



การสังเคราะห์เซ็นเซอร์สำหรับการตรวจจับไอออนปรอทในสารละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ



โดย
นางสาวพรทิพย์ ปิยะนุช

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีอินทรีย์

ภาควิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การสังเคราะห์เซ็นเซอร์สำหรับการตรวจจับไอออนปรอทในสารละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีอินทรีย์

ภาควิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

CHEMOSENSORS FOR MERCURY IONS (II) DETECTION IN AQUEOUS SOLUTION.



**By
Miss Pornthip Piyanuch**

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree

Master of Science Program in Organic Chemistry

Department of Chemistry

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2015

Copyright of Graduate School, Silpakorn University

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร อนุมัติให้วิทยานิพนธ์เรื่อง “การสังเคราะห์เซ็นเซอร์ สำหรับการตรวจจับไอออนปรอทในสารละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ” เสนอโดย นางสาวพรทิพย์ ปิยะนุช เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีอินทรีย์

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปานใจ ชารัทสนวงศ์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่.....เดือน..... พ.ศ.

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทนิตย์ วานิชชีวะ

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วยา พุทธวงศ์)

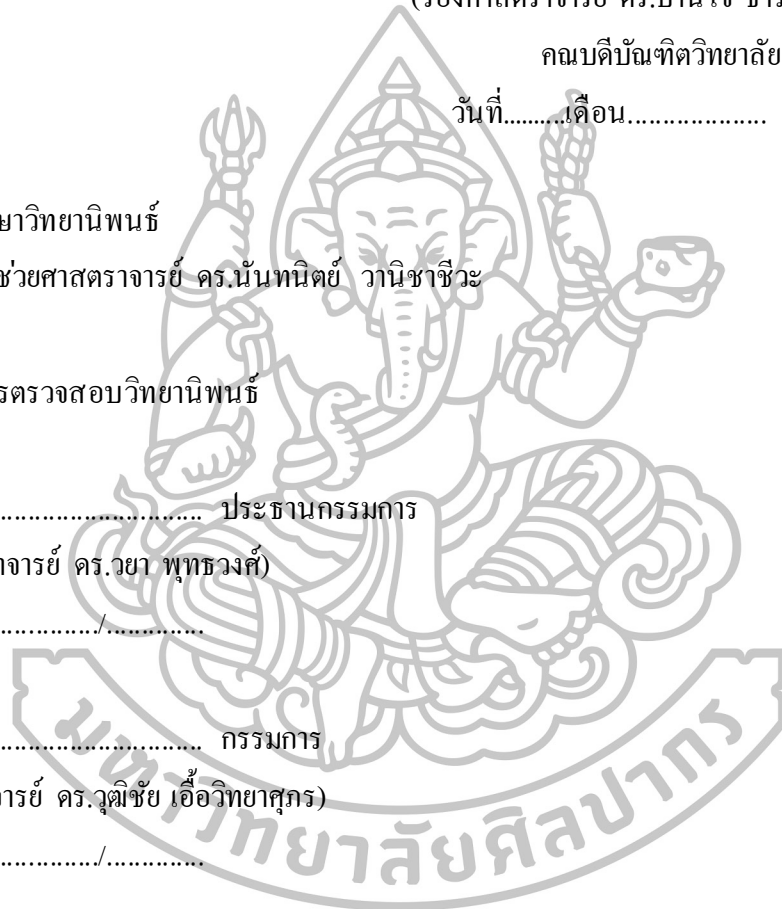
...../...../.....

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย เอื้อวิทาศุกร)

...../...../.....

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทนิตย์ วานิชชีวะ)

...../...../.....



56302203 : สาขาวิชาเคมีอินทรีย์

คำสำคัญ : เซ็นเซอร์ปรอท/ฟลูออเรสเซนส์เซ็นเซอร์/ไอโอโนฟอว์/ฟลูออโรฟอว์/

ฟลูออโรไอโอโนฟอว์/การคายแสงฟลูออเรสเซนส์

พรทิพย์ ปิยะนุช : การสังเคราะห์เซ็นเซอร์สำหรับการตรวจจับไอออนปรอทในสารละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ผศ.ดร. นันทนิตย์ วานิชชีวะ. 131 หน้า.

ปรอทเป็นโลหะหนักที่มีความเป็นพิษสูงเมื่อมีการสะสมปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นอันตรายหากร่างกายได้รับการสะสมในปริมาณที่มากเกินไป วิธีการหนึ่งที่สามารถตรวจจับไอออนปรอทได้รวดเร็ว สะดวก และราคาไม่แพง คือ การใช้สารฟลูออเรสเซนส์เซ็นเซอร์ ในงานวิจัยนี้จึงได้นำเสนอการสังเคราะห์และการประยุกต์ใช้สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์ 2 ชนิด สำหรับการดักจับไอออนปรอทอย่างจำเพาะเจาะจง โดยฟลูออเรสเซนส์เซ็นเซอร์ 1 ใช้หมู่ฟลูออเรซีน จำนวน 1 หมู่เป็นฟลูออโรฟอว์ เชื่อมต่อกับ 2-[4-(2-aminothylsulfanyl)butylsulfanyl]ethmine ทำหน้าที่เป็นไอโอโนฟอว์ ซึ่งเซ็นเซอร์ CFC4 มีพฤติกรรมการดักจับไอออนปรอทได้อย่างจำเพาะเจาะจงในสารละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์กับตัวทำละลายอินทรีย์ แม้ในสภาวะที่มีไอออนรบกวนอื่นๆปนเปื้อน โดยมีค่าความสามารถต่ำสุดของการตรวจวัดไอออนปรอทต่ำกว่าค่ามาตรฐานสำหรับน้ำดื่ม ที่กำหนดโดย US EPA การคายแสงฟลูออเรสเซนส์ต่อไอออนปรอทของเซ็นเซอร์ CFC4 มีลักษณะคล้ายการ “เปิด-ปิด” สวิตช์ (ON-OFF switch) สำหรับเซ็นเซอร์ T10RhB ประกอบด้วยส่วนของโรดามีนบี ทำหน้าที่เป็นฟลูออโรฟอว์ เชื่อมต่อกับ ไฮดรอกซิลิน ทำหน้าที่เป็นไอโอโนฟอว์ โดยเซ็นเซอร์ชนิดนี้ได้ถูกเชื่อมต่อกับ polyoctahedral silsesquioxanes (POSS) ซึ่งเป็นอนุภาคขนาดนาโน โดยเซ็นเซอร์ T10RhB จะถูกศึกษาระบบตัวทำละลายที่ทำให้เกิดสัญญาณฟลูออเรสเซนส์เมื่อมีไอออนปรอทอยู่ในสารละลายและมีความจำเพาะเจาะจงกับไอออนปรอทเพียงชนิดเดียว พบว่าในสารละลายผสมระหว่างเมทานอลกับไดคลอโรมีเทน เป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุดสำหรับการศึกษาของเซ็นเซอร์ T10RhB ซึ่งการคายแสงฟลูออเรสเซนส์ต่อไอออนปรอทมีลักษณะคล้ายการ “ปิด-เปิด” สวิตช์ (OFF-ON switch) และสามารถตรวจจับไอออนปรอทได้ดีเมื่อเทียบกับไอออนโลหะหนักชนิดอื่น

ภาควิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ปีการศึกษา 2558

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

56302203 : MAJOR: ORGANIC CHEMISTRY

KEY WORD : MERCURY SENSOR/ FLUORESCENCE SENSOR/ IONOPHORE/
FLUOROPHORE/ FLUOROIONOPHORE/ FLUORESCENCE
QUENCHING

PORNTHIP PIYANUCH: CHEMOSENSORS FOR MERCURY (II) IONS
DETECTION IN AQUEOUS SOLUTION. THESIS ADVISOR: ASSIST. PROF. NANTANIT
WANICHACHEVA, Ph.D. 131 pp.

Mercury is a highly toxic metal ion which is hazard for environment. Fluorescence sensor was technique that has high sensitivity, high selectivity, inexpensive cost, rapid respond and could be applied for mercury ion detection in real field. In this study, two fluorescence macromolecules were synthesized for the selective detection of mercury ions. Sensor **CFC4** based on fluorescein moieties covalently bound to 2-[4-(2-aminoethylsulfanyl)butylsulfanyl]ethanamine. The sensor **CFC4** exhibited a selective ON-OFF fluorescence quenching behavior toward Hg^{2+} in the presence of various interfering ions in aqueous methanol solution. Detection limit of this sensor was approximate 1.48 ppb for Hg^{2+} ion which is lower than the maximum level of mercury ion in drinking water specified by U.S. EPA. Sensor **T10RhB** based on rhodamine B moieties covalently bound to hydrazine and then was prepared on polyoctahedral silsesquioxanes (POSS) as nanomolecules. The sensor **T10RhB** exhibited Hg^{2+} selective OFF-ON type behavior in organic solution with low detection limit.

Department of Chemistry

Graduate School, Silpakorn University

Student's signature.....

Academic Year 2015

Thesis Advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทินิตย์ วานิชชีวะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ เป็นอย่างสูง สำหรับความกรุณาที่มีให้ ทั้งการให้คำปรึกษา คำแนะนำ ความรู้ รวมไปถึงความช่วยเหลืออันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการทำวิทยานิพนธ์ซึ่งทำให้งานนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น และการวางแผนการเรียนในขั้นสูงขึ้นไป ตลอดจนกำลังใจ โอกาสและประสบการณ์ดี ๆ ที่มอบให้ดิฉันตลอดมา

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วยา พุทธิวงศ์ ประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. วุฒิชัย เอื้อวิทยาคุกร อาจารย์กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่างๆ อันเป็นประโยชน์ต่อวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณอาจารย์ ดร. อัญชวี ฐปตาท้อง ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่างๆ รวมถึงคำสั่งสอนอันเป็นประโยชน์ต่อการดำเนินชีวิตและการเรียนต่อในอนาคต

ขอขอบคุณพ่อ คุณแม่ และพี่ชาย ที่เป็นกำลังใจ ให้ความรักความอบอุ่นและให้การสนับสนุนในทุกๆ เรื่อง ตลอดจนคำปรึกษาที่ดี ในด้านต่างๆ มาโดยตลอด

ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร สำหรับความรู้และประสบการณ์ที่ดี ในขณะที่ดิฉันได้ศึกษาอยู่ ณ สถาบันการศึกษาแห่งนี้

ขอขอบคุณอาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่าน ที่กรุณาประสิทธิ์ประสาทความรู้ต่างๆ ทั้งความรู้ในด้านวิชาการและด้านการดำเนินชีวิต

ขอขอบคุณพี่ น้อง และเพื่อนในกลุ่มทำงานทุกคน สำหรับคำปรึกษาในการแก้ปัญหาทางด้านต่างๆ และไม่ตรีจิตอันดีที่มอบให้แก่กันมาโดยตลอด

สุดท้ายขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาเคมีทุกท่าน ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการดำเนินงานเอกสาร อีกทั้งขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเคมีทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือด้านอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำวิทยานิพนธ์ ด้วยความเอื้อเฟื้อตลอดมา

ประโยชน์อันใดที่เกิดจากการทำวิทยานิพนธ์นี้ ย่อมเป็นผลมาจากความกรุณาของทุกท่าน ดังกล่าว ดิฉันรู้สึกซาบซึ้งและระลึกถึงความกรุณาเป็นอย่างยิ่ง จึงใคร่ขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ.....	ญ
รายชื่ออักษรย่อ.....	ด
บทที่	
1 บทนำ.....	1
2 ทบทวนวรรณกรรม.....	9
3 อุปกรณ์และสารเคมี.....	22
4 วิธีการทดลอง.....	26
5 ผลการดำเนินงานวิจัย.....	40
6 สรุปผลการทดลอง.....	96
รายการอ้างอิง.....	98
ภาคผนวก.....	104
ประวัติผู้วิจัย.....	113

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณปรอทสูงสุดที่สามารถปนเปื้อนในแหล่งธรรมชาติตามมาตรฐานการควบคุมมลพิษของสถาบันนานาชาติ	1
2	ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ สำหรับการทดสอบความไวของเซ็นเซอร์ CFC4.....	33
3	ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ สำหรับการทดสอบความไวของเซ็นเซอร์ T10RhB.....	38
4	ข้อมูลค่าความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมลงในสารละลายเซ็นเซอร์ (M), ค่า log ของความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมลงไป และค่าเชิงสัมพัทธ์ของเซ็นเซอร์ CFC4 สำหรับสมการ 1.....	69
5	ข้อมูลค่าความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมลงในสารละลายเซ็นเซอร์ (M), ค่า log ของความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมลงไป และค่าเชิงสัมพัทธ์ของเซ็นเซอร์ CFC4 สำหรับสมการ 2.....	71
6	ข้อมูลค่าความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมลงในสารละลายเซ็นเซอร์ (M), ค่า log ของความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมลงไป และค่าเชิงสัมพัทธ์ของเซ็นเซอร์ CFC4 สำหรับสมการ 3.....	72
7	ข้อมูลค่าความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมลงในสารละลายเซ็นเซอร์ (M), ค่า log ของความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมลงไป และค่าเชิงสัมพัทธ์ของเซ็นเซอร์ CFC4 สำหรับสมการ 4.....	74
8	ข้อมูลค่าความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมลงในสารละลายเซ็นเซอร์ (M), ค่า log ของความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมลงไป และค่าเชิงสัมพัทธ์ของเซ็นเซอร์ CFC4 สำหรับสมการ 5.....	75
9	สรุป ค่า detection limit ในการตรวจจับไอออนปรอทคลอไรด์ ของเซ็นเซอร์ CFC4..	77
10	ข้อมูลค่าความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมลงไป (M), ค่า log ของความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมลงไป และ Relative Value ของเซ็นเซอร์ CFC4, λ_{ex} เท่ากับ 493 nm.....	78
11	ข้อมูลค่าความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมลงไป $[Hg^{2+}]$, ค่า $1/[Hg^{2+}]$ ค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์ CFC4 และ ค่า $1/(I_0 - I_{obs})$ ที่ได้จากการคำนวณ ของเซ็นเซอร์ CFC4, λ_{ex} เท่ากับ 493 nm.....	81

ตารางที่		หน้า
12	สรุปผลการทดลองของเซ็นเซอร์ CFC4	96
13	สรุปผลการทดลองของเซ็นเซอร์ T10RhB.....	97



สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไอโอโนเฟอร์และไอออน.....	4
2	ลักษณะการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ก่อนไอโอโนเฟอร์ตรวจจับไอออนโลหะ (ซ่าย) และ ภายหลังตรวจจับไอออนโลหะ (ขวา).....	5
3	กระบวนการปิด (OFF state) และเปิดวง spirolactam.....	6
4	ลักษณะการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ก่อนไอโอโนเฟอร์ตรวจจับไอออนโลหะ (ซ่าย) และ ภายหลังตรวจจับไอออนโลหะ (ขวา).....	6
5	กระบวนการ photoinduced electron transfer ก่อนดักจับไอออน (ซ่าย) และหลังดัก จับไอออน (ขวา).....	7
6	โครงสร้างสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์สำหรับวิทยานิพนธ์นี้.....	8
7	โครงสร้างเซ็นเซอร์ 1.....	9
8	โครงสร้างเซ็นเซอร์ 2.....	10
9	โครงสร้างเซ็นเซอร์ 3.....	10
10	โครงสร้างเซ็นเซอร์ 4 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มี hypochlorite anion กับ ไอออนอื่นๆ.....	11
11	โครงสร้างเซ็นเซอร์ 5, เซ็นเซอร์ 6 และการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออน สังกะสีในปริมาณต่างๆ.....	12
12	โครงสร้างเซ็นเซอร์ 7 และการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนปรอทใน ปริมาณต่างๆ.....	12
13	โครงสร้างเซ็นเซอร์ 8 และการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนปรอทและ TPEN.....	13
14	โครงสร้างเซ็นเซอร์ 9 และการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนทอง (Au^{3+}) เทียบกับไอออนอื่นๆ.....	13
15	โครงสร้างเซ็นเซอร์ 10 และการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนแคดเมียมใน ปริมาณต่างๆ.....	14
16	โครงสร้างเซ็นเซอร์ 11 และเซ็นเซอร์ 12.....	14

ภาพที่		หน้า
17	เซ็นเซอร์ 13 และการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนปรอทและไอออนอื่นๆ.....	15
18	เซ็นเซอร์ 14 และเซ็นเซอร์ 15.....	15
19	เซ็นเซอร์ 16.....	16
20	เซ็นเซอร์ 17 และการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนปรอทในปริมาณต่างๆ..	16
21	เซ็นเซอร์ 18 และการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนปรอทในปริมาณต่างๆ	17
22	เซ็นเซอร์ 19 และการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนปรอทกับไอออนอื่นๆ....	17
23	เซ็นเซอร์ 20	18
24	เซ็นเซอร์ 21.....	18
25	เซ็นเซอร์ 22.....	19
26	octakis[3-(3-amino-1,2,4-triazole)propyl]octasilsesquioxane.....	19
27	octakis[3-(2-amino-1,3,4-thiadiazole)propyl]octasilsesquioxane.....	20
28	Octakis[(thiourea)propyl] octasilsesquioxane.....	20
29	Thiol-rich polyhedral oligomeric silsesquioxane.....	21
30	โครงสร้างฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ชนิดใหม่ 2 ชนิด.....	26
31	สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์ 2-[4-(2-aminoethylsulfanyl)butylsulfanyl]ethanamine (I-3).....	27
32	สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์ fluorescein dicarboxaldehyde (I-5).....	28
33	สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์เซ็นเซอร์ CFC4 (Sensor CFC4).....	29
34	สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์ rhodamine B hydrazide; II-3.....	30
35	สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์เซ็นเซอร์ T10RhB (Sensor T10RhB).....	31
36	โครงสร้างทางเคมีของ 2-[4-(2-aminoethylsulfanyl)butylsulfanyl]ethanamine (I-3)	40
37	¹ H NMR ของ 2-[4-(2-aminoethylsulfanyl)butylsulfanyl]ethanamine (I-3).....	41
38	¹³ C NMR ของ 2-[4-(2-aminoethylsulfanyl)butylsulfanyl]ethanamine (I-3).....	41
39	HR-ESI MS ของ 2-[4-(2-aminoethylsulfanyl)butylsulfanyl]ethanamine (I-3).....	42
40	กลไกการเกิดปฏิกิริยาของสารประกอบ 4', 5'-bis(bromomethyl)fluorescein dibenzoate (I-3).....	43

ภาพที่	หน้า
41	โครงสร้างของสารประกอบ 4', 5'-bis(bromomethyl)fluorescein dibenzoate (I-4).... 43
42	¹ H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ I-4..... 44
43	¹³ C NMR สเปกตรัมของสารประกอบ I-4..... 44
44	¹³ C DEPT 135 NMR สเปกตรัมของสารประกอบ I-4..... 45
45	HR-ESI MS สเปกตรัมของสารประกอบ I-4..... 45
46	โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ fluorescein dicarboxaldehyde (I-5)..... 46
47	¹ H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ fluorescein dicarboxaldehyde (I-5)..... 47
48	¹³ C NMR สเปกตรัมของสารประกอบ fluorescein dicarboxaldehyde (I-5)..... 47
49	¹³ C DEPT135 NMR สเปกตรัมของสารประกอบ fluorescein dicarboxaldehyde (I-5) 48
50	HR-ESI MS สเปกตรัมของสารประกอบ fluorescein dicarboxaldehyde (I-5)..... 48
51	กลไกการเกิดปฏิกิริยาของสารประกอบ fluorescein dicarboxaldehyde (I-5)..... 50
52	กลไกการเกิดปฏิกิริยาของสารประกอบ fluorescein dicarboxaldehyde (I-5)ต่อ..... 51
53	โครงสร้างทางเคมีของเซ็นเซอร์ (Sensor CFC4)..... 52
54	¹ H NMR สเปกตรัมของเซ็นเซอร์ (Sensor CFC4)..... 53
55	¹³ C NMR สเปกตรัมของเซ็นเซอร์ (Sensor CFC4)..... 53
56	¹³ C DEPT135 NMR สเปกตรัมของเซ็นเซอร์ (Sensor CFC4)..... 54
57	HR-ESI MS สเปกตรัมของเซ็นเซอร์ (Sensor CFC4)..... 54
58	กลไกการเกิดปฏิกิริยาของเซ็นเซอร์ (Sensor CFC4)..... 56
59	โครงสร้างทางเคมีโรดามีนบีไฮดราไซด์ (II-3)..... 57
60	¹ H NMR สเปกตรัมของโรดามีนบีไฮดราไซด์ (II-3)..... 58
61	¹³ C NMR สเปกตรัมของโรดามีนบีไฮดราไซด์ (II-3)..... 58
62	¹³ C Dept 135 สเปกตรัมของโรดามีนบีไฮดราไซด์ (II-3)..... 59
63	HR-ESI MS สเปกตรัมของโรดามีน บีไฮดราไซด์ (II-3)..... 59

ภาพที่		หน้า
64	กลไกการเกิดปฏิกิริยาของสารประกอบ โรดามีนบีไฮดราไซด์ (II-3).....	60
65	การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{ex} = 493 \text{ nm}$ และ $\lambda_{em} = 514 \text{ nm}$) ของเซ็นเซอร์ CFC4 (0.01 μM) ในสารละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ Tris(hydroxymethyl)-aminomethane (Tris-HCl buffer) เข้มข้น 2.62 mM และ methanol ในอัตราส่วน 95:5 v/v ที่ pH ต่างๆ ก่อนและหลังเติมไอออนปรอทคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 3.33 μM	62
66	การดูดกลืนแสงของเซ็นเซอร์ CFC4 (3.00 μM) ในสารละลายผสมระหว่าง 2.62 mM Tris-HCl buffer และ methanol (95:5 v/v pH 7.20) ก่อนและหลังเติมไอออนปรอทคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ a: 0 μM , b: 0.06 μM , c: 0.13 μM , d: 0.20 μM , e: 0.27 μM , f: 0.40 μM , g: 0.53 μM , h: 0.73 μM , i: 0.93 μM , j: 1.20 μM	63
67	การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{ex} = 493 \text{ nm}$ และ $\lambda_{em} = 514 \text{ nm}$) ของเซ็นเซอร์ CFC4 (0.01 μM) ในสารละลายผสมระหว่าง 2.62 mM Tris-HCl buffer และ methanol (95:5 v/v pH 7.20) ในภาวะที่มีไอออนโลหะของเกลือคลอไรด์ชนิดต่างๆ ในปริมาณที่ต่างกัน.....	64
68	การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{ex} = 493 \text{ nm}$ และ $\lambda_{em} = 514 \text{ nm}$) ของเซ็นเซอร์ CFC4 (0.01 μM) ในสารละลายผสมระหว่าง 2.62 mM Tris-HCl buffer และ methanol (95:5 v/v pH 7.20) ในภาวะที่มีไอออนโลหะของเกลือคลอไรด์ชนิดต่างๆ เข้มข้น 10.38 μM	65
69	การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{ex} = 493 \text{ nm}$ และ $\lambda_{em} = 514 \text{ nm}$) ของเซ็นเซอร์ CFC4 (0.01 μM) ในสารละลายผสมระหว่าง 2.62 mM Tris-HCl buffer และ methanol (95:5 v/v pH 7.20) ก่อนและหลังเติมไอออนปรอทคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ a: 0 M, b: 0.013 μM , c: 0.027 μM , d: 0.043 μM , e: 0.11 μM , f: 0.71 μM , g: 10.38 μM	66
70	การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{ex} = 493 \text{ nm}$ และ $\lambda_{em} = 514 \text{ nm}$) ของเซ็นเซอร์ CFC4 (0.01 μM) ในสารละลายผสมระหว่าง 2.62 mM Tris-HCl buffer และ methanol (95:5 v/v pH 7.20) ในภาวะที่มีความเข้มข้นไอออนรบกวนต่างๆ เจือปนในสารละลายเท่ากับ 0.3 μM (10 equiv.) ของความเข้มข้นไอออนปรอท 0.03 μM	68

ภาพที่	หน้า	
71	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า log ของความเข้มข้นของไอออนปรอทคลอไรด์ที่ เติมลงไป กับ Relative Value ของ เซ็นเซอร์ CFC4, λ_{ex} เท่ากับ 493 nm.....	70
72	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า log ของความเข้มข้นของไอออนปรอทคลอไรด์ที่ เติมลงไป กับ Relative Value ของ เซ็นเซอร์ CFC4, λ_{ex} เท่ากับ 493 nm.....	71
73	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า log ของความเข้มข้นของไอออนปรอทคลอไรด์ที่ เติมลงไป กับ Relative Value ของ เซ็นเซอร์ CFC4, λ_{ex} เท่ากับ 493 nm.....	73
74	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า log ของความเข้มข้นของไอออนปรอทคลอไรด์ที่ เติมลงไป กับ Relative Value ของ เซ็นเซอร์ CFC4, λ_{ex} เท่ากับ 493 nm.....	74
75	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า log ของความเข้มข้นของไอออนปรอทคลอไรด์ที่ เติมลงไป กับ Relative Value ของ เซ็นเซอร์ CFC4, λ_{ex} เท่ากับ 493 nm.....	76
76	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า relative value ของ เซ็นเซอร์ CFC4, λ_{ex} เท่ากับ 493 nm กับความเข้มข้นของไอออนปรอทคลอไรด์ที่เติมลงไป ในหน่วย ppb (log [Hg ²⁺]).....	79
77	กราฟแสดงอัตราส่วนระหว่างโมเลกุลของเซ็นเซอร์ CFC4 กับไอออนปรอทที่ใช้ในการ เกิด binding ศึกษาโดยวิธี Job's plot.....	80
78	กราฟจากการคำนวณตามสมการ Benesi-Hildebrand ของเซ็นเซอร์ CFC4 เมื่อ n = 1	82
79	แสดงลักษณะโครงสร้างด้วยเทคนิค Molecular modeling ของ a) เซ็นเซอร์ CFC4 และ b) เซ็นเซอร์ CFC4:Hg ²⁺ อัตราส่วน 1:1.....	83
80	ภาพถ่ายของสารละลายเซ็นเซอร์ CFC4 (3.0 μ M) ในภาวะที่ไม่มีและมีไอออน Hg ²⁺ , Mg ²⁺ , Cu ²⁺ , Cd ²⁺ , Fe ³⁺ , K ⁺ , Mn ²⁺ , Ba ²⁺ , Pb ²⁺ , Ca ²⁺ , Al ³⁺ , Na ⁺ and Ni ²⁺ (20.0 μ M) ภายใต้แสง UV.....	84
81	ภาพถ่ายของสารละลายเซ็นเซอร์ CFC4 (10.0 μ M) ในภาวะที่ไม่มีและมีไอออน Hg ²⁺ , Mg ²⁺ , Cu ²⁺ , Cd ²⁺ , Fe ³⁺ , K ⁺ , Mn ²⁺ , Ba ²⁺ , Pb ²⁺ , Ca ²⁺ , Al ³⁺ , Na ⁺ and Ni ²⁺ (45.0 μ M) ในสภาวะปกติ.....	84
82	ภาพถ่ายของกระดาษกรองที่เคลือบด้วยสารละลายเซ็นเซอร์ CFC4 (0.1 μ M) ใน สารละลาย Methanol ก่อนและหลังเติมไอออนปรอทคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ a: 0 M, b: 0.01 μ M, c: 0.1 μ M, d: 1.0 μ M ภายใต้แสง UV.....	85

83	การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{ex} = 558 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 578 \text{ nm}$) ของเซ็นเซอร์ T10RhB (0.1 μM) ในสารละลาย CH_2Cl_2 ก่อนและหลังเติมไอออนปรอทเปอร์คลอเรตที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อความเข้มข้นปรอทเท่ากับ a: 0 μM , b: 0.007 μM , c: 0.010 μM , d: 0.017 μM , e: 0.023 μM , f: 0.043 μM , g: 0.103 μM , h: 0.303 μM , i: 0.437 μM , j: 0.567 μM , k: 0.703 μM , l: 0.837 μM , m: 0.967 μM n: 1.103 μM , o: 1.237 μM , p: 1.370 μM , q: 1.503 μM , r: 1.637 μM , s: 2.303 μM	86
84	การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{ex} = 558 \text{ nm}$ และ $\lambda_{em} = 578 \text{ nm}$) ของเซ็นเซอร์ T10RhB (1.0 μM) ในสารละลาย dichloromethane ในภาวะที่มีไอออนโลหะของเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ ในปริมาณที่ต่างกัน.....	87
85	การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{ex} = 558 \text{ nm}$ และ $\lambda_{em} = 578 \text{ nm}$) ของเซ็นเซอร์ T10RhB (1.0 μM) ในสารละลาย acetonitrile ในภาวะที่มีไอออนโลหะของเกลือเปอร์คลอเรต ชนิดต่างๆ ในปริมาณที่ต่างกัน.....	88
86	การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{ex} = 558 \text{ nm}$ และ $\lambda_{em} = 578 \text{ nm}$) ของเซ็นเซอร์ T10RhB (1.0 μM) ในสารละลาย ethanol ในภาวะที่มีไอออนโลหะของเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ ในปริมาณที่ต่างกัน.....	89
87	การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{ex} = 558 \text{ nm}$ และ $\lambda_{em} = 578 \text{ nm}$) ของเซ็นเซอร์ T10RhB (1.0 μM) ในสารละลาย methanol ในภาวะที่มีไอออนโลหะของเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ ในปริมาณที่ต่างกัน.....	90
88	การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{ex} = 558 \text{ nm}$ และ $\lambda_{em} = 578 \text{ nm}$) ของเซ็นเซอร์ T10RhB (1.0 μM) ในสารละลาย $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ (90:10 v/v) ในภาวะที่มีไอออนโลหะของเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ ในปริมาณที่ต่างกัน.....	92
89	การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{ex} = 558 \text{ nm}$ และ $\lambda_{em} = 578 \text{ nm}$) ของเซ็นเซอร์ T10RhB (1.0 μM) ในสารละลาย $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ (50:50 v/v) ในภาวะที่มีไอออนโลหะของเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ ในปริมาณที่ต่างกัน.....	93
90	การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{ex} = 558 \text{ nm}$ และ $\lambda_{em} = 578 \text{ nm}$) ของเซ็นเซอร์ T10RhB (1.0 μM) ในสารละลาย $\text{MeOH:CH}_2\text{Cl}_2$ (10:90 v/v) ในภาวะที่มีไอออนโลหะของเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ ในปริมาณที่ต่างกัน.....	94

ภาพที่

หน้า

- 81 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{ex} = 558 \text{ nm}$ และ $\lambda_{em} = 578 \text{ nm}$) ของเซ็นเซอร์ T10RhB (1.0 μM) ในสารละลาย MeOH:CH₂Cl₂ (50:50 v/v) ในภาวะที่มีไอออนโลหะของเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ ในปริมาณที่ต่างกัน.....

95



รายชื่ออักษรย่อ

คำย่อ	คำเต็ม
ϕ_f	fluorescence quantum yield
$^{\circ}\text{C}$	degree Celsius
λ	Wavelength
μL	microlitter
μM	micromolar
AAS	atomic absorption spectrometry
anh.	Anhydrous
br	board (NMR spectroscopy)
CH_2Cl_2	dichloromethane
^{13}C NMR	carbon 13 nuclear magnetic resonance Spectroscopy
d	doublet (NMR spectroscopy)
dd	doublet of doublet (NMR spectroscopy)
DFT	density functional theory
DI	deionized
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNP	double numerical polarization
EAP	United States Environmental Protection Agency
E_{bind}	binding energy
em	emission
eq.	equivalent
EtOAc	ethyl acetate
EtOH	ethanol
ex	excitation
FDA	Food and Drug Administration
PET	Photoinduced electron transfer

h	hour
HCl	hydrochloric
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
^1H NMR	hydrogen nuclear magnetic resonance spectroscopy
H_2O	water
HOMO	the highest occupied molecular orbital
HR-MS	high resolution mass spectrometry
Hz	Hertz
ICP-AES	inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry
J	coupling constant (NMR spectroscopy)
K_{assoc}	association constant
K_2CO_3	potassium carbonate
LUMO	the lowest unoccupied molecular orbital
M	mass (mass spectrometry)
M	molar
m	multiplet (NMR spectroscopy)
MeOH	methanol
min	minute
mL	milliliter
mmol	mill mole
MW	molecular weight
m/z	mass to charge ratio (mass spectrometry)
NaCl	sodium chloride
NaOMe	sodium methoxide
NaOH	sodium hydroxide
Na_2SO_4	sodium sulfate

Et ₃ N	triethylamine
nm	nanometer
OSHA	Occupational Safety and Health Administration
ppb	part per billion
ppm	part per million
q	quartet (NMR spectroscopy)
R _f	flow rate
s	singlet (NMR spectroscopy)
t	triplet (NMR spectroscopy)
THF	tetrahydrofuran
v/v	volume by volume
w/v	weight by volume





วิทยานิพนธ์นี้

ได้รับทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์จากเงินงบประมาณแผ่นดิน
(หมวดเงินอุดหนุนทั่วไป) ของบัณฑิตวิทยาลัย
ประจำปีงบประมาณ 2558 (ครั้งที่ 2)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันโรงงานอุตสาหกรรมภายในประเทศขยายจำนวนเพิ่มมากขึ้น เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่ทำให้ชีวิตและความเป็นอยู่ของมนุษย์มีความสะดวกสบายมากขึ้น ซึ่งในกระบวนการผลิตต่างๆ นั้น มักใช้สารเคมีในขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งอยู่เสมอ ทำให้สารเคมีที่เหลืออยู่ หรือของเสียที่เกิดจากกระบวนการผลิตนี้ อาจตกค้างจนเป็นพิษต่อคนและสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะมลพิษที่อยู่ในรูปของสารประกอบไฮดรอกซิลอะโรมาติก เช่น ตะกั่ว (ใช้ในอุตสาหกรรมแบตเตอรี่ อุตสาหกรรมสีและพลาสติก) เมื่อตะกั่วเข้าสู่ร่างกายของมนุษย์ ทำให้เกิดอาการมึนงง นอนไม่หลับ ตื่นตระหนก มีอาการโลหิตจาง หากได้รับในปริมาณมากถึงแก่ความตายได้ หรือแคดเมียมที่ปนเปื้อนในน้ำบริเวณเหมือง หากเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารของมนุษย์แล้ว จะทำให้เกิดโรคอิไตอิไต (Itai Itai) รวมถึงปรอท เป็นโลหะหนักที่อยู่ในรูปของเหลวที่ระเหยกลายเป็นไอได้ สามารถปนเปื้อนได้ในสิ่งแวดล้อมทั้งใน ดิน น้ำ อากาศ ในสิ่งมีชีวิต และสะสมในเนื้อเยื่อสัตว์น้ำ ปรอทอินทรีย์ที่อยู่ในธรรมชาติสามารถเปลี่ยนรูปกลายเป็นปรอทอินทรีย์ในรูปของเมธิลเมอร์คิวรี โดยมีเชื้อจุลินทรีย์ในดิน ตะกอนเป็นตัวเร่งในการเกิดปฏิกิริยา ทำให้ปรอทในรูปของเมธิลเมอร์คิวรี สามารถละลายน้ำได้ดีมากจึงมีโอกาสเข้าไปสะสมในร่างกายของสิ่งมีชีวิตได้เป็นอย่างดี หากร่างกายมนุษย์เรามีการสะสมปริมาณปรอท จะส่งผลให้ DNA สมอง ระบบประสาทถูกทำลาย และก่อให้เกิดโรคมินามาตะ [1-4]

ทั้งนี้มีการกำหนดปริมาณสูงสุดของปรอทที่อาจตกค้างในแหล่งธรรมชาติโดยสถาบันต่างๆ แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณปรอทสูงสุดที่สามารถปนเปื้อนในแหล่งธรรมชาติตามมาตรฐานการควบคุมมลพิษของสถาบันนานาชาติ

แหล่งที่มา	ปริมาณปรอทสูงสุดไม่เกิน
น้ำดื่ม (EPA) [5]	2 ppb
อาหารทะเล (FDA) [6]	1 ppm
อากาศ (OSHA) [7]	0.1 mg/m ³

จากตารางข้างต้นจะเห็นได้ว่า ปริมาณปรอทสูงสุดที่สามารถปนเปื้อนในแหล่งที่มาต่างๆ มีปริมาณน้อยมาก และเนื่องจากการปนเปื้อนของไอออนโลหะหนักสู่สิ่งแวดล้อมสามารถเกิดได้จากหลายสาเหตุ ด้วยเหตุนี้จึงต้องให้ความสำคัญกับสิ่งแวดล้อมรอบตัว โดยเฉพาะสิ่งแวดล้อมทางน้ำ ที่เป็นแหล่งปนเปื้อนที่สำคัญอันจะนำมาสู่การปนเปื้อนในห่วงโซ่อาหารของมนุษย์ได้ง่ายมากที่สุด ดังนั้นการที่มีเครื่องมือหรือวิธีตรวจวัดความเป็นพิษของสิ่งแวดล้อมใกล้ตัวที่ไม่ยุ่งยาก ซับซ้อน ประหยัดค่าใช้จ่าย และมีประสิทธิภาพ ถือว่าเป็นสิ่งที่มีประโยชน์ต่อชีวิตมนุษย์และสิ่งแวดล้อมมาก

การใช้เซ็นเซอร์เพื่อตรวจวัดโมเลกุลหรือไอออน โดยตรวจวัดด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปีเป็นทางเลือกหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจอย่างแพร่หลายในการตรวจวิเคราะห์ไอออนโลหะชนิดต่างๆ ทั้งด้านคุณภาพวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์ เนื่องจากมีข้อดีคือเป็นเทคนิคที่มีสภาพไว (sensitivity) ในการวิเคราะห์สูง ใช้สารตัวอย่างเพียงเล็กน้อยก็สามารถแสดงผลในเวลาอันรวดเร็ว จึงสามารถใช้วิเคราะห์อย่างต่อเนื่อง (continuous monitoring) อีกทั้งไม่ทำลายสารตัวอย่างอีกด้วย ซึ่งนับเป็นข้อดีเหนือการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค flame photometry atomic absorption spectrometry (AAS) หรือ inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-AES) เนื่องจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค AAS และ ICP-AES มีข้อเสียคือต้องใช้ปริมาณสารตัวอย่างในการวิเคราะห์มาก เครื่องมือที่ใช้มีราคาค่อนข้างสูง และขนาดใหญ่ ทำให้มีข้อจำกัดในการนำไปวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักในภาคสนาม นอกจากนี้เทคนิคดังกล่าวต้องคำนึงถึงการกำจัดสารรบกวนในกรณีที่ใช้สารตัวอย่างเป็นน้ำกร่อย น้ำทะเล สิ่งมีชีวิตจากทะเลหรือดินตะกอน ที่มีเกลือปนเปื้อนเป็นจำนวนมาก ซึ่งอาจทำให้เกิดการอุดตันของเครื่องมือขณะทำการวิเคราะห์ (salt-clogging)

การออกแบบเซ็นเซอร์ให้สามารถตรวจวัดไอออนโดยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปีได้อย่างมีประสิทธิภาพนั้น จำเป็นต้องออกแบบให้ระบบโครงสร้างโมเลกุล (molecular system) ของเซ็นเซอร์ทำงานได้ โดยใช้แสงเหนี่ยวนำให้เกิดสภาวะกระตุ้น (light-induced logic operation) เพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงของการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ หรือการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเล็ต และภายในโครงสร้างควรมีส่วนของโมเลกุลที่แสดงอันตรกิริยาจำเพาะ (selective interaction) ต่อไอออนที่ต้องการวิเคราะห์ด้วย

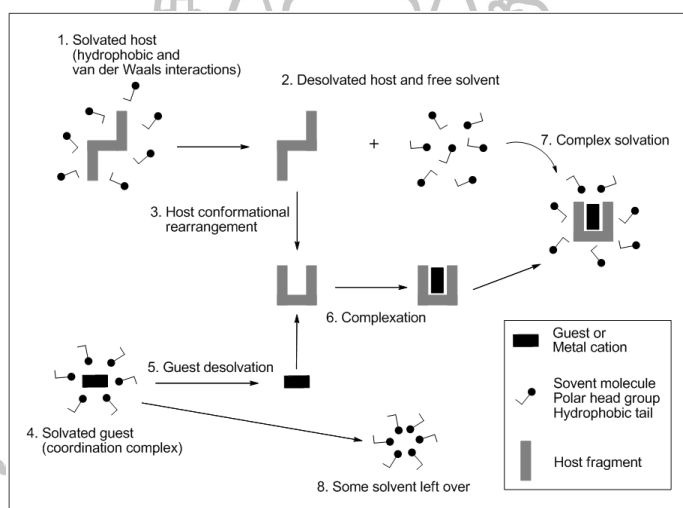
โดยทั่วไปโครงสร้างโมเลกุลของสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ (fluorescence sensor) ประกอบด้วย 2 ส่วนหลัก ได้แก่ 1. ฟลูออโรฟอร์ (fluorophore) คือส่วนที่แสดงคุณสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อมีการดูดกลืนพลังงานในช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสม 2. ไอโอโนฟอร์

(ionophore) เป็นส่วนที่สามารถตรวจจับโมเลกุลหรือไอออนที่ต้องการตรวจวัด ดังนั้นจึงเรียกสารที่ใช้วิเคราะห์โดยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปีนี้ว่า “ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์” หรือ “ฟลูออโรไอออนฟออร์ (fluoroionophore)” โดยส่วนที่แสดงสัญญาณเปรียบเสมือนตัวแปลงสัญญาณ เปลี่ยนข้อมูลของกลไกการตรวจจับของไอออน (recognition event) ไปสู่การเปลี่ยนแปลงสัญญาณทางแสง (optical signal) ดังนั้นการพัฒนาประสิทธิภาพของเซ็นเซอร์จึงขึ้นกับการปรับเปลี่ยนโครงสร้างส่วนฟลูออโรฟออร์ เพื่อพัฒนาสภาพไวของการวิเคราะห์ (sensitivity) และการปรับเปลี่ยนโครงสร้างส่วนไอออนฟออร์เพื่อพัฒนาความจำเพาะเจาะจง (selectivity) ต่อไอออนที่ต้องการวิเคราะห์

วิทยานิพนธ์นี้ได้เสนอการสังเคราะห์เซ็นเซอร์สำหรับตรวจจับไอออนปรอทชนิดใหม่เพื่อให้มีสภาพไวสูง (high sensitivity) และมีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนชนิดใดชนิดหนึ่ง (high selectivity) โดยมีหลักการต่างๆ เช่น การสังเคราะห์เซ็นเซอร์สำหรับปรอท เนื่องจากไอออนปรอท (Hg^{2+}) มีขนาดอะตอมใหญ่และโพลาริซได้ง่าย จัดเป็น soft acid (จาก Pearson's principle หรือทฤษฎี Hard and Soft Acid and Base) [8] ซึ่งชอบเกิดอันตรกิริยาและสร้างพันธะ (bond binding) กับอะตอมหรือหมู่ฟังก์ชัน (functional group) ที่เป็น soft base เช่น อะตอมไนโตรเจนและอะตอมซัลเฟอร์ ที่มีขนาดใหญ่และมีความหนาแน่นของอิเล็กตรอนสูง ดังนั้นวิทยานิพนธ์นี้จึงเลือกสังเคราะห์ส่วนไอออนฟออร์ที่มีอะตอมไนโตรเจนและอะตอมซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ [9-11] เพื่อทำหน้าที่เป็น soft donor ligand ให้อิเล็กตรอนแก่ไอออนปรอท เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวัดและเพิ่มความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนโลหะหนัก และเลือกสังเคราะห์โมเลกุลให้มีลักษณะเป็นสายโซ่ยาว (long chain) เพื่อให้เกิดอันตรกิริยากับไอออนในตำแหน่งที่เหมาะสมโดยการม้วนตัวล้อมรอบไอออนโลหะหนักได้อย่างอิสระ (self assembly) เพื่อขจัดปัญหาเรื่องขนาดของช่องว่างที่ไม่เหมาะสม สำหรับงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ฟลูออโรฟออร์ชนิดหมู่ฟลูออเรสซิน (fluorescein group) และโรดามีนบี (rhodamine B group) ซึ่งเป็นสารประกอบอะโรมาติก (aromatic compound) ที่มีค่าประสิทธิภาพเชิงควอนตัมทางฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence quantum yield; Φ_f) สูง จึงให้ฟลูออเรสเซนซ์ได้ดี โดยฟลูออโรฟออร์ทั้งสองชนิดคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในช่วงการมองเห็นได้ (visible region) [12-15] ซึ่งมีประโยชน์ต่อการนำไปพัฒนาใช้ในอุปกรณ์ในภาคสนามต่อไป นอกจากนี้ฟลูออโรฟออร์ทั้งสองชนิดมีโครงสร้างที่ง่ายต่อการปรับเปลี่ยนจึงเหมาะที่จะนำมาศึกษาและพัฒนาเป็นเซ็นเซอร์ชนิดใหม่ต่อไป

จากการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลโฮสต์-เกสต์ (host-guest chemistry) เพื่อการออกแบบและสร้างเครื่องมือนำไปใช้งาน โดยออกแบบโมเลกุลโฮสต์ (host) ให้จับกับโมเลกุลเกสต์

(guest) ได้อย่างจำเพาะเจาะจงนั้นต้องพิจารณาถึงความเหมาะสมในด้าน 1. อันตรกิริยา (interaction) ที่จะเกิดขึ้นระหว่างไอออนฟอรักับไอออนที่ต้องการตรวจจับ ซึ่งสามารถเกิดได้หลายลักษณะ เช่น อันตรกิริยาไอออน-ไอออน (ion-ion interaction) อันตรกิริยาไอออน-ไดโพล (ion-dipole interaction) อันตรกิริยาไดโพล-ไดโพล (dipole-dipole interaction) พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonding) อันตรกิริยาไพ-ไพ (π - π interaction) และ อันตรกิริยาแคทไอออน-ไพ (cation- π interaction) เป็นต้น ซึ่งอันตรกิริยาดังกล่าวมีความแข็งแรงของพันธะแตกต่างกัน หากพันธะที่เกิดขึ้นมีความแข็งแรงมาก การตรวจจับก็จะมีประสิทธิภาพที่ดี และ/หรือ 2. โครงสร้างโมเลกุลของโฮสต์ควรมีขนาดรูปร่างหรือขนาดช่องว่างที่เหมาะสม (size fit requirement) ต่อโมเลกุลเกสต์ เพื่อเพิ่มความจำเพาะของการวิเคราะห์ได้อีกด้วย

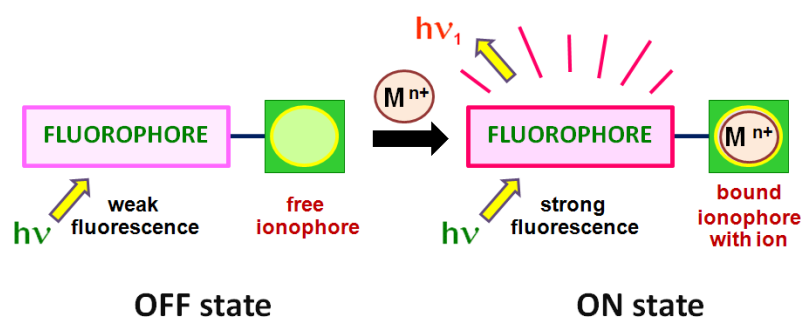


ภาพที่ 1 การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไอออนฟอรัและไอออน

ในที่นี้ส่วนไอออนฟอรัเปรียบเสมือนโฮสต์ และไอออนที่ต้องการตรวจจับเปรียบเสมือนเกสต์ ซึ่งกระบวนการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโฮสต์กับเกสต์ในสารละลายสามารถแสดงดังภาพที่ 1 เมื่ออยู่ในสารละลาย ตัวทำละลายจะจัดตัวล้อมรอบโมเลกุลโฮสต์ด้วยอันตรกิริยาแวนเดอร์วาลส์ (van der Waals) และอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) และล้อมรอบโมเลกุลเกสต์ด้วยอันตรกิริยาโคออร์ดิเนต (coordination) เพื่อให้สารทั้งสองสามารถคงตัวอยู่ได้ในสารละลาย ซึ่งการเกิดการตรวจจับหรือการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไอออนฟอรัและไอออนนั้น โมเลกุลของสารทั้งสองชนิดจำเป็นต้องใช้พลังงานเพื่อทำลายแรงยึดเหนี่ยวที่เกิดจากโมเลกุลของสารละลาย เพื่อให้ได้โมเลกุลอิสระ จากนั้นโมเลกุลโฮสต์อิสระจะเกิดการปรับเปลี่ยนโครงสร้าง

เพื่อให้มีขนาดและรูปร่างที่เหมาะสมกับเกสต์ จึงสามารถตรวจจับไอออนที่ต้องการได้ ในขณะที่สารประกอบที่เกิดขึ้นจะถูกโมเลกุลของสารละลายล้อมรอบไว้เช่นเดียวกัน[16] ซึ่งกระบวนการตรวจจับไอออนของเซ็นเซอร์ที่สังเคราะห์ได้ในงานนี้ เสนอกระบวนการทำงานที่ทำให้เซ็นเซอร์เกิดการเปลี่ยนแปลงการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์นี้ สามารถอธิบายได้ 2 แบบด้วยกัน

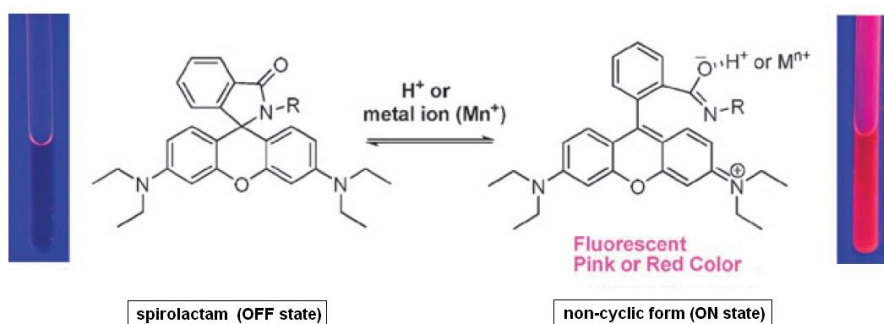
1. การเปลี่ยนแปลงแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ในลักษณะคล้ายการปิด-เปิดสวิตช์ไฟ (OFF-ON system) แสดงดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ลักษณะการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ก่อนไอออนฟลูออโรตรวจจับไอออนโลหะ (ซ้าย) และภายหลังตรวจจับไอออนโลหะ (ขวา)

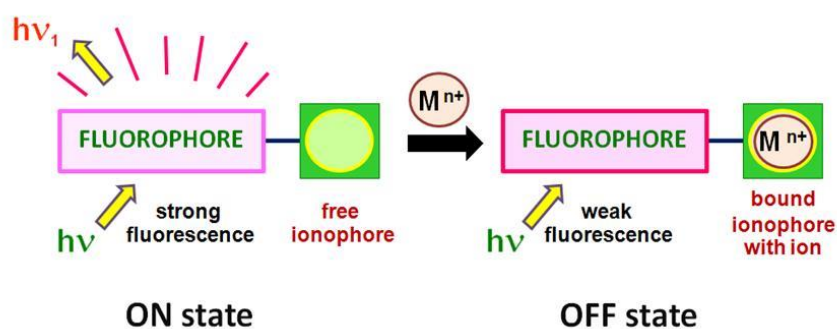
จากภาพที่ 2 สามารถอธิบายได้ว่า ในภาวะที่สารละลายไม่มีไอออนโลหะ เซ็นเซอร์สามารถคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ออกมาได้ในปริมาณความเข้มแสงต่ำ ในทางตรงข้ามหากมีไอออนโลหะอยู่ในสารละลาย ไอออนโลหะจะเข้าจับกับไอออนฟลูออโรทำให้เซ็นเซอร์คายแสงฟลูออเรสเซนซ์ออกมาได้มากขึ้น โดยความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์จะเพิ่มขึ้นในลักษณะแปรผันตามกับปริมาณไอออนโลหะในสารละลาย

โดยการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซ็นเซอร์ภายหลังการตรวจจับไอออน [17] : กระบวนการทำงานของเซ็นเซอร์แบบแรกเกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซ็นเซอร์เมื่อมีการตรวจจับไอออน แสดงได้ดังภาพที่ 3 กล่าวคือ ในภาวะที่สารละลายไม่มีไอออน เซ็นเซอร์จะมีการปิดวง spirolactam ทำให้เกิดการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้น้อยมาก (OFF state) เนื่องจากระบบคอนจูเกต (conjugation system) ในโครงสร้างของเซ็นเซอร์ไม่ต่อเนื่อง และค่อนข้างสั้น แต่เมื่อเซ็นเซอร์เกิดอันตรกิริยากับไอออน ทำให้เกิดการเปิดวง spirolactam และเหนี่ยวนำให้อิเล็กตรอนในโครงสร้างเคลื่อนที่เข้าสู่ระบบคอนจูเกต จึงสังเกตเห็นการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ออกมาในปริมาณที่เพิ่มขึ้น (ON state)



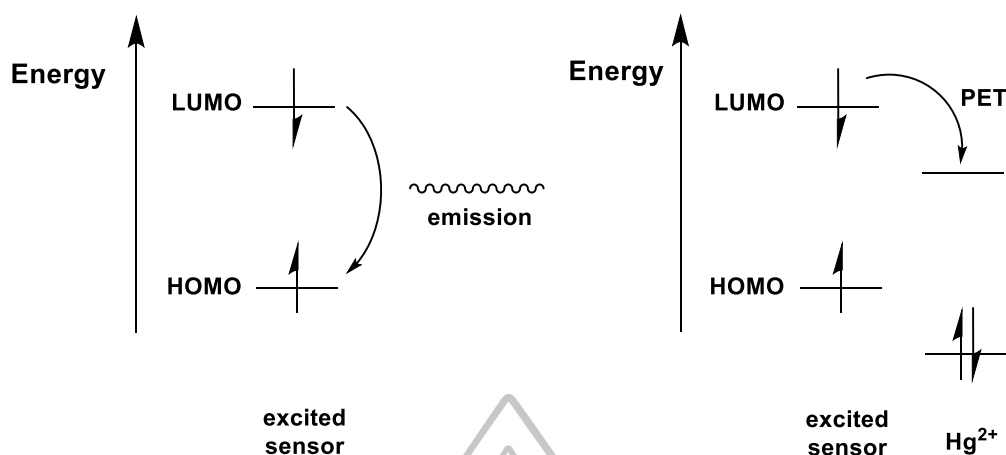
ภาพที่ 3 กระบวนการปิด (OFF state) และเปิดวง spirolactam (ON state) [17]

2. การเปลี่ยนแปลงแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ในลักษณะคล้ายการเปิด-ปิดสวิตช์ไฟ (ON-OFF system) แสดงดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ลักษณะการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ก่อนไอโอโนฟอร์ตรวจับไอออนโลหะ (ซ้าย) และภายหลังตรวจับไอออนโลหะ (ขวา)

จากภาพที่ 4 สามารถอธิบายได้ว่า ในภาวะที่สารละลายไม่มีไอออนโลหะ เซ็นเซอร์สามารถคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ออกมา ในทางตรงข้าม หากมีไอออนโลหะอยู่ในสารละลาย ไอโอโนฟอร์จะเข้าจับไอออนโลหะ ทำให้เซ็นเซอร์คายแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้น้อยลง โดยความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ลดลงในลักษณะแปรผกผันกับปริมาณไอออนในสารละลาย ซึ่งสามารถเสนอแผนภาพเพื่ออธิบายกลไกการลดลงของแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้ดังภาพที่ 5

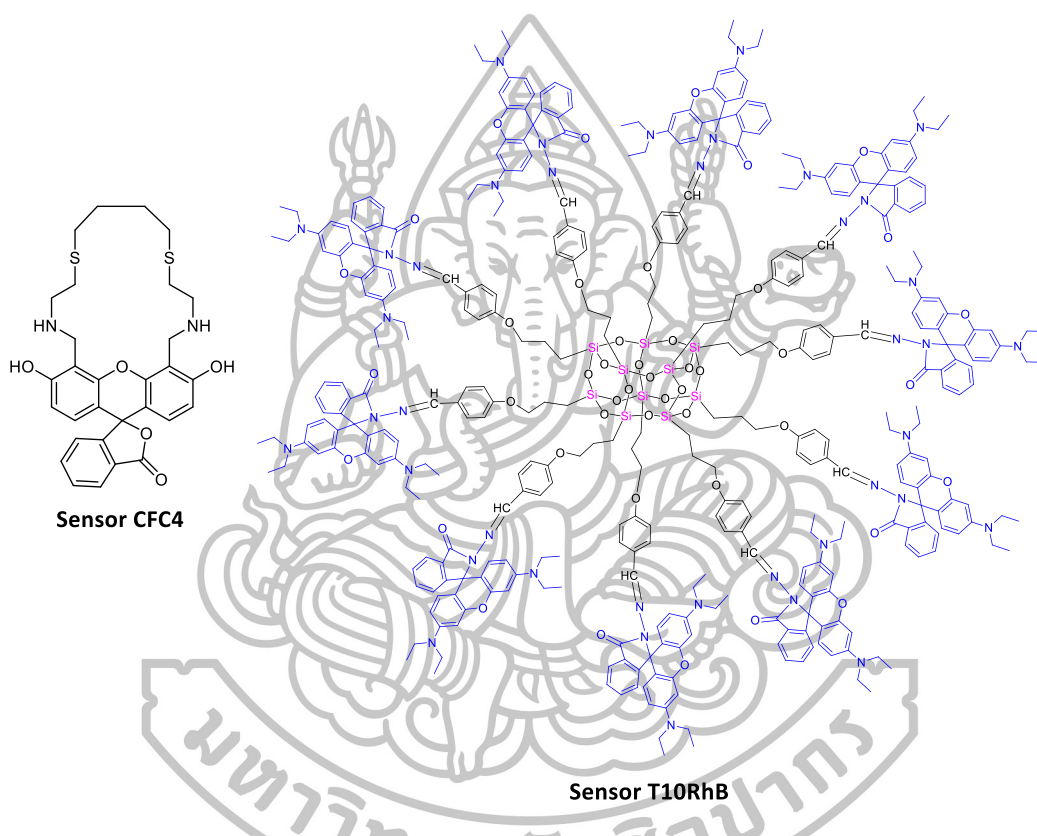


ภาพที่ 5 กระบวนการ photoinduced electron transfer ก่อนดักจับไอออน (ซ้าย)

และหลังดักจับไอออน (ขวา)

กลไกการส่งผ่านอิเล็กตรอนจากไอออนปรอทไปสู่เซ็นเซอร์เช่นนี้ เรียกว่า กระบวนการ photoinduced electron transfer (PET) [18-19] โดยในสถานะที่สารละลายไม่มีไอออนปรอท (ภาพซ้าย) เมื่อกระตุ้นเซ็นเซอร์ด้วยแสงความยาวคลื่นที่เหมาะสม อิเล็กตรอนในระดับพลังงาน HOMO (the highest occupied molecular orbital) ของเซ็นเซอร์จะรับพลังงานและเปลี่ยนระดับพลังงานไปยังระดับพลังงาน LUMO (the lowest unoccupied molecular orbital) ทำให้ระดับพลังงาน HOMO ของเซ็นเซอร์ว่าง เมื่อระบบต้องการลดพลังงานเพื่อกลับลงสู่สถานะพื้น อิเล็กตรอนดังกล่าวจึงกลับสู่ระดับพลังงานเดิม (HOMO ของเซ็นเซอร์) และคายพลังงานในรูปแบบของแสงฟลูออเรสเซนซ์ออกมา ในทางตรงกันข้าม หากเซ็นเซอร์เกิดอันตรกิริยากับไอออนปรอท (ภาพขวา) ระดับพลังงาน LUMO ของไอออนปรอทจะมีค่าสูงกว่าระดับพลังงาน HOMO ของเซ็นเซอร์ แต่มีค่าต่ำกว่าระดับพลังงาน LUMO ของเซ็นเซอร์ เมื่อเซ็นเซอร์ถูกกระตุ้นด้วยแสง อิเล็กตรอนในระดับพลังงาน HOMO ของเซ็นเซอร์จะขึ้นสู่ระดับพลังงาน LUMO และเมื่อระบบต้องการลดพลังงานเพื่อกลับลงสู่สถานะพื้น อิเล็กตรอนในระดับพลังงาน LUMO ของเซ็นเซอร์จะเคลื่อนลงสู่ระดับพลังงาน LUMO ของไอออนปรอท ผลของการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนเช่นนี้ ทำให้การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ลดลง และ/หรือไม่คายแสงฟลูออเรสเซนซ์เนื่องจากเกิด intramolecular electron transfer quenching

จากภาพที่ 6 แสดงโครงสร้างสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์สำหรับวิทยานิพนธ์นี้ โดยคาดว่า ภายหลังจากการตรวจจับไอออนปรอท เซ็นเซอร์ CFC4 อาจเกิดกระบวนการ photoinduced electron transfer (PET) ภายหลังจากการตรวจจับไอออน ส่งผลให้เห็นสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่ลดลง ส่วน เซ็นเซอร์ T10RhB ออกแบบให้เกิด open spirolactam ring ของ fluorophore เมื่อมีการจับไอออน โลหะหนัก ส่งผลให้เห็นสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่เพิ่มขึ้น



ภาพที่ 6 โครงสร้างสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์สำหรับวิทยานิพนธ์นี้

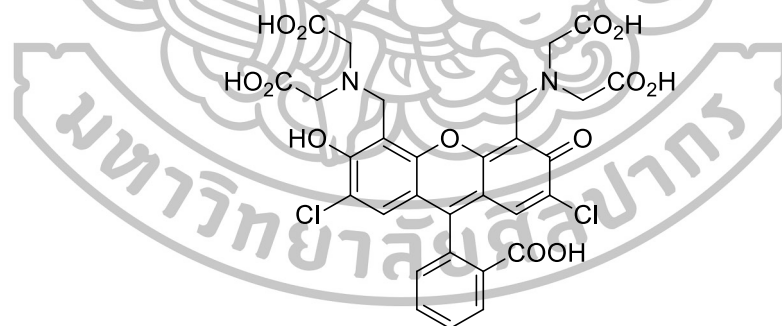
วิทยานิพนธ์นี้ถือได้ว่าเป็นการออกแบบและพัฒนาเครื่องมือตรวจจับไอออนให้มีความไว และมีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนโลหะ โดยทดสอบความสามารถตรวจจับไอออนโลหะต่างๆ ได้แก่ โลหะทรานซิชัน โลหะอัลคาไลน์ และโลหะอัลคาไลน์เอิร์ท ในสารละลาย ซึ่งฟลูออเรสเซนต์ เซ็นเซอร์ชนิดใหม่นี้ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากไอโอโนฟอร์ที่มีอะตอมซัลเฟอร์ และ/หรือไนโตรเจนเป็น องค์ประกอบ คาดว่าเซ็นเซอร์ชนิดใหม่ สามารถตรวจจับไอออนได้อย่างจำเพาะเจาะจง รวมทั้ง ดูดกลืนและคายแสงในช่วง visible ซึ่งง่ายต่อการพัฒนาหรือประยุกต์เป็นเครื่องมือที่มีราคาไม่ แพงต่อไปได้ในอนาคต

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

การนำโมเลกุลของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ หรือฟลูออโรโอบีโอโอฟอร์ มาใช้ในการติดตามหรือตรวจจับปริมาณไอออนโลหะหนัก เป็นเทคนิคที่ได้รับความสนใจจากนักวิจัยอย่างแพร่หลาย โดยนักวิจัยมุ่งหวังที่จะพัฒนาการสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ เพื่อใช้เป็นเซ็นเซอร์สำหรับติดตามหรือตรวจวัดไอออนโลหะหนักที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ทั้งในด้าน สภาพความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) ไอออน และความจำเพาะเจาะจง (selectivity) ต่อไอออนโลหะหนัก รวมไปถึงการประยุกต์ใช้เซ็นเซอร์ในการวิเคราะห์ไอออนในสารละลายน้ำ และ/หรือ ในสารละลายผสมของตัวทำละลายอินทรีย์กับน้ำได้ ซึ่งในที่นี้ได้แสดงตัวอย่างบทความวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดไอออนโลหะ ดังนี้

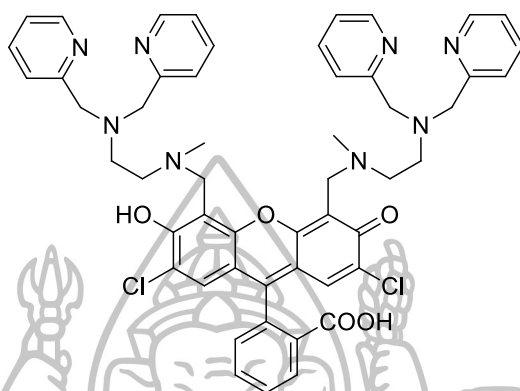
ค.ศ. 2006 Jun และคณะ [20] ได้นำไอโอบีโอโอฟอร์ชนิด diethyl iminodiacetate มาต่อกับ fluorescein derivative ซึ่งเป็นฟลูออโรโอฟอร์เพื่อทำการสังเคราะห์ diethyl iminodiacetate fluorescein (ภาพที่ 7) ซึ่งสามารถใช้เป็นเซ็นเซอร์ตรวจจับไอออนทองแดงได้ในสารละลาย HEPES buffer pH 7.4 โดยมี detection limit เท่ากับ 2.6×10^{-5} M และแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่มีความยาวคลื่นที่ 522 nm



เซ็นเซอร์ 1

ภาพที่ 7 โครงสร้างเซ็นเซอร์ 1

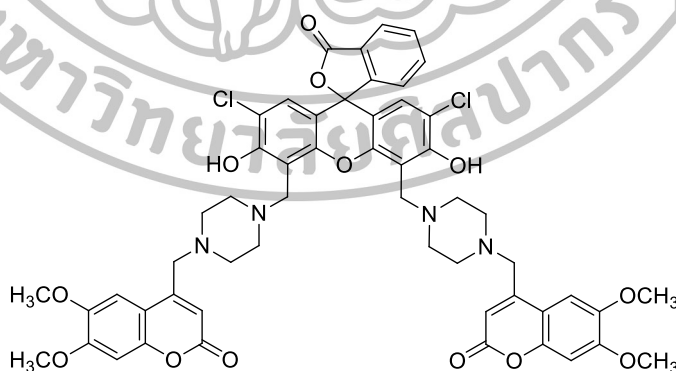
ค.ศ. 2007 Swamy และคณะ [21] ได้นำไอโอโนฟอร์ชนิด N'-Methyl-N, N-bis-pyridin-2-ylmethyl-ethane-1,2-diamine มาต่อกับ fluorescein derivative เพื่อทำการสังเคราะห์เซ็นเซอร์ (ภาพที่ 8) ซึ่งสามารถตรวจจับไอออนปรอท, pyrophosphate และ ATP ได้ในสารละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ



เซ็นเซอร์ 2

ภาพที่ 8 โครงสร้างเซ็นเซอร์ 2

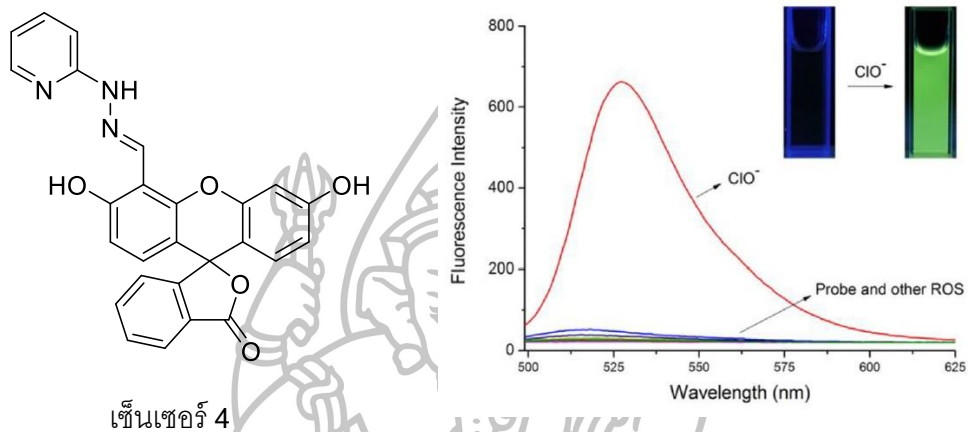
ค.ศ. 2010 Kim และคณะ [22] ได้นำไอโอโนฟอร์ชนิด piperazinyl-coumarin มาต่อกับ fluorescein derivative ซึ่งเป็นฟลูออโรฟอร์เพื่อทำการสังเคราะห์ dichlorofluorescein-coumarin derivative (ภาพที่ 9) ซึ่งสามารถใช้เป็นเซ็นเซอร์ตรวจจับไอออนปรอทได้ในสารละลาย DMSO/aqueous buffer (1:99) โดยมี detection limit เท่ากับ 4.3×10^{-6} M และแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่มีความยาวคลื่นที่ 527 nm



เซ็นเซอร์ 3

ภาพที่ 9 โครงสร้างเซ็นเซอร์ 3

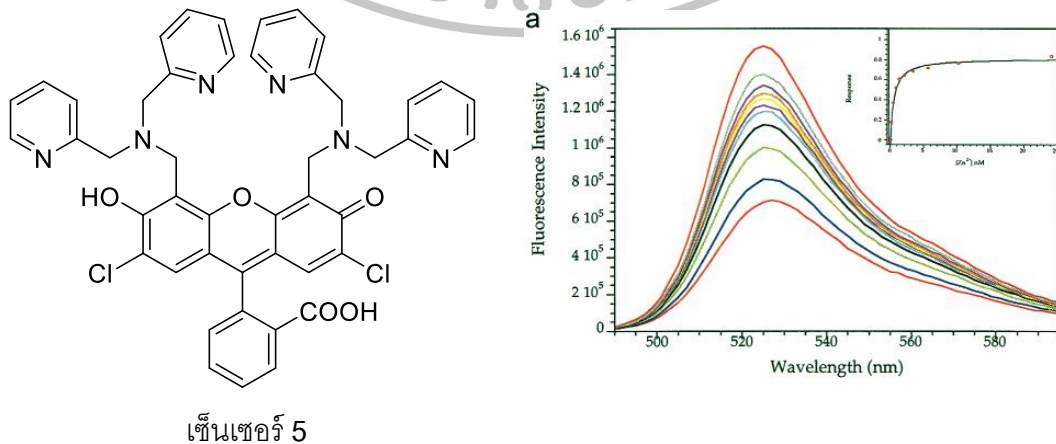
ค.ศ. 2015 Chen และคณะ [23] ได้นำไฮโดรซิดีน 1-(pyridin-2-yl)hydrazine มาต่อกับ fluorescein derivative ซึ่งเป็นฟลูออโรโพรบ์เพื่อทำการสังเคราะห์ dichlorofluorescein-coumarin monoaldehyde (ภาพที่ 10) ซึ่งสามารถใช้เป็นเซ็นเซอร์ตรวจจับ hypochlorite anion ได้ในสารละลาย 10 mM PBS, 1% (v/v) CH₃CN, pH = 7.4 โดยมี detection limit เท่ากับ 7.3 nM และแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่มีความยาวคลื่นที่ 521 nm



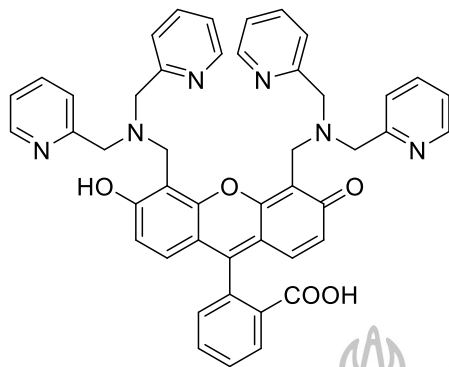
เซ็นเซอร์ 4

ภาพที่ 10 โครงสร้างเซ็นเซอร์ 4 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มี hypochlorite anion กับไอออนอื่นๆ

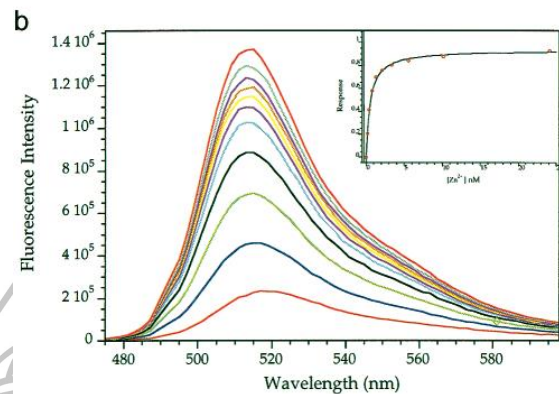
ค.ศ. 2001 Lippard และคณะ [24] ได้นำไฮโดรซิดีน di-(2-picoly)amine มาต่อกับ fluorescein derivative ซึ่งเป็นฟลูออโรโพรบ์เพื่อทำการสังเคราะห์ เซ็นเซอร์ 5 และ เซ็นเซอร์ 6 (ภาพที่ 11) ซึ่งสามารถใช้เป็นเซ็นเซอร์ตรวจจับไอออนสังกะสีได้ในสารละลาย PIPES buffer (100 mM KCl, 50 mM PIPES, pH 7) โดยมี detection limit เท่ากับ 0.1 nM และแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่มีความยาวคลื่นที่ 527 nm และ 512 nm สำหรับ เซ็นเซอร์ 5 และ เซ็นเซอร์ 6 ตามลำดับ



เซ็นเซอร์ 5

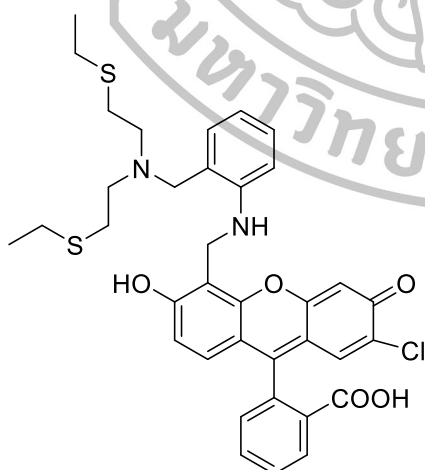


เซ็นเซอร์ 6

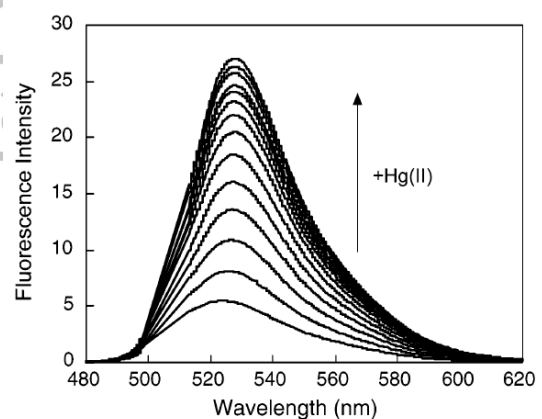


ภาพที่ 11 โครงสร้างเซ็นเซอร์ 5, เซ็นเซอร์ 6 และการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนสังกะสีในปริมาณต่างๆ

ค.ศ. 2003 Lippard และคณะ [25] ได้นำไอโอโนฟอร์ชนิด *N*-(2-Aminobenzyl)-3,9-dithia-6-azaundecane มาต่อกับ fluorescein derivative ซึ่งเป็นฟลูออโรฟอร์เพื่อทำการสังเคราะห์ เซ็นเซอร์ 7 (ภาพที่ 12) ซึ่งสามารถใช้เป็นเซ็นเซอร์ตรวจจับไอออนปรอทได้ในสารละลาย 50 mM PIPES buffer, 100 mM KCl โดยมี detection limit น้อยกว่า 2 ppb และแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่นที่ 528 nm

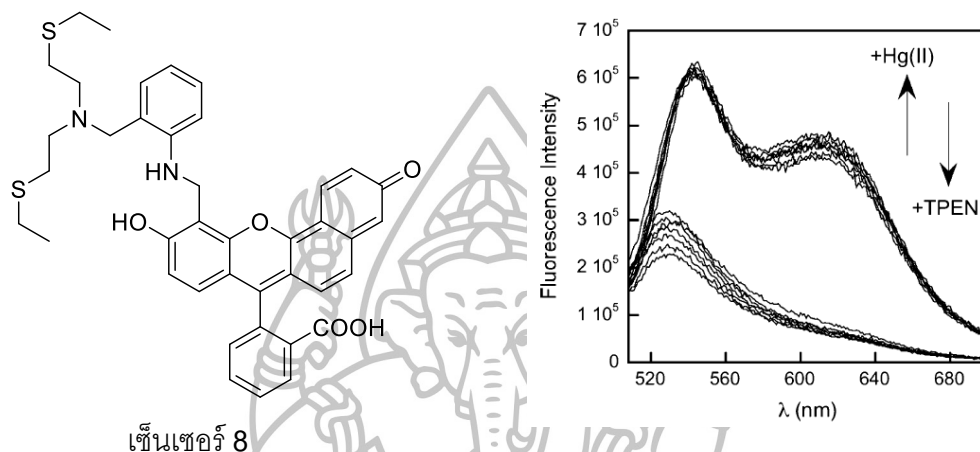


เซ็นเซอร์ 7



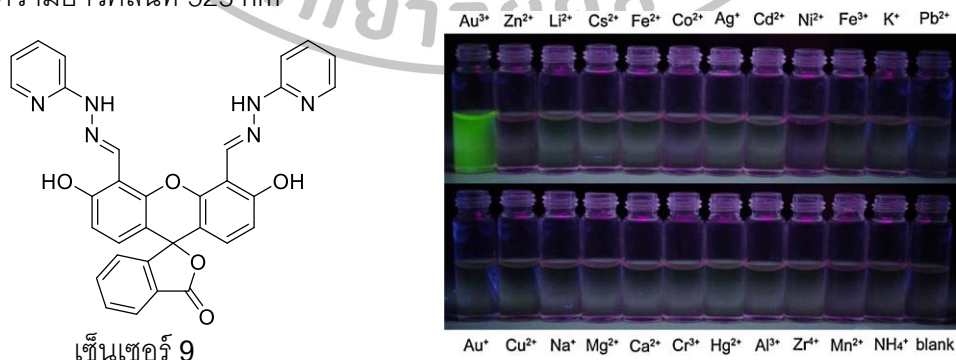
ภาพที่ 12 โครงสร้างเซ็นเซอร์ 7 และการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนปรอทในปริมาณต่างๆ

ค.ศ. 2007 Lippard และคณะ [26] ได้นำไอโอโนฟอร์ชนิด *N*-(2-Aminobenzyl)-3,9-dithia-6-azaundecane มาต่อกับ seminaphthofluorescein aldehyde ซึ่งเป็นฟลูออโรฟอร์เพื่อทำการสังเคราะห์ เซ็นเซอร์ 8 (ภาพที่ 13) ซึ่งสามารถใช้เป็นเซ็นเซอร์ตรวจจับไอออนปรอทได้ในสารละลาย 50 mM PIPES, 100 mM KCl, pH 7 โดยมี detection limit เท่ากับ 50 nM และแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่มีความยาวคลื่นที่ 530 nm



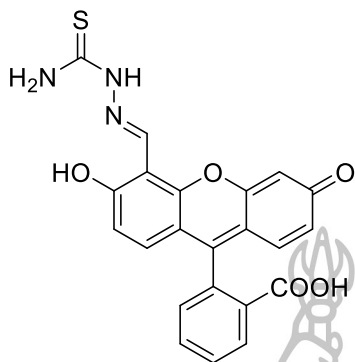
ภาพที่ 13 โครงสร้างเซ็นเซอร์ 8 และการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนปรอทและ TPEN

ค.ศ. 2015 Kambam และคณะ [27] ได้นำไอโอโนฟอร์ชนิด 1-(pyridin-2-yl)hydrazine มาต่อกับ 4',5'-fluoresceindicarboxaldehyde ซึ่งเป็นฟลูออโรฟอร์เพื่อทำการสังเคราะห์ เซ็นเซอร์ 9 (ภาพที่ 14) ซึ่งสามารถใช้เป็นเซ็นเซอร์ตรวจจับไอออนทอง (Au^{3+}) ได้ในสารละลาย HEPES buffer (10 mM, pH 7.4) โดยมี detection limit เท่ากับ 0.07 μM และแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่มีความยาวคลื่นที่ 523 nm

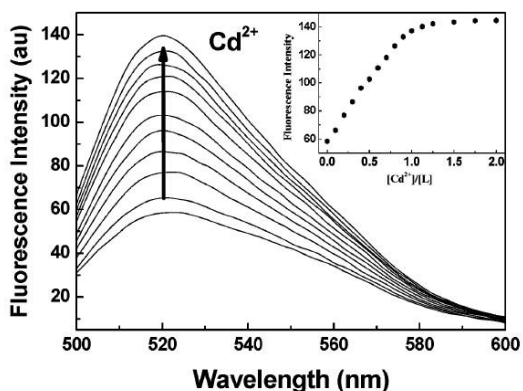


ภาพที่ 14 โครงสร้างเซ็นเซอร์ 9 และการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนทอง (Au^{3+}) เทียบกับไอออนอื่นๆ

ค.ศ. 2007 Wang และคณะ [28] ได้นำไอโอโนฟอร์ชนิด thiosemicarbazide มาต่อกับ fluorescein derivative ซึ่งเป็นฟลูออโรฟอร์เพื่อทำการสังเคราะห์ เซ็นเซอร์ 10 (ภาพที่ 15) ซึ่งสามารถใช้เป็นเซ็นเซอร์ตรวจจับไอออนแคดเมียมได้ ในสารละลาย buffer solution (50 mM HEPES, 100 mM KCl, pH 7.0) โดยแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่มีความยาวคลื่นที่ 521 nm

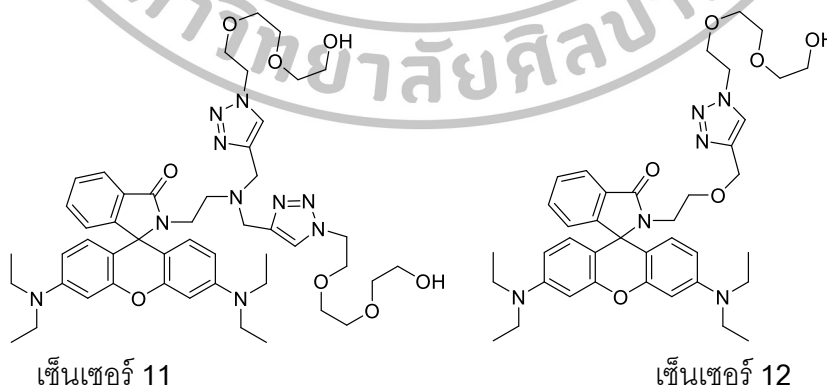


เซ็นเซอร์ 10



ภาพที่ 15 โครงสร้างเซ็นเซอร์ 10 และกราฟคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนแคดเมียมในปริมาณต่างๆ

ค.ศ. 2014 Li และคณะ [29] สังเคราะห์อนุพันธ์ของ rhodamine ดังภาพที่ 16 โดยเซ็นเซอร์ทั้งสองชนิดสามารถตรวจจับไอออนปรอทได้ในน้ำ เมื่อจับกับปรอทสารละลายเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพู และแสดงความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์มากที่สุดที่ความยาวคลื่น 589 nm แต่ไม่พบการรายงานค่า detection limit

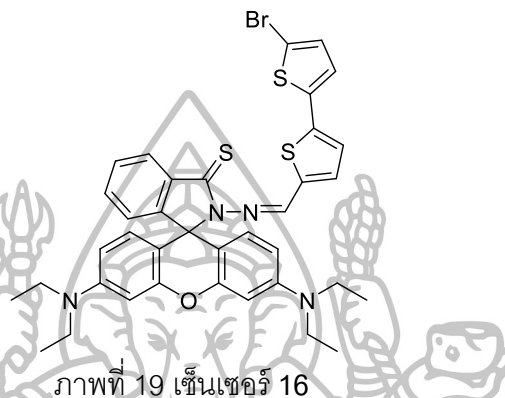


เซ็นเซอร์ 11

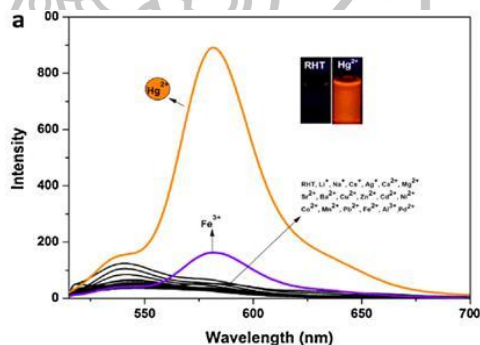
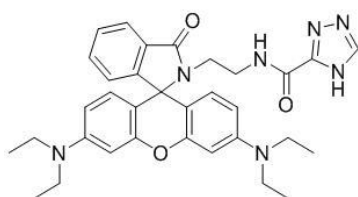
เซ็นเซอร์ 12

ภาพที่ 16 โครงสร้างเซ็นเซอร์ 11 และเซ็นเซอร์ 12

ค.ศ. 2014 Aydin และคณะ [32] นำ rhodamine มาต่อกับ 5-bromo-2,2'-bithiophene-5'-carboxaldehyde เพื่อใช้เป็นปรอทเซ็นเซอร์ (เซ็นเซอร์ 16) ที่มีความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์มากที่สุดที่ความยาวคลื่น 595 nm ในสารละลายผสม acetonitrile และสารละลายบัฟเฟอร์ MOPS เข้มข้น 10 mM pH 7.3 (1:1 v/v) แต่ไม่พบการรายงานค่า detection limit

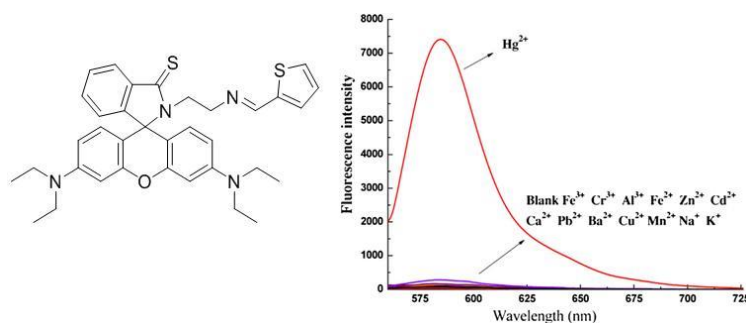


ค.ศ. 2015 Erdemir และคณะ [33] สังเคราะห์เซ็นเซอร์ 17 ที่ประกอบด้วย rhodamine จำนวน 1 หมู่ต่อกับ triazole ในสารละลายผสม DMF และน้ำ (1:1 v/v) ในสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES เข้มข้น 5 mM pH 6.5 พบว่าเมื่อมีการจับไอออนปรอท สารละลายเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพู และแสดงความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์มากที่สุดที่ความยาวคลื่น 580 nm โดยมีค่า detection limit เท่ากับ 1.7×10^{-6} M



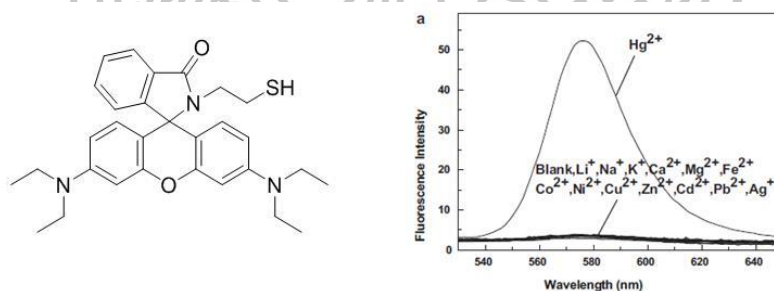
ภาพที่ 20 เซ็นเซอร์ 17 และการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนปรอทในปริมาณต่างๆ

ค.ศ. 2015 Wang และคณะ [34] สังเคราะห์เซ็นเซอร์ 18 จากปฏิกิริยาของ rhodamine B และ 2-thiophenecarboxaldehyde พบว่าเซ็นเซอร์ 18 สามารถใช้เป็นปรอทเซ็นเซอร์ได้ในสารละลายผสม methanol และน้ำ (7:3 v/v) ในสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES เข้มข้น 20 mM pH 7.2 แต่ไม่พบการรายงานค่า detection limit



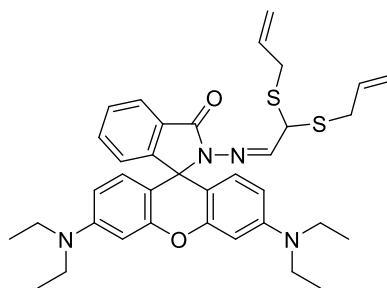
ภาพที่ 21 เซ็นเซอร์ 18 และการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนปรอทในปริมาณต่างๆ

ค.ศ. 2012 Lui และคณะ [35] นำ rhodamine B มาทำปฏิกิริยากับ cysteamine hydrochloride ได้เป็นปรอทเซ็นเซอร์ดังภาพที่ 29 ในสารละลายผสม ethanol และน้ำ เมื่อมีการดักจับไอออนปรอท สารละลายจะเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพู และแสดงความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์มากที่สุดที่ความยาวคลื่น 578 nm แต่ไม่พบการรายงานค่า detection limit



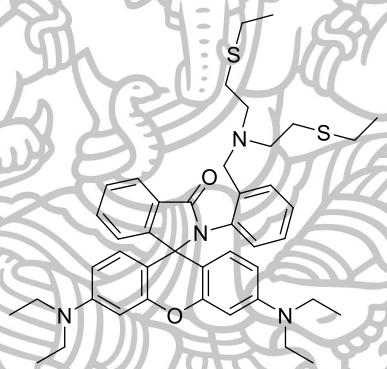
ภาพที่ 22 เซ็นเซอร์ 19 และการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนปรอทกับไอออนอื่นๆ

ค.ศ. 2012 Rode และคณะ [36] สังเคราะห์เซ็นเซอร์ 20 ที่ประกอบด้วย S,S0-diallyl carbohydrazonodithioate และ rhodamine เพื่อใช้เป็นปรอทเซ็นเซอร์ พบว่าความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์มากที่สุดที่ความยาวคลื่น 576.5 nm ในสารละลายผสม ethanol และน้ำ (80:20 v/v) และเมื่อเซ็นเซอร์ 20 จับกับไอออนปรอท สารละลายเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพู โดยมีค่า detection limit เท่ากับ 2.0×10^{-8} M



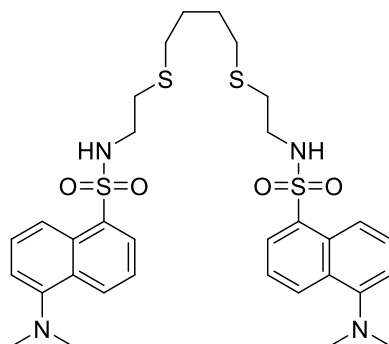
ภาพที่ 23 เซ็นเซอร์ 20

ค.ศ. 2009 Huang และคณะ [37] สังเคราะห์เซ็นเซอร์ 21 โดยเตรียมจาก rhodamine ที่ทำหน้าที่เป็นฟลูออโรฟอร์ สำหรับปรอทเซ็นเซอร์ ในสารละลายผสม acetonitrile และน้ำ (15:85 v/v) พบว่าสามารถตรวจจับไอออนปรอทได้อย่างเฉพาะเจาะจง โดยแสดงความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์มากที่สุดที่ความยาวคลื่น 597 nm และมีค่า detection limit เท่ากับ 1.0×10^{-6} M



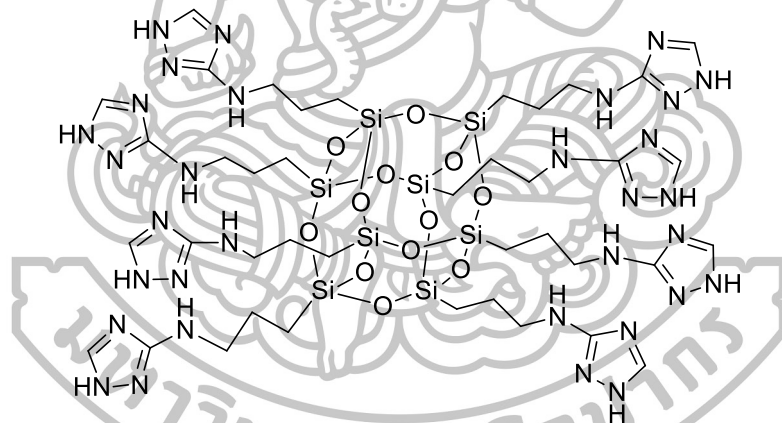
ภาพที่ 24 เซ็นเซอร์ 21

ค.ศ. 2010 Wanichacheva และคณะ [38] ได้สังเคราะห์เซ็นเซอร์ 22 ที่ใช้ไอโอโนฟอร์ ชนิด 2-[4-(2-aminoethylsulfanyl)butylsulfanyl]ethanamine เชื่อมต่อกับ 5-(dimethylamino)-naphthalene-1-sulfonyl chloride ซึ่งทำหน้าที่เป็นฟลูออโรฟอร์ จำนวน 2 หมู่ ดังภาพที่ 32 พบว่าเซ็นเซอร์ 22 นำมาใช้เป็นฟลูออโรไอโอโนฟอร์ เพื่อตรวจจับไอออนปรอท ในสารละลายผสม acetonitrile และน้ำ (80:20 v/v) พบว่าสามารถตรวจจับไอออนปรอทได้อย่างเฉพาะเจาะจง โดยแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์มากที่สุดที่ความยาวคลื่นที่ 525 nm และมี detection limit เท่ากับ 2.49×10^{-7} M



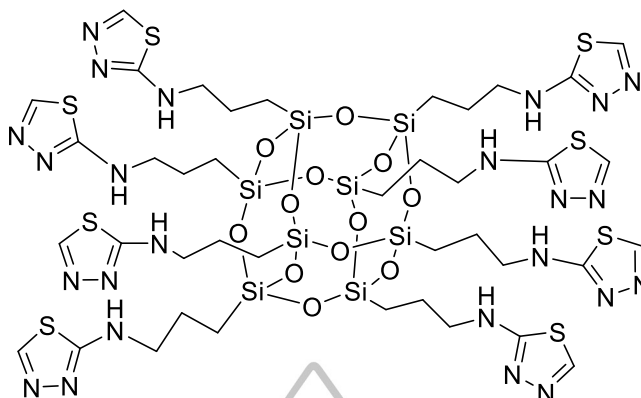
ภาพที่ 25 เซ็นเซอร์ 22

ค.ศ. 2007 Dias Filho และคณะ [39] ได้มีการสังเคราะห์ octakis[3-(3-amino-1,2,4-triazole)propyl]octasilsesquioxane (ภาพที่ 26) ซึ่งเป็นอนุภาคระดับนาโนโมเลกุลที่สามารถดักจับไอออนต่างๆเช่น ทองแดง, นิกเกิล, แคดเมียม, สังกะสีและเหล็ก ในสารละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบได้



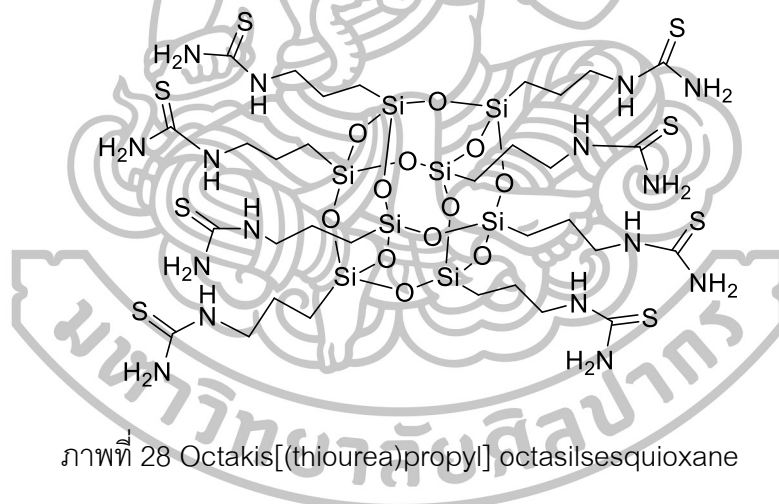
ภาพที่ 26 octakis[3-(3-amino-1,2,4-triazole)propyl]octasilsesquioxane

ค.ศ. 2013 Dias Filho และคณะ [40] ได้มีการสังเคราะห์ octakis[3-(2-amino-1,3,4-thiadiazole)propyl]octasilsesquioxane (ภาพที่ 27) ซึ่งเป็นอนุภาคระดับนาโนโมเลกุลที่สามารถดักจับไอออนต่างๆเช่น ทองแดง, นิกเกิล, และโคบอลต์ ในสารละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบได้



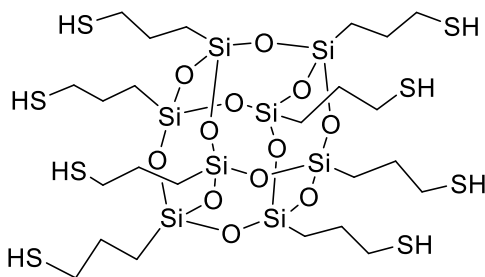
ภาพที่ 27 octakis[3-(2-amino-1,3,4-thiadiazole)propyl]octasilsesquioxane

ค.ศ. 2015 Dias Filho และคณะ [41] ได้มีการสังเคราะห์ Octakis[(thiourea)propyl] octasilsesquioxane (ภาพที่ 28) ซึ่งเป็นอนุภาคระดับนาโนโมเลกุลที่สามารถดักจับไอออนต่างๆ เช่น เหล็ก, โครเมียม, วานาเดียมและสังกะสี ในสารละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบได้



ภาพที่ 28 Octakis[(thiourea)propyl] octasilsesquioxane

ค.ศ. 2014 Wang และคณะ [42] ได้มีการสังเคราะห์ Thiol-rich polyhedral oligomeric silsesquioxane (ภาพที่ 29) ซึ่งเป็นอนุภาคระดับนาโนโมเลกุลที่สามารถดักจับไอออนต่างๆ เช่นปรอทและเมทิลเมอควิรี ในสารละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบได้



ภาพที่ 29 Thiol-rich polyhedral oligomeric silsesquioxane

จากบทความวิจัยข้างต้นจะเห็นได้ว่า โครงสร้างโมเลกุลของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ ประกอบด้วย 2 ส่วนหลัก ส่วนแรกจะเป็นส่วนที่ใช้ในการดักจับไอออนโลหะหนัก (ไอโอโนฟอร์) ซึ่งจะมีคุณสมบัติในการให้อิเล็กตรอน และส่วนที่สอง คือส่วนที่แสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ (ฟลูออโรฟอร์) ซึ่งจะมีความสามารถในการรับอิเล็กตรอน โดยนำทั้งสองส่วนมาต่อกัน และเพื่อให้การส่งผ่านอิเล็กตรอนเกิดได้ดีขึ้น จึงต้องเพิ่มระบบคอนจูเกตให้ยาวขึ้น และยังเป็นการเพิ่มความเข้มของฟลูออเรสเซนต์ ทำให้ได้ฟลูออเรสเซนต์สเปกตรัมที่มีการคายแสงในช่วงความยาวคลื่นที่มากขึ้นอีกด้วย ฟลูออโรฟอร์ ส่วนใหญ่มักเป็นสารประกอบอะโรมาติกที่มีคอนจูเกชัน (conjugation) จำนวนมาก เพื่อให้สารเกิดการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ได้ดี และสำหรับไอโอโนฟอร์ มีทั้งลักษณะที่เป็นวง (cyclic compound) ซึ่งการเลือกใช้ต้องคำนึงถึงอันตรกิริยาระหว่างอะตอมภายในวงและขนาดของวงที่เหมาะสมกับไอออนเป้าหมาย และไอโอโนฟอร์ชนิดสายโซ่ยาว (long chain compound) ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าการปรับเปลี่ยนโครงสร้างเพียงส่วนใดส่วนหนึ่งของเซ็นเซอร์ จะส่งผลต่อความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนได้อีกด้วย

ถึงแม้ว่าการสังเคราะห์สารเซ็นเซอร์สำหรับตรวจจับไอออนโลหะหนักต่างๆ จะมีเป็นจำนวนมาก แต่เซ็นเซอร์ที่ได้หลายชนิดไม่จำเพาะเจาะจงต่อไอออนใดไอออนหนึ่งเพียงชนิดเดียว และยังมีค่า detection limit ที่สูง กล่าวคือไม่สามารถตรวจจับไอออนโลหะที่ปริมาณความเข้มข้นต่ำได้ ดังนั้นในงานวิทยานิพนธ์นี้จึงสนใจการพัฒนาสารเซ็นเซอร์สำหรับตรวจจับไอออนโลหะหนักที่มีความเข้มข้นต่ำ อย่างมีความจำเพาะเจาะจงมากที่สุด โดยเปรียบเทียบกับโลหะทรานซิชัน โลหะอัลคาไลน์ และโลหะอัลคาไลน์เอิร์ท อีกทั้งให้สามารถคายแสงฟลูออเรสเซนต์ในช่วงการมองเห็นได้ (visible region) ซึ่งมีประโยชน์ต่อการนำไปพัฒนาใช้ในอุปกรณ์ตรวจสอบไอออนปรอทในภาคสนามต่อไปได้

บทที่ 3 อุปกรณ์และสารเคมี

1. อุปกรณ์

- 1.1 เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance 300 MHz: Bruker 300
- 1.2 เครื่อง UV-visible spectrometer: HP-8453
- 1.3 เครื่อง Fluorescence spectrometer: Perkin Elmer Luminescence spectrometer model LS-50B
- 1.4 เครื่อง Mass spectrometer: ESI-FT-ICR (High resolution) Bruker BioAPEX 70e spectrometer
- 1.5 เครื่อง Rotary evaporator: Buchi Rotavapor R-114
- 1.6 เครื่อง Vacuum pump: Tokyo Rikakikai Co., Ltd. model A-3S
- 1.7 เครื่อง Hot air oven: Binder model ED115 (E2)
- 1.8 เครื่องชั่งละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง): Denver instrument model S-234
- 1.9 เครื่องชั่งละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง): Mettler Toledo model AB204
- 1.10 เครื่อง Hotplate and stirrer: Framo model M21/1
- 1.11 Micropipette: Finnpiette, HH10711 ขนาด 1-10 μL
- 1.12 TLC Silica gel 60 F₂₅₄ aluminium sheet, Merck
- 1.13 อุปกรณ์สำหรับเตรียมแผ่น preparative TLC: Desaga Brinkmann
- 1.14 กระดาษกรอง: Advantec ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 110 mm
- 1.15 กระดาษกรอง: Advantec ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 70 mm
- 1.16 เครื่องแก้วพื้นฐาน
- 1.17 ชุดกรองแบบลดความดัน
- 1.18 Clamp และ Clamp Holder

2. สารเคมี

- 2.1 Acetonitrile: LAB-SCAN
- 2.2 Argon gas: Masser Specialty Gas Co., Ltd. (99.999 %)
- 2.3 Barium acetate: Sigma-Aldrich (99 %, $M_w = 255.43 \text{ g/mol}$)
- 2.4 Barium chloride dehydrate: Sigma-Aldrich ($M_w = 244.27 \text{ g/mol}$)

- 2.5 Barium perchlorate trihydrate: Strem chemical (99.9 %, $M_w = 336.24$ g/mol)
- 2.6 Cadmium acetate dehydrate: Fluka (98 %, $M_w = 266.53$ g/mol)
- 2.7 Anhydrous cadmium chloride: Fluka ($M_w = 183.31$ g/mol)
- 2.8 Cadmium perchlorate hexahydrate: Strem chemical (99 %, $M_w = 311.30$ g/mol)
- 2.9 Calcium chloride dehydrate: Carlo erba ($M_w = 147.01$ g/mol)
- 2.10 Calcium acetate: Fluka ($M_w = 158.17$ g/mol)
- 2.11 Calcium perchlorate tetrahydrate: Sigma-Aldrich (99 %, $M_w = 311.04$ g/mol)
- 2.12 Chloroform-*d* (contains 1% v/v of TMS): Sigma-Aldrich (99.8 atom %D)
- 2.13 Cobalt acetate tetrahydrate: Fluka ($M_w = 249.08$ g/mol)
- 2.14 Cobalt perchlorate hexahydrate: Sigma-Aldrich ($M_w = 365.93$ g/mol)
- 2.15 Copper acetate monohydrate: Fluka ($M_w = 199.65$ g/mol)
- 2.16 Copper perchlorate hexahydrate: Sigma-Aldrich (98 %, $M_w = 370.54$ g/mol)
- 2.17 Cupric chloride dehydrate: Fluka ($M_w = 170.48$ g/mol)
- 2.18 Cysteamine hydrochloride: Fluka (≥ 97.0 %, $M_w = 113.61$ g/mol)
- 2.19 De-ionized water: Department of chemistry, Silpakorn University
- 2.20 1,4-Dibromobupane: Fluka ($> 99\%$, $d = 1.989$ g/mL, $M_w = 201.89$ g/mol)
- 2.21 Dichloromethane (distillation)
- 2.22 Dichloromethane (for analysis): MERCK (99.8 %)
- 2.23 Dimethyl sulfoxide: Ridel-de-Haen (99.5 %, $d = 1.10$ g/mL, $M_w = 78.13$ g/mol)
- 2.24 Ethanol (distillation)
- 2.25 Ethanol (absolute for analysis): MERCK
- 2.26 Ethylacetate (distillation)
- 2.27 Anhydrous ferric chloride: Fluka ($M_w = 162.21$ g/mol)Hexane (distillation)
- 2.28 Fluorescein dibenzoate: Strem chemical ($M_w = 726.36$ g/mol)
- 2.29 Fluorescein standard: BDH ($M_w = 332.31$ g/mol)
- 2.30 Hydrazine hydrate (80 %, $d = 1.03$ g/mL, $M_w = 50.06$ g/mol)
- 2.31 Hydrochloric acid: J.T. Baker (37% , $d = 1.18$ g/mL, $M_w = 36.46$ g/mol)
- 2.32 Iron acetate: Fluka ($M_w = 232.98$ g/mol)
- 2.33 Iron perchlorate hydrate: Sigma-Aldrich (98 %, $M_w = 354.20$ g/mol)

- 2.34 Lead acetate: Carlo ($M_w = 235.29$ g/mol)
- 2.35 Lead chloride: Unilab ($M_w = 278.10$ g/mol)
- 2.36 Lead perchlorate hydrate: Sigma-Aldrich (98 %, $M_w = 406.09$ g/mol)
- 2.37 Anhydrous lithium chloride: Fluka ($M_w = 42.39$ g/mol)
- 2.38 Lithium perchlorate trihydrate: Strem chemical (99 %, $M_w = 311.30$ g/mol)
- 2.39 Magnesium perchlorate hydrate: Fluka (98 %, $M_w = 223.21$ g/mol)
- 2.40 Magnesium chloride hexahydrate: Fluka ($M_w = 203.31$ g/mol)
- 2.41 Manganese acetate tetrahydrate: Fluka ($M_w = 245.09$ g/mol)
- 2.42 Manganese chloride monohydrate: Sigma-Aldrich ($M_w = 143.86$ g/mol)
- 2.43 Manganese perchlorate hexahydrate: Strem chemical (99 %, $M_w = 253.84$ g/mol)
- 2.44 Mercuric acetate: Fluka ($M_w = 318.68$ g/mol)
- 2.45 Mercuric chloride: Carlo erba ($M_w = 471.50$ g/mol)
- 2.46 Mercuric perchlorate hydrate: Sigma-Aldrich (98 %, $M_w = 372.06$ g/mol)
- 2.47 Mercuric perchlorate trihydrate: Strem chemical (99+ %, $M_w = 399.46$ g/mol)
- 2.48 Methanesulfonylchloride: KANTO CHEMICAL ($M_w = 114.56$ g/mol)
- 2.49 Methanol (distillation)
- 2.50 Methanol (for analysis): MERCK (99.9 %)
- 2.51 Nickel acetate tetrahydrate: BDH ($M_w = 248.84$ g/mol)
- 2.52 Nickel chloride hexahydrate: Fluka ($M_w = 237.71$ g/mol)
- 2.53 Nickel perchlorate hexahydrate: Fluka (≥ 98.0 %, $M_w = 365.69$ g/mol)
- 2.54 Potassium acetate: Fluka ($M_w = 98.14$ g/mol)
- 2.55 Potassium chloride: Fluka ($M_w = 74.55$ g/mol)
- 2.56 Potassium perchlorate: Sigma-Aldrich (99+ %, $M_w = 138.55$ g/mol)
- 2.57 Rhodamine B: Fluka ($M_w = 479.02$ g/mol)
- 2.58 Silica gel 60 (0.063-0.200 mm) สำหรับ column chromatography, Merck
- 2.59 Silica gel 60 F₂₅₄ containing gypsum สำหรับ preparative thin layer chromatography, Merck
- 2.60 Silver acetate: BDH ($M_w = 166.91$ g/mol)
- 2.61 Silver perchlorate monohydrate: Strem chemical (99 %, $M_w = 207.32$ g/mol)

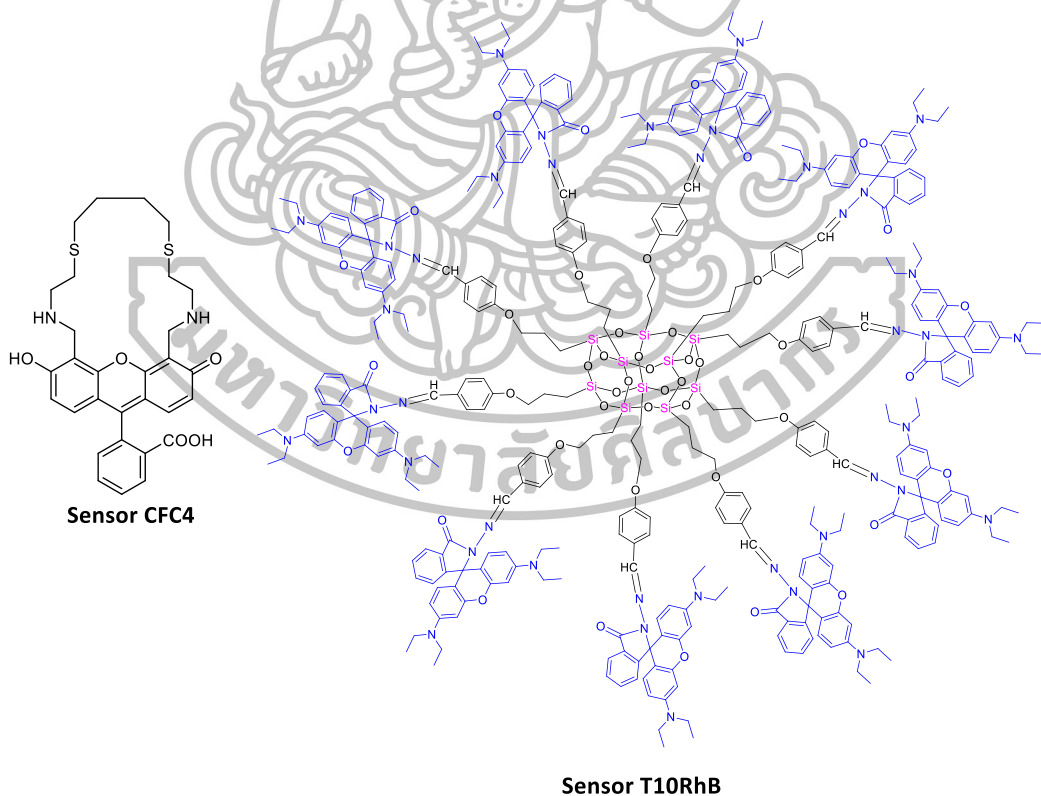
- 2.62 Sulfuric acid: LAB-SCAN (98% w/w, 1.84 g/mL, $M_w = 98.08$ g/mol)
- 2.63 Sodium acetate: Fluka ($M_w = 82.03$ g/mol)
- 2.64 Sodium bicarbonate: Sigma-Aldrich ($M_w = 84.01$ g/mol)
- 2.65 Sodium chloride ($M_w = 58.5$ g/mol)
- 2.66 Sodium hydroxide: Fluka (≥ 98.0 %, $M_w = 40.00$ g/mol)
- 2.67 Sodium methoxide: Fluka (≥ 98.0 %, $M_w = 54.02$ g/mol)
- 2.68 Sodium perchlorate: Fluka (98 %, $M_w = 82.03$ g/mol)
- 2.69 Sodium sulfate anhydrous: Sigma-Aldrich (99.0 %)
- 2.70 Tetrahydrofuran (Analytical reagent; A.R.): LAB-SCAN (99.8 %)
- 2.71 Triethanolamine: CARLO ($M_w = 149.19$ g/mol)
- 2.72 Triethylamine: Ridel-de-Haen (99 %, $d = 0.73$ g/mL, $M_w = 101.19$ g/mol)
- 2.73 Tris(hydroxymethyl)aminomethane buffer: Sigma-Aldrich ($M_w = 121.41$ g/mol)
- 2.74 Zinc acetate dehydrate: Fluka ($M_w = 219.51$ g/mol)
- 2.75 Zinc perchlorate hexahydrate: Sigma-Aldrich ($M_w = 372.36$ g/mol)



บทที่ 4 วิธีการทดลอง

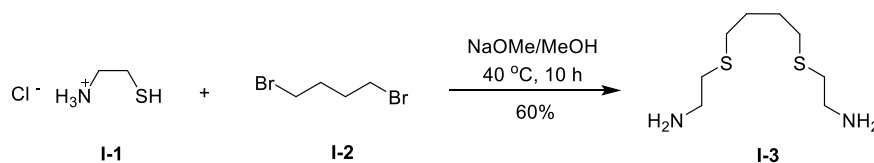
1. การสังเคราะห์เซ็นเซอร์

งานวิจัยนี้ได้ทำการสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์สำหรับตรวจวัดไอออนปรอทใหม่ทั้งหมด 2 ชนิด เซ็นเซอร์ CFC4 ประกอบด้วย 2-[4-(2-aminoethylsulfanyl)butylsulfanyl]-ethanamine ซึ่งทำหน้าที่เป็นไอโอโนฟอร์ เชื่อมต่อกับหมู่ฟลูออเรสซิน (fluorescein group) จำนวน 1 หมู่ ซึ่งทำหน้าที่เป็นฟลูออโรฟอร์ และเซ็นเซอร์ T10RhB ประกอบด้วยส่วนของโรดามีน บี (rhodamine B group) ซึ่งทำหน้าที่เป็นฟลูออโรฟอร์ เชื่อมต่อกับ ไฮโดรราซีน ซึ่งทำหน้าที่เป็นไอโอโนฟอร์ โดยเซ็นเซอร์ชนิดนี้ได้ถูกเชื่อมต่อกับ polyoctahedral silsesquioxanes (POSS) ซึ่งเป็นอนุภาคนาโน โครงสร้างของเซ็นเซอร์ทั้ง 2 ชนิดแสดงดังภาพที่ 30



ภาพที่ 30 โครงสร้างฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ชนิดใหม่ 2 ชนิด

1.1 การสังเคราะห์ไอโอโนฟอร์ชนิด 2-(4-(2-aminoethylsulfanyl)butylsulfanyl)ethanamine (I-3)

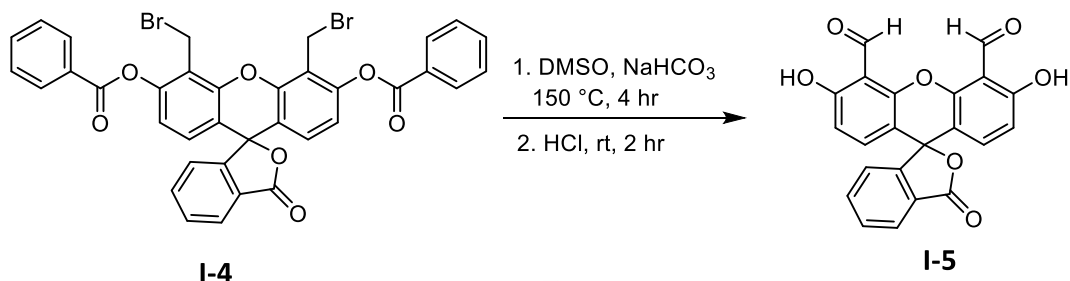


ภาพที่ 31 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์ 2-[4-(2-aminoethylsulfanyl)butylsulfanyl]ethanamine (I-3)

วิธีการสังเคราะห์ 2-[4-(2-aminoethylsulfanyl)butylsulfanyl]ethanamine (I-3) ได้ศึกษาตามวิธีของ Wanichacheva และคณะ [38] ดังภาพที่ 31 โดยซัง sodium methoxide (NaOMe) ปริมาณ 0.68 กรัม (12.0 มิลลิโมล) ใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นละลายด้วย dry methanol (MeOH) ปริมาณ 3.0 มิลลิลิตร และเติมซิสเตอีนไฮโดรคลอไรด์ (cysteamine hydrochloride; I-1) ปริมาณ 1.14 กรัม (10.0 มิลลิโมล) ลงในสารละลาย แล้วจึงกวนปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศอาร์กอน (argon atmosphere) ที่อุณหภูมิห้อง (room temperature) เป็นระยะเวลา 30 นาที แล้วจึงเติม 1,4-ไดโบรมอบิวเทน (1,4-dibromobutane; I-2) ปริมาณ 0.50 มิลลิลิตร (4.19 มิลลิโมล) แล้วกวนปฏิกิริยาพร้อมให้ความร้อนจนอุณหภูมิถึง 40 °C เป็นระยะเวลา 10 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาจึงนำไปกำจัดตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator จากนั้นเติมสารละลาย sodium hydroxide (NaOH) เข้มข้น 30% w/v ปริมาณ 15.0 มิลลิลิตร ลงในขวดปฏิกิริยาข้างต้นและกวนเบาๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำไปสกัดด้วย dichloromethane (CH_2Cl_2) ปริมาณ 20.0 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง โดยเก็บสารละลายชั้น CH_2Cl_2 ที่ได้รวมกัน

นำสารละลายชั้น CH_2Cl_2 ที่ได้ มาสกัดด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water; น้ำ DI) ปริมาณ 60.0 มิลลิลิตร อีกหนึ่งครั้ง โดยเลือกเก็บชั้น CH_2Cl_2 มากำจัดน้ำออกโดยเติม sodium sulfate anhydrous (anh. Na_2SO_4) ลงไปปริมาณเล็กน้อย และนำไปกำจัด CH_2Cl_2 ออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator ได้สาร I-3 มีลักษณะเป็นน้ำมันสีเหลืองอ่อน ปริมาณ 0.44 กรัม (2.11 มิลลิโมล) คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตได้เท่ากับ 60% (นำไปใช้ในปฏิกิริยาขั้นตอนต่อไปโดยไม่ผ่านการแยกบริสุทธิ์)

1.2 การสังเคราะห์ fluorescein dicarboxaldehyde (I-5)



ภาพที่ 32 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์ fluorescein dicarboxaldehyde (I-5)

การสังเคราะห์ fluorescein dicarboxaldehyde (I-5) ได้ศึกษาตามวิธีของ Lippard และคณะ [24] ผู้วิจัยได้รับสารตั้งต้น fluorescein dibenzoate (I-4) จากบริษัท stem chemical ดังนั้นก่อนการสังเคราะห์ผู้วิจัยจึงนำสารตั้งต้นดังกล่าวไปพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิค nuclear magnetic resonance spectroscopy และ mass spectroscopy ก่อนนำมาใช้

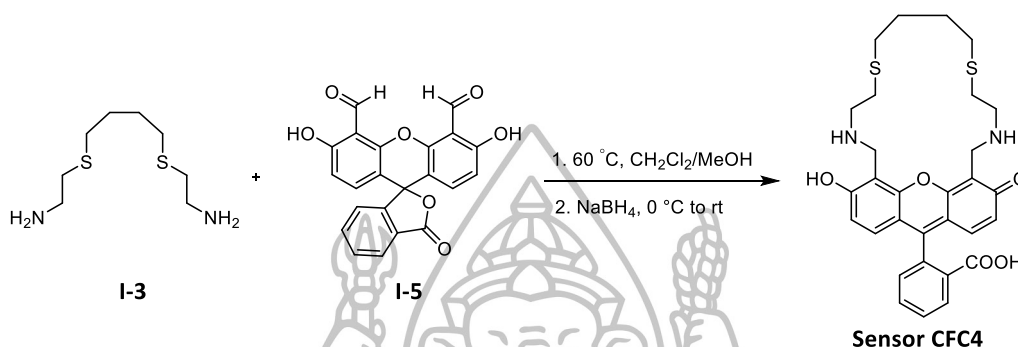
วิธีการสังเคราะห์ fluorescein dicarboxaldehyde (I-5) แสดงได้ดังภาพที่ 32 ซึ่ง fluorescein dibenzoate (I-4) ปริมาณ 0.40 กรัม (0.50 มิลลิโมล) ใส่ขวดก้นกลมขนาด 100 มิลลิลิตร ซึ่งละลายด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาณ 40 มิลลิลิตร จากนั้นเติม โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (NaHCO₃) ปริมาณ 0.40 กรัม (4.80 มิลลิโมล) ลงในสารละลาย กวนปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 150 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (จะได้สารละลายสีแดงเข้ม) เมื่อครบเวลา ทำให้สารละลายเย็นตัวลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง เติมสารละลายไฮโดรคลอริกเจือจาง (2M HCl) ปริมาณ 280 มิลลิลิตร กวนสารละลาย ณ อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง

นำสารละลายที่ได้มาสกัดด้วย dichloromethane ปริมาณ 40 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง เลือกลงเก็บสารละลายชั้นไดคลอโรมีเทน (CH₂Cl₂) และนำไปกำจัดตัวทำละลายออกด้วย rotary evaporator จากนั้นเติมน้ำ DI ปริมาณ 60 มิลลิลิตร ลงในขวดข้างต้น จะได้ตะกอนสีส้มอ่อน กรองตะกอนที่ได้โดยวิธีลดความดัน และล้างตะกอนด้วยน้ำ DI ปริมาณเล็กน้อย

ละลายตะกอนด้วย ไดคลอโรมีเทน (CH₂Cl₂) แล้วเติมโซเดียมซัลเฟต (anh. Na₂SO₄) ปริมาณเล็กน้อยเพื่อกำจัดน้ำที่อาจปนเปื้อนอยู่ จากนั้นกำจัด ไดคลอโรมีเทน (CH₂Cl₂) ออกด้วย rotary evaporator และแยกบริสุทธิ์สารที่ได้ด้วยเทคนิค preparative thin layer chromatography ในที่มืด โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง CH₂Cl₂ และ MeOH ในอัตราส่วน 33:1 v/v ตามลำดับ เป็น mobile phase ได้สารประกอบ I-5 เป็นของแข็งสีส้มเข้ม ปริมาณ 76 มิลลิกรัม (0.20 มิลลิ

โมล) คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตได้เท่ากับ 39.2% มีค่าจุดหลอมเหลวเท่ากับ 301.4-303.9 °C โดยการแยกด้วยเทคนิคนี้มีอัตราการเคลื่อนที่ของสารบนตัวดูดซับ (Retention factor; R_f) เท่ากับ 0.79

1.3 การสังเคราะห์เซ็นเซอร์ CFC4 (Sensor CFC4)



ภาพที่ 33 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์เซ็นเซอร์ CFC4 (Sensor CFC4)

เนื่องจาก fluorescein dicarboxaldehyde (I-5) ที่ได้หลังจากการทำให้บริสุทธิ์ (pure I-5) มีปริมาณน้อย ดังนั้นในการสังเคราะห์ขั้นตอนนี้จึงเลือกใช้สาร I-5 โดยไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (crude I-5) ดังนี้

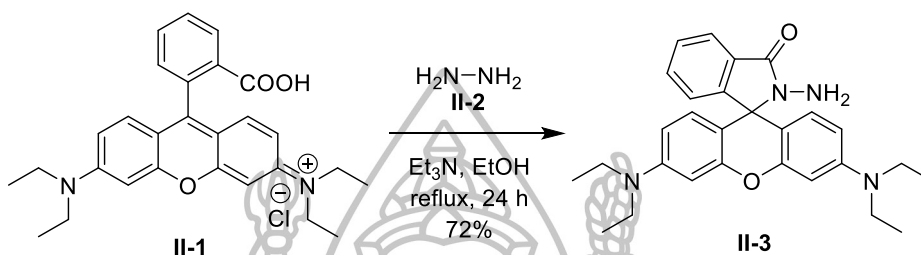
วิธีการสังเคราะห์เซ็นเซอร์ CFC4 (Sensor CFC4) แสดงได้ดังภาพที่ 33 ซึ่งสาร fluorescein dicarboxaldehyde (I-5) ปริมาณ 0.10 กรัม (0.30 มิลลิโมล) ใส่ขวดก้นกลมขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายด้วย dry dichloromethane 8.0 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 2-(4-(2-aminoethylthio)-butylthio)ethanamine (I-3) ปริมาณ 0.06 กรัม (0.30 มิลลิโมล) ที่ละลายอยู่ใน dry dichloromethane 5.0 มิลลิลิตร และ dry methanol 9.0 มิลลิลิตร กวนสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 60 °C และกวนปฏิกิริยาต่ออีก 2 ชั่วโมง

เมื่อครบเวลา ทำให้อุณหภูมิสารละลายเย็นลงที่ 0 °C เป็นเวลา 30 นาที ค่อยๆเติม NaBH_4 ปริมาณ 0.09 กรัม (2.00 มิลลิโมล) ลงในสารละลาย กวนปฏิกิริยาที่ 0 °C นาน 1 ชั่วโมงและกวนสารละลายต่อ ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำ DI เล็กน้อย เพื่อกำจัด NaBH_4 ที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาและนำไปกำจัดตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator

ละลายสารที่ได้ด้วยน้ำ DI และสกัดด้วย dichloromethane (15 มิลลิลิตร) นำสารในชั้นน้ำ ไปกำจัดน้ำออกด้วยเครื่อง rotary evaporator และทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิค preparative thin layer chromatography (ใช้ 100% methanol เป็น mobile phase) ได้เซ็นเซอร์ CFC4 (Sensor

CFC4) มีลักษณะเป็นของแข็งสีแดงอมน้ำตาล 0.082 กรัม (0.15 มิลลิโมล) คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเท่ากับ 48% ค่าจุดหลอมเหลวเท่ากับ 247.1-249.3 °C โดยการแยกด้วยเทคนิคนี้มีอัตราการเคลื่อนที่ของสารบนตัวดูดซับ (Retention factor; R_f) เท่ากับ 0.30

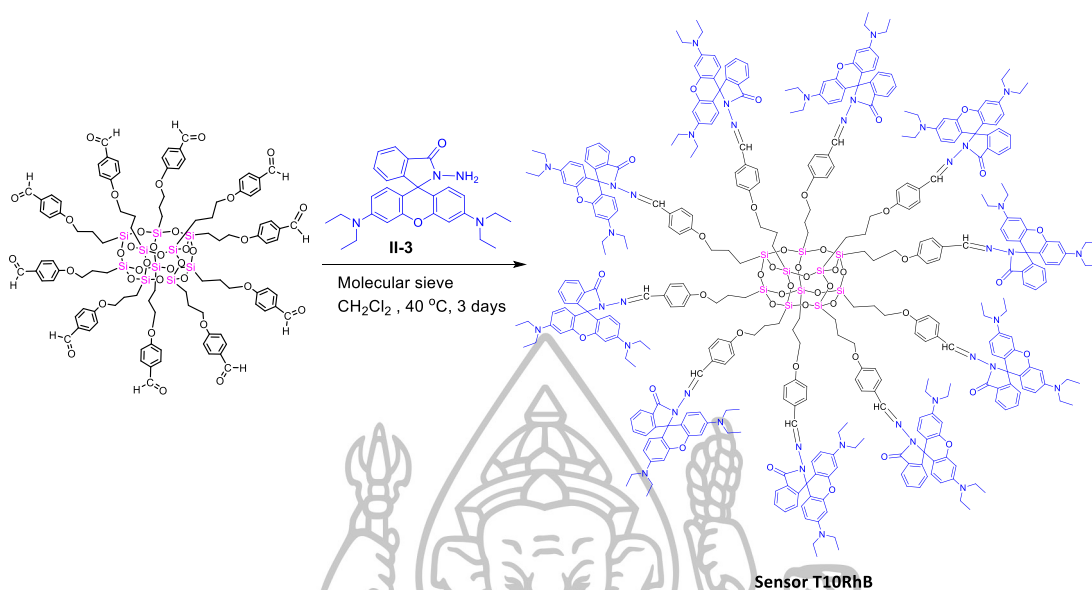
1.4 การสังเคราะห์โรดามีนบีไฮไดรราไซด์ (rhodamine B hydrazide; II-3)



ภาพที่ 34 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์ rhodamine B hydrazide; II-3

การสังเคราะห์โรดามีนบีไฮไดรราไซด์ (rhodamine B hydrazide; II-3) [43-44] ดังภาพที่ 34 ซึ่งโรดามีนบี (II-1) ปริมาณ 0.20 กรัม (0.42 มิลลิโมล) ใส่ขวดก้นกลมขนาด 25 มิลลิลิตร จากนั้นละลายด้วย dry ethanol ปริมาณ 10.0 มิลลิลิตร และเติม dry Et₃N ซึ่งทำหน้าที่เป็นเบส ปริมาณ 0.20 มิลลิลิตร (3.40 มิลลิโมล) กวนปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศอาร์กอนที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 30 นาที แล้วเติมไฮไดรราซีน (hydrazine: II-2) ปริมาณ 0.13 มิลลิลิตร (2.10 มิลลิโมล) จากนั้นให้ความร้อนจนอุณหภูมิถึง 78 °C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาที่ให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำไปกรองและกำจัด ethanol ออกด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้นเติม CH₂Cl₂ ปริมาณ 30.0 มิลลิลิตร ลงในขวดที่นำไปใส่เครื่อง rotary evaporator ข้างต้น แล้วนำไปสกัดด้วยน้ำ DI ปริมาณ 30.0 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง โดยเลือกเก็บสารละลายชั้น CH₂Cl₂ มากำจัดน้ำออกโดยเติม โซเดียมซัลเฟต (anh. Na₂SO₄) ลงไปปริมาณเล็กน้อย และนำไปกำจัด CH₂Cl₂ ออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator จากนั้นแยกบริสุทธิ์สารที่ได้ด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง CH₂Cl₂ และ MeOH ในอัตราส่วน 97:3 v/v ตามลำดับ เป็น mobile phase พบว่าได้สาร II-3 มีลักษณะเป็นของแข็งชมพูอ่อน ปริมาณ 138 มิลลิกรัม (0.303 มิลลิโมล) คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเท่ากับ 72% โดยการแยกด้วยเทคนิคนี้มีอัตราการเคลื่อนที่ของสารบนตัวดูดซับ (Retention factor; R_f) เท่ากับ 0.44

1.5 การสังเคราะห์เซ็นเซอร์ T10RhB (Sensor T10RhB)



ภาพที่ 35 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์เซ็นเซอร์ T10RhB (Sensor T10RhB)

การสังเคราะห์เซ็นเซอร์ T10RhB (Sensor T10RhB) ในขั้นตอนนี้ ทำการสังเคราะห์โดยนางสาว รุ่งทิพย์ ชันถม นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

2. การทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจจับไอออนโลหะหนักของเซ็นเซอร์ CFC4

การศึกษาคุณสมบัติในการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ ของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ CFC4 เริ่มต้นโดยตรวจสอบ excitation spectrum และ emission spectrum ของสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์แต่ละชนิดในสารละลายอินทรีย์ และสารละลายผสมที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ผสมน้ำ เพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์การดักจับไอออน เมื่อได้ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้ว ขั้นตอนต่อมา คือ การศึกษาประสิทธิภาพในการทำงานเกี่ยวกับการตรวจจับไอออนปรอท (Hg^{2+}) ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี เพื่อหาความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) ความจำเพาะเจาะจงกับไอออนปรอท (selectivity) เปรียบเทียบกับไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ รวมทั้งนำไปศึกษาถึงประสิทธิภาพในการตรวจจับไอออนปรอทในภาวะที่มีไอออนรบกวนอื่นๆ อัตราส่วน และค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออนปรอท (Association constant; K_{assoc})

2.1 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (selectivity)

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเซ็นเซอร์ CFC4 นั้น ได้ศึกษาด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี โดยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากการไตเตรตด้วยสารละลายปรอทลงในสารละลายเซ็นเซอร์ที่ถูกต้องเตรียมขึ้น 3.0 มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้นจากการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนอื่นๆ ลงในสารละลายเซ็นเซอร์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ระหว่างการไตเตรตด้วยสารละลายปรอทและการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนรบกวนอื่นๆ

2.1.1 การเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์

เตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ CFC4 ในสารละลายผสมระหว่างตัวทำละลายอินทรีย์ (methanol) และสารละลายบัฟเฟอร์ (buffer) pH 7.2 ซึ่งเป็นค่า pH เฉลี่ยในเลือดของมนุษย์ สารละลายเซ็นเซอร์ CFC4 เข้มข้น 1.0×10^{-4} M ใน สารละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris-HCl buffer) เข้มข้น 2.62 mM pH 7.2 และ methanol ในอัตราส่วน 95:5 v/v ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายเซ็นเซอร์ CFC4 ด้วยวิธี serial dilution โดยให้ความเข้มข้นลดลงครั้งละ 10 เท่า จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0×10^{-8} M ในสารละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl buffer เข้มข้น 2.62 mM pH 7.2 และ methanol ในอัตราส่วน 95:5 v/v ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งการเจือจางทุกครั้งปรับปริมาตรด้วยสารละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl buffer เข้มข้น 2.62 mM pH 7.2 และ methanol ในอัตราส่วน 95:5 v/v

2.1.2 การเตรียมสารละลายปรอทและไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ

ในการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเซ็นเซอร์ CFC4 ในสารละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl buffer เข้มข้น 2.62 mM pH 7.2 และ methanol ในอัตราส่วน 95:5 v/v จะเตรียมสารละลายปรอทและไอออนเกลือคลอไรด์ชนิดต่างๆ ในน้ำ DI ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายปรอทและไอออนเกลือคลอไรด์ชนิดต่างๆ ด้วยวิธี serial dilution เช่นเดียวกับการเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ โดยให้ความเข้มข้นลดลงครั้งละ 10 เท่า จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0×10^{-5} M ปริมาตร 10 มิลลิลิตร สำหรับการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเซ็นเซอร์ CFC4

ไอออนที่ใช้ในการทดสอบ

ไอออนปรอท (Hg^{2+}) ไอออนอะลูมิเนียม (Al^{3+}) ไอออนแบเรียม (Ba^{2+}) ไอออนแคลเซียม (Ca^{2+}) ไอออนแคดเมียม (Cd^{2+}) ไอออนทองแดง (Cu^{2+}) ไอออนเหล็ก (Fe^{3+}) ไอออนโพแทสเซียม (K^{+}) ไอออนแมกนีเซียม (Mg^{2+}) ไอออนแมงกานีส (Mn^{2+}) ไอออนโซเดียม (Na^{+}) ไอออนนิกเกิล (Ni^{2+}) และไอออนตะกั่ว (Pb^{2+})

2.1.3 การทดสอบ

นำสารละลายเซ็นเซอร์ที่เตรียมขึ้นไปวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้น โดยเปรียบเทียบระหว่างการไตเตรตสารละลายปรอท กับการไตเตรตสารละลายไอออนเกลือคลอไรด์ชนิดต่างๆ โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการทดสอบตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ สำหรับการทดสอบความไวของเซ็นเซอร์ CFC4

เซ็นเซอร์	เซ็นเซอร์ CFC4
	ในสารละลาย Tris-HCl buffer:MeOH (95:5 v/v)
λ_{ex} (nm)	493
Scan speed (nm/min)	300
Slit width (nm)	5.0
ช่วงความยาวคลื่นที่ศึกษา (nm)	500-600

2.2 การทดสอบความไว (sensitivity)

การทดสอบความไวของเซ็นเซอร์ CFC4 นั้น ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปีนั้น จะทำการศึกษาสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์ที่เปลี่ยนไป เมื่อมีการเติมไอออนปรอทเพิ่มขึ้น โดยการปิเปตสารละลายเซ็นเซอร์ที่ถูกเตรียมขึ้น 3.0 มิลลิลิตร วัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้นก่อนการเติมไอออนปรอท จากนั้นจึงไตเตรตด้วยสารละลายปรอทที่เตรียมไว้ แล้ววัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้นภายหลังการเติมไอออนปรอทในแต่ละครั้ง จะสังเกตเห็นการลดลงของความเข้มสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ นอกจากนี้ผลการทดลองที่ได้จาก

การทดสอบนี้ ได้นำไปใช้ในการหาค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออน (K_{assoc}) จากสมการ Benesi-Hildebrand [45-47] ตามสมการที่ (1)

ตามสมการ Benesi-Hildebrand;

$$\frac{1}{(A-A_0)} = \frac{1}{K \cdot (A_{\text{max}} - A_0) \cdot [\text{Hg}^{2+}]^n} + \frac{1}{A_{\text{max}} - A_0} \quad (1)$$

จากสมการที่ (1) มีลักษณะความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ดังนั้นการสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{1}{(A-A_0)}$ ในแนวแกน y และ $\frac{1}{[\text{Hg}^{2+}]^n}$ ในแนวแกน x จะหาค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออนปรอทได้ เมื่อกำหนดให้

A_0 = ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์เริ่มต้น

A = ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์หลังเติมไอออนที่ความเข้มข้นใดๆ

A_{max} = ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์มากที่สุด

n = จำนวนเต็มใดๆ เช่น 1, 2 และ 3

พบว่าค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออนคำนวณได้จากความชันของกราฟที่สร้างขึ้น ดังนี้

$$\text{slope} = \frac{1}{K \cdot (A_{\text{max}} - A_0)}$$

$$K = \frac{1}{\text{slope} \cdot (A_{\text{max}} - A_0)}$$

2.2.1 การเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์

สารละลายเซ็นเซอร์ CFC4 จะเตรียมขึ้นในลักษณะเดียวกับการทดสอบความไว โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นและความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากัน แต่การทดสอบความจำเพาะเจาะจงจะเจือจางความเข้มข้นสุดท้ายในปริมาณ 10 มิลลิลิตร

2.2.2 การเตรียมสารละลายปรอท

ในการทดสอบความไวของเซ็นเซอร์ CFC4 ในสารละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl buffer เข้มข้น 2.62 mM pH 7.2 และ methanol ในอัตราส่วน 95:5 v/v จะเตรียมสารละลายปรอทคลอไรด์เข้มข้น 1.0×10^{-2} M ในน้ำ DI ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายปรอท ด้วยวิธี serial dilution เช่นเดียวกับการเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ โดยให้ความเข้มข้นลดลงครั้งละ 10 เท่า จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0×10^{-5} M ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

2.2.3 การทดสอบ

สารละลายเซ็นเซอร์ CFC4 ที่เตรียมสำหรับวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้น เมื่อมีการไตเตรตสารละลายปรอท ซึ่งกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการทดสอบสำหรับเซ็นเซอร์ CFC4 ตามตารางที่ 2 ในการทดสอบความจำเพาะเจาะจง

2.3 การทดสอบความสามารถในการตรวจจับไอออนปรอทในภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ (competitive)

การทดสอบความสามารถในการตรวจจับไอออนปรอท ในภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี โดยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์แต่ละชนิด ในขณะก่อนเติมและหลังเติมสารละลายปรอท ลงในเซ็นเซอร์แต่ละชนิดที่ถูกเตรียมขึ้น ปริมาณ 3.0 มิลลิลิตร จนสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ชัดเจนที่ความเข้มค่าหนึ่ง จากนั้นเติมสารละลายไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ในปริมาณ 10 เท่าของสารละลายปรอทที่เติมลงไป และวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ภายหลังการเติมไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ อีกครั้ง โดยสารละลายเซ็นเซอร์แต่ละชนิด สารละลายปรอทและสารละลายไอออนรบกวนชนิดต่างๆ นั้น สามารถเตรียมได้เช่นเดียวกับการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเซ็นเซอร์แต่ละชนิด

2.3.1 การเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์

สารละลายเซ็นเซอร์ CFC4 จะเตรียมขึ้นในลักษณะเดียวกับการทดสอบความจำเพาะ โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นและความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากัน แต่การทดสอบความสามารถในการตรวจจับไอออนปรอทในภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ จะเจือจางความเข้มข้นสุดท้ายในปริมาณ 10 มิลลิลิตร เช่นเดียวกับการทดสอบความจำเพาะเจาะจง

2.3.2 การเตรียมสารละลายปรอทและไอออนรบกวนชนิดอื่น ๆ

สำหรับเซ็นเซอร์ CFC4 จะเตรียมสารละลายปรอท และไอออนเกลือคลอไรด์ชนิดต่างๆ เพื่อใช้ทดสอบความสามารถในการตรวจจับไอออนปรอทในภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ เช่นเดียวกับการเตรียมเพื่อใช้ทดสอบความจำเพาะเจาะจง

2.3.3 การทดสอบ

นำสารละลายเซ็นเซอร์ ที่เตรียมขึ้นไปวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้น เมื่อมีการเติมสารละลายปรอทและสารละลายไอออนเกลือคลอไรด์ชนิดต่างๆ ลงในสารละลายเซ็นเซอร์ โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการทดสอบตามตารางที่ 2 เช่นเดียวกับการทดสอบความไว จากนั้นสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า I_f/I_0 ที่ความยาวคลื่นที่ความเข้มมากที่สุด ในแนวแกน y และชนิดของสารต่างๆ ในแนวแกน x เมื่อกำหนดให้

I_0 = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายก่อนเติมไอออน

I_f = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายหลังเติมไอออน

3. การทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจจับไอออนโลหะหนักของเซ็นเซอร์ T10RhB

การศึกษาคูณสมบัติในการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ ของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ T10RhB เริ่มต้นโดยตรวจสอบ excitation spectrum และ emission spectrum ของสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์แต่ละชนิดในสารละลายอินทรีย์ และสารละลายผสมที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ผสมน้ำ เพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์การจับไอออน เมื่อได้ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้ว ขั้นตอนต่อมา คือ การศึกษาประสิทธิภาพในการทำงานเกี่ยวกับการตรวจจับไอออนปรอท (Hg^{2+}) ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี เพื่อหาความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) ความจำเพาะเจาะจงกับไอออนปรอท (selectivity) เปรียบเทียบกับไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ

3.1 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (selectivity)

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเซ็นเซอร์ T10RhB นั้น ได้ศึกษาด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโกปี โดยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนส์จากการไตเตรตด้วยสารละลายปรอทลงในสารละลายเซ็นเซอร์ที่ถูกเตรียมขึ้น 3.0 มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่เกิดขึ้นจากการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนอื่นๆ ลงในสารละลายเซ็นเซอร์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ระหว่างการไตเตรตด้วยสารละลายปรอทและการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนรบกวนอื่นๆ

3.1.1 การเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์

เตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ T10RhB ในระบบตัวทำละลายชนิดต่างๆ ดังนี้ dichloromethane (CH_2Cl_2), methanol (MeOH), สารละลายผสม methanol และน้ำ (90:10 v/v และ 50:50 v/v) และสารละลายผสม dichloromethane และ methanol (90:10 v/v และ 50:50 v/v) โดยเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ T10RhB เข้มข้น 1.0×10^{-4} M ใน CH_2Cl_2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายเซ็นเซอร์ T10RhB ด้วยวิธี serial dilution โดยให้ความเข้มข้นลดลงครั้งละ 10 เท่า จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0×10^{-6} M ในสารละลายต่างดั่งนี้ methanol (MeOH), acetonitrile (MeCN), ethanol (EtOH), สารละลายผสม methanol และน้ำ (90:10 v/v และ 50:50 v/v) และสารละลายผสมระหว่าง CH_2Cl_2 :MeOH (90:10 v/v) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0×10^{-7} M ในตัวทำละลาย dichloromethane (CH_2Cl_2) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.1.2 การเตรียมสารละลายปรอทและไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ

ในการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเซ็นเซอร์ T10RhB ในตัวทำละลาย dichloromethane (CH_2Cl_2) และสารละลายผสมระหว่าง CH_2Cl_2 :MeOH (90:10 v/v) จะเตรียมสารละลายปรอทและไอออนเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ (ไอออนทองแดง (Cu^{2+}) ไอออนเงิน (Ag^{2+}) และไอออนตะกั่ว (Pb^{2+})) ใน THF ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายปรอทและไอออนเกลือเปอร์คลอเรต ชนิดต่างๆ ด้วยวิธี serial dilution เช่นเดียวกับการเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ โดยให้ความเข้มข้นลดลงครั้งละ 10 เท่า จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0×10^{-5} M ปริมาตร 10 มิลลิลิตร สำหรับในสารละลายต่างดั่งนี้ methanol (MeOH), acetonitrile (MeCN), ethanol (EtOH), สารละลายผสม methanol และน้ำ (90:10 v/v และ 50:50 v/v) จะเตรียมสารละลายปรอทและไอออนเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ ในน้ำ จากนั้นเจือจางสารละลาย

ปรอทและไอออนเกลือเปอร์คลอเรต ชนิดต่างๆ ด้วยวิธี serial dilution โดยให้ความเข้มข้นลดลงครั้งละ 10 เท่า จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0×10^{-4} M ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.1.3 การทดสอบ

นำสารละลายเซ็นเซอร์ T10RhB ที่เตรียมขึ้นไปวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้น โดยเปรียบเทียบระหว่างการไตเตรตสารละลายปรอท กับการไตเตรตสารละลายไอออนเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการทดสอบตามตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ สำหรับการทดสอบความไวของเซ็นเซอร์ T10RhB

เซ็นเซอร์	เซ็นเซอร์ T10RhB
	ในระบบตัวทำละลายชนิดต่างๆ
λ_{ex} (nm)	558
Scan speed (nm/min)	300
Slit width (nm)	5.0
ช่วงความยาวคลื่นที่ศึกษา (nm)	560-650

3.2 การทดสอบความไว (sensitivity)

การทดสอบความไวของเซ็นเซอร์ T10RhB นั้น ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปีนั้น จะทำการศึกษาสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์ที่เปลี่ยนไป เมื่อมีการเติมไอออนปรอทเพิ่มขึ้น โดยการปิเปตสารละลายเซ็นเซอร์ที่ถูกเตรียมขึ้น 3.0 มิลลิลิตร วัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้นก่อนการเติมไอออนปรอท จากนั้นจึงไตเตรตด้วยสารละลายปรอทที่เตรียมไว้ แล้ววัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้นภายหลังการเติมไอออนปรอท ในแต่ละครั้ง จะสังเกตเห็นการเพิ่มขึ้นของความเข้มสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์

3.2.1 การเตรียมสารละลายซีเอ็นเซอร์

สารละลายซีเอ็นเซอร์ T10RhB จะเตรียมขึ้นในลักษณะเดียวกับการทดสอบความจำเพาะเจาะจง

3.2.2 การเตรียมสารละลายปรอท

ในการทดสอบความไวของซีเอ็นเซอร์ T10RhB จะเตรียมสารละลายปรอทเปอร์คลอเรตเข้มข้น 1.0×10^{-2} M ใน THF สำหรับในระบบทำละลาย dichloromethane (CH_2Cl_2) และสารละลายผสมระหว่าง CH_2Cl_2 :MeOH (90:10 v/v) และในน้ำสำหรับ methanol (MeOH), acetonitrile (MeCN), ethanol (EtOH), สารละลายผสม methanol และน้ำ (90:10 v/v และ 50:50 v/v) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายปรอท ด้วยวิธี serial dilution เช่นเดียวกับการเตรียมสารละลายซีเอ็นเซอร์ โดยให้ความเข้มข้นลดลงครั้งละ 10 เท่า จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0×10^{-5} M ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.2.3 การทดสอบ

สารละลายซีเอ็นเซอร์ T10RhB ที่เตรียมสำหรับวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้น เมื่อมีการไตเตรตสารละลายปรอท ซึ่งกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการทดสอบสำหรับซีเอ็นเซอร์ T10RhB ตามตารางที่ 3 ในการทดสอบความจำเพาะเจาะจง



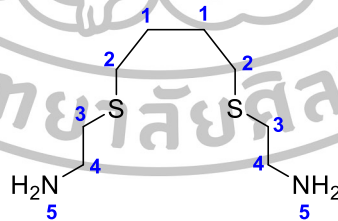
บทที่ 5 ผลการดำเนินงานวิจัย

จากการสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดใหม่ 2 ชนิด ได้มีการนำเซ็นเซอร์ที่สังเคราะห์ได้มาศึกษา เพื่อยืนยันโครงสร้างของเซ็นเซอร์ด้วยเทคนิค nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) และ high resolution mass spectroscopy (HR-ESI MS) จากนั้นจึงนำเซ็นเซอร์ CFC4 ที่ได้ มาทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจจับไอออนปรอทในสารละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris-HCl buffer) เข้มข้น 2.62 mM pH 7.2 และ methanol ในอัตราส่วน 95:5 v/v และสำหรับเซ็นเซอร์ T10RhB ที่ได้ มาทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจจับไอออนปรอทในสารละลายอินทรีย์ และสารละลายน้ำผสมกับสารอินทรีย์ ได้ผลการทดลองดังนี้

1. การยืนยันโครงสร้าง

จากผลการสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์แต่ละชนิดตามวิธีการทดลองที่ได้กล่าวไว้แล้วนั้น พบว่าได้ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์สำหรับตรวจจับไอออนโลหะหนักชนิดใหม่ 2 ชนิด ซึ่งสามารถวิเคราะห์และยืนยันโครงสร้างของสารที่สังเคราะห์ได้แต่ละชนิดด้วยวิธีทางสเปกโทรสโกปีดังนี้

1.1 โครงสร้างของ 2-[4-(2-aminoethylsulfanyl)butylsulfanyl]ethanamine (I-3)

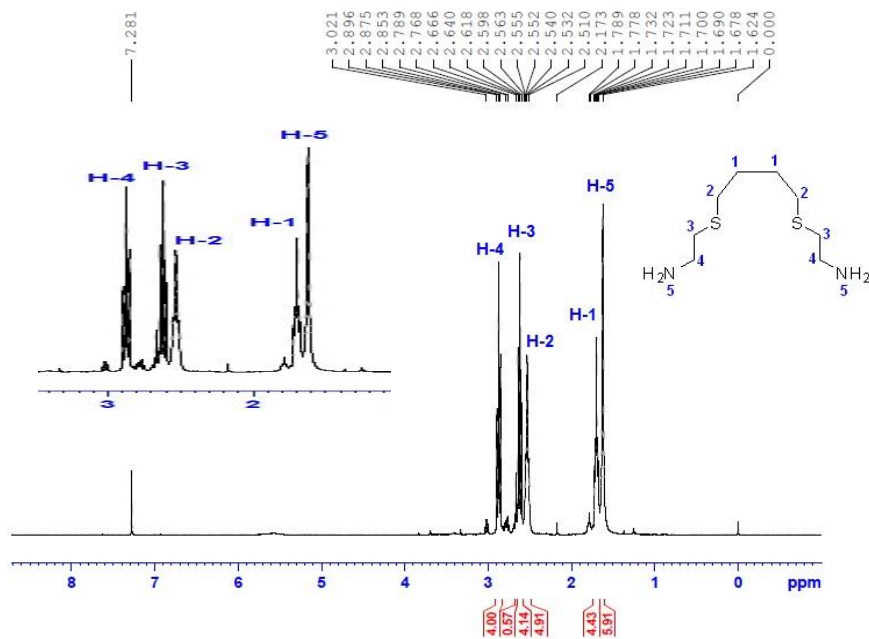


ภาพที่ 36 โครงสร้างทางเคมีของ 2-[4-(2-aminoethylsulfanyl)butylsulfanyl]ethanamine (I-3)

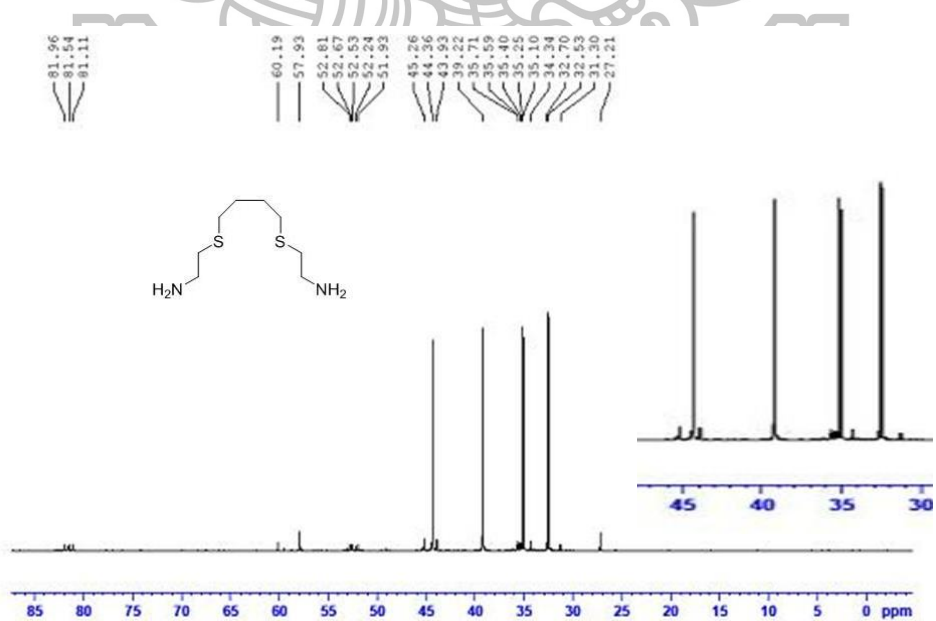
จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของ 2-[4-(2-aminoethylsulfanyl)butylsulfanyl]ethanamine (I-3) โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีสามารถยืนยันโครงสร้างได้ดังนี้

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.54 (br s, 4NH_2), 1.65-1.73 (m, 4H), 2.53 (t, $J = 6.0$ Hz, 4H), 2.62 (t, $J = 6.0$ Hz, 4H), 2.88 (t, $J = 6.0$ Hz, 4H) ppm (ภาพที่ 37).; ^{13}C NMR (75

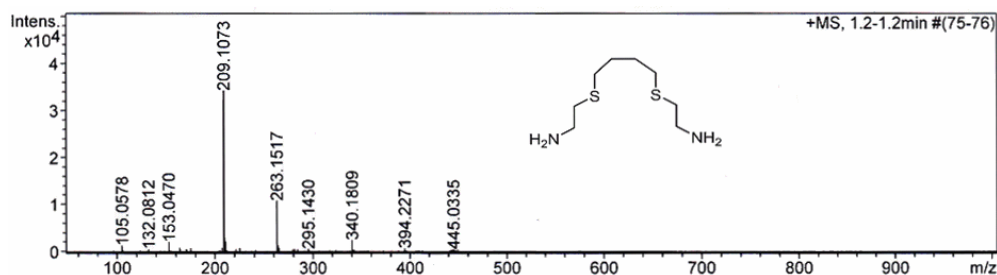
MHz, CDCl_3): δ 32.5 (2CH_2), 35.2 (2CH_2), 39.2 (2CH_2), 44.4 (2CH_2) ppm (ภาพที่ 38).; HR-ESI MS จากการคำนวณ $\text{C}_8\text{H}_{21}\text{N}_2\text{S}_2$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺ 209.1073 m/z จากการทดสอบ 209.1146 m/z (ภาพที่ 39).



ภาพที่ 37 ^1H NMR ของ 2-[4-(2-aminoethylsulfanyl)butylsulfanyl]ethanamine (I-3)

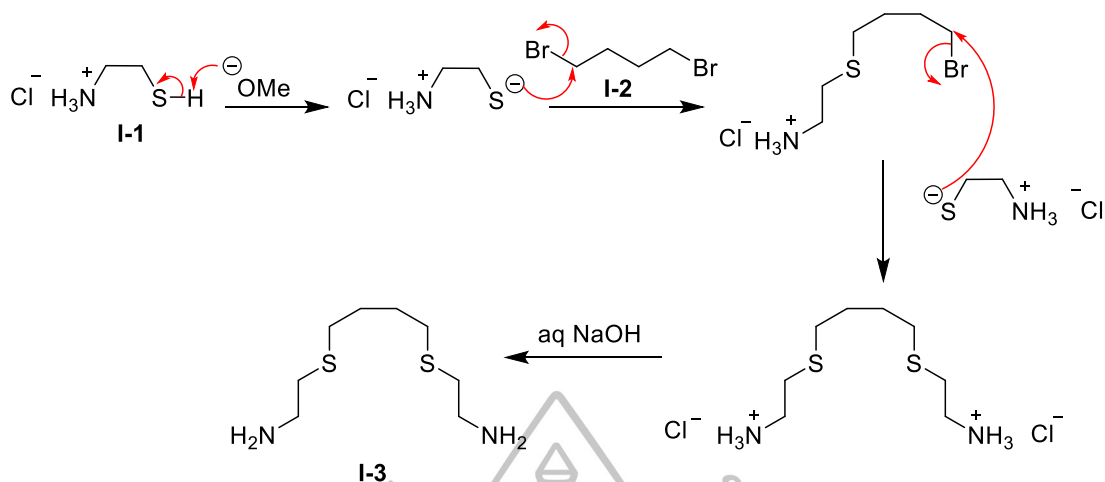


ภาพที่ 38 ^{13}C NMR ของ 2-[4-(2-aminoethylsulfanyl)butylsulfanyl]ethanamine (I-3)



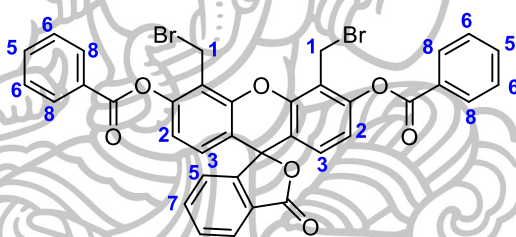
ภาพที่ 39 HR-ESI MS ของ 2-[4-(2-aminoethylsulfanyl)butylsulfanyl]ethanamine (I-3)

จากผล $^1\text{H NMR}$ สเปกตรัม แสดงให้เห็นลักษณะสัญญาณของโปรตอน 5 กลุ่ม ดังนี้ สัญญาณลักษณะ singlet ที่ตำแหน่ง δ 1.54 ppm เกิดจากโปรตอนของหมู่เอมีน ($-\text{NH}_2$) ถัดมา บริเวณ δ 1.65-1.73 ppm มีลักษณะเป็น multiplet เกิดจากเอทิลีนโปรตอนตำแหน่ง 1 (H-1) เนื่องจากเมื่อเทียบกับเอทิลีนโปรตอนตำแหน่งอื่น เอทิลีนโปรตอนกลุ่มนี้จะอยู่ห่างจากอะตอมที่มีความสามารถดึงอิเล็กตรอน (S และ N โดยที่ค่า EN_N มากกว่า EN_S) มากที่สุด จึงปรากฏสัญญาณบริเวณที่มีสนามแม่เหล็กสูงที่สุด (up field) ส่วนเอทิลีนโปรตอนบนคาร์บอน 2 (H-2) อยู่ใกล้อะตอมซัลเฟอร์ (S) มากกว่าจึงปรากฏสัญญาณบริเวณสนามแม่เหล็กต่ำกว่า โดยแสดงสัญญาณ triplet ที่ δ 2.53 ppm และมีค่า coupling constant (J) เท่ากับ 6.0 Hz ถัดมาสัญญาณที่ δ 2.62 ppm และ 2.88 ppm ต่าง แสดงลักษณะเป็น triplet และมีค่า coupling constant (J) เท่ากับ 6.3 Hz แสดงว่าโปรตอนทั้งสองชนิดเกิด coupling กัน โดยที่โปรตอนชนิดหนึ่งได้รับอิทธิพลของแรงดึงอิเล็กตรอนมากกว่าจึง ปรากฏสัญญาณบริเวณสนามแม่เหล็กต่ำกว่า เมื่อพิจารณาโครงสร้างโมเลกุลจะเห็นว่า เอทิลีน โปรตอนบนคาร์บอน 4 (H-4) อยู่ใกล้อะตอมไนโตรเจนมากกว่า ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสัญญาณทั้งสองเกิดจากเอทิลีนโปรตอนบนคาร์บอน 3 (H-3) และ 4 (H-4) ตามลำดับ นอกจากนี้ ได้ยืนยันโครงสร้างจาก HR-ESI MS ได้ผลเท่ากับ 209.1073 m/z จากการคำนวณ $\text{C}_8\text{H}_{21}\text{N}_2\text{S}_2$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ เท่ากับ 209.1146 m/z โดยสามารถเสนอกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังภาพที่ 40



ภาพที่ 40 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของสารประกอบ 4', 5'-bis(bromomethyl)fluorescein dibenzoate (I-3)

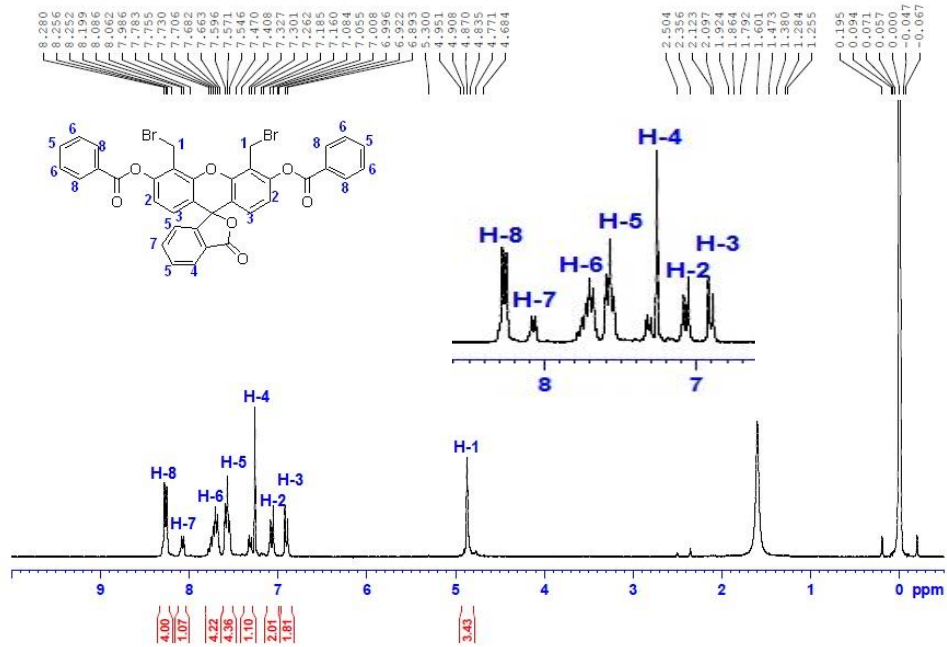
1.2 โครงสร้างของสารประกอบ 4', 5'-bis(bromomethyl)fluorescein dibenzoate (I-4)



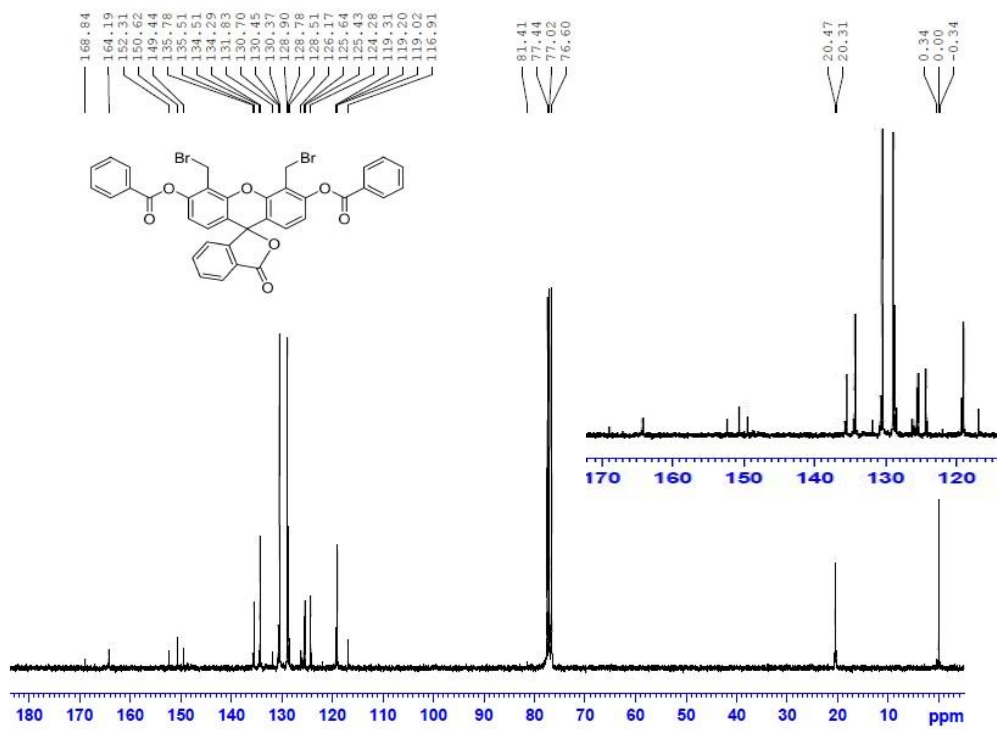
ภาพที่ 41 โครงสร้างของสารประกอบ 4', 5'-bis(bromomethyl)fluorescein dibenzoate (I-4)

จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ I-4 โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีสามารถยืนยันโครงสร้างได้ดังนี้

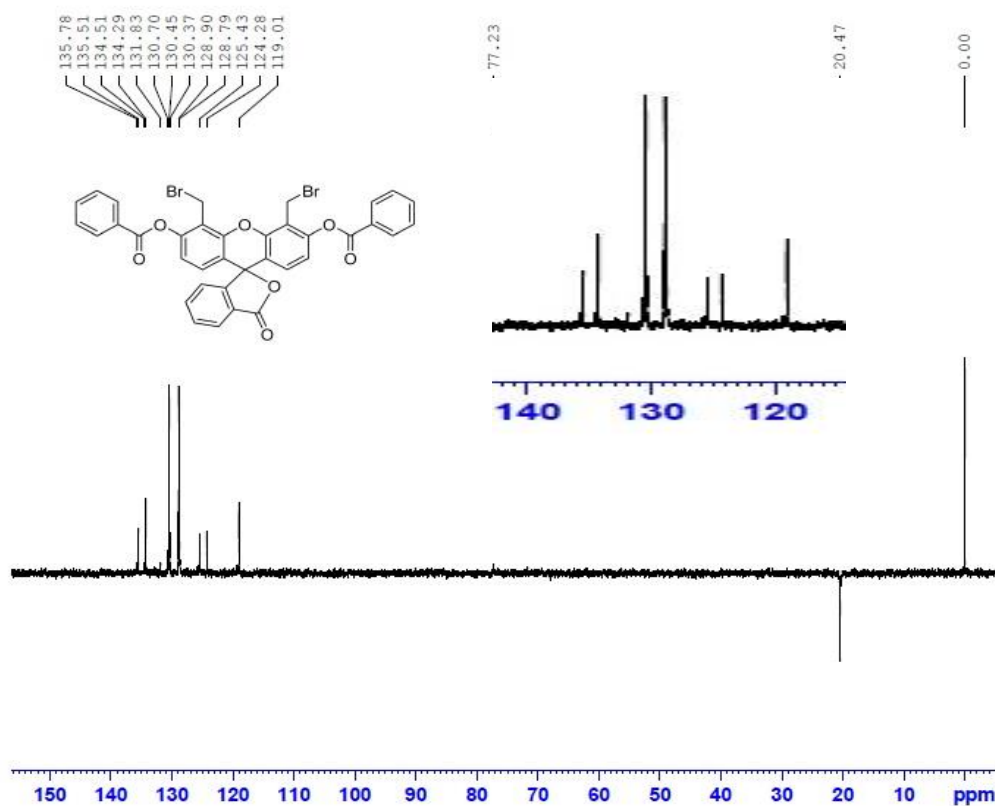
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 4.87 (s, 4H), 6.91 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.07 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.31 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.57 (t, $J = 7.5$ Hz, 4H), 7.66-7.78 (m, 4H), 8.07 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 8.27 (d, $J = 8.4$ Hz, 4H) (ภาพที่ 42); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 81.4 (C), 116.9 (C), 119.02 (CH), 119.2 (C), 119.3 (CH), 124.3 (CH), 125.4 (CH), 125.6 (C), 126.2 (C), 128.5 (C), 128.8 (CH), 128.9 (CH), 130.4 (CH), 130.4 (CH), 130.7 (CH), 131.8 (CH), 134.3 (CH), 134.5 (CH), 135.5 (CH), 135.8 (CH), 149.4 (C), 150.6 (C), 152.3 (C), 164.2 (C), 168.8 (2C) (ภาพที่ 43-44). HR-ESI MS calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{22}\text{Br}_2\text{O}_7$ (M) $^+$ 726.3637 m/z , found 726.9681 m/z (ภาพที่ 45).



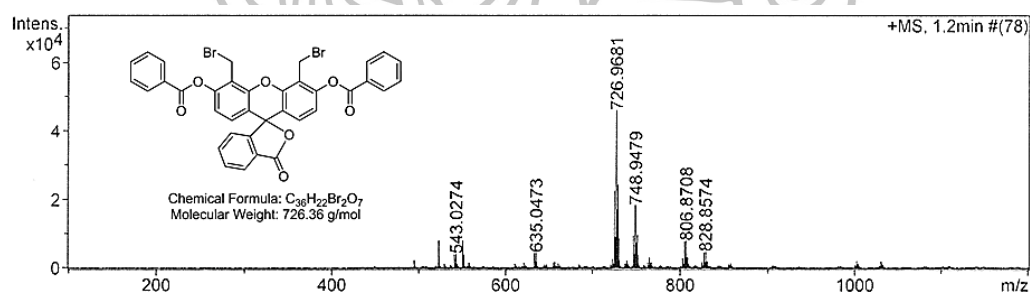
ภาพที่ 42 ^1H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ I-4



ภาพที่ 43 ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารประกอบ I-4



ภาพที่ 44 ^{13}C DEPT 135 NMR สเปกตรัมของสารประกอบ I-4

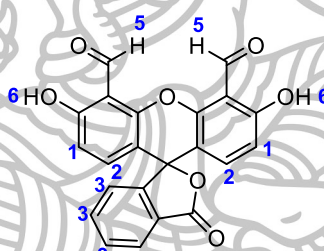


ภาพที่ 45 HR-ESI MS สเปกตรัมของสารประกอบ I-4

เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างของสารประกอบ I-4 (ภาพที่ 41) และ ^1H NMR สเปกตรัม (ภาพที่ 42) แสดงให้เห็นสัญญาณของโปรตอน 8 ชนิดที่แตกต่างกัน โดยสัญญาณที่สามารถระบุได้ชัดเจนมีดังนี้สัญญาณ singlet ที่ δ 4.87 ppm เกิดจากโปรตอน ตำแหน่ง 1 (H-1) เนื่องจากมีอะตอมโบรมีนเกาะบนคาร์บอนในตำแหน่งที่อยู่ถัดไปจึงทำให้มีค่า chemical shift ค่อนข้างสูง สองสัญญาณถัดมา ที่ chemical shift δ 6.91 และ 7.07 ppm ต่างแยกเป็น doublet และมีค่า J -

Coupling เท่ากัน คือ 8.7 Hz ควรจะเกิดจาก coupling ของอะโรมาติกโปรตอนที่อยู่ในตำแหน่ง ortho- ซึ่งกันและกัน จากโครงสร้าง สัญญาณดังกล่าวควรเกิดจากโปรตอนตำแหน่ง 3 (H-3) และ 2 (H-3) ตามลำดับ โดย H-3 มีค่า δ มากกว่า เนื่องจากอยู่ในตำแหน่ง ortho- กับหมู่เอสเทอร์ (-O-COPh) จึงได้รับอิทธิพลของแรงดึงอิเล็กตรอนมากกว่า ถัดมาสัญญาณ doublet ที่ δ 7.31 ppm ($J = 7.8$ Hz, 1H) เกิดจากโปรตอนตำแหน่ง 4 (H-4) ถัดมาสัญญาณ doublet ที่ δ 8.07 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H) เกิดจากโปรตอนตำแหน่ง 7 (H-7) และสัญญาณ doublet ที่ δ 8.27 ppm ($J = 8.4$ Hz, 4H) เกิดจากโปรตอนตำแหน่ง 8 (H-8) (ซึ่งอยู่ในสภาพแวดล้อมเหมือนกัน) เนื่องจากอยู่ในตำแหน่ง ortho- กับหมู่เอสเทอร์จึงได้รับอิทธิพลจากแรงดึงอิเล็กตรอนของหมู่คาร์บอนิลของเอสเทอร์โดยตรง สัญญาณที่ได้ จึงปรากฏที่บริเวณสนามแม่เหล็กต่ำที่สุด (down field) นอกจากนี้สามารถยืนยันโครงสร้างจาก HR-ESI MS ได้เท่ากับ 726.9681 m/z (จากการคำนวณ $C_{36}H_{22}Br_2O_7$ (M)⁺ เท่ากับ 726.3637 m/z)

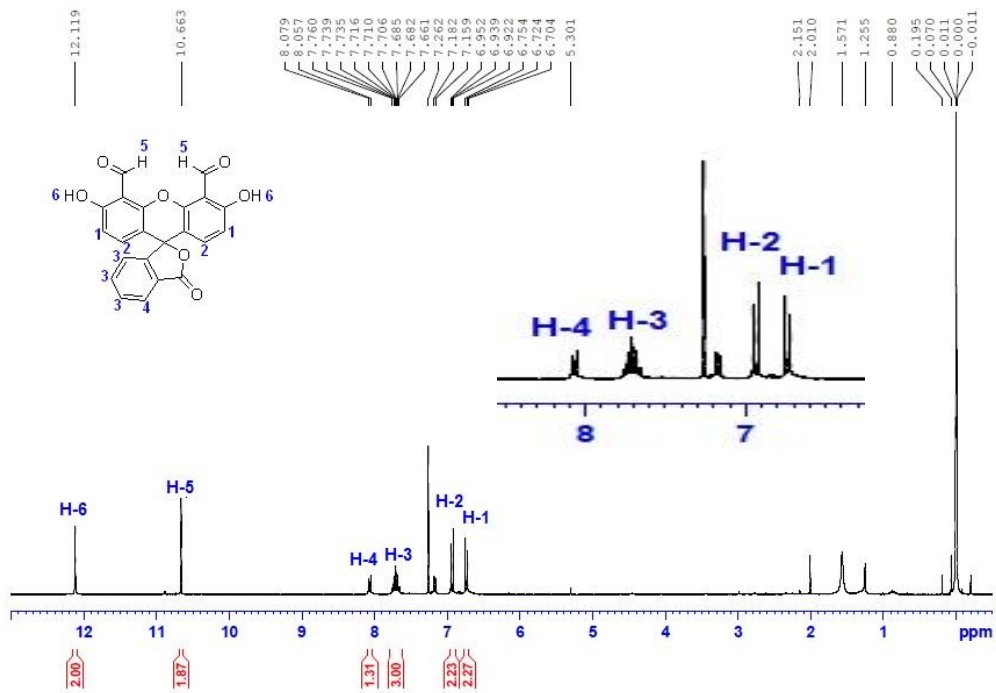
1.3 โครงสร้างของสารประกอบ fluorescein dicarboxaldehyde (I-5)



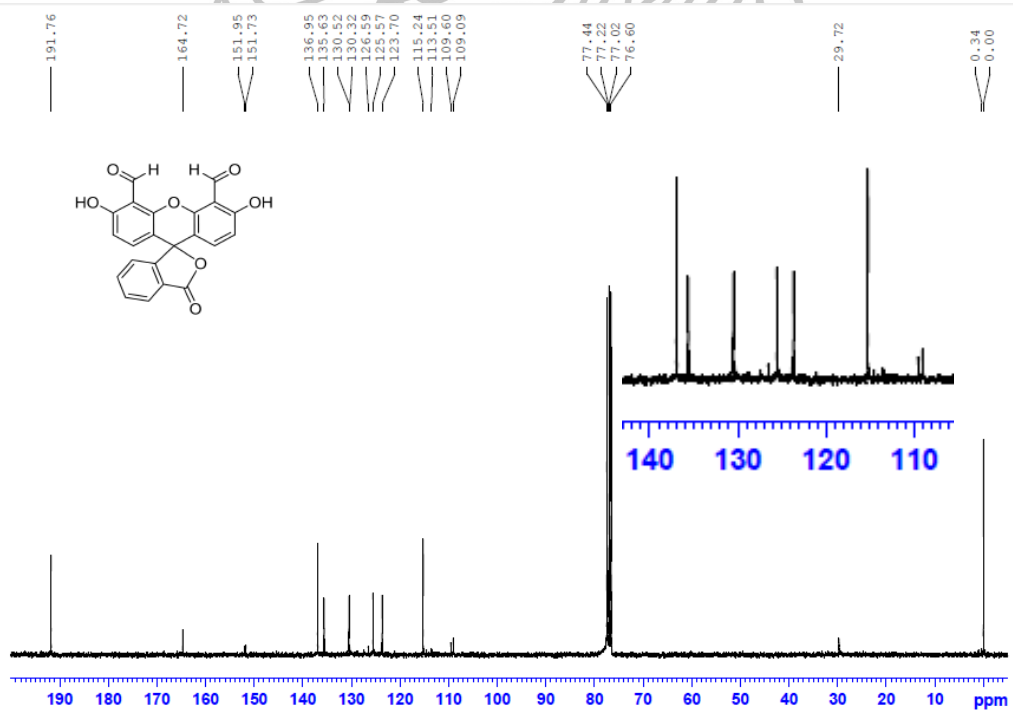
ภาพที่ 46 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ fluorescein dicarboxaldehyde (I-5)

จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ fluorescein dicarboxaldehyde (I-5) โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีสามารถยืนยันโครงสร้างได้ดังนี้

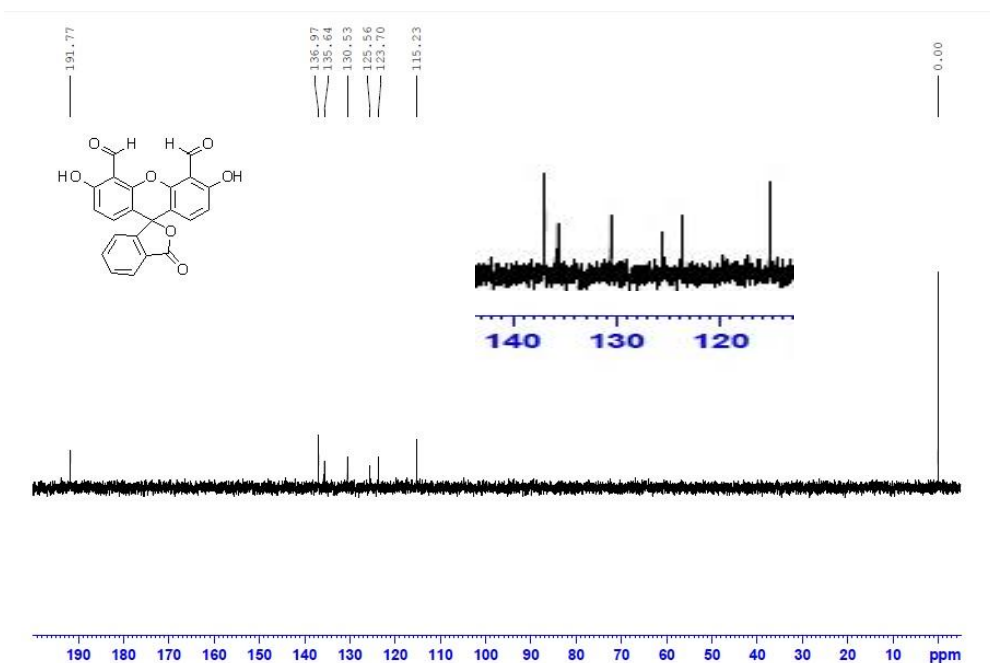
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 6.74 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 6.94 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.63-7.79 (m, 3H), 8.07 (d, $J = 6.6$ Hz, 1H), 10.66 (s, 2H), 12.12 (s, 2H); (ภาพที่ 47).; ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 77.2 (C), 109.1 (2C), 109.6 (C), 113.5 (2C), 115.2 (2CH), 123.7 (CH), 125.6 (CH), 126.6 (C), 130.5 (CH), 135.6 (CH), 137.0 (2CH), 151.7 (2C), 152.0 (2C), 164.7 (C), 191.8 (2C); (ภาพที่ 48-49).; HR-ESI MS จากการคำนวณ $C_{22}H_{13}O_7^+$ (MH)⁺ เท่ากับ 389.0661 m/z และจากการทดสอบ 389.0757 m/z (ภาพที่ 50).



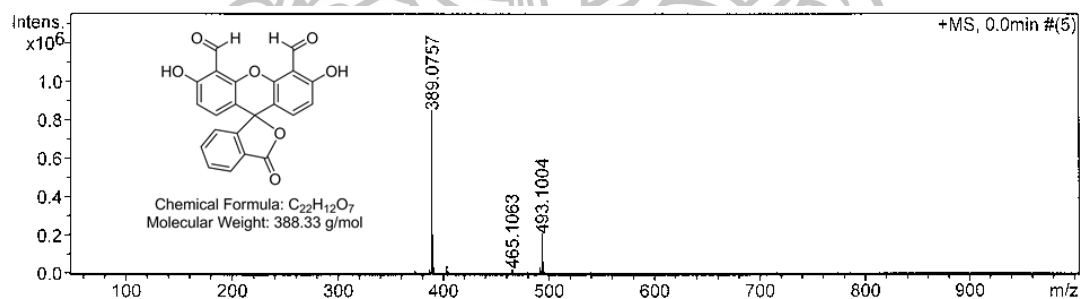
ภาพที่ 47 ¹H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ fluorescein dicarboxaldehyde (I-5)



ภาพที่ 48 ¹³C NMR สเปกตรัมของสารประกอบ fluorescein dicarboxaldehyde (I-5)



ภาพที่ 49 ^{13}C DEPT135 NMR สเปกตรัมของสารประกอบ fluorescein dicarboxaldehyde (I-5)

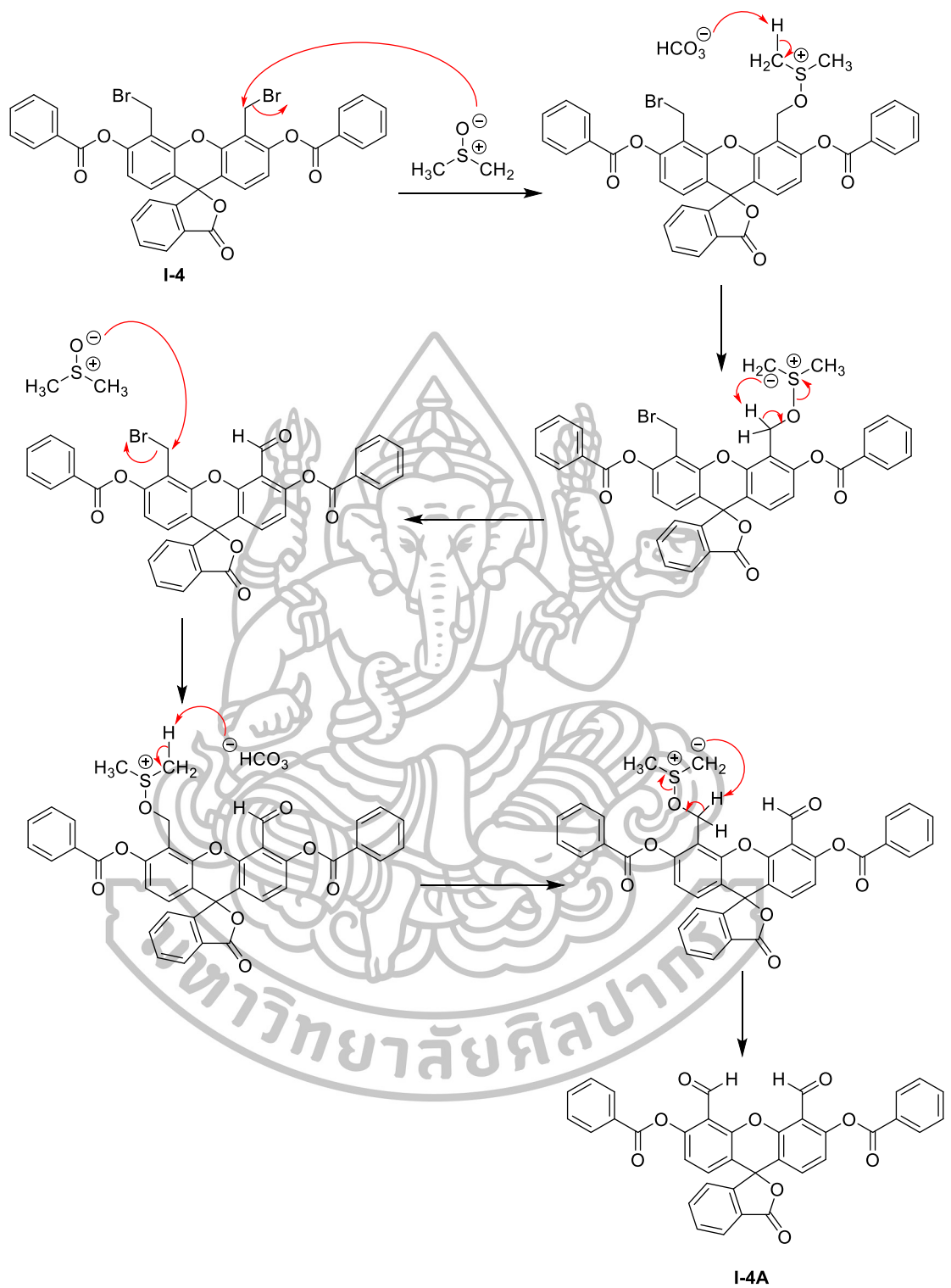


ภาพที่ 50 HR-ESI MS สเปกตรัมของสารประกอบ fluorescein dicarboxaldehyde (I-5)

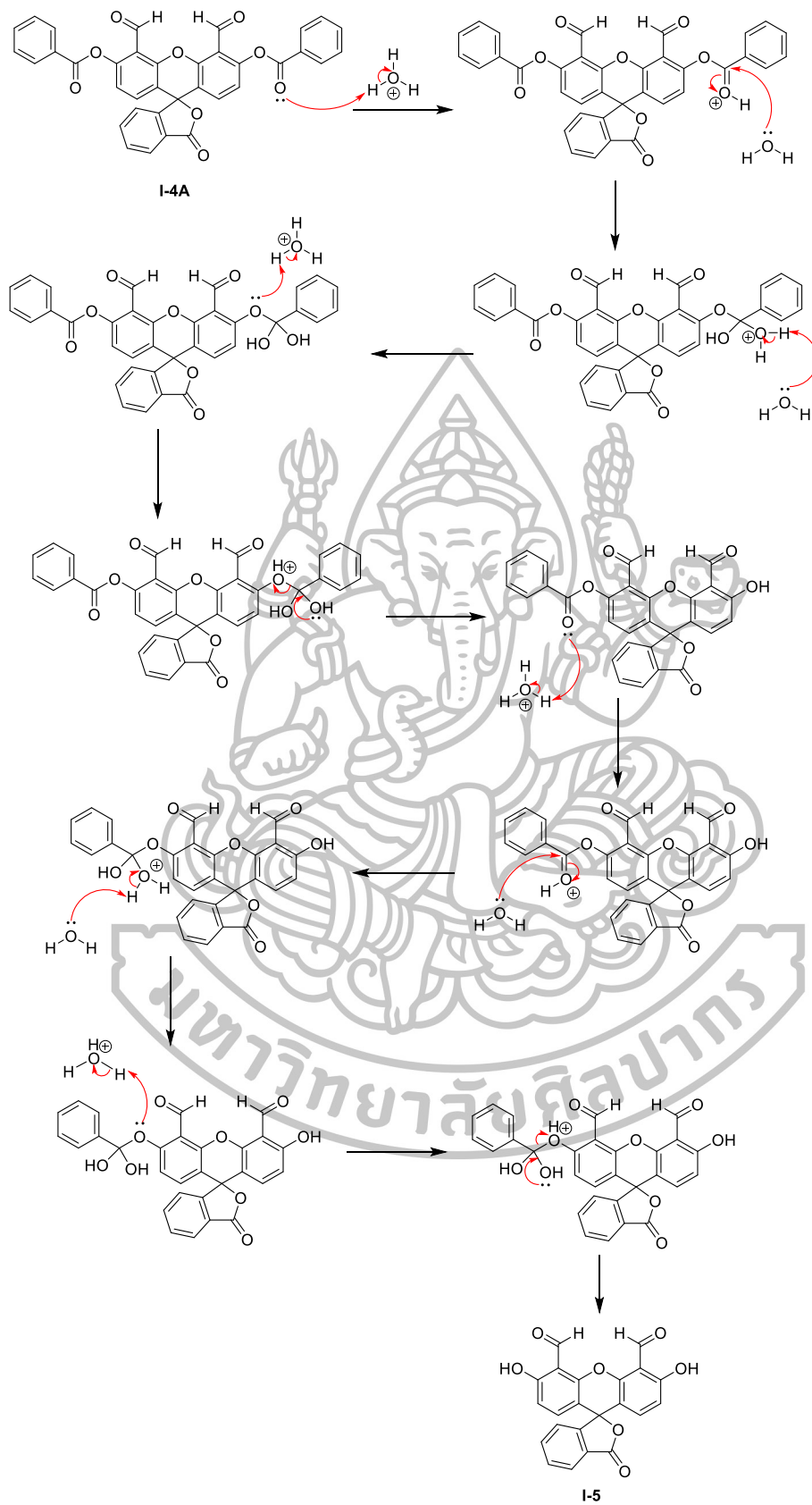
จากผล ^1H NMR สเปกตรัม แสดงให้เห็นลักษณะสัญญาณของโปรตอน 6 กลุ่ม ดังนี้ สองสัญญาณแรกแสดงเป็น doublet ที่ δ 6.79 และ 7.94 ppm ที่มีค่า J -Coupling เท่ากัน คือ 9.0 Hz แสดงว่าโปรตอนทั้งสองชนิด ต่าง coupling กับโปรตอนข้างเคียงหนึ่งโปรตอน และเป็นอะโรมาติกโปรตอนที่อยู่ในตำแหน่ง ortho- ซึ่งกันและกัน จากโครงสร้างคือ โปรตอนตำแหน่ง 1 (H-1) และ 2 (H-2) ตามลำดับ (โดยที่ H-1 มีค่า δ ต่ำกว่าเนื่องจากได้รับอิทธิพลจากหมู่ให้อิเล็กตรอน (หมู่ -OH) มากกว่า) สัญญาณที่ δ 7.63-7.79 ppm มีลักษณะเป็น multiplet เกิดจาก coupling ระหว่าง

โปรตอนตำแหน่ง 3 (H-3) ทั้งสามตัว ถัดมาเป็นสัญญาณของโปรตอนตำแหน่ง 4 (H-4) ที่เกิด coupling กับโปรตอนตำแหน่ง 3 (H-3) หนึ่งตัวที่อยู่ในตำแหน่งข้างเคียง จึงแสดงสัญญาณเป็น doublet ที่ δ 8.07 ppm ($J = 6.6$ Hz) สัญญาณกลุ่มที่ห้าเกิดจากโปรตอนของหมู่อัลดีไฮด์ (H-5) มีลักษณะเป็น singlet ที่ δ 10.66 ppm ซึ่งเป็นตำแหน่งสำคัญที่บอกถึงปฏิกิริยาที่สังเคราะห์สามารถเปลี่ยน $-\text{CH}_2\text{Br}$ (δ_{H} 4.87) เป็น $-\text{CHO}$ (δ_{H} 10.66) ได้จริง และสัญญาณสุดท้ายเกิดจากโปรตอนของหมู่ $-\text{OH}$ (H-6) จึงปรากฏสัญญาณลักษณะ singlet ที่ δ 12.12 ppm จากนั้นยืนยันโครงสร้างด้วยผล HR-ESI MS พบค่า $389.0757 m/z$ (จากการคำนวณ $\text{C}_{22}\text{H}_{13}\text{O}_7$ (M+H)⁺ $389.3344 m/z$) โดยสามารถเสนอกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังภาพที่ 51-52



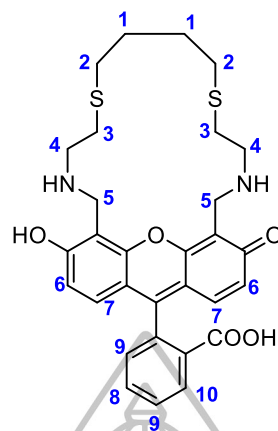


ภาพที่ 51 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของสารประกอบ fluorescein dicarboxaldehyde (I-5)



ภาพที่ 52 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของสารประกอบ fluorescein dicarboxaldehyde (I-5) ต่อ

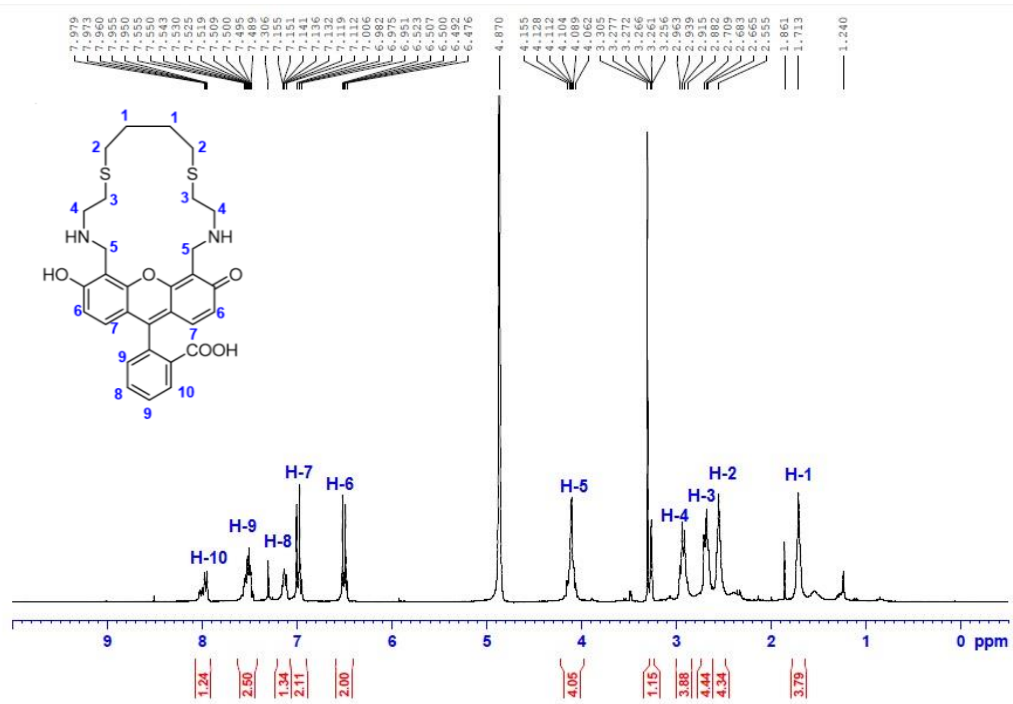
1.4 โครงสร้างของเซ็นเซอร์ (Sensor CFC4)



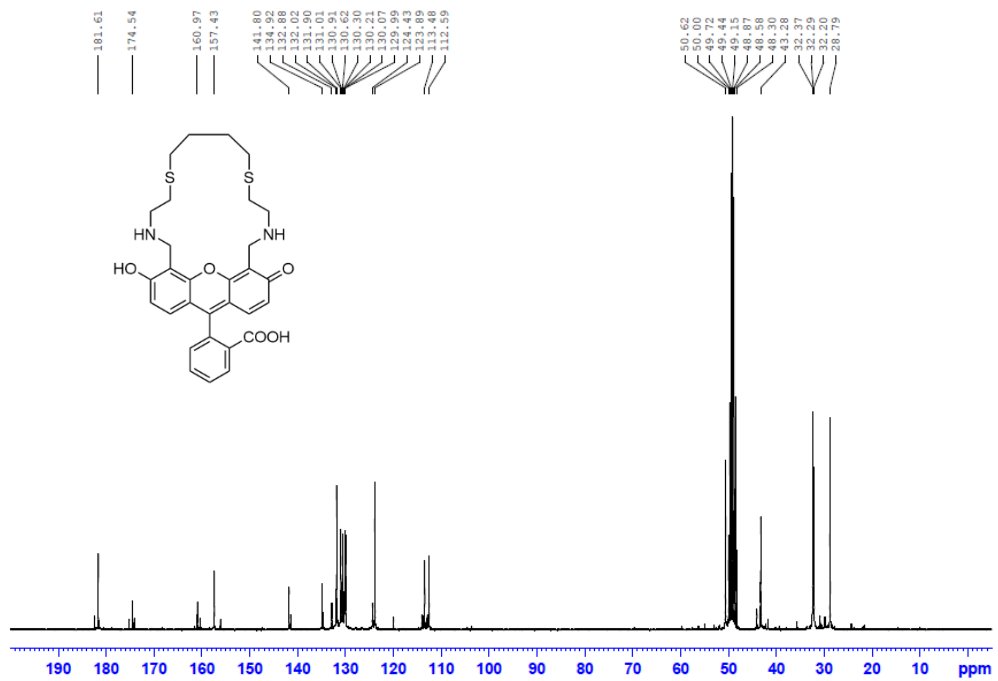
ภาพที่ 53 โครงสร้างทางเคมีของเซ็นเซอร์ (Sensor CFC4)

จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของเซ็นเซอร์ (Sensor CFC4) โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปี สามารถยืนยันโครงสร้างได้ดังนี้

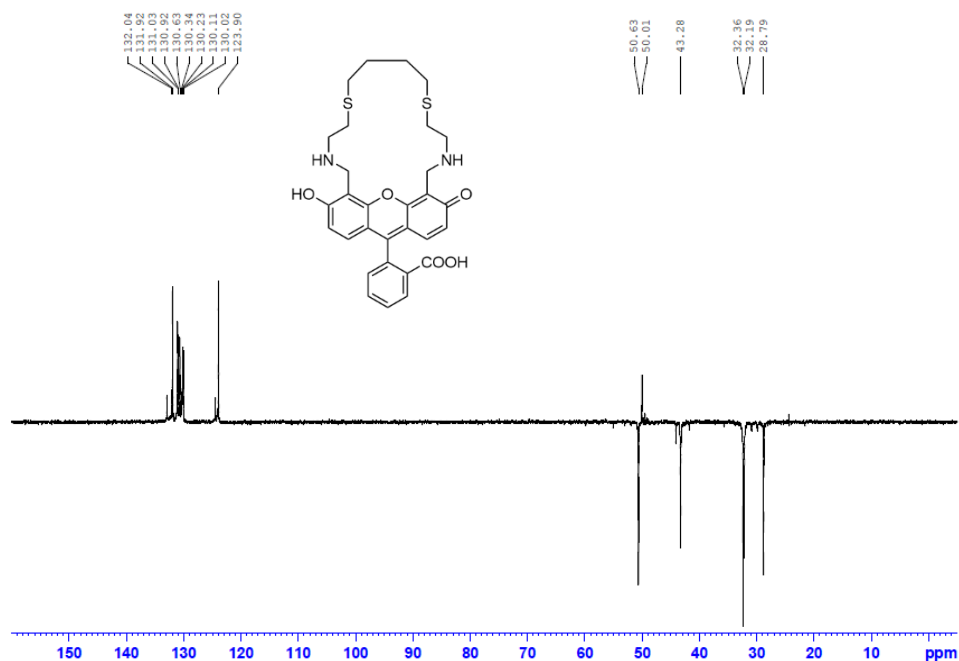
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, MeOD): δ 1.68-1.84 (m, 4H), 2.50-2.68 (m, 4H), 2.68-2.83 (m, 4H), 2.90-3.06 (m, 4H), 4.08-4.24 (m, 4H), 6.50-6.60 (m, 2H), 6.98-7.11 (m, 2H), 7.12-7.24 (m, 1H), 7.48-7.63 (m, 2H), 7.95-8.07 (m, 1H); (ภาพที่ 54) $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, MeOD): δ 28.8 (2CH₂), 31.7 (2CH₂), 32.4 (2CH₂), 43.2 (2CH₂), 50.4 (2CH₂), 112.4 (C), 112.7 (2C), 123.9 (2CH), 130.1 (2CH), 130.7 (CH), 131.0 (CH), 132.2 (2CH), 134.8 (2C), 141.9 (C), 157.5 (2C), 161.2 (C), 174.4 (2C), 181.5 (C); (ภาพที่ 55-56) HR-ESI MS จากการคำนวณ C₃₀H₃₃N₂O₅S₂⁺ (MH)⁺ 565.1831 *m/z*, จากการทดสอบ 565.1824 *m/z*. (ภาพที่ 57)



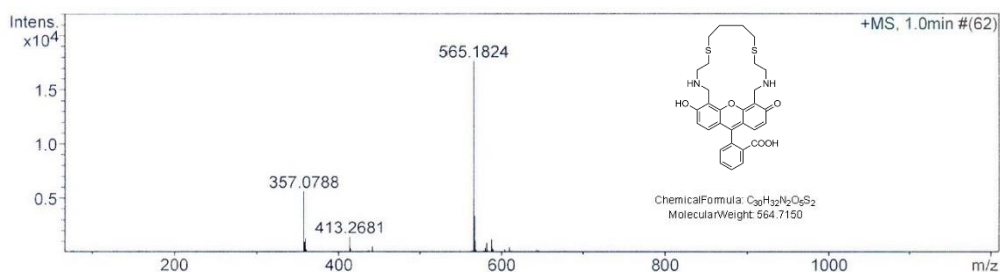
ภาพที่ 54 $^1\text{H NMR}$ สเปกตรัมของเซ็นเซอร์ (Sensor CFC4)



ภาพที่ 55 $^{13}\text{C NMR}$ สเปกตรัมของเซ็นเซอร์ (Sensor CFC4)



ภาพที่ 56 ^{13}C DEPT135 NMR สเปกตรัมของเซ็นเซอร์ (Sensor CFC4)

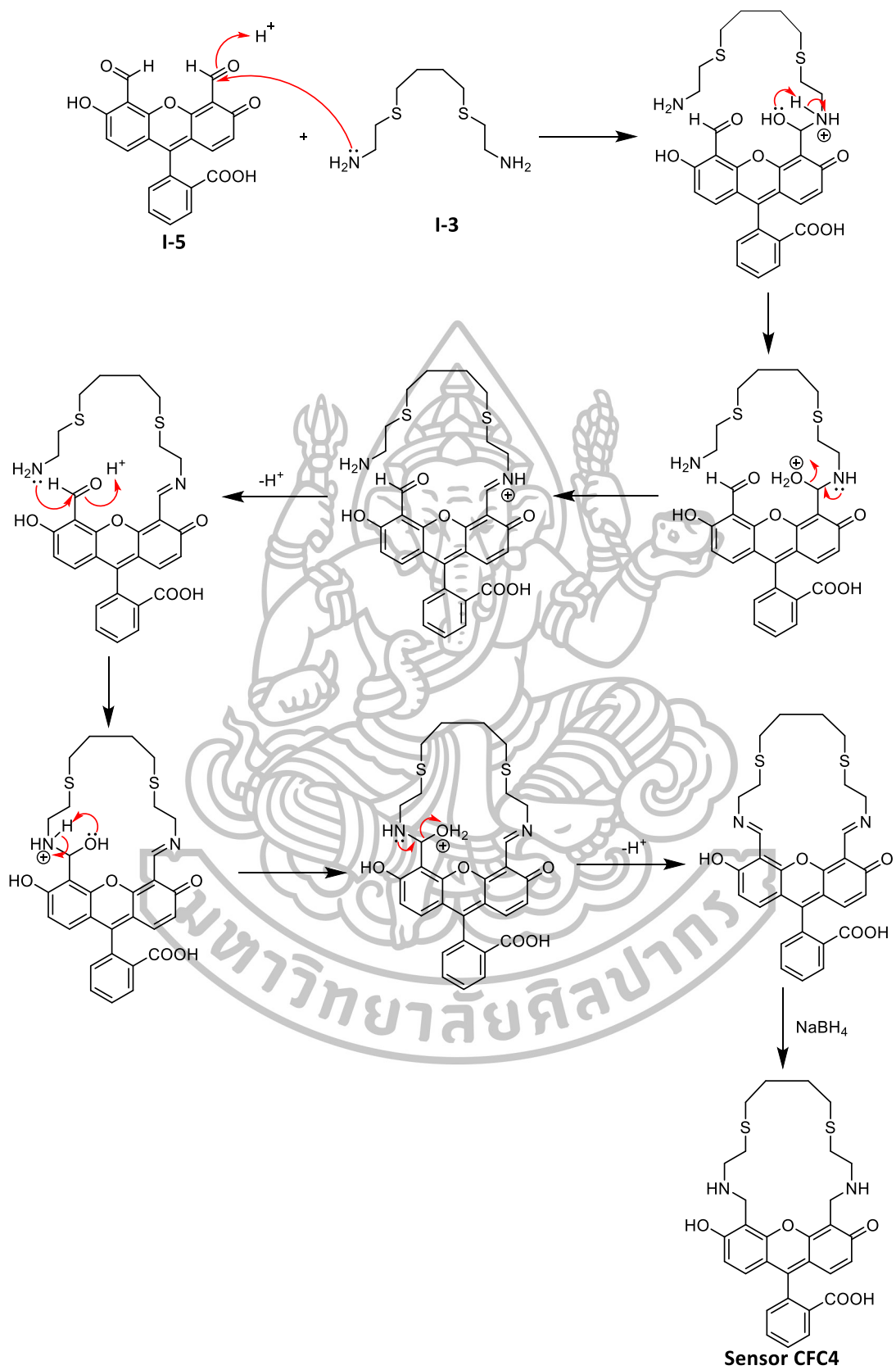


ภาพที่ 57 HR-ESI MS สเปกตรัมของเซ็นเซอร์ (Sensor CFC4)

จาก ^1H NMR สเปกตรัม แสดงให้เห็นสัญญาณของโปรตอน 10 กลุ่มที่แตกต่างกัน โดยสัญญาณที่สามารถระบุได้ชัดเจนมีดังนี้ สัญญาณกลุ่มแรกปรากฏที่ δ 1.68–1.84 ppm เป็น multiplet เกิดจากโปรตอนตำแหน่ง 1 (H-1) ถัดมาที่ δ 2.50–2.68 ppm เป็นสัญญาณของโปรตอนตำแหน่ง 2 (H-2) สัญญาณ multiplet สองกลุ่มถัดมาปรากฏที่ δ 2.68–2.83 และ 2.90–3.06 ppm โดยเกิดจากโปรตอนตำแหน่ง 3 (H-3) และ 4 (H-4) ตามลำดับ ดังเหตุผลที่ได้กล่าวไว้ในหัวข้อ NMR ของสาร 2-[4-(2-aminoethylsulfanyl)butylsulfanyl]ethanamine (I-3) สัญญาณที่ δ 4.08–4.24 ppm มีลักษณะเป็น multiplet เกิดจากโปรตอนตำแหน่ง 5 (H-5) ซึ่งการปรากฏของโปรตอน

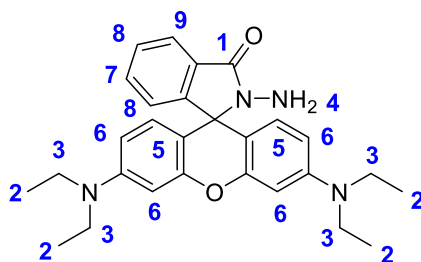
ตำแหน่งนี้เป็นการชี้ให้เห็นว่าปฏิกิริยาที่สังเคราะห์สามารถเปลี่ยน $-\text{CHO}$ (δ_{H} 10.66) เป็น $-\text{CH}_2\text{NH}$ (δ_{H} 4.08-4.24) ได้จริง สัญญาณลักษณะ multiplet สองกลุ่มถัดมาที่ δ 6.50-6.60 และ 6.98-7.11 ppm เกิดจากโปรตอนตำแหน่ง 6 (H-6) และ 7 (H-7) ตามลำดับ (โดยที่ H-7 มีค่า δ ต่ำกว่า เนื่องจากได้รับอิทธิพลจากหมู่ให้อิเล็กตรอน (-OH) มากกว่า) สัญญาณสองกลุ่มถัดมาที่ δ 7.11-7.24 และ 7.48-7.63 ppm มีลักษณะ multiplet เกิดจากโปรตอนตำแหน่ง 8 (H-8) และ 9 (H-9) ตามลำดับ และสัญญาณลำดับสุดท้ายที่ δ 7.95-8.07 ppm มีลักษณะ multiplet เกิดจากโปรตอนตำแหน่ง 10 (H-10) ซึ่งอยู่ใกล้หมู่คาร์บอนิลมากที่สุดจึงปรากฏที่บริเวณสนามแม่เหล็กต่ำสุด (down field) ทั้งนี้สามารถยืนยันโครงสร้างจาก HR-ESI MS ได้เท่ากับ 565.1831 m/z (จากการคำนวณ $\text{C}_{30}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}_2$ (MH)⁺ เท่ากับ 565.1824 m/z) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันจึงสามารถยืนยันได้ว่าเซ็นเซอร์ CFC4 (Sensor CFC4) เกิดขึ้นจริงจากการสังเคราะห์ โดยสามารถเสนอกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังภาพที่ 58





ภาพที่ 58 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของเซ็นเซอร์ (Sensor CFC4)

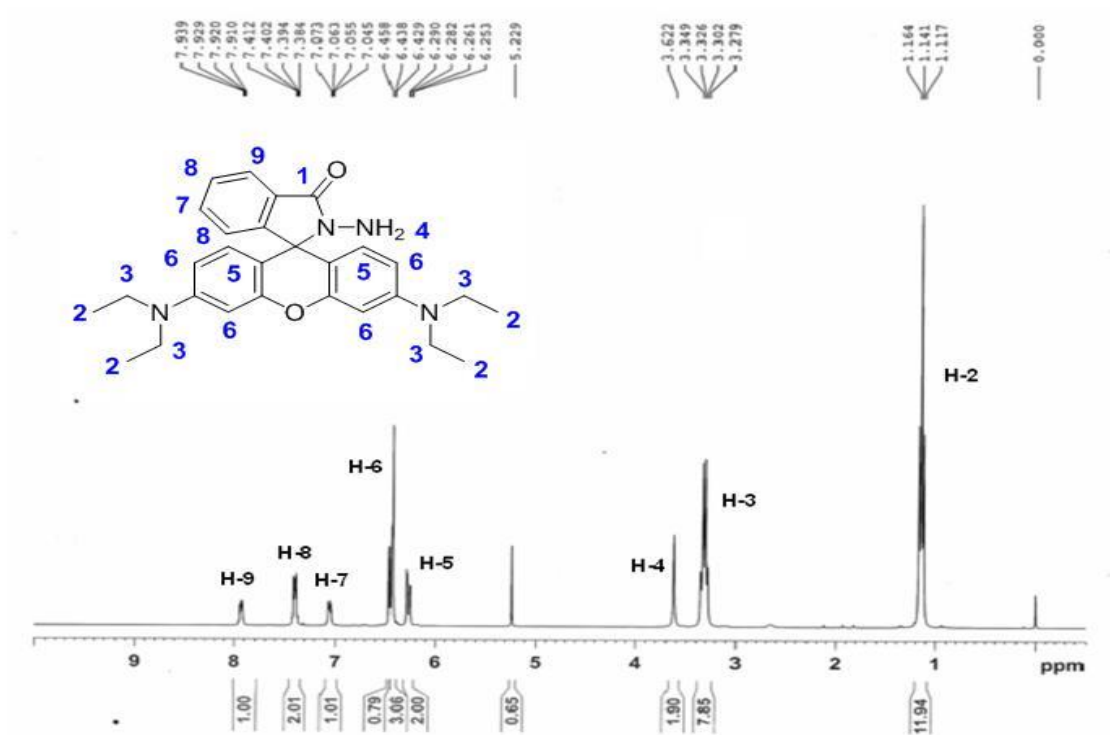
1.5 โครงสร้างของโรดามีนบีไฮดราไซด์ (II-3)



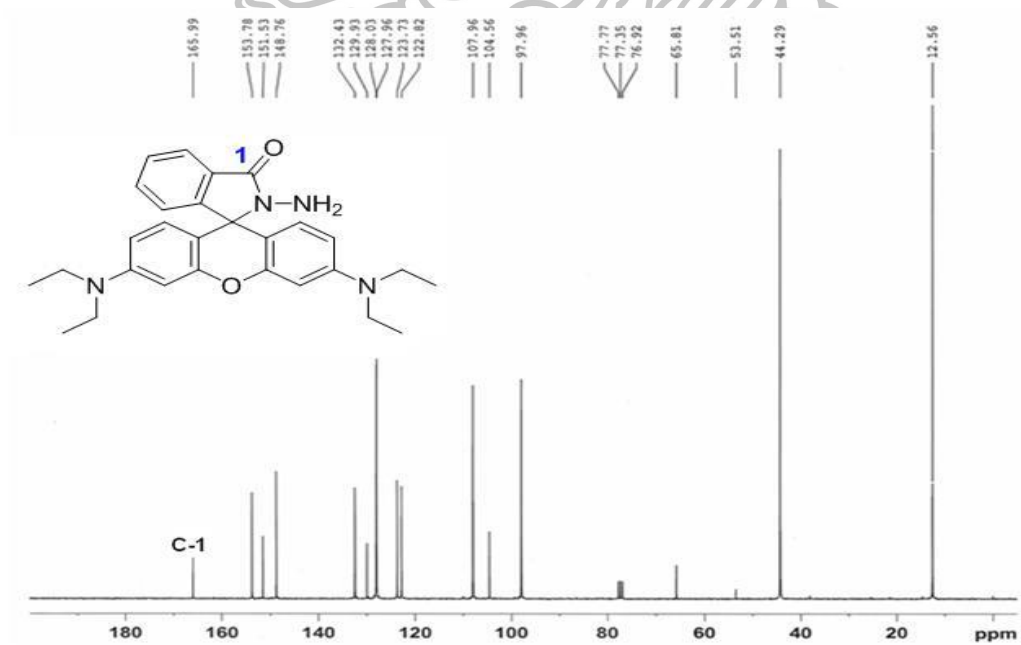
ภาพที่ 59 โครงสร้างทางเคมีโรดามีนบีไฮดราไซด์ (II-3)

จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสาร II-3 โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีสามารถยืนยันโครงสร้างได้ดังนี้

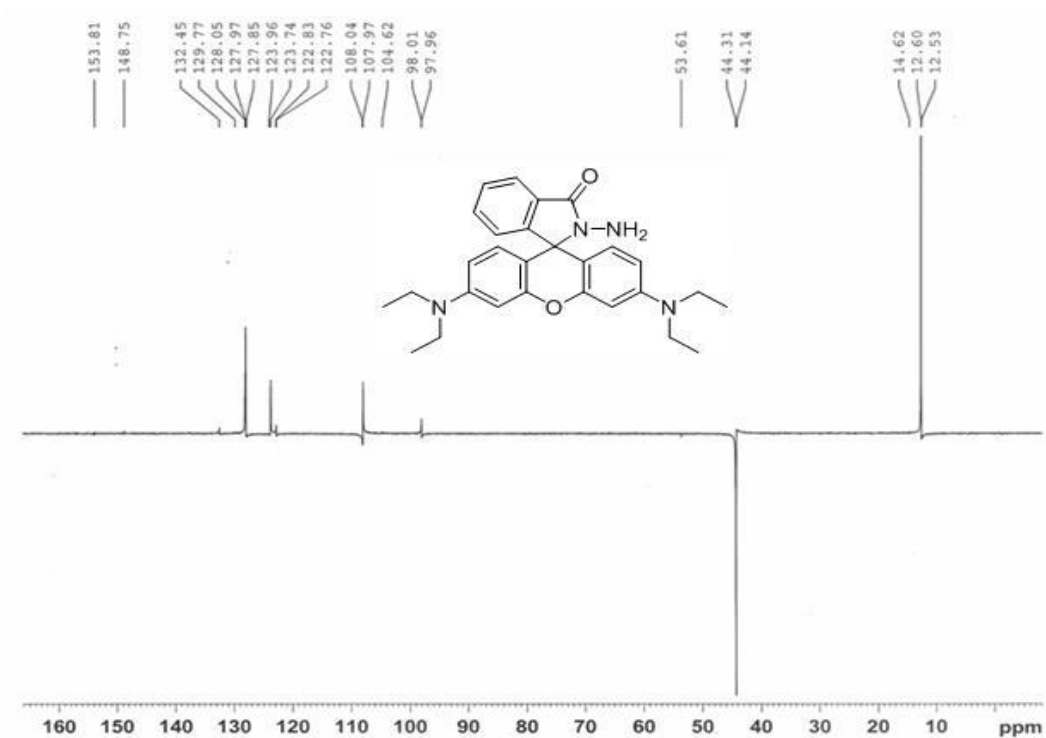
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.14 (t, $J = 6.9$ Hz, 12H), 3.31 (q, $J = 6.9$ Hz, 8H), 3.62 (br s, 2H, NH_2), 6.27 (dd, $J_1 = 8.7$ Hz, $J_2 = 2.4$ Hz, 2H), 6.43-6.46 (m, 4H), 7.06 (dd, $J_1 = 5.4$ Hz, $J_2 = 3.0$ Hz, 1H), 7.39 (dd, $J_1 = 5.4$ Hz, $J_2 = 3.6$ Hz, 2H), 7.92 (dd, $J_1 = 5.7$ Hz, $J_2 = 3.0$ Hz, 1H) ppm (ภาพที่ 60).; ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 12.6 (4CH_3), 44.3 (4CH_2), 65.8 (C), 98.0 (2CH), 104.6 (2C), 108.0 (2CH), 122.8 (CH), 123.7 (CH), 127.9 (CH), 128.0 (2CH), 129.9 (2C), 132.4 (CH), 148.8 (2C), 151.5 (C), 153.8 (C), 166.0 (C) ppm (ภาพที่ 61-62).; HR-ESI MS จากการคำนวณ $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_2$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 457.2604 m/z, จากการทดสอบ 457.2366 m/z (ภาพที่ 63).



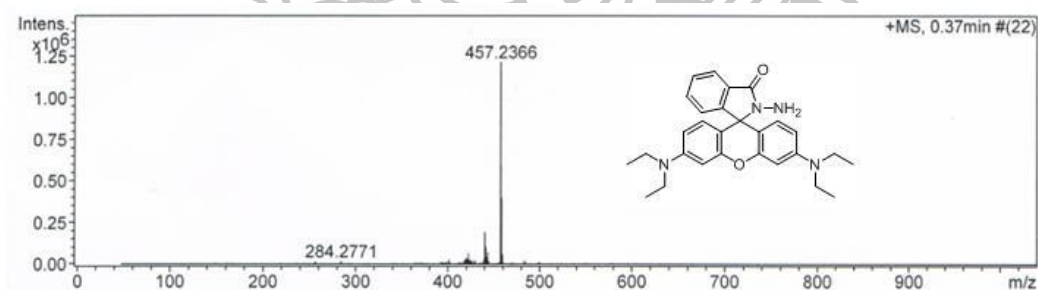
ภาพที่ 60 ¹H NMR สเปกตรัมของโรดามีนบีไฮดร่าไซด์ (II-3)



ภาพที่ 61 ¹³C NMR สเปกตรัมของโรดามีนบีไฮดร่าไซด์ (II-3)



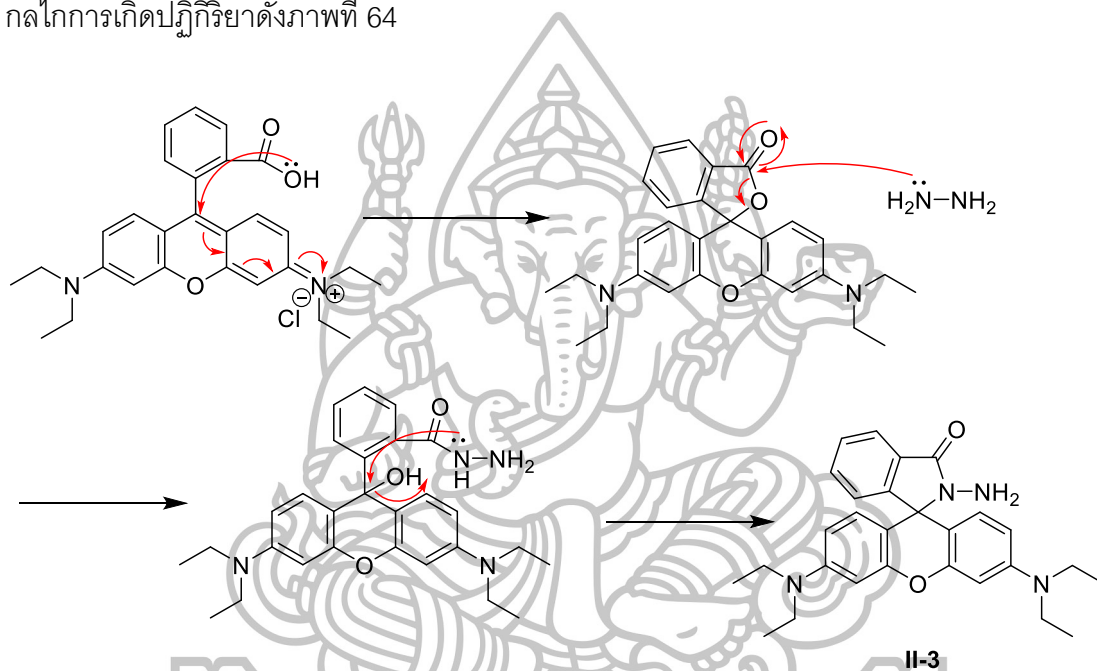
ภาพที่ 62 ^{13}C Dept 135 สเปกตรัมของโรดามีนบีไฮดร่าไซด์ (II-3)



ภาพที่ 63 HR-ESI MS สเปกตรัมของโรดามีนบีไฮดร่าไซด์ (II-3)

เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างสาร II-3 (ภาพที่ 59) และ ^1H NMR สเปกตรัม (ภาพที่ 60) แสดงให้เห็นสัญญาณของโปรตอน 8 ชนิดที่แตกต่างกัน แต่ไม่สามารถยืนยันโครงสร้างที่แน่นอนได้อย่างชัดเจน เนื่องจากโครงสร้างเริ่มต้นของโรดามีนบีคลอไรด์ (II-1) แสดงผล ^1H NMR แตกต่างกับผลโรดามีน บี ไฮดร่าไซด์ (II-3) เพียงแค่สัญญาณของหมู่เอมีนในตำแหน่ง δ เท่ากับ 3.62 ppm เท่านั้น ส่วนสัญญาณที่เหลือไม่สามารถบอกได้อย่างชัดเจน จึงต้องอาศัยผลของ ^{13}C NMR สเปกตรัม (ภาพที่ 59) มาอธิบายเพิ่มเติม โดยสัญญาณที่สามารถระบุได้ชัดเจนคือ สัญญาณที่ปรากฏตำแหน่ง δ เท่ากับ 166.0 ppm ซึ่งเกิดจากสัญญาณคาร์บอน ของหมู่คาร์บอนิล ($\text{C}=\text{O}$) ที่

เกิดพันธะกับอะตอมไนโตรเจนได้เป็นหมู่เอไมด์ (N-C=O; C-1) ซึ่งได้เปลี่ยนตำแหน่งของสัญญาณจากเดิมโรดามีนปีคลอไรด์ (II-3) หมู่คาร์บอนิล (C=O) จะมีพันธะอยู่กับอะตอมออกซิเจนได้เป็นหมู่คาร์บอกซิลิก (O-C=O) ซึ่งจะแสดงสัญญาณปรากฏที่ δ 167.29 ppm ทั้งนี้สามารถใช้ผลจากการตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลยืนยันร่วมด้วย โดยพิจารณาจาก HR-ESI MS (ภาพที่ 56) ในสูตรโมเลกุล $C_{28}H_{33}N_2O_2$ (M+H)⁺ ได้เท่ากับ 457.2366 *m/z* มีค่าใกล้เคียงจากการคำนวณโดยมีค่าเท่ากับ 457.2604 *m/z* จึงยืนยันได้ว่าได้สาร II-3 เกิดขึ้นจริงจากการสังเคราะห์ โดยสามารถเสนอกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังภาพที่ 64



ภาพที่ 64 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของสารประกอบ โรดามีนปีไฮดราไซด์ (II-3)

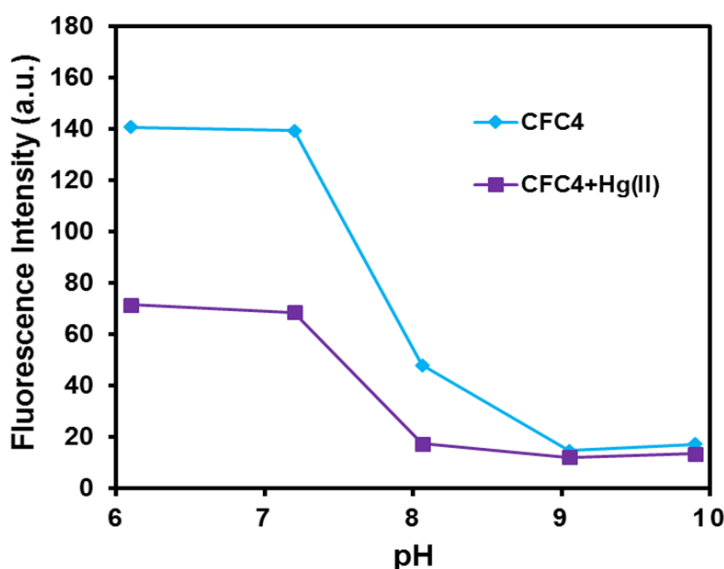
2. การทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจจับไอออนโลหะและไอออนรบกวนอื่นๆ ของเซ็นเซอร์ CFC4 ในสารละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris-HCl buffer) เข้มข้น 2.62 mM pH 7.2 และ methanol ในอัตราส่วน 95:5 v/v

เมื่อฟลูออเรสเซนส์เซ็นเซอร์ CFC4 ได้รับการยืนยันโครงสร้างแล้ว จึงได้นำเซ็นเซอร์ CFC4 มาศึกษาถึงประสิทธิภาพในการทำงานเกี่ยวกับการตรวจจับไอออนโลหะหนัก ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโกปีในสภาวะที่เป็นสารละลายอินทรีย์ และสารละลายน้ำผสมสารละลายอินทรีย์ เพื่อหาความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) ความจำเพาะเจาะจงกับไอออน (selectivity) เปรียบเทียบกับไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ รวมทั้งนำไปศึกษาถึงประสิทธิภาพในการตรวจจับไอออนปรอทในภาวะที่มีไอออนรบกวนอื่นๆ (competitive) ค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออน (Association constant; K_{assoc})

โดยการนำเซ็นเซอร์ I ที่สังเคราะห์ได้มาศึกษาประสิทธิภาพในการตรวจจับไอออนปรอทและไอออนรบกวนอื่นๆ ในสารละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl buffer เข้มข้น 2.62 mM pH 7.20 และ methanol ในอัตราส่วน 95:5 v/v ทั้งนี้ไอออนปรอท ไอออนโลหะทรานซิชัน ไอออนโลหะอัลคาไลน์ และไอออนโลหะอัลคาไลน์เอิร์ทชนิดต่างๆ เตรียมโดยนำเกลือคลอไรด์ของโลหะแต่ละชนิด ละลายในน้ำ DI

2.1. ผลการทดสอบสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนส์ในสารละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris-HCl buffer) เข้มข้น 2.62 mM และ methanol ในอัตราส่วน 95:5 v/v ที่ pH ต่างกันก่อนและหลังการเติมไอออนปรอท

การคายแสงฟลูออเรสเซนส์ของเซ็นเซอร์ CFC4 จะศึกษาในสารละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl buffer เข้มข้น 2.62 mM และ methanol ในอัตราส่วน 95:5 v/v ที่ pH ต่างกัน โดยติดตามสเปกตรัมของการคายแสงฟลูออเรสเซนส์ (fluorescence emission spectra) ก่อนและหลังการเติมไอออนปรอท ในช่วงความยาวคลื่น 514 nm ($\lambda_{em} = 514$ nm) เมื่อ λ_{ex} เท่ากับ 493 nm ความเข้มข้นของเซ็นเซอร์ CFC4 เท่ากับ 0.01 μ M และใช้ไอออนปรอทในรูปแบบของเกลือคลอไรด์ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 65

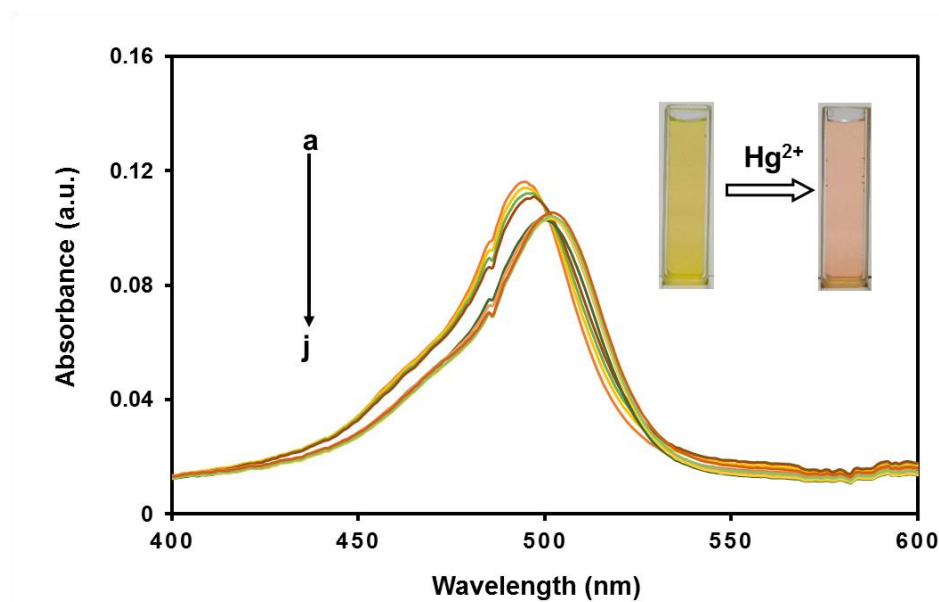


ภาพที่ 65 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{\text{ex}} = 493 \text{ nm}$ และ $\lambda_{\text{em}} = 514 \text{ nm}$) ของเซ็นเซอร์ CFC4 (0.01 μM) ในสารละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl buffer เข้มข้น 2.62 mM และ methanol ในอัตราส่วน 95:5 v/v ที่ pH ต่างๆ ก่อนและหลังเติมไอออนปรอทคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 3.33 μM .

จากผลการทดลองพบว่า เมื่อ pH ของสารละลายบัฟเฟอร์ เข้มข้น 2.62 mM Tris-HCl buffer เปลี่ยนไป ค่า Fluorescence Intensity ของเซ็นเซอร์ CFC4 ก็มีค่าที่เปลี่ยนแปลงตามไปด้วย เมื่อ pH ของสารละลายเพิ่มขึ้น ประสิทธิภาพในการจับไอออนปรอทลดลง ซึ่งได้ทำการศึกษา pH ในช่วง pH 6.10-9.90 โดยที่สารละลาย pH 6.10-7.20 เซ็นเซอร์ I สามารถจับไอออนปรอทได้ดีกว่าสารละลายที่มี pH สูงกว่า (pH >7.20) โดยสารละลายที่ pH 6.10 และ 7.20 ทำให้ค่า Fluorescence Intensity ของเซ็นเซอร์ I มีการเปลี่ยนแปลงมากที่สุด ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกสารละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl buffer เข้มข้น 2.62 mM และ methanol ในอัตราส่วน 95:5 v/v pH 7.20 มาใช้ในการทดลองต่อไป เนื่องจากที่ pH 7.20 เป็นค่าเฉลี่ยในเลือดของมนุษย์ ซึ่งคาดหวังว่าเซ็นเซอร์ชนิดนี้จะสามารถประยุกต์ใช้ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตได้

2.2. ผลการทดสอบสมบัติการดูดกลืนแสงในภาวะที่มีไอออนปรอทของเซ็นเซอร์ CFC4

การดูดกลืนแสงของเซ็นเซอร์ CFC4 ศึกษาในสารละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl buffer เข้มข้น 2.62 mM และ methanol ในอัตราส่วน 95:5 v/v pH 7.20 โดยติดตามสเปกตรัมของการดูดกลืนแสง (absorption spectra) ซึ่งความเข้มข้นของเซ็นเซอร์ CFC4 เท่ากับ 3.00 μM และใช้ไอออนปรอทในรูปของเกลือคลอไรด์ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 66



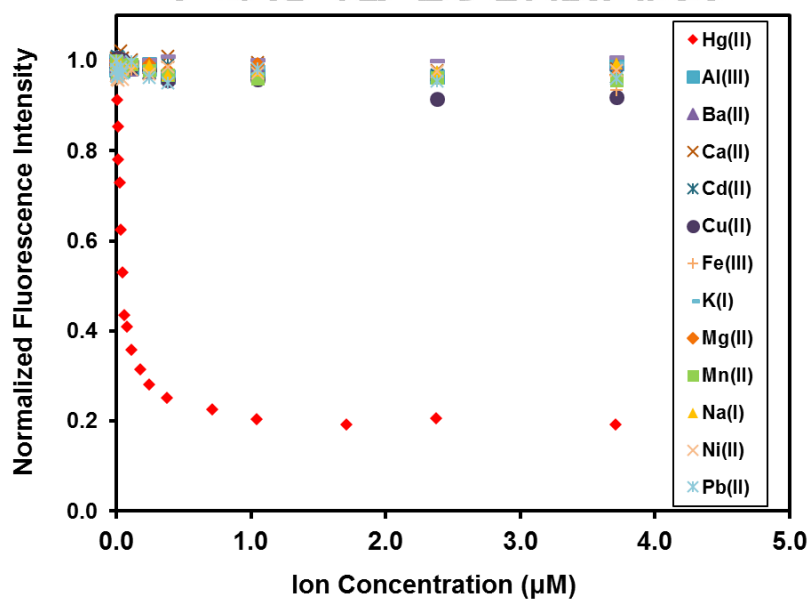
ภาพที่ 66 การดูดกลืนแสงของเซ็นเซอร์ CFC4 (3.00 μM) ในสารละลายผสมระหว่าง 2.62 mM Tris-HCl buffer และ methanol (95:5 v/v pH 7.20) ก่อนและหลังเติมไอออนปรอทคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ a: 0 μM , b: 0.06 μM , c: 0.13 μM , d: 0.20 μM , e: 0.27 μM , f: 0.40 μM , g: 0.53 μM , h: 0.73 μM , i: 0.93 μM , j: 1.20 μM .

จากผลการทดลองพบว่า การตรวจจับของเซ็นเซอร์ CFC4 กับไอออนปรอทแสดงสัญญาณการดูดกลืนแสงในช่วงยูวี-วิสิเบิล (UV-Vis absorption) แบบระบบ ON-OFF ซึ่งเกิดจากกลไกการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนโดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซ็นเซอร์ภายหลังการตรวจจับไอออนปรอทของเซ็นเซอร์ในสารละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl buffer เข้มข้น 2.62 mM และ methanol ในอัตราส่วน 95:5 v/v pH 7.20 โดยพบว่าในภาวะที่ไม่มีไอออนปรอท ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ CFC4 จะดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 495 nm แต่เมื่อมีการเติมปรอทคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ เซ็นเซอร์ CFC4 จะแสดงสัญญาณการดูดกลืนแสงลดลงและเกิด red-shift ทำให้การดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 502 nm อีกทั้งยังสามารถ

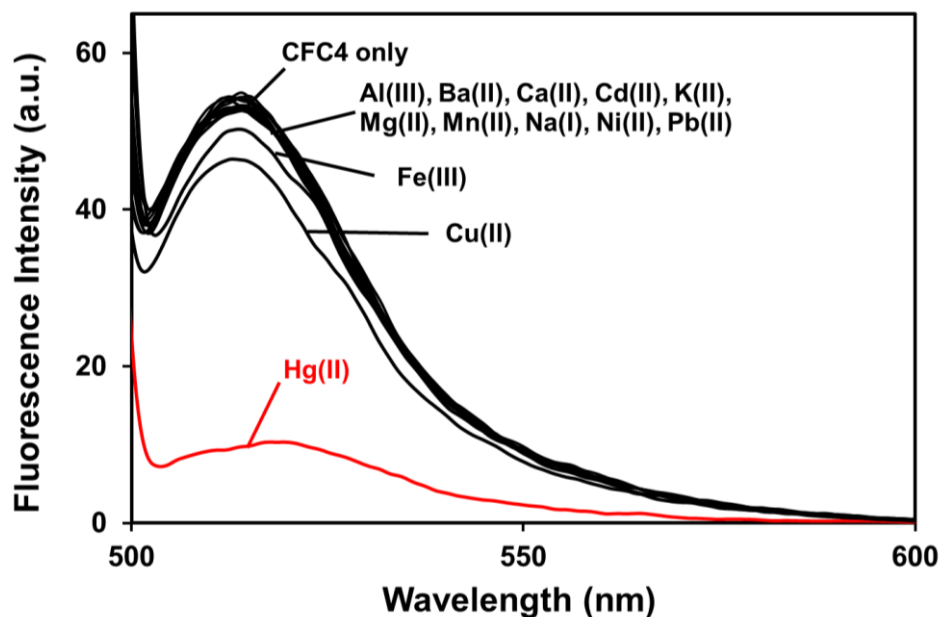
เห็นการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายได้ด้วยตาเปล่าโดยเมื่อไม่มีไอออนปรอท สารละลายของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ CFC4 มีสีเหลือง และเปลี่ยนเป็นสารละลายสีส้มเมื่อมีการเติมไอออนปรอท

2.3. ผลการทดสอบสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ในภาวะที่มีไอออนปรอทเปรียบเทียบกับไอออนรบกวนอื่นๆ ของเซ็นเซอร์ CFC4

การทดสอบการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของเซ็นเซอร์ CFC4 ในสารละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl buffer เข้มข้น 2.62 mM และ methanol ในอัตราส่วน 95:5 v/v pH 7.20 ในภาวะที่มีไอออนปรอทในรูปของเกลือคลอไรด์ เปรียบเทียบกับในภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดต่างๆ ได้แก่ Al^{3+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , Ni^{2+} และ Pb^{2+} ได้ผลดังภาพที่ 67



ภาพที่ 67 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ ($\lambda_{\text{ex}} = 493 \text{ nm}$ และ $\lambda_{\text{em}} = 514 \text{ nm}$) ของเซ็นเซอร์ CFC4 ($0.01 \mu\text{M}$) ในสารละลายผสมระหว่าง 2.62 mM Tris-HCl buffer และ methanol (95:5 v/v pH 7.20) ในภาวะที่มีไอออนโลหะของเกลือคลอไรด์ชนิดต่างๆ ในปริมาณที่ต่างกัน

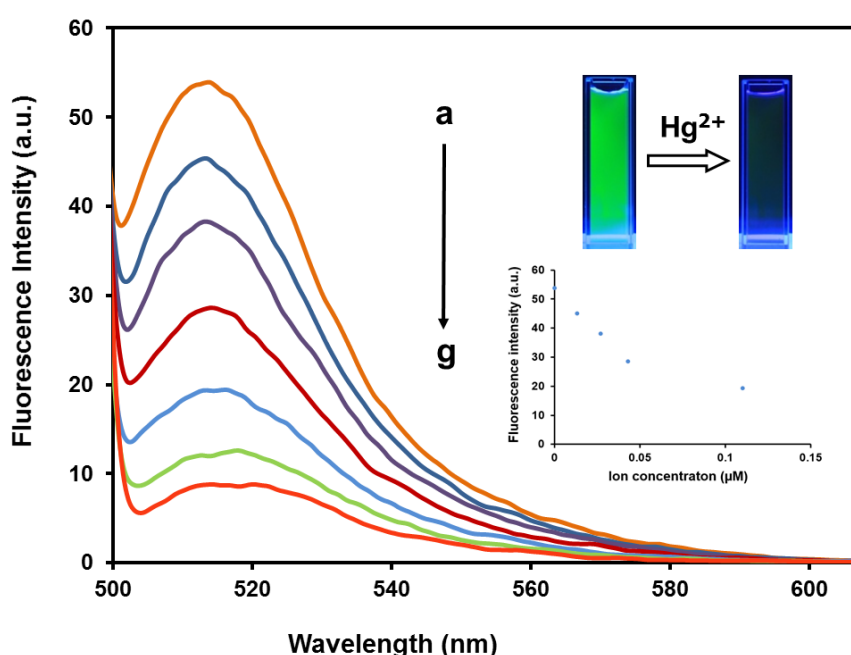


ภาพที่ 68 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{\text{ex}} = 493 \text{ nm}$ และ $\lambda_{\text{em}} = 514 \text{ nm}$) ของเซ็นเซอร์ CFC4 (0.01 μM) ในสารละลายผสมระหว่าง 2.62 mM Tris-HCl buffer และ methanol (95:5 v/v pH 7.20) ในภาวะที่มีไอออนโลหะของเกลือคลอไรด์ชนิดต่างๆ เข้มข้น 10.38 μM

ภาพที่ 67 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า normalized Fluorescence Intensity (แกน y) ของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 514 nm และความเข้มข้นของไอออนชนิดต่างๆ (แกน x) พบว่าเซ็นเซอร์ CFC4 มีความจำเพาะเจาะจงที่ดีกับไอออนของปรอท เมื่อเปรียบเทียบกับไอออนตัวอื่นๆ ที่ทำการทดลอง โดยค่า normalized Fluorescence Intensity มีแนวโน้มลดลงอย่างเห็นได้ชัดและคงที่ในที่สุด ทั้งนี้ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อมีการเติมไอออนปรอท จะทำให้เกิดการลดลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์อย่างชัดเจน ในขณะที่สัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์หลังเติมไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ได้แก่ ไอออนอะลูมิเนียม (Al^{3+}), ไอออนแบเรียม (Ba^{2+}), ไอออนแคลเซียม (Ca^{2+}), ไอออนแคดเมียม (Cd^{2+}), ไอออนทองแดง (Cu^{2+}), ไอออนเหล็ก (Fe^{3+}), ไอออนโพแทสเซียม (K^+), ไอออนแมกนีเซียม (Mg^{2+}), ไอออนแมงกานีส (Mn^{2+}), ไอออนโซเดียม (Na^+), ไอออนนิกเกิล (Ni^{2+}) และ ไอออนตะกั่ว (Pb^{2+}) ในความเข้มข้น 10.38 μM เท่ากันกับไอออนปรอท (เท่ากับค่าความเข้มข้นสูงสุดของไอออนปรอทที่ทำให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์มีค่าต่ำสุด) ไม่แสดงการเปลี่ยนแปลงหรือมีการเปลี่ยนแปลงน้อยกว่า 2% เมื่อเทียบกับความเข้มของสัญญาณเริ่มต้น (เมื่อไม่มีไอออนโลหะเจือปนในสารละลายเซ็นเซอร์) ภาพที่ 68

2.4. ผลการทดสอบสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่ไม่มีไอออนปรอทของ เซ็นเซอร์ CFC4

การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ CFC4 ศึกษาในสารละลายผสมระหว่าง สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl buffer เข้มข้น 2.62 mM และ methanol ในอัตราส่วน 95:5 v/v pH 7.20 โดยติดตามสเปกตรัมของการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence emission spectra) เมื่อ λ_{ex} เท่ากับ 493 nm ความเข้มข้นของเซ็นเซอร์ CFC4 เท่ากับ 0.01 μM และใช้ไอออนปรอท ในรูปของเกลือคลอไรด์ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 64



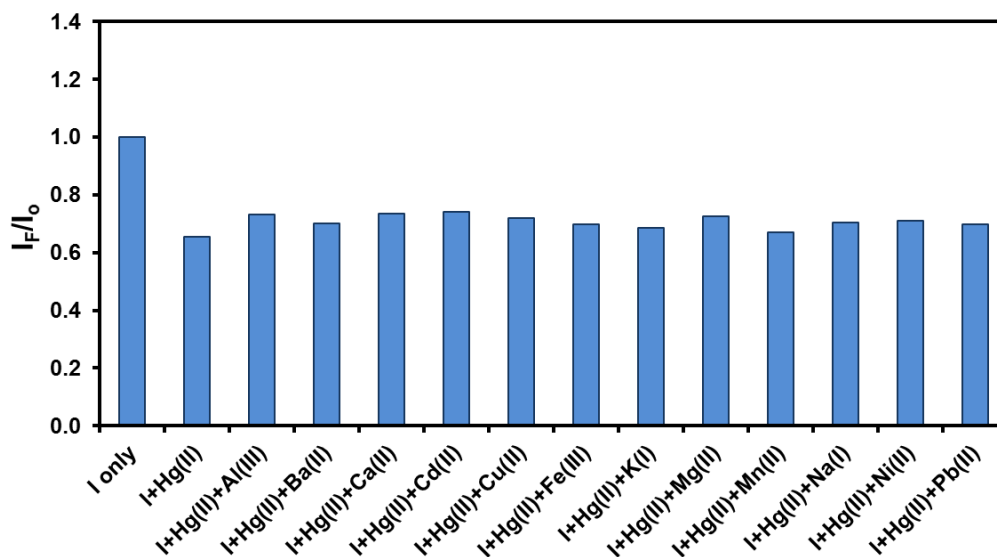
ภาพที่ 69 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{ex} = 493 \text{ nm}$ และ $\lambda_{em} = 514 \text{ nm}$) ของเซ็นเซอร์ CFC4 (0.01 μM) ในสารละลายผสมระหว่าง 2.62 mM Tris-HCl buffer และ methanol (95:5 v/v pH 7.20) ก่อนและหลังเติมไอออนปรอทคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ a: 0 M, b: 0.013 μM , c: 0.027 μM , d: 0.043 μM , e: 0.11 μM , f: 0.71 μM , g: 10.38 μM .

จากผลการทดลองพบว่า การตรวจจับของเซ็นเซอร์ CFC4 กับไอออนปรอทแสดง สัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์แบบระบบ ON-OFF ซึ่งเกิดจากกลไกการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนโดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซ็นเซอร์ภายหลังการตรวจจับไอออนปรอทของ เซ็นเซอร์ใน สารละลายผสมระหว่าง 2.62 mM Tris-HCl buffer และ methanol (95:5 v/v pH 7.20) โดยพบว่าในภาวะที่ไม่มีไอออนปรอท เซ็นเซอร์ CFC4 จะคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่สูง แต่

ในทางตรงข้ามภายหลังจากการเติมปรอทคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ เซ็นเซอร์จะแสดงสัญญาณคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ลดลงในช่วงความยาวคลื่น 500-600 nm โดยความยาวคลื่นมากที่สุด (λ_{max}) ของการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์เท่ากับ 514 nm ซึ่งการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ CFC4 จะลดลงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณไอออนปรอทที่เพิ่มขึ้นในสารละลาย พบว่าหากในสารละลายมีไอออนปรอทคลอไรด์มากกว่าความเข้มข้นของสารละลายเซ็นเซอร์ 10,371 เท่า จะทำให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ลดลงจนถึงที่ ซึ่งลดลงจากสัญญาณเดิมของเซ็นเซอร์ (เมื่อไม่มีไอออนปรอท) 84% โดยสามารถวัดค่าประสิทธิภาพเชิงควอนตัม (quantum yield: Q_f) ของเซ็นเซอร์ได้เท่ากับ 0.56 (ใช้ fluorescein เป็นสารอ้างอิง) [48] มีความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์กับความเข้มข้นของไอออนปรอทเป็นเส้นตรงในช่วง 2-12 ppb ซึ่งถือเป็นช่วงการทำงาน และมีค่าต่ำสุดของการตรวจวัดไอออนปรอท (detection limit) เท่ากับ 7.38 nM or 1.48 ppb

2.5. ผลการทดสอบสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนปรอทรวมกับไอออนรบกวนอื่นๆ ของเซ็นเซอร์ CFC4

การทดสอบการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ CFC4 ในสารละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl buffer เข้มข้น 2.62 mM และ methanol ในอัตราส่วน 95:5 v/v pH 7.20 ในภาวะที่มีไอออนปรอทละลายรวมอยู่กับไอออนรบกวนอื่นๆ ได้แก่ Al^{3+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , Ni^{2+} และ Pb^{2+} ซึ่งได้ตรวจวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ในขณะที่มีปริมาณไอออนรบกวนต่างๆ เท่ากับ 10 เท่า ของปริมาณไอออนปรอทในสารละลาย โดยความเข้มข้นของเซ็นเซอร์ CFC4 เท่ากับ 0.01 μ M และใช้ไอออนชนิดต่างๆ ในรูปของเกลือคลอไรด์ ซึ่งผลการทดลองแสดงในรูปของกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า I/I_0 (แกน y) และชนิดของไอออนชนิดต่างๆ (แกน x) ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 70



ภาพที่ 70 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{ex} = 493 \text{ nm}$ และ $\lambda_{em} = 514 \text{ nm}$) ของเซ็นเซอร์ CFC4 (0.01 μM) ในสารละลายผสมระหว่าง 2.62 mM Tris-HCl buffer และ methanol (95:5 v/v pH 7.20) ในภาวะที่มีความเข้มข้นไอออนรบกวนต่างๆ เจือปนในสารละลายเท่ากับ 0.3 μM (10 equiv.) ของความเข้มข้นไอออนปรอท 0.03 μM .

การทดลองนี้เป็นการทดสอบความสามารถในการตรวจจับไอออนปรอทของเซ็นเซอร์ CFC4 ในภาวะที่มีไอออนรบกวนอื่นๆ ได้แก่ ไอออนอะลูมิเนียม (Al^{3+}), ไอออนแบเรียม (Ba^{2+}), ไอออนแคลเซียม (Ca^{2+}), ไอออนแคดเมียม (Cd^{2+}), ไอออนทองแดง (Cu^{2+}), ไอออนเหล็ก (Fe^{3+}), ไอออนโพแทสเซียม (K^+), ไอออนแมกนีเซียม (Mg^{2+}), ไอออนแมงกานีส (Mn^{2+}), ไอออนโซเดียม (Na^+), ไอออนนิกเกิล (Ni^{2+}) และ ไอออนตะกั่ว (Pb^{2+}) ซึ่งมีความเข้มข้นของไอออนรบกวนต่างๆ (เข้มข้น 0.3 μM) เป็น 10 equiv. ของความเข้มข้นของไอออนปรอท (เข้มข้น 0.03 μM) โดยตรวจวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 514 nm จากภาพที่ 65 สังเกตได้ว่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้หลังจากเติมไอออนรบกวนอื่นๆ รวมกับไอออนปรอท ไม่มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อเทียบกับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์หลังการเติมไอออนปรอทเพียงชนิดเดียว แสดงให้เห็นว่าเซ็นเซอร์ I มีประสิทธิภาพในการทำงานที่ดี แม้ในสภาวะที่มีไอออนอื่นๆ รบกวน ดังนั้นหากในระบบที่ตรวจจับมีไอออนชนิดอื่นๆ เท่ากับปริมาณไอออนปรอท หรือมากกว่าไอออนปรอท เซ็นเซอร์ CFC4 ยังคงแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์แบบ ON-OFF ได้โดยประสิทธิภาพของเซ็นเซอร์ไม่ลดลง และสามารถดักจับไอออนปรอทอย่างจำเพาะเจาะจงสูง

2.6. ค่าความสามารถต่ำสุดของการตรวจจับไอออนปรอท (detection limit)

การคำนวณค่าความสามารถต่ำสุดของการตรวจจับ (detection limit) กระทำโดยพลอต-กราฟค่า log ของความเข้มข้นของปรอทที่เติมลงไป (แกน X) กับ Relative value ที่จุดใดๆ (แกน y)

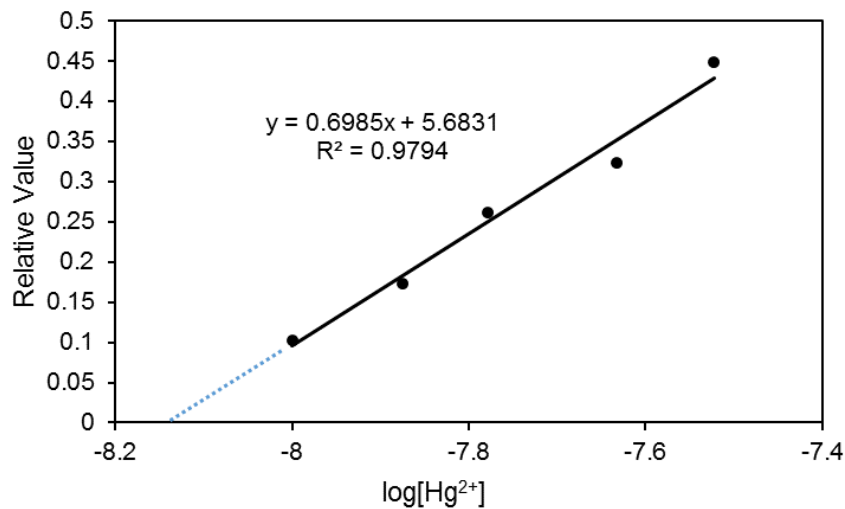
$$\text{Relative Value} = (I_{\max} - I) / (I_{\max} - I_{\min})$$

เมื่อ I_{\max} = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายซีเอ็นเซอร์ CFC4 ก่อนเติมไอออนปรอท
 I_{\min} = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่มีค่าน้อยสุด
 I = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายซีเอ็นเซอร์ CFC4 หลังเติมไอออนปรอทที่ความเข้มข้นได้

ข้อมูลต่างๆ ของซีเอ็นเซอร์ I แสดงดังตารางที่ 4-8 และสร้างกราฟแสดงดังภาพที่ 66-70

ตารางที่ 4 ข้อมูลค่าความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมลงในสารละลายซีเอ็นเซอร์ (M), ค่า log ของความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมลงไป และค่าเชิงสัมพันธ์ของซีเอ็นเซอร์ CFC4 สำหรับสมการ 1

[Hg ²⁺], M	log[Hg ²⁺]	Relative value
0	0	0
1.00×10 ⁻⁸	-8.00000	0.10241
1.33×10 ⁻⁸	-7.87506	0.17358
1.67×10 ⁻⁸	-7.77815	0.26082
2.33×10 ⁻⁸	-7.63202	0.32307
3.00×10 ⁻⁸	-7.52288	0.44801



ภาพที่ 71 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า \log ของความเข้มข้นของไอออนปรอทคลอไรด์ที่เติมลงไป กับ Relative Value ของ เซ็นเซอร์ CFC4, λ_{ex} เท่ากับ 493 nm

การคำนวณ

จากกราฟได้สมการเส้นตรงคือ $y = 0.6985x + 5.6831$; $R^2 = 0.9794$

หาจุดตัดแกน x ; กำหนดให้ $y = 0$

ดังนั้น

$$0 = 0.6985x + 5.6831$$

$$x = -5.6831/0.6985$$

$$x = -8.1361$$

แต่ $x = \log [Hg^{2+}]$; จะได้

$$\log [Hg^{2+}] = -8.1361$$

$$[Hg^{2+}] = 10^{-8.1361}$$

$$= 7.31 \times 10^{-9} \text{ M}$$

$$= 1.47 \text{ ppb.}$$

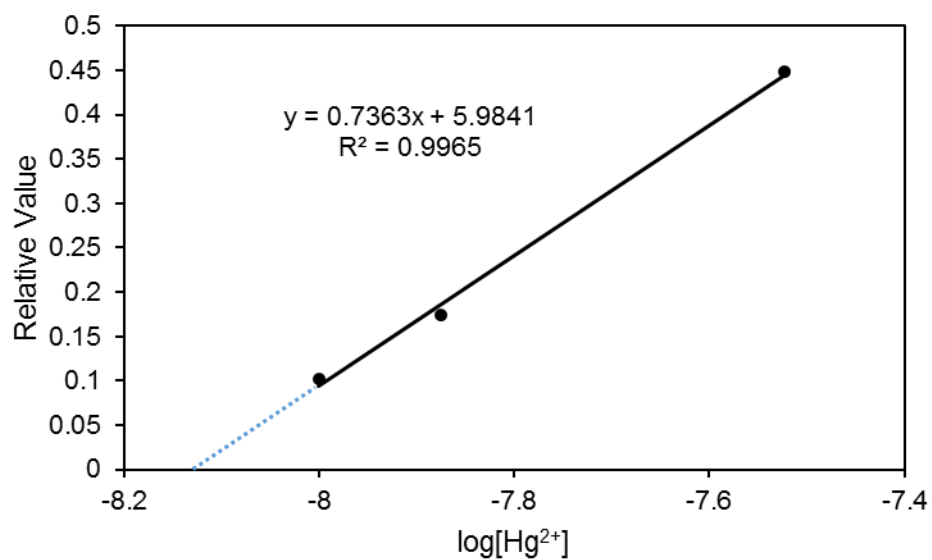
ดังนั้นจากสมการที่ 1 detection limit ในการตรวจจับไอออนปรอทคลอไรด์ เท่ากับ $7.31 \times 10^{-9} \text{ M}$ หรือ 1.47 ppb.

ในการคำนวณหาค่าความสามารถต่ำสุดของการตรวจจับ (detection limit) จะมีการคำนวณหาค่าความคลาดเคลื่อนของค่าความสามารถต่ำสุดของการตรวจจับ (detection limit) จาก 5 สมการที่แตกต่างกัน เพื่อให้ค่าที่ได้ใกล้เคียงความถูกต้องมากที่สุด

โดยการคำนวณอีก 4 แบบจะคำนวณวิธีเดียวกันกับที่กล่าวแล้วข้างต้น

ตารางที่ 5 ข้อมูลค่าความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมลงในสารละลายซีเอ็นซี (M), ค่า log ของความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมลงไป และค่าเชิงสัมพันธ์ของซีเอ็นซี CFC4 สำหรับสมการ 2

$[\text{Hg}^{2+}]$, M	$\log[\text{Hg}^{2+}]$	Relative value
0	0	0
1.00×10^{-8}	-8.00000	0.10241
1.33×10^{-8}	-7.87506	0.17358
3.00×10^{-8}	-7.52288	0.44801



ภาพที่ 72 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า log ของความเข้มข้นของไอออนปรอทคลอไรด์ที่เติมลงไป กับ Relative Value ของ ซีเอ็นซี CFC4, λ_{ex} เท่ากับ 493 nm

การคำนวณ

จากกราฟได้สมการเส้นตรงคือ $y = 0.7363x + 5.9841$; $R^2 = 0.9965$

หาจุดตัดแกน x ; กำหนดให้ $y = 0$

ดังนั้น

$$0 = 0.7363x + 5.9841$$

$$x = -5.9841/0.7363$$

$$x = -8.1273$$

แต่ $x = \log [\text{Hg}^{2+}]$; จะได้

$$\log [\text{Hg}^{2+}] = -8.1273$$

$$[\text{Hg}^{2+}] = 10^{-8.1273}$$

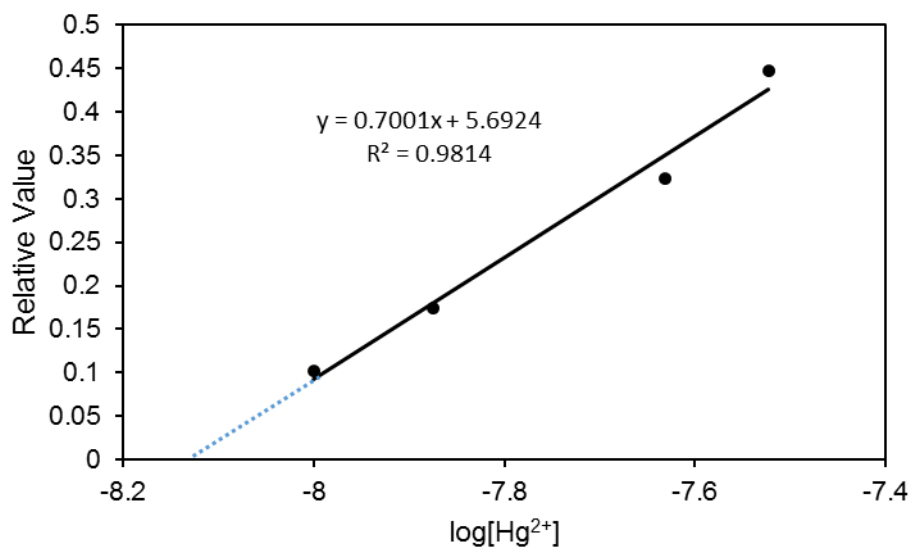
$$= 7.46 \times 10^{-9} \text{ M}$$

$$= 1.50 \text{ ppb.}$$

ดังนั้นจากสมการที่ 2 detection limit ในการตรวจจับไอออนปรอทคลอไรด์ เท่ากับ $7.46 \times 10^{-9} \text{ M}$ หรือ 1.50 ppb.

ตารางที่ 6 ข้อมูลค่าความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมลงในสารละลายซีเอ็นซี (M), ค่า log ของความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมลงไป และค่าเชิงสัมพันธ์ของซีเอ็นซี CFC4 สำหรับสมการ 3

$[\text{Hg}^{2+}]$, M	$\log[\text{Hg}^{2+}]$	Relative value
0	0	0
1.00×10^{-8}	-8.00000	0.10241
1.33×10^{-8}	-7.87506	0.17358
2.33×10^{-8}	-7.63202	0.32307
3.00×10^{-8}	-7.52288	0.44801



ภาพที่ 73 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า \log ของความเข้มข้นของไอออนปรอทคลอไรด์ที่เติมลงไป กับ Relative Value ของ เซ็นเซอร์ CFC4, λ_{ex} เท่ากับ 493 nm

การคำนวณ

จากกราฟได้สมการเส้นตรงคือ $y = 0.7001x + 5.6924$; $R^2 = 0.9814$

หาจุดตัดแกน x ; กำหนดให้ $y = 0$

ดังนั้น

$$0 = 0.7001x + 5.6924$$

$$x = -5.6924/0.7001$$

$$x = -8.1308$$

แต่ $x = \log [Hg^{2+}]$; จะได้

$$\log [Hg^{2+}] = -8.1308$$

$$[Hg^{2+}] = 10^{-8.1308}$$

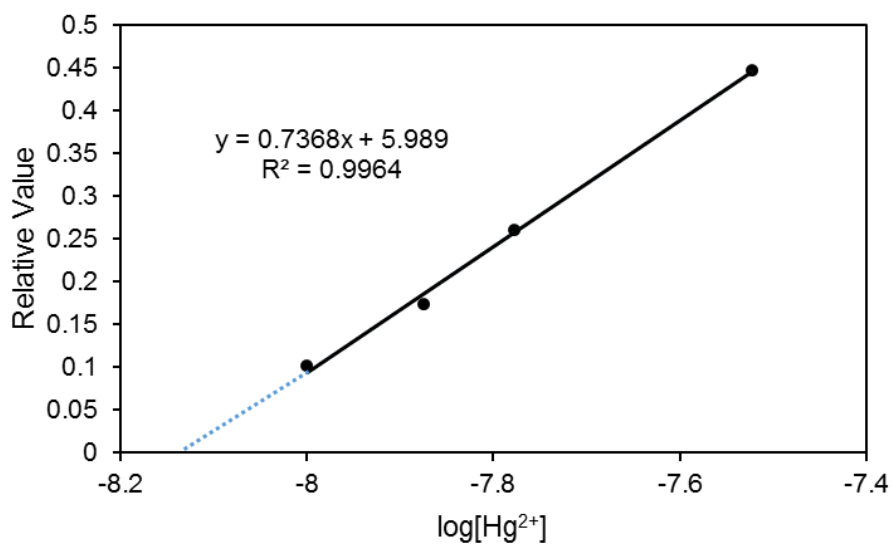
$$= 7.40 \times 10^{-9} \text{ M}$$

$$= 1.48 \text{ ppb.}$$

ดังนั้นจากสมการที่ 3 detection limit ในการตรวจจับไอออนปรอทคลอไรด์ เท่ากับ $7.40 \times 10^{-9} \text{ M}$ หรือ 1.48 ppb.

ตารางที่ 7 ข้อมูลค่าความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมลงในสารละลายเซ็นเซอร์ (M), ค่า log ของความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมลงไป และค่าเชิงสัมพันธ์ของเซ็นเซอร์ CFC4 สำหรับสมการ 4

[Hg ²⁺], M	log[Hg ²⁺]	Relative value
0	0	0
1.00x10 ⁻⁸	-8.00000	0.10241
1.33x10 ⁻⁸	-7.87506	0.17358
1.67x10 ⁻⁸	-7.77815	0.26082
3.00x10 ⁻⁸	-7.52288	0.44801



ภาพที่ 74 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า log ของความเข้มข้นของไอออนปรอทคลอไรด์ที่เติมลงไป กับ Relative Value ของ เซ็นเซอร์ CFC4, λ_{ex} เท่ากับ 493 nm

การคำนวณ

จากกราฟได้สมการเส้นตรงคือ $y = 0.7368x + 5.989$; $R^2 = 0.9964$

หาจุดตัดแกน x ; กำหนดให้ $y = 0$

ดังนั้น

$$0 = 0.7368x + 5.989$$

$$x = -5.989/0.7368$$

$$x = -8.1284$$

แต่ $x = \log [\text{Hg}^{2+}]$; จะได้

$$\log [\text{Hg}^{2+}] = -8.1284$$

$$[\text{Hg}^{2+}] = 10^{-8.1284}$$

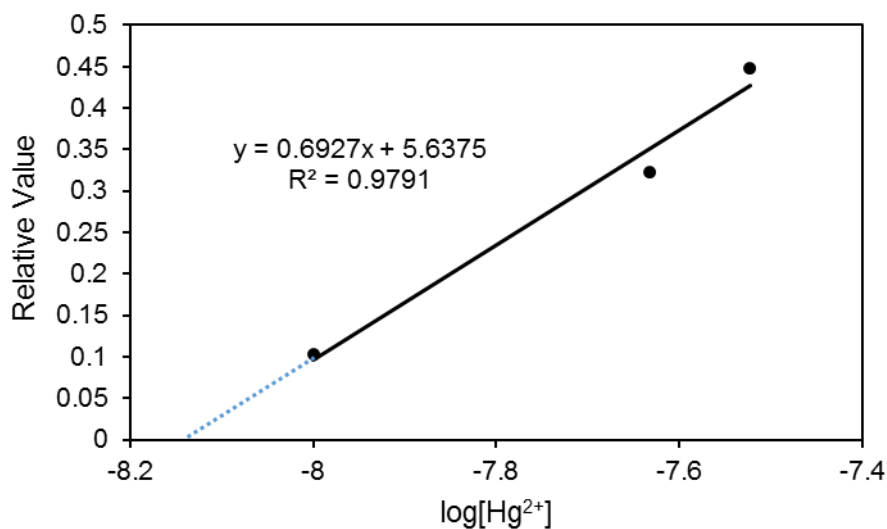
$$= 7.44 \times 10^{-9} \text{ M}$$

$$= 1.49 \text{ ppb.}$$

ดังนั้นจากสมการที่ 4 Detection limit ในการตรวจจับไอออนปรอทคลอไรด์ เท่ากับ $7.44 \times 10^{-9} \text{ M}$ หรือ 1.49 ppb.

ตารางที่ 8 ข้อมูลค่าความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมลงในสารละลายซีเอ็นซี (M), ค่า log ของความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมลงไป และค่าเชิงสัมพันธ์ของซีเอ็นซี CFC4 สำหรับสมการ 5

$[\text{Hg}^{2+}], \text{ M}$	$\log[\text{Hg}^{2+}]$	Relative value
0	0	0
1.00×10^{-8}	-8.00000	0.10241
1.33×10^{-8}	-7.87506	0.17358
3.00×10^{-8}	-7.52288	0.448014



ภาพที่ 75 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า \log ของความเข้มข้นของไอออนปรอทคลอไรด์ที่เติมลงไป กับ Relative Value ของ เซ็นเซอร์ CFC4, λ_{ex} เท่ากับ 493 nm

การคำนวณ

จากกราฟได้สมการเส้นตรงคือ $y = 0.6927x + 5.6375$; $R^2 = 0.9791$

หาจุดตัดแกน x ; กำหนดให้ $y = 0$

ดังนั้น

$$0 = 0.6927x + 5.6375$$

$$x = -5.6375/0.6927$$

$$x = -8.1384$$

แต่ $x = \log [Hg^{2+}]$; จะได้

$$\log [Hg^{2+}] = -8.1384$$

$$[Hg^{2+}] = 10^{-8.1384}$$

$$= 7.27 \times 10^{-9} \text{ M}$$

$$= 1.46 \text{ ppb.}$$

ดังนั้นจากสมการที่ 5 detection limit ในการตรวจจับไอออนปรอทคลอไรด์ เท่ากับ $7.27 \times 10^{-9} \text{ M}$ หรือ 1.46 ppb.

ตารางที่ 9 สรุป ค่า detection limit ในการตรวจจับไอออนปรอทคลอไรด์ ของเซ็นเซอร์ CFC4

สมการ	Detection limit (M)	Detection limit (ppb)
1	7.31×10^{-9}	1.47
2	7.44×10^{-9}	1.49
3	7.46×10^{-9}	1.50
4	7.40×10^{-9}	1.48
5	7.27×10^{-9}	1.46
ค่าเฉลี่ย (average)	7.38×10^{-9}	1.48
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)	8.26×10^{-11}	0.016

เพราะฉะนั้นจากการคำนวณข้างต้นพบว่า ค่า Detection limit ในการตรวจจับไอออนปรอทคลอไรด์ เท่ากับ $7.38 \times 10^{-9} \pm 8.26 \times 10^{-11}$ M หรือ 1.48 ± 0.016 ppb

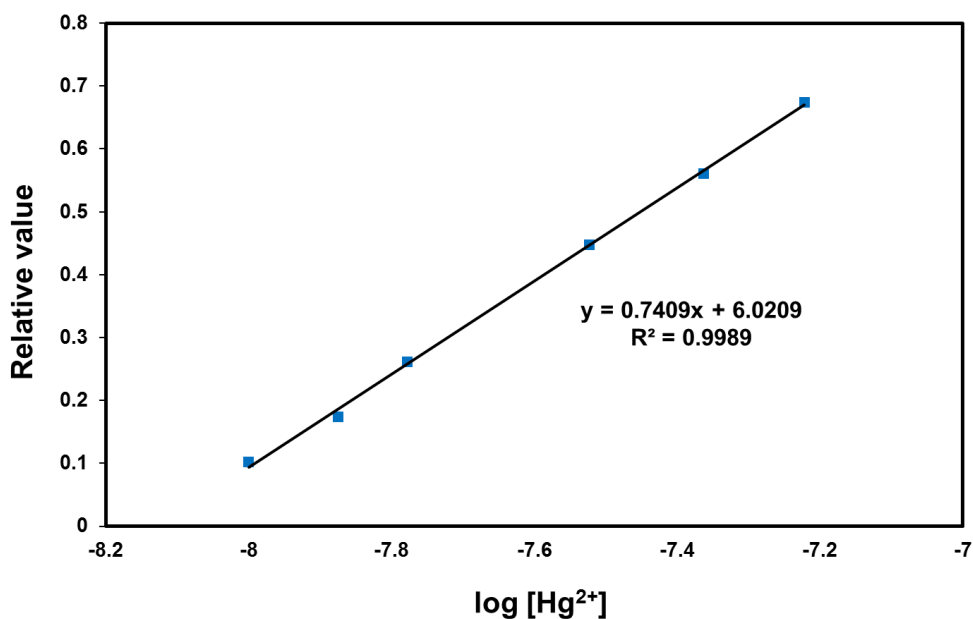
2.7. การหาช่วงความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรง (linear range)

Linear range คือ ช่วงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์และความเข้มข้นของไอออนปรอท ที่มีลักษณะเป็นเส้นตรง ซึ่งถือเป็นช่วงการใช้งาน (working range) สามารถหาโดยพลอตกราฟระหว่างค่าเชิงสัมพัทธ์ (สมการ 1) บนแกน y และความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมลงในสารละลายบนแกน x โดยข้อมูลต่างๆของเซ็นเซอร์ CFC4 แสดงดังตารางที่ 3 และสร้างกราฟแสดงดังภาพที่ 73

ข้อมูลต่างๆของเซ็นเซอร์ CFC4 แสดงดังตารางที่ 10 และสร้างกราฟแสดงดังภาพที่ 73

[Hg ²⁺], M	log[Hg ²⁺]	[Hg ²⁺], ppb	Relative Value	Fluorescence Intensity
0	0	0	0	53.44
1.00x10 ⁻⁸	-8.00000	2.01	0.10	48.85
1.33x10 ⁻⁸	-7.87506	2.67	0.17	45.66
1.67x10 ⁻⁸	-7.77815	3.34	0.26	41.75
3.00x10 ⁻⁸	-7.52288	6.02	0.45	33.36
4.33x10 ⁻⁸	-7.36318	8.69	0.56	28.31
6.00x10 ⁻⁸	-7.22185	12.04	0.67	23.21

ตารางที่ 10 ข้อมูลค่าความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมลงไป (M), ค่า log ของความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมและ Relative value ของเซ็นเซอร์ CFC4, λ_{ex} เท่ากับ 493 nm

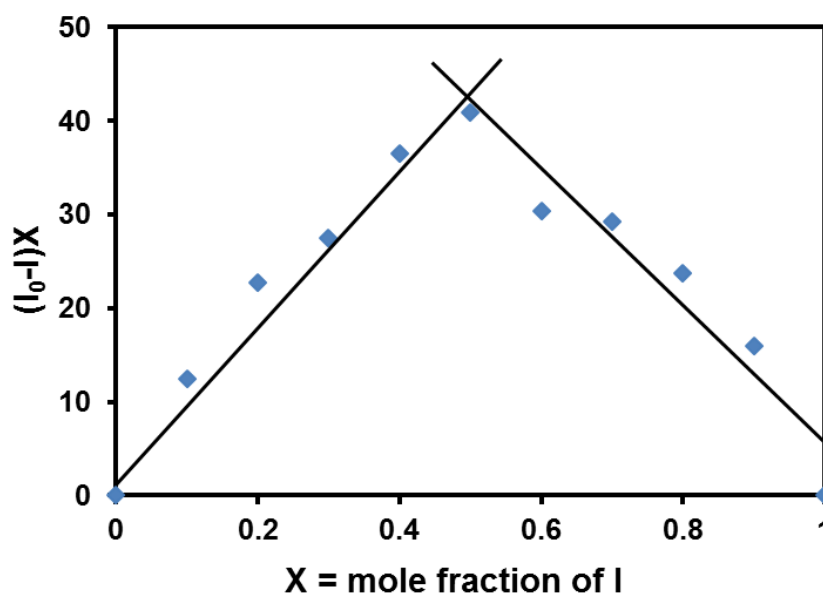


ภาพที่ 76 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า relative value ของ เซ็นเซอร์ CFC4, λ_{ex} เท่ากับ 493 nm กับความเข้มข้นของไอออนปรอทคลอไรด์ที่เติมลงไปเป็นหน่วย ppb ($\log [Hg^{2+}]$)

จากภาพที่ 76 จะเห็นว่า ค่า Relative Value กับความเข้มข้นของไอออนปรอท มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 2.01 ppb ถึง 12.04 ppb มีค่า $R^2 = 0.9989$ ซึ่งใกล้เคียง 1 มาก ดังนั้น ช่วงความเข้มข้นดังกล่าวจึงเป็นช่วงที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ตรวจวัดไอออนปรอทคลอไรด์ได้

2.8. อัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนและค่าคงที่สมดุลของการเกิดไอออนเชิงซ้อน

การทดลองเพื่อหาอัตราส่วนระหว่างโมเลกุลของเซ็นเซอร์ CFC4 กับไอออนปรอทที่ใช้ในการเกิด binding ศึกษาโดยวิธี Job's plot ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 77



ภาพที่ 77 กราฟแสดงอัตราส่วนระหว่างโมเลกุลของเซ็นเซอร์ CFC4 กับไอออนปรอทที่ใช้ในการเกิด binding ศึกษาโดยวิธี Job's plot

จากผล Job's plot แสดงให้เห็นว่า เซ็นเซอร์ CFC4 หนึ่งโมเลกุลสามารถดักจับไอออนปรอทคลอไรด์ 1 โมเลกุล ($\text{CFC4}:\text{Hg}^{2+} = 1:1$) จากนั้นจึงศึกษาค่าคงที่สมดุลของการเกิดไอออนเชิงซ้อน (Association constant; K_{assoc}) โดยใช้สมการ Benesi-Hildebrand [45-47] สามารถแสดงดังภาพที่ 69 และสามารถคำนวณค่า K_{assoc} ได้เท่ากับ $6.40 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$

การคำนวณค่าคงที่สมดุลของการเกิดไอออนเชิงซ้อน (Association constant; K_{assoc}) โดยใช้สมการ Benesi-Hildebrand [45-47] กระทำโดยพลอตกราฟค่า $1/\text{ความเข้มข้นของปรอทที่เติมลงไป} [\text{Hg}^{2+}]$ (แกน X) กับ $1/(I_0 - I_{\text{obs}})$ ที่จุดใดๆ (แกน y)

$$K_{\text{assoc}} = 1/\text{slope} * (I_{\text{max}} - I_{\text{min}})$$

เมื่อ I_{max} = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์ CFC4 ก่อนเติมไอออนปรอท

I_{\min} = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่มีค่าน้อยสุด

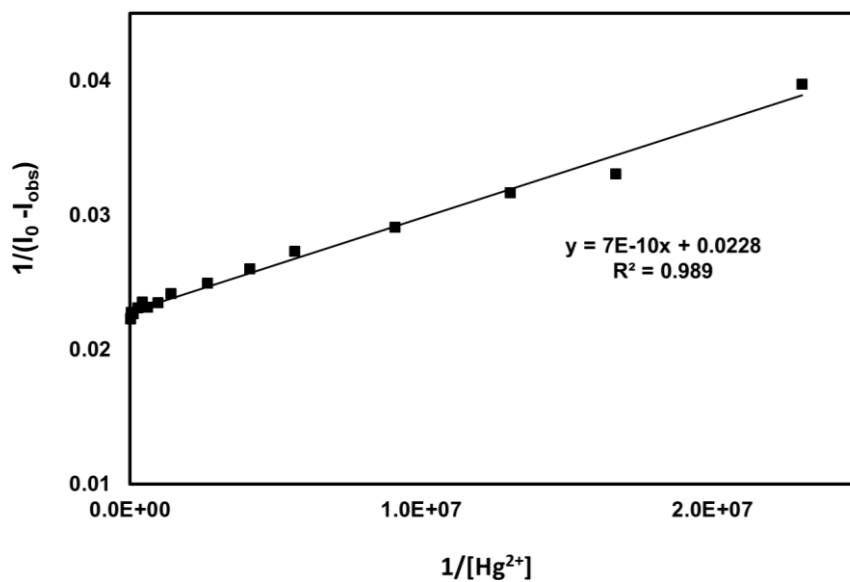
I_0 = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายซีเอ็นเซอร์ CFC4 เริ่มต้น ไม่มีไอออนปรอทในสารละลาย

I_{obs} = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายซีเอ็นเซอร์ CFC4 ณ ความเข้มข้นต่างๆของไอออนปรอทในสารละลาย

ตารางที่ 11 ข้อมูลค่าความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมลงไป [Hg^{2+}], ค่า $1/[\text{Hg}^{2+}]^n$ (ความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมลงไป) ค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายซีเอ็นเซอร์ CFC4 และ ค่า $1/(I_0 - I_{\text{obs}})$ ที่ได้จากการคำนวณ ของซีเอ็นเซอร์ CFC4, λ_{ex} เท่ากับ 493 nm

$[\text{Hg}^{2+}]$, M	intensity(I_{obs})	$1/[\text{Hg}^{2+}]^n$, (n=1)	$1/(I_0 - I_{\text{obs}})$
0	53.44	0	0
4.3333×10^{-8}	28.31	2.31×10^7	0.0398
6.0000×10^{-8}	23.21	1.67×10^7	0.0331
7.6667×10^{-8}	21.88	1.30×10^7	0.0317
1.1000×10^{-7}	19.14	9.09×10^6	0.0292
1.7667×10^{-7}	16.87	5.66×10^6	0.0273
2.4333×10^{-7}	15.03	4.11×10^6	0.0260
3.7667×10^{-7}	13.43	2.65×10^6	0.0250
7.1000×10^{-7}	12.09	1.41×10^6	0.0242
1.0433×10^{-6}	10.93	9.58×10^5	0.0235

$[\text{Hg}^{2+}]$, M	intensity(I_{obs})	$1/[\text{Hg}^{2+}]^n$, (n=1)	$1/(I_0 - I_{\text{obs}})$
1.7100×10^{-6}	10.27	5.85×10^5	0.0232
2.3767×10^{-6}	10.99	4.21×10^5	0.0236
3.7100×10^{-6}	10.25	2.70×10^5	0.0232
1.0377×10^{-5}	9.36	9.64×10^4	0.0227
2.3710×10^{-5}	9.56	4.22×10^4	0.0228
3.7043×10^{-5}	9.54	2.70×10^4	0.0228
7.0377×10^{-5}	8.71	1.42×10^4	0.0224
1.0371×10^{-4}	8.62	9.64×10^3	0.0223



ภาพที่ 78 กราฟจากการคำนวณตามสมการ Benesi-Hildebrand ของเซ็นเซอร์ CFC4 เมื่อ $n = 1$

การคำนวณ

$$K_{\text{assoc}} = 1/\text{slope} * (I_{\text{max}} - I_{\text{min}})$$

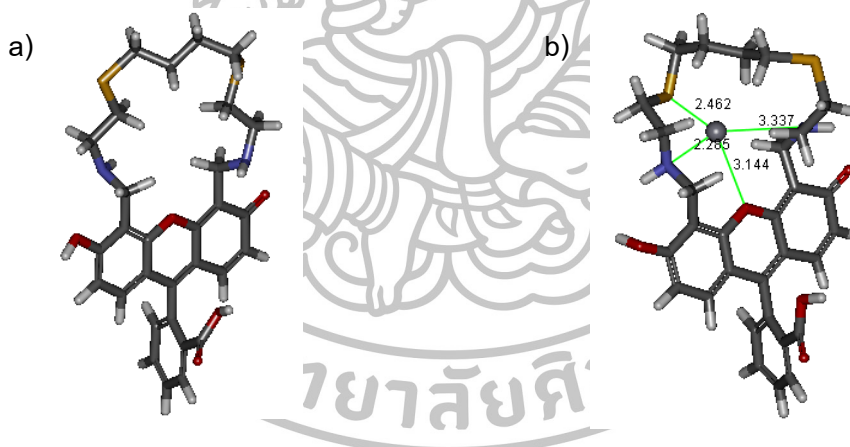
จากกราฟได้สมการเส้นตรงคือ $y = 7.0 \times 10^{-10} x + 0.0228$; $R^2 = 0.989$

ซึ่ง slope = 7.0×10^{-10} , $I_{\text{max}} = 53.44$, $I_{\text{min}} = 8.62$

$$\begin{aligned} \text{ดังนั้น } K_{\text{assoc}} &= 1/(7.0 \times 10^{-10}) * (53.44 - 8.62) \\ &= 6.40 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \end{aligned}$$

ดังนั้น อัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน ของเซ็นเซอร์ CFC4 ต่อการดักจับไอออนปรอทเป็น หนึ่งต่อหนึ่ง ($\text{CFC4}:\text{Hg}^{2+} = 1:1$) และสามารถคำนวณค่าคงที่สมดุลของการเกิดไอออนเชิงซ้อน, K_{assoc} ได้เท่ากับ $6.40 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$

2.9. ผลการทำนายการเปลี่ยนแปลงของเซ็นเซอร์ CFC4 ก่อนและหลังการจับไอออนปรอท โดยเทคนิค Molecular modeling



ภาพที่ 79 แสดงลักษณะโครงสร้างด้วยเทคนิค Molecular modeling ของ a) เซ็นเซอร์ CFC4 และ b) เซ็นเซอร์ $\text{CFC4}:\text{Hg}^{2+}$ อัตราส่วน 1:1

ในภาวะก่อนเติมไอออนปรอทลงไปในสารละลาย เซ็นเซอร์ CFC4 มีลักษณะโครงสร้างดังภาพที่ 79a เมื่อเติมไอออนปรอทลงไปในสารละลาย ไอออนปรอทจะไปโคออดิเนตกับอะตอมของไนโตรเจน (N), อะตอมของซัลเฟอร์ (S) และ อะตอมออกซิเจน (O) ที่ใจกลางของโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นวง ด้วยกระบวนการ electrostatic interactions โดยไอออนปรอทเกิดโคออร์ดิเนตกับ

2 อะตอมไนโตรเจน (N), 1 อะตอมของซัลเฟอร์ (S) และ 1 อะตอมออกซิเจน (O) ในระยะทางเท่ากับ 2.285 Å, 3.337 Å, 2.462 Å และ 3.144 Å ตามลำดับ ดังภาพที่ 79b ซึ่งจากการศึกษานี้สามารถช่วยยืนยันว่าเซ็นเซอร์ CFC4 สามารถดักจับไอออนปรอทได้ในอัตราส่วน 1:1 ตรงตามผลการศึกษาด้วยเทคนิค Job's plot และในการคำนวณค่าคงที่สมดุลของการเกิดไอออนเชิงซ้อน, K_{assoc}

2.10 ภาพถ่ายของสารละลายเซ็นเซอร์ CFC4 ในภาวะที่ไม่มีไอออนปรอท เปรียบเทียบกับไอออนรบกวนอื่นๆ



ภาพที่ 80 ภาพถ่ายของสารละลายเซ็นเซอร์ CFC4 (3.0 μM) ในภาวะที่ไม่มีและมีไอออน Hg^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{3+} , K^+ , Mn^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} , Na^+ และ Ni^{2+} (20.0 μM) ภายใต้แสง UV.

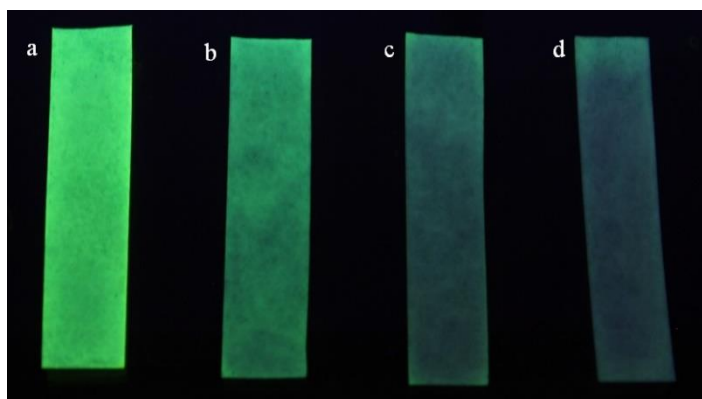


ภาพที่ 81 ภาพถ่ายของสารละลายเซ็นเซอร์ CFC4 (10.0 μM) ในภาวะที่ไม่มีและมีไอออน Hg^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{3+} , K^+ , Mn^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} , Na^+ และ Ni^{2+} (45.0 μM) ในสภาวะปกติ

จากภาพถ่าย แสดงให้เห็นว่าเซ็นเซอร์ CFC4 มีจำเพาะเจาะจงกับไอออนปรอทสูงเมื่อเทียบกับไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ โดยการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ CFC4 จะลดลงเมื่อมีการเติมไอออนปรอทลงในสารละลาย (ภาพที่ 80) ในขณะที่เมื่อมีการเติมไอออนชนิดอื่นได้แก่ Hg^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{3+} , K^+ , Mn^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} , Na^+ และ Ni^{2+} ลงในสารละลาย การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ CFC4 ไม่มีการเปลี่ยนแปลง อีกทั้งยังสามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงนี้ได้ด้วยตาเปล่า โดยจะเห็นการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายจากสีเหลืองเมื่อไม่มี

ไอออนปรอท เกิดการเปลี่ยนเป็นสีส้มเมื่อทำการเติมไอออนปรอทลงในสารละลาย ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสีของสารละลายที่มีการเติมไอออนชนิดอื่นๆพบว่าสารละลายยังคงมีสีเหลืองเช่นเดิม (ภาพที่ 81)

2.11 ภาพถ่ายกระดาษกรองที่เคลือบด้วยสารละลายเซ็นเซอร์ CFC4 ในภาวะที่ไม่มีและมีไอออนปรอท ในความเข้มข้นต่างๆ



ภาพที่ 82 ภาพถ่ายของกระดาษกรองที่เคลือบด้วยสารละลายเซ็นเซอร์ CFC4 ($0.1 \mu\text{M}$) ในสารละลาย methanol ก่อนและหลังเติมไอออนปรอทคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ a: 0 M , b: $0.01 \mu\text{M}$, c: $0.1 \mu\text{M}$, d: $1.0 \mu\text{M}$ ภายใต้แสง UV.

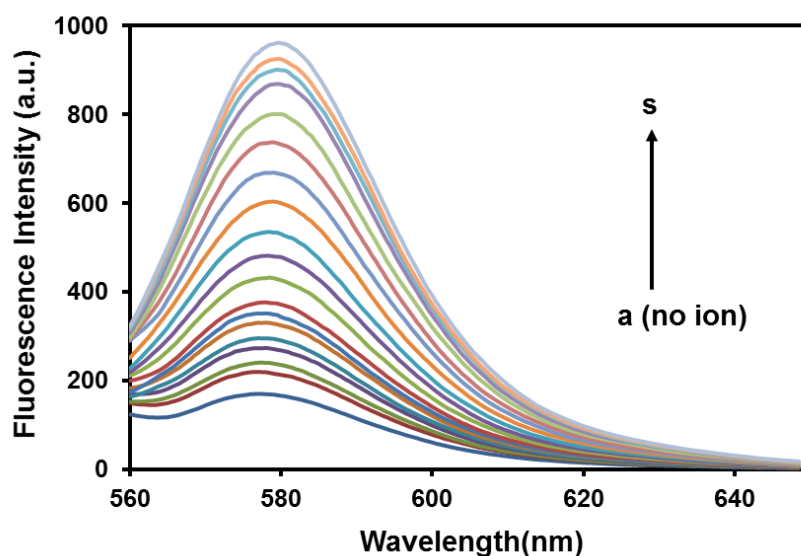
จากภาพถ่าย แสดงให้เห็นว่าเซ็นเซอร์ CFC4 สามารถนำมาประยุกต์การใช้งานให้มีความสะดวกมากขึ้นได้ โดยการใช้กระดาษกรองเคลือบด้วยสารละลายเซ็นเซอร์ CFC4 และจากนั้นนำไปทดสอบในสารละลายไอออนปรอทในความเข้มข้นต่างๆ (ภาพที่ 82) พบว่า เมื่อนำกระดาษกรองที่ได้ไปส่องภายใต้แสง UV สังเกตเห็นการคายแสงที่แตกต่างกันในความเข้มข้นของไอออนปรอทที่ต่างกัน ซึ่งการคายแสงจะลดลงแปรผกผันกับความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เพิ่มขึ้น จากความสามารถนี้ทำให้เซ็นเซอร์ CFC4 มีโอกาสพัฒนาเป็นอุปกรณ์ทดสอบไอออนโลหะปรอทภาคสนามได้

3. การศึกษาระบบตัวทำละลายที่มีผลต่อกระบวนการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของ เซ็นเซอร์ T10RhB

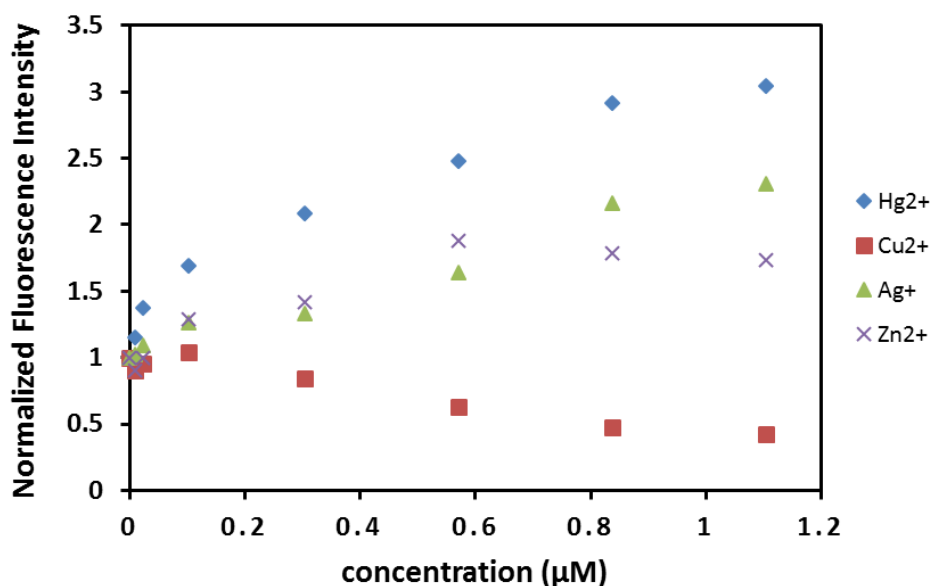
หลังจากยืนยันโครงสร้างของเซ็นเซอร์ T10RhB จึงนำมาศึกษาความสามารถในการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อมีการเติมไอออนปรอทลงไป ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรสโกปี ในตัวทำละลายอินทรีย์และสารละลายน้ำผสมสารละลายอินทรีย์โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ในช่วงการคายแสงของหมู่โรดามีน

3.1 ผลการทดสอบคุณสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ในสารละลาย dichloromethane ในสถานะที่มีไอออนปรอทของเซ็นเซอร์ T10RhB

การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ T10RhB ถูกศึกษาใน dichloromethane โดยติดตามสเปกตรัมของการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อเตรียมความเข้มข้นของเซ็นเซอร์ T10RhB เท่ากับ $0.10 \mu\text{M}$ และใช้ไอออนปรอทในรูปของเกลือเปอร์คลอเรต โดยกำหนด λ_{ex} เท่ากับ 558 nm ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 83



ภาพที่ 83 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{\text{ex}} = 558 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 578 \text{ nm}$) ของเซ็นเซอร์ T10RhB ($0.1 \mu\text{M}$) ในสารละลาย CH_2Cl_2 ก่อนและหลังเติมไอออนปรอทเปอร์คลอเรตที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อความเข้มข้นปรอทเท่ากับ a: $0 \mu\text{M}$, b: $0.007 \mu\text{M}$, c: $0.010 \mu\text{M}$, d: $0.017 \mu\text{M}$, e: $0.023 \mu\text{M}$, f: $0.043 \mu\text{M}$, g: $0.103 \mu\text{M}$, h: $0.303 \mu\text{M}$, i: $0.437 \mu\text{M}$, j: $0.567 \mu\text{M}$, k: $0.703 \mu\text{M}$, l: $0.837 \mu\text{M}$, m: $0.967 \mu\text{M}$, n: $1.103 \mu\text{M}$, o: $1.237 \mu\text{M}$, p: $1.370 \mu\text{M}$, q: $1.503 \mu\text{M}$, r: $1.637 \mu\text{M}$, s: $2.303 \mu\text{M}$

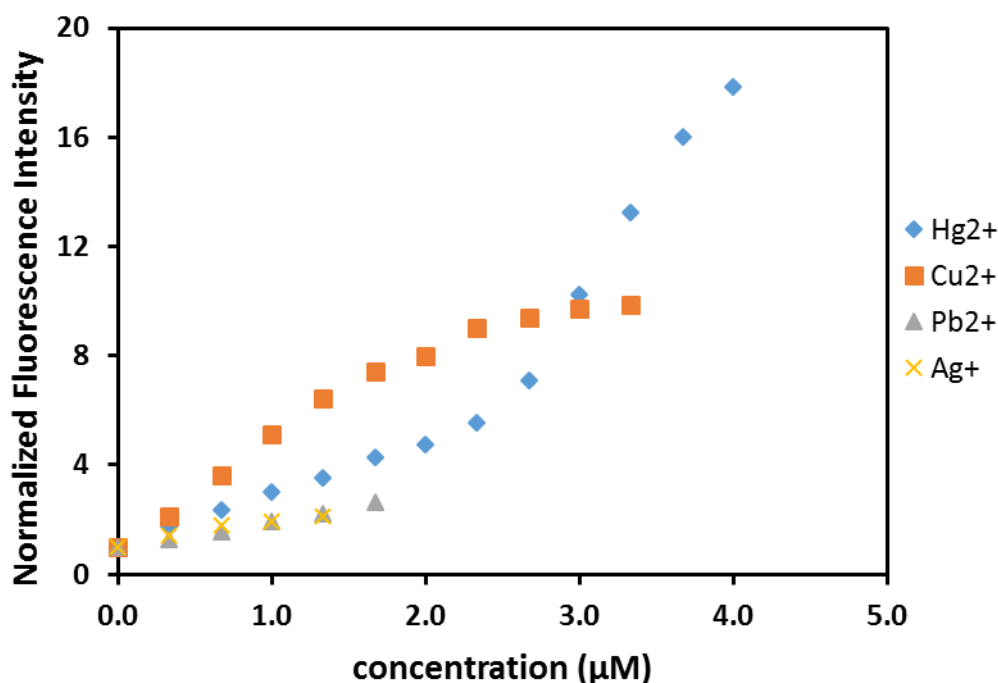


ภาพที่ 84 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{ex} = 558 \text{ nm}$ และ $\lambda_{em} = 578 \text{ nm}$) ของเซ็นเซอร์ T10RhB ($1.0 \mu\text{M}$) ในสารละลาย dichloromethane ในภาวะที่มีไอออนโลหะของเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ ในปริมาณที่ต่างกัน

จากผลการทดลองพบว่า การตรวจจับของเซ็นเซอร์ T10RhB กับไอออนปรอทแสดงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์แบบระบบ OFF-ON ซึ่งเกิดจากกลไกการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนโดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซ็นเซอร์ภายหลังการตรวจจับไอออนของเซ็นเซอร์ใน dichloromethane โดยพบว่าในภาวะที่ไม่มีไอออนปรอท ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ T10RhB จะคายแสงฟลูออเรสเซนซ์น้อยมาก แต่ในทางตรงข้ามภายหลังการเติมปรอทเปอร์คลอเรตที่ความเข้มข้นต่างๆ เซ็นเซอร์จะแสดงสัญญาณคายแสงฟลูออเรสเซนซ์เพิ่มขึ้นในช่วงความยาวคลื่น 560-650 nm โดยความยาวคลื่นมากที่สุด (λ_{max}) ของการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์เท่ากับ 578 nm ซึ่งการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ T10RhB จะเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณไอออนปรอทที่เพิ่มขึ้นในสารละลาย ซึ่งมีค่า detection limit เท่ากับ 0.04 ppb ถึงแม้ในระบบนี้จะสามารถตรวจวัดไอออนปรอทได้ในความเข้มข้นที่ต่ำมาก แต่พบว่าเซ็นเซอร์ไม่มีความจำเพาะเจาะจงกับไอออนปรอท จึงได้ทำการศึกษาในระบบตัวทำละลายอื่นๆ

3.2. ผลการทดสอบคุณสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ในสารละลาย acetonitrile ในสถานะที่มีไอออนปรอท เปรียบเทียบกับไอออนรบกวนอื่นๆ ของเซ็นเซอร์ T10RhB

การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ T10RhB ถูกศึกษาใน acetonitrile โดยติดตามสเปกตรัมของการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อเตรียมความเข้มข้นของเซ็นเซอร์ T10RhB เท่ากับ 1.00 μM ในสถานะที่มีไอออนปรอท (Hg^{2+}) ในรูปของเกลือเปอร์คลอเรต เปรียบเทียบกับในสถานะที่มีไอออนรบกวนชนิดต่างๆ ได้แก่ Cu^{2+} , Pb^{2+} และ Ag^+ โดยกำหนด λ_{ex} เท่ากับ 558 nm และคายแสงที่ความยาวคลื่น 578 nm ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 85



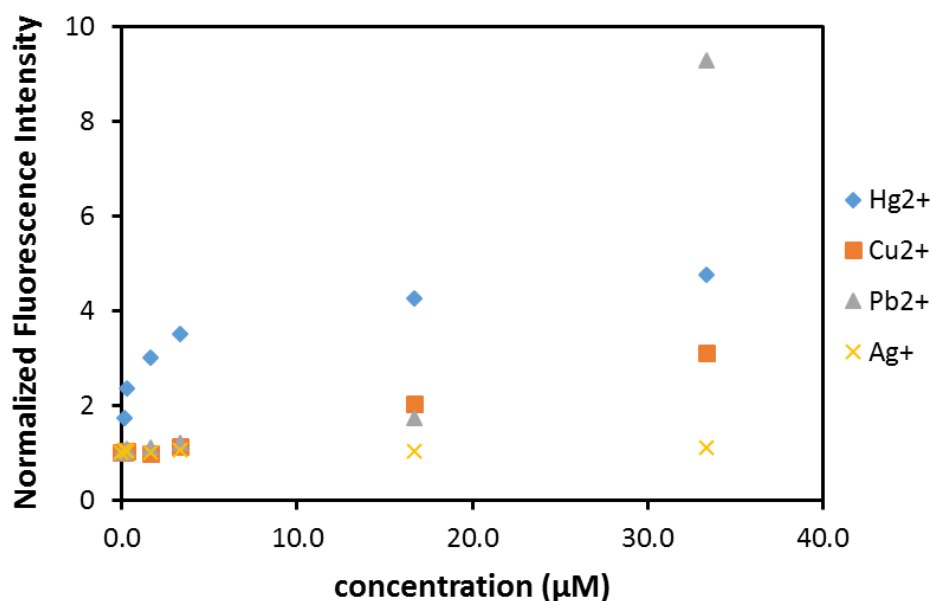
ภาพที่ 85 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{\text{ex}} = 558 \text{ nm}$ และ $\lambda_{\text{em}} = 578 \text{ nm}$) ของเซ็นเซอร์ T10RhB (1.0 μM) ในสารละลาย acetonitrile ในสถานะที่มีไอออนโลหะของเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ ในปริมาณที่ต่างกัน

จากผลการทดลองพบว่า การตรวจจับของเซ็นเซอร์ T10RhB กับไอออนปรอทแสดงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์แบบระบบ OFF-ON เช่นเดียวกับใน dichloromethane แต่การตอบสนองไม่ดีเท่ากับเซ็นเซอร์ T10RhB ใน dichloromethane ทั้งนี้เนื่องจากตัวทำละลายชนิดนี้ค่อนข้างมีขี้ทำให้การจัดเรียงตัวของเซ็นเซอร์ T10RhB ไม่อยู่ในสถานะที่เหมาะสมในการดักจับไอออนปรอทได้ และในสารละลาย acetonitrile พบว่า เซ็นเซอร์ T10RhB ไม่มี

ความจำเพาะเจาะจง กับไอออนโลหะชนิดใดชนิดหนึ่งจึงทำให้ระบบตัวทำละลายชนิดนี้ไม่เหมาะสมในการทำงานของเซ็นเซอร์ T10RhB กับการดักจับไอออนโลหะ

3.3 ผลการทดสอบคุณสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ในสารละลาย ethanol ในสถานะที่มีไอออนปรอท เปรียบเทียบกับไอออนรบกวนอื่นๆ ของเซ็นเซอร์ T10RhB

การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ T10RhB ถูกศึกษาใน ethanol โดยติดตามสเปกตรัมของการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อเตรียมความเข้มข้นของเซ็นเซอร์ T10RhB เท่ากับ $1.00 \mu\text{M}$ ในสถานะที่มีไอออนปรอท (Hg^{2+}) ในรูปของเกลือเปอร์คลอเรต เปรียบเทียบกับในสถานะที่มีไอออนรบกวนชนิดต่างๆ ได้แก่ Cu^{2+} , Pb^{2+} และ Ag^+ โดยกำหนด λ_{ex} เท่ากับ 558 nm และคายแสงที่ความยาวคลื่น 578 nm ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 86



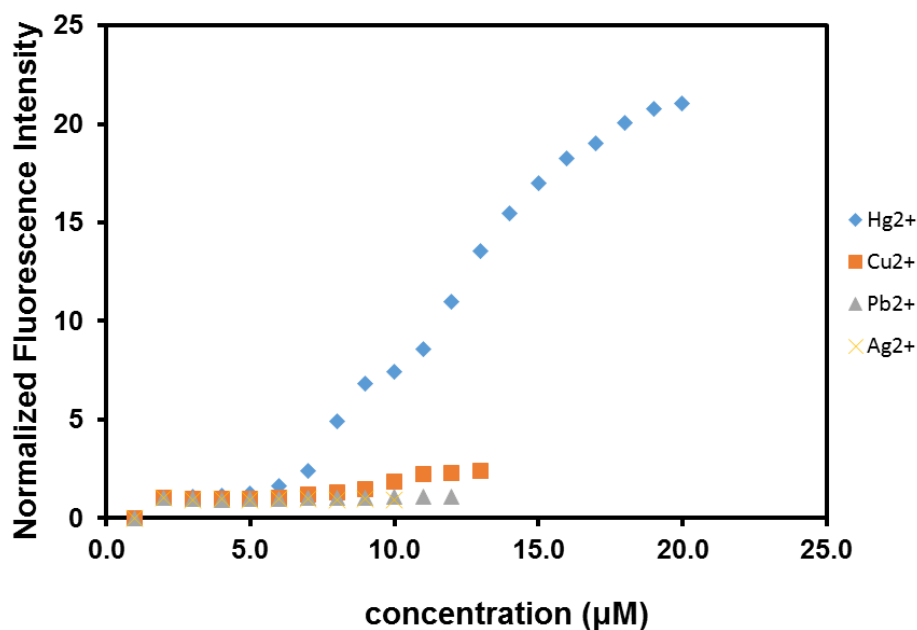
ภาพที่ 86 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{\text{ex}} = 558 \text{ nm}$ และ $\lambda_{\text{em}} = 578 \text{ nm}$) ของเซ็นเซอร์ T10RhB ($1.0 \mu\text{M}$) ในสารละลาย ethanol ในสถานะที่มีไอออนโลหะของเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ ในปริมาณที่ต่างกัน

จากผลการทดลองพบว่า การตรวจจับของเซ็นเซอร์ T10RhB กับไอออนปรอทแสดงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์แบบระบบ OFF-ON เช่นเดียวกับใน dichloromethane แต่การตอบสนองไม่ดีเท่ากับเซ็นเซอร์ T10RhB ใน dichloromethane ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก ตัวทำ

ละลายชนิดนี้ค่อนข้างมีขี้ทำให้การจืดเรียงตัวของเซ็นเซอร์ T10RhB ไม่อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมในการดักจับไอออนปรอทได้ และในสารละลาย ethanol พบว่า เซ็นเซอร์ T10RhB ไม่มีความจำเพาะเจาะจง กับไอออนโลหะชนิดใดชนิดหนึ่งจึงทำให้ระบบตัวทำละลายชนิดนี้ไม่เหมาะสมในการทำงานของเซ็นเซอร์ T10RhB กับการดักจับไอออนโลหะ

3.4. ผลการทดสอบคุณสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ในสารละลาย methanol ในสภาวะที่มีไอออนปรอท เปรียบเทียบกับไอออนรบกวนอื่นๆ ของเซ็นเซอร์ T10RhB

การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ T10RhB ถูกศึกษาใน methanol โดยติดตามสเปกตรัมของการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อเตรียมความเข้มข้นของเซ็นเซอร์ T10RhB เท่ากับ $1.00 \mu\text{M}$ ในสภาวะที่มีไอออนปรอท (Hg^{2+}) ในรูปของเกลือเปอร์คลอเรต เปรียบเทียบกับในสภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดต่างๆ ได้แก่ Cu^{2+} , Pb^{2+} และ Ag^+ โดยกำหนด λ_{ex} เท่ากับ 558 nm และคายแสงที่ความยาวคลื่น 578 nm ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 87



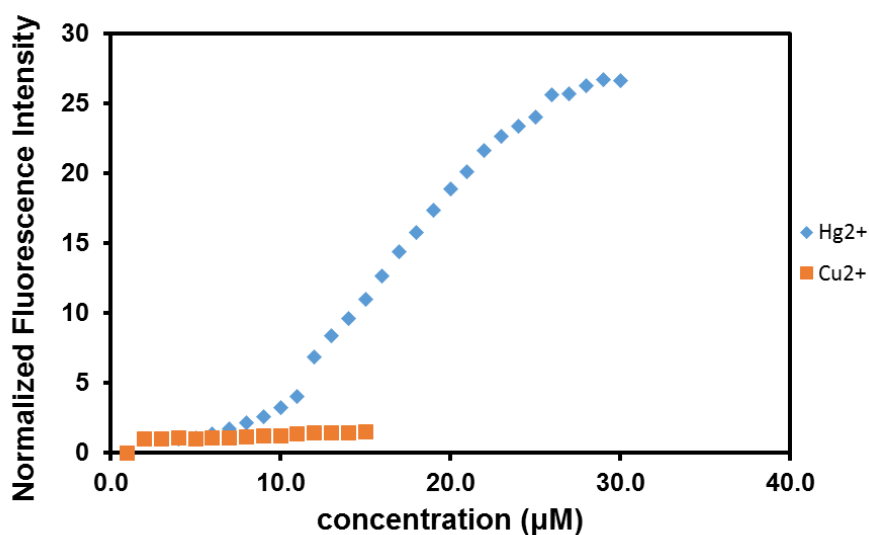
ภาพที่ 87 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{\text{ex}} = 558 \text{ nm}$ และ $\lambda_{\text{em}} = 578 \text{ nm}$) ของเซ็นเซอร์ T10RhB ($1.0 \mu\text{M}$) ในสารละลาย methanol ในสภาวะที่มีไอออนโลหะของเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ ในปริมาณที่ต่างกัน

จากผลการทดลองพบว่า การตรวจจับของเซ็นเซอร์ T10RhB กับไอออนปรอทแสดงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์แบบระบบ OFF-ON เช่นเดียวกับใน dichloromethane แต่การตอบสนองไม่ดีเท่ากับเซ็นเซอร์ T10RhB ใน dichloromethane ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก ตัวทำละลายชนิดนี้ค่อนข้างมีขี้ทำให้การจัดเรียงตัวของเซ็นเซอร์ T10RhB ไม่อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมในการดักจับไอออนปรอทได้ แต่ในระบบสารละลาย methanol พบว่า เซ็นเซอร์ T10RhB มีความจำเพาะเจาะจงกับไอออนปรอทเมื่อเปรียบเทียบกับไอออนรบกวนอื่นๆ ได้แก่ Cu^{2+} , Pb^{2+} และ Ag^+ จึงคาดหวังว่าระบบตัวทำละลายชนิดนี้จะมีความเหมาะสมในการทำงานของเซ็นเซอร์ T10RhB กับการดักจับไอออนปรอท

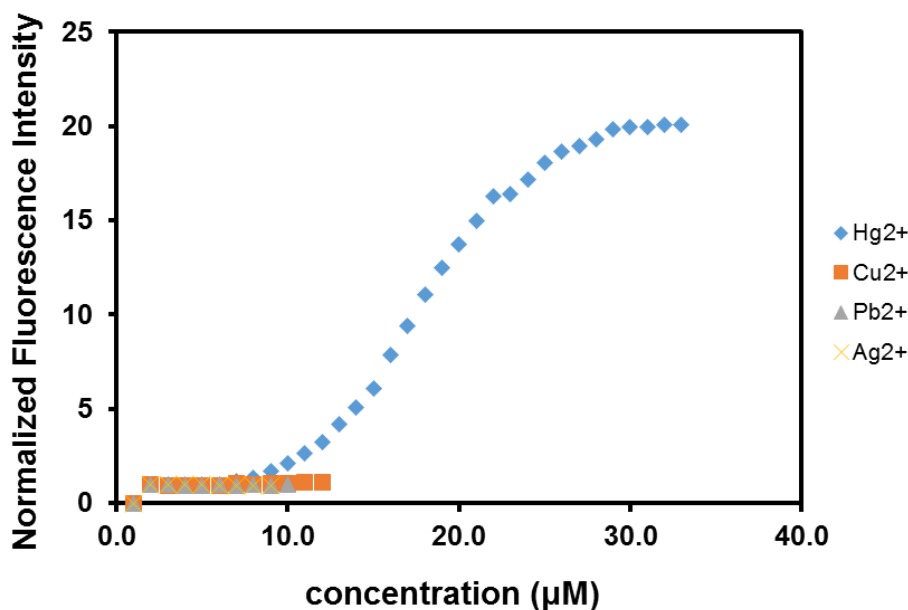


3.5. ผลการทดสอบคุณสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ในสารละลายผสมระหว่าง methanol กับน้ำ ในสภาวะที่มีไอออนปรอท เปรียบเทียบกับไอออนรบกวนอื่นๆ ของเซ็นเซอร์ T10RhB

การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ T10RhB ถูกศึกษาในสารละลายผสมระหว่าง methanol กับน้ำ ในอัตราส่วน MeOH:H₂O (90:10 v/v) และ (50:50 v/v) โดยติดตามสเปกตรัมของการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อเตรียมความเข้มข้นของเซ็นเซอร์ T10RhB เท่ากับ 1.00 μ M ในสภาวะที่มีไอออนปรอท (Hg²⁺) ในรูปของเกลือเปอร์คลอเรต เปรียบเทียบกับในสภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดต่างๆ ได้แก่ Cu²⁺, Pb²⁺ และ Ag⁺ โดยกำหนด λ_{ex} เท่ากับ 558 nm และคายแสงที่ความยาวคลื่น 578 nm ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 88 และภาพที่ 89 ตามลำดับ



ภาพที่ 88 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{ex} = 558$ nm และ $\lambda_{em} = 578$ nm) ของเซ็นเซอร์ T10RhB (1.0 μ M) ในสารละลาย MeOH:H₂O (90:10 v/v) ในสภาวะที่มีไอออนโลหะของเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ ในปริมาณที่ต่างกัน

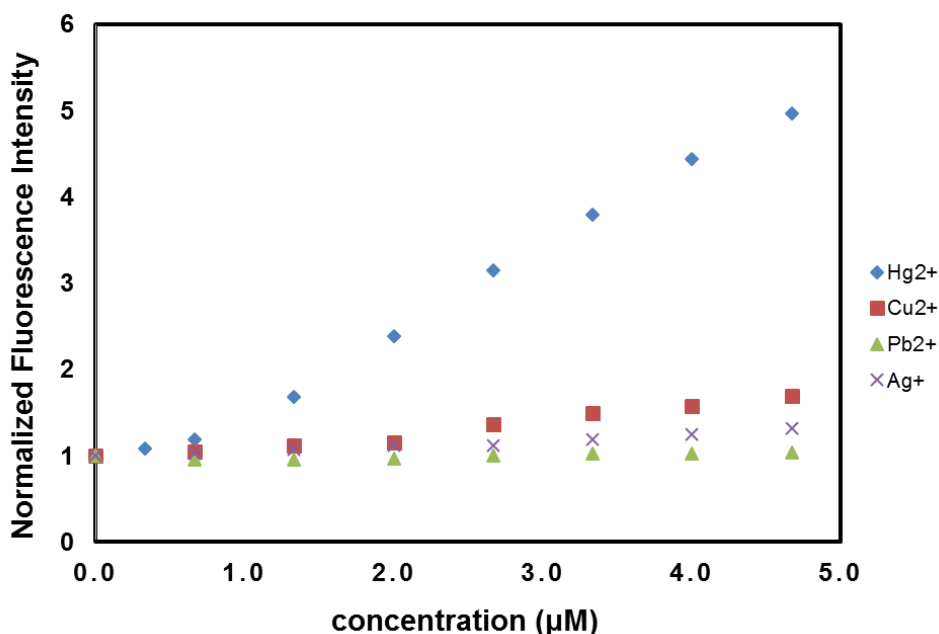


ภาพที่ 89 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{ex} = 558 \text{ nm}$ และ $\lambda_{em} = 578 \text{ nm}$) ของเซ็นเซอร์ T10RhB (1.0 μM) ในสารละลาย MeOH:H₂O (50:50 v/v) ในภาวะที่มีไอออนโลหะของเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ ในปริมาณที่ต่างกัน

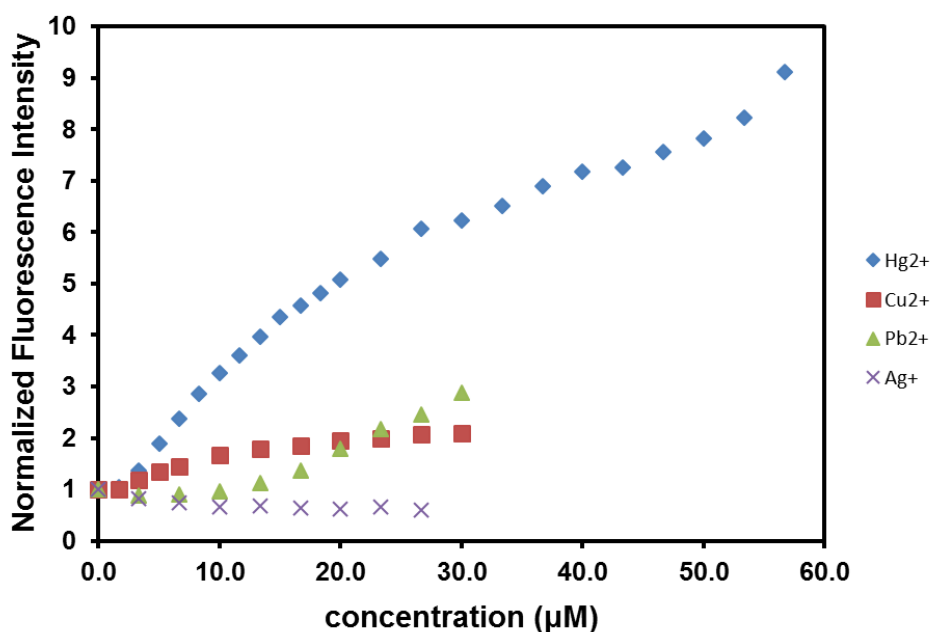
จากผลการทดลองพบว่า การตรวจจับของเซ็นเซอร์ T10RhB กับไอออนปรอทแสดงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์แบบระบบ OFF-ON เช่นเดียวกับในระบบสารละลาย dichloromethane แต่การตอบสนองไม่ดีเท่ากับเซ็นเซอร์ T10RhB ใน dichloromethane ทั้งนี้เนื่องจาก ตัวทำละลายทั้งสองชนิดค่อนข้างมีขี้ผึ้งทำให้การจัดเรียงตัวของเซ็นเซอร์ T10RhB ไม่อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมในการดักจับไอออนปรอทได้ ถึงแม้จะพบว่าระบบสารละลายนี้ทั้ง MeOH:H₂O (90:10 v/v) และ (50:50 v/v) จะทำให้การทำงานของเซ็นเซอร์ T10RhB มีความจำเพาะเจาะจงกับไอออนปรอทเมื่อเปรียบเทียบกับไอออนรบกวนอื่นๆ ได้แก่ Cu²⁺, Pb²⁺ และ Ag⁺ แต่ในระบบสารละลายนี้ พบว่า ความว่องไวในการดักจับไอออนปรอทของเซ็นเซอร์ T10RhB ไม่ดี ต้องใช้ไอออนปรอทในความเข้มข้นสูง เมื่อเทียบกับระบบสารละลาย dichloromethane จึงทำให้ระบบตัวทำละลายชนิดนี้ไม่เหมาะสมในการทำงานของเซ็นเซอร์ T10RhB กับการดักจับไอออนโลหะ

3.6. ผลการทดสอบคุณสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ในสารละลายผสมระหว่าง methanol กับ dichloromethane ในสภาวะที่มีไอออนปรอท เปรียบเทียบกับ ไอออนรบกวนอื่นๆ ของเซ็นเซอร์ T10RhB

การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ T10RhB ถูกศึกษาในสารละลายผสมระหว่าง methanol กับ dichloromethane ในอัตราส่วน MeOH:CH₂Cl₂ (10:90 v/v) และ (50:50 v/v) โดยติดตามสเปกตรัมของการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อเตรียมความเข้มข้นของเซ็นเซอร์ T10RhB เท่ากับ 1.00 μM ในสภาวะที่มีไอออนปรอท (Hg²⁺) ในรูปของเกลือเปอร์คลอเรต เปรียบเทียบกับในสภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดต่างๆ ได้แก่ Cu²⁺, Pb²⁺ และ Ag⁺ โดยกำหนด λ_{ex} เท่ากับ 558 nm และคายแสงที่ความยาวคลื่น 578 nm ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 90 และภาพที่ 91 ตามลำดับ



ภาพที่ 90 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{\text{ex}} = 558 \text{ nm}$ และ $\lambda_{\text{em}} = 578 \text{ nm}$) ของเซ็นเซอร์ T10RhB (1.0 μM) ในสารละลาย MeOH:CH₂Cl₂ (10:90 v/v) ในสภาวะที่มีไอออนโลหะของเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ ในปริมาณที่ต่างกัน



ภาพที่ 91 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{ex} = 558 \text{ nm}$ และ $\lambda_{em} = 578 \text{ nm}$) ของเซ็นเซอร์ T10RhB (1.0 μM) ในสารละลาย MeOH:CH₂Cl₂ (50:50 v/v) ในภาวะที่มีไอออนโลหะของเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ ในปริมาณที่ต่างกัน

จากผลการทดลองพบว่า การตรวจจับของเซ็นเซอร์ T10RhB กับไอออนปรอทแสดงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์แบบระบบ OFF-ON เช่นเดียวกับในระบบสารละลาย CH₂Cl₂ แต่การตอบสนองไม่ดีเท่ากับเซ็นเซอร์ T10RhB ใน CH₂Cl₂ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก ตัวทำละลายทั้งสองชนิดค่อนข้างมีขั้วทำให้การจัดเรียงตัวของเซ็นเซอร์ T10RhB ไม่อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมในการดักจับไอออนปรอทได้ ถึงแม้จะพบว่าระบบสารละลาย MeOH:CH₂Cl₂ (50:50 v/v) จะทำให้การทำงานของเซ็นเซอร์ T10RhB มีความจำเพาะเจาะจงกับไอออนปรอทได้บ้างเมื่อเปรียบเทียบกับไอออนรบกวนอื่นๆ ได้แก่ Cu²⁺, Pb²⁺ และ Ag⁺ แต่ในระบบสารละลายนี้ พบว่าความว่องไวในการดักจับไอออนปรอทของเซ็นเซอร์ T10RhB ไม่ดี ต้องใช้ไอออนปรอทในความเข้มข้นสูง เมื่อเทียบกับระบบสารละลาย CH₂Cl₂ จึงทำให้ระบบตัวทำละลายชนิดนี้ไม่เหมาะสมในการทำงานของเซ็นเซอร์ T10RhB กับการดักจับไอออนโลหะ แต่สำหรับในระบบสารละลาย MeOH:CH₂Cl₂ (10:90 v/v) พบว่าจะทำให้การทำงานของเซ็นเซอร์ T10RhB มีความจำเพาะเจาะจงกับไอออนปรอท และมีความว่องไวของการดักจับไอออนปรอทไม่ต่างกับในระบบสารละลาย dichloromethane ซึ่งพบว่ามี detection limit เท่ากับ 13.5 ppb

บทที่ 6
สรุปผลการทดลอง

วิทยานิพนธ์นี้สามารถสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ชนิดใหม่ 2 ชนิด ได้จากเส้นทางการสังเคราะห์สั้น ใช้สารตั้งต้นที่มีราคาถูก ทำให้ลดต้นทุนในการสังเคราะห์ โดยเซ็นเซอร์ CFC4 ประกอบด้วยไอโอโนฟอร์ชนิด 2-[4-(2-aminoethylsulfanyl)butylsulfanyl]ethanamine เชื่อมต่อกับฟลูออโรฟอร์ชนิดฟลูออเรสเซิน (fluorescein group) จำนวน 1 หมู่ จากผลการทดสอบความสามารถในการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์เมื่อจับกับไอออนแสดงได้ดังตารางที่ 11

sensor	CFC4
สภาวะที่ทำงาน	ในสารละลาย ผสมระหว่าง 2.62 mM Tris-HCl buffer และ methanol (95:5 v/v pH 7.20)
ชนิดของไอออน	Hg ²⁺
λ_{ex} (nm)	493
λ_{em} (nm)	514
Detection limit (ppb)	1.48 สำหรับ Hg ²⁺
K_{assoc}	$6.40 \times 10^{10} M^{-1}$
quantum yield: ϕ_f	0.56
Ratio[sensor:ion(s)]	1:1
working range (ppb)	2-12

ตารางที่ 12 สรุปผลการทดลองของเซ็นเซอร์ CFC4

เซ็นเซอร์ CFC4 ที่สังเคราะห์ได้สามารถตรวจจับไอออนปรอทในสารละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบได้อย่างจำเพาะเจาะจงสูง โดยมีค่า detection limit อยู่ในช่วง 2-12 ppb ซึ่งต่ำกว่าความเข้มข้นต่ำสุดของปรอทที่สามารถปนเปื้อนน้ำดื่ม โดยเซ็นเซอร์ CFC4 แสดงการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ในลักษณะ ON-OFF ในช่วงความยาวคลื่นการมองเห็นได้ และยัง

สามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงของสีสารละลายจากสารละลายสีเหลืองเป็นสารละลายสีส้มเมื่อมีการจับไอออนปรอท ที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

และเซ็นเซอร์ T10RhB ที่ประกอบด้วยส่วนของหมู่โรดามีนบี (rhodamine B group) ซึ่งทำหน้าที่เป็นฟลูออโรฟอร์ เชื่อมต่อกับ ไฮโดรไรไซด์ ซึ่งทำหน้าที่เป็นไอโอโนฟอร์ โดยเซ็นเซอร์ชนิดนี้ได้ถูกเชื่อมต่อกับ polyoctahedral silsesquioxanes (POSS) ซึ่งเป็นอนุภาคนาโน โดยเซ็นเซอร์ T10RhB สามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงสีเป็นสีชมพูจากสารละลายใสไม่มีสีเมื่อมีการตรวจจับไอออนปรอท และแสดงการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ลักษณะ OFF-ON ในช่วงความยาวคลื่นการมองเห็นได้ โดยสภาวะในการตรวจจับไอออนปรอทได้อย่างจำเพาะเจาะจง และมีความไวในการตรวจวัดได้ดีใน MeOH:CH₂Cl₂ (10:90 v/v) ซึ่งเซ็นเซอร์ T10RhB สามารถตรวจจับไอออนปรอทได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับไอออนรบกวนอื่นๆ เช่น Cu²⁺, Pb²⁺, Ag⁺ และ Zn²⁺ เป็นต้น

System	Selectivity
Dichloromethane	Hg ²⁺ , Cu ²⁺ , Ag ⁺ , Zn ²⁺
Acetonitrile	Hg ²⁺ , Cu ²⁺ , Ag ⁺ , Pb ²⁺
Ethanol	Hg ²⁺ , Cu ²⁺
Methanol	Hg ²⁺
MeOH : H ₂ O (90:10, 50:50 v/v)	Hg ²⁺
MeOH : CH ₂ Cl ₂ (10:90 v/v)	Hg ²⁺
MeOH : CH ₂ Cl ₂ (50:50 v/v)	Hg ²⁺ , Cu ²⁺ , Pb ²⁺

ตารางที่ 13 สรุปผลการทดลองของเซ็นเซอร์ T10RhB

รายการอ้างอิง

- [1] Tchounwou, P. B.; Ayensu, W. K.; Ninashvili, N.; Sutton, D. (2003). "Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic implications for public health." *Environmental Toxicology*. Vol. 18: 149-175.
- [2] Davidson, P. W.; Myers, G. J.; Cox, C.; Shamlaye, C. F.; Marsh, D. O.; Tanner, M. A.; Berlin, M.; Sloane-Reeves, J.; Cernichiari, E.; Choisy, O.; Choi, A.; Clarkson, T. W. (1995). "Longitudinal neurodevelopmental study of Seychellois children following in utero exposure to methylmercury from maternal fish ingestion: outcomes at 19 and 29 months." *Neurotoxicology*. Vol. 16: 677-688.
- [3] Grandjean, P.; Weihe, P.; White, R. F.; Debes, F. (1998). "Cognitive performance of children prenatally exposed to 'safe' levels of methylmercury." *Environmental Research*. Vol. 77: 165-172.
- [4] Harada, M. (1995). "Minamata disease: methylmercury poisoning in japan caused by environmental pollution." *Critical Reviews in Toxicology*. Vol. 25: 1-24.
- [5] United States Environmental Protection Agency. เข้าถึงเมื่อ 31 กรกฎาคม 2555. เข้าถึงได้จาก <http://water.epa.gov/drink/contaminants/index.cfm>.
- [6] Food and Drug Administration. เข้าถึงเมื่อ 31 กรกฎาคม 2555. เข้าถึงได้จาก <http://www.fda.gov>.
- [7] Occupational Safety and Health Administration. เข้าถึงเมื่อ 31 กรกฎาคม 2555. เข้าถึงได้จาก <http://www.osha.gov>.
- [8] Miessler, G. L. (2004). *Inorganic Chemistry*. 3rd ed. Pearson Education.
- [9] Park, S. M.; Kim, M. H.; Choe, J. I.; No, K. T.; Chang, S.-K. (2007). "Cyclams bearing diametrically disubstituted pyrenes as Cu^{2+} - and Hg^{2+} -selective fluoroionophores." *The Journal of Organic Chemistry*. Vol. 72: 3550-3553.
- [10] Kim, S. H.; Kim, J. S.; Park, S. M.; Chang, S. K. (2006). " Hg^{2+} -Selective OFF-ON and Cu^{2+} -selective ON-OFF type fluoroionophore based upon cyclam." *Organic Letters*. Vol. 8, 371-374.

- [11] Martinez, R.; Espinosa, A.; Tarraga, A.; Molina, P. (2005). "New Hg²⁺ and Cu²⁺ selective chromo- and fluoroionophore based on a bichromophoric azine." *Organic Letters*. Vol. 7: 5869-5872.
- [12] Chen, Q.-Y.; Chen, C.-F. (2005). "A new Hg²⁺-selective fluorescent sensor based on a dansyl amide-armed calix[4]-aza-crown." *Tetrahedron Letters*. Vol. 46: 165-168.
- [13] Liu, S.-Y.; He, Y.-B.; Qing, G.-Y.; Xu, K.-X.; Qin, H.-J. (2005). "Fluorescent sensors for amino acid anions based on calix[4]arenes bearing two dansyl groups." *Tetrahedron: Asymmetry*. Vol. 16: 1527-1534.
- [14] Brannon, J. H.; Magde, D. (1978). "Absolute quantum yield determination by thermal blooming. Fluorescein." *The Journal of Physical Chemistry*. Vol. 82: 705-709.
- [15] Ali, M.; Dutta, P.; Pandey, S. (2010). "Effect of ionic liquid on prototropic and solvatochromic behavior of fluorescein." *The Journal of Physical Chemistry B*. Vol. 114: 15042-15051.
- [16] Steed, J. W.; Atwood, J. L. (2000). *Supramolecular Chemistry: A Concise Introduction*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- [17] Kim, H. N.; Lee, H. M.; Kim, H. J.; Kim, J. S.; Yoon, J. (2008). "A new trend in rhodamine-based chemosensors: application of spirolactam ring-opening to sensing ions." *Chemical Society Reviews*. Vol. 37: 1465-1472.
- [18] Urano, Y.; Kamiya, M.; Kanda, K.; Ueno, T.; Hirose, K.; Nagano, T. (2005). "Evolution of Fluorescein as a Platform for Finely Tunable Fluorescence Probes." *Journal of the American Chemical Society*. Vol. 127: 4888-4894
- [19] Burdette, S. C.; Frederickson, C. J.; Bu, W.; Lippard, S. J. (2003). "ZP4, an Improved Neuronal Zn²⁺ Sensor of the Zinpyr Family." *Journal of the American Chemical Society*. Vol. 125: 1778-1787
- [20] Jun, E. J.; Kim, J. A.; Swamy, K. M. K.; Park, K.; Yoon, J. (2006). "A fluorescein derivative for nanomolar aqueous copper and monitoring copper ion

- uptake by transferrin and amyloid precursor protein." **Tetrahedron Letters**. Vol. 47: 1051-1054.
- [21] Swamy, K. M. K.; Kwon, S. K.; Lee, H. N.; Kumar, S. M. S.; Kim, J. S.; Yoon, J. (2007). "Fluorescent sensing of pyrophosphate and ATP in 100% aqueous solution using a fluorescein derivative and Mn^{2+} ." **Tetrahedron Letters**. Vol. 48: 8683-8686.
- [22] Kim, H. J.; Park, J. E.; Choi, M. G.; Ahn, S.; Chang, S. K. (2010). "Selective chromogenic and fluorogenic signalling of Hg^{2+} ions using a fluorescein-coumarin conjugate." **Dyes and Pigments**. Vol. 84: 54-58.
- [23] Wang, B.; Chen, D.; Kambam, S.; Wang, F.; Wang, Y.; Zhang, W.; Yin, J.; Chen, H.; Chen, X. (2015). "A highly specific fluorescent probe for hypochlorite based on fluorescein derivative and its endogenous imaging in living cells." **Dyes and Pigments**. Vol. 120: 22-29.
- [24] Burdette, S. C.; Walkup, G. K.; Spingler, B.; Tsien, R. Y.; Lippard, S. J. (2001). "Fluorescent Sensors for Zn^{2+} Based on a Fluorescein Platform: Synthesis, Properties and Intracellular Distribution." **Journal of the American Chemical Society**. Vol. 123: 7831-7841.
- [25] Nolan, E. M.; Lippard, S. J. (2003). "A "Turn-On" Fluorescent Sensor for the Selective Detection of Mercuric Ion in Aqueous Media." **Journal of the American Chemical Society**. Vol. 125: 14270-14271.
- [26] Nolan, E. M.; Lippard, S. J. (2007). "Turn-On and Ratiometric Mercury Sensing in Water with a Red-Emitting Probe." **Journal of the American Chemical Society**. Vol. 129: 5910-5918.
- [27] Kambama, S.; Wang, B.; Wang, F.; Wang, Y.; Chen, H.; Yin, J.; Chena, X. (2015). "A highly sensitive and selective fluorescein-based fluorescence probe for Au^{3+} and its application in living cell imaging" **Sensor and Actuators B: Chemical**. Vol. 209: 1005-1010.

- [28] Liu, W.; Xu, L.; Sheng, R.; Wang, P.; Li, H.; Wu, S. (2007). "A Water-Soluble "Switching On" Fluorescent Chemosensor of Selectivity to Cd²⁺" **Organic Letters**. Vol. 9: 3829-3832.
- [29] Li, K.-B.; Wang, H.; Zang, Y.; He, X.-P.; Li, J.; Chen, G.-R.; Tian, H. (2014). "One-Step Click Engineering Considerably Ameliorates the Practicality of an Unqualified Rhodamine Probe." **Applied Materials & Interfaces**. Vol. 6: 19600-19605.
- [30] Liu, Y.; Yang, E.-B.; han, R.; Zhang, D.; Ye, Y.; Zhao, Y.-F. (2014). "A new rhodamine-based fluorescent chemosensor for mercury in aqueous media." **Chinese Chemical Letters**. Vol. 25: 1065-1068.
- [31] Park, S.; Kim, W.; Swamy, K.M.K.; Lee, H. Y.; Jung, J. Y.; Kim, G.; Kim, Y.; Kim, S.-J.; Yoon, J. (2013). "Rhodamine hydrazone derivatives bearing thiophene group as fluorescent chemosensors for Hg²⁺." **Dyes and Pigments**. Vol. 99: 323-328.
- [32] Aydin, Z.; Wei, Y.; Guo, M. (2014). "An "off-on" optical sensor for mercury ion detection in aqueous solution and living cells." **Inorganic Chemistry Communications**. Vol. 50: 84-87.
- [33] Erdemir, S.; Kocyigit, O.; Malkondu, S. (2015). "Detection of Hg²⁺ ion in aqueous media by new fluorometric and colorimetric sensor based on triazole-rhodamine." **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**. Vol. 309: 15-21.
- [34] Wang, F.-H.; Cheng, C.-W.; Duan, L.-C.; Lei, W.; Xia, M.-Z.; Wang, F.-Y. (2015). "Highly selective fluorescent sensor for Hg²⁺ ion based on a novel rhodamine B derivative." **Sensors and Actuators B: Chemical**. Vol. 206: 679-683.
- [35] Lui, W.; Chen, J.; Xu, L.; Wu, J.; Xu, H.; Zhang, H.; Wang, P. (2012). "Reversible "off-on" fluorescent chemosensor for Hg²⁺ based on rhodamine derivative." **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. Vol. 85:38-42.

- [36] Rode, A. B.; Kim, J.; Kim, S.-H.; Gupta, G.; Hong, I. S. (2012). "A highly selective chemodosimeter for the rapid detection of Hg^{2+} ions in aqueous media." **Tetrahedron Letters**. Vol. 53: 2571-2574.
- [37] Huang, J.; Xu, J.; Qian, X. (2009). "A rhodamine-based Hg^{2+} sensor with high selectivity and sensitivity in aqueous solution: a NS_2 -containing receptor." **The Journal of Organic Chemistry**. Vol. 74: 2167-2170.
- [38] Wanichacheva, N., Watpathomsub, S., Vannajan, S. L., Grudpan, K. (2010). "Synthesis of a Novel Fluorescent Sensor Bearing Dansyl Fluorophores for the Highly Selective Detection of Mercury (II) Ions." **Molecules**. Vol. 15: 1798-1810.
- [39] Filho, N. L. D.; Costa, R. M.; Marangoni, F.; Pereira, D. S. (2007). "Nanoparticles of octakis[3-(3-amino-1,2,4-triazole)propyl]octasilsesquioxane as ligands for Cu(II), Ni(II), Cd(II), Zn(II), and Fe(III) in aqueous solution." **Journal of Colloid and Interface Science**. Vol. 316: 250-259.
- [40] Soares, I. V.; Vieira, E. G.; Filho, N. L.D.; Bastos, A. C.; Silva, N. C. D.; Garcia, D. F.; Lima, L. J. A. (2013). "Adsorption of heavy metal ions and epoxidation catalysis using a new polyhedral oligomeric silsesquioxane." **Chemical Engineering Journal**. Vol. 218: 405-414.
- [41] Vieira, E. G.; Soares, I. V.; Pires, G.; Ramos, R. A. V.; Carmo, D. R. D.; Filho, N. L. D. (2015). "Study on determination and removal of metallic ions from aqueous and alcoholic solutions using a new POSS adsorbent." **Chemical Engineering Journal**. Vol. 264: 77-88.
- [42] Wang, W.; Chen, M.; Chen, X.; Wang, J. (2014). "Thiol-rich polyhedral oligomeric silsesquioxane as a novel adsorbent for mercury adsorption and speciation." **Chemical Engineering Journal**. Vol. 242: 62-68.
- [43] Kim, K. N.; Choi, M. G.; Noh, J. H.; Ahn, S.; Chang, S.-K. (2008). "Rhodamine B hydrazide revisited : chemodosimetric Hg^{2+} -selective signaling behavior in aqueous environments." **Bulletin of the Korean Chemical Society**. Vol. 29: 571-574.

- [44] Yang, X.-F.; Guo, X.-Q.; Zhao, Y.-B. (2002). "Novel spectrofluorimetric method for the determination of sulfite with rhodamine B hydrazide in a micellar medium." *Analytica Chimica Acta*. Vol. 456: 121-128.
- [45] Shiraishi, Y.; Sumiya, S.; Kohno, Y.; Hirai, T. (2008). "A rhodamine-cyclen conjugate as a highly sensitive and selective fluorescent chemosensor for Hg(II)." *The Journal of Organic Chemistry*. Vol. 73: 8571–8574.
- [46] Ma, T.-H.; Zhang, A.-J.; Dong, M.; Dong, Y.-M.; Peng, Y.; Wang, Y.-W. (2010). "A simply and highly selective "turn-on" type fluorescent chemosensor for Hg²⁺ based on chiral BINOL-Schiff's base ligand." *Journal of Luminescence*. Vol. 130: 888-892.
- [47] Wang, X.-L.; Zheng, W.-Y.; Liu, G.-C.; Lin, H.-Y. (2010). "A turn-on fluorescent chemosensor for Hg²⁺ based on phenanthroline fluorophore." *Journal of Luminescence*. Vol. 130: 52-55.
- [48] James, B. H.; Douglas, M.; (1978). "Absolute Quantum Yield Determination by Thermal Blooming. Fluorescein." *The Journal of Physical Chemistry*. Vol. 6: 705-709.





Output 1: Piyanuch, P.; Watpathomsub, S.; Lee, V. S.; Nienaber, H. A.; Wanichacheva, N. Highly sensitive and selective Hg^{2+} -chemosensor based on dithia-cyclic fluorescein for optical and visual-eye detections in aqueous buffer solution. *Sens. Actuator B: Chem.*, 2016, 224, 201-208.



Highly sensitive and selective Hg²⁺-chemosensor based on dithia-cyclic fluorescein for optical and visual-eye detections in aqueous buffer solution

Pornthip Piyanuch^a, Supraneer Watpathomsab^{a,1}, Vannajan Sanghiran Lee^b, Hubert A. Nienaber^c, Nantanit Wanichacheva^{a,*}

^a Department of Chemistry, Faculty of Science, Silpakorn University, Nakhon Pathom 73000, Thailand

^b Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Malaya, Kuala Lumpur 50603, Malaysia

^c Strem Chemicals Inc., Newburyport, MA 01950, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 August 2015

Received in revised form

23 September 2015

Accepted 25 September 2015

Available online 28 September 2015

Keywords:

Fluorescein

Mercury

Fluorescent

Chromogenic

Selectivity

ABSTRACT

A new fluorescent sensor (**FC4**) based on fluorescein dithia-cyclic skeleton was designed and prepared as a fluoroionophore for the optical and visual-eye detections of Hg²⁺ in aqueous buffer solution. **FC4** was prepared via Kornblum oxidation, ester hydrolysis, alkylation, imine formation and imine reduction. The sensor provided highly sensitive and selective ON–OFF fluorescence sensing toward Hg²⁺ and was shown to discriminate various interfering metal ions, particularly Cu²⁺ and Pb²⁺ as well as Al³⁺, Ba²⁺, Ca²⁺, Cd²⁺, Fe³⁺, K⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Na⁺ and Ni²⁺. Sensor **FC4** also exhibited chromogenic change upon binding to Hg²⁺, which served as a “visual-eye” indicator which could be observed as a noticeable change of the solution color from yellow to orange. The Hg²⁺ detection limit of the sensor was 7.38 × 10^{−9} or 1.48 ppb which was lower than a permissible concentration of Hg²⁺ in drinking water regulated by the United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA).

© 2015 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Mercury is a highly toxic metal ion which is dangerous for the environment. Mercury contamination can be accumulated in the environment and biota [1–3]. In the marine system, inorganic mercury (Hg²⁺) can be converted to methyl mercury by bacteria and then absorbed into biological membranes and entered into human food chain [2–5]. Human, as the final consumer, can collect more mercury which can lead DNA mutation, central nervous damage and endocrine system disorder as well as Minamata disease [4,6,7]. Considering the high toxicity of mercury, the United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA) specifies a standard for the maximum allowed level of inorganic mercury in dietary sources, such as 0.55 ppm in edible fish and 2 ppb for Hg²⁺ in drinking water [8].

Fluorescent sensor was an interesting alternative technique for qualitative and quantitative analyses of many analytes, such as protons, small molecules, anions or cations, including Hg²⁺ [9–12]. This method was well-known for high sensitivity, high selectivity, inexpensive cost and rapid response, and could be applied for on-site detection of heavy metal ions [13–16]. Many fluorescent sensors have been reported for Hg²⁺ detection. All of these sensors utilized the ligands which responded and bound to Hg²⁺ to serve as the ionophores. These ligands included hydroxyquinolines [17,18], cyclens [19,20], cyclams [21–23], dioxocyclams [24], diazatetraethia crown ethers [25], azines [26], and calixarenes [27–29].

However, there was only few fluorescent sensors which could serve as “visual-eye” indicators and capable of Hg²⁺ detection in the aqueous or buffer solutions [30–32]. These properties are great advantages for the applications in the analysis of environmental sources and biological systems.

In order to provide the advantage of a fluorescent sensor for application in an environment, we have designed and developed a new aqueous fluorescent sensor, **FC4**, for Hg²⁺ detection, as a dithia-cyclic structure that has appropriate binding site to Hg²⁺. The binding portion of the sensor was covalently connected to the fluorescein moiety which could serve as a signaling portion. We have chosen fluorescein as a fluorophore in this study due to its large

* Corresponding author.

E-mail addresses: pornthippiyanuch@gmail.com (P. Piyanuch), watpathomsab.s.j@gmail.com (S. Watpathomsab), vannajan@gmail.com (V.S. Lee), hubert@strem.com (H.A. Nienaber), wanichacheva.nantanit@gmail.com, nantanit@su.ac.th (N. Wanichacheva).

¹ Present address: Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

molar extinction coefficient, high fluorescence quantum yield, relatively long absorption and emission wavelength (>490 nm) in the visible regions and structural flexibility for derivatization [33–36].

Furthermore, the compound in this study was designed based on an approach similar to host–guest supramolecular chemistry. The binding site of the sensor was preorganised by semi-rigid framework for the size to fit Hg^{2+} , and was also incorporated by sulfur and nitrogen atoms for strong and favorable interaction to Hg^{2+} . The preorganisation of a rigidly conformational host can enhance the affinity of sensor toward guest molecule by management of interactions and provides no additional energetic cost arising from host conformational rearrangement binding to a guest molecule. Therefore, we expected that our designed sensor, **FC4**, would be suitable for Hg^{2+} recognition which could contribute to strong and selective binding to Hg^{2+} .

Herein, we reported a new aqueous chemosensor (**FC4**) which was prepared from an assembly of 2-(4-(2-aminoethylthio)butylthio)ethanamine and fluorescein moiety for Hg^{2+} determination. Sensor **FC4** showed high sensitivity with low detection limit, high Hg^{2+} -selectivity in comparison with foreign ions in aqueous buffer solutions. Molecular modeling of the cyclic structure illustrated that **FC4** provided a semi-rigid framework and size fit for Hg^{2+} . In addition, **FC4** did not only exhibit fluorogenic response but also exhibited chromogenic change upon binding to Hg^{2+} , which could be observed by visual-eye as a color change of the solution from yellow to orange.

2. Experiment

2.1. Material and methods

2.1.1. Materials

The reagents and solvents were purchased from Sigma–Aldrich Corporation, Fluka Chemical Corporation while all of the metal salts (chloride salts) were purchased from Strem chemicals, Inc. 4',5'-Bis(bromomethyl)fluorescein dibenzoate was obtained from Strem

chemicals, Inc. All reagents, solvents, and metal salts were used as received.

2.1.2. Methods

NMR spectra in CDCl_3 and MeOD solutions were recorded using Bruker Avance 300 spectrometer operating at 300 MHz for ^1H and 75 MHz for ^{13}C . Melting points of the synthetic compounds were measured by Stuart Scientific Melting Point Apparatus SMP2. Absorption spectra were determined on a single beam Hewlett Packard 8453 spectrophotometer. Fluorescence spectra were measured using Perkin Elmer Luminescence spectrometer LS 50B. The excitation and emission slit widths used in fluorescence measurements were 5.0 nm with a scan rate of 300 nm/min. ThermoElectron LCQ-DECA-XP, ESI-Ion trap mass spectrometer was used to record mass spectra of the synthetic compounds. Molecular modeling was performed with the Discovery Studio 2.5 program package.

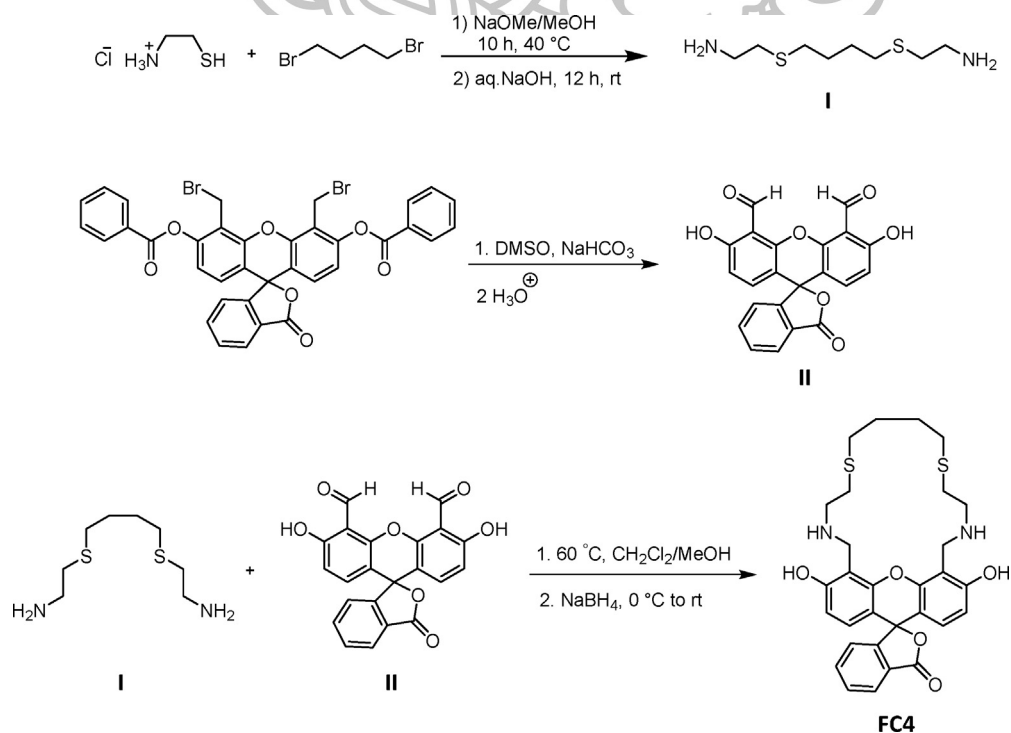
2.2. Syntheses

2.2.1. Synthesis of 2-(4-(2-aminoethylthio)butylthio)ethanamine (**I**)

The synthesis of the title compound was performed in the same manner as described previously [37] and the synthetic steps are outlined in Scheme 1.

2.2.2. Synthesis of 4',5'-fluoresceindicarboxaldehyde (**II**)

Modified from a previous report [38], 4',5'-bis(bromomethyl)fluorescein dibenzoate (0.40 g, 0.5 mmol) and NaHCO_3 (0.40 g, 4.8 mmol) were combined in 40 mL of DMSO and heated to 150°C for 4 h. When the reaction mixture was cooled down to room temperature, it was slowly poured into 2 M hydrochloric solution (140 mL). The acid mixture was then stirred at room temperature for 2 h. The aqueous solution was extracted with CH_2Cl_2 (3×40 mL), and the organic portions were collected and removed to yield a dark orange liquid. Deionized water (60 mL) was added and the mixture kept at room temperature for 18 h, then the resulting orange precipitate was collected by vacuum filtration



Scheme 1. Synthesis of sensor **FC4**.

and washed thoroughly with water. The orange solid was dissolved in CH_2Cl_2 (40 mL) and dried over Na_2SO_4 . After that the dichloromethane phase was collected and removed under vacuum. Finally, the crude product was purified by preparative thin layer chromatography using CH_2Cl_2 :MeOH (33:1) as the mobile phase to provide **II** 76 mg of a yellow solid, 39.2% yield. mp = 301.4–303.9 °C, ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 6.74 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 6.94 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 7.63–7.79 (m, 3H), 8.07 (d, $J=6.6$ Hz, 1H), 10.66 (s, 2H), 12.12 (s, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 77.2 (C), 109.1 (2C), 109.6 (C), 113.5 (2C), 115.2 (2CH), 123.7 (CH), 125.6 (CH), 126.6 (C), 130.5 (CH), 135.6 (CH), 137.0 (2CH), 151.7 (2C), 152.0 (2C), 164.7 (C), 191.8 (2C); HR-ESI MS calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{13}\text{O}_7^+$ (MH) $^+$ 389.0661 m/z , found 389.0757 m/z .

2.2.3. Synthesis of sensor FC4

In a round bottom flask, 4',5'-fluoresceindicarboxaldehyde (**II**) (0.10 g, 0.26 mmol) was dissolved in 8 mL of dry dichloromethane and then 2-(4-(2-aminoethylthio)butylthio) ethanamine **I** (0.06 g, 0.28 mmol) dissolved in CH_2Cl_2 :MeOH (5 mL:9 mL) was added into the reaction mixture. The solution was stirred at room temperature for 2 h and then heated to 60 °C for 2 h. The solution was cooled down to 0 °C for 30 min and then sodium borohydride (0.09 g, 2.40 mmol) was added. The solution was stirred at 0 °C for 1 h and further stirred at room temperature for 1 h. The solvent was subsequently removed by a rotary evaporator. Then, 15 mL of deionized water was added to the residue. Next, the mixture was extracted three times, each with 15 mL of dichloromethane. After that the aqueous phase was collected and removed under vacuum. Finally, the crude product was purified by preparative thin layer chromatography using 100% MeOH as the mobile phase to provide **FC4** which appeared as the red solid with 48% yield. mp = 247.1–249.3 °C, ^1H NMR (300 MHz, MeOD): δ 1.68–1.84 (m, 4H), 2.50–2.68 (m, 4H), 2.68–2.83 (m, 4H), 2.90–3.06 (m, 4H), 4.08–4.24 (m, 4H), 6.50–6.60 (m, 2H), 6.98–7.11 (m, 2H), 7.11–7.24 (m, 1H), 7.48–7.63 (m, 2H), 7.95–8.07 (m, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, MeOD): δ 28.8 (2 CH_2), 31.7 (2 CH_2), 32.4 (2 CH_2), 43.2 (2 CH_2), 50.4 (2 CH_2), 112.4 (C), 112.7 (2C), 123.9 (2CH), 130.1 (2CH), 130.7 (CH), 131.0 (CH), 132.2 (2CH), 134.8 (2C), 141.9 (C), 157.5 (2C), 161.2 (C), 174.4 (2C), 181.5 (C); HR-ESI MS calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}_2^+$ (MH) $^+$ 565.1831 m/z , found 565.1824 m/z .

2.3. Binding studies

The binding studies of sensor **FC4** were carried out in (2.63 mM) 95:5 Tris–HCl buffer (pH 7.2):MeOH. The chloride salt solutions (1.0×10^{-2} M) were prepared by dissolving the desired amount of salts in Tris–HCl buffer. The fluorescence titration was performed using solutions of **FC4** (0.01 μM) and the fluorescence spectra were measured as a function of metal ions concentration over a fixed wavelength range (500–600 nm) with the excitation wavelength (λ_{ex}) = 493 nm.

3. Results and discussion

3.1. Synthesis and molecular design of FC4

The synthesis of sensor **FC4** was accomplished by an imine formation between 2-(4-(2-aminoethylthio)butylthio) ethanamine and 4',5'-fluoresceindicarboxaldehyde (**II**), prepared from Kornblum oxidation and ester hydrolysis of 4',5'-bis (bromomethyl)fluorescein dibenzoate according to previously published procedure [38], then following by an imine reduction (Scheme 1).

Sensor **FC4** is a cyclic host containing two sulfur atoms and two nitrogen atoms in a pocket for the binding sites, which are covalently bound to fluorescein fluorophore. Based on an approach

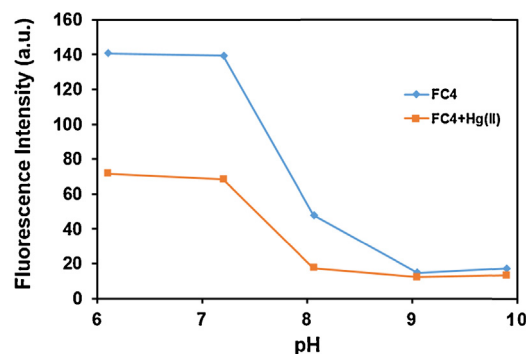


Fig. 1. Fluorescence responses (514 nm) of **FC4** (0.01 μM) and after addition of Hg^{2+} (3.33 μM) in 95:5 Tris–HCl buffer:MeOH as function of pH. The excitation wavelength was 493 nm.

similar to host–guest supramolecular chemistry, the binding site of **FC4** was preorganised by semi-rigid framework and was incorporated with sulfur and nitrogen atoms as the donor atoms for strong and favorable electrostatic interaction to Hg^{2+} . Therefore, we expect that the sensitive and selective binding can take place through ion–dipole interactions between the sulfur and nitrogen atoms of **FC4** sensor and Hg^{2+} .

3.2. Sensitivity studies

The Hg^{2+} sensing ability of sensor **FC4** was investigated in the aqueous buffer/methanol solutions by the UV–vis and fluorescence experiments. In this study, the effects of pH on the fluorescence emission of **FC4** in the absence and presence of Hg^{2+} were systematically investigated in 95:5 Tris–HCl buffer:MeOH solutions (Fig. 1). As pH of the buffer increased, the fluorescence emission of **FC4** was decreased progressively. The largest different of fluorescence emissions in the absence and presence of Hg^{2+} was found at pH 6.1–7.2, which was much larger compared to the of **FC4** in higher pH solution. Based on this observation and consideration of practical use of the sensor in biological samples, we focused on the fluorescence behavior of **FC4** in the presence of various metal ions in 95:5 Tris–HCl buffer:MeOH solution at pH 7.2.

It was found that **FC4** provided yellow color and strong fluorescence signal in 95:5 Tris–HCl buffer (pH 7.2):MeOH solutions. The addition of Hg^{2+} to the solutions of **FC4** results in a chromogenic change to an orange color as well as quenching of the fluorescence signals. Fig. 2 shows detailed absorption of **FC4** upon gradual titration of Hg^{2+} . The addition of Hg^{2+} to a solution of **FC4** led to a red-shift of the absorption maximum from 495 nm to 502 nm and induced a color change from yellow to orange which could be easily seen by the visual-eye.

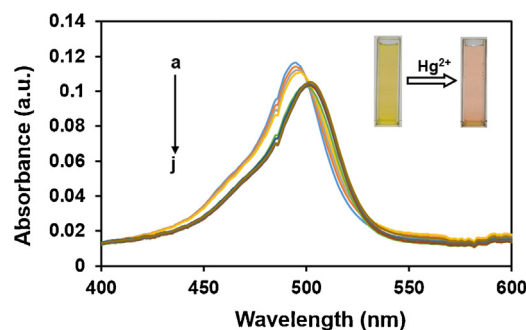


Fig. 2. Absorption spectra of **FC4** (3.0 μM) in 95:5 Tris–HCl buffer (pH 7.2):MeOH as a function of $[\text{Hg}^{2+}]$. (a) 0 μM , (b) 0.06 μM , (c) 0.13 μM , (d) 0.20 μM , (e) 0.27 μM , (f) 0.40 μM , (g) 0.53 μM , (h) 0.73 μM , (i) 0.93 μM , (j) 1.20 μM .

Table 1
Comparison of the recently reported fluorescence sensors for determination of Hg²⁺.

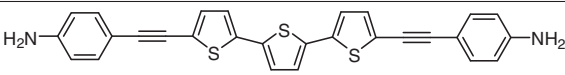
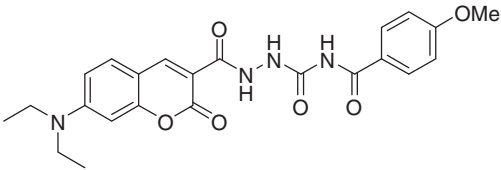
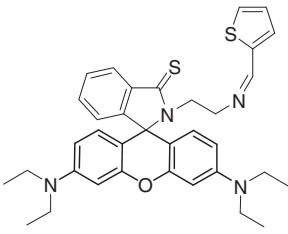
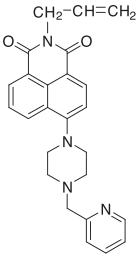
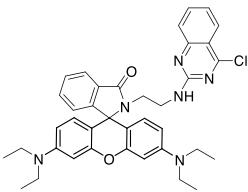
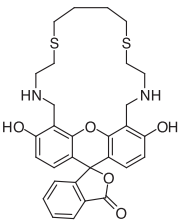
Hg ²⁺ -sensor	Working system	$\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ (nm)	Detection limit	Reference
	THF:CH ₃ CN:H ₂ O, 45:50:5, v/v/v	330/507	4.39 × 10 ⁻⁷ M (87.8 ppb)	[43]
	EtOH/HEPES buffer (20 mM, pH 7.2, 1:1, v/v)	445/495	1.0 × 10 ⁻⁷ M (20.0 ppb)	[44]
	MeOH/HEPES buffer (20 mM, pH 7.2, 7:3, v/v)	550/582	1.9 × 10 ⁻⁷ M (38.0 ppb)	[45]
	EtOH/Tris-HCl buffer (0.05 M, pH 7.01, 1:1, v/v)	420/520	2.0 × 10 ⁻⁶ M (0.40 ppm)	[46]
	MeOH/HEPES buffer (0.01 M, pH 7.0, 3:7, v/v)	525/581	2.7 × 10 ⁻⁸ M (5.40 ppb)	[47]
 FC4	MeOH/Tris-HCl buffer (2.62 mM, pH 7.2, 95:5, v/v)	493/514	7.38 × 10 ⁻⁹ M (1.48 ppb)	This work

Fig. 3 shows detailed fluorescence emission spectra of FC4 upon gradual titration of Hg²⁺ in an aqueous buffer/MeOH (pH 7.2). The solution of FC4 showed very strong fluorescence in visible region (approximately at 514 nm) when it was excited at 493 nm. When the Hg²⁺ were added, the quenching of initial fluorescence of FC4 was observed. The rapid decreasing of fluorescence signal clearly demonstrated the “ON–OFF” switching mechanism occurred in response to Hg²⁺ complexation. The fluorescence quenching of FC4 upon Hg²⁺ sensing could be attributed to the inherent quenching nature of Hg²⁺, and a similar quenching was previously observed in many Hg²⁺ fluorescence sensors [25,35,39–41].

The detection limit of FC4 as a Hg²⁺-fluorescent sensor was determined from the correlation between the fluorescence intensity and Hg²⁺ concentration [42]. It was found to be 7.38 × 10⁻⁹ ± 8.26 × 10⁻¹¹ M or 1.48 ± 0.016 ppb for Hg²⁺, which is lower than the maximum allowed level of inorganic mercury in drinking water (2 ppb) specified by the United States

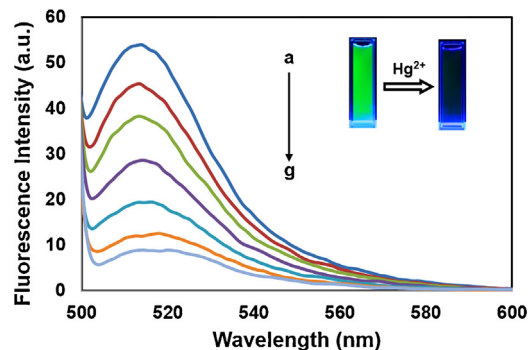


Fig. 3. Fluorescence emission spectra (λ_{ex} 493 nm) of FC4 (0.01 μM) in 95:5 Tris-HCl buffer (pH 7.2):MeOH as function of [Hg²⁺]. a: 0 M, b: 0.013 μM , c: 0.027 μM , d: 0.043 μM , e: 0.11 μM , f: 0.71 μM , g: 10.38 μM .

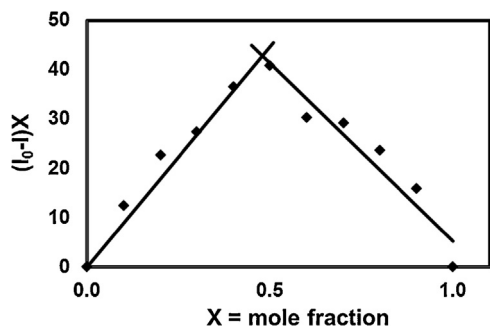


Fig. 4. Job's plots for FC4 with Hg²⁺ in 95:5 Tris-HCl buffer (pH 7.2):MeOH. The total concentrations of [FC4] + [Hg²⁺] are 1 μ M.

Environmental Protection Agency (U.S. EPA). Some recently reported fluorescence Hg²⁺-sensors which employed in aqueous organic or aqueous-organic buffer systems are shown in Table 1.

The fluorescence quantum yield (Φ_f) of FC4 with Hg²⁺ was determined to be 0.56, using fluorescein standard with a Φ_f of 0.95 in a 0.1 N aqueous sodium hydroxide as a reference [48]. The association constant, K_{assoc} , was found to be $6.04 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ by the Benesi-Hildebrand plot of the signal changes in the fluorescence titration results [20,49] and the 1:1 complex formation of FC4-Hg²⁺ was suggested. The result was consistent with Job's plot analysis (Fig. 4) and molecular modeling experiments.

Molecular modeling was performed using the Discovery Studio 2.5 program package, to clarify the coordination geometry of FC4 and Hg²⁺ upon binding. The 3D structure of fluorescein was initially modified from the X-ray crystal structure of fluorescein adduct (N-(6-acetamidohexyl)-3',6'-dihydroxy-1-oxo-spiro[2-benzofuran-3,9'-xanthene]-5-carboxamide) (PDB ID = 2FDC). This initial structure was optimized using CHARMM molecular mechanic force field using the "Smart Minimizer" option which began with the Steepest Descent method for 500 steps, followed by the Conjugate Gradient method for another 500 steps for faster convergence toward a local minimum in the implicit solvent model in 2.62 mM Tris-HCl buffer:MeOH (95:5, v/v) at pH 7.2 with the distance-dependent dielectrics of 103.06. Then, the host-guest complexation was constructed by placing Hg²⁺ in the center of

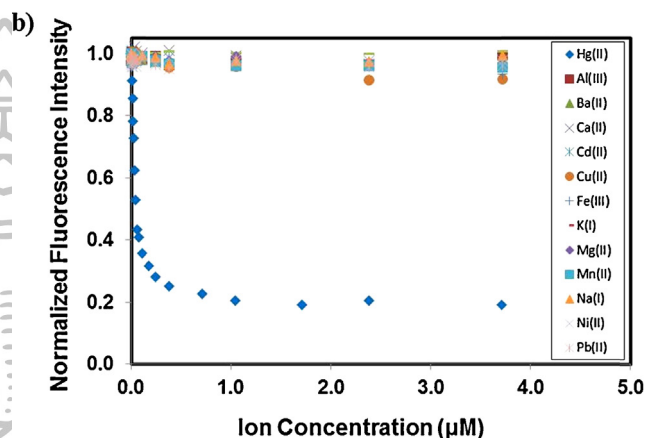
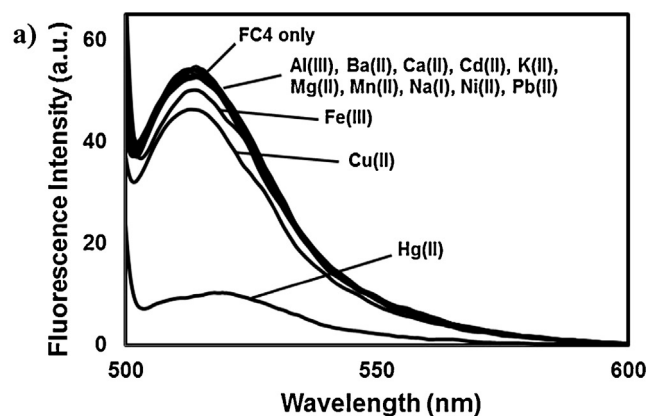


Fig. 6. (a) Fluorescence spectra (λ_{ex} 493 nm) of FC4 (0.01 μ M) in 95:5 Tris-HCl buffer (pH 7.2):MeOH with addition of chloride salts of Hg²⁺, Al³⁺, Ba²⁺, Ca²⁺, Cd²⁺, Cu²⁺, Fe³⁺, K⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Na⁺, Ni²⁺ and Pb²⁺ (10.4 μ M). (b) Normalized emission intensity (λ_{ex} 493 nm) of FC4 (0.01 μ M) in 95:5 Tris-HCl buffer (pH 7.2):MeOH versus the concentration of various metal ions: Hg²⁺, Al³⁺, Ba²⁺, Ca²⁺, Cd²⁺, Cu²⁺, Fe³⁺, K⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Na⁺, Ni²⁺ and Pb²⁺.

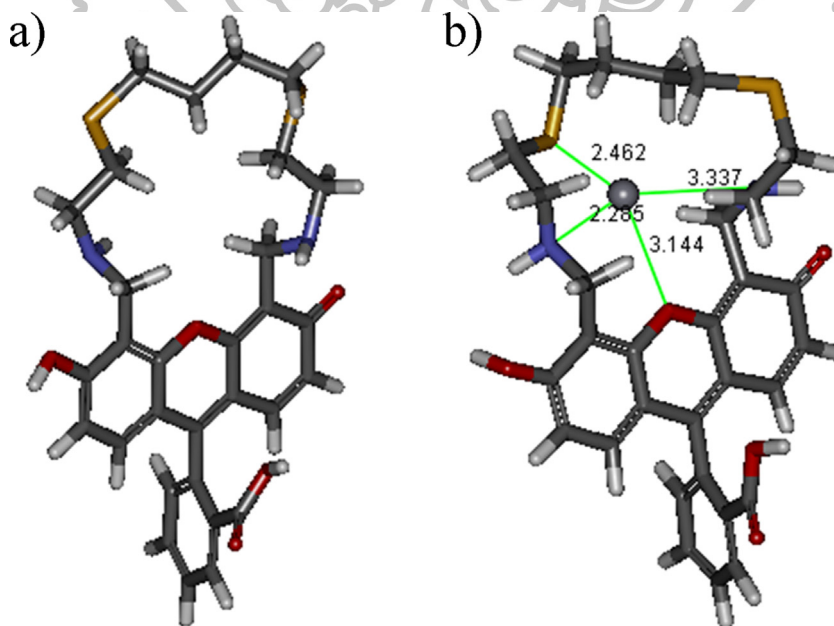


Fig. 5. Optimized structure with CHARMM force field in Tris-HCl buffer:methanol (95:5, v/v) using implicit distance-dependent dielectric of 103.06 (a) sensor FC4, and (b) 1:1 complex formation of FC4:Hg²⁺ with the lowest interaction energy.

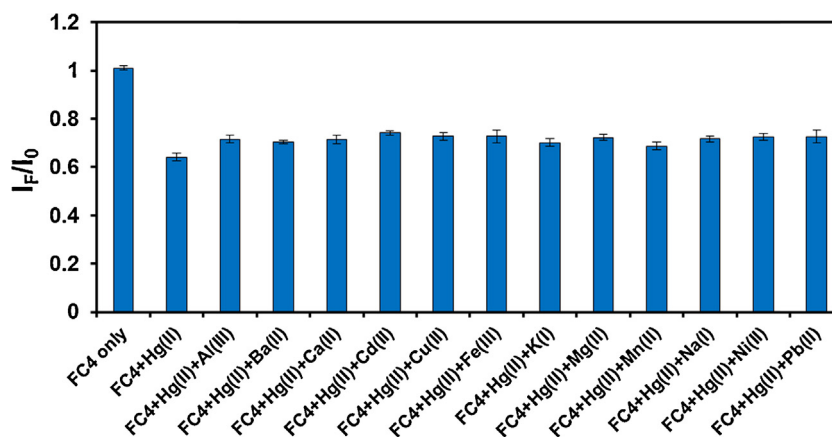


Fig. 7. Competitive experiments (at 514 nm) in the **FC4**- Hg^{2+} system with common foreign metal ions: $[\text{FC4}] = 0.01 \mu\text{M}$, $[\text{Hg}^{2+}] = 0.03 \mu\text{M}$ and $[\text{Mn}^{2+}] = 0.3 \mu\text{M}$ in 95:5 Tris-HCl buffer (pH 7.2):MeOH ($\lambda_{\text{ex}} 493 \text{ nm}$). The error bars represent the standard deviation.

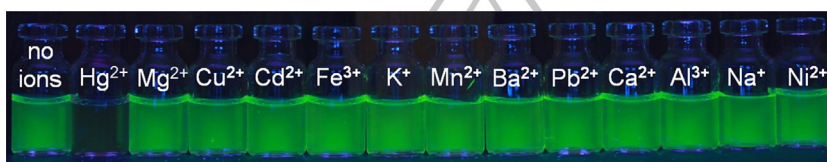


Fig. 8. The luminescence of **FC4** ($3.0 \mu\text{M}$) in the absence and presence of Hg^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{3+} , K^+ , Mn^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} , Na^+ and Ni^{2+} ($20.0 \mu\text{M}$) under a UV light.

the loop in coordinated with $-\text{NH}$ and $-\text{S}$. Energy minimization was performed on the model structures prior to dynamics to relax the conformation and remove steric overlap that produced bad contacts. MD simulation was performed further to obtain the lowest complex energy configuration in the implicit solvent at 300 K for 1000 ps with time step of 1 fs under NVT ensemble with the constraint force of $0.001 \text{ kcal/mol}/\text{\AA}^2$. The formal charge for Hg^{2+} was assigned. The final structure of the host and host-guest complex was shown in Fig. 5.

The optimized structure of 1:1 complex formation of **FC4**: Hg^{2+} indicated that ion-recognition of **FC4** resulted in Hg^{2+} coordinated with nitrogen (NH), sulfur (S) and oxygen (O) in the center of the loop through favorable electrostatic interactions as shown in Fig. 5b. From the optimization using CHARMM force field and MD simulation, Hg^{2+} was coordinated to two nitrogen atoms, one sulfur atom and oxygen atom of fluorescein with the distances of 2.285 Å, 3.337 Å, 2.462 Å and 3.144 Å, respectively. Interestingly, the oxygen atom of the fluorescein fluorophore also served as one of the binding site of the sensor to Hg^{2+} , which was similar to crown ether type molecule.

3.3. Selectivity studies

The selectivity of **FC4** was investigated in 95:5 Tris-HCl buffer (pH 7.2):MeOH solutions in the presence of various metals ions, such as Hg^{2+} , Al^{3+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , Ni^{2+} and Pb^{2+} . The results were clearly demonstrated high selectivity of **FC4** which reflected in the fluorescence spectra after additions of each various metal ion (Fig. 6). It was shown that the fluorescence response of **FC4** at 514 nm only drastically decreased as a function

of added Hg^{2+} concentrations. On the other hand, the fluorescence response of **FC4** did not indicate a significantly change after the addition of Al^{3+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , Ni^{2+} and Pb^{2+} under identical concentrations and conditions.

To further explore the selectivity of **FC4**, the competitive experiment was performed in 95:5 Tris-HCl buffer (pH 7.2):MeOH solutions. The fluorescence spectra of the **FC4** solutions before and after addition of Hg^{2+} in the absence and presence of 10 equiv. of various interfering ions (Al^{3+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , Ni^{2+} and Pb^{2+}), were recorded. The result are shown in Fig. 6, the bars in Fig. 7 represented the final fluorescence emission response (I_F) over the initial fluorescence emission response (I_0) at 514 nm (I_F/I_0) and the I_F/I_0 reference value (intensity of **FC4** in the presence of Hg^{2+} only) was equal to 0.64. All of the I_F/I_0 values in the presence of interfering ions were found to lie between 0.68 and 0.74, which indicated that a relatively consistent Hg^{2+} -induced fluorescence quenching was observed in the background foreign ions. Therefore, the results illustrated that the sensor can bind specifically toward Hg^{2+} ion and provided selective response to Hg^{2+} in the presence of competitive background metal ions. It should be noted that, **FC4**, in particular, demonstrated the high selectivity for Hg^{2+} over Cu^{2+} and Pb^{2+} , which are potential competitors due to their similar chemical behaviors to Hg^{2+} .

Moreover, the selective binding of **FC4** to Hg^{2+} over other representative ions was not only indicated by fluorescence quenching but also chromogenic changes. The luminescence of **FC4** disappeared when Hg^{2+} was added to the solution of **FC4**, while the foreign ions including Al^{3+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , Ni^{2+} and Pb^{2+} still showed strong fluorescence emission under UV light (Fig. 8). The addition of Hg^{2+} to the solution of **FC4**



Fig. 9. Chromogenic change of **FC4** ($10.0 \mu\text{M}$) in the absence and presence of Hg^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{3+} , K^+ , Mn^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} , Na^+ and Ni^{2+} ($45.0 \mu\text{M}$).

led to a change of color of the solution from yellow to orange, which could be easily detected by the visual-eye (Fig. 9).

4. Conclusion

In conclusion, we have used the idea of preorganisation of a rigidly conformational host for design and synthesis of a new fluorescent sensor (**FC4**) for Hg^{2+} detection. The sensor is based on a dithia-cyclic construction covalently bound to a fluorescein moiety. The sensor can be utilized in aqueous buffer solutions and exhibits high sensitivity and selectivity toward Hg^{2+} over various interfering ions. The selective binding of **FC4** to Hg^{2+} provides the dual optical sensing through both fluorescence quenching and concurrent visual color change from yellow to orange. The detection limit of the sensor was 1.5 ppb for Hg^{2+} which is sufficient to detect the maximum allowed Hg^{2+} level in drinking water specified by U.S. EPA. This sensor is a good candidate for future applications of mercury analysis in environmental samples or the biological system.

Acknowledgments

We thank the Thailand Research Fund (TRF) and Faculty of Science, Silpakorn University, Thailand (Grant RSA 5680034) for funding. The authors would like to express grateful acknowledgment to the Computational Nanoscience Consortium (CNC), Nanotechnology (NANOTEC), Thailand for the access to Discovery Studio program package.

References

- [1] A. Renzoni, F. Zino, E. Franchi, Mercury levels along the food chain and risk for exposed populations, *Environ. Res.* 77 (1998) 68–72.
- [2] S. Hardy, P. Jones, Capillary electrophoresis determination of methylmercury in fish and crab meat after extraction as the dithizone sulphinate complex, *J. Chromatogr.* 791 (1997) 333–338.
- [3] H.H. Harris, I.J. Pickering, G.N. George, The chemical form of mercury in fish, *Science* 301 (2003) 1203.
- [4] P.B. Tchounwou, W.K. Ayensu, N. Ninashevili, D. Sutton, Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic implications for public health, *Environ. Toxicol.* 18 (2003) 149–175 (Review).
- [5] M. Harada, Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution, *Crit. Rev. Toxicol.* 25 (1995) 1–24.
- [6] J. Gutknecht, Inorganic mercury (Hg^{2+}) transport through lipid bilayer membranes, *J. Membr. Biol.* 61 (1981) 61–66.
- [7] N. Wanichacheva, N. Prapawattapanol, V.S. Lee, K. Grudpan, A. Petsom, Hg^{2+} -induced self-assembly of a naphthalimide derivative by selective turn-on monomer/excimer emissions, *J. Lumin.* 134 (2013) 686–690.
- [8] (a) US EPA, Regulatory Impact Analysis of the Clean Air Mercury Rule: EPA-452/R-05-003, 2005; (b) US EPA, National Primary Drinking Water Regulations: EPA 816-F-09-0004, 2009, May.
- [9] C. Xiaohong, L. Shuang, Z. Aoshu, Q. Jingui, L. Zhen, New fluorescent probes for mercury(II) with simple structure, *Sens. Actuators B: Chem.* 157 (2011) 57–63.
- [10] C. Thivierge, J. Han, R.M. Jenkins, K. Burgess, Fluorescent proton sensors based on energy transfer, *J. Org. Chem.* 76 (2011) 5219–5228.
- [11] D. Buckland, S.V. Bhosale, S.J. Langford, A chemodosimeter based on a core-substituted naphthalene diimide for fluoride ion detection, *Tetrahedron Lett.* 52 (2011) 1990–1992.
- [12] Y. Ooyama, A. Matsugasako, T. Nagano, K. Oka, K. Kushimoto, K. Komaguchi, I. Imae, Y. Harima, Fluorescence PET (Photo-induced Electron Transfer) sensor for water based on anthracene-amino acid, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 222 (2011) 52–55.
- [13] P. Panida, T. Duangdeetip, N. Chimpalee, C. Wainiphithapong, P. Swanglap, N. Wanichacheva, Colorimetric sensor for detection of Hg^{2+} in aqueous samples utilizing rhodamine B hydrazide-modified silica, *Mater. Exp.* 5 (2015) 300–308.
- [14] N. Wanichacheva, M. Siriprumpoonthum, A. Kamkaew, K. Grudpan, Dual optical detection of a novel selective mercury sensor based on 7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazolyl subunits, *Tetrahedron Lett.* 50 (2009) 1783–1786.
- [15] W. Liu, J. Chen, L. Xu, J. Wu, H. Xu, H. Zhang, P. Wang, Reversible “OFF–ON” fluorescent chemosensor for Hg^{2+} based on rhodamine derivative, *Spectrochim. Acta A* 85 (2012) 38–42.
- [16] X. Hu, X. Zhang, G. He, C. He, C. Duan, A FRET approach for luminescence sensing Cr^{3+} in aqueous solution and living cells through functionalizing glutathione and glucose moieties, *Tetrahedron* 67 (2011) 1091–1095.
- [17] Y. Cheng, M. Zhang, H. Yang, F. Li, T. Yi, C. Huang, Azo dyes based on 8-hydroxyquinoline benzoates: synthesis and application as colorimetric Hg^{2+} -selective chemosensors, *Dyes Pigments* 76 (2008) 775–783.
- [18] L. Praveen, J. Babu, M.L.P. Reddy, R.L. Varma, Unfolding with mercury: anthracene-oxyquinoline dyad as a fluorescent indicator for $\text{Hg}(\text{II})$, *Tetrahedron Lett.* 53 (2012) 3951–3954.
- [19] J. Choi, S.K. Lee, J. Bae, S.K. Chang, Colorimetric signaling of Hg^{2+} ions by a nitrobenzoxadiazole-appended cyclen-triester, *Tetrahedron Lett.* 55 (2014) 5294–5297.
- [20] M. Li, H.Y. Lu, R.L. Liu, J.D. Chen, C.F. Chen, Turn-on fluorescent sensor for selective detection of Zn^{2+} , Cd^{2+} , and Hg^{2+} in water, *J. Org. Chem.* 77 (2012) 3670–3673.
- [21] S. Voutsadaki, G.K. Tsikalas, E. Klontzas, G.E. Froudakis, S.A. Pergantis, K.D. Demadisa, H.E. Katerinopoulos, A cyclam-type “turn on” fluorescent sensor selective for mercury ions in aqueous media, *RSC Adv.* 2 (2012) 12679–12682.
- [22] S.M. Park, M.H. Kim, J.I. Choe, K.T. No, S.K. Chang, Cyclams bearing diametrically disubstituted pyrenes as Cu^{2+} - and Hg^{2+} -selective fluoronophores, *J. Org. Chem.* 72 (2007) 3550–3553.
- [23] Y.H. Lau, J.R. Price, M.H. Todd, P.J. Rutledge, A click fluorophore sensor that can distinguish Cu^{II} and Hg^{II} via selective anion-induced demetallation, *Chem. Eur. J.* 17 (2011) 2850–2858.
- [24] J. Isaad, A.E. Achari, A water soluble fluorescent BODIPY dye with azathia-crown ether functionality for mercury chemosensing in environmental media, *Analyst* 138 (2013) 3809–3819.
- [25] J. Isaad, A.E. Achari, Azathia crown ether possessing a dansyl fluorophore moiety functionalized silica nanoparticles as hybrid material for mercury detection in aqueous medium, *Tetrahedron* 69 (2013) 4866–4874.
- [26] A. Espinosa, F. Oton, R. Martínez, A. Tarraga, P. Molina, A multidimensional undergraduate experiment for easy solution and surface sensing of mercury(II) and copper(II) metal cations, *J. Chem. Educ.* 90 (2013) 1057–1060.
- [27] S. Erdemir, O. Kocyyigit, S. Karakurt, A new perylene bisimide-armed calix[4]-aza-crown as “turn on” fluorescent sensor for Hg^{2+} ion and its application to living cells, *Sens. Actuators B: Chem.* 220 (2015) 381–388.
- [28] Y.H. Lee, M.H. Lee, J.F. Zhang, J.S. Kim, Pyrene excimer-eased calix[4]arene FRET chemosensor for mercury(II), *J. Org. Chem.* 75 (2010) 7159–7165.
- [29] S. Erdemir, S. Malkondu, O. Kocyyigit, O. Alici, A novel colorimetric and fluorescent sensor based on calix[4]arene possessing triphenylamine units, *Spectrochim. Acta A* 114 (2013) 190–196.
- [30] L.W. Hong, W. Bin, D.Q. Yong, L. Lei, W. Yuqing, A highly selective fluorescent sensor for mercury ions in aqueous solution: detection based on target-induced aggregation, *Sens. Actuators B: Chem.* 148 (2010) 49–53.
- [31] L.R. Chuda, N.N. Lok, K.M. Joong, L.H. Keun, Selectively and sensitively monitoring Hg^{2+} in aqueous buffer solutions with fluorescent sensors based on unnatural amino acids, *Sens. Actuators B: Chem.* 161 (2012) 1088–1096.
- [32] S. Chunxia, Z. Xiaolin, J. Cuiying, Z. Peng, Q. Xie, D. Chunying, Highly sensitive and selective fluorescence sensor based on functional SBA-15 for detection of Hg^{2+} in Aqueous Media, *Talanta* 81 (2010) 643–649.
- [33] Y.F. Xiao, L. Yu, B. Quan, A highly selective and sensitive fluorescein-based chemodosimeter for Hg^{2+} ions in aqueous media, *Anal. Chim. Acta* 584 (2007) 95–100.
- [34] K.M.K. Swamy, K.K. Soo, L.N. Ha, K.S.M. Shantha, K.S. Jong, Y. Juyoung, Fluorescent sensing of pyrophosphate and ATP in 100% aqueous solution using a fluorescein derivative and Mn^{2+} , *Tetrahedron Lett.* 48 (2007) 8683–8686.
- [35] K.J. Hee, P.E. Ji, C.G. Myung, A. Sangdo, C.K. Suk, Selective chromogenic and fluorogenic signalling of Hg^{2+} ions using a fluorescein-coumarin conjugate, *Dyes Pigments* 84 (2010) 54–58.
- [36] L. Tianrong, Y. Zhengyin, L. Yong, L. Zengchen, Q. Gaofei, W. Baodui, A novel fluorescein derivative as a colorimetric chemosensor for detecting copper(II) ion, *Dyes Pigments* 88 (2011) 103–108.
- [37] N. Wanichacheva, S. Watpathomsub, V.S. Lee, K. Grudpan, Synthesis of a novel fluorescent sensor bearing dansyl fluorophores for the highly selective detection of mercury (II) ions, *Molecules* 15 (2010) 1798–1810.
- [38] S.C. Burdette, G.K. Walkup, B. Spingler, R.Y. Tsien, S.J. Lippard, Fluorescent sensors for Zn^{2+} based on a fluorescein platform: synthesis, properties and intracellular distribution, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 7831–7841.
- [39] F. Ma, M. Sun, K. Zhang, S. Wang, A ratiometric fluorescence sensor for highly selective and sensitive detection of mercuric ion, *Sens. Actuators B: Chem.* 209 (2015) 377–383.
- [40] A. Han, X. Liu, G.D. Prestwich, L. Zang, Fluorescent sensor for Hg^{2+} detection in aqueous solution, *Sens. Actuators B: Chem.* 198 (2014) 274–277.
- [41] W.J. Qu, G.Y. Gao, B.B. Shi, T.B. Wei, Y.M. Zhang, Q. Lin, H. Yao, A highly selective and sensitive fluorescent chemosensor for mercury ions based on the mechanism of supramolecular self-assembly, *Sens. Actuators B: Chem.* 204 (2014) 368–374.
- [42] M. Shortreed, R. Kopelman, M. Kuhn, B. Hoyland, Fluorescent fiber-optic calcium sensor for physiological measurement, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1414–1418.
- [43] Q. Niu, X. Wu, S. Zhang, T. Li, Y. Cui, X. Li, A highly selective and sensitive fluorescence sensor for the rapid detection of Hg^{2+} based on phenylamine-oligothiophene derivative, *Spectrochim. Acta A* 153 (2016) 143–146.
- [44] Y. Xu, Z. Jiang, Y. Xiao, T.T. Zhang, J.Y. Miao, B.X. Zhao, A new fluorescent turn-on chemodosimeter for mercury ions in solution and its application in cells and organisms, *Anal. Chim. Acta* 807 (2014) 126–134.

- [45] F.H. Wang, C.W. Cheng, L.C. Duan, W. Lei, M.Z. Xia, F.Y. Wang, Highly selective fluorescent sensor for Hg^{2+} ion based on a novel rhodamine B derivative, *Sens. Actuators B: Chem.* 206 (2015) 679–683.
- [46] X.F. Wu, Q.J. Ma, X.J. Wei, Y.M. Hou, X. Zhu, A selective fluorescent sensor for Hg^{2+} based on covalently immobilized naphthalimide derivative, *Sens. Actuators B: Chem.* 183 (2013) 565–573.
- [47] M. Wang, F.Y. Yan, Y. Zou, N. Yang, L. Chen, L.G. Chen, A rhodamine derivative as selective fluorescent and colorimetric chemosensor for mercury (II) in buffer solution, test strips and living cells, *Spectrochim. Acta A* 123 (2014) 216–223.
- [48] B.H. James, M. Douglas, Absolute quantum yield determination by thermal blooming: fluorescein, *J. Phys. Chem.* 6 (1978) 705–709.
- [49] M.H. Tian, Z.J. Ai, D. Ming, D.M. Yu, P. Yu, W.W. Ya, A simply and highly selective “turn-on” type fluorescent chemosensor for Hg^{2+} based on chiral BINOL-Schiff's base ligand, *J. Lumin.* 130 (2010) 888–892.

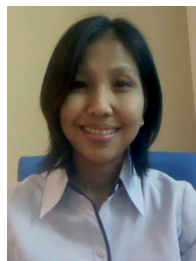
Biographies



Pornthip Piyanuch received her B.Sc. degree in chemistry from Silpakorn University, Thailand, in 2013. She is currently a M.Sc. student in organic chemistry at Silpakorn University under supervision of Assistant Professor Dr. Nantanit Wanichacheva. Her research interests involve design and development of fluorescence chemosensors.



Supraneer Watpathomsub gained her M.Sc. degree at the Department of Chemistry, Faculty of Science, Silpakorn University, Thailand under the supervision of Assistant Professor Dr. Nantanit Wanichacheva. She is now a Ph.D. student at the Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Thailand.



Vannajan Sanghiran Lee is an Associate Professor at Computational Chemistry Laboratory, Department of Chemistry, University of Malaya, Malaysia. She got her Ph.D. in Pharmaceutical Sciences and Physical Chemistry from University of Missouri-Kansas City, USA. She has currently served as the deputy head of Center of Theoretical and Computational Physics (TCP). Her present research interest includes computer-aided molecular modeling and computational chemistry using Molecular Dynamics (MD), Monte Carlo Simulations (MC) and Quantum Mechanics (QM) in biomolecular/material design.



Hubert A. Nienaber received his Ph.D. in Chemistry from the University of Münster (Germany). After doing post-docs at the University of Pretoria (South Africa) and at WPI (USA), he is now working in the Manufacturing Lab at Strem Chemicals Inc., Newburyport, Massachusetts, USA.



Nantanit Wanichacheva is an Assistant Professor in Department of Chemistry at Silpakorn University, Thailand. She received her Ph.D. in Chemistry from Worcester Polytechnic Institute, Massachusetts, USA. She is currently served as the deputy head of Department of Chemistry, Faculty of Science, Silpakorn University, Thailand. Her current research interests include design, syntheses and development of new fluorescence sensors for metal ions detections, such as mercury ion, copper ion and zinc ion, and their utilization in solutions, solid support-strip tests and portable monitoring devices.



ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล	พรทิพย์ ปิยะนุช
ที่อยู่	52/287 หมู่ 10 ตำบลห้วยบง อำเภอเฉลิมพระเกียรติ จังหวัด สระบุรี 18000
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2555	สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเอกเคมี เกียรตินิยมอันดับ 2 จากมหาวิทยาลัยศิลปากร
พ.ศ. 2556	ศึกษาต่อระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเอกเคมีอินทรีย์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ผลงานวิจัยที่ได้รับตีพิมพ์ในระดับนานาชาติ	
	Piyanuch, P.; Watpathomsub, S.; Lee, V. S.; Nienaber, H. A.; Wanichacheva, N. Highly sensitive and selective Hg^{2+} -chemosensor based on dithia-cyclic fluorescein for optical and visual-eye detections in aqueous buffer solution. Sens. Actuator B: Chem., 2016, 224, 201-208.
รางวัลที่เคยได้รับ	
พ.ศ. 2556-2558	ได้รับทุนผู้ช่วยสอน (Teaching Assistant) ภาควิชาเคมี คณะ วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
พ.ศ. 2558	ทุนอุดหนุนการวิจัย จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร