



การออกแบบและสังเคราะห์สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ในช่วงวิสิเบิลและช่วงใกล้อินฟราเรดสำหรับ
การตรวจวัดไอออนทองแดงและไอออนฟลูออไรด์



โดย
นายยอดขวัญ เตชะเพิ่มผล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีอินทรีย์ แบบ 1.1 ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต

ภาควิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2561

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การออกแบบและสังเคราะห์สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ในช่วงวิสิเบิลและช่วงใกล้
อินฟราเรดสำหรับการตรวจวัดไอออนทองแดงและไอออนฟลูออไรด์



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาเคมีอินทรีย์ แบบ 1.1 ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
ภาควิชาเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2561
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

DESIGN AND SYNTHESSES OF VISIBLE AND NEAR-INFRARED FLUORESCENT
SENSORS FOR COPPER AND FLUORIDE ION DETECTION



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for Doctor of Philosophy ORGANIC CHEMISTRY
Department of CHEMISTRY
Graduate School, Silpakorn University
Academic Year 2018
Copyright of Graduate School, Silpakorn University

หัวข้อ การออกแบบและสังเคราะห์สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ในช่วงวิสิ
เบิลและช่วงใกล้อินฟราเรดสำหรับการตรวจวัดไอออนทองแดง
และไอออนฟลูออไรด์
โดย ยอดขวัญ เตชะเพิ่มผล
สาขาวิชา เคมีอินทรีย์ แบบ 1.1 ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก รองศาสตราจารย์ ดร. นันทนิตย์ วานิชชีวะ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต

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

พิจารณาเห็นชอบโดย

..... ประธานกรรมการ
(อาจารย์ ดร. มุฮำหมัด นียมเดชา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. นันทนิตย์ วานิชชีวะ)

..... ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(ดร. ชาญศาสตร์ สุขศรีเมือง)

58302802 : เคมีอินทรีย์ แบบ 1.1 ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต

คำสำคัญ : เซ็นเซอร์ทองแดง, เซ็นเซอร์ฟลูออไรด์, ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์, ฟลูออโรฟอร์, ฟลูออโรไอโอโนฟอร์

นาย ยอดขวัญ เตชะเพิ่มผล: การออกแบบและสังเคราะห์สารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ในช่วงวิสิเบิลและช่วงใกล้อินฟราเรดสำหรับการตรวจวัดไอออนทองแดงและไอออนฟลูออไรด์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : รองศาสตราจารย์ ดร. นันทินิตย์ วานิชชีวะ

สารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ชนิดใหม่ 2 ชนิด ได้รับการพัฒนาเป็นเซ็นเซอร์เพื่อตรวจวัดไอออนทองแดงและฟลูออไรด์ เซ็นเซอร์ I ประกอบด้วยอนุพันธ์ของ aza-boron-dipyrromethene (aza-BODIPY) ซึ่งเป็นฟลูออโรฟอร์ในช่วงคลื่นรังสีอินฟราเรด เชื่อมต่อกับอนุพันธ์ของ di-2-picolylamine สองหมู่ เพื่อใช้ตรวจวัดไอออนทองแดงในสารละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ โดยเซ็นเซอร์ I ถูกสังเคราะห์โดยผ่านปฏิกิริยา aldol condensation, 1,4-Michael addition, reduction, amide formation และ N-alkylation คุณสมบัติทางสเปกโทรสโกปี และความสามารถในการจับกับไอออนโลหะของเซ็นเซอร์ I ถูกทดลองในสารละลายเกลือฟอสเฟต (pH 7.4): อะซิโตนไทล (95: 5 v / v) ด้วย Triton X-100 ผ่านการไทเทรตด้วยเทคนิคทางฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี สัญญาณการเรืองแสงของเซ็นเซอร์ I จะลดลงเมื่อเติมไอออนทองแดง ในขณะที่มีไอออนอัลคาไลและไอออนทรานซิชันของโลหะปะปนอยู่ โดยความเข้มข้นของทองแดงที่น้อยที่สุดที่วัดได้คือ 13 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าต่ำกว่าระดับที่อนุญาตของทองแดงในน้ำดื่ม ที่ได้รับอนุญาตตามแนวทางที่อธิบายโดยหน่วยงานปกป้องสิ่งแวดล้อมของสหรัฐอเมริกา (EPA) และองค์การอนามัยโลก (WHO) อีกทั้งยังมีการประยุกต์ใช้เซ็นเซอร์ในการตรวจจับไอออนทองแดงในเซลล์ HepG2 ได้อีกด้วย เซ็นเซอร์ II ประกอบด้วยอนุพันธ์ของ 2-Amino phenylboronic acid pinacol ester เชื่อมต่อกับอนุพันธ์ของฟลูออเรสซินหนึ่งหมู่ เพื่อใช้ตรวจวัดไอออนฟลูออไรด์ ซึ่งเซ็นเซอร์ II ถูกสังเคราะห์โดยผ่านปฏิกิริยา Reimer-Tiemann reaction และ imine formation โดยพฤติกรรมการดักจับของเซ็นเซอร์ ถูกทดลองในด้านของความไวและความจำเพาะเจาะจงด้วยเทคนิคทางฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซ็นเซอร์ II มีพฤติกรรมการคายแสงแบบ ON - OFF และมีความจำเพาะเจาะจงสูงกับไอออนฟลูออไรด์ ในสถานะที่มีไอออนอื่นๆรบกวนในสารละลายอินทรีย์ที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ

58302802 : Major ORGANIC CHEMISTRY

Keyword : copper sensor, fluoride sensor, fluorescence sensor, fluorophore, fluoroionophore

MR. YORDKHUAN TACHAPERMPON : DESIGN AND SYNTHESSES OF VISIBLE AND NEAR-INFRARED FLUORESCENT SENSORS FOR COPPER AND FLUORIDE ION DETECTION
THESIS ADVISOR : ASSOCIATE PROFESSOR NANTANIT WANICHACHEVA, Ph.D.

Two novel fluorescence sensors were developed for detection of copper and fluoride ions. Sensor I composed of an aza-boron-dipyromethene (aza-BODIPY) core as near-infrared (NIR) fluorophore covalently bound to two di-2-picolylamine moieties was conceived for near-infrared Cu^{2+} detection in aqueous solutions. Sensor I was synthesised by aldol condensation, 1,4-Michael addition, reduction, amide formation and *N*-alkylation of the amine. Spectroscopic properties and binding abilities with several metal ions were investigated in phosphate buffered saline (pH 7.4): acetonitrile (95:5 v/v) with Triton X-100 via fluorometric titrations. The fluorescence of sensor I was quenched selectively by cupric ions in the presence of alkali- and transition-metal-ions. A detection limit of 13 ppb was measured for this system, and this is significantly lower than permissible levels of Cu^{2+} in drinking water according to the guidelines described by the U.S. Environmental Protection Agency (EPA) and by the World Health Organization (WHO). Application of the sensor in detecting Cu^{2+} in HepG2 cells was demonstrated. Sensor II based on 2-Amino phenylboronic acid pinacol ester covalently bound to one unit of fluorescein aldehyde moieties was designed for the optical detection of F^- ions. Sensor II was synthesised by Reimer-Tiemann reaction, imine formation. The binding behaviours of the sensor was investigated in terms of sensitivity and selectivity by fluorescence spectroscopy. Especially, sensor II provided the highly F^- -selective ON-OFF fluorescence behaviour by discriminating various interfering anionic species in aqueous organic solutions.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.นันทนิตย์ วานิชชีวะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์เป็นอย่างสูง สำหรับความกรุณา ทั้งการให้คำปรึกษา คำแนะนำ ความรู้ รวมไปถึงความช่วยเหลืออันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการทำวิทยานิพนธ์ ซึ่งทำให้งานนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ตลอดจนการวางแผนชีวิตในอนาคต และประสบการณ์ดีๆ ที่มอบให้กระผมตลอดมา

ขอขอบคุณอาจารย์ ดร. มุฮำหมัด นิยมเดชา ประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำต่างๆ อันเป็นประโยชน์ต่อวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณ ดร. ธนศาสตร์ สุขศรีเมือง อาจารย์กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่างๆ อันเป็นประโยชน์ต่อวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณอาจารย์ ดร.จิตนภา ศิริรักษ์ อาจารย์ผู้ซึ่งที่ให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือในการศึกษา molecular modeling อันเป็นประโยชน์ต่อวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณอาจารย์ ดร.อดิศรี เจริญพานิช อาจารย์ผู้ซึ่งที่ให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือในการศึกษา ทางด้านชีววิทยา อันเป็นประโยชน์ต่อวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณพ่อ คุณแม่ พี่สาวและน้องชาย ที่เป็นกำลังใจ ให้ความรักความอบอุ่นและให้การสนับสนุนในทุกๆเรื่อง ตลอดจนคำปรึกษาที่ดี ในด้านต่างๆมาโดยตลอด

ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร สำหรับความรู้และประสบการณ์ที่ดี ในขณะที่กระผมได้ศึกษาอยู่ ณ สถาบันการศึกษาแห่งนี้

ขอขอบคุณอาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่าน ที่กรุณาประสิทธิ์ประสาทความรู้ต่างๆ ทั้งความรู้ในด้านวิชาการและด้านการดำเนินชีวิต

ขอขอบคุณพี่ น้อง และเพื่อนในห้องแลปทุกคน สำหรับคำปรึกษาและความช่วยเหลือในการแก้ปัญหาทางด้านต่างๆ และไม่ตรีจิตอันดีที่มอบให้แก่กันมาโดยตลอด

สุดท้ายขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาเคมีทุกท่าน ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการดำเนินงานเอกสาร อีกทั้งขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเคมีทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือด้านอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำงานวิจัย ด้วยความเอื้อเฟื้อตลอดมา

ประโยชน์อันใดที่เกิดจากการทำงานวิจัยนี้ ย่อมเป็นผลมาจากความกรุณาของทุกท่านดังกล่าว กระผมรู้สึกซาบซึ้งและระลึกถึงความกรุณาเป็นอย่างยิ่ง จึงใคร่ขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

ยอดขวัญ เตชะเพิ่มผล

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ซ
สารบัญรูปภาพ.....	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	6
ประโยชน์ที่ได้รับของงานวิจัย	7
ขอบเขตของงานวิจัย.....	7
บทที่ 2 บทความวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	8
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	17
บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัย.....	39
บทที่ 5 สรุปผลการดำเนินงานวิจัย	89
ภาคผนวก.....	91
รายการอ้างอิง	105
ประวัติผู้เขียน.....	107

สารบัญตาราง

หน้า

ไม่พบรายการสารบัญภาพ



สารบัญรูปภาพ

หน้า

ไม่พบรายการสารบัญภาพ



บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันมลพิษในสิ่งแวดล้อมเป็นปัญหาที่ได้รับความสนใจทั่วโลก โดยส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศวิทยา โภชนาการและสภาพแวดล้อม [1] เนื่องจากโรงงานอุตสาหกรรมในประเทศที่ขยายจำนวนเพิ่มมากขึ้น โดยในกระบวนการขั้นตอนการผลิตนั้น มักเกิดของเสียที่เป็นสารเคมีรั่วไหลออกมาจากกระบวนการผลิต อาจสะสมตกค้างจนทำให้เกิดความเป็นพิษต่อคนและสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารพิษที่อยู่ในรูปของสารประกอบไอออนโลหะและไอออนลบต่างๆ ดังนั้นไอออนเหล่านี้มีบทบาทสำคัญมากมายในระบบสิ่งมีชีวิต จึงจำเป็นต้องมีวิธีการตรวจจับและการระบุนชนิดของไอออน เพื่อตรวจสอบสภาพแวดล้อมและระบบนิเวศให้เป็นปกติ

เนื่องจากในปัจจุบันมีการใช้ไอออนสองชนิดอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น ไอออนทองแดงพบในอุตสาหกรรมการผลิตอุปกรณ์ไฟฟ้า อุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ อุปกรณ์เกี่ยวกับเครื่องยนต์ และอุปกรณ์การก่อสร้าง เป็นต้น ทำให้เกิดการสะสมของไอออนปริมาณมากในสิ่งแวดล้อม ทั้งในดินและแหล่งน้ำซึ่งเป็นแหล่งเพาะปลูก และเป็นที่อยู่อาศัยของสัตว์น้ำ เป็นต้น ซึ่งส่งผลให้ไอออนมีการตกค้างในอาหารที่มนุษย์บริโภค ซึ่งหากมนุษย์มีการสะสมของไอออนในร่างกายในปริมาณที่มากเกินไปจะก่อให้เกิดปัญหาสุขภาพตามมา ผู้วิจัยได้ทำการออกแบบสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ที่มีความไวและ ความจำเพาะเจาะจงสูง เพื่อใช้สำหรับตรวจวัดไอออนที่สนใจ ได้แก่ ไอออนทองแดง และไอออนฟลูออไรด์

ทองแดงจัดเป็นองค์ประกอบที่มีความจำเป็นต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิต โดยควบคุมการเจริญเติบโตการพัฒนาและการออกกำลังกายของสิ่งมีชีวิต [2-5] ในสถานะที่มีการสูญเสียสะสมดุลของทองแดง ถ้าได้รับในปริมาณที่เหมาะสมกับร่างกาย โดยเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในกระดูกและกล้ามเนื้อ แต่ถ้ามนุษย์มีการสะสมของไอออนทองแดงในปริมาณที่สูงจนเกินไปจะทำให้เกิดพิษต่อร่างกาย โดยการเกิดพิษขึ้นอยู่กับปริมาณที่ได้รับเข้าไป เนื่องจากไอออนทองแดงจะถูกดูดซึมได้ดีในกระเพาะอาหารและลำไส้ส่วนบน โดยซึมผ่านเข้าผนังลำไส้ไปที่ตับ จากนั้นจะรวมตัวกับน้ำดี แล้วถูกหลั่งออกมาบริเวณลำไส้ ขับออกไปกับอุจจาระ หรืออาจถูกดูดกลับเข้าสู่ร่างกาย 30% โดยไปสะสมที่กระดูก กล้ามเนื้อ ตับ และสมอง ซึ่งเมื่อมีการสะสมของไอออนทองแดงในปริมาณมากจะทำให้เกิดการอักเสบในช่องท้องและกล้ามเนื้อ ท้องเสีย การทำงานของหัวใจผิดปกติ และอาจส่งผลให้เกิดความผิดปกติทางจิต ความผิดปกติของหัวใจและหลอดเลือด [6-8] อัลไซเมอร์และ โรคเกี่ยวกับระบบประสาทที่เกี่ยวข้อง [9-13] รวมถึงพันธุกรรม การยับยั้งโปรตีน ATT7A ที่ใช้ในการจัดการทองแดง

ATP7B และ SCO1 / 2 โดยส่งผลกระทบต่อที่ร้ายแรง [14] หากได้รับปริมาณทองแดงที่น้อยเกินไปก็จะทำให้เกิดโรค Menkes [15-16] ส่งผลให้กล้ามเนื้ออ่อนแอ ผิวหน้าหย่อนคล้อย สติปัญญาพัฒนาล่าช้า เป็นต้น แต่หากได้รับปริมาณทองแดงที่มากเกินไป จะทำให้เกิดโรควิลสัน (Wilson' Diseases) [17] ซึ่งมีอาการร่างกายสิ้นเทาอยู่ตลอดเวลา กล้ามเนื้อแข็งเกร็ง มีน้ำมูกน้ำลายไหล ควบคุมการพูดลำบาก

อีกทั้งยังมีไอออนที่มีความสำคัญอีกชนิดหนึ่งคือไอออนฟลูออไรด์ โดยไอออนฟลูออไรด์พบมากอย่างกว้างขวางในทางชีวภาพ ระบบและสภาพแวดล้อมภายนอก ปริมาณฟลูออไรด์ที่เหมาะสมสามารถช่วยป้องกันฟันผุและเสริมการสะสมแร่ในกระดูก [18] เป็นส่วนผสมสำคัญในตัวแทนยาสีฟัน และผลิตภัณฑ์ทางยา แม้กระทั่งการเติมลงน้ำดื่มเพื่อที่จะป้องกันการผุกร่อนของฟัน [19] และการเคลือบผิวแบบ demineralization ที่เกิดจากการสวมใส่เครื่องมือทันตกรรมจัดฟัน อีกทั้งยังสามารถใช้ในการรักษาโรคกระดูกพรุน [20]

อย่างไรก็ตามสมาคมทันตกรรมอเมริกัน American Dental Association (ADA) กำหนดให้ใช้ฟลูออไรด์เข้มข้น 0.6 ~ 1.2 มก. / ลิตรในน้ำดื่มบรรจุขวด แต่ความเข้มข้นสูงของฟลูออไรด์ ได้รับการพิสูจน์แล้วว่าเป็นพิษและก่อให้เกิดโรคเฉียบพลันหรือเรื้อรัง ในหลายปีที่ผ่านมาการได้รับฟลูออไรด์ในปริมาณสูงอาจทำให้เกิดฟลูออโรซิส [21] และนำไปสู่การสะสมสารพิษบริเวณไต [22] และ urolithiasis ในมนุษย์ [23] ฟลูออโรซิสในฟัน จะมีลักษณะสีขาวเล็กน้อยริ้วในฟันในรูปแบบที่ไม่รุนแรง และการเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลเมื่อรุนแรงมากขึ้น ซึ่งถาวรหรือมีดลงเมื่อเวลาผ่านไป ในส่วนของโครงกระดูก ฟลูออโรซิสกระดูกพรุน ทำให้ปวดอย่างรุนแรงในข้อต่อพร้อม ด้วยความแข็งซึ่งในที่สุดอาจทำให้เป็นอัมพาตหรือพิการได้ ความผิดปกติของเมตาบอลิซึมและมะเร็ง [24] นอกจากนี้ฟลูออไรด์ สามารถก่อให้เกิดพิษต่อระบบประสาทในสัตว์ทดลองทั้งสอง และมนุษย์ [25-26] โดยปริมาณของฟลูออไรด์นั้นมีทั้งข้อดีและข้อเสีย เราจึงควรให้ความสำคัญในการตรวจสอบความเข้มข้นของฟลูออไรด์ ในหลอดทดลองและในร่างกาย

ในระดับโมเลกุลและชีววิทยาของเซลล์สิ่งมีชีวิต NaF จะมีอิทธิพลต่อกระบวนการส่งสัญญาณเซลล์ต่าง ๆ [27] และสามารถเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ที่ความเข้มข้นสูงเป็นเวลา 24 ชั่วโมงในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม [28] ด้วยเหตุผลเหล่านี้ ผู้วิจัยจึงได้ความพยายามศึกษา และพัฒนาวิธีการใหม่ๆ ในการตรวจจับฟลูออไรด์ [29-30] โดยการพัฒนาของเซ็นเซอร์ที่ใช้ตัวรับสำหรับการตรวจจับฟลูออไรด์ไอออนคือ ความท้าทายเนื่องจากฟลูออไรด์ไอออนมีขนาดเล็ก และมีค่าอิเล็กโตรเนกาตีฟสูง ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ศึกษาและตรวจวัดไอออนฟลูออไรด์ในรูปของเกลือฟลูออไรด์ tetrabutylammonium (TBAF) ในตัวทำละลายอินทรีย์ เพื่อที่สามารถตรวจจับได้ ฟลูออไรด์ไอออน เช่นเดียวกับ NaF ในสารละลายที่เป็นน้ำได้ [30] จากรายงานของทางสหภาพยุโรปและ องค์การอนามัยโลก (WHO) ได้กำหนดให้มีปริมาณไอออนฟลูออไรด์มาตรฐานในน้ำดื่มได้สูงสุดไม่เกิน 1.5

มิลลิกรัมต่อลิตร [31-32] และองค์การพิทักษ์สิ่งแวดล้อมอเมริกา (US-EPA) มีการปริมาณไอออนฟลูออไรด์มาตรฐานในน้ำดื่มได้สูงสุดไม่เกิน 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร [33]

ด้วยเหตุนี้ ผู้วิจัยจึงเห็นความสำคัญของปัญหาสิ่งแวดล้อมรอบตัว โดยเฉพาะสิ่งแวดล้อมทางน้ำซึ่งเป็นแหล่งปนเปื้อนที่สำคัญอันนำมาสู่สารปนเปื้อนในห่วงโซ่อาหารได้มากที่สุด จึงควรได้มีการออกแบบและพัฒนาเครื่องมือหรือวิธีตรวจสอบความเป็นพิษของสิ่งแวดล้อมใกล้ตัว ที่ไม่ยุ่งยาก ไม่ซับซ้อนมีประสิทธิภาพและประหยัดค่าใช้จ่ายให้น้อยที่สุด

จากปัญหาดังกล่าวที่เกิดจากการสะสมของไอออนชนิดต่างๆนั้น จะเห็นว่าการพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณไอออนที่สนใจในสิ่งแวดล้อมเป็นสิ่งสำคัญ ทั้งในน้ำดื่ม และในแหล่งน้ำธรรมชาติต่างๆ ได้วิธีการวิเคราะห์ ตรวจวัดไอออนต่าง ๆ นั้น นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายและเป็นเทคนิคมาตรฐานในปัจจุบันได้แก่ ionselective electrode [34], Flame Atomic Absorption Spectrometry (AAS), Ion chromatography [35], Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry (ICP-AES) แต่เทคนิคเหล่านี้มีข้อเสียและข้อจำกัดได้แก่ ต้นทุนในการวิเคราะห์สูง เครื่องมือมีขนาดใหญ่มาก และอุปกรณ์มีองค์ประกอบจำนวนมาก จึงทำให้ไม่เหมาะกับการดัดแปลงสู่การวิเคราะห์ในระดับภาคสนาม ใช้เวลาและวิธีการที่ซับซ้อนในการเตรียมตัวอย่างเพื่อลดการอุดตันของเครื่องมือ รวมถึงอนุภาคแขวนลอยต่างๆ การใช้ตัวอย่างในปริมาณมากในการวิเคราะห์ เนื่องจากการวิเคราะห์เป็นระบบ flow ดังนั้นในการวิเคราะห์ตัวอย่างประเภทชีวภาพ เช่น เลือด หรือ ปัสสาวะ ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ได้ ดังนั้นการใช้สารเรืองแสงเป็นตัวกระตุ้น ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปีสำหรับการวิเคราะห์ไอออน [36-40] จึงเป็นเทคนิคทางเลือกที่ดี ได้รับความสนใจเนื่องจากใช้งานง่ายตอบสนองทันที สามารถใช้ในภาคสนามและควบคุมระยะไกลได้ [41-42] ราคาต้นทุนต่ำ ใช้ตัวอย่างในการวิเคราะห์น้อย สามารถตรวจวัดปริมาณทั้งไอออนบวกและประจุลบได้ในระดับความเข้มข้นเดียวกับวิธีมาตรฐาน และมีประสิทธิภาพเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิควิธีที่ตอบสนองเป้าหมายเดียวกันก่อนหน้านี้ [43-45] ดังนั้นจึงเหมาะกับตัวอย่างประเภทชีวภาพ อีกทั้งเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปียังเป็นเทคนิคที่มีความไวสูง (high sensitivity) และมีความจำเพาะสูง (high selectivity) เหมาะสมกับการวิเคราะห์ไอออนโลหะที่มีปริมาณความเข้มข้นต่ำๆ ในสิ่งแวดล้อม

ในช่วงที่ผ่านมา ได้มีการออกแบบและพัฒนาเซ็นเซอร์ เพื่อใช้สำหรับการตรวจสอบไอออนหรือ analytes มากขึ้นได้รับความสนใจอย่างมาก ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปีได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยต้องคำนึงถึงการออกแบบให้โครงสร้างโมเลกุล (molecular system) ของเซ็นเซอร์ให้มีความสามารถในการตรวจจับโมเลกุลหรือไอออน ของเซ็นเซอร์ทำงานได้โดยใช้คลื่นแสงเหนี่ยวนำให้เกิดสถานะกระตุ้น (light-induced logic operation) ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ และเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเล็ต และภายในโครงสร้างควรมีส่วน

ของโมเลกุลที่แสดงอันตรกิริยาจำเพาะ (selective interaction) ต่อโมเลกุลหรือไอออนที่ต้องการวิเคราะห์อีกด้วย

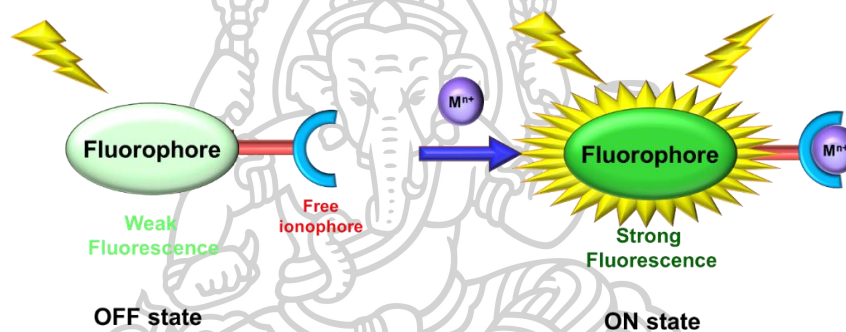
เทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปีสำหรับการตรวจวัดปริมาณไอออนเป็นเทคนิคที่อาศัยคุณสมบัติทางแสงของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ โดยเมื่อมีการให้แสงที่มีความยาวคลื่นที่เหมาะสม (λ_{ex}) เซ็นเซอร์จะสามารถคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่มีความยาวคลื่นที่จำเพาะกับชนิดของเซ็นเซอร์ ทำให้เทคนิคนี้มีความจำเพาะเจาะจงสูงในการวิเคราะห์หาปริมาณไอออน ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ประกอบด้วย 2 ส่วนที่สำคัญ ได้แก่ (1) ฟลูออโรฟอร์ (fluorophore) เป็นส่วนที่แสดงคุณสมบัติในการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์โดยการดูดกลืนและคายแสงในช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสม (2) ไอโอโนฟอร์ (ionophore) เป็นส่วนที่มีความสามารถในการดักจับไอออนโลหะและส่งสัญญาณไปยังฟลูออโรฟอร์ ซึ่งโดยทั่วไปแล้วส่วนของฟลูออโรฟอร์จะเชื่อมต่อกับส่วนของไอโอโนฟอร์ด้วยพันธะโควาเลนต์ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์นี้จะทำงานเปรียบเสมือนกับการทำงานของทรานสดิวเซอร์โดยการเปลี่ยนข้อมูลของกลไกการดักจับไอออนโลหะ (recognition event) ไปเป็นการเปลี่ยนแปลงทางแสงและแสดงผลโดยการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางโฟโตฟิสิกส์ (photophysical characteristic) ของเซ็นเซอร์

ในวิทยานิพนธ์นี้นำเสนอการสังเคราะห์สารเซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดไอออนทองแดง และฟลูออไรด์ชนิดใหม่ที่มีสภาพไวสูง (high sensitivity) และมีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนทองแดง และฟลูออไรด์สูง (high selectivity) อีกทั้งสามารถนำไปประยุกต์ใช้งานได้จริง โดยมีหลักการคือ ไอออนทองแดง (Cu^{2+} ion) มีขนาดอะตอมกลางและโพลาริไซได้ง่าย จัดเป็นกึ่ง soft acid (จาก Pearson's principle หรือ ทฤษฎี Hard and Soft Acid and Base) [46] ซึ่งชอบเกิดอันตรกิริยาและสร้างพันธะ (bond binding) กับอะตอมหรือหมู่ฟังก์ชัน (functional group) ที่เป็น soft base เช่น อะตอมไนโตรเจนและอะตอมซัลเฟอร์ที่มีอิเล็กตรอนมาก ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกสังเคราะห์ส่วนไอโอโนฟอร์ที่มีอะตอมไนโตรเจนและอะตอมออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ [47-49] เพื่อทำหน้าที่เป็น soft donor ligand ให้อิเล็กตรอนแก่ไอออนทองแดง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการดักจับและเพิ่มความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนทองแดง และเลือกสังเคราะห์โมเลกุลให้มีลักษณะเป็นสายโซ่ยาว (acyclic chain) เพื่อให้เกิดกระบวนการดักจับไอออน ในตำแหน่งที่เหมาะสมโดยการม้วนตัวล้อมรอบไอออนทองแดงได้อย่างอิสระ (self assembly) เพื่อขจัดปัญหาเรื่องขนาดของช่องว่างที่ไม่เหมาะสม และเลือกใช้ฟลูออโรฟอร์ชนิดหมู่ฟลูออเรสซิน (fluorescein group) และ หมู่เอซาโบดีปี (aza BODIPY group) ซึ่งเป็นสารประกอบอะโรมาติก (aromatic compound) ที่มีค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง (extinction coefficient: ϵ) และมีค่าประสิทธิภาพเชิงควอนตัม (quantum yield: ϕ_f) สูง จึงมีการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้ดี โดยฟลูออโรฟอร์ทั้งสองชนิดคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในช่วงแสงที่ตามองเห็น (visible region) [50-53] และ ช่วงใกล้อินฟราเรด (near-infrared region) [54-56]

ตามลำดับ เนื่องจากแสงในช่วงช่วงใกล้อินฟราเรดมีพลังงานน้อยกว่าเมื่อเทียบกับความยาวคลื่นในช่วงแสงที่ตามองเห็น (visible region) ทำให้ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต ส่งผลต่อการศึกษาระบบ ภายในเซลล์สิ่งมีชีวิตมากขึ้น รวมถึงการปรับเปลี่ยนโครงสร้างได้ง่ายเหมาะสำหรับการนำมาใช้งาน ซึ่งมีประโยชน์ต่อการนำไปพัฒนาใช้ในอุปกรณ์ในภาคสนามต่อไป

เมื่อทำการศึกษาระบบการดักจับไอออนของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ที่ทำให้เซ็นเซอร์เกิดการเปลี่ยนแปลงการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ พบว่าไอออนโลหะและไอออนลบมีกระบวนการทำงานที่แตกต่างกัน โดยกระบวนการดักจับไอออนโลหะของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์สามารถอธิบายได้ 2 แบบด้วยกัน ดังนี้

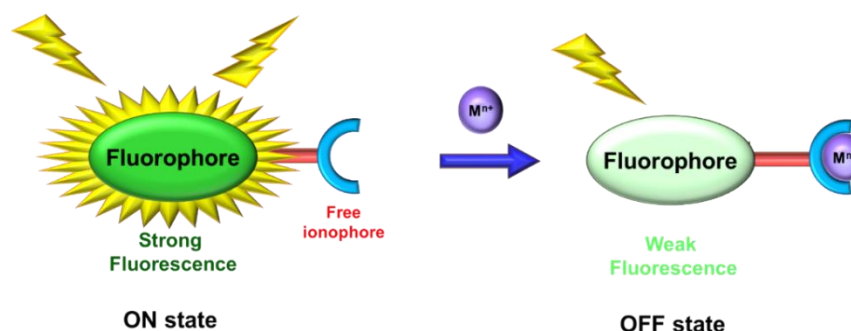
1) การเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ในลักษณะคล้ายการปิด-เปิดสวิตช์ไฟ (OFF-ON system) แสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แสดงลักษณะการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ก่อนไอออนฟลูออเรสเซนต์จับไอออนโลหะ (ซ้าย) และภายหลังดักจับไอออนโลหะ (ขวา)

จากภาพที่ 1 สามารถอธิบายได้ว่าในสภาวะที่สารละลายไม่มีไอออน เซ็นเซอร์จะคายแสงฟลูออเรสเซนต์ออกมาในปริมาณความเข้มแสงต่ำ แต่เมื่อมีไอออนอยู่ในสารละลาย ไอออนจะเข้าจับกับไอออนฟลูออเรสเซนต์ทำให้เซ็นเซอร์สามารถคายแสงฟลูออเรสเซนต์ได้สูงขึ้น

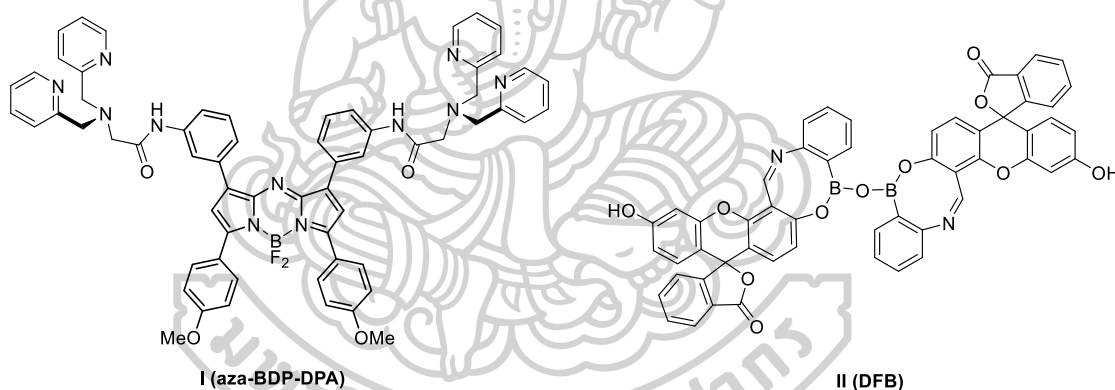
2) การเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ในลักษณะการเปิด-ปิดสวิตช์ไฟ (ON-OFF system) แสดงดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 แสดงลักษณะการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ก่อนไอออนฟลูออเรสเซนต์จับไอออนโลหะ (ซ้าย) และภายหลังดักจับไอออนโลหะ (ขวา)

จากภาพที่ 2 สามารถอธิบายได้ว่าในสภาวะที่สารละลายไม่มีไอออน เซ็นเซอร์จะคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ออกมาในปริมาณความเข้มแสงที่สูง แต่เมื่อมีไอออนอยู่ในสารละลาย ไอออนจะเข้าจับกับไอออนฟอรั่มทำให้เซ็นเซอร์คายแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้น้อยลง โดยความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ลดลงจะขึ้นกับปริมาณไอออนในสารละลาย

ในงานวิจัยนี้จะนำเสนอวิธีการออกแบบและสังเคราะห์โมเลกุลเซ็นเซอร์ สำหรับตรวจวัดไอออนทองแดงและฟลูออไรด์ชนิดใหม่ที่มีสภาพไวสูง (high sensitivity) และมีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนทองแดงและฟลูออไรด์สูง (high selectivity) อีกทั้งสามารถนำไปประยุกต์ใช้งานได้จริง โดยมีโครงสร้างแสดงดังภาพที่ 3 อีกทั้งยังเป็นงานวิจัยที่มีความสำคัญ ช่วยในการแก้ปัญหาสิ่งแวดล้อม โดยเป็นการพัฒนาเครื่องมือหรือวิธีตรวจสอบความเป็นพิษในสิ่งแวดล้อมที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน ซึ่งเป็นไปตามแนวทางของแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่สิบสอง พ.ศ. 2560-2564 ยุทธศาสตร์การเติบโตและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมเพื่อการพัฒนาอย่างยั่งยืน และยุทธศาสตร์การพัฒนาศาสตร์ เทคโนโลยี วิจัย และนวัตกรรม



ภาพที่ 3 โครงสร้างของโมเลกุลเป้าหมาย

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อออกแบบฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ชนิดใหม่ สำหรับตรวจวัดไอออนทองแดง และไอออนฟลูออไรด์ ที่สามารถสังเคราะห์ขึ้นได้โดยใช้เส้นทางการสังเคราะห์ที่ง่าย และประหยัด เพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาเซ็นเซอร์ในเชิงพาณิชย์ต่อไป
- 2) เพื่อออกแบบเซ็นเซอร์ชนิดใหม่สำหรับตรวจวัดไอออนทองแดง และไอออนฟลูออไรด์อย่างจำเพาะเจาะจง (selectivity) ว่องไว (sensitivity) และสามารถวิเคราะห์เชิงปริมาณและวิเคราะห์เชิงคุณภาพได้โดยใช้วิธีทางฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปีได้อย่างมีประสิทธิภาพ
- 3) เพื่อออกแบบเซ็นเซอร์ชนิดใหม่ให้มีความสามารถตรวจวัดไอออนทองแดง และไอออนฟลูออไรด์ ในสารละลายอินทรีย์หรือตัวกลางที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ (aqueous solution)

ประโยชน์ที่ได้รับของงานวิจัย

1) สามารถสังเคราะห์เซ็นเซอร์ทั้งสองชนิด ที่มีกระบวนการสังเคราะห์ที่ง่าย ไม่ซับซ้อน ต้นทุนการสังเคราะห์ต่ำ และสามารถตรวจวัด ไอออนทองแดง และไอออนฟลูออไรด์ได้อย่างจำเพาะเจาะจงได้เทียบเท่ากับเครื่องมือราคาแพง

2) สามารถนำเซ็นเซอร์ที่ได้จากการสังเคราะห์มาตรวจวัดหาปริมาณ ไอออนทองแดง และไอออนฟลูออไรด์ ที่มีคุณสมบัติ มีความจำเพาะเจาะจงสูงกับไอออนทองแดงและไอออนฟลูออไรด์ มีความไวสูง การแข่งขันในสถานะที่มีไอออนรบกวนอื่น ๆ น้อย และมีค่า detection limit ต่ำ อีกทั้งยังสามารถทดสอบสารตัวอย่างในธรรมชาติได้ในอนาคต

ขอบเขตของงานวิจัย

- 1) ออกแบบ สังเคราะห์และแยกสารบริสุทธิ์เซ็นเซอร์ทองแดงและฟลูออไรด์ชนิดใหม่ 2 ชนิด
- 2) นำเซ็นเซอร์ใหม่ที่สังเคราะห์ได้ไปทดสอบคุณสมบัติการเรืองแสง ในสารละลายอินทรีย์ โดยมีน้ำเป็นองค์ประกอบได้



บทที่ 2

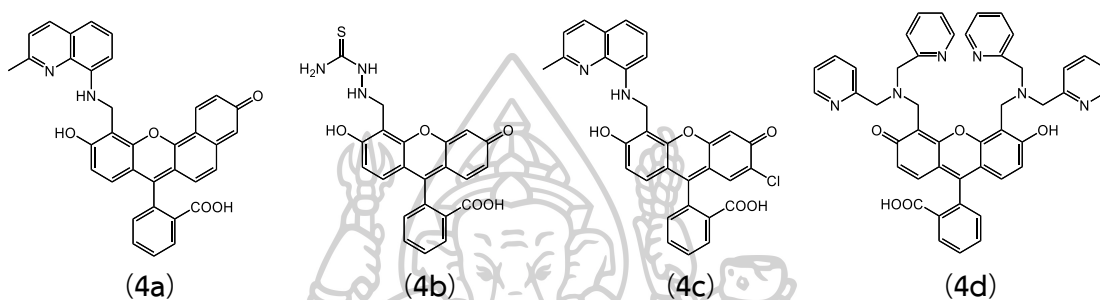
บทความวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การออกแบบและสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดไอออนต่างๆ ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโกปีได้รับความสนใจจากนักวิจัยอย่างแพร่หลาย อีกทั้งยังพัฒนากระบวนการติดตามและตรวจสอบปริมาณไอออนโลหะ เพื่อใช้ประโยชน์ทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ คือการนำฟลูออโรไอโอโนฟอร์มาใช้ในการติดตามและตรวจวัดปริมาณไอออนโลหะหนัก เป็นเทคนิคที่ได้รับความสนใจจากนักวิจัยอย่างแพร่หลาย โดยนักวิจัยมุ่งหวังที่จะพัฒนาการสังเคราะห์สารฟลูออเรสเซนต์ ในการออกแบบฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์นั้นจะออกแบบให้มีประสิทธิภาพในการดักจับไอออนที่สนใจสูงที่สุด ทั้งในด้านความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) และความจำเพาะเจาะจง (selectivity) รวมถึงการใช้งานฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ในตัวทำละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ เพื่อให้สามารถใช้งานได้กับตัวอย่างจริง เช่น น้ำจากแหล่งน้ำต่างๆ เป็นต้น

ในงานวิทยานิพนธ์นี้ได้แสดงตัวอย่าง บทความวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดไอออนโลหะ โดยงานวิจัยที่น่าเสนอนี้จะเน้น การออกแบบและพัฒนาระบบเซ็นเซอร์ โดยใช้หลักของ Pearson acid base concept (HSAB) ที่ถูกค้นพบโดย Ralph G. Pearson ในปี 1969 โดยหลักการดังกล่าวได้กล่าวไว้ว่าไอออนชนิด hard acid จะสามารถเกิดปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็วและสร้างพันธะที่แข็งแรงกับไอออนชนิด hard base ส่วนไอออนชนิด soft acid จะสามารถเกิดปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็วและสร้างพันธะที่แข็งแรงกับไอออนชนิด soft base ดังนั้นในส่วนของไอโอโนฟอร์จะส่งผลต่อการตรวจจับไอออนโลหะชนิดต่างๆ ดังมีรายงานไว้ในงานวิจัยหลายฉบับ [57-76] และ ตัวอย่างโครงสร้างทางเคมีของเซ็นเซอร์บางชนิด แสดงดังในภาพที่ 4-10

ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้ fluorescein เป็นฟลูออโรฟอร์ ได้แก่ ในปี ค.ศ. 2007 Lippard และคณะ [57] ได้นำไอโอโนฟอร์ชนิด N-(2-aminobenzyl)-3,9-dithia-6-azaundecane มาต่อกับ seminaphtho fluorescein aldehyde ทำหน้าที่เป็นฟลูออโรฟอร์เพื่อทำการสังเคราะห์เซ็นเซอร์ปรอท **4a** ในสารละลาย 50 mM PIPES, 100 mM KCl, pH 7 โดยมี detection limit เท่ากับ 50 nM และแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่ความยาวคลื่น 530 nm และในปีเดียวกัน Wang และคณะ [58] ได้นำไอโอโนฟอร์ชนิด thiosemicarbazide มาต่อกับ fluorescein derivative ซึ่งเป็นฟลูออโรฟอร์ เพื่อทำการสังเคราะห์เซ็นเซอร์ **4b** พบว่า เซ็นเซอร์ชนิดนี้ มีความสามารถในการดักจับไอออนแคดเมียม ได้ในสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES 50 mM, 100 mM KCl, pH 7.0 โดยแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่ความยาวคลื่น 521 nm ต่อมาในปี ค.ศ. 2010 Mc Quade และ คณะ [59] ได้นำไอโอโนฟอร์ชนิด 2-methyl-8-aminoquinoline ซึ่งมีไนโตรเจนสองอะตอมเป็นส่วนประกอบมาต่อเข้า

กับฟลูออเรสซิน (4c) และ พบว่าเซ็นเซอร์สามารถเกิดอันตรกิริยากับไอออนทองแดงได้อย่างจำเพาะเจาะจงสูง และคณะผู้วิจัยได้นำเซ็นเซอร์ชนิดนี้ไปประยุกต์ใช้ เพื่อตรวจสอบและติดตามปริมาณไอออนทองแดงในสารละลายน้ำและในเซลล์ที่มีชีวิต นอกจากนี้ Burdette และ คณะ [60] ซึ่งได้สังเคราะห์เซ็นเซอร์สองชนิดที่ประกอบด้วยฟลูออโรฟอร์ชนิดฟลูออเรสซิน และ ไอโอโนฟอร์ชนิด bis(2-pyridyl methyl)amine(dipicolylamine) (4d) เพื่อใช้เป็นเซ็นเซอร์สังกะสีในการติดตามปริมาณไอออนสังกะสีในเซลล์ประสาท และเพื่อใช้ประโยชน์ในการศึกษาการรับส่งสัญญาณของเซลล์ประสาทที่มีผลต่อสิ่งเร้า

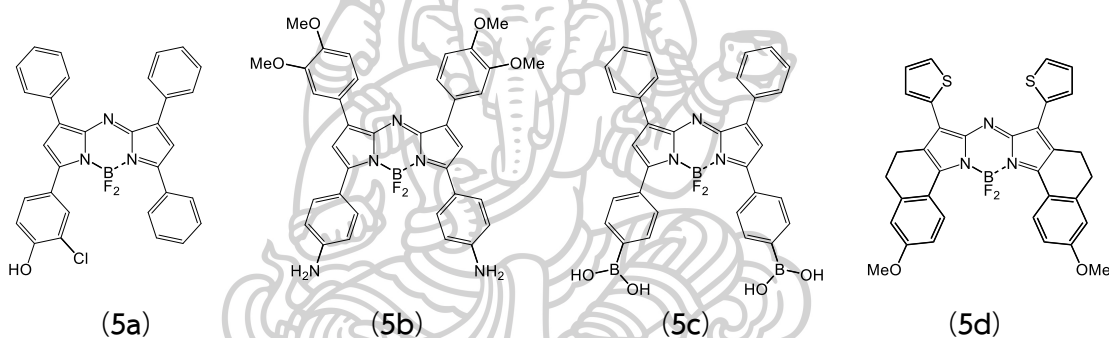


ภาพที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของเซ็นเซอร์ที่มีฟลูออโรฟอร์ชนิดฟลูออเรสซินเป็นองค์ประกอบ

อีกทั้งยังมีฟลูออโรฟอร์ที่น่าสนใจอีกชนิด คือ aza-BODIPY ซึ่งเป็นฟลูออโรฟอร์ที่มีการดูดกลืนและคายแสงในช่วงความยาวคลื่นใกล้อินฟราเรด (near-infrared region) ซึ่งมีประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้ในงานด้านต่างๆ เช่น ด้านชีวภาพ และวิทยาศาสตร์ทางยา นอกจากนี้ความยาวคลื่นในใกล้อินฟราเรด ยังมีประโยชน์ในการศึกษาทางด้านสิ่งมีชีวิต เนื่องจากแสงในช่วงนี้มีพลังงานน้อยกว่าเมื่อเทียบกับความยาวคลื่นในช่วงแสงที่ตามองเห็น (visible region) ทำให้ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต ส่งผลต่อการศึกษาระบบ ภายในเซลล์สิ่งมีชีวิตมากขึ้น รวมถึงการปรับเปลี่ยนโครงสร้างได้ง่ายเหมาะสำหรับการนำมาใช้งาน ซึ่งมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ aza BODIPY ดังนี้

ในปี ค.ศ. 2012 Jokic และคณะ [61] ได้เสนอการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ aza BODIPY (5a) พบว่าเซ็นเซอร์ชนิดนี้มีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนโปรตอน ในสารละลายผสมระหว่าง EtOH:buffer ในอัตราส่วน 1:1 v/v โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ในการดูดกลืนแสงสูงโดยมีค่าเท่ากับ $80000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ เหมาะสำหรับนำมาประยุกต์ใช้เป็น pH probe ได้ ต่อมาในปี ค.ศ. 2013 Adarsh และคณะ [62] ได้เสนอการสังเคราะห์ nitrile ion probe 5b โดยการแทนที่โปรตอนบน phenyl ด้วยหมู่ amino พบว่า 5b มีความจำเพาะเจาะจงต่อ nitrile ion โดยมี detection limit เท่ากับ 20 ppb โดยที่สารละลายจะมีการเปลี่ยนสีจากสีฟ้าเป็นสีเขียว ในสภาวะที่มีไอออน สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าเหมาะสำหรับการตรวจวิเคราะห์เบื้องต้น และสามารถนำมาอาบลงบนผิวของกระจก หรือ

solid-state ได้ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ใน งานภาคสนามได้ ต่อมาในปี ค.ศ. 2015 Liu และคณะ [63] ได้เสนอการสังเคราะห์สารประกอบ **5c** โดยใช้ aza BODIPY โดยมีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างด้วยหมู่ boronic acid พบว่าสารประกอบ ชนิดนี้มีความสามารถในการตรวจวัดน้ำตาลกลูโคสในเลือดได้อย่างจำเพาะเจาะจง โดยที่สามารถ วัดระดับน้ำตาลกลูโคสได้ต่ำกว่าระดับน้ำตาลกลูโคสที่มีอยู่ในเลือดของคนปกติ 40 เท่า ซึ่งสารชนิดนี้คายแสงในช่วงความยาวคลื่นใกล้รังสีอินฟราเรดส่งผลให้ interference ที่มีอยู่ในเลือดไม่มี การรบกวนการวิเคราะห์ทำให้ผลการวิเคราะห์มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือมากขึ้น และล่าสุดในปี ค.ศ. 2016 Jiang และคณะ [64] ได้เสนอการสังเคราะห์สารประกอบ **5d** โดยใช้ aza- BODIPY โดยทำปฏิกิริยากับ 3-(thiophen-2-yl)-2H-azirine พบว่าเซ็นเซอร์ชนิดนี้มีความสามารถในการตรวจวัดไอออนปรอทได้อย่างจำเพาะเจาะจง อีกทั้งผู้วิจัยได้นำเซ็นเซอร์ชนิดนี้ไปประยุกต์ใช้ เพื่อตรวจสอบและติดตามปริมาณไอออนปรอทภายในเซลล์สิ่งมีชีวิต MCF-7 ได้

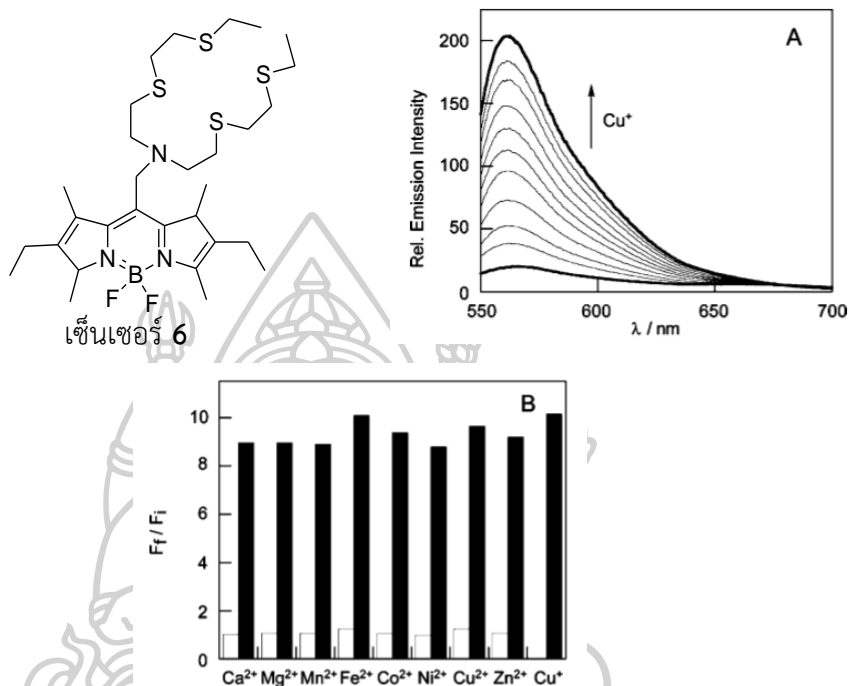


ภาพที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของเซ็นเซอร์ที่มีฟลูออโรฟอร์ชนิด aza-bodipy เป็นองค์ประกอบ

จากตัวอย่างงานวิจัยในข้างต้น การออกแบบส่วนของฟลูออโรฟอร์ที่มีอนุพันธ์ของ fluorescein และ aza BODIPY เป็นองค์ประกอบของเซ็นเซอร์ที่ใช้ในการตรวจวัดไอออนโลหะต่างๆ นอกจากนี้ผู้วิจัยยังสนใจออกแบบและสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับไอออนทองแดง และไอออนฟลูออไรด์ โดยออกแบบส่วนของไอโคโนฟอร์ให้มีอะตอมไนโตรเจน อะตอมออกซิเจน และอะตอมซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ ทำให้ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ที่ได้มีความจำเพาะเจาะจง และมีประสิทธิภาพในการตรวจวัดไอออนทองแดง ดังตัวอย่างงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่เกี่ยวข้องกับการออกแบบและสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดไอออนทองแดง มีดังนี้

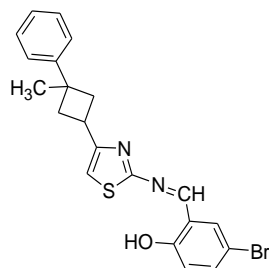
ในปี ค.ศ. 2005 Zeng และคณะ [65] ได้ทำการออกแบบฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ **6** ซึ่งประกอบด้วย azatetrathia ทำหน้าที่เป็นไอโคโนฟอร์มาเชื่อมต่อกับฟลูออโรฟอร์ชนิด BODIPY ซึ่งมีการดูดกลืนแสงและการคายแสงอยู่ในช่วงที่ตามองเห็น (ภาพที่ 6) เมื่อทำการศึกษาเซ็นเซอร์ **6** ในสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES (20 mM, pH = 7.0) พบว่าเซ็นเซอร์ชนิดนี้มีการคายแสงฟลูออเรสเซนต์

แบบ OFF-ON system และมีการดักจับระหว่างเซ็นเซอร์ 6 ต่อไอออนทองแดงในอัตราส่วน 1:1 โดยไม่มีการรายงานค่า detection limit และเมื่อทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเซ็นเซอร์ พบว่าเซ็นเซอร์ 6 มีความจำเพาะกับไอออนทองแดงสูง เมื่อเทียบกับไอออนโลหะชนิดอื่นๆ ได้แก่ Ni^{2+} Ca^{2+} Co^{2+} Mg^{2+} Zn^{2+} Cd^{2+} Fe^{2+} Cr^{3+} และ K^+ เป็นต้น

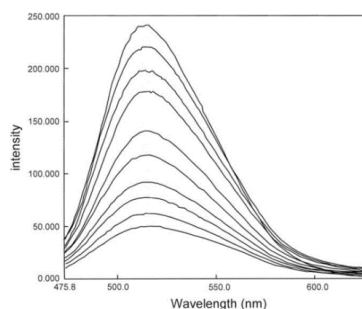


ภาพที่ 6 แสดงโครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีของเซ็นเซอร์ 6 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES (20 mM, pH = 7.0) ในสภาวะที่มีไอออนทองแดงรวมอยู่กับไอออนรบกวนชนิดต่างๆ

ในปี ค.ศ. 2009 Aksuner และคณะ [66] ได้ทำการออกแบบฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ 7 โดยใช้ 4-(1-phenyl-1-methylcyclobutane-3-yl)-2-(2-hydroxy-5-romobenzylidene)amino thiazole เป็นไอออนฟอร์ (ภาพที่ 7) และเมื่อทำการศึกษาเซ็นเซอร์ดังกล่าวบนฟิล์มพอลิเมอร์ พบว่าเซ็นเซอร์ 7 มีระบบการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์แบบ ON-OFF system ที่ความยาวคลื่น 527 นาโนเมตร มีค่า detection limit เท่ากับ 5.66×10^{-7} M (35.97 ppb) และมีการดักจับระหว่างเซ็นเซอร์ 7 ต่อไอออนทองแดงในอัตราส่วน 1:1 นอกจากนี้เมื่อทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเซ็นเซอร์ 7 พบว่าเซ็นเซอร์ชนิดนี้มีความจำเพาะกับไอออนทองแดงสูง เมื่อเทียบกับไอออนโลหะชนิดอื่นๆ ได้แก่ Na^+ K^+ Mg^{2+} Ca^{2+} Zn^{2+} Mn^{2+} Hg^{2+} Ni^{2+} Co^{2+} Pb^{2+} Cd^{2+} Fe^{2+} Cr^{3+} Ag^+ และ Li^+ เป็นต้น

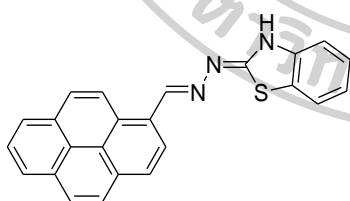


เซ็นเซอร์ 7

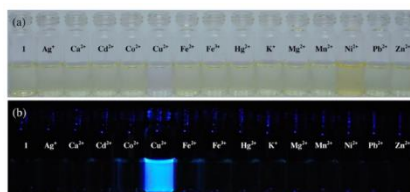
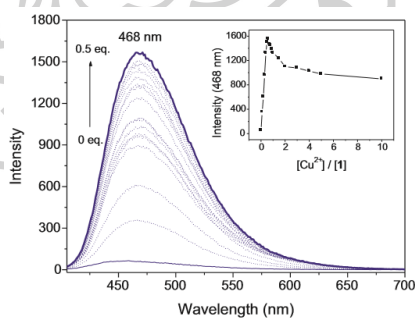


ภาพที่ 7 แสดงโครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีของเซ็นเซอร์ 7 และการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์บนฟิล์มพอลิเมอร์ที่ความยาวคลื่น 527 nm ก่อนและหลังการเติมไอออน

ต่อมาในปี ค.ศ. 2013 Wang และคณะ [67] ได้ทำการออกแบบฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ 8 โดยใช้ 1-pyrenecarboxaldehyde เป็นไอโอโนฟอร์เชื่อมต่อกับฟลูออโรฟอร์ชนิด benzothiazolenehydrazone (ภาพที่ 8) เมื่อทำการศึกษาเซ็นเซอร์ 8 ในสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES (5mM, pH = 7.0) พบว่าเซ็นเซอร์ชนิดนี้มีการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์แบบ OFF-ON system และมีความไวในการตรวจจับกับไอออนทองแดงสูงมาก โดยมีการตรวจจับระหว่างเซ็นเซอร์ 8 ต่อไอออนทองแดงในอัตราส่วน 1:1 และมีค่า detection limit เท่ากับ 2.73×10^{-6} M (173.48 ppb) เมื่อทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเซ็นเซอร์ พบว่าเซ็นเซอร์ 8 มีความจำเพาะกับไอออนทองแดงสูงสุดเมื่อเทียบกับไอออนโลหะชนิดอื่นๆ นอกจากนี้ในสภาวะที่มีไอออนทองแดงสารละลายมีการเปลี่ยนสีจากสีเหลืองอ่อนเป็นไม่มีสี ซึ่งมีประโยชน์สำหรับการตรวจวิเคราะห์เบื้องต้นและการนำไปใช้งานภาคสนาม

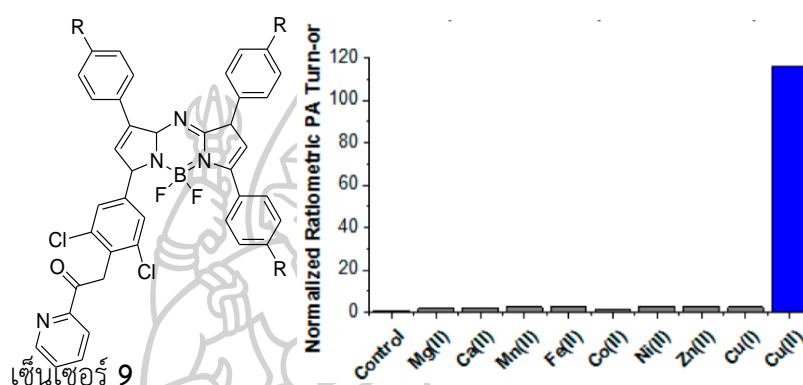


เซ็นเซอร์ 8



ภาพที่ 8 แสดงโครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีของเซ็นเซอร์ 8 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES และการเปลี่ยนสีของเซ็นเซอร์

ในปี ค.ศ. 2015 Li และคณะ [68] ได้ทำการออกแบบฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ **9** โดยใช้ส่วนของฟลูออโรฟอร์เป็น boron azadipyrromethene (aza-BODIPY) (ภาพที่ 9) ซึ่งมีการดูดกลืนแสงและการคายแสงอยู่ในช่วงที่ตามองเห็น เมื่อทำการศึกษาเซ็นเซอร์ **9** ในสารละลาย phosphate buffered saline (PBS) พบว่าเซ็นเซอร์ **9** มีการคายแสงฟลูออเรสเซนต์แบบ OFF-ON system โดยไม่ได้มีการรายงานค่า detection limit เมื่อทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเซ็นเซอร์พบว่าเซ็นเซอร์ **9** มีความจำเพาะกับไอออนทองแดงสูงเมื่อเทียบกับไอออนโลหะชนิดอื่นๆ ได้แก่ K^+ Mg^{2+} Ca^{2+} Zn^{2+} Mn^{2+} Hg^{2+} Ni^{2+} Co^{2+} Pb^{2+} Cd^{2+} Fe^{2+} Cr^{3+} และ Ag^+ เป็นต้น



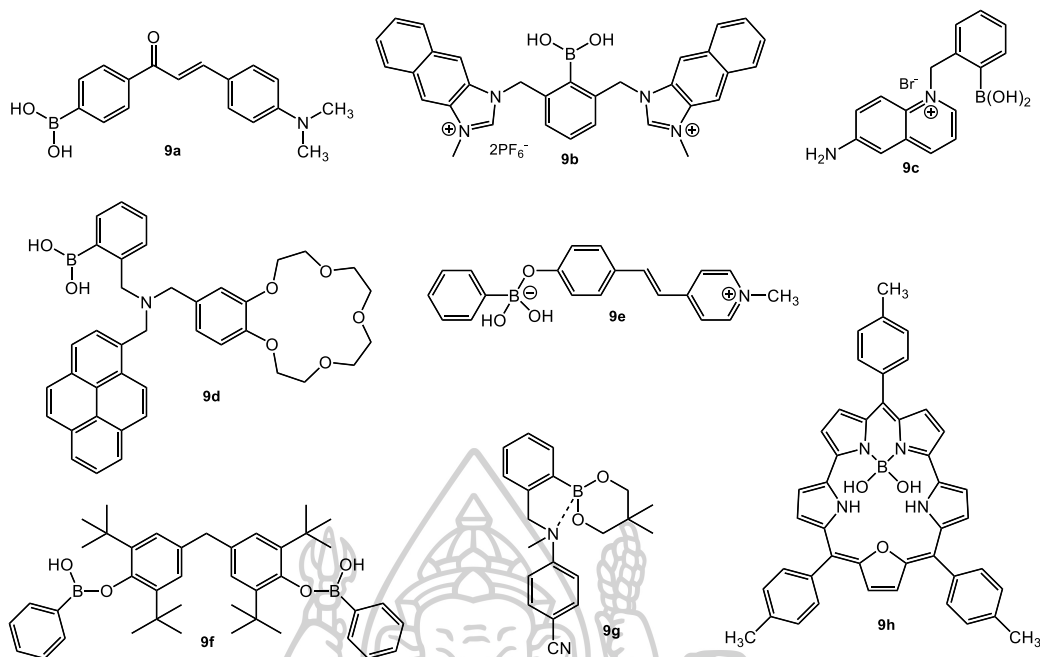
ภาพที่ 9 แสดงโครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีของเซ็นเซอร์ **9** และอัตราส่วนในการเปลี่ยนแปลงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ในสารละลายบัฟเฟอร์ PBS (pH = 7.4) เมื่อมีการเติมไอออนทองแดงและไอออนรบกวนอื่นๆ

จากตัวอย่างงานวิจัยในข้างต้น จะเห็นว่าการออกแบบส่วนของไอโอโนฟอร์ให้มีอะตอมไนโตรเจน และอะตอมออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ ทำให้ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจง และมีประสิทธิภาพในการตรวจวัดไอออนทองแดง นอกจากนี้ผู้วิจัยยังสนใจฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ที่มีความสามารถในการตรวจวัดไอออนฟลูออไรด์ ซึ่งจะมีอะตอมของโบรอนหรือ boronic acid เป็นองค์ประกอบ โดยตัวอย่างงานวิจัยก่อนหน้านี้ ที่เกี่ยวข้องกับการออกแบบและสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดไอออนฟลูออไรด์ มีดังนี้

ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้สารที่มีอะตอมโบรอนเป็นองค์ประกอบเพื่อให้ตรวจวัดไอออนฟลูออไรด์ ได้แก่ ในปี ค.ศ. 2002 Lakowicz และ คณะ [69] ได้ออกแบบและสังเคราะห์อนุพันธ์ของ charcone มาต่อกับ boronic acid ทำหน้าที่เป็นไอโอโนฟอร์ เพื่อทำการสังเคราะห์เซ็นเซอร์ฟลูออไรด์ **9a** ในสารละลายผสมระหว่างน้ำกับเมทานอล (2:1 v/v) โดยมีการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์แบบเป็นสัดส่วนโดยตรง ต่อมาในปี 2009 Xu และคณะ [70] ได้นำไอโอโนฟอร์ชนิด imidazolium

มาต่อกับ boronic acid เพื่อสังเคราะห์เซ็นเซอร์ **9b** พบว่า เซ็นเซอร์ชนิดนี้ มีความสามารถในการดักจับไอออนฟลูออไรด์ ได้ในสารละลาย $\text{CH}_3\text{CN}/\text{HEPES}$ (95:5 v/v) โดยแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์แบบ blue shift สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ที่ความยาวคลื่นจาก 445 nm เป็น 370 nm ซึ่งเป็นผลมาจากพันธะไฮโดรเจนระหว่างไอออนฟลูออไรด์กับอนุพันธ์ของ imidazolium ที่ตำแหน่ง C-H ในปี ค.ศ. 2005 Badugu และคณะ [71] ได้ออกแบบฟลูออเรสเซนซ์ที่มีความสามารถละลายในน้ำได้ดี เซ็นเซอร์ **9c** โดยใช้ boronic acid เป็นไอโอโนฟอรัลเชื่อมต่อกับฟลูออโรฟอร์ชนิด quinolinium เมื่อทำการศึกษาเซ็นเซอร์ **9c** ในสารละลายน้ำ พบว่าเมื่อเติมไอออนฟลูออไรด์ลงไป เซ็นเซอร์ชนิดนี้มีการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ลดลงที่ความยาวคลื่น 546 nm และมีสัญญาณใหม่ ปรากฏขึ้นที่ความยาวคลื่น 450 nm อีกทั้งยังสามารถทดสอบได้ในเครื่องตีแม่แอลกอฮอล์ประเภทค็อกเทลได้ และในปีเดียวกัน Koskela และคณะ [72] ได้สังเคราะห์อนุพันธ์ของ benzocrown-ether เชื่อมต่อกับ boronic acid **9d** โดยมีความสามารถดักจับไอออนโพแทสเซียมและไอออนฟลูออไรด์ เมื่อมีการดักจับไอออนจะส่งผลให้เกิดการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เพิ่มขึ้น

ต่อมาในปี 2007 Nicolini และคณะ [73] ได้ออกแบบฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ **9e** โดยใช้อนุพันธ์ merocyanine เชื่อมกับ phenyl boronic acid โดยเซ็นเซอร์ชนิดนี้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 571 nm โดยมีการเปลี่ยนสีจากใสไม่มีสีเป็นสีม่วง ด้วยค่า $K_{\text{binding constant}}$ เท่ากับ $(1.93 \pm 0.53) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ต่อมาในปี 2008 Galbraith และคณะ [74] ได้สังเคราะห์เซ็นเซอร์ **9f** โดยใช้อนุพันธ์ของ phenol เชื่อมกับ phenyl boronic acid เมื่อมีการเติมไอออนฟลูออไรด์ลงในสารละลาย chloroform จะเกิดการเปลี่ยนสีจากใสไม่มีสีเป็นสีเหลือง และมีการคายแสงที่ลดลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ ต่อมาในปี 2011 Rao และ Ravikanth [75] ได้ออกแบบฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ **9g** โดยใช้อนุพันธ์ porphyrin oxasmaragdyrin เชื่อมกับ boronic acid โดยพบว่าเมื่อมีการเติมไอออนฟลูออไรด์ในสารละลาย CH_2Cl_2 จะมีค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงที่ความยาวคลื่น 446, 475 และ 705 nm และเกิดสัญญาณใหม่ที่ความยาวคลื่น 455, 487 และ 720 nm โดยเมื่อคำนวณด้วยสมการ Benesi-Hildebrand พบว่าเซ็นเซอร์มีการจับกับไอออนฟลูออไรด์แบบ 1:1 ด้วยค่า $K_{\text{binding constant}}$ เท่ากับ $1.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ในปี 2007 Tan และคณะ [76] ได้ออกแบบและสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ **9h** โดยใช้อนุพันธ์ 4-N, N-dimethylaminobenzonitrile เชื่อมกับ phenyl boronic acid พบว่าเมื่อเติมไอออนฟลูออไรด์จะมีการคายแสงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ลดลง ที่ความยาวคลื่น 464 และ 352 nm โดยเกิดกลไกแบบ twisted-intramolecular-charge-transfer (TICT) ด้วยค่า $K_{\text{binding constant}}$ เท่ากับ 1.47×10^4 , 2.37×10^3 , and $2.10 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ในสารละลาย DMF THF และ CH_2Cl_2 ตามลำดับ



ภาพที่ 10 โครงสร้างทางเคมีของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ที่มีอะตอมโบรอนเป็นองค์ประกอบ

จากตัวอย่างงานวิจัยในข้างต้น มีฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์หลายชนิด ที่สามารถดักจับได้ทั้งไอออนทองแดง และไอออนฟลูออไรด์ แต่ส่วนของไอโอโนฟอร์ที่ใช้ในการดักจับไอออนทั้งสองชนิดนั้นคล้ายกัน ทำให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการออกแบบฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์สำหรับดักจับทั้งไอออนทองแดง และไอออนฟลูออไรด์ให้มีประสิทธิภาพได้ โดยฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ที่มีการออกแบบให้ส่วนไอโอโนฟอร์ที่เป็นหมู่ boronic acid จะมีความสามารถในการจับกับไอออนฟลูออไรด์ โดยอะตอมของโบรอนจะสามารถสร้างพันธะคู่กับไอออนฟลูออไรด์ได้ดี ส่งผลให้เกิดเป็นสารฟลูออโรฟอร์ที่มีโครงสร้างชนิดใหม่ จึงเกิดการเปลี่ยนแปลงของสสารละลาย และการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ที่เปลี่ยนไป จากคุณสมบัตินี้จึงมีการพัฒนาเซ็นเซอร์หลายชนิดที่มีหมู่ boronic acid ในการตรวจจับไอออนฟลูออไรด์ และมีความเหมาะสมอย่างยิ่งในการนำมาพัฒนาเป็นชุดทดสอบสำหรับใช้ตรวจวัดและติดตามการปนเปื้อนของไอออนฟลูออไรด์ได้

โดยทั้งหมดที่กล่าวมานี้ จะเห็นได้ว่าการใช้หลักการฟลูออเรสเซนต์ควบคู่กับการออกแบบไอโอโนฟอร์ทำให้มีความจำเพาะเจาะจงกับไอออนที่ต่างชนิดกัน โดยการพัฒนาประสิทธิภาพของเซ็นเซอร์ขึ้นอยู่กับปรับเปลี่ยนโครงสร้างในส่วนฟลูออโรฟอร์ เพื่อพัฒนาสภาพไวของการวิเคราะห์ (sensitivity) และการปรับเปลี่ยนโครงสร้างส่วนไอโอโนฟอร์ เพื่อพัฒนาความจำเพาะเจาะจง (selectivity) ต่อไอออนที่ต้องการวิเคราะห์เพื่อให้มีประสิทธิภาพได้ และเซ็นเซอร์ดังกล่าวแสดงความจำเพาะเจาะจงกับไอออนที่ต้องการวิเคราะห์ได้ อีกทั้งยังมีความสามารถในการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ในช่วงที่ตามองเห็นได้ (visible region) ในช่วงใกล้อินฟราเรด (near-infrared region) ซึ่งมี

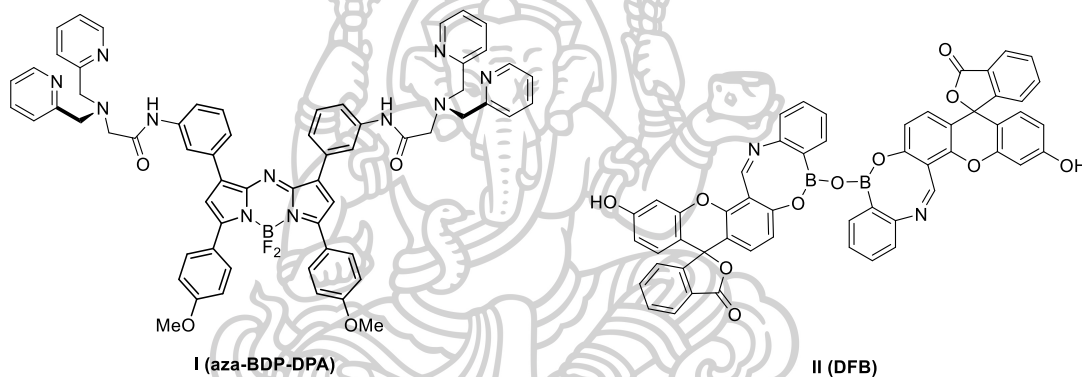
ประโยชน์ต่อการนำไปพัฒนาใช้ในอุปกรณ์ตรวจสอบไอออนโลหะในภาคสนามต่อไปได้ ทดสอบภายในเซลล์ระบบสิ่งมีชีวิต ตลอดจนสามารถใช้ทดสอบหาไอออนต่างๆที่เป็นอันตรายในน้ำดื่ม และอาหาร เช่น เมล็ดข้าว พืชผลทางการเกษตร ผลไม้ อาหารทะเล รวมทั้งการติดตามการปนเปื้อนของโลหะหนักในแหล่งน้ำธรรมชาติ ทะเล และสิ่งแวดล้อมในภาคสนามได้ตามแนวทางของแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติฉบับที่สิบสอง พ.ศ. 2560-2564 –ยุทธศาสตร์ที่ 4 การเติบโตที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมเพื่อการพัฒนาที่ยั่งยืน และยุทธศาสตร์ที่ 8 การพัฒนาวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีวิจัย และนวัตกรรม



บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

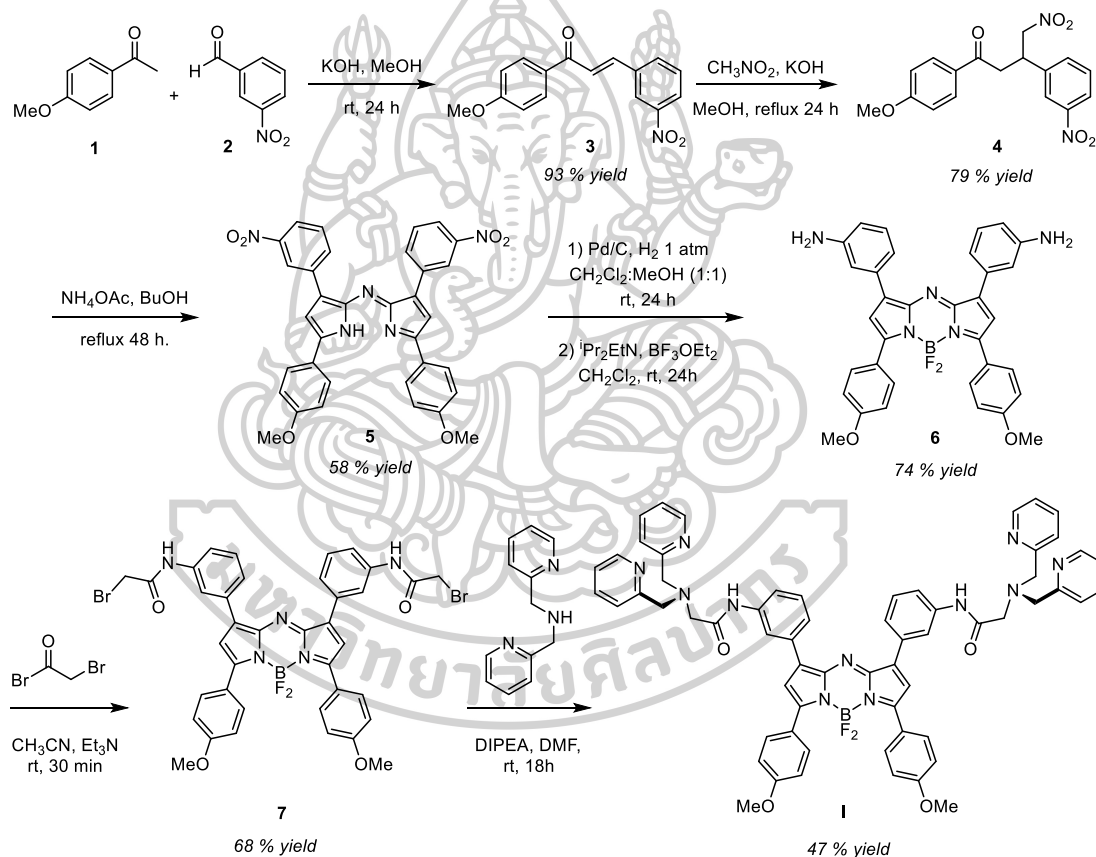
ในวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ได้ออกแบบและสังเคราะห์โครงสร้างของสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ ที่มีความสามารถตรวจวัดไอออนทองแดงและไอออนฟลูออไรด์ ชนิดใหม่ 2 ชนิด แสดงดังภาพที่ 11 ได้แก่ เซ็นเซอร์ I และ II โดยฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ I ประกอบด้วยอนุพันธ์ของ aza-BODIPY ทำหน้าที่เป็นฟลูออโรฟอร์เชื่อมต่อกับไอโอโนฟอร์ชนิด di-2-picolylamine ส่วนสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ II จะมีการเลือกใช้ฟลูออโรฟอร์ชนิด fluorescein มาทำปฏิกิริยากับไอโอโนฟอร์ชนิด 2-Aminophenylboronic acid pinacol ester



ภาพที่ 11 โครงสร้างฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ I และ II

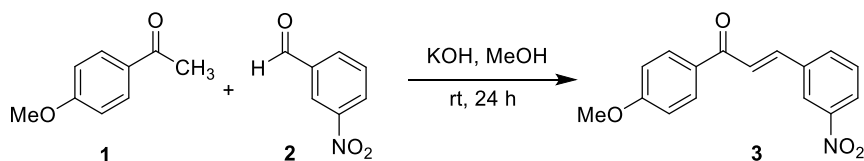
1. การสังเคราะห์เซ็นเซอร์ I

เริ่มจากการสังเคราะห์ฟลูออโรฟอร์ชนิด aza-BODIPY (6) ตามวิธีการสังเคราะห์ของ Burgess และคณะ [77] โดยเริ่มจากการสังเคราะห์สารประกอบ chalcone (3) โดยผ่านปฏิกิริยา aldol condensation จากนั้นทำปฏิกิริยา 1,4-Michael addition ได้สารประกอบ nitro-ketone (4) ตามด้วยการสร้างวง dipyrrole (5) จากนั้นทำปฏิกิริยา reduction ด้วย H_2 , Pd/C และทำปฏิกิริยากับ BF_3OEt_2 เพื่อสร้างเป็นสารประกอบโบรอนเรียกว่า aza-BODIPY (6) ตามด้วยทำปฏิกิริยา amide formation กับ bromoacetyl bromide ได้สารประกอบ aza-BDP-Br (7) และในขั้นตอนสุดท้าย ทำปฏิกิริยา N-alkylation กับ di-2-picolyamine ได้สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ I ดังภาพที่ 12



ภาพที่ 12 เส้นทางการสังเคราะห์เซ็นเซอร์ I

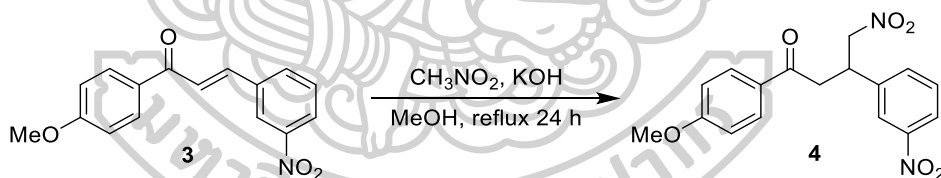
1.1 การสังเคราะห์สารประกอบ chalcone (3)



ภาพที่ 13 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารประกอบ chalcone (3)

ชั่ง 4-methoxy acetophenone (1) ปริมาณ 6.0 กรัม (0.04 โมล) และ 3-nitrobenzaldehyde (2) ปริมาณ 6.0 กรัม (0.041 โมล) ใส่ขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร ละลายด้วย MeOH ปริมาตร 200 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเบส KOH ปริมาณ 2.83 กรัม (0.05 โมล) ลงไปในสารละลายผสม ทำการกวนปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จะสังเกตเห็นตะกอนของแข็งสีเหลืองอ่อนตกลงมา เมื่อครบกำหนดเวลาทำการแยกตะกอนที่ไม่ละลายออกจากสารละลายด้วยการกรองแบบลดความดัน จากนั้นล้างตะกอนด้วย MeOH ที่ทำให้เย็นแล้วได้สารประกอบ chalcone (3) เป็นของแข็งสีขาวปริมาณ 10.48 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตได้เท่ากับ 93% (นำไปใช้ในปฏิกิริยาขั้นตอนต่อไปโดยไม่ผ่านการแยกบริสุทธิ์) โดยเส้นทางการสังเคราะห์แสดงดังภาพที่ 13

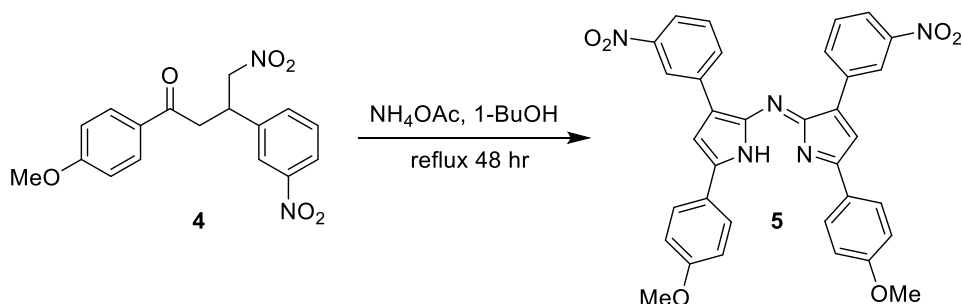
1.2 การสังเคราะห์สารประกอบ nitroketone (4)



ภาพที่ 14 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารประกอบ nitroketone (4)

ชั่ง chalcone (3) ปริมาณ 9.80 กรัม (0.034 โมล) ใส่ขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร ละลายด้วย MeOH ปริมาตร 150 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเบส KOH ปริมาณ 2.33 กรัม (0.042 โมล) และ nitromethane ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (0.93 โมล) ลงไปในสารละลาย และ reflux เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จะสังเกตเห็นว่ามีตะกอนสีน้ำตาลอ่อนเกิดขึ้น เมื่อครบกำหนดเวลาทำสารละลายให้เย็นลง และแยกตะกอนที่ไม่ละลายออกจากสารละลายด้วยการกรองแบบลดความดัน จากนั้นล้างตะกอนด้วย MeOH ที่ทำให้เย็นแล้ว ได้สารประกอบ nitroketone (4) เป็นของแข็งสีน้ำตาลอ่อนปริมาณ 9.46 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตได้เท่ากับ 79% (นำไปใช้ในปฏิกิริยาขั้นตอนต่อไปโดยไม่ผ่านการแยกบริสุทธิ์) โดยเส้นทางการสังเคราะห์แสดงดังภาพที่ 14

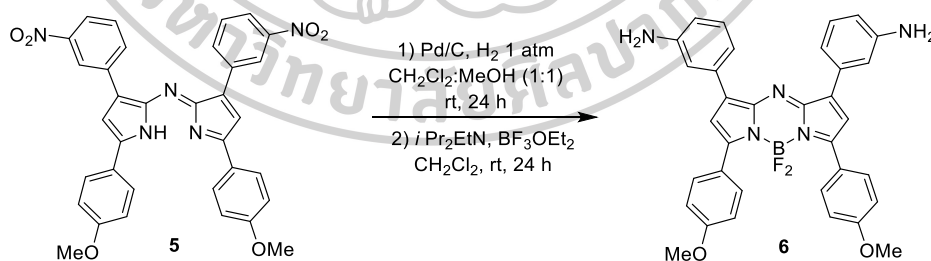
1.3 การสังเคราะห์สารประกอบ dipyrrole (5)



ภาพที่ 15 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารประกอบ dipyrrole (5)

ชั่ง nitroketone (4) ปริมาณ 9.07 กรัม (0.026 โมล) ใส่ขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร ละลายด้วย 1-butanol ปริมาตร 150 มิลลิลิตร จากนั้นเติม NH_4OAc ปริมาณ 42 กรัม (0.54 โมล) ลงไปในสารละลาย ทำการ reflux เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง จะสังเกตเห็นว่ามีตะกอนสีดำเกิดขึ้น เมื่อครบกำหนดเวลาทำให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิประมาณ 40°C จากนั้นกำจัด 1-butanol ออกด้วยเครื่อง rotary evaporator เติม MeOH ที่เย็นลงไป และตั้งทิ้งไว้ในภาชนะใส่น้ำแข็งที่มีอุณหภูมิต่ำเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการแยกตะกอนออกจากสารละลายด้วยการกรองแบบลดความดัน จากนั้นล้างตะกอนด้วย MeOH ที่ทำให้เย็นแล้วได้สารประกอบ dipyrrole (5) เป็นของแข็งสีดำ ปริมาณ 4.56 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตได้เท่ากับ 58% (นำไปใช้ในปฏิกิริยาขั้นตอนต่อไปโดยไม่ผ่านการแยกบริสุทธิ์) โดยเส้นทางการสังเคราะห์แสดงดังภาพที่ 15

1.4 การสังเคราะห์สารประกอบ aza-BODIPY (6)



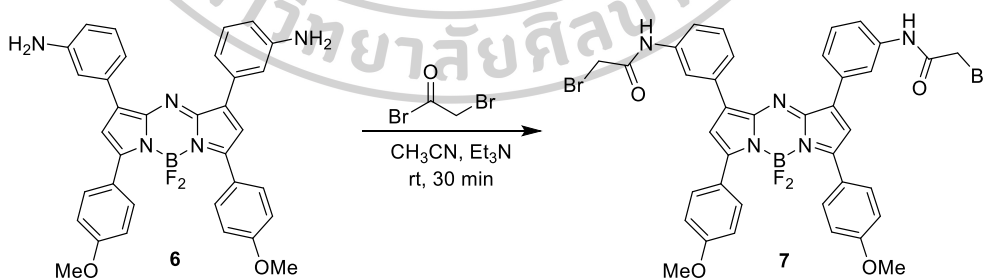
ภาพที่ 16 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารประกอบ aza-BODIPY (6)

ชั่ง dipyrrole (5) ปริมาณ 0.80 กรัม (.33 มิลลิโมล) ใส่ขวดก้นกลมขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง CH_2Cl_2 :MeOH ในอัตราส่วน 1:1 v/v โดยมีปริมาตรรวม 40 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Pd/C ปริมาณ 0.19 กรัม (1.8 มิลลิโมล) กวนปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศแก๊สไฮโดรเจน (hydrogen atmosphere) ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จะสังเกตเห็นว่าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้ม เมื่อครบกำหนด กรองผงคาร์บอนออก จากนั้นล้างด้วยตัวทำ

ละลายผสมระหว่าง $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ ในอัตราส่วน 1:1 v/v จนสารละลายเป็นสีฟ้าอ่อน กำจัดตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ได้สารประกอบเป็นของแข็งสีน้ำเงินเข้มปริมาณ 0.67 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตได้เท่ากับ 92% (นำไปใช้ในปฏิกิริยาขั้นตอนต่อไปโดยไม่ผ่านการแยกบริสุทธิ์)

นำมาทำปฏิกิริยาต่อโดยชั่งสารดังกล่าว ปริมาณ 0.24 กรัม (0.44 มิลลิโมล) ใส่ขวดก้นกลมขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายด้วย dry CH_2Cl_2 ปริมาณ 20 มิลลิลิตร จากนั้นเติม *N,N*-diisopropylethyl amine (*i*-Pr₂EtN; DIPEA) ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร (4.58 มิลลิโมล) ทำการกวนปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศอาร์กอนที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 20 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาเติม boron trifluoride etherate 48% w/v ($\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$) ลงในสารละลายปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร (6.76 มิลลิโมล) จากนั้นทำการกวนปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศอาร์กอนที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง สารละลายจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเข้มเป็นสีเขียวเข้ม เมื่อครบกำหนดเวลานำไปสกัดด้วยสารละลายอิ่มตัวของโซเดียมไบคาร์บอเนต (sat. NaHCO_3) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง ตามด้วย brine ปริมาตร 30 มิลลิลิตร จำนวน 1 ครั้ง แล้วเก็บสารละลายชั้น CH_2Cl_2 ทำกำจัดน้ำออกโดยเติม anhydrous Na_2SO_4 ลงไปปริมาณเล็กน้อยและนำไปกำจัด CH_2Cl_2 ออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator และแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane:EtOAc ในอัตราส่วน 1:1 v/v เป็น mobile phase ได้สารประกอบ aza-BODIPY (6) เป็นของแข็งสีเขียวเข้มปริมาณ 0.19 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตได้เท่ากับ 74% มีค่า R_f เท่ากับ 0.30 โดยเส้นทางการสังเคราะห์แสดงดังภาพที่ 16

1.5 การสังเคราะห์สารประกอบ aza-BDP-Br (7)

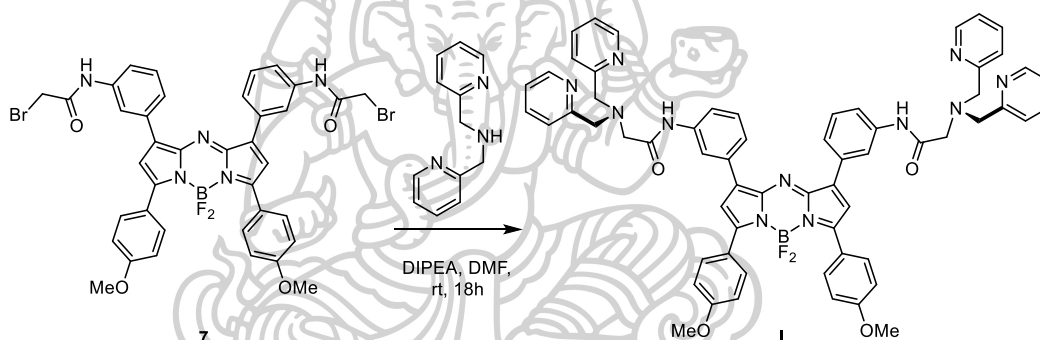


ภาพที่ 17 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารประกอบ aza-BDP-Br (7)

ชั่ง aza-BODIPY (6) ปริมาณ 0.073 กรัม (0.12 มิลลิโมล) ใส่ขวดก้นกลมขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายด้วย dry CH_3CN ปริมาตร 8 มิลลิลิตร จากนั้นเติม dry Et_3N ซึ่งทำหน้าที่เป็นเบสปริมาตร 0.20 มิลลิลิตร (3.42 มิลลิโมล) กวนปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศแก๊สอาร์กอนที่ 0 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม bromoacetyl bromide ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร (1.15 มิลลิโมล) กวนปฏิกิริยา

ภายใต้บรรยากาศอาร์กอนที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการกำจัด CH_3CN ออกด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้นเติม CH_2Cl_2 ลงไปปริมาตร 30 มิลลิลิตร นำไปสกัดด้วย sat. NaHCO_3 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง ตามด้วย brine ปริมาตร 30 มิลลิลิตร จำนวน 1 ครั้ง จากนั้นเก็บสารละลายชั้น CH_2Cl_2 ที่ได้กำจัดน้ำออกโดยเติม anhyd. Na_2SO_4 ลงไปปริมาณเล็กน้อย และนำไปกำจัด CH_2Cl_2 ออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator ทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง CH_2Cl_2 :EtOAc เริ่มจากอัตราส่วน 95:5 v/v ทำหน้าที่เป็น mobile phase ได้สารประกอบ aza-BDP-Br (7) เป็นของแข็งสีขาวเข็ม ปริมาณ 0.032 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตได้เท่ากับ 68% โดยมีค่า R_f เท่ากับ 0.46 โดยเส้นทางการสังเคราะห์แสดงดังภาพที่ 17

1.6 การสังเคราะห์เซ็นเซอร์ aza-BDP-DPA (I)

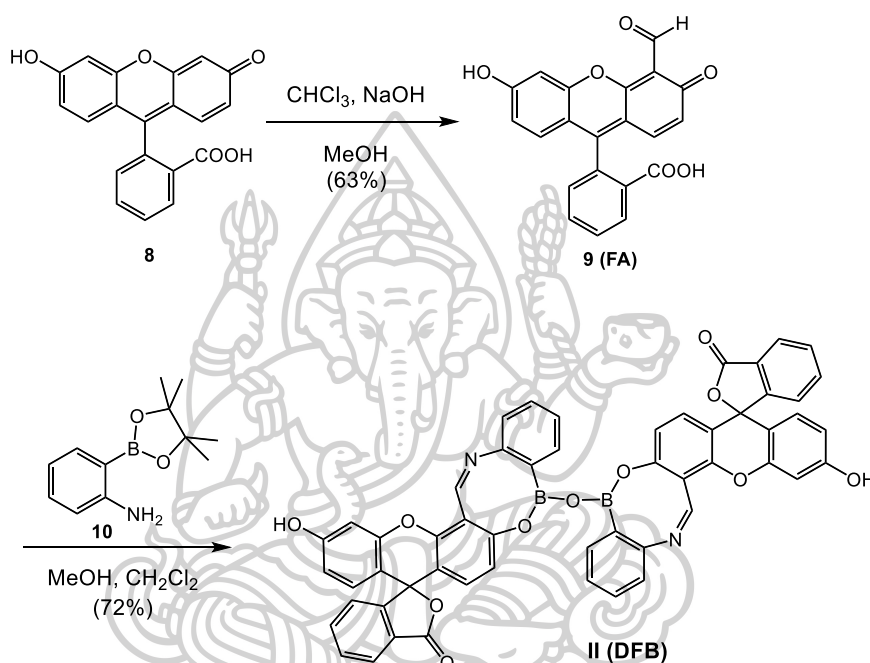


ภาพที่ 18 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์เซ็นเซอร์ I

ซึ่ง aza-BDP-Br (7) ปริมาณ 0.1 กรัม (0.1 มิลลิโมล) ใส่ขวดก้นกลมขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายด้วย dry *N,N*-dimethyl-formamide (DMF) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม *N,N*-diisopropylethyl amine (*i*Pr₂EtN; DIPEA) ซึ่งทำหน้าที่เป็นเบสปริมาตร 0.30 มิลลิลิตร (2.2 มิลลิโมล) จากนั้นเติม Di-2-picolyamine ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร (1.4 มิลลิโมล) กวนปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศอาร์กอนที่อุณหภูมิห้อง 18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการกำจัด DMF ออกด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้นเติม CH_2Cl_2 ลงไปปริมาตร 30 มิลลิลิตร นำไปสกัดด้วย sat. NaHCO_3 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเก็บสารละลายชั้น CH_2Cl_2 ที่ได้กำจัดน้ำออกโดยเติม anhyd. Na_2SO_4 ลงไปปริมาณเล็กน้อย และนำไปกำจัด CH_2Cl_2 ออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator ทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง CH_2Cl_2 : MeOH อัตราส่วน 90:10 v/v ทำหน้าที่เป็น mobile phase ได้เซ็นเซอร์ I เป็นของแข็งสีขาวเข็ม ปริมาณ 0.062 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตได้เท่ากับ 47% โดยมีค่า R_f เท่ากับ 0.5 โดยเส้นทางการสังเคราะห์แสดงดังภาพที่ 18

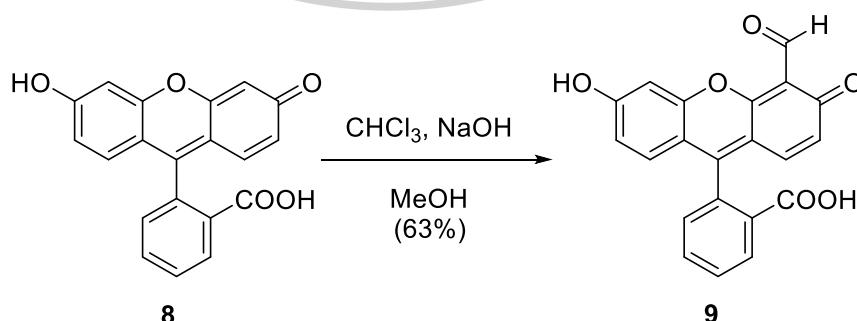
2. การสังเคราะห์เซ็นเซอร์ II

การสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ II เริ่มจากการสังเคราะห์ฟลูออโรฟอร์ fluorescein monoaldehyde (9) ผ่านปฏิกิริยา Reimer-Tiemann ตามวิธีของ Liu จากนั้นทำการสังเคราะห์เซ็นเซอร์ II โดยใช้ปฏิกิริยา schiff base formation ระหว่าง fluorescein monoaldehyde (9) และ 2-Amino phenylboronic acid pinacol ester (10) ได้สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ II โดยเส้นทางการสังเคราะห์เซ็นเซอร์ II แสดงไว้ดังภาพที่ 19



ภาพที่ 19 เส้นทางการสังเคราะห์เซ็นเซอร์ II

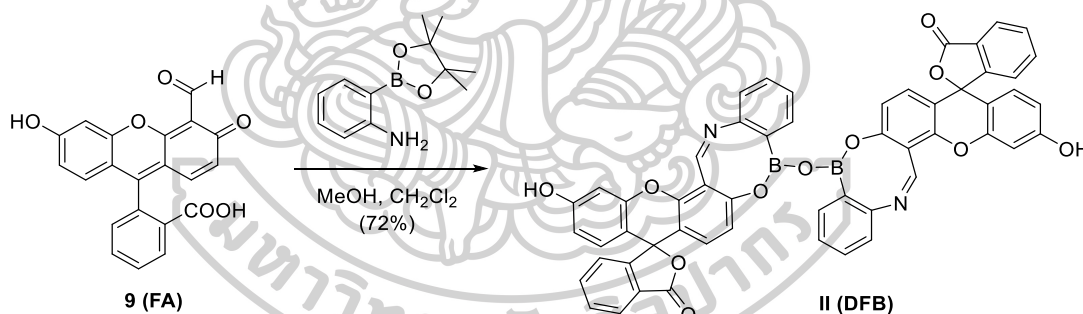
2.1 การสังเคราะห์ fluorescein monoaldehyde (9)



ภาพที่ 20 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารประกอบ fluorescein monoaldehyde (9)

ในการสังเคราะห์สาร fluorescein monoaldehyde (**9**) สามารถสังเคราะห์ผ่านปฏิกิริยา Reimer-Tiemann ตามวิธีของ Liu และคณะ [78] แสดงได้ดังภาพที่ 20 โดยซึ่ง fluorescein (**8**) ปริมาณ 0.26 กรัม (0.78 มิลลิโมล) ใส่ขวดก้นกลมขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายด้วย MeOH ปริมาณ 1.0 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 50% w/v ปริมาณ 3.0 กรัม และคลอโรฟอร์ม (CHCl₃) ปริมาณ 0.80 มิลลิลิตร กวนปฏิกิริยาพร้อมให้ความร้อนจนอุณหภูมิถึง 55 °C เป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง จะได้สารละลายสีส้มเข้ม เมื่อครบกำหนดเวลาทำให้สารละลายเย็นจนเท่ากับอุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมสารละลาย hydrochloric acid (HCl) ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 5 M จนสารละลายมีความเป็นกลาง ตรวจสอบด้วยกระดาษลิตมัสเพื่อเป็นการหยุดปฏิกิริยา จากนั้นแยกตะกอนที่ไม่ละลายออกจากสารละลายด้วยการกรองแบบลดความดัน และนำตะกอนที่ได้มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค preparative thin layer chromatography โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง CH₂Cl₂:EtOAc อัตราส่วน 90:10 v/v ทำหน้าที่เป็น mobile phase ได้สารประกอบหมายเลข **9** เป็นของแข็งสีส้มปริมาณ 0.060 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตได้เท่ากับ 31% โดยมีค่า R_f เท่ากับ 0.3 โดยเส้นทางการสังเคราะห์แสดงดังภาพที่ 20

2.2 การสังเคราะห์เซ็นเซอร์ II (DFB)



ภาพที่ 21 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์เซ็นเซอร์ II

ซึ่งสาร fluorescein monoaldehyde (**9**) (0.115 g, 0.32 mmol) ใส่ขวดก้นกลมขนาด 25 mL ละลายด้วย dry. CH₂Cl₂ ปริมาตร 1.0 mL และ dry methanol ปริมาตร 3.0 mL จากนั้นเติม 2-Aminophenylboronic acid pinacol ester (**10**) ปริมาณ 0.044 g (0.33 mmol) ที่ละลายอยู่ใน dry methanol 2.0 mL กวนสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 60 °C และกวนต่ออีก 18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจะเกิดตะกอนสีเหลือง นำตะกอนที่ได้มาล้างด้วย CH₂Cl₂ และพียงให้แห้ง จะได้เซ็นเซอร์ II เป็นของแข็งสีเหลืองส้มปริมาณ 0.104 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตได้เท่ากับ 72% โดยเส้นทางการสังเคราะห์แสดงดังภาพที่ 21

3. การทดสอบประสิทธิภาพในการดักจับไอออนทองแดงและไอออนรบกวนอื่นๆของเซ็นเซอร์ I

เมื่อได้สารประกอบฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์มาแล้ว จึงนำสารมาศึกษาสมบัติทางสเปกโทรสโกปี โดยการวัดการดูดกลืนแสงเพื่อหาความยาวคลื่นสูงสุดของการดูดกลืนแสง (λ_{ex}) และวัดการคายแสงเพื่อหาความยาวคลื่นสูงสุดของการคายแสง (λ_{em}) ของเซ็นเซอร์ในตัวทำละลายที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ไอออนทองแดงก่อนนำมาศึกษาความสามารถในการดักจับกับไอออนทองแดง (Cu^{2+}) และศึกษาการรบกวนจากไอออนโลหะชนิดอื่นๆ ที่สามารถพบได้ในธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมโดยใช้เทคนิคทางฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปี (fluorescence spectroscopy)

3.1 การทดสอบความไวในการดักจับไอออนทองแดงของเซ็นเซอร์ I (sensitivity)

การศึกษาความไวในการดักจับไอออนทองแดงของเซ็นเซอร์ I ทำโดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโกปี และเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปี โดยศึกษาความสามารถในการเปลี่ยนแปลงสัญญาณการดูดกลืนแสงและการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายเซ็นเซอร์ I เมื่อมีการเติมไอออนที่สนใจ ได้แก่ ไอออนทองแดงโดยจะทำการวัดสัญญาณการดูดกลืนแสงและการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายเซ็นเซอร์ที่ถูกเตรียมขึ้นปริมาตร 3.00 มิลลิลิตร ในสภาวะที่ไม่มีไอออนทองแดงจากนั้นจะทำการไตเตรตสารละลายไอออนทองแดงลงในสารละลายเซ็นเซอร์ และสังเกตการเปลี่ยนแปลงสัญญาณการดูดกลืนแสงและการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ ที่เกิดจากการเติมไอออนทองแดงแต่ละครั้ง

3.1.1 การเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ I ที่ความเข้มข้น 1×10^{-5} M

ชั่งเซ็นเซอร์ I ปริมาณต่างๆ ละลายใน CH_3CN ในขวดปริมาตรขนาด 10.00 มิลลิลิตร ให้สารละลายเซ็นเซอร์ที่ความเข้มข้น 1×10^{-3} M จากนั้นเจือจางสารละลายเซ็นเซอร์ด้วยวิธี serial dilution โดยปิเปตสารละลายเซ็นเซอร์จากขวดแรกมา 2.00 มิลลิลิตรลงในขวดปริมาตรขนาด 10.00 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย CH_3CN จะได้สารละลายเซ็นเซอร์ที่ความเข้มข้น 2×10^{-4} M จากนั้นเจือจางสารละลายอีกครั้งโดยปิเปตสารละลายเซ็นเซอร์จากขวดที่สองมา 0.50 มิลลิลิตรลงในขวดปริมาตรขนาด 10.00 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Triton X-100 ปริมาตร 2.0 μL และปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน จะได้สารละลายเซ็นเซอร์ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1×10^{-5} M

3.1.2 การเตรียมสารละลายไอออนทองแดง

เตรียมสารละลายทองแดง(II)เปอร์คลอเรต ที่ความเข้มข้น 1.0×10^{-2} M โดยการชั่งทองแดง (II)เปอร์คลอเรต ปริมาณ 0.0370 กรัม ลงในขวดปริมาตรขนาด 10.00 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

3.1.3 การทดสอบด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรสโกปี

นำสารละลายเซ็นเซอร์ I ที่ความเข้มข้น 1.0×10^{-5} M ในตัวทำละลายต่างๆที่ผ่านการศึกษามาแล้ว ไปวัดสัญญาณการดูดกลืนแสง ในสภาวะที่ไม่มีไอออนทองแดง โดยใช้ ตัวทำละลาย ชนิดนั้น เป็น blank จากนั้นจะทำการไตเตรตสารละลายไอออนทองแดง ลงในสารละลายเซ็นเซอร์แล้วสังเกตเพื่อหาการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่สูงที่สุด

3.1.4 การทดสอบด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี

นำสารละลายเซ็นเซอร์ I ที่ความเข้มข้น 1.0×10^{-5} M ในตัวทำละลายต่างๆที่ผ่านการศึกษามาแล้ว ไปวัดสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์จากการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนทองแดงแล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้น โดยใช้ค่าพารามิเตอร์ในการทดสอบตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงค่าพารามิเตอร์ที่ใช้ในการวัดฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ของเซ็นเซอร์ I

เซ็นเซอร์	I
Condition	5 mM PBS buffer (pH 7.4); acetonitrile (95:5 v/v) with 0.5% triton X-100.
λ_{ex} (nm)	650
λ_{em} (nm)	717
Slit width (nm)	10.0/10.0
Scan speed (nm/min)	500
Range (nm)	650-800

3.2 การหาค่าความสามารถต่ำสุดในการดักจับไอออนทองแดง ของเซ็นเซอร์ I (detection limit)

จากผลการทดสอบความไวในการดักจับไอออนทองแดงของเซ็นเซอร์ I (sensitivity) สามารถคำนวณค่าความสามารถต่ำสุดในการดักจับ (detection limit) โดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ (แกน y) กับความเข้มข้นของไอออนทองแดงที่เติมลงไป (แกน x) จะได้สมการกราฟที่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงดังนี้

$$y = mx + c$$

เมื่อกำหนดให้ m คือ ความชันของกราฟเส้นตรง

c คือ จุดตัดแกน y

จากนั้นนำค่าความชัน และค่าจุดตัดแกน y ที่ได้จากสมการมาคำนวณหาค่าความสามารถต่ำสุดในการดักจับ

จาก
$$DL = \frac{(Blank - 3SD) - c}{slope}$$

เมื่อกำหนดให้ SD คือ ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.3 การหาค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออนทองแดงของเซ็นเซอร์ I (Association constant)

การหาค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออนทองแดง (K_{assoc}) จากสมการ Benesi-Hildebrand [79] ตามสมการที่ (1) ของเซ็นเซอร์ I ทำโดยศึกษาความสามารถในการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์ เมื่อมีการเติมไอออนโลหะที่สนใจ ได้แก่ ไอออนทองแดง ลงไปในปริมาณที่เพิ่มขึ้น กล่าวคือ จะทำการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เริ่มต้นของสารละลายเซ็นเซอร์ที่ถูกเตรียมขึ้นปริมาตร 3.00 มิลลิลิตร ในสถานะที่ไม่มีไอออนโลหะ จากนั้นจึงไตเตรตด้วยสารละลายไอออนทองแดงที่เตรียมไว้ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้นภายหลังการเติมไอออนโลหะในแต่ละครั้ง จะสังเกตเห็นการเพิ่มขึ้นหรือการลดลงของสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการทดสอบตามตารางที่ 1

สมการ Benesi-Hildebrand;

$$\frac{1}{(A - A_0)} = \frac{1}{K_{assoc} (A_{max} - A_0) [M^{2+}]^n} + \frac{1}{A_{max} - A_0} \quad (1)$$

จากสมการที่ (1) ถ้าสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{1}{(A-A_0)}$ ในแนวแกน y และ $\frac{1}{[M^{2+}]^n}$ ในแนวแกน x จะได้กราฟที่มีลักษณะความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ส่งผลให้สามารถหาค่าคงที่สมดุล (K_{assoc}) ของการจับกับไอออนโลหะได้ โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้

- A_0 = ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์เริ่มต้น
- A = ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์หลังเติมไอออนโลหะที่ความเข้มข้นใดๆ
- A_{max} = ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์มากที่สุดหลังเติมไอออนโลหะที่ความเข้มข้นสูงสุด
- $[Mn^{2+}]$ = ความเข้มข้นของไอออนโลหะที่สนใจ
- n = จำนวนเต็มใดๆ เช่น 1, 2 และ 3

พบว่าค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออนโลหะคำนวณได้จากความชันของกราฟที่สร้างขึ้น ดังนี้

$$\text{slope} = \frac{1}{K_{assoc} (A_{max} - A_0)}$$

$$K_{assoc} = \frac{1}{\text{slope}(A_{max} - A_0)}$$

3.4 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการดักจับไอออนทองแดง และไอออนรบกวนอื่นๆ ของเซ็นเซอร์ I (selectivity)

การศึกษาสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ I ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปีทำโดยศึกษาความสามารถในการเปลี่ยนแปลงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์ I เมื่อมีการเติมไอออนทองแดงเปรียบเทียบกับความสามารถในการเปลี่ยนแปลงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์เมื่อมีการเติมไอออนรบกวนอื่นๆ ในสารละลายเซ็นเซอร์ที่ถูกเตรียมขึ้นปริมาตร 3.00 มิลลิลิตร

3.4.1 การเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ I ที่ความเข้มข้น 1.0×10^{-5} M

เตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ I ในตัวทำละลายต่างๆที่ผ่านการศึกษามาแล้ว ในลักษณะเดียวกันกับการเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์สำหรับการทดสอบความว่องไวของเซ็นเซอร์

3.4.2 การเตรียมสารละลายไอออนทองแดง และไอออนรบกวนอื่นๆ

เตรียมสารละลายจากเกลือของไอออนโลหะเปอร์คลอเรตทั้งหมด 17 ชนิด ได้แก่ Ag^+ Al^{3+} Ba^{2+} Ca^{2+} Cd^{2+} Co^{2+} Cu^{2+} Fe^{3+} Hg^{2+} K^+ Li^+ Mg^{2+} Mn^{2+} Na^+ Ni^{2+} Pb^{2+} และ Zn^{2+} ที่ความเข้มข้น 1×10^{-2} M โดยละลายเกลือของไอออนโลหะด้วยน้ำปราศจากไอออนในขวดปริมาตรขนาด 10.00 มิลลิลิตร

3.4.3 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงในการดักจับไอออนทองแดง และไอออนรบกวนอื่นๆ ของเซ็นเซอร์ I

นำสารละลายเซ็นเซอร์ I ที่ความเข้มข้น 1.0×10^{-5} M ในตัวทำละลายต่างๆที่ผ่านการศึกษามาแล้ว ไปวัดสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์จากการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนทองแดง แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบกับสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้จากการไตเตรตด้วยไอออนรบกวนอื่นๆ โดยใช้ค่าพารามิเตอร์ในการทดสอบตามตารางที่ 1

3.3.5 การศึกษาสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในสภาวะที่มีไอออนทองแดงร่วมกับไอออนรบกวนอื่นๆของเซ็นเซอร์ I (competitive)

การศึกษาสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ I ในสภาวะที่มีไอออนรบกวนอื่นๆร่วมกับไอออนทองแดงด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี ทำโดยการวัดสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์จากการเติมสารละลายไอออนทองแดงลงในสารละลายเซ็นเซอร์ปริมาตร 3.00 มิลลิลิตรให้ความเข้มข้นของสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์ลดลงประมาณ 50% ของความเข้มข้นของสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์ ในขณะที่ไม่มีไอออนทองแดง เปรียบเทียบกับสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดจากการเติมสารละลายไอออนรบกวนอื่นๆให้มีความเข้มข้นเป็นหนึ่งเท่าและสิบเท่าของไอออนทองแดงลงในสารละลายเซ็นเซอร์ที่มีไอออนทองแดงอยู่

3.5.1 การเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ I ที่ความเข้มข้น 1.0×10^{-5} M

เตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ I ในตัวทำละลายต่างๆที่ผ่านการศึกษามาแล้ว ในลักษณะเดียวกันกับการเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์สำหรับการทดสอบความไวของเซ็นเซอร์

3.5.2 การเตรียมสารละลายไอออนทองแดงและไอออนรบกวนอื่นๆ

เตรียมสารละลายจากเกลือของไอออนโลหะเปอร์คลอเรตทั้งหมด 17 ชนิด ได้แก่ Ag^+ Al^{3+} Ba^{2+} Ca^{2+} Cd^{2+} Co^{2+} Cu^{2+} Fe^{3+} Hg^{2+} K^+ Li^+ Mg^{2+} Mn^{2+} Na^+ Ni^{2+} Pb^{2+} และ Zn^{2+} ที่ความเข้มข้น 1×10^{-2} M โดยละลายเกลือของไอออนโลหะด้วยน้ำปราศจากไอออนในขวดปริมาตรขนาด 10.00 มิลลิลิตร

3.5.3 การทดสอบสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ในสถานะที่มีไอออนทองแดงรวมกับไอออนรบกวนอื่นๆของเซ็นเซอร์ I

นำสารละลายเซ็นเซอร์ I ที่ความเข้มข้น 1.0×10^{-5} M ในตัวทำละลายต่างๆที่ผ่านการศึกษามาแล้ว ไปวัดสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ โดยการเติมสารละลายไอออนทองแดงลงในสารละลายเซ็นเซอร์ เปรียบเทียบกับสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดจากการเติมไอออนทองแดงรวมกับการเติมไอออนรบกวนอื่นๆที่ความเข้มข้นหนึ่งเท่าและสิบเท่าของไอออนทองแดงลงในสารละลายเซ็นเซอร์ โดยใช้ค่าพารามิเตอร์ในการทดสอบตามตารางที่ 1

3.6 การหาอัตราส่วนของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเซ็นเซอร์ I กับไอออนทองแดง (Job's plot)

การหาอัตราส่วนของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเซ็นเซอร์ I กับไอออนทองแดงด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี โดยการหาอัตราส่วนของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนดังกล่าวด้วยวิธี Job's plot โดยใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปีในการติดตามผล โดยการเตรียมสารละลายผสมระหว่างเซ็นเซอร์ และไอออนโลหะที่สนใจ โดยให้มีอัตราส่วนโดยโมลของเซ็นเซอร์ ตั้งแต่ 0 ถึง 1 ในปริมาตรสารละลายทั้งหมด 10.00 มิลลิลิตร และทำการวัดค่าของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ จากนั้นนำผลการทดลองที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนโดยโมลของเซ็นเซอร์ (แกน x) และ $(I-I_0)X$ (แกน y) เมื่อกำหนดให้

I_0 = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์ก่อนเติมไอออนโลหะ

I = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์หลังเติมไอออนโลหะ

X = อัตราส่วนโดยโมลของเซ็นเซอร์

เมื่อสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์จะแสดงอัตราส่วนการเกิดแรงกระทำระหว่างเซ็นเซอร์กับไอออนโลหะ จากค่าการเปลี่ยนแปลงที่สูงที่สุดของค่า $(I-I_0)X$ โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ตามตารางที่ 2 เพื่อหาอัตราส่วนของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเซ็นเซอร์ I กับไอออนทองแดง โดยในการทดลองนี้ใช้เซ็นเซอร์ I ความเข้มข้น 1.0×10^{-4} M และไอออนทองแดงความเข้มข้น 1.00×10^{-2} M

ตารางที่ 2 แสดงการหาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของเซ็นเซอร์ I กับไอออนทองแดง

ขวดที่	ปริมาตรเซ็นเซอร์ (mL)	ปริมาตรไอออน ทองแดง(μ L)	เศษส่วนโมล ของเซ็นเซอร์ (X_i)
0	0	10.0	0
1	0.1	9.0	0.1
2	0.2	8.0	0.2
3	0.3	7.0	0.3
4	0.4	6.0	0.4
5	0.5	5.0	0.5
6	0.6	4.0	0.6
7	0.7	3.0	0.7
8	0.8	2.0	0.8
9	0.9	1.0	0.9
10	1.0	0	1.0

3.7 การศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเซ็นเซอร์ I กับไอออนทองแดงด้วยวิธีการสร้างแบบจำลองโมเลกุลทางคอมพิวเตอร์ (computational molecular modeling)

การศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเซ็นเซอร์ I กับไอออนทองแดง สามารถวิเคราะห์ได้จากการโครงสร้างที่มีพลังงานต่ำที่สุดของเซ็นเซอร์ในสภาวะก่อน และหลังการจับกับไอออนทองแดง ด้วยวิธีการสร้างแบบจำลองโมเลกุลทางคอมพิวเตอร์ ตามระเบียบวิธี Density Functional Theory (DFT-B3LYP) เบสิกเซต 6-311G** สำหรับธาตุกลุ่มหลักและ Lan2DZ สำหรับไอออนทองแดง จากนั้นนำมาคำนวณหาโครงสร้างที่มีพลังงานต่ำที่สุดของเซ็นเซอร์ I และสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเซ็นเซอร์ I กับไอออนทองแดงด้วยรูปภาพจากโปรแกรม Visual Molecular Dynamics (VMD)

4. การทดสอบประสิทธิภาพในการดักจับไอออนฟลูออไรด์ และไอออนรบกวนอื่นๆของเซ็นเซอร์ II

เมื่อได้สารประกอบฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์มาแล้วจึงนำสารมาศึกษาสมบัติทางสเปกโทรสโกปี โดยการวัดการดูดกลืนแสงเพื่อหาความยาวคลื่นสูงสุดของการดูดกลืนแสง (λ_{ex}) และวัดการคายแสงเพื่อหาความยาวคลื่นสูงสุดของการคายแสง (λ_{em}) ของเซ็นเซอร์ในตัวทำละลายที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ไอออนฟลูออไรด์ ก่อนนำมาศึกษาความสามารถในการดักจับกับไอออนฟลูออไรด์ (F⁻) และศึกษาการรบกวนจากไอออนลบชนิดอื่นๆ ที่สามารถพบได้ในธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมโดยใช้เทคนิคทางฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปี (fluorescence spectroscopy)

4.1 การทดสอบความไวในการดักจับไอออนฟลูออไรด์ของเซ็นเซอร์ II (sensitivity)

การศึกษาความไวในการดักจับไอออนฟลูออไรด์ ของเซ็นเซอร์ II ทำโดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรสโกปี และเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปี โดยศึกษาความสามารถในการเปลี่ยนแปลงสัญญาณการดูดกลืนแสงและการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายเซ็นเซอร์ II เมื่อมีการเติมไอออนที่สนใจ ได้แก่ ไอออนฟลูออไรด์ กล่าวคือ จะทำการวัดสัญญาณการดูดกลืนแสงและการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายเซ็นเซอร์ที่ถูกเตรียมขึ้นปริมาตร 3.00 มิลลิเมตร ในสถานะที่ไม่มีไอออนฟลูออไรด์ จากนั้นจะทำการไตเตรตสารละลายไอออนฟลูออไรด์ลงในสารละลายเซ็นเซอร์ และสังเกตการเปลี่ยนแปลงสัญญาณการดูดกลืนแสงและการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดจากการเติมไอออนฟลูออไรด์แต่ละครั้ง

4.1.1 การเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ II ที่ความเข้มข้น 1.0×10^{-5} M

ชั่งเซ็นเซอร์ II ปริมาณต่างๆ 10 mM PBS (pH 7.4) : MeOH (1:9 v/v) ในขวดปริมาตรขนาด 10.00 มิลลิลิตร ให้สารละลายเซ็นเซอร์ที่ความเข้มข้น 1.0×10^{-3} M จากนั้นเจือจางสารละลายเซ็นเซอร์ด้วยวิธี serial dilution โดยปิเปตสารละลายเซ็นเซอร์จากขวดแรกมา 1.00 มิลลิลิตรลงในขวดปริมาตรขนาด 10.00 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย MeOH จะได้สารละลายเซ็นเซอร์ที่ความเข้มข้น 1.0×10^{-4} M จากนั้นเจือจางสารละลายอีกครั้งโดยปิเปตสารละลายเซ็นเซอร์จากขวดที่สองมา 1.00 มิลลิลิตรลงในขวดปริมาตรขนาด 10.00 มิลลิลิตร จากนั้นเติม MeOH ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน จะได้สารละลายเซ็นเซอร์ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1.0×10^{-5} M

4.1.2 การเตรียมสารละลายไอออนฟลูออไรด์

เตรียมสารละลายเตตระบิวทิลแอมโมเนียมฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้น 1.0×10^{-2} M โดยการชั่งเตตระบิวทิลฟลูออไรด์ ปริมาณ 0.0261 กรัม ลงในขวดปริมาตรขนาด 10.00 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

4.1.3 การทดสอบด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรสโกปี

นำสารละลายเซ็นเซอร์ II ที่ความเข้มข้น 1.0×10^{-5} M ในตัวทำละลายต่างๆที่ผ่านการศึกษามาแล้ว ไปวัดสัญญาณการดูดกลืนแสง ในสภาวะที่ไม่มีไอออนฟลูออไรด์ โดยใช้ ตัวทำละลาย ชนิดนั้น เป็น blank จากนั้นจะทำการไตเตรตสารละลายไอออนฟลูออไรด์ ลงในสารละลายเซ็นเซอร์แล้วสังเกต เพื่อหาการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่สูงที่สุด

4.1.4 การทดสอบด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี

นำสารละลายเซ็นเซอร์ II ที่ความเข้มข้น 1.0×10^{-5} M ในตัวทำละลายต่างๆที่ผ่านการศึกษามาแล้ว ไปวัดสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์จากการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนฟลูออไรด์ แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้น โดยใช้ค่าพารามิเตอร์ในการทดสอบตามตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงค่าพารามิเตอร์ที่ใช้ในการวัดฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ของเซ็นเซอร์ II

เซ็นเซอร์	II
Condition	10 mM PBS buffer (pH 7.4): acetonitrile (10:90 v/v)
λ_{ex} (nm)	485
λ_{em} (nm)	515
Slit width (nm)	10.0/10.0
Scan speed (nm/min)	500
Range (nm)	485-700

4.2 การหาค่าความสามารถต่ำสุดในการดักจับไอออนฟลูออไรด์ของเซ็นเซอร์ II (detection limit)

จากผลการทดสอบความไวในการดักจับไอออนฟลูออไรด์ของเซ็นเซอร์ II (sensitivity) มาคำนวณค่าความสามารถต่ำสุดในการดักจับ (detection limit) โดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ (แกน y) กับความเข้มข้นของไอออนฟลูออไรด์ที่เติมลงไป (แกน x) จะได้สมการกราฟที่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงดังนี้

$$y = mx + c$$

เมื่อกำหนดให้ m คือ ความชันของกราฟเส้นตรง

c คือ จุดตัดแกน y

จากนั้นนำค่าความชัน และค่าจุดตัดแกน y ที่ได้จากสมการมาคำนวณหาค่าความสามารถต่ำสุดในการจับไอออนจาก

$$DL = \frac{(Blank - 3SD) - c}{slope}$$

เมื่อกำหนดให้ SD คือ ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน

4.3 การหาค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออนฟลูออไรด์ (K_{assoc}) ของเซ็นเซอร์ II (Association constant)

การหาค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออนฟลูออไรด์ (K_{assoc}) จากสมการ Benesi-Hildebrand [40] ตามสมการที่ (1) ของเซ็นเซอร์ II ทำโดยศึกษาความสามารถในการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์ เมื่อมีการเติมไอออนที่สนใจ ได้แก่ ไอออนฟลูออไรด์ลงไป ในปริมาณที่เพิ่มขึ้น กล่าวคือ จะทำการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เริ่มต้นของสารละลายเซ็นเซอร์ที่ถูกเตรียมขึ้นปริมาตร 3.00 มิลลิลิตร ในสภาวะที่ไม่มีไอออนฟลูออไรด์ จากนั้นจึงไตเตรตด้วยสารละลายไอออนฟลูออไรด์ที่เตรียมไว้ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้น ภายหลังจากเติมไอออนฟลูออไรด์ในแต่ละครั้ง จะสังเกตเห็นการเพิ่มขึ้นหรือการลดลงของสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการทดสอบตามตารางที่ 3

สมการ Benesi-Hildebrand;

$$\frac{1}{(A - A_0)} = \frac{1}{K_{assoc} (A_{max} - A_0) [F^-]^n} + \frac{1}{A_{max} - A_0} \quad (1)$$

จากสมการที่ (1) ถ้าสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{1}{(A - A_0)}$ ในแนวแกน y และ $\frac{1}{[F^-]^n}$ ในแนวแกน x จะได้กราฟที่มีลักษณะความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ส่งผลให้สามารถหาค่าคงที่สมดุล (K_{assoc}) ของการจับกับไอออนฟลูออไรด์ได้ โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้

- A_0 = ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์เริ่มต้น
 A = ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์หลังเติมไอออนฟลูออไรด์ ที่ความเข้มข้นใดๆ
 A_{max} = ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์มากที่สุดหลังเติมไอออนฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้นสูงสุด
 $[F]$ = ความเข้มข้นของไอออนฟลูออไรด์ที่สนใจ
 n = จำนวนเต็มใดๆ เช่น 1, 2 และ 3

พบว่าค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออนฟลูออไรด์คำนวณได้จากความชันของกราฟที่สร้างขึ้น ดังนี้

$$\text{slope} = \frac{1}{K_{assoc} (A_{max} - A_0)}$$

$$K_{assoc} = \frac{1}{\text{slope}(A_{max} - A_0)}$$

4.4 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการดักจับไอออนฟลูออไรด์และไอออนรบกวนอื่นๆ ของเซ็นเซอร์ II (selectivity)

การศึกษาสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ II ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปีทำโดยศึกษาความสามารถในการเปลี่ยนแปลงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์ II เมื่อมีการเติมไอออนฟลูออไรด์ เปรียบเทียบความสามารถในการเปลี่ยนแปลงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์เมื่อมีการเติมไอออนรบกวนอื่นๆ ในสารละลายเซ็นเซอร์ที่ถูกเตรียมขึ้นปริมาตร 3.00 มิลลิลิตร

4.4.1 การเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ II ที่ความเข้มข้น 1.0×10^{-5} M

เตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ II ในตัวทำละลายต่างๆที่ผ่านการศึกษามาแล้ว ในลักษณะเดียวกันกับการเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์สำหรับการทดสอบความไวของเซ็นเซอร์

4.4.2 การเตรียมสารละลายไอออนฟลูออไรด์และไอออนรบกวนอื่นๆ

เตรียมสารละลายไอออนฟลูออไรด์และไอออนรบกวนอื่นๆ ได้แก่ TBAF TBACl TBABr TBAI TBASCN และ TBAOAc ในน้ำปราศจากไอออนที่ความเข้มข้น 1.0×10^{-2} M ในขวดปริมาตรขนาด 10.00 มิลลิลิตร

4.4.3 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงในการดักจับไอออนฟลูออไรด์และไอออนรบกวนอื่นๆ ของเซ็นเซอร์ II

นำสารละลายเซ็นเซอร์ II ที่ความเข้มข้น 1.0×10^{-5} M ในตัวทำละลายต่างๆที่ผ่านการศึกษามาแล้ว ไปวัดสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ จากการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนฟลูออไรด์ แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบกับสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้จากการไตเตรตด้วยไอออนรบกวนอื่นๆ โดยใช้ค่าพารามิเตอร์ในการทดสอบตามตารางที่ 3

4.5 การศึกษาสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในสถานะที่มีไอออนฟลูออไรด์ร่วมกับไอออนรบกวนอื่นๆของเซ็นเซอร์ II (competitive)

การศึกษาสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ II ในสถานะที่มีไอออนรบกวนอื่นๆร่วมกับไอออนฟลูออไรด์ ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี ทำโดยการวัดสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์จากการเติมสารละลายไอออนฟลูออไรด์ลงในสารละลายเซ็นเซอร์ปริมาตร 3.00 มิลลิลิตรให้ความเข้มข้นของสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์เพิ่มขึ้นประมาณ 50% ของความเข้มของสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์ ในขณะที่ไม่มีไอออนฟลูออไรด์เปรียบเทียบกับสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดจากการเติมสารละลายไอออนรบกวนอื่นๆให้ความเข้มข้นเป็นหนึ่งเท่าและสิบเท่าของไอออนฟลูออไรด์ลงในสารละลายเซ็นเซอร์ที่มีไอออนฟลูออไรด์อยู่

4.5.1 การเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ II ที่ความเข้มข้น 1.0×10^{-5} M

เตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ II ในตัวทำละลายต่างๆที่ผ่านการศึกษามาแล้ว ในลักษณะเดียวกันกับการเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์สำหรับการทดสอบความว่องไวของเซ็นเซอร์

4.5.2 การเตรียมสารละลายไอออนฟลูออไรด์และไอออนรบกวนอื่นๆ

เตรียมสารละลายไอออนฟลูออไรด์และไอออนรบกวนอื่นๆได้แก่ TBAF TBACl TBABr TBAI TBASCN และ TBAOAc ในน้ำปราศจากไอออนที่ความเข้มข้น 1.0×10^{-2} M ในขวดปริมาตรขนาด 10.00 มิลลิลิตร

4.5.3 การทดสอบสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในสภาวะที่มีไอออนฟลูออไรด์รวมกับไอออนรบกวนอื่นๆของเซ็นเซอร์ II

นำสารละลายเซ็นเซอร์ II ที่ความเข้มข้น 1.0×10^{-5} M ในตัวทำละลายต่างๆที่ผ่านการศึกษามาแล้ว ไปวัดสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ โดยการเติมสารละลายไอออนฟลูออไรด์ลงในสารละลายเซ็นเซอร์ เปรียบเทียบกับสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดจากการเติมไอออนฟลูออไรด์รวมกับการเติมไอออนรบกวนอื่นๆที่ความเข้มข้นหนึ่งเท่าและสปีท่างของไอออนฟลูออไรด์ลงในสารละลายเซ็นเซอร์ โดยใช้ค่าพารามิเตอร์ในการทดสอบตามตารางที่ 3

4.6 การหาอัตราส่วนของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเซ็นเซอร์ II กับไอออนฟลูออไรด์ (Job's plot)

การหาอัตราส่วนของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเซ็นเซอร์ II กับไอออนฟลูออไรด์ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี โดยการหาอัตราส่วนของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนดังกล่าว ด้วยวิธี Job's plot โดยใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปีในการติดตามผล โดยการเตรียมสารละลายผสมระหว่างเซ็นเซอร์ และไอออนฟลูออไรด์สนใจ โดยให้มีอัตราส่วนโดยโมลของเซ็นเซอร์ตั้งแต่ 0 ถึง 1 ในปริมาตรสารละลายทั้งหมด 10.00 มิลลิลิตร และทำการวัดค่าของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ จากนั้นนำผลการทดลองที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนโดยโมลของเซ็นเซอร์ (แกน x) และ $(I-I_0)X$ (แกน y) เมื่อกำหนดให้

I_0 = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์ก่อนเติมไอออนฟลูออไรด์

I = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์หลังเติมไอออนฟลูออไรด์

X = อัตราส่วนโดยโมลของเซ็นเซอร์

เมื่อสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์จะแสดงอัตราส่วนการเกิดแรงกระทำระหว่างเซ็นเซอร์กับไอออนฟลูออไรด์ จากค่าการเปลี่ยนแปลงที่สูงสุดของค่า $(I-I_0)X$ โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ตามตารางที่ 4 เพื่อหาอัตราส่วนของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเซ็นเซอร์ II กับไอออนฟลูออไรด์ โดยในการทดลองนี้ใช้เซ็นเซอร์ II ความเข้มข้น 1×10^{-4} M และไอออนฟลูออไรด์ความเข้มข้น 1.00×10^{-2} M

ตารางที่ 4 แสดงการหาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของเซ็นเซอร์ II กับไอออนฟลูออไรด์

ขวดที่	ปริมาตรเซ็นเซอร์ (mL)	ปริมาตรไอออนฟลูออไรด์ (μL)	เศษส่วนโมลของเซ็นเซอร์ (X_i)
0	0	10.0	0
1	0.1	9.0	0.1
2	0.2	8.0	0.2
3	0.3	7.0	0.3
4	0.4	6.0	0.4
5	0.5	5.0	0.5
6	0.6	4.0	0.6
7	0.7	3.0	0.7
8	0.8	2.0	0.8
9	0.9	1.0	0.9
10	1.0	0	1.0



บทที่ 4

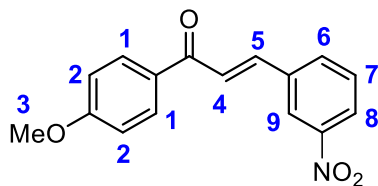
ผลการดำเนินงานวิจัย

จากผลการสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์แต่ละชนิด ตามวิธีการทดลองที่ได้กล่าวไว้แล้วนั้น พบว่าได้ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์สำหรับตรวจจับไอออนชนิดใหม่ 2 ชนิด คือ เซ็นเซอร์ I และ II จากนั้นนำสารประกอบทั้งหมด 2 ชนิดที่สังเคราะห์ได้มาศึกษาด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) และ High resolution mass spectroscopy (HRMS-ESI) เพื่อยืนยันโครงสร้างของสารประกอบที่สังเคราะห์ได้ จากนั้นนำเซ็นเซอร์ที่ผ่านการยืนยันโครงสร้างแล้วมาทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจจับไอออน โดยเซ็นเซอร์ I ทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจจับไอออนทองแดง ในสารละลายผสมระหว่างน้ำกับตัวทำละลายอินทรีย์ ในขณะที่เซ็นเซอร์ II ทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจจับไอออนฟลูออไรด์ ในสารละลายผสมระหว่างน้ำกับตัวทำละลายอินทรีย์ ได้ผลการทดลองดังนี้

1. การยืนยันโครงสร้างของเซ็นเซอร์ I

ในการสังเคราะห์เซ็นเซอร์ I สามารถสังเคราะห์ด้วยฟลูออโรฟอร์ชนิด aza BODIPY โดยเริ่มจากการสังเคราะห์สารประกอบชนิด chalcone (3) โดยผ่านปฏิกิริยา aldol condensation จากนั้นทำปฏิกิริยา 1,4-Michael addition ได้สารประกอบ nitro-ketone (4) จากนั้นสร้างวง dipyrrole (5) ตามด้วยปฏิกิริยา reduction และทำปฏิกิริยากับ BF_3OEt_2 เพื่อสร้างเป็นสารประกอบโบรอน เรียกว่า aza-BODIPY (6) จากนั้นทำปฏิกิริยา amide formation กับ bromoacetyl-bromide ได้สารประกอบ aza-BDP-Br (7) และในขั้นตอนสุดท้าย ทำปฏิกิริยา nucleophilic substitution กับ di-2-picolyamine ได้สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ I ซึ่งสารประกอบที่เกิดขึ้นในแต่ละขั้นตอนของการเกิดปฏิกิริยา ได้มีการวิเคราะห์กลไกการเกิดปฏิกิริยาและยืนยันโครงสร้างของสารที่สังเคราะห์ได้ ด้วยวิธีทางสเปกโทรสโกปีดังนี้

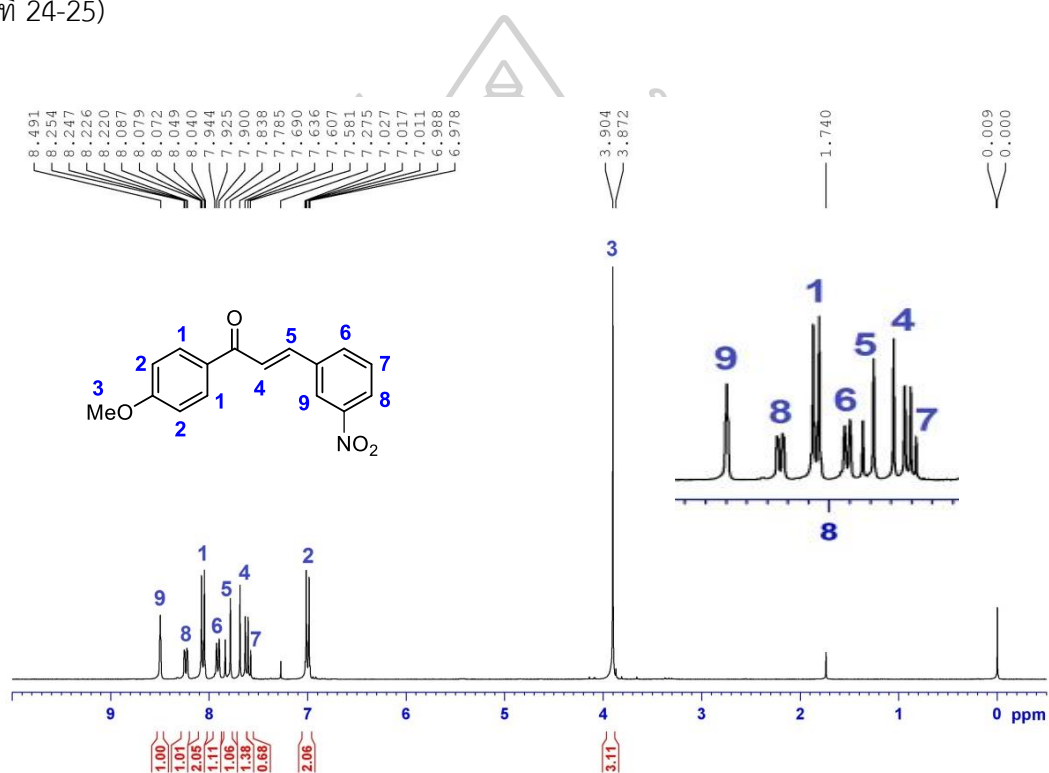
1.1 โครงสร้างของ chalcone (3)



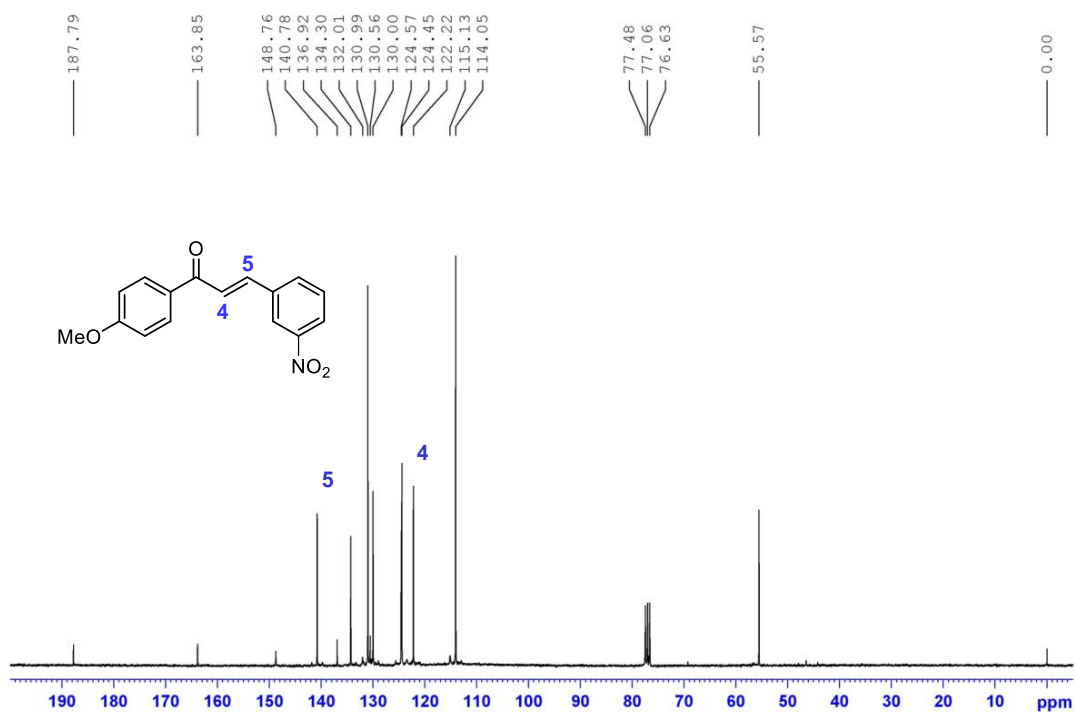
ภาพที่ 22 โครงสร้างของสารประกอบ chalcone (3)

จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของ chalcone (3) โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีสามารถยืนยันโครงสร้างได้ดังนี้

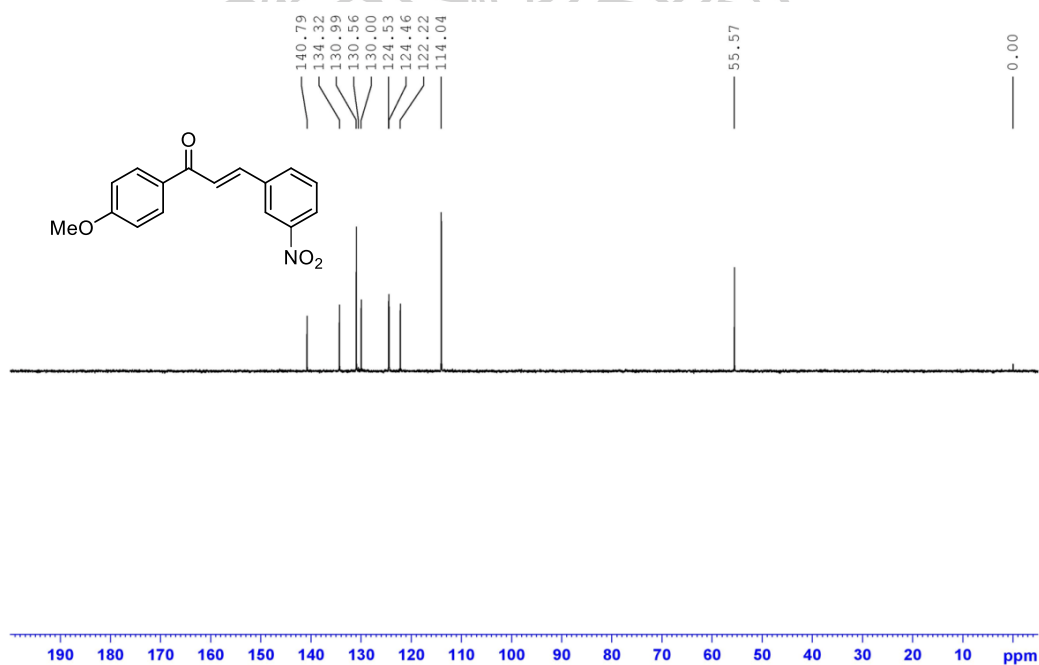
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 3.90 (s, 3H), 7.01 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.61 (t, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.67 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H), 7.81 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 7.91 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 8.06 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 8.22 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.50 (s, 1H) ppm (ภาพที่ 23); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 55.6 (CH_3), 114.1 (2CH), 122.2 (CH), 124.6 (2CH), 130.0 (CH), 130.6 (C), 131.0 (2CH), 134.3 (CH), 136.9 (C), 140.8 (CH), 148.8 (C), 163.9 (C), 187.8 ($\text{C}=\text{O}$) ppm (ภาพที่ 24-25)



ภาพที่ 23 ^1H NMR สเปกตรัมของสารประกอบหมายเลข 3

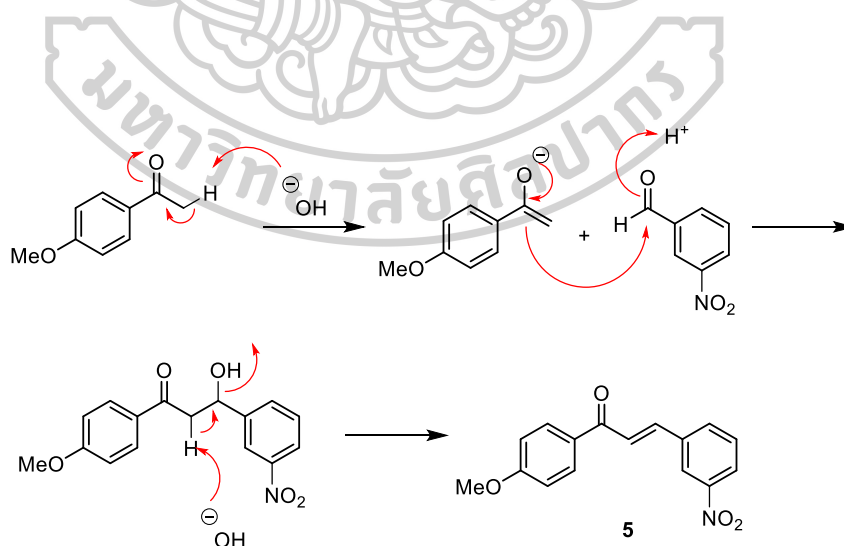


ภาพที่ 24 ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารประกอบหมายเลข 3



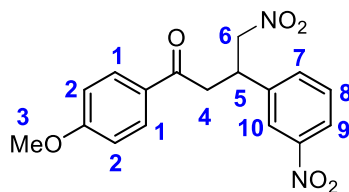
ภาพที่ 25 ^{13}C DEPT135 NMR สเปกตรัมของสารประกอบหมายเลข 3

การสังเคราะห์สารประกอบ aza-BODIPY (6) สังเคราะห์ตามวิธีของ Burgess และคณะ [77] และทำการตรวจสอบเปรียบเทียบระหว่างสเปกตรัม ในการยืนยันโครงสร้างทางเคมี ที่ได้จากการสังเคราะห์กับสเปกตรัมที่มีการรายงานไว้ตามเอกสารอ้างอิง [77] โดยเริ่มจากสารตัวกลางชนิดแรกคือ สารประกอบหมายเลข 3 เมื่อพิจารณาโครงสร้างของสารประกอบ และผล ^1H NMR สเปกตรัมของ สารประกอบหมายเลข 3 (ภาพที่ 23) แสดงให้เห็นลักษณะสัญญาณของโปรตอน 9 กลุ่ม แต่มีสัญญาณสองกลุ่มที่สามารถยืนยันโครงสร้างที่แน่นอนได้อย่างชัดเจนดังนี้ สัญญาณของโปรตอนที่ปรากฏ ณ ตำแหน่ง chemical shift (δ) ที่ 7.81 และ 7.91 ppm ซึ่งเป็นสัญญาณที่เกิดจากโปรตอนบนคาร์บอน ตำแหน่งที่ 4 และ 5 ตามลำดับ ถือว่าปรากฏสัญญาณที่บริเวณสนามแม่เหล็กต่ำกว่าอะลิฟาติกโปรตอนบนแอลคีนทั่วไป หรือมีค่า δ มากกว่าเมื่อเทียบกับอะลิฟาติกโปรตอนบนแอลคีนทั่วไป (โดยปกติมีค่า δ 4.5-6.5 ppm) เนื่องจากการได้รับอิทธิพลจากหมู่ไนโตรบนวงเบนซีนของสารตั้งต้นชนิด 3-nitrobenzaldehyde และหมู่คาร์บอนิลของสารตั้งต้นชนิด 4-methoxy acetophenone นอกจากนี้สัญญาณมีลักษณะเป็น doublet และมีค่า coupling constant (J) เท่ากับ 16.2 และ 15.9 Hz ตามลำดับ ซึ่งเกิดจากการ coupling ซึ่งกันและกันของโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 และ 5 ในทำนองเดียวกับ ^{13}C NMR สเปกตรัม (ภาพที่ 24-25) พบว่ามีสัญญาณคาร์บอนของ CH ปรากฏที่ δ 122.2 และ 140.8 ppm ซึ่งเกิดจากคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 และ 5 ตามลำดับ โดยผลที่ปรากฏสอดคล้องกับผลของ ^1H NMR และ ^{13}C NMR ที่ได้มีการรายงานไว้ก่อนหน้านี้ [77] จึงสามารถยืนยันได้ว่า สารประกอบหมายเลข 3 เกิดขึ้นจริงจากการสังเคราะห์ โดยเสนอกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังภาพที่ 26



ภาพที่ 26 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของสารประกอบหมายเลข 3

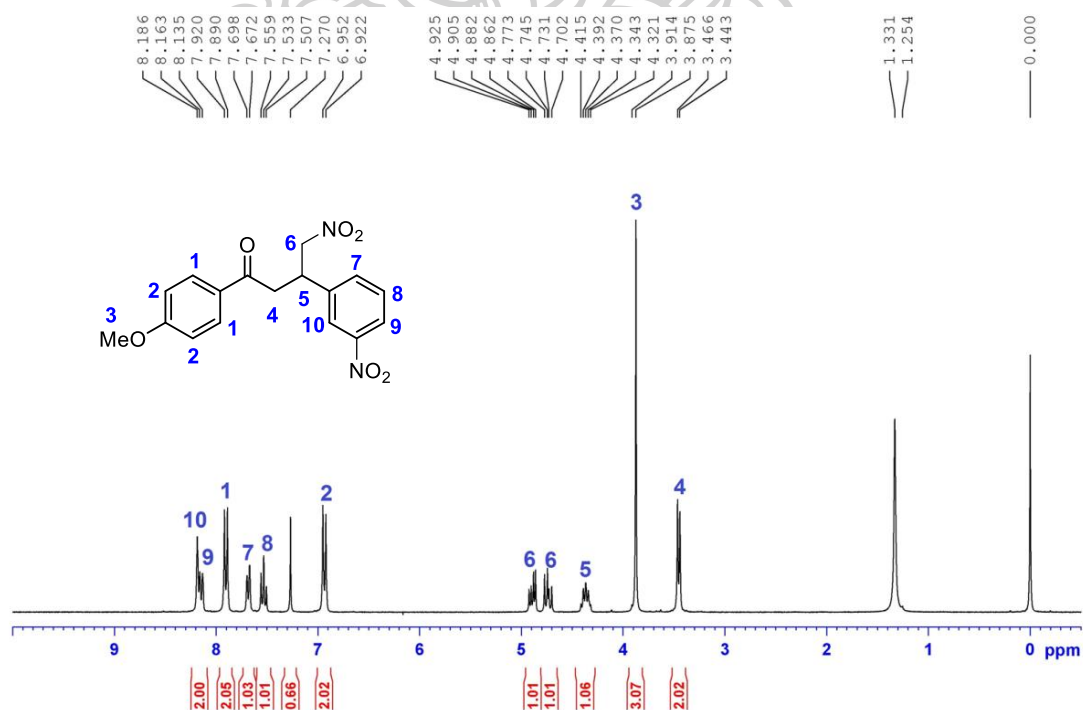
1.2 โครงสร้างของ nitro-ketone (4)

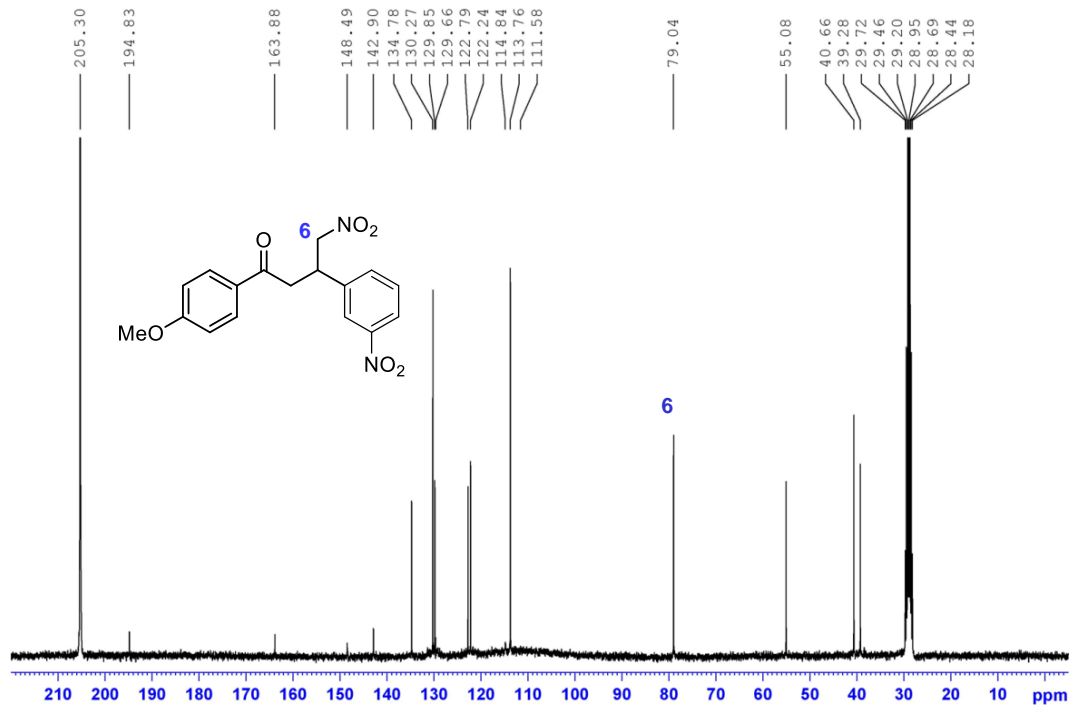


ภาพที่ 27 โครงสร้างของสารประกอบ nitro-ketone (4)

จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของ nitro-ketone (4) โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีสามารถยืนยันโครงสร้างได้ดังนี้

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 3.45 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 3.88 (s, 3H), 4.32-4.42 (m, 1H), 4.70-4.75 (m, 1H), 4.86-4.93 (m, 1H), 6.94 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.53 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.68 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.91 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 8.15 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.19 (s, 1H) ppm (ภาพที่ 28); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 39.8 (CH), 40.7 (CH_2), 55.1 (CH_3), 79.0 (CH_2), 113.8 (2CH), 122.2 (CH), 122.8 (CH), 129.7 (C), 129.9 (CH), 130.3 (2CH), 134.8 (CH), 142.9 (C), 148.5 (C), 163.9 (C), 194.8 (C=O) ppm (ภาพที่ 29-30)

ภาพที่ 28 ^1H NMR สเปกตรัมของสารประกอบหมายเลข 4

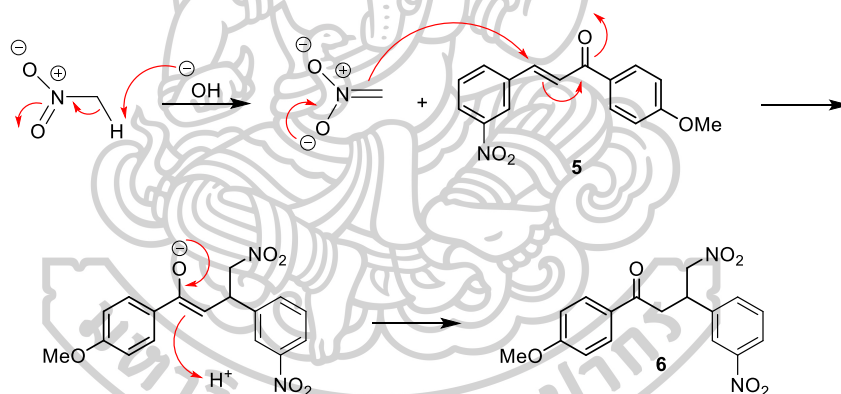


ภาพที่ 29 ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารประกอบหมายเลข 4



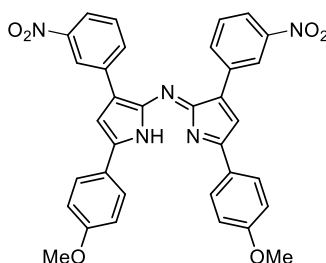
ภาพที่ 30 ^{13}C DEPT135 NMR สเปกตรัมของสารประกอบหมายเลข 4

เมื่อพิจารณาโครงสร้างของสารประกอบหมายเลข 4 และผล ^1H NMR สเปกตรัม (ภาพที่ 28) พบว่ามีการแสดงลักษณะสัญญาณของโปรตอน 10 กลุ่ม แต่มีสัญญาณสองกลุ่มที่สามารถยืนยันโครงสร้างที่แน่นอนได้อย่างชัดเจนดังนี้ สัญญาณของโปรตอนที่ปรากฏ ณ ตำแหน่ง chemical shift (δ) ที่ 4.70-4.75 และ 4.86-4.93 ppm ซึ่งเป็นสัญญาณที่เกิดจากโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ทั้งสองตัว ถือว่าปรากฏสัญญาณที่บริเวณสนามแม่เหล็กต่ำกว่าอะลิฟาติกโปรตอนทั่วไป หรือมีค่า δ มากกว่าเมื่อเทียบกับอะลิฟาติกโปรตอนทั่วไป เนื่องจากการได้รับอิทธิพลจากหมู่ไนโตร ของสารตั้งต้นชนิด nitromethane นอกจากนี้สัญญาณมีลักษณะเป็น multiplet ซึ่งเกิดจากการ coupling ซึ่งกันและกันของโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 และ เกิดการ coupling กับโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 อีกด้วย ในทำนองเดียวกับ ^{13}C NMR สเปกตรัม (ภาพที่ 29-30) พบว่ามีสัญญาณคาร์บอนของ CH_2 ปรากฏที่ δ 79.0 ppm ซึ่งเกิดจากคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 โดยผลที่ปรากฏสอดคล้องกับผลของ ^1H NMR และ ^{13}C NMR ที่ได้มีการรายงานไว้ก่อนหน้านี้ [77] จึงสามารถยืนยันได้ว่า สารประกอบหมายเลข 4 เกิดขึ้นจริงจากการสังเคราะห์ โดยเสนอกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังภาพที่ 31



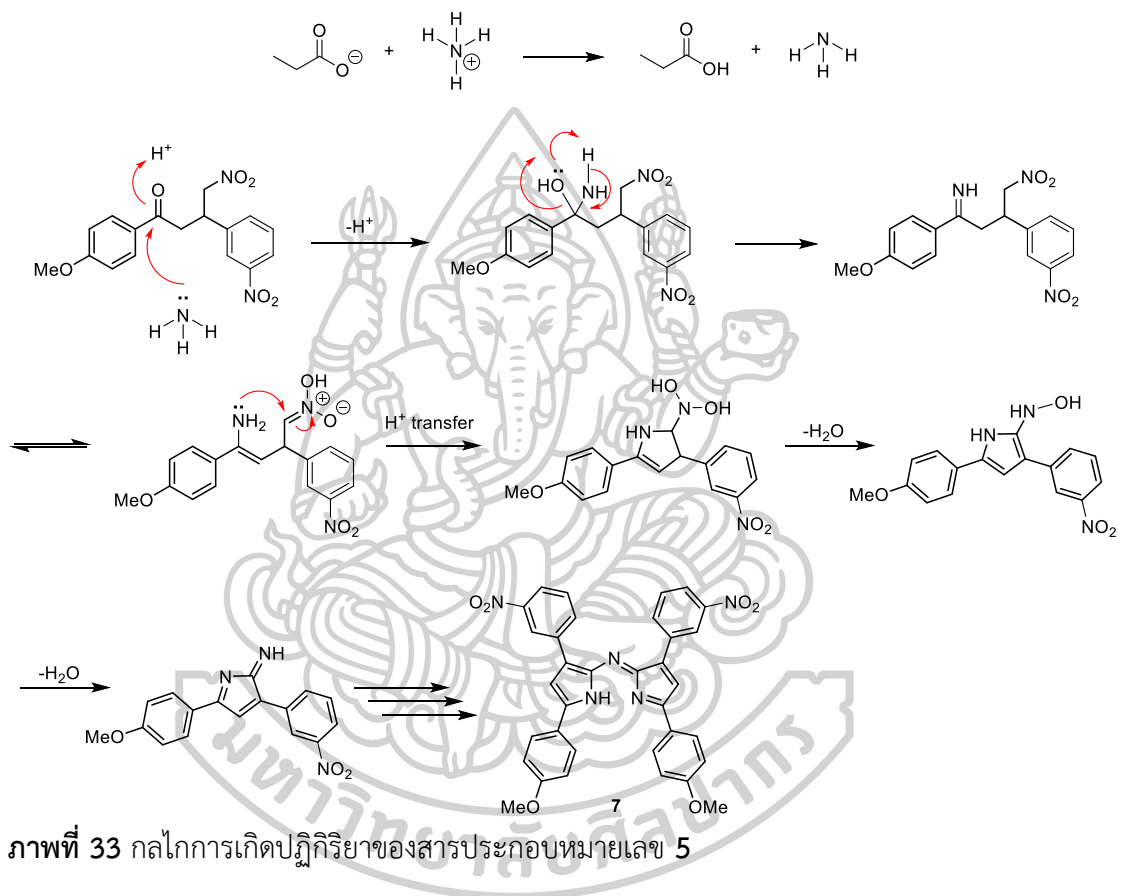
ภาพที่ 31 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของสารประกอบหมายเลข 4

1.3 โครงสร้างของ dipyrrole (5)

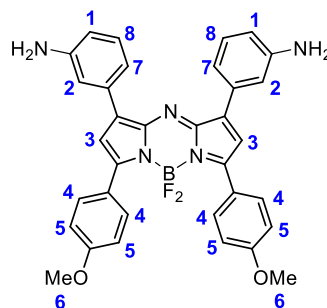


ภาพที่ 32 โครงสร้างของสารประกอบ dipyrrole (5)

สารประกอบ dipyrrole (5) ไม่สามารถยืนยันโครงสร้างได้ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี เนื่องจากสารประกอบไม่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ทุกชนิด ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี แต่พบว่าเมื่อนำไปทำปฏิกิริยาต่อ ได้สารผลิตภัณฑ์ที่สามารถยืนยันโครงสร้างได้ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า สารประกอบ dipyrrole (5) สามารถสังเคราะห์ได้จริงและมีการเสนอกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังภาพที่ 33



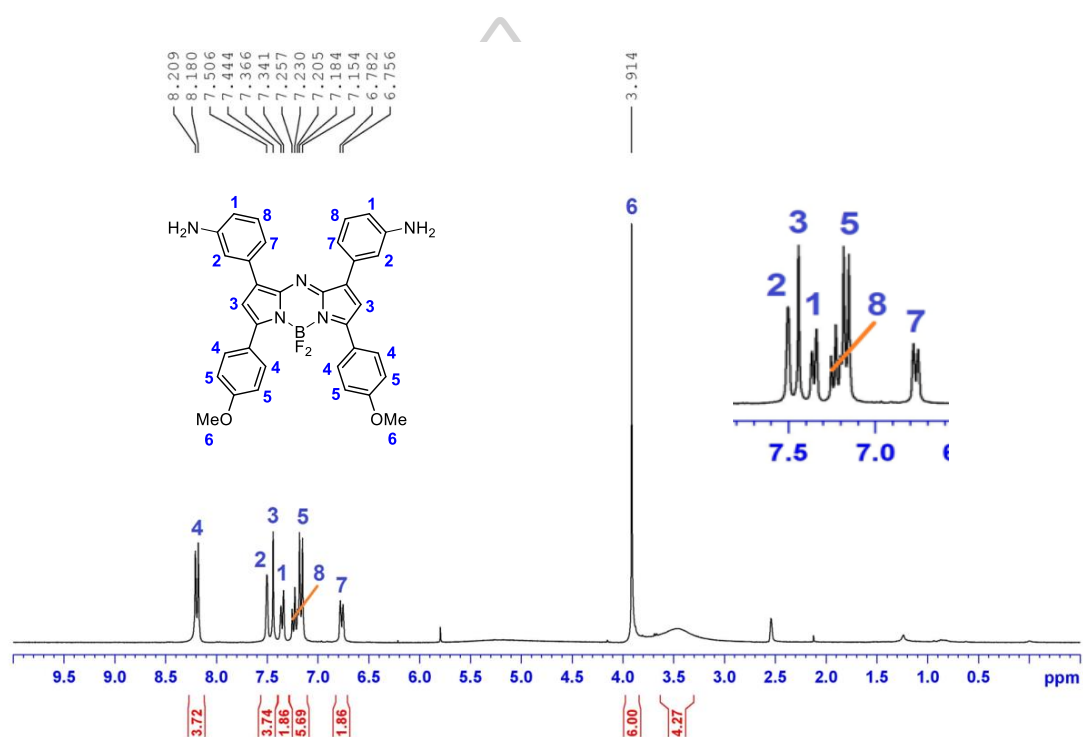
1.4 โครงสร้างของ aza-BODIPY (6)



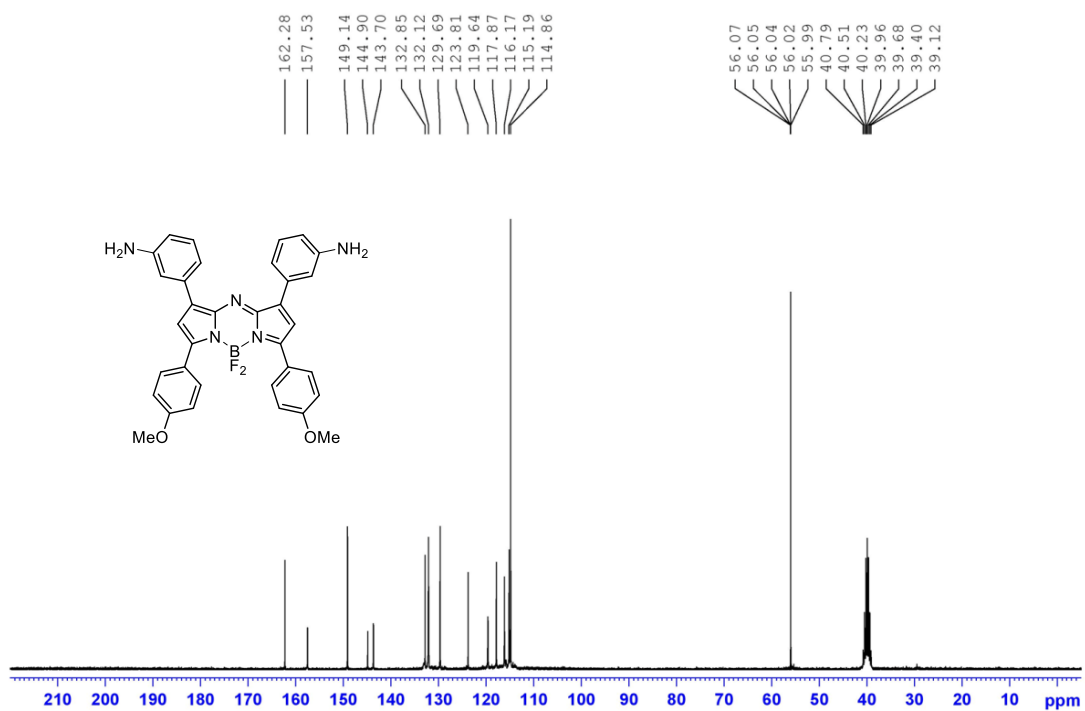
ภาพที่ 34 โครงสร้างของสารประกอบ aza-BODIPY (6)

จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของ aza-BODIPY (6) โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีสามารถยืนยันโครงสร้างได้ดังนี้

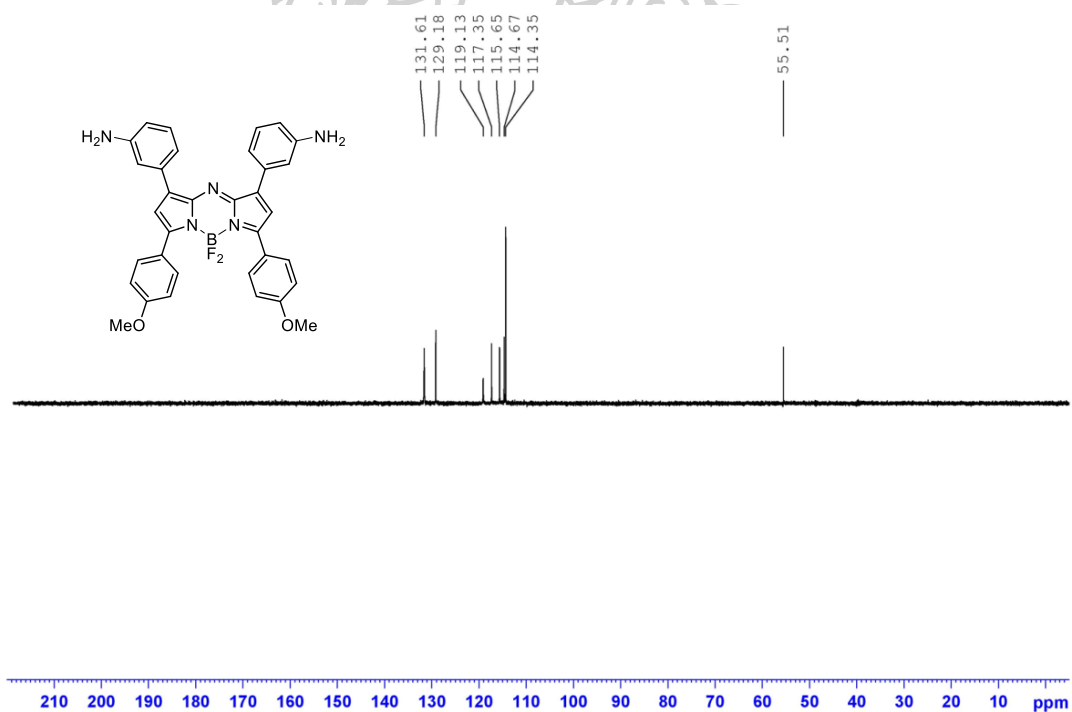
^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 3.91 (s, 6H), 6.77 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.15-7.26 (m, 6H), 7.35 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.44 (s, 2H), 7.51 (s, 2H), 8.19 (d, J = 8.7 Hz, 4H) ppm (ภาพที่ 35); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ 56.0 (2CH $_3$), 114.9 (5CH), 115.2 (2CH), 116.2 (2CH), 119.6 (CH), 123.8 (2C), 129.7 (4CH), 132.1 (2CH), 132.9 (2C), 143.7 (2C), 144.9 (2C), 149.1 (2C), 157.5 (2C), 162.3 (2C) ppm (ภาพที่ 36-37)



ภาพที่ 35 ^1H NMR สเปกตรัมของสารประกอบหมายเลข 6

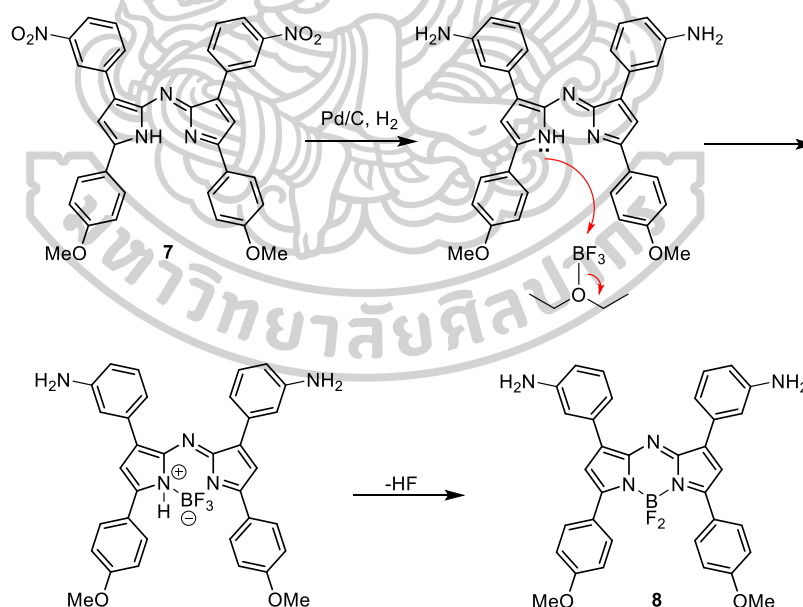


ภาพที่ 36 ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารประกอบหมายเลข 6



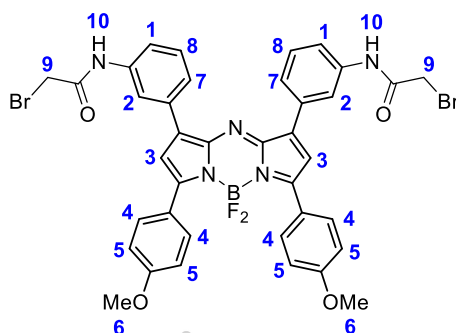
ภาพที่ 37 ^{13}C DEPT135 NMR สเปกตรัมของสารประกอบหมายเลข 6

เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างของสารประกอบหมายเลข 6 (ภาพที่ 35) และ ^1H NMR สเปกตรัม (ภาพที่ 36) แสดงให้เห็นสัญญาณของโปรตอนที่แตกต่างกันหลายกลุ่มมาก เนื่องจากมีโครงสร้างขนาดใหญ่ แต่มีสัญญาณ 2 กลุ่มที่สามารถยืนยันโครงสร้างได้อย่างชัดเจนโดยมีลักษณะเป็น singlet และปรากฏสัญญาณบริเวณสนามแม่เหล็กต่ำกว่าอะลิฟาติกโปรตอนบน แอลคีนทั่วไป โดยสัญญาณของโปรตอนกลุ่มแรกที่ปรากฏ ณ ตำแหน่ง chemical shift (δ) ที่ 7.44 ppm ซึ่งเป็นสัญญาณที่เกิดจากโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และสัญญาณที่ค่า δ เท่ากับ 7.51 ppm ซึ่งเป็นสัญญาณที่เกิดจากโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 โดยที่สัญญาณของโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 จะปรากฏสัญญาณที่บริเวณสนามแม่เหล็กต่ำกว่า สัญญาณของโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 เนื่องจากการได้รับอิทธิพลจากอะตอมไนโตรเจน และวงเบนซีน ซึ่งมีความสามารถในการดึงอิเล็กตรอน จึงสามารถยืนยันได้ว่าสารประกอบหมายเลข 6 เกิดขึ้นจริงจากการสังเคราะห์ และได้มีการเปรียบเทียบผลที่ได้จากการทดลองที่กับผลของ ^1H NMR และ ^{13}C NMR (ภาพที่ 36-37) ที่ได้มีการรายงานไว้ก่อนหน้านี้ [77] และมีการเสนอกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังภาพที่ 38 ในทางตรงกันข้ามหากสารประกอบหมายเลข 6 ไม่เกิดขึ้นจริงจากการสังเคราะห์ควรจะพบสัญญาณของโปรตอนที่มีลักษณะเป็น singlet ณ บริเวณสนามแม่เหล็กต่ำเพียง 1 สัญญาณเท่านั้น



ภาพที่ 38 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของสารประกอบหมายเลข 6

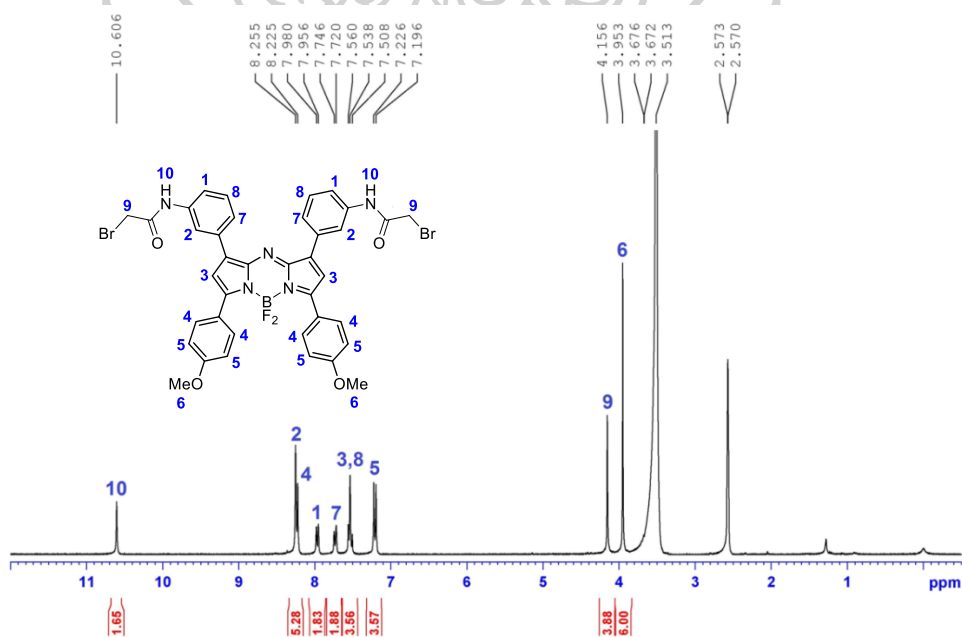
1.5 โครงสร้างของ aza-BDP-Br (7)

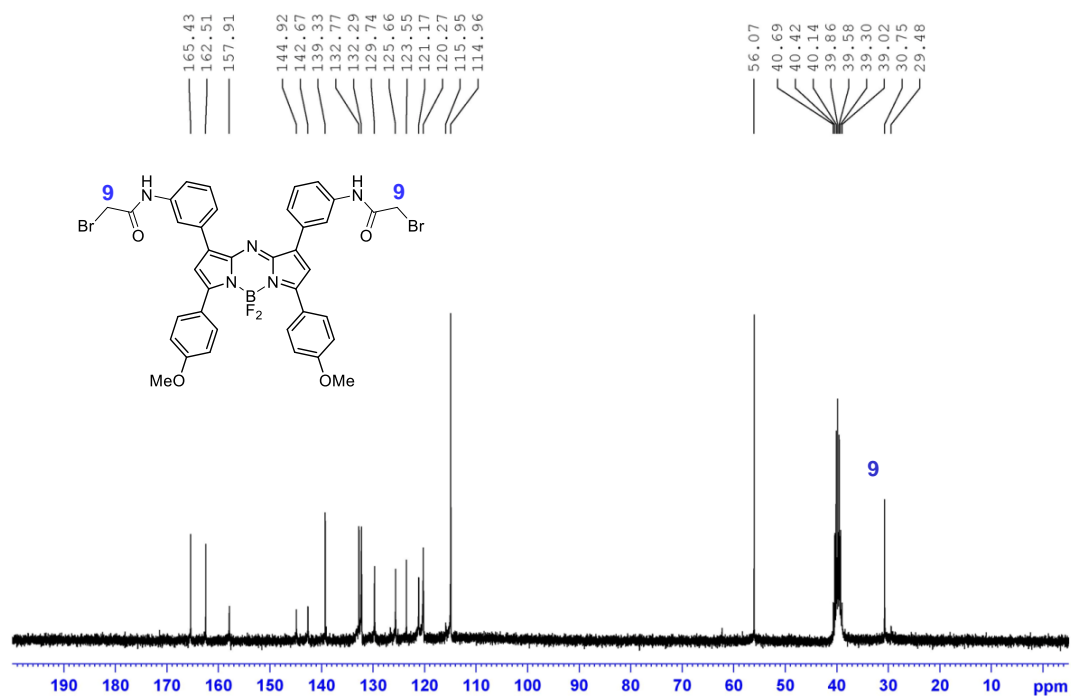


ภาพที่ 39 โครงสร้างของสารประกอบ aza-BDP-Br (7)

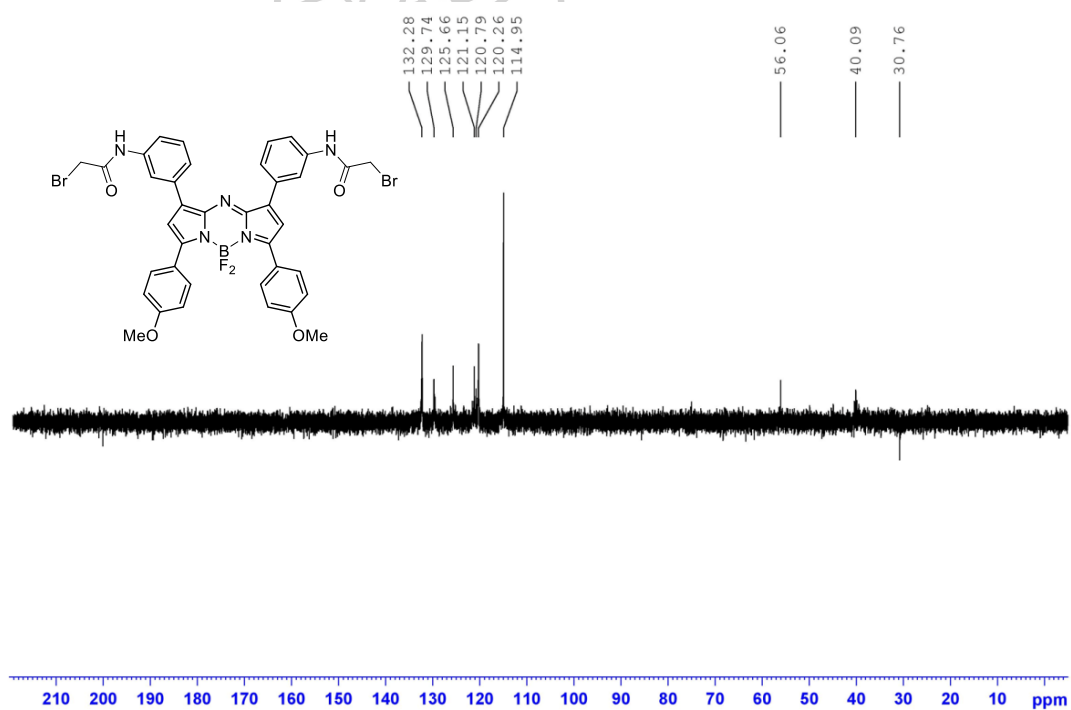
จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของ aza-BDP-Br (7) โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีสามารถยืนยันโครงสร้างได้ดังนี้

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 3.95 (s, 6H), 4.16 (s, 4H), 7.21 (d, J = 9.0 Hz, 4H), 7.54 (t, J = 7.8 Hz, 4H), 7.73 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.97 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 8.24 (d, J = 9.0 Hz, 6H), 10.61 (s, 2H) ppm (ภาพที่ 40); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ 30.8 (2CH₂), 56.1 (2CH₃), 115.0 (5CH), 120.3 (2CH), 120.8 (CH), 121.2 (2CH), 123.6 (2C), 125.7 (2CH), 129.7 (2CH), 132.3 (4CH), 132.8 (2C), 139.3 (2C), 142.7 (2C), 144.9 (2C), 157.9 (2C), 162.5 (2C), 165.4 (2C) ppm (ภาพที่ 41-42); HR-ESI MS จากการคำนวณ $\text{C}_{38}\text{H}_{30}\text{BBr}_2\text{F}_2\text{N}_5\text{O}_4\text{Na}^+$ ($\text{M}+\text{Na}$)⁺ 852.0603 m/z, จากการทดสอบ 852.0612 m/z. (ภาพที่ 43)

ภาพที่ 40 ^1H NMR สเปกตรัมของสารประกอบหมายเลข 7



ภาพที่ 41 ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารประกอบหมายเลข 7



ภาพที่ 42 ^{13}C DEPT135 NMR สเปกตรัมของสารประกอบหมายเลข 7

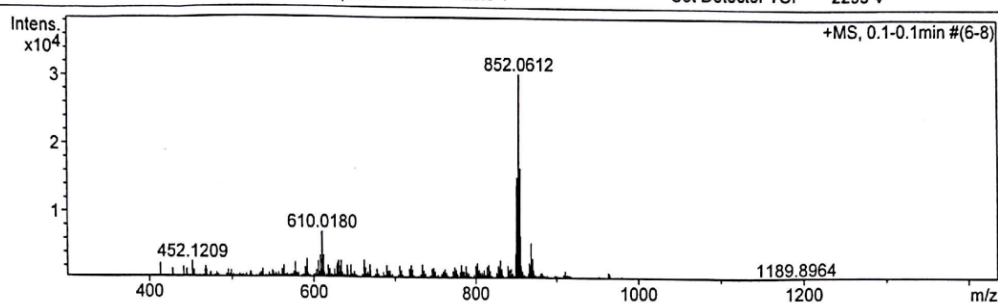
Mass Spectrum List Report

Analysis Info

Analysis Name	OSSSUS600131003.d	Acquisition Date	1/31/2017 12:03:31 PM
Method	Tune_wide_POS_pin_600.m	Operator	Administrator
Sample Name	aza-BDP-aceBr	Instrument	micrOTOF 72
	aza-BDP-aceBr		

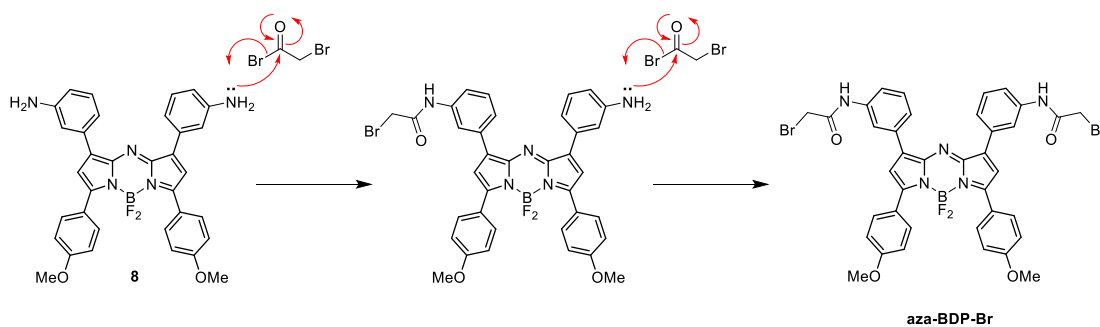
Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Corrector Fill	50 V
Scan Range	n/a	Capillary Exit	250.0 V	Set Pulsar Pull	337 V
Scan Begin	50 m/z	Hexapole RF	600.0 V	Set Pulsar Push	337 V
Scan End	3000 m/z	Skimmer 1	75.0 V	Set Reflector	1300 V
		Hexapole 1	25.0 V	Set Flight Tube	9000 V
				Set Detector TOF	2295 V



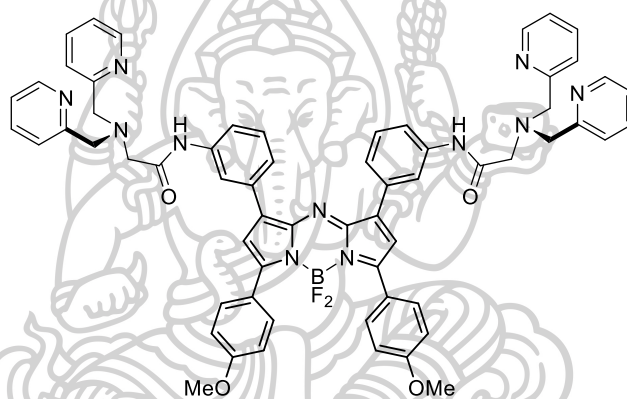
ภาพที่ 43 HR-ESI MS สเปกตรัมของสารประกอบหมายเลข 7

เมื่อพิจารณาโครงสร้างของสารประกอบหมายเลข 7 และผล ^1H NMR สเปกตรัม (ภาพที่ 40) พบว่าจากผล ^1H NMR แสดงให้เห็นลักษณะสัญญาณของโปรตอน 8 กลุ่ม มีสองกลุ่มที่สามารถยืนยันโครงสร้างที่แน่นอนได้อย่างชัดเจนดังนี้ สัญญาณของโปรตอนที่ปรากฏ ณ ตำแหน่ง chemical shift (δ) ที่ 4.16 ppm มีลักษณะเป็น singlet ซึ่งเป็นสัญญาณที่เกิดจากโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่งที่ 9 และเป็นสัญญาณที่ปรากฏบริเวณสนามแม่เหล็กต่ำกว่าอะลิฟาติกโปรตอนทั่วไป หรือมีค่า δ มากกว่าเมื่อเทียบกับอะลิฟาติกโปรตอนทั่วไป เนื่องจากการได้รับอิทธิพลจากอะตอมโบรมีน และหมู่คาร์บอนิล ที่มีความสามารถในการดึงอิเล็กตรอน และสัญญาณกลุ่มที่สอง มีลักษณะเป็น singlet ที่ค่า δ เท่ากับ 10.61 ppm ซึ่งเกิดจากโปรตอนบนอะตอมไนโตรเจนตำแหน่งที่ 10 ซึ่งสามารถพิสูจน์ได้ว่ามีหมู่เอไมด์เกิดขึ้นจากการสังเคราะห์ ในทำนองเดียวกับ ^{13}C NMR สเปกตรัม (ภาพที่ 41-42) พบว่ามีสัญญาณคาร์บอนของ CH_2 ปรากฏที่ δ 30.8 ppm ซึ่งเกิดจากคาร์บอนตำแหน่งที่ 9 อีกทั้งมี HR-ESI MS สเปกตรัม ซึ่งมีค่าตรงกับสารประกอบหมายเลข 7 ซึ่งผลที่ปรากฏสอดคล้องกับผลของ ^1H NMR ^{13}C NMR และ Mass spectrum (ภาพที่ 43) จึงสามารถยืนยันได้ว่า สารประกอบหมายเลข 7 เกิดขึ้นจริงจากการสังเคราะห์ โดยเสนอกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังภาพที่ 44



ภาพที่ 44 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของสารประกอบ aza-BDP-Br (7)

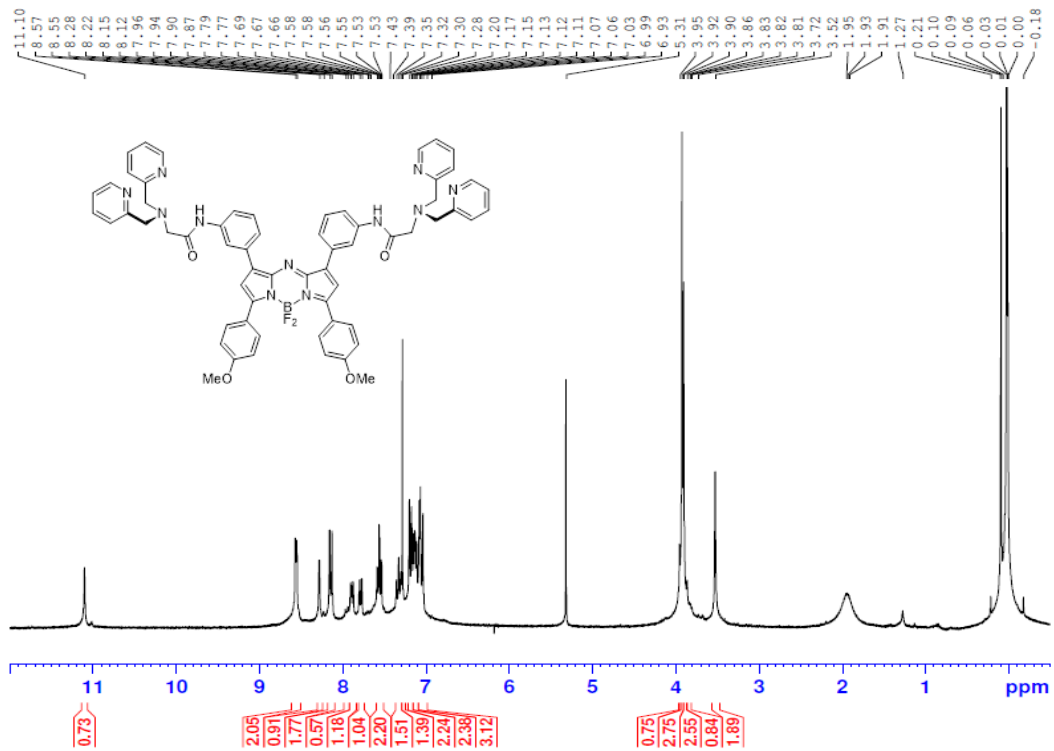
1.6 โครงสร้างของเซ็นเซอร์ aza-BDP-DPA (I)



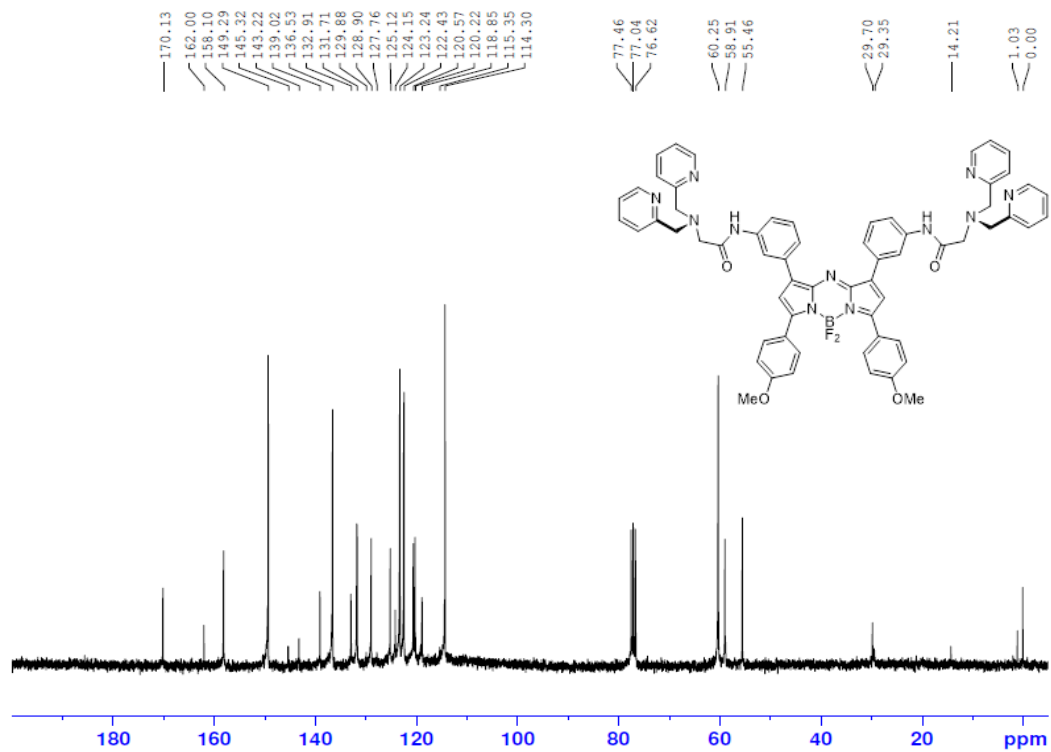
ภาพที่ 45 โครงสร้างของเซ็นเซอร์ I

จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของเซ็นเซอร์ I โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีสามารถยืนยันโครงสร้างได้ดังนี้

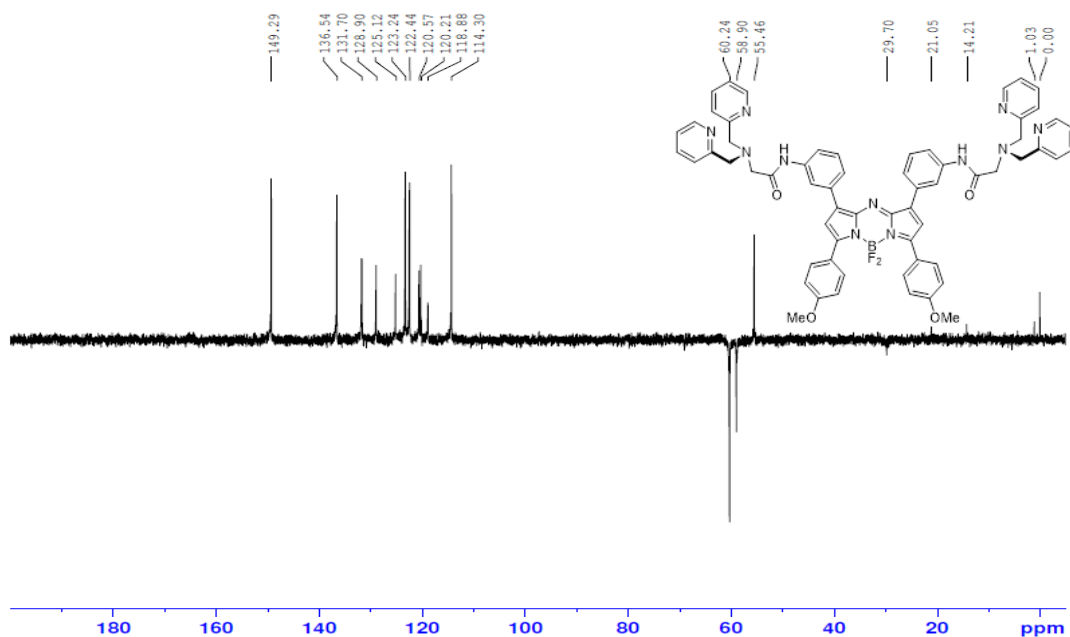
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 3.52 (s, 4H), 3.90 (s, 8H), 3.93 (s, 6H), 7.14 (m, 12H), 7.34 (m, 4H), 7.55 (t, $J = 6.0$ Hz, 4H), 7.78 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.88 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 8.14 (d, $J = 6.0$ Hz, 4H), 8.27 (s, 2H) 8.56 (d, $J = 4.8$ Hz, 4H), 11.10 (s, 2NH) ppm (ภาพที่ 46); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 55.4 (2 CH_3), 58.9 (2 CH_2), 60.2 (4 CH_2), 114.3 (4CH), 118.8 (2CH), 120.2 (2CH), 120.6 (2CH), 122.4 (4CH), 123.2 (4CH), 124.1 (2C), 125.1 (2CH), 127.8 (2C), 128.9 (2CH), 129.9 (2C), 131.7 (4CH), 132.9 (2C), 136.5 (4CH), 139.0 (2C), 143.2 (2C), 145.3 (2C), 149.2 (4CH), 158.1 (2C), 162.0 (2C), 170.1 (2C) ppm (ภาพที่ 47-48); HR-ESI MS จากการคำนวณ $\text{C}_{62}\text{H}_{55}\text{BF}_2\text{N}_{11}\text{O}_4^+$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 1066.4494 m/z, จากการทดสอบ 1066.4491 m/z (ภาพที่ 49).



ภาพที่ 46 ^1H NMR สเปกตรัมของเซ็นเซอร์ I



ภาพที่ 47 ^{13}C NMR สเปกตรัมของเซ็นเซอร์ I



ภาพที่ 48 ^{13}C DEPT135 NMR สเปกตรัมของเซ็นเซอร์ I

Mass Spectrum List Report

Analysis Info

Analysis Name OSSUYT590307004.d
 Method esi_tune_wide_pos_20150911.m
 Sample Name aza_BDP_DPA
 aza_BDP_DPA

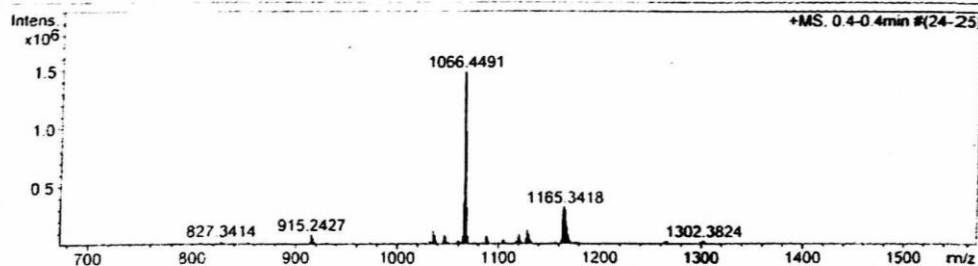
Acquisition Date 3/7/2016 4:24:51 PM
 Operator Administrator
 Instrument micrOTOF 72

Acquisition Parameter

Source Type ESI
 Scan Range n/a
 Scan Begin 50 m/z
 Scan End 3000 m/z

Ion Polarity Positive
 Capillary Exit 300.0 V
 Hexapole RF 600.0 V
 Skimmer 1 70.0 V
 Hexapole 1 25.0 V

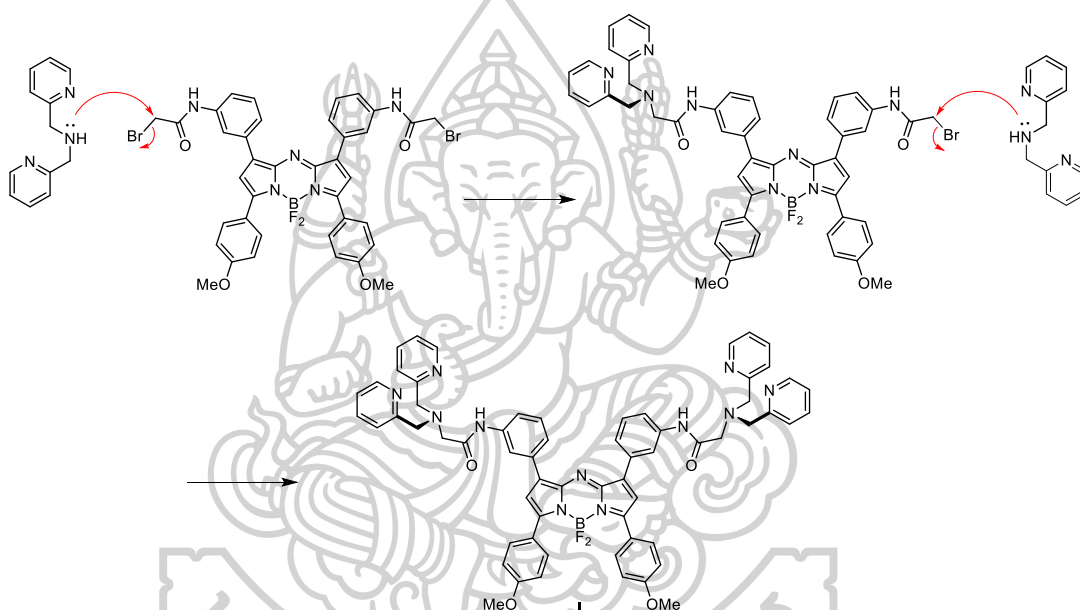
Set Corrector Fill 50 V
 Set Pulsar Pull 337 V
 Set Pulsar Push 337 V
 Set Reflector 1300 V
 Set Flight Tube 9000 V
 Set Detector TOF 2295 V



ภาพที่ 49 HR-ESI MS สเปกตรัมของเซ็นเซอร์ I

เมื่อพิจารณาโครงสร้างของเซ็นเซอร์ I และผล ^1H NMR สเปกตรัม (ภาพที่ 46) พบว่าจากผล ^1H NMR แสดงให้เห็นลักษณะสัญญาณของโปรตอน 8 กลุ่ม มีสองกลุ่มที่สามารถยืนยันโครงสร้างที่แน่นอนได้อย่างชัดเจนดังนี้ สัญญาณของโปรตอนที่ปรากฏ ณ ตำแหน่ง chemical shift (δ) ที่ 4.16 ppm มีลักษณะเป็น singlet ซึ่งเป็นสัญญาณที่เกิดจากโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่งที่ 9 และเป็นสัญญาณที่ปรากฏบริเวณสนามแม่เหล็กต่ำกว่าอะลิฟาติกโปรตอนทั่วไป หรือมีค่า δ มากกว่าเมื่อเทียบ

กับอะลิฟาติก โปรตอนทั่วไป เนื่องจากการได้รับอิทธิพลจากอะตอมโบรมีน และหมู่คาร์บอนิล ที่มีความสามารถในการดึงอิเล็กตรอน และสัญญาณกลุ่มที่สอง มีลักษณะเป็น singlet ที่ค่า δ เท่ากับ 10.61 ppm ซึ่งเกิดจากโปรตอนบนอะตอมไนโตรเจนตำแหน่งที่ 10 ซึ่งสามารถพิสูจน์ได้ว่ามีหมู่เอไมด์เกิดขึ้นจากการสังเคราะห์ ในทำนองเดียวกับ ^{13}C NMR สเปกตรัม (ภาพที่ 47-48) พบว่ามีสัญญาณคาร์บอนของ CH_2 ปรากฏที่ δ 30.8 ppm ซึ่งเกิดจากคาร์บอนตำแหน่งที่ 9 อีกทั้งมี HR-ESI MS สเปกตรัม ซึ่งมีค่าตรงกับเซ็นเซอร์ I ซึ่งผลที่ปรากฏสอดคล้องกับผลของ ^1H NMR ^{13}C NMR และ Mass spectrum (ภาพที่ 49) จึงสามารถยืนยันได้ว่า เซ็นเซอร์ aza-BDP-DPA (I) เกิดขึ้นจริงจากการสังเคราะห์ โดยเสนอกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังภาพที่ 50

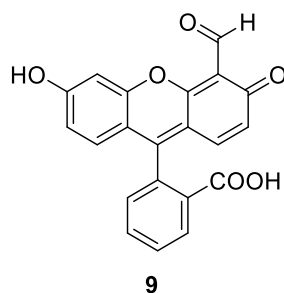


ภาพที่ 50 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของเซ็นเซอร์ aza-BDP-DPA (I)

2. การยืนยันโครงสร้างของเซ็นเซอร์ II

การสังเคราะห์สารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ II เริ่มจากการสังเคราะห์ฟลูออโรฟอร์ชนิด fluorescein monoaldehyde (9) มาทำปฏิกิริยากับไอโอโนฟอร์ชนิด 2-Aminophenylboronic acid pinacol ester (10) ได้สารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ II

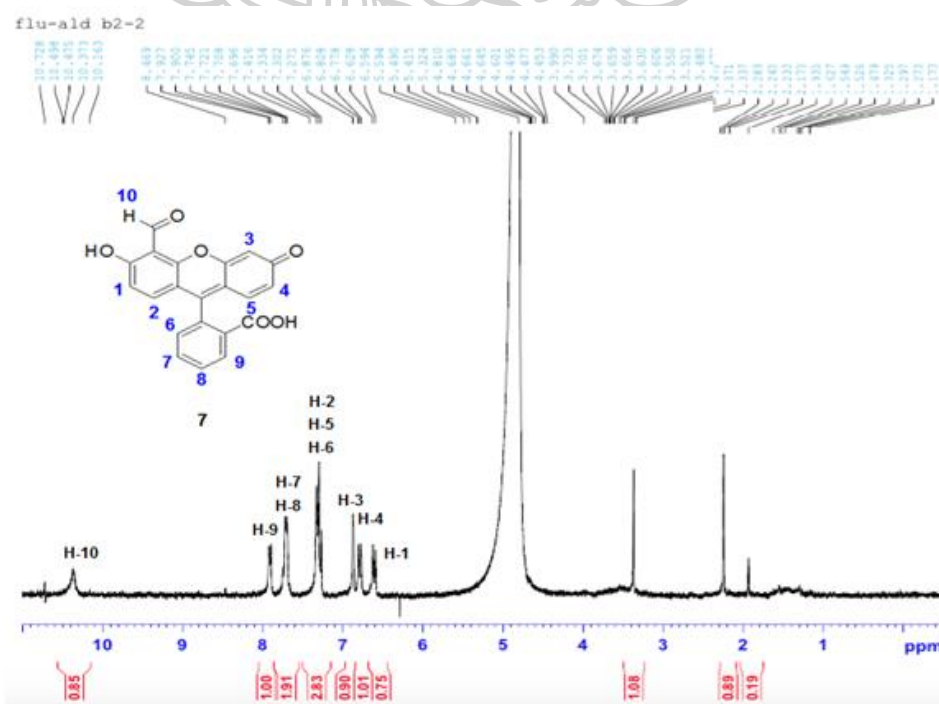
2.1 โครงสร้างของสารประกอบ fluorescein monoaldehyde (9)



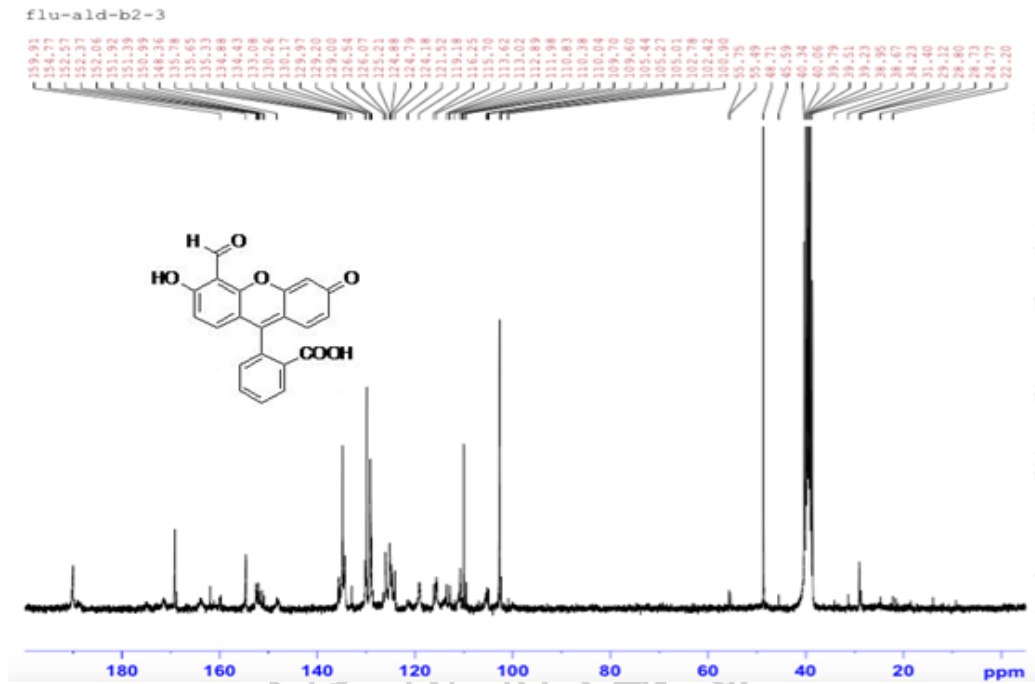
ภาพที่ 51 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบหมายเลข 9

จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบหมายเลข 9 โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปี สามารถยืนยันโครงสร้างได้ดังนี้

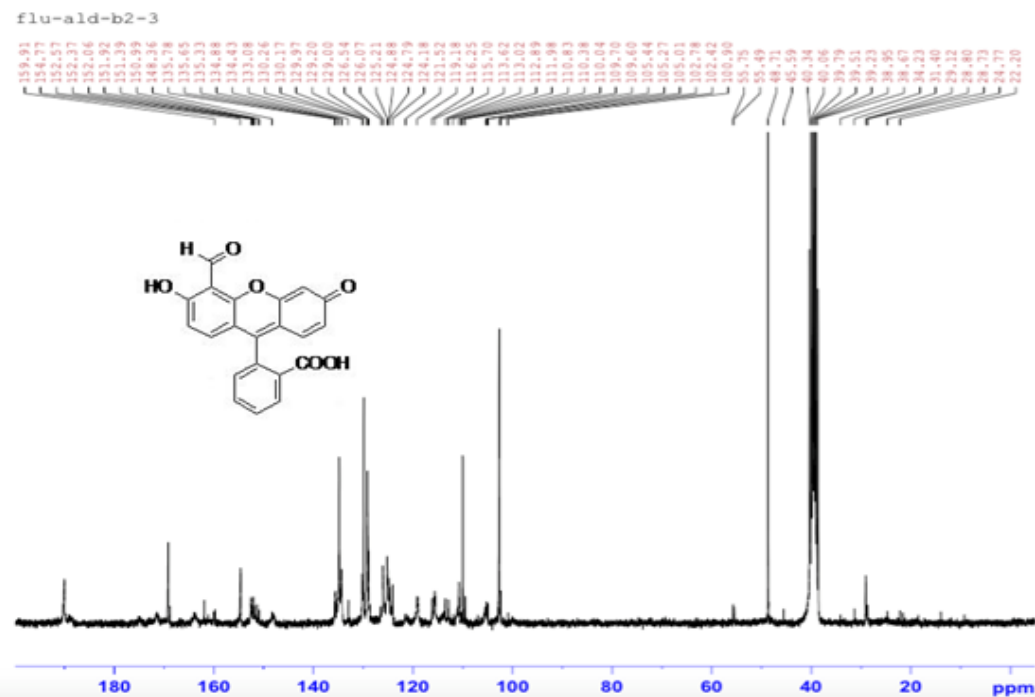
^1H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ 6.61(d, $J = 10.2$ Hz, 1H), 6.79(d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 6.88(s, 1H), 7.27-7.42(m, 3H), 7.70-7.74(m, 2H), 7.91(d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 10.48(s, 1H)ppm (ภาพที่ 52); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6): δ 103.1 (CH), 113.9.7 (C), 116.6 (C), 119.4 (C), 124.5 (CH), 125.2 (CH), 126.4 (CH), 129.1 (CH), 129.5 (CH), 130.6 (CH), 131.5 (CH), 136.0 (CH), 148.4 (C), 152.4 (C), 154.8 (C), 154.7 (C), 156.1(C), 159.9 (C), 162.0 (C), 170.1 (C=O), 188.7 (CHO) ppm(ภาพที่ 53-54); HRMS (ESI) จากการคำนวณ $\text{C}_{21}\text{H}_{12}\text{O}_6\text{Na}^+$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ 383.0532, จากการทดสอบ 383.0532. (ภาพที่ 55);



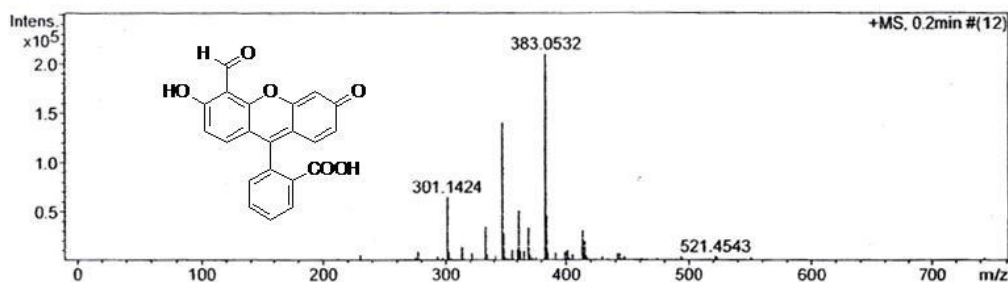
ภาพที่ 52 ^1H NMR สเปกตรัมของสารประกอบหมายเลข 9



ภาพที่ 53 ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารประกอบหมายเลข 9



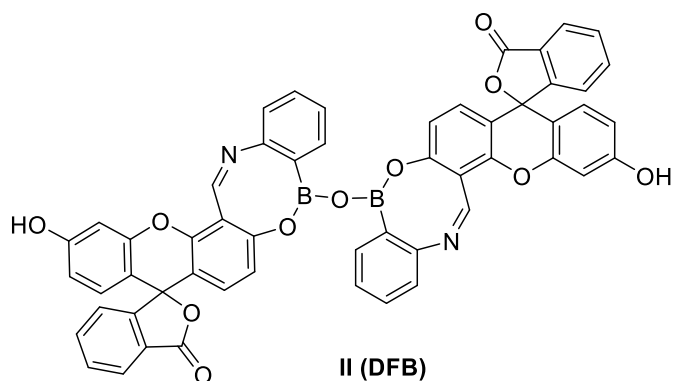
ภาพที่ 54 DEPT 135 NMR สเปกตรัมของสารประกอบหมายเลข 9



ภาพที่ 55 HR-ESI MS สเปกตรัมของสารประกอบหมายเลข 9

เมื่อพิจารณาโครงสร้างของสารประกอบหมายเลข 9 (ภาพที่ 51) และ ^1H NMR สเปกตรัมของสารประกอบหมายเลข 9 (ภาพที่ 52) แสดงให้เห็นสัญญาณของโปรตอน 7 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มแรกมีค่า chemical shift (δ) 6.61 ppm เกิดจากโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่ง 1 (H-1) มีลักษณะเป็น doublet เนื่องจากเกิด coupling กับโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่ง 2 (H-2) ถัดมาที่ δ 6.79 ppm เกิดจากโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่ง 4 (H-4) มีลักษณะเป็น doublet เนื่องจากเกิด coupling กับโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่ง 5 (H-5) ถัดมาที่ δ 6.88 ppm เกิดจากโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่ง 3 (H-3) มีลักษณะเป็น singlet เนื่องจากไม่เกิดการ coupling กับโปรตอนใดๆ ถัดมาที่ δ 7.2-7.42 ppm เกิดจากสามโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่ง 2, 5, 6 (H-2, 5, 6) มีลักษณะเป็น multiplet เนื่องจากมีสภาพแวดล้อมคล้ายกัน เกิด coupling กับโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่งใกล้เคียง ถัดมาที่ δ 7.70-7.74 ppm เกิดจากสองโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่ง 7,8 (H-7,8) มีลักษณะเป็น multiplet เนื่องจากเกิด coupling กับโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่ง 6 (H-6) และตำแหน่ง 9 (H-9) ถัดมาที่ δ 7.91 ppm เกิดจากโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่ง 9 (H-9) มีลักษณะเป็น doublet เนื่องจากเกิด coupling กับโปรตอนหนึ่งกลุ่มบนคาร์บอนตำแหน่ง 8 (H-8) ถัดมาที่ δ 10.48 ppm เกิดจากโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่ง 10 (H-10) บนหมู่ aldehyde มีลักษณะเป็น singlet เนื่องจากเกิดไม่ coupling กับโปรตอนใดเลย และทั้งนี้สามารถยืนยันโครงสร้างจาก HR-ESI MS โดยพบค่ามวลโมเลกุลเท่ากับ 383.0532 m/z (จากการคำนวณ $(\text{M}+\text{Na})^+$ ได้เท่ากับ 383.0532 m/z) (ภาพที่ 55)

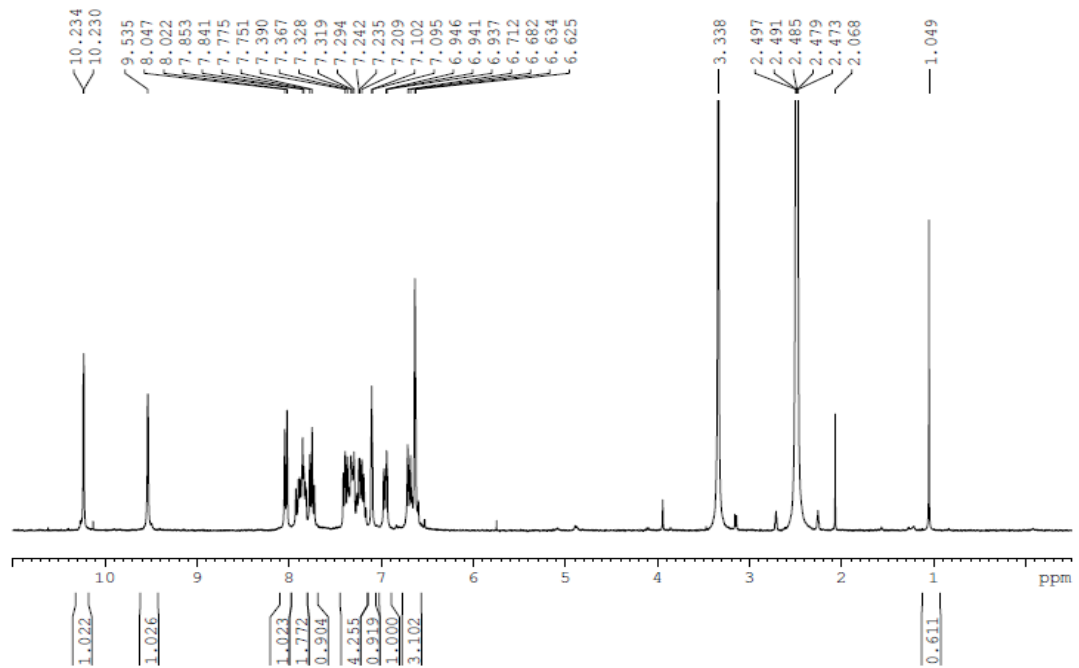
2.2 โครงสร้างของเซ็นเซอร์ II (DFB)



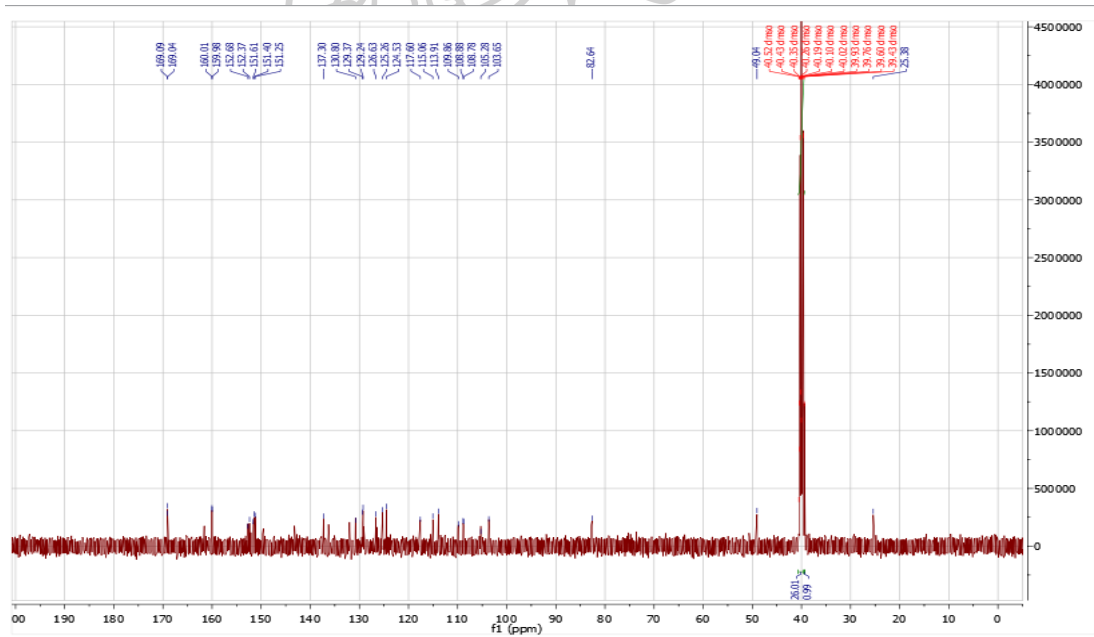
ภาพที่ 56 โครงสร้างทางเคมีของเซ็นเซอร์ II

จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของเซ็นเซอร์ II โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีสามารถยืนยันโครงสร้างได้ดังนี้

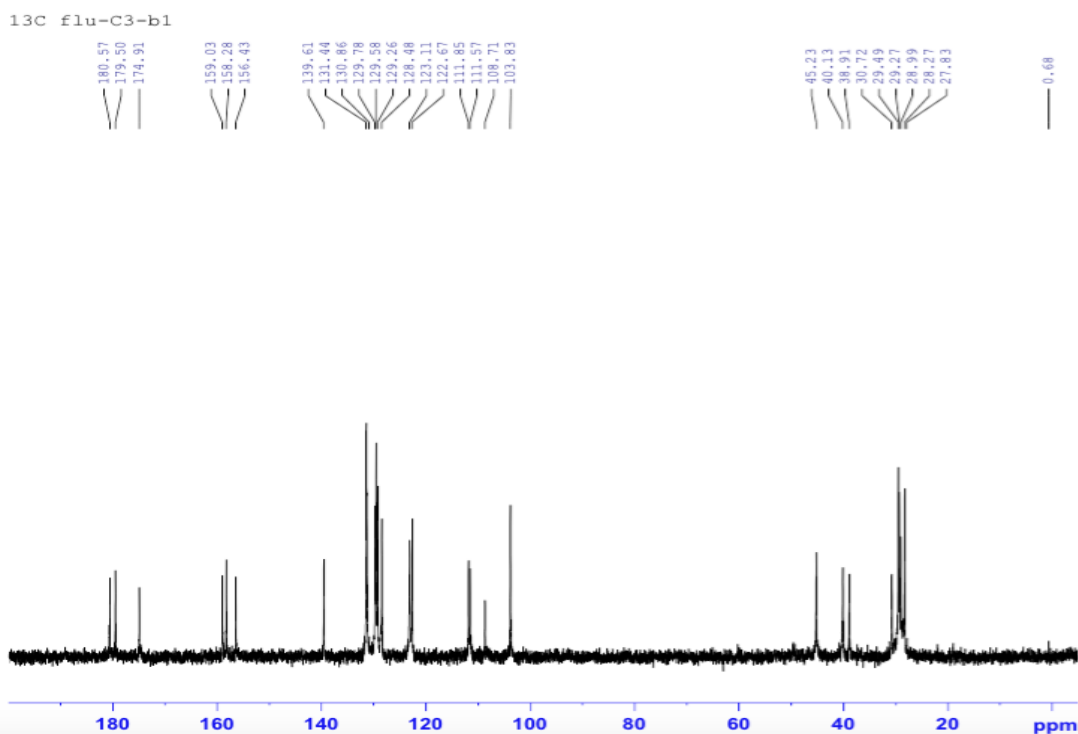
^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 6.62–6.71 (m, 3H), 6.93–6.97 (m, 1H), 7.09 (s, 1H), 7.19–7.41 (m, 4H), 7.76 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.84–7.90 (m, 2H) 8.03 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 9.53 (s, 1H), 10.23 (s, 1H), ppm (ภาพที่ 57); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): δ 49.0 (2C), 82.6 (2C), 103.6 (2CH), 105.3 (2C), 108.8 (2C), 108.9 (2C), 109.8 (2C), 113.9 (2C), 115.1 (2C), 117.6 (2CH), 124.5 (2CH), 125.3 (2C), 126.6 (2C), 129.2 (2CH), 129.4 (2CH), 130.8 (2CH), 136.5 (2C), 137.3 (2C), 151.2 (2CH), 151.40 (2C), 151.6 (2C), 152.4 (2C), 152.7 (2C), 159.9 (2C), 160.0 (2C), 162.5 (2C), 169.0 (C=O), 169.1 (C=O) ppm (ภาพที่ 58-59); HRMS (ESI) จากการคำนวณ $\text{C}_{54}\text{H}_{30}\text{B}_2\text{N}_2\text{O}_{11}\text{Na}^+$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ 927.1928 m/z, จากการทดสอบ 927.1938 m/z. (ภาพที่ 60)



ภาพที่ 57 ^1H NMR สเปกตรัมของเซ็นเซอร์ II



ภาพที่ 58 ^{13}C NMR สเปกตรัมของเซ็นเซอร์ II

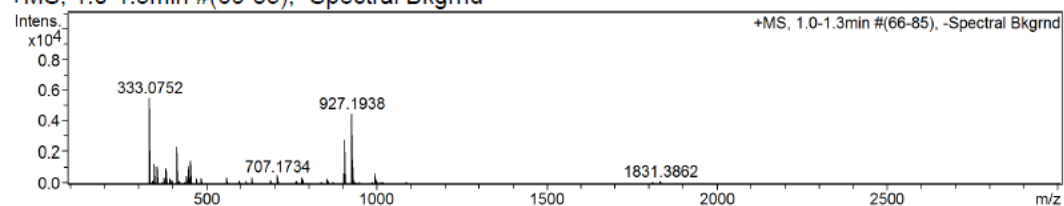


ภาพที่ 59 ¹³C DEPT135 NMR สเปกตรัมของเซ็นเซอร์ II

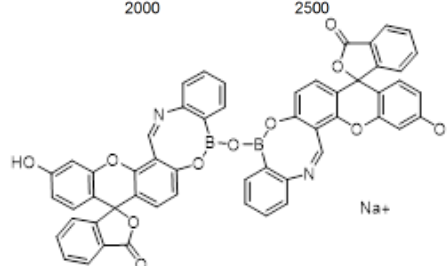
Confirmation of Expected Formula

Sample-ID	yt604_flu-ald-BANH2	Submitter	yt604 Yordkhuan Tachapermporn
Analysis Name	yt604_flu-ald-BANH2_358213_87_01_64561.d	Supervisor	- Tony James
Method used	Confirm Formula Positive 50to1500 loop inj.m	Acquisition Date	07/08/2018 09:54:32
Ionisation Mode	positive electrospray (ESI)		

+MS, 1.0-1.3min #(66-85), -Spectral Bkgnd



#	m/z	I	I%	Area	S/N
1	333.0752	5489	100.0	179	5704.6
2	347.0910	1297	23.6	39	1233.1
3	355.0594	1085	19.8	23	984.3
4	413.2843	2314	42.2	39	1925.9
5	414.2722	1294	23.6	17	1080.3
6	447.3468	1090	19.9	37	1010.8
7	452.1133	1492	27.2	48	1406.0
8	905.2141	2788	50.8	226	1856.7
9	927.1938	4472	81.5	410	2768.6
10	928.1996	1574	28.7	114	971.4



Chemical Formula: C₅₄H₃₀B₂N₂NaO₁₁⁺
Exact Mass: 927.1928

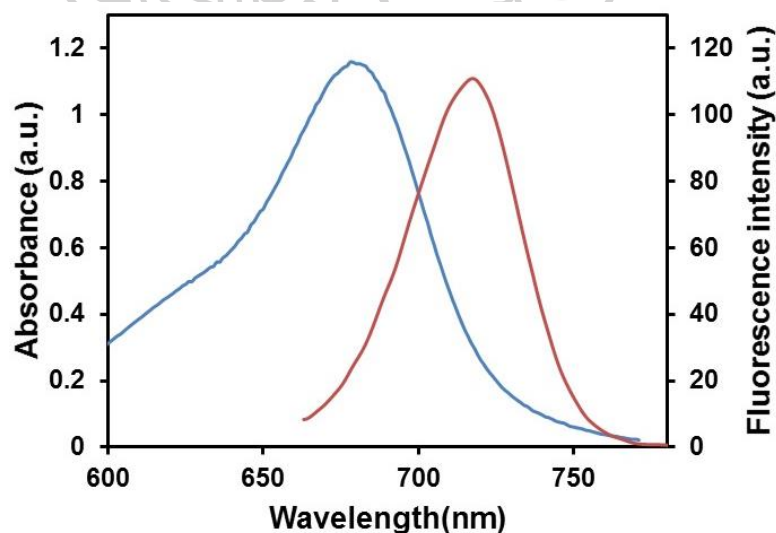
ภาพที่ 60 HR-ESI MS สเปกตรัมของเซ็นเซอร์ II

3. การทดสอบความสามารถในการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ และความสามารถในการดักจับไอออนทองแดงเทียบกับไอออนรบกวนอื่นๆ ของเซ็นเซอร์ aza-BDP-DPA (I)

เมื่อยืนยันโครงสร้างของเซ็นเซอร์ I ที่สังเคราะห์ได้ จากนั้นนำมาศึกษาสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในสารละลายผสมของตัวทำละลายอินทรีย์และน้ำ เพื่อศึกษาความสามารถในการดักจับไอออนทองแดง เปรียบเทียบกับไอออนรบกวนอื่นๆ ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรสโกปี และศึกษาความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) และความจำเพาะเจาะจงกับไอออนทองแดง (selectivity) ของเซ็นเซอร์ I เทียบกับไอออนของโลหะทรานซิชัน ไอออนของโลหะอัลคาไลน์ และไอออนของโลหะอัลคาไลน์เอิร์ท ซึ่งเตรียมจากไอออนโลหะของเกลืออะซิเตตแต่ละชนิดละลายในน้ำที่ปราศจากไอออน (DI water) โดยตรวจวัดจากเครื่อง Perkin Elmer Luminescence Spectrometer LS-55 ทำการติดตามสเปกตรัมของการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence emission spectra) ในช่วง 660-800 nm เมื่อกำหนด λ_{ex} เท่ากับ 650 nm

3.1 การทดสอบความสามารถในการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตและการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ของเซ็นเซอร์ I

ผลการทดสอบสมบัติในการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต และการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ I ก่อนเติมไอออนทองแดง ในสารละลายผสมระหว่าง 5mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4) : acetonitrile (95:5 v/v) ผสม 0.5% triton X 100 แสดงผลดังภาพที่ 61

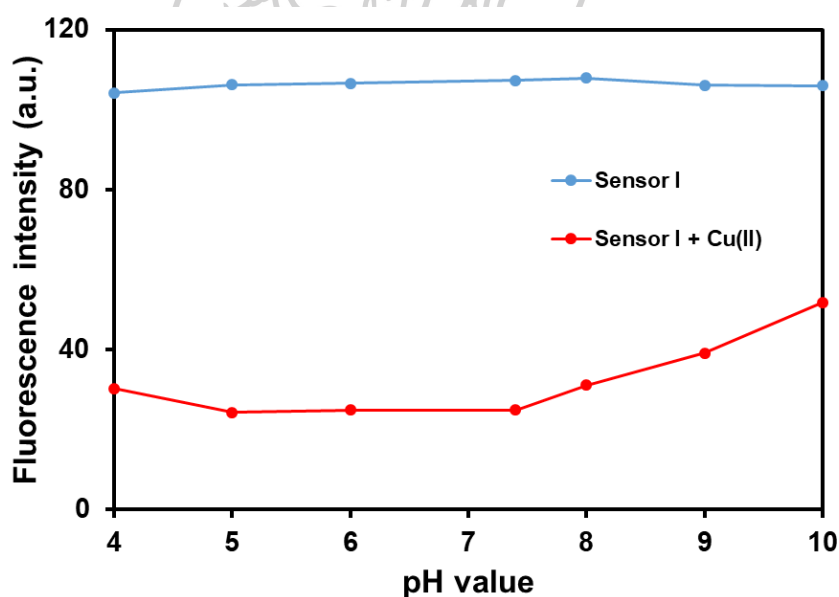


ภาพที่ 61 การดูดกลืนแสง UV-Vis (สีน้ำเงิน) และการคายแสง (สีแดง) ของเซ็นเซอร์ I (5.0 μ M) ในสารละลายผสมระหว่าง 5mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4) : acetonitrile (95:5 v/v) ผสม 0.5% triton X 100 ในสภาวะก่อนเติมไอออนทองแดง

จากผลการทดลองพบว่า เซ็นเซอร์ I มีการดูดกลืนและคายแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงสุดที่ความยาวคลื่น 680 nm และคายแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงสุดที่ความยาว 717 nm ซึ่งเป็นความยาวคลื่นในช่วงใกล้อินฟราเรด (near infrared) จึงมีประโยชน์อย่างมากในการนำมาประยุกต์ใช้ในการทำเครื่องมือวิเคราะห์ที่ราคาไม่แพง และยังสามารถนำมาทดสอบระบบเซลล์สิ่งมีชีวิตได้อีกด้วย เนื่องจากความยาวคลื่นในช่วงใกล้อินฟราเรด (near infrared) เป็นคลื่นที่มีพลังงานต่ำ ไม่ทำลายเซลล์สิ่งมีชีวิต

3.2 ผลการทดสอบผลกระทบของค่า pH ในสารละลายต่อการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของ เซ็นเซอร์ I

เนื่องจากในงานวิจัยนี้ต้องการนำเซ็นเซอร์ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดปริมาณไอออนทองแดงที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมและระบบชีวภาพ จึงนำมาสู่การศึกษาผลกระทบของค่า pH ในระบบต่อการเรืองแสงของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ก่อนเติมไอออนทองแดง และหลังเติมไอออนทองแดง ลงในสารละลาย เซ็นเซอร์ I ($5.0 \mu\text{M}$) ในสารละลายที่ค่า pH ต่างๆ ได้ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 62

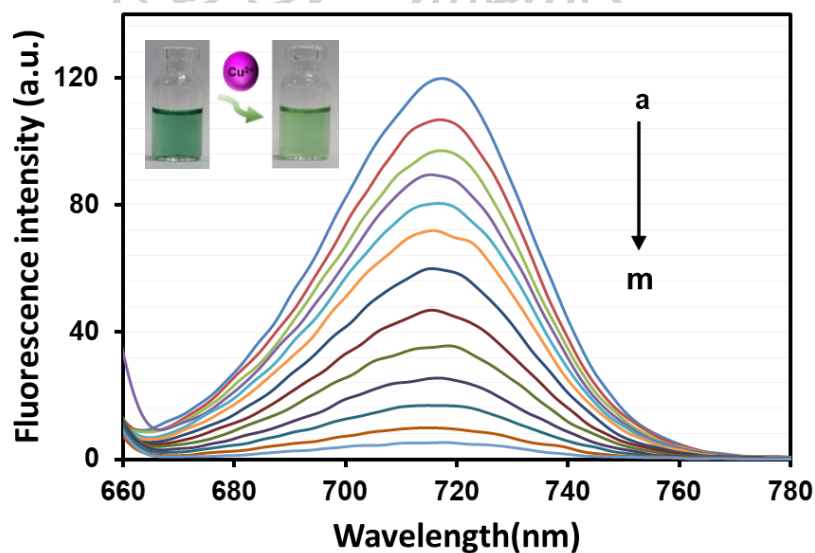


ภาพที่ 62 การเปลี่ยนแปลงสัญญาณเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ และ $\lambda_{\text{em}} = 560 \text{ nm}$) ของเซ็นเซอร์ I ($5.0 \mu\text{M}$) ในสารละลายผสมระหว่าง 5mM phosphate buffered saline (PBS) ที่ค่า pH ต่างๆ : acetonitrile (95:5 v/v) ผสม 0.5% triton X 100

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าค่า pH มีผลต่อการลดลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ โดยพบว่าในขณะที่ก่อนเติมไอออนทองแดง ที่ pH เท่ากับ 4-10 ให้ค่าการคายแสงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เกือบคงที่ และในขณะที่หลังเติมไอออนทองแดง ที่ pH เท่ากับ 5-7.4 จะมีการลดลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่มากที่สุดและคงที่ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกทดสอบสมบัติการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ I ในสารละลายผสมระหว่าง 5mM phosphate buffered saline (PBS): acetonitrile (95:5 v/v) ผสม 0.5% triton X 100 ที่ค่า pH เท่ากับ 7.4

3.3 ผลการทดสอบสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนทองแดง ของเซ็นเซอร์ I

การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ I ศึกษาโดยเตรียมสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์เข้มข้น 5.0 μM ในสารละลายผสมระหว่าง 5mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4) : acetonitrile (95:5 v/v) ผสม 0.5% triton X 100 ใช้ไอออนทองแดงในรูปของเกลือทองแดงอะซิเตต และกำหนดค่าความยาวคลื่นกระตุ้น (excitation wavelength: λ_{ex}) เท่ากับ 650 nm เพื่อติดตามสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ ผลการทดลองแสดงดังในภาพที่ 63



ภาพที่ 63 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{\text{ex}} = 650 \text{ nm}$ และ $\lambda_{\text{em}} = 717 \text{ nm}$) ของเซ็นเซอร์ I (5.0 μM) ในสารละลายผสมระหว่าง 5mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4) : acetonitrile (95:5 v/v) ผสม 0.5% triton X 100 ก่อนและหลังเติมไอออนทองแดงอะซิเตตที่ความเข้มข้นต่างๆ a: 0 M, b: 0.33 μM , c: 0.67 μM , d: 1.0 μM , e: 1.33 μM , f: 1.67 μM , g: 2.33 μM , h: 3 μM , i: 3.67 μM , j: 4.33 μM , k: 5.0 μM , l: 5.67 μM , m: 6.33 μM .

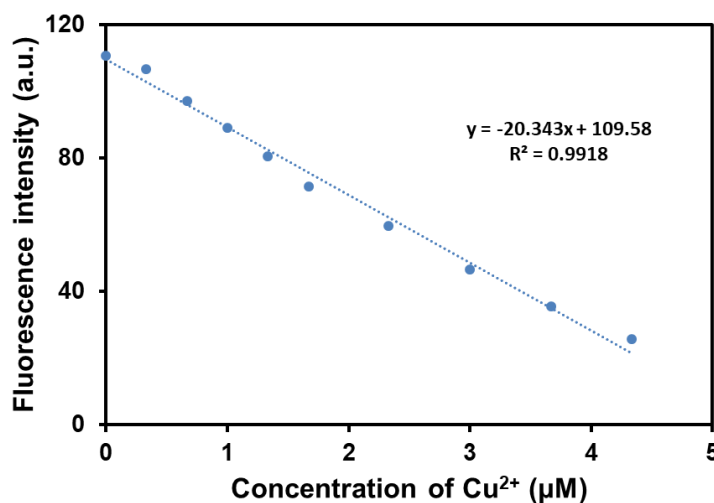
จากผลการทดลองพบว่าในสถานะที่ไม่มีไอออนทองแดง ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ I คายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในช่วงความยาวคลื่น 660-780 nm โดยมีความยาวคลื่นของการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงสุด (λ_{em}) เท่ากับ 717 nm เมื่อเติมไอออนทองแดงอะซิเตดลงในสารละลาย ทำให้การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ I มีค่าลดลง (มี λ_{em} ณ ความยาวคลื่นเดิม) ในลักษณะแปรผกผันกับปริมาณไอออนทองแดงที่เพิ่มขึ้น (ระบบ ON-OFF fluorescence signal) และพบว่าในสถานะที่ไม่มีไอออนทองแดง เซ็นเซอร์ I มีการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ เนื่องจากอะตอมไนโตรเจนของ di-2-picolylamine สามารถเกิดการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนให้กับอนุพันธ์ aza BODIPY ผ่านกระบวนการ ICT ส่งผลให้มีการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ภายหลังจากเติมไอออนทองแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าเซ็นเซอร์จะแสดงสัญญาณคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ลดลง ในช่วงความยาวคลื่น 660-800 nm และลดลงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณไอออนทองแดงที่เพิ่มขึ้นในสารละลาย ทั้งนี้เนื่องจากในสถานะที่เซ็นเซอร์ I มีการดักจับกับไอออนทองแดงเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนแล้วส่งผลให้กระบวนการ ICT ถูกยับยั้ง

3.4 ค่าความสามารถต่ำสุดของการตรวจจับไอออนทองแดง (detection limit)

การคำนวณค่าความสามารถต่ำสุดของการตรวจจับไอออนทองแดง (detection limit) กระทำโดยสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของทองแดงที่เติมลงไป (แกน x) กับ ความต่างของความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่จุดเริ่มต้นลบจุดใดๆ (แกน y) โดยข้อมูลต่างๆ แสดงดังกราฟแสดงดังภาพที่ 64

ตารางที่ 5 ข้อมูลค่าความเข้มข้นของไอออนทองแดงที่เติมลงไป (μM), และ ความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์, λ_{ex} เท่ากับ 717 nm

[Cu ²⁺] (μM)	0.33	0.67	1.00	1.33	1.67	2.33	3.00
I ₀ -I (a.u.)	3.99	13.72	21.66	30.31	39.19	51.08	64.27



ภาพที่ 64 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไอออนทองแดงที่เติมลงกับความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ I ที่จุดใดๆ

การคำนวณ

จากกราฟได้สมการเส้นตรงคือ $y = -20.343x + 109.58$; $R^2 = 0.9918$

จากนั้นนำค่าความชัน และค่าจุดตัดแกน y ที่ได้จากสมการมาคำนวณหาค่าความสามารถต่ำสุดในการ

$$\text{DL} = \frac{(\text{Blank} - 3SD) - c}{m}$$

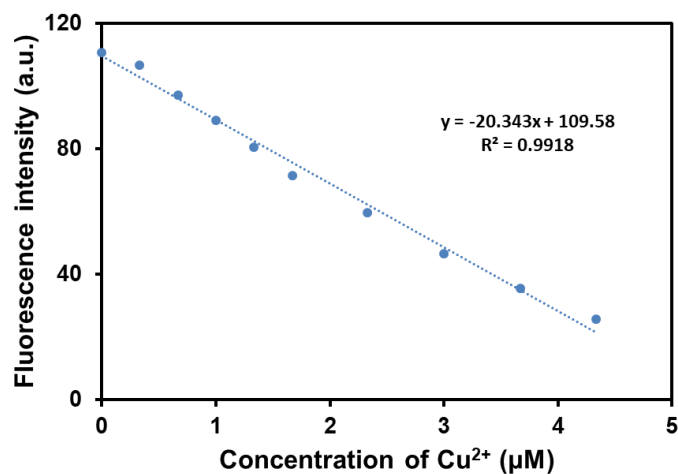
$$\text{DL} = \frac{(112.05 - 3(0.8234)) + 109.58}{-20.343}$$

$$\text{DL} = 0.205 \mu\text{M} \text{ (13 ppb)}$$

ดังนั้นจากการทดลองพบว่าค่า detection limit ในการตรวจจับไอออนทองแดงอะซีเตตของเซ็นเซอร์ I เท่ากับ $0.205 \mu\text{M}$ หรือ 13 ppb ซึ่งมีค่าต่ำกว่าค่ามาตรฐานของปริมาณไอออนทองแดงในน้ำดื่ม ซึ่งกำหนดโดย US Environmental Protection Agency (U.S. EPA) และ World Health Organization (WHO) มีค่าเท่ากับ 1.3 และ 2.0 ppm ตามลำดับ [80]

3.5 การหาช่วงความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรง (linear range)

Linear range คือ ช่วงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์และความเข้มข้นของไอออนทองแดง ที่มีลักษณะเป็นเส้นตรง ซึ่งถือเป็นช่วงการใช้งาน (working range) สามารถหาโดยพลอตกราฟระหว่างความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ (แกน y) และความเข้มข้นของไอออนทองแดงที่เติมลงในสารละลาย (แกน x) กราฟแสดงดังภาพที่ 65

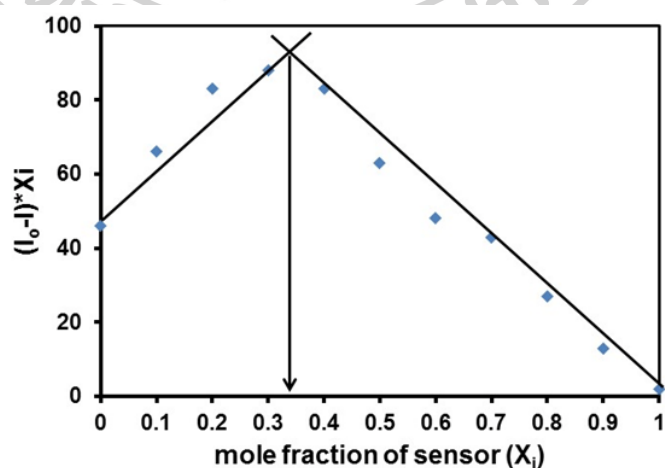


ภาพที่ 65 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ I (5.0 µM) หลังเติมไอออนทองแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ

จากภาพที่ 65 จะเห็นกราฟแสดงความสัมพันธ์มีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.2 µM ถึง 4.5 µM โดยมีค่า $R^2 = 0.9918$ ซึ่งใกล้เคียง 1 มาก ดังนั้น ช่วงความเข้มข้นดังกล่าวจึงเป็นช่วงที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ตรวจวัดไอออนทองแดงได้

3.6 อัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนและค่าคงที่สมดุลของการเกิดไอออนเชิงซ้อน

การทดลองเพื่อหาอัตราส่วนระหว่างโมเลกุลของเซ็นเซอร์ I กับไอออนทองแดง ที่ใช้ในการเกิด binding ศึกษาโดยวิธี Job's plot ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 66



ภาพที่ 66 กราฟแสดงอัตราส่วนระหว่างโมเลกุลเซ็นเซอร์ I กับไอออนทองแดงที่ใช้ในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนศึกษาโดยวิธี Job's plot

จากผล Job's plot แสดงให้เห็นว่า กราฟตัดกันที่อัตราส่วนโดยโมลของเซ็นเซอร์ I ที่ค่าประมาณ 0.33 นั้นแสดงว่า โมเลกุลของ I สามารถดักจับไอออนทองแดงได้ 2 โมเลกุล (I:Cu²⁺ = 1:2) จากนั้นทำการศึกษาความสามารถในการดักจับของเซ็นเซอร์ I กับไอออนทองแดงสามารถบอกได้ด้วยค่าคงที่สมดุลของการเกิดไอออนเชิงซ้อน (association constant; K_{assoc}) ซึ่งคำนวณได้จากสมการ Benesi-Hildebrand [79] ตามสมการที่ (1)

$$\frac{1}{(A - A_0)} = \frac{1}{K_{assoc} (A_{max} - A_0) [Mn^{2+}]^n} + \frac{1}{A_{max} - A_0} \quad (1)$$

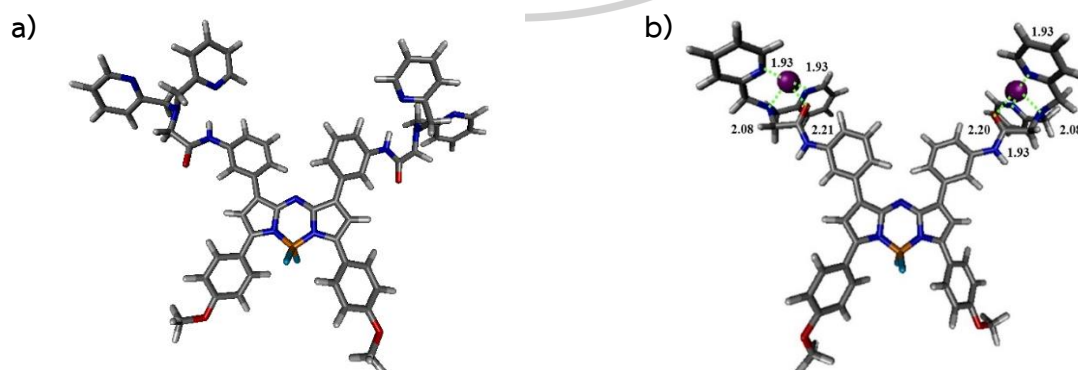
และสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า $1/[Cu^{2+}]^n$ (แกน x) กับ $1/(A - A_0)$ ที่จุดใดๆ (แกน y) แสดงดังภาพที่ 66 และสามารถหาค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออนทองแดงได้จากความชันของกราฟที่สร้างขึ้น ดังนี้

$$\text{slope} = \frac{1}{K_{assoc} (A_{max} - A_0)}$$

$$K_{assoc} = \frac{1}{\text{slope}(A_{max} - A_0)}$$

โดยจากการพลอตกราฟพบว่า เมื่อแทนค่า $n = 2$ ในสมการทำให้ได้สมการที่มีความเป็นเส้นตรงสูงสุด ซึ่งตรงกับผลการศึกษาด้วยวิธี Job's plot และสามารถคำนวณค่า K_{assoc} ได้เท่ากับ $3.2 \times 10^{11} \text{ M}^{-2}$

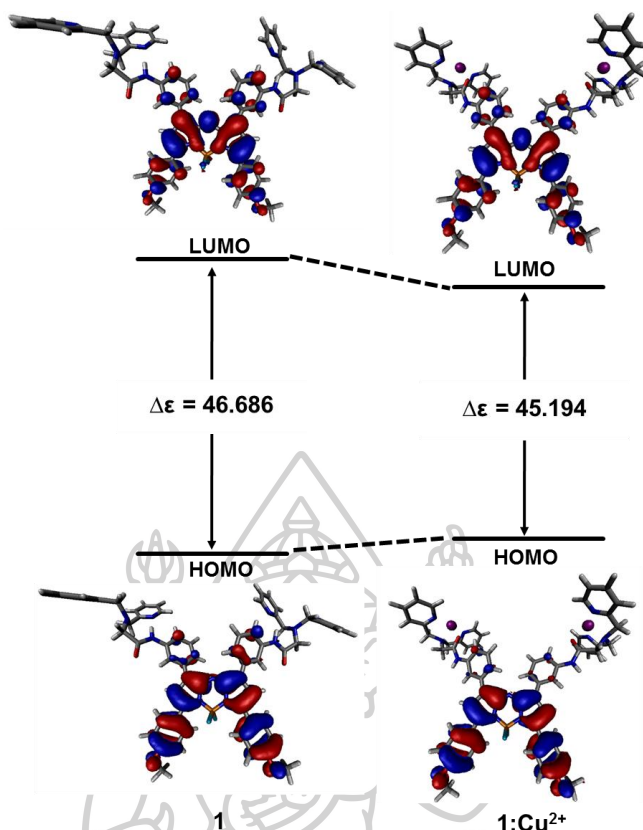
3.7 ผลการทำนายการเปลี่ยนแปลงของเซ็นเซอร์ I ก่อนและหลังการจับไอออนทองแดง โดยการคำนวณทาง Molecular modeling



ภาพที่ 67 แสดงลักษณะโครงสร้างด้วยเทคนิค Molecular modeling ของ a) เซ็นเซอร์ I และ b) เซ็นเซอร์ I:Cu²⁺ อัตราส่วน 1:2

นอกจากนี้ยังมีการคำนวณโดยอาศัยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่เรียกว่า Gaussian 09 [81] โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ตามโปรแกรมพื้นฐานของ B3LYP/6-311G** เข้ามาช่วยในการจัดเรียงโครงสร้างของสารประกอบ ในสถานะที่มีและไม่มีไอออนทองแดง โดยจัดเรียงให้มีโครงสร้างที่มีความเสถียรและมีพลังงานต่ำที่สุด โดยโครงสร้างของเซ็นเซอร์ I อีสระ และสารประกอบเชิงซ้อนของ I:Cu²⁺ แสดงดังภาพที่ 67 พบว่าในสถานะที่มีไอออนทองแดง ในสารละลายที่เกิดจากการคำนวณทางโปรแกรมคอมพิวเตอร์ จะเห็นว่ามีการโคออร์ดิเนตของอะตอมทองแดง ณ ตำแหน่งของอะตอมของไนโตรเจน (N) และอะตอมออกซิเจน (O) ด้วยกระบวนการ electrostatic interactions โดยไอออนทองแดงอะตอมแรก (อะตอมซ้าย) จะเกิดโคออร์ดิเนตกับอะตอมของไนโตรเจน (N) 3 อะตอม และอะตอมออกซิเจน (O) 1 อะตอม ด้วยระยะทางเท่ากับ 1.93, 1.93, 2.08 Å และ 2.21 Å ตามลำดับ ในขณะที่ไอออนทองแดงอะตอมที่สอง (อะตอมขวา) จะเกิดโคออร์ดิเนตกับอะตอมของไนโตรเจน (N) 3 อะตอม และอะตอมออกซิเจน (O) 1 อะตอม ด้วยระยะทางเท่ากับ 1.93, 1.93, 2.08 Å และ 2.20 Å ตามลำดับ โดยที่ค่าความต่างกันของระดับพลังงานต่ำที่สุดที่คำนวณทางโปรแกรมทางคอมพิวเตอร์ของเซ็นเซอร์ I:Cu²⁺ เทียบกับเซ็นเซอร์ I มีค่าเท่ากับ -211.65 kcal/mol

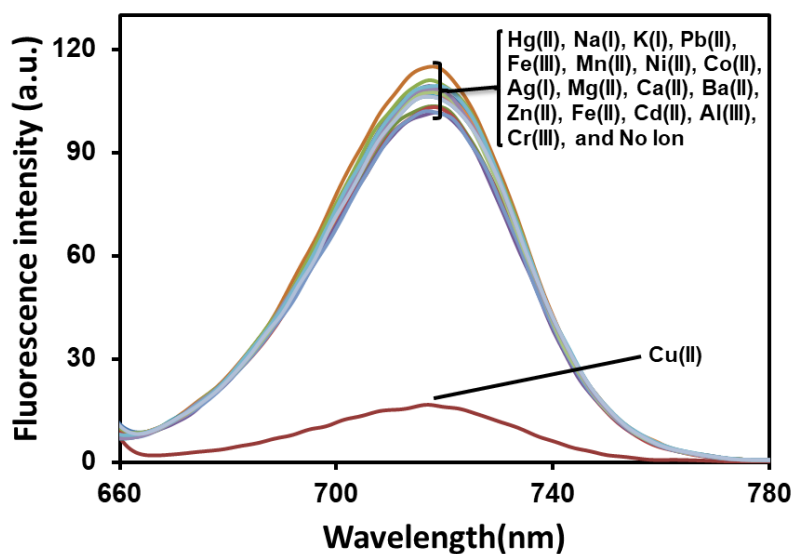
จะเห็นว่าพลังงานลดลงอย่างมากในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน แสดงว่า โมเลกุลของ I:Cu²⁺ มีความเสถียรมากกว่าโมเลกุล I อีสระ นอกจากนี้สามารถช่วยยืนยันได้ว่าเซ็นเซอร์ I สามารถดักจับไอออนทองแดงได้ในอัตราส่วน 1:2 ซึ่งตรงตามผลการศึกษาด้วยเทคนิค Job's plot และในการคำนวณค่าคงที่สมดุลของการเกิดไอออนเชิงซ้อน, K_{assoc} อีกทั้งยังสามารถคำนวณหาค่าความต่างของพลังงาน HOMO-LUMO ได้อีกด้วย โดยพบว่าเมื่อเซ็นเซอร์เกิดการดักจับกับไอออนทองแดง ส่งผลให้ energy gap มีค่าต่ำลง ดังแสดงในภาพที่ 68



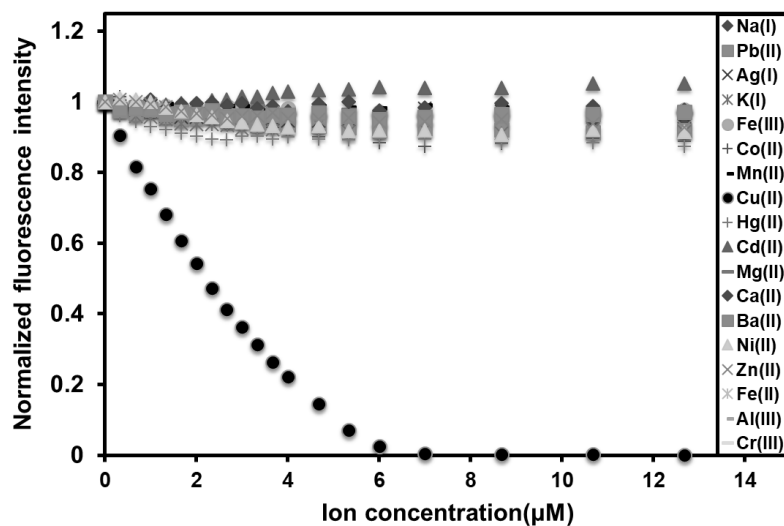
ภาพที่ 68 แสดงค่าความแตกต่างของพลังงาน HOMO-LUMO (energy gaps) ด้วยเทคนิค Molecular modeling ของเซ็นเซอร์ 1 และ เซ็นเซอร์ 1:Cu²⁺ อัตราส่วน 1:2

3.8 ผลการทดสอบสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ 1 ในสถานะที่มีไอออนทองแดงเทียบกับไอออนรบกวนอื่นๆ

การทดสอบการคายแสงของเซ็นเซอร์ 1 ในสารละลายผสมระหว่าง 5mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4) : acetonitrile (95:5 v/v) ผสม 0.5% triton X 100 ในสถานะที่มีไอออนทองแดง (Cu²⁺) ในรูปของเกลืออะซิเตต เปรียบเทียบกับในสถานะที่มีไอออนรบกวนชนิดต่างๆ ได้แก่ ไอออนปรอท (Hg²⁺) ไอออนโซเดียม (Na⁺) ไอออนโพแทสเซียม (K⁺) ไอออนตะกั่ว (Pb²⁺) ไอออนเหล็ก (Fe³⁺) ไอออนแมงกานีส (Mn²⁺) ไอออนแคดเมียม (Cd²⁺) ไอออนนิกเกิล (Ni²⁺) ไอออนโคบอลต์ (Co²⁺) ไอออนเงิน (Ag⁺) ไอออนแมกนีเซียม (Mg²⁺) ไอออนแคลเซียม (Ca²⁺) ไอออนแบเรียม (Ba²⁺) และไอออนสังกะสี (Zn²⁺) ไอออนเหล็ก (Fe²⁺) ไอออนอลูมิเนียม (Al³⁺) และไอออนโครเมียม (Cr³⁺) แสดงผลดังในภาพที่ 69 และ 70



ภาพที่ 69 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ I (5.0 μM) ในสารละลายผสมระหว่าง 5mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4) : acetonitrile (95:5 v/v) ผสม 0.5% triton X 100 ในสภาวะที่มีไอออนต่างๆ ได้แก่ Cu^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Ag^+ , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Na^+ , Ni^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Al^{3+} และ Cr^{3+} (5.0 μM)

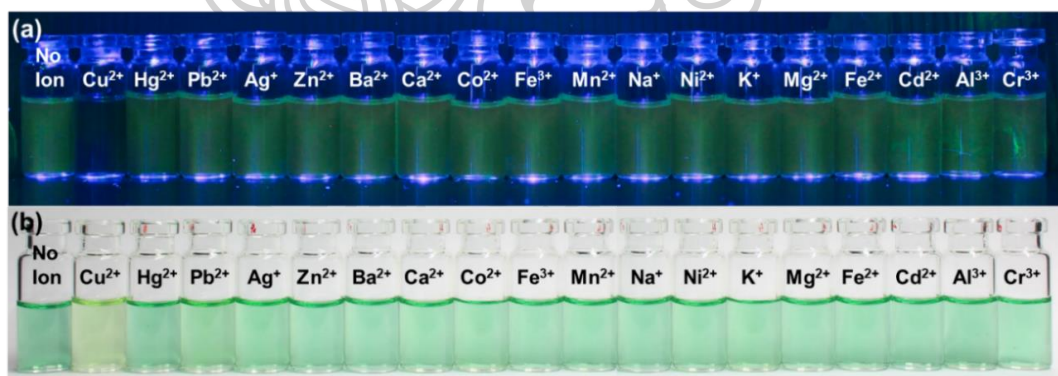


ภาพที่ 70 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{\text{ex}} = 650 \text{ nm}$ และ $\lambda_{\text{em}} = 717 \text{ nm}$) ของเซ็นเซอร์ I (5.0 μM) ในสารละลายผสมระหว่าง 5mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4) : acetonitrile (95:5 v/v) ผสม 0.5% triton X 100 ในสภาวะที่มีไอออนโลหะของเกลืออะซิเตตชนิดต่างๆ ในปริมาณที่ต่างกัน

จากภาพที่ 70 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า normalized fluorescence intensity (แกน y) ของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 717 nm และความเข้มข้นของไอออนชนิดต่างๆ (แกน x) พบว่าเซ็นเซอร์ I มีความจำเพาะเจาะจงสูงกับไอออนทองแดง โดยเมื่อความเข้มข้นของไอออนทองแดงเพิ่มมากขึ้น ค่า normalized fluorescence intensity มีแนวโน้มลดลงอย่างชัดเจนและคงที่ในที่สุด ในขณะที่หลังเติมไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ได้แก่ ไอออนปรอท (Hg^{2+}) ไอออนโซเดียม (Na^+) ไอออนโพแทสเซียม (K^+) ไอออนตะกั่ว (Pb^{2+}) ไอออนเหล็ก (Fe^{3+}) ไอออนแมงกานีส (Mn^{2+}) ไอออนแคดเมียม (Cd^{2+}) ไอออนนิกเกิล (Ni^{2+}) ไอออนโคบอลต์ (Co^{2+}) ไอออนเงิน (Ag^+) ไอออนแมกนีเซียม (Mg^{2+}) ไอออนแคลเซียม (Ca^{2+}) ไอออนแบเรียม (Ba^{2+}) และไอออนสังกะสี (Zn^{2+}) ไอออนเหล็ก (Fe^{2+}) ไอออนอลูมิเนียม (Al^{3+}) และไอออนโครเมียม (Cr^{3+}) ในความเข้มข้นเดียวกันกับไอออนทองแดง ไม่แสดงการเปลี่ยนแปลงการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ หรือมีการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณน้อยมาก

จะเห็นว่าเฉพาะไอออนทองแดงเท่านั้นที่มีการแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ต่ำสุด ในขณะที่ไอออนชนิดอื่นไม่มีการแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ จากผลการทดลองทั้งหมดนี้สามารถสรุปได้ว่าเซ็นเซอร์ I มีความจำเพาะเจาะจงสูงในการตรวจจับไอออนทองแดงเมื่อเทียบกับไอออนชนิดอื่นๆ

3.9 ภาพถ่ายของสารละลายเซ็นเซอร์ I ภายใต้แสงปกติและแสง UV ในภาวะที่มีไอออนทองแดง เปรียบเทียบกับไอออนรบกวนอื่นๆ



ภาพที่ 71 ภาพถ่ายของสารละลายเซ็นเซอร์ I ($24 \mu\text{M}$) ภายใต้แสง UV (a) และแสงปกติ (b) ในภาวะที่ไม่มีและมไอออน Cu^{2+} และไอออนรบกวนต่างๆ ดังนี้ Hg^{2+} , Pb^{2+} , Ag^+ , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Na^+ , Ni^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Al^{3+} และ Cr^{3+} ($40 \mu\text{M}$)

จากภาพถ่ายภายใต้แสงปกติ และแสง UV แสดงให้เห็นว่าเซ็นเซอร์ I มีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนทองแดงเมื่อเทียบกับไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ โดยในสภาวะที่มีไอออนทองแดง จะมีการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ I และสามารถมองด้วยตาเปล่าเป็นสีเขียวภายใต้แสงปกติ และแสง UV (ภาพที่ 71) ในขณะที่เมื่อมีการเติมไอออนชนิดอื่นได้แก่ Hg^{2+} , Pb^{2+} , Ag^+ , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Na^+ , Ni^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Al^{3+} และ Cr^{3+} ลงในสารละลายเซ็นเซอร์ I เมื่อมองด้วยตาเปล่าจะไม่มีมีการเปลี่ยนแปลงทั้งภายใต้แสงปกติ และแสง UV ซึ่งความสามารถในการเปลี่ยนสีของเซ็นเซอร์ภายใต้แสง UV จากสีเขียวเข้มเป็นสีเขียวเหลืองในสภาวะที่มีไอออนทองแดงนั้นมีประโยชน์อย่างมากในการตรวจสอบหาไอออนทองแดงในสารตัวอย่างได้ในเบื้องต้น

3.10 ผลการทดสอบสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ I ในสภาวะที่มีไอออนทองแดงร่วมกับไอออนรบกวนอื่นๆ

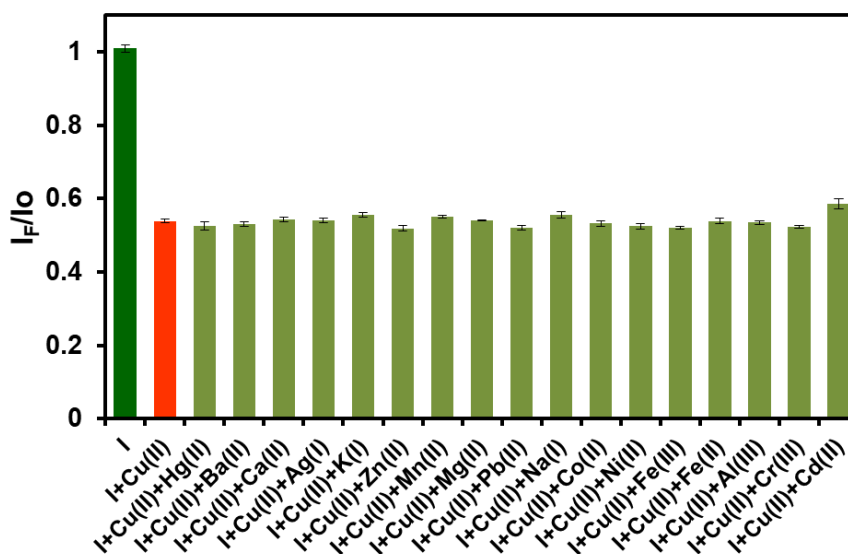
การทดสอบสมบัติการคายแสงของเซ็นเซอร์ I ในสารละลายผสมระหว่าง 5mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4) : acetonitrile (95:5 v/v) ผสม 0.5% triton X 100 ในสภาวะที่มีไอออนทองแดงร่วมกับไอออนรบกวนอื่นๆ ได้แก่ ไอออนปรอท (Hg^{2+}) ไอออนโซเดียม (Na^+) ไอออนโพแทสเซียม (K^+) ไอออนตะกั่ว (Pb^{2+}) ไอออนเหล็ก (Fe^{3+}) ไอออนแมงกานีส (Mn^{2+}) ไอออนแคดเมียม (Cd^{2+}) ไอออนนิกเกิล (Ni^{2+}) ไอออนโคบอลต์ (Co^{2+}) ไอออนเงิน (Ag^+) ไอออนแมกนีเซียม (Mg^{2+}) ไอออนแคลเซียม (Ca^{2+}) ไอออนแบเรียม (Ba^{2+}) และไอออนสังกะสี (Zn^{2+}) ไอออนเหล็ก (Fe^{2+}) ไอออนอลูมิเนียม (Al^{3+}) และไอออนโครเมียม (Cr^{3+}) โดยในสารละลายมีปริมาณไอออนรบกวนมากกว่าไอออนทองแดง 1 เท่า และ 10 เท่า

โดยแสดงผลการทดลองในรูปกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า I_f/I_0 (แกน y) และชนิดของสาร (แกน x)

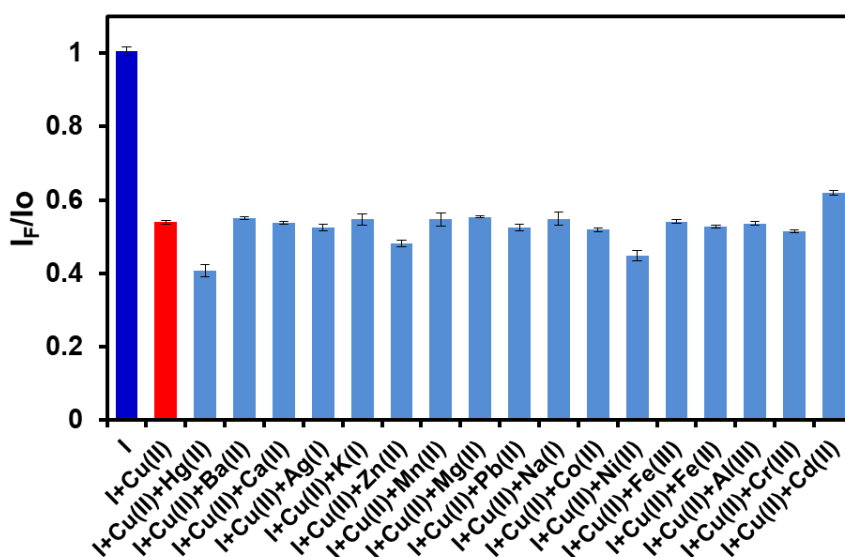
เมื่อ I_0 = Fluorescence Intensity ของสารละลายเซ็นเซอร์ I ก่อนเติมไอออน

I_f = Fluorescence Intensity ของสารละลายเซ็นเซอร์ I หลังเติมไอออน

แสดงผลดังภาพที่ 72 และ 73



ภาพที่ 72 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{ex} = 650$ nm และ $\lambda_{em} = 717$ nm) ของเซ็นเซอร์ I (5.0 μ M) ในสารละลายผสมระหว่าง 5mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4) : acetonitrile (95:5 v/v) ผสม 0.5% triton X 100 ในสถานะที่มีไอออนรบกวนเข้มข้น 2.33 μ M เจือปนในสารละลายที่มีไอออนทองแดงเข้มข้น 2.33 μ M

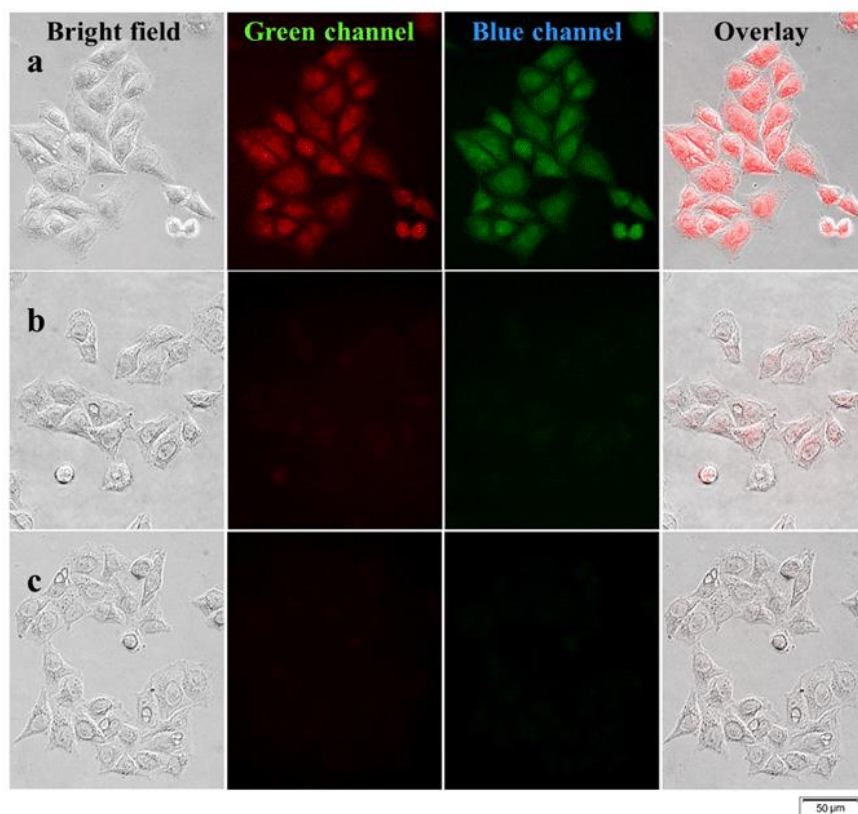


ภาพที่ 73 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{ex} = 650$ nm และ $\lambda_{em} = 717$ nm) ของเซ็นเซอร์ I (5.0 μ M) ในในสารละลายผสมระหว่าง 5mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4) : acetonitrile (95:5 v/v) ผสม 0.5% triton X 100 ในสถานะที่มีไอออนรบกวนเข้มข้น 23.3 μ M เจือปนในสารละลายที่มีไอออนทองแดงเข้มข้น 2.33 μ M

จากผลการทดลองนี้เป็นการทดสอบความสามารถในการดักจับไอออนทองแดงของเซ็นเซอร์ I ในสถานะที่มีไอออนตัวอื่นเป็นตัวรบกวน โดยเตรียมสารละลายที่ประกอบด้วยไอออนทองแดงเข้มข้น $2.33 \mu\text{M}$ ปนอยู่ในไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ได้แก่ ไอออนปรอท (Hg^{2+}) ไอออนโซเดียม (Na^+) ไอออนโพแทสเซียม (K^+) ไอออนตะกั่ว (Pb^{2+}) ไอออนเหล็ก (Fe^{3+}) ไอออนแมงกานีส (Mn^{2+}) ไอออนแคดเมียม (Cd^{2+}) ไอออนนิกเกิล (Ni^{2+}) ไอออนโคบอลต์ (Co^{2+}) ไอออนเงิน (Ag^+) ไอออนแมกนีเซียม (Mg^{2+}) ไอออนแคลเซียม (Ca^{2+}) ไอออนแบเรียม (Ba^{2+}) และไอออนสังกะสี (Zn^{2+}) ไอออนเหล็ก (Fe^{2+}) ไอออนอลูมิเนียม (Al^{3+}) และไอออนโครเมียม (Cr^{3+}) เข้มข้น $23.3 \mu\text{M}$ (10 เท่าของความเข้มข้นไอออนทองแดง) จากภาพที่ 73 สังเกตได้ว่า สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้หลังจากเติมไอออนทองแดงรวมกับไอออนรบกวนอื่นๆ มีการเปลี่ยนแปลงน้อยกว่า $\pm 10\%$ ของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์หลังการเติมไอออนทองแดงเพียงชนิดเดียว นั้นแสดงให้เห็นว่า หากในระบบที่ตรวจวัดมีไอออนชนิดอื่นๆ เจือปนประมาณ 10 เท่าของปริมาณไอออนทองแดง เซ็นเซอร์ I ยังคงแสดงสัญญาณ ON-OFF fluorescence และสามารถดักจับไอออนทองแดงอย่างจำเพาะเจาะจงสูง

3.11 ผลการศึกษาความสามารถในการดักจับไอออนทองแดงของเซ็นเซอร์ I ภายในเซลล์ HepG2

จากความสามารถการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ I ที่ให้ค่าความไวและความจำเพาะเจาะจงที่สูง จึงได้มีการนำเซ็นเซอร์ I มาทดสอบในเซลล์ HepG2 (ซึ่งเป็น human liver cancer cell lines) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที ภายในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (phosphate-buffered saline) ใช้ไอออนทองแดงในรูปของเกลือทองแดงอะซิเตต เพื่อติดตามสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ ผลการทดลองแสดงดังในภาพที่ 74



ภาพที่ 74 ภาพการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์/แสงปกติ ภายในเซลล์ HepG2 ด้วยเซ็นเซอร์ I (50 μM) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 30 นาที ภายในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (phosphate-buffered saline) กับไอออนทองแดงในรูปของเกลือทองแดงอะซิเตต ที่ความเข้มข้น (a) 0 μM , (b) 20 μM , (c) 50 μM ตามลำดับ

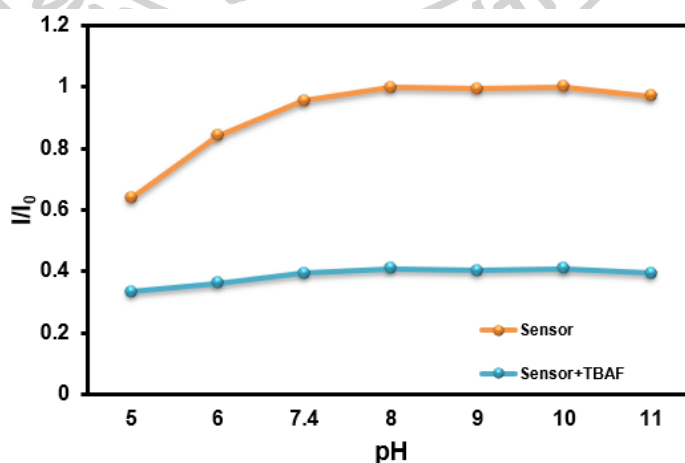
จากผลการทดลองการดักจับไอออนทองแดงของเซ็นเซอร์ I ภายในเซลล์ HepG2 พบว่าเซลล์ที่มีเซ็นเซอร์ I จะคายแสงสีเขียวออกมา ดังภาพ 74a และเมื่อมีการเติมไอออนทองแดงที่ความเข้มข้น 20 และ 50 μM จะส่งผลให้การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์จะค่อยๆ ลดลงดังภาพ 74b-c ตามลำดับซึ่งสามารถนำเซ็นเซอร์ I มาประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดไอออนทองแดงภายในเซลล์สิ่งมีชีวิตได้

4. การทดสอบความสามารถในการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ และความสามารถในการดักจับไอออนฟลูออไรด์เทียบกับไอออนรบกวนอื่นๆ ของเซ็นเซอร์ II (DFB)

เมื่อยืนยันโครงสร้างของเซ็นเซอร์ II ที่สังเคราะห์ได้ จากนั้นนำมาศึกษาสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในสารละลายผสม 10 mM PBS buffer และ MeOH (1:9 v/v) เพื่อศึกษาความสามารถในการดักจับไอออนฟลูออไรด์ เปรียบเทียบกับไอออนรบกวนอื่นๆ ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรสโกปี และศึกษาความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) และความจำเพาะเจาะจงกับไอออนฟลูออไรด์ (selectivity) ของเซ็นเซอร์ II เทียบกับไอออนลบต่างๆ ซึ่งเตรียมจากเกลือไอออนเตตระบิวทิลแอมโมเนียมแต่ละชนิดละลายในน้ำที่ปราศจากไอออน (DI water) โดยตรวจวัดจากเครื่อง Perkin Elmer Luminescence Spectrometer LS-55 ทำการติดตามสเปกตรัมของการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence emission spectra) ในช่วง 500-590 nm เมื่อกำหนด λ_{ex} เท่ากับ 495 nm

4.1 ผลการทดสอบผลกระทบของค่า pH ในสารละลายต่อการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์

เนื่องจากในงานวิจัยนี้ ต้องการนำเซ็นเซอร์ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดปริมาณไอออนฟลูออไรด์ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมและระบบชีวภาพ จึงนำมาสู่การศึกษาผลกระทบของค่า pH ในระบบต่อการเรืองแสงของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ก่อนเติมไอออนฟลูออไรด์ และหลังเติมไอออนฟลูออไรด์ ลงในสารละลายเซ็นเซอร์ (6.33 mM) ในสารละลายที่ค่า pH ต่างๆ ได้ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 75

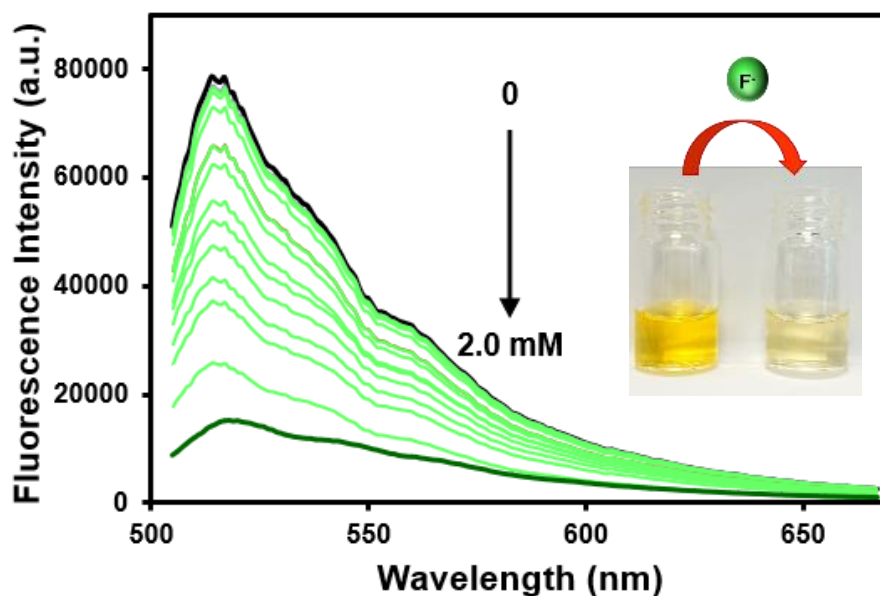


ภาพที่ 75 การเปลี่ยนแปลงสัญญาณเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{ex} = 495$ nm และ $\lambda_{em} = 515$ nm) ของเซ็นเซอร์ II (4.0 mM) ในสารละลายผสม 10 mM PBS buffer ที่ค่า pH ต่างๆ และ MeOH (1:9 v/v) ก่อนเติมไอออนฟลูออไรด์ (สีส้ม) และหลังเติมไอออนฟลูออไรด์ (สีฟ้า) (TBAF 0.5 mM)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าค่า pH มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ โดยค่า pH ที่ต่างกันจะส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของสัญญาณไม่เท่ากันอย่างไม่สามารถคาดการณ์ได้ ซึ่งจากผลการทดลอง สังเกตเห็นการเพิ่มขึ้นของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์อย่างชัดเจนที่สุดในระบบที่มีค่า pH เท่ากับ 7.4-11.0 ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกทดสอบสมบัติการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ในสารละลายที่ค่า pH เท่ากับ 7.4 เนื่องจากสามารถประยุกต์ใช้ในเซลล์สิ่งมีชีวิตได้

4.2 ผลการทดสอบสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนฟลูออไรด์ ของเซ็นเซอร์ II

การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ II ศึกษาโดยเตรียมสารฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์เข้มข้น $0.27 \mu\text{M}$ ในสารละลายผสม 10 mM PBS (pH 7.4) : MeOH (1:9 v/v) ใช้ไอออนฟลูออไรด์ในภาพของเกลือเตรตะบิวทิล แอมโมเนียม และกำหนดค่าความยาวคลื่นกระตุ้น (excitation wavelength: λ_{ex}) เท่ากับ 495 nm เพื่อติดตามสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ ผลการทดลองแสดงดังในภาพที่ 76



ภาพที่ 76 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{\text{ex}} = 495 \text{ nm}$ และ $\lambda_{\text{em}} = 516 \text{ nm}$) ของเซ็นเซอร์ II ($0.27 \mu\text{M}$) ในสารละลายผสม 10 mM PBS (pH 7.4) : MeOH (1:9 v/v) ก่อนและหลังเติมไอออนฟลูออไรด์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ a: 0 M, b: $0.067 \mu\text{M}$, c: $0.133 \mu\text{M}$, d: $0.267 \mu\text{M}$, e: $0.4 \mu\text{M}$, f: $0.567 \mu\text{M}$, g: $1.0 \mu\text{M}$, h: $1.67 \mu\text{M}$, i: $3.33 \mu\text{M}$, j: $6.33 \mu\text{M}$ k: $10.0 \mu\text{M}$ l: $13.33 \mu\text{M}$.

จากผลการทดลองพบว่าในสถานะที่ไม่มีไอออนฟลูออไรด์ ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ II คายแสงฟลูออเรสเซนต์ในช่วงความยาวคลื่น 500-590 nm โดยมีความยาวคลื่นของการคายแสงฟลูออเรสเซนต์สูงสุด (λ_{em}) เท่ากับ 516 nm เมื่อเติมไอออนฟลูออไรด์ลงในสารละลาย ส่งผลให้ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์ของเซ็นเซอร์ II มีค่าลดลง (มี λ_{em} ณ ความยาวคลื่นเดิม) ในลักษณะแปรผกผันกับปริมาณไอออนฟลูออไรด์ ที่เพิ่มขึ้น (ระบบ ON-OFF fluorescence signal) และพบว่าเมื่อความเข้มของไอออนฟลูออไรด์เพิ่มขึ้นเป็น 23 เท่าของความเข้มข้นของเซ็นเซอร์จะทำให้สัญญาณฟลูออเรสเซนต์ลดลงจนคงที่ซึ่งลดลงจากสัญญาณเริ่มต้น 80% สามารถวัดค่า quantum yield (Q_f) ของเซ็นเซอร์ได้เท่ากับ 0.31 (ใช้ Fluorescein เป็นสารอ้างอิง) [82]

4.3 ค่าความสามารถต่ำสุดของการตรวจจับไอออนฟลูออไรด์ (detection limit)

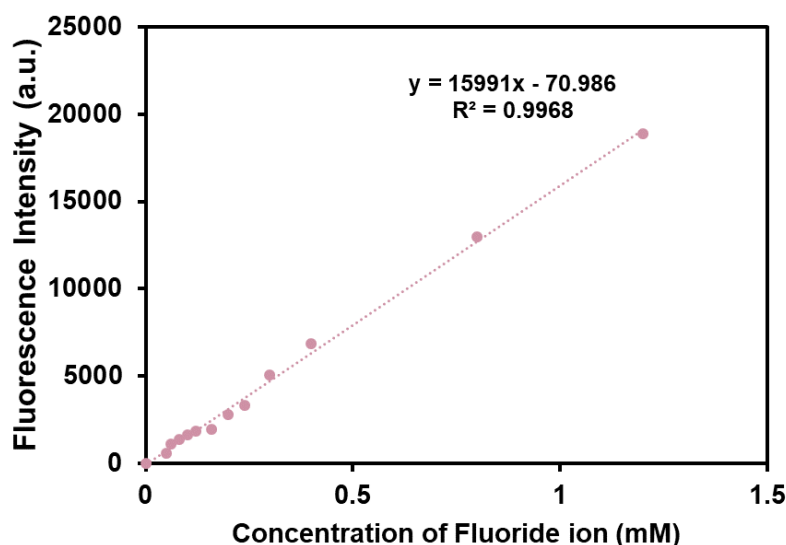
การคำนวณค่าความสามารถต่ำสุดของการตรวจจับไอออนฟลูออไรด์ (detection limit) กระทำโดยสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของฟลูออไรด์ที่เติมลงไป (แกน x) กับค่าเฉลี่ยของความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่จุดใดๆ (แกน y) เพื่อหาความชันของกราฟ (slope) จากนั้นนำมาคำนวณตามสมการที่ 5 โดยข้อมูลต่างๆ แสดงดังกราฟแสดงดังภาพที่ 77

$$\text{Detection limit} = 3SD/\text{slope} \dots\dots\dots(5)$$

โดยที่ SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ของ blank

ตารางที่ 6 ข้อมูลค่าความเข้มข้นของไอออนฟลูออไรด์ที่เติมลงไป (μM), และ ความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์, λ_{ex} เท่ากับ 516 nm

Sensor II [F] (μM)	Fluorescence Intensity					
	1	2	3	Avg.	SD	10^{-1}avg.
0	82913	82968	82906	82929	33.95585	0
0.05	82094	82257	82762	82371	348.2858	558
0.06	81400	81870	82166	81812	386.2797	1117
0.08	81319	81385	81888	81530.67	311.2143	1398.333
0.1	81076	80968	81862	81302	487.9713	1627
0.12	81016	80588	81580	81061.33	497.5513	1867.667
0.16	80879	80487	81560	80975.33	542.9478	1953.667
0.2	80623	80108	79645	80125.33	489.2303	2803.667
0.24	80068	79628	79049	79581.67	511.0776	3347.333
0.3	78272	76688	78675	77878.33	1050.368	5050.667
0.4	77255	75500	75529	76094.67	1004.983	6834.333
0.8	69885	70460	69598	69981	438.9453	12948
1.2	64315	64005	63770	64030	273.3587	18899



ภาพที่ 77 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไอออนฟลูออไรด์ [F⁻] ที่เติมลงไป (แกน x) กับ ค่าเฉลี่ยของความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่จุดใดๆ (แกน y) ของเซ็นเซอร์ II

การคำนวณ

จากกราฟ จะได้สมการเส้นตรงคือ $y = 15991x - 70.986$; $R^2 = 0.9968$ และจากการทดลอง ค่า SD ของ Blank เท่ากับ

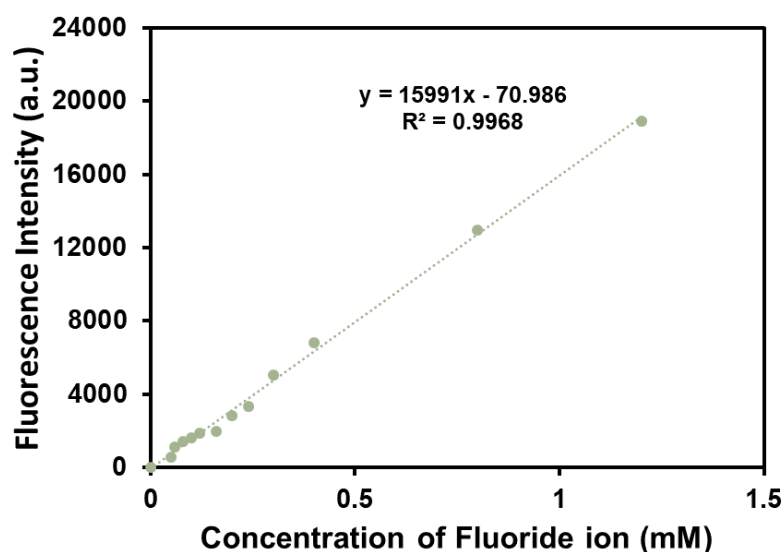
$$\begin{aligned} \text{ดังนั้น Detection limit ของ [F}^-] &= 3SD/\text{slope} = (3 \times 33.95)/15991 \\ &= 0.00637 \text{ mM} = 6.37 \text{ }\mu\text{M} \\ &= 0.121 \text{ ppm} = 121.0 \text{ ppb} \end{aligned}$$

ดังนั้น ค่าความสามารถต่ำสุดของการตรวจวัดกับไอออนฟลูออไรด์ เท่ากับ 121.0 ppb

ดังนั้นจากการทดลองพบว่าค่า detection limit ในการตรวจจับไอออนฟลูออไรด์ ของเซ็นเซอร์ II เท่ากับ 6.37 μM หรือ 121 ppb ซึ่งมีค่าต่ำกว่าค่ามาตรฐานของปริมาณไอออนฟลูออไรด์ในน้ำดื่ม ซึ่งกำหนดโดยรายงานของทางสหภาพยุโรปและ องค์การอนามัยโลก (WHO) ได้กำหนดให้มีปริมาณไอออนฟลูออไรด์มาตรฐานในน้ำดื่มได้สูงสุดไม่เกิน 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร [31-32] และองค์การพิทักษ์สิ่งแวดล้อมอเมริกา (US-EPA) มีการปริมาณไอออนฟลูออไรด์มาตรฐานในน้ำดื่มได้สูงสุดไม่เกิน 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร [33]

4.4 การหาช่วงความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรง (linear range)

Linear range คือ ช่วงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์และความเข้มข้นของไอออนฟลูออไรด์ ที่มีลักษณะเป็นเส้นตรง ซึ่งถือเป็นช่วงการใช้งาน (working range) สามารถหาโดยพลอตกราฟระหว่างความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ (แกน y) และความเข้มข้นของไอออนฟลูออไรด์ที่เติมลงในสารละลาย (แกน x) กราฟแสดงดังภาพที่ 78

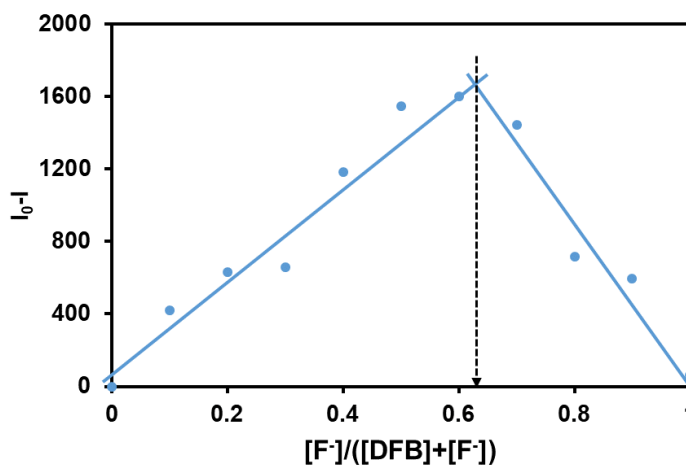


ภาพที่ 78 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ II (5.0 μM) หลังเติมไอออนฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

จากภาพที่ 78 จะเห็นกราฟแสดงความสัมพันธ์มีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.05 mM ถึง 1.2 mM โดยมีค่า $R^2 = 0.9968$ ซึ่งใกล้เคียง 1 มาก ดังนั้น ช่วงความเข้มข้นดังกล่าวจึงเป็นช่วงที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ตรวจวัดไอออนฟลูออไรด์ได้

4.5 อัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนและค่าคงที่สมดุลของการเกิดไอออนเชิงซ้อน

การทดลองเพื่อหาอัตราส่วนระหว่างโมเลกุลของเซ็นเซอร์ II กับไอออนฟลูออไรด์ ที่ใช้ในการเกิด binding ศึกษาโดยวิธี Job's plot ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 79



ภาพที่ 79 กราฟแสดงอัตราส่วนระหว่างโมเลกุลของเซินเซอร์ II กับไอออนฟลูออไรด์ที่ใช้ในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนศึกษาโดยวิธี Job's plot

จากผล Job's plot แสดงให้เห็นว่า กราฟตัดกันที่อัตราส่วนโดยโมลของเซินเซอร์ II ที่ค่าประมาณ 0.65 นั้นแสดงว่า หนึ่งโมเลกุลของเซินเซอร์ II สามารถดักจับไอออนฟลูออไรด์ได้ 2 โมเลกุล ($II:F^- = 1:2$) จากนั้นทำการศึกษาความสามารถในการดักจับของเซินเซอร์ II กับไอออนฟลูออไรด์สามารถบอกได้ด้วยค่าคงที่สมดุลของการเกิดไอออนเชิงซ้อน (association constant; K_{assoc}) ซึ่งคำนวณได้จากสมการ Benesi-Hildebrand [79] ตามสมการที่ (1)

$$\frac{1}{(A - A_0)} = \frac{1}{K_{assoc} (A_{max} - A_0) [Mn^{2+}]^n} + \frac{1}{A_{max} - A_0} \quad (1)$$

และสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า $1/[F^-]^n$ (แกน x) กับ $1/(A - A_0)$ ที่จุดใดๆ (แกน y) แสดงดังภาพที่ 80 และสามารถหาค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออนฟลูออไรด์ ได้จากความชันของกราฟที่สร้างขึ้น ดังนี้

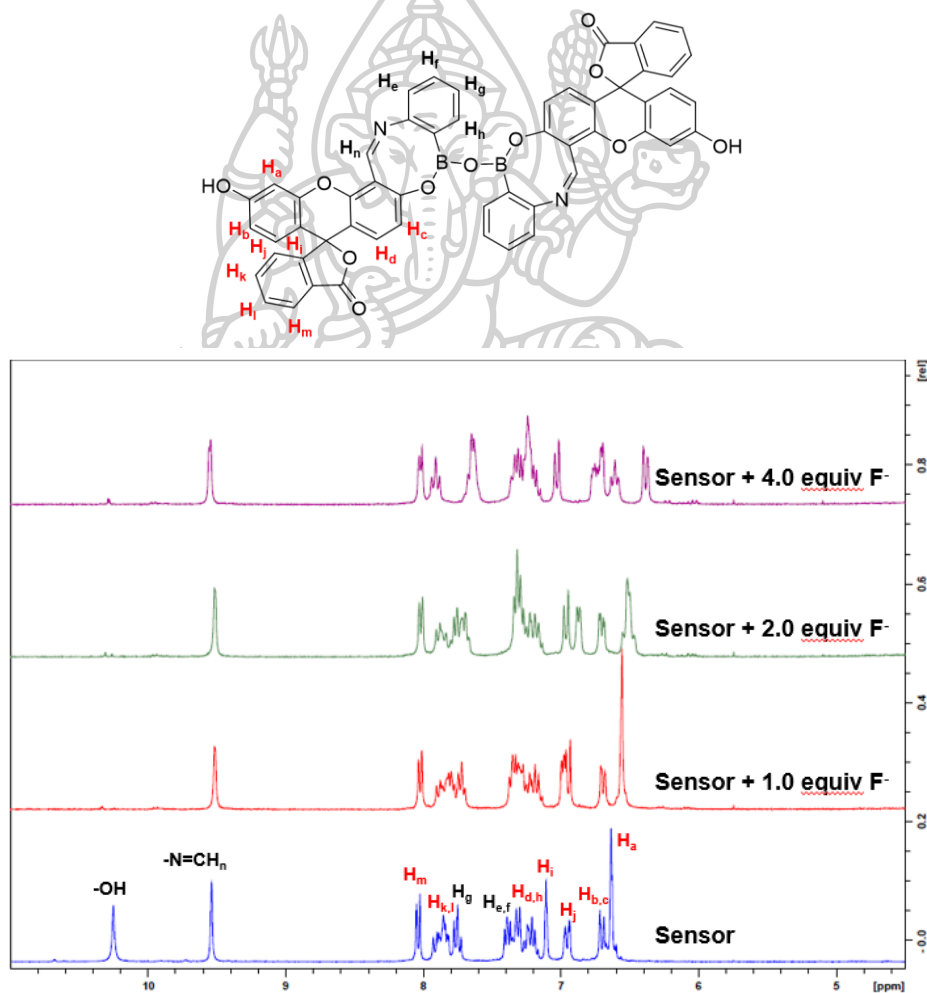
$$\text{slope} = \frac{1}{K_{assoc} (A_{max} - A_0)}$$

$$K_{assoc} = \frac{1}{\text{slope}(A_{max} - A_0)}$$

โดยจากการพลอตกราฟพบว่า เมื่อแทนค่า $n = 2$ ในสมการทำให้ได้สมการที่มีความเป็นเส้นตรงสูงสุด ซึ่งตรงกับผลการศึกษาด้วยวิธี Job's plot และสามารถคำนวณค่า K_{assoc} ได้เท่ากับ $1.4 \times 10^8 \text{ M}^{-2}$

4.6 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซ็นเซอร์ II ด้วยเทคนิค ^1H NMR สเปกตรัม ในสภาวะก่อนและหลังการจับไอออนฟลูออไรด์ (^1H NMR titration)

การศึกษากการเปลี่ยนแปลง ^1H NMR สเปกตรัมของเซ็นเซอร์ II ในสภาวะก่อนและหลังเติมไอออนฟลูออไรด์ เพื่อยืนยันการเกิดอันตรกิริยาระหว่างเซ็นเซอร์กับไอออนฟลูออไรด์ จะกระทำโดยการวิเคราะห์ ^1H NMR สเปกตรัมของเซ็นเซอร์ ก่อนเติมไอออนฟลูออไรด์ในตัวทำละลาย deuterated dimethyl sulfoxide จากนั้นได้เตรทไอออนฟลูออไรด์ในปริมาณ 1.0 equiv., 2.0 equiv. และ 4.0 equiv. ลงไปตามลำดับ นำสารละลายเซ็นเซอร์ ไปวิเคราะห์ ^1H NMR สเปกตรัมอีกครั้ง เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมระหว่างก่อนและหลังเติมไอออนฟลูออไรด์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 80 และตารางที่ 7



ภาพที่ 80 โครงสร้างทางเคมีของเซ็นเซอร์ II และ ^1H NMR สเปกตรัมของเซ็นเซอร์ II ในสภาวะก่อนและหลังเติมไอออนฟลูออไรด์ ปริมาณ 1.0, 2.0 และ 4.0 equiv.

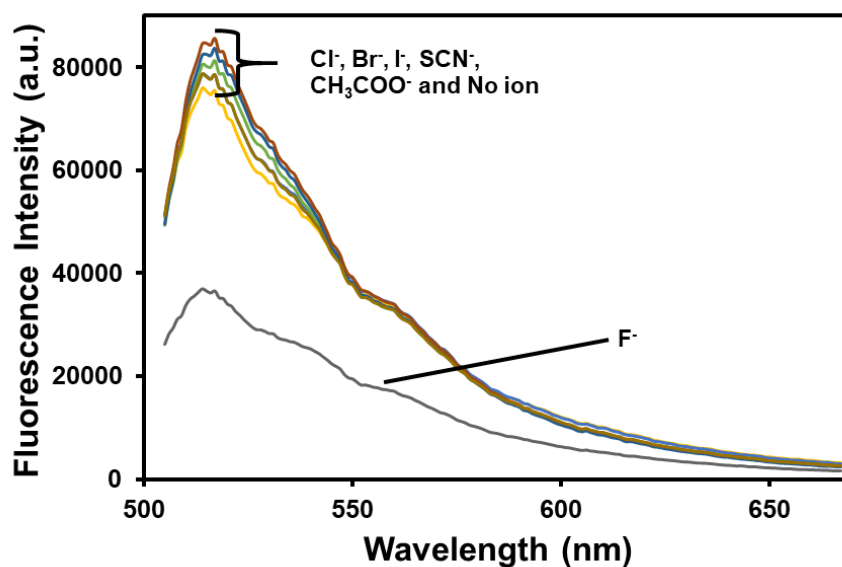
ตารางที่ 7 ค่า chemical shift ของเซ็นเซอร์ II ในสภาวะก่อนและหลังเติมไอออนฟลูออไรด์

Proton	δ of DFB (ppm)	δ of DFB with 1.0 equivi. of TBAF (ppm)	δ of DFB with 2.0 equivi. of TBAF (ppm)	δ of DFB with 4.0 equivi. of TBAF (ppm)
H _a	6.63	6.55	6.49	6.38
H _b	6.68	6.56	6.51	6.60
H _c	6.71	6.70	6.70	6.70
H _d	7.21	7.18	7.18	7.18
H _e	7.31	7.30	7.29	7.28
H _f	7.39	7.35	7.35	7.35
H _g	7.75	7.72	7.67	7.64
H _h	7.24	7.22	7.22	7.24
H _i	7.10	6.93	6.87	6.77
H _j	6.94	6.97	6.94	7.02
H _k	7.85	7.81	7.80	7.67
H _l	7.88	7.87	7.87	7.90
H _m	8.03	8.03	8.02	8.01
H _n	9.54	9.51	9.51	9.54
-OH	10.25	Not observed	Not observed	Not observed

จากผล ^1H NMR สเปกตรัม ในภาพที่ 80 ของเซ็นเซอร์ II จะเห็นได้ว่าเมื่อมีการเติม ไอออนฟลูออไรด์ ลงในสารละลาย จะทำให้สัญญาณของ ^1H NMR สเปกตรัม มีลักษณะ board เล็กน้อย โดยพบว่าเมื่อเติมไอออนฟลูออไรด์ที่ความเข้มข้น 1.0 equiv สัญญาณของ -OH (10.25 ppm) ได้หายไป และสัญญาณโปรตอนบนวงอะโรมาติกมีการ shift ไปทางด้าน up-field เล็กน้อย เนื่องจากเกิดอันตรกิริยากับไอออนฟลูออไรด์ที่เติมลงไป โดยคาดว่าป็นผลมาจากการที่ไอออนฟลูออไรด์ให้อิเล็กตรอนไปที่ p_z -orbital ของอะตอมโบรอนและส่งผลกับโปรตอนบนวงอะโรมาติก

4.7 ผลการทดสอบสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ II ในสถานะที่มีไอออนฟลูออไรด์เทียบกับไอออนรบกวนอื่นๆ

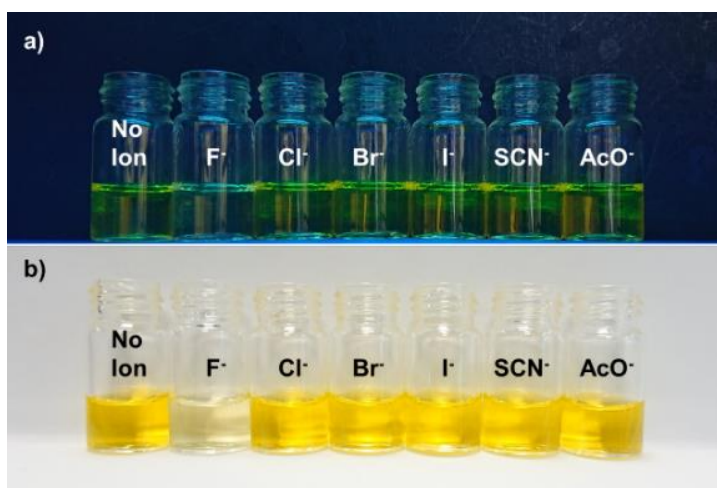
การทดสอบการคายแสงของเซ็นเซอร์ II ในสารละลาย 10 mM PBS (pH 7.4) : MeOH (1:9 v/v) ในสถานะที่มีไอออนฟลูออไรด์ (F^-) ของเกลือเตตระบิวทิล เปรียบเทียบกับในสถานะที่มีไอออนรบกวนชนิดต่างๆ TBAF TBACl TBABr TBAI TBAScN และ TBAOAc แสดงผลดังในภาพที่ 81



ภาพที่ 81 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ II ($0.27 \mu\text{M}$) ($\lambda_{\text{ex}} = 495 \text{ nm}$ และ $\lambda_{\text{em}} = 516 \text{ nm}$) ในสารละลายผสม 10 mM PBS (pH 7.4) : MeOH (1:9 v/v) ในสถานะที่มีไอออนต่างๆ F^- , Cl^- , Br^- , I^- , SCN^- และ AcO^- ($3.33 \mu\text{M}$)

จะเห็นว่าเฉพาะไอออนฟลูออไรด์เท่านั้นที่มีการแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ต่ำสุด ในขณะที่ไอออนชนิดอื่นไม่มีการแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ จากผลการทดลองทั้งหมดนี้สามารถสรุปได้ว่าเซ็นเซอร์ II มีความจำเพาะเจาะจงสูงในการดักจับไอออนฟลูออไรด์เมื่อเทียบกับไอออนชนิดอื่นๆ

4.8 ภาพถ่ายของสารละลายเซ็นเซอร์ II ภายใต้แสงปกติและแสง UV ในภาวะที่มีไอออนฟลูออไรด์ เปรียบเทียบกับไอออนรบกวนอื่นๆ



ภาพที่ 82 ภาพถ่ายของสารละลายเซ็นเซอร์ II ($86 \mu\text{M}$) ภายใต้แสงปกติ(a) และแสง UV (b) ในภาวะที่ไม่มีและมไอออนฟลูออไรด์ และไอออนรบกวนต่างๆ ดังนี้ F^- , Cl^- , Br^- , I^- , SCN^- และ AcO^- ($10.0 \mu\text{M}$)

จากภาพถ่ายภายใต้แสงปกติและแสง UV แสดงให้เห็นว่าเซ็นเซอร์ II มีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนฟลูออไรด์เมื่อเทียบกับไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ โดยในสภาวะที่มีไอออนฟลูออไรด์ จะมีการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ II และสามารถมองด้วยตาเปล่าเป็นสีเหลืองภายใต้แสงปกติ และแสง UV (ภาพที่ 82) ในขณะที่เมื่อมีการเติมไอออนชนิดอื่นได้แก่ F^- , Cl^- , Br^- , I^- , SCN^- และ AcO^- ลงในสารละลายเซ็นเซอร์ II เมื่อมองด้วยตาเปล่าจะไม่มี การเปลี่ยนแปลงทั้งภายใต้แสงปกติ และแสง UV ซึ่งความสามารถในการเปลี่ยนสีของเซ็นเซอร์ภายใต้แสง UV จากสีเขียวเข้มเป็นสีเหลืองในสภาวะที่มีไอออนฟลูออไรด์นั้น มีประโยชน์อย่างมากในการตรวจสอบหาไอออนฟลูออไรด์ในสารตัวอย่างได้ในเบื้องต้น

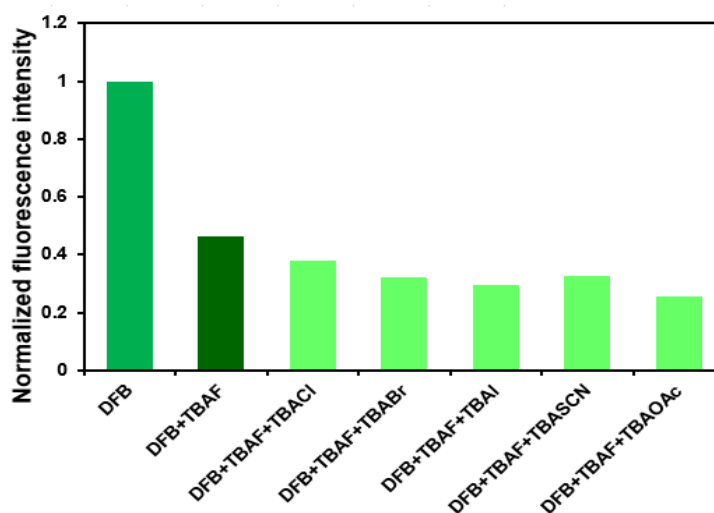
4.9 ผลการทดสอบสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ II ในสภาวะที่มีไอออนฟลูออไรด์ร่วมกับไอออนรบกวนอื่นๆ

การทดสอบสมบัติการคายแสงของเซ็นเซอร์ II ในสารละลายผสม 10 mM PBS ($\text{pH } 7.4$) : MeOH ($1:9 \text{ v/v}$) ในสภาวะที่มีไอออนฟลูออไรด์ร่วมกับไอออนรบกวนอื่นๆ ได้แก่ Cl^- , Br^- , I^- , SCN^- และ AcO^- โดยในสารละลายมีปริมาณไอออนรบกวนมากกว่าไอออนฟลูออไรด์ 10 เท่า โดยแสดงผลการทดลองในภาพกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า I_f/I_0 (แกน y) และชนิดของสาร (แกน x)

เมื่อ I_0 = Fluorescence Intensity ของสารละลายเซ็นเซอร์ II ก่อนเติมไอออน

I_F = Fluorescence Intensity ของสารละลายเซ็นเซอร์ II หลังเติมไอออน

แสดงผลดังภาพที่ 83



ภาพที่ 83 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ($\lambda_{ex} = 495$ nm และ $\lambda_{em} = 516$ nm) ของเซ็นเซอร์ II ($0.25 \mu\text{M}$) ในสารละลายผสม 10 mM PBS (pH 7.4) : MeOH (1:9 v/v) ในสถานะที่มีไอออนรบกวนเข้มข้น $33.0 \mu\text{M}$ เจือปนในสารละลายที่มีไอออนฟลูออไรด์เข้มข้น $3.3 \mu\text{M}$

จากผลการทดลองนี้เป็นการทดสอบความสามารถในการดักจับไอออนฟลูออไรด์ของเซ็นเซอร์ II ในสถานะที่มีไอออนตัวอื่นเป็นตัวรบกวน โดยเตรียมสารละลายที่ประกอบด้วยไอออนฟลูออไรด์เข้มข้น $3.3 \mu\text{M}$ ปนอยู่ในไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ได้แก่ F^- , Cl^- , Br^- , I^- , SCN^- และ AcO^- เข้มข้น $33 \mu\text{M}$ (10 เท่าของความเข้มข้นไอออนฟลูออไรด์) จากภาพที่ 83 สังเกตได้ว่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้หลังจากเติมไอออนฟลูออไรด์ร่วมกับไอออนรบกวนอื่นๆ มีการเปลี่ยนแปลงน้อยกว่า $\pm 10\%$ ของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์หลังการเติมไอออนฟลูออไรด์เพียงชนิดเดียว นั่นแสดงให้เห็นว่าหากในระบบที่ตรวจวัดมีไอออนชนิดอื่นๆเจือปนประมาณ 10 เท่าของปริมาณไอออนฟลูออไรด์ เซ็นเซอร์ II ยังคงแสดงสัญญาณ ON-OFF fluorescence และสามารถดักจับไอออนฟลูออไรด์อย่างจำเพาะเจาะจงสูง

บทที่ 5

สรุปผลการดำเนินงานวิจัย

ในวิทยานิพนธ์นี้ ได้ออกแบบและสังเคราะห์โครงสร้างของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ชนิดใหม่ 2 ชนิด คือ สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ I (aza-BDP-DPA) ใช้ตรวจวัดไอออนทองแดง และสารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ II (DFB) ใช้ตรวจวัดไอออนฟลูออไรด์

สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ I ประกอบด้วยหมู่ aza-BODIPY ทำหน้าที่เป็นฟลูออโรฟอร์เชื่อมต่อกับไอโอโนฟอร์ชนิด di-2-picolyamine โดยเซ็นเซอร์ชนิดนี้ สามารถตรวจวัดไอออนทองแดงในสารละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบได้อย่างจำเพาะเจาะจงสูงเมื่อเทียบกับไอออนอื่นๆ ได้แก่ Cu^{2+} Hg^{2+} Pb^{2+} Ag^{+} Zn^{2+} Ba^{2+} Ca^{2+} Co^{2+} Fe^{3+} Mn^{2+} Na^{+} Ni^{2+} K^{+} Mg^{2+} Fe^{2+} Cd^{2+} Al^{3+} และ Cr^{3+} โดยมีค่า detection limit เท่ากับ $0.205 \mu\text{M}$ หรือ 13 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าต่ำกว่าค่ามาตรฐานของปริมาณไอออนทองแดงในน้ำดื่ม ซึ่งกำหนดโดย United State Environmental Protection Agency (U.S. EPA) และ World Health Organization (WHO) มีค่าเท่ากับ 1.3 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเซ็นเซอร์ I แสดงการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ในลักษณะ ON-OFF อีกทั้งสามารถสังเกตการเปลี่ยนสีจากสีเขียวเข้มเป็นสีเขียวจาง ซึ่งสามารถสังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งโมเลกุลของเซ็นเซอร์ I เกิดการโคออดิเนตกับไอออนทองแดง บริเวณอะตอมไนโตรเจน 3 อะตอมและอะตอมออกซิเจนของหมู่คาร์บอนิล 1 อะตอม ด้วยอันตรกิริยาแบบ cation-dipole interaction ที่ความยาวคลื่นในการดูดกลืนแสงและความยาวคลื่นในการคายแสงสูงสุดอยู่ในช่วงความยาวคลื่นที่ใกล้อินฟราเรด ซึ่งมีพลังงานต่ำและสามารถนำเซ็นเซอร์ที่สังเคราะห์ได้นี้ไปใช้ตรวจวัดปริมาณไอออนทองแดงในเซลล์ HepG2 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งตับได้

สารฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ II จะมีการเลือกใช้ฟลูออโรฟอร์ชนิด fluorescein monoaldehyde มาทำปฏิกิริยากับไอโอโนฟอร์ชนิด 2-Aminophenylboronic acid pinacol ester ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนฟลูออไรด์สูง เมื่อเปรียบเทียบกับไอออนรบกวนอื่นๆ ได้แก่ TBAF TBACl TBABr TBAI TBASCN และ TBAOAc โดยแสดงสัญญาณการตรวจจับไอออนฟลูออไรด์ด้วยการเพิ่มขึ้นของสัญญาณเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ (ระบบ ON-OFF fluorescence signal) และได้ค่า detection limit ของการตรวจวัดไอออนฟลูออไรด์ที่ต่ำ เท่ากับ $6.37 \mu\text{M}$ หรือ 121 ppb ซึ่งมีค่าต่ำกว่ามาตรฐานของทางสหภาพยุโรปและ องค์การอนามัยโลก (WHO) ที่กำหนดให้มีปริมาณไอออนฟลูออไรด์มาตรฐานในน้ำดื่มได้สูงสุดไม่เกิน 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และองค์การพิทักษ์สิ่งแวดล้อมอเมริกา (US-EPA) มีการปริมาณไอออนฟลูออไรด์มาตรฐานในน้ำดื่มได้สูงสุดไม่เกิน 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้เมื่อฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์จับกับไอออนฟลูออไรด์ จะแสดงการเปลี่ยนสี

จากสีเหลืองเป็นใสไม่มีสี ซึ่งสามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงได้ด้วยตาเปล่า โดยคาดว่าโมเลกุลของเซ็นเซอร์ II เกิดการโคออดิเนตกับไอออนฟลูออไรด์ บริเวณอะตอมโบรอน ด้วยอันตรกิริยาแบบ ion-dipole interaction ที่ความยาวคลื่นในการดูดกลืนแสงและความยาวคลื่นในการคายแสงสูงสุดอยู่ในช่วงความยาวคลื่นวิซิเบิล

โดยตารางสรุปผลการทดสอบความสามารถในการทำงานของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์แต่ละชนิดแสดงได้ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 สรุปผลการทดลองการทดสอบฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ I และ II

เซ็นเซอร์	I	II
ชนิดของไอออน	Cu^{2+}	F^-
สภาวะที่ทำงาน	5 mM PBS (pH 7.4) : acetonitrile (95:5 v/v) ผสม 0.5% triton X 100	10 mM PBS (pH 7.4) : MeOH (1:9 v/v)
λ_{ex} (nm)	650	485
λ_{em} (nm)	717	515
Detection limits (ppb)	13	121
Detection limits (μM)	0.205	6.37
Quantum yield (Q_f)	-	0.31
K_{assoc}	$3.2 \times 10^{11} \text{ M}^{-2}$	$1.4 \times 10^8 \text{ M}^{-2}$
Ratio [sensor:ion(s)]	1:2	1:2
working range (μM)	0.2-4.5	5-1200
การเปลี่ยนสี	สีเขียวเข้ม – สีเขียวเหลือง	สีเหลือง – ใสไม่มีสี

โดยเซ็นเซอร์ทั้งหมดนี้ มีศักยภาพเพียงพอที่จะสามารถพัฒนาต่อยอดเป็นอุปกรณ์ตรวจวัดไอออนทองแดงและฟลูออไรด์ในภาคสนามหรือชุดทดสอบอย่างง่ายได้ในอนาคตและยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับตัวอย่างจากธรรมชาติได้



อุปกรณ์และสารเคมี

1. อุปกรณ์

- 1.1 เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance 300 MHz: Bruker 300
- 1.2 เครื่อง UV-visible spectrometer: HP-8453
- 1.3 เครื่อง Fluorescence spectrometer: Perkin Elmer Luminescence spectrometer model LS-50B
- 1.4 เครื่อง Fluorescence spectrometer: Perkin Elmer Luminescence spectrometer model LS-55
- 1.5 เครื่อง Mass spectrometer: ESI-FT-ICR (High resolution) Bruker BioAPEX 70e spectrometer
- 1.6 เครื่อง Rotary evaporator: Buchi Rotavapor R-114
- 1.7 เครื่อง Vacuum pump: Tokyo Rikakikai Co., Ltd. model A-3S
- 1.8 เครื่อง Hot air oven: Binder model ED115 (E2)
- 1.9 เครื่องชั่งละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง): Denver instrument model S-234
- 1.10 เครื่องชั่งละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง): Mettler Toledo model AB204
- 1.11 เครื่อง Hotplate and stirrer: Framo model M21/1
- 1.12 Micropipette: Finnpiquette, HH10711 ขนาด 1-10 μL
- 1.13 TLC Silica gel 60 F₂₅₄ aluminium sheet, Merck
- 1.14 Silica gel 60 F₂₅₄ containing gypsum สำหรับ preparative thin layer chromatography, Merck
- 1.15 อุปกรณ์สำหรับเตรียมแผ่น preparative TLC: Desaga Brinkmann
- 1.16 กระดาษกรอง: Advantec ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 110 mm
- 1.17 กระดาษกรอง: Advantec ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 70 mm
- 1.18 เครื่องแก้วพื้นฐาน
- 1.19 ชุดกรองแบบลดความดัน
- 1.20 Clamp และ Clamp Holder

2. สารเคมี

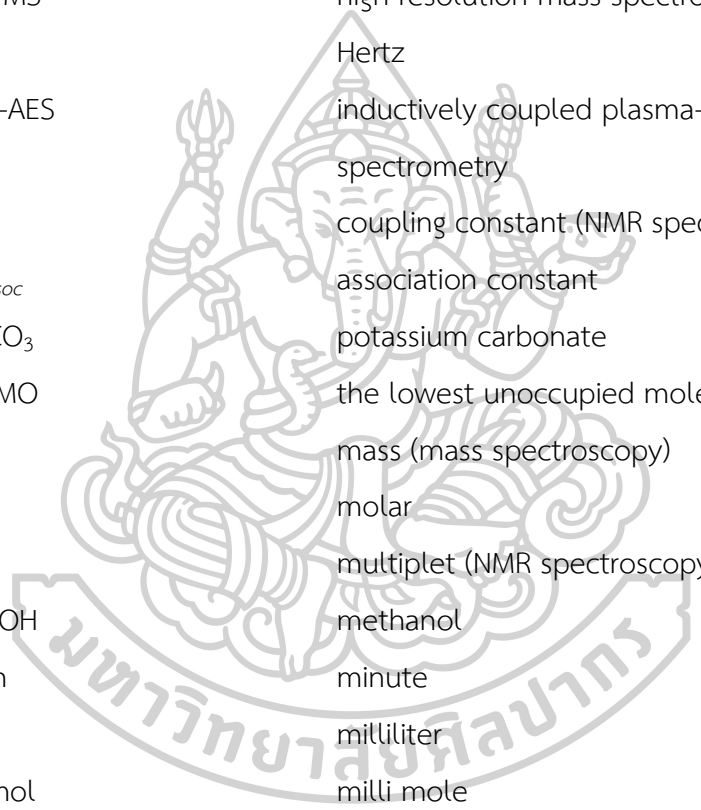
- 2.1 Acetonitrile: LAB-SCAN
- 2.2 Ammonium acetate: AR/ACS ($M_w = 77.08$ g/mol)
- 2.3 Anhydrous sodium sulphate, BDH
- 2.4 Argon gas: Masser Specialty Gas Co., Ltd. (99.999 %)
- 2.5 Barium acetate, Sigma-Aldrich ($M_w = 255.43$ g/mol)
- 2.6 Boron trifluoride etherate: ACROS (48%, $M_w = 141.93$ g/mol)
- 2.7 Bromoacetyl bromide: Sigma-Aldrich ($\geq 98\%$, $M_w = 201.84$ g/mol))
- 2.8 1-Butanol: BHD
- 2.9 Cadmium acetate dihydrate, Fluka ($M_w = 266.52$ g/mol)
- 2.10 Calcium acetate, Fluka ($M_w = 158.17$ g/mol)
- 2.11 Chloroform-*d* (contains 1% v/v of TMS): Sigma-Aldrich (99.8 atom %D)
- 2.12 Chloroform: LAB-SCAN
- 2.13 Cobalt acetate tetrahydrate, Fluka ($M_w = 249.09$ g/mol)
- 2.14 Copper acetate monohydrate, Fluka ($M_w = 199.65$ g/mol)
- 2.15 Cysteamine hydrochloride: Fluka ($\geq 97.0\%$, $M_w = 113.61$ g/mol)
- 2.16 Deionized water: Department of chemistry, Silpakorn University
- 2.17 Deuterium oxide-*d*2: Sigma-Aldrich (99.99 atom %D)
- 2.18 Dichloromethane (distillation)
- 2.19 Dichloromethane (for analysis): MERCK (99.8 %)
- 2.20 Diethylamine: Fluka ($d = 0.707$ g/mL, $M_w = 73.14$ g/mol)
- 2.21 *N,N*-Diisopropylethylamine: Sigma-Aldrich ($> 99.0\%$, $M_w = 129.24$ g/mol)
- 2.22 *N,N*-Dimethylformamide, Sigma-Aldrich ($d = 0.944$ g/mL, $M_w = 73.10$ g/mol)
- 2.23 Dimethylsulfoxide-*d*6: Wilmad (99.9 atom %D)
- 2.24 Ethanol (distillation)
- 2.25 Ethanol (absolute for analysis): MERCK
- 2.26 Ethylacetate (distillation)
- 2.27 Fluorescein standard: ACROS ($M_w = 332.30$ g/mol)
- 2.28 Hexane (distillation)
- 2.29 Hydrochloric acid: HCl ($M_w = 36.46$ g/mol)
- 2.30 Iron acetate, Fluka ($M_w = 232.98$ g/mol)

- 2.31 Lead acetate, Carlo erba ($M_w = 235.29$ g/mol)
- 2.32 Lithium perchlorate trihydrate: Strem chemical (99 %, $M_w = 311.30$ g/mol)
- 2.33 Magnesium acetate tetrahydrate, Sigma-Aldrich ($M_w = 214.46$ g/mol)
- 2.34 Manganese acetate tetrahydrate, Fluka ($M_w = 245.09$ g/mol)
- 2.35 Manganese perchlorate hexahydrate: Strem chemical (99 %, $M_w = 253.84$ g/mol)
- 2.36 Mercuric acetate, Fluka ($M_w = 318.68$ g/mol)
- 2.37 Mercuric perchlorate hydrate: Sigma-Aldrich (98 %, $M_w = 372.06$ g/mol)
- 2.38 Methanol (distillation)
- 2.39 Methanol (for analysis): MERCK (99.9 %)
- 2.40 Methanol-d4: Cambridge Isotope Laboratories, Inc.(99.8 atom %D)
- 2.41 4-Methoxyacetophenone: Fluka (≥ 99.0 %, $M_w = 365.69$ g/mol)
- 2.42 Nickel acetate tetrahydrate, BHD ($M_w = 248.84$ g/mol)
- 2.43 Nickel perchlorate hexahydrate: Fluka (≥ 98.0 %, $M_w = 365.69$ g/mol)
- 2.44 Nitric acid
- 2.45 3-Nitrobenzaldehyde: Fluka (≥ 95.0 %, $M_w = 150.17$ g/mol)
- 2.46 Nitromethane: Fluka (≥ 98.0 %, $M_w = 61.04$ g/mol)
- 2.47 Palladium acetate: Sigma-Aldrich ($M_w = 224.49$ g/mol)
- 2.48 Palladium-charcoal activated hydrogenation catalyst: Merck (10% Pd)
- 2.49 Potassium acetate: $KC_2H_3O_2$ ($M_w = 98.14$ g/mol), Fluka
- 2.50 Potassium bromide: KBr ($M_w = 119.002$ g/mol), Merck
- 2.51 Potassium chlorate: $KClO_3$ ($M_w = 122.55$ g/mol), Fluka
- 2.52 Potassium chloride: KCl ($M_w = 74.5513$ g/mol), Fluka
- 2.53 Potassium cyanide: KCN ($M_w = 65.12$ g/mol), Fluka
- 2.54 Potassium fluoride: KF ($M_w = 58.0967$ g/mol), Fluka
- 2.55 di-Potassium hydrogen Phosphate: K_2HPO_4 ($M_w = 174.2$ g/mol), Fluka
- 2.56 Potassium hydroxide: Fluka ($M_w = 56.11$ g/mol)
- 2.57 Potassium iodide: KI ($M_w = 166.003$ g/mol), Ajax
- 2.58 Potassium nitrate: KNO_3 ($M_w = 101.1032$ g/mol), Merck
- 2.59 Potassium sulfate: KSO_4 ($M_w = 174.259$ g/mol), Merck
- 2.60 Pyridine: C_5H_5N ($M_w = 79.10$ g/mol)

- 2.61 Silica gel 60 (0.063-0.200 mm) สำหรับ column chromatography, Merck
- 2.62 Silica gel 60 F₂₅₄ containing gypsum สำหรับ preparative thin layer chromatography, Merck
- 2.63 Silver acetate, Acros ($M_w = 166.91$ g/mol)
- 2.64 Silver perchlorate monohydrate: Strem chemical (99 %, $M_w = 207.32$ g/mol)
- 2.65 Sodium acetate, Fluka ($M_w = 82.03$ g/mol)
- 2.66 Sodium bicarbonate: Sigma-Aldrich ($M_w = 84.01$ g/mol)
- 2.67 Sodium borohydride: Sigma-Aldrich ($M_w = 37.83$ g/mol)
- 2.68 Sodium chloride ($M_w = 58.5$ g/mol)
- 2.69 Sodium hydroxide: Fluka (≥ 98.0 %, $M_w = 40.00$ g/mol)
- 2.70 Sodium methoxide: Fluka (≥ 98.0 %, $M_w = 54.02$ g/mol)
- 2.71 Sodium perchlorate: Fluka (98 %, $M_w = 82.03$ g/mol)
- 2.72 Sodium sulfate anhydrous: Sigma-Aldrich (99.0 %)
- 2.73 Sulfuric acid, LAB-SCAN (98% w/w, 1.84 g/mL, $M_w = 98.08$ g/mol)
- 2.74 Tetrahydrofuran (Analytical reagent; A.R.): LAB-SCAN (99.8 %)
- 2.75 1,2,3,3-tetramethyl-3H-indoliumiodide: C₁₂H₁₆IN ($M_w = 301.17$ g/mol), Sigma-Aldrich Chemistry
- 2.76 Triethylamine: Ridel-de-Haen (99 %, $d = 0.73$ g/mL, $M_w = 101.19$ g/mol)
- 2.77 Tris(hydroxymethyl)aminomethane buffer, Sigma-Aldrich ($M_w = 121.41$ g/mol)
- 2.78 Zinc acetate dehydrate, Fluka ($M_w = 219.51$ g/mol)
- 2.79 Zinc perchlorate hexahydrate: Sigma-Aldrich ($M_w = 372.36$ g/mol)

รายชื่ออักษรย่อ

คำย่อ	คำเต็ม
Φ_f	fluorescence quantum yield
$^{\circ}\text{C}$	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 spectroscopy	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-piperazineethanesulfonic 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
MW	molecular weight
m/z	mass to charge ratio (mass spectroscopy)
NaCl	sodium chloride
NaOMe	sodium methoxide
NaOH	sodium hydroxide
Na_2SO_4	sodium sulfate
Et_3N	triethylamine
nm	nanometer
OSHA	Occupational Safety and Health Administration

ppb	part per billion
ppm	part per million
q	quartet (NMR spectroscopy)
R_f	flow rate
s	singlet (NMR spectroscopy)
t	triplet (NMR spectroscopy)
THF	tetrahydrofuran
v/v	volume by volume
w/v	weight by volume





Cite this: *Dalton Trans.*, 2017, **46**, 16251

Received 16th September 2017,
Accepted 31st October 2017
DOI: 10.1039/c7dt03481d

rscl/dalton

Near-infrared aza-BODIPY fluorescent probe for selective Cu²⁺ detection and its potential in living cell imaging†

Yordkhuang Tachapermpoon,^a Sopida Thavornpradit,^a Adisri Charoenpanich,^b Jitnapa Sirirak,^a Kevin Burgess^c and Nantanit Wanichacheva^{a*}

A near-infrared (NIR) fluorescent sensor **1** composed of an aza-boron-dipyromethene (aza-BODIPY) core covalently bound to two di-2-picolyamine moieties was conceived for Cu²⁺ detection in aqueous solutions. Spectroscopic properties and binding abilities with several metal ions were investigated in phosphate buffered saline (pH 7.4): acetonitrile (95:5 v/v) with Triton X-100 via fluorometric titrations. The fluorescence of sensor **1** was quenched selectively by cupric ions in the presence of alkali- and transition-metal-ions. A detection limit of 13 ppb was measured for this system, and this is significantly lower than permissible levels of Cu²⁺ in drinking water according to the guidelines described by the U.S. Environmental Protection Agency (EPA) and by the World Health Organization (WHO). Application of the sensor in detecting Cu²⁺ in HepG2 cells was demonstrated.

Introduction

Copper is an essential trace element in all biological systems and it is particularly important for the functions of several cellular enzymes.¹ However, copper pollution has become more widespread due to the increase in the use of Cu-containing materials in industry and agriculture,² and excessive accumulation of Cu²⁺ in humans is associated with several neurodegenerative diseases such as Menkes syndrome, Wilson's disease, and Alzheimer's disease.³

Methods for the quantitative detection of Cu²⁺ include atomic absorption spectroscopy (AAS),⁴ electrochemistry,⁵ inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-OES),⁶ and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS).⁷ Most of these techniques require sophisticated instruments, specially trained operators, and significant time to perform; these factors limit their applications for on-site and real-time detection.

Fluorescence-based techniques are not constrained in the same ways as many other methods for the quantitative detec-

tion of Cu²⁺; hence there is considerable interest in this area; indeed, fluorescent probes for Cu²⁺ based on carbazole,⁸ rhodamine,⁹ fluorescein,¹⁰ pyrene¹¹ and naphthalimide¹² have been prepared. Unfortunately, most of these Cu²⁺-sensitive probes have excitation or emission maxima that overlap with fluorophors in biological samples; this leads to lower signal-to-noise and damage to living cells on illumination. Thus for many applications, fluorescent sensors should optimally absorb/emit in the red/near-infrared (NIR) spectral region (650–800 nm) where cellular autofluorescence is minimal and for which light penetration into biological tissues is deeper.

In this work, we aimed to develop a Cu²⁺ near-infrared (NIR) fluorescent sensor based on aza-boron-dipyromethene (aza-BODIPY) fluors. Aza-BODIPYs have strong absorption and emission in the near IR region, large molar extinction coefficients (ϵ) and tend to permeate living cells.¹³ However, aza-BODIPY-based fluorescent probes, especially cation-chemosensors, are rare,¹⁴ possibly because they are hydrophobic and poorly water soluble. However, we hypothesized that using aza-BODIPY scaffolds to support di-2-picolyamine fragments was an attractive strategy for two reasons. Firstly, di-2-picolyamine fragments tend to interact strongly with Cu²⁺.¹⁵ Secondly, these highly hydrophilic moieties might compensate for the poor solubilities of aza-BODIPY dyes in aqueous media. Consequently, the NIR probe **1** was conceived for its potential to detect Cu²⁺ in aqueous media *via* excitation and emission detection at wavelengths that are conducive to imaging biological samples (Fig. 1).

^aDepartment of Chemistry, Faculty of Science, Silpakorn University, Nakhon Pathom 73000, Thailand. E-mail: wanichacheva.nantanit@gmail.com, wanichacheva_n@su.ac.th

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

^cDepartment of Chemistry, Texas A & M University, Box 30012, College Station, TX 77842, USA

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c7dt03481d



Fig. 1 Structure of sensor 1.

Results and discussion

Sensor 1 was synthesized as described in Scheme 1. The photo-physical properties of 1 were investigated in 5 mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4):acetonitrile (95:5 v/v) with 0.5% Triton X-100 by UV-visible and fluorescence measurements. Triton X-100 was added into the solution system as a surfactant to improve the solubility of 1 in buffer. The absorption spectrum of 1 exhibited maximum absorbance at 680 nm ($\epsilon = 5.18 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), whereas the fluorescence spectrum showed a long fluorescence emission wavelength in the near-IR region, approximately at 717 nm as shown in Fig. 2a.

Sensitivity studies of 1 were determined by fluorescence spectroscopy (Fig. 2b). Sensor 1 without Cu^{2+} demonstrated strong fluorescence at 717 nm upon excitation at 650 nm in 5 mM phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4):acetonitrile (95:5 v/v) with 0.5% Triton X-100. Progressive quenching of the fluorescence of sensor 1 was observed when a solution of 1 was gradually titrated with Cu^{2+} . Complete "ON-OFF" fluorescence switching of 1 is attributed to the paramagnetic properties of Cu^{2+} (unfilled d-shell of Cu^{2+}) causing strong fluorescence quenching through electron transfer.¹⁶

The effect of coexisting anions on the fluorescence response of 1 to Cu^{2+} was studied using acetate, perchlorate, nitrate and chloride salts. The results showed that although there were

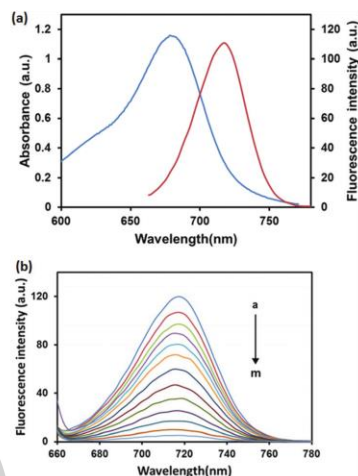


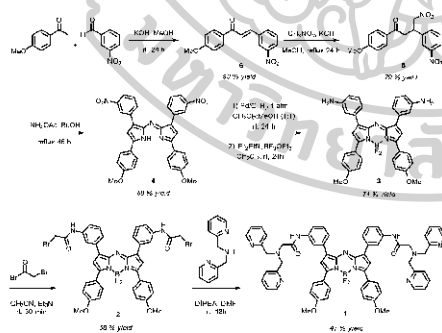
Fig. 2 (a) Absorption and fluorescence emission spectra of 1 (5.0 μM) in 5 mM PBS buffer (pH 7.4):acetonitrile (95:5 v/v) with 0.5% Triton X-100. (b) Fluorescence emission spectra ($\lambda_{\text{exc}} = 650 \text{ nm}$) of 1 (5.0 μM) in 5 mM PBS buffer (pH 7.4):acetonitrile (95:5 v/v) with 0.5% Triton X-100 as a function of $[\text{Cu}^{2+}]$: a: 0 M, b: 0.33 μM , c: 0.67 μM , d: 1.0 μM , e: 1.33 μM , f: 1.67 μM , g: 2.33 μM , h: 3 μM , i: 3.67 μM , j: 4.33 μM , k: 5.0 μM , l: 5.67 μM , m: 6.33 μM .

coexisting anions in the solution of 1, the fluorescence quenching of 1 upon the addition of Cu^{2+} was observed. The best sensitivity of 1 for Cu^{2+} sensing was found when the anion was acetate (ESI, Fig. S9†).

In addition, the effect of pH in the range of 4–10 on the sensitivity of 1 was investigated and the results are shown in the ESI (Fig. S10†). The optimum sensitivity of 1 was found at pH 5.0–7.4. In our work, the sensitivity and selectivity studies of 1 were performed in PBS buffer at pH 7.4 in order to illustrate that 1 can be applied for the determination of Cu^{2+} at the pH of physiological and biological samples.

A detection limit of 0.2 μM or 13 ppb was determined for 1 sensing Cu^{2+} (from 3SD per slope¹⁷). This limit is sufficiently low for the detection of Cu^{2+} in dietary and environmental sources since it is lower than the maximum allowed levels of Cu^{2+} in drinking water, specified by the WHO (2.0 ppm) and the U.S. EPA (1.3 ppm),¹⁸ and comparable or lower than other recently reported Cu^{2+} -sensors^{19–25} as shown in Table 1. However, the known Cu^{2+} -sensors that gave lower detection limits operated in the visible region or lacked selectivity.

A Job's plot analysis of emission fluorescence at 717 nm as a function of the molar fractions of 1 (up to a total concentration of 10 μM) was performed to ascertain the 1: Cu^{2+} binding stoichiometry. Maximal fluorescence intensity was observed at a mole fraction of 1 of approximately 0.33 (Fig. 3), which indicated the existence of 1:2 stoichiometry between 1



Scheme 1 Synthesis of sensor 1.

Table 1 Comparison of the recently reported Cu²⁺ sensors

Cu ²⁺ -sensor	Working system	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ (nm)	Detection limit (M)	Interference	Ref.
A	HEPES buffer (20 mM, pH 7.4)	442/458, 567	1×10^{-7} (6.3 ppb)	None	(2015) ²⁰
B	TrisHCl buffer (50 mM, pH 7.2)	370/508	1.3×10^{-7} (8.6 ppb)	Fe ²⁺	(2017) ²⁰
C	CH ₃ CN	365/475	4.3×10^{-8} (2.7 ppm)	Zn ²⁺	(2015) ²²
D	CH ₃ CN/H ₂ O (1 : 1 v/v)	310/410	1.0×10^{-8} (0.63 ppm)	None	(2015) ²²
E	PBS (10 mM, pH 7.5, 20% CH ₃ CN)	365/555	2.5×10^{-8} (0.16 ppm)	Fe ²⁺	(2016) ²³
F	EtOH/H ₂ O (1 : 1 v/v, pH 7.0)	530/554	7.0×10^{-7} (44 ppb)	Fe ²⁺	(2015) ²⁴
G	PBS + 0.1% CrEL (pH 7.4)	697/—	No data	None	(2015) ²⁵
Sensor 1	PBS buffer (5 mM, pH 7.4, 5% CH ₃ CN) + 0.5% Triton X-100	650/717	2.1×10^{-7} (13 ppb)	None	This work

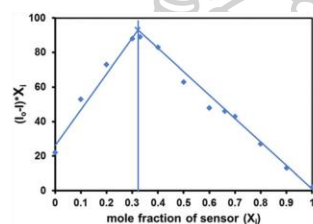


Fig. 3 Job's plot analysis of **1** with the Cu²⁺ complex in 5 mM PBS buffer (pH 7.4) : acetonitrile (95 : 5 v/v) with 0.5% Triton X-100 solutions (λ_{exc} = 650 nm). The total concentrations of **1** and Cu²⁺ were 10 μ M.

and Cu²⁺ ions. As expected, two Cu²⁺ ions were chelated at the two units of DPA moieties, which contained three nitrogen atoms and were electron donors which were suitable for a strong interaction with Cu²⁺ via favorable electrostatic interaction. Based on this Job's plot, the association constant (K_{assoc}) of **1**-Cu²⁺ was evaluated by the Benesi-Hildebrand plot,²⁶ assuming a 1 : 2 ratio of **1** : Cu²⁺: 3.2×10^{11} M⁻².

Fig. 4 illustrates optimized structures of **1** and the 1 : Cu²⁺ complex obtained at the DFT-B3LYP level with 6-311G** for main group elements and LanL2DZ for Cu²⁺ in water with IEEPCM. The starting structure of the 1 : Cu²⁺ complex was designed using a 1 : 2 ratio of sensor to Cu²⁺ from Job's plot results. A complex formation energy of -272.64 kcal mol⁻¹ was obtained. Interestingly, the amide carbonyl oxygen atom of the sensor to Cu²⁺ with distances of 2.19 Å and 2.20 Å for each

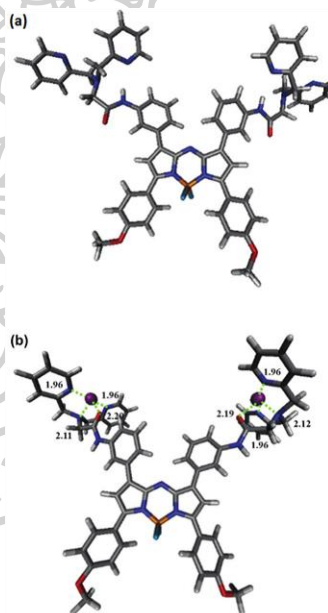


Fig. 4 Optimized structures in water using the Gaussian 09 program. (a) **1**, calculated with the B3LYP/6-311G** basis set and (b) 1 : 2 complex formation of **1** : Cu²⁺, calculated with B3LYP/6-311G** and LanL2DZ for Cu²⁺.

Cu^{2+} ion. Moreover, HOMO, LUMO and the HOMO–LUMO energy gap of **1** and **1**: Cu^{2+} complexes were explored and are shown in Fig. S11.†

Selectivity studies were performed from the fluorescence of **1** as a function of several metal ions, Cu^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Ag^+ , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Na^+ , Ni^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Al^{3+} and Cr^{3+} , in phosphate buffered saline (PBS; pH 7.4): acetonitrile (95:5 v/v) with Triton X-100 solution. The fluorescence of **1** was quenched by Cu^{2+} (see above), but not by the other metal ions (Fig. 5a). These data indicate that the nitrogen atoms of di-2-picolyamine connected to the aza-BODIPY fluorophore provided stronger binding affinity towards Cu^{2+} compared to the other ions under these solvent conditions.

To investigate the Cu^{2+} selectivity of **1** in the background of competing ions, the fluorescence signals of **1** in the solutions of Cu^{2+} with 1 or 10 eq. of other ions were observed and are shown in Fig. 6. The results showed that there was a relatively consistent Cu^{2+} -induced fluorescence quenching in both 1 and 10 equivalents of background competitive ions (23.3 μM each of Hg^{2+} , Pb^{2+} , Ag^+ , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Na^+ , Ni^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Al^{3+} and Cr^{3+}) and Cu^{2+} (2.3 μM). The selectivity of **1** for Cu^{2+} over Hg^{2+} and Zn^{2+} is notable because all three ions tend to have similar complexation behavior.

The high Cu^{2+} -selectivity of **1** was illustrated by chromogenic changes as well as the fluorogenic ones. The green fluorescence of **1** disappeared when Cu^{2+} was added to the PBS buffer solutions, while interfering ions such as Hg^{2+} , Pb^{2+} , Ag^+ , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Na^+ , Ni^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Al^{3+} , and Cr^{3+} still showed strong emission under

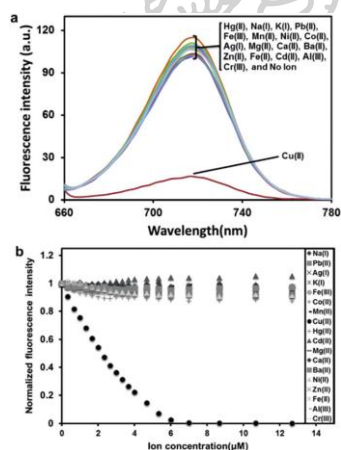


Fig. 5 (a) Fluorescence spectra ($\lambda_{\text{ex}} = 650 \text{ nm}$) of **1** (5.0 μM) with the addition of Cu^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Ag^+ , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Na^+ , Ni^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Al^{3+} and Cr^{3+} (5.0 μM). (b) Normalized emission intensity (717 nm) of **1** (5.0 μM) versus the concentration of various metal ions.

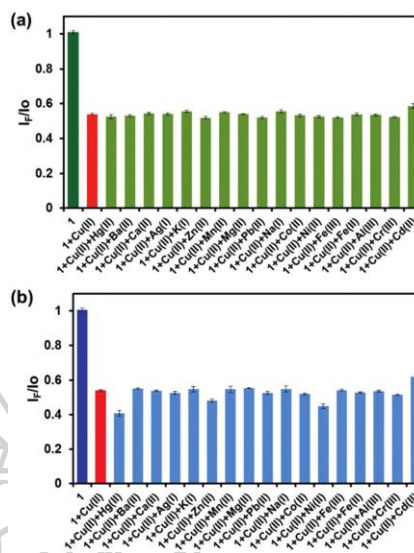


Fig. 6 Competitive experiments of **1**- Cu^{2+} ($\lambda_{\text{em}} = 717 \text{ nm}$) in 5 mM PBS buffer (pH 7.4): acetonitrile (95:5 v/v) with 0.5% Triton X-100 ($\lambda_{\text{ex}} = 650 \text{ nm}$). (a) $[\mathbf{1}] = 5.0 \mu\text{M}$, $[\text{Cu}^{2+}] = 2.33 \mu\text{M}$ and $[\text{M}^{n+}] = 2.33 \mu\text{M}$. (b) $[\mathbf{1}] = 5.0 \mu\text{M}$, $[\text{Cu}^{2+}] = 2.33 \mu\text{M}$ and $[\text{M}^{n+}] = 23.3 \mu\text{M}$. The error bars represent the standard deviation.

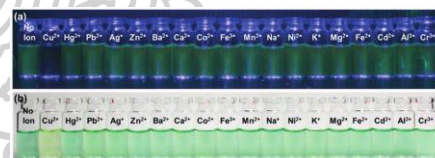


Fig. 7 (a) Fluorescence change and (b) chromogenic change of **1** (24 μM) in 5 mM PBS buffer (pH 7.4): acetonitrile (95:5 v/v) with 0.5% Triton X-100 solutions upon the addition of various metal ions of Cu^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Ag^+ , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Na^+ , Ni^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Al^{3+} , and Cr^{3+} (40 μM).

UV light (Fig. 7a). The addition of Cu^{2+} to the buffer solutions of **1** demonstrated that the color changed from green to light-green, which were easily visualized as shown in Fig. 7b.

The following experiments were performed to test the sensors in live cells. HepG2 cells (liver hepatocellular carcinoma) were incubated with **1** (50 μM) for 4 h at 37 $^{\circ}\text{C}$ in growth media, under physiological pH conditions. In the absence of additional Cu^{2+} , there was intense intracellular fluorescence upon excitation in green and blue channels (Fig. 8a) which confirmed that **1** was cell-permeable. When

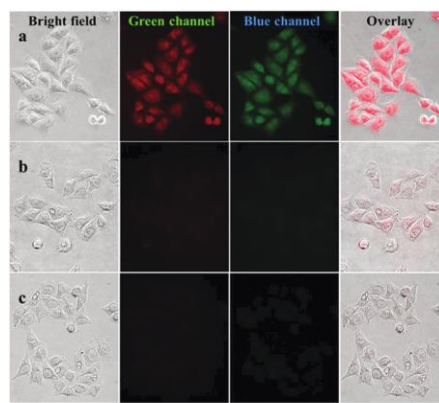


Fig. 8 Bright field and fluorescence images in the green and blue channels of HepG2. The fluorescence image of cells incubated with **1** (50 μM) at 37 $^{\circ}\text{C}$ growth media (10% DMSO) in each concentration of $\text{Cu}(\text{OAc})_2$: (a) 0 μM , (b) 20 μM , (c) 50 μM , respectively.

HepG2 cells were pre-incubated in Cu^{2+} (20 μM and 50 μM) for 1 h prior to **1** exposure, the fluorescence intensities in the green and blue channels were quenched and showed weaker fluorescence from the intracellular area (Fig. 8b and c). This result clearly demonstrated that **1** could detect Cu^{2+} and had a good potential for tracking Cu^{2+} in living cells.

Experimental

Materials and instrumentation

The reagents and solvents were obtained from Sigma-Aldrich Corporation and were used as received. The acetate salts were purchased from Strem Chemicals, Inc.

NMR spectra were obtained by using a Bruker Avance 300 spectrometer operating at 300 MHz for ^1H and at 75 MHz for ^{13}C in CDCl_3 and DMSO. HRMS results were carried out by using a Thermo Electron LCQ-DECA-XP, electrospray ionization trap mass spectrometer. UV-Visible absorption spectra were obtained by a single beam Hewlett Packard 8453 spectrophotometer. Fluorescence emission spectra were determined by a PerkinElmer Luminescence spectrometer LS 55 with excitation and emission slit widths at 10.0 nm. The scan rate was 300 nm min^{-1} .

Cell culture and fluorescence imaging

The HepG2 (liver hepatocellular carcinoma) cell lines were provided by the Department of Biology, Faculty of Science, Silpakorn University (Thailand). HepG2 cells were incubated with 50 μM **1** in growth media (10% DMSO), for 4 hours at 37 $^{\circ}\text{C}$. Cells were washed twice in PBS followed by 1 hour of incubation at 37 $^{\circ}\text{C}$ in PBS with no copper or 20 μM or 50 μM $\text{Cu}(\text{OAc})_2$.

Syntheses of compounds 3–6

The title compounds were prepared in the same manner as in the previous report.²⁷

Synthesis of compound 2

Dried triethylamine (0.2 mL, 3.4 mmol) was added to the solution of compound **3** (73 mg, 0.1 mmol) in 8.0 mL dried acetonitrile. The solution was stirred and cooled down at 0 $^{\circ}\text{C}$ for 15 min under an argon atmosphere. Then, bromoacetyl bromide (0.1 mL, 1.2 mmol) was added into the reaction and stirred at room temperature under an argon atmosphere. The reaction was followed by TLC. After completion, the solvent was removed by a rotary evaporator. The residue was dissolved in dichloromethane (30 mL) and extracted with sat. NaHCO_3 (30 mL \times 3) and brine (20 mL). The organic phase was dried over anhydrous Na_2SO_4 . The dichloromethane was removed under vacuum. Finally, the crude product was purified by preparative thin layer chromatography using CH_2Cl_2 :EtOAc (95:5, R_f = 0.45) to provide compound **2** (32 mg, 68%) as a dark green solid; ^1H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ 3.95 (s, 6H), 4.16 (s, 4H), 7.21 (d, J = 9.0 Hz, 4H), 7.54 (t, J = 7.8 Hz, 4H), 7.73 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.97 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 8.24 (d, J = 9.0 Hz, 6H), 10.61 (s, 2H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6): δ 30.8 (2 CH_2), 56.1 (2 CH_3), 115.0 (5CH), 120.3 (2CH), 120.8 (CH), 121.2 (2CH), 123.6 (2C), 125.7 (2CH), 129.7 (2CH), 132.3 (4CH), 132.8 (2C), 139.3 (2C), 142.7 (2C), 144.9 (2C), 157.9 (2C), 162.5 (2C), 165.4 (2C) ppm; HR-ESI MS calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{30}\text{BF}_2\text{F}_2\text{N}_5\text{O}_4\text{Na}^+$ ($M + \text{Na}$)⁺ 852.0603 m/z , found 852.0612 m/z .

Synthesis of sensor 1

Di-2-picolyamine (0.1 mL, 0.7 mmol) was added to the solution of compound **2** (100 mg, 0.1 mmol), N,N -diisopropylethylamine (0.3 mL, 2.2 mmol) in dried N,N -dimethylformamide 5.0 mL. The solution was stirred for 5 h at room temperature under an argon atmosphere. The solvent was removed by a rotary evaporator. The residue was dissolved in dichloromethane (30 mL) and extracted with sat. NaHCO_3 (30 mL \times 3). The organic phase was dried over anhydrous Na_2SO_4 . The solvent was removed under vacuum. Finally, the crude product was purified by preparative thin layer chromatography using CH_2Cl_2 :MeOH (90:10, R_f = 0.5) to provide sensor **1** (62 mg, 47%) as a dark green solid; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 3.52 (s, 4H), 3.90 (s, 8H), 3.93 (s, 6H), 7.14 (m, 12H), 7.34 (m, 4H), 7.55 (t, J = 6.0 Hz, 4H), 7.78 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.88 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 8.14 (d, J = 6.0 Hz, 4H), 8.27 (s, 2H) 8.56 (d, J = 4.8 Hz, 4H), 11.10 (s, 2NH) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 55.4 (2 CH_3), 58.9 (2 CH_2), 60.2 (4 CH_2), 114.3 (4CH), 118.8 (2CH), 120.2 (2CH), 120.6 (2CH), 122.4 (4CH), 123.2 (4CH), 124.1 (2C), 125.1 (2CH), 127.8 (2C), 128.9 (2CH), 129.9 (2C), 131.7 (4CH), 132.9 (2C), 136.5 (4CH), 139.0 (2C), 143.2 (2C), 145.3 (2C), 149.2 (4CH), 158.1 (2C), 162.0 (2C), 170.1 (2C) ppm; HR-ESI MS calcd for $\text{C}_{62}\text{H}_{55}\text{BF}_2\text{N}_{11}\text{O}_4^+$ ($M + \text{H}$)⁺ 1066.4494 m/z , found 1066.4491 m/z .

รายการอ้างอิง



รายการอ้างอิง

1. Kim, H. N., Ren, W. X., Kim, J. S., and Yoon, J., Fluorescent and colorimetric sensors for detection of lead, cadmium, and mercury ions, *Chem. Soc. Rev.*, 2012. 41: 3210-3244.
2. Que, E., Domaille, D.W., Chan, C.J., Metals in neurobiology: Probing their chemistry and biology with molecular imaging, *Chem Rev.* 2008. 108: 1517–1549.
3. Thiele, D.J., Gitlin, J.D., Assembling the pieces. *Nat Chem Biol*, 2008. 4: 145–147.
4. Davis, A.V., O’Halloran, T.V., A place for thioether chemistry in cellular copper ion recognition and trafficking. *Nat Chem Biol*, 2008. 4: 148–151.
5. Robinson, N.J., Winge, D.R., Assembling the pieces. *Annu. Rev. Biochem.*, 2010. 79: 537–562.
6. Looi, Y.H., et al., Involvement of Nox2 NADPH oxidase in adverse cardiac remodeling after myocardial infarction. *Hypertension*, 2008. 51: 319–325.
7. Kim, B.E., et al. *Cardiac copper deficiency activates a systemic signaling mechanism that communicates with the copper acquisition and storage organs.* *Cell Metab*, 2010. 11: 353–363.
8. Kang, Y.J., Copper and homocysteine in cardiovascular diseases. *Pharmacol Ther*, 2011. 129: 321–331.
9. Barnham, K. J., Masters, C. L., Bush AI., Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov*, 2004. 3: 205–214.
10. Gaggelli, E., Kozłowski, H., Valensin, D., Valensin, G., Copper homeostasis and neurodegenerative disorders (Alzheimer’s, prion, and Parkinson’s diseases and amyotrophic lateral sclerosis). *Chem Rev.*, 2006. 106: 1995–2044.
11. Lutsenko, S., Gupta, A., Burkhead, J.L., Zuzel, V. Cellular multitasking: The dual role of human Cu-ATPases in cofactor delivery and intracellular copper balance. *Arch Biochem Biophys*, 2008. 476: 22–32.
12. Brown, D., Kozłowski, H., Biological inorganic and bioinorganic chemistry of neurodegeneration based on prion and Alzheimer diseases. *Dalton Trans* 2004. 1907–1917.

13. Millhauser, G., Copper binding in the prion protein. *Acc Chem Res.*, 2004. 37: 79–85.
14. Camakaris, J., Voskoboinik, I., Merce,r J.F., Molecular mechanisms of copper homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun.*, 1999. 261: 225–232.
15. Bertini, I., Rosato, A., Menkes disease. *Cell Mol Life Sci.*, 2008. 65: 89–91.
16. Kaler, S.G., ATP7A-related copper transport diseases—emerging concepts and future trends. *Nat Rev Neurol*, 2011. 7: 15–29.
17. Cox, D., Moore, S.D., Copper transporting P-type ATPases and human disease. *J Bioenerg Biomemb*, 2002. 34: 333–338.
18. Waddington, R., Langley, M., Altered expression of matrix metalloproteinases within mineralizing bone cells in vitro in the presence of fluoride. *Connective tissue research.*, 2003. 44: 88-95.
19. Horowitz, H. S., Early childhood caries: prevalence and risk factors in Seoul, Korea. *J. Public Health Dent.*, 2003, 63: 183–188.
20. Kleerekoper, M., *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, 1998, 27: 441–452.
21. Weatherall, J. A., *Pharmacology of Fluorides.* in *Handbook of Experimental Pharmacology XX/1*, Springer-Verlag, Berlin, 1969, Part 1, 141–172.
22. Cittanova, M. L., Lelongt, B. and Verpont, M. C., Fluoride ion toxicity in human kidney collecting duct cells. *Anesthesiology*, 1996. 84: 428–435.
23. Singh, P. P., Barjatiya, M. Dhing, K., S., Bhatnagar, R., Kothari, S. and Dhar, V., Distribution and Removal of Fluoride Ions in the Drinking Waters in the Algerian South (Ouargla as a Showcase). *Urol. Res.*, 2001. 29: 238–244.
24. Gazzano, E., Bergandi, L., Riganti, C., Aldieri, E., Doublier, S., Costamagna, C., et al. Fluoride effects: the two faces of janus. *Curr Med Chem.* 2010. 17: 2431-41.
25. Grandjean, P., Landrigan, P.J., Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *The Lancet.*, 2006. 368: 2167-2178.
26. Mullenix, P.J., Denbesten, P.K., Schunior, A., Kernan, W.J., Neurotoxicity of sodium fluoride in rats. *Neurotoxicol Teratol.*, 1995. 17: 169-77.
27. Arhima, M. H., Gulati, O. P. and Sharma, S. C., The effect of Pycnogenol on fluoride induced rat kidney lysosomal damage in vitro. *Phytother. Res.*, 2004. 18: 244–246.

28. Matsui, M., Morimoto, M., Horimoto, K. and Nishimura, Y., Some characteristics of fluoride-induced cell death in rat thymocytes: Cytotoxicity of sodium fluoride. *Toxicol. In vitro*, 2007. 21: 1113–1120.
29. Hudnall, T. W. and Gabbai, F. P., A BODIPY boronium cation for the sensing of fluoride ions. *Chem. Commun.*, 2008. 38: 4596–4597.
30. Cametti, M. and Rissanen, K., Recognition and sensing of fluoride anion. *Chem. Commun.*, 2009. 20: 2809–2829.
31. Guidelines for drinking-water quality, World Health Organization, Geneva, 2011.
32. Council Directive 98/83/EC on the Quality of Water Intended for Human Consumption, European Union, November 3, 1998; source: CELEX-EUR Official Journal 1998, L330, 32–54.
33. United States Environmental Protection Agency, National Primary Drinking Water Regulations, <https://www.epa.gov/ground-waterand-drinking-water/national-primary-drinking-water-regulations>.
34. Zhang, Q., Majumdar, H. S., Kaisti, M., Prabhu, A., Ivaska, A., Osterbacka, R., Rahman, A., Levon, K., Surface Functionalization of Ion-Sensitive Floating-Gate Field-Effect Transistors with Organic Electronics. *IEEE Trans. Electron Devices*, 2015. 62: 1291–1298.
35. Yiping, H., Caiyun, W., Ion chromatography for rapid and sensitive determination of fluoride in milk after headspace single-drop microextraction with in situ generation of volatile hydrogen fluoride. *Anal. Chim. Acta*, 2010. 661: 161–166.
36. Zhou, X. Q., Lai, R., Li, H., Stains, C. I., The 8-Silyloxyquinoline Scaffold as a Versatile Platform for the Sensitive Detection of Aqueous Fluoride. *Anal. Chem.*, 2015. 87: 4081–4086.
37. Chen, S., Yu, H., Zhao, C., Hu, R., Zhu, J., Li, L., Indolo[3,2-b]carbazole derivative as a fluorescent probe for fluoride ion and carbon dioxide detections. *Sens. Actuators B*, 2017. 250: 591–600.
38. Zheng, X. J., Zhu, W. C., Liu, H., Huang, Y., Lu, Z. Y., Ai, H., Highly Selective Colorimetric/ Fluorometric Dual-Channel Fluoride Ion Probe, and Its Capability of Differentiating Cancer Cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2014. 6: 7996–8000.

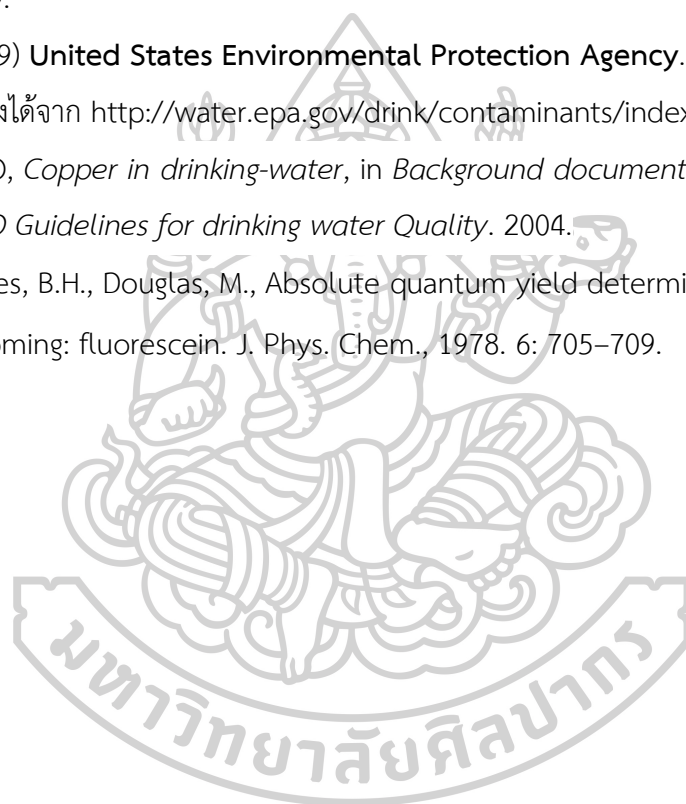
39. Ke, B. W., Chen, W. X., Ni, N. T., Cheng, Y. F., Dai, C. F., Dinh, H., Wang, B. H., A Fluorescent Probe for Rapid Aqueous Fluoride Detection and Cell Imaging. *Chem. Commun.*, 2013. 49: 2494–2496.
40. Zhang, J. F., Lim, C. S., Bhuniya, S., Cho, B. R., Kim, J. S., A Highly Selective Colorimetric and Ratiometric Two-Photon Fluorescent Probe for Fluoride Ion Detection. *Org. Lett.*, 2011. 13: 1190–1193.
41. Kim, H. N., Ren, W. X., Kim, J. S., Yoon, J., Fluorescent and Colorimetric Sensors for Detection of Lead, Cadmium, and Mercury Ions. *Chem. Soc. Rev.*, 2012. 41: 3210-3244.
42. Lee, S. A., You, G. R., Choi, Y. W., Jo, H. Y., Kim, A. R., Noh, I., Kim, S.-J., Kim, Y., Kim, C. A., New Multifunctional Schiff Base as a Fluorescence Sensor for Al³⁺ and a Colorimetric Sensor for CN⁻ in Aqueous Media: An Application to Bioimaging. *Dalton Trans.*, 2014. 43: 6650-6659.
43. Liu, K., Zhao, X., Liu, Q., Huo, J., Li, Z., Wang, X. A., Novel Multifunctional BODIPY-Derived Probe for the Sequential Recognition of Hg²⁺ and I⁻, and the Fluorometric Detection of Cr³⁺. *Sens. Actuators B*, 2017. 239: 883-889.
44. La, Y.K., Hong, J.A., Jeong, Y.J., Lee, J. A., 1,8-Naphthalimide-Based Chemosensor for Dual-Mode Sensing: Colorimetric and Fluorometric Detection of Multiple Analytes. *RSC Adv.*, 2016. 6: 84098-84105.
45. Dhaka, G., Kaur, N., Singh, J., Spectroscopic Evaluation of a Novel Multi-Element Sensitive Fluorescent Probe Derived from 2-(2'-Phenylbenzamide) benzimidazole: Selective Discrimination of Al³⁺ and Cd²⁺ from Their Congeners. *Inorg. Chem. Commun.*, 2016. 72: 57-61.
46. Miessler, G. L., *Inorganic Chemistry*, (2004). 3rd Ed., Pearson Education.
47. Park, S. M., Kim, M. H., Choe, J. I., No, K. T., Chang, S. K., Cyclams Bearing Diametrically Disubstituted Pyrenes as Cu²⁺- and Hg²⁺-Selective Fluoroionophores. *Journal Organic Chemistry*, 2007. 72: 3550-3553.
48. Kim, S. H., Kim, J. S., Park, S. M., Chang, S. K., Hg²⁺-Selective OFF–ON and Cu²⁺-Selective ON–OFF Type Fluoroionophore Based upon Cyclam. *Organic Letter*, 2006. 8: 371-373.

49. Martinez, R., Espinosa, A., Tarraga, A., Molina, P., New Hg²⁺ and Cu²⁺ selective chromo and fluoroionophore based on a bichromophoric azine. *Organic Letter*, 2005. 7: 5869-5872.
50. Chen, Q.Y., Chen, C.F., A new Hg²⁺-selective fluorescent sensor based on a dansyl amide-armed calix[4]-aza-crown. *Tetrahedron Letter*, 2005. 46: 165-168.
51. Liu, S. Y., He, Y. B., Qing, G. Y., Xu, K. X., Qin, H. J., Fluorescent sensors for amino acid anions based on calix[4]arenes bearing two dansyl groups. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2005. 16: 1527-1534.
52. Brannon, J. H., Magde, D., Absolute quantum yield determination by thermal blooming. *Fluorescein. Journal Physical Chemistry B*, 1978. 6: 705-709.
53. Ali, M., Dutta, P., Pandey, S., Effect of Ionic Liquid on Prototropic and Solvatochromic Behavior of Fluorescein. *Journal Physical Chemistry B*, 2010. 114: 15042-15051.
54. Avanish, D., Sunit, K., Mangalampalli, R., Nucleophilic addition of CN⁻ ion to CN bond of aza-BODIPY leading to turn-on fluorescence sensor. *Sensor and Actuator B*, 2016. 224: 364-371.
55. Tachapermpon, Y., Thavornpradit, S., Charoenpanich, A., Sirirak, J., Burgess, K., Wanichacheva, N., Near-infrared aza-BODIPY fluorescent probe for selective Cu²⁺ detection and its potential in living cell imaging. *Dalton Trans.*, 2017. 46: 16251-16256.
56. Tian, y. Li., Zaifei. M., Zhi, Q., Christian, K., Koen, V. Z., Karl, L., Aza-BODIPY Derivatives Containing BF(CN) and B(CN)₂ Moieties. *Chempluschem*, 2017. 82: 190-194.
57. Nolan, E. M., Lippard, S. J., Turn-On and Ratiometric Mercury Sensing in Water with a Red-Emitting Probe. *Journal of the American Chemical Society.*, 2007. 129: 5910-5918.
58. Liu, W., Xu, L., Sheng, R., Wang, P., Li, H., Wu, S., A Water-Soluble "Switching On" Fluorescent Chemosensor of Selectivity to Cd²⁺. *Organic Letters*, 2007. 9: 3829-3832.

59. McQuade, L. E., Lippard, S., Fluorescence-based nitric oxide sensing by Cu(II) complexes that can be trapped in living cells. *J. Inorganic Chem.*, 2010. 49: 7464-7471.
60. Burdette, S. C., Walkup, G. K., Spingler, B., Tsien, R. Y., Lippard, S. J., Fluorescent sensors for Zn²⁺ based on a fluorescein platform: synthesis, properties and intracellular distribution. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001. 123: 7831-7841.
61. Jokic, T., Borisov, S. M., Saf, R., Nielsen, D. A., Kühn, M., Klimant, I., Highly photostable near-infrared fluorescent pH indicators and sensors based on BF₂-chelated tetraarylazadipyrrro methene dyes. *Anal. Chem.*, 2012. 84: 6723-6730.
62. Adarsh, N., Shanmugasundaram, M., Ramaiah, D., Efficient reaction based colorimetric probe for sensitive detection, quantification, and on-site analysis of nitrite ions in natural water resources. *Anal. Chem.*, 2013. 85: 10008-10012.
63. Liu, Y., Zhu, J., Xu, Y., Qin, Y., Jiang, D., Boronic Acid Functionalized Aza-Bodipy (azaBDPBA) based Fluorescence Optodes for the Analysis of Glucose in Whole Blood. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2015. 7: 11141-11145.
64. Jiang, D., Zhao, J., Li, Q., Sun, C., Guan, J., Sun, G., Synthesis of NIR fluorescent thienyl-containing aza-BODIPY and its application for detection of Hg²⁺: Electron transfer by bonding with Hg²⁺. *Dyes and Pigments*, 2016. 125: 136-141.
65. Zeng, L., Evan, W. M., Arnd, P., Ehud, Y. I., Christopher, J. C., Effects of Thioether Substituents on the O₂ Reactivity of β -Diketiminato-Cu(I) Complexes: Probing the Role of the Methionine Ligand in Copper Monooxygenases. *Journal of American Chemical Society*, 2006. 128: 3445-3458.
66. Aksuner N., Emur, H., Ibrahim, Y., Alaadin, C., A highly sensitive and selective fluorescent sensor for the determination of copper(II) based on a Schiff base. *Dye and Pigments*, 2009. 83: 211-217.
67. Wang H., F., Shu, P. W., A pyrene-based highly selective turn-on fluorescent sensor for copper(II) ions and its application in living cell imaging. *Sensor and Actuator B*, 2013. 181: 743-748.

68. Li, H., Zhang, P., Smaga, L. P., Hoffman, R. A., Chan, J. K. F., Photoacoustic Probes for Ratiometric Imaging of Copper(II). *Journal of American Chemical Society*, 2015. 137: 15628-15631.
69. Di Cesare, N., Lakowicz, J. R., New Sensitive and Selective Fluorescent Probes for Fluoride Using Boronic Acids. *Anal. Biochem.*, 2002. 301: 111-116.
70. Jun, E. J., Xu, Z., Lee, M., Yoon, J., A ratiometric fluorescent probe for fluoride ions with a tridentate receptor of boronic acid and imidazolium. *Tetrahedron Lett.*, 2013. 54: 2755-2758.
71. Badugu, R., Lakowicz, J. R., Geddes, C. D., A wavelength-ratiometric fluoride-sensitive probe based on the quinolinium nucleus and boronic acid moiety. *Sens. Actuators B*, 2005. 104: 103-110.
72. Koskela, S. J. M., Fyles, T. M., James, T. D., A ditopic fluorescent sensor for potassium fluoride. *Chem. Commun.*, 2005. 7: 945-947.
73. Nicolini, J., Testoni, F. M., Schuhmacher, S. M., Machado, V. G., Use of the interaction of a boronic acid with a merocyanine to develop an anionic colorimetric assay. *Tetrahedron Lett.*, 2007. 48: 3467-3470.
74. Galbraith, E., Fyles, T. M., Marken, F., Davidson, M. G., James, T. D., Fluorescent boron bis(phenolate) with association response to chloride and dissociation response to fluoride. *Inorg. Chem.*, 2008. 47: 6236-6244.
75. Rao, M. R., Ravikanth, M. J., Boron Complexes of Oxasmaragdyrin, a Core-Modified Expanded Porphyrin. *Org. Chem.*, 2011. 76: 3582-3587.
76. Tan, W., Zhang, D., Zhu, D., 4-N-Methyl-N'-(2-dihydroxyboryl-benzyl)amino benzonitrile and its boronate analogue sensing saccharides and fluoride ion. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2007. 17: 2629-2633.
77. Kamkaew, A., Burgess, K., Aza-BODIPY dyes with enhanced hydrophilicity. *Chemical Communications*, 2015. 51: 10664-10667.
78. Liu, W., Xu, L., Sheng, R., Wang, P., Li, H., Wu, S., A water-soluble "switching on" fluorescent chemosensor of selectivity to Cd²⁺. *Organic Letter*, 2007. 9: 3829-3832.

79. Benesi, H. A., Hildebrand, J. H., A Spectrophotometric Investigation of the Interaction of Iodine with Aromatic Hydrocarbons. *Journal of the American Chemical Society*, 1949. 71: 2703-2707.
80. (a) WHO, copper in drinking water, WHO reference number: WHO/SDE/WSH/03.04/88, 2004; (b) US EPA, National Primary Drinking Water Regulations: EPA 812-Z-94-001, May 2009.
81. Frisch, M. J. et al., Gaussian 09W, Revision A.1, Gaussian Inc, Wallingford, CT, 2009.
80. (2559) **United States Environmental Protection Agency**. เข้าถึงเมื่อ 31 มกราคม. เข้าถึงได้จาก <http://water.epa.gov/drink/contaminants/index.cfm>.
81. WHO, *Copper in drinking-water*, in *Background document for development of WHO Guidelines for drinking water Quality*. 2004.
82. James, B.H., Douglas, M., Absolute quantum yield determination by thermal blooming: fluorescein. *J. Phys. Chem.*, 1978. 6: 705–709.



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ยอดขวัญ เตชะเพิ่มผล
วัน เดือน ปี เกิด	8 มีนาคม 2533
สถานที่เกิด	นครปฐม
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2554 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา เคมี มหาวิทยาลัยศิลปากร (เกียรตินิยมอันดับ 1) พ.ศ. 2557 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา เคมีอินทรีย์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร พ.ศ. 2558 ศึกษาต่อระดับปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชา เคมีอินทรีย์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ที่อยู่ปัจจุบัน	262 ถ.เกษตรสิน ต.ลำพญา อ.เมือง จ.นครปฐม 73000
ผลงานตีพิมพ์	Tachapermpon, Y., Chaneam, S., Charoenpanich, A., Sirirak, J., Wanichacheva, N., Highly Cu ²⁺ -sensitive and selective colorimetric and fluorescent probes: Utilizations in batch, flow analysis and living cell imaging. <i>Sens. Actuator B: Chem.</i> , 2017. 241: 868-878. Tachapermpon, Y., Maniam, S., Wanichacheva, N., Langford, S., New Di-, Tri-, and Tetra-Core-Functionalized Naphthalene Diimides from Reactions of Allyl Ethers with Lewis Acids. <i>Asian J. Org. Chem.</i> , 2017. 6: 47-53. Tachapermpon, Y., Thavornpradit, S., Charoenpanich, A., Sirirak, J., Burgess, K., Wanichacheva, N., Near-infrared aza-BODIPY fluorescent probe for selective Cu ²⁺ detection and its potential in living cell imaging. <i>Dalton Trans.</i> , 2017. 46: 16251-16256.
รางวัลที่ได้รับ	พ.ศ. 2548-ปัจจุบัน โครงการพัฒนาและส่งเสริม ผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (โครงการ พสวท.) พ.ศ. 2555 ทุนผู้ช่วยสอน (Teaching assistant) ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

- พ.ศ. 2556 ทุนวิจัย Japan Student Service Organization ณ Japan Advanced Institute of Science and Technology ประเทศญี่ปุ่น
- พ.ศ. 2557 ทุนทำวิจัยต่างประเทศระยะสั้น ในโครงการพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ณ Monash University ประเทศออสเตรเลีย
- พ.ศ. 2559 รางวัลโปสเตอร์ดีเด่น “Springer Nature Publishing Prize” of poster presentation in 5th International Conference on Molecular Sensors and Molecular Logic Gates (MSMLG2016) ณ ประเทศอังกฤษ
- พ.ศ. 2561 ทุนทำวิจัยต่างประเทศระยะสั้น ในโครงการพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ณ University of Bath ประเทศอังกฤษ
- พ.ศ. 2562 ทุนทำวิจัยต่างประเทศระยะสั้น ในโครงการพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ณ University of Houston ประเทศสหรัฐอเมริกา

