



การสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์จากอนุพันธ์ของเพนตะเฮลิซีนเพื่อใช้เป็นสารทำ
เครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิงและเซ็นเซอร์ตรวจจับไอออนทองแดง



โดย
นายนิรวิทย์ แก้วนก

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมี แผน ก แบบ ก 2 ปริญญามหาบัณฑิต

ภาควิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2560

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์จากอนุพันธ์ของเพนตะเฮลิซีนเพื่อใช้เป็นสาร
ทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิงและเซ็นเซอร์ตรวจจับไอออนทองแดง



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมี แผน ก แบบ ก 2 ปริญญามหาบัณฑิต

ภาควิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2560

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

SYNTHESIS OF FLUORESCENCE COMPOUNDS BASED ON [5]HELICENE
DERIVATIVES FOR UTILIZING AS PETROLEUM MARKER AND COPPER(II)
SENSOR



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for Master of Science CHEMISTRY
Department of CHEMISTRY
Graduate School, Silpakorn University
Academic Year 2017
Copyright of Graduate School, Silpakorn University

หัวข้อ	การสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์จากอนุพันธ์ของเพนตะเฮลิซีนเพื่อใช้เป็นสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิงและเซ็นเซอร์ตรวจจับไอออนทองแดง
โดย	นิรวิทย์ แก้วนก
สาขาวิชา	เคมี แผนก ก แบบ ก 2 ปริญญาโทบริหารธุรกิจ
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. นันทินต์ วานิชชีวะ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.จุไรรัตน์ นันทานิช)

พิจารณาเห็นชอบโดย

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กนกอร ระย้านิล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. นันทินต์ วานิชชีวะ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ดร. ธนศาสตร์ สุขศรีเมือง)

..... ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(ดร. สมบุญ สหสิทธิ์วัฒน์)

59317202 : เคมี แผน ก แบบ ก 2 ปริญญามหาบัณฑิต

คำสำคัญ : เซ็นเซอร์ทองแดง, ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์, ไอโอโนฟอว์, ฟลูออโรฟอว์, ฟลูออโรไอโอโนฟอว์, สารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิง

นาย นิรวิธ แก้วนก: การสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์จากอนุพันธ์ของเพนตะเฮลิซีนเพื่อใช้เป็นสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิงและเซ็นเซอร์ตรวจจับไอออนทองแดง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : รองศาสตราจารย์ ดร. นันทนิตย์ วานิชชีวะ

สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ชนิดใหม่ (MCA และ MNH) สังเคราะห์ขึ้นจากอนุพันธ์ของเพนตะเฮลิซีน เพื่อใช้ประโยชน์เป็นสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิงและเซ็นเซอร์ตรวจจับไอออนทองแดง โดยที่ MCA ถือเป็นสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิงชนิดแรกที่มีอนุพันธ์ของเพนตะเฮลิซีนเป็นองค์ประกอบ สามารถสังเคราะห์ได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างอนุพันธ์ของเพนตะเฮลิซีนเชื่อมต่อกับคาร์บอนอล ซึ่งเป็นส่วนที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการละลายน้ำมัน จากผลการทดลองด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์พบว่า MCA สามารถใช้เป็นสารทำเครื่องหมายในน้ำมันแก๊สโซฮอล์ 91 ได้ที่ความเข้มข้น 20 ppm มีวิธีการตรวจวิเคราะห์ได้ง่ายด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี และมีความเสถียรเมื่อเติมลงไป ในน้ำมันแก๊สโซฮอล์ 91 เป็นระยะเวลา 3 เดือน สำหรับทองแดงเซ็นเซอร์ MNH ประกอบด้วยอนุพันธ์ของเพนตะเฮลิซีนเชื่อมต่อกับไฮดราซีนซึ่งเป็นส่วนของไอโอโนฟอว์ที่มีความจำเพาะต่อการตรวจจับไอออนทองแดง โดยสามารถสังเคราะห์ผ่านการทำปฏิกิริยาเพียงขั้นตอนเดียว จากการทดสอบประสิทธิภาพการตรวจจับไอออนต่างๆ ด้วยเทคนิคทางฟลูออเรสเซนซ์พบว่า MNH มีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อไอออนทองแดง โดยแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์แบบ OFF-ON ในสารละลาย acetonitrile ที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบและมี Stokes shift ที่กว้าง (~183 nm) โดยเซ็นเซอร์ MNH สามารถตรวจจับกับไอออนทองแดงด้วยอัตราส่วน 1:1 จากผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี Job's plot และเทคนิค molecular modeling และมีค่า detection limit ในการตรวจวัดไอออนทองแดงเท่ากับ 2.57 ppb ซึ่งต่ำกว่าค่าความเข้มข้นมาตรฐานของทองแดงที่มีได้ในน้ำดื่มตามข้อกำหนดของ U.S. EPA และ WHO นอกจากนี้ยังสามารถตรวจวัดไอออนทองแดงได้ในเซลล์สิ่งมีชีวิต (HepG2) อีกด้วย

59317202 : Major CHEMISTRY

Keyword : COPPER SENSOR, FLUORESCENCE SENSOR, IONOPHORE, FLUOROPHORE,
FLUOROIONOPHORE, PETROLEUM MARKER

MR. NIRAWIT KAEWNOK : SYNTHESIS OF FLUORESCENCE COMPOUNDS
BASED ON [5]HELICENE DERIVATIVES FOR UTILIZING AS PETROLEUM MARKER AND
COPPER(II) SENSOR THESIS ADVISOR : ASSOCIATE PROFESSOR NANTANIT
WANICHACHEVA

Two new fluorescence compounds (MCA and MNH) based [5]helicene derivatives were synthesized for the applications of petroleum marker and Cu^{2+} sensor. MCA was the novel [5]helicene-based petroleum marker, which was prepared via simple synthetic route. Its structure contained [5]helicene moiety as a fluorophore connected to cardanol, for increasing oil-soluble capability. This synthetic marker presented invisible color in gasohol 91 with a workable level at 20 ppm. It could be simply detected by fluorescence spectrophotometer and provided good stability in gasohol 91 for 3 months. In the other application, [5]helicene-based fluorescence compound could be used as a Cu^{2+} -specific fluorescence sensor. Sensor MNH consisted of [5]helicene derivatives coupled to hydrazine. It was successfully synthesized through simple one-step reaction. The potency of Cu^{2+} detection among different ions has been studied using fluorescence spectrophotometer. The results showed that MNH indicated a highly sensitive fluorescence response toward Cu^{2+} with OFF-ON fluorescence system in aqueous acetonitrile solution and revealed very large Stokes shift (~183 nm). The binding of MNH with Cu^{2+} was found to be 1:1 ratio by Job's plot analysis and the molecular modeling study. The detection limit of MNH for Cu^{2+} determination was estimated to be 2.57 ppb, and was lower than drinking water permission concentration specified by the U.S. EPA and WHO. Moreover, the sensor has the potential for the detection of Cu^{2+} in biological samples by enhancement fluorescence from the intracellular area in HepG2 cellular system.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. นันทินต์ วานิชชีวะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์และ ดร.ธนา ศาสตร สุขศรีเมือง อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์เป็นอย่างสูง สำหรับความคำแนะนำและความช่วยเหลืออันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการทำวิทยานิพนธ์ ตลอดจนการวางแผนศึกษาต่อ และประสบการณ์ดีๆ ที่มอบให้กระผมตลอดมา

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กนกอร ระย้านิล ประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำต่างๆ อันเป็นประโยชน์ต่อวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณ ดร.สมบุญ สหสิทธิวัฒน์ อาจารย์กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่างๆ อันเป็นประโยชน์ต่อวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณ อาจารย์ ดร.จิตนภา ศิริรักษ์ อาจารย์ผู้ซึ่งให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือในการศึกษา molecular modeling

ขอขอบคุณ อาจารย์ ดร.อดิสรีย์ เจริญพานิช อาจารย์ผู้ซึ่งให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือในการศึกษาทางด้านชีววิทยา

ขอขอบคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่สาวและน้องสาว ที่เป็นกำลังใจ ให้ความรักความอบอุ่นและให้ความช่วยเหลือตลอดจนคำปรึกษาที่ดี ในด้านต่างๆ มากมายมาโดยตลอด

ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร สำหรับความรู้และประสบการณ์ที่ดี ในขณะที่กระผมได้ศึกษาอยู่ ณ สถาบันการศึกษาแห่งนี้

ขอขอบคุณอาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่าน ที่กรุณาประสิทธิ์ประสาทความรู้ต่างๆ ทั้งความรู้ในด้านวิชาการ และด้านการดำเนินชีวิต

ขอขอบคุณพี่ น้อง และเพื่อนใน Sensor Research Laboratory ทุกคน ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ตลอดจนมิตรจิตอันดีที่มอบให้แก่มานี้มาโดยตลอด

สุดท้ายขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาเคมีทุกท่าน ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการดำเนินงานเอกสาร อีกทั้งขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเคมีทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือด้านอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำวิทยานิพนธ์ ด้วยความเอื้อเฟื้อตลอดมา

ประโยชน์อันใดที่เกิดจากการทำวิทยานิพนธ์นี้ ย่อมเป็นผลมาจากความกรุณาของทุกท่านดังกล่าว กระผมรู้สึกซาบซึ้งและระลึกถึงความกรุณาเป็นอย่างยิ่ง จึงใคร่ขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

นिरวิทย์ แก้วนก

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
ที่มาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	9
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนี้.....	9
ขอบเขตของงานวิจัย.....	10
บทที่ 2 บทความวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	11
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	24
บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัย.....	42
บทที่ 5 สรุปผลการดำเนินงานวิจัย.....	83
ภาคผนวก.....	85
รายการอ้างอิง	101
ประวัติผู้เขียน.....	105

บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ปัญหามลพิษในสิ่งแวดล้อมเป็นปัญหาที่สำคัญในระดับชาติและมีแนวโน้มที่จะทวีความรุนแรงขึ้น เนื่องจากการขยายตัวทางเศรษฐกิจและอุตสาหกรรม ซึ่งมีการใช้เชื้อเพลิงฟอสซิลและสารเคมีบางชนิดในกระบวนการผลิต ส่งผลให้เกิดปัญหาการใช้เชื้อเพลิงฟอสซิลที่ไม่ผ่านมาตรฐานและการปนเปื้อนของสารเคมีอันตรายลงสู่สิ่งแวดล้อม

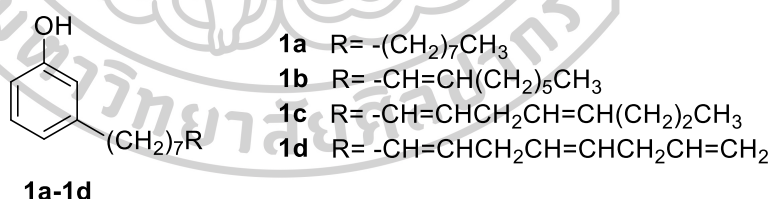
อุตสาหกรรมประเภทหนึ่งที่มีการเติบโตอย่างรวดเร็วคืออุตสาหกรรมปิโตรเคมี เพื่อตอบสนองความต้องการใช้น้ำมันเชื้อเพลิงของผู้บริโภคที่มีอัตราเพิ่มขึ้นเป็นอย่างมากในยุคปัจจุบัน โดยทั่วไปแล้วน้ำมันเชื้อเพลิงจะต้องผ่านการชำระภาษีตามอัตราที่ทางรัฐบาลได้กำหนดไว้ ซึ่งอัตราดังกล่าวขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำมันเชื้อเพลิงและประโยชน์ของการนำน้ำมันเชื้อเพลิงนั้นไปใช้งาน หมายถึงถ้าเป็นน้ำมันเชื้อเพลิงชนิดเดียวกันแต่ใช้ในวัตถุประสงค์ที่แตกต่างกันก็ต้องชำระภาษีในอัตราที่แตกต่างกันออกไป นอกจากนี้รัฐบาลยังต้องเผชิญกับปัญหาต่างๆ โดยเฉพาะการเจือปนของผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าต่ำกว่าในผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูง ตัวอย่างเช่น การเจือปนของน้ำมันเบนซินธรรมดาในเบนซินพิเศษ การผสมตัวทำละลายลงในน้ำมันเชื้อเพลิง หรือการเจือปนของน้ำมันดีเซลที่ชำระภาษีต่ำในน้ำมันดีเซลที่ชำระภาษีสูงกว่า เป็นต้น ด้วยปัญหาดังกล่าวจึงจำเป็นที่จะพัฒนาระบบการติดตามและตรวจสอบน้ำมันเชื้อเพลิง เพื่อประโยชน์ในการจำแนกประเภทและความแตกต่างของน้ำมันเชื้อเพลิงที่มีอยู่มากมายในปัจจุบัน

วิธีการหนึ่งที่สามารถใช้ตรวจสอบและป้องกันปัญหาดังกล่าว คือการเติมสารทำเครื่องหมาย (markers) ลงในผลิตภัณฑ์น้ำมันชนิดต่างๆ โดยสารทำเครื่องหมายในน้ำมันเชื้อเพลิงได้ถูกนำมาใช้เพื่อประโยชน์ในการระบุแหล่งที่มาของน้ำมันเชื้อเพลิงและเพื่อตรวจสอบการชำระภาษีของน้ำมันเชื้อเพลิงให้ถูกต้องตามอัตราที่กำหนด ทั้งนี้สารทำเครื่องหมายในน้ำมันเชื้อเพลิงที่เติมลงไป ในผลิตภัณฑ์จะต้องประกอบด้วยคุณสมบัติสำคัญ 5 ประการด้วยกัน ได้แก่

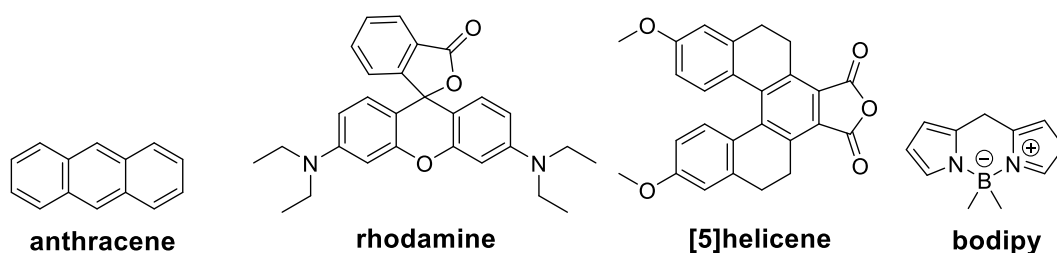
1. ละลายได้ดีในผลิตภัณฑ์น้ำมันเชื้อเพลิง
2. ไม่สามารถสังเกตเห็นสีได้ด้วยตาเปล่าภายหลังจากการเติมสารลงไป ในน้ำมันเชื้อเพลิง
3. มีวิธีการวิเคราะห์ที่ง่าย ไม่ยุ่งยาก ซับซ้อน

4. มีความเสถียรอยู่ในน้ำมันเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 3 เดือน
5. ไม่ส่งผลกระทบต่อคุณสมบัติทางกายภาพของน้ำมันเชื้อเพลิง

จากคุณสมบัติดังกล่าว งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้คาร์ดานอล (cardanol) ดังแสดงโครงสร้างในภาพที่ 1 (1a-1d) มาเป็นสารตั้งต้นเพื่อออกแบบและสังเคราะห์สารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิงชนิดใหม่ เนื่องจากคาร์ดานอลเป็นสารประกอบประเภทแอลคิลฟีนอลที่มีสมบัติละลายในน้ำมันได้ดี โดยเป็นสารที่ได้มาจากปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชัน (decarboxylation) ของกรดแอนาคาคิก (anacardic acid) ซึ่งมีในเปลือกของเมล็ดมะม่วงหิมพานต์ในปริมาณสูงมาก เปลือกของเมล็ดมะม่วงหิมพานต์เป็นของเหลือ (waste) จากการผลิตเมล็ดมะม่วงหิมพานต์ซึ่งเป็นอุตสาหกรรมที่สำคัญทางภาคใต้ของประเทศไทย งานวิจัยนี้จะเป็นการศึกษาการนำคาร์ดานอลมาดัดแปลงโดยการเพิ่มสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ (fluorophore) โดยตัวอย่างและโครงสร้างทางเคมีของฟลูออโรฟอร์บางชนิดแสดงดังภาพที่ 2 เชื่อมต่อเข้ากับสารประกอบคาร์ดานอล ทำให้สารผลิตภัณฑ์มีความสามารถในการละลายในน้ำมันเชื้อเพลิงชนิดต่างๆ ได้ดีและมีคุณสมบัติของการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ ซึ่งเมื่อผสมลงในน้ำมันเชื้อเพลิงแล้วจะสามารถใช้เทคนิคทางฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปีหรือชุดทดสอบเพื่อตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของสารทำเครื่องหมายในน้ำมันเชื้อเพลิงได้ รวมทั้งมีขั้นตอนการสังเคราะห์ที่ไม่ซับซ้อน ดังนั้น การนำคาร์ดานอลมาใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับผลิตสารทำเครื่องหมายน้ำมันของงานวิจัยนี้ นอกจากจะช่วยแก้ปัญหาระบบติดตามน้ำมันเชื้อเพลิงและภาษีน้ำมันเชื้อเพลิงแล้ว ยังเป็นการนำของเหลือใช้มาประยุกต์ให้เกิดประโยชน์สูงสุดอีกด้วย



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของคาร์ดานอล



ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของอนุพันธ์ของฟลูออโรฟอร์บางชนิด

นอกเหนือจากปัญหาการหลีกเลี่ยงภาษีน้ำมันแล้ว อีกหนึ่งปัญหาสำคัญที่เป็นผลกระทบจากการขยายตัวของภาคอุตสาหกรรมคือการปลดปล่อยสารเคมีอันตรายลงสู่สิ่งแวดล้อม เช่น การปลดปล่อยโลหะหนักอันตราย ซึ่งอาจก่อให้เกิดการสะสมและเข้าสู่ระบบห่วงโซ่อาหารได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุตสาหกรรมอิเล็กทรอนิกส์ที่มีอยู่ค่อนข้างมากในปัจจุบัน มีการใช้ทองแดงเป็นวัตถุดิบหลักในกระบวนการผลิต ส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนของโลหะทองแดงลงสู่สิ่งแวดล้อมได้ง่าย

ทองแดงเป็นโลหะทรานซิชันที่สำคัญ ที่สามารถพบได้ตามธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม อีกทั้งยังสามารถพบได้ในกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์สิ่งมีชีวิต แต่หากร่างกายได้รับทองแดงในปริมาณที่มากเกินไป จะเกิดผลเสียต่อสมดุลและกลไกต่างๆ ของร่างกายในระดับเซลล์ได้[1] เช่น ทำให้เกิดอาการคลื่นเหียนอาเจียน เกิดการอักเสบในช่องท้องและกล้ามเนื้อ การทำงานของหัวใจผิดปกติ กดระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและอาจส่งผลให้เกิดความผิดปกติทางจิต สำหรับอาการเรื้อรังจากการได้รับทองแดงติดต่อกันเป็นเวลานาน จะทำให้ตับทำหน้าที่บกพร่องไม่สามารถขับทองแดงออกจากร่างกายได้ตามปกติ จนเกิดการสะสมอยู่ในร่างกายเป็นปริมาณมาก ส่งผลให้เกิดความผิดปกติของร่างกาย ตัวอย่างเช่น กลุ่มอาการ Wilson's Diseases ที่ร่างกายผู้ป่วยจะแสดงอาการสั่นเทาอยู่ตลอดเวลา กล้ามเนื้อแข็งเกร็ง มีน้ำมูกน้ำลายไหล ควบคุมการพูดลำบาก กลุ่มอาการ Menkes Syndrome เกิดจากความบกพร่องในยีน ATP7A ส่งผลให้กล้ามเนื้ออ่อนแอ ผิวหน้าห่อหุ้มคล้ายสติปัญญาพัฒนาล่าช้า[2] นอกจากนี้ยังพบว่า ทองแดงยังเป็นหนึ่งในสาเหตุของโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) หรือโรคความจำเสื่อม และโรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) ซึ่งเป็นโรคที่พบมากในผู้สูงอายุอีกด้วย[3] โดยทั่วไปไอออนทองแดงสามารถพบได้ ทั้งในรูปของไอและเกลือของทองแดงจากการหลอม การเชื่อมและบัดกรีโลหะที่มีทองแดงเป็นองค์ประกอบ ดังนั้น ไอออนทองแดงจึงสามารถปนเปื้อนได้ในสิ่งแวดล้อมทั้งใน ดิน น้ำ อากาศ ในสิ่งมีชีวิต และสะสมในเนื้อเยื่อสัตว์น้ำ ด้วยพิษที่อันตรายของไอออนทองแดงที่กล่าวมาข้างต้นนี้ จึงได้มีการกำหนดค่าความเข้มข้นสูงสุดของทองแดงที่ปนเปื้อนในแหล่งธรรมชาติจากสถาบันต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงค่าความเข้มข้นสูงสุดของทองแดงที่ปนเปื้อนในแหล่งธรรมชาติจากสถาบันต่างๆ

แหล่งธรรมชาติ (กำหนดโดยสถาบัน)	ความเข้มข้นสูงสุดของทองแดงที่มีได้
น้ำดื่ม (US EPA)[4]	1.3 ppm
น้ำดื่ม (WHO)[5]	2.0 ppm
อาหารทะเล (FDA)[6]	20 ppm
อากาศ (OSHA)[7]	30 mg/m ³

ด้วยเหตุนี้ จึงต้องให้ความสำคัญกับปัญหาสิ่งแวดล้อมรอบตัว โดยเฉพาะสิ่งแวดล้อมทางน้ำ ซึ่งเป็นแหล่งปนเปื้อนที่สำคัญ อันนำมาสู่สารปนเปื้อนในห่วงโซ่อาหารได้มากที่สุด และคงดีไม่น้อยถ้ามีเครื่องมือหรือวิธีตรวจสอบความเป็นพิษของสิ่งแวดล้อมใกล้ตัว ที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน มีประสิทธิภาพ และประหยัดค่าใช้จ่ายให้น้อยที่สุด

ในปัจจุบันมีเทคนิคมาตรฐานหลายเทคนิคที่ถูกนำมาใช้สำหรับวิเคราะห์ไอออนทองแดง เช่น Flame Photometry Atomic Absorption Spectrometry (Flame-AAS), Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry (ICP-AES) และเทคนิคทางเซลล์ไฟฟ้าเคมี (Electrochemistry) เทคนิคการวิเคราะห์ที่กล่าวมาข้างต้นนี้ เป็นเทคนิคที่ต้องใช้สารตัวอย่างในปริมาณมาก เครื่องมือที่ใช้มีราคาแพง ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ ไม่เหมาะสมกับการวิเคราะห์อย่างต่อเนื่อง (continuous monitoring) ไม่สามารถใช้เป็นอุปกรณ์สำหรับตรวจจับไอออนโลหะหนักในภาคสนามได้ และต้องคำนึงถึงการกำจัดสารบวกรวบรวมในกรณีที่มีตัวอย่างเป็นน้ำกร่อย น้ำทะเล สิ่งมีชีวิตจากทะเล หรือดินตะกอน ที่มีการปนเปื้อนของเกลือจำนวนมาก ซึ่งจะทำให้เกิดการอุดตันของเกลือ (salt-clogging) ขณะทำการวิเคราะห์ได้ จากข้อจำกัดที่กล่าวมาข้างต้น ทำให้มีการพัฒนาเทคนิคทางเลือกเพื่อตรวจวิเคราะห์ไอออนโลหะชนิดต่างๆ นั่นคือ เทคนิคฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ (fluorescence sensor) โดยเทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่ไม่ทำลายสารตัวอย่าง สามารถใช้เป็น real time monitoring ได้ ใช้สารตัวอย่างปริมาณน้อย (1-3 มิลลิลิตร) มีค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์ค่อนข้างต่ำและสามารถตรวจวัดไอออนโลหะในระดับความเข้มข้นใกล้เคียงกับเทคนิคมาตรฐานด้วย

ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์เป็นการนำระบบโครงสร้างโมเลกุล (molecular system) ที่สามารถเหนี่ยวนำให้ทำงานได้โดยการใช้แสงเป็นตัวกระตุ้น (light-induced logic operation) เมื่อ

ระบบถูกกระตุ้นด้วยแสง จะแสดงผลการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางโฟโตฟิสิกส์ (photophysics) ของเซ็นเซอร์ เช่น เปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ และ/หรือ เปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตเซ็นเซอร์ดังกล่าวได้รับความสนใจอย่างแพร่หลายในแง่ของการใช้งานในการตรวจจับไอออนโลหะหนักต่างๆ ทั้งด้านคุณภาพวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์ โดยทั่วไปโครงสร้างโมเลกุลของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ประกอบด้วย 3 ส่วนหลัก ได้แก่

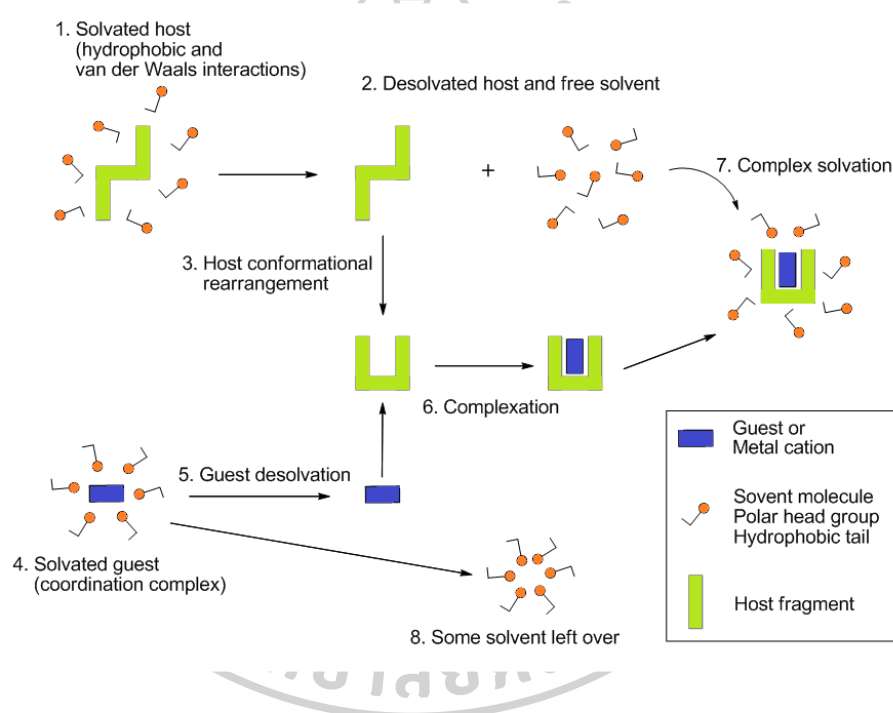
- 1) ฟลูออโรฟอร์ (fluorophore) เป็นส่วนที่แสดงคุณสมบัติของฟลูออเรสเซนซ์โดยการดูดกลืนหรือคายแสงในช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสม
- 2) ไอโอโนฟอร์ (ionophore) เป็นส่วนที่สามารถดักจับไอออนได้
- 3) ตัวเชื่อม (linker) จะเป็นส่วนที่ใช้เชื่อมต่อระหว่าง ฟลูออโรฟอร์ และไอโอโนฟอร์ เข้าด้วยกัน (ซึ่งก็คือ พันธะโคเวเลนต์)

ดังนั้นจึงเรียกระบบฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์นี้ว่า ฟลูออโรไอโอโนฟอร์ (fluoroionophore) การทำงานของระบบเซ็นเซอร์นี้ส่วนที่แสดงสัญญาณจะเปรียบเสมือน transducer ซึ่งจะทำให้การเปลี่ยนข้อมูลของกลไกการดักจับของไอออนทองแดง (recognition event) ไปสู่การเปลี่ยนแปลงสัญญาณทางแสง (optical signal)

การออกแบบโครงสร้างส่วนไอโอโนฟอร์ควรคำนึงถึง 1) อันตรกิริยา (interaction) ที่จะเกิดขึ้นระหว่างไอโอโนฟอร์กับไอออนที่สนใจซึ่งสามารถเกิดได้หลายลักษณะ เช่น ion-ion interaction, ion-dipole interaction, dipole-dipole interaction, hydrogen bonding และ cation- π interaction เป็นต้น โดยอันตรกิริยาดังกล่าวมีความแข็งแรงของพันธะแตกต่างกัน หากพันธะที่เกิดขึ้นมีความแข็งแรงมาก การดักจับก็จะมีประสิทธิภาพที่ดี และ/หรือ 2) ขนาดหรือรูปร่างที่เหมาะสมของไอโอโนฟอร์ (size fit requirement) เพื่อเพิ่มความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนที่ต้องการวิเคราะห์ได้อีกด้วย ในงานวิจัยนี้นำเสนอการสังเคราะห์เซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดไอออนทองแดงชนิดใหม่ที่มีความไวสูง (high sensitivity) และจำเพาะเจาะจงสูง (high selectivity) ต่อไอออนทองแดง โดยอาศัยความรู้จากทฤษฎี Hard and Soft Acid and Base[8] กล่าวคือ ไอออนทองแดง (Cu^{2+} ion) มีขนาดอะตอมใหญ่โพลาริซ่ายง่าย ถือเป็น soft acid ซึ่งชอบเกิดอันตรกิริยาและสร้างพันธะ (bond binding) กับอะตอมหรือหมู่ฟังก์ชัน (functional group) ที่เป็น soft base นั่นคืออะตอมไนโตรเจน และอะตอมออกซิเจนที่มีอิเล็กตรอนมาก ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกสังเคราะห์ส่วนไอโอโนฟอร์ที่มีอะตอมไนโตรเจนและอะตอมออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ เพื่อทำหน้าที่เป็น soft donor ligand ให้อิเล็กตรอนแก่ไอออนทองแดง เพื่อเพิ่มความจำเพาะเจาะจงต่อการดักจับไอออน

ทองแดง สำหรับงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้อนุพันธ์ของเพนตะเฮลิซีน ([5]helicene derivatives) เป็นส่วน
ของฟลูออโรฟอร์ (fluorophore) ในที่นี้เลือกใช้อนุพันธ์ของเพนตะเฮลิซีนที่มีหมู่ฟังก์ชันแอนไฮไดรด์
(anhydride functional group) เป็นองค์ประกอบ เนื่องจากง่ายต่อการปรับเปลี่ยนโครงสร้าง
นอกจากนี้ยังเป็นอนุพันธ์ที่มีการคายแสงฟลูออเรสเซนส์ในช่วงที่ตามองเห็นและมีค่าสัมประสิทธิ์เชิง
ควันตัมที่สูง (quantum yield; Φ_f) สามารถพัฒนาต่อยอดเป็นชุดทดสอบในภาคสนามได้ต่อไป

กระบวนการดักจับไอออนของฟลูออเรสเซนส์เซ็นเซอร์เป็นการเกิดอันตรกิริยาในลักษณะ
โฮสต์-เกสต์ (host-guest chemistry) ระหว่างโฮอโนฟอร์กับไอออนที่สนใจและเกิดเป็น
สารประกอบเชิงซ้อน (complex compounds) สามารถอธิบายกลไกแสดงดังภาพที่ 3

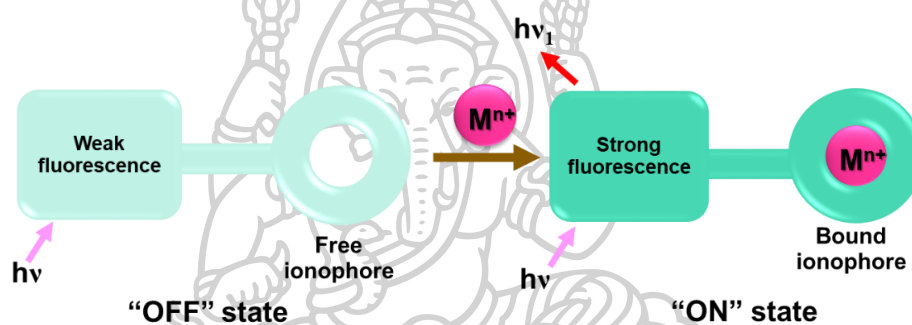


ภาพที่ 3 กลไกการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโฮอโนฟอร์และไอออน

จากภาพสามารถอธิบายได้ว่า เมื่ออยู่ในสารละลาย โมเลกุลของสารละลายจะจัดตัวล้อมรอบ
โมเลกุลของโฮอโนฟอร์ด้วยอันตรกิริยาชนิด Van der Waals และ hydrophobic และล้อมรอบ
โมเลกุลของไอออนด้วยอันตรกิริยาชนิด coordination เพื่อให้สารทั้งสองสามารถคงตัวอยู่ได้ใน
สารละลาย ซึ่งการเกิดการดักจับหรือการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโฮอโนฟอร์และไอออนนั้น
โมเลกุลของสารทั้งสองชนิดต้องใช้พลังงานเพื่อทำลายแรงยึดเหนี่ยวที่เกิดจากโมเลกุลของสารละลาย
เพื่อให้ได้โมเลกุลโฮอโนฟอร์อิสระและไอออนอิสระ จากนั้นโมเลกุลโฮอโนฟอร์อิสระจะเกิดการ

ปรับเปลี่ยนโครงสร้างเพื่อให้มีขนาดและรูปร่างที่เหมาะสมกับไอออนจึงสามารถดักจับไอออนที่ต้องการได้ ซึ่งสารประกอบที่เกิดขึ้นนี้จะถูกโมเลกุลของสารละลายล้อมรอบเช่นเดียวกัน

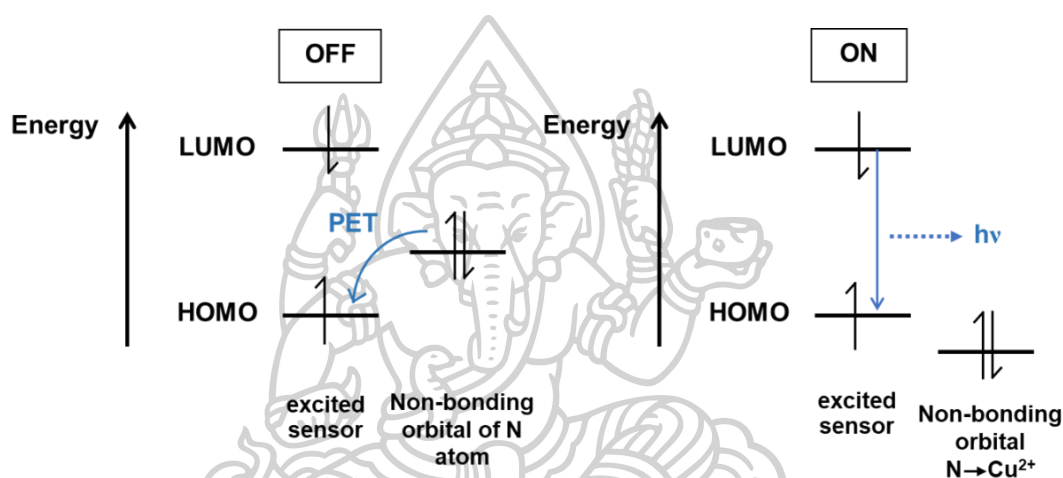
ระบบการทำงานของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์มีลักษณะคล้ายสวิตช์ปิดเปิดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ โดยทั่วไปมีอยู่ 2 ระบบการทำงาน ได้แก่ OFF-ON และ ON-OFF fluorescence switch สำหรับงานวิจัยนี้ให้ความสนใจระบบการทำงานแบบ OFF-ON fluorescent switch กล่าวคือ เมื่อเซ็นเซอร์อยู่ในสถานะที่ไม่มีการจับกับไอออน จะไม่แสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนต์หรือแสดงสัญญาณในความเข้มต่ำๆ ในทางตรงข้าม สถานะที่มีการดักจับไอออนอย่างจำเพาะเจาะจงด้วยไอโอโนฟอร์ สัญญาณฟลูออเรสเซนต์จะเพิ่มขึ้นแปรผันตรงกับความเข้มข้นของไอออนที่ตรวจวัดได้ ลักษณะการทำงานดังกล่าวแสดงโดยภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ลักษณะการแสดงผลสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของเซ็นเซอร์ในระบบ OFF-ON fluorescence switch

ลักษณะการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ข้างต้นสามารถอธิบายได้โดยกลไกการส่งผ่านอิเล็กตรอนจากไอออนทองแดงสู่เซ็นเซอร์แสดงดังภาพที่ 5 เริ่มจากในสถานะที่ไม่มีการดักจับไอออนทองแดง (ภาพซ้ายมือ) เมื่อเซ็นเซอร์รับพลังงานจากแสงความยาวคลื่นที่เหมาะสม อิเล็กตรอนในระดับพลังงาน HOMO (the highest occupied molecular orbital) ของเซ็นเซอร์จะได้รับพลังงานกระตุ้นและเปลี่ยนระดับพลังงานไปยัง LOMO (the lowest unoccupied molecular orbital) ทำให้ระดับพลังงาน HOMO ของเซ็นเซอร์ว่าง เมื่อระบบต้องการลดพลังงานเพื่อกลับลงสู่สถานะพื้น อิเล็กตรอนจาก non-bonding orbital ของไนโตรเจน จะเคลื่อนลงสู่ระดับพลังงาน HOMO ของเซ็นเซอร์ การเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนเช่นนี้เรียกว่า intramolecular electron transfer ส่งผลให้มีมีการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของเซ็นเซอร์ ในทางตรงกันข้าม สถานะที่อะตอมไนโตรเจนมีการดักจับไอออนทองแดงโดยใช้ non-bonding orbital (ภาพขวามือ) ระดับพลังงาน

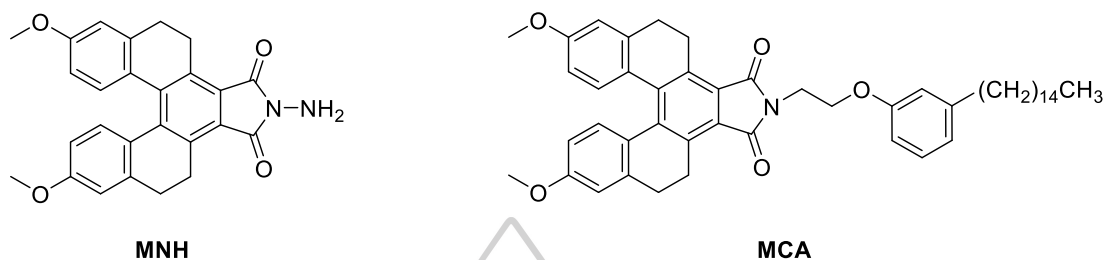
non-bonding orbital ของอะตอมไนโตรเจนจะมีค่าต่ำกว่าระดับพลังงาน HOMO ของเซ็นเซอร์ ทำให้กระบวนการ intramolecular electron transfer ไม่สามารถเกิดได้ ดังนั้น เมื่อเซ็นเซอร์ได้รับพลังงานแสง อิเล็กตรอนในระดับพลังงาน HOMO จะได้รับพลังงานกระตุ้นเคลื่อนที่สู่ระดับพลังงาน LUMO ของเซ็นเซอร์ และเมื่อระบบต้องการลดพลังงานลงสู่สภาวะพื้น อิเล็กตรอนที่ระดับพลังงาน LUMO ของเซ็นเซอร์จะสามารถเคลื่อนที่ลงสู่ระดับพลังงาน HOMO ของเซ็นเซอร์ได้ ทำให้เกิดการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ออกมา กระบวนการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนที่อธิบายมานี้ เรียกว่า กระบวนการ photoinduced electron transfer (PET)[9, 10]



ภาพที่ 5 กลไกของกระบวนการ Photoinduced Electron Transfer (PET) ในสภาวะก่อนดักจับไอออน (ซ้าย) และหลังการดักจับไอออน (ขวา)

ในวิทยานิพนธ์นี้ได้มีการออกแบบและสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์จากอนุพันธ์ของเพนตะเฮลิซีนที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิง (MCA) และเซ็นเซอร์ตรวจจับไอออนทองแดง (MNH) มีโครงสร้างแสดงภาพที่ 6 อีกทั้งยังเป็นงานวิจัยที่ให้ความสำคัญกับปัญหาสิ่งแวดล้อมรอบตัว กล่าวคือ การออกแบบและสังเคราะห์สารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิง (MCA) เป็นการพัฒนาระบบการติดตามและตรวจสอบน้ำมันเชื้อเพลิงร่วมกับการใช้ประโยชน์จากกากของเสียจากเปลือกของเม็ดมะม่วงหิมพานต์เป็นของเหลือ (waste) ในกระบวนการผลิตเม็ดมะม่วงหิมพานต์ ซึ่งเป็นอุตสาหกรรมที่สำคัญทางภาคใต้ของประเทศไทยให้เกิดประโยชน์สูงสุด การออกแบบและสังเคราะห์เซ็นเซอร์เพื่อตรวจจับไอออนทองแดง (MNH) เป็นการพัฒนาเครื่องมือหรือวิธีตรวจสอบความเป็นพิษของโลหะหนักใกล้ตัวที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน เพื่อตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของโลหะทองแดงในสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นไปตามแนวทางของแผนพัฒนา

เศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติฉบับที่สิบสอง พ.ศ. 2560-2564 ยุทธศาสตร์การเติบโตที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมเพื่อการพัฒนาอย่างยั่งยืน และยุทธศาสตร์การพัฒนาวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี วิจัย และนวัตกรรม



ภาพที่ 6 โครงสร้างของโมเลกุลเป้าหมาย

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อออกแบบและสังเคราะห์สารทำเครื่องหมายในน้ำมันเชื้อเพลิง เพื่อตรวจสอบการชำระภาษีของผลิตภัณฑ์น้ำมัน ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์ได้อย่างมีประสิทธิภาพด้วยวิธีทางฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี
- 2) เพื่อออกแบบและสังเคราะห์ทองแดงเซ็นเซอร์ที่มีคุณสมบัติในการเรืองแสง เพื่อตรวจจับไอออนทองแดง ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์ในเชิงปริมาณ และคุณภาพได้อย่างมีประสิทธิภาพด้วยวิธีทางฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี อีกทั้งยังมีความจำเพาะเจาะจงสูง (high selectivity) และมีความไวสูง (high sensitivity)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัยนี้

- 1) สามารถผลิตสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิงที่มีต้นทุนการสังเคราะห์ต่ำ และมีความไวต่อการตรวจวัดทางคุณภาพและปริมาณของน้ำมันเชื้อเพลิงได้ และสามารถผลิตในเชิงพาณิชย์ได้
- 2) สามารถนำกากของเสียจากเปลือกของเม็ดมะม่วงหิมพานต์ซึ่งเป็นของเหลือทิ้ง (waste) จากการผลิตเม็ดมะม่วงหิมพานต์จากอุตสาหกรรมที่สำคัญทางภาคใต้ของประเทศไทย มาใช้ประโยชน์และเพิ่มมูลค่าให้มากขึ้น

- 3) สามารถพัฒนาต่อยอดเป็นสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิงชนิดใหม่ๆ ที่สามารถนำมาพัฒนาสำหรับใช้ตรวจวัดและติดตามการปนเปื้อนของน้ำมันเชื้อเพลิง และเพื่อประโยชน์ในการจำแนกประเภทและความแตกต่างของน้ำมันเชื้อเพลิงที่มีอยู่มากมายในอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ต่อไปในอนาคต
- 4) สามารถผลิตเซ็นเซอร์ชนิดใหม่ที่มีต้นทุนการสังเคราะห์ต่ำ มีความจำเพาะเจาะจง และมีความไวต่อการตรวจวัดไอออนทองแดงได้เทียบเท่ากับเครื่องมือราคาแพง เช่น Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry (ICP-AES), Atomic Absorption Spectrometry, Anodic Stripping Voltammetry, X-ray Fluorescence Spectrometry และ Microprobes
- 5) เพื่อพัฒนาต่อยอดเป็นเครื่องมือตรวจวัดไอออนทองแดงที่สามารถติดตามการปนเปื้อนของโลหะทองแดงในแหล่งน้ำชุมชนและสิ่งแวดล้อมในภาคสนามได้จริง

ขอบเขตของงานวิจัย

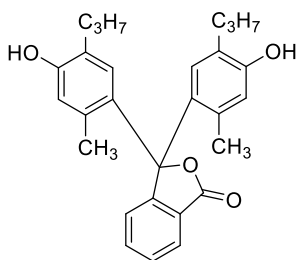
- 1) ออกแบบ สังเคราะห์และแยกสารบริสุทธิ์สารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิงและเซ็นเซอร์ตรวจจับไอออนทองแดงจากอนุพันธ์ของเพนตะเฮลิซีน
- 2) นำสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิงชนิดใหม่ที่สังเคราะห์ได้ไปทดสอบสมบัติการเรืองแสง (Fluorescence properties) ในน้ำมันเชื้อเพลิง
- 3) นำเซ็นเซอร์ตรวจจับไอออนทองแดงที่สังเคราะห์ได้ไปทดสอบสมบัติการเรืองแสง (Fluorescence properties) ในสารละลายอินทรีย์โดยมีน้ำเป็นองค์ประกอบ

บทที่ 2

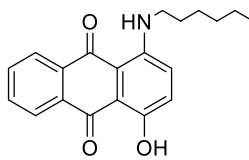
บทความวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การนำสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์มาใช้เป็นเซ็นเซอร์สำหรับติดตามและตรวจวัดไอออนโลหะหนัก เป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อไอออนที่สนใจ สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณด้วยประสิทธิภาพที่เทียบเท่ากับเทคนิคมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ไอออนต่างๆ นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์เป็นสารทำเครื่องหมายในน้ำมันเชื้อเพลิงด้วย ซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งของการพัฒนากระบวนการติดตามและตรวจสอบน้ำมันเชื้อเพลิง เพื่อประโยชน์ในการจำแนกประเภทของน้ำมันเชื้อเพลิงและตรวจสอบการชำระภาษีระหว่างกระบวนการผลิตของผลิตภัณฑ์ทางปิโตรเคมี

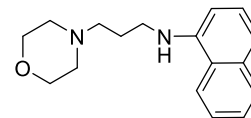
วิธีการติดตามและตรวจสอบผลิตภัณฑ์ทางปิโตรเคมีด้วยการเติมสารทำเครื่องหมายได้ถูกนำมาใช้อย่างช้านานแล้ว[11] และมีการรายงานในหลายบทความวิจัยด้วยกัน ตัวอย่างของสารทำเครื่องหมายชนิดต่างๆ (ภาพที่ 7) ได้แก่ ไดเฟนิลเอมีน (diphenylamine) และ ควินิซาริน (quinizarin) ถูกนำมาใช้เป็นสารทำเครื่องหมายในน้ำมันทำความร้อน (heating oil) คูมาริน (coumarin) ถูกนำมาใช้เป็นสารทำเครื่องหมายในน้ำมันก๊าด นอกจากนี้สารทำเครื่องหมายอื่นๆ ที่มีการสังเคราะห์และรายงานไว้ มีตัวอย่างดังนี้ ไอโซเบนโซฟีวราโนน (isobenzofuranone)[12] ซึ่งเตรียมได้จากปฏิกิริยาระหว่างกรดธาลิก (phthalic) กับอนุพันธ์ของฟินอล เป็นสารทำเครื่องหมายสีม่วง (purple marker) หรืออนุพันธ์ของควินิซาริน (quinizarin derivatives)[13] สารประกอบอะโรมาติกเอมีน เช่น อนุพันธ์ของ 2-แนพทิลเอมีน (2-naphthylamine derivatives)[14] อนุพันธ์ของแอนทราควิโนน เช่น 1,4-ไดไฮดรอกซีแอนทราควิโนน (1,4-dihydroxyanthraquinones) [15] สารประกอบเอโซ (azo compounds) ได้แก่ อนุพันธ์ของเฟนิลเอโซฟินอล (phenylazophenol) และ เฟนิลเอโซแนพทอล (phenylazonaphthol)[16-18] และสารทำเครื่องหมายที่เรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ได้แก่ ธาโลไซยานิน (Phthalocyanine) และแนพธาโลไซยานิน (Naphthocyanine)[19-21]



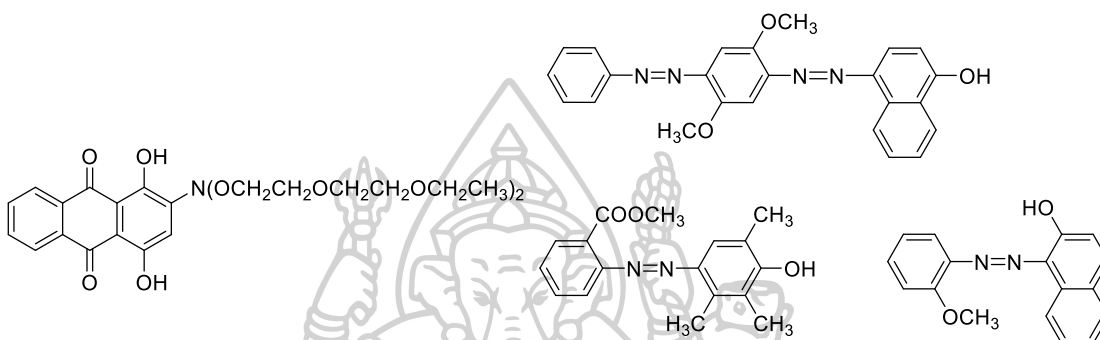
isobenzofuranone



quinizarin



2-Naphthylamine



1,4-Dihydroxyanthraquinones

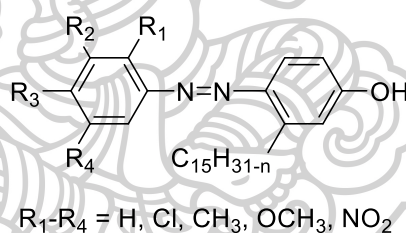
azo compounds

ภาพที่ 7 โครงสร้างของสารทำเครื่องหมายน้ำมันชนิดต่างๆ [11-18]

อย่างไรก็ตามพบว่าสารทำเครื่องหมายส่วนใหญ่จะมีปัญหาเรื่องการละลายในน้ำมันเชื้อเพลิง เนื่องจากสารทำเครื่องหมายเหล่านี้มีโครงสร้างโมเลกุลที่มีความซับซ้อนสูง ดังนั้นความสามารถในการละลายในน้ำมันจึงค่อนข้างต่ำ ทำให้มีขีดจำกัดในการนำไปใช้ประโยชน์ และจำเป็นต้องใช้วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายและ/หรือทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์ที่เหมาะสมในขั้นตอนการวิเคราะห์ ถึงแม้จะมีการแก้ปัญหาเรื่องการละลายด้วยการเพิ่มส่วนที่ไม่มีขั้วเข้าไปในโมเลกุล เช่น การเพิ่มหมู่ไฮโดรคาร์บอนโซ่ยาว (long chain hydrocarbon) เพื่อเพิ่มความสามารถในการละลายในน้ำมัน แต่วิธีการดังกล่าวมีหลายขั้นตอนและใช้ต้นทุนในการผลิตสูง เมื่อเร็ว ๆ นี้ได้มีงานวิจัยรายงานถึงการเตรียมสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิงจากอนุพันธ์ของแอลคิลเบนซีนโซ่ตรงที่มีความยาวของโซ่ไฮโดรคาร์บอนอยู่ในช่วง C10-C14 ผลการทดลองพบว่าแม้จะแก้ปัญหาการละลายในน้ำมันเชื้อเพลิงได้ แต่ยังมีข้อจำกัดในขั้นตอนการสังเคราะห์

คาร์ดานอล (cardanol) เป็นอนุพันธ์ที่ได้จากสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะม่วงหิมพานต์อันเป็นของเสียจากอุตสาหกรรมการผลิตเมล็ดมะม่วงหิมพานต์[22] สารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะม่วงหิมพานต์นี้เป็นแหล่งที่มีกรดแอนาคาติกอยู่ในปริมาณสูงมาก และเมื่อกรดแอนาคาติก (anacardic acid) เกิด

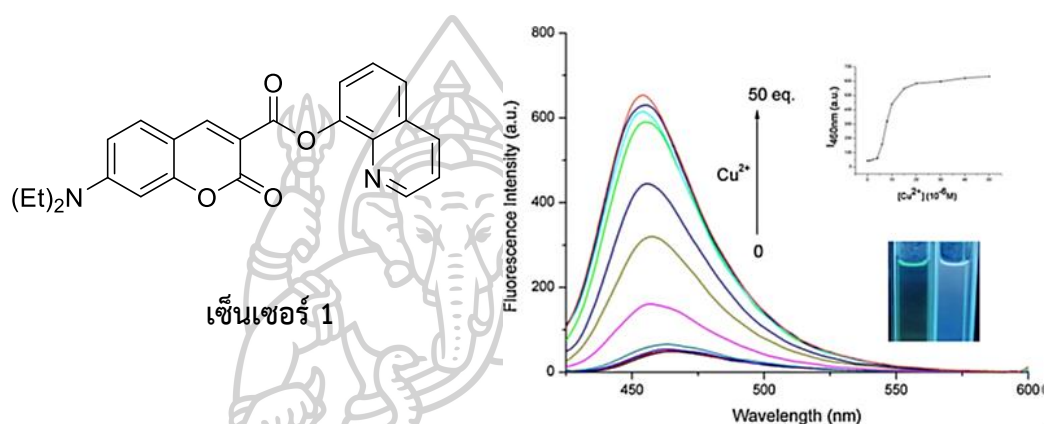
การดีคาร์บอกซิเลต (decarboxylated) ก็จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นของผสมของ 3-แอลคิลฟีนอล (3-alkylphenol mixture) ที่มีตัวและไม่อิมตัว (1a-1d ในภาพที่ 1)[23] ซึ่งละลายได้ดีในน้ำมัน เนื่องจากคาร์ดานอลเป็นสารที่ไม่พบเป็นองค์ประกอบในน้ำมันเชื้อเพลิง สามารถผลิตได้ในปริมาณมากๆ ราคาถูก และได้จากของเหลือจากอุตสาหกรรมที่มีในประเทศไทย ดังนั้นจึงมีความเหมาะสมอย่างยิ่งที่จะใช้คาร์ดานอลมาใช้เป็นองค์ประกอบสำหรับสังเคราะห์สารทำเครื่องหมายสำหรับน้ำมันเชื้อเพลิง อย่างไรก็ตามการผสมคาร์ดานอลลงในน้ำมันเชื้อเพลิงโดยตรงมีขีดจำกัดในการตรวจวิเคราะห์ ในปี 2004 Suwanprasop และคณะ[24] ได้มีรายงานครั้งแรกถึงการนำคาร์ดานอลมาดัดแปลงและนำมาเตรียมเป็นสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิง โดยสารทำเครื่องหมายดังกล่าวได้มาจากการเติมหมู่อโซ (azo-) เข้าไปบริเวณอะโรมาติกของคาร์ดานอล (ภาพที่ 8) ซึ่งสารทำเครื่องหมายเหล่านี้จะเกิดสีเด่นชัดเมื่อนำมาสกัดกับสารละลายเบสของเอธิลีนไดเอมีน (ethylene diamine) สารทำเครื่องหมายจากคาร์ดานอลดังกล่าวสามารถละลายได้ดีในน้ำมัน แต่พบว่ายังมีความยุ่งยากในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเนื่องจากต้องผ่านการสกัดด้วยสารละลายเบสของเอธิลีนไดเอมีนและทำให้ต้นทุนในการวิเคราะห์สูงขึ้นอีกด้วย



ภาพที่ 8 โครงสร้างของสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิงที่มีคาร์ดานอลเป็นองค์ประกอบ

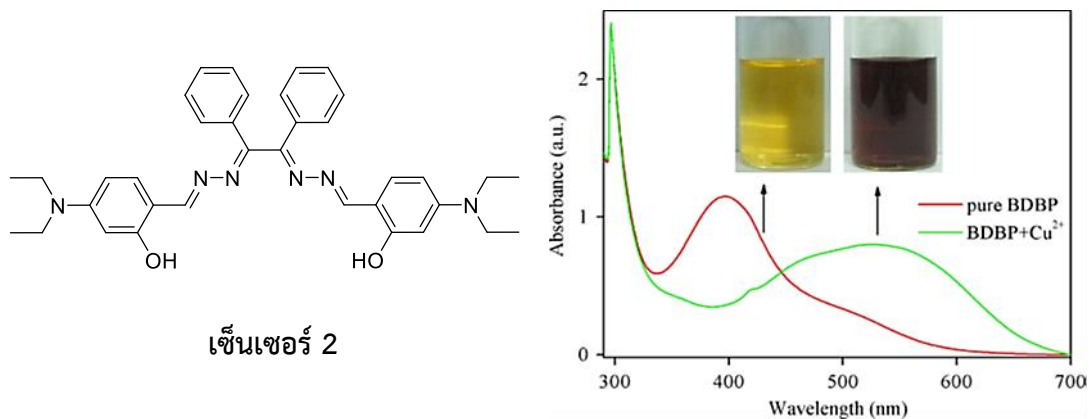
สำหรับการออกแบบและการสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์เพื่อตรวจจับไอออนของโลหะหนัก โดยส่วนใหญ่จะใช้หลักการของ Pearson acid base concept (Hard Soft Acid Base Principle) ซึ่งหลักการ Hard Soft Acid Base กล่าวไว้ว่า ไอออนหรืออะตอมที่ Hard คือ ไอออนหรืออะตอมที่มีขนาดเล็กและมีประจุเป็นจำนวนมาก (high charge states) ซึ่งหมายถึง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของประจุได้ยาก (weakly polarizable) ส่วนไอออนหรืออะตอมที่ Soft คือ ไอออนหรืออะตอมที่มีขนาดใหญ่และมีประจุเป็นจำนวนน้อย (low charge states) ซึ่งหมายถึง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของประจุได้ง่าย (strongly polarizable) โดยไอออนหรืออะตอมที่มีคุณสมบัติเป็น Hard จะเกิดอันตรกิริยาหรือสร้างแรงกระทำระหว่างกันได้ดีกับไอออนหรืออะตอมที่เป็น Hard

ด้วยกัน เช่นเดียวกันกับ Soft จะสร้างแรงกระทำระหว่างกันได้ดีกับไอออนหรืออะตอมที่เป็น Soft ด้วยกัน จากหลักการที่กล่าวมาข้างต้น ได้มีหลายงานวิจัยก่อนหน้านี้พยายามสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์เพื่อตรวจจับไอออนของโลหะหนักชนิดต่างๆ อาทิเช่น เซ็นเซอร์สำหรับตรวจจับไอออนทองแดง มักออกแบบให้มีส่วนของ ไอโอโนฟอร์ (ionophore) ที่ประกอบด้วยอะตอมที่มีคุณสมบัติเป็น Soft จึงเลือกใช้ไอโอโนฟอร์ที่มีอะตอมไนโตรเจน (nitrogen) และอะตอมออกซิเจน (oxygen) เป็นองค์ประกอบเพื่อเพิ่มความจำเพาะเจาะจงในการตรวจจับไอออนทองแดง และนำไอโอโนฟอร์ดังกล่าวต่อเข้ากับฟลูออโรฟอร์ชนิดต่างๆ ซึ่งมีตัวอย่างบทความวิจัยที่เกี่ยวข้องดังต่อไปนี้



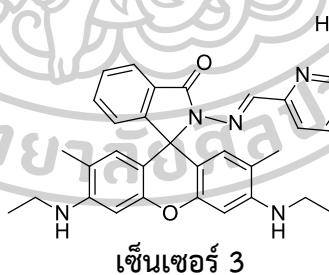
ภาพที่ 9 โครงสร้างของเซ็นเซอร์ 1 และการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในสถานะที่มีไอออนทองแดงปริมาณต่างๆ

ในปี ค.ศ. 2012 Jiang และคณะ[25] ได้ทำการสังเคราะห์เซ็นเซอร์สำหรับตรวจจับไอออนทองแดงชนิดใหม่ โดยใช้ 8-hydroxyquinoline เป็นไอโอโนฟอร์ทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อกับอนุพันธ์ของ coumarine เป็นส่วนฟลูออโรฟอร์ (เซ็นเซอร์ 1) เมื่อนำเซ็นเซอร์ชนิดดังกล่าวไปทดสอบการตรวจจับไอออนทองแดง พบว่ามีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อไอออนทองแดงในระบบตัวทำละลายผสม $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (99:1 v/v) โดยให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ในระบบ OFF-ON fluorescence switch ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น (λ_{ex}) 365 nm และคายแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงสุดที่ความยาวคลื่น (λ_{em}) 460 nm มีค่า detection limit เท่ากับ 1.16 μM และมีอัตราส่วนในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนเมื่อตรวจจับไอออนทองแดงเป็น 1:1 (เซ็นเซอร์ 1 : Cu^{2+})

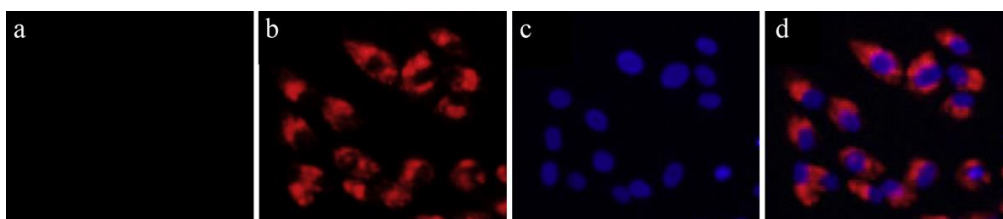


ภาพที่ 10 โครงสร้างของเซ็นเซอร์ 2 และการดูดกลืนแสงในสถานะที่มีและไม่มีไอออนทองแดง

ในปี ค.ศ. 2013 Chang และคณะ[26] รายงานเซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดไอออนทองแดง โดยสังเคราะห์ได้จากสารประกอบ benzil ทำปฏิกิริยา condensation กับ hydrazine ตามด้วยปฏิกิริยา schiff base formation กับ 4-(diethylamino)-2-hydroxybenzaldehyde ได้สารผลิตภัณฑ์เป็นเซ็นเซอร์ 2 ซึ่งมีอะตอมของไนโตรเจนและออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ เมื่อนำเซ็นเซอร์ไปทดสอบความสามารถในการดักจับไอออนโลหะหนักชนิดต่างๆ พบว่า มีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อการตรวจจับไอออนทองแดงในตัวทำละลายผสม DMSO:H₂O (8:2, v/v) ที่ความยาวคลื่นการคายแสงสูงสุด (λ_{em}) 561 nm โดยเซ็นเซอร์มีการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์แบบ ON-OFF fluorescence switch และสีของสารละลายเซ็นเซอร์เปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาลภายหลังการดักจับไอออนทองแดงโดยสังเกตได้ด้วยตาเปล่า

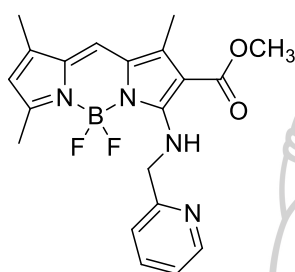


เซ็นเซอร์ 3

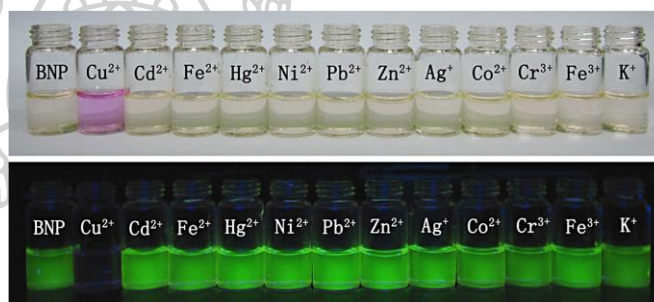


ภาพที่ 11 โครงสร้างของเซ็นเซอร์ 3 และการแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ในเซลล์สิ่งมีชีวิตในสถานะที่มีและไม่มีไอออนทองแดง

ในปีเดียวกันนี้ Wang และคณะ[27] ได้รายงานการสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ที่มีอนุพันธ์ของ rhodamine เป็นฟลูออโรฟอร์ต่อเข้ากับไอโอโนฟอร์ชนิด 8-hydroxyquinoline-2-carbaldehyde ซึ่งมีอะตอมของไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ (**เซ็นเซอร์ 3**) จากการศึกษาพบว่าเซ็นเซอร์ชนิดนี้มีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนทองแดงในตัวทำละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl:EtOH (7:3 v/v, pH = 7.4) มีค่า detection limit เท่ากับ $0.19 \mu\text{M}$ โดยแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ในระบบ OFF-ON fluorescence switch ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น (λ_{ex}) 500 nm และมีความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงสุดที่ความยาวคลื่น (λ_{em}) 562 nm นอกจากนี้ยังสามารถตรวจจับไอออนทองแดงในเซลล์สิ่งมีชีวิตได้อีกด้วย

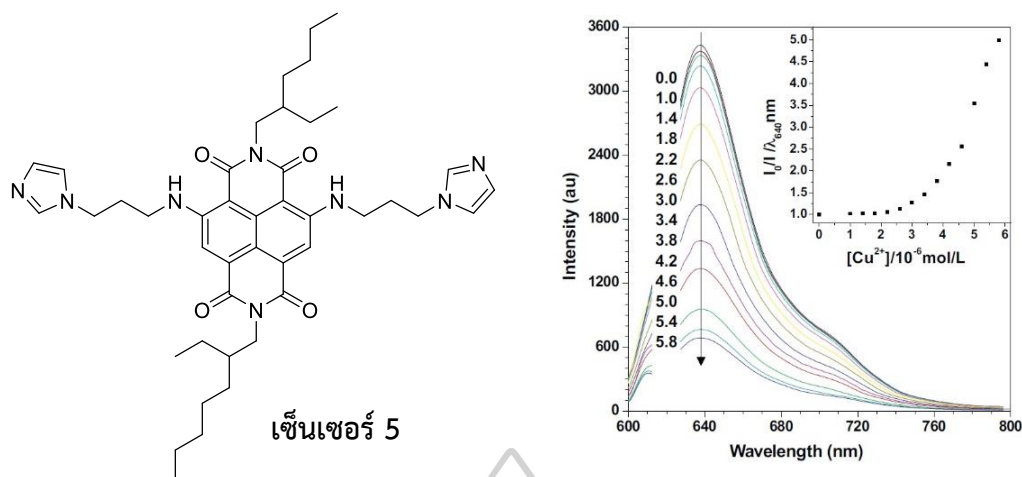


เซ็นเซอร์ 4



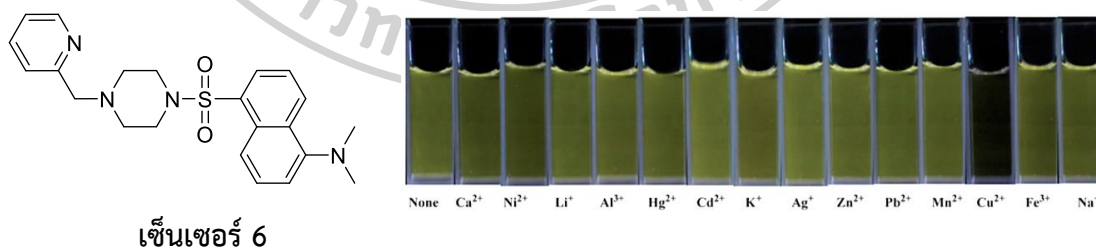
ภาพที่ 12 โครงสร้างของ**เซ็นเซอร์ 4** และการเปลี่ยนสีของสารละลายเซ็นเซอร์ในสภาวะก่อนและหลังเติมไอออนทองแดง

ในปี ค.ศ. 2014 Wang และคณะ[28] ได้สังเคราะห์เซ็นเซอร์ชนิดใหม่ที่มีอนุพันธ์ของ 2,3-modified boron-dipyromethene (Bodipy) เป็นฟลูออโรฟอร์ทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อกับ pyridine-2-ylmethamine เป็นไอโอโนฟอร์ (**เซ็นเซอร์ 4**) จากการศึกษาพฤติกรรมการดักจับไอออนโลหะหนักต่างๆ พบว่าเซ็นเซอร์ชนิดนี้มีความจำเพาะต่อไอออนทองแดง โดยแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น (λ_{em}) 539 nm และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นกระตุ้น (λ_{ex}) 500 nm ในตัวทำละลาย $\text{H}_2\text{O}:\text{DMSO}$ (60:40 v/v) โดยมี detection limit เท่ากับ $0.53 \mu\text{M}$ และมีอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนเมื่อดักจับไอออนทองแดงต่อเซ็นเซอร์เป็น 1:1 (**เซ็นเซอร์ 4** : Cu^{2+}) สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีม่วงเมื่อมีการดักจับไอออนทองแดง ซึ่งสามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงได้ด้วยตาเปล่า



ภาพที่ 13 โครงสร้างของเซ็นเซอร์ 5 และการเปลี่ยนแปลงการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในสภาวะที่ไอออนทองแดงความเข้มข้นต่างๆ

ในปี ค.ศ. 2015 Li และคณะ[29] ได้นำฟลูออโรฟอร์ชนิด naphthalene diimide ทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อกับ imidazole (เซ็นเซอร์ 5) พบว่าเซ็นเซอร์ชนิดนี้มีความจำเพาะเจาะจงสูงในการตรวจจับไอออนทองแดงในตัวทำละลายบัฟเฟอร์ HEPES มีค่า detection limit เท่ากับ 1.8 μM และแสดงความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์สูงสุดที่ความยาวคลื่น (λ_{em}) 646 nm นอกจากนี้ยังมีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ไอออนทองแดงในเซลล์สิ่งมีชีวิตโดยแสดงการลดลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ ในสภาวะที่มีการดักจับไอออนทองแดง นอกจากนี้ ยังสามารถพัฒนาเป็นอุปกรณ์ทดสอบ test strips และ silica gel plates สำหรับวิเคราะห์ไอออนทองแดงได้อีกด้วย

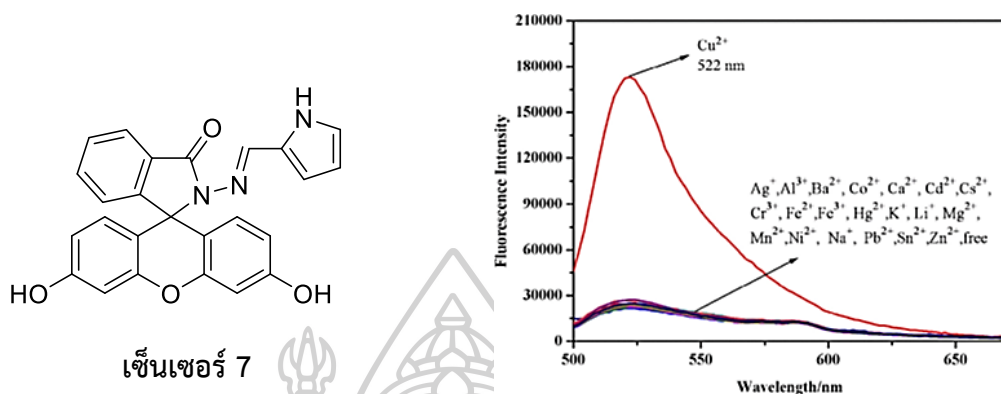


เซ็นเซอร์ 6

ภาพที่ 14 โครงสร้างของเซ็นเซอร์ 6 และการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเซ็นเซอร์ภายใต้แสง UV ในสภาวะที่เติมไอออนโลหะชนิดต่างๆ ลงไป

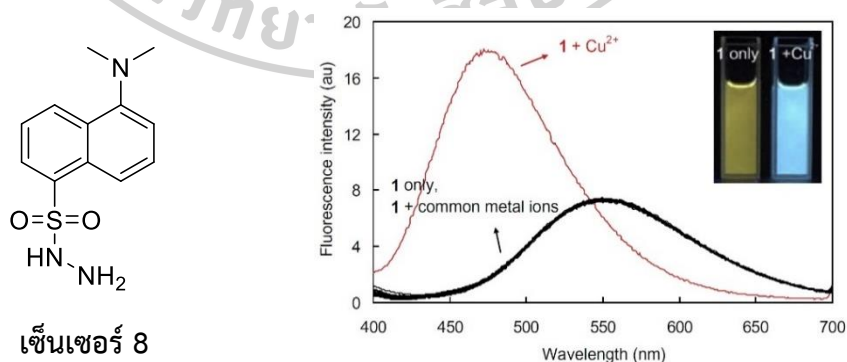
ในปีเดียวกันนี้ Cao และคณะ[30] ได้รายงานฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ชนิดใหม่ โดยสังเคราะห์จากอนุพันธ์ของ densyl เชื่อมต่อกับ sulfonamide (เซ็นเซอร์ 6) เมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพการดักจับไอออนโลหะชนิดต่างๆ พบว่า มีความไวและจำเพาะเจาะจงต่อไอออน

ทองแดง ในตัวทำละลายบัฟเฟอร์ HEPES โดยแสดงการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์แบบ ON-OFF fluorescence switch มีค่า detection limit เท่ากับ 29 nM และสามารถตรวจวัดไอออนทองแดงในเซลล์สิ่งมีชีวิตได้



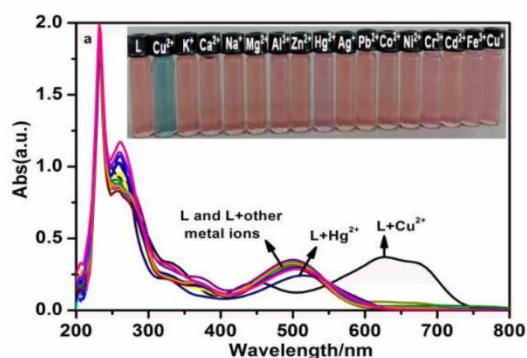
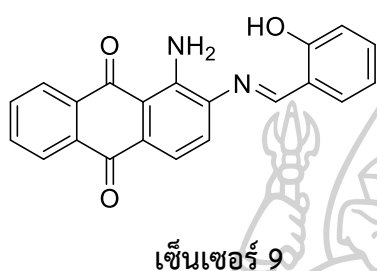
ภาพที่ 15 โครงสร้างของเซ็นเซอร์ 7 และการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในสถานะที่มีการเติมไอออนโลหะชนิดต่างๆ

ในปี ค.ศ. 2016 Bao และคณะ[31] ได้ออกแบบและสังเคราะห์เซ็นเซอร์สำหรับดักจับไอออนทองแดงชนิดใหม่จากอนุพันธ์ของ fluorescein และ pyrrole (เซ็นเซอร์ 7) เซ็นเซอร์ชนิดนี้สามารถตรวจวัดไอออนทองแดงด้วยการเปลี่ยนสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์แบบ OFF-ON fluorescence switch ได้อย่างจำเพาะเจาะจงสูงในตัวทำละลายบัฟเฟอร์ HEPES โดยการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเซ็นเซอร์กับไอออนทองแดงมีอัตราส่วนของเป็น 1:1 (เซ็นเซอร์ 7 : Cu²⁺) และมีค่า detection limit เท่ากับ 0.296 μ M



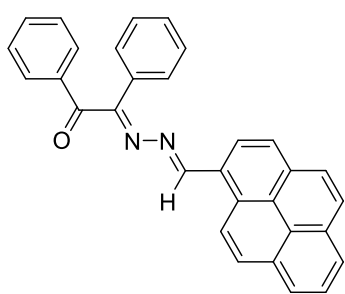
ภาพที่ 16 โครงสร้างของเซ็นเซอร์ 8 และการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในสถานะที่มีการเติมไอออนโลหะชนิดต่างๆ

Choi และคณะ[32] รายงานการสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ชนิดใหม่ โดยนำอนุพันธ์ของ densyl เป็นส่วนของฟลูออโรฟอร์ เชื่อมต่อกับ hydrazine ได้เป็นเซ็นเซอร์ 8 ซึ่งมีความไวและจำเพาะเจาะจงต่อการดักจับไอออนทองแดงในตัวทำละลายบัฟเฟอร์ PBS โดยกลไกการดักจับเกิดผ่านปฏิกิริยา hydrolysis ตรงตำแหน่ง hydrazine ทำให้สารละลายเปลี่ยนการเรืองแสงจากสีเหลืองเป็นสีฟ้า มีค่า detection limit เท่ากับ 60 nM นอกจากนี้ยังสามารถตรวจวัดปริมาณไอออนทองแดงในตัวอย่างปัสสาวะได้อีกด้วย

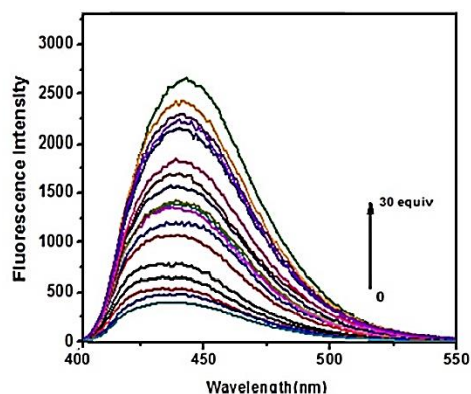


ภาพที่ 17 โครงสร้างของเซ็นเซอร์ 9 และการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนหลังจากเติมไอออนโลหะชนิดต่างๆ

ในปี ค.ศ. 2017 Hou และคณะ[33] ได้รายงานการสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ชนิดใหม่ผ่านปฏิกิริยาเพียงขั้น ตอนเดียวคือ ปฏิกิริยา condensation ระหว่าง 1,2-diaminoanthraquinone และ salicylaldehyde ได้เป็นเซ็นเซอร์ 9 ซึ่งสามารถดักจับไอออนทองแดงได้อย่างจำเพาะเจาะจงในตัวทำละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ (THF:H₂O (1:1 v/v)) โดยแสดงความเข้มสัญญาณฟลูออเรสเซนต์สูงสุดที่ความยาวคลื่น 604 nm เมื่อดักจับไอออนทองแดงจะเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนต์แบบ ON-OFF fluorescence switch และสามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายจากชมพูเป็นสีฟ้าได้ด้วยตาเปล่า มีค่า detection limit เท่ากับ 89 nM

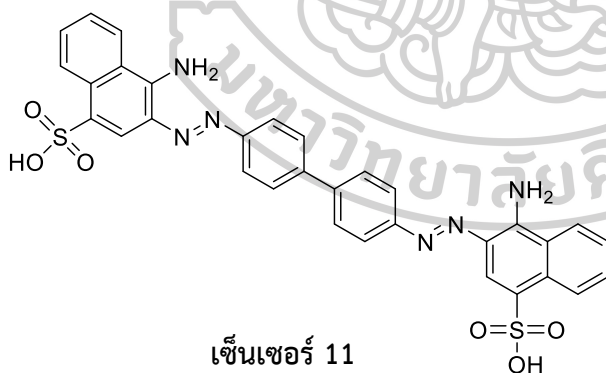


เซ็นเซอร์ 10

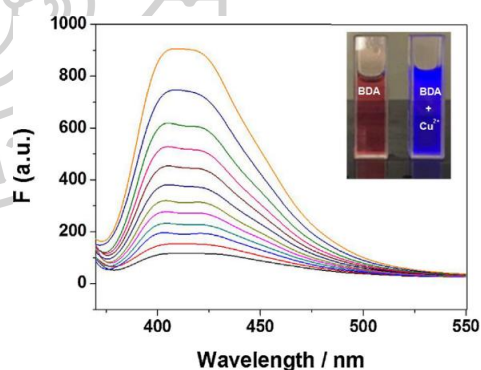


ภาพที่ 18 โครงสร้างของเซ็นเซอร์ 10 และการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ในสภาวะที่มีไอออนทองแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ

ในปี ค.ศ. 2018 Ghorai และคณะ[34] ได้นำฟลูออโรฟอร์ชนิด pyrene มาทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อกับ benzilmonohydrazone เป็นไอโอโนฟอร์ (เซ็นเซอร์ 10) เซ็นเซอร์ชนิดนี้จำเพาะเจาะจงต่อการดักจับไอออนทองแดงโดยมีการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์แบบ OFF-ON fluorescence switch ในตัวทำละลาย $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (2:1 v/v) แสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์สูงสุดที่ความยาวคลื่น (λ_{em}) 433 nm เมื่อดูดกลืนพลังงานที่ความยาวคลื่นกระตุ้น (λ_{ex}) 305 nm มีค่า detection limit เท่ากับ 7.8 nM และอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเซ็นเซอร์และไอออนทองแดงเป็น 1:1 (เซ็นเซอร์ 10 : Cu^{2+})



เซ็นเซอร์ 11

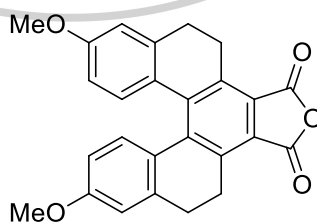


ภาพที่ 19 โครงสร้างของเซ็นเซอร์ 11 และการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ในสภาวะที่มีไอออนทองแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ

Wang และคณะ[35] ได้รายงานฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์สำหรับตรวจจับไอออนทองแดงชนิด 3,3'-[biphenyl-4,4'-diyl]di(E)diazene-2,1'-diyl]bis(4-aminonaphthalene) (เซ็นเซอร์ 11) มีความไวและจำเพาะสูงต่อการดักจับไอออนทองแดงโดยมีการเปลี่ยนแปลงสัญญาณ

ฟลูออเรสเซนซ์แบบ OFF-ON fluorescence switch ในตัวทำละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น (λ_{ex}) 360 nm และคายแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงสุดที่ความยาวคลื่น (λ_{em}) 407 nm สามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีสารละลายจากสีแดงเป็นสีน้ำเงินได้ด้วยตาเปล่า ภายหลังจากการเติมไอออนทองแดงลงในสารละลายเซ็นเซอร์ และมีค่า detection limit เท่ากับ 0.12 μM

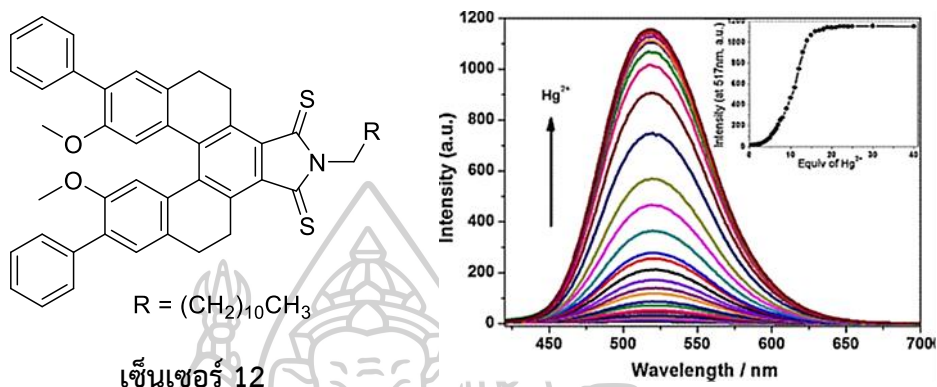
จากบทความวิจัยที่กล่าวมาข้างต้น จะเห็นว่าเซ็นเซอร์ทองแดงถูกออกแบบให้มีอะตอมของไนโตรเจนและออกซิเจนเป็นองค์ประกอบในส่วนไอโอโนฟอร์ เพื่อให้เกิดอันตรกิริยาที่ดีกับไอออนทองแดงตามทฤษฎี Hard Soft acid base นอกจากนี้ องค์ประกอบสำคัญภายในโมเลกุลฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์คือฟลูออโรฟอร์ หรือส่วนที่ทำหน้าที่แสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ จะต้องมีความเสถียรเชิงแสงที่ดี เช่น มีค่าสัมประสิทธิ์เชิงแสง (quantum yield, Φ_f) สูง มีความเสถียรเชิงแสงที่ดี (photostability) ซึ่งในงานวิจัยนี้ให้ความสนใจของเพนตะเฮลิซีน ([5]helicene derivative) เนื่องจากมีการคายแสงที่ดีในช่วง visible และมีค่าสัมประสิทธิ์เชิงแสง (quantum yield, Φ_f) สูง โดยในปี ค.ศ. 2009 Dr.Thanasat Sooksimuang และคณะ[36] ได้สังเคราะห์สารกลุ่มเพนตะเฮลิซีน ([5]helicene, M201) มาประยุกต์ใช้ใน OLED และได้จดสิทธิบัตรสารกลุ่มนี้โดยใช้ชื่อสารประกอบ 3,12-ไดเมทอกซี-5,6,9,10-เตตระไฮโดร-ฟิวราโน-1,3-ไดโอโน-[5]เฮลิซีน เนื่องด้วยสารประกอบกลุ่ม [5]helicene เป็น ortho-condensed polycyclic aromatic compounds จึงสามารถคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้ดีมาก และมี quantum yield ค่อนข้างสูง ทั้งนี้ จึงเหมาะที่จะนำมาใช้เป็นฟลูออโรฟอร์ (fluorophore) เนื่องด้วยมีสมบัติที่ดีและยังไม่เป็นที่นิยมนำมาใช้ทำเซ็นเซอร์มากนัก โครงสร้างทางเคมีของสารที่มีองค์ประกอบเพนตะเฮลิซีนแสดงดังภาพที่ 20



ภาพที่ 20 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบเพนตะเฮลิซีน ([5]helicene, M201)

สำหรับฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ที่มีอนุพันธ์ของเพนตะเฮลิซีนเป็นส่วนฟลูออโรฟอร์มีรายงานอยู่ไม่ค่อนมากนักเมื่อเทียบกับฟลูออโรฟอร์ชนิดอื่นๆ ดังตัวอย่างบทความวิจัยต่อไปนี้ ในปี 2014 Li และคณะ[37] ได้สังเคราะห์ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ชนิด tetrahydro[5]helicene thioimide

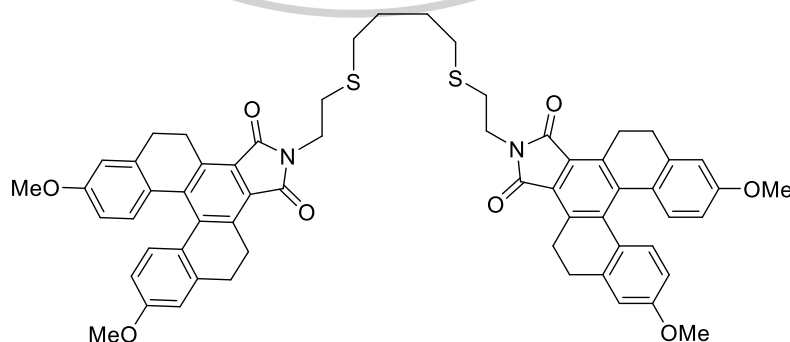
(เซ็นเซอร์ 12) ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงต่อการดักจับไอออนปรอทแบบ OFF-ON fluorescence switch ในตัวละลายบัฟเฟอร์ HEPES โดยคายแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงสุดที่ความยาวคลื่น (λ_{em}) 507 nm และสามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายได้ด้วยตาเปล่า จากสีน้ำตาลเข้มเป็นสีเหลืองหลังจากการเติมไอออนปรอทลงในสารละลาย



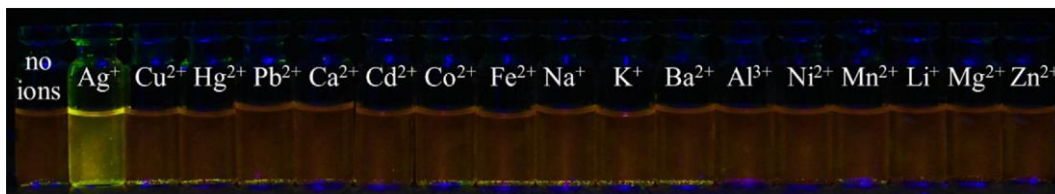
เซ็นเซอร์ 12

ภาพที่ 21 โครงสร้างของเซ็นเซอร์ 12 และการเปลี่ยนแปลงการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในสภาวะที่มีการเติมไอออนปรอทความเข้มข้นต่างๆ

ต่อมาในปี 2018 Anuwut Petdum และคณะ[38] ได้รายงานการออกแบบและสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ชนิดใหม่ ที่มีอนุพันธ์ของเพนตะเฮลิซีนเป็นฟลูออโรฟอร์ และใช้ 2-(4-(2-aminoethylsulfanyl)butylsulfanyl)ethanamine เป็นไอโอโนฟอร์ (เซ็นเซอร์ 13) เซ็นเซอร์ชนิดนี้มีความไวและจำเพาะเจาะจงสูงต่อการดักจับไอออนเงินแบบ OFF-ON fluorescence switch ในตัวทำละลาย $CH_3OH:H_2O$ (9:1 v/v) มีค่า detection limit เท่ากับ 93 nM และสามารถนำมาประยุกต์ใช้วิเคราะห์ปริมาณอนุภาคนาโนของไอออนโลหะเงิน (silver nanoparticle) ได้



เซ็นเซอร์ 13



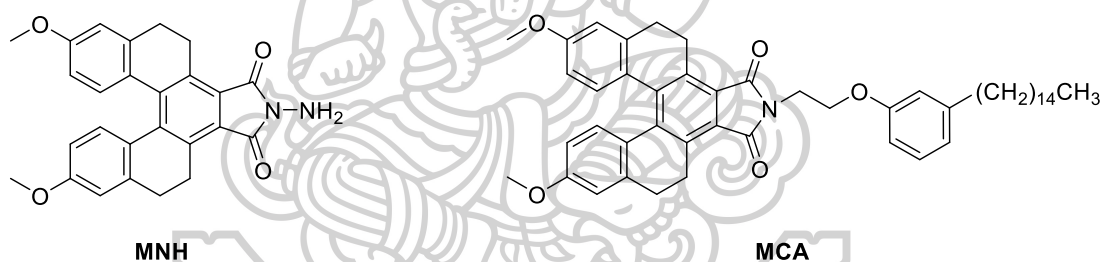
ภาพที่ 22 โครงสร้างของเซ็นเซอร์ 13 และการเปลี่ยนสีของสารละลายภายใต้แสง UV ในสถานะที่ตรวจจับไอออนเงิน

สำหรับงานวิจัยนี้ ได้มีการออกแบบและสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์จากอนุพันธ์ของเพนตะเฮลิซีนที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิงและเซ็นเซอร์ตรวจจับไอออนทองแดง อีกทั้งยังเป็นงานวิจัยที่ให้ความสำคัญกับปัญหาสิ่งแวดล้อมรอบตัว กล่าวคือ การออกแบบและสังเคราะห์สารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิง เป็นการพัฒนาระบบการติดตามและตรวจสอบน้ำมันเชื้อเพลิงร่วมกับการใช้ประโยชน์จากกากของเสียจากเปลือกของเม็ดมะม่วงหิมพานต์เป็นของเหลือ (waste) ในกระบวนการผลิตเม็ดมะม่วงหิมพานต์ ซึ่งเป็นอุตสาหกรรมที่สำคัญทางภาคใต้ของประเทศไทยให้เกิดประโยชน์สูงสุด นอกจากนี้ยังถือเป็นงานวิจัยแรกที่มีการนำอนุพันธ์ของเพนตะเฮลิซีนมาพัฒนาเป็นสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิงด้วย สำหรับการออกแบบและสังเคราะห์เซ็นเซอร์เพื่อตรวจจับไอออนทองแดง เป็นการพัฒนาเครื่องมือหรือวิธีตรวจสอบความเป็นพิษของโลหะหนักใกล้ตัวที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน เพื่อตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของโลหะทองแดงในสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นไปตามแนวทางของแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติฉบับที่สิบสอง พ.ศ. 2560-2564 ยุทธศาสตร์การเติบโตที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมเพื่อการพัฒนาอย่างยั่งยืน และยุทธศาสตร์การพัฒนาศาสตร์ เทคโนโลยี วิจัย และนวัตกรรม

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

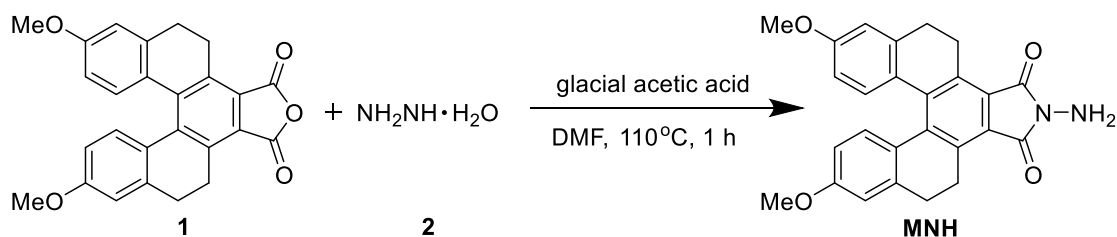
สำหรับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยได้ออกแบบและสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์จากอนุพันธ์ของเพนตะเฮลิซีน ([5]helicene) ทั้งหมด 2 ชนิด สำหรับใช้เป็นเซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนทองแดงและสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิง ดังแสดงในภาพที่ 23 สำหรับเซ็นเซอร์ทองแดง MNH ประกอบด้วยอนุพันธ์ของเพนตะเฮลิซีน ([5]helicene) ทำหน้าที่เป็นฟลูออโรฟอร์เชื่อมต่อกับไฮดราซีน (hydrazine) ทำหน้าที่เป็นไอโอโนฟอร์ สำหรับสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิง MCA ประกอบด้วยอนุพันธ์ของเพนตะเฮลิซีน ([5]helicene) เชื่อมต่อกับอนุพันธ์ของคาร์ดานอล (cardanol) ที่ได้มาจากของเสียในอุตสาหกรรมการผลิตเม็ดมะม่วงหิมพานต์ ซึ่งงานวิจัยนี้ถือเป็นงานวิจัยแรกที่มีการนำอนุพันธ์ของเพนตะเฮลิซีน ([5]helicene) มาพัฒนาเพื่อใช้เป็นสารทำเครื่องหมายในน้ำมันเชื้อเพลิง



ภาพที่ 23 โครงสร้างสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ทั้ง 2 ชนิด ในงานวิจัยนี้

1. การสังเคราะห์เซ็นเซอร์ MNH

การสังเคราะห์เซ็นเซอร์ MNH สามารถสังเคราะห์ได้ผ่านปฏิกิริยา imidation ระหว่าง [5]helicene anhydride (1) กับ hydrazine hydrate (2) ในสภาวะที่มี glacial acetic acid ทำหน้าที่เป็นกรด โดยมีสมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์เซ็นเซอร์ MNH แสดงดังภาพที่ 24

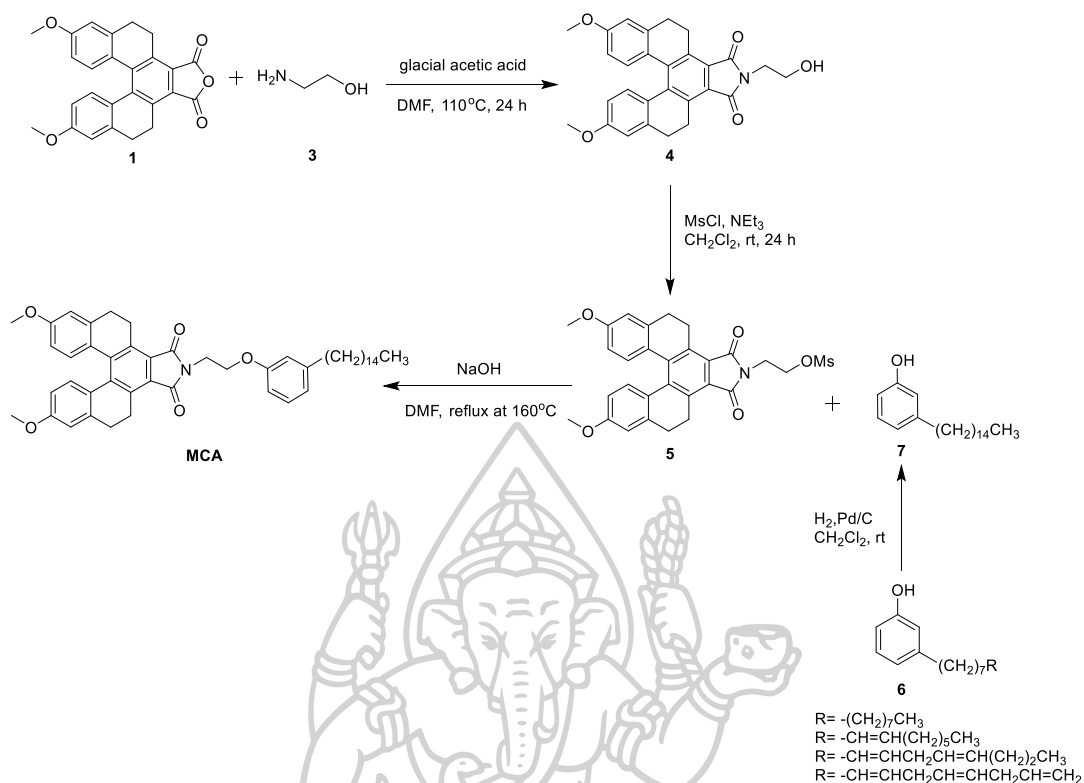


ภาพที่ 24 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์เซ็นเซอร์ MNH

การสังเคราะห์เซ็นเซอร์ MNH เริ่มจากซิ่ง [5]helicene anhydride (1) ปริมาณ 0.20 กรัม (0.48 มิลลิโมล) ใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 10 มิลลิลิตร จากนั้นละลายด้วย *N,N*-dimethylformamide ปราศจากน้ำ (dry DMF) ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร เติม hydrazine hydrate (2) ปริมาณ 0.8 มิลลิลิตร (25.0 มิลลิโมล) และ glacial acetic acid ปริมาณ 1.0 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย กวนสารละลายที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส (°C) ภายใต้บรรยากาศอาร์กอน (argon atmosphere) เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา จึงหยุดให้ความร้อนและรอให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเทสารละลายที่ได้ลงในน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และกวนสารละลายอย่างรุนแรงเป็นเวลา 25-30 นาที จะเกิดตะกอนสีเหลืองขึ้น จึงนำมากรองแบบลดความดันเพื่อเก็บตะกอนที่ได้และล้างตะกอนด้วยน้ำปราศจากไอออนเย็นปริมาณ 50 มิลลิลิตร ทั้งตะกอนที่ได้ให้แห้งและทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการตกผลึกซ้ำ (recrystallization) ด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง MeOH:CH₂Cl₂ ในอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร (v/v) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นตะกอนสีเหลือง 183.0 มิลลิกรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเท่ากับ 88% และทำการตกผลึก (single crystal) ด้วยวิธี vapor diffusion ด้วยระบบตัวละลายผสม MeOH:CH₂Cl₂ (1 : 1 v/v)

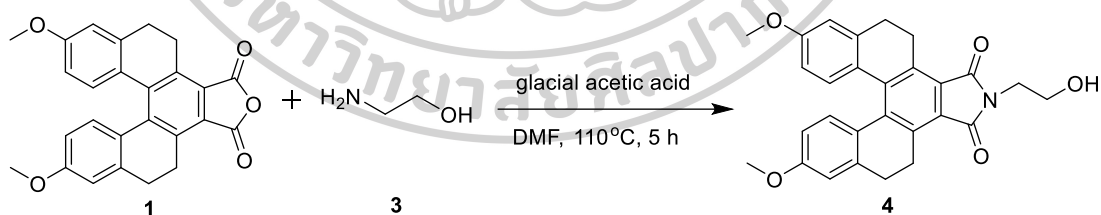
2. การสังเคราะห์สารทำเครื่องหมายน้ำมัน MCA

การสังเคราะห์สารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิง MCA เริ่มจากการสังเคราะห์สารประกอบหมายเลข 5 เริ่มต้นจากปฏิกิริยา imidation ระหว่าง [5]helicene anhydride (1) กับ ethanolamine (2) ในสถานะที่มี glacial acetic acid ทำหน้าที่เป็นกรด ได้สารผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบหมายเลข 4 จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยา mesylation กับ methanesulfonyl chloride ในสถานะที่มี triethylamine ทำหน้าที่เป็นเบส ได้สารผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบหมายเลข 5 ในขั้นตอนสุดท้ายนำสารประกอบหมายเลข 5 มาทำปฏิกิริยา *o*-alkylation ในสถานะเบส NaOH กับ hydrogenated cardanol (7) ที่ผ่านการทำปฏิกิริยา hydrogenation ของ unsaturated cardanol (6) มาแล้ว ได้เป็นสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิง MCA ดังแสดงเส้นทางการสังเคราะห์ในภาพที่ 25



ภาพที่ 25 เส้นทางการสังเคราะห์สารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิง MCA

2.1 การสังเคราะห์สารประกอบหมายเลข 4

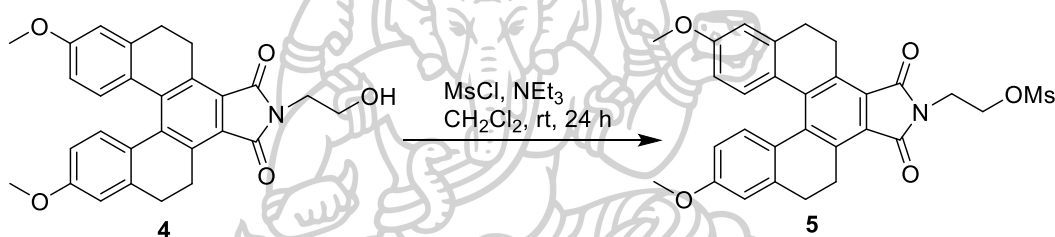


ภาพที่ 26 สมการปฏิบัติการสังเคราะห์สารประกอบหมายเลข 4

การสังเคราะห์สารประกอบหมายเลข 4 เริ่มจากซิ่ง [5]helicene anhydride (1) ปริมาณ 0.20 กรัม (0.48 มิลลิโมล) ใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 10 มิลลิลิตร จากนั้นละลายด้วย *N,N*-dimethylformamide ปราศจากน้ำ (dry DMF) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เติม ethanolamine (3) ปริมาณ 0.8 มิลลิลิตร (13.3 มิลลิโมล) และ glacial acetic acid ปริมาณ 0.8 มิลลิลิตร ลงใน

สารละลาย กวนสารละลายที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ($^{\circ}\text{C}$) ภายใต้บรรยากาศอาร์กอน (argon atmosphere) เป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา จึงหยุดให้ความร้อนและรอให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเทสารละลายที่ได้ลงในน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และกวนสารละลายอย่างรุนแรงเป็นเวลา 25-30 นาที จะเกิดตะกอนสีเหลืองขึ้นจึงนำมากรองแบบลดความดันเพื่อเก็บตะกอนที่ได้และล้างตะกอนด้วยน้ำปราศจากไอออนเย็นปริมาณ 50 มิลลิลิตร ทั้งตะกอนที่ได้ให้แห้ง จะได้สารประกอบหมายเลข 4 เป็นของแข็งสีเหลือง 181.0 มิลลิกรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเท่ากับ 82% นำไปทำปฏิกิริยาขั้นต่อไปโดยไม่ผ่านการแยกบริสุทธิ์

2.2 การสังเคราะห์สารประกอบหมายเลข 5

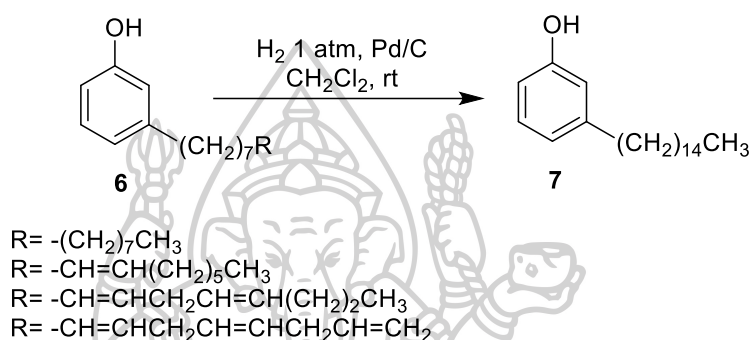


ภาพที่ 27 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารประกอบหมายเลข 5

การสังเคราะห์สารประกอบหมายเลข 5 เริ่มต้นจากละลายสารประกอบหมายเลข 4 น้หนัก 0.21 กรัม (0.46 มิลลิโมล) ด้วย dichloromethane (CH₂Cl₂) ปริมาตร 8.0 มิลลิลิตร ในขวดก้นกลมขนาด 25 มิลลิลิตร จากนั้นเติม triethylamine (Et₃N) ปริมาตร 0.16 มิลลิลิตร (1.15 มิลลิโมล) ภายใต้บรรยากาศอาร์กอน (argon atmosphere) ทำการกวนสารละลายเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 0 $^{\circ}\text{C}$ เมื่อครบกำหนดเวลา ค่อยๆ เติม methanesulfonyl chloride (MsCl) อย่างช้าโดยใช้ไมโครปิเปต (micropipette) ปริมาตร 0.089 มิลลิลิตร (1.15 มิลลิโมล) จากนั้นทำการกวนสารละลายต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้บรรยากาศอาร์กอน (argon atmosphere) เมื่อครบกำหนดเวลาเติม dichloromethane (CH₂Cl₂) ให้มีปริมาตรโดยรวมประมาณ 15 มิลลิลิตร นำสารละลายผสมมาสกัดด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ปริมาณ 20 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้งจากนั้นเก็บชั้น dichloromethane มากำจัดน้ำออกใช้ sodium sulfate anhydrous (anh. Na₂SO₄) โดยเติมลงไปปริมาณเล็กน้อย จากนั้นนำไประเหย dichloromethane ออกโดยใช้

rotary evaporator ภายใต้ระบบสุญญากาศ ได้สารผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน นำมาแยกบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค column chromatography ด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง EtOAc:CH₂Cl₂ อัตราส่วน 1:10 โดยปริมาตร (v/v) มีค่า R_f เท่ากับ 0.32 ได้สารประกอบหมายเลข 5 เป็นของแข็งสีเหลือง 134 มิลลิกรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเท่ากับ 54%

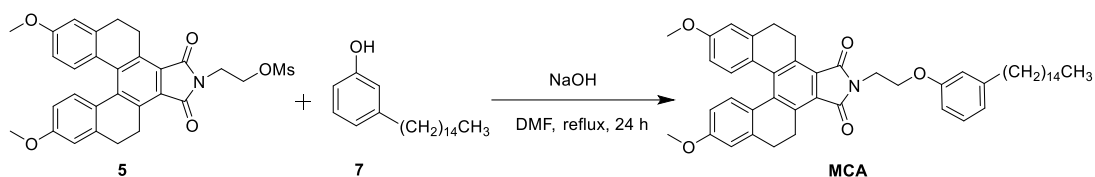
2.3 การสังเคราะห์สารประกอบ hydrogenated cardanol (7)



ภาพที่ 28 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารประกอบ saturated cardanol (7)

การสังเคราะห์สารประกอบ hydrogenated cardanol (7) เริ่มจากซังสารประกอบ unsaturated cardanol (6) 1.000 กรัม (3.35 มิลลิโมล) ลงในขวดก้นกลมขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายด้วย dichloromethane ปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร จากนั้นค่อยๆ เติมสารเร่งปฏิกิริยา Pd/C 35.6 กรัม (0.335 มิลลิโมล) ลงในสารละลาย กวนสารละลายภายใต้บรรยากาศไฮโดรเจน (hydrogen atmosphere) ความดัน 1 atm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำสารละลายมากรองเพื่อกำจัดผง Pd/C ออกไป จากนั้นนำสารละลายที่ได้ภายหลังจากการกรองไปกำจัดตัวทำละลาย dichloromethane โดยใช้เครื่อง rotary evaporator และนำมาแยกบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography ในระบบสารละลายผสม CH₂Cl₂:MeOH (97:3 v/v) มีค่า R_f = 0.70 ได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของเหลวสีน้ำตาลอ่อน 820 มิลลิกรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเท่ากับ 82%

2.4 การสังเคราะห์สารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิง MCA



ภาพที่ 29 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิง MCA

การสังเคราะห์สารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิง MCA เริ่มจากซึ่งสารประกอบ hydrogenated cardanol 0.071 กรัม (0.23 มิลลิโมล) และ NaOH 0.0093 กรัม (0.23 มิลลิโมล) ลงในขวดก้นกลมขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายด้วย *N,N*-dimethylformamide ปราศจากน้ำ (dry DMF) ปริมาตร 4.0 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารประกอบหมายเลข 5 ปริมาณ 0.050 กรัม (0.094 มิลลิโมล) รีฟลักซ์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำสารละลายมากำจัดตัวทำละลาย *N,N*-dimethylformamide (DMF) ออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ภายใต้ระบบสุญญากาศ จากนั้นนำ crude มาละลายด้วย dichloromethane (CH_2Cl_2) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำมาสกัดด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) 20 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง โดยเก็บชั้นสารละลาย dichloromethane (CH_2Cl_2) นำมากำจัดน้ำโดยเติม sodium sulfate anhydrous (anh. Na_2SO_4) ปริมาณเล็กน้อย จากนั้นนำสารละลายชั้น dichloromethane (CH_2Cl_2) มากำจัดตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator ภายใต้ระบบสุญญากาศ ทำการแยกบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography ในระบบสารละลายผสมระหว่าง CH_2Cl_2 :MeOH (99:1 v/v) $R_f = 0.75$ จะได้ผลิตภัณฑ์ MCA ที่มีลักษณะเป็นของเหลวสีเหลือง 47.0 มิลลิกรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเท่ากับ 68%

3. การทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจจับไอออนโลหะทองแดงของเซ็นเซอร์ MNH

เนื่องจากฟลูออเรสเซนส์เซ็นเซอร์ MNH ที่สังเคราะห์ได้เป็นสารชนิดใหม่ จึงต้องนำมาศึกษาคุณสมบัติเชิงแสงด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโกปี เพื่อวิเคราะห์หาความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนแสง (λ_{ex}) และการคายแสงฟลูออเรสเซนส์ (λ_{em}) สูงที่สุดในตัวทำละลายอินทรีย์ และระบบตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ จากนั้นเลือกระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดที่เซ็นเซอร์สามารถตรวจจับไอออนทองแดงได้ดีเพื่อนำมาศึกษาความไว (sensitivity) และ

ความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจจับไอออนทองแดง (selectivity) ของเซ็นเซอร์ อีกทั้งศึกษาการตรวจจับไอออนทองแดงเปรียบเทียบกับไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ (competitive) ค่าประสิทธิภาพเชิงควอนตัมทางฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence quantum yield; Q_f) อัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนด้วยวิธีของ Job (Job's plot) และค่าคงที่สมดุลของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนเมื่อเซ็นเซอร์ตกจับกับไอออนทองแดง (Association constant; K_{assoc})

4. การทดสอบความไวในการตรวจจับไอออนทองแดง (sensitivity)

การทดสอบความไวในการตรวจจับไอออนทองแดงของเซ็นเซอร์ MNH ได้ศึกษาด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี โดยเตรียมสารละลายของเซ็นเซอร์ MNH และปิเปตสารละลายของเซ็นเซอร์มาปริมาตร 3.00 มิลลิลิตร แล้ววัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เปลี่ยนแปลงก่อนและหลังเติมไอออนทองแดงในแต่ละครั้ง สังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงความเข้มของสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้น โดยผลการทดสอบที่ได้สามารถนำไปใช้คำนวณหาค่าคงที่สมดุลของการจับไอออนทองแดง (K_{assoc}) ซึ่งเป็นค่าที่บอกความสามารถในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเซ็นเซอร์กับไอออนทองแดง โดยสามารถคำนวณได้จากสมการของ Benesi-Hildebrand

4.1 การเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ MNH

เตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ MNH ในสารละลายผสม $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (9:1, v/v) ในขวดปริมาตรขนาด 10.0 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้น 1.00×10^{-3} M จากนั้นเจือจางสารละลายเซ็นเซอร์ด้วยวิธี serial dilution โดยให้ความเข้มข้นลดลงทีละ 10 เท่า จนได้ความเข้มข้นเท่ากับ 1.00×10^{-6} M ปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร

4.2 การเตรียมสารละลายไอออนทองแดง

การศึกษาความไวของเซ็นเซอร์ MNH ทำได้โดยเตรียมสารละลายไอออนทองแดงเปอร์คลอเรตที่มีความเข้มข้น 1.00×10^{-2} M ในน้ำกลั่นปราศจากไอออน (deionized water) ปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายไอออนทองแดงเปอร์คลอเรต ด้วยวิธี serial dilution โดยให้ความเข้มข้นลดลง 10 เท่า จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.00×10^{-3} M ปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร โดยปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน (deionized water)

4.3 การทดสอบ

นำสารละลายเซ็นเซอร์ MNH ที่เตรียมได้ไปวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้นเมื่อมีการไตเตรตสารละลายไอออนทองแดง โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ใช้ในการทดสอบดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงค่าพารามิเตอร์ที่ใช้ในการวัดฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ MNH

λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Scan speed (nm/min)	Slit width (nm)	ช่วงความยาวคลื่นที่ศึกษา (nm)
373	556	300	5	400-700

5. การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (selectivity)

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเซ็นเซอร์ MNH กับไอออนชนิดต่างๆ ได้ศึกษาด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี โดยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนทองแดงลงในสารละลายเซ็นเซอร์ที่ถูกเตรียมขึ้นปริมาตร 3.00 มิลลิลิตร เทียบกับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดจากการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ลงในสารละลายเซ็นเซอร์ที่ถูกเตรียมขึ้นในลักษณะเดียวกัน แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ระหว่างการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนทองแดงและการไตเตรตด้วยไอออนอื่นๆ

5.1 การเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ MNH

เตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ MNH ในสารละลายผสม $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (9:1 v/v) ในขวดปริมาตรขนาด 10.00 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 1.00×10^{-3} M จากนั้นเจือจางสารละลายเซ็นเซอร์จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 3.00×10^{-6} M และมีปริมาตร 50.0 มิลลิลิตร

5.2 การเตรียมสารละลายไอออนทองแดงและไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเซ็นเซอร์ MNH ทำได้โดยเตรียมสารละลายจากเกลือของไอออนโลหะเปอร์คลอเรตทั้งหมด 17 ชนิด ได้แก่ Cu^{2+} Hg^{2+} Ag^+ Ba^{2+} Ca^{2+} Cd^{2+} Co^{2+} Fe^{3+} K^+ Mn^{2+} Na^+ Ni^{2+} Pb^{2+} Mg^{2+} Al^{3+} Li^+ และ Zn^{2+} ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 1.00×10^{-2} M ในน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายไอออน

ชนิดต่างๆ ด้วยวิธี serial dilution โดยให้ความเข้มข้นลดลง 10 เท่าจนได้ความเข้มข้นเท่ากับ 1.00×10^{-3} M ปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร โดยปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) เช่นเดียวกับการศึกษาความว่องไว (4.2)

5.3 การทดสอบ

นำสารละลายเซ็นเซอร์ MNH ที่เตรียมได้ไปวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้น เมื่อมีการไตเตรตสารละลายไอออนทองแดง เปรียบเทียบกับไอออนของเกลือเปอร์คลอเรตชนิดอื่นๆ โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ใช้ในการทดสอบตามตารางที่ 2

6. การทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนทองแดงในสภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ (competitive studies)

การทดสอบความสามารถในการดักจับไอออนทองแดงในสภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ สามารถศึกษาได้ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี โดยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ในขณะก่อนและหลังเติมสารละลายไอออนทองแดงลงในสารละลายเซ็นเซอร์ที่ถูกเตรียมขึ้นในปริมาตร 3.00 มิลลิลิตร จนสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เพิ่มขึ้น 50-60% หลังจากนั้นจึงเติมสารละลายของไอออนรบกวนชนิดต่างๆ ในปริมาตรและความเข้มข้นที่เท่ากับสารละลายไอออนทองแดงที่เติมลงไปครั้งแรก แล้ววัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์อีกครั้งภายหลังการเติมไอออนรบกวนชนิดต่างๆ

6.1 การเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ MNH

เตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ MNH จะเตรียมในลักษณะเดียวกันกับการศึกษาความว่องไว (4.1) แต่การศึกษาความสามารถในการดักจับไอออนทองแดงในสภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ (competitive studies) จะเตรียมให้มีปริมาตร 50.0 มิลลิลิตร เช่นเดียวกับการเตรียมสารเพื่อทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเซ็นเซอร์ (5.1)

6.2 การเตรียมสารละลายไอออนทองแดงและไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ

การทดสอบความสามารถในการดักจับไอออนทองแดงในสภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ของเซ็นเซอร์ MNH ทำได้โดยเตรียมสารละลายจากเกลือของไอออนโลหะเปอร์คลอเรตทั้งหมด 17 ชนิด ได้แก่ Cu^{2+} Hg^{2+} Ag^+ Ba^{2+} Ca^{2+} Cd^{2+} Co^{2+} Fe^{3+} K^+ Mn^{2+} Na^+ Ni^{2+} Pb^{2+} Mg^{2+} Al^{3+} Li^+ และ Zn^{2+} ให้มีความเข้มข้น 1.00×10^{-2} M ในสารละลายน้ำกลั่นปราศจากไอออน (deionized water) ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร

6.3 การทดสอบ

นำสารละลายเซ็นเซอร์ MNH ที่เตรียมได้ไปวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้น เมื่อมีการไตเตรตสารละลายไอออนทองแดง เปรียบเทียบกับไอออนของเกลือเปอร์คลอเรตชนิดอื่นๆ โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ใช้ในการทดสอบตามตารางที่ 1 จากนั้นสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า normalized fluorescence intensity (I_F/I_0) ในแนวแกน y และชนิดของไอออนต่างๆ ที่เติมลงไปแนวแกน x โดยที่

$$I_0 = \text{ความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์ก่อนเติมไอออน}$$

$$I_F = \text{ความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์หลังเติมไอออน}$$

7. การหาค่าประสิทธิภาพเชิงควอนตัมทางฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescent quantum yield)

การหาค่าประสิทธิภาพเชิงควอนตัมทางฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ เป็นการหาอัตราส่วนของจำนวนโฟตอนที่ถูกคายออกมาต่อจำนวนโฟตอนที่ถูกดูดกลืน โดยสารที่เกิดการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้ดี จะมีค่าเข้าใกล้ 1 ซึ่งสามารถคำนวณได้ตามสมการที่ 1

$$Q_x = Q_{\text{std}} \left(\frac{\text{Slope}_x}{\text{Slope}_{\text{std}}} \right) \left(\frac{\eta_x^2}{\eta_{\text{std}}^2} \right) \dots \dots \dots (1)$$

เมื่อ Q_x = Quantum yield ของสารตัวอย่าง

Q_{std} = Quantum yield ของสารมาตรฐาน

Slope_x = ค่าความชันจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์กับการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

- Slope_{std} = ค่าความชันจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์กับการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน
- η_x = refractive index ของตัวทำละลายสารตัวอย่าง
- η_{std} = refractive index ของตัวทำละลายมาตรฐาน

7.1 การเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์และสารละลายไอออนทองแดง

สารละลายเซ็นเซอร์เตรียมในลักษณะเดียวกับการศึกษาความว่องไว (4.1) โดยเตรียมให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1.00×10^{-5} M ในขวดปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วย CH_3CN สำหรับสารละลายไอออนทองแดงก็เตรียมในลักษณะเดียวกับการศึกษาความว่องไวเช่นเดียวกัน (4.1) โดยให้มีความเข้มข้นเป็น 1.00×10^{-2} M

7.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐาน 9,10-diphenylanthracene ในสารละลาย CH_3CN เข้มข้น 1.00×10^{-4} M ปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐานในการคำนวณค่า quantum yield ของเซ็นเซอร์ MNH

7.3 การทดสอบ

นำสารละลายเซ็นเซอร์ MNH ปริมาตร 3.00 มิลลิลิตร มาวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ตามตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ตารางแสดงค่าพารามิเตอร์ที่ใช้ในการวัดฟลูออเรสเซนซ์เพื่อหาค่าประสิทธิภาพเชิงควอนตัมทางฟลูออเรสเซนซ์

λ_{ex} (nm)	Scan speed (nm/min)	Slit width (nm)	ช่วงความยาวคลื่นที่ศึกษา (nm)	ความยาวคลื่นของการคายแสง; λ_{em} (nm)
373	300	5.0	400-700	530

จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นกระตุ้น (λ_{ex}) 373 nm และวัดการคายแสงฟลูออ-เรสเซนส์ที่ความยาวคลื่นของการคายแสง (λ_{em}) ดังแสดงใน ตารางที่ 3 และทำการวัดซ้ำ โดยการเจือจางสารละลายดังกล่าวครึ่งละ 2/3 เท่า อย่างน้อย 3 ครั้ง แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงและคายแสงที่วัดได้ มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างการคายแสงฟลูออเรสเซนส์ในแนวแกน y และค่าการดูดกลืนแสงในแนวแกน x เพื่อนำความชันของกราฟเส้นตรงที่ได้ ไปคำนวณค่า quantum yield ตามสมการที่ 1 ต่อไป

8. การหาอัตราส่วนของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนด้วยวิธีการของ Job (Job's plot)

การหาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนด้วยวิธีการของ Job ได้ศึกษาด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสปี โดยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ในระบบที่มีเศษส่วนโมล (mole fraction) หรืออัตราส่วนจำนวนโมลของไอออนทองแดงต่อจำนวนโมลของเซ็นเซอร์ในอัตราส่วนต่างๆ การหาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของเซ็นเซอร์ MNH สามารถทำได้โดยการเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ที่มีความเข้มข้น 2.00×10^{-4} M ในลักษณะเดียวกับการเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ในหัวข้อ การศึกษาความว่องไว (4.1) และปิเปตสารละลายเซ็นเซอร์ MNH ให้ได้ปริมาณตามตารางที่ 3 ลงในขวดปริมาตรขนาด 10.0 มิลลิลิตร และปรับให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 10.0 มิลลิลิตร ด้วยตัวทำละลาย $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (9:1 v/v) โดยไม่ต้องเติมสารละลายไอออนทองแดง จากนั้นนำไปวัดสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนส์ก่อนเติมไอออนทองแดง (I_0) โดยกำหนดพารามิเตอร์ต่างๆ ตามตารางที่ 1 ต่อมาเติมสารละลายไอออนทองแดงในขวดสารละลายเซ็นเซอร์ข้างต้น โดยมีอัตราส่วนปริมาณที่เติมตามตารางที่ 4 แล้วนำไปวัดสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนส์หลังการเติมไอออนทองแดง (I_F) จากนั้นสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลคูณของ I_0-I_F กับเศษส่วนโมลของไอออนทองแดง (X_i) ที่ความยาวคลื่นที่แสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนส์สูงสุดในแนวแกน y และเศษส่วนโมลของไอออนทองแดง (X_i) ในแนวแกน x เพื่อหาอัตราส่วนของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเซ็นเซอร์ MNH กับไอออนทองแดง

ตารางที่ 4 ตารางแสดงการหาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของเซ็นเซอร์ด้วยวิธีของ Job

ขวด ที่	ปริมาตร เซ็นเซอร์ (มิลลิลิตร) ($2.00 \times 10^{-5} M$)	ปริมาตรไอออน ทองแดง (ไมโครลิตร) ($1.00 \times 10^{-3} M$)	เศษส่วนโมล (mole fraction) ของ เซ็นเซอร์	เศษส่วนโมล (mole fraction) ของไอออน ทองแดง (X_i)
0	0	20	0	1.0
1	0.1	18	0.1	0.9
2	0.2	16	0.2	0.8
3	0.3	14	0.3	0.7
4	0.4	12	0.4	0.6
5	0.5	10	0.5	0.5
6	0.6	8	0.6	0.4
7	0.7	6	0.7	0.3
8	0.8	4	0.8	0.2
9	0.9	2	0.9	0.1
10	1.0	0	1.0	0.0

9. การหาค่าคงที่สมดุลของการจับไอออน (K_{assoc})

Association constant (K_{assoc}) หรือ ค่าคงที่การเกิด (formation constant) หรือค่าคงที่เสถียรภาพ (stability constant, K_f) หรือค่าคงที่สมดุลของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน พิจารณาจากสมการที่ 2



$$K_{assoc} = \frac{M_nL}{[L][M]^n} \dots\dots\dots (2)$$

เมื่อ L คือ เซ็นเซอร์
M คือ ไอออนโลหะ
n คือ จำนวนไอออนโลหะ

K_{assoc} คือ Association constant (K_{assoc})

การคำนวณหาค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออนโดยใช้สมการของ Benesi-Hildeband[39]

$$\frac{1}{(I_F - I_0)} = \frac{1}{K_{assoc} \cdot (I_{max} - I_0) \cdot [Cu^{2+}]^n} + \frac{1}{I_{max} - I_0} \quad \dots\dots\dots(3)$$

จากสมการที่ 3 มีลักษณะความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ดังนั้นการสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{1}{(I_F - I_0)}$ ในแนวแกน y และ $\frac{1}{[Cu^{2+}]^n}$ ในแนวแกน x จะสามารถหาค่าคงที่สมดุลของการจับไอออนทองแดงได้ เมื่อกำหนดให้

I_0 คือ ความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ก่อนการเติมไอออนทองแดง

I_F คือ ความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์หลังการเติมไอออนทองแดงที่ความเข้มข้นใดๆ

I_{max} คือ ความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์มากที่สุดของเซ็นเซอร์หลังการเติมไอออนทองแดง

$[n]$ คือ จำนวนเต็มใดๆ เช่น 1, 2, 3 ...

พบว่า ค่าคงที่สมดุลของการจับไอออนทองแดง คำนวณได้จากความชันของกราฟที่สร้างขึ้น ดังนี้

$$\text{Slope} = \frac{1}{K_{assoc} \cdot (I_{max} - I_0)} \quad \dots\dots\dots (4)$$

$$K_{assoc} = \frac{1}{\text{Slope} \cdot (I_{max} - I_0)} \quad \dots\dots\dots (5)$$

10. การศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเซ็นเซอร์ MNH กับไอออนทองแดงวิธีการสร้างแบบจำลองโมเลกุลทางคอมพิวเตอร์ (computational molecular modeling)

การศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเซ็นเซอร์ MNH กับไอออนทองแดง สามารถวิเคราะห์ได้จากโครงสร้างที่เหมาะสม (optimized structure) ของเซ็นเซอร์ในสภาวะก่อนและหลังจากการดักจับไอออนทองแดงด้วยการสร้างแบบจำลองโมเลกุลทางคอมพิวเตอร์ตามระเบียบวิธี Density Functional Theory (DFT-B3LYP)[40] เบสิสเซต 6-311G** สำหรับธาตุกลุ่มหลักและ

LanL2DZ สำหรับไอออนทองแดง[41] จากนั้นรายงานผลการวิเคราะห์โครงสร้างโมเลกุลที่เหมาะสมของเซ็นเซอร์ MNH และสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเซ็นเซอร์ MNH กับไอออนทองแดง (MNH-Cu²⁺ complex) ด้วยรูปภาพจากโปรแกรม Visual Molecular Dynamics (VMD)[42]

11. การศึกษาประสิทธิภาพการตรวจวัดไอออนทองแดงของเซ็นเซอร์ MNH ในเซลล์สิ่งมีชีวิต

HepG2 cell lines (hepatic cancer หรือ เซลล์มะเร็ง) สำหรับศึกษาในงานวิจัยนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร โดยการศึกษาประสิทธิภาพการตรวจวัดไอออนทองแดงของเซ็นเซอร์ MNH ในตัวอย่างเซลล์สิ่งมีชีวิต จะวิเคราะห์การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ที่อยู่ภายในเซลล์ ในสภาวะที่มีและไม่มีไอออนทองแดง โดยการเตรียมเซลล์จะเริ่มจากบ่มเซลล์กับเซ็นเซอร์ MNH เข้มข้น 50 mM ในตัวทำละลายบัฟเฟอร์ PBS (DMSO : PBS (1 : 9 v/v), pH 7.4) ที่อุณหภูมิ 37 °C ระยะเวลา 15 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา จากนั้นทำการล้างเซลล์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBS จำนวน 2 ครั้ง แล้วจึงนำเซลล์มาบ่มด้วย Cu(ClO₄)₂ เข้มข้น 10 mM ที่อุณหภูมิ 37 °C ระยะเวลา 10 นาที และนำไปบันทึกผลการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์อีกครั้ง

12. ทดสอบความสามารถในการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence properties) และความสามารถในการตรวจวัดทางคุณภาพและปริมาณในน้ำมันเชื้อเพลิงของสารทำเครื่องหมายน้ำมัน MCA

เนื่องจากสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิงที่สังเคราะห์ได้เป็นสารชนิดใหม่ ซึ่งจะไม่มีการรายงานผลใดๆ มาก่อน ดังนั้นสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิงที่สังเคราะห์ได้นี้จะถูกนำมาศึกษาสมบัติการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ ได้แก่ การตรวจสอบ Excitation spectrum และ Emission spectrum ของสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิงที่สังเคราะห์ได้ในน้ำมันชนิดต่างๆ จากนั้นนำมาศึกษาการตรวจวัดทางคุณภาพและปริมาณในน้ำมันเชื้อเพลิง ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี ตรวจสอบความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) ศึกษาช่วงความเข้มข้นที่สารทำเครื่องหมายสามารถทำงานได้ (working range) และ ค่าต่ำสุดของการตรวจวัด (detection limit) รวมทั้งทดสอบคุณภาพของน้ำมันที่เติมสารทำเครื่องหมายแล้วตามมาตรฐาน ASTM

12.1 การทดสอบความสามารถการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารทำเครื่องหมายน้ำมันในน้ำมันเชื้อเพลิง gasohol 91 gasohol 95 และ diesel

การทดสอบความสามารถในการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิง MCA ได้ศึกษาด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี โดยเตรียมสารละลายของสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิง MCA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในตัวอย่างน้ำมันเชื้อเพลิง 3 ชนิด ได้แก่ gasohol 91 gasohol 95 และ diesel จากนั้นนำไปวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ และนำมาพลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์และความเข้มข้นของสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิง เพื่อศึกษาแนวโน้มความเป็นเส้นตรงที่ดีที่สุดของการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ในน้ำมันแต่ละชนิด

12.1.1 การเตรียมสารละลายของสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิง 3 ชนิด

เตรียมสารละลายสารทำเครื่องหมายน้ำมัน MCA ในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 ให้มีความเข้มข้น 1000 ppm ปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลาย ให้เหลือความเข้มข้น 200 ppm ปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร โดยปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย CH_2Cl_2 จากสารละลายความเข้มข้น 200 ppm ปิเปตสารละลายปริมาตร 0 0.20 0.40 0.60 0.80 และ 1.00 มิลลิลิตร ตามลำดับ ลงในขวดปริมาตรขนาด 10.0 มิลลิลิตร กำจัดตัวทำละลาย CH_2Cl_2 ด้วยการเป่าลมร้อนเพื่อให้ตัวทำละลายระเหยออกไปให้มากที่สุดหรือจนแห้งสนิท จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำมันเชื้อเพลิง จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0 4 8 12 16 และ 20 ppm ตามลำดับ

12.1.2 การทดสอบ

นำสารละลายที่เตรียมในข้อ 12.1.1 ไปวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์โดยเริ่มจากความเข้มข้นต่ำสุดไปถึงความเข้มข้นสูงที่สุด โดยวิเคราะห์สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ด้วยค่า %Transmittance หรือร้อยละการส่งผ่าน กล่าวคือ

$$\%T = 100 \times \frac{I}{I_0}$$

เมื่อ T = ความส่งผ่าน (transmittance)

I = ความเข้มของแสงที่ผ่านเข้าไป (intensity of transmitted light)

I_0 = ความเข้มของแสงที่ผ่านออกมา (intensity of incident light)

สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้นและบันทึกผล โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ใช้ในการทดสอบตามตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ตารางแสดงค่าพารามิเตอร์ที่ใช้ในการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เพื่อศึกษาความสามารถการคาย แสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารทำเครื่องหมายน้ำมันในตัวอย่างน้ำมันเชื้อเพลิง gasohol 91 gasohol 95 และ diesel

λ_{ex} (nm)	Scan speed (nm/min)	Slit width (nm)	ช่วงความยาวคลื่นที่ศึกษา (nm)	ความยาวคลื่นของการคายแสง; λ_{em} (nm)
395	500	5.0	400-700	525

เมื่อทำการทดลองและบันทึกค่าสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์แล้ว นำผลการทดลองไปพลอตความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์และความเข้มข้นของสารทำเครื่องหมายน้ำมัน เพื่อพิจารณาว่าในตัวอย่างน้ำมันเชื้อเพลิงชนิดใดมีแนวโน้มความเป็นเส้นตรงที่ดีที่สุด และเลือกผลิตภัณฑ์น้ำมันชนิดนั้นไปศึกษาเสถียรภาพของสาร (stability) ในน้ำมันเชื้อเพลิงต่อไป

12.2 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับเติมในน้ำมันเชื้อเพลิงที่เลือกวิเคราะห์

การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารทำเครื่องหมายน้ำมัน จะทำการศึกษาโดยเตรียมสารละลายสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิง MCA ในน้ำมันเชื้อเพลิงที่เลือกวิเคราะห์ ความเข้มข้น 0 20 40 60 80 และ 100 ppm ตามลำดับ แล้วนำไปวัดค่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ นำผลการทดลองมาพลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์และความเข้มข้นของสารทำเครื่องหมายน้ำมัน พิจารณาความเป็นเส้นตรงและเลือกความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้อย่างมีนัยสำคัญ และคำนึงด้วยว่าสีของสารละลายน้ำมันต้องไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า

12.2.1 การเตรียมสารละลายของสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิง

เตรียมสารละลายสารทำเครื่องหมายน้ำมัน MCA ในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 ให้มีความเข้มข้น 1000 ppm ปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายให้เหลือความเข้มข้น 500 ppm ปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร โดยปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย CH_2Cl_2 จากสารละลายความเข้มข้น 500 ppm ปิเปตสารละลายปริมาตร 0 0.40 0.80 1.20 1.60 และ 2.00 มิลลิลิตร ตามลำดับ ลงในขวดปริมาตรขนาด 10.0 มิลลิลิตร กำจัดตัวทำละลาย CH_2Cl_2 ด้วยการเป่าลมร้อนเพื่อให้ตัวทำละลายระเหยออกไปให้มากที่สุดหรือจนแห้งสนิท ปรับปริมาตรด้วยน้ำมันเชื้อเพลิงที่เลือกวิเคราะห์ จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0 20 40 60 80 และ 100 ppm ตามลำดับ

12.2.2 การทดสอบ

นำสารละลายที่เตรียมได้ในข้อ 13.2.1 ไปวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์โดยเริ่มจากความเข้มข้นต่ำสุดไปถึงความเข้มข้นสูงที่สุด และตั้งค่าพารามิเตอร์เช่นเดียวกับตารางที่ 5

12.3 การทดสอบเสถียรภาพของสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิงในตัวอย่างน้ำมันที่เลือกวิเคราะห์ (stability study)

เมื่อเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับเติมลงไปในน้ำมันเชื้อเพลิงแล้ว ขั้นตอนต่อไปคือการทดสอบเสถียรภาพของสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิงในตัวอย่างน้ำมันที่เลือกวิเคราะห์ เพื่อทดสอบความเสถียรของสารเมื่ออยู่ในน้ำมันเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 3 เดือน

12.3.1 การเตรียมสารละลายของสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิง

เตรียมสารละลายสารทำเครื่องหมายน้ำมัน MCA ในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 ให้มีความเข้มข้น 1000 ppm ปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร จากนั้นบีบเปิดสารละลายมา 2.00 มิลลิลิตร ใส่ขวดปริมาตร 100.0 มิลลิลิตร กำจัดตัวทำละลาย CH_2Cl_2 ด้วยการเป่าลมร้อนเพื่อให้ตัวทำละลายระเหยออกไปให้มากที่สุดหรือจนแห้งสนิท ปรับปริมาณด้วยน้ำมันเชื้อเพลิงที่เลือกวิเคราะห์ จะได้สารละลายความเข้มข้น 20 ppm ต่อมาแบ่งสารละลายใส่ขวด vial สีขาขนาด 2.00 มิลลิลิตร ทั้งหมด 28 ขวด และปิดฝีนึกฝาขวด vial ให้สนิทเพื่อป้องกันการระเหยของน้ำมัน

12.3.2 การทดสอบ

นำสารละลายที่เตรียมในข้อ 12.3.1 ไปวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ครั้งละ 4 ขวด ทุกๆ 15 วัน จนครบระยะเวลา 90 วัน โดยวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของน้ำมันเชื้อเพลิงก่อนการเติมสารทำเครื่องหมายน้ำมันด้วย สำหรับใช้เป็น blank เพื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ก่อนเติมและหลังเติมสารทำเครื่องหมายน้ำมัน

บทที่ 4

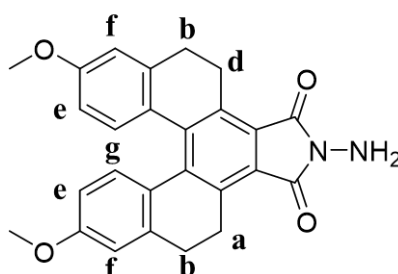
ผลการดำเนินงานวิจัย

จากการสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ทั้ง 2 ชนิด ได้มีการนำสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ที่สังเคราะห์ได้มายืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) และ High Resolution Mass Spectroscopy (HR-ESI MS) จากนั้นนำมาทดสอบสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรสโกปี ทั้งนี้สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ 2 ชนิดในงานวิจัยนี้ ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาเพื่อใช้ประโยชน์ในจุดประสงค์ที่ต่างกัน จึงมีการทดสอบที่ค่อนข้างต่างกัน กล่าวคือ ทองแดงซีเอ็นเซอร์จะนำไปทดสอบประสิทธิภาพการดักจับไอออนทองแดงในสารละลายอินทรีย์และสารละลายอินทรีย์ที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ สำหรับสารทำเครื่องหมายน้ำมันจะนำมาศึกษาประสิทธิภาพการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ในผลิตภัณฑ์น้ำมันเชื้อเพลิงชนิดต่างๆ จากนั้นนำมาศึกษาการตรวจวัดในเชิงคุณภาพและปริมาณในน้ำมันเชื้อเพลิง ได้ผลการทดลองดังนี้

1. การยืนยันโครงสร้าง

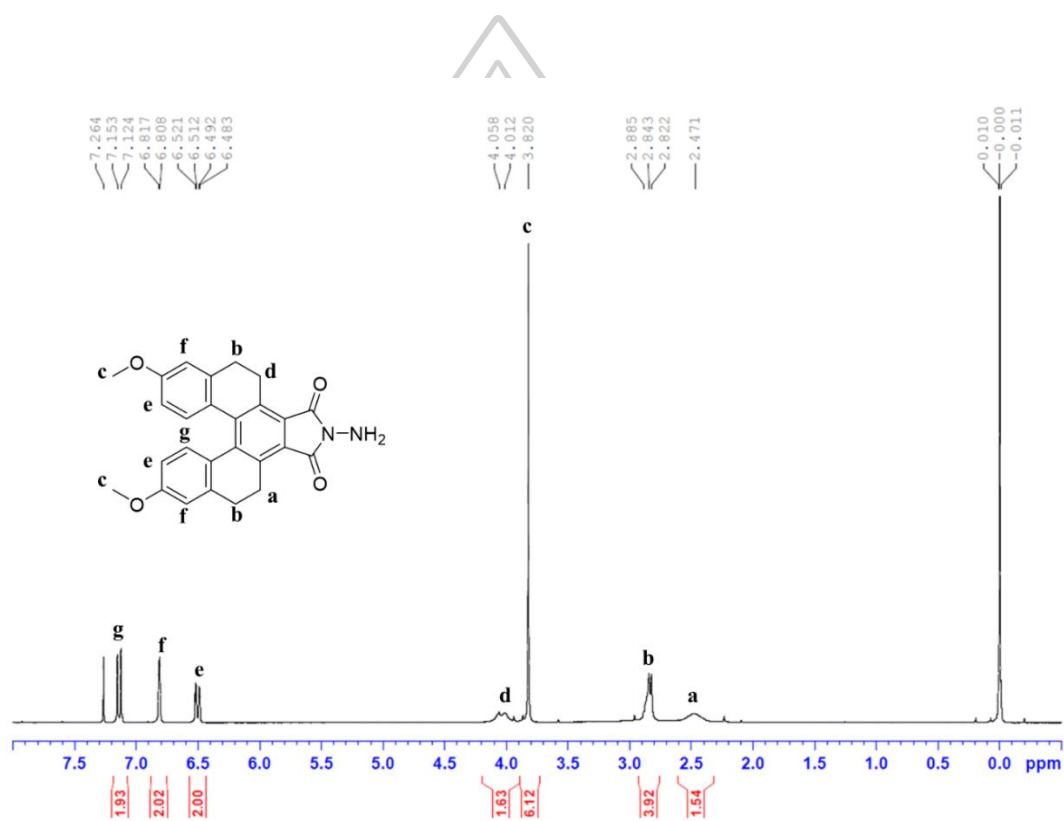
จากผลการสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์แต่ละชนิดตามวิธีการทดลอง ที่ได้รายงานในบทที่ 4 พบว่าได้สารฟลูออเรสเซนต์ซีเอ็นเซอร์สำหรับตรวจจับไอออนทองแดงชนิดใหม่หนึ่งชนิด และสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิงชนิดใหม่อีกหนึ่งชนิด ซึ่งสามารถวิเคราะห์และยืนยันโครงสร้างของสารทั้งสองชนิดได้ด้วยวิธีทางสเปกโตรสโกปีดังนี้

1.1 โครงสร้างทางเคมีของซีเอ็นเซอร์ MNH

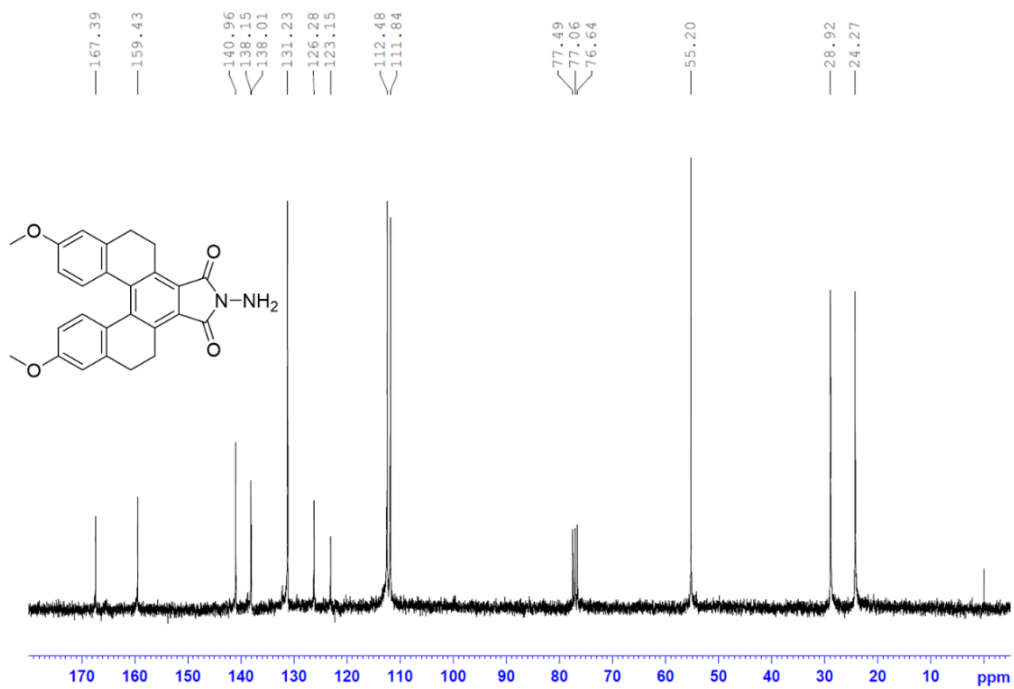


ภาพที่ 30 โครงสร้างทางเคมีของฟลูออเรสเซนต์ซีเอ็นเซอร์ MNH

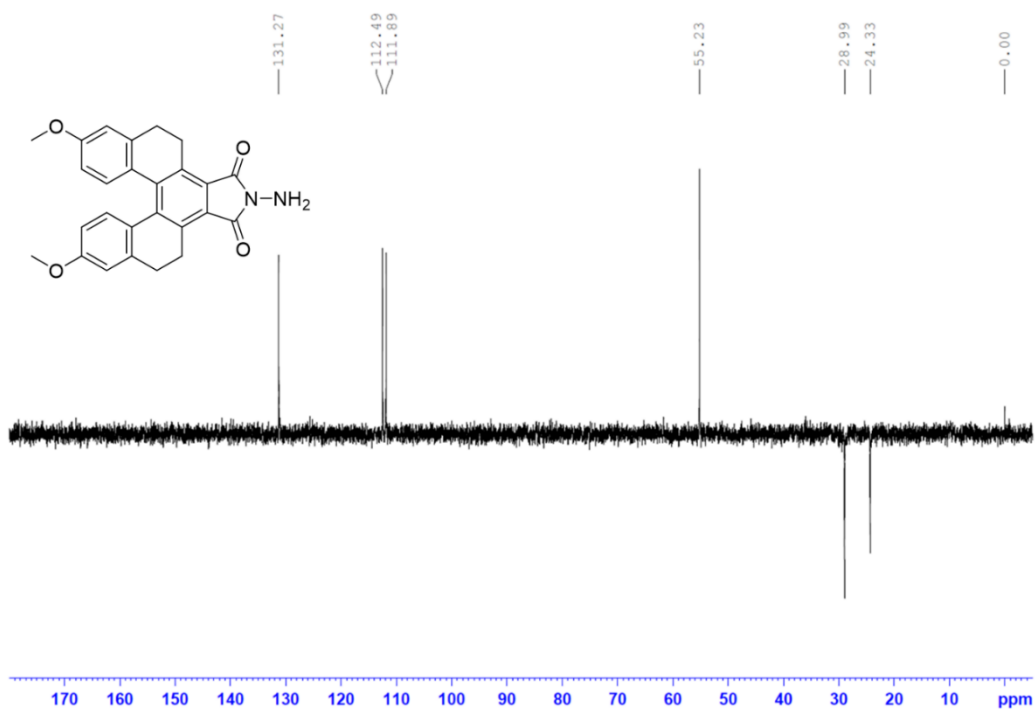
จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของ **MNH** สามารถยืนยันโครงสร้างโดยวิธีทางสเปกโตรสโกปีได้ดังนี้ ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 2.47 (s, 2H), 2.84 (t, $J = 9.3$ Hz 4H), 3.82 (s, 6H), 4.03 (d, 2H), 6.50 (dd, $J = 8.7$ Hz, $j = 2.7$ Hz, 2H), 6.80 (d, $J = 3.0$ Hz, 2H), 7.13 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 24.3 (2CH_2), 28.9 (2CH_2), 55.2 (2CH_3), 111.8 (2CH), 112.5 (2CH), 123.2 (2C), 126.3 (2C), 131.2 (2CH), 138.0 (2C), 138.2 (2C), 141.0 (2C), 159.4 (2C), 167.4 ($2\text{C}=\text{O}$) ppm. HR-ESI MS calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4\text{Na}^+$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ 449.1472 m/z, found 449.1468 m/z.



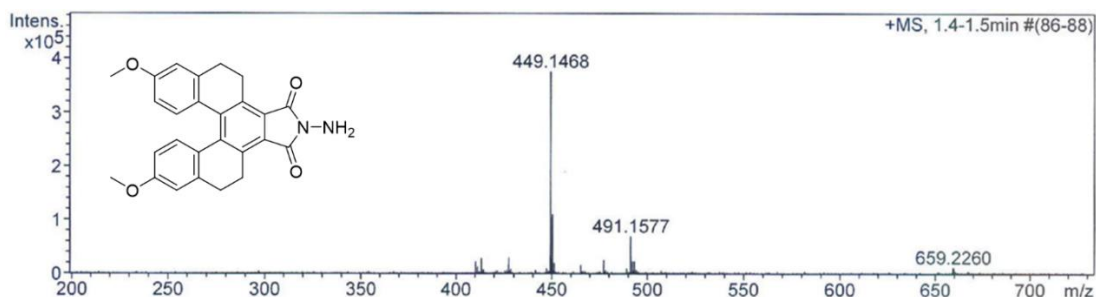
ภาพที่ 31 ^1H NMR สเปกตรัมของ MNH



ภาพที่ 32 ^{13}C NMR สเปกตรัมของ MNH



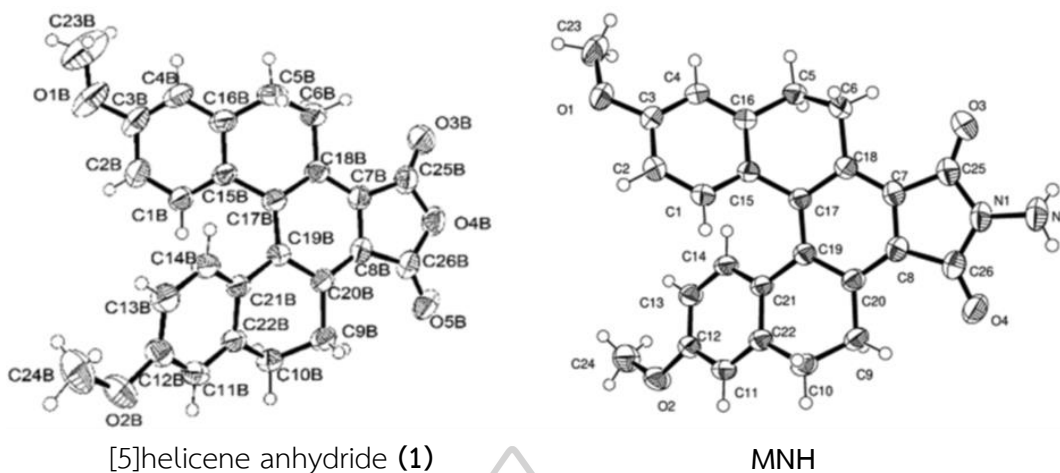
ภาพที่ 33 DEPT-135 NMR สเปกตรัมของ MNH



ภาพที่ 34 HR-ESI MS สเปกตรัมของ MNH

เมื่อพิจารณาโครงสร้างสาร MNH (ภาพที่ 30) และ ¹H NMR สเปกตรัมของสาร MNH (ภาพที่ 31) แสดงให้เห็นสัญญาณของโปรตอน 7 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มแรกมีค่า chemical shift (δ) 2.47 ppm เป็น broad singlet เกิดจากโปรตอนของ methylene (-CH₂) บนคาร์บอนตำแหน่ง a ถัดมาที่ δ 2.84 ppm เกิดจากโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่ง b มีลักษณะเป็น triplet เนื่องจากเกิด coupling กับ 2 โปรตอนจากคาร์บอนตำแหน่ง a ถัดมาสัญญาณของโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่ง c ที่ δ 3.82 ppm มีลักษณะเป็น singlet ที่มี integration สูงที่สุด ถัดมาเป็นที่ δ 4.03 ppm เป็นสัญญาณของ methylene (-CH₂) บนคาร์บอนตำแหน่ง d ถัดมาเป็นค่า δ 6.50 6.80 และ 7.13 เป็นสัญญาณของโปรตอนบนวง aromatic จึงปรากฏสัญญาณที่ downfield กว่าโปรตอนกลุ่มอื่นๆ ทั้งนี้สามารถยืนยันโครงสร้างจาก HR-ESI MS โดยพบค่ามวลโมเลกุลเท่ากับ 449.1468 m/z (จากการคำนวณ (M+Na)⁺ ได้เท่ากับ 449.1472 m/z)

นอกจากนี้ยังสามารถยืนยันโครงสร้างของเซ็นเซอร์ MNH ได้ด้วยเทคนิค X-ray diffraction spectroscopy แสดงผลการวิเคราะห์ดังภาพที่ 35 และตารางที่ 6 เนื่องจาก MNH เตรียมมาจากสารตั้งต้น [5]helicene anhydride (1) ซึ่งได้รายงานผลการวิเคราะห์โครงสร้างผลึกมาแล้ว ดังนั้นจึงนำผลการวิเคราะห์โครงสร้างผลึกของ [5]helicene anhydride (1) มาอภิปรายเปรียบเทียบกับเซ็นเซอร์ MNH จากผลการวิเคราะห์พบว่า conformations ของ 1 และ เซ็นเซอร์ MNH มีลักษณะคล้ายกัน โดยหมู่ methoxy group (-OCH₃) ของทั้งสองโมเลกุลชี้ไปในทิศทางเดียวกัน สำหรับ มุมบิด (torsion angles) ที่ตำแหน่ง (C1-C15-C17-C19) (C15-C17-C19-C21) และ (C17-C19-C21-C14) ของ 1 มีค่าเท่ากับ 34.41 20.11 and 30.01 ตามลำดับ ในขณะที่มุมบิด (torsion angles) ที่ตำแหน่ง (C1B-C15B-C17B-C19B) (C15B-C17B-C19B-C21B) และ (C17B-C19B-C21B-C14B) ของเซ็นเซอร์ MNH มีค่าเท่ากับ 32.61 24.81 และ 29.61 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า conformation ของเซ็นเซอร์ MNH ไม่ได้แตกต่างไปจากเดิมมากนักเมื่อเปรียบเทียบกับสารตั้งต้น 1

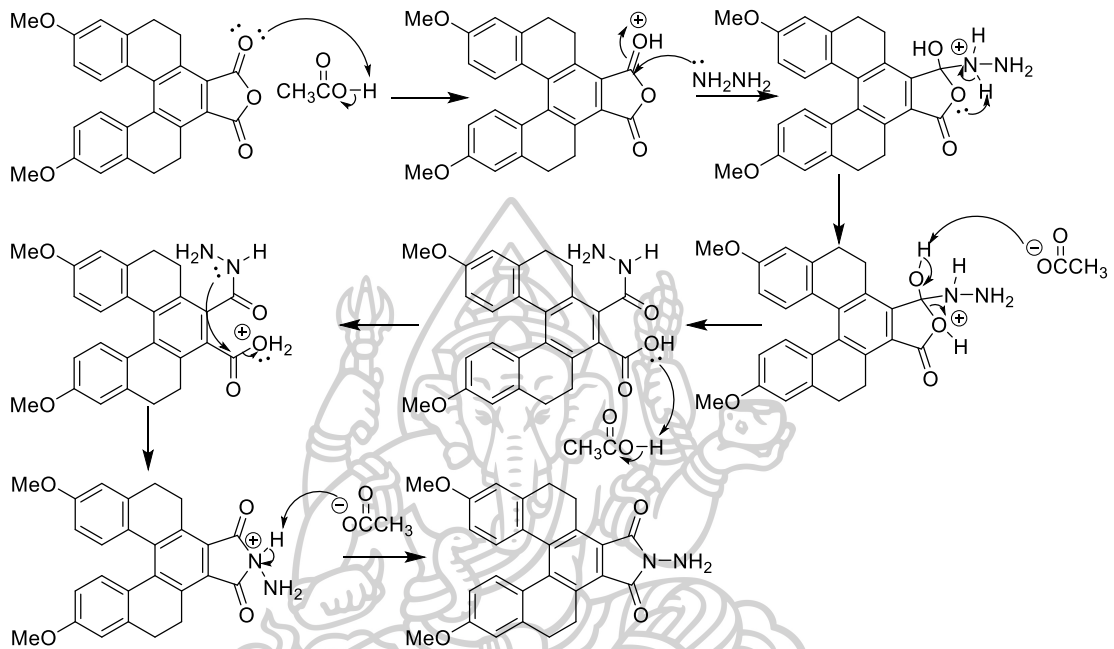


ภาพที่ 35 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างผลึกของ [5]helicene anhydride (1) และเซ็นเซอร์ MNH

ตารางที่ 6 แสดงข้อมูล Crystallographic data ของเซ็นเซอร์ MNH

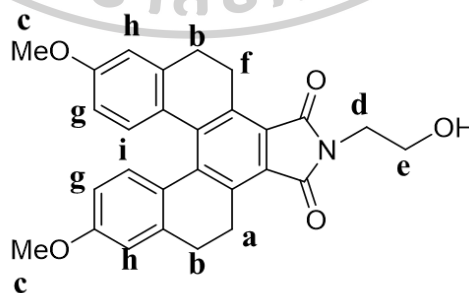
Bond precision:	C-C = 0.0020 Å	Wavelength=1.54178	
Cell:	a=21.755 (4) alpha=90	b=11.303 (2) beta=90	c=16.615 (3) gamma=90
Temperature:	273 K		
	Calculated	Reported	
Volume	4085.6 (13)	4085.8 (14)	
Space group	P b c n	P b c n	
Hall group	-P 2n 2ab	-P 2n 2ab	
Moiety formula	C ₂₆ H ₂₂ N ₂ O ₄	C ₂₆ H ₂₂ N ₂ O ₄	
Sum formula	C ₂₆ H ₂₂ N ₂ O ₄	C ₂₆ H ₂₂ N ₂ O ₄	
Mr	426.46	426.46	
Dx, g cm ⁻³	1.387	1.387	
Z	8	8	
Mu (mm ⁻¹)	0.766	0.766	
F000	1792.0	1792.0	
F000'	1797.56		
h, k, lmax	26, 13, 20	26, 13, 20	
Nref	4044	4010	
Tmin, Tmax	0.795, 0.795	0.656, 0.754	
Tmin'	0.795		
Correction method= # Reported T Limits: Tmin=0.656 Tmax=0.754			
AbsCorr = MULTI-SCAN			
Data completeness=	0.992	Theta(max) = 72.430	
R(reflections)=	0.0429 (3276)	wR2(reflections)= 0.1221 (4010)	
S =	1.036	Npar= 292	

จากผลการยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค NMR HR-ESI MS และ single crystal analysis สามารถพิสูจน์ได้ว่าเป็นโครงสร้าง MNH จริง ซึ่งมีกลไกของปฏิกิริยา imidation ในการสังเคราะห์ เซ็นเซอร์ MNH สามารถเสนอกลไกได้ดังภาพที่ 36



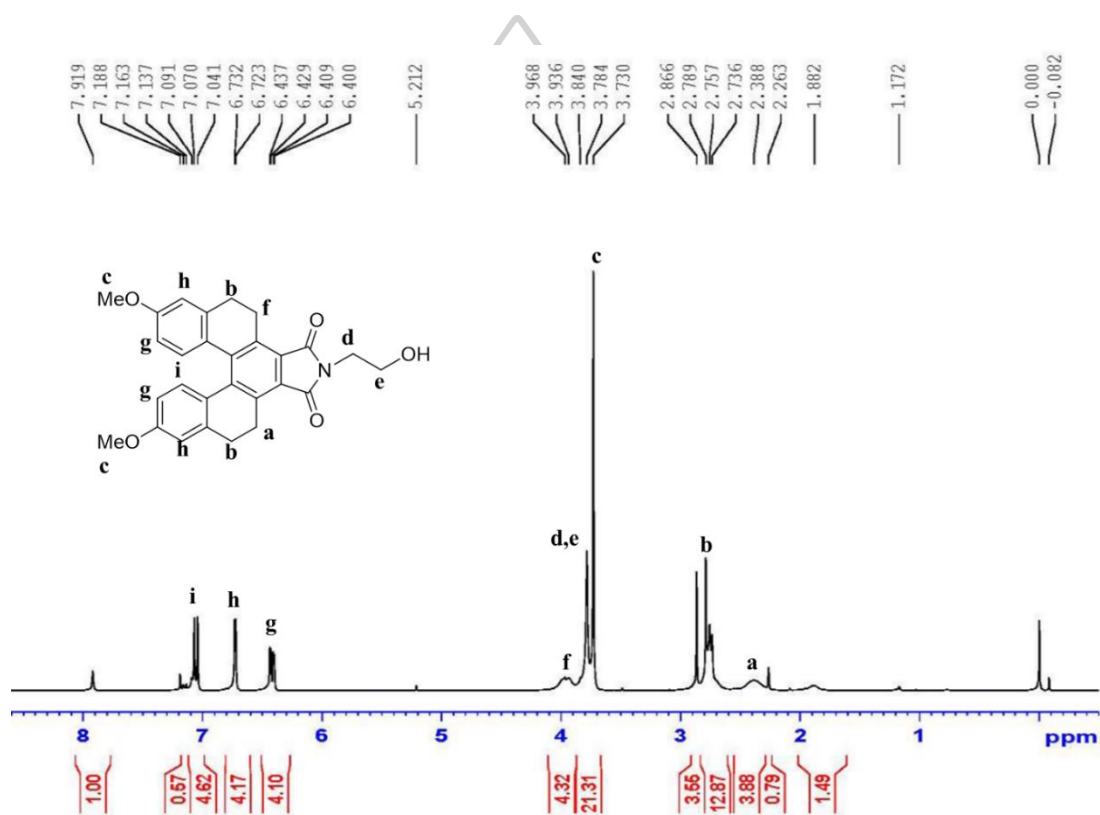
ภาพที่ 36 กลไกการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์เซ็นเซอร์ MNH

1.2 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ 4

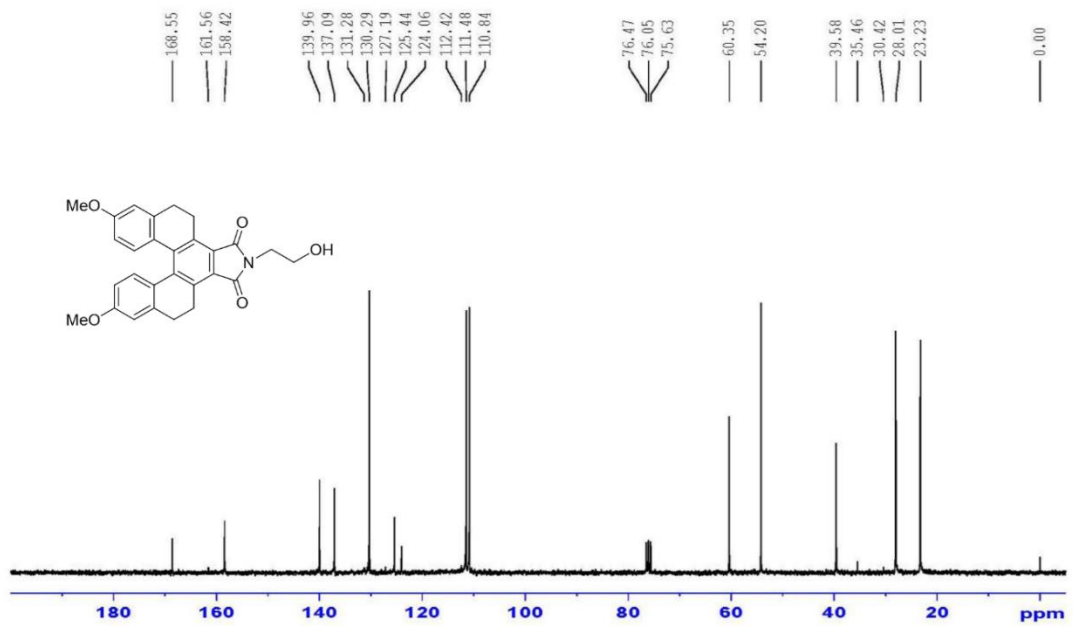


ภาพที่ 37 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ 4

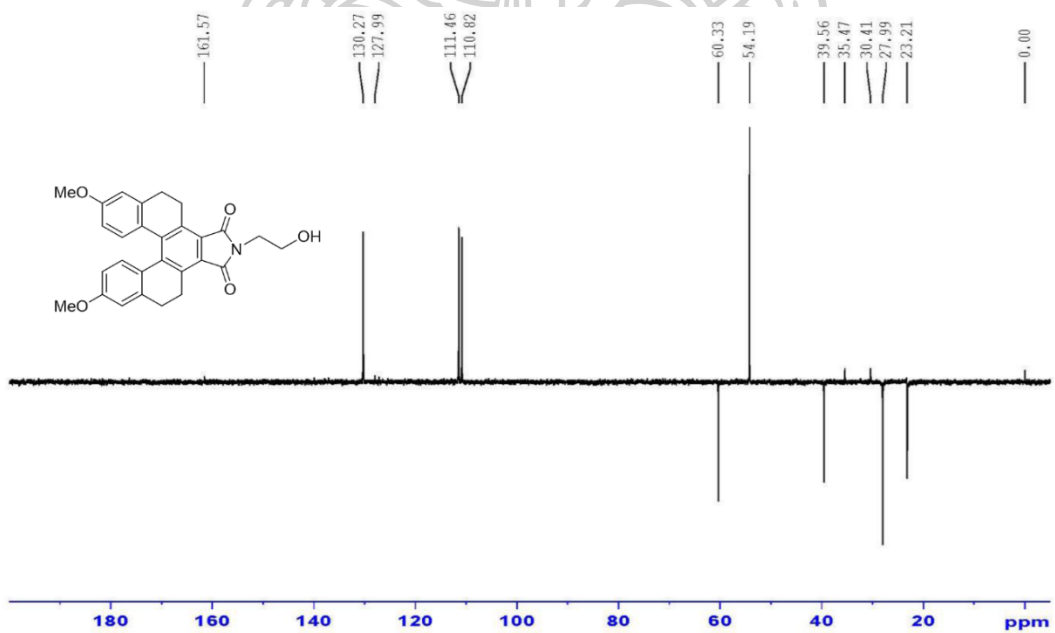
จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ **4** สามารถยืนยันโครงสร้างโดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีได้ดังนี้ $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 2.30-2.45 (br-s, 2H), 2.74-2.76 (m, 4H), 3.73 (s, 6H), 3.78 (s, 4H), 3.90-4.00 (br-s, 2H), 6.43 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.73 (d, $J = 2.7$ Hz, 2H), 7.05 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 23.23 (2CH_2), 28.01 (2CH_2), 39.58 (CH_2), 54.20 (2CH_3), 60.35 (CH_2), 110.84 (2CH), 111.48 (2CH), 124.06 (2C), 125.44 (4C), 130.29 (2CH), 137.09 (2C), 139.96 (2C), 158.42 (2C), 168.55 ($2\text{C}=\text{O}$); HR-ESI MS calcd $\text{C}_{28}\text{H}_{25}\text{NNaO}_5^+$ for $(\text{M}+\text{Na})^+$ 478.1625 m/z, found 478.1620 m/z.



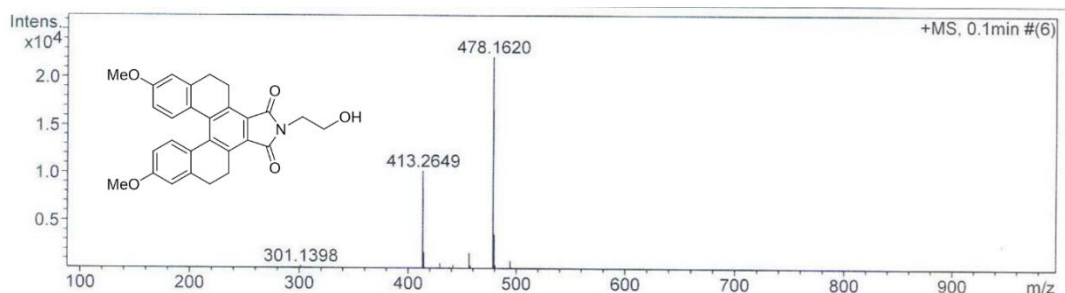
ภาพที่ 38 $^1\text{H NMR}$ สเปกตรัมของสารประกอบ **4**



ภาพที่ 39 ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารประกอบ 4

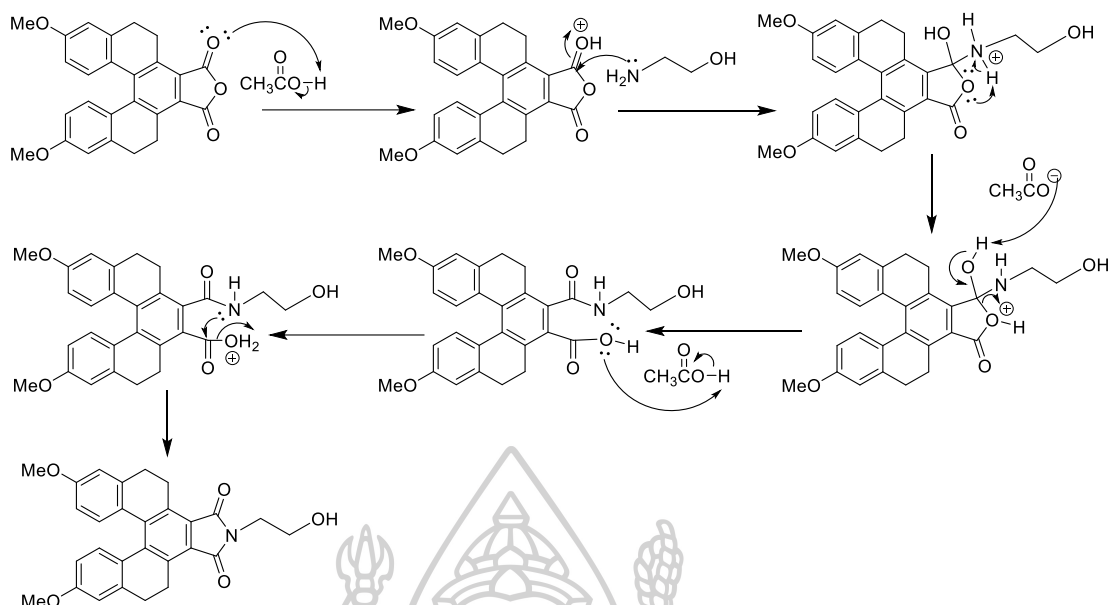


ภาพที่ 40 DEPT-135 NMR สเปกตรัมของสารประกอบ 4



ภาพที่ 41 HR-ESI MS สเปกตรัมของสารประกอบ 4

เมื่อพิจารณาโครงสร้างสารประกอบ 4 (ภาพที่ 37) และ ¹H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ 4 (ภาพที่ 38) แสดงให้เห็นสัญญาณของโปรตอน 8 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มแรกมีค่า chemical shift (δ) 2.30-2.45 ppm ลักษณะเป็น broad singlet เกิดจากโปรตอนของ methylene (-CH₂) บนคาร์บอนตำแหน่ง a ถัดมาที่ δ 2.74-2.76 ppm เกิดจากโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่ง b มีลักษณะเป็น multiplet ถัดมาสัญญาณของโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่ง c หรือโปรตอนของ methoxy group (-OCH₃) ที่ δ 3.73 ppm มีลักษณะเป็น singlet ที่มี integration สูงสุด ถัดมาที่ δ 3.78 ppm เป็นสัญญาณของ methylene (-CH₂) บนคาร์บอนตำแหน่ง d และ e เนื่องจาก methylene ทั้งสองตำแหน่งเชื่อมต่อกับอะตอมที่มีค่า EN สูงคือ ไนโตรเจนอะตอมของหมู่ amide และออกซิเจนอะตอมของหมู่ hydroxyl จึงปรากฏสัญญาณโปรตอนที่เท่าๆ กัน ถัดมาที่ค่า δ 3.90-4.00 ppm เป็นสัญญาณของโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่ง f ลักษณะเป็น broad peak ถัดมาเป็นค่า δ 6.43 6.73 และ 6.50 เป็นสัญญาณของโปรตอนบนวง aromatic จึงปรากฏสัญญาณที่ downfield กว่าโปรตอนกลุ่มอื่นๆ ทั้งนี้สามารถยืนยันโครงสร้างจาก HR-ESI MS โดยพบค่ามวลโมเลกุลเท่ากับ 478.1620 m/z (จากการคำนวณ (M+Na)⁺ ได้เท่ากับ 478.1625 m/z) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันจึงสามารถยืนยันได้ว่าเป็นโครงสร้างของสารประกอบ 5 จริง และมีการเสนอกลไกการสังเคราะห์แสดงดังภาพที่ 42



ภาพที่ 42 กลไกการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารประกอบ 4

1.3 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ 5

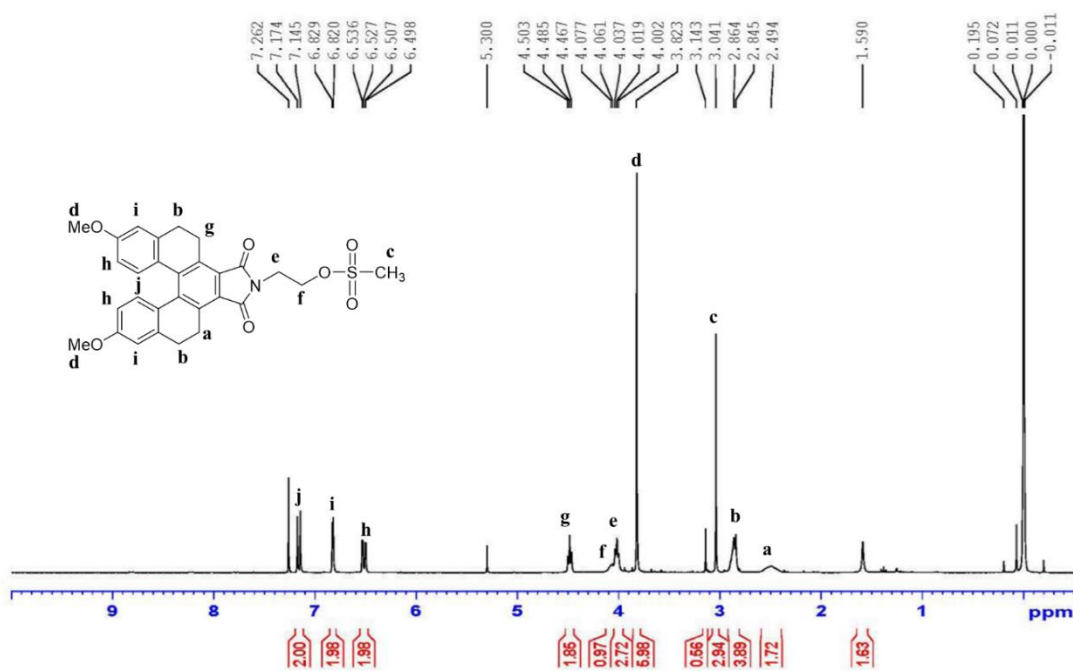


ภาพที่ 43 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ 5

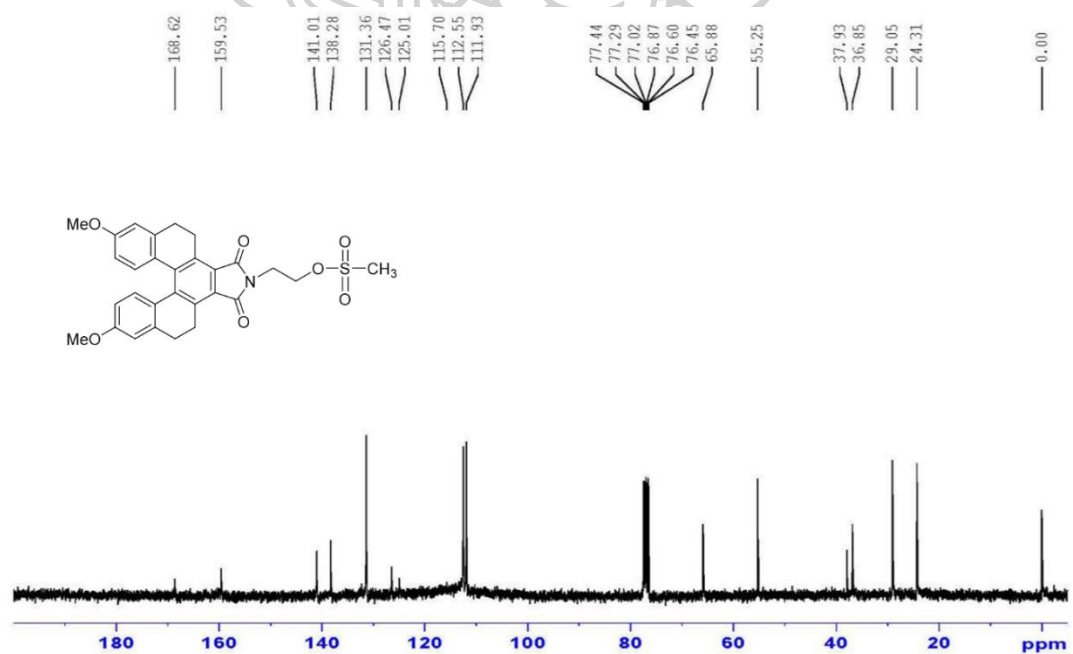
โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ 5 สามารถยืนยันโครงสร้างโดยวิธีทางสเปกโทรสโกปี

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 2.40-2.60 (br-s, 2H), 2.80-2.90 (m, 4H), 3.06 (s, 3H), 3.82 (s, 6H), 4.02 (t, $J = 5.4$ Hz, 2H), 4.05-4.08 (br-s, 2H), 4.49 (t, $J = 5.4$ Hz, 2H), 6.53 (d, $J = 2.7$ Hz, 2H), 6.82 (d, $J = 2.7$ Hz, 2H), 7.15 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 24.29 (2CH_2), 29.02 (2CH_2), 36.83 (CH_2), 37.91 (CH_3), 55.22 (2CH_3), 65.86 (CH_2), 111.91 (2CH), 112.52 (2CH), 124.98 (2C), 126.44 (4C), 131.33 (2CH),

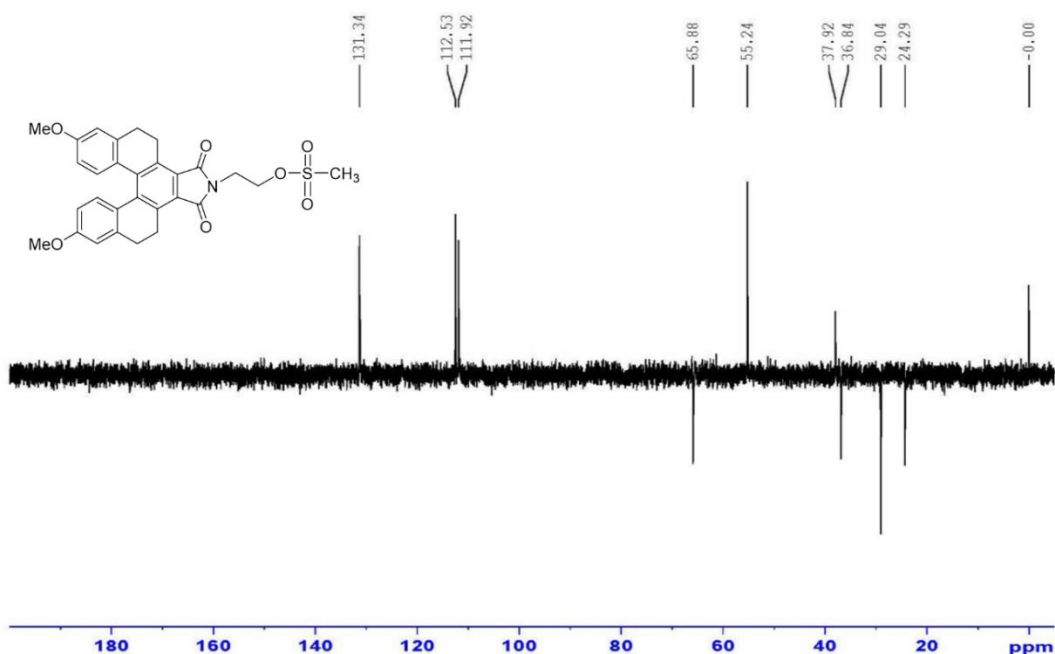
138.26 (2C), 140.98 (2C), 159.51 (2C), 168.60 (2C=O); HR-ESI MS calcd $C_{29}H_{27}NNaO_7S^+$ for $(M+Na)^+$ 556.1400 m/z, found 556.1404 m/z.



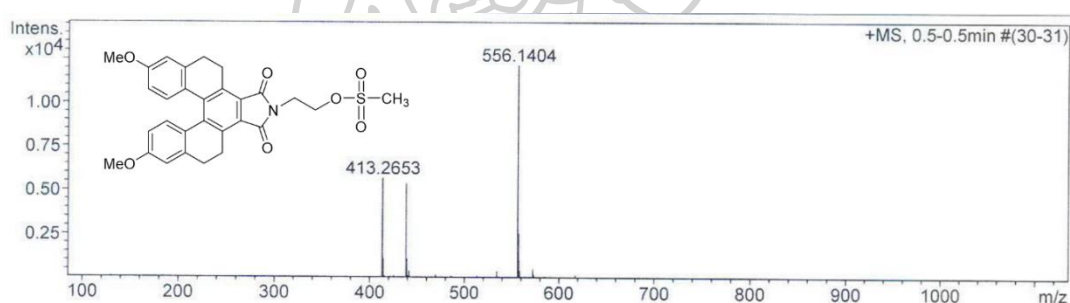
ภาพที่ 44 1H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ 5



ภาพที่ 45 ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารประกอบ 5



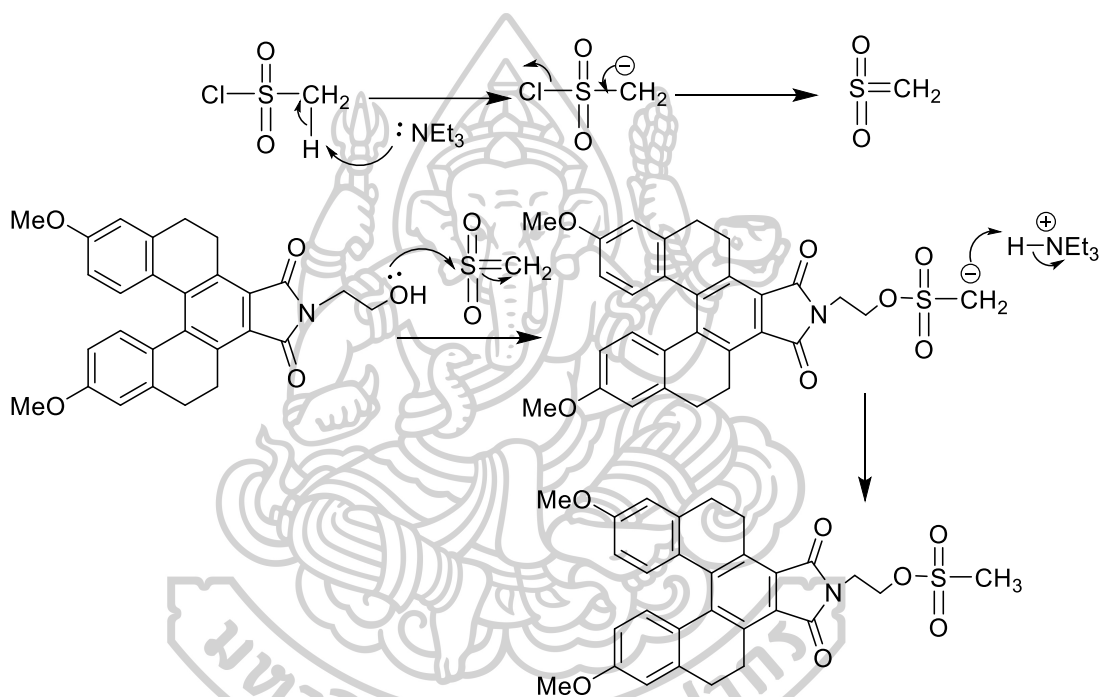
ภาพที่ 46 DEPT-135 NMR สเปกตรัมของสารประกอบ 5



ภาพที่ 47 HR-ESI MS สเปกตรัมของสารประกอบ 5

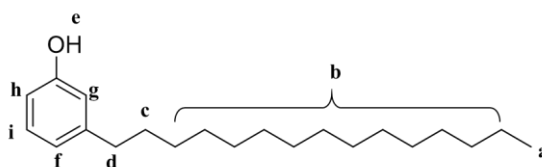
เมื่อพิจารณาโครงสร้างสารประกอบ 5 (ภาพที่ 43) และ ^1H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ 5 (ภาพที่ 44) แสดงให้เห็นสัญญาณของโปรตอน 10 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มแรกมีค่า chemical shift (δ) 2.40-2.60 ppm ลักษณะเป็น broad singlet เกิดจากโปรตอนของ methylene ($-\text{CH}_2$) บนคาร์บอนตำแหน่ง a ถัดมาที่ δ 2.80-2.90 ppm เกิดจากโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่ง b มีลักษณะเป็น multiplet ถัดมาสัญญาณของโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่ง c หรือโปรตอนของ mesyl group ($-\text{OMs}$) ที่ δ 3.06 ppm มีลักษณะเป็น singlet ถัดมาที่ δ 3.82 ppm ลักษณะเป็น singlet ที่มี integration สูงสุด เป็นของหกโปรตอนบนหมู่ methoxy หรือคาร์บอนตำแหน่ง d ถัดมาที่ δ 4.02 ppm เป็นสัญญาณของ methylene ($-\text{CH}_2$) บนคาร์บอน

ตำแหน่ง **e** ลักษณะเป็น triplet เนื่องจาก coupling กับสองโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่ง **f** ถัดมาที่ δ 4.05-4.08 ppm ลักษณะเป็น broad singlet เกิดจากโปรตอนของ methylene ($-\text{CH}_2$) บนคาร์บอนตำแหน่ง **f** ที่เชื่อมต่อหมู่ mesyl ($-\text{OMs}$) δ 6.53 6.82 และ 7.15 เป็นสัญญาณของโปรตอนบนวง aromatic จึงปรากฏสัญญาณที่ downfield กว่าโปรตอนกลุ่มอื่นๆ ทั้งนี้สามารถยืนยันโครงสร้างจาก HR-ESI MS โดยพบค่ามวลโมเลกุลเท่ากับ 478.1620 m/z (จากการคำนวณ $(\text{M}+\text{Na})^+$ ได้เท่ากับ 478.1625 m/z) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันจึงสามารถยืนยันได้ว่าเป็นโครงสร้างของสารประกอบ 5 จริง และมีการเสนอกลไกการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์แสดงดังภาพที่ 49



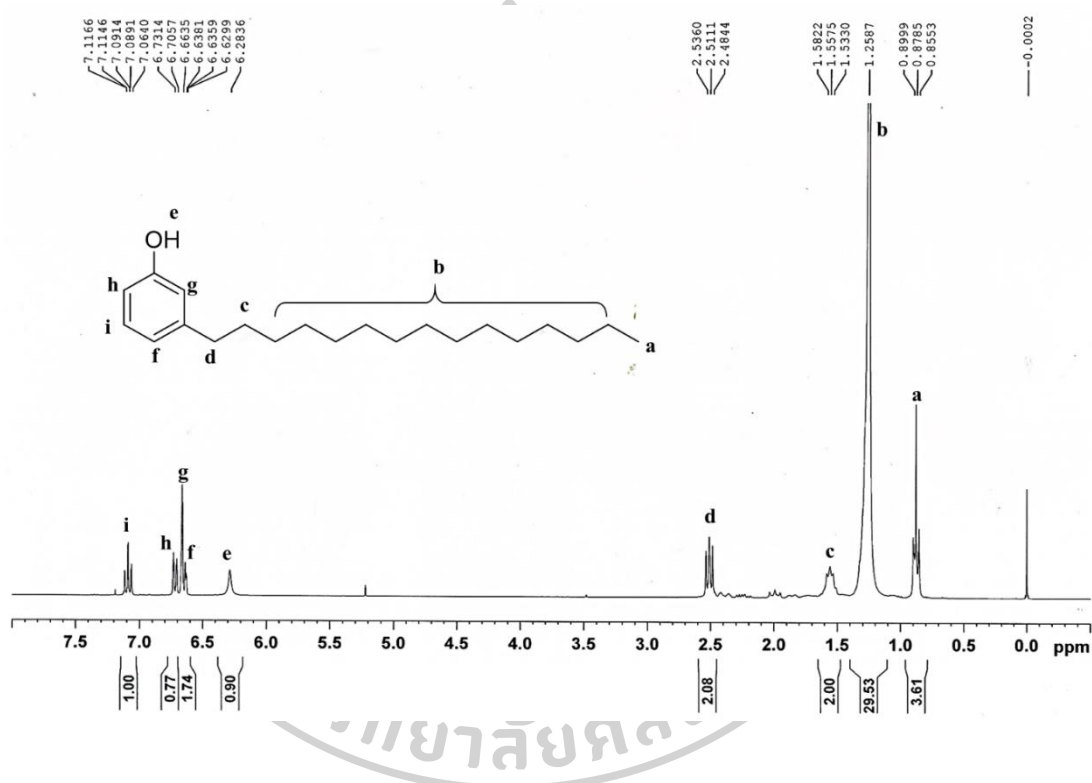
ภาพที่ 48 กลไกการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารประกอบ 5

1.4 โครงสร้างทางเคมีของ hydrogenated cardanol 7

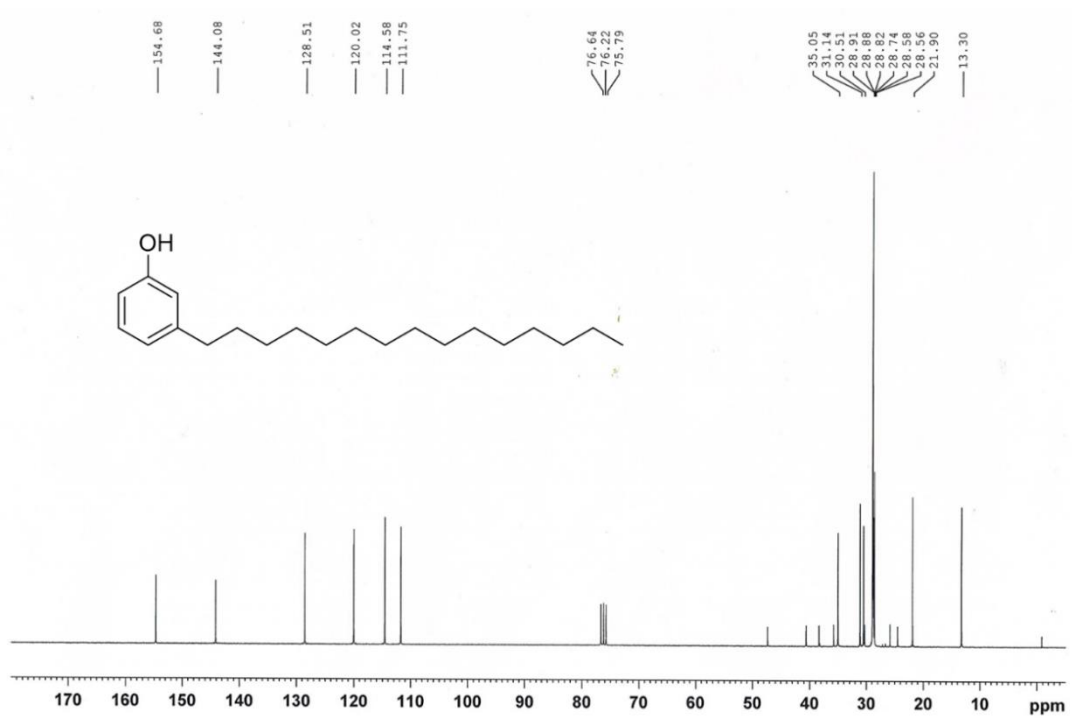


ภาพที่ 49 โครงสร้างทางเคมีของ hydrogenated cardanol 7

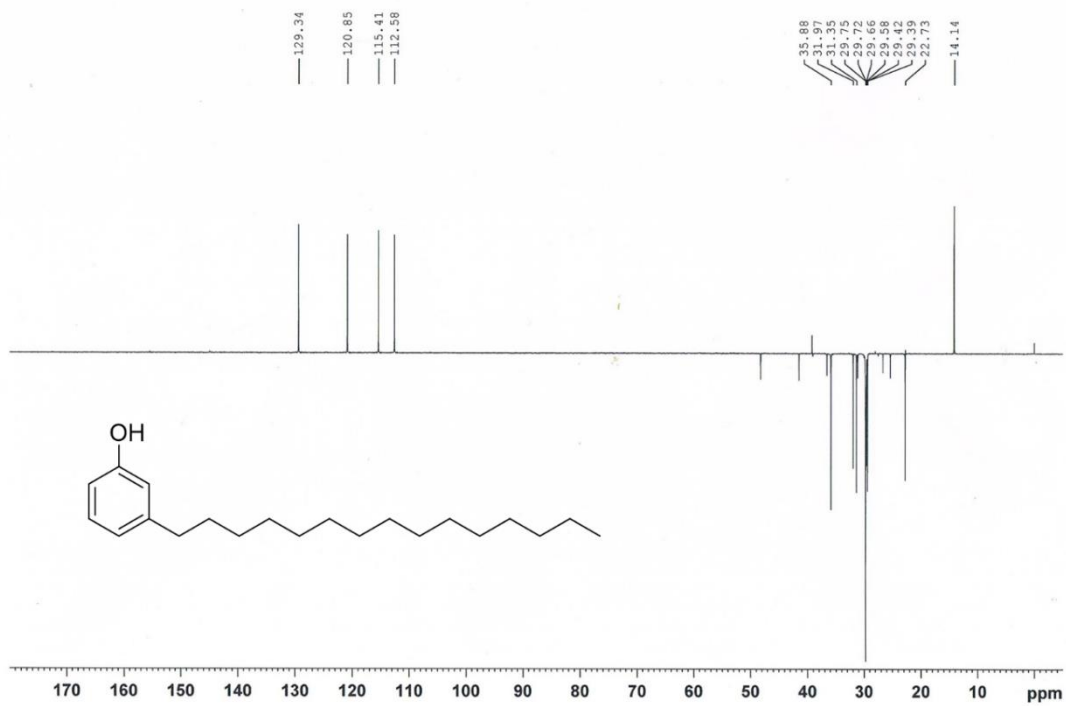
โครงสร้างทางเคมีของ hydrogenated cardanol **7** สามารถยืนยันโครงสร้างโดยวิธีทางสเปกโทรสโกปี $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 0.87 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H), 1.25 (s, 24H), 1.55 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.51 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 6.28 (s, 1H), 6.64 (t, $J = 1.2$ Hz, 1H), 6.66 (s, 1H), 6.72 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.09 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H) $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 13.30 (CH_3), 21.90 (CH_2), 28.74 (CH_2), 28.88 (9CH_2), 30.51 (CH_2), 31.14 (CH_2), 35.05 (CH_2), 111.75 (CH), 114.58 (CH), 120.02 (CH), 128.51 (CH), 144.08 (C), 154.68 (C)



ภาพที่ 50 $^1\text{H NMR}$ สเปกตรัมของ hydrogenated cardanol **7**



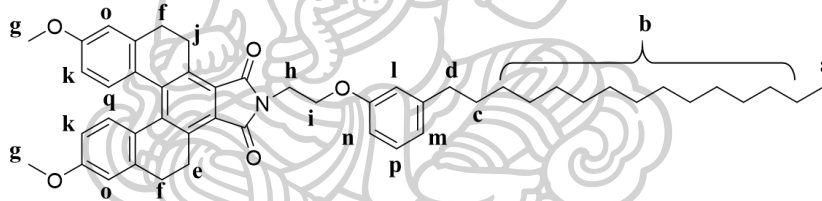
ภาพที่ 51 ^{13}C NMR สเปกตรัมของ hydrogenated cardanol 7



ภาพที่ 52 DEPT-135 NMR สเปกตรัมของ hydrogenated cardanol 7

เมื่อพิจารณาโครงสร้าง hydrogenated cardanol **7** (ภาพที่ 49) และ ^1H NMR สเปกตรัมของ hydrogenated cardanol **7** (ภาพที่ 50) แสดงให้เห็นสัญญาณของโปรตอน 9 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มแรกมีค่า chemical shift (δ) 0.87 ppm เป็นสัญญาณของโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่ง **a** ลักษณะเป็น triplet เกิดจากการ coupling กับสองโปรตอนข้างเคียง ถัดมาที่ค่า chemical shift (δ) 1.25 ppm เป็นสัญญาณของโปรตอนสายโซ่ไฮโดรคาร์บอนทั้งหมด 24 โปรตอน ถัดมาที่ δ 1.55 ppm เป็นสัญญาณของ methylene group ($-\text{CH}_2$) บนคาร์บอนตำแหน่ง **c** ถัดมาเป็นสัญญาณลักษณะ triplet ที่ δ 2.51 ppm ของโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่ง **d** ซึ่งเกิดการ coupling กับสองโปรตอนข้างเคียง ถัดมาที่ δ 6.28 ppm เป็น labile proton ของ hydroxyl group และที่ δ 6.64, 6.66, 6.72 และ 7.09 ppm เป็นสัญญาณโปรตอนทั้งสี่บนวง aromatic จึงปรากฏสัญญาณโปรตอนที่ downfield กว่าโปรตอนตำแหน่งอื่นๆ

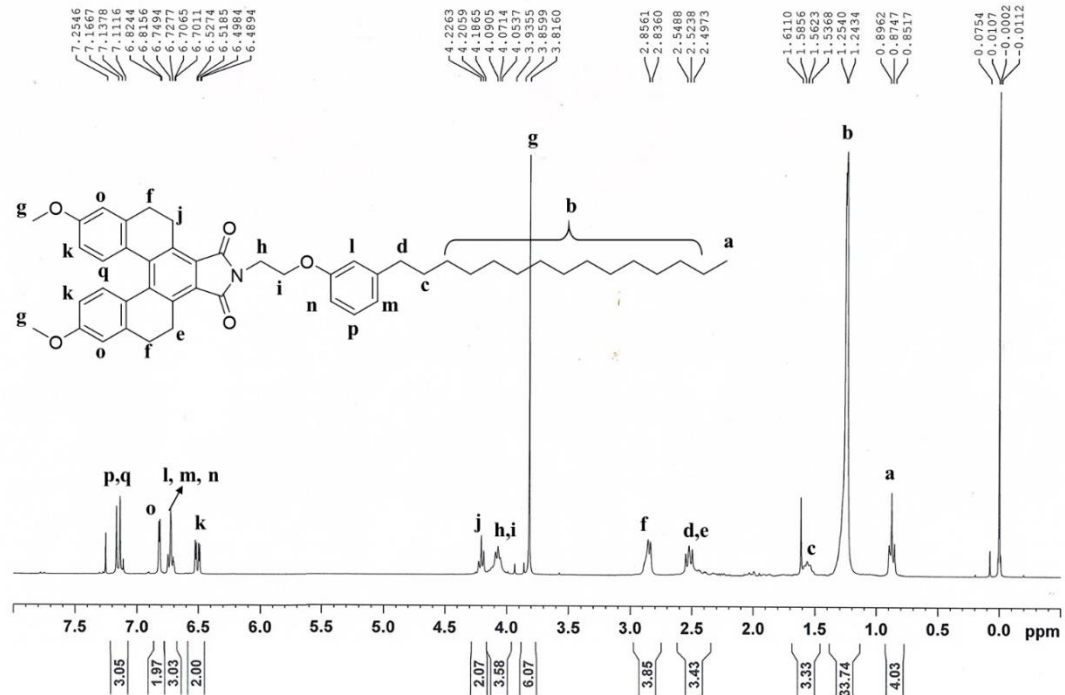
1.5 โครงสร้างทางเคมีของสารทำเครื่องหมายน้ำมัน MCA



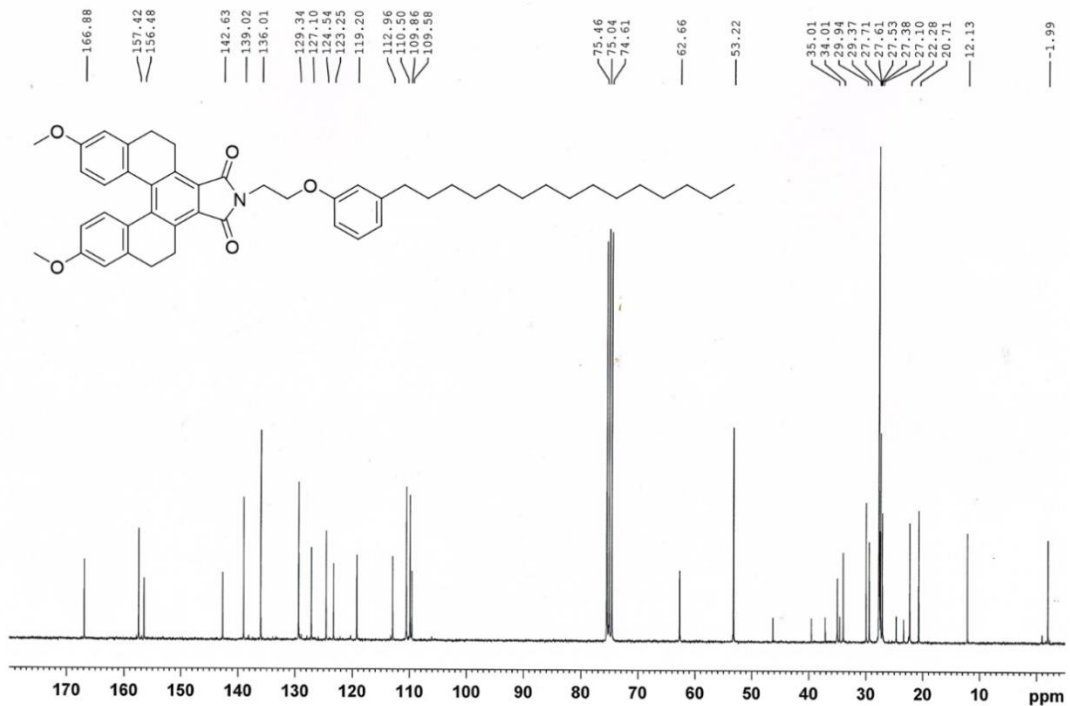
ภาพที่ 53 โครงสร้างทางเคมีของสารทำเครื่องหมายน้ำมัน MCA

โครงสร้างทางเคมีของสารทำเครื่องหมายน้ำมัน MCA สามารถยืนยันโครงสร้างโดยวิธีทางสเปกโทรสโกปี $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) 0.87 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H), 1.25 (s, 24H), 1.56 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.52 (t, $J = 7.3$ Hz, 4H), 2.85 (d, $J = 6.0$ Hz, 4H), 3.82 (s, 6H), 4.07 (m, 4H), 4.21 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 6.51 (dd, $J = 2.7$ Hz, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.72 (m, 3H), 6.82 (d, $J = 2.6$ Hz, 2H), 7.14 (t, $J = 8.3$ Hz, 3H) ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm) 12.13 (CH_3), 20.71 (CH_2), 22.28 (2CH_2), 27.10 (2CH_2), 27.38 (CH_2), 27.53 (2CH_2), 27.61 (CH_2), 27.71 (6CH_2), 29.37 (CH_2), 29.94 (CH_2), 34.01 (CH_2), 35.01 (CH_2), 53.22 (2CH_3), 62.66 (CH_2), 109.58 (CH), 109.86 (2CH), 110.50 (2CH), 112.96 (CH), 119.20 (CH), 123.25 (2C), 124.54 (2C), 127.10 (CH), 129.34 (2CH), 136.01 (4C), 139.02 (2C), 142.63 (C), 156.48 (C),

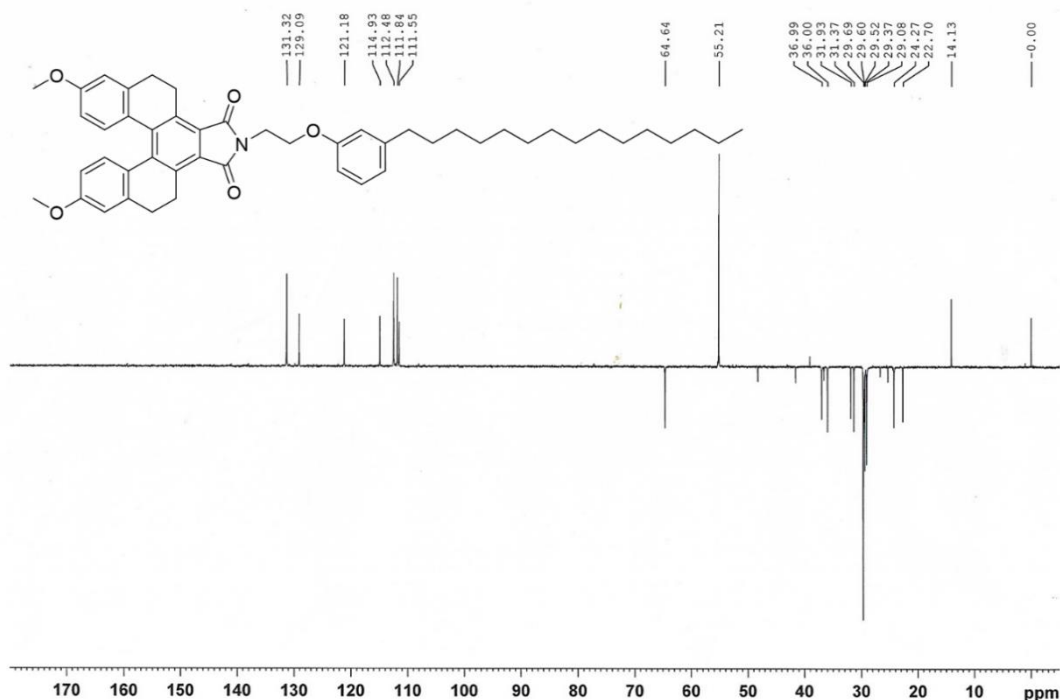
157.42 (2C), 166.88 (2C=O) HR-ESI MS calcd $C_{49}H_{60}NO_5^+$ for $(M+H)^+$ 742.4466 m/z, found 742.4528 m/z.



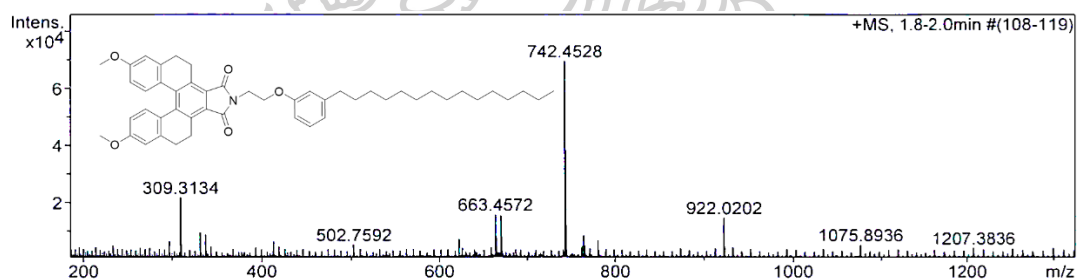
ภาพที่ 54 1H NMR สเปกตรัมของสารทำเครื่องหมายน้ำมัน MCA



ภาพที่ 55 ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารทำเครื่องหมายน้ำมัน MCA



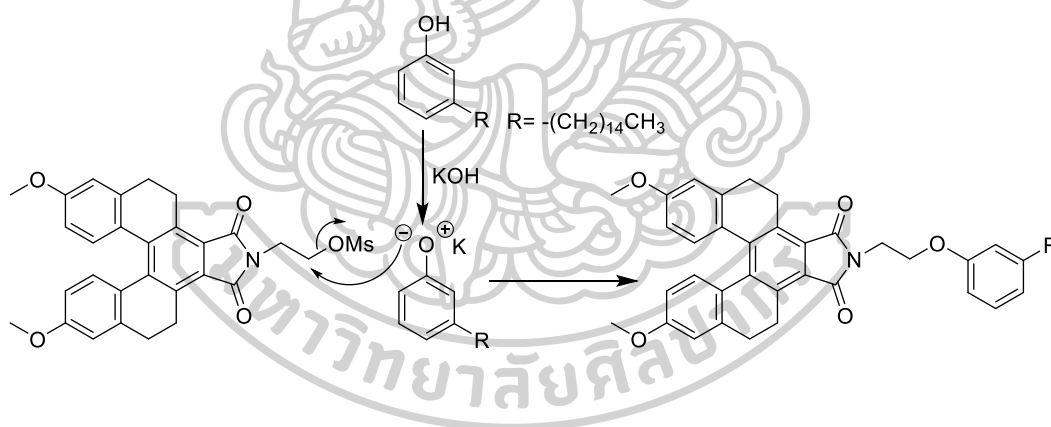
ภาพที่ 56 DEPT-135 NMR สเปกตรัมของสารทำเครื่องหมายน้ำมัน MCA



ภาพที่ 57 HR-ESI MS สเปกตรัมของสารทำเครื่องหมายน้ำมัน MCA

เมื่อพิจารณาโครงสร้างสารทำเครื่องหมายน้ำมัน MCA (ภาพที่ 53) และ ^1H NMR สเปกตรัมของสารทำเครื่องหมายน้ำมัน MCA (ภาพที่ 54) แสดงให้เห็นสัญญาณของโปรตอน 12 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มแรกมีค่า chemical shift (δ) 0.87 ppm เป็นสัญญาณของโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่ง **a** ลักษณะเป็น triplet เกิดจากการ coupling กับสองโปรตอนข้างเคียง ถัดมาที่ค่า chemical shift (δ) 1.25 ppm เป็นสัญญาณของโปรตอนสายโซ่ไฮโดรคาร์บอนทั้งหมด 24 โปรตอน ถัดมาที่ δ 1.55 ppm เป็นสัญญาณของ methylene group ($-\text{CH}_2$) บนคาร์บอนตำแหน่ง **c** ถัดมา δ 2.52 ppm มีลักษณะเป็น triplet ของสัญญาณโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่ง **d** ที่เกิดการ coupling กับสอง

โปรตอนข้างเคียง จะเห็นว่าฐาน peak มีลักษณะ broad เนื่องจากมีสัญญาณของโปรตอนตำแหน่ง e ซึ่งมีลักษณะเป็น broad singlet ถูกซ้อนทับอยู่ด้วยที่ค่า chemical shift เดียวกัน โดยที่ค่าทับกับสัญญาณของโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่ง ถัดมาที่ค่า δ 2.85 ppm เป็นสัญญาณสี่โปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่ง f ถัดมาที่ δ 3.82 ppm ลักษณะเป็น singlet ที่มี integration สูงสุด เป็นของหกโปรตอนบนหมู่ methoxy หรือคาร์บอนตำแหน่ง g ถัดมาที่ δ 4.07 ppm เป็นสัญญาณของ methylene ($-\text{CH}_2$) 2 กลุ่มบนคาร์บอนตำแหน่ง h และ i เนื่องจาก methylene ทั้งสองหมู่เชื่อมต่อกับอะตอมของออกซิเจนและไนโตรเจน ทำให้สัญญาณโปรตอนทั้งสี่มีค่าใกล้เคียงกัน ถัดมาที่ δ 4.20 ppm เป็นสัญญาณโปรตอนของ methylene group ($-\text{CH}_2$) ที่ตำแหน่ง j และที่ δ 6.51, 6.72, 6.82, และ 7.14 ppm เป็นสัญญาณโปรตอนทั้งสิบบนวง aromatic จึงปรากฏสัญญาณโปรตอนที่ downfield กว่าโปรตอนตำแหน่งอื่นๆ ทั้งนี้สามารถยืนยันโครงสร้างจาก HR-ESI MS โดยพบค่ามวลโมเลกุลเท่ากับ 742.4528 m/z (จากการคำนวณ $(\text{M}+\text{H})^+$ ได้เท่ากับ 742.4466 m/z) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันจึงสามารถยืนยันได้ว่าเป็นโครงสร้างของสารทำเครื่องหมายน้ำมัน MCA จริงและสามารถเสนอกลไกการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์แสดงดังภาพที่ 58



ภาพที่ 58 กลไกการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารทำเครื่องหมายน้ำมัน MCA

2. การทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจจับไอออนทองแดงและไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ของเซ็นเซอร์ MNH ในตัวทำละลายผสมระหว่าง acetonitrile และน้ำ ในอัตราส่วน 9:1 v/v

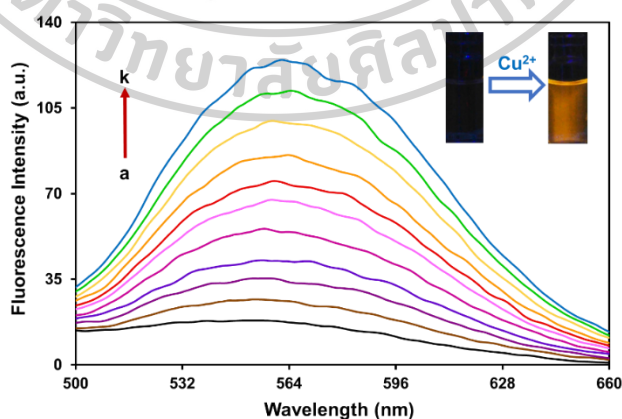
หลังจากสังเคราะห์และยืนยันโครงสร้างของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ MNH แล้ว จึงนำเซ็นเซอร์ที่ได้มาศึกษาสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรสโกปีเพื่อศึกษาความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) และความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนทองแดง (selectivity) อีกทั้งศึกษาการดักจับไอออนทองแดงในสภาวะที่มีไอออนรบกวนอื่นๆ อยู่ด้วย

(competitive) ผลของค่า pH ที่มีต่อการดักจับไอออนทองแดง อัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนด้วยวิธีของ Job (Job's plot) ค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออนทองแดง (Association constant; K_{assoc}) ค่าประสิทธิภาพเชิงควอนตัมทางฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence quantum yield; Φ_f) ศึกษาโครงสร้างโมเลกุลหลังจากเกิดอันตรกิริยากับไอออนทองแดง (molecular modeling) และประสิทธิภาพการตรวจวัดไอออนทองแดงในเซลล์สิ่งมีชีวิต

โดยการนำเซ็นเซอร์ MNH ที่สังเคราะห์ได้มาศึกษาประสิทธิภาพการดักจับไอออนทองแดงและไอออนออร์แกนิกชนิดอื่นๆ ในตัวทำละลายผสม $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (9:1 v/v) ทั้งนี้ไอออนทองแดงและไอออนโลหะทรานซิชัน ไอออนโลหะอัลคาไลน์ และอัลคาไลน์เอิร์ทชนิดต่างๆ เตรียมโดยนำเกลือเปอร์คลอเรต (perchlorate salt) ของโลหะแต่ละชนิดละลายในน้ำปราศจากไอออน (Deionized water)

2.1 ผลการทดสอบสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในสภาวะที่มีไอออนทองแดงในตัวทำละลายผสม $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (9:1 v/v)

การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ MNH ศึกษาในตัวทำละลายผสม $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (9:1 v/v) โดยติดตามสเปกตรัมของการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ (emission spectra) ของเซ็นเซอร์เมื่อเตรียมสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์เข้มข้น $1.0 \mu\text{M}$ ใช้ไอออนทองแดงในรูปแบบของเกลือเปอร์คลอเรต และกำหนดค่าความยาวคลื่นกระตุ้น (excitation wavelength: λ_{ex}) เท่ากับ 373 nm ผลการทดลองแสดงดังในภาพที่ 59



ภาพที่ 59 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{ex} = 373 \text{ nm}$ และ $\lambda_{em} = 556 \text{ nm}$) ของเซ็นเซอร์ MNH ($1.0 \mu\text{M}$) ในสารละลาย $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (9 : 1 v/v) ก่อนและหลังเติมไอออนทองแดงเปอร์คลอเรตที่

ความเข้มข้นต่างๆ a: 0.00 μM , b: 6.67 μM , c: 8.33 μM , d: 10.00 μM , e: 11.67 μM , f: 13.33 μM , g: 15.00 μM , h: 16.67 μM , i: 21.67 μM , j: 31.67 μM , k: 45.00 μM

จากผลการทดลองพบว่า การดักจับไอออนของเซ็นเซอร์ MNH กับไอออนทองแดงมีลักษณะการทำงานเป็นแบบ OFF-ON system ในตัวทำละลายผสม $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (9 :1 v/v) กล่าวคือสถานะที่ไม่มีไอออนทองแดงมีการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์เล็กน้อยในช่วงความยาวคลื่น 400-700 nm โดยมีความยาวคลื่นที่มีความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงสุด (λ_{em}) เท่ากับ 556 nm เมื่อวิเคราะห์ที่มีความยาวคลื่นกระตุ้น (λ_{ex}) 373 nm แต่เมื่อมีการเติมทองแดงเปอร์คลอเรตที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงไปพบว่า สัญญาณคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของ MNH จะเพิ่มขึ้น โดยการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์จะเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของไอออนทองแดงที่เติมลงไปในการละลาย พบว่าค่าความสามารถต่ำสุดของการตรวจวัดหาปริมาณทองแดงของเซ็นเซอร์ MNH (detection limit) มีค่าเท่ากับ 2.57 ppb ซึ่งวิธีการหาค่า detection limit สามารถคำนวณได้ดังนี้

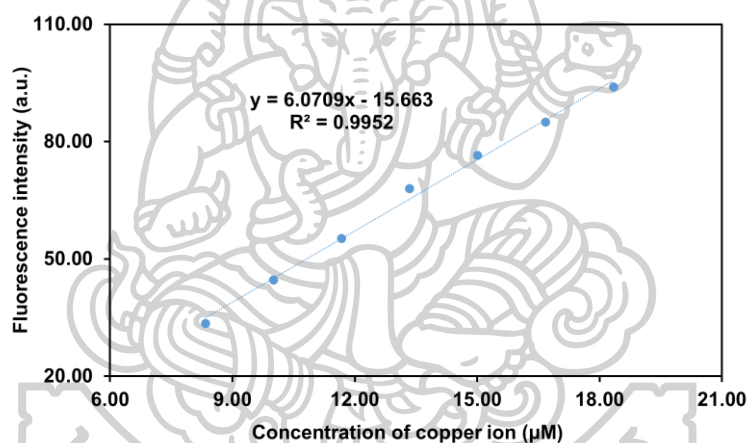
การคำนวณค่า detection limit กระทำโดยการพลอตกราฟค่าความเข้มข้นของทองแดงที่เติมลงไป (แกน x) กับ ค่าเฉลี่ยของสัญญาณ fluorescence intensity ที่จุดใดๆ (แกน y) เพื่อหาความชันของกราฟ (slope) จากนั้นนำมาคำนวณตามสมการที่ 6 โดยข้อมูลต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 7 และสร้างกราฟแสดงดังภาพที่ 60

$$\text{Detection limit} = \frac{3SD}{\text{slope}} \dots\dots\dots(6)$$

โดยที่ SD คือ ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ของ blank

ตารางที่ 7 แสดงข้อมูลที่ใช้ในการคำนวณค่า detection limit ของเซ็นเซอร์ MNH

[Cu ²⁺] (μM)	Fluorescence Intensity				
	1st	2nd	3rd	Avg.	SD
0.00	14.70	14.86	14.81	14.79	0.08
8.33	32.77	34.39	33.47	33.54	0.81
10.00	44.50	44.00	45.46	44.65	0.74
11.67	55.57	55.10	55.08	55.25	0.28
13.33	68.16	69.52	66.44	68.04	1.54
15.00	74.70	77.65	77.12	76.49	1.57
16.67	85.23	82.75	86.95	84.98	2.11
18.33	92.05	93.45	96.55	94.02	2.30



ภาพที่ 60 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น (λ_{em}) 556 nm และความเข้มข้นของไอออนทองแดงที่เติมลงไป

การคำนวณ

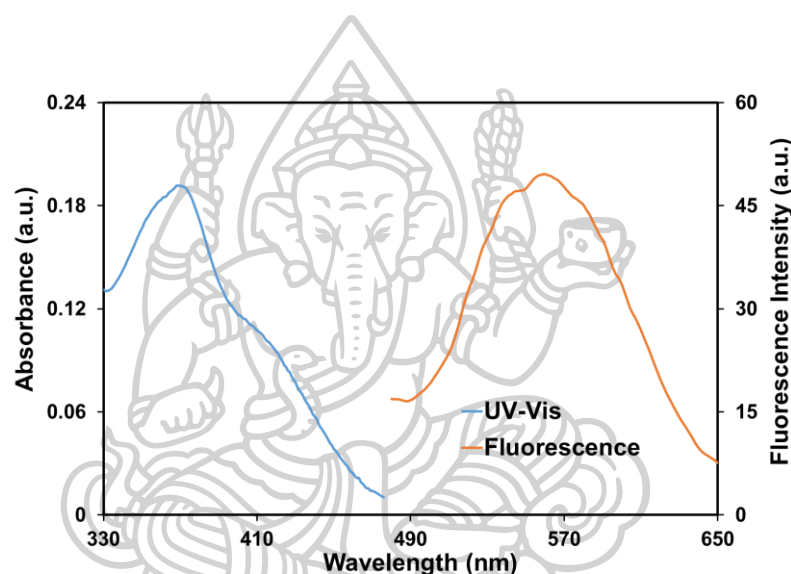
จากกราฟได้สมการเส้นตรงคือ $y = 6.0709x - 15.663$; $R^2 = 0.9794$ และจากการทดลองค่า SD ของ blank เท่ากับ 0.08

$$\begin{aligned}
 \text{ดังนั้น} \quad \text{Detection limit} &= (3 \times 0.08) / 6.0709 \\
 &= 0.04 \mu\text{M} \\
 &= 2.57 \text{ ppb.}
 \end{aligned}$$

ดังนั้น ค่าความสามารถต่ำสุดของการตรวจจับ (detection limit) กับไอออนทองแดงของเซ็นเซอร์ MNH เท่ากับ 2.57 ppb

2.2 การทดสอบความสามารถในการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตและการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ MNH ในสภาวะที่มีการเติมไอออนทองแดง

ผลการทดสอบสมบัติในการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตและการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ MNH หลังเติมไอออนทองแดงในตัวทำละลายผสม $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (9 :1 v/v) แสดงผลดังรูปที่ 61



ภาพที่ 61 การดูดกลืนแสง UV-Vis และการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ MNH ในตัวทำละลายผสม $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (9 :1 v/v) ในสภาวะหลังเติมไอออนทองแดง

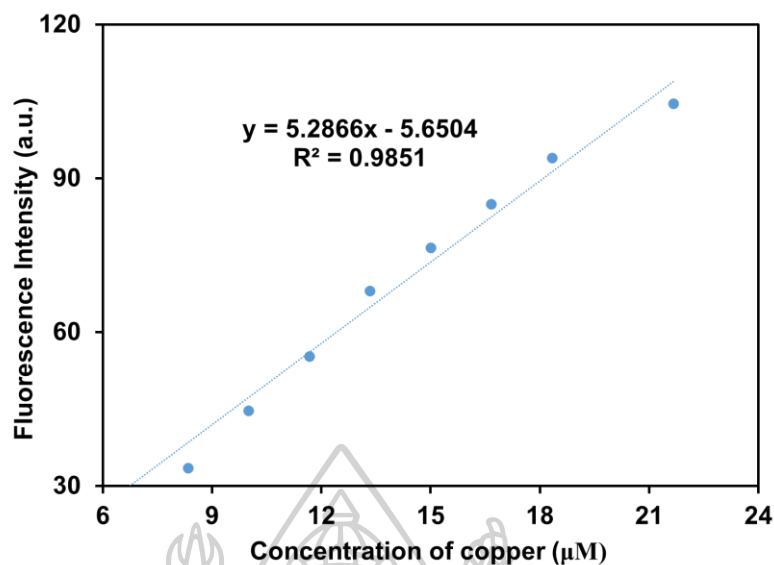
จากผลการทดลองพบว่าความยาวคลื่นที่เซ็นเซอร์มีการดูดกลืนแสงช่วง UV-Vis สูงที่สุดเท่ากับ 373 nm และค่าความยาวคลื่นที่มีการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงที่สุดเท่ากับ 556 nm แสดงให้เห็นว่ามี Stokes shift ที่กว้างถึง 183 nm ซึ่งการที่มีค่า Stokes shift กว้างเช่นนี้ทำให้ช่วยลดปัญหา self-absorption หรือการที่เซ็นเซอร์ดูดกลืนพลังงานบางส่วนจากในช่วงความยาวคลื่นที่เซ็นเซอร์คายแสงฟลูออเรสเซนซ์ออกมา ส่งผลให้การคายแสงของเซ็นเซอร์มีประสิทธิภาพลด นอกจากนี้ยังช่วยลดปัญหาเรื่องสัญญาณรบกวนจากแหล่งกำเนิดแสง (light source) ซึ่งเป็นประโยชน์ในการนำไปพัฒนาเป็นอุปกรณ์ทดสอบในภาคสนามและการตรวจวิเคราะห์ไอออนทองแดงในตัวอย่างทางชีวภาพได้

2.3 การหาช่วงความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรง (Working range) ของเซ็นเซอร์ MNH กับความเข้มข้นของไอออนทองแดง

Working range คือ ช่วงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์และความเข้มข้นของไอออนทองแดงที่มีลักษณะเป็นเส้นตรงสามารถทำได้ โดยพลอตกราฟระหว่างค่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ (แกน y) กับความเข้มข้นของไอออนทองแดงที่เติมลงไปหน่วย μM (แกน x) ณ จุดใดๆ โดยข้อมูลต่างๆ ของเซ็นเซอร์ MNH แสดงดังตารางที่ 8 และกราฟเส้นตรงแสดงดังรูปที่ 62

ตารางที่ 8 แสดงข้อมูลที่ใช้ในการพลอตกราฟเส้นตรงเพื่อหาช่วงความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรงของเซ็นเซอร์ MNH

$[\text{Cu}^{2+}] (\mu\text{M})$	Intensity
3.33	16.92
6.67	25.88
8.33	33.54
10.00	44.65
11.67	55.25
13.33	68.04
15.00	76.49
16.67	84.98
18.33	94.02
21.67	104.54

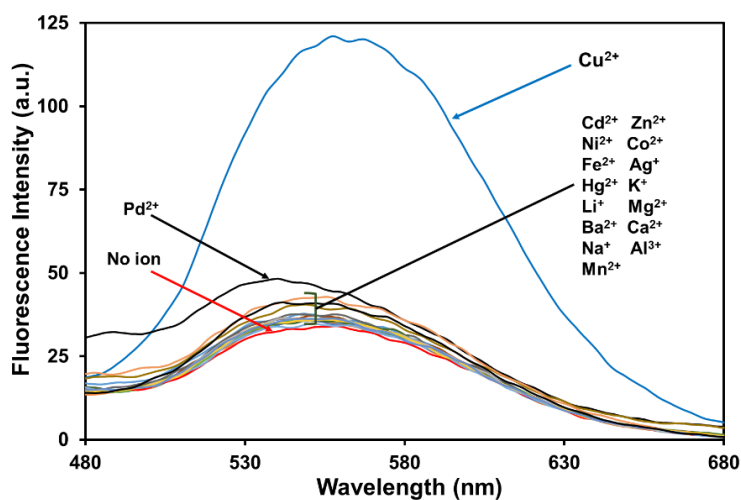


ภาพที่ 62 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ MNH กับค่าความเข้มข้นของไอออนทองแดงที่เติมลงไป ในตัวทำละลายผสม $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (9 :1 v/v)

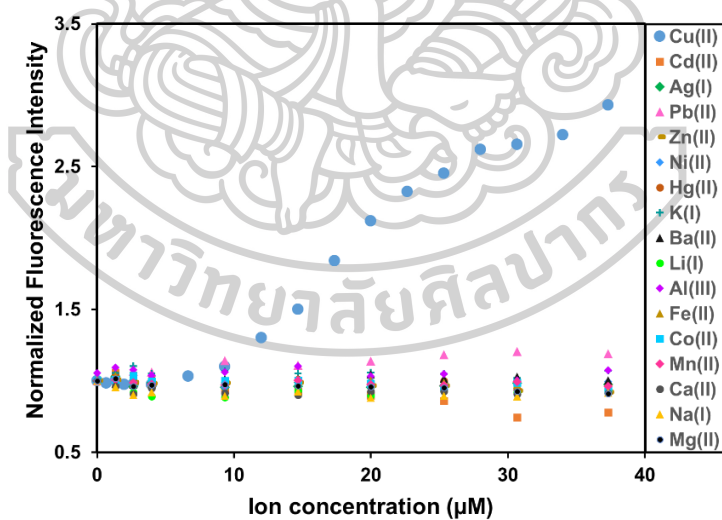
จากภาพที่ 62 จะเห็นว่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์และค่าความเข้มข้นของไอออนทองแดงมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง $3.33 \mu\text{M}$ ถึง $21.67 \mu\text{M}$ มีค่า $R^2 = 0.9851$ ซึ่งใกล้เคียง 1 มาก ดังนั้นช่วงความเข้มข้นดังกล่าวจึงเป็นช่วงที่เซ็นเซอร์ MNH สามารถตรวจวัดไอออนทองแดงได้ในตัวทำละลายผสม $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (9 :1 v/v)

2.4 ผลการทดสอบสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในสถานะที่มีไอออนทองแดงเทียบกับไอออนรบกวนอื่นๆ

ผลการทดสอบการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ MNH ในตัวทำละลายผสม $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (9:1 v/v) ในสถานะที่มีไอออนทองแดงและไอออนรบกวนอื่นๆ ดังนี้ Hg^{2+} Zn^{2+} Ag^+ Cd^{2+} Pb^{2+} Ni^{2+} Mg^{2+} K^+ Ba^{2+} Li^+ Al^{3+} Fe^{2+} Co^{2+} Mn^{2+} Ca^{2+} และ Na^+ แสดงดังภาพที่ 63 และ 64

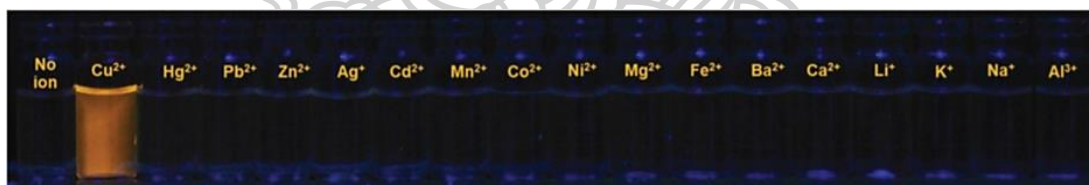


ภาพที่ 63 ผลการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{\text{ex}} = 373 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 556 \text{ nm}$) ของเซ็นเซอร์ MNH ($3.00 \mu\text{M}$) ในตัวทำละลายผสม $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (9:1 v/v) ในสถานะที่มีไอออนโลหะหนักชนิดต่างๆ ได้แก่ Cu^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} , Ag^+ , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Ba^{2+} , Li^+ , Al^{3+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} และ Na^+ ($37.0 \mu\text{M}$)



ภาพที่ 64 ผลการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{\text{ex}} = 373 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 556 \text{ nm}$) ของเซ็นเซอร์ MNH ($3.00 \mu\text{M}$) ในตัวทำละลายผสม $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (9:1 v/v) ในสถานะที่มีไอออนโลหะหนักชนิดต่างๆ ในความเข้มข้นที่ต่างกัน

ภาพที่ 64 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ MNH ที่ความยาวคลื่น 556 nm เมื่อให้พลังงานที่ความยาวคลื่นกระตุ้น 373 nm ในแนวแกน y และความเข้มข้นของไอออนโลหะหนักชนิดต่างๆ ในแนวแกน x พบว่าฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ MNH มีความจำเพาะเจาะจงกับไอออนทองแดงเมื่อเปรียบเทียบกับไอออนชนิดอื่นๆ ทั้งนี้ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อมีการเติมไอออนทองแดงลงไปในการละลายเซ็นเซอร์ MNH จะทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์อย่างชัดเจน ในขณะที่สัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์หลังเติมไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ได้แก่ Hg^{2+} Zn^{2+} Ag^+ Cd^{2+} Pb^{2+} Ni^{2+} Mg^{2+} K^+ Ba^{2+} Li^+ Al^{3+} Fe^{2+} Co^{2+} Mn^{2+} Ca^{2+} และ Na^+ ที่ความเข้มข้นเดียวกันกับไอออนทองแดง ($37.0 \mu\text{M}$) ไม่แสดงการเปลี่ยนแปลงหรือมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับความสัญญาณเริ่มต้น (สถานะที่ไม่มีไอออนโลหะใดๆ เจือปนในการละลายฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์) นอกจากนี้ ยังเป็นที่น่าสังเกตว่าฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ MNH ที่สังเคราะห์ได้นั้นแสดงความจำเพาะเจาะจงกับไอออนทองแดงได้ดีกว่าไอออนปรอทซึ่งโดยปกติแล้วไอออนชนิดนี้สามารถเกิดอันตรกิริยากับอะตอมไนโตรเจนได้เช่นเดียวกับไอออนทองแดง ซึ่งผลการทดลองที่กล่าวมาข้างต้นสอดคล้องกับผลการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเซ็นเซอร์ MNH ภายใต้แสง UV แสดงดังภาพที่ 65



ภาพที่ 65 การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเซ็นเซอร์ MNH ($10 \mu\text{M}$) ในตัวทำละลายผสม $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (9:1 v/v) ภายหลังจากการเติมไอออนโลหะหนักชนิดต่างๆ ดังนี้ Cu^{2+} Hg^{2+} Pb^{2+} Zn^{2+} Ag^+ Cd^{2+} Mn^{2+} Co^{2+} Ni^{2+} Mg^{2+} Fe^{2+} Ba^{2+} Ca^{2+} Li^+ K^+ Na^+ และ Al^{3+} ($30 \mu\text{M}$)

จะเห็นว่า มีเพียงขวดของสารละลายเซ็นเซอร์ที่เติมไอออนทองแดงลงไปเท่านั้นที่มีการเรืองแสงสีส้มปรากฏอย่างเห็นได้ชัด ดังนั้น จึงสามารถสรุปได้ว่า ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ MNH มีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนทองแดงสูง เนื่องจากไม่สามารถตรวจจับไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ได้ในระบบตัวทำละลายผสม $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (9:1 v/v)

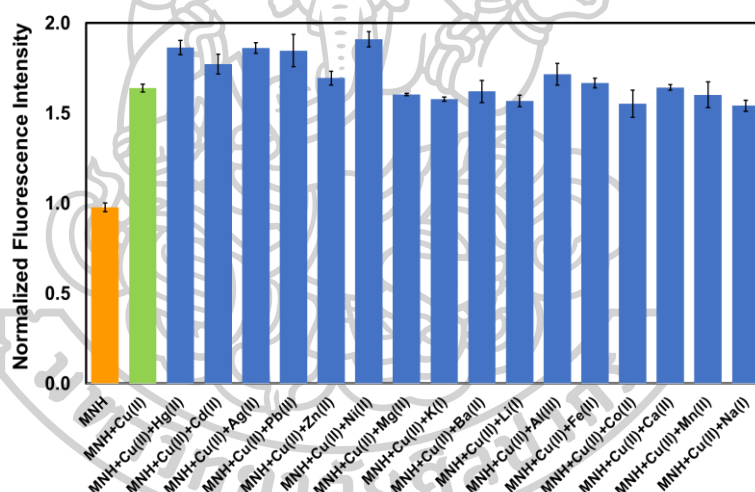
2.5 ผลการทดสอบความสามารถในการดักจับไอออนทองแดงในสถานะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ของเซ็นเซอร์ MNH (Competitive studies)

ทดสอบสมบัติการคายแสงของเซ็นเซอร์ MNH ในตัวทำละลายผสม $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (9:1 v/v) ในสถานะที่มีไอออนทองแดงร่วมกับไอออนรบกวนอื่นๆ ได้แก่ Cu^{2+} Hg^{2+} Pb^{2+} Zn^{2+} Ag^+ Cd^{2+} Mn^{2+} Co^{2+} Ni^{2+} Mg^{2+} Fe^{2+} Ba^{2+} Ca^{2+} Li^+ K^+ Na^+ และ Al^{3+} โดยในสารละลายมีปริมาณไอออนรบกวนอยู่ 1 เท่าของไอออนทองแดง โดยแสดงผลการทดลองในรูปกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า I_f/I_0 หรือ normalized fluorescence intensity (แกน y) และสารละลายเซ็นเซอร์ในสถานะที่มีการเติมไอออนโลหะชนิดต่างๆ ลงไป (แกน x)

เมื่อ I_0 = Fluorescence Intensity ของสารละลายเซ็นเซอร์ MNH ก่อนเติมไอออน

I_f = Fluorescence Intensity ของสารละลายเซ็นเซอร์ MNH หลังเติมไอออน

ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 66



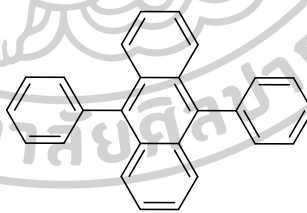
ภาพที่ 66 แสดงผลการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{\text{ex}} = 373 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 556 \text{ nm}$) ของเซ็นเซอร์ MNH ($1.0 \mu\text{M}$) ในตัวทำละลายผสม $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (9:1 v/v) ที่มีการเติมไอออนทองแดงเข้มข้น $50.0 \mu\text{M}$ ในสถานะที่มีไอออนรบกวนชนิดต่างๆ ได้แก่ Hg^{2+} Zn^{2+} Ag^+ Cd^{2+} Pb^{2+} Ni^{2+} Mg^{2+} K^+ Ba^{2+} Li^+ Al^{3+} Fe^{2+} Co^{2+} Mn^{2+} Ca^{2+} และ Na^+ 1 เท่า ($50.0 \mu\text{M}$)

จากภาพที่ 66 แสดงการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ MNH ($1.00 \mu\text{M}$) ในตัวทำละลายผสม $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (9:1 v/v) ที่มีการเติมไอออนทองแดงเข้มข้น $50.0 \mu\text{M}$ ในสถานะที่มีไอออนโลหะชนิดอื่น ได้แก่ Hg^{2+} Zn^{2+} Ag^+ Cd^{2+} Pb^{2+} Ni^{2+} Mg^{2+} K^+ Ba^{2+} Li^+ Al^{3+} Fe^{2+} Co^{2+} Mn^{2+}

Ca^{2+} และ Na^+ เจือปนอยู่ในระบบ ปริมาณ 1 เท่าของปริมาณไอออนทองแดง ($50.0 \mu\text{M}$) พบว่าเมื่อเติมไอออนทองแดงลงไปในการละลายของเซ็นเซอร์ MNH ค่า Normalized Fluorescence Intensity (I_f/I_0) มีค่าเท่ากับ 1.61 และเมื่อเติมไอออนชนิดอื่นลงไปในการละลายของเซ็นเซอร์ MNH ที่มีไอออนทองแดงอยู่พบว่าค่า I_f/I_0 มีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 1.49-1.86 แสดงให้เห็นว่าเซ็นเซอร์ MNH ยังคงประสิทธิภาพการดักจับไอออนทองแดงโดยแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์แบบ OFF-ON fluorescence switch ได้เช่นเดิม แม้ว่าในระบบที่ทำการตรวจวัดมีไอออนโลหะอื่นๆ ได้แก่ Hg^{2+} Zn^{2+} Ag^+ Cd^{2+} Pb^{2+} Ni^{2+} Mg^{2+} K^+ Ba^{2+} Li^+ Al^{3+} Fe^{2+} Co^{2+} Mn^{2+} Ca^{2+} และ Na^+ เจือปนอยู่ปริมาณ 1 เท่าของไอออนทองแดง

2.6 ผลการหาค่า Quantum yield ของเซ็นเซอร์ MNH

จากการทดลองพบว่าเมื่อให้พลังงานแก่เซ็นเซอร์ MNH ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น (λ_{ex}) เท่ากับ 373 nm ทำให้เกิดการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงสุดที่ความยาวคลื่น (λ_{em}) 530 nm ในสารละลาย acetonitrile การหาค่า quantum yield จะใช้ 9,10-diphenylanthracene[49-52] โครงสร้างแสดงดังภาพที่ 67 เป็นสารมาตรฐานทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง UV-Vis และการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์ในสภาวะก่อนและหลังเติมไอออนทองแดง จากนั้นนำมาพลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ เพื่อหาค่าความชันของกราฟเส้นตรงเพื่อนำคำนวณตามสมการที่ 7



รูปที่ 67 โครงสร้างทางเคมีของ 9,10-diphenylanthracene

$$Q_x = Q_{\text{std}} \left(\frac{\text{Slope}_x}{\text{Slope}_{\text{std}}} \right) \left(\frac{n_x^2}{n_{\text{std}}^2} \right) \dots\dots\dots(7)$$

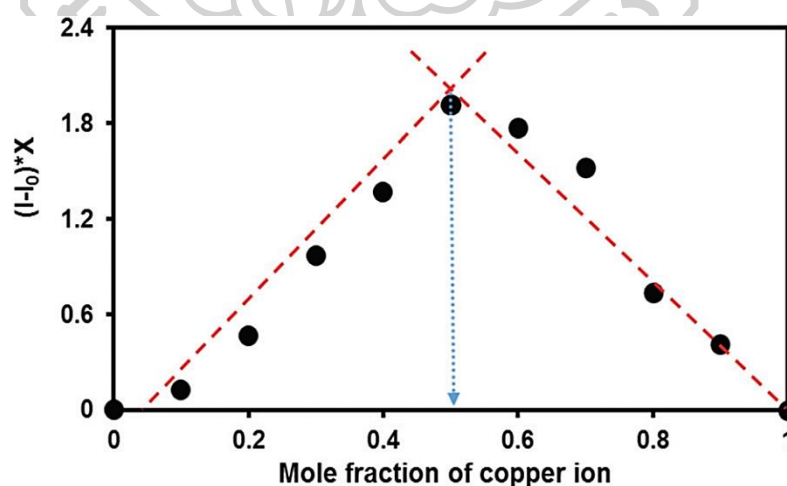
เมื่อ Q_x = Quantum yield ของสารตัวอย่าง
 Q_{std} = Quantum yield ของสารมาตรฐาน

$Slope_x$	=	ค่าความชันจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์กับการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง
$Slope_{std}$	=	ค่าความชันจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์กับการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน
η_x	=	refractive index ของตัวทำละลายสารตัวอย่าง
η_{std}	=	refractive index ของตัวทำละลายมาตรฐาน

จากการคำนวณพบว่า เซ็นเซอร์ MNH มีค่า quantum yield เท่ากับ 0.49 ในสภาวะที่ไม่มี การเติมไอออนทองแดงและค่า quantum yield เท่ากับ 0.69 ในสภาวะที่มีการเติมไอออนทองแดง ลงไป 10 เท่า แสดงให้เห็นว่ากระบวนการ Photo induced electron transfer (PET) ถูกยับยั้งไป ทำให้การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์เพิ่มขึ้นเมื่อเซ็นเซอร์ดักจับกับไอออนทองแดง

2.7 ผลการหาอัตราส่วนการจับระหว่างเซ็นเซอร์ MNH กับ ไอออนทองแดงด้วยวิธีของ Job (Job's Plot) และค่าคงที่สมดุลของการเกิดไอออนเชิงซ้อน (Association constant; K_{assoc})

การทดลองเพื่อหาอัตราส่วนระหว่างโมเลกุลของเซ็นเซอร์ MNH กับไอออนทองแดงศึกษา โดยวิธี Job's plot ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 68



ภาพที่ 68 กราฟแสดงอัตราส่วนระหว่างโมเลกุลของเซ็นเซอร์ MNH กับไอออนทองแดงที่ใช้ในการ เกิด binding ศึกษาโดยวิธี Job's plot

จากผล Job's plot แสดงให้เห็นว่า เซ็นเซอร์ MNH หนึ่งโมเลกุลสามารถดักจับไอออนทองแดง เปอร์คลอเรต 1 โมเลกุล ($MNH : Cu^{2+} = 1:1$) จากนั้นจึงศึกษาค่าคงที่สมดุลของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไอออนทองแดงกับเซ็นเซอร์ (Association constant; K_{assoc}) โดยใช้สมการ Benesi-Hildebrand และสามารถคำนวณค่า K_{assoc} ได้เท่ากับ $1.35 \times 10^4 M^{-1}$

การคำนวณค่าคงที่สมดุลของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน (Association constant; K_{assoc}) โดยใช้สมการ Benesi-Hildebrand กระทำโดยพลอตกราฟค่า $1/[Cu^{2+}]$ (แกน x) กับ $1/(I_F - I_0)$ ที่จุดใดๆ (แกน y) และคำนวณตามสมการที่ 8

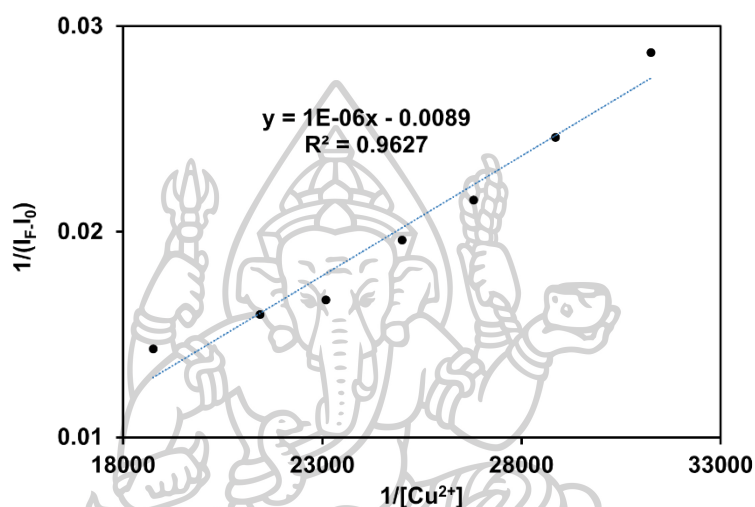
$$K_{assoc} = (1/\text{slope})(I_{\max} - I_{\min}) \quad \dots\dots\dots(8)$$

เมื่อ I_{\max} = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์ MNH ก่อนเติมไอออนทองแดง
 I_{\min} = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่มีค่าน้อยสุด
 I_0 = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์ MNH เริ่มต้นไม่มีไอออนทองแดงในสารละลาย
 I_F = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์ MNH ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของไอออนทองแดงในสารละลาย

ตารางที่ 9 แสดงข้อมูลค่าความเข้มข้นของไอออนทองแดงที่เติมลงไป $[Cu^{2+}]$, ค่า $1/[Cu^{2+}]$ (ความเข้มข้นของไอออนทองแดงที่เติมลงไป) ค่าความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์ MNH และ ค่า $1/(I_F - I_0)$ ที่ได้จากการคำนวณของเซ็นเซอร์ MNH ที่ λ_{ex} เท่ากับ 373 nm

$[Cu^{2+}]$ (10^{-5} M)	Intensity (I_F)	$1/[Cu^{2+}]^n$, ($\times 10^4$), ($n=1$)	$1/(I_F - I_0)$
3.20	64.48	3.13	0.029
3.47	70.32	2.88	0.025
3.73	76.07	2.68	0.022
4.00	80.65	2.50	0.020

[Cu ²⁺] (10 ⁻⁵ M)	Intensity (I _F)	1/[Cu ²⁺] ⁿ , (×10 ⁴), (n=1)	1/(I _F -I ₀)
4.33	89.53	2.31	0.017
4.67	92.22	2.14	0.016
5.33	99.57	1.88	0.014



ภาพที่ 69 กราฟจากการคำนวณตามสมการ Benesi-Hildebrand ของเซ็นเซอร์ MNH เมื่อ $n = 1$

การคำนวณ

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

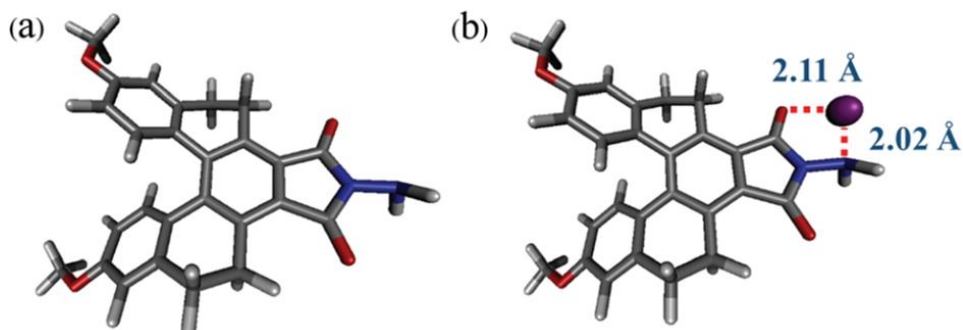
จากกราฟได้สมการเส้นตรงคือ $y = 1.0 \times 10^{-6}x + 0.0089$; $R^2 = 0.9627$

ซึ่ง $\text{slope} = 1.0 \times 10^{-6}$, $I_{\text{max}} = 103.92$, $I_{\text{min}} = 29.66$

$$\begin{aligned} \text{ดังนั้น} \quad K_{\text{assoc}} &= (1/(1.0 \times 10^{-6}))(103.92 - 29.66) \\ &= 1.35 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \end{aligned}$$

ดังนั้น อัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน ของเซ็นเซอร์ MNH ต่อการดักจับไอออนทองแดงเป็น หนึ่งต่อหนึ่ง (MNH: Cu²⁺ = 1:1) และสามารถคำนวณค่าคงที่สมดุลของการเกิดไอออนเชิงซ้อน, K_{assoc} ได้เท่ากับ $1.35 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ($n = 1$)

2.8 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซ็นเซอร์ MNH ในสภาวะก่อนและหลังดักจับไอออนทองแดงด้วยเทคนิคทาง molecular modeling



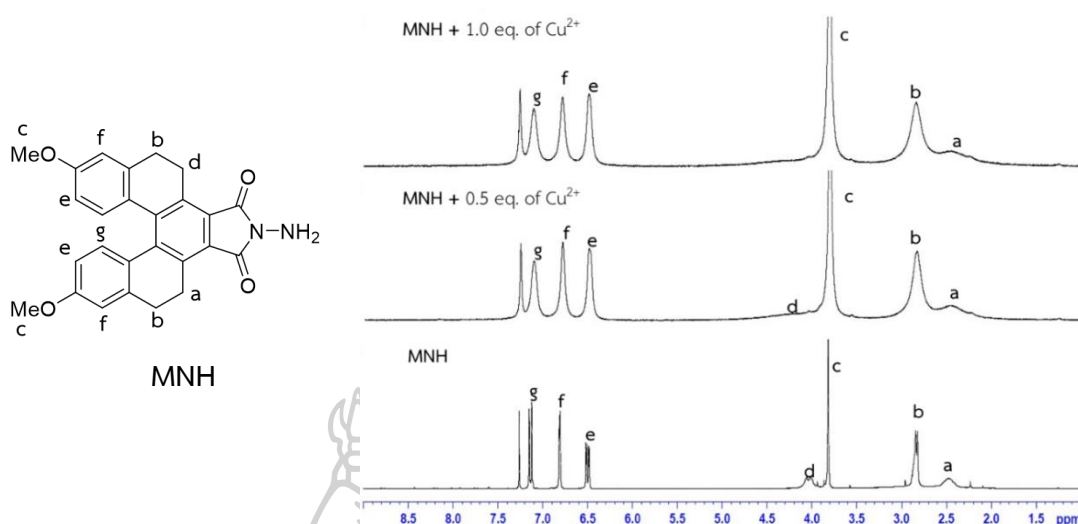
ภาพที่ 70 ลักษณะโครงสร้างของเซ็นเซอร์ MNH ที่ได้จากเทคนิค molecular modeling ; (a) โครงสร้างของเซ็นเซอร์ MNH ในสภาวะก่อนการดักจับไอออนทองแดง (b) โครงสร้างของเซ็นเซอร์ MNH ในสภาวะหลังดักจับไอออนทองแดง

จากการศึกษาทางเทคนิค molecular modeling ของเซ็นเซอร์ MNH เข้าจับกับไอออนทองแดงในสารละลาย acetonitrile พบว่าในการเกิดอันตรกิริยาระหว่างเซ็นเซอร์ MNH กับไอออนทองแดง จะเกิดการโคออดิเนตกับอะตอมไนโตรเจนของ hydrazine และอะตอมออกซิเจนของหมู่ carbonyl โดยมีระยะห่างระหว่างอะตอม เท่ากับ 2.02 และ 2.11 ตามลำดับ ดังภาพ 70 ซึ่งพลังงานการจับกันระหว่างเซ็นเซอร์กับไอออนทองแดงหนึ่งอะตอมของโครงสร้างที่เสถียรมีค่าเท่ากับ -3054.89 a.u.

2.8 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลง ^1H NMR สเปกตรัมของเซ็นเซอร์ MNH ในสภาวะก่อนและหลังการดักจับไอออนทองแดงด้วยเทคนิคทาง ^1H NMR spectrometry (^1H NMR titration)

การศึกษากการเปลี่ยนแปลง ^1H NMR สเปกตรัมของเซ็นเซอร์ MNH ในสภาวะก่อนและหลังดักจับไอออนทองแดง เพื่อยืนยันการเกิดอันตรกิริยาระหว่างเซ็นเซอร์กับไอออนทองแดง จะกระทำโดยการวิเคราะห์ ^1H NMR สเปกตรัมของเซ็นเซอร์ MNH ก่อนเติมไอออนทองแดงในตัวทำละลาย deuterated acetonitrile จากนั้นไตเตรทไอออนทองแดงในปริมาณ 0.5 eq และ 1.0 eq ลงไป สารละลายเซ็นเซอร์และนำไปวิเคราะห์ ^1H NMR สเปกตรัมอีกครั้ง เพื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของ

สเปกตรัมระหว่างสภาวะก่อนเติมและหลังเติมไอออนทองแดง ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 71 และตารางที่ 9



ภาพที่ 71 โครงสร้างทางเคมีของเซ็นเซอร์ MNH และ ^1H NMR สเปกตรัมของเซ็นเซอร์เปรียบเทียบระหว่าง สภาวะที่ไม่มีการเติมไอออนทองแดงและหลังเติมไอออนทองแดงปริมาณ 0.5 และ 1.0 eq.

ตารางที่ 10 ค่า chemical shift ของเซ็นเซอร์ MNH เปรียบเทียบระหว่างสภาวะที่ไม่มีการเติมไอออน ทองแดงและหลังเติมไอออนทองแดง

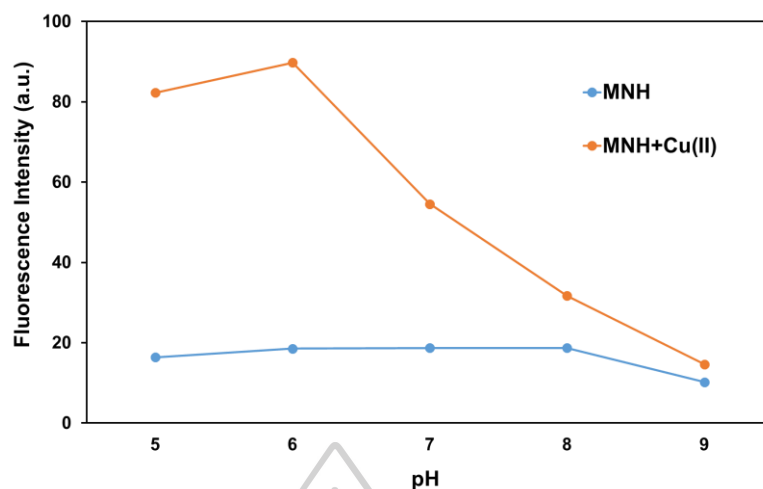
Proton	δ of MNH (ppm)	δ of MNH with 0.5 eq. of Cu^{2+} (ppm)	δ of MNH with 1.0 eq. of Cu^{2+} (ppm)
a	2.37-2.59	2.25-2.67	2.18-2.63
b	2.84	2.85	2.65-3.13
c	3.82	3.82	3.81
d	4.05	4.08-4.89	Not observed
e	6.50	6.50	6.49

Proton	δ of MNH (ppm)	δ of MNH with 0.5 eq. of Cu^{2+} (ppm)	δ of MNH with 1.0 eq. of Cu^{2+} (ppm)
f	6.80	6.80	6.79
g	7.15	7.12	7.11

จากผลสเปกตรัมในภาพที่ 71 จะเห็นว่าเมื่อมีการเติมไอออนทองแดงในสารละลายจะมีผลทำให้สัญญาณของ ^1H NMR มีลักษณะ broad เนื่องจากคุณสมบัติ paramagnetic ของไอออนทองแดง และเมื่อเติมไอออนทองแดง 0.5 eq ลงในสารละลายเช่นเซอร์พบว่าสัญญาณโปรตอนของ methylene (d) ที่ค่า δ 4.05 ppm จะเกิดการ shift ไปที่ upfield ขึ้นมาที่ δ ประมาณ 4.08-4.89 ppm และเมื่อเติมไอออนทองแดงลงไปเป็น 1.0 eq. พบว่าสัญญาณโปรตอนของ methylene (d) หายไปเนื่องจากเกิดการ shift ทาง upfield จนรวมกับ peak ของสัญญาณโปรตอน (e) ที่ δ ประมาณ 3.79 ppm ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาทาง molecular modeling ที่พบว่าไอออนทองแดงเกิดอันตรกิริยากับ donor atom ได้แก่ ไนโตรเจนอะตอมและออกซิเจนอะตอมของเซ็นเซอร์ MNH และเหนี่ยวนำให้สัญญาณ δ ของโปรตอนข้างเคียงเปลี่ยนแปลงไป

2.9 ผลการทดสอบการดักจับไอออนทองแดงของเซ็นเซอร์ MNH ในตัวทำละลายผสมระหว่าง CH_3CN : HEPES buffer (9:1 v/v) ที่ค่า pH ต่างกัน

เพื่อศึกษาผลกระทบของค่า pH ต่อประสิทธิภาพการดักจับไอออนทองแดงของเซ็นเซอร์ MNH จะศึกษาในระบบตัวละลายผสมระหว่าง CH_3CN : HEPES buffer (9:1 v/v) ที่ค่า pH 5.0-9.0 แสดงผลการทดลองดังภาพที่ 72

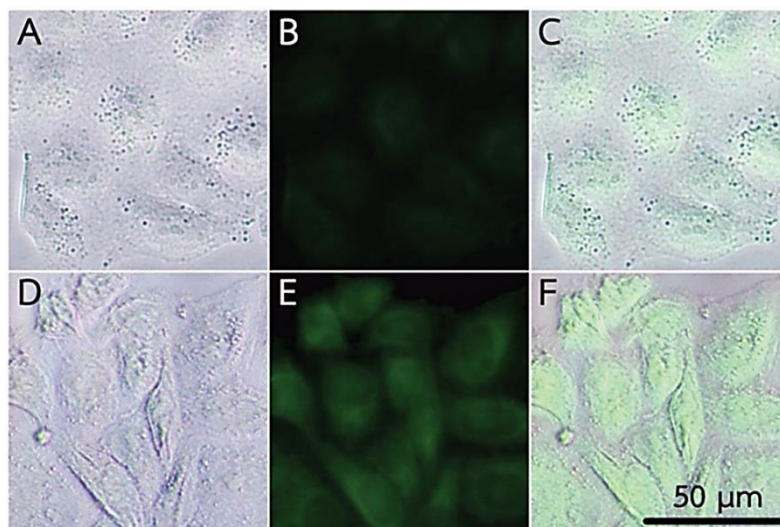


ภาพที่ 72 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{ex} = 373 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 556 \text{ nm}$) ของเซ็นเซอร์ MNH (2.40 μM) เมื่อเติมไอออนทองแดง Cu^{2+} (66.7 μM) ในตัวทำละลายบัฟเฟอร์ HEPES buffer ที่ pH 5.0-9.0

จากภาพที่ 72 จะเห็นว่าเซ็นเซอร์ MNH มีประสิทธิภาพการดักจับไอออนทองแดงลดลงเมื่อ pH มีค่าเพิ่มขึ้น โดยเซ็นเซอร์ทำงานได้ดีในช่วง pH 5-7.5 พิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ดีในช่วง pH ดังกล่าว และเนื่องจากค่า pH เฉลี่ยในสิ่งมีชีวิตเท่ากับ 7.20 จากผลการทดลองนี้จึงคาดว่าเซ็นเซอร์ MNH สามารถประยุกต์ใช้ในตัวอย่างเซลล์สิ่งมีชีวิตได้

2.10 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการดักจับไอออนทองแดงของเซ็นเซอร์ MNH ในเซลล์สิ่งมีชีวิต

สำหรับการศึกษาประสิทธิภาพการดักจับไอออนทองแดงในเซลล์สิ่งมีชีวิต ได้ทำการทดสอบใน HepG2 cell lines (hepatic cancer หรือ เซลล์มะเร็ง) โดยจะวิเคราะห์การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ที่อยู่ภายในเซลล์ ในสภาวะที่มีและไม่มีไอออนทองแดง ในตัวทำละลายบัฟเฟอร์ PBS (DMSO : PBS (1 : 9 v/v), pH 7.4) ได้ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 73



ภาพที่ 73 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการดักจับไอออนทองแดงของเซ็นเซอร์ MNH ใน HepG2 cells (A-C) ภาพถ่าย HepG2 cells ในสถานะที่มีเซ็นเซอร์ MNH แต่ไม่มี $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ (D-F): ภาพถ่าย HepG2 cells ในสถานะที่มีเซ็นเซอร์ MNH และ $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ 20 μm

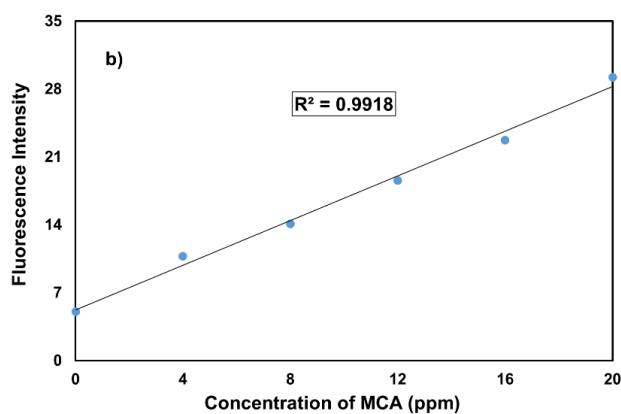
จากภาพที่ 73 จะเห็นว่าในสถานะที่ไม่มีไอออนทองแดงภายในเซลล์ เซ็นเซอร์ MNH จะแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ต่ำ (A-C) แต่เมื่อมีไอออนทองแดงในเซลล์ เซ็นเซอร์ MNH แสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์สูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัด (D-F) แสดงว่าเซ็นเซอร์ MNH สามารถตรวจวัดไอออนทองแดงภายในเซลล์สิ่งมีชีวิตได้ โดยมีการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ในระบบ OFF-ON fluorescence switch เมื่อดักจับไอออนทองแดงเช่นเดียวกับในระบบสารละลาย

3. ทดสอบความสามารถในการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence properties) และความสามารถในการตรวจวัดทางคุณภาพและปริมาณในน้ำมันเชื้อเพลิงของสารทำเครื่องหมายน้ำมัน MCA

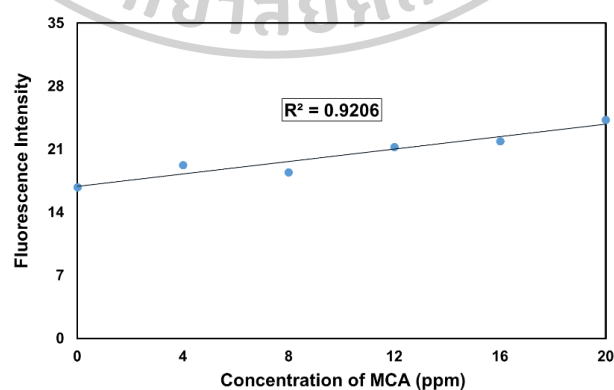
เมื่อสังเคราะห์และยืนยันโครงสร้างของสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิงแล้ว ต่อไปจะนำสารมาศึกษาสมบัติการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ ได้แก่ การตรวจสอบ Excitation spectrum และ Emission spectrum ของสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิงที่สังเคราะห์ได้ในน้ำมันชนิดต่างๆ จากนั้นนำมาศึกษาการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณในน้ำมันเชื้อเพลิง ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี ตรวจสอบความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) เสถียรภาพของสารในน้ำมัน (stability) รวมทั้งทดสอบคุณภาพของน้ำมันที่เติมสารทำเครื่องหมายแล้วตามมาตรฐาน ASTM

3.1 การทดสอบความสามารถการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารทำเครื่องหมายน้ำมัน MCA ในตัวอย่างน้ำมันเชื้อเพลิง gasohol 91 gasohol 95 และ diesel

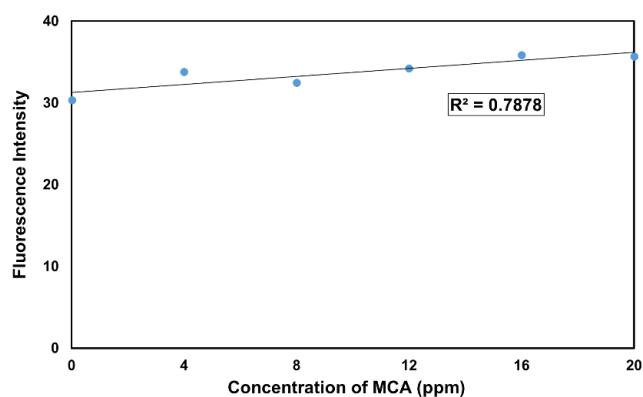
การทดสอบความสามารถในการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิง MCA ได้ศึกษาด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี น้ำมันเชื้อเพลิง 3 ชนิด ได้แก่ gasohol 91 gasohol 95 และ diesel เนื่องจากเป็นน้ำมันที่มีการจำหน่ายมากในท้องตลาด โดยวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารทำเครื่องหมายน้ำมันที่ความเข้มข้นต่างๆ ในน้ำมันแต่ละชนิด ที่ความยาวคลื่นการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ (λ_{em}) 525 nm เมื่อให้พลังงานที่ความยาวคลื่นกระตุ้น (λ_{em}) 395 nm จากนั้นนำมาพลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์และความเข้มข้นของสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิง เพื่อศึกษาแนวโน้มความเป็นเส้นตรงที่ดีที่สุดของการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ในน้ำมันแต่ละชนิด ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 74-76



รูปที่ 74 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์และความเข้มข้นของสารทำเครื่องหมายน้ำมัน MCA ในน้ำมัน gasohol 91



รูปที่ 75 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์และความเข้มข้นของสารทำเครื่องหมายน้ำมัน MCA ในน้ำมัน gasohol 95



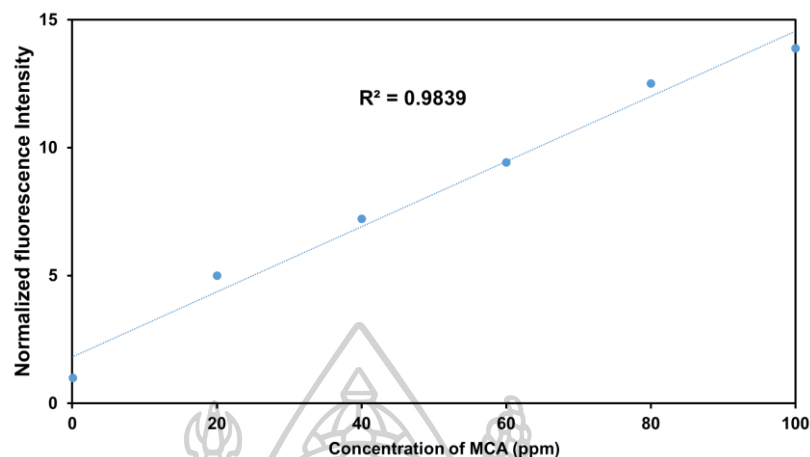
รูปที่ 76 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์และความเข้มข้นของสารทำเครื่องหมายน้ำมัน MCA ในน้ำมัน diesel

จากผลการทดลองข้างต้น จะเห็นว่าความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิง MCA ในน้ำมันเชื้อเพลิงชนิด gasohol 91 (ภาพที่ 74) มีแนวโน้มความเป็นเส้นตรงมากที่สุด และมีการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองในน้ำมันเชื้อเพลิงอีก 2 ชนิด ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากสารให้สีที่เติมลงไป ในน้ำมัน gasohol 95 และ diesel สำหรับแบ่งแยกชนิดน้ำมัน สามารถคายแสงได้ในช่วงความยาวคลื่นที่ทำการทดลอง ($\lambda_{em} = 525 \text{ nm}$) จึงทำให้เกิดการบดบังสัญญาณการคายแสงของสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิง MCA การเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จึงไม่ชัดเจนเท่าใน gasohol 91 ในการทดลองขั้นถัดไป คือการศึกษาเสถียรภาพของสารทำเครื่องหมายน้ำมันในตัวอย่างน้ำมันที่เลือกวิเคราะห์ (stability) ผู้วิจัยจึงเลือกที่จะศึกษา stability ของ สารทำเครื่องหมายน้ำมัน MCA ใน gasoline 91 เพราะมีการเปลี่ยนแปลงสัญญาณที่ชัดเจนที่สุด

3.2 การทดสอบเสถียรภาพของสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิง MCA ใน gasohol 91 (stability study)

เพื่อที่จะทดสอบเสถียรภาพของสารทำเครื่องหมายน้ำมันใน gasohol 91 จำเป็นต้องทำการทดลองเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารที่จะเติมลงไป ในน้ำมันก่อน โดยการทดสอบการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของ MCA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ใน gasohol 91 เพื่อพิจารณาความเป็นเส้นตรง และเลือกความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้อย่างมีนัยสำคัญ และต้องคำนึงถึงความ

เข้มข้นของสารที่เติมลงไปต้องไม่เปลี่ยนสีของน้ำมันไปจากเดิมเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 77



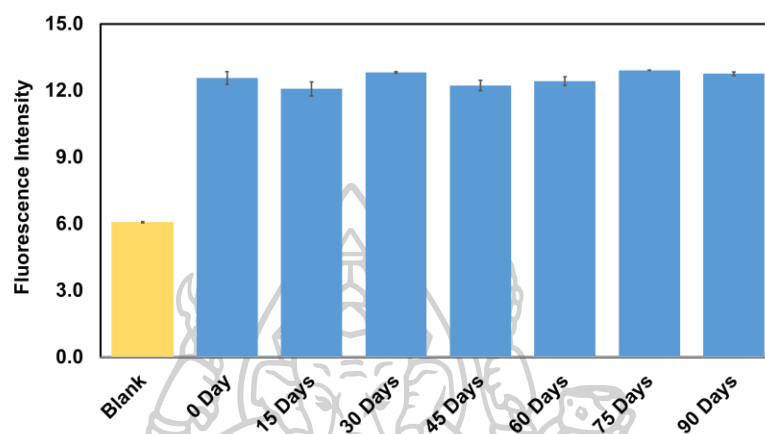
ภาพที่ 77 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์และความเข้มข้นของสารทำเครื่องหมายน้ำมัน MCA ในน้ำมัน gasohol 91 ($\lambda_{em} = 525 \text{ nm}$, $\lambda_{ex} = 395 \text{ nm}$)

จากผลการทดลองพบว่าความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์และความเข้มข้นของสารทำเครื่องหมายน้ำมัน MCA ใน gasohol 91 ในช่วง 20 ppm ถึง 100 ppm อยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรงที่ดี มีค่า R^2 เท่ากับ 0.9839 ดังนั้นเพื่อที่จะศึกษา stability ในลำดับต่อไป จึงเลือกใช้ความเข้มข้นต่ำสุดที่สารทำเครื่องหมายน้ำมันสามารถทำงานได้คือ 20 ppm โดยเมื่อเติมสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิง MCA เข้มข้น 20 ppm ลงในน้ำมัน gasohol 91 พบว่าไม่มีผลทำให้สีของน้ำมันเปลี่ยนไปเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า แสดงดังภาพที่ 78



ภาพที่ 78 สีของน้ำมัน gasohol 91 ก่อนและหลังเติมสารทำเครื่องหมายน้ำมัน MCA

เมื่อเลือกความเข้มข้นของ MCA ที่เหมาะสมสำหรับเติมลงไปในน้ำมัน gasohol 91 แล้ว ขั้นตอนต่อไปคือการทดสอบเสถียรภาพของสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิงในตัวอย่างน้ำมันที่เลือกวิเคราะห์ เพื่อทดสอบความเสถียรของสารทำเครื่องหมายน้ำมันเมื่ออยู่ในน้ำมันเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 3 เดือน ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 79



ภาพที่ 79 แสดงผลการศึกษา stability ของ สารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิง MCA ใน gasohol 91 ระยะเวลา 3 เดือน

จากภาพที่ 79 จะเห็นว่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารทำเครื่องหมายน้ำมัน MCA ใน น้ำมัน gasohol 91 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก แสดงว่าสารทำเครื่องหมายน้ำมัน MCA ไม่เกิดการสลายตัวใน gasohol 91 เป็นระยะเวลานานถึง 3 เดือน

บทที่ 5

สรุปผลการดำเนินงานวิจัย

ในวิทยานิพนธ์นี้ได้รายงานการสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดใหม่ทั้งหมด 2 ชนิดจากอนุพันธ์ของเพนตะเฮลิซีน ([5]helicene derivatives) ซึ่งถูกออกแบบโดยอาศัยปฏิกิริยาทางเคมีอินทรีย์เชื่อมต่อส่วนของไอโอฟอร์เข้าไปสำหรับใช้เป็นเซ็นเซอร์ตรวจจับไอออนทอง (MNH) และเชื่อมต่อกับโมเลกุลที่มีสายโซ่ไฮโดรคาร์บอนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการละลายน้ำมันและใช้เป็นสารทำเครื่องหมายในน้ำมันเชื้อเพลิง (MCA)

สำหรับฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ MNH สามารถสังเคราะห์ผ่านปฏิกิริยาเพียงขั้นตอนเดียว คือ ปฏิกิริยา imidation ระหว่าง [5]helicene anhydride กับ hydrazine โดยที่ hydrazine ทำหน้าที่เป็นไอออนโฟร์ และ [5]helicene ทำหน้าที่เป็นส่วนฟลูออโรฟอร์ จากการทดสอบประสิทธิภาพการตรวจจับไอออนโลหะหนักด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรสโกปีพบว่า มีความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจจับไอออนทองแดงในตัวทำละลายผสม $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (9:1 v/v) โดยแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนต์แบบ Turn-ON ในสภาวะที่มีการตรวจจับไอออนทองแดง ที่ความยาวคลื่น (λ_{em}) 556 nm เมื่อให้พลังงานที่ความยาวคลื่นกระตุ้น (λ_{ex}) 373 nm อัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเซ็นเซอร์และไอออนทองแดงเป็น 1:1 (MNH : Cu^{2+}) โดยไอออนทองแดงจะเกิดอันตรกิริยากับอะตอมไนโตรเจนของ hydrazine และอะตอมออกซิเจนของ carbonyl นอกจากนี้เซ็นเซอร์ MNH ยังสามารถทำงานได้ดีในช่วง pH ตั้งแต่ 5-7 และมี Stokes shift ที่กว้างซึ่งจะช่วยลดปัญหา self-absorption ทำให้สามารถนำเซ็นเซอร์มาประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดไอออนทองแดงในเซลล์สิ่งมีชีวิตได้ด้วย จากผลการศึกษาการตรวจวัดไอออนทองแดงของเซ็นเซอร์ MNH สามารถสรุปได้ดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 สรุปผลการทดสอบทางฟลูออเรสเซนต์ของเซ็นเซอร์ MNH

ไอออนที่สามารถตรวจจับได้	Cu^{2+}
ระบบสารละลาย	$\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (9:1 v/v)
ระบบการทำงาน	OFF-ON
Detection limit, ppb	2.57

Working range, μM	3.33 - 21.67
Association constant (K_{asso} , M^{-1})	1.35×10^4
Ratio(MNH : Cu^{2+})	1 : 1

สำหรับสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิง MCA ได้ออกแบบโดยเชื่อมต่อกับอนุพันธ์ของคาร์ดานอล (cardanol) ที่เป็นสารประกอบประเภท phenolic hydrocarbon เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการละลายน้ำมันให้กับโมเลกุล จากผลการทดลองพบว่า MCA สามารถละลายได้ดีในน้ำมัน และแสดงการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ดีที่สุดในน้ำมัน gasohol 91 ที่ความยาวคลื่นการคายแสง (λ_{em}) 525 nm มีช่วงความเข้มข้นที่สามารถตรวจวัดสัญญาณได้ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์เท่ากับ 20 ppm ถึง 100 ppm สามารถใช้เป็นสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิงสำหรับ gasohol 91 ได้ ที่ความเข้มข้น 20 ppm เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ได้ โดยไม่ส่งผลกระทบต่อสีและไม่สลายตัวเมื่อเติมลงไป ในน้ำมัน gasohol 91 นาน 3 เดือน แสดงให้เห็นว่าสารทำเครื่องหมายน้ำมัน MCA มีแนวโน้มที่ดีสำหรับใช้เป็นสารทำเครื่องหมายในน้ำมัน gasohol 91 ผลการทดสอบสมบัติทางฟลูออเรสเซนซ์ของสารทำเครื่องหมายน้ำมัน MCA แสดงดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 แสดงผลการทดสอบทางฟลูออเรสเซนซ์ของสารทำเครื่องหมายน้ำมัน MCA

ชนิดน้ำมันที่ทำงานได้	Gasohol 91
λ_{ex}	395
λ_{em}	525
ความเข้มข้นที่เติมในน้ำมัน, ppm	20
เทคนิคที่ใช้วิเคราะห์	Fluorescence spectroscopy

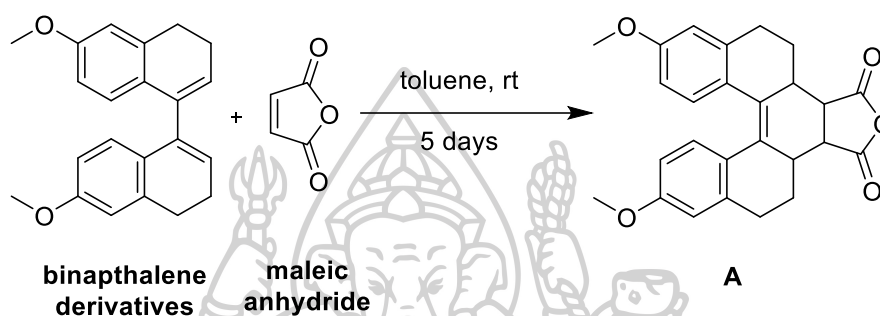


ภาคผนวก

การสังเคราะห์สารประกอบ 1

การสังเคราะห์สารประกอบหมายเลข 1 สามารถสังเคราะห์ผ่านการทำปฏิกิริยา 2 ขั้นตอน ดังนี้

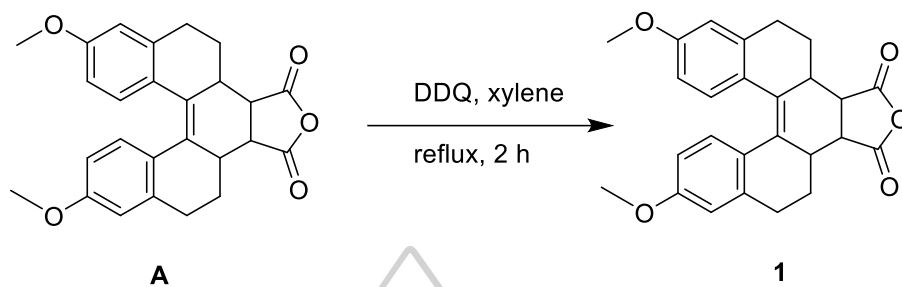
ขั้นที่ 1 ปฏิกิริยา Diels-Alder ระหว่างอนุพันธ์ของ binaphthalene กับ maleic anhydride ได้สารผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบ A ดังสมการปฏิกิริยาในรูปที่ 80



รูปที่ 80 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารประกอบ A

ซึ่งอนุพันธ์ของ binaphthalene 2.22 กรัม (6.287 มิลลิโมล) ลงในขวดก้นกลมขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายด้วยตัวทำละลาย toluene ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร กวนสารละลายอย่างรุนแรง และค่อยๆ เติม maleic anhydride 3.94 กรัม (34.9 มิลลิโมล) จากนั้นกวนสารละลายต่อไปที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน เมื่อครบกำหนดเวลานำมาละลายด้วยตัวทำละลาย dichloromethane (CH_2Cl_2) 50 มิลลิลิตร และสกัดกับน้ำปราศจากไอออน (deionized water) 50 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง เก็บสารละลายชั้น dichloromethane นำมากำจัดน้ำโดยเติม sodium sulfate anhydrous ($\text{anh. Na}_2\text{SO}_4$) ปริมาณเล็กน้อย จากนั้นนำสารละลายชั้น dichloromethane (CH_2Cl_2) มากำจัดตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator ภายใต้ระบบสุญญากาศ ทำการแยกบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography ในระบบสารละลายผสมระหว่าง Hexane:EtOAc (4:1 v/v) $R_f = 0.3$ จะได้สารประกอบ 1 ที่มีลักษณะเป็นสารสีน้ำตาล 2.0 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเท่ากับ 69%

ขั้นที่ 2 นำสารประกอบ **A** มาทำปฏิกิริยากับ 2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone หรือ DDQ ซึ่งเป็น oxidizing agent ได้สารผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบ **1** ดังสมการปฏิกิริยาในรูปที่ 81



รูปที่ 81 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารประกอบหมายเลข **1**

ชั่งสารประกอบ **1** 1.0 กรัม (2.40 มิลลิโมล) ลงในขวดก้นกลมขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายด้วยตัวทำละลาย xylene ปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร เติม DDQ 1.3 กรัม (6.00 มิลลิโมล) แล้วรีฟลักซ์สารละลายที่อุณหภูมิ 120 °C เมื่อครบกำหนดเวลานำสารละลายมากรองเพื่อกำจัด DDQ ที่เหลือออกไปพร้อมกับชะสารที่ติดอยู่ที่กระดาษกรองด้วยตัวทำละลาย dichloromethane (CH₂Cl₂) นำสารละลายที่ได้จากการกรองไปกำจัดตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้นเติมสารละลายผสมระหว่าง Hexane:EtOAc (7:1 v/v) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อละลายสารผลิตภัณฑ์และนำไปกำจัดตัวทำละลายอีกครั้ง จะได้สารประกอบ **1** ที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง 890 มิลลิกรัมคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเท่ากับ 89% และนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารเรืองแสงทั้งสองชนิดในงานวิจัยนี้ได้โดยไม่ต้องผ่านการแยกบริสุทธิ์

อุปกรณ์และสารเคมี

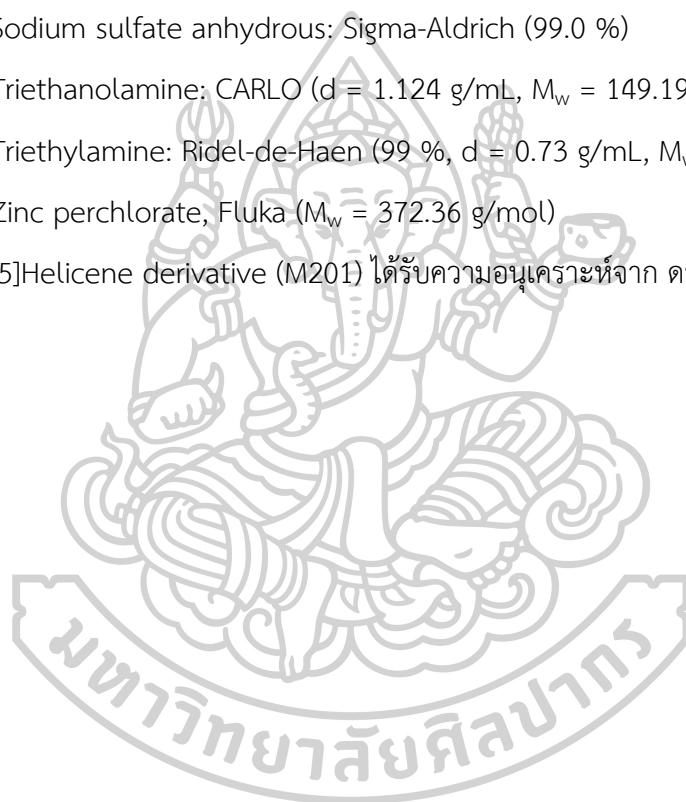
1. อุปกรณ์

- 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-55B
- 1.4 เครื่อง Mass spectrometer: ESI-FT-ICR (High resolution) Bruker BioAPEX 70e Spectrometer
- 1.5 X-Ray Diffraction spectrometer, Bruker Sc XRD D8 venture
- 1.6 เครื่อง Rotary evaporator: Buchi Rotavapor R-114
- 1.7 เครื่อง Vacuum pump: Tokyo Rikakikai Co., Ltd. model A-3S
- 1.8 เครื่อง Hot air oven: Binder model ED115 (E2)
- 1.9 เครื่องชั่งละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง): Denver instrument model S-234
- 1.10 เครื่องชั่งละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง): Mettler Toledo model AB204
- 1.11 เครื่อง Hotplate and stirrer: Framo model M21/1
- 1.12 Micropipette: Finn pipette, HH10711 ขนาด 1-10 μ l
- 1.13 TLC Silica gel 60 F254 aluminium sheet, Merck
- 1.14 อุปกรณ์สำหรับเตรียมแผ่น preparative TLC: Desaga Brinkmann
- 1.15 กระดาษกรอง: Advantec ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 110 mm
- 1.16 กระดาษกรอง: Advantec ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 70 mm
- 1.17 เครื่องแก้วพื้นฐาน
- 1.18 ชุดกรองแบบลดความดัน
- 1.19 Clamp และ Clamp Holder
- 1.20 Head space vial และ caps ขนาด 2 มิลลิลิตร
- 1.21 TLC Silica gel 60 F254 aluminium sheet, Merck

2. สารเคมี

- 2.1 Acetonitrile , LAB-SCAN, ($M_w = 41.05$ g/mol)
- 2.2 Aluminium perchlorate, Sigma-Aldrich ($M_w = 484.47$ g/mol)
- 2.3 Argon gas: Masser Specialty Gas Co., Ltd. (99.999 %)
- 2.4 Anhydrous sodium sulphate, Sigma-Aldrich
- 2.5 Barium perchlorate, Sigma-Aldrich ($M_w = 390.29$ g/mol)
- 2.6 Calcium perchlorate, Sigma-Aldrich ($M_w = 311.04$ g/mol)
- 2.7 Cadmium perchlorate hexahydrate, Strem chemical ($M_w = 311.30$ g/mol)
- 2.8 Cardanol substance (ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. อมร เพชรสม; จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
- 2.9 Chloroform D, Sigma-Aldrich
- 2.10 Cobalt perchlorate hexahydrate, Sigma-Aldrich ($M_w = 365.93$ g/mol)
- 2.11 Copper Perchlorate hexahydrate, Strem chemical ($M_w = 370.54$ g/mol)
- 2.12 Dichloromethane, MERCK, ($M_w = 84.93$ g/mol)
- 2.13 Dimethylformamide, LAB-SCAN, ($M_w = 73.10$ g/mol)
- 2.14 Diesel, PTT Public Company Limited
- 2.15 Ethanol, Fluka, ($M_w = 46.06$ g/mol)
- 2.16 Ethyl acetate (distillation)
- 2.17 Hydrazine hydrate, Sigma-Aldrich, ($M_w = 50.060$ g/mol)
- 2.18 Hexane, J.T. Baker
- 2.19 Glacial acetic acid, Sigma-Aldrich, ($M_w = 60.05$ g/mol)
- 2.20 Gasohol 91, PTT Public Company Limited
- 2.21 Gasohol 95, PTT Public Company Limited
- 2.22 Iron perchlorate hydrate, Sigma-Aldrich ($M_w = 354.22$ g/mol)
- 2.23 Lead perchlorate hydrate, Strem chemical ($M_w = 406.09$ g/mol)
- 2.24 Lithium perchlorate, Strem chemical ($M_w = 160.45$ g/mol)
- 2.25 Magnesium perchlorate hydrate, Fluka ($M_w = 253.84$ g/mol)
- 2.26 Methanol, Fluka, ($M_w = 32.04$ g/mol)

- 2.27 Mercuric perchlorate hydrate, Strem chemical ($M_w = 372.06$ g/mol)
- 2.28 Manganese perchlorate, Fluka ($M_w = 361.93$ g/mol)
- 2.29 Nickel perchlorate, Strem chemical ($M_w = 365.76$ g/mol)
- 2.30 Potassium hydroxide, Sigma-Aldrich ($M_w = 56.11$ g/mol)
- 2.31 Silver perchlorate monohydrate, Strem chemical ($M_w = 207.32$ g/mol)
- 2.32 Sodium hydroxide: Fluka (≥ 98.0 %, $M_w = 40.00$ g/mol)
- 2.33 Sodium perchloride, Strem chemical ($M_w = 122.44$ g/mol)
- 2.34 Sodium sulfate anhydrous: Sigma-Aldrich (99.0 %)
- 2.35 Triethanolamine: CARLO ($d = 1.124$ g/mL, $M_w = 149.19$ g/mol)
- 2.36 Triethylamine: Ridel-de-Haen (99 %, $d = 0.73$ g/mL, $M_w = 101.19$ g/mol)
- 2.37 Zinc perchlorate, Fluka ($M_w = 372.36$ g/mol)
- 2.38 [5]Helicene derivative (M201) ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. ธนศาสตร์; MTEC



รายชื่ออักษรย่อ

AAS	atomic absorption spectrometry
ACN	acetonitrile
aq.	aqueous
anh.	anhydrous
°C	degree Celsius
¹³ C NMR	carbon 13 nuclear magnetic resonance
d	doublet (NMR spectroscopy)
DFT	density functional theory
DI	deionized
DMSO	dimethyl sulfoxide
em	emission
Et ₃ N	triethylamine
eq.	equivalent
ex	excitation
FDA	Food and Drug Administration
g	gram
h	hour
¹ H NMR	proton nuclear magnetic resonance spectroscopy
HOMO	the highest occupied molecular orbital
HR-MS	high resolution mass spectrometry
Hz	Hertz
ICP-AES	inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry
K _{assoc}	association constant
KOH	potassium hydroxide
LDA	local density approximation
LUMO	the lowest unoccupied molecular orbital
m	multiplet (NMR spectroscopy)

M	molar
MeOH	methanol
mL	milliliter
mmol	mill mole
mM	milli molar
MsCl	Mesyl chloride
MW	molecular weight
m/z	mass of charge ratio (mass spectroscopy)
NaCl	sodium chloride
NaOH	sodium hydroxide
Na ₂ SO ₄	sodium sulfate
nm	nanometer
OSHA	Occupational Safety and Health Administration
Pd/C	Palladium on activated chacoal
PET	photoinduced electron transfer
ppb	part per billion
ppm	Part per million
q	quartet (NMR spectroscopy)
r.t.	room temperature
s	singlet (NMR spectroscopy)
t	triplet (NMR spectroscopy)
v/v	volume by volume
w/v	weight by volume
μL	microliter
μM	micro molar
ε	extinction coefficient
Φ _f	quantum yield
λ	wavelength



NJC

PAPER



Cite this: *New J. Chem.*, 2018, 42, 5540

Received 29th December 2017,
Accepted 27th February 2018

DOI: 10.1039/c7nj05176j

rsc.li/njc

Novel Cu²⁺-specific "Turn-ON" fluorescent probe based on [5]helicene with very large Stokes shift and its potential application in living cells†

Nirawit Kaewnok,^a Anuwut Petdum,^a Jitnapa Sirirak,^a Adisri Charoenpanich,^b Waraporn Panchan,^c Somboon Sahasithiwat,^c Thanasat Sooksimuang^c and Nantanit Wanichacheva^{b,*†}

A novel fluorescent sensor based on a [5]helicene dye bearing hydrazine (**1**) was synthesized through a simple reaction. The sensor was fully characterized by NMR, single crystal X-ray analysis, and HRMS spectrometry. Fluorescence technique was also employed to study the ability of **1** for the detection of Cu²⁺ among different ions. It was found that **1** exhibited a highly sensitive fluorescence response toward Cu²⁺ with a "Turn-ON" fluorescence enhancement and a very large Stokes shift of ~183 nm. The sensor selectively bound to Cu²⁺ in the presence of various metal ions, such as Cd²⁺, Ag⁺, Pb²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺, Hg²⁺, K⁺, Li⁺, Ba²⁺, Al³⁺, Fe²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Ca²⁺, Na⁺, and Mg²⁺ in aqueous acetonitrile solution. The Cu²⁺ detection limit was 2.6 ppb (3σ/slope), which was lower than the permissible concentration in drinking water determined by the US EPA and WHO. In addition, the sensor can enhance fluorescence from the intracellular area in the HepG2 cellular system. Hence, it has the potential for the detection of Cu²⁺ in biological samples.

Introduction

Copper is an important trace element that is directly involved in numerous biological processes, particularly in the central nervous system. In the human body, suitable amount of Cu²⁺ is required in microgram scale. The over intake and the accumulation of Cu²⁺ in the human body could lead to incomplete neurodevelopment as well as many diseases including Wilson's, Alzheimer's, and Parkinson's.^{1–5} Cu²⁺ is also toxic to algae, fungi, and fish and thus affects aquatic life.⁶ Therefore, a sensor for the simple and rapid Cu²⁺-detection in environmental and biological samples is necessary.

Fluorescent sensors have recently attracted much attention as they can be applied for the qualitative and quantitative detection of neutral molecules, such as saccharide, water, and L-histidine^{7–11} as well as protons (H⁺),^{12,13} anions,^{14,15} and

cations^{16,17} including Cu²⁺.^{18–22} Moreover, fluorescence technique is advantageous as it is relatively inexpensive, rapid and non-destructive. However, the inherent quenching nature of Cu²⁺ owing to its paramagnetic property and unfilled d-shell limits the application of Cu²⁺ sensors^{23–25} as noticing the change in the fluorescent signal would be difficult. Consequently, "Turn-ON" Cu²⁺ fluorescent sensors are required. For Cu²⁺ fluorescent sensors, the selectivity is controlled by the Cu²⁺-selective coordination of an ionophore, while the sensitivity is governed by the optical properties of the fluorophore. Herein, [5]helicene was chosen as the fluorophore due to its unique photophysical properties, such as excellent photostability, large extinction coefficient, intense fluorescence signal in the visible region ($\lambda_{em} > 500$ nm), and a very large Stokes shift. In fact, the interference caused by self-absorption can be reduced by the large Stokes shift of the sensor. Hydrazine was employed as the ionophore because it could provide a selective binding site for Cu²⁺.^{26,27} Moreover, the polarity of hydrazine is high, which can increase the hydrophilicity of the designed sensor, resulting in more applications in aqueous-organic solutions and biological systems.

Herein, the new fluorescent sensor **1** consisting of the [5]helicene dye and a hydrazine moiety could exhibit selective binding to Cu²⁺, which can be verified through "Turn-ON" fluorescence enhancement and a very large Stokes shift. The sensor **1** was prepared by a simple method and exhibited high sensitivity and selectivity towards Cu²⁺ among various metal

^a Department of Chemistry, Faculty of Science, Silpakorn University, Nakhon Pathom 73000, Thailand. E-mail: wanichacheva.nantanit@gmail.com, wanichacheva_n@su.ac.th; Fax: +66 34 271 356; Tel: +66 34 255 797

^b Department of Biology, Faculty of Science, Silpakorn University, Nakhon Pathom 73000, Thailand

^c National Metal and Materials Technology Center (MTEC), Pathumthani 12120, Thailand

† Electronic supplementary information (ESI) available. CCDC 1587045. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/c7nj05176j

ions (Cd^{2+} , Ag^+ , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} , K^+ , Ba^{2+} , Li^+ , Al^{3+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , and Mg^{2+}) in aqueous acetonitrile solution with a very low detection limit. In addition, **1** was cell-permeable and provided strong emission upon the addition of Cu^{2+} in the HepG2 cellular system. The results reported herein demonstrated that the new class of “[5]helicene” sensor provided great potential for environmental and biological applications.

Results and discussion

Sensor **1** was prepared *via* imidation between [5]helicene anhydride **2** and hydrazine monohydrate **3** under acidic conditions with good yield (83%) as shown in Scheme 1. The synthetic route was simple and the sensor was fully characterized by ^1H NMR, ^{13}C NMR, and HRMS. The structure of **1** was further confirmed by X-ray analysis as illustrated in Fig. 1. The single crystal was grown through the vapor diffusion method using $\text{MeOH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1:1 v/v) as the solvent system.

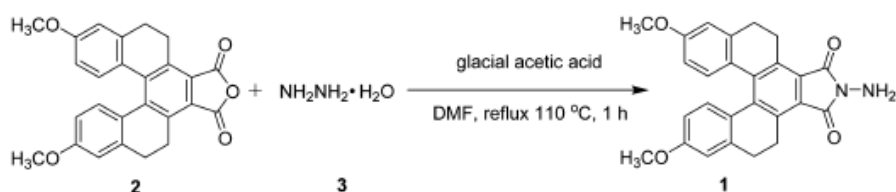
The X-ray analysis of sensor **1** was performed on a single crystal obtained from a racemic mixture of the precursor **2**. As shown in Fig. 1 and Table S1 (ESI †), the conformations of precursor **2** and sensor **1** are similar with the two methoxy groups of both compounds pointing in the same direction. The torsion angles (C1–C15–C17–C19), (C15–C17–C19–C21), and (C17–C19–C21–C14) of **1** were 34.4° , 20.1° , and 30.0° , respectively, while the torsion angles (C1B–C15B–C17B–C19B), (C15B–C17B–C19B–C21B), and (C17B–C19B–C21B–C14B) of precursor **2** were 32.6° , 24.8° , and

29.6° , respectively. The moieties in positions 7 and 8 of the molecular structures of precursor **2** and sensor **1** were slightly different, indicating that the core structure slightly affected the conformation of these helicenes.

The molecular structure of **1** was designed in accordance with the theoretical requirements for selective host–guest interactions in supramolecular chemistry. Sensor **1** contained nitrogen and oxygen atoms in the suitable geometry for favorable interactions with Cu^{2+} . In addition, **1** consisted of a hydrazine moiety that increased the hydrophilicity of the sensor, allowing **1** to operate in aqueous acetonitrile solutions. In contrast, precursor **2** was insoluble in water.

The UV-Vis and fluorescence spectra of **1**, which has [5]helicene as fluorophore, in aqueous acetonitrile solution revealed the maximum absorption intensity (λ_{max}) at 373 nm and the maximum emission intensity at 556 nm (Fig. 2). The Stokes shift of **1** was very large (183 nm) compared to that of Cu^{2+} -fluorescent sensing probes reported previously (Table 1). In fact, the large Stokes shift of the sensor provided several advantages, such as the reduction of the self-absorption problem and the removal of the interference from the light source, 28 which could be beneficial for the development of real-time detecting equipment and for application in sensing biological samples.

For the quantitative analysis, the Cu^{2+} -sensing efficiency of **1** was monitored in aqueous acetonitrile solution ($\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$, 1:9 v/v). The titration results were investigated in the presence and absence of Cu^{2+} through fluorescence measurements upon excitation at 373 nm. As shown in Fig. 3, **1** exhibited weak fluorescence intensity in the absence of Cu^{2+} . The gradual addition



Scheme 1 Synthesis of **1**.

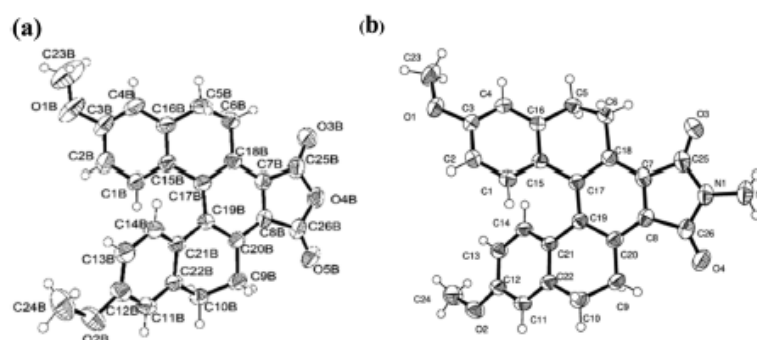


Fig. 1 Crystal structures of (a) the [5]helicene anhydride precursor **2** and (b) sensor **1**.

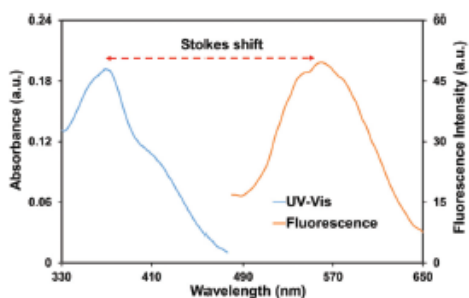


Fig. 2 UV-Vis spectrum of **1** (10.0 μM) and fluorescence spectrum ($\lambda_{\text{em}} = 556 \text{ nm}$) of **1** (1.0 μM) in the presence of Cu^{2+} in aqueous acetonitrile solution.

of Cu^{2+} into the sensor solution caused the enhancement of the fluorescence signal at 556 nm and the “Turn-ON” of fluorescence emission under UV light.

The fluorescence quantum yield (Φ_f) of **1** was estimated to be 0.49 in acetonitrile solution with 9,10-diphenylanthracene as ref. 29–32 Subsequently, the quantum yield (Φ_f) increased to 0.69 upon the addition 10 eq. of Cu^{2+} , indicating that the photoinduced electron transfer (PET) mechanism occurred. Using $3\sigma/m$, where σ is the standard deviation of blank samples and m is the slope of the calibration curve, the detection limit of **1** for the determination of Cu^{2+} was calculated to be 2.6 ppb. Hence, **1** can be used for the detection of Cu^{2+} in numerous dietary and environmental sources, including drinking water, in accordance with U.S. EPA (1.3 ppm) and WHO (2.0 ppm)

Table 1 Comparison of the as-prepared fluorescent sensors **1** with those reported previously for the detection of Cu^{2+}

Entry	Operation mode	Working system	$\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ (nm)	Stokes shift (nm)	Detection limit	Ref.
A	Turn-ON	$\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (9:1 v/v)	380/480	100	$1.1 \times 10^{-6} \text{ M}$ (69 ppb)	35 (2015)
B	Turn-OFF	CH_3CN	293/367	74	$2.3 \times 10^{-6} \text{ M}$ (146 ppb)	36 (2015)
C	Turn-OFF	HEPES buffer	482/525	43	$2.0 \times 10^{-7} \text{ M}$ (13 ppb)	37 (2011)
D	Turn-ON	$\text{CH}_3\text{OH}:\text{PBS}$ buffer (5:5 v/v)	556/576	20	$3.0 \times 10^{-6} \text{ M}$ (191 ppb)	38 (2013)
E	Turn-OFF	HEPES:DMSO (9:1 v/v)	430/479	49	$5.0 \times 10^{-7} \text{ M}$ (32 ppb)	39 (2009)
F	Turn-OFF	$\text{H}_2\text{O}:\text{DMSO}$ (9:1 v/v)	450/523	73	$1.0 \times 10^{-7} \text{ M}$ (6.4 ppb)	40 (2011)
G	Turn-OFF	Ethanol	328/432	104	$1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$ (64 ppb)	41 (2017)
H	Turn-ON	$\text{CH}_3\text{CN}:\text{HEPES}$ buffer (7:3 v/v)	446/500	54	$1.5 \times 10^{-6} \text{ M}$ (95 ppb)	42 (2015)
I	Turn-ON	$\text{CH}_3\text{CN}:\text{PBS}$ buffer (5:5 v/v)	452/482	30	$5.0 \times 10^{-8} \text{ M}$ (3.2 ppb)	43 (2016)
Sensor 1	Turn-ON	$\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (9:1 v/v)	373/556	183	$4.04 \times 10^{-8} \text{ M}$ (2.6 ppb)	This work

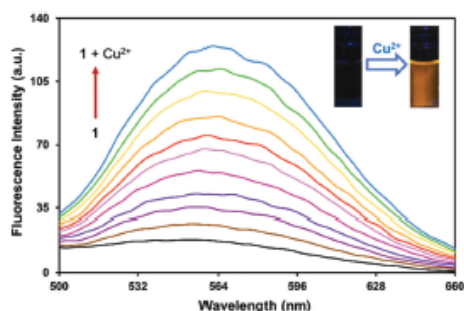


Fig. 3 Fluorescence emission spectra ($\lambda_{\text{exc}} = 373 \text{ nm}$) of **1** (1.0 μM) in $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ (1:9 v/v) as a function of Cu^{2+} -concentration.

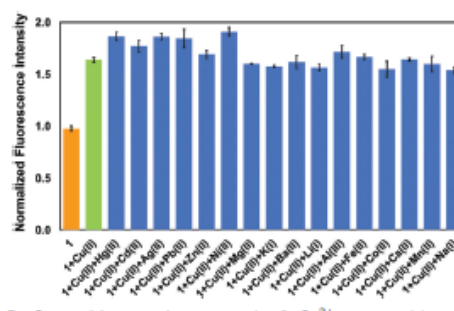


Fig. 5 Competitive experiments on the **1**- Cu^{2+} system with common cations: [**1**] = 1.00 μM , [Cu^{2+}] = 50.0 μM , and [M^{n+}] = 50.0 μM in $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ (1:9 v/v) ($\lambda_{\text{exc}} = 373 \text{ nm}$).

specifications.^{33,34} The sensitivity in terms of the detection limit of **1** was comparable to or lower than that of previously reported Cu^{2+} -fluorescent sensors³⁵⁻⁴³ as shown in Table 1.

The selectivity of **1** was investigated by monitoring the changes in the fluorescence signals of **1** at 556 nm in the presence and absence of various cations (Cu^{2+} , Cd^{2+} , Ag^+ , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} , K^+ , Ba^{2+} , Li^+ , Al^{3+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , and Mg^{2+}) in aqueous acetonitrile solution. Fig. 4 shows the enhancement in

the fluorescence intensity upon the addition of Cu^{2+} . Other cations caused insignificant changes in the fluorescence signals.

To investigate the selectivity of **1** as a Cu^{2+} sensor, competitive experiments were carried out by measuring the fluorescence signals of the sensor in the presence of competing cations and Cu^{2+} . The results shown in Fig. 5 indicate that the relatively consistent Cu^{2+} -induced fluorescence enhancement was still observed after the addition of Cu^{2+} with competing cations including Cd^{2+} , Ag^+ , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} , K^+ , Ba^{2+} , Li^+ , Al^{3+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , and Mg^{2+} .

The selectivity of **1** was also illustrated by the fluorogenic changes under UV light as shown in Fig. 6. The "Turn-ON" fluorescence of **1** was induced when Cu^{2+} was added to the solution. In contrast, the other cations (Cd^{2+} , Ag^+ , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} , K^+ , Ba^{2+} , Li^+ , Al^{3+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , and Mg^{2+}) did not exhibit emission under UV light.

The **1**: Cu^{2+} binding stoichiometry was determined using the Job's plot of the changes in emission fluorescence at 556 nm and the molar fractions of **1** up to a total concentration of 20 μM . Maximal emission for **1** was obtained at a mole fraction of 0.5 (Fig. 7), suggesting that the stoichiometry between **1** and Cu^{2+} was 1:1. Moreover, based on the results from Job's plot (1:1 for **1**: Cu^{2+} ratio), the association constant (K_{assoc}) of **1**- Cu^{2+} was calculated by the Benesi-Hilderbrand plot⁴⁴ and was determined to be $1.35 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

Using the X-ray crystal structure of **1**, a complex of **1**- Cu^{2+} was designed. Sensor **1** and complex **1**- Cu^{2+} were then optimized at the DFT-B3LYP level with the 6-311G** basis set for the main group elements and LanL2DZ for Cu^{2+} with the integral equation formalism polarizable continuum model (IEFPCM). As expected, the DFT-optimized structure of the **1**- Cu^{2+} complex (Fig. 8) showed the coordination between Cu^{2+} and the carbonyl oxygen of the helixene dye and the nitrogen of the hydrazine moiety. This coordination might occur *via* favorable electrostatic interactions between Cu^{2+} and the oxygen and nitrogen atoms. The distances between Cu^{2+} to carbonyl oxygen and nitrogen atoms were found to be 2.11 Å and 2.02 Å, respectively.

^1H NMR titrations were carried out to further verify the binding mechanism. The NMR spectra of **1** were recorded in CD_3CN in the presence and absence of Cu^{2+} . The comparison of

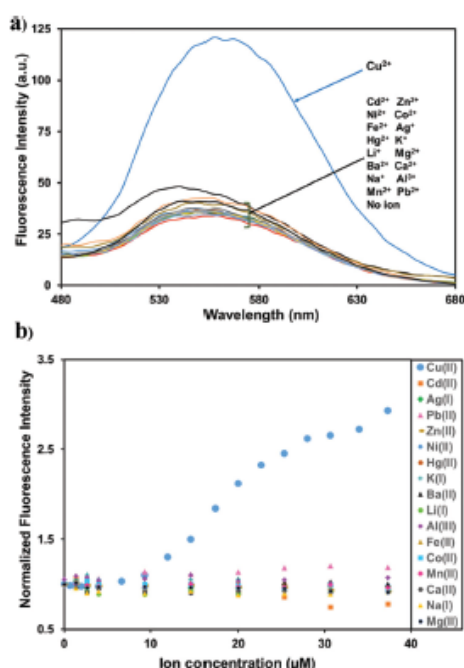


Fig. 4 (a) Fluorescence emission spectra of **1** (3.00 μM) in $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ (1:9 v/v) after addition of cations (37.0 μM) and (b) normalized emission intensity of **1** (3.00 μM) in $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ (1:9 v/v) versus the concentration of various cations (37.0 μM).

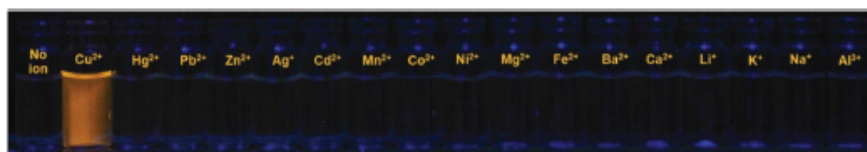


Fig. 6 Fluorogenic changes of **1** (10 μM) in $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ (1: 9 v/v) upon addition of various cations, Cu^{2+} , Cd^{2+} , Ag^+ , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} , K^+ , Ba^{2+} , Li^+ , Al^{3+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , and Mg^{2+} (30 μM).

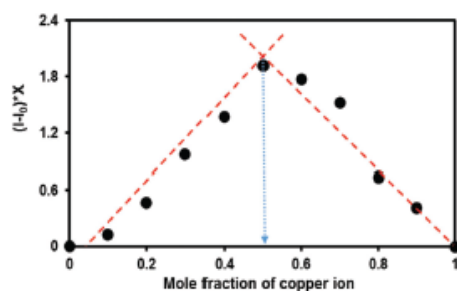


Fig. 7 Job's plot of binding of **1** with Cu^{2+} in $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ (1:9 v/v). The total concentration of **1** and Cu^{2+} was 20.0 μM .

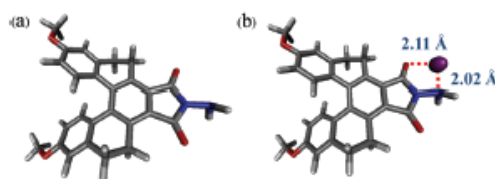


Fig. 8 Optimized structures of (a) sensor **1** and (b) **1**- Cu^{2+} complex.

^1H NMR spectra is illustrated in Fig. 9. Upon addition of Cu^{2+} , the peaks of the methylene protons (CH_2) of the [5]helicene moiety (H_d) shifted upfield and combined with that of H_e at 3.79 ppm. Furthermore, the peaks of the amino protons (H_b) at 2.32–2.52 ppm are not observed after the addition of Cu^{2+} (1.0 eq.). These results are consistent with the molecular modeling results (Fig. 8), which indicated that Cu^{2+} is bound to donor atoms such as the nitrogen and oxygen atoms of sensor **1** and induces environmental changes.

In this study, the effects of pH in the range of 5–9 on the fluorescence emission of **1** in the presence and absence of Cu^{2+} were systematically investigated. The results are shown in the supplementary data (Fig. S5, ESI †). Upon the addition of Cu^{2+} , the fluorescence emission of **1** increased when the pH of the buffers was in the range of 5–7. According to this observation, the sensor can be used in biological samples.

To determine the potential of **1** for detecting Cu^{2+} in real samples, fluorescence imaging was carried out to explore the performance of the sensor in live cells. HepG2 cells (liver hepatocellular carcinoma) were incubated with **1** (50 μM) for

15 min at 37 $^\circ\text{C}$ in growth media (pH 7.4). Before the addition of Cu^{2+} to the HepG2 cells, a very small intracellular fluorescence occurred upon excitation in the blue channel (Fig. 10B), which indicates that **1** could enter the cell membrane. Then, the HepG2 cells were incubated in 10 μM $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ for 15 minutes and the fluorescence intensity in the blue channel enhanced in the intracellular area (Fig. 10E). This result clearly illustrates that **1** can detect Cu^{2+} in live cells and can potentially track Cu^{2+} in biological samples. In addition, the toxicity of **1** was tested with propidium iodide staining, a widely used method to determine cell viability based on plasma membrane integrity and permeability.^{45,46} The results illustrated that concentrations of **1** up to 100 μM did not kill cells as shown by the negative propidium iodide stain (ESI, † Fig. S6).

Experimental

Materials and instrumentation

In this study, for the synthesis part, all reagents and solvents were commercially obtained from Fluka Chemical Corporation and Sigma-Aldrich Corporation. For the ion sensing experiments, perchlorate salts were used and purchased from Strem Chemicals, Inc. Optical spectroscopic studies were carried out on with a Perkin Elmer Luminescence Spectrometer LS 50B. The sensitivity and selectivity studies were performed in an analytical quartz cuvette (path length = 1 cm) with 500 nm min^{-1} scan speed and 5.0/5.0 nm excitation/emission slit widths. NMR spectra were recorded in CDCl_3 with TMS as an internal standard on a Bruker Avance 300 Spectrometer operating at 300 MHz and 75 MHz for ^1H and ^{13}C , respectively. Mass spectra were recorded using a Thermo Electron LCQ-DECA-XP electrospray ionization ion trap mass spectrometer. The X-ray measurement of single crystals was recorded on a Bruker Sc XRD D8 venture. The optimized structures were approached by molecular modeling analysis and density functional theory (DFT) calculations using the Gaussian 09 program.⁴⁷ The geometry optimization was obtained at the DFT-B3LYP level using 6-311G** for the main group elements and LanL2DZ for copper.⁴⁸ Molecular orbital images of **1** and the **1**- Cu^{2+} complex were obtained via VMD.⁴⁹

Synthesis procedure

Compound **2** was prepared in the same manner as previously reported.³⁰

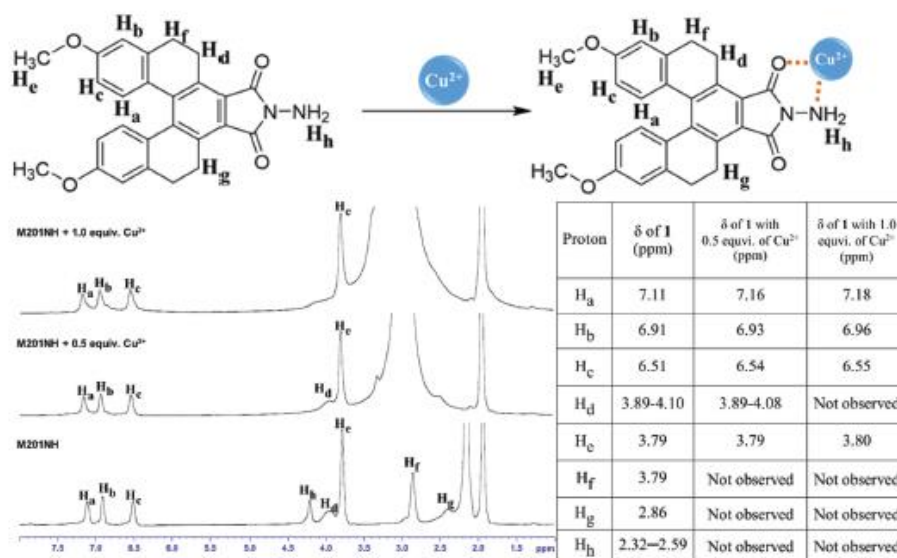


Fig. 9 ^1H NMR spectra of sensor **1** upon addition of Cu^{2+} (0–1.0 eq.) in CD_3CN (left) and comparison table (right).

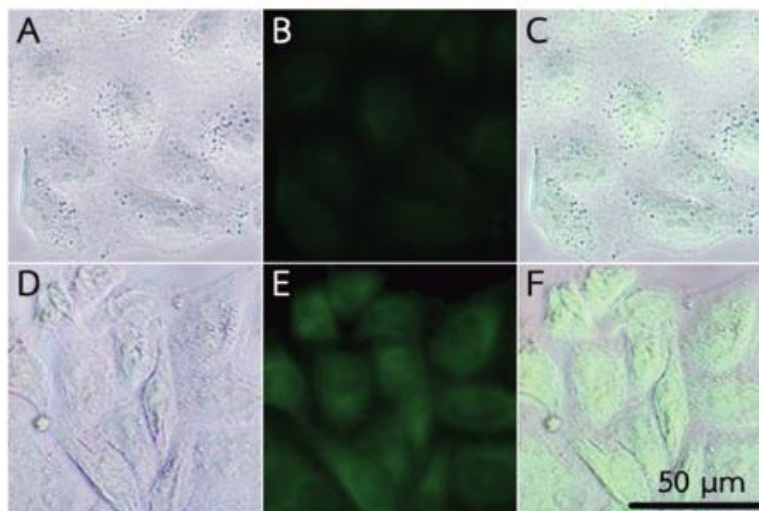


Fig. 10 Bright field and fluorescence images in the blue channel of HepG2 incubated with **1** at 37 °C in growth media in PBS with 10% DMSO (v/v): (A–C): fluorescence images of HepG2 cells in the absence of $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$; (D–F): HepG2 cells in the presence of sensor **1** and $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ 20 μM ; (A and D): bright field images of living HepG2 cells in parts B and E, respectively; (C and F): overlaid images of (A) and (B) and (D) and (E), respectively.

Synthesis of **1**

[5]Helicene anhydride (**2**, 0.0200 g, 0.485 mmol) was dissolved in 3.00 mL of dimethylformamide. Then, hydrazine monohydrate (3, 0.80 mL, 0.025 mol, excess) was added into the solution, followed by gradually addition of 1.00 mL of glacial acetic acid

to the mixture. The reaction was then heated at 110 °C under argon atmosphere at atmospheric pressure for 1 h. Then, the reaction was left to cool down to room temperature before pouring into 20 mL of deionized water and the solution was stirred vigorously for 25–30 min. A yellow sediment was formed and was filtered under pressure using a Büchner funnel.

Finally, sensor **1** was obtained as a yellow solid (183 mg, 88% yield) via recrystallization using methanol and dichloromethane (1 : 1 v/v). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 2.47 (br-s, 2H), 2.84 (m, 4H), 3.82 (s, 6H), 4.03 (m, 2H), 6.50 (dd, $J = 8.7$ Hz, $J = 2.7$ Hz, 2H), 6.80 (d, $J = 3.0$ Hz, 2H), 7.13 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ ; 24.3 (2CH₃), 28.9 (2CH₂), 55.2 (2CH₃), 111.8 (2CH), 112.5 (2CH), 123.2 (2C), 126.3 (2C), 131.2 (2CH), 138.0 (2C), 138.2 (2C), 141.0 (2C), 159.4 (2C), 167.4 (2C=O) ppm. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4\text{Na}^+$ ($\text{M} + \text{Na}$)⁺ 449.1472 m/z , found 449.1468 m/z .

Cell culture and fluorescence imaging

The HepG2 (hepatic cancer) cell lines were provided by the Department of Biology, Faculty of Science, Silpakorn University (Thailand). The HepG2 cells were incubated with 50 μM of sensor **1** in growth media (DMSO : PBS (1 : 9 v/v)) for 15 minutes at 37 °C. The cells were washed twice in PBS before incubating with 10 μM $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ for 30 minutes at 37 °C.

Cell toxicity

The HepG2 cells were seeded at 5000 cells per well in a 96-well plate and incubated for 24 hours. The cells were exposed to sensor **1** at concentrations of 0–100 μM for 15 minutes, followed by 4 hours incubation in complete growth media. The cells were stained with propidium iodide and visualized under a fluorescent microscope.

Conclusion

In conclusion, a novel [5]helicene derivative based-fluorescence sensor (**1**) for the highly selective detection of Cu^{2+} was successfully prepared with excellent yield. Fluorescence studies of **1** revealed its high sensitivity for Cu^{2+} detection with a "Turn-ON" switching system with a very large Stokes shift in aqueous acetonitrile solution. The sensor **1** was further utilized to detect Cu^{2+} in the presence of competing metal ions, namely, Cd^{2+} , Ag^+ , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} , K^+ , Ba^{2+} , Li^+ , Al^{3+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , and Mg^{2+} . The detection limit for Cu^{2+} was 2.6 ppb, which was much lower than the maximum concentration of Cu^{2+} permissible in drinking water as specified by the U.S. EPA and WHO. Moreover, the sensor displayed potential for the detection of Cu^{2+} in the applications involving biological samples and physiological systems as evidenced by the enhancement of fluorescence from the intracellular area in the HepG2 cellular system.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

This study was supported by the Thailand Research Fund and Faculty of Science, Silpakorn University, Thailand (Grant RSA 6080058) and Thailand Graduate Institute of Science and

Technology (TGIST), Grant TG-33-16-59-050M from National Science and Technology Development Agency, NSIDA, Thailand. J. Sirirak was supported by the DPST Research Grant 005/2557.

Notes and references

- P. C. Bull, G. R. Thomas, J. M. Rommens, J. R. Forbes and D. W. Cox, *Nat. Genet.*, 1993, **5**, 327.
- V. Desai and S. G. Kaler, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2008, **88**, 855–858.
- G. Rotilio, M. T. Carri, L. Rossi and M. R. Ciriolo, *IUBMB Life*, 2000, **50**, 309–314.
- D. Strausak, J. F. B. Mercer, H. H. Dieter, W. Stremmel and G. Multhaup, *Brain Res. Bull.*, 2001, **55**, 175–185.
- D. J. Waggoner, T. B. Bartnikas and J. D. Gitlin, *Neurobiol. Dis.*, 1999, **6**, 221–230.
- D. H. Baldwin, J. F. Sandahl, J. S. Labenia and N. L. Scholz, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2003, **22**, 2266–2274.
- H. S. Jung, P. Verwilst, W. Y. Kim and J. S. Kim, *Chem. Soc. Rev.*, 2016, **45**, 1242–1256.
- X.-Y. Wang, C.-G. Niu, L. Y. Hu, D.-W. Huang, S.-Q. Wu, L. Zhang, X.-J. Wen and G.-M. Zeng, *Sens. Actuators, B*, 2017, **243**, 1046–1056.
- Y. E. Wang, R. X. Rong, H. Chen, M. Y. Zhu, B. H. Wang and X. L. Li, *Chin. Chem. Lett.*, 2017, **28**, 1262–1267.
- S. Arimori, M. L. Bell, C. S. Oh, K. A. Frimat and T. D. James, *Chem. Commun.*, 2001, 1836–1837.
- D. Wang, J.-Q. Zheng, X.-J. Zheng, D.-C. Fang, D.-Q. Yuan and L.-P. Jin, *Sens. Actuators, B*, 2016, **228**, 387–394.
- H. Yuasa, N. Fujii and S. Yamazaki, *Org. Biomol. Chem.*, 2007, **5**, 2920–2924.
- B. He, J. Dai, D. Zherebetsky, T. L. Chen, B. A. Zhang, S. J. Teat, Q. Zhang, L. Wang and Y. Liu, *Chem. Sci.*, 2015, **6**, 3180–3186.
- H. M. Chawla, R. Shukla and S. Pandey, *Tetrahedron Lett.*, 2013, **54**, 2063–2066.
- Q. Lin, L. Li, F. Zheng, P.-P. Mao, J. Liu, Y.-M. Zhang, H. Yao and T.-B. Wei, *Tetrahedron*, 2017, **73**, 5307–5310.
- M. Hong, X. Lu, Y. Chen and D. Xu, *Sens. Actuators, B*, 2016, **232**, 28–36.
- G. Men, C. Chen, S. Zhang, C. Liang, Y. Wang, M. Deng, H. Shang, B. Yang and S. Jiang, *Dalton Trans.*, 2015, **44**, 2755–2762.
- Y. Tachapermporn, S. Chaneam, A. Charoenpanich, J. Sirirak and N. Wanichacheva, *Sens. Actuators, B*, 2017, **241**, 868–878.
- S. Thavornpradit, J. Sirirak and N. Wanichacheva, *J. Photochem. Photobiol., A*, 2016, **330**, 55–63.
- X. Chen, T. Pradhan, F. Wang, J. S. Kim and J. Yoon, *Chem. Rev.*, 2012, **112**, 1910–1956.
- S. C. Yin, V. Leen, S. Van Snick, N. Boens and W. Dehaen, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 6329–6331.
- X. X. He, J. Zhang, X. G. Liu, L. Dong, D. Li, H. Y. Qiu and S. C. Yin, *Sens. Actuators, B*, 2014, **192**, 29–35.
- P. A. More and G. S. Shankarling, *Sens. Actuators, B*, 2017, **241**, 552–559.
- Z. Ekmekci, *Tetrahedron Lett.*, 2015, **56**, 1878–1881.

- 25 P. N. Borase, P. B. Thale and G. S. Shankarling, *Dyes Pigm.*, 2016, **134**, 276–284.
- 26 S. I. Reja, V. Bhalla, S. Manchanda, G. Kaur and M. Kumar, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 43470–43476.
- 27 Y. Liu, Y. Sun, J. Du, X. Lv, Y. Zhao, M. Chen, P. Wang and W. Guo, *Org. Biomol. Chem.*, 2011, **9**, 432–437.
- 28 B. Gu, L. Huang, N. Mi, P. Yin, Y. Zhang, X. Tu, X. Luo, S. Luo and S. Yao, *Analyst*, 2015, **140**, 2778–2784.
- 29 S. Sahasithiwat, T. Sooksimuang, L. Kangkaew and W. Panchan, *Dyes Pigm.*, 2017, **136**, 754–760.
- 30 S. Sahasithiwat, T. Mophuang, L. Menbangpung, S. Kamtonwong and T. Sooksimuang, *Synth. Met.*, 2010, **160**, 1148–1152.
- 31 T. Sooksimuang, S. Kamtonwong, W. Panchan, L. Kangkaew and S. Sahasithiwat, *Acta Crystallogr., Sect. E: Crystallogr. Commun.*, 2014, **70**, 418–420.
- 32 A. M. Brouwer, *Pure Appl. Chem.*, 2011, **83**, 2213–2228.
- 33 US EPA, National Primary Drinking Water Regulations: EPA 812-Z-94-001, May 2009.
- 34 WHO, copper in drinking water, WHO reference number: WHO/SDE/WSH/03.04/88, 2004.
- 35 S. Erdemir and S. Malkondu, *J. Lumin.*, 2015, **158**, 86–90.
- 36 H. M. Chawla, P. Munjal and P. Goel, *J. Lumin.*, 2015, **164**, 138–145.
- 37 B. N. Ahamed and P. Ghosh, *Dalton Trans.*, 2011, **40**, 6411–6419.
- 38 Z. Yang, M. She, J. Zhang, X. Chen, Y. Huang, H. Zhu, P. Liu, J. Li and Z. Shi, *Sens. Actuators, B*, 2013, **176**, 482–487.
- 39 H. S. Jung, P. S. Kwon, J. W. Lee, J. I. Kim, C. S. Hong, J. W. Kim, S. Yan, J. Y. Lee, J. H. Lee, T. Joo and J. S. Kim, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 2008–2012.
- 40 L. Huang, J. Cheng, K. Xie, P. Xi, F. Hou, Z. Li, G. Xie, Y. Shi, H. Liu, D. Bai and Z. Zeng, *Dalton Trans.*, 2011, **40**, 10815–10817.
- 41 H. Seo, M. An, B. Y. Kim, J. H. Choi, A. Helal and H. S. Kim, *Tetrahedron*, 2017, **73**, 4684–4691.
- 42 A. K. Mahapatra, S. Mondal, S. K. Manna, K. Maiti, R. Maji, M. R. Uddin, S. Mandal, D. Sarkar, T. K. Mondal and D. K. Maiti, *Dalton Trans.*, 2015, **14**, 6490–6501.
- 43 Y. Li, H. Zhou, S. Yina, H. Jiang, N. Niu, H. Huang, S. A. Shahzad and C. Yu, *Sens. Actuators, B*, 2016, **235**, 33–38.
- 44 H. A. Benesi and J. H. Hildebrand, *J. Am. Chem. Soc.*, 1949, **71**, 2703–2707.
- 45 A. M. Rieger, K. L. Nelson, J. D. Konowalchuk and D. R. Barreda, *J. Visualized Exp.*, 2011, **50**, e2597.
- 46 S. A. Altman, L. Randers and G. Rao, *Biotechnol. Prog.*, 1993, **6**, 671–674.
- 47 M. J. Frisch, *et al.*, *Gaussian 09W, Revision A.1*, Gaussian Inc, Wallingford, CT., 2009.
- 48 M. Shkir, S. Muhammad, S. AlFaify, A. R. Chaudhry and A. G. Al-Sehemi, *Arabian J. Chem.*, 2016, DOI: 10.1016/j.arabjc.2016.06.016.
- 49 W. Humphrey, A. Dalke and K. Schulten, *J. Mol. Graphics*, 1996, **14**, 33–38.

รายการอ้างอิง

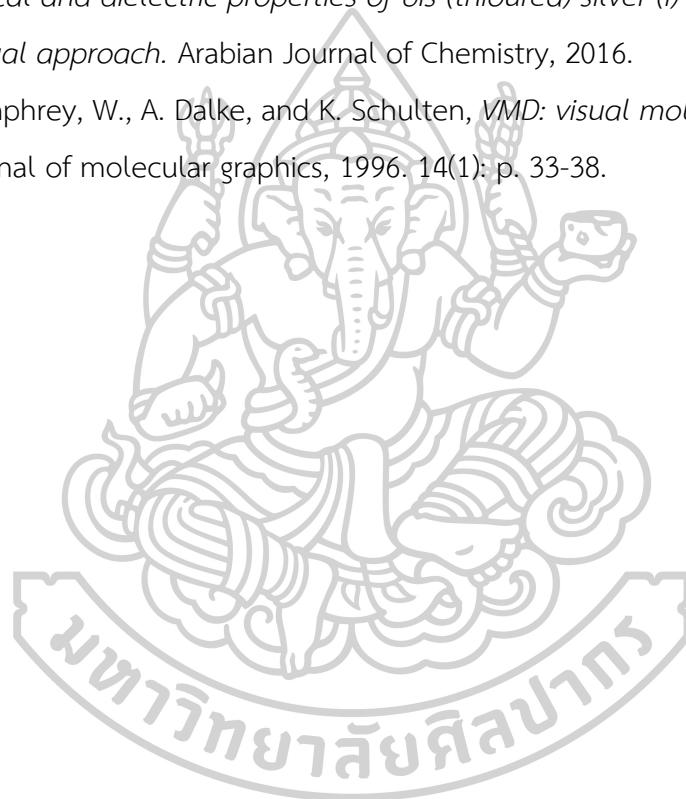
1. Gaggelli, E., et al., *Copper homeostasis and neurodegenerative disorders (Alzheimer's, prion, and Parkinson's diseases and amyotrophic lateral sclerosis)*. Chemical reviews, 2006. 106(6): p. 1995-2044.
2. Vulpe, C., et al., *Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase*. Nature genetics, 1993. 3(1): p. 7.
3. Waggoner, D.J., T.B. Bartnikas, and J.D. Gitlin, *The role of copper in neurodegenerative disease*. Neurobiology of disease, 1999. 6(4): p. 221-230.
4. Agency, U.S.E.P., *National Primary Drinking Water Regulation Table*, in EPA 816-F-09-004. 2009. p. 7.
5. WHO, *Copper in Drinking-water*, in *Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality*. 2004.
6. Administration, U.S.F.a.D. [cited 2018 11 June]; Available from: <http://www.fda.gov>.
7. Administration, O.S.a.H. [cited 2018 11 June]; Available from: <http://www.osha.gov>.
8. Miessler, G.L. and D.A. Tarr, *Inorganic Chemistry*. 3rd ed, ed. P. Education. 2004.
9. Urano, Y., et al., *Evolution of fluorescein as a platform for finely tunable fluorescence probes*. Journal of the American Chemical Society, 2005. 127(13): p. 4888-4894.
10. Burdette, S.C., et al., *ZP4, an improved neuronal Zn²⁺ sensor of the Zinpyr family*. Journal of the American Chemical Society, 2003. 125(7): p. 1778-1787.
11. Orelup, R.B., *Method for detecting a tagging compound*. 1988, US Patent 4,764,474.
12. Smith, M.J. and B. Desai, *Colorless petroleum markers*. 1999, US Patent 6,002,056.
13. Friswell, M.R. and M.P. Hinton, *Markers for petroleum, method of tagging, and method of detection*. 1993, US Patent 5,205,840.
14. Orelup, R.B., *Marker for petroleum fuels*. 1980, US Patent 5,205,840.

15. Orelup, R.B., *Colored petroleum markers*. 1988, US Patent 4,735,631.
16. Brenzinger, R., et al. *Detection of Marked Mineral oils and Novel Azo Dyes*. US Patent 5,487,770, 1996. in *Chem. Abstr.* 1996.
17. Hallisy, M.J., *Base extractable petroleum markers*. 1993, US Patent 5,252,106.
18. Suwanprasop, S., et al., *Petroleum markers synthesized from n-alkylbenzene and aniline derivatives*. *Industrial & engineering chemistry research*, 2003. 42(21): p. 5054-5059.
19. Albert, B., et al. *Use of Compounds Which Absorb and/or Fluoresce in the IR Range as Markers for Liquids*. WO Patent 94/02570, 1993. in *Chem. Abstr.* 1993.
20. Krutak, J., M. Cushman, and M. Weaver. *Method for Tagging Petroleum Products*. US Patent 5,525,516, 1996. in *Chem. Abstr.* 1996.
21. Smith, M. *Fluorescent Petroleum Markers*. US Patent 5,498,808, 1996. in *Chem. Abstr.* 1996.
22. Tyman, J., et al., *The extraction of natural cashew nut-shell liquid from the cashew nut (Anacardium occidentale)*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1989. 66(4): p. 553-557.
23. Tyman, J., *Purification of cardanol*. US Patent 2152925A, 1985.
24. Suwanprasop, S., et al., *Petroleum marker dyes synthesized from cardanol and aniline derivatives*. *Industrial & engineering chemistry research*, 2004. 43(17): p. 4973-4978.
25. Jiang, Z.-J., et al., *New fluorescent chemosensor based on quinoline and coumarine for Cu²⁺*. *Synthetic Metals*, 2012. 162(23): p. 2112-2116.
26. Chang, W.-L. and P.-Y. Yang, *A color-switching colorimetric sensor towards Cu²⁺ ion: Sensing Behavior and logic operation*. *Journal of Luminescence*, 2013. 141: p. 38-43.
27. Wang, J., et al., *Cu²⁺-selective "Off-On" chemsensor based on the rhodamine derivative bearing 8-hydroxyquinoline moiety and its application in live cell imaging*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2013. 177: p. 27-33.
28. Wang, J., et al., *A highly sensitive and selective naked-eye probe for detecting copper ion based on 2, 3-modified Bodipy derivatives*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014. 194: p. 149-155.

29. Li, N., et al., *An imidazole-containing core-substituted naphthalene diimide: Fluorescent sensing properties toward copper ion and optimized selectivity by tuning the solvent medium*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2015. 207: p. 827-832.
30. Cao, M., et al., *A dansyl-based fluorescent probe for selectively detecting Cu²⁺ and imaging in living cells*. *RSC Advances*, 2015. 5(30): p. 23666-23670.
31. Bao, X., et al., *Design and synthesis of a new selective fluorescent chemical sensor for Cu²⁺ based on a Pyrrole moiety and a Fluorescein conjugate*. *Tetrahedron Letters*, 2016. 57(8): p. 942-948.
32. Choi, M.G., et al., *Cu²⁺-selective ratiometric fluorescence signaling probe based on the hydrolysis of dansylhydrazine*. *Tetrahedron Letters*, 2016. 57(9): p. 975-978.
33. Hou, L., et al., *An anthraquinone-based highly selective colorimetric and fluorometric sensor for sequential detection of Cu²⁺ and S²⁻ with intracellular application*. *Journal of Materials Chemistry B*, 2017. 5(45): p. 8957-8966.
34. Ghorai, A., et al., *A novel pyrene based highly selective reversible fluorescent-colorimetric sensor for the rapid detection of Cu²⁺ ions: application in bio-imaging*. *Analytical Methods*, 2018. 10(9): p. 1063-1073.
35. Wang, Q., et al., *A highly selective, fast-response and fluorescent turn on chemosensor for the detection of Cu²⁺ ions and its potential applications*. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2018. 357: p. 149-155.
36. วนาศาสตร์ สุขศรีเมือง, et al., สารประกอบ 3,12-ไดเมทอกซี-5,6,9,10-เตตระไฮโดร-[1]พิวราน-1,3-ไดโอน-[5]เฮลิซีน และการนำไปใช้เป็นสารเปล่งแสงสำหรับไดโอดเปล่งแสงจากสารอินทรีย์. 2009, เลขที่คำขอ 0901003446.
37. Li, M., et al., *Tetrahydro [5] helicene thioimide-based fluorescent and chromogenic chemodosimeter for highly selective and sensitive detection of Hg²⁺*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014. 202: p. 583-587.
38. Petdum, A., et al., *"Turn-ON"[5] helicene-based fluorescence sensor with very large Stokes shift for highly selective detection of Ag⁺ and AgNPs*. *Sensors and*

Actuators B: Chemical, 2017.

39. Benesi, H.A. and J. Hildebrand, *A spectrophotometric investigation of the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons*. Journal of the American Chemical Society, 1949. 71(8): p. 2703-2707.
40. Frisch, M., et al., *Gaussian 09, revision a. 02*, gaussian. Inc., Wallingford, CT, 2009. 200.
41. Shkir, M., et al., *Shedding light on molecular structure, spectroscopic, nonlinear optical and dielectric properties of bis (thiourea) silver (I) nitrate single crystal: A dual approach*. Arabian Journal of Chemistry, 2016.
42. Humphrey, W., A. Dalke, and K. Schulten, *VMD: visual molecular dynamics*. Journal of molecular graphics, 1996. 14(1): p. 33-38.



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นิรวิทย์ แก้วนก
วัน เดือน ปี เกิด	11 พฤษภาคม 2536
สถานที่เกิด	นครศรีธรรมราช
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2558 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี มหาวิทยาลัยศิลปากร พ.ศ. 2559 ศึกษาต่อระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ที่อยู่ปัจจุบัน	41/1 หมู่ที่ 1 ตำบลเคิ่ง อำเภอลำทะเมนชัย จังหวัดนครศรีธรรมราช 80180
ผลงานตีพิมพ์	Kaewnok N., Petdum, A., Sirirak, J., Charoenpanich, A., Panchan, W., Sahasithiwat, S., Sooksimuang, T., Wanichacheva, N.* “New Cu ²⁺ -specific “turn-on” fluorescent probe based on [5]helicene with very large Stokes shift and its potential in living cell” New Journal of Chemistry (2018), 42, 5540–5547.
รางวัลที่ได้รับ	ทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ทุนผู้ช่วยสอน (Teaching Assistant) ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร