การสังเคราะห์เซ็นเซอร์โดยใช้อนุพันธ์ของโรดามีนสำหรับการตรวจจับไอออนปรอทที่เห็นการเปลี่ยนสีได้ด้วยตาเปล่า

โดย

นางสาวภณิดา พรายแก้ว

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีอินทรีย์

ภาควิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การสังเคราะห์เซ็นเซอร์โดยใช้อนุพันธ์ของโรดามีนสำหรับการตรวจจับไอออนปรอทที่เห็นการเปลี่ยนสีได้ด้วยตาเปล่า

โดย

นางสาวภณิดา พรายแก้ว

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีอินทรีย์

ภาควิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

NAKED-EYES COLORIMETRIC SENSOR UTILIZING RHODAMINE DERIVATIVES FOR DETERMINATION OF MERCURY (II) IONS.

By

Miss Panida Praikaew

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

Master of Science Program in Organic Chemistry

Department of Chemistry

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2015

Copyright of Graduate School, Silpakorn University

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร อนุมัติให้วิทยานิพนธ์เรื่อง “การสังเคราะห์เซ็นเซอร์โดยใช้อนุพันธ์ของโรดามีนสำหรับการตรวจจับไอออนปรอทที่เห็นการเปลี่ยนสีได้ด้วยตาเปล่า” เสนอโดย นางสาวภณิดา พรายแก้ว เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีอินทรีย์

……..
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปานใจ ธารทัศนวงศ์)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
วันที่.....เดือน..... พ.ศ. .....

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทนิตย์ วานิชาชีวะ

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พัลลภ กันธิยงค์)
...../...../.....

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย เอื้อวิทยาศุภร)
...../...../.....

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทนิตย์ วานิชาชีวะ)
...../...../.....

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.พัฒนาวิศว์ สว่างลาภ)
...../...../.....

56302204 : สาขาวิชาเคมีอินทรีย์

คำสำคัญ : โรดามีน/ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์/ไอโอโนฟอร์/ฟลูออโรฟอร์/การตรวจวัดไอออนปรอท/การเปลี่ยนแปลงของสีได้ด้วยตาเปล่า

ภณิดา พรายแก้ว: การสังเคราะห์เซ็นเซอร์โดยใช้อนุพันธ์ของโรดามีนสำหรับการตรวจจับไอออนปรอทที่เห็นการเปลี่ยนสีได้ด้วยตาเปล่า. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ผศ.ดร. นันทนิตย์ วานิชาชีวะ. 134 หน้า.

ในงานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ชนิดใหม่ 3 ชนิด (**monoRh6G**, **diRh6G** และ **RhB-Silica**) เพื่อใช้ในการตรวจจับไอออนปรอท โดยใช้อนุพันธ์ของโรดามีน ซึ่งทำการศึกษาคุณสมบัติทางแสงด้วยวิธีทางฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปีและอุลตร้าไวโอเลตสเปคโทรสโกปี โดยเซ็นเซอร์ดังกล่าวจะแสดงสัญญาณการคายแสดงฟลูออเรสเซนซ์ในลักษณะ “ปิด-เปิด” สวิตซ์ ในภาวะที่มีไอออนปรอท และมีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อไอออนปรอทเมื่อเทียบกับไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ได้แก่ Ag^{+}, Cu^{2+}, Ba^{2+}, Li^{+}, Pb^{2+}, Ca^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+}, Na^{+}, Ni^{2+}, K^{+} and Zn^{2+} และที่สำคัญคือ สามารถสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงสีของเซ็นเซอร์ได้ด้วยตาเปล่าจากไม่มีสีเป็นสีชมพูในภาวะที่มีไอออนปรอท โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซ็นเซอร์ **RhB-Silica** ที่ถูกพัฒนาเพื่อนำไปใช้งานในภาคสนามสำหรับตรวจวัดไอออนปรอท ซึ่งประกอบไปด้วย rhodamine B hydrazide ที่ต่อลงบนพื้นผิวของซิลิกาเจล โดยการพัฒนานี้ก็เพื่อที่จะให้สะดวกต่อการพกพาและนำไปใช้งานในการตรวจวัดปริมาณปรอทขั้นเบื่องต้นในตัวอย่างที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบหลักในสิ่งแวดล้อมได้

ภาควิชาเคมี บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ลายมือชื่อนักศึกษา..... ปีการศึกษา 2558

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

56302204 : MAJOR: ORGANIC CHEMISTRY
KEY WORD : RHODAMINE/ FLUORESCENCE SENSOR/ IONOPHORE/
FLUOROPHORE/ MERCURY DETECTION/ NAKED EYES

PANIDA PRAIKAEW: NAKED-EYES COLORIMETRIC SENSOR UTILIZING RHODAMINE DERIVATIVES FOR DETERMINATION OF MERCURY (II) IONS: ASSIST. PROF. NANTANIT WANICHACHEVA, Ph.D. 134 pp.

Fluorescence and colorimetric sensors based on rhodamine (**monoRh6G, diRh6G** and **RhB-Silica**) had been successfully synthesized for detection of Hg^{2+} and their sensing behaviors toward metal ions were investigated by fluorescence spectroscopy and UV/Vis spectroscopy. The sensors exhibited a selective OFF-ON fluorescence enhancement sensing toward Hg^{2+} and provided high selectivity to Hg^{2+} in the presence of other metal ions, such as Ag^{+}, Cu^{2+}, Ba^{2+}, Li^{+}, Pb^{2+}, Ca^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+}, Na^{+}, Ni^{2+}, K^{+} and Zn^{2+}. Importantly, the color of the sensors changed from colorless to pink in the presence of Hg^{2+}, which was noticeable for naked eye detection. Especially, **RhB-Silica** was developed for an on-site preliminary screening of Hg^{2+} which consisted of rhodamine B hydrazide attached to silica gel as a solid support. The developed sensors are practical for easily handle and screening of Hg^{2+} in aqueous samples in the environments.

Department of Chemistry Graduate School, Silpakorn University
Student's signature..... Academic Year 2015
Thesis Advisor's signature.....
Thesis Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทนิตย์ วานิชาชีวะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ เป็นอย่างสูง สำหรับความกรุณาที่มีให้ ทั้งการให้คำปรึกษา คำแนะนำ ความรู้ รวมไปถึงความช่วยเหลืออันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการทำวิทยานิพนธ์ซึ่งทำให้งานนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น และการวางแผนการเรียนในขั้นสูงขึ้นต่อไป ตลอดจนกำลังใจ โอกาสและประสบการณ์ดีๆ ที่มอบให้ดิฉันตลอดมา

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พัลลภ คันธิยงค์ ประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย เอื้อวิทยาศุภร อาจารย์กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่างๆ อันเป็นประโยชน์ต่อวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณอาจารย์ อ. ดร. พัฒนาวิศว์ สว่างลาภ ที่ให้ความรู้ คำปรึกษาและคำแนะนำต่างๆ ต่อการทำงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณพ่อ คุณแม่ และน้องสาว ที่เป็นกำลังใจ ให้ความรักความอบอุ่นและให้การสนับสนุนในทุกๆเรื่อง ตลอดจนคำปรึกษาที่ดี ในด้านต่างๆ มาโดยตลอด

ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร สำหรับความรู้และประสบการณ์ที่ดี ในขณะที่ดิฉันได้ศึกษาอยู่ ณ สถาบันการศึกษาแห่งนี้

ขอขอบคุณอาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่าน ที่กรุณาประสิทธิ์ประสาทความรู้ต่างๆ ทั้งความรู้ในด้านวิชาการและด้านการดำเนินชีวิต

ขอขอบคุณพี่ น้อง และเพื่อนในกลุ่มทำงานทุกคน สำหรับคำปรึกษาในการแก้ปัญหาทางด้านต่างๆ และไมตรีจิตอันดีที่มอบให้แก่กันมาโดยตลอด

สุดท้ายขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาเคมีทุกท่าน ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการดำเนินงานเอกสาร อีกทั้งขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเคมีทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือด้านอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำวิทยานิพนธ์ ด้วยความเอื้อเฟื้อตลอดมา

ประโยชน์อันใดที่เกิดจากการทำวิทยานิพนธ์นี้ ย่อมเป็นผลมาจากความกรุณาของทุกท่านดังกล่าว ดิฉันรู้สึกซาบซึ้งและระลึกถึงความกรุณาเป็นอย่างยิ่ง จึงใคร่ขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญตาราง..... ช

สารบัญภาพ..... ฌ

รายชื่ออักษรย่อ..... ฒ

บทที่

1 บทนำ..... 1

2 ทบทวนวรรณกรรม..... 10

3 อุปกรณ์และสารเคมี..... 21

4 วิธีการทดลอง..... 25

5 ผลการดำเนินงานวิจัย..... 40

6 สรุปผลการทดลอง..... 94

รายการอ้างอิง..... 96

ภาคผนวก..... 101

ประวัติผู้วิจัย..... 117

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณปรอทสูงสุดที่สามารถปนเปื้อนในแหล่งธรรมชาติตามมาตรฐานการควบคุมมลพิษของสถาบันนานาชาติ.....	2
2	ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ สำหรับการทดสอบความไวของเซ็นเซอร์ monoRh6G และ diRh6G.....	33
3	การหาอัตราส่วนการเกิดสารเชิงซ้อนของเซ็นเซอร์.....	36
4	แสดงค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ได้จากผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DSC.....	60
5	ความถี่ของการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของหมู่ฟังก์ชันต่างๆ.....	63
6	ข้อมูลค่าความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมลงในสารละลายเซ็นเซอร์ monoRh6G กับ intensity ของเซ็นเซอร์ monoRh6G (λ_{ex} = 529 nm และ λ_{em} = 545 nm).....	73
7	ข้อมูลค่าความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมลงในสารละลายเซ็นเซอร์ diRh6G กับ intensity ของเซ็นเซอร์ diRh6G (λ_{ex} = 529 nm และ λ_{em} = 545 nm).....	74
8	ข้อมูลค่าความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมลงในเซ็นเซอร์ RhB-Silica กับความเข้มสี	90
9	สรุปผลการทดลองของเซ็นเซอร์ monoRh6G และ diRh6G.....	94

มหาวิทยาลัยศิลปากร

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไอโอโนฟอร์และไอออน.....	5
2	ลักษณะการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ ก่อนไอโอโนฟอร์ตรวจจับไอออนโลหะ (ซ้าย) และภายหลังตรวจจับไอออนโลหะ (ขวา)	6
3	กระบวนการปิด (OFF state) และเปิดวง spirolactam (ON state)	7
4	โครงสร้างสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์สำหรับวิทยานิพนธ์นี้.....	8
5	วิธีการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ thiosemicarbazides และผลการทดลองบางส่วนในภาวะที่มีไอออนต่างๆ.....	10
6	วิธีการสังเคราะห์เซ็นเซอร์จาก rhodamine 6G เชื่อมต่อกับ carbohydrazone.....	11
7	วิธีการสังเคราะห์เซ็นเซอร์ **Rh6G-py** และการดูดกลืนแสงของเซ็นเซอร์ในสารละลาย acetonitrile หลังเติมไอออนปรอทที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	12
8	วิธีการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ rhodamine–nitrobenzoxadiazole และผลการทดลองบางส่วนในภาวะที่มีไอออนปรอทที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	13
9	โครงสร้างของ SERS เซ็นเซอร์.....	13
10	โครงสร้างของ rhodamine B hydrazide และการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของเซ็นเซอร์ในภาวะที่มีไอออนโลหะชนิดต่างๆ.....	14
11	วิธีการสังเคราะห์เซ็นเซอร์ **RhB-NS$_2$** และการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของเซ็นเซอร์ ก่อนและหลังเติมไอออนปรอท.....	14
12	วิธีการสังเคราะห์เซ็นเซอร์ของ rhodamine B-cysteamine hydrochloride และผลการทดลองบางส่วนในภาวะที่มีไอออนต่างๆ.....	15
13	วิธีการสังเคราะห์เซ็นเซอร์ของอนุพันธ์ *S*,*S*'-diallyl carbohydrazonodithioate.....	15
14	วิธีการสังเคราะห์และโครงสร้างของเซ็นเซอร์ **I** และ **II**.....	16
15	วิธีการสังเคราะห์และโครงสร้างของเซ็นเซอร์ **RhB-thio** และ **RhB-bis**.....	17
16	แสดงการปรับปรุงพื้นผิวของ silica particles สำหรับดักจับไอออนปรอท.....	18
17	แสดงการปรับปรุงพื้นผิวของ silica particles สำหรับดักจับกับไอออนปรอท โดยใช้ rhodamine-6G hydrazine.....	19

ภาพที่ หน้า

18 แสดงการปรับปรุงพื้นผิวของ silica nanoshere สำหรับดักจับกับไอออนปรอท โดยใช้เซ็นเซอร์ **Rh6G-CHO** 19

19 โครงสร้างฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ชนิดใหม่ทั้ง 2 กลุ่ม 25

20 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์ 2-(3-(2-aminoethylthio)propylthio)ethanamine (**I-1**). 26

21 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์ **monoRh6G** และ **diRh6G** 27

22 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์ rhodamine B hydrazide **(RhB-1)** 28

23 สมการแสดงการปรับปรุงพื้นผิวของซิลิกาเจลให้เป็น **S-1** 29

24 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์เซ็นเซอร์ **RhB-Silica** 30

25 โครงสร้างทางเคมีของ 2-(3-(2-aminoethylthio)propylthio)ethanamine (**I-1**) 40

26 ^{1}H NMR สเปกตรัมของ 2-(3-(2-aminoethylthio)propylthio)ethanamine (**I-1**) 41

27 ^{13}C NMR สเปกตรัมของ 2-(3-(2-aminoethylthio)propylthio)ethanamine (**I-1**) 42

28 HR-ESI MS สเปกตรัมของ 2-(3-(2-aminoethylthio)propylthio)ethanamine (**I-1**) 42

29 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของสารประกอบ 2-(3-(2-aminoethylthio)propylthio) ethanamine (**I-1**) 43

30 โครงสร้างทางเคมีของเซ็นเซอร์ **monoRh6G** 43

31 ^{1}H NMR สเปกตรัมของเซ็นเซอร์ **monoRh6G** 44

32 ^{13}C NMR สเปกตรัมของเซ็นเซอร์ **monoRh6G** 44

33 ^{13}C DEPT 135 NMR สเปกตรัมของเซ็นเซอร์ **monoRh6G** 45

34 HR-ESI MS สเปกตรัมของเซ็นเซอร์ **monoRh6G** 45

35 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของสารประกอบเซ็นเซอร์ **monoRh6G** 46

36 โครงสร้างทางเคมีของเซ็นเซอร์ **diRh6G** 47

37 ^{1}H NMR สเปกตรัมของเซ็นเซอร์ **diRh6G** 48

38 ^{13}C DEPT135 NMR สเปกตรัมและ ^{13}C NMR สเปกตรัมของเซ็นเซอร์ **diRh6G** 48

39 HR-ESI MS สเปกตรัมของเซ็นเซอร์ **diRh6G** 49

40 โครงสร้างทางเคมีของโรดามีนบีไฮดราไซด์ (**RhB-1**) 49

41 ^{1}H NMR สเปกตรัมของโรดามีนบีไฮดราไซด์ (**RhB-1**) 50

ภาพที่		หน้า
42	^{13}C NMR สเปกตรัมของโรดามีนบีไฮดราไซด์ (**RhB-1**).....	50
43	^{13}C DEPT 135 NMR สเปกตรัมของโรดามีนบีไฮดราไซด์ (**RhB-1**).....	51
44	HR-ESI MS สเปกตรัมของโรดามีนบีไฮดราไซด์ (**RhB-1**).....	51
45	กลไกการเกิดปฏิกิริยาของสารประกอบโรดามีนบีไฮดราไซด์ (**RhB-1**).....	52
46	โครงสร้างทางเคมีของแต่ละขั้นตอนในการปรับปรุงพื้นผิวของซิลิกาเจล.....	53
47	แสดงโครงสร้างสัณฐานวิทยาของซิลิกา **S-OH**, ซิลิกา **S-1** และ เซ็นเซอร์ **RhB-Silica** ที่กำลังขยาย a) 100 เท่า, b) 500 เท่า, และ c) 2000 เท่า (ซิลิกาเจลตั้งต้น 63-200 μm)	53
48	แสดงโครงสร้างสัณฐานวิทยาของซิลิกา **S-OH** และ เซ็นเซอร์ **RhB-Silica** ที่กำลังขยาย a) 100 เท่า และ b) 500 เท่า (ซิลิกาเจลตั้งต้น 40-63 μm).....	54
49	กราฟแสดงผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DTG ของซิลิกา **S-OH** ที่ผ่านการทำความสะอาดด้วยสารละลายปิรันยา.....	55
50	กราฟแสดงผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DTG ของซิลิกา **S-1** ที่ผ่านการที่ผ่านการต่อกับ (3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilane (**GPTs**).....	56
51	กราฟแสดงผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DTG ของเซ็นเซอร์ **RhB-Silica** ที่ผ่านการที่ผ่านการต่อกับ Rhodamine B hydrazide.....	57
52	กราฟแสดงผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DSC ของซิลิกา **S-OH** ที่ผ่านการทำความสะอาดด้วยสารละลายปิรันยา.....	58
53	กราฟแสดงผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DSC ของซิลิกา **S-1** ที่ผ่านการที่ผ่านการต่อกับ (3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilane (**GPTs**).....	59
54	กราฟแสดงผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DSC ของเซ็นเซอร์ **RhB-Silica** ที่ผ่านการที่ผ่านการต่อกับ Rhodamine B hydrazide.....	59
55	IR สเปกตรัมของซิลิกา **S-OH**, ซิลิกา **S-1** และ เซ็นเซอร์ **RhB-Silica**.....	61
56	สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์เซ็นเซอร์ **RhB-Silica**.....	62
57	การดูดกลืนแสงของเซ็นเซอร์ **monoRh6G** (3.4×10^{-4} M) ในสารละลาย acetonitrile ก่อนและหลังเติมไอออนปรอทเปอร์คลอเรตที่ความเข้มข้นต่างๆ (a) 0 μM, (b) 20.8 μM, (c) 27.7 μM, (d) 41.6 μM, (e) 55.5 μM, (f) 69.3 μM.....	64

ภาพที่ หน้า

58 การดูดกลืนแสงของเซ็นเซอร์ **diRh6G** (1.2×10^{-4} M) ในสารละลาย acetonitrile ก่อนและหลังเติมไอออนปรอทเปอร์คลอเรตที่ความเข้มข้นต่างๆ (a) 0 μM, (b) 13.9 μM, (c) 20.8 μM, (d) 27.7 μM, (e) 41.6 μM, (f) 55.5 μM, (g) 69.3 μM, (h) 76.3 μM 65

59 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (λ_{ex} = 529 nm และ λ_{em} = 545 nm) ของเซ็นเซอร์ **monoRh6G** (3.4×10^{-6} M) ในสารละลาย acetonitrile ก่อนและหลังเติมไอออนปรอทเปอร์คลอเรตที่ความเข้มข้นต่างๆ (a) 0 μM, (b) 0.6 μM, (c) 1.1 μM, (d) 1.9 μM, (e) 2.7 μM, (f) 3.5 μM, (g) 4.3 μM, (h) 5.1 μM, (i) 5.9 μM, (j) 6.8 μM.... 66

60 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (λ_{ex} = 529 nm และ λ_{em} = 545 nm) ของเซ็นเซอร์ **diRh6G** (1.2×10^{-6} M) ในสารละลาย acetonitrile ก่อนและหลังเติมไอออนปรอทเปอร์คลอเรตที่ความเข้มข้นต่างๆ (a) 0 μM, (b) 0.9 μM, (c) 20.9 μM, (d) 30.0 μM, (e) 33.9 μM, (f) 36.6 μM, (g) 39.2 μM, (h) 40.5 μM..... 67

61 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (λ_{ex} = 529 nm และ λ_{em} = 545 nm) ของเซ็นเซอร์ **monoRh6G** (3.4×10^{-6} M) ในสารละลาย acetonitrile ในภาวะที่มีไอออนโลหะของเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ ในปริมาณที่ต่างกัน..... 68

62 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (λ_{ex} = 529 nm และ λ_{em} = 545 nm) ของเซ็นเซอร์ **diRh6G** (1.2×10^{-6} M) ในสารละลาย acetonitrile ในภาวะที่มีไอออนโลหะของเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ ในปริมาณที่ต่างกัน..... 69

63 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (λ_{ex} = 529 nm และ λ_{em} = 545 nm) ของเซ็นเซอร์ **monoRh6G** (3.4×10^{-6} M) ในสารละลาย acetonitrile ในภาวะที่มีไอออนโลหะของเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ เข้มข้น 6.8 μM..... 69

64 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (λ_{ex} = 529 nm และ λ_{em} = 545 nm) ของเซ็นเซอร์ **diRh6G** (1.2×10^{-6} M) ในสารละลาย acetonitrile ในภาวะที่มีไอออนโลหะของเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ เข้มข้น 3.5 μM..... 70

65 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (λ_{ex} = 529 nm และ λ_{em} = 545 nm) ของเซ็นเซอร์ **monoRh6G** (3.4×10^{-6} M) ในสารละลาย acetonitrile ในภาวะที่มีความเข้มข้นไอออนรบกวนต่างๆ เจือปนในสารละลายเท่ากับ 68 μM (10 equiv.) ของความเข้มข้นไอออนปรอท 6.8 μM..... 71

ภาพที่ หน้า

66 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (λ_{ex} = 529 nm และ λ_{em} = 545 nm) ของเซ็นเซอร์ **diRh6G** ($1.2x10^{-6}$ M) ในสารละลาย acetonitrile ในภาวะที่มีความเข้มข้นไอออนรบกวนต่างๆ เจือปนในสารละลายเท่ากับ 59 μM (10 equiv.) ของความเข้มข้นไอออนปรอท 5.9 μM..... 72

67 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า log ของความเข้มข้นของไอออนปรอทเปอร์คลอเรตที่เติมลงไป กับ intensity ของเซ็นเซอร์ **monoRh6G**, λ_{ex} เท่ากับ 529 nm..... 73

68 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า log ของความเข้มข้นของไอออนปรอทเปอร์คลอเรตที่เติมลงไป กับ intensity ของเซ็นเซอร์ **diRh6G**, λ_{ex} เท่ากับ 529 nm..... 75

69 กราฟแสดงความสัมพันธ์จากการคำนวณตามสมการ Benesi-Hildebrand ของเซ็นเซอร์ **monoRh6G** เมื่อ n = 1..... 77

70 กราฟแสดงความสัมพันธ์จากการคำนวณตามสมการ Benesi-Hildebrand ของเซ็นเซอร์ **diRh6G** เมื่อ n = 1..... 78

71 กราฟแสดงอัตราส่วนระหว่างโมเลกุลของเซ็นเซอร์ **monoRh6G** กับไอออนปรอทที่ใช้ในการเกิด binding..... 79

72 แสดงลักษณะโครงสร้างด้วยเทคนิค Molecular modeling ของ a) เซ็นเซอร์ **monoRh6G** และ b) เซ็นเซอร์ **monoRh6G**:Hg^{2+} อัตราส่วน 1:1..... 80

73 การเปลี่ยนแปลงสีของเซ็นเซอร์ **monoRh6G** ในสารละลาย acetonitrile ก่อนและหลังเติมไอออน Hg^{2+}, Ag^{+}, Cu^{2+}, Ba^{2+}, Li^{+}, Pb^{2+}, Ca^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+}, Na^{+}, Ni^{2+}, K^{+} และ Zn^{2+} 81

74 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของเซ็นเซอร์ **monoRh6G (1)** ($3.4x10^{-6}$ M) ในสารละลาย acetonitrile ในสภาวะที่มีไอออนปรอท และ tetraethylammonium iodide (TEAI) โดย Hg^{2+}/ TEAI ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0/0, 2/0, 2/0.3, 4/0.3) 82

75 การดูดกลืนแสงของเซ็นเซอร์ **RhB-1** ($3.3x10^{-5}$ M) ในสารละลาย MeOH:H_2O (10:90 v/v) ก่อนและหลังเติมไอออนปรอทอะซิเตรตที่ความเข้มข้นต่างๆ (a) 0 μM, (b) 3.3 μM, (c) 6.7 μM, (d) 10.0 μM, (e) 13.3 μM, (f) 16.7 μM, (g) 20.0 μM..... 83

ภาพที่ หน้า

76 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (λ_{ex} = 550 nm และ λ_{em} = 575 nm) ของเซ็นเซอร์ RhB-1 (4.4×10^{-6} M) ในสารละลาย acetonitrile ก่อนและหลังเติมไอออนปรอทอะซิเตรต ที่ความเข้มข้นต่างๆ (a) 0 μM, (b) 0.2 μM, (c) 0.3 μM, (d) 0.6 μM, (e) 0.9 μM, (f) 1.52 μM, (g) 2.24 μM..... 84

77 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (λ_{ex} = 550 nm และ λ_{em} = 575 nm) ของเซ็นเซอร์ RhB-1 (20.0×10^{-6} M) ในสารละลาย MeOH:H_2O (10:90 v/v) ในภาวะที่มีไอออนโลหะของเกลืออะซิเตรตชนิดต่างๆ ในปริมาณที่ต่างกัน..... 85

78 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (λ_{ex} = 550 nm และ λ_{em} = 575 nm) ของเซ็นเซอร์ RhB-1 (20.0×10^{-6} M) ในสารละลาย MeOH:H_2O (10:90 v/v) ในภาวะที่มีไอออนโลหะของเกลืออะซิเตรตชนิดต่างๆ เข้มข้น 26.7 μM..... 86

79 การเปลี่ยนแปลงสีของเซ็นเซอร์ RhB-Silica (ขนาด 63-200 μm) ในน้ำ DI ในภาวะที่มีไอออนปรอทที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 87

80 การเปลี่ยนแปลงสีของเซ็นเซอร์ RhB-Silica (ขนาด 63-200 μm) ในน้ำ DI ในภาวะที่มีไอออนโลหะของเกลืออะซิเตรตชนิดต่างๆ เข้มข้น 100 ppm..... 88

81 การเปลี่ยนแปลงสีของเซ็นเซอร์ RhB-Silica (ขนาด 40-63 μm) ในน้ำ DI ในภาวะที่มีไอออนปรอทที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 88

82 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีของเซ็นเซอร์ RhB-Silica (ขนาด 40-63 μm) หลังการเติมไอออนปรอท กับความเข้มข้นของไอออนปรอท..... 89

83 แถบสีของเซ็นเซอร์ RhB-Silica (ขนาด 40-63 μm) ในภาวะที่มีไอออนปรอทที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 89

84 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า log ของความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมลงไปกับความเข้มสีของเซ็นเซอร์ RhB-Silica..... 91

85 การเปลี่ยนแปลงสีของเซ็นเซอร์ RhB-Silica (ขนาด 40-63 μm) ในน้ำ DI ในภาวะที่มีไอออนโลหะของเกลืออะซิเตรตชนิดต่างๆ เข้มข้น 100 ppm..... 92

86 การเปลี่ยนแปลงสีของเซ็นเซอร์ RhB-Silica (ขนาด 40-63 μm) ในตัวอย่างแม่น้ำเจ้าพระยาที่ผ่านการกรองแล้ว (river) และน้ำดื่มยี่ห้อ มิเนเร่ (drink) ในสภาวะที่ไม่มีการเติมไอออนปรอท และในสภาวะที่มีการเติมไอออนปรอทเข้มข้น 50 ppm..... 92

รายชื่ออักษรย่อ

คำย่อ	คำเต็ม
ϕ_f	fluorescence quantum yield
^{o}C	degree Celsius
λ	wavelength
µL	microlitter
µM	micromolar
µm	micrometer
AAS	atomic absorption spectrometry
anh.	anhydrous
br	board (NMR spectroscopy)
^{13}C NMR	carbon 13 nuclear magnetic resonance spectroscopy
cm^{-1}	wavenumber
d	doublet (NMR spectroscopy)
dd	doublet of doublet (NMR spectroscopy)
DFT	density functional theory
DI	deionized
DNP	double numerical polarization
DSC	differential scanning calorimetry
DTG	differential thermogravimetry analysis
EAP	United States Environmental Protection Agency
E_{bind}	binding energy
em	emission
eq.	equivalent
EtOH	ethanol
ex	excitation
FDA	Food and Drug Administration

GPTs	(3-glycidyloxypropyl)trimethoxysilane
h	hour
HCl	hydrochloric
H_2O_2	hydrogen peroxide
H_2SO_4	sulfuric acid
^{1}H NMR	hydrogen nuclear magnetic resonance spectroscopy
H_2O	water
HR-MS	high resolution mass spectrometry
Hz	Hertz
ICP-AES	inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry
IR	Infrared
J	coupling constant (NMR spectroscopy)
K_{assoc}	association constant
K_2CO_3	potassium carbonate
M	mass (mass spectroscopy)
M	molar
m	multiplet (NMR spectroscopy)
MeOH	methanol
min	minute
mL	milliliter
mmol	mill mole
MW	molecular weight
m/z	mass to charge ratio (mass spectroscopy)
NaOMe	sodium methoxide
NaOH	sodium hydroxide
Na_2SO_4	sodium sulfate
Et_3N	triethylamine

nm	nanometer
OSHA	Occupational Safety and Health Administration
ppb	part per billion
ppm	part per million
q	quartet (NMR spectroscopy)
R_f	flow rate
s	singlet (NMR spectroscopy)
SEM	scanning electron microscopy
t	triplet (NMR spectroscopy)
v/v	volume by volume
w/v	weight by volume

มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทที่ 1
บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญ

ในปัจจุบันโลหะหนักมีบทบาทที่สำคัญในกระบวนการอุตสาหกรรมหลายประเภท มีการนำมาเป็นวัตถุดิบในกระบวนการผลิตต่างๆ หรือถูกนำไปใช้เป็นส่วนผสมในหลายภาคส่วน อาทิ เช่น ด้านอุตสาหกรรม ใช้ในกระบวนการผลิตหลอดไฟ พีวีซี สีทาอาคาร ถ่านไฟฉาย สำหรับทางด้านการเกษตร ใช้ในการกำจัดเชื้อรา เป็นส่วนผสมของยาฆ่าแมลงและปุ๋ย ใช้ในการเคลือบเมล็ดพืช หรือถูกใช้เป็นส่วนผสมของยา ผลิตเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ เครื่องสำอางค์ หรือเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการผลิตกระดาษ พลาสติก และอื่นๆ จากการขยายตัวทางเศรษฐกิจและการพัฒนาของเทคโนโลยีในปัจจุบัน ส่งผลให้ภาคอุตสาหกรรมมีการขยายตัวมากยิ่งขึ้น ทำให้จำนวนกากของเสียหรือน้ำทิ้งที่เป็นผลจากกระบวนการผลิตในแต่ละขั้นตอนเพิ่มตามไปด้วย โดยกากของเสียดังกล่าวอาจเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต หรือไม่สามารถย่อยสลายได้เองในกระบวนการทางธรรมชาติ ถูกปล่อยลงสู่แหล่งน้ำหรือดิน หรือมีการกำจัดกากของเสียอย่างผิดวิธี ทำให้มีการสะสมอยู่ในอากาศ ดินและแหล่งน้ำ และสะสมในเนื้อเยื่อสัตว์น้ำได้อีกด้วย โดยปรอท จัดว่าเป็นโลหะหนักชนิดหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในกระบวนการอุตสาหกรรมเป็นจำนวนมาก โดยธรรมชาติไอออนโลหะหนักจะสามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนได้ดีกับสารประกอบอินทรีย์ที่มีองค์ประกอบของอะตอมออกซิเจน ไนโตรเจน หรือ ซัลเฟอร์ ซึ่งจะส่งผลต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในบริเวณนั้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีการปนเปื้อนในแหล่งน้ำ ปรอทสามารถเปลี่ยนรูปกลายไปเป็นปรอทอนินทรีย์ในรูปของเมธิลเมอคิวรี โดยมีเชื้อจุลินทรีย์ในดินตะกอนเป็นตัวเร่งในการเกิดปฏิกิริยา และสามารถละลายน้ำได้ดีมากจึงมีโอกาสเข้าไปสะสมในร่างกายของสิ่งมีชีวิตได้เป็นอย่างดี และส่งถ่ายไปตามห่วงโซ่อาหารจากการกินต่อกันไปเรื่อยๆ โดยมนุษย์จัดได้ว่าเป็นหนึ่งในผู้บริโภคของห่วงโซ่อาหาร เมื่อร่างกายได้รับไอออนปรอทเข้าไปและมีการสะสมในปริมาณมากจะส่งผลทำให้ DNA ถูกทำลาย [1] ระบบประสาทและสมองถูกทำลาย [1-3] รวมไปถึงทำให้เกิดโรคมินามาตะ [4] เป็นต้น

ทั้งนี้จึงมีการกำหนดปริมาณสูงสุดที่ยอมรับได้ของปรอทที่อาจตกค้างในธรรมชาติโดยสถาบันต่างๆ แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณปรอทสูงสุดที่สามารถปนเปื้อนในแหล่งธรรมชาติตามมาตรฐานการควบคุมมลพิษของสถาบันนานาชาติ

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

จากตารางข้างต้นจะเห็นได้ว่า ปริมาณปรอทสูงสุดที่สามารถปนเปื้อนในแหล่งที่มาต่างๆ มีปริมาณน้อยมาก สำหรับในประเทศไทยมีข่าวการปนเปื้อนและรั่วไหลของสารปรอทที่ส่งผลกระทบต่อผู้คน อาทิเช่น ในปี พ.ศ. 2555 ช่วงเดือนพฤษภาคม พบสารปรอทปนเปื้อนในปลาและคนที่อาศัยอยู่รอบโรงไฟฟ้าถ่านหินและโรงงานเยื่อกระดาษ ในพื้นที่ อ.ศรีมหาโพธิ จ.ปราจีนบุรี โดยพบการปนเปื้อนของสารปรอทอยู่ในระดับสูงเกินมาตรฐานหลายเท่า และในเดือนพฤศจิกายนมีการตรวจพบตัวอย่างปลาที่มีสารปรอทปนเปื้อนสูงตั้งแต่ 0.07-0.22 ppm ซึ่งเกินค่ามาตรฐานที่กระทรวงสาธารณสุขกำหนดไว้ คือ ไม่เกิน 0.02 ppm (ข่าว mcot.net เมื่อวันที่ 9 ม.ค.2556) หรือจากเหตุการณ์น้ำมันรั่วกลางอ่าวไทย ช่วงเดือนกรกฎาคม ในปี พ.ศ. 2556 บริเวณเกาะเสม็ด จังหวัดระยอง พบว่าน้ำทะเลบริเวณอ่าวพร้าวและอ่าวทับทิมมีปริมาณสารปรอทเกินค่ามาตรฐาน ซึ่งค่ามาตรฐานปริมาณสารปรอทในน้ำทะเลต้องไม่เกิน 0.1 ไมโครกรัมต่อลิตร แต่พบว่าที่อ่าวพร้าวมีค่าสูงถึง 2.9 ไมโครกรัมต่อลิตร ส่วนที่อ่าวทับทิมนั้นสูงถึง 0.25 ไมโครกรัมต่อลิตร (ข่าวไทยรัฐออนไลน์ เมื่อวันที่ 14 ส.ค. 2556) ด้วยเหตุนี้จึงต้องให้ความสำคัญกับสิ่งแวดล้อมรอบตัว โดยเฉพาะสิ่งแวดล้อมทางน้ำ ที่เป็นแหล่งปนเปื้อนที่สำคัญอันจะนำมาสู่การปนเปื้อนในห่วงโซ่อาหารของมนุษย์ได้ง่ายมากที่สุด ดังนั้นการที่มีเครื่องมือหรือวิธีตรวจจับความเป็นพิษของสิ่งแวดล้อมใกล้ตัวที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน ประหยัดค่าใช้จ่าย และมีประสิทธิภาพ ถือว่าเป็นสิ่งที่มีประโยชน์ต่อชีวิตมนุษย์และสิ่งแวดล้อมมาก

การใช้ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์เพื่อตรวจจับโมเลกุลหรือไอออน โดยตรวจวัดด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปีเป็นทางเลือกหนึ่งที่ได้รับความสนใจอย่างแพร่หลายในการตรวจวิเคราะห์ไอออนโลหะชนิดต่างๆ ทั้งด้านคุณภาพวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์ เนื่องจากมีข้อดีคือเป็นเทคนิคที่มีสภาพไว (sensitivity) ในการวิเคราะห์สูง ใช้สารตัวอย่างเพียงเล็กน้อยก็สามารถแสดงผลในเวลาอันรวดเร็ว จึงสามารถใช้วิเคราะห์อย่างต่อเนื่อง (continuous monitoring) อีกทั้ง

ไม่ทำลายสารตัวอย่างอีกด้วย ซึ่งนับเป็นข้อดีเหนือการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค flame photometry atomic absorption spectrometry (AAS) หรือ inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-AES) เนื่องจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค AAS และ ICP-AES มีข้อจำกัดคือ ต้องใช้ปริมาณสารตัวอย่างในการวิเคราะห์มาก เครื่องมือที่ใช้มีราคาค่อนข้างสูง และขนาดใหญ่ ทำให้มีข้อจำกัดในการนำไปวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักในภาคสนาม นอกจากนี้เทคนิคดังกล่าวต้องคำนึงถึงการกำจัดสารรบกวนในกรณีที่สารตัวอย่างเป็นน้ำกร่อย น้ำทะเล สิ่งมีชีวิตจากทะเล หรือดินตะกอน ที่มีเกลือปนเปื้อนเป็นจำนวนมาก ซึ่งอาจทำให้เกิดการอุดตันของเครื่องมือขณะทำการวิเคราะห์ (salt-clogging)

การออกแบบฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ให้สามารถตรวจจับไอออนโดยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปีได้อย่างมีประสิทธิภาพ จำเป็นต้องออกแบบให้ระบบโครงสร้างโมเลกุล (molecular system) ของเซ็นเซอร์ให้ทำงานได้โดยใช้แสงเหนี่ยวนำให้เกิดสภาวะกระตุ้น (light-induced logic operation) เพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงของการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ หรือการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงอุลตร้าไวโอเลต และภายในโครงสร้างควรมีส่วนของโมเลกุลที่แสดงอันตรกิริยาจำเพาะ (selective interaction) ต่อไอออนที่ต้องการวิเคราะห์ด้วย

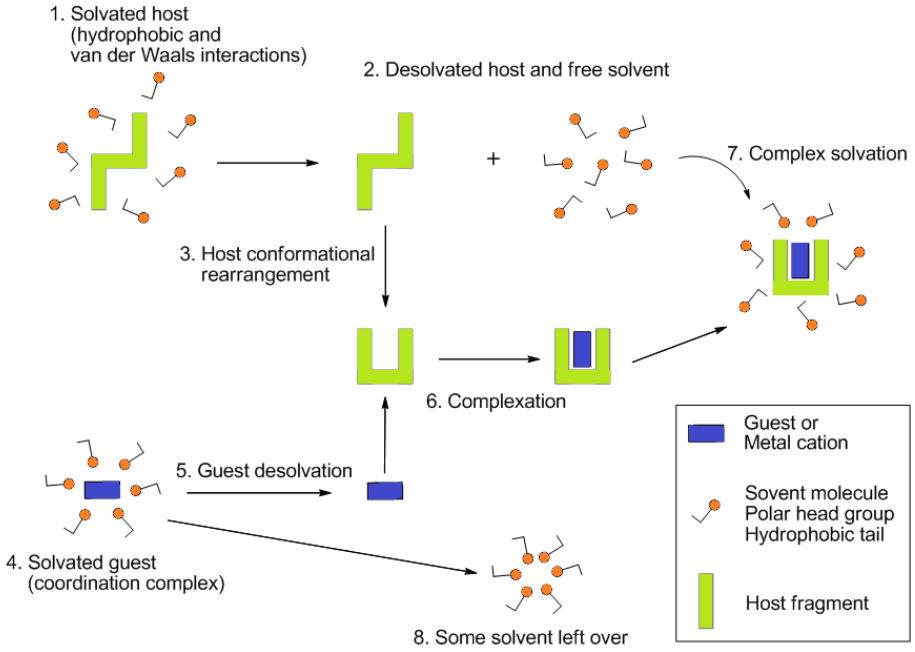
โดยทั่วไปโครงสร้างโมเลกุลของสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ (fluorescence sensor) ประกอบด้วย 2 ส่วนหลัก ได้แก่

ฟลูออโรฟอร์ (fluorophore) คือส่วนที่แสดงคุณสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ เมื่อมีการดูดกลืนพลังงานในช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสม

ไอโอโนฟอร์ (ionophore) เป็นส่วนที่สามารถตรวจจับโมเลกุลหรือไอออนที่ต้องการตรวจวัด ดังนั้นจึงเรียกสารที่ใช้วิเคราะห์โดยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปีนี้ว่า “ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์” หรือ “ฟลูออโรไอโอโนฟอร์ (fluoroionophore)” โดยส่วนที่แสดงสัญญาณเปรียบเสมือนตัวแปลงสัญญาณเปลี่ยนข้อมูลของกลไกการตรวจจับของไอออน (recognition event) ไปสู่การเปลี่ยนแปลงสัญญาณทางแสง (optical signal) ดังนั้นการพัฒนาประสิทธิภาพของเซ็นเซอร์จึงขึ้นกับการปรับเปลี่ยนโครงสร้างส่วนฟลูออโรฟอร์ เพื่อพัฒนาสภาพไวของการวิเคราะห์ (sensitivity) และการปรับเปลี่ยนโครงสร้างส่วนไอโอโนฟอร์เพื่อพัฒนาความจำเพาะเจาะจง (selectivity) ต่อไอออนที่ต้องการวิเคราะห์

วิทยานิพนธ์นี้ได้เสนอการสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์สำหรับตรวจจับไอออนปรอทชนิดใหม่เพื่อให้มีสภาพไวสูง (high sensitivity) และมีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนชนิดใดชนิด

หนึ่ง (high selectivity) โดยมีหลักการต่างๆ เช่น การสังเคราะห์เซ็นเซอร์สำหรับปรอท เนื่องจากไอออนปรอท (Hg^{2+}) มีขนาดอะตอมใหญ่และโพลาไรซ์ได้ง่าย จัดเป็น soft acid (จาก Pearson's principle หรือ ทฤษฎี Hard and Soft Acid and Base) [8] ซึ่งชอบเกิดอันตรกิริยาและสร้างพันธะ (bond binding) กับอะตอมหรือหมู่ฟังก์ชัน (functional group) ที่เป็น soft base เช่น อะตอมไนโตรเจน และอะตอมซัลเฟอร์ ที่มีขนาดใหญ่และมีความหนาแน่นของอิเล็กตรอนสูง ดังนั้นวิทยานิพนธ์นี้จึงเลือกสังเคราะห์ส่วนไอโอโนฟอร์ที่มีอะตอมไนโตรเจนและอะตอมซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ [9-11] เพื่อทำหน้าที่เป็น soft donor ligand ให้อิเล็กตรอนแก่ไอออนปรอท เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวัดและเพิ่มความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนโลหะหนัก และเลือกสังเคราะห์โมเลกุลให้มีลักษณะเป็นสายโซ่ยาว (long chain) เพื่อให้เกิดอันตรกิริยากับไอออนในตำแหน่งที่เหมาะสมโดยการม้วนตัวล้อมรอบไอออนโลหะหนักได้อย่างอิสระ (self assembly) เพื่อขจัดปัญหาเรื่องขนาดของช่องว่างที่ไม่เหมาะสม สำหรับงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ฟลูออโรฟอร์ชนิดหมู่ rhodamine 6G และ rhodamine B ซึ่งเป็นสารประกอบอะโรมาติก (aromatic compound) ที่มีค่าประสิทธิภาพเชิงควอนตัมทางฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence quantum yield; Φ_f) สูง จึงให้สัญญาณฟลูออเรสเซนต์ได้ดี โดยฟลูออโรฟอร์ทั้งสองชนิดคายแสงฟลูออเรสเซนต์ในช่วงที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (visible region) [12-13] ซึ่งมีประโยชน์ต่อการนำไปพัฒนาใช้ในอุปกรณ์ในภาคสนามต่อไป นอกจากนี้ฟลูออโรฟอร์ทั้งสองชนิดมีโครงสร้างที่ง่ายต่อการปรับเปลี่ยนจึงเหมาะที่จะนำมาศึกษาและพัฒนาเป็นเซ็นเซอร์ชนิดใหม่ต่อไป จากนั้นนำเซ็นเซอร์ที่สังเคราะห์ได้ไปศึกษาในตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อไป โดยกระบวนการเกิดการดักจับไอออน (หรือ guest) ของไอโอโนฟอร์ (หรือ host) ในสารละลาย สามารถแสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไอโอโนฟอร์และไอออน

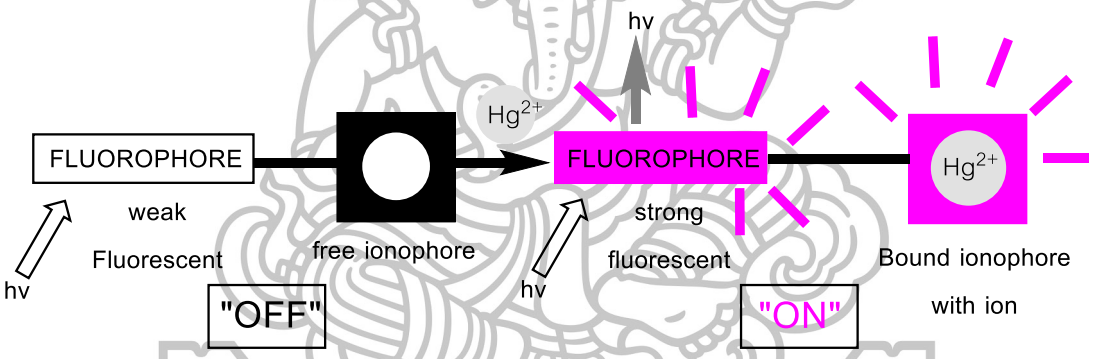
ในที่นี้ส่วนไอโอโนฟอร์เปรียบเสมือนโฮสต์ และไอออนที่ต้องการตรวจจับเปรียบเสมือนเกสต์ ซึ่งกระบวนการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโฮสต์กับเกสต์ในสารละลายสามารถแสดงดังภาพที่ 1 เมื่ออยู่ในสารละลาย ตัวทำละลายจะจัดตัวล้อมรอบโมเลกุลโฮสต์ด้วยอันตรกิริยาแวนเดอร์วาลส์ (van der Waals) และอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) และล้อมรอบโมเลกุลเกสต์ด้วยอันตรกิริยาโคออร์ดิเนต (coordination) เพื่อให้สารทั้งสองสามารถคงตัวอยู่ได้ในสารละลาย ซึ่งการเกิดการตรวจจับหรือการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไอโอโนฟอร์และไอออนนั้น โมเลกุลของสารทั้งสองชนิดจำเป็นต้องใช้พลังงานเพื่อทำลายแรงยึดเหนี่ยวที่เกิดจากโมเลกุลของสารละลาย เพื่อให้ได้โมเลกุลอิสระ จากนั้นโมเลกุลโฮสต์อิสระจะเกิดการปรับเปลี่ยนโครงสร้างเพื่อให้มีขนาดและรูปร่างที่เหมาะสมกับเกสต์ จึงสามารถตรวจจับไอออนที่ต้องการได้ ในขณะที่สารประกอบที่เกิดขึ้นจะถูกโมเลกุลของสารละลายล้อมรอบไว้เช่นเดียวกัน [14]

จากการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลโฮสต์-เกสต์ (host-guest chemistry) เพื่อการออกแบบและสร้างเครื่องมือนำไปใช้งาน โดยออกแบบโมเลกุลโฮสต์ (host) ให้จับกับโมเลกุลเกสต์ (guest) ได้อย่างจำเพาะเจาะจงนั้นต้องพิจารณาถึงความเหมาะสมในด้าน 1. อันตรกิริยา (interaction) ที่จะเกิดขึ้นระหว่างไอโอโนฟอร์กับไอออนที่ต้องการตรวจจับ ซึ่งสามารถเกิดได้หลาย

ลักษณะ เช่น อันตรกิริยาไอออน-ไอออน (ion-ion interaction) อันตรกิริยาไอออน-ไดโพล์ (ion-dipole interaction) อันตรกิริยาไดโพล์-ไดโพล์ (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

ซึ่งกระบวนการตรวจจับไอออนของเซ็นเซอร์ที่สังเคราะห์ได้ในงานนี้ เสนอกระบวนการทำงานที่ทำให้เซ็นเซอร์เกิดการเปลี่ยนแปลงการคายแสงฟลูออเรสเซนต์นี้ สามารถอธิบายได้ดังนี้

การเปลี่ยนแปลงแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ในลักษณะคล้ายการปิด-เปิดสวิตซ์ไฟ (OFF-ON system) แสดงดังภาพที่ 2

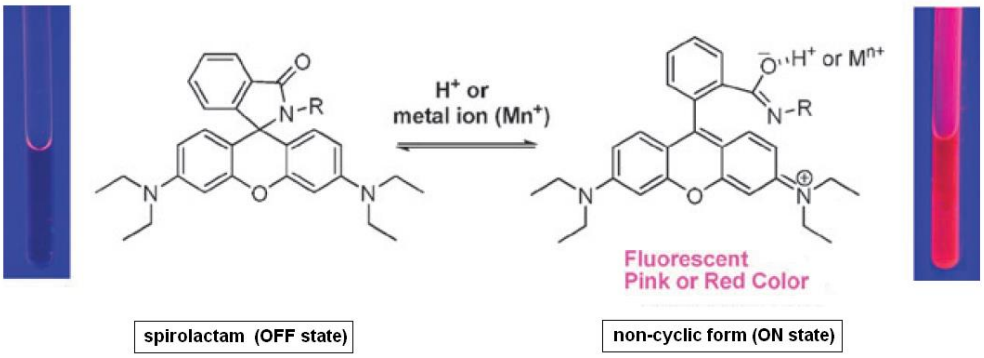


ภาพที่ 2 ลักษณะการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ ก่อนไอโอโนฟอร์ตรวจจับไอออนโลหะ (ซ้าย) และภายหลังตรวจจับไอออนโลหะ (ขวา)

จากภาพที่ 2 สามารถอธิบายได้ว่า ในภาวะที่สารละลายไม่มีไอออนโลหะ เซ็นเซอร์สามารถคายแสงฟลูออเรสเซนต์ออกมาได้ในปริมาณความเข้มแสงต่ำ ในทางตรงข้ามหากมีไอออนโลหะอยู่ในสารละลาย ไอออนโลหะจะเข้าจับกับไอโอโนฟอร์ทำให้เซ็นเซอร์คายแสงฟลูออเรสเซนต์ออกมาได้มากขึ้น โดยความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนต์จะเพิ่มขึ้นในลักษณะแปรผันตามกับปริมาณไอออนโลหะในสารละลาย

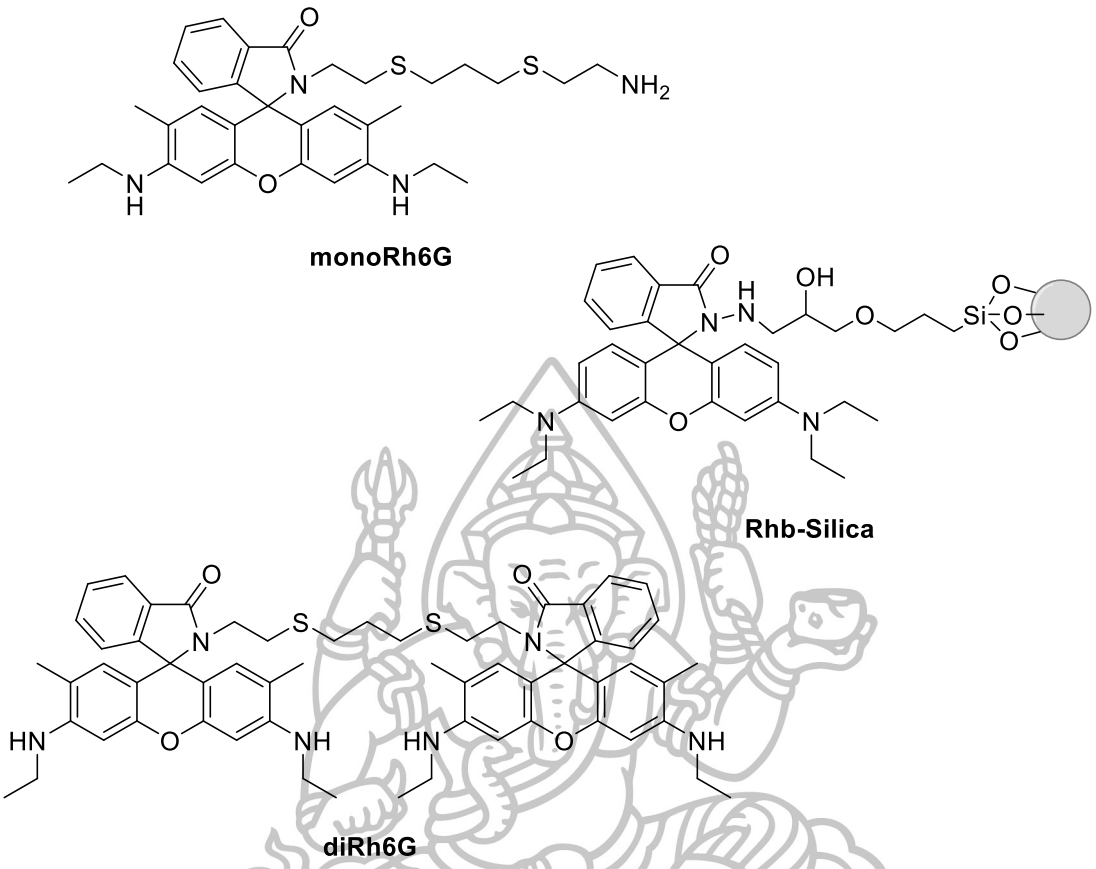
โดยการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซ็นเซอร์ภายหลังการตรวจจับไอออน [15] : กระบวนการทำงานของเซ็นเซอร์แบบแรกเกิดจากการเปลี่ยนแปลง

โครงสร้างของเซ็นเซอร์เมื่อมีการตรวจจับไอออน แสดงได้ดังภาพที่ 3 กล่าวคือ ในภาวะที่สารละลายไม่มีไอออน เซ็นเซอร์จะมีการปิดวง spirolactam ทำให้เกิดการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ได้น้อยมาก (OFF state) เนื่องจากระบบคอนจูเกต (conjugation system) ในโครงสร้างของเซ็นเซอร์ไม่ต่อเนื่อง และค่อนข้างสั้น แต่เมื่อเซ็นเซอร์เกิดอันตรกิริยากับไอออน ทำให้เกิดการเปิดวง spirolactam และเหนี่ยวนำให้อิเล็กตรอนในโครงสร้างเคลื่อนที่เข้าสู่ระบบคอนจูเกต จึงสังเกตเห็นการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ออกมาในปริมาณที่เพิ่มขึ้น (ON state)



ภาพที่ 3 กระบวนการปิด (OFF state) และเปิดวง spirolactam (ON state)
ที่มา: Kim H. N. et al, "A new trend in rhodamine-based chemosensors: application of spirolactam ring-opening to sensing ions," **Chemical Society Reviews**. Vol. 37 (2008): 1465-1472.

จากภาพที่ 6 แสดงโครงสร้างสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์สำหรับวิทยานิพนธ์นี้ โดยคาดว่าภายหลังการตรวจจับไอออนปรอท เซ็นเซอร์ดังกล่าวอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซ็นเซอร์ภายหลังการตรวจจับไอออน ส่งผลให้เห็นสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่เพิ่มขึ้น



ภาพที่ 4 โครงสร้างสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์สำหรับวิทยานิพนธ์นี้

วิทยานิพนธ์นี้ถือได้ว่าเป็นการออกแบบและพัฒนาเครื่องมือตรวจจับไอออนให้มีความไวและมีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนโลหะ โดยทดสอบความสามารถตรวจจับไอออนโลหะต่างๆ ได้แก่ โลหะทรานซิชัน โลหะอัลคาไลน์ และโลหะอัลคาไลน์เอิร์ท ในสารละลาย ซึ่งฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ชนิดใหม่นี้ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากไอโอโนฟอร์ที่มีอะตอมซัลเฟอร์ และ/หรือไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ คาดว่าเซ็นเซอร์ชนิดใหม่ สามารถตรวจจับไอออนได้อย่างจำเพาะเจาะจง รวมทั้งดูดกลืนและคายแสงในช่วง visible ซึ่งง่ายต่อการพัฒนาหรือประยุกต์เป็นเครื่องมือที่มีราคาไม่แพงต่อไปได้ในอนาคต

2. วัตถุประสงค์

2.1. เพื่อออกแบบและสังเคราะห์สารออแกนิกที่มีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจจับไอออนปรอท ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ในเชิงปริมาณ และคุณภาพ ด้วยวิธีทางฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปีและ/หรืออุลตร้าไวโอเลตสเปกโทรสโกปี

2.2. เพื่อออกแบบและสังเคราะห์สารออแกนิกที่มีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจจับไอออนปรอทในสารละลาย และสามารถนำไปพัฒนาต่อบนพื้นผิวของซิลิกาเพื่อความสะดวกในการใช้งานภาคสนามและสิ่งแวดล้อมที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก

3. สมมติฐานของงานวิจัย

คาดว่าเซ็นเซอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่สามารถดักจับไอออนปรอทได้อย่างว่องไวและมีความจำเพาะสูง สามารถนำไปประยุกต์ใช้งานในภาคสนามและสิ่งแวดล้อมที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนี้

4.1 สามารถสังเคราะห์สารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ชนิดใหม่ 2 ชนิดที่สามารถตรวจจับไอออนปรอทได้อย่างว่องไวและมีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนปรอทสูง ในขณะเดียวกันก็มีค่า detection limit ที่ต่ำและเปอร์เซ็นต์ผลผลิตในการสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ที่สูง สามารถทำงานได้ในสภาวะที่เป็น

4.2 สามารถปรับปรุงพื้นผิว silica particle เพื่อใช้สำหรับตรวจจับไอออนปรอทชนิดใหม่ ซึ่งเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพและสะดวกต่อการนำไปใช้งานในภาคสนามมากยิ่งขึ้น

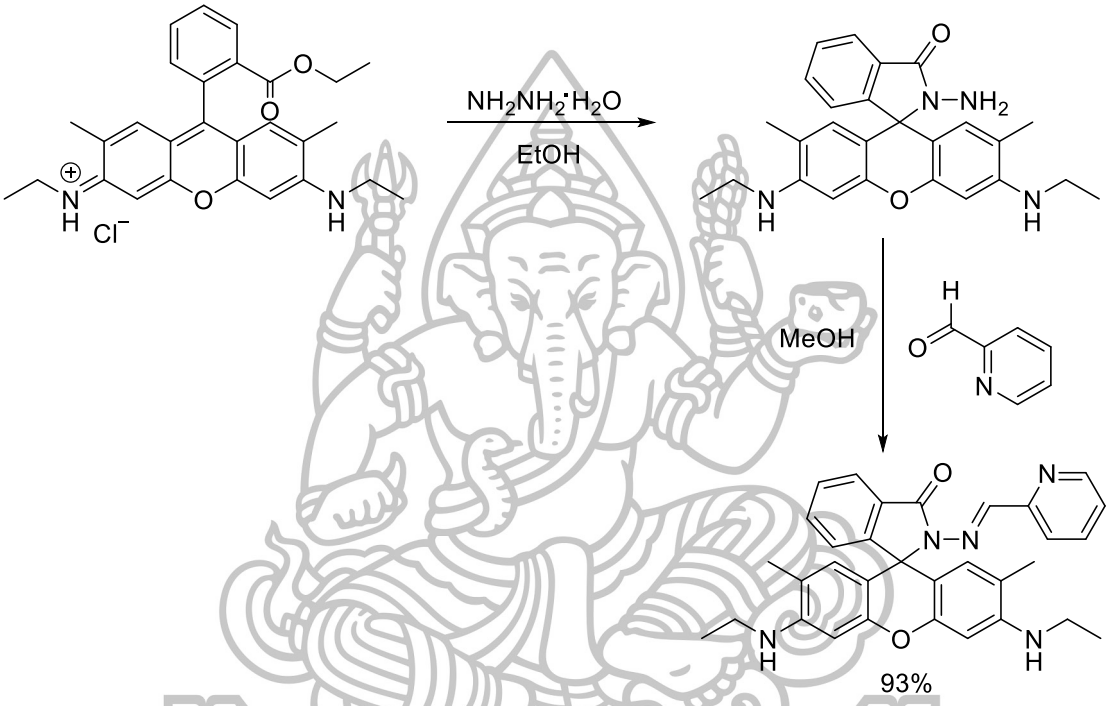
บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรม

การนำฟลูออโรไอโอโนฟอร์หรือโมเลกุลของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ มาใช้ในการติดตามหรือตรวจจับปริมาณไอออนโลหะหนัก เป็นเทคนิคที่ได้รับความสนใจจากนักวิจัยอย่างแพร่หลาย โดยผู้วิจัยหลายคณะพยายามที่จะพัฒนาประสิทธิภาพของสารฟลูออโรไอโอโนฟอร์ให้ดีขึ้น โดยมุ่งหวังที่จะพัฒนาการสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ให้มีขั้นตอนที่สั้น ใช้สารตั้งต้นราคาไม่แพง และมุ่งเน้นให้เซ็นเซอร์ที่สังเคราะห์ได้มีสภาพไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) ต่อไอออน และมีความจำเพาะเจาะจง (selectivity) ต่อไอออนโลหะเป้าหมายสูงขึ้น รวมไปถึงการนำเซ็นเซอร์ไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ไอออนในสารละลายน้ำ และ/หรือ ในสารละลายผสมของตัวทำละลายอินทรีย์กับน้ำได้ ซึ่งในที่นี้ได้แสดงตัวอย่างบทความวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดไอออนโลหะ ดังนี้

ในปี ค.ศ. 2005 Yang และคณะ [16] ได้สังเคราะห์อนุพันธ์ของ thiosemicarbazides โดยใช้ rhodamine 6G เป็นฟลูออโรฟอร์ (ภาพที่ 5) เป็นเซ็นเซอร์ดักจับไอออนปรอท (Hg^{2+}) ในภาวะที่มีไอออนปรอท เซ็นเซอร์เกิดการเปลี่ยนสีจากไม่มีสีเป็นสีชมพูและเห็นการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 556 nm (λ_{ex} = 500 nm) ซึ่งสามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นสารละลายผสมระหว่าง MeOH:H_2O ในอัตราส่วน 20:80 ปริมาตร/ปริมาตร ที่ค่า pH เท่ากับ 7

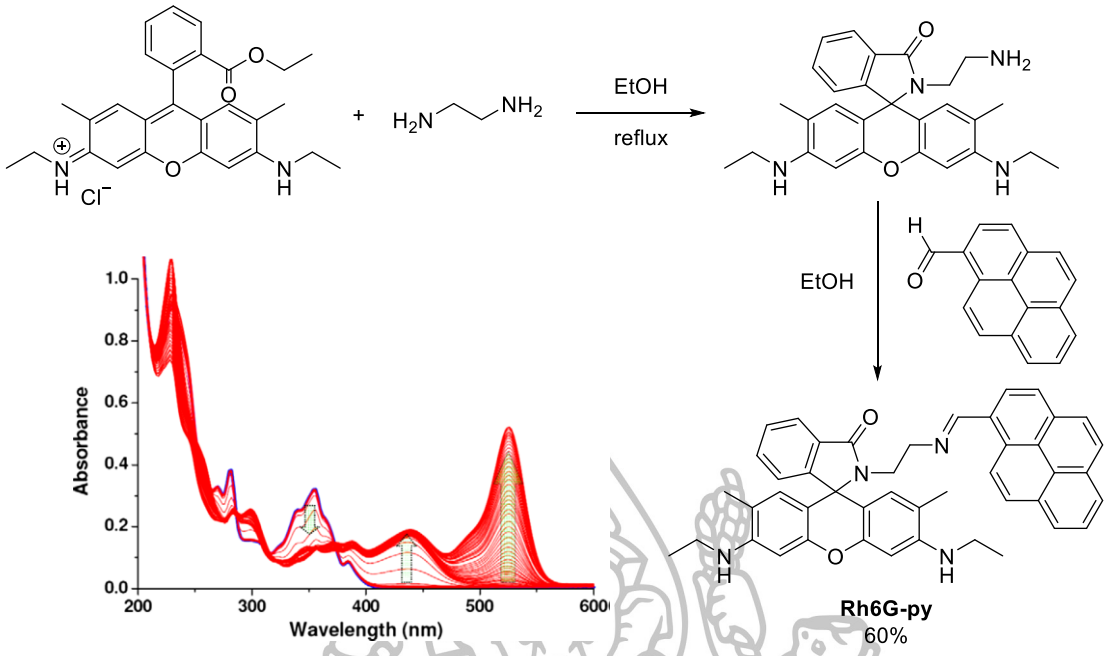
ภาพที่ 5 วิธีการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ thiosemicarbazides และผลการทดลองบางส่วนในภาวะที่มีไอออนต่างๆ

ในปี ค.ศ. 2007 Wu และคณะ [17] ได้สังเคราะห์ rhodamine 6G เชื่อมต่อกับ carbohydrazone ดังแสดงในภาพที่ 6 ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนปรอท ในสารละลาย DMF (*N*,*N*-dimethylformamide) ในอัตราส่วน DMF:H_2O (1:1 ปริมาตร/ปริมาตร) โดยมีความสามารถต่ำสุดของการตรวจจับ (detection limit) ในระดับพันล้านส่วน (ppb) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2 ppb และแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่ความยาวคลื่น 560 nm (λ_{ex} = 500 nm)



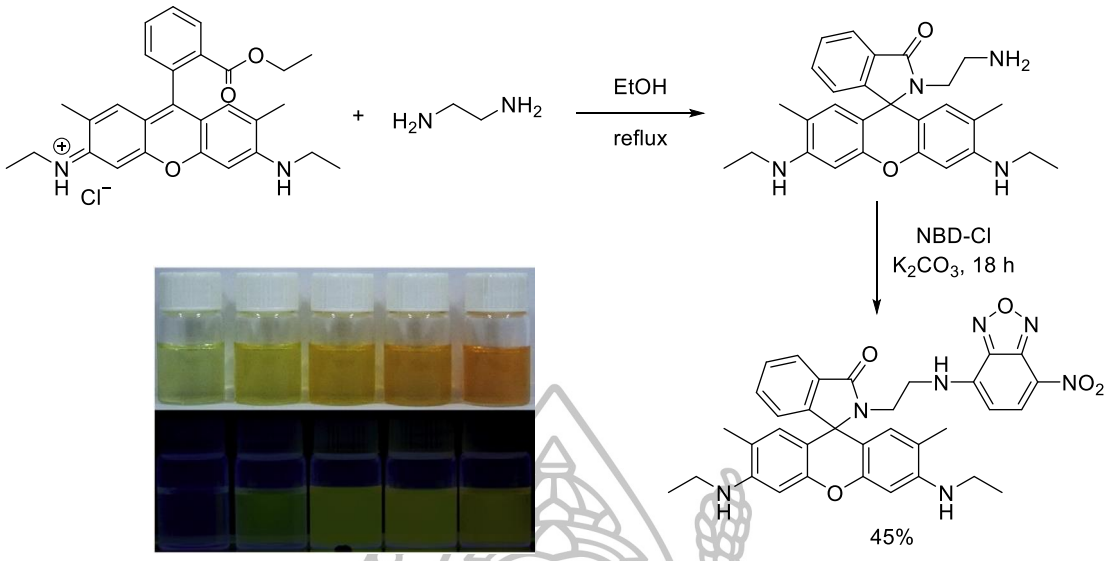
ภาพที่ 6 วิธีการสังเคราะห์เซ็นเซอร์จาก rhodamine 6G เชื่อมต่อกับ carbohydrazone

ในปี ค.ศ. 2011 Ghosh และคณะ [18] สังเคราะห์เซ็นเซอร์ **Rh6G-py** ดังภาพที่ 7 ที่อาศัยกระบวนการทำงานแบบ FRET ซึ่งมีฟลูออโรฟอร์ 2 ชนิด ได้แก่ pyrene และ rhodamine 6G เป็นส่วนประกอบ โดย pyrene ทำหน้าที่เป็น donor และฟลูออโรฟอร์ชนิด rhodamine 6G ทำหน้าที่เป็น acceptor ซึ่งมีความสามารถในการตรวจจับไอออนปรอท ในสารละลาย acetonitrile โดยช่วงความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เซ็นเซอร์สามารถตรวจจับผ่านกระบวนการทำงานแบบ FRET อยู่ในช่วง 1.5 x 10^{-5} ถึง 3.8 x 10^{-5} โมลาร์ (M; mol/L) และแสดงความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์มากที่สุดที่ความยาวคลื่น 550 nm (λ_{ex} = 525 nm)



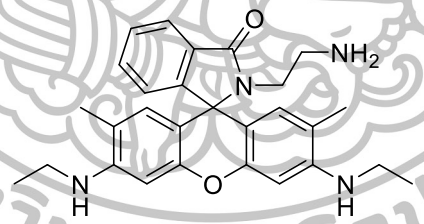
ภาพที่ 7 วิธีการสังเคราะห์เซ็นเซอร์ Rh6G-py และการดูดกลืนแสงของเซ็นเซอร์ในสารละลาย acetonitrile หลังเติมไอออนปรอทที่ความเข้มข้นต่างๆ

ในปี ค.ศ. 2011 Yao และคณะ [19] ได้สังเคราะห์เซ็นเซอร์โดยใช้ rhodamine 6G และ 7-nitrobenzo [1,2,5] oxadiazole-4-ylamine (NBD) ดังแสดงในภาพที่ 8 เป็นเซ็นเซอร์ดักจับไอออนปรอท ในสารละลาย acetonitrile ในภาวะที่มีไอออนปรอท สีของเซ็นเซอร์จะเข้มขึ้นแปรผันตรงตามปริมาณไอออนปรอทที่ใส่ลงไป โดยมี detection limit เท่ากับ 8.7×10^{-7} M และแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่ความยาวคลื่นที่ 543 nm



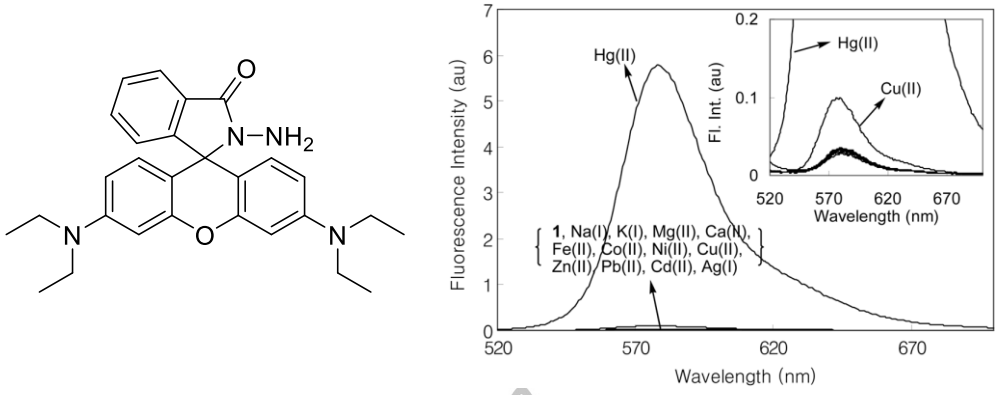
ภาพที่ 8 วิธีการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ rhodamine–nitrobenzoxadiazole และผลการทดลองบางส่วนในภาวะที่มีไอออนปรอทที่ความเข้มข้นต่างๆ

ในปี ค.ศ. 2013 Li และคณะ [20] ได้ใช้ ethylenediamine ทำหน้าที่เป็นไอโอโนฟอร์ต่อกับ rhodamine 6G ดังแสดงในภาพที่ 9 มาใช้งานเป็น Surface Enhanced Raman scattering (SERS) เซ็นเซอร์ ซึ่งมีค่า detection limit เท่ากับ 1.0×10^{-9} M



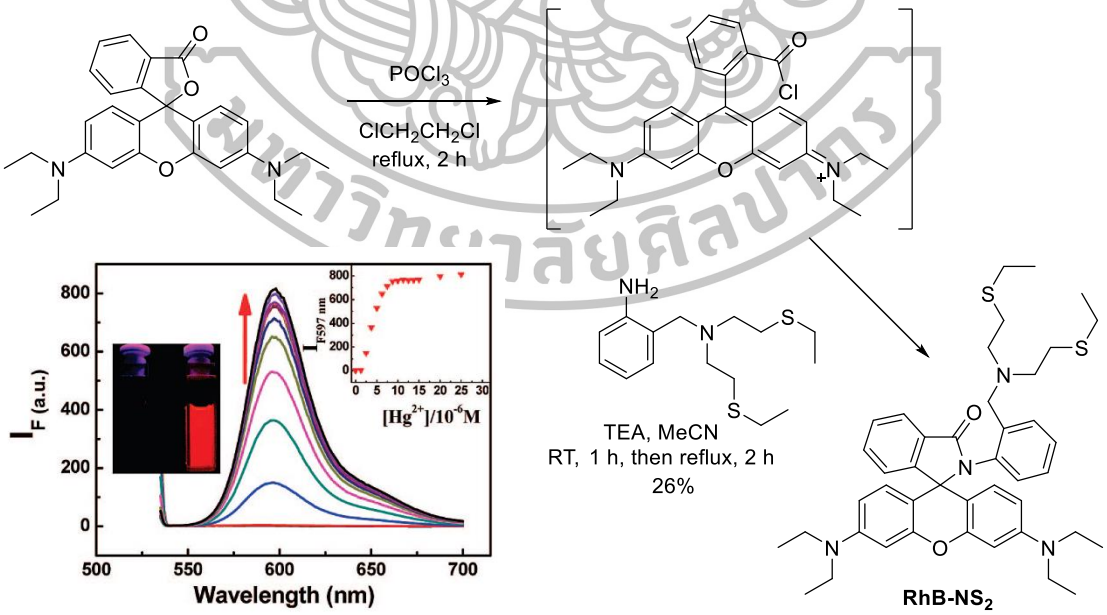
ภาพที่ 9 โครงสร้างของ SERS เซ็นเซอร์

ในปี ค.ศ. 2008 Kim และคณะ [21] ได้สังเคราะห์ rhodamine B hydrazide ดังภาพที่ 10 ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนปรอท และสามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นสารละลาย MeOH:H_2O ในอัตราส่วน 10:90 ปริมาตร/ปริมาตร โดยมี detection limit เท่ากับ 0.2×10^{-6} M หรือ 40 ppb และเมื่อมีการดักจับกับไอออนปรอท สารละลายจะเกิดการเปลี่ยนสีจากไม่มีสีเป็นสีชมพู



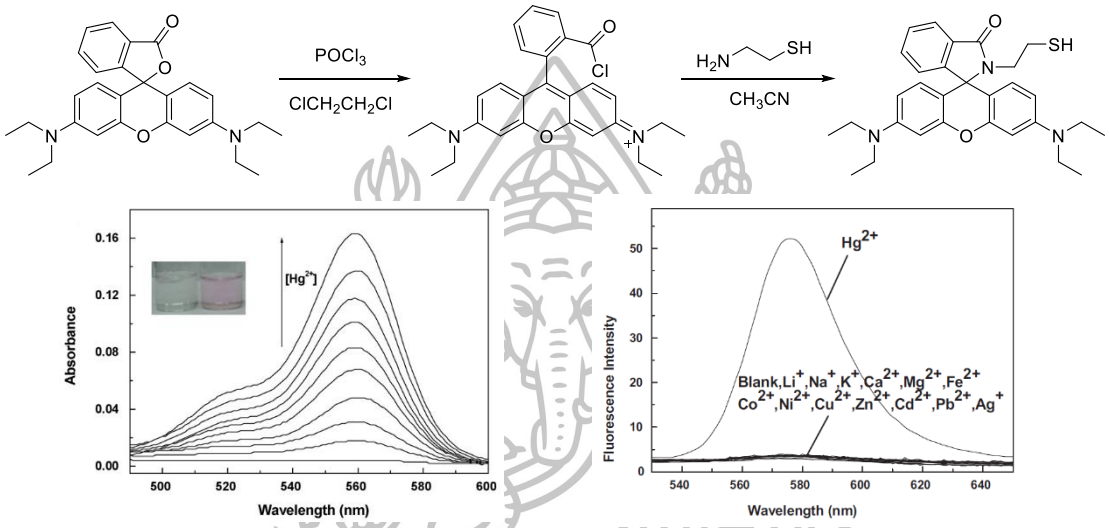
ภาพที่ 10 โครงสร้างของ rhodamine B hydrazide และการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของเซ็นเซอร์ในภาวะที่มีไอออนโลหะชนิดต่างๆ

ในปี ค.ศ. 2009 Huang และคณะ [22] ได้สังเคราะห์เซ็นเซอร์ RhB-NS_2 (ภาพที่ 11) โดยใช้ rhodamine B ทำหน้าที่เป็นฟลูออโรฟอร์ และไอโอโนฟอร์ที่มีองค์ประกอบของอะตอมไนโตรเจนและซัลเฟอร์ ดังภาพที่ 11 สำหรับเป็นเซ็นเซอร์ในการตรวจจับปรอทในสารละลายผสม acetonitrile และน้ำ (15:85 ปริมาตร/ปริมาตร) พบว่าสามารถตรวจจับไอออนปรอทได้อย่างจำเพาะเจาะจง โดยแสดงความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์มากที่สุดที่ความยาวคลื่น 597 nm (λ_{ex} = 530 nm) และมีค่า detection limit เท่ากับ 1.0×10^{-6} M



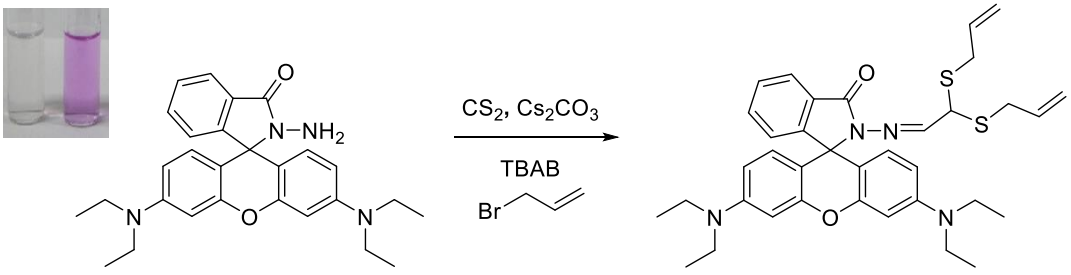
ภาพที่ 11 วิธีการสังเคราะห์เซ็นเซอร์ RhB-NS_2 และการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของเซ็นเซอร์ก่อนและหลังเติมไอออนปรอท

ในปี ค.ศ. 2012 Lui และคณะ [23] นำ rhodamine B มาทำปฏิกิริยากับ cysteamine hydrochloride ได้เป็นปรอทเซ็นเซอร์ดังภาพที่ 12 ในสารละลายผสม EtOH:H_2O (80:20 ปริมาตร/ปริมาตร) เมื่อมีการดักจับไอออนปรอท สารละลายจะเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพู และแสดงความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์มากที่สุดที่ความยาวคลื่น 578 nm และมีค่า detection limit น้อยกว่า 2.5×10^{-6} M



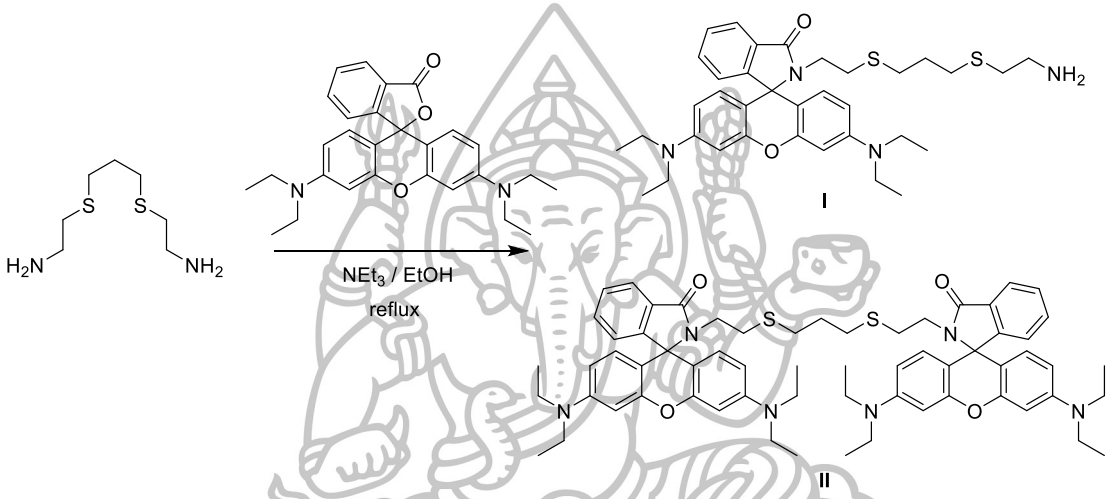
ภาพที่ 12 วิธีการสังเคราะห์เซ็นเซอร์ของ rhodamine B-cysteamine hydrochloride และผลการทดลองบางส่วนในภาวะที่มีไอออนต่างๆ

ในปี ค.ศ. 2012 Rode และคณะ [24] สังเคราะห์เซ็นเซอร์ที่ประกอบด้วย *S,S'*-diallyl carbohydrazonodithioate และ rhodamine B ดังภาพที่ 13 เพื่อใช้เป็นปรอทเซ็นเซอร์ พบว่าความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์มากที่สุดที่ความยาวคลื่น 576.5 nm ในสารละลายผสม EtOH:H_2O (80:20 ปริมาตร/ปริมาตร) และเมื่อเซ็นเซอร์มีการดักจับกับไอออนปรอท สารละลายจะเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพู โดยมีค่า detection limit เท่ากับ 2.0×10^{-8} M



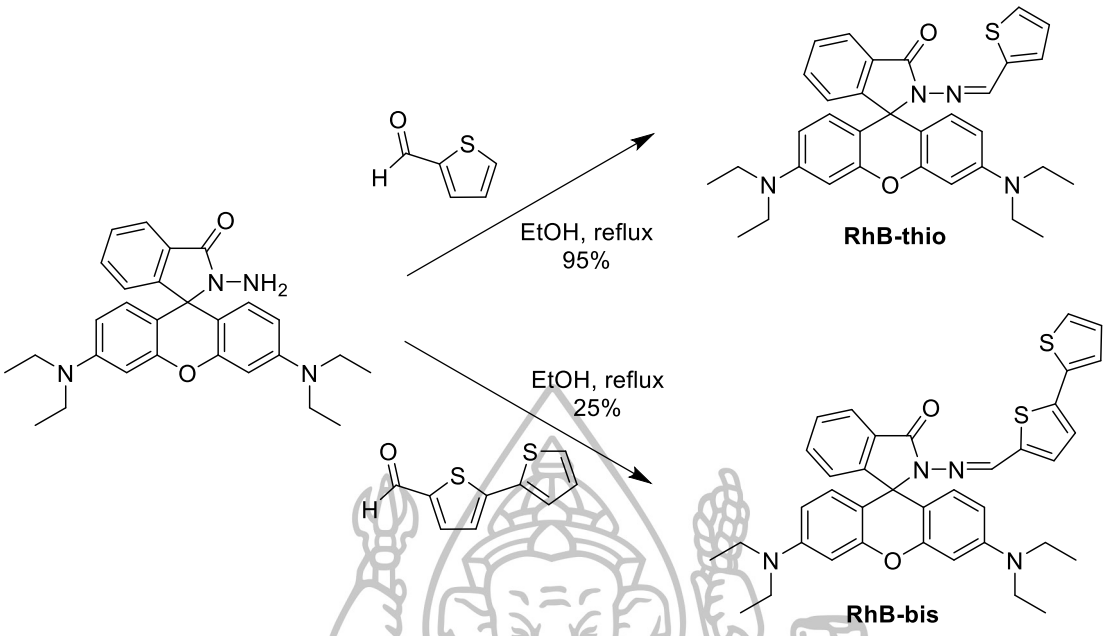
ภาพที่ 13 วิธีการสังเคราะห์เซ็นเซอร์ของอนุพันธ์ *S,S'*-diallyl carbohydrazonodithioate

ในปี ค.ศ. 2012 Wanichacheva และคณะ [25] ได้สังเคราะห์ 2-[3-(2-aminoethylsulfanyl)propylsulfanyl]ethanamine เชื่อมต่อกับ rhodamine B หนึ่งกลุ่ม (I) และ rhodamine B สองกลุ่ม (II) เพื่อใช้เป็นตัวตรวจวัดไอออนปรอท (ภาพที่ 14) เมื่อมีการดักจับกับไอออนปรอทแล้วสารละลายจะเกิดการเปลี่ยนสีจากไม่มีสีไปเป็นสีชมพู ซึ่งสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า โดย I และ II สามารถดักจับไอออนปรอทได้อย่างจำเพาะเจาะจง โดยมี detection limit เท่ากับ 10 ppb และ 15 ppb ตามลำดับ



ภาพที่ 14 วิธีการสังเคราะห์และโครงสร้างของเซ็นเซอร์ I และ II

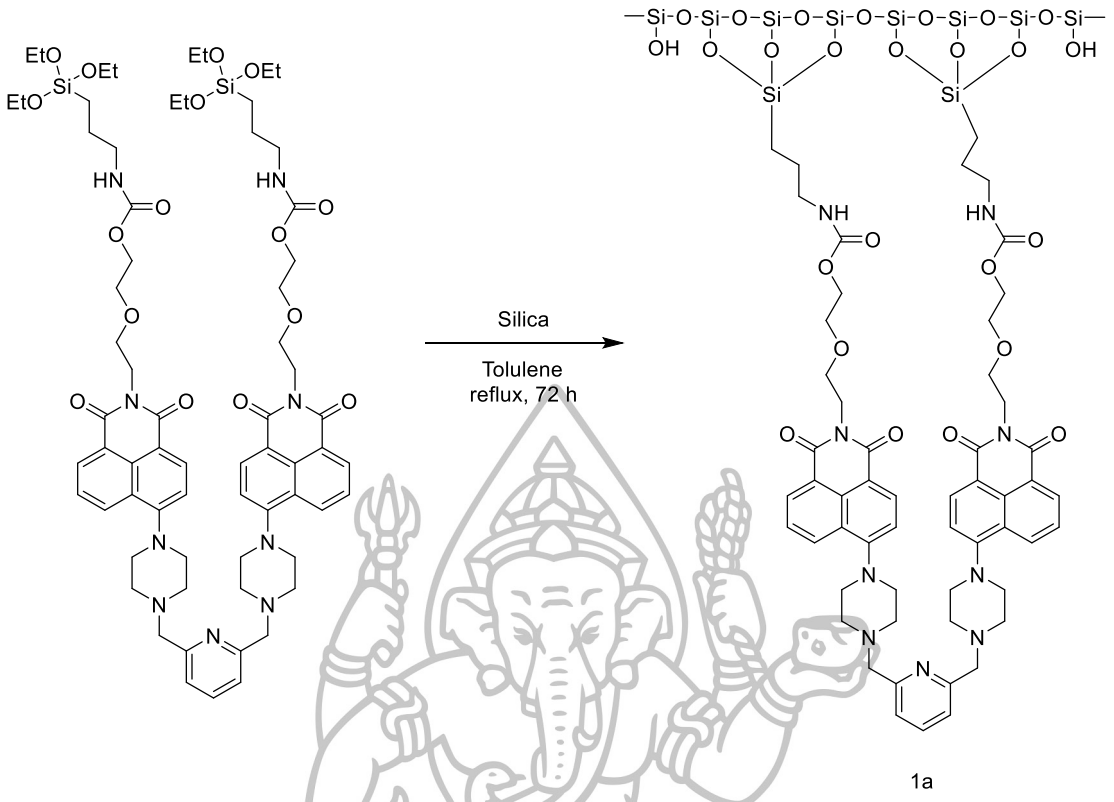
ในปี ค.ศ. 2013 Park และคณะ [26] ได้สังเคราะห์เซ็นเซอร์ 2 ชนิด ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ rhodamine-hydrazone ซึ่งมีส่วนประกอบของ rhodamine B เพื่อใช้เป็นส่วนของฟลูออโรฟอร์ และ thiophene หนึ่งกลุ่ม (**RhB-thio**) และสองกลุ่ม (**RhB-bis**) ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 15 เพื่อเป็นเซ็นเซอร์สำหรับดักจับไอออนปรอท ในสารละลายผสม EtOH:H_2O (1:1 ปริมาตร/ปริมาตร) โดยเซ็นเซอร์ทั้งสองแสดงความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่ความยาวคลื่น 582 nm และมีค่า detection limit เท่ากับ 2.58×10^{-8} M และ 2.31×10^{-2} M ตามลำดับ



ภาพที่ 15 วิธีการสังเคราะห์และโครงสร้างของเซ็นเซอร์ RhB-thio และ RhB-bis

นอกจากบทความวิจัยข้างต้น ที่มีการนำฟลูออโรไอโอโนฟอร์หรือโมเลกุลของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ มาใช้ในการติดตามหรือตรวจจับปริมาณไอออนโลหะหนักในสภาวะสารละลายแล้ว ยังมีบทความวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการนำฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์มาต่อลงบนตัวกลางที่เป็นของแข็ง (solid support) เช่น ซิลิกาเจล หรือ อนุภาคขนาดเล็ก (particle) ซึ่งจะทำให้ประสิทธิภาพการนำไปใช้งานภาคสนาม หรือในระบบสิ่งแวดล้อม สะดวกและง่ายมากยิ่งขึ้น ซึ่งในที่นี้เป็นตัวอย่างบทความวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการนำเซ็นเซอร์ต่อลงบน solid support ชนิดต่างๆ และการปรับปรุงพื้นผิวของ solid support เพื่อนำไปใช้งานในด้านต่างๆ แสดงดังนี้

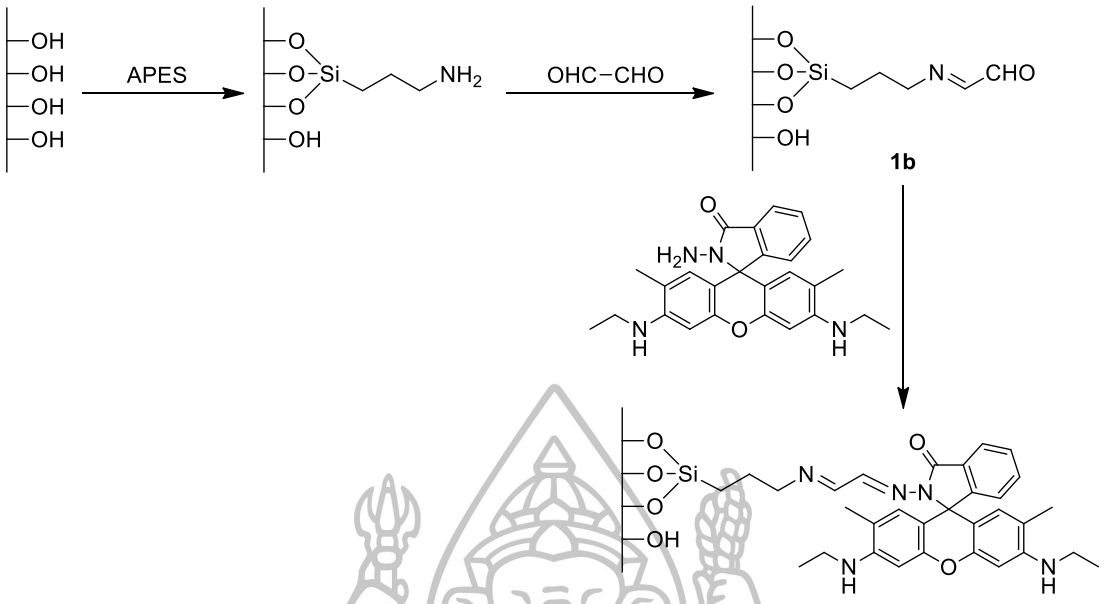
ในปี 2009 Zhu กับ Qian [27] และคณะ ได้นำ aminonaphthalimide จำนวน 2 โมเลกุล ทำปฏิกิริยากับ 2,6-bis(aminomethyl)pyridine เชื่อมต่อกับ triethoxy(3-isocyanatopropyl) silane จากนั้นนำมาติดบนพื้นผิวของ silica particles โดยทำปฏิกิริยากับหมู่ hydroxyl (-OH) จะได้เป็นเซ็นเซอร์ (**1a**) โดยมีdetection limit เท่ากับ 6.8×10^{-9} M นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้เป็นตัวกรองจับไอออนปรอทโดยมีค่า adsorption capacity เท่ากับ 6.1 มิลลิกรัมของไอออนปรอทต่อกรัมของตัวดูดซับ



ภาพที่ 16 แสดงการปรับปรุงพื้นผิวของ silica particles สำหรับดักจับไอออนปรอท

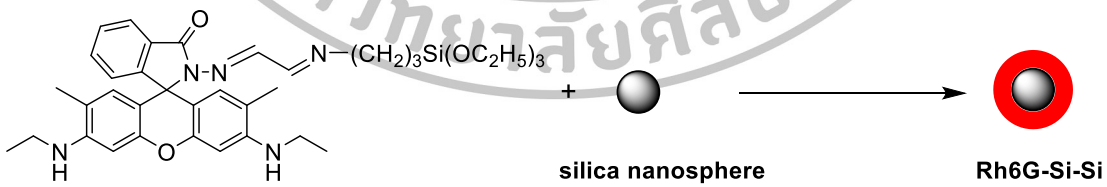
ในปี 2012 Wu และคณะ [28] ได้ทำการต่อ rhodamine-6G hydrazine ลงบนซิลิกาเจลที่ทำการปรับปรุงพื้นผิวให้อยู่ในรูปของ modified-silica (**1b**) ซึ่งเตรียมจากการทำปฏิกิริยาของ 3-aminopropyltriethoxysilane (APES) กับหมู่ hydroxyl บนพื้นผิวซิลิกาเจล แล้วทำปฏิกิริยาต่อกับ glyoxal ซึ่งสามารถทดสอบความเข้มข้นของปรอทได้ในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 78 x 10^{-5} M นอกจากนี้ได้นำมาใช้เป็นตัวกรองจับไอออนปรอท โดยดูดซับปรอทได้ 72% และเมื่อมีการจับกับไอออนปรอทจะสามารถสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงของสีได้ด้วยตาเปล่า

และในปีเดียวกันนี้ Wu และคณะ [29] ได้พัฒนาตัวกรองจับไอออนปรอท โดยเปลี่ยน solid support จากซิลิกาเจลเป็น mesoporous silica โดยใช้เป็น SBA-15 ซึ่งพบว่ามีค่า detection limit ต่ำลงถึง 1.0 x 10^{-8} M หรือ 2 ppb



ภาพที่ 17 แสดงการปรับปรุงพื้นผิวของ silica particles สำหรับดักจับกับไอออนปรอท โดยใช้ rhodamine-6G hydrazine

ในปี 2014 Chen และ Mu [30] ได้ทำการได้สังเคราะห์เซ็นเซอร์ Rh6G-CHO ซึ่งพบว่ามีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนปรอท และสามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นสารละลายผสม EtOH:H_2O (7:3 ปริมาตร/ปริมาตร) เมื่อนำเซ็นเซอร์ Rh6G-CHO ที่ผ่านการต่อกับสายโซ่ 3-aminopropyltrimethoxysilane ให้อยู่ในรูป Rh6G-Si แล้วต่อลงบน silica nanosphere ซึ่งทำหน้าที่เป็น solid support ได้เป็นเซ็นเซอร์ Rh6G-Si-Si ซึ่งสามารถทดสอบความเข้มข้นของปรอทได้ในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 22×10^{-6} M ในสารละลายผสม EtOH:H_2O (7:3 ปริมาตร/ปริมาตร)



ภาพที่ 18 แสดงการปรับปรุงพื้นผิวของ silica nanoshere สำหรับดักจับกับไอออนปรอท โดยใช้เซ็นเซอร์ Rh6G-CHO

จากบทความวิจัยทั้งหมดข้างต้นจะเห็นได้ว่า โครงสร้างโมเลกุลของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ประกอบด้วย 2 ส่วนหลัก ส่วนแรกจะเป็นส่วนของไอโอโนฟอร์ มีหน้าที่ในการดักจับ

ไอออนโลหะหนัก ซึ่งจะมีคุณสมบัติในการให้อิเล็กตรอน และส่วนที่สอง คือ ฟลูออโรฟอร์ เป็นส่วนที่แสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ ซึ่งจะมีความสามารถในการรับอิเล็กตรอน โดยเมื่อนำทั้งสองส่วนมาต่อกัน จะทำให้เกิดการส่งผ่านอิเล็กตรอนได้ดีขึ้น และเมื่อยิ่งเพิ่มระบบคอนจูเกตในระบบให้ยาวขึ้น จะทำให้ความเข้มของฟลูออเรสเซนต์เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้ฟลูออเรสเซนต์สเปกตรัมมีช่วงการคายแสงในช่วงความยาวคลื่นที่สูงขึ้นอีกด้วย จึงทำให้ในการออกแบบฟลูออโรฟอร์ ส่วนใหญ่มักจะออกแบบหรือเลือกใช้สารประกอบอะโรมาติกที่มีคอนจูเกชัน (conjugation) จำนวนมาก เพื่อให้สารเกิดการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ได้ดี ซึ่งหนึ่งในนั้นก็ คือ อนุพันธ์ของ rhodamine และสำหรับในการเลือกใช้ไอโอโนฟอร์จะต้องคำนึงถึงอะตอมภายในโครงสร้างมีความเหมาะสมที่จะเกิดอันตรกิริยากับไอออนเป้าหมาย จะเห็นได้ว่าโครงสร้างโมเลกุลของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ทั้ง 2 ส่วน นั้นมีความสำคัญต่อความจำเพาะเจาะจงต่อการดับจับไอออนและสัญญาณที่แสดงออกมา

ถึงแม้ว่าการสังเคราะห์สารเซ็นเซอร์สำหรับตรวจจับไอออนโลหะหนัก จะมีการรายงานไว้เป็นจำนวนมาก แต่ก็มีข้อจำกัดของเซ็นเซอร์หลายชนิดที่ไม่จำเพาะเจาะจงต่อไอออนใดไอออนหนึ่งเพียงชนิดเดียว และยังมีค่า detection limit ที่สูง กล่าวคือไม่สามารถตรวจจับไอออนโลหะที่ปริมาณความเข้มข้นต่ำได้ อีกทั้งยังมีข้อจำกัดในการนำไปประยุกต์ใช้งานในตัวอย่างจริงในภาคสนาม หรือในตัวอย่างที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งมีอยู่เป็นจำนวนมากในสิ่งแวดล้อม

ดังนั้นในงานวิทยานิพนธ์นี้จึงสนใจที่จะพัฒนาและสังเคราะห์เซ็นเซอร์สำหรับตรวจจับไอออนโลหะหนักที่มีความเข้มข้นต่ำ อย่างมีความจำเพาะเจาะจงมากที่สุด ในสารละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในตัวอย่างจริงในระบบสิ่งแวดล้อม โดยเปรียบเทียบกับโลหะทรานซิชัน โลหะอัลคาไลน์ และโลหะอัลคาไลน์เอิร์ท อีกทั้งพัฒนาและออกแบบเซ็นเซอร์ให้คายแสงฟลูออเรสเซนต์ในช่วงที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (visible region) และ/หรือสามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงสีของเซ็นเซอร์ได้ด้วยตาเปล่า อีกทั้งมีการนำเซ็นเซอร์เคลือบบนตัวกลางที่เป็นของแข็ง เช่น ซิลิกาเจล (silica gel) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและความสะดวกต่อการนำไปใช้งาน ซึ่งจะมีประโยชน์ต่อการนำไปพัฒนาใช้ในอุปกรณ์ตรวจสอบไอออนปรอทในภาคสนามต่อไปได้

บทที่ 3
อุปกรณ์และสารเคมี

1. อุปกรณ์

1.1 เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance 300 MHz: Bruker 300

1.2 เครื่อง UV-visible spectrometer: HP-8453

1.3 เครื่อง Fluorescence spectrometer: Perkin Elmer Luminescence spectrometer model LS-50B

1.4 เครื่อง Mass spectrometer: ESI-FT-ICR (High resolution) Bruker BioAPEX 70e spectrometer

1.5 เครื่อง Rotary evaporator: Buchi Rotavapor R-114

1.6 เครื่อง Vacuum pump: Tokyo Rikakikai Co., Ltd. model A-3S

1.7 เครื่อง Hot air oven: Binder model ED115 (E2)

1.8 เครื่อง Scanning Electron Microscopy : CamScan Maxim 2000

1.9 เครื่อง Differential Thermogravimetry Analyzer (DTG): Perkin Elmer Pyris 1

1.10 เครื่อง Differential Scanning Calorimeters (DSC): Perkin Elmer Pyris Diamonds

1.11 เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) : Perkin Elmer Spectrum

1.12 เครื่องชั่งละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง): Denver instrument model S-234

1.13 เครื่องชั่งละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง): Mettler Toledo model AB204

1.14 เครื่อง Hotplate and stirrer: Framo model M21/1

1.15 Micropipette: Finnpipette, HH10711 ขนาด 1-10 µL

1.16 TLC Silica gel 60 F_{254} aluminium sheet, Merck

1.17 อุปกรณ์สำหรับเตรียมแผ่น preparative TLC: Desaga Brinkmann

1.18 กระดาษกรอง: Advantec ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 110 mm

1.19 กระดาษกรอง: Advantec ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 70 mm

1.20 เครื่องแก้วพื้นฐาน

1.21 ชุดกรองแบบลดความดัน

1.22 Clamp และ Clamp Holder

2. สารเคมี

2.1 Argon gas: Masser Specialty Gas Co., Ltd. (99.999 %)

2.2 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane (GPTS): ALDRICH

2.3 Cysteamine hydrochloride: Fluka (≥ 97.0 %, M_w = 113.61 g/mol)

2.4 1,3-Dibromopropane, Fluka (>99%, d = 1.989 g/mL, M_w = 201.89 g/mol)

2.5 Triethylamine: Ridel-de-Haen (99 %, d = 0.73 g/mL, M_w = 101.19 g/mol)

2.6 Rhodamine 6G: Sigma-Aldrich (M_w = 479.02 g/mol)

2.7 Rhodamine B: Fluka (M_w = 479.02 g/mol)

2.8 Sulfuric acid: J.T Baker (98% w/w, 1.84 g/mL, Mw = 98.08 g/mol)

2.9 Hydrogen peroxide: Merck

2.10 Hydrazine hydrate (80 %, d = 1.03 g/mL, M_w = 50.06 g/mol)

2.11 Hydrochloric acid: J.T. Baker (37% , d = 1.18 g/mL, M_w = 36.46 g/mol)

2.12 Barium acetate: Sigma-Aldrich (99 %, M_W = 255.43 g/mol)

2.13 Barium chloride dehydrate: Sigma-Aldrich (M_w = 244.27 g/mol)

2.14 Barium perchlorate trihydrate: Strem chemical (99.9 %, M_w = 336.24 g/mol)

2.15 Cadmium acetate dehydrate: Fluka (98 %, M_W = 266.53 g/mol)

2.16 Anhydrous cadmium chloride: Fluka (M_w = 183.31 g/mol)

2.17 Cadmium perchlorate hexahydrate: Strem chemical (99 %, M_w = 311.30 g/mol)

2.18 Calcium chloride dehydrate: Carlo erba (M_w = 147.01 g/mol)

2.19 Calcium acetate: Fluka (M_W = 158.17 g/mol)

2.20 Calcium perchlorate tetrahydrate: Sigma-Aldrich (99 %, M_w = 311.04 g/mol)

2.21 Chloroform-*d* (contains 1% v/v of TMS): Sigma-Aldrich (99.8 atom %D)

2.22 Cobalt acetate tetrahydrate: Fluka (M_W = 249.08 g/mol)

2.23 Cobalt perchlorate hexahydrate: Sigma-Aldrich (M_w = 365.93 g/mol)

2.24 Copper acetate monohydrate: Fluka (M_W = 199.65 g/mol)

2.25 Copper perchlorate hexahydrate: Sigma-Aldrich (98 %, M_w = 370.54 g/mol)

2.26 Cupric chloride dehydrate: Fluka (M_w = 170.48 g/mol)

2.27 Anhydrous ferric chloride: Fluka (M_w = 162.21 g/mol)Hexane (distillation)

2.28 Iron acetate: Fluka (M_W = 232.98 g/mol)

2.29 Iron perchlorate hydrate: Sigma-Aldrich (98 %, M_w = 354.20 g/mol)

2.30 Lead acetate: Carlo (M_W = 235.29 g/mol)

2.31 Lead chloride: Unilab (M_w = 278.10 g/mol)

2.32 Lead perchlorate hydrate: Sigma-Aldrich (98 %, M_w = 406.09 g/mol)

2.33 Anhydrous lithium chloride: Fluka (M_w = 42.39 g/mol)

2.34 Lithium perchlorate trihydrate: Strem chemical (99 %, M_w = 311.30 g/mol)

2.35 Magnesium perchlorate hydrate: Fluka (98 %, M_w = 223.21 g/mol)

2.36 Magnesium chloride hexahydrate: Fluka (M_w = 203.31 g/mol)

2.37 Manganese acetate tetrahydrate: Fluka (M_W = 245.09 g/mol)

2.38 Manganese chloride monohydrate: Sigma-Aldrich (M_w = 143.86 g/mol)

2.39 Manganese perchlorate hexahydrate: Strem chemical (99 %, M_w = 253.84 g/mol)

2.40 Mercuric acetate: Fluka (M_W = 318.68 g/mol)

2.41 Mercuric chloride: Carlo erba (M_w = 471.50 g/mol)

2.42 Mercuric perchlorate hydrate: Sigma-Aldrich (98 %, M_w = 372.06 g/mol)

2.43 Mercuric perchlorate trihydrate: Strem chemical (99+ %, M_w = 399.46 g/mol)

2.44 Nickel acetate tetrahydrate: BDH (M_W = 248.84 g/mol)

2.45 Nickel chloride hexahydrate: Fluka (M_w = 237.71 g/mol)

2.46 Nickel perchlorate hexahydrate: Fluka (≥ 98.0 %, M_w = 365.69 g/mol)

2.47 Potassium acetate: Fluka (M_W = 98.14 g/mol)

2.48 Potassium chloride: Fluka (M_w = 74.55 g/mol)

2.49 Potassium perchlorate: Sigma-Aldrich (99+ %, M_w = 138.55 g/mol)

2.50 Silver acetate: BDH (M_W = 166.91 g/mol)

2.51 Silver perchlorate monohydrate: Strem chemical (99 %, M_w = 207.32 g/mol)

2.52 Sodium acetate: Fluka (M_W = 82.03 g/mol)

2.53 Sodium chloride (M_w = 58.5 g/mol)

2.54 Sodium hydroxide: Fluka (≥ 98.0 %, M_w = 40.00 g/mol)

2.55 Sodium methoxide: Fluka (≥ 98.0 %, M_w = 54.02 g/mol)

2.56 Sodium perchlorate: Fluka (98 %, M_w = 82.03 g/mol)

2.57 Sodium sulfate anhydrous: Sigma-Aldrich (99.0 %)

2.58 Zinc acetate dehydrate: Fluka (M_W = 219.51 g/mol)

2.59 Zinc perchlorate hexahydrate: Sigma-Aldrich (M_w = 372.36 g/mol)

2.60 Acetonitrile: LAB-SCAN

2.61 Dichloromethane (distillation)

2.62 Dichloromethane (for analysis): MERCK (99.8 %)

2.63 Ethanol (distillation)

2.64 Ethanol (absolute for analysis): MERCK

2.65 Ethylacetate (distillation)

2.66 Methanol (distillation)

2.67 Methanol (for analysis): MERCK (99.9 %)

2.68 De-ionized water: Departmentment of chemistry, Silpakorn University

2.69 Silica gel (ขนาด 63-200 μm): สำหรับ column chromatography, Merck

2.70 Silica gel (ขนาด 40-63 μm): SILICYCLE

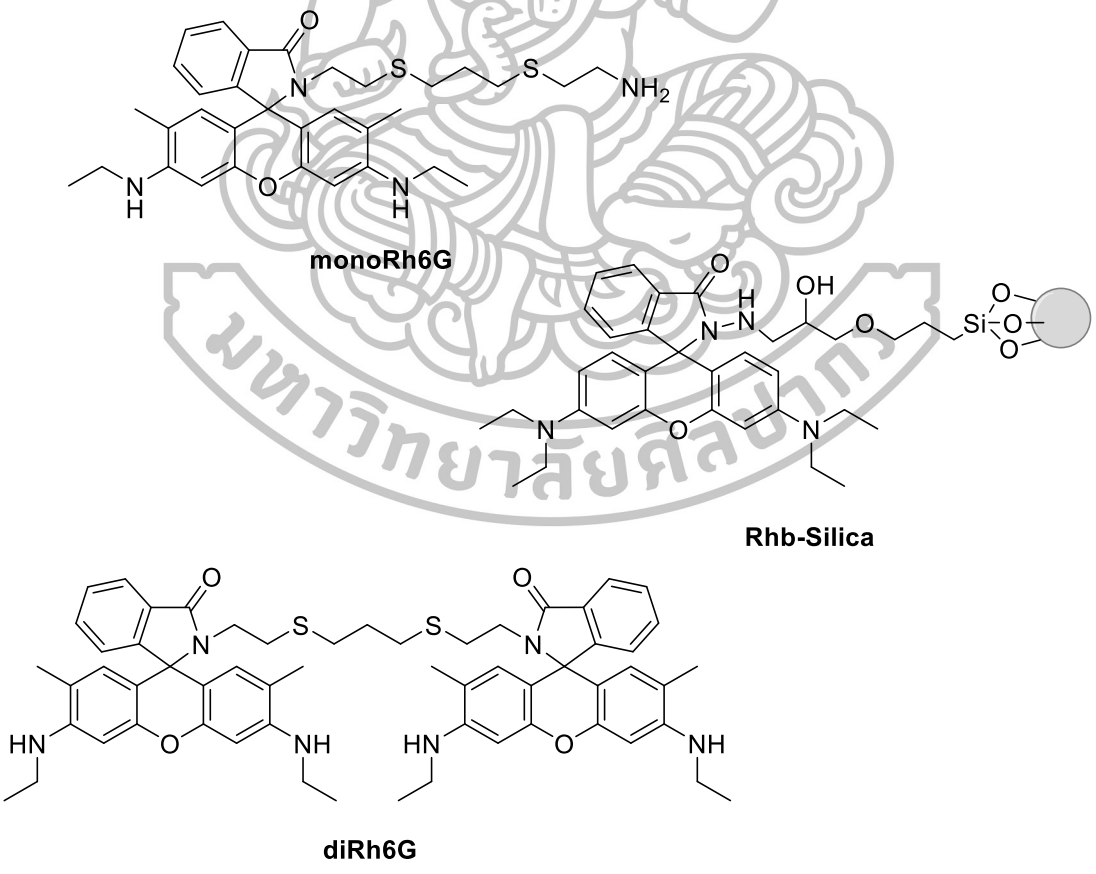
2.71 Silica gel 60 F_{254} containing gypsum สำหรับ preparative thin layer chromatography, Merck

มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทที่ 4
วิธีการทดลอง

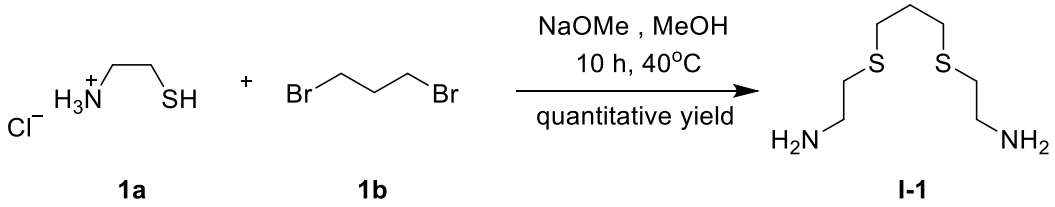
1. การสังเคราะห์เซ็นเซอร์

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์สำหรับตรวจวัดไอออนปรอทชนิดใหม่ทั้งหมด 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ใช้โรดามีนซิกจี (rhodamine 6G) ทำหน้าที่เป็นฟลูออโรฟอร์ ได้แก่ เซ็นเซอร์ monoRh6G และ diRh6G ซึ่งใช้ 2-(3-(2-aminoethylthio)propylthio)ethanamine ทำหน้าที่เป็นไอโอโนฟอร์ และกลุ่มที่ใช้โรดามีนบี (rhodamine B) ทำหน้าที่เป็นฟลูออโรฟอร์ ได้แก่ เซ็นเซอร์ RhB-Silica โดยมีไฮดราซีน ทำหน้าที่เป็นไอโอโนฟอร์ โดยเซ็นเซอร์ชนิดนี้ได้ถูกเชื่อมต่อกับซิลิกาเจล (silica gel) ซึ่งมีขนาดอนุภาค 63-200 ไมโครเมตร และ 40-63 ไมโครเมตร ตามลำดับ โครงสร้างของเซ็นเซอร์ทั้ง 2 กลุ่มแสดงดังภาพที่ 19



ภาพที่ 19 โครงสร้างฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ชนิดใหม่ทั้ง 2 กลุ่ม

1.1 **การสังเคราะห์ไอโอโนฟอร์ซนิด** 2-(3-(2-aminoethylthio)propylthio)ethanamine (I-1)



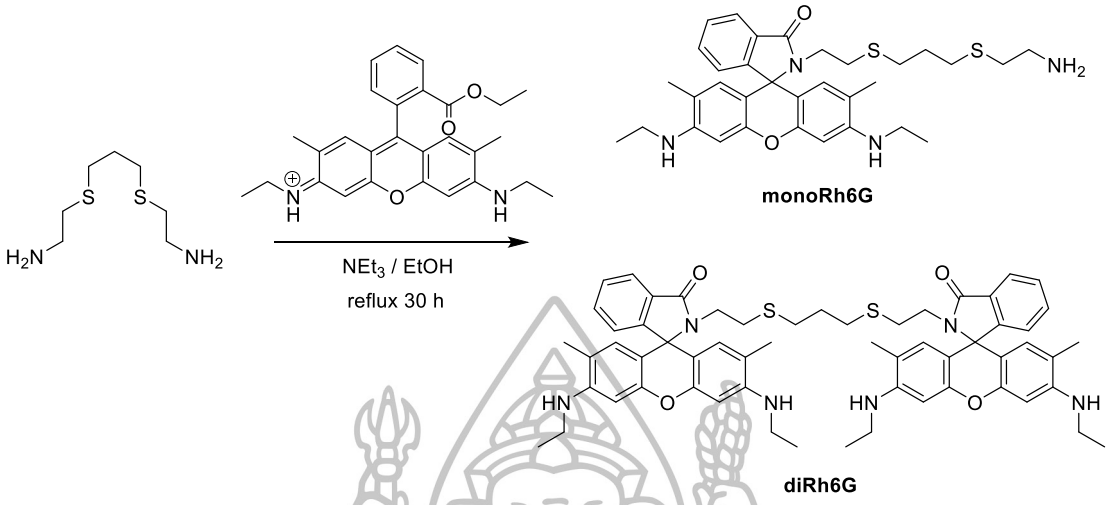
1a **1b** **I-1**

ภาพที่ 20 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์ 2-(3-(2-aminoethylthio)propylthio)ethanamine (**I-1**)

วิธีการสังเคราะห์ 2-(3-(2-aminoethylthio)propylthio)ethanamine (**I-1**) นั้นได้ทำการสังเคราะห์ตามวิธีของ Wanichacheva และคณะ [12] ดังภาพที่ 20 โดยชั่ง sodium methoxide (NaOMe) ปริมาณ 1.50 กรัม (27.8 มิลลิโมล) ใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นละลายด้วยเมทานอลที่ปราศจากน้ำ (dry methanol; dry MeOH) ปริมาณ 7.00 มิลลิลิตร ตามด้วยเติม cysteamine hydrochloride (**1a**) ปริมาณ 1.00 กรัม (8.80 มิลลิโมล) ลงในสารละลาย กวนปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศอาร์กอน (argon atmosphere) ที่อุณหภูมิห้อง (room temperature) เป็นระยะเวลา 30 นาที แล้วจึงเติม 1,3-dibromopropane (**1b**) ปริมาณ 0.36 มิลลิลิตร (3.52 มิลลิโมล) กวนปฏิกิริยาพร้อมให้ความร้อนจนอุณหภูมิถึง 40 องศาเซลเซียส (^{o}C) เป็นระยะเวลา 10 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลานำไปกำจัดตัวทำละลายออก โดยใช้เครื่อง rotary evaporator

จากนั้นเติมสารละลาย sodium hydroxide (NaOH) เข้มข้น 30% น้ำหนักโดยปริมาตร (w/v) ปริมาณ 15.0 มิลลิลิตร ลงในขวดปฏิกิริยาข้างต้นและกวนเบาๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน (dichloromethane; CH_2Cl_2) ปริมาณ 20.0 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง โดยเลือกเก็บเฉพาะสารละลายชั้นไดคลอโรมีเทน แล้วนำมาสกัดด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน (deionized water; น้ำ DI) อีกหนึ่งครั้ง ด้วยปริมาณ 60.0 มิลลิลิตร เก็บสารละลายชั้นไดคลอโรมีเทน แล้วทำการเติม sodium sulfate anhydrous (anh. Na_2SO_4) ลงไปปริมาณเล็กน้อย เพื่อกำจัดน้ำออก สุดท้ายกำจัดตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator ได้สาร **I-1** ที่มีลักษณะเป็นน้ำมันสีเหลืองอ่อน คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเกือบ 100% (นำไปใช้ในปฏิกิริยาขั้นตอนต่อไปโดยไม่ผ่านการแยกบริสุทธิ์)

1.2 การสังเคราะห์เซ็นเซอร์ monoRh6G และ diRh6G



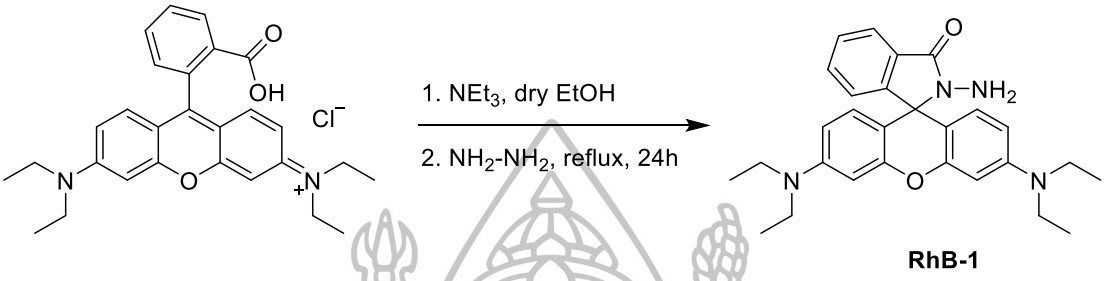
ภาพที่ 21 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์ monoRh6G และ diRh6G

การสังเคราะห์เซ็นเซอร์ monoRh6G และ diRh6G แสดงได้ดังภาพที่ 21 เริ่มจากการชั่งไอโอโนฟอร์ I-1 ปริมาณ 0.20 กรัม (1.03 มิลลิโมล) ใส่ขวดก้นกลมขนาด 25 มิลลิลิตร จากนั้นละลายด้วยเอทานอลที่ปราศจากน้ำ (dry ethanol; dry EtOH) ปริมาณ 6.0 มิลลิลิตร ตามด้วย dry triethylamine (Et_3N) ซึ่งทำหน้าที่เป็นเบส ปริมาณ 0.75 มิลลิลิตร (5.38 มิลลิโมล) ลงในสารละลาย กวนปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศอาร์กอน (argon atmosphere) ที่อุณหภูมิห้อง (room temperature) เป็นระยะเวลา 30 นาที แล้วจึงเติมโรดามีนซิกจี (rhodamine 6G) ปริมาณ 0.20 กรัม (0.42 มิลลิโมล) กวนปฏิกิริยาต่อพร้อมให้ความร้อนจนเกิดการ reflux ภายใต้บรรยากาศอาร์กอน เป็นระยะเวลา 30 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาทิ้งให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง แล้วนำไปกรองและกำจัดเอทานอลโดยใช้เครื่อง rotary evaporator

จากนั้นเติมไดคลอโรมีเทน ปริมาณ 20.0 มิลลิลิตร ลงในขวดปฏิกิริยาข้างต้น นำไปสกัดด้วยน้ำ DI ปริมาณ 20.0 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง โดยเลือกเก็บเฉพาะสารละลายชั้นไดคลอโรมีเทน แล้วทำการเติม anh. Na_2SO_4 ลงไปปริมาณเล็กน้อย เพื่อกำจัดน้ำออก ทำการกำจัดตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator จากนั้นแยกบริสุทธิ์สารที่ได้ด้วยเทคนิค preparative thin layer chromatography ในที่มืด โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง CH_2Cl_2, MeOH และ NEt_3 ในอัตราส่วน 90:10:0.5 v/v/v ตามลำดับ เป็น mobile phase พบว่าได้เซ็นเซอร์ monoRh6G มีลักษณะเป็นน้ำมัน มีสีเหลืองอ่อน และเซ็นเซอร์ diRh6G มีลักษณะเป็นของแข็งสีชมพูอ่อน ปริมาณ 74 และ 52 มิลลิกรัม ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตได้เท่ากับ 29% และ 16%

ตามลำดับ โดยมีอัตราการเคลื่อนที่ของสารบนตัวดูดซับ (Retention factor; R_f) เท่ากับ 0.52 (**monoRh6G**) และ 0.79 (**diRh6G**)

1.3 การสังเคราะห์โรดามีนบีไฮดราไซด์ (rhodamine B hydrazide; RhB-1)

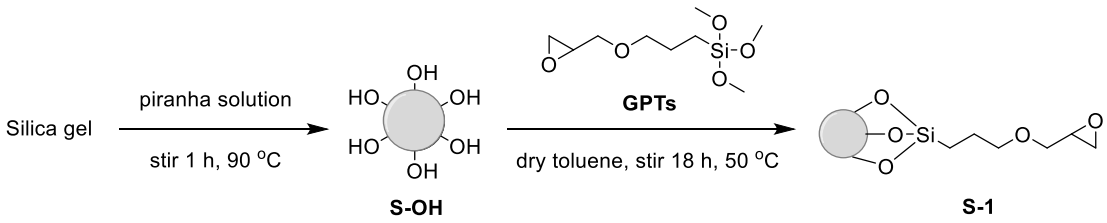


RhB-1

ภาพที่ 22 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์ rhodamine B hydrazide (**RhB-1**)

วิธีการสังเคราะห์โรดามีนบีไฮดราไซด์ (rhodamine B hydrazide; **RhB-1**) ได้ทำการสังเคราะห์ตามวิธีของ Kim และคณะ [21] ดังภาพที่ 22 โดยชั่งโรดามีนบี (rhodamine B; **RhB**) ปริมาณ 0.10 กรัม (2.08 มิลลิโมล) ใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 25 มิลลิลิตร จากนั้นละลายด้วยเอทานอลที่ปราศจากน้ำปริมาณ 6.00 มิลลิลิตร และเติม dry triethylamine ปริมาณ 0.50 มิลลิลิตร (3.61 มิลลิโมล) กวนปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศอาร์กอนที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมไฮดราซีน (hydrazine) ปริมาณ 0.20 มิลลิลิตร (4.12 มิลลิโมล) จากนั้นกวนปฏิกิริยาต่อพร้อมให้ความร้อนจนเกิดการ reflux ภายใต้บรรยากาศอาร์กอน เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาทิ้งให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง นำไปกรองและกำจัดเอทานอลออกด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้นเติมไดคลอโรมีเทนปริมาณ 20.0 มิลลิลิตร แล้วนำไปสกัดด้วยน้ำ DI ปริมาณ 30.0 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง เก็บสารละลายชั้นไดคลอโรมีเทน แล้วทำการเติม anh. Na_2SO_4 ลงไปปริมาณเล็กน้อย เพื่อกำจัดน้ำออก สุดท้ายกำจัดตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator จากนั้นแยกบริสุทธิ์สารที่ได้ด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนและเมทานอล (methanol; MeOH) ในอัตราส่วน 97:3 v/v สามารถแยกได้สาร **RhB-1** ที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีชมพูอ่อน ปริมาณ 390 มิลลิกรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเท่ากับ 77% โดยมีอัตราการเคลื่อนที่ของสารบนตัวดูดซับ (Retention factor; R_f) เท่ากับ 0.43

1.4 การปรับปรุงพื้นผิวของซิลิกาเจลให้เป็นซิลิกา S-1

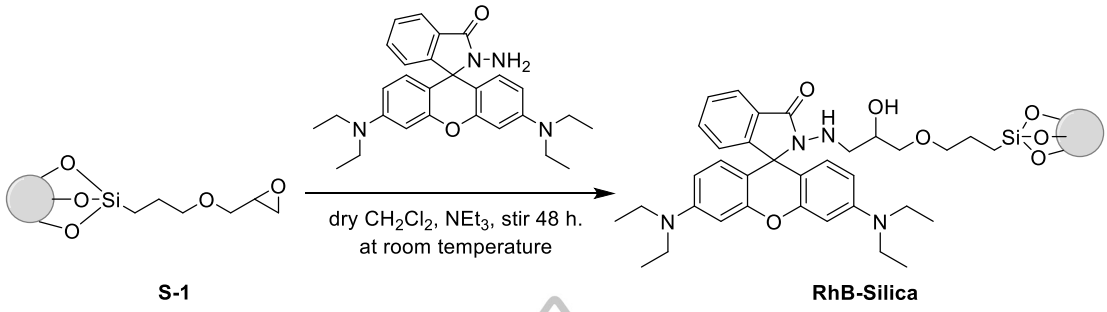


ภาพที่ 23 สมการแสดงการปรับปรุงพื้นผิวของซิลิกาเจลให้เป็น S-1

วิธีการเตรียมซิลิกาเจล ให้มีพื้นผิวเป็นซิลิกา S-1 เริ่มจากการทำความสะอาดพื้นผิวตามวิธีของ Sekar และคณะ [31] ดังภาพที่ 23 และกำจัดสารสารออร์แกนิกต่างๆ โดยนำซิลิกาเจลปริมาณ 10.0 กรัม ใส่ลงในสารละลายปิรันยา (piranha solution; 98% H_2SO_4: 30% H_2O_2 ปริมาตร 70:30 ปริมาตรโดยปริมาตร (v/v)) ปริมาณ 30.0 มิลลิลิตร ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นรอทิ้งไว้ให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง ตามด้วยล้างซิลิกาเจลด้วยน้ำ DI จนกระทั่งน้ำหลังจากการล้างซิลิกามีความเป็นกลาง กรองซิลิกาเจลโดยวิธีกรองแบบลดความดัน นำซิลิกาเจลที่กรองได้ไปอบที่อุณหภูมิประมาณ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลาหนึ่งคืน ได้ซิลิกา S-OH

จากนั้นนำซิลิกาเจลที่ผ่านกระบวนการทำความสะอาดพื้นผิว (ซิลิกา S-OH) ปริมาณ 5.00 กรัม ชั่งใส่ในขวดก้นกลม ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมโทลูอีนที่ปราศจากน้ำ (dry toluene) ปริมาณ 15.00 มิลลิลิตร เติม (3-glycidyloxypropyl)trimethoxysilane หรือที่เรียกว่า GPTs ปริมาณ 1.20 มิลลิลิตร (ปริมาณที่มากเกินพอ) จากนั้นกวนภายใต้บรรยากาศอาร์กอน ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาทิ้งไว้ให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง นำซิลิกาเจลที่ได้มากรองแบบลดความดัน ล้างด้วยโทลูอีนที่ปราศจากน้ำปริมาณ 20 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง ตามด้วยไดคลอโรมีเทนที่ปราศจากน้ำ (dry dichloromethane; dry CH_2Cl_2) ปริมาณ 20 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง สุดท้ายกำจัดไดคลอโรมีเทนและโทลูอีนที่ปราศจากน้ำออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator ได้ซิลิกา S-1 ที่มีลักษณะเป็นผงของแข็งสีขาว

1.5 **การสังเคราะห์เซ็นเซอร์** RhB-Silica



ภาพที่ 24 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์เซ็นเซอร์ RhB-Silica

วิธีการสังเคราะห์เซ็นเซอร์ RhB-Silica แสดงดังภาพที่ 24 โดยเริ่มจากการนำซิลิกาเจลที่ต่อกับ GPTs เรียบร้อยแล้ว (ซิลิกา S-1) ปริมาณ 5.0 กรัม ใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมไดคลอโรมีเทนที่ปราศจากน้ำปริมาณ 20 มิลลิลิตร ตามด้วยการเติม Rhodamine B hydrazide จำนวน 1.00 กรัม (2.03 มิลลิโมล) และ dry triethylamine ปริมาณ 0.30 มิลลิลิตร กวนปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศอาร์กอนที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นให้ความร้อนต่อจนอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่งโมง เมื่อครบกำหนดเวลาทิ้งไว้ให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง นำซิลิกาที่ได้ไปกรองแบบลดความดัน ล้างด้วยไดคลอโรมีเทนที่ปราศจากน้ำปริมาณ 20 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นนำซิลิกาเจลที่กรองได้ไปอบที่อุณหภูมิประมาณ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ได้ RhB-Silica

2. การทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจจับไอออนโลหะหนักของเซ็นเซอร์ monoRh6G และ diRh6G

การศึกษาคุณสมบัติในการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ ของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ monoRh6G และ diRh6G เริ่มต้นโดยตรวจสอบคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงอุลตร้าไวโอเลต (excitation spectrum) และการคายแสงฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ (emission spectrum) ของสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์แต่ละชนิดในสารละลายอินทรีย์แต่ละชนิด และสารละลายผสมที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ผสมกับน้ำ เพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์การดักจับไอออน เมื่อได้ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้ว ขั้นตอนต่อมา คือ การศึกษาประสิทธิภาพในการทำงานเกี่ยวกับการตรวจจับไอออนปรอท (Hg^{2+}) ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปี เพื่อหาความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) ความจำเพาะเจาะจงกับไอออนปรอท (selectivity) เปรียบเทียบ

กับไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ รวมทั้งนำไปศึกษาประสิทธิภาพในการตรวจจับไอออนปรอทในภาวะที่มีไอออนรบกวนอื่นๆ อัตราส่วนของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ต่อปริมาณไอออนปรอท (Job's plot) ค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออนปรอท (Association constant; K_{assoc}) และค่าประสิทธิภาพเชิงควอนตัมทางฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence quantum yield: Φ_f) นอกจากนี้เซ็นเซอร์ monoRh6G และ diRh6G ยังถูกนำไปศึกษาถึงโครงสร้างโมเลกุลหลังจากเกิดอันตรกิริยากับไอออนปรอทโดยการคำนวณ (molecular modeling) และศึกษาความสามารถในการนำกลับมาใช้ใหม่ (Reversibility study) ของเซ็นเซอร์ดังกล่าว

2.1 การทดสอบความไว (sensitivity)

การทดสอบความไวของเซ็นเซอร์ monoRh6G และ diRh6G ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปีนั้นจะทำการศึกษาสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายเซ็นเซอร์ที่เปลี่ยนไปเมื่อมีการเติมไอออนปรอทเพิ่มขึ้น โดยการปิเปตสารละลายเซ็นเซอร์ที่ถูกเตรียมขึ้น 3.0 มิลลิลิตร วัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้นก่อนการเติมไอออนปรอท จากนั้นจึงไตเตรตด้วยสารละลายปรอทที่เตรียมไว้ แล้ววัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้นภายหลังการเติมไอออนปรอทในแต่ละครั้ง โดยผลของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่วัดได้จะถูกนำไปใช้ในการหาค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออน (K_{assoc}) จากสมการ Benesi-Hildebrand [32-34]

ตามสมการ Benesi-Hildebrand;

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

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

A_0 = ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายเซ็นเซอร์เริ่มต้น

A = ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายเซ็นเซอร์หลังเติมไอออนที่ความเข้มข้นใดๆ

A_{max} = ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายเซ็นเซอร์มากที่สุด

n = จำนวนเต็มใดๆ เช่น 1, 2 และ 3

พบว่าค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออนคำนวณได้จากความชันของกราฟที่สร้างขึ้น ดังนี้

$$Slope = \frac{1}{K(A_{max} - A_0)}$$

$$K = \frac{1}{Slope(A_{max} - A_0)}$$

2.2.1 การเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์

เตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ monoRh6G และ diRh6G ให้มีความเข้มข้น 3.4×10^{-4} M และ 1.2×10^{-4} M ตามลำดับ ในสารละลาย acetonitrile ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายเซ็นเซอร์ monoRh6G และ diRh6G ด้วยวิธี serial dilution โดยให้ความเข้มข้นลดลงครั้งละ 10 เท่า จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 3.4×10^{-6} M และ 1.2×10^{-6} M ตามลำดับ ในสารละลาย acetonitrile ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

2.2.2 การเตรียมสารละลายปรอท

ในการทดสอบความไวของเซ็นเซอร์ monoRh6G และ diRh6G ในสารละลาย acetonitrile จะเตรียมสารละลายปรอทเปอร์คลอเรต ($Hg(ClO_4)_2$) เข้มข้น 1.0×10^{-2} M ใน acetonitrile ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายปรอท ด้วยวิธี serial dilution เช่นเดียวกับการเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ โดยให้ความเข้มข้นลดลงครั้งละ 10 เท่า จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0×10^{-4} M ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

2.2.3 การทดสอบ

สารละลายเซ็นเซอร์ monoRh6G และ diRh6G ที่เตรียมสำหรับวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้น เมื่อมีการไตเตรตสารละลายปรอท โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการทดสอบแสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ สำหรับการทดสอบความไวของเซ็นเซอร์ monoRh6G และ diRh6G

ค่าพารามิเตอร์	monoRh6G และ diRh6G ในสารละลาย acetonitrile
λ_{ex} (nm)	529
Scan speed (nm/min)	300
Slit width (nm)	5.0
ช่วงความยาวคลื่นที่ศึกษา (nm)	530-600

2.2 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (selectivity)

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเซ็นเซอร์ monoRh6G และ diRh6G นั้น ได้ศึกษาด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปี โดยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์จากการไตเตรตด้วยสารละลายปรอทลงในสารละลายเซ็นเซอร์ที่ถูกเตรียมขึ้น 3.0 มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้นจากการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนอื่นๆ ลงในสารละลายเซ็นเซอร์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ระหว่างการไตเตรตด้วยสารละลายปรอทและการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนรบกวนอื่นๆ

2.1.1 การเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์

เตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ monoRh6G และ diRh6G ให้มีความเข้มข้น 3.4×10^{-4} M และ 1.2×10^{-4} M ตามลำดับ ในสารละลาย acetonitrile ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายเซ็นเซอร์ monoRh6G และ diRh6G ด้วยวิธี serial dilution โดยให้ความเข้มข้นลดลงครั้งละ 10 เท่า จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 3.4×10^{-6} M และ 1.2×10^{-6} M ตามลำดับ ในสารละลาย acetonitrile ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

2.1.2 การเตรียมสารละลายปรอทและไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ

ในการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเซ็นเซอร์ monoRh6G และ diRh6G ในสารละลาย acetonitrile ทำการเตรียมสารละลายปรอทและไอออนเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ ใน acetonitrile ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายปรอทและไอออนเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ ด้วยวิธี serial dilution เช่นเดียวกับการเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ โดยให้ความ

เข้มข้นลดลงครั้งละ 10 เท่า จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ $1.0x10^{-4}$ M ปริมาตร 10 มิลลิลิตร สำหรับการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเซ็นเซอร์ monoRh6G และ diRh6G

ไอออนที่ใช้ในการทดสอบ

ไอออนปรอท (Hg^{2+}) ไอออนเงิน (Ag^{+}) ไอออนลิเธียม (Li^{+}) ไอออนแบเรียม (Ba^{2+}) ไอออนแคลเซียม (Ca^{2+}) ไอออนแคดเมียม (Cd^{2+}) ไอออนโคบอลต์ (Co^{2+}) ไอออนทองแดง (Cu^{2+}) ไอออนเหล็ก (Fe^{3+}) ไอออนโพแทสเซียม (K^{+}) ไอออนสังกะสี (Zn^{2+}) ไอออนแมงกานีส (Mn^{2+}) ไอออนโซเดียม (Na^{+}) ไอออนนิกเกิล (Ni^{2+}) และไอออนตะกั่ว (Pb^{2+})

2.1.3 การทดสอบ

นำสารละลายเซ็นเซอร์ที่เตรียมไว้ นำไปวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้น โดยเปรียบเทียบระหว่างการไตเตรตสารละลายปรอท กับการไตเตรตสารละลายไอออนเกลือคลอไรด์ชนิดต่างๆ โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการทดสอบดังแสดงตามตารางที่ 2

2.3 การทดสอบความสามารถในการตรวจจับไอออนปรอทในภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ (competitive)

การทดสอบความสามารถในการตรวจจับไอออนปรอท ในภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปี โดยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายเซ็นเซอร์ ในขณะก่อนและหลังเติมสารละลายปรอทลงในสารละลายเซ็นเซอร์ที่ถูกเตรียมขึ้น ปริมาณ 3.0 มิลลิลิตร จนสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ชัดเจนที่ความเข้มค่าหนึ่ง จากนั้นเติมสารละลายไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ในปริมาณ 1 เท่า และ 10 เท่า ของสารละลายปรอทที่เติมลงไป และวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ภายหลังการเติมไอออนรบกวนอื่นๆ อีกครั้ง

2.3.1 การเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์

สารละลายเซ็นเซอร์ monoRh6G และ diRh6G จะเตรียมขึ้นในลักษณะเช่นเดียวกับการทดสอบความไวและความจำเพาะเจาะจง โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นและความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากัน แต่การทดสอบความสามารถในการตรวจจับไอออนปรอทในภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ จะเจือจางความเข้มข้นสุดท้ายในปริมาณ 10 มิลลิลิตร เช่นเดียวกับการทดสอบความจำเพาะเจาะจง

2.3.2 การเตรียมสารละลายปรอทและไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ

สารละลายปรอท และไอออนเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการทดสอบ จะเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมเพื่อใช้ในการทดสอบความไวและความจำเพาะเจาะจง

2.3.3 การทดสอบ

นำสารละลายเซ็นเซอร์ ที่เตรียมขึ้นไปวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้น เมื่อมีการเติมสารละลายปรอทและสารละลายไอออนเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ ลงในสารละลายเซ็นเซอร์ โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการทดสอบตามตารางที่ 2 จากนั้นสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า I_F/I_0 ที่ความยาวคลื่นที่ความเข้มมากที่สุด ในแนวแกน y และชนิดของสารต่างๆ ในแนวแกน x เมื่อกำหนดให้

I_0 = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายก่อนเติมไอออน

I_F = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายหลังเติมไอออน

2.4 การหาอัตราส่วนการเกิดสารเชิงซ้อนโดยวิธีการของ Job (Job's plot)

การหาอัตราส่วนการเกิดสารเชิงซ้อนวิธีการของ Job ได้ศึกษาด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปี โดยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ในระบบที่มีเศษส่วนโมล (mole fraction) หรืออัตราส่วนระหว่างจำนวนโมลของเซ็นเซอร์แต่ละชนิดต่อจำนวนโมลไอออนปรอทในอัตราส่วนต่างๆ

2.4.1 การหาอัตราส่วนการเกิดสารเชิงซ้อนของเซ็นเซอร์

การหาอัตราส่วนการเกิดสารเชิงซ้อนของเซ็นเซอร์ monoRh6G สามารถทำได้โดยผสมสารละลายเซ็นเซอร์ใน acetonitrile เข้มข้น 1.04×10^{-5} M และสารละลายปรอทเปอร์คลอเรตใน acetonitrile เข้มข้น 1.04×10^{-3} M ในขวดปริมาตร 10 มิลลิลิตร ด้วยอัตราส่วนดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การหาอัตราส่วนการเกิดสารเชิงซ้อนของเซ็นเซอร์

ขวดที่	Mole fraction sensor	monoRh6G (mL)	Hg^{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

โดยแต่ละขวดปรับจนมีปริมาตรรวม 10 มิลลิลิตร ด้วย acetonitrile แล้วนำไปวัดสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ จากนั้นสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่ความยาวคลื่น 545 nm ในแนวแกน y และเศษส่วนโมลในแนว แกน x เพื่อหาอัตราส่วนระหว่างเซ็นเซอร์ต่อไอออนปรอทที่สามารถแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ได้มากที่สุด

2.5 การหาค่าประสิทธิภาพเชิงควอนตัมทางฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence quantum yield)

การหาค่าประสิทธิภาพเชิงควอนตัมทางฟลูออเรสเซนต์ของเซ็นเซอร์แต่ละชนิด เป็นการหาอัตราส่วนของจำนวนโฟตอนที่ถูกคายออกมาต่อจำนวนโฟตอนที่ถูกดูดกลืน โดยสารที่เกิดการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ได้มากจะมีค่าเข้าใกล้ 1 โดยคำนวณหาได้ตามสมการที่แสดงดังต่อไปนี้

$$\frac{\Phi_x}{\Phi_s} = \left(\frac{Grad_x}{Grad_s}\right)\left(\frac{\eta_x^2}{\eta_s^2}\right)$$

เมื่อ Φ_x = quantum yield ของสารตัวอย่าง

Φ_s = quantum yield ของสารมาตรฐาน

$Grad_x$ = ค่าความชันจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนต์กับการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

$Grad_s$ = ค่าความชันจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนต์กับการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน

η_x = refractive index ของตัวทำละลายสารตัวอย่าง

η_s = refractive index ของตัวทำละลายสารมาตรฐาน

2.5.1 การเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์และสารละลายปรอท

สารละลายเซ็นเซอร์ monoRh6G และ diRh6G และสารละลายปรอทเปอร์คลอเรตเตรียมขึ้นในลักษณะเดียวกับการทดสอบความไว โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นและความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากัน

2.5.2 การเตรียมสารละลายอ้างอิง

การหาค่าประสิทธิภาพเชิงควอนตัมทางฟลูออเรสเซนต์ของเซ็นเซอร์ monoRh6G และ diRh6G จะคำนวณหาโดยใช้สารละลายโรดามีนบีซิกจี (rhodamine 6G) [35] เป็นสารอ้างอิง

2.5.3 การทดสอบ

นำสารละลายเซ็นเซอร์ monoRh6G และ diRh6G ปริมาณ 3 มิลลิลิตร เติมสารละลายไอออนปรอทเทียบกับความเข้มข้นของเซ็นเซอร์และวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการทดสอบตามตารางที่ 2

จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 529 nm และค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ที่ความยาวคลื่น 545 nm (λ_{ex} = 529 nm) วัดซ้ำ 5 ครั้ง โดยแต่ละครั้งเจือจางสารละลายดังกล่าวครั้งละ 2/3 เท่า แล้วนำค่าการดูดกลืนและค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ที่วัดได้ สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ในแนวแกน y และค่าการดูดกลืนแสงในแนวแกน x จากนั้นทำการทดลองซ้ำโดยเปลี่ยนสารละลายเซ็นเซอร์เป็นสารละลายอ้างอิงที่

ไม่มีไอออนปรอท แล้วคำนวณหาค่าประสิทธิภาพเชิงควอนตัมทางฟลูออเรสเซนต์ตามสมการข้างต้น เมื่อ

เซ็นเซอร์ monoRh6G และ diRh6G

Φ_s quantum yield ของโรดามีนบีซิกจีเท่ากับ 0.94

η_x refractive index ของ acetonitrile เท่ากับ 1.346

η_s refractive index ของ ethanol เท่ากับ 1.360

3. การทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจจับไอออนโลหะหนักของเซ็นเซอร์ RhB-Silica

การศึกษาประสิทธิภาพของเซ็นเซอร์ RhB-Silica ที่สังเคราะห์ได้ ทำโดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีของเซ็นเซอร์ RhB-Silica ในน้ำที่ไม่มีไอออนปรอทรบกวน และในน้ำที่มีไอออนปรอทที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน สังเกตแนวโน้มของสีของเซ็นเซอร์ RhB-Silica ที่เปลี่ยนแปลงไป

3.1 การทดสอบความไว (sensitivity)

การทดสอบความไวของเซ็นเซอร์ RhB-Silica นั้น ได้ทำการศึกษาสีของเซ็นเซอร์ที่เปลี่ยนแปลงไป ในน้ำที่มีการเติมไอออนปรอทที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยเตรียมสารละลายปรอทที่ความเข้มข้นต่างๆ ในหลอดทดลอง หลอดละ 2.00 มิลลิลิตร จากนั้นใส่เซ็นเซอร์ RhB-Silica ลงไป คนสารละลายและเซ็นเซอร์ RhB-Silica ให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ให้เซ็นเซอร์ RhB-Silica ที่มีลักษณะเป็นผงของแข็งตกตะกอนลงมาที่ก้นหลอด ดูดในส่วนของสารละลายปรอทเหนือผงของแข็งทิ้งไป สังเกตสีของเซ็นเซอร์ที่เกิดขึ้น จากนั้นถ่ายรูปเพื่อบันทึกผล

3.1.1 การเตรียมเซ็นเซอร์

เตรียมเซ็นเซอร์ RhB-Silica ใส่หลอดทดลองหลอดละ 100 mg

3.1.2 การเตรียมสารละลายปรอท

ในการทดสอบความไวของเซ็นเซอร์ RhB-Silica จะเตรียมสารละลายปรอทอะซิเตรตเข้มข้น 1000 ppm ในน้ำ DI จากนั้นเจือจางสารละลายปรอท 500, 200, 100, 80, 60, 40, 30, 20, 10 ppm ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

3.2 **การทดสอบความจำเพาะเจาะจง** (selectivity)

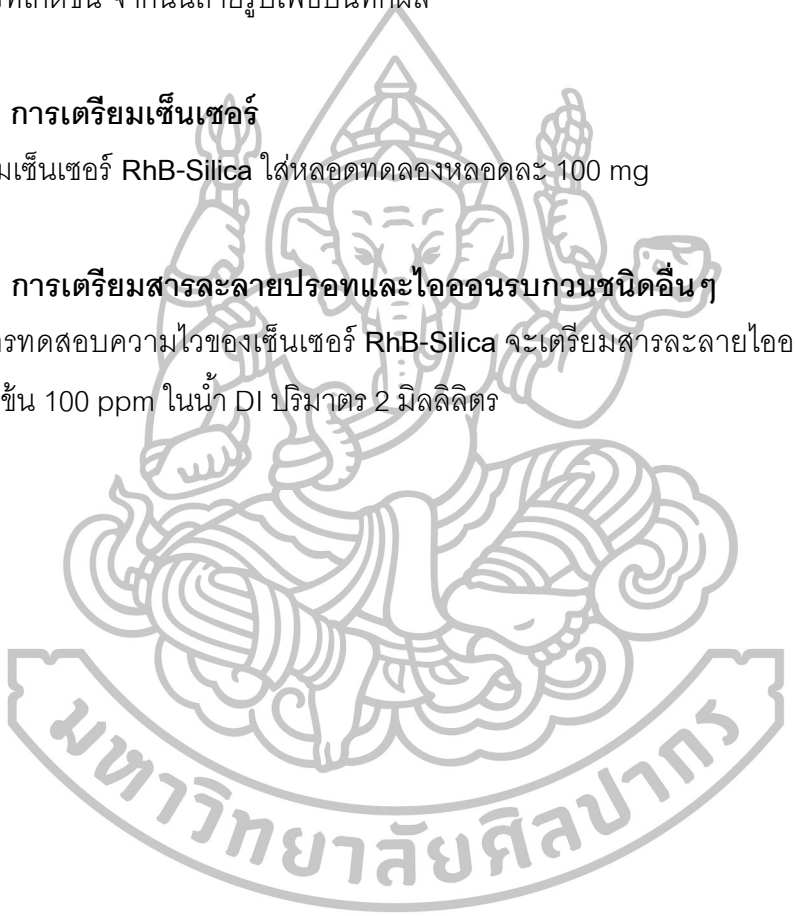
การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเซ็นเซอร์ RhB-Silica นั้น ได้ทำการศึกษาสีของเซ็นเซอร์ที่เปลี่ยนแปลงไป ในน้ำที่มีการเติมไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ เปรียบเทียบที่มีการเติมไอออนปรอทที่ความเข้มข้นเท่ากัน จากนั้นใส่เซ็นเซอร์ RhB-Silica ลงไป คนสารละลายและเซ็นเซอร์ RhB-Silica ให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ให้เซ็นเซอร์ RhB-Silica ที่มีลักษณะเป็นผงของแข็งตกตะกอนลงมาที่ก้นหลอด ดูดในส่วนของสารละลายปรอทเหนือผงของแข็งทิ้งไป สังเกตสีของเซ็นเซอร์ที่เกิดขึ้น จากนั้นถ่ายรูปเพื่อบันทึกผล

3.1.1 **การเตรียมเซ็นเซอร์**

เตรียมเซ็นเซอร์ RhB-Silica ใส่หลอดทดลองหลอดละ 100 mg

3.2.1 **การเตรียมสารละลายปรอทและไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ**

ในการทดสอบความไวของเซ็นเซอร์ RhB-Silica จะเตรียมสารละลายไอออนชนิดต่างๆ ให้มีความเข้มข้น 100 ppm ในน้ำ DI ปริมาตร 2 มิลลิลิตร



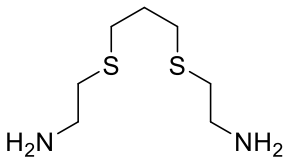
บทที่ 5
ผลการดำเนินงานวิจัย

เมื่อทำการสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดใหม่ 3 ชนิด ซึ่งได้แก่ **monoRh6G**, **diRh6G** และ **RhB-Silica** มาได้ จากนั้นนำมาศึกษาเพื่อยืนยันโครงสร้างของเซ็นเซอร์ด้วยเทคนิค nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) และ high resolution mass spectroscopy (HR-ESI MS) หลังจากทำการยืนยันโครงสร้างเป็นที่เรียบร้อย เซ็นเซอร์ **monoRh6G** และ **diRh6G** จะถูกนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจจับไอออนปรอทในสารละลาย acetonitrile ในงานวิจัยนี้มีการพัฒนานำเอาเซ็นเซอร์ต่อลงบนตัวกลางที่เป็นของแข็งเพื่อให้สะดวกต่อการใช้งานมากยิ่งขึ้น ซึ่งก็คือเซ็นเซอร์ **RhB-Silica** โดยการนำเอา rhodamine B hydrazide ต่อลงบนซิลิกาเจล (Silica gel) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวกลางที่เป็นของแข็ง ทำการยืนยันโครงสร้างของเซ็นเซอร์ด้วยเทคนิค scanning electron microscopy (SEM), differential thermogravimetry analysis (DTG), differential scanning calorimetry (DSC) และ Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) ได้ผลการทดลองดังนี้

1. การยืนยันโครงสร้าง

จากผลการสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์แต่ละชนิดตามวิธีการทดลองที่ได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น พบว่าได้ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์สำหรับตรวจจับไอออนโลหะหนักชนิดใหม่ 2 ชนิด ซึ่งสามารถวิเคราะห์และยืนยันโครงสร้างของสารที่สังเคราะห์ได้แต่ละขั้นด้วยวิธีทางสเปกโทรสโกปีดังนี้

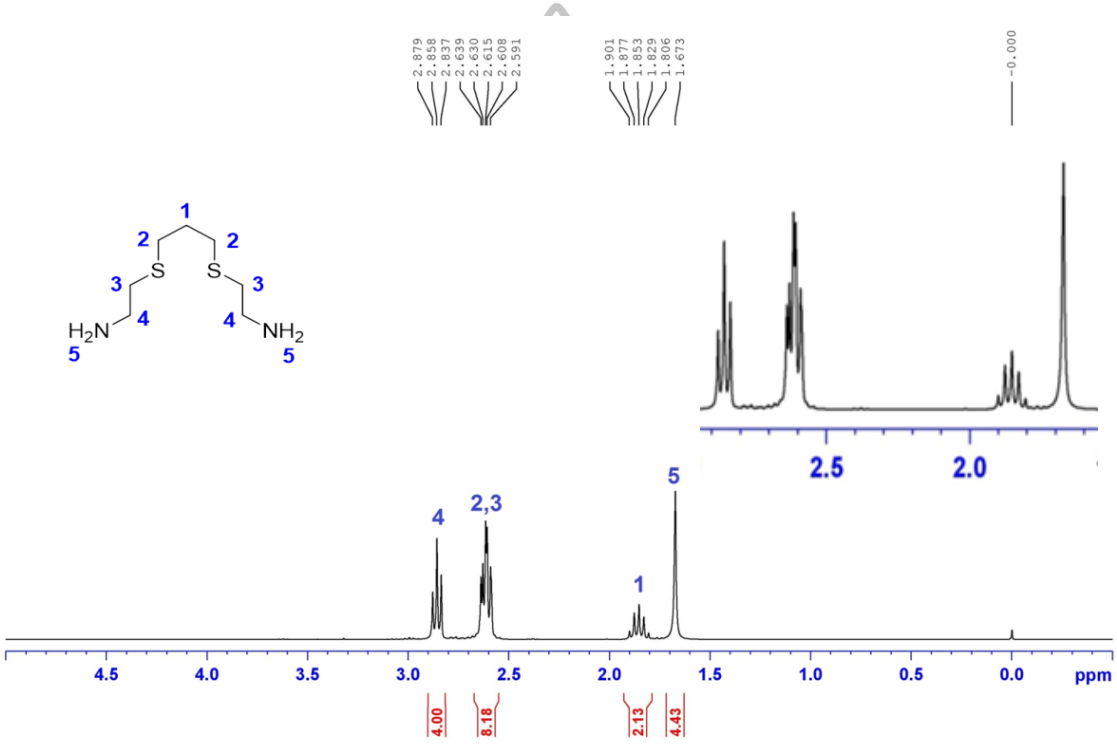
1.1 โครงสร้างของ 2-(3-(2-aminoethylthio)propylthio)ethanamine (I-1)



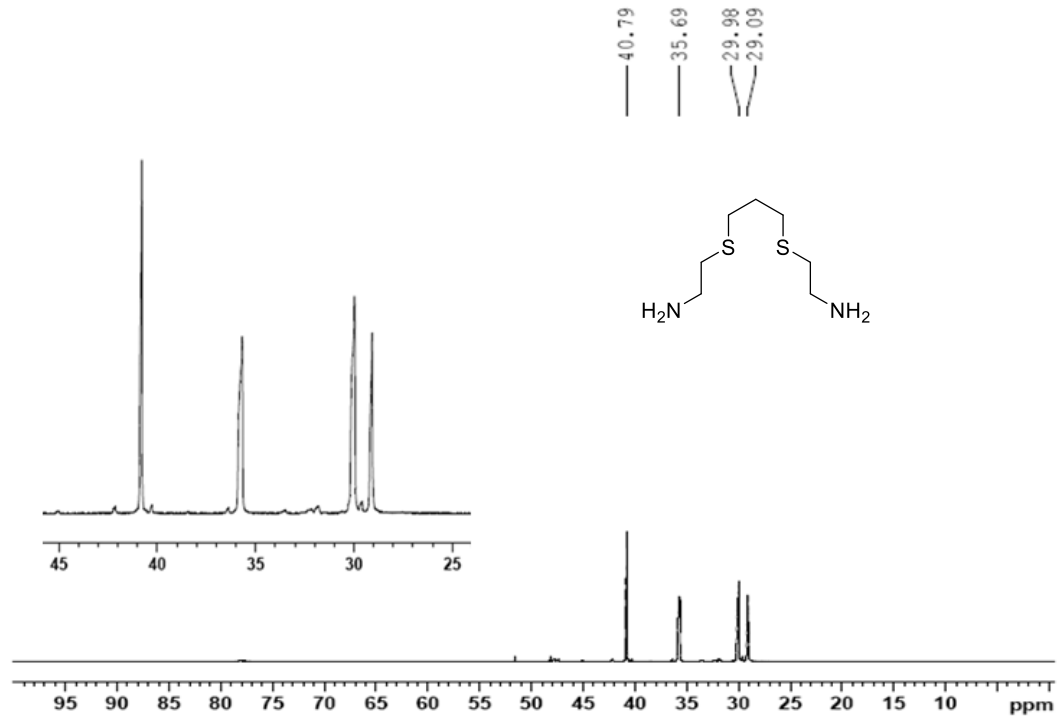
ภาพที่ 25 โครงสร้างทางเคมีของ 2-(3-(2-aminoethylthio)propylthio)ethanamine (**I-1**)

จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของ 2-(3-(2-aminoethylthio)propylthio)ethanamine (**I-1**) โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีสามารถยืนยันโครงสร้างได้ดังนี้

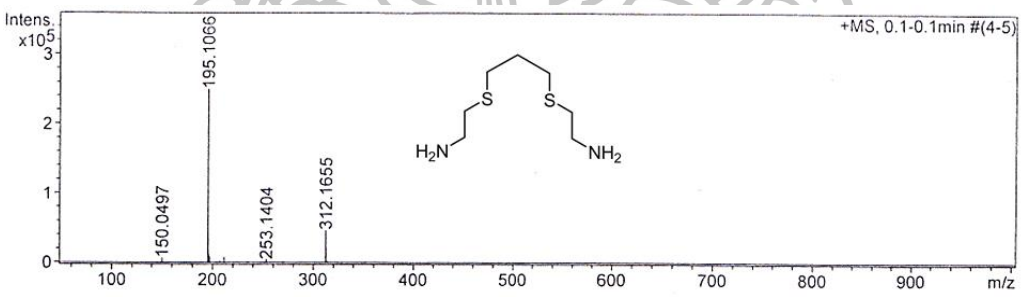
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 1.67 (br-s, 4H), 1.85 (quintet, J = 7.1 Hz, 2H), 2.59-2.63 (m, 8H), 2.86 (t, J = 6.3 Hz, 4H) ppm (ภาพที่ 26).; ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 29.4 (CH_2), 30.6 ($2CH_2$), 36.1 ($2CH_2$), 40.9 ($2CH_2$) ppm (ภาพที่ 27).; จากการคำนวณ $C_7H_{19}N_2S_2^+$ $(M+H)^+$ 195.0990 m/z จากการทดสอบ 195.1066 m/z (ภาพที่ 28).



ภาพที่ 26 ^{1}H NMR สเปกตรัมของ 2-(3-(2-aminoethylthio)propylthio)ethanamine (**I-1**)

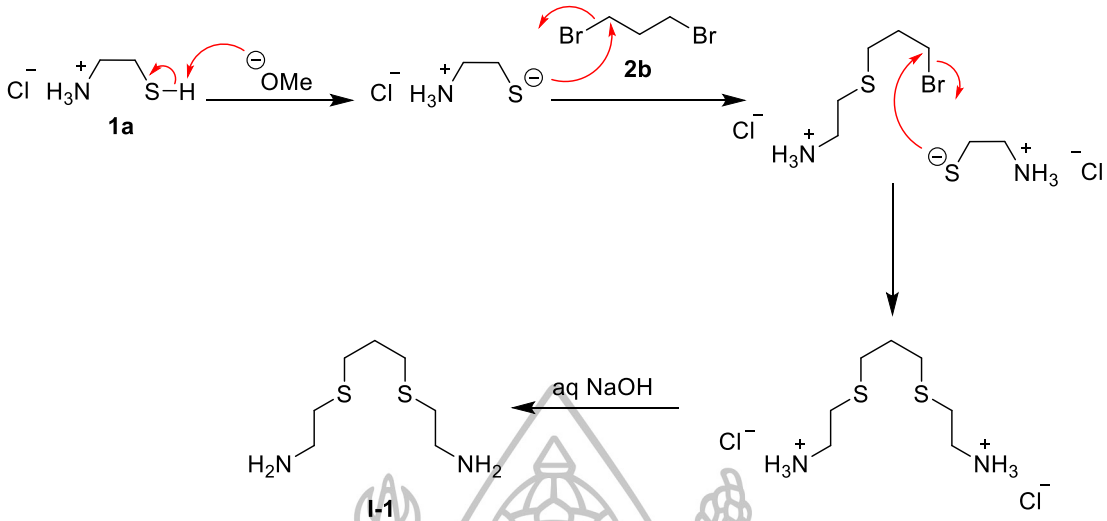


ภาพที่ 27 ^{13}C NMR สเปกตรัมของ 2-(3-(2-aminoethylthio)propylthio)ethanamine (**I-1**)



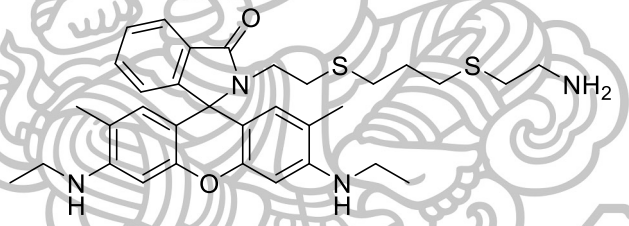
ภาพที่ 28 HR-ESI MS สเปกตรัมของ 2-(3-(2-aminoethylthio)propylthio)ethanamine (**I-1**)

จากผล ^{1}H NMR สเปกตรัม, ^{13}C NMR สเปกตรัม สามารถยืนยันการเกิดสารประกอบของโครงสร้าง 2-(3-(2-aminoethylthio)propylthio)ethanamine (**I-1**) นอกจากนี้ ยังสามารถยืนยันโครงสร้างจาก HR-ESI MS ได้ผลเท่ากับ 195.1066 m/z ซึ่งมีค่าใกล้เคียงจากการคำนวณ $C_7H_{19}N_2S_2^+$ $(M+H)^+$ มีค่าเท่ากับ 195.0990 m/z จึงยืนยันได้ว่าได้สาร 2-(3-(2-aminoethylthio) propylthio)ethanamine (**I-1**) เกิดขึ้นจริงจากการสังเคราะห์และมีความบริสุทธิ์ โดยสามารถเสนอกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังภาพที่ 29



ภาพที่ 29 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของสารประกอบ 2-(3-(2-aminoethylthio)propylthio) ethanamine (**I-1**)

1.2 โครงสร้างของเซ็นเซอร์ monoRh6G

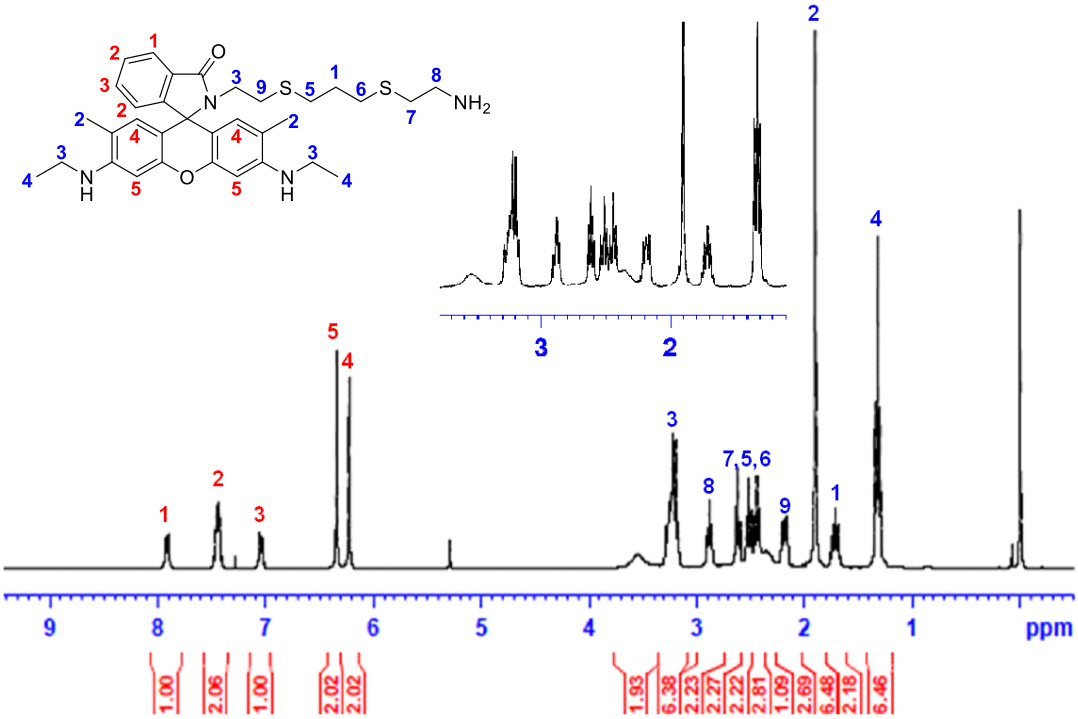


ภาพที่ 30 โครงสร้างทางเคมีของเซ็นเซอร์ monoRh6G

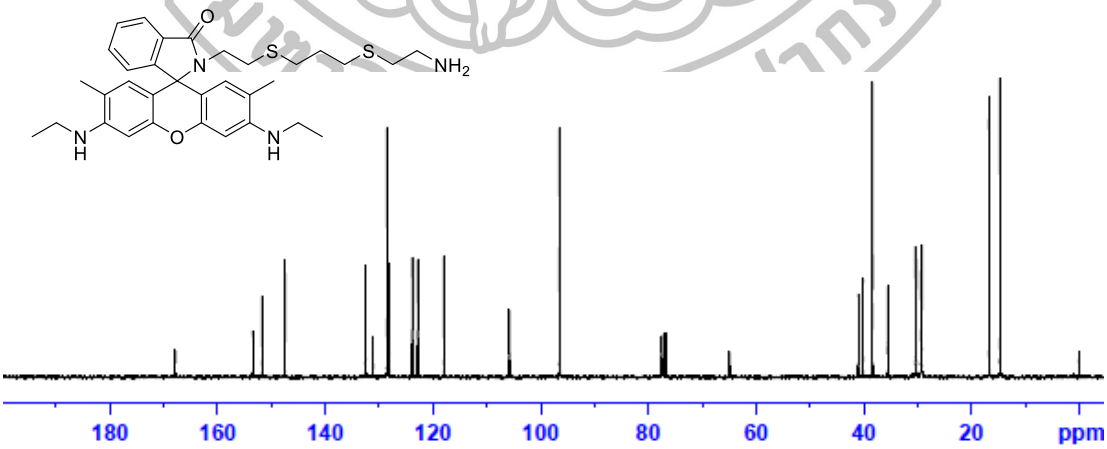
จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของเซ็นเซอร์ monoRh6G โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปี สามารถยืนยันโครงสร้างได้ดังนี้

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 1.32 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H), 1.71 (quintet, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.90 (s, 6H), 2.17–2.21 (m, 2H), 2.36 (s, NH_2), 2.44 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.52 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.62 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.88 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.17–3.29 (m, 6H), 3.54 (s, 2H, NH_2), 6.23 (s, 2H), 6.34 (s, 2H), 7.02–7.06 (m, 1H), 7.41–7.48 (m, 2H), 7.90–7.93 (m, 1H) ppm (ภาพที่ 31).; ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ14.7 ($2CH_3$), 16.7 ($2CH_3$), 29.2 (CH_2), 29.4 (CH_2), 30.3 (CH_2), 30.4 (CH_2), 35.5 (CH_2), 38.4 ($2CH_2$), 40.1 (CH_2), 40.9 (CH_2), 64.9 (C), 96.5 (2CH), 105.8 (2C), 118.0 (2C), 122.8 (CH), 123.8 (CH), 128.1 (CH), 128.5

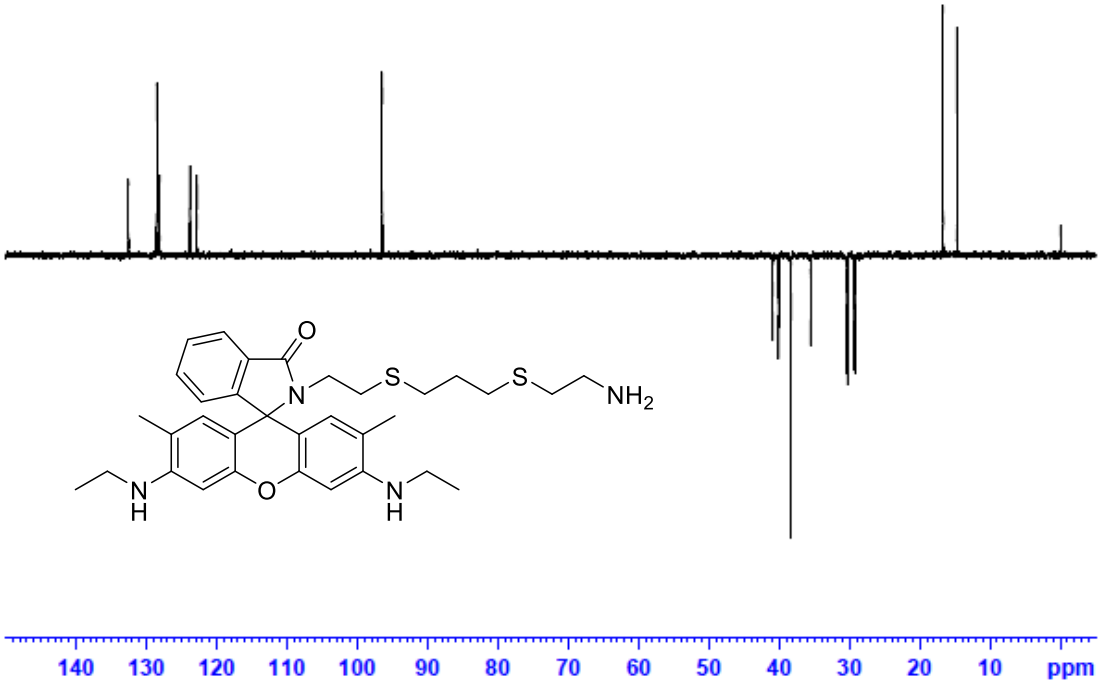
(2CH), 131.1 (C), 132.5 (CH), 147.5 (2C), 151.7 (2C), 153.4 (C), 167.8 (C=O) ppm (ภาพที่ 32-33).; จากการคำนวณ $C_{33}H_{43}N_4O_2S_2^+$ $(M+H)^+$ 591.2827 m/z จากการทดสอบ 591.2824 m/z (ภาพที่ 34).



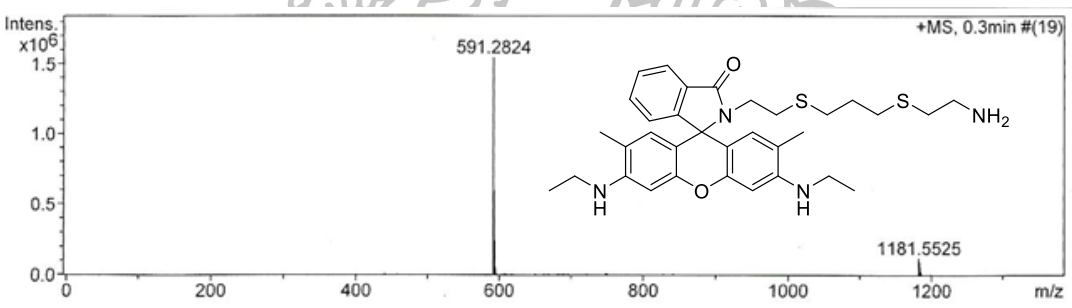
ภาพที่ 31 ^{1}H NMR สเปกตรัมของเซ็นเซอร์ monoRh6G



ภาพที่ 32 ^{13}C NMR สเปกตรัมของเซ็นเซอร์ monoRh6G

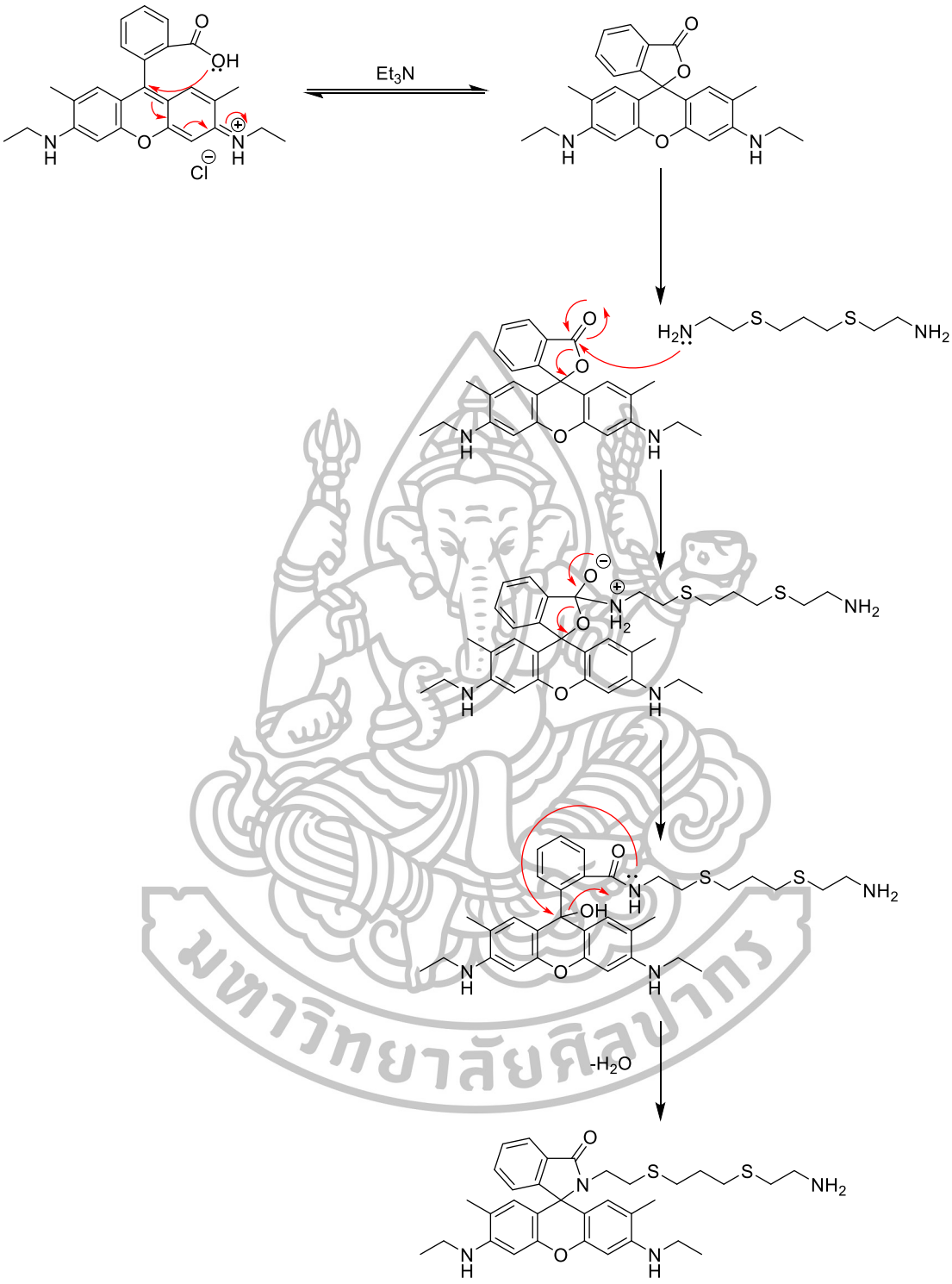


ภาพที่ 33 ^{13}C DEPT 135 NMR สเปกตรัมของเซ็นเซอร์ monoRh6G



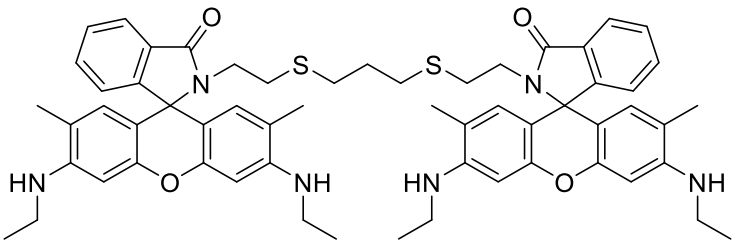
ภาพที่ 34 HR-ESI MS สเปกตรัมของเซ็นเซอร์ monoRh6G

จากผล ^{1}H NMR สเปกตรัม, ^{13}C NMR สเปกตรัม และ ^{13}C DEPT 135 สเปกตรัม สามารถยืนยันการเกิดสารประกอบเซ็นเซอร์ monoRh6G นอกจากนี้ ยังสามารถยืนยันโครงสร้างจาก HR-ESI MS ได้ผลเท่ากับ 591.2824 m/z ซึ่งมีค่าใกล้เคียงจากการคำนวณ $C_7H_{19}N_2S_2^+$ $(M+H)^+$ มีค่าเท่ากับ 591.2827 m/z จึงยืนยันได้ว่าได้สาร monoRh6G เกิดขึ้นจริงจากการสังเคราะห์และมีความบริสุทธิ์ โดยสามารถเสนอกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังภาพที่ 35



ภาพที่ 35 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของสารประกอบเซ็นเซอร์ monoRh6G

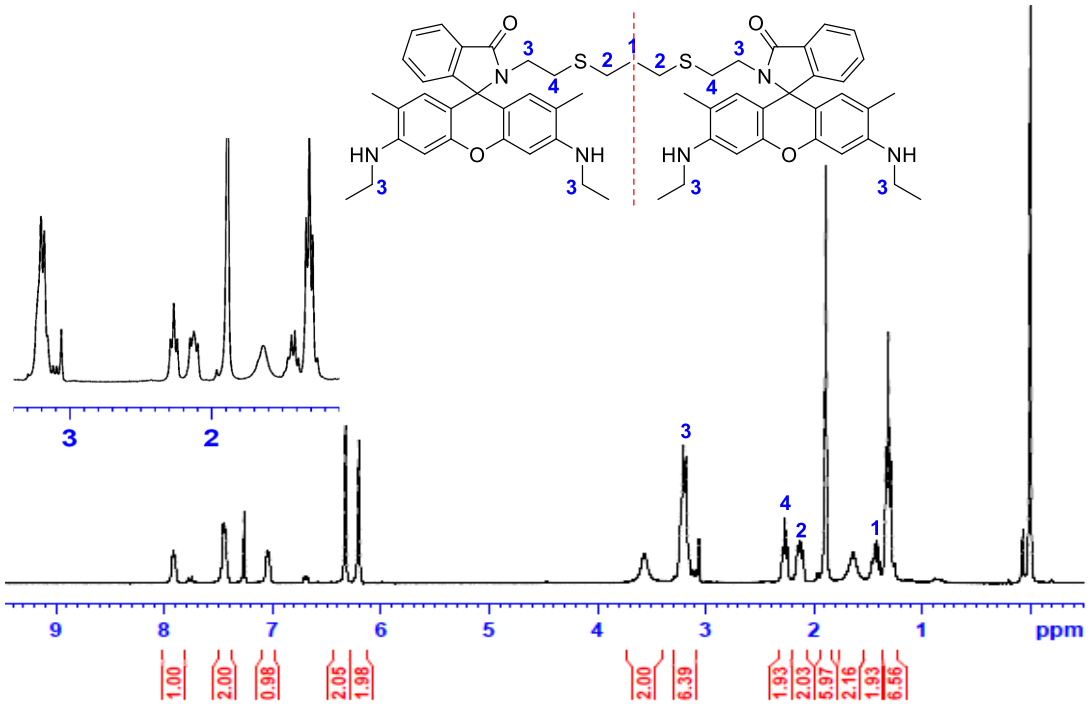
1.3 **โครงสร้างของเซ็นเซอร์** diRh6G



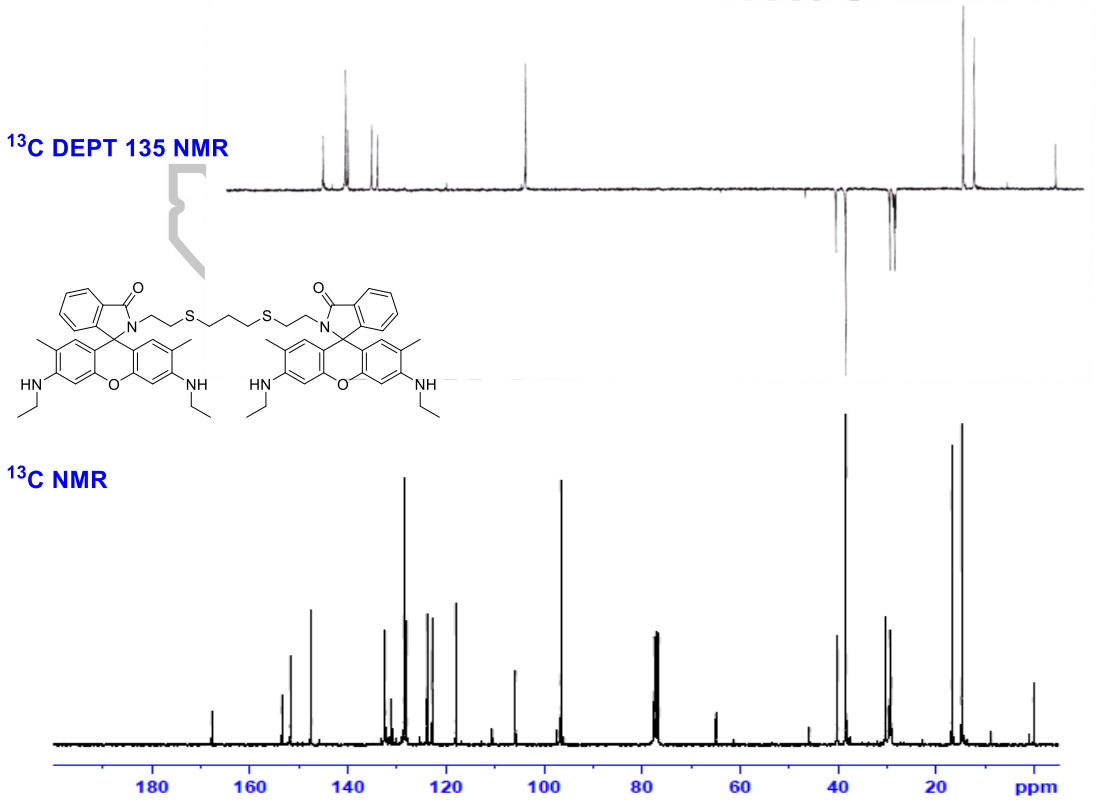
ภาพที่ 36 โครงสร้างทางเคมีของเซ็นเซอร์ diRh6G

จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของของเซ็นเซอร์ diRh6G โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปี สามารถยืนยันโครงสร้างได้ดังนี้

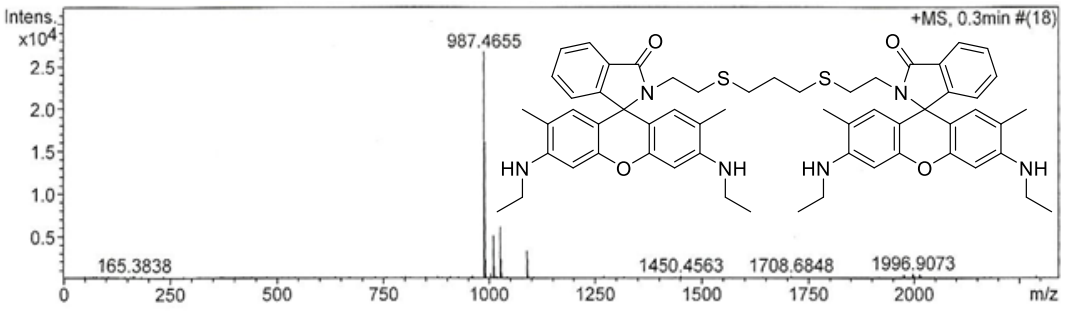
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 1.31 (t, *J* = 7.2 Hz, 12H), 1.39–1.46 (m, 2H), 1.89 (s, 12H), 2.13 (t, *J* = 7.8 Hz, 4H), 2.27 (t, *J* = 7.2 Hz, 4H), 3.16–3.20 (m, 12H), 3.56 (s, 4NH), 6.20 (s, 4H), 6.33 (s, 4H), 7.03–7.06 (m, 2H), 7.43–7.46 (m, 4H), 7.90–7.93 (m, 2H) ppm (ภาพที่ 37).; ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 14.7 ($4CH_3$), 16.7 ($4CH_3$), 29.4 ($2CH_2$), 30.3 ($2CH_2$), 38.4 ($4CH_2$), 40.2 ($2CH_2$), 45.9 (CH_2), 64.9 (2C), 96.5 (4CH), 105.9 (4C), 118.0 (4C), 122.8 (2CH), 123.8 (2CH), 128.5 (2CH), 128.8 (4CH), 131.3 (2C), 132.2 (2CH), 147.5 (4C), 151.8 (4C), 153.5 (2C), 167.8 (2C=O) ppm (ภาพที่ 38).; จากการคำนวณ $C_{59}H_{67}N_6O_4S_2^+$ $(M+H)^+$ 987.4665 m/z จากการทดสอบ 987.4655 m/z (ภาพที่ 39).



ภาพที่ 37 ^{1}H NMR สเปกตรัมของเซ็นเซอร์ diRh6G



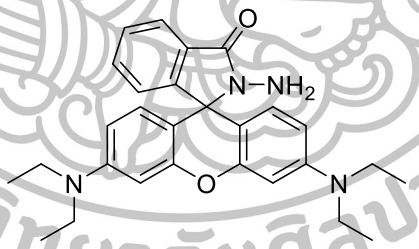
ภาพที่ 38 ^{13}C DEPT135 NMR สเปกตรัมและ ^{13}C NMR สเปกตรัมของเซ็นเซอร์ diRh6G



ภาพที่ 39 HR-ESI MS สเปกตรัมของเซ็นเซอร์ diRh6G

จากผล ^{1}H NMR สเปกตรัม, ^{13}C NMR สเปกตรัม และ ^{13}C DEPT 135 สเปกตรัม สามารถยืนยันการเกิดสารประกอบเซ็นเซอร์ diRh6G นอกจากนี้ ยังสามารถยืนยันโครงสร้างจาก HR-ESI MS ได้ผลเท่ากับ 591.2824 m/z ซึ่งมีค่าใกล้เคียงจากการคำนวณ $C_7H_{19}N_2S_2^+$ $(M+H)^+$ มีค่าเท่ากับ 591.2827 m/z จึงยืนยันได้ว่าได้สาร diRh6G เกิดขึ้นจริงจากการสังเคราะห์และมีความบริสุทธิ์ โดยกลไกการเกิดปฏิกิริยามีลักษณะเช่นเดียวกับกลไกการเกิดปฏิกิริยาของเซ็นเซอร์ monoRh6G แต่ในเซ็นเซอร์ diRh6G จะเกิดปฏิกิริยาทั้งสองข้าง

1.4 โครงสร้างของ โรดามีนบีไฮดราไซด์ (rhodamine B hydrazide; RhB-1)

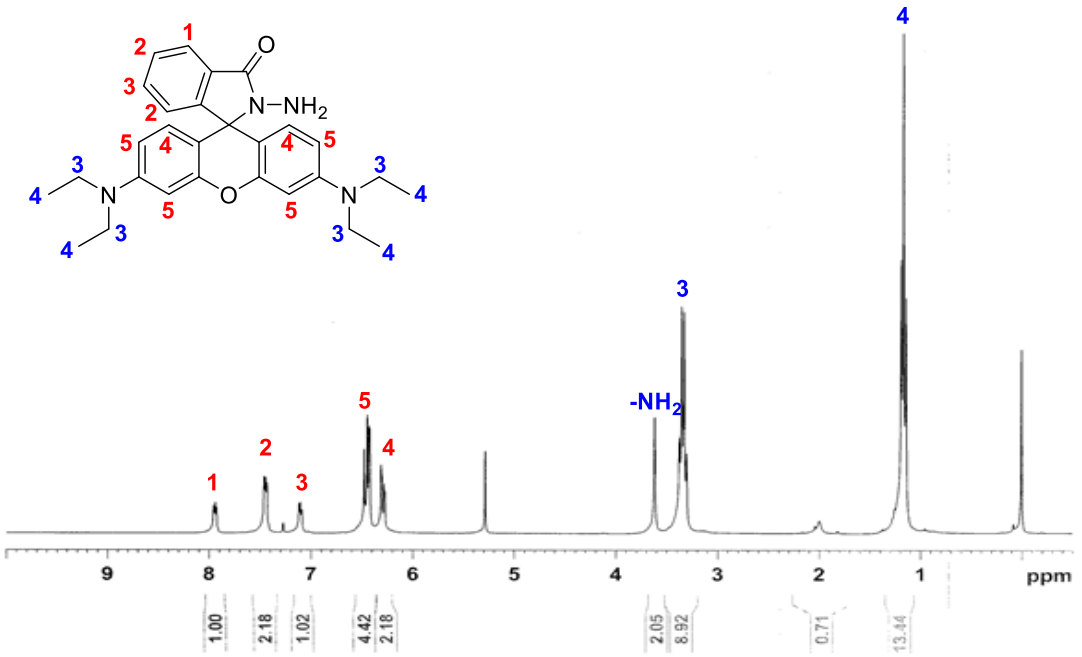


ภาพที่ 40 โครงสร้างทางเคมีของโรดามีนบีไฮดราไซด์ (RhB-1)

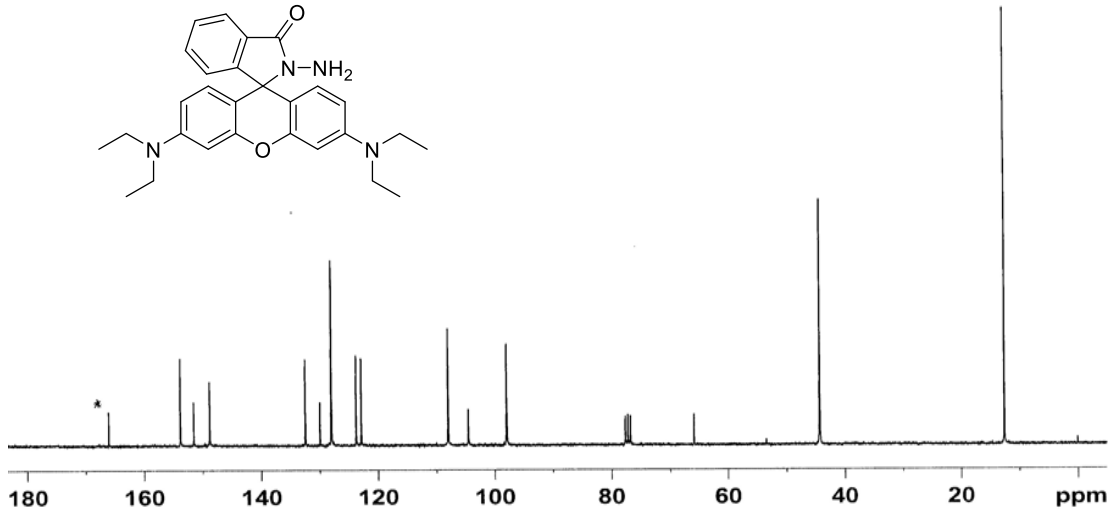
จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของโรดามีนบีไฮดราไซด์ (RhB-1) โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีสามารถยืนยันโครงสร้างได้ดังนี้

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 1.16 (t, J = 7.1 Hz, 12H), 3.32 (q, J = 7.0 Hz, 8H), 3.62 (br s, 2H, NH_2), 6.27 (dd, J_1 = 8.7 Hz, J_2 = 2.4 Hz, 2H), 6.43-6.46 (m, 4H), 7.09-7.13 (m, 1H), 7.41-7.47 (m, 2H), 7.92-7.85 (m, 1H) ppm (ภาพที่ 41).; ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 12.6 ($4CH_3$), 44.4 ($4CH_2$), 66.0 (C), 98.0 (2CH), 104.5 (2C), 108.0 (2CH), 123.0 (CH),

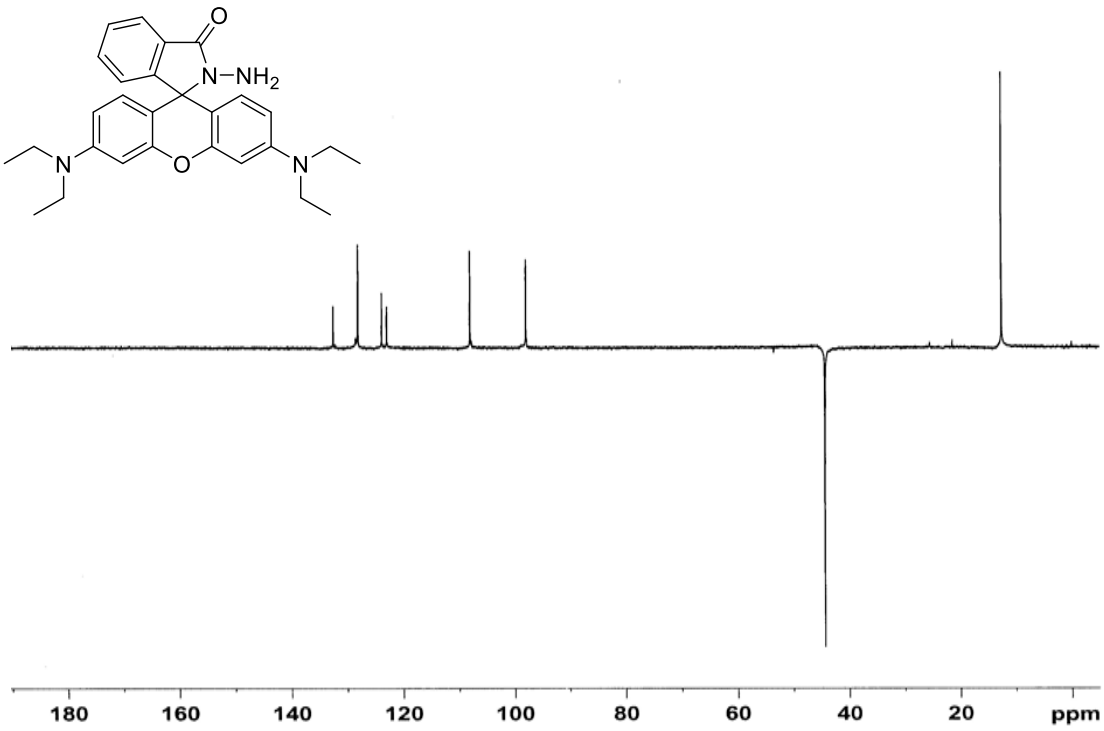
123.8 (CH), 128.0 (CH), 128.1 (2CH), 130.0 (2CH), 132.5 (CH), 148.8 (2C),151.5 (C), 153.8 (C), 166.1 (C) ppm (ภาพที่ 42-43).; จากการคำนวณ HR-ESI MS $C_{28}H_{33}N_2O_2^+$ $(M+H)^+$ 457.2604 m/z, จากการทดสอบ 457.2366 m/z (ภาพที่ 44).



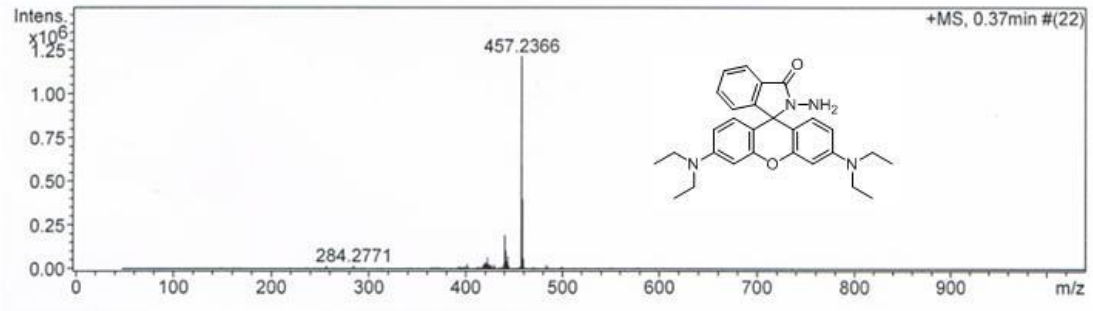
ภาพที่ 41 ^{1}H NMR สเปกตรัมของโรดามีนบีไฮดราไซด์ (RhB-1)



ภาพที่ 42 ^{13}C NMR สเปกตรัมของโรดามีนบีไฮดราไซด์ (RhB-1)

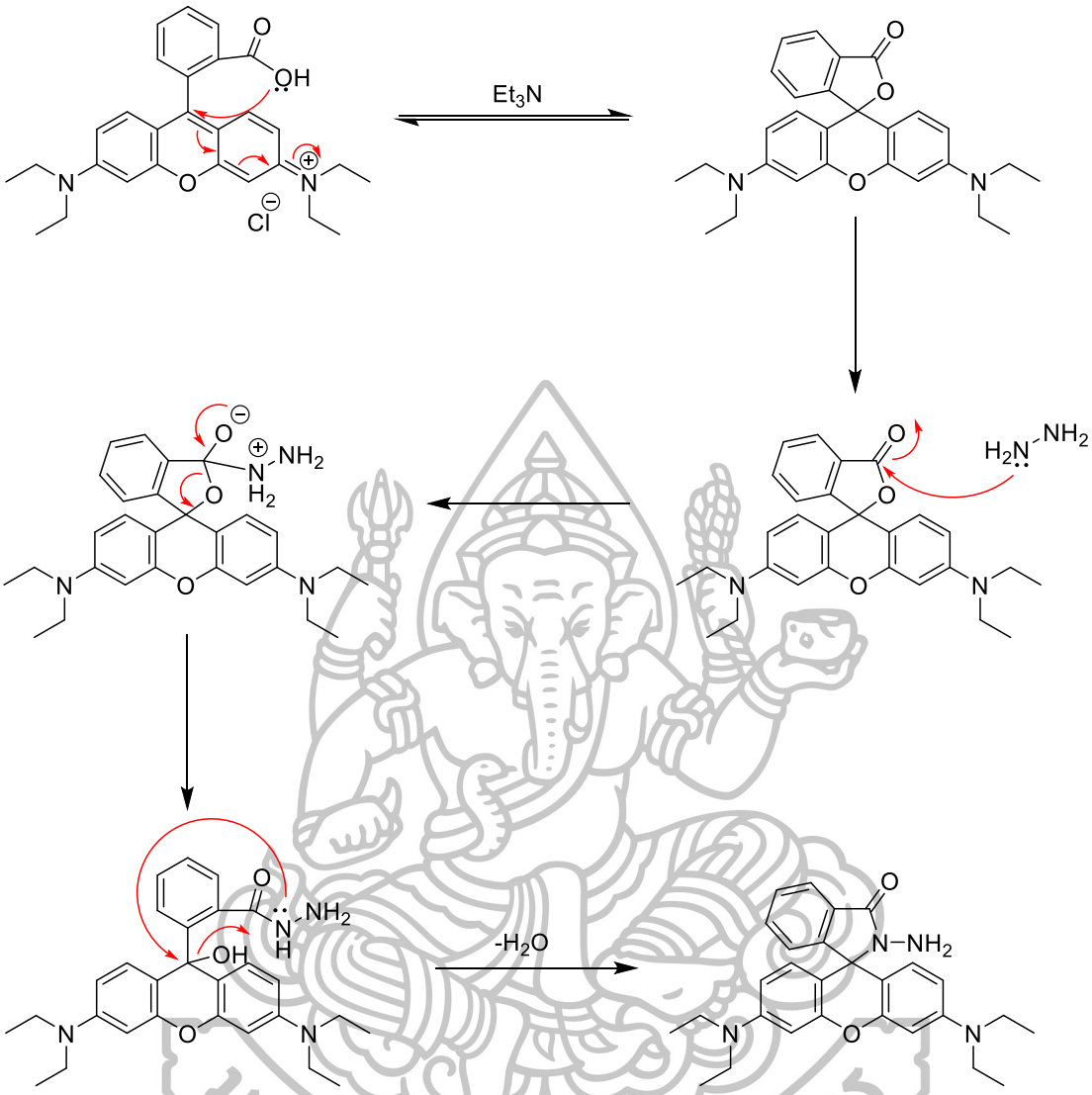


ภาพที่ 43 ^{13}C DEPT 135 NMR สเปกตรัมของโรดามีนบีไฮดราไซด์ (**RhB-1**)



ภาพที่ 44 HR-ESI MS สเปกตรัมของโรดามีนบีไฮดราไซด์ (**RhB-1**)

จากผล ^{1}H NMR สเปกตรัม, ^{13}C NMR สเปกตรัม และ ^{13}C DEPT 135 สเปกตรัม สามารถยืนยันการเกิดสารประกอบโรดามีนบีไฮดราไซด์ (**RhB-1**) นอกจากนี้ ยังสามารถยืนยันโครงสร้างจาก HR-ESI MS ได้ผลเท่ากับ 457.2366 m/z ซึ่งมีค่าใกล้เคียงจากการคำนวณ $C_{28}H_{33}N_2O_2^+$ $(M+H)^+$ มีค่าเท่ากับ 457.2604 m/z จึงยืนยันได้ว่าได้สารโรดามีนบีไฮดราไซด์ (**RhB-1**) เกิดขึ้นจริงจากการสังเคราะห์และมีความบริสุทธ์ โดยสามารถเสนอกลไกการเกิดปฏิกิริยาดัง ภาพที่ 45

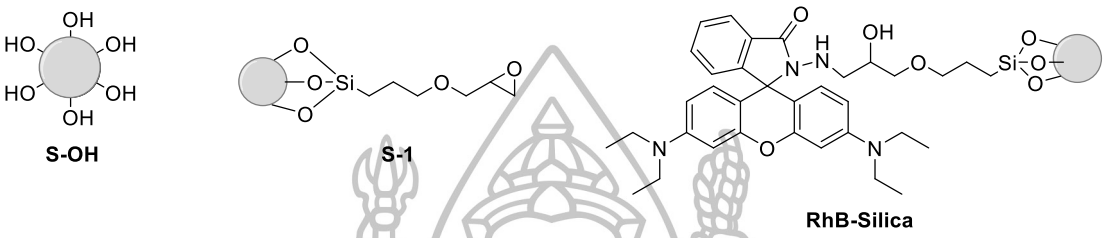


ภาพที่ 45 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของสารประกอบโรดามีนบีไฮดราไซด์ (RhB-1)

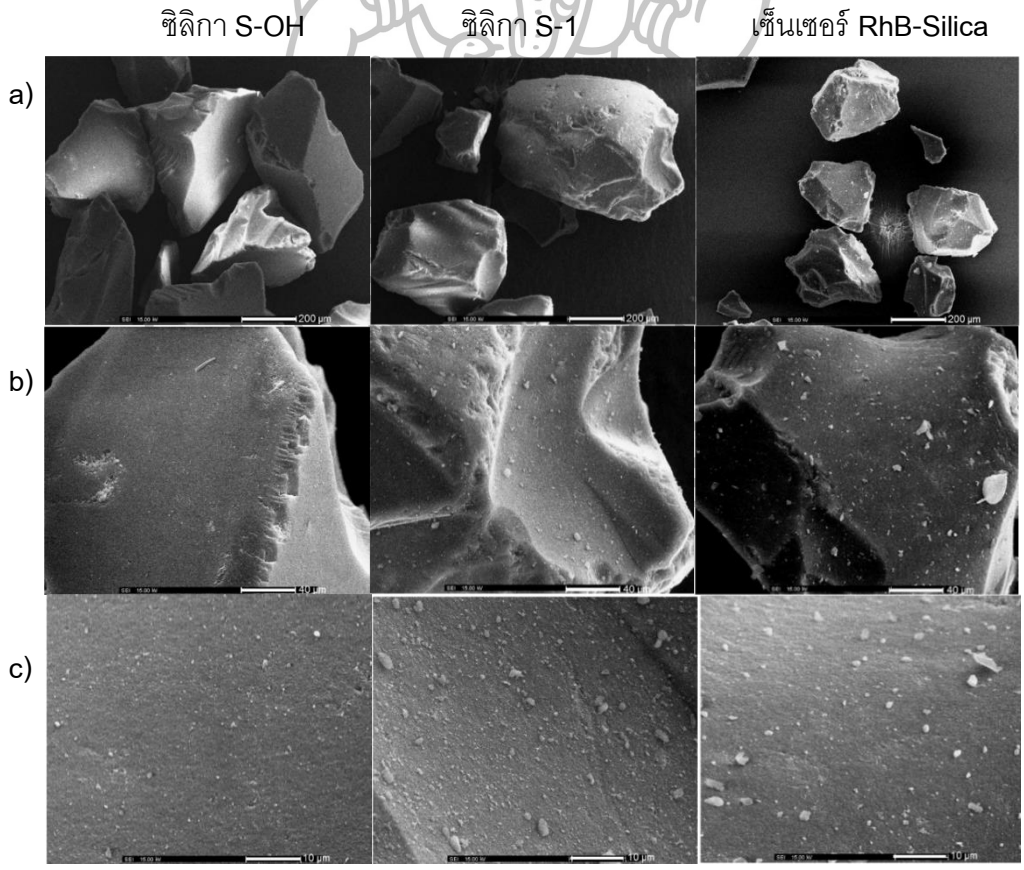
จากผลการสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ของโรดามีนบีไฮดราไซด์ (RhB-1) ตามวิธีการทดลองที่ได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น และยืนยันโครงสร้างด้วยด้วยเทคนิค nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) และ high resolution mass spectroscopy (HR-ESI MS) เป็นที่เรียบร้อย ในขั้นตอนของการปรับปรุงพื้นผิวของซิลิกาเจลในแต่ละขั้นตอน สามารถวิเคราะห์และยืนยันการเปลี่ยนแปลงแต่ละขั้นตอนด้วยเทคนิค scanning electron microscopy (SEM), differential thermogravimetry analysis (DTG), differential scanning calorimetry (DSC) และ Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) ได้ผลการทดลองดังนี้

1.5 การศึกษาสมบัติทางกายภาพของเซ็นเซอร์ RhB-Silica ด้วยเทคนิค Scanning Electron Microscopy (SEM)

จากผลการวิเคราะห์โครงสร้างพื้นผิวทางเคมีของแต่ละขั้นตอนของการปรับปรุงพื้นผิวของซิลิกาเจลด้วยเทคนิค SEM จะทำให้ทราบรายละเอียดของขนาด รูปร่าง และพื้นผิวของซิลิกาเจลที่เปลี่ยนแปลงไป โดยโครงสร้างทางเคมีของแต่ละขั้นตอนที่ถูกปรับปรุงพื้นผิวแสดงได้ดังภาพที่ 46



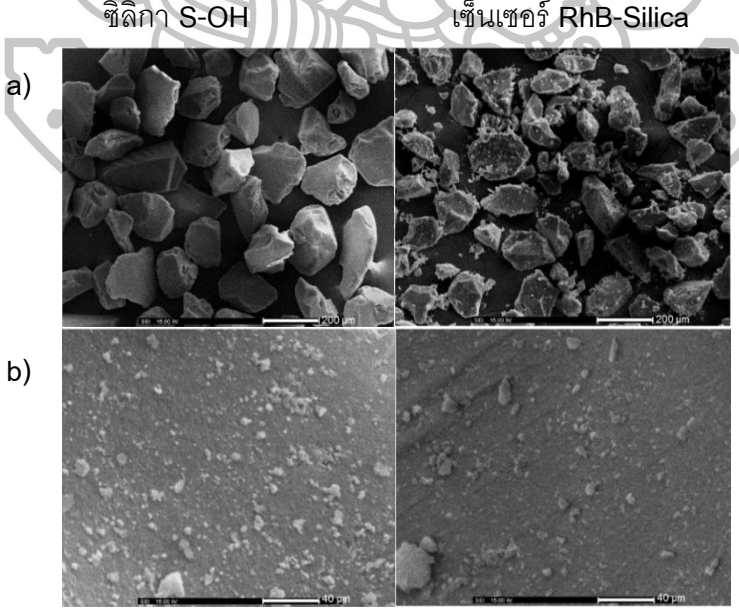
ภาพที่ 46 โครงสร้างทางเคมีของแต่ละขั้นตอนในการปรับปรุงพื้นผิวของซิลิกาเจล



ภาพที่ 47 แสดงโครงสร้างสัณฐานวิทยาของซิลิกา S-OH, ซิลิกา S-1 และ เซ็นเซอร์ RhB-Silica ที่กำลังขยาย a) 100 เท่า, b) 500 เท่า, และ c) 2000 เท่า (ซิลิกาเจลตั้งต้น 63-200 μm)

จากภาพที่ 47 เป็นผลจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SEM โดยการนำซิลิกาเจลขนาด 63-200 μm ที่ผ่านกระบวนการทำความสะอาดด้วยสารละลายปิรันยา ซึ่งจะได้เป็นซิลิกา **S-OH** ตามด้วยปรับปรุงให้พื้นผิวมี(3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilane (**GPTs**) ได้เป็นซิลิกา **S-1** แล้วนำไปต่อกับ Rhodamine B hydrazide ได้เป็นเซ็นเซอร์ **RhB-Silica** จะเห็นว่าซิลิกา **S-OH** ที่ได้มีโครงสร้างสัณฐานวิทยาที่ไม่แน่นอน โดยมีขนาดประมาณ 200 μm ลักษณะของพื้นผิวค่อนข้างเรียบ แต่เมื่อพื้นผิวของซิลิกามีการต่อกับ **GPTs** (ซิลิกา **S-1**) โครงสร้างสัณฐานวิทยามีการเปลี่ยนแปลงไป ซิลิกาที่ได้มีขนาดประมาณ 100-200 μm ซึ่งเล็กกว่าขนาดของซิลิกา **S-OH** อีกทั้งพื้นผิวมีความขรุขระมากขึ้น มีเศษขนาดเล็กติดที่พื้นผิวจำนวนมากเมื่อเทียบกับของซิลิกา **S-OH** เมื่อนำซิลิกา **S-1** มาต่อกับ Rhodamine B hydrazide จะเห็นว่าจากผลที่ได้ซิลิกาจะมีขนาดเล็กลงเมื่อเทียบกับในขั้นซิลิกา **S-OH** และ ซิลิกา **S-1** รูปร่างและขนาดมีการเปลี่ยนแปลงไป ลักษณะของพื้นผิวมีความเรียบขึ้น แต่มีเศษขนาดเล็กติดที่พื้นผิวซึ่งเห็นชัดมากขึ้น

ในทำนองเดียวกัน เมื่อเปลี่ยนตัวกลางซิลิกาเจลให้มีขนาดเล็กลง จากขนาด 63-200 μm เป็น 40-63 μm จะเห็นว่าภาพของผลการวิเคราะห์ของเซ็นเซอร์ **RhB-Silica** เทียบกับผลของซิลิกา **S-OH** ก่อนต่อ (3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilane (**GPTs**) และ Rhodamine B hydrazide โครงสร้างสัณฐานวิทยามีการเปลี่ยนแปลงไป โดยขนาดของซิลิกามีแนวโน้มเล็กลง ซึ่งผลดังกล่าวแสดงได้ดังภาพที่ 48

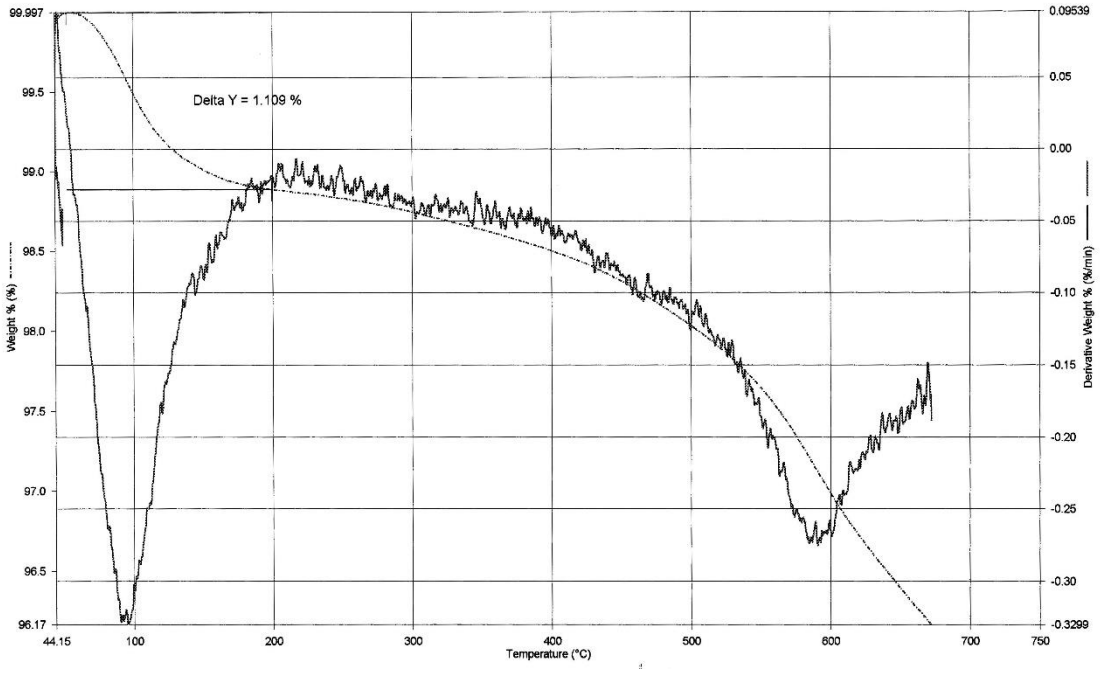


ภาพที่ 48 แสดงโครงสร้างสัณฐานวิทยาของซิลิกา **S-OH** และ เซ็นเซอร์ **RhB-Silica** ที่กำลังขยาย a) 100 เท่า และ b) 500 เท่า (ซิลิกาเจลตั้งต้น 40-63 μm)

จากผลการวิเคราะห์ดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าในแต่ละขั้นตอนของการปรับปรุงพื้นผิวซิลิกาเจล พื้นผิวและขนาดมีการเปลี่ยนไป แต่ก็ยังไม่สามารถยืนยันหรือบอกได้ว่าในแต่ละขั้นตอนมีการเชื่อมต่อกันระหว่าง Si-OH (silanol group) บนพื้นผิวของซิลิกาเจลกับ (3-Glycidyloxypropyl) trimethoxysilane (**GPTs**) หรือ Rhodamine B hydrazide เข้าเปิดวงอีพอกไซด์ (epoxide) ซึ่งต้องยืนยันด้วยเทคนิคอื่นๆ ต่อไป

1.6 **การศึกษาสมบัติทางกายภาพของเซ็นเซอร์** RhB-Silica **ด้วยเทคนิค** Differential Thermogravimetry Analysis (DTG)

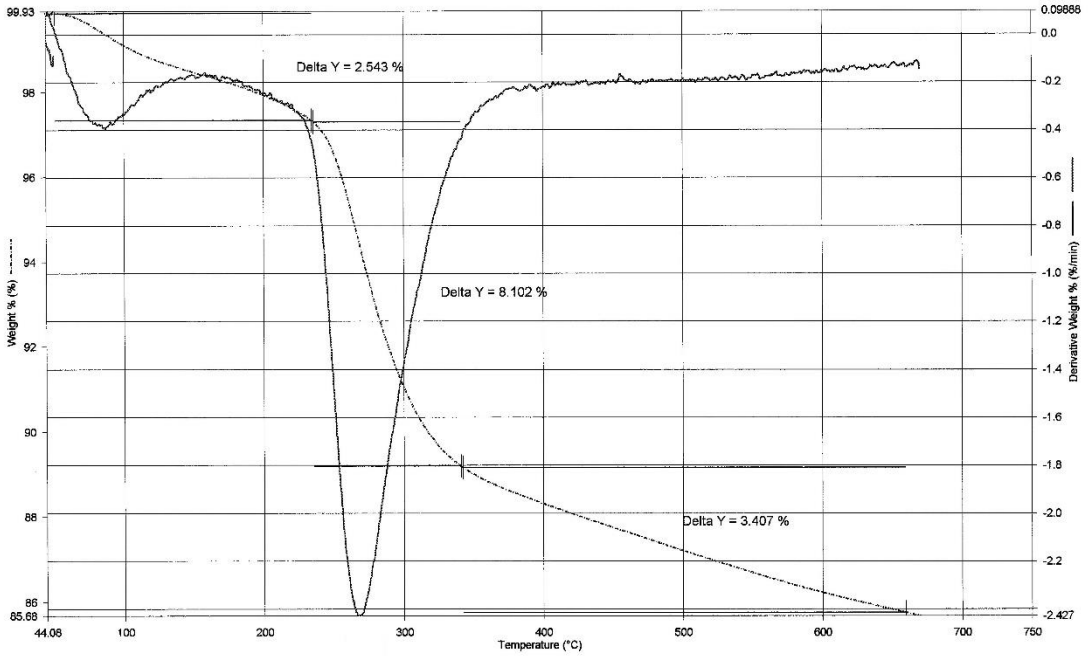
จากผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DTG ของแต่ละขั้นตอนของการปรับปรุงพื้นผิวของซิลิกาเจล จะทำให้ทราบน้ำหนักของซิลิกาที่เปลี่ยนแปลงไป เมื่อได้รับความร้อน โดยแสดงออกมาในรูปแบบของกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักและอุณหภูมิ



ภาพที่ 49 กราฟแสดงผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DTG ของซิลิกา **S-OH** ที่ผ่านการทำความสะอาดด้วยสารละลายปิรันยา

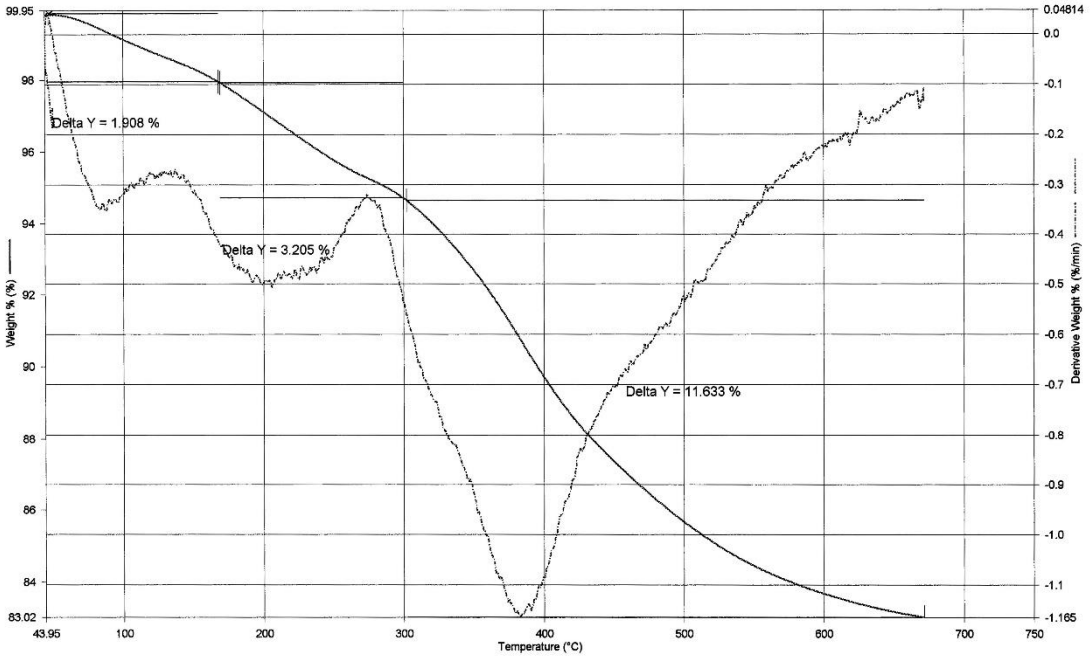
จากกราฟภาพที่ 49 ซิลิกาเจลที่ผ่านการทำความสะอาดด้วยสารละลายปิรันยา (ซิลิกา **S-OH**) จะเห็นว่าเมื่อให้ความร้อนไปจนถึง 44 องศาเซลเซียส เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 44-200 องศาเซลเซียส และมีการเปลี่ยนแปลงมากสุดที่

อุณหภูมิประมาณ 80-100 องศาเซลเซียส ซึ่งคาดว่าเป็นการสูญเสียน้ำหนักที่เกิดจากการระเหยของน้ำคิดเป็น 4%



ภาพที่ 50 กราฟแสดงผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DTG ของซิลิกา S-1 ที่ผ่านการที่ผ่านการต่อกับ (3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilane (GPTs)

ในส่วนของซิลิกาเจลที่ผ่านการต่อกับ (3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilane (GPTs) ซึ่งก็คือซิลิกา S-1 จะเห็นว่ามีการสูญเสียน้ำหนักที่เกิดจากการระเหยของน้ำประมาณ 4% ที่อุณหภูมิประมาณ 80-100 องศาเซลเซียส เหมือนกันกับในซิลิกา S-OH นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักในช่วงอุณหภูมิ 200-350 องศาเซลเซียส ซึ่งเปลี่ยนแปลงมากที่สุดที่อุณหภูมิประมาณ 270 องศาเซลเซียส คิดเป็น 14% ซึ่งไม่พบการสูญเสียน้ำหนักดังกล่าวในซิลิกา S-OH นั้นหมายความว่าซิลิกา S-OH ถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของซิลิกา S-1 แล้ว ซึ่งมีการต่อกับ (3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilane (GPTs) ส่งผลให้สมบัติทางความร้อนเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งผลแสดงดังภาพที่ 50



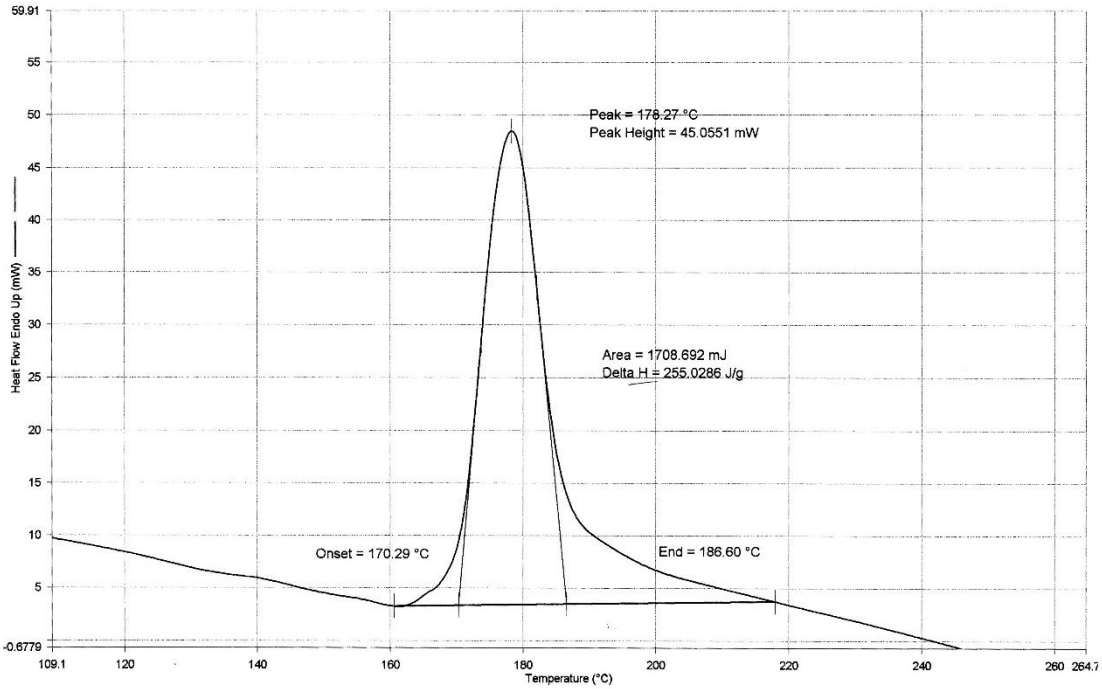
ภาพที่ 51 กราฟแสดงผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DTG ของเซ็นเซอร์ **RhB-Silica** ที่ผ่านการที่ผ่านการต่อกับ Rhodamine B hydrazide

จากกราฟภาพที่ 51 เมื่อนำซิลิกา **S-1** มาต่อกับ Rhodamine B hydrazide ผลปรากฏว่ามีการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักในช่วงที่อุณหภูมิ 290-700 องศาเซลเซียส และมีการเปลี่ยนแปลงมากที่สุดที่อุณหภูมิประมาณ 390 องศาเซลเซียส จากกราฟจะเห็นได้ว่ามีน้ำหนักหายไปคิดเป็น 17% ซึ่งคุณสมบัติถ้าความร้อนดังกล่าวได้เปลี่ยนแปลงไปหลังจากมีการต่อ Rhodamine B hydrazide นั้นหมายความว่า ซิลิกา **S-1** ถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของเซ็นเซอร์ **RhB-Silica** แล้ว

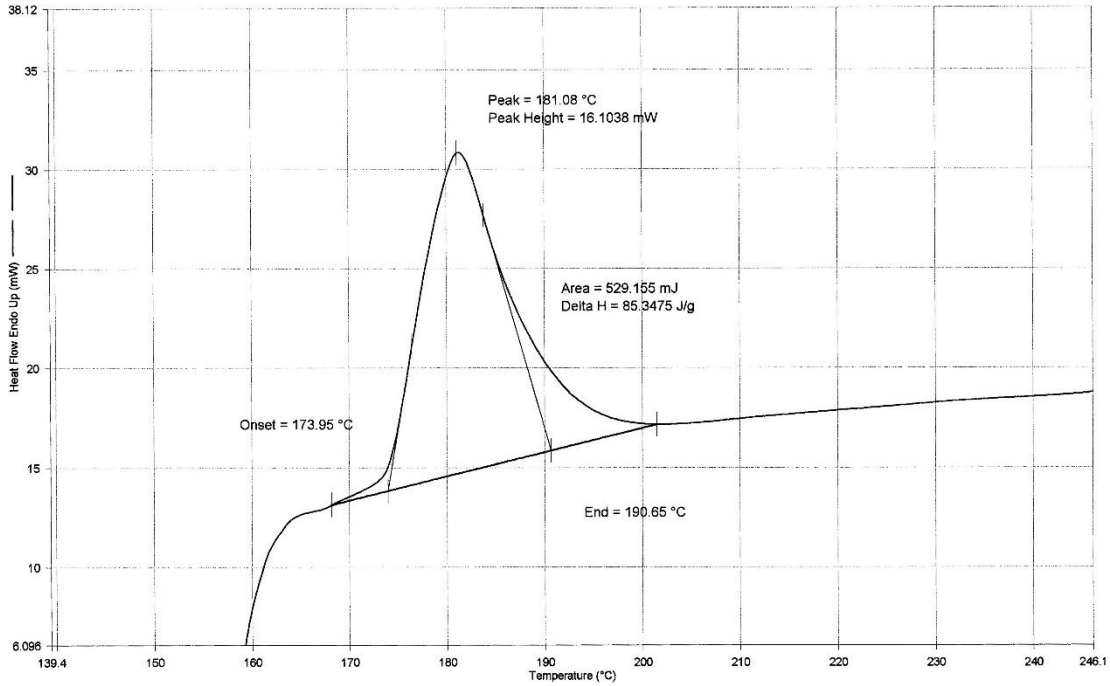
1.7 การศึกษาสมบัติทางกายภาพของเซ็นเซอร์ RhB-Silica ด้วยเทคนิค Differential Scanning Calorimeters (DSC)

จากผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DSC ของแต่ละขั้นตอนของการปรับปรุงพื้นผิวของซิลิกาเจล จะทำให้ทราบค่าพลังงานความร้อนและอุณหภูมิของซิลิกาเจลแต่ละขั้นตอนของการปรับปรุงพื้นผิวเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพหรือทางเคมี ซึ่งรายงานเป็น ค่าความจุความร้อนจำเพาะของสาร (Specific heat capacity หรือ C_p), จุดหลอมเหลว (Melting point หรือ T_m) หรือ ปริมาณพลังงานที่ใช้ในการหลอมเหลว (Heat of fusion หรือ H_f) โดยผลดังกล่าวแสดงออกมาในรูปแบบของกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าพลังงานที่ถูกวัดใน

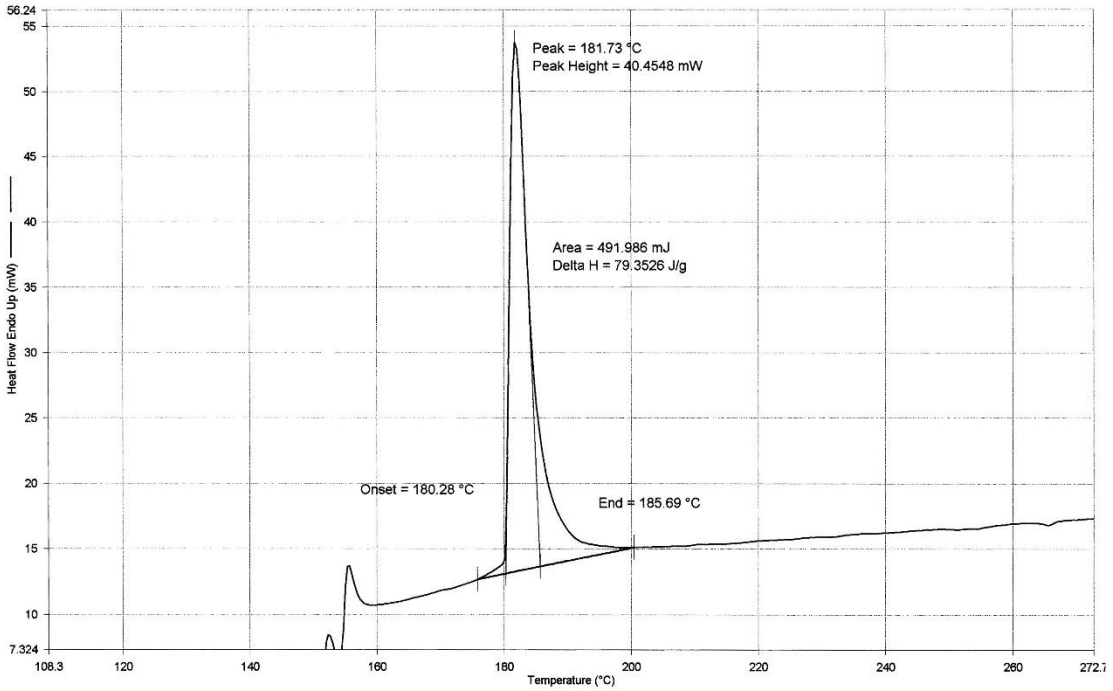
หน่วยมิลลิวัตต์ (mW) และอุณหภูมิ ซึ่งผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DSC ของซิลิกา **S-OH**, ซิลิกา **S-1** และ เซ็นเซอร์ **RhB-Silica** แสดงดังภาพที่ 52, 53 และ 54 ตามลำดับ



ภาพที่ 52 กราฟแสดงผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DSC ของซิลิกา **S-OH** ที่ผ่านการทำความสะอาดด้วยสารละลายปิรันยา



ภาพที่ 53 กราฟแสดงผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DSC ของซิลิกา **S-1** ที่ผ่านการที่ผ่านการต่อกับ (3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilane (**GPTs**)



ภาพที่ 54 กราฟแสดงผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DSC ของเซ็นเซอร์ **RhB-Silica** ที่ผ่านการที่ผ่านการต่อกับ Rhodamine B hydrazide

ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ดังกล่าวด้วยเทคนิค DSC ได้แสดงค่าพลังงานความร้อนและอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงไปของแต่ละขั้นตอนของการปรับปรุงพื้นผิวซิลิกาเจล ซึ่งสามารถคำนวณหาค่าความจุความร้อน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ได้จากผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DSC

ซิลิกา	T_{onset} (^{0}C)	T_m (^{0}C)	H_f (J/g)	C_p ($Jg^{-1}K^{-1}$)
S-OH	170.29	178	255.0286	0.5667
S-1	173.95	181.08	85.3475	0.1897
เซ็นเซอร์ RhB-Silica	180.28	181.73	79.352	0.1763

จากผลการทดลองในตารางที่ 4 แสดงอุณหภูมิที่เริ่มมีการเปลี่ยนแปลง (T_{onset}), จุดหลอมเหลว (T_m), ปริมาณพลังงานที่ใช้ในการหลอมเหลว (H_f) ซึ่งคำนวณได้จากพื้นที่ใต้พีคในหน่วยของจูลต่อกรัม (J/g) ดังแสดงในภาพที่ 52-54 และสามารถคำนวณหาค่าความจุความร้อนจำเพาะของสารแต่ชนิด (C_p) ได้จาก

$$C_p = \Delta Q / \Delta T$$

เมื่อ ΔQ คือ ปริมาณพลังงานที่ใช้ในการหลอมเหลว (J/g)

ΔT คือ อุณหภูมิที่ทำให้สารเกิดการเปลี่ยนแปลง (K)

จะเห็นว่าค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ของซิลิกาในแต่ละขั้นตอนตอนมีค่าแตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างหรือลักษณะของซิลิกาที่ได้ในแต่ละขั้นมีความแตกต่างกัน จึงทำให้สมบัติทางความร้อนเปลี่ยนแปลงไป นั้นหมายความว่าพื้นผิวของซิลิกาเจลมีการเปลี่ยนไปหลังจากทำการต่อด้วย (3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilane (**GPTs**) และ Rhodamine B hydrazide

1.8 การศึกษาสมบัติทางกายภาพของเซ็นเซอร์ RhB-Silica ด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)

จากผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FT-IR ของแต่ละขั้นตอนของการปรับปรุงพื้นผิวของซิลิกาเจล จะทำให้ทราบหมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวของซิลิกาที่เปลี่ยนแปลงไป โดยแสดงออกมาในรูปแบบของกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างย่านความถี่ (เลขคลื่น หรือ Wavenumber, cm^{-1}) กับอัตราส่วนระหว่างความเข้มของรังสีที่ผ่านสารตัวอย่าง และความเข้มของรังสีที่ตกกระทบสารตัวอย่าง (Transmittance,%) ดังภาพที่ 55

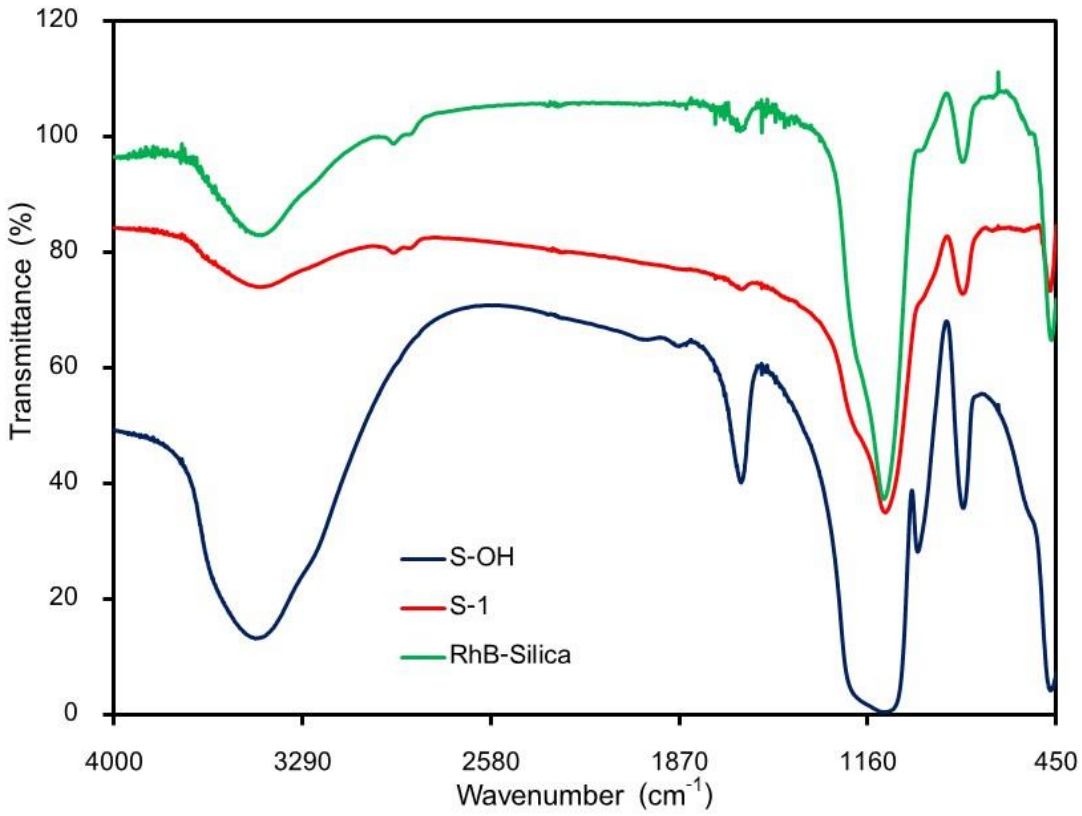
สมการที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของรังสีที่ผ่านสารตัวอย่างและความเข้มของรังสีที่ตกกระทบสารตัวอย่าง

$$\text{Transmittance} = \frac{I}{I_0}$$

I = ความเข้มของรังสีที่ผ่านสารตัวอย่าง

I_0 = ความเข้มของรังสีที่ตกกระทบสารตัวอย่าง

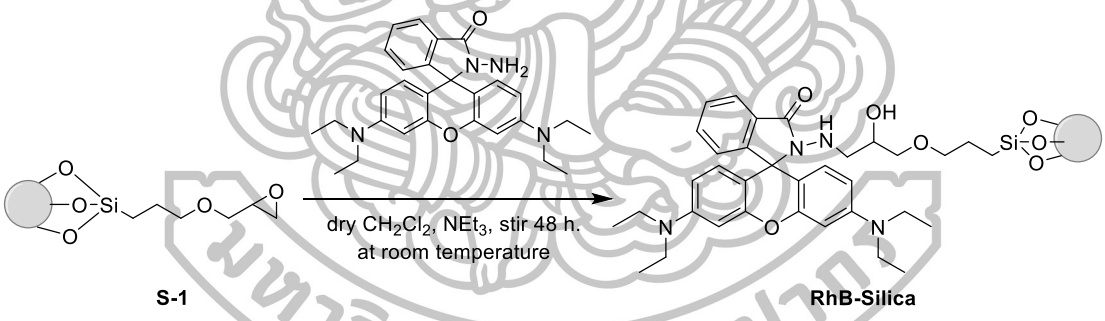
%Transmittance = 100T



ภาพที่ 55 IR สเปกตรัมของซิลิกา S-OH, ซิลิกา S-1 และ เซ็นเซอร์ RhB-Silica

จากผลการวิเคราะห์ IR สเปกตรัม ภาพที่ 55 พบว่าสเปกตรัมของซิลิกาเจลที่ผ่านการทำความสะอาดด้วยสารละลายปิรันยา (ซิลิกา S-OH) จะแสดงหมู่ฟังก์ชันของ OH-stretching และ OH-bending ที่ช่วงย่านความถี่ 3440-3460 cm^{-1} และ 1630-1640 cm^{-1} ตามลำดับ ซึ่งที่ช่วงย่านความถี่ 3440-3460 cm^{-1} จะปรากฏลักษณะพีคของ OH-stretching ที่กว้างและมีค่าเปอร์เซนต์ Transmittance ที่สูง แสดงให้เห็นว่าหลังจากที่ทำความสะอาดพื้นผิวของซิลิกาเจลด้วยสารละลายปิรันยา พื้นผิวของซิลิกาเจลมีหมู่ฟังก์ชันที่เป็น silanol group และเมื่อนำซิลิกา S-OH

มาต่อกับ (3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilane (**GPTs**) จะเห็นว่าที่ช่วงย่านความถี่ 3440-3460 cm^{-1} ของ OH-stretching ค่าเปอร์เซนต์ Transmittance มีค่าลดลง แสดงให้เห็นว่าปริมาณหมู่ฟังก์ชันที่เป็น silanol group ที่พื้นผิวของซิลิกาเจลมีปริมาณลดลง ซึ่งหมายถึง silanol group ที่พื้นผิวของซิลิกาเจลมีการต่อกับ (3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilane (**GPTs**) เกิดเป็นซิลิกา **S-1** ทำให้พื้นผิวจากเดิมที่มีองค์ประกอบของหมู่ฟังก์ชันที่เป็น silanol group กลายเป็น siloxane (-Si-O-Si-) จึงส่งผลให้ค่าเปอร์เซนต์ Transmittance ที่ช่วงความยาวคลื่นดังกล่าวมีค่าน้อยลงจากเดิม และเมื่อนำซิลิกา **S-1** มาต่อกับ Rhodamine B hydrazide พบว่าปรากฏพีคในช่วงย่านความถี่ 1400-1800 cm^{-1} และปรากฏพีคของ OH-stretching ที่ช่วงย่านความถี่ 3440-3460 cm^{-1} ซึ่งมีค่าเปอร์เซนต์ Transmittance ที่เพิ่มขึ้นจากเดิมเมื่อเทียบกับในขั้นของการเตรียมซิลิกา **S-1** จากผลดังกล่าวอาจสรุปได้ว่า Rhodamine B hydrazide เข้าเปิดวงอีพอกไซด์ของ **GPTs** ได้เป็นเซ็นเซอร์ **RhB-Silica** ซึ่งมีหมู่ฟังก์ชันที่เป็นไฮดรอกซิล (-OH group) เกิดขึ้น ดังแสดงตามสมการการเตรียมเซ็นเซอร์ **RhB-Silica** ภาพที่ 56 นอกจากนี้ใน IR สเปกตรัม ยังปรากฏช่วงพีคในช่วงย่านความถี่ 1400-1800 cm^{-1} ซึ่งแสดงพันธะและหมู่ฟังก์ชันที่น่าจะเป็นองค์ประกอบของ Rhodamine B hydrazide ดังตารางที่ 5



ภาพที่ 56 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์เซ็นเซอร์ **RhB-Silica**

ตารางที่ 5 ความถี่ของการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของหมู่ฟังก์ชันต่างๆ

ย่านความถี่ (cm^{-1})	พันธะ	หมู่ฟังก์ชัน
3400–3250	N–H stretch	1°, 2° amines, amides
3000-2850	C-H stretch	alkanes
1760–1665	C=O stretch	carbonyls
1680–1640	–C=C– stretch	alkenes
1600–1585	C–C stretch (in–ring)	aromatics
1500–1400	C–C stretch (in–ring)	aromatics
1470–1450	C–H bend	alkanes

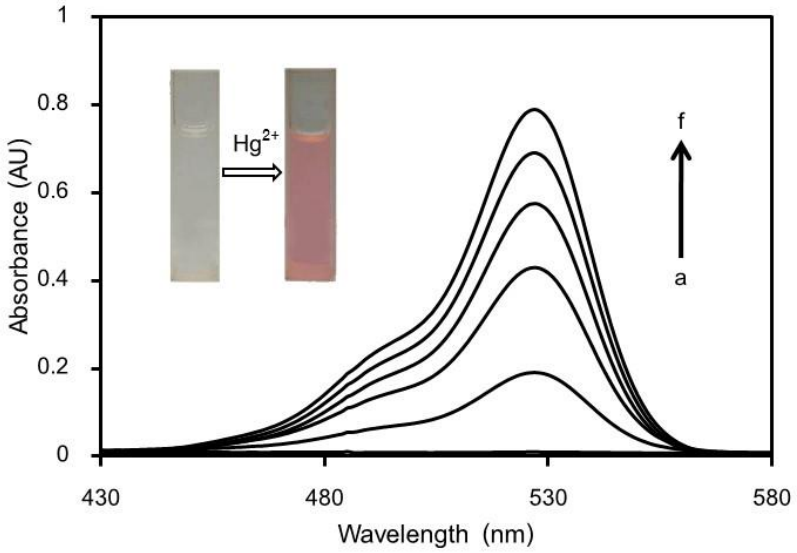
2. การทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจจับไอออนโลหะและไอออนรบกวนอื่น ๆ ของเซ็นเซอร์ monoRh6G และ diRh6G ในสารละลาย acetonitrile

เมื่อทำการยืนยันโครงสร้างของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ monoRh6G และ diRh6G เรียบร้อยแล้ว จากนั้นเซ็นเซอร์ monoRh6G และ diRh6G จะถูกนำมาศึกษาถึงประสิทธิภาพในการทำงานเกี่ยวกับการตรวจจับไอออนโลหะหนัก ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปีในสภาวะที่เป็นสารละลายต่างๆ เพื่อหาความว่องไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) ความจำเพาะเจาะจงกับไอออนปรอท (selectivity) เปรียบเทียบกับไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ รวมทั้งนำไปศึกษาถึงประสิทธิภาพในการตรวจจับไอออนปรอทในภาวะที่มีไอออนรบกวนอื่นๆ (competitive) อัตราส่วนการเกิดสารเชิงซ้อนด้วยวิธีการของ Job (Job's plot) ค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออน (Association constant; K_{assoc}) ค่าประสิทธิภาพเชิงควอนตัมทางฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescence quantum yield) และโครงสร้างโมเลกุลหลังจากเกิดอันตรกิริยากับไอออนปรอท (molecular modeling)

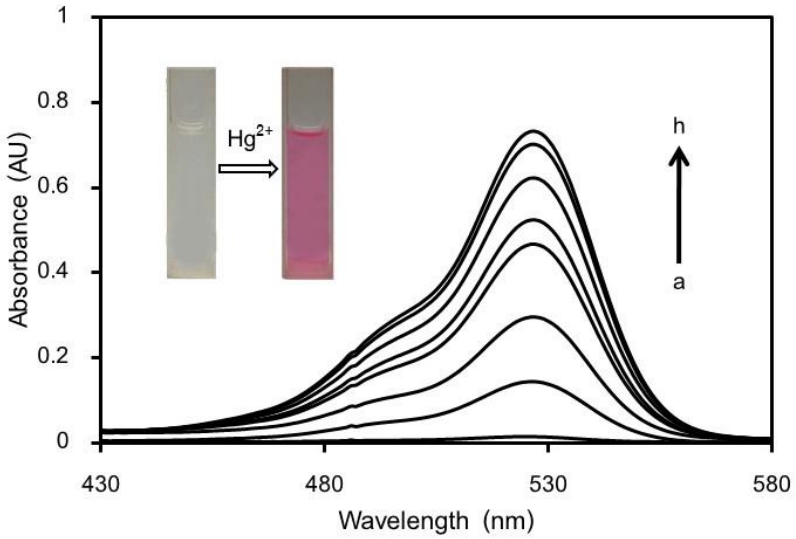
โดยการนำเซ็นเซอร์ monoRh6G และ diRh6G ที่สังเคราะห์ได้มาศึกษาประสิทธิภาพในการตรวจจับไอออนปรอทและไอออนรบกวนอื่นๆ ในสารละลาย acetonitrile ทั้งนี้ไอออนปรอท ไอออนโลหะทรานซิชัน ไอออนโลหะอัลคาไลน์ และไอออนโลหะอัลคาไลน์เอิร์ทชนิดต่างๆ เตรียมโดยนำเกลือเปอร์คลอเรตของไอออนแต่ละชนิด ละลายใน acetonitrile

2.1. **ผลการทดสอบสมบัติการดูดกลืนแสงอุลตร้าไวโอเลตในภาวะที่มีไอออนปรอทของเซ็นเซอร์** monoRh6G **และ** diRh6G

การดูดกลืนแสงอุลตร้าไวโอเลตของเซ็นเซอร์ **monoRh6G** และ **diRh6G** ศึกษาในสารละลาย acetonitrile โดยติดตามสเปกตรัมของการดูดกลืนแสง (absorption spectra) ซึ่งความเข้มข้นของเซ็นเซอร์ **monoRh6G** และ **diRh6G** มีค่าเท่ากับ 3.4×10^{-4} M และ 1.2×10^{-4} M ตามลำดับ และใช้ไอออนปรอทในรูปของเกลือเปอร์คลอเรต ผลการทดลองที่ได้แสดงดังภาพที่ 57 และ ภาพที่ 58



ภาพที่ 57 การดูดกลืนแสงของเซ็นเซอร์ **monoRh6G** (3.4×10^{-4} M) ในสารละลาย acetonitrile ก่อนและหลังเติมไอออนปรอทเปอร์คลอเรตที่ความเข้มข้นต่างๆ (a) 0 μM, (b) 20.8 μM, (c) 27.7 μM, (d) 41.6 μM, (e) 55.5 μM, (f) 69.3 μM



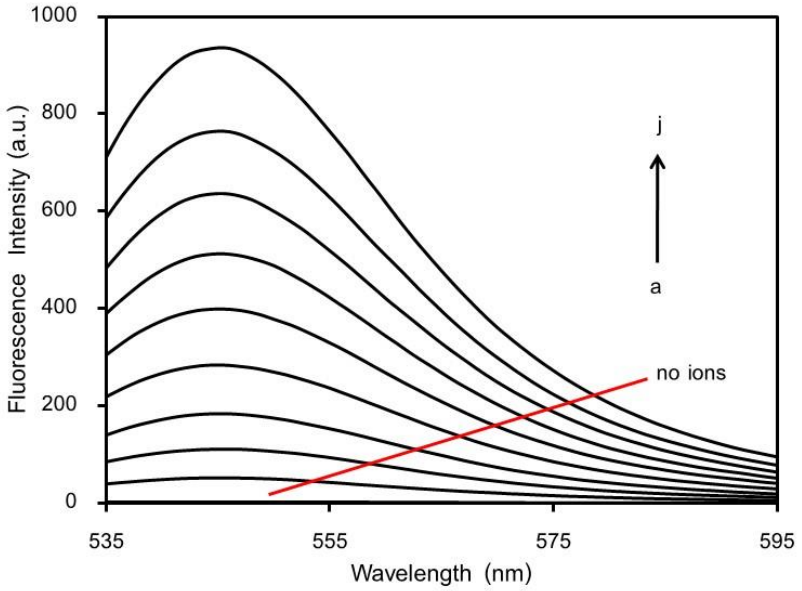
ภาพที่ 58 การดูดกลืนแสงของเซ็นเซอร์ **diRh6G** ($1.2x10^{-4}$ M) ในสารละลาย acetonitrile ก่อนและหลังเติมไอออนปรอทเปอร์คลอเรตที่ความเข้มข้นต่างๆ (a) 0 μM, (b) 13.9 μM, (c) 20.8 μM, (d) 27.7 μM, (e) 41.6 μM, (f) 55.5 μM, (g) 69.3 μM, (h) 76.3 μM

จากผลการทดลองพบว่า การตรวจจับของเซ็นเซอร์ทั้ง **monoRh6G** และ **diRh6G** กับไอออนปรอทแสดงสัญญาณการดูดกลืนแสงในช่วงยูวี-วิซิเบิล (UV-Vis absortion) แบบระบบ OFF-ON โดยพบว่าภายหลังการเติมไอออนปรอทเปอร์คลอเรตที่ความเข้มข้นต่างๆ ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ **monoRh6G** และ **diRh6G** จะดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 529 nm และแสดงสัญญาณการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นปรอทเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงความเข้มของการดูดกลืนแสงที่เกิดขึ้นนี้ ส่งผลให้สามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายได้ด้วยตาเปล่าโดยจากสารละลายไม่มีสีเป็นสีชมพู

2.2. ผลการทดสอบสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ในภาวะที่มีไอออนปรอทของเซ็นเซอร์ monoRh6G และ diRh6G

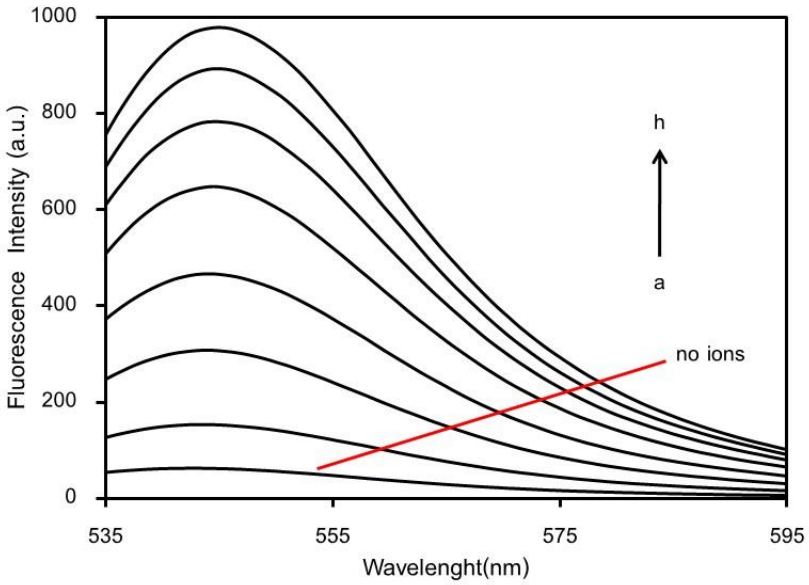
การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของเซ็นเซอร์ **monoRh6G** และ **diRh6G** ถูกศึกษาในสารละลาย acetonitrile โดยติดตามสเปกตรัมของการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence emission spectra) ก่อนและหลังการเติมไอออนปรอท ในช่วงความยาวคลื่น 545 nm (λ_{ex} = 529 nm) ความเข้มข้นของเซ็นเซอร์ **monoRh6G** และ **diRh6G** เท่ากับ $3.4x10^{-6}$ M และ $1.2x10^{-6}$ M

ตามลำดับ และใช้ไอออนปรอทในรูปของเกลือเปอร์คลอเรตผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 59 และภาพที่ 60



ภาพที่ 59 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (λ_{ex} = 529 nm และ λ_{em} = 545 nm) ของเซ็นเซอร์ monoRh6G (3.4×10^{-6} M) ในสารละลาย acetonitrile ก่อนและหลังเติมไอออนปรอทเปอร์คลอเรตที่ความเข้มข้นต่างๆ (a) 0 μM, (b) 0.6 μM, (c) 1.1 μM, (d) 1.9 μM, (e) 2.7 μM, (f) 3.5 μM, (g) 4.3 μM, (h) 5.1 μM, (i) 5.9 μM, (j) 6.8 μM.

มหาวิทยาลัยศิลปากร

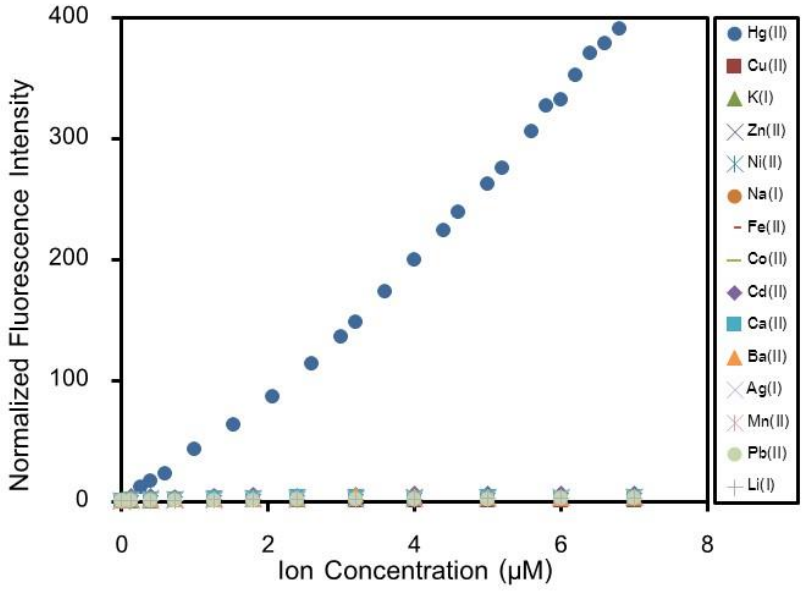


ภาพที่ 60 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (λ_{ex} = 529 nm และ λ_{em} = 545 nm) ของเซ็นเซอร์ diRh6G ($1.2x10^{-6}$ M) ในสารละลาย acetonitrile ก่อนและหลังเติมไอออนปรอทเปอร์คลอเรตที่ความเข้มข้นต่างๆ (a) 0 μM, (b) 0.9 μM, (c) 20.9 μM, (d) 30.0 μM, (e) 33.9 μM, (f) 36.6 μM, (g) 39.2 μM, (h) 40.5 μM

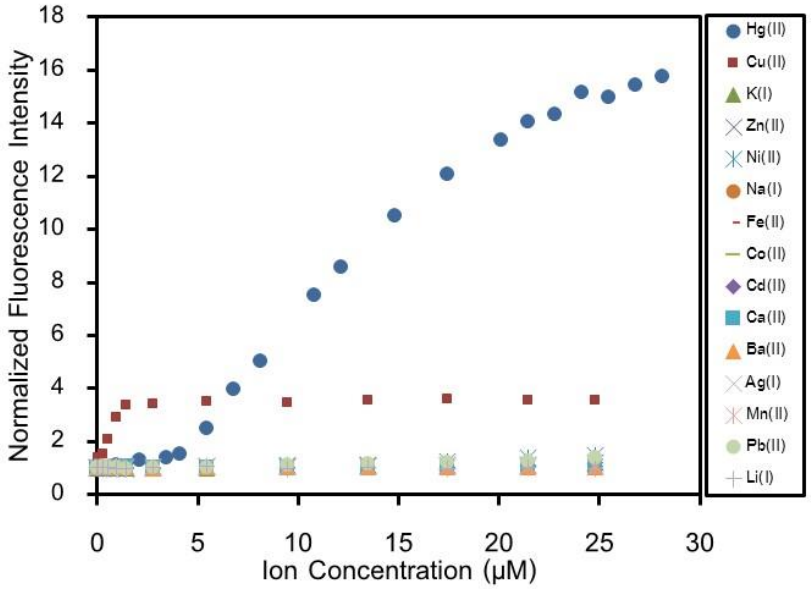
จากภาพที่ 59 และภาพที่ 60 พบว่า การตรวจจับของเซ็นเซอร์ monoRh6G และ diRh6G กับไอออนปรอทแสดงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์แบบระบบ OFF-ON ซึ่งเกิดจากกลไกการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนโดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซ็นเซอร์ภายหลังการตรวจจับไอออนปรอทของเซ็นเซอร์ในสารละลาย acetonitrile โดยพบว่าในภาวะที่ไม่มีไอออนปรอท ทั้งเซ็นเซอร์ monoRh6G และ diRh6G จะคายแสงฟลูออเรสเซนต์ในปริมาณที่น้อยมาก แต่ภายหลังเมื่อมีการเติมปรอทเปอร์คลอเรตที่ความเข้มข้นต่างๆ เซ็นเซอร์จะแสดงสัญญาณคายแสงฟลูออเรสเซนต์เพิ่มขึ้นในช่วงความยาวคลื่น 535-595 nm โดยความยาวคลื่นมากที่สุด (λ_{max}) ของการคายแสงฟลูออเรสเซนต์มีค่าเท่ากับ 545 nm ซึ่งการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของเซ็นเซอร์ทั้ง monoRh6G และ diRh6G จะเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณไอออนปรอทที่เพิ่มขึ้นในสารละลาย โดยสามารถวัดค่าประสิทธิภาพเชิงควอนตัม (quantum yield: Q_f) ของเซ็นเซอร์ monoRh6G และ diRh6G ได้เท่ากับ 0.49 และ 0.05 ตามลำดับ (โดยใช้ rhodamine 6G ใน ethanol เป็นสารอ้างอิง) [35] และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดของการตรวจวัดไอออนปรอท (detection limit) เท่ากับ 1.7 ppb cและ 3.0 ppm ตามลำดับ

2.3. ผลการทดสอบสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ในภาวะที่มีไอออนปรอทเปรียบเทียบกับไอออนรบกวนอื่นๆ ของเซ็นเซอร์ monoRh6G และ diRh6G

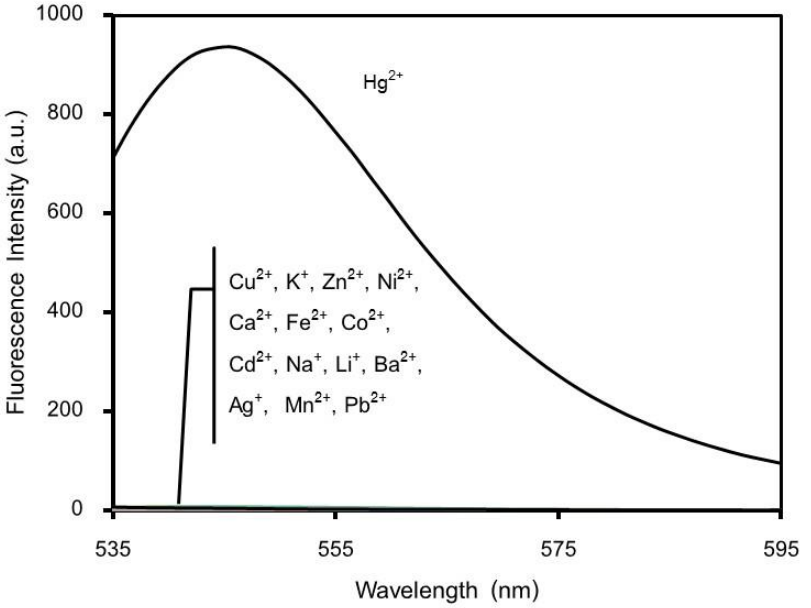
การทดสอบการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของเซ็นเซอร์ **monoRh6G และ diRh6G** ในสารละลาย acetonitrile ในภาวะที่มีไอออนปรอทในรูปของเกลือเปอร์คลอเรตเปรียบเทียบกับในภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดต่างๆ ได้แก่ Ag^{+}, Cu^{2+}, Ba^{2+}, Li^{+}, Pb^{2+}, Ca^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+}, Na^{+}, Ni^{2+}, K^{+} และ Zn^{2+} ได้ผลดังภาพข้างล่างนี้



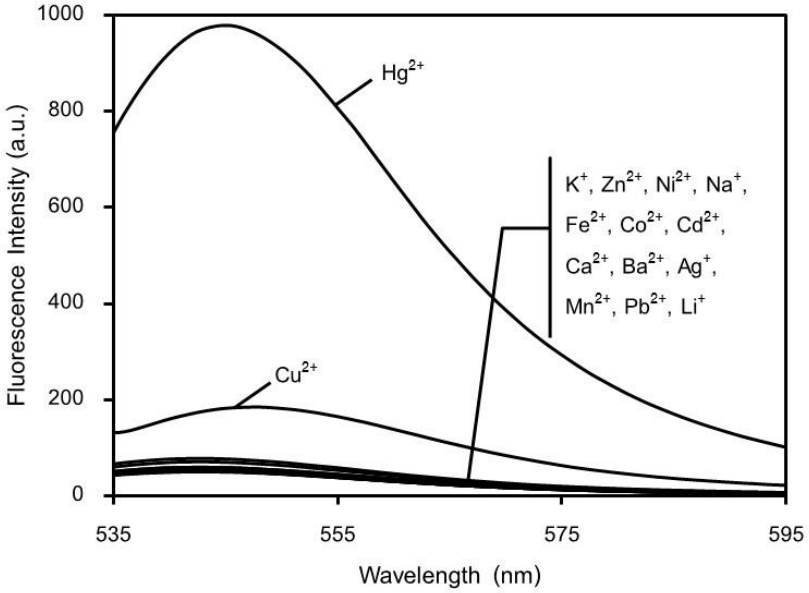
ภาพที่ 61 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (λ_{ex} = 529 nm และ λ_{em} = 545 nm) ของเซ็นเซอร์ **monoRh6G** (3.4×10^{-6} M) ในสารละลาย acetonitrile ในภาวะที่มีไอออนโลหะของเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ ในปริมาณที่ต่างกัน



ภาพที่ 62 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (λ_{ex} = 529 nm และ λ_{em} = 545 nm) ของเซ็นเซอร์ diRh6G ($1.2x10^{-6}$ M) ในสารละลาย acetonitrile ในภาวะที่มีไอออนโลหะของเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ ในปริมาณที่ต่างกัน



ภาพที่ 63 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (λ_{ex} = 529 nm และ λ_{em} = 545 nm) ของเซ็นเซอร์ monoRh6G ($3.4x10^{-6}$ M) ในสารละลาย acetonitrile ในภาวะที่มีไอออนโลหะของเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ เข้มข้น 6.8 μM

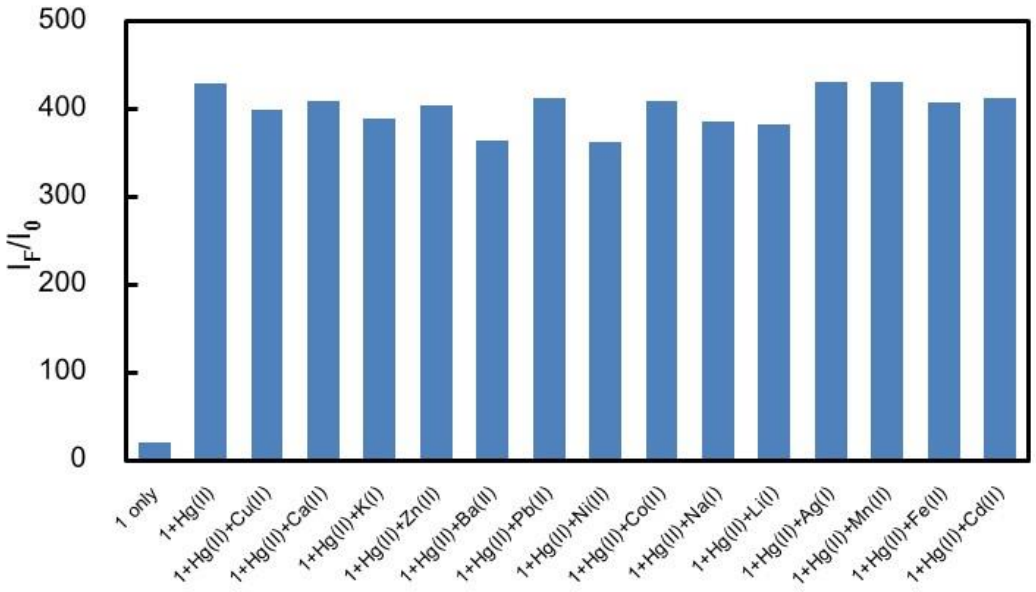


ภาพที่ 64 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (λ_{ex} = 529 nm และ λ_{em} = 545 nm) ของเซ็นเซอร์ **diRh6G** ($1.2x10^{-6}$ M) ในสารละลาย acetonitrile ในภาวะที่มีไอออนโลหะของเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ เข้มข้น 3.5 μM

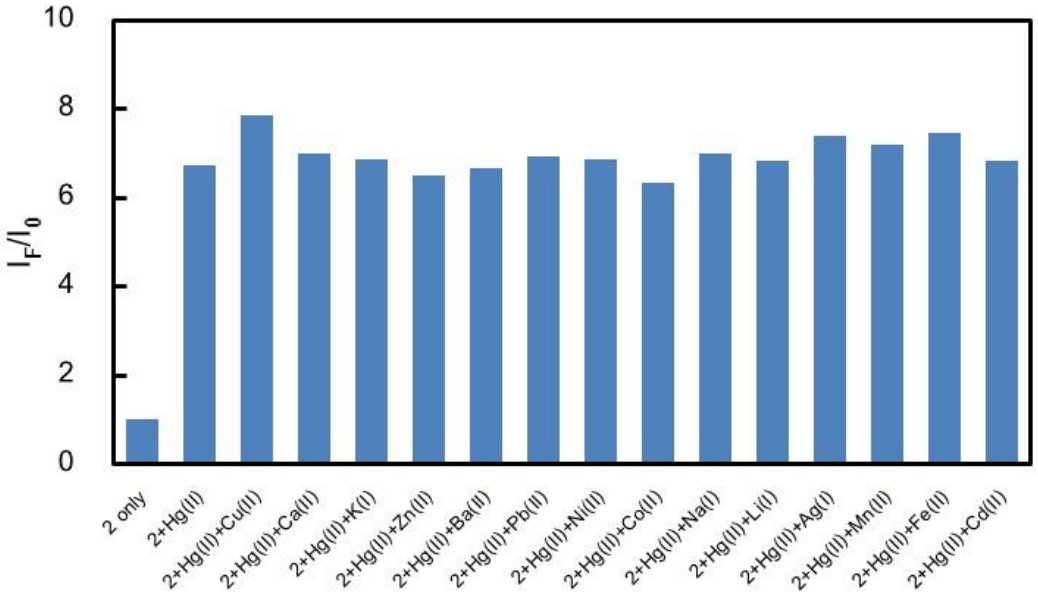
ภาพที่ 61 และภาพที่ 62 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Normalized Fluorescence Intensity (แกน y) ของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่ความยาวคลื่น 545 nm และความเข้มข้นของไอออนชนิดต่างๆ (แกน x) เมื่อ λ_{ex} = 529 nm ส่วนภาพที่ 63 และภาพที่ 64 แสดงความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ เมื่อ λ_{ex} = 529 nm ที่ความเข้มข้นของไอออนแต่ละชนิด 6.8 μM ในการทดสอบเซ็นเซอร์ **monoRh6G** และไอออนเข้มข้น 3.5 μM ในการทดสอบเซ็นเซอร์ **diRh6G** จากผลดังกล่าวพบว่าเซ็นเซอร์ **monoRh6G** มีความจำเพาะเจาะจงที่ดีกับไอออนของปรอท เมื่อเปรียบเทียบกับไอออนตัวอื่นๆ โดยสัญญาณฟลูออเรสเซนต์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเจน ในขณะที่สัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์หลังเติมไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ได้แก่ ไอออนเงิน (Ag^{+}) ไอออนลิเธียม (Li^{+}) ไอออนแบเรียม (Ba^{2+}) ไอออนแคลเซียม (Ca^{2+}) ไอออนแคดเมียม (Cd^{2+}) ไอออนโคบอลต์ (Co^{2+}) ไอออนทองแดง (Cu^{2+}) ไอออนเหล็ก (Fe^{2+}) ไอออนโพแทสเซียม (K^{+}) ไอออนสังกะสี (Zn^{2+}) ไอออนแมงกานีส (Mn^{2+}) ไอออนโซเดียม (Na^{+}) ไอออนนิกเกิล (Ni^{2+}) และไอออนตะกั่ว (Pb^{2+}) มีการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่น้อยมาก เมื่อเทียบกับความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์เริ่มต้น ในขณะที่เซ็นเซอร์ **diRh6G** เมื่อมีการเติมไอออนทองแดง (Cu^{2+}) มีการเพิ่มขึ้นของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์เล็กน้อยเมื่อเทียบกับไอออนปรอท

2.4. ผลการทดสอบสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ในภาวะที่มีไอออนปรอทรวมกับไอออนรบกวนอื่นๆ ของเซ็นเซอร์ monoRh6G และ diRh6G

การทดสอบการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของเซ็นเซอร์ **monoRh6G** และ **diRh6G** ในสารละลาย acetonitrile ในภาวะที่มีไอออนปรอทละลายรวมอยู่กับไอออนรบกวนอื่นๆ ได้แก่ Ag^{+}, Cu^{2+}, Ba^{2+}, Li^{+}, Pb^{2+}, Ca^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+}, Na^{+}, Ni^{2+}, K^{+} และ Zn^{2+} ซึ่งได้ทำการตรวจวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ในขณะที่มีปริมาณไอออนรบกวนต่างๆ เท่ากับ 10 เท่า ของปริมาณไอออนปรอทในสารละลาย โดยความเข้มข้นของเซ็นเซอร์ **monoRh6G** และ **diRh6G** เท่ากับ 3.4×10^{-6} M และ 1.2×10^{-6} M ตามลำดับ และใช้ไอออนในรูปของเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ ซึ่งผลการทดลองแสดงในรูปของกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า I_F/I_0 (แกน y) และชนิดของไอออนชนิดต่างๆ (แกน x) ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 65 และ ภาพที่ 66



ภาพที่ 65 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (λ_{ex} = 529 nm และ λ_{em} = 545 nm) ของเซ็นเซอร์ **monoRh6G** (3.4×10^{-6} M) ในสารละลาย acetonitrile ในภาวะที่มีความเข้มข้นไอออนรบกวนต่างๆ เจือปนในสารละลายเท่ากับ 68 μM (10 equiv.) ของความเข้มข้นไอออนปรอท 6.8 μM.



ภาพที่ 66 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (λ_{ex} = 529 nm และ λ_{em} = 545 nm) ของเซ็นเซอร์ diRh6G ($1.2x10^{-6}$ M) ในสารละลาย acetonitrile ในภาวะที่มีความเข้มข้นไอออนรบกวนต่างๆ เจือปนในสารละลายเท่ากับ 59 μM (10 equiv.) ของความเข้มข้นไอออนปรอท 5.9 μM

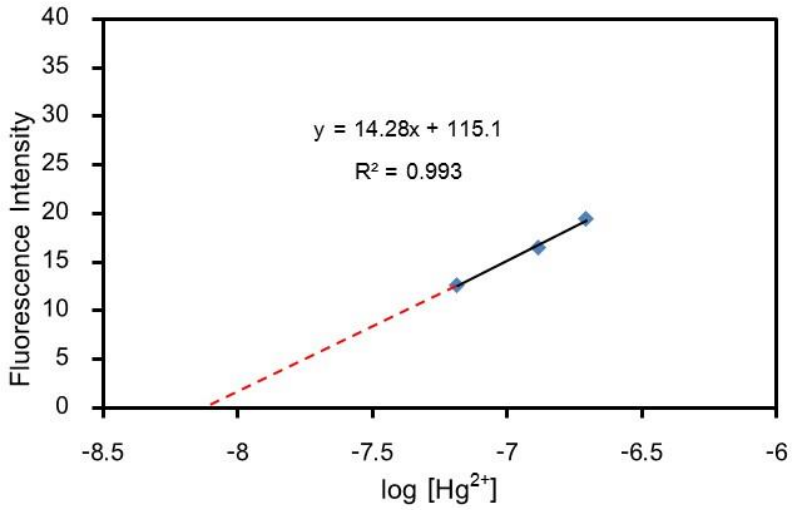
การทดลองนี้เป็นการทดสอบความสามารถในการตรวจจับไอออนปรอทของเซ็นเซอร์ monoRh6G และ diRh6G ในภาวะที่มีไอออนรบกวนอื่นๆ ได้แก่ ไอออนเงิน (Ag^{+}) ไอออนลิเธียม (Li^{+}) ไอออนแบเรียม (Ba^{2+}) ไอออนแคลเซียม (Ca^{2+}) ไอออนแคดเมียม (Cd^{2+}) ไอออนโคบอลต์ (Co^{2+}) ไอออนทองแดง (Cu^{2+}) ไอออนเหล็ก (Fe^{3+}) ไอออนโพแทสเซียม (K^{+}) ไอออนสังกะสี (Zn^{2+}) ไอออนแมงกานีส (Mn^{2+}) ไอออนโซเดียม (Na^{+}) ไอออนนิกเกิล (Ni^{2+}) และไอออนตะกั่ว (Pb^{2+}) ซึ่งมีความเข้มข้นของไอออนรบกวนต่างๆ เป็น 10 เท่าของความเข้มข้นของไอออนปรอท โดยตรวจวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่ความยาวคลื่น 545 nm จากภาพที่ 65 และ ภาพที่ 66 สังเกตได้ว่าสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่ได้หลังจากเติมไอออนรบกวนอื่นๆ รวมกับไอออนปรอท ไม่มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อเทียบกับสัญญาณฟลูออเรสเซนต์หลังการเติมไอออนปรอทเพียงชนิดเดียว แสดงให้เห็นว่า เซ็นเซอร์ทั้ง monoRh6G และ diRh6G มีประสิทธิภาพในการทำงานที่ดี แม้ในสภาวะที่มีไอออนอื่นๆรบกวน ดังนั้นหากในระบบที่ตรวจจับมีไอออนชนิดอื่นๆ เท่ากับปริมาณไอออนปรอท หรือมากกว่าไอออนปรอท เซ็นเซอร์ monoRh6G และ diRh6G ก็ยังคงแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนต์แบบ OFF-ON ได้โดยที่ประสิทธิภาพของเซ็นเซอร์ไม่ลดลง และสามารถดักจับไอออนปรอทได้อย่างจำเพาะเจาะจงสูง

2.5. **ค่าความสามารถต่ำสุดของการตรวจจับไอออนปรอท** (detection limit)

การคำนวณค่าความสามารถต่ำสุดของการตรวจจับ (detection limit) [36] กระทำโดยพลอต กราฟค่า log ของความเข้มข้นของปรอทที่เติมลงไป (แกน X) กับ intensity ที่จุดใดๆ (แกน y) ข้อมูลต่างๆ ของเซ็นเซอร์ **monoRh6G** และ **diRh6G** แสดงดังตารางที่ 6-7 และสร้างกราฟแสดงดังภาพที่ 67-68

ตารางที่ 6 ข้อมูลค่าความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมลงในสารละลายเซ็นเซอร์ **monoRh6G** กับ intensity ของเซ็นเซอร์ **monoRh6G** (λ_{ex} = 529 nm และ λ_{em} = 545 nm)

$[Hg^{2+}]$, mol/L	$log[Hg^{2+}]$	Intensity
$0.65x10^{-7}$	-7.18486	12.63
$1.31x10^{-7}$	-6.88383	16.50
$1.96x10^{-7}$	-6.70774	19.53



ภาพที่ 67 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า log ของความเข้มข้นของไอออนปรอทเปอร์คลอเรตที่เติมลงไป กับ intensity ของเซ็นเซอร์ **monoRh6G**, λ_{ex} เท่ากับ 529 nm

<u>การคำนวณ</u>

จากกราฟได้สมการเส้นตรงคือ $y = 14.28x + 115.1$; $R^2 = 0.993$

หาจุดตัดแกน x ; กำหนดให้ y = 0

ดังนั้น $0 = 14.28x + 115.1$

$x = -115.1/14.28$

$x = -8.06$

แต่ $x = \log [Hg^{2+}]$; จะได้ $\log [Hg^{2+}] = -8.06$

$[Hg^{2+}] = 10^{-8.06}$

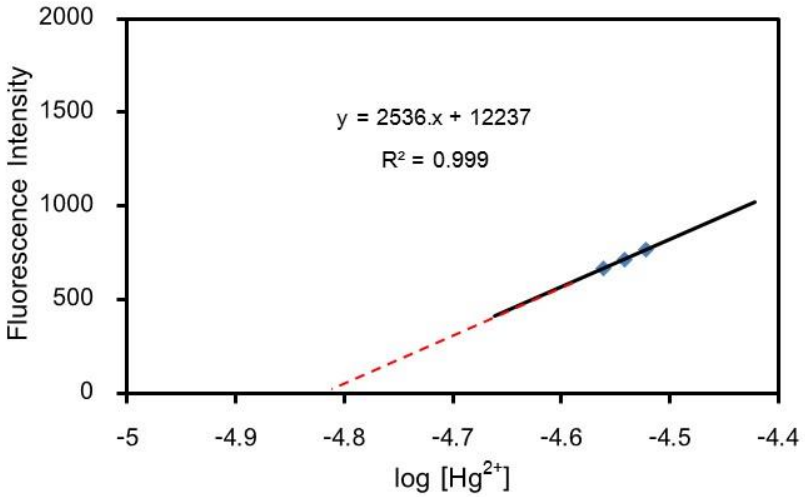
$= 8.71 \times 10^{-9}$ M

= 1.74 ppb.

จากสมการจะได้ detection limit ของเซ็นเซอร์ monoRh6G ในการตรวจจับไอออนปรอทเปอร์คลอเรต มีค่าเท่ากับ 8.71×10^{-9} M หรือ 1.74 ppb.

ตารางที่ 7 ข้อมูลค่าความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมลงในสารละลายเซ็นเซอร์ diRh6G กับ intensity ของเซ็นเซอร์ diRh6G (λ_{ex} = 529 nm และ λ_{em} = 545 nm)

$[Hg^{2+}]$, mol/L	$\log[Hg^{2+}]$	Intensity
2.74×10^{-5}	-4.56161	666.45
2.87×10^{-5}	-4.54141	716.75
3.00×10^{-5}	-4.52211	766.68



ภาพที่ 68 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า log ของความเข้มข้นของไอออนปรอทเปอร์คลอเรต ที่เติมลงไป กับ intensity ของเซ็นเซอร์ diRh6G, λ_{ex} เท่ากับ 529 nm

<u>การคำนวณ</u>

จากกราฟได้สมการเส้นตรงคือ $y = 2536x + 12237$; $R^2 = 0.999$

หาจุดตัดแกน x ; กำหนดให้ y = 0

ดังนั้น $0 = 2536x + 12237$

$x = -12237/2536$

$x = -4.82$

แต่ $x = \log [Hg^{2+}]$; จะได้ $\log [Hg^{2+}] = -4.82$

$[Hg^{2+}] = 10^{-4.82}$

$= 1.30 \times 10^{-5}$ M

= 3.00 ppm

จากสมการจะได้ detection limit ของเซ็นเซอร์ diRh6G ในการตรวจจับไอออนปรอทเปอร์คลอเรต มีค่าเท่ากับ 1.30×10^{-5} M หรือ 3.00 ppm.

2.6. ค่าคงที่สมดุลของการเกิดไอออนเชิงซ้อนและอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน

การคำนวณค่าคงที่สมดุลของการเกิดไอออนเชิงซ้อน (Association constant; K_{assoc}) จะคำนวณตามสมการของ Benesi-Hildebrand [32-34]

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

ซึ่งค่า K_{assoc} หาได้จากการพลอตตกราฟระหว่าง $1/[Hg^{2+}]$ (แกน X) กับ $1/A\text{-}A_0$ ที่จุดใดๆ (แกน y)

$$Slope = \frac{1}{K(A_{max} - A_0)}$$

$$K = \frac{1}{Slope(A_{max} - A_0)}$$

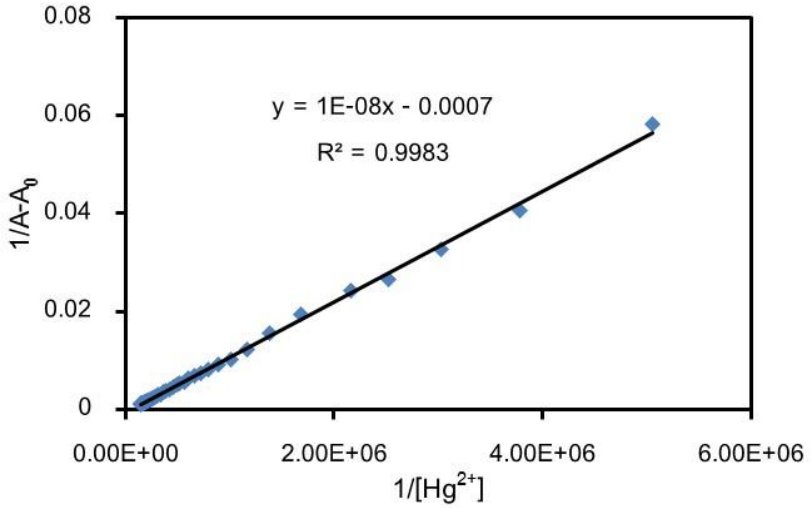
เมื่อ A_{max} = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนต์ที่มีค่ามากที่สุดของสารละลายเซ็นเซอร์ หลังเติมไอออนปรอท

A_0 = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายเซ็นเซอร์เริ่มต้น

A = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายเซ็นเซอร์ หลังเติมไอออนที่ความเข้มข้นใดๆ

มหาวิทยาลัยศิลปากร

การคำนวณค่า K_{assoc} ของเซ็นเซอร์ monoRh6G



ภาพที่ 69 กราฟแสดงความสัมพันธ์จากการคำนวณตามสมการ Benesi-Hildebrand ของเซ็นเซอร์ monoRh6G เมื่อ n = 1

$$K = \frac{1}{Slope(A_{max} - A_0)}$$

เมื่อ A_{max} = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนต์ที่มีค่ามากที่สุดของสารละลายเซ็นเซอร์ หลังเติมไอออนปรอท มีค่าเท่ากับ 962.04

A_0 = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายเซ็นเซอร์ ก่อนเติมไอออนปรอท มีค่าเท่ากับ 2.36

จากกราฟได้สมการเส้นตรงคือ $y = (1.0 \times 10^{-8})x + 0.0007$; $R^2 = 0.9983$

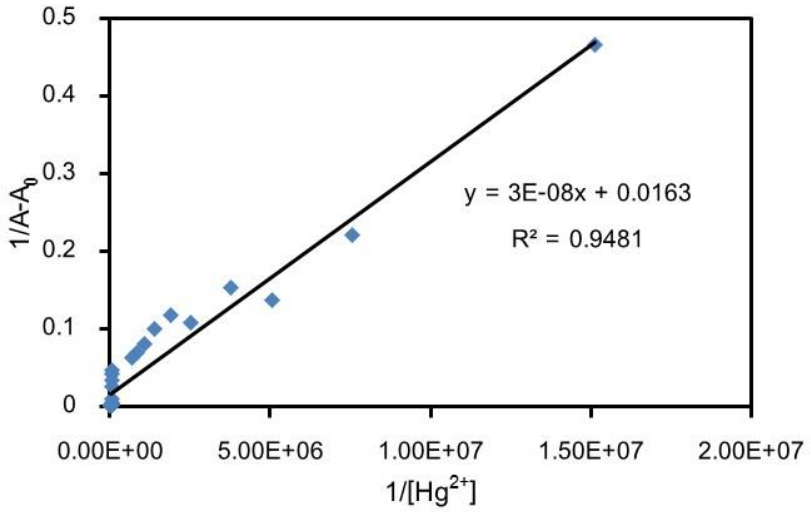
ซึ่ง slope $= 1.0 \times 10^{-8}$

ดังนั้น $K_{assoc} = 1/[(1.0 \times 10^{-8})(962.04-2.36)]$

$= 1.04 \times 10^{5}\ M^{-1}$

ดังนั้น ค่าคงที่สมดุลของการเกิดไอออนเชิงซ้อน, K_{assoc} ของเซ็นเซอร์ monoRh6G มีค่าเท่ากับ $1.04 \times 10^{5}\ M^{-1}$

การคำนวณค่า K_{assoc} ของเซ็นเซอร์ diRh6G



ภาพที่ 70 กราฟแสดงความสัมพันธ์จากการคำนวณตามสมการ Benesi-Hildebrand ของเซ็นเซอร์ diRh6G เมื่อ n = 1

$$K = \frac{1}{Slope(A_{max} - A_0)}$$

เมื่อ A_{max} = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนต์ที่มีค่ามากที่สุดของสารละลายเซ็นเซอร์ หลังเติมไอออนปรอท มีค่าเท่ากับ 950.67

A_0 = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายเซ็นเซอร์ ก่อนเติมไอออนปรอท มีค่าเท่ากับ 59.84

จากกราฟได้สมการเส้นตรงคือ $y = (3.0 \times 10^{-8})x + 0.0163$; $R^2 = 0.9983$

ซึ่ง slope $= 3.0 \times 10^{-8}$

ดังนั้น $K_{assoc} = 1/[(3.0 \times 10^{-8})(950.67-59.84)]$

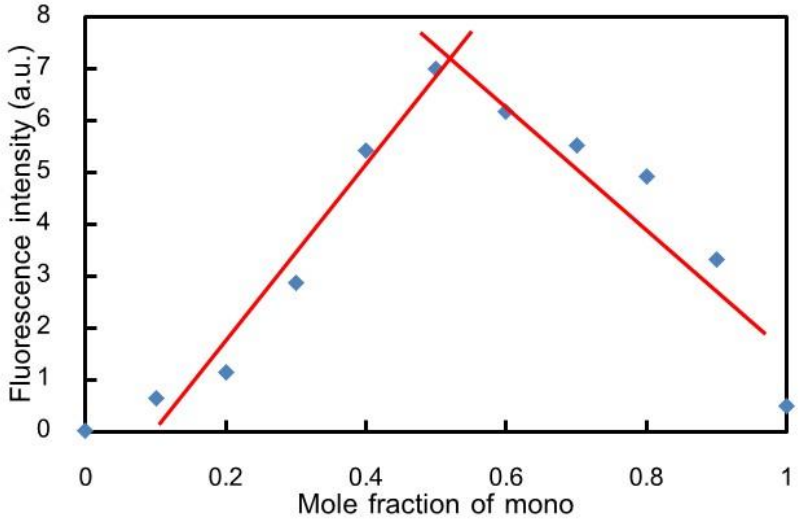
$= 3.74 \times 10^{4}\ M^{-1}$

ดังนั้น ค่าคงที่สมดุลของการเกิดไอออนเชิงซ้อน, K_{assoc} ของเซ็นเซอร์ diRh6G มีค่าเท่ากับ $3.74 \times 10^{4}\ M^{-1}$

จากผลการทดลองต่างๆ ที่ผ่านมา จะเห็นได้ว่า เซ็นเซอร์ monoRh6G มีประสิทธิภาพที่ดีกว่าเซ็นเซอร์ diRh6G ทั้งในแง่ความไวของเซ็นเซอร์ในการตรวจจับไอออนปรอท ความจำเพาะ

เจาะจงต่อไอออนปรอท รวมไปถึง detection limit ที่ต่ำกว่า ในการศึกษาในลำดับถัดไปจึงมุ่งเน้นไปที่เซ็นเซอร์ monoRh6G

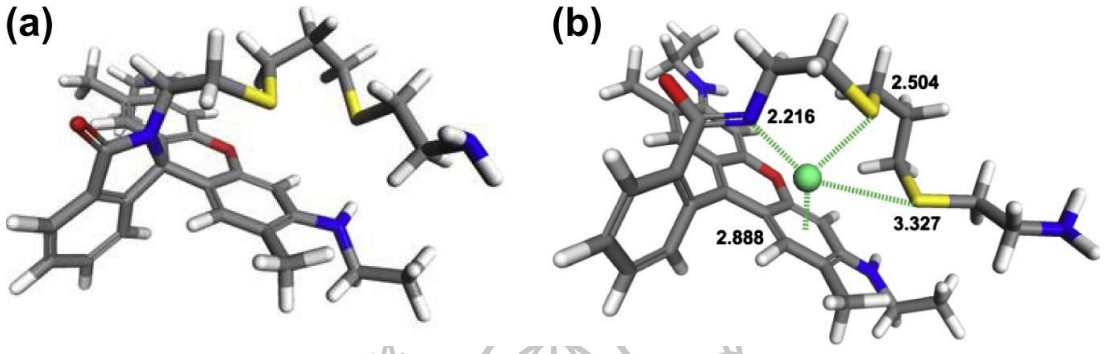
จากการศึกษาหาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโมเลกุลของเซ็นเซอร์ monoRh6G กับไอออนปรอทที่ใช้ในการเกิด binding โดยวิธี Job's plot ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 71



ภาพที่ 71 กราฟแสดงอัตราส่วนระหว่างโมเลกุลของเซ็นเซอร์ monoRh6G กับไอออนปรอทที่ใช้ในการเกิด binding

จากผลของ Job's plot แสดงให้เห็นว่า เซ็นเซอร์ monoRh6G หนึ่งโมเลกุลสามารถดักจับไอออนปรอทเปอร์คลอเรต 1 โมเลกุล (monoRh6G:Hg^{2+} = 1:1) และจากการศึกษาค่าคงที่สมดุลของการเกิดไอออนเชิงซ้อน (Association constant; K_{assoc}) ของเซ็นเซอร์ monoRh6G มีค่าเท่ากับ 1.04×10^{5} M^{-1} โดยที่ n = 1 ซึ่งแสดงถึงความสอดคล้องกัน

2.7. **ผลการทำนายการเปลี่ยนแปลงของเซ็นเซอร์** monoRh6G **ก่อนและหลังการจับไอออนปรอท โดยเทคนิค** Molecular modeling



ภาพที่ 72 แสดงลักษณะโครงสร้างด้วยเทคนิค Molecular modeling ของ a) เซ็นเซอร์ **monoRh6G** และ b) เซ็นเซอร์ **monoRh6G**:Hg^{2+} อัตราส่วน 1:1

ในการทำนายการเปลี่ยนแปลงของเซ็นเซอร์ **monoRh6G** ก่อนและหลังการจับไอออนปรอท โดยเทคนิค molecular modeling ในงานวิจัยนี้เลือกใช้โปรแกรม Material Studio 5.5 program package (Dmol3 program) โดยผลปรากฏว่า ในภาวะก่อนเติมไอออนปรอทลงไปในสารละลาย เซ็นเซอร์ **monoRh6G** มีลักษณะโครงสร้างดังภาพที่ 72a เมื่อเติมไอออนปรอทลงไปในสารละลาย ไอออนปรอทจะไปโคออดิเนตกับอะตอมของไนโตรเจน (N), อะตอมของซัลเฟอร์ (S) และที่ใจกลางของวง aromatic (cation–dipole และ cation–¶ interactions) ด้วยกระบวนการ electrostatic interactions โดยไอออนปรอทเกิดโคออร์ดิเนตกับ 1 อะตอมไนโตรเจน (N), 2 อะตอมของซัลเฟอร์ (S) และวง aromatic ในระยะทางเท่ากับ 2.504 Å, 3.327 Å, 2.216 Å และ 2.888 Å ตามลำดับ ดังภาพที่ 72b ซึ่งจากการศึกษานี้สามารถช่วยยืนยันว่าเซ็นเซอร์ **monoRh6G** สามารถดักจับไอออนปรอทได้ในอัตราส่วน 1:1 ตรงตามผลการศึกษาด้วยเทคนิค Job's plot และในการคำนวณค่าคงที่สมดุลของการเกิดไอออนเชิงซ้อน, K_{assoc}

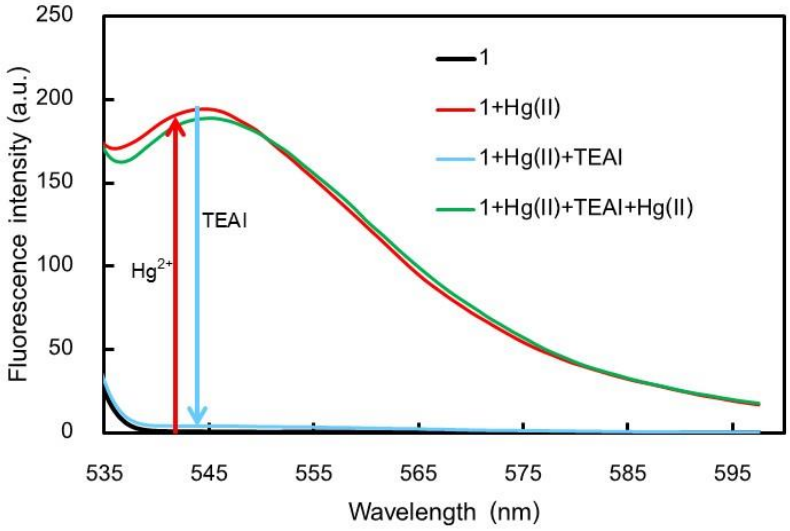
2.8. ภาพถ่ายของสารละลายเซ็นเซอร์ monoRh6G ในภาวะที่มีไอออนปรอทเปรียบเทียบกับไอออนรบกวนอื่นๆ

ภาพที่ 73 การเปลี่ยนแปลงสีของเซ็นเซอร์ monoRh6G ในสารละลาย acetonitrile ก่อนและหลังเติมไอออน Hg^{2+}, Ag^{+}, Cu^{2+}, Ba^{2+}, Li^{+}, Pb^{2+}, Ca^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+}, Na^{+}, Ni^{2+}, K^{+} และ Zn^{2+}

จากภาพถ่าย แสดงให้เห็นว่าเซ็นเซอร์ monoRh6G มีจำเพาะเจาะจงกับไอออนปรอทสูงเมื่อเทียบกับไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ โดยจะเห็นการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายจากไม่มีสีเป็นสีชมพูเมื่อมีการเติมไอออนปรอทลงในสารละลาย (ภาพที่ 73) ในขณะที่เมื่อมีการเติมไอออนชนิดอื่นได้แก่ Ag^{+}, Cu^{2+}, Ba^{2+}, Li^{+}, Pb^{2+}, Ca^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+}, Na^{+}, Ni^{2+}, K^{+} และ Zn^{2+} ลงในสารละลายจะไม่เห็นการเปลี่ยนแปลง โดยสีของสารละลายยังคงไม่มีสีเช่นเดิม

2.9. ผลการทดสอบความสามารถในการนำกลับมาใช้ใหม่ ของเซ็นเซอร์ monoRh6G (Reversibility study)

การทดสอบความสามารถในการนำกลับมาใช้ใหม่ของเซ็นเซอร์ monoRh6G ในสารละลาย acetonitrile ในสภาวะที่มีไอออนปรอท และ tetraethylammonium iodide (TEAI) แสดงผลดังภาพที่ 74



ภาพที่ 74 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของเซ็นเซอร์ **monoRh6G (1)** ($3.4x10^{-6}$ M) ในสารละลาย acetonitrile ในสภาวะที่มีไอออนปรอท และ tetraethylammonium iodide (TEAI) โดย Hg^{2+}/ TEAI ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0/0, 2/0, 2/0.3, 4/0.3)

จากภาพที่ 74 พบว่าในสภาวะที่ไม่มีไอออนปรอท เซ็นเซอร์จะคายแสงฟลูออเรสเซนต์ในปริมาณที่น้อยมาก (เส้นสีดำ) เมื่อมีการเติมไอออนปรอทลงไปในสารละลายเซ็นเซอร์ monoRh6G สัญญาณฟลูออเรสเซนต์มีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้น (เส้นสีแดง) แต่เมื่อเติม TEAI พบว่าสัญญาณฟลูออเรสเซนต์มีการลดลง (เส้นสีฟ้า) เท่ากับสัญญาณฟลูออเรสเซนต์เริ่มต้นที่ไม่มีไอออนปรอทเจือปนอยู่ และเมื่อเติมไอออนปรอทลงไปในสารละลายอีกครั้งพบว่า สัญญาณฟลูออเรสเซนต์สามารถเพิ่มกลับขึ้นไปจนเกือบเท่าสัญญาณเดิมที่มีการเติมไอออนปรอทไปในครั้งแรก (เส้นสีเขียว) แสดงว่าการเติม TEAI มีความสามารถในการเป็นตัวเหนี่ยวนำให้เซ็นเซอร์ monoRh6G สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อีกครั้ง

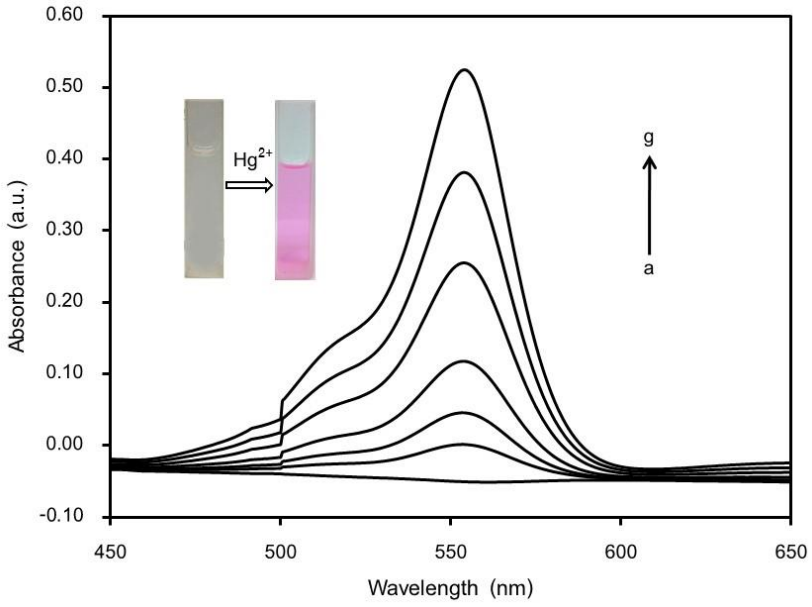
3. การศึกษาความสามารถในการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ และ ความสามารถในการดักจับไอออนปรอท และ ไอออนรบกวนอื่นๆ ของเซ็นเซอร์ RhB-1

จากการศึกษาเซ็นเซอร์ RhB-1 ในสภาวะที่เป็นสารละลายต่างๆ ของ Kim และคณะ [21] พบว่า ในระบบสารละลาย MeOH:H_2O (10:90 v/v) เซ็นเซอร์มีความว่องไวและจำเพาะเจาะจงสูงต่อไอออนปรอท ดังนั้นระบบสารละลายของ MeOH:H_2O (10:90 v/v) จึงถูกนำใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพในการทำงานของเซ็นเซอร์ในการตรวจจับไอออนโลหะหนัก ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปี เพื่อเป็นการยืนยันความว่องไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) ความจำเพาะ

เจาะจง (selectivity) กับไอออนปรอท เปรียบเทียบกับไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ก่อนจะนำไปศึกษาต่อบนตัวกลางที่เป็นของแข็งในลำดับถัดไป

3.1. ผลการทดสอบสมบัติการดูดกลืนแสงอุลตร้าไวโอเลตในภาวะที่มีไอออนปรอทของเซ็นเซอร์ RhB-1

การดูดกลืนแสงอุลตร้าไวโอเลตของเซ็นเซอร์ **RhB-1** ศึกษาในสารละลาย MeOH:H_2O (10:90 v/v) โดยติดตามสเปกตรัมของการดูดกลืนแสง (absorption spectra) ซึ่งความเข้มข้นของเซ็นเซอร์ **RhB-1** มีค่าเท่ากับ $3.3x10^{-5}$ M และใช้ไอออนปรอทในรูปของเกลืออะซิเตรต ผลการทดลองที่ได้แสดงดังภาพที่ 75



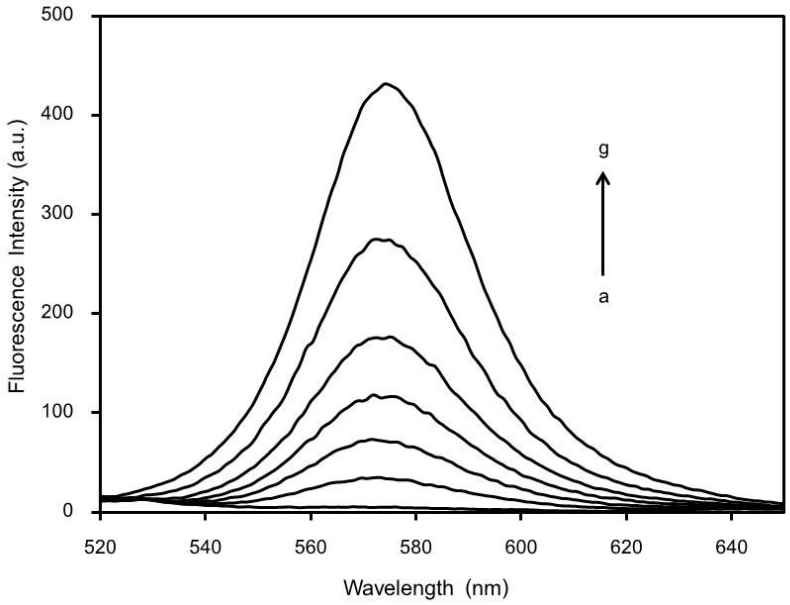
ภาพที่ 75 การดูดกลืนแสงของเซ็นเซอร์ **RhB-1** ($3.3x10^{-5}$ M) ในสารละลาย MeOH:H_2O (10:90 v/v) ก่อนและหลังเติมไอออนปรอทอะซิเตรตที่ความเข้มข้นต่างๆ (a) 0 μM, (b) 3.3 μM, (c) 6.7 μM, (d) 10.0 μM, (e) 13.3 μM, (f) 16.7 μM, (g) 20.0 μM

จากผลการทดลองพบว่า การตรวจจับของเซ็นเซอร์ **RhB-1** กับไอออนปรอทแสดงสัญญาณการดูดกลืนแสงในช่วงยูวี-วิซิเบิล (UV-Vis absortion) แบบระบบ OFF-ON โดยพบว่าภายหลังการเติมไอออนปรอทอะซิเตรตที่ความเข้มข้นต่างๆ ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ **RhB-1** จะดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 550 nm และแสดงสัญญาณการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเมื่อ

ความเข้มข้นปรอทเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงความเข้มของการดูดกลืนแสงที่เกิดขึ้นนี้ ส่งผลให้สามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายได้ด้วยตาเปล่าโดยจากสารละลายไม่มีสีเป็นสีชมพู

3.2. ผลการทดสอบสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ในภาวะที่มีไอออนปรอทของเซ็นเซอร์ RhB-1

การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของเซ็นเซอร์ **RhB-1** ถูกศึกษาในสารละลาย MeOH:H_2O (10:90 v/v) โดยติดตามสเปกตรัมของการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence emission spectra) ก่อนและหลังการเติมไอออนปรอท ในช่วงความยาวคลื่น 575 nm เมื่อ λ_{ex} = 500 nm ความเข้มข้นของเซ็นเซอร์ **RhB-1** เท่ากับ 4.4×10^{-6} M ใช้ไอออนปรอทในรูปของเกลืออะซิเตรต ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 76



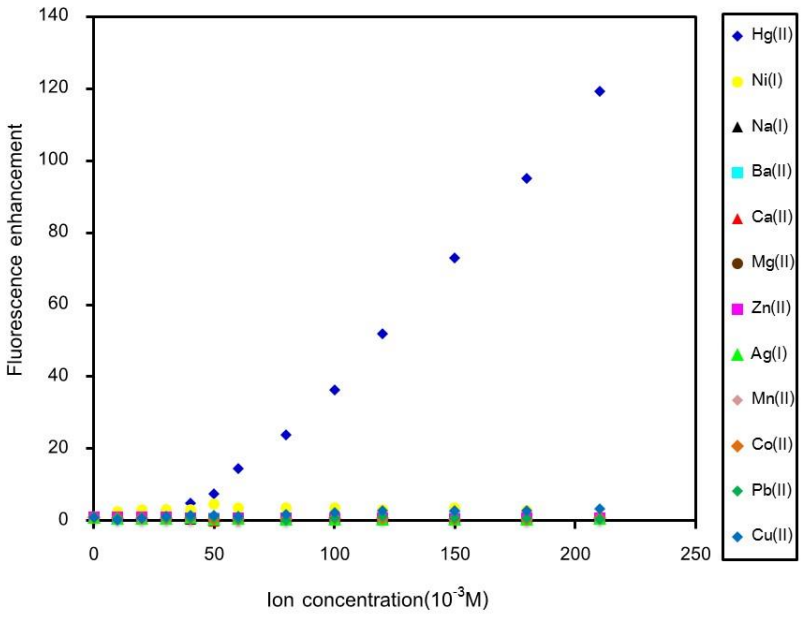
ภาพที่ 76 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (λ_{ex} = 500 nm และ λ_{em} = 575 nm) ของเซ็นเซอร์ **RhB-1** (4.4×10^{-6} M) ในสารละลาย acetonitrile ก่อนและหลังเติมไอออนปรอทอะซิเตรต ที่ความเข้มข้นต่างๆ (a) 0 μM, (b) 0.2 μM, (c) 0.3 μM, (d) 0.6 μM, (e) 0.9 μM, (f) 1.52 μM, (g) 2.24 μM.

จากภาพที่ 76 พบว่า การตรวจจับของเซ็นเซอร์ **RhB-1** กับไอออนปรอทแสดงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์แบบระบบ OFF-ON ซึ่งเกิดจากกลไกการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนโดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซ็นเซอร์ภายหลังการตรวจจับไอออนปรอทของเซ็นเซอร์ใน

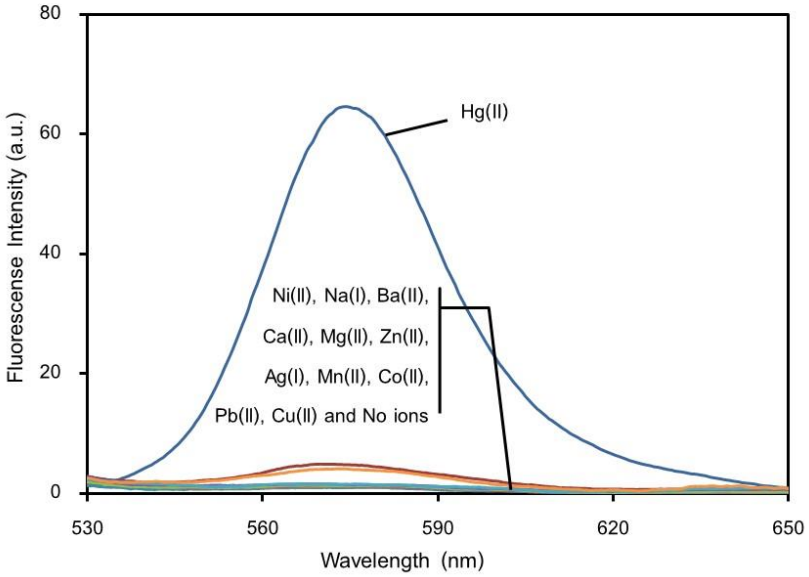
สารละลาย MeOH:H_2O (10:90 v/v) โดยพบว่าในภาวะที่ไม่มีไอออนปรอท เซ็นเซอร์ **RhB-1** จะคายแสงฟลูออเรสเซนต์ในปริมาณที่น้อยมาก แต่ภายหลังเมื่อมีการเติมไอออนปรอทอะซิเตรตที่ความเข้มข้นต่างๆ เซ็นเซอร์จะแสดงสัญญาณคายแสงฟลูออเรสเซนต์เพิ่มขึ้นในช่วงความยาวคลื่น 520-650 nm โดยความยาวคลื่นมากที่สุด (λ_{max}) ของการคายแสงฟลูออเรสเซนต์มีค่าเท่ากับ 575 nm ซึ่งการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของเซ็นเซอร์ **RhB-1** จะเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณไอออนปรอทที่เพิ่มขึ้นในสารละลาย โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดของการตรวจวัดไอออนปรอท (detection limit) เท่ากับ 0.24×10^{-6} M หรือ 48 ppb

3.3. ผลการทดสอบสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ในภาวะที่มีไอออนปรอทเปรียบเทียบกับไอออนรบกวนอื่นๆ ของเซ็นเซอร์ RhB-1

การทดสอบการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของเซ็นเซอร์ **RhB-1** ในสารละลาย MeOH:H_2O (10:90 v/v) ในภาวะที่มีไอออนปรอทในรูปของเกลืออะซิเตรต เปรียบเทียบกับในภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดต่างๆ ได้แก่ Ag^+, Cu^{2+}, Ba^{2+}, Pb^{2+}, Ca^{2+}, Co^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Na^+, Ni^{2+} และ Zn^{2+} ได้ผลดังภาพที่ 77 และ 78



ภาพที่ 77 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (λ_{ex} = 500 nm และ λ_{em} = 575 nm) ของเซ็นเซอร์ **RhB-1** (20.0×10^{-6} M) ในสารละลาย MeOH:H_2O (10:90 v/v) ในภาวะที่มีไอออนโลหะของเกลืออะซิเตรตชนิดต่างๆ ในปริมาณที่ต่างกัน



ภาพที่ 78 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (λ_{ex} = 500 nm และ λ_{em} = 575 nm) ของเซ็นเซอร์ **RhB-1** (20.0×10^{-6} M) ในสารละลาย MeOH:H_2O (10:90 v/v) ในภาวะที่มีไอออนโลหะของเกลืออะซิเตรตชนิดต่างๆ เข้มข้น 26.7 μM

จากภาพที่ 77 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Normalized Fluorescence Intensity (แกน y) ของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่ความยาวคลื่น 575 nm และความเข้มข้นของไอออนชนิดต่างๆ (แกน x) เมื่อ λ_{ex} = 500 nm ส่วนภาพที่ 78 แสดงความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ เมื่อ λ_{ex} = 500 nm ที่ความเข้มข้นของไอออนแต่ละชนิด 26.7 μM จากผลดังกล่าวพบว่าเซ็นเซอร์ **RhB-1** มีความจำเพาะเจาะจงที่ดีกับไอออนของปรอท เมื่อเปรียบเทียบกับไอออนตัวอื่นๆ โดยค่า Normalized Fluorescence Intensity มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเจน ในขณะที่สัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์หลังเติมไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ได้แก่ ไอออนแมกนีเซียม (Mg^{2+}) ไอออนเงิน (Ag^{+}) ไอออนแบเรียม (Ba^{2+}) ไอออนแคลเซียม (Ca^{2+}) ไอออนโคบอลต์ (Co^{2+}) ไอออนทองแดง (Cu^{2+}) ไอออนสังกะสี (Zn^{2+}) ไอออนแมงกานีส (Mn^{2+}) ไอออนโซเดียม (Na^{+}) ไอออนนิกเกิล (Ni^{2+}) และไอออนตะกั่ว (Pb^{2+}) มีการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่น้อยมากเมื่อเทียบกับความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์เริ่มต้น

4. การทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจจับไอออนโลหะและไอออนรบกวนอื่น ๆ ของเซ็นเซอร์ RhB-Silica

เมื่อทำการยืนยันโครงสร้างและศึกษาสมบัติทางกายภาพของเซ็นเซอร์ RhB-Silica ด้วยเทคนิคต่างๆ เรียบร้อยแล้ว จากนั้นเซ็นเซอร์ RhB-Silica จะถูกนำมาศึกษาถึงประสิทธิภาพในการทำงานเกี่ยวกับการตรวจจับไอออนโลหะหนัก โดยสังเกตการเปลี่ยนสีของเซ็นเซอร์ในสารละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ เพื่อหาความว่องไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) ความจำเพาะเจาะจงกับไอออน (selectivity) เปรียบเทียบกับไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ รวมทั้งนำเซ็นเซอร์ RhB-Silica ไปศึกษาในแหล่งน้ำตัวอย่างในชีวิตประจำวัน

โดยการนำเซ็นเซอร์ RhB-Silica ที่อยู่ในลักษณะเป็นผงของแข็งใส่ในสารละลาย ที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ ทั้งนี้ไอออนปรอท ไอออนโลหะทรานซิชัน ไอออนโลหะอัลคาไลน์ และไอออนโลหะอัลคาไลน์เอิร์ทชนิดต่างๆ เตรียมโดยนำเกลืออะซิเตรตของไอออนแต่ละชนิด ละลายในน้ำ DI

4.1 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงสีของเซ็นเซอร์ RhB-Silica **(ขนาด** 63-200 μm**) เมื่อมีการจับไอออนปรอทในน้ำ** DI

ภาพที่ 79 การเปลี่ยนแปลงสีของเซ็นเซอร์ RhB-Silica (ขนาด 63-200 μm) ในน้ำ DI ในภาวะที่มีไอออนปรอทที่ความเข้มข้นต่างๆ

จากภาพที่ 79 เป็นผลการทดสอบการนำเซ็นเซอร์ RhB-Silica ที่ใช้ซิลิกาเจลขนาด 63-200 μm ในการสังเคราะห์เซ็นเซอร์ ใส่ลงในน้ำ DI ที่มีไอออนปรอทที่ความเข้มข้นต่างๆ สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของเซ็นเซอร์ ถ่ายภาพผงซิลิกา (เซ็นเซอร์ RhB-Silica) ก้นหลอด พบว่าสีของซิลิกาในสารละลายน้ำเปลี่ยนแปลงเป็นสีชมพูเข้มมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของปรอทเพิ่มขึ้น โดยความเข้มข้นที่น้อยที่สุด (detection limit) ที่สามารถมองเห็นการเปลี่ยนแปลงของสีได้ด้วยตาเปล่าเท่ากับ 30 ppm

4.2 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงสีของเซ็นเซอร์ RhB-Silica (ขนาด 63-200 μm) ในน้ำ DI ในภาวะที่มีไอออนปรอท เปรียบเทียบกับไอออนรบกวนอื่นๆ

ภาพที่ 80 การเปลี่ยนแปลงสีของเซ็นเซอร์ RhB-Silica (ขนาด 63-200 μm) ในน้ำ DI ในภาวะที่มีไอออนโลหะของเกลืออะซิเตรตชนิดต่างๆ เข้มข้น 100 ppm

จากภาพที่ 80 เป็นผลการทดสอบการนำเซ็นเซอร์ RhB-Silica ที่ใช้ซิลิกาเจลขนาด 63-200 μm ในการสังเคราะห์เซ็นเซอร์ ใส่ลงในน้ำ DI ที่มีไอออน Hg^{2+}, Ni^{+}, Na^{+}, Ba^{2+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}, Ag^{+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, Pb^{2+} และ Cu^{2+} ในแต่ละหลอดทดลอง ตามลำดับ สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของเซ็นเซอร์ ถ่ายภาพผงซิลิกา (เซ็นเซอร์ RhB-Silica) ก้นหลอด พบว่าในสารละลายของไอออน Cu^{2+} และ Co^{2+} เห็นการเปลี่ยนแปลงเป็นสีชมพูเล็กน้อยเมื่อเทียบกับไอออนชนิดอื่นๆ แต่ก็ยังน้อยกว่าในสารละลายของไอออน Hg^{2+} ซึ่งสีของเซ็นเซอร์เปลี่ยนเป็นสีชมพูเข้มอย่างชัดเจน แสดงให้เห็นว่าเซ็นเซอร์ RhB-Silica ที่สังเคราะห์ได้มีความจำเพาะเจาะจงกับไอออนปรอทดีที่สุด

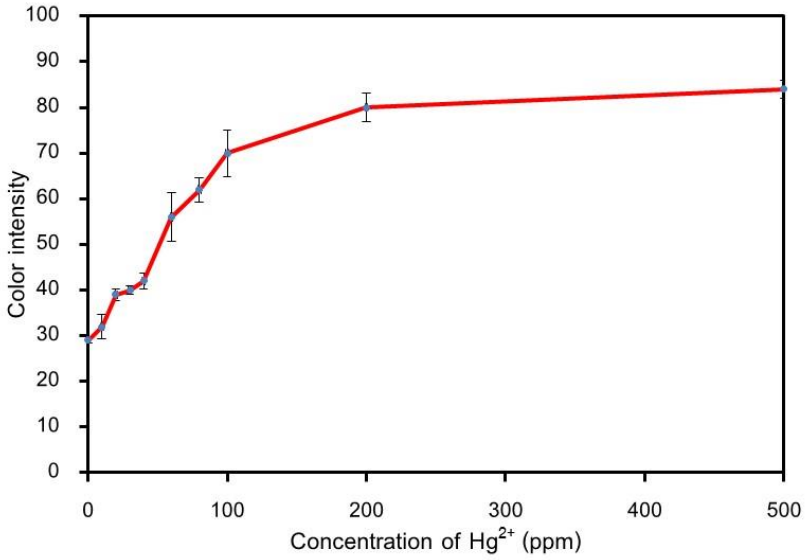
4.3 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงสีของเซ็นเซอร์ RhB-Silica (ขนาด 40-63 μm) เมื่อมีการจับไอออนปรอทในน้ำ DI

ภาพที่ 81 การเปลี่ยนแปลงสีของเซ็นเซอร์ RhB-Silica (ขนาด 40-63 μm) ในน้ำ DI ในภาวะที่มีไอออนปรอทที่ความเข้มข้นต่างๆ

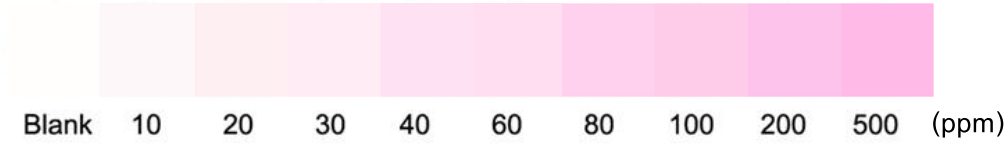
จากภาพที่ 81 เป็นผลการทดสอบการนำเซ็นเซอร์ RhB-Silica ที่ใช้ซิลิกาเจลขนาด 40-63 μm ในการสังเคราะห์เซ็นเซอร์ ใส่ลงในน้ำ DI ที่มีไอออนปรอทที่ความเข้มข้นต่างๆ สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของเซ็นเซอร์ ถ่ายภาพผงซิลิกา (เซ็นเซอร์ RhB-Silica) ก้นหลอด พบว่าสีของซิลิกาในสารละลายน้ำเปลี่ยนแปลงจากไม่มีสีเป็นสีชมพู เมื่อความเข้มข้นของปรอทเพิ่มขึ้น สีของ

เซ็นเซอร์มีแน้วโน้มเป็นสีชมพูเพิ่มมากขึ้น โดยความเข้มข้นที่น้อยที่สุด (detection limit) ที่สามารถมองเห็นการเปลี่ยนแปลงของสีได้ด้วยตาเปล่าเท่ากับ 20 ppm

จากนั้นนำภาพถ่ายผงซิลิกา (เซ็นเซอร์ RhB-Silica) ที่ผ่านการทดสอบกับไอออนปรอทแล้ว เข้าสู่โปรแกรม Adobe Photoshop แล้วทำการวิเคราะห์ผ่านระบบสี CMYK ตามวิธีของ Mentele และคณะ [37] ได้เป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสี (Color intensity) เฉลี่ยของภาพถ่ายแต่ละความเข้มข้น ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยของความเป็นสีแดงอมม่วง (Magenta, M) กับความเข้มข้นของไอออนปรอท แสดงดังภาพที่ 82 จากนั้นนำค่าความเข้มสีเฉลี่ยที่ได้มาสร้างเป็นแถบสีเทียบกับความเข้มข้นของปรอท ได้ดังภาพที่ 83



ภาพที่ 82 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีของเซ็นเซอร์ RhB-Silica (ขนาด 40-63 µm) หลังการเติมไอออนปรอท กับความเข้มข้นของไอออนปรอท



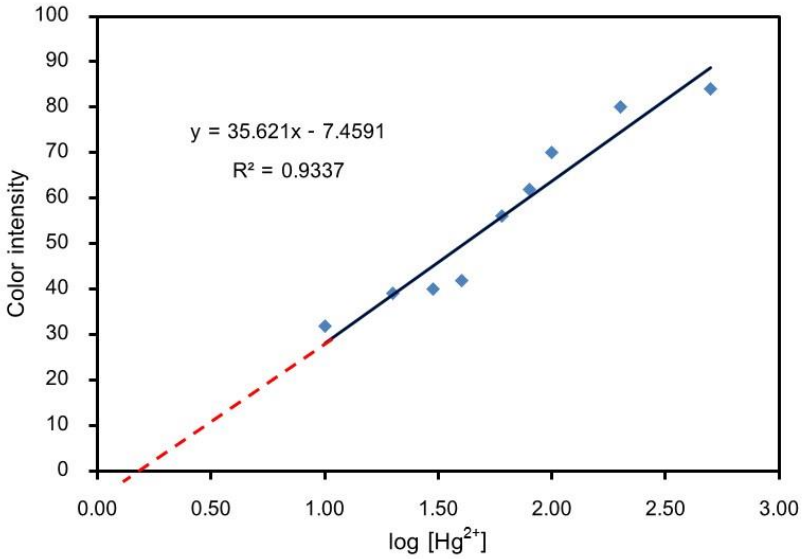
ภาพที่ 83 แถบสีของเซ็นเซอร์ RhB-Silica (ขนาด 40-63 µm) ในภาวะที่มีไอออนปรอทที่ความเข้มข้นต่างๆ

จากภาพที่ 82 จะเห็นว่าช่วงของความเป็นเส้นตรงของกราฟที่เห็นการเปลี่ยนแปลงสีของเซ็นเซอร์ RhB-Silica มีค่าความเข้มข้นของไอออนปรอทที่ใช้ตั้งแต่ 0-100 ppm ซึ่งสามารถคำนวณ

ค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของการตรวจจับไอออนปรอท (detection limit) ที่เห็นการเปลี่ยนแปลงสีได้ด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop ผ่านระบบสี CMYK มีค่าเท่ากับ 1.62 ppm โดยการคำนวณค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของการตรวจจับไอออนปรอทกระทำโดยพลอต กราฟค่า log ของความเข้มข้นของปรอทที่เติมลงไป (แกน X) กับความเข้มสีที่จุดใดๆ (แกน y) ซึ่งแสดงข้อมูลต่างๆ ดังตารางที่ 8 และสร้างกราฟแสดงดังภาพที่ 84

ตารางที่ 8 ข้อมูลค่าความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมลงในเซ็นเซอร์ RhB-Silica กับความเข้มสี

$[Hg^{2+}]$, ppm	$log[Hg^{2+}]$	Color Intensity (M)
10	1.00	32
20	1.30	39
30	1.48	40
40	1.60	42
60	1.78	56
80	1.90	62
100	2.00	70



ภาพที่ 84 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า log ของความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมลงไปกับความเข้มสีของเซ็นเซอร์ RhB-Silica

<u>การคำนวณ</u>

จากกราฟได้สมการเส้นตรงคือ $y = 35.621x - 7.4591$; $R^2 = 0.9337$

หาจุดตัดแกน x ; กำหนดให้ y = 0

ดังนั้น $0 = 35.621x - 7.4591$

$x = 7.4591/35.621$

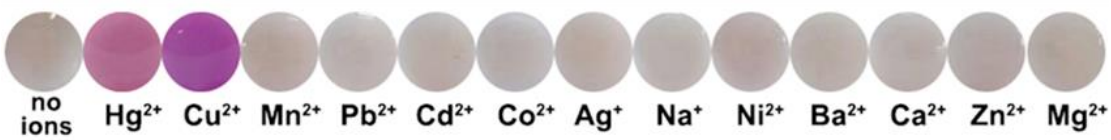
$x = 0.209$

แต่ $x = \log [Hg^{2+}]$; จะได้ $\log [Hg^{2+}] = 0.209$

$[Hg^{2+}] = 10^{0.209}$

$= 1.62$ ppm

4.4 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงสีของเซ็นเซอร์ RhB-Silica (ขนาด 40-63 μm) ในน้ำ DI ในภาวะที่มีไอออนปรอท เปรียบเทียบกับไอออนรบกวนอื่น ๆ



ภาพที่ 85 การเปลี่ยนแปลงสีของเซ็นเซอร์ RhB-Silica (ขนาด 40-63 μm) ในน้ำ DI ในภาวะที่มีไอออนโลหะของเกลืออะซิเตรตชนิดต่างๆ เข้มข้น 100 ppm

จากภาพที่ 85 เป็นผลการทดสอบการนำเซ็นเซอร์ RhB-Silica ที่ใช้ซิลิกาเจลขนาด 40-63 μm ในการสังเคราะห์เซ็นเซอร์ ใส่ลงในน้ำ DI ที่มีไอออน Hg^{2+}, Ni^{+}, Na^{+}, Ba^{2+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}, Ag^{+}, Mn^{2+}, Co^{2+},Cd^{2+}, Pb^{2+} และ Cu^{2+} ในแต่ละหลอดทดลอง ตามลำดับ สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของเซ็นเซอร์ ถ่ายภาพผงซิลิกา (เซ็นเซอร์ RhB-Silica) ก้นหลอด พบว่าในหลอดที่มีการเติมไอออน Hg^{2+} สีของเซ็นเซอร์เปลี่ยนเจากไม่มีสีเป็นสีชมพู ในขณะที่หลอดทดลองที่มีการเติมไอออนรบกวนอื่นๆ สีของเซ็นเซอร์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ยกเว้นในสารละลายของไอออน Cu^{2+} ที่เห็นการเปลี่ยนแปลงเป็นสีม่วง ซึ่งมีโทนสีที่แตกต่างกับสีของเซ็นเซอร์ในภาวะที่มีไอออน Hg^{2+} แสดงให้เห็นว่า เซ็นเซอร์ RhB-Silica ที่สังเคราะห์ได้มีความจำเพาะเจาะจงที่ดีกับไอออนปรอท

4.5 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงสีของเซ็นเซอร์ RhB-Silica (ขนาด 40-63 μm) ในตัวอย่างแหล่งน้ำในชีวิตประจำวัน

ภาพที่ 86 การเปลี่ยนแปลงสีของเซ็นเซอร์ RhB-Silica (ขนาด 40-63 μm) ในตัวอย่างแม่น้ำเจ้าพระยาที่ผ่านการกรองแล้ว (river) และน้ำดื่มยี่ห้อ มิเนเร่ (drink) ในสภาวะที่ไม่มีการเติมไอออนปรอท และในสภาวะที่มีการเติมไอออนปรอทเข้มข้น 50 ppm

จากภาพที่ 86 เป็นผลการทดสอบการนำเซ็นเซอร์ RhB-Silica ที่ใช้ซิลิกาเจลขนาด 40-63 μm ในการสังเคราะห์เซ็นเซอร์ มาทดสอบกับตัวอย่างจากแม่น้ำเจ้าพระยา และน้ำดื่ม (ยี่ห้อ มิเนเร่) พบว่าสีของเซ็นเซอร์ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงในตัวอย่างดังกล่าว แต่เมื่อมีการเติมไอออนปรอทลง

ไป 50 ppm ในตัวอย่าง ผลปรากฏว่าสีของเซ็นเซอร์เปลี่ยนเป็นสีชมพู จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าส่วนประกอบอื่นๆ ที่อยู่ในตัวอย่างแม่น้ำเจ้าพระยาและน้ำดื่ม ไม่ได้รบกวนการเปลี่ยนแปลงสีของซิลิกาเจลที่สังเคราะห์ได้

บทที่ 6
สรุปผลการทดลอง

วิทยานิพนธ์นี้ประสบความสำเร็จในการสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ชนิดใหม่ 3 ชนิด ได้แก่ monoRh6G และ diRh6G ในรูปแบบของสารละลาย และ RhB-Silica ที่ถูกออกแบบต่อลงบนตัวกลางที่เป็นของแข็ง โดยใช้อนุพันธ์ของโรดามีนทำหน้าที่เป็นฟลูออโรฟอร์ ซึ่งเลือกใช้โรดามีนซิกจี (rhodamine 6G) และโรดามีนบี (rhodamine B) ตามลำดับ ส่วนของไอโอโนฟอร์ถูกออกแบบให้มีองค์ประกอบของอะตอมไนโตรเจนและซัลเฟอร์ ซึ่งจากผลการทดสอบทั้งหมดของ monoRh6G และ diRh6G ที่ได้กล่าวมาข้างต้นสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 สรุปผลการทดลองของเซ็นเซอร์ monoRh6G และ diRh6G

เซ็นเซอร์	monoRh6G	diRh6G
สภาวะที่ทำงาน	acetonitrile	acetonitrile
ชนิดของไอออน	Hg^{2+}	Hg^{2+}
λ_{ex} (nm)	529	529
λ_{em} (nm)	545	545
Detection limit	1.74 ppb	3.00 ppm
K_{assoc}	$1.04 \times 10^{5}\ M^{-1}$	$3.74 \times 10^{4}\ M^{-1}$
quantum yield: ϕ_f	0.49	0.05
Ratio [sensor:Hg^{2+}]	1:1	1:2

จากตารางที่ 9 จะเห็นว่าเซ็นเซอร์ monoRh6G และ diRh6G ที่สังเคราะห์ได้สามารถตรวจจับไอออนปรอทได้ในสารละลาย acetonitrile โดยเซ็นเซอร์ทั้ง 2 ชนิด เมื่อมีการจับกับไอออนปรอทจะแสดงการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ในลักษณะ OFF-ON และสามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายได้ด้วยตาเปล่าจากไม่มีสีเป็นสีชมพูในภาวะที่มีไอออนปรอทได้

อย่างจำเพาะเจาะจง ในขณะที่ไอออนรบกวนอื่นๆ ได้แก่ Ag^{+}, Cu^{2+}, Ba^{2+}, Li^{+}, Pb^{2+}, Ca^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+}, Na^{+}, Ni^{2+}, K^{+} และ Zn^{2+} ไม่เกิดการการเปลี่ยนแปลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซ็นเซอร์ monoRh6G ที่มีค่า detection limit ที่ต่ำมาก ซึ่งอยู่ในระดับพันล้านส่วน (ppb) และเซ็นเซอร์ยังมีความสามารถในการนำกลับมาใช้ใหม่ ซึ่งเหมาะที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณปรอทที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมหรือน้ำดื่ม

และในส่วนของเซ็นเซอร์ RhB-Silica ที่มีการนำเอา rhodamine B hydrazide ต่อลงบนตัวกลางที่เป็นของแข็ง สามารถยืนยันได้ว่ามีการเชื่อมต่อกันจริงของสารแต่ละตัวบนซิลิกาเจลด้วยเทคนิค SEM, DTG, DSC และ FT-IR และเมื่อนำเซ็นเซอร์ RhB-Silica มาศึกษาประสิทธิภาพในการตรวจจับไอออนโลหะ พบว่าซิลิกาเจลที่มีขนาดเล็กกว่า (40-63 μm) มีประสิทธิภาพการทำงานที่ดีกว่าซิลิกาเจลขนาดใหญ่ (63-200 μm) เนื่องจากมีพื้นที่ผิวที่มากกว่า ทำให้ rhodamine B hydrazide ที่ทำหน้าที่เป็นเซ็นเซอร์ในการดักจับไอออนปรอท สามารถติดอยู่บนพื้นผิวได้ในจำนวนที่มาก ส่งผลให้เห็นการเปลี่ยนแปลงที่ดีกว่า โดยมีค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของการตรวจจับไอออนปรอทที่เห็นการเปลี่ยนแปลงสีได้ด้วยตาเปล่าอยู่ในช่วง 10-20 ppm และเห็นการเปลี่ยนแปลงสีได้ด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop ผ่านระบบสี CMYK มีค่าเท่ากับ 1.62 ppm โดยสีของเซ็นเซอร์ RhB-Silica จะเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพูในภาวะที่มีไอออนปรอท ในขณะที่ไอออนรบกวนอื่นๆ ได้แก่ Ni^{+}, Na^{+}, Ba^{2+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}, Ag^{+}, Mn^{2+}, Co^{2+},Cd^{2+} และ Pb^{2+} สีของเซ็นเซอร์จะไม่มีการเปลี่ยนแปลง ยกเว้นในภาวะที่มีไอออน Cu^{2+} ที่สามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงสีได้เช่นกัน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงสีดังกล่าวจะมีเฉดสีที่แตกต่างจากในภาวะที่มีไอออนปรอท โดยสีของเซ็นเซอร์ RhB-Silica จะมีการเปลี่ยนแปลงจากไม่มีสีเป็นสีม่วง แต่ถึงอย่างไรเซ็นเซอร์ RhB-Silica ก็สามารถนำไปประยุกต์ใช้งานในตัวอย่างแหล่งน้ำในชีวิตประจำวันได้ โดยที่ส่วนประกอบอื่นๆ (interferences) ที่อยู่ในตัวอย่างไม่มีผลต่อการทำงานของเซ็นเซอร์

ภาคผนวก

Output 1: **Praikaew, P.**; Suwanich, T.; Sukrat, K.; Wanichacheva, N. (2014). ‘‘Naked-eye’’ colorimetric and ‘‘turn-on’’ fluorometricchemosensors for reversible Hg^{2+} detection. Spectrochimica Acta Part A. Vol. 118: 908-914.

Output 2: **Praikaew, P.**; Duangdeetip, T.; Chimpalee, N.; Wainiphithapong, C.; Swanglap, P.; Wanichacheva, N. (2015). ‘‘Colorimetric sensor for detection of Hg^{2+} in aqueous samples utilizing rhodamine B hydrazide-modified silica.” Materials Express. Vol. 5: 300-308.

รายการอ้างอิง

[1] Tchounwou, P. B.; Ayensu, W. K.; Ninashvili, N.; Sutton, D. (2003). "Environ- mental exposure to mercury and its toxicopathologic implications for public health." **Environmental Toxicology**. Vol. 18: 149-175.

[2] Davidson, P. W.; Myers, G. J.; Cox, C.; Shamlaye, C. F.; Marsh, D. O.; Tanner, M. A.; Berlin, M.; Sloane-Reeves, J.; Cernichiari, E.; Choisy, O.; Choi, A.; Clarkson, T. W. (1995). "Longitudinal neurodevelopmental study of Seychellois children following in utero exposure to methylmercury from maternal fish ingestion: outcomes at 19 and 29 months." **Neurotoxicology**. Vol. 16: 677-688.

[3] Grandjean, P.; Weihe, P.; White, R. F.; Debes, F. (1998). "Cognitive performance of children prenatally exposed to 'safe' levels of methylmercury." **Environmental Research**. Vol. 77: 165-172.

[4] Harada, M. (1995). "Minamata disease: methylmercury poisoning in japan caused by environmental pollution." **Critical Reviews in Toxicology**. Vol. 25: 1-24.

[5] เข้าถึงเมื่อ 4 กรกฎาคม 2559. **United States Environmental Protection Agency**. เข้าถึงได้จาก https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/table-regulated-drinking-water-contaminants.

[6] เข้าถึงเมื่อ 4 กรกฎาคม 2559. **Food and Drug Administration**. เข้าถึงได้จาก http://www.fda.gov.

[7] เข้าถึงเมื่อ 4 กรกฎาคม 2559. **Occupational Safety and Health Administration**. เข้าถึงได้จาก https://www.osha.gov/SLTC/mercury/standards.html.

[8] Miessler, G. L. (2004). **Inorganic Chemistry**. 3rd ed. Pearson Education.

[9] Park, S. M.; Kim, M. H.; Choe, J. I.; No, K. T.; Chang, S.-K. (2007). "Cyclams bearing diametrically disubstituted pyrenes as Cu^{2+}- and Hg^{2+}-selective fluoroionophores." **The Journal of Organic Chemistry**. Vol. 72: 3550-3553.

[10] Kim, S. H.; Kim, J. S.; Park, S. M.; Chang, S. K. (2006). "Hg^{2+}-Selective OFF-ON and Cu^{2+}-selective ON-OFF type fluoroionophore based upon cyclam." **Organic Letters**. Vol. 8, 371-374.

[11] Martinez, R.; Espinosa, A.; Tarraga, A.; Molina, P. (2005). "New Hg^{2+} and Cu^{2+} selective chromo- and fluoroionophore based on a bichromophoric azine." **Organic Letters**. Vol. 7: 5869-5872.

[12] Wanichacheva, N.; Siriprumpoonthum, M.; Kamkaew, A.; Grudpan, K. (2009). "Dual optical detection of a novel selective mercury sensor based on 7-nitrobenzo-2-oxa-1, 3-diazolyl subunits." **Tetrahedron Letters**. Vol. 50: 1783–1786.

[13] Liu, W.; Chen, J.; Xu, L.; Wu, J.; Xu, H.; Zhang, H.; Wang, P. (2012) "Reversible "off–on" fluorescent chemosensor for Hg^{2+} based on rhodamine derivative." **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. Vol. 85: 38–42.

[14] Steed, J. W.; Atwood, J. L. (2000). **Supramolecular Chemistry: A Concise Introduction**. New York: John Wiley & Sons, Inc.

[15] Kim, H. N.; Lee, H. M.; Kim, H. J.; Kim, J. S.; Yoon, J. (2008). "A new trend in rhodamine-based chemosensors: application of spirolactam ring-opening to sensing ions." **Chemical Society Reviews**. Vol. 37: 1465-1472.

[16] Yang, Y.-K.; Yook, K.-J.; Tae, J. (2005). "A Rhodamine-Based Fluorescent and Colorimetric Chemodosimeter for the Rapid Detection of Hg^{2+} Ions in Aqueous Media." **Journal of the American Chemical Society**. Vol. 127: 4888-4894.

[17] Wu, D.; Huang, W.; Duan, C.; Lin, Z.; Meng, Q. (2007). "Highly Sensitive Fluorescent Probe for Selective Detection of Hg^{2+} in DMF Aqueous Media." **Inorganic Chemistry**. Vol. 46: 1538-1540.

[18] Ahamed, B. N.; Ghosh, P. (2011). "An integrated system of pyrene and rhodamine-6G for selective colorimetric and fluorometric sensing of mercury(II)." **Inorganica Chimica Acta**. Vol. 372: 100-107.

[19] Liu, K.; Zhou, Y.; Yao, C. (2011). "A highly sensitive and selective ratiometric and colorimetric sensor for Hg^{2+} based on a rhodamine–nitrobenzoxadiazole conjugate." **Inorganic Chemistry Communications**. Vol. 14: 1798–1801.

[20] Li, P.; Liu, H.; Yang, L.; Liu, J. (2013). "Sensitive and selective SERS probe for Hg(II) detection using aminated ring-close structure of Rhodamine 6G." **Talanta**. Vol. 106: 381–387.

[21] Kim, K. N.; Choi, M. G.; Noh, J. S.; Ahn, S.; Chang, S. K. (2008). "Rhodamine B Hydrazide Revisited: Chemodosimetric Hg^{2+}-selective Signaling Behavior in Aqueous Environments." **Bulletin of the Korean Chemical Society**. Vol. 29: 571-574.

[22] Huang, J.; Xu, J.; Qian, X. (2009). "A rhodamaine-based Hg^{2+} sensor with high selectivity and sensitivity in aqeous solution: a NS_2-containing receptor." **The Journal of Organic Chemistry**. Vol. 74: 2167-2170.

[23] Lui, W.; Chen, J.; Xu, L.; Wu, J.; Xu, H.; Zhang, H.; Wang, P. (2012). "Reversible "off–on" fluorescent chemosensor for Hg^{2+} based on rhodamine derivative." **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. Vol. 85: 38-42.

[24] Rode, A. B.; Kim, J.; Kim, S.-H.; Gupta, G.; Hong, I. S. (2012). "A highly selective chemodosimeter for the rapid detection of Hg^{2+} ions in aqueous media." **Tetrahedron Letters**. Vol. 53: 2571-2574.

[25] Wanichacheva, N.; Setthakarn, K.; Prapawattanapol, N.; Hanmeng, O.; Lee, V. S.; Gradpan, K. (2012). "Rhodamine B-based "turn-on" fluorescent and colorimetric chemosensors for highly sensitive and selective detection of mercury (II) ions." **Journal of Luminescence**. Vol. 132: 35-40.

[26] Park, S.; Kim, W.; Swamy, K.M.K.; Lee, H. Y.; Jung, J. Y.; Kim, G.; Kim, Y.; Kim, S.-J.; Yoon, J. (2013). "Rhodamine hydrazone derivatives bearing thiophene group as fluorescent chemosensors for Hg^{2+}." **Dyes and Pigments**. Vol. 99: 323-328.

[27] Zhu, W.; Qian, X.; He, C.; Xu, Y.; Chen, T. (2009). "Trace mercury (II) detection and separation in serum and water samples using a reusable bifunctional fluorescent sensor." **Analytica Chimica Acta.** Vol. 651: 227-233.

[28] Huang, W.; Wu, D.; Wu, G.; Wang, Z. (2012). "Dual functional rhodamine-immobilized silica toward sensing and extracting mercury ions in natural water samples." **Dalton Transactions.** Vol. 41: 2620-2625.

[29] Wu, D.; Wang, Z.; Wu, G.; Huang, W. (2012). "Chemosensory rhodamine-immobilized mesoporous silica material for extracting mercury ion in water with improved sensitivity." **Materials Chemistry and Physics.** Vol. 137: 428-433.

[30] Chen, Y.; Mu, S. (2014). "Silica nanospheres functionalized by a rhodamine-based Hg(II)-sensing probe having two sensing channels: Preparation, characterization and sensing performance." **Journal ofLuminescence.** Vol. 145: 760-766.

[31] Sekar, M. M. A.; Hampton, P. D.; Buranda, T.; López G. P. (1999). "Multifunctional monolayer assemblies for reversible direct fluorescence transduction of protein-ligand interactions at surfaces." **Journal of the American Chemical Society.** Vol. 121: 5135-5141.

[32] Shiraishi, Y.; Sumiya, S.; Kohno, Y.; Hirai, T. (2008). "A rhodamine-cyclen conjugate as a highly sensitive and selective fluorescent chemosensor for Hg(II)." **The Journal of Organic Chemistry**. Vol. 73: 8571–8574.

[33] Ma, T.-H.; Zhang, A.-J.; Dong, M.; Dong, Y.-M.; Peng, Y.; Wang, Y.-W. (2010). "A simply and highly selective "turn-on" type fluorescent chemosensor for Hg^{2+} based on chiral BINOL-Schiff's base ligand." **Journal of Luminescence**. Vol. 130: 888-892.

[34] Wang, X.-L.; Zheng, W.-Y.; Liu, G.-C.; Lin, H.-Y. (2010). "A turn-on fluorescent chemosensor for Hg^{2+} based on phenanthroline fluorophore." **Journal of Luminescence**. Vol. 130: 52-55.

[35] Fischer, M.; Georges, J. (1996). “Fluorescence quantum yield of rhodamine 6G in ethanol as a function of concentration using thermal lens spectrometry.” **Chemical Physics Letters**. Vol. 260: 115-118.

[36] Shortreed, M.; Kopelman, R.; Kuhn, M.; Hoyland, B. (1996). “Fluorescent Fiber-Optic Calcium Sensor for Physiological Measurements.” **Analytical Chemistry**. Vol. 68: 1414–1418.

[37] Mentele, M. M.; Cunningham, J.; Koehler, K.; Volckens, J.; Henry, C. S. (2012). “Micro fluidic paper-based analytical device for particulate metals.” **Analytical Chemistry**. Vol. 84: 4474-4480.

มหาวิทยาลัยศิลปากร

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 118 (2014) 908–914

Contents lists available at ScienceDirect

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/saa

"Naked-eye" colorimetric and "turn-on" fluorometric chemosensors for reversible Hg^{2+} detection

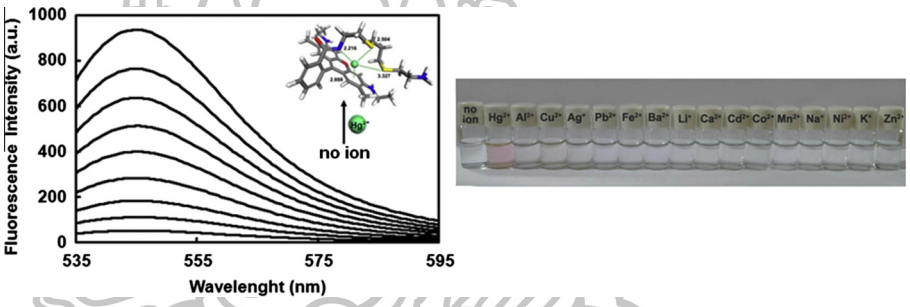
Nantanit Wanichacheva [a,*], Panida Praikaew [a], Thanapat Suwanich [a], Kanjarat Sukrat [b]

[a] Department of Chemistry, Faculty of Science, Silpakorn University, Nakorn Pathom 73000, Thailand
[b] Chemistry Program, Faculty of Science and Technology, Nakorn Pathom Rajabhat University, Nakorn Pathom 73000, Thailand

HIGHLIGHTS

- New Hg^{2+}-colorimetric and fluorescent sensors based on rhodamine 6G were prepared.
- Hg^{2+}-binding is indicated by both fluorescence enhancement and chromogenic change.
- Hg^{2+}-sensor shows high sensitivity and selectivity with detection limit of 1.7 ppb.
- Sensor serves as a naked-eye indicator by color change from colorless to pink.
- Hg^{2+}-sensor shows reversible behavior by the alternate addition of ammonium salts.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:
Received 29 June 2013
Received in revised form 20 September 2013
Accepted 29 September 2013
Available online 9 October 2013

Keywords:
Mercury sensor
High-sensitivity
High-selectivity
Colorimetric change
Fluorescent turn-on

ABSTRACT

Two new Hg^{2+}-colorimetric and fluorescent sensors based on 2-[3-(2-aminoethylsulfanyl) propylsulfanyl]ethanamine covalently bound to one and two units of rhodamine-6G moieties, **1** and **2**, were synthesised, and their sensing behaviors toward metal ions were investigated by UV/Vis and fluorescence spectroscopy. Upon the addition of Hg^{2+}, the sensors exhibited highly sensitive "turn-on" fluorescence enhancement as well as a color change from colorless to pink, which was readily noticeable for naked eye detection. Especially, **1** exhibited the reversible behavior and revealed a very high selectivity in the presence of competitive ions, particularly Cu^{2+}, Ag^{+}, Pb^{2+}, Ca^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+}, Na^{+}, Ni^{2+}, K^{+}, Ba^{2+}, Li^{+} and Zn^{2+}, with a low detection limit of 1.7 ppb toward Hg^{2+}.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

Mercury is one of the most highly poisonous and hazardous pollutants with recognized accumulative and persistent characters in the environment and biota [1–3]. Inorganic mercury (Hg^{2+}) can be converted into methylmercury by bacteria in the marine system and can easily enter the food chain and accumulate in the upper level, especially in large edible fish [1–3]. Mercury can cause serious human health problems, resulting in DNA damage, mitosis impairment and permanent damages of the central nervous system [4,5], including Minamata diseases [6]. The monitoring and observation of mercury contamination are therefore of paramount importance in order to prevent the harmful effect of mercury on the world population.

Current techniques for Hg^{2+} determination, including atomic absorption spectroscopy [7], inductively coupled plasma mass

* Corresponding author. Tel.: +66 827878249; fax: +66 34271356.
E-mail addresses: nantanit@su.ac.th, wanichacheva.nantanit@gmail.com (N. Wanichacheva).

1386-1425/$ - see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2013.09.140

spectrometry [8] and electrochemistry [9] often require relatively large amount of samples, expensive, large and sophisticated instrumentations which pose serious limitations for on-site determination of Hg^{2+} in environmental samples such as agricultural produce and biological samples. On the other hand, fluorescence detections of Hg^{2+} present many promising approaches because they allow nondestructive, rapid and prompt determinations, real time tracking for the detection of Hg^{2+}, and they allow remote detections or even "naked-eye" detections [10,11].

A number of fluorescence chemosensors for Hg^{2+} have been developed by utilizing synthetic or commercial ionophores, including hydroxyquinolines [12,13], cyclens [14,15], cyclams [16–19], diazatetrathia crown ethers [20], azine [21], and calixarenes [22–24]. However, many of these lack suitability for commercial and practical applications due to multi-step syntheses, high costs of starting materials [14–20] and some of them exhibited quenching responses [13,16,17,19,20,24–27]. In addition, many Hg^{2+}-fluorescent sensors suffer from cross-sensitivity toward other ions, particularly potential competitors such as copper (Cu^{2+}), silver (Ag^{+}) and lead (Pb^{2+}) due to their similar chemical behaviors to Hg^{2+} [13,18–22,27–29].

Therefore, the goals of this study were to develop novel mercury sensors that exhibited high sensitivity and high selectivity for Hg^{2+} over a wide range of competing ions, but with significantly reduced synthetic efforts. In the light of many reports and also our previous studies, we have found that not only the favorable electrostatic interactions between Hg^{2+} ion and soft donor atoms (nitrogen and/or sulfur atoms) are necessary for the design of Hg^{2+} sensors but also the direction upon the chelation between the ions and the sensors must be taken into consideration to provide the selective complexation [30,24]. In the present report, the design concepts for the sensors were based on the fundamental requirements for the selective host–guest interactions in supramolecular chemistry. We have focused on utilizing the acyclic hosts, 2-[3-(2-aminoethylsulfanyl)propylsulfanyl]ethanamine, with pendant binding sites, containing several sulfur and nitrogen atoms as the selective binding sites to Hg^{2+}. We anticipated that the selective cation recognition could originate from the self-assembly of the sensors and Hg^{2+} by correct direction and favorable interactions of Hg^{2+} coordinated with the donor atoms resulting in emission changes of the fluorophores.

In addition, we sought to increase the sensitivity of the sensor system by employing rhodamine 6G as the fluorophore portion since rhodamine 6G provides large molar extinction coefficients, long absorption and emission wavelengths (>500 nm) in the visible region, which is necessary for the development of economical portable devices. In addition, the high quantum yield of rhodamine 6G (Φ_f = 0.94 in EtOH) [31] was expected to enhance the sensitivity of our sensor system.

Sensors **1** and **2** presented in this work were based on 2-[3-(2-aminoethylsulfanyl) propylsulfanyl]ethanamine covalently bound to one and two units of rhodamine-6G moieties. The operation of the sensors was carried out through an "off–on" fluorescence switch based on the change in structure of rhodamine 6G from the spirolactam (non-fluorescent form) to the non-cyclic form (fluorescent form) upon Hg^{2+} binding, resulting in both "turn-on" fluorescence enhancement and color change from colorless to pink which is easily noticeable for naked eye detection. Especially, **1** revealed the reversible behavior and demonstrated very high selectivity in the presence of competitive ions with low detection limit toward Hg^{2+}. The colorimetric change and "turn-on" fluorometric behavior upon Hg^{2+} binding of the sensor presented here could be used in potential portable devices and test strips for "naked-eye" detections.

Experimental

Materials and methods

All reagents and solvents were purchased from Sigma–Aldrich Corporation, Fluka Chemical Corporation and were used as received. All the metal salts used in this study were perchlorate salts and were purchased from Strem chemicals, Inc. All NMR spectra were obtained in $CDCl_3$ solutions with a Bruker Avance 300 spectrometer operating at 300 MHz for ^1H and 75 MHz for ^{13}C with TMS as the internal standard. Mass spectra were performed by a ThermoElectron LCQ-DECA-XP, electrospray ionization ion trap mass spectrometer. Fluorescence measurements were performed on a Perkin Elmer Luminescence spectrometer LS 50B. The excitation and emission slit widths were 5.0 nm. Absorption spectra were determined on a single beam Hewlett Packard 8453 spectrophotometer.

Synthesis of 2-[3-(2-aminoethylsulfanyl)propylsulfanyl]ethanamine

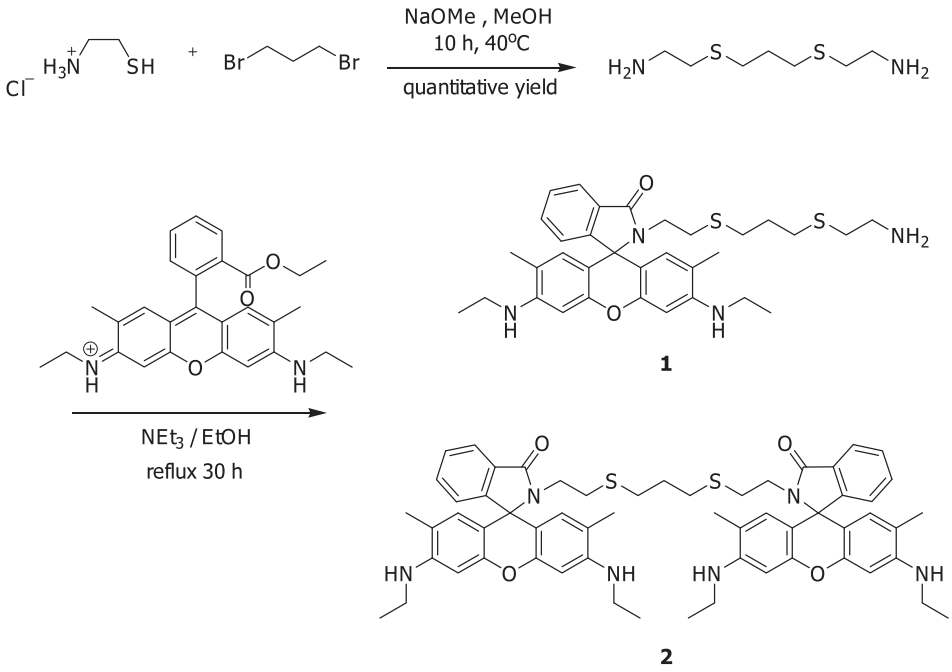
The compound was prepared in the same manner as previously reported [10]. The synthetic steps are outlined in Scheme 1.

*Syntheses of sensors **1** and **2***

In a round bottom flask, 2-[3-(2-aminoethylsulfanyl)propylsulfanyl]ethanamine (0.20 g, 1.03 mmol) and dry triethylamine (0.75 mL, 5.38 mmol) were dissolved in 6 mL of dry ethanol. The solution was stirred for 30 min and then rhodamine 6G (0.20 g, 0.42 mmol) was added. The solution was refluxed for 30 h under an argon atmosphere. The solvent was subsequently removed by a rotary evaporator. Dichloromethane was added to the residue. The mixture was extracted three times each with 30 mL of deionized water. The dichloromethane phase was collected and dried over anhydrous Na_2SO_4. The dichloromethane was removed under vacuum. The crude product was purified in the dark by preparative thin layer chromatography using CH_2Cl_2:MeOH:NEt_3 = 90:10:0.5 as the mobile phase.

1: (R_f = 0.52) yield 74 mg of the product as a yellow oil (29%). ^1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ (ppm): 1.32 (*t*, *J* = 7.2 Hz, 6H), 1.71 (quintet, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.90 (*s*, 6H), 2.17–2.21 (*m*, 2H), 2.36 (*s*, NH_2), 2.44 (*t*, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.52 (*t*, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.62 (*t*, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.88 (*t*, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.17–3.29 (*m*, 6H), 3.54 (*s*, 2H, NH_2), 6.23 (*s*, 2H), 6.34 (*s*, 2H), 7.02–7.06 (*m*, 1H), 7.41–7.48 (*m*, 2H), 7.90–7.93 (*m*, 1H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz,) δ (ppm): 14.7 ($2CH_3$), 16.7 ($2CH_3$), 29.2 (CH_2), 29.4 (CH_2), 30.3 (CH_2), 30.4 (CH_2), 35.5 (CH_2), 38.4 ($2CH_2$), 40.1 (CH_2), 40.9 (CH_2), 64.9 (C), 96.5 (2CH), 105.8 (2C), 118.0 (2C), 122.8 (CH), 123.8 (CH), 128.1 (CH), 128.5 (2CH), 131.1 (C), 132.5 (CH), 147.5 (2C), 151.7 (2C), 153.4 (C), 167.8 (C=O). HRMS (ESI) calcd for $C_{33}H_{43}N_4O_2S_2^+$ $(M + H)^+$ 591.2827, found 591.2824.

2: (R_f = 0.79) yield 52 mg the product as a pale pink oil (16%). ^1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ (ppm): 1.31 (*t*, *J* = 7.2 Hz, 12H), 1.39–1.46 (*m*, 2H), 1.89 (*s*, 12H), 2.13 (*t*, *J* = 7.8 Hz, 4H), 2.27 (*t*, *J* = 7.2 Hz, 4H), 3.16–3.20 (*m*, 12H), 3.56 (*s*, 4NH), 6.20 (*s*, 4H), 6.33 (*s*, 4H), 7.03–7.06 (*m*, 2H), 7.43–7.46 (*m*, 4H), 7.90–7.93 (*m*, 2H) ppm. ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ (ppm): 14.7 ($4CH_3$), 16.7 ($4CH_3$), 29.4 ($2CH_2$), 30.3 ($2CH_2$), 38.4 ($4CH_2$), 40.2 ($2CH_2$), 45.9 (CH_2), 64.9 (2C), 96.5 (4CH), 105.9 (4C), 118.0 (4C), 122.8 (2CH), 123.8 (2CH), 128.5 (2CH), 128.8 (4CH), 131.3 (2C), 132.2 (2CH), 147.5 (4C), 151.8 (4C), 153.5 (2C), 167.8 (2C=O). HRMS (ESI) calcd for $C_{59}H_{67}N_6O_4S_2^+$ $(M + H)^+$ 987.4665, found 987.4655.



Scheme 1. Syntheses of **1** and **2.**

Binding studies

The binding studies of compounds **1** and **2** were carried out in acetonitrile. The perchlorate salts solutions (1.0×10^{-2} M) were prepared by dissolving the desired amount of perchlorate salts in acetonitrile. The fluorescence titrations were performed with solutions of **1** (3.4×10^{-6} M) and **2** (1.2×10^{-6} M) and were measured as a function of metal ions concentrations over a fixed wavelength range (530–600 nm) with the excitation wavelength (λ_{ex}) 529 nm.

Results and discussion

*Molecular design and syntheses of sensors **1** and **2***

Based on the selective host–guest design for Hg^{2+} sensors, we utilized the 2-(3-(2-aminoethylsulfanyl)propylsulfanyl)ethanamine acyclic ligand as a host that can provide selective binding sites to Hg^{2+} via favorable electrostatic interactions of Hg^{2+} to the sulfur and nitrogen atoms. We expected that the selective ion recognition can originate from self-assembly of the sensors and Hg^{2+} resulting in both fluorescent enhancement and colorimetric changes.

The syntheses of **1** and **2** were performed according to the synthetic steps outlined in Scheme 1. The sensors were readily synthesized with the emphasis to minimize synthetic efforts compared with those required for many previously published sensors by employing shorter synthetic routes and economy of starting materials. 2-[3-(2-Aminoethylsulfanyl) propylsulfanyl]ethanamine was prepared by alkylation of cysteamine hydrochloride with 1,3-dibromopropane in quantitative yield. Then, **1** and **2** were obtained by amidation of rhodamine 6G with 2-[3-(2-aminoethylsulfanyl)propylsulfanyl]ethanamine.

Sensitivity studies

The sensing behaviors of fluorescent sensors **1** and **2** were observed by UV–visible and fluorescence measurements. It was found that **1** and **2** were colorless and non-fluorescent in solutions such as 5% DMSO/water, methanol, dichloromethane and acetonitrile. The addition of Hg^{2+} ions to the solutions of **1** and **2** resulted in chromogenic changes as well as rapidly increased strong fluorescence signals. Figs. 1 and S1 (Supplementary data) show detailed absorption of **1** and **2**, respectively, before and after gradual addition of Hg^{2+} ions. Upon the increasing concentrations of Hg^{2+} ion, the absorbance was significantly enhanced with a new band appearing at approximately 529 nm and a concurrent visual color change from colorless to pink, which could be easily observed by the naked eye.

To demonstrate the binding of the sensors, fluorescence titrations of **1** and **2** with Hg^{2+} ions were carried out. Figs. 2 and 3 show the fluorescence spectra of **1** and **2**, respectively, in the presence and absence of different concentrations of Hg^{2+} when excited at 529 nm.

The rapid increase of a maximum emission at 545 nm was observed when an ion-complexation was operative. The fluorescence behavior of sensors **1** and **2** clearly demonstrated the "OFF–ON" switching mechanism that occurred in response to Hg^{2+} ion complexation. In the absence of Hg^{2+}, the fluorescence response was at a minimum and the fluorescence was "turned-on" as the Hg^{2+} concentration was increased. When the added mercury perchlorate

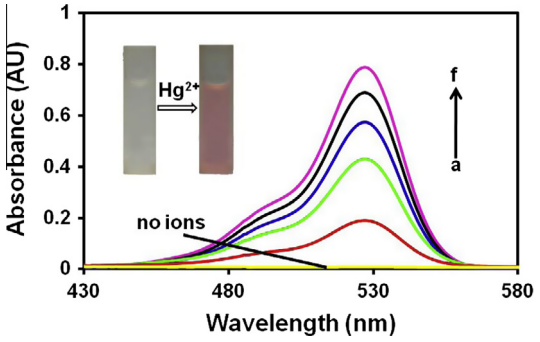


Fig. 1. Absorption spectra of **1** (3.4×10^{-4} M) in acetonitrile with addition of (Hg^{2+}). (a) 0 μM, (b) 20.8 μM, (c) 27.7 μM, (d) 41.6 μM, (e) 55.5 μM, (f) 69.3 μM.

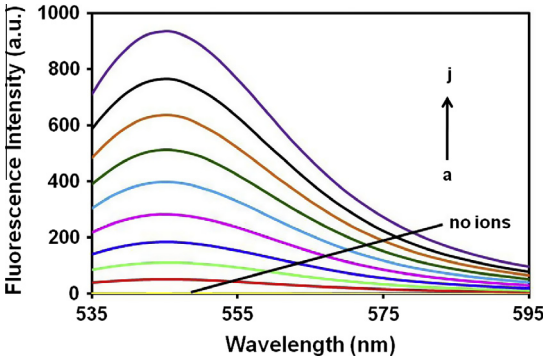


Fig. 2. Fluorescence titrations of **1** (3.4 μM) in acetonitrile with addition of (Hg^{2+}). (a) 0 μM, (b) 0.6 μM, (c) 1.1 μM, (d) 1.9 μM, (e) 2.7 μM, (f) 3.5 μM, (g) 4.3 μM, (h) 5.1 μM, (i) 5.9 μM, (j) 6.8 μM.

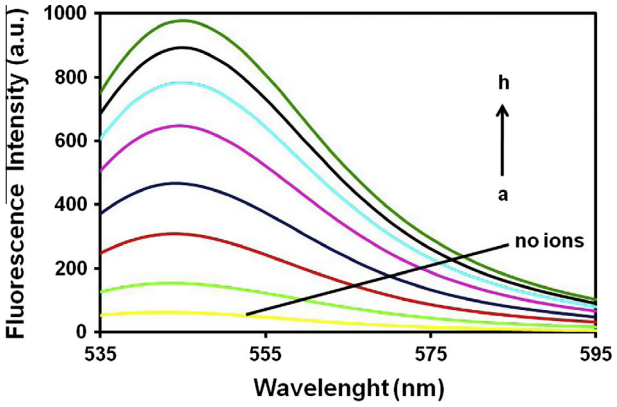


Fig. 3. Fluorescence titrations of **2** (1.2 μM) in acetonitrile with addition of (Hg^{2+}). (a) 0 μM, (b) 0.9 μM, (c) 20.9 μM, (d) 30.0 μM, (e) 33.9 μM, (f) 36.6 μM, (g) 39.2 μM, (h) 40.5 μM.

attained a concentration 2 times higher than that of **1**, the fluorescence response evoked >400 folds fluorescence turn-on response. The fluorescence quantum yield (Φ_f) of **1** with Hg^{2+} was determined to be 0.49, using rhodamine 6G standard with a Φ_f of 0.94 in ethanol as reported by a Ref. [31]. The association constant, K_{assoc}, was determined by the Benesi–Hildebrand plot of the signal changes in the fluorescence titration results [14,32,33]. It was found to be $1.04 \times 10^5\ M^{-1}$ and the 1:1 complex formation of **1**-Hg^{2+} was suggested, consistent with molecular modeling experiments and Job's plot analysis (Supplementary data).

The detection limit of **1** as a fluorescent sensor for the analysis of Hg^{2+} was determined from the plot of the fluorescence intensity as a function of the Hg^{2+} concentrations [34]. It was found that **1** had a detection limit of 8.7×10^{-9} M or 1.7 ppb for Hg^{2+} ions, which lies in a lower value range compared with the recently reported rhodamine-based Hg^{2+} sensors [11,35–43] and is sufficient to detect the maximum allowed mercury levels in dietary and environmental sources [44,45]. It should be noted that the sensitivity of this sensor, employing rhodamine 6G, has improved significantly compared to that of similar sensor, employing rhodamine B (detection limits are 1.7 ppb and 10 ppb, respectively). This enhancement in sensitivity is possibly due to (1) the increase in quantum yield of rhodamine 6G (Φ_f = 0.94 in EtOH) [31] compared to that of rhodamine B (Φ_f = 0.69 in EtOH) [14] and (2) the change in complex formations of the sensors, from 1:2 rhodamine B-sensor:Hg^{2+} to 1:1 rhodamine 6G-sensor:Hg^{2+}, which results in the improvement in the sensitivity.

In a similar study, the fluorescence changes in **2** were observed upon addition of Hg^{2+}. However, sensor **2** was found to be an inferior fluorescence sensor as compared to **1** in terms of sensitivity. The absorbance enhancement in UV–visible (Figs. 1 and S1-Supplementary data) was comparable when Hg^{2+} was added to the solutions of **1** and **2**. However, the fluorescence enhancement was much less upon addition of Hg^{2+} to the solution of **2** compared to **1**. The fluorescence quantum yield (Φ_f) of **2** with Hg^{2+} was determined to be 0.05, using rhodamine 6G as a standard. It was found that **2** provided a detection limit of approximately 1.5×10^{-5} M or 3.0 ppm for Hg^{2+} ions which is >1700 greater to the detection limit of **1** (1.7 ppb). Therefore, it might be possible that the lack of sensitivity of **2** could be due to a self-quenching effect when both rhodamine 6G dyes were in the ring-opened form as well as steric effect from two bulky groups of rhodamine 6G upon Hg^{2+} binding.

Proposed operation of sensors and modes of binding

The spectroscopic data (UV–visible and fluorescence measurements) and molecular modeling results revealed that the binding of the sensors and Hg^{2+} took place through electrostatic (cation–dipole and cation–π) interactions between the sulfur and nitrogen atoms as well as the aromatic portion of the sensors and Hg^{2+}. UV–visible absorption spectra (Fig. 1) displayed no absorbance above 450–550 nm in the absence of Hg^{2+}, suggesting that the spirolactam ring of rhodamine 6G existed in the preferred ring-closed form under this condition. In the presence of Hg^{2+}, however, significant enhancement of the absorbance maximum at 529 nm (Fig. 1), which is the characteristic absorption pattern of rhodamine 6G, and the "turn-on" fluorescence responses at 545 nm (λ_{ex} = 529 nm) were observed (Figs. 2 and 3). These results indicated that the interactions of the sensors and Hg^{2+} took place and promoted ring opening of rhodamine 6G cyclolactams. The operation of the sensor is proposed and demonstrated in Scheme 2.

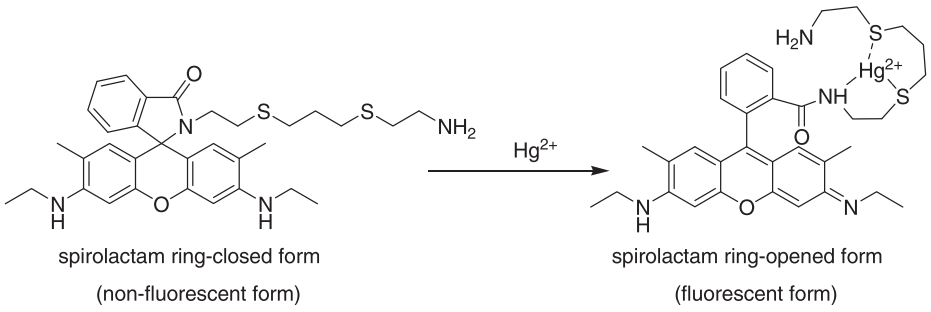
To elucidate the coordination geometry of **1** and Hg^{2+} upon binding, a molecular modeling study was performed using the Material Studio 5.5 program package (Dmol3 program). The initial structure of **1** was modified from the crystal structure of rhodamine 6G in the protein databank PDB ID = DB03825 and optimized using density functional theory with local density approximation (LDA) of local functional PWC [46]. The complexation energy of the host–guest structure was calculated by using the density functional theory with local density approximation (LDA) of local functional PWC with implicit distance-dependent dielectrics.

The dynamic molecular modeling observations suggested that cation-recognition of the sensor originated from a self-assembly process of **1** and Hg^{2+} from the favorable electrostatic interactions of Hg^{2+} coordinated with two sulfur atoms and one nitrogen atom as well as aromatic moieties (cation–dipole and cation–π interactions with Hg^{2+} ion) to form a cyclic-like structure.

The complexation energy was determined from the difference between the energy of the complex and the sum of individual **1** and Hg^{2+} energies. The lowest complexation energy was equal to −205.8 kcal/mol, indicating the stability of this complex for a 1:1 complex formation of **1**:Hg^{2+}. The distances to indicate the binding site of Hg^{2+} bound to **1** were illustrated in Fig. 4. From the optimization using DFT, Hg^{2+} was coordinated between two sulfur atoms, one nitrogen atom and the aromatic moiety with the distances of 2.504 Å, 3.327 Å, 2.216 Å and 2.888 Å, respectively.

Reversibility studies

The reversibility of the chemosensor is one of the essential aspects for sensor applications. In this study, the reversibility of **1** was demonstrated by the alternate addition of Hg^{2+} and tetraethylammonium iodide (TEAI), as shown in Fig. 5.



Scheme 2. Proposed operation of sensor **1**: before binding to Hg^{2+} (left) and after binding to Hg^{2+} (right).

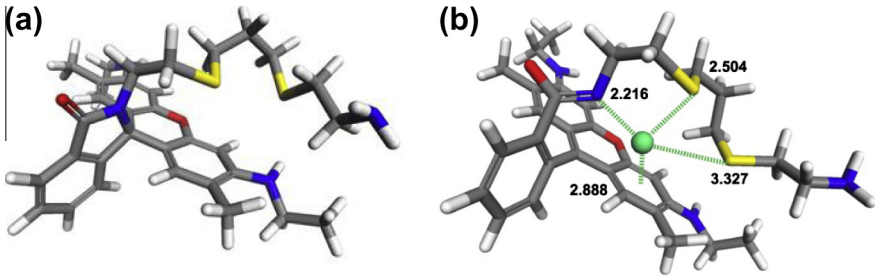


Fig. 4. Optimized structure with CHARMm force field in acetonitrile using implicit distance-dependent dielectric of 37.5; (a) **1**, and (b) 1:1 complex formation of **1**:Hg^{2+} with the lowest interaction energy.

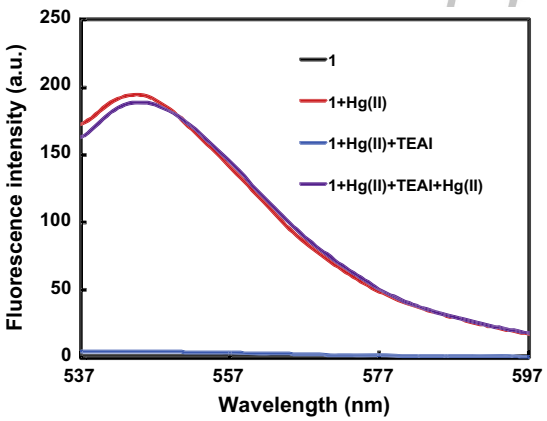


Fig. 5. Fluorescence intensity of **1** (3.4 μM) in acetonitrile solution upon alternate addition of Hg^{2+}/TEAI with the concentrations (0/0, 2/0, 2/0.3, 4/0.3).

Addition of Hg^{2+} to the solution of **1** promoted ring opening of rhodamine 6G and enhanced the fluorescence at 529 nm. By addition of TEAI into the solution containing **1** and Hg^{2+}, the fluorescence emission of **1** was diminished. On further addition of Hg^{2+} ions, the fluorescence intensity was revived again indicating the reversible behavior of chemosensor **1** for Hg^{2+} ions.

Selectivity studies

The selectivity studies of **1** and **2** to a series of metals ions such as Hg^{2+}, Ag^{+}, Cu^{2+}, Ba^{2+}, Li^{+}, Pb^{2+}, Ca^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+}, Na^{+}, Ni^{2+}, K^{+} and Zn^{2+} were performed by recording the fluorescence spectra of the sensors solutions after addition of each representative metal ion. These studies were carried out by a similar method to the Separate Solution Method (SSM) used in ion-selective electrode applications, which involved the measurement of a series of separate solutions, each containing only a salt of the studied ion [47]. Fig. 6 shows the fluorescence intensity of **1** upon addition of various metal ions.

The selectivity studies clearly revealed the high selectivity of **1** to Hg^{2+} in comparison with other foreign ions. A remarkable enhancement in fluorescence emission intensity was observed when only Hg^{2+} was added to the solution of sensor **1.** The values in the plot in Fig. 6b are normalized to the fluorescence intensity (545 nm) in the absence of any cations. The results showed that the fluorescence response of **1** at 545 nm increased as a function of added Hg^{2+}, while the response of **1** did not cause any significant changes after the addition of Ag^{+}, Cu^{2+}, Ba^{2+}, Li^{+}, Pb^{2+}, Ca^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+}, Na^{+}, Ni^{2+}, K^{+} and Zn^{2+} under identical conditions. In particular, **1** illustrated the high selectivity for Hg^{2+} over Cu^{2+}, Pb^{2+} and Ag^{+} which are potential competitors due to their similar chemical behaviors to Hg^{2+}, and therefore sensor **1** revealed a superior affinity over several previously reported Hg^{2+} sensors [13,18–22,27–29]. The selectivity of **1** presented here could be due to the appropriate locations of the S and N donor atoms on the ligand as well as the appropriate direction to bind to Hg^{2+} ions of the acyclic sensor, resulting in the selective self-assembly of the sensor molecule around the Hg^{2+} ions.

In contrast, sensor **2** was found to be a slightly inferior fluoroionophore as compared to **1** in terms of selectivity to Hg^{2+} ions. Selectivity studies of **2** were performed and it was found that some metal ions, such as Cu^{2+}, promoted small fluorescence intensity changes at 545 nm (Supplementary data). The lack of selectivity of **2** could be due to the steric effects from two bulky groups of rhodamine 6G upon Hg^{2+} binding.

Meanwhile the selectivity of sensor **1** was not only observed by rapid turn-on fluorescence switch but also the distinct color changes. The addition of Hg^{2+} to the solution of **1** led to the change of color of the solution from colorless to pink, which could be easily detected by the naked eye. In contrast, the titration of foreign ions under identical conditions such as Ag^{+}, Cu^{2+}, Ba^{2+}, Li^{+}, Pb^{2+}, Ca^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+}, Na^{+}, Ni^{2+}, K^{+} and Zn^{2+} induced negligible col-

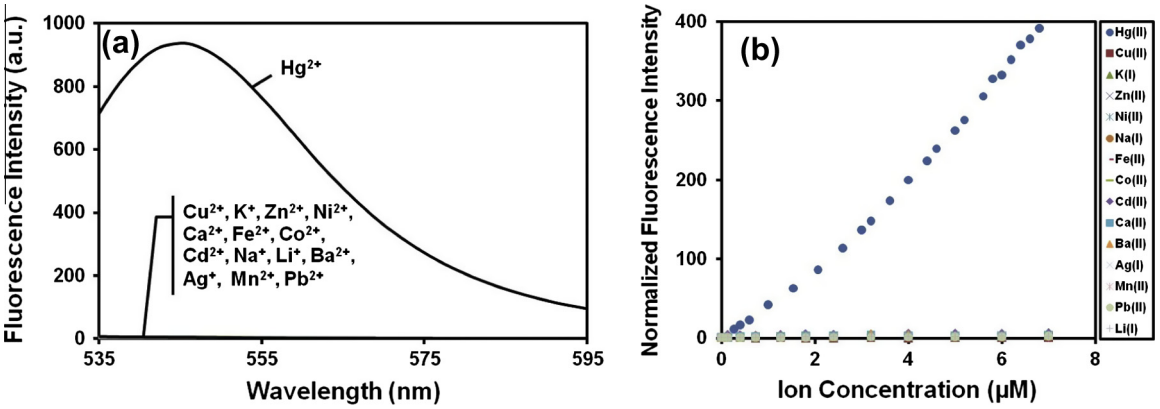


Fig. 6. (a) Fluorescence spectra (λ_{ex} = 529 nm) of **1** (3.4 μM) in acetonitrile with addition of perchlorate salts of Hg^{2+}, Ag^{+}, Cu^{2+}, Ba^{2+}, Li^{+}, Pb^{2+}, Ca^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+}, Na^{+}, Ni^{2+}, K^{+} and Zn^{2+} (6.8 μM), (b) Normalized emission intensity (545 nm) of **1** (3.4 μM) versus the concentrations of various metal ions in acetonitrile.

Fig. 7. Chromogenic change of sensor 1 (3.4 μM) in the absence and presence of Hg^{2+}, Ag^{+}, Cu^{2+}, Ba^{2+}, Li^{+}, Pb^{2+}, Ca^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+}, Na^{+}, Ni^{2+}, K^{+} and Zn^{2+} (6.8 μM).

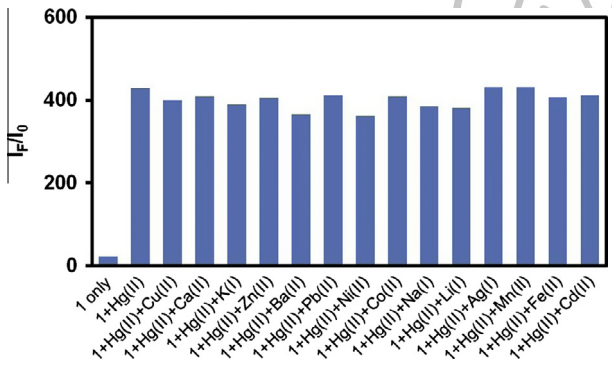


Fig. 8. Competitive experiments in the **1**-Hg^{2+} system with common foreign metal ions: [**1**] = 3.4 μM, [Hg^{2+}] = 6.8 μM and [M^{n+}] = 68 μM in acetonitrile solutions (λ_{ex} = 529 nm).

or changes in solutions. The selective binding indicated by the chromogenic change is demonstrated in Fig. 7.

To further explore the utility of **1** as an ion-selective fluorescence sensor for Hg^{2+}, competition experiments were performed (Fig. 8) by observing the fluorescence spectra of solutions of **1** in the presence of Hg^{2+} at 6.8 μM mixed with 10 equiv of Ag^{+}, Cu^{2+}, Ba^{2+}, Li^{+}, Pb^{2+}, Ca^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+}, Na^{+}, Ni^{2+}, K^{+} and Zn^{2+}.

The results in Fig. 8 clearly illustrated that sensor **1** was selective to Hg^{2+} and provided fluorescence enhancement even in the presence of representative competitive background metal ions. It is clear that **1** can be utilized as an Hg^{2+}-selective fluorescence sensor providing sensitivity for Hg^{2+} even in the presence of 10 equivalents of background Cu^{2+}, Pb^{2+}, and Ag^{+}, which are known to be potential competitors. The observed selectivity for Hg^{2+} of sensor **1** was remarkable compared to many multidentate thioether-containing ligands, hydroxyquinoline, calixarenes and cyclams in previous reports [13,18–22].

Conclusion

In conclusion, we have successfully synthesised two new fluorescent sensors, **1** and **2**, for Hg^{2+} detection based on 2-[3-(2-aminoethylsulfanyl)propylsulfanyl]ethanamine covalently bound to one and two units of rhodamine-6G moieties. Especially, sensor **1** exhibited high sensitivity and selectivity toward Hg^{2+} ions in the presence of various background competitive metal ions. The synthetic sensor **1** presented here is superior to many previous mercury sensors in terms of (1) synthetic simplicity and economical cost of starting materials which make them attractive for commercial uses, (2) low detection limit for the detection of Hg^{2+} (1.7 ppb), (3) high selectivity in the presence of competitive background metal ions (in particular discrimination of Cu^{2+}, Ag^{+} and Pb^{2+}) and (4) reversible behaviors. In addition, the sensor demonstrated chromogenic behaviors toward Hg^{2+} ions as evidenced by noticeable color changes of the solutions from colorless to pink, which offer great potential for the development of economical portable devices and test strips for "naked-eye" detections.

Acknowledgments

This work was supported by Grant RSA 5680034 from the Thailand Research Fund and Faculty of Science, Silpakorn University, Grant RGJ 2554-02 from Faculty of Science, Silpakorn University, Thailand and partially supported by Integrated Innovation Academic Center: IIAC Chulalongkorn University Centenary Academic Development Project (Project Code: CU56-EN14). The authors would like to express our gratitude to the Computational Chemistry Unit Cell (CCUC), Faculty of Science, Chulalongkorn University for providing research facilities for molecular modeling and software packages.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2013.09.140.

References

[1] A. Renzoni, F. Zino, E. Franchi, Environ. Res. 77 (1998) 68–72.
[2] S. Hardy, P. Jones, J. Chromatogr. A 791 (1997) 333–338.
[3] H.H. Harris, I.J. Pickering, G.N. George, Science 301 (2003) 1203.
[4] J. Gutknecht, J. Membr. Biol. 61 (1981) 61–66.
[5] P.B. Tchounwou, W.K. Ayensu, N. Ninashvili, D. Sutton, Environ. Toxicol. 18 (2003) 149–175.
[6] M. Harada, Crit. Rev. Toxicol. 25 (1995) 1–24.
[7] N.S. Bloom, W.F. Fitzgerald, Anal. Chim. Acta 208 (1988) 151–161.
[8] J.A. Moreton, H.T. Delves, J. Anal. At. Spectrom. 13 (1998) 659–665.
[9] K.H. Chen, H.W. Wang, B.S. Kang, C.Y. Chang, Y.L. Wang, T.P. Lele, F. Ren, S.J. Pearton, A. Dabiran, A. Osinsky, P.P. Chow, Sens. Actuator B: Chem. 134 (2008) 386–389.
[10] N. Wanichacheva, M. Siriprumpoonthum, A. Kamkaew, K. Grudpan, Tetrahedron Lett. 50 (2009) 1783–1786.
[11] W. Liu, J. Chen, L. Xu, J. Wu, H. Xu, H. Zhang, P. Wang, Spectrochim. Acta A 85 (2012) 38–42.
[12] H. Zhang, L.-F. Han, K.A. Zachariasse, Y.-B. Jiang, Org. Lett. 7 (2005) 4217–4220.
[13] S.Y. Moon, N.R. Cha, Y.H. Kim, S.-K. Chang, J. Org. Chem. 69 (2004) 181–183.
[14] Y. Shiraishi, S. Sumiya, Y. Kohno, T. Hirai, J. Org. Chem. 73 (2008) 8571–8574.
[15] M. Li, H.-Y. Lu, R.-L. Liu, J.-D. Chen, C.-F. Chen, J. Org. Chem. 77 (2012) 3670–3673.
[16] N.J. Youn, S.-K. Chang, Tetrahedron Lett. 46 (2005) 125–129.
[17] S.M. Park, M.H. Kim, J.I. Choe, K.T. No, S.-K. Chang, J. Org. Chem. 72 (2007) 3550–3553.
[18] S.H. Kim, J.S. Kim, S.M. Park, S.-K. Chang, Org. Lett. 8 (2006) 371–374.
[19] K.-C. Song, M.H. Kim, H.J. Kim, S.-K. Chang, Tetrahedron Lett. 48 (2007) 7464–7468.
[20] S.H. Kim, K.C. Song, S. Ahn, Y.S. Kang, S.-K. Chang, Tetrahedron Lett. 47 (2006) 497–500.
[21] R. Martinez, A. Espinosa, A. Tarraga, P. Molina, Org. Lett. 7 (2005) 5869–5872.
[22] R. Metivier, I. Leray, B. Valeur, Chem. Eur. J. 10 (2004) 4480–4490.
[23] Y.H. Lee, M.H. Lee, J.F. Zhang, J.S. Kim, J. Org. Chem. 75 (2010) 7159–7165.
[24] Q.-Y. Chen, C.-F. Chen, Tetrahedron Lett. 46 (2005) 165–168.
[25] N. Wanichacheva, P. Kumsorn, R. Sangsuwan, A. Kamkaew, S.L. Vannajan, K. Grudpan, Tetrahedron Lett. 52 (2011) 6133–6136.
[26] N. Wanichacheva, A. Kamkaew, S. Watpathomsub, S.L. Vannajan, K. Grudpan, Chem. Lett. 10 (2010) 1099–1101.
[27] Y.-B. Chen, Y.-J. Wang, Y.-J. Lin, C.-H. Hu, S.-J. Chen, J.-L. Chir, A.-T. Wu, Carbohydr. Res. 345 (2010) 956–959.
[28] J. Tan, X.-P. Yan, Talanta 76 (2008) 9–14.
[29] K. Rurack, M. Kollmannsberger, U. Resch-Genger, J. Daub, J. Am. Chem. Soc. 122 (2000) 968–969.
[30] L.E. McQuade, S.J. Lippard, Inorg. Chem. 49 (2010) 7464–7471.
[31] M. Fischer, J. Georges, Chem. Phys. Lett. 260 (1996) 115–118.
[32] T.-H. Ma, A.-J. Zhang, M. Dong, Y.-M. Dong, Y. Peng, Y.-W. Wang, J. Lumin. 130 (2010) 888–892.
[33] X.-L. Wang, W.-Y. Zheng, G.-C. Liu, H.-Y. Lin, J. Lumin. 130 (2010) 52–55.
[34] M. Shortreed, R. Kopelman, M. Kuhn, B. Hoyland, Anal. Chem. 68 (1996) 1414–1418.
[35] J. Huang, Y. Xu, X. Qian, J. Org. Chem. 74 (2009) 2167–2170.
[36] D. Wu, W. Huang, C. Duan, Z. Lin, Q. Meng, Inorg. Chem. 46 (2007) 1538–1540.
[37] M. Kumar, N. Kumar, V. Bhalla, H. Singh, P.R. Sharma, T. Kaur, Org. Lett. 13 (2011) 1422–1425.
[38] H. Zheng, Z.-H. Qian, L. Xu, F.-F. Yuan, L.-D. Lan, J.-G. Xu, Org. Lett. 8 (2006) 859–861.
[39] J.H. Soh, K.M.K. Swamy, S.K. Kim, S. Kim, S.-H. Lee, J. Yoon, Tetrahedron Lett. 48 (2007) 5966–5969.
[40] V. Bhalla, R. Tejpal, M. Kumar, Sens. Actuator B: Chem. 151 (2010) 180–185.
[41] Q.-J. Ma, X.-B. Zhang, X.-H. Zhao, Z. Jin, G.-J. Mao, G.-L. Shen, R.-Q. Yu, Anal. Chim. Acta. 663 (2010) 85–90.
[42] X. Chen, K.-H. Baek, Y. Kim, S.-J. Kim, I. Shin, J. Yoon, Tetrahedron 66 (2010) 4016–4021.
[43] N. Wanichacheva, K. Setthakarn, N. Prapawattanapol, O. Hanmeng, S.V. Lee, K. Grudpan, J. Lumin. 132 (2012) 35–40.
[44] U.S. EPA, Regulatory impact analysis of the clean air mercury rule: EPA-452/R-05-003, 2005.
[45] Mercury update: impact on fish advisories. EPA Fact Sheet EPA- 823-F-01-011; EPA, Office of Water: Washington, DC, 2001.
[46] J.P. Perdew, Y. Wang, Phys. Rev. B 45 (1992) 13244–13249.
[47] E. Bakker, P. Buhlmann, E. Pretsch, Chem. Rev. 97 (1997) 3083–3132.

มหาวิทยาลัยศิลปากร

Materials Express

Copyright © 2015 by American Scientific Publishers
All rights reserved.
Printed in the United States of America

2158-5849/2015/5/300/009
doi:10.1166/mex.2015.1250
www.aspbs.com/mex

Article

Colorimetric sensor for detection of Hg^{2+} in aqueous samples utilizing rhodamine B hydrazide-modified silica

Panida Praikaew, Theeranan Duangdeetip, Narong Chimpalee, Chantana Wainiphithapong, Pattanawit Swanglap, and Nantanit Wanichacheva*

Department of Chemistry, Faculty of Science, Silpakorn University, Nakorn Pathom 73000, Thailand

ABSTRACT

A colorimetric sensor for Hg^{2+} preliminary screening in aqueous samples has been successfully developed. The sensor consisted of rhodamine B hydrazide attached to silica gel solid support. In the presence of Hg^{2+} the color of the sensor changed from colorless to pink. Importantly, the sensor exhibited high selectivity to Hg^{2+} detection with negligible interference of other metal ions. The developed sensor are practical for an on-site preliminary screening of Hg^{2+} in aqueous samples from industrial wastes or environments due to the ease of the synthetic method, high stability, adequate sensitivity and high selectivity for Hg^{2+}.

Keywords: Colorimetric Sensor, Hg^{2+} Preliminary Screening, Ionophore, Rhodamine B Hydrazide, Modified Silica Gel.

1. INTRODUCTION

Contamination of heavy metals in an environment is harmful for living organisms. In an aqueous environment, inorganic mercury can be converted to methylmercury by marine organisms. The methylmercury can easily enter and accumulate in the upper levels food chain. Traces of Hg^{2+} over the standard maximum level can cause serious health problems in human such as DNA damage,[1] brain damage,[2,3] mitosis impairment and permanent damage to the central nervous system,[1,4] including Minamata disease.[5] Because of the high toxicity of mercury, development of the effective methods for on-site detection of Hg^{2+} has gained lot of interests.

Recently, fluorometric sensing for detection of Hg^{2+} has been studied intensively because of their adequate sensitivity, high selectivity as well as simplicity and relatively low cost of the detections compared to other spectroscopic methods such as atomic absorption spectrometry[6] or inductively coupled plasma mass spectrometry.[7] In particular, many ionophoric molecules have been utilized as the sensors for Hg^{2+} due to their strong binding affinity to Hg^{2+}. These ionophoric molecules included diazatetrathia crown ethers,[8] cyclen,[9,10] cyclams,[11–14] calixarenes,[15–17] nitrobenzoxadiazole[18] and azine.[19] These studies illustrated that the nitrogen, oxygen, and sulfur atoms present in the ionophores promoted the coordination of Hg^{2+}. Although many fluorescent sensors have been developed for Hg^{2+} sensing, some of them have limitations due to high cost of the required chemicals, materials for the detection[8,9–14] and lack of selectivity in the presence of the other interference ions, particularly copper (Cu^{2+}), silver (Ag^{+}) and lead (Pb^{2+}) because of their similar chemical behavior to Hg^{2+}.[8,11,12,14,15,19–22] Furthermore, some of the sensors are not suitable for on-site detection or preliminary screening of Hg^{2+} in an aqueous sample because of theirs need of organic or aqueous-organic solvents for detection of Hg^{2+}.[18,23–28]

Therefore, a major goal in our work is to develop a Hg^{2+} sensor that offers practical, rapid and on-site preliminary

*Author to whom correspondence should be addressed.
Emails: nantanit@su.ac.th, wanichacheva.nantanit@gmail.com

screening of Hg^{2+} in aqueous environments. The sensor also needs to exhibit high selectivity and adequate sensitivity for Hg^{2+} with low cost to make and a short synthetic strategy. In addition, it has been reported that attaching fluorescent sensor to a solid support which was easy to modify, such as MCM-41,[30] silica gel,[30] glass wafer,[31] quartz,[32] and silica particles,[29, 30, 33–35] could improve stabilities of the sensors.

Taking all of the criteria and requirements for on-site preliminary screening of Hg^{2+} in to consideration, we have developed a "visual detection" sensor based on rhodamine B hydrazide attached to functionalized silica gel solid support. Although the previous studies have shown that derivative of rhodamine B could serve as Hg^{2+} fluorescent sensors but the sensors were not practical for on-site screening of Hg^{2+} due to the need to use the organic solvents in the detection procedure.[36, 37] In our work, this problem was solved by attaching rhodamine B hydrazide to functionalized silica gel which allowed on-site preliminary screening of Hg^{2+} with no need of organic solvent. In the presence of Hg^{2+}, a color of the sensor changed from colorless to pink which could be observed by eyes. Furthermore, our synthetic method is relatively short and easy with negligible interference of the other metal ions for detection of Hg^{2+}. Therefore, the developed sensor is practical and suitable for on-site preliminary screening of Hg^{2+} in aqueous samples.

Delivered by Ingenta to: Chulalongkorn University
IP: 110.77.225.34 On: Tue, 07 Jul 2015 08:37:12
Copyright: American Scientific Publishers

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. Chemicals

Two sizes of silica gel with diameter of 63–200 μm and 40–63 μm were purchased from Merck and Silicycle Corporation, respectively. Rhodamine B and hydrazine hydrate was purchased from Sigma Corporation and (3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilane (GPTS) was purchased from Aldrich Corporation. All the metal-acetate salts were purchased from Strem Chemicals, Inc.

2.2. Synthesis of Rhodamine B Hydrazide (1)

The synthesis of compound **1** is shown in Figure 1, the synthesis procedures have been previously reported by Kim et al.[37] In a round bottom flask, rhodamine B hydrochloride (0.10 g, 2.08 mmol) and dry triethylamine (0.50 mL, 3.61 mmol) were dissolved in 6 mL of dry ethanol. The solution was stirred for 30 min and then hydrazine hydrate (0.20 mL, 4.12 mmol) was added. The solution was refluxed for 24 h under an argon atmosphere. The solvent was subsequently removed by a rotary evaporator. Dichloromethane (20 mL) was added to the residue. Then the mixture was extracted two times by 30 mL of deionized water. The dichloromethane phase was collected and dried over anhydrous Na_2SO_4. The dichloromethane was removed under vacuum. The crude product was purified by column chromatography using CH_2Cl_2:MeOH = 97:3 (R_f = 0.43) to give 390 mg of the product as a pale pink solid (77% yield). ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 1.16 (t, J = 7.1 Hz, 12 H), 3.32 (q, J = 7.0 Hz, 8 H), 3.62 (brs, 2 H, NH_2), 6.27 (dd, J_1 = 8.7 Hz, J_2 = 2.4 Hz, 2 H), 6.43–6.46 (m, 4 H), 7.09–7.13 (m, 1 H), 7.41–7.47 (m, 2 H), 7.92–7.85 (m, 1 H) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 12.6 ($4CH_3$), 44.4 ($4CH_2$), 66.0 (C), 98.0 (2CH), 104.5 (2C), 108.0 (2CH), 123.0 (CH), 123.8 (CH), 128.0 (CH), 128.1 (2CH), 130.0 (2CH), 132.5 (CH), 148.8 (2C), 151.5 (C), 153.8 (C), 166.1 (C) (ppm). HRMS (ESI) calcd. for $C_{28}H_{33}N_4O_2^+$ $(M+H)^+$ 457.2604, found 457.2366.

2.3. Preparation of Rhodamine B Hydrazide-Modified Silica Gel

The rhodamine B hydrazide-modified silica gel was prepared in three steps as outlined in Figure 2.

(i) First, silica gel was cleaned with "piranha solution"[38] (98% H_2SO_4:30% H_2O_2 = 70:30 v/v) at 90 °C for 1 h, then the silica gel was washed by distilled water to remove the excess piranha solution. After that, the silica gel was separated by filtration under vacuum. Finally the cleaned silica gel was dried for 18 h at 110 °C.

(ii) In a round bottom flask, a mixture of the piranha-cleaned silica gel (5.00 g) and GPTS (1.20 mL) was stirred in 15 mL of dry toluene for 18 h at 50 °C under an argon atmosphere. The resulting product was then separated by vacuum filtration. Then, unattached GPTS was removed from the product by washing with dry toluene (2 times, 20 mL each) and dry dichloromethane (2 times, 20 mL each). Finally, dichloromethane was removed under vacuum to give pure GPTS bound-modified silica gel (**2**).

(iii) In a round bottom flask, the rhodamine B hydrazide (1.00 g, 2.03 mmol) and dry triethylamine (0.30 mL) were dissolved in 20 mL of dry dichloromethane and stirred.

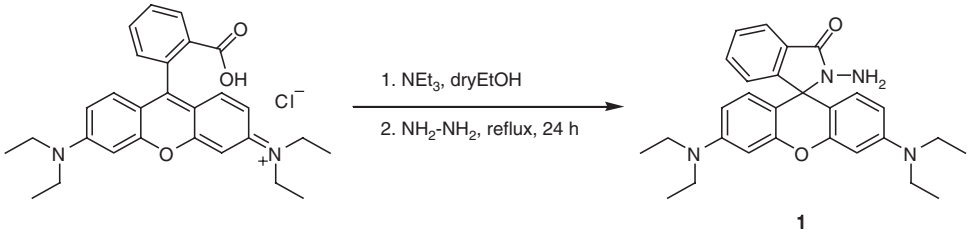


Fig. 1. Synthesis of rhodamine B hydrazide.

Article

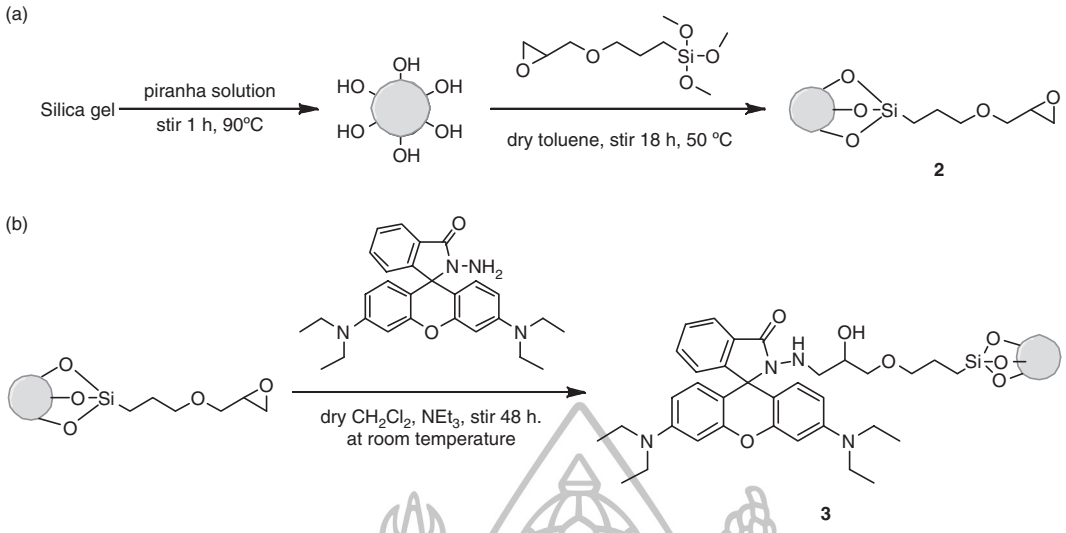


Fig. 2. (a) Cleaning of silica gel and preparation of GPTS-modified silica gel (**2**), (b) Preparation of rhodamine B hydrazide-modified silica gel (**3**).

Next, the modified silica gel (**2**) (5.00 g) were added, and the mixture was stirred for 48 h at room temperature under an argon atmosphere. Then the solution was immediately heated for 1 h at 40 °C and the resulting product was separated by filtration under vacuum. After that the product was washed with dry dichloromethane (3 times, 20 mL each). Finally, the product was dried for 5 min at 100 °C to give rhodamine B hydrazide-modified silica gel (**3**).

2.4. Characterization

NMR spectra of the synthesized rhodamine B hydrazide (**1**) were taken by the BrukerAvance 300 spectrometer operated at 300 MHz and 75 MHz for ^{1}H and ^{13}C, respectively. All NMR spectra were obtained in $CDCl_3$ solutions with TMS as an internal standard. Mass spectra were collected by a ThermoElectron LCQ-DECA-XP, electrospray ionization ion trap mass spectrometer. Functionalization of the modified silica gels after each modification step was monitored by differential thermogravimetry analysis (DTG) and differential scanning calorimetry (DSC) using a Perkin Elmer Pyris 1 and a Perkin Elmer Pyris Diamonds, respectively. The heating rate of 20 °C min^{-1} under a flow of dry air was used for both DTG and DSC analyses. Further characterization of the modified silica gels was done by an infrared spectroscopy (Perkin Elmer Spectrum, GX FT-IR System). The shape, size and surface of the modified silica gels were characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM, CamScan Maxim 2000).

2.5. Fluorescence Response and UV-Visible Absorption

Fluorescence measurements of the solution of rhodamine B hydrazide with addition of Hg^{2+} were performed on a Perkin Elmer Luminescence spectrometer LS 50B. The excitation and emission slit widths were 5.0 nm. The absorption spectra of rhodamine B hydrazide (Fig. 3) were determined by a single beam Hewlett Packard 8453 spectrophotometer. The absorption spectra of rhodamine B hydrazide was comparable to the previously report work.[37] All spectra were obtained from rhodamine B hydrazide solution in MeOH:H_2O (10:90 v/v).

2.6. Sensitivity and Selectivity Studies of the Rhodamine B Hydrazide-Modified Silica Gel

The selectivity of the rhodamine B hydrazide-modified silica gel (**3**) was tested in deionized water. The color change of the rhodamine B hydrazide-modified silica gel were monitored after the addition of the metal ions including Hg^{2+}, Ba^{2+}, Ag^{+}, Cu^{2+}, Pb^{2+}, Ca^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Mn^{2+}, Na^{+}, Ni^{2+}, Mg^{2+} and Zn^{2+}. Beside that the sensitivity of the rhodamine B hydrazide-modified silica gel was studied by addition of Hg^{2+} ions at difference concentrations (10–500 ppm).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Sensitivity and Selectivity of Rhodamine B Hydrazide

Previous fluorescence study of rhodamine B hydrazide showed that good sensitivity and selectivity for Hg^{2+} was observed for solution of rhodamine B hydrazide dissolving in a solvent system of MeOH:H_2O (10:90 v/v).[37] Therefore a mixture of MeOH and H_2O (10:90 v/v) was selected as a solvent for the study of fluorescence behavior of rhodamine B hydrazide in response to the presence of the metal ions.

To elucidate the quantitative binding affinity of rhodamine B hydrazide, fluorescence titrations of rhodamine B hydrazide with Hg^{2+} ions was carried out in Figure 4. Binding of Hg^{2+} to rhodamine B hydrazide (ion-complexation) led to fluorescence emission which exhibited maximum emission at 575 nm for the excitation at 550 nm.

Article
Copyright American Scientific Publishers

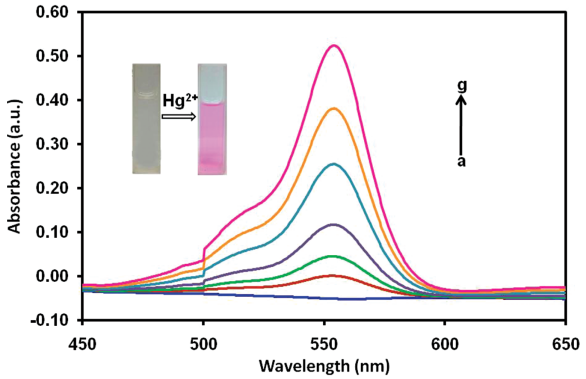


Fig. 3. UV-visible absorption spectra of rhodamine B hydrazide (3.3×10^{-5} M) in MeOH with addition of [Hg^{2+}]. a: 0 μM, b: 3.3 μM, c: 6.7 μM, d: 10.0 μM, e: 13.3 μM, f: 16.7 μM, g: 20.0 μM.

When an ion-complexation was operative, the fluorescence behavior of rhodamine B hydrazide clearly demonstrated the OFF–ON switching mechanism that occurred in response to Hg^{2+} ion complexation. In the absence of Hg^{2+} ions, the fluorescence intensity was at a minimum and the fluorescence was "turn off," while the fluorescence was "turn on" as the Hg^{2+} concentration increase. The "turn on" state could be observed as a concurrent visual color change of the rhodamine B hydrazide solution from colorless to pink. The detection limit of rhodamine B hydrazide for the detection of Hg^{2+}, determined from the plot of the fluorescence intensity as a function of the Hg^{2+} concentration, was 0.24 μM. The detection limit of the synthesized rhodamine B hydrazide for the detection of Hg^{2+} was comparable to the previously report work.[37]

Selectivity studies of rhodamine B hydrazide was also performed in MeOH:H_2O (10:90 v/v) solutions by recording the fluorescence spectra of rhodamine B hydrazide in the solution after addition of various metal ions including Hg^{2+}, Ba^{2+}, Ag^{+}, Cu^{2+}, Pb^{2+}, Ca^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Mn^{2+}, Na^{+}, Ni^{2+}, Mg^{2+} and Zn^{2+} (Fig. 5). These ions were

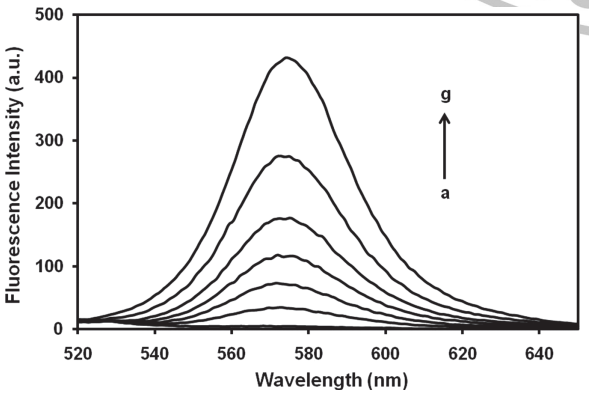


Fig. 4. Fluorescence titrations of rhodamine B hydrazide (4.4 μM) in MeOH:H_2O (10:90 v/v) with addition of [Hg^{2+}]. a: 0 μM, b: 0.2 μM, c: 0.3 μM, d: 0.6 μM, e: 0.9 μM, f: 1.52 μM, g: 2.24 μM.

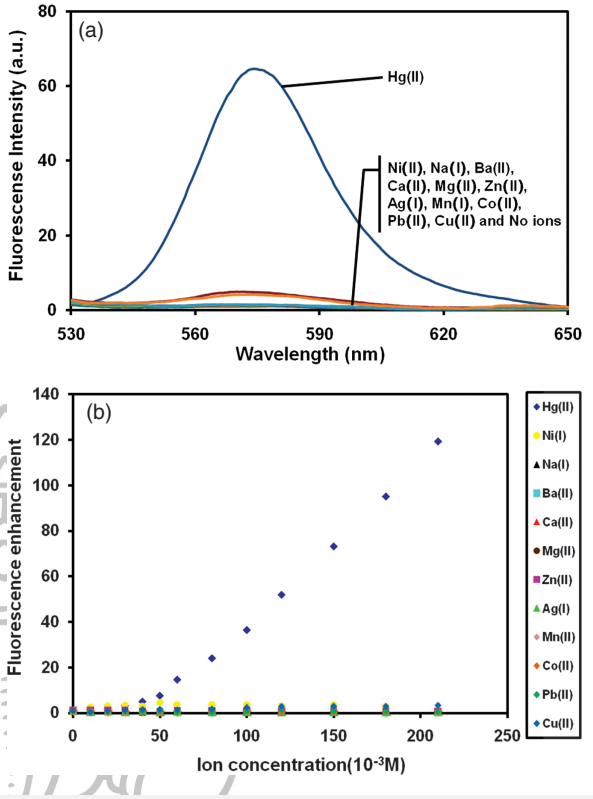


Fig. 5. (a) Fluorescence spectra (λ_{ex} = 550 nm) of rhodamine B hydrazide with addition of acetate salts of Hg^{2+}, Ni^{+}, Na^{+}, Ba^{2+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}, Ag^{+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, Pb^{2+} and Cu^{2+} (26.7 μM). (b) Fluorescence enhancements at 575 nm of rhodamine B hydrazide after addition of each metal ion as a function of concentrations of the metal ions. In all measurements, rhodamine B hydrazide (20 μM) were dissolved in MeOH:H_2O (10:90 v/v).

chosen because they are commonly founded in an aqueous environment. The Separate Solution Method (SSM), which were used in ion-selective electrode applications,[40] was chosen for selectivity studies of rhodamine B hydrazide. Briefly, this method measures a series of solutions with each solution contains only a salt of the interested ions.[40] The result indicated remarkably selectivity of rhodamine B hydrazide to Hg^{2+} binding which reflected as significantly high fluorescence intensity upon Hg^{2+} binding compared to other metal ions as shown in Figure 5(a). In fact, the fluorescence intensities with addition of the other metal ions, were hardly changed under the identical measuring conditions. The fluorescence enhancement at 575 nm as a function of concentrations of each metal ion clearly showed great specific binding affinity of rhodamine B hydrazide to Hg^{2+} as shown in Figure 5(b). The enhancements were calculated by normalization the fluorescence intensities after addition of each metal ions to the fluorescence intensity at 575 nm of bare rhodamine B hydrazide.

3.2. Characterization of Modified Silica Gel

Two sizes of silica gel (silica gel with size 63–200 μm and 40–63 μm, denoted as "L-silica gel" and "S-silica gel,"

Article

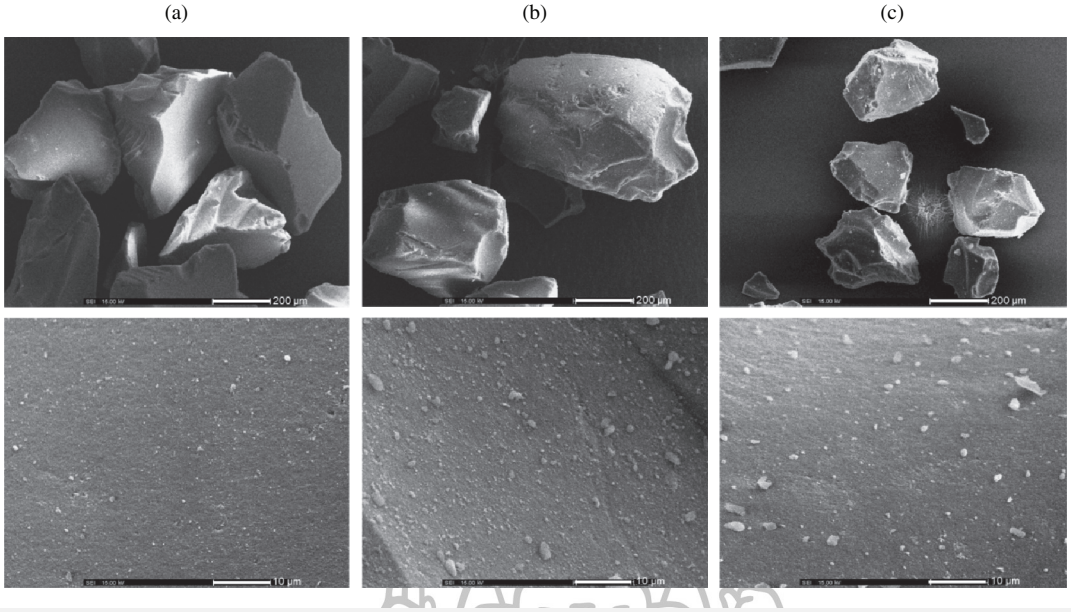


Fig. 6. SEM images of the modified L-silica gel at 100X (top) and 2000X (bottom) magnifications of (a) piranha-cleaned silica gel, (b) GPTS-modified silica gel and (c) rhodamine B hydrazide-modified silica gel. The scale bars are 200 μm and 10 μm for top and bottom SEM images, respectively.

respectively) were used as solid supports for preparation of rhodamine B hydrazide-modified silica gel. Scanning Electron Microscopy (SEM) images showed that shapes, sizes and surfaces of both types of the silica gels were slightly difference after each step of modification as shown in Figures 6 and 7. For the L-silica gel, cleaning the silica gel with a piranha solution resulted in relatively smooth surface with appearance of small debris as shown in Figure 6(a). Modification of silica gel with GPTs resulted in smaller silica gel with rougher surface and larger debris than the one in the first modification step as shown in Figure 6(b). Finally, attachment of rhodamine B hydrazide to the GPTs-attached silica gel led to even smaller silica gel with the same surface roughness and debris as the silica gels in the second step as shown in Figure 6(c). Similarly, the SEM images of the modified S-silica gel showed that sizes of the silica gel were smaller with appearance of surface roughness and debris on the silica gel after each step of modification as shown in Figure 7. The smaller sizes of the modified silica gels with appearance of the debris on the surface of silica gels suggested that the silica gels were fractured during each modification step.

Chemical changes of the modified silica gel were characterized by thermal analysis (DTG and DSC) and IR spectroscopy. For DTG, weights of the modified silica gel (L-silica gel) after each step of modification were monitored as a function of temperature (30–700 °C with a ramping rate 20 °C/min) as shown in Figure 8.

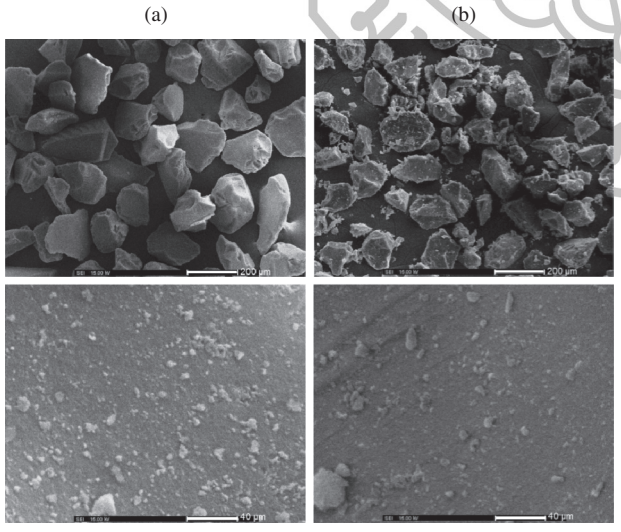


Fig. 7. SEM images of the modified S-silica gel at 100X (top) and 5000X (bottom) magnifications of (a) piranha-cleaned silica gel and (b) rhodamine B hydrazide-modified silica gel. The scale bars are 200 μm and 40 μm for top and bottom SEM images, respectively.

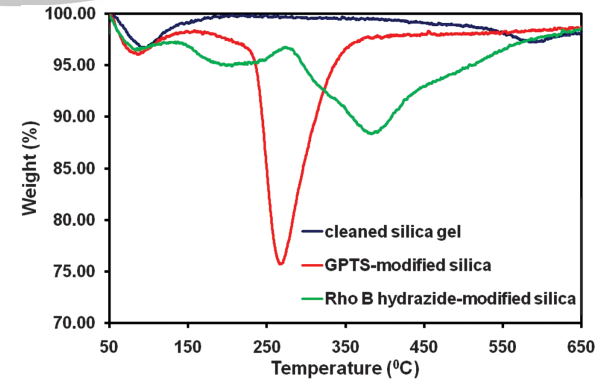


Fig. 8. DTG curves of the modified silica gel after each modification step.

Article

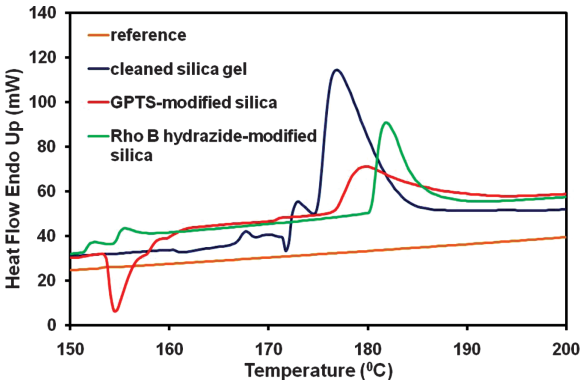


Fig. 9. DSC curves of the modified silica gels after each modification step.

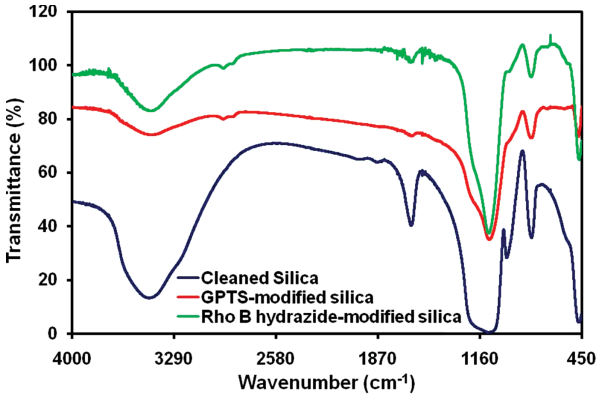


Fig. 10. IR spectra of the modified S-silica gels.

For piranha-cleaned silica gel, changes of weights were observed at temperature started from 44–200 °C. The maximum rate of weight loss was observed at the temperature around 80–100 °C. An approximately 4% weight loss could be attributed to an evaporation of water. Next, the weight of GPTS-attached modified silica gel changed at the temperature started from 200–350 °C. The maximum rate of weight loss was observed at temperature around 270 °C, and in total a weight loss was approximately 14%. Finally, weight loss of the rhodamine B hydrazide-modified silica gel was observed at the temperatures started from 290–700 °C. The maximum rate of weight loss appeared at around 390 °C with a total weight loss of approximately 17%. In conclusion, the difference DTG curves of the modified silica gels after each modification step could be implied that the GPTs and rhodamine B hydrazide were truly presence at the surface of the silica gel. According to DTG result we can also implied that the rhodamine B hydrazide-modified silica gel is thermally stable at temperature below 80 °C and should be able to detect Hg^{2+} for an on-site preliminary screening application.

Similarly, we found that the DSC curves of the modified silica gels after each modification step were clearly difference as shown in Figure 9. The important DSC parameters of the modified silica gels were shown in Table I. The DSC result was in good agreement with the DTG result which could be implied that the modified silica gels were changed chemically after each modification step, and GTPs and Rhodamine B hydrazide were indeed attached to the modified silica gels.

Table I. Important DSC parameters of the modified silica gels.

Materials	T_{onset} (°C)	T_m (°C)	H_f (J/g)	C_p (J/°C)
Piranha-cleaned silica gel	170.29	178	255.0286	0.5667
GPTS-modified silica gel	173.95	181.08	85.3475	0.1897
Rhodamine B hydrazide-modified silica gel	180.28	181.73	79.352	0.1763

The IR spectra of the modified silica gels suggested that there were chemical changes to the modified silica gel after each modification step. Briefly, for functionalization of GTPs onto surface of the piranha-cleaned silica gel resulted in weakening of OH-stretching mode and OH-bending mode at 3440–3460 cm^{-1} and 1630–1640 cm^{-1}, respectively. The weakening of these vibration modes could be attributed to the attachment of GTPS to OH-group of the piranha-cleaned silica gel. Next, functionalization of rhodamine B hydrazide to the GTPs-attached silica gel led to appearance of multiple but weak IR modes at 1400–1800 cm^{-1}. The weak IR modes could be attributed to a low concentration of the rhodamine B hydrazide and the dominant of the broad IR peak at 1000–1200 cm^{-1} (CO-stretching) and 2800–3700 cm^{-1} (OH-stretching). Although the attaching nature of the of rhodamine B hydrazide to the GTPs-attached silica gel could not be clearly characterized (chemically and/or physically adsorption) but most of rhodamine B hydrazide molecules should be adsorbed to the GTPs-attached silica gel covalently because the physically adsorbed rhodamine B hydrazide should be washed away in the dichloromethane cleaning step as mentioned in the experimental methods. All IR spectra are shown in Figure 10. The thermal analyses couple to IR result indicated the successful modification of the silica gel (**3**).

3.3. Sensitivity and Selectivity as Hg^{2+} Sensor

The sensing capability of rhodamine B hydrazide-modified silica gel (**3**) as Hg^{2+} sensor in deionized water was tested. Addition of deionized water (blank) resulted in colorless sensor, while the addition of Hg^{2+} led to color change of the sensor from colorless to pink. Higher concentration of Hg^{2+} resulted in more intense pink color as shown in Figure 11.

The calibration curve and linear range of the sensor were obtained by similar quantitative image processing procedure previously reported in the work done by

Fig. 11. Colors of the modified S-silica gel **3** in deionized water with addition of Hg^{2+}. Concentrations of added Hg^{2+} (ppm) were denoted by numbers below the modified S-silica.

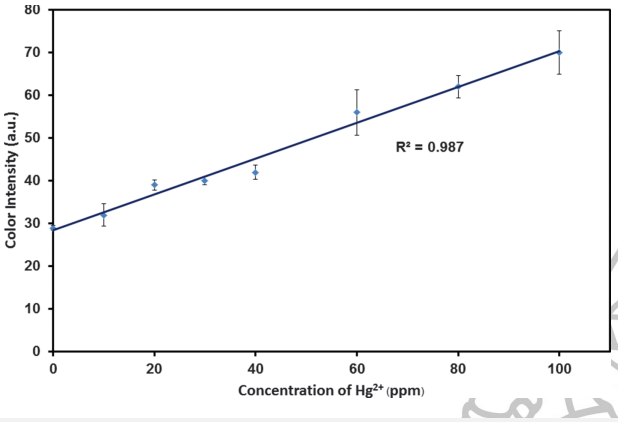


Fig. 12. Calibration curve of the modified S-silica gel(**3**). The color intensities of the sensors were obtained after addition of Hg^{2+} with difference concentration (0, 10, 20, 30, 40, 60, 80 and 100 ppm).

Mentele et al.[41] Briefly, the photos of the sensor were uploaded to photo-management software (Adobe Photoshop) then the color of the sensor from the photos were interpreted by the software and presented in CMYK color system. Only the M (magenta) values changed with the concentration of added Hg^{2+} and were used to create the calibration curve shown in Figure 12. The detection limit and linear range of the modified S-silica gel (**3**) were 1.62 ppm and 0–100 ppm, respectively. The detection limit of the sensor for the determination of Hg^{2+} was calculated from the plot of color intensity as a function of the Hg^{2+} concentrations, this method was previously reported by Shortreed et al.[42]

Furthermore, the selectivity study of the sensor were tested in deionized water by observing the color changes after addition of Hg^{2+} and other metal ions including Ba^{2+}, Ag^{+}, Cu^{2+}, Pb^{2+}, Ca^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Mn^{2+}, Na^{+}, Ni^{2+}, Mg^{2+} and Zn^{2+} as shown in Figure 13. The color of the sensor turned to "deep pink" only when Hg^{2+} ions were added. Addition of Cu^{2+} and Co^{2+} ions led to color changes of the sensor but with difference shades, which could be distinguished from the "deep pink" resulted from addition of Hg^{2+}, while the other ions hardly changed the color of the sensor at the same concentration of Hg^{2+} (100 ppm). The result suggested that the other metals could not interfered the binding of the rhodamine B hydrazide-modified silica gel (**3**) to Hg^{2+} and the modified silica gel could serve as Hg^{2+} sensor.

In a similar study, we found that the sensitivity of the rhodamine B hydrazide-modified L-silica gel (**3**) was slightly inferior compared to the rhodamine B hydrazide-modified S-silica gel (**3**) as shown in Figure 14. The inferior sensing capability of the modified L-silica gel (**3**) could be attributed to a lower total surface area which led to lower number of rhodamine B hydrazide molecules on the modified L-silica gel surface than the modified S-silica gel (**3**).

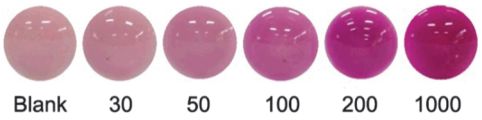


Fig. 14. Color of the modified L-silica gel (**3**) in deionized water with addition of Hg^{2+}. Hg^{2+} concentrations were 30–1000 ppm as denoted in the figure.

Fig. 15. Color of the modified S-silica gel (**3**) tested with the Chaophraya river (denoted as "river") and a drinking water (denoted as "drink") samples without and with the addition of Hg^{2+} 50 ppm (denoted as "+50").

3.4. Application

The sensing application of the modified S-silica gel (**3**) for Hg^{2+} preliminary screening was further shown in the real-life aqueous samples from the Chaophraya river and a drinking water (Mineré) spiked by 50 ppm of Hg^{2+} as shown in Figure 15. The sensor turned pink for the spiked river and a drinking water samples which indicated that the contaminations in the sample matrix could not affect Hg^{2+} detection of the sensor. This result suggested that the developed sensor has high tolerance to the sample matrix and could be used for on-site preliminary screening of Hg^{2+} in the aqueous samples.

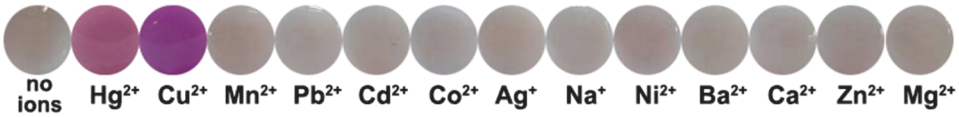


Fig. 13. Color of the modified S-silica gel (**3**) in deionized water with addition of acetate salts of Hg^{2+}, Ba^{2+}, Ag^{+}, Cu^{2+}, Pb^{2+}, Ca^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Mn^{2+}, Na^{+}, Ni^{2+}, Mg^{2+} and Zn^{2+} (100 ppm).

Delivered by Publishing Technology to: Guest User
IP: 110.77.225.41 On: Tue, 28 Apr 2015 03:56:38
Copyright: American Scientific Publishers

4. CONCLUSION

In summary, we have successfully designed and synthesized rhodamine B hydrazide-modified silica gel as a solid fluorescent sensor. The result showed that our developed sensor could detect Hg^{2+} in the everyday-life aqueous samples, the sensor exhibited adequate sensitivity and high selectivity to Hg^{2+} even in the presence of the interferences from sample matrix and other competitive metal ions. In the presence of Hg^{2+} the color of the sensor turned from colorless to deep pink which could be easily observed. Additionally, the silica gel solid support allowed easy transportation of the sensor. Therefore, our developed sensor is practical and has a potential to be used as an on-site sensor for Hg^{2+} preliminary screening in the aqueous samples from industrial waste and aqueous environments. Furthermore, the positive-tested samples should be further analyzed by higher precision techniques such as atomic absorption spectrometry or inductively coupled plasma mass spectrometry.

Acknowledgments: This work was supported by Grant RSA 5680034 from the Thailand Research Fund and Faculty of Science, Silpakorn University, and Grant SRF-JRG-2557-04 from Faculty of Science, Silpakorn University, Thailand.

Delivered by Publishing Technology to: User
IP: 110.77.225.34 On: Tue, 19 May 2015 07:46:46
Copyright: American Scientific Publishers

References and Notes

1. P. B. Tchounwou, W. K. Ayensu, N. Ninashvili, and D. Sutton; Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic implications for public health; *Environ. Toxicol.* 18, 149 (**2003**).
2. P. W. Davidson, G. J. Myers, C. Cox, C. F. Shamlaye, D. O. Marsh, M. A. Tanner, M. Berlin, J. Sloane-Reeves, E. Cernichiari, and O. Choisy; Longitudinal neurodevelopmental study of Seychellois children following in utero exposure to methylmercury from maternal fish ingestion: Outcomes at 19 and 29 months; *Neurotoxicology* 16, 677 (**1995**).
3. P. Grandjean, P. Weihe, R. F. White, and F. Debes; Cognitive performance of children prenatally exposed to "safe" levels of methylmercury; *Environ. Res.* 77, 165 (**1998**).
4. J. Gutknecht; Inorganic mercury (Hg^{2+}) transport through lipid bilayer membranes; *J. Membr. Biol.* 61, 66 (**1981**).
5. M. Harada; Minamata disease: Methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution; *Crit. Rev. Toxicol.* 25, 24 (**1995**).
6. N. S. Bloom and W. F. Fitzgerald; Determination of volatile mercury species at the picogram level by low-temperature gas chromatography with cold-vapour atomic fluorescence detection; *Anal. Chim. Acta.* 208, 161 (**1988**).
7. J. A. Moreton and H. T. Delves; Simple direct method for the determination of total mercury levels in blood and urine and nitric acid digests of fish by inductively coupled plasma mass spectrometry; *J. Anal. Atom. Spectrosc.* 13, 665 (**1998**).
8. S. H. Kim, K. C. Song, S. Ahn, Y. S. Kang, and S.-K. Chang; Hg^{2+}-selective fluoroionophoric behavior of pyrene appended diazatetrathia-crown ether; *Tetrahedron Lett.* 47, 500 (**2006**).
9. Y. Shiraishi, S. Sumiya, Y. Kohno, and T. Hirai; A rhodamine-cyclen conjugate as a highly sensitive and selective fluorescent chemosensor for Hg(II); *J. Org. Chem.* 73, 8574 (**2008**).
10. B. K. McMahon and T. Gunnlaugsson; Lanthanide luminescence sensing of copper and mercury ions using an iminodiacetate-based Tb(III)-cyclen chemosensor; *Tetrahedron Lett.* 51, 5410 (**2010**).
11. S. H. Kim, J. S. Kim, S. M. Park, and S.-K. Chang; Hg^{2+}-selective Off–On and Cu^{2+}-selective On–Off type fluoroionophore based upon cyclam; *Org. Lett.* 8, 374 (**2006**).
12. S. M. Park, M. H. Kim, J. I. Choe, K. T. No, and S.-K. Chang; Cyclams bearing diametrically disubstituted pyrenes as Cu^{2+}- and Hg^{2+}-selective fluoroionophores; *J. Org. Chem.* 72, 3553 (**2007**).
13. N. J. Youn and S.-K. Chang; Dimethylcyclam based fluoroionophore having Hg^{2+}- and Cd^{2+}-selective signaling behaviors; *Tetrahedron Lett.* 46, 129 (**2005**).
14. K.-C. Song, M. H. Kim, H. J. Kim, and S.-K. Chang; Hg^{2+}- and Cu^{2+}-selective fluoroionophoric behaviors of a dioxocyclam derivative bearing anthrylacetamide moieties; *Tetrahedron Lett.* 48, 7468 (**2007**).
15. R. Metivier, I. Leray, and B. Valeur; Lead and mercury sensing by calixarene-based fluoroionophores bearing two or four dansyl fluorophores; *Chem. Eur. J.* 10, 4490 (**2004**).
16. Y. H. Lee, M. H. Lee, J. F. Zhang, and J. S. Kim; Pyrene excimer-based calix[4]arene FRET chemosensor for mercury(II); *J. Org. Chem.* 75, 7165 (**2010**).
17. Q.-Y. Chen and C.-F. Chen; A new Hg^{2+}-selective fluorescent sensor based on a dansyl amide-armed calix[4]-aza-crown; *Tetrahedron Lett.* 46, 168 (**2005**).
18. L. Ke, Z. Yi, and Y. Cheng; A highly sensitive and selective ratiometric and colorimetric sensor for Hg^{2+} based on a rhodamine–nitrobenzoxadiazole conjugate; *Inorg. Chem. Communications.* 14, 1801 (**2011**).
19. R. Martinez, A. Espinosa, A. Tarraga, and P. Molina; New Hg^{2+} and Cu^{2+} selective chromo- and fluoroionophore based on a bichromophoric azine; *Org. Lett.* 7, 5872 (**2005**).
20. J. Wang and X. Qian; Two regioisomeric and exclusively selective Hg(II) sensor molecules composed of a naphthalimide fluorophore and an *o*-phenylenediamine derived triamide receptor; *Chem. Commun.* 1, 109 (**2006**).
21. J. Tan and X.-P. Yan; 2,1,3-Benzoxadiazole-based selective chromogenic chemosensor for rapid naked-eye detection of Hg^{2+} and Cu^{2+}; *Talanta* 76, 14 (**2008**).
22. Y.-B. Chen, Y.-J. Wang, Y.-J. Lin, C.-H. Hu, S.-J. Chen, J.-L. Chir, and A.-T. Wu; A water-soluble ribosyl-based fluorescent sensor for Hg^{2+} and Cu^{2+} ions; *Carbohydr. Res.* 345, 959 (**2010**).
23. B. Vandana, T. Ruchi, and K. Manoj; Rhodamine appended terphenyl: A reversible "off–on" fluorescent chemosensor for mercury ions; *Sens. Actuators B* 151, 185 (**2010**).
24. Y.-L. Hye, K. M. K. Swamy, Y.-J. Ji, K. Gyoungmi, and Y. Juyoung; Rhodamine hydrazone derivatives based selective fluorescent and colorimetric chemodosimeters for Hg^{2+} and selective colorimetric chemosensor for Cu^{2+}; *Sens. Actuators B* 182, 537 (**2013**).
25. N. Wanichacheva, K. Setthakarn, N. Prapawattanapol, O. Hanmeng, S. L. Vannajan, and K. Grudpan; Rhodamine B-based"turn-on"fluorescent and colorimetric chemosensors for highly sensitive and selective detection of mercury(II) ions; *J. Lumin.* 132, 40 (**2012**).
26. N. Wanichacheva, N. Prapawattanapol, S. L. Vannajan, K. Grudpan, and A. Petsom; Hg^{2+}-induced self-assembly of a naphthalimide derivative by selective "turn-on" monomer/excimer emissions; *J. Lumin.* 134, 690 (**2013**).
27. N. Wanichacheva, P. Praikaew, T. Suwanich, and K. Sukrat; "Naked-eye" colorimetric and "turn-on" fluorometric chemosensors for reversible Hg^{2+} detection; *Spectrochim. Acta. A* 118, 914 (**2014**).
28. N. Jingkai, L. Qiuyan, L. Bin, and Z. Liming; A novel fluorescent probe based on rhodamine B derivative for highly selective and sensitive detection of mercury(II) ion in aqueous solution; *Sens. Actuators B* 186, 285 (**2013**).
29. Y.-K. Peng, C.-W. Lai, Y.-H. Hsiao, K.-C. Tang, and P.-T. Chou; Multifunctional mesoporous silica-coated hollow manganese oxide nanoparticles for targeted optical imaging, *T*1 magnetic resonance imaging and photodynamic therapy; *Mater. Express* 1, 143 (**2011**).
30. F. Unop and M. Puanngam; Preparation and use of chemically modified MCM-41 and silica gel as selective adsorbents for Hg(II) ions; *J. Hazard. Mater.* 154, 587 (**2008**).

31. Y. Fang, L. Gao, F. Lu, X. Yin, L. Ding, and J. Kang; Fluorescence behaviors of 5-dimethylamino-1-naphthalene-sulfonylfunctionalized self-assambled monolayer on glass wafer surface and its sensing properties for nitrobenzene; *Thin Solid Films* 515, 3119 **(2007)**.
32. H. Murata, T. Nakayama, and T. Matsushima; Immobilization of aromatic aldehyde molecules on indium tin oxide surface using acetalization reaction; *Thin Solid Films* 518, 742 **(2009)**.
33. W. Zhu, X. Qian, C. He, Y. Xu, and T. Chen; Trace mercury(II) detection and separation in serum and water samples using a reusable bifunctional fluorescent sensor; *Anal. Chim. Acta.* 651, 233 **(2009)**.
34. X. Chen, D. Du, H. Liu, P. Yu, C. He, B. Qiu, and G. Chen; Rhodamine-based ratiometric fluorescence sensing for the detection of mercury(II) in aqueous solution; *Talanta* 81, 437 **(2010)**.
35. W. Huang, D. Wu, G. Wu, and Z. Wang; Dual functional rhidamine-immobilized silica toward sensing and extracting mercury ions in natural water sample; *Dalton Trans.* 41, 2625 **(2012)**.
36. J. H. Soh, K. M. K. Swamy, S. K. Kim, S. Kim, S.-H. Lee, and J. Yoon; Rhodamine urea derivatives as fluorescent chemosensors for Hg^{2+}; *Tetrahedron Lett.* 48, 5969 **(2007)**.
37. K. N. Kim, M. G. Choi, J. H. Noh, S. Ahn, and S.-K. Chang; Rhodamine B hydrazide revisited: chemodosimetric Hg^{2+}-selective signaling behavior in aqueous environments; *Bull. Korean Chem. Soc.* 29, 574 **(2008)**.
38. M. M. A. Sekar, P. D. Hampton, T. Buranda, and G. P. López; Multifunctional monolayer assemblies for reversible direct fluorescence transduction of protein-ligand interactions at surfaces; *J. Am. Chem. Soc.* 121, 5141 **(1999)**.
39. M. Shortreed, R. Kopelman, M. Kuhn, and B. Hoyland; Fluorescent fiber-optic calcium sensor for physiological measurements; *Anal. Chem.* 68, 1418 **(1996)**.
40. E. Bakker, P. Buhlmann, and E. Pretsch; Carrier-based ion-selective electrodes and bulk optodes. 1. general characteristics; *Chem. Rev.* 97, 3132 **(1997)**.
41. M. M. Mentele, J. Cunningham, K. Koehler, J. Volckens, and C. S. Henry; Micro fluidic paper-based analytical device for particulate metals; *Anal. Chem.* 84, 4474 **(2012)**.
42. M. Shortreed, R. Kopelman, M. Kuhn, and B. Hoyland; Fluorescent fiber-optic calcium sensor for physiological measurements; *Anal. Chem.* 68, 1414 **(1996)**.

Received: 24 October 2014. Revised/Accepted: 17 March 2015.

Delivered by Publishing Technology to: Guest User
IP: 110.77.225.34 On: Tue, 19 May 2015 02:20:46
Copyright: American Scientific Publishers

Article

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล ภณิดา พรายแก้ว

ที่อยู่ 1/5 หมู่ 1 ตำบลท่ามะขาม อำเภอเมือง จังหวัดกาญจนบุรี 71000

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2555 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเอกเคมี เกียรตินิยมอันดับ 2 จากมหาวิทยาลัยศิลปากร

พ.ศ. 2556 ศึกษาต่อระดับปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเอก เคมีอินทรีย์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ผลงานวิจัยที่ได้รับตีพิมพ์ในระดับนานาชาติ

Praikaew, P.; Suwanich, T.; Sukrat, K.; Wanichacheva, N. (2014). ‘‘Naked-eye’’ colorimetric and ‘‘turn-on’’ fluorometric chemosensors for reversible Hg^{2+} detection. **Spectrochimica Acta Part A**. Vol. 118: 908-914.

Praikaew, P.; Duangdeetip, T.; Chimpalee, N.; Wainiphithapong, C.; Swanglap, P.; Wanichacheva, N. (2015). ‘‘Colorimetric sensor for detection of Hg2+ in aqueous samples utilizing rhodamine B hydrazide-modified silica.’’ **Materials Express**. Vol. 5: 300-308.

รางวัลที่เคยได้รับ

พ.ศ. 2556 รางวัลรองชนะเลิศอันดับ 2 การประกวดโปสเตอร์วิชาการ สาขาวิชาเคมี งาน วทท. เพื่อเยาวชนครั้งที่ 8