



ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดไอออนโลหะในสารละลาย การวิเคราะห์แบบฉีดไหลและแผ่น
พอลิเมอร์



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีอินทรีย์ แบบ 1.1 ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต

ภาควิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2562

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดไอออนโลหะในสารละลาย การวิเคราะห์แบบฉีด
ไหลและแผ่นพอลิเมอร์



โดย
นางสาวอรนวล หาญเม่ง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาเคมีอินทรีย์ แบบ 1.1 ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
ภาควิชาเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

FLUORESCENT SENSORS FOR DETERMINING METAL IONS IN SOLUTION,
FLOW INJECTION ANALYSIS AND POLYMER MEMBRANE



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for Doctor of Philosophy ORGANIC CHEMISTRY
Department of CHEMISTRY
Graduate School, Silpakorn University
Academic Year 2019
Copyright of Graduate School, Silpakorn University

58302806 : เคมีอินทรีย์ แบบ 1.1 ปรัชญาคุณภูมิบัณฑิต

คำสำคัญ : สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์, Near IR sensor, Flow Injection analysis, อิเล็กโตรสปินนิง

นางสาว อรนวล หาญเม่ง: ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดไอออนโลหะในสารละลาย การวิเคราะห์แบบฉีดไหลและแผ่นพอลิเมอร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : รองศาสตราจารย์ ดร. นันทินิตย์ วานิชชีวะ

งานวิจัยนี้สนใจการออกแบบและสังเคราะห์สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ Cy7C3 ที่มีการคายแสงในช่วงใกล้อินฟราเรดสำหรับตรวจวัดไอออนทองแดงได้อย่างจำเพาะเจาะจง ในตัวทำละลายผสมระหว่างบัฟเฟอร์ HEPES ที่ pH 7.0; acetonitrile ในอัตราส่วน 3:7 v/v ซึ่งมีค่า detection limit เท่ากับ 9 ppb และยังพบว่าสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ Cy7C3 สามารถตรวจวัดไอออนทองแดงในเซลล์มะเร็งตับ HepG2 และน้ำปัสสาวะได้ด้วย นอกจากนี้ได้นำสารได้มีการนำสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ M-141 ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนเหล็ก มาศึกษาด้วยเทคนิคการวิเคราะห์แบบฉีดไหล (Flow Injection Analysis) พบว่ามีช่วงใช้งานในการตรวจวัดไอออนเหล็กอยู่ที่ 2-10 mM ในตัวพาแบบสารละลายผสมระหว่าง Tris buffer pH 7.2 และ ethanol (95:5 v/v) อีกทั้งยังได้นำสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ RhBH มีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนปรอทและสามารถเปลี่ยนสีได้จากการสังเกตด้วยตาเปล่า ไปขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มกับเส้นใยโพลิเมอร์ชนิด Poly(methyl methacrylate) ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิง (electrospinning) พบว่าแผ่นฟิล์มจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูเมื่อมีการตรวจวัดไอออนปรอท แสดงว่าสาร RhBH ยังสามารถตรวจวัดไอออนปรอทได้แม้จะอยู่ในรูปของแผ่นฟิล์ม ซึ่งทำให้ได้แนวทางในการพัฒนาเป็นชุดทดสอบในภาคสนามได้

58302806 : Major ORGANIC CHEMISTRY

Keyword : FLUORESCENCE SENSOR, NEAR IR SENSOR, FLOW INJECTION ANALYSIS, ELECTROSPINNING

MISS ORANUAL HANMENG : FLUORESCENT SENSORS FOR DETERMINING METAL IONS IN SOLUTION, FLOW INJECTION ANALYSIS AND POLYMER MEMBRANE THESIS ADVISOR : ASSOCIATE PROFESSOR DR. NANTANIT WANICHACHEVA, Ph.D.

This research is interested in the design and synthesis of near infrared fluorescent sensor, Cy7C3, for determining copper ion in HEPES buffer:acetonitrile (3:7 v/v) at pH 7.0. The detection limit of was found to be 9 ppb and also found that Cy7C3 sensor could determine copper ion in liver cancer cells, HepG2, and hydroponics fertilizer. In addition, iron-selective fluorescent sensor, M-141, which was studied with flow injection analysis technique, exhibited the working ranges of 2-10 mM in tris buffer:ethanol (95:5 v/v) at pH 7.2. Moreover, the mercury- selective fluorescent sensor, RhBH, was made fiber films with poly(methyl methacrylate) polymers by electrospinning. The result showed that the films changed color to pink for detected mercury ion in water with the naked eye. Indicating that RhBH can work for mercury ion even in the film forms which way to develop as a test kit in the field.



กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณอาจารย์ รองศาสตราจารย์.ดร. นันทนิตย์ วานิชชีวะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ เป็นอย่างสูง สำหรับความกรุณาที่มีให้ ทั้งการให้คำปรึกษา การแนะนำอันเป็นประโยชน์ต่อการทำวิทยานิพนธ์ซึ่งทำให้งานนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ตลอดจนความรัก กำลังใจ ความปรารถนาดี ประสพการณ์ต่าง ๆ และคำสั่งสอนที่เป็นประโยชน์ต่อการดำเนินชีวิตด้วยมุมมองที่ดีที่มอบให้มาโดยตลอด

ขอขอบคุณอาจารย์ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วยา พุทธวงศ์ ประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และ ดร.ธนศาสตร์ สุขศรีเมือง อาจารย์กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์ต่อวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณพ่อแม่ ญาติพี่น้อง ที่เป็นกำลังใจและให้ความช่วยเหลือตลอดจนคำปรึกษาที่ดี ในด้านต่าง ๆ มากมายมาโดยตลอด

ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร สำหรับการสนับสนุนทุนค่าเล่าเรียน ในขณะที่ดิฉันได้ศึกษาอยู่ ณ สถาบันการศึกษาแห่งนี้

ขอขอบคุณอาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่าน ที่กรุณาประสิทธิ์ประสาทความรู้ต่าง ๆ ทั้งความรู้ในด้านวิชาการและด้านการดำเนินชีวิต

ขอขอบคุณน้อง และเพื่อนในกลุ่มทำงานทุกคน สำหรับคำปรึกษาและมิตรจิตอันดีที่มอบให้แก่มานี้มาโดยตลอด

สุดท้ายขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาเคมีทุกท่าน ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการดำเนินงานเอกสาร อีกทั้งขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเคมีทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือด้านอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำวิทยานิพนธ์ ด้วยความเอื้อเฟื้อตลอดมา

ประโยชน์อันใดที่เกิดจากการทำวิทยานิพนธ์นี้ ย่อมเป็นผลมาจากความกรุณาของทุกท่าน ดังกล่าว ดิฉันรู้สึกซาบซึ้งและระลึกถึงความกรุณาเป็นอย่างยิ่ง จึงใคร่ขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

อรนวล หาญเม่ง

สารบัญ

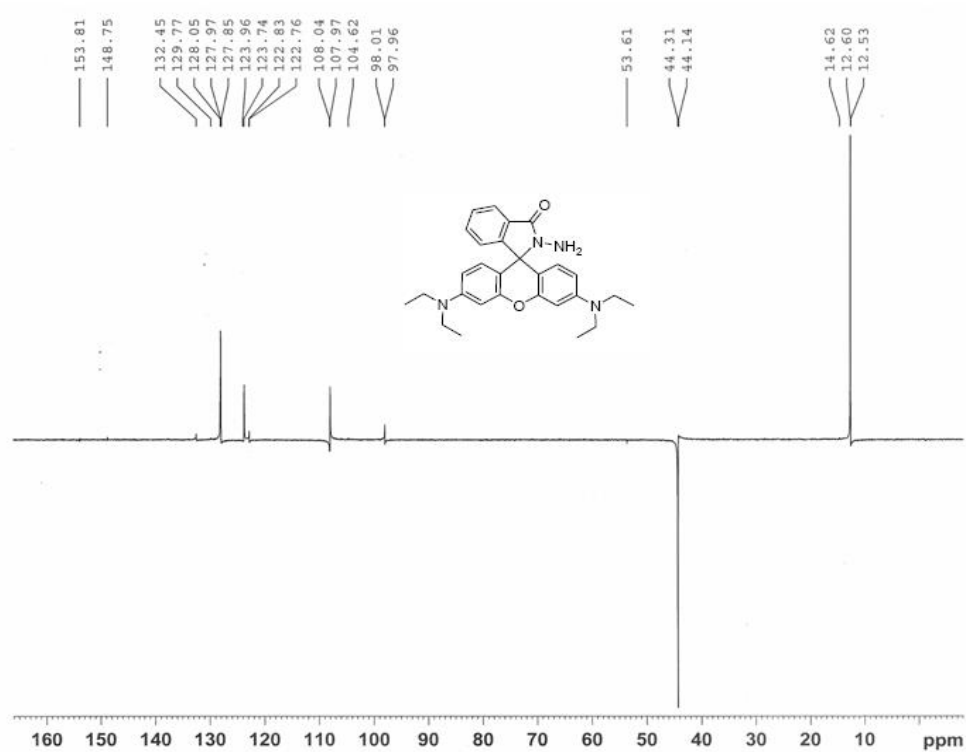
	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญรูปภาพ.....	ญ
บทที่ 1.....	1
บทนำ.....	1
บทที่ 2.....	10
ทบทวนวรรณกรรม.....	10
บทที่ 3.....	20
อุปกรณ์และสารเคมี.....	20
บทที่ 4.....	23
วิธีการทดลอง.....	23
บทที่ 5.....	38
ผลการดำเนินงานวิจัย.....	38
ภาพที่ 31 ^1H NMR ของ 2-[3-(2-aminoethylsulfanyl)propylsulfanyl]ethanamine (I-3).....	39
ภาพที่ 32 ^{13}C NMR ของ 2-[3-(2-aminoethylsulfanyl)propylsulfanyl]ethanamine (I-3).....	39
ภาพที่ 35 ^1H NMR สเปกตรัมของสารไซยานีน F-2.....	41
ภาพที่ 36 ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารไซยานีน F-2.....	42
ภาพที่ 37 ^{13}C DEPT135 NMR สเปกตรัมของสารไซยานีน F-2.....	42

ภาพที่ 40 ¹H NMR สเปกตรัมของสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ Cy7C3 45

ภาพที่ 41 ¹³C NMR สเปกตรัมของสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ Cy7C3 45

ภาพที่ 42 ¹³C DEPT135 NMR สเปกตรัมของสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ Cy7C3..... 46

ภาพที่ 60 ¹³C NMR สเปกตรัมของสาร RhBH 61



ภาพที่ 61 ¹³C Dept 135 สเปกตรัมของสาร RhBH..... 62

ภาพที่ 62 HR-ESI MS สเปกตรัมของสาร RhBH..... 62

บทที่ 6..... 64

สรุปผลการทดลอง 64

รายการอ้างอิง 66

ประวัติผู้เขียน 71

สารบัญตาราง

หน้า

ไม่พบรายการสารบัญภาพ



สารบัญรูปภาพ

หน้า

ไม่พบรายการสารบัญภาพ



บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันความต้องการของมนุษย์ เช่น เทคโนโลยีเพื่ออำนวยความสะดวกสบายในการดำรงชีวิต ความต้องการทางด้านความสวยงามงาน ความต้องการทางการแพทย์ รวมถึงอาหารในการดำรงชีวิต มีเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ การตอบสนองความต้องการเหล่านี้จึงเป็นโอกาสให้โรงงานอุตสาหกรรมขยายจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งในกระบวนการผลิตต่าง ๆ นั้น มักมีการใช้สารเคมีในขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งอยู่เสมอ และสารเคมีที่เหลืออยู่หรือของเสียที่เกิดจากกระบวนการผลิตนี้อาจตกค้างจนเป็นพิษต่อคนและสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะมลพิษที่อยู่ในรูปของสารประกอบไอออนโลหะหนัก แม้ว่าโลหะหนักบางชนิดนั้นมีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น ทองแดง (Cu) เป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ ทำหน้าช่วยส่งผ่านออกซิเจนเข้าสู่เซลล์ อีกทั้งช่วยป้องกันโรคโลหิตจาง และเหล็ก (Fe) เป็นส่วนประกอบของเม็ดเลือดแดง ซึ่งจะช่วยการจับออกซิเจนได้มากขึ้น เป็นต้น แต่หากได้รับโลหะเหล่านี้เข้าสู่ร่างกายมากเกินไป จากประโยชน์จะแปรเปลี่ยนเป็นโทษ เช่น ทองแดงจะทำให้เม็ดเลือดแดงแตกตัว ทำลายตับ ยับยั้งการทำงานของตับ หากมีการสะสมในปริมาณมากจะก่อให้เกิดโรควิลสัน (Wilson's disease) [1] ส่วนเหล็ก หากสะสมในร่างกายมากเกินไปจะส่งผลต่อการขยายตัวหลอดเลือด ทำให้ความดันเลือดผิดปกติ และทำให้ตับเสื่อมสภาพ [2] เป็นต้น ในขณะที่โลหะหนักบางชนิดแต่โลหะหนักบางชนิดมักมีความเป็นพิษต่อร่างกาย เช่นปรอท (Hg) เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะทำลาย DNA ระบบประสาทและสมอง [3-6] รวมไปถึงทำให้เกิดโรคมินามาตะ [3] เป็นต้น ทั้งนี้มีการกำหนดค่ามาตรฐานของไอออนโลหะหนักต่าง ๆ ที่อาจตกค้างในน้ำดื่มโดย U.S. EPA ดังตารางที่ 1

ชนิดของโลหะหนัก	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)
ทองแดง	1
เหล็ก	0.3
ปรอท	0.002

ตารางที่ 1 ค่ามาตรฐานของไอออนโลหะหนักต่าง ๆ ที่อาจตกค้างในน้ำดื่มโดย U.S. EPA

จากตารางข้างต้นจะเห็นได้ว่า ปริมาณไอออนโลหะหนักที่สามารถปนเปื้อนในน้ำดื่มสูงสุด มีปริมาณน้อยมาก แล้วถ้าพิจารณาถึงแหล่งผลิตไอออนโลหะหนักที่สำคัญในประเทศไทย ก็มักพบว่า เกิดจากอุตสาหกรรมต่าง ๆ หากไม่มีการจัดการอย่างถูกวิธีจะทำให้ไอออนโลหะหนักแพร่เข้าสู่ทะเล ซึ่งเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของมนุษย์ โดยเฉพาะปลาทะเลที่มีวงจรชีวิตยาวจะสะสมไอออนโลหะหนักได้มาก เช่น ปลาทูน่า และปลาดูแลม เป็นต้น เนื่องจากการปนเปื้อนของไอออนโลหะหนักสู่สิ่งแวดล้อมสามารถเกิดขึ้นได้โดยง่าย ดังนั้นจึงต้องตระหนักถึงความสำคัญกับสิ่งแวดล้อมรอบตัว โดยเฉพาะสิ่งแวดล้อมทางน้ำ ที่เป็นแหล่งปนเปื้อนที่สามารถนำมาสู่การปนเปื้อนในห่วงโซ่อาหารของมนุษย์ได้ง่ายมากที่สุด ด้วยเหตุนี้การที่มีเครื่องมือเพื่อใช้ตรวจจับความเป็นพิษของสิ่งแวดล้อมใกล้ตัวที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน มีประสิทธิภาพ และประหยัดค่าใช้จ่าย ถือว่าเป็นสิ่งที่มีประโยชน์ต่อชีวิตมนุษย์ และสิ่งแวดล้อมมาก

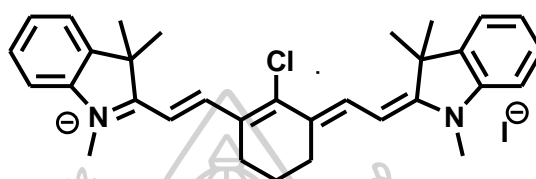
วิธีการตรวจวัดไอออนโลหะที่ได้รับความสนใจและถูกพัฒนาขึ้นอย่างแพร่หลายในปัจจุบันคือ การใช้ระบบโครงสร้างโมเลกุล (molecular system) ที่สามารถเหนี่ยวนำให้ทำงานได้โดยการใช้แสงเป็นตัวกระตุ้น (light-induced logic operation) หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือการใช้สารฟลูออเรสเซนต์ เซ็นเซอร์ (fluorescence sensor) เพื่อตรวจวัดไอออนโลหะ โดยการตรวจวัดนั้นจะติดตามด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปี ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจอย่างแพร่หลายในการตรวจวิเคราะห์ไอออนโลหะชนิดต่าง ๆ สามารถตรวจวัดได้ทั้งด้านคุณภาพวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์ โดยเทคนิคนี้เมื่อเทียบกับวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์แบบอื่น ๆ เช่น Flame Photometry Atomic Absorption Spectrometry (AAS) หรือ Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry (ICP-EAS) เป็นต้น พบว่ามีข้อดีกว่า เนื่องจากมีสภาพไว (sensitivity) ในการวิเคราะห์สูง ไม่ทำลายสารตัวอย่างและใช้สารตัวอย่างเพียงเล็กน้อยก็สามารถแสดงผลในเวลาอันรวดเร็วได้ จึงสามารถใช้วิเคราะห์ตัวอย่างได้อย่างต่อเนื่อง (continuous monitoring) อีกทั้งการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค AAS และ ICP-EAS ต้องใช้สารตัวอย่างในปริมาณมาก (ระดับ ppm) อีกทั้งคำนึงถึงการกำจัดสารรบกวนในกรณีที่ตัวอย่างเป็นน้ำกร่อย น้ำทะเล สิ่งมีชีวิตจากทะเล หรือดินตะกอน ที่มีการปนเปื้อนของเกลือจำนวนมากซึ่งอาจจะทำให้เกิดการอุดตันของเกลือ (salt-clogging) ในเครื่องมือขณะทำการวิเคราะห์ได้ด้วย

โดยทั่วไปการออกแบบโครงสร้างโมเลกุลของสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ให้สามารถตรวจวัดไอออนโลหะโดยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปีได้อย่างมีประสิทธิภาพนั้น ต้องออกแบบระบบโครงสร้างโมเลกุล (molecular system) ของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ให้ทำงานได้จากการเกิดสถานะกระตุ้นที่ถูกเหนี่ยวนำโดยแสง (light-induced logic operation) เพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงสัญญาณจากการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ หรือการเปลี่ยนแปลงสัญญาณจากการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเล็ต และภายในโครงสร้างควรมีส่วนของโมเลกุลที่สามารถเกิดอันตรกิริยาจำเพาะ (selective

interaction) ต่อไอออนโลหะที่ต้องการวิเคราะห์ด้วย ซึ่งโครงสร้างโมเลกุลของสารฟลูออเรสเซนต์ เซ็นเซอร์ จะประกอบด้วย 2 ส่วนหลัก ได้แก่ 1. ฟลูออโรฟออร์ (fluorophore) คือส่วนที่แสดงคุณสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ เมื่อมีการดูดกลืนพลังงานในช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสม 2. ไอโอโนฟออร์ (ionophore) เป็นส่วนที่สามารถตรวจจับไอออนโลหะที่ต้องการตรวจวัด ดังนั้นจึงเรียกลำโพงที่ใช้วิเคราะห์โดยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปีว่า “ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์” หรือ “ฟลูออโรไอโอโนฟออร์ (fluoroionophore)” โดยส่วนที่แสดงสัญญาณเปรียบเสมือนตัวแปลงสัญญาณเปลี่ยนข้อมูลของกลไกการตรวจจับไอออน (recognition event) ไปสู่การเปลี่ยนแปลงสัญญาณทางแสง (optical signal) ผ่านกระบวนการต่าง ๆ เช่น Photoinduced electron transfer (PET), Formation of monomer/excimer, Energy transfer และ Fluorescence resonance energy transfer (FRET) ดังนั้นการพัฒนาประสิทธิภาพของสารฟลูออเรสเซนต์ เซ็นเซอร์จึงขึ้นกับการปรับเปลี่ยนโครงสร้างส่วนไอโอโนฟออร์เพื่อพัฒนาความจำเพาะเจาะจง (selectivity) ต่อไอออนโลหะที่ต้องการวิเคราะห์ และการปรับเปลี่ยนโครงสร้างส่วนฟลูออโรฟออร์เพื่อพัฒนาสภาพไวของการวิเคราะห์ (sensitivity) โดยปัจจุบันการเน้นให้การดูดกลืนและคายแสงฟลูออเรสเซนต์อยู่ในช่วงใกล้อินฟราเรด (near infrared region) กำลังเป็นที่สนใจ เนื่องจากมีประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้ในงานด้านต่าง ๆ เช่น ด้านชีวภาพ และวิทยาศาสตร์ทางแพทย์ เป็นต้น นอกจากนี้ความยาวคลื่นในช่วงใกล้รังสีอินฟราเรด ยังมีประโยชน์ในการนำไปศึกษาเกี่ยวกับตัวอย่างชีวภาพและสิ่งมีชีวิต เนื่องจากแสงในช่วงใกล้อินฟราเรด ถือว่ามีพลังงานต่ำเมื่อเทียบกับความยาวคลื่นในช่วงแสงที่ตามองเห็น (visible region) ทำให้ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์สิ่งมีชีวิตและไม่ถูกรบกวนโดยสารอื่น ๆ ที่สามารถดูดกลืนแสงได้ในเซลล์สิ่งมีชีวิต ดังนั้นในการตรวจวัดไอออนโลหะในเซลล์สิ่งมีชีวิตจึงไม่มีการทำลายเนื้อเยื่อ และสามารถลดขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างได้ เช่น การย่อยสลายตัวอย่าง การตรวจวัดจึงเป็นไปได้โดยสะดวก รวดเร็ว สามารถใช้งานได้ง่ายเพื่อตรวจวัดการปนเปื้อนของไอออนโลหะอันตรายในตัวอย่างจากธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

วิทยานิพนธ์นี้ได้เสนอการสังเคราะห์สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดไอออนทองแดงชนิดใหม่ที่มีสภาพไวสูง (high sensitivity) และมีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนทองแดงสูง (high selectivity) โดยมีหลักการคือ ไอออนทองแดง (Cu^{2+}) มีขนาดอะตอมใหญ่ ซึ่งจัดเป็น soft acid (จาก Pearson's principle หรือ ทฤษฎี Hard and Soft Acid and Base) [7] ซึ่งชอบเกิดอันตรกิริยาและสร้างพันธะ (bond binding) กับอะตอมหรือหมู่ฟังก์ชัน (functional group) ที่เป็น soft base เช่น อะตอมซัลเฟอร์ ที่มีขนาดใหญ่มากและความหนาแน่นของอิเล็กตรอนสูง ซึ่งไอออนโลหะต่าง ๆ มักจะเกิดการโคออดิเนตให้อยู่ในรูปร่างที่เหมาะสม เช่น ไอออนทองแดง ชอบที่เกิดการโคออดิเนตให้อยู่ในรูปร่างสี่เหลี่ยมแบนราบ ไอออนปรอทชอบเกิดการโคออดิเนตให้อยู่ในรูปร่างทรงสี่หน้า และไอออนเหล็กชอบเกิดการโคออดิเนตให้อยู่ในรูปร่างทรงแปดหน้า เป็นต้น ดังนั้นใน

วิทยานิพนธ์นี้จึงเลือกสังเคราะห์ส่วนไอโอโนฟอร์ที่มีอะตอมซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ เพื่อทำหน้าที่เป็น soft donor ligand ให้อิเล็กตรอนแก่ออนทองแดง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวัดและเพิ่มความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนทองแดง และเลือกสังเคราะห์โมเลกุลให้มีลักษณะเป็นสายโซ่ยาว (long chain) เพื่อให้เกิดอันตรกิริยากับไอออนในตำแหน่งที่เหมาะสมโดยการม้วนตัวล้อมรอบไอออนทองแดงได้อย่างอิสระ เพื่อขจัดปัญหาเรื่องขนาดของช่องว่างที่ไม่เหมาะสม และเลือกใช้สารฟลูออโรฟอร์ที่มีการคายแสงในช่วงใกล้อินฟราเรดคืออนุพันธ์ของ cyanine ดังภาพที่ 1

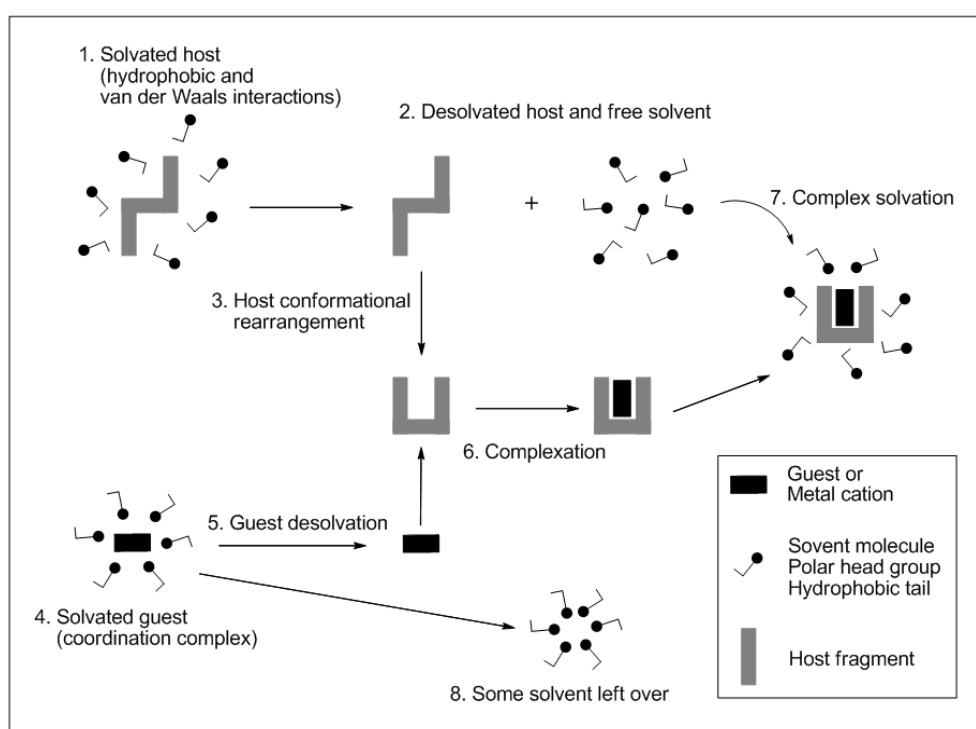


ภาพที่ 1 โครงสร้างอนุพันธ์ของ cyanine ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ซึ่งเป็นสารฟลูออโรฟอร์ที่ลักษณะเป็นสายโพลิเมทิน (polymethine group) อยู่ระหว่างอะตอมไนโตรเจนสองอะตอม ซึ่งอะตอมหนึ่งจะมีประจุ ทำให้อิเล็กตรอนคูโดดเดี่ยวของไนโตรเจนอีกอะตอมหนึ่งสามารถเคลื่อนที่ผ่านระบบคอนจูเกต (conjugated system) ไปยังอีกอะตอมหนึ่งได้ ทำให้เกิดการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้ดีในช่วงใกล้อินฟราเรด และนอกจากนี้สารฟลูออโรฟอร์ชนิดนี้ยังมีโครงสร้างที่ง่ายต่อการปรับเปลี่ยนจึงเหมาะที่จะนำมาศึกษาและพัฒนาเป็นสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ชนิดใหม่ต่อไป ทั้งนี้ยังพบว่ามีงานนำสารในกลุ่มของไซยานิน ไปพัฒนาใช้ในงานต่าง ๆ อีกมากมาย เช่น การพัฒนาเป็นไดโอดเปล่งแสง (light emitting diode) การพัฒนาให้ใช้งานด้านวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวกับสิ่งมีชีวิต เช่น สีย้อมดีเอ็นเอ (DNA) และ สีย้อมเพื่อดูการสร้างพันธะของโปรตีน นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาไปสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดไอออนลบ (anion) และ ไอออนบวก (cation) ด้วย

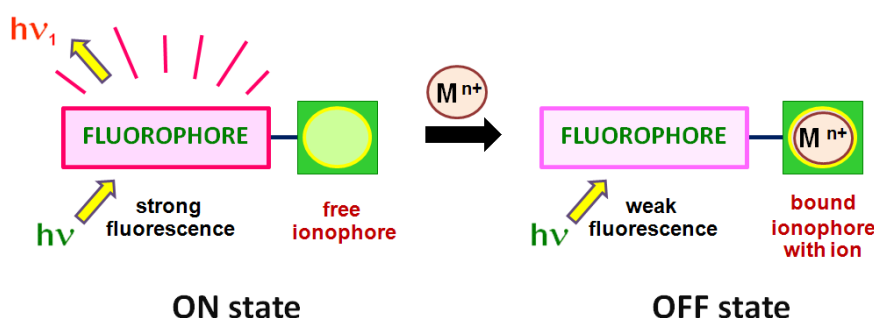
จากการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์และไอออนโลหะนั้น พบว่ามีลักษณะการเกิดอันตรกิริยาแบบ โฮสต์-เกสต์ (host-guest chemistry) กล่าวคือ โมเลกุลโฮสต์ (host) จะจับกับโมเลกุลเกสต์ (guest) ได้อย่างจำเพาะเจาะจงนั้น ต้องพิจารณาถึงความเหมาะสมในด้าน 1. อันตรกิริยา (interaction) ที่จะเกิดขึ้นระหว่างไอโอโนฟอร์กับไอออนโลหะที่ต้องการตรวจวัด 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 การตรวจวัดจะมีประสิทธิภาพที่ดี และ/หรือ 2.

โครงสร้างโมเลกุลของโฮสต์ควรมีขนาดรูปร่างหรือขนาดช่องว่างที่เหมาะสม (size fit requirement) ต่อโมเลกุลเกสต์ เพื่อเพิ่มความจำเพาะของการวิเคราะห์ได้อีกด้วย ในที่นี้ส่วนไอโอโนฟอรั่เปรียบเสมือนโฮสต์ และไอออนโลหะที่ต้องการตรวจวัดเปรียบเสมือนเกสต์ ซึ่งกระบวนการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโฮสต์กับเกสต์ในสารละลายสามารถแสดงดังภาพที่ 2



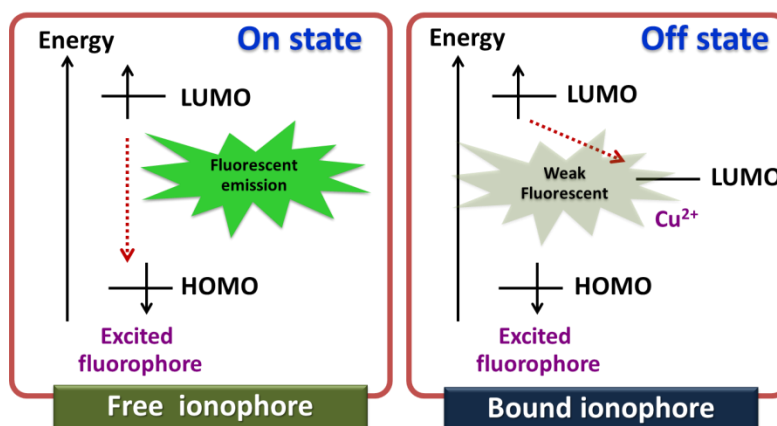
ภาพที่ 2 การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไอโอโนฟอรั่และไอออน [8]

เมื่ออยู่ในสารละลาย ตัวทำละลายจะจัดตัวล้อมรอบโมเลกุลโฮสต์ด้วยอันตรกิริยาแวนเดอร์วาลส์ (van der Waals) และอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) และล้อมรอบโมเลกุลเกสต์หรือไอออนโลหะด้วยอันตรกิริยาโคออร์ดิเนต (coordination) เพื่อให้สารทั้งสองสามารถอยู่ในสารละลายได้ ซึ่งการเกิดการตรวจวัดหรือเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไอโอโนฟอรั่และไอออนโลหะนั้น โมเลกุลของสารทั้งสองชนิดจำเป็นต้องใช้พลังงานเพื่อทำลายแรงยึดเหนี่ยวที่เกิดจากโมเลกุลของสารละลาย เพื่อให้ได้โมเลกุลอิสระ จากนั้นโมเลกุลโฮสต์อิสระจะเกิดการปรับเปลี่ยนโครงสร้างเพื่อให้มีขนาดและรูปร่างที่เหมาะสมกับเกสต์ จึงสามารถตรวจวัดไอออนโลหะที่ต้องการได้ ในขณะที่สารประกอบที่เกิดขึ้นจะถูกโมเลกุลของสารละลายล้อมรอบไว้เช่นเดียวกัน ซึ่งกระบวนการตรวจวัดไอออนโลหะของสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ที่สังเคราะห์ได้ในวิทยานิพนธ์นี้ จะแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ในลักษณะคล้ายการเปิด-ปิดสวิตช์ไฟ (ON- OFF system) แสดงดังภาพที่ 3



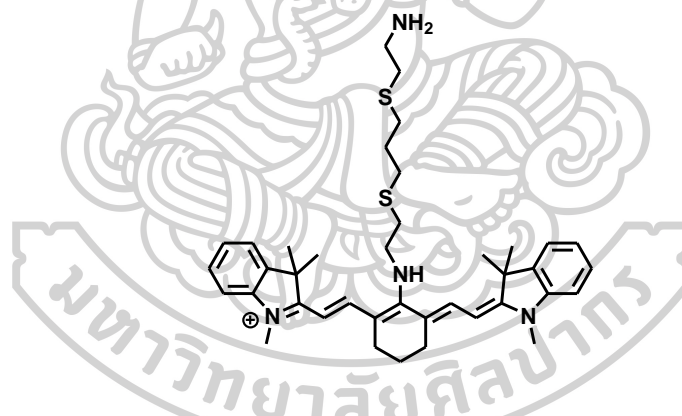
ภาพที่ 3 ลักษณะการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ก่อนไอออนโฟร์ตรวจับไอออนโลหะ (ซ้าย) และ ภายหลังตรวจับไอออนโลหะ (ขวา)

จากภาพที่ 3 สามารถอธิบายได้ว่า ในภาวะที่สารละลายไม่มีไอออนโลหะ สารฟลูออเรสเซนซ์ เซ็นเซอร์จะสามารถคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ออกมาได้ในปริมาณความเข้มข้นแสงสูง ในทางตรงข้าม หากมีไอออนโลหะอยู่ในสารละลาย ไอออนโลหะจะเข้าจับกับไอออนโฟร์ทำให้สารฟลูออเรสเซนซ์ เซ็นเซอร์คายแสงฟลูออเรสเซนซ์ออกมาได้น้อยลง โดยความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์จะลดลงใน ลักษณะแปรผันตามกับปริมาณไอออนโลหะในสารละลาย โดยกระบวนการทำงานที่ทำให้สารฟลูออ เรสเซนซ์เซ็นเซอร์เกิดการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์เพิ่มขึ้นนี้ สามารถอธิบายได้ด้วยการรบกวน กระบวนการ Photoinduced Electron Transfer (PET) [9] โดยกระบวนการทำงานของสารฟลูออ เรสเซนซ์เซ็นเซอร์ในลักษณะนี้สามารถอธิบายได้ดังภาพที่ 4 กล่าวคือในภาวะที่สารละลายไม่มีไอออน โลหะ (ON state) เมื่อกระตุ้นสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ด้วยแสงความยาวคลื่นที่เหมาะสม อิเล็กตรอนในระดับพลังงาน HOMO (the highest occupied molecular orbital) ของฟลูออโร โฟร์จะรับพลังงาน และถูกกระตุ้นไปยังระดับพลังงานที่สูงขึ้นหรือระดับ LUMO (the lowest unoccupied molecular orbital) ของฟลูออโรโฟร์ ทำให้ระดับพลังงาน HOMO ของฟลูออโรโฟร์ เกิดที่ว่าง เมื่ออิเล็กตรอนคายพลังงานกลับลงมายังระดับพลังงาน HOMO หรือสถานะพื้น (ground state) จึงสังเกตเห็นการคายพลังงานออกมาในรูปของสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ เกิดลักษณะคล้าย การเปิดสวิตช์ไฟ (ON state) ในทางตรงกันข้ามหากสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์เกิดอันตรกิริยากับ ไอออนโลหะ ระดับพลังงาน HOMO ของฟลูออโรโฟร์จะมีค่าต่ำกว่าระดับพลังงาน LUMO ของ ไอออนโลหะ เมื่อสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ถูกกระตุ้นด้วยแสง อิเล็กตรอนในระดับพลังงาน HOMO ของฟลูออโรโฟร์จะขึ้นสู่ระดับพลังงาน LUMO เมื่อเกิดการคายพลังงานกลับลงมา อิเล็กตรอนเคลื่อนที่ลงมาสู่ระดับพลังงาน LUMO ของไอออนโลหะแทน ทำให้อิเล็กตรอนไม่สามารถ กลับสู่ระดับพลังงาน HOMO ของฟลูออโรโฟร์ หรือสถานะพื้นได้ จึงทำให้สังเกตเห็นการคาย สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ลดลงเกิดลักษณะคล้ายการปิดสวิตช์ไฟ (OFF state) ซึ่งกระบวนการนี้เรียกว่า PET process



ภาพที่ 4 กระบวนการ Photoinduced Electron Transfer (PET)

จากภาพที่ 5 แสดงโครงสร้างสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ (Cy7C3) ที่มีการคายแสงในช่วงใกล้อินฟราเรดสำหรับวิทยานิพนธ์นี้ โดยคาดว่าภายหลังการตรวจจับไอออนโลหะทองแดง Cy7C3 อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ เนื่องจากเกิดกระบวนการ PET

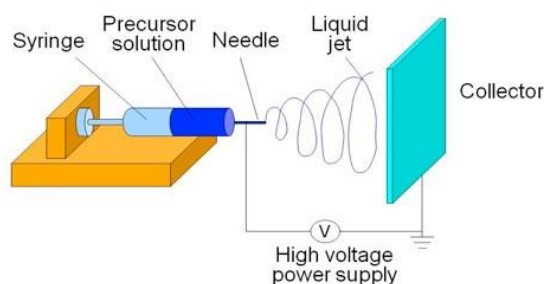


ภาพที่ 5 โครงสร้างสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ (Cy7C3)

โดยการตรวจวัดไอออนโลหะนั้น จะทำการทดสอบความสามารถตรวจวัดไอออนโลหะต่าง ๆ ได้แก่ โลหะทรานซิชั่น โลหะอัลคาไลน์ และโลหะอัลคาไลน์เอิร์ท ในสารละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ ให้มีความไว และมีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนโลหะทองแดง รวมทั้งยังมีการทดสอบการเกิดอันตรกิริยากับโลหะทองแดงในตัวอย่างจริง เพื่อต้องการพัฒนาต่อยอดให้สามารถนำไปใช้ทางด้านการแพทย์และพัฒนาในเชิงพาณิชย์ โดยทำเป็นเครื่องมือหรือชุดตรวจสอบ เพื่อใช้ในการตรวจวัดในภาคสนามที่มีราคาไม่แพงได้อีกด้วย

ไปสู่ระบบตรวจวัดที่จะวัดการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น โดยเทคนิคนี้เหมาะกับการวิเคราะห์สารตัวอย่างชนิดเดียว แต่มีจำนวนหลายตัวอย่าง เพราะเป็นเทคนิคที่ประหยัดเวลาในการวิเคราะห์

สำหรับสารเซ็นเซอร์ชนิด RhBH ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับไอออนปรอท ได้มีการนำมาขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มด้วยเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิง (electrospinning) [11] ดังภาพที่ 8 โดยการผสมกับ Poly(methyl methacrylate (PMMA)



ภาพที่ 8 ลักษณะขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มด้วยเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิง (electrospinning)

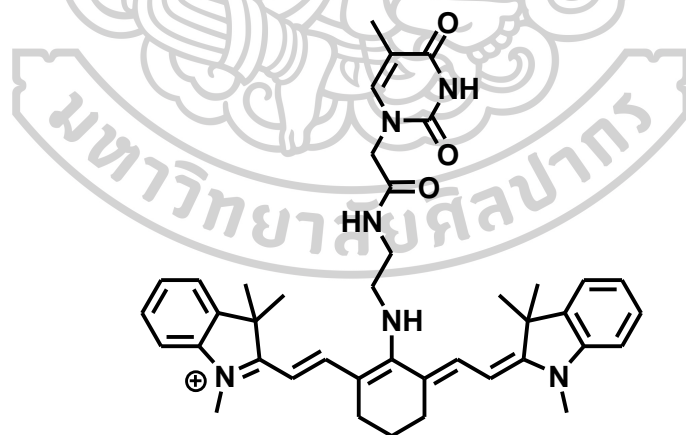
โดยหลักการของเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิงนั้น จะเริ่มจากการให้ศักย์ไฟฟ้ากำลังสูงแก่สารละลายโพลิเมอร์เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อหยดของโพลิเมอร์มีการสะสมของประจุเพิ่มมากขึ้นจะทำให้เกิดแรงผลักกันของประจุที่เพิ่ม และเมื่อแรงผลักนี้มากกว่าแรงตึงผิวของสารละลายโพลิเมอร์ จะทำให้เกิดกระแสโพลิเมอร์พุ่งออกมาและจะพุ่งไปยังอุปกรณ์รองรับเกิดเป็นเส้นใย โดยกระบวนการปั่นเส้นใยโพลิเมอร์ขึ้นจนเห็นเป็นลักษณะเหมือนแผ่นฟิล์ม ซึ่งสามารถพัฒนาไปเป็นเครื่องมือหรือชุดตรวจวัด เพื่อใช้ในการตรวจวัดในภาคสนามที่มีราคาไม่แพงได้อีกด้วย

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ ได้มีผู้วิจัยหลายกลุ่มให้ความสนใจที่จะพัฒนาคุณสมบัติของสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ ให้มีความจำเพาะเจาะจงและความไวสำหรับตรวจวัดไอออนโลหะชนิดต่าง ๆ โดยใช้สารอนุพันธ์ของไซยานิน เป็นส่วนของฟลูออโรฟอร์ ซึ่งมีการดูดกลืนและคายแสงในช่วงความยาวคลื่นใกล้อินฟราเรด โดยมุ่งเน้นให้เซ็นเซอร์มีสภาพไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) ไอออน และมีความจำเพาะเจาะจง (selectivity) ต่อไอออนโลหะเป้าหมายสูงขึ้น และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในสารละลายอินทรีย์ สารละลายน้ำ หรือในสารละลายผสมของสารละลายอินทรีย์กับน้ำได้ ซึ่งในที่นี้ได้แสดงตัวอย่างบทความวิจัยที่เกี่ยวข้องกับอนุพันธ์ของไซยานินไว้ดังนี้

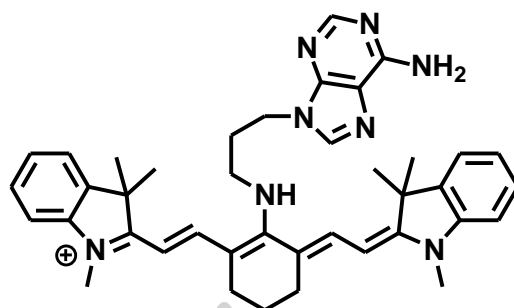
ปี ค.ศ. 2012 Zheng และคณะ [12] ได้เสนอการสังเคราะห์สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ จากสารอนุพันธ์ของไซยานิน สำหรับใช้เป็นเซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนปรอท ดังภาพที่ 9 พบว่าเซ็นเซอร์ชนิดนี้มีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนปรอทในสารละลายผสมระหว่าง Methanol:H₂O ในอัตราส่วน 2:98 v/v ที่ pH 6.60 โดยมีค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนต์อยู่ในช่วงใกล้อินฟราเรดที่มีความยาวคลื่น 714 nm และมีค่า detection limit สำหรับตรวจวัดไอออนปรอท เท่ากับ 4.8 nM



ภาพที่ 9 โครงสร้างของสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ของ Zheng และคณะ (เซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนปรอท)

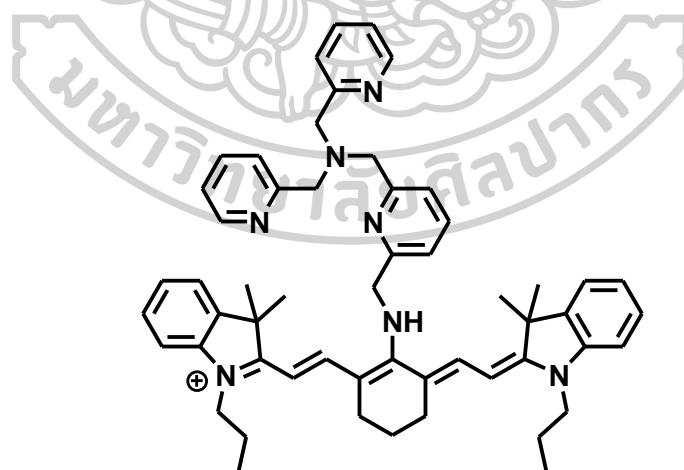
ในปีเดียวกัน Zheng และคณะ [13] ได้เสนอการสังเคราะห์สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ จากอนุพันธ์ของไซยานินสำหรับใช้เป็นเซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนเงิน ดังภาพที่ 10 พบว่าเซ็นเซอร์ชนิดนี้มีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนเงินในสารละลายผสมระหว่าง Methanol:H₂O ในอัตราส่วน

1:4 v/v ที่ pH 5.40 โดยมีค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์อยู่ในช่วงใกล้อินฟราเรดที่ความยาวคลื่น 731 nm และมีค่า detection limit สำหรับตรวจวัดไอออนเงิน เท่ากับ 34 nM



ภาพที่ 10 โครงสร้างของสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ของ Zheng และคณะ (เซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนเงิน)

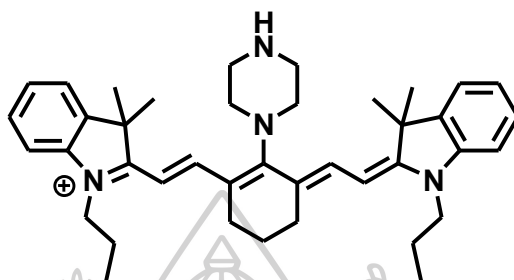
นอกจากนั้น ภายในปีเดียวกัน Guo และคณะ [14] ได้เสนอการสังเคราะห์สารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์จากอนุพันธ์ของไซยานินสำหรับใช้เป็นเซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนสังกะสี ดังภาพที่ 11 พบว่าเซ็นเซอร์ชนิดนี้มีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนสังกะสีในสารละลาย 10% acetonitrile ในบัฟเฟอร์ HEPES ที่ pH 7.4 โดยมีค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์อยู่ในช่วงใกล้อินฟราเรดที่ความยาวคลื่น 730 nm และยังมีการนำเซ็นเซอร์ไปทดสอบการใช้งานในเซลล์สิ่งมีชีวิตชนิด C2C12 และ NIH3T3 อีกด้วย



ภาพที่ 11 โครงสร้างของสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ของ Guo และคณะ (เซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนสังกะสี)

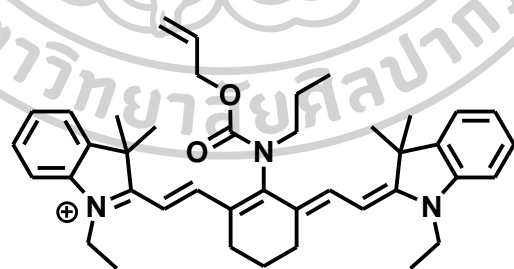
ต่อมาในปี ค.ศ. 2013 Li และคณะ [15] ได้เสนอการสังเคราะห์สารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์จากอนุพันธ์ของไซยานินสำหรับใช้เป็นเซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนเงิน ดังภาพที่ 12 พบว่า

เซ็นเซอร์ชนิดนี้มีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนเงินในสารละลายผสมระหว่าง Ethanol:H₂O ในอัตราส่วน 40:1 v/v ที่ pH 7.0 (บัฟเฟอร์ HEPES) โดยมีค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์อยู่ในช่วงใกล้อินฟราเรดที่ความยาวคลื่น 758 nm และมีค่า detection limit สำหรับตรวจวัดไอออนเงินเท่ากับ 0.2 μ M



ภาพที่ 12 โครงสร้างของสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ของ Li และคณะ (เซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนเงิน)

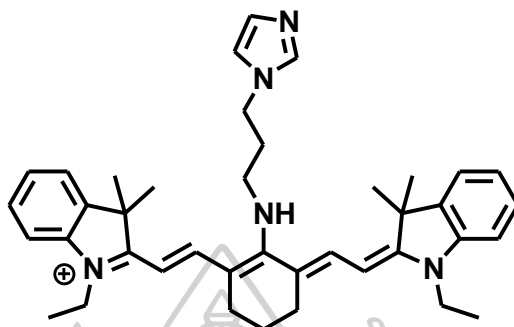
ในปีเดียวกัน Wang และคณะ [16] ได้เสนอการสังเคราะห์สารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์จากอนุพันธ์ของไซยานีนสำหรับใช้เป็นเซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนพาราเดียม ดังภาพที่ 13 พบว่าเซ็นเซอร์ชนิดนี้มีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนพาราเดียมในสารละลายผสมระหว่างบัฟเฟอร์ PBS:PEG400 (1:1) กับ NaBH₄ (100 mM) ที่ pH 7.40 โดยมีค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์อยู่ในช่วงใกล้อินฟราเรดที่ความยาวคลื่น 750 nm และยังมีการนำเซ็นเซอร์ไปทดสอบการตรวจวัดไอออนพาราเดียมในตัวอย่างจริง โดยทดสอบใช้งานในเซลล์ชนิด HeLa cells และหนูอีกด้วย



ภาพที่ 13 โครงสร้างของสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ของ Wang และคณะ (เซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนพาราเดียม)

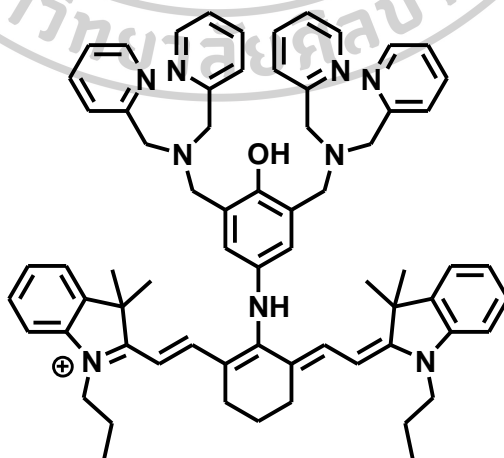
ต่อมาในปี ค.ศ. 2015 Datta และคณะ [17] ได้เสนอการสังเคราะห์สารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์จากอนุพันธ์ของไซยานีนสำหรับใช้เป็นเซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนอะลูมิเนียม ดังภาพที่ 14 พบว่าเซ็นเซอร์ชนิดนี้มีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนอะลูมิเนียมในสารละลายผสมระหว่าง Methanol:H₂O ในอัตราส่วน 2:3 v/v ที่ pH 7.4 (บัฟเฟอร์ HEPES) โดยมีค่าการคายแสงฟลูออ

เรสเซนต์อยู่ในช่วงใกล้อินฟราเรดที่ความยาวคลื่น 730 nm และได้มีการนำเซ็นเซอร์ไปทดสอบการใช้งานในเซลล์ชนิด HeLa cells นอกจากนี้ยังพบว่าเซ็นเซอร์ชนิดนี้สามารถเกิด interaction กับ CT-DNA ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาเป็นตัวติดตามการทำงานของ nuclease ได้อีกด้วย



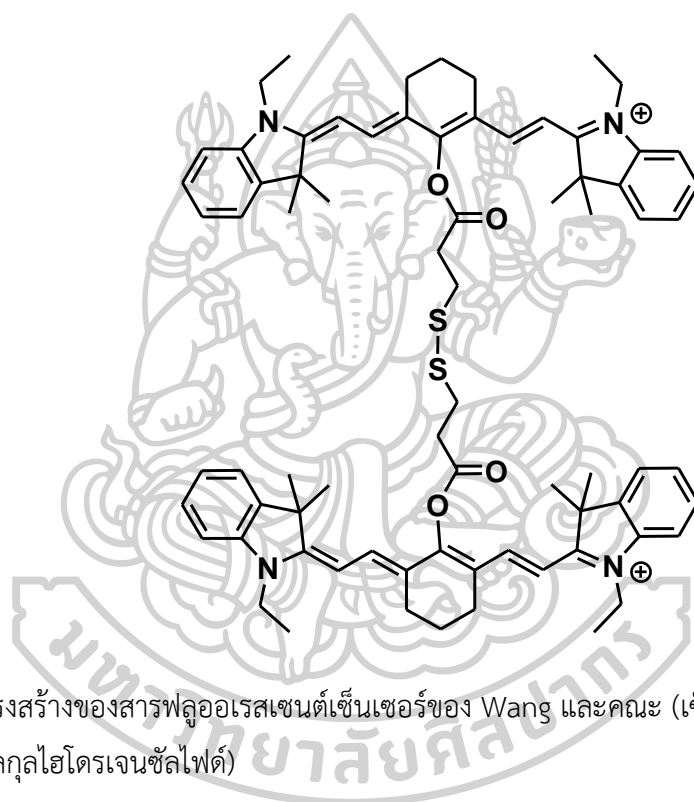
ภาพที่ 14 โครงสร้างของสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ของ Datta และคณะ (เซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนอะลูมิเนียม)

ต่อมาในปี ค.ศ. 2016 Hu และคณะ [18] ได้เสนอการสังเคราะห์สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์จากอนุพันธ์ของไซยานินสำหรับใช้เป็นเซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนสังกะสีและไอออนทองแดง ดังภาพที่ 15 ในสารละลายผสมระหว่าง 1% DMSO ที่ pH 7.4 (บัฟเฟอร์ HEPES) พบว่าเซ็นเซอร์ชนิดนี้มีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนสังกะสีและไอออนทองแดง กล่าวคือ มีการเปลี่ยนสีจากสารละลายสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน เมื่อมีการตรวจวัดไอออนสังกะสีและไอออนทองแดง และเมื่อมีการเติม S^{2-} ลงในสารละลายของไอออนโลหะทั้งสองชนิด จะพบว่า มีเพียงสารละลายของไอออนทองแดงที่สามารถเปลี่ยนกลับมาเป็นสีเขียวได้เช่นเดิม



ภาพที่ 15 โครงสร้างของสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ของ Hu และคณะ (เซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนสังกะสีและไอออนทองแดง)

นอกจากสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์จากอนุพันธ์ของไซยานีนจะใช้เป็นเซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดไอออนโลหะแล้ว ยังพบว่าสามารถใช้ตรวจวัดโมเลกุลอื่น ๆ ได้อีก เช่น ในปี ค.ศ. 2017 Wang และคณะ [19] ได้เสนอการสังเคราะห์สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์จากอนุพันธ์ของไซยานีนสำหรับใช้เป็นเซ็นเซอร์ตรวจวัดโมเลกุลของไฮโดรเจนซัลไฟด์ ดังภาพที่ 16 ในสารละลายผสม DMSO/HEPES อัตราส่วน 2:8 (v/v) ที่ pH 7.2 พบว่าเซ็นเซอร์ชนิดนี้มีความจำเพาะเจาะจงต่อไฮโดรเจนซัลไฟด์ โดยมีค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนส์อยู่ในช่วงใกล้อินฟราเรดที่ความยาวคลื่น 633 nm และมีการเปลี่ยนสีจากสารละลายสีเขียวเป็นสีชมพู เมื่อมีการตรวจวัดโมเลกุลของไฮโดรเจนซัลไฟด์

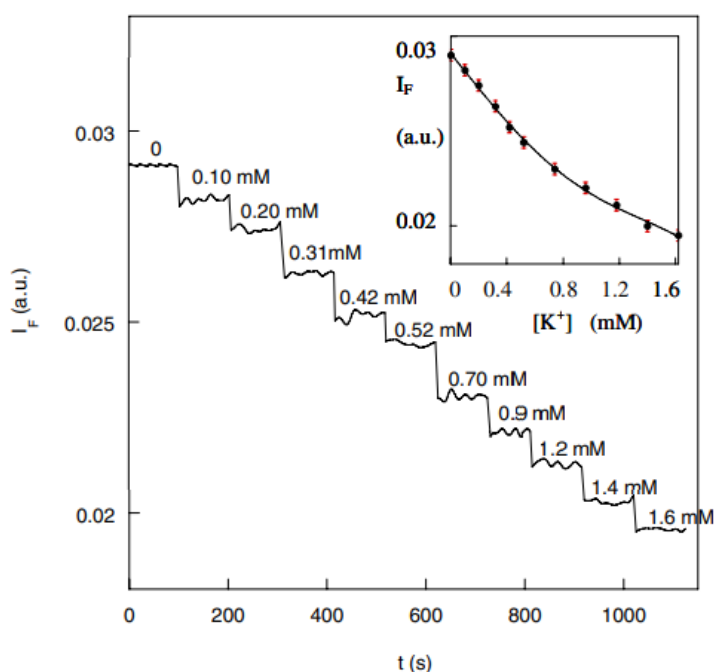
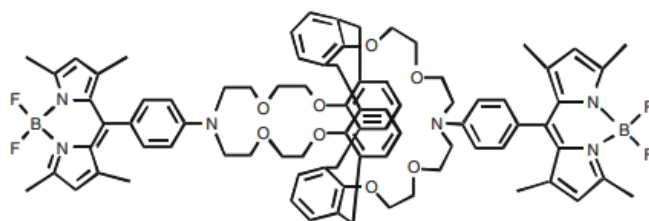


ภาพที่ 16 โครงสร้างของสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ของ Wang และคณะ (เซ็นเซอร์ตรวจวัดโมเลกุลไฮโดรเจนซัลไฟด์)

นอกจากจะมีกลุ่มผู้วิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์มีการคายแสงในช่วงใกล้อินฟราเรดด้วยวิธีการวิเคราะห์แบบไม่ต่อเนื่อง (batch analysis) แล้วนั้น พบว่ามีกลุ่มผู้วิจัยบางกลุ่มที่ให้ความสนใจการตรวจวัดไอออนโลหะของสารเซ็นเซอร์ด้วยวิธีการวิเคราะห์แบบต่อเนื่องหรือวิธีการวิเคราะห์แบบฉีดไหล (Flow Injection Analysis, FIA) แต่การวิเคราะห์ไอออนโลหะด้วยเทคนิคนี้ยังไม่เป็นที่แพร่หลายมากนัก ซึ่งสามารถศึกษาได้จากงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ดังตัวอย่างเช่น

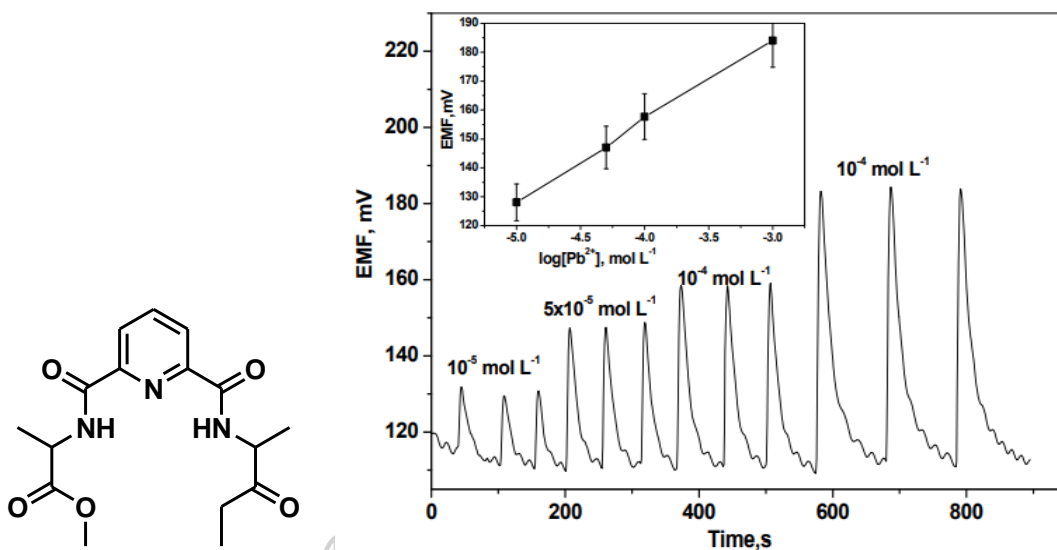
ในปี ค.ศ. 2007 Destandau และคณะ [20] ได้เสนอการใช้สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ชนิด calix-Bodipy ดังภาพที่ 17 สำหรับใช้เป็นเซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนโพแทสเซียมด้วยวิธีการวัดแบบ FIA ในตัวพาแบบ 10:90 (v/v) H_2O :acetonitrile ผสมกับ HClO_4 ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ

10^{-4} M ที่ pH 4.5 โดยมีปริมาตรการฉีดตัวอย่างเท่ากับ 100 μ L และอัตราการไหลคงที่เท่ากับ 0.5 mL.h⁻¹



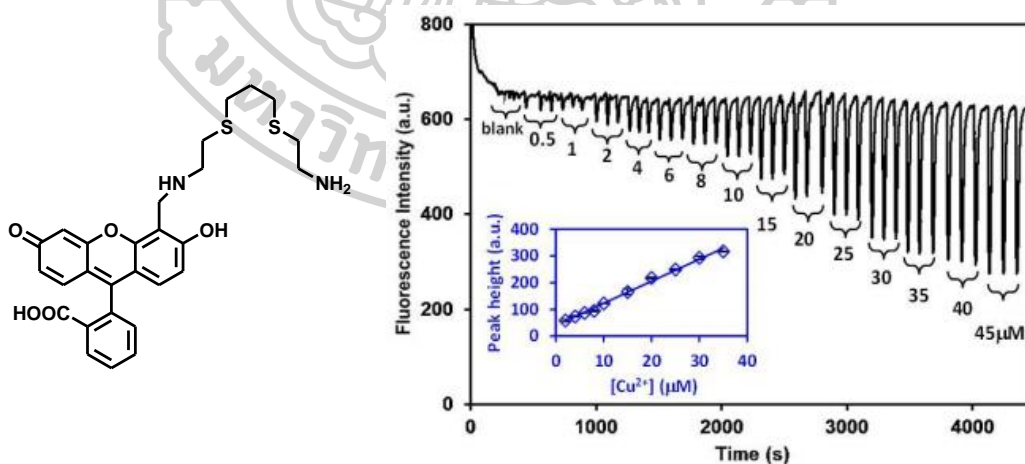
ภาพที่ 17 โครงสร้างของสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ชนิด calix-Bodipy ของ Destandau และคณะ

ต่อมาในปี ค.ศ. 2013 Kamel และคณะ [21] ได้เสนอการใช้สารเซ็นเซอร์ที่มีส่วนของไอออนฟออร์ชนิด pyridine carboximide derivatives ดังภาพที่ 18 สำหรับใช้เป็นเซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนตะกั่ว ด้วยวิธีการวัดแบบ FIA ในตัวพาแบบ acetate buffer ที่ความเข้มข้น 10^{-2} M ที่ pH 4.5 โดยมีปริมาตรการฉีดตัวอย่างเท่ากับ 100 μ L และอัตราการไหลที่ 3.5 mL.min⁻¹



ภาพที่ 18 โครงสร้างไอออนโฟร์ชนิด pyridine carboximide derivative ของ Kamel และคณะ

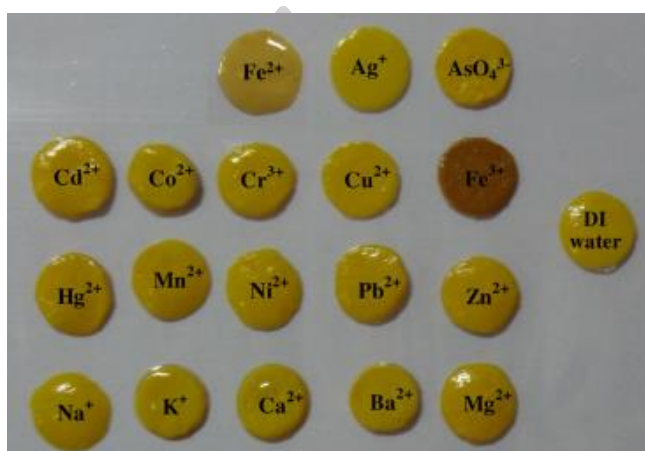
ในปี ค.ศ. 2017 Tachapermpoon และคณะ [22] ได้เสนอการใช้สารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ชนิด MF3 ดังภาพที่ 19 สำหรับใช้เป็นเซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนทองแดง ด้วยวิธีการวัดแบบ FIA ในตัวพาแบบสารละลายผสม 50:50 v/v acetonitrile/water โดยมีปริมาตรการฉีดตัวอย่างเท่ากับ 30 μL และอัตราการไหลที่ 2.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$



ภาพที่ 19 โครงสร้างของสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ชนิด MF3 ของ Tachapermpoon และคณะ

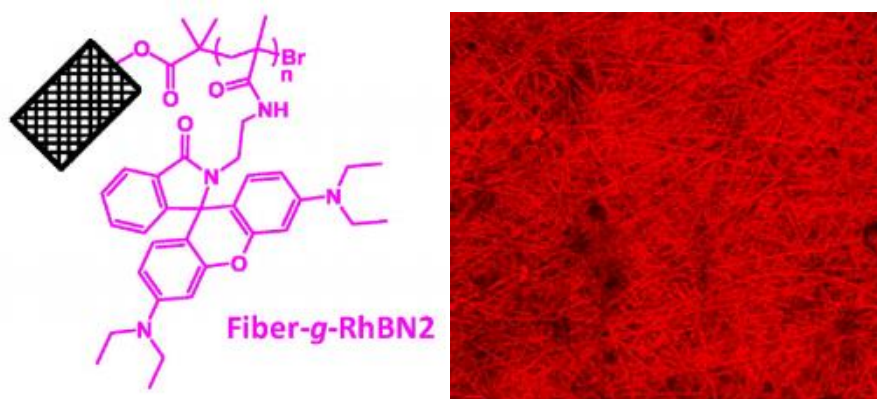
นอกจากนี้การพัฒนาสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ให้ง่ายต่อการนำไปใช้งานก็ได้เป็นที่สนใจ ซึ่งมีนักวิจัยบางกลุ่มสนใจการขึ้นรูปฟิล์มด้วยเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิง (electrospinning) ซึ่งสามารถศึกษาได้ดังตัวอย่างบทความวิจัยที่เกี่ยวข้องในที่นี่ ดังต่อไปนี้

ในปี ค.ศ. 2014 Saithongdee และคณะ [23] ได้เสนอการขึ้นรูปฟิล์มด้วยเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิงจาก zein โดยมีการใส่สารฟลูออเรสเซนต์ชนิด curcumin ลงไปเป็นส่วนประกอบ จากนั้นจึงนำไปทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนโลหะ พบว่าแผ่นฟิล์มนี้มีความสามารถในการตรวจวัดไอออนเหล็กได้อย่างจำเพาะเจาะจง ดังแสดงในภาพที่ 20



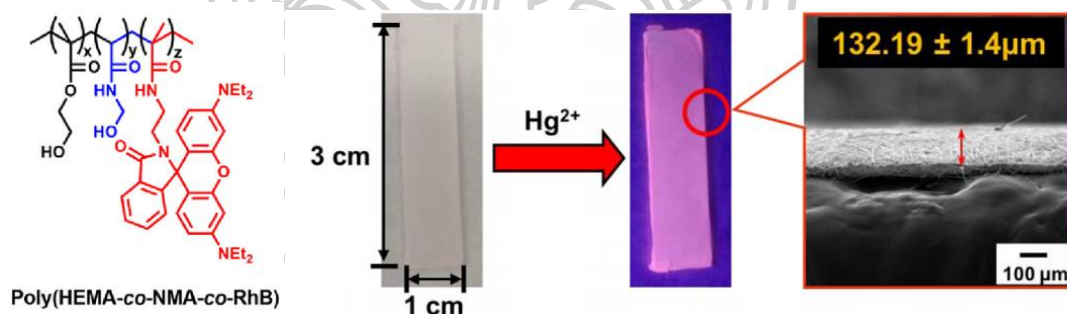
ภาพที่ 20 การทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนโลหะด้วยแผ่นฟิล์ม ของ Saithongdee และคณะ

ในปี ค.ศ. 2016 Cho และคณะ [24] ได้เสนอการขึ้นรูปฟิล์มด้วยเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิงจากโพลีเมอร์ชนิด poly(2-hydroxyethylmethacrylate-co-N-methylolacrylamide) โดยมีการใส่สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ของอนุพันธ์โรดามีน บี ดังภาพที่ 21 ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนปรอท พบว่าแผ่นฟิล์มเมื่อมีการตรวจวัดไอออนปรอทจะสามารถสังเกตเห็นการเปลี่ยนสีของแผ่นฟิล์มได้ด้วยตาเปล่า



ภาพที่ 21 การทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนปรอทด้วยแผ่นฟิล์ม ของ Cho และคณะ

ในปี ค.ศ. 2017 Chen และคณะ [25] ได้เสนอการขึ้นรูปฟิล์ม poly(HEMA-co-NMA-co-RhBN2AM) ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิงจากโพลิเมอร์ชนิด poly(2-hydroxyethylmethacrylate-co-N-methylolacrylamide) โดยมีการใส่สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ของอนุพันธ์โรดามีน ปี ดังภาพที่ 22 ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนปรอท พบว่าแผ่นฟิล์มเมื่อมีการตรวจวัดไอออนปรอท จะสามารถสังเกตเห็นการเปลี่ยนสีได้ด้วยตาเปล่า



ภาพที่ 22 การทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนโลหะด้วยแผ่นฟิล์ม ของ Chen และคณะ

จากตัวอย่างงานวิจัยข้างต้นจะเห็นได้ว่ามีผู้วิจัยหลายกลุ่มที่ให้ความสนใจและศึกษาเกี่ยวกับการพัฒนาโครงสร้างโมเลกุลของสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์มีการคายแสงในช่วงใกล้อินฟราเรด ซึ่งอาจมีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างตรงส่วนไอโอโนฟอร์ หรือส่วนฟลูออโรฟอร์เพื่อให้มีความสามารถในการคายแสงฟลูออเรสเซนต์และการตรวจวัดไอออนโลหะที่ต้องการได้ดีขึ้น นอกจากนี้ก็ยังมีบางกลุ่มได้หันไปให้ความสนใจในเรื่องของวิธีการวัด และการพัฒนาเพื่อให้สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์อยู่ในรูปแบบที่ง่ายต่อการนำไปใช้งาน เช่น การขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์ม ทั้งนี้ยังสามารถนำไปต่อยอดเป็นชุดเครื่องมือหรืออุปกรณ์ตรวจสอบไอออนโลหะในภาคสนามต่อไปได้อีกด้วย

อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าจะมีผู้วิจัยอื่น ๆ ที่ศึกษาและพัฒนาโครงสร้างโดยทำการสังเคราะห์สาร เซ็นเซอร์สำหรับตรวจจับไอออนโลหะชนิดใหม่เป็นจำนวนมาก แต่เซ็นเซอร์ที่มีฟลูออโรพอร์ชนิดไซยานินที่และสามารถตรวจวัดโลหะทองแดงได้อย่างจำเพาะเจาะจงยังมีไม่มากนัก ดังนั้นงานวิทยานิพนธ์นี้จึงสนใจการพัฒนาสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์สำหรับตรวจจับไอออนทองแดงที่มีความเข้มข้นต่ำ อย่างมีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนทองแดงมากที่สุด โดยเปรียบเทียบกับโลหะทรานซิชัน โลหะอัลคาไลน์ และโลหะอัลคาไลน์เอิร์ท และมีการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ที่ความยาวคลื่นในช่วงใกล้รังสีอินฟราเรด ซึ่งมีประโยชน์ในการนำไปศึกษากับตัวอย่างทางชีวภาพและสิ่งมีชีวิต เนื่องจากแสงในช่วงใกล้อินฟราเรด ถือว่ามีพลังงานต่ำทำให้ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์สิ่งมีชีวิตและไม่ถูกรบกวนโดยสารอื่น ๆ นอกจากนี้ยังสนใจการศึกษาความสามารถในการตรวจวัดไอออนโลหะด้วยวิธีการวิเคราะห์แบบ FIA เพราะสามารถช่วยให้ประหยัดเวลาในการวิเคราะห์หากมีตัวอย่างจำนวนมาก รวมไปถึงการพัฒนาเพื่อให้สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์อยู่ในรูปแบบที่ง่ายต่อการนำไปใช้งานด้วย



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-55
- 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 peristaltic pump: Ismatec model ISM827
- 1.8 เครื่อง Hot air oven: Binder model ED115 (E2)
- 1.9 เครื่องชั่งละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง): Denver instrument model S-234
- 1.10 เครื่องชั่งละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง): Mettler Toledo model AB204
- 1.11 เครื่อง Hotplate and stirrer: Framo model M21/1
- 1.12 Micropipette: Finnpiquette, HH10711 ขนาด 1-10 μL
- 1.13 TLC Silica gel 60 F₂₅₄ aluminium sheet, Merck
- 1.14 อุปกรณ์สำหรับเตรียมแผ่น preparative TLC: Desaga Brinkmann
- 1.15 กระดาษกรอง: Advantec ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 110 mm
- 1.16 กระดาษกรอง: Advantec ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 70 mm
- 1.17 ชุดกรองแบบลดความดัน
- 1.18 Clamp และ Clamp Holder
- 1.19 เครื่องแก้วพื้นฐาน

2. สารเคมี

- 2.1 Aluminium perchlorate nonahydrate: Sigma-Aldrich (98 %, $M_w = 487.47 \text{ g/mol}$)
- 2.2 Argon gas: Masser Specialty Gas Co., Ltd. (99.999 %)
- 2.3 n-Butanol, BDH
- 2.4 Barium perchlorate trihydrate: Strem chemical (99.9 %, $M_w = 336.24 \text{ g/mol}$)
- 2.5 Cadmium perchlorate hexahydrate: Strem chemical (99 %, $M_w = 311.30 \text{ g/mol}$)
- 2.6 Calcium perchlorate tetrahydrate: Sigma-Aldrich (99 %, $M_w = 311.04 \text{ g/mol}$)

- 2.7 Chloroform-*d* (contains 1% v/v of TMS): Sigma-Aldrich (99.8 atom %D)
- 2.8 Cobalt perchlorate hexahydrate: Sigma-Aldrich ($M_w = 365.93$ g/mol)
- 2.9 Copper perchlorate hexahydrate: Sigma-Aldrich (98 %, $M_w = 370.54$ g/mol)
- 2.10 Cyclohexanone
- 2.11 Cysteamine hydrochloride: Fluka (≥ 97.0 %, $M_w = 113.61$ g/mol)
- 2.12 De-ionized water: Department of chemistry, Silpakorn University
- 2.13 1,3-Dibromopropane: Fluka ($> 99\%$, $d = 1.989$ g/mL, $M_w = 201.89$ g/mol)
- 2.14 Dichloromethane (distillation)
- 2.15 Dichloromethane (for analysis): MERCK (99.8 %)
- 2.16 Dimethylformamide: J.T. Baker
- 2.17 Ethanol (distillation)
- 2.18 Ethanol (absolute for analysis): MERCK
- 2.19 Hydrazine hydrate: (80 %, $d = 1.03$ g/mL, $M_w = 50.06$ g/mol)
- 2.20 Hydrochloric acid: J.T. Baker (37% , $d = 1.18$ g/mL, $M_w = 36.46$ g/mol)
- 2.21 Hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid (HEPES)
- 2.22 Iron(III) chloride hexahydrate: Sigma-Aldrich ($M_w = 270.30$ g/mol)
- 2.23 Iron perchlorate hydrate: Sigma-Aldrich (98 %, $M_w = 354.20$ g/mol)
- 2.24 Lead perchlorate hydrate: Sigma-Aldrich (98 %, $M_w = 406.09$ g/mol)
- 2.25 Lithium perchlorate trihydrate: Strem chemical (99 %, $M_w = 311.30$ g/mol)
- 2.26 M-141: ได้รับความอนุเคราะห์สารจากกลุ่มวิจัยของ ดร.ธนศาสตร์ สุขศรีเมือง
- 2.27 Magnesium perchlorate hydrate: Fluka (98 %, $M_w = 223.21$ g/mol)
- 2.28 Manganese perchlorate hexahydrate: Strem chemical (99 %, $M_w = 253.84$ g/mol)
- 2.29 Mercuric perchlorate hydrate: Sigma-Aldrich (98 %, $M_w = 372.06$ g/mol)
- 2.30 Methanol (distillation)
- 2.31 Methanol (for analysis): MERCK (99.9 %)
- 2.32 Nickel perchlorate hexahydrate: Fluka (≥ 98.0 %, $M_w = 365.69$ g/mol)
- 2.33 Phosphoryl chloride
- 2.34 Potassium perchlorate: Sigma-Aldrich (99+ %, $M_w = 138.55$ g/mol)
- 2.35 Rhodamine B hydrochloride: Fluka ($M_w = 479.02$ g/mol)
- 2.36 Silica gel 60 (0.063-0.200 mm) สำหรับ column chromatography, Merck
- 2.37 Silica gel 60 F₂₅₄ containing gypsum สำหรับ preparative thin layer chromatography, Merck
- 2.38 Silver perchlorate monohydrate: Strem chemical (99 %, $M_w = 207.32$ g/mol)
- 2.39 Sodium bicarbonate: Sigma-Aldrich ($M_w = 84.01$ g/mol)
- 2.40 Sodium hydroxide: Fluka (≥ 98.0 %, $M_w = 40.00$ g/mol)

- 2.41 Sodium methoxide: Fluka ($\geq 98.0\%$, $M_w = 54.02$ g/mol)
- 2.42 Sodium perchlorate: Fluka (98 %, $M_w = 82.03$ g/mol)
- 2.43 Sodium sulfate anhydrous: Sigma-Aldrich (99.0 %)
- 2.44 1,2,3,3-Tetramethyl-3H-indolium iodide: Sigma-Aldrich
- 2.45 Toluene: BDH (99.5 %)
- 2.46 Triethylamine: Ridel-de-Haen (99 %, $d = 0.73$ g/mL, $M_w = 101.19$ g/mol)
- 2.47 Tris(hydroxymethyl)aminomethane
- 2.48 Zinc perchlorate hexahydrate: Sigma-Aldrich ($M_w = 372.36$ g/mol)



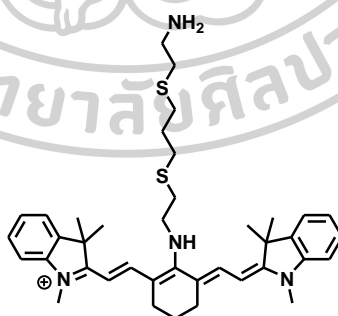
บทที่ 4

วิธีการทดลอง

ในวิทยานิพนธ์นี้ได้สังเคราะห์ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดไอออนทองแดงชนิดใหม่ 1 ชนิด ซึ่งมีการคายแสงฟลูออเรสเซนต์อยู่ในช่วงใกล้อินฟราเรด มีการศึกษาการวิเคราะห์แบบฉีดไหล (Flow Injection Analysis, FIA) ของสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ M-141 ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนเหล็ก รวมทั้งการผสมสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนปรอทแล้วนำไปขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มด้วยเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิง (electrospinning) มีวิธีการดำเนินงานดังต่อไปนี้

1. สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ Cy7C3

การสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดไอออนทองแดงชนิดใหม่ ที่มีการคายแสงฟลูออเรสเซนต์อยู่ในช่วงใกล้อินฟราเรด และมีความจำเพาะสูงต่อไอออนทองแดงนั้น ในโครงสร้างจะประกอบด้วยส่วนของไอออนโอฟอร์ที่มีอะตอมซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ 2-[3-(2-aminoethylsulfanyl)propylsulfanyl]ethanamine เชื่อมต่อกับสารฟลูออเรสเซนต์ชนิด ไซยานิน (Cyanine dye) ซึ่งทำหน้าที่เป็นฟลูออโรฟอร์ โดยโครงสร้างของสารเซ็นเซอร์ Cy7C3 แสดงได้ดังภาพที่ 23



ภาพที่ 23 โครงสร้างของเซ็นเซอร์ Cy7C3

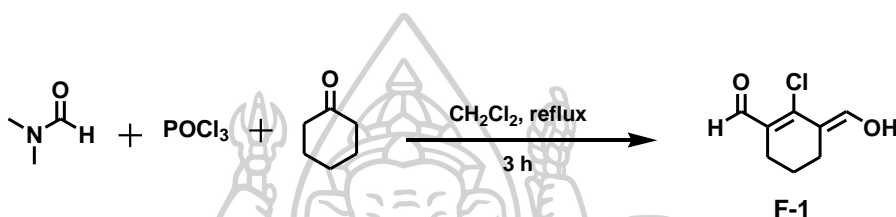
1.1 การสังเคราะห์สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ Cy7C3

ในขั้นตอนการสังเคราะห์สารเซ็นเซอร์ Cy7C3 นั้นจะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน กล่าวคือ จะต้องสังเคราะห์ส่วนของไอออนโอฟอร์ และส่วนของฟลูออโรฟอร์ขึ้นมาก่อน จากนั้นจึงนำทั้ง 2 ส่วนมาเชื่อมเข้าด้วยกันโดยการปฏิกิริยาการแทนที่แบบนิวคลีโอฟิลิก

1.1.2 การสังเคราะห์สารฟลูออโรฟอร์ชนิดไซยานีน (Cyanine dye, F-2)

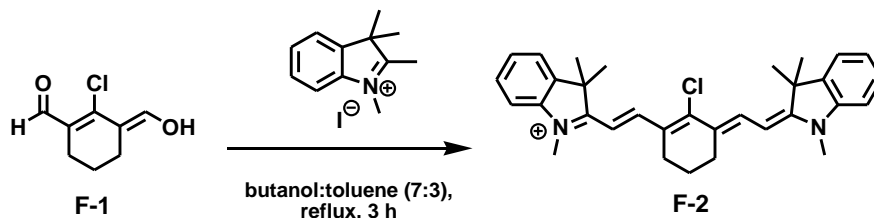
การสังเคราะห์สารฟลูออโรฟอร์ชนิดไซยานีนนั้นสามารถทำได้ภายใน 2 ขั้นตอน ในขั้นแรกนั้นจะอาศัยการเกิดปฏิกิริยาโดยใช้ Vilsmeier Haack reagents ทำปฏิกิริยากับ cyclohexanone ได้สาร F-1 ดังภาพที่ 25 และในขั้นตอนที่ 2 จะเป็นการทำปฏิกิริยา alkylation ระหว่างสาร F-1 กับ Indolium Iodide ดังภาพที่ 26 จึงเกิดเป็นสารฟลูออโรฟอร์ชนิดไซยานีน F-2 ซึ่งสามารถแสดงรายละเอียดการสังเคราะห์ที่ได้ดังต่อไปนี้

1) การสังเคราะห์สาร F-1



วิธีการสังเคราะห์สาร F-1 สามารถทำได้ตามสมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดังภาพที่ 25 โดยได้ศึกษาตามวิธีของ Reynolds และคณะ [27] เริ่มจากนำ dimethylformamide ปริมาณ 4.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดก้นกลมใบที่ 1 ขนาด 25 มิลลิลิตร จากนั้นเติมตัวทำละลาย dry dichloromethane ปริมาณ 4.0 มิลลิลิตร ภายใต้บรรยากาศอาร์กอน แล้วจึงกวนสารละลายขณะแช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที ในขณะเดียวกัน นำ phosphoryl chloride ปริมาณ 3.7 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดก้นกลมใบที่ 2 ขนาด 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติมตัวทำละลาย dry dichloromethane ปริมาณ 3.5 มิลลิลิตร ภายใต้บรรยากาศอาร์กอน แล้วจึงนำสารละลายจากขวดใบที่ 2 ใส่ลงสารละลายของขวดใบที่ 1 อย่างช้า ๆ แล้วจึงกวนปฏิกิริยาเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นให้เติม cyclohexanone ปริมาณ 1 มิลลิลิตร จากนั้นให้นำสารละลายผสมนั้นไป รีฟลักซ์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาให้ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงเทปฏิกิริยาลงบนน้ำแข็ง ปริมาณ 20 กรัม และตั้งทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะสังเกตเห็นตะกอนสีเหลืองส้มของสาร F-1 จากนั้นกรองแบบลดความดันเพื่อแยกเก็บตะกอนและทิ้งให้ตะกอนแห้งใน decicator เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำสาร F-1 ที่ได้ไปตั้งปฏิกิริยาต่อทันที (สาร F-1 นำไปใช้ในปฏิกิริยาขั้นตอนต่อไปโดยไม่ผ่านการแยกบริสุทธิ์)

2) การสังเคราะห์สาร F-2

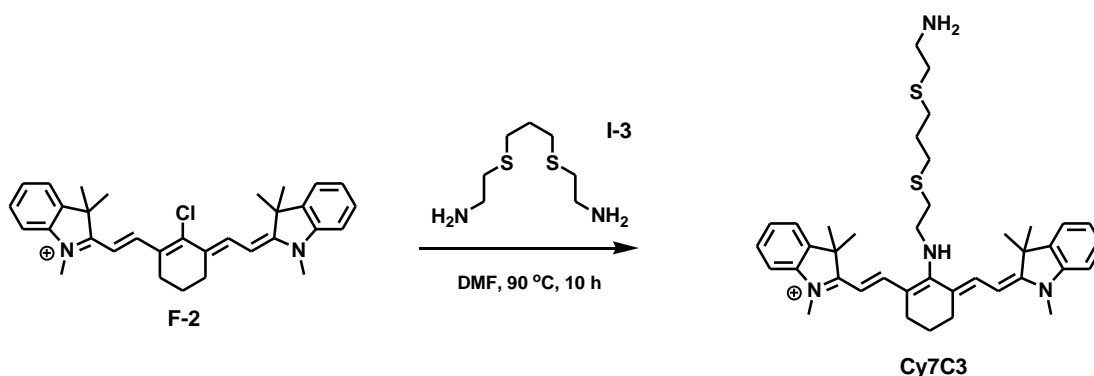


ภาพที่ 26 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารไซยานีน F-2

วิธีการสังเคราะห์สาร F-2 สามารถทำได้ตามสมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดังภาพที่ 26 โดยได้ศึกษาตามวิธีของ Narayanan และคณะ [28] เริ่มจากซึ่ง 1,2,3,3-Tetramethyl-3H-indolium iodide ปริมาณ 0.18 กรัม (0.6 มิลลิโมล) และสาร F-1 ปริมาณ 0.06 กรัม (0.3 มิลลิโมล) ใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 25 มิลลิลิตร จากนั้นเติมตัวทำละลายผสมของระหว่าง n-butanol และ toluene ในอัตราส่วน 7:3 v/v ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ภายใต้บรรยากาศอาร์กอน แล้วนำสารละลายผสมนั้นไปรีฟลักซ์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำไประเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator จะได้ของแข็งสีเหลืองอมสีเขียวเป็น crude product จากนั้นนำ crude product ที่ได้มาแยกบริสุทธิ์สารที่ได้ด้วยเทคนิค column chromatography ในที่มีด โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง CH_2Cl_2 และ MeOH ในอัตราส่วน 97:3 v/v ตามลำดับ เป็น mobile phase พบว่าจะได้สาร F-2 มีลักษณะเป็นของแข็งสีเขียวปึกแมลงทับ ปริมาณผลผลิตใน 0.13 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตได้เท่ากับ 99% โดยการแยกด้วยเทคนิคนี้ มีค่า Rf เท่ากับ 0.27

1.1.3 การสังเคราะห์สารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ Cy7C3

การสังเคราะห์สารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ Cy7C3 นั้นสามารถทำได้ภายในขั้นตอนเดียว โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยา alkylation ในสภาวะเบส ดังภาพที่ 27



ภาพที่ 27 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ Cy7C3

การสังเคราะห์เซ็นเซอร์ Cy7C3 สามารถทำได้ตามสมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดังภาพที่ 27 โดยได้ศึกษาตามวิธีของ Guo และคณะ [29] เริ่มจากซิงสาร cyanine dye F-2 ปริมาณ 0.16 กรัม (0.26 มิลลิโมล) และสารไอออโนพอร์ I-3 ปริมาณ 0.10 กรัม (0.52 มิลลิโมล) ใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 25 มิลลิลิตร จากนั้นเติมตัวทำละลาย dry dimethylformamide ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ภายใต้บรรยากาศอาร์กอน แล้วนำสารละลายผสมนั้นไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำไปประเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator จะได้ crude product มีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำเงินเข้ม จากนั้นนำ crude product ที่ได้มาแยกบริสุทธิ์สารที่ได้ด้วยเทคนิค column chromatography ในที่มีด โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง CH_2Cl_2 และ MeOH ในอัตราส่วน 95:5 v/v ตามลำดับ เป็น mobile phase พบว่าจะได้สารเซ็นเซอร์ Cy7C3 มีลักษณะเป็นของแข็งสีน้ำเงินเข้ม ปริมาณผลผลิตใน 23 มิลลิกรัม (0.036 มิลลิโมล) คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตได้เท่ากับ 13.8% โดยการแยกด้วยเทคนิคนี้ มีค่า R_f เท่ากับ 0.24

1.2 การทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจวัดไอออนทองแดง

จากการที่สามารถสังเคราะห์สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ชนิดใหม่ได้นั้น จึงมีการนำมาศึกษาคุณสมบัติในการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ และคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเล็ต โดยการตรวจสอบ excitation spectrum และ emission spectrum ของสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์แต่ละชนิดในตัวทำละลายที่เหมาะสม จากนั้นนำมาศึกษาประสิทธิภาพในการทำงานเกี่ยวกับการตรวจจับไอออนทองแดง ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปี เพื่อหาความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) ความจำเพาะเจาะจงกับไอออนทองแดง (selectivity) เปรียบเทียบกับไอออนรบกวนชนิดอื่น ๆ รวมทั้งนำไปศึกษาถึงประสิทธิภาพในการตรวจจับไอออนปรอทในภาวะที่มีไอออนรบกวนอื่น ๆ อัตราส่วนการเกิดสารเชิงซ้อนด้วยวิธีการของ Job (Job's plot) ค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออนปรอท (Association constant; K_{asso}) และนำไปศึกษาถึงโครงสร้างโมเลกุลหลังจากเกิดอันตร

กิริยากับไอออนทองแดงโดยการคำนวณ (molecular modeling) นอกจากนี้ได้นำฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นไปทดสอบในตัวอย่างจริงด้วย

1.2.1 การทดสอบความไว (sensitivity)

การทดสอบความไวของสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์นั้น สามารถศึกษาการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง UV Visible spectrophotometer และการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ด้วยเครื่องมือ fluorescence spectrophotometer โดยการปิเปตสารละลายเซ็นเซอร์ที่ถูกเตรียมขึ้นมาปริมาณ 3 มิลลิลิตร แล้ววัดสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้นก่อนการเติมไอออนก่อนเติมไอออนทองแดง จากนั้นจึงไตเตรตด้วยสารละลายไอออนทองแดงที่เตรียมขึ้น แล้ววัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้นภายหลังการเติมไอออนทองแดงในแต่ละครั้ง จะสังเกตเห็นการลดลงของความเข้มสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ นอกจากนี้ผลการทดลองที่ได้จากการทดสอบนี้ ได้นำไปใช้ในการหาค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออนปรอท (K_{asso}) จากสมการ Benesi-Hildebrand [30-32] ตามสมการที่ (1)

ตามสมการ Benesi-Hildebrand;

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

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

A_0 = ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์เริ่มต้น

A = ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์หลังเติมไอออนที่ความเข้มข้นใด ๆ

A_{max} = ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์มากที่สุด

n = จำนวนเต็มใด ๆ เช่น 1, 2 และ 3

พบว่าค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออนทองแดงคำนวณได้จากความชันของกราฟที่สร้างขึ้น ดังนี้

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

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

1) การเตรียมสารละลายฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ Cy7C3

เตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ Cy7C3 เข้มข้น 5×10^{-4} M ในตัวทำละลาย acetonitrile ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายเซ็นเซอร์ Cy7C3 โดยปิเปตสารละลายจากขวดที่มีความเข้มข้น 5×10^{-4} M มาปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ขวดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย HEPES buffer pH 7.0 ปริมาณ 3 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วย acetonitrile จะได้สารละลายเซ็นเซอร์ Cy7C3 เจือจางความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5×10^{-6} M (ได้มีการทดสอบเบื้องต้นเพื่อเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม โดยใช้ตัวทำละลายเป็น methanol ethanol และ acetonitrile พบว่าใน acetonitrile มีการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ชัดเจนที่สุด จากนั้นจึงนำไปทดสอบ %water ของสารละลาย พบว่าที่ น้ำ 30% ในตัวทำละลาย acetonitrile มีการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ชัดเจนที่สุด และสุดท้ายเป็นการหาสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ 3 ชนิด ได้แก่ PES, HEPES และ Tris buffer แทนน้ำ พบว่าในสารละลาย HEPES buffer มีการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ชัดเจนที่สุด ดังนั้นจึงได้สภาวะที่เหมาะสม คือ 30% HEPES buffer ใน acetonitrile)

2) การเตรียมสารละลายไอออนทองแดง

ในการทดสอบความไวของสารเซ็นเซอร์ Cy7C3 จะเตรียมสารละลายไอออนทองแดงเปอร์คลอเรตเข้มข้น 1.0×10^{-2} M ใน H_2O ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายไอออนทองแดง ด้วยวิธี serial dilution โดยให้ความเข้มข้นลดลงครั้งละ 10 เท่า จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0×10^{-3} M และ 1.0×10^{-4} M ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3) การทดสอบความไว

นำสารละลายเซ็นเซอร์เซ็นเซอร์ Cy7C3 ความเข้มข้น 5×10^{-6} M ที่เตรียมขึ้น ไปวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้น เมื่อมีการไตเตรตสารละลายไอออนทองแดง โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ในการทดสอบสำหรับเซ็นเซอร์เซ็นเซอร์ Cy7C3 ตามตารางที่ 2

พารามิเตอร์ที่ศึกษา	ค่าพารามิเตอร์ที่กำหนด
ปริมาตรสารเซ็นเซอร์ (mL)	3
λ_{ex} (nm)	647
λ_{em} (nm)	718
Scan speed (nm/min)	300
Slit width (nm)	5.0
ช่วงความยาวคลื่นที่ศึกษา (nm)	650-800

ตารางที่ 2 ค่าพารามิเตอร์ที่กำหนดสำหรับการทดสอบความไวของเซ็นเซอร์ Cy7C3

1.2.2 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (selectivity)

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเซ็นเซอร์ Cy7C3 ได้ศึกษาด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี โดยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนทองแดงลงในสารละลายเซ็นเซอร์ที่ถูกเตรียมขึ้น ปริมาณ 3 มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้นจากการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนรบกวนอื่น ๆ ลงในสารละลายเซ็นเซอร์ที่ถูกเตรียมขึ้น ปริมาณ 3 มิลลิลิตร จะสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่แตกต่างกันระหว่างการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนทองแดงและการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนรบกวนอื่น ๆ

1) การเตรียมสารละลายฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ Cy7C3

การเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ Cy7C3 จะเตรียมขึ้นโดยใช้ความเข้มข้นของสารเซ็นเซอร์เท่ากับการทดสอบความไวโดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5×10^{-6} M ในปริมาณ 50 มิลลิลิตร สามารถทำได้โดยปิเปตสารละลายจากขวดที่มีความเข้มข้น 5×10^{-4} M มาปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ขวดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย HEPES buffer pH 7.0 ปริมาณ 15 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วย acetonitrile จะได้สารละลายเซ็นเซอร์ Cy7C3 เจือจางความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5×10^{-6} M ปริมาณ 50 มิลลิลิตร

2) การเตรียมสารละลายไอออนทองแดงและไอออนรบกวนชนิดอื่น ๆ

ในการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเซ็นเซอร์ Cy7C3 จะเตรียมสารละลายไอออนทองแดงและไอออนโลหะเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่าง ๆ ใน H_2O ที่ความเข้มข้นเดียวกับการทดสอบความไว ซึ่งใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นและความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากัน โดยไอออนรบกวนอื่น ๆ ได้แก่ Li^+ , Na^+ , K^+ , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{3+} และ Ag^+

3) การทดสอบความจำเพาะเจาะจง

นำสารละลายเซ็นเซอร์เซ็นเซอร์ Cy7C3 ที่เตรียมขึ้นไปวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้น เมื่อมีการไตเตรตสารละลายไอออนทองแดงเทียบกับการไตเตรตสารละลายไอออนโลหะเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่าง ๆ ซึ่งในการไตเตรทไอออนรบกวนอื่น ๆ จะใช้ความเข้มข้นเท่ากับการไตเตรทไอออนทองแดง โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ในการทดสอบตามตารางที่ 2 เช่นเดียวกับการทดสอบความไว

1.2.3 การทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนทองแดงในสถานะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่น ๆ (competitive)

การทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนทองแดงในสถานะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่น ๆ ได้ศึกษาด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี โดยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ในขณะก่อนเติมและหลังเติมสารละลายไอออนทองแดงลงในสารละลายเซ็นเซอร์ Cy7C3 ที่ถูกเตรียมขึ้น ปริมาณ 3 มิลลิลิตร จนสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ชัดเจนที่ความเข้มข้นหนึ่ง จากนั้นจึงเติมสารละลายไอออนรบกวนชนิดอื่น ๆ ในปริมาณ 10 เท่าของสารละลายไอออนทองแดงที่เติมลงไป และวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ภายหลังการเติมไอออนรบกวนอื่น ๆ อีกครั้ง โดยสารละลายเซ็นเซอร์แต่ละชนิด สารละลายไอออนทองแดง และสารละลายไอออนรบกวนชนิดต่าง ๆ นั้น สามารถเตรียมได้เช่นเดียวกับการทดสอบความจำเพาะเจาะจง

1) การเตรียมสารละลายฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ Cy7C3

การเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ Cy7C3 จะเตรียมขึ้นในลักษณะเดียวกับการทดสอบความจำเพาะเจาะจง โดยใช้ความเข้มข้นของสารเซ็นเซอร์สุดท้ายเท่ากับ 5×10^{-6} M ในปริมาณ 50 มิลลิลิตร ในตัวทำละลายผสมระหว่าง HEPES buffer pH 7.0 และ acetonitrile ในอัตราส่วน 3:7 v/v

2) การเตรียมสารละลายไอออนทองแดงและไอออนรบกวนชนิดอื่น ๆ

ในการทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนทองแดงในสถานะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่น ๆ ของเซ็นเซอร์ Cy7C3 จะเตรียมสารละลายไอออนทองแดง และโดยไอออนรบกวนอื่น ๆ ชนิดเดียวกับที่ใช้ในการทดสอบความจำเพาะเจาะจง

3) การทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนทองแดงในสถานะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่น ๆ

การทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนทองแดงในสถานะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่น ๆ ของเซ็นเซอร์ Cy7C3 สามารถทำได้โดยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์และสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้น เมื่อมีการเติมสารละลายไอออนทองแดงและสารละลายไอออนโลหะเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่าง ๆ ลงในสารละลายเซ็นเซอร์ โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ในการทดสอบตามตารางที่ 2 เช่นเดียวกับการทดสอบความไว จากนั้นสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า I_F/I_0 ที่ความยาวคลื่น 718 nm ในแนวแกน y และชนิดของสารต่าง ๆ ในแนวแกน x เมื่อกำหนดให้

I_0 = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายก่อนเติมไอออน

I_F = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายหลังเติมไอออน

1.2.4 การหาอัตราส่วนการเกิดสารเชิงซ้อนวิธีการของ Job (Job's plot) ของเซ็นเซอร์ Cy7C3

การหาอัตราส่วนการเกิดสารเชิงซ้อนวิธีการของ Job [33] ได้ศึกษาด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี โดยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ในระบบที่มีเศษส่วนโมล (mole fraction) หรืออัตราส่วนระหว่างจำนวนโมลของเซ็นเซอร์แต่ละชนิดต่อจำนวนโมลไอออนทองแดงในอัตราส่วนต่าง ๆ สามารถทำได้โดยผสมสารละลายเซ็นเซอร์ Cy7C3 ในตัวทำละลายผสมระหว่าง HEPES buffer pH 7.0 และ acetonitrile ในอัตราส่วน 3:7 v/v เข้มข้น 5×10^{-6} M และสารละลายไอออนทองแดงเปอร์คลอเรตใน H_2O เข้มข้น 5×10^{-4} M ในขวดปริมาตร 10 มิลลิลิตร ด้วยอัตราส่วนดังตารางที่ 3

ขวดที่	ปริมาตรสารเซ็นเซอร์ (mL)	ปริมาตรไอออนทองแดง (μ L)	Mole fraction
1	0	1.0	0
2	0.1	0.9	0.1
3	0.2	0.8	0.2
4	0.3	0.7	0.3
5	0.4	0.6	0.4
6	0.5	0.5	0.5
7	0.6	0.4	0.6
8	0.7	0.3	0.7
9	0.8	0.2	0.8
10	0.9	0.1	0.9
11	1.0	0	1.0

ตารางที่ 3 การหาอัตราส่วนการเกิดสารเชิงซ้อนของเซ็นเซอร์ Cy7C3

โดยแต่ละขวดปรับปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยการคำนวณให้ตัวทำละลายผสมระหว่าง HEPES buffer pH 7.0 และ acetonitrile มีอัตราส่วนเป็น 3:7 v/v แล้วนำไปวัดสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ จากนั้นสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 718 nm ในแนวแกน y และเศษส่วนโมลในแนว แกน x เพื่อหาอัตราส่วนระหว่างเซ็นเซอร์ต่อไอออนทองแดงที่สามารถแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ได้มาก

1.2.5 ลักษณะการตรวจจับไอออนทองแดงเซอร์ด้วยเทคนิคเคมีเชิงคำนวณ (molecular modeling)

การศึกษาเคมีเชิงคำนวณเป็นการศึกษาลักษณะโครงสร้างของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ก่อนและหลังตรวจวัดไอออนทองแดง โดยใช้พื้นฐานความรู้ทางเคมีเชิงฟิสิกส์ ผ่านโปรแกรม Gaussian 09 [34] โดยเป็นการคำนวณผ่าน density functional theory (DFT)/ B3LYP density functional กำหนด basis sets เป็น 6-311G** สำหรับ main group element และ LanL2DZ สำหรับไอออนโลหะ ตัวทำละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์จะจำลองโดยให้ค่าความเป็นขั้วในระบบที่ศึกษา โดยใช้ integral equation formalism polarizable continuum model (IEFPCM) จากนั้นเมื่อได้ข้อมูลมาจะทำการสร้างภาพโดยใช้โปรแกรม Visual Molecular Dynamics [35]

1.2.6 การทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนทองแดงของเซ็นเซอร์ Cy3C7 ในตัวอย่างจริง

ในวิทยานิพนธ์นี้มีการนำสารเซ็นเซอร์ Cy3C7 ไปศึกษาในตัวอย่างจริง แต่เป็นการศึกษาเบื้องต้นสำหรับการนำไปพัฒนาเป็นชุดเครื่องมือต่อไป ในที่นี่ได้ศึกษาในตัวอย่างจริง 2 ชนิดคือ การทดสอบกับเซลล์สิ่งมีชีวิตและการทดสอบกับน้ำปύไฮโดรโปนิคส์

1) ความสามารถในการตรวจวัดไอออนทองแดงในเซลล์ HepG2

การทดสอบกับเซลล์สิ่งมีชีวิต เป็นการศึกษาเบื้องต้นสำหรับการพัฒนาไปใช้กับร่างกายมนุษย์ โดยตัวอย่างที่นำมาใช้ คือ เซลล์มะเร็งตับ (HepG2 cancer cells) ของมนุษย์ โดยทำการศึกษาโดยบ่มเซลล์ในสถานะที่มี และไม่มีไอออนทองแดง และบ่มเซลล์ต่อด้วยสารละลายเซ็นเซอร์ Cy3C7 จากนั้นจึงนำไปทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence microscope)

2) ความสามารถในการตรวจวัดไอออนทองแดงในน้ำปύไฮโดรโปนิคส์

การทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนทองแดงของเซ็นเซอร์ Cy3C7 ในน้ำปύไฮโดรโปนิคส์ สามารถศึกษาได้โดยการเปรียบเทียบระดับของสีของสารละลายเซ็นเซอร์ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 5×10^{-6} M ในตัวทำละลายผสมระหว่าง HEPES buffer pH 7.0 และ acetonitrile (3:7 v/v) ในขณะที่มีและไม่มีไอออนทองแดง

2. การวิเคราะห์แบบฉีดไหล (Flow Injection Analysis, FIA) ของสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ M-141

ในวิทยานิพนธ์นี้นอกจากได้มีการได้สังเคราะห์ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ที่มีการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์อยู่ในช่วงใกล้อินฟราเรดแล้ว ยังได้มีการนำสาร M-141 ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับไอออนเหล็กมาทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนเหล็กด้วยวิธีการแบบ FIA อีกด้วย

1) การเตรียมสารละลายฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ M-141

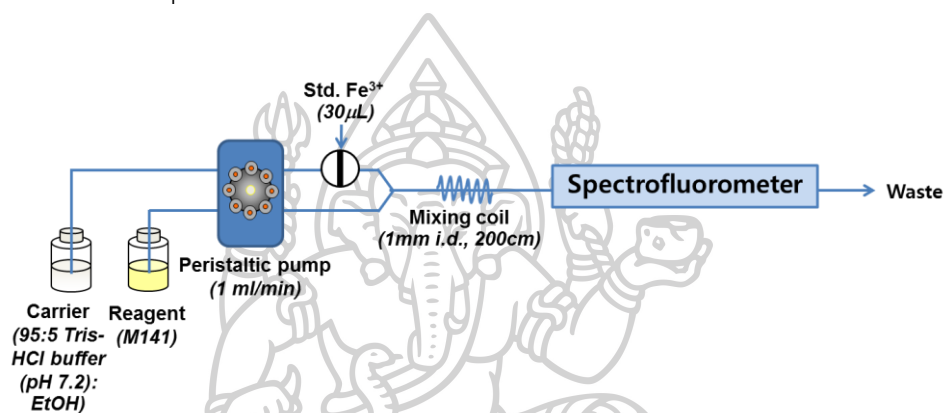
โดยการเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ M-141 เข้มข้น 5×10^{-4} M ในตัวทำละลาย ethanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางโดยปิเปตสารละลายจากขวดที่มีความเข้มข้น 5×10^{-4} M มาปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม ethanol ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยสารละลาย Tris buffer เข้มข้น 5 mM ในขวดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร จะได้สารละลายเซ็นเซอร์ เซ็นเซอร์ M-141 เจือจางความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5×10^{-6} M ในตัวทำละลายผสมระหว่าง Tris buffer pH 7.2 และ ethanol (95:5 v/v)

2) การเตรียมสารละลายไอออนเหล็ก

ในการทดสอบนี้จะเตรียมสารละลายไอออนเหล็ก(II) เกลือคลอไรด์ในน้ำ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 2 mM 4 mM 6 mM 8 mM และ 10 mM ความเข้มข้นละ 10 มิลลิลิตร

3) การทดสอบการตรวจวัดไอออนเหล็กด้วยวิธีการแบบ FIA

ในการต่อระบบ FIA สำหรับตรวจวัดไอออนเหล็กสามารถทำได้ดังภาพที่ 28 โดยใช้ตัวพาแบบสารตัวทำละลายผสมระหว่าง Tris buffer pH 7.2 และ ethanol (95:5 v/v) โดยมีปริมาตรการฉีดตัวอย่างเท่ากับ 30 μ L และอัตราการไหลที่ 2.0 mL.min⁻¹



ภาพที่ 28 การต่อระบบ FIA สำหรับตรวจวัดไอออนเหล็ก

โดยการตรวจวัดครั้งนี้จะสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อมีการฉีดไอออนเหล็กเข้าสู่ระบบ FIA โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ในการทดสอบสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ ตารางที่ 4

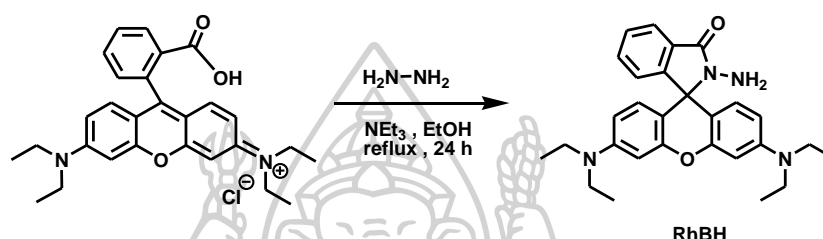
พารามิเตอร์ที่ศึกษา	ค่าพารามิเตอร์ที่กำหนด
λ_{ex} (nm)	308
λ_{em} (nm)	500

ตารางที่ 4 ค่าพารามิเตอร์ที่กำหนดสำหรับตรวจวัดไอออนเหล็กของเซ็นเซอร์ M141

3. การขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มด้วยเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิง (electrospinning)

ในวิทยานิพนธ์นี้ยังได้ให้ความสนใจต่อการพัฒนาสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ให้ง่ายและสะดวกต่อการนำไปใช้งาน โดยนำสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ชนิด RhBH ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับไอออนปรอทมาขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มด้วยเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิง โดยใช้โพลิเมอร์เป็นตัวจับเอาไว้

3.1 การสังเคราะห์สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ RhBH



ภาพที่ 29 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์ RhBH

การสังเคราะห์สาร RhBH สามารถทำตามวิธีของ Kraithong และคณะ [36] ดังภาพที่ 29 โดยชั่งสารโรดามีน บี ไฮโดรคลอไรด์ปริมาณ 0.20 กรัม (0.42 มิลลิโมล) ใส่ขวดก้นกลมขนาด 25 มิลลิลิตร จากนั้นละลายด้วย dry ethanol ปริมาณ 10.0 มิลลิลิตร และเติม dry NEt₃ ซึ่งทำหน้าที่เป็นเบส ปริมาณ 0.20 มิลลิลิตร (3.4 มิลลิโมล) กวนปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศอาร์กอนที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 30 นาที แล้วเติมไฮดราซีนปริมาณ 0.13 มิลลิลิตร (2.1 มิลลิโมล) จากนั้นรีฟลักซ์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาที่ให้เขียนจนถึงอุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำไปกรองและกำจัด ethanol ออกด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้นเติม CH₂Cl₂ ปริมาณ 30 มิลลิลิตร ลงในขวดที่นำไปใส่เครื่อง rotary evaporator ข้างต้น แล้วนำไปสกัดด้วยน้ำ DI ปริมาณ 30 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง โดยเลือกเก็บสารละลายชั้น CH₂Cl₂ มากำจัดน้ำออกโดยเติม 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 RhBH มีลักษณะเป็นของแข็งสีชมพูอ่อนปริมาณ 138 มิลลิกรัม (0.303 มิลลิโมล) คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเท่ากับ 72% โดยมีค่า R_f เท่ากับ 0.44

3.2 การขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มด้วยเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิง (electrospinning)

ในการขึ้นรูปฟิล์มด้วยเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิงในที่นี้ จะใช้โพลีเมอร์ชนิด Poly(methyl methacrylate) ละลายผสมกับโดยมีการใส่สารเซ็นเซอร์ RhBH จากนั้นจึงนำผ่านกระแสไฟฟ้ากำลังสูง เพื่อเกิดเป็นเส้นใยโพลีเมอร์ที่รวมตัวกันมากพอจนเป็นแผ่นฟิล์ม

3.3 การทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนปรอทของแผ่นฟิล์ม

การทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนปรอทของแผ่นฟิล์ม สามารถศึกษาได้โดยการสังเกตด้วยตาเปล่า จากการเปรียบเทียบระดับความเข้มของสีของแผ่นฟิล์มขนาด 1 ตารางเซนติเมตร เมื่ออยู่ในสถานะที่มีความเข้มข้นของไอออนปรอทเกลือเปอร์คลอเรตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยในภาวะที่ไม่มีไอออนปรอทสารเซ็นเซอร์ RhBH จะไม่มีสีแต่เมื่อมีการตรึงไอออนปรอท สารเซ็นเซอร์ RhBH จะเปลี่ยนเป็นสีชมพู



บทที่ 5

ผลการดำเนินงานวิจัย

ในวิทยานิพนธ์นี้ได้สังเคราะห์สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดไอออนทองแดง และมีการคายแสงฟลูออเรสเซนต์อยู่ในช่วงใกล้อินฟราเรด มีการศึกษาการวิเคราะห์แบบฉีดไหล (Flow Injection Analysis, FIA) ของสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ M-141 ที่มีความจำเพาะเจาะจง ต่อไอออนเหล็ก นอกจากนี้มีการศึกษาขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มด้วยเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิง (electrospinning) จากการผสมสารเซ็นเซอร์ที่สำหรับตรวจวัดไอออนปรอทพบว่าได้ผลการทดลอง ดังต่อไปนี้

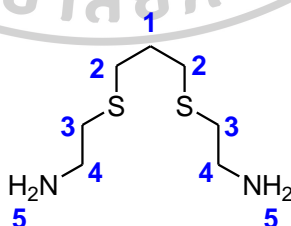
1. สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ Cy7C3

จากการศึกษาเกี่ยวกับสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ชนิด Cy7C3 สำหรับตรวจวัดไอออนทองแดงและมีการคายแสงฟลูออเรสเซนต์อยู่ในช่วงใกล้อินฟราเรดพบว่าได้ผลการทดลองดังนี้

1.1 การสังเคราะห์สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ Cy7C3

ในขั้นตอนการสังเคราะห์สารเซ็นเซอร์ Cy7C3 นั้นจะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน กล่าวคือ จะต้องสังเคราะห์ส่วนของไอโอโนฟอร์ และส่วนของฟลูออโรฟอร์ขึ้นมาก่อน จากนั้นจึงนำทั้ง 2 ส่วนมาเชื่อมเข้าด้วยกันโดยการปฏิกิริยาการแทนที่แบบนิวคลีโอฟิลิก

1.1.1 การยืนยันโครงสร้างไอโอโนฟอร์ชนิด 2-[3-(2-aminoethylsulfanyl)propylsulfanyl]ethanamine (I-3)

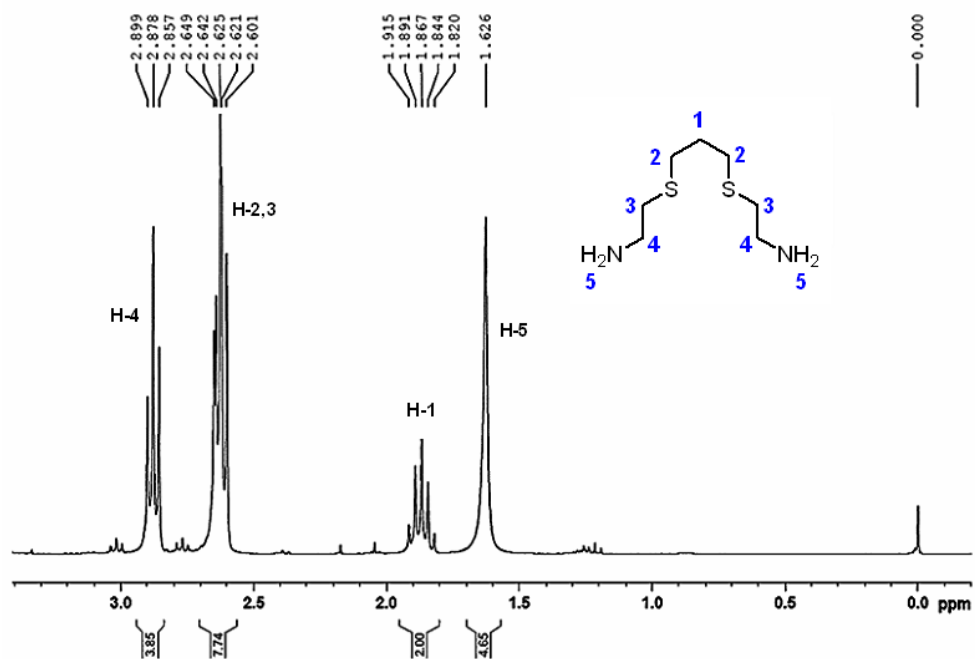


ภาพที่ 30 โครงสร้างของ 2-[3-(2-aminoethylsulfanyl)propylsulfanyl]ethanamine (I-3)

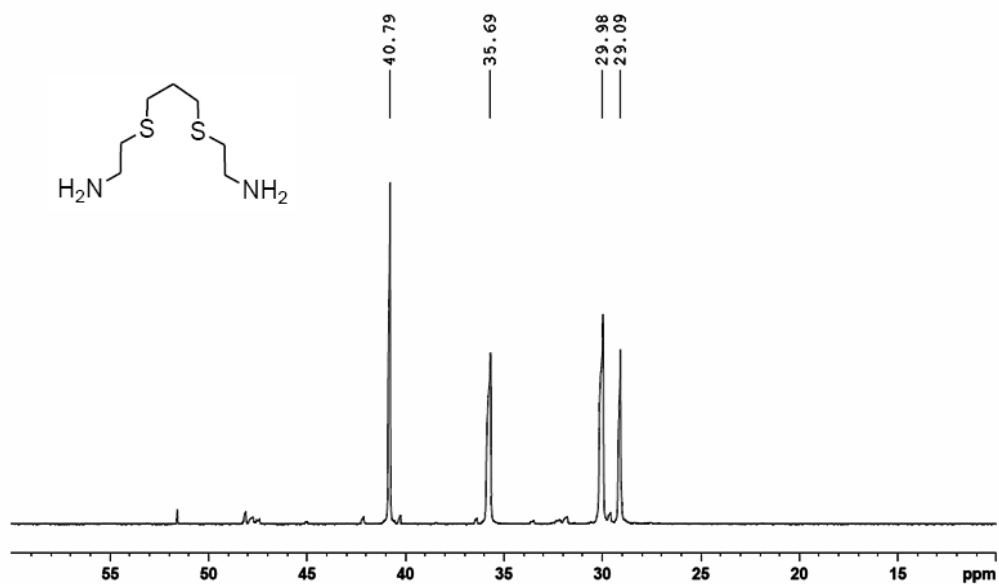
จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของ 2-[3-(2-aminoethylsulfanyl)propylsulfanyl]ethanamine (I-3) ดังภาพที่ 30 โดยวิธีทาง NMR สเปกโทรสโกปีสามารถยืนยันโครงสร้างได้ดังนี้

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.63 (br s, 2NH_2), 1.87 (quintet, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.60–2.65 (m, 8H), 2.88 (t, $J = 6.3$ Hz, 4H) ppm (ภาพที่ 31); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ

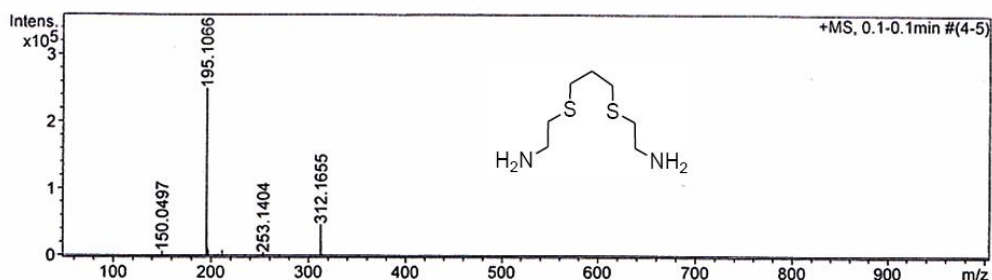
29.1 (CH₂), 30.0 (2CH₂), 35.7 (2CH₂), 40.8 (2CH₂) ppm (ภาพที่ 32); HR-ESI MS จากการคำนวณ C₇H₁₉N₂S₂ (M+H)⁺ 195.0990 m/z, จากการทดสอบ 195.1066 m/z (ภาพที่ 33).



ภาพที่ 31 ¹H NMR ของ 2-[3-(2-aminoethylsulfanyl)propylsulfanyl]ethanamine (I-3)



ภาพที่ 32 ¹³C NMR ของ 2-[3-(2-aminoethylsulfanyl)propylsulfanyl]ethanamine (I-3)

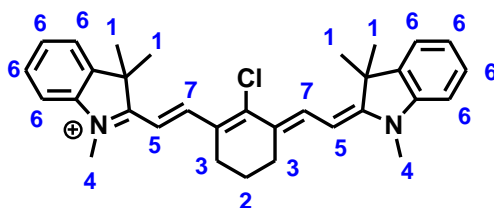


ภาพที่ 33 HR-ESI MS ของ 2-[3-(2-aminoethylsulfanyl)propylsulfanyl]ethanamine (I-3)

เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างสาร I-3 (ภาพที่ 30) และ ¹H NMR สเปกตรัม (ภาพที่ 31) แสดงให้เห็นสัญญาณของโปรตอน 5 กลุ่ม ดังนี้ สัญญาณชุดแรกมีค่า chemical shift (δ) 1.63 ppm เป็น singlet มีลักษณะ board เกิดจากโปรตอนของหมู่เอมีน (-NH₂; H-5) ถัดมาที่ δ 1.87 ppm เกิดจากโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่ง 1 (H-1) มีลักษณะเป็น quintet มีค่า coupling constant (J) เท่ากับ 6.9 Hz เนื่องจากเกิด coupling กับสี่โปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่ง 2 (H-2) ถัดมาสัญญาณของโปรตอนตำแหน่ง 2 (H-2) และโปรตอนตำแหน่ง 3 (H-3) ปรากฏใกล้กันมาก จึงเห็นเป็น multiplet ที่ δ 2.60–2.65 ppm และสุดท้ายสัญญาณของโปรตอนตำแหน่ง 4 (H-4) มีลักษณะเป็น triplet ที่ δ 2.88 ppm มีค่า coupling constant (J) เท่ากับ 6.3 Hz เนื่องจากเกิด coupling กับสองโปรตอนของ H-3 โดยปรากฏบริเวณสนามแม่เหล็กต่ำ (down field) กว่าโปรตอนชนิดอื่นๆ เนื่องจากอิทธิพลของหมู่เอมีนที่อยู่บนคาร์บอนเดียวกัน พบว่าเพียงแค่ ¹H NMR สเปกตรัม สามารถที่จะยืนยันโครงสร้างสาร I-3 ได้ แต่เพื่อความแน่นอนมากยิ่งขึ้น สามารถยืนยันผลจากการตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลร่วมด้วย โดยพิจารณาจาก HR-ESI MS (ภาพที่ 33) ในสูตรโมเลกุลเป็น C₇H₁₉N₂S₂ (M+H)⁺ ได้เท่ากับ 195.1066 m/z มีค่าใกล้เคียงกับที่ได้จากการคำนวณมาก โดยมีค่าเท่ากับ 195.0990 m/z จึงยืนยันได้ว่าได้สาร I-3 เกิดขึ้นจริงจากการสังเคราะห์

1.1.2 การยืนยันโครงสร้างสารฟลูออโรฟอร์ชนิดไซยานีน (Cyanine dye, F-2)

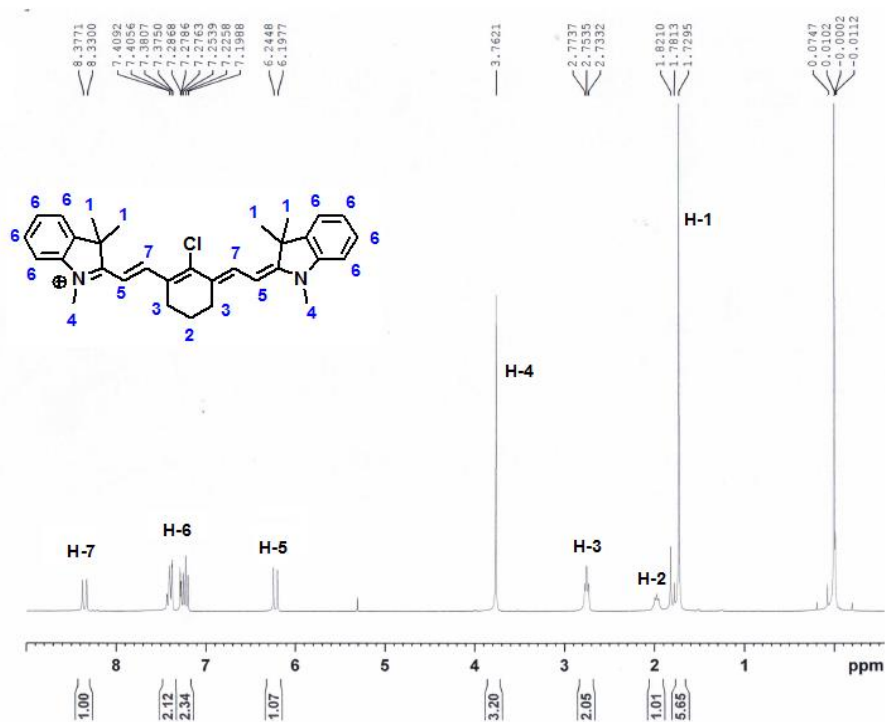
จากการสังเคราะห์สารฟลูออโรฟอร์ชนิดไซยานีน F-2 นั้น จะต้อง ทำภายใน 2 ขั้นตอน แต่เมื่อทำการทดลองแล้วพบว่า สาร F-1 ที่สังเคราะห์ได้นั้น มีความเสถียรน้อยมาก เมื่อนำไปทำการยืนยันโครงสร้างของสารด้วยเทคนิค NMR ก็พบว่าสารนั้นได้สลายตัวในเวลาอันรวดเร็ว



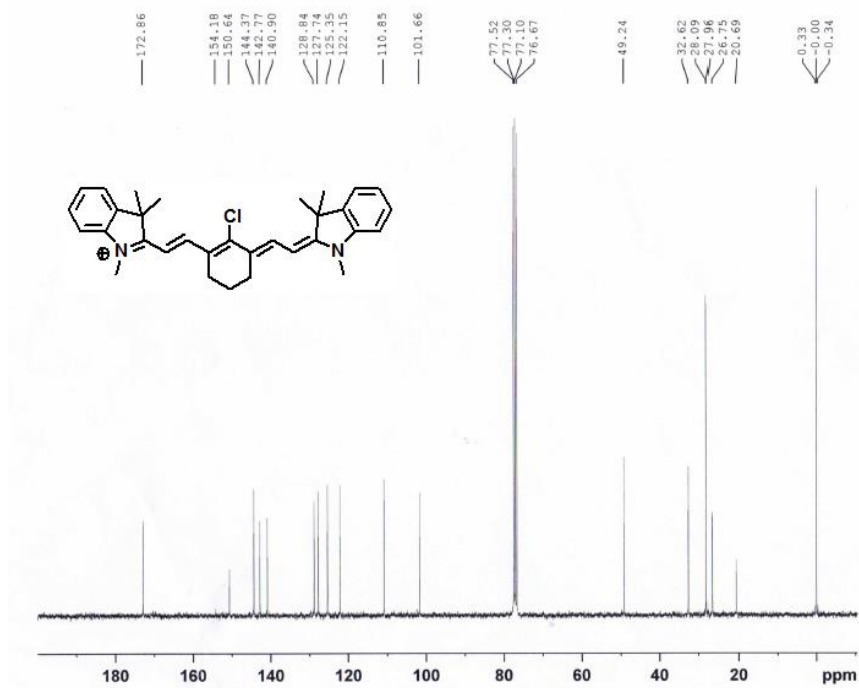
ภาพที่ 34 โครงสร้างทางเคมีสารไซยานีน F-2

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงไม่ได้มีการยืนยันโครงสร้างของสาร F-1 แต่ได้นำไปทดลองทำปฏิกิริยาต่อทันทีในขั้นตอนถัดไปที่พบว่าเกิดสารไซยานีน F-2 ที่มีโครงสร้างดังภาพที่ 34 และสามารถยืนยันโครงสร้างด้วยวิธีทาง NMR สเปกโทรสโกปีได้ดังนี้

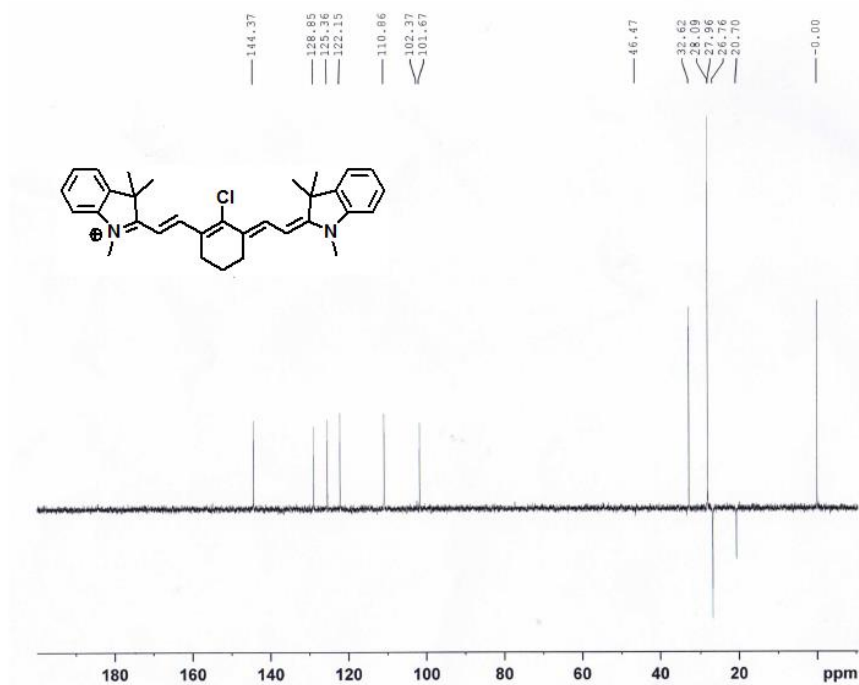
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.73 (s, 12H), 1.90 (m, 2H), 2.75 (t, $J = 6.0$ Hz, 4H), 3.76 (s, 6H), 6.22 (d, $J = 15$ Hz, 2H), 7.20-7.41(m, 8H), 8.35 (d, $J = 12$ Hz, 2H) ppm (ภาพที่ 35); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 20.7 (2CH_2), 26.8 (CH_2), 28.0 (2CH_3), 28.1 (2CH_3), 32.6 (2CH_3), 49.2 (2C), 101.7 (2CH), 110.9 (2CH), 122.2 (2CH), 125.4 (2CH), 127.7 (C), 128.8 (2CH), 140.1 (2C), 142.8(2C), 144.4 (2CH), 150.6 (2C), 172.9 (2C) ppm (ภาพที่ 36); HR-ESI MS จากการคำนวณ $\text{C}_{32}\text{H}_{36}\text{ClN}_2^+$ (M) 483.2562 m/z, จากการทดสอบ 483.2562 m/z (ภาพที่ 38).



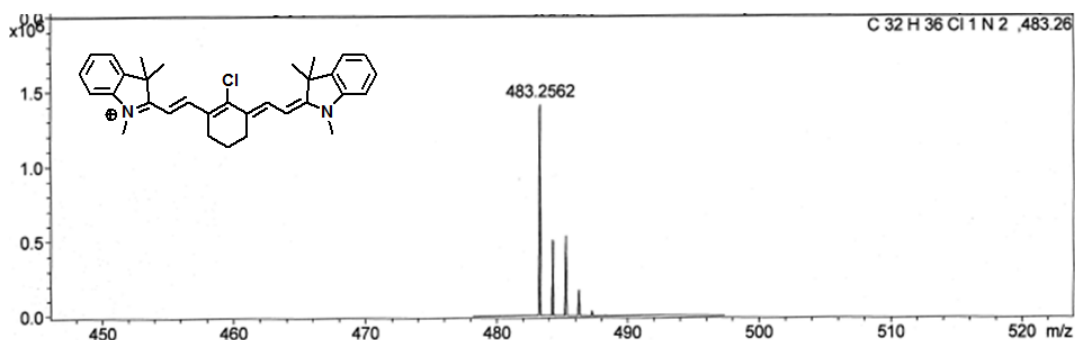
ภาพที่ 35 ^1H NMR สเปกตรัมของสารไซยานีน F-2



ภาพที่ 36 ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารไซยานิน F-2

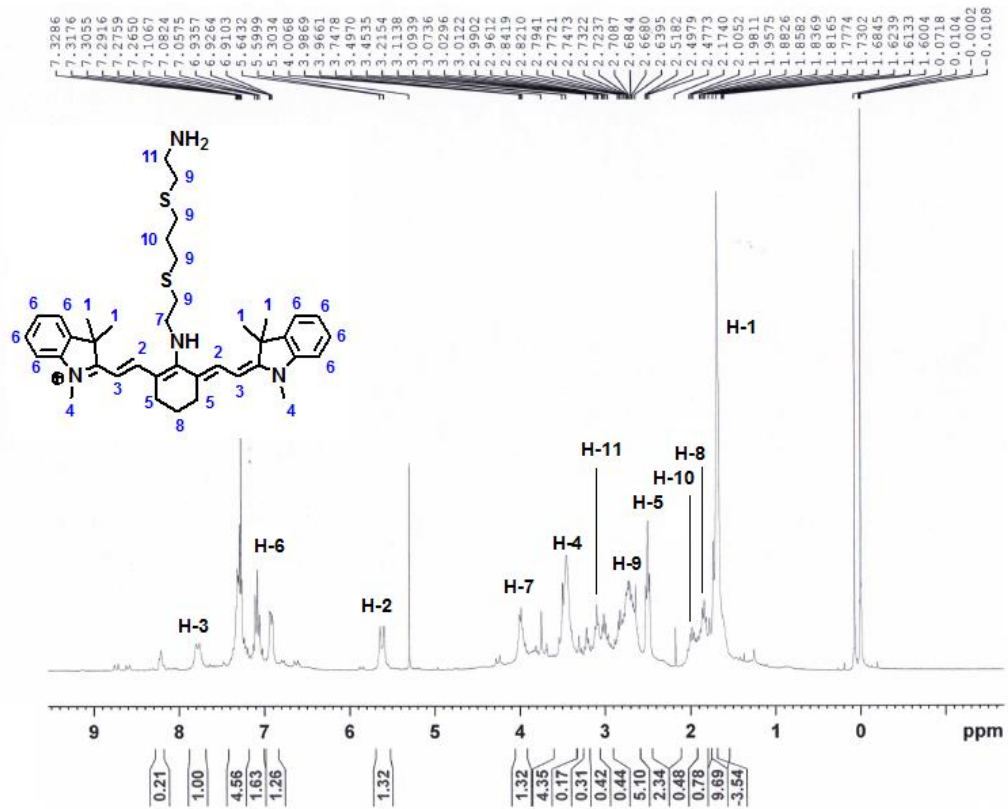


ภาพที่ 37 ^{13}C DEPT135 NMR สเปกตรัมของสารไซยานิน F-2

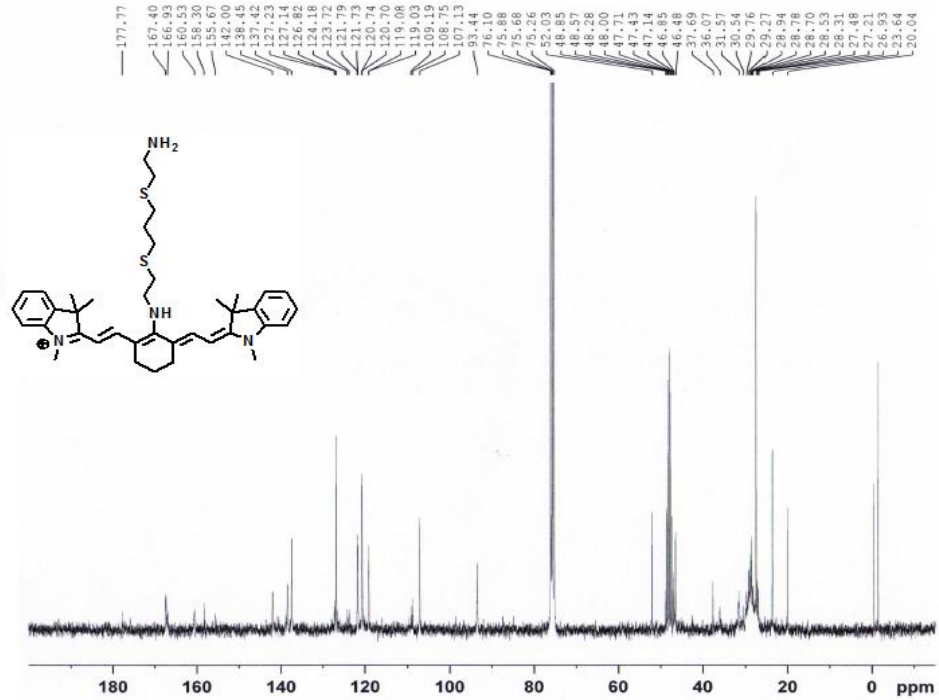


ภาพที่ 38 HR-ESI MS สเปกตรัมของสารไซยานีน F-2

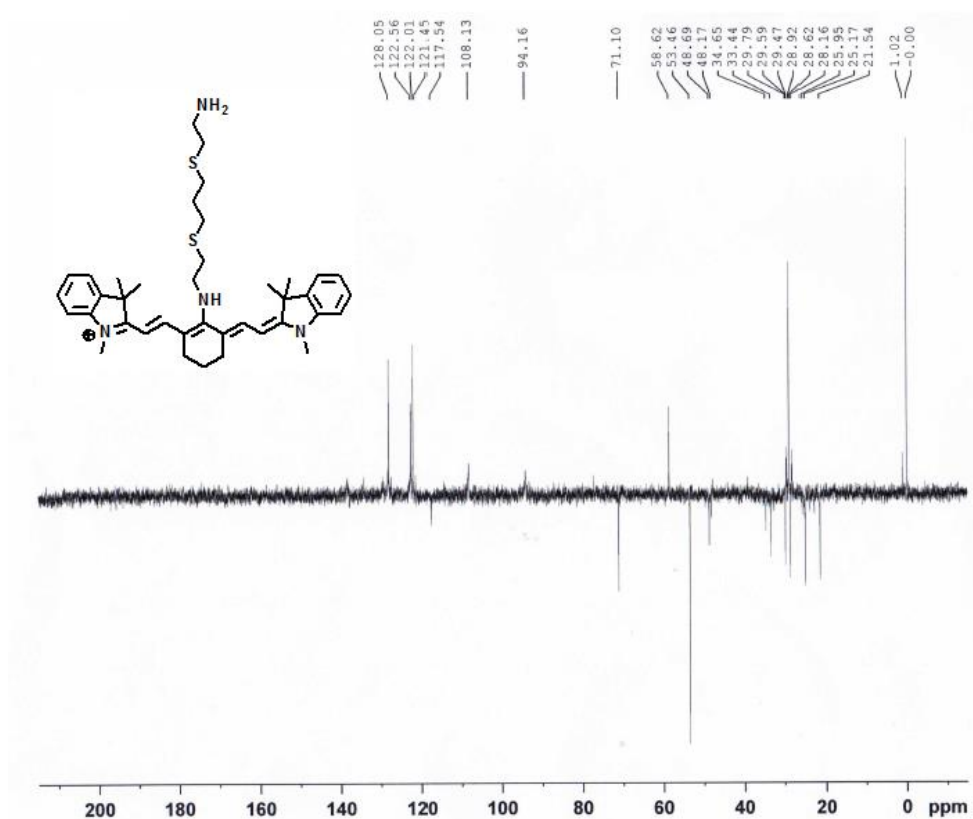
เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างสารไซยานีน F-2 (ภาพที่ 34) และ ^1H NMR สเปกตรัม (ภาพที่ 35) แสดงให้เห็นสัญญาณของโปรตอน 7 กลุ่ม ที่แตกต่างกัน โดยสัญญาณตำแหน่งแรกปรากฏบริเวณ chemical shift (δ) ต่ำสุดคือ 1.73 ppm มีลักษณะเป็น singlet เมื่ออินทิเกรตได้ค่าเท่ากับ 12 โปรตอน นั้นแสดงว่าเกิดจากโปรตอนตำแหน่ง 1 (H-1) เนื่องจากห่างไกลจากอิทธิพลของแรงดึงอิเล็กตรอนมากที่สุด สัญญาณถัดมาปรากฏที่ δ 1.90 ppm มีลักษณะเป็น multiplet เกิดจากโปรตอนตำแหน่ง 2 (H-2) ที่มีการเกิด coupling กับโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 (H-3) สัญญาณที่สามมีลักษณะเป็น triplet ที่ δ 2.75 ppm มีค่า J เท่ากับ 6.6 Hz เกิดจากการ coupling กับโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 (H-2) สัญญาณถัดมามีค่า δ ปรากฏที่ 3.76 ppm เป็น singlet มีลักษณะเกิดจากโปรตอนตำแหน่งที่ 4 (H-4) สัญญาณถัดมาปรากฏที่ δ 6.22 ppm มีลักษณะเป็น doublet มีค่า J เท่ากับ 15 Hz เกิดจากโปรตอนตำแหน่ง 5 (H-5) coupling กับโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่งที่ 7 (H-7) ส่วน δ ปรากฏที่ช่วง 7.20-7.41 ppm เกิดจากโปรตอนตำแหน่ง 6 (H-6) ซึ่งเป็นโปรตอนของกลุ่ม aromatic ring จึงเห็นการ split ของสัญญาณในลักษณะเป็น multiplet ส่วนโปรตอนตำแหน่ง 7 (H-7) มีค่า δ ปรากฏที่ 8.35 ppm ซึ่งพบลักษณะสัญญาณเป็น doublet มีค่า J เท่ากับ 12 Hz โดยเกิดจากการ coupling กับโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 (H-5) และเพื่อความแน่นอนมากยิ่งขึ้น สามารถยืนยันผลจากการตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลร่วมด้วย โดยพิจารณาจาก HR-ESI MS (ภาพที่ 38) ในสูตรโมเลกุลเป็น $\text{C}_{32}\text{H}_{36}\text{ClN}_2^+$ (M) ได้เท่ากับ 483.2562 m/z ซึ่งมีค่าเท่ากับที่ได้จากการคำนวณมาก โดยมีค่าเท่ากับ 483.2562 m/z จึงยืนยันได้ว่าได้สาร F-2 เกิดขึ้นจริงจากการสังเคราะห์



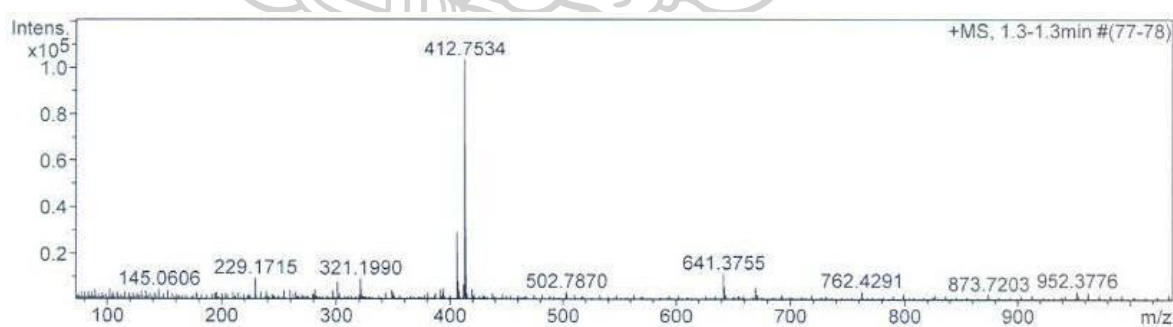
ภาพที่ 40 ¹H NMR สเปกตรัมของสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ Cy7C3



ภาพที่ 41 ¹³C NMR สเปกตรัมของสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ Cy7C3



ภาพที่ 42 ^{13}C DEPT135 NMR สเปกตรัมของสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ Cy7C3



ภาพที่ 43 HR-ESI MS สเปกตรัมของสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ Cy7C3

เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างสารเซ็นเซอร์ Cy7C3 (ภาพที่39) และ ^1H NMR สเปกตรัม (ภาพที่ 40) แสดงให้เห็นสัญญาณของโปรตอน 11 กลุ่ม ที่แตกต่างกัน โดยสัญญาณตำแหน่งแรกปรากฏบริเวณ chemical shift (δ) ต่ำสุดคือ 1.62 ppm มีลักษณะเป็น singlet เมื่ออินทิเกรตได้ค่าเท่ากับ 12 โปรตอน นั้นแสดงว่าเกิดจากโปรตอนตำแหน่ง 1 (H-1) เนื่องจากห่างไกลจากอิทธิพลของแรงดึงอิเล็กตรอนมากที่สุด สัญญาณถัดมาปรากฏที่ δ 1.85 ppm มีลักษณะเป็น multiplet เกิดจากโปรตอนตำแหน่ง 8 (H-8) ที่มีการเกิด coupling กับโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 (H-5)

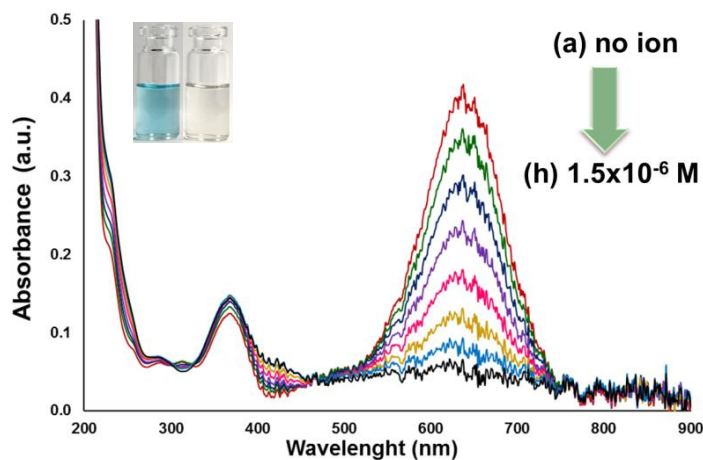
สัญญาณที่สามมีลักษณะเป็น multiplet ที่ δ 1.98 ppm เป็นสัญญาณโปรตอนตำแหน่งที่ 10 (H-10) เกิดจากการ coupling กับโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่งที่ 9 (H-9) สัญญาณถัดมามีค่า δ ปรากฏที่ 2.50 ppm เป็นสัญญาณโปรตอนตำแหน่งที่ 5 (H-) มีลักษณะเป็น triplet มีค่า J เท่ากับ 6.0 Hz เกิดจากการ coupling กับโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่งที่ 8 (H-8) สัญญาณถัดมามีค่า δ ปรากฏที่ 2.82 ppm มีลักษณะ multiplet เกิดจากโปรตอนตำแหน่งที่ 9 (H-9) สัญญาณถัดมามีค่า δ ปรากฏที่ 3.21 ppm เป็นมีลักษณะ multiplet เกิดจากโปรตอนตำแหน่งที่ 11 (H-11) ที่อยู่ใกล้กับหมู่เอมีน สัญญาณถัดมาปรากฏที่ δ 3.45 ppm มีลักษณะเป็น singlet ของโปรตอนตำแหน่งที่ 4 (H-4) ที่อยู่ใกล้กับหมู่เอมีน สัญญาณถัดมามีค่า δ ปรากฏที่ 3.98 ppm มีลักษณะแบบ multiplet เกิดจากโปรตอนตำแหน่งที่ 7 (H-7) ถัดมามีค่า δ ปรากฏที่ 5.60 ppm มีลักษณะเป็น doublet มีค่า J เท่ากับ 15 Hz เกิดจากโปรตอนตำแหน่ง 2 (H-2) coupling กับโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 (H-3) ในส่วนของสัญญาณตำแหน่งถัดมา δ ปรากฏที่ 6.91 เกิดหมู่เอมีนของสายโซ่ไอออโนฟอรัตำแหน่งถัดมา δ ปรากฏที่ช่วง 7.10-7.32 ppm เกิดจากโปรตอนตำแหน่ง 6 (H-6) ซึ่งเป็นโปรตอนของกลุ่ม aromatic ring จึงเห็นการ split ของสัญญาณในลักษณะเป็น multiplet ส่วนโปรตอนตำแหน่ง 3 (H-3) มีค่า δ ปรากฏที่ 7.80 ppm ซึ่งพบลักษณะสัญญาณเป็น doublet มีค่า J เท่ากับ 12 Hz โดยเกิดจากการ coupling กับโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 (H-2) และเพื่อความแน่นอนมากยิ่งขึ้น สามารถยืนยันผลจากการตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลรวมด้วย โดยพิจารณาจาก HR-ESI MS (ภาพที่ 43) ในสูตรโมเลกุลเป็น $C_{39}H_{53}N_4S_2^+$ (M) 6 ได้เท่ากับ 641.3755 m/z ซึ่งมีค่าใกล้เคียงที่ได้จากการคำนวณมากโดยมีค่าเท่ากับ 41.3706 m/z จึงยืนยันได้ว่าได้สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ Cy7C3 เกิดขึ้นจริงจากการสังเคราะห์

1.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจวัดไอออนทองแดง

นำได้สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ Cy7C3 แล้วก็ได้มีการนำมาศึกษาถึงประสิทธิภาพในการตรวจวัดไอออนทองแดง เช่น ความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) ความจำเพาะเจาะจงกับไอออนทองแดง (selectivity) เมื่อเปรียบเทียบกับไอออนรบกวนชนิดอื่น ๆ รวมทั้งนำไปศึกษาถึงประสิทธิภาพในการตรวจจับไอออนปรอทในภาวะที่มีไอออนรบกวนอื่น ๆ อัตราส่วนการเกิดสารเชิงซ้อน เป็นต้น ซึ่งสามารถแสดงผลการทดสอบได้ดังต่อไปนี้

1.2.1 ผลการทดสอบความไว (sensitivity)

การทดสอบความไว สามารถศึกษาได้จากความสามารถในการดูดกลืนแสง (absorption) และการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ ทำได้โดยเตรียมสารละลายฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ Cy7C3 ในระบบตัวทำละลายผสมระหว่าง HEPES buffer pH 7.0 และ acetonitrile ในอัตราส่วน 3:7 v/v และนำติดตามสัญญาณการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-visible spectrometer: HP-8453 เมื่อความเข้มข้นของเซ็นเซอร์ Cy7C3 เท่ากับ 10 μ M และใช้ไอออนทองแดงในรูปของเกลือเปอร์คลอเรต ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 44



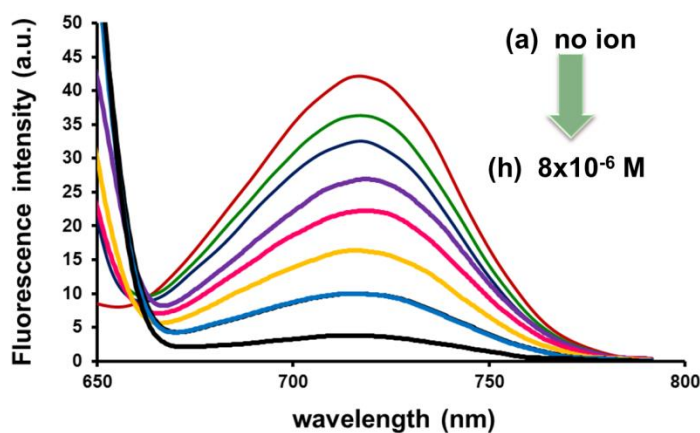
ภาพที่ 44 การดูดกลืนแสง UV-Vis ของเซ็นเซอร์ Cy7C3 (10 μM) ในสารละลาย HEPES buffer:CH₃CN (3:7 v/v) ก่อนและหลังเติมไอออนทองแดงที่ความเข้มข้นต่าง ๆ a: 0 μM , b: 0.50 μM , c: 0.67 μM , d: 0.83 μM , e: 1.00 μM , f: 1.17 μM , g: 1.33 μM and h: 1.50 μM

จากผลการทดสอบการดูดกลืนแสง พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น (λ_{max}) ที่ความยาวคลื่น 647 นาโนเมตร ในระบบตัวทำละลายผสมระหว่าง HEPES buffer pH 7.0 และ acetonitrile ในอัตราส่วน 3:7 v/v ภายหลังจากการเติมไอออนทองแดงเปอร์คลอเรตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ส่งผลให้การดูดกลืนแสงของเซ็นเซอร์ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงความเข้มของการดูดกลืนแสงที่เกิดขึ้นนี้ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีจากสารละลายใสสีฟ้าเป็นสารละลายใสไม่มีสีอย่างชัดเจน โดยสามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า ในขณะที่ไอออนรบกวนชนิดอื่น ๆ ได้แก่ Li⁺, Na⁺, K⁺, Ba²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Al³⁺, Ni²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Hg²⁺, Pb²⁺, Fe³⁺ และ Ag⁺ ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสง UV-Vis และการเปลี่ยนสีดังภาพที่ 45



ภาพที่ 45 การเปลี่ยนแปลงสีของเซ็นเซอร์ Cy7C3 ในสารละลาย HEPES buffer:CH₃CN (3:7 v/v) ก่อนและหลังเติมไอออนทองแดงและไอออนรบกวนอื่น ๆ

ส่วนการสำหรับติดตามสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ ด้วยเครื่อง Fluorescence spectrometer: Perkin Elmer Luminescence spectrometer model LS-55 โดยศึกษาในสารละลายผสมระหว่าง HEPES buffer pH 7.0 และ acetonitrile ในอัตราส่วน 3:7 v/v โดยติดตามสเปกตรัมของการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence emission spectra) เมื่อ λ_{ex} เท่ากับ 647 นาโนเมตร ความเข้มข้นของเซ็นเซอร์ Cy7C3 เท่ากับ 5 μM และใช้ไอออนทองแดง ในรูปของเกลือเปอร์คลอเรต ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 46



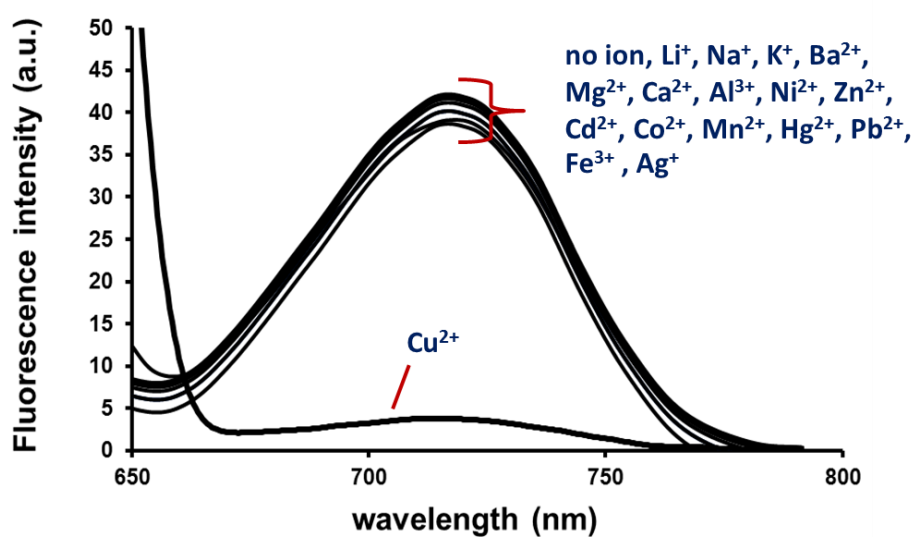
ภาพที่ 46 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{ex} = 647 \text{ nm}$ และ $\lambda_{em} = 718 \text{ nm}$) ของเซ็นเซอร์ Cy7C3 (5 μM) ในสารละลาย HEPES buffer:CH₃CN (3:7 v/v) ก่อนและหลังเติมไอออนทองแดงที่ความเข้มข้นต่าง ๆ a: 0 μM , b: 1.33 μM , c: 2.00 μM , d: 2.67 μM , e: 3.33 μM , f: 4.67 μM , g: 6.00 μM and h: 8.00 μM

จากผลการทดลองการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์พบว่า การตรวจวัดไอออนทองแดงของเซ็นเซอร์ Cy7C3 จะแสดงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์แบบระบบ ON - OFF ซึ่งคาดว่าเกิดจากกลไกกระบวนการ PET โดยไอออนทองแดง พบว่าในสภาวะที่ไม่มีไอออนทองแดงสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์จะคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้มาก แต่ในทางตรงข้ามภายหลังการเติมไอออนทองแดงเปอร์คลอเรตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เซ็นเซอร์จะแสดงสัญญาณคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ลดลงในช่วงความยาวคลื่นใกล้อินฟราเรดที่ 650-800 นาโนเมตร โดยความยาวคลื่นที่มีการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงสุด (λ_{max}) เท่ากับ 718 นาโนเมตร ซึ่งการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์จะลดลงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณไอออนทองแดงที่เพิ่มขึ้นในสารละลาย และเมื่อคำนวณค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออนปรอท (K_{ass0}) โดยใช้การเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อมีการเติมไอออนของปรอทในความเข้มข้นต่าง ๆ จากสมการ Benesi-Hildebrand ได้เท่ากับ $1.24 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$

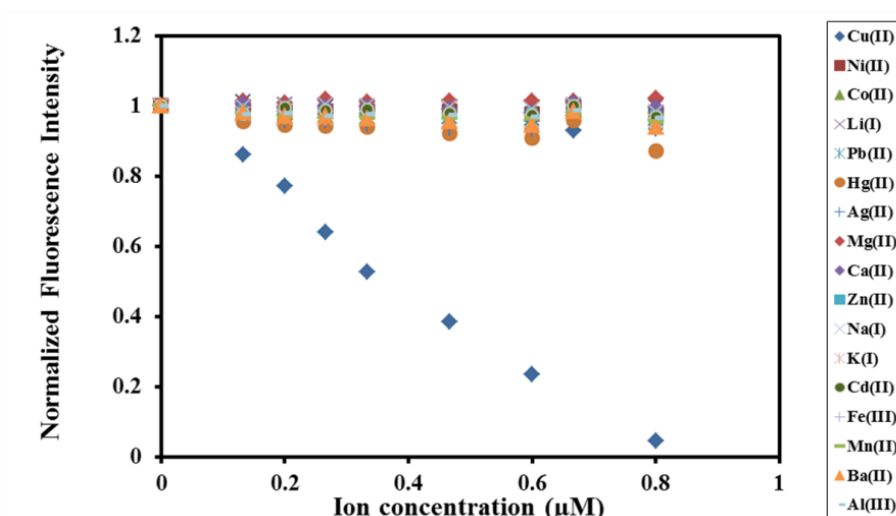
ซึ่งคาดว่าแรงกระทำแบบ 1:1 ระหว่างเซ็นเซอร์ Cy7C3 กับไอออนทองแดง และพบว่าในระบบนี้มีค่าความเข้มข้นต่ำสุด (detection limit) ในการตรวจวัดไอออนทองแดง เท่ากับ 9 ppb

1.2.2 ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจง (selectivity)

การทดสอบการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ในระบบตัวทำละลายผสมระหว่าง HEPES buffer pH 7.0 และ acetonitrile ในอัตราส่วน 3:7 v/v ในสถานะที่มีไอออนทองแดงเปรียบเทียบกับในสถานะที่มีไอออนรบกวนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ได้แก่ Li^+ , Na^+ , K^+ , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{3+} และ Ag^+ ดังภาพที่ 47 และ 48



ภาพที่ 47 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของ Cy7C3 (5 μM) ในสถานะที่มีไอออนโลหะของเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่าง ๆ เข้มข้น 8 μM

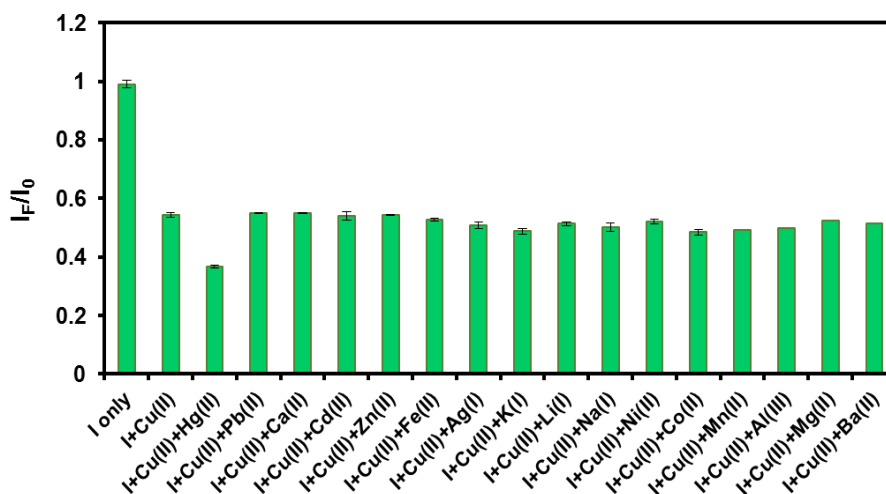


ภาพที่ 48 Normalized fluorescence intensity plot (λ_{ex} 647nm, λ_{em} 718 nm) ของเซ็นเซอร์ Cy7C3 (5 μ M) ในสถานะที่มีไอออนโลหะของเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่าง ๆ

จากการทดลองพบว่าสารเซ็นเซอร์ Cy7C3 มีความจำเพาะเจาะจงที่ดีกับไอออนทองแดงเมื่อเปรียบเทียบกับไอออนโลหะชนิดอื่น ๆ โดยจากการทดลองครั้งนี้ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อมีการเติมไอออนทองแดงจะทำให้เกิดการลดลงของการคายสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์อย่างชัดเจน ในขณะที่สัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์หลังเติมไอออนโลหะรบกวนชนิดอื่น ๆ ได้แก่ Li^+ , Na^+ , K^+ , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{3+} และ Ag^+ ในความเข้มข้นเดียวกันกับไอออนทองแดง แทบจะไม่แสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงหรือมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก เมื่อเทียบกับความเข้มข้นของสัญญาณเริ่มต้นหรือในกรณีที่ไม่มีไอออนโลหะเจือปนในสารละลายเซ็นเซอร์

1.2.3 ผลการทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนทองแดงในสถานะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่น ๆ (competitive)

การทดสอบการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ Cy7C3 ในระบบตัวทำละลายผสมระหว่าง HEPES buffer pH 7.0 และ acetonitrile ในอัตราส่วน 3:7 v/v ในสถานะที่มีไอออนทองแดงละลายรวมอยู่กับไอออนรบกวนอื่น ๆ ได้แก่ Li^+ , Na^+ , K^+ , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{3+} และ Ag^+ ซึ่งได้ตรวจวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ในขณะที่มีปริมาณไอออนรบกวนต่าง ๆ มากกว่าปริมาณไอออนทองแดงในสารละลาย โดยผลการทดลองแสดงในรูปแบบของกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า I_f/I_0 (แกน y) และชนิดของสาร (แกน x) ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 49

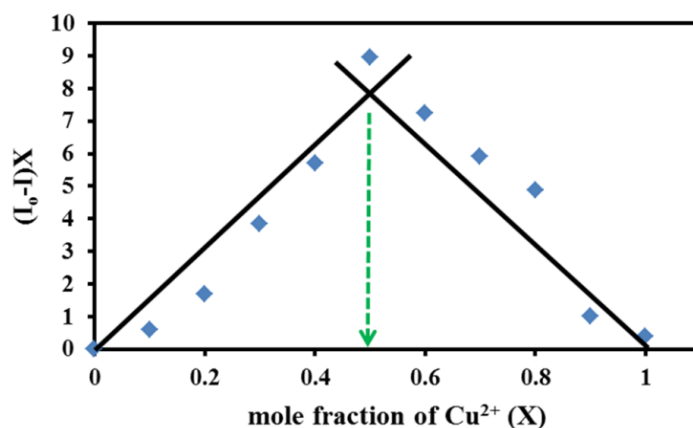


ภาพที่ 49 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของ Cy7C3 เข้มข้น 5 μM (λ_{ex} 647nm, λ_{em} 718 nm) ในสถานะที่มีความเข้มข้นไอออนรบกวนต่าง ๆ เจือปนในสารละลายมากกว่าความเข้มข้นของไอออนทองแดง 10 เท่า

การทดลองนี้เป็นการทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนทองแดงของเซ็นเซอร์ Cy7C3 ในสถานะที่มีไอออนรบกวนอื่น ๆ เข้มข้นมากกว่าไอออนทองแดง ปริมาณ 10 เท่า โดยตรวจวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 718 นาโนเมตร สังเกตได้ว่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้หลังจากเติมไอออนรบกวนอื่น ๆ ร่วมกับไอออนทองแดง มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก เมื่อเทียบกับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์หลังการเติมไอออนทองแดงเพียงชนิดเดียว นั้นแสดงให้เห็นว่าเซ็นเซอร์ Cy7C3 ยังคงมีประสิทธิภาพในการทำงานเพื่อตรวจวัดไอออนทองแดงได้แม้ว่าจะมีไอออนรบกวน แต่จะมีไอออนรบกวนบางตัว คือ Hg^{2+} เท่านั้นที่ส่งผลกระทบต่อการทำงานของเซ็นเซอร์

1.2.4 ผลการศึกษาเพื่อหาอัตราส่วนการเกิดสารเชิงซ้อนวิธีการของ Job (Job's plot) ของเซ็นเซอร์ Cy7C3

การทดลองเพื่อหาอัตราส่วนระหว่างโมเลกุลของเซ็นเซอร์ Cy7C3 กับไอออนทองแดงที่ใช้ในการเกิดการ binding ศึกษาโดยวิธี Job's plot ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 50

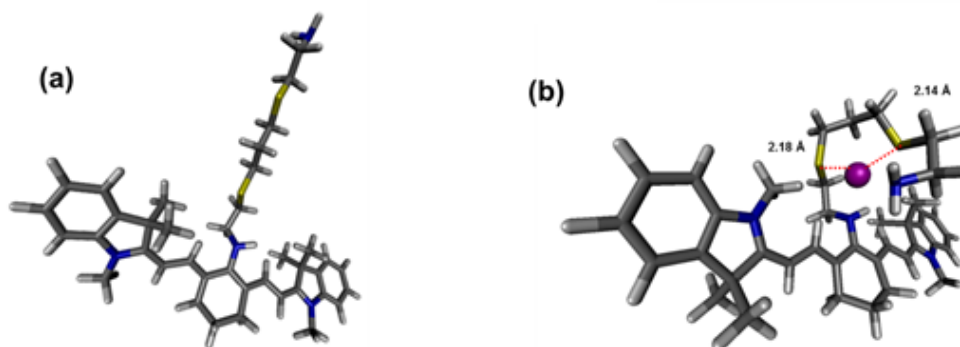


ภาพที่ 50 Job's plot ของเซ็นเซอร์ Cy7C3

จากผลการศึกษา Job's plot พบว่าค่าสัดส่วนโมลสูงสุดมีค่าตรงกับสัดส่วนโมลของไอออนทองแดงเท่ากับ 0.5 นั้นแสดงว่าอัตราส่วนการเกิดไอออนเชิงซ้อนระหว่างโมเลกุลของฟลูออเรสเซนส์เซ็นเซอร์ Cy7C3 กับไอออนทองแดงเกิดแรงกระทำแบบ 1:1 ($\text{Cy7C3}:\text{Cu}^{2+} = 1:1$) ในสารละลายผสมระหว่าง HEPES buffer pH 7.0 และ acetonitrile ในอัตราส่วน 3:7 v/v

1.2.7 ลักษณะการตรวจจับไอออนทองแดงเซอร์ด้วยเทคนิคเคมีเชิงคำนวณ (molecular modeling)

ผลจากการศึกษาลักษณะโครงสร้างของฟลูออเรสเซนส์เซ็นเซอร์ Cy7C3 ก่อน และหลังตรวจวัดไอออนทองแดง เพื่อคำนวณหาโครงสร้างที่เสถียรที่สุด สามารถทำได้โดยคำนวณผ่านโปรแกรม Gaussian 09 ซึ่งใช้คำสั่งการทำงานโดย DFT-B3LYP กำหนด basic set ของการคำนวณเป็น 6-311G** สำหรับธาตุในหมู่ 1A-8A (ไนโตรเจน ออกซิเจน คาร์บอน ไฮโดรเจน และซัลเฟอร์) และใช้ LanL2DZ สำหรับไอออนทองแดง กำหนดตัวทำละลายที่ใช้เป็นอะซิโตรไนไทรล์ต่อน้ำในอัตราส่วน 7:3 โดยใช้วิธีทาง integral equation formalism polarizable continuum model (IEFPCM) เมื่อคำนวณจนได้โครงสร้างที่เสถียรที่สุดแล้ว จะนำข้อมูลทางตำแหน่งของอะตอมไปสร้างภาพด้วยโปรแกรม Visual Molecular Dynamics (VMD) ผลแสดงดังภาพที่ 51



ภาพที่ 51 (a) ลักษณะโครงสร้างที่เสถียรที่สุดของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ Cy7C3 (b) สารประกอบเชิงซ้อนระหว่างฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ Cy7C3:Cu²⁺ ในอัตราส่วน 1:1

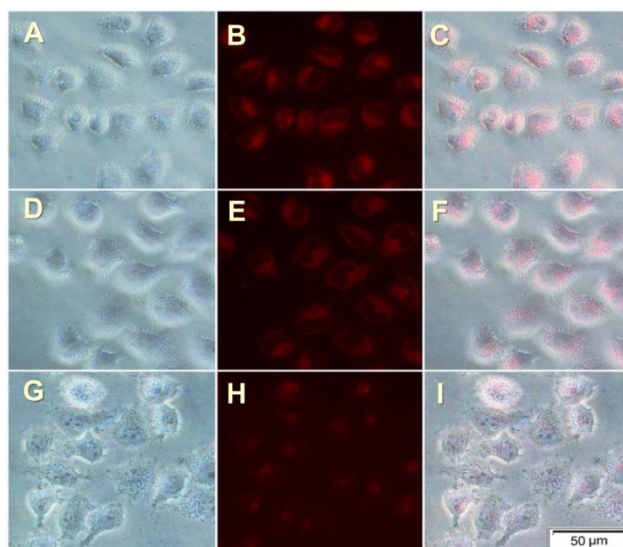
จากโครงสร้างที่ได้จะเห็นได้ว่าฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ Cy7C3 ตรงส่วนของไอออนฟอร์จะมีลักษณะเป็นเส้นตรง เมื่อไม่มีไอออนทองแดงในระบบตัวทำละลาย และเมื่อในสถานะที่มีไอออนทองแดงจะเห็นได้ว่าส่วนของไอออนฟอร์จะมีลักษณะล้อมรอบไอออนทองแดง โดยใช้อะตอมของซัลเฟอร์ 2 อะตอมมาสร้างพันธะ โดยมีระยะห่างเท่ากับ 2.18 Å และ 2.14 Å โดยอัตราส่วนที่ใช้ในการตรวจวัดเป็น 1:1 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองด้วยวิธี job's plots และการหาค่าคงที่สมดุลของการเกิดไอออนเชิงซ้อนตามสมการ Benesi-Hildebrand

1.2.8 ผลการทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนทองแดงของเซ็นเซอร์ Cy3C7 ในตัวอย่างจริง

การนำสารเซ็นเซอร์ Cy3C7 ไปศึกษาในตัวอย่างจริง ซึ่งถือได้ว่าเป็นการศึกษาเบื้องต้นสำหรับการนำไปพัฒนาเป็นชุดเครื่องมือต่อไป ในที่นี้ได้ศึกษาในตัวอย่างจริง 2 ชนิดคือ การทดสอบกับเซลล์สิ่งมีชีวิตและการทดสอบกับน้ำปัสสาวะโพรโทโซนิกส์ ได้ผลการทดลองดังนี้

1) ความสามารถในการตรวจวัดไอออนทองแดงในเซลล์ HepG2

ผลการการศึกษาตรวจวัดไอออนทองแดงในตัวอย่างจากสิ่งมีชีวิต เป็นการศึกษาเบื้องต้นสำหรับนำไปพัฒนาใช้กับร่างกายมนุษย์ โดยตัวอย่างที่ใช้ คือ เซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ หรือ HepG2 cancer cells โดยผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 52



ภาพที่ 52 ภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนซ์แบบ Bright-field และ fluorescence images ของ HepG2: (A, D, G) bright-field images ของ HepG2 cells ที่บ่มด้วย CuCl_2 ก่อนนำไปบ่มด้วยสารเซ็นเซอร์ : (A) 0 μM , (D) 50 μM และ (G) 100 μM ; (B, E, H) fluorescence images ของเซลล์ที่บ่มด้วยสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ Cy7C3 ที่ 37 $^{\circ}\text{C}$ ในสารละลาย PBS buffer: (C, F, I) bright-field images ของเซลล์ที่บ่มด้วยสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ Cy7C3 ที่ 37 $^{\circ}\text{C}$ ในสารละลาย PBS buffer

จากผลการทดลองที่เพิ่มความเข้มข้นของไอออนทองแดงในการบ่มเซลล์ และเมื่อนำเซลล์เหล่านั้นไปบ่มต่อกับสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ พบว่า มีสารเซ็นเซอร์สามารถเข้าไปทำงานในเซลล์ได้ โดยสังเกตเห็นการลดลงของแสงฟลูออเรสเซนซ์อย่างชัดเจนเมื่อเซลล์นั้นมีความเข้มข้นของไอออนทองแดงมากขึ้น นั่นหมายความว่าสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ Cy7C3 สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นตัวตรวจหาไอออนทองแดงในเซลล์สิ่งมีชีวิตได้ ซึ่งสามารถนำไปเป็นต้นแบบในการนำไปประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ได้

2) ความสามารถในการตรวจวัดไอออนทองแดงในน้ำปัสสาวะไฮโดรโปนิคส์

ผลการทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนทองแดงของเซ็นเซอร์ Cy3C7 ในน้ำปัสสาวะไฮโดรโปนิคส์ ได้ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 53

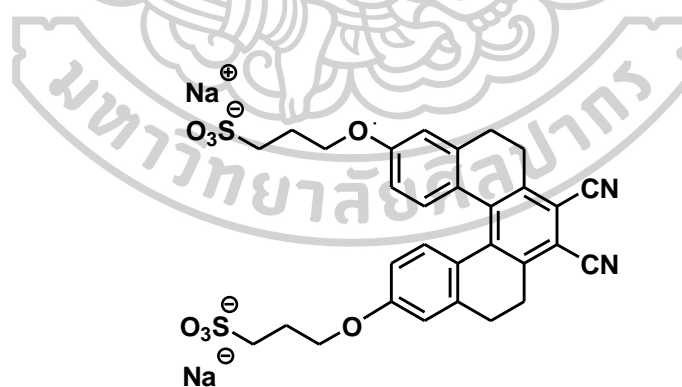


ภาพที่ 53 การตรวจวัดไอออนทองแดงของเซ็นเซอร์ Cy3C7 ในน้ำปุ๋ยไฮโดรโปนิคส์

จากผลการทดลองพบว่า ภายหลังจากเติมตัวอย่างน้ำปุ๋ยไฮโดรโปนิคส์ทั้ง 4 ชนิด ผสมกับสารละลายเซ็นเซอร์ ทำให้เกิดการแปลงเปลี่ยนสีจากสารละลายสีฟ้าเป็นสารละลายสีฟ้าอ่อน โดยสามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า แสดงให้เห็นว่าเซ็นเซอร์ Cy3C7 สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในตัวอย่างอย่างจริงได้

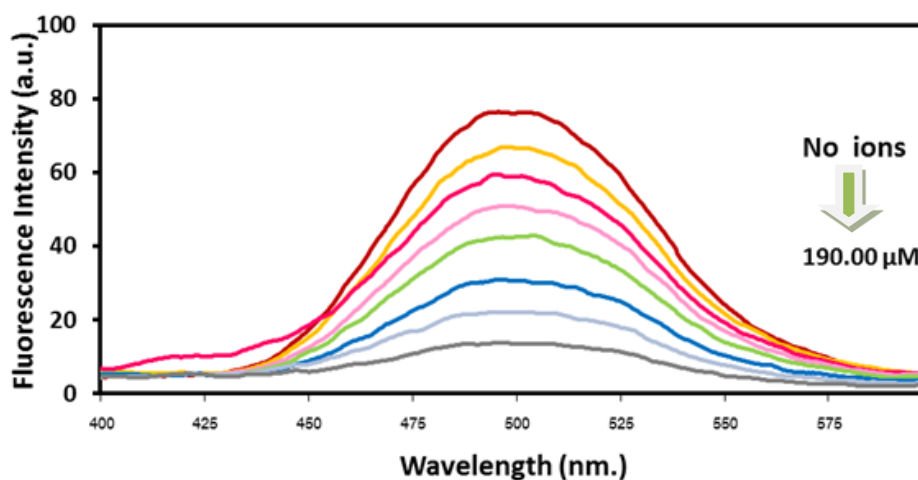
2. ผลการวิเคราะห์แบบฉีดไหล (Flow Injection Analysis, FIA) ของสารฟลูออเรสเซนซ์ เซ็นเซอร์ M-141

ในการศึกษาการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสาร M-141 นั้น ผู้วิจัยได้รับความอนุเคราะห์สารจากกลุ่มวิจัยของ ดร.จันศาสตร์ สุขศรีเมือง ซึ่งมีโครงสร้างดังภาพที่ 54



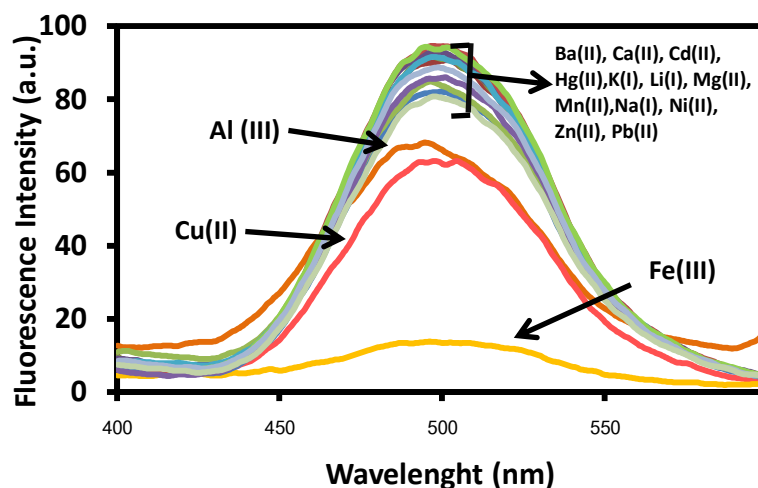
ภาพที่ 54 โครงสร้างทางเคมีสาร M-141

ในการทดลองนี้ได้นำสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ M-141 ไปทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจจับไอออนเหล็กเบื้องต้น ด้วยวิธีการวิเคราะห์แบบไม่ต่อเนื่อง (batch analysis) พบว่า สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ M-141 ตรวจวัดไอออนเหล็กเกลือคลอไรด์ได้อย่างไวในสารละลายผสม Ethanol:Tris buffer (5:95 v/v) โดยกำหนดค่า excitation wavelength (λ_{ex}) เท่ากับ 308 nm ค่า emission wavelength (λ_{em}) เท่ากับ 500 nm ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 55



ภาพที่ 55 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ของ M-141 (10 μM) ในสารละลาย Ethanol:Tris buffer (5:95 v/v) หลังการเติมไอออนเหล็กของเกลือคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ a: 0 μM, b: 6.67 μM, c: 13.33 μM, d: 36.67 μM, e: 56.67 μM, f: 83.33 μM, g: 136.67 μM, h: 190.00 μM

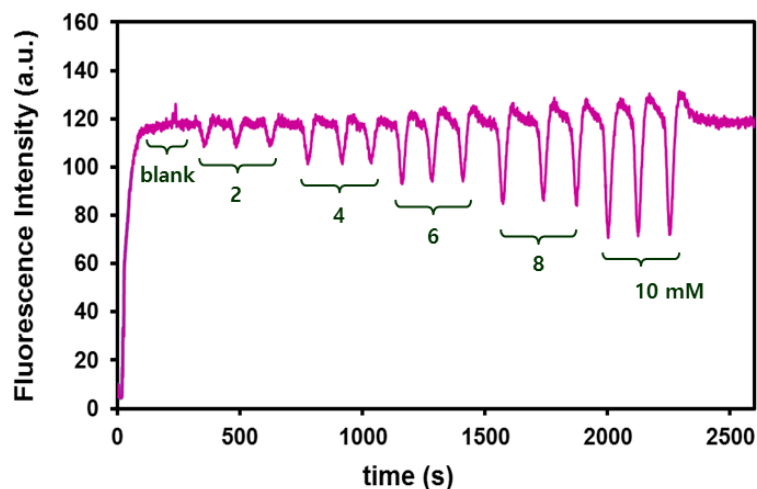
จากผลการทดลองเมื่อเซ็นเซอร์มีการตรวจวัดไอออนเหล็กเกลือคลอไรด์ในสารละลาย Ethanol:Tris buffer (5:95 v/v) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จะพบว่ามีลักษณะการทำงานเป็นแบบ ON-OFF fluorescence switch แสดงให้เห็นว่ามีการลดลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณไอออนเหล็กเปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่มีไอออนเหล็ก โดยการคายแสงฟลูออเรสเซนต์สูงสุดในช่วงความยาวคลื่น 400-600 nm กำหนดให้ค่า λ_{em} ของการคายแสงฟลูออเรสเซนต์เท่ากับ 500 nm ความสามารถในการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ และ detection limit ของการตรวจวัดหาปริมาณของเหล็ก มีค่าเท่ากับ 2.68 ppb และยังได้นำไปทดสอบความจำเพาะเจาะจงของสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ในสารละลาย Ethanol:Tris buffer (5:95 v/v) ในสภาวะที่มีไอออนเหล็กเปรียบเทียบกับไอออนโลหะรบกวนอื่น ๆ ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 56



ภาพที่ 56 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ของ M-141 (10 μM) ในสารละลาย Ethanol:Tris buffer (5:95 v/v) ในสถานะที่มีไอออนชนิดอื่นๆ ได้แก่ Cu^{2+} , Al^{3+} , Li^+ , K^+ , Na^+ , Ca^+ , Ba^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} และ Pb^{2+} (190 μM)

จากผลการทดลองการคายสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ 500 nm แสดงให้เห็นว่า เซ็นเซอร์ M-141 มีความจำเพาะเจาะจงกับไอออนเหล็ก เมื่อเปรียบเทียบกับไอออนชนิดอื่น ๆ ที่เติมลงไป ในสารละลาย ได้แก่ Cu^{2+} , Al^{3+} , Li^+ , K^+ , Na^+ , Ca^+ , Ba^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} และ Pb^{2+} แต่ในการทดลอง พบว่าอาจมีการรบกวนของไอออนอื่นบางชนิดเล็กน้อย คือ Cu^{2+} และ Al^{3+} ของเซ็นเซอร์ต่อการตรวจจับไอออนเหล็กเล็กน้อย แต่ก็ถือว่าไม่นัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ การลดลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากไอออนเหล็กที่ความเข้มข้นเดียวกัน

เมื่อทำการทดสอบเบื้องต้นแล้ว พบว่าสารเซ็นเซอร์ M-141 มีความไวและความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนเหล็ก จึงได้มีการนำไปทดลองวัดด้วยวิธีการ FIA ซึ่งได้ผลการทดลองดังภาพที่ 57

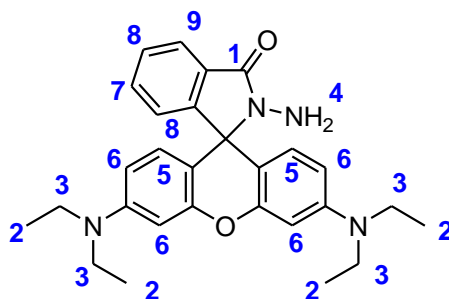


ภาพที่ 57 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ของ M-141 ด้วยวิธีการวิเคราะห์แบบ FIA จากการทดสอบนี้เมื่อมีการฉีดไอออนเหล็กความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวน 3 ซ้ำ โดยกำหนดค่า excitation wavelength (λ_{ex}) เท่ากับ 308 nm ค่า emission wavelength (λ_{em}) เท่ากับ 500 nm เช่นเดียวกับการวัดแบบ batch เมื่อเข้าสู่ระบบ FIA พบว่า ที่ความเข้มข้นเหล็กเพิ่มขึ้น การลดลงของการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ก็จะเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งจากผลการทดลองจะมีช่วงการใช้งานอยู่ที่ความเข้มข้น 2-10 mM โดยมีค่า detection limit เท่ากับ 0.08 mM สำหรับเทคนิค FIA แม้ว่าค่า DL ที่หาได้จะค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับวิธีการแบบ batch analysis แต่เทคนิคนี้ก็มีข้อดีตรงที่สามารถวัดตัวอย่างได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น และจากผลการทดลองยังทำให้เห็นถึงแนวทางการพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สำหรับสารฟลูออเรสเซนซ์เพื่อใช้ตรวจวัดไอออนโลหะได้อีกด้วย

3. ผลการทดสอบการขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มด้วยเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิง (electrospinning)

การศึกษาวิธีการพัฒนาสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ให้ง่ายและสะดวกต่อการนำไปใช้งาน นั้น มีวิธีการหนึ่งที่น่าสนใจ คือ การขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มด้วยเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิง โดยใช้โพลิเมอร์เป็นตัวจับสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์เอาไว้ ในที่นี้ได้เลือกใช้สารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ชนิด RhBH ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับไอออนปรอทมาทำการศึกษา ซึ่งได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

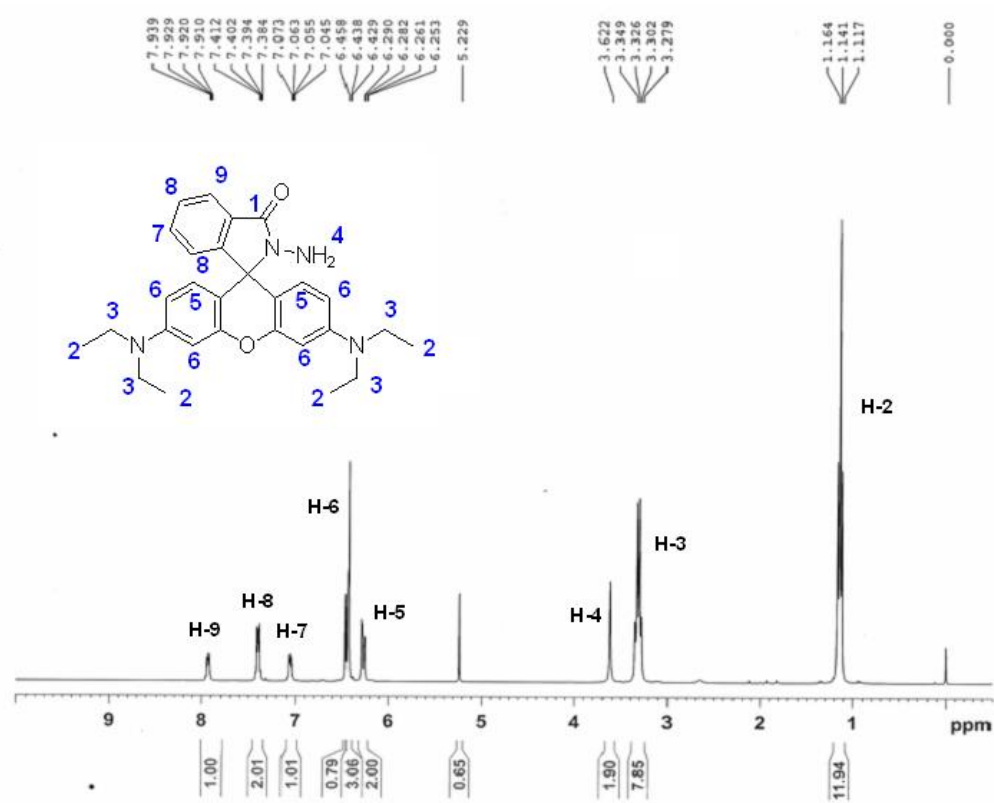
3.4 การยืนยันโครงสร้างสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ RhBH



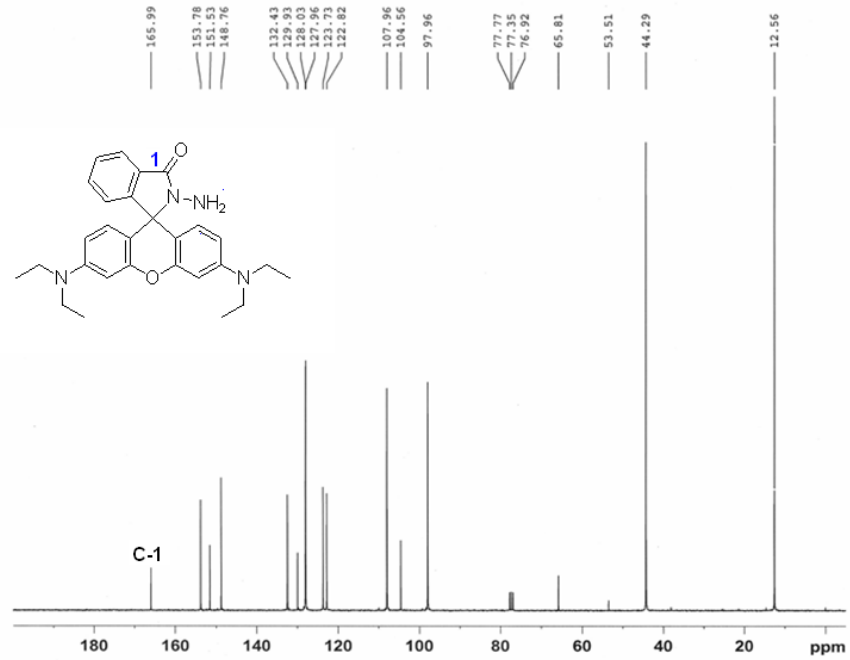
ภาพที่ 58 โครงสร้างทางเคมีของสาร RhBH

จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสาร RhBH โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีสามารถยืนยันโครงสร้างได้ดังนี้

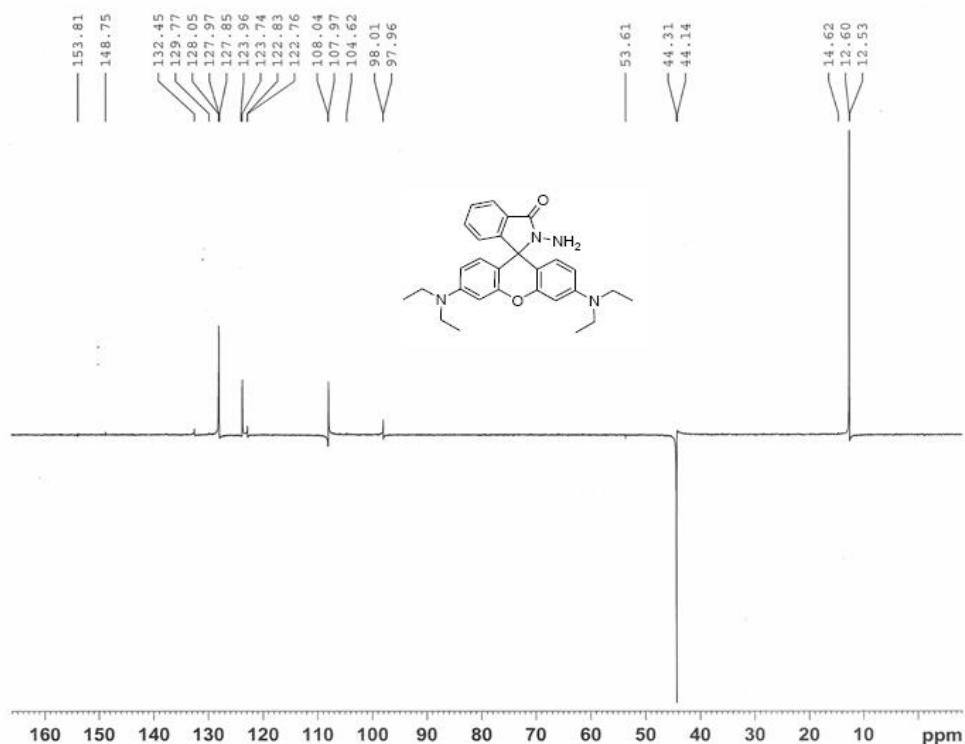
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.14 (t, $J = 6.9$ Hz, 12H), 3.31 (q, $J = 6.9$ Hz, 8H), 3.62 (br s, 2H, NH_2), 6.27 (dd, $J_1 = 8.7$ Hz, $J_2 = 2.4$ Hz, 2H), 6.43-6.46 (m, 4H), 7.06 (dd, $J_1 = 5.4$ Hz, $J_2 = 3.0$ Hz, 1H), 7.39 (dd, $J_1 = 5.4$ Hz, $J_2 = 3.6$ Hz, 2H), 7.92 (dd, $J_1 = 5.7$ Hz, $J_2 = 3.0$ Hz, 1H) ppm (ภาพที่ 59).; ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 12.6 (4 CH_3), 44.3 (4 CH_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), 139.9 (2C), 132.4 (CH), 148.8 (2C), 151.5 (C), 153.8 (C), 166.0 (C) ppm (ภาพที่ 60).; 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 62).



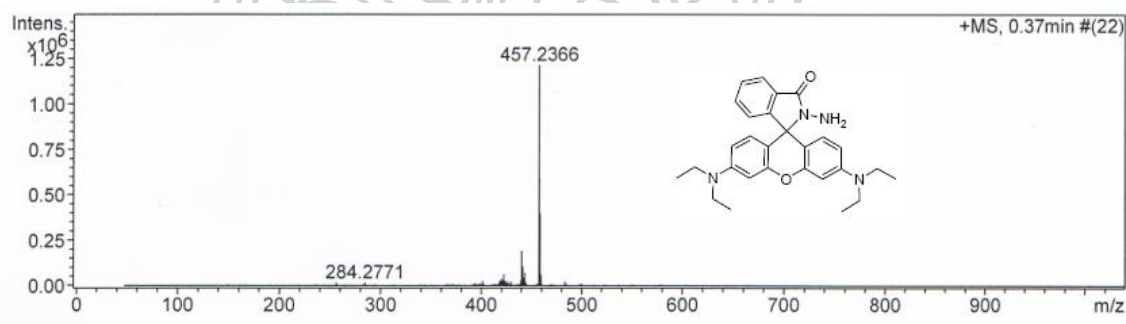
ภาพที่ 59 ¹H NMR สเปกตรัมของสาร RhBH



ภาพที่ 60 ¹³C NMR สเปกตรัมของสาร RhBH



ภาพที่ 61 ^{13}C Dept 135 สเปกตรัมของสาร RhBH



ภาพที่ 62 HR-ESI MS สเปกตรัมของสาร RhBH

เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างสาร RhBH (ภาพที่ 58) และ ^1H NMR สเปกตรัม (ภาพที่ 59) แสดงให้เห็นสัญญาณของโปรตอน 8 ชนิดที่ต่างจากกัน แต่ไม่สามารถยืนยันโครงสร้างที่แน่นอนได้อย่างชัดเจน เนื่องจากโครงสร้างเริ่มต้นของโรดามีน บี ไฮโดรคลอไรด์แสดงผล ^1H NMR แตกต่างกับสาร RhBH เพียงแค่สัญญาณของหมู่เอมีนในตำแหน่ง δ เท่ากับ 3.62 ppm เท่านั้น ส่วนสัญญาณที่เหลือไม่สามารถบอกได้อย่างชัดเจน จึงต้องอาศัยผลของ ^{13}C NMR สเปกตรัม (ภาพที่ 60) มาอธิบายเพิ่มเติม โดยสัญญาณที่สามารถระบุได้ชัดเจนคือ สัญญาณที่ปรากฏตำแหน่ง δ เท่ากับ 166.0 ppm ซึ่งเกิดจากสัญญาณคาร์บอน ของหมู่คาร์บอนิล ($\text{C}=\text{O}$) ที่เกิดพันธะกับอะตอมไนโตรเจนได้เป็นหมู่เอ

ไมด์ (N-C=O; C-1) ซึ่งได้เปลี่ยนตำแหน่งของสัญญาณจากเดิมโรตามีน บี ไฮโดรคลอไรด์ หมูคาร์บอนิล (C=O) จะมีพันธะอยู่กับอะตอมออกซิเจนได้เป็นหมูคาร์บอกซิลิก (O-C=O) ซึ่งจะแสดงสัญญาณปรากฏที่ δ 167.29 ppm ทั้งนี้สามารถใช้ผลจากการตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลยืนยันร่วมด้วย โดยพิจารณาจาก HR-ESI MS (ภาพที่ 62) ในสูตรโมเลกุล $C_{28}H_{33}N_2O_2$ (M+H)⁺ ได้เท่ากับ 457.2366 m/z มีค่าใกล้เคียงจากการคำนวณโดยมีค่าเท่ากับ 457.2604 m/z จึงยืนยันได้ว่าได้สาร RhBH เกิดขึ้นจริงจากการสังเคราะห์

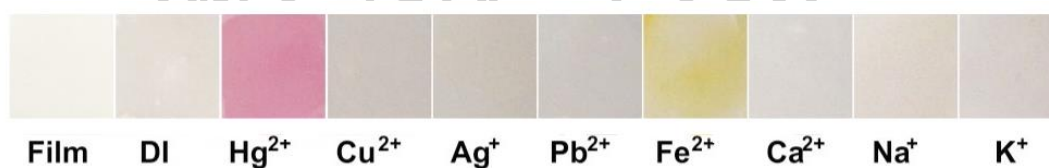
3.5 ผลการทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนปรอทของแผ่นฟิล์ม

ผลการทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนปรอทของแผ่นฟิล์มที่ได้จากการขึ้นรูปด้วยเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิงนั้น พบว่าสามารถทำงานได้เมื่อนำไปจุ่มในสารละลายปรอทที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยได้ผลการทดลองดังภาพที่ 63



ภาพที่ 63 การเปลี่ยนสีของแผ่นฟิล์มที่ความเข้มข้นของไอออนปรอทต่าง ๆ

จากการสังเกตด้วยตาเปล่าพบว่า เมื่อปรอทมีความเข้มข้นมากขึ้นแผ่นฟิล์มจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูเข้มขึ้นด้วย นอกจากนี้ยังได้ทดสอบความจำเพาะเจาะจงต่อการวิเคราะห์ไอออนปรอทบนแผ่นฟิล์มอีกด้วย โดยได้ผลดังภาพที่ 64



ภาพที่ 64 ความจำเพาะเจาะจงต่อการวิเคราะห์ไอออนปรอทบนแผ่นฟิล์ม

จากผลการทดลอง พบว่าสาร RhBH ยังสามารถทำงานได้อย่างมีความจำเพาะเจาะจงกับไอออนปรอท เมื่อเทียบกับไอออนชนิดอื่น ได้แก่ Cu^{2+} Ag^+ Pb^{2+} Fe^{2+} Ca^{2+} Na^+ และ K^+ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงในลักษณะนี้สามารถพัฒนาเพื่อไปเป็นอุปกรณ์ภาคสนามที่สามารถวิเคราะห์ได้ในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพได้อีกด้วย

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

วิทยานิพนธ์นี้สามารถสังเคราะห์สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ Cy7C3 ที่มีการคายแสงในช่วงใกล้อินฟราเรดสำหรับตรวจวัดไอออนทองแดง โดยภายในโครงสร้างจะประกอบด้วยส่วนของไอออนฟออร์ที่มีอะตอมซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ 2-[3-(2-aminoethylsulfanyl)-propylsulfanyl]ethanamine เชื่อมต่อกับสารฟลูออเรสเซนต์ชนิด ไชยานิน (Cyanine dye) จากผลการทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนทองแดงในตัวทำละลายผสมระหว่างบัฟเฟอร์ HEPES: acetonitrile ในอัตราส่วน 3:7 v/v ที่ pH 7.0 สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 5

พารามิเตอร์	ผลการทดลอง
λ_{ex} (nm)	647
λ_{em} (nm)	718
Detection limit (ppb)	9
K_{asso}	$1.24 \times 10^6 M^{-1}$
Ratio [Cy7C3:Cu ²⁺]	1:1
Color	เปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นใสไม่มีสี
ตัวอย่างจริง	1. เซลล์มะเร็งตับ (HepG2) 2. น้ำปัสสาวะ

ตารางที่ 5 สรุปผลการทดลองของสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ Cy7C3

เซ็นเซอร์ Cy7C3 มีค่า detection limit สำหรับตรวจวัดไอออนทองแดงที่ต่ำกว่ามาตรฐานของ U.S. EPA และแสดงการคายสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ลักษณะ ON - OFF ในช่วงความยาวคลื่นใกล้อินฟราเรด โดยพฤติกรรมนี้ไม่แสดงผลต่อไอออนโลหะทรานซิชันอื่น ๆ ได้แก่ Li⁺, Na⁺, K⁺, Ba²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Al³⁺, Ni²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Hg²⁺, Pb²⁺, Fe³⁺ และ Ag⁺ เป็นต้น จึงถือได้ว่ามีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนทองแดงเป็นอย่างมาก นอกจากนี้ได้นำสารได้มีการนำสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ M-141 ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนเหล็ก มาศึกษาด้วยเทคนิคการ

วิเคราะห์แบบฉีดไหล (Flow Injection Analysis) พบว่ามีช่วงใช้งานในการตรวจวัดไอออนเหล็กอยู่ที่ 2-10 mM ในตัวพาแบบสารละลายผสมระหว่าง Tris buffer pH 7.2 และ ethanol (95:5 v/v) โดยมีค่า detection limit เท่ากับ 0.08 mM สำหรับเทคนิค FIA แม้ว่าค่า DL ที่หาได้จะค่อนข้างสูงแต่สามารถวัดตัวอย่างได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น ดังนั้นจึงสามารถใช้เป็นแนวทางการพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สำหรับสารฟลูออเรสเซนต์เพื่อใช้ตรวจวัดไอออนโลหะอื่น ๆ ต่อไปได้ อีกทั้งยังได้นำสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ RhBH มีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนปรอทและสามารถเปลี่ยนสีได้จากการสังเกตด้วยตาเปล่าดังภาพที่ 65



จากผลการทดลองข้างต้นนั้นสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางการพัฒนาสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ให้สามารถนำออกไปใช้เป็นอุปกรณ์ภาคสนาม หรือพัฒนาเป็นชุดทดสอบที่มีราคาไม่แพงต่อไปได้ในอนาคต

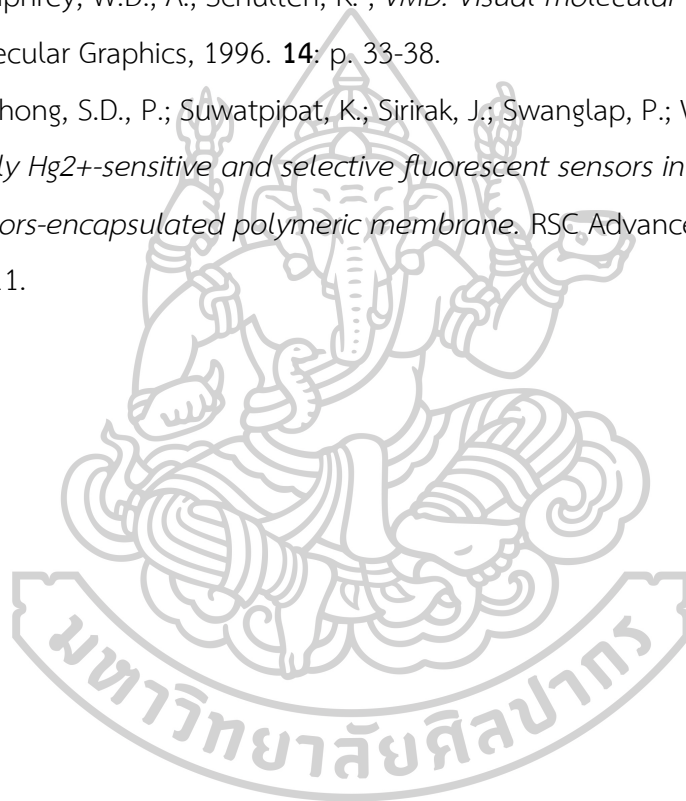
รายการอ้างอิง

1. Roberts, E.A. and M.L. Schilsky, *A practice guideline on Wilson disease*. Hepatology, 2003. **37**: p. 1475-1492.
2. Baranwal, A.K. and S.C. Singhi, *Acute iron poisoning: management guidelines*. Indian Pediatr, 2003. **40**: p. 534-540.
3. Davidson, P.W., et al., *Longitudinal neurodevelopmental study of Seychellois children following in utero exposure to methylmercury from maternal fish ingestion: outcomes at 19 and 29 months* Neurotoxicology, 1995. **16**: p. 677-688.
4. Grandjean, P.W., P.; White, R. F.; Debes, F. , *Cognitive performance of children prenatally exposed to 'safe' levels of methylmercury*. Environmental Research 1998. **77**: p. 165-172.
5. Harada, M., *Minamata disease: methylmercury poisoning in japan caused by environmental pollution*. Critical Reviews in Toxicology, 1995. **25**: p. 1-24.
6. Tchounwou, P.B., et al., *Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic implications for public health*. Environmental Toxicology, 2003. **18**: p. 149-175.
7. Miessler, G.L., *Inorganic Chemistry*, ed. 3rd. 2004: Pearson Education.
8. Steed, J.W.A., J. L. , *Supramolecular Chemistry: A Concise Introduction*. 2000, New York: John Wiley & Sons, Inc.
9. วานิชชีวะ, น., การออกแบบเซ็นเซอร์เพื่อใช้ตรวจวัดไอออนโลหะเชิงคุณภาพและปริมาณวิเคราะห์ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโกปี. บทความวิชาการ ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยศิลปากร, 2554. **27**: p. 241-263.
10. วิธีวิเคราะห์แบบฉีดยุติ. วิธีวิเคราะห์แบบฉีดยุติ. [cited 2563 10 มีนาคม 2563]; วิธีวิเคราะห์แบบฉีดยุติ.
11. electrospinning. *electrospinning*. [cited 2563 10 มีนาคม 2563].
12. Zheng, H.Z., X.-J.; Cai, X.; Bian, Q.-N.; Yan, M.; Wu, G.-H. , *Ratiometric Fluorescent Chemosensor for Hg²⁺ Based on Heptamethine Cyanine Containing a Thymine Moiety*. Organic Letters, 2012. **14**: p. 1986–1989.

13. Zheng, H.Y., M.; Fan, X.-X.; Sun, D.; Yang, S.-Y.; Yang, L.-J.; Li, J.-D.; Jiang, Y.-B. , *A heptamethine cyanine-based colorimetric and ratiometric fluorescent chemosensor for the selective detection of Ag⁺ in an aqueous medium*. Chemical Communications, 2012. **48**: p. 2243-2245.
14. Guo, Z.K., G.-H.; Shin, I.; Yoon, J., *A cyanine-based fluorescent sensor for detecting endogenous zinc ions in live cells and organisms*. Biomaterials, 2012. **33**: p. 7818-7827.
15. Li, C.-Y.K., X.-F.; Li, Y.-F.; Zou, C.-X.; Liu, D.; Zhu, W.-G. , *Ratiometric and colorimetric fluorescent chemosensor for Ag⁺ based on tricyanocyanine*. Dyes and Pigments, 2013. **99**: p. 903-907
16. Wang, J.S., F.; Wang, J.; Peng, X., *A near-infrared and ratiometric fluorescent chemosensor for palladium*. Analyst, 2013. **138**: p. 3667-3672.
17. Datta, B.K.T., D.; Kar, C.; Ramesh, A.; Das, G. , *A near-infrared emissive Al(3+) sensing platform for specific detection in solution, cells and probing DNase activity*. Analytica Chimica Acta, 2015. **882**: p. 76-82.
18. Hu, Y.Y., J.; Yoon, J. , *A multi-responsive cyanine-based colorimetric chemosensor containing dipicolylamine moieties for the detection of Zn (II) and Cu (II) ions*. Sensors and Actuators B. , 2016. **230**: p. 40-45.
19. Wang, H.Y., D.; Tan, R.; Zhou, Z. J.; Xu, R.; Zhang, J. F.; Zhou, Y. , *A cyanine-based colorimetric and fluorescence probe for detection of hydrogen sulfide in vivo*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2017. **247**: p. 883-888.
20. Destandau, E.L., J.-P.; Eddine, F.; Chouai, A.; Desportes, S.; Jullien, M. C.; Hierle, R.; Delaire, J. A., *A novel microfluidic flow-injection analysis device with fluorescence detection for cation sensing: Application to potassium*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007. **387**: p. 2627-2632.
21. Kamel, A.H.R., F. M. A.; Amr A.-G. E. , *Miniaturized potentiometric sensors based on PbS nanoparticles and a newly synthesized ionophore and their application for static and hydrodynamic monitoring of lead as a hazardous waste*. Eur. Chem. Bull, 2013. **2**: p. 687-693.
22. Tachapermpon, Y.C., S.; Charoenpanich, A.; Sirirak, J.; Wanichacheva, N. , *Highly Cu²⁺-sensitive and selective colorimetric and fluorescent probes: Utilizations in*

- batch, flow analysis and living cell imaging. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2017. **241**: p. 868–878.
23. Saithongdee, A.P., N.; Imyim, A. , *Electrospun curcumin-loaded zein membrane for iron(III) ions sensing*. *Sensors and Actuators B: Chemical.*, 2014. **202**: p. 935–940.
24. Cho, C.-J.L., S.-T.; Kuo, C.-C.; Liang, F.-C., Chen, B.-Y.; Chu, C.-C. , *Pyrene or rhodamine derivative–modified surfaces of electrospun nanofibrous chemosensors for colorimetric and fluorescent determination of Cu²⁺, Hg²⁺, and pH*. *Reactive and Functional Polymers*, 2016. **108**: p. 137–147.
25. Chen, B.-Y.K., C.-C.; Cho, C.-J.; Liang, F.-C.; Jeng, R.-J. , *Novel fluorescent chemosensory filter membranes composed of electrospun nanofibers with ultra-selective and reversible pH and Hg²⁺ sensing characteristics*. *Dyes and Pigments*, 2017. **143**: p. 129–142.
26. Wanichacheva, N.S., M.; Kamkaew, A.; Grudpan, K. , *Dual optical detection of a novel selective mercury sensor based on 7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazolyl subunits*. *Tetrahedron Letters*, 2009. **50**: p. 1783–1786.
27. Reynolds, G.A.D., K. H. , *Stable Heptamethine Pyrylium Dyes That Absorb in the Infrared*. *J. Org. Chem.* , 1977. **42**: p. 885-888.
28. Narayanan, N.P., G. , *A New Method for the Synthesis of Heptamethine Cyanine Dyes: Synthesis of New Near-Infrared Fluorescent Labels*. *J. Org. Chem.* , 1995. **60**: p. 2391-2395.
29. Guo, Z.K., G.-H.; Shin, I.; Yoon, J. , *A cyanine-based fluorescent sensor for detecting endogenous zinc ions in live cells and organisms*. *Biomaterials*, 2012. **33**: p. 7818-7827.
30. Ma, T.-H.Z., A.-J.; Dong, M.; Dong, Y.-M.; Peng, Y.; Wang, Y.-W. , *A simply and highly selective “turn-on” type fluorescent chemosensor for Hg²⁺ based on chiral BINOL-Schiff’s base ligand*. *Journal of Luminescence*, 2010. **130**: p. 888-892.
31. Shiraishi, Y.S., S.; Kohno, Y.; Hirai, T. , *A rhodamine-cyclen conjugate as a highly sensitive and selective fluorescent chemosensor for Hg(II)*. *The Journal of Organic Chemistry*, 2008. **73**: p. 8571–8574.

32. Wang, X.-L.Z., W.-Y.; Liu, G.-C.; Lin, H.-Y., *A turn-on fluorescent chemosensor for Hg²⁺ based on phenanthroline fluorophore*. *Journal of Luminescence*. , 2010. **130**: p. 52-55.
33. Nachtigal, F.F.L., M.; Nome, F. J. , *Interaction of calix[4]arene and aliphatic amines: a combined NMR, spectrophotometric and conductimetric investigation*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2002. **13**: p. 295-299.
34. Frisch, M.e.A., *GAUSSIAN 09 (Revision B.01)*. Gaussian, Inc., Wallingf.
35. Humphrey, W.D., A.; Schulten, K. , *VMD: Visual molecular dynamics*. *Journal of Molecular Graphics*, 1996. **14**: p. 33-38.
36. Kraithong, S.D., P.; Suwatpipat, K.; Sirirak, J.; Swanglap, P.; Wanichacheva, N. , *Highly Hg²⁺-sensitive and selective fluorescent sensors in aqueous solution and sensors-encapsulated polymeric membrane*. *RSC Advances*, 2016. **6**: p. 10401–10411.





ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	อรนวล หาญเม่ง
วัน เดือน ปี เกิด	27 กรกฎาคม พ.ศ. 2530
สถานที่เกิด	สระบุรี
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2553 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเอกเคมี จากมหาวิทยาลัยศิลปากร พ.ศ. 2555 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเอกเคมีอินทรีย์ จากมหาวิทยาลัยศิลปากร
ที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 99/12 ม.3 ต.ป่าตาล อ.เมืองลพบุรี จ.ลพบุรี
ผลงานตีพิมพ์	1. Wanichacheva, N. ; Hanmeng, O.; Kraithong, S.; Sukrat, K. “Dual optical Hg ²⁺ -selective sensing through FRET system of fluorescein and rhodamine B fluorophores” Journal of photochemistry and photobiology A: Chemistry. 278 (2014) 75-81. 2. Wainiphithapong, C.; Hanmeng, O.; Vannajan, S. L.; K. Grudpan, Wanichacheva, N. “Diphenylmaleimide derivatives and their efficiency in OFF-ON Hg ²⁺ fluorometric sensing” Maejo Int. J. Sci. Technol. 6 (2012) 449-460. 3. Wanichacheva, N.; Setthakarn, K.; Prapawattanapol, N.; Hanmeng, O.; Vannajan, S. L.; Grudpan, K. “Rhodamine B-based “Turn-on” Fluorescent and Colorimetric Chemosensors for Highly Selective and Rapid Detection of Mercury (II) Ions” J. Lumin. 132 (2012) 35-40.
รางวัลที่ได้รับ	Bangkok Bank Young Chemists Awards 2011 - The 14th Asian Chemical Congress (14 ACC Conference)