลูมิเนียมมีความเหมาะสมมากที่สุดในการนำมาขยายสัญญาณรามานของตัวอย่างซีรัม (ภาพที่ 2A) เนื่องจากเทปอะลูมิเนียมมีพีครามานเฉพาะตัวที่ไม่ก่อให้เกิดการบดบังสัญญาณของสารชีวโมเลกุลในตัวอย่างซีรัม อีกทั้งลักษณะและตำแหน่งของพีคจำเพาะของซีรัมที่ตรวจพบทั้งในสัญญาณรามานปกติและสัญญาณ SERS มีความถูกต้องและสอดคล้องกับงานวิจัยอื่น [18] กล่าวคือ ในสัญญาณรามานปกติของซีรัมตรวจพบที่ตำแหน่งพีค 853 1,004 1,446 และ 1,657 cm^{-1} และเมื่อนำตัวอย่างซีรัมมาตรวจวัดร่วมกับการเติมอนุภาคนาโนบนพื้นผิวขั้วสเตรตชนิดเทปอะลูมิเนียมพบว่าการขยายสัญญาณได้สูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัดจนโดยเฉพาะในตำแหน่งพีคที่ 636 cm^{-1} และ 725 cm^{-1} ซึ่งลักษณะสัญญาณ SERS ที่เกิดขึ้นนี้เป็นรูปแบบเดียวกันกับงานวิจัยก่อนหน้า [19] โดยจะสังเกตได้ว่าลักษณะสัญญาณรามานและสัญญาณ SERS ของซีรัมมีลักษณะที่แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเจนอันเกิดจากการเคลื่อนที่ของตำแหน่งพีค (peak shift) ซึ่งเป็นไปตามทฤษฎีที่กล่าวว่าเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามาน (SERS) เกิดจากการทำงานร่วมกันของ 2 กลไก คือ การเกิดคุณสมบัติทางเคมี (chemical) ซึ่งเป็นการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารตัวอย่างและโฟตอน และคุณสมบัติทางแม่เหล็กไฟฟ้า (electromagnetic) เกิดจากสนามแม่เหล็กไฟฟ้าที่เกิดขึ้นบริเวณพื้นผิวของอนุภาคนาโนหรือเรียกว่าบนพื้นผิวเรโซแนนซ์พลาสมอน (localized surface plasmon resonance, LSPR) [20] โดยมีหลักการ คือ เมื่อแสงส่องมากระทบทำให้อนุภาคนาโนเกิดการดูดซับโฟตอน (photon) จากแสงเลเซอร์ ส่งผลให้อิเล็กตรอนเกิดการสั่นสะเทือนและถ่ายโอนประจุเข้าไปในโมเลกุลของสารตัวอย่าง หลังจากนั้นอิเล็กตรอนจะกลับเข้าสู่สภาวะปกติและปล่อยโฟตอนออกมาด้วยความถี่ที่ต่างออกไป (stokes shift) ซึ่งความถี่ที่ต่างออกไปนี้จะแสดงในรูปแบบของแถบสีน้ำเงิน (blue shift) และสีแดง (red shift) โดยทั้ง 2 แถบนี้เป็นผลมาจากการสั่นสะเทือนของสารตัวอย่างและสารตัวอย่างที่อยู่บนพื้นผิวอนุภาคนาโน ดังนั้นการสั่นสะเทือนที่เกิดขึ้นนี้จะส่งผลทำให้พันธะเคมีระหว่างอะตอมเกิดการเปลี่ยนแปลงไป [21] จึงเป็นสาเหตุให้การระบุตำแหน่งของสารชีวโมเลกุลที่ตรวจวัดด้วยเทคนิครามานสเปกโทรสโกปีและเทคนิค SERS แตกต่างกันไปด้วยเช่นกัน



ภาพที่ 2 การตรวจวัดตัวอย่างซีรัมด้วย SERS ขั้วสเตรตที่ทำจากวัสดุ 4 ชนิด ได้แก่ A) เทปอะลูมิเนียม B) กระดาษกรอง C) หมึกกราฟีน D) แผ่นบลูเรย์ เส้นทึบและพื้นที่แรเงาแสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของข้อมูลสเปกตรัมที่วัดจาก 5 ตำแหน่งบนพื้นผิวขั้วสเตรต ข้อมูลที่แสดงมีการปรับค่าระยะห่าง (offset) ระหว่างเส้นสเปกตรัมเพื่อให้สามารถเปรียบเทียบลักษณะของสัญญาณได้อย่างชัดเจน

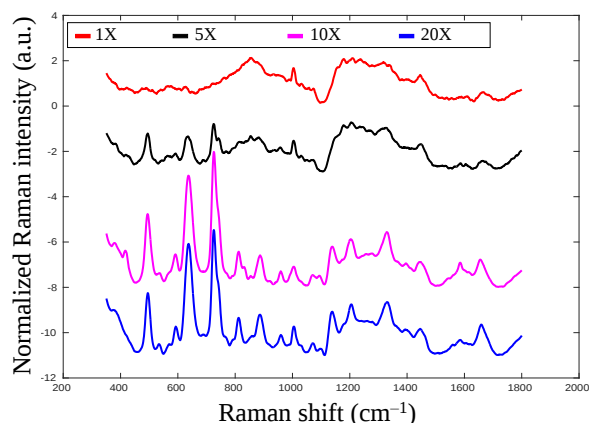
ผลการทดสอบ SERS ขับสเตรตชนิดกระดาษกรองพบว่ากระดาษกรองมีความเหมาะสมสำหรับนำมาใช้เป็นวัสดุขับสเตรตในการขยายสัญญาณรามาน (ภาพที่ 2B) รองลงมาจากเทปอะลูมิเนียม เนื่องจากลักษณะสัญญาณของกระดาษกรองสามารถขยายสัญญาณของซีรัมได้ในบางตำแหน่ง ดังจะเห็นได้ที่พีค 724 cm^{-1} อย่างไรก็ตามเมื่อเติมอนุภาคซิลเวอร์นาโนแล้วพบว่าสัญญาณมีความแปรปรวนค่อนข้างสูง นอกจากนี้ยังพบพีคที่ตำแหน่ง $1,194\text{ cm}^{-1}$ เกิดขึ้นในสเปกตรัมทั้ง 4 เส้น ซึ่งเป็นพีคจำเพาะของเส้นใยเซลลูโลส (cellulose) [22] ทั้งนี้การตรวจวัดตัวอย่างพบการขยายสัญญาณของซีรัมได้น้อยมากและพบพีคเฉพาะตัวของกระดาษกรองที่เด่นชัด อาจเนื่องมาจากวัสดุกระดาษกรองมีลักษณะเป็นเส้นใย ทำให้เมื่อหยดสารตัวอย่างแล้วอนุภาคซิลเวอร์นาโนเกิดการกระจายตัวไม่เท่ากันและรวมกลุ่มกันเป็นก้อน (aggregation) ในบางจุด ส่งผลให้สามารถขยายสัญญาณของโมเลกุลในตัวอย่างซีรัมได้น้อย [23] รวมถึงเส้นใยกระดาษมีสัญญาณเฉพาะตัวที่เด่นชัดทำให้บดบังการกระเจิงของแสงเลเซอร์ที่ตกกระทบบนพื้นผิว ส่งผลทำให้ความสูงของสัญญาณค่อนข้างต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่พบว่าการกระจายตัวของโครงสร้างนาโนพลาสมอนิกของพื้นผิว SERS ขับสเตรตชนิดกระดาษกรองนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น การกระจายของเส้นใย ขนาดรูพรุนของกระดาษ รวมถึงพื้นผิวที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน (heterogenous) [24] ทำให้ส่งผลโดยตรงต่อการแพร่กระจายของสารที่ทำการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งประสิทธิภาพของการขยายสัญญาณของตัวอย่างซีรัมนี้ขึ้นอยู่กับกระบวนการควบคุมการกระจายตัวของอนุภาคนาโนเพื่อให้เกิดจุด hot spot ที่มากขึ้นในการเพิ่มการขยายสัญญาณรามาน จากผลการทดลองนี้จึงสามารถสรุปได้ว่า SERS ขับสเตรตชนิดกระดาษกรองไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการตรวจวัดตัวอย่างซีรัม เนื่องจากสามารถขยายสัญญาณของตัวอย่างซีรัมได้น้อยมากและมีพีคจำเพาะของวัสดุที่ส่งผลให้เกิดการบดบังสารชีวโมเลกุล

สำหรับผลการทดลองวัดพื้นผิว SERS ขับสเตรตที่ทำจากหมึกกราฟีนพบว่าขับสเตรตชนิดดังกล่าวไม่สามารถขยายสัญญาณรามานได้ เนื่องจากไม่พบพีคสารชีวโมเลกุลของตัวอย่างซีรัมเกิดขึ้น โดยลักษณะของสัญญาณสเปกตรัมทั้งหมด 4 เส้นมีความคล้ายคลึงกันทั้งการตรวจวัดด้วยเทคนิครามานสเปกโทรสโกปีแบบดั้งเดิมและเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามานที่มีการเติมอนุภาคซิลเวอร์นาโนแล้วก็ตาม รวมถึงเมื่อพิจารณาทั้ง 2 เทคนิคที่ได้กล่าวมาข้างต้นพบว่าสัญญาณมีความแปรปรวนค่อนข้างสูง และนอกจากนี้ยังพบสัญญาณจำเพาะของวัสดุกราฟีนชนิด G band [25] และ D band [26] ในช่วงตำแหน่งพีคที่ $1,600\text{ cm}^{-1}$ และ $1,325\text{ cm}^{-1}$ ตามลำดับ ซึ่งทำให้บดบังตำแหน่งของสารชีวโมเลกุลในตัวอย่างซีรัม แม้ว่ากราฟีนจะมีคุณสมบัติที่ประกอบด้วยกลุ่มอีพอกซี (epoxy) และไฮดรอกซิล (hydroxyl) ที่สามารถละลายน้ำได้ดีก็ตาม แต่อาจเนื่องมาจากการเติมการเข้าไปเป็นส่วนผสมในการเตรียมหมึกกราฟีน จึงส่งผลให้เกิดการเคลือบบริเวณพื้นผิวของอนุภาคอนุภาคซิลเวอร์นาโนแทนกราฟีน ด้วยสาเหตุนี้จึงทำให้โมเลกุลของกราฟีนไม่สามารถดูดซับบนพื้นผิวอนุภาคซิลเวอร์นาโนได้ และในขณะเดียวกันเมื่อคุณสมบัติของกราฟีนเปลี่ยนแปลงไปจึงอาจส่งผลให้เกิดออกซิเดชันที่รวดเร็วเกินไปในโครงสร้างนาโนของโลหะ ทำให้พื้นผิวขับสเตรตไม่สามารถกักเก็บอิเล็กตรอนและเกิดการกระตุ้นบริเวณพื้นผิวเรโซแนนซ์พลาสมอน (LSPR) ที่มีส่วนในการเพิ่มประสิทธิภาพการขยายสัญญาณรามานได้ ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อกลไกทางแม่เหล็กไฟฟ้า (electromagnetic mechanism, EM) ทำให้คุณสมบัติการนำไฟฟ้าของกราฟีนลดลง [27] ดังนั้นจึงทำให้ SERS ขับสเตรตชนิดหมึกกราฟีนไม่สามารถขยายสัญญาณรามานของตัวอย่างซีรัมได้ดังแสดงในภาพที่ 2C

ผลการทดลองวัดพื้นผิว SERS ขับสเตรตชนิดแผ่นบลูเรย์พบว่า SERS ขับสเตรตชนิดนี้ไม่สามารถขยายสัญญาณของตัวอย่างซีรัมได้แม้จะมีการเติมและไม่เติมอนุภาคซิลเวอร์นาโนก็ตาม (ภาพที่ 2D) รวมถึงสัญญาณของวัสดุชนิดแผ่นบลูเรย์ยังแสดงให้เห็นพีคจำนวนมาก ซึ่งส่งผลต่อการบดบังและการวิเคราะห์ตำแหน่งของสารชีวโมเลกุลในตัวอย่างซีรัม โดยพีครามานของแผ่นบลูเรย์ที่เกิดขึ้นที่ตำแหน่ง 888 cm^{-1} , $1,111\text{ cm}^{-1}$, $1,178\text{ cm}^{-1}$, $1,235\text{ cm}^{-1}$ และ $1,603\text{ cm}^{-1}$ นั้นเป็นรูปแบบเฉพาะตัวของวัสดุชนิดพอลิคาร์บอเนต (polycarbonate) [28] เนื่องจากแผ่นบลูเรย์ทำจากวัสดุชนิดพอลิคาร์บอเนตซึ่งถูกออกแบบให้มีโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นร่องนาโนและนาโนพิตฝังอยู่บริเวณพื้นผิวของแผ่น โดยพื้นผิวเหล่านี้สามารถใช้เป็นอิเล็กโทรดสำหรับรองรับและ

ยึดเกาะของอนุภาคซิลเวอร์นาโนให้มีลักษณะการจัดเรียงตัวของอนุภาคอย่างมีระเบียบ ซึ่งจะทำให้เกิดจุดร้อน (hot spot) ที่มีความสม่ำเสมอทั่วทั้งบริเวณแผ่นซับสเตรตเพื่อให้เกิดการขยายสัญญาณรามานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งนี้ได้มีงานวิจัยก่อนหน้า [7] ที่ได้ออกแบบ SERS ซับสเตรตชนิดแผ่นบลูเรย์โดยมีขั้นตอนในการปรับปรุงพื้นผิว (surface treatment) ด้วยวิธีการทางไฟฟ้าเคมี (electrochemical, EC) ทำให้อนุภาคโกลด์และซิลเวอร์นาโนที่เกิดขึ้นบนพื้นผิวนาโนพิตมีการจัดเรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบจึงสามารถขยายสัญญาณรามานได้สำเร็จ อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ได้ทำการออกแบบวิธีการที่แตกต่างโดยทำการหยด (deposit) อนุภาคซิลเวอร์นาโนลงบนบริเวณหลุมนาโนพิตของพื้นผิวซับสเตรต เนื่องจากต้องการเตรียมวัสดุที่มีขั้นตอนไม่ซับซ้อน มีต้นทุนต่ำและเหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการทำวิจัยในพื้นที่ที่มีข้อจำกัดทางด้านทรัพยากรโดยไม่มีการทำการปรับปรุงพื้นผิวซึ่งเป็นวิธีการที่จำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือเฉพาะและมีราคาสูง แต่ทั้งนี้พบว่าวิธีการหยดอนุภาคซิลเวอร์นาโนไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอในการขยายสัญญาณรามาน เนื่องจากไม่สามารถควบคุมทิศทางการกระจายตัวของอนุภาคซิลเวอร์นาโนให้มีการเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบและทำให้อนุภาคเกิดการจับตัวกันเป็นก้อน ส่งผลให้ไม่สามารถขยายสัญญาณรามานของตัวอย่างซีรัมได้

ดังนั้นจากการศึกษาพื้นผิว SERS ซับสเตรตชนิดหมึกกราฟีนและแผ่นบลูเรย์จึงสามารถสรุปได้ว่าวัสดุทั้ง 2 ชนิดนี้ไม่เหมาะสมที่จะนำมาตรวจวัดตัวอย่างด้วยเทคนิค SERS เนื่องจากไม่สามารถขยายสัญญาณรามานของตัวอย่างซีรัมได้ รวมถึงพิศจำเพาะของวัสดุดังกล่าวยังมีความเด่นชัดจนทำให้บดบังสารชีวโมเลกุลในซีรัม จากผลการวิเคราะห์สัญญาณของพื้นผิว SERS ซับสเตรตทั้ง 4 ชนิด สามารถสรุปได้ว่าเทปอะลูมิเนียมมีความเหมาะสมสำหรับนำมาเป็นซับสเตรตมากที่สุดเนื่องจากสามารถขยายสัญญาณ SERS ซึ่งเป็นพิศจำเพาะของตัวอย่างซีรัมได้อย่างถูกต้อง และด้วยคุณสมบัติเด่นเฉพาะตัวของการเป็นวัสดุที่มีพื้นผิวโลหะซึ่งเป็นสารกึ่งตัวนำ (semiconductor) นั้น เมื่อทำปฏิกิริยากับอนุภาคซิลเวอร์นาโน (AgNPs) ที่มีความต่างศักย์ (redox potential) กันจะทำให้เกิดปฏิกิริยาทางไฟฟ้าเคมีขึ้น ส่งผลให้อะตอมของซิลเวอร์กลายเป็นศูนย์และเกิดเป็นโครงสร้างผลึกขึ้นบนพื้นผิวโลหะซับสเตรต โดยผลึกส่วนใหญ่จะเป็นรูปแบบโครงสร้างสาขาสีรุปรูป (fractal) ผลึกกิ่งไม้ (dendritic) และผลึกรูปหลายเหลี่ยม (polygonal) ซึ่งรูปทรงของผลึกเหล่านี้จะเป็นส่วนที่เพิ่มประสิทธิภาพในการขยายสัญญาณรามาน [29] รวมถึงคุณสมบัติความเป็นพื้นผิวที่ทำจากโลหะบริสุทธิ์ (pure metals-based) ของเทปอะลูมิเนียมทำให้มีสัญญาณพื้นหลัง (background) ของวัสดุต่ำหรือแทบไม่พบพิศรามานจำเพาะของเทปอะลูมิเนียม จึงเป็นจุดเด่นทำให้ซับสเตรตชนิดนี้ไม่ก่อให้เกิดการรบกวนสัญญาณที่เกิดขึ้นจากสารชีวโมเลกุลที่ทำการตรวจวัด [30] นอกจากนี้พบว่าเทปอะลูมิเนียมมีสัญญาณค่อนข้างเรียบและความแปรปรวนน้อย ด้วยคุณสมบัติที่ได้กล่าวมาข้างต้นนี้จึงเป็นสาเหตุทำให้วัสดุชนิดเทปอะลูมิเนียมมีความแตกต่างจากซับสเตรตชนิดอื่น รวมถึงมีราคาถูก ต้นทุนในการออกแบบต่ำและมีกระบวนการผลิตที่ไม่ซับซ้อน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้นำ SERS ซับสเตรตชนิดเทปอะลูมิเนียมมาใช้สำหรับตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างซีรัมต่อไป

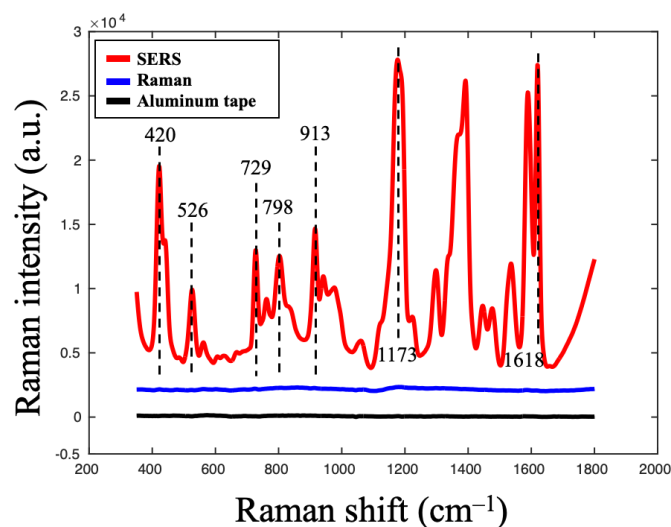


ภาพที่ 3 การวัดตัวอย่างซีรัมด้วยสเปกตรอนิเดเทปอะลูมิเนียมที่ใช้อนุภาคซิลเวอร์นาโนคอลลอยด์ความเข้มข้น 1.85×10^{-3} โมลาร์ (1X) 9.27×10^{-3} โมลาร์ (5X) 1.85×10^{-2} โมลาร์ (10X) และ 3.71×10^{-2} โมลาร์ (20X) โดยเส้นทึบและพื้นที่แรเงาแสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของข้อมูลสเปกตรัมที่วัดจาก 5 ตำแหน่งบนพื้นผิวซับสเตรต ข้อมูลที่แสดงมีการปรับค่าระยะห่าง (offset) ระหว่างเส้นสเปกตรัมเพื่อการเปรียบเทียบลักษณะสัญญาณ

นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของอนุภาคซิลเวอร์นาโนคอลลอยด์ในการขยายสัญญาณรามานโดยได้ทำการทดสอบทั้งหมด 4 ความเข้มข้น ได้แก่ 1 เท่า (1.85×10^{-3} โมลาร์) 5 เท่า (9.27×10^{-3} โมลาร์) 10 เท่า (1.85×10^{-2} โมลาร์) และ 20 เท่า (3.71×10^{-2} โมลาร์) ซึ่งผลการทดลองแสดงในภาพที่ 3 เมื่อพิจารณาที่ความเข้มข้น 1 เท่า พบว่าสามารถขยายสัญญาณของตัวอย่างซีรัมได้น้อยมากซึ่งพบพีกสัญญาณ SERS ของตัวอย่างซีรัมเพียงบางตำแหน่งเท่านั้น และเมื่อพิจารณาที่ความเข้มข้น 5 เท่า จะพบว่าลักษณะของสัญญาณสามารถขยายได้สูงขึ้นโดยจะเห็นได้ชัดเจนในช่วงที่ 500 cm^{-1} และ $600\text{--}700 \text{ cm}^{-1}$ แต่อย่างไรก็ตามยังคงพบความแปรปรวนค่อนข้างสูงในช่วง $400\text{--}800 \text{ cm}^{-1}$ และพบพีกที่เกิดขึ้นมีความสมบูรณ์ถูกต้องในช่วง $400\text{--}800 \text{ cm}^{-1}$ เท่านั้น ในขณะที่ความเข้มข้นของอนุภาคซิลเวอร์นาโนคอลลอยด์เป็น 10 และ 20 เท่า พบว่าสัญญาณมีการขยายมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเจน ทั้งนี้เมื่อพิจารณาลักษณะการขยายสัญญาณที่ความเข้มข้น 10 และ 20 เท่า พบว่าความสูงของพีกมีความใกล้เคียงกัน รวมถึงหากพิจารณาในเรื่องของค่าใช้จ่ายและปริมาณในการใช้อนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ความเข้มข้น 10 เท่า มีความคุ้มค่าและเหมาะสมสำหรับนำมาวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิค SERS มากที่สุด

จากผลการทดลองข้างต้นจึงสามารถสรุปได้ว่าการใช้เทปอะลูมิเนียมสำหรับเป็นพื้นผิวซับสเตรตร่วมกับอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ความเข้มข้น 1.85×10^{-2} โมลาร์ มีความเหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างซีรัม ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้นำ SERS ซับสเตรตชนิดดังกล่าวมาใช้ในการตรวจวัดคริสตัลไวโอเลต (CV) ซึ่งเป็นโมเลกุลต้นแบบสำหรับวิเคราะห์หาค่ากำลังในการขยายสัญญาณรามาน (EF) โดยจากผลการทดลองดังภาพที่ 4 พบว่าพีกที่เกิดขึ้นสามารถขยายสัญญาณ SERS ของคริสตัลไวโอเลตได้อย่างถูกต้องและชัดเจน และจากการคำนวณค่ากำลังในการขยายสัญญาณของคริสตัลไวโอเลตทำให้ค่า EF ในช่วง 83 - 4,096 เท่า ที่ตำแหน่งพีก 729 และ $1,618 \text{ cm}^{-1}$ ตามลำดับ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wei Meng และคณะ [31] ที่ได้ทำการขยายสัญญาณรามานโดยใช้อนุภาคซิลเวอร์นาโนร่วมกับคริสตัลไวโอเลต โดยได้ค่ากำลังขยายสูงที่สุดเท่ากับ 1.8×10^3 เท่า รวมถึงได้ระบุตำแหน่งพีกของคริสตัลไวโอเลตที่มีรูปแบบใกล้เคียงกับงานวิจัยนี้ อย่างไรก็ตามงานวิจัยของ Wei Meng เป็นการทดสอบโดยใช้ซิลเวอร์นาโนคอลลอยด์ (silver colloids) ซึ่งเป็นการตรวจแบบซับสเตรตชนิดเปียก (liquid substrate) เมื่อเปรียบเทียบกับค่ากำลังในการขยายสัญญาณรามานจะพบว่าการตรวจวัดตัวอย่างแบบแห้ง (solid substrate) ที่งานวิจัยนี้ได้ออกแบบขึ้นสามารถ

ให้ค่ากำลังขยายสัญญาณสูงสุดที่ 4,096 เท่า ซึ่งสูงกว่างานวิจัยดังกล่าว ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการวัดตัวอย่างแบบเปียก นั้นพื้นผิวไม่มีความเสถียร กล่าวคือ อนุภาคคอลลอยด์ (colloids) ยังคงมีการเคลื่อนที่อย่างต่อเนื่องและไม่หยุดนิ่ง ทำให้ประสิทธิภาพในการดูดซับ (adsorb) ระหว่างสารตัวอย่างและอนุภาคซิลเวอร์นาโนลดลง ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อการเกิด จุด hot spot ในการขยายสัญญาณรามาน และการเคลื่อนที่อย่างอิสระนี้ไม่สามารถควบคุมรูปแบบการรวมตัวกันของ อนุภาคนาโนได้ รวมถึงระหว่างการทำซ้ำการวัดตัวอย่างอาจเป็นช่วงที่อนุภาคนาโนเกิดการตกตะกอนจึงทำให้ความเข้มข้น ของแต่ละจุดที่ทำการวัดตัวอย่างไม่เท่ากัน ในขณะที่ระหว่างการวัดตัวอย่างแบบแห้งนั้นพื้นผิวมีความเสถียรมากกว่า เนื่องจากอนุภาคไม่มีการเคลื่อนที่และได้ยึดติดบนพื้นผิวซับสเตรต ทำให้สัญญาณที่เกิดขึ้นมีความชัดเจนและสามารถ ขยายสัญญาณได้อย่างมีประสิทธิภาพ [32] โดยตารางเปรียบเทียบค่า enhancement factor (EF) ที่ได้จากการขยาย สัญญาณรามานของคริสตัลไวโอเลต (CV) แสดงในตารางที่ 1



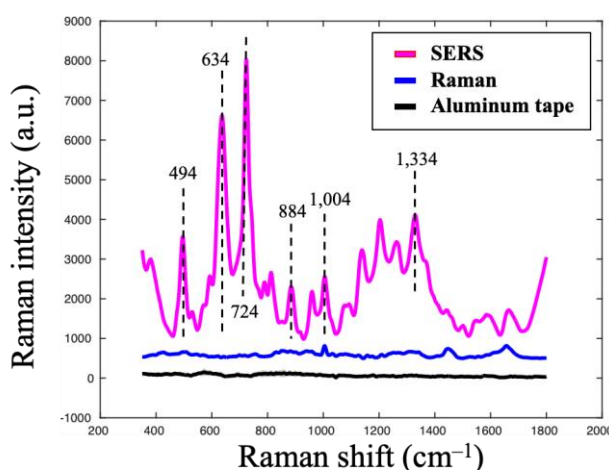
ภาพที่ 4 การเปรียบเทียบการวัดตัวอย่างคริสตัลไวโอเลตระหว่างการใช้เทคนิครามานสเปกโทรสโกปี (Raman) และ เทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามาน (SERS) ด้วยซับสเตรตชนิดเทปอะลูมิเนียมและซิลเวอร์นาโนที่ความเข้มข้น 1.85×10^{-2} โมลาร์ สเปกตรัมแสดงค่าเฉลี่ยจากการวัดทั้งหมด 5 ตำแหน่งบนหลุมหยดสาร โดยมีการปรับค่า ระยะห่าง (offset) ระหว่างเส้นสเปกตรัมเพื่อการแสดงข้อมูลที่ชัดเจน

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบค่า enhancement factor (EF) ที่ได้จากการขยายสัญญาณรามานของคริสตัลไวโอเลต (CV) ณ ตำแหน่งพิกัดต่างๆ

ตำแหน่งพิกัด (cm^{-1})	420	526	729	798	913	1,173	1,618
I_{Raman}	101.94	55.26	89.65	19.65	75.67	234.02	5.12
I_{SERS}	13,607.56	5,255.35	7,410.48	5,484.86	8,071.97	22,399.55	20,975.60
Enhancement factor (EF)	133.48	95.09	82.66	279.15	106.67	95.72	4,096.07

หลังจากการทดลองเปรียบเทียบพื้นผิวชนิด SERS ซับสเตรตและความเข้มข้นของอนุภาคซิลเวอร์นาโน คอลลอยด์แล้วพบว่า SERS ซับสเตรตชนิดเทปอะลูมิเนียมและอนุภาคซิลเวอร์นาโนคอลลอยด์ที่ความเข้มข้น 1.85×10^{-2}

โมลาร์ มีความเหมาะสมสำหรับนำมาตรวจวัดตัวอย่างด้วยเทคนิค SERS จึงได้นำวัสดุดังกล่าวมาใช้ในการทดสอบค่ากำลังขยายของตัวอย่างซีรัมต่อไป ดังแสดงในภาพที่ 5 ซึ่งเป็นการผสมตัวอย่างซีรัมและอนุภาคซิลเวอร์นาโนคอลลอยด์อัตราส่วน 1:1 และทำการหยดตัวอย่างปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นซับสเตรต จากผลการทดลองพบว่าตัวอย่างซีรัมมีกำลังในการขยายสัญญาณในช่วง 4 - 164 เท่า โดยค่าสูงสุดพบที่ตำแหน่งพิก 634 cm^{-1} ซึ่งเป็นพิกของสารชีวโมเลกุลชนิดไทโรซีน (tyrosine) นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการตรวจวัดตัวอย่างด้วยเทคนิครามานสเปกโทรสโกปีแบบดั้งเดิม และเทคนิค SERS ยังสามารถที่จะระบุสารชีวโมเลกุลที่มีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดจนที่ตำแหน่งพิก 494 634 724 884 1,004 และ 1,334 cm^{-1} ซึ่งเป็นของสารชีวโมเลกุลชนิด แอลอูจินีน (l-arginine, พิก 494 cm^{-1}) ไทโรซีน (tyrosine, พิก 634 cm^{-1}) ทริปโตเฟน (tryptophan, พิก 884 cm^{-1}) ฟีนีลอะลานีน (phenylalanine, พิก 1,001 cm^{-1}) และกรดนิวคลีอิก (nucleic acid bases, พิก 1,334 cm^{-1}) โดยตารางแสดงค่ากำลังในการขยายสัญญาณรามาน (EF) รวมถึงองค์ประกอบทางชีวโมเลกุลของซีรัม ณ ตำแหน่งพิกต่างๆแสดงในภาพที่ 5 และตารางที่ 2 ตามลำดับ



ภาพที่ 5 การเปรียบเทียบระหว่างเทคนิครามานสเปกโทรสโกปี (Raman) และเทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามาน

(SERS) ที่ใช้ซับสเตรตเทปอะลูมิเนียมและซิลเวอร์นาโนคอลลอยด์ความเข้มข้น 1.85×10^{-2} โมลาร์ ในการวัดตัวอย่างซีรัม สเปกตรัมแสดงค่าเฉลี่ยจากการวัดทั้งหมด 5 ตำแหน่งบนพื้นผิวซับสเตรต และการแสดงข้อมูลมีการปรับค่าระยะห่าง (offset) ระหว่างเส้นสเปกตรัม เส้นประแสดงถึงการระบุตำแหน่งพิกจำเพาะจากสัญญาณ SERS ของตัวอย่างซีรัม

จากผลการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่างานวิจัยนี้สามารถออกแบบพื้นผิว SERS ซับสเตรตชนิดเทปอะลูมิเนียมร่วมกับอนุภาคซิลเวอร์นาโนได้อย่างมีประสิทธิภาพในการขยายสัญญาณรามาน (EF) ของตัวอย่างซีรัม โดยมีวิธีการเตรียมตัวอย่างที่ไม่ซับซ้อน มีราคาถูก และมีความเหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในพื้นที่ที่มีข้อจำกัดทางด้านทรัพยากร รวมถึงสามารถระบุสารชีวโมเลกุลของตัวอย่างซีรัมได้อย่างถูกต้องและสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเหมาะสมสำหรับนำไปเป็นต้นแบบในการออกแบบและพัฒนาซับสเตรตที่มีต้นทุนต่ำ หาซื้อได้ง่ายตามท้องตลาดและมีความสะดวกรวดเร็วในการเตรียม โดย SERS ซับสเตรตที่ออกแบบขึ้นนี้สามารถใช้งานได้จริง และยังสามารถนำเทคนิคเหล่านี้ไปใช้ในการตรวจคัดกรองโรคได้ในอนาคตรวมถึงสามารถระบุตำแหน่งของสารชีวโมเลกุลที่แตกต่างกันได้อีกด้วย

นอกจากนี้งานวิจัยนี้ได้ทำการเปรียบเทียบผลของค่ากำลังในการขยายสัญญาณรามาน (EF) ที่ได้กับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่เกี่ยวข้องกับการใช้เทคนิคพื้นผิวขยายสัญญาณรามาน (SERS) โดยพบว่าได้มีงานวิจัยที่น่าวัสดุซับสเตรตชนิด

ต่างกัน ยกตัวอย่างเช่น แผนกราฟีน แผ่นซิลิกอนและฟรอยส์อะลูมิเนียมมาใช้เป็นซับสเตรต และมีการใช้งานร่วมกับอนุภาคนาโนในการขยายสัญญาณรามาน ซึ่งได้ทำการสรุปและเปรียบเทียบค่า EF ไว้ดังแสดงในตารางที่ 3 โดยพบว่าการวิจัยดังกล่าวให้ค่า EF อยู่ในช่วง $2-6.2 \times 10^5$ เท่า เมื่อพิจารณาการวิจัยที่ทดสอบโดยใช้ซับสเตรตชนิดเส้นใยนาโน WO_3 ร่วมกับอนุภาคซิลเวอร์นาโนพบว่าให้ค่า EF สูงสุดเท่ากับ 6.2×10^5 ซึ่งถือว่ามีความท้าทายที่ค่อนข้างสูง ทั้งนี้เนื่องจากเป็นวัสดุที่ออกแบบมาโดยเฉพาะให้สามารถรีไซเคิลได้และบริเวณจุดยอดสเปกตรัมมีความหนาแน่นสูง แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยดังกล่าวมีขั้นตอนในการสังเคราะห์วัสดุที่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ราคาสูง รวมถึงมีวิธีการที่ซับซ้อนในการออกแบบซึ่งถือเป็นประเด็นที่ต้องพิจารณาสำหรับการทำวิจัยในพื้นที่ที่มีทรัพยากรจำกัด

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบค่า enhancement factor (EF) ที่ได้จากการขยายสัญญาณรามานของซีรัม ณ ตำแหน่งพิกัดต่างๆ

ตำแหน่งพิกัด(cm^{-1})	494	634	724	884	1,004	1,334
I_{Raman}	33.51	27.33	53.85	57.8	282.08	37.62
I_{SERS}	2,059.03	4,487.19	4,799.30	1,301.6	1,257.52	2,071.15
Enhancement factor (EF)	61.44	164.16	89.12	22.53	4.46	55.06
องค์ประกอบทางชีวโมเลกุล	l-arginine	tyrosine	adenine	tryptophan	Phenylalanine	nucleic acid bases
Vibrational mode	S-S stretching [33]	C-S stretching [34]	C-H stretching [33]	ring bending [35]	C-C stretching [33]	C-H stretching [36]

งานวิจัยนี้ยังได้ทำการประเมินราคาค่าต้นทุนวัสดุซับสเตรตชนิดเทปอะลูมิเนียมต่อ 1 แผ่น (4 หลุมหยดสาร) โดยได้แสดงรายละเอียดของอุปกรณ์ต่างๆไว้ในตารางที่ 4 ซึ่งจากตารางสามารถสรุปได้ว่าราคาค่าต้นทุนวัสดุซับสเตรตชนิดเทปอะลูมิเนียมร่วมกับอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ได้ออกแบบขึ้นนั้นมีราคารวมเท่ากับ 36.1 บาทต่อแผ่น หากคิดราคาต่อหลุมจะพบว่ามีราคาเท่ากับ 9.03 บาทต่อหลุมหยดสารซึ่งถือว่าออกแบบได้ง่าย สามารถนำมาใช้งานได้จริงและมีต้นทุนต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับราคาของวัสดุซับสเตรตชนิดอื่นๆในท้องตลาดซึ่งมีราคาโดยประมาณเท่ากับ 700-2,830 บาท [37] ยกตัวอย่างเช่น แผ่นเคลือบอนุภาคโกลด์นาโน 1,836.79 บาท [30] ซึ่งถือว่ามีความท้าทายที่ค่อนข้างสูง จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ที่มีความจำเพาะและมีขั้นตอนในการผลิตที่ซับซ้อน

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบค่า enhancement factor (EF) ของเทคนิค SERS

งานวิจัย	วัสดุที่ใช้ทำ ชั้นสเตรต	ชนิดของ วัสดุ	อนุภาค นาโน	สารที่ตรวจวัด	ค่า EF	อ้างอิง
SERS and DFT study of crystal violet	-	ของเหลว	ซิลเวอร์ นาโน	คริสตัลไวโอเลต (CV)	1.8×10^3 เท่า	[38]
Can Graphene be used as a Substrate for Raman Enhancement?	แผ่นกราฟีน	ของแข็ง	-	ทาโลไซยานีน (Pc) โรดามีน 6G (R6G) โปรโตพอร์ฟิริน IX (PPP) และ CV	2-17 เท่า	[39]
Preparation of SERS substrates for the detection of organic molecules at low concentration	แผ่นซิลิกอน	ของแข็ง	ซิลเวอร์ นาโน	Triphenylmethan e Dye (Malachite Green (MG)	20 เท่า	[40]
Commercial Gold Nanoparticles on Untreated Aluminum Foil: Versatile, Sensitive, and Cost-Effective SERS Substrate	ฟรอยส์ อะลูมิเนียม	ของแข็ง	โกลด์นา โน	โพแทสเซียมไนเตรด	2×10^3 เท่า	[13]
Surface-enhanced Raman scattering activities and recyclability of Ag-incorporated WO ₃ nanofiber-based substrates	เส้นใยนาโน WO ₃ /Ag	ของแข็ง	ซิลเวอร์ นาโน	เมทิลีนบลู	6.2×10^5 เท่า	[41]
งานวิจัยนี้	เทป อะลูมิเนียม	ของแข็ง	ซิลเวอร์ นาโน	คริสตัลไวโอเลต	4,096 เท่า	-

ตารางที่ 4 ราคาต้นทุนวัสดุขั้นเตรตชนิดเทปอะลูมิเนียมร่วมกับอนุภาคซิลเวอร์นาโนต่อ 1 แผ่น (4 หลุมหยดสาร)

ชนิดวัสดุ	ราคา (บาท)
กั้นเข็มขนาด 0.58 มิลลิเมตร	0.06
แผ่น glass slide 25.4 x 76.2 มิลลิเมตร	5.41
เทปอะลูมิเนียม ขนาดเท่ากับแผ่น glass slide	4.11
อนุภาคซิลเวอร์นาโน	26.52
ราคาขั้นเตรตชนิดเทปอะลูมิเนียม	36.1

สำหรับงานวิจัยนี้มีข้อจำกัดในส่วนของการหาค่าเฉลี่ย (deposit) สารผสมระหว่างอนุภาคซิลเวอร์นาโน (AgNPs) และตัวอย่างซีรัมลงบนแผ่นขั้นเตรต ซึ่งวิธีการนี้อาจทำให้อนุภาคซิลเวอร์นาโนเกิดการกระจายตัวอย่างไม่สม่ำเสมอ ทำให้เกิดความแปรปรวน (variability) ในแต่ละจุดบนแผ่นขั้นเตรตและค่าความเข้ม (intensity) ของสัญญาณที่วัดได้นั้นไม่เท่ากัน แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ได้ทำการวัดค่าหลายจุดบนพื้นผิวขั้นเตรตเพื่อหาค่าเฉลี่ยในการขยายสัญญาณรามานของตัวอย่างซีรัมในขณะเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการปรับปรุงพื้นผิว (surface treatment) ของขั้นเตรตด้วยวิธีการทางไฟฟ้าเคมี (electrochemical, EC) ซึ่งมีข้อดีคือ สามารถทำให้อนุภาคซิลเวอร์นาโนมีความสม่ำเสมอและจุด hot spot มีการจัดเรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบ ส่งผลให้มีประสิทธิภาพในการขยายสัญญาณรามานมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวอาจมีค่าใช้จ่ายสูงและจำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ที่ซับซ้อน นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังมีข้อจำกัดในขั้นตอนการหาค่าเฉลี่ยลงบนแผ่นขั้นเตรตแล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง โดยขั้นตอนการเตรียมขั้นเตรตดังกล่าวนี้ไม่สามารถเตรียมไว้ล่วงหน้าเป็นเวลานานได้ เนื่องจากอนุภาคซิลเวอร์นาโนเมื่อได้รับรังสี UV เป็นเวลานานจะทำให้เกิดการออกซิเดชันและปล่อยประจุ Ag^+ ออกมา ส่งผลให้เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของ AgNPs เพิ่มขึ้น รวมถึงอุณหภูมิหรือสภาพแวดล้อมภายนอกยังมีผลทำให้อนุภาคซิลเวอร์นาโนเกิดการเกาะกลุ่มกันทำให้มีขนาดใหญ่ขึ้น [42,43] ซึ่งการที่อนุภาคเกาะกลุ่มกันเป็นก้อนและมีขนาดใหญ่ขึ้นนี้จะทำให้ไม่สามารถเกิดช่องว่างระหว่างโมเลกุลในการเกิดจุด hot spot ได้ เป็นผลให้การขยายสัญญาณรามานลดลง

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ทำการออกแบบและพัฒนาพื้นผิวขั้นเตรตต้นทุนต่ำ เตรียมได้อย่างรวดเร็วในขั้นตอนที่ง่ายและสะดวก โดยไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ในการผลิตที่มีราคาสูง สำหรับตรวจตัวอย่างซีรัมด้วยเทคนิค SERS โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการขยายสัญญาณรามานของวัสดุทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ แผ่นกระดาษกรอง แผ่นบลูเรย์ หมึกกราฟีนและเทปอะลูมิเนียม ร่วมกับการหาความเข้มข้นของอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่เหมาะสมแตกต่างกัน 4 ค่า ได้แก่ 1.85×10^{-3} 9.27×10^{-3} 1.85×10^{-2} และ 3.71×10^{-2} ไมลาร์ จากการทดลองพบว่าเทปอะลูมิเนียมมีความเหมาะสมที่สุดสำหรับการนำมาผลิตเป็น SERS ขั้นเตรต เนื่องจากให้ค่ากำลังในการขยายสัญญาณรามานที่สูงที่สุด สามารถขยายสัญญาณรามานของตัวอย่างซีรัมซึ่งเป็นรูปแบบที่ถูกต้องและสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ รวมถึงสัญญาณเฉพาะตัวของวัสดุชนิดเทปอะลูมิเนียมไม่เกิดการบดบังสัญญาณของสารชีวโมเลกุลในตัวอย่างซีรัม นอกจากนี้ยังพบว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโนคอลลอยด์ที่มีความเข้มข้น 1.85×10^{-2} ไมลาร์ มีความเหมาะสมสำหรับนำมาวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิค SERS มากที่สุด เนื่องจากมีลักษณะการขยายสัญญาณที่เด่นชัดร่วมกับการพิจารณาในส่วนของการค่าใช้จ่ายและปริมาณในการนำสารละลายมาใช้ในการตรวจตัวอย่าง โดยพบว่าค่ากำลังการขยายสัญญาณของ

คริสตัลไวโอเล็ตให้ค่า EF ในช่วง 83 (พีค 729 cm^{-1}) - $4,096$ (พีค $1,618\text{ cm}^{-1}$) เท่า สำหรับการตรวจวิเคราะห์ด้วยตัวอย่างซีรัมนั้นพบว่าค่า EF จะอยู่ในช่วง $5.34 - 244$ เท่า โดยสูงสุดเท่ากับ 244 เท่า ที่ตำแหน่งพีค 634 cm^{-1}

นอกจากนี้การใช้ SERS ขับสเตรตชนิดดังกล่าวยังสามารถตรวจพบสารชีวโมเลกุลที่วัดได้จากตัวอย่างซีรัม ได้แก่ แอลอานีน (l-arginine, พีค 494 cm^{-1}) ไทโรซีน (tyrosine, พีค 634 cm^{-1}) อะดีนีน (adenine, พีค 724 cm^{-1}) ทริปโตเฟน (tryptophan, พีค 884 cm^{-1}) ฟีนิลอะลานีน (phenylalanine, พีค $1,004\text{ cm}^{-1}$) กรดนิวคลีอิก (nucleic acid bases, พีค $1,334\text{ cm}^{-1}$) ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากงานวิจัยนี้ได้ออกแบบวัสดุขับสเตรตที่มีวิธีการไม่ซับซ้อนโดยใช้วิธีการหยดสารลงบนพื้นผิวเพปอะลูมิเนียม จึงมีข้อจำกัดในส่วนของการกระจายตัวและเรียงตัวของจุด hot spot ที่ไม่สม่ำเสมอ ดังนั้นจึงใช้วิธีการวัดซ้ำหลายจุดบนพื้นผิวขับสเตรตเพื่อหาค่าเฉลี่ยของสัญญาณตัวอย่างซีรัม อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ทำให้สามารถออกแบบและพัฒนาขับสเตรตที่มีราคาถูกและมีกระบวนการผลิตไม่ซับซ้อน ซึ่งมีราคาเท่ากับ 36.1 บาท โดย SERS ขับสเตรตที่พัฒนาขึ้นนี้ยังสามารถขยายสัญญาณรามาได้สำเร็จ มีความเหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการตรวจวัดตัวอย่างซีรัมและตรวจวิเคราะห์โรคชนิดอื่นจากเทคนิค SERS รวมถึงวิธีการดังกล่าวนี้ยังเหมาะสมสำหรับนำไปใช้กับพื้นที่ที่มีข้อจำกัดทางด้านทรัพยากรในการผลิต SERS ขับสเตรตที่มีต้นทุนสูงได้อีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเข้าใช้เครื่อง Horiba XploRA PLUS confocal Raman microscope สำหรับเก็บข้อมูลในการศึกษาวิจัย งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากงบประมาณสนับสนุนงานมูลฐาน (Fundamental Fund) ของมหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2567 ผ่านกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (ววน.)

เอกสารอ้างอิง

1. Dawuti W, Zheng X, Liu H, Zhao H, Dou J, Sun L, et al. Urine surface-enhanced Raman spectroscopy combined with SVM algorithm for rapid diagnosis of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2022; 38: 102811.
2. Lu Y, Lin Y, Zheng Z, Tang X, Lin J, Liu X, et al. Label free hepatitis B detection based on serum derivative surface enhanced Raman spectroscopy combined with multivariate analysis. Biomed Opt Express. 2018; 9(10): 4755-4766.
3. Ling X, Xie L, Fang Y, Xu H, Zhang H, Kong J, et al. Can graphene be used as a substrate for Raman enhancement?. Nano Lett. 2010; 10(2): 553-561.
4. Pilot R, Signorini R, Durante C, Orian L, Bhamidipati M, Fabris L. A review on surface-enhanced Raman scattering. 2019; 9(2): 57.
5. Radu AI, Ussembayev YY, Jahn M, Schubert US, Weber K, Cialla-May D, et al. HD DVD substrates for surface enhanced Raman spectroscopy analysis: Fabrication, theoretical predictions and practical performance. RSC Adv. 2016; 6(50): 44163-44169.
6. Sanguansap Y, Kam-orachai K, Laocharoensuk R. Tailor-made porous striped gold-silver nanowires for surface enhanced Raman scattering based trace detection of β -hydroxybutyric acid. Appl Surf Sci. 2020; 500: 144049.

7. Ngamaroonchote A, Karn-Orachai K. Bimetallic Au-Ag on a Patterned Substrate Derived from Discarded Blu-ray Discs: Simple, Inexpensive, Stable, and Reproducible Surface-Enhanced Raman Scattering Substrates. *Langmuir*. 2021; 37(24): 7392–7404.
8. Dong J, Cao Y, Han Q, Wang Y, Qi M, Zhang W, et al. Plasmon-exciton coupling for nanophotonic sensing on chip. *Opt Express*. 2020; 28(14): 20817.
9. Chamuah N, Saikia A, Joseph AM, Nath P. Blu-ray DVD as SERS substrate for reliable detection of albumin, creatinine and urea in urine. *Sens Actuators B Chem*. 2019; 285: 108–115.
10. Mu Y, Zhang X. A Paper-Fiber-Supported 3D SERS Substrate. *Plasmonics*. 2020; 15(3): 889–896.
11. Zhang L, Liu J, Zhou G, Zhang Z. Controllable in-situ growth of silver nanoparticles on filter paper for flexible and highly sensitive sers sensors for malachite green residue detection. *Nanomaterials*. 2020; 10(5): 826.
12. Song H, Li X, Yoo S, Wu Y, Liu W, Wang X, et al. Highly sensitive surface enhanced raman spectroscopy from Ag nanoparticles decorated graphene sheet. *J Nanomater*. 2014: 164.
13. Gudun K, Elemessova Z, Khamkhash L, Ralchenko E, Bukasov R. Commercial Gold Nanoparticles on Untreated Aluminum Foil: Versatile, Sensitive, and Cost-Effective SERS Substrate. *J Nanomater*. 2017.
14. Lu Y, Lin Y, Zheng Z, Tang X, Lin J, Liu X, et al. Label free hepatitis B detection based on serum derivative surface enhanced Raman spectroscopy combined with multivariate analysis. *Biomed Opt Express*. 2018; 9(10): 4755.
15. Jenkins CA, Jenkins RA, Pryse MM, Welsby KA, Jitsumura M, Thornton CA, et al. A high-throughput serum Raman spectroscopy platform and methodology for colorectal cancer diagnostics. *Analyst*. 2018; 143(24): 6014–24.
16. Li S, Li L, Zeng Q, Zhang Y, Guo Z, Liu Z, et al. Characterization and noninvasive diagnosis of bladder cancer with serum surface enhanced Raman spectroscopy and genetic algorithms. *Scientific Reports*. 2015; 5(1): 1–7.
17. Vargas-Obieta E, Martínez-Espinosa JC, Martínez-Zerega BE, Jave-Suárez LF, Aguilar-Lemarroy A, González-Solís JL. Breast cancer detection based on serum sample surface enhanced Raman spectroscopy. *Lasers Med Sci*. 2016; 31(7): 1317–1324.
18. Suksuratin P, Rodpai R, Luvira V, Intapan PM, Maleewong W, Chuchuen O. Rapid label-free detection of cholangiocarcinoma from human serum using Raman spectroscopy. *PLoS One*. 2022; 17(10): e0275362.
19. Lin D, Feng S, Huang H, Chen W, Shi H, Liu N, et al. Label-free detection of blood plasma using silver nanoparticle based surface-enhanced Raman spectroscopy for esophageal cancer screening. *J Biomed Nanotechnol*. 2014; 10(3): 478–484.
20. Badr Y, Mahmoud MA. Effect of silver nanowires on the surface-enhanced Raman spectra (SERS) of the RNA bases. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2006; 63(3): 639–645.

21. Colas FJ, Cottat M, Gillibert R, Guillot N, Djaker N, Lidgi-Guigui N, et al. Red-Shift Effects in Surface Enhanced Raman Spectroscopy: Spectral or Intensity Dependence of the Near-Field? *Journal of Physical Chemistry C*. 2016; 120(25): 13675–13683.
22. Agarwal UP. Analysis of cellulose and lignocellulose materials by raman spectroscopy: A review of the current status. *Molecules*. 2019; 24(9): 1659.
23. Ross MB, Ashley MJ, Schmucker AL, Singamaneni S, Naik RR, Schatz GC, et al. Structure-Function Relationships for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy-Active Plasmonic Paper. *Journal of Physical Chemistry C*. 2016; 120(37): 20789–20797.
24. Ngo YH, Li D, Simon GP, Garnier G. Effect of cationic polyacrylamides on the aggregation and SERS performance of gold nanoparticles-treated paper. *J Colloid Interface Sci*. 2013; 392(1): 237–246.
25. Chang J, Zhi X, Zhang A. Application of Graphene in Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Nano Biomed Eng*. 2017; 9(1): 49–56.
26. Mutalib TNABTA, Tan SJ, Foo KL, Liew YM, Heah CY, Abdullah MMAB. Properties of polyaniline/graphene oxide (PANI/GO) composites: effect of GO loading. *Polymer Bulletin*. 2021; 78(9): 4835–4847.
27. Garg P, Bharti, Soni RK, Raman R. Graphene oxide–silver nanocomposite SERS substrate for sensitive detection of nitro explosives. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*. 2020; 31(2): 1094–1104.
28. Zimmerer C, Matulaitiene I, Niaura G, Reuter U, Janke A, Boldt R, et al. Nondestructive characterization of the polycarbonate - octadecylamine interface by surface enhanced Raman spectroscopy. *Polym Test*. 2019; 73: 152–158.
29. Betz JF, Yu WW, Cheng Y, White IM, Rubloff GW. Simple SERS substrates: powerful, portable, and full of potential. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2014; 16(6): 2224–2239.
30. Cui L, Butler HJ, Martin-Hirsch PL, Martin FL. Aluminium foil as a potential substrate for ATR-FTIR, transfection FTIR or Raman spectrochemical analysis of biological specimens. *Analytical Methods*. 2016; 8(3): 481–487.
31. Meng W, Hu F, Zhang LY, Jiang XH, Lu L De, Wang X. SERS and DFT study of crystal violet. *J Mol Struct*. 2013; 1035: 326–331.
32. Dao TC, Luong TQN, Cao TA, Nguyen NH, Kieu NM, Luong TT, et al. Trace detection of herbicides by SERS technique, using SERS-active substrates fabricated from different silver nanostructures deposited on silicon. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*. 2015; 6(3): 035012.
33. Electrochemically deposited silver detection substrate for surface-enhanced Raman spectroscopy cancer diagnostics. *J Biomed Opt*. 2018; 23(07): 1.
34. He X, Ge C, Zheng X, Tang B, Chen L, Li S, et al. Rapid identification of alpha-fetoprotein in serum by a microfluidic SERS chip integrated with Ag/Au Nanocomposites. *Sens Actuators B Chem*. 2020; 317: 128196.



35. Akbar S, Majeed MI, Nawaz H, Rashid N, Tariq A, Hameed W, et al. Surface-Enhanced Raman Spectroscopic (SERS) Characterization of Low Molecular Weight Fraction of the Serum of Breast Cancer Patients with Principal Component Analysis (PCA) and Partial Least Square-Discriminant Analysis (PLS-DA). *Analytical Letters*. 2021; 55(10): 1588–15604.
36. Israelsen ND, Hanson C, Vargis E. Nanoparticle properties and synthesis effects on surface-enhanced Raman scattering enhancement factor: An introduction. *Scientific World Journal*. 2015.
37. Aleknavičienė I, Pabrėža E, Talaikis M, Jankunec M, Račiukaitis G. Low-cost SERS substrate featuring laser-ablated amorphous nanostructure. *Appl Surf Sci*. 2022; 571: 151248.
38. Meng W, Hu F, Zhang LY, Jiang XH, Lu L De, Wang X. SERS and DFT study of crystal violet. *J Mol Struct*. 2013; 1035: 326–331.
39. Ling X, Xie L, Fang Y, Xu H, Zhang H, Kong J, et al. Can graphene be used as a substrate for Raman enhancement?. *Nano Lett*. 2010; 10(2): 553–561.
40. Thi Kim Chi T, Thi N LE, Thi Thu Hien B, Quoc Trung D, Quang Liem N. PREPARATION OF SERS SUBSTRATES FOR THE DETECTION OF ORGANIC MOLECULES AT LOW CONCENTRATION. *Communications in Physics*. 2016; 26(3): 261–268.
41. Juntaracena K, Yuangkaew T, Horprathum M, Triroj N, Jaroenapibal P. Surface-enhanced Raman scattering activities and recyclability of Ag-incorporated WO₃ nanofiber-based substrates. *Vib Spectrosc*. 2021; 115: 103276.
42. Mittelman AM, Fortner JD, Pennell KD. Effects of ultraviolet light on silver nanoparticle mobility and dissolution. *Environ Sci Nano*. 2015; 2(6): 683–691.
43. Walters C, Pool E, Somerset V. Aggregation and dissolution of silver nanoparticles in a laboratory-based freshwater microcosm under simulated environmental conditions. *Toxicol Environ Chem*. 2013; 95(10): 1690–1701.