วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 26 (ฉบับที่ 2) พฤษภาคม – สิงหาคม พ.ศ. 2564
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 26 (No.2) May – August 2021 บทความวิจัย

การสังเคราะห์วัสดุเรืองแสงคาร์บอนดอทโดยวิธีการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟและการประยุกต์ใช้ทางด้านการติดฉลากทางชีวภาพ

Preparation of Fluorescent Carbon Dots Using Microwave-Assisted Pyrolysis and Its Application in Biolabeling

ชุตินธร โสมนิล[1], กัลยา ประไพนพ[2], ประพิณ วิไลรัตน์[3], ดวงใจ นาคะปริชา[1] และ พูนทวี แซ่เตีย[1*]

Chutintorn Somnin[1], Kanlaya Prapainop[2], Prapin Wilairat[3],

Duangjai Nacapricha[1] and Phoonthawee Saetear[1*]

[1]ภาควิชาเคมีและศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

[2]ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

[3] ศูนย์ตรวจสอบสารต้องห้ามในนักกีฬา มหาวิทยาลัยมหิดล

[1]Department of Chemistry and the Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University,

[2]Department of Biochemistry Faculty of Science, Mahidol University

[3] National Doping Control Centre, Mahidol University

Received : 26 June 2020

Revised : 23 August 2020

Accepted : 13 October 2020

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้สังเคราะห์วัสดุเรืองแสงชนิดคาร์บอนดอท (carbon dots) จากกรดซิตริกและยูเรีย ด้วยวิธีการที่ง่ายและรวดเร็ว นั่นคือ วิธีให้ความร้อนในการเผาไหม้ด้วยไมโครเวฟ (microwave-assisted pyrolysis) ซึ่งเวลาในการให้ความร้อนจากไมโครเวฟจะมีผลต่อสีของแสงฟลูออเรสเซนต์ที่คาร์บอนดอทปล่อยออกมา และพบว่าเมื่อให้ความร้อนเป็นเวลา 5 นาที คาร์บอนดอทจะให้แสงฟลูออเรสเซนต์สีฟ้าที่สว่างที่สุด ได้มีการพิสูจน์เอกลักษณ์ของคาร์บอนดอทจากเทคนิคการดูดกลืนแสงยูวี-วิสิเบิล (UV-Vis), สเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนต์, สเปกตรัมฟูเรียร์ทรานสฟอร์ม-อินฟราเรด (FTIR) และภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) คาร์บอนดอทที่สังเคราะห์ได้มีขนาดเล็กกว่า 5 นาโนเมตร และมีคุณสมบัติเชิงแสงที่ดี จึงได้นำไปประยุกต์ใช้ทางด้านการติดฉลากทางชีวภาพ (biolabeling) โดยการเชื่อมติด (binding) กับแอนติบอดีชนิด 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) โดยใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมขวาง ซึ่งงานวิจัยนี้อาจจะสามารถพัฒนาเป็นส่วนหนึ่งที่สามารถประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์และหาปริมาณของสารบ่งชี้ทางชีวภาพที่บ่งบอกถึงการมีภาวะความไม่สมดุลของการเกิดอนุมูลอิสระ (oxidative stress) ในร่างกายมนุษย์ได้ในอนาคต

คำสำคัญ : คาร์บอนดอท ; ฟลูออเรสเซนต์ ; วิธีให้ความร้อนในการเผาไหม้ด้วยไมโครเวฟ ; แอนติบอดี ; 8-OHdG

Abstract

In this work, we synthesized fluorescent carbon dots (CDs) from citric acid and urea using an easy and rapid method so called "microwave-assisted pyrolysis". The synthesized CDs under the difference in microwave heating time provided different colors of fluorescent light. Under UV illumination, it was observed that the maximum intensity of blue fluorescence was carried out from microwave heating process at 5 min. Characterization of CDs was analyzed by UV-Vis absorption, fluorescent spectra, fourier-transform infrared (FTIR) and transmission electron microscope (TEM). The synthesized CDs were less than 5 nm in size and good in optical properties. Moreover, we investigated the use of CDs in biolabeling application by linking CDs with 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) antibody using glutaraldehyde as molecular cross linker. This work can be applied to analysis and quantification of 8-OHdG, which is a biological marker indicating of oxidative stress in human body.

Keywords : carbon dots (CDs) ; fluorescence ; microwave-assisted pyrolysis method ; antibody ; 8-OHdG

***Corresponding author. E-mail** : phoonthawee.sae@mahidol.edu

บทนำ

ในปัจจุบันเทคโนโลยีทางด้านนาโน (nanotechnology) ถูกพัฒนาและได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะด้านวัสดุนาโน (nanomaterials) หลายชนิดได้ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาให้มีคุณสมบัติในการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ เช่น โลหะนาโนคลัสเตอร์ (metal nanoclusters, NCs) และควอนตัมดอท (quantum dots, QDs) (Miao *et al*., 2016) อย่างไรก็ตาม วัสดุเหล่านี้มีความเป็นพิษสูงทั้งต่อตัวผู้สังเคราะห์และสิ่งแวดล้อม เช่น โคบอลต์ (Co) ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์โลหะนาโนคลัสเตอร์ (Shi *et al*., 2020) และ แคดเมียม (Cd) ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ควอนตัมดอท (Dong *et al*.,2015) เป็นต้น

ในปี 2004 Xu และคณะ (Xu *et al*.,2004) ได้เสนอวัสดุเรืองแสงอีกชนิดหนึ่ง ที่ไม่มีความเป็นพิษ โดยเรียกวัสดุนี้ว่า “คาร์บอนดอท (carbon dots; CDs)” คาร์บอนดอทเป็นอนุภาคนาโนที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 10 นาโนเมตร (Li *et al*., 2019) สามารถเปล่งแสงฟลูออเรสเซนต์ และมีคุณสมบัติเชิงแสงที่ดีและเป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัว อาทิ เช่น ความเสถียรเชิงแสงสูง (photostability) ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) และการปราศจากความเป็นพิษ (non-toxicity) ในแง่ของราคาและต้นทุนการผลิต วัสดุคาร์บอนดอทจะมีราคาที่ถูกกว่าเมื่อเทียบกับวัสดุเรืองแสงชนิดอื่น ๆ เช่น Au-NCs และ CdSe-QDs (Liu *et al*., 2019) สำหรับการประยุกต์วัสดุคาร์บอนดอทในงานวิจัยมีหลายด้าน เช่น การพัฒนาเซนเซอร์ (sensor) การพัฒนาอุปกรณ์เปล่งแสง (light-emitting device) การพัฒนาตัวเร่งเชิงแสง (photocatalysis) รวมไปถึงการประยุกต์ทางด้านชีวภาพ เช่น ระบบนำส่งยาในสิ่งมีชีวิต (drug delivery system) การถ่ายภาพทางชีวภาพ (bioimaging) และ การติดฉลากทางชีวภาพ (biolabeling) เป็นต้น (Liu *et al*., 2017)

การสังเคราะห์คาร์บอนดอทสามารถทำได้ 2 แนวทางคือ (1) แบบ top-down และ (2) แบบ bottom-up สำหรับการสังเคราะห์แบบ top-down เป็นวิธีการสังเคราะห์อนุภาคนาโนจากสารประกอบจำพวกคาร์บอนที่ขนาดใหญ่ อาศัยวิธีต่าง ๆ เช่น laser ablation (Reyes *et al*., 2016), arc discharge (Xu *et al*., 2004) และ oxidative acid treatment (Li *et al*., 2016) เพื่อให้เป็นอนุภาคระดับนาโนของคาร์บอนดอท อย่างไรก็ตาม วิธีดังกล่าวเหล่านี้ ค่อนข้างทำได้ยากและใช้เวลานานในการสังเคราะห์ ด้วยเหตุนี้ การสังเคราะห์แบบ bottom-up จึงเป็นอีกทางเลือกและเป็นที่นิยมในการสังเคราะห์วัสดุคาร์บอนดอท โดยการสังเคราะห์แบบ bottom-up นี้ เป็นวิธีการสังเคราะห์คาร์บอนดอทจากสารตั้งต้นที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น กรดซิตริก ยูเรีย เอทิลีนไดแอมมีน หรือกลูโคส โดยอาศัยวิธีการต่าง ๆ เช่น การใช้อุณหภูมิและแรงดันสูง (hydrothermal process) (Xiao *et al*., 2018) การให้ความร้อนในการเผาไหม้ด้วยไมโครเวฟ (microwave-assisted pyrolysis) (Deng *et al*., 2016; Ma *et al*., 2017) การสั่นด้วยคลื่นความถี่สูง (ultrasonification) (Li *et al*., 2011) วิธีทางไฟฟ้าเคมี (electrochemical synthesis) (Wang *et al*., 2014) และ การเผาไหม้ด้วยความร้อน (thermal pyrolysis) (Qu *et al*., 2016)

ในงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะสังเคราะห์วัสดุคาร์บอนดอทโดยวิธีการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ (microwave-assisted pyrolysis) เพราะเป็นวิธีการที่ทำได้ง่าย รวดเร็วและใช้สารตั้งต้นปริมาณน้อย วัสดุคาร์บอนดอทที่สังเคราะห์ได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้ทางด้านการติดฉลากทางชีวภาพ กล่าวคือ ทำการเชื่อมติด (binding) กับแอนติบอดี (antibody) ของ 8-hydroxy-2’-deoxyguanosine (8-OHdG) โดยใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมขวาง (cross-linker) 8-OHdG เป็นสารบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) ที่สามารถบ่งบอกถึงการมีภาวะเครียดที่เกิดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) หรือภาวะความไม่สมดุลของการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกายมนุษย์ ซึ่งจะส่งผลทำให้เกิดโรคร้ายต่าง ๆ เช่น ความผิดปกติทางระบบประสาทหรือมะเร็งได้ นอกจากนี้ ผู้วิจัยยังได้ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของคาร์บอนดอทที่

สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิควิเคราะห์เชิงแสงต่าง ๆ รวมถึงการตรวจสอบเพื่อยืนยันการเชื่อมติดกันของคาร์บอนดอทและ 8-OHdG แอนติบอดีอีกด้วย

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นเกรดสำหรับวิเคราะห์ (analytical grade) กรดซิตริกมอนอไฮเดรต ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) จากบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี ยูเรีย ($CO(NH_2)_2$) จากบริษัท Ajax finechem ประเทศออสเตรเลีย สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ($OHC(CH_2)_3CHO$) จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสิงคโปร์ น้ำอัลตร้าเพียว (18 MΩ cm) จากเครื่อง Milli-Q system ยี่ห้อ Millipore ประเทศเยอรมนี ใช้สำหรับการเตรียมสารละลายทุกชนิด และ 8-OHdG แอนติบอดี (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine antibody) ความเข้มข้น 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากบริษัท Abcam ประเทศอังกฤษ สารละลาย 8-OHdG แอนติบอดี ถูกเตรียมให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ ในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (phosphate buffer saline) pH 7.4 จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศอังกฤษ

2. การสังเคราะห์วัสดุเรืองแสงคาร์บอนดอท

คาร์บอนดอทสังเคราะห์จากกรดซิตริกและยูเรีย โดยวิธีการให้ความร้อนในการเผาไหม้ด้วยไมโครเวฟ ซึ่งได้ปรับปรุงวิธีมาจากงานวิจัยก่อนหน้า (Ma *et al.*, 2017) กล่าวคือ ทำการละลายกรดซิตริกมอนอไฮเดรต 0.03 กรัม และยูเรีย 0.03 กรัม ในน้ำอัลตร้าเพียว 10.00 มิลลิลิตร แล้วให้ความร้อนด้วยเครื่องไมโครเวฟที่กำลัง 750 วัตต์ เป็นเวลา 5 นาที จากสารละลายใสไม่มีสีจะเปลี่ยนเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลซึ่งบ่งบอกได้ว่าเกิดคาร์บอนดอทแล้ว จากนั้นรอให้ของเหลวหนืดดังกล่าวเย็นตัวลงจนถึงอุณหภูมิห้อง แล้วทำการละลายด้วยน้ำอัลตร้าเพียว 10.00 มิลลิลิตร ในขั้นนี้จะได้สารละลายใสสีเหลืองของคาร์บอนดอทที่มีความเข้มข้น 6.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของคาร์บอนดอท

เทคนิคและเครื่องมือต่อไปนี้ ถูกใช้เพื่อการพิสูจน์เอกลักษณ์ของคาร์บอนดอทที่สังเคราะห์ขึ้น

3.1 ยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis spectrophotometer) ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น Lambda 25 สำหรับการวัดการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 300 – 650 นาโนเมตร โดยใช้ cuvette cell ที่มีความกว้าง 1 เซนติเมตร

3.2 ฟลูออเรสเซนต์ สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (fluorescence spectrophotometer) ยี่ห้อ Horiba รุ่น Fluoromax-4 สำหรับการวัดการเรืองแสงของคาร์บอนดอท โดยใช้ cuvette cell ที่มีความกว้าง 1 เซนติเมตร กำหนดค่าความกว้างของช่องแสงตกกระทบ (excitation slit width) และความกว้างของช่องแสงที่ต้องการวัด (emission slit width) เท่ากับ 3 และ 2 นาโนเมตร ตามลำดับ

3.3 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope, TEM) ยี่ห้อ JEOL รุ่น JEM-2100Plus โดยมีแรงดันเร่ง (acceleration voltage) 200 กิโลโวลต์ สำหรับการวัดขนาดของคาร์บอนดอท และใช้กริดทองแดง (copper grid) ในการเตรียมตัวอย่างก่อนการถ่ายภาพ

3.4 ฟูเรียร์ทรานสฟอร์ม-อินฟราเรด สเปกโทรมิเตอร์ (fourier-transform infrared spectrometer, FTIR) ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น Frontier สำหรับตรวจสอบพีคเอกลักษณ์ของคาร์บอนดอท โดยทำการวัดด้วยวิธี Attenuated Total Reflectance (ATR) สำหรับของเหลวหนืดของคาร์บอนดอท (หัวข้อ 2 ในหัวข้อวิธีดำเนินการวิจัย) เทียบกับสารตั้งต้น

กรดซิตริกและยูเรีย การเตรียมตัวอย่างวิเคราะห์ ใช้วิธีอัดสารตัวอย่างเป็นแผ่น (disc) โดยผสมสารตัวอย่างกับโพแทสเซียมโบรไมด์ (KBr) แล้วนำไปวิเคราะห์ในช่วงเลขคลื่น 4000 - 400 cm^{-1}

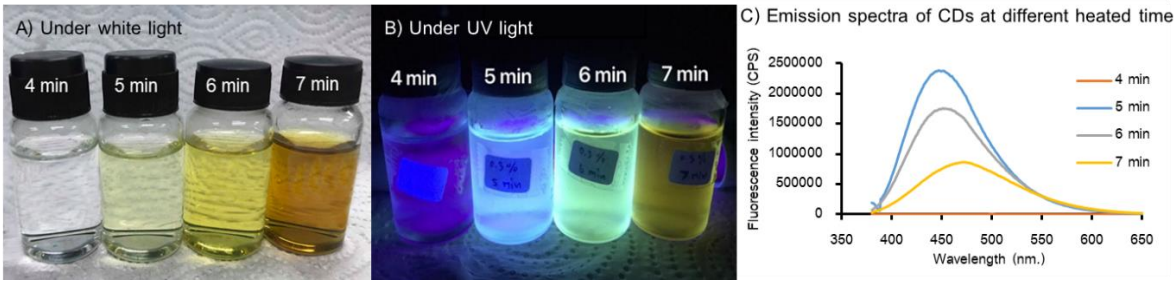
4. การประยุกต์วัสดุคาร์บอนดอทในงานด้านการติดฉลากทางชีวภาพ

ผู้วิจัยได้นำคาร์บอนดอทที่สังเคราะห์ขึ้น ใช้เป็นวัสดุเรืองแสงสำหรับใช้ในทางด้านการติดฉลากทางชีวภาพ ซึ่งถูกเชื่อมติดกับ 8-OHdG แอนติบอดี โดยใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมขวาง ทำการเชื่อมติดโดยการหยดสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 2.5% โดยน้ำหนัก ปริมาตร 2.00 มิลลิลิตร ลงในสารละลายคาร์บอนดอทความเข้มข้น 0.60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (จากหัวข้อ 2 ในหัวข้อวิธีดำเนินการวิจัย) ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร คนต่อเนื่องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นค่อย ๆ หยดสารละลาย 8-OHdG แอนติบอดีที่มีความเข้มข้น 0.50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟส pH 7.4 และทำการคนต่ออีก 1 ชั่วโมง แล้วกรองด้วย syringe filter ชนิดไนลอน ขนาด 0.22 ไมโครเมตร และเก็บไว้ที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนใช้ต่อไป

ผลการวิจัย

1. การศึกษาเวลาในการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟสำหรับการสังเคราะห์คาร์บอนดอท

จากการสังเคราะห์คาร์บอนดอทที่ได้กล่าวในหัวข้อ 2 : วิธีดำเนินการวิจัย ผู้วิจัยได้ศึกษาอิทธิพลของเวลาในการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ (กำลัง 750 วัตต์) เป็นเวลา 4, 5, 6 และ 7 นาที จากนั้นทำการละลายของเหลวหนืดด้วยน้ำอัลตร้าเพียว จะพบว่าสีของสารละลายที่ได้แตกต่างกัน โดยจะมีสีเหลืองเข้มขึ้นเมื่อให้ความร้อนเป็นเวลานานขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 1A และเมื่อทดสอบการเรืองแสงภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต (UV) ดังแสดงในภาพที่ 1B พบว่า สารละลายคาร์บอนดอทที่ได้จากการให้ความร้อนเป็นเวลา 4 นาที ไม่ให้การเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ ในขณะที่ สารละลายคาร์บอนดอทที่ได้จากการให้ความร้อนเป็นเวลา 5, 6 และ 7 นาที ให้การเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์เป็นสีฟ้า, เขียว และส้ม ตามลำดับ

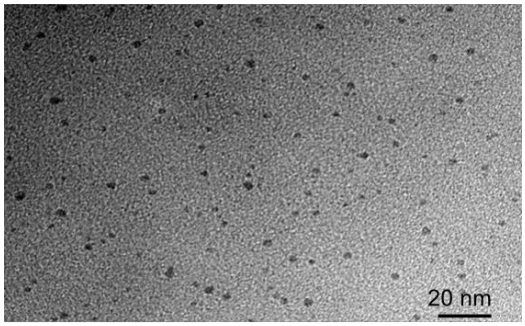


ภาพที่ 1 ภาพแสดงสารละลายคาร์บอนดอทภายใต้แสงขาว(A) และแสงอัลตร้าไวโอเลต (B) และสเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนต์ (emission spectra) (C) ของคาร์บอนดอทที่สังเคราะห์โดยการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟที่เวลาต่าง ๆ

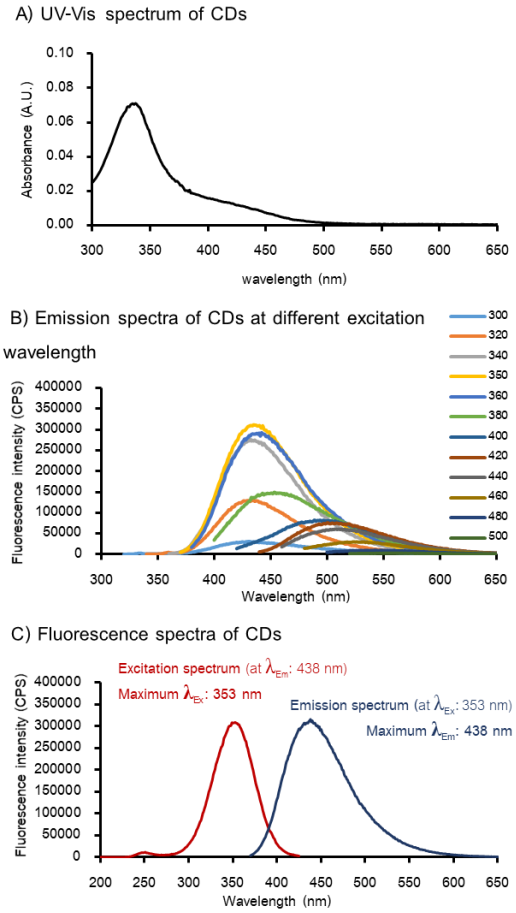
2. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของคาร์บอนดอท

ผู้วิจัยทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของคาร์บอนดอทที่สังเคราะห์ได้จากการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟเป็นเวลา 5 นาที ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรเมตรี ฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรเมตรี กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านและฟูเรียร์ทรานสฟอร์ม-อินฟราเรด

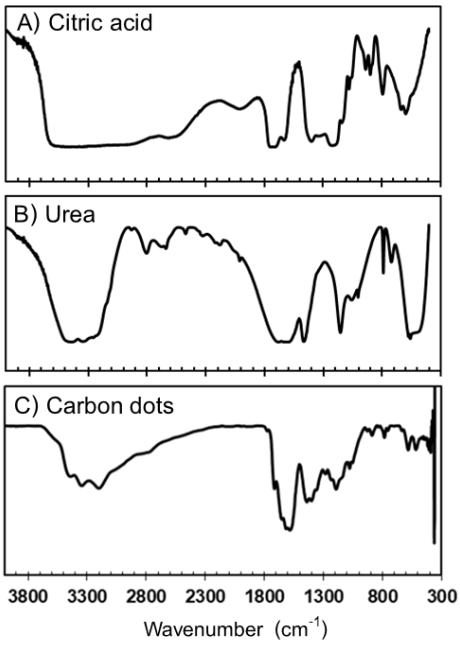
ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM image) แสดงในภาพที่ 2 และ ผลการทดสอบคุณสมบัติเชิงแสงของคาร์บอนดอทแสดงในภาพที่ 3 โดยเทคนิคเชิงแสงที่ใช้ คือ เทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรเมตรี (ภาพที่ 3A) ฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรเมตรี (ภาพที่ 3B และ 3C) นอกจากนี้ ผู้วิจัยยังได้ศึกษาหมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวของคาร์บอนดอทด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานสฟอร์ม-อินฟราเรด สเปกตรัม (ภาพที่ 4) อีกด้วย



ภาพที่ 2 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านของคาร์บอนดอท



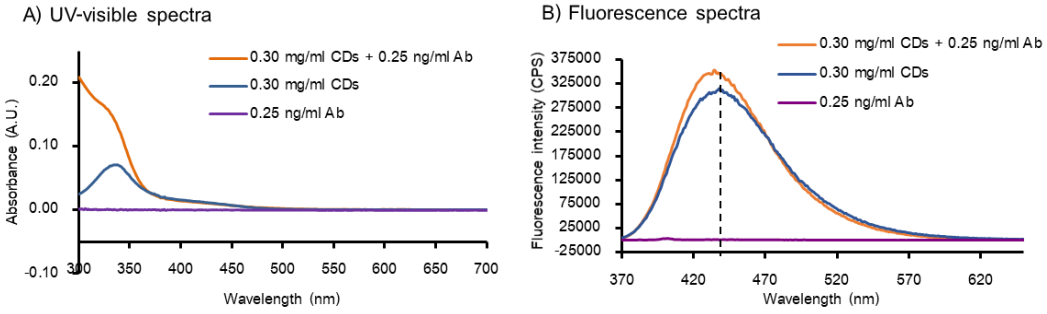
ภาพที่ 3 ยูวี-วิสิเบิล สเปกตรัมของคาร์บอนดอท (A), สเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนต์ เมื่อให้ความยาวคลื่นแสงตกกระทบที่ต่างกันตั้งแต่ 300 – 500 นาโนเมตร (B), ฟลูออเรสเซนต์สเปกตรัมของคาร์บอนดอท (C)



ภาพที่ 4 ฟูเรียร์ทรานสฟอร์ม-อินฟราเรด สเปกตรัมของกรดซิตริก (A), ยูเรีย (B) และคาร์บอนดอท (C) ตามลำดับ

3. ผลการประยุกต์ใช้ด้านการติดฉลากทางชีวภาพ

หลังจากการทำปฏิกิริยากันระหว่างคาร์บอนดอทและ 8-OHdG แอนติบอดี โดยมีกลูตารัลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมขวาง สารละลายผสมนี้จะถูกวิเคราะห์ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรเมตรี และ ฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรเมตรี เพื่อดูคุณสมบัติที่เปลี่ยนแปลงไปของคาร์บอนดอทภายหลังจากการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งมีผลการทดลองดังสเปกตรัมในภาพที่ 5A และ 5B ตามลำดับ



ภาพที่ 5 ยูวี-วิสิเบิล สเปกตรัม (A) และสเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนต์ (B) ของคาร์บอนดอท ก่อนและหลังการเชื่อมติดกับแอนติบอดี

วิจารณ์ผลการวิจัย

1. การศึกษาเวลาในการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟสำหรับการสังเคราะห์คาร์บอนดอท

การให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟเป็นเวลา 4 นาทีนั้น ไม่เพียงพอต่อการเกิดขึ้นของคาร์บอนดอท เพราะไม่สามารถวัดการเรืองแสงของคาร์บอนดอทได้ (สเปกตรัมเส้นสีส้มในภาพที่ 1C) แต่เมื่อเพิ่มเวลาในการให้ความร้อน พบว่า

เกิดสารละลายคาร์บอนดอทที่สามารถเรืองแสงได้และให้แสงสีฟ้าที่สว่างที่สุดเมื่อให้ความร้อนในการสังเคราะห์ด้วยไมโครเวฟ 750 วัตต์เป็นเวลา 5 นาที (สเปกตรัมสีฟ้าในภาพที่ 1C) ดังนั้น ผู้วิจัยจึงได้เลือกใช้เวลาในการสังเคราะห์คาร์บอนดอทเพียง 5 นาที เพื่อทำการศึกษาต่อไป

2. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของคาร์บอนดอท

ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน แสดงในภาพที่ 2 บ่งบอกว่าคาร์บอนดอทที่สังเคราะห์โดยการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟเป็นเวลา 5 นาที มีขนาดอนุภาคที่เล็กกว่า 5 นาโนเมตร และมีการกระจายตัวของอนุภาคอย่างสม่ำเสมอในตัวกลางที่เป็นน้ำ

เมื่อทดสอบคุณสมบัติเชิงแสงของคาร์บอนดอท พบว่า สารละลายคาร์บอนดอท 0.30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น (λ_{max}) 335 นาโนเมตร (ภาพที่ 3A) ซึ่งเป็นการดูดกลืนแสงของการทรานสิชันแบบ π ไป π^* ของอิเล็กตรอนในคาร์บอนดอท (Liu *et al*., 2019) และเมื่อให้ความ ยาวคลื่นแสงตกกระทบที่ต่างกันตั้งแต่ 300 – 500 นาโนเมตร (ภาพที่ 3B) พบว่าสเปกตรัมการเปล่งแสงมีการเลื่อนไปทางความยาวคลื่นที่สูงกว่า (red-shifted) ค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์จะสูงขึ้นเมื่อให้ความยาวคลื่นแสงตกกระทบตั้งแต่ 300 – 350 นาโนเมตร แต่ถ้าความยาวคลื่นมากกว่า 350 นาโนเมตร ค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์จะลดลง โดยแสงฟลูออเรสเซนต์สีฟ้าของคาร์บอนดอทมีความยาวคลื่นแสงตกกระทบ (excitation wavelength; λ_{ex}) และความยาวคลื่นการคายแสง (emission wavelength; λ_{em}) สูงสุดที่ 353 และ 438 นาโนเมตร ตามลำดับ ดังแสดงในสเปกตรัมภาพที่ 3C

ฟูเรียร์ทรานสฟอร์ม-อินฟราเรด สเปกตรัม (ภาพที่ 4) แสดงถึงหมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวของคาร์บอนดอท ซึ่งจะเห็นได้ว่าแตกต่างจากกรดซิตริก และยูเรีย ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ จากสเปกตรัมจะพบพีคที่เลขคลื่น 3200 - 3400 cm^{-1} ซึ่งจะเป็นตำแหน่งในการสั่นแบบยืดของหมู่อะมิโน (N-H) และหมู่ไฮดรอกซิล (O-H) ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้คาร์บอนดอทมีความเสถียรและละลายน้ำได้ (Ma *et al*., 2017) และพีคที่เลขคลื่น 1615 cm^{-1} เป็นตำแหน่งในการสั่นแบบยืดของหมู่คาร์บอนิล (C=O) ที่จะพบหมู่นี้เช่นเดียวกับในสารตั้งต้นทั้งสองชนิด

3. ผลการประยุกต์ใช้ด้านการติดฉลากทางชีวภาพ

การเชื่อมติดกันระหว่างคาร์บอนดอทและ 8-OHdG แอนติบอดีจะเกิดโดยหมู่เอมีน โดยกลูตารัลดีไฮด์จะเชื่อมพันธะระหว่างเอมีนปฐมภูมิ (primary amine) ของแอนติบอดี และหมู่เอมีนที่มีมากบนพื้นผิวของคาร์บอนดอท (Wu *et al*., 2015) จากผลการทดลองในภาพที่ 5 พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายสูงขึ้น โดยสังเกตจากสเปกตรัมในการดูดกลืนแสงของคาร์บอนดอทหลังการเชื่อมติด (สเปกตรัมเส้นสีส้มในภาพที่ 5A) เปลี่ยนแปลงไปจากสเปกตรัมเดิมของคาร์บอนดอท (สเปกตรัมเส้นสีน้ำเงินในภาพที่ 5A) และสเปกตรัมเดิมของแอนติบอดี (สเปกตรัมเส้นสีม่วงในภาพที่ 5A) นอกจากนี้ สเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนต์ (ภาพที่ 5B) ของคาร์บอนดอทหลังการเชื่อมติดกับแอนติบอดีนั้นเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม (blue-shifted) จากการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนต์สูงสุดที่ความยาวคลื่น 438 นาโนเมตร เลื่อนเป็น 432 นาโนเมตร เนื่องจากการเกิดพันธะโควาเลนท์ระหว่างคาร์บอนดอทและแอนติบอดีโดยใช้หมู่เอมีนอาจจะทำให้แรงไดโพล-ไดโพลระหว่างคาร์บอนดอทอ่อนลง และเกิดการ storkes shift ที่แคบลง ทำให้พีคการเปล่งแสงเกิดการเลื่อนแบบ blue-shifted ได้ (Dong *et al*., 2015)

สรุปผลการวิจัย

วัสดุเรืองแสงคาร์บอนดอทสามารถสังเคราะห์ได้ง่ายด้วยวิธีการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟเป็นเวลา 5 นาที โดยใช้กรดซิตริกและยูเรียเป็นสารตั้งต้น และมีการพิสูจน์เอกลักษณ์ของคาร์บอนดอทด้วยเทคนิคการดูดกลืนแสงยูวี-วิสิเบิล, สเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนต์, สเปกตรัมฟูเรียร์ทรานสฟอร์ม-อินฟราเรด และภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน คาร์บอนดอทที่สังเคราะห์ได้สามารถเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์สีฟ้า มีขนาดเล็กกว่า 5 นาโนเมตร และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ทางด้านการติดฉลากทางชีวภาพ ได้โดยการเชื่อมติดกับ 8-OHdG แอนติบอดี ซึ่งอาจจะสามารถมีประโยชน์ในการตรวจวิเคราะห์และหาปริมาณของสารบ่งชี้ทางชีวภาพชนิด 8-OHdG ที่บ่งบอกถึงการมีภาวะความไม่สมดุลของการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกายมนุษย์ได้ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนการศึกษาจากโครงการพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.) และขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี (PERCH-CIC) กระทรวงอุดมศึกษาวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม

เอกสารอ้างอิง

Deng, M., Wang, S., Liang, C., Shang H., & Jiang, S. (2016). A FRET fluorescent nanosensor based on carbon dots for ratiometric detection of Fe^{3+} in aqueous solution. *RSC Advances, 6*(32), 26936-26940.

Dong, W., Zhou, S., Dong, Y., Wang, J., Ge, X., & Sui, L. (2015). The preparation of ethylenediamine-modified fluorescent carbon dots and their use in imaging of cells. *Luminescence, 30*(6), 867-871.

Li, H., He, X., Liu, Y., Huang, H., Lian, S., Lee, S.-T., & Kang, Z. (2011). One-step ultrasonic synthesis of water-soluble carbon nanoparticles with excellent photoluminescent properties. *Carbon, 49*(2), 605-609.

Li, M., Chen, T., Gooding, J. J., & Liu, J. (2019). Review of carbon and graphene quantum dots for sensing. *ACS Sensors, 4*(7), 1732-1748.

Li, N., Than, A., Wang, X., Xu, S., Sun, L., Duan, H., Xu, C., & Chen, P. (2016). Ultrasensitive profiling of metabolites using tyramine-functionalized graphene quantum dots. *ACS Nano, 10*(3), 3622-3629.

Liu, H., Zhao, X., Wang, F., Wang, Y., Guo, L., Mei, J., Tian, C., Yang, X., & Zhao, D. (2017). High-efficient excitation-independent blue luminescent carbon dots. *Nanoscale Research Letters, 12*(1), 399.

Liu, M. L., Chen, B. B., Li, C. M., & Huang, C. Z. (2019). Carbon dots: synthesis, formation mechanism, fluorescence origin and sensing applications. *Green Chemistry, 21*(3), 449-471.

Ma, J. L., Yin, B. C., Wu, X., & Ye, B. C. (2017). Simple and cost-effective glucose detection based on carbon nanodots supported on silver nanoparticles. *Analytical Chemistry, 89*(2), 1323-1328.

Miao, H., Wang, L., Zhuo, Y., Zhou, Z., & Yang, X. (2016). Label-free fluorimetric detection of CEA using carbon dots derived from tomato juice. *Biosensors and Bioelectronics, 86*, 83-89.

Qu, F., Guo, X., Liu, D., Chen, G., & You, J. (2016). Dual-emission carbon nanodots as a ratiometric nanosensor for the detection of glucose and glucose oxidase. *Sensors and Actuators B: Chemical, 233*, 320-327.

Reyes, D., Camacho, M., Camacho, M., Mayorga, M., Weathers, D., Salamo, G., Wang, Z., & Neogi, A. (2016). Laser ablated carbon nanodots for light emission. *Nanoscale Research Letters, 11*, 424, 1-11.

Shi, Z., Yingzhe, Z., Xin, C., Fei, Z., Liyun, Z., Guangshuo, W., Jie, G., Yingying, M., Lianhong, Z., Bin, F., & Ruitao, Y. (2020). Mesoporous superparamagnetic cobalt ferrite nanoclusters: Synthesis, characterization and application in drug delivery. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 498*, 166222.

Wang, C.-I., Wu, W.–C., Periasamy, A. P., & Chang, H.–T. (2014). Electrochemical synthesis of photoluminescent carbon nanodots from glycine for highly sensitive detection of hemoglobin. *Green Chemistry, 16*(5), 2509–2514.

Wu, Y., Wei, P. Pengpumkiat, S., Schumacher, E. A., & Remcho, V. T. (2015). Development of a carbon dot (C-Dot)-linked immunosorbent assay for the detection of human alpha-fetoprotein. *Analytical Chemistry, 87*(16), 8510-8516.

Xiao, N., Liu, S. G., Mo, S., Yang, Y. Z., Han, L., Ju, Y. J., Li, N. B. & Luo, H. Q. (2018). B,N-carbon dots-based ratiometric fluorescent and colorimetric dual-readout sensor for H_2O_2 and H_2O_2-involved metabolites detection using $ZnFe_2O_4$ magnetic microspheres as peroxidase mimics. *Sensors and Actuators B: Chemical, 273*, 1735-1743.

Xu, X., Ray, R., Gu, Y., Ploehn, H. J., Gearheart, L., Raker, K., & Scrivens, W. A. (2004). Electrophoretic analysis and purification of fluorescent single-walled carbon nanotube fragments. *Journal of the American Chemical Society, 126*(40), 12736-12737.