



ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์จากอนุพันธ์ของแนพทาลินไดอิมไมด์และเอซาโบติปีสำหรับตรวจวัดไอออน

โลหะ

โดย

นางสาวภณิดา พรายแก้ว



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีอินทรีย์ แบบ 1.1 ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต

ภาควิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2562

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์จากอนุพันธ์ของแนพทาลินไดอิมไมด์และเอซาโบดิปีสำหรับ
ตรวจวัดไอออนโลหะ



โดย
นางสาวภณิดา พรายแก้ว

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

FLUORESCENCE SENSORS BASED ON CORE-SUBSTITUTED NAPHTHALENE
DIIMIDE AND AZA-BODIPY FOR RECOGNITION OF METAL IONS



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

59302802 : เคมีอินทรีย์ แบบ 1.1 ปรัชญาคุชภักดิ์บัณฑิต

คำสำคัญ : เอซาโบติปี, แนพทาลีนไดอิมไมด์, ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์, การตรวจวัดไอออนทองแดง

นางสาว ภาณิดา พรายแก้ว: ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์จากอนุพันธ์ของแนพทาลีนไดอิมไมด์ และเอซาโบติปีสำหรับตรวจวัดไอออนโลหะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : รองศาสตราจารย์ ดร. นันทินิตย์ วานิชชีวะ

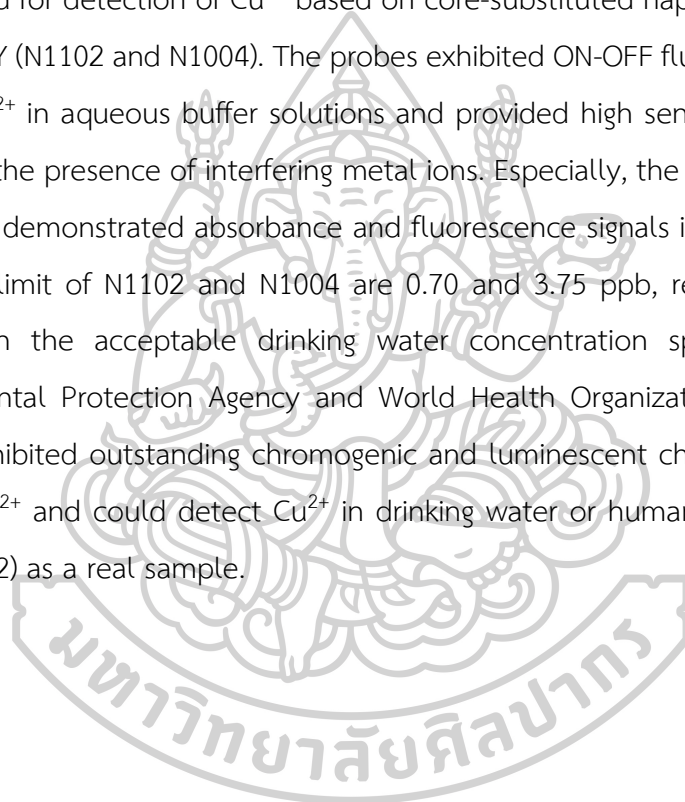
ในงานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ชนิดใหม่ 2 ชนิดเพื่อใช้ในการตรวจวัดไอออนทองแดง โดยใช้อนุพันธ์ของแนพทาลีนไดอิมไมด์และเอซาโบติปี (N1102 และ N1004) โดยเซ็นเซอร์ดังกล่าวจะแสดงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในลักษณะ “เปิด-ปิด” สวิตช์ ในภาวะที่มีไอออนทองแดงในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ และมีความไวและความจำเพาะเจาะจงสูงต่อไอออนทองแดงเมื่อเทียบกับไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะการตรวจวัดไอออนทองแดงของเซ็นเซอร์ N1004 ที่แสดงสัญญาณการดูดกลืนแสงและการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในช่วงใกล้รังสีอินฟราเรด ค่าความสามารถต่ำสุดของการตรวจวัดไอออนทองแดงของเซ็นเซอร์ N1102 และ N1004 มีค่าเท่ากับ 0.70 และ 3.75 ppb ตามลำดับ ซึ่งมีค่าต่ำกว่าค่ามาตรฐานของปริมาณไอออนทองแดงในน้ำดื่ม ซึ่งกำหนดโดย United State Environmental Protection Agency (U.S. EPA) และ World Health Organization (WHO) มีค่าเท่ากับ 1.3 และ 2.0 ppm และที่สำคัญคือ สามารถสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงสีและการเรืองแสงของเซ็นเซอร์ทั้ง 2 ชนิดได้ด้วยตาเปล่าในภาวะที่มีไอออนทองแดงเพียงอย่างเดียว และเซ็นเซอร์สามารถตรวจวัดไอออนทองแดงในน้ำดื่มหรือเซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ซึ่งเป็นตัวอย่างจริงในธรรมชาติได้

59302802 : Major ORGANIC CHEMISTRY

Keyword : Aza-BODIPY, NAPHTHALENE DIIMIDE, FLUORESCENT SENSOR, COPPER
DETECTION

MISS PANIDA PRAIKAEW : FLUORESCENCE SENSORS BASED ON CORE-SUBSTITUTED NAPHTHALENE DIIMIDE AND AZA-BODIPY FOR RECOGNITION OF METAL IONS
THESIS ADVISOR : ASSOCIATE PROFESSOR DR. NANTANIT WANICHACHEVA

In this work, two new fluorescence probes had been successfully synthesized for detection of Cu^{2+} based on core-substituted naphthalene diimide and Aza-BODIPY (N1102 and N1004). The probes exhibited ON-OFF fluorescence quenching toward Cu^{2+} in aqueous buffer solutions and provided high sensitivity and selectivity to Cu^{2+} in the presence of interfering metal ions. Especially, the Cu^{2+} sensing ability of the N1004 demonstrated absorbance and fluorescence signals in near-IR regions. The detection limit of N1102 and N1004 are 0.70 and 3.75 ppb, respectively which are lower than the acceptable drinking water concentration specified by the U.S. Environmental Protection Agency and World Health Organization. Importantly, the probes exhibited outstanding chromogenic and luminescent change in the presence of only Cu^{2+} and could detect Cu^{2+} in drinking water or human liver carcinoma cell line (HepG2) as a real sample.



กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.นันทนิตย์ วานิชชีวะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ เป็นอย่างสูง สำหรับความรู้ คำแนะนำ ความเมตตากรุณา และความช่วยเหลืออันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี อีกทั้งเป็นผู้สนับสนุน ให้โอกาสดิฉันในการไปนำเสนอผลงาน ทำวิจัยระยะสั้นในต่างประเทศ ซึ่งมีประโยชน์ต่อดิฉันเป็นอย่างมาก สามารถนำความรู้และประสบการณ์ที่ได้รับ มาพัฒนาต่อยอดงานวิจัยของตนเอง ทำให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ Prof. Steven J. Langford เป็นอย่างสูง สำหรับความรู้ คำชี้แนะต่างๆ ตลอดระยะเวลาที่ดิฉันทำวิจัยระยะสั้นที่ประเทศออสเตรเลีย และขอขอบคุณ Dr. Subashani Maniam ที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา และเป็นพี่เลี้ยงคอยดูแลสนับสนุนตลอดการทำวิจัยขณะอยู่ที่ประเทศออสเตรเลีย ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.อดิษฐ์ เจริญพานิช ที่ให้ความช่วยเหลือและการสนับสนุน การทำวิจัยด้าน cell fluorescence imaging และขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.จิตนภา ศิริรักษ์ และนางสาว ธารทิพย์ รุ่งเจริญ ในการทำ molecular modeling จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.วยา พุทธรังค์ ที่ให้เกียรติเป็นประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และ ดร.ธนศาสตร์ สุขศรีเมือง อาจารย์กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่างๆ อันเป็นประโยชน์ต่อวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณพ่อแม่ และน้องสาว สำหรับความรักความอบอุ่น และคอยเป็นกำลังใจอยู่เคียงข้าง ในทุกสถานการณ์มาโดยตลอด ให้การสนับสนุนในทุกๆ เรื่อง อีกทั้งขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ในกลุ่มวิจัย ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาในการแก้ปัญหาทางด้านต่างๆ และมีมิตรจิตอันดีที่มอบให้แก่กันมาโดยตลอด จนทำให้ดิฉันประสบความสำเร็จ

ขอขอบคุณคณาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่าน ที่กรุณาประสิทธิ์ประสาทความรู้ในทุกๆ ด้าน และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาเคมีและเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเคมีทุกท่าน ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการดำเนินงานเอกสาร ด้านอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำวิทยานิพนธ์ ด้วยความเอื้อเฟื้อตลอดมา สุดท้ายขอขอบคุณทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.)

ประโยชน์อันใดที่เกิดจากการทำวิทยานิพนธ์นี้ ย่อมเป็นผลมาจากความกรุณาของทุกท่าน ดังกล่าว ดิฉันรู้สึกซาบซึ้งและระลึกถึงความกรุณาเป็นอย่างยิ่ง จึงใคร่ขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

ภณิดา พรายแก้ว



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
บทที่ 1	1
บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
วัตถุประสงค์.....	5
สมมติฐานของงานวิจัย.....	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนี้.....	6
บทที่ 2	7
ทบทวนวรรณกรรม.....	7
บทที่ 3	16
อุปกรณ์และสารเคมี.....	16
อุปกรณ์.....	16
สารเคมี.....	17
บทที่ 4	20
วิธีการทดลอง.....	20
การสังเคราะห์เซ็นเซอร์.....	20
การทดสอบประสิทธิภาพของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1102 และ N1004 ในการตรวจจับ ไอออนโลหะหนัก.....	27

การศึกษาลักษณะการเกิดปฏิกิริยาระหว่างฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์และไอออน	36
การศึกษาการประยุกต์ใช้ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์สำหรับการตรวจวัดไอออนในตัวอย่างจริง.....	38
บทที่ 5	40
ผลการดำเนินงานวิจัย	40
การยืนยันโครงสร้างของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ N1102.....	41
การยืนยันโครงสร้างของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ N1004.....	48
การทดสอบประสิทธิภาพของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1102 ในการตรวจจับไอออนทองแดง..	59
การศึกษาลักษณะการเกิดปฏิกิริยาระหว่างฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1102 และไอออนทองแดง	71
การศึกษาการประยุกต์ใช้ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1102 สำหรับการตรวจวัดไอออนทองแดงในตัวอย่างจริง	73
การทดสอบประสิทธิภาพของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1004 ในการตรวจจับไอออนทองแดง..	75
การศึกษาลักษณะการเกิดปฏิกิริยาระหว่างฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1004 และไอออนทองแดง	85
การศึกษาการประยุกต์ใช้ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1004 สำหรับการตรวจวัดไอออนทองแดงในตัวอย่างจริง	87
บทที่ 6	89
สรุปผลการทดลอง.....	89
รายการอ้างอิง	91
ประวัติผู้เขียน.....	96

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญ

การปนเปื้อนของไอออนโลหะในสิ่งแวดล้อม สามารถก่อให้เกิดปัญหาสุขภาพที่รุนแรงต่อสิ่งมีชีวิตและมนุษย์ ในปัจจุบันไอออนโลหะมีบทบาทที่สำคัญในกระบวนการอุตสาหกรรมหลายประเภท มีการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการผลิตหรือถูกนำมาใช้เป็นส่วนผสมในหลายภาคส่วน อาทิเช่น ด้านอุตสาหกรรม ใช้ในกระบวนการผลิตหลอดไฟ พิววีซี สีทาอาคาร ถ่านไฟฉาย สำหรับทางด้านการเกษตร เป็นส่วนผสมของยาฆ่าแมลงและปุ๋ย ใช้ในการกำจัดเชื้อรา การเคลือบเมล็ดพืช หรือถูกใช้เป็นส่วนผสมของยา ผลิตเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ เครื่องสำอางค์ หรือเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการต่างๆ ไอออนโลหะหลายชนิดมีบทบาทและหน้าที่สำคัญในระบบชีวภาพ มีประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์เมื่อมีอยู่ในปริมาณที่เหมาะสม แต่เนื่องจากไอออนโลหะสามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนได้ดีกับสารประกอบอินทรีย์ที่ประกอบด้วย อะตอมของออกซิเจน (O) ไนโตรเจน (N) หรือซัลเฟอร์ (S) ซึ่งสารประกอบอินทรีย์เหล่านี้มีมากมายในร่างกายมนุษย์และในระบบชีวภาพ ดังนั้นเมื่อมีไอออนโลหะในปริมาณที่มากเกินไปจะส่งผลให้โครงสร้างของโปรตีนผิดปกติ เกิดการยับยั้งระบบเอ็นไซม์ และทำให้เกิดความเป็นพิษร้ายแรง หรือ ก่อให้เกิดโรคมะเร็ง

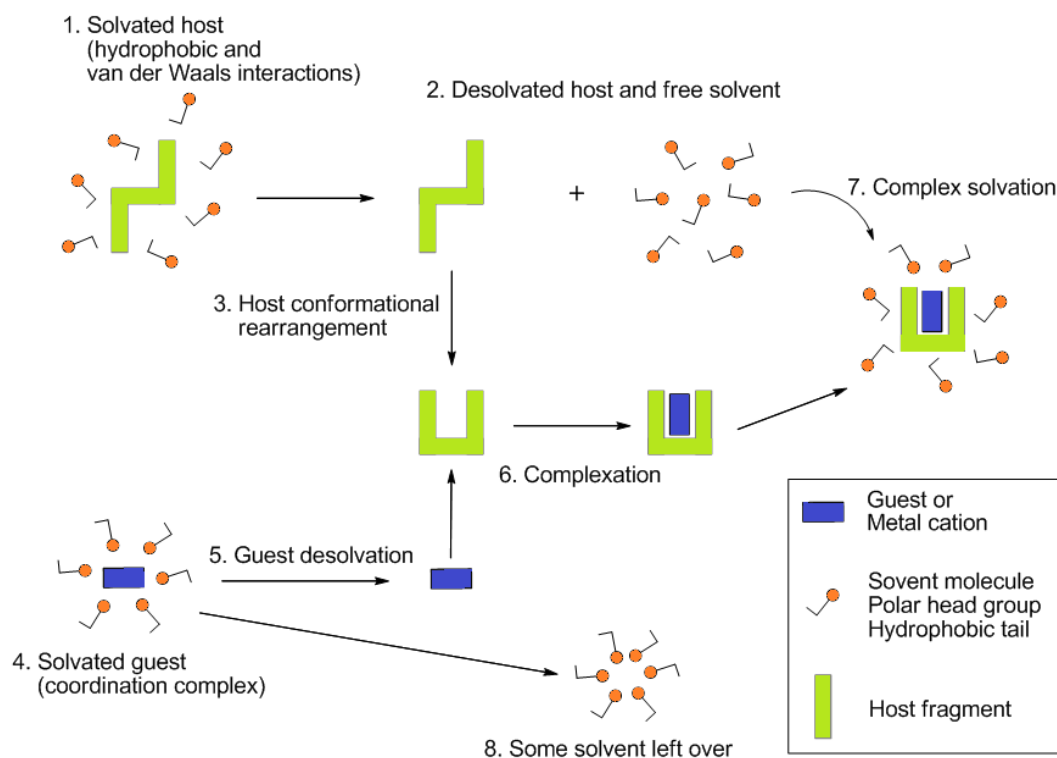
ทองแดง เป็นโลหะหนักชนิดหนึ่ง จัดอยู่ในประเภทโลหะแทรนซิชัน (Transition metal) ถูกนำมาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาหรือส่วนประกอบที่สำคัญในกระบวนการผลิตต่างๆ ในภาคอุตสาหกรรม นอกจากนี้ยังมีบทบาทที่สำคัญในกระบวนการทำงานของเอ็นไซม์ของกระบวนการทางชีวภาพภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต [1-3] ในรูปของสารประกอบไอออนโลหะ แต่หากร่างกายได้รับทองแดงในปริมาณที่มากเกินไป จะเกิดผลเสียต่อสมดุลและกลไกต่างๆ ของร่างกายในระดับเซลล์ได้ [4] เช่น ทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ เวียนหัว อาเจียน เกิดการอักเสบในช่องท้องและกล้ามเนื้อ การทำงานของหัวใจผิดปกติ อาจส่งผลให้เกิดความผิดปกติทางจิตและระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และความผิดปกติของปริมาณไอออนทองแดงในร่างกายยังเป็นหนึ่งในสาเหตุของโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) [5-7] ซึ่งส่งผลกระทบต่อการทำงานของสมองและเชื่อมโยงกับกลุ่มอาการ Menkes Syndrome [5, 8] และโรควิลสัน (Wilson's Diseases) [9] เนื่องด้วยตับทำหน้าที่บกพร่อง ไม่สามารถขับทองแดงออกจากร่างกายได้ตามปกติ ซึ่งจะทำให้ร่างกายของผู้ป่วยมีอาการสั่นเทาอยู่ตลอดเวลา มีน้ำมูกน้ำลายไหล

กล้ามเนื้อแข็งเกร็ง ควบคุมการพูดลำบาก ด้วยเหตุนี้องค์การอนามัยโลก (WHO) และ United States Environmental Protection Agency (U.S.EPA) จึงมีการกำหนดระดับปริมาณทองแดงที่สามารถปนเปื้อนในน้ำดื่มได้ไม่เกิน 1.0 และ 1.3 ppm [10] ตามลำดับ

ด้วยเหตุนี้ จึงมีการพัฒนาและออกแบบฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์เพื่อเป็นวิธีการหนึ่งสำหรับแก้ไขหรือเฝ้าระวังปัญหาสิ่งแวดล้อมที่อาจจะเกิดขึ้น โดยเฉพาะสิ่งแวดล้อมทางน้ำซึ่งเป็นแหล่งปนเปื้อนของไอออนโลหะที่สำคัญซึ่งสามารถนำมาสู่การปนเปื้อนในห่วงโซ่อาหาร อีกทั้งสามารถพัฒนา เพื่อนำไปใช้ประโยชน์หรือเป็นตัวเลือกหนึ่งสำหรับการประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ให้มีประสิทธิภาพในการรักษาที่ดียิ่งขึ้น ซึ่งการใช้ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์เพื่อตรวจจับโมเลกุลหรือไอออน โดยตรวจวัดด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปีเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีความสนใจอย่างแพร่หลายในการตรวจวิเคราะห์ไอออนโลหะชนิดต่างๆ ทั้งด้านคุณภาพวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์ เนื่องจากมีข้อดีคือเป็นเทคนิคที่มีสภาพไว (sensitivity) ในการวิเคราะห์สูง ใช้สารตัวอย่างเพียงเล็กน้อยก็สามารถแสดงผลในเวลาอันรวดเร็ว จึงสามารถใช้วิเคราะห์อย่างต่อเนื่อง (continuous monitoring) อีกทั้งไม่ทำลายสารตัวอย่างอีกด้วย งานวิจัยนี้จึงนำเสนอการออกแบบและสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ชนิดใหม่สำหรับตรวจสอบคุณภาพวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์ของไอออนโลหะในสิ่งแวดล้อมที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบหรือระบบเซลล์สิ่งมีชีวิต ที่มีความไวสูง (high sensitivity) และมีความจำเพาะเจาะจงสูง (selectivity) ต่อไอออนโลหะ เพื่อใช้เฝ้าระวังและติดตามตรวจสอบปริมาณของไอออนโลหะให้อยู่ในสถานะที่เหมาะสม

การออกแบบฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ (fluorescence sensor) ให้สามารถตรวจจับไอออน โดยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปีได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยทั่วไปโครงสร้างจะประกอบด้วย 2 ส่วนหลัก ได้แก่ 1. ฟลูออโรฟอร์ (fluorophore) คือส่วนที่แสดงคุณสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อมีการดูดกลืนพลังงานในช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสม 2. ไอโอโนฟอร์ (ionophore) เป็นส่วนที่สามารถตรวจจับโมเลกุลหรือไอออนที่ต้องการตรวจวัด ดังนั้นจึงเรียกสารที่ใช้วิเคราะห์โดยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปีนี้ว่า “ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์” หรือ “ฟลูออโรไอโอโนฟอร์ (fluoroionophore)” กระบวนการทำงานจะใช้แสงเหนี่ยวนำให้เกิดสถานะกระตุ้น (light-induced logic operation) เพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงของการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ หรือการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเล็ต และภายในโครงสร้าง ไอโอโนฟอร์ (ionophore) จะแสดงอันตรกิริยาจำเพาะ (selective interaction) ต่อไอออนที่ต้องการวิเคราะห์ โดยไอโอโนฟอร์ทำหน้าที่

เปรียบเสมือนโฮสต์ และไอออนที่ต้องการตรวจจับเปรียบเสมือนเกสต์ ซึ่งกระบวนการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโฮสต์กับเกสต์ในสารละลายสามารถแสดงดังภาพที่ 1 เมื่ออยู่ในสารละลาย ตัวทำละลายจะจัดตัวล้อมรอบโมเลกุลโฮสต์ด้วยอันตรกิริยาแวนเดอร์วาลส์ (van der Waals) และอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) และล้อมรอบโมเลกุลเกสต์ด้วยอันตรกิริยาโคออร์ดิเนต (coordination) เพื่อให้สารทั้งสองสามารถคงตัวอยู่ได้ในสารละลาย ซึ่งการเกิดการตรวจจับหรือการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไอออนโอฟอร์และไอออนนั้น โมเลกุลของสารทั้งสองชนิดจำเป็นต้องใช้พลังงานเพื่อทำลายแรงยึดเหนี่ยวที่เกิดจากโมเลกุลของสารละลาย เพื่อให้ได้โมเลกุลอิสระ จากนั้นโมเลกุลโฮสต์อิสระจะเกิดการปรับเปลี่ยนโครงสร้างเพื่อให้มีขนาดและรูปร่างที่เหมาะสมกับเกสต์ จึงสามารถตรวจจับไอออนที่ต้องการได้ ในขณะที่สารประกอบที่เกิดขึ้นจะถูกโมเลกุลของสารละลายล้อมรอบไว้เช่นเดียวกัน [11]

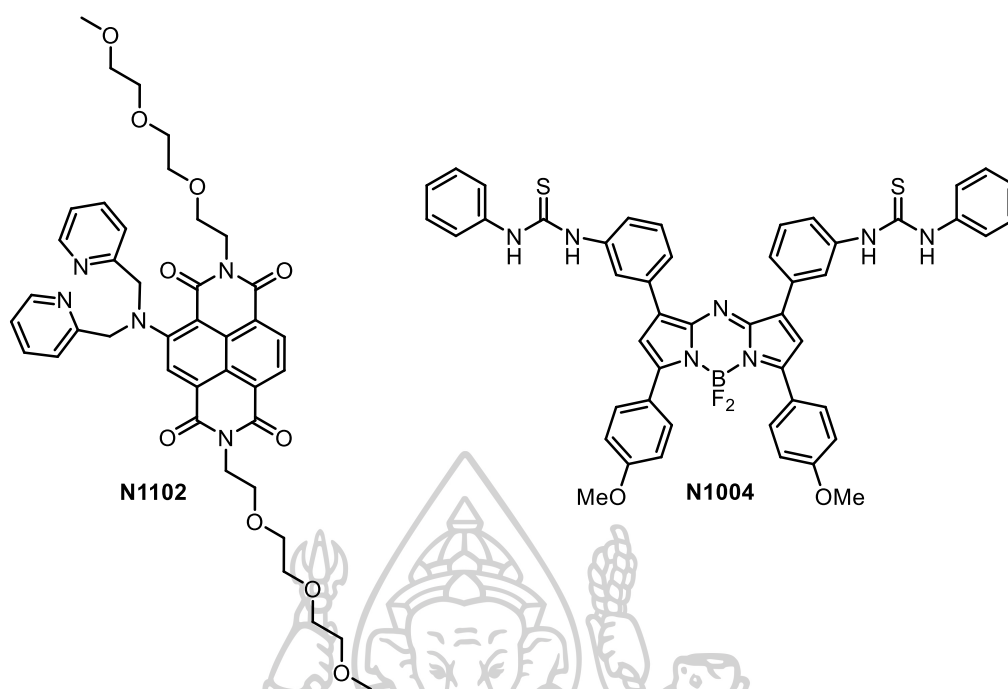


ภาพที่ 1 การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไอออนโอฟอร์และไอออน

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

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

ในงานวิจัยนี้เลือกใช้ฟลูออโรฟอร์ 2 ชนิด เป็นส่วนในการแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ (signaling moiety) คือ แนฟทาลีนไดอิมไมด์ (Core-Substituted Naphthalene Diimides) ซึ่งมีคุณสมบัติทางแสงที่ดี สามารถดูดกลืนแสงและคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ได้ในช่วงความยาวคลื่นวิสิเบิล (visible region) ซึ่งโครงสร้างของแนฟทาลีนไดอิมไมด์สามารถถูกออกแบบและปรับเปลี่ยนโครงสร้างได้ง่าย เพื่อให้ละลายน้ำได้ดีและมีสมบัติทางกายภาพเชิงแสง (Photophysical properties) ตามที่ต้องการ เหมาะสำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ในสิ่งแวดล้อม และฟลูออโรฟอร์อีกชนิดก็คือ เอซาโบดิปี (aza-BODIPY) ที่สามารถดูดกลืนแสงและคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้ในช่วงความยาวคลื่นใกล้อินฟราเรด (near-infrared region) ซึ่งเป็นช่วงความยาวคลื่นที่ไม่ทำลายระบบเซลล์สิ่งมีชีวิตและสามารถปรับเปลี่ยนโครงสร้างได้อย่างไม่ซับซ้อน ส่วนของไอออนฟอรจะออกแบบตามทฤษฎี Hard and Soft Acids and Bases (HSAB theory) [12] ซึ่งไอออนฟอรที่ใช้จะมีองค์ประกอบของอะตอมของไนโตรเจน (N) หรืออะตอมของซัลเฟอร์ (S) ที่มีคุณสมบัติเป็น soft base ที่สามารถทำการดักจับ (recognition event) ไอออนทองแดงที่มีคุณสมบัติเป็น soft acid ได้อย่างจำเพาะเจาะจง และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสัญญาณทางแสง (optical signal)



ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดใหม่สำหรับวิทยานิพนธ์นี้

วัตถุประสงค์

2.1. เพื่อออกแบบและสังเคราะห์เซ็นเซอร์ที่มีคุณสมบัติในการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์สำหรับตรวจจับไอออนโลหะ ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ในเชิงปริมาณ และคุณภาพ ด้วยวิธีทางฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรสโกปีและ/หรืออุลตราไวโอเลตสเปกโตรสโกปี

2.2. เพื่อออกแบบและสังเคราะห์เซ็นเซอร์ที่มีความไว (Sensitivity) และมีความจำเพาะเจาะจง (Selectivity) ในการตรวจจับไอออนโลหะในสารละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ และสามารถนำไปพัฒนาตรวจวัดไอออนโลหะในตัวอย่างจริงของเซลล์สิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดลอมที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก

สมมติฐานของงานวิจัย

คาดว่าเซ็นเซอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่สามารถตรวจจับไอออนทองแดงได้อย่างไวและมีความจำเพาะสูง สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในสิ่งแวดลอมที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบหรือเซลล์สิ่งมีชีวิตได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนี้

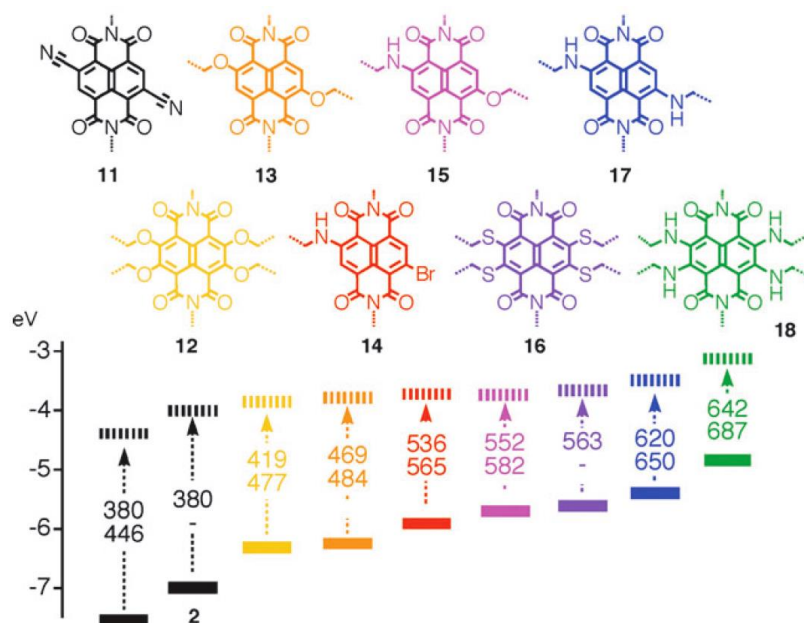
สามารถสังเคราะห์สารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ชนิดใหม่ 2 ชนิดที่สามารถตรวจจับไอออนทองแดงได้อย่างไวและมีความจำเพาะเจาะจงสูง ในขณะเดียวกันก็มีค่า detection limit ที่ต่ำ และเปอร์เซ็นต์ผลผลิตในการสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ที่สูง สามารถทำงานได้ในสภาวะที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบหรือเซลล์สิ่งมีชีวิต



บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

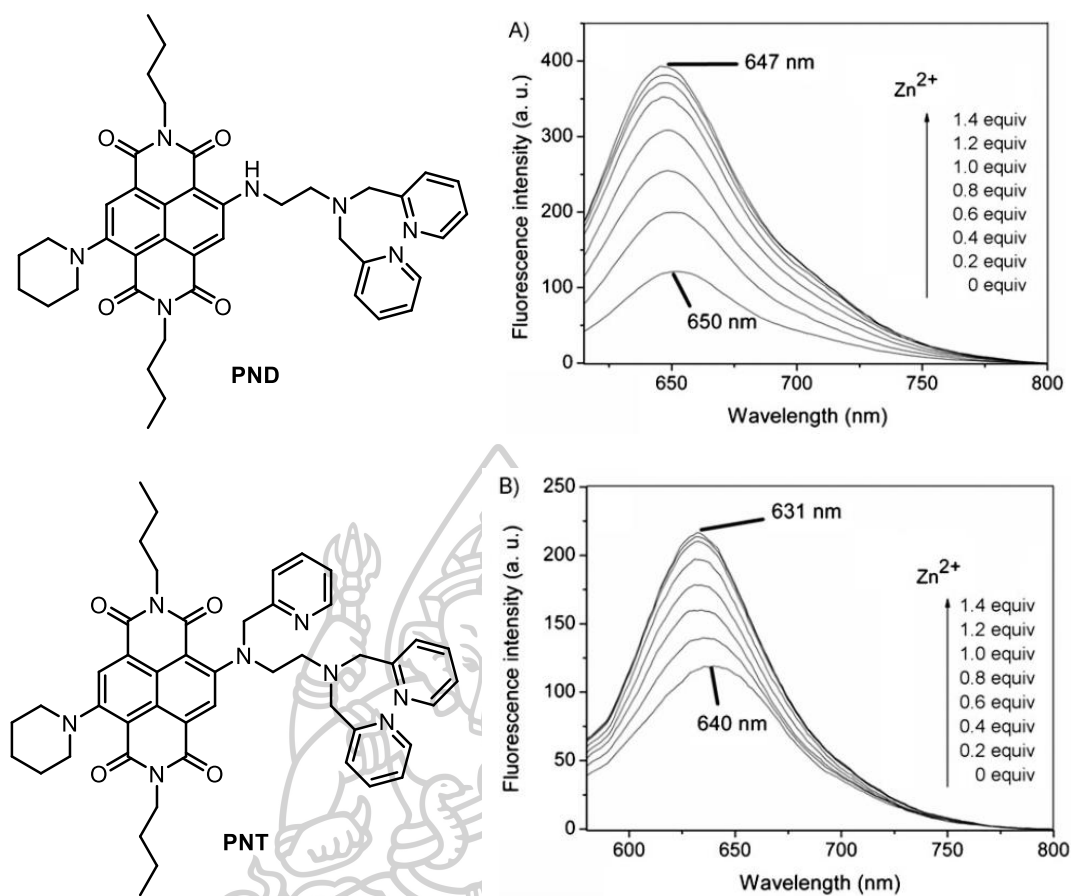
การนำฟลูออโรไอโอโนฟอร์หรือโมเลกุลของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ มาใช้ในการติดตามหรือตรวจจับปริมาณไอออนโลหะหนัก เป็นเทคนิคที่ได้รับความสนใจจากนักวิจัยอย่างแพร่หลาย โดยผู้วิจัยหลายคณะพยายามที่จะพัฒนาประสิทธิภาพของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ให้ดีขึ้น โดยมุ่งหวังที่จะพัฒนาการสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ให้มีขั้นตอนที่สั้น ใช้สารตั้งต้นราคาไม่แพง และมุ่งเน้นให้เซ็นเซอร์ที่สังเคราะห์ได้มีสภาพไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) ต่อไอออน และมีความจำเพาะเจาะจง (selectivity) ต่อไอออนโลหะเป้าหมายสูงขึ้น รวมไปถึงการนำเซ็นเซอร์ไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ไอออนในสารละลายน้ำ และ/หรือในสารละลายผสมของตัวทำละลายอินทรีย์กับน้ำ โดยอนุพันธ์ของแนฟทาลีนไดอิมิด (Core-Substituted Naphthalene Diimides) เป็นฟลูออโรฟอร์ตัวหนึ่งที่ได้รับความสนใจ เนื่องจากถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลที่มีความจำเพาะซึ่งกันและกัน (Supramolecular chemistry) ซึ่งจะเกิดอันตรกิริยาแบบ non-covalent bond หรือถูกนำมาใช้ในระบบที่มีการถ่ายโอนอิเล็กตรอน [13-16] เช่น สารกึ่งตัวนำ (Semiconductor) และฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ ซึ่งอนุพันธ์ของแนฟทาลีนไดอิมิดง่ายต่อการออกแบบและปรับปรุงโครงสร้างเพื่อให้มีสมบัติทางกายภาพเชิงแสง (Photophysical properties) และสมบัติทางเคมีตามที่ต้องการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการแทนที่ด้วยหมู่ให้อิเล็กตรอน (electron donor substituents) บน Core-Substituted Naphthalene Diimides ที่ตำแหน่ง 2, 3, 6 และ 7 จะทำให้ได้อนุพันธ์ของแนฟทาลีนไดอิมิดที่มีสีที่แตกต่างกันออกไป และมีช่วงการดูดกลืนแสงที่หลากหลายขึ้นอยู่กับชนิดหมู่ให้อิเล็กตรอนและจำนวนหมู่แทนที่บน Core-Substituted Naphthalene Diimides ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 แสดงระดับพลังงาน HOMO (เส้นทึบ) และ LUMO (เส้นประ) และช่วงความยาวคลื่นที่มากที่สุดของการดูดกลืนแสง (ด้านบน) และคายแสง (ด้านล่าง) ของการแทนที่ด้วยหมู่ต่างๆ บน Core-substituted naphthalenediimides [17]

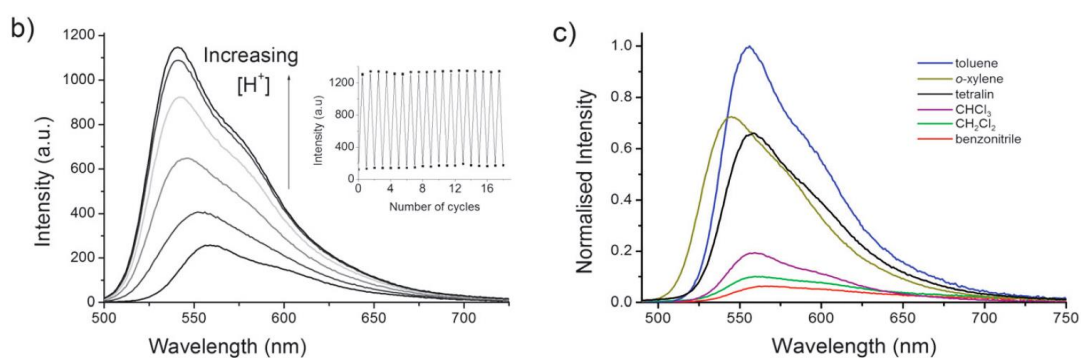
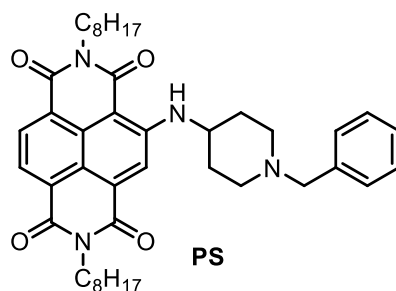
จากคุณสมบัติดังกล่าวจึงมีการนำอนุพันธ์ของแนพทาไลน์ไดอิมไมด์ไปใช้เป็นสารเรืองแสงหรือสีย้อม หนึ่งใน การนำไปใช้ประโยชน์คือการนำมาเป็นฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ ดังตัวอย่างในงาวิจัยต่อไปนี้

ในปี ค.ศ. 2010 Xinyu Lu และคณะ [18] ได้สังเคราะห์ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์เพื่อใช้สำหรับตรวจจับไอออนสังกะสี (ภาพที่ 4) โดยออกแบบ core-substituted naphthalenediimide ให้มีการดูดกลืนและคายแสงใกล้ช่วงรังสีอินฟราเรด ซึ่ง N,N-di(pyridin-2-ylmethyl)ethane-1,2-diamine (DPEA) และ N,N,N'-tri(pyridin-2-ylmethyl)ethane-1,2-diamine (TPEA) ถูกนำมาใช้เป็นไอออนฟอรีในการดักจับไอออนสังกะสี ซึ่งฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ PND และ PNT สามารถดักจับไอออนสังกะสีได้ดีในสภาวะสารละลายผสมระหว่างอะซิโตน (Acetone) และบัฟเฟอร์ MOPS (100 mM MOPS buffer) ในอัตราส่วน 90:10 ที่ pH 7.0 ซึ่งแสดงสัญญาณในลักษณะ OFF-ON Fluorescence switch เมื่อมีการจับกับไอออนสังกะสีจะทำให้ความเข้มของฟลูออเรสเซนต์เพิ่มขึ้น



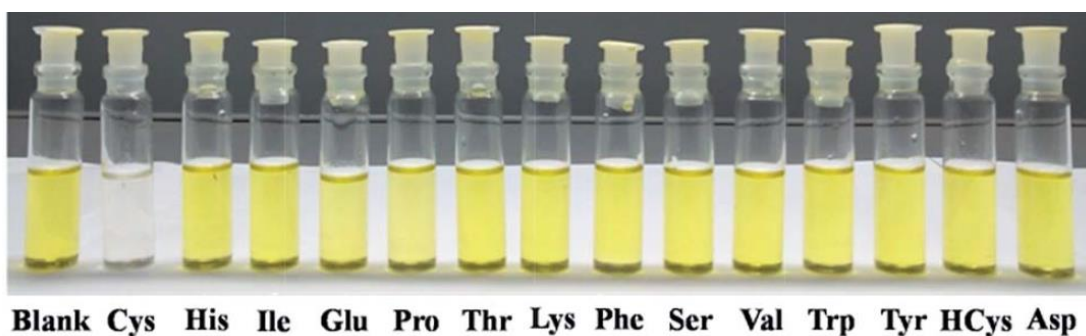
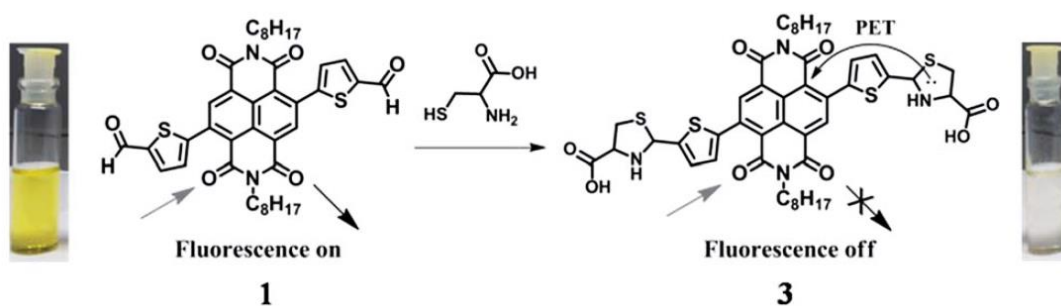
ภาพที่ 4 โครงสร้างฟลูออโรเรซเซนต์เซ็นเซอร์ PND และ PNT และกราฟแสดงการคายแสงในสภาวะที่มีการดักจับไอออนสังกะสี

ในปี ค.ศ. 2013 Heather F. Higginbotham และคณะ [19] ได้ออกแบบ core-substituted naphthalenediimide (ภาพที่ 5) เพื่อประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดไอออนโปรตอน (H⁺) และศึกษาสมบัติทางกายภาพเชิงแสงในตัวทำละลายชนิดต่างๆ



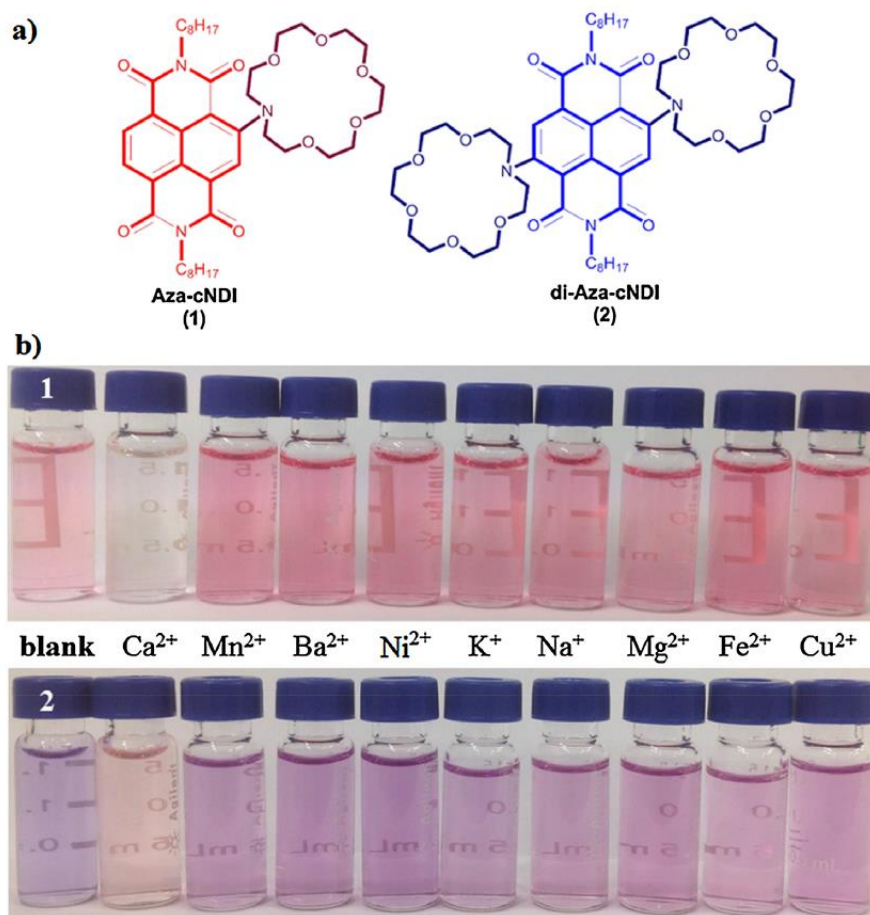
ภาพที่ 5 โครงสร้างฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ PS และกราฟแสดงการคายแสงในสภาวะที่มีโปรตอนไฮดรอน (H^+) และตัวทำละลายแต่ละชนิด

ปี ค.ศ. 2015 Sharad R. Bobe และคณะ [20] ได้ออกแบบเซ็นเซอร์โดยใช้ core-substituted naphthalenediimide (ภาพที่ 6) เป็นส่วนที่แสดงสัญญาณในการตรวจวัดกรดอะมิโนซิสเทอีน (cysteine; Cys) โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างหมู่แอลดีไฮด์ (aldehyde groups) ของ thiazolidine heterocycle บน core-substituted naphthalenediimide กับหมู่ไทออล (Thio group; -SH) และหมู่อะมิโน (Amino group; $-NH_2$) ของซิสเทอีน ซึ่งเซ็นเซอร์ที่สังเคราะห์ได้มีความจำเพาะเจาะจงต่อกรดอะมิโนซิสเทอีน ทำงานได้ดีในสารละลาย DMSO สามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงสีได้ด้วยตาเปล่าจากสีเหลืองเป็นไม่มีสี ในขณะที่สีของสารละลายเซ็นเซอร์ที่มีกรดอะมิโนตัวอื่นผสมอยู่จะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง



ภาพที่ 6 แสดงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซ็นเซอร์และสีของสารละลายเซ็นเซอร์ ในสภาวะที่มีกรดอะมิโนชนิดต่างๆ

ในปี ค.ศ. 2017 William Hughes และคณะ [21] ได้ออกแบบเซ็นเซอร์โดยใช้ core-substituted naphthalenediimide เป็นส่วนที่แสดงสัญญาณในการตรวจวัดไอออนแคลเซียม (Ca^{2+}) โดยในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยใช้วง aza-crown ether ในการดักจับไอออนแคลเซียม (ภาพที่ 7) ซึ่งเซ็นเซอร์ที่สังเคราะห์ได้มีกระบวนการทำงานผ่าน Photoinduced electron transfer (PET) ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นตัวอย่างแรกของการศึกษาผลของการแทนที่ด้วย aza-crown ต่อประสิทธิภาพการเรืองแสงที่เกิดจาก chelation-induced ของสาร naphthalenediimide (NDI) ซึ่งเซ็นเซอร์ทำงานได้ดีในสารละลาย acetonitrile สามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงสีได้ด้วยตาเปล่า สำหรับเซ็นเซอร์ Aza-cNDI สามารถสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงจากสีชมพูเป็นไม่มีสี และสีของสารละลายเซ็นเซอร์ di-Aza-cNDI เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นชมพูอ่อนในภาวะที่มีไอออนแคลเซียม (Ca^{2+})

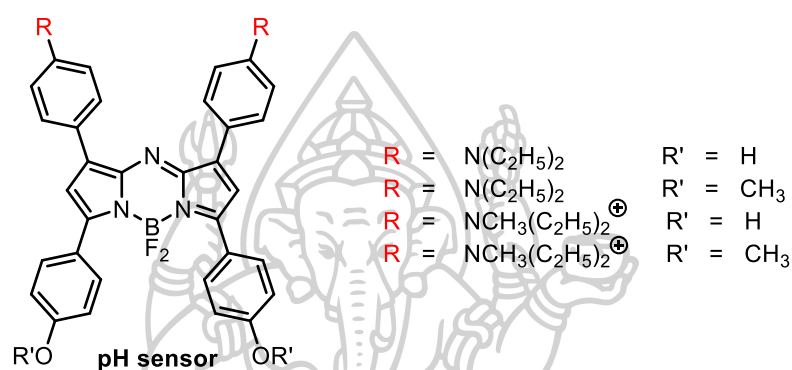


ภาพที่ 7 แสดงโครงสร้างของเซ็นเซอร์ Aza-cNDI และ di-Aza-cNDI และการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเซ็นเซอร์ในสภาวะที่มีไอออนชนิดต่างๆ

นอกจากนี้ Aza-BODIPY เป็นฟลูออโรฟอร์อีกตัวหนึ่งที่น่าสนใจ มีโครงสร้างเป็น dipyrromethene ที่สร้างพันธะอยู่กับ BF₂ สารประกอบ Aza-BODIPY จัดอยู่ในกลุ่มของอนุพันธ์ Boron dipyrromethene (BODIPY) ซึ่งอะตอมคาร์บอน (C) ตำแหน่งที่ 8 ถูกแทนที่ด้วยอะตอมของไนโตรเจน (N) ส่งผลให้การดูดกลืนแสงและการคายแสงเข้าใกล้ช่วงอินฟราเรด [22, 23] ซึ่งปัจจุบันถูกนำมาประยุกต์ใช้งานเป็นสารเรืองแสงในการติดตามและถ่ายภาพในเซลล์สิ่งมีชีวิต [24, 25] ด้านชีวภาพ และวิทยาศาสตร์ทางยาเป็นอย่างมาก เนื่องจาก Aza-BODIPY มีการดูดกลืนและคายแสงในช่วงความยาวคลื่นใกล้อินฟราเรด ซึ่งแสงในช่วงดังกล่าวจะมีพลังงานน้อยกว่าเมื่อเทียบกับความยาวคลื่นในช่วงแสงที่ตามองเห็น (visible region) ทำให้ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต ส่งผลให้ง่ายต่อการศึกษากับระบบภายในเซลล์สิ่งมีชีวิตมากขึ้น การใช้ฟลูออโรฟอร์ที่มีการดูดกลืนและคายแสง

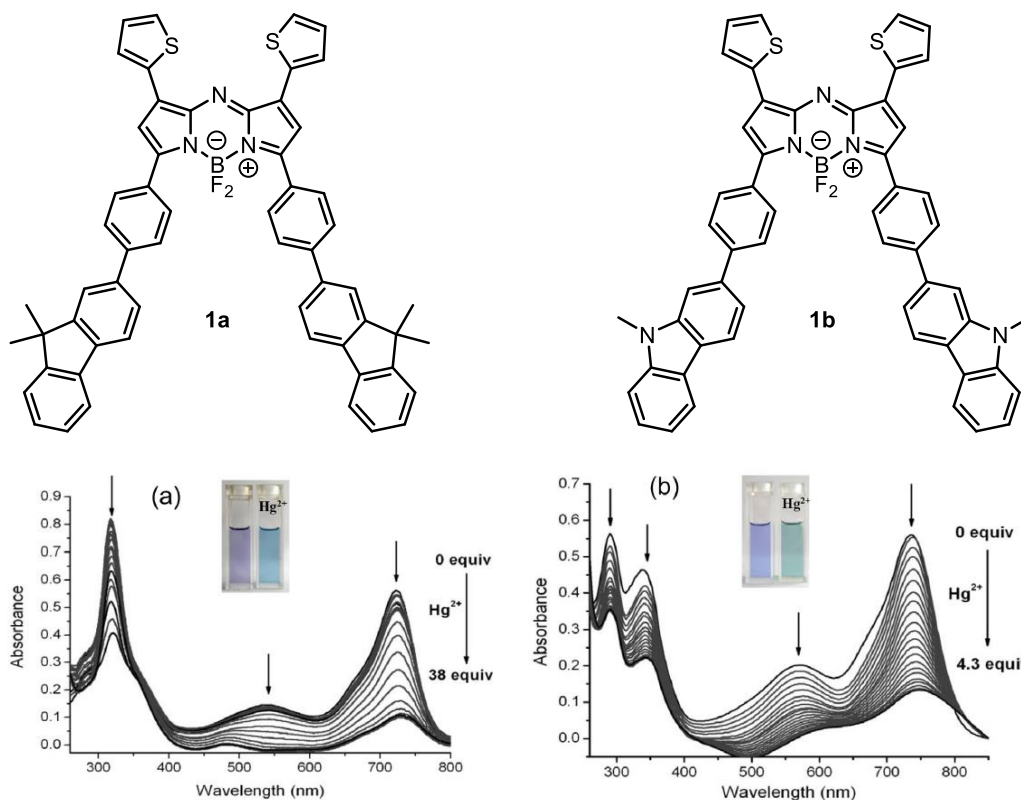
ในช่วงความยาวคลื่นใกล้อินฟราเรดจะช่วยลด background absorption และ autofluorescence ของโครงสร้างทางชีวภาพได้ อีกทั้งโครงสร้างของโมเลกุลสามารถถูกปรับเปลี่ยนได้ง่ายเหมาะสำหรับการนำมาใช้งาน ซึ่งมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ aza-BODIPY ดังนี้

ในปี ค.ศ. 2013 Chen และคณะ [26] ได้เสนอการสังเคราะห์อนุพันธ์ aza-BODIPY เพื่อประยุกต์ใช้เป็น pH-Sensitive Fluorescent Dyes ใน Micelles และ Liposomes (ภาพที่ 8) รวมถึงการทำ Live-Cell Imaging



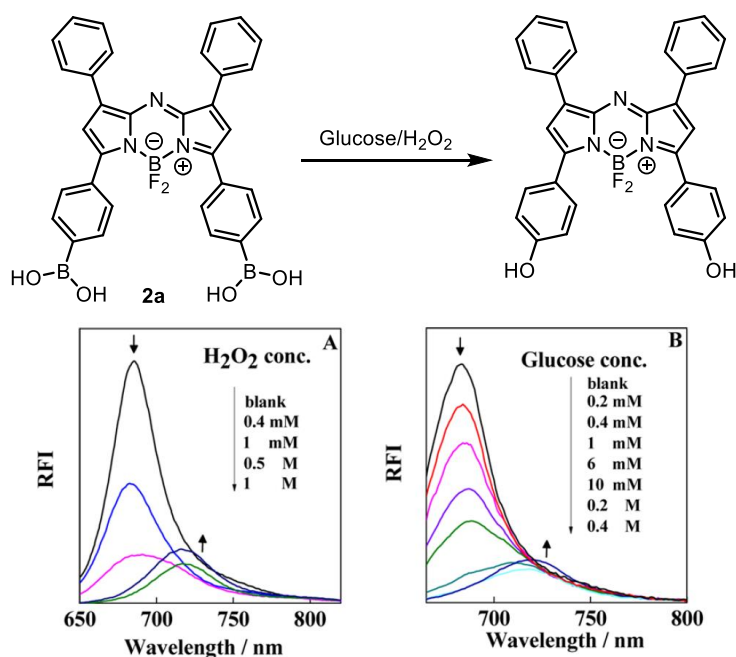
ภาพที่ 8 โครงสร้างของ pH sensor ที่มีการปรับเปลี่ยนหมู่ R- ของอนุพันธ์ aza-BODIPY

ในปี ค.ศ. 2014 Shujuan Liu และคณะ [27] ได้เสนอการสังเคราะห์อนุพันธ์ aza-BODIPY 1a และ 1b (ภาพที่ 9) ซึ่งมีการปรับเปลี่ยนหมู่แทนที่เป็น Carbazole และ fluorine ส่งผลให้สมบัติทางกายภาพเชิงแสงเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางที่เข้าใกล้ช่วงรังสีอินฟราเรดมากขึ้น โดยอนุพันธ์ aza-BODIPY 1a และ 1b ถูกออกแบบให้มี thienyl groups เพื่อใช้ในการดักจับไอออนปรอทได้อย่างจำเพาะเจาะจง ซึ่งเซ็นเซอร์ทั้ง 2 ชนิด จะแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ในลักษณะ ON-OFF Fluorescence switch เมื่อมีการดักจับกับไอออนปรอทในสถานะตัวทำละลายอินทรีย์



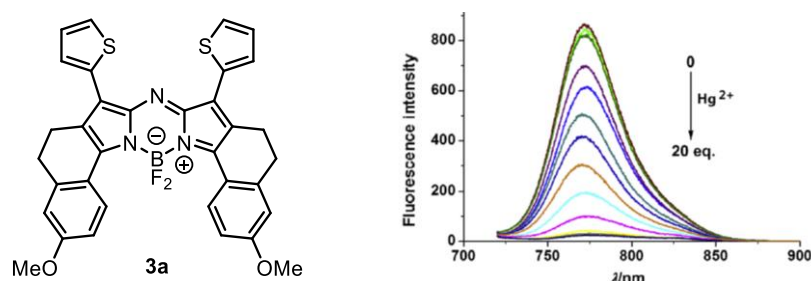
ภาพที่ 9 โครงสร้างฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ **1a** และ **1b** และกราฟแสดงการคายแสงในสภาวะที่มีการดักจับไอออนปรอท

ต่อมาในปี ค.ศ. 2015 Yueling Liu และคณะ [28] ได้เสนอการสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ **2a** (ภาพที่ 10) โดยใช้ aza-BODIPY โดยมีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างให้มีหมู่ boronic acid เพื่อให้เกิดการดักจับกับโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคส พบว่าเซ็นเซอร์ชนิดนี้มีความสามารถในการตรวจวัดน้ำตาลกลูโคสในเลือดได้อย่างจำเพาะเจาะจง จากการที่กลูโคสจะถูกเปลี่ยนไปเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide; H₂O₂) ด้วยเอนไซม์ glucose oxidase โดยเซ็นเซอร์ชนิดนี้สามารถวัดระดับน้ำตาลกลูโคสได้ต่ำกว่าระดับน้ำตาลกลูโคสที่มีอยู่ในเลือดของคนปกติ 40 เท่า เมื่อมีการดักจับกับน้ำตาลกลูโคสจะเกิดการคายแสงในช่วงความยาวคลื่น 682 และ 724 นาโนเมตร ซึ่งเป็นย่านที่ใกล้รังสีอินฟราเรด ส่งผลให้สารรบกวนอื่นๆ (Interference) ที่มีอยู่ในเลือดไม่รบกวนการวิเคราะห์ ทำให้การวิเคราะห์มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือมากขึ้น



ภาพที่ 10 โครงสร้างฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ **2a** และการเปลี่ยนแปลงในสภาวะที่มีการเติมกลูโคสและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ในปี ค.ศ. 2016 Xin-Dong Jiang และคณะ [29] ได้เสนอการสังเคราะห์อนุพันธ์ aza-BODIPY **3a** (ภาพที่ 11) โดยมีส่วนของ 2-vinylthiophene ทำหน้าที่เป็นไอออนฟอรีในการดักจับไอออนปรอท โดยมีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ที่ 760 นาโนเมตร และมีการคายแสงในช่วงความยาวคลื่น 782 นาโนเมตร เซ็นเซอร์ชนิดนี้มีความสามารถในการตรวจวัดไอออนปรอทในตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งผู้วิจัยได้นำเซ็นเซอร์ชนิดนี้ไปประยุกต์ใช้เพื่อตรวจสอบและติดตามปริมาณไอออนปรอทภายในเซลล์สิ่งมีชีวิต MCF-7 ได้



ภาพที่ 11 โครงสร้างฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ **3a** และกราฟแสดงการคายแสงเมื่อมีการดักจับไอออนปรอท

บทที่ 3 อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

- 1.1 เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance 300 MHz: Bruker 300
- 1.2 เครื่อง UV-visible spectrometer: HP-8453
- 1.3 เครื่อง Fluorescence spectrometer: Perkin Elmer Luminescence spectrometer model LS-50B
- 1.4 เครื่อง Mass spectrometer: ESI-FT-ICR (High resolution) Bruker BioAPEX 70e spectrometer
- 1.5 เครื่อง Rotary evaporator: Buchi Rotavapor R-114
- 1.6 เครื่อง Vacuum pump: Tokyo Rikakikai Co., Ltd. model A-35
- 1.7 เครื่อง Hot air oven: Binder model ED115 (E2)
- 1.8 เครื่องชั่งละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง): Denver instrument model S-234
- 1.9 เครื่องชั่งละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง): Mettler Toledo model AB204
- 1.10 เครื่อง Hotplate and stirrer: Framo model M21/1
- 1.11 Micropipette: Finnpiette, HH10711 ขนาด 1-10 μL
- 1.12 TLC Silica gel 60 F₂₅₄ aluminium sheet, Merck
- 1.13 อุปกรณ์สำหรับเตรียมแผ่น preparative TLC: Desaga Brinkmann
- 1.14 กระดาษกรอง: Advantec ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 110 mm
- 1.15 กระดาษกรอง: Advantec ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 70 mm
- 1.16 เครื่องแก้วพื้นฐาน
- 1.17 ชุดกรองแบบลดความดัน
- 1.18 Clamp และ Clamp Holder

สารเคมี

- 2.1 Argon gas: Masser Specialty Gas Co., Ltd. (99.999 %)
- 2.2 Chloroform-*d* (contains 1% v/v of TMS): Sigma-Aldrich (99.8 atom %D)
- 2.3 Barium acetate: Sigma-Aldrich (99 %, $M_w = 255.43$ g/mol)
- 2.4 Barium chloride dehydrate: Sigma-Aldrich ($M_w = 244.27$ g/mol)
- 2.5 Barium perchlorate trihydrate: Strem chemical (99.9 %, $M_w = 336.24$ g/mol)
- 2.6 Cadmium acetate dehydrate: Fluka (98 %, $M_w = 266.53$ g/mol)
- 2.7 Anhydrous cadmium chloride: Fluka ($M_w = 183.31$ g/mol)
- 2.8 Cadmium perchlorate hexahydrate: Strem chemical (99 %, $M_w = 311.30$ g/mol)
- 2.9 Calcium chloride dehydrate: Carlo erba ($M_w = 147.01$ g/mol)
- 2.10 Calcium acetate: Fluka ($M_w = 158.17$ g/mol)
- 2.11 Calcium perchlorate tetrahydrate: Sigma-Aldrich (99 %, $M_w = 311.04$ g/mol)
- 2.12 Cobalt acetate tetrahydrate: Fluka ($M_w = 249.08$ g/mol)
- 2.13 Cobalt perchlorate hexahydrate: Sigma-Aldrich ($M_w = 365.93$ g/mol)
- 2.14 Copper acetate monohydrate: Fluka ($M_w = 199.65$ g/mol)
- 2.15 Copper perchlorate hexahydrate: Sigma-Aldrich (98 %, $M_w = 370.54$ g/mol)
- 2.16 Cupric chloride dehydrate: Fluka ($M_w = 170.48$ g/mol)
- 2.17 Anhydrous ferric chloride: Fluka ($M_w = 162.21$ g/mol)Hexane (distillation)
- 2.18 Iron acetate: Fluka ($M_w = 232.98$ g/mol)
- 2.19 Iron perchlorate hydrate: Sigma-Aldrich (98 %, $M_w = 354.20$ g/mol)
- 2.20 Lead acetate: Carlo ($M_w = 235.29$ g/mol)
- 2.21 Lead chloride: Unilab ($M_w = 278.10$ g/mol)
- 2.22 Lead perchlorate hydrate: Sigma-Aldrich (98 %, $M_w = 406.09$ g/mol)
- 2.23 Anhydrous lithium chloride: Fluka ($M_w = 42.39$ g/mol)
- 2.24 Lithium perchlorate trihydrate: Strem chemical (99 %, $M_w = 311.30$ g/mol)
- 2.25 Magnesium perchlorate hydrate: Fluka (98 %, $M_w = 223.21$ g/mol)
- 2.26 Magnesium chloride hexahydrate: Fluka ($M_w = 203.31$ g/mol)
- 2.27 Manganese acetate tetrahydrate: Fluka ($M_w = 245.09$ g/mol)
- 2.28 Manganese chloride monohydrate: Sigma-Aldrich ($M_w = 143.86$ g/mol)

- 2.29 Manganese perchlorate hexahydrate: Strem chemical (99 %, $M_w = 253.84$ g/mol)
- 2.30 Mercuric acetate: Fluka ($M_w = 318.68$ g/mol)
- 2.31 Mercuric chloride: Carlo erba ($M_w = 471.50$ g/mol)
- 2.32 Mercuric perchlorate hydrate: Sigma-Aldrich (98 %, $M_w = 372.06$ g/mol)
- 2.33 Nickel acetate tetrahydrate: BDH ($M_w = 248.84$ g/mol)
- 2.34 Nickel chloride hexahydrate: Fluka ($M_w = 237.71$ g/mol)
- 2.35 Nickel perchlorate hexahydrate: Fluka (≥ 98.0 %, $M_w = 365.69$ g/mol)
- 2.36 Potassium acetate: Fluka ($M_w = 98.14$ g/mol)
- 2.37 Potassium chloride: Fluka ($M_w = 74.55$ g/mol)
- 2.38 Potassium perchlorate: Sigma-Aldrich (99+ %, $M_w = 138.55$ g/mol)
- 2.39 Silver acetate: BDH ($M_w = 166.91$ g/mol)
- 2.40 Silver perchlorate monohydrate: Strem chemical (99 %, $M_w = 207.32$ g/mol)
- 2.41 Sodium acetate: Fluka ($M_w = 82.03$ g/mol)
- 2.42 Sodium chloride ($M_w = 58.5$ g/mol)
- 2.43 Sodium perchlorate: Fluka (98 %, $M_w = 82.03$ g/mol)
- 2.44 Sodium sulfate anhydrous: Sigma-Aldrich (99.0 %)
- 2.45 Zinc acetate dehydrate: Fluka ($M_w = 219.51$ g/mol)
- 2.46 Zinc perchlorate hexahydrate: Sigma-Aldrich ($M_w = 372.36$ g/mol)
- 2.47 Acetonitrile: LAB-SCAN
- 2.48 Dichloromethane (distillation)
- 2.49 Dichloromethane (for analysis): MERCK (99.8 %)
- 2.50 Chloroform (for analysis): MERCK
- 2.51 Ethanol (distillation)
- 2.52 Ethanol (absolute for analysis): MERCK
- 2.53 Ethylacetate (distillation)
- 2.54 Methanol (distillation)
- 2.55 Methanol (for analysis): MERCK (99.9 %)
- 2.56 *n*-Hexane (distillation)
- 2.57 *n*-Hexane (for analysis): Lab scan
- 2.58 De-ionized water: Department of chemistry, Silpakorn University

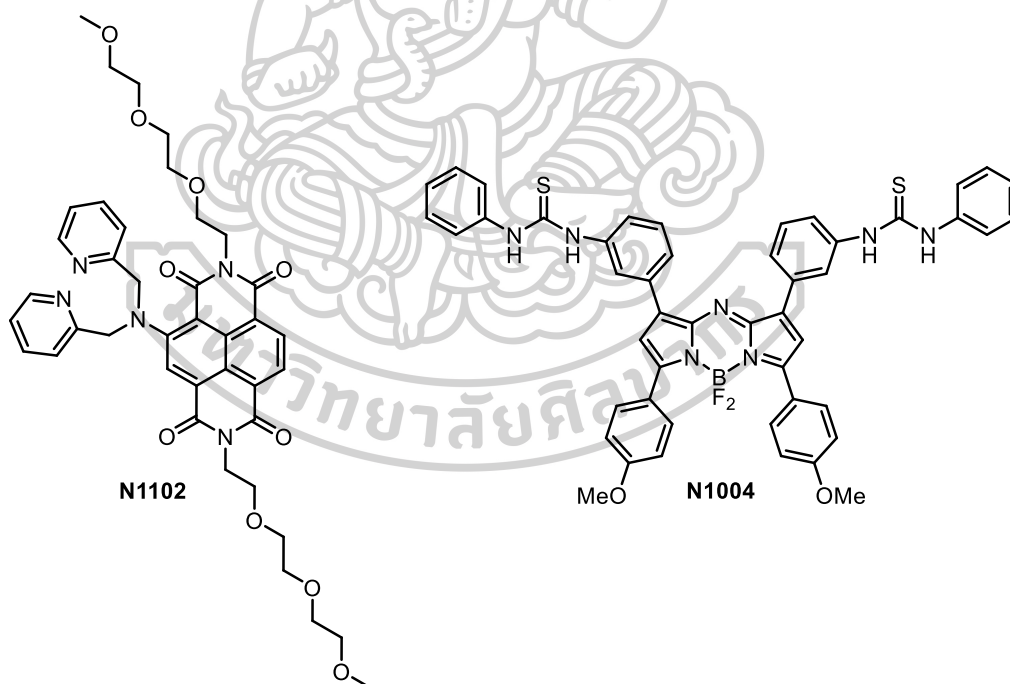
- 2.59 De-ionized water: Faculty of Pharmacy, Silpakorn University
- 2.60 Silica gel (ขนาด 63-200 μm): สำหรับ column chromatography, Merck
- 2.61 Silica gel 60 F₂₅₄ containing gypsum สำหรับ preparative thin layer chromatography, Merck



บทที่ 4 วิธีการทดลอง

การสังเคราะห์เซ็นเซอร์

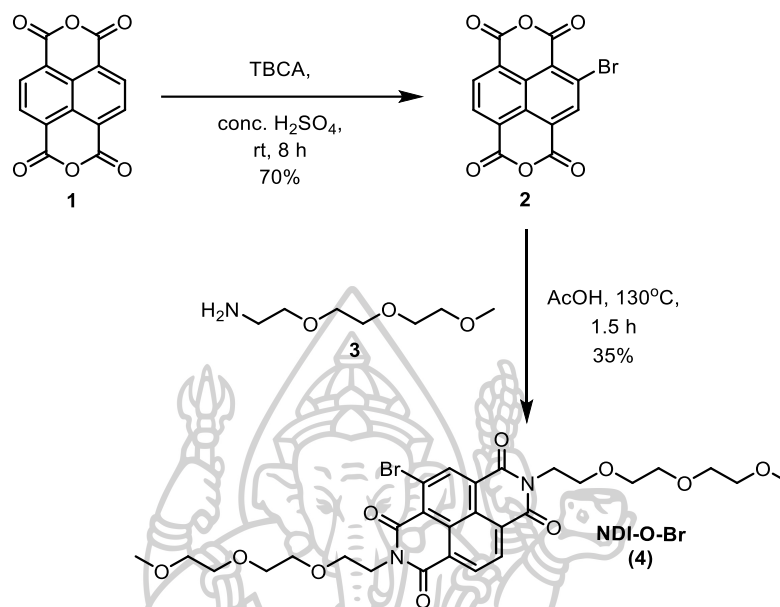
ในงานวิจัยนี้ได้ทำการออกแบบและสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์สำหรับตรวจวัดไอออนโลหะชนิดใหม่จากอนุพันธ์สารเรืองแสง 2 กลุ่ม คือ แนฟทาลีนไดอิมไมด์ (Naphthalene Diimide) และเอซาโบดิปี (Aza-BODIPY) ทำหน้าที่เป็นฟลูออโรฟอร์ โดยใช้ไดพิโคลริลเอมีน (Dipicolylamine) และฟีนิลไอโซไทโอไซยาเนต (Phenyl isothiocyanate) ที่เมื่อทำปฏิกิริยาต่อกับอนุพันธ์สารเรืองแสงจะอยู่ในรูปของอนุพันธ์ไทโอยูเรีย (Thiourea) ทำหน้าที่เป็นไอออนฟอร์ของระบบฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ โดยฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์จากอนุพันธ์ของแนฟทาลีนไดอิมไมด์และเอซาโบดิปี ได้แก่ เซ็นเซอร์ N1102 และ N1004 มีโครงสร้างแสดงดังภาพที่ 12



ภาพที่ 12 โครงสร้างฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ชนิดใหม่จากอนุพันธ์ของแนฟทาลีนไดอิมไมด์ (N1102) และเอซาโบดิปี (N1004)

1.1 การสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1102

1.1.1 ฟลูออโรฟอร์จากอนุพันธ์ของแนพทาลินไดอิมไมด์ (NDI-O-Br; 4)

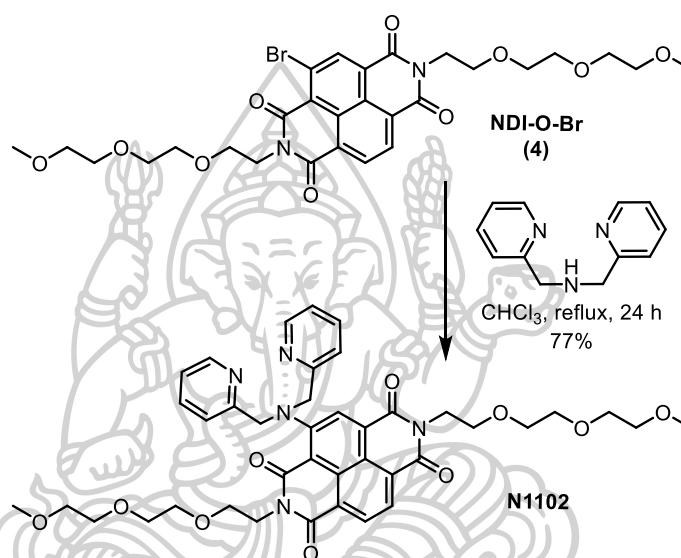


ภาพที่ 13 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์ฟลูออโรฟอร์ NDI-O-Br (4)

ในการสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1102 เริ่มจากการสังเคราะห์อนุพันธ์ของแนพทาลินไดอิมไมด์ (NDI-O-Br; 4) เป็นส่วนของฟลูออโรฟอร์ของระบบฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ ในขั้นตอนนี้ ทำการสังเคราะห์โดย Subashani Maniam ผู้ช่วยวิจัยในห้องปฏิบัติการของ Prof. Steven J. Langford ที่ School of Chemistry, Monash University ประเทศออสเตรเลีย โดยในขั้นตอนการสังเคราะห์เริ่มจากนำสารประกอบ Naphthalenetetracarboxylic Dianhydride (NDA; 1) ผ่านปฏิกิริยา Bromination ตามวิธีการสังเคราะห์ของ Suseela และคณะ [30] ได้สารประกอบ Bromo-NDA (2) จากนั้นทำปฏิกิริยา imidation กับอนุพันธ์ของ alkylamine (3) ที่ได้จากการสังเคราะห์ตามวิธีของ Clerc และคณะ [31] ในขั้นสุดท้ายของการเตรียมฟลูออโรฟอร์ NDI-O-Br เตรียมได้จากปฏิกิริยา imidation ดังภาพที่ 13 ทำโดยซึ่ง 2-(2-(2-Methoxyethoxy) ethoxy)ethan-1-amine (3) ปริมาณ 0.67 กรัม (4.09 มิลลิโมล) ผสมกับ Bromo-Naphthalenetetracarboxylic Dianhydride (Bromo-NDA; 2) ปริมาณ 0.50 กรัม (1.44 มิลลิโมล) ละลายด้วยกรดแอสติก (acetic acid; CH₃COOH) ปริมาณ 30 มิลลิลิตร จากนั้นกวนปฏิกิริยาพร้อมให้ความร้อนจนอุณหภูมิถึง 130 °C เป็นระยะเวลา 1.5 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาจะสังเกตเห็นตะกอนของแข็งสีเหลืองตกลงมา ทำ

การแยกส่วนที่เป็นตะกอนของแข็งออกจากสารละลายด้วยการกรองแบบลดความดัน จากนั้นล้างตะกอนด้วยเมทานอล (MeOH) ที่ทำให้เย็นแล้ว ตามด้วยเฮกเซน (*n*-Hexane) ที่ทำให้เย็นแล้ว จะได้สารประกอบ NDI-O-Br (4) เป็นของแข็งสีเหลือง ปริมาณ 0.32 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตได้เท่ากับ 35%

1.1.2 ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1102



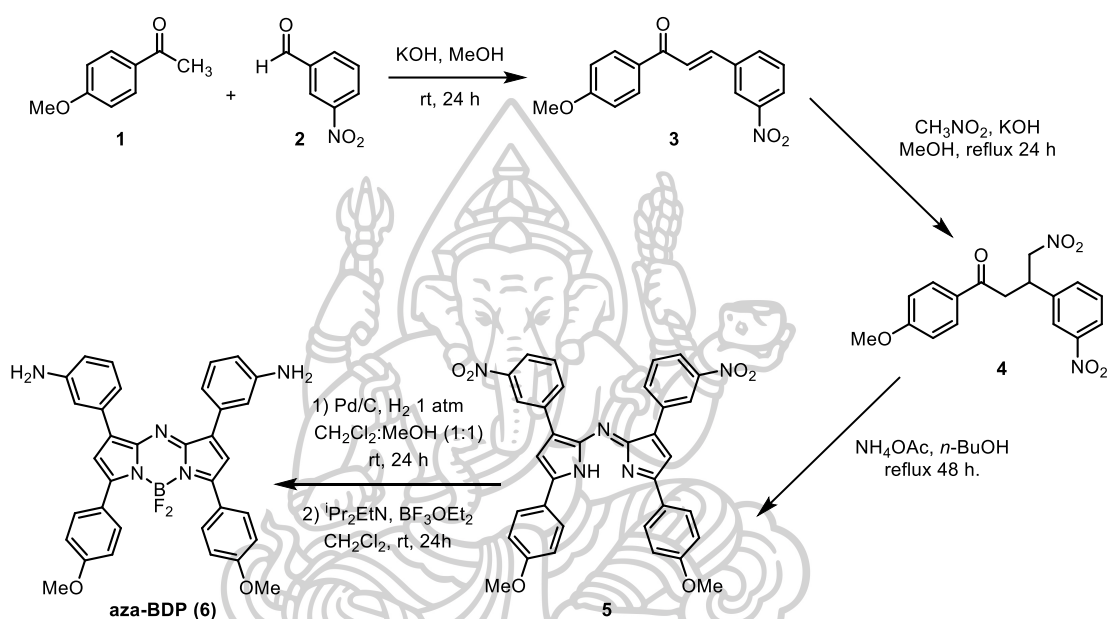
ภาพที่ 14 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์เซ็นเซอร์ N1102

ในการสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1102 จะนำเอาส่วนของฟลูออโรฟอร์ NDI-O-Br (4) ทำปฏิกิริยากับไอโอโนฟอร์ ซึ่งในงานวิจัยนี้เลือกใช้เป็น Dipicolylamine แสดงดังภาพที่ 14 โดยเริ่มจากการชั่ง NDI-O-Br ปริมาณ 0.02 กรัม (0.031 มิลลิโมล) และ Di-2-picoylamine ปริมาณ 0.10 มิลลิลิตร (0.55 มิลลิโมล) ใส่ขวดก้นกลมขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายด้วยคลอโรฟอร์ม (chloroform; CHCl₃) ปริมาณ 3 มิลลิลิตร ทำการกวนปฏิกิริยาและ reflux ภายใต้บรรยากาศอาร์กอนเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จะสังเกตเห็นสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีแดงเข้ม เมื่อครบเวลาทำการกำจัดคลอโรฟอร์มออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง CH₂Cl₂:MeOH อัตราส่วน 95:5 v/v ทำหน้าที่เป็น mobile phase ได้สารประกอบเซ็นเซอร์ N1102 เป็นของแข็งสีแดงเข้ม ปริมาณ

0.018 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตได้เท่ากับ 77% โดยมีค่าอัตราการเคลื่อนที่ของสารบนตัวดูดซับ (Retention factor; R_f) เท่ากับ 0.3

1.2 การสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1004

1.2.1 ฟลูออโรฟอร์จากอนุพันธ์ของเอซาโบดิปี (aza-BDP; 6)



ภาพที่ 15 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์ฟลูออโรฟอร์ aza-BDP (6)

ในการสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1004 เริ่มจากการสังเคราะห์อนุพันธ์ของเอซาโบดิปี (aza-BDP; 6) ซึ่งเป็นส่วนฟลูออโรฟอร์ของระบบฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ ตามวิธีการสังเคราะห์ของ Kamkaew และคณะ [32] โดยประกอบไปด้วย 5 ขั้นตอน ดังแสดงในภาพที่ 15 มีดังนี้

1. การเตรียมสารประกอบ Chalcone (3)

การสังเคราะห์สารประกอบ Chalcone (3) เริ่มจากซึ่งสาร 4-methoxy acetophenone ปริมาณ 5.00 กรัม (33.30 มิลลิโมล) และ 3-nitrobenzaldehyde ปริมาณ 5.00 กรัม (33.09 มิลลิโมล) ใส่ขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร ละลายด้วยเมทานอลปริมาตร 150 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ซึ่งทำหน้าที่เป็นเบสในปฏิกิริยา ปริมาณ 1.83 กรัม (45.00 มิลลิโมล) ลงในสารละลายผสม จากนั้นกวนปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จะสังเกตเห็น

ตะกอนผลิตภัณฑ์ลักษณะของแข็งสีเหลืองอ่อนตกลงมา เมื่อครบกำหนดเวลาทำการแยกตะกอนออกจากสารละลายด้วยการกรองแบบลดความดัน และล้างตะกอนด้วยตัวทำละลายเมทานอลที่ทำให้เย็น จะได้สารประกอบ Chalcone (3) เป็นของแข็งสีขาว ปริมาณ 9.18 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตได้เท่ากับ 98% (ซึ่งนำไปใช้ในปฏิกิริยาขั้นตอนต่อไปโดยไม่ผ่านการแยกบริสุทธิ์)

2. การเตรียมสารประกอบ Chalcone-NO₂ (4)

การสังเคราะห์สารประกอบ Chalcone-NO₂ (4) เริ่มจากซังสาร Chalcone (3) ปริมาณ 10.41 กรัม (36.75 มิลลิโมล) ใส่ขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร ละลายด้วยเมทานอลปริมาตร 150 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งทำหน้าที่เป็นเบสในปฏิกิริยา ปริมาณ 3.01 กรัม (53.64 มิลลิโมล) ตามด้วยสาร nitromethane ปริมาตร 50.0 กรัม (0.93 มิลลิโมล) ลงในสารละลายผสม จากนั้นกวนปฏิกิริยาพร้อมให้ความร้อนจนอุณหภูมิถึง 78 °C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จะสังเกตเห็นตะกอนผลิตภัณฑ์ลักษณะของแข็งสีน้ำตาลอ่อนตกลงมา เมื่อครบกำหนดเวลาทำการแยกตะกอนออกจากสารละลายด้วยการกรองแบบลดความดัน และล้างตะกอนด้วยตัวทำละลายเมทานอลที่ทำให้เย็น จะได้สารประกอบ Chalcone-NO₂ (4) เป็นของแข็งสีน้ำตาล ปริมาณ 10.81 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตได้เท่ากับ 85% (ซึ่งนำไปใช้ในปฏิกิริยาขั้นตอนต่อไปโดยไม่ผ่านการแยกบริสุทธิ์)

3. การเตรียมสารประกอบ Aza-dipyrrromethene (5)

การสังเคราะห์สารประกอบ Aza-dipyrrromethene (5) เริ่มจากซังสาร Chalcone-NO₂ (4) ปริมาณ 5.12 กรัม (14.87 มิลลิโมล) ใส่ขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร ละลายด้วยบิวทานอล (buthanol) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมแอมโมเนียมอะซิเตต (NH₄OAc) ซึ่งทำหน้าที่เป็นเบสในปฏิกิริยา ปริมาณ 20.20 กรัม (0.26 โมล) ลงในสารละลายผสม จากนั้นกวนปฏิกิริยาพร้อมให้ความร้อนจนอุณหภูมิถึง 120 °C เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาทำให้สารละลายเย็น ตัวลงให้มีอุณหภูมิ 40-50 °C นำไปกำจัดตัวทำละลายด้วยการกลั่นแบบลดความดันด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้นเติมตัวทำละลายเมทานอลที่ทำให้เย็นใส่ลงในส่วนที่เหลือ จะสังเกตเห็นตะกอนสีดำตกลงมา กรองตะกอนที่ได้ด้วยการกรองแบบลดความดันและล้างด้วยเมทานอลที่ทำให้เย็น จะได้สารประกอบ Aza-dipyrrromethene (5) เป็นของแข็งสีดำ ปริมาณ 2.34 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตได้เท่ากับ 52% (ซึ่งนำไปใช้ในปฏิกิริยาขั้นตอนต่อไปโดยไม่ผ่านการแยกบริสุทธิ์)

4. ปฏิกิริยา Hydrogenation ของ Aza-dipyrromethene (5)

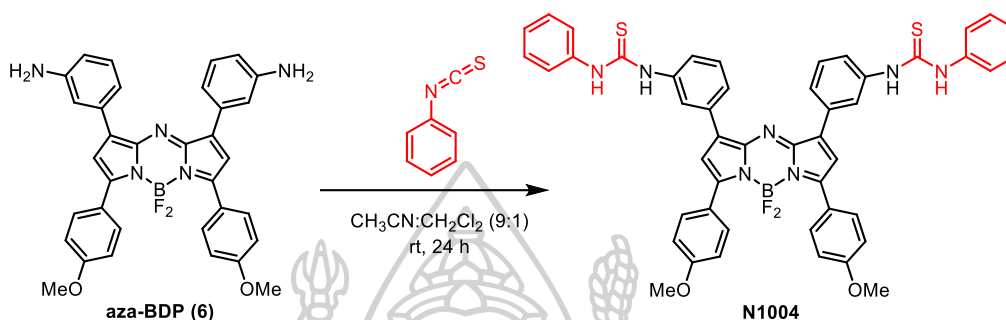
ในขั้นปฏิกิริยา Hydrogenation ของ Aza-dipyrromethene (5) เริ่มจากชั่งสาร Aza-dipyrromethene (5) ปริมาณ 0.80 กรัม (1.33 มิลลิโมล) ใส่ขวดก้นกลมขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ ในอัตราส่วน 1:1 v/v โดยมีปริมาตรรวม 40 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Pd/C ปริมาณ 0.19 กรัม (1.79 มิลลิโมล) กวนปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศของ ก๊าซไฮโดรเจน (hydrogen atmosphere) ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จะสังเกตเห็นว่า สารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้ม เมื่อครบกำหนดเวลาจึงทำการกรองผงคาร์บอนออก จากนั้นล้าง ด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร จนสารละลายเป็นสีฟ้าอ่อน กำจัดตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ได้สารประกอบเป็นของแข็งสีน้ำเงินเข้ม ปริมาณ 0.67 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตได้เท่ากับ 92% (นำไปใช้ในปฏิกิริยาขั้นตอนต่อไป โดยไม่ผ่านการแยกบริสุทธิ์)

5. การสังเคราะห์เอซาโบดีปี (aza-BDP; 6)

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากขั้นปฏิกิริยา Hydrogenation ของ Aza-dipyrromethene (5) ซึ่งใส่ขวดก้นกลมขนาด 50 มิลลิลิตร ปริมาณ 0.24 กรัม (0.44 มิลลิโมล) ละลายด้วยตัวทำละลายไดคลอมีเทน (CH_2Cl_2) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสาร *N,N*-diisopropylethylamine (*i*-Pr₂EtN; DIPEA) ปริมาณ 0.8 มิลลิลิตร (4.58 มิลลิโมล) ทำการกวนปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศอาร์กอนที่ อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 20 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาเติมสาร boron trifluoride etherate 48% w/v (BF_3OEt_2) ลงในสารละลายปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร (6.76 มิลลิโมล) จากนั้นทำการกวน ปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศอาร์กอนที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จะสังเกตเห็นว่า สารละลายจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเข้มเป็นสีเขียวเข้ม เมื่อครบกำหนดเวลานำไปสกัดด้วยสารละลาย อิมตัวของโซเดียมไบคาร์บอเนต (sat.NaHCO₃) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง ตามด้วย สารละลายอิมตัวของโซเดียมคลอไรด์ (sat.brine) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร จำนวน 1 ครั้ง โดยเก็บ สารละลายชั้นตัวทำละลายไดคลอมีเทนที่ได้กำจัดน้ำออกโดยการเติม anhydrous Na₂SO₄ ลงไปปริมาณ เล็กน้อย และนำไปกำจัดตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator และทำการแยกสารให้ บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง Hexane:EtOAc

อัตราส่วน 1:1 v/v ทำหน้าที่เป็น mobile phase โดยมีค่า R_f เท่ากับ 0.30 จะได้สารประกอบ **aza-BDP (6)** เป็นของแข็งสีขาวเข็ม ปริมาณ 0.19 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตได้เท่ากับ 74%

1.2.2 ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1004



ภาพที่ 16 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์เซ็นเซอร์ N1004

ในขั้นตอนสุดท้ายของการสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1004 จะนำเอาส่วนของฟลูออโรฟอร์ **aza-BDP (6)** ทำปฏิกิริยากับไอโซไธโอไซยาเนต ซึ่งในงานวิจัยนี้เลือกใช้เป็น Phenyl isothiocyanate แสดงดังภาพที่ 16 โดยเริ่มจากการชั่ง **aza-BDP (6)** ปริมาณ 0.08 กรัม (0.14 มิลลิโมล) ใส่ขวดกั่นกลมขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายด้วยสารละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนและอะซิโตนไไตรล์ (CH₂Cl₂:CH₃CN) ในอัตราส่วน 1:9 ปริมาณ 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Phenyl isothiocyanate ปริมาณ 0.20 มิลลิลิตร (1.67 มิลลิโมล) ลงในสารละลายผสม ทำการกวนปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องภายใต้บรรยากาศอาร์กอนเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการกำจัดตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค preparative thin layer chromatography โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง EtOAc:Hexane อัตราส่วน 1:1 v/v ทำหน้าที่เป็น mobile phase จะได้สารประกอบเซ็นเซอร์ N1004 เป็นของแข็งสีขาวเข็ม ปริมาณ 0.040 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตได้เท่ากับ 33% โดยมีค่าอัตราการเคลื่อนที่ของสารบนตัวดูดซับ (Retention factor; R_f) เท่ากับ 0.45

การทดสอบประสิทธิภาพของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1102 และ N1004 ในการตรวจจับไอออนโลหะหนัก

2.1 การศึกษาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม

การศึกษาคุณสมบัติในการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1102 และ N1004 เริ่มจากการตรวจสอบคุณสมบัติการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเล็ต (Excitation spectrum) และการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ (Emission spectrum) ของสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์แต่ละชนิดในระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์การตรวจจับไอออน ซึ่งในการเลือกระบบตัวทำละลายเพื่อมาศึกษาความสามารถของเซ็นเซอร์ในการตรวจจับไอออน ทางผู้วิจัยจะทำการศึกษาในสารละลายผสมที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ผสมกับน้ำ หรือในระบบตัวทำละลายที่เป็นน้ำ 100% เนื่องจากวัตถุประสงค์ในการออกแบบเซ็นเซอร์ ก็เพื่อจะใช้ในการตรวจวัดไอออนโลหะในตัวอย่างจริงในสิ่งแวดล้อม ซึ่งระบบส่วนใหญ่ในสิ่งแวดล้อมจะมีน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก

เมื่อได้ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม ทำการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ในการตรวจจับไอออนทองแดง (Cu^{2+}) ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี โดยสังเกตและบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ที่ค่าความยาวคลื่นกระตุ้น (Excitation wavelength: λ_{ex}) ที่ได้จากการตรวจสอบคุณสมบัติการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเล็ตในตัวทำละลายที่เหมาะสมที่ได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น เพื่อหาความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) และความจำเพาะเจาะจงกับไอออนทองแดง (selectivity) เปรียบเทียบกับไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ

2.2 การทดสอบความไว (sensitivity)

การทดสอบความไวของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1102 และ N1004 สามารถศึกษาได้ด้วยวิธีทางฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์ที่เปลี่ยนไป เมื่อมีการเติมไอออนทองแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยการเปิดสารละลายเซ็นเซอร์ที่ถูกเตรียมไว้ ณ ความเข้มข้นหนึ่ง ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่ในเซลล์ (Cell) สำหรับวัดฟลูออเรสเซนซ์ วัดสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้นก่อนการเติมไอออนทองแดง จากนั้นจึงไตเตรตด้วยสารละลายไอออนทองแดงที่เตรียมไว้ แล้ววัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้นภายหลังการเติมไอออนทองแดงในแต่ละครั้ง โดยค่าสัญญาณการเปลี่ยนแปลงการคายแสง

ฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้จะถูกนำไปใช้ในการคำนวณหาค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออน (K_{assoc}) ตามสมการ Benesi-Hildebrand [33, 34]

สมการ Benesi-Hildebrand;

$$\frac{1}{I - I(int.)} = \frac{1}{K(I(Max) - I(int.)) [ions]^n} + \frac{1}{I(Max) - I(int.)}$$

จากสมการที่มีลักษณะความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ดังนั้นการสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{1}{I - I(int.)}$ ในแนวแกน y และ $\frac{1}{[ions]^n}$ ในแนวแกน x จะหาค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออนได้ เมื่อกำหนดให้

$I(int.)$ = ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์เริ่มต้น

I = ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์หลังเติมไอออนที่ความเข้มข้นใดๆ

$I(Max)$ = ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์มากที่สุด

n = จำนวนเต็มใดๆ เช่น 1, 2 และ 3

พบว่าค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออนคำนวณได้จากความชันของกราฟที่สร้างขึ้น ดังนี้

$$slope = \frac{1}{K(I(Max) - I(int.))}$$

$$K = \frac{1}{slope(I(Max) - I(int.))}$$

จากการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้และความเข้มของไอออนในแต่ละครั้งที่เติมลงไป จะถูกนำมาคำนวณความสามารถต่ำสุดของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ในการตรวจวัดไอออน ซึ่งคำนวณได้จาก 3 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เมื่อไม่มีการเติมไอออนใดๆ [35-37]

โดยกำหนดแกน Y แทนความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ ส่วนแกน X แทน ความเข้มชั้นต่างๆ ของไอออนที่เติมลงไป จากนั้นนำค่าความชันของกราฟ (slope) ที่ได้มาคำนวณตามสมการ (1)

$$\text{Blank} - 3\text{SD} = \text{slope} [\text{ions}] + C \quad (1)$$

เมื่อกำหนดให้

Blank คือ ค่าความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เมื่อไม่มีการเติมไอออน

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เมื่อไม่มีการเติมไอออน

slope คือ ค่าความชันของกราฟ

[ions] คือ ความเข้มชั้นของไอออนต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้

C คือ จุดตัดบนแกน y

2.2.1 การเตรียมสารละลายฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1102

ในการเตรียมสารละลายฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ **N1102** เริ่มจากชั่ง **N1102** ตามที่ต้องการละลายด้วยน้ำ บัฟเฟอร์ ปริมาตรในขวดปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายเซ็นเซอร์ **N1102** ด้วยวิธี serial dilution โดยให้ความเข้มข้นลดลงครั้งละ 10 เท่า จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น $2.38 \times 10^{-5} \text{ M}$ ในน้ำหรือสารละลายบัฟเฟอร์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปตรวจสอบคุณสมบัติการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต และศึกษาการเปลี่ยนแปลงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ (เครื่องมือ PerkinElmer luminescence spectrometer LS 55) ของสารละลายเซ็นเซอร์ที่เปลี่ยนไป เมื่อมีการเติมไอออนทองแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยการปิเปตสารละลายเซ็นเซอร์ที่ถูกเตรียมไว้ ณ ความเข้มข้นหนึ่ง ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่ในเซลล์ (Cell)

2.2.2 การเตรียมสารละลายฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1004

ในการเตรียมสารละลายฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1004 เริ่มจากชั่ง N1004 ตามที่ต้องการละลายด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ CH_2Cl_2 ปริมาตรในขวดปริมาตร 5 มิลลิลิตร เนื่องจากฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1004 ไม่สามารถละลายในน้ำหรือสารละลายบัฟเฟอร์ได้ 100% ในการเตรียมขั้นแรกจึงต้องทำการละลายด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ CH_2Cl_2 ซึ่งสามารถละลาย N1004 ได้ 100% จากนั้นเปิดสารละลาย N1004 จากขวดปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาปริมาตร 0.1 mL ปรับปริมาตรในขวดปริมาตร 10 มิลลิลิตร ด้วยตัวทำละลายอะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile) จากนั้นเจือจางสารละลายเซ็นเซอร์ N1004 ด้วยวิธี serial dilution โดยให้ความเข้มข้นลดลงครึ่งละ 10 เท่า ปรับปริมาตรด้วยน้ำหรือสารละลายบัฟเฟอร์ จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1.00×10^{-6} M ในอัตราส่วนของน้ำหรือสารละลายบัฟเฟอร์:อะซิโตไนไตรล์ 6:4 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปตรวจสอบคุณสมบัติการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเล็ต และศึกษาการเปลี่ยนแปลงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ (เครื่องมือ FluoroMax-4 spectrofluorometer by HORIBA Scientific) ของสารละลายเซ็นเซอร์ที่เปลี่ยนไป เมื่อมีการเติมไอออนทองแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยการปิเปตสารละลายเซ็นเซอร์ที่ถูกเตรียมไว้ ณ ความเข้มข้นหนึ่ง ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่ในเซลล์ (Cell)

2.2.3 การเตรียมสารละลายไอออนทองแดง

ในการทดสอบความไวของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1102 และ N1004 จะเตรียมสารละลายไอออนทองแดงของเกลือชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นขวดแรก 1.0×10^{-2} M ในน้ำที่ปราศจากไอออน (น้ำ DI) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายทองแดง ด้วยวิธี serial dilution เช่นเดียวกับการเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ โดยให้ความเข้มข้นลดลงครึ่งละ 10 เท่า จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0×10^{-4} M ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

2.2.4 การทดสอบการเปลี่ยนแปลงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ในภาวะที่มีไอออนทองแดง ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี

ทำการปิเปตสารละลายฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1102 และ N1004 ที่เตรียมสำหรับวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่ในเซลล์ (Cell) สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ จากนั้นทำการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนทองแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ สังเกตการ

เปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้นในแต่ละครั้งที่ใส่ ซึ่งค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ใช้ในการทดสอบแสดงดังตารางที่ 1

ค่าพารามิเตอร์	N1102	N1004
	ระบบสารละลาย 5 mM phosphate buffered saline (PBS บัฟเฟอร์)	ระบบสารละลาย 5 mM Tris;CH ₃ CN (6:4 v/v)
λ_{ex} (nm)	525	670
Scan speed (nm/min)	300	300
Slit width (nm)	5.0	10
ช่วงความยาวคลื่นที่ศึกษา (nm)	530 - 700	680 - 800

ตารางที่ 1 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ สำหรับการทดสอบความไวของเซ็นเซอร์ N1102 และ N1004

2.3 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (selectivity)

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1102 และ N1004 สามารถศึกษาได้ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี โดยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากการไตเตรตด้วยสารละลายทองแดงลงในสารละลายเซ็นเซอร์ที่ถูกปิเปตใส่ในเซลล์ (Cell) สำหรับวัดฟลูออเรสเซนซ์ 3 มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้นจากการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนอื่นๆ ลงในสารละลายเซ็นเซอร์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ระหว่างการไตเตรตด้วยสารละลายทองแดงและการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนรบกวนอื่นๆ

2.3.1 การเตรียมสารละลายฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1102

ในการเตรียมสารละลายฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1102 เริ่มจากชั่ง N1102 ตามที่ต้องการละลายด้วยน้ำ บัฟเฟอร์ ปรับปริมาตรในขวดปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายเซ็นเซอร์ N1102 ด้วยวิธี serial dilution โดยให้ความเข้มข้นลดลงครั้งละ 10 เท่า จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2.38×10^{-5} M ในน้ำหรือสารละลายบัฟเฟอร์ปริมาตรรวม 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไป

ตรวจสอบคุณสมบัติการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต และศึกษาการเปลี่ยนแปลงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ (เครื่องมือ PerkinElmer luminescence spectrometer LS 55) ของสารละลายเซ็นเซอร์ที่เปลี่ยนไป เมื่อมีการเติมไอออนทองแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยการปิเปตสารละลายเซ็นเซอร์ที่ถูกเตรียมไว้ ณ ความเข้มข้นหนึ่ง ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่ในเซลล์ (Cell)

2.3.2 การเตรียมสารละลายฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1004

ในการเตรียมสารละลายฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1004 เริ่มจากชั่ง N1004 ตามที่ต้องการละลายด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ CH_2Cl_2 ปริมาตรในขวดปริมาตร 5 มิลลิลิตร เนื่องจากฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1004 ไม่สามารถละลายในน้ำหรือสารละลายบัฟเฟอร์ได้ 100% ในการเตรียมขั้นแรกจึงต้องทำการละลายด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ CH_2Cl_2 ซึ่งสามารถละลาย N1004 ได้ 100% จากนั้นปิเปตสารละลาย N1004 จากขวดปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาปริมาตร 0.1 mL ปรับปริมาตรในขวดปริมาตร 10 มิลลิลิตร ด้วยตัวทำละลายอะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile) จากนั้นเจือจางสารละลายเซ็นเซอร์ N1004 ด้วยวิธี serial dilution โดยให้ความเข้มข้นลดลงครึ่งละ 10 เท่า ปรับปริมาตรด้วยน้ำหรือสารละลายบัฟเฟอร์ จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1.30×10^{-7} M ในอัตราส่วนของน้ำหรือสารละลายบัฟเฟอร์:อะซิโตไนไตรล์ 6:4 ปริมาตรรวม 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปตรวจสอบคุณสมบัติการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต และศึกษาการเปลี่ยนแปลงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ (เครื่องมือ PerkinElmer luminescence spectrometer LS 55) ของสารละลายเซ็นเซอร์ที่เปลี่ยนไป เมื่อมีการเติมไอออนทองแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยการปิเปตสารละลายเซ็นเซอร์ที่ถูกเตรียมไว้ ณ ความเข้มข้นหนึ่ง ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่ในเซลล์ (Cell)

2.3.3 การเตรียมสารละลายไอออนทองแดงและไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ

ในการทดสอบความไวของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1102 และ N1004 จะเตรียมสารละลายไอออนทองแดงและไอออนรบกวนชนิดอื่นๆของเกลือเปอร์คลอเรตที่ความเข้มข้นขวดแรก 1.0×10^{-2} M ในน้ำที่ปราศจากไอออน (น้ำ DI) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายทองแดง ด้วยวิธี serial dilution เช่นเดียวกับการเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ โดยให้ความเข้มข้นลดลงครึ่งละ 10 เท่า จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0×10^{-4} M ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ไอออนที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ ไอออนทองแดง (Cu^{2+}) ไอออนสังกะสี (Zn^{2+}) ไอออนตะกั่ว (Pb^{2+}) ไอออนโพแทสเซียม (K^+) ไอออนลิเทียม (Li^+) ไอออนแมกนีเซียม (Mg^{2+}) ไอออนแคลเซียม

(Ca²⁺) ไอออนโคบอลต์ (Co²⁺) ไอออนโซเดียม (Na⁺) ไอออนเหล็ก (Fe²⁺) ไอออนนิกเกิล (Ni²⁺) ไอออนอะลูมิเนียม (Al³⁺) ไอออนแคดเมียม (Cd²⁺) ไอออนแบเรียม (Ba²⁺) ไอออนแมงกานีส (Mn²⁺) ไอออนเงิน (Ag⁺) และ ไอออนปรอท (Hg²⁺)

2.3.4 การทดสอบการเปลี่ยนแปลงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ในภาวะที่มี ไอออนแต่ละชนิด ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี

ทำการปิเปตสารละลายฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1102 และ N1004 ที่เตรียมตามข้อ 2.3.1 และ 2.3.2 ตามลำดับ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่ในเซลล์ (Cell) นำไปวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ จากนั้นทำการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้น โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการทดสอบดังแสดงตาม ตารางที่ 1

2.3.5 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (selectivity) ด้วยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายภายใต้แสงธรรมชาติและการเรืองแสงของสารละลายภายใต้แสง UV ด้วยตาเปล่า

2.3.5.1 การเตรียมสารละลายฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1102

ในการเตรียมสารละลายฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1102 เริ่มจากชั่ง N1102 ตามที่ต้องการ ละลายด้วยน้ำ บัฟเฟอร์ ปรับปริมาตรในขวดปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลาย เซ็นเซอร์ N1102 ด้วยวิธี serial dilution โดยให้ความเข้มข้นลดลงครึ่งละ 10 เท่า จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2.38×10^{-5} M ในน้ำหรือสารละลายบัฟเฟอร์ปริมาตรรวม 50 มิลลิลิตร

2.3.5.2 การเตรียมสารละลายฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1004

ในการเตรียมสารละลายฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1004 เริ่มจากชั่ง N1004 ตามที่ต้องการ ละลายด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ CH₂Cl₂ ปรับปริมาตรในขวดปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปต สารละลาย N1004 จากขวดปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาปริมาตร 0.1 mL ปรับปริมาตรในขวดปริมาตร 10 มิลลิลิตร ด้วยตัวทำละลายอะซิโตไนโตรล (Acetonitrile) จากนั้นเจือจางสารละลายเซ็นเซอร์ N1004 ด้วยวิธี serial dilution โดยให้ความเข้มข้นลดลงครึ่งละ 10 เท่า ปรับปริมาตรด้วยน้ำหรือ

สารละลายบัฟเฟอร์ จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1.76×10^{-5} M ในอัตราส่วนของน้ำหรือสารละลายบัฟเฟอร์:อะซีโตไนไตรล์ 6:4 ปริมาตรรวม 50 มิลลิลิตร

2.3.5.3 วิธีการทดสอบการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1102 ด้วยตาเปล่า

ปิเปตสารละลาย N1102 ที่ถูกเตรียมขึ้นตามข้อ 2.3.5.1 ใส่ใน vial จากนั้นจึงทำการเติมไอออนชนิดต่างๆ ที่ถูกเตรียมขึ้นตามข้อ 2.3.3 ที่ความเข้มข้นเดียวกันลงใน vial ที่เตรียมไว้ และสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายภายใต้แสงธรรมชาติและการเรืองแสงของสารละลายภายใต้แสง UV ด้วยตาเปล่าแล้วทำการบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายรูป

2.3.5.4 วิธีการทดสอบการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1004 ด้วยตาเปล่า

ปิเปตสารละลาย N1004 ที่ถูกเตรียมขึ้นตามข้อ 2.3.5.2 ใส่ใน vial จากนั้นเติมซิสเตอีน (Cysteine) ลงไปในขวด vial แต่ละขวด ปริมาตร 2 equivalent ขึ้นต่อมาทำการเติมไอออนชนิดต่างๆ ที่ถูกเตรียมขึ้นตามข้อ 2.3.3 ที่ความเข้มข้นเดียวกันลงใน vial ที่เตรียมไว้ และสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายภายใต้แสงธรรมชาติและการเรืองแสงของสารละลายภายใต้แสง UV ด้วยตาเปล่าแล้วทำการบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายรูป

2.4 การทดสอบความสามารถในการตรวจจับไอออนทองแดงในภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ผสมอยู่ในระบบ (competitive)

การทดสอบความสามารถในการตรวจจับไอออนทองแดง ในภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ผสมอยู่ ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี โดยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1102 และ N1004 ในขณะก่อนและหลังเติมสารละลายไอออนทองแดงลงในสารละลายเซ็นเซอร์ที่ถูกเตรียมขึ้น ปริมาณ 3.0 มิลลิลิตร จนสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ชัดเจนที่ความเข้มข้นหนึ่ง จากนั้นเติมสารละลายไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ในปริมาณ 1 เท่า 5 เท่า 10 เท่า และ 20 เท่า ของสารละลายไอออนทองแดงที่เติมลงไป และวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ภายหลังการเติมไอออนรบกวนอื่นๆ อีกครั้ง

2.4.1 การเตรียมสารละลายฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์

ในการเตรียมสารละลายฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1102 และ N1004 จะเตรียมขึ้นในลักษณะเช่นเดียวกับการทดสอบความจำเพาะเจาะจง (selectivity) โดยรายละเอียดการเตรียมตามข้อ 2.3.1 และ 2.3.2 ตามลำดับ จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1102 และ N1004 เท่ากับ 2.38×10^{-5} M และ 1.30×10^{-7} M ตามลำดับ

2.4.2 การเตรียมสารละลายไอออนทองแดงและไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ

สารละลายไอออนทองแดงและไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ของเกลือเปอร์คลอเรต ที่ใช้ในการทดสอบ จะเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมเพื่อใช้ในการทดสอบความจำเพาะเจาะจง (selectivity) โดยรายละเอียดการเตรียมตามข้อ 2.3.3

ไอออนที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ ไอออนทองแดง (Cu^{2+}) ไอออนสังกะสี (Zn^{2+}) ไอออนตะกั่ว (Pb^{2+}) ไอออนโพแทสเซียม (K^+) ไอออนลิเทียม (Li^+) ไอออนแมกนีเซียม (Mg^{2+}) ไอออนแคลเซียม (Ca^{2+}) ไอออนโคบอลต์ (Co^{2+}) ไอออนโซเดียม (Na^+) ไอออนเหล็ก (Fe^{2+}) ไอออนนิกเกิล (Ni^{2+}) ไอออนอะลูมิเนียม (Al^{3+}) ไอออนแคดเมียม (Cd^{2+}) ไอออนแบเรียม (Ba^{2+}) ไอออนแมงกานีส (Mn^{2+}) ไอออนเงิน (Ag^+) และ ไอออนปรอท (Hg^{2+})

2.4.3 การทดสอบการเปลี่ยนแปลงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ ในภาวะที่มีไอออนทองแดงและไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ผสมอยู่ในระบบ

ทำการปิเปตสารละลายฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1102 และ N1004 ที่เตรียมตามข้อ 2.3.1 และ 2.3.2 ตามลำดับ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่ในเซลล์ (Cell) นำไปวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ก่อนเติมไอออน จากนั้นเติมสารละลายไอออนทองแดงลงไป ในสารละลายดังกล่าว สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้น เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์จากเดิม 50% ทำการเติมสารละลายไอออนเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ ลงในสารละลายเซ็นเซอร์ ปริมาณ 1 เท่า 5 เท่า และ 20 เท่า ของสารละลายไอออนทองแดงที่เติมลงไป สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้นหลังจากเติมสารละลายไอออนเกลือเปอร์คลอเรตแต่ละชนิด

โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการทดสอบตามตารางที่ 1 จากนั้นสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า I_f/I_0 ในแนวแกน y และชนิดของสารละลายไอออนต่างๆที่เติมลงไป ในสารละลายฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ ในแนวแกน x

เมื่อกำหนดให้

I_0 = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์ก่อนเติมไอออน

I_F = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์หลังเติมไอออนทองแดง หรือ

I_F = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์หลังเติมไอออนทองแดง

ผสมกับไอออนเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ

การศึกษาลักษณะการเกิดปฏิกิริยาระหว่างฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์และไอออน

3.1 การหาอัตราส่วนการเกิดสารเชิงซ้อนโดยวิธีการของ Job (Job's plot analysis)

การหาอัตราส่วนการเกิดสารเชิงซ้อนโดยวิธีการของ Job ศึกษาได้ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี โดยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ในระบบที่มีเศษส่วนโมล (mole fraction) หรืออัตราส่วนระหว่างจำนวนโมลของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ต่อจำนวนโมลของไอออนในอัตราส่วนต่างๆ

3.1.1 การเตรียมอัตราส่วนของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1102 และไอออน

การหาอัตราส่วนการเกิดสารเชิงซ้อนของเซ็นเซอร์ **N1102** สามารถทำได้โดย ผสมสารละลายเซ็นเซอร์ที่ละลายอยู่ในระบบสารละลาย phosphate buffered saline (PBS บัฟเฟอร์) ที่ pH 7.2 เข้มข้น 1.00×10^{-5} M และสารละลายทองแดงเปอร์คลอเรตในน้ำ DI เข้มข้น 1.00×10^{-3} M ในขวดปริมาตร 10 มิลลิลิตร ด้วยอัตราส่วนดัง [ตารางที่ 2](#)

โดยปรับแต่ละขวดจนมีปริมาตรรวม 10 มิลลิลิตร ด้วยสารละลาย PBS บัฟเฟอร์ ที่ pH 7.2 แล้วนำไปวัดสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ จากผลที่ได้นำมาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร ในแนวแกน y และเศษส่วนโมลของไอออนทองแดง ในแนวแกน x เพื่อหาอัตราส่วนระหว่างเซ็นเซอร์ **N1102** ต่อไอออนทองแดงที่สามารถแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ได้มากที่สุด

ขวดที่	Mole fraction sensor	N1102 (mL)	Cu ²⁺ (uL)
1	1	1	0

2	0.9	0.9	1
3	0.8	0.8	2
4	0.7	0.7	3
5	0.6	0.6	4
6	0.5	0.5	5
7	0.4	0.4	9
8	0.3	0.3	7
9	0.2	0.2	8
10	0.1	0.1	9
11	0	0	10

ตารางที่ 2 การหาอัตราส่วนการเกิดสารเชิงซ้อนของเซ็นเซอร์ N1102

3.1.2 การเตรียมอัตราส่วนของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1004 และไอออน

การหาอัตราส่วนการเกิดสารเชิงซ้อนของเซ็นเซอร์ N1004 สามารถทำได้โดย ผสมสารละลายเซ็นเซอร์ที่ละลายอยู่ในระบบสารละลายผสมระหว่าง Tris buffer และอะซีโตนไทรล์ ในอัตราส่วน 6:4 ที่ pH 7.2 เข้มข้น 1.00×10^{-5} M และสารละลายทองแดงเปอร์คลอเรตในน้ำ DI เข้มข้น 1.00×10^{-3} M ในขวดปริมาตร 10 มิลลิลิตร ด้วยอัตราส่วนดังตารางที่ 3

โดยปรับแต่ละขวดจนมีปริมาตรรวม 10 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายผสมระหว่าง Tris buffer และอะซีโตนไทรล์ ในอัตราส่วน 6:4 ที่ pH 7.2 แล้วนำไปวัดสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่จากผลที่ได้นำมาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 670 นาโนเมตร ในแนวแกน y และเศษส่วนโมลของไอออนทองแดง ในแนวแกน x เพื่อหาอัตราส่วนระหว่างเซ็นเซอร์ N1004 ต่อไอออนทองแดงที่สามารถแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ได้มากที่สุด

ขวดที่	Mole fraction sensor	N1004 (mL)	Cu ²⁺ (uL)
1	1	1	0

2	0.9	0.9	1
3	0.8	0.8	2
4	0.7	0.7	3
5	0.6	0.6	4
6	0.5	0.5	5
7	0.4	0.4	9
8	0.3	0.3	7
9	0.2	0.2	8
10	0.1	0.1	9
11	0	0	10

ตารางที่ 3 การหาอัตราส่วนการเกิดสารเชิงซ้อนของเซ็นเซอร์ N1004

3.2 การศึกษาตำแหน่งการเกิดปฏิกิริยาระหว่างฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์และไอออนโดยการคำนวณทางคอมพิวเตอร์ด้วยวิธี DFT calculation

การทดสอบเพื่อศึกษาหาตำแหน่งการเกิดปฏิกิริยาระหว่างฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์และไอออนโดยการคำนวณทางคอมพิวเตอร์โดยใช้โปรแกรม Gaussian 09 ด้วยทฤษฎีฟังก์ชันความหนาแน่น (Density Functional Theory, DFT) โดยระดับของทฤษฎีที่นำมาใช้ในการศึกษตำแหน่งการเกิดปฏิกิริยาระหว่างฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1102 ก่อนและหลังการเกิดปฏิกิริยากับไอออนทองแดงคือระดับ B3LYP/6-311G** ในระบบสารละลาย PBS บัฟเฟอร์ สำหรับการศึกษาตำแหน่งการเกิดปฏิกิริยาระหว่างฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1004 ก่อนและหลังการเกิดปฏิกิริยากับไอออนทองแดงจะใช้ระดับ B3LYP/LANL2DZ ในระบบสารละลายผสมระหว่าง Tris buffer และอะซิโตนไตรัล ในอัตราส่วน 6:4 ซึ่งในการตั้งค่าพารามิเตอร์ต่างๆ จะใช้น้ำแทนสารละลายบัฟเฟอร์

การศึกษาการประยุกต์ใช้ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์สำหรับการตรวจวัดไอออนในตัวอย่างจริง

4.1 การศึกษาความสามารถการตรวจวัดไอออนทองแดงของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1102

ภายในเซลล์สิ่งมีชีวิต

การศึกษาความสามารถของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ **N1102** สำหรับการตรวจวัดไอออนทองแดงในตัวอย่างจริงทางระบบสิ่งมีชีวิต ในงานวิจัยนี้เลือกทดสอบภายในเซลล์ HepG2 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ชนิด Human liver carcinoma cell line ซึ่งขั้นตอนการศึกษาเริ่มจากการเพาะเซลล์ HepG2 ในหลุมเพาะเชื้อแบบ 96 well plate เป็นเวลา 1 วันก่อนการทดลอง จากนั้นทำการบ่มเซลล์ด้วยสารละลายฟีนอลเรด (Phenol red) และสารละลาย CuCl_2 เข้มข้น $100 \mu\text{M}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาทำการล้างส่วนเกินของสารละลาย CuCl_2 ออกด้วยสารละลาย PBS บัฟเฟอร์จำนวน 3 รอบ หลังจากนั้นเติมสารละลาย **N1102** ที่ความเข้มข้น $200 \mu\text{M}$ เข้าไปในเซลล์ HepG2 และบ่มเป็นเวลา 15 นาที จะได้เซลล์เพื่อใช้ศึกษาความสามารถการตรวจวัดไอออนทองแดงของ **N1102** โดยทำการติดตามสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของ **N1102** ภายในเซลล์ ก่อนและหลังการดักจับไอออนทองแดงด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted fluorescence microscope (Olympus CKX53/DP27-2) สำหรับการติดตามสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์แล้วถ่ายภาพ (Fluorescence imaging) จะใช้ค่าความยาวคลื่นกระตุ้น (λ_{ex}) ที่ 490 นาโนเมตร เป็นช่องสีน้ำเงิน และ 545 นาโนเมตร เป็นช่องสีเขียว

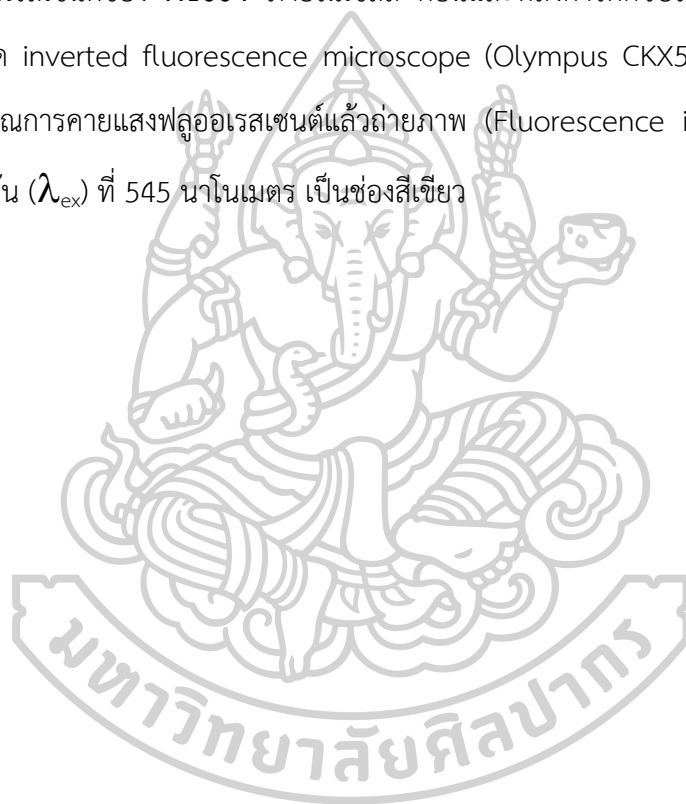
4.2 การศึกษาความสามารถการตรวจวัดไอออนทองแดงในตัวอย่างจริง (น้ำดื่ม) ของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ **N1102**

การศึกษาความสามารถของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ **N1102** สำหรับการตรวจวัดไอออนทองแดงในตัวอย่างจริง (น้ำดื่ม) เตรียมได้จากการนำฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ **N1102** มาละลายในน้ำดื่ม แล้วเปิดใส่ขวด vial ขวดละ 3 มิลลิลิตร ทำการเติมไอออนทองแดงเพิ่มลงไปที่มีความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายดังกล่าว สังเกตการเปลี่ยนสีของสารละลายที่เกิดขึ้นได้ด้วยตาเปล่าภายใต้แสงธรรมชาติและการเรืองแสงของสารละลายภายใต้แสง UV และถ่ายภาพ

4.3 การศึกษาความสามารถการตรวจวัดไอออนทองแดงของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ **N1004** ภายในเซลล์สิ่งมีชีวิต

การศึกษาความสามารถของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ **N1004** สำหรับการตรวจวัดไอออนทองแดงในตัวอย่างจริงทางระบบสิ่งมีชีวิต ในงานวิจัยนี้เลือกทดสอบภายในเซลล์ HepG2 ซึ่งเป็น

เซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ชนิด Human liver carcinoma cell line ซึ่งขั้นตอนการศึกษาเริ่มจากการเพาะเซลล์ HepG2 ในหลุมเพาะเชื้อแบบ 96 well plate เป็นเวลา 1 วันก่อนการทดลอง จากนั้นทำการบ่มเซลล์ด้วยสารละลาย $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ เข้มข้น 50 และ 100 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาทำการล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS บัฟเฟอร์ ตามด้วยตรึงใน 70% เอทานอล เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย **N1004** ที่ความเข้มข้น 50 μM เข้าไปในเซลล์ HepG2 จะได้เซลล์เพื่อใช้ศึกษาความสามารถการตรวจวัดไอออนทองแดงของ **N1004** โดยทำการติดตามสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของ **N1004** ภายในเซลล์ ก่อนและหลังการดักจับไอออนทองแดงด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted fluorescence microscope (Olympus CKX53/DP27-2) สำหรับการติดตามสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์แล้วถ่ายภาพ (Fluorescence imaging) จะใช้ค่าความยาวคลื่นกระตุ้น (λ_{ex}) ที่ 545 นาโนเมตร เป็นช่องสี่เหลี่ยม



เมื่อได้สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์สำหรับตรวจวัดไอออนโลหะชนิดใหม่ 2 ชนิด ได้แก่ N1102 และ N1004 จากนั้นทำการศึกษาเพื่อยืนยันโครงสร้างและตรวจวัดประสิทธิภาพของฟลูออเรสเซนต์ทั้ง 2 ชนิด ดังนี้

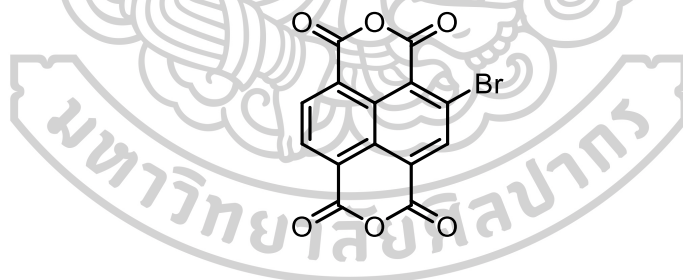
ทำการศึกษาเพื่อยืนยันโครงสร้างสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ N1102 และ N1004 ด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) และ High Resolution Mass Spectroscopy (HR-ESI MS)

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ N1102 และ N1004 ในการตรวจจับไอออนโลหะในสารละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบในเชิงปริมาณและคุณภาพ ด้วยวิธีทางฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรสโกปีและ/หรืออูลตราไวโอเลตสเปกโตรสโกปี

ทำการทดสอบสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ N1102 และ N1004 ในตัวอย่างจริง เช่น น้ำจากแหล่งน้ำในธรรมชาติ น้ำดื่ม หรือเซลล์สิ่งมีชีวิต ได้ผลการทดลองดังนี้

การยืนยันโครงสร้างของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ N1102

1.1 โครงสร้างของ Bromo-NDA (2)

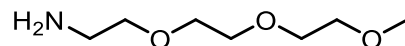


ภาพที่ 17 โครงสร้างทางเคมีของ Bromo-NDA (2)

จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของ Bromo-NDA (2) โดยวิธีทางสเปกโตรสโกปีสามารถยืนยันโครงสร้างได้ดังนี้

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.71 (s, 1H), 8.57 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 8.21 (d, J = 7.6 Hz, 1H) ppm; ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 168.1, 160.0, 159.4, 137.4, 131.6, 131.5, 130.7, 129.3, 128.4, 125.4, 124.6, 121.9 ppm.

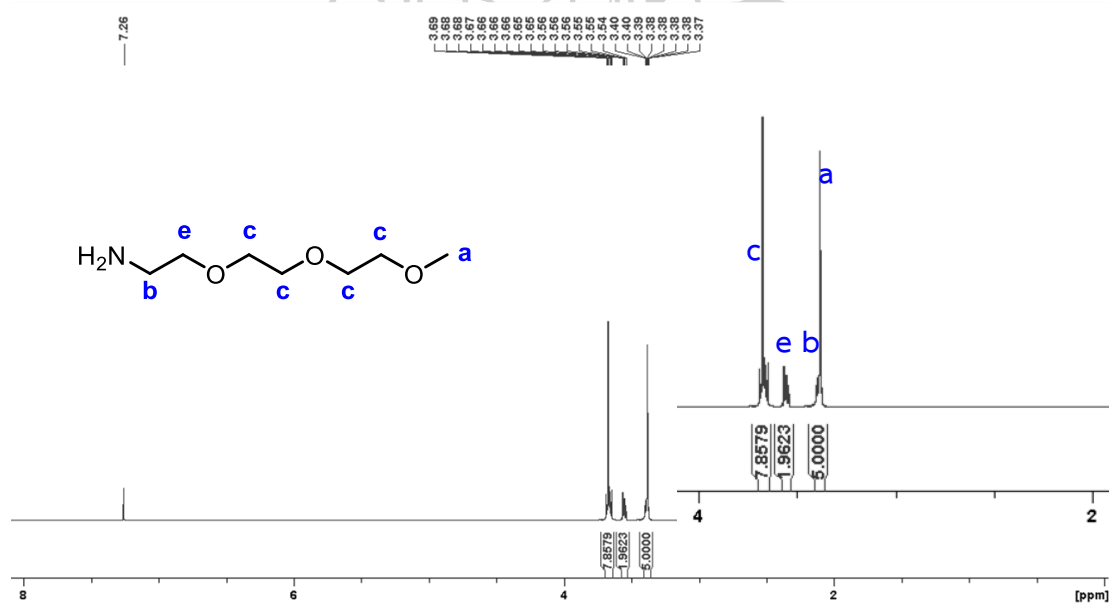
1.2 โครงสร้างของ Alkylamine (3)



ภาพที่ 18 โครงสร้างทางเคมีของ Alkylamine (3)

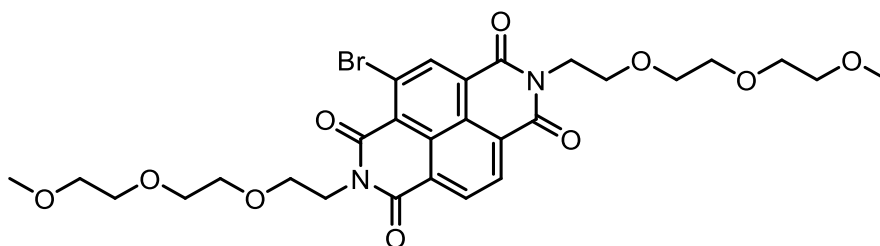
จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของ Alkylamine (3) โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีสามารถยืนยันโครงสร้างได้ดังนี้

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 3.67-3.61 (m, 8H, CH_2), 3.56-3.53 (m, 2H, CH_2), 3.52-3.49 (m, 2H, CH_2), 3.37 (s, 3H, O- CH_3), 1.52 (br s, 2H, NH_2) ppm (ภาพที่ 19); จากการคำนวณ $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3$, $[\text{M}]^+$ มีค่าเท่ากับ 164.2 m/z จากการทดสอบมีค่าเท่ากับ 164.2 m/z.



ภาพที่ 19 ^1H NMR สเปกตรัมของ Alkylamine (3)

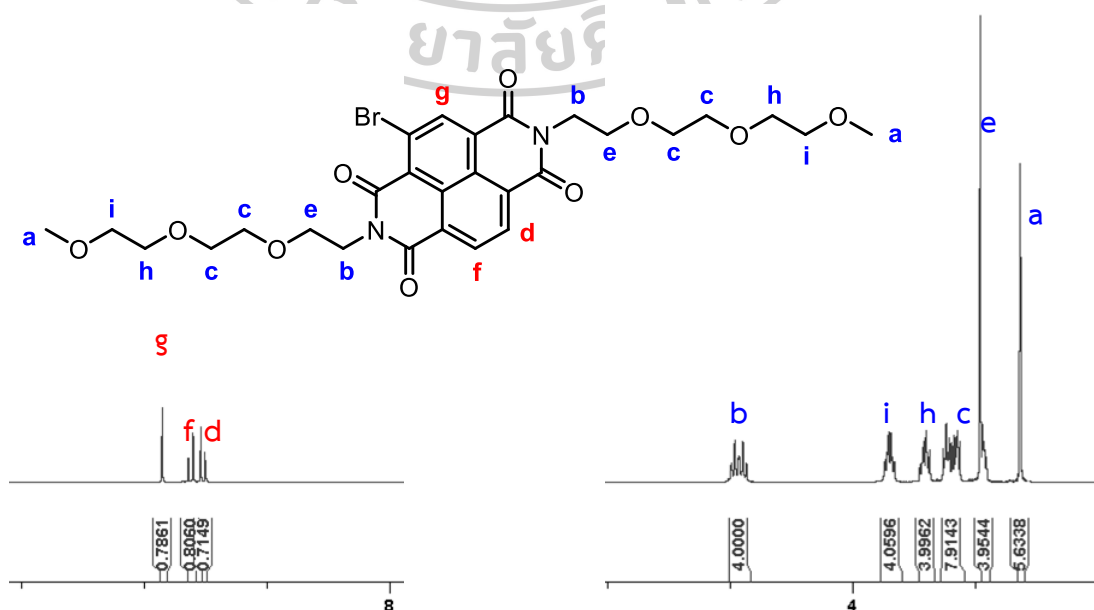
1.3 โครงสร้างของ NDI-O-Br (4)



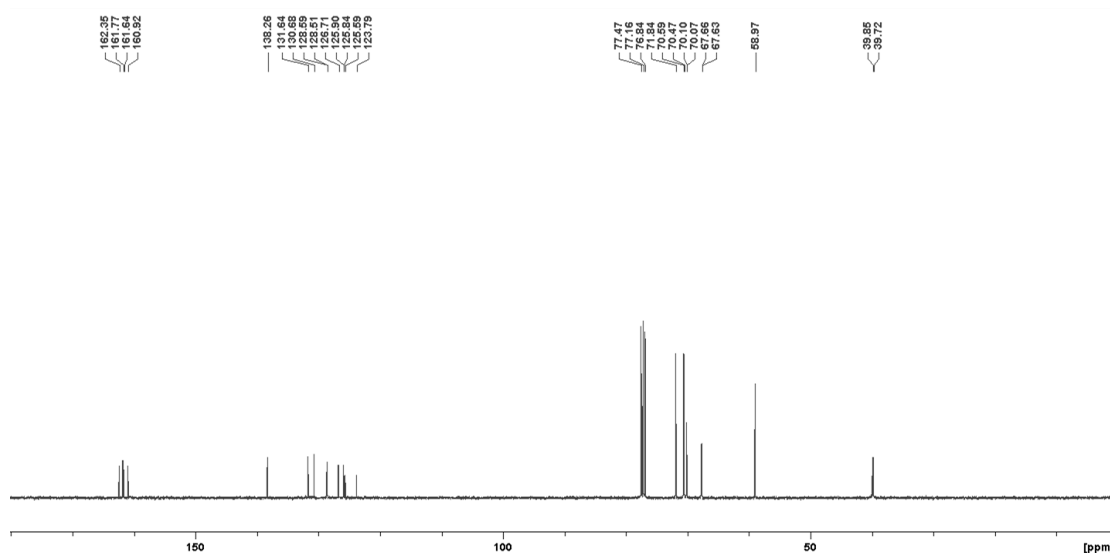
ภาพที่ 20 โครงสร้างทางเคมีของฟลูออโรพอร์ NDI-O-Br (4)

จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของ NDI-O-Br (4) โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีสามารถยืนยันโครงสร้างได้ดังนี้

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.92 (s, 1H, Ar-H), 8.81 (d, $J = 4$ Hz, 1H, Ar-H), 8.75 (d, $J = 4$ Hz, 1H, Ar-H), 4.49-4.43 (m, 4H, CH_2), 3.86-3.83 (m, 4H, CH_2), 3.72-3.68 (m, 4H, CH_2), 3.63-3.56 (m, 8H, CH_2), 3.48-3.47 (m, 4H, CH_2), 3.32 (s, 3H, CH_3), 3.31 (s, 3H, CH_3) ppm (ภาพที่ 21); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 162.4 (C=O), 161.8 (C=O), 161.6 (C=O), 160.9 (C=O), 138.3 (C), 131.6 (C), 130.7 (CH), 128.6 (C), 128.5 (C), 126.7 (CH), 125.9 (C), 125.8 (C), 125.6 (C), 123.8 (CH), 71.8 (2CH_2), 70.6 (CH_2), 70.5 (CH_2), 70.10 (2CH_2), 70.07 (2CH_2), 67.7 (CH_2), 67.6 (CH_2), 59.0 (2CH_3), 39.9 (CH_2), 39.7 (CH_2) ppm (ภาพที่ 22); จากการคำนวณ $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{BrN}_2\text{O}_{10}$, $[\text{M}+\text{H}]^+$ มีค่าเท่ากับ 637.1391 m/z จากการทดสอบมีค่าเท่ากับ 637.1390 m/z.



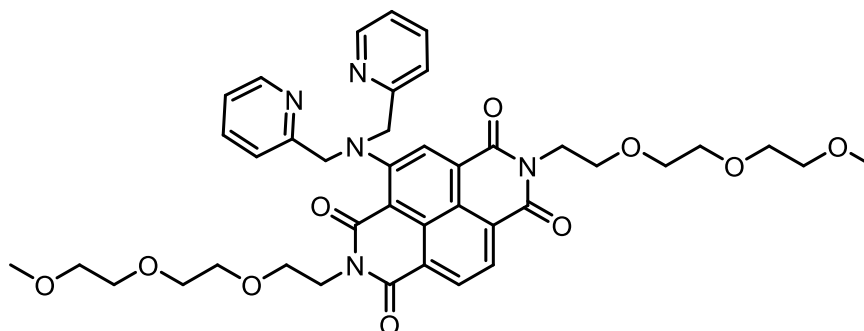
ภาพที่ 21 ^1H NMR สเปกตรัมของ NDI-O-Br (4)



ภาพที่ 22 ^{13}C NMR สเปกตรัมของ NDI-O-Br (4)

จากผล ^1H NMR สเปกตรัมที่แสดงในภาพที่ 21 จะเห็นว่าโปรตอน (H) ที่ตำแหน่ง b ที่ติดกับหมู่เอมีน (amine) ของ Alkylamine (3) มีค่า chemical shift (δ) เปลี่ยนไปจากเดิม เมื่อหมู่เอมีนของ Alkylamine (3) ทำปฏิกิริยากับหมู่ anhydride ของ Bromo-NDA (2) เกิดเป็น diimide ส่งผลให้ค่า chemical shift ของโปรตอนที่ตำแหน่ง b มีค่าเพิ่มขึ้น (Downfield) จาก 3.51 ppm เป็น 4.46 ppm และใน ^{13}C NMR สเปกตรัม มีการปรากฏของหมู่ C=O ของ naphthalenediimide ที่ δ 162.4 161.8 161.6 และ 160.9 ppm ซึ่งจากผลดังกล่าวสามารถยืนยันได้ว่า โครงสร้างสารประกอบ NDI-O-Br (4) ที่สังเคราะห์ได้ มีความบริสุทธิ์และมีโครงสร้างแสดงดังภาพที่ 20 อีกทั้งยังสามารถยืนยันโครงสร้างจาก HRMS (ESI) ที่ได้ผลเท่ากับ 637.1390 m/z ซึ่งมีค่าใกล้เคียงจากการคำนวณ $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{BrN}_2\text{O}_{10}$, $[\text{M}+\text{H}]^+$ มีค่าเท่ากับ 637.1391 m/z

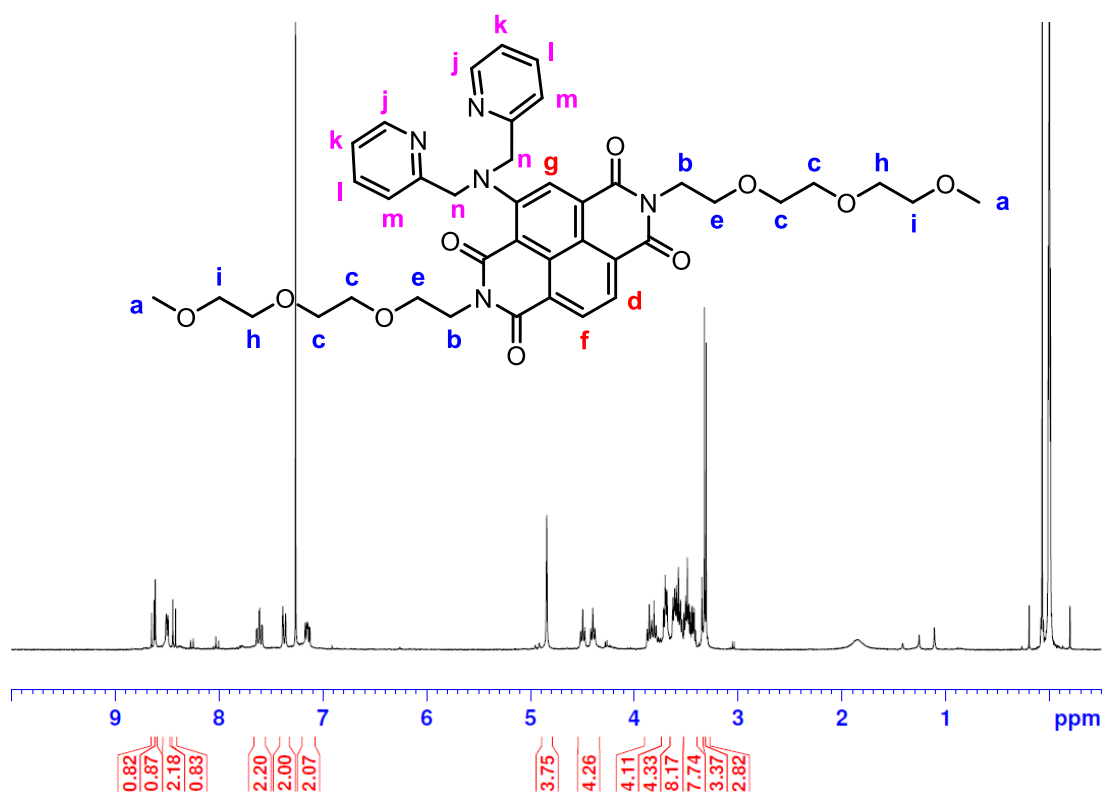
1.4 โครงสร้างของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1102



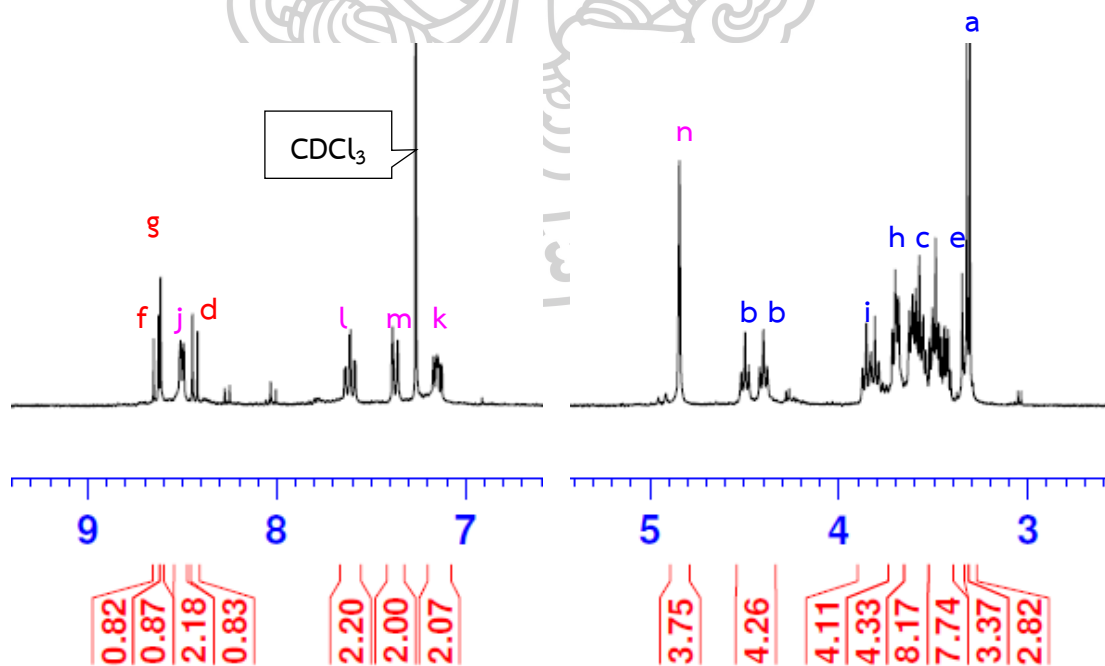
ภาพที่ 23 โครงสร้างทางเคมีของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1102

จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1102 โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีสามารถยืนยันโครงสร้างได้ดังนี้

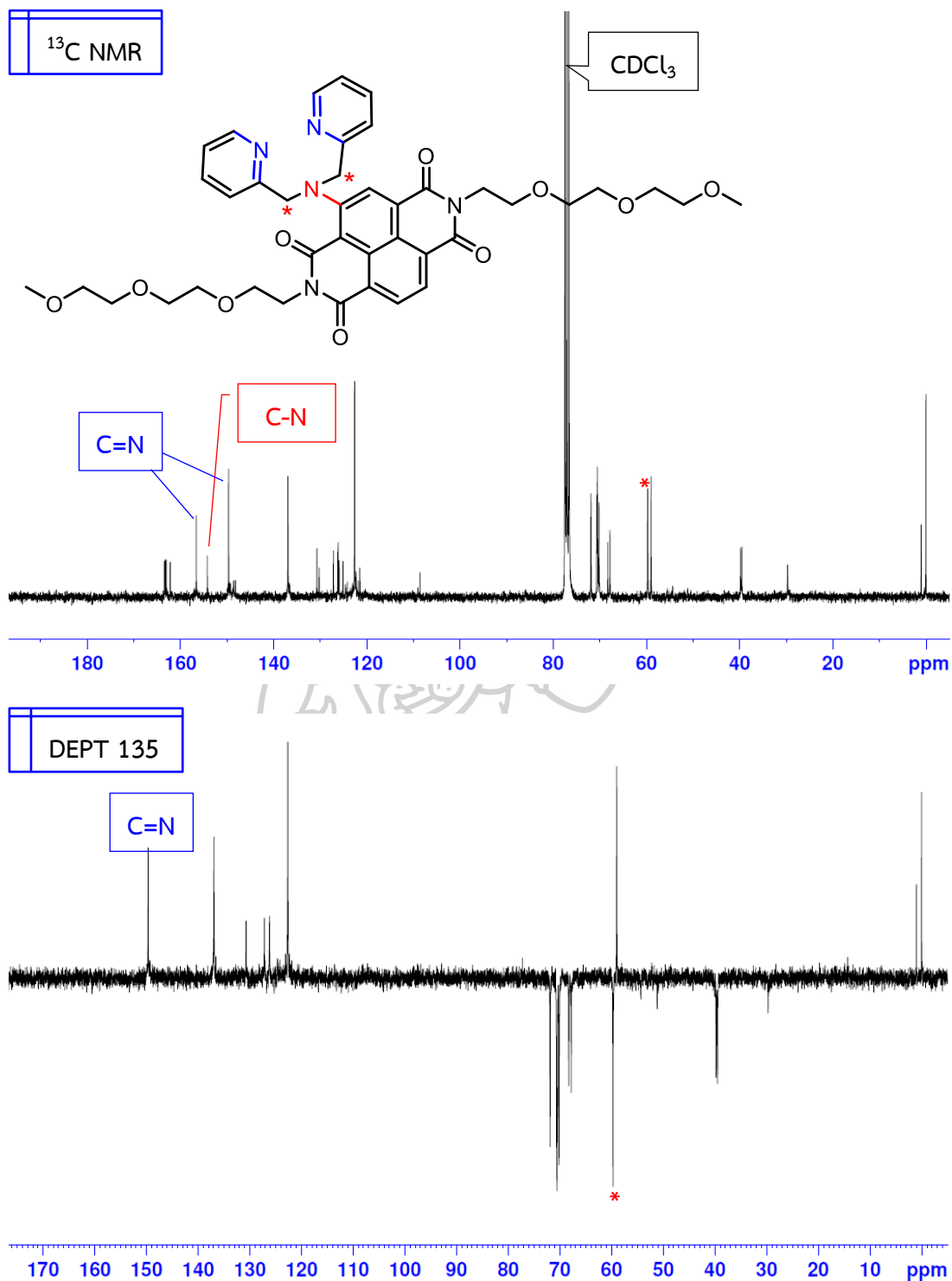
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 8.64 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, Ar-H), 8.61 (s, 1H, Ar-H), 8.50 (d, $J = 4.0$ Hz, 2H, Ar-H), 8.43 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, Ar-H), 7.61 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, Ar-H), 7.37 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, Ar-H), 7.17-7.12 (m, 2H, Ar-H), 4.84 (s, 4H, CH_2), 4.49 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, CH_2), 4.39 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, CH_2), 3.87-3.78 (m, 4H, CH_2), 3.71-3.68 (m, 4H, CH_2), 3.63-3.56 (m, 8H, CH_2), 3.53-3.45 (m, 4H, CH_2), 3.32 (s, 3H, CH_3), 3.30 (s, 3H, CH_3) ppm (ภาพที่ 24); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 161.3 (C=O), 161.2 (C=O), 160.9 (C=O), 160.1 (C=O), 154.5 (2C), 152.1 (C), 147.5 (2CH), 134.8 (2CH), 128.6 (CH), 128.1 (2C), 125.1 (CH), 124.1 (CH), 124.1 (2C), 123.8 (2C), 123.0 (4CH), 69.7 (2 CH_2), 68.5 (2 CH_2), 68.43 (CH_2), 68.36 (CH_2), 68.1 (2 CH_2), 66.2 (CH_2), 65.7 (CH_2), 57.6 (2 CH_2), 56.9 (2 CH_3), 37.7 (CH_2), 37.4 (CH_2) ppm (ภาพที่ 26); จากการคำนวณ for $\text{C}_{40}\text{H}_{46}\text{N}_5\text{O}_{10}^+$, $[\text{M}+\text{H}]^+$ มีค่าเท่ากับ 756.3239 m/z จากการทดสอบมีค่าเท่ากับ 756.3251 m/z



ภาพที่ 24 ^1H NMR สเปกตรัมของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1102



ภาพที่ 25 ส่วนขยายของ ^1H NMR สเปกตรัมของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1102 ช่วง δ 5.50-2.50 ppm และ 9.50-6.50 ppm



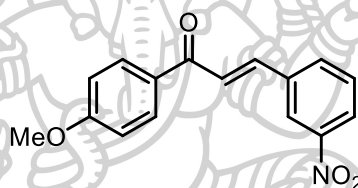
ภาพที่ 26 ^{13}C NMR และ ^{13}C DEPT 135 NMR สเปกตรัมของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1102

จากผล ^1H NMR สเปกตรัมส่วนขยายในภาพที่ 25 จะเห็นว่าโปรตอน (H) ที่ตำแหน่ง g มีค่า chemical shift เปลี่ยนไปจากเดิม คือค่า chemical shift (δ) ของโปรตอนที่ตำแหน่ง g มีค่าลดลง

(Upfiled) เนื่องจากอิทธิพลของ dipicolylamine เข้าทำปฏิกิริยาแทนที่ที่โบรมีน และใน ^{13}C NMR สเปกตรัม (ภาพที่ 26) มีการปรากฏของ C-N ที่ตำแหน่ง δ 152.1 ppm ที่เกิดจากปฏิกิริยาการแทนที่ของโบรมีนด้วย secondary amine และ C=N ของ dipicolylamine ที่ตำแหน่ง δ 154.5 และ 147.5 ppm และ $-\text{CH}_2$ ของ dipicolylamine ที่ตำแหน่ง δ 57.6 ppm ซึ่งจากผลดังกล่าวสามารถยืนยันได้ว่า โครงสร้างฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1102 ที่สังเคราะห์ได้ มีความบริสุทธิ์และมีโครงสร้างแสดงดังภาพที่ 23 อีกทั้งยังสามารถยืนยันโครงสร้างจาก HRMS (ESI) ที่ได้ผลเท่ากับ 756.3251 m/z ซึ่งมีค่าใกล้เคียงจากการคำนวณ $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{BrN}_2\text{O}_{10}$, $[\text{M}+\text{H}]^+$ มีค่าเท่ากับ 756.3239 m/z

การยืนยันโครงสร้างของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ N1004

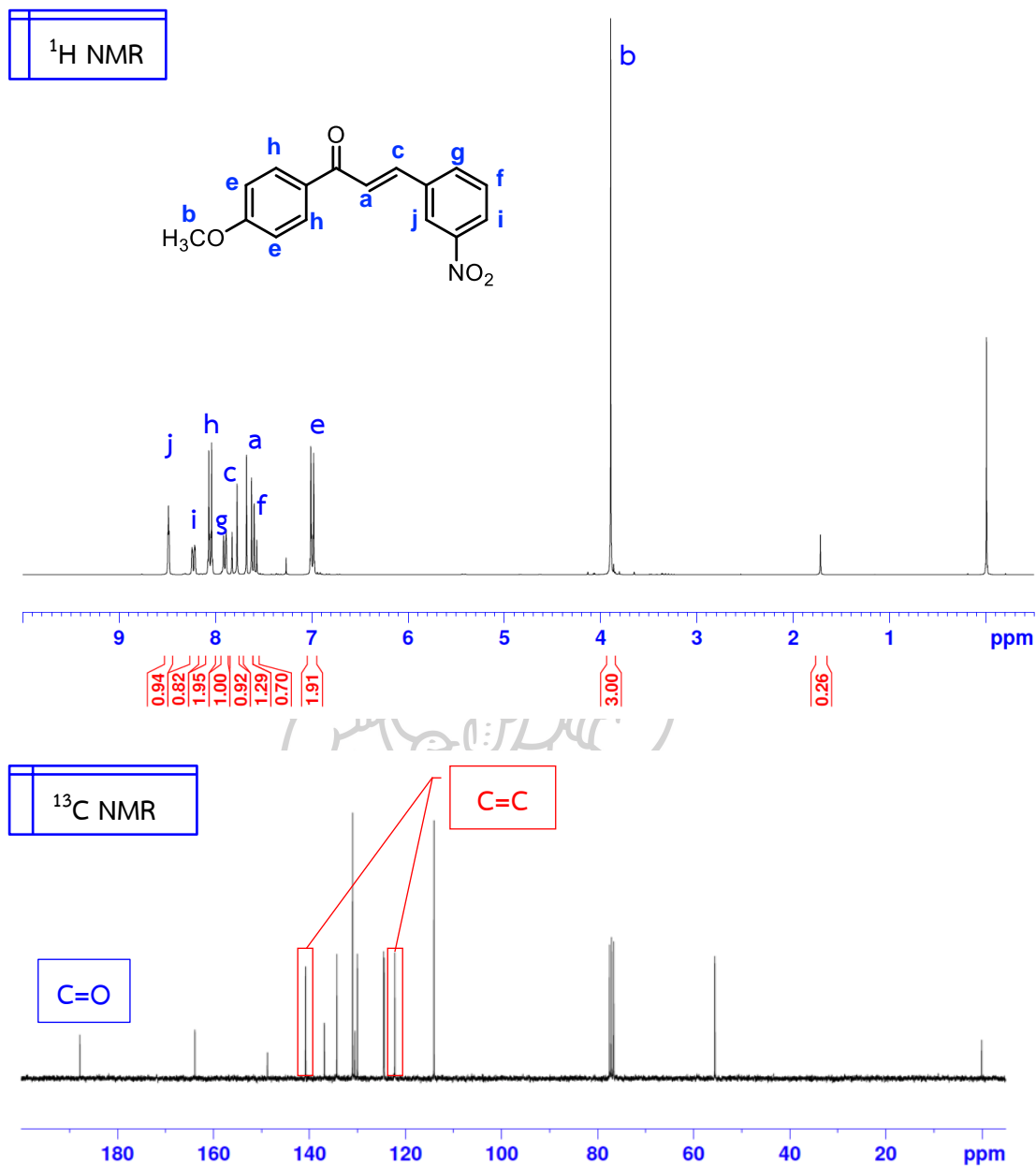
2.1 โครงสร้างของ Chalcone (3)



ภาพที่ 27 โครงสร้างทางเคมีของ Chalcone (3)

จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของ Chalcone (3) โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีสามารถยืนยันโครงสร้างได้ดังนี้

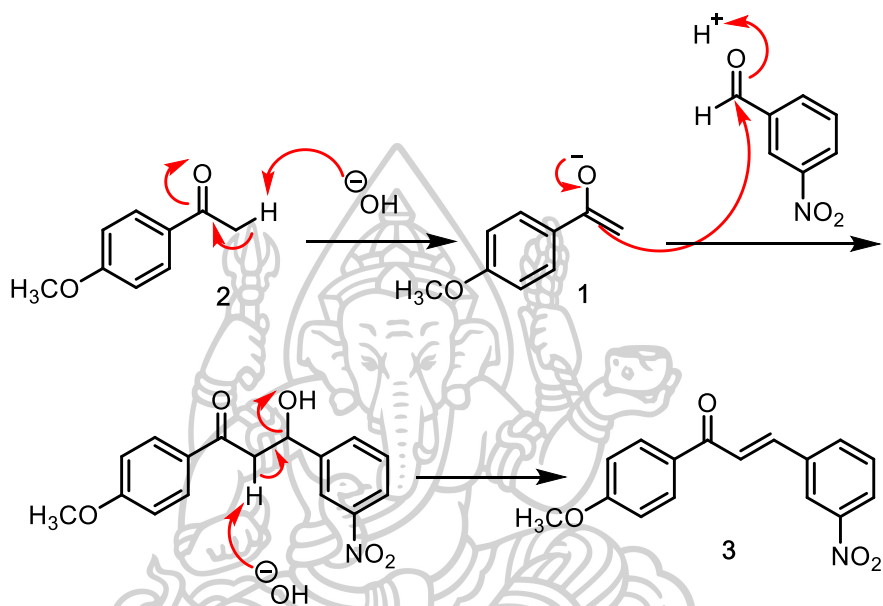
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 8.50 (s, 1H), 8.22 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.06 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.91 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.81 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 7.67 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H), 7.61 (t, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.01 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 3.90 (s, 3H) ppm (ภาพที่ 28); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 187.8 (C=O), 163.9 (C), 148.8 (C), 140.8 (CH), 136.9 (C), 134.3 (CH), 131.0 (2CH), 130.6 (C), 130.0 (CH), 124.6 (2CH), 122.2 (CH), 114.1 (2CH), 55.6 (CH_3) ppm (ภาพที่ 28)



ภาพที่ 28 ¹H NMR และ ¹³C NMR สเปกตรัมของ Chalcone (3)

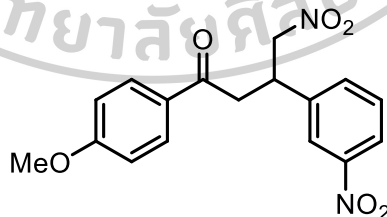
จากปฏิกิริยา aldol condensation ระหว่าง 4-methoxy acetophenone (1) และ 3-nitrobenzaldehyde (2) จะได้สารประกอบ Chalcone (3) อยู่ในรูปของ enone จากผล ¹H NMR สเปกตรัมที่แสดงในภาพที่ 28 จะเห็นได้ว่าการปรากฏของโปรตอน (H) ที่ตำแหน่ง a และ c ของ alkene ที่มีระบบคอนจูเกต (conjugated system) เชื่อมต่อกับคีโตนหรือที่เรียกว่า enone ซึ่งมีค่า δ 7.67 และ 7.81 ppm ตามลำดับ โดยโปรตอนทั้งสองตัวเกิดการ coupling ซึ่งกันและกัน มีค่า J coupling เท่ากับ 16.2 และ 15.9 Hz ตามลำดับ และใน ¹³C NMR สเปกตรัม มีการปรากฏของ C=O

ของ enone ที่ตำแหน่ง δ 187.8 ppm และ C=C ที่ได้รับอิทธิพลจากหมู่คาร์บอนิลและไนโตรเบนวงเบนซีน ทำให้คาร์บอนที่ตำแหน่งพันธะคู่ปรากฏที่ δ 122.2 และ 140.8 ppm ซึ่งจากผลดังกล่าวสามารถยืนยันโครงสร้างของ Chalcone (3) ที่สังเคราะห์ที่ได้ว่ามีโครงสร้างแสดงดังภาพที่ 27 โดยสามารถเสนอกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังภาพที่ 29



ภาพที่ 29 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของ Chalcone (3)

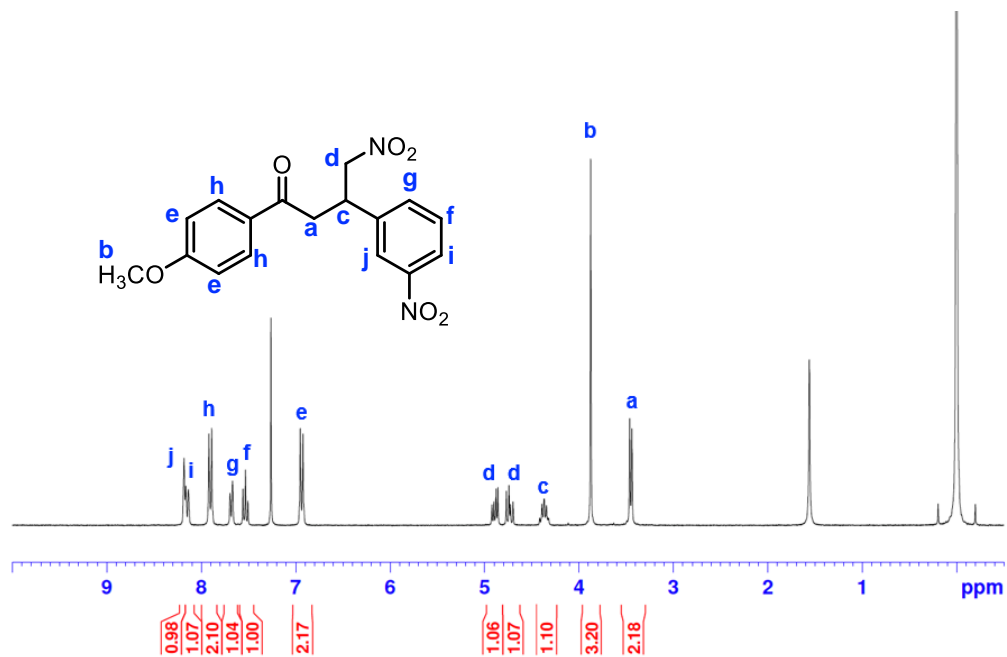
2.2 โครงสร้างของ Chalcone-NO₂ (4)



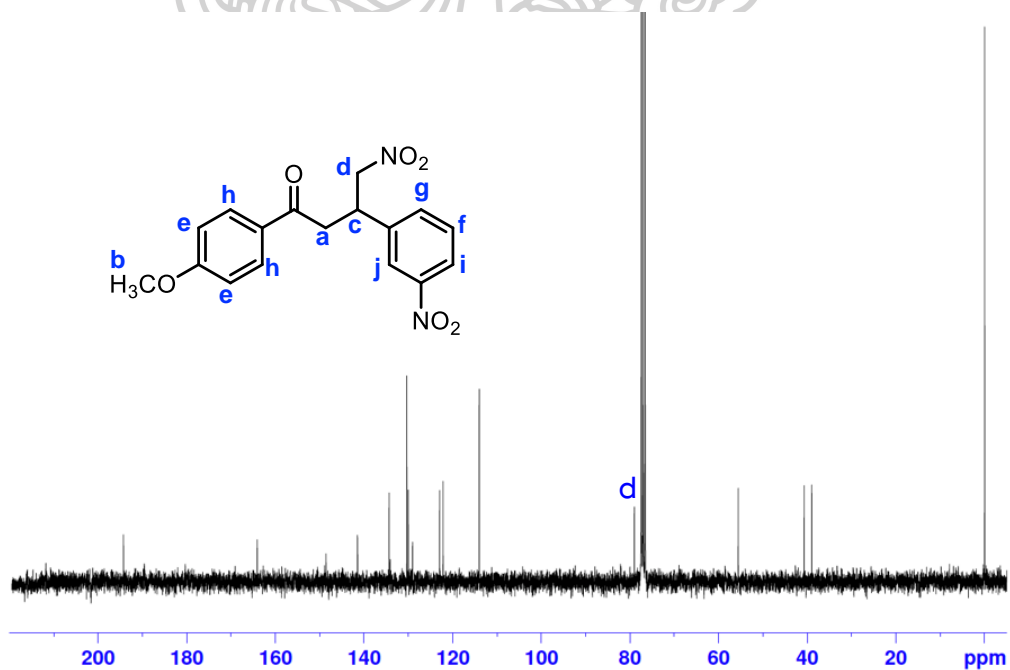
ภาพที่ 30 โครงสร้างทางเคมีของ Chalcone-NO₂ (4)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.19 (s, 1H), 8.15 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.91 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.68 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.53 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 6.94 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 4.86-4.93 (m, 1H), 4.70-4.75 (m, 1H), 4.32-4.42 (m, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.45 (d, J = 6.9 Hz, 2H)

ppm (ภาพที่ 31); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 194.8 (C=O), 163.9 (C), 148.5 (C), 142.9 (C), 134.8 (CH), 130.3 (2CH), 129.9 (CH), 129.7 (C), 122.8 (CH), 122.2 (CH), 113.8 (2CH), 79.0 (CH₂), 55.1 (CH₃), 40.7 (CH₂), 39.8 (CH) ppm (ภาพที่ 32)

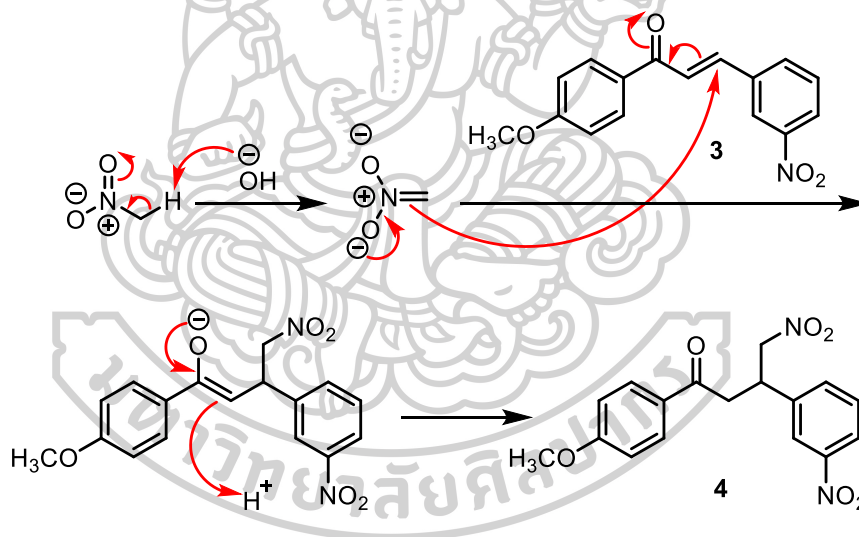


ภาพที่ 31 ^1H NMR สเปกตรัมของ Chalcone-NO₂ (4)



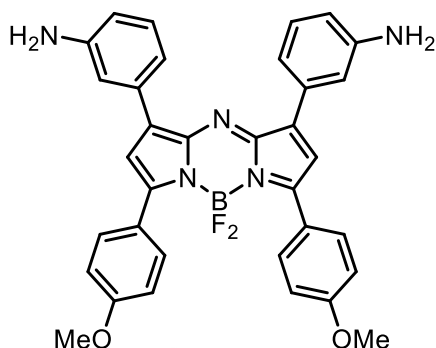
ภาพที่ 32 ^{13}C NMR สเปกตรัมของ Chalcone-NO₂ (4)

จากปฏิกิริยา 1,4 addition ระหว่าง Chalcone (3) และ nitromethane จะได้สารประกอบ Chalcone-NO₂ (4) ซึ่งจะไม่ปรากฏพันธะคู่ภายในโครงสร้าง ซึ่งจากผล ¹H NMR สเปกตรัมที่ได้ (ภาพที่ 31) จะปรากฏโปรตอน (H) ที่ตำแหน่ง a มีค่า δ เปลี่ยนแปลงเป็น 3.45 ppm มีอินทิเกรชันเป็น 2 และมีมัลติพลิตี (multiplicity) เป็น doublet ที่เกิดจากการ coupling กับโปรตอนที่ตำแหน่ง c ในขณะที่โปรตอน (H) ที่ตำแหน่ง c มีอินทิเกรชันเป็น 1 และมี multiplicity เป็น multiplet เนื่องจากเกิดการ coupling กับโปรตอนที่ตำแหน่ง a และ d ซึ่งจากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าไม่มีพันธะคู่เกิดขึ้นที่บริเวณ a และ c เพราะ multiplicity ที่ตำแหน่ง a ได้เปลี่ยนเป็น doublet และใน ¹³C NMR สเปกตรัม (ภาพที่ 32) มีการปรากฏของ HC-NO₂ ที่ δ 79.0 ppm (คาร์บอนที่ตำแหน่ง d) แสดงให้เห็นว่า nitromethane เข้าทำปฏิกิริยากับ Chalcone (3) ได้เป็น Chalcone-NO₂ (4) ที่มีโครงสร้างแสดงดังภาพที่ 30 โดยสามารถเสนอกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังภาพที่ 33



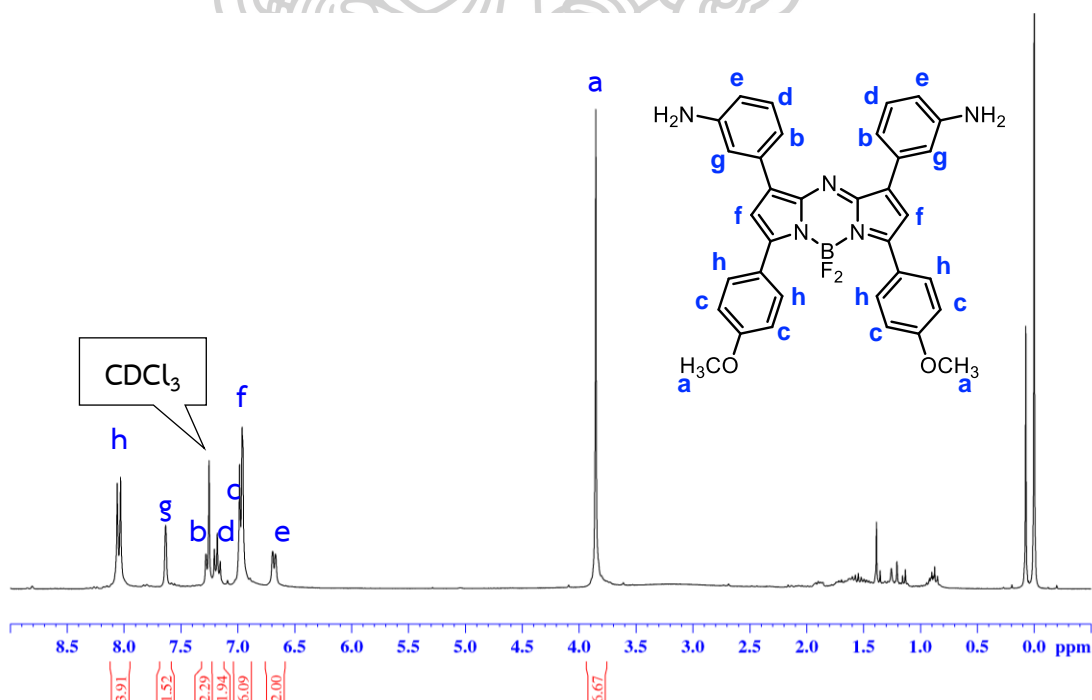
ภาพที่ 33 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของ Chalcone-NO₂ (4)

2.3 โครงสร้างของ aza-BDP (6)

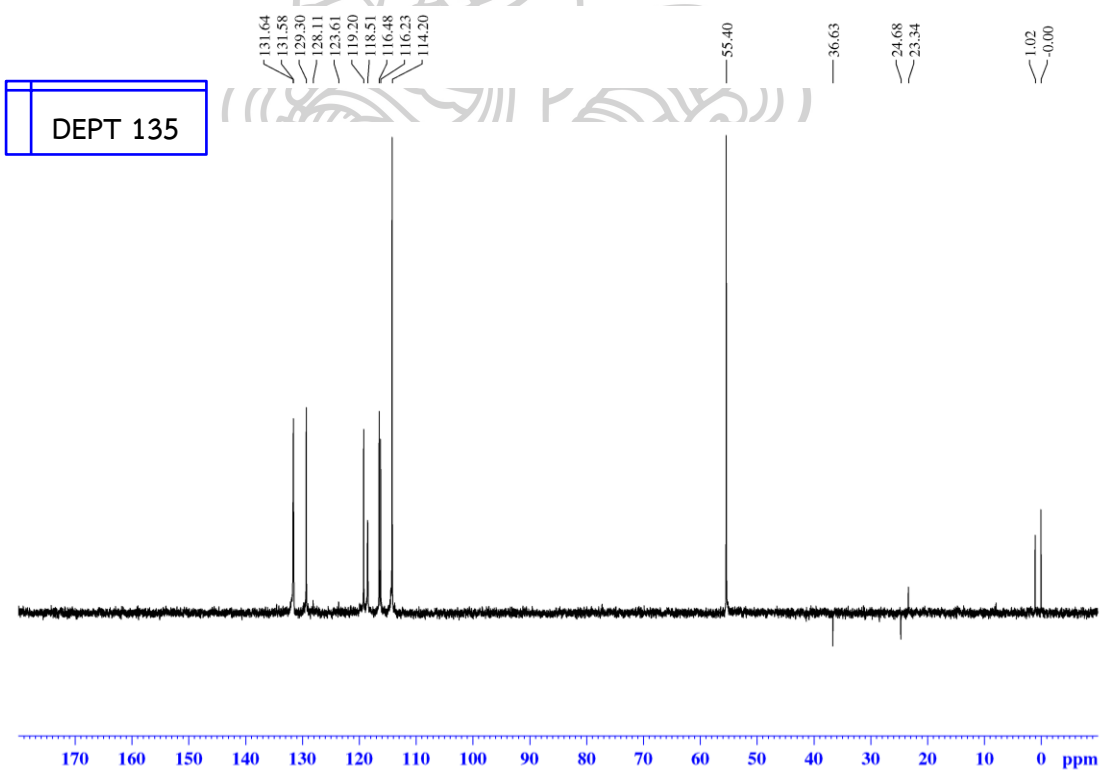
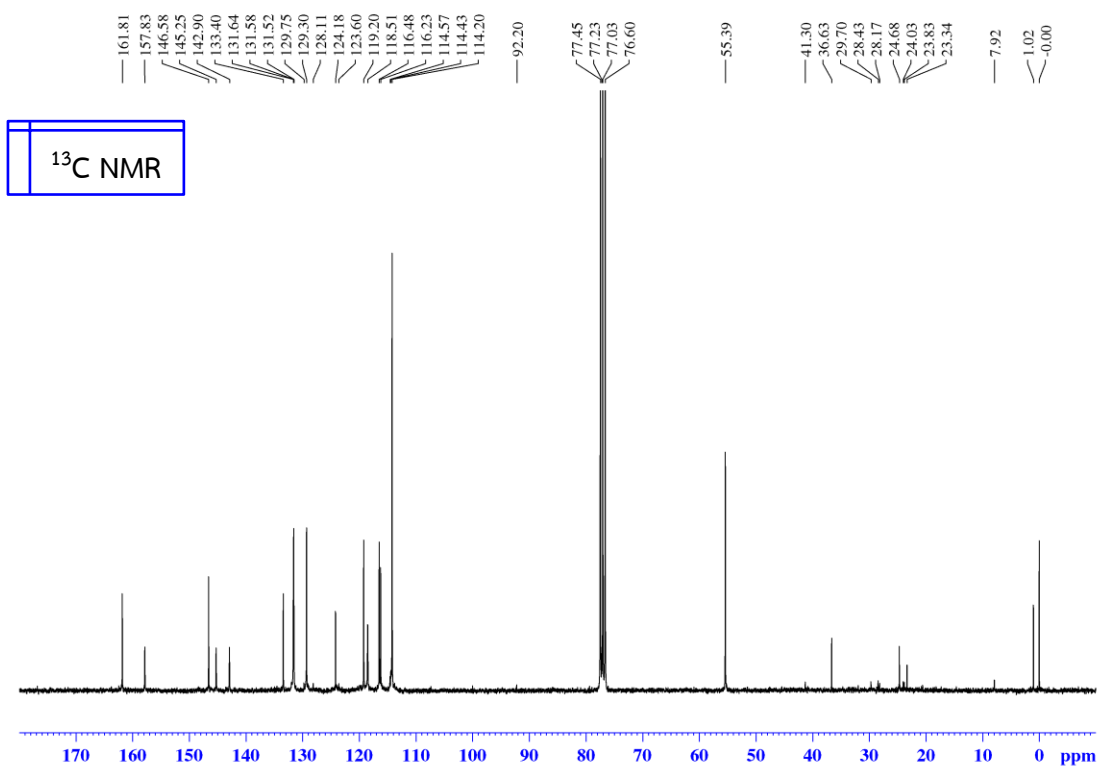


ภาพที่ 34 โครงสร้างทางเคมีของฟลูออโรพอร์ aza-BDP (6)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 8.05 (d, $J = 8.7$ Hz, 4H), 7.64 (s, 2H), 7.27 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.18 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 6.97 (d, $J = 8.7$ Hz, 4H), 6.96 (s, 2H), 6.68 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 3.85 (s, 6H) ppm (ภาพที่ 35); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 161.8 (2C), 157.8 (2C), 146.6 (2C), 145.3 (2C), 142.9 (2C), 133.4 (2C), 131.6 (2CH), 129.3 (2CH), 124.2 (2C), 119.2 (2CH), 118.5 (2CH), 116.4 (2CH), 116.2 (2CH), 114.4 (6CH), 55.4 (2CH₃) ppm (ภาพที่ 36)



ภาพที่ 35 ^1H NMR สเปกตรัมของ aza-BDP (6)

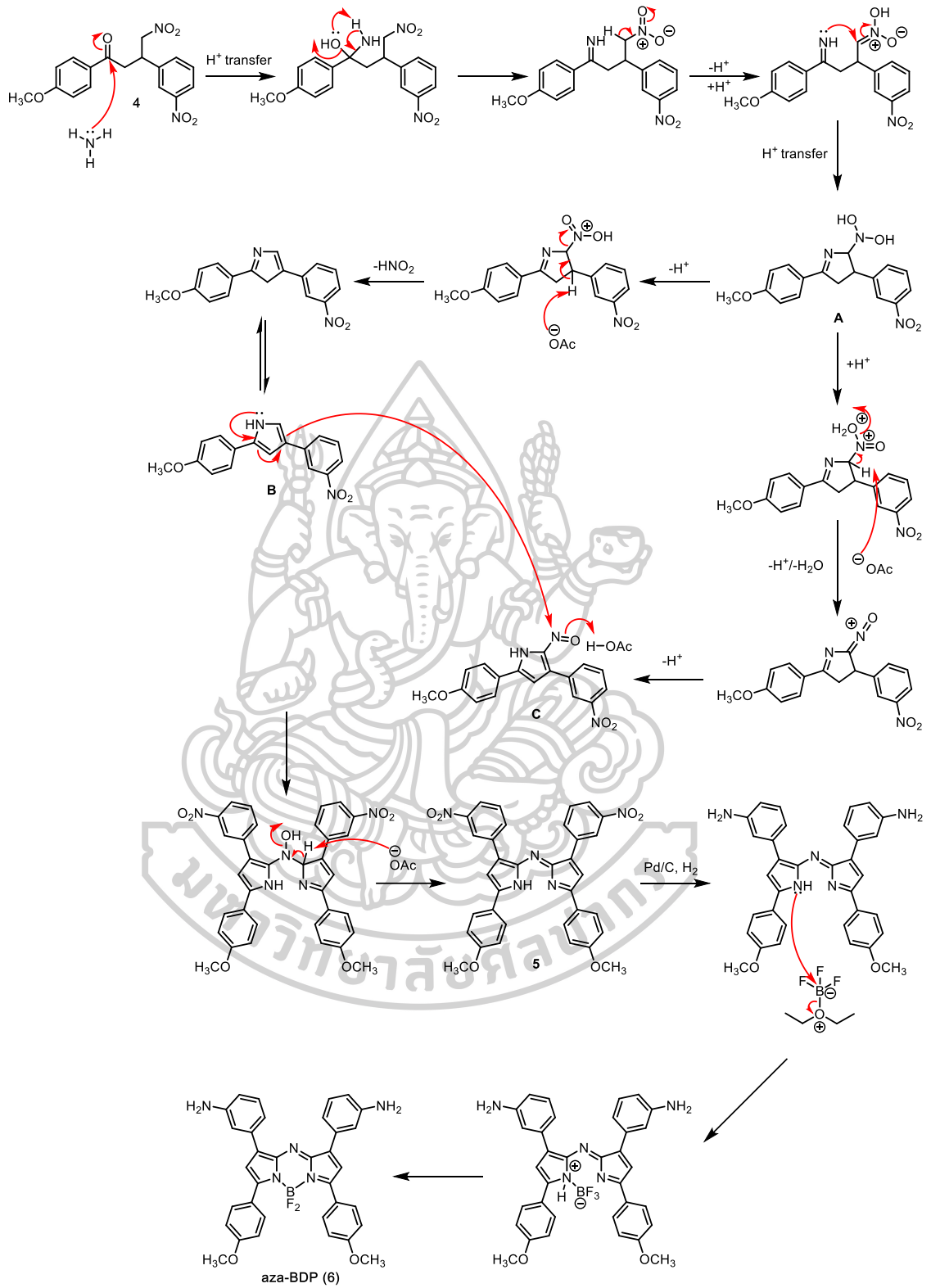


ภาพที่ 36 ^{13}C NMR และ ^{13}C DEPT 135 NMR สเปกตรัมของ aza-BDP (6)

เนื่องด้วยสารประกอบ Aza-dipyrromethene (5) ซึ่งเป็นสารผลิตภัณฑ์ขั้นก่อนหน้าที่จะนำมาใช้สังเคราะห์เป็น aza-BDP (6) ไม่สามารถยืนยันโครงสร้างทางเคมีได้ด้วยวิธี NMR เนื่องจากความสามารถในการละลายในตัวทำละลายที่น้อยมาก จึงไม่ได้แสดงผลการวิเคราะห์ในที่นี้ โดยเส้นทางการสังเคราะห์สารเรืองแสง aza-BDP (6) ชนิดนี้ได้ทำตามขั้นตอนการสังเคราะห์ที่มีรายงานในก่อนหน้า³² ซึ่งสารผลิตภัณฑ์ Aza-dipyrromethene (5) ที่ได้มีลักษณะเช่นเดียวกับที่มีรายงาน จึงสามารถยืนยันโครงสร้างของสารประกอบชนิดนี้ได้โดยการอ้างอิงจากงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ [32]

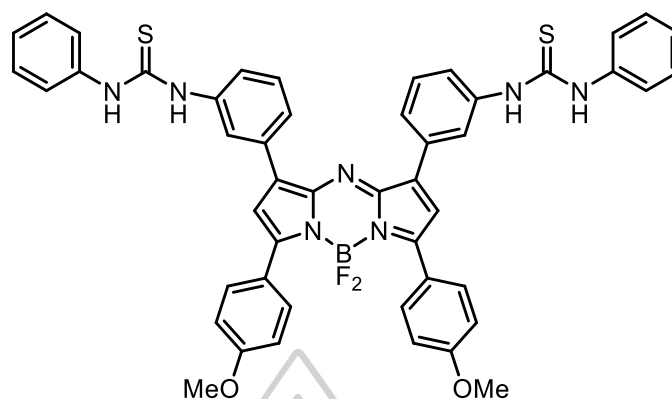
จากผล ^1H NMR สเปกตรัม (ภาพที่ 35) จะเห็นว่ามีการปรากฏของโปรตอน (H) ของ azadipyrromethene ที่ตำแหน่ง f ซึ่งปรากฏค่า chemical shift เท่ากับ 6.96 ppm มีอินทิเกรชันเป็น 2 และมี multiplicity เป็น singlet เนื่องจากไม่มีโปรตอนบนคาร์บอนข้างเคียง และโปรตอน (H) ที่ตำแหน่ง ortho- ของ aniline ที่ตำแหน่ง g ที่ไม่เกิดการ coupling กับโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่งใดๆ มี multiplicity เป็น singlet เช่นกัน ซึ่งปรากฏค่า chemical shift เท่ากับ 7.64 ppm รวมทั้งผลของ ^{13}C NMR สเปกตรัม (ภาพที่ 36) ที่เมื่อเปรียบเทียบสเปกตรัมที่ได้กับผลการยืนยันโครงสร้างที่มีรายงานไว้ก่อนหน้า³² พบว่าได้ผลการทดลองที่เหมือนกัน ซึ่งจากผลดังกล่าวจึงสามารถยืนยันได้ว่า โครงสร้างของ aza-BDP (6) ที่สังเคราะห์ได้ มีความบริสุทธิ์และมีโครงสร้างแสดงดังภาพที่ 34 โดยสามารถเสนอกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังภาพที่ 37





ภาพที่ 37 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของ aza-BDP (6)

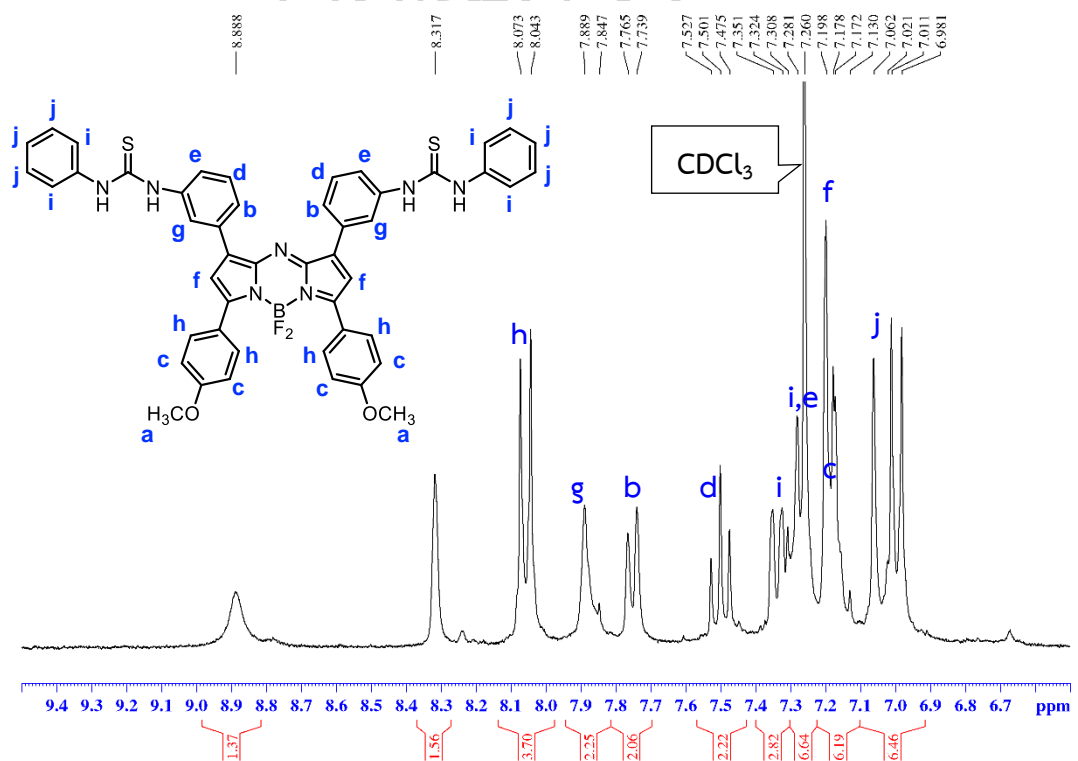
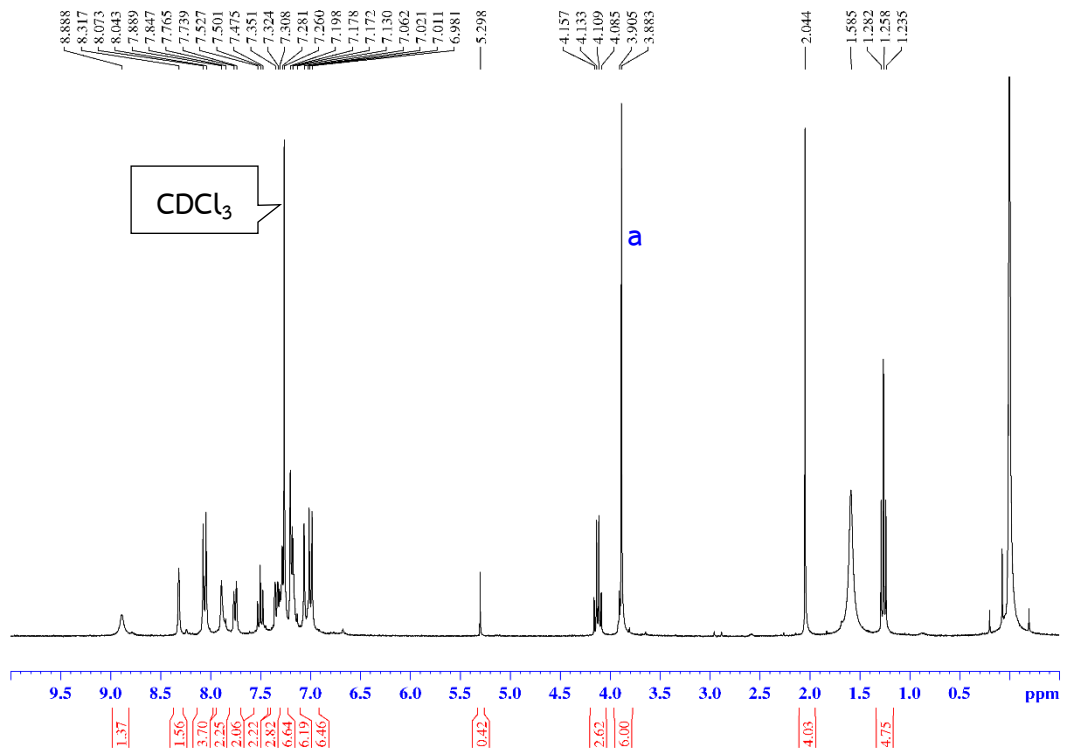
2.4 โครงสร้างของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1004



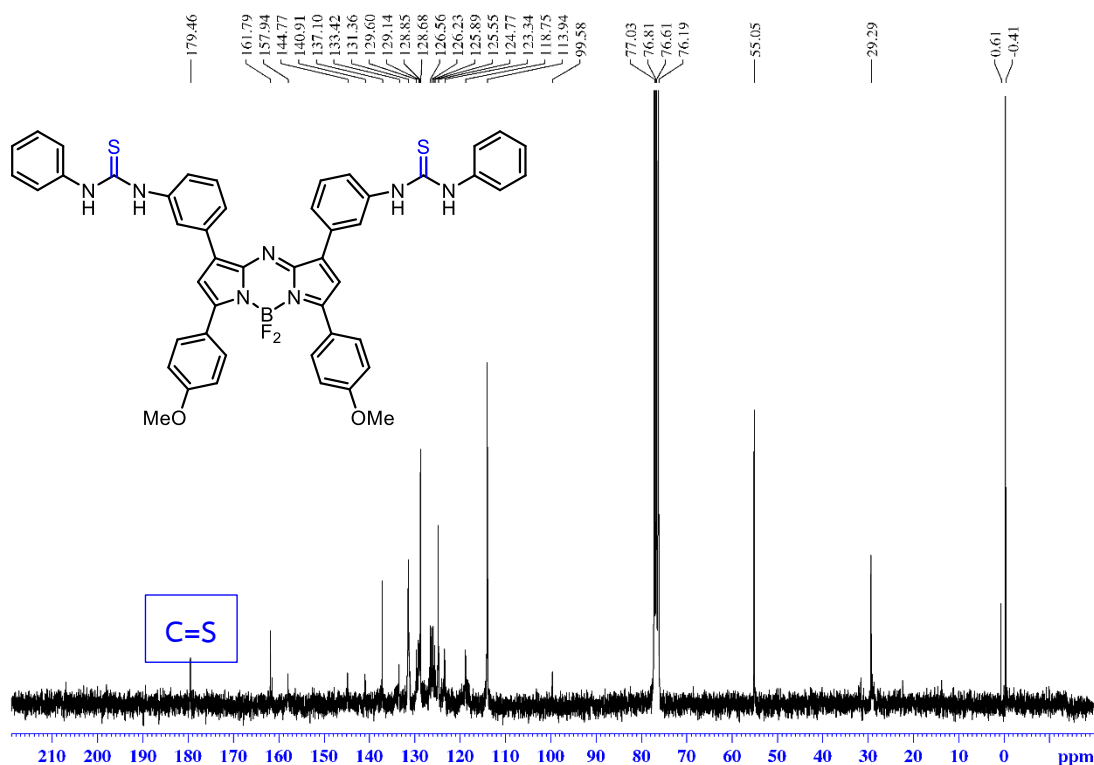
ภาพที่ 38 โครงสร้างทางเคมีของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1004

จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1004 โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีสามารถยืนยันโครงสร้างได้ดังนี้

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 8.89 (s, 2H, NH), 8.32 (s, 2H, NH), 8.06 (d, $J = 8.8$ Hz, 4H, Ar-H), 7.88 (s, 2H, Ar-H), 7.75 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, Ar-H), 7.50 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H, Ar-H), 7.35-7.28 (m, 6H, Ar-H), 7.20-7.12 (m, 6H, Ar-H), 7.06-6.98 (m, 6H, Ar-H), 3.88 (s, 6H, CH_3) ppm (ภาพที่ 39); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 55.0 (2 CH_3), 113.9 (6CH), 118.8 (2CH), 123.3 (2CH), 124.8 (4CH), 125.6 (2C), 125.9 (2CH), 126.2 (2CH), 126.6 (2CH), 128.7 (4CH), 129.6 (2CH), 131.4 (2CH), 133.4 (2C), 137.1 (4C), 140.9 (2C), 144.8 (2C), 157.9 (2C), 161.8 (2C), 179.5 (2C=S) ppm (ภาพที่ 40); จากการคำนวณ $\text{C}_{48}\text{H}_{38}\text{BF}_2\text{N}_7\text{NaO}_2\text{S}_2^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ มีค่าเท่ากับ 880.2482 m/z จากการทดสอบมีค่าเท่ากับ 880.2486 m/z



ภาพที่ 39 ^1H NMR สเปกตรัมของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1004



ภาพที่ 40 ^{13}C NMR สเปกตรัมของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1004

จากผล ^1H NMR สเปกตรัม จะเห็นว่าการเพิ่มขึ้นของจำนวนโปรตอนบนวงอะโรมาติก (Aromatic) ของ Phenyl thiourea ในช่วง chemical shift 6.90-7.70 ppm ที่ตำแหน่ง i และ j ดังแสดงในภาพที่ 39 นอกจากนี้ยังมีการปรากฏของโปรตอน -NH- ของ thiourea ที่ตำแหน่ง δ 8.89 และ 8.32 ppm และใน ^{13}C NMR สเปกตรัม (ภาพที่ 40) ยังมีการปรากฏของ C=S ที่ตำแหน่ง δ 179.5 ppm ของ thiourea ในโครงสร้าง ซึ่งจากผลดังกล่าวสามารถยืนยันได้ว่า โครงสร้างฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1004 ที่สังเคราะห์ได้ มีความบริสุทธิ์และมีโครงสร้างแสดงดังภาพที่ 38 อีกทั้งยังสามารถยืนยันโครงสร้างจาก HRMS (ESI) ที่ได้ผลเท่ากับ 880.2486 m/z ซึ่งมีค่าใกล้เคียงจากการคำนวณ $\text{C}_{48}\text{H}_{38}\text{BF}_2\text{N}_7\text{NaO}_2\text{S}_2^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ มีค่าเท่ากับ 880.2482 m/z

การทดสอบประสิทธิภาพของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1102 ในการตรวจจับไอออนทองแดง

3.1 การศึกษาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม

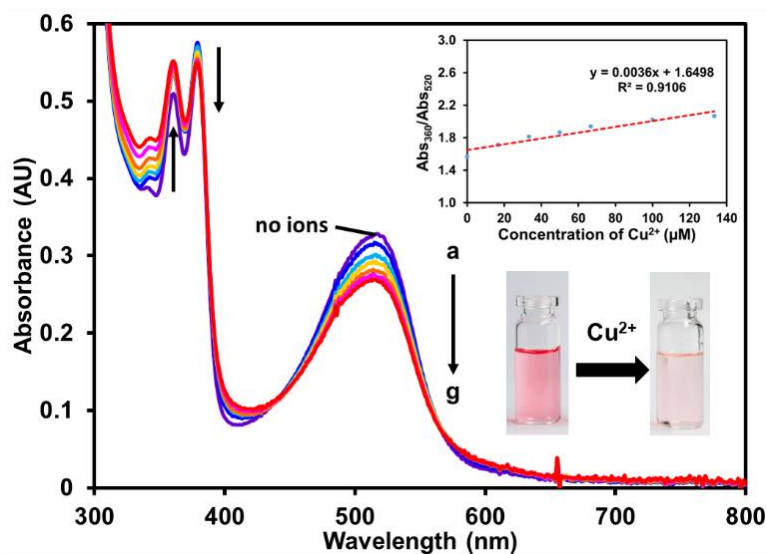
เนื่องจากวัตถุประสงค์ในการออกแบบเซ็นเซอร์ ก็เพื่อจะใช้ในการตรวจวัดหรือตรวจสอบไอออนโลหะในตัวอย่างจริงในสิ่งแวดล้อม ซึ่งระบบต่างๆ ในสิ่งแวดล้อมส่วนใหญ่จะมีน้ำเป็น

องค์ประกอบหลัก สำหรับฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ **N1102** ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ไอออนทองแดง คือ 5 mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4) เซ็นเซอร์ **N1102** จะถูกนำมาศึกษาสมบัติการดูดกลืนแสงและการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ในระบบตัวทำละลาย 5 mM phosphate buffered saline (pH 7.4) ในสถานะที่มีและไม่มีไอออนทองแดง เปรียบเทียบกับในสถานะที่มีและไม่มีไอออนรบกวนอื่นๆ ซึ่งในขั้นของกระบวนการศึกษาความสามารถความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) และความจำเพาะเจาะจง (selectivity) ของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ **N1102** ต่อไอออนทองแดง จะทำการเตรียมไอออนแต่ละชนิด ได้แก่ ไอออนของโลหะอัลคาไลน์ ไอออนของโลหะอัลคาไลน์เอิร์ท และไอออนของโลหะทรานซิชันรวมถึงไอออนทองแดงจากเกลือเปอร์คลอเรตละลายในน้ำที่ปราศจากไอออน (DI water) ทำการไตเตรตหรือเติมลงไปในระบบตัวทำละลายเซ็นเซอร์ **N1102** สังเกตและบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงสัญญาณที่เกิดขึ้น

3.2 การทดสอบความไว (sensitivity)

3.2.1 ผลการทดสอบความสามารถในการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ **N1102**

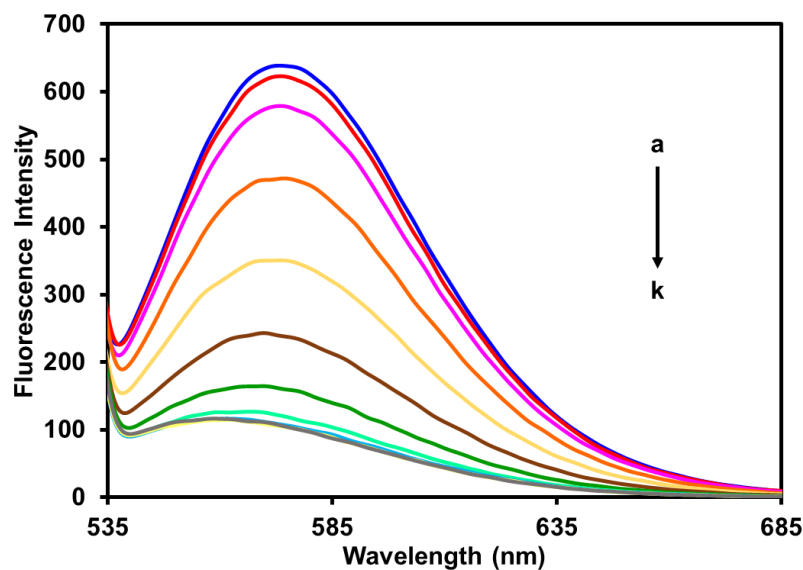
จากการทดสอบสมบัติการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ **N1102** ในระบบตัวทำละลาย 5 mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4) ในสถานะที่ไม่มีและมีไอออนทองแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า การตรวจจับของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ **N1102** กับไอออนทองแดง แสดงการเปลี่ยนแปลงสัญญาณการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520, 378 และ 360 นาโนเมตร ตามลำดับ โดยที่ความยาวคลื่นที่ 520 และ 378 nm จะแสดงสัญญาณการดูดกลืนแสงแบบ ON-OFF คือสัญญาณการดูดกลืนแสงจะลดลงแปรผันตามความเข้มข้นของไอออนทองแดงที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่ความยาวคลื่นที่ 360 nm จะแสดงสัญญาณการดูดกลืนแสงแบบ OFF-ON คือสัญญาณการดูดกลืนแสงจะค่อยๆเพิ่มแปรผันตามการเพิ่มขึ้นของไอออนทองแดง แสดงดังภาพที่ 41 อีกทั้งยังสามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายได้ด้วยตาเปล่า โดยสีของสารละลายเซ็นเซอร์จะค่อยๆจางลงจากสีแดงเป็นชมพูอ่อนเมื่อปริมาณไอออนทองแดงเพิ่มมากขึ้น



ภาพที่ 41 การดูดกลืนแสง UV-Vis ของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1102 (4.8×10^{-5} M) ในสารละลาย 5 mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4) ก่อนและหลังเติมไอออนทองแดงที่ความเข้มข้น a: 0 μ M, b: 16.67 μ M, c: 33.33 μ M, d: 50.00 μ M, e: 66.67 μ M, f: 100.00 μ M, g: 133.33 μ M

3.2.2 ผลการทดสอบความสามารถในการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1102 ในสถานะที่มีและไม่มีไอออนทองแดงในสารละลาย

จากการทดสอบสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1102 ในระบบตัวทำละลาย 5 mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4) ในสถานะที่ไม่มีและมีไอออนทองแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ (ภาพที่ 42) พบว่าในสถานะที่ไม่มีไอออนทองแดง ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1102 มีการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ในช่วงความยาวคลื่น 535-685 nm โดยมีค่าความยาวคลื่นของการคายแสงฟลูออเรสเซนต์สูงสุด (λ_{em}) เท่ากับ 575 nm เมื่อมีการเติมไอออนทองแดงเปอร์คลอเรตลงในสารละลายเซ็นเซอร์ พบว่าค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์ของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1102 มีค่าลดลงที่ความยาวคลื่นเดิม ($\lambda_{em} = 575$ nm) ในลักษณะแปรผกผันกับปริมาณไอออนทองแดงที่เพิ่มขึ้น (ระบบ ON-OFF fluorescence signal)



ภาพที่ 42 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{\text{ex}} = 525 \text{ nm}$ และ $\lambda_{\text{em}} = 575 \text{ nm}$) ของฟลูออเรสเซนซ์ เซ็นเซอร์ N1102 ($23.8 \mu\text{M}$) ในสารละลาย 5 mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4) ก่อนและหลังเติมไอออนทองแดงเปอร์คลอเรตที่ความเข้มข้นต่างๆ a: $0 \mu\text{M}$, b: $0.7 \mu\text{M}$, c: $1.3 \mu\text{M}$, d: $2.0 \mu\text{M}$, e: $2.7 \mu\text{M}$, f: $3.3 \mu\text{M}$, g: $4.0 \mu\text{M}$, h: $4.7 \mu\text{M}$, i: $5.3 \mu\text{M}$, j: $6.0 \mu\text{M}$, k: $6.7 \mu\text{M}$

3.2.3 ผลการศึกษาความสามารถต่ำสุดของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1102 ในการตรวจวัดไอออนทองแดง (detection limit)

การคำนวณค่าความสามารถต่ำสุดของการตรวจวัด (detection limit) ทำได้โดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้ที่ 575 nm (แกน Y) กับความเข้มข้นของไอออนทองแดงที่เติมลงไป (แกน X) จากนั้นนำค่าความชันของกราฟ (slope) ที่ได้มาคำนวณกับ 3 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เมื่อไม่มีการเติมไอออนใดๆ ตามสมการ (1)

$$\text{Blank} - 3\text{SD} = \text{slope} [\text{ions}] + C \quad (1)$$

เมื่อกำหนดให้

Blank คือ ค่าความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เมื่อไม่มีการเติมไอออน

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เมื่อไม่มีการเติมไอออน

slope คือ ค่าความชันของกราฟ

[ions] คือ ความเข้มข้นของไอออนต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้

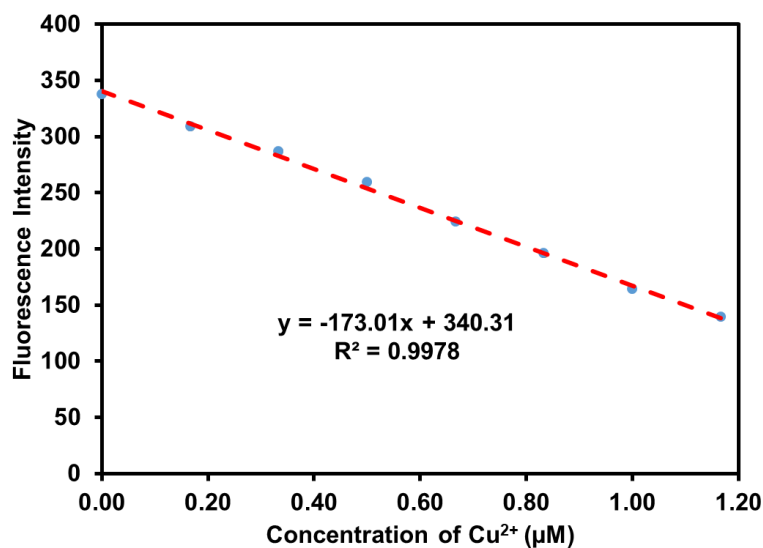
C คือ จุดตัดบนแกน y

จากภาพที่ 42 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ **N1102** ที่ความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{ex} = 525 \text{ nm}$ และ $\lambda_{em} = 575 \text{ nm}$) ในระบบตัวทำละลาย 5 mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4) ในสภาวะที่ไม่มีและมีไอออนทองแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้ผลดังตารางที่ 4

[Cu ²⁺], (μM)	ค่าความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์			ค่าเฉลี่ย	SD
0 (Blank)	337.18	337.78	337.57	337.51	0.30
0.17	308.75				
0.33	286.87				
0.50	259.2				
0.67	224.11				
0.83	195.82				
1.00	163.82				
1.17	139.04				

ตารางที่ 4 ค่าความเข้มข้นของไอออนทองแดงที่เติมลงไปในการละลาย (μM) และความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ **N1102** ที่วัดได้ที่ 575 nm

จากค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้ที่ 575 nm กับความเข้มข้นของไอออนทองแดงที่เติมลงไป สามารถสร้างกราฟความสัมพันธ์แสดงดังภาพที่ 43 โดยกำหนดแกน Y แทนความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้ที่ 575 nm ส่วนแกน X แทน ความเข้มข้นต่างๆ ของไอออนทองแดงที่เติมลงไป จากนั้นคำนวณค่าความสามารถต่ำสุดของการตรวจวัดได้ดังนี้



ภาพที่ 43 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไอออนทองแดงที่เติมลงไปกับความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1102

การคำนวณ

จากกราฟได้สมการเส้นตรงคือ $y = -173.01x + 340.31$; $R^2 = 0.9978$

	ค่าที่คำนวณได้		ค่าที่คำนวณได้
3SD	0.91	Blank-3SD	338.42
blank	337.51	(blank-3SD)-C	-1.89
C	340.31	((blank-3SD)-C)/m	0.01
slope	-173.01	X, ppb	0.69

จากการคำนวณค่าความสามารถต่ำสุดของการตรวจวัด (detection limit) ของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1102 ในการตรวจจับไอออนทองแดง มีค่าเท่ากับ 1.00×10^{-8} M หรือ 0.69 ppb

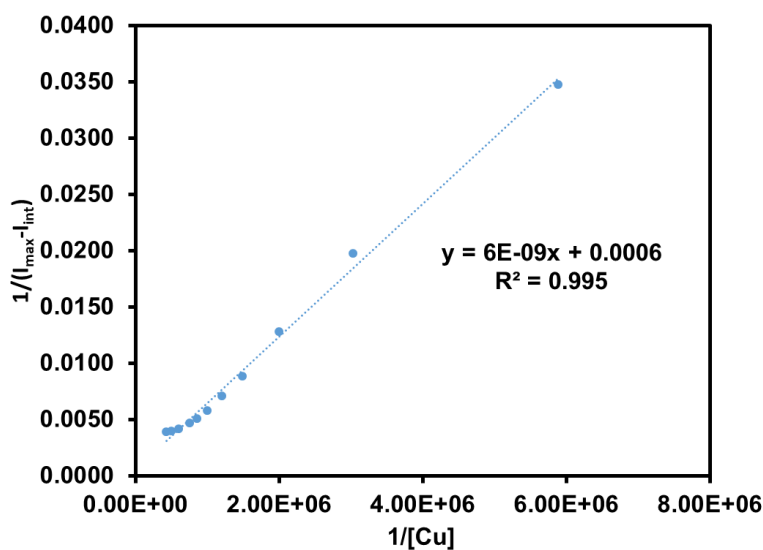
3.2.4 การคำนวณหาค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออนทองแดง (K_{assoc}) ของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1102

จากการวัดสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์เมื่อมีการเติมไอออนทองแดง ที่ความเข้มข้นของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ 575 นาโนเมตร ของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1102 ในระบบตัวทำละลาย 5 mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4) ได้ผลดังตารางที่ 5

$[\text{Cu}^{2+}]$, (μM)	Intensity, (a.u)	$1/[\text{Cu}^{2+}]$	$1/(I_{\text{max}}-I_{\text{int}})$
0.17	308.75	5.88E+06	0.0348
0.33	286.87	3.03E+06	0.0197
0.50	259.2	2.00E+06	0.0128
0.67	224.11	1.49E+06	0.0088
0.83	195.82	1.20E+06	0.0071
1.00	163.82	1.00E+06	0.0058
1.17	139.04	8.55E+05	0.0050
1.33	123.67	7.52E+05	0.0047
1.67	97.73	5.99E+05	0.0042
2.00	86.33	5.00E+05	0.0040
2.33	79.84	4.29E+05	0.0039

ตารางที่ 5 ข้อมูลการคำนวณหาค่าคงที่สมดุลโดยสมการ Benesi-Hildebrand ของเซ็นเซอร์ N1102

จากข้อมูลตามตารางที่ 5 นำมาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์หาค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออนทองแดงของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1102 ตามสมการ Benesi-Hildebrand ได้ดังภาพที่



ภาพที่ 44 กราฟแสดงความสัมพันธ์ตามสมการ Benesi-Hildebrand ของเซ็นเซอร์ N1102

จากสมการที่มีลักษณะความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง $y = 6 \times 10^{-9}x + 0.0006$; $R^2 = 0.995$

จะหาค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออนได้ เมื่อ

$$\text{slope} = \frac{1}{K(I(\text{Max}) - I(\text{int.}))}$$

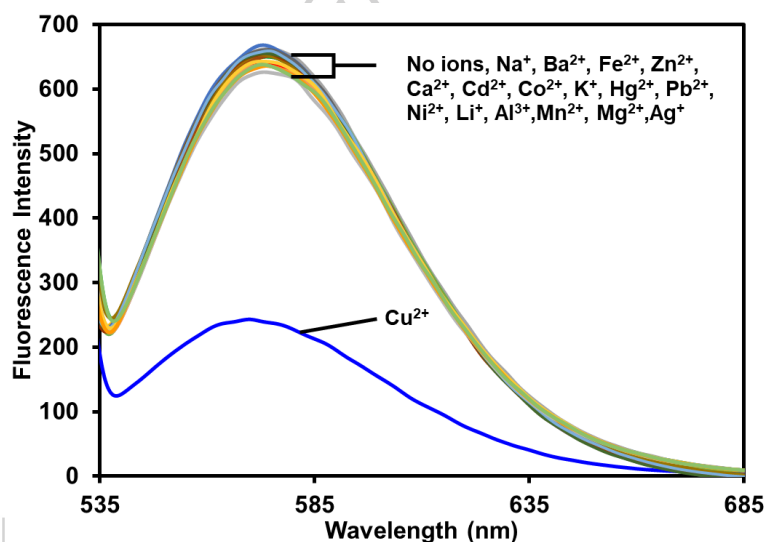
$$K = \frac{1}{\text{slope}(I(\text{Max}) - I(\text{int.}))}$$

จะได้ว่าค่าคงที่สมดุลของการเกิดไอออนเชิงซ้อนระหว่างฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1102 และไอออนทองแดงมีค่าเท่ากับ $6.47 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ และอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง N1102 และไอออนทองแดง เป็น 1:1

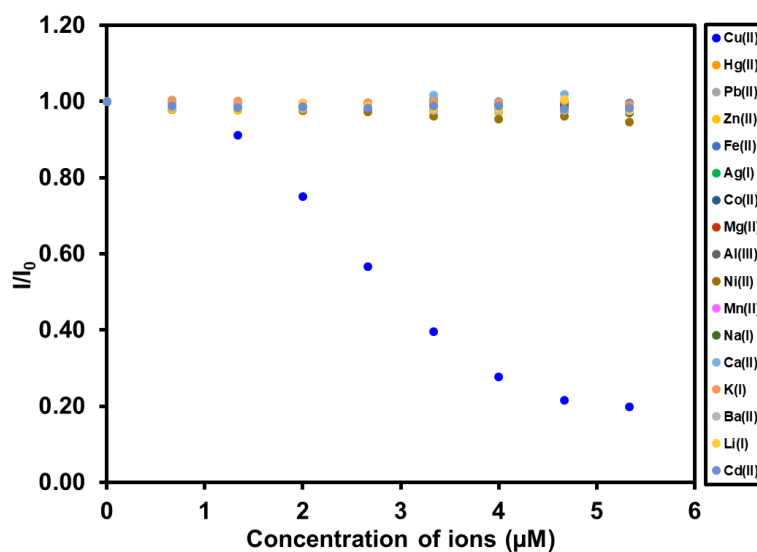
3.3 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (selectivity)

3.3.1 ผลการทดสอบความสามารถในการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของฟลูออเรสเซนต์ เซ็นเซอร์ N1102 ในสถานะที่มีไอออนทองแดงเทียบกับไอออนรบกวนอื่นๆ

การทดสอบการคายแสงของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1102 ในสารละลาย 5 mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4) ในสถานะที่มีไอออนทองแดง เปรียบเทียบกับในสถานะที่ไม่มีและมีไอออนอื่นๆ รบกวนในระบบ ได้แก่ ไอออนของโลหะอัลคาไลน์ ไอออนของโลหะอัลคาไลน์เอิร์ท และไอออนของโลหะทรานซิชัน แสดงผลดังในภาพที่ 45 และ ภาพที่ 46



ภาพที่ 45 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ N1102 (23.8 μM) ในสารละลาย 5mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4) ในสถานะที่มีไอออนต่างๆ ได้แก่ Cu^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Ag^+ , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , Ni^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Cd^{2+} , Al^{3+} และ Li^+ (3.33 μM)

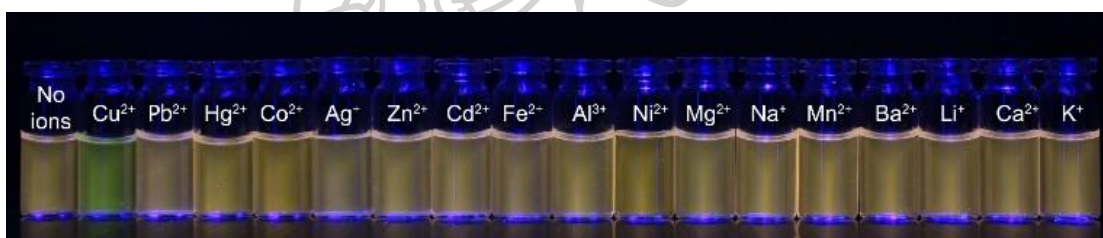


ภาพที่ 46 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{ex} = 525 \text{ nm}$ และ $\lambda_{em} = 575 \text{ nm}$) ของเซ็นเซอร์ N1102 (23.8 μM) ในสารละลาย 5mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4) ในสถานะที่มีไอออนโลหะของเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ ในปริมาณที่ต่างกัน

จากกราฟภาพที่ 46 แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างค่า normalized fluorescence intensity (แกน y) และความเข้มข้นของไอออนชนิดต่างๆ (แกน x) พบว่าเมื่อความเข้มข้นของไอออนทองแดงเพิ่มมากขึ้น ค่า normalized fluorescence intensity มีแนวโน้มลดลงอย่างชัดเจน ในขณะที่หลังเติมไอออนรบกวนอื่นๆ ได้แก่ ไอออนทองแดง (Cu^{2+}) ไอออนสังกะสี (Zn^{2+}) ไอออนตะกั่ว (Pb^{2+}) ไอออนโพแทสเซียม (K^+) ไอออนลิเทียม (Li^+) ไอออนแมกนีเซียม (Mg^{2+}) ไอออนแคลเซียม (Ca^{2+}) ไอออนโคบอลต์ (Co^{2+}) ไอออนโซเดียม (Na^+) ไอออนเหล็ก (Fe^{2+}) ไอออนนิกเกิล (Ni^{2+}) ไอออนอะลูมิเนียม (Al^{3+}) ไอออนแคดเมียม (Cd^{2+}) ไอออนแบเรียม (Ba^{2+}) ไอออนแมงกานีส (Mn^{2+}) ไอออนเงิน (Ag^+) และ ไอออนปรอท (Hg^{2+}) ในความเข้มข้นเดียวกันกับไอออนทองแดง ไม่แสดงการเปลี่ยนแปลงการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ จากผลการทดลองทั้งหมดนี้จึงสรุปได้ว่า ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1102 มีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนทองแดงสูงมาก

3.3.2 ผลการทดสอบความสามารถในการสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายภายใต้แสงธรรมชาติและการเรืองแสงของสารละลายภายใต้แสง UV ด้วยตาเปล่า

จากภาพถ่าย (ภาพที่ 47) แสดงให้เห็นว่าฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1102 มีความจำเพาะเจาะจงกับไอออนทองแดงเมื่อเทียบกับไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ โดยสามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงการคายแสงฟลูออเรสเซนต์และสีของสารละลายนี้ได้ด้วยตาเปล่า จะสังเกตเห็นการเรืองแสงของสารละลายเซ็นเซอร์ N1102 เปลี่ยนแปลงจากสารละลายสีเหลืองเป็นสีเขียวภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตเฉพาะขวด vial ที่มีไอออนทองแดง ในขณะที่เมื่อมีการเติมไอออนชนิดอื่นๆ ได้แก่ Hg^{2+} , Pb^{2+} , Ag^+ , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , Ni^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Cd^{2+} , Al^{3+} และ Li^+ ลงในสารละลาย การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ N1102 ไม่มีการเปลี่ยนแปลง อีกทั้งยังสามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายภายใต้แสงธรรมชาติได้โดยสีของสารละลายจากสีแดงอมชมพูจะจางลงเมื่อมีไอออนทองแดง (ภาพที่ 41) แสดงให้เห็นว่าสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ N1102 มีความจำเพาะสูงในการตรวจจับไอออนทองแดง



ภาพที่ 47 ภาพถ่ายการเปลี่ยนสีของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ N1102 ($23.8 \mu\text{M}$) ในภาวะที่ไม่มีและมียไอออนต่างๆ ได้แก่ Cu^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Ag^+ , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , Ni^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Cd^{2+} , Al^{3+} และ Li^+ ที่ความเข้มข้น $66.7 \mu\text{M}$

3.4 การทดสอบความสามารถในการตรวจจับไอออนทองแดงในภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ผสมอยู่ในระบบ (competitive) ของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1102

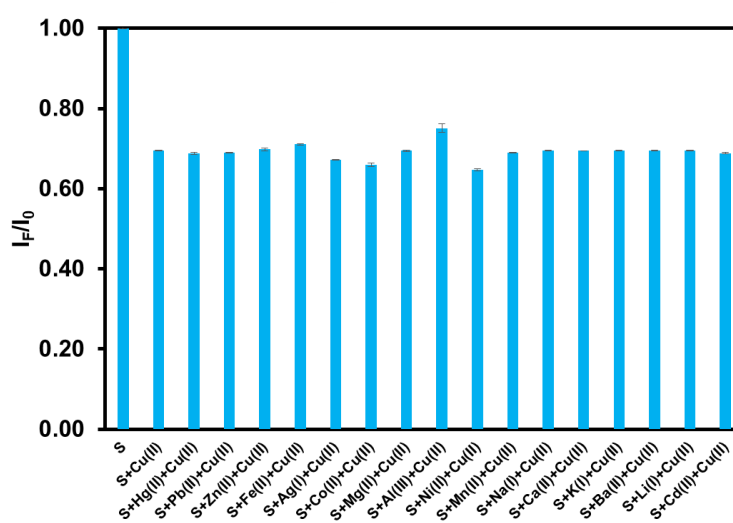
การทดสอบการคายแสงของเซ็นเซอร์ N1102 ในสารละลาย 5 mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4) ในสภาวะที่มีไอออนทองแดงผสมอยู่กับไอออนรบกวนอื่นๆ 20 เท่า แสดงดังภาพที่ 48

โดยจากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า I_F/I_0 (แกน y) และไอออนทองแดงผสมอยู่กับไอออนรบกวนอื่นๆ 20 เท่า ในสารละลายเซ็นเซอร์ **N1102** (แกน x)

เมื่อ I_0 = Fluorescence Intensity ของสารละลายเซ็นเซอร์ **N1102** ก่อนเติมไอออน

I_F = Fluorescence Intensity ของสารละลายเซ็นเซอร์ **N1102** หลังเติมไอออน

S = ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ **N1102**



ภาพที่ 48 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{ex} = 525 \text{ nm}$ และ $\lambda_{em} = 575 \text{ nm}$) ของเซ็นเซอร์ **N1102** ($23.8 \mu\text{M}$) ในสารละลาย 5mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4) ในสภาวะที่มีไอออนรบกวนเข้มข้น $33.3 \mu\text{M}$ เจือปนในสารละลายที่มีไอออนทองแดงเข้มข้น $1.70 \mu\text{M}$

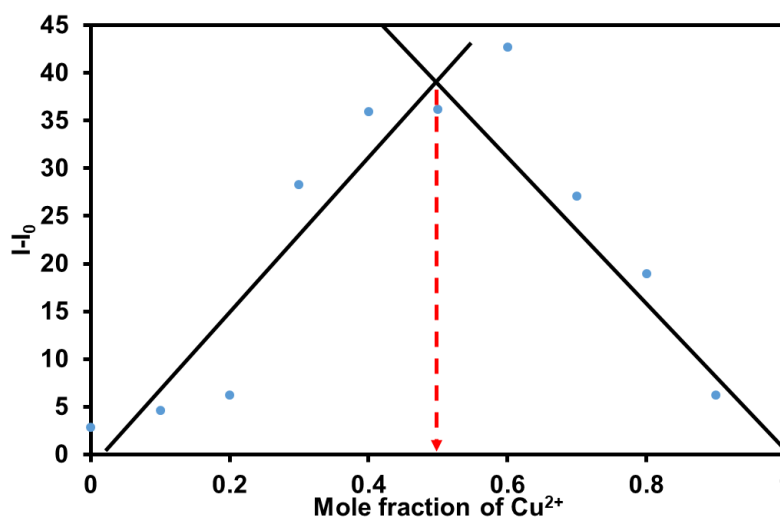
จากผลการทดลองพบว่า ในสภาวะที่มีไอออนรบกวนอื่นๆ อยู่ในระบบ ได้แก่ ไอออนสังกะสี (Zn^{2+}) ไอออนตะกั่ว (Pb^{2+}) ไอออนโพแทสเซียม (K^+) ไอออนลิเทียม (Li^+) ไอออนแมกนีเซียม (Mg^{2+}) ไอออนแคลเซียม (Ca^{2+}) ไอออนโคบอลต์ (Co^{2+}) ไอออนโซเดียม (Na^+) ไอออนเหล็ก (Fe^{2+}) ไอออนนิกเกิล (Ni^{2+}) ไอออนอะลูมิเนียม (Al^{3+}) ไอออนแคดเมียม (Cd^{2+}) ไอออนแบเรียม (Ba^{2+}) ไอออนแมงกานีส (Mn^{2+}) ไอออนเงิน (Ag^+) และ ไอออนปรอท (Hg^{2+}) เข้มข้น $33.3 \mu\text{M}$ (20 เท่าของความเข้มข้นไอออนทองแดง) ปนอยู่ในสารละลายเซ็นเซอร์ **N1102** ที่ประกอบด้วยไอออนทองแดงเข้มข้น $1.70 \mu\text{M}$ สัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้ มีค่าการเปลี่ยนแปลงที่น้อยมากหรือแทบจะไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อเทียบกับสัญญาณการคายแสงฟลูออ

เรสเซนต์ที่มีการเติมไอออนทองแดงเพียงชนิดเดียวดังแสดงในภาพที่ 48 จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าหากในระบบที่ตรวจวัดปริมาณไอออนทองแดงมีไอออนชนิดอื่นๆเจือปนอยู่ ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1102 จะยังมีความสามารถในการตรวจวิเคราะห์ไอออนทองแดงได้อย่างจำเพาะเจาะจงเหนือไอออนรบกวนอื่นๆ ที่มีอยู่ในระบบ ซึ่งจะไม่ส่งผลกระทบต่อกระบวนการเปลี่ยนแปลงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์

การศึกษาลักษณะการเกิดปฏิกิริยาระหว่างฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1102 และไอออนทองแดง

4.1 ผลการศึกษาอัตราส่วนการเกิดสารเชิงซ้อนระหว่างเซ็นเซอร์ N1102 และไอออนทองแดง ด้วยวิธีการของ Job

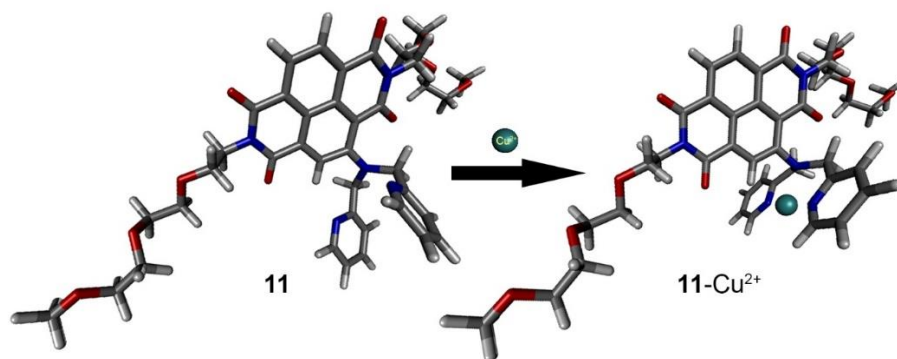
จากผล Job's plot ของเซ็นเซอร์ N1102 ดังภาพที่ 49 แสดงให้เห็นว่าเกิดแรงกระทำกันระหว่างเซ็นเซอร์กับไอออนทองแดง ในอัตราส่วน 1:1 หรือ $(N1102:Cu^{2+} = 1:1)$ ในสารละลาย 5 mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4) จากการคำนวณโดยใช้สมการ Benesi-Hildebrand เพื่อศึกษาค่าคงที่สมดุลของการจับกับระหว่างเซ็นเซอร์ N1102 และไอออนทองแดง (K_{assoc}) โดยการพล็อตกราฟการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร กับปริมาณความเข้มข้นของไอออนทองแดงที่เปลี่ยนแปลงไป พบว่า ในอัตราส่วน 1:1 ของ $N1102:Cu^{2+}$ มีค่าคงที่สมดุลของการจับเท่ากับ $6.47 \times 10^5 M^{-1}$ และมีความสามารถต่ำสุดในการตรวจวิเคราะห์ไอออนทองแดง เท่ากับ 0.7 ppb ซึ่งมีค่าต่ำกว่าค่ามาตรฐานของปริมาณไอออนทองแดงในน้ำดื่ม ซึ่งกำหนดโดย United State Environmental Protection Agency (U.S. EPA) และ World Health Organization (WHO) มีค่าเท่ากับ 1.3 และ 2.0 ppm



ภาพที่ 49 Job's plot ของเซ็นเซอร์ N1102 กับไอออนทองแดง

4.2 ผลการศึกษาตำแหน่งการเกิดปฏิกิริยาระหว่างฟลูออโรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1102 และ ไอออนทองแดงโดยการคำนวณทางคอมพิวเตอร์ด้วยวิธี DFT calculation

จากผลการศึกษาด้วยเทคนิค molecular modeling พบว่าในภาวะก่อนเติมไอออนทองแดง ลงไปในสารละลายเซ็นเซอร์ N1102 มีลักษณะโครงสร้างดังภาพที่ 50 (ทางซ้าย) เมื่อเติมไอออนทองแดงลงในสารละลาย ไอออนทองแดงจะไปโคออดิเนตกับอะตอมของไนโตรเจน (N) ของ di-2-picolylamine ด้วยกระบวนการ electrostatic interactions โดยไอออนทองแดงเกิดโคออร์ดิเนตกับ 3 อะตอมไนโตรเจน (N) ในระยะทางเท่ากับ 1.90 1.91 และ 2.08 Å ตามลำดับ ดังภาพที่ 50 (ทางขวา) ซึ่งพลังงานการจับกันระหว่างเซ็นเซอร์กับไอออนทองแดงมีค่าเท่ากับ -123.09 kcal/mol จากการศึกษาสามารถช่วยยืนยันว่าเซ็นเซอร์ N1102 สามารถดักจับไอออนทองแดงได้ในอัตราส่วน 1:1 ตรงตามผลการศึกษาด้วยเทคนิค Job's plot และในการคำนวณค่าคงที่สมดุลของการเกิดไอออนเชิงซ้อน (K_{assoc})

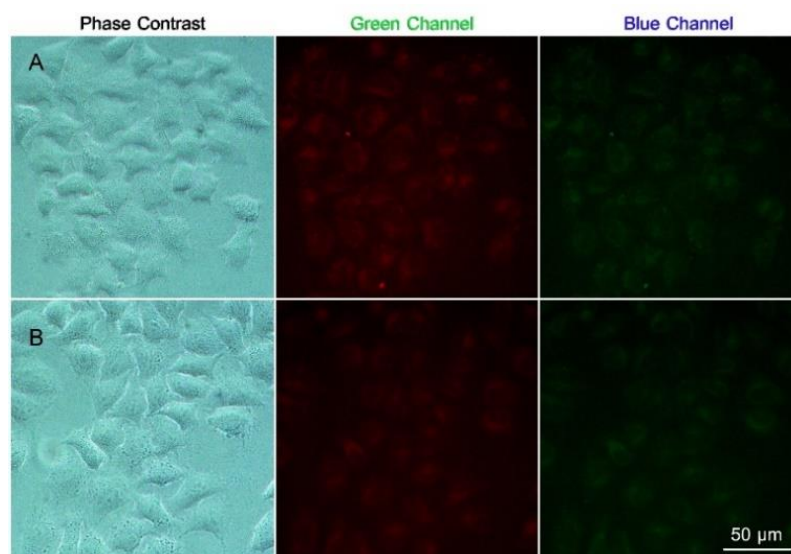


ภาพที่ 50 ลักษณะโครงสร้างของเซ็นเซอร์ N1102 ที่ได้จากเทคนิค molecular modeling ในสภาวะก่อนและหลังการดักจับไอออนทองแดง โดยใช้ B3LYP level using 6-311G**

การศึกษาการประยุกต์ใช้ฟลูออเรสเซนส์เซ็นเซอร์ N1102 สำหรับการตรวจวัดไอออนทองแดงในตัวอย่างจริง

5.1 ผลการศึกษาความสามารถการตรวจวัดไอออนทองแดงของฟลูออเรสเซนส์เซ็นเซอร์ N1102 ภายในเซลล์สิ่งมีชีวิต

จากความสามารถการคายแสงฟลูออเรสเซนส์ของเซ็นเซอร์ N1102 ที่มีความไวและความจำเพาะเจาะจงสูงต่อไอออนทองแดง จึงได้มีการนำเซ็นเซอร์ N1102 มาทดสอบในเซลล์ HepG2 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ (human liver cancer cell lines) โดยการบ่มเซลล์ HepG2 ด้วยสารละลายฟีนอลเรด (phenol red) ตามด้วยสารละลายไอออนทองแดงในรูปของเกลือคลอไรด์ (CuCl_2) เข้มข้น 100 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการบ่มกับสารละลายเซ็นเซอร์ N1102 เข้มข้น 200 μM ที่ละลายอยู่ใน 10%DMSO เพื่อติดตามสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนส์ของเซ็นเซอร์ ซึ่งได้ผลการทดลองแสดงดังใน**ภาพที่ 51**



ภาพที่ 51 ภาพถ่ายการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซลล์ HepG2 ในสภาวะที่มีและไม่มี การบ่มด้วย ไอออนทองแดงในรูปของเกลือคลอไรด์ในสารละลาย 10%DMSO ของเซ็นเซอร์ N1102

จากภาพถ่ายการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซลล์ HepG2 แสดงให้เห็นการดักจับไอออนทองแดงของเซ็นเซอร์ N1102 ภายในเซลล์ HepG2 พบว่าเซลล์ที่มีเพียงเซ็นเซอร์ N1102 (แถว A) จะมีการคายแสงสีแดงในช่อง green channel ($\lambda_{ex} = 490 \text{ nm}$) และมีการคายแสงสีเขียวในช่อง blue channel ($\lambda_{ex} = 545 \text{ nm}$) แสดงดัง**ภาพที่ 51** และเมื่อมีการบ่มด้วยไอออนทองแดงที่มีความเข้มข้น $200 \mu\text{M}$ จะส่งผลให้การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ลดลงดังแสดงใน**ภาพที่ 51** (แถว B) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซ็นเซอร์ N1102 นี้สามารถซึมผ่านเข้าไปในเซลล์และตรวจวัดไอออนทองแดงที่มีอยู่ภายในเซลล์ได้ จึงเป็นผลทำให้เห็นการเปลี่ยนแปลงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์

5.2 ผลการศึกษาความสามารถการตรวจวัดไอออนทองแดงในตัวอย่างจริง (น้ำดื่ม) ของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1102

จากการนำเซ็นเซอร์ N1102 มาละลายน้ำดื่ม แล้วทำการเติมไอออนทองแดงเพิ่มลงไปที่มีความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายดังกล่าว จะสังเกตเห็นการเปลี่ยนสีของสารละลายเซ็นเซอร์ N1102 ได้ด้วยตาเปล่า ดังแสดงใน**ภาพที่ 52** จากผลการทดสอบเมื่อมีการเติมไอออนทองแดงเพิ่มลงไป ในสารละลายเซ็นเซอร์ N1102 ที่ความเข้มข้นต่างๆ จะสังเกตเห็นการเรืองแสงของสารละลายเซ็นเซอร์เปลี่ยนแปลงจากสารละลายสีส้มกลายเป็นสีเหลืองอมเขียวภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ใน

ขณะเดียวกันจะสังเกตเห็นสีของสารละลายเซ็นเซอร์ค่อยๆจางลงจากสีแดงเป็นชมพูอ่อนภายใต้แสงไฟปกติ ในสภาวะที่ระบบตัวทำละลายเป็นน้ำดื่มทั้งหมด จากผลการทดลองจะเห็นว่าเซ็นเซอร์ N1102 สามารถนำมาใช้วิเคราะห์หาปริมาณไอออนทองแดงในตัวอย่างเป็นน้ำดื่มหรือตัวอย่างที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบหลักได้



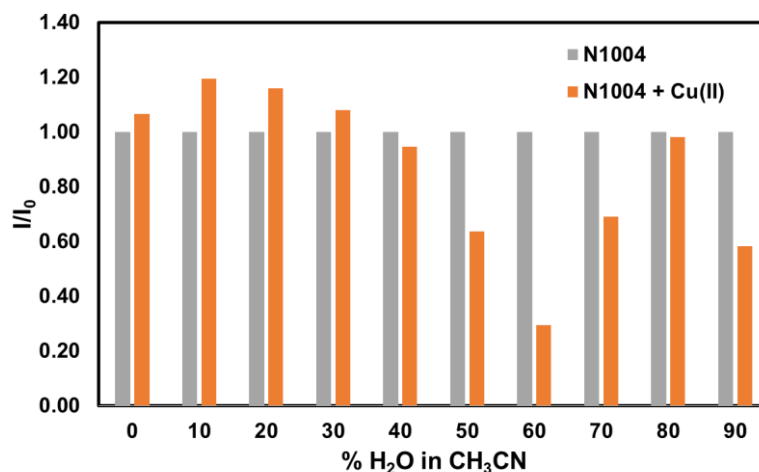
ภาพที่ 52 ภาพถ่ายการเปลี่ยนสีของสารละลายเซ็นเซอร์ N1102 ในภาวะที่มีไอออนทองแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตและแสงไฟปกติ

การทดสอบประสิทธิภาพของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1004 ในการตรวจจับไอออนทองแดง

6.1 การศึกษาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม

เนื่องจากวัตถุประสงค์ในการออกแบบเซ็นเซอร์ ก็เพื่อจะใช้ในการตรวจวัดหรือตรวจสอบไอออนโลหะในตัวอย่างเป็นสิ่งแวดล้อม ซึ่งระบบต่างๆ ในสิ่งแวดล้อมส่วนใหญ่จะมีน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก เนื่องจากฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1004 ไม่สามารถละลายในน้ำหรือสารละลายบัฟเฟอร์ได้ 100% เพื่อให้เซ็นเซอร์สามารถศึกษาเป็นตัวอย่างเป็นระบบสิ่งแวดล้อมได้ จึงได้มีการศึกษาสัดส่วนที่แตกต่างกันของน้ำในสารละลายอะซิโตนไนไตรล์ (Acetonitrile) ต่อการ

เปลี่ยนแปลงความเข้มของการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1004 ในภาวะที่มีไอออนทองแดง ดังภาพที่ 53



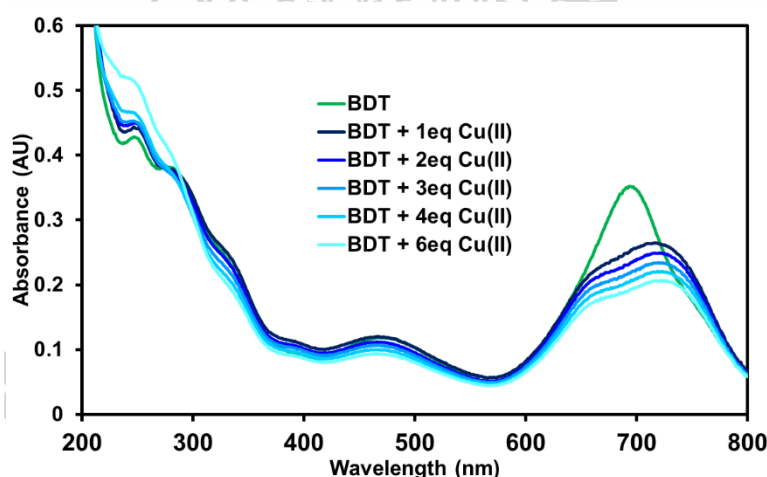
ภาพที่ 53 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{\text{ex}} = 670 \text{ nm}$ และ $\lambda_{\text{em}} = 725 \text{ nm}$) ของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1004 (22.0 μM) ในสารละลายผสมระหว่าง H₂O:CH₃CN ในอัตราส่วนต่างๆ

จากการศึกษาอัตราส่วนของน้ำใน acetonitrile พบว่าระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ไอออนทองแดง คือ 60% ของน้ำใน acetonitrile หรืออัตราส่วนระหว่างน้ำและ acetonitrile 6:4 มีการแสดงการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1004 ในภาวะที่มีไอออนทองแดงได้มากที่สุด ซึ่งเซ็นเซอร์ N1004 จะถูกนำมาศึกษาสมบัติการดูดกลืนแสงและการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในระบบตัวทำละลายผสมระหว่าง 5 mM Tris บัฟเฟอร์ และ acetonitrile ในอัตราส่วน 6:4 ที่ pH 7.4 ในสภาวะที่มีและไม่มีไอออนทองแดง เปรียบเทียบกับในสภาวะที่มีและไม่มีไอออนรบกวนอื่นๆ ซึ่งในขั้นของกระบวนการศึกษาความสามารถความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) และความจำเพาะเจาะจง (selectivity) ของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1004 ต่อไอออนทองแดง จะทำการเตรียมไอออนแต่ละชนิด ได้แก่ ไอออนของโลหะอัลคาไลน์ ไอออนของโลหะอัลคาไลน์เอิร์ท และไอออนของโลหะทรานซิชันรวมถึงไอออนทองแดงจากเกลือเปอร์คลอเรตละลายในน้ำที่ปราศจากไอออน (DI water) ทำการไตเตรตหรือเติมลงไปในระบบตัวทำละลายเซ็นเซอร์ N1004 สังเกตและบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงสัญญาณที่เกิดขึ้น

6.2 การทดสอบความไว (sensitivity)

6.2.1 ผลการทดสอบความสามารถในการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตของฟลูออเรสเซนต์ เซ็นเซอร์ N1004

จากการทดสอบสมบัติการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1004 ในระบบตัวทำละลาย 60% 5 mM Tris/acetonitrile (pH 7.2) ในสถานะที่ไม่มีและมีไอออนทองแดง ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1004 ในสถานะที่ไม่มีไอออนทองแดง มีการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่นสูงสุดที่ 690 นาโนเมตร แต่เมื่อฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1004 มีการตรวจจับไอออนทองแดง สัญญาณการดูดกลืนแสงจะลดลง โดยสเปกตรัมที่ได้จะเป็นช่วงกว้างและเป็นลักษณะ broad shoulder ในช่วงความยาวคลื่น 600-800 นาโนเมตร โดยที่ความยาวคลื่นที่ 670 และ 720 นาโนเมตร จะแสดงสัญญาณการดูดกลืนแสงแบบ ON-OFF คือสัญญาณการดูดกลืนแสงจะลดลงแปรผันตามความเข้มข้นของไอออนทองแดงที่เพิ่มขึ้น แสดงดังภาพที่ 54

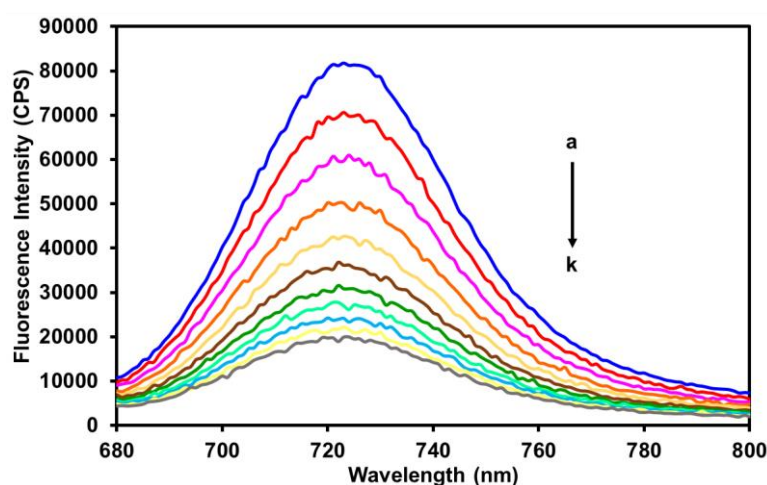


ภาพที่ 54 การดูดกลืนแสง UV-Vis ของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1004 (1.1×10^{-5} M) ในสารละลาย 60% 5 mM Tris/acetonitrile (pH 7.2) ก่อนและหลังเติมไอออนทองแดงที่ความเข้มข้น 1-6 equivalent ของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1004

6.2.2 ผลการทดสอบความสามารถในการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของฟลูออเรสเซนต์ เซ็นเซอร์ N1102 ในสถานะที่มีและไม่มีไอออนทองแดงในสารละลาย

จากการทดสอบสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1004 ในระบบตัวทำละลาย 60% 5 mM Tris/acetonitrile (pH 7.2) ในสถานะที่ไม่มีและมีไอออนทองแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ (ภาพที่ 55) พบว่าในสถานะที่ไม่มีไอออนทองแดง ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์

N1004 มีการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในช่วงความยาวคลื่น 680-800 nm โดยมีค่าความยาวคลื่นของการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงสุด (λ_{em}) เท่ากับ 725 nm เมื่อมีการเติมไอออนทองแดงเปอร์คลอเรตลงในสารละลายเซ็นเซอร์ พบว่าค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ **N1004** มีค่าลดลงที่ความยาวคลื่นเดิม ($\lambda_{em} = 575$ nm) ในลักษณะแปรผกผันกับปริมาณไอออนทองแดงที่เพิ่มขึ้น (ระบบ ON-OFF fluorescence signal)



ภาพที่ 55 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{ex} = 670$ nm และ $\lambda_{em} = 725$ nm) ของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ **N1004** ($0.93 \mu\text{M}$) ในสารละลาย 60% 5 mM Tris/acetonitrile (pH 7.2) ก่อนและหลังเติมไอออนทองแดงเปอร์คลอเรตที่ความเข้มข้นต่างๆ a: $0 \mu\text{M}$, b: $0.20 \mu\text{M}$, c: $0.40 \mu\text{M}$, d: $0.60 \mu\text{M}$, e: $0.80 \mu\text{M}$, f: $1.00 \mu\text{M}$, g: $1.20 \mu\text{M}$, h: $1.40 \mu\text{M}$, i: $1.60 \mu\text{M}$, j: $1.80 \mu\text{M}$, k: $2.00 \mu\text{M}$

6.2.3 ผลการศึกษาความสามารถต่ำสุดของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ **N1004** ในการตรวจวัดไอออนทองแดง (detection limit)

การคำนวณค่าความสามารถต่ำสุดของการตรวจวัด (detection limit) ทำได้โดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้ที่ 725 nm (แกน Y) กับความเข้มข้นของไอออนทองแดงที่เติมลงไป (แกน X) จากนั้นนำค่าความชันของกราฟ (slope) ที่ได้มาคำนวณกับ 3 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เมื่อไม่มีการเติมไอออนใดๆ ตามสมการ (1)

$$\text{Blank} - 3\text{SD} = \text{slope} [\text{ions}] + C \quad (1)$$

เมื่อกำหนดให้

Blank คือ ค่าความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เมื่อไม่มีการเติมไอออน

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เมื่อไม่มีการเติมไอออน

slope คือ ค่าความชันของกราฟ

[ions] คือ ความเข้มข้นของไอออนต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้

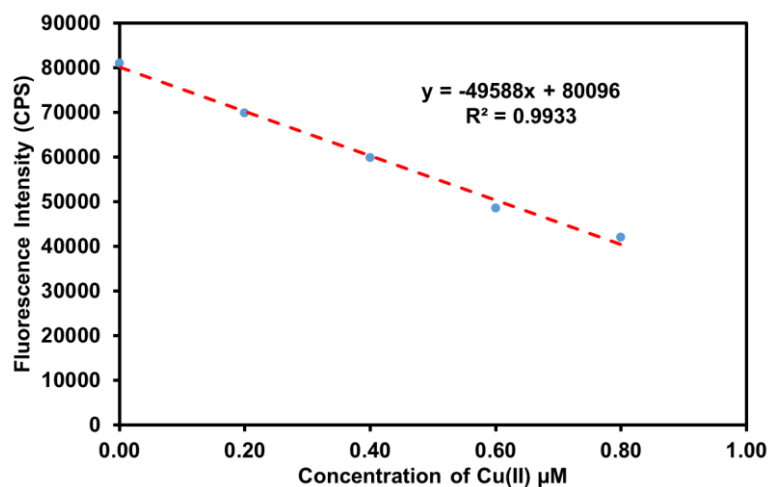
C คือ จุดตัดบนแกน y

จากภาพที่ 55 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1004 ที่ความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{ex} = 670 \text{ nm}$ และ $\lambda_{em} = 725 \text{ nm}$) ในระบบตัวทำละลาย 60% 5 mM Tris/acetonitrile (pH 7.2) ในสถานะที่ไม่มีและมีไอออนทองแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้ผลดังตารางที่ 6

[Cu ²⁺], (μM)	ค่าความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์			ค่าเฉลี่ย	SD
0 (Blank)	81650	81050	80285	80995	684.16
0.20	69825				
0.40	59865				
0.60	48600				
0.80	42020				

ตารางที่ 6 ค่าความเข้มข้นของไอออนทองแดงที่เติมลงไปในการละลาย (μM) และความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1004 ที่วัดได้ที่ 725 nm

จากค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้ที่ 725 nm กับความเข้มข้นของไอออนทองแดงที่เติมลงไป สามารถสร้างกราฟความสัมพันธ์แสดงดังภาพที่ 56 โดยกำหนดแกน Y แทนความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้ที่ 725 nm ส่วนแกน X แทน ความเข้มข้นต่างๆ ของไอออนทองแดงที่เติมลงไป จากนั้นคำนวณค่าความสามารถต่ำสุดของการตรวจวัดได้ดังนี้



ภาพที่ 56 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไอออนทองแดงที่เติมลงไปกับความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1004

การคำนวณ

จากกราฟได้สมการเส้นตรงคือ $y = -49588x + 80096$; $R^2 = 0.9933$

	ค่าที่คำนวณได้		ค่าที่คำนวณได้
3SD	2052.48	Blank+3SD	83047.48
blank	80995.00	(blank+3SD)-C	2951.48
C	80096.00	((blank+3SD)-C)/m	0.06
slope	49588.00	X, ppb	3.75

จากการคำนวณค่าความสามารถต่ำสุดของการตรวจวัด (detection limit) ของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1004 ในการตรวจจับไอออนทองแดง มีค่าเท่ากับ 6.00×10^{-8} M หรือ 3.75 ppb

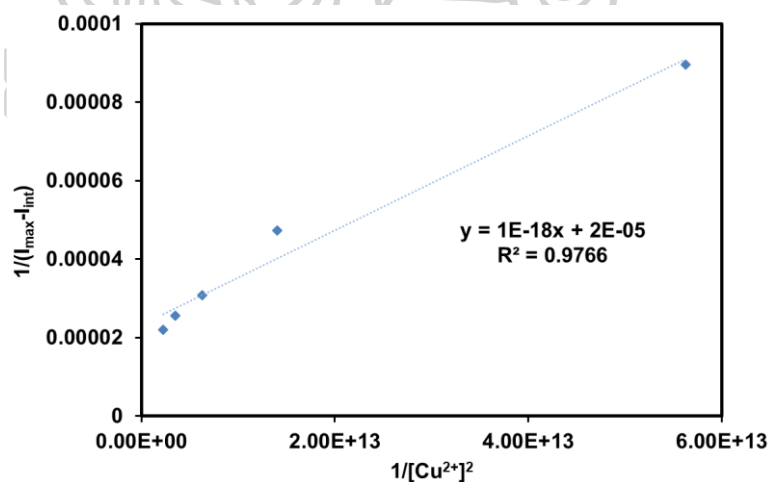
6.2.4 การคำนวณหาค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออนทองแดง (K_{assoc}) ของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1004

จากการวัดสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์เมื่อมีการเติมไอออนทองแดง ที่ความเข้มข้นของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ 725 นาโนเมตร ของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ **N1004** ในระบบตัวทำละลาย 60% 5 mM Tris/acetonitrile (pH 7.2) ได้ผลดัง**ตารางที่ 7**

[Cu ²⁺], (μM)	Intensity, (a.u)	1/[Cu ²⁺] ²	1/(I _{max} -I _{int})
0.13	69825	5.63E+13	8.95255E-05
0.27	59865	1.41E+13	4.73261E-05
0.40	48600	6.25E+12	3.0869E-05
0.53	42020	3.52E+12	2.56575E-05
0.67	35580	2.25E+12	2.20192E-05

ตารางที่ 7 ข้อมูลการคำนวณหาค่าคงที่สมดุลโดยสมการ Benesi-Hildebrand ของเซ็นเซอร์ **N1004**

จากข้อมูลตาม**ตารางที่ 7** นำมาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์หาค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออนทองแดงของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ **N1004** ตามสมการ Benesi-Hildebrand ได้ดัง**ภาพที่ 57**



ภาพที่ 57 กราฟแสดงความสัมพันธ์ตามสมการ Benesi-Hildebrand ของเซ็นเซอร์ **N1004**

จากสมการที่มีลักษณะความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง $y = (1 \times 10^{-18})x + (2 \times 10^{-5})$; $R^2 = 0.9766$

จะหาค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออนได้ เมื่อ

$$\text{slope} = \frac{1}{K(I(\text{Max}) - I(\text{int.}))}$$

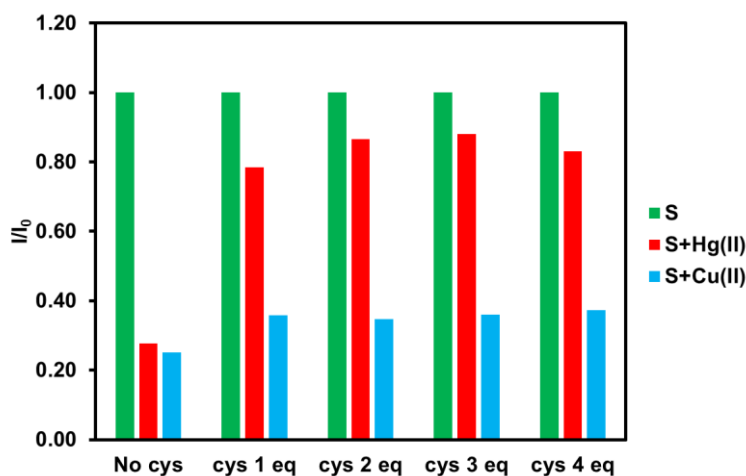
$$K = \frac{1}{\text{slope}(I(\text{Max}) - I(\text{int.}))}$$

จะได้ว่าค่าคงที่สมดุลของการเกิดไอออนเชิงซ้อนระหว่างฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ **N1004** และไอออนทองแดงมีค่าเท่ากับ $2.20 \times 10^{13} \text{ M}^{-2}$ และอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง **N1004** และไอออนทองแดง เป็น 2:1

6.3 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (selectivity)

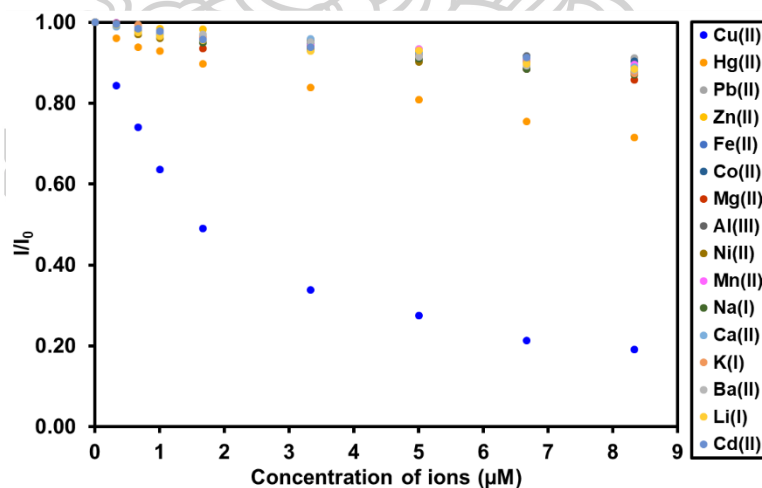
6.3.1 การศึกษาปริมาณ cysteine ในระบบสารละลายฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ **N1004** ต่อการตรวจวัดไอออนทองแดง

ในการทดสอบการคายแสงของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ **N1004** ในสารละลาย 60% 5 mM Tris/acetonitrile (pH 7.2) ในสภาวะที่มีไอออนของเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ พบว่าทั้งไอออนทองแดง (Cu^{2+}) และไอออนปรอท (Hg^{2+}) แสดงการลดลงของสัญญาณความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์ เนื่องจากทั้งสองมีคุณสมบัติที่คล้ายกัน คือมีความสมบัติเป็น soft acid ตามหลักการของ Hard and Soft Acids and Bases กับกรดอ่อน ดังนั้น อะตอมซัลเฟอร์ (S) ของ Thiourea ที่มีสมบัติความเป็น soft base จึงสามารถสร้างพันธะอ่อนๆ กับไอออนทองแดง (Cu^{2+}) และไอออนปรอท (Hg^{2+}) ได้ ในการศึกษาความจำเพาะเจาะจง จึงมีการเติม cysteine ลงไป เพื่อให้การทำงานของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ **N1004** มีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนทองแดงมากขึ้น โดยปริมาณ cysteine ที่เติมลงไป 1-4 equivalent ของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ จะทำให้ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ **N1004** สามารถตรวจวัดไอออนทองแดงได้อย่างจำเพาะเจาะจง ซึ่งสังเกตได้จากการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์ ดังภาพที่ 58 ที่จะมีสัญญาณการลดลงของความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์ในสภาวะที่มีแคไอออนทองแดง



ภาพที่ 58 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{ex} = 670$ nm และ $\lambda_{em} = 725$ nm) ของเซ็นเซอร์ N1004 ในสถานะที่มีการเติม cysteine 0-4 equivalent ในระบบ และในสถานะที่มีการเติมไอออนปรอท (สีแดง) และไอออนทองแดง ในระบบ N1004-cysteine

6.3.2 ผลการทดสอบความสามารถในการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1004 ในสถานะที่มีไอออนทองแดงเทียบกับไอออนรบกวนอื่นๆ

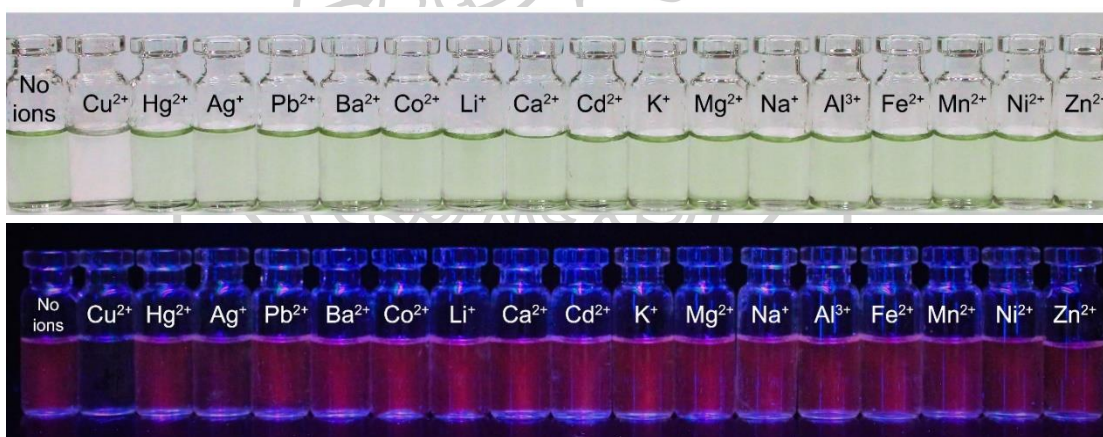


ภาพที่ 59 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{ex} = 670$ nm และ $\lambda_{em} = 725$ nm) ของเซ็นเซอร์ N1004-cysteine ($23.8 \mu\text{M} + 2$ equiv of cysteine) ในสารละลาย 60% 5 mM Tris/acetonitrile (pH 7.2) ในสถานะที่มีไอออนโลหะของเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ ในปริมาณที่ต่างกัน

เมื่อในระบบสารละลายของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1004 ผสมอยู่กับ cysteine พบว่า จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า normalized fluorescence intensity (แกน y) และความ

เข้มข้นของไอออนชนิดต่างๆ (แกน x) ดังแสดงใน**ภาพที่ 59** เฉพาะการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของไอออนทองแดงเท่านั้น ที่ส่งผลต่อค่า normalized fluorescence intensity ที่แสดงการลดลงอย่างชัดเจน ในขณะที่การเติมไอออนรบกวนอื่นๆ ได้แก่ ไอออนทองแดง (Cu^{2+}) ไอออนสังกะสี (Zn^{2+}) ไอออนตะกั่ว (Pb^{2+}) ไอออนโพแทสเซียม (K^+) ไอออนลิเทียม (Li^+) ไอออนแมกนีเซียม (Mg^{2+}) ไอออนแคลเซียม (Ca^{2+}) ไอออนโคบอลต์ (Co^{2+}) ไอออนโซเดียม (Na^+) ไอออนเหล็ก (Fe^{2+}) ไอออนนิกเกิล (Ni^{2+}) ไอออนอะลูมิเนียม (Al^{3+}) ไอออนแคดเมียม (Cd^{2+}) ไอออนแบเรียม (Ba^{2+}) ไอออนแมงกานีส (Mn^{2+}) และ ไอออนปรอท (Hg^{2+}) ในความเข้มข้นเดียวกันกับไอออนทองแดง ไม่แสดงการเปลี่ยนแปลงการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ จากผลการทดลองทั้งหมดนี้จึงสรุปได้ว่า ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ **N1004** มีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนทองแดงสูง และประสิทธิภาพจะยิ่งมากขึ้นเมื่อมีการเติม cysteine ลงไปในระบบ

6.3.3 ผลการทดสอบความสามารถในการสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายภายใต้แสงธรรมชาติและการเรืองแสงของสารละลายภายใต้แสง UV ด้วยตาเปล่า



ภาพที่ 60 ภาพถ่ายการเปลี่ยนสีของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ **N1004** ($17.64 \mu\text{M} + 2$ equiv of cysteine) ในภาวะที่ไม่มีและมีไอออนต่างๆ ได้แก่ Cu^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Ag^+ , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , Ni^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Cd^{2+} , Al^{3+} และ Li^+ ที่ความเข้มข้น $6.67 \mu\text{M}$

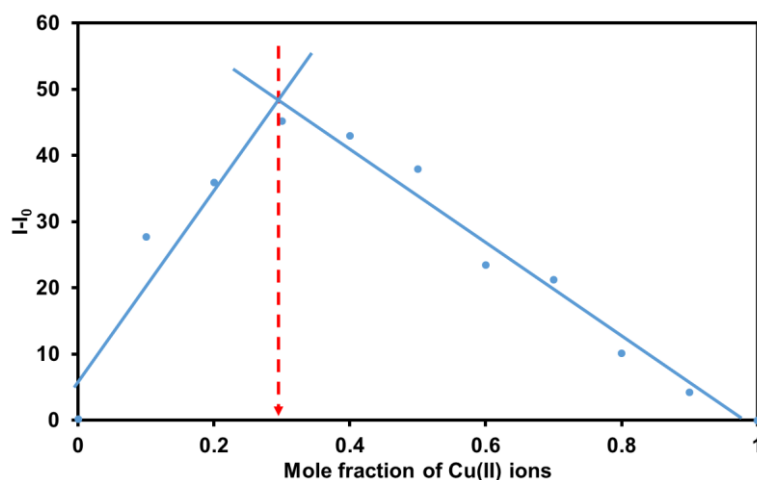
จากภาพถ่าย (**ภาพที่ 60**) แสดงให้เห็นว่าฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ **N1004** มีความจำเพาะเจาะจงกับไอออนทองแดงเมื่อเทียบกับไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ โดยสามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์และสีของสารละลายนี้ได้ด้วยตาเปล่า ภายใต้แสงธรรมชาติจะสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายจากสีเขียวกลายเป็นไม่มีสีเมื่อมีไอออนทองแดงดังแสดงใน**ภาพที่**

60 (ด้านบน) ในขณะที่ไอออนชนิดอื่นๆ ได้แก่ Hg^{2+} , Pb^{2+} , Ag^+ , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , Ni^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Cd^{2+} , Al^{3+} และ Li^+ ในสารละลายฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1004 ไม่มีการเปลี่ยนแปลง นอกจากนี้ยังสามารถสังเกตการเรืองแสงของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1004 ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตได้ด้วยตาเปล่าเช่นกัน ซึ่งสารละลายจะเรืองแสงเห็นเป็นสารละลายสีแดง แต่ในภาวะที่มีไอออนทองแดงจะไม่ปรากฏการเรืองแสง ในขณะที่เมื่อมีการเติมไอออนชนิดอื่นๆ ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ยังมีการเรืองแสงเห็นเป็นสารละลายสีแดงเช่นเดิมดังแสดงใน **ภาพที่ 60** (ด้านล่าง) จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1004 มีความจำเพาะเจาะจงสูงในการดักจับไอออนทองแดง

การศึกษาลักษณะการเกิดปฏิกิริยาระหว่างฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1004 และไอออนทองแดง

7.1 ผลการศึกษาอัตราส่วนการเกิดสารเชิงซ้อนระหว่างเซ็นเซอร์ N1004 และไอออนทองแดง ด้วยวิธีการของ Job

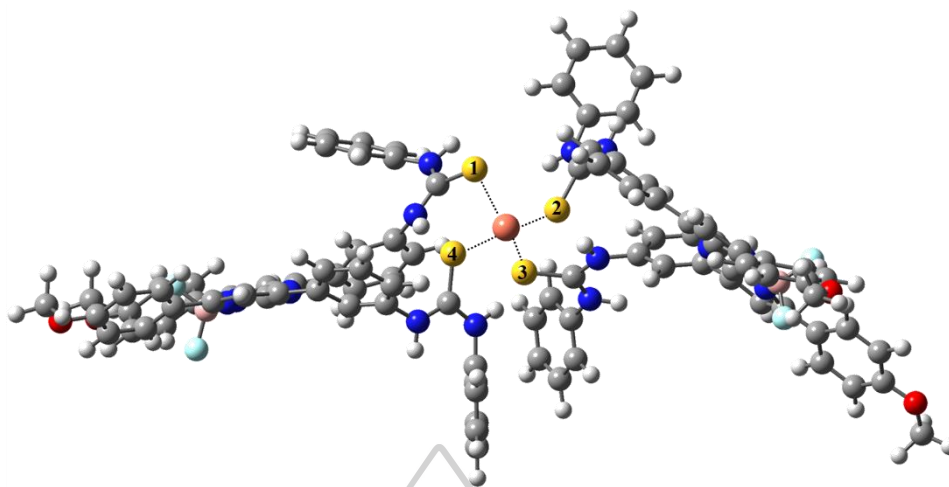
จากผล Job's plot ของเซ็นเซอร์ N1004 ดัง **ภาพที่ 61** แสดงให้เห็นว่าเกิดแรงกระทำกันระหว่างเซ็นเซอร์กับไอออนทองแดง ในอัตราส่วน 2:1 หรือ ($\text{N1004}:\text{Cu}^{2+} = 2:1$) ในสารละลาย 60% 5 mM Tris/acetonitrile (pH 7.2) จากการคำนวณโดยใช้สมการ Benesi-Hildebrand เพื่อศึกษา ค่าคงที่สมดุลของการจับกับระหว่างเซ็นเซอร์ N1004 และไอออนทองแดง (K_{assoc}) โดยการพล็อตกราฟการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร กับปริมาณความเข้มข้นของไอออนทองแดงที่เปลี่ยนแปลงไป พบว่า ในอัตราส่วน 2:1 ของ $\text{N1004}:\text{Cu}^{2+}$ มีค่าคงที่สมดุลของการจับเท่ากับ $2.20 \times 10^{13} \text{ M}^{-2}$ และมีความสามารถต่ำสุดในการตรวจวิเคราะห์ไอออนทองแดง เท่ากับ 3.75 ppb ซึ่งมีค่าต่ำกว่าค่ามาตรฐานของปริมาณไอออนทองแดงในน้ำดื่ม ซึ่งกำหนดโดย United State Environmental Protection Agency (U.S. EPA) และ World Health Organization (WHO) มีค่าเท่ากับ 1.3 และ 2.0 ppm



ภาพที่ 61 Job's plot ของเซ็นเซอร์ N1004 กับไอออนทองแดง

7.2 ผลการศึกษาตำแหน่งการเกิดปฏิกิริยาระหว่างฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ N1102 และ ไอออนทองแดงโดยการคำนวณทางคอมพิวเตอร์ด้วยวิธี DFT calculation

จากผลการศึกษาด้วยเทคนิค molecular modeling พบว่าไอออนทองแดงเกิดการโคออดิเนตกับอะตอมซัลเฟอร์ (S) ทั้ง 4 อะตอม ดังแสดงในภาพที่ 62 ซึ่งจากที่คาดการณ์ไว้ไอออนทองแดง จะเกิดการโคออดิเนตกับอะตอมซัลเฟอร์ ของหมู่ Thiourea ที่มีอยู่ 2 ตำแหน่งในโมเลกุลของ เซ็นเซอร์ N1004 ดังนั้นการโคออดิเนตระหว่างไอออนทองแดงกับ 2 โมเลกุลเซ็นเซอร์ N1004 จะทำให้เกิด electrostatic interactions ในรูปร่าง square planar ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ค่อนข้างเสถียร โดยไอออนทองแดงเกิดโคออร์ดิเนตกับ 4 อะตอมซัลเฟอร์ ในระยะทางเท่ากับ 2.46, 2.41, 2.43 และ 2.44 Å. ตามลำดับ ซึ่งพลังงานการจับกันระหว่างเซ็นเซอร์กับไอออนทองแดงมีค่าเท่ากับ -480.3130467 kcal/mol หรือ -20.83 eV

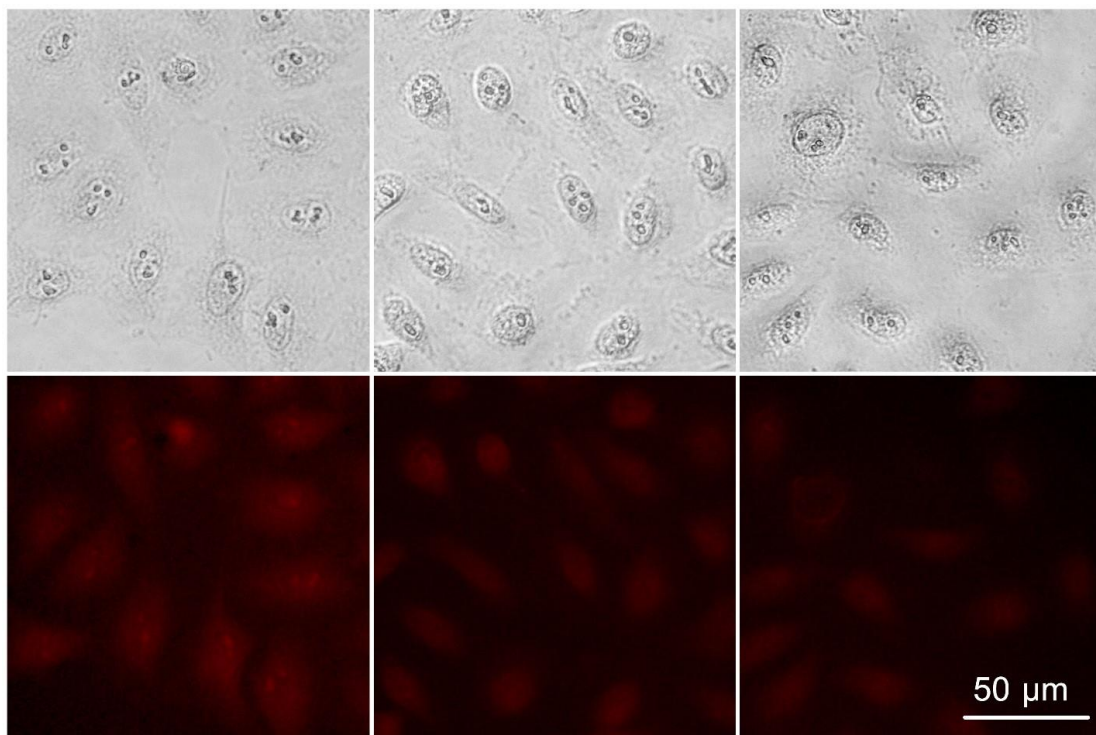


ภาพที่ 62 ลักษณะโครงสร้างของเซ็นเซอร์ **N1004** ที่ได้จากเทคนิค molecular modeling ในสภาวะก่อนและหลังการดักจับไอออนทองแดง โดยใช้ B3LYP/LANL2DZ

การศึกษาการประยุกต์ใช้ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ **N1004** สำหรับการตรวจวัดไอออนทองแดงในตัวอย่างจริง

8.1 ผลการศึกษาความสามารถการตรวจวัดไอออนทองแดงของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ **N1002** ภายในเซลล์สิ่งมีชีวิต

จากความสามารถการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ **N1004** ที่มีความไวและความจำเพาะเจาะจงสูงต่อไอออนทองแดง จึงได้มีการนำเซ็นเซอร์ **N1004** มาทดสอบในเซลล์ HepG2 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งระดับของมนุษย์ (human liver cancer cell lines) โดยการบ่มเซลล์ด้วยสารละลาย Cu(OAc)_2 เข้มข้น 50 และ 100 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาทำการล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS บัฟเฟอร์ ตามด้วยตรึงใน 70% เอทานอล เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย **N1004** ที่ความเข้มข้น 50 μM เข้าไปในเซลล์ HepG2 เพื่อติดตามสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ ซึ่งได้ผลการทดลองแสดงดังใน**ภาพที่ 63**



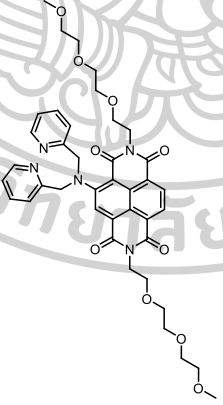
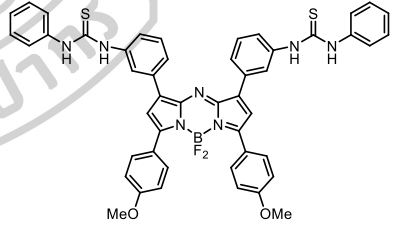
ภาพที่ 63 ภาพถ่ายการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซลล์ HepG2 ในสภาวะที่มีและไม่มีการบ่มด้วย ไอออนทองแดงในรูปของเกลืออะซิเตรตและซีเอ็นเซอร์ N1004

จากภาพถ่ายการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซลล์ HepG2 แสดงให้เห็นการดักจับไอออนทองแดงของเซ็นเซอร์ N1004 ภายในเซลล์ HepG2 พบว่าในภาวะที่เซลล์ HepG2 ไม่ถูกบ่มด้วย $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ สามารถสังเกตเห็นการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของ N1004 เป็นสีแดงอย่างชัดเจน แสดงดัง**ภาพที่ 63** คอลัมน์ A แต่เมื่อเซลล์ HepG2 ถูกบ่มด้วย $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 μM จะสังเกตเห็นการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ลดลง ตามที่แสดงในคอลัมน์ B และ C ของ**ภาพที่ 63** ที่เป็นเช่นนี้แสดงว่าฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ N1004 เกิดการจับกับ Cu^{2+} เป็นการยืนยันว่า N1004 สามารถซึมผ่านเข้าไปในเซลล์และตรวจวัดไอออนทองแดงที่มีอยู่ภายในเซลล์ได้

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

วิทยานิพนธ์นี้ประสบความสำเร็จในการสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ชนิดใหม่ 2 ชนิด จากอนุพันธ์สารเรืองแสง 2 กลุ่ม คือ แนฟทาลีนไดอิมิด (Naphthalene Diimide) และเอซาโบดีปี (Aza-BODIPY) ซึ่งทำหน้าที่เป็นฟลูออโรฟอร์ ได้แก่ **N1102** และ **N1004** ตามลำดับ ในส่วนของไอโอโนฟอร์ถูกออกแบบให้มีความไวและความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนทองแดง โดยฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ **N1102** จะมีส่วนของ Dipicolylamine ที่จำเพาะเจาะจงต่อไอออนทองแดง ในขณะที่ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ **N1004** จะมีส่วนของ Thiourea ที่สามารถสร้างพันธะอ่อนๆ กับไอออนทองแดง โดยองค์ประกอบของไอโอโนฟอร์ของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ทั้ง 2 ชนิด ที่ประกอบไปด้วยอะตอมของไนโตรเจนและซัลเฟอร์ ถูกออกแบบภายใต้หลักการ Hard and Soft Acids and Bases ซึ่งจากผลการทดสอบทั้งหมดของ **N1102** และ **N1004** ที่ได้กล่าวมาข้างต้น สามารถสรุปประสิทธิภาพการทำงานของแต่ละเซ็นเซอร์ได้ดังตารางที่ 8

เซ็นเซอร์	N1102	N1004
โครงสร้าง		
ชนิดของไอออนที่ตรวจวัด	Cu^{2+}	Cu^{2+}
Detection limit	0.69 ppb	3.75 ppb
สภาวะที่ทำงาน	100% PBS buffer	60% Tris buffer/acetonitrile

ตารางที่ 8 ประสิทธิภาพการทำงานของเซ็นเซอร์ **N1102** และ **N1004**

จากตารางที่ 8 จะเห็นว่าฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1102 และ N1004 ที่สังเคราะห์ได้สามารถตรวจจับไอออนทองแดงได้ในสารละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก และมีค่าความสามารถต่ำสุดของการตรวจวัดไอออนทองแดง (detection limit) ที่ต่ำกว่าค่ามาตรฐานของปริมาณไอออนทองแดงในน้ำดื่ม ซึ่งกำหนดโดย United State Environmental Protection Agency (U.S. EPA) และ World Health Organization (WHO) มีค่าเท่ากับ 1.3 และ 2.0 ppm โดยการทำงานของเซ็นเซอร์ทั้ง 2 ชนิด เมื่อมีการจับกับไอออนทองแดงจะแสดงการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ในลักษณะ ON-OFF และสามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายได้ด้วยตาเปล่าเมื่อมีการจับกับไอออนทองแดงภายใต้แสงธรรมชาติและแสง UV ได้อย่างชัดเจน ซึ่งรายละเอียดผลการทดสอบอื่นๆ ของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ N1102 และ N1004 แสดงดังตารางที่ 9

เซ็นเซอร์	N1102	N1004
λ_{ex} (nm)	525	670
λ_{em} (nm)	575	725
Ratio [sensor:Cu ²⁺]	1:1	2:1
สีของสารละลายเมื่อตรวจวัดไอออนทองแดง (แสง UV)	สีแดงอมชมพู ⇌ ชมพูจาง	สีเขียว ⇌ ไม่มีสี
สีของสารละลายเมื่อตรวจวัดไอออนทองแดง (แสงธรรมชาติ)	สีส้มอมเหลือง ⇌ สีเขียว	สีแดง ⇌ ไม่มีสี
จุดเด่น	ตรวจวัดได้ในน้ำ 100%	ตรวจวัดในช่วง Near-IR
	DL ต่ำกว่าค่ามาตรฐาน U.S. EPA และ WHO	
	ตรวจวัดได้ในตัวอย่างจริง	

ตารางที่ 9 สรุปผลการทดลองของเซ็นเซอร์ N1102 และ N1004

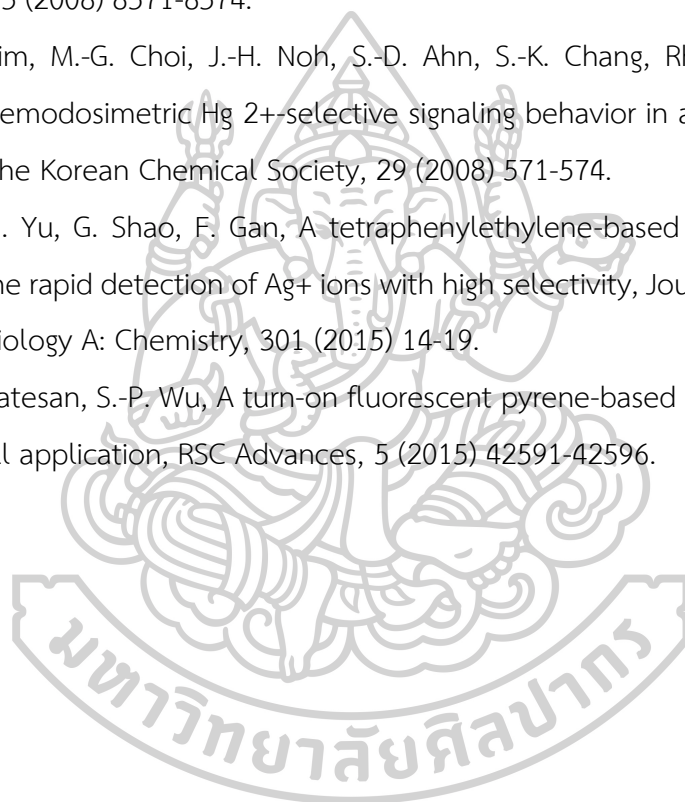
รายการอ้างอิง

- [1] C.N. Hancock, L.H. Stockwin, B. Han, R.D. Divilbiss, J.H. Jun, S.V. Malhotra, M.G. Hollingshead, D.L. Newton, A copper chelate of thiosemicarbazone NSC 689534 induces oxidative/ER stress and inhibits tumor growth in vitro and in vivo, *Free Radical Biology and Medicine*, 50 (2011) 110-121.
- [2] N.E. Le Brun, Copper in prokaryotes, *Nanoscope Materials: Size-Dependent Phenomena and Growth Principles*, (2014) 461.
- [3] Z. Zhao, Z. Zhou, L. Li, X. Xian, X. Ke, M. Chen, Y. Zhang, A copper-responsive gene cluster is required for copper homeostasis and contributes to oxidative resistance in *Deinococcus radiodurans* R1, *Molecular BioSystems*, 10 (2014) 2607-2616.
- [4] E. Gaggelli, H. Kozłowski, D. Valensin, G. Valensin, Copper homeostasis and neurodegenerative disorders (Alzheimer's, prion, and Parkinson's diseases and amyotrophic lateral sclerosis), *Chemical reviews*, 106 (2006) 1995-2044.
- [5] A. Ahuja, K. Dev, R.S. Tanwar, K.K. Selwal, P.K. Tyagi, Copper mediated neurological disorder: Visions into amyotrophic lateral sclerosis, Alzheimer and Menkes disease, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 29 (2015) 11-23.
- [6] H. Kozłowski, M. Luczkowski, M. Remelli, D. Valensin, Copper, zinc and iron in neurodegenerative diseases (Alzheimer's, Parkinson's and prion diseases), *Coordination Chemistry Reviews*, 256 (2012) 2129-2141.
- [7] R. Squitti, I. Simonelli, E. Cassetta, D. Lupoi, M. Rongioletti, M. Ventriglia, M. Siotto, Patients with Increased Non-Ceruloplasmin Copper Appear a Distinct Sub-Group of Alzheimer's Disease: A Neuroimaging Study, *Current Alzheimer Research*, 14 (2017) 1318-1326.
- [8] S.G. Kaler, ATP7A-related copper transport diseases—emerging concepts and future trends, *Nature reviews Neurology*, 7 (2011) 15.
- [9] P. Dusek, P.M. Roos, T. Litwin, S.A. Schneider, T.P. Flaten, J. Aaseth, The neurotoxicity of iron, copper and manganese in Parkinson's and Wilson's diseases, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 31 (2015) 193-203.

- [10] M. Kumar, A. Puri, A review of permissible limits of drinking water, *Indian journal of occupational and environmental medicine*, 16 (2012) 40.
- [11] J.W. Steed, J.L. Atwood, *Supramolecular chemistry*, John Wiley & Sons, 2013.
- [12] T.-L. Ho, *Hard and soft acids and bases principle in organic chemistry*, Elsevier, 2012.
- [13] S. Basak, N. Nandi, K. Bhattacharyya, A. Datta, A. Banerjee, Fluorescence from an H-aggregated naphthalenediimide based peptide: photophysical and computational investigation of this rare phenomenon, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17 (2015) 30398-30403.
- [14] H.F. Higginbotham, S. Maniam, S.J. Langford, T.D. Bell, New brightly coloured, water soluble, core-substituted naphthalene diimides for biophysical applications, *Dyes and Pigments*, 112 (2015) 290-297.
- [15] S.V. Bhosale, S.V. Bhosale, S.K. Bhargava, Recent progress of core-substituted naphthalenediimides: highlights from 2010, *Organic & biomolecular chemistry*, 10 (2012) 6455-6468.
- [16] A. Fin, I. Petkova, D.A. Doval, N. Sakai, E. Vauthey, S. Matile, Naphthalene-and perylenediimides with hydroquinones, catechols, boronic esters and imines in the core, *Organic & biomolecular chemistry*, 9 (2011) 8246-8252.
- [17] N. Sakai, J. Mareda, E. Vauthey, S. Matile, Core-substituted naphthalenediimides, *Chemical Communications*, 46 (2010) 4225-4237.
- [18] X. Lu, W. Zhu, Y. Xie, X. Li, Y. Gao, F. Li, H. Tian, Near-IR Core-Substituted Naphthalenediimide Fluorescent Chemosensors for Zinc Ions: Ligand Effects on PET and ICT Channels, *Chemistry–A European Journal*, 16 (2010) 8355-8364.
- [19] H.F. Higginbotham, R.P. Cox, S. Sandanayake, B.A. Graystone, S.J. Langford, T.D. Bell, A fluorescent “2 in 1” proton sensor and polarity probe based on core substituted naphthalene diimide, *Chemical Communications*, 49 (2013) 5061-5063.
- [20] S.R. Bobe, R.S. Bhosale, S.P. Goskulwad, A.L. Puyad, S.V. Bhosale, S.V. Bhosale, A highly selective colorimetric Cys sensor based on core-substituted naphthalene diimides, *RSC Advances*, 5 (2015) 100697-100701.

- [21] W. Hughes, A. Rananaware, D.D. La, L.A. Jones, S. Bhargava, S.V. Bhosale, Aza-crown ether-core substituted naphthalene diimide fluorescence “turn-on” probe for selective detection of Ca²⁺, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 244 (2017) 854-860.
- [22] E.M. Al-Imarah, P.J. Derrick, A. Partridge, New wavelength-tunable aza-dipyromethene dyes with intense near-infrared absorption and emission, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 337 (2017) 82-90.
- [23] J.K. Karlsson, A. Harriman, Origin of the Red-Shifted Optical Spectra Recorded for Aza-BODIPY Dyes, *J Phys Chem A*, 120 (2016) 2537-2546.
- [24] A. Kamkaew, S. Thavornpradit, T. Puangsamlee, D. Xin, N. Wanichacheva, K. Burgess, Oligoethylene glycol-substituted aza-BODIPY dyes as red emitting ER-probes, *Organic & biomolecular chemistry*, 13 (2015) 8271-8276.
- [25] A. Kamkaew, F. Li, Z. Li, K. Burgess, An agent for optical imaging of TrkC-expressing, breast cancer, *MedChemComm*, 8 (2017) 1946-1952.
- [26] X.-X. Zhang, Z. Wang, X. Yue, Y. Ma, D.O. Kiesewetter, X. Chen, pH-sensitive fluorescent dyes: are they really pH-sensitive in cells?, *Molecular pharmaceutics*, 10 (2013) 1910-1917.
- [27] S. Liu, Z. Shi, W. Xu, H. Yang, N. Xi, X. Liu, Q. Zhao, W. Huang, A class of wavelength-tunable near-infrared aza-BODIPY dyes and their application for sensing mercury ion, *Dyes and Pigments*, 103 (2014) 145-153.
- [28] Y. Liu, J. Zhu, Y. Xu, Y. Qin, D. Jiang, Boronic acid functionalized aza-Bodipy (azaBDPBA) based fluorescence optodes for the analysis of glucose in whole blood, *ACS applied materials & interfaces*, 7 (2015) 11141-11145.
- [29] F. Wu, H. Liu, C. Zhong, L. Zhu, Revealing a nucleophilic addition reaction between aza-BODIPY and cyanide anion, *Tetrahedron Letters*, 57 (2016) 5120-5123.
- [30] Y. Suseela, M. Sasikumar, T. Govindaraju, An effective and regioselective bromination of 1, 4, 5, 8-naphthalenetetracarboxylic dianhydride using tribromoisocyanuric acid, *Tetrahedron Letters*, 54 (2013) 6314-6318.
- [31] J. Clerc, B. Schellenberg, M. Groll, A.S. Bachmann, R. Huber, R. Dudler, M. Kaiser, Convergent synthesis and biological evaluation of syringolin A and derivatives as eukaryotic 20S proteasome inhibitors, *European Journal of Organic Chemistry*, 2010 (2010) 3991-4003.

- [32] A. Kamkaew, K. Burgess, Aza-BODIPY dyes with enhanced hydrophilicity, *Chemical Communications*, 51 (2015) 10664-10667.
- [33] H.A. Benesi, J. Hildebrand, A spectrophotometric investigation of the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons, *Journal of the American Chemical Society*, 71 (1949) 2703-2707.
- [34] Y. Shiraishi, S. Sumiya, Y. Kohno, T. Hirai, A rhodamine- cyclen conjugate as a highly sensitive and selective fluorescent chemosensor for Hg (II), *The Journal of organic chemistry*, 73 (2008) 8571-8574.
- [35] K.-N. Kim, M.-G. Choi, J.-H. Noh, S.-D. Ahn, S.-K. Chang, Rhodamine B hydrazide revisited: chemodosimetric Hg²⁺-selective signaling behavior in aqueous environments, *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 29 (2008) 571-574.
- [36] Y. Li, H. Yu, G. Shao, F. Gan, A tetraphenylethylene-based “turn on” fluorescent sensor for the rapid detection of Ag⁺ ions with high selectivity, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 301 (2015) 14-19.
- [37] P. Venkatesan, S.-P. Wu, A turn-on fluorescent pyrene-based chemosensor for Cu (II) with live cell application, *RSC Advances*, 5 (2015) 42591-42596.





ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ภณิดา พรายแก้ว
วัน เดือน ปี เกิด	21 กันยายน 2533
สถานที่เกิด	ราชบุรี
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2555 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเอกเคมี เกียรตินิยมอันดับ 2 มหาวิทยาลัยศิลปากร พ.ศ. 2558 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเอกเคมีอินทรีย์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ที่อยู่ปัจจุบัน	1/5 ม.1 ต.ท่ามะขาม อ.เมือง จ.กาญจนบุรี 71000
ผลงานตีพิมพ์	Praikaew, P.; Maniam, S.; Charoenpanich, A.; Sirirak, J.; Promarak, V.; Langford, S. J.; Wanichacheva, N. (2019). "Water-soluble Cu ²⁺ -fluorescent sensor based on core-substituted naphthalene diimide and its application in drinking water analysis and live cell imaging." <i>Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry</i> . Vol. 382: 111852.

