



การออกแบบและสังเคราะห์เซ็นเซอร์เรืองแสงชนิดคายแสงช่วงวิสิเบิลและใกล้อินฟราเรดสำหรับการ
ตรวจจับไอออนโลหะหนัก และประยุกต์ใช้เป็นแผ่นทดสอบโดยใช้เทคนิคอิเล็กโทรสปินนิง



โดย
นางสาวนิถมล ใจเหล็ก

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาเคมี แบบ 2.1 ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต

ภาควิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2564

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

การออกแบบและสังเคราะห์เซ็นเซอร์เรืองแสงชนิดคายแสงช่วงวิสิเบิลและใกล้อินฟราเรด
สำหรับการตรวจจับไอออนโลหะหนัก และประยุกต์ใช้เป็นแผ่นทดสอบโดยใช้เทคนิคอิเล็ก
โทรสปินนิง



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาเคมี แบบ 2.1 ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
ภาควิชาเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

DESIGN AND SYNTHESIS OF VISIBLE AND NEAR-INFRARED FLUORESCENCE
SENSORS FOR HEAVY METAL IONS SENSING AND APPLICATION AS A STRIP
TEST USING ELECTROSPINNING TECHNIQUE



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for Doctor of Philosophy CHEMISTRY
Department of CHEMISTRY
Graduate School, Silpakorn University
Academic Year 2021
Copyright of Silpakorn University

หัวข้อ การออกแบบและสังเคราะห์เซ็นเซอร์เรืองแสงชนิดคายแสงช่วงวิสิ
เบิลและใกล้อินฟราเรดสำหรับการตรวจจับไอออนโลหะหนัก และ
ประยุกต์ใช้เป็นแผ่นทดสอบโดยใช้เทคนิคอิเล็กโทรสปินนิง
โดย นางสาวนิถมล ใจเหล็ก
สาขาวิชา เคมี แบบ 2.1 ปรัชญาคุณฐิบัณฑิต
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ศาสตราจารย์ ดร. นันทินิตย์ วานิชชีวะ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุธินี เกิดเทพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปรัชญาคุณฐิบัณฑิต

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

พิจารณาเห็นชอบโดย

.....ประธานกรรมการ
(ดร. ชนศาสตร์ สุขศรีเมือง)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ศาสตราจารย์ ดร. นันทินิตย์ วานิชชีวะ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุธินี เกิดเทพ)

.....ผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พัฒนวิศว์ สว่างลาภ)

.....ผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตนภา ศิริรักษ์)

61317803 : เคมี แบบ 2.1 ปรัชญาคชภูษิต

คำสำคัญ : ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์, ไซยานีน, เพนตะเฮลิซีน, ความจำเพาะเจาะจง, การตรวจวัดไอออนโลหะหนัก, การเปลี่ยนแปลงของสีได้ด้วยตาเปล่า

นางสาว นิถมล ใจเหล็ก: การออกแบบและสังเคราะห์เซ็นเซอร์เรืองแสงชนิดคายแสงช่วงวิสิเบิลและใกล้อินฟราเรดสำหรับการตรวจจับไอออนโลหะหนัก และประยุกต์ใช้เป็นแผ่นทดสอบโดยใช้เทคนิคอิเล็กโทรสปีนนิ่ง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ศาสตราจารย์ ดร. นันทินิตย์ วานิชชีวะ

งานวิจัยนี้เกี่ยวข้องกับการออกแบบ และสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ชนิดใหม่ 2 ชนิดสำหรับตรวจจับไอออนทองแดงจากอนุพันธ์ของไซยานีน (cyanine) ที่มีการคายแสงในช่วงใกล้อินฟราเรด และตรวจจับไอออนทองปรอทจากอนุพันธ์ของเพนตะเฮลิซีน ([5]helicene) ที่มีการคายแสงในช่วงยูวี-วิสิเบิล โดยฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ชนิดแรก (Cy7C4) ประกอบด้วยอนุพันธ์ของ cyanine สามารถตรวจวัดไอออนทองแดงได้อย่างจำเพาะเจาะจงในตัวทำละลาย 50:50 v/v ระหว่างบัฟเฟอร์ HEPES (pH 7.4): acetonitrile และสามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายจากสีน้ำเงินเป็นใสไม่มีสีได้ด้วยตาเปล่า มีค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่เซ็นเซอร์สามารถตรวจวัดไอออนทองแดงได้เท่ากับ 1.56 ppb สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนทองแดงได้ในตัวอย่างน้ำ เซลล์มะเร็งสมอง นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์แบบฉีดไหลได้ (flow injection analysis) สำหรับการตรวจวัดไอออนทองแดงแบบอัตโนมัติได้อีกด้วย ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ชนิดที่สอง (M201NHP) ประกอบด้วยอนุพันธ์ของ [5]helicene ซึ่งมีค่า Stokes shift ที่กว้าง สามารถตรวจวัดไอออนปรอทได้อย่างจำเพาะเจาะจงในตัวทำละลาย 40:60 v/v ระหว่าง H₂O: acetonitrile มีค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่เซ็นเซอร์สามารถตรวจวัดไอออนปรอทได้เท่ากับ 1.94 ppb โดยที่เซ็นเซอร์มีความไวและความจำเพาะเจาะจงสูงต่อไอออนปรอทเพียงชนิดเดียวเมื่อเทียบกับไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ที่เจือปนอยู่ระบบเดียวกัน สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้หลายครั้งและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนปรอทในตัวอย่างครีมเจล น้ำตัวอย่าง และเซลล์มนุษย์ (U251, HEK-293 และ HaCaT) นอกจากนี้ยังมีการนำแผ่นเยื่ออิเล็กโทรสปิน PMMA/RBH และ PMMA/R6GH ที่เซ็นเซอร์ประกอบด้วยอนุพันธ์ของ rhodamine ที่ขึ้นรูปโดยเทคนิคอิเล็กโทรสปินนิ่งมาทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนปรอท พบว่าแผ่นเยื่อทั้งสองชนิดมีความสามารถในการตรวจวัดไอออนปรอทได้อย่างจำเพาะเจาะจงในตัวกลางที่เป็นน้ำ ซึ่งสามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีจากสีขาวเป็นสีชมพูได้ด้วยตาเปล่าอย่างง่ายดาย

61317803 : Major CHEMISTRY

Keyword : FLUORESCENCE SENSOR, CYANINE, [5]HELICENE, SELECTIVITY, HEAVY METAL ION DETECTION, NEKED EYES

MISS NIRUMON CHAILEK : DESIGN AND SYNTHESIS OF VISIBLE AND NEAR-
INFRARED FLUORESCENCE SENSORS FOR HEAVY METAL IONS SENSING AND
APPLICATION AS A STRIP TEST USING ELECTROSPINNING TECHNIQUE THESIS ADVISOR :
PROFESSOR DR. NANTANIT WANICHACHEVA

Two new fluorescence sensors were designed and synthesized. For the detection of Cu^{2+} using cyanine derivative offered the emission in the near-infrared (NIR) regions and the detection of Hg^{2+} using [5]helicene derivative offered the emission in the UV-visible regions. Fluorescence sensor (Cy7C4) based on cyanine derivative show high selectivity to detect Cu^{2+} in 50:50 v/v HEPES buffer (pH 7.4): acetonitrile with the chromogenic change from blue to colorless via naked-eye observation. The detection limit was estimated to be 1.56 ppb. Cy7C4 was capable to distinguish the contaminated Cu^{2+} in real water samples and brain tumor cell. In addition, this sensor was adopted in flow injection analysis (FIA) for automated monitoring Cu^{2+} with dual channel detections of UV-Vis and fluorescence signaling. Fluorescence sensor (M201NHP) was synthesized from [5]helicene derivative with a very large Stokes shift. The sensor exhibited the highly selective recognition of Hg^{2+} in 40:60 v/v H_2O : acetonitrile, with the low detection limit down to 1.94 ppb. Remarkably, the sensitivity and selectivity toward Hg^{2+} of M201NHP did not receive any influences from the existence of other competing ions in the system. This sensor showed a reversible behavior to determine Hg^{2+} using cysteine for several times. Moreover, M201NHP was capable to distinguish the contaminated Hg^{2+} in skin-lightening gel, real water samples and human cell lines (U251, HEK-293 and HaCaT). Additionally, electrospun sensor strips (PMMA/RBH and PMMA/R6GH) containing rhodamine derivative by electrospinning technique were tested for detection of Hg^{2+} . The sensor strips shows high selectivity to detect Hg^{2+} in aqueous media and show colorimetric change unique to Hg^{2+} (white to pink) by the naked eye.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดีเพราะได้รับความกรุณาชี้แนะและช่วยเหลือเป็นอย่างดี จากผู้มีพระคุณหลายท่าน

ขอขอบพระคุณโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก (คปก.) สำหรับการสนับสนุนตลอดการศึกษาปริญญาเอกและการดำเนินวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณศาสตราจารย์ ดร. นันทินิตย์ วานิชชิวะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์เป็นอย่างสูง สำหรับความกรุณาที่มีให้ทั้งการให้คำปรึกษาคำแนะนำ ความรู้รวมถึงความช่วยเหลืออันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการทำวิทยานิพนธ์ซึ่งทำให้งานนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น และการวางแผนการเรียนในขั้นสูงขึ้นไป ตลอดจนกำลังใจโอกาสและประสบการณ์ดีๆ ที่มอบให้ดิฉันตลอดมา

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุธินี เกิดเทพ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม เป็นอย่างสูง สำหรับคำแนะนำคำปรึกษา และอนุเคราะห์สารเคมีซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำวิทยานิพนธ์ ทำให้สามารถดำเนินการทำวิทยานิพนธ์อย่างราบรื่นเป็นอย่างดี

ขอขอบคุณ ดร. ธนศาสตร์ สุขศรีเมือง ประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และอนุเคราะห์สารเคมีซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พัฒนาวีศว์ สว่างลาภ อาจารย์กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่างๆ อันเป็นประโยชน์ต่อวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณอาจารย์ ดร.จิตนภา ศิริรักษ์ อาจารย์กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษาและให้ความช่วยเหลือทางด้านเคมีเชิงคำนวณ รวมถึงคำสอนอันเป็นประโยชน์ต่อการดำเนินชีวิตและการเรียนต่อในอนาคต

ขอขอบคุณพ่อ คุณแม่ และน้องสาว ที่เป็นกำลังใจ ให้ความรักความอบอุ่นและให้การ สนับสนุนในทุกๆ เรื่อง ตลอดจนคำปรึกษาที่ดีในด้านต่างๆ มาโดยตลอด

ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร สำหรับความรู้และประสบการณ์ที่ดีในขณะที่ได้ศึกษาอยู่ ณ สถาบันการศึกษาแห่งนี้

ขอขอบคุณอาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่าน ที่กรุณาประสิทธิ์ประสาทความรู้ต่างๆ ทั้งความรู้ในด้านวิชาการและด้านการดำเนินชีวิต

ขอขอบคุณพี่ น้อง และเพื่อนในกลุ่มทำงานทุกคน สำหรับคำปรึกษาในการแก้ปัญหาทางด้าน ต่างๆ และมิตรจิตอันดีที่มอบให้แกกันมาโดยตลอด

สุดท้ายขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาเคมีทุกท่าน ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการดำเนินงานเอกสาร อีกทั้งขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเคมีทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือด้านอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำวิทยานิพนธ์ด้วยความเอื้อเฟื้อตลอดมา

ประโยชน์อันใดที่เกิดจากการทำวิทยานิพนธ์นี้ย่อมเป็นผลมาจากความกรุณาของทุกท่าน ดังกล่าว ดิฉันรู้สึกซาบซึ้งและระลึกถึงความกรุณาเป็นอย่างยิ่ง จึงใคร่ขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

นางสาว นิยมล ใจเหล็ก

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ซ
สารบัญรูปภาพ.....	ฅ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....	9
บทที่ 3 อุปกรณ์และสารเคมี.....	21
บทที่ 4 วิธีการทดลอง.....	25
บทที่ 5 ผลการดำเนินงานวิจัย.....	55
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย.....	123
ภาคผนวก.....	126
รายการอ้างอิง.....	155
ประวัติผู้เขียน.....	161

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณทองแดงและปรอทสูงสุดที่สามารถปนเปื้อนในน้ำดื่มได้ โดย WHO และ U.S. EPA.....	2
ตารางที่ 2 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ สำหรับการทดสอบความไว (sensitivity) ของเซ็นเซอร์ Cy7C4....	34
ตารางที่ 3 ค่าพารามิเตอร์ที่กำหนดสำหรับตรวจวัดไอออนทองแดงของเซ็นเซอร์ Cy7C4	41
ตารางที่ 4 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ สำหรับการทดสอบความไว (sensitivity) ของเซ็นเซอร์ M201NHP	43
ตารางที่ 5 ตารางแสดงค่าพารามิเตอร์ที่ใช้ในการวัดฟลูออเรสเซนซ์เพื่อหาค่าประสิทธิภาพเชิงควอนตัมทางฟลูออเรสเซนซ์.....	49
ตารางที่ 6 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ สำหรับการทดสอบความไว (sensitivity) ของแผ่นเยื่อ PMMA/RBH และ PMMA/R6GH (sensor strips).....	53
ตารางที่ 7 แสดงข้อมูลที่ใช้ในการคำนวณค่า detection limit ของเซ็นเซอร์ Cy7C4.....	81
ตารางที่ 8 ข้อมูลค่าความเข้มข้นของไอออนทองแดงที่เติมลงไป $[Cu^{2+}]$, ค่า $1/[Cu^{2+}]$ (ความเข้มข้นของไอออนทองแดงที่เติมลงไป) ค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์ Cy7C4 และ ค่า $1/(I_0-I)$ ที่ได้จากการคำนวณ ของเซ็นเซอร์ Cy7C4, λ_{ex} เท่ากับ 640 nm	88
ตารางที่ 9 แสดงค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) การหาปริมาณไอออนทองโดยวิธีที่แตกต่างกัน	96
ตารางที่ 10 แสดงข้อมูลที่ใช้ในการคำนวณค่า detection limit ของเซ็นเซอร์ M201NHP	102
ตารางที่ 11 ข้อมูลค่าความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมลงไป $[Hg^{2+}]$, ค่า $1/[Hg^{2+}]$ (ความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมลงไป) ค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์ M201NHP และ ค่า $1/(I_0-I)$ ที่ได้จากการคำนวณของเซ็นเซอร์ M201NHP, λ_{ex} เท่ากับ 373 nm	108
ตารางที่ 12 สรุปผลการทดลองของสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ Cy7C4	123
ตารางที่ 13 สรุปผลการทดลองของสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ M201NHP	124

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 ลักษณะการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์แบบ OFF-ON system ก่อนตรวจจับไอออนโลหะ (ซ้าย) และภายหลังการตรวจจับไอออนโลหะ (ขวา)	4
ภาพที่ 2 ลักษณะการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์แบบ ON-OFF system ก่อนตรวจจับไอออนโลหะ (ซ้าย) และภายหลังตรวจจับไอออนโลหะ (ขวา).....	4
ภาพที่ 3 โครงสร้างของโมเลกุลเป้าหมาย (target molecules).....	5
ภาพที่ 4 โครงสร้างของสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ชนิด RBH และ R6GH.....	6
ภาพที่ 5 แสดงการผลิตแผ่นเยื่อพอลิเมอร์โดยเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิง [22]	7
ภาพที่ 6 โครงสร้างของสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ของ Zheng และคณะ (เซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนเงิน) และการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในสถานะที่มีไอออน	10
ภาพที่ 7 โครงสร้างของสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ของ Guo และคณะ (เซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนสังกะสี) และการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในสถานะที่มีไอออน.....	10
ภาพที่ 8 โครงสร้างของสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ของ Wang และคณะ (เซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนแคลเซียม) และการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในสถานะที่มีไอออน (ภาพ inset แสดงการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเซ็นเซอร์ ก่อนและหลังตรวจวัดไอออนแคลเซียมภายใต้แสงปกติ) .	11
ภาพที่ 9 โครงสร้างของสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ของ Datta และคณะ (เซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนอะลูมิเนียม) และการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในสถานะที่มีไอออน (ภาพ inset แสดงการเปลี่ยนแปลงเรืองแสงของสารละลายเซ็นเซอร์ ก่อนและหลังตรวจวัดไอออนอะลูมิเนียมภายใต้แสงยูวี)	11
ภาพที่ 10 โครงสร้างของสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ของ Zhang และคณะ (เซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนเงิน) และการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในสถานะที่มีไอออน (ภาพ inset แสดงการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเซ็นเซอร์ ก่อนและหลังตรวจวัดไอออนเงินภายใต้แสงปกติ).....	12
ภาพที่ 11 โครงสร้างของสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ของ Li และคณะ (เซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนสังกะสี, แคลเซียม และปรอท) และการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในสถานะที่มีไอออนต่างๆ	13
ภาพที่ 12 โครงสร้างของสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ของ Li และคณะ (เซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนปรอท) และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง และการเปลี่ยนแปลงสีภายใต้แสงปกติและใต้แสงยูวี	13

ภาพที่ 13 โครงสร้างของสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ของ Petdum และคณะ (เซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนเงิน) และการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ในสภาวะที่มีไอออน.....	14
ภาพที่ 14 โครงสร้างของสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ของ Petdum และคณะ (เซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนปรอท) และการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ในสภาวะที่มีไอออน (ภาพ inset แสดงการเปลี่ยนแปลงเรืองแสงของสารละลายเซ็นเซอร์ ก่อนและหลังตรวจวัดไอออนปรอทภายใต้แสงยูวี)...	14
ภาพที่ 15 โครงสร้างของสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ของ Kaewnok และคณะ (เซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนปรอท) และการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ในสภาวะที่มีไอออน (ภาพ inset แสดงการเปลี่ยนแปลงเรืองแสงของสารละลายเซ็นเซอร์ ก่อนและหลังตรวจวัดไอออนปรอทภายใต้แสงยูวี)	15
ภาพที่ 16 ภาพประกอบสำหรับการเตรียมแผ่นเยื่อ poly (MMA-co-NAAP) โดยวิธีอิเล็กโทรสปินนิงสำหรับการตรวจวัดไอออนทองแดง (Cu^{2+})	16
ภาพที่ 17 ภาพกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ของแผ่นเยื่ออิเล็กโทรสปิน EC/ODC-3 ภายใต้กำลังขยายที่แตกต่างกัน.....	17
ภาพที่ 18 แสดงการเปลี่ยนแปลงสีในการตรวจวัดไอออนโลหะหนักที่ความเข้มข้นของไอออนเหล็กและ pH ต่างๆ ด้วยแผ่นเยื่อของ Saithongdee และคณะ.....	18
ภาพที่ 19 ภาพลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นใยโดย SEM ของแผ่นเยื่อของ Cho และคณะ และการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ในสภาวะที่มีไอออน.....	18
ภาพที่ 20 แสดงการเปลี่ยนแปลงสีของแผ่นเยื่อของ Chen และคณะก่อนและหลังแช่ลงในสารละลายไอออนปรอท.....	19
ภาพที่ 21 แสดงการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไอออนโลหะกับแผ่นเยื่ออิเล็กโทรสปิน PCL/FPN.....	19
ภาพที่ 22 แสดงการเปลี่ยนแปลงสีของแผ่นเยื่อของ Tonsomboon และคณะ ก่อนและหลังแช่ลงในสารละลายไอออนปรอทภายใต้แสงปกติ (แสงขาว) และภายใต้แสงยูวี และภาพลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นใยโดย SEM.....	20
ภาพที่ 23 โครงสร้างของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ Cy7C4 และ M201NHP.....	25
ภาพที่ 24 Retrosynthesis ของเซ็นเซอร์ Cy7C4.....	26
ภาพที่ 25 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ 2-(4-(2-aminoethylsulfanyl)butylsulfanyl)ethanamine (I-1)	26
ภาพที่ 26 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาร F-1.....	28

ภาพที่ 27 ปฏิกริยาการสังเคราะห์สารไซยานีน F-2	29
ภาพที่ 28 สมการปฏิกริยาการสังเคราะห์สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ Cy7C4	29
ภาพที่ 29 Retrosynthesis ของเซ็นเซอร์ M201NHP	30
ภาพที่ 30 สมการปฏิกริยาการสังเคราะห์ M201NH	31
ภาพที่ 31 สมการปฏิกริยาการสังเคราะห์ M201NHP	32
ภาพที่ 32 การต่อระบบ FIA สำหรับตรวจวัดไอออนทองแดง	41
ภาพที่ 33 โครงสร้างทางเคมีของ 2-[4-(2-aminoethylsulfanyl)butylsulfanyl]ethanamine (I-1) 56	
ภาพที่ 34 ¹ H NMR ของ 2-[4-(2-aminoethylsulfanyl)butylsulfanyl]ethanamine (I-1).....	56
ภาพที่ 35 ¹³ C NMR ของ 2-[4-(2-aminoethylsulfanyl)butylsulfanyl]ethanamine (I-1)	57
ภาพที่ 36 ¹³ C DEPT135 NMR สเปกตรัมของ 2-[4-(2-aminoethylsulfanyl)butylsulfanyl].....	57
ภาพที่ 37 HR-ESI MS ของ 2-[4-(2-aminoethylsulfanyl)butylsulfanyl]ethanamine (I-1)...	58
ภาพที่ 38 กลไกการเกิดปฏิกริยาของ 2-[4-(2-aminoethylsulfanyl)butylsulfanyl]ethanamine (I-1)....	59
ภาพที่ 39 โครงสร้างทางเคมีของไซยานีน F-2	59
ภาพที่ 40 ¹ H NMR สเปกตรัมของไซยานีน F-2.....	60
ภาพที่ 41 ¹³ C NMR สเปกตรัมของไซยานีน F-2	60
ภาพที่ 42 ¹³ C DEPT135 NMR สเปกตรัมของไซยานีน F-2	61
ภาพที่ 43 HR-ESI MS สเปกตรัมของไซยานีน F-2.....	61
ภาพที่ 44 กลไกการเกิดปฏิกริยาของสารประกอบ F-1	63
ภาพที่ 45 กลไกการเกิดปฏิกริยาของสารฟลูออโรฟอร์ชนิดไซยานีน (cyanine dye, F-2).....	64
ภาพที่ 46 โครงสร้างทางเคมีของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ Cy7C4	64
ภาพที่ 47 ¹ H NMR สเปกตรัมของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ Cy7C4	65
ภาพที่ 48 ¹³ C NMR สเปกตรัมของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ Cy7C4	66
ภาพที่ 49 ¹³ C DEPT135 NMR สเปกตรัมของสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ Cy7C4.....	66
ภาพที่ 50 HR-ESI MS สเปกตรัมของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ Cy7C4	67

ภาพที่ 51 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ Cy7C4.....	68
ภาพที่ 52 โครงสร้างทางเคมีของ M201NH.....	69
ภาพที่ 53 ¹ H NMR สเปกตรัมของ M201NH.....	70
ภาพที่ 54 ¹³ C NMR สเปกตรัมของ M201NH.....	70
ภาพที่ 55 DEPT-135 NMR สเปกตรัมของ M201NH	71
ภาพที่ 56 HR-ESI MS สเปกตรัมของ M201NH	71
ภาพที่ 57 กลไกการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์ M201NH	72
ภาพที่ 58 โครงสร้างทางเคมีของ M201NHP.....	72
ภาพที่ 59 ¹ H NMR สเปกตรัมของ M201NHP	73
ภาพที่ 60 ¹³ C NMR สเปกตรัมของ M201NHP	74
ภาพที่ 61 DEPT-135 NMR สเปกตรัมของ M201NHP	74
ภาพที่ 62 HR-ESI MS สเปกตรัมของ M201NHP	75
ภาพที่ 63 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ M201NHP.....	76
ภาพที่ 64 แสดงค่าความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสง และค่าความยาวคลื่นของการคายแสงของ เซ็นเซอร์ Cy7C4 (10 μM).....	77
ภาพที่ 65 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง florescence intensity (λ_{ex} 640 nm, λ_{em} 720 nm) และ เวลาของเซ็นเซอร์ Cy7C4 (10 μM) เมื่อเติมไอออนทองแดงเปอร์คลอเรต (10 μM) สารละลายผสม ระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES buffer เข้มข้น 5 mM pH 7.2 และ acetonitrile ในอัตราส่วน 50:50 v/v	78
ภาพที่ 66 การดูดแสงของเซ็นเซอร์ Cy7C4 (60 μM) สารละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES buffer เข้มข้น 5 mM pH 7.2 และ acetonitrile ในอัตราส่วน 50:50 v/v ก่อนและหลัง เติมไอออนทองแดงเปอร์คลอเรตที่ความเข้มข้นต่างๆ a: 0 μM, b: 2.0 μM, c: 4.0 μM, d: 6.0 μM, e: 8.0 μM, f: 10 μM, g: 12 μM, h: 14 μM, i: 16 μM, j: 18 μM และ k: 20 μM	79
ภาพที่ 67 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (λ_{ex} 640 nm) ของเซ็นเซอร์ Cy7C4 (10 μM) สารละลาย ผสมระหว่าง สารละลายบัฟเฟอร์ HEPES buffer เข้มข้น 5 mM pH 7.2 และ acetonitrile (50:50 v/v) ก่อนและหลังเติมไอออนทองแดงเปอร์คลอเรตที่ความเข้มข้นต่างๆ a: 0 μM, b: 2.0 μM, c: 3.3	

μM, d: 4.7 μM, e: 6 μM, f: 7.3 μM, g: 8.7 μM, h: 10 μM, i: 11 μM, j: 13 μM, k: 14 μM และ l: 15 μM..... 80

ภาพที่ 68 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยส่วนต่างของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ (I_0-I) ที่ความยาวคลื่น (λ_{em}) 720 nm และความเข้มข้นของทองแดงที่เติมลงไป..... 82

ภาพที่ 69 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ (λ_{ex} 640 nm, λ_{em} 720 nm) ของเซ็นเซอร์ Cy7C4 (10 μM) ในสารละลายผสมระหว่าง HEPES buffer เข้มข้น 5 mM pH 7.2 และ acetonitrile (50:50 v/v) ในภาวะที่มีไอออนโลหะของเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 83

ภาพที่ 70 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ (λ_{ex} 640 nm, λ_{em} 720 nm) ของเซ็นเซอร์ Cy7C4 (10 μM) ในสารละลายผสมระหว่าง HEPES buffer เข้มข้น 5 mM pH 7.2 และ acetonitrile (50:50 v/v) ในภาวะที่มีไอออนโลหะของเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 15 μM..... 83

ภาพที่ 71 สีของสารละลายเซ็นเซอร์ Cy7C4 (10 μM) ในสารละลายผสมระหว่าง HEPES buffer เข้มข้น 5 mM pH 7.2 และ acetonitrile (50:50 v/v) ภายใต้แสงปกติ (แสงขาว) ก่อนและหลังการเติมไอออนเปอร์คลอเรต (perchlorate salts) ของไอออนโลหะชนิดต่างๆ คือ Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{2+} , Ag^+ , Ni^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , Li^+ และ Al^{3+} (5 μM).... 85

ภาพที่ 72 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ (λ_{ex} 640 nm, λ_{em} 720 nm) ของเซ็นเซอร์ Cy7C4 (10 μM) ในสารละลายผสมระหว่าง HEPES buffer เข้มข้น 5 mM pH 7.2 และ acetonitrile (50:50 v/v) ในภาวะที่มีความเข้มข้นของไอออนรบกวนต่างๆ เจือปนในสารละลาย 33.3 μM (10 equiv.) ที่มีความเข้มข้นของไอออนทองแดง 3.33 μM..... 86

ภาพที่ 73 กราฟแสดงอัตราส่วนระหว่างโมเลกุลของเซ็นเซอร์ Cy7C4 กับไอออนทองแดงที่ใช้ในการเกิด binding ศึกษาโดยวิธี Job's plot..... 87

ภาพที่ 74 กราฟจากการคำนวณตามสมการ Benesi-Hildebrand ของเซ็นเซอร์ Cy7C4 (n=1).... 88

ภาพที่ 75 แสดงลักษณะโครงสร้างด้วยเทคนิค molecular modeling ของ a) โครงสร้างของเซ็นเซอร์ Cy7C4 ในสภาวะก่อนดักจับไอออนทองแดง b) โครงสร้างของเซ็นเซอร์ Cy7C4 ในสภาวะหลังดักจับไอออนทองแดง (Cy7C4: Cu^{2+} อัตราส่วน 1:1) 89

ภาพที่ 76 การเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเซ็นเซอร์ Cy7C4 (10 μM) ในน้ำ ตัวอย่าง (a) น้ำดื่ม (DW) (b) น้ำแร่ (MW) (c) น้ำจากอ่างเก็บน้ำ (PW) (d) น้ำจากแม่น้ำ (RW) (e) น้ำทะเล (SW) (f) น้ำประปา (TW) ก่อนและหลังเติม Cu^{2+} (1, 2, 3, 4 และ 5 μM)..... 91

ภาพที่ 77 ภาพการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ภายในเซลล์ U251 a) control cells; ป่มด้วย Cy7C4 (10 μ M); ป่มด้วย $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$; การป่มด้วย $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ (50, 100 และ 200 μ M) เป็นเวลา 20 ชั่วโมงก่อน ป่มด้วย Cy7C4 (10 μ M) อีก 30 นาที b) ข้อมูลการเรืองแสงของเซลล์ U251 (n = 40) ที่ป่มด้วย Cy7C4 (10 μ M) ก่อนและหลังเติม Cu^{2+} (50-200 μ M) และมีการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้การทดสอบแบบ Student's two tailed t-test (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)	93
ภาพที่ 78 แผนผังอย่างง่ายของระบบ flow injection analysis (FIA).....	94
ภาพที่ 79 a) แสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ อิมิสชัน ที่ 720 nm b) ค่าการดูดกลืนแสงที่ λ_{max} 640 nm ที่เติมไอออนทองแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยมีฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ Cy7C4 ใน flow injection analysis	95
ภาพที่ 80 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของไอออนทองแดงที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง peak height ที่ความยาวคลื่น (λ_{em}) 720 nm และความเข้มข้นของทองแดงที่เติมลงไปที่ได้จากเทคนิค FIA-spectrofluorometer	96
ภาพที่ 81 แสดงค่าความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสง และค่าความยาวคลื่นของการคายแสงของ เซ็นเซอร์ M201NHP (50 μ M) ในสารละลายผสม H_2O และ acetonitrile ในอัตราส่วน 40:60 v/v	98
ภาพที่ 82 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง florescence intensity (λ_{ex} 373 nm, λ_{em} 565 nm) และ เวลาของเซ็นเซอร์ M201NHP (50 μ M) เมื่อเติมไอออนปรอทคลอไรด์ (10 μ M) ในสารละลายผสม H_2O และ acetonitrile ในอัตราส่วน 40:60 v/v.....	99
ภาพที่ 83 การดูดแสงของเซ็นเซอร์ M201NHP (50 μ M) สารละลาย H_2O และ acetonitrile ใน อัตราส่วน 40:60 v/v ก่อนและหลังเติมไอออนปรอทที่ความเข้มข้นต่างๆ a: 0 μ M, b: 3.3 μ M, c: 6.7 μ M, d: 10 μ M, e: 13 μ M, f: 17 μ M, g: 20 μ M และ h: 23 μ M	100
ภาพที่ 84 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ (λ_{ex} 373 nm) ของเซ็นเซอร์ M201NHP (50 μ M) ใน สารละลายผสม $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ ในอัตราส่วน 40:60 v/v ก่อนและหลังเติมไอออนปรอทคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ, [Hg^{2+}] ที่ a: 0.0 μ M, b: 0.75 μ M, c: 3.3 μ M, d: 4.5 μ M, e: 5.8 μ M, f: 7.0 μ M, g: 8.25 μ M, h: 9.5 μ M และ i: 11 μ M	101
ภาพที่ 85 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยส่วนต่างของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ (I_0-I) ที่ ความยาวคลื่น (λ_{em}) 565 nm และความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมลงไป	102

ภาพที่ 86 แสดงผลการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ (λ_{ex} 373 nm, λ_{em} 565 nm) ของเซ็นเซอร์ M201NHP (50 μ M) ในสารละลายผสม H₂O และ acetonitrile (40:60 v/v) ในภาวะที่มีไอออนโลหะของเกลือคลอไรด์ชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นต่างๆ 104

ภาพที่ 87 การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเซ็นเซอร์ M201NHP (50 μ M) ในสารละลายผสม H₂O และ acetonitrile (40:60 v/v) ก่อนและหลังการเติมไอออนโลหะชนิดต่างๆ ดังนี้ Hg²⁺, Cu²⁺, Ag⁺, Pb²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺, Fe³⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Al³⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Ba²⁺, K⁺, Li⁺ และ Na⁺ (20 μ M) 104

ภาพที่ 88 แสดงผลการทดสอบการรบกวน (competitive experiments) ของไอออนโลหะชนิดต่างๆ ที่มีต่อค่านอร์มัลไลซ์ อิมิสชัน อินเทนซิตี (normalized emission intensity; I/I₀ ที่ 565 nm) (λ_{ex} 373 nm) ของสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ M201NHP และ Hg²⁺ (M201NHP:Hg²⁺) ในสารละลายผสม H₂O และ acetonitrile (40:60 v/v) โดยความเข้มข้นของ [M201NHP] = 5 μ M; [Hg²⁺] = 10 μ M และไอออนโลหะ [Mⁿ⁺] = 100 μ M 106

ภาพที่ 89 โครงสร้างทางเคมีของ 9,10-diphenylanthracene 106

ภาพที่ 90 กราฟแสดงอัตราส่วนระหว่างโมเลกุลของเซ็นเซอร์ M201NHP กับไอออนปรอทที่ใช้ในการเกิด binding ศึกษาโดยวิธี Job's plot 107

ภาพที่ 91 กราฟจากการคำนวณตามสมการ Benesi-Hildebrand ของเซ็นเซอร์ M201NHP เมื่อ n=1.... 108

ภาพที่ 92 แสดงลักษณะโครงสร้างด้วยเทคนิค molecular modeling ของ a) โครงสร้างของเซ็นเซอร์ M201NHP ในสภาวะก่อนดักจับไอออนปรอท b) โครงสร้างของเซ็นเซอร์ M201NHP ในสภาวะหลังดักจับไอออนปรอท (M201NHP:Hg²⁺ อัตราส่วน 1:1) 109

ภาพที่ 93 แสดงผลการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ (λ_{ex} 373 nm, λ_{em} 565 nm) ของเซ็นเซอร์ M201NHP (50 μ M) ในสารละลายผสม HEPES buffer และ acetonitrile (40:60 v/v) ในภาวะที่มีไอออนปรอท (10 μ M) ที่ pH ช่วง 3.0-10.0 110

ภาพที่ 94 แสดงการนำกลับมาใช้ใหม่ของเซ็นเซอร์ M201NHP (50 μ M) โดยใช้ Cys เป็นสารที่มีแรงกระทำกับไอออนปรอทเมื่อเติม [Hg²⁺] = 6.7 μ M และ [Cys] = 20 μ M 111

ภาพที่ 95 การเปลี่ยนแปลงสีภายใต้แสงยูวีของเซ็นเซอร์ M201NHP ดังนี้ (a) เจลเพิ่มความกระจ่างใส, (b) เจลเพิ่มความกระจ่างใส+M201NHP และ (c)-(h) เจลเพิ่มความกระจ่างใส+M201NHP โดยมีความเข้มข้นของไอออนปรอท 0.01, 0.03, 0.04, 0.05, 0.07 และ 0.13 mM 112

ภาพที่ 96 การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายภายใต้แสงยูวีของเซ็นเซอร์ M201NHP (50 μM) ในน้ำ
ตัวอย่าง (a) น้ำดื่ม (DW) (b) น้ำแร่ (MW) (c) น้ำประปา (TW) และ (d) น้ำจากอ่างเก็บน้ำ (PW)
ก่อนและหลังเติม Hg^{2+} (5, 10 และ 15 μM)..... 113

ภาพที่ 97 (A) ภาพการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ภายในเซลล์ U251, HEK-293 และ HaCaT
ประกอบด้วย control cells; 20 μM ของ HgCl_2 ; 10 μM ของ M201NHP และ HgCl_2 ความเข้มข้น
20 μM ร่วมกับเซ็นเซอร์ M201NHP เข้มข้น 10 μM โดยทำการบ่ม HgCl_2 เป็นเวลา 30 นาที แล้ว
ล้างออกด้วย PBS บัฟเฟอร์ 3 ครั้ง จากนั้นเติม M201NHP บ่มเป็นเวลา 30 นาที ก่อนที่จะล้างออก
ด้วย PBS บัฟเฟอร์ 3 ครั้ง และนำไปถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอล (B) ข้อมูลการเรือง
แสงของเซลล์ U251, HEK-293 และ HaCaT ในเชิงปริมาณโดยใช้ โปรแกรม image J ($n = 30$) และ
มีการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้การทดสอบแบบ T-test ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$)..... 114

ภาพที่ 98 ผลของเซ็นเซอร์ M201NHP ต่อความมีชีวิตของเซลล์ U251, HEK-293 และ HaCaT (%)
ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0-50 μM) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 115

ภาพที่ 99 โครงสร้างทางเคมีของ RBH และ R6GH..... 115

ภาพที่ 100 ภาพถ่าย SEM และการกระจายขนาดของแผ่นเยื่ออิเล็กทรอนิกส์ a) PMMA/RBH และ
b) PMMA/R6GH (sensor strips)..... 116

ภาพที่ 101 ภาพถ่ายแผ่นเยื่ออิเล็กทรอนิกส์ PMMA/RBH และ PMMA/R6GH ก่อนและหลังแช่ใน
สารละลายปรอทที่ความเข้มข้นต่างๆ 117

ภาพที่ 102 แสดงการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{\text{ex}} 500 \text{ nm}$) ของแผ่นเยื่อ PMMA/RBH และ
PMMA/R6GH sensor strips ก่อนและภายหลังการแช่ในสารละลายปรอทเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ a) 0
 μM , b) DI water, c) 2 μM , d) 20 μM และ e) 200 μM 118

ภาพที่ 103 แสดงการเกิดสารประกอบ (complex) ของแผ่นเยื่อ PMMA/RBH และ PMMA/R6GH
sensor strips ภายหลังจากการจับกับไอออนปรอท 119

ภาพที่ 104 a) แสดงการเปลี่ยนแปลงสีของแผ่นเยื่อ PMMA/RBH และ PMMA/R6GH ก่อนและหลัง
แช่ในสารละลายไอออนต่างๆ (20 mM) b) แสดง normalized fluorescence intensity ที่ 582
nm ของแผ่นเยื่อ PMMA/RBH และ PMMA/R6GH sensor strips ภายหลังจากแช่ในสารละลาย
ไอออนต่างๆ เข้มข้น 20 mM และ 200 μM 120

ภาพที่ 105 แสดงผลการทดสอบการรบกวน (competitive experiments) ของไอออนโลหะชนิด ต่างๆ ที่มีต่อค่า normalized emission intensity; I_f/I_0 ที่ 514 nm ของแผ่นเยื่อ PMMA/RBH และ PMMA/R6GH sensor strips โดย $[Hg^{2+}]:[M^{n+}] = 1:10$	121
ภาพที่ 106 การนำกลับมาใช้ใหม่ (reusability) ของแผ่นเยื่อ PMMA/RBH และ PMMA/R6GH sensor strips	122



บทที่ 1

บทนำ

ด้วยประชากรมนุษย์บนโลกเพิ่มจำนวนขึ้น ความต้องการของมนุษย์ก็เพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ เช่น ความต้องการด้านเทคโนโลยีเพื่ออำนวยความสะดวกสบายในการดำรงชีวิต ความต้องการทางด้านความสวยความงาม ความต้องการทางการแพทย์ รวมถึงอาหารในการดำรงชีวิต ซึ่งการตอบสนองความต้องการเหล่านี้ ส่งผลให้ภาคอุตสาหกรรมขยายตัวเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และในกระบวนการผลิตต่างๆ นั้น มักจะมีการใช้สารเคมีในขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งอยู่เสมอ และสารเคมีที่เหลืออยู่หรือของเสียที่เกิดจากกระบวนการผลิตนี้ อาจตกค้างซึ่งเป็นอันตรายทั้งต่อระบบนิเวศน์ และร่างกายมนุษย์ โดยเฉพาะมลพิษที่อยู่ในรูปของสารประกอบไอออนของโลหะหนักที่ร่างกายมนุษย์สามารถรับผ่านทางน้ำดื่ม อาหาร สิ่งแวดล้อม และแหล่งทางชีววิทยา หากปัญหาเหล่านี้ไม่ได้รับการแก้ไข อาจส่งผลกระทบต่อวิวัฒนาการของมนุษย์และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ได้ เช่น ไอออนทองแดงเป็นไอออนโลหะหนักที่มีประโยชน์ในกระบวนการต่างๆ ของร่างกาย แต่หากร่างกายของมนุษย์ได้รับทองแดงในปริมาณมาก และเกินความต้องการ จะเกิดผลเสียต่อสมดุลและกลไกต่างๆ ของร่างกายในระดับเซลล์ได้ [1, 2] เช่น ทำให้เกิดอาการอาเจียน ท้องเสีย ปวดท้อง เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อในช่องท้อง และกล้ามเนื้อ หัวใจทำงานผิดปกติ ภูมิคุ้มกันร่างกายเสื่อม และหากได้รับทองแดงติดต่อกันเป็นเวลานาน จะทำให้ตับทำหน้าที่บกพร่อง ไม่สามารถขับทองแดงออกจากร่างกายได้ตามปกติ จนเกิดการสะสมอยู่ในร่างกายเป็นปริมาณมาก ส่งผลให้เกิดความผิดปกติของร่างกาย ตัวอย่างเช่น กลุ่มอาการวิลสัน (Wilson's diseases) ที่ร่างกายผู้ป่วยจะแสดงอาการสันเทาอยู่ตลอดเวลา กล้ามเนื้อแข็งเกร็ง มีน้ำมูกน้ำลายไหล ควบคุมการพูดลำบาก กลุ่มอาการ Menkes syndrome เกิดจากความบกพร่องในยีน ATPase Copper Transporting Alpha (ATP7A) ส่งผลให้กล้ามเนื้ออ่อนแอ ผิวหน้าหย่อนคล้อย พัฒนาการด้านสติปัญญาล่าช้า นอกจากนี้ยังพบว่า ทองแดงยังเป็นหนึ่งในสาเหตุของโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) หรือโรคความจำเสื่อม และโรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) ซึ่งเป็นโรคที่พบมากในผู้สูงอายุอีกด้วย [3-5] และไอออนปรอท เป็นไอออนโลหะหนักที่สามารถปนเปื้อนได้ในสิ่งแวดล้อมทั้งในดิน น้ำ อากาศ ในสิ่งมีชีวิตและสะสมในเนื้อเยื่อสัตว์น้ำ โดยปรอทในรูปของปรอทอินทรีย์ชื่อว่า เมทิลเมอร์คิวรี (methyl mercury, $[CH_3Hg]^+$) ที่สามารถละลายน้ำได้ดีมากจึงมีโอกาสเข้าไปสะสมในร่างกายของสิ่งมีชีวิตได้เป็นอย่างดี จะเป็นพิษต่อร่างกายของมนุษย์มาก หากมีการสะสมปรอทในปริมาณมากจะส่งผลให้เกิดการทำลายดีเอ็นเอ (DNA) [6] ทำลายระบบประสาทและสมอง [6-8] รวมไปถึงทำให้เกิดโรคมินามาตะ [9] โรคนี้แสดงผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง มีอาการบวมหรืออักเสบที่สมอง แขนขาเคลื่อนไหวลำบาก มีการกระตุกตัวแข็ง แขนขาบิดงออย่างรุนแรง ดังนั้นเพื่อเป็นการป้องกันและแก้ไขปัญหาดังกล่าวนี้ จึงมีความจำเป็น

ที่จะต้องได้รับการร่วมมือทุกด้าน ทั้งทางภาคอุตสาหกรรมในการกำจัดไอออนโลหะหนักเหล่านี้ก่อนปล่อยทิ้งสู่ธรรมชาติ รวมถึงต้องมีการตรวจวัดปริมาณไอออนโลหะหนักต่างๆ ไม่ให้ปนเปื้อนมากเกินไปจนก่อให้เกิดปัญหาสุขภาพของมนุษย์ และสิ่งมีชีวิต องค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) และสำนักงานปกป้องสิ่งแวดล้อมสหรัฐ (U.S. Environmental Protection Agency, U.S. EPA) จึงได้มีการกำหนดค่ามาตรฐานความเข้มข้นของไอออนทองแดงและไอออนปรอทสูงสุดที่สามารถพบได้ในน้ำดื่ม [10-12] ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณทองแดงและปรอทสูงสุดที่สามารถปนเปื้อนในน้ำดื่มได้ โดย WHO และ U.S. EPA

ชนิดของโลหะหนัก	ความเข้มข้นสูงสุดของโลหะที่มีได้ในน้ำดื่ม (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	WHO	U.S. EPA
ทองแดง	2.0	1.3
ปรอท	0.006	0.002

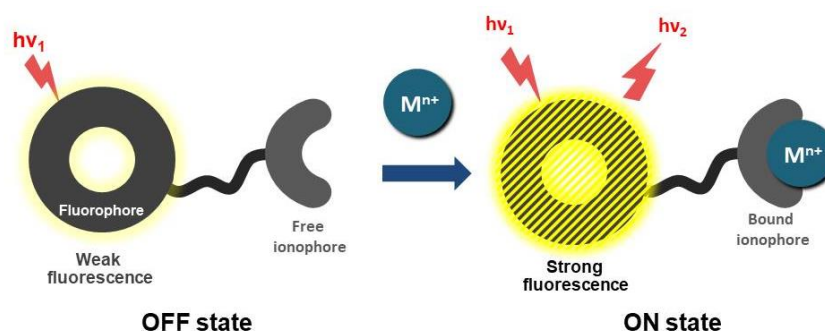
จากตารางที่ 1 จะเห็นได้ว่าทั้งโลหะทองแดงและโลหะปรอทมีความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถปนเปื้อนได้ในน้ำดื่มน้อยมากๆ อยู่ในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร หรือ ppm ดังนั้นการให้ความสำคัญกับปัญหาสิ่งแวดล้อมรอบตัวจึงเป็นสิ่งที่ควรตระหนักอย่างยิ่ง โดยเฉพาะสิ่งแวดล้อมทางน้ำซึ่งเป็นแหล่งปนเปื้อนที่สำคัญอันนำมาสู่การปนเปื้อนของไอออนอันตรายในห่วงโซ่อาหารได้ง่าย ซึ่งน้ำที่ปนเปื้อนด้วยสารอันตรายจัดเป็นมลพิษทางน้ำที่อยู่ในระดับรุนแรง เพราะส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์และสิ่งมีชีวิต ซึ่งลักษณะของน้ำเสียนั้นจะมีลักษณะดำ ส่องกลิ่นเหม็น หรือไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ดังนั้นคงจะดีไม่น้อยหากมีเครื่องมือหรือวิธีตรวจวัดความเป็นพิษของสิ่งแวดล้อมใกล้ตัวที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน มีประสิทธิภาพ และประหยัดค่าใช้จ่ายให้มากที่สุด

ปัจจุบันมีเทคนิคมาตรฐานมากมายในการตรวจวัดไอออนโลหะมากมาย เช่น อินดักทีฟลีคัปเปิล พลาสมา อะตอม อิมิสชัน สเปกโตรเมทรี (inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, ICP-AES) [13], เฟรม อะตอมมิก แอปซอพชั่น สเปกโตรโฟโตเมทรี (flame atomic absorption spectrometry, AAS) [14, 15], เซอร์เฟส พลาสมอน เรโซแนนซ์ สเปกโตรสโคปี (surface plasmon resonance spectroscopy, SPR) [16], โครมาโทกราฟี (chromatography) [17] และ โวลแทมเมทรี (voltammetry) [18] อย่างไรก็ตามเทคนิคเหล่านี้ต้องใช้ต้นทุนอุปกรณ์สูง ต้นทุนการดำเนินงานสูง ผู้ปฏิบัติงานที่มีทักษะสูงและใช้เวลานาน [19] แต่อีกเทคนิคทางเลือกหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจอย่างแพร่หลายในการตรวจวัดไอออนโลหะชนิดต่าง ๆ ที่มี

ประสิทธิภาพมากทั้งด้านคุณภาพวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์ คือการใช้ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ (fluorescence sensor) เพื่อตรวจวัดโมเลกุลหรือไอออนบางชนิด ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี (fluorescence spectroscopy) ซึ่งมีข้อดีกว่าเทคนิคที่กล่าวข้างต้น เนื่องจากมีความไวในการตรวจวัดสูง (high sensitivity) ความจำเพาะเจาะจงสูง (high selectivity) ต้นทุนการทำงานต่ำ ใช้งานง่าย ใช้สารตัวอย่างเพียงเล็กน้อย (1-3 มิลลิลิตร) ก็สามารถแสดงผลได้ทันที สามารถใช้วิเคราะห์ตัวอย่างได้อย่างต่อเนื่อง (continuous monitoring) และไม่ทำลายสารตัวอย่าง [20] จึงเหมาะกับการวิเคราะห์หาไอออนโลหะหนักที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมที่ความเข้มข้นต่ำๆ ได้

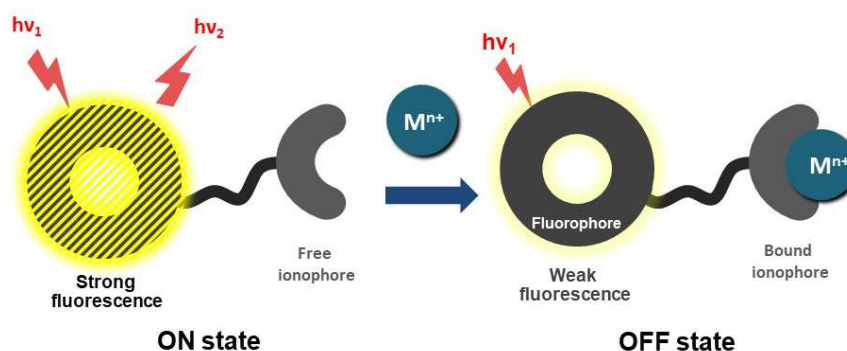
ในการใช้ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ในการตรวจวัดไอออนชนิดหนึ่งๆ จะอาศัยสมบัติทางแสง โดยจะให้แสงที่มีความยาวคลื่นที่เหมาะสม (λ_{ex}) เข้าไปเป็นตัวกระตุ้น แล้วเมื่อฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ได้รับการแสงกระตุ้นเข้ามาในระบบ เซ็นเซอร์จะแสดงการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ออกมาเป็นความยาวคลื่นที่จำเพาะกับชนิดของเซ็นเซอร์นั้น ทำให้เกิดความจำเพาะเจาะจงในการวิเคราะห์ โดยทั่วไปโครงสร้างโมเลกุลของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ ประกอบด้วย 2 ส่วนหลักที่สำคัญ ได้แก่ 1) ฟลูออโรฟอร์ (fluorophore) เป็นส่วนที่แสดงคุณสมบัติฟลูออเรสเซนซ์ โดยการดูดกลืนหรือคายแสงในช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสม 2) ไอโอโนฟอร์ (ionophore) เป็นส่วนที่สามารถดักจับไอออนได้ โดยทั้งสองส่วนนี้จะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะโควาเลนต์ จึงเรียกรวมที่วิเคราะห์โดยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปีว่า “ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ (fluorescence sensor)” หรือ “ฟลูออโรไอโอโนฟอร์ (fluoroionophore)” โดยในระบบเซ็นเซอร์เมื่อทำงานส่วนที่แสดงสัญญาณเปรียบเสมือนตัวแปลงสัญญาณ (transducer) ที่เปลี่ยนข้อมูลของกลไกการดักจับไอออน (recognition event) ไปสู่การเปลี่ยนแปลงสัญญาณทางแสง (optical signal) ผ่านกระบวนการต่าง ๆ เช่น photoinduced electron transfer (PET), formation of monomer/excimer, energy transfer และ fluorescence resonance energy transfer (FRET)

การทำงานของเซ็นเซอร์ในการเกิดการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ จะแบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ 1) ระบบการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่มีลักษณะคล้ายกับการปิด-เปิด สวิตช์ไฟ (OFF-ON system) กล่าวคือในกรณีที่ไม่มีไอออนในสารละลายเซ็นเซอร์จะแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ต่ำ แต่เมื่อมีการตรวจจับไอออนในส่วนของไอโอโนฟอร์แล้วสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ก็จะเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จะแปรผันตรงกับปริมาณของไอออนในสารละลาย ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ลักษณะการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์แบบ OFF-ON system ก่อนตรวจจับไอออนโลหะ (ซ้าย) และภายหลังการตรวจจับไอออนโลหะ (ขวา)

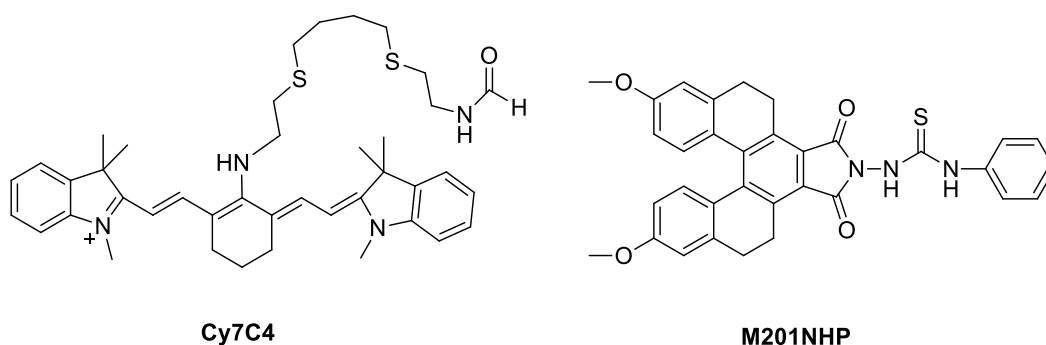
และการทำงานอีกระบบหนึ่ง คือ 2) ระบบการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่มีลักษณะคล้ายกับการเปิด-ปิด สวิตช์ไฟ (ON-OFF system) กล่าวคือในขณะที่ไม่มีไอออนในสารละลายเซ็นเซอร์จะแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่สูง แต่เมื่อมีการตรวจจับไอออนในส่วนของไอออนฟอเรแล้วสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ก็จะลดต่ำลง ซึ่งสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จะแปรผกผันกับปริมาณของไอออนในสารละลาย ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ลักษณะการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์แบบ ON-OFF system ก่อนตรวจจับไอออนโลหะ (ซ้าย) และภายหลังตรวจจับไอออนโลหะ (ขวา)

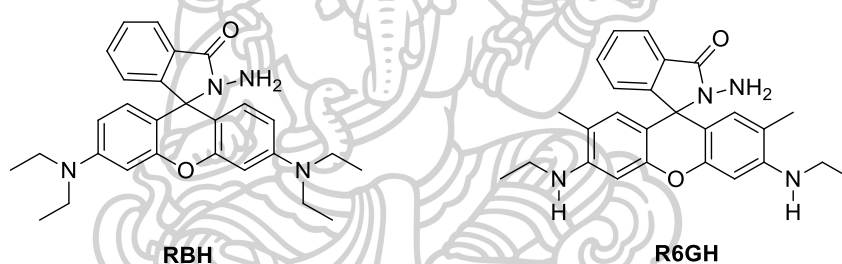
ในปัจจุบันการออกแบบฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ที่มีส่วนของฟลูออโรฟอร์ที่คายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในช่วงใกล้อินฟราเรด (near infrared region, 650-900 nm) และในช่วงวิสิเบิล (visible region, 400-800 nm) กำลังได้รับความสนใจ เนื่องจากมีประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้ในงานด้านต่าง ๆ เช่น ด้านชีวภาพ และวิทยาศาสตร์ทางแพทย์ เป็นต้น นอกจากนี้ความยาวคลื่นในช่วงใกล้อินฟราเรด ยังมีประโยชน์ในการนำไปศึกษาเกี่ยวกับตัวอย่างชีวภาพและสิ่งมีชีวิต เนื่องจากแสงในช่วงใกล้อินฟราเรด ถือว่ามีพลังงานต่ำเมื่อเทียบกับความยาวคลื่นในช่วงแสงที่ตามองเห็น (visible region) ทำให้ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์สิ่งมีชีวิตและไม่ถูกรบกวนโดยสารอื่นๆ ที่ดูดกลืนแสงได้ในเซลล์สิ่งมีชีวิต ดังนั้นในการตรวจวัดไอออนโลหะหนักในเซลล์สิ่งมีชีวิตจึงไม่มีการทำลายเนื้อเยื่อ จึงสามารถ

ลดขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างได้ เช่น การย่อยสลายตัวอย่าง การตรวจวัดจึงเป็นไปได้อย่างสะดวก รวดเร็ว สามารถใช้งานได้ง่ายเพื่อตรวจวัดการปนเปื้อนของไอออนโลหะอันตรายในตัวอย่างจากธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ในวิทยานิพนธ์นี้ได้เสนอการออกแบบและสังเคราะห์สารฟลูออเรสเซนต์ เซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดไอออนทองแดง (Cy7C4) และฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัด ไอออนปรอท (M201NHP) ชนิดใหม่ ที่มีความไวสูงในการตรวจวัดสูง (high sensitivity) และมีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อไอออนทองแดงและไอออนปรอท (high selectivity) อีกทั้งสามารถนำ เซ็นเซอร์ทั้งสองไปประยุกต์ใช้ได้ในตัวอย่างจริง โดยจะเน้นการออกแบบฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ที่ใช้ ฟลูออโรฟอร์เป็นอนุพันธ์ของไซยานีน (cyanine) และอนุพันธ์ของเพนตะเฮลิซีน ([5]helicene) และนอกจากนี้การปรับเปลี่ยนโครงสร้างของ cyanine และ [5]helicene นั้นสามารถทำได้ง่ายจึง เหมาะสำหรับการนำมาใช้งาน โดยเชื่อมต่อกับไอโอโนฟอร์ที่ประกอบด้วยอะตอมที่สามารถดักจับ ไอออนทองแดงและไอออนปรอทได้ได้อย่างจำเพาะเจาะจงโดยอาศัยทฤษฎี Hard and Soft Acid and Base [21] จาก Pearson's principle ดังแสดงในภาพที่ 3 โดยหลักการของ Hard Soft Acid Base (HSAB) กล่าวไว้ว่า hard คือ ส่วนของอะตอมหรือไอออนที่มีขนาดเล็ก มีจำนวนประจุมาก (high charge states) ซึ่งหมายถึงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของประจุได้ยาก (weak polarization) ส่วน soft คือ อะตอมหรือไอออนที่มีขนาดใหญ่ มีจำนวนประจุน้อย (low charge states) กล่าวคือ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของประจุได้ง่าย (strong polarization) โดยอะตอมหรือไอออนที่มี คุณสมบัติเป็น hard จะสามารถจับหรือสร้างแรงกระทำระหว่างกันได้ดีกับอะตอมหรือไอออนที่เป็น hard เหมือนกัน เช่นเดียวกันกับ soft ก็จะสามารถจับหรือสร้างแรงกระทำระหว่างกันได้ดีกับอะตอม หรือไอออนที่เป็น soft เหมือนกัน ดังนั้นไอโอโนฟอร์ที่มีอะตอมไนโตรเจน อะตอมออกซิเจน หรือ อะตอมซัลเฟอร์ (soft base) ที่มีอิเล็กตรอนมากเป็นองค์ประกอบหลัก จะเกิดการดักจับหรือเกิดแรง กระทำได้ดีกับไอออนโลหะที่มีคุณสมบัติเป็น soft acid เช่น ไอออนทองแดง (Cu^{2+}) และไอออน ปรอท (Hg^{2+}) ได้อย่างมีความจำเพาะเจาะจงมากขึ้น



ภาพที่ 3 โครงสร้างของโมเลกุลเป้าหมาย (target molecules)

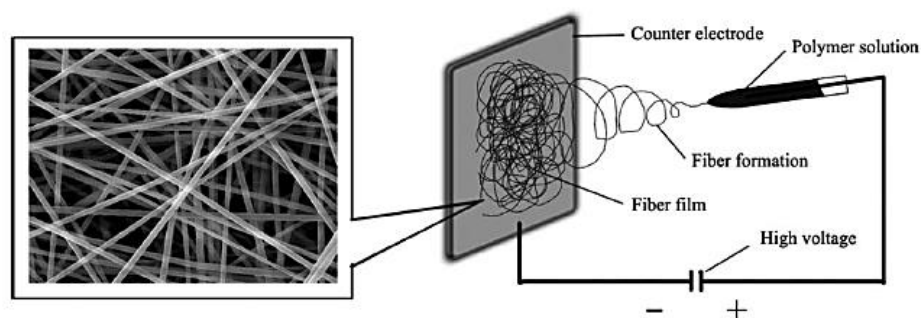
การประยุกต์ใช้งานในเทคนิคการวิเคราะห์ที่เกี่ยวข้องในเฟสที่เป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneous phase) ไม่เหมาะสำหรับการแยก และการกำจัด [22] ในวิทยานิพนธ์นี้นอกจากจะมีการออกแบบและสังเคราะห์ รวมถึงการประยุกต์ใช้งานได้จริงของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ที่มีการคายแสงในช่วงใกล้อินฟราเรด และวิสิเบิลแล้วนั้น ยังมีการนำแผ่นเยื่ออิเล็กโทรสปินที่ขึ้นรูปโดยอิเล็กโทรสปินนิ่ง (electrospinning) ที่มีการผสมสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ที่มีอนุพันธ์ของโรดามีน (RBH และ R6GH) มีความสามารถในการตรวจวัดไอออนปรอทได้อย่างจำเพาะเจาะจง ดังภาพที่ 4 และคายแสงในช่วงความยาวคลื่นที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่าภายใต้แสงปกติ (แสงขาว) มาทำการศึกษาสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ต่อ เพื่อพัฒนาต่อยอดเป็นชุดตรวจวัด (test kit) ในภาคสนามที่สามารถใช้งานได้สะดวก ซึ่งเทคนิคอิเล็กโทรสปินนิ่งนั้นเป็นวิธีที่เหมาะสมเนื่องจากเป็นเทคนิคการขึ้นรูปเส้นใยที่ง่าย การจัดอุปกรณ์ง่าย ไม่ซับซ้อน มีต้นทุนการผลิตต่ำ สามารถผลิตเส้นใยที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางที่น้อยมากในระดับไมโครเมตรหรือนาโนเมตร จึงให้พื้นที่ผิวที่สูง มีความยืดหยุ่นและให้สมบัติเชิงกลที่ดี เหมาะแก่การขึ้นรูปเป็นแผ่นเยื่อและนำไปใช้งานด้านการดูดซับ [23, 24]



ภาพที่ 4 โครงสร้างสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ชนิด RBH และ R6GH

หลักการการทำงานของอิเล็กโทรสปินนิ่งจะอาศัยแรงทางไฟฟ้าที่เกิดจากการให้ศักย์ไฟฟ้ากำลังสูง ทำให้เกิดแรงผลักดันของประจุในสารละลายที่บรรจุอยู่ในหลอดบรรจุสารละลายที่ติดปลายเข็มโลหะ เพื่อให้เส้นใยตกลงบนวัสดุรองรับที่เป็นโลหะซึ่งเป็นอีกด้านหนึ่งของขั้วไฟฟ้าที่เชื่อมต่อกับสายดิน ในระหว่างที่เส้นใยถูกดึงออกมาจากปลายเข็ม จะทำให้สารละลายยืดออกเป็นแบบสุ่ม ส่งผลให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยลดลง และยังรอบการบิดโค้งมีจำนวนมากขึ้นจะทำให้สารละลายยืดออกเป็นเส้นที่เล็กลงดังแสดงในภาพที่ 5 พร้อมกับการระเหยออกไปของตัวทำละลาย ในที่สุดจะเกิดเส้นใยในระดับนาโนได้ ซึ่งส่วนประกอบที่สำคัญของอิเล็กโทรสปินนิ่ง คือ แหล่งกำเนิดไฟฟ้ากำลังสูง วัสดุรองรับที่เป็นโลหะ หลอดบรรจุสารละลายที่ติดเข็มโลหะ และเครื่องควบคุมการไหลของสารละลาย [23] ทั้งนี้พารามิเตอร์ที่สำคัญ 3 ประการ ที่ควบคุมขนาดของเส้นใย คือ พารามิเตอร์เชิงสารละลายพอลิเมอร์ (polymer solution parameters) เช่น ความหนืด (viscosity), ความยืดหยุ่น (elasticity), การนำไฟฟ้า (conductivity), แรงตึงผิว (surface tension) พารามิเตอร์เชิงกระบวนการ (processing parameters) เช่น แรงดันไฟฟ้าสถิต (hydrostatic pressure),

ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ (electric potential), ระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับวัสดุรองรับ (tip to collector distance) และพารามิเตอร์เชิงสิ่งแวดล้อม (ambient parameters) เช่น อุณหภูมิของสารละลาย (solution temperature) ความชื้น (humidity) และความเร็วของอากาศ (air velocity) ในห้องอิเล็กโทรสปินนิ่ง [24, 25]



ภาพที่ 5 แสดงการผลิตแผ่นเยื่อพอลิเมอร์โดยเทคนิคอิเล็กโทรสปินนิ่ง [22]

ในวิทยานิพนธ์นี้มุ่งเน้นการออกแบบและสังเคราะห์สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ เพื่อใช้เป็นเซ็นเซอร์ที่มีความไวสูง (high sensitivity) และมีความจำเพาะเจาะจงสูง (high selectivity) กับไอออนโลหะจากฟลูออโรฟอร์ที่มีการคายแสงช่วงใกล้อินฟราเรด (near infrared) และวิสิเบิล (visible) เพื่อใช้ในการตรวจวัดไอออนโลหะหนักอันตราย คือ ไอออนทองแดง และไอออนทองปรอทตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีการนำแผ่นเยื่ออิเล็กโทรสปินที่มีการผสมเซ็นเซอร์ที่สามารถตรวจวัดไอออนปรอทและมีการคายแสงที่อยู่ในช่วงที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า มาพัฒนาต่อยอดเป็นชุดทดสอบภาคสนาม (test kit) ในรูปแบบแผ่นทดสอบ (strip test) ที่สามารถใช้งานได้สะดวก อันจะเป็นพื้นฐานในการนำไปใช้ได้จริงและพัฒนาในเชิงพาณิชย์ได้ ซึ่งจะสามารถพัฒนาไปเป็นเครื่องมือหรือชุดตรวจวัด เพื่อใช้ในการตรวจวัดในภาคสนามที่มีราคาไม่แพงได้อีกด้วย และวิทยานิพนธ์นี้ยังส่งเสริมการแก้ไขปัญหาวิกฤตสิ่งแวดล้อมและพัฒนางานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ ตามแนวทางของแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติฉบับที่สิบสอง พ.ศ. 2560-2564 ยุทธศาสตร์ที่ 4 การเติบโตที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมเพื่อการพัฒนาอย่างยั่งยืน และยุทธศาสตร์ที่ 8 การพัฒนาวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี วิจัย และนวัตกรรม

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) เพื่อออกแบบและสังเคราะห์สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ชนิดใหม่ที่คายแสงช่วงใกล้อินฟราเรด และช่วงวิสิเบิล สำหรับตรวจวัดไอออนทองแดง และไอออนปรอท ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์ในเชิงปริมาณ และคุณภาพได้ด้วยวิธีทางฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปี

2) เพื่อออกแบบเซ็นเซอร์ชนิดใหม่สำหรับตรวจวัดไอออนทองแดง และไอออนปรอทได้ในตัวกลางที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ (aqueous solution) มีความไวในการตรวจวัดสูง (high sensitivity) และมีจำเพาะเจาะจงสูง (high selectivity)

3) เพื่อนำเซ็นเซอร์ชนิดใหม่ที่สังเคราะห์ได้ไปตรวจวัดไอออนทองแดง และไอออนปรอทในตัวอย่างจริง

4) เพื่อนำแผ่นเยื่ออิเล็กทรอนิกส์ (test kit) ที่ขึ้นรูปโดยเทคนิคอิเล็กทรอนิกส์ในรูปแบบแผ่นทดสอบ (strip test) ที่มีการเติมฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ลงไป สามารถตรวจวัดไอออนปรอทได้อย่างจำเพาะเจาะจง และมีความไวในการตรวจวัดสูง และมองเห็นการเปลี่ยนแปลงได้ด้วยตาเปล่า

ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

1) สามารถสังเคราะห์เซ็นเซอร์ชนิดใหม่ทั้งสองชนิด และสามารถตรวจวัดไอออนทองแดง และไอออนปรอทได้เทียบเท่ากับเครื่องมือที่มีราคาแพง

2) สามารถนำเซ็นเซอร์ชนิดใหม่ทั้งสองชนิดมาตรวจวัดหาไอออนทองแดงและไอออนปรอทได้อย่างจำเพาะเจาะจงและมีความไวสูง มีค่า detection limit ที่ต่ำ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างจริงในสิ่งแวดล้อมได้

3) สามารถนำแผ่นเยื่อที่มีการเติมเซ็นเซอร์ที่ขึ้นรูปโดยเทคนิคอิเล็กทรอนิกส์ในรูปแบบแผ่นทดสอบ (strip test) มาตรวจวัดไอออนปรอทได้อย่างจำเพาะเจาะจง และสามารถมองเห็นการเปลี่ยนแปลงได้ด้วยตาเปล่า

ขอบเขตของงานวิจัย

1) ออกแบบ สังเคราะห์และแยกบริสุทธิ์สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ชนิดใหม่ 2 ชนิด

2) นำฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ชนิดใหม่ที่สังเคราะห์ได้ไปทดสอบสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence properties) ในตัวทำละลายอินทรีย์ หรือสารละลายผสมของสารละลายอินทรีย์และน้ำได้

3) นำเซ็นเซอร์ใหม่ที่สังเคราะห์ได้ไปทดสอบสมบัติการเรืองแสง ในสภาวะที่มีไอออนเป้าหมายเทียบกับไอออนรบกวนตัวอื่นๆ

4) นำเซ็นเซอร์ใหม่ที่สังเคราะห์ได้ไปทดสอบสมบัติการเรืองแสงในสภาวะที่มีไอออนโลหะหนักในตัวอย่างจริงในสิ่งแวดล้อม

5) นำแผ่นเยื่อที่มีการเติมเซ็นเซอร์ที่ขึ้นรูปโดยเทคนิคอิเล็กทรอนิกส์ในรูปแบบแผ่นทดสอบ (strip test) มาทดสอบสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence properties)

บทที่ 2

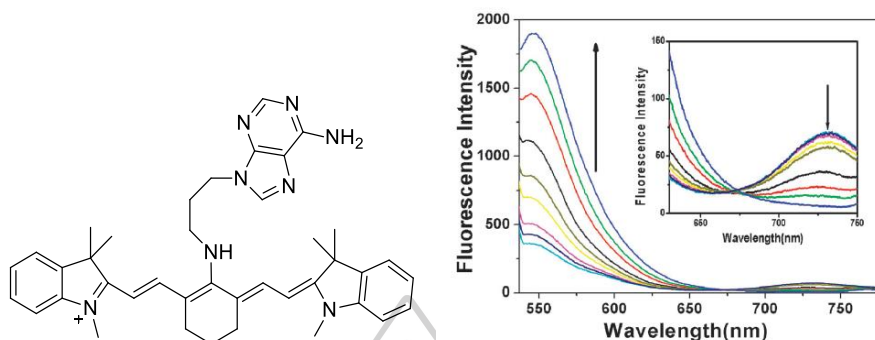
ทบทวนวรรณกรรม

ในปัจจุบันการออกแบบฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ที่มีส่วนของฟลูออโรฟอร์คายแสงฟลูออเรสเซนต์ ในช่วงใกล้อินฟราเรด (near infrared region, 650-900 nm) และวิสิเบิล (visible region, 400-800 nm) กำลังได้รับความสนใจ เนื่องจากมีประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้ในงานด้านต่างๆ เช่น ด้านชีวภาพ และวิทยาศาสตร์ทางแพทย์ เป็นต้น นอกจากนี้ความยาวคลื่นในช่วงใกล้รังสีอินฟราเรด ยังมีประโยชน์ในการนำไปศึกษาเกี่ยวกับตัวอย่างชีวภาพและสิ่งมีชีวิต เนื่องจากแสงในช่วงใกล้อินฟราเรด ถือว่ามีพลังงานต่ำเมื่อเทียบกับความยาวคลื่นในช่วงแสงที่ตามองเห็น (visible region) ทำให้ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์สิ่งมีชีวิตและไม่ถูกรบกวนโดยสารอื่น ๆ ที่ดูดกลืนแสงได้ในเซลล์สิ่งมีชีวิต ดังนั้น ในการตรวจวัดไอออนโลหะหนักในเซลล์สิ่งมีชีวิตจึงไม่มีการทำลายเนื้อเยื่อ สามารถลดขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างได้ เช่น การย่อยสลายตัวอย่าง การตรวจวัดจึงเป็นไปได้อย่างสะดวก รวดเร็ว สามารถใช้งานได้ง่ายเพื่อตรวจวัดการปนเปื้อนของไอออนโลหะอันตรายในตัวอย่างจากธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ในงานวิจัยนี้จะออกแบบฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ที่มีอนุพันธ์ของ cyanine และอนุพันธ์ของ [5]helicene ชนิดใหม่เพื่อใช้เป็นเซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดโลหะหนักด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปี

สำหรับในงานวิจัยนี้มีเป้าหมายในการพัฒนาเซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดไอออนโลหะหนัก ที่มีความไว (sensitivity) และจำเพาะเจาะจง (selectivity) สูง ซึ่งการออกแบบฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์จะต้องคำนึงถึงส่วนฟลูออโรฟอร์ เนื่องจากเป็นส่วนที่แสดงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์และฟลูออโรฟอร์จะเป็นส่วนที่แสดงผลโดยตรงกับความไวของเซ็นเซอร์ ทำให้เซ็นเซอร์ที่สังเคราะห์มีความสามารถตรวจวัดไอออนโลหะด้วยค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (detection limit) ต่ำๆ ได้ ซึ่งในวิทยานิพนธ์นี้ ผู้วิจัยได้ให้ความสนใจฟลูออโรฟอร์ 2 ชนิด ได้แก่ อนุพันธ์ของ cyanine ที่ดูดกลืนและคายแสงในช่วงใกล้อินฟราเรด (near infrared region) และอนุพันธ์ของ [5]helicene ที่ดูดกลืนและคายแสงในช่วงยูวี-วิสิเบิล (UV-visible region) และ นอกจากนี้การปรับเปลี่ยนโครงสร้างของ cyanine และ [5]helicene นั้นสามารถทำได้ง่าย จึงเหมาะสำหรับการนำมาใช้งาน โดยในช่วงหลายปีที่ผ่านมา มีรายงานไว้ในงานวิจัยหลายฉบับที่เกี่ยวข้องกับอนุพันธ์ของ cyanine และ [5]helicene ที่ใช้เป็นเซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนโลหะต่างๆ

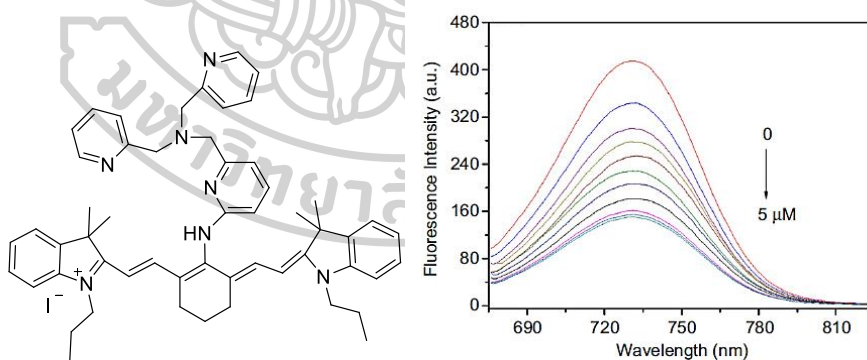
โดยงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับอนุพันธ์ของ cyanine ที่ใช้เป็นเซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนโลหะต่างๆ ซึ่งมีการคายแสงในช่วงใกล้อินฟราเรด ดังนี้ ในปี ค.ศ. 2012 Zheng และคณะ [26] ได้เสนอการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ cyanine สำหรับใช้เป็นเซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนเงิน (Ag^+) ดังภาพที่ 6 พบว่าเซ็นเซอร์ชนิดนี้มีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนเงินในสารละลายผสมระหว่าง MeOH:H₂O

ในอัตราส่วน 1:4 v/v ที่ pH 5.40 โดยมีค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์อยู่ในช่วงใกล้อินฟราเรดที่ 731 nm และมี detection limit เท่ากับ 34 nM



ภาพที่ 6 โครงสร้างของสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ของ Zheng และคณะ (เซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนเงิน) และการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในสภาวะที่มีไอออน

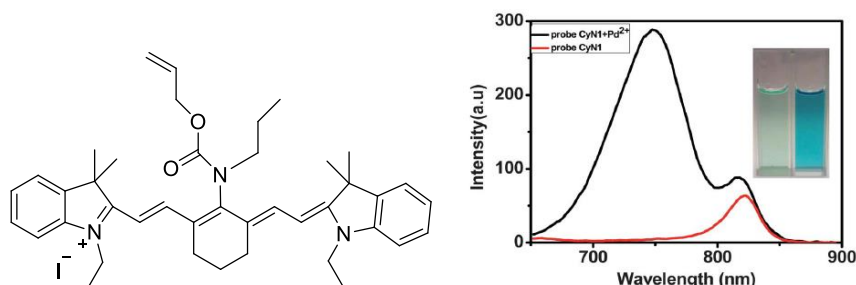
นอกจากนั้นภายในปีเดียวกัน Guo และคณะ [27] ได้เสนอการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ cyanine สำหรับใช้เป็นเซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนสังกะสี (Zn^{2+}) ดังภาพที่ 7 พบว่าเซ็นเซอร์ชนิดนี้มีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนสังกะสีในสารละลาย 10% acetonitrile ใน HEPES buffer (pH 7.4) โดยมีค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์อยู่ในช่วงใกล้อินฟราเรดที่ 730 nm และยังมีการนำเซ็นเซอร์ไปทดสอบการใช้งานในเซลล์สิ่งมีชีวิตชนิด C2C12 และ NIH3T3 อีกด้วย



ภาพที่ 7 โครงสร้างของสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ของ Guo และคณะ (เซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนสังกะสี) และการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในสภาวะที่มีไอออน

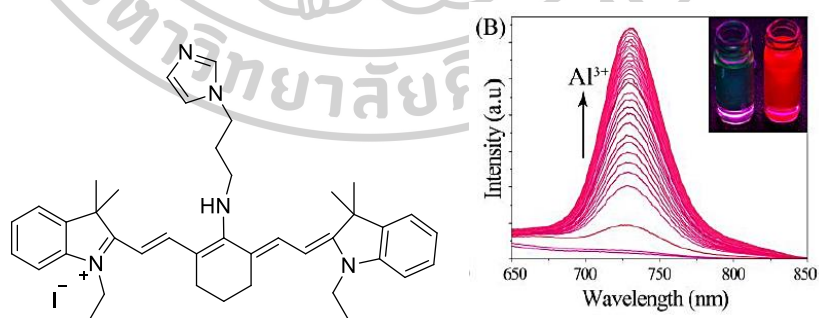
ปี ค.ศ. 2013 Wang และคณะ [28] ได้เสนอการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ cyanine สำหรับใช้เป็นเซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนแพลเลเดียม (Pd^{2+}) ดังภาพที่ 8 พบว่าเซ็นเซอร์ชนิดนี้มีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนแพลเลเดียมในสารละลายผสมระหว่างบัฟเฟอร์ PBS:PEG400 (1:1) กับ $NaBH_4$

(100 mM) ที่ pH 7.40 มีค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์อยู่ในช่วงใกล้อินฟราเรดที่ 750 nm และยังมี การนำเซ็นเซอร์ไปทดสอบการใช้งานในเซลล์ชนิด HeLa cells และหนูอีกด้วย



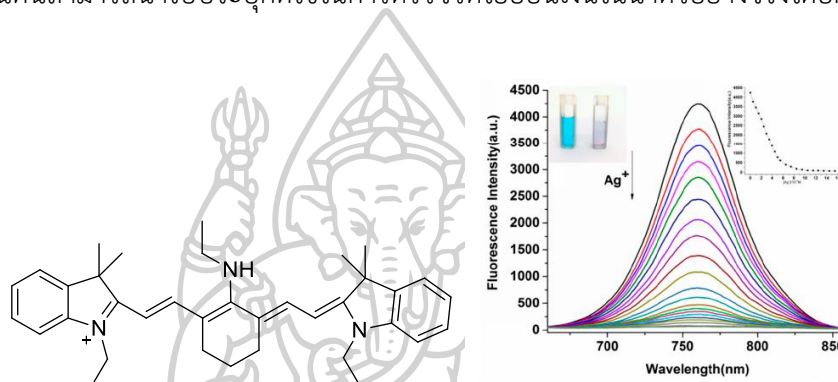
ภาพที่ 8 โครงสร้างของสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ของ Wang และคณะ (เซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออน แพลเลเดียม) และการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในสภาวะที่มีไอออน (ภาพ inset แสดงการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเซ็นเซอร์ ก่อนและหลังตรวจวัดไอออนแพลเลเดียมภายใต้แสงปกติ)

ต่อมาในปี ค.ศ. 2015 Datta และคณะ [29] ได้เสนอการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ cyanine สำหรับใช้เป็นเซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนอะลูมิเนียม (Al^{3+}) ดังภาพที่ 9 พบว่าเซ็นเซอร์ชนิดนี้มีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนอะลูมิเนียมในสารละลายผสมระหว่าง MeOH:H₂O ในอัตราส่วน 2:3 v/v ที่ pH 7.4 (บัฟเฟอร์ HEPES) โดยมีค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์อยู่ในช่วงใกล้อินฟราเรดที่ 730 nm และได้มีการนำเซ็นเซอร์ไปทดสอบการใช้งานในเซลล์ชนิด HeLa cells นอกจากนี้ยังพบว่าเซ็นเซอร์ชนิดนี้สามารถเกิดอันตรกิริยากับ CT-DNA ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาเป็นตัวติดตามการทำงานของนิวเคลียสได้



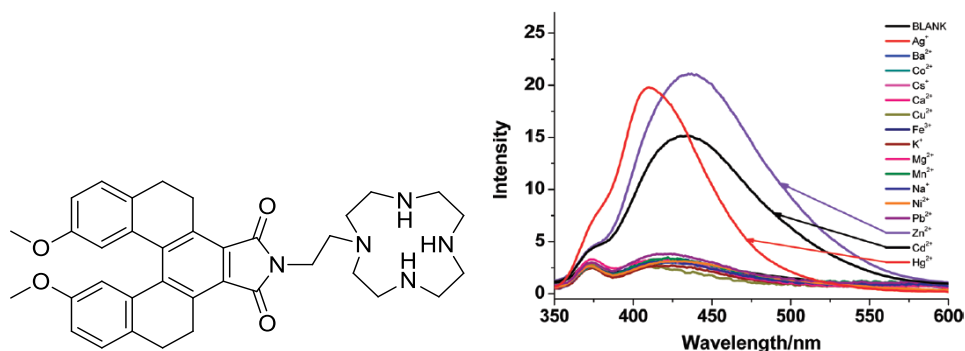
ภาพที่ 9 โครงสร้างของสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ของ Datta และคณะ (เซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออน อะลูมิเนียม) และการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในสภาวะที่มีไอออน (ภาพ inset แสดงการเปลี่ยนแปลงเรืองแสงของสารละลายเซ็นเซอร์ ก่อนและหลังตรวจวัดไอออนอะลูมิเนียมภายใต้แสงยูวี)

ในปี ค.ศ. 2019 Zhang และคณะ [30] ได้เสนอการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ cyanine สำหรับใช้เป็นเซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนเงิน (Ag^+) ดังภาพที่ 10 พบว่าเซ็นเซอร์ชนิดนี้มีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนเงินในสารละลายผสมระหว่าง EtOH/PBS buffer (pH = 7.0, 10 mM) ในอัตราส่วน 1:9 v/v โดยมีค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์อยู่ในช่วงใกล้อินฟราเรดที่ 760 nm และสามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเซ็นเซอร์ได้ด้วยตาเปล่าภายใต้แสงปกติ (แสงขาว) โดยในสภาวะที่ไม่มีไอออนเงินสารละลายจะมีสีฟ้า เมื่อมีการเติมไอออนเงินลงไปสารละลายจะเปลี่ยนเป็นใสไม่มีสี นอกจากนี้ยังได้มีการนำเซ็นเซอร์ไปทดสอบการใช้งานในน้ำตัวอย่างจริง พบว่าเซ็นเซอร์ชนิดนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดไอออนเงินในน้ำตัวอย่างจริงได้อีกด้วย



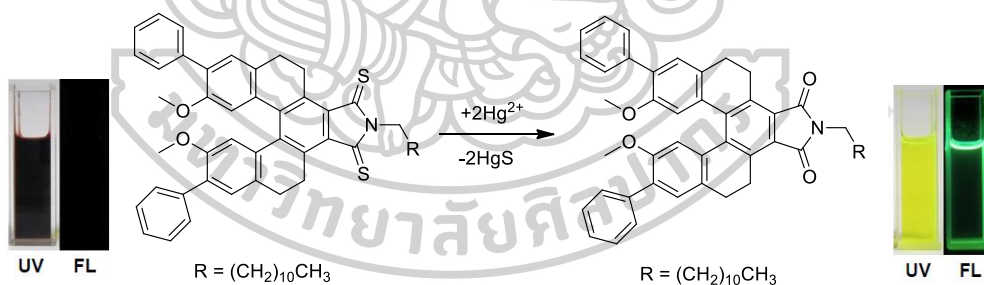
ภาพที่ 10 โครงสร้างของสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ของ Zhang และคณะ (เซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนเงิน) และการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในสภาวะที่มีไอออน (ภาพ inset แสดงการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเซ็นเซอร์ ก่อนและหลังตรวจวัดไอออนเงินภายใต้แสงปกติ)

โดยงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับอนุพันธ์ของ [5]helicene ที่ใช้เป็นเซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนโลหะต่างๆ ซึ่งมีการคายแสงในช่วงวิสิเบิล (visible region) ดังนี้ ในปี ค.ศ. 2012 Li และคณะ [31] ได้เสนอการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ [5]helicene สำหรับใช้เป็นเซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนโลหะ 3 ชนิด ได้แก่ ไอออนสังกะสี (Zn^{2+}), ไอออนแคดเมียม (Cd^{2+}) และไอออนปรอท (Hg^{2+}) ในสารละลาย HEPES buffer (10 mM, pH=7.2) ดังภาพที่ 11 โดยมีค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์อยู่ในช่วงวิสิเบิล แต่หากในสารละลายบัฟเฟอร์มี cysteine ร่วมด้วยจะทำให้เซ็นเซอร์สามารถจับกับไอออนสังกะสีได้อย่างจำเพาะเจาะจง



ภาพที่ 11 โครงสร้างของสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ของ Li และคอปเปอร์ (เซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนสังกะสี, แคดเมียม และปรอท) และการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ในสภาวะที่มีไอออนต่างๆ

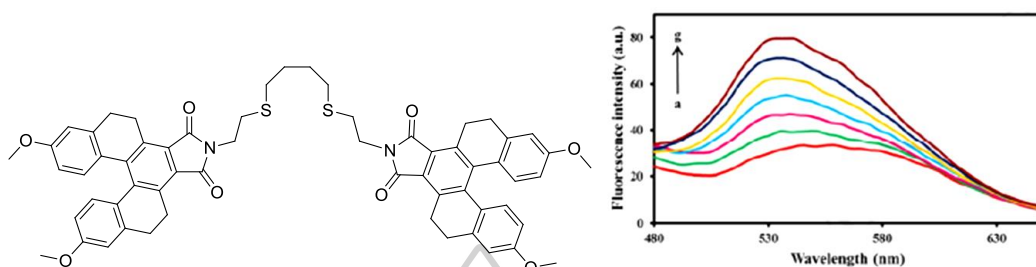
ต่อมาในปี ค.ศ. 2014 Li และคอปเปอร์ [32] ได้เสนอการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ [5]helicene สำหรับใช้เป็นเซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนโลหะปรอท (Hg^{2+}) ดังภาพที่ 12 ในสารละลายผสม $\text{CH}_3\text{CN}/\text{HEPES}$ buffer (10 mM, pH=5) อัตราส่วน 19:1 v/v โดยเซ็นเซอร์นี้สามารถตรวจวัดไอออนปรอทได้อย่างจำเพาะเจาะจง โดยมีค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนต์อยู่ในช่วงวิสิเบิลที่ 517 nm มีค่าความเข้มข้นของไอออนปรอทต่ำที่สุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (detection limit) เท่ากับ 5.0×10^{-7} M นอกจากนี้ยังสามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเซ็นเซอร์ก่อนและหลังจับไอออนปรอทได้ทั้งภายใต้แสงปกติ และใต้แสงยูวีได้อีกด้วย



ภาพที่ 12 โครงสร้างของสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ของ Li และคอปเปอร์ (เซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนปรอท) และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง และการเปลี่ยนแปลงสีภายใต้แสงปกติและใต้แสงยูวี

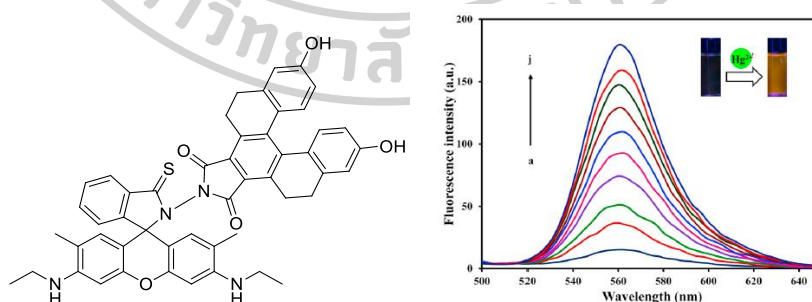
ในปี ค.ศ. 2018 Petdum และคอปเปอร์ [33] ได้เสนอการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ [5]helicene สำหรับใช้เป็นเซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนโลหะเงิน (Ag^+) ดังภาพที่ 13 ในสารละลายผสม $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ ในอัตราส่วน 1:9 v/v โดยเซ็นเซอร์นี้สามารถตรวจวัดไอออนเงินได้อย่างจำเพาะเจาะจง มีค่า Stokes shift ที่กว้างมาก (187 nm) โดยมีค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนต์อยู่ในช่วงวิสิเบิลที่ 534 nm มีค่าความเข้มข้นของไอออนเงินต่ำที่สุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (detection limit) เท่ากับ 10 ppb นอกจากนี้ยังสามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเซ็นเซอร์ก่อนและหลังจับไอออนเงินได้

ภายใต้แสงยูวี นอกจากนี้ยังสามารถใช้เซ็นเซอร์สำหรับการตรวจวัดอนุภาคนาโนเงิน (AgNPs) ด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยใช้ H_2O_2 ในสถานะที่เป็นกรดเพียงขั้นตอนเดียว ดังนั้นจึงสามารถใช้เซ็นเซอร์ตรวจวัด AgNPs/ Ag^+ ในสินค้าอุปโภคบริโภคและในสิ่งแวดล้อมได้



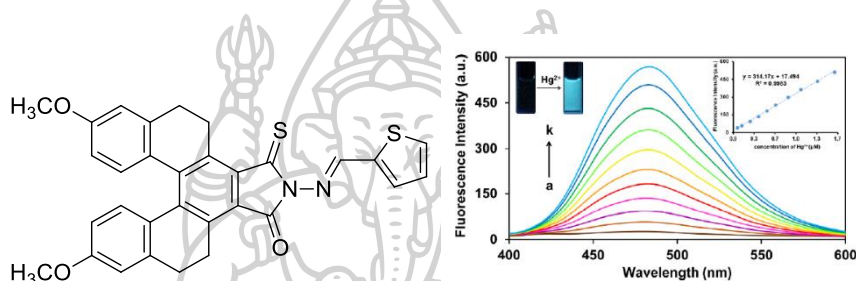
ภาพที่ 13 โครงสร้างของสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ของ Petdum และคณะ (เซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนเงิน) และการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ในสถานะที่มีไอออน

ในปี 2020 Petdum และคณะ [12] ได้เสนอการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ [5]helicene สำหรับใช้เป็นเซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนโลหะปรอท (Hg^{2+}) ดังภาพที่ 14 โดยสามารถตรวจวัดไอออนปรอทได้อย่างจำเพาะเจาะจงในสารละลายผสม MeOH:HEPES buffer (pH = 7.2) อัตราส่วน 1:1 v/v เมื่อเกิดการตรวจวัดไอออนปรอทเซ็นเซอร์ชนิดนี้จะแสดงการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนต์แบบปิด-เปิด (OFF-ON) และเปลี่ยนสีของสารละลายจากสีเหลืองเป็นสีชมพูเข้มได้แสงปกติมีค่าความเข้มข้นของไอออนปรอทต่ำที่สุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (detection limit) เท่ากับ 1.5 nM อีกทั้งยังสามารถนำไปวิเคราะห์หาปริมาณไอออนปรอทในตัวอย่างจริงได้หลายชนิด เช่น ผลิตภัณฑ์ครีมบำรุงผิวขาว อาหารทะเล เนื้อเยื่อพืช และเซลล์มะเร็งตับ



ภาพที่ 14 โครงสร้างของสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ของ Petdum และคณะ (เซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนปรอท) และการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ในสถานะที่มีไอออน (ภาพ inset แสดงการเปลี่ยนแปลงเรื่องแสงของสารละลายเซ็นเซอร์ ก่อนและหลังตรวจวัดไอออนปรอทภายใต้แสงยูวี)

ต่อมาในปี 2021 Kaewnok และคณะ [34] ได้เสนอการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ [5]helicene สำหรับใช้เป็นเซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนโลหะปรอท (Hg^{2+}) ดังภาพที่ 15 โดยเซ็นเซอร์สามารถตรวจวัดไอออนปรอทได้อย่างจำเพาะเจาะจงในสารละลายผสม MeOH:H₂O อัตราส่วน 3:2 v/v และเมื่อเซ็นเซอร์นี้ตรวจจับไอออนปรอทจะแสดงการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์แบบปิด-เปิด (OFF-ON) มีค่าความเข้มข้นของไอออนปรอทต่ำที่สุดที่วิเคราะห์ได้ (detection limit) เท่ากับ 6.0 nM และเซ็นเซอร์ชนิดนี้มีความสามารถในการวิเคราะห์ไอออนปรอทที่ปนเปื้อนในตัวอย่างจริงได้หลายชนิด ได้แก่ น้ำดื่ม น้ำทะเล เนื้อเยื่อต้นอ่อนของต้นผักกาดขาว และเซลล์เนื้ออกในสมอง นอกจากนี้ยังประยุกต์ใช้เป็นชุดทดสอบแบบแถบกระดาษ (paper test strips) เพื่อใช้วิเคราะห์ไอออนปรอทในน้ำได้ทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณได้อีกด้วย

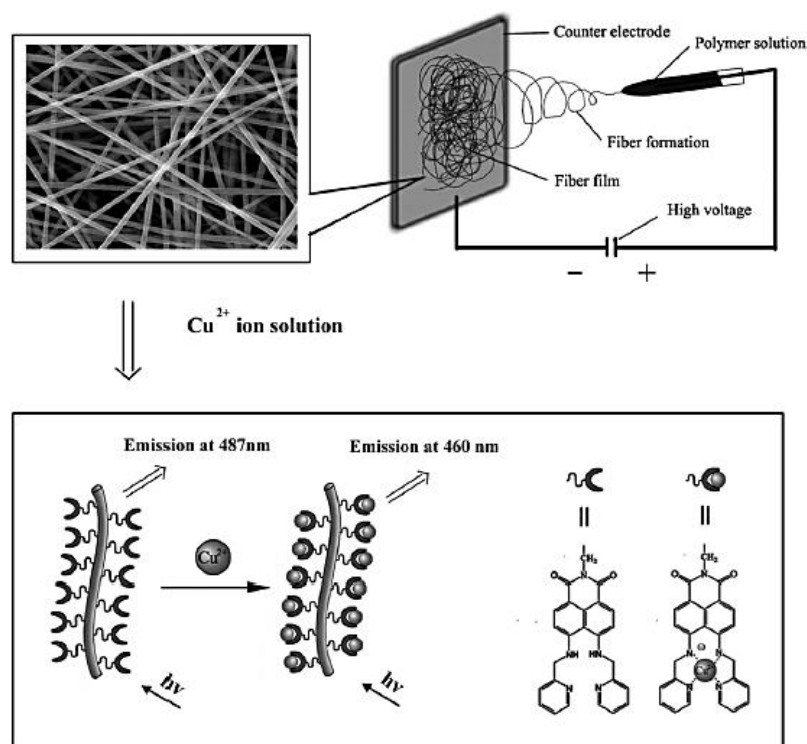


ภาพที่ 15 โครงสร้างของสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ของ Kaewnok และคณะ (เซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนปรอท) และการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในสภาวะที่มีไอออน (ภาพ inset แสดงการเปลี่ยนแปลงเรืองแสงของสารละลายเซ็นเซอร์ ก่อนและหลังตรวจวัดไอออนปรอทภายใต้แสงยูวี)

นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังมีการนำแผ่นเยื่อที่ขึ้นรูปโดยเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิง (electrospinning) ที่มีการผสมเมทริกซ์พอลิเมอร์และเซ็นเซอร์ที่สามารถตรวจวัดไอออนปรอทได้ในรูปแบบแผ่นทดสอบ (strip test) มาทำการศึกษาสมบัติการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์เพิ่มเติม เพื่อให้ง่ายต่อการนำไปใช้งาน ซึ่งมีรายงานก่อนหน้านี้เกี่ยวกับการนำเซ็นเซอร์มาผสมกับเมทริกซ์พอลิเมอร์แล้วขึ้นรูปเป็นแผ่นเยื่อที่ใช้ในการตรวจวัดไอออนโลหะต่างๆ และขึ้นรูปแผ่นเยื่อด้วยเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิงดังรายละเอียดต่อไปนี้

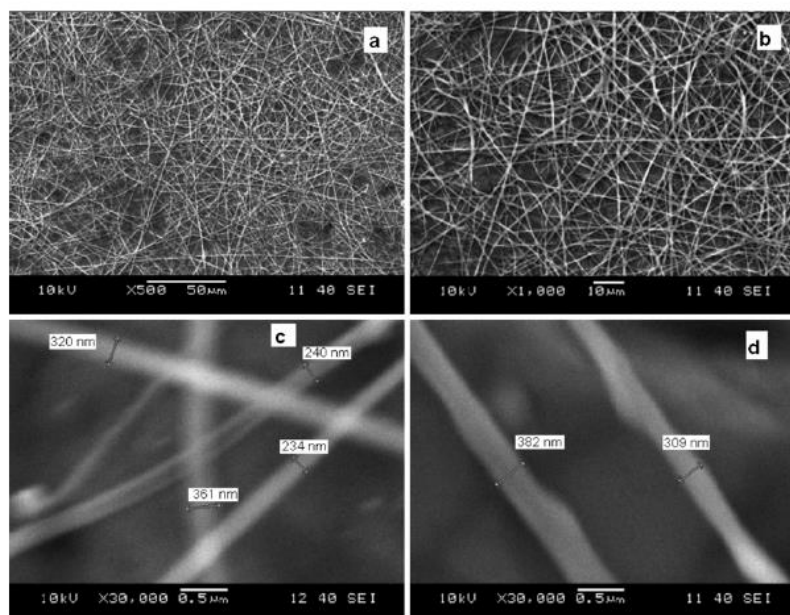
ในปี ค.ศ. 2011 Wang และคณะ [35] ได้เสนอการสังเคราะห์ poly (MMA-co-NAAP) จากโคพอลิเมอร์ไรเซชัน (copolymerization) ระหว่าง 1,8-naphthalimide functionalized (NAAP) และ methyl methacrylate (MMA) ใช้การเบลนดโดยตรงและขึ้นรูปแผ่นเยื่ออิเล็กโตรสปินนิงโดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรสปินนิงดังภาพที่ 16 สำหรับใช้เป็นเซ็นเซอร์ตรวจวัดเฉพาะไอออนทองแดง (Cu^{2+}) เมื่อเติมแผ่นเยื่ออิเล็กโตรสปินนิงลงในสารละลาย CH₃CN: H₂O (1:1 v/v) ได้แสดงให้เห็นถึงความไวต่อการตรวจวัด เนื่องจากโครงสร้างของเส้นใยที่มีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรที่สูง มี detection limit เท่ากับ

20 μM นอกจากนี้วัสดุที่เตรียมได้สามารถนำไปใช้ประโยชน์เพื่อเป็นตัวดูดซับในการกำจัด Cu^{2+} ในสารละลายที่เป็นน้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีประสิทธิภาพในการดูดซับ (adsorption capacity) คือ 10.39 mg/g (มิลลิกรัมของ Cu^{2+} ต่อกรัมของแผ่นเยื่ออิเล็กโทรสปิน) แสดงให้เห็นว่าแผ่นเยื่ออิเล็กโทรสปินมีความไวและมีคุณสมบัติตัวดูดซับที่ดีเยี่ยมต่อ Cu^{2+} มากกว่าไอออนของโลหะอื่น ๆ



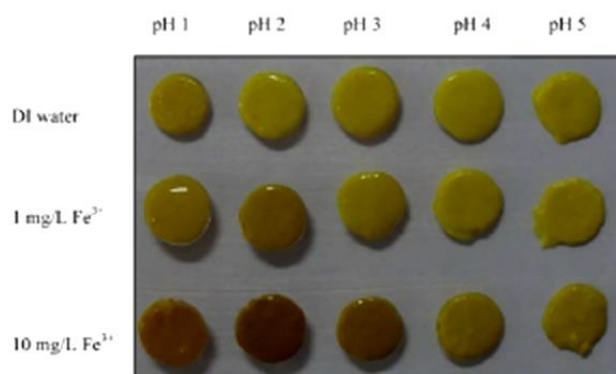
ภาพที่ 16 ภาพประกอบสำหรับการเตรียมแผ่นเยื่อ poly (MMA-co-NAAP) โดยวิธีอิเล็กโทรสปินนิ่ง สำหรับการตรวจวัดไอออนทองแดง (Cu^{2+})

ในปี ค.ศ. 2013 Ongun และคณะ [36] ได้เสนอการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ carbazole คือ 2-(9-methyl-9H-carbazol-3-yl)-5-(pyridin-4-yl)-1,3,4-oxadiazole (ODC-3) ซึ่งใช้ตรวจวัดไอออนปรอท (Hg^{2+}) ได้เติมลงในเมทริกซ์พอลิเมอร์ที่เป็น ethyl cellulose (EC) โดยการเบลนด์โดยตรง จากนั้นขึ้นรูปเป็นแผ่นเยื่ออิเล็กโทรสปินโดยวิธีอิเล็กโทรสปินนิ่งดังภาพที่ 17 และแบบฟิล์มบาง โดยผลการทดลองพบว่า ODC-3 สามารถตรวจวัดปริมาณ Hg^{2+} ในช่วงความเข้มข้น 1.0×10^{-11} ถึง 1.0×10^{-3} M และพบว่าแผ่นเยื่ออิเล็กโทรสปิน EC/ODC-3 มีความไวในการวิเคราะห์ที่มากกว่า, ค่า LOD ที่ต่ำกว่า และใช้เวลาในการตรวจวัด Hg^{2+} ที่เร็วกว่าแบบฟิล์มบาง EC/ODC-3



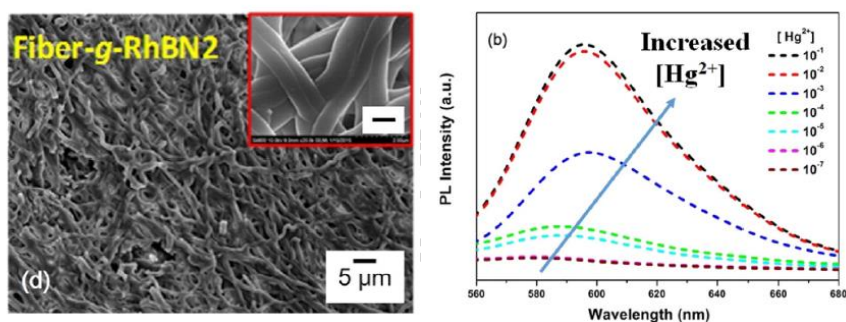
ภาพที่ 17 ภาพกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ของแผ่นเยื่ออิเล็กทรอนิกส์ EC/ODC-3 ภายใต้กำลังขยายที่แตกต่างกัน

ในปี ค.ศ. 2014 Saithongdee และคณะ [37] ได้เสนอการขึ้นรูปแผ่นเยื่อด้วยเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิง โดยใช้ zein เป็นเมทริกซ์ผสมกับสารฟลูออเรสเซนต์ชนิด curcumin ลงไป จากนั้นจึงนำไปทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนโลหะ พบว่าแผ่นเยื่อนี้มีความสามารถในการตรวจวัดไอออนเหล็กได้อย่างจำเพาะเจาะจง โดยเมื่อแช่แผ่นเยื่อลงในสารละลายไอออนเหล็ก (Fe^{3+}) แผ่นเยื่อจะเปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาล ซึ่งสามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่าภายใต้แสงปกติ และค่า pH ก็ส่งผลต่อสีที่ปรากฏอีกด้วย โดยสีที่ได้จากการตรวจวัดจะชัดเจนมากขึ้นเมื่ออยู่ในสารละลายโลหะเหล็กที่มี pH ต่ำๆ ดังแสดงในภาพที่ 18 นอกจากนี้ยังมีการนำแผ่นเยื่อที่ได้ไปวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณในน้ำตัวอย่างต่างๆ อีกด้วย



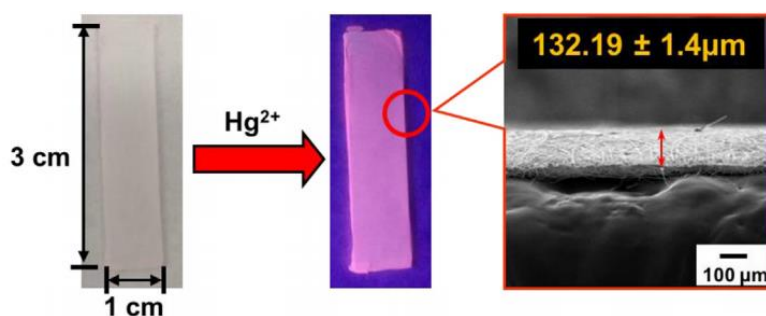
ภาพที่ 18 แสดงการเปลี่ยนแปลงสีในการตรวจวัดไอออนโลหะเหล็กที่ความเข้มข้นของไอออนเหล็ก และ pH ต่างๆ ด้วยแผ่นเยื่อของ Saithongdee และคณะ

ในปี ค.ศ. 2016 Cho และคณะ [38] ได้เสนอการขึ้นรูปแผ่นเยื่อด้วยเทคนิคอิเล็กโทรสปินนิง โดยมี poly(2-hydroxyethylmethacrylate-co-N-methylolacrylamide) เป็นเมทริกซ์พอลิเมอร์ ผสมกับสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ของอนุพันธ์โรดามีน บี ดังภาพที่ 19 ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนปรอท พบว่าแผ่นเยื่อเมื่อมีการตรวจวัดไอออนปรอทจะสามารถสังเกตเห็นการเปลี่ยนสีของแผ่นฟิล์มได้ด้วยตาเปล่าภายใต้แสงปกติ (แสงขาว)



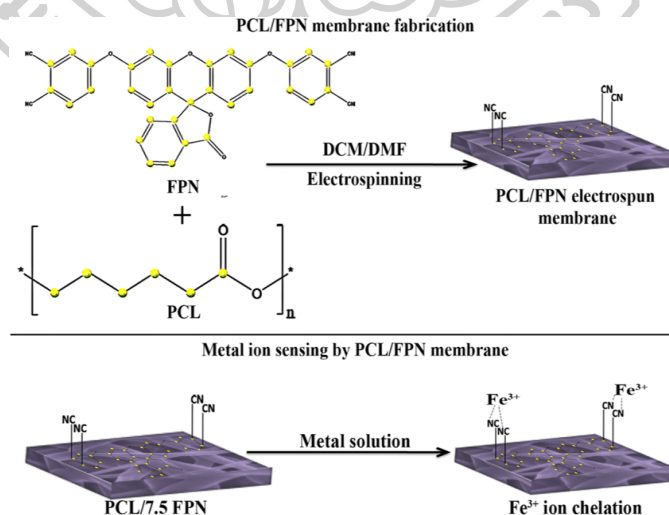
ภาพที่ 19 ภาพลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นใยโดย SEM ของแผ่นเยื่อของ Cho และคณะ และการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ในสภาวะที่มีไอออน

ในปี ค.ศ. 2017 Chen และคณะ [39] ได้เสนอการขึ้นรูปแผ่นเยื่อด้วยเทคนิคอิเล็กโทรสปินนิง โดยมี poly(2-hydroxyethylmethacrylate-co-N-methylolacrylamide) เป็นเมทริกซ์พอลิเมอร์ ผสมกับสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ของอนุพันธ์โรดามีนดังภาพที่ 20 ซึ่งแผ่นเยื่อที่ได้มีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนปรอท (Hg^{2+}) และก่อนแช่ลงในสารละลายไอออนปรอทแผ่นเยื่อจะมีสีขาว เมื่อมีการตรวจวัดไอออนปรอทจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูซึ่งสามารถสังเกตเห็นการได้ด้วยตาเปล่าภายใต้แสงปกติ (แสงขาว)



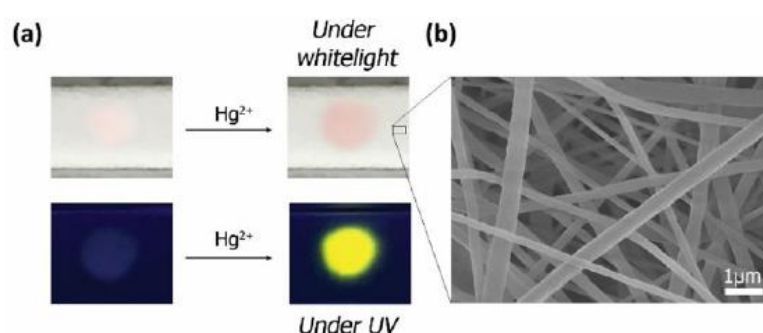
ภาพที่ 20 แสดงการเปลี่ยนแปลงสีของแผ่นเยื่อของ Chen และคณะก่อนและหลังแช่ลงในสารละลายไอออนปรอท

ในปี ค.ศ. 2019 Rijin และคณะ [40] ได้เสนอการสังเคราะห์แผ่นเยื่ออิเล็กโทรสปิน polycaprolactone (PCL)/ 4,4'-fluoresceinoxy bisphthalonitrile (FPN) เป็นแถบเซ็นเซอร์ (sensor strips) สำหรับตรวจวัดไอออนเหล็ก (Fe^{3+}) ซึ่งใช้ PCL เป็นเมทริกซ์พอลิเมอร์ โดยการเบลนด์โดยตรง แล้วขึ้นรูปแผ่นเยื่ออิเล็กโทรสปินโดยวิธีอิเล็กโทรสปินนิ่งดังภาพที่ 21 จากนั้นนำแผ่นเยื่อที่ได้ไปวิเคราะห์โดยเทคนิค SEM, FTIR, contact angle, mechanical strength และ emission properties โดยใช้เทคนิค fluorescence spectroscopy การทดสอบความจำเพาะเจาะจงต่อไอออน Fe^{3+} ของแถบเซ็นเซอร์อิเล็กโทรสปิน PCL/FPN โดยวิเคราะห์จากความสามารถในการละลายโลหะไอออนต่างๆ ค่า LOD ของการตรวจหาไอออนเหล็กถูกตรวจสอบที่ช่วงความเข้มข้น 10-70 nM และพบว่ามีความจำเพาะเป็น 2.94 nM จากค่า LOD ที่ต่ำพิสูจน์ได้ว่าแผ่นเซ็นเซอร์อิเล็กโทรสปิน PCL/FPN มีความจำเพาะเจาะจงและมีความไวในการวิเคราะห์ต่อไอออนเหล็กที่สูง



ภาพที่ 21 แสดงการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไอออนโลหะกับแผ่นเยื่ออิเล็กโทรสปิน PCL/FPN

และในปี 2021 Tonsomboon และคณะ [41] ได้เสนอการสังเคราะห์แผ่นเยื่ออิเล็กทรอนิกส์ปีน cellulose acetate (CA)/ polycaprolactone (PCL)/ mercury-sensitive organic dye (NF06) เป็นแถบทดสอบ (test strips) สำหรับตรวจวัดไอออนปรอท (Hg^{2+}) ซึ่งใช้ CA/PCL เป็นเมทริกซ์พอลิเมอร์ โดยการทำให้ NF06-coated strips พบว่าแผ่นเยื่อที่ได้มีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนปรอท สามารถมองเห็นการเปลี่ยนแปลงได้ด้วยตาเปล่า ทั้งได้แสงปกติและได้แสงยูวีดังภาพที่ 22 นอกจากนี้ยังมีการนำแผ่นเยื่อไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดไอออนปรอทในน้ำตัวอย่างจริงและในเซรัมบำรุงผิวอีกด้วย



ภาพที่ 22 แสดงการเปลี่ยนแปลงสีของแผ่นเยื่อของ Tonsomboon และคณะ ก่อนและหลังแช่ลงในสารละลายไอออนปรอทภายใต้แสงปกติ (แสงขาว) และภายใต้แสงยูวี และภาพลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นใยโดย SEM

จากตัวอย่างงานวิจัยข้างต้นที่ได้กล่าวมาจะเห็นได้ว่ามีผู้วิจัยหลายกลุ่มที่ให้ความสนใจและศึกษาเกี่ยวกับการพัฒนาโครงสร้างโมเลกุลของสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ที่มีการคายแสงในช่วงใกล้อินฟราเรดและวิสิเบิล อย่างไรก็ตาม ในวิทยานิพนธ์นี้จะเน้นการออกแบบและปรับปรุงความไวในการวิเคราะห์ของเซ็นเซอร์โดยการใช้อนุพันธ์ของ cyanine และ [5]helicene เป็นส่วนของฟลูออโรฟอร์ ซึ่งแสดงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ในช่วงความยาวคลื่นใกล้รังสีอินฟราเรดและวิสิเบิล โดยใช้ความรู้ทาง ion recognition concept รวมทั้งทำการทดสอบด้วยระบบสารละลายน้ำหรือสารละลายผสมของสารละลายอินทรีย์และน้ำ ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าจะสามารถสังเคราะห์เซ็นเซอร์ชนิดใหม่ที่สามารถนำมาพัฒนาต่อยอดเป็นชุดทดสอบสำหรับใช้ตรวจวัดและติดตามการปนเปื้อนของทองแดงและปรอทในแหล่งน้ำ และสิ่งแวดล้อมในภาคสนามได้ และจะเห็นว่ามีงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่สามารถเตรียมแผ่นเยื่ออิเล็กทรอนิกส์ปีนที่มีเมทริกซ์เป็นพอลิเมอร์โดยมีการเติมโมเลกุลอินทรีย์เข้าไปในการตรวจวัดไอออนโลหะต่างๆ ดังนั้นในงานวิจัยนี้คาดว่าจะสามารถนำแผ่นเยื่อที่ผสมเซ็นเซอร์ที่มีความสามารถตรวจวัดไอออนปรอท ตรวจวัดการปนเปื้อนไอออนปรอทได้อย่างจำเพาะเจาะจง

บทที่ 3

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อุปกรณ์

- 1.1 เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance 300 MHz: Bruker 300
- 1.2 เครื่อง UV-visible spectrometer: HP-8453
- 1.3 เครื่อง Fluorescence spectrometer: Perkin Elmer Luminescence spectrometer model LS-55
- 1.4 เครื่อง Mass spectrometer: ESI-FT-ICR (High resolution) Bruker BioAPEX 70e spectrometer
- 1.5 เครื่อง Rotary evaporator: Buchi Rotavapor R-114
- 1.6 เครื่อง Vacuum pump: Tokyo Rikakikai Co., Ltd. model A-3S
- 1.7 เครื่อง Hot air oven: Binder model ED115 (E2)
- 1.8 เครื่องชั่งละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง): Denver instrument model S-234
- 1.9 เครื่องชั่งละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง): Mettler Toledo model AB204
- 1.10 เครื่อง Hotplate and stirrer: Framo model M21/1
- 1.11 Micropipette: Finnpiptette, HH10711 ขนาด 1-10 μL
- 1.12 TLC Silica gel 60 F₂₅₄ aluminium sheet, Merck
- 1.13 อุปกรณ์สำหรับเตรียมแผ่น preparative TLC: Desaga Brinkmann
- 1.14 กระดาษกรอง: Advantec ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 110 mm
- 1.15 กระดาษกรอง: Advantec ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 70 mm
- 1.16 เครื่องแก้วพื้นฐาน
- 1.17 ชุดกรองแบบลดความดัน
- 1.18 Clamp และ Clamp Holder
- 1.19 เครื่อง peristaltic pump: Ismatec model ISM827
- 1.20 Fibre optic coupler

2. สารเคมี

- 2.1 Acetonitrile: RCI Labscan (99.7 %)
- 2.2 Argon gas: Masser Specialty Gas Co., Ltd. (99.999%)
- 2.3 Barium chloride dihydrate: Strem chemical (99.999%, $M_w = 244.27 \text{ g/mol}$)

- 2.4 Barium perchlorate trihydrate: Strem chemical (99.9%, $M_w = 390.29$ g/mol)
- 2.5 Aluminum chloride, anhydrous: Strem chemical (99.99%, $M_w = 133.34$ g/mol)
- 2.6 Aluminum perchlorate nonahydrate: Sigma-Aldrich (98%, $M_w = 487.47$ g/mol)
- 2.7 1-Butanol: BHD ($M_w = 74.12$ g/mol)
- 2.8 Cadmium chloride, anhydrous: Strem chemical (99.995 %, $M_w = 183.32$ g/mol)
- 2.9 Cadmium perchlorate hexahydrate: Strem chemical (99%, $M_w = 419.39$ g/mol)
- 2.10 Calcium acetate: Fluka ($M_w = 158.17$ g/mol)
- 2.11 Calcium chloride hydrate: Strem chemical (99.999+%, $M_w = 147.01$ g/mol)
- 2.12 Calcium perchlorate hydrate: Strem chemical (99%, $M_w = 238.98$ g/mol)
- 2.13 Chloroform-d : Cambridge Isotope Laboratories (D, 99.8%)+silver foil
- 2.14 Cobalt (II) chloride, anhydrous: Strem chemical (99.999+%, $M_w = 129.84$ g/mol)
- 2.15 Cobalt (II) perchlorate hexahydrate: Sigma-Aldrich (98+%, $M_w = 365.93$ g/mol)
- 2.16 Copper acetate monohydrate: Fluka ($M_w = 199.65$ g/mol)
- 2.17 Copper (II) perchlorate hexahydrate: Strem chemical (98+%, $M_w = 370.53$ g/mol)
- 2.18 Copper (II) chloride dihydrate: Strem chemical (99.999%, $M_w = 170.40$ g/mol)
- 2.19 Cysteamine hydrochloride: Fluka ($\geq 97.0\%$, $M_w = 113.61$ g/mol)
- 2.20 L-Cysteine: Sigma-Aldrich (97%, $M_w = 240.30$ g/mol)
- 2.21 Cyclohexanone: Fluka ($d = 0.779$ g/mL, $M_w = 84.16$ g/mol)
- 2.22 De-ionized water: Department of chemistry, Silpakorn University
- 2.23 1,4-Dibromobutane: Fluka ($> 99\%$, $d = 1.989$ g/mL, $M_w = 201.89$ g/mol)
- 2.24 Dichloromethane (distillation)
- 2.25 N,N-Dimethylformamide: LAB-SCAN (analytical reagent; A.R., $M_w 73.10$ g/mol)
- 2.26 Electrospun/sensor strips ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ. ดร. สุธินี เกียรติเทพ
- 2.27 Ethylenediamine: Sigma-Aldrich (≥ 99 %, $M_w = 60.10$ g/mol)
- 2.28 Ethylenediaminetetraacetic acid: Fluka ($M_w = 292.24$ g/mol)
- 2.29 Glacial acetic acid: Sigma-Aldrich ($M_w = 60.65$ g/mol)
- 2.30 Hydrazine hydrate: Sigma-Aldrich (80%, $d = 1.03$ g/mL, $M_w = 50.06$ g/mol)
- 2.31 Hydrochloric acid: RCI Labscan ($M_w = 36.46$ g/mol)

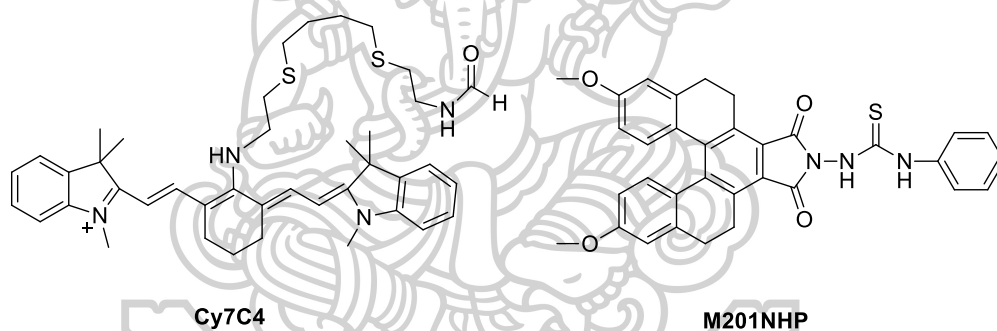
- 2.32 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid: PubChem ($M_w = 238.31$ g/mol)
- 2.33 [5]helicence derivitive (M201) ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. วิชาสาร สุธศรีเมือง (MTEC)
- 2.34 Iron (II) acetate: Fluka ($M_w = 232.98$ g/mol)
- 2.35 Iron (II) acetate: Fluka ($M_w = 650.90$ g/mol)
- 2.36 Iron (II) chloride, anhydrous: Sigma-Aldrich (98%, $M_w = 126.75$ g/mol)
- 2.37 Iron (II) perchlorate hydrate: Sigma-Aldrich (98%, $M_w = 254.74$ g/mol)
- 2.38 Lead (II) acetate: Carlo ($M_w = 235.29$ g/mol)
- 2.39 Lead (II) chloride: Strem chemical (99%, $M_w = 278.10$ g/mol)
- 2.40 Lead (II) perchlorate trihydrate: Strem chemical (97+%, $M_w = 460.15$ g/mol)
- 2.41 Lithium chloride: Strem chemical (99%, $M_w = 42.39$ g/mol)
- 2.42 Lithium perchlorate trihydrate: Strem chemical (98%, $M_w = 160.45$ g/mol)
- 2.43 Magnesium chloride: Strem chemical (97.5%, $M_w = 95.22$ g/mol)
- 2.44 Magnesium perchlorate hexahydrate: Strem chemical (99%, $M_w = 331.33$ g/mol)
- 2.45 Manganese (II) chloride, anhydrous: Strem chemical (99.995+%, $M_w = 125.84$ g/mol)
- 2.46 Manganese (II) perchlorate hexahydrate: Strem chemical (99%, $M_w = 361.93$ g/mol)
- 2.47 Mercuric acetate: Fluka ($M_w = 318.68$ g/mol)
- 2.48 Mercury (II) chloride: Strem chemical (99+%, $M_w = 217.50$ g/mol)
- 2.49 Mercury (II) perchlorate trihydrate: Strem chemical (99+%, $M_w = 453.51$ g/mol)
- 2.50 Methanol (distillation)
- 2.51 Methanol (for analysis): MERCK (99%)
- 2.52 Nickel (II) chloride, anhydrous: Strem chemical (98%, $M_w = 129.62$ g/mol)
- 2.53 Nickel (II) perchlorate hexahydrate: Strem chemical (99%, $M_w = 365.70$ g/mol)
- 2.54 Potassium acetate: Fluka ($M_w = 98.14$ g/mol)
- 2.55 Potassium chloride: Strem chemical (99+%, $M_w = 74.56$ g/mol)
- 2.56 Potassium perchlorate: Sigma-Aldrich (99+%, $M_w = 138.55$ g/mol)
- 2.57 Phosphoryl trichloride: Sigma-Aldrich (99%, $M_w = 137.33$ g/mol)

- 2.58 Silica gel 60 (0.063-0.200 mm) สำหรับ column chromatography, Merck
- 2.59 Silica gel 60 F₂₅₄ containing gypsum สำหรับ preparative thin layer chromatography, Merck
- 2.60 Silver acetate: BDH ($M_w = 166.91$ g/mol)
- 2.61 Silver chloride: Strem chemical (99.9%, $M_w = 143.32$ g/mol)
- 2.62 Silver perchlorate, anhydrous: Strem chemical (97%, $M_w = 207.32$ g/mol)
- 2.63 Sodium acetate: Fluka ($M_w = 82.03$ g/mol)
- 2.64 Sodium chloride: Strem chemical (99.9999%, $M_w = 58.44$ g/mol)
- 2.65 Sodium hydroxide: Fluka ($\geq 98.0\%$, $M_w = 40.00$ g/mol)
- 2.66 Sodium methoxide: Fluka ($\geq 98.0\%$, $M_w = 54.02$ g/mol)
- 2.67 Sodium perchlorate, anhydrous: Strem chemical (98%, $M_w = 122.44$ g/mol)
- 2.68 Sodium sulfate anhydrous: Sigma-Aldrich (99.0%)
- 2.69 Sodium sulfide: Sigma-Aldrich ($M_w = 78.04$ g/mol)
- 2.70 Tetraethylammonium iodide: BDH
- 2.71 Triethanolamine (TEA) : CARLO ERBA (d = 1.124 g/mL, $M_w = 149.19$ g/mol)
- 2.72 Triethylamine: Fluka ($>98\%$, d = 0.726 g/mL, $M_w = 101.19$ g/mol)
- 2.73 1,2,3,3-tetramethyl-3H-indol-1-ium iodide: Sigma-Aldrich ($M_w = 301.17$ g/mol)
- 2.74 Toluene: MERCK (99%, $M_w = 92.14$ g/mol)
- 2.75 Zinc acetate dehydrate: Fluka ($M_w = 219.51$ g/mol)
- 2.76 Zinc chloride: Strem chemical (97%, $M_w = 136.28$ g/mol)
- 2.77 Zinc perchlorate hexahydrate: Sigma-Aldrich ($M_w = 372.36$ g/mol)

บทที่ 4

วิธีการทดลอง

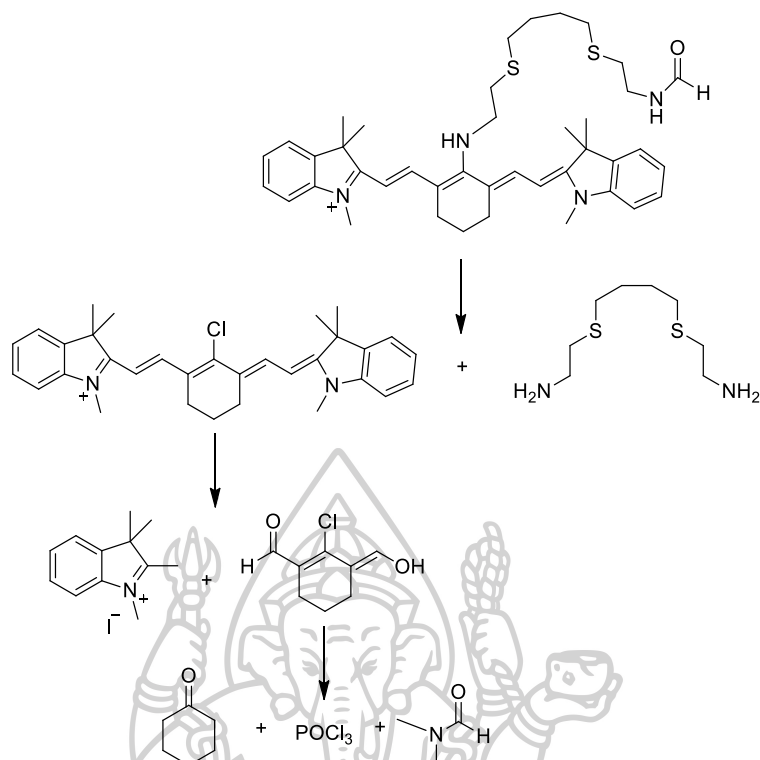
งานวิจัยนี้ได้ออกแบบและสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ที่มีความสามารถในการตรวจวัดไอออนทองแดงและไอออนปรอทชนิดใหม่ 2 ชนิด ดังแสดงภาพที่ 23 ได้แก่ ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ชนิดที่ 1 (Cy7C4) และฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ชนิดที่ 2 (M201NHP) โดยเซ็นเซอร์ Cy7C4 ประกอบด้วยอนุพันธ์ของไซยานิน (cyanine) ทำหน้าที่เป็นฟลูออโรฟอร์เชื่อมต่อกับไอออนฟอรั ชนิด 2-(4-(2-aminoethylsulfanyl)butylsulfanyl)ethanamine ส่วนเซ็นเซอร์ M201NHP ประกอบด้วยอนุพันธ์ของ [5]helicene anhydrous ทำหน้าที่เป็นฟลูออโรฟอร์เชื่อมต่อกับไอออนฟอรั phenyl isothiocyanate รวมทั้งนำแผ่นเยื่ออิเล็กโทรสปินที่ขึ้นรูปโดยเทคนิคอิเล็กโทรสปินนิง (electrospinning) ที่ทำการผสมสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนปรอท นำไปทดสอบการคายแสงฟลูออเรสเซนต์



ภาพที่ 23 โครงสร้างของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ Cy7C4 และ M201NHP

1. สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ Cy7C4

การสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดไอออนทองแดงชนิดใหม่ ที่มีการคายแสงฟลูออเรสเซนต์อยู่ในช่วงใกล้อินฟราเรด และมีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อไอออนทองแดงนั้น ในโครงสร้างจะประกอบด้วยส่วนของไอออนฟอรัที่มีอะตอมซัลเฟอร์ และอะตอมไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ 2-(4-(2-aminoethylsulfanyl)butylsulfanyl)ethanamine เชื่อมต่อกับสารฟลูออเรสเซนต์ชนิดไซยานิน (cyanine dye) ซึ่งทำหน้าที่เป็นฟลูออโรฟอร์ โดย Retrosynthesis ของเซ็นเซอร์ Cy7C4 แสดงได้ดังภาพที่ 24

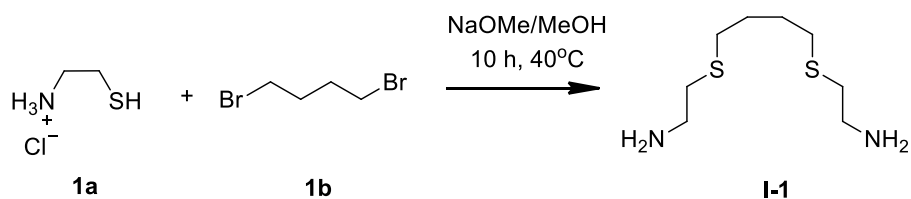


ภาพที่ 24 Retrosynthesis ของเซ็นเซอร์ Cy7C4

ในขั้นตอนการสังเคราะห์สารเซ็นเซอร์ Cy7C4 นั้นจะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน กล่าวคือ จะต้องสังเคราะห์ส่วนของไอออนฟอร์ และส่วนของฟลูออโรฟอร์ขึ้นมาก่อน จากนั้นจึงจะนำทั้งสองส่วนมาเชื่อมเข้าด้วยกันโดยผ่านปฏิกิริยาการแทนที่แบบนิวคลีโอฟิลิก (nucleophilic substitution)

1.1 การสังเคราะห์ไอออนฟอร์ 2-(4-(2-aminoethylsulfanyl)butylsulfanyl)ethanamine (I-1)

การสังเคราะห์สารไอออนฟอร์นั้นสามารถทำได้เพียง 1 ขั้นตอน โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยาการแทนที่แบบนิวคลีโอฟิลิก ในสภาวะเบส ดังภาพที่ 25



ภาพที่ 25 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ 2-(4-(2-aminoethylsulfanyl)butylsulfanyl)ethanamine (I-1)

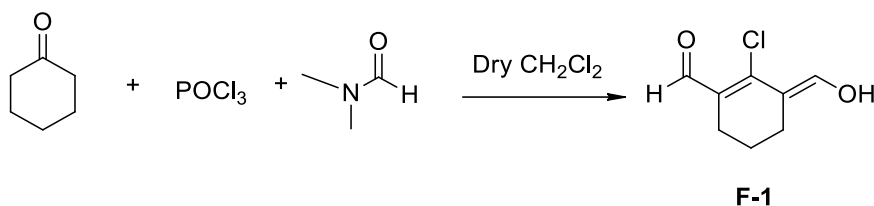
วิธีการสังเคราะห์ 2-(4-(2-aminoethylsulfanyl)butylsulfanyl)ethanamine (**I-1**) ได้ศึกษาตามวิธีของ Wanichacheva และคณะ [42] โดยซิงโซเดียมเมทออกไซด์ (sodium methoxide, NaOMe) 0.68 กรัม หรือ 12 มิลลิโมล ลงในขวดก้นกลมขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นละลายด้วย เมทานอลปราศจากน้ำ (dry methanol) ปริมาณ 3.00 มิลลิลิตร และเติม cysteamine hydrochloride (**1a**) 1.14 กรัม หรือ 10 มิลลิโมล ลงในสารละลาย และกวนผสมภายในบรรยากาศ อาร์กอน (argon atmosphere) ที่อุณหภูมิห้อง (room temperature) เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม 1,4-dibromobutane (**1b**) ปริมาณ 0.50 มิลลิลิตร หรือ 4.19 มิลลิโมล แล้วกวนปฏิกิริยาพร้อมให้ความร้อน 40 องศาเซลเซียส (°C) เป็นเวลาต่อเนื่อง 10 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วนำสารละลายมากรอง แล้วล้างตะกอนด้วยเมทานอล (methanol) แล้วนำไปกำจัดตัวทำละลายออก โดยการระเหยแบบลดความดัน (rotary evaporator)

จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide, NaOH) เข้มข้น 30% น้ำหนักโดยปริมาตร (w/v) ปริมาณ 15 มิลลิลิตร ลงในขวดปฏิกิริยาข้างต้นจากนั้นกวนเบาๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำไปสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) 3 ครั้ง ครั้งละ 20 มิลลิลิตร โดยเก็บเฉพาะสารละลายชั้นไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) รวมไว้ด้วยกัน แล้วนำมาสกัดด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water, น้ำ DI) 2 ครั้ง ครั้งละ 60 มิลลิลิตร โดยเลือกเก็บชั้นไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) และมากำจัดน้ำออกโดยการเติม โซเดียมซัลเฟตปราศจากน้ำ (sodium sulfate anhydrous, anh. Na₂SO₄) ลงไปปริมาณเล็กน้อย จากนั้นนำสารไประเหยไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) ออกแบบลดความดัน จะได้สาร **I-1** ที่มีลักษณะเป็นน้ำมันสีเหลืองอ่อน คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเกือบ 100% (นำไปใช้ในปฏิกิริยาขั้นต่อไป โดยไม่ผ่านการแยกบริสุทธิ์)

1.2 การสังเคราะห์สารฟลูออโรฟอร์ชนิดไซยานีน (Cyanine dye, F-2)

การสังเคราะห์สารฟลูออโรฟอร์ชนิดไซยานีนนั้นสามารถทำได้ภายใน 2 ขั้นตอน ในขั้นแรกนั้นจะอาศัยการเกิดปฏิกิริยาโดยใช้ Vilsmeier Haack reagents ทำปฏิกิริยากับ cyclohexanone ได้สาร **F-1** ดังภาพที่ 26 และในขั้นตอนที่ 2 จะเป็นการทำปฏิกิริยา alkylation ระหว่างสาร **F-1** กับ Indolium Iodide ดังภาพที่ 27 จึงเกิดเป็นสารฟลูออโรฟอร์ชนิดไซยานีน **F-2** ซึ่งสามารถแสดงรายละเอียดการสังเคราะห์ได้ดังต่อไปนี้

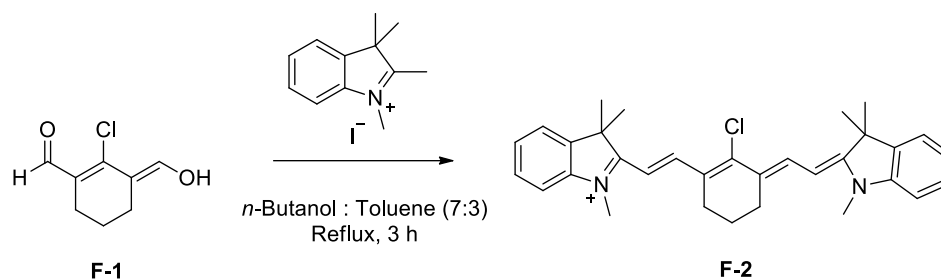
1.2.1 การสังเคราะห์สาร F-1



ภาพที่ 26 ปฏิกริยาการสังเคราะห์สาร F-1

วิธีการสังเคราะห์สาร F-1 สามารถทำได้ตามสมการปฏิกริยาการสังเคราะห์ดังภาพที่ 26 โดยได้ศึกษาตามวิธีของ Reynolds และคณะ [43] เริ่มจากเติมตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนปราศจากน้ำ (dry dichloromethane) ปริมาณ 4 มิลลิลิตรในขวดกั้นกลมและเติมไดเมทิลฟอร์มาไมด์ปราศจากน้ำ (dry dimethylformide) ปริมาณ 4 มิลลิลิตร ทำการกวนผสมกันภายใต้บรรยากาศอาร์กอน (argon atmosphere) ในอ่างควบคุมความเย็นด้วยน้ำแข็ง (ขวดที่ 1) จากนั้นเตรียมขวดกั้นกลมใหม่ (ขวดที่ 2) เติมไดคลอโรมีเทนปราศจากน้ำ (dry dichloromethane) ปริมาณ 2.00 มิลลิลิตร จากนั้นเติมฟอสฟอริล ไตรคลอไรด์ (phosphoryl trichloride) 3.00 มิลลิลิตร ในตู้ดูดควัน (fume hood) ทำการกวนผสมกันภายใต้บรรยากาศอาร์กอน (argon atmosphere) จากนั้นค่อยๆ ตูดสารละลายผสมในขวดที่ 2 เติมลงในสารละลายในขวดที่ 1 อย่างช้าๆ จนครบ 2.00 มิลลิลิตร จากนั้นเติมไดคลอโรมีเทน (dry dichloromethane) ลงไปในขวดที่ 2 อีกประมาณ 1.50 มิลลิลิตร แล้วทำการตูดสารละลายในขวดที่ 2 เติมลงในสารละลายในขวดที่ 1 จนหมด และตั้งทิ้งไว้จนไม่เห็นไอสารข้างขวด จากนั้นเติม cyclohexanone ปริมาณ 1 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นรอให้เย็น แล้วเทลงในปีกเกอร์ที่บรรจุน้ำแข็งที่ปราศจากไอออน (ประมาณ 20 กรัม) แล้วกวนเบาๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที (ระวังอย่าให้ไดคลอโรมีเทนแห้ง) จากนั้นนำไปเก็บในตู้เย็นเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วนำไปกรองด้วยสุญญากาศ แล้วเก็บตะกอนที่กรองได้ในตู้ดูดความชื้น (desiccator) ประมาณ 3-4 ชั่วโมงจนสารแห้ง สารที่ได้ออกมาคือสารระหว่างกลางเป็นสารประกอบ F-1 ซึ่งมีความเสถียรน้อยมาก จึงมาทำปฏิกริยาต่อโดยไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

1.2.1 การสังเคราะห์สาร F-2

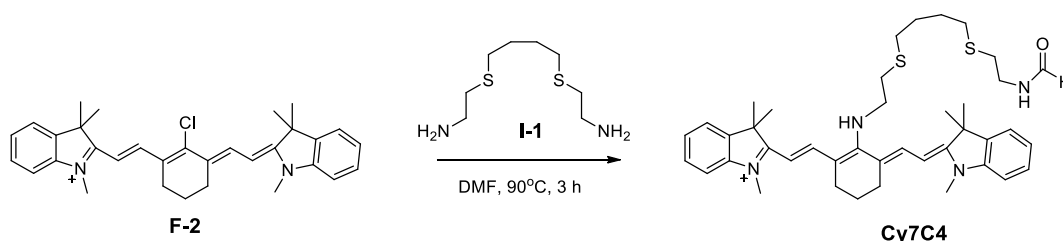


ภาพที่ 27 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารไซยานีน F-2

วิธีการสังเคราะห์สาร F-2 สามารถทำได้ตามสมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดังภาพที่ 27 โดยได้ศึกษาตามวิธีของ Narayanan และคณะ [44] เริ่มจากทำได้โดยซึ่ง F-1 มา 0.06 กรัม หรือ 0.3 มิลลิโมล แล้วเติมตัวทำละลายผสมระหว่างโทลูอีน (toluene) และบิวทานอล (n-butanol) ในอัตราส่วน (7:3 v/v) และเติม 1,2,3,3-tetramethyl-3H-indol-1-ium iodide 0.18 กรัม หรือ 0.6 มิลลิโมล ในขวดก้นกลมขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปรีฟลักซ์ (reflux) 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 100°C สารละลายที่ได้จะมีสีเขียว จากนั้นรอกให้เย็น แล้วนำไปกำจัดตัวทำละลายออก โดยการระเหยแบบลดความดัน จะได้สารผลิตภัณฑ์ที่ยังไม่บริสุทธิ์ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ทำการแยกบริสุทธิ์โดยใช้วิธีโครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวทำละลายผสม 3% โดยปริมาตร (v/v) เมทานอล (methanol, MeOH): ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane, CH_2Cl_2) มีค่าอัตราการเคลื่อนที่ของสารบนตัวดูดซับ (retention factor, R_f) เท่ากับ 0.3 ได้ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นฟลูออโรฟอร์ F-2 มีลักษณะเป็นของแข็งสีเขียว 0.13 มิลลิกรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตได้เท่ากับ 99%

1.3 การสังเคราะห์สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ Cy7C4

การสังเคราะห์สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ Cy7C4 นั้นสามารถทำได้ภายในขั้นตอนเดียว โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยา alkylation ดังภาพที่ 28

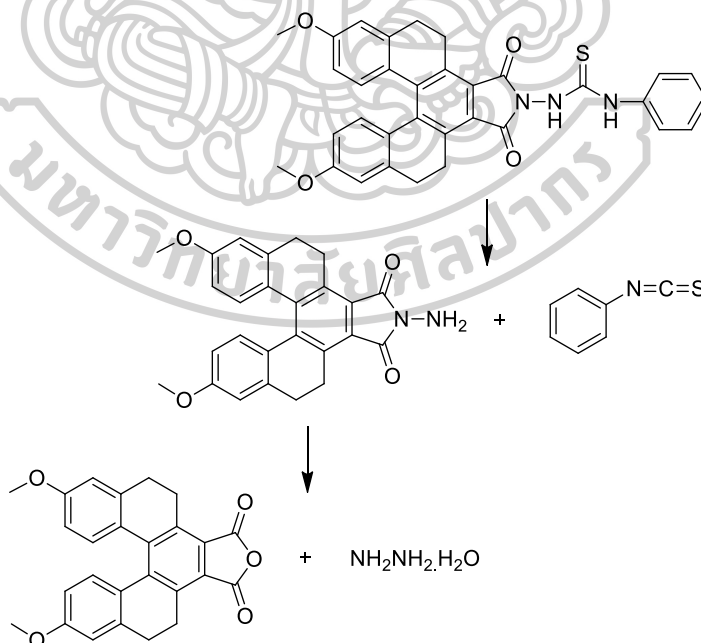


ภาพที่ 28 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ Cy7C4

การสังเคราะห์เซ็นเซอร์ **Cy7C4** ดังภาพที่ 28 โดยซัง **F-2** 0.21 กรัม หรือ 0.43 มิลลิโมล ละลายในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (dimethylformamide) 10 มิลลิตร จากนั้นเติม **I-1** 0.18 กรัม หรือ 0.86 มิลลิโมล นำไปทำการกวนผสมกันภายใต้บรรยากาศอาร์กอน (argon atmosphere) 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 90°C จากนั้นนำไประเหยเอาตัวทำละลายออกแบบลดความดัน จะได้สารผลิตภัณฑ์ที่ยังไม่บริสุทธิ์ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ทำการแยกบริสุทธิ์โดยการใช้วิธีทิน เลเยอร์โครมาโทกราฟี (preparative thin layer chromatography) โดยใช้ตัวทำละลายผสม 2 %โดยปริมาตร (%v/v) เมทานอล (methanol): ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) มีค่าอัตราการเคลื่อนที่ของสารบนตัวดูดซับ (retention factor, R_f) เท่ากับ 0.2 ได้ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ **Cy7C4** มีลักษณะเป็นของแข็งสีน้ำเงิน 57.9 มิลลิกรัม คิดเปอร์เซ็นต์ผลผลิตได้เท่ากับ 19.5%

2. สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ M201NHP

การสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดไอออนปรอทชนิดใหม่ ที่มีการคายแสงฟลูออเรสเซนต์อยู่ในช่วงยูวี-วิสิเบิล และมีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อไอออนปรอทนั้น ในโครงสร้างจะประกอบด้วยส่วนของไอออนฟอร์ที่มีอะตอมซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ phenyl isothiocyanate เชื่อมต่อกับสารฟลูออเรสเซนต์ชนิด เพนตะเฮลิซีน ([5]helicene) ซึ่งมีหน้าที่เป็นฟลูออโรฟอร์ โดย Retrosynthesis ของเซ็นเซอร์ **M201NHP** แสดงได้ดังภาพที่ 29

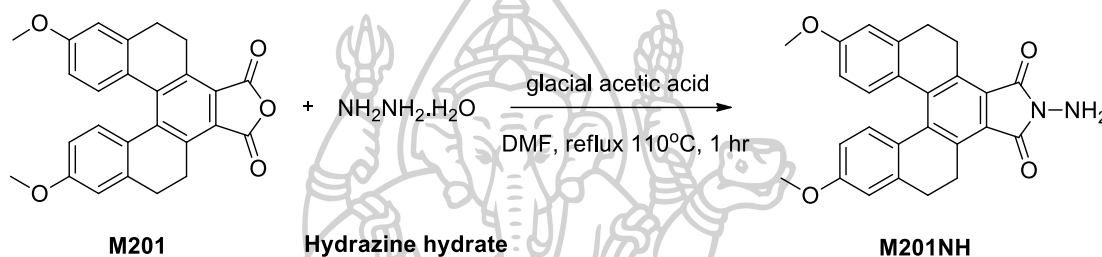


ภาพที่ 29 Retrosynthesis ของเซ็นเซอร์ M201NHP

ในขั้นตอนการสังเคราะห์สารเซ็นเซอร์ M201NHP นั้นจะแบ่งออกเป็นสองส่วน กล่าวคือ จะต้องสังเคราะห์ส่วนของฟลูออโรฟอร์ขึ้นมาก่อน จากนั้นจึงนำมาเชื่อมกับไอโอโนฟอร์เข้าด้วยกัน โดยผ่านปฏิกิริยาการสร้างไธโอยูเรีย (formation of thiourea)

2.1 การสังเคราะห์ฟลูออโรฟอร์ [5]helicene imide (M201NH)

การสังเคราะห์ฟลูออโรฟอร์ [5]Helicene imide (M201NH) สามารถสังเคราะห์ได้ผ่านปฏิกิริยา imidation ระหว่าง [5]helicene anhydride (M201) กับ hydrazine hydrate ในสถานะที่มี glacial acetic acid ทำหน้าที่เป็นกรด ในตัวทำละลาย dimethylformamide (DMF) โดยมีสมการปฏิกิริยาสังเคราะห์แสดงดังภาพที่ 30



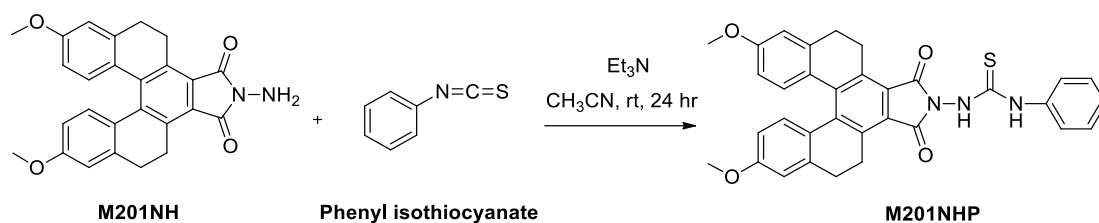
ภาพที่ 30 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์ M201NH

วิธีการสังเคราะห์ [5]Helicene imide (M201NH) ได้ศึกษาตามวิธีของ Kaewnok และคณะ [45] โดยเริ่มจากการชั่ง [5]helicene anhydride (M201) 0.10 กรัม (0.24 มิลลิโมล) จากนั้นละลายด้วยไดเมทิลฟอร์มามิดปราศจากน้ำ (dry dimethylformamide; dry DMF) 3.0 มิลลิลิตร ภายใต้บรรยากาศอาร์กอน (Ar) ต่อมาเติมกรดอะซิติกปราศจากน้ำ (glacial acetic acid) 0.8 มิลลิลิตร และเติมไฮดราซีน (NH₂NH₂.H₂O) ปริมาณ 0.8 มิลลิลิตร (16.40 มิลโมล) จากนั้นรีฟลักซ์ (reflux) ภายใต้บรรยากาศอาร์กอน (Ar) เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา รอสารละลายให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการเทสารละลายที่ได้ลงไปใต้น้ำกลั่นปราศจากไอออน (deionized water) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และกวนสารละลายอย่างรุนแรงเป็นเวลา 15 นาที จะพบว่ามีตะกอนสีเหลืองค่อยๆ เกิดขึ้น (M201NH) เมื่อครบกำหนดเวลาจึงกรองแบบลดความดันเพื่อเก็บตะกอนที่ได้และล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนเย็นปริมาณ 40 มิลลิลิตร จากนั้นจึงทิ้งตะกอนไว้ให้แห้งและใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ฟลูออโรเรสเซนต์เซ็นเซอร์ M201NHP

2.2 การสังเคราะห์สารฟลูออโรเรสเซนต์เซ็นเซอร์ M201NHP

การสังเคราะห์เซ็นเซอร์ M201NHP สามารถสังเคราะห์ได้ผ่านปฏิกิริยาการสร้างไธโอยูเรีย (formation of thiourea) ระหว่าง [5]helicene imide (M201NH) กับ phenyl isothiocyanate

ในสถานะที่มีไตรเอทิลเอมีน ทำหน้าที่เป็นเบส ในตัวทำละลาย acetonitrile โดยมีสมการปฏิกิริยาสังเคราะห์แสดงดังภาพที่ 31



ภาพที่ 31 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์ M201NHP

การสังเคราะห์เซ็นเซอร์ M201NHP ดังภาพที่ 31 เริ่มจากการชั่ง M201NH ปริมาณ 0.98 กรัม (0.23 มิลลิโมล) ละลายด้วยอะซิโตไนไตรล์ (CH_3CN) ปริมาณ 4.0 มิลลิลิตร ภายใต้บรรยากาศอาร์กอน (Ar) เติมเบสไตรเอทิลเอมีน ปริมาตร 130 ไมโครลิตร และเติมฟีนิลไอโซไธโอไซยาเนต ปริมาณ 110 ไมโครลิตร (0.92 มิลลิโมล) นำไปกวนสารละลายที่อุณหภูมิห้องภายใต้บรรยากาศอาร์กอน (Ar) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกแบบลดความดัน จากนั้นเทไดคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2) 20 มิลลิลิตร เพื่อละลายสารที่ได้นำมาสกัดด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน (deionized water) 3 ครั้ง ครั้งละ 20 มิลลิลิตร เก็บสารละลายชั้น CH_2Cl_2 จากนั้นนำไประเหย CH_2Cl_2 ออก ต่อมานำผลิตภัณฑ์ที่ได้ทำการแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี โดยใช้สารละลายผสม เมทานอล (MeOH) : ไดคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2) อัตราส่วน 1:99 v/v ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง 0.11 กรัม คิดเป็นผลผลิตเท่ากับ 86%

3. การทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจจับไอออนทองแดงและไอออนรบกวนอื่นๆ ของเซ็นเซอร์ Cy7C4

การศึกษาประสิทธิภาพในการตรวจจับไอออนโลหะหนักของเซ็นเซอร์ Cy7C4 เริ่มจากการศึกษาสมบัติในการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ โดยศึกษาคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต (excitation spectrum) และการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (emission spectrum) ของสารละลายเซ็นเซอร์ Cy7C4 ในตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิด และสารละลายผสมที่มีตัวทำละลายอินทรีย์กับน้ำ เพื่อหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์การดักจับไอออนที่มีความไวและความจำเพาะเจาะจงกับไอออนทองแดง เมื่อได้ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้ว ต่อไปคือศึกษาประสิทธิภาพในการทำงานของเซ็นเซอร์เกี่ยวกับการตรวจจับไอออนทองแดง (Cu^{2+}) ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปี เพื่อหาความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) ค่าคงที่สมดุลของ

การจับกับไอออนทองแดง (association constant; K_{assoc}) จากสมการ Benesi-Hildebrand ความจำเพาะเจาะจงกับไอออนทองแดง (selectivity) เปรียบเทียบกับไอออนรบกวน ชนิดอื่นๆ รวมทั้งศึกษาถึงประสิทธิภาพในการตรวจจับไอออนทองแดงในภาวะที่มีไอออนรบกวนอื่นๆ (competitive) และอัตราส่วนของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ต่อปริมาณไอออนทองแดง (Job's plot) นอกจากนี้ยังมีการนำเซ็นเซอร์ **Cy7C4** มาประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดไอออนทองแดงในเซลล์สมอง (U251) ในน้ำตัวอย่างจริง และการวิเคราะห์หาปริมาณไอออนทองแดงเชิงปริมาณในตัวอย่างจริงด้วยระบบโฟลอินเจกชันอะนาไลซิส (flow injection analysis, FIA) อีกด้วย

3.1 การทดสอบความไว (sensitivity)

การศึกษาความไวในการตรวจจับไอออนทองแดงของเซ็นเซอร์ **Cy7C4** ทำได้โดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรสโกปี และเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี โดยศึกษาความสามารถในการเปลี่ยนแปลงสัญญาณการดูดกลืนแสงและการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์เมื่อมีการเติมไอออนทองแดง โดยจะทำการวัดการดูดกลืนแสงและการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์ ปริมาตร 3.00 มิลลิลิตร ในสภาวะที่ไม่เติมและเติมไอออนทองแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ

3.1.1 การเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์

เตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ **Cy7C4** เข้มข้น 1.0×10^{-3} M ใน dichloromethane 10.00 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายเซ็นเซอร์ **Cy7C4** ด้วยวิธี serial dilution โดยให้ความเข้มข้นลดลง 10 เท่าในตัวทำละลาย acetonitrile จากนั้นเจือจางสารละลายเซ็นเซอร์ **Cy7C4** ด้วยวิธี serial dilution โดยให้ความเข้มข้นลดลง 10 เท่าในตัวทำละลายผสมระหว่างตัวทำละลายอินทรีย์ (acetonitrile) และสารละลายบัฟเฟอร์ 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES buffer) เข้มข้น 5 mM pH 7.2 ซึ่งเป็นค่า pH เฉลี่ยในเลือดของมนุษย์ในอัตราส่วน 50:50 v/v จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0×10^{-5} M ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร สำหรับการไทเทรตด้วยไอออนทองแดงโดยวิธีฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี และความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 6.0×10^{-5} M ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร สำหรับการไทเทรตด้วยไอออนทองแดงโดยวิธียูวี-วิสิเบิล สเปกโทรสโกปี

3.1.2 การเตรียมสารละลายไอออนทองแดง

การศึกษาความไวของเซ็นเซอร์ **Cy7C4** จะเตรียมสารละลายทองแดงเปอร์คลอเรต ในน้ำปราศจากไอออน (DI water) ความเข้มข้น 1.0×10^{-2} M ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายทองแดงด้วยวิธี serial dilution เช่นเดียวกับการเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ โดยให้ความเข้มข้นลดลงครั้งละ 10 เท่า จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0×10^{-3} M ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร ซึ่งการเจือจางทุกครั้งปรับปริมาตรด้วย DI water

3.1.3 การทดสอบด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรสโกปี

นำสารละลายเซ็นเซอร์ **Cy7C4** ความเข้มข้น 6.0×10^{-5} M ในตัวทำละลายผสมระหว่าง acetonitrile และสารละลาย HEPES buffer เข้มข้น 5 mM pH 7.2 ในอัตราส่วน 50:50 v/v ไปวัดสัญญาณการดูดกลืนแสง ในสภาวะที่ไม่มีไอออนทองแดง โดยใช้ตัวทำละลายชนิดนั้นเป็น blank จากนั้นทำการไทเทรตสารละลายไอออนทองแดง ลงในสารละลายเซ็นเซอร์แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่สูงที่สุด

3.1.4 การทดสอบด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี

นำสารละลายเซ็นเซอร์ความเข้มข้น 1.0×10^{-5} M ไปวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้น โดยเปรียบเทียบระหว่างการไทเทรตสารละลายทองแดง โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการทดสอบตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ สำหรับการทดสอบความไว (sensitivity) ของเซ็นเซอร์ **Cy7C4**

พารามิเตอร์ที่ศึกษา	ค่าพารามิเตอร์ที่กำหนด
สภาวะที่ทำงาน	ใน HEPES buffer (5 mM pH 7.2):acetonitrile (50:50 v/v)
λ_{ex} (nm)	640
Scan speed (nm/min)	500
Ex slit width (nm)	10
Em slit width (nm)	20
ช่วงความยาวคลื่นที่ศึกษา (nm)	630-800

3.2 การหาค่าความสามารถต่ำสุดในการตรวจวัดไอออนทองแดงของเซ็นเซอร์ **Cy7C4** (detection limit)

จากการทดสอบความไวในการตรวจวัดไอออนทองแดงของเซ็นเซอร์ **Cy7C4** (sensitivity) สามารถคำนวณค่าความสามารถต่ำสุดในตรวจจับไอออน (detection limit) โดยการพลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของทองแดงที่เติมลงไปกับความเข้มข้นต่างๆ (แกน x) กับค่าเฉลี่ย fluorescence intensity (I_0-I) ที่จุดใดๆ ของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ 720 nm (แกน y) เพื่อหาความชันของกราฟ (slope) จากนั้นนำมาคำนวณตามสมการที่ 1 [12]

$$\text{Detection limit} = \frac{3SD_{\text{blank}}}{\text{slope}} \quad \text{สมการที่ 1}$$

โดยที่ SD_{blank} คือ ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ของ blank

3.3 การหาค่าคงที่สมดุลของการจับไอออนทองแดงของเซ็นเซอร์ Cy7C4 (K_{assoc})

จากการทดสอบความไวในการดักจับไอออนทองแดงของเซ็นเซอร์ Cy7C4 (sensitivity) จะสามารถนำค่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้จากการไทเทรตด้วยไอออนทองแดงไปใช้ในการหาค่าคงที่สมดุลของการจับไอออน (K_{assoc}) จากสมการ Benesi-Hildebrand [46] ดังสมการที่ 2

สมการ Benesi-Hildebrand;

$$\frac{1}{I_0 - I} = \frac{1}{K_{\text{assoc}}(I_0 - I_{\text{min}})[Q]^n} + \frac{1}{I_0 - I_{\text{min}}} \quad \text{สมการที่ 2}$$

จากสมการมีลักษณะความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงโดยแสดงความสัมพันธ์ ระหว่าง $\frac{1}{I_0 - I}$ ในแกน y และ $\frac{1}{[Q]^n}$ ในแกน x จะหาค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออนทองแดง (K_{assoc}) ได้ เมื่อกำหนดให้

I_0 = ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์เริ่มต้น

I = ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์หลังเติมไอออนที่ความเข้มข้นใดๆ

I_{min} = ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์น้อยที่สุด

n = จำนวนเต็มใดๆ เช่น 1, 2 และ 3

พบว่าค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออนคำนวณได้จากความชันของกราฟที่สร้างขึ้น ดังนี้

$$\text{Slope} = \frac{1}{K_{\text{assoc}}(I_0 - I_{\text{min}})} \quad \text{สมการที่ 3}$$

$$K_{\text{assoc}} = \frac{1}{\text{Slope}(I_0 - I_{\text{min}})} \quad \text{สมการที่ 4}$$

3.4 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงในการดักจับไอออนทองแดง และไอออนรบกวนอื่นๆ ของเซ็นเซอร์ Cy7C4 (selectivity)

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเซ็นเซอร์ Cy7C4 นั้นด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปีนั้น จะทำการศึกษาสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์ที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อมีการเติมไอออนทองแดงและไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ที่เพิ่มขึ้น โดยการปิเปตสารละลายเซ็นเซอร์ปริมาตร 3.00 มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้นจากการไทเทรตด้วยสารละลายทองแดงและไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์

ระหว่างการไทเทรตด้วยสารละลายไอออนทองแดงและการไทเทรตด้วยสารละลายไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ และยังสามารถศึกษาได้ด้วยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายภายใต้แสงปกติ (แสงขาว) ได้ด้วยตาเปล่าอีกด้วย

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

3.4.1 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (selectivity) ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ สเปกโทรสโกปี

1) การเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์

สารละลายเซ็นเซอร์ **Cy7C4** จะเตรียมขึ้นความเข้มข้น 1.0×10^{-5} M ในลักษณะเดียวกับการศึกษาความไว โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นและความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากัน แต่การศึกษาความจำเพาะเจาะจงจะเตรียมความเข้มข้นสุดท้ายในปริมาณ 50.00 มิลลิลิตร

2) การเตรียมสารละลายไอออนทองแดงและไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ

ในการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ **Cy7C4** จะเตรียมสารละลายไอออนทองแดง และไอออนโลหะเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ ใน DI water โดยเตรียมขึ้นในลักษณะเดียวกับการทดสอบความไว ซึ่งใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นและความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากัน

3) การทดสอบ

นำสารละลายเซ็นเซอร์ **Cy7C4** ที่เตรียมไว้ไปวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้น โดยเปรียบเทียบระหว่างการไทเทรตสารละลายไอออนทองแดง กับการไทเทรตสารละลายไอออนเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการทดสอบเช่นเดียวกับการทดสอบความไว (ตามตารางที่ 2)

3.4.2 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (selectivity) ด้วยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายภายใต้แสงปกติ (แสงขาว)

1) การเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์

เตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ **Cy7C4** จะเตรียมขึ้นความเข้มข้น 1.0×10^{-5} M ในสารละลายผสม HEPES buffer: acetonitrile (50:50 v/v) ลักษณะเดียวกับการศึกษาความไว

2) การเตรียมสารละลายไอออนทองแดงและไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ

ในการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของฟลูออเรสเซนส์เซ็นเซอร์ **Cy7C4** จะเตรียมสารละลายไอออนทองแดง และไอออนโลหะเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ ใน DI water โดยเตรียมขึ้นในลักษณะเดียวกับการทดสอบความไว ซึ่งใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นและความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากัน

3) การทดสอบ

เปิดสารละลายเซ็นเซอร์ **Cy7C4** ลงในขวด vial ปริมาตร 2.00 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเติมไอออนชนิดต่างๆ ที่เตรียมไว้ที่ความเข้มข้นเท่ากันลงใน vial และสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายด้วยตาเปล่า และทำการบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายรูป

3.5 การทดสอบความสามารถในการตรวจจับไอออนทองแดงในภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ (competitive)

การทดสอบความสามารถในการตรวจจับไอออนทองแดง ในภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโกปี โดยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ของสารละลายเซ็นเซอร์ **Cy7C4** ในขณะก่อนเติมและหลังเติมสารละลายไอออนทองแดงลงในสารละลายเซ็นเซอร์ที่ถูกเตรียมขึ้นปริมาตร 3.00 มิลลิลิตร จนสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ชัดเจนที่ความเข้มค่าหนึ่ง จากนั้นเติมสารละลายไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ในปริมาณ 10 เท่าของสารละลายไอออนทองแดงที่เติมลงไป และวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ภายหลังการเติมไอออนรบกวนอีกครั้ง โดยสารละลายเซ็นเซอร์ **Cy7C4** สารละลายไอออนทองแดง และสารละลายไอออนรบกวนชนิดต่างๆ นั้นสามารถเตรียมได้เช่นเดียวกับการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเซ็นเซอร์ **Cy7C4**

3.5.1 การเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์

สารละลายเซ็นเซอร์ **Cy7C4** จะเตรียมที่ความเข้มข้น 1.0×10^{-5} M ในลักษณะเดียวกับการศึกษาความไว โดยใช้ ความเข้มข้นเริ่มต้นและความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากัน แต่การศึกษา

ความสามารถในการตรวจจับไอออนทองแดงในภาวะที่มีไอออนรบกวนอื่นๆ จะเตรียมความเข้มข้นสุดท้ายในปริมาตร 50.00 มิลลิลิตร

3.5.2 การเตรียมสารละลายไอออนทองแดงและไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ

เตรียมสารละลายไอออนทองแดง และไอออนเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ เพื่อใช้ทดสอบความสามารถในการตรวจจับไอออนทองแดงในภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ เช่นเดียวกับการเตรียมเพื่อใช้ทดสอบความจำเพาะเจาะจง

3.5.3 การทดสอบ

นำสารละลายเซ็นเซอร์แต่ละชนิดที่เตรียมขึ้นไปวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้นเมื่อมีการเติมสารละลายไอออนทองแดง และสารละลายไอออนเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ ลงในสารละลายเซ็นเซอร์ โดยกำหนด ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการทดสอบตามตารางที่ 2 เช่นเดียวกับการทดสอบความไว จากนั้นสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า I_f/I_0 (Normalized fluorescence intensity) ที่ความยาวคลื่นที่ความเข้มมากที่สุด (λ_{max}) ในแนวแกน y และ ชนิดของสารต่างๆ ในแนวแกน x เมื่อกำหนดให้

I_0 = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายก่อนเติมไอออน

I_f = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายหลังเติมไอออน

3.6 การหาอัตราส่วนของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเซ็นเซอร์ Cy7C4 กับไอออนทองแดง (Job's plot)

การหาอัตราส่วนของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเซ็นเซอร์ Cy7C4 กับไอออนทองแดงด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปีด้วยวิธี Job's plot โดยเตรียมสารละลายผสมระหว่างเซ็นเซอร์ Cy7C4 กับไอออนทองแดง โดยให้อัตราส่วนโดยโมลของเซ็นเซอร์ตั้งแต่ 0 ถึง 1 ในปริมาตรสารละลายทั้งหมด 3.00 มิลลิลิตร แล้วทำการวัดค่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ จากนั้นนำผลการทดลองมาพลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนโดยโมลของเซ็นเซอร์ (แกน x) และ I_0-I (แกน y) โดยกำหนดให้

I_0 = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายก่อนเติมไอออน

I = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายหลังเติมไอออน

เมื่อสร้างกราฟแล้วจะแสดงอัตราส่วนการเกิดแรงกระทำระหว่างเซ็นเซอร์กับไอออนโลหะ จากค่าการเปลี่ยนแปลงที่สูงที่สุดโดยในการทดลองนี้ใช้เซ็นเซอร์ Cy7C4 เข้มข้น 1.0×10^{-5} M และ ไอออนทองแดงเข้มข้น 1.0×10^{-3} M

3.7 การศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเซ็นเซอร์ Cy7C4 กับไอออนทองแดง ด้วยวิธีการสร้างแบบจำลองโมเลกุลทางคอมพิวเตอร์ (computational molecular modeling)

การศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเซ็นเซอร์ Cy7C4 กับไอออนทองแดง สามารถวิเคราะห์ได้จากโครงสร้างที่มีพลังงานต่ำสุดของเซ็นเซอร์ในสภาวะก่อน และหลังจับไอออนทองแดง ด้วยวิธีการสร้างแบบจำลองโมเลกุลทางคอมพิวเตอร์ ตามระเบียบวิธี Density Functional Theory (DFT) เบสิกเซต 6-311G** สำหรับธาตุกลุ่มหลัก และ Lan2DZ และรูปภาพจากโปรแกรม Visual Molecular Dynamics (VMD)

3.8 การทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนทองแดงของเซ็นเซอร์ Cy7C4 ในตัวอย่างจริง

ในวิทยานิพนธ์นี้มีการนำสารเซ็นเซอร์ Cy7C4 ไปศึกษาในตัวอย่างจริง เป็นการศึกษาเบื้องต้นสำหรับการนำไปพัฒนาเป็นชุดเครื่องมือต่อไป ในที่นี่ได้ศึกษาในตัวอย่างจริง 3 ชนิดคือ การทดสอบในน้ำตัวอย่าง เซลล์สิ่งมีชีวิต (U251) และการทดสอบการตรวจวัดไอออนทองแดงด้วยเทคนิค FIA

3.8.1 ความสามารถในการตรวจวัดไอออนทองแดงในน้ำตัวอย่าง

การทดสอบการตรวจวัดไอออนทองแดงในน้ำตัวอย่างได้แก่ น้ำดื่ม (DW), น้ำแร่ (MW), น้ำจากอ่างเก็บน้ำ (PW), น้ำจากแม่น้ำ (RW), น้ำทะเล (SW) และน้ำประปา (TW) โดยเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ Cy7C4 เข้มข้น 1.0×10^{-5} M ในตัวทำละลายผสมระหว่างน้ำตัวอย่าง: acetonitrile อัตราส่วน 50:50 v/v และเตรียมไอออนทองแดงเข้มข้น 1.0×10^{-3} M จากนั้น เติมไอออนทองแดงที่ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4 และ 5 μ M ลงไป และสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายในขณะที่ไม่มี และมีไอออนทองแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ

3.8.2 ความสามารถในการตรวจวัดไอออนทองแดงในเซลล์ U251

การทดสอบกับเซลล์สิ่งมีชีวิต เป็นการศึกษาเบื้องต้นสำหรับการพัฒนาไปใช้กับร่างกายมนุษย์ โดยตัวอย่างที่นำมาใช้ คือ เซลล์เนื้องอกในสมองมนุษย์ ชนิด กลัยโอบลาสโตมา แอสโตรไซโตมา (glioblastoma astrocytoma, U251) โดยทำการศึกษาโดยบ่มเซลล์ในสภาวะที่ไม่มี และมีไอออนทองแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ (50, 100 และ 200 μ M) และบ่มเซลล์ต่อด้วยสารละลายเซ็นเซอร์ Cy7C4 (10 μ M) จากนั้นจึงนำไปทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence microscope)

3.8.3 การตรวจวัดไอออนทองแดงโดยประยุกต์กับเทคนิคโพล อินเจกชัน อะนาลิซิส (flow injection analysis, FIA)

ในวิทยานิพนธ์นี้นอกจากได้มีการได้สังเคราะห์ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ที่มีการคายแสงฟลูออเรสเซนต์อยู่ในช่วงใกล้อินฟราเรดแล้ว ยังได้มีการนำสาร **Cy7C4** ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับไอออนทองแดงมาทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนทองแดงด้วยเทคนิค FIA ทั้งแบบ FIA-spectrophotometry และ FIA-spectrofluorometer และนอกจากนี้สารละลายเซ็นเซอร์ **Cy7C4** ยังถูกนำไปใช้วิเคราะห์เชิงปริมาณ (FIA-spectrofluorometer) เพื่อหาปริมาณของไอออนทองแดงในตัวอย่างสังเคราะห์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเคมี (chemical laboratory) โดยเปรียบเทียบกับไทเทรตแบบไอโอดิเมตริก (reference iodometric titration)

1) การเตรียมสารละลายฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ **Cy7C4**

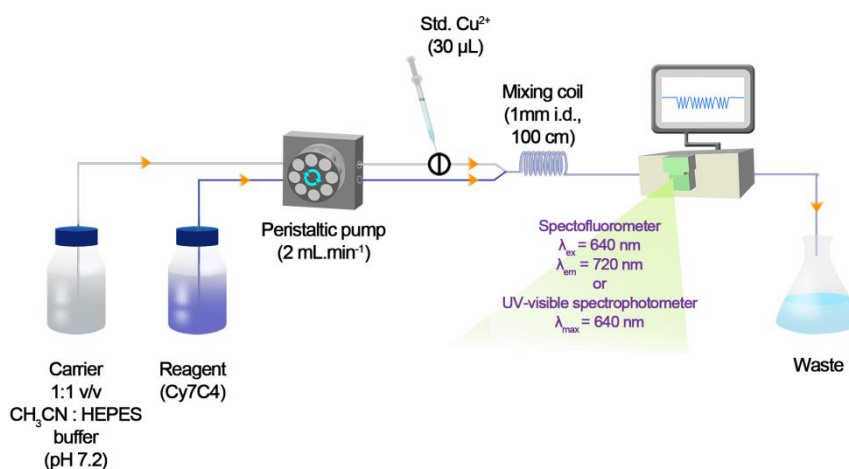
โดยการเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ **Cy7C4** เข้มข้น 4×10^{-5} M ในตัวทำละลาย ใน HEPES buffer (5 mM pH 7.2):acetonitrile (50:50 v/v) ในขนาดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

2) การเตรียมสารละลายไอออนทองแดง

ในการทดสอบนี้จะเตรียมสารละลายไอออนทองแดงเปอร์คลอเรตในน้ำ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0.05 mM, 0.10 mM, 0.50 mM, 1.0 mM, 3.0 mM, 5.0 mM, 7.0 mM และ 9.0 mM ความเข้มข้นละ 10 มิลลิลิตร

3) การทดสอบการตรวจวัดไอออนทองแดงด้วยวิธีการแบบ FIA

ในการต่อระบบ FIA สำหรับตรวจวัดไอออนทองแดงสามารถทำได้ดังภาพที่ 32 โดยใช้ตัวพาแบบสารตัวทำละลายผสมระหว่าง HEPES buffer (5 mM pH 7.2): acetonitrile (50:50 v/v) โดยมีปริมาตรการฉีดตัวอย่างเท่ากับ 30 μ L และอัตราการไหล (flow rate) 2.0 mL.min⁻¹



ภาพที่ 32 การต่อระบบ FIA สำหรับตรวจวัดไอออนทองแดง

โดยการตรวจวัดครั้งนี้จะสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณการดูดกลืนแสง และสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อมีการฉีดไอออนทองแดงเข้าสู่ระบบ FIA-spectrophotometry และ FIA-spectrofluorometer โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการทดสอบสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ ตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ค่าพารามิเตอร์ที่กำหนดสำหรับตรวจวัดไอออนทองแดงของเซ็นเซอร์ Cy7C4

พารามิเตอร์ที่ศึกษา	ค่าพารามิเตอร์ที่กำหนด
λ_{ex} (nm)	640
λ_{em} (nm)	720

4. การทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจจับไอออนปรอทและไอออนรบกวนอื่นๆ ของเซ็นเซอร์ M201NHP

เริ่มจากการศึกษาสมบัติในการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ โดยศึกษาคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต (excitation spectrum) เพื่อให้ทราบความยาวคลื่นสูงสุดของการดูดกลืนแสง (λ_{ex}) และการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ (emission spectrum) เพื่อให้ทราบความยาวคลื่นสูงสุดของการคายแสง (λ_{em}) ของสารละลายเซ็นเซอร์ M201NHP ในตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิด และสารละลายผสมที่มีตัวทำละลายอินทรีย์กับน้ำ เพื่อหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์การดักจับไอออนที่มีความไวและความจำเพาะเจาะจงกับไอออนปรอท เมื่อได้ระบบตัวทำละลายที่

เหมาะสมแล้ว ต่อไปคือศึกษาการประสิทธิภาพในการทำงานของเซ็นเซอร์เกี่ยวกับการตรวจจับไอออนปรอท (Hg^{2+}) ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี เพื่อหาความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) ค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออนปรอท (association constant; K_{assoc}) จากสมการ Benesi-Hildebrand ความจำเพาะเจาะจงกับไอออนปรอท (selectivity) เปรียบเทียบกับไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ รวมทั้งศึกษาถึงประสิทธิภาพในการตรวจจับไอออนปรอทในภาวะที่มีไอออนรบกวนอื่นๆ (competitive) การทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนปรอทในสภาวะที่มี pH ต่างๆ (pH effect) อัตราส่วนของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ต่อปริมาณไอออนปรอท (Job's plot) การหาค่าประสิทธิภาพเชิงควอนตัมทางฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence quantum yield) และศึกษาความสามารถในการนำกลับมาใช้ใหม่ (reversibility study) นอกจากนี้ยังมีการนำเซ็นเซอร์ M201NHP มาประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดไอออนปรอทในน้ำตัวอย่าง คริมเจล และในเซลล์สิ่งมีชีวิตอีกด้วย

4.1 การทดสอบความไว (sensitivity)

การศึกษาความไวในการตรวจจับไอออนปรอทของเซ็นเซอร์ M201NHP ทำได้โดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรสโกปี และเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี โดยศึกษาความสามารถในการเปลี่ยนแปลงสัญญาณการดูดกลืนแสงและการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์เมื่อมีการเติมไอออนปรอท โดยจะทำการวัดการดูดกลืนแสงและการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์ ปริมาตร 3.00 มิลลิลิตร ในสภาวะที่ไม่เติมและเติมไอออนปรอทที่มีความเข้มข้นต่างๆ

4.1.1 การเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์

เตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ M201NHP เข้มข้น 1.0×10^{-3} M ใน dichloromethane 10.00 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายเซ็นเซอร์ M201NHP ด้วยวิธี serial dilution โดยให้ความเข้มข้นลดลง 10 เท่าในตัวทำละลาย acetonitrile จากนั้นเจือจางสารละลายเซ็นเซอร์ M201NHP ด้วยวิธี serial dilution โดยให้ความเข้มข้นลดลง 10 เท่าในตัวทำละลายผสม H_2O (DI water): acetonitrile (CH_3CN) ในอัตราส่วน 40:60 v/v จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5.0×10^{-5} M ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร

4.1.2 การเตรียมสารละลายไอออนปรอท

การศึกษาความไวของเซ็นเซอร์ M201NHP จะเตรียมสารละลายปรอทคลอไรด์ในน้ำปราศจากไอออน (DI water) ความเข้มข้น 1.0×10^{-2} M ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายปรอทด้วยวิธี serial dilution เช่นเดียวกับการเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ โดยให้ความ

เข้มข้นลดลงครั้งละ 10 เท่า จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0×10^{-3} M ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร ซึ่งการเจือจางทุกครั้งปรับปริมาตรด้วย DI water

4.1.3 การทดสอบด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรสโกปี

นำสารละลายเซ็นเซอร์ M201NHP ความเข้มข้น 5.0×10^{-5} M ในตัวทำละลายผสม H₂O: acetonitrile (40:60 v/v) ไปวัดสัญญาณการดูดกลืนแสง ในสถานะที่ไม่มีไอออนปรอท โดยใช้ตัวทำละลายชนิดนั้นเป็น blank จากนั้นทำการไทเทรตสารละลายไอออนปรอท ลงในสารละลายเซ็นเซอร์ แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่สูงที่สุด

4.1.4 การทดสอบด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี

นำสารละลายเซ็นเซอร์ความเข้มข้น 5.0×10^{-5} M ไปวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้น โดยเปรียบเทียบระหว่างการไทเทรตสารละลายปรอท โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการทดสอบตามตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ สำหรับการทดสอบความไว (sensitivity) ของเซ็นเซอร์ M201NHP

พารามิเตอร์ที่ศึกษา	ค่าพารามิเตอร์ที่กำหนด
สถานะที่ทำงาน	ใน H ₂ O: acetonitrile (40:60 v/v)
λ_{ex} (nm)	373
Scan speed (nm/min)	500
Ex slit width (nm)	5
Em slit width (nm)	5
ช่วงความยาวคลื่นที่ศึกษา (nm)	400-700

4.2 การหาค่าความสามารถต่ำสุดในการตรวจวัดไอออนปรอทของเซ็นเซอร์ M201NHP (detection limit)

จากการทดสอบความไวในการตรวจวัดไอออนปรอทของเซ็นเซอร์ M201NHP (sensitivity) สามารถคำนวณค่าความสามารถต่ำสุดในการตรวจวัดไอออน (detection limit) โดยการพลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของปรอทที่เติมลงไปกับความเข้มข้นต่างๆ (แกน x) กับค่าเฉลี่ย fluorescence intensity (I_0-I) ที่จุดใดๆ ของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ 565 nm (แกน y) เพื่อหาความชันของกราฟ (slope) จากนั้นนำมาคำนวณตามสมการที่ 1 [12]

$$\text{Detection limit} = \frac{3SD_{\text{blank}}}{\text{slope}} \quad \text{สมการที่ 1}$$

โดยที่ SD_{blank} คือ ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ของ blank

4.3 การหาค่าคงที่สมดุลของการจับไอออนปรอทของเซ็นเซอร์ M201NHP (K_{assoc})

จากการทดสอบความไวในการดักจับไอออนปรอทของเซ็นเซอร์ M201NHP (sensitivity) จะสามารถนำค่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้จากการไทเทรตด้วยไอออนปรอทไปใช้ในการหาค่าคงที่สมดุลของการจับไอออน (K_{assoc}) จากสมการ Benesi-Hildebrand [46] โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการทดลองตามตารางที่ 4

สมการ Benesi-Hildebrand;

$$\frac{1}{I_0 - I} = \frac{1}{K_{\text{assoc}}(I_0 - I_{\text{min}})[Q]^n} + \frac{1}{I_0 - I_{\text{min}}} \quad \text{สมการที่ 2}$$

จากสมการมีลักษณะความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงโดยแสดงความสัมพันธ์ ระหว่าง $\frac{1}{I_0 - I}$ ในแกน y และ $\frac{1}{[Q]^n}$ ในแกน x จะหาค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออนทองแดง (K_{assoc}) ได้ เมื่อกำหนดให้

I_0 = ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์เริ่มต้น

I = ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์หลังเติมไอออนที่ความเข้มข้นใดๆ

I_{min} = ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์น้อยที่สุด

n = จำนวนเต็มใดๆ เช่น 1, 2 และ 3

พบว่าค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออนคำนวณได้จากความชันของกราฟที่สร้างขึ้น ดังนี้

$$\text{Slope} = \frac{1}{K_{\text{assoc}}(I_0 - I_{\text{min}})} \quad \text{สมการที่ 3}$$

$$K_{\text{assoc}} = \frac{1}{\text{Slope}(I_0 - I_{\text{min}})} \quad \text{สมการที่ 4}$$

4.4 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงในการดักจับไอออนปรอท และไอออนรบกวนอื่นๆ ของเซ็นเซอร์ M201NHP (selectivity)

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเซ็นเซอร์ M201NHP นั้นด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปีนั้น จะทำการศึกษาสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์ที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อมีการเติมไอออนปรอทและไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ที่ความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น โดยการเปิดสารละลายเซ็นเซอร์ปริมาตร 3.00 มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้นจากการ

ไทเทรตด้วยสารละลายปรอทและไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ระหว่างการไทเทรตด้วยสารละลายไอออนปรอทและการไทเทรตด้วยสารละลายไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ และยังสามารถศึกษาได้ด้วยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงของสารละลายภายใต้แสง UV ได้ด้วยตาเปล่าอีกด้วย

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

4.4.1 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (selectivity) ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี

1) การเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์

สารละลายเซ็นเซอร์ M201NHP จะเตรียมขึ้นที่เข้มข้น 5.0×10^{-5} M ในลักษณะเดียวกับการศึกษาความไว โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นและความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากัน แต่การศึกษาความจำเพาะเจาะจงจะเตรียมความเข้มข้นสุดท้ายในปริมาณ 50.00 มิลลิลิตร

2) การเตรียมสารละลายไอออนปรอทและไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ

ในการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ M201NHP จะเตรียมสารละลายไอออนปรอทและไอออนโลหะเกลือคลอไรด์ชนิดต่างๆ ใน DI water โดยเตรียมขึ้นในลักษณะเดียวกับการทดสอบความไว ซึ่งใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นและความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากัน

3) การทดสอบ

นำสารละลายเซ็นเซอร์ M201NHP ที่เตรียมไว้ไปวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้น โดยเปรียบเทียบระหว่างการไทเทรตสารละลายไอออนปรอท กับการไทเทรตสารละลายไอออนเกลือคลอไรด์ชนิดต่างๆ โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการทดสอบเช่นเดียวกับการทดสอบความไวตามตารางที่ 4

4.4.2 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (selectivity) ด้วยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงของสารละลายภายใต้แสง UV ด้วยตาเปล่า

1) การเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์

เตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ M201NHP จะเตรียมขึ้นที่เข้มข้น 1.0×10^{-5} M ในสารละลายผสม H_2O : acetonitrile (40:60 v/v) ลักษณะเดียวกับการศึกษาความไว

2) การเตรียมสารละลายไอออนปรอทและไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ

ในการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ M201NHP จะเตรียมสารละลายไอออนปรอท และไอออนโลหะเกลือคลอไรด์ชนิดต่างๆ ใน DI water โดยเตรียมขึ้นในลักษณะเดียวกับการทดสอบความไว ซึ่งใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นและความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากัน

3) การทดสอบ

เปิดสารละลายเซ็นเซอร์ M201NHP ลงในขวด vial ปริมาตร 2.00 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเติมไอออนชนิดต่างๆ ที่เตรียมไว้ที่ความเข้มข้นเท่ากันลงใน vial และสังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงการเรืองแสงของสารละลายภายใต้แสง UV ด้วยตาเปล่า และทำการบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายรูป

4.5 การทดสอบความสามารถในการตรวจจับไอออนปรอทในภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ (competitive)

การทดสอบความสามารถในการตรวจจับไอออนปรอท ในภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี โดยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์ M201NHP ในขณะก่อนเติมและหลังเติมสารละลายไอออนปรอทลงในสารละลายเซ็นเซอร์ที่ถูกเตรียมขึ้นปริมาตร 3.00 มิลลิลิตร จนสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ชัดเจนที่ความเข้มค่าหนึ่ง จากนั้นเติมสารละลายไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ในปริมาณ 10 เท่าของสารละลายไอออนปรอทที่เติมลงไป และวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ภายหลังการเติมไอออนรบกวนอื่นๆ อีกครั้ง โดยสารละลายเซ็นเซอร์ M201NHP สารละลายไอออนปรอท และสารละลายไอออนรบกวนชนิดต่างๆ นั้นสามารถเตรียมได้เช่นเดียวกับการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเซ็นเซอร์ M201NHP

4.5.1 การเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์

สารละลายเซ็นเซอร์ M201NHP จะเตรียมขึ้นที่เข้มข้น 5.0×10^{-5} M ในลักษณะเดียวกับการศึกษาความไว โดยใช้ ความเข้มข้นเริ่มต้นและความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากัน แต่การศึกษาความสามารถในการตรวจจับไอออนปรอทในภาวะที่มีไอออนรบกวนอื่นๆ จะเตรียมความเข้มข้นสุดท้ายในปริมาตร 50.00 มิลลิลิตร

4.5.2 การเตรียมสารละลายไอออนปรอทและไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ

จะเตรียมสารละลายไอออนปรอท และไอออนเกลือคลอไรด์ชนิดต่างๆ เพื่อใช้ทดสอบความสามารถในการตรวจจับไอออนปรอทในภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ เช่นเดียวกับการเตรียมเพื่อใช้ทดสอบความจำเพาะเจาะจง

4.5.3 การทดสอบ

นำสารละลายเซ็นเซอร์ที่เตรียมขึ้นไปวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้นเมื่อมีการเติมสารละลายไอออนปรอท และสารละลายไอออนเกลือคลอไรด์ชนิดต่างๆ ลงในสารละลายเซ็นเซอร์ โดยกำหนด ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการทดสอบตามตารางที่ 4 เช่นเดียวกับการทดสอบความไว จากนั้นสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า I_F/I_0 (normalized fluorescence intensity) ที่ความยาวคลื่นที่ความเข้มมากที่สุด (λ_{max}) ในแนวแกน y และ ชนิดของสารต่างๆ ในแนวแกน x เมื่อกำหนดให้

I_0 = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายก่อนเติมไอออน

I_F = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายหลังเติมไอออน

4.6 การทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนปรอทในสถานะที่ pH ต่างๆ (pH effect)

การทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนปรอทในสถานะที่ pH ต่างๆ ศึกษาด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ในขณะก่อนและหลังเติมไอออนปรอทในระบบสารละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES (5 mM, pH 7.2): acetonitrile (40:60 v/v) ที่ pH ต่างๆ

4.6.1 การเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์

สารละลายเซ็นเซอร์ M201NHP จะเตรียมขึ้นที่เข้มข้น 5.0×10^{-5} M ในลักษณะเดียวกับการศึกษาความไว โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นและความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากัน แต่เตรียมในระบบสารละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES (5 mM, pH 7.2): acetonitrile (40:60 v/v) ที่ pH ต่างๆ คือ pH 3-10 อย่างละ 10.00 มิลลิลิตร

4.6.2 การเตรียมสารละลายไอออนทองแดงและไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ

จะเตรียมสารละลายไอออนปรอท ด้วยวิธีเช่นเดียวกับการเตรียมเพื่อใช้ทดสอบความไว

4.6.3 การทดสอบ

นำสารละลายเซ็นเซอร์ในภาวะ pH ต่างๆ ที่เตรียมขึ้นปริมาตร 3.00 มิลลิลิตร ไปวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ก่อนและหลังเติมไอออนปรอทโดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการทดสอบตามตารางที่ 4 จากนั้นสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ 565 nm ในแนวแกน y และ pH ต่างๆ ของสารละลายเซ็นเซอร์ในแนวแกน x

4.7 การหาอัตราส่วนของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเซ็นเซอร์ M201NHP กับ ไอออนปรอท (Job's plot)

การหาอัตราส่วนของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเซ็นเซอร์ M201NHP กับไอออนปรอทด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปีด้วยวิธี Job's plot โดยเตรียมสารละลายผสมระหว่างเซ็นเซอร์ M201NHP กับไอออนปรอท โดยให้มีอัตราส่วนโดยโมลของเซ็นเซอร์ตั้งแต่ 0 ถึง 1 ในปริมาตรสารละลายทั้งหมด 3.00 มิลลิลิตร แล้วทำการวัดค่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ จากนั้นนำผลการทดลองมาพลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนโดยโมลของเซ็นเซอร์ (แกน x) และ $I_0 - I$ (แกน y) โดยกำหนดให้

I_0 = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายก่อนเติมไอออน

I = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายหลังเติมไอออน

เมื่อสร้างกราฟแล้วจะแสดงอัตราส่วนการเกิดแรงกระทำระหว่างเซ็นเซอร์กับไอออนโลหะ จากค่าการเปลี่ยนแปลงที่สูงที่สุดโดยในการทดลองนี้ใช้เซ็นเซอร์ M201NHP เข้มข้น 1.0×10^{-5} M และไอออนทองแดงเข้มข้น 1.0×10^{-3} M

4.8 การหาค่าประสิทธิภาพเชิงควอนตัมทางฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence quantum yield)

การหาค่าประสิทธิภาพเชิงควอนตัมทางฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ M201NHP เป็นการหาอัตราส่วนของจำนวนโฟตอนที่ถูกดูดกลืน โดยสารที่เกิดการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์มากจะมีค่าเข้าใกล้ 1 โดยคำนวณหาได้จากสมการที่ 5 [12]

$$\frac{Q_x}{Q_s} = \left(\frac{\text{Slope}_x}{\text{Slope}_s} \right) \left(\frac{\eta_x^2}{\eta_s^2} \right) \quad \text{สมการที่ 5}$$

เมื่อ Q_x = quantum yield ของสารตัวอย่าง

Q_s = quantum yield ของสารมาตรฐาน

Slope_x = ค่าความชันจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์กับการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

Slope_s = ค่าความชันจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์กับการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน

η_x = refractive index ของตัวทำละลายสารตัวอย่าง

η_s = refractive index ของตัวทำละลายสารมาตรฐาน

4.8.1 การเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์และสารละลายไอออนปรอท

สารละลายเซ็นเซอร์ M201NHP จะเตรียมขึ้นในลักษณะเดียวกับการศึกษาความไว โดยใช้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0×10^{-5} M ในขวดปริมาตร 10.00 มิลลิลิตรใน acetonitrile สำหรับสารละลายไอออนปรอทก็เตรียมในลักษณะเดียวกับการศึกษาความไวเช่นเดียวกัน โดยให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1.0×10^{-2} M

4.8.2 การเตรียมสารละลายอ้างอิง

เตรียมสารละลายมาตรฐาน 9,10-diphenylanthracene เป็นสารอ้างอิง [12] ใน acetonitrile เข้มข้น 1.00×10^{-4} M ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐานในการคำนวณค่า quantum yield ของเซ็นเซอร์ M201NHP

4.8.3 การทดสอบ

นำสารละลายเซ็นเซอร์ M201NHP ปริมาตร 3.00 มิลลิลิตร โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ตามตารางที่ 5 จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 373 nm และค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ 565 nm (λ_{ex} 373 nm) วัดซ้ำ 5 ครั้ง โดยแต่ละครั้งเจือจางสารละลายดังกล่าวครั้งละ 2/3 เท่า แล้วนำค่าการดูดกลืนและค่าการคายแสงที่ได้ สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในแนวแกน y กับค่าการดูดกลืนแสงในแนวแกน x จากนั้นทำการทดลองซ้ำโดยเปลี่ยนสารละลายเซ็นเซอร์เป็นสารละลายเซ็นเซอร์ที่เติมสารละลายไอออนปรอทแล้วคำนวณค่าประสิทธิภาพเชิงควอนตัมทางฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อ

η_x = refractive index ของ acetonitrile เท่ากับ 1.3441

η_s = refractive index ของ hexane เท่ากับ 1.4262

ตารางที่ 5 ตารางแสดงค่าพารามิเตอร์ที่ใช้ในการวัดฟลูออเรสเซนซ์เพื่อหาค่าประสิทธิภาพเชิงควอนตัมทางฟลูออเรสเซนซ์

พารามิเตอร์ที่ศึกษา	ค่าพารามิเตอร์ที่กำหนด
สภาวะที่ทำงาน	ใน acetonitrile
λ_{ex} (nm)	373
Scan speed (nm/min)	300
Slit width (nm)	5.0
ช่วงความยาวคลื่นที่ศึกษา (nm)	400-700
λ_{em} (nm)	565

4.9 การศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเซ็นเซอร์ M201NHP กับไอออนปรอท ด้วยวิธีการสร้างแบบจำลองโมเลกุลทางคอมพิวเตอร์ (computational molecular modeling)

การศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเซ็นเซอร์ M201NHP กับไอออนปรอท สามารถวิเคราะห์ได้จากโครงสร้างที่มีพลังงานต่ำสุดของเซ็นเซอร์ในสถานะก่อน และหลังจับไอออนปรอท ด้วยวิธีการสร้างแบบจำลองโมเลกุลทางคอมพิวเตอร์ ตามระเบียบวิธี Density Functional Theory (DFT) เบสิกเซต 6-311G** สำหรับธาตุกลุ่มหลัก และ Lan2DZ และรูปภาพจากโปรแกรม Visual Molecular Dynamics (VMD)

4.10 การศึกษาการนำกลับมาใช้ใหม่ (reversibility)

การศึกษาการนำกลับมาใช้ใหม่ของเซ็นเซอร์ M201NHP โดยการวัดสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ ในภาวะก่อนและหลังเติมสารละลายไอออนปรอทลงในเซ็นเซอร์แต่ละชนิดที่ถูกระบายขึ้น ปริมาตร 3.00 มิลลิลิตร จนสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ชัดเจนที่ความเข้มข้นหนึ่ง จากนั้น เติมสารละลายสารที่มีแรงกระทำกับไอออนปรอท และวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ภายหลังการเติมสารละลายสารที่มีแรงกระทำกับไอออนปรอทอีกครั้ง ซึ่งถ้าเซ็นเซอร์สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ จะสามารถเติมสารละลายไอออนปรอทและสารละลายสารที่มีแรงกระทำกับไอออนปรอทสลับกันหลายครั้ง

4.10.1 การเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์

สารละลายเซ็นเซอร์ M201NHP จะเตรียมขึ้นในลักษณะเดียวกับการศึกษาความไว โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นและความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากันคือ 5.0×10^{-5} M แต่การศึกษาการนำกลับมาใช้ใหม่จะเตรียมความเข้มข้นสุดท้ายในปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร

4.10.2 การเตรียมสารละลายไอออนปรอท

จะเตรียมสารละลายไอออนปรอทเพื่อใช้ทดสอบความสามารถในนำกลับมาใช้ใหม่ เช่นเดียวกับการเตรียมเพื่อใช้ทดสอบความไว ที่ความเข้มข้น 1.0×10^{-2} M ใน DI water ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร

4.10.3 การเตรียมสารละลายสารที่มีแรงกระทำกับไอออนปรอท

การศึกษาการนำกลับมาใช้ใหม่ของเซ็นเซอร์ M201NHP จะเตรียมสารละลายสารที่มีแรงกระทำกับไอออนปรอทเข้มข้น 1.00×10^{-2} M ใน DI water ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร โดยสารที่มีแรงกระทำกับไอออนปรอทที่เลือกนำมาใช้ คือ cysteine (Cys)

4.10.4 การทดสอบ

นำสารละลายเซ็นเซอร์ M201NHP ที่เตรียมขึ้นไปวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้นบันทึกสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เมื่อมีการเติมสารละลายไอออนปรอท และเมื่อเติมสารละลายสารที่มีแรงกระทำกับไอออนปรอทในภาวะที่มีไอออนปรอท ซึ่งจะทำให้ลักษณะเช่นนี้ ไปเรื่อยๆ จนกระทั่งไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อเติมไอออนปรอทและสารที่มีแรงกระทำกับไอออนปรอท โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ ต่างๆ ในการทดสอบตามตารางที่ 4 เช่นเดียวกับการทดสอบความไว

4.11 การทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนปรอทของเซ็นเซอร์ M201NHP ในตัวอย่างจริง

ในวิทยานิพนธ์นี้มีการนำสารเซ็นเซอร์ M201NHP ไปศึกษาในตัวอย่างจริง เป็นการศึกษาเบื้องต้นสำหรับการนำไปพัฒนาเป็นชุดเครื่องมือต่อไป ในที่นี่ได้ศึกษาในตัวอย่างจริง 3 ชนิดคือ การทดสอบกับน้ำตัวอย่าง ครีมเจล และเซลล์สิ่งมีชีวิต

4.11.1 ความสามารถในการตรวจวัดไอออนปรอทในครีมเจล

การทดสอบการตรวจวัดไอออนปรอทในครีมเจล โดยเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ M201NHP ละลายในครีมเจล และเตรียมไอออนปรอทเข้มข้น 1.0×10^{-2} M จากนั้น เติมไอออนปรอทที่ความเข้มข้น 0.01, 0.03, 0.04, 0.05, 0.07 และ 0.13 mM ลงไป และสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของครีมเจลในขณะที่ไม่เติมและมีไอออนปรอทที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แสงยูวี

4.11.2 ความสามารถในการตรวจวัดไอออนปรอทในน้ำตัวอย่าง

การทดสอบการตรวจวัดไอออนปรอทในน้ำตัวอย่างได้แก่ น้ำดื่ม (DW), น้ำแร่ (MW), น้ำประปา (TW) และน้ำจากอ่างเก็บน้ำ (PW) โดยเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ M201NHP เข้มข้น 5.0×10^{-5} M ในตัวทำละลายผสมระหว่างน้ำตัวอย่าง: acetonitrile อัตราส่วน 40:60 v/v และเตรียมไอออนปรอทเข้มข้น 1.0×10^{-3} M จากนั้น เติมไอออนปรอทที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 μ M ลงไป และสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายในขณะที่มีและไม่มีไอออนปรอทที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แสงยูวี

4.11.3 ความสามารถในการตรวจวัดไอออนปรอทในเซลล์ U251, HEK-293 และ HaCaT

การทดสอบกับเซลล์สิ่งมีชีวิต เป็นการศึกษาเบื้องต้นสำหรับการพัฒนาไปใช้กับร่างกายมนุษย์ โดยตัวอย่างที่นำมาใช้ ได้แก่ human glioblastoma astrocytoma (U251, ATCC), Human embryonic kidney 293 (HEK-293, ATCC) และ human immortalized keratinocyte (HaCaT, ATCC) โดยทำการศึกษาโดยบ่มเซลล์ในสภาวะที่ไม่มี และมีไอออนปรอทที่ความเข้มข้น 20 μM และบ่มเซลล์ด้วยสารละลายซีเอ็นเซอร์ M201NHP (10 μM) จากนั้นจึงนำไปทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence microscope)

5. การทดสอบการตรวจวัดไอออนปรอทของแผ่นเยื่ออิเล็กทรอนิกส์โพรสปีนที่ขึ้นรูปด้วยเทคนิคอิเล็กทรอนิกส์สปินนิ่ง (electrospinning)

ในวิทยานิพนธ์นี้ยังได้ให้ความสนใจต่อการพัฒนาสารฟลูออเรสเซนซ์ซีเอ็นเซอร์ให้ง่ายและสะดวกต่อการนำไปใช้งาน โดยนำสารฟลูออเรสเซนซ์ซีเอ็นเซอร์ชนิด RBH และ R6GH ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับไอออนปรอทที่เคยสังเคราะห์ขึ้นแล้วในกลุ่มวิจัย มาขึ้นรูปเป็นแผ่นเยื่อด้วยเทคนิคอิเล็กทรอนิกส์สปินนิ่ง โดยใช้พอลิเมอร์ polymethyl methacrylate (PMMA) เป็นเมทริกซ์พอลิเมอร์ โดยผู้วิจัยได้รับความอนุเคราะห์แผ่นเยื่ออิเล็กทรอนิกส์โพรสปีนที่ผสมซีเอ็นเซอร์แล้วจากกลุ่มวิจัยของ ผศ.ดร. สุธิณี เกิดเทพ ซึ่งได้นำมาทดลองดังต่อไปนี้

5.1. การวิเคราะห์ลักษณะพื้นฐานวิทยาของเส้นใย ขนาด และการกระจายตัวของ PMMA/RBH และ PMMA/R6GH nanofibre membranes ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning Electron Microscopy, SEM)

ตัวอย่างถูกตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด MIRA3 TESCAN และทำการบันทึกภาพที่กำลังขยาย 1,000 เท่า ในการศึกษาขนาดของเส้นใยนาโนได้ทำการวัดเส้นใยจากภาพถ่าย SEM เป็นจำนวน 100 เส้นต่อ 1 การทดลอง โดยใช้โปรแกรม Image J

5.2 การทดสอบความไว (sensitivity) ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี

ทำการตัดแผ่นเยื่อ PMMA/RBH และ PMMA/R6GH (sensor strips) ทั้งสองชนิดให้มีขนาด 1 cm×1cm จากนั้นนำแผ่นเยื่อที่ตัดไว้ไปแช่ในสารละลายปรอทอะซิเตด (pH 7.4) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 20 นาที แล้วนำไปวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้น โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการทดสอบตามตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ สำหรับการทดสอบความไว (sensitivity) ของแผ่นเยื่อ PMMA/RBH และ PMMA/R6GH (sensor strips)

เซ็นเซอร์	แผ่นเยื่อ PMMA/RBH และ PMMA/R6GH (sensor strips)
λ_{ex} (nm)	500
Scan speed (nm/min)	500
Ex slit width (nm)	5
Em slit width (nm)	10
ช่วงความยาวคลื่นที่ศึกษา (nm)	450-650

5.3. การหาค่าความสามารถต่ำสุดในการตรวจจับไอออนปรอทของแผ่นเยื่อ PMMA/RBH และ PMMA/R6GH (sensor strips)

จากการทดสอบความไวในการตรวจจับไอออนปรอทของแผ่นเยื่อ PMMA/RBH และ PMMA/R6GH (sensor strips) สามารถคำนวณค่าความสามารถต่ำสุดในการตรวจจับไอออนปรอท (detection limit) โดยการพลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของปรอทที่เติมลงไปกับความเข้มข้นต่างๆ (แกน x) กับค่าเฉลี่ย fluorescence intensity ($I - I_0$) ที่จุดใดๆ (แกน y) เพื่อหาความชันของกราฟ (slope) จากนั้นนำมาคำนวณตามสมการที่ 1

$$\text{Detection limit} = \frac{3SD_{\text{blank}}}{\text{slope}} \quad \text{สมการที่ 1}$$

โดยที่ SD_{blank} คือ ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ของ blank
slope คือ ค่าความชันของกราฟ

5.4 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงในการตรวจจับไอออนปรอท และไอออนรบกวนอื่นๆ ของแผ่นเยื่อ PMMA/RBH และ PMMA/R6GH (sensor strips)

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของแผ่นเยื่อ PMMA/RBH และ PMMA/R6GH (sensor strips) ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปีนั้น จะทำการศึกษาสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของแผ่นเยื่อที่เปลี่ยนแปลงไปทั้งก่อนและหลังจากแช่ในสารละลายไอออนปรอทและไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำเมมเบรนมาวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้น (I_F) โดยไอออนที่ใช้ในการทดสอบเป็นเกลืออะซิเตตประกอบด้วย ไอออนปรอท (Hg^{2+}) ไอออนทองแดง (Cu^{2+}) ไอออนแมกนีเซียม (Mg^{2+}) ไอออนเงิน (Ag^+) ไอออนตะกั่ว (Pb^{2+}) ไอออนเฟอร์ริก (Fe^{3+}) ไอออนเฟอร์รัส

(Fe²⁺) ไอออนแคลเซียม (Ca²⁺) ไอออนสังกะสี (Zn²⁺) และไอออนโซเดียม (Na⁺) โดยเจือจางสารละลายไอออนต่างๆ ด้วยวิธี serial dilution โดยให้ความเข้มข้นลดลงครั้งละ 10 เท่า

5.5 การทดสอบความสามารถในการตรวจจับไอออนปรอทในภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ (competitive)

การทดสอบความสามารถในการตรวจจับไอออนปรอท ในภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโกปี โดยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ของแผ่นเยื่อ PMMA/RBH และ PMMA/R6GH (sensor strips) ในขณะก่อนและหลังแช่ในสารละลายที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ที่มีความเข้มข้น 10 เท่าของความเข้มข้นสารละลายไอออนปรอทที่เติมลงไป และวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนส์

5.6 การศึกษาการนำกลับมาใช้ใหม่ (reusability)

การศึกษาการนำกลับมาใช้ใหม่ของแผ่นเยื่อ PMMA/RBH และ PMMA/R6GH (sensor strips) โดยการวัดสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนส์ของเซ็นเซอร์ ในภาวะก่อนและหลังแช่ในสารละลายไอออนปรอทเป็นเวลา 15 นาที แล้ววัดสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ จากนั้นนำแผ่นเยื่อเดิมมาแช่ในสารละลาย ethylenediamine (EDA) และวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนส์อีกครั้ง ซึ่งถ้าแผ่นเยื่อสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ จะสามารถนำแผ่นเยื่อมาแช่ในสารละลายไอออนปรอทและสารละลาย EDA สลับกันหลายครั้ง



บทที่ 5 ผลการดำเนินงานวิจัย

จากการสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ทั้ง 2 ชนิด คือ **Cy7C4** และ **M201NHP** โดยมีการนำเซ็นเซอร์ที่สังเคราะห์ได้มาศึกษา และยืนยันโครงสร้างของเซ็นเซอร์ด้วยเทคนิค nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) และ high resolution mass spectroscopy (HR-ESI MS) จากนั้นจึงนำเซ็นเซอร์ ทั้ง 2 ชนิดที่ได้นี้ มาทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจจับไอออนโลหะที่แตกต่างกัน กล่าวคือเซ็นเซอร์ **Cy7C4** จะนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการดักจับไอออนทองแดงในสารละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES buffer) เข้มข้น 5 mM pH 7.2 และ acetonitrile ในอัตราส่วน 50:50 v/v สำหรับเซ็นเซอร์ **M201NHP** จะนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการดักจับไอออนปรอทในสารละลายผสมระหว่างน้ำปราศจากไอออน (deionize water) และ acetonitrile ในอัตราส่วน 40:60 v/v นอกจากนี้มีการศึกษาตรวจวัดไอออนปรอทด้วยแผ่นเยื่อที่ขึ้นรูปเส้นใยโดยเทคนิคอิเล็กโทรสปินนิง (electrospinning) จากการผสมสารเซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดไอออนปรอท แล้วนำแผ่นเยื่อไปทดสอบประสิทธิภาพในการดักจับไอออนปรอท พบว่าได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

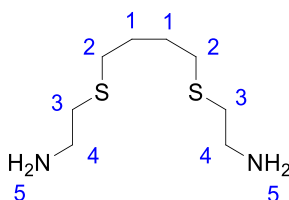
1. การยืนยันโครงสร้าง

จากการสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ทั้งสองชนิดตามวิธีการทดลองนั้นที่ได้รายงานในบทที่ 4 พบว่าได้สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์สำหรับไอออนทองแดงชนิดใหม่ที่มีการคายแสงฟลูออเรสเซนต์อยู่ในช่วงใกล้อินฟราเรดหนึ่งชนิด และสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์สำหรับไอออนปรอทชนิดใหม่ที่มีการคายแสงฟลูออเรสเซนต์อยู่ในช่วงวิสิเบิลอีกหนึ่งชนิด ซึ่งสามารถวิเคราะห์และยืนยันโครงสร้างของสารทั้งสองชนิดได้ด้วยวิธีทางสเปกโทรสโกปี

1.1 สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ **Cy7C4**

จากการสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ตามวิธีการทดลองที่กล่าวมาก่อนหน้านั้น พบว่าขั้นตอนการสังเคราะห์สารเซ็นเซอร์ **Cy7C4** นั้นจะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ สังเคราะห์ส่วนของไอโอโนฟอร์ และส่วนของฟลูออโรฟอร์ขึ้นมาก่อน จากนั้นจึงนำทั้ง 2 ส่วนมาเชื่อมเข้าด้วยกันโดยการทำปฏิกิริยาการแทนที่แบบนิวคลีโอฟิลิก (nucleophilic substitution) ระหว่างหมู่คลอไรด์ของฟลูออโรฟอร์ **F-2** เพื่อสร้างหมู่เอมีนกับสารประกอบไอโอโนฟอร์ **I-1** ในไดเมทิลฟอร์มามาไมด์ (dimethylformamide, DMF) ซึ่งสามารถวิเคราะห์และยืนยันโครงสร้างของสารที่สังเคราะห์ได้แต่ละชนิดด้วยวิธีทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่ nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) และ high resolution mass spectroscopy (HR-ESI MS) โดยมีผลการทดลองดังนี้

1.1.1 โครงสร้างทางเคมีของ 2-[4-(2-aminoethylsulfanyl)butylsulfanyl]ethanamine (I-1)

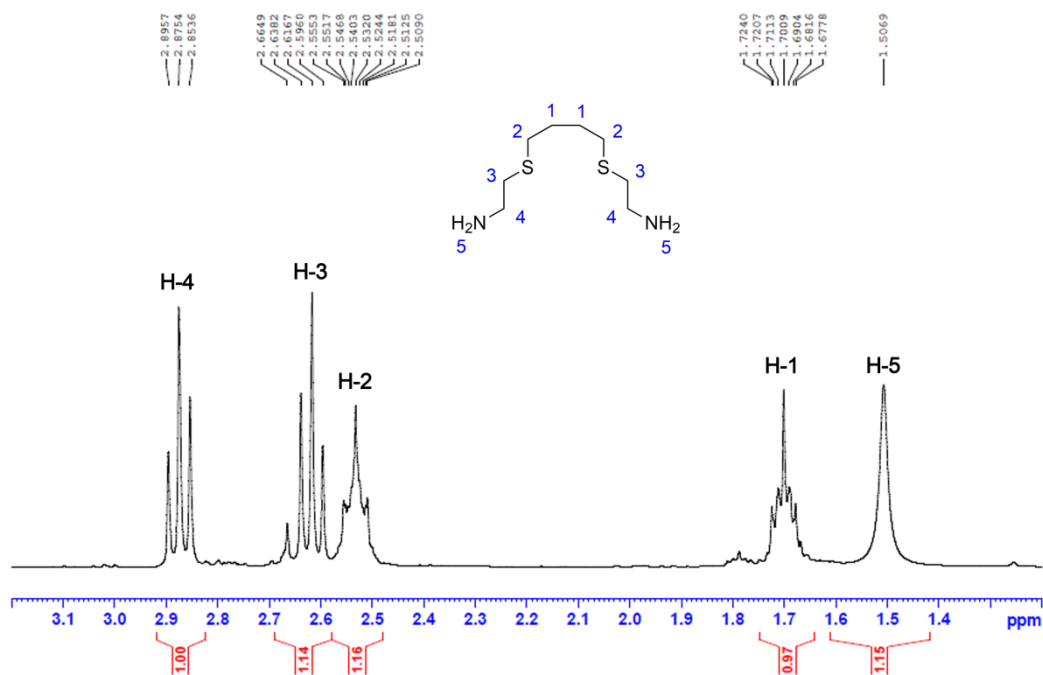


ภาพที่ 33 โครงสร้างทางเคมีของ 2-[4-(2-aminoethylsulfanyl)butylsulfanyl]ethanamine (I-1)

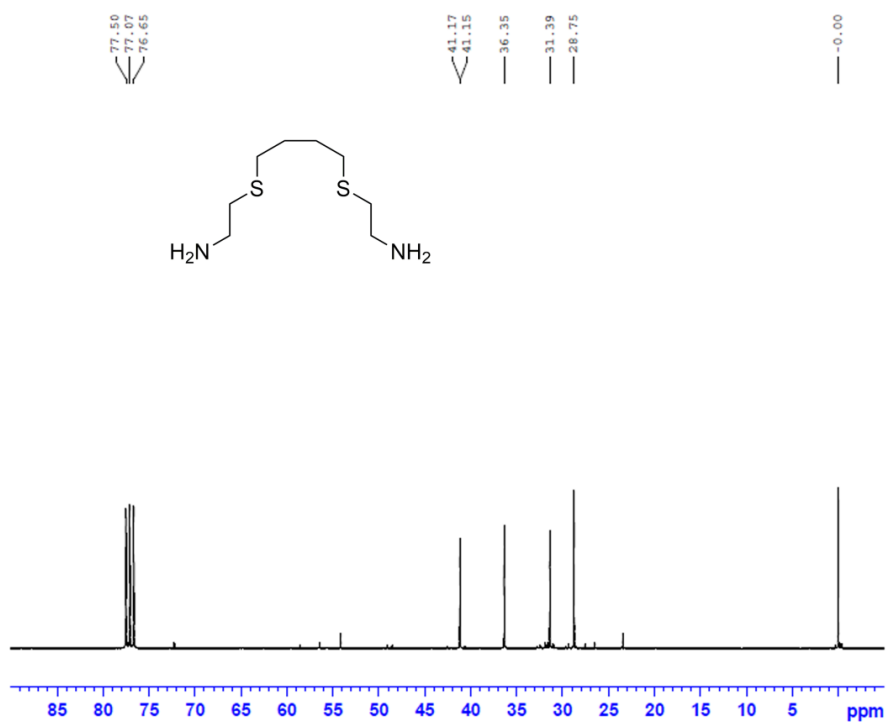
จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของ 2-[4-(2-aminoethylsulfanyl)butylsulfanyl]ethanamine (I-1) ดังภาพที่ 33 โดยวิธีการทางสเปกโทรสโกปีสามารถยืนยันโครงสร้างได้ดังนี้

การวิเคราะห์โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (^1H NMR, 300 MHz, CDCl_3): δ 1.51 (br s, 2NH_2), 1.68-1.72 (m, 4H), 2.54 (t, $J = 6.0$ Hz, 4H), 2.62 (t, $J = 6.33$ Hz, 4H), 2.88 (t, $J = 6.32$ Hz, 4H) ppm (ภาพที่ 34)

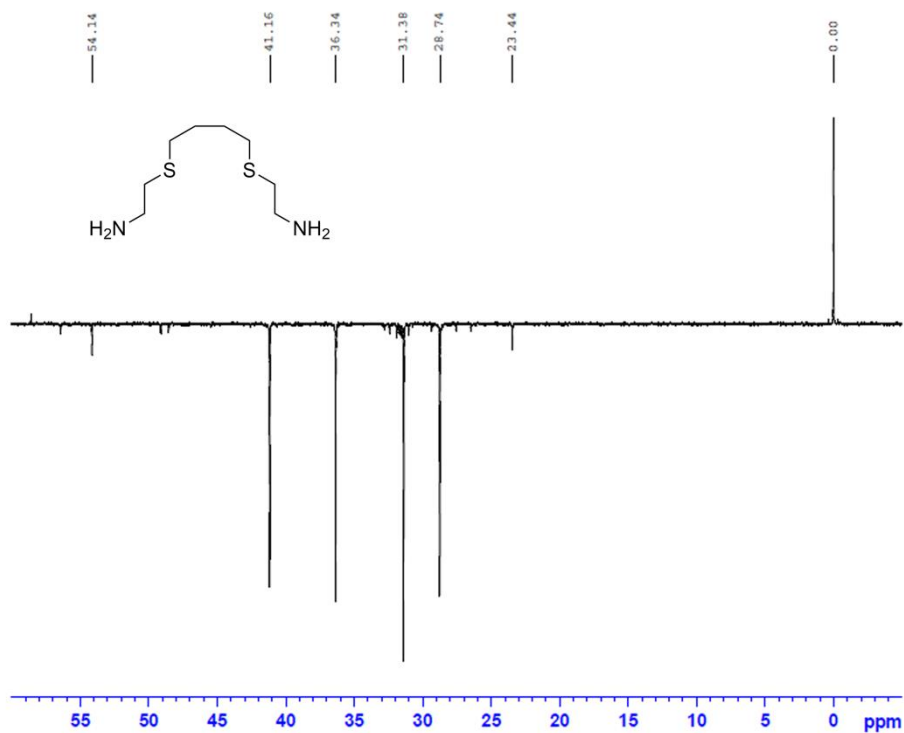
การวิเคราะห์คาร์บอนเอ็นเอ็มอาร์ (^{13}C NMR, 75 MHz, CDCl_3): δ 28.8 (2CH_2), 31.4 (2CH_2), 36.4 (2CH_2), 41.16 (2CH_2) ppm (ภาพที่ 36); HR-ESI MS จากการคำนวณ $\text{C}_8\text{H}_{21}\text{N}_2\text{S}_2$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 209.1146 m/z จากการทดสอบ 209.1073 m/z (ภาพที่ 37)



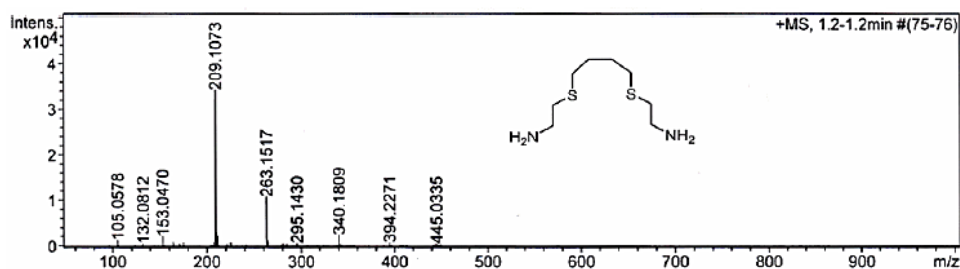
ภาพที่ 34 ^1H NMR ของ 2-[4-(2-aminoethylsulfanyl)butylsulfanyl]ethanamine (I-1)



ภาพที่ 35 ^{13}C NMR ของ 2-[4-(2-aminoethylsulfanyl)butylsulfanyl]ethanamine (I-1)

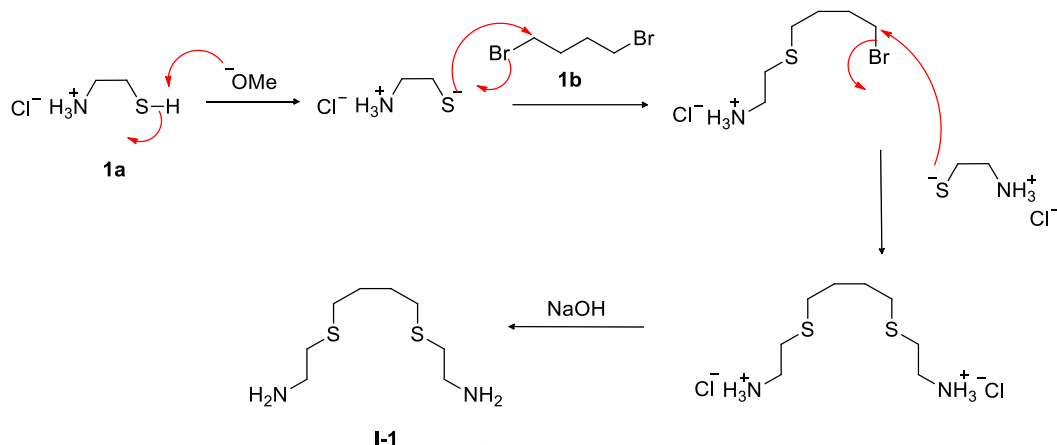


ภาพที่ 36 ^{13}C DEPT135 NMR สเปกตรัมของ 2-[4-(2-aminoethylsulfanyl)butylsulfanyl]ethanamine (I-1)



ภาพที่ 37 HR-ESI MS ของ 2-[4-(2-aminoethylsulfanyl)butylsulfanyl]ethanamine (I-1)

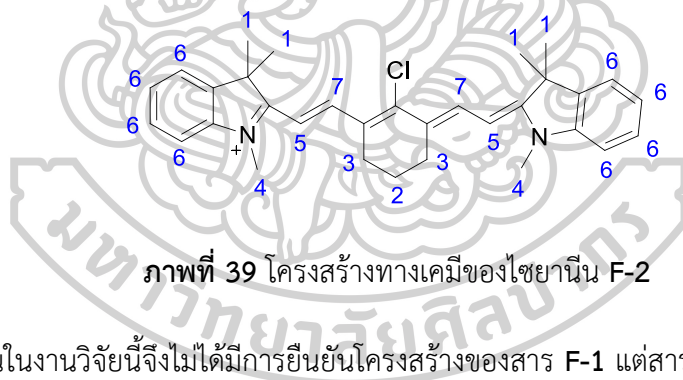
เมื่อพิจารณาโครงสร้างทางเคมีสารประกอบ I-1 (ภาพที่ 33) และ ^1H NMR สเปกตรัม (ภาพที่ 34) แสดงสัญญาณโปรตอนทั้งหมด 5 กลุ่ม ประกอบด้วย สัญญาณที่มีลักษณะเป็น siglet ที่ตำแหน่ง δ 1.51 ppm เกิดจากโปรตอนของกลุ่มเอมีน ($-\text{NH}_2$) ถัดมาคือ สัญญาณที่มีลักษณะเป็น multiplet ที่ตำแหน่ง δ 1.68-1.72 ppm เกิดจากเอธิลีนโปรตอนตำแหน่งที่ 1 (H1) เนื่องจากเอธิลีนโปรตอนกลุ่มนี้อยู่ห่างจากอะตอมที่มีความสามารถในการดึงอิเล็กตรอน (S และ N โดยที่ EN ของ N มีค่ามากกว่า EN ของ S) มากที่สุด ส่งผลให้ปรากฏสัญญาณบริเวณที่มีสนามแม่เหล็กสูง (up field) ถัดมาเป็นสัญญาณที่มีลักษณะเป็น triplet ที่ตำแหน่ง δ 2.54 ppm มีค่า coupling constant (J) เท่ากับ 6.00 Hz คือเอธิลีนโปรตอนตำแหน่งที่ 2 (H2) มีตำแหน่งที่อยู่ใกล้อะตอมของซัลเฟอร์ (S) มากกว่า จึงปรากฏสัญญาณบริเวณที่มีสนามแม่เหล็กต่ำกว่า และสัญญาณที่มีลักษณะเป็น triplet ปรากฏที่ตำแหน่ง δ 2.62 ppm และ 2.88 ppm มีค่า ppm มีค่า coupling constant (J) ใกล้เคียงกันคือโปรตอน 6.33 และ 6.32 Hz ตามลำดับ แสดงว่าเป็นโปรตอนที่ตำแหน่งที่ 3 (H3) และ 4 (H4) เกิดการ coupling กัน เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างพบว่าโปรตอนที่ตำแหน่งที่ 4 (H4) อยู่ใกล้อะตอมไนโตรเจน (N) มากกว่า เป็นโปรตอนที่ได้รับอิทธิพลของแรงดึงอิเล็กตรอนมากกว่า จึงแสดงสัญญาณบริเวณที่มีสนามแม่เหล็กต่ำกว่า (down field) นอกจากนี้ยังยืนยันโครงสร้างสารจาก HR-ESI MS (ภาพที่ 37) ได้ผลการทดสอบเท่ากับ 209.1073 m/z มีค่าใกล้เคียงกับที่ได้จากการคำนวณ $\text{C}_8\text{H}_{21}\text{N}_2\text{S}_2^+$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ โดยมีค่าเท่ากับ 209.1146 m/z จึงยืนยันได้ว่าได้สาร I-1 เกิดขึ้นจริงจากการสังเคราะห์ ซึ่งสามารถเสนอกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังภาพที่ 38



ภาพที่ 38 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของ 2-[4-(2-aminoethylsulfanyl)butylsulfanyl]ethanamine (I-1)

1.1.2 การยืนยันโครงสร้างทางเคมีของไซยานิน (cyanine dye, F-2)

การสังเคราะห์สารฟลูออโรฟอร์ชนิดไซยานิน F-2 นั้น ประกอบด้วยวิธีการสังเคราะห์ที่อยู่ทั้งหมดสองขั้นตอน แต่ในขณะที่สังเคราะห์ขั้นตอนแรกได้สาร F-1 นั้น พบว่ามีความเสถียรในอากาศน้อยมาก เมื่อนำไปยืนยันโครงสร้างของสาร F-1 ด้วยเทคนิค NMR ก็พบว่าสาร F-1 นั้นได้สลายตัวไปแล้วในเวลาอันรวดเร็ว



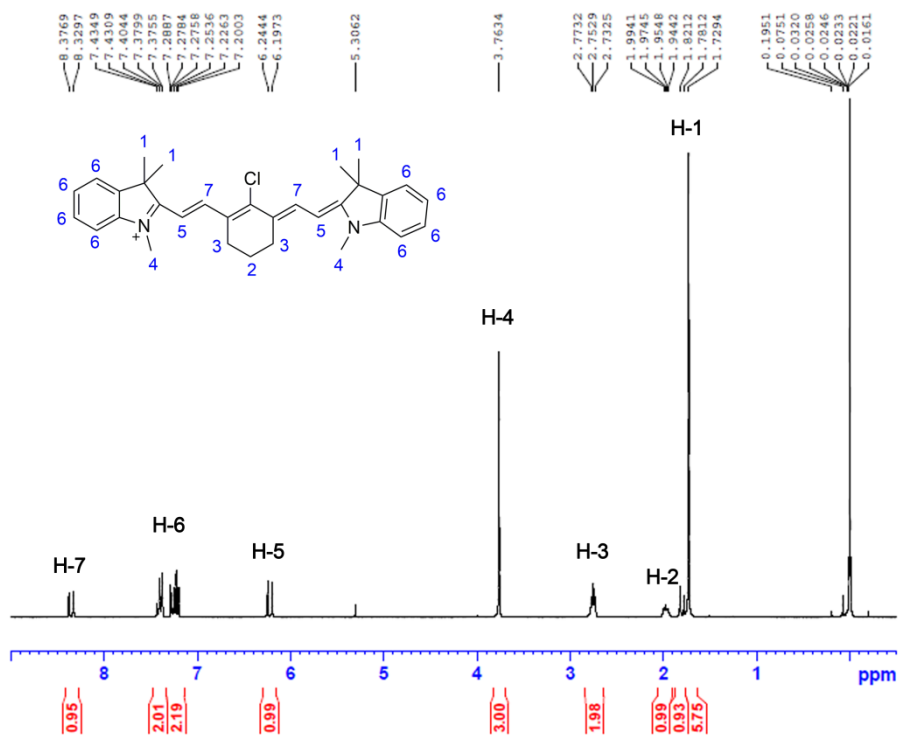
ภาพที่ 39 โครงสร้างทางเคมีของไซยานิน F-2

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงไม่ได้มีการยืนยันโครงสร้างของสาร F-1 แต่สารที่ได้จะมีลักษณะเป็นผงสีเหลือง และทำไปทำปฏิกิริยาขั้นต่อไปทันที พบว่าเกิดสารไซยานิน F-2 ที่มีโครงสร้างดังภาพที่ 39 จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสาร F-2 โดยวิธีการทางสเปกโทรสโกปีสามารถยืนยันโครงสร้างได้ดังนี้

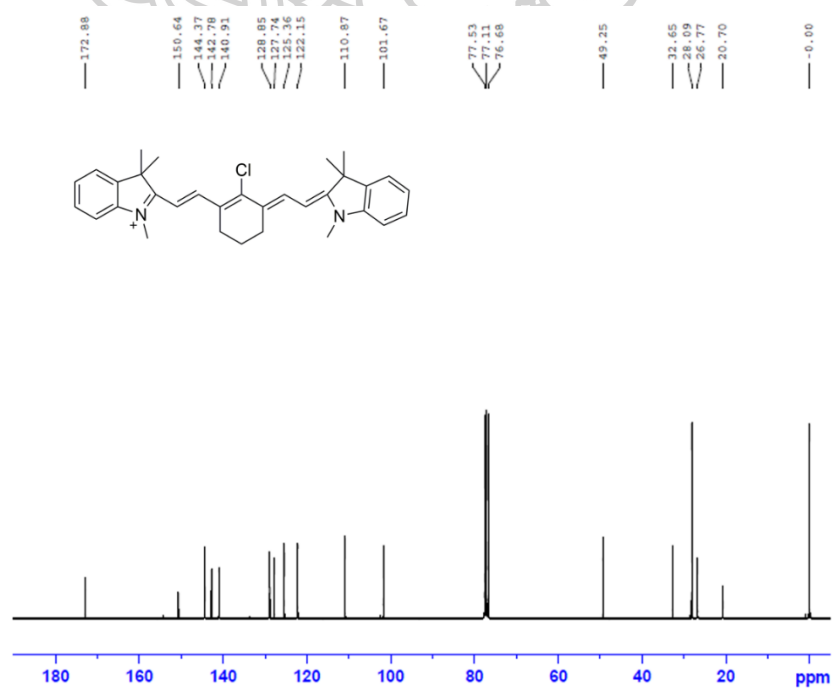
การวิเคราะห์โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (¹H NMR, 300 MHz, CDCl₃): δ 1.73 (s, 12H), 1.90-2.00 (m, 2H), 2.75 (t, *J* = 6.1 Hz, 4H), 3.76 (s, 6H), 6.22 (d, *J* = 14.1 Hz, 2H), 7.20-7.43 (m, 8H), 8.36 (d, *J* = 14.2 Hz, 2H) ppm (ภาพที่ 40)

การวิเคราะห์คาร์บอนเอ็นเอ็มอาร์ (¹³C NMR, 75 MHz, CDCl₃): δ 20.7 (CH₂), 26.8 (2CH₂), 28.1 (4CH₃), 32.6 (2CH₃), 49.2 (2C), 101.7 (2CH), 110.9 (2CH), 122.2 (2CH), 125.4 (2CH), 127.7 (C), 128.8 (2CH), 140.9 (2C), 142.8 (2C), 144.4 (2CH), 150.6 (2C), 172.9 (2C)

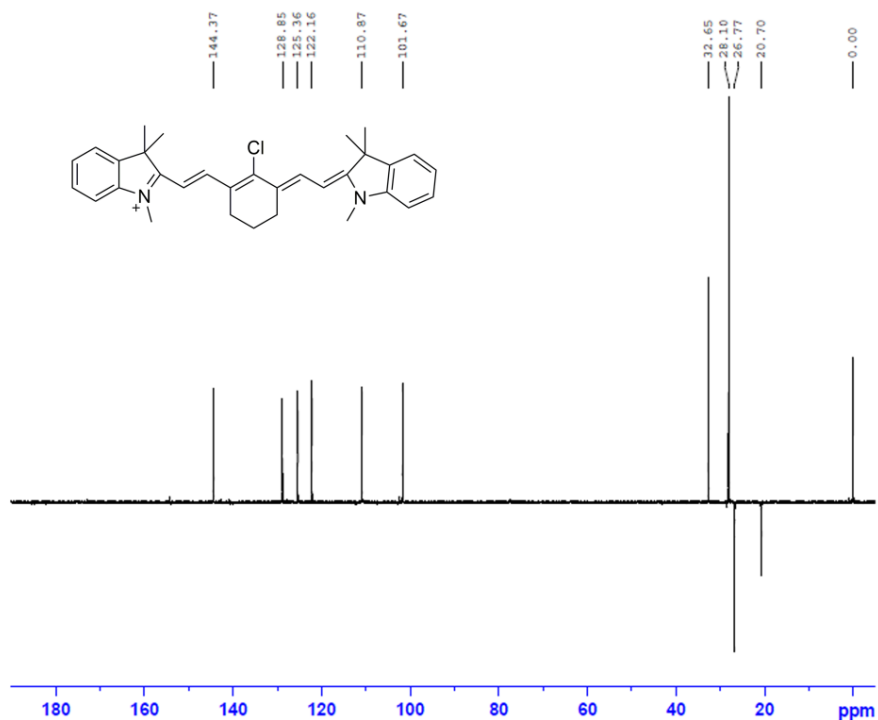
ppm (ภาพที่ 41); HR-ESI MS จากการคำนวณ $C_{32}H_{36}ClN_2^+$ (M) 483.2562 m/z จากการตรวจสอบ 483.2562 m/z (ภาพที่ 43)



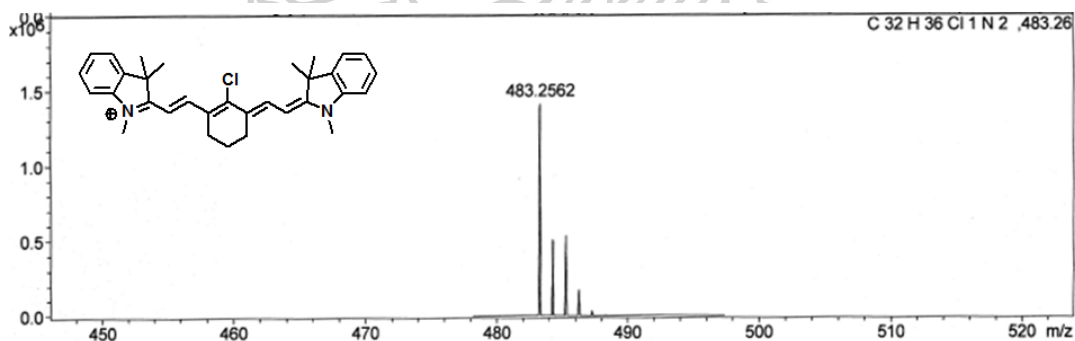
ภาพที่ 40 1H NMR สเปกตรัมของไซยานิน F-2



ภาพที่ 41 ^{13}C NMR สเปกตรัมของไซยานิน F-2



ภาพที่ 42 ^{13}C DEPT135 NMR สเปกตรัมของไซยานิน F-2

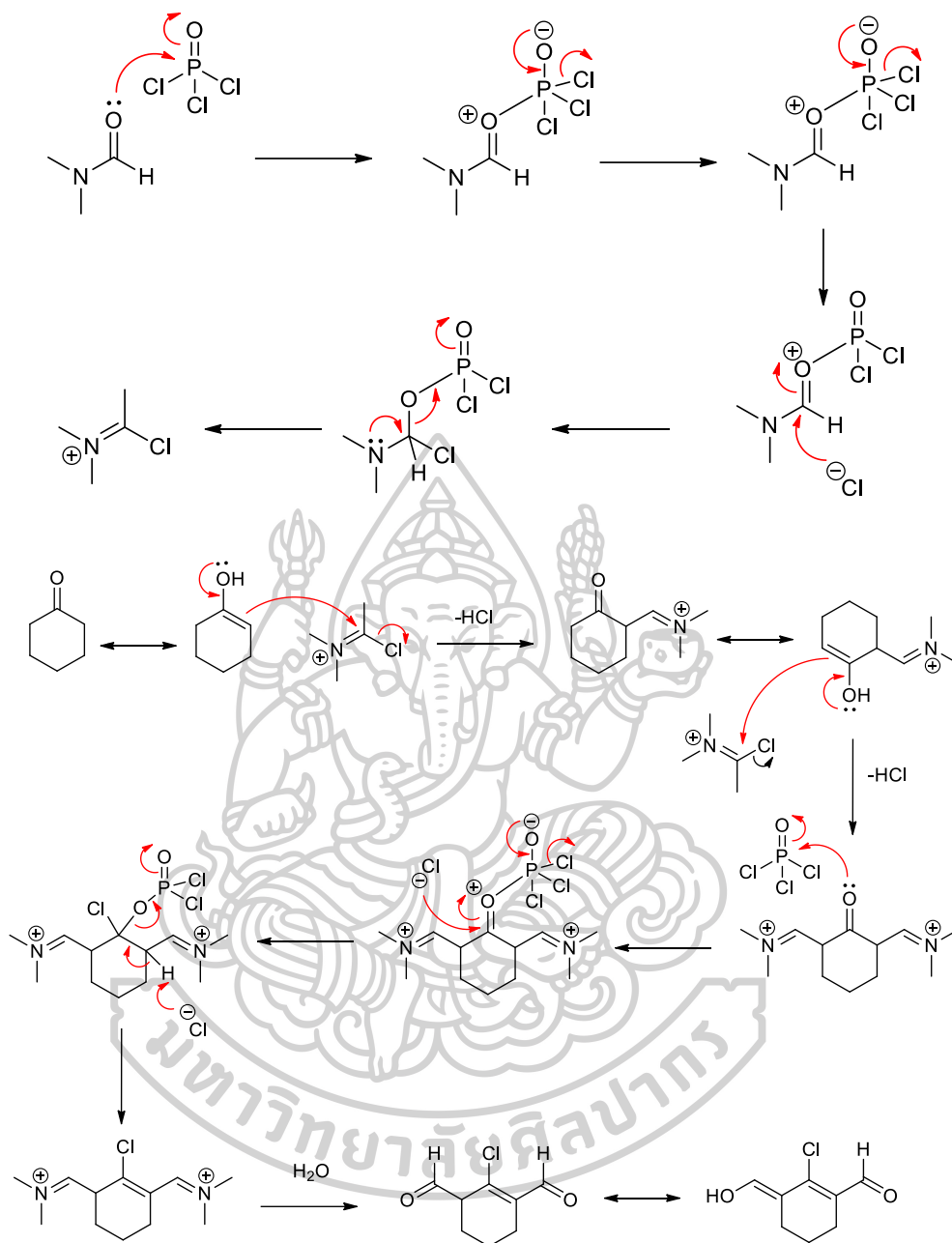


ภาพที่ 43 HR-ESI MS สเปกตรัมของไซยานิน F-2

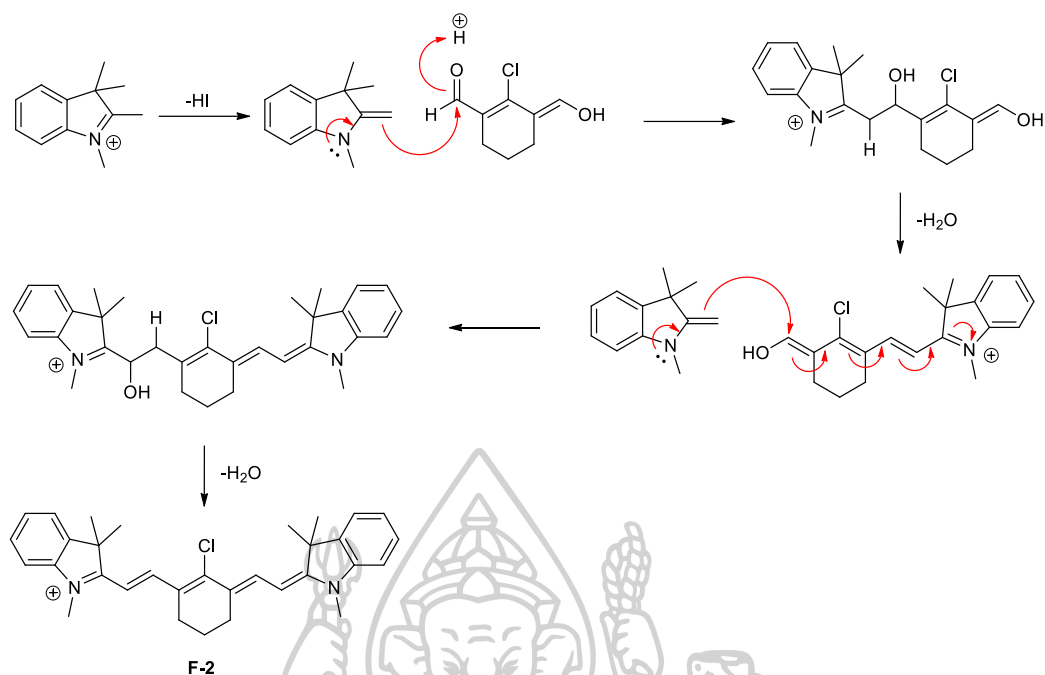
เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างสารไซยานิน F-2 (ภาพที่ 39) และ ^1H NMR สเปกตรัม (ภาพที่ 40) แสดงให้เห็นสัญญาณของโปรตอน 7 กลุ่ม ที่แตกต่างกัน โดยสัญญาณตำแหน่งแรกปรากฏบริเวณ chemical shift (δ) ต่ำสุดคือ 1.73 ppm มีลักษณะเป็น singlet เมื่ออินทิเกรตได้ค่าเท่ากับ 12 โปรตอน นั้นแสดงว่าเกิดจากโปรตอนตำแหน่ง 1 (H-1) เนื่องจากห่างไกลจากอิทธิพลของแรงดึงอิเล็กตรอนมากที่สุด สัญญาณถัดมาปรากฏที่ δ 1.90-2.00 ppm มีลักษณะเป็น multiplet เกิดจากโปรตอนตำแหน่ง 2 (H-2) ที่มีการเกิด coupling กับโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 (H-3)

สัญญาณที่สามมีลักษณะเป็น triplet ที่ δ 2.75 ppm มีค่า J เท่ากับ 6.1 Hz เกิดจากการ coupling กับโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 (H-2) สัญญาณถัดมามีค่า δ ปรากฏที่ 3.76 ppm เป็น singlet มีลักษณะเกิดจากโปรตอนตำแหน่งที่ 4 (H-4) สัญญาณถัดมาปรากฏที่ δ 6.22 ppm มีลักษณะเป็น doublet มีค่า J เท่ากับ 14.1 Hz เกิดจากโปรตอนตำแหน่ง 5 (H-5) coupling กับโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่งที่ 7 (H-7) ส่วน δ ปรากฏในช่วง 7.20-7.43 ppm เกิดจากโปรตอนตำแหน่ง 6 (H-6) ซึ่งเป็นโปรตอนของกลุ่ม aromatic ring จึงเห็นการ split ของสัญญาณในลักษณะเป็น multiplet ส่วนโปรตอนตำแหน่ง 7 (H-7) มีค่า δ ปรากฏที่ 8.36 ppm ซึ่งพบลักษณะสัญญาณเป็น doublet มีค่า J เท่ากับ 14.2 Hz โดยเกิดจากการ coupling กับโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 (H-5) และเพื่อความแน่นอนมากยิ่งขึ้น สามารถยืนยันผลจากการตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลร่วมด้วย โดยพิจารณาจาก HR-ESI MS (ภาพที่ 43) ในสูตรโมเลกุลเป็น $C_{32}H_{36}ClN_2^+$ (M) ได้เท่ากับ 483.2562 m/z ซึ่งมีค่าเท่ากับที่ได้จากการคำนวณมากโดยมีค่าเท่ากับ 483.2562 m/z จึงยืนยันได้ว่าได้สาร F-2 เกิดขึ้นจริงจากการสังเคราะห์ ซึ่งสามารถเสนอกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังภาพที่ 44-45



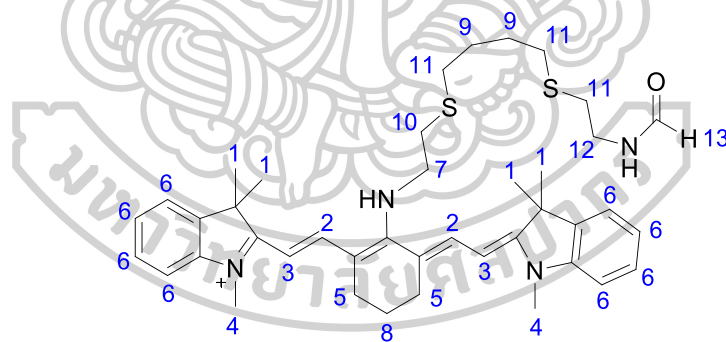


ภาพที่ 44 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของสารประกอบ F-1



ภาพที่ 45 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของสารฟลูออโรฟอร์ชนิดไซยานีน (cyanine dye, F-2)

1.1.3 การยืนยันโครงสร้างทางเคมีของเซ็นเซอร์ Cy7C4



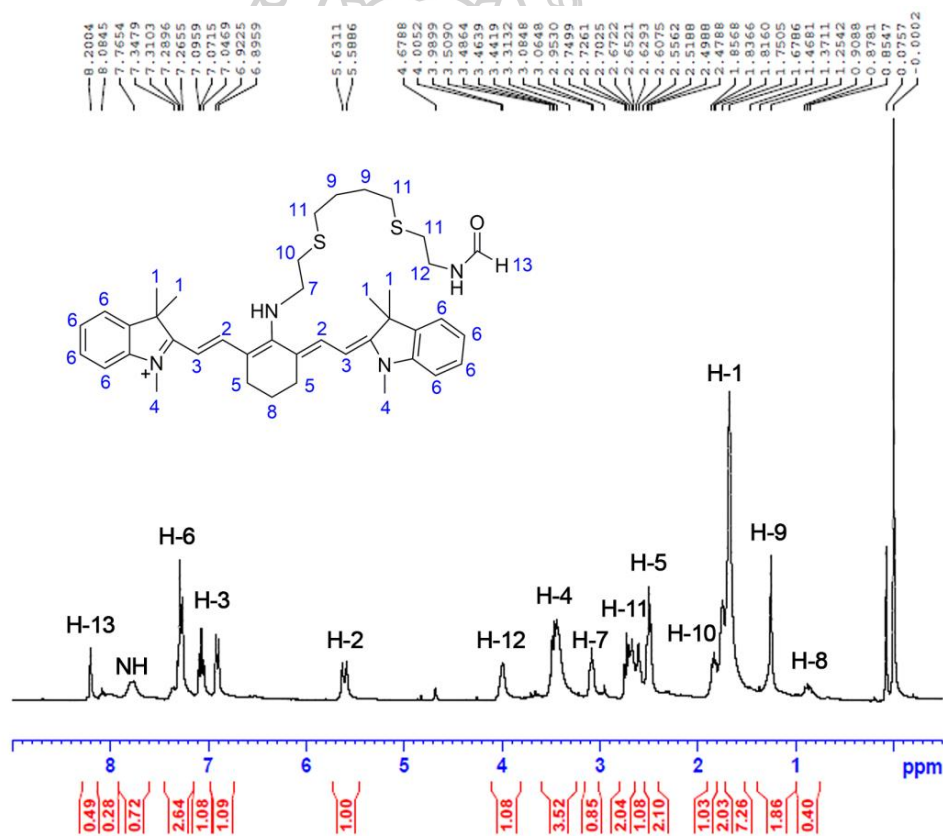
ภาพที่ 46 โครงสร้างทางเคมีของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ Cy7C4

เมื่อสังเคราะห์สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ Cy7C4 ที่มีโครงสร้างดังภาพที่ 46 ได้แล้ว จึงยืนยันโครงสร้างโดยวิธีการทางสเปกโทรสโกปีได้ดังนี้

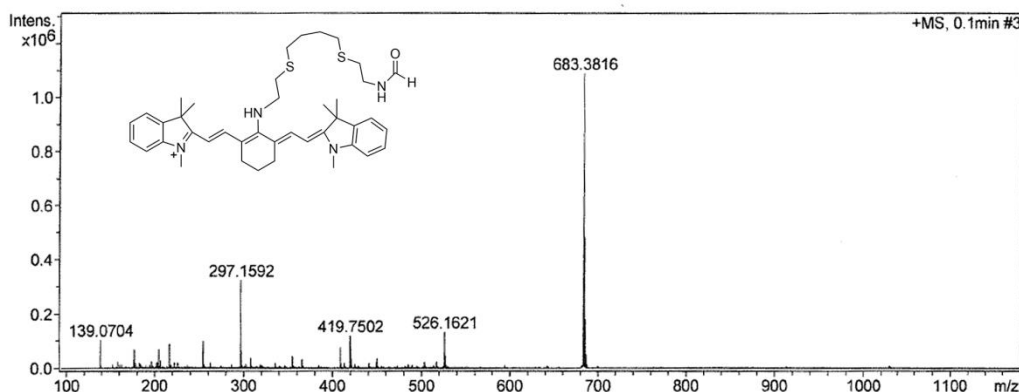
การวิเคราะห์โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (^1H NMR, 300 MHz, CDCl_3): δ 0.80-0.95 (m, 2H), 1.25 (s, 4H), 1.67 (s, 12H), 1.75-2.00 (m, 2H), 2.52 (t, $J = 8.55$ Hz, 4H), 2.55-2.80 (m, 6H), 3.09 (t, $J = 6.00$ Hz, 2H), 3.30-3.60 (m, 6H), 4.00 (d, $J = 4.5$ Hz, 2H), 5.61 (d, $J = 12.6$

Hz, 2H) , 6.91 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H) , 7.00-7.40 (m, 8H) , 7.76 (br s, 2NH) , 8.20 (s, 1H) ppm (ภาพที่ 47)

การวิเคราะห์คาร์บอนเอ็นเอ็มอาร์ (^{13}C NMR, 75 MHz, CDCl_3): δ 21.49 (CH_2), 25.17 (CH_2), 28.65 (CH_2), 28.80 (CH_2), 29.34 (CH_3), 29.67 (CH_2), 31.15 (CH_2), 31.23 (CH_2), 31.69 (CH_3), 31.90 (CH_3), 32.25 (CH_2), 33.56 (CH_3), 37.67 (CH_2), 41.54 (CH_2), 41.79 (CH_3), 48.55 (CH_2), 63.03 (CH_3), 94.62 (CH), 108.42 (CH), 120.64 (2C), 122.04 (2CH), 122.90 (2CH), 128.18 (CH), 129.71 (CH), 138.55 (2CH), 139.90 (2C), 143.55 (C), 161.79 (2CH), 164.50 (2C), 165.42 (2C), 168.30 (2C), 169.13 (C), ppm (ภาพที่ 48); HRMS (ESI) จากการคำนวณ $\text{C}_{41}\text{H}_{55}\text{N}_4\text{OS}_2^+$ (M) 683.3812 m/z , จากการทดสอบ 683.3816 m/z (ภาพที่ 50)



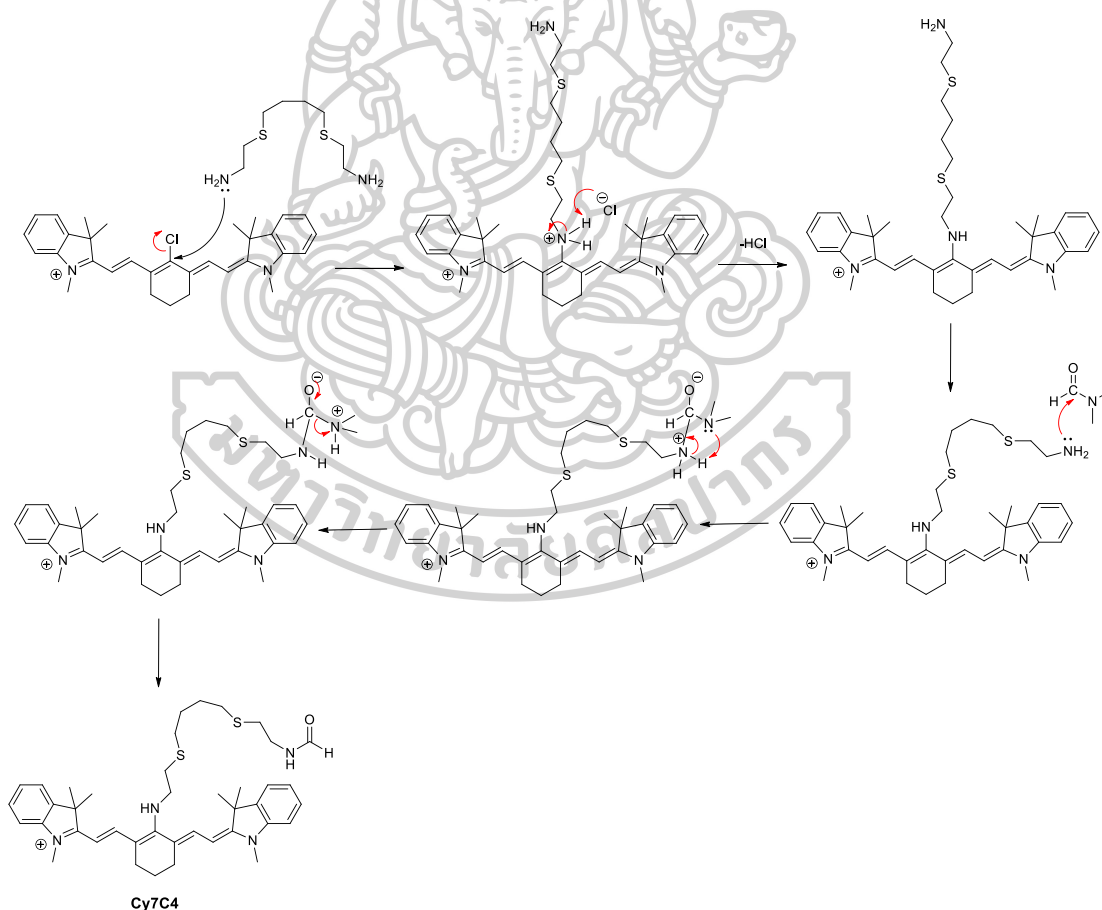
ภาพที่ 47 ^1H NMR สเปกตรัมของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ Cy7C4



ภาพที่ 50 HR-ESI MS สเปกตรัมของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ Cy7C4

เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างสารเซ็นเซอร์ Cy7C4 (ภาพที่ 46) และ ^1H NMR สเปกตรัม (ภาพที่ 47) แสดงให้เห็นสัญญาณของโปรตอน 13 กลุ่ม ที่แตกต่างกัน โดยสัญญาณตำแหน่งแรกปรากฏบริเวณ chemical shift (δ) ต่ำสุดอยู่ในช่วง 0.80-0.95 ppm มีลักษณะเป็น multiplet เกิดจากโปรตอนตำแหน่ง 8 (H-8) ที่มีการ coupling กับโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 (H-5) เมื่ออินทิเกรตได้ค่าเท่ากับ 2 โปรตอน สัญญาณถัดมาปรากฏที่ δ 1.25 ppm มีลักษณะเป็น singlet multiplet เกิดจากโปรตอนตำแหน่ง 9 (H-9) เมื่ออินทิเกรตได้ค่าเท่ากับ 4 โปรตอน สัญญาณที่สามคือ 1.67 ppm มีลักษณะเป็น singlet เมื่ออินทิเกรตได้ค่าเท่ากับ 12 โปรตอน นั้นแสดงว่าเกิดจากโปรตอนตำแหน่ง 1 (H-1) เนื่องจากไม่มีโปรตอนข้างเคียง สัญญาณถัดมามีลักษณะเป็น multiplet อยู่ในช่วง δ 1.75-2.00 ppm เป็นสัญญาณโปรตอนตำแหน่งที่ 10 (H-10) เมื่ออินทิเกรตได้ค่าเท่ากับ 2 โปรตอน เกิดจากการ coupling กับโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่งที่ 7 (H-7) สัญญาณถัดมามีค่า δ ปรากฏที่ 2.52 ppm เป็นสัญญาณโปรตอนตำแหน่งที่ 5 (H-5) เมื่ออินทิเกรตได้ค่าเท่ากับ 4 โปรตอน มีลักษณะเป็น triplet มีค่า J เท่ากับ 8.55 Hz เกิดจากการ coupling กับโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่งที่ 8 (H-8) สัญญาณถัดมามีค่า δ ปรากฏในช่วงที่ 2.55-2.80 ppm มีลักษณะ multiplet เกิดจากโปรตอนตำแหน่งที่ 11 (H-11) เมื่ออินทิเกรตได้ค่าเท่ากับ 6 โปรตอน สัญญาณถัดมามีค่า δ ปรากฏที่ 3.09 ppm มีลักษณะเป็น triplet มีค่า J เท่ากับ 6.00 Hz เมื่ออินทิเกรตได้ค่าเท่ากับ 2 โปรตอน เกิดจากโปรตอนตำแหน่งที่ 7 (H-7) ที่อยู่ใกล้กับหมู่เอมีน สัญญาณถัดมาปรากฏในช่วง δ 3.30-3.60 ppm เมื่ออินทิเกรตได้ค่าเท่ากับ 6 โปรตอน มีลักษณะเป็น multiplet ของโปรตอนตำแหน่งที่ 4 (H-4) หรือหมู่เมทิลเอมีน สัญญาณถัดมามีค่า δ ปรากฏที่ 4.00 ppm มีลักษณะแบบ doublet มีค่า J เท่ากับ 4.50 Hz เมื่ออินทิเกรตได้ค่าเท่ากับ 2 โปรตอน เกิดจากโปรตอนตำแหน่งที่ 12 (H-12) ถัดมามีค่า δ ปรากฏที่ 5.61 ppm อินทิเกรตได้เท่ากับ 2 โปรตอน มีลักษณะเป็น doublet มีค่า J เท่ากับ 12.6 Hz เกิดจากโปรตอนตำแหน่ง 2 (H-2) coupling กับโปรตอนบน

คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 (H-3) ที่ปรากฏ δ ที่ 6.91 ppm มีลักษณะเป็น doublet มีค่า J เท่ากับ 8.1 Hz ซึ่งอินทิเกรตได้เท่ากับ 2 โปรตอน ตำแหน่งถัดมา δ ปรากฏในช่วง 7.00-7.42 ppm เกิดจากโปรตอนตำแหน่ง 6 (H-6) ซึ่งเป็นโปรตอนของกลุ่ม aromatic ring จึงเห็นการ split ของสัญญาณในลักษณะเป็น multiplet อินทิเกรตได้เท่ากับ 8 โปรตอน ส่วนโปรตอนตำแหน่งมีค่า δ ปรากฏที่ 7.76 ppm ซึ่งพบลักษณะสัญญาณเป็น broad singlet peak ของหมู่ -NH และสัญญาณกลุ่มสุดท้ายปรากฏ δ ที่ 8.20 ppm เป็นลักษณะสัญญาณแบบ singlet ของหมู่แอลดีไฮด์บริเวณปลายสายของไอออนฟอร์ นอกจากนี้สามารถยืนยันผลจากการตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลร่วมด้วย โดยพิจารณาจาก HR-ESI MS (ภาพที่ 50) ในสูตรโมเลกุลเป็น $C_{41}H_{55}N_4OS_2^+$ (M) ได้เท่ากับ 683.3816 m/z ซึ่งมีค่าใกล้เคียงที่ได้จากการคำนวณมากโดยมีค่าเท่ากับ 683.3812 m/z จึงยืนยันได้ว่าได้สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ **Cy7C4** เกิดขึ้นจริงจากการสังเคราะห์ ซึ่งสามารถเสนอกฎการเกิดปฏิกิริยาดังภาพที่ 51

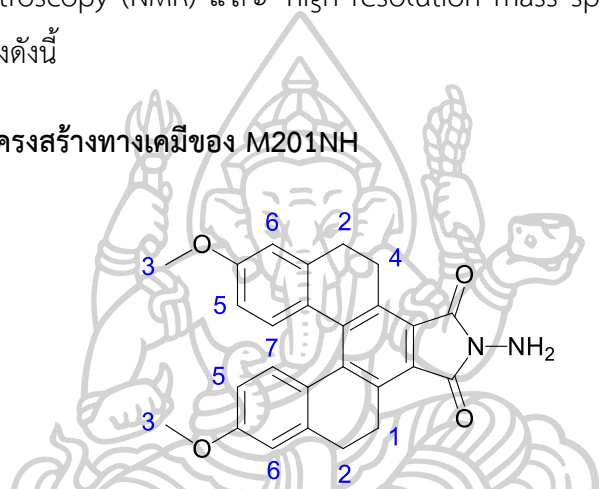


ภาพที่ 51 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ **Cy7C4**

1.2 สารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ M201NHP

จากการสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ตามวิธีการทดลองที่กล่าวมาก่อนหน้านั้นพบว่าขั้นตอนการสังเคราะห์สารเซ็นเซอร์ M201NHP นั้นจะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ สังเคราะห์ส่วนของฟลูออโรฟอร์ M201NH ขึ้นมาก่อน จากนั้นจึงนำ M201NH มาเชื่อมต่อกับไอโซไทโอไซยาไนด์ phenyl isothiocyanate ผ่านปฏิกิริยาการสร้างไธโอยูเรีย (formation of thiourea) ในสภาวะที่มีไตรเอทิลเอมีนทำหน้าที่เป็นเบส ในตัวทำละลาย acetonitrile ซึ่งสามารถวิเคราะห์และยืนยันโครงสร้างของสารที่สังเคราะห์ได้แต่ละชนิดด้วยวิธีทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่ nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) และ high resolution mass spectroscopy (HR-ESI MS) โดยมีผลการทดลองดังนี้

1.2.1 โครงสร้างทางเคมีของ M201NH

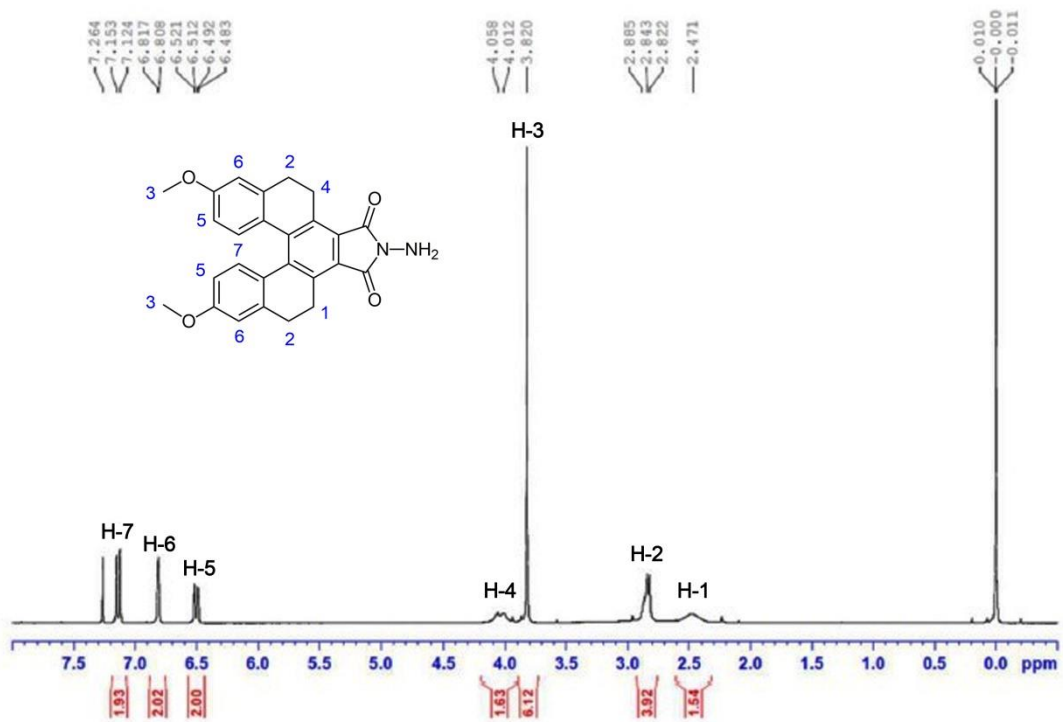


ภาพที่ 52 โครงสร้างทางเคมีของ M201NH

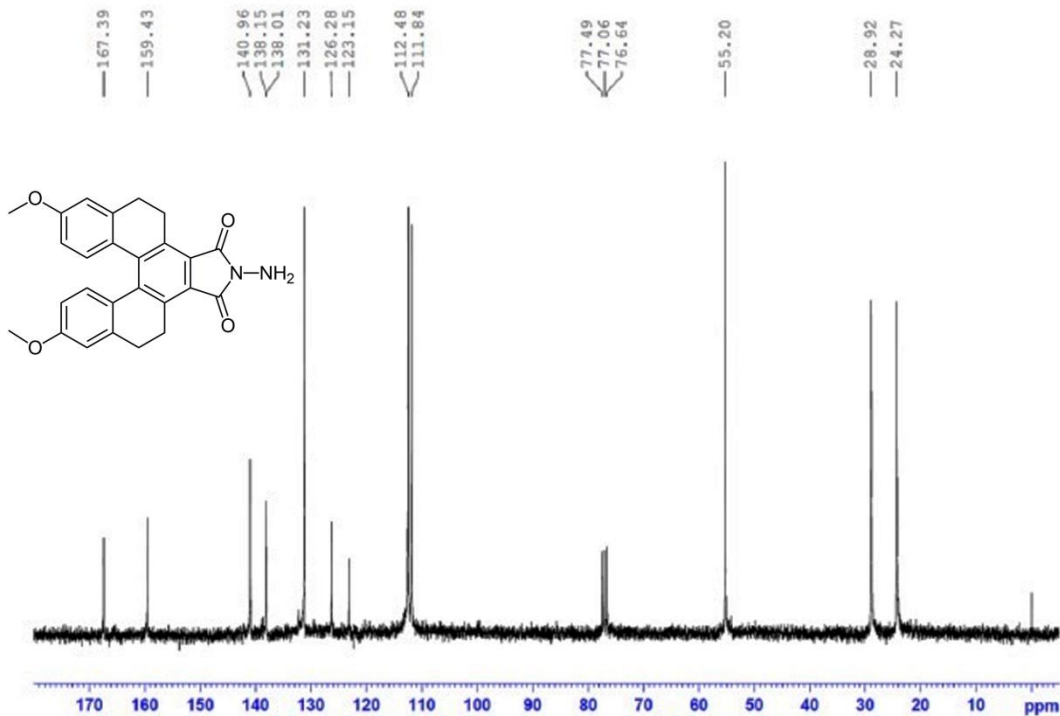
จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของ M201NH ดังภาพที่ 52 โดยวิธีการทางสเปกโทรสโกปีสามารถยืนยันโครงสร้างได้ดังนี้

การวิเคราะห์โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (^1H NMR, 300 MHz, CDCl_3): δ 2.47 (s, 2H), 2.84 (t, $J = 9.3$ Hz, 4H), 2.82 (s, 6H), 4.03 (d, $J = 13.8$ Hz 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 (ภาพที่ 53)

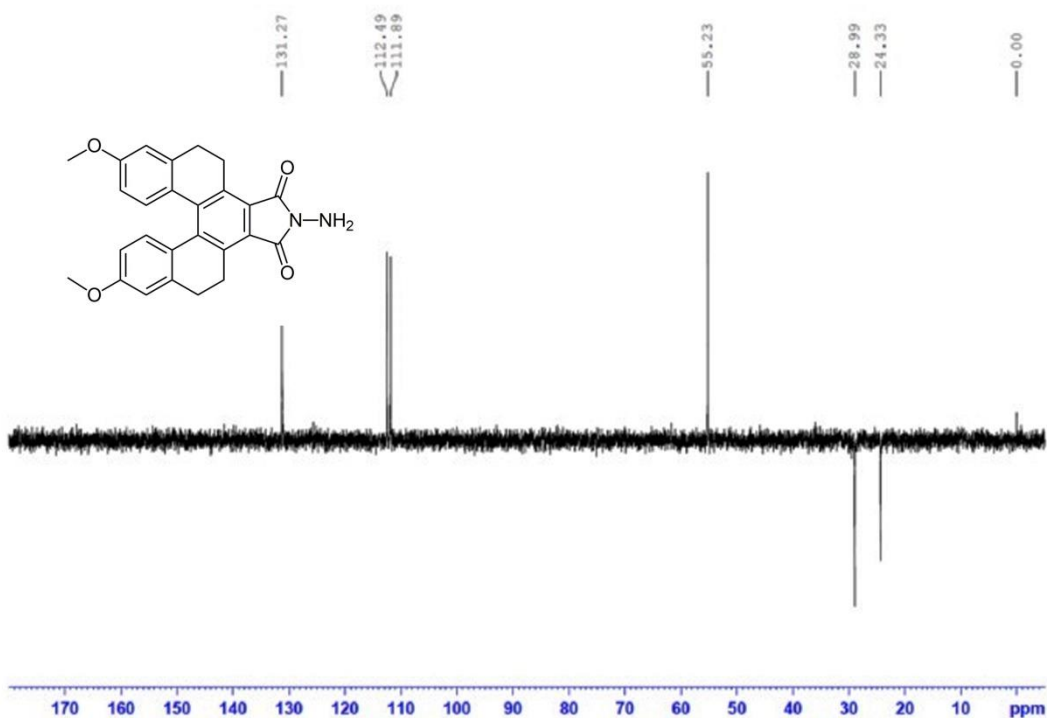
การวิเคราะห์คาร์บอนเอ็นเอ็มอาร์ (^{13}C NMR, 75 MHz, CDCl_3): δ 24.3 (2CH_2), 28.9 (2CH_2), 55.2 (2CH_2), 111.8 (2CH), 112.5 (2CH), 123.2 (2C), 126.3 (2C), 131.2 (2CH), 138.0 (2C), 138.2 (2C), 141.0 (2C), 159.4 (2C), 167.4 ($2\text{C}=\text{O}$) ppm (ภาพที่ 54) ; HR-ESI MS จากการคำนวณ $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4\text{Na}^+$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ 449.1472 m/z จากการทดสอบ 449.1468 m/z (ภาพที่ 56)



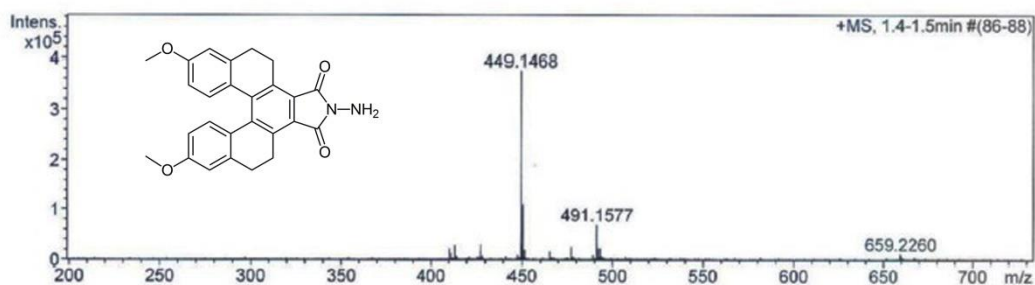
ภาพที่ 53 ¹H NMR สเปกตรัมของ M201NH



ภาพที่ 54 ¹³C NMR สเปกตรัมของ M201NH



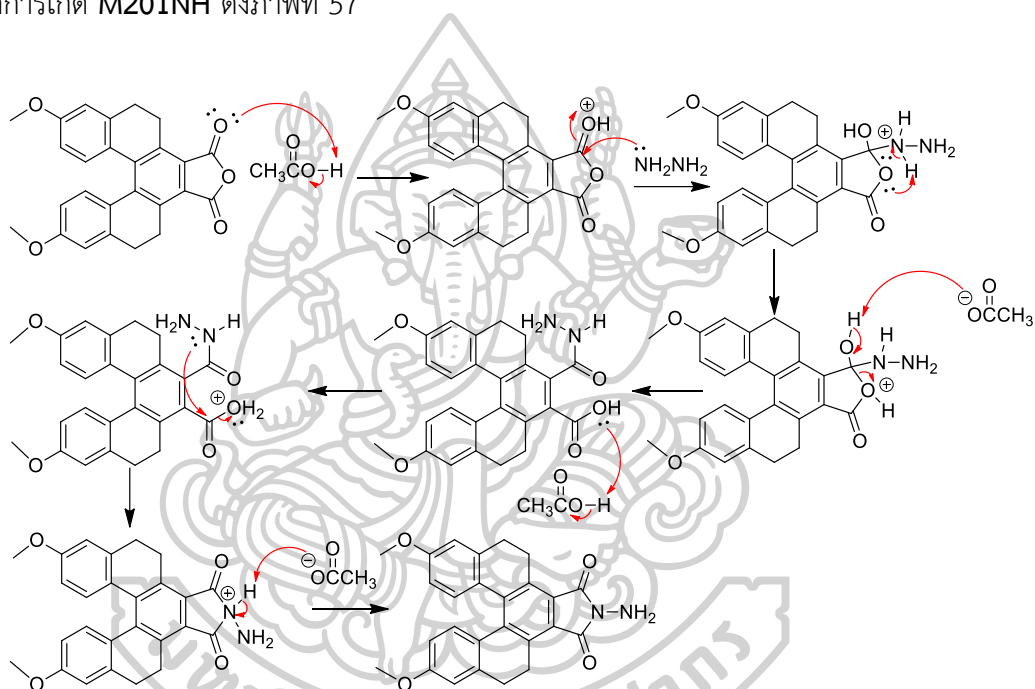
ภาพที่ 55 DEPT-135 NMR สเปกตรัมของ M201NH



ภาพที่ 56 HR-ESI MS สเปกตรัมของ M201NH

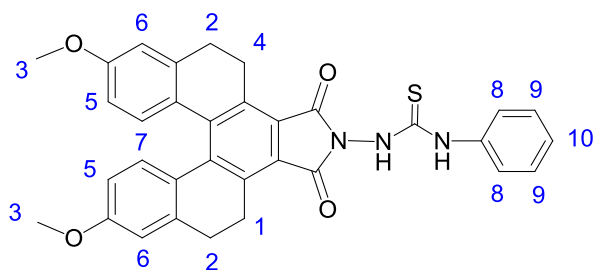
เมื่อพิจารณาโครงสร้างทางเคมีของ **M201NH** (ภาพที่ 52) และ ^1H NMR สเปกตรัมของ **M201NH** (ภาพที่ 53) แสดงให้เห็นสัญญาณของโปรตอน 7 กลุ่ม ที่แตกต่างกัน โดยสัญญาณตำแหน่งแรกปรากฏบริเวณ chemical shift (δ) ต่ำสุดคือ 2.47 ppm มีลักษณะเป็น broad singlet peak เมื่ออินทิเกรตได้ค่าเท่ากับ 2 โปรตอน นั้นแสดงว่าเกิดจากโปรตอนของ methylene ($-\text{CH}_2$) บนคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 (H-1) ถัดมา δ 2.84 ppm เมื่ออินทิเกรตได้ค่าเท่ากับ 4 โปรตอน เกิดจากโปรตอนของคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 (H-2) มีลักษณะเป็น triplet เนื่องจากเกิด coupling กับ 2 โปรตอนจากคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ถัดมา δ 2.82 ppm เมื่ออินทิเกรตได้ค่าเท่ากับ 6 โปรตอน เกิดจากโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 (H-3) มีลักษณะเป็น singlet ถัดมา δ 4.03 ppm มีลักษณะ

เป็น doublet มีค่า J เท่ากับ 13.8 Hz อินทิเกรตได้ค่าเท่ากับ 2 โปรตอน เป็นสัญญาณของ methylene ($-\text{CH}_2$) บนคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 (H-4) ถัดมาเป็นค่า δ 6.50 6.80 และ 7.13 ppm เมื่ออินทิเกรตได้ค่าเท่ากับ 6 โปรตอน เป็นสัญญาณของโปรตอนบนวง aromatic จึงปรากฏสัญญาณที่ downfield กว่าโปรตอนกลุ่มอื่นๆ และเพื่อความแน่นอนมากยิ่งขึ้น สามารถยืนยันผลจากการตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลร่วมด้วย โดยพิจารณาจาก HR-ESI MS (ภาพที่ 56) ในสูตรโมเลกุลเป็น $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4\text{Na}^+$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ ได้เท่ากับ 449.1472 m/z ซึ่งมีค่าใกล้เคียงที่ได้จากการคำนวณมากโดยมีค่าเท่ากับ 449.1468 m/z จึงยืนยันได้ว่าได้ว่า **M201NH** เกิดขึ้นจริงจากการสังเคราะห์ และแสดงกลไกการเกิด **M201NH** ดังภาพที่ 57



ภาพที่ 57 กลไกการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์ M201NH

1.2.2 โครงสร้างของทางเคมีของเซ็นเซอร์ M201NHP

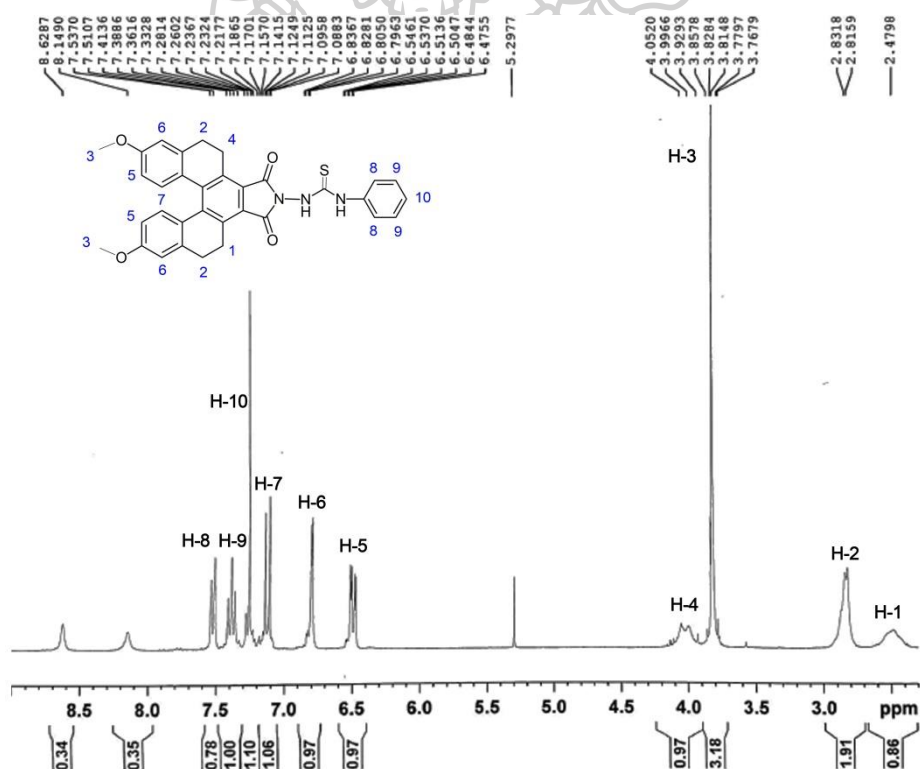


ภาพที่ 58 โครงสร้างทางเคมีของ M201NHP

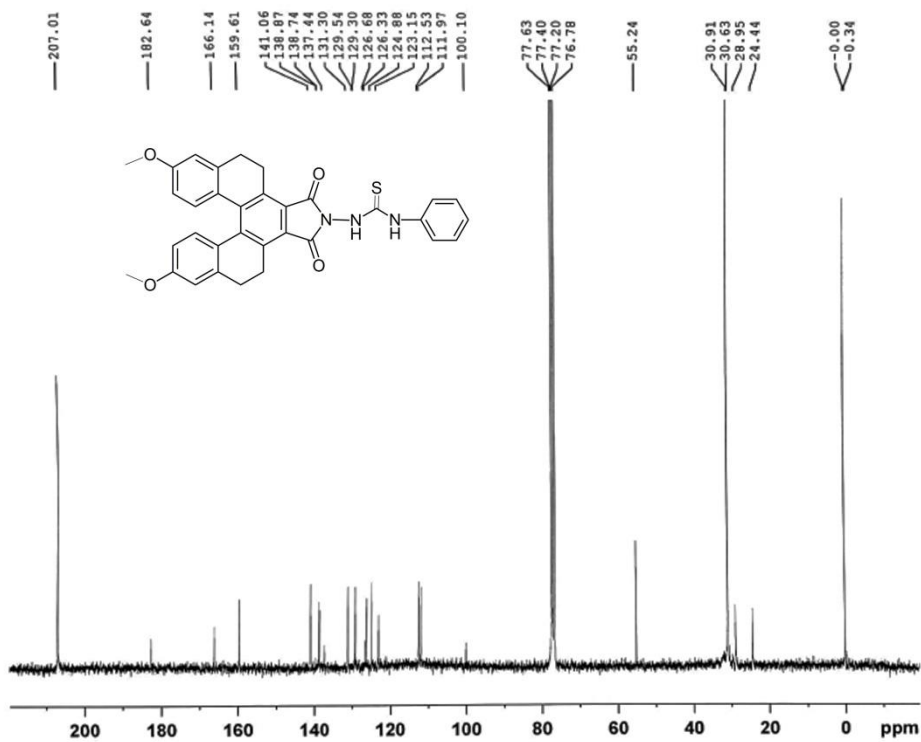
จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของ M201NHP ดังภาพที่ 58 โดยวิธีการทางสเปกโทรสโกปีสามารถยืนยันโครงสร้างได้ดังนี้

การวิเคราะห์โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ ($^1\text{H-NMR}$, 300 MHz, CDCl_3): δ 2.40-2.55 (br-s, 2H), 2.78-2.92 (d, $J = 4.77$ Hz, 4H), 3.83 (s, 6H), 3.98-4.07 (d, $J = 16.62$ Hz, 2H), 6.45-6.53 (dd, $J = 2.67$ Hz, 2H), 6.78-6.83 (t, $J = 8.24$, 2H), 7.08-7.17 (dd, $J = 4.19$ Hz, 2H), 7.20-7.29 (t, $J = 9.89$ Hz, H), 7.35-7.43 (t, $J = 11.55$ Hz, 2H), 7.49-7.57 (d, $J = 7.89$ Hz, 2H) ppm (ภาพที่ 59)

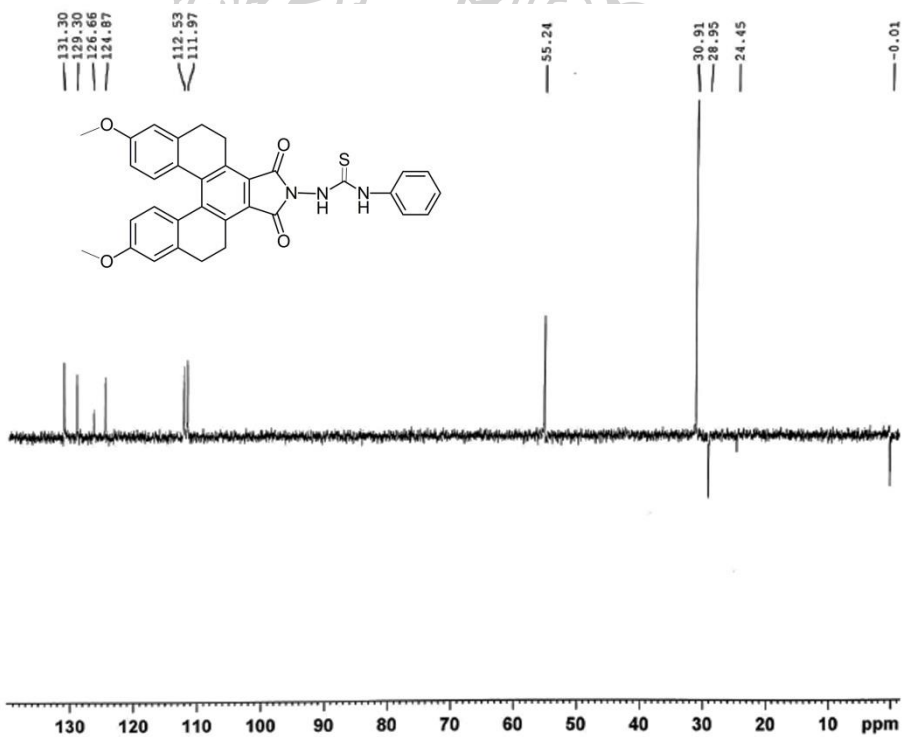
การวิเคราะห์คาร์บอนเอ็นเอ็มอาร์ ($^{13}\text{C NMR}$, 75 MHz, CDCl_3): δ 24.44 (CH_2), 28.95 (2CH_2), 55.24 (CH_3), 111.97 (CH), 112.53 (CH), 123.15 (CH), 124.88 (CH), 126.33 (CH), 126.68 (CH), 129.30 (CH), 131.30 (CH), 138.87 (CH), 141.06 (CH), 159.61 (C=O), 166.14 (C-O), 207.01 (C=S) ppm (ภาพที่ 60); HR-ESI MS จากการคำนวณ $\text{C}_{33}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}^+$ ($\text{M}+\text{H}^+$) 562.1795 m/z , จากการทดสอบ 562.1798 m/z (ภาพที่ 62)



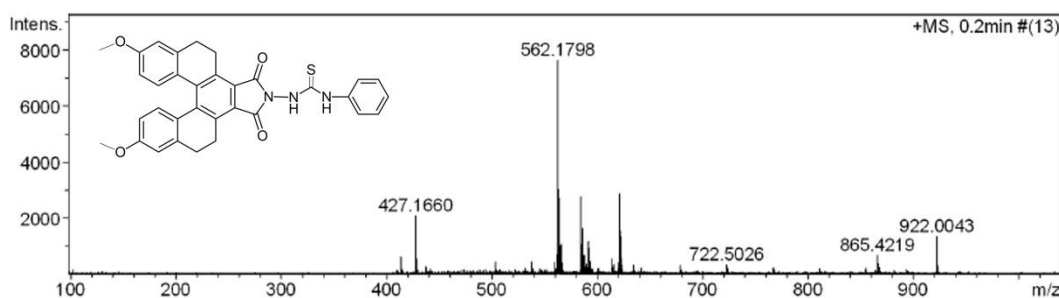
ภาพที่ 59 $^1\text{H NMR}$ สเปกตรัมของ M201NHP



ภาพที่ 60 $^{13}\text{C-NMR}$ สเปกตรัมของ M201NHP

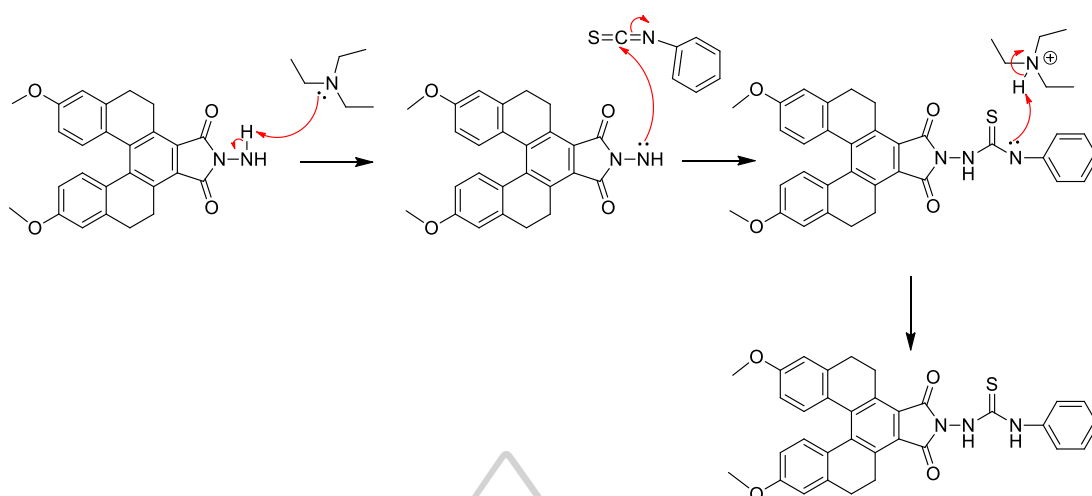


ภาพที่ 61 DEPT-135 NMR สเปกตรัมของ M201NHP



ภาพที่ 62 HR-ESI MS สเปกตรัมของ M201NHP

เมื่อพิจารณาโครงสร้างทางเคมีของ **M201NHP** (ภาพที่ 58) และ ^1H NMR สเปกตรัมของ **M201NHP** (ภาพที่ 59) แสดงให้เห็นสัญญาณของโปรตอน 10 กลุ่ม ที่แตกต่างกัน โดยสัญญาณตำแหน่งแรกปรากฏบริเวณ chemical shift (δ) ต่ำสุดคือ 2.40-2.55 ppm มีลักษณะเป็น broad singlet peak เมื่ออินทิเกรตได้ค่าเท่ากับ 2 โปรตอน นั้นแสดงว่าเกิดจากโปรตอนของ methylene ($-\text{CH}_2$) บนคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 (H-1) ถัดมา δ 2.78-2.92 ppm เกิดจากโปรตอนของบนคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 (H-2) มีลักษณะเป็น doublet มีค่า J เท่ากับ 4.77 Hz อินทิเกรตได้ค่าเท่ากับ 4 โปรตอน เนื่องจากเกิด coupling กับโปรตอนจากคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ถัดมา δ 3.83 ppm เกิดจากของโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 (H-3) มีลักษณะเป็น singlet อินทิเกรตได้ค่าเท่ากับ 6 โปรตอน ถัดมา δ 3.98-4.07 ppm เป็นสัญญาณของ methylene ($-\text{CH}_2$) บนคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 (H-4) เมื่ออินทิเกรตได้ค่าเท่ากับ 2 โปรตอน ถัดมาเป็นค่า δ 6.45-6.53 6.78-6.83 และ 7.08-7.17 ppm อินทิเกรตรวมได้ค่าเท่ากับ 6 โปรตอน เป็นสัญญาณของโปรตอนบนวง aromatic จากส่วนของฟลูออโรฟอร์ **M201NH** และสัญญาณถัดมาเป็นค่า δ 7.20-7.29 7.35-7.43 และ 7.49-7.57 ppm อินทิเกรตรวมได้ค่าเท่ากับ 5 โปรตอน เป็นสัญญาณของโปรตอนบนวง aromatic จากส่วนไอออโนฟอร์ จึงปรากฏสัญญาณที่ downfield กว่าโปรตอนกลุ่มอื่นๆ และเพื่อความแน่นอนมากยิ่งขึ้นสามารถยืนยันผลจากการตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลร่วมด้วย โดยพิจารณาจาก HR-ESI MS (ภาพที่ 62) ในสูตรโมเลกุลเป็น $\text{C}_{33}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}^+$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ ได้เท่ากับ 562.1798 m/z ซึ่งมีค่าใกล้เคียงที่ได้จากการคำนวณมากโดยมีค่าเท่ากับ 562.1795 m/z จึงยืนยันได้ว่าได้ว่า **M201NHP** เกิดขึ้นจริงจากการสังเคราะห์ และแสดงกลไกการเกิด **M201NHP** ดังภาพที่ 63



ภาพที่ 63 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ M201NHP

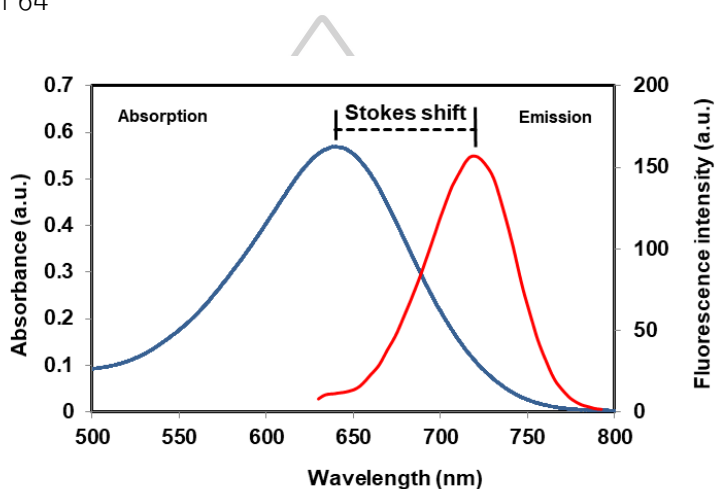
2. การทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจวัดไอออนทองแดงของสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ Cy7C4 ในสารละลายผสมระหว่างสารละลาย HEPES buffer เข้มข้น 5 mM pH 7.2 และ acetonitrile ในอัตราส่วน 50:50 v/v

เมื่อฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ Cy7C4 ได้รับการยืนยันโครงสร้างแล้ว จึงได้นำเซ็นเซอร์ Cy7C4 มาศึกษาถึงประสิทธิภาพในการทำงานเกี่ยวกับการตรวจจับไอออนโลหะหนัก ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปีในสถานะที่เป็นสารละลายอินทรีย์ และสารละลายน้ำผสมสารละลายอินทรีย์ เพื่อหาความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) ความจำเพาะเจาะจงกับชนิดของไอออน (selectivity) เปรียบเทียบกับไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ นอกจากนี้ยังศึกษาถึงประสิทธิภาพในการตรวจจับไอออนทองแดงในสถานะที่มีไอออนรบกวนอื่นๆ รวมอยู่ด้วย (competitive) และค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออนทองแดง (association constant; K_{assoc})

นำเซ็นเซอร์ Cy7C4 ที่สังเคราะห์ได้มาศึกษาประสิทธิภาพในการตรวจจับไอออนทองแดงและไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ในสารละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES buffer เข้มข้น 5 mM pH 7.2 (เป็นค่า pH ในเลือดของมนุษย์) และ acetonitrile ในอัตราส่วน 50:50 v/v ซึ่งเตรียมเกลือเปอร์คลอเรตของโลหะแต่ละชนิด ประกอบด้วยไอออนทองแดง ไอออนของโลหะทรานซิชัน ไอออนของโลหะอัลคาไลน์ และไอออนของโลหะอัลคาไลน์เอิร์ทชนิดต่างๆ ละลายในน้ำปราศจากไอออน (deionized water, DI)

2.1 การศึกษาความสามารถในการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต และการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ Cy7C4

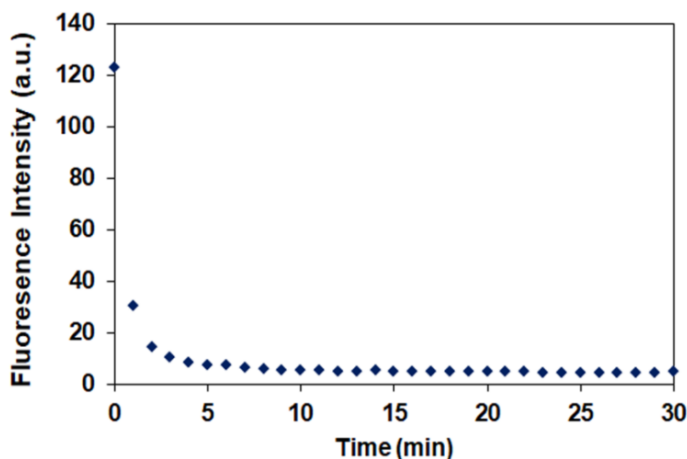
การศึกษาค่าระยะห่างระหว่างความยาวคลื่นที่เซ็นเซอร์ดูดกลืนแสง (excitation wavelength) กับความยาวคลื่นที่เซ็นเซอร์คายแสง (emission wavelength) หรือ Stokes shift จะทำการศึกษาโดยใช้เครื่องมือ 2 ชนิด ได้แก่ เครื่อง UV-visible spectrometer สำหรับติดตามสัญญาณการดูดกลืนแสง และเครื่อง fluorescence spectrometer: Perkin Elmer Luminescence spectrometer model LS-50B เพื่อติดตามสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ Cy7C4 ดังภาพที่ 64



ภาพที่ 64 แสดงค่าความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสง และค่าความยาวคลื่นของการคายแสงของเซ็นเซอร์ Cy7C4 (10 μ M)

จากผลการทดลองภาพที่ 64 พบว่าค่าความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงที่สูงที่สุด (λ_{ex}) ของเซ็นเซอร์ Cy7C4 มีค่าเท่ากับ 640 nm และค่าความยาวคลื่นของการคายแสงที่สูงที่สุด (λ_{em}) ของเซ็นเซอร์ Cy7C4 มีค่า 720 nm ทำให้มีค่า Stokes shift เท่ากับ 80 nm ซึ่งเป็นค่าที่สูง (มากกว่า 50 nm) โดยข้อดีของการมี Stokes shift กว้าง จะทำให้ลดการเกิด self-absorption และไม่ต้องใช้ตัวกรองแสง (filter) จึงช่วยลดต้นทุน และน้ำหนักของเครื่องมือที่ใช้ในภาคสนามได้ และการตรวจวิเคราะห์ไอออนทองแดงในตัวอย่างชีวภาพได้

2.2 การศึกษาเวลาตอบสนองของเซ็นเซอร์ Cy7C4 เมื่อตรวจวัดไอออนทองแดง (time response for Cu²⁺ detection)

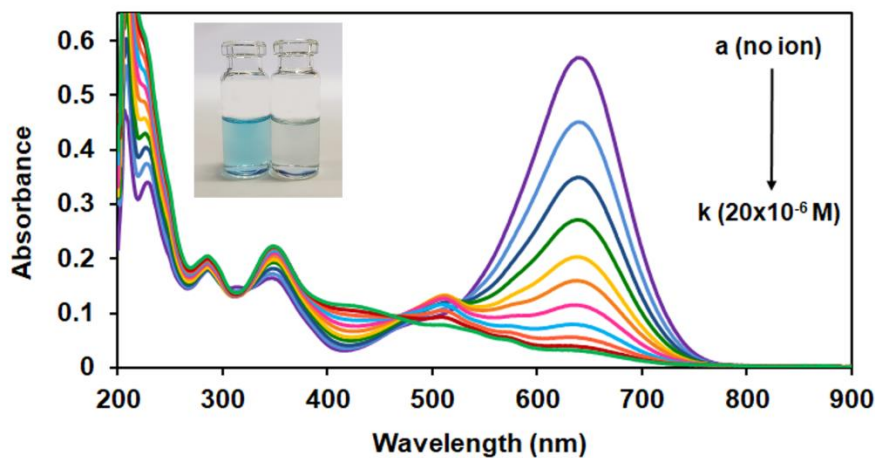


ภาพที่ 65 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง fluorescence intensity (λ_{ex} 640 nm, λ_{em} 720 nm) และเวลาของเซ็นเซอร์ Cy7C4 (10 μ M) เมื่อเติมไอออนทองแดงเปอร์คลอเรต (10 μ M) สารละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES buffer เข้มข้น 5 mM pH 7.2 และ acetonitrile ในอัตราส่วน 50:50 v/v

จากผลการทดลองภาพที่ 65 แสดง fluorescence intensity และเวลาตอบสนองของเซ็นเซอร์เมื่อตรวจจับไอออนทองแดงที่ 720 nm ทุกๆ หนึ่งนาที่เป็นเวลาทั้งหมด 30 นาที ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า fluorescence intensity ของเซ็นเซอร์ลดลงอย่างมากในระยะแรกและคงที่ที่เวลาประมาณ 5 นาที ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จะบันทึกการเปลี่ยนแปลงสเปกตรัมเมื่อเวลาผ่านไป 5 นาที หลังจากเติมไอออนทองแดง หรือไอออนโลหะอื่นๆ ลงไป

2.3 ผลการทดสอบสมบัติการดูดกลืนแสงในภาวะที่มีไอออนทองแดงของเซ็นเซอร์ Cy7C4

การดูดกลืนแสงของเซ็นเซอร์ Cy7C4 ได้ศึกษาในสารละลายผสมระหว่างบัฟเฟอร์ HEPES buffer เข้มข้น 5 mM pH 7.2 และ acetonitrile ในอัตราส่วน 50:50 v/v โดยได้ทำการติดตามสเปกตรัมของการดูดกลืนแสง (absorption spectra) ด้วยเครื่อง single-beam Agilent Technologies spectrophotometer (Cary 60 UV-Vis) ซึ่งใช้ความเข้มข้นของเซ็นเซอร์เท่ากับ 60 μ M และใช้ไอออนทองแดงในรูปแบบเกลือเปอร์คลอเรต ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 66



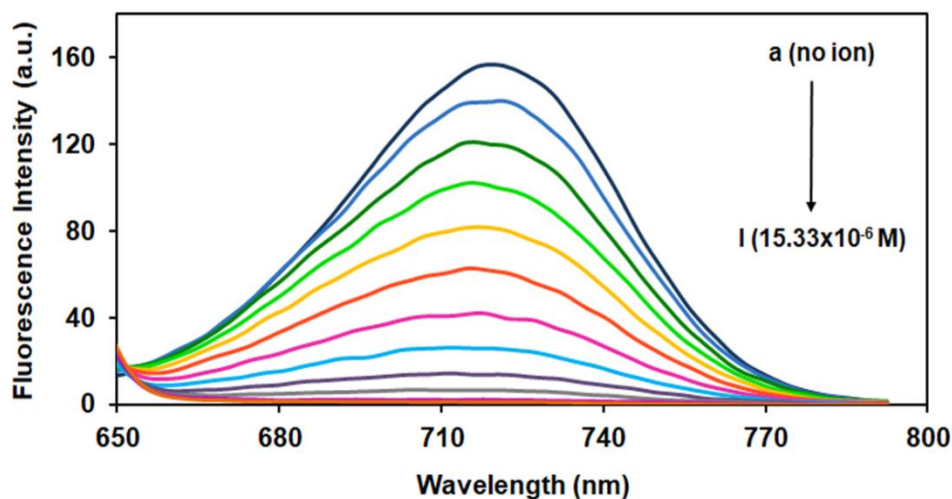
ภาพที่ 66 การดูดแสงของเซ็นเซอร์ Cy7C4 (60 μM) สารละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES buffer เข้มข้น 5 mM pH 7.2 และ acetonitrile ในอัตราส่วน 50:50 v/v ก่อนและหลังเติมไอออนทองแดงเปอร์คลอเรตที่ความเข้มข้นต่างๆ a: 0 μM , b: 2.0 μM , c: 4.0 μM , d: 6.0 μM , e: 8.0 μM , f: 10 μM , g: 12 μM , h: 14 μM , i: 16 μM , j: 18 μM และ k: 20 μM

จากผลการทดลองภาพที่ 66 แสดงให้เห็นว่าการตรวจจับไอออนทองแดงของเซ็นเซอร์ Cy7C4 อยู่ในช่วงยูวี-วิสิเบิล (UV-Vis absorption) และเป็นแบบระบบ ON-OFF ซึ่งเกิดจากการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนอันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซ็นเซอร์เมื่อจับกับไอออนของทองแดงในสารละลายผสมระหว่างบัฟเฟอร์ HEPES buffer เข้มข้น 5 mM pH 7.2 และ acetonitrile ในอัตราส่วน 50:50 v/v โดยในสถานะที่ไม่มีไอออนทองแดง ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ Cy7C4 จะดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 640 nm และเมื่อมีการเติมไอออนทองแดงเปอร์คลอเรตที่ความเข้มข้นต่างๆ ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ Cy7C4 จะแสดงสัญญาณการดูดกลืนแสงที่ลดลง นอกจากนี้ยังสามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายได้ด้วยตาเปล่า โดยเมื่อสารละลายไม่มีไอออนทองแดง ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ Cy7C4 จะมีสีฟ้า แต่เมื่อมีการเติมไอออนทองแดงเปอร์คลอเรตลงไปจะทำให้เกิดสารละลายใส ไม่มีสี

2.4 ผลการทดสอบสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในสถานะที่มีไอออนทองแดงของเซ็นเซอร์ Cy7C4

การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ Cy7C4 ได้ทำการศึกษาในสารละลายผสมระหว่างบัฟเฟอร์ HEPES buffer เข้มข้น 5 mM pH 7.2 และ acetonitrile ในอัตราส่วน 50:50 v/v โดยทำการติดตามการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence emission spectra) ด้วยเครื่อง

Perkin-Elmer luminescence spectrometer LS5 เมื่อใช้ λ_{ex} เท่ากับ 640 nm ความเข้มข้นของเซ็นเซอร์ **Cy7C4** เท่ากับ 10 μM และใช้ไอออนของทองแดงในรูปเกลือเปอร์คลอเรต



ภาพที่ 67 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ (λ_{ex} 640 nm) ของเซ็นเซอร์ **Cy7C4** (10 μM) สารละลายผสมระหว่าง สารละลายบัฟเฟอร์ HEPES buffer เข้มข้น 5 mM pH 7.2 และ acetonitrile (50:50 v/v) ก่อนและหลังเติมไอออนทองแดงเปอร์คลอเรตที่ความเข้มข้นต่างๆ a: 0 μM , b: 2.0 μM , c: 3.3 μM , d: 4.7 μM , e: 6 μM , f: 7.3 μM , g: 8.7 μM , h: 10 μM , i: 11 μM , j: 13 μM , k: 14 μM และ l: 15 μM

จากผลการทดลองดังภาพที่ 67 พบว่า การตรวจจับไอออนทองแดงของเซ็นเซอร์ **Cy7C4** ให้สัญญาณคายแสงฟลูออเรสเซนซ์เป็นแบบระบบ ON-OFF ซึ่งเกิดจากการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนอันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซ็นเซอร์เมื่อจับกับไอออนของทองแดงในสารละลายผสมระหว่างบัฟเฟอร์ HEPES buffer เข้มข้น 5 mM pH 7.2 และ acetonitrile ในอัตราส่วน 50:50 v/v โดยในสภาวะที่ไม่มีไอออนทองแดง ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ **Cy7C4** จะคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่มีความเข้มสูง และเมื่อมีการเติมไอออนทองแดงเปอร์คลอเรตที่ความเข้มข้นต่างๆ ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ **Cy7C4** จะคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่มีความเข้มต่ำลงในช่วงความยาวคลื่น 650-770 nm โดยความยาวคลื่นมากที่สุดของการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์เท่ากับ 720 nm ซึ่งการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ **Cy7C4** จะแปรผกผันกับปริมาณไอออนทองแดงในสารละลาย

2.5 ค่าความสามารถต่ำสุดของการตรวจจับไอออนทองแดง (detection limit)

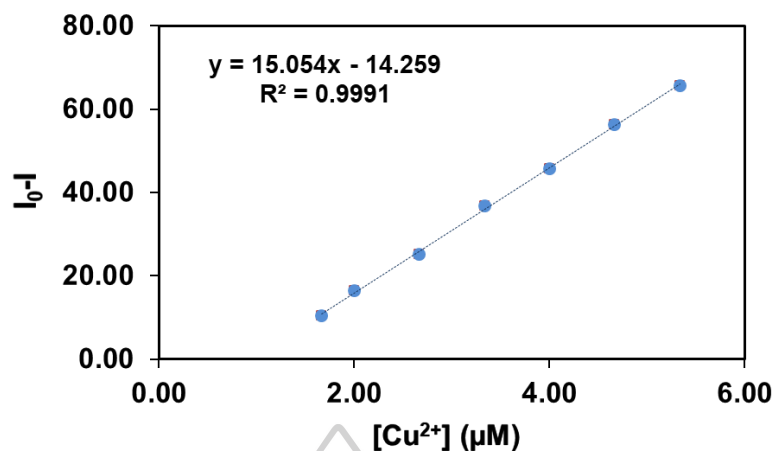
การคำนวณหาค่า detection limit กระทำโดยการพลอตกราฟค่าความเข้มข้นของทองแดงที่เติมลงไปกับความเข้มข้นต่างๆ (แกน x) กับค่าเฉลี่ยส่วนต่างของ fluorescence intensity (I_0-I) ที่จุดใดๆ (แกน y) เพื่อหาความชันของกราฟ (slope) จากนั้นนำมาคำนวณตามสมการที่ 1 โดยข้อมูลต่างๆ แสดงดังตารางที่ 7 และสร้างกราฟดังภาพที่ 68

$$\text{Detection limit} = \frac{3SD_{\text{blank}}}{\text{slope}} \quad \text{สมการที่ 1}$$

โดยที่ SD_{blank} คือ ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ของ blank

ตารางที่ 7 แสดงข้อมูลที่ใช้ในการคำนวณค่า detection limit ของเซ็นเซอร์ Cy7C4

[Cu ²⁺] (μM)	Fluorescence Intensity					
	1st	2nd	3rd	Avg.	I_0-I	SD
0.00	156.85	156.81	157.04	156.9	0.00	0.123
1.67	147.46	145.97	146.21	146.54	10.35	0.800
2.00	140.7	140.03	140.38	140.37	16.53	0.335
2.67	132.43	131.41	131.54	131.79	25.11	0.555
3.33	120.34	120.27	119.88	120.16	36.74	0.248
4.00	110.69	111.56	111.18	111.14	45.76	0.436
4.67	100.58	100.22	101.06	100.62	56.28	0.421
5.33	91.81	90.96	90.83	91.20	65.70	0.532



ภาพที่ 68 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยส่วนต่างของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ (I_0-I) ที่ความยาวคลื่น (λ_{em}) 720 nm และความเข้มข้นของทองแดงที่เติมลงไป

จากภาพที่ 68 จะเห็นได้ว่าค่า I_0-I กับความเข้มข้นของไอออนทองแดงเป็นเส้นตรงในช่วง 1.67-5.33 μM ซึ่งถือเป็นช่วงการทำงาน และมีค่าต่ำสุดการตรวจจับไอออนทองแดง (detection limit) เท่ากับ 24.5 nM หรือ 1.56 ppb

การคำนวณ จากกราฟได้สมการเส้นตรงคือ $y = 15.054x + 14.259$; $R^2 = 0.9991$ และจากการทดลองได้ค่า SD_{blank} เท่ากับ 0.123

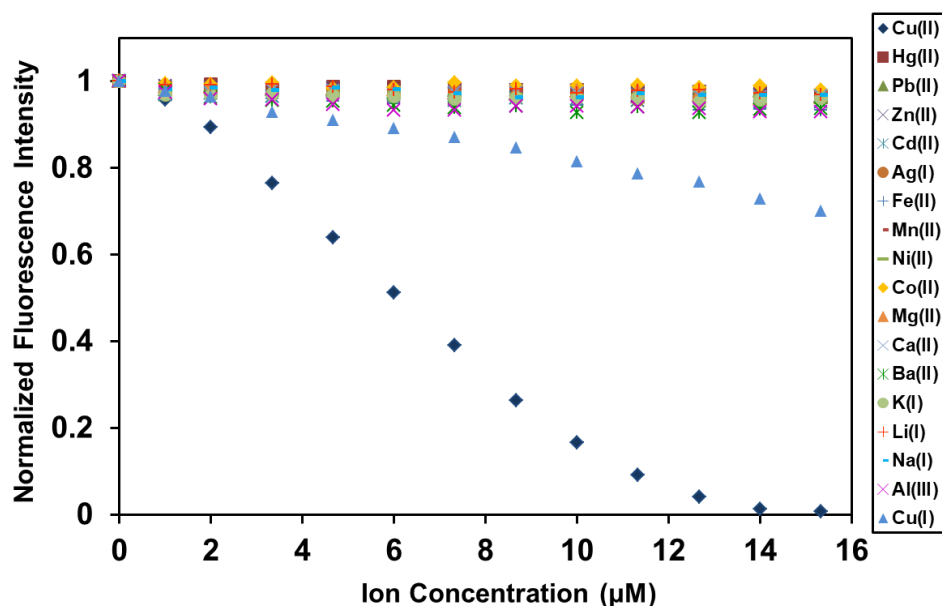
ดังนั้นจากสมการที่ 1

$$\begin{aligned} \text{Detection limit} &= (3 \times 0.123) / 15.054 \\ &= 24.5 \text{ nM} \\ &= 1.56 \text{ ppb} \end{aligned}$$

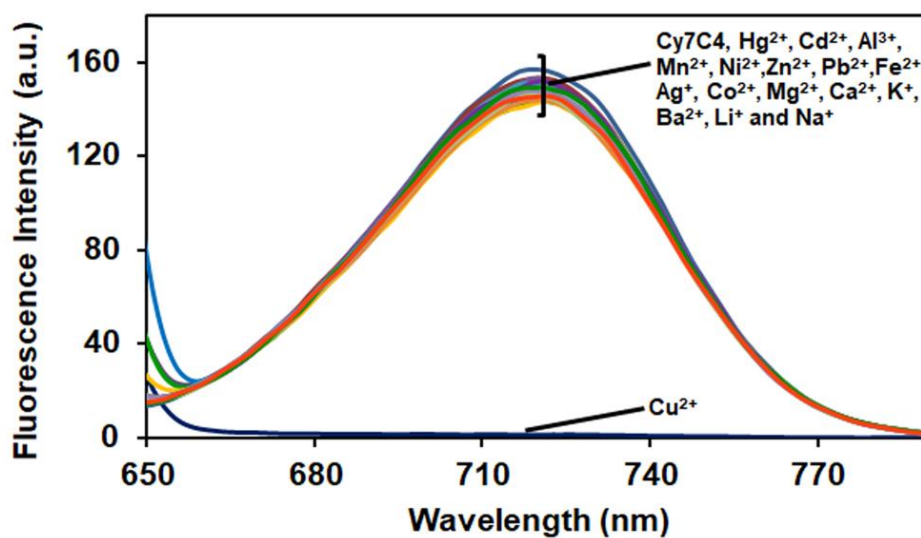
ดังนั้นค่าต่ำสุดการตรวจจับ (detection limit) กับไอออนทองแดงของเซ็นเซอร์ **Cy7C4** เท่ากับ 24.5 nM หรือ 1.56 ppb

2.6 ผลการทดสอบสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนทองแดงเปรียบเทียบกับไอออนรบกวนอื่นๆ ของเซ็นเซอร์ Cy7C4

การทดสอบการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ **Cy7C4** ได้ทำการศึกษาในสารละลายผสมระหว่าง HEPES buffer เข้มข้น 5 mM pH 7.2 และ acetonitrile ในอัตราส่วน 50:50 v/v ในภาวะที่มีไอออนทองแดงในรูปแบบเปอร์คลอเรต เปรียบเทียบกับในภาวะที่มีไอออนรบกวนอื่นๆ ได้แก่ Cu^+ , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Ag^+ , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , K^+ , Li^+ , Na^+ และ Al^{3+} ซึ่งผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 69



ภาพที่ 69 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ (λ_{ex} 640 nm, λ_{em} 720 nm) ของเซ็นเซอร์ Cy7C4 (10 μM) ในสารละลายผสมระหว่าง HEPES buffer เข้มข้น 5 mM pH 7.2 และ acetonitrile (50:50 v/v) ในภาวะที่มีไอออนโลหะของเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นต่างๆ



ภาพที่ 70 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ (λ_{ex} 640 nm, λ_{em} 720 nm) ของเซ็นเซอร์ Cy7C4 (10 μM) ในสารละลายผสมระหว่าง HEPES buffer เข้มข้น 5 mM pH 7.2 และ acetonitrile (50:50 v/v) ในภาวะที่มีไอออนโลหะของเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 15 μM

จากภาพที่ 69 แสดงค่า normalized fluorescence intensity (แกน y) ของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 720 nm และความเข้มข้นของไอออนชนิดต่างๆ (แกน x) พบว่าเซ็นเซอร์ **Cy7C4** มีความจำเพาะเจาะจงกับไอออนทองแดง เมื่อทำการเปรียบเทียบกับไอออนชนิดอื่นๆ โดยจะเห็นได้ว่าเมื่อเติมไอออนทองแดงในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้น ทำให้ค่า normalized fluorescence intensity มีแนวโน้มลดลงอย่างเห็นได้ชัดและคงที่ในที่สุด ในขณะที่เมื่อเติมไอออนชนิดอื่นๆ ลงไปในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้น ไม่ได้ทำให้ normalized fluorescence intensity เปลี่ยนแปลง และจากภาพที่ 70 ยังแสดงให้เห็นว่าเมื่อมีการเติมไอออนทองแดงที่ความเข้มข้น 15 μM จะเกิดการลดลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์อย่างชัดเจน ในขณะที่สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์หลังเติมไอออนชนิดอื่นๆ ได้แก่ ได้แก่ ไอออนปรอท (Hg^{2+}) ไอออนตะกั่ว (Pb^{2+}) ไอออนสังกะสี (Zn^{2+}) ไอออนแคดเมียม (Cd^{2+}) ไอออนเงิน (Ag^+) ไอออนเหล็ก (Fe^{2+}) ไอออนแมงกานีส (Mn^{2+}) ไอออนนิกเกิล (Ni^{2+}) ไอออนโคบอลต์ (Co^{2+}) ไอออนแมกนีเซียม (Mg^{2+}) ไอออนแคลเซียม (Ca^{2+}) ไอออนแบเรียม (Ba^{2+}) ไอออนโพแทสเซียม (K^+) ไอออนลิเทียม (Li^+) ไอออนโซเดียม (Na^+) และไอออนอะลูมิเนียม (Al^{3+}) ที่ความเข้มข้น 15 μM เท่ากันกับความเข้มข้นของไอออนทองแดง (เป็นความเข้มข้นของไอออนทองแดงสูงสุดที่ทำให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ **Cy7C4** มีค่าต่ำที่สุด) ไม่มีการเปลี่ยนแปลงหรือเปลี่ยนแปลงน้อยมากเมื่อเทียบกับความเข้มข้นของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เริ่มต้น

2.7 ภาพถ่ายของสารละลายเซ็นเซอร์ **Cy7C4** ในภาวะที่มีไอออนทองแดงเปรียบเทียบกับไอออนรบกวนอื่นๆ

ภาพถ่ายของสารละลายเซ็นเซอร์ **Cy7C4** ในภาวะที่มีไอออนทองแดงและไอออนชนิดอื่นๆ ภายใต้แสงปกติ (แสงขาว) เป็นการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของเซ็นเซอร์ต่อไอออนทองแดงอีกวิธีหนึ่ง โดยสามารถสังเกตด้วยตาเปล่าเมื่อสารละลายอยู่ภายใต้แสงปกติ (แสงขาว) โดยสารละลายจะเตรียมใส่ขวดโดยมีปริมาตร 2.00 มิลลิลิตร และในแต่ละขวดจะมีความเข้มข้นของไอออนชนิดต่างๆ ในปริมาณที่เท่าๆ กัน ผลการทดลองจะได้ดังภาพที่ 71

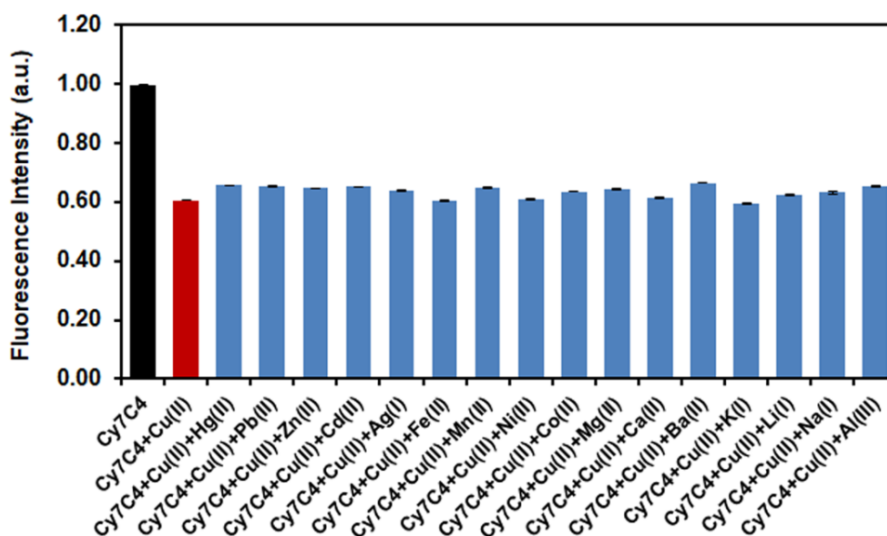


ภาพที่ 71 สีของสารละลายเซ็นเซอร์ **Cy7C4** ($10 \mu\text{M}$) ในสารละลายผสมระหว่าง HEPES buffer เข้มข้น 5 mM pH 7.2 และ acetonitrile ($50:50 \text{ v/v}$) ภายใต้แสงปกติ (แสงขาว) ก่อนและหลังการเติมไอออนเปอร์คลอเรต (perchlorate salts) ของไอออนโลหะชนิดต่างๆ คือ Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{2+} , Ag^+ , Ni^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , Li^+ และ Al^{3+} ($5 \mu\text{M}$)

จากภาพที่ 71 แสดงสีของสารละลายเซ็นเซอร์ **Cy7C4** ภายใต้แสงปกติ (แสงขาว) หลังจากเติมไอออนชนิดต่างๆ ลงไปในสารละลาย จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่า เซ็นเซอร์ **Cy7C4** มีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนทองแดงสูง เมื่อสังเกตสีของสารละลายเซ็นเซอร์ **Cy7C4** พบว่ามีเฉพาะไอออนทองแดงเท่านั้น ที่ทำให้สีของสารละลายเซ็นเซอร์เปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นไม่มีสี ในขณะที่ไอออนชนิดอื่นๆ ได้แก่ Hg^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Ag^+ , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , K^+ , Li^+ , Na^+ และ Al^{3+} ไม่มีการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเมื่อเทียบกับสีของสารละลายเซ็นเซอร์ **Cy7C4** ก่อนเติมไอออน สรุปได้ว่าเซ็นเซอร์ **Cy7C4** มีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อไอออนทองแดง ซึ่งสามารถตรวจวัดด้วยสายตาได้

2.8 ผลการทดสอบสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนทองแดงรวมอยู่กับไอออนรบกวนอื่นๆ ของเซ็นเซอร์ **Cy7C4**

การทดสอบการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ **Cy7C4** ได้ทำการศึกษาในสารละลายผสมระหว่างบัฟเฟอร์ HEPES buffer เข้มข้น 5 mM pH 7.2 และ acetonitrile ในอัตราส่วน $50:50 \text{ v/v}$ ในสภาวะที่มีไอออนทองแดงรวมอยู่ร่วมกับไอออนรบกวนอื่นๆ ในรูปเกลือเปอร์คลอเรต ได้แก่ Hg^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Ag^+ , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , K^+ , Li^+ , Na^+ และ Al^{3+} ซึ่งได้ทำการตรวจวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ในสภาวะที่มีไอออนรบกวนอื่นๆ เท่ากับ 10 เท่าของปริมาณไอออนทองแดงในสารละลาย และใช้ความเข้มข้นของเซ็นเซอร์ **Cy7C4** เท่ากับ $10 \mu\text{M}$ ซึ่งผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 72

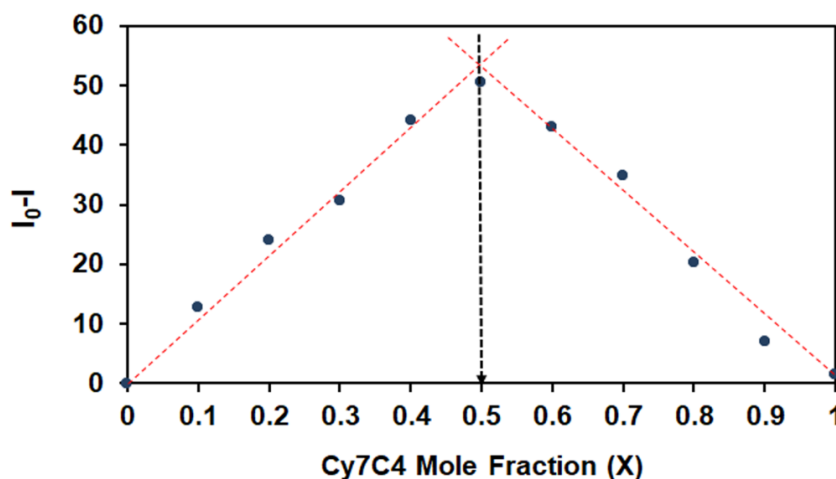


ภาพที่ 72 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ (λ_{ex} 640 nm, λ_{em} 720 nm) ของเซ็นเซอร์ **Cy7C4** (10 μ M) ในสารละลายผสมระหว่าง HEPES buffer เข้มข้น 5 mM pH 7.2 และ acetonitrile (50:50 v/v) ในภาวะที่มีความเข้มข้นของไอออนรบกวนต่างๆ เจือปนในสารละลาย 33.3 μ M (10 equiv.) ที่มีความเข้มข้นของไอออนทองแดง 3.33 μ M

การทดลองนี้เป็นการทดสอบความสามารถในการตรวจจับไอออนทองแดงของเซ็นเซอร์ **Cy7C4** ในภาวะที่มีไอออนทองแดงรวมอยู่กับไอออนรบกวนอื่นๆ ซึ่งเป็นเกลือเปอร์คลอเรต ได้แก่ ไอออนปรอท (Hg^{2+}), ไอออนตะกั่ว (Pb^{2+}), ไอออนสังกะสี (Zn^{2+}), ไอออนแคดเมียม (Cd^{2+}), ไอออนเงิน (Ag^+), ไอออนเหล็ก (Fe^{2+}), ไอออนแมงกานีส (Mn^{2+}), ไอออนนิกเกิล (Ni^{2+}), ไอออนโคบอลต์ (Co^{2+}), ไอออนแมกนีเซียม (Mg^{2+}), ไอออนแคลเซียม (Ca^{2+}), ไอออนแบเรียม (Ba^{2+}), ไอออนโพแทสเซียม (K^+), ไอออนลิเทียม (Li^+), ไอออนโซเดียม (Na^+) และไอออนอะลูมิเนียม (Al^{3+}) ซึ่งไอออนรบกวนต่างๆ มีความเข้มข้นเป็น 33.3 μ M คิดเป็น 10 equiv. ของความเข้มข้นของไอออนทองแดง (3.33 μ M) โดยทำการตรวจวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 720 nm จากภาพที่ 70 จะเห็นได้ว่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้จากการเติมไอออนรบกวนอื่นๆ รวมกับไอออนทองแดงไม่มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อเปรียบเทียบกับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่มีการเติมไอออนทองแดงเพียงชนิดเดียว แสดงให้เห็นว่าเซ็นเซอร์ **Cy7C4** มีประสิทธิภาพในการทำงานที่ดีแม้ในสภาวะที่มีไอออนรบกวนอื่นๆ ปนอยู่ด้วย แสดงให้เห็นว่าในระบบตรวจวัดที่มีปริมาณไอออนอื่นๆ ปนอยู่กับไอออนของทองแดง เซ็นเซอร์ **Cy7C4** จะยังคงจะแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์แบบ ON-OFF fluorescence switch ได้ โดยประสิทธิภาพของเซ็นเซอร์ยังคงเหมือนเดิม สามารถดักจับไอออนทองแดงอย่างมีความจำเพาะเจาะจง

2.9 อัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเซ็นเซอร์ Cy7C4 กับไอออนทองแดง โดยวิธี Job's plot และค่าคงที่สมดุลของการเกิดไอออนเชิงซ้อน (Association constant; K_{assoc})

การทดลองเพื่อหาอัตราส่วนระหว่างโมเลกุลของเซ็นเซอร์ Cy7C4 กับไอออนทองแดงที่ใช้ในการเกิด binding ศึกษาโดยวิธี Job's plot ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 73



ภาพที่ 73 กราฟแสดงอัตราส่วนระหว่างโมเลกุลของเซ็นเซอร์ Cy7C4 กับไอออนทองแดงที่ใช้ในการเกิด binding ศึกษาโดยวิธี Job's plot

จากผล Job's plot แสดงให้เห็นว่าเซ็นเซอร์ Cy7C4 หนึ่งโมเลกุลสามารถดักจับไอออนทองแดงเปอร์คลอเรตหนึ่งโมเลกุล ($\text{Cy7C4}:\text{Cu}^{2+} = 1:1$) จากนั้นจึงศึกษาค่าคงที่สมดุลของการเกิดไอออนเชิงซ้อน (association constant; K_{assoc}) โดยใช้สมการ Benesi-Hildebrand ตามสมการที่ 4 สามารถแสดงดังภาพที่ 74 และสามารถคำนวณค่า K_{assoc} ได้เท่ากับ $6.42 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$

การคำนวณค่าคงที่สมดุลของการเกิดไอออนเชิงซ้อน (association constant; K_{assoc}) โดยใช้สมการ Benesi-Hildebrand [44] ทำได้โดยพลอตกราฟค่า $1/[\text{Cu}^{2+}]$ (แกน X) กับ $1/(I_0 - I)$ ที่จุดใดๆ (แกน y)

$$K_{\text{assoc}} = \frac{1}{\text{Slope } (I_0 - I_{\min})} \quad \text{สมการที่ 4}$$

เมื่อ I_0 = ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์เริ่มต้นที่ไม่มีไอออนทองแดงในสารละลาย

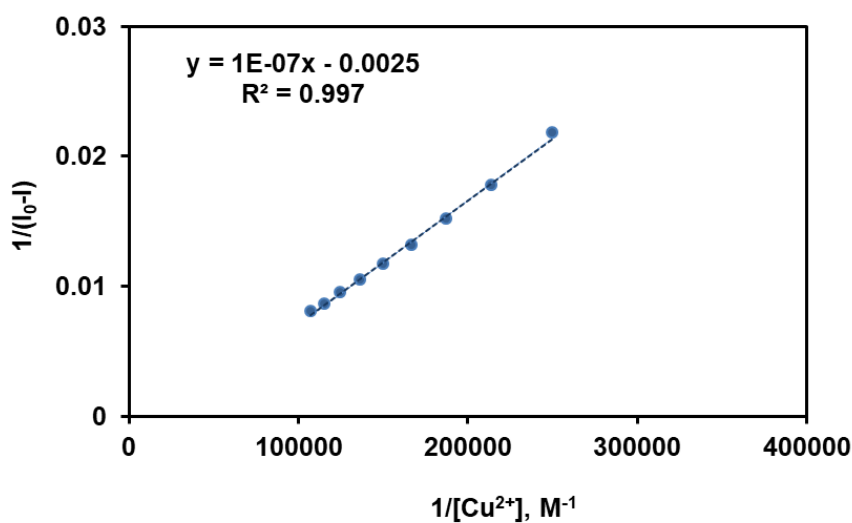
I = ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์หลังเติมไอออนที่ความเข้มข้นใดๆ

I_{\min} = ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์น้อยที่สุด

n = จำนวนเต็มใดๆ เช่น 1, 2 และ 3

ตารางที่ 8 ข้อมูลค่าความเข้มข้นของไอออนทองแดงที่เติมลงไป $[Cu^{2+}]$, ค่า $1/[Cu^{2+}]$ (ความเข้มข้นของไอออนทองแดงที่เติมลงไป) ค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์ **Cy7C4** และ ค่า $1/(I_0-I)$ ที่ได้จากการคำนวณ ของเซ็นเซอร์ **Cy7C4**, λ_{ex} เท่ากับ 640 nm

$[Cu^{2+}]$, M	Intensity (I)	$1/[Cu^{2+}]$, M^{-1} (n=1)	$1/(I_0-I)$
4.0000×10^{-6}	111.14	2.50×10^5	0.0219
4.6667×10^{-6}	100.62	2.15×10^5	0.0178
5.3333×10^{-6}	91.20	1.88×10^5	0.0152
6.0000×10^{-6}	81.01	1.67×10^5	0.0132
6.6667×10^{-6}	71.45	1.50×10^5	0.0117
7.3333×10^{-6}	61.60	1.36×10^5	0.0105
8.0000×10^{-6}	51.68	1.25×10^5	0.0095
8.6667×10^{-6}	41.12	1.15×10^5	0.0086
9.3333×10^{-6}	33.26	1.07×10^5	0.0081



ภาพที่ 74 กราฟจากการคำนวณตามสมการ Benesi-Hildebrand ของเซ็นเซอร์ **Cy7C4** (n=1)
การคำนวณ

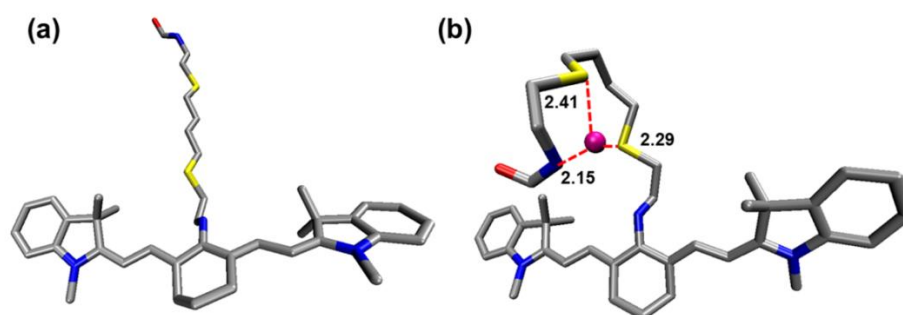
จากสมการที่ 4 กราฟได้สมการเส้นตรงคือ $y = 1.0 \times 10^{-7}x - 0.0025$; $R^2 = 0.997$

ซึ่ง slope = 1.0×10^{-7} , $I_0 = 156.9$, $I_{min} = 1.17$

ดังนั้น $K_{assoc} = 1/(1.0 \times 10^{-7}) \times (156.9 - 1.17)$
 $= 6.42 \times 10^4 M^{-1}$

ดังนั้นอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน ของเซ็นเซอร์ **Cy7C4** ต่อการดักจับไอออนทองแดงเป็นหนึ่งในหนึ่ง ($\text{Cy7C4}:\text{Cu}^{2+} = 1:1$) และสามารถคำนวณค่าคงที่สมดุลของการเกิดไอออนเชิงซ้อน, K_{assoc} ได้เท่ากับ $6.42 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ($n=1$)

2.10 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซ็นเซอร์ **Cy7C4** ในสภาวะก่อนและหลังการจับไอออนทองแดงด้วยเทคนิคทาง Molecular modeling



ภาพที่ 75 แสดงลักษณะโครงสร้างด้วยเทคนิค molecular modeling ของ a) โครงสร้างของเซ็นเซอร์ **Cy7C4** ในสภาวะก่อนดักจับไอออนทองแดง b) โครงสร้างของเซ็นเซอร์ **Cy7C4** ในสภาวะหลังดักจับไอออนทองแดง ($\text{Cy7C4}:\text{Cu}^{2+}$ อัตราส่วน 1:1)

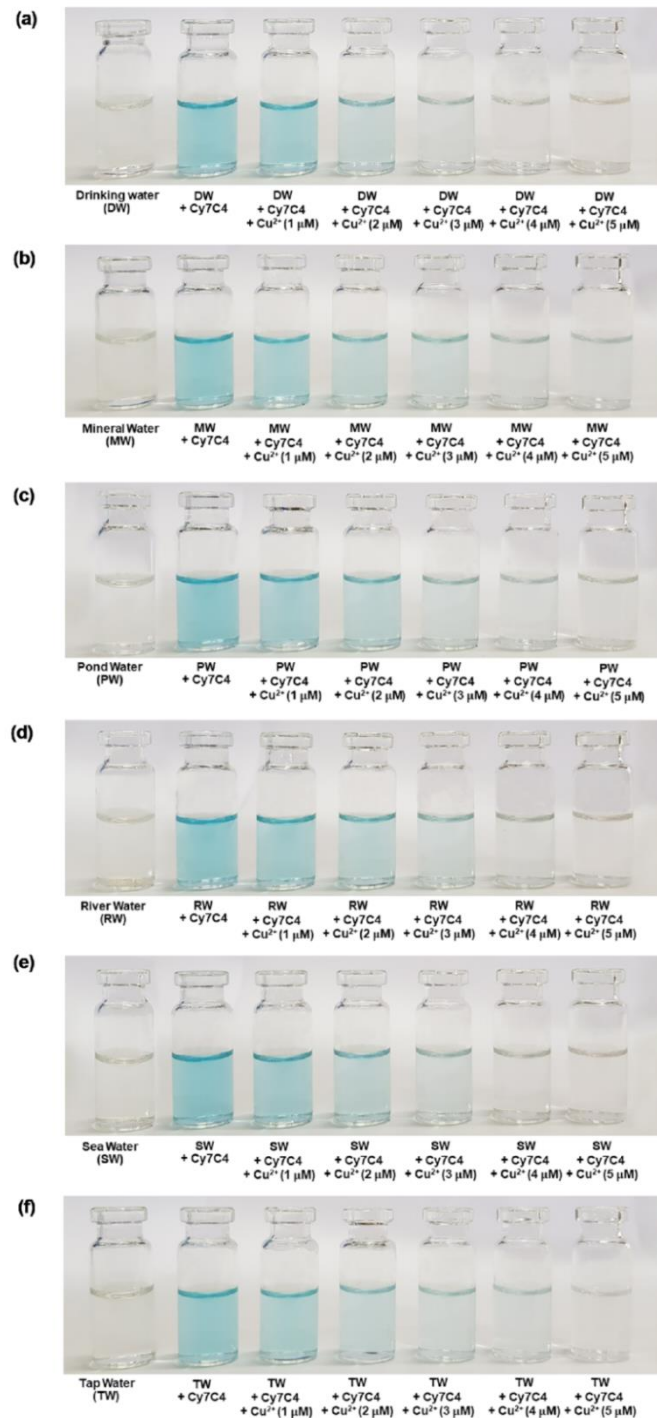
จากการศึกษาด้วยเทคนิค molecular modeling ของเซ็นเซอร์ **Cy7C4** ในสภาวะก่อนจับไอออนทองแดงในสารละลาย acetonitrile พบเกิดอันตรกิริยาระหว่างเซ็นเซอร์ **Cy7C4** และไอออนทองแดง โดยโครงสร้างของเซ็นเซอร์ **Cy7C4** ในสภาวะก่อนดักจับไอออนทองแดงจะมีลักษณะโครงสร้างดังภาพที่ 75a เมื่อเติมไอออนทองแดงลงในสารละลาย ไอออนทองแดงจะไปโคออดิเนตกับอะตอมของไนโตรเจน (N) และอะตอมของซัลเฟอร์ (S) ด้วยกระบวนการ electrostatic interactions โดยไอออนทองแดงจะเกิดโคออร์ดิเนตกับ 1 อะตอมไนโตรเจน (N) และ 2 อะตอมของซัลเฟอร์ (S) ในระยะทางเท่ากับ 2.15 Å, 2.41 Å และ 2.29 Å ตามลำดับ ดังภาพที่ 75b ซึ่งจากการศึกษานี้สามารถช่วยยืนยันว่าเซ็นเซอร์ **Cy7C4** สามารถดักจับไอออนทองแดงได้ในอัตราส่วน 1:1 ตรงตามผลการศึกษาด้วยเทคนิค Job's plot และในการคำนวณค่าคงที่สมดุลของการเกิดไอออนเชิงซ้อน, K_{assoc}

2.11 การทดสอบประสิทธิภาพการดักจับไอออนทองแดงของเซ็นเซอร์ **Cy7C4** ในน้ำตัวอย่าง

ทำการสังเกตการเปลี่ยนสีของสารละลายเซ็นเซอร์ด้วยตาเปล่า เพื่อดูความสามารถของเซ็นเซอร์ **Cy7C4** ในตัวทำละลายผสม 50% น้ำตัวอย่าง/acetonitrile สำหรับการตรวจวัดไอออนทองแดง ก่อนและหลังเติมไอออนทองแดง (1, 2, 3, 4 และ 5 μM) ในน้ำตัวอย่างจริง ประกอบด้วย

น้ำดื่ม (DW), น้ำแร่ (MW), น้ำจากอ่างเก็บน้ำ (PW) ,น้ำจากแม่น้ำ (RW), น้ำทะเล (SW) และ น้ำประปา (TW) แสดงในภาพที่ 76 จะเห็นว่าน้ำตัวอย่างทุกชนิดจะใสไม่มีสี ในขณะที่ตัวอย่างน้ำที่มีเซ็นเซอร์ **Cy7C4** สารละลายจะเป็นสีฟ้า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไอออนทองแดงในปริมาณต่างๆ ให้กับตัวอย่างน้ำในแต่ละตัวอย่างทำให้สีของสารละลายเปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นสีฟ้าอ่อน ยิ่งปริมาณของ ไอออนทองแดงสูงขึ้นสารละลายก็จะเปลี่ยนเป็นใสไม่มีสี แสดงให้เห็นว่าเซ็นเซอร์ **Cy7C4** สามารถตรวจวัดปริมาณของไอออนทองแดงในน้ำตัวอย่างจริงได้ด้วยตาเปล่าได้อย่างง่ายดาย



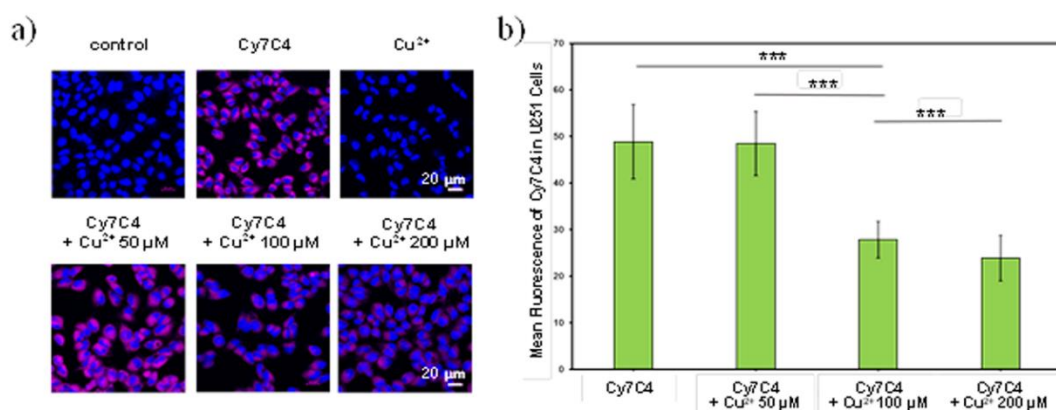


ภาพที่ 76 การเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเซ็นเซอร์ Cy7C4 (10 μM) ในน้ำ ตัวอย่าง (a) น้ำดื่ม (DW) (b) น้ำแร่ (MW) (c) น้ำจากอ่างเก็บน้ำ (PW) (d) น้ำจากแม่น้ำ (RW) (e) น้ำทะเล (SW) (f) น้ำประปา (TW) ก่อนและหลังเติม Cu²⁺ (1, 2, 3, 4 และ 5 μM)

2.12 การทดสอบประสิทธิภาพการดักจับไอออนทองแดงของเซ็นเซอร์ Cy7C4 ในเซลล์สิ่งมีชีวิต

เซลล์มะเร็งสมองกลีโอม่า (U251) ถูกเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหาร DMEM/high glucose ที่มีส่วนผสมของ FBS (10%) และยาปฏิชีวนะ เพนิซิลลิน-สเตรปโตมัยซิน (penicillin-streptomycin) ความเข้มข้น 1% ซึ่งขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ถูกบ่มที่ 37°C ภายใต้บรรยากาศที่มีความชื้น และมีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ในการเตรียมเซลล์สำหรับการถ่ายภาพฟลูออเรสเซนซ์ เซลล์จะถูกเลี้ยงในถาด 8 หลุมที่มีฝาปิดกระຈก โดยมีเซลล์เริ่มต้นที่ 7,000 เซลล์ต่อหลุม โดยบ่มไว้ที่ตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิและความชื้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นอาหารใหม่ที่มี $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ อยู่ โดยความเข้มข้นที่ใช้คือ 50, 100, และ 200 ไมโครโมลาร์ และเซลล์ถูกบ่มต่อเป็นเวลา 20 ชั่วโมง หลังจากนั้นเซลล์ถูกล้างด้วย PBS และบ่มต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี Cy7C4 อยู่ 10 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้น เซลล์ถูกล้างด้วย PBS สามรอบ แล้วย้อมนิวเคลียสของเซลล์ด้วย Hoechst 33342 เป็นเวลา 10 นาที ก่อนที่จะนำไปถ่ายรูปแสงฟลูออเรสเซนซ์ด้วยกล้องคอนโฟคอลโดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยายขนาด 60 เท่าผ่านน้ำมัน และกระตุ้น Cy7C4 ด้วยเลเซอร์ 641 นาโนเมตร และ Hoechst 33342 ด้วยเลเซอร์ 405 นาโนเมตร สำหรับการวิเคราะห์รูปถ่าย ใช้ซอฟต์แวร์ imageJ เวอร์ชัน 1.52V

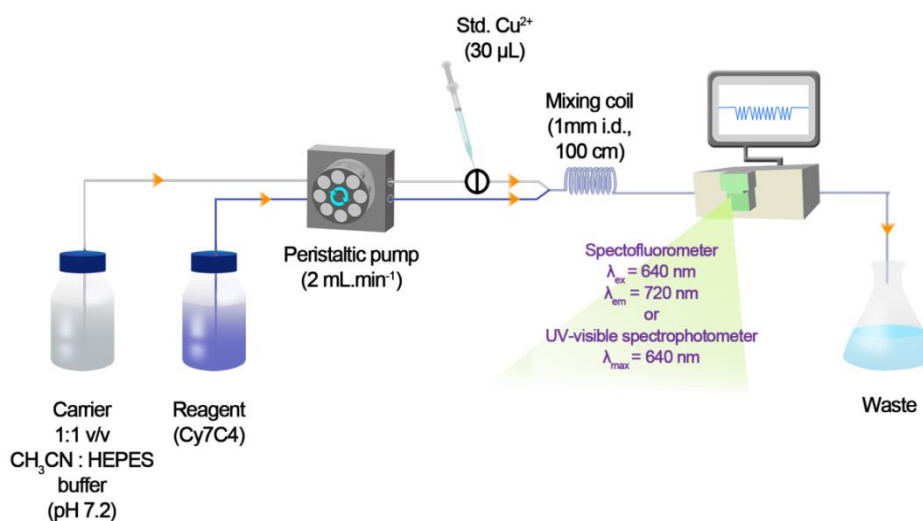
การประยุกต์ใช้งานของเซ็นเซอร์ Cy7C4 ในกลุ่มเซลล์มนุษย์กลีโอบลาสโตมา แอสโตรไซต์โตมา (glioblastoma astrocytoma, U251) ในภาพที่ 77 จากผลการทดลองพบว่าในสภาวะที่ไม่มีไอออนทองแดงภายในเซลล์ เซ็นเซอร์ Cy7C4 จะแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่สูง แต่เมื่อมีปริมาณไอออนทองแดงในเซลล์ที่เพิ่มขึ้น เซ็นเซอร์ Cy7C4 จะแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ต่ำลงแสดงให้เห็นว่าเซ็นเซอร์ Cy7C4 สามารถใช้ตรวจวัดไอออนทองแดงภายในเซลล์สิ่งมีชีวิตได้ โดยมีการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์แบบ ON-OFF fluorescence switch เมื่อดักจับไอออนทองแดงเช่นเดียวกับในระบบสารละลาย



ภาพที่ 77 ภาพการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ภายในเซลล์ U251 a) control cells; บ่มด้วย Cy7C4 (10 μM); บ่มด้วย Cu(ClO₄)₂; การบ่มด้วย Cu(ClO₄)₂ (50, 100 และ 200 μM) เป็นเวลา 20 ชั่วโมงก่อน บ่มด้วย Cy7C4 (10 μM) อีก 30 นาที b) ข้อมูลการเรืองแสงของเซลล์ U251 (n = 40) ที่บ่มด้วย Cy7C4 (10 μM) ก่อนและหลังเติม Cu²⁺ (50-200 μM) และมีการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้การทดสอบแบบ Student's two tailed t-test (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)

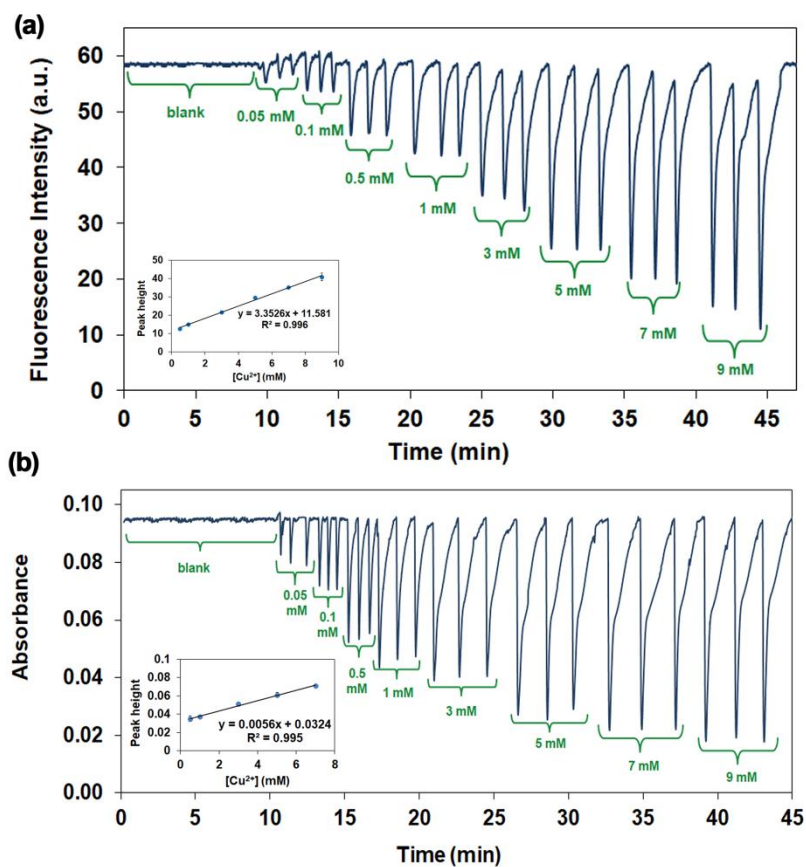
2.13 การประยุกต์ใช้งานของเซ็นเซอร์ Cy7C4 ในการตรวจวัดไอออนทองแดงโดยการวิเคราะห์แบบฉีดไหล (flow injection analysis, FIA)

เซ็นเซอร์ Cy7C4 ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในระบบ flow injection analysis (FIA) เพื่อใช้ในการตรวจวัดไอออนทองแดงโดยระบบอัตโนมัติและเพื่อความรวดเร็วในการตรวจวัด ส่วนประกอบพื้นฐานของระบบ FIA แสดงดังภาพที่ 78 โดยสังเขป โดยที่ใช้สารละลายของเซ็นเซอร์ Cy7C4 (40 ไมโครโมลาร์) เป็นรีเอเจนต์ร่วมกับสารละลายผสมระหว่าง HEPES buffer เข้มข้น 5 mM pH 7.2 และ acetonitrile (50:50 v/v) และอัตราการไหล 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที (ml/min) โดยเริ่มแรก 30 ไมโครลิตรของมาตรฐาน Cu²⁺ หรือสารละลายตัวอย่างถูกฉีดเข้าไปในวาล์วหัวฉีด 6-port จากนั้นจึงผสมให้เข้ากันกับรีเอเจนต์ในหลอดวัด (1.0 mm. i.d., 100 cm.) ต่อมา สารละลายผสมผ่านเครื่องวิเคราะห์สเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ (spectrofluorometer) หรือ UV-Vis สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis spectrophotometer) แล้วส่งผลให้สัญญาณตอบสนองโดยอัตโนมัติ



ภาพที่ 78 แผนผังอย่างง่ายของระบบ flow injection analysis (FIA)

การประยุกต์ใช้งานของเซ็นเซอร์ **Cy7C4** ในการตรวจวัดไอออนทองแดงในเทคนิคโฟล อินเจคชั่น อะนาลิซิส (flow injection analysis, FIA) ในภาพที่ 79 แสดงสัญญาณและเส้นโค้งการสอบเทียบที่ได้จาก (ภาพที่ 79a) FIA-spectrofluorometer และ (ภาพที่ 79b) FIA-spectrophotometer ซึ่งผลการทดลองใน ภาพที่ 79a แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณไอออนทองแดงในรีเอเจนต์ จะลดความเข้มของการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ มีค่าต่ำที่สุดที่วิเคราะห์ได้ (limit of detection, LOD) เท่ากับ 0.15 mM โดยมี sample throughput เท่ากับ 33 ตัวอย่างต่อชั่วโมง และในภาพที่ 79b แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณไอออนทองแดงในรีเอเจนต์ จะมีค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลง โดยมีค่าต่ำที่สุดที่วิเคราะห์ได้ (LOD) เท่ากับ 0.45 mM โดยมี sample throughput เท่ากับ 39 ตัวอย่างต่อชั่วโมง สำหรับเทคนิค FIA แม้ว่าจะมีค่าต่ำที่สุดที่วิเคราะห์ได้ค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับวิธีการแบบ batch analysis แต่เทคนิคนี้ก็มีข้อดีตรงที่สามารถวัดตัวอย่างได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น และจากผลการทดลองยังทำให้เห็นถึงแนวทางการพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สำหรับสารฟลูออเรสเซนซ์เพื่อใช้ตรวจวัดไอออนโลหะได้อีกด้วย



ภาพที่ 79 a) แสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ อิมิสชัน ที่ 720 nm b) ค่าการดูดกลืนแสงที่ λ_{max} 640 nm ที่เดิมไอออนทองแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยมีฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ Cy7C4 ใน flow injection analysis

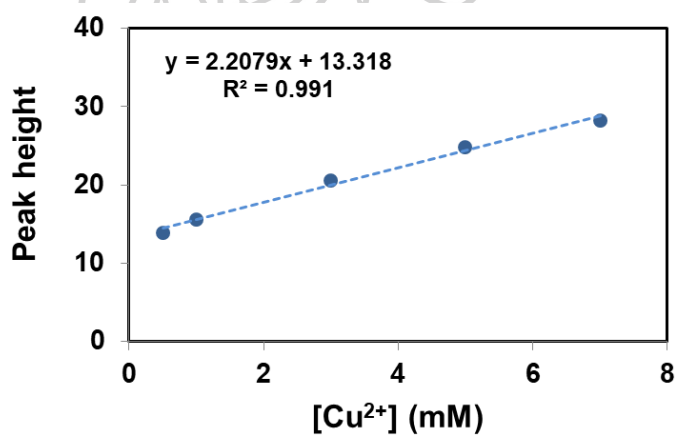
นอกจากนี้เซ็นเซอร์ Cy7C4 ยังถูกนำไปใช้วิเคราะห์เชิงปริมาณเพื่อหาปริมาณของไอออนทองแดงในตัวอย่างสังเคราะห์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเคมี (chemical laboratory) โดยเปรียบเทียบกับการไตเตรทแบบไอโอดิเมตริก (reference iodometric titration) และเนื่องจากตัวอย่างส่วนใหญ่มีไอออนทองแดง และไอออนเหล็ก จึงใช้สารละลายโซเดียม ไพโรฟอสเฟต (sodium pyrophosphate) เป็นสารกำบัง (masking agent) ในเทคนิคการไตเตรท สำหรับ FIA-spectrofluorometry สารละลายเซ็นเซอร์จะถูกฉีดเข้าไปในระบบโดยตรงตารางที่ 9 แสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณไอออนทองแดงที่ได้จาก FIA-spectrofluorometry และการไตเตรทไอโอดิเมตริกโดยสอบเทียบกับกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของไอออนทองแดงในภาพที่ 80 จากการใช้การทดสอบแบบที (t -test) พบว่าทั้งสองวิธีให้ผลลัพธ์ที่ใกล้เคียงกัน (ค่า $t_{\text{statistic}} = 0.94$, $t_{\text{critical}} = 2.45$ (ระดับความน่าจะเป็น 95%)) ดังนั้นระบบ FIA จึงเป็นเทคนิคที่สะดวกรวดเร็วในการตรวจวัดปริมาณไอออน

ทองแดงและการใช้เซ็นเซอร์ชนิดนี้ไม่ต้องใช้สารกำบังสำหรับการหาปริมาณไอออนทองแดงอีกด้วย
อย่างถูกต้องและแม่นยำ

ตารางที่ 9 แสดงค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) การหาปริมาณไอออนทองแดงโดย
ใช้วิธีที่แตกต่างกัน

ตัวอย่าง	ปริมาณไอออนทองแดง (%w/v) ^a	
	วิธีที่นำเสนอ (FIA- spectrofluorimetry)	วิธีที่ใช้อ้างอิง (Iodometric titration)
1	0.475 ± 0.003	0.424 ± 0.031
2	0.514 ± 0.004	0.484 ± 0.053
3	0.462 ± 0.007	0.443 ± 0.013
4	0.476 ± 0.034	0.487 ± 0.004
5	0.476 ± 0.030	0.456 ± 0.004

^a mean ± S.D. จากการทำ 3 ซ้ำ



ภาพที่ 80 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของไอออนทองแดงที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง peak height ที่ความยาวคลื่น (λ_{em}) 720 nm และความเข้มข้นของทองแดงที่เติมลงไปที่ได้จากเทคนิค FIA-spectrofluorometer

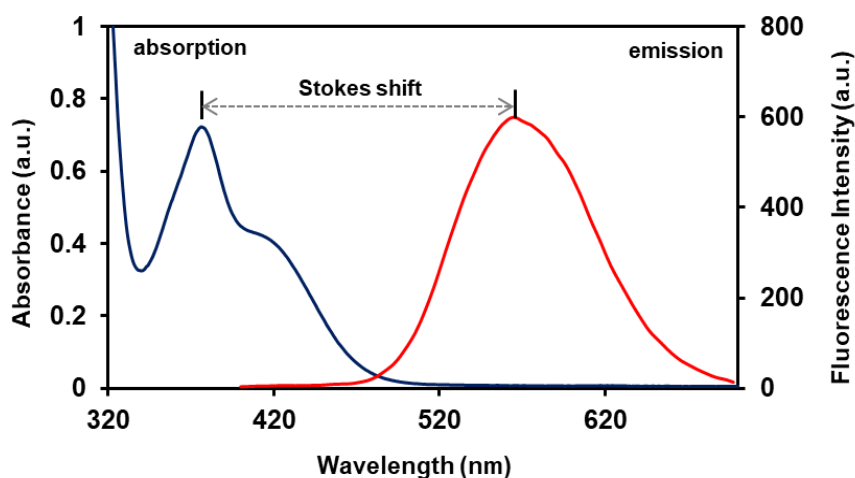
3. ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจวัดไอออนปรอทของสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ M201NHP ในสารละลายผสมระหว่าง H₂O และ acetonitrile ในอัตราส่วน 40:60 v/v

หลังจากฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ M201NHP ได้รับการยืนยันโครงสร้างแล้ว จึงนำเซ็นเซอร์ M201NHP ที่ได้มาศึกษาถึงประสิทธิภาพในการทำงานเกี่ยวกับการตรวจจับไอออนโลหะหนัก ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปีในสารละลายน้ำผสมสารละลายอินทรีย์ เพื่อหาความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) ความจำเพาะเจาะจงกับชนิดของไอออน (selectivity) เปรียบเทียบกับไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ อีกทั้งยังศึกษาถึงประสิทธิภาพในการตรวจจับไอออนปรอทในสภาวะที่มีไอออนรบกวนอื่นๆ อยู่ด้วย (competitive) ผลของค่า pH ที่มีผลต่อการดักจับไอออนปรอท และค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออน (association constant; K_{assoc})

โดยการนำเซ็นเซอร์ M201NHP ที่สังเคราะห์ได้มาศึกษาประสิทธิภาพในการตรวจจับไอออนปรอทและไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ในสารละลายผสม deionized water และ acetonitrile ในอัตราส่วน 40:60 v/v ซึ่งเตรียมเกลือคลอไรด์ของโลหะแต่ละชนิด ประกอบด้วยไอออนทองแดง ไอออนของโลหะทรานซิชัน ไอออนของโลหะอัลคาไลน์ และไอออนของโลหะอัลคาไลน์เอิร์ทชนิดต่างๆ ละลายในน้ำปราศจากไอออน (deionized water, DI)

3.1 การศึกษาความสามารถในการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต และการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของเซ็นเซอร์ M201NHP

การศึกษาค่าระยะห่างระหว่างความยาวคลื่นที่เซ็นเซอร์ดูดกลืนแสง (excitation wavelength) กับความยาวคลื่นที่เซ็นเซอร์คายแสง (emission wavelength) หรือ Stokes shift จะทำการศึกษาโดยใช้เครื่องมือ 2 ชนิด ได้แก่ เครื่อง UV-visible spectrometer สำหรับติดตามสัญญาณการดูดกลืนแสง และเครื่อง fluorescence spectrometer: Perkin Elmer Luminescence spectrometer model LS-50B เพื่อติดตามสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของเซ็นเซอร์ M201NHP โดยแสดงดังภาพที่ 81

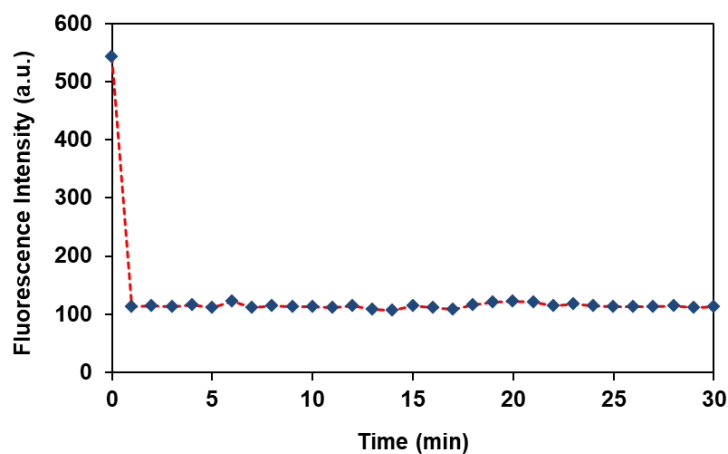


ภาพที่ 81 แสดงค่าความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสง และค่าความยาวคลื่นของการคายแสงของ เซ็นเซอร์ M201NHP (50 μM) ในสารละลายผสม H_2O และ acetonitrile ในอัตราส่วน 40:60 v/v

จากผลการทดลองภาพที่ 81 พบว่าค่าความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงที่สูงที่สุด (λ_{max}) ของเซ็นเซอร์ M201NHP มีค่าเท่ากับ 373 nm และค่าความยาวคลื่นของการคายแสงที่สูงที่สุด (λ_{em}) ของเซ็นเซอร์ M201NHP มีค่า 565 nm ทำให้มีค่า Stokes shift เท่ากับ 192 nm ซึ่งเป็นค่าที่สูงมาก โดยข้อดีของการมี Stokes shift กว้าง จะช่วยลดการเกิด self-absorption หรือการที่ เซ็นเซอร์ดูดพลังงานบางส่วนในช่วงความยาวคลื่นที่เซ็นเซอร์นั้นคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ออกมา ซึ่งจะส่งผลให้ประสิทธิภาพของการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ลดลง และยังช่วยลดปัญหาเรื่อง สัญญาณรบกวนจากแหล่งกำเนิดแสง (light source) ไม่ต้องใช้ตัวกรองแสง (filter) จึงช่วยลดต้นทุน และน้ำหนักของเครื่องมือที่ใช้ในภาคสนามได้ และสามารถตรวจวิเคราะห์ไอออนปรอทในตัวอย่าง ชีวภาพได้

3.2 การศึกษาเวลาตอบสนองของเซ็นเซอร์ M201NHP เมื่อตรวจวัดไอออนปรอท (time response for Hg^{2+} detection)

ผลการทดสอบเวลาการตอบสนองของเซ็นเซอร์ M201NHP เมื่อตรวจวัดไอออนปรอท หลังเติมไอออนปรอทในตัวทำละลายผสม H_2O และ acetonitrile ในอัตราส่วน 40:60 v/v แสดงดัง ภาพที่ 82

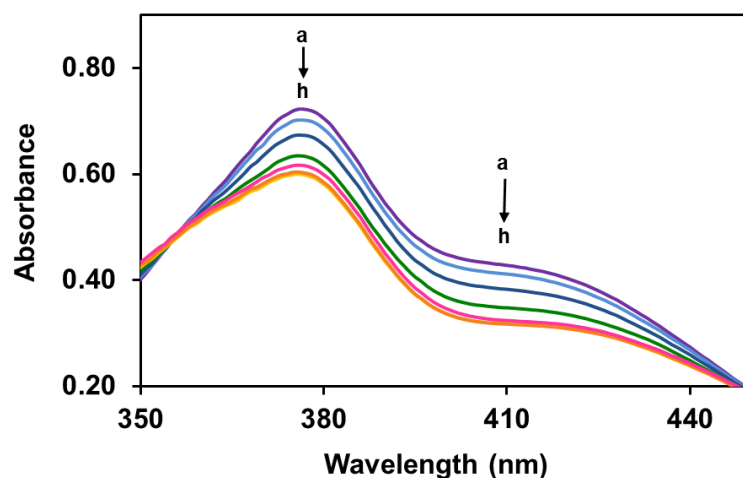


ภาพที่ 82 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง fluorescence intensity (λ_{ex} 373 nm, λ_{em} 565 nm) และ เวลาของเซ็นเซอร์ M201NHP (50 μ M) เมื่อเติมไอออนปรอทคลอไรด์ (10 μ M) ในสารละลายผสม H₂O และ acetonitrile ในอัตราส่วน 40:60 v/v

จากผลการทดลองภาพที่ 82 แสดง fluorescence intensity และเวลาตอบสนองของเซ็นเซอร์ เมื่อตรวจจับไอออนทองแดงที่ 565 nm ทุกๆ หนึ่งนาทิตั้งแต่เป็นเวลาที่ทั้งหมด 30 นาที ผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่า fluorescence intensity ของเซ็นเซอร์ลดลงและคงที่ทันทีเมื่อเติมไอออนปรอทลงไป ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะบันทึกการเปลี่ยนแปลงสเปกตรัมทันทีหลังจากเติมไอออนปรอท หรือไอออน โลหะอื่นๆ ลงไป

3.3 ผลการทดสอบสมบัติการดูดกลืนแสงในภาวะที่มีไอออนปรอทของเซ็นเซอร์ M201NHP

การดูดกลืนแสงของเซ็นเซอร์ M201NHP ได้ศึกษาในสารละลายผสม H₂O และ acetonitrile ในอัตราส่วน 40:60 v/v โดยได้ทำการติดตามสเปกตรัมของการดูดกลืนแสง (absorption spectra) ด้วยเครื่อง single-beam Agilent Technologies spectrophotometer (Cary 60 UV-Vis) ซึ่งใช้ความเข้มข้นของเซ็นเซอร์เท่ากับ 50 μ M และใช้ไอออนปรอทคลอไรด์ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 83

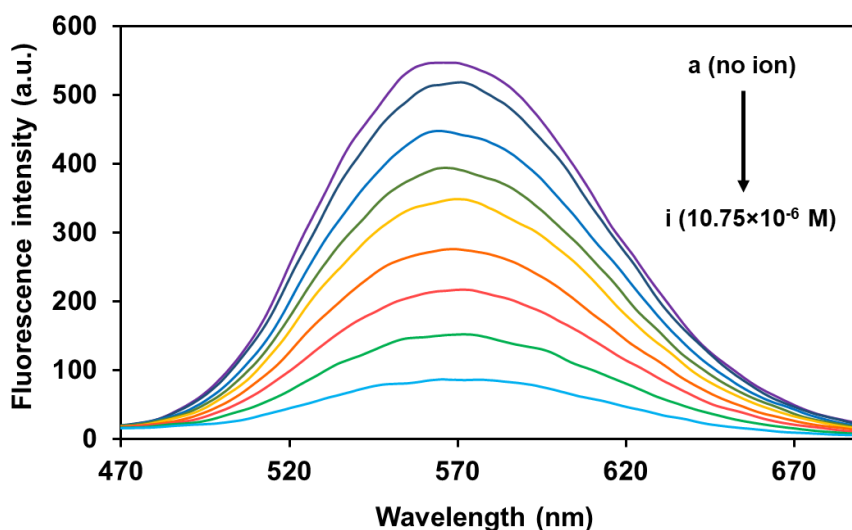


ภาพที่ 83 การดูดแสงของเซ็นเซอร์ M201NHP (50 μ M) สารละลาย H₂O และ acetonitrile ในอัตราส่วน 40:60 v/v ก่อนและหลังเติมไฮออนปรอทที่ความเข้มข้นต่างๆ a: 0 μ M, b: 3.3 μ M, c: 6.7 μ M, d: 10 μ M, e: 13 μ M, f: 17 μ M, g: 20 μ M และ h: 23 μ M

จากผลการทดลองภาพที่ 83 แสดงให้เห็นว่าการตรวจจับไฮออนปรอทของเซ็นเซอร์ M201NHP เป็นแบบระบบ ON-OFF ซึ่งเกิดจากการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนอันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซ็นเซอร์เมื่อจับกับไฮออนปรอทในสารละลายผสม H₂O และ acetonitrile ในอัตราส่วน 40:60 v/v โดยในสถานะที่ไม่มีไฮออนปรอทเซ็นเซอร์ M201NHP จะดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 373 nm และเมื่อมีการเติมไฮออนปรอทคลอไรด์ที่ความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น เซ็นเซอร์ M201NHP จะแสดงสัญญาณการดูดกลืนแสงที่ลดลง

3.4 ผลการทดสอบสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในสถานะที่มีไฮออนปรอทของเซ็นเซอร์ M201NHP

การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ M201NHP ได้ทำการศึกษาในสารละลายผสมระหว่าง H₂O และ acetonitrile ในอัตราส่วน 40:60 v/v โดยทำการติดตามการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence emission spectra) ด้วยเครื่อง Perkin-Elmer luminescence spectrometer LS5 เมื่อใช้ λ_{ex} เท่ากับ 373 nm ความเข้มข้นของเซ็นเซอร์ M201NHP เท่ากับ 50 μ M และใช้ไฮออนของปรอทในรูปเกลือคลอไรด์



ภาพที่ 84 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ (λ_{ex} 373 nm) ของเซ็นเซอร์ M201NHP (50 μ M) ในสารละลายผสม $H_2O:CH_3CN$ ในอัตราส่วน 40:60 v/v ก่อนและหลังเติมไอออนปรอทคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ, $[Hg^{2+}]$ ที่ a: 0.0 μ M, b: 0.75 μ M, c: 3.3 μ M, d: 4.5 μ M, e: 5.8 μ M, f: 7.0 μ M, g: 8.25 μ M, h: 9.5 μ M และ i: 11 μ M

จากผลการทดลองภาพที่ 84 พบว่า การตรวจจับไอออนปรอทของเซ็นเซอร์ M201NHP ให้สัญญาณคายแสงฟลูออเรสเซนซ์เป็นแบบระบบ ON-OFF ซึ่งเกิดจากการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนอันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซ็นเซอร์เมื่อจับกับไอออนปรอทในสารละลายผสม H_2O และ acetonitrile ในอัตราส่วน 40:60 v/v โดยในสถานะที่ยังไม่มีการเติมไอออนปรอท ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ M201NHP จะคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่มีความเข้มสูง แต่เมื่อมีการเติมไอออนปรอทที่มีความเข้มข้นต่างๆ เซ็นเซอร์ M201NHP จะคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่มีความเข้มต่ำลงในช่วงความยาวคลื่น 480-670 nm โดยความยาวคลื่นมากที่สุดของการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์เท่ากับ 565 nm ซึ่งการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ M201NHP จะแปรผกผันกับปริมาณไอออนปรอทในสารละลาย

3.5 ค่าความสามารถต่ำสุดของการตรวจจับไอออนปรอท (detection limit)

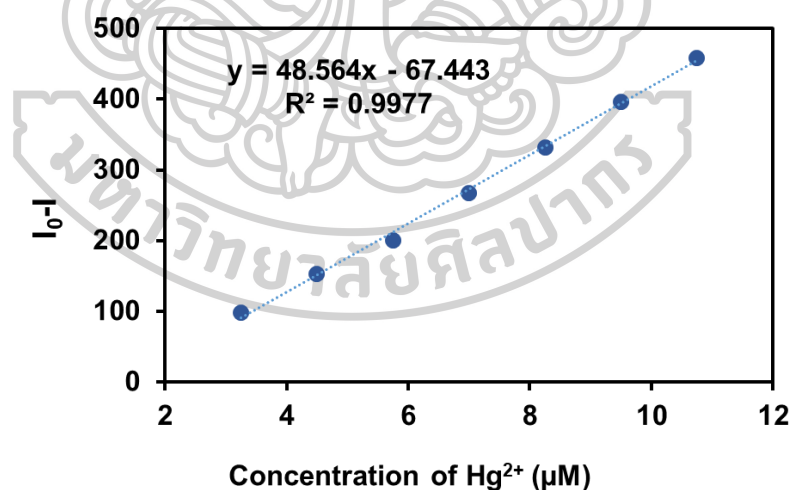
การคำนวณหาค่า detection limit กระทำโดยการพลอตกราฟค่าความเข้มข้นของปรอทที่เติมลงไปกับความเข้มต่างๆ (แกน x) กับค่าเฉลี่ยส่วนต่างๆของ fluorescence intensity (I_0-I) ที่จุดใดๆ (แกน y) เพื่อหาความชันของกราฟ (slope) จากนั้นนำมาคำนวณตามสมการที่ 1 โดยข้อมูลต่างๆ แสดงดังตารางที่ 10 และสร้างกราฟดังภาพที่ 85

$$K_{\text{assoc}} = \frac{1}{\text{Slope } (I_0 - I_{\text{min}})} \quad \text{สมการที่ 4}$$

โดยที่ SD_{blank} คือ ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ของ blank

ตารางที่ 10 แสดงข้อมูลที่ใช้ในการคำนวณค่า detection limit ของเซ็นเซอร์ M201NHP

[Hg ²⁺] (μM)	Fluorescence Intensity					
	1st	2nd	3rd	Avg.	$I_0 - I$	SD
0.00	546.23	546.3	546	546.18	0.00	0.157
3.25	448.15	446.17	449.94	448.09	98.09	1.886
4.50	393.43	393.50	391.10	392.68	153.50	1.366
5.75	346.81	344.19	344.67	345.22	200.96	1.395
7.00	278.17	279.49	279.15	278.94	267.24	0.685
8.25	212.27	214.00	215.20	213.82	332.36	1.473
9.50	149.04	150.12	149.75	149.64	396.54	0.549
10.75	85.12	86.96	89.91	87.33	458.85	2.416



ภาพที่ 85 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยส่วนต่างของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ ($I_0 - I$) ที่ความยาวคลื่น (λ_{em}) 565 nm และความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมลงไป

จากภาพที่ 85 จะเห็นได้ว่าค่า I_0-I กับความเข้มข้นของไอออนปรอทเป็นเส้นตรงในช่วง 3.25-10.75 μM ซึ่งถือเป็นช่วงการทำงาน และมีค่าต่ำสุดการตรวจจับไอออนปรอท (detection limit) เท่ากับ 9.70 nM หรือ 1.94 ppb

การคำนวณ จากกราฟได้สมการเส้นตรงคือ $y = 48.564x - 67.443$; $R^2 = 0.9977$ และจากการทดลองได้ค่า SD_{blank} เท่ากับ 0.157

ดังนั้นจากสมการที่ 1

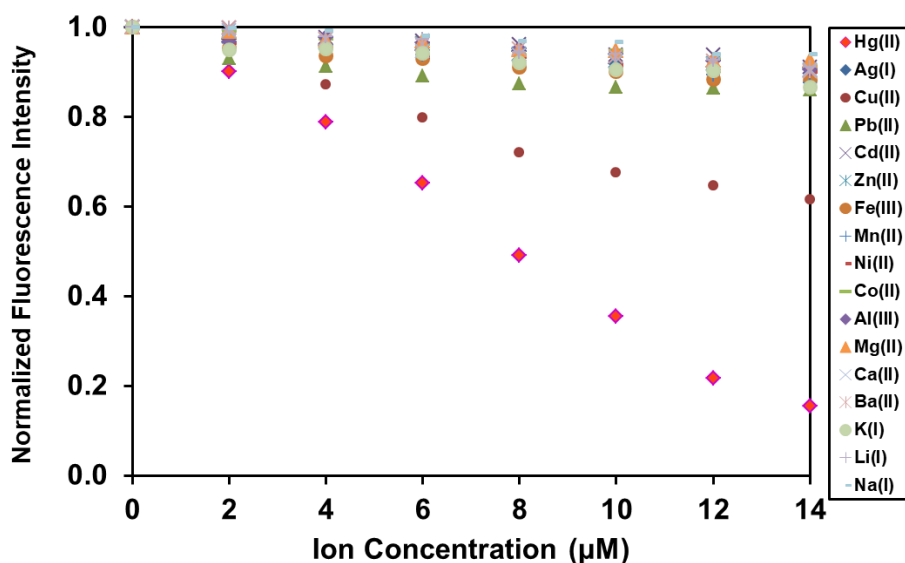
$$\begin{aligned} \text{Detection limit} &= (3 \times 0.157) / 48.564 \\ &= 9.70 \text{ nM} \\ &= 1.94 \text{ ppb} \end{aligned}$$

ดังนั้นค่าต่ำสุดการตรวจจับ (detection limit) กับไอออนปรอทของเซ็นเซอร์ M201NHP เท่ากับ 9.70 nM หรือ 1.94 ppb

3.6 ผลการทดสอบสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนปรอทเปรียบเทียบกับไอออนรบกวนอื่นๆ ของเซ็นเซอร์ M201NHP

การทดสอบการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ M201NHP ได้ทำการศึกษาในสารละลายผสม H_2O และ acetonitrile ในอัตราส่วน 40:60 v/v ในภาวะที่มีไอออนปรอทเปรียบเทียบกับในภาวะที่มีไอออนรบกวนอื่นๆ ในรูปเกลือคลอไรด์ ได้แก่ Hg^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Ag^+ , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , K^+ , Li^+ , Na^+ และ Al^{3+} ซึ่งผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 86

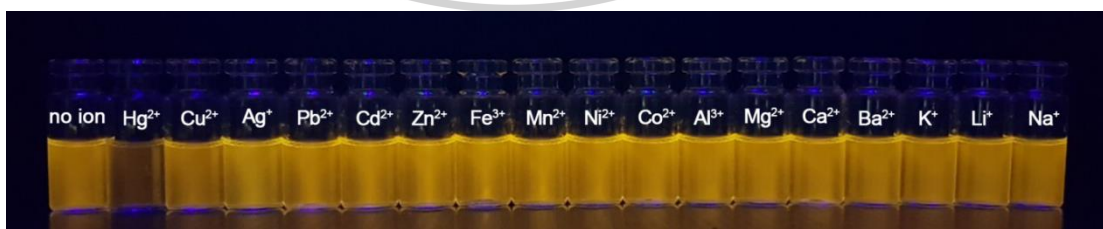
จากภาพที่ 86 แสดงค่า normalized fluorescence intensity (แกน y) ของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 565 nm และความเข้มข้นของไอออนชนิดต่างๆ (แกน x) พบว่าเมื่อมีการไตเตรตไอออนเกลือคลอไรด์ชนิดต่าง ๆ ลงไปในสารละลายเซ็นเซอร์ M201NHP มีเพียงไอออนปรอทเท่านั้นที่มีการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 565 นาโนเมตร แบบลดลง (ON-OFF) อย่างชัดเจน ในขณะที่ไอออนชนิดอื่น ๆ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงหรือเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยของสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ แสดงให้เห็นว่าสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ M201NHP มีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดไอออนปรอทเพียงชนิดเดียว



ภาพที่ 86 แสดงผลการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ (λ_{ex} 373 nm, λ_{em} 565 nm) ของเซ็นเซอร์ M201NHP (50 μ M) ในสารละลายผสม H₂O และ acetonitrile (40:60 v/v) ในภาวะที่มีไอออนโลหะของเกลือคลอไรด์ชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นต่างๆ

3.7 ภาพถ่ายของสารละลายเซ็นเซอร์ M201NHP ในภาวะที่มีไอออนปรอทเปรียบเทียบกับไอออนรบกวนอื่นๆ ภายใต้แสงยูวี

ภาพถ่ายของสารละลายเซ็นเซอร์ M201NHP ในภาวะที่มีไอออนปรอทและไอออนชนิดอื่นๆ ภายใต้แสงยูวี เป็นการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของเซ็นเซอร์ต่อไอออนปรอททีกววิธีหนึ่ง โดยสามารถสังเกตด้วยตาเปล่าเมื่อสารละลายอยู่ภายใต้แสงยูวี โดยสารละลายจะเตรียมในขวดโดยมีปริมาตร 2.00 มิลลิลิตร และในแต่ละขวดจะมีความเข้มข้นของไอออนชนิดต่างๆ ในปริมาณที่เท่ากัน ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 87



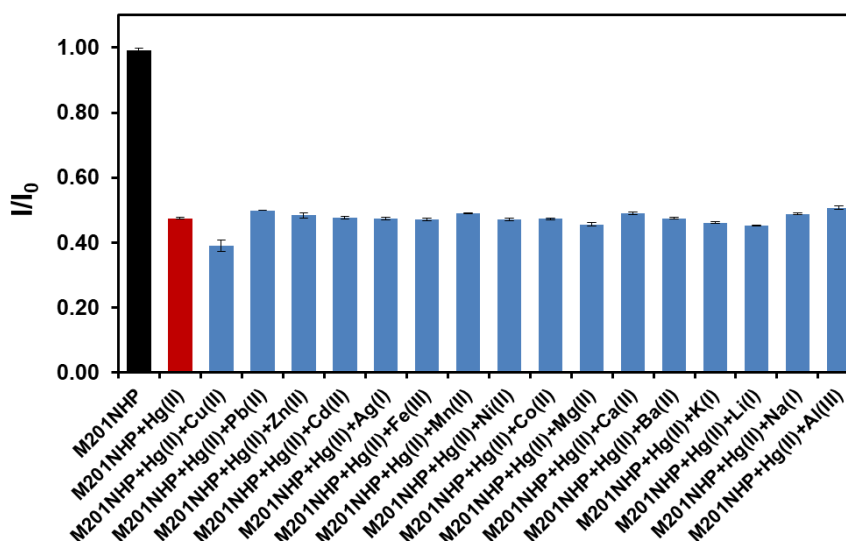
ภาพที่ 87 การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเซ็นเซอร์ M201NHP (50 μ M) ในสารละลายผสม H₂O และ acetonitrile (40:60 v/v) ก่อนและหลังการเติมไอออนโลหะชนิดต่างๆ ดังนี้ Hg²⁺, Cu²⁺, Ag⁺, Pb²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺, Fe³⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Al³⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Ba²⁺, K⁺, Li⁺ และ Na⁺ (20 μ M)

จากภาพที่ 87 แสดงการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเซ็นเซอร์ ภายใต้การกระตุ้นด้วยแสงยูวีของสารละลายฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ M201NHP หลังจากการเติมไอออนชนิดต่างๆ ลงไป แสดงให้เห็นว่าขั้วของสารละลายฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ M201NHP ที่มีการเติมไอออนปรอทมีการดับลงของการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์อย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับไอออนชนิดอื่นๆ ที่มีการเรืองแสงสีเหลืองอย่างชัดเจน โดยสามารถสังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงนี้ภายใต้แสงยูวี จึงสรุปได้ว่าสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ที่ได้มีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดไอออนปรอทเพียงชนิดเดียว ซึ่งสามารถตรวจวัดด้วยสายตาภายใต้แสงยูวีได้

3.8 ผลการทดสอบสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนปรอทรวมอยู่กับไอออนรบกวนอื่นๆ ของเซ็นเซอร์ M201NHP

การทดสอบการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ M201NHP ได้ทำการศึกษาในสารละลายผสม H_2O และ acetonitrile (40:60 v/v) ในสภาวะที่มีไอออนปรอทรวมอยู่กับไอออนรบกวนอื่นๆ ในรูปเกลือคลอไรด์ ได้แก่ Cu^{2+} , Ag^+ , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Al^{3+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , K^+ , Li^+ และ Na^+ โดยในสารละลายมีปริมาณความเข้มข้นไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ มากกว่าความเข้มข้นของไอออนปรอท 10 เท่า โดยแสดงผลการทดลองในรูปกราฟความสัมพันธ์ความเข้มข้นแสงฟลูออเรสเซนซ์ ระหว่างค่า นอร์มัลไลซ์ อิมิตชัน อินเทนซิตี (normalized emission intensity; I/I_0 , แกน y) และชนิดของไอออนเกลือคลอไรด์ชนิดต่างๆ (แกน x) ซึ่งผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 88

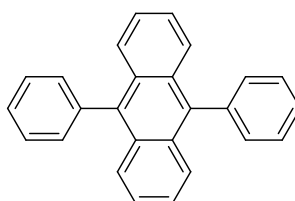
จากผลการทดลองพบว่าการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์เมื่อมีการเติมไอออนปรอท ในขณะที่สารละลายมีไอออนรบกวนชนิดอื่น ปริมาณ 10 เท่าของปริมาณไอออนปรอทที่เติมลงไป สารละลาย ดังผลการทดลองภาพที่ 88 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ M201NHP สามารถทำงานในการตรวจวัดไอออนปรอทได้ในภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ได้แก่ Cu^{2+} , Ag^+ , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Al^{3+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , K^+ , Li^+ และ Na^+ เจือปนในสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงกว่าไอออนปรอทถึง 10 เท่า โดยยังคงมีการเปลี่ยนแปลงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 565 nm แบบสลับลง (ON-OFF) อย่างชัดเจน จึงสรุปได้ว่าสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ M201NHP มีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดไอออนปรอทและยังสามารถทำงานได้ดีในภาวะที่มีไอออนรบกวนอื่นชนิดอื่น ๆ เจือปนอยู่สูงกว่าไอออนปรอทถึง 10 เท่า



ภาพที่ 88 แสดงผลการทดสอบการรบกวน (competitive experiments) ของไอออนโลหะชนิดต่างๆ ที่มีต่อค่าออร์มาลไลซ์ อีมิตชัน อินเทนซิตี (normalized emission intensity; I/I_0 ที่ 565 nm) (λ_{ex} 373 nm) ของสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ M201NHP และ Hg^{2+} (M201NHP: Hg^{2+}) ในสารละลายผสม H_2O และ acetonitrile (40:60 v/v) โดยความเข้มข้นของ [M201NHP] = 5 μM ; [Hg^{2+}] = 10 μM และไอออนโลหะ [M^{n+}] = 100 μM

3.9 ผลการหาค่าประสิทธิภาพเชิงควอนตัมทางฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence quantum yield) ของเซ็นเซอร์ M201NHP

จากการทดลองพบว่าเมื่อให้พลังงานแก่เซ็นเซอร์ M201NHP ที่ λ_{ex} 373 nm ทำให้เกิดการคายแสงฟลูออเรสเซนต์สูงสุดที่ 565 nm ในสารละลาย acetonitrile โดยในการหาค่า Quantum yield จะใช้ 9,10-diphenylanthracene ใน cyclohexane [10] โครงสร้างแสดงดังภาพที่ 89 เป็นสารมาตรฐานทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง UV-Vis และการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายเซ็นเซอร์ ในสภาวะก่อนและหลังเติมไอออนปรอท จากนั้นนำมาพล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและค่าคายแสงฟลูออเรสเซนต์ เพื่อใช้ในการหาค่าความชันของกราฟเส้นตรงตามสมการที่ 5

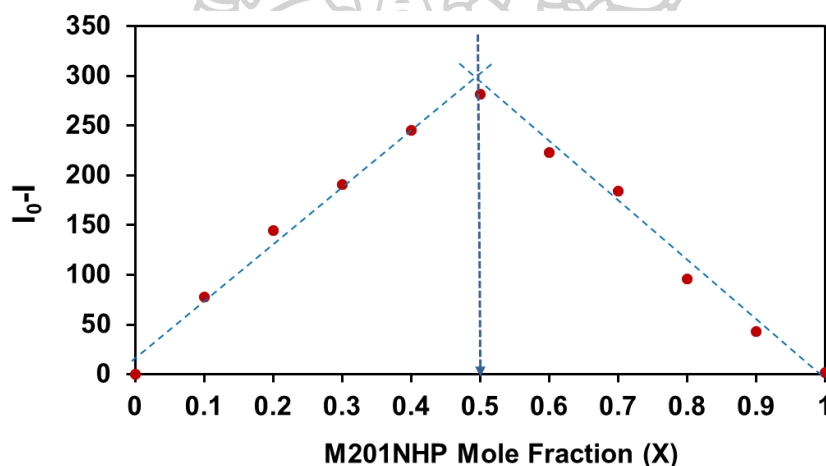


ภาพที่ 89 โครงสร้างทางเคมีของ 9,10-diphenylanthracene

จากการคำนวณพบว่าในสถานะที่ไม่มีไอออนปรอทเซ็นเซอร์ M201NHP มีค่า quantum yield เท่ากับ 0.58 และในสถานะที่มีการเติมไอออนปรอทมากเกินไป เซ็นเซอร์ M201NHP มีค่า quantum yield เท่ากับ 0.46 แสดงให้เห็นว่าหลังจากไอออนปรอทเกิดเป็นไอออนเชิงซ้อนแล้ว ไอออนปรอทจะสามารถรับอิเล็กตรอนจากเซ็นเซอร์ได้ ทำให้ไม่มีการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ซึ่งเป็นการหยุดการเกิดกระบวนการ photoinduced electron transfer (PET) ภายในโมเลกุล ทำให้มีการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ลดลง

3.10 อัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเซ็นเซอร์ M201NHP กับไอออนปรอท โดยวิธี Job's plot และค่าคงที่สมดุลของการเกิดไอออนเชิงซ้อน (association constant; K_{assoc})

การทดลองเพื่อหาอัตราส่วนระหว่างโมเลกุลของเซ็นเซอร์ M201NHP กับไอออนปรอทที่ใช้ในการเกิด binding ศึกษาโดยวิธี Job's plot ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 90



ภาพที่ 90 กราฟแสดงอัตราส่วนระหว่างโมเลกุลของเซ็นเซอร์ M201NHP กับไอออนปรอทที่ใช้ในการเกิด binding ศึกษาโดยวิธี Job's plot

จากผล Job's plot แสดงให้เห็นว่าเซ็นเซอร์ M201NHP หนึ่งโมเลกุลสามารถดักจับไอออนปรอทคลอไรด์ 1 โมเลกุล ($\text{M201NHP} : \text{Hg}^{2+} = 1:1$) จากนั้นจึงศึกษาค่าคงที่สมดุลของการเกิดไอออนเชิงซ้อน (Association constant; K_{assoc}) โดยใช้สมการ Benesi-Hildebrand ตามสมการที่ 4 สามารถแสดงดังภาพที่ 91 และสามารถคำนวณค่า K_{assoc} ได้เท่ากับ $7.09 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$

การคำนวณค่าคงที่สมดุลของการเกิดไอออนเชิงซ้อน (association constant; K_{assoc}) โดยใช้สมการ Benesi-Hildebrand [46] ทำได้โดยพลอตกราฟค่า $1/[\text{Hg}^{2+}]$ (แกน X) กับ $1/(I_0 - I)$ ที่จุดใดๆ (แกน y) ดังแสดงในตารางที่ 11

$$K_{\text{assoc}} = \frac{1}{\text{Slope } (I_0 - I_{\text{min}})} \quad \text{สมการที่ 4}$$

เมื่อ I_0 = ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์เริ่มต้นที่ไม่มีไอออนปรอทในสารละลาย

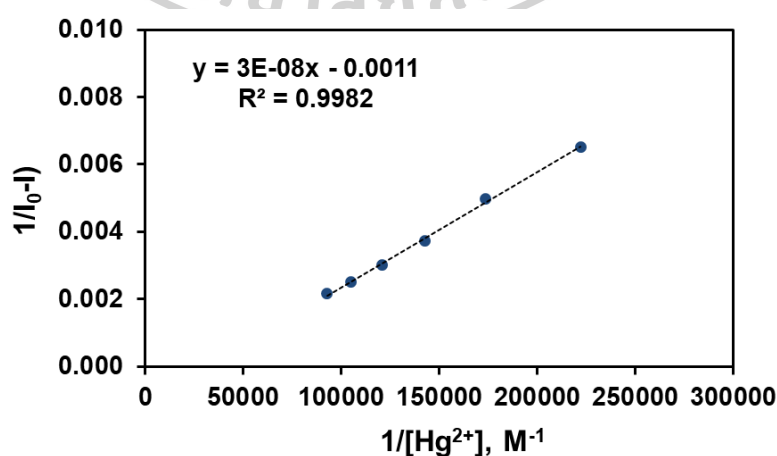
I = ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์หลังเติมไอออนปรอทที่ความเข้มข้นใดๆ

I_{min} = ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์น้อยที่สุด

n = จำนวนเต็มใดๆ เช่น 1, 2 และ 3

ตารางที่ 11 ข้อมูลค่าความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมลงไป [Hg^{2+}], ค่า $1/[\text{Hg}^{2+}]$ (ความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมลงไป) ค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์ M201NHP และ ค่า $1/(I_0 - I)$ ที่ได้จากการคำนวณของเซ็นเซอร์ M201NHP, λ_{ex} เท่ากับ 373 nm

[Hg^{2+}], M	Intensity (I)	$1/[\text{Hg}^{2+}]$, M^{-1} (n=1)	$1/(I_0 - I)$
4.5000×10^{-6}	392.68	2.22×10^5	0.0065
5.7500×10^{-6}	345.22	1.74×10^5	0.0050
7.0000×10^{-6}	278.94	1.43×10^5	0.0037
8.2500×10^{-6}	213.82	1.21×10^5	0.0030
9.5000×10^{-6}	149.64	1.05×10^5	0.0025
10.750×10^{-6}	87.33	0.93×10^5	0.0022



ภาพที่ 91 กราฟจากการคำนวณตามสมการ Benesi-Hildebrand ของเซ็นเซอร์ M201NHP เมื่อ $n=1$

การคำนวณ

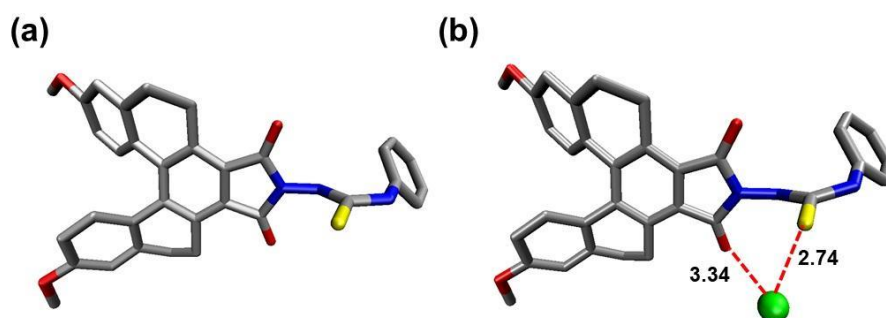
จากสมการที่ 4 กราฟได้สมการเส้นตรงคือ $y = 3.0 \times 10^{-8}x - 0.0011$; $R^2 = 0.998$

ซึ่ง slope = 3.0×10^{-8} , $I_0 = 546.18$, $I_{\min} = 76.16$

$$\begin{aligned} \text{ดังนั้น } K_{\text{assoc}} &= 1/(3.0 \times 10^{-8}) \times (546.18 - 76.16) \\ &= 7.09 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \end{aligned}$$

ดังนั้นอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของเซ็นเซอร์ M201NHP ต่อการดักจับไอออนปรอทเป็นหนึ่งในหนึ่ง ($\text{M201NHP}:\text{Hg}^{2+} = 1:1$) และสามารถคำนวณค่าคงที่สมดุลของการเกิดไอออนเชิงซ้อน, K_{assoc} ได้เท่ากับ $7.09 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ($n=1$)

3.11 ผลการทำนายการเปลี่ยนแปลงของเซ็นเซอร์ M201NHP ก่อนและหลังการจับไอออนปรอทโดยเทคนิค molecular modeling

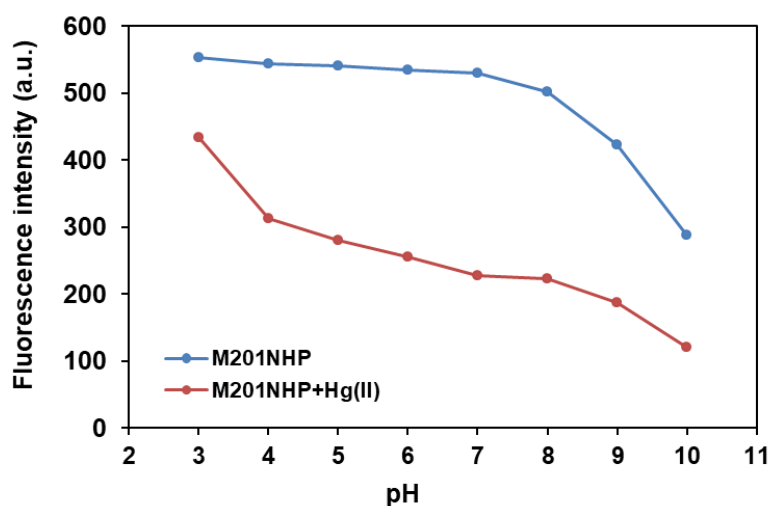


ภาพที่ 92 แสดงลักษณะโครงสร้างด้วยเทคนิค molecular modeling ของ a) โครงสร้างของเซ็นเซอร์ M201NHP ในสภาวะก่อนดักจับไอออนปรอท b) โครงสร้างของเซ็นเซอร์ M201NHP ในสภาวะหลังดักจับไอออนปรอท ($\text{M201NHP}:\text{Hg}^{2+}$ อัตราส่วน 1:1)

จากการศึกษาด้วยเทคนิค molecular modeling เพื่อทำนายโครงสร้างที่เสถียรที่สุดของเซ็นเซอร์ M201NHP ในสภาวะก่อนจับไอออนปรอทในสารละลาย acetonitrile จะมีลักษณะโครงสร้างดังภาพที่ 92a เมื่อเติมไอออนปรอทลงไป สารละลาย ไอออนปรอทจะไปโคออดิเนตกับอะตอมของออกซิเจน (O) และอะตอมของซัลเฟอร์ (S) ด้วยกระบวนการ electrostatic interactions โดยไอออนปรอทจะเกิดโคออร์ดิเนตกับ 1 อะตอมออกซิเจน (O) และ 1 อะตอมของซัลเฟอร์ (S) ในระยะทางเท่ากับ 3.34 Å และ 2.74 Å ตามลำดับดังภาพที่ 92b ซึ่งจากการศึกษานี้สามารถช่วยยืนยันว่าเซ็นเซอร์ M201NHP สามารถดักจับไอออนปรอทได้ในอัตราส่วน 1:1 ตรงตามผลการศึกษาด้วยเทคนิค Job's plot และในการคำนวณค่าคงที่สมดุลของการเกิดไอออนเชิงซ้อน, K_{assoc}

3.12 ผลการทดสอบการดักจับไอออนปรอทของเซ็นเซอร์ M201NHP ที่ค่า pH ต่างกัน

การศึกษาผลกระทบของค่า pH ต่อประสิทธิภาพการดักจับไอออนปรอทของเซ็นเซอร์ M201NHP จะทำการศึกษาในสารละลายผสม H₂O และ acetonitrile (40:60 v/v) ที่ค่า pH 3.0-10.0 แสดงผลการทดลองดังภาพที่ 93

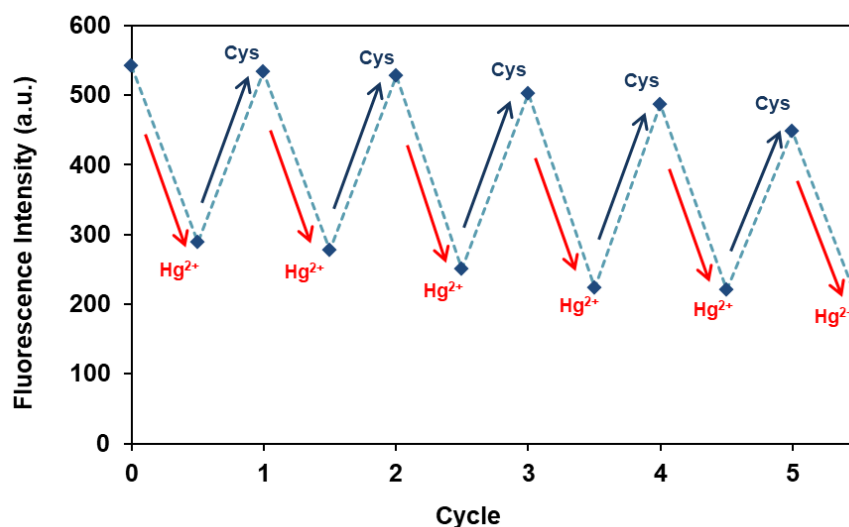


ภาพที่ 93 แสดงผลการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ (λ_{ex} 373 nm, λ_{em} 565 nm) ของเซ็นเซอร์ M201NHP (50 μ M) ในสารละลายผสม HEPES buffer และ acetonitrile (40:60 v/v) ในภาวะที่มีไอออนปรอท (10 μ M) ที่ pH ช่วง 3.0-10.0

จากภาพที่ 93 จะเห็นว่าเซ็นเซอร์ M201NHP มีการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเติมไอออนปรอทในช่วง pH 5.0-8.0 ซึ่งหากพิจารณาช่วงการเปลี่ยนแปลงค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ใน pH ช่วงดังกล่าวเป็นช่วง pH ที่ดี เนื่องจากอยู่ในช่วง pH เฉลี่ยในสิ่งมีชีวิตซึ่งอยู่ในช่วง 7.2-7.4 จากผลการทดลองนี้ทำให้เห็นว่า M201NHP มีศักยภาพสูงในการตรวจวัด Hg²⁺ ในตัวอย่างเซลล์ของสิ่งมีชีวิตได้

3.13 การศึกษาการนำกลับมาใช้ใหม่ของเซ็นเซอร์ M201NHP

การศึกษาการนำกลับมาใช้ใหม่ของเซ็นเซอร์ สามารถทำได้โดยการเติมสารที่มีแรงกระทำกับไอออนปรอทลงในสารละลายของเซ็นเซอร์ที่หลังเติมไอออนแล้ว เพื่อวิเคราะห์ใหม่ได้อีกครั้ง โดยในการศึกษานี้ใช้ cysteine (Cys) เป็นสารที่มีแรงกระทำกับไอออนปรอท ผลการทดลองดังภาพที่ 94



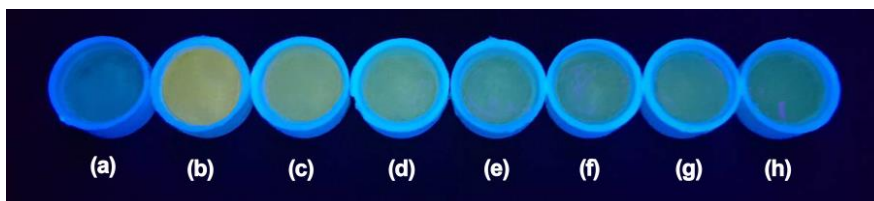
ภาพที่ 94 แสดงการนำกลับมาใช้ใหม่ของเซ็นเซอร์ M201NHP (50 μ M) โดยใช้ Cys เป็นสารที่มีแรงกระทำกับไอออนปรอทเมื่อเติม $[Hg^{2+}] = 6.7 \mu$ M และ $[Cys] = 20 \mu$ M

จากผลการทดลองภาพที่ 94 พบว่าเซ็นเซอร์สามารถตรวจจับไอออนปรอทได้และสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อีกครั้งโดยการเติม Cys ที่มีความเข้มข้นเป็น 3 เท่าของความเข้มข้นปรอท ซึ่งจะเห็นวก่อนที่จะเติมไอออนปรอท เซ็นเซอร์ M201NHP แสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่มีความเข้มสูงสุด เมื่อเติมไอออนปรอทลงไปจะทำให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ลดลงในค่าความเข้มแสงค่าหนึ่ง และเมื่อเติม Cys ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารที่มีแรงกระทำกับไอออนปรอทพบว่า สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์กลับขึ้นไปเท่ากับเริ่มต้นอีกครั้ง (เท่ากับสัญญาณของเซ็นเซอร์ M201NHP ก่อนเติมไอออนปรอทลงไป) แสดงให้เห็นว่าสารเชิงซ้อน M201NHP: Hg^{2+} แยกออกจากกันโดย Cys และกระบวนการนี้สามารถทำซ้ำได้อย่างน้อยห้าครั้งโดยการเติม Hg^{2+} และ Cys สลับกัน จากผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าการลดลงของการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ M201NHP จากการเติมไอออนปรอทสามารถย้อนกลับได้โดย Cys และยังคงมีประสิทธิภาพในการตรวจจับไอออนปรอทได้เหมือนเดิม ดังนั้นเซ็นเซอร์ M201NHP มีสมบัติในการนำกลับมาใช้ใหม่ได้ ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนในการสังเคราะห์ ทำให้ประหยัดงบประมาณในการวิเคราะห์ตัวอย่างได้

3.14 ผลการศึกษาความสามารถการตรวจวัดไอออนปรอทของเซ็นเซอร์ M201NHP ในเจลบำรุงผิวหน้า (brightening gel)

จากความสามารถการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ M201NHP ที่มีความไวและความจำเพาะเจาะจงที่สูงต่อไอออนปรอท จึงได้มีการนำเซ็นเซอร์ M201NHP มาทดสอบประสิทธิภาพการตรวจวัดไอออนปรอทในตัวอย่างจริง โดยทำการศึกษาในเจลบำรุงผิวหน้า

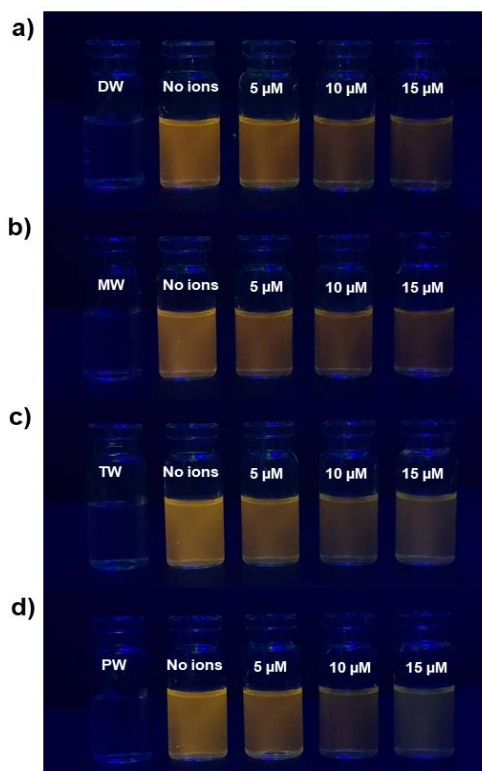
(brightening gel) โดยใช้ไอออนปรอทในรูปของเกลือคลอไรด์ เพื่อติดตามสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ **M201NHP** ผลการทดลองแสดงดังในภาพที่ 95 แสดงให้เห็นว่าภายใต้แสงยูวี **M201NHP** มีประสิทธิภาพในการตรวจวัดไอออนปรอทในตัวอย่างจริง เช่น เจลบำรุงผิวหน้า (brightening gel)



ภาพที่ 95 การเปลี่ยนแปลงสีภายใต้แสงยูวีของเซ็นเซอร์ **M201NHP** ดังนี้ (a) เจลเพิ่มความกระจ่างใส, (b) เจลเพิ่มความกระจ่างใส+**M201NHP** และ (c)-(h) เจลเพิ่มความกระจ่างใส+**M201NHP** โดยมีความเข้มข้นของไอออนปรอท 0.01, 0.03, 0.04, 0.05, 0.07 และ 0.13 mM

3.15 การทดสอบประสิทธิภาพการตรวจจับไอออนปรอทของเซ็นเซอร์ **M201NHP** ในน้ำตัวอย่าง

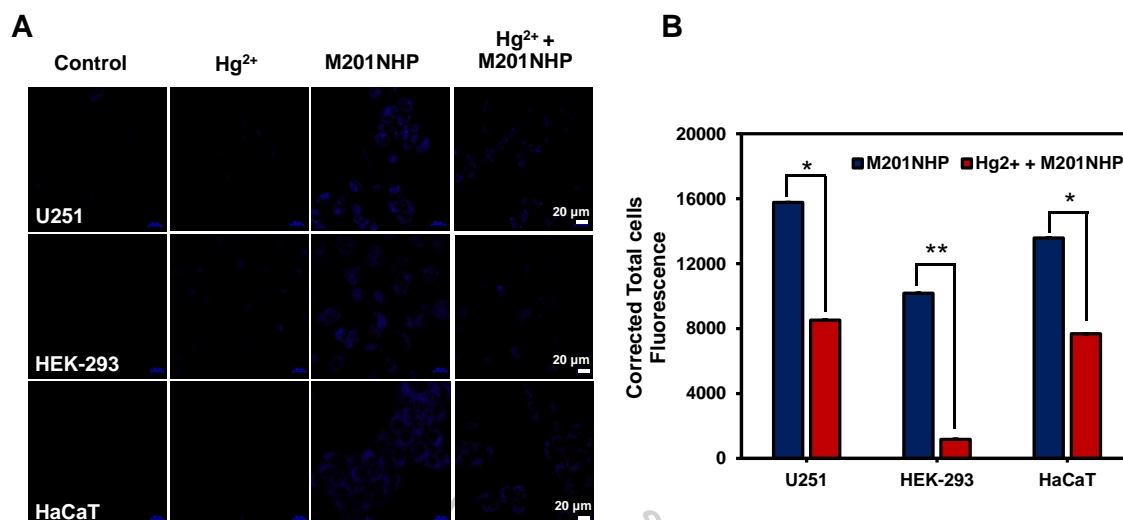
ทำการสังเกตการเปลี่ยนสีของสารละลายเซ็นเซอร์ด้วยตาเปล่าภายใต้แสงยูวี เพื่อดูความสามารถของเซ็นเซอร์ **M201NHP** ในตัวทำละลายผสม 40% น้ำตัวอย่าง/acetonitrile สำหรับการตรวจวัดไอออนปรอท ก่อนและหลังเติมไอออนปรอท (5, 10 และ 15 μM) ในน้ำตัวอย่างจริง ประกอบด้วย น้ำดื่ม (DW), น้ำแร่ (MW), น้ำประปา (TW) และน้ำจากแม่น้ำ (RW) แสดงในภาพที่ 96 จะเห็นได้ว่าภายใต้แสงยูวีน้ำตัวอย่างทุกชนิดจะใสไม่มีสี ในขณะที่ตัวอย่างน้ำที่มีเซ็นเซอร์ **M201NHP** สารละลายจะเรืองแสงสีส้ม เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไอออนปรอทในปริมาณต่างๆ ให้กับตัวอย่างน้ำในแต่ละตัวอย่างทำให้สารละลายเรืองแสงสีส้มน้อยลง ยิ่งปริมาณของไอออนปรอทสูงขึ้น สารละลายก็จะยิ่งเรืองแสงน้อยลง แสดงให้เห็นว่าเซ็นเซอร์ **M201NHP** สามารถตรวจวัดปริมาณของไอออนปรอทในน้ำตัวอย่างจริงได้ด้วยตาเปล่าได้อย่างง่ายดายภายใต้แสงยูวี



ภาพที่ 96 การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายภายใต้แสงยูวีของเซ็นเซอร์ M201NHP (50 μM) ในน้ำ ตัวอย่าง (a) น้ำดื่ม (DW) (b) น้ำแร่ (MW) (c) น้ำประปา (TW) และ (d) น้ำจากอ่างเก็บน้ำ (PW) ก่อนและหลังเติม Hg^{2+} (5, 10 และ 15 μM)

3.16 ผลการศึกษาความสามารถในการตรวจจับไอออนปรอทของเซ็นเซอร์ M201NHP ภายในเซลล์ U251, HEK-293 และ HaCaT

เนื่องจากไอออนปรอทมีความเป็นพิษสูงและสามารถสะสมอยู่ในอวัยวะภายในโดยเฉพาะสมอง ไต และผิวหนัง จึงได้นำเซ็นเซอร์ M201NHP มาทดสอบในเซลล์ U251, HEK-293 และ HaCaT (ซึ่งเป็น human glioblastoma astrocytoma cell, human embryonic kidney cell และ human immortalized keratinocyte cell) เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการตรวจจับไอออนปรอทในตัวอย่างเซลล์สิ่งมีชีวิต ผลการทดลองแสดงดังในภาพที่ 97

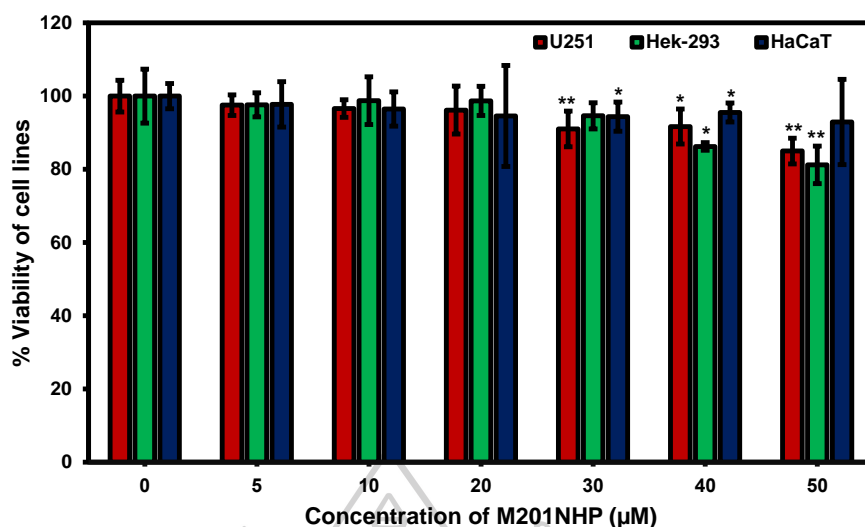


ภาพที่ 97 (A) ภาพการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ภายในเซลล์ U251, HEK-293 และ HaCaT ประกอบด้วย control cells; 20 μM ของ HgCl_2 ; 10 μM ของ M201NHP และ HgCl_2 ความเข้มข้น 20 μM ร่วมกับเซ็นเซอร์ M201NHP เข้มข้น 10 μM โดยทำการบ่ม HgCl_2 เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างออกด้วย PBS บัฟเฟอร์ 3 ครั้ง จากนั้นเติม M201NHP บ่มเป็นเวลา 30 นาที ก่อนที่จะล้างออกด้วย PBS บัฟเฟอร์ 3 ครั้ง และนำไปถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอล (B) ข้อมูลการเรืองแสงของเซลล์ U251, HEK-293 และ HaCaT ในเชิงปริมาณโดยใช้ โปรแกรม image J ($n = 30$) และมีการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้การทดสอบแบบ T-test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

จากผลการทดลองการตรวจจับไอออนปรอทของเซ็นเซอร์ M201NHP ภายในเซลล์ U251, HEK-293 และ HaCaT พบว่าเซลล์ที่มีเซ็นเซอร์ M201NHP จะเรืองแสงสีน้ำเงินออกมา ดังภาพที่ 97(A) และเมื่อมีการเติมไอออนปรอทที่ความเข้มข้น 20 μM จะส่งผลให้การคายเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ลดลง แสดงให้เห็นว่าสามารถนำเซ็นเซอร์ M201NHP มาประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดไอออนปรอทภายในเซลล์สิ่งมีชีวิตได้

3.17 ผลการศึกษาความเป็นพิษของเซ็นเซอร์ M201NHP ต่อเซลล์ U251, HEK-293 และ HaCaT

จากความสามารถการตรวจวัดไอออนปรอทของฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ M201NHP ภายในเซลล์สิ่งมีชีวิต U251, HEK-293 และ HaCaT จึงได้ทำการทดสอบความเป็นพิษของเซ็นเซอร์ที่อาจส่งผลต่อเซลล์ U251, HEK-293 และ HaCaT โดยการบ่มเซ็นเซอร์ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 5, 10, 20, 30, 40 และ 50 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังในภาพที่ 98

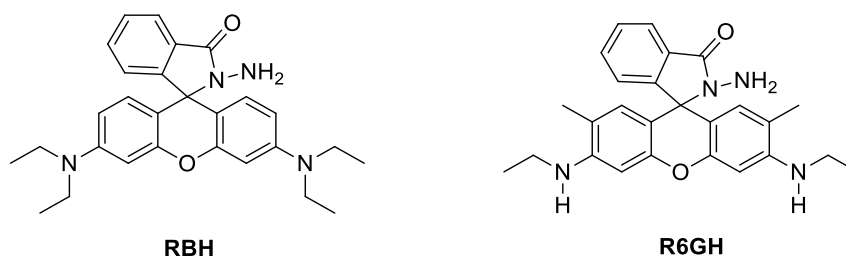


ภาพที่ 98 ผลของเซ็นเซอร์ M201NHP ต่อความมีชีวิตของเซลล์ U251, HEK-293 และ HaCaT (%) ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0-50 µM) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากผลการทดลองพบว่า เซ็นเซอร์ M201NHP ที่ความเข้มข้น 0-50 µM มีเปอร์เซ็นต์ cell viability ต่อเซลล์ U251, HEK-293 และ HaCaT มากกว่า 80% แสดงให้เห็นว่าเซ็นเซอร์ M201NHP มีความเป็นพิษต่อเซลล์ U251, HEK-293 และ HaCaT น้อยมาก ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดไอออนปรอทภายในเซลล์สิ่งมีชีวิตได้

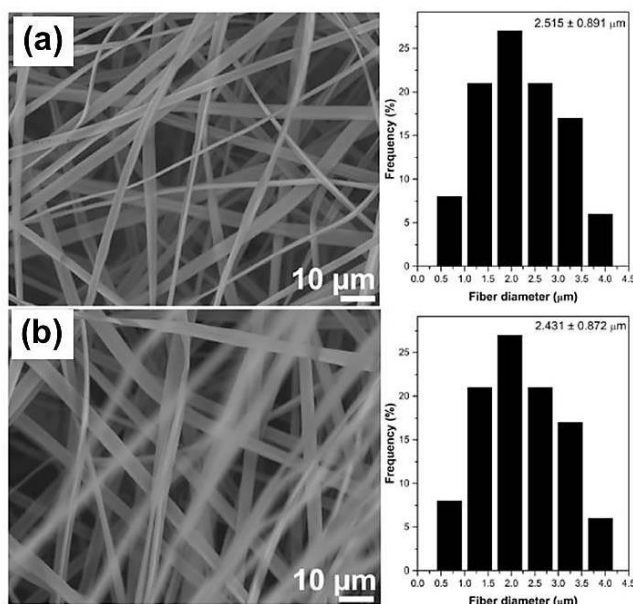
4. ผลการศึกษาการขึ้นรูปเป็นแผ่นเยื่อด้วยเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิง (electrospinning) จากการผสมสารเซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดไอออนปรอท

ในการศึกษาการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของแผ่นเยื่ออิเล็กโตรสปินที่ผสมเซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดไอออนปรอทนั้น (เซ็นเซอร์ที่ใช้คือ RBH และ R6GH มีโครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 99) ผู้วิจัยได้รับความอนุเคราะห์แผ่นเยื่ออิเล็กโตรสปินที่ผสมเซ็นเซอร์จาก ผศ.ดร. สุธินี เกิดเทพ ซึ่งมีผลการทดลองดังต่อไปนี้



ภาพที่ 99 โครงสร้างทางเคมีของ RBH และ R6GH

4.1 ผลการวิเคราะห์ลักษณะพื้นฐานวิทยาของเส้นใย ขนาด และการกระจายตัวของแผ่นเยื่ออิเล็กทรอนิกส์ PMMA/RBH และ PMMA/R6GH ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscopy, SEM)



ภาพที่ 100 ภาพถ่าย SEM และการกระจายขนาดของแผ่นเยื่ออิเล็กทรอนิกส์ a) PMMA/RBH และ b) PMMA/R6GH (sensor strips)

ผลการทดลองเมื่อขึ้นรูปแผ่นเยื่ออิเล็กทรอนิกส์ PMMA/RBH และ PMMA/R6GH (sensor strips) ด้วยเทคนิคอิเล็กทรอนิกส์หนึ่ง แสดงลักษณะพื้นฐานวิทยาของเส้นใย ขนาด และการกระจายตัวของแผ่นเยื่ออิเล็กทรอนิกส์ด้วย SEM พบว่าในตัวทำละลายผสม ethanol (ET): tetrahydrofuran (THF) ในอัตราส่วน 0.6:0.4 v/v สามารถขึ้นรูปเส้นใยแผ่นเยื่อได้ทั้ง PMMA/RBH และ PMMA/R6GH โดยมีขนาดเส้นใยขนาดเล็กและการกระจายตัวของขนาดเท่ากับ $2.515 \pm 0.891 \mu\text{m}$ และ $2.431 \pm 0.872 \mu\text{m}$ ตามลำดับดังแสดงในภาพที่ 100

4.2 ผลการทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนปรอทของแผ่นเยื่ออิเล็กทรอนิกส์ PMMA/RBH และ PMMA/R6GH ในภาวะที่มีไอออนปรอทที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้แสงปกติ (แสงขาว)

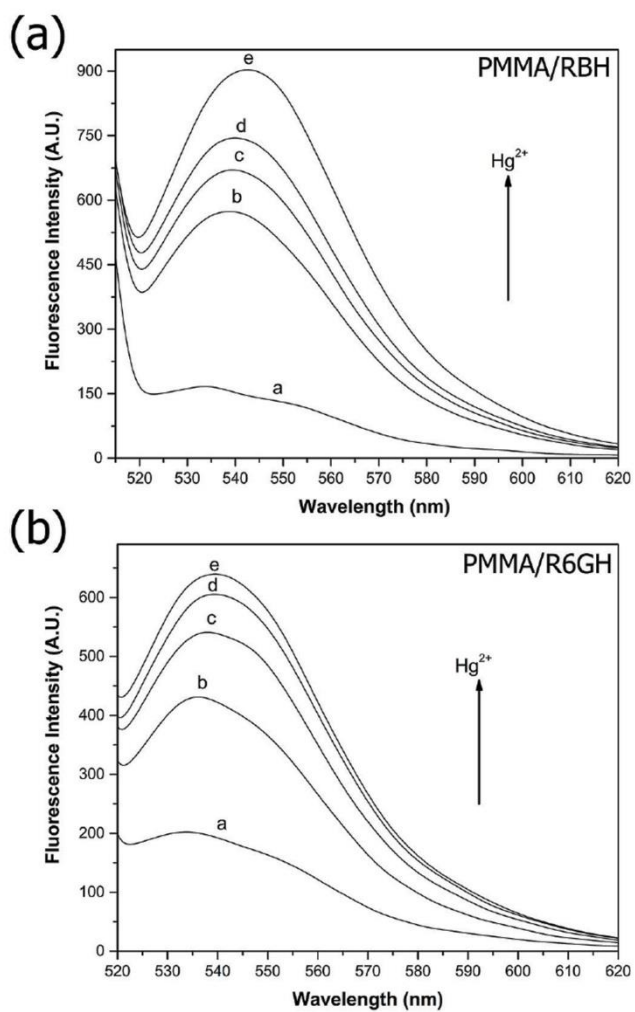
จากภาพที่ 101 แสดงภาพถ่ายภายใต้แสงปกติ (แสงขาว) ของแผ่นเยื่ออิเล็กทรอนิกส์ PMMA/RBH และ PMMA/R6GH ก่อนและหลังแช่สารละลายปรอทที่ความเข้มข้น $2 \mu\text{M}$ ถึง 20mM จะเห็นได้ว่าสีของแผ่นเยื่อทั้งสองชนิดจะมีสีขาว-ชมพูอ่อน-ชมพูเข้ม เมื่อความเข้มข้นของปรอทเพิ่มมากขึ้นตามลำดับ และสามารถมองเห็นการเปลี่ยนสีได้ด้วยตาเปล่าภายใต้แสงปกติ (แสงขาว)



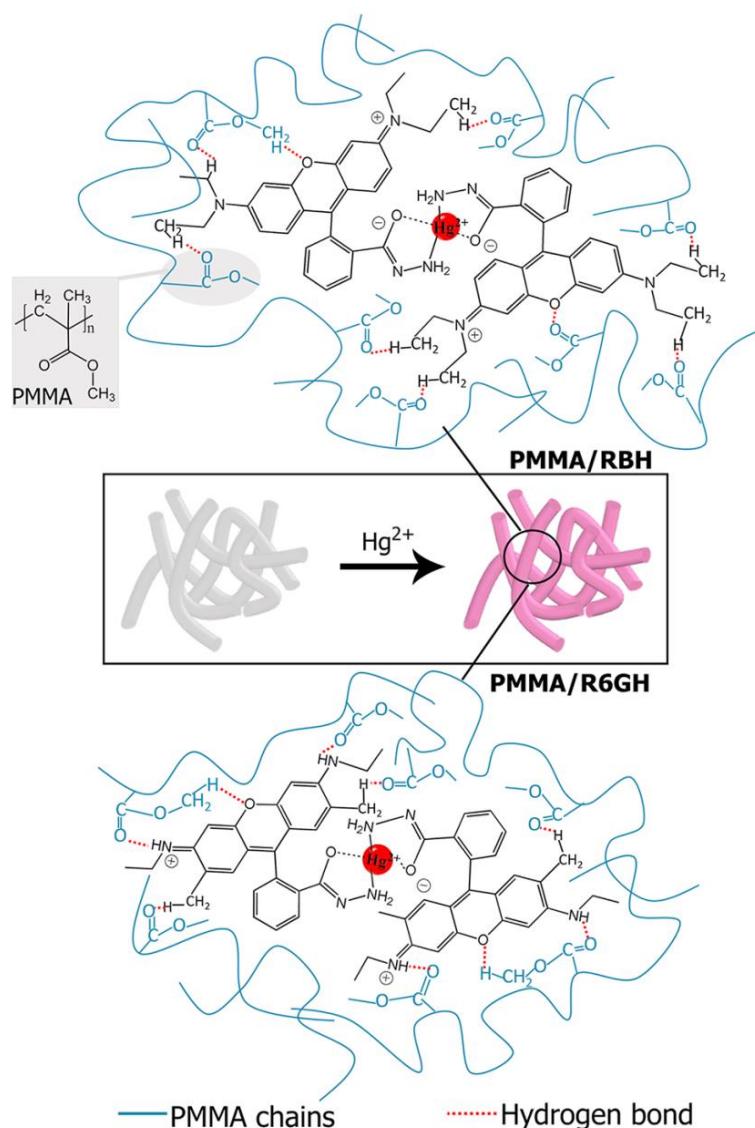
ภาพที่ 101 ภาพถ่ายแผ่นเยื่ออิเล็กโทรสปิน PMMA/RBH และ PMMA/R6GH ก่อนและหลังแช่ในสารละลายปรอทที่มีความเข้มข้นต่างๆ

4.3 ผลการทดสอบสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของแผ่นเยื่อ PMMA/RBH และ PMMA/R6GH ในสถานะที่มีไฮออนปรอทที่มีความเข้มข้นต่างๆ

การทดสอบการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของแผ่นเยื่อ PMMA/RBH และ PMMA/R6GH ในช่วงความยาวคลื่น 500-620 nm ผลการทดสอบแสดงในภาพที่ 102 ซึ่งมีค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงสุด (λ_{em}) เท่ากับ 545 nm จะเห็นได้ชัดว่าในสถานะที่ไม่มีไฮออนปรอทจะให้ค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ต่ำที่สุด แต่ภายหลังการแช่แผ่นเยื่อที่ความเข้มข้นต่างๆ ของไฮออนปรอทพบว่า การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของแผ่นเยื่อทั้งสองจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีปริมาณไฮออนปรอทที่เพิ่มขึ้น (OFF-ON) และพบว่าค่าต่ำสุดที่วัดได้ (detection limit) ของการตรวจวัดหาปริมาณไฮออนปรอทของแผ่นเยื่อ PMMA/RBH และ PMMA/R6GH มีค่าประมาณ 0.8-1.099 และ 3.6-4.3 ppb ตามลำดับ และภาพแสดงการเกิดสารประกอบ (complex) ของแผ่นเยื่อ PMMA/RBH และ PMMA/R6GH ภายหลังจากการจับกับไฮออนปรอทแสดงดังภาพที่ 103



ภาพที่ 102 แสดงการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ (λ_{ex} 500 nm) ของแผ่นเยื่อ PMMA/RBH และ PMMA/R6GH sensor strips ก่อนและภายหลังการแช่ในสารละลายปรอทเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ a) 0 μM , b) DI water, c) 2 μM , d) 20 μM และ e) 200 μM

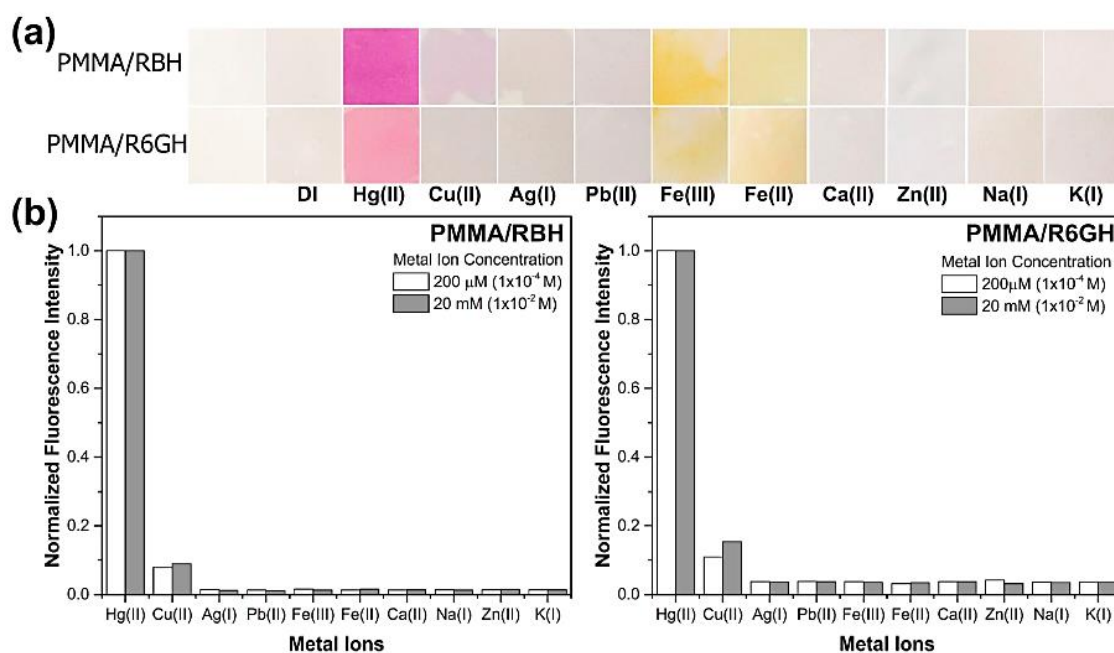


ภาพที่ 103 แสดงการเกิดสารประกอบ (complex) ของแผ่นเยื่อ PMMA/RBH และ PMMA/R6GH sensor strips ภายหลังจากการจับกับไอออนปรอท

4.4 ผลการทดสอบสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของแผ่นเยื่อ PMMA/RBH และ PMMA/R6GH ในสถานะที่มีไอออนปรอทและไอออนชนิดอื่นๆ ในสารละลาย

เมื่อนำแผ่นเยื่อแช่ในสารละลายไอออนต่างๆ คือ Hg²⁺, Cu²⁺, Ag⁺, Pb²⁺, Fe³⁺, Fe²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺, Na⁺ และ K⁺ ที่ความเข้มข้นเท่ากันคือ 20 mM ดังผลการทดลองภาพที่ 104a แสดงให้เห็นว่าแผ่นเยื่อทั้งสองเป็นสีชมพูภายหลังจากการแช่สารละลายไอออนปรอท ในขณะที่ภายหลังจากการแช่ไอออนอื่นๆ แผ่นเยื่อทั้งสองไม่มีการเปลี่ยนสี ซึ่งการเปลี่ยนแปลงสีนี้สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ภายใต้แสงปกติ (แสงขาว) และผลการทดลองภาพที่ 104b แสดงค่า normalized fluorescence

intensity ที่ 582 nm ของแผ่นเยื่อ PMMA/RBH และ PMMA/R6GH sensor strips ภายหลังจากแช่ในสารละลายไอออนต่างๆ เข้มข้น 20 mM และ 200 μM จะเห็นได้ว่าแผ่นเยื่อที่แช่ในสารละลายไอออนปรอทเท่านั้นที่มีการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ (OFF-ON) เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน โดยไอออนชนิดอื่น ๆ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงหรือเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งผลการทดลองนี้สรุปได้ว่าแผ่นเยื่อทั้งสองชนิดที่ได้มีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดไอออนปรอทเพียงชนิดเดียว

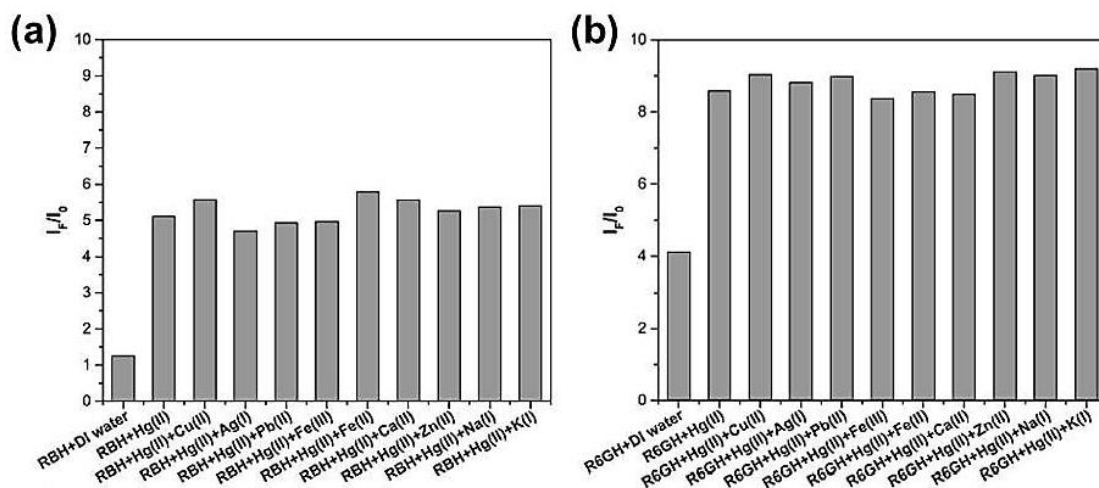


ภาพที่ 104 a) แสดงการเปลี่ยนแปลงสีของแผ่นเยื่อ PMMA/RBH และ PMMA/R6GH ก่อนและหลังแช่ในสารละลายไอออนต่างๆ (20 mM) b) แสดง normalized fluorescence intensity ที่ 582 nm ของแผ่นเยื่อ PMMA/RBH และ PMMA/R6GH sensor strips ภายหลังจากแช่ในสารละลายไอออนต่างๆ เข้มข้น 20 mM และ 200 μM

4.5 ผลการทดสอบสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของของแผ่นเยื่อ PMMA/RBH และ PMMA/R6GH ในสภาวะที่มีไอออนปรอทรวมกับไอออนรบกวนอื่นๆ ในสารละลายเดียวกัน

การตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของแผ่นเยื่อทั้งสองชนิด ภายหลังจากการแช่ในสารละลายที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นที่มีความเข้มข้น 10 เท่าของความเข้มข้นของไอออนปรอท ดังภาพที่ 105 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแผ่นเยื่อทั้งสองชนิดสามารถทำงานในการตรวจวัดไอออนปรอทได้ในสภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ได้แก่ Cu^{2+} , Ag^+ , Pb^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Na^+ และ K^+ เจือปนในสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงกว่าไอออนปรอทถึง 10 เท่า โดยยังคงมีการ

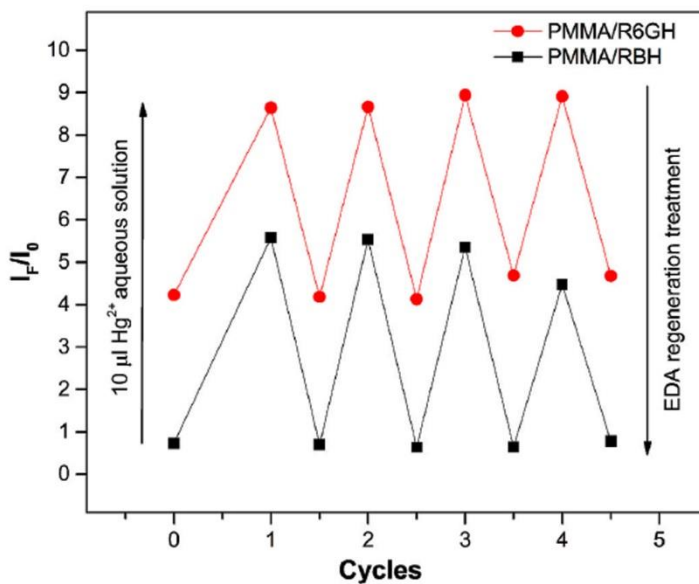
เปลี่ยนแปลงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 514 นาโนเมตร แบบเพิ่มขึ้น (OFF-ON) อย่างชัดเจน จึงสรุปได้ว่าแผ่นเยื่อทั้งสองชนิด มีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัด ไอออนปรอทและยังสามารถทำงานได้ดีในภาวะที่มีไอออนรบกวนอื่นชนิดอื่น ๆ เจือปนอยู่สูงกว่า ไอออนปรอทถึง 10 เท่า



ภาพที่ 105 แสดงผลการทดสอบการรบกวน (competitive experiments) ของไอออนโลหะชนิดต่างๆ ที่มีต่อค่า normalized emission intensity; I_f/I_0 ที่ 514 nm ของแผ่นเยื่อ PMMA/RBH และ PMMA/R6GH sensor strips โดย $[Hg^{2+}]:[M^{n+}] = 1:10$

4.6 การศึกษาการนำกลับมาใช้ใหม่ของแผ่นเยื่อ PMMA/RBH และ PMMA/R6GH sensor strips

การศึกษาความสามารถในการนำกลับมาใช้ใหม่ของแผ่นเยื่อทั้งสองชนิด ทำได้โดยการนำแผ่นเยื่อทั้งสองชนิดแช่ในสารละลายไอออนปรอท จากนั้นนำมาแช่ในสารละลายที่มีสารที่มีแรงกระทำกับไอออนปรอทหลังจากที่แช่ในสารละลายปรอทมาแล้ว เพื่อวิเคราะห์ใหม่ได้อีกครั้งโดยในการศึกษานี้ใช้ ethylenediamine (EDA) เป็นสารที่มีแรงกระทำกับไอออนปรอท ผลการทดลองดังภาพที่ 106



ภาพที่ 106 การนำกลับมาใช้ใหม่ (reusability) ของแผ่นเยื่อ PMMA/RBH และ PMMA/R6GH sensor strips

จากผลการทดลองพบว่าแผ่นเยื่อ PMMA/RBH และ PMMA/R6GH สามารถตรวจวัดไอออนปรอทได้ และสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อีกครั้งโดยการนำแผ่นเยื่อที่ผ่านการแช่ในสารละลายไอออนปรอทแล้วมาแช่ในสารละลาย EDA ซึ่งจะเห็นว่าก่อนที่จะนำแผ่นเยื่อไปแช่ในสารละลายไอออนปรอทแผ่นเยื่อทั้งสองแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่มีความเข้มต่ำสุด เมื่อนำแผ่นเยื่อไปแช่ในสารละลายไอออนปรอทจะทำให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เพิ่มขึ้นที่ค่าความเข้มแสงค่าหนึ่ง และเมื่อนำแผ่นเยื่อมาแช่ในสารละลาย EDA พบว่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์กลับลงไปเท่ากับเริ่มต้นอีกครั้ง (เท่ากับสัญญาณของแผ่นเยื่อก่อนเติมไอออนปรอทลงไป) และกระบวนการนี้สามารถทำซ้ำได้อย่างน้อยสี่ครั้งโดยการแช่ในสารละลาย Hg^{2+} และ EDA สลับกัน จากผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าการเพิ่มขึ้นของการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของแผ่นเยื่อหลังจากการแช่ในสารละลายไอออนปรอท สามารถย้อนกลับได้โดย EDA และยังคงมีประสิทธิภาพในการตรวจจับไอออนปรอทได้เหมือนเดิม ดังนั้นแผ่นเยื่อทั้งสองมีสมบัติในการนำกลับมาใช้ใหม่ได้ ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนในการสังเคราะห์ ทำให้ประหยัดงบประมาณในการวิเคราะห์ตัวอย่างได้

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัย

วิทยานิพนธ์นี้สามารถออกแบบและสังเคราะห์เซ็นเซอร์ชนิดใหม่ 2 ชนิด คือเซ็นเซอร์ที่ประกอบด้วยอนุพันธ์ของ cyanine ที่มีคุณสมบัติการคายแสงในช่วงใกล้รังสีอินฟราเรด และเซ็นเซอร์ที่ประกอบด้วยอนุพันธ์ของ [5]helicene ที่มีคุณสมบัติการคายแสงในช่วงยูวี-วิสิเบิลได้สำเร็จ จากเส้นทางการสังเคราะห์สั้น และใช้สารตั้งต้นที่มีราคาถูกทำให้ลดต้นทุนในการสังเคราะห์ โดยเซ็นเซอร์ที่ประกอบด้วยอนุพันธ์ของ cyanine คือ **Cy7C4** ประกอบด้วยไอโอโนฟอร์ชนิด 2-[4-(2-aminoethylsulfanyl)butylsulfanyl]ethanamine เชื่อมต่อกับฟลูออโรฟอร์ชนิดไซยานิน (cyanine group) จำนวน 1 หมู่ จากผลการทดสอบความสามารถในการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์เมื่อจับกับไอออนทองแดงแสดงได้ดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 สรุปผลการทดลองของสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ **Cy7C4**

พารามิเตอร์	ผลการทดลอง
สภาวะที่ทำงาน	ในสารละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES buffer เข้มข้น 5 mM pH 7.2 และ acetonitrile ในอัตราส่วน 50:50 v/v
ชนิดของไอออน	Cu ²⁺
λ_{ex} (nm)	640
λ_{em} (nm)	720
Detection limit (ppb)	1.56
Association constant (K_{assoc} , M ⁻¹)	6.42×10^4
Ratio [Cy7C4:Cu ²⁺]	1:1
Working range (μ M)	1.67-5.33

เซ็นเซอร์ **Cy7C4** ที่สังเคราะห์ได้สามารถตรวจจับไอออนทองแดงได้อย่างจำเพาะเจาะจง ในระบบตัวทำละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ สามารถตรวจวัดไอออนทองแดงได้ในระบบการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์แบบเปิด-ปิด (ON-OFF) ในช่วงความยาวคลื่นการมองเห็นได้ และสามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า จากสีน้ำเงินเป็นใสไม่มีสีเมื่อมีการจับไอออนทองแดง มีค่า detection limit เท่ากับ 1.56 ppb ซึ่งต่ำกว่าความเข้มข้นสูงสุดของทองแดงที่สามารถปนเปื้อนในน้ำดื่มที่กำหนดโดย U.S. EPA มีความจำเพาะเจาะจง

(selectivity) และความไวต่อการตรวจวัด (sensitivity) ดี สามารถใช้เป็นเซ็นเซอร์ในการตรวจวัดไอออนทองแดง และสามารถนำเซ็นเซอร์ **Cy7C4** ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนทองแดงในตัวอย่างน้ำ เซลล์มะเร็งสมอง (U251) นอกจากนี้ยังสามารถผนวกเข้ากับเทคนิค FIA เพื่อวิเคราะห์ปริมาณไอออนทองแดงแบบอัตโนมัติได้ในตัวพาแบบสารละลายผสมระหว่าง HEPES buffer เข้มข้น 5 mM pH 7.2 และ acetonitrile ในอัตราส่วน 50:50 v/v โดยมีการประยุกต์เทคนิค FIA เข้ากับการตรวจวัดเป็น 2 ระบบ ประกอบด้วยเทคนิค FIA-spectrofluorometer พบว่ามีช่วงใช้งานในการตรวจวัดไอออนทองแดงอยู่ที่ 0.5-9.0 mM โดยมีค่า LOD เท่ากับ 0.15 mM และมี sample throughput 33 ตัวอย่างต่อชั่วโมง และเทคนิค FIA-spectrophotometry มีช่วงใช้งานในการตรวจวัดไอออนทองแดงอยู่ที่ 0.5-7.0 mM โดยมีค่า LOD เท่ากับ 0.45 mM และมี sample throughput 39 ตัวอย่างต่อชั่วโมง นอกจากนี้ยังมีการนำ FIA-spectrofluorometer มาใช้หาปริมาณของไอออนทองแดงได้อย่างแม่นยำในตัวอย่างสังเคราะห์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเคมี (chemical laboratory) เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานอีกด้วย สำหรับเทคนิค FIA แม้ว่าค่า detection limit ที่หาได้จะค่อนข้างสูงแต่สามารถวัดตัวอย่างได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น ดังนั้นจึงสามารถใช้เป็นแนวทางการพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สำหรับสารฟลูออเรสเซนต์เพื่อใช้ตรวจวัดไอออนโลหะอื่นๆ ต่อไปได้

เซ็นเซอร์ชนิดที่สองสังเคราะห์จากอนุพันธ์ของ [5]helicene ที่มีคุณสมบัติการคายแสงในช่วงยูวี-วิสิเบิล คือ **M201NHP** ประกอบด้วยไอโอโนฟออร์ชนิด phenylthiocyanate เชื่อมต่อกับฟลูออโรฟออร์ชนิดเพนตะเฮลิซีน ([5]helicene) จำนวน 1 หมู่ จากผลการทดสอบความสามารถในการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์เมื่อจับกับไอออนปรอทแสดงได้ดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 สรุปผลการทดลองของสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ **M201NHP**

พารามิเตอร์	ผลการทดลอง
สถานะที่ทำงาน	ในสารละลายผสมระหว่างน้ำ (DI water) และ acetonitrile ในอัตราส่วน 40:60 v/v
ชนิดของไอออน	Hg ²⁺
λ_{ex} (nm)	373
λ_{em} (nm)	565
Detection limit (ppb)	1.94
Association constant (K_{assoc} , M ⁻¹)	7.09×10^4
Ratio [M201NHP :Hg ²⁺]	1:1
Working range (μ M)	3.25-10.75

เซ็นเซอร์ M201NHP ที่สังเคราะห์ได้สามารถตรวจจับไอออนปรอทได้อย่างจำเพาะเจาะจงในระบบตัวทำละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ โดยตรวจวัดไอออนปรอทผ่านการแสดงการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์แบบเปิด-ปิด (ON-OFF) โดยมีค่า detection limit เท่ากับ 1.94 ppb ซึ่งต่ำกว่าความเข้มข้นสูงสุดของปรอทที่สามารถปนเปื้อนในน้ำดื่มที่กำหนดโดย U.S. EPA มีค่าการเลื่อนของความยาวคลื่น (stokes shift) ที่กว้าง สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้มากกว่า 3 ครั้ง มีความจำเพาะเจาะจงและมีความไวสูงต่อการตรวจวัดไอออนปรอทเมื่อเทียบกับไอออนชนิดอื่นๆ และสามารถทำงานได้แม้ว่าในระบบตัวทำละลายจะมีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ปะปนอยู่ และสามารถนำเซ็นเซอร์ M201NHP ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนปรอทในตัวอย่างครีมเจล น้ำตัวอย่าง และเซลล์มนุษย์ (U251, HEK-293 และ HaCaT) นอกจากนี้ความเป็นพิษของ M201NHP ต่อเซลล์มนุษย์ (U251, HEK-293 และ HaCaT) ยังมีค่าที่ต่ำอีกด้วย

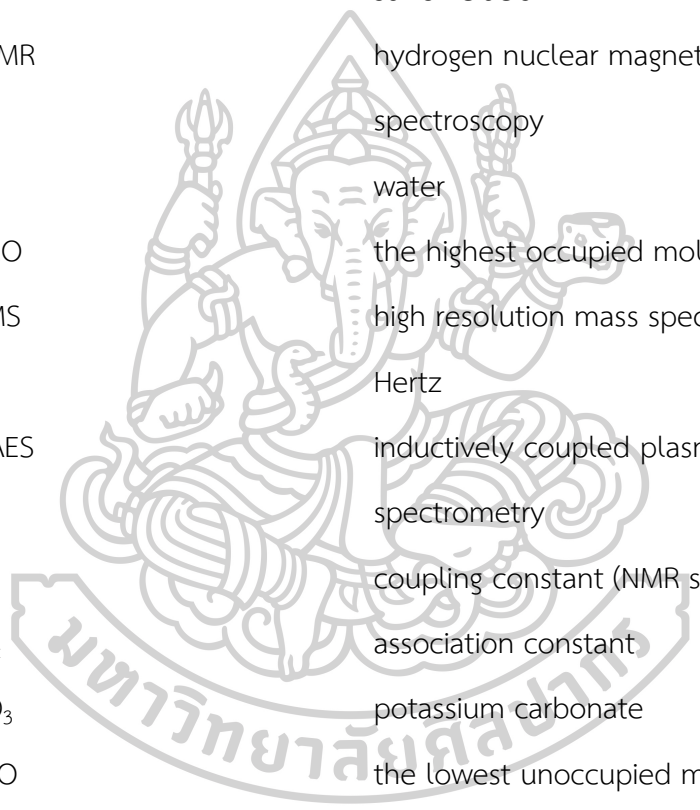
นอกจากนี้ได้มีการนำแผ่นเยื่อ PMMA/RBH และ PMMA/R6GH sensor strips ที่มีความจำเพาะเจาะจง (selectivity) และความไวต่อการตรวจวัด (sensitivity) ต่อไอออนปรอท มาศึกษาสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ พบว่าแผ่นเยื่อ PMMA/RBH และ PMMA/R6GH ค่า detection limit อยู่ในช่วง 0.8-1.099 และ 3.6-4.3 ppb ตามลำดับ สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้มากกว่า 3 ครั้ง ดังนั้นจึงสามารถนำแผ่นเยื่อ PMMA/RBH และ PMMA/R6GH sensor strips มาใช้ตรวจวัดไอออนปรอท และใช้เป็นอุปกรณ์พกพาสำหรับการตรวจวัด Hg^{2+} แบบเรียลไทม์ ด้วยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีได้ด้วยตาเปล่าได้อย่างง่ายดาย





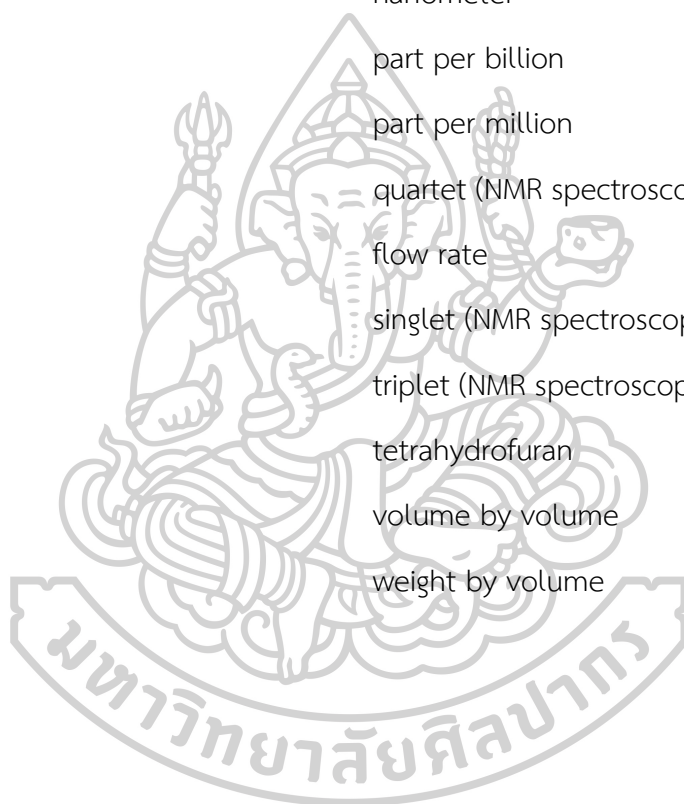
รายชื่ออักษรย่อ

คำย่อ	คำเต็ม
Q	fluorescence quantum yield
°C	degree celsius
λ	wavelength
μL	microlitter
μM	micromolar
AAS	atomic absorption spectrometry
anh.	anhydrous
br	board (NMR spectroscopy)
CH_2Cl_2	dichloromethane
^{13}C NMR	carbon 13 nuclear magnetic resonance spectroscopy
d	doublet (NMR spectroscopy)
dd	doublet of doublet (NMR spectroscopy)
DFT	density functional theory
DI	deionized
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNP	double numerical polarization
U.S. EPA	United States Environmental Protection Agency
E	bind binding energy
em	emission
eq.	equivalent
EtOAc	ethyl acetate
EtOH	ethanol



ex	excitation
FDA	Food and Drug Administration
PET	Photoinduced electron transfer
h	hour
HCl	hydrochloric
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethane sulfonic acid
^1H NMR	hydrogen nuclear magnetic resonance spectroscopy
H_2O	water
HOMO	the highest occupied molecular orbital
HR-MS	high resolution mass spectrometry
Hz	Hertz
ICP-AES	inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry
J	coupling constant (NMR spectroscopy)
K_{assoc}	association constant
K_2CO_3	potassium carbonate
LUMO	the lowest unoccupied molecular orbital
M	mass (mass spectroscopy)
M	molar
m	multiplet (NMR spectroscopy)
MeOH	methanol
min	minute
mL	milliliter
mmol	milli mole
M_w	molecular weight

m/z	mass to charge ratio (mass spectroscopy)
NaCl	sodium chloride
NaOMe	sodium methoxide
NaOH	sodium hydroxide
Na ₂ SO ₄	sodium sulfate
Et ₃ N	triethylamine
nm	nanometer
ppb	part per billion
ppm	part per million
q	quartet (NMR spectroscopy)
R _f	flow rate
s	singlet (NMR spectroscopy)
t	triplet (NMR spectroscopy)
THF	tetrahydrofuran
v/v	volume by volume
w/v	weight by volume



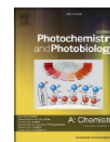
ผลงานที่ได้รับการตีพิมพ์

Journal of Photochemistry & Photobiology, A: Chemistry 421 (2021) 113533



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Photochemistry & Photobiology, A: Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jphotochemNear infrared and colorimetric fluorescence sensor for ultra-selective detection of Cu^{2+} level with applications in diverse water samples, brain tumor cell and flow injection analysisNirumon Chailek^a, Nirawit Kaewnok^a, Anuwut Petdum^b, Jitnapa Sirirak^a, Sumonmarn Chaneam^a, Anyanee Kamkaew^c, Sutinee Girdthep^a, Nantanit Wanichacheva^{a,*}^a Department of Chemistry, Faculty of Science, Silpakorn University, Nakhon Pathom 73000, Thailand^b Thailand National Metal and Materials Technology Center (MTEC), Pathumthani 12120, Thailand^c School of Chemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

ARTICLE INFO

Keywords:

Cyanine

Near Infrared dye

Copper sensor

 Cu^{2+} -selectivity

Flow injection analysis (FIA)

ABSTRACT

A new colorimetric NIR fluorescence sensor based on heptamethine cyanine connected to 2-(4-(2-aminoethylsulfanyl)butylsulfanyl)ethanamine (Cy7C4) was successfully synthesized and characterized in this work. The sensor possessed high sensitivity to discriminate Cu^{2+} from other interfering ions with colorimetric change and NIR-fluorescence quenching. Cy7C4 formed a complex with Cu^{2+} in 1:1 ratio ($\text{Cy7C4}:\text{Cu}^{2+}$) derived by Job's plot analysis and the possible structure of $\text{Cy7C4}:\text{Cu}^{2+}$ complex was predicted using molecular modeling. The detection limit was calculated to be 1.56 ppb, which was lower than the highest of Cu^{2+} level in safe drinking water defined by the U.S. EPA. In addition, Cy7C4 was capable to detect Cu^{2+} in diverse real water samples and brain tumor cells. Moreover, this sensor was adopted in flow injection analysis (FIA) for automated monitoring Cu^{2+} in dual channels of UV-Vis absorption and fluorescence signaling.

1. Introduction

Heavy metal ion contamination is one of very significant environmental problem and being the cause of various health disorders. Copper is one of crucial metal ion contaminants that widespread persists in environmental sources. Human can incidentally get copper ions into body by several pathways such as drinking contaminated water and consuming unhygienic foods. Even though this element is necessary for the basic biological processes, especially for typical functions and development in human brain [1], the abnormal level of copper ion in human body is toxic and leads to cause neurological symptoms such as Parkinson's, Alzheimer's, Wilson's and Menkes disease [2–7]. Therefore, the development of analytical method for detecting trace amount of copper ion in environmental and biological contexts is highly demanded.

There are many traditional techniques used to detect copper ion with high sensitivity, for example, inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES) [8,9], atomic absorption spectrometry (AAS) [10,11], surface plasmon resonance spectroscopy (SPR) [12], chromatography [13] and voltammetry [14,15]. However, these techniques require high equipment costs, highly skilled operator, and long operating time

[16]. On the other hand, using fluorescence sensor has superior benefits that overcome the above mentioned problems including, easiness to use, low cost, non-destructiveness to sample, highly sensitive and specific detection [17].

In the past few years, numerous fluorescence sensors for selective detection of Cu^{2+} ion have been reported [1,16,18–29]. However, these sensors possessed the excitation and emission wavelength in the UV-visible region, which suffered from the certain limitations, including, auto-fluorescence, tissue damage, light scattering and background disturbances. [30]. Conversely, NIR-fluorescence sensor presented the excellent advantages of less tissue damage, low background of fluorescence less light scattering [31,32]. With these attractive properties, NIR-fluorescence sensor provided high potential to detect Cu^{2+} in not only biological but also in medicinal fields. Thus, the synthesis of NIR-fluorescence sensors has earned great interests.

In recent decades, cyanine dyes have been employed as a fluorophore of NIR-fluorescence sensors for detecting numerous metal ions [33–45]. However, cyanine-based fluorescence sensors for determination of Cu^{2+} have not been much reported. In this work, a new fluorescence sensor, Cy7C4 consisting of nitrogen and sulfur atom-containing ionophore linked

* Corresponding author.

E-mail address: wanichacheva_n@su.ac.th (N. Wanichacheva).<https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2021.113533>

Received 5 July 2021; Received in revised form 25 August 2021; Accepted 30 August 2021

Available online 2 September 2021

1010-6030/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

to heptamethine cyanine dye was designed and synthesized. The Cy7C4 had sensitive and selective efficiency to recognize Cu^{2+} in 50% HEPES buffer (5 mM, pH 7.2)/ CH_3CN with fluorescence quenching at NIR region ($\lambda_{\text{em}} = 720 \text{ nm}$) and colorimetric change that could be noticed by the naked eyes. This sensor was able to discriminate Cu^{2+} from other metal ions, including, Zn^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{2+} , Ag^+ , Ni^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , Li^+ and Al^{3+} . Additionally, Cy7C4 effectively monitored Cu^{2+} ion in real water samples, human cancer cells and further used as an on-line detection system of flow injection analysis (FIA) for quick determination of Cu^{2+} .

2. Experiment

2.1. Materials and instruments

In this research, all of chemicals were from Fluka Chemical and Sigma-Aldrich and utilized without any additional steps for further purification. All metal ion salts, including $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$, $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2$, $\text{Pb}(\text{ClO}_4)_2$, $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$, $\text{Mn}(\text{ClO}_4)_2$, $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$, $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2$, AgClO_4 , $\text{Ni}(\text{ClO}_4)_2$, $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$, $\text{Co}(\text{ClO}_4)_2$, $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$, $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$, KClO_4 , NaClO_4 , LiClO_4 and $\text{Al}(\text{ClO}_4)_3$, were used as metal ion sources and they were obtained from Strem Chemicals, Inc. All of NMR spectra used CDCl_3 as a solution were taken in a Bruker Avance 300 spectrometer that run at 300 MHz for ^1H and 75 MHz for ^{13}C . Additionally, internal standard was TMS. For mass spectra were measured by a micrOTOF Bruker, which was calibrated by sodium formate. For spectra of UV-visible absorption and fluorescence emission were performed on a single-beam Agilent Technologies spectrophotometer (Cary 60 UV-Vis) and Perkin-Elmer luminescence spectrometer LS 50, respectively.

2.2. Synthesis of 1, fluorophore 2 and ionophore 3

1, Fluorophore 2 and Ionophore 3 were synthesized according to the previous reports [46,30,47] and its synthetic step was displayed in Scheme S1, S2 and S3.

2.3. Synthesis of Cy7C4

0.21 g (0.4345 mmol) of fluorophore 2 and 0.18 g (0.8649 mmol) of ionophore 3 were dissolved in dry DMF (10 mL) and stirred at 90°C for 3 h

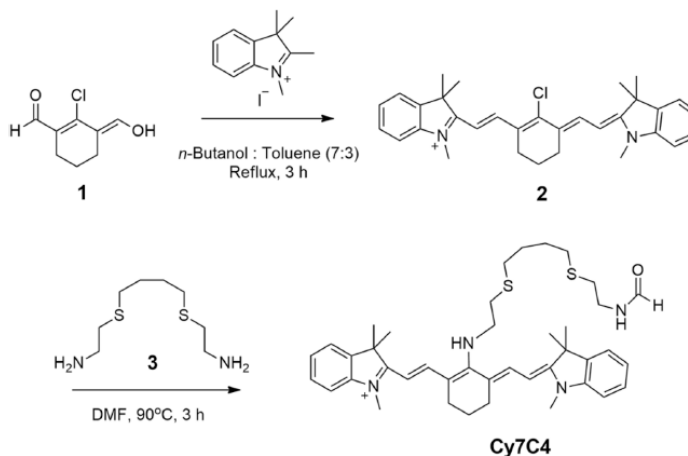
under an argon atmosphere. After that, the reaction mixture was cooled down to room temperature, followed by solvent removal using a rotary evaporator. The crude product was purified by preparative thin layer chromatography using MeOH: CH_2Cl_2 (2:98 v/v), ($R_f = 0.20$) to give 57.9 mg of the product (19.5 %). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 0.80–0.95 (m, 2H), 1.25 (s, 4H), 1.67 (s, 12H), 1.75–2.00 (m, 2H), 2.52 (t, $J = 8.55 \text{ Hz}$, 4H), 2.55–2.80 (m, 6H), 3.09 (t, $J = 6.00 \text{ Hz}$, 2H), 3.30–3.60 (m, 6H), 4.00 (d, $J = 4.5 \text{ Hz}$, 2H), 5.61 (d, $J = 12.6 \text{ Hz}$, 2H), 6.91 (d, $J = 8.1 \text{ Hz}$, 2H), 7.00–7.40 (m, 8H), 7.76 (br s, 2NH), 8.20 (s, 1H) ppm.; ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 21.49 (CH_2), 25.17 (CH_2), 28.65 (CH_2), 28.80 (CH_2), 29.34 (CH_2), 29.67 (CH_2), 31.15 (CH_2), 31.23 (CH_2), 31.69 (CH_2), 31.90 (CH_2), 32.25 (CH_2), 33.56 (CH_2), 37.67 (CH_2), 41.54 (CH_2), 41.79 (CH_2), 48.55 (CH_2), 63.03 (CH_2), 94.62 (CH), 108.42 (CH), 120.64 (2C), 122.04 (2CH), 122.90 (2CH), 128.18 (CH), 129.71 (CH), 138.55 (2CH), 139.90 (2C), 143.55 (C), 161.79 (2CH), 164.50 (2C), 165.42 (2C), 168.30 (2C), 169.13 (C), ppm.; HRMS (ESI) calcd. for $\text{C}_{41}\text{H}_{55}\text{N}_4\text{OS}_2^+$ (M) 683.3812 m/z, found 683.3816 m/z (Scheme 1).

3. Results and discussion

3.1. Design and synthesis of Cy7C4

Novel chromogenic and NIR fluorescence sensor, Cy7C4, was designed based on heptamethine cyanine derivative (2) as fluorescence dye connected with 2-(4-(2-aminoethylsulfanyl)butylsulfanyl)ethanamine (3) ionophore for detection of Cu^{2+} . Heptamethine cyanine dye provided the fluorescence spectra in Near-IR region (650–900 nm) with the long wave length excitation ($> 600 \text{ nm}$) which avoided the photoluminescence in the biological system. The cyanine scaffold, containing of indolinium salts, had benefit for water solvable behavior and easily dyed in cell imaging application. Moreover, the ionophore 3, consisted of nitrogen atoms and sulfur atoms in molecule, was designed for selective binding with Cu^{2+} through the principle of hard and soft acids and bases (HSAB). Thus, Heptamethine cyanine dye bearing ligand 3 was utilized as NIR fluorescence sensor for recognition of Cu^{2+} with high selectivity and sensitivity.

As elucidated in Scheme 1, Heptamethine cyanine dye (2) and ionophore 3 were prepared by our previous publications [30,47]. Cy7C4 was conveniently synthesized through one-pot reaction of *N*-alkylation of fluorescence dye 2 with ionophore 3 followed formylation of primary



Scheme 1. Synthesis steps of Cy7C4.

amine with DMF. The new fluorescence sensor was successfully characterized by ^1H NMR, ^{13}C NMR and HRMS (Fig. S1-S3).

3.2. Sensitivity studies

Spectral properties of Cy7C4 with the addition of various concentrations of Cu^{2+} in 50% HEPES buffer (5 mM, pH 7.2)/ CH_3CN were explored using UV-Vis and fluorescence spectroscopy. The spectral change was recorded at 5 min after addition of Cu^{2+} according to the time response study (Fig. S4). The Cy7C4 solution appeared in a blue color, with the maximum absorption at 640 nm. Fig. 1 demonstrated that the increasing of Cu^{2+} concentration resulted in the significantly decreased in the absorbance of Cy7C4 solution at 640 nm and the color change of Cy7C4 solution from blue to colorless, indicating that the Cy7C4 could be used as Cu^{2+} sensor with naked-eyes detection. To gain more information about the change in absorption spectra of the sensor after binding with Cu^{2+} , the molecular orbitals of Cy7C4 and its Cu^{2+} complex were conducted (Fig. S9). The results showed that the molecular orbitals of the sensor before and after binding with Cu^{2+} were rather different. The electron density of free Cy7C4 was almost distributed on cyanine core while those of Cy7C4: Cu^{2+} complex were lied on cyanine core and Cu^{2+} -ligand moiety. Moreover, the energy gap between HOMO and LUMO was increased after Cu^{2+} was bound with the ionophore, which related to the blue shift of absorption wavelength. As can be seen in Fig. 1, the absorption spectra of Cy7C4 around 530–750 nm was decreased while those of Cy7C4: Cu^{2+} complex range of 300–470 nm was increased which was blue shift of the sensor after binding with Cu^{2+} .

The fluorescence emission spectra of Cy7C4 containing Cu^{2+} in (5 mM, pH 7.2)/ CH_3CN were shown in Fig. 2. It can be seen that, with the excitation of a wavelength at 640 nm, the Cy7C4 exhibited strong fluorescence emission intensity at 720 nm. On the other hand, a dominant fluorescence of Cy7C4 disappeared with the increase of Cu^{2+} concentration. These results clearly demonstrated that Cy7C4 exhibited a very sensitive fluorescence quenching to detect Cu^{2+} . The detection limit (DL) was found to be 24.5 nM or 1.56 ppb calculated by $\text{DL} = 3SD_{\text{blank}}/\text{slope}$ equation [48], where SD_{blank} is the standard deviation of the blank signal ($S/N = 3$) and slope is the slope of the linear calibration plot (Fig. S5). The DL was also lower than the maximum Cu^{2+} concentration in drinking water (1.3 ppm) defined by the U.S. EPA as well as the DL of previously reported Cu^{2+} sensors (Table 1).

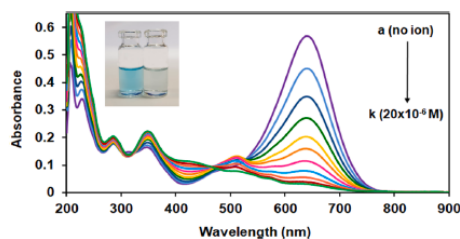


Fig. 1. UV-Visible absorption spectra of Cy7C4 (60 μM) in 50% HEPES buffer (5 mM, pH 7.2)/ CH_3CN with the adding of Cu^{2+} : a: 0 μM , b: 2.0 μM , c: 4.0 μM , d: 6.0 μM , e: 8.0 μM , f: 10 μM , g: 12 μM , h: 14 μM , i: 16 μM , j: 18 μM and k: 20 μM .

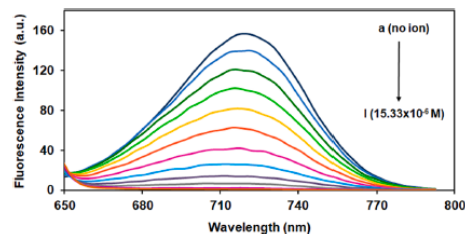


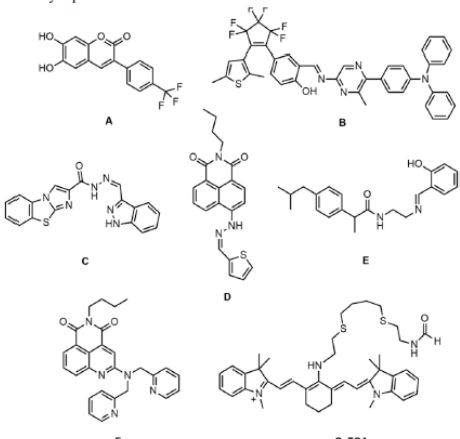
Fig. 2. Spectra from fluorescence emission of Cy7C4 (10 μM) at 720 nm (λ_{ex} 640 nm) in 50% HEPES buffer (5 mM, pH 7.2)/ CH_3CN with the addition of Cu^{2+} : a: 0 μM , b: 2.0 μM , c: 3.3 μM , d: 4.7 μM , e: 6.0 μM , f: 7.3 μM , g: 8.7 μM , h: 10 μM , i: 11 μM , j: 13 μM , k: 14 μM and l: 15 μM .

3.3. Binding studies

Job's plot analysis was conducted to explore the binding stoichiometry of Cy7C4 and Cu^{2+} . Fig. 3 showed that there was a maximum change in fluorescence intensity at 0.5 Cy7C4 mole fraction, indicating that the ratio of Cy7C4: Cu^{2+} was 1:1, and ionophore 3 bound with only one Cu^{2+} . The binding constant (K_{assoc}) of the complex of Cy7C4 with Cu^{2+} was $6.49 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ with linearity of $R^2 = 0.9963$ (Fig. S6), calculated using the Stern-Volmer equation [49], $I_0/(I_0 - I) = 1/A + 1/K_A \cdot 1/[Q]$, where I_0 and I are the fluorescence intensity of free Cy7C4 and the Cy7C4: Cu^{2+} complex, respectively, $[Q]$ is the concentration of Cu^{2+} , A is the constant and K is the binding constant. Additionally, the binding constant (K_{assoc}) was evaluated by the Benesi-Hildebrand equation [50,51], $1/(I_0 - I) = 1/(K_{\text{assoc}}(I_0 - I_{\text{min}})[Q]^2) + 1/(I_0 - I_{\text{min}})$, where I_0 and I are the fluorescence intensity of free Cy7C4 and the Cy7C4: Cu^{2+} complex, respectively, I_{min} is the minimum fluorescence intensity of Cy7C4 in the presence of Cu^{2+} and K_{assoc} is the association constant. It was found that the association constant (K_{assoc}) based on the Benesi-Hildebrand equation was approximately $6.42 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ with linearity of $R^2 = 0.997$ (Fig. S7), meaning that the ratio of Cy7C4: Cu^{2+} was 1:1, which agreed with the result from Job's plot analysis.

To predict the binding between Cy7C4 and Cu^{2+} , DFT calculations were performed using Gaussian09. The optimized structures of Cy7C4 and Cy7C4: Cu^{2+} complex in three different conformations were obtained at the DFT-B3LYP level where 6-311G** basis set was applied for the main group elements and the LanL2DZ basis set was used for the

Table 1
Recently reported fluorescence sensors for the detection of Cu^{2+} .



Cu^{2+} sensor	Working system	Detection limit (M)	$\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ (nm)	Stokes shift (nm)	Applications	Reference
A	$\text{CH}_3\text{CN}/\text{HEPES}$ (95/5, v/v) buffer media (pH = 7.0)	2.45×10^{-8}	364/458 (visible)	94	drinking water, mineral water	[1]
B	THF	2.47×10^{-8}	413/629 (visible)	216	test strips	[16]
C	MeOH: Tris buffer (9:1, 10 mM, pH 7.4)	4.32×10^{-8}	385/465 (visible)	80	actual water samples	[18]
D	$\text{CH}_3\text{CN}: \text{H}_2\text{O}$ (3:1, v/v, pH 7.4)	9.15×10^{-9}	450/550 (visible)	100	real water samples, live cell imaging	[22]
E	Tris buffer (pH 7.4, 10 mM)	$1.71\text{--}2.12 \times 10^{-6}$	320/502 (visible)	182	–	[26]
F	4:1 (v/v) aqueous CH_3CN (pH 7.2, 10 mM HEPES buffer)	0.44×10^{-6}	440/552 (visible)	112	living yeast cells	[29]
Cy7C4	50% HEPES buffer (5 mM, pH 7.2)/ CH_3CN	2.45×10^{-8} (1.56 ppb)	640/720 (NIR)	80	real water sample, brain cell, FIA	This work

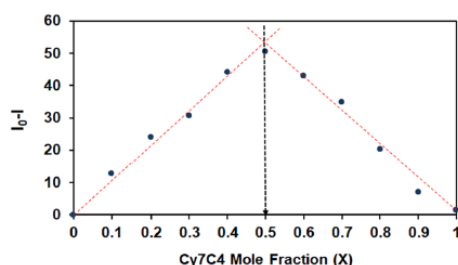


Fig. 3. Job's plot analysis of Cy7C4 with Cu^{2+} in 50% HEPES buffer (5 mM, pH 7.2)/ CH_3CN . The total concentrations of [Cy7C4] and [Cu^{2+}] were 10 μM . (λ_{ex} = 640 nm, λ_{em} = 720 nm).

Cu^{2+} (Fig. S8). The integral equation formalism polarizable continuum model (IEFPCM) was also used for solvation model. The molecular diagram and energy calculated by DFT were also explored and displayed in Fig. S9. According to the optimized structure of Cy7C4 and Cy7C4: Cu^{2+} complex shown in Fig. 4, it was found that, to bind with Cu^{2+} ,

ionophore part of Cy7C4 folded around Cu^{2+} . Cu^{2+} was coordinated by two sulfur atoms and one nitrogen atom of the ionophore part of Cy7C4 with the distances of 2.29 Å, 2.41 Å and 2.15 Å respectively, supporting that Cy7C4 showed an excellent binding with Cu^{2+} .

3.4. Selectivity studies

Highly selective detection to target analyzing agent is one of the most important behaviors for efficient fluorescence sensors. In this experiment, the sensitivity studies of Cy7C4 were performed by recording the fluorescence intensity of sensor in the presence of metal ions (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{2+} , Ag^{+} , Ni^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , K^{+} , Na^{+} , Li^{+} and Al^{3+}) in 50% HEPES buffer (5 mM, pH 7.2)/ CH_3CN system. As illustrated in Fig. 5, the sensor without metal ions provided the strong emission spectra around 650–780 nm (near-IR region) with the maximum intensity at 720 nm. The fluorescence intensity at 720 nm of Cy7C4 with Cu^{2+} was greatly decreased, while those of other metal ions (same concentration to Cu^{2+}) was unchanged and similar to the fluorescence intensity of free Cy7C4. As can be seen in Fig. 6, the sensor provided a highly selective fluorescence quenching to recognition of Cu^{2+} over other metal ions. These results indicated that Cy7C4 had the Cu^{2+} -selective detection behavior which had benefit for determination of Cu^{2+} in the system containing other metal ions.

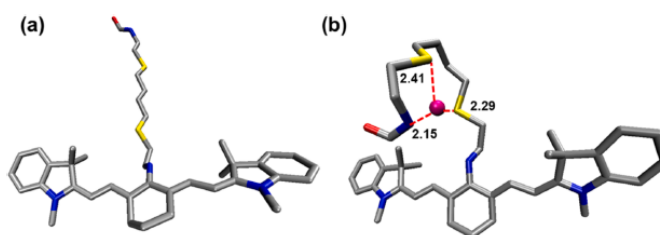


Fig. 4. The optimized structures of (a) Cy7C4 and (b) Cy7C4:Cu²⁺ complex.

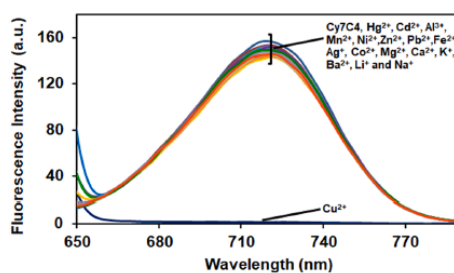


Fig. 5. Fluorescence emission spectra of Cy7C4 (10 μM) at 720 nm (λ_{ex} 640 nm) in 50% HEPES buffer (5 mM, pH 7.2)/CH₃CN as functions of varying metal ions (15 μM).

Since Cy7C4 exhibited the clearly color change toward Cu²⁺, the selectivity studies of Cy7C4 with other interfering metal ions were also investigated by naked eye detection. After adding Cu²⁺, the color of Cy7C4 solution was evidently changed from blue to colorless. Conversely, the Cy7C4 solution with other metal ions, including Zn²⁺, Pb²⁺, Hg²⁺, Mn²⁺, Cd²⁺, Fe²⁺, Ag⁺, Ni²⁺, Mg²⁺, Co²⁺, Ba²⁺, Ca²⁺, K⁺, Na⁺, Li⁺ and Al³⁺, exhibited no color change as shown in Fig. 7. Thus, Cy7C4 showed the efficiently potential as chromogenic sensor for highly selective determination of Cu²⁺ which easily detected by visual detection.

In addition, the competitive studies of sensor were performed by recording the fluorescence intensity at 720 nm of the sensor solution in

the present of Cu²⁺ ions with 10 equivalents of other competitive metal ions. As shown in Fig. 8, the fluorescence intensity of sensor at 720 nm containing Cu²⁺ with other metal ions (10 equiv. of Cu²⁺) was similar to those of the sensor with only Cu²⁺, indicating that Cy7C4 was able to be used to detect Cu²⁺ even the system contaminated by other metal ion with high concentration over Cu²⁺ 10 time. These results suggested that Cy7C4 permitted an excellently selective detection toward Cu²⁺ over competitive metal ions which have potential as an efficient fluorescence sensor for determination of Cu²⁺ in real samples bearing many other ions in the system.

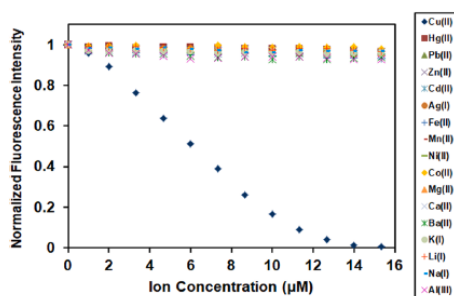


Fig. 6. Normalized fluorescence emission of Cy7C4 (10 μM) at 720 nm (λ_{ex} = 640 nm) in 50% HEPES buffer (5 mM, pH 7.2)/CH₃CN with adding up metal ions. a: 0 μM , b: 2.0 μM , c: 3.3 μM , d: 4.7 μM , e: 6.0 μM , f: 7.3 μM , g: 8.7 μM , h: 10 μM , i: 11 μM , j: 13 μM , k: 14 μM and l: 15 μM .



Fig. 7. Colors of the Cy7C4 sensor (10 μM) before and after the addition of Cu^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Ag^+ , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , K^+ , Li^+ , Na^+ and Al^{3+} (5.0 μM).

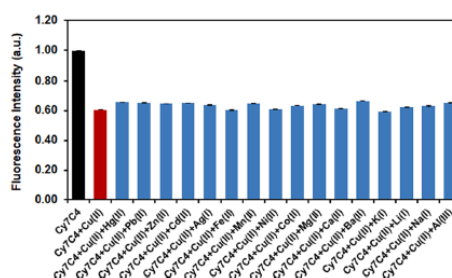


Fig. 8. Competitive studies of $\text{Cy7C4}:\text{Cu}^{2+}$ system with 10 equivalent of other disturbing metal ions in 50% HEPES buffer (5 mM, pH 7.2)/ CH_3CN : [Cy7C4] = 10 μM , [Cu^{2+}] = 3.3 μM , and [M^{n+}] = 33 μM .

3.5. Application in real water samples

To explore the ability of Cy7C4 for Cu^{2+} -determination in real samples, the detection of Cu^{2+} in water samples such as drinking water (DW), mineral water (MW), pond water (PW), river water (RW), sea water (SW) and tap water (TW) using Cy7C4 were investigated. As demonstrated in Fig. 9, the water samples without Cy7C4 were colorless meanwhile the water samples containing Cy7C4 were blue. Moreover, the addition of various concentrations of Cu^{2+} to each water samples led to the color change from blue to pale blue; the blue color was paler when the concentration of Cu^{2+} were increased. These results exhibited the ability of Cy7C4 for the determination the trace levels of Cu^{2+} in actual water samples which easily visualized by naked-eye detection.

3.6. Application in human brain tumor cells

Human glioblastoma astrocytoma (U251) cell line was used as a model in this study. Due to the abnormal functioning of brain cells caused by abnormal copper balance, it affects the nervous system leading to many of diseases. Live cell imaging experiment of U251 incubated with 10 μM of Cy7C4 was performed to investigate the efficiency of dye toward Cu^{2+} sensing. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) images of U251 cells in the presence or absence of Cy7C4 and Cu^{2+} were exhibited in Fig. 10a. The cells exhibited bright red fluorescence after incubated with Cy7C4 for 30 min, while the control cells and the cells incubated with only Cu^{2+} showed none observable fluorescent signal. Nevertheless, when the cells were pre-treated with copper ions (50–200 μM) for 20 h followed by incubating with Cy7C4, the

fluorescence became lessen, especially when the concentration of Cu^{2+} was higher than 50 μM , compared to those without copper ion pre-treatment. Moreover, mean fluorescent signals from the cells incubated with Cy7C4 in the presence of Cu^{2+} at 100 and 200 μM exhibited ~ 1.7 and 2.1-fold fluorescence reduction, respectively (Fig. 10b). Therefore, Cy7C4 could be an indicator to probe Cu^{2+} level in living cells.

3.7. Flow injection analysis (FIA)

The Cy7C4 sensor was applied in the Flow Injection Analysis (FIA) system to enable fast and automatic detection of Cu^{2+} . Basic components of the FIA system was illustrated in Fig. 11. Briefly, a solution of Cy7C4 (40 μM) was used as a reagent in combination with a carrier solution, 50% HEPES buffer (5 mM, pH 7.2)/ CH_3CN and a flow rate of 2.0 mL/min. Initially, 30 μL of the Cu^{2+} standard or sample solution was injected into a 6-port injection valve which was then mixed well with the reagent in a mixing coil (1.0 mm i.d., 100 cm). Next, the mixture solution passed through the analyzer, spectrofluorometer or UV-Vis spectrophotometer resulted the signal responses automatically.

Signal profiles and calibration curves presented in Fig. 12 were obtained from the proposed FIA-spectrofluorometer (Fig. 12a) and FIA-spectrophotometer (Fig. 12b). In Fig. 12 a, the results showed that adding of Cu^{2+} into the Cy7C4 reagent stream resulted in fluorescence decrease. The fluorescence intensity decreased as a function of the Cu^{2+} concentration, which was displayed excellent linearity over the Cu^{2+} concentration range of 0.5–9.0 mM ($R^2 = 0.996$) (inset). LOD was calculated to be 0.15 mM, 4.73% RSD (1 mM, $n = 6$) with a sample throughput of 33 samples h^{-1} . In Fig. 12 b, depicted absorbance signal

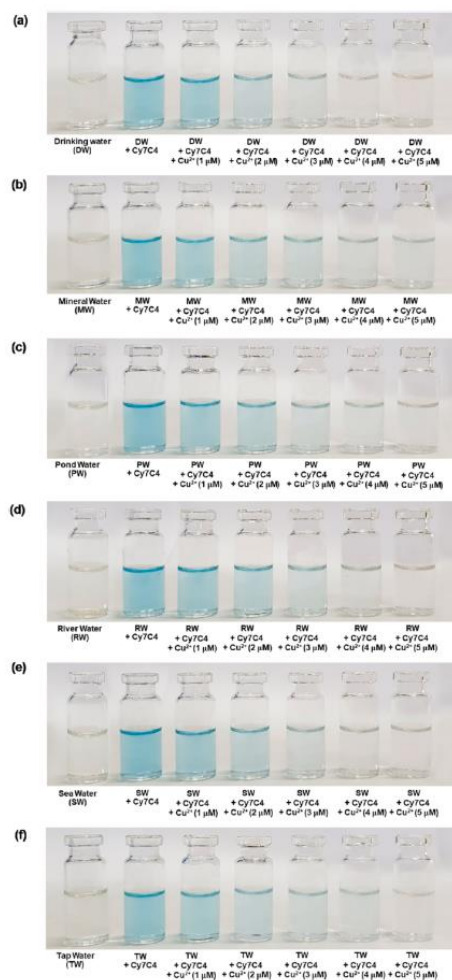


Fig. 9. Comparison of the color change of Cy7C4 (10 μM) in actual water samples (a) drinking water (DW) (b) mineral water (MW) (c) pond water (PW) (d) river water (RW) (e) sea water (SW) (f) tap water (TW) without and with spiking by of Cu^{2+} (1, 2, 3, 4 and 5 μM).

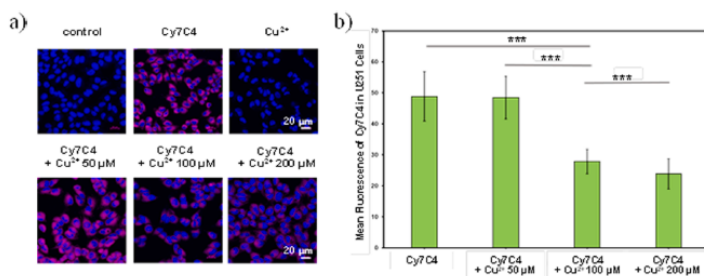


Fig. 10. Detection of Cu^{2+} in U251 cells. a) Confocal images of U251 cells; for treatment group, the cells were pre-treated with $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ (50, 100 and 200 μM) for 20 h before incubating with Cy7C4 (10 μM) for another 30 min. Scale bars = 20 μm . b) Corrected total cell fluorescence (CTCF) of U251 cells ($n = 40$) incubated with Cy7C4 (10 μM) the presence and absence of Cu^{2+} (50–200 μM). Statistical analysis was performed using Student's two tailed t -test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

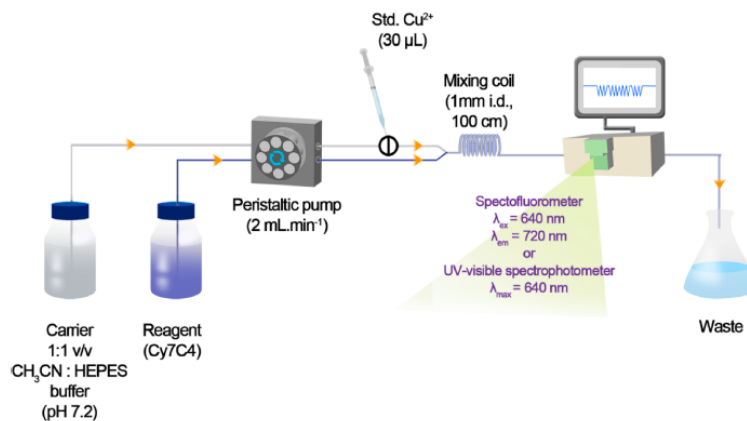


Fig. 11. Schematic diagram of the flow injection system for determination of Cu^{2+} with Cy7C4 as a sensor.

profile in the same manner of the fluorescence results. The absorbance decreased as a function of the Cu^{2+} concentration, which was demonstrated good linearity over the Cu^{2+} concentration range of 0.5–7.0 mM ($R^2 = 0.995$) (inset). LOD was also evaluated as 0.45 mM with 5.10% RSD (1 mM, $n = 6$). Please noted that, slightly rapid sample throughput of 39 samples h^{-1} was achieved because of shorter arrangement of the FIA system. Thus, the Cy7C4 sensor presented the potential to detect Cu^{2+} by the FIA systems in two mode detections, spectrophotometry and spectrofluorometry.

Finally, the Cy7C4 sensor was applied to analysis of copper content in synthetic samples which were used in chemical laboratory. In this work, the reliability of our proposed Cu^{2+} sensor by comparing with the reference iodometric titration were demonstrated [52]. Since, the sample mainly contained of Cu^{2+} and Fe^{3+} , sodium pyrophosphate solution was used as a masking agent in titration technique. In case of the FIA-spectrofluorometry, the sample was injected into the system directly. Table 2 lists the mean copper content values obtained from the FIA-

spectrofluorometry and iodometric titration. Comparing with batch iodometric titration, statistic t -test showed agreement between the two methods. The calculated $t_{\text{statistic}} = 0.94$ and the result of the $t_{\text{critical}} = 2.45$ (95% probability level). Thus our proposed FIA system is a convenient and rapid technique for analysis of Cu^{2+} without requirement of any masking agent.

4. Conclusions

A new colorimetric and NIR fluorescence sensor, Cy7C4 was developed and successfully synthesized for selective detection toward Cu^{2+} . Cy7C4 permitted a highly sensitive fluorescence quenching respond to Cu^{2+} over other metal ions in the HEPES buffer solution in physiological pH. The sensor provided a chromogenic change observable that easily visualized by naked eye detection. Cy7C4 has a very low detection limit of 1.56 ppb or 2.45 nM, which was below than the highest of Cu^{2+} concentration in drinking water specified by the U.S. EPA. Because of

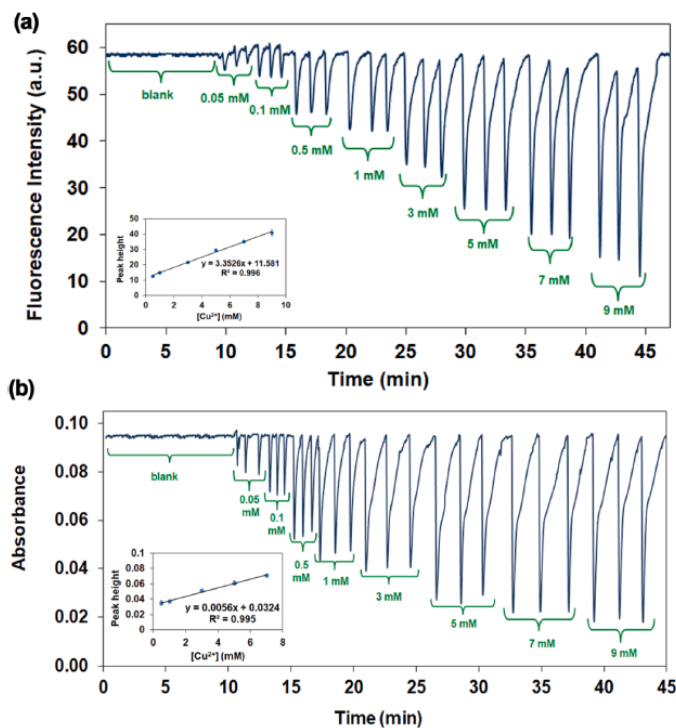


Fig. 12. a) Fluorescence emission signal profile at 720 nm b) Absorbance signal profile at $\lambda_{\text{max}} = 640$ nm for various concentrations of Cu^{2+} solutions with Cy7C4 as a fluorescence sensor with flow injection analysis.

Table 2
Results of copper content using different methods.

Sample	Copper content (%w.v) ^a	
	Proposed method (FLA-spectrofluorimetry)	Reference method (Iodometric titration)
1	0.475 ± 0.003	0.424 ± 0.031
2	0.514 ± 0.004	0.464 ± 0.053
3	0.462 ± 0.007	0.443 ± 0.013
4	0.476 ± 0.034	0.467 ± 0.004
5	0.476 ± 0.030	0.456 ± 0.004

^a mean ± SD from triplicate analysis.

the clearly color change of Cy7C4 in the present of Cu^{2+} , the sensor was successfully applied for the determination of trace levels of Cu^{2+} in actual water samples such as drinking water, mineral water, pond water, river water, sea water and tap water. Cy7C4 was productively used for detection of Cu^{2+} in brain tumor cells. Additionally, a fast Cu^{2+} determination based on Cy7C4 was utilized in flow injection analysis (FIA) with spectrofluorometric detection (33 samples h^{-1}) and spectrophotometric detection (39 samples h^{-1}) which showed not significant

different comparing to the reference iodometric titration (standard method). The effective detection to Cu^{2+} of the sensor, which could overcome the matrix of various samples (water sample and brain cells) and was applied with flow injection analysis (~ 30 samples h^{-1}), ensure that the sensor had high potential for controlling Cu^{2+} contamination in real samples and the environment.

CRediT authorship contribution statement

Nirumon Chailek: Investigation, Writing – original draft. Nirawit Kaewnok: Investigation. Anuwut Petdum: Investigation. Jitnapa Sirirak: Investigation. Sumonmarn Chaneam: Investigation. Anyanee Kamkaew: Investigation. Sutinee Girdthep: Investigation. Nantanit Wanichacheva: Conceptualization, Supervision, Methodology.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

N. Wanichacheva acknowledges Faculty of Science, Silpakorn University, Thailand (Grant SRIF-JRG-2564-09) for support. J. Sirirak acknowledges financial support from Reinventing University System Program by the Ministry of Higher Education, Science, Research and Innovation (Fiscal Year 2021). N. Chailek acknowledges the National Research Council of Thailand (NRCT) under the Royal Golden Jubilee (RGJ) Ph.D. Program, Thailand (Grant no. PHD/0191/2561) for funding. N. Kaewnok thanks to Thailand Graduate Institute of Science and Technology (TGIST), the National Science and Technology Development Agency (NSTDA) [Grant TG-33-16-61-017D].

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2021.113533>.

References

- [1] F.N. Arslan, G.A. Geyik, K. Koran, F. Ozen, D. Aydin, S.N.K. Elmas, A.O. Elmas, I. Y. Gorgulu, Fluorescence "Turn On-Off" Sensing of Copper (II) Ions Utilizing Coumarin-Based Chemosensor: Experimental Study, Theoretical Calculation, Mineral and Drinking Water Analysis, *J. Fluorescence* 30 (2020) 317–327, <https://doi.org/10.1007/s10995-020-02503-4>.
- [2] D.J. Waggoner, T.B. Bartnikas, J.D. Gitlin, The Role of Copper in Neurodegenerative Disease, *Neurobiol. Dis.* 6 (4) (1999) 221–230, <https://doi.org/10.1006/nbdi.1999.0250>.
- [3] Z. Xu, H. Wang, X. Hou, W. Xu, T. Xiang, C. Wu, A novel ratiometric colorimetric and NIR fluorescent probe for detecting Cu²⁺ with high selectivity and sensitivity based on rhodamine-appended cyanine, *Sens. Actuators, B* 201 (2014) 469–474, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.05.026>.
- [4] C. Vulpe, E. Levinson, S. Whitney, S. Packman, J. Gitzchler, Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase, *Nat. Genet.* 3 (1993) 7–13, <http://doi.org/10.1038/ng0193-7>.
- [5] G. Multhaup, A. Schlicksupp, L. Hesse, D. Beher, T. Ruppert, C.L. Masters, K. Beyreuther, The Amyloid Precursor Protein of Alzheimer's Disease in the Reduction of Copper(II) to Copper(I), *Science* 271 (5254) (1996) 1406–1409, <https://doi.org/10.1126/science.271.5254.1406>.
- [6] D. Strausak, J.F.B. Mercer, H.H. Dieter, W. Stremmel, G. Multhaup, Copper in disorders with neurological symptoms: Alzheimer's, Prion, and Parkinson's Diseases and Amyotrophic Lateral Sclerosis, *Chem. Rev.* 106 (2006) 1995–2044, <http://doi.org/10.1021/cr040410w>.
- [7] Y. Liu, P. Liang, L. Guo, Nanometer titanium dioxide immobilized on silica gel as sorbent for preconcentration of metal ions prior to their determination by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, *Talanta* 66 (1) (2005) 25–30, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.04.035>.
- [8] Z. Li, L. Zhang, Z. Zang, X. Chang, X. Zou, Attapulgite modified with 2-hydroxy-1-naphthaldehyde as selective solid-phase extractant for determination of copper(II) in environmental samples by ICP-OES, *Microchim. Acta* 171 (1–2) (2010) 161–168, <https://doi.org/10.1007/s00604-010-0407-0>.
- [9] M. Soyulak, I. Narin, M. Dogan, Trace Enrichment and Atomic Absorption Spectrometric Determination of Lead, Copper, Cadmium and Nickel in Drinking Water Samples by Use of an Activated Carbon Column, *Anal. Lett.* 30 (1997) 2801–2810, <https://doi.org/10.1080/00032719708001823>.
- [10] N. Pourreza, R. Hovezavi, Simultaneous preconcentration of Cu, Fe and Pb as methylthymol blue complexes on naphthalene adsorbent and flame atomic absorption determination, *Analitica Chimica Acta* 549 (1–2) (2005) 124–128, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.06.037>.
- [11] E.S. Forzani, H. Zhang, W. Chen, N. Tao, Detection of Heavy Metal Ions in Drinking Water Using a High-Resolution Differential Surface Plasmon Resonance Sensor, *Environ. Sci. Technol.* 39 (5) (2005) 1257–1262, <https://doi.org/10.1021/es049234z>.
- [12] A. Aili, H. Shen, X. Yin, Simultaneous determination of trace amounts of nickel, copper and mercury by liquid chromatography coupled with flow-injection on-line derivatization and preconcentration, *Analitica Chimica Acta* 369 (1998) 215–223, 39 (2005) 1257–1262, [https://doi.org/10.1016/s0003-2670\(98\)00252-9](https://doi.org/10.1016/s0003-2670(98)00252-9).
- [13] A. Bobrowski, K. Nowak, J. Zarebski, Application of a bismuth film electrode to the voltammetric determination of trace iron using a Fe(III)-TEA-Br³-catalytic system, *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 1691–1697, <https://doi.org/10.1007/s00216-005-3313-2>.
- [14] J. Singh, C.A. Huerta-Aguilar, H. Singh, T. Fandiyan, N. Singh, Voltammetric Simultaneous Determination of Cu²⁺, Cd²⁺ and Pb²⁺ in Full Aqueous Medium Using Organic Nanoparticles of Disulfide Based Receptor, *Electroanalysis* 27 (11) (2015) 2544–2551, <https://doi.org/10.1002/elan.201500197>.
- [15] F. Shi, S. Cui, H. Liu, S. Pu, A high selective fluorescent sensor for Cu²⁺ in solution and test paper strips, *Dyes Pigm.* 173 (2020), 107914, <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.107914>.
- [16] Y.-R. Chiou, H. Yan, C. Wan, C. Yen Huang, A.-T. Wu, A Schiff-based fluorescence sensor for the detection of Cu²⁺ and its application in living cells, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 390 (2019) 10.1016/j.jphotochem.2019.112326.
- [17] H. Wang, S. Zhao, Y. Xu, L. Li, B. Li, M. Pei, G. Zhang, A new fluorescent probe based on imidazole[2,1-b]benzothiazole for sensitive and selective detection of Cu²⁺, *J. Mol. Struct.* 1203 (2019), 127884, <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.127884>.
- [18] G. Sivaraman, M. Iniya, T. Anand, N.G. Kotla, O. Sunnapu, S. Singaravelu, A. Gulyani, D. Chellappa, Chemically diverse small molecule fluorescent chemosensors for copper ion, *Coord. Chem. Rev.* 357 (2018) 50–104, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.11.020>.
- [19] G. Sivaraman, T. Anand, D. Chellappa, A Fluorescence Switch for the Detection of Nitric Oxide and Histidine and Its Application in Live Cell Imaging, *ChemPlusChem* 79 (2014) 1761–1766, <https://doi.org/10.1002/cplu.201402217>.
- [20] V.K.G. Gangatharan, K.M. Falsamy, S. Gandhi, A. Jamespandi, A. Kandasamy, T. Arunachalam, A. Sreemuganarayanan, S. Balasubramaniyam, R. Jegathalaprathaban, Reversible NIR fluorescent probes for Cu²⁺ ions detection and its living cell imaging, *Sens. Actuators, B* 255 (2018) 3235–3247, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.09.150>.
- [21] Y.-L. Liu, L. Yang, P. Li, S.-J. Li, L. Li, X.-X. Pang, F. Ye, Y. Fu, A novel colorimetric and "turn-off" fluorescent probe based on catalyzed hydrolysis reaction for detection of Cu²⁺ in real water and in living cells, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 227 (2020) 117540, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117540>.
- [22] T. Anand, G. Sivaraman, D. Chellappa, Quinazolinocopper(II) ensemble as turn-on fluorescence sensor for cysteine and chemodiosimeter for NO, *J. Photochem. Photobiol., A* 281 (2014) 47–52, <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2014.02.015>.
- [23] S.J. Rane, G. Sivaraman, A. Mery Pushpalatha, S. Muthusubramanian, Quinoline based sensors for bivalent copper ions in living cells, *Sensors and Actuators B: Chemical* 255 (2018) 630–637, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.08.111>.
- [24] G. Sivaraman, T. Anand, D. Chellappa, Quick accessible dual mode turn-on red fluorescent chemosensor for Cu(II) and its applicability in live cell imaging, *RSC Adv.* 3 (2013) 17029–17033, <https://doi.org/10.1039/c3ra42109k>.
- [25] S. Lal, K. Fralash, S. Hooda, V. Kumar, F. Kumar, Bupropren-based chemosensor for efficient binding and sensing of Cu²⁺ ion in aqueous medium, *J. Mol. Struct.* 1199 (2020), 127003, <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.127003>.
- [26] J.S. Ganesan, S. Gandhi, K. Radhakrishnan, A. Balasubramaniam, M. Seppurumal, S. Ayyanar, Execution of julolidine based derivative as bifunctional chemosensor for Zn²⁺ and Cu²⁺ ions: Applications in bio-imaging and molecular logic gate, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 219 (2019) 33–43, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.04.029>.
- [27] K.S. Mani, R. Rajamanikandan, B. Murugesapandian, R. Shankar, G. Sivaraman, M. Ilanchelian, S.P. Rajendran, Coumarin based hydrazone as an ICT-based fluorescence chemosensor for the detection of Cu²⁺ ions and the application in HeLa cells, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 214 (2019) 170–176, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.02.020>.
- [28] Y. Zhang, L. Li, J. Wang, L. Jia, R. Yang, X. Guo, A 4,5-quinolimidate-based fluorescent sensor for sequential detection of Cu²⁺ and cysteine in water and living cells with application in a memorized device, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 230 (2020) 118030, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118030>.
- [29] O. Hanmeng, N. Chailek, A. Charoenpanich, P. Phuekivilai, N. Yoongkhaew, N. Saunanee, J. Sirirak, P. Swanglap, N. Wanichacheva, Cu²⁺-selective NIR fluorescence sensor based on heptamethine cyanine in aqueous media and its application, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 240 (2020) 118606, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118606>.
- [30] R. Kaur, S.K. Sahoo, A. Kuwar, N. Kaur, N. Singh, Rhodamine based NIR and ratiometric fluorescent sensor for selective identification of potassium ion: application in biological sample, *Supramolecular Chemistry* 31 (1) (2019) 36–44, <https://doi.org/10.1080/10610278.2018.1535709>.
- [31] D. Oushiki, H. Kojima, T. Terai, M. Arita, K. Hanaoka, Y. Urano, T. Nagano, Development and Application of a Near-Infrared Fluorescence Probe for Oxidative Stress Based on Differential Reactivity of Linked Cyanine Dyes, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (8) (2010) 2795–2801, <https://doi.org/10.1021/ja910090v>.
- [32] Z. Guo, C.-H. Kim, I. Shin, J. Yoon, A cyanine-based fluorescent sensor for detecting endogenous zinc ions in live cells and organisms, *Biomaterials* 33 (31) (2012) 7818–7827, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.07.014>.
- [33] H. Zheng, M. Yan, X.-X. Fan, D. Sun, S.-Y. Yang, L.-J. Yang, J.-D. Li, Y.-B. Jiang, A heptamethine cyanine-based colorimetric and ratiometric fluorescent chemosensor for the selective detection of Ag⁺ in an aqueous medium, *Chem. Commun.* 48 (2012) 2243–2245, <https://doi.org/10.1039/c2cc17388c>.
- [34] L. Long, X. Tan, S. Luo, C. Shi, Fluorinated near-infrared fluorescent probes for specific detection of Hg²⁺ in an aqueous medium and mitochondria of living cells, *New J. Chem.* 41 (17) (2017) 8999–8904, <https://doi.org/10.1039/c7nj01327b>.
- [35] S. Li, D. Zhang, X. Xie, S. Ma, Y. Liu, Z. Xu, Y. Gao, Y. Ye, A novel solvent-dependently bifunctional NIR absorptive and fluorescent ratiometric probe for detecting Fe³⁺/Cu²⁺ and its application in bioimaging, *Sens. Actuators, B* 224 (2016) 661–667, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.10.086>.
- [36] K. Vijay, C. Nandi, S.D. Samant, Synthesis of a dihydroquinoline based fluorescent cyanine for selective, naked eye, and turn off detection of Fe³⁺ ions, *RSC Adv.* 6 (55) (2016) 49724–49729, <https://doi.org/10.1039/C6RA06642A>.

- [38] H. Zheng, X.-J. Zhang, X. Cai, Q.-N. Bian, M. Yan, G.-H. Wu, X.-W. Lai, Y.-B. Jiang, Ratiometric Fluorescent Chemosensor for Hg^{2+} Based on Heptamethine Cyanine Containing a Thymine Moiety, *Org. Lett.* 14 (8) (2012) 1986–1989, <https://doi.org/10.1021/ol3004047>.
- [39] C.-Y. Li, X.-F. Kong, Y.-F. Li, C.-X. Zou, D. Liu, W.-G. Zhu, Ratiometric and colorimetric fluorescent chemosensor for Ag^+ based on tricarboyanine, *Dyes Pigm.* 99 (3) (2013) 903–907, <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2013.07.032>.
- [40] J. Wang, F. Song, J. Wang, X. Peng, A near-infrared and ratiometric fluorescent chemosensor for palladium, *Analyst* 138 (2013) 3667–3672, <https://doi.org/10.1039/c3an00616f>.
- [41] B.K. Datta, D. Thiagarajan, C. Kar, A. Ramesh, G. Das, A Near-Infrared emissive Al^{3+} sensing platform for specific detection in solution, cells and probing DNase activity, *Analytica Chimica Acta* 882 (2015) 76–82, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.04.032>.
- [42] W. Sun, S. Guo, C. Hu, J. Fan, X. Peng, Recent Development of Chemosensors Based on Cyanine Platforms, *Chem. Rev.* 116 (2016) 7768–7817, <http://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00001>.
- [43] D. Wu, L. Chen, W. Lee, G. Ko, J. Yin, J. Yoon, Recent progress in the development of organic dye based near-infrared fluorescence probes for metal ions, *Coord. Chem. Rev.* 354 (2017) 74–97, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.06.011>.
- [44] M.D. Laramie, A. Levitz, M. Henary, Cyanine and Squaric Acid Metal Sensors, *Sensors and Actuators B: Chemical* 243 (2017) 1191–1204, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.12.051>.
- [45] K. Kiyose, H. Kojima, Y. Urano, T. Nagano, Development of a Ratiometric Fluorescent Zinc Ion Probe in Near-Infrared Region, Based on Tricarboyanine Chromophore, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (20) (2006) 6548–6549, <https://doi.org/10.1021/ja060399c10.1021/ja060399c.s001>.
- [46] G.A. Reynolds, K.H. Drexhage, Stable Heptamethine Pyrylium Dyes That Absorb in the Infrared, *J. Org. Chem.* 42 (5) (1977) 885–888, <https://doi.org/10.1021/jo00425a027>.
- [47] P. Piyasuch, S. Watpathomsab, V.S. Lee, H.A. Nienaber, N. Wanichacheva, Highly sensitive and selective Hg^{2+} -chemosensor based on diindole-cyclic fluorescein for optical and visual-eye detections in aqueous buffer solution, *Sens. Actuators, B* 224 (2016) 201–208, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.09.131>.
- [48] A. Petdum, N. Warakiziri, O. Hammeng, S. Jarutikom, S. Chaneam, J. Sirirak, A. Charoenpanich, W. Panchan, T. Sooksimuang, N. Wanichacheva, A new water-soluble Fe^{3+} fluorescence sensor with a large Stokes shift based on [5]helicene derivative: Its application in flow injection analysis and biological systems, *J. Photochem. Photobiol., A* 401 (2020), 112769, <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2020.112769>.
- [49] D. Karak, A. Banerjee, A. Sahana, S. Guha, S. Lohar, S. S. Adhikari, D. Das, 9-Acridone-4-carboxylic acid as an efficient Cr(III) fluorescent sensor: Trace level detection, estimation and speciation studies, *Journal of Hazardous Materials*, 188 (2011) 274–280, [10.1016/j.jhazmat.2011.01.110](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.01.110).
- [50] M. Faraz, A. Abbasi, F.K. Naqvi, N. Khare, R. Prasad, I. Barman, R. Pandey, Polyindole/cadmium sulphide nano-composite based turn-on, multi-ion fluorescence sensor for detection of Cr^{3+} , Fe^{3+} and Sr^{2+} ions, *Sens. Actuators, B* 269 (2018) 195–202, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.04.110>.
- [51] Y. Wei, L. Xu, S. He, C. Li, Q. Wu, X. Zeng, H. Wang, K. Liu, Novel benzimidazole-based conjugated polyelectrolytes: synthesis, solution photophysics and fluorescent sensing of metal ions, *e-Polymers* 20 (2020) 16–31, [10.1515/epoly-2020-0003](https://doi.org/10.1515/epoly-2020-0003).
- [52] G. D. Christian, P. K. Dasgupta, K. A. Schug, *Analytical Chemistry*, Seventh ed., Wiley Global Education, 2013.



Contents lists available at ScienceDirect

Polymer Testing

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/polytest>



Theoretical solvent selection for nanostructured surface fabrication of reusable and colourimetric visual-eye sensor strips with rhodamine derivative-encapsulated polymeric membranes for highly sensitive and selective detection of Hg^{2+}

Sutinee Girdthep^{a,*}, Oranual Hanmeng^{a,b}, Narit Triamnak^c, Nirumon Chailek^a, Nantant Wanichacheva^a

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

^b Chemistry Program, Faculty of Science and Technology, Thapsatri Rajabhat University, Lop Buri, 15000, Thailand

^c Department of Materials Science and Engineering, Faculty of Engineering and Industrial Technology, Silpakorn University, Nakhon Pathom, 73000, Thailand

ARTICLE INFO

Keywords:

PMMA electrospun membrane
Visual eye strip test
Hg detection
Electrospinning
Solubility parameter
Rhodamine derivative

ABSTRACT

Homogenous electrospinnable solutions were prepared through theoretical solvent selection using the high solubility parameters of rhodamine derivatives (rhodamine B hydrazide, RBH and rhodamine 6G hydrazide, R6GH) and poly(methylmethacrylate) (PMMA). Results of the systematic method showed that the best solvent for the Hg^{2+} -sensing membranes was ethanol/tetrahydrofuran at 0.6/0.4 (v/v). PMMA/RBH and PMMA/R6GH membranes were fabricated using electrospinning. The optimal PMMA concentration was 11 wt%. The PMMA/RBH and PMMA/R6GH membranes possessed a nanostructured smooth surface with a high surface area of ultra-fine narrow nanofibres (about 2.5 μm in diameter). Given their high surface area with narrow-diameter fibres, the PMMA/RBH and PMMA/R6GH electrospun membranes showed high selectivity and sensitivity fluorescent sensing of Hg^{2+} ion with low detection limit (ranges of 0.0–1.099 and 3.6–4.3 ppb, respectively) than the sensor-encapsulated polymeric membranes prepared by spinning technique. The sensing membranes provided a vibrant colourimetric response unique to Hg^{2+} ions (white-pink) over other potential interfering metal cations that were observed within 30 s by the visual eye. Furthermore, the membranes were effective for reuse up to four times with a high fluorescence intensity. Therefore, PMMA/RBH and PMMA/R6GH can be used as portable colourimetric visual-eye and fluorescent sensors for the easy real-time monitoring of Hg^{2+} ions in dietary and environment sources.

1. Introduction

Nanoscale materials have continuously gained recognition as novel structural and functional materials [1–4]. Electrospun nanofibre membranes are characterised by high porosity, high surface area, good thermal stability and water permeability, interconnected pore structure and well-controlled composition [1,5,6].

Electrospinning is employed to produce nanofibre membranes. This technique is versatile and can be used in a wide range of polymer materials because of its simplicity, low cost and easy setup. Electrospinning produces thin electrospun nanofibres with a high surface area per volume ratio of membranes [7,8].

These outstanding characteristics make electrospun nanofibre membranes a great choice for various applications [1,9,10], including sensing. For instance, colourimetric chemosensors have been developed for the visual detection and quantitative determination of heavy metals [11–13]. Fluorescent chemosensors have been widely used for metal ion detection. They also allow on-site and remote detections of environmental samples or even 'visual-eye' and chromogenic change detections [14–17]. Moreover, colourimetric strategies offer clear benefits in terms of sensitivity, selectivity, response time and on-site monitoring as an easily read-out visual eye [18].

Many methods for metal ion detection are time consuming [19]. Thus, fluorescent sensor strips with a rapid visual change in colour are of

* Corresponding author.

E-mail addresses: GIRDTHEP_S@SU.ac.th, S.GIRDTHEP@gmail.com (S. Girdthep).

<https://doi.org/10.1016/j.polymeresting.2021.107151>

Received 20 December 2020; Received in revised form 8 February 2021; Accepted 2 March 2021

Available online 5 March 2021

0142-9418/© 2021 The Authors.

Published by Elsevier Ltd.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

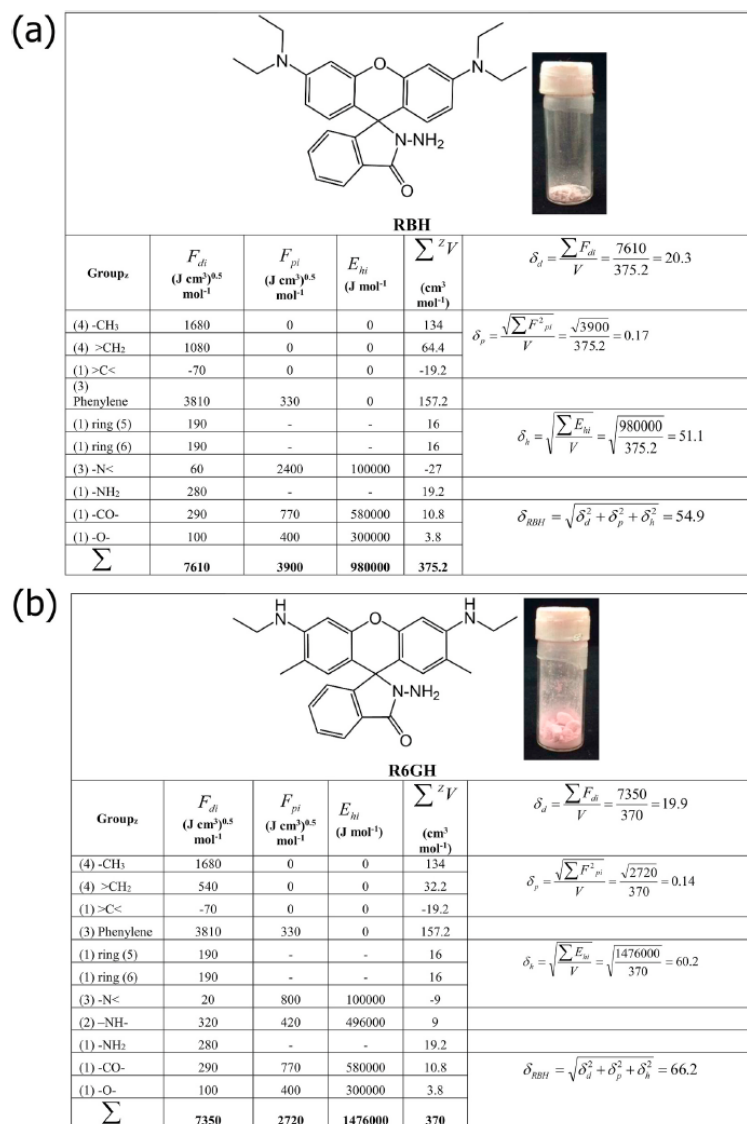


Fig. 1. Structural, physical appearance and solubility parameter calculations for (a) rhodamine B hydrazine (RBH) and (b) rhodamine 6G hydrazide (R6GH).

the highest interest in heavy metal detection. Most recent studies have focused on the production of portable sensor strips using polymeric membranes with fluorescence chemosensor incorporation [19].

Among toxic trace heavy metals, mercury (Hg) is one of the most dangerous pollutants and causes many serious human health problems [20–22]. Aquatic systems can be contaminated by methylmercury,

soluble complexes of mercuric ions with organic or inorganic ligands. Nowadays, different approaches have been developed for the sensitive detection of mercury even at concentrations below nanomolar levels.

The most common fluorescence chemosensors for Hg²⁺ are rhodamine derivatives. Their structure contains a colourless tricyclic lactam. The colour changes result from the opening of this lactam ring in the

Table 1
Difference in solubility parameter ($\Delta\delta$), relative energy distance (RED) and polymer-solvent interaction parameter (χ_{12}) of ET/THF at different volume fractions (optimal binary solvent system).

Parameter	Volume fraction of ET in ET/THF (v/v)										
	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0.0
$\Delta\delta^a$	5.72	2.29	1.40	0.51	0.38	1.27	2.16	3.05	3.94	4.83	3.18
RED ^b	1.55	0.72	0.75	0.81	0.89	0.98	1.08	1.19	1.31	1.42	0.71
χ_{12}^c	4.22	2.34	1.78	1.17	0.50	0.19	0.93	1.71	2.52	3.36	2.84

^a Hildebrand solubility parameters: $\Delta\delta \leq 0.9 \text{ MPa}^{0.5}$ binary solvent likely to be miscible with PMMA, $\Delta\delta > 0.9 \text{ MPa}^{0.5}$; immiscibility

^b Hansen solubility: RED < 1; binary solvent likely to be miscible with PMMA, RED > 1; immiscibility

^c Flory-Huggins parameter: $\chi_{12} \leq 0.5$; binary solvent likely to be miscible with PMMA, $\chi_{12} > 0.5$; immiscibility

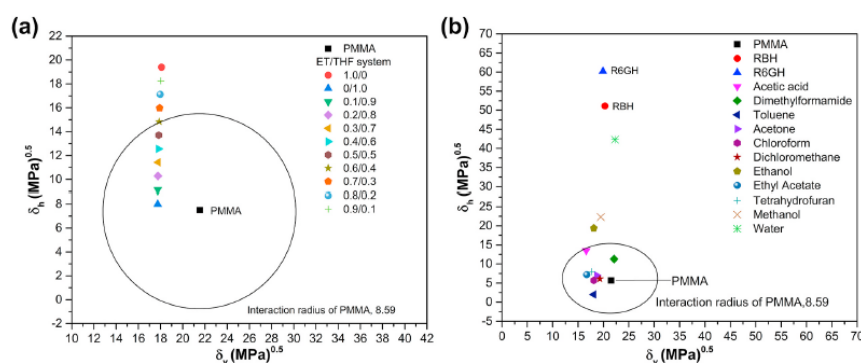


Fig. 2. Bagley solubility graph of PMMA containing the (a) binary solvent system of ET/THF at different ratios and (b) Hansen solubility parameter of RBH, R6GH and single solvent.

presence of a metal ion [23–25]. Moreover, it has a dual detection for fluorogenic and chemogenetic changes, which can be easily detected by the visual eye [24].

Hence, portable electrospun sensor strips based on polymeric membranes with fluorescence chemosensors could have high sensitivity, selectivity and low detection limits because of their unique high surface area [19,26].

Many studies reported on Hg^{2+} electrospun membranes. Hg^{2+} -sensing membranes were produced via encapsulation or loading of fluorescence chemosensors on polymeric electrospun membranes. In specific, a spirocyclic phenyl thiosemi-carbazide rhodamine derivative was loaded into hydrophilic polymer [27], RBH was modified by reacting with an electrophilic *p*-phenylene diisothiocyanate in chitosan-based nanofibres [24], polyaniline-based nanofibres (polymer-based sensor) and fluorescent gold nanoclusters with an electrospun bovine serum albumin-poly(ethylene oxide) mat were prepared [18] and 9,9-dihexyl fluorene-2,7-bipyridine (bpy-F-bpy) in poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-*N*-methylacrylamide) (poly(HEMA-co-NMA)) was developed [28].

Additionally, rhodamine derivatives of rhodamine B hydrazide (RBH) and rhodamine 6G hydrazide (R6GH) were encapsulated on PMMA by spin coating [29]. Nevertheless, portable sensor strips containing RBH and R6GH have yet to be fabricated using electrospinning for Hg^{2+} detection.

Solvent properties affect not only polymer spinnability but also fibre morphology and diameter [30]. However, the selection of a suitable solvent for electrospinning a given polymer is generally based on experience with similar polymer systems or on solubility models limited by the current physico-chemical database [30]. Thus, solubility parameters (δ) are good indicators for choosing solvents to fabricate nanofibres through electrospinning [32,33].

The objective of the present study is to fabricate easy-handling free sensor strips based on PMMA electrospun membranes. PMMA is a highly transparent thermoplastic frequently used in medical, dental and membrane applications because of its non-toxicity and low cost [34–38]. This study is the first to apply theoretical solvent selection in electrospinning using the solubility parameters of PMMA and rhodamine derivatives (RBH or R6GH). Theoretical selection would reduce a time to find the best solvents. In this research, the solubility parameters of rhodamine derivatives RBH and R6GH were first calculated and reported. Additionally, Hg^{2+} sensing electrospun membranes (sensor strips) were fabricated containing PMMA with RBH or R6GH by using the optimal solvent from theoretical selection. The effect of polymer concentration and rhodamine derivative (RBH or R6GH) incorporation on fibre morphology was reported. Hg^{2+} -sensing membrane strips (PMMA/RBH and PMMA/R6GH) were studied for the sensitivity, selectivity, competitive and colourimetric detection of Hg^{2+} ion in aqueous solutions. The relationship between the surface area and detection limit of sensing membrane was also investigated, which have been a very few literature reports. Moreover, the response time of visual-eye Hg^{2+} detection using PMMA/RBH and PMMA/R6GH membrane strips was evaluated from the kinetic study of colour change. This work suggests possible molecular phenomena during visual-eye strip test in the PMMA/RBH and PMMA/R6GH sensing membranes when attacked with Hg^{2+} . The reusability of the PMMA/RBH and PMMA/R6GH membrane strips was also investigated.

2. Experimental

2.1. Materials

PMMA with $M_w = 120,000 \text{ g mol}^{-1}$ was purchased from

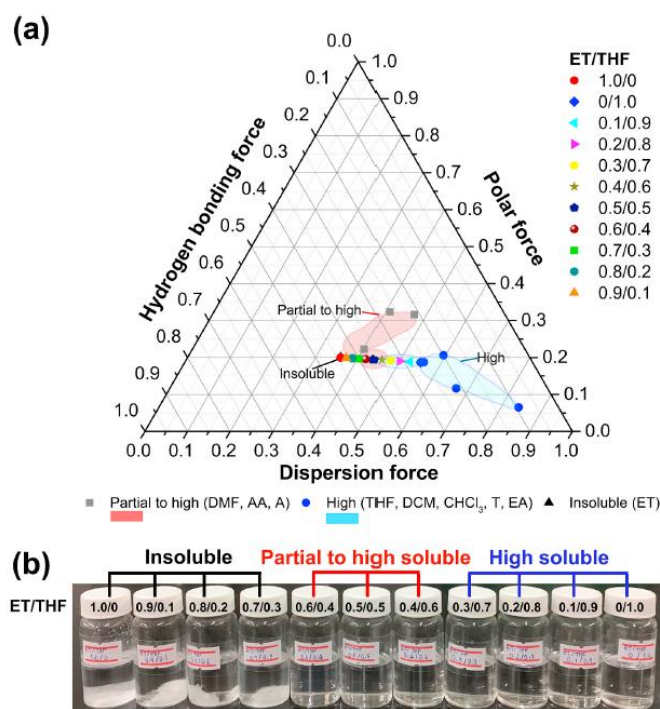


Fig. 3. (a) Teas graph of PMMA for the binary solvent system of ET/THF (b) PMMA in ET/THF at different ratios after 24 h.

Sigma-Aldrich (USA). RBH and R6GH were synthesised and characterised as described previously [29,39]. Dichloromethane (DCM), acetone (A), chloroform (CHCl₃), tetrahydrofuran (THF), toluene (T) and *N,N*-dimethylformamide (DMF) were obtained from RCI Labscan, Thailand. Acetic acid (AA), ethyl acetate (EA) and ethanol (ET) were obtained from Sigma-Aldrich (USA). All reagents were of analytical grade and used as received. Deionised (DI) water was purified by the Barnstead water purification system (USA). All metal salts, such as acetate of Hg²⁺, Cu²⁺, Ag⁺, Pb²⁺, Fe³⁺, Fe²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺, Na⁺ and K⁺, were purchased from Aldrich and used as received.

2.2. Solubility parameter calculation of RBH and R6GH

The Hansen solubility parameters (HSPs) of RBH and R6GH molecules were determined from the chemical structures utilising the Hoytzer/Van Krevelen approaches [40]. The solubility parameter of PMMA was 22.68 MPa^{1/2} [30]. The units of solubility parameters are MPa^{1/2}, (J m⁻³)^{1/2} or (cal cm⁻³)^{1/2}, where 1 (cal cm⁻³)^{1/2} is comparable to 2.0421 MPa^{1/2} [41,42]. The solubility parameters of RBH, R6GH and PMMA are important to predict the optimal solvent for preparing the sensing membranes via electrospinning.

2.3. Theoretical approach for the solvent selection to produce Hg²⁺-sensing membranes

2.3.1. Hildebrand solubility parameter

The first step in selecting an appropriate solvent system, the theory of

Hildebrand solubility parameter is in [supporting information S1: Theoretical approach for the solvent selection](#). Solvent-polymer interactions are favorable if the miscibility parameter or the difference of solubility parameter ($\Delta\delta$) is less than 0.9. This condition indicates that the solvent could dissolve PMMA [43]. The solubility parameter of the binary system solvent (δ_{mixture}) is calculated as follows (Eq. S(2) in [supporting information S1](#)).

2.3.2. Hansen solubility parameter theory

From the HSP theory, the relative energy difference (RED number) as shown in Eq. (S6). RED values lower than 1 indicate that the liquid is a PMMA solvent. Moreover, the solubility distance ($D_{\text{solvent-PMMA}}$) could be calculated in Eq. S(10). The complete miscibility is obtained when the solubility distance $D_{\text{solvent-PMMA}}$ is lower than the solubility radius of PMMA.

2.3.3. Flory-Huggins solubility parameter

Flory-Huggins chi parameter (χ_{12}), as shown in Eq. S(11). The lower the Flory-Huggins parameter value ($\chi_{12} \leq 0.5$), the greater the miscibility of the solvent. χ_{12} values much above 0.5 indicate non-solvency [43].

2.3.4. Developing solubility regions of PMMA on Teas graph

The Teas graph was used to confirm whether or not the optimal solvent composition agreed with other theoretical approaches ([Details in Supporting information](#)), such as the Hildebrand solubility parameter. The ET/THF system (from theoretical selection), especially a ratio of 0.6/0.4 was confirmed by the Teas graph for the best solvents for PMMA.

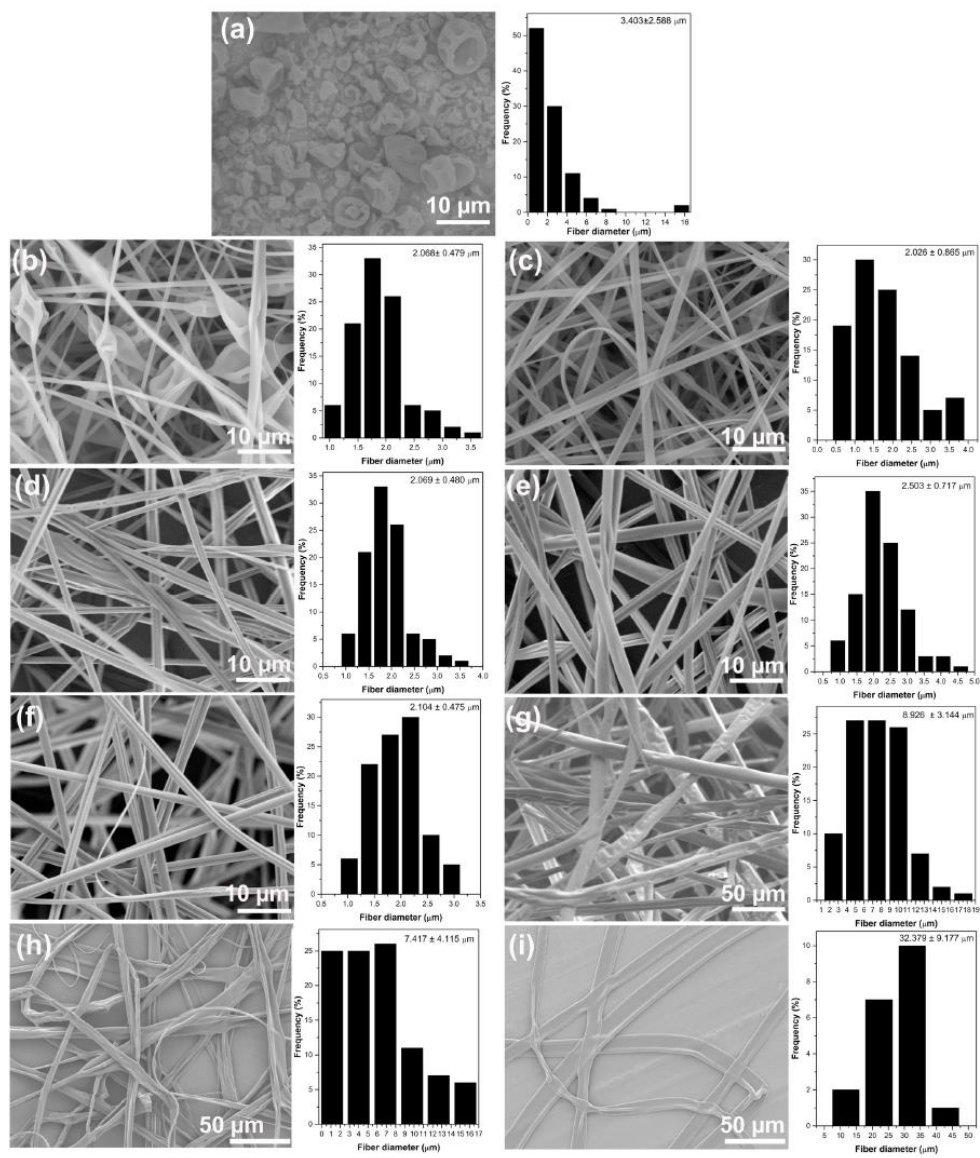


Fig. 4. Morphology micrographs of electrospun PMMA membranes obtained at PMMA concentrations of (a) 5, (b) 10, (c) 11, (d) 12, (e) 13, (f) 14, (g) 15, (h) 17 and (i) 19 wt%.

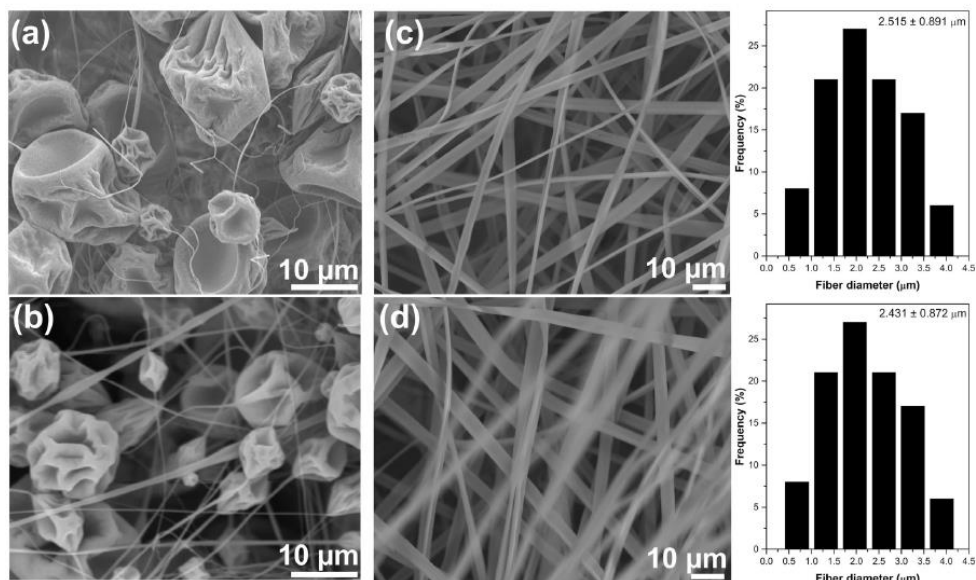


Fig. 5. Morphology micrographs of electrospun PMMA membranes of (a) PMMA/RBH(CHCl_3), (b) PMMA/R6GH(CHCl_3), ($\times 2000$) (c) PMMA/RBH (ET/THF 0.6/0.4) and (d) PMMA/R6GH(ET/THF 0.6/0.4) ($\times 1000$).

2.4. Fabrication of PMMA, PMMA/RBH and PMMA/R6GH nanofibre membranes

Electrospun solutions were prepared by dissolving 10–20 wt% of PMMA for 4 h under magnetic stirring in the optimal binary solvent mixtures of ET/THF at a 0.6/0.4 ratio (the theoretical and systematic methods for selecting solvents).

For the fabrication of PMMA/RBH and PMMA/R6GH, 0.008 g of RBH or R6GH (7.0×10^{-4} M or 0.3 wt% with respect to the weight of PMMA in accordance with Kraithong et al. [29]) was added to 11 wt% of PMMA solutions (optimal concentration of PMMA) in ET/THF. PMMA/RBH and PMMA/R6GH prepared using the universal solvent of CHCl_3 were denoted as PMMA/RBH (CHCl_3) or PMMA/R6GH (CHCl_3), respectively.

Pure PMMA and a mixture solution of PMMA/RBH and PMMA/R6GH (5 mL) were loaded into a syringe tipped with a stainless steel needle with an inner diameter of 0.8 mm. The voltages were fixed at 25 kV and applied to the spinneret in a controlled system. A grounded metal drum with the aluminium foil substrate taped on it was used as the collector and placed 10 cm below the tip of the spinneret. Electrospinning was operated in a closed chamber with a relative humidity of $55 \pm 5\%$ and an ambient temperature of 24.0 ± 1.0 °C.

2.5. Characterisation of PMMA, PMMA/RBH and PMMA/R6GH nanofibre membranes

The morphologies of the electrospun mats and fibres were analysed using a MIRA3 TESCAN scanning electron microscope (SEM). Mat samples were coated by a thin layer of gold using a sputter coater operated at 18 mA under 0.1 mbar for 1 min. The fibre diameter size was determined using Image J software ($n = 100$). Additionally, the effect of PMMA concentration (10–20 wt%) on nanofibre diameter and

nanoporous was investigated.

2.6. Hg-sensing properties of PMMA/RBH and PMMA/R6GH membranes

2.6.1. Sensitivity study

The response performance of the fibres towards Hg^{2+} ions was evaluated as follows. The nanofibres deposited on aluminium substrate were cut into $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ pieces. Then, the membranes were immersed in aqueous mercury (II) acetate solutions in physiological pH ($\text{pH} \approx 7.4$) with different Hg^{2+} concentrations for 0–30 min. The utilisation of polymeric membranes as simple visual-eye sensors was investigated with a Cary 60 UV-Visible spectrophotometer and a Perkin Elmer Luminescence spectrometer LS 50B with a fibre optic coupler. Fluorescence emission was measured at the excitation wavelength of 500 nm for the PMMA/RBH and PMMA/R6GH sensors.

2.6.2. Kinetic study of sensing process (response time)

The kinetic sensing response was studied using a Cary 60 UV-Visible spectrophotometer with a fibre optic coupler. The absorbance intensity spectra at the maximum wavelength ($\lambda_{\text{max}} \approx 560$ nm of PMMA/RBH and 520 nm of PMMA/R6GH) and the chromogenic change (redness parameter in term of a^+ value, CIE Lab [46]) of the membranes were plotted as a function of time after the addition of 20 mM Hg^{2+} (100 μL , $\text{pH} \approx 7.4$).

2.6.3. Detection limit

The detection limits of the membrane were determined based on $3\delta/k$, where δ is standard deviation of the measured intensity of the blank solution and k is the slope of the calibration plot [47,48]. The Hg^{2+} solution (100 μL , $\text{pH} \approx 7.4$) had different concentrations in the linear concentration range of 0.20059 ppm (1×10^{-6} M) to 20.059 ppm ($1 \times$

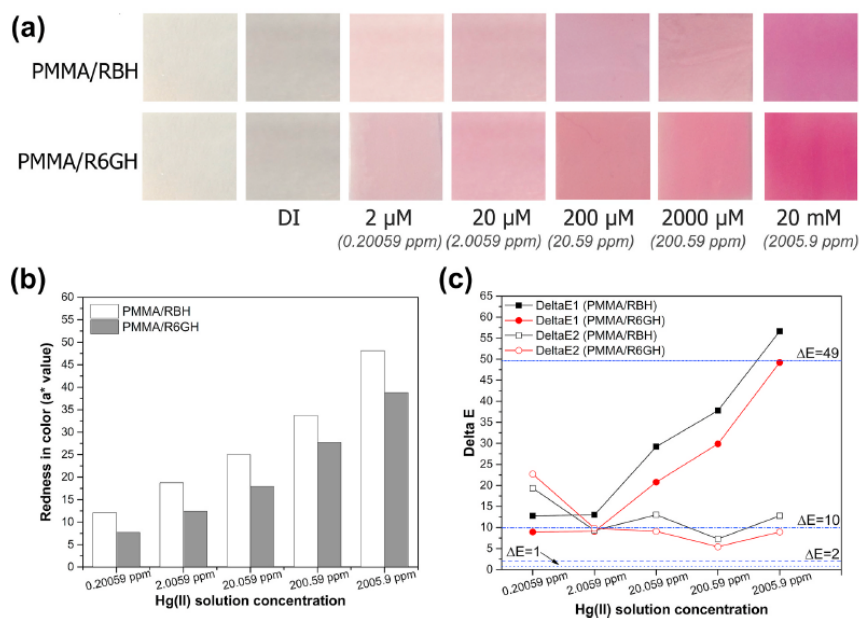


Fig. 6. (a) Optical colourimetric responses of (A) PMMA/RBH and (B) PMMA/R6GH sensor strips after incubation for 20 min in Hg^{2+} aqueous solutions ($\text{pH} \approx 7.4$) with different Hg^{2+} concentrations, (b) CIE LAB colour changes in redness (a^* value) of membranes and (c) colour difference (Delta E); Delta E1 = colour difference of test membranes and free membrane and Delta E2 = colour difference of each adjacent test membranes. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Table 2

Colour coordination values in the L^* , a^* , b^* , C and H^* systems of PMMA/RBH and PMMA/R6GH membranes in different aqueous solutions ($\text{pH} \approx 7.4$).

	Aqueous solution	L^*	a^*	b^*	Delta E1	Delta E2	C	H^*
PMMA/RBH	None	87.06	-0.71	6.37			87.06	96.4
	DI	73.40	-0.20	5.08			73.40	92.2
	2 μM Hg^{2+} (0.20059 ppm)	72.77	12.07	1.62	12.76	19.33	72.77	7.7
	20 μM Hg^{2+} (2.0059 ppm)	69.95	18.74	0.87	12.99	9.28	69.95	2.7
	200 μM Hg^{2+} (20.059 ppm)	58.78	25.00	3.03	29.20	12.99	58.78	6.9
	2000 μM Hg^{2+} (200.59 ppm)	57.52	33.74	0.17	37.78	7.28	57.52	0.3
PMMA/R6GH	20 mM Hg^{2+} (2005.9 ppm)	45.25	48.12	-3.83	56.63	12.76	45.26	355.4
	None	88.96	-1.91	7.57			7.81	104.1
	DI	74.50	-0.20	5.06			5.07	92.3
	2 μM Hg^{2+} (0.20059 ppm)	82.90	8.11	5.19	11.81	22.69	9.63	32.7
	20 μM Hg^{2+} (2.0059 ppm)	72.50	12.45	1.77	9.02	10.59	12.57	8.1
	200 μM Hg^{2+} (20.059 ppm)	65.36	17.56	3.84	20.01	9.02	17.98	12.3
2000 μM Hg^{2+} (200.59 ppm)	64.79	27.74	0.98	29.86	11.78	27.76	2.0	
20 mM Hg^{2+} (2005.9 ppm)	49.88	38.83	-12.06	49.22	11.81	40.66	342.7	

10^{-4} M). The fluorescence intensity of the membrane was recorded using a Perkin Elmer Luminescence spectrometer LS 50B with a fibre optic coupler.

2.6.4. Selectivity and competitive studies

The selectivity of the membranes towards metal ions was investigated using a method similar to the separate solution method (SSM). The membranes were immersed into aqueous solutions of metal ions (20.059 ppm (1×10^{-4}) and 2005.9 ppm (1×10^{-2} M)), including Hg^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Ag^+ , Pb^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Na^+ and K^+ ($\text{pH} \approx 7.4$). The physical appearance and fluorescence intensity of the membranes

(I_f) were recorded before and after immersion (15 min) into aqueous solutions.

Then, aqueous solutions containing Hg^{2+} (1×10^{-2} M, $\text{pH} \approx 7.4$) and other metal ions (1×10^{-2} M, $\text{pH} \approx 7.4$) at a ratio of 1/10 (v/v) were used in a study of interference effect. The I_f/I_0 was reported where I_0 is the fluorescence emission intensity of each membrane sensor (PMMA/RBH and PMMA/R6GH) in the presence of Hg^{2+} (0.01 M) as a reference.

2.6.5. Reusability of membrane

Membrane sensors immersed in a solution of Hg^{2+} (1×10^{-2} M, $\text{pH} \approx 7.4$) for 15 min were transferred into 1 M ethylenediamine (EDA)

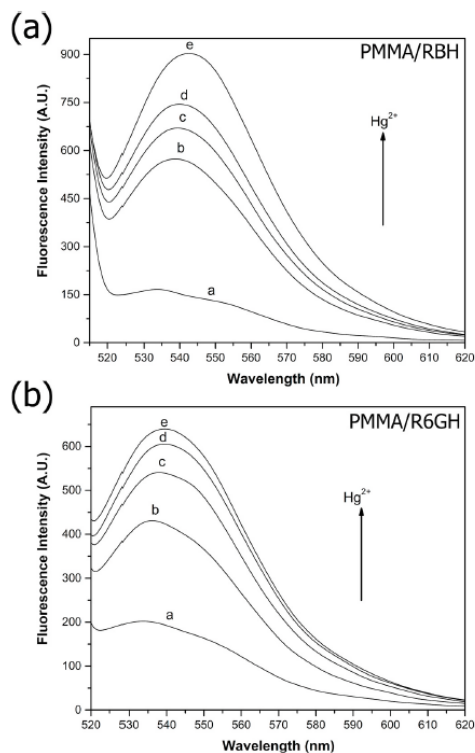


Fig. 7. Fluorescence intensity of the (a) PMMA/RBH and (b) PMMA/R6GH sensor strips after incubation for 20 min in Hg^{2+} aqueous solutions (10 μL , pH \approx 7.4): (a) Free sample, (b) DI water, (c) 2 μM (0.20059 ppm), (d) 20 μM (2.0059 ppm) and (e) 200 μM (20.059 ppm).

Table 3

Analytical parameters of PMMA/RBH and PMMA/R6GH sensing electrospun membranes.

Sensors	Working system	Detection limit	Working range	Ref
RBH	MeOH/ H_2O solution (1:9 v/v)	46.7–51.3 ppb	500–2500 ppb	[29]
	PMMA-spinning	0.137–0.263 ppb	50–750 ppb	[29]
	PMMA-electrospinning (ET:THF 0.6:0.4)	0.6–1.099 ppb	200–800 ppb	This work
R6GH	MeOH/ H_2O solution (1:9 v/v)	4.8–7.0 ppb	100–250 ppb	[29]
	PMMA-spinning	9.6–14.2 ppb	100–700 ppb	[29]
	PMMA electrospinning (ET:THF 0.6:0.4)	3.6–4.3 ppb	200–800 ppb	This work

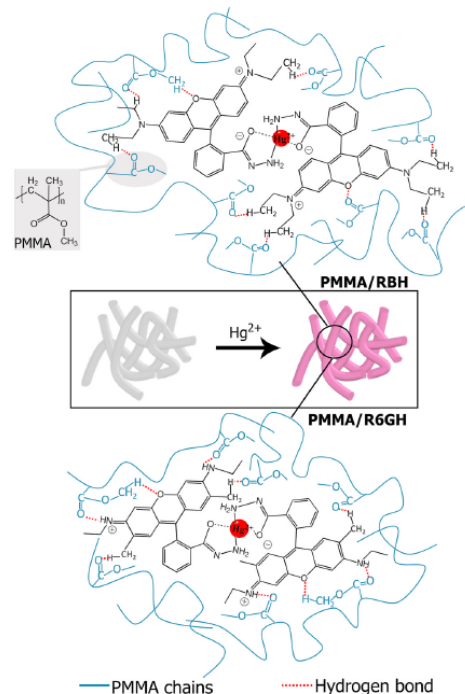


Fig. 8. Proposed operation of sensors RBH and R6GH in PMMA/RBH and PMMA/R6GH membranes after binding to Hg^{2+} .

(100 mL) to determine the reusability of the sensors. Then, the decolourised membrane sensor was washed with DI water until neutral pH.

3. Results and discussion

3.1. Solubility parameters of RBH and R6GH

The estimates of the solubility parameter (δ) have been used with some success to predict the miscibility of RBH and R6GH, as shown in Fig. 1. These values can be estimated in accordance with the methods of Hoftyzer/Van Krevelen, which are in the HSPs [39,40,49]. The HSPs of RBH (δ_{RBH}) and R6GH (δ_{R6GH}) molecule were $54.9 \text{ (MPa)}^{1/2}$ and $66.2 \text{ (MPa)}^{1/2}$, respectively. This result indicates that δ_{RBH} and δ_{R6GH} are important to predict the optimal solvent for the preparation of Hg^{2+} membranes containing PMMA and a rhodamine derivative.

3.2. Database and selection of solubility parameters

The solubility parameters of the single and binary solvent systems were estimated in terms of polymer (PMMA)/solvent system interactions for the solvent selection to produce Hg^{2+} -sensing membranes. All parameter data from the theoretical approach are shown in Supporting information Tables S3–S5 in S2: Results and discussion.

The binary solvent system ET/THF showed consistent parameters, such as the difference in solubility parameter $\Delta\delta$ (Hildebrand solubility parameters), RED (Hansen solubility) and Flory–Huggins χ_{12}

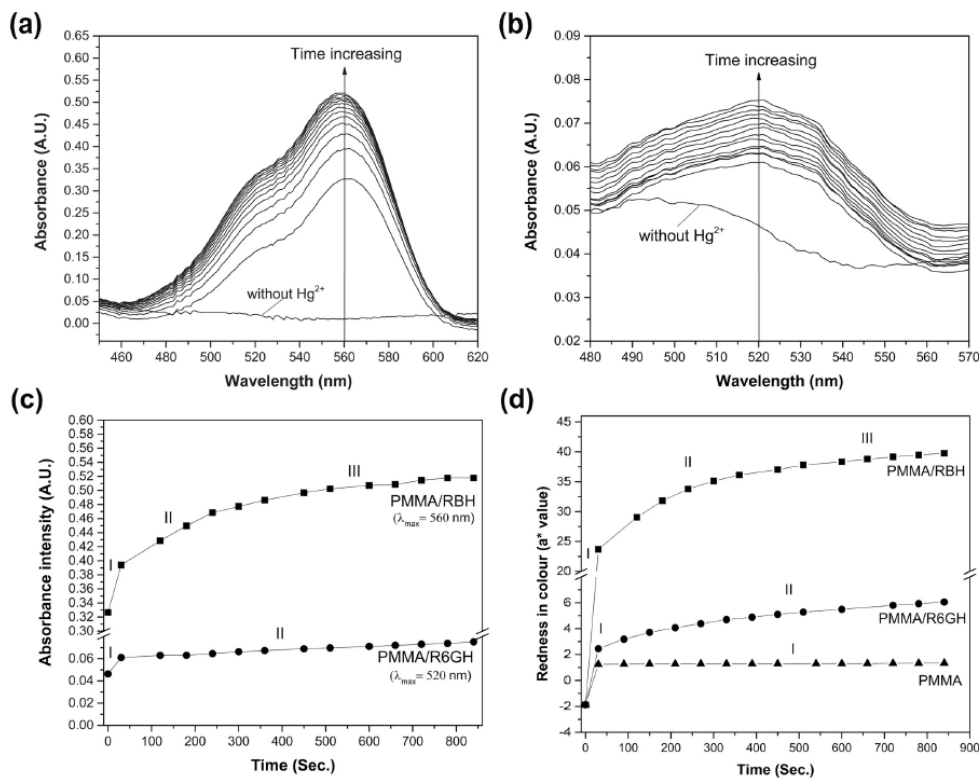


Fig. 9. Kinetic UV-Visible response of the (a) PMMA/RBH and (b) PMMA/R6GH sensor strips as a function of time after incubation in 20 mM Hg^{2+} aqueous solutions (10 μL , pH \approx 7.4) (c) and (d) corresponding time-dependent visualisation of (c) absorbance intensity at maximum wavelength and (d) CIE LAB colour changes of redness (a^* value). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

parameter. The ET/THF system represented a good solvent for PMMA, especially at the 0.6/0.4 v/v ratio, as summarised in Table 1. This ratio suggests that this solvent is likely to be miscible with PMMA (white area in Table 1). ET/THF (0.6/0.4) allowed the polymer chains to expand in solution, with $\Delta\delta = 0.38$, RED = 0.89 and $\chi_{12} = 0.50$.

A PMMA Bagley diagram was constructed with a radius of 8.59, as illustrated in Fig. 2(a). The composition of 0.6/0.4 in the Bagley solubility graph (the HSPs) was in PMMA cycle. A working system for rhodamine derivative sensors was the alcohol/water system (methanol/water at 1/9 v/v). However, alcohol (ET, methanol) and water were located outside the PMMA circle related to PMMA immiscibility, as shown in the Bagley solubility graph in Fig. 2(b). Thus, the point standing for methanol, ethanol and water lies outside the solubility sphere, indicating that PMMA could not be dissolved. ET/THF is an interesting solvent in membrane production because it contains a mixture of alcohol for the solubility of highly polar rhodamine derivatives (RBH and R6GH).

Furthermore, solubility maps (Teas graphs) for PMMA were developed to confirm PMMA solubility. PMMA was tested in various single solvents, and the results are presented as a graph in Fig. 3. THF, DCM, CHCl_3 , T and EA were active solvents for PMMA as a high level (blue dot marks and blue area on the graph).

Blue dot marks and blue area on the graph indicate that THF, DCM, CHCl_3 , T and EA have high levels of solubility for PMMA. DMF, AA and A are active solvents for PMMA with a partial-to-high level (grey square marks and red area on the graph). ET (black triangle marks) is a non-solvent for PMMA.

Additionally, PMMA dissolved in ET/THF if the composition of ET does not exceed the volume fraction of 0.6. The fractional cohesion parameters (f_d , f_p and f_h) of ET/THF were plotted at different ratios on the Teas graph. The ET/THF solvent at 0.6/0.4 was located in a partial-to-high level for PMMA. This phenomenon corresponded to the Bagley solubility graph in Fig. 2(b) and the PMMA solubility graph in Fig. 3(b). Consequently, the Teas graph confirmed the ET/THF ratio at 0.6/0.4, which agreed with the results of the other theoretical approaches.

Due to the high solubility parameter of RBH (54.9 $(\text{MPa})^{1/2}$) and R6GH (66.2 $(\text{MPa})^{1/2}$), the $\delta_{\text{ET/THF}}$ at 0.6/0.4 ratio was closer to RBH and R6GH ($\delta_{\text{ET/THF}}$ at 0.6/0.4 ratio = 23.23 $(\text{MPa})^{1/2}$ and $\delta_{\text{ET/THF}}$ at 0.5/0.5 ratio = 22.49 $(\text{MPa})^{1/2}$).

Hence, the thermodynamic criteria of the methodology proposed for the preparation of homogenous electrospinnable solutions were achieved. The best solvent for the Hg^{2+} -sensing PMMA/RBH and PMMA/R6GH membranes was ET/THF at a volume ratio of 0.6/0.4.

Table 4
Kinetic parameters from maximum absorbance intensity and redness parameter (a^* value) of PMMA/RBH and PMMA/R6GH sensor membranes.

Maximum absorbance intensity	Membrane ^a	Stage	Linear regression equation	R ²	Rate constant (k, A.U s ⁻¹)
	PMMA/RBH ($\lambda_{\max} = 560 \text{ nm}$)	I	$y = 0.0023x + 0.3265$	1.00	2.30×10^{-3}
		II	$y = 0.0030x + 0.3931$	0.96	3.00×10^{-3}
		III	$y = 6 \times 10^{-5}x + 0.4731$	0.97	6.00×10^{-5}
	PMMA/R6GH ($\lambda_{\max} = 520 \text{ nm}$)	I	$y = 0.0005x + 0.0463$	1.00	5.00×10^{-4}
		II	$y = 2 \times 10^{-5}x + 0.0607$	0.99	2.00×10^{-5}
Redness parameter (a^* value)	Membrane	Stage	Linear regression equation	R ²	Rate constant (k, Unit s ⁻¹)
	PMMA/RBH	I	$y = 0.8523x + 1.8712$	1.00	8.523×10^{-1}
		II	$y = 0.0236x + 27.315$	0.92	2.36×10^{-2}
		III	$y = 0.006x + 34.76$	0.99	6.00×10^{-3}
	PMMA/R6GH	I	$y = 0.1444x - 1.8712$	1.00	1.444×10^{-1}
		II	$y = 0.0052x + 2.8898$	0.97	5.20×10^{-3}
		III	$y = 0.0024x + 4.0617$	0.99	2.40×10^{-3}

^a The linear regression equation of the PMMA membrane was $y = 9 \times 10^{-5}x + 1.2552$, $R^2 = 0.9218$.

3.3. Membrane characterisation

3.3.1. Effect of polymer concentration and loading RBH and R6GH on membrane

The concentration of PMMA in ET/THF (0.6/0.4 v/v) was varied from 5 wt% to 19 wt% to study its effect on fibre morphology. The spinning parameters were kept constant.

Fig. 4 shows the electron micrographs of the non-woven fibre mats electrospun at different concentrations of polymer solutions. The average fibre diameters were determined by measuring the diameters of 100 individual fibres.

A ring-like particle shape of PMMA was obtained on the collecting plate at a low PMMA concentration (above 10 wt%) as in Fig. 4(a). ET and THF have higher boiling points of 78 °C and 66 °C than ambient temperature, which could force some solvents out of the system during PMMA electrospinning [36].

When the PMMA concentration was above 10 wt%, uniform and continuous fibres were obtained. The increase in the viscosity of the PMMA solution caused the formation of bead-free fibres. The viscosity of the solution increased as the concentration of polymers was increased to a critical value, at which point the beads disappeared completely [37,50, 51].

The SEM images show that the fibre diameter increased from $2.068 \pm 0.479 \mu\text{m}$ (10 wt% of PMMA) to $7.417 \pm 4.115 \mu\text{m}$ (17 wt% of PMMA) with increasing PMMA solution concentration.

The small diameter of the nanofibres from the low PMMA concentration (10 wt% PMMA) can be attributed to the fact that the solution was easily stretched during electrospinning (Fig. 4(b)). The large diameter of the nanofibres from the high PMMA concentration (19 wt%) can be attributed to the fact that the viscosity of the solution was high enough to lower the bending instability of the jet (Fig. 4(i)).

The solution becomes resistant to stretching because of the electrical charges on the electrospinning jet [52,53]. The results suggest that 11 wt% PMMA is a good solvent to form nanostructure fibres with a smooth surface and a diameter of $2.026 \pm 0.865 \mu\text{m}$.

Membranes were prepared by RBH (or R6GH) loading in PMMA (11 wt%) solution using ET/THF (0.6/0.4) as a solvent. Upon rhodamine derivative loading, the membranes slightly increased in fibre diameter from $2.026 \pm 0.865 \mu\text{m}$ (11 wt% PMMA) to $2.515 \pm 0.891 \mu\text{m}$ (PMMA/RBH(ET/THF 0.6/0.4)) and $2.431 \pm 0.872 \mu\text{m}$, as shown in Fig. 5(c and d). The diameter fibre increased because of a slight increase in the viscosity of electrospinnable solutions after rhodamine derivative loading.

As a universal polymer solvent, CHCl_3 was used to prepare the Hg^{2+} polymeric membranes containing rhodamine derivative in PMMA via electrospinning [29]. Thus, the rhodamine derivative-containing membranes were also prepared from 11 wt% PMMA solution with CHCl_3 as a solvent (PMMA/RBH(CHCl_3)) and PMMA/R6GH(CHCl_3). The morphology of the membranes was compared with PMMA/RBH (ET/THF 0.6/0.4) and PMMA/R6GH (ET/THF 0.6/0.4).

The membranes prepared from CHCl_3 (both PMMA/RBH(CHCl_3) and PMMA/R6GH(CHCl_3)) contained bead-like nanofibres, as shown in Fig. 5(a). This result agrees with previous reports [36,54]. After the playing and splitting of an unstable jet, it undergoes rapid evaporations [36] because CHCl_3 is a low-boiling-point solvent (62 °C).

Moreover, the dielectric constant (ϵ) values of ET ($\epsilon = 22.4$ [30]) and THF ($\epsilon = 7.6$ [30]) were greater than that of CHCl_3 ($\epsilon = 4.8$ [30]), which produced ultra-fine nanofibres with smooth surface and fine fibres without other types of blemishes [36,55].

3.3.2. Characterisation of PMMA/RBH and PMMA/R6GH and their use as visual-eye sensors

3.3.2.1. Optical colourimetric and fluorescence responses. The optical colourimetric responses of the PMMA/RBH and PMMA/R6GH membranes in the presence of different concentrations of Hg^{2+} are illustrated in Fig. 6(a). In general, PMMA used as a membrane mat does not lose its sensing ability for Hg^{2+} . It cannot act as a visual-eye sensor for any metal ions [11]. When adding RBH and R6GH in PMMA as PMMA/RBH and PMMA/R6GH membranes, they suggested a visual eye with the colour changes.

After being immersed in DI, the PMMA/RBH and PMMA/R6GH membranes did not change in colour and exhibited a white membrane as a free membrane. Additionally, it exhibited chromogenic changes and displayed distinguishable colour changes of 'white-whitepink-pink' with the increase in Hg^{2+} concentration. It could be clearly identified with the visual eye or a charge-coupled device camera. The colour coordination values (CIE Lab; L^* , a^* , b^* and Hue angle; C , and H°) values of the membranes before and after being immersed in the different of aqueous solutions are listed in Table 2. After being immersed in aqueous Hg^{2+} , the membranes increased in redness (a^* value) with increasing Hg^{2+} concentration (Fig. 6(b)). The hue angle (H°) range of the membranes was 0–35 when immersed in 2–2000 μM Hg^{2+} . This phenomenon corresponded to an increase in a^* value (redness). Additionally, the hue angles (H°) of PMMA/RBH and PMMA/R6GH when immersed in the highest Hg^{2+} concentrations (20 mM Hg^{2+} or 2005.9 ppm) were 355.4 and 342.7, respectively. The colour was dark pink with purple (≈ 330 –360). The colour changes of PMMA/RBH and PMMA/R6GH were due to the chromogenic changes (colourless to pink) of the Hg^{2+} chemosensors RBH and R6GH [29]. A noticeable colour change from colourless to pink occurred in the sensors dissolved in aqueous solution (10% v/v MeOH/water) in the presence of Hg^{2+} .

The Delta E (quantitative difference) between two colours is equal to the Euclidean distance between the two tristimulus values. Delta E was measured on a scale from 0 to 100, where 0 is less colour difference, and 100 indicates complete distortion. The standard perception ranges are as follows: ≤ 1.0 : Not perceptible by the human eye, 1–2: Perceptible

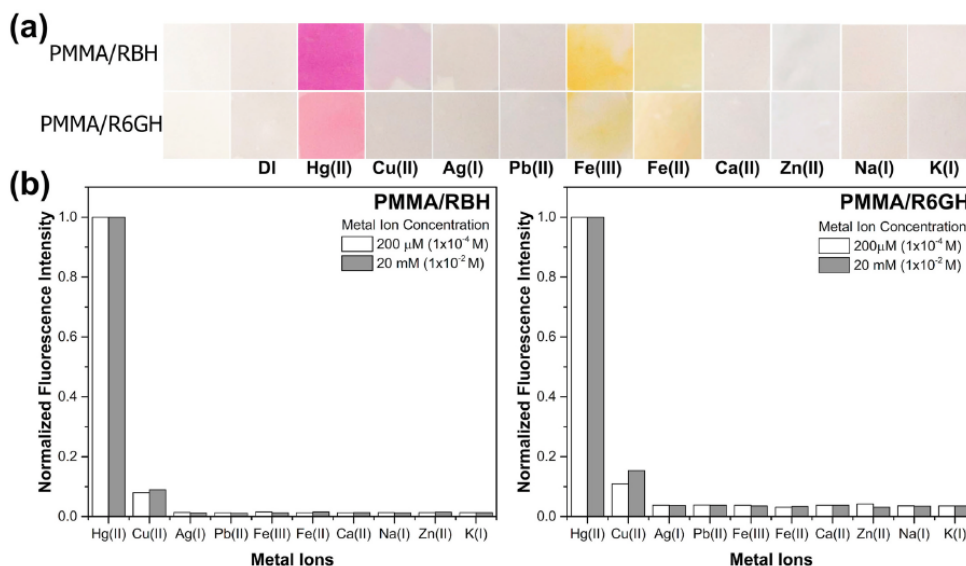


Fig. 10. (a) Selectivity (concentration of 20 mM) and (b) fluorescence response of (A) PMMA/RBH and (B) PMMA/R6GH sensor strips after incubation for 20 min in the presence of various metal cations at the same concentration of 20 mM and 200 μM ($\text{pH} \approx 7.4$). Excitation/emission was selected at 530/582 nm. Slit: Excitation/emission = 5.0/10.0 nm.

through close observation, 2–10: Perceptible at a glance, 11–49: Colours are more similar than the opposite and 100: Colours are exactly the opposite [18,56].

Fig. 6(c) illustrates the colour difference (ΔE) of the membranes. The colour difference of the test membranes and free membrane is presented by the calculated sensitivity $\Delta E1$. The colour difference of each adjacent test membrane is presented by the gradient sensitivity $\Delta E2$.

The difference in colour change after detecting Hg^{2+} ions at a low concentration (2 μM) reflected a difference in the human eye. The visual-eye colour test could detect this difference. For the detection of 10 μM Hg^{2+} , which was the Environmental Protection Agency (EPA) drinking water mandatory standard [18], it was clearly identifiable from the pink colour.

The relevant fluorescence response of the membranes was monitored upon the addition of metal ions to determine the binding capacities of the cations. Fig. 7 shows the emission spectra of PMMA/RBH and PMMA/R6GH in the presence of different Hg^{2+} concentrations.

The fluorescence behaviours of PMMA/RBH and PMMA/R6GH clearly suggested the 'OFF-ON' switching mechanism as a result of RBH and R6GH chemosensors. They showed highly sensitive OFF-ON fluorescence enhancement [29]. In the absence of Hg^{2+} , the PMMA/RBH and PMMA/R6GH membranes showed non-fluorescence providing weak emission signals. The Hg^{2+} addition resulted in the 'turn-on' fluorescence with the increase in emitted fluorescence intensities as a function of Hg^{2+} concentration.

Moreover, the fluorescence emission in PMMA/RBH and PMMA/R6GH was a consequence of rapidly enhanced strong emissions at 540 nm. The PMMA/RBH and PMMA/R6GH membranes showed similar performance in Hg^{2+} detection to pure sensors of RBH and R6GH in water [29]. The detection limits for the membrane sensors PMMA/RBH and PMMA/R6GH were determined from the fluorescence intensity plot

as a function of Hg^{2+} concentration as described in a previous report [57]. The detection limits of the PMMA/RBH and PMMA/R6GH membrane sensors were 0.8–1.099 and 3.6–4.3 ppb, respectively.

Table 3 shows a comparison of the analytical parameters of polymeric membrane sensors with RBH and R6GH (From spinning and electrospinning method preparation) for Hg^{2+} determination in solutions.

The carbonyl oxygen and nitrogen atoms of the sensors in the PMMA matrix form a chelation complex with Hg^{2+} ion via electrostatic interactions, resulting in fluorescence enhancement and colourimetric change of the membranes similar to RBH and R6GH sensors [29]. Moreover, polarities of the sensors and PMMA film were influenced by the higher detection limit of R6GH than RBH in sensor-encapsulated polymer membranes, which agree with the findings of Kraithong et al. [29].

When the sensors in the PMMA/RBH and PMMA/R6GH membranes attracted the Hg^{2+} ions, more conjugated double bonds in the spirulactam (non-fluorescent or low fluorescence emission) of the rhodamine structure changed to the ring-opening spirulactam (fluorescent or strong fluorescence emission), which increased the fluorescence intensity. The colour change was caused by the Hg^{2+} complexation of the rhodamine molecule in the PMMA matrix of fibres the same as neat RBH or R6GH in aqueous solution. Moreover, the complexation of RBH or R6GH: Hg^{2+} as agree well with hard soft acid and base theory, in which strong affinity of soft acid (Hg^{2+}) and soft base (oxygen and nitrogen atoms) was favorable via electrostatic interaction [29].

Given their high surface area with narrow-diameter fibres, the PMMA/RBH and PMMA/R6GH electrospun membranes had lower detection limits ($\text{RBH}_{\text{electrospinning}} = 0.8\text{--}1.099$ ppb and $\text{R6GH}_{\text{electrospinning}} = 3.6\text{--}4.3$ ppb) than the sensor-encapsulated polymeric membranes prepared by spinning ($\text{RBH}_{\text{spinning}} = 0.137\text{--}0.263$ ppb and $\text{R6GH}_{\text{spinning}} = 9.8\text{--}14.2$ ppb), as shown in Table 3. Moreover, the detection limits of the PMMA/RBH and PMMA/R6GH electrospun membranes were lower

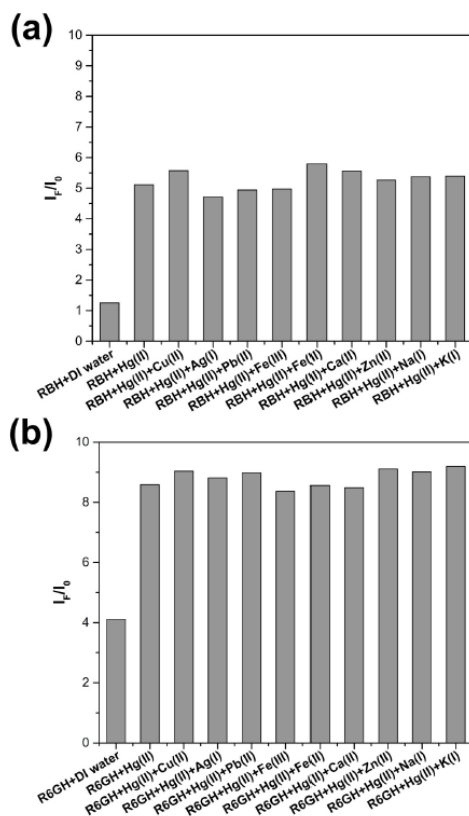


Fig. 11. Competitive experiments of (a) PMMA/RBH (at 514 nm) and (b) PMMA/R6GH (at 514 nm) sensor membrane strips towards Hg^{2+} (0.01 M, pH \approx 7.4) in the presence of other metal ions (0.01 M, pH \approx 7.4) at Hg^{2+}/Mn^{+} ratio of 1/10 (v/v) (10 times of other metal ions).

than the detection limit of the RBH (or R6GH) sensor dissolved in the solution. A similar phenomenon was reported by Kraithong et al. [29]. They suggested that the complex between RBH (or R6GH) and Hg^{2+} ion is bonded by carbonyl oxygen atom and nitrogen atom as a chelation in shorter distances than the complex in aqueous solution. The sensor molecules (RBH and R6GH) that were encapsulated on polymer chains were restricted. Sensor molecules are likely to be close together and a chelation complex could form between Hg^{2+} and two molecules of sensors. The operation of the RBH and R6GH sensors in the PMMA/RBH and PMMA/R6GH membranes is proposed and shown in Fig. 8. Additionally, the sub-micromolar detection limits of our membrane sensors are sufficient for Hg^{2+} ion detection in environmental and many biological systems, such as ground water, drinking water and edible fish.

3.3.2.2. Kinetic study of sensing process. The kinetic sensing response was studied by continuously monitoring the UV-Visible spectra of the PMMA/RBH and PMMA/R6GH membrane sensors as a function of time (0–900 s) after the addition of Hg^{2+} .

As shown in Fig. 9(a and b), the maximum wavelengths of

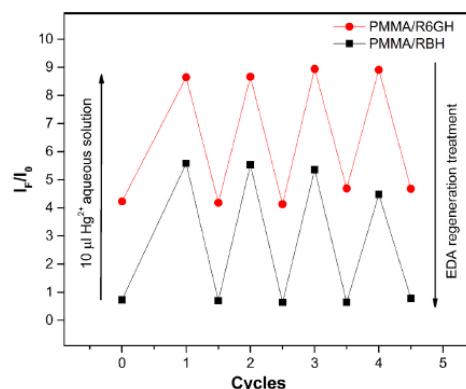


Fig. 12. Reusability of PMMA/RBH and PMMA/R6GH reacting with Hg^{2+} (10 μ L, pH \approx 7.4). The fluorescence spectrum was acquired 20 min after Hg^{2+} addition.

UV-Visible spectra were 560 and 520 nm in the PMMA/RBH and PMMA/R6GH membrane sensors, respectively. The maximum absorbance intensities ($\lambda_{max,560}$ and $\lambda_{max,520}$ of PMMA/RBH and PMMA/R6GH) increased as a function of time (Fig. 9(c)). This phenomenon is concordant with the absorption spectral investigation of a red-pink matter [57], leading to a rise in the positive values of the redness parameter (a^+ value) in both membrane sensors (Fig. 9(d)). This effect can be ascribed to the Hg^{2+} complexation by rhodamine molecule chelation (Fig. 8).

Moreover, the kinetics of colour change from absorbance intensity at maximum intensity (PMMA/RBH $=\lambda_{max,560}$, PMMA/R6GH $=\lambda_{max,520}$) is shown in Fig. 9(c), Table 4. The kinetics of PMMA/RBH showed three stages. The significant rate constants (zero order) at stages I and II from the absorbance intensity at 560 nm were 2.30×10^{-3} and 3.00×10^{-3} A U. s^{-1} , respectively. Moreover, the absorbance intensity at maximum intensity was constant since 500 s (\approx 8 min) with 6.00×10^{-5} A U. s^{-1} of rate constant (Stage III). Meanwhile, the kinetics of PMMA/R6GH showed two stages. The rate constant at Stage I was 5.00×10^{-4} A U. s^{-1} . Stage II indicated the rate constant (2.00×10^{-5} A U. s^{-1}) since 30 s ($<$ 1 min).

Additionally, the a^+ value (redness) of PMMA/RBH and PMMA/R6GH increased with prolonged time (Fig. 9(d), listed in Table 4). The high rate constant of the kinetics of colour change from a^+ value was found in Stage I. The rate constants (zero order) at Stage I of PMMA/RBH and PMMA/R6GH were 8.523×10^{-1} and 1.444×10^{-1} Unit s^{-1} , respectively. The a^+ value change of PMMA/RBH and PMMA/R6GH was constant at Stage III since 450 s (\approx 7 min) with rate constants of 6.00×10^{-5} and 2.40×10^{-5} Unit s^{-1} , respectively.

From the kinetic sensing response, the colour of the PMMA/RBH and PMMA/R6GH membranes changed from white to pink after immersion in Hg^{2+} aqueous solutions within 30 s and then stabilised within approximately 8 min.

3.3.2.3. Selectivity and interference studies. In sensor studies, the ability to change colour is highly important for the visual-eye detection of any ion [11]. PMMA/RBH and PMMA/R6GH showed chemosensor features only for Hg^{2+} ions in the visible light, as shown in Fig. 10(a).

The sensor membrane strips showed clear visual-eye colour change (white to pink) in Hg^{2+} solution. In other cation solutions, they did not change and retained their original white colour (Fig. 6(a)). Moreover, the selectivity of the PMMA/RBH and PMMA/R6GH membranes was

tested by the SSM method as shown in Fig. 10(b).

Other metal cations were rarely interfered with the Hg^{2+} recognition of the sensors similar to RBH and R6GH in solutions [29]. This result demonstrated that the PMMA/RBH and PMMA/R6GH membranes could be conveniently used for on-site Hg^{2+} detection with high selectivity and sensitivity.

3.3.2.4. Competitive experiments. Competitive experiments were performed by observing the fluorescence spectra of the PMMA/RBH and PMMA/R6GH membranes to explore their functions as ion-selective fluorescence sensors for Hg^{2+} . The fluorescence spectra of the PMMA/RBH and PMMA/R6GH membranes were observed in the presence of Hg^{2+} at 0.01 M mixed with 10 equiv of Cu^{2+} , Ag^+ , Pb^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Na^+ and K^+ . The membrane sensors were selective to Hg^{2+} and provided fluorescence enhancement even in the presence of representative competitive background metal ions, as clearly illustrated in Fig. 11(a and b).

3.3.2.5. Reusability of membrane. Reusability is an essential aspect in membrane sensor applications. As shown in Fig. 12, the reusability of the PMMA/RBH and PMMA/R6GH membranes was demonstrated by the alternate addition of Hg^{2+} and EDA (1 M, 100 mL). The membranes enhanced the fluorescence at 514 nm after being immersed in Hg^{2+} solution with visual-eye sensors (pink in colour) due to the chelation-induced ring opening of rhodamine spirolactam.

By transferring into EDA solution and decolorising the membrane sensors with DI water until neutral pH, the fluorescence emission of the membranes diminished with the original colours of the membrane (white). This phenomenon indicated the regeneration of the free chemosensor RBH and R6GH, and the regenerated sensor was still able to respond to Hg^{2+} . These findings indicated that RBH and R6GH in matrix membranes uncoordinated with Hg^{2+} caused by the Hg^{2+} complexation of EDA molecules via electrostatic interactions [58]. The similar phenomenon result was reported by the literature [59]. This result demonstrated that the PMMA/RBH and PMMA/R6GH membranes are effective for reuse up to four times.

PMMA/RBH and PMMA/R6GH could be developed as portable devices for real-time Hg^{2+} detection based on the colour change principle.

4. Conclusion

The theoretical approach was applied to select suitable solvents of PMMA and rhodamine derivatives for membrane production through electrospinning. The solubility parameters of RBH and R6GH ($54.9 \text{ (MPa)}^{1/2}$ and $66.2 \text{ (MPa)}^{1/2}$, respectively) were calculated to engage in optimal solvent prediction. Thermodynamic criteria of the methodology proposed to prepare homogenous electrospinnable solutions were achieved with the optimal condition of solvent system of ET/THF at a volume ratio of 0.6/0.4 for the Hg^{2+} -sensing membranes fabrication. The PMMA/RBH and PMMA/R6GH electrospun membranes showed vivid colourimetric response specifically to Hg^{2+} ion (white to pink) over other possible interfering metal cations observed by the visual eye in aqueous media. The high surface area of the electrospun PMMA/RBH and PMMA/R6GH membranes from an ultra-fine nanofibres with narrow-diameter fibre suggested high selectivity and sensitivity fluorescent sensing with low detection limits (0.8–1.099 and 3.6–4.3 ppb, respectively). Both PMMA/RBH and PMMA/R6GH were sufficiently selective and sensitive to detect the maximum-allowed Hg^{2+} contamination in drinking water of EPA. The sensing response of membranes from white to pink occurred within 30 s with a relatively stable colour after approximately 8 min. Furthermore, the PMMA/RBH and PMMA/R6GH electrospun membranes were effective for reuse up to four times with a high fluorescence intensity. PMMA/RBH and PMMA/R6GH could be developed as portable devices for real-time Hg^{2+} detection based on the colour change principle in visual-eye colourimetric and fluorescent

strip test. These devices could be used for the easy monitoring the Hg^{2+} ion in dietary and environment sources to prevent Hg-contaminated food and drinking water.

Credit author statement

Sutinee Girdthep: Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition, Resources. **Oranual Hanmeng:** Investigation. **Narit Triamnak:** Investigation. **Nirumon Chailek:** Investigation. **Nantantit Wanichacheva:** Validation, Resources, Supervision.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Faculty of Science, Silpakorn University, Thailand (Grant No. SRF-PRG-2562-05 and Grant No. SRF-PRG-2563-13 for Sutinee Girdthep), the National Research Council of Thailand (NRCT) under the Royal Golden Jubilee (RGJ) Ph.D. Program, Thailand (Grant No. PHD/0191/2561 for Nirumon Chailek).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2021.107151>.

References

- [1] D. Wang, Y. Yue, Q. Wang, W. Cheng, G. Han, Preparation of cellulose acetate-polyacrylonitrile composite nanofibers by multi-fluid mixing electrospinning method: morphology, wettability, and mechanical properties, *Appl. Surf. Sci.* 510 (2020) 145462.
- [2] D. Wang, W. Cheng, Q. Wang, J. Zang, Y. Zhang, G. Han, Preparation of electrospun chitosan/poly(ethylene oxide) composite nanofibers reinforced with cellulose nanocrystals: structure, morphology, and mechanical behavior, *Compos. Sci. Technol.* 182 (2019) 107774.
- [3] A. Celebioglu, S. Demirci, T. Uyar, Cyclodextrin-grafted electrospun cellulose acetate nanofibers via "Click" reaction for removal of phenanthrene, *Appl. Surf. Sci.* 305 (2014) 551–558.
- [4] C. Yang, D.-G. Yu, D. Fan, X.-K. Liu, X. Wang, S.W.A. Bligh, G.R. Williams, Electrospun pH-sensitive core-shell polymer nanocomposites fabricated using a tri-axial process, *Acta Biomater.* 35 (2016) 77–86.
- [5] Y. Liao, C.-H. Loh, M. Tian, R. Wang, A.G. Fane, Progress in electrospun polymeric nanofibrous membranes for water treatment: fabrication, modification and applications, *Prog. Polym. Sci.* 77 (2018) 69–94.
- [6] D. Lv, M. Zhu, Z. Jiang, S. Jiang, Q. Zhang, R. Xiong, C. Huang, Green electrospun nanofibers and their application in air filtration, *Macromol. Mater. Eng.* 303 (2018) 1800336.
- [7] S. Mansoori, R. Davarnejad, T. Matsuura, A.F. Iemail, Membranes based on non-synthetic (natural) polymers for wastewater treatment, *Polym. Test.* 84 (2020) 106381.
- [8] Y. Hu, Y. Cheng, X. Zhang, D. Huang, W. Chen, M. Duan, In-situ thermal crosslinked PA66/ β -cyclodextrin/PA66 nanofibrous membranes with high mechanical strength for removal of heavy metal ions by flow through adsorption, *Polym. Test.* 91 (2020) 106854.
- [9] W. Ma, Z. Guo, J. Zhao, Q. Yu, F. Wang, J. Han, H. Pan, J. Yao, Q. Zhang, S. K. Samal, S.C. De Smedt, C. Huang, Polyimide/cellulose acetate core/shell electrospun fibrous membranes for oil-water separation, *Separ. Purif. Technol.* 177 (2017) 71–85.
- [10] Y.-W. Ju, G.-Y. Oh, Behavior of toluene adsorption on activated carbon nanofibers prepared by electrospinning of a polyacrylonitrile-cellulose acetate blending solution, *Kor. J. Chem. Eng.* 34 (2017) 2731–2737.
- [11] H. Ozay, O. Ozay, Rhodamine based reusable and colorimetric naked-eye hydrogel sensors for Fe^{3+} ion, *Chem. Eng. J.* 232 (2013) 364–371.
- [12] M. She, Z. Yang, B. Yin, J. Zhang, J. Gu, W. Yin, J. Li, G. Zhao, Z. Shi, A novel rhodamine-based fluorescent and colorimetric "off-on" chemosensor and investigation of the recognizing behavior towards Fe^{3+} , *Dyes Pigments* 92 (2012) 1337–1343.

- [13] L.-F. Zhang, J.-L. Zhao, X. Zeng, L. Mu, X.-K. Jiang, M. Deng, J.-X. Zhang, G. Wei, Tuning with pH: the selectivity of a new rhodamine B derivative chemosensor for Fe^{3+} and Cu^{2+} , *Sens. Actuatur. B Chem.* 160 (2011) 662–669.
- [14] C. Hou, A.M. Urbane, H. Cao, A rapid Hg^{2+} sensor based on azo-15-crown-5 ether functionalized 1,8-naphthalimide, *Tetrahedron Lett.* 52 (2011) 4903–4905.
- [15] W. Liu, J. Chen, L. Xu, J. Wu, H. Xu, H. Zhang, P. Wang, Reversible "off-on" fluorescent chemosensor for Hg^{2+} based on rhodamine derivative, *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc.* 85 (2012) 38–42.
- [16] X. Peng, Y. Wang, X. Tang, W. Liu, Functionalized magnetic core-shell $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ nanoparticles as selectivity-enhanced chemosensor for $\text{Hg}(\text{II})$, *Dyes Pigments* 91 (2011) 26–32.
- [17] Z. Gu, M. Zhao, Y. Sheng, L.A. Bentolila, Y. Tang, Detection of mercury ion by infrared fluorescent protein and its hydrogel-based paper assay, *Anal. Chem.* 83 (2011) 2324–2329.
- [18] Y. Si, X. Wang, Y. Li, K. Chen, J. Wang, J. Yu, H. Wang, B. Ding, Optimized colorimetric sensor strip for mercury(II) assay using hierarchical nanostructured conjugated polymers, *J. Mater. Chem.* 2 (2014) 645–652.
- [19] K.K. Rajin, P. Sagitha, G.S. Amitha, S. Vasudevan, A. Sujith, 4,4'-Fluoreseinoxy biphthalonitrile (FPN)-incorporated polycaprolactone electrospun membranes: a portable sensor strip for detection of Fe^{3+} ions, *J. Mater. Sci.* 54 (2019) 13433–13444.
- [20] J.R. Peralta-Videa, M.L. Lopez, M. Narayan, G. Saupé, J. Gardea-Torresdey, The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: implications for the food chain, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41 (2009) 1665–1677.
- [21] R.F.M. Elshaarawy, H.A. El-Azim, W.H. Hegazy, F.H.A. Mustafa, T.A. Takhlan, Poly (ammonium/pyridinium)-chitosan Schiff base as a smart biosorbent for scavenging of Cu^{2+} ions from aqueous effluents, *Polym. Test.* 83 (2020) 106244.
- [22] J. Wu, W. Jiang, A. Deng, Y. Shen, W. Jiang, R. Tian, Facile synthesis of magnetic fluorescence probe for recyclable displacement detection of Hg^{2+} in aqueous solutions and living cells, *Sens. Actuatur. B Chem.* 234 (2016) 691–702.
- [23] K.H. Chen, H.W. Wang, B.S. Kang, C.Y. Chang, Y.L. Wang, T.P. Lele, F. Ren, S. J. Pearton, A. Dabiran, A. Osinsky, P.P. Chow, Low $\text{Hg}(\text{II})$ ion concentration electrical detection with AlGaIn/GaN high electron mobility transistors, *Sens. Actuatur. B Chem.* 134 (2008) 386–389.
- [24] N. Horzum, D. Mete, E. Karakul, M. Üçüncü, M. Emrullahoğlu, M.M. Demir, Rhodamine-immobilized electrospun chitosan nanofibrous material as a fluorescence turn-on Hg^{2+} sensor, *ChemistrySelect* 1 (2016) 896–900.
- [25] M. Li, G. Xiong, Y. Zhang, X. Yu, Q. Cao, H. Xiao, Remarkable fluorimetric response and colorimetric sense on the mercury deionization in aqueous solution by a new adsorbent based on chitosan, *Eur. Polym. J.* 130 (2020) 109663.
- [26] M.Z. Ongun, K. Ertekin, C.G. Hizliates, O. Oter, Y. Ergun, E. Celik, Determination of $\text{Hg}(\text{II})$ at sub-nanomolar levels: a comparative study with nanofibrous materials and continuous thin films, *Sens. Actuatur. B Chem.* 181 (2013) 244–250.
- [27] F.J. Orriach-Fernández, A.L. Medina-Castillo, J.E. Díaz-Gómez, A. Muñoz de la Peña, J.F. Fernández-Sánchez, A. Fernández-Gutiérrez, A sensing microfiber mat produced by electrospinning for the turn-on luminescence determination of Hg^{2+} in water samples, *Sens. Actuatur. B Chem.* 195 (2014) 8–14.
- [28] C.-C. Hung, C.-C. Kuo, N.-K. Weng, W.-C. Wu, B.-Y. Chen, C.-J. Cho, I.J. Hsu, Y.-C. Chiu, W.-C. Chen, Novel highly sensitive and reversible electrospun nanofibrous chemosensor-filters composed of poly(HEMA-co-MNA) and bpy-P-bpy with metal-ion-modulated multicolor fluorescence emission, *Polym. J.* 48 (2016) 439–449.
- [29] S. Kraithong, P. Danrongrak, K. Suwatpipat, J. Sirirak, P. Swanglap, N. Wanichacheva, Highly Hg^{2+} -sensitive and selective fluorescent sensors in aqueous solution and sensors-encapsulated polymeric membrane, *RSC Adv.* 6 (2016) 10401–10411.
- [30] L. Li, R. Li, M. Li, Z. Rong, T. Fang, Theoretical selection of solvent for production of electrospun PMMA fibers with wrinkled surfaces, *RSC Adv.* 4 (2014).
- [31] J. Liu, S. Kumar, Microscopic polymer cups by electrospinning, *Polymer* 46 (2005) 3211–3214.
- [32] X. Wu, L. Wang, H. Yu, Y. Huang, Effect of solvent on morphology of electrospinning ethyl cellulose fibers, *J. Appl. Polym. Sci.* 97 (2005) 1292–1297.
- [33] E. Rebollar, D. Cordero, A. Martins, S. Chiuzzi, R.L. Reis, N.M. Neves, B. León, Improvement of electrospun polymer fiber meshes pore size by femtosecond laser irradiation, *Appl. Surf. Sci.* 257 (2011) 4091–4095.
- [34] S. Piperno, L. Lozzi, R. Rastelli, M. Passacantando, S. Santucci, PMMA nanofibers production by electrospinning, *Appl. Surf. Sci.* 252 (2006) 5583–5586.
- [35] Y.F. Qian, Y. Su, X.Q. Li, H.S. Wang, C.L. He, Electrospinning of polymethyl methacrylate nanofibers in different solvents, *Iran. Polym. J.* 19 (2010) 123–129.
- [36] H.-S. Bae, A. Haider, K.M.K. Selim, D.-Y. Kang, E.-J. Kim, I.-K. Kang, Fabrication of highly porous PMMA electrospun fibers and their application in the removal of phenol and iodine, *J. Polym. Res.* 20 (2013) 158.
- [37] S. Megelski, J.S. Stephens, D.B. Chase, J.F. Rabolt, Micro- and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers, *Macromolecules* 35 (2002) 8456–8466.
- [38] N. Wanichacheva, P. Praikaeaw, T. Suwanich, K. Sukrat, "Naked-eye" colorimetric and "turn-on" fluorometric chemosensors for reversible Hg^{2+} detection, *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc.* 118 (2014) 908–914.
- [39] P.J. Hollyzer, D.W. Van Krevelen, Properties of Polymers, 1976.
- [40] A. Forster, J. Hemenstall, I. Tucker, T. Rades, Selection of excipients for melt extrusion with two poorly water-soluble drugs by solubility parameter calculation and thermal analysis, *Int. J. Pharm.* 226 (2001) 147–161.
- [41] B.C. Hancock, G. Zograf, Characteristics and significance of the amorphous state in pharmaceutical systems, *J. Pharm. Sci.* 86 (1997) 1–12.
- [42] C.M. Hansen, Hansen Solubility Parameters-A User's Handbook, 1991.
- [43] S. Girdharp, J. Sirirak, D. Daranarong, R. Daengngern, S. Charayutra, Physico-chemical characterization of natural lake pigments obtained from *Cesalpinia Sappan* Linn. and their composite films for poly(lactic acid)-based packaging materials, *Dyes Pigments* 157 (2018) 27–39.
- [44] E. Normaya, M.F.A. Hamdan, M.N. Ahmad, Y.F.A. Aziz, K.H.K. Bulat, DFT/TD-DFT study on development and optimization of 1- amino-3- phenyliminourea as a colorimetric chemosensor for Hg^{2+} recognition in aqueous medium, *J. Mol. Struct.* 1206 (2020) 127699.
- [45] B. Hu, L.-L. Hu, M.-L. Chen, J.-H. Wang, A FRET ratiometric fluorescence sensing system for mercury detection and intracellular colorimetric imaging in live HeLa cells, *Biosens. Bioelectron.* 49 (2013) 499–505.
- [46] D.J. Greenhalgh, A.C. Williams, P. Timmins, P. York, Solubility parameters as predictors of miscibility in solid dispersions, *J. Pharm. Sci.* 88 (1999) 1182–1190.
- [47] J.M. Deitzel, J. Kleinmeyer, D. Harris, N.C. Beck Tan, The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles, *Polymer* 42 (2001) 261–272.
- [48] H. Fong, I. Chun, D.H. Reneker, Beaded nanofibers formed during electrospinning, *Polymer* 40 (1999) 4585–4592.
- [49] V. Jacobs, R.D. Anandjwala, M. Maaza, The influence of electrospinning parameters on the structural morphology and diameter of electrospun nanofibers, *J. Appl. Polym. Sci.* 115 (2010) 3130–3136.
- [50] A.R. de Vries, K.P. Matabola, A.S. Luyt, R. Kumar, Studies on single polymer composites of poly(methyl methacrylate) reinforced with electrospun nanofibers with a focus on their dynamic mechanical properties, *Express Polym. Lett.* 5 (2011) 636–642.
- [51] X.M. Mo, C.Y. Xu, M. Kotaki, S. Ramakrishna, Electrospun P(LLA-CL) nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation, *Biomaterials* 25 (2004) 1883–1890.
- [52] C.J. Luo, M. Nangrejo, M. Edirisinghe, A novel method of selecting solvents for polymer electrospinning, *Polymer* 51 (2010) 1654–1662.
- [53] M.M. Hawkeye, M.J. Brett, Optimized colorimetric photonic-crystal humidity sensor fabricated using glancing angle deposition, *Adv. Funct. Mater.* 21 (2011) 3652–3658.
- [54] R.M. Christie, Colour Chemistry, 2001.
- [55] T. Duplancić, D. Gradencić, B. Kamenar, P. Matković, M. Šiljarić, Mercury(II)-ethylenediamine complexes. Crystal and molecular structure of bis(ethylenediamine)mercury(II) dperchlorate and dithionato(ethylenediamine)mercury(II), *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1976) 887–890.
- [56] Z. Qu, X. Meng, H. Duan, D. Qin, L. Wang, Rhodamine-immobilized optical hydrogels with shape deformation and Hg^{2+} -sensitive fluorescence behaviors, *Sci. Rep.* 10 (2020) 7723.

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. Uauy, R., M. Olivares, and M. Gonzalez, *Essentiality of copper in humans*. The American journal of clinical nutrition, 1998. 67(5): p. 952S-959S.
3. Bull, P.C., et al., *The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene*. Nature genetics, 1993. 5(4): p. 327-337.
4. 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. 7-13.
5. 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.
6. Tchounwou, P.B., et al., *Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic implications for public health*. Environmental Toxicology: An International Journal, 2003. 18(3): p. 149-175.
7. Davidson, P.W., et al., *Longitudinal neurodevelopmental study of Seychellois children following in utero exposure to methylmercury from maternal fish ingestion: outcomes at 19 and 29 months*. Neurotoxicology, 1995. 16(4): p. 677-688.
8. Grandjean, P., et al., *Cognitive performance of children prenatally exposed to "safe" levels of methylmercury*. Environmental research, 1998. 77(2): p. 165-172.
9. Harada, M., *Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution*. Critical reviews in toxicology, 1995. 25(1): p. 1-24.
10. Hanmeng, O., et al., *Cu²⁺-selective NIR fluorescence sensor based on heptamethine cyanine in aqueous media and its application*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2020. 240: p. 118606.
11. Kraithong, S., et al., *Improving sensitivity of a new Hg²⁺-Selective fluorescent sensor by silver nanoparticles via plasmonic enhancement*. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2021. 407: p. 113064.

12. Petdum, A., et al., [5] *Helicene-rhodamine 6 G hybrid-based sensor for ultrasensitive Hg²⁺ detection and its biological applications*. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2020. 394: p. 112473.
13. Liu, Y., P. Liang, and L. Guo, *Nanometer titanium dioxide immobilized on silica gel as sorbent for preconcentration of metal ions prior to their determination by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry*. *Talanta*, 2005. 68(1): p. 25-30.
14. Pourreza, N. and R. Hoveizavi, *Simultaneous preconcentration of Cu, Fe and Pb as methylthymol blue complexes on naphthalene adsorbent and flame atomic absorption determination*. *Analytica Chimica Acta*, 2005. 549(1-2): p. 124-128.
15. Soylak, M., I. Narin, and M. Dogan, *Trace enrichment and atomic absorption spectrometric determination of lead, copper, cadmium and nickel in drinking water samples by use of an activated carbon column*. *Analytical Letters*, 1997. 30(15): p. 2801-2810.
16. Forzani, E.S., et al., *Detection of heavy metal ions in drinking water using a high-resolution differential surface plasmon resonance sensor*. *Environmental science & technology*, 2005. 39(5): p. 1257-1262.
17. Ali, A., H. Shen, and X. Yin, *Simultaneous determination of trace amounts of nickel, copper and mercury by liquid chromatography coupled with flow-injection on-line derivatization and preconcentration*. *Analytica chimica acta*, 1998. 369(3): p. 215-223.
18. Singh, J., et al., *Voltammetric simultaneous determination of Cu²⁺, Cd²⁺ and Pb²⁺ in full aqueous medium using organic nanoparticles of disulfide based receptor*. *Electroanalysis*, 2015. 27(11): p. 2544-2551.
19. Shi, F., et al., *A high selective fluorescent sensor for Cu²⁺ in solution and test paper strips*. *Dyes and Pigments*, 2020. 173: p. 107914.
20. Zong, C., et al., *Dual-emission fluorescent silica nanoparticle-based probe for ultrasensitive detection of Cu²⁺*. *analytical chemistry*, 2011. 83(8): p. 3126-3132.
21. Porterfield, W.W., *Inorganic chemistry*. 2013: Academic press.
22. Wang, W., et al., *Preparation of fluorescent nanofibrous film as a sensing*

- material and adsorbent for Cu²⁺ in aqueous solution via copolymerization and electrospinning.* Journal of hazardous materials, 2011. 194: p. 185-192.
23. Bao, Q., et al., *Graphene-polymer nanofiber membrane for ultrafast photonics.* Advanced functional materials, 2010. 20(5): p. 782-791.
 24. Huang, Z.-M., et al., *A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites.* Composites science and technology, 2003. 63(15): p. 2223-2253.
 25. Matthews, F.L. and R.D. Rawlings, *Composite materials: engineering and science.* 1999: Woodhead Publishing.
 26. Zheng, H., et al., *A heptamethine cyanine-based colorimetric and ratiometric fluorescent chemosensor for the selective detection of Ag⁺ in an aqueous medium.* Chemical Communications, 2012. 48(16): p. 2243-2245.
 27. Guo, Z., et al., *A cyanine-based fluorescent sensor for detecting endogenous zinc ions in live cells and organisms.* Biomaterials, 2012. 33(31): p. 7818-7827.
 28. Wang, J., et al., *A near-infrared and ratiometric fluorescent chemosensor for palladium.* Analyst, 2013. 138(13): p. 3667-3672.
 29. Datta, B.K., et al., *A near-infrared emissive Al³⁺ sensing platform for specific detection in solution, cells and probing DNase activity.* Analytica Chimica Acta, 2015. 882: p. 76-82.
 30. Zhang, Y., et al., *A sensitive near-infrared fluorescent probe for detecting heavy metal Ag⁺ in water samples.* Sensors, 2019. 19(2): p. 247.
 31. Li, M., et al., *Turn-on fluorescent sensor for selective detection of Zn²⁺, Cd²⁺, and Hg²⁺ in water.* The Journal of organic chemistry, 2012. 77(7): p. 3670-3673.
 32. 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.
 33. 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, 2018. 259: p. 862-870.
 34. Kaewnok, N., et al., *Detection of hazardous mercury ion using [5] helicene-based fluorescence probe with “TurnON” sensing response for practical*

- applications*. Journal of Hazardous Materials, 2021. 418: p. 126242.
35. Wang, W., et al., *Preparation of fluorescent nanofibrous film as a sensing material and adsorbent for Cu²⁺ in aqueous solution via copolymerization and electrospinning*. Journal of hazardous materials, 2011. 194: p. 185-192.
36. Ongun, M.Z.e.a., *Determination of Hg (II) at sub-nanomolar levels: A comparative study with nanofibrous materials and continuous thin films*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2013. 181: p. 244-250.
37. Saithongdee, A., et al., *Electrospun curcumin-loaded zein membrane for iron(III) ions sensing*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2014. 202: p. 935-940.
38. Cho, C.-J., et al., *Pyrene or rhodamine derivative–modified surfaces of electrospun nanofibrous chemosensors for colorimetric and fluorescent determination of Cu²⁺, Hg²⁺, and pH*. Reactive and Functional Polymers, 2016. 108: p. 137-147.
39. Chen, B.-Y., et al, *Novel fluorescent chemosensory filter membranes composed of electrospun nanofibers with ultra-selective and reversible pH and Hg²⁺ sensing characteristics*. Dyes and Pigments, 2017. 143: p. 129-142.
40. Rijin, K.K., et al., *4, 4'-Fluoresceinoxy bisphthalonitrile (FPN)-incorporated polycaprolactone electrospun membranes: A portable sensor strip for detection of Fe³⁺ ions*. Journal of Materials Science, 2019. 54: p. 13433-13444.
41. Tonsomboon, K., et al., *Turn-On fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based electrospun fibrous membranes: Rapid and ultrasensitive test strips for on-site detection of Mercury (II) ion*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2021. 344: p. 130212.
42. Wanichacheva, N., et al., *Synthesis of a Novel Fluorescent Sensor Bearing Dansyl Fluorophores for the Highly Selective Detection of Mercury (II) Ions*. Molecules, 2010. 15: p. 1798-1810.
43. Reynolds, G.A., et al., *Stable Heptamethine Pyrylium Dyes That Absorb in the Infrared*. J. Org. Chem., 1977. 42: p. 885-888.
44. Narayanan, N., et al., *A New Method for the Synthesis of Heptamethine Cyanine Dyes: Synthesis of New Near-Infrared Fluorescent Labels*. J. Org. Chem., 1995. 60: p. 2391-2395.

45. Kaewnok, N., et al., *Novel Cu²⁺-specific "Turn-ON" fluorescent probe based on [5]helicene with very large Stokes shift and its potential application in living cells*. *New Journal of Chemistry*, 2018. 42: p. 5540-5547.
46. Faraz, M., et al., *Polyindole/cadmium sulphide nanocomposite based turn-on, multi-ion fluorescence sensor for detection of Cr³⁺, Fe³⁺ and Sn²⁺ ions*. *Sens. Actuators, B*, 2018. 269: p. 195-202.





ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	น.ส. นิถมล ใจเหล็ก
วัน เดือน ปี เกิด	3 มีนาคม 2534
สถานที่เกิด	จังหวัดพะเยา
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2557 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับ 1) สาขาเคมี อุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พ.ศ. 2560 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ที่อยู่ปัจจุบัน	189 หมู่ 5 ต. สบียง อ. ภูซาง จ. พะเยา 56110
ผลงานตีพิมพ์	1. Chailek, N., Kaewnok, N., Petdum, A., Sirirak, J., Chaneam, S., Kamkaew, A., Girdthep, S., Wanichacheva, N.* “Near infrared and colorimetric fluorescence sensor for ultra-selective detection of Cu ²⁺ level with applications in diverse water samples, brain tumor cell and flow injection analysis” Journal of Photochemistry & Photobiology, A: Chemistry 421 (2021) 113533. 2. Girdthep, S.*, Hanmeng, O., Triamnak, N., Chailek, N., Wanichacheva, N. “Theoretical solvent selection for nanostructured surface fabrication of reusable and colourimetric visual-eye sensor strips with rhodamine derivative-encapsulated polymeric membranes for highly sensitive and selective detection of Hg ²⁺ ” Polymer Testing 97 (2021) 107151. 3. Kraithong, S., Chailek, N., Sirirak, J., Suwatpipat, K., Wanichacheva, N., Swanglap, P.* “Improving sensitivity of a new Hg ²⁺ -Selective fluorescent sensor by silver nanoparticles via plasmonic enhancement” Journal of Photochemistry & Photobiology, A: Chemistry 407 (2021) 113064.
รางวัลที่ได้รับ	พ.ศ. 2559-2560 ได้รับทุนผู้ช่วยสอน (Teaching Assistant, TA) ภาควิชา เคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

พ.ศ. 2563-2564 ได้รับทุนผู้ช่วยสอน (Teaching Assistant, TA) ภาควิชา
เคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

พ.ศ. 2561-2565 ได้รับทุนโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก (Royal
Golden Jubilee: RGJ) เลขที่สัญญา PHD/0191/2561 จากสำนักงานการ
วิจัยแห่งชาติ (วช.)

