การสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ในช่วงอัลตราไวโอเลตวิสิเบิลและช่วงใกล้อินฟราเรดชนิดใหม่สำหรับประยุกต์ใช้เป็นเซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนและสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิง

โดย
นางสาวพรทิพย์ ปิยะนุช

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

การสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ในช่วงอัลตราไวโอเลตวิสิเบิลและช่วงใกล้อินฟราเรดชนิดใหม่สำหรับประยุกต์ใช้เป็นเซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนและสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิง

โดย
นางสาวพรทิพย์ ปิยะนุช

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

SYNTHESES OF NOVEL ULTRAVIOLET-VISIBLE AND NEAR-INFRARED FLUORESCENT PROBES FOR THEIR APPLICATIONS OF ION SENSING AND PETROLEUM LABELING



By

MISS Pornthip PIYANUCH

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for Doctor of Philosophy ORGANIC CHEMISTRY

Department of CHEMISTRY

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2019

Copyright of Graduate School, Silpakorn University

หัวข้อ	การสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ในช่วงอัลตราไวโอเลตวิสิเบิลและช่วงใกล้อินฟราเรดชนิดใหม่สำหรับประยุกต์ใช้เป็นเซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนและสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิง
โดย	พรทิพย์ ปิยะนุช
สาขาวิชา	เคมีอินทรีย์ แบบ 1.1 ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. นันทนิตย์ วานิชาชีวะ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต

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

พิจารณาเห็นชอบโดย

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

---------- อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.นันทนิตย์ วานิชาชีวะ)

---------- ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(ดร.ธนศาสตร์ สุขศรีเมือง)

58302807 : เคมีอินทรีย์ แบบ 1.1 ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
คำสำคัญ : ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์, เซ็นเซอร์ทางเคมี, สารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิง

นางสาว พรทิพย์ ปิยะนุช: การสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ในช่วงอัลตราไวโอเลตวิสิเบิลและช่วงใกล้อินฟราเรดชนิดใหม่สำหรับประยุกต์ใช้เป็นเซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออนและสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : รองศาสตราจารย์ ดร. นันทนิตย์ วานิชาชีวะ

วิทยานิพนธ์นี้ได้ออกแบบและสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดใหม่จำนวน 4 ชนิด บนพื้นฐานของสารประกอบโรดามีนบี (rhodamine B) เอซาโบดิปี (aza-BODIPY) และสารประกอบ อินโดล (indole) ซึ่งแสดงการดูดกลืนและคายแสงในช่วงความคลื่นยูวี-วิสิเบลและช่วงใกล้อินฟราเรด สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ 1 ถูกออกแบบโดยการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันบนพื้นผิวของ polyhedral oligomeric silsesquioxanes (POSS) ด้วยฟลูออโรฟอร์โรดามีนบีจำนวนหลายหมู่ผ่านปฏิกิริยา Schiff base (hydrazone) formation เพื่อเพิ่มความไวในการตรวจวัดไอออนปรอทในสารละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ เซ็นเซอร์ 1 แสดงการตรวจวัดไอออนปรอทได้อย่างว่องไวและจำเพาะเจาะจงสูงด้วยค่าความสามารถในการตรวจวัดต่ำสุดเท่ากับ 0.63 ppb อีกทั้งยังสามารถวิเคราะห์หาไอออนปรอทในตัวอย่างจริง ได้แก่ น้ำแร่ น้ำดื่มและครีมบำรุงผิวกาย ได้ด้วย สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ 2 ถูกสังเคราะห์บนพื้นฐานเอซาโบดิปีฟลูออโรฟอร์เชื่อมต่อกับหมู่ไอโซไทโอไซยาเนตสำหรับตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ด้วยปฏิกิริยาการเติมของนิวคลีโอไฟล์ในสารละลายบัฟเฟอร์ เซ็นเซอร์นี้แสดงการตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ได้อย่างว่องไวและจำเพาะเจาะจงสูงด้วยค่าความสามารถในการตรวจวัดต่ำสุดเท่ากับ 19 ppb อีกทั้งยังสามารถวิเคราะห์หาไอออนไซยาไนด์ในเซลล์สิ่งมีชีวิตได้ สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ 3 ประกอบด้วยเซ็นเซอร์ทางเคมีจำพวกสารประกอบ indole จำนวน 3 โมเลกุลที่มีหมู่แทนที่บนวงเบนซีนตำแหน่งที่ 5 ที่แตกต่างกันได้แก่ -H -OCH_3 และ -Br โดยเซ็นเซอร์ทั้ง 3 แสดงการตรวจวัดไอออนเหล็กเฟอรัส (Fe^{2+}) และไอออนเหล็กเฟอริก (Fe^{3+})ได้อย่างจำเพาะเจาะจงสูงและว่องไวด้วยค่าความสามารถในการตรวจวัดต่ำสุดแตกต่างกันซึ่งขึ้นอยู่กับหมู่แทนที่บนวงเบนซีนของโครงสร้าง อีกทั้งยังสามารถวิเคราะห์หาไอออนเหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) ในเซลล์สิ่งมีชีวิตได้ สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ 4 ถูกเตรียมจากเอซาโบดิปีฟลูออโรฟอร์เพื่อใช้เป็นสารทำเครื่องหมายในน้ำมันเชื้อเพลิง 3 ชนิด ได้แก่ น้ำมันดีเซล, น้ำมันแก๊สโซฮอล์อี 10 ออกเทน 91 และน้ำมันแก๊สโซฮอล์อี 10 ออกเทน 95 โดยสามารถตรวจวัดได้ด้วยการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ซึ่งสามารถวิเคราะห์หาปริมาณสารทำเครื่องหมายได้ด้วยวิธีการทางสเปกโตรสโกปี นอกจากนี้สารทำเครื่องหมายยังมีความคงตัวในน้ำมันเชื้อเพลิงอย่างน้อย 3 เดือน และไม่ส่งผลกระทบให้คุณสมบัติทางกายภาพของน้ำมันเชื้อเพลิงเปลี่ยนแปลง

58302807 : Major ORGANIC CHEMISTRY
Keyword : FLUORESCENT SENSOR, CHEMOSENSOR, PETROLEUM LABELING

MISS PORNTHIP PIYANUCH : SYNTHESES OF NOVEL ULTRAVIOLET-VISIBLE AND NEAR-INFRARED FLUORESCENT PROBES FOR THEIR APPLICATIONS OF ION SENSING AND PETROLEUM LABELING THESIS ADVISOR : ASSOCIATE PROFESSOR DR. NANTANIT WANICHACHEVA

In this work, four new fluorescence probes were successfully synthesized based on rhodamine B, Aza-BODIPY and indole alkaloid compounds. The compounds offered the absorption and emission in the UV-visible and near-infrared (NIR) regions. Fluorescence probe 1 was designed by functionalization on the surface of polyhedral oligomeric silsesquioxanes (POSS) with several rhodamine B fluorophores ***via*** a Schiff base (hydrazone) formation for increasing the sensitivity of Hg^{2+}-detection in aqueous ethanol solution. The sensor offered high selectivity and provided very low detection limit (0.63 ppb). In addition, this sensor was successfully utilized for the selective and sensitive determination of Hg^{2+} ion in real samples such as mineral water, drinking water and skin lightening cream. Fluorescence probe 2 was synthesized based on Aza-BODIPY containing isothiocyanate groups for cyanide ion sensing ***via*** nucleophilic addition reaction in aqueous buffer solution. The probe can quantitatively determine CN^- with high specificity and sensitivity, as well as a low detection limit (19 ppb) Moreover, this probe was compatible and capable of sensing cyanide anion in living cells. Fluorescence probe 3 is a series of indole-based chemosensors consist of three isomeric Iheyamines compound with different substituents on benzene ring at position 5 (-H, $-OCH_3$, -Br). The probe showed high sensitivity and selectivity for Fe^{2+} and Fe^{3+} detection over other metal ions depended on their substituent on benzene ring and exhibited the potential for the detection of Fe^{3+} in HeLa cellular system. Fluorescence probe 4 was prepared based on the Aza-BODIPY which was utilized as a taxation petroleum marker. Probe 4 could be used as fluorescent petroleum marker for the quantitative determination of different commercial fuel oils, (diesel and gasohol). Moreover, this marker was stable under storage conditions over a period of at least 3 months and did not alter the physical properties of the three fuel oils according to the American Society for Testing and Materials standard (ASTM).

มหาวิทยาลัยศิลปากร

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดีเพราะได้รับความกรุณาชี้แนะและช่วยเหลือเป็นอย่างดี จากผู้มีพระคุณหลายท่าน

ขอขอบคุณโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษกสำหรับการสนันสนุนตลอดการศึกษาระดับปริญญาเอกและการดำเนินงานวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร. นันทนิตย์ วานิชาชีวะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ เป็นอย่างสูงสำหรับความกรุณาที่มีให้ ทั้งการให้คำปรึกษา คำแนะนำ ความรู้ รวมไปถึงความช่วยเหลืออันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการทำวิทยานิพนธ์ซึ่งทำให้งานนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ตลอดจนกำลังใจ โอกาสและประสบการณ์ดีๆ ที่มอบให้ดิฉันตลอดมา

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กนกอร ระย้านิล ประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และ ดร.ธนศาสตร์ สุขศรีเมือง อาจารย์กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำแนะนำต่างๆ อันเป็นประโยชน์ต่อวิทยานิพนธ์นี้และการพัฒนางานวิจัยให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นในอนาคต

ขอขอบคุณพ่อ คุณแม่ และพี่ชาย ที่เป็นกำลังใจ ให้ความรักความอบอุ่นและการสนับสนุนในทุกๆ เรื่อง ตลอดจนคำปรึกษาที่ดีมากมายมาโดยตลอด

ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร สำหรับความรู้และประสบการณ์ที่ดี ในขณะที่ดิฉันได้ศึกษาอยู่ ณ สถาบันการศึกษาแห่งนี้

ขอขอบคุณ Prof.Dr. Kevin Burgess อาจารย์ต่างประเทศ สำหรับการให้โอกาสในการเดินทางไปทำวิจัย ณ ต่างประเทศ ที่มหาวิทยาลัย Texas A&M เมืองเท็กซัส ประเทศสหรัฐอเมริกา ทำให้ได้รับความรู้และประสบการณ์อันดีที่เป็นประโยชน์ต่อวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณอาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่าน ที่กรุณาประสิทธิ์ประสาทความรู้ต่างๆ ทั้งความรู้ในด้านวิชาการและด้านการดำเนินชีวิต

ขอขอบคุณพี่ น้อง และเพื่อนในกลุ่มทำงานทุกคน สำหรับคำปรึกษาในการแก้ปัญหาทางด้านต่างๆ และไมตรีจิตอันดีที่มอบให้แก่กันมาโดยตลอด

สุดท้ายขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาเคมีทุกท่าน ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการดำเนินงานเอกสาร อีกทั้งขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเคมีทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือด้านอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำวิทยานิพนธ์ ด้วยความเอื้อเฟื้อตลอดมา

ประโยชน์อันใดที่เกิดจากการทำวิทยานิพนธ์นี้ ย่อมเป็นผลมาจากความกรุณาของทุกท่านดังกล่าว ดิฉันรู้สึกซาบซึ้งและระลึกถึงความกรุณาเป็นอย่างยิ่ง จึงใคร่ขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

พรทิพย์ ปิยะนุช

มหาวิทยาลัยศิลปากร

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ช

สารบัญ ..... ฌ

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญรูปภาพ ..... ฎ

บทที่ 1 1

บทนำ 1

บทที่ 2 7

ทบทวนวรรณกรรม 7

บทที่ 3 16

วิธีการทดลอง 16

บทที่ 4 49

ผลการดำเนินงานวิจัย 49

บทที่ 5 142

สรุปผลการทดลอง 142

ภาคผนวก 145

รายการอ้างอิง 182

ประวัติผู้เขียน 187

สารบัญตาราง

หน้า

No table of figures entries found.

สารบัญรูปภาพ

หน้า

No table of figures entries found.

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรงงานอุตสาหกรรมในปัจจุบันได้มีการขยายจำนวนเพิ่มมากขึ้นเพื่อตอบสนองความต้องการในด้านต่างๆ ของมนุษย์ ทำให้การดำรงชีวิตของมนุษย์มีความสะดวกสบายมากขึ้นซึ่งในกระบวนการผลิตต่างๆ นั้นมักมีการใช้สารเคมีในขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งอยู่เสมอทำให้สารเคมีที่เหลืออยู่หรือของเสียที่เกิดจากกระบวนการผลิตนี้อาจตกค้างจนเป็นพิษต่อคนและสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะมลพิษที่อยู่ในรูปของสารประกอบไอออนโลหะ เช่น ปรอทซึ่งเป็นโลหะหนักที่อยู่ในรูปของเหลวสามารถระเหยกลายเป็นไอได้ทำให้เป็นอันตรายต่อร่างกายได้ง่ายขึ้น สามารถปนเปื้อนได้ในสิ่งแวดล้อมทั้งในดิน น้ำ อากาศ ในสิ่งมีชีวิตและสะสมในเนื้อเยื่อสัตว์น้ำ ปรอทอนินทรีย์ชื่อว่า methylmercury ที่ปนเปื้อนอยู่ในธรรมชาติหากร่างกายมนุษย์เรามีการสะสมปริมาณปรอทในปริมาณมากจะส่งผลให้ DNA สมอง ระบบประสาทถูกทำลายรวมถึงก่อให้เกิดโรคมินามาตะ โรคนี้แสดงผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง มีอาการบวมหรืออักเสบที่สมอง แขนขาเคลื่อนไหวลำบาก มีการกระตุกตัวแข็ง แขนขาบิดงออย่างรุนแรง[1-4] สังกะสี เป็นโลหะสีเงิน มันวาว ที่นิยมนำมาใช้ในภาคอุตสาหกรรมมากมาย และมีความสำคัญต่อการทำงานของทุกอวัยวะในร่างกาย แต่หากมีการสะสมของสังกะสีในร่างกายมากเกินไปจนส่งผลให้กระบวนการในร่างกายที่มีสังกะสีเป็นองค์เกิดความผิดปกติจะสามารถก่อให้เกิดโรคต่างๆ ได้เช่น ภาวะโลหิตจางเพราะสังกะสีจะเข้าไปลดการดูดซึมทองแดงและธาตุเหล็ก โรคอัลไซเมอร์ โรคลมบ้าหมู โรคสมองขาดเลือด และโรคพาร์กินสัน [5] เหล็ก เป็นโลหะหนักชนิดหนึ่งที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในระบบสิ่งมีชีวิต ซึ่งมีส่วนสำคัญในกระบวนการทางเคมีต่างภายในเซลล์ (cell metabolism) ได้แก่ การสร้างเม็ดเลือดแดง (hemoglobin formation) กระบวนการขนส่งออกซิเจน (oxygen transport) และเป็นโคแฟคเตอร์ของเอนไซม์ [6] หากเมื่อร่างกายมีไอออนเหล็กในปริมาณที่มากหรือน้อยเกินไปจะก่อให้เกิดผลกระทบต่อกระบวนการทางเคมีต่างภายในเซลล์และก่อให้เกิดโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคกระดูกพรุน โรคหัวใจ ภาวะเหล็กเกินและโรคอัลไซเมอร์ [7-9]

โดยในประเทศไทยเองได้มีข่าวการปนเปื้อนของไอออนอันตรายอยู่บ่อยครั้ง ดังเช่นในเดือนมกราคม พ.ศ. 2556 พบว่ามีโลหะปรอทปนเปื้อนเกินค่ามาตรฐานหลายเท่า จากการสุ่มตรวจตัวอย่างจากปลาในแหล่งน้ำ และเส้นผมของชาวบ้านในบริเวณ ต.ท่าตูม อ.ศรีมหาโพธิ์ จ.ปราจีนบุรี ซึ่งคาดว่ามีการปนเปื้อนมาจากโรงไฟฟ้าถ่านหินและโรงงานเยื่อกระดาษ *(ที่มา สำนักข่าวไทย TNA News วันที่ 9 มกราคม พ.ศ. 2556)* ต่อมาในเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2556 เกิดเหตุน้ำมันรั่วกลางทะเลจากท่อรับน้ำมันดิบ ทำให้เกิดคราบสีดำของน้ำมันดิบเป็นวงกว้างบริเวณทะเลเกาะเสม็ดและพบว่ามีโลหะปรอทปนเปื้อนเกินกว่าปริมาณปรอทมาตรฐานที่มีได้ในน้ำทะเลถึง 29 เท่า *(ที่มา ASTV ผู้จัดการรายวัน วันที่ 14 สิงหาคม 2556)*

นอกจากไอออนโลหะหนักที่สามารถก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกายของมนุษย์ได้นั้น ไอออนลบก็สามารถสร้างความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิตได้เช่นเดียวกัน นั่นคือไอออนไซยาไนด์ ซึ่งเป็น

อีกหนึ่งไอออนที่มีอันตรายต่อร่างกายมนุษย์ สารประกอบที่เป็นเกลือไซยาไนด์ (Cyanide salts) มีหลายชนิดที่พบบ่อย เช่น โซเดียมไซยาไนด์ (Sodium cyanide) โพแทสเซียมไซยาไนด์ (Potassium cyanide) หรือพบในรูปเกลือชนิดอื่นๆ เช่น แคลเซียมไซยาไนด์ (Calcium cyanide) ไอโอดีนไซยาไนด์ (Iodine cyanide) เป็นต้น สารประกอบเกลือไซยาไนด์เหล่านี้จัดเป็นสารพิษที่พบได้ทั่วไปในพืชหลากหลายชนิด อุตสาหกรรมหลายชนิด รูปแบบที่เป็นพิษคือรูปอิสระหรือไฮโดรเจนไซยาไนด์ (hydrogen cyanide, HCN) ในพืชนั้นพบมากมายหลายชนิดได้แก่ มันสำปะหลัง ข้าวชนิดต่างๆ เช่น ข้าวเจ้า ข้าวสาลี ข้าวบาร์เล่ย์ ข้าวโอ๊ต ข้าวไรน์ ข้าวฟ่าง ข้าวโพด ถั่วชนิดต่างๆ อ้อย แอบเปิ้ล เผือก หน่อไม้ เมล็ดอัลมอล เชอรี่ พีช มะม่วง มะละกอ ฝรั่ง มะนาว เป็นต้น ซึ่งการได้รับสารพิษไซยาไนด์นี้จะไปจับตัวกับสารในเม็ดเลือดแดง (hemoglobin) แทนที่ออกซิเจน มีฤทธิ์ยับยั้งการหายใจในระดับเซลล์ เกิดการชักเกร็ง ภาวะเป็นลมหมดสติและทำให้ถึงแก่การตายได้ [10] ด้วยเหตุนี้จึงต้องให้ความสำคัญกับปัญหาสิ่งแวดล้อมรอบตัว โดยเฉพาะสิ่งแวดล้อมทางน้ำซึ่งเป็นแหล่งปนเปื้อนที่สำคัญอันนำมาสู่สารปนเปื้อนของไอออนอันตรายในห่วงโซ่อาหารได้มากที่สุดและคงดีไม่น้อยถ้ามีเครื่องมือหรือวิธีตรวจสอบความเป็นพิษของสิ่งแวดล้อมใกล้ตัวที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อนมีประสิทธิภาพและประหยัดค่าใช้จ่ายให้น้อยที่สุด โดยในปี 2551 ได้มีการรายงานข่าวว่าหมู่บ้านนานหองบง ต.เขาหลวง อ.วังสะพุง จ.เลย มีการปล่อยสารพิษโดยเฉพาะสารไซยาไนด์ลงสู่แม่น้ำจากการทำเหมืองทองคำของบริษัททุ่งคำ จากการตรวจสอบของกระทรวงสาธารณสุขพบว่า มีผู้ป่วย 6 รายเจ็บป่วยจากสารพิษไซยาไนด์ และจากการตรวจสอบแหล่งน้ำธรรมชาติและลำน้ำของแม่น้ำเลย พบว่ามีการปนเปื้อนของสารไซยาไนด์เกินค่ามาตรฐาน อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าทางฝ่ายที่เกี่ยวข้องจะมีการบำบัดไซยาไนด์ดังกล่าว แต่การตรวจสอบผลกระทบจากการปนเปื้อนของสารไซยาไนด์ในดิน น้ำ และ สัตว์ทะเล จึงควรที่จะได้รับการเฝ้าระวังก่อนที่จะเข้าไปสู่ห่วงโซ่อาหาร และ เข้าสู่ผู้บริโภคชาวไทยในที่สุด

จากปัญหาการปนเปื้อนของไอออนอันตรายในสิ่งแวดล้อมที่สามารถส่งผลกระทบต่อความเป็นอยู่ของมนุษย์และอาจก่อให้เกิดโรคร้ายแรงหรือเป็นอันตรายต่อชีวิตได้นั้น จึงควรมีงานวิจัยที่พัฒนาวิธีการหรือเครื่องมือที่สามารถตรวจวัดไอออนอันตรายเหล่านี้ในสิ่งแวดล้อมหรือระบบเซลล์สิ่งมีชีวิตได้ทั้งในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพเพื่อป้องกันหรือเฝ้าระวังความเป็นพิษของไอออนอันตรายในแหล่งต่างๆ ทางสิ่งแวดล้อมและร่างกายของมนุษย์ก่อนที่จะเกิดผลกระทบที่ร้ายแรง

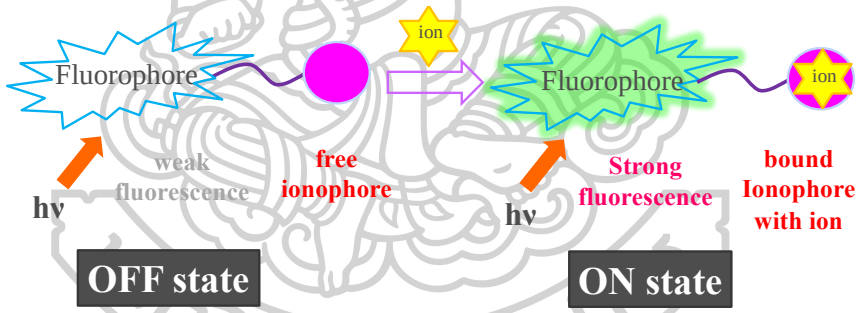
โดยปัจจุบันระบบโครงสร้างโมเลกุล (Molecular system) ที่สามารถเหนี่ยวนำให้ทำงานได้โดยการใช้แสงเป็นตัวกระตุ้น (light-induced logic operation) ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากและถูกพัฒนาขึ้นอย่างแพร่หลายเพื่อใช้เป็นเซ็นเซอร์ (Sensors) สำหรับดักจับโมเลกุลหรือไอออนบางชนิด โดยการตรวจวัดด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปีเป็นทางเลือกหนึ่งที่ได้รับความสนใจอย่างแพร่หลายในการตรวจวิเคราะห์ไอออนต่างๆ ทั้งด้านคุณภาพวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์ ซึ่งเทคนิคนี้มีข้อดีกว่าเมื่อเทียบกับวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์แบบอื่นๆ เช่น Flame Photometry Atomic Absorption Spectrometry (AAS) หรือ Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry (ICP-EAS) เนื่องจากใช้สารตัวอย่างเพียงเล็กน้อยก็สามารถแสดงผลในเวลาอันรวดเร็วได้ จึงสามารถใช้วิเคราะห์อย่างต่อเนื่อง (continuous monitoring) อีกทั้งการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค AAS และ ICP-EAS ต้องใช้สารตัวอย่างในปริมาณมาก (ระดับ ppm) เครื่องมือที่ใช้มีราคาแพง จึงไม่เหมาะสมกับการตรวจจับไอออนโลหะหนักในภาคสนาม และต้องคำนึงถึงการกำจัด

สารรบกวนในกรณีที่ตัวอย่างเป็นน้ำกร่อย น้ำทะเล สิ่งมีชีวิตจากทะเล หรือดินตะกอน ที่มีการปนเปื้อนของเกลือจำนวนมากซึ่งจะทำให้เกิดการอุดตันของเกลือ (Salt-Clogging)

โดยทั่วไปโครงสร้างโมเลกุลของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ (fluorescent sensor) ประกอบด้วย 2 ส่วนสำคัญ ได้แก่ 1) ฟลูออโรฟอร์ (Fluorophore) เป็นส่วนที่แสดงคุณสมบัติของฟลูออเรสเซนต์โดยการดูดกลืนหรือคายแสงในช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสม 2) ไอโอโนฟอร์ (Ionophore) เป็นส่วนที่สามารถดักจับไอออนได้ ดังนั้นจึงเรียกสารที่ใช้วิเคราะห์โดยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปีนี้ว่า “ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ (fluorescent sensor)” หรือ “ฟลูออโรไอโอโนฟอร์ (fluoroionophore)” โดยส่วนที่แสดงสัญญาณเปรียบเสมือนตัวแปลงสัญญาณเปลี่ยนข้อมูลของกลไกการดักจับของไอออน (recognition event) ไปสู่การเปลี่ยนแปลงสัญญาณทางแสง (optical signal) ผ่านกระบวนการต่างๆ เช่น Photoinduced electron transfer (PET) transfer Intramolecular charge transfer (ICT) และ Fluorescence resonance energy transfer (FRET)

โดยกระบวนการทำงานของเซ็นเซอร์สำหรับตรวจจับไอออนที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ สามารถอธิบายได้ 2 วิธี ได้แก่

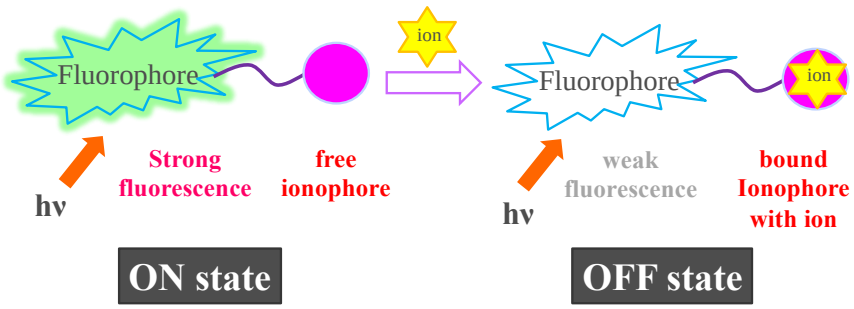
1. การเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ในลักษณะคล้ายการปิด-เปิดสวิตซ์ไฟ (OFF-ON system) แสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ลักษณะการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของเซ็นเซอร์ก่อนการตรวจจับไอออน (ซ้าย) และภายหลังการตรวจจับไอออน (ขวา)

จากภาพที่ 1 สามารถอธิบายได้ว่า ในภาวะที่สารละลายไม่มีไอออน เซ็นเซอร์สามารถคายแสงฟลูออเรสเซนต์ออกมาได้ในปริมาณความเข้มแสงต่ำ ในทางตรงข้ามหากมีไอออนอยู่ในสารละลายไอออนจะเข้าจับกับไอโอโนฟอร์ทำให้เซ็นเซอร์คายแสงฟลูออเรสเซนต์ออกมาได้มากขึ้น โดยความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนต์จะเพิ่มขึ้นในลักษณะแปรผันตามกับปริมาณไอออนในสารละลาย

2. การเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ในลักษณะคล้ายการเปิด-ปิดสวิตซ์ไฟ (ON-OFF system) แสดงดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ลักษณะการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของเซ็นเซอร์ก่อนการตรวจจับไอออน (ซ้าย) และภายหลังการตรวจจับไอออน (ขวา)

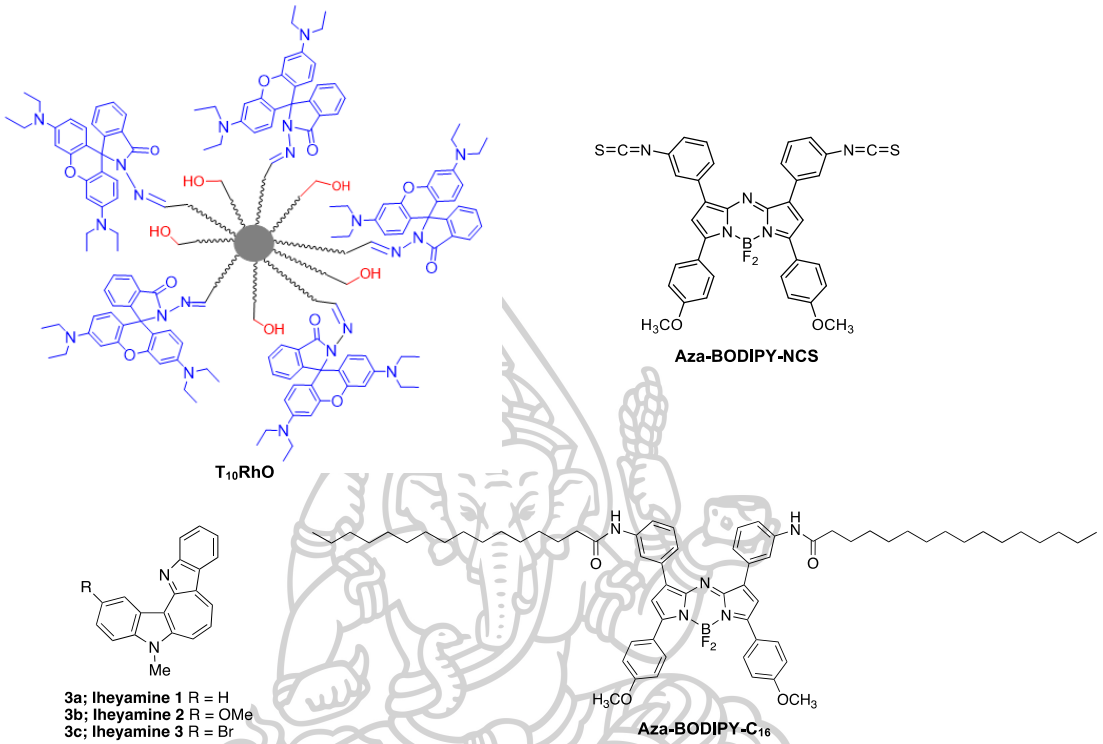
จากภาพที่ 2 สามารถอธิบายได้ว่า ในภาวะที่สารละลายไม่มีไอออน เซ็นเซอร์สามารถคายแสงฟลูออเรสเซนต์ออกมาที่ความเข้มแสงค่าหนึ่ง ในทางตรงข้ามหากมีไอออนอยู่ในสารละลาย ไอโอโนฟอร์จะเข้าจับไอออน ทำให้เซ็นเซอร์คายแสงฟลูออเรสเซนต์ได้น้อยลง โดยความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนต์ลดลงในลักษณะแปรผกผันกับปริมาณไอออนในสารละลาย

นอกจากปัญหาทางสิ่งแวดล้อมที่สามารถส่งผลกระทบต่อประเทศและเศรษฐกิจแล้วนั้น ปัญหาอีกอย่างนึงที่สามารถส่งผลอย่างมากต่อประเทศได้แก่ การหลีกเลี่ยงการชำระภาษีของน้ำมันที่มีนำเข้าในประเทศ โดยในปัจจุบันนี้ความต้องการน้ำมันเชื้อเพลิงทั้งในและต่างประเทศพบว่ามีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นอย่างมาก โดยทั่วไปแล้วน้ำมันเชื้อเพลิงจะต้องผ่านการชำระภาษีตามอัตราที่ทางรัฐบาลได้กำหนดไว้ ซึ่งอัตราดังกล่าวขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำมันเชื้อเพลิงและประโยชน์ของการนำน้ำมันเชื้อเพลิงนั้นไปใช้งาน หมายถึงถ้าเป็นน้ำมันเชื้อเพลิงชนิดเดียวกันแต่ใช้ในวัตถุประสงค์ที่แตกต่างกันก็จะต้องชำระภาษีในอัตราที่แตกต่างกันออกไป นอกจากนี้รัฐบาลยังต้องเผชิญกับปัญหาต่างๆ โดยเฉพาะการเจือปนของผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าต่ำกว่าในผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูง ตัวอย่างเช่น การเจือปนของน้ำมันเบนซินธรรมดาในเบนซินพิเศษ การผสมตัวทำละลายลงในน้ำมันเชื้อเพลิง หรือการเจือปนของน้ำมันดีเซลที่ชำระภาษีต่ำในน้ำมันดีเซลที่ชำระภาษีสูงกว่า เป็นต้น ด้วยปัญหาดังกล่าวจึงจำเป็นที่จะพัฒนากระบวนการติดตามและตรวจสอบน้ำมันเชื้อเพลิง เพื่อประโยชน์ในการจำแนกประเภทและความแตกต่างของน้ำมันเชื้อเพลิงที่มีอยู่มากมาย

วิธีการหนึ่งซึ่งสามารถใช้ตรวจสอบและป้องกันปัญหาดังกล่าว คือ การเติมสารทำเครื่องหมาย (Markers) ลงในผลิตภัณฑ์น้ำมันชนิดต่างๆ โดยสารทำเครื่องหมายในน้ำมันเชื้อเพลิงได้ถูกนำมาใช้เพื่อประโยชน์ในการระบุแหล่งที่มาของน้ำมันเชื้อเพลิงและเพื่อตรวจสอบการชำระภาษีของน้ำมันเชื้อเพลิงให้ถูกต้องตามอัตราที่กำหนด

จากเหตุผลและความอันตรายดังกล่าวนี้จึงควรให้ความสำคัญกับปัญหาสิ่งแวดล้อมรอบตัว โดยเฉพาะสิ่งแวดล้อมทางน้ำและแหล่งเกษตรกรรมต่างๆ ซึ่งเป็นแหล่งปนเปื้อนของไอออนที่สำคัญอันนำมาสู่สารปนเปื้อนในห่วงโซ่อาหารและปัญหาของการตรวจสอบการชำระภาษีของน้ำมันเชื้อเพลิงให้ถูกต้อง งานวิจัยนี้จึงนำเสนอการออกแบบและสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดใหม่สำหรับใช้เป็นเซ็นเซอร์ตรวจสอบคุณภาพวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์ของไอออนในสิ่งแวดล้อมและระบบเซลล์สิ่งมีชีวิตที่มีความว่องไวสูง (high sensitivity) และความจำเพาะเจาะจงสูง (selectivity) ต่อไอออนและสำหรับเป็นสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิงซึ่งสามารถใช้ในการเฝ้า

ระวังและติดตามตรวจสอบการชำระภาษีของน้ำมันเชื้อเพลิง รวมทั้งยังใช้ในการควบคุมคุณภาพของน้ำมันหรือการปนเปื้อนของน้ำมันได้โดยง่าย โดยมีโครงสร้างทางเคมีของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดใหม่ที่พัฒนาขึ้นสำหรับวิทยานิพนธ์นี้แสดงดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดใหม่สำหรับวิทยานิพนธ์นี้

วิทยานิพนธ์นี้ถือได้ว่าเป็นการออกแบบและพัฒนาเครื่องมือตรวจจับไอออนให้มีความไวและมีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนซึ่งถูกสังเคราะห์ขึ้นจากไอโอโนฟอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนที่ต้องการ โดยสำหรับการวิเคราะห์ไอออนโลหะจะทำการออกแบบไอโอโนฟอร์ที่มีอะตอมซัลเฟอร์ และ/หรือไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ และสำหรับการวิเคราะห์ไอออนไซยาไนด์จะทำการออกแบบไอโอโนฟอร์ที่มีความเป็นอิเล็กโทรไฟล์ โดยคาดว่าเซ็นเซอร์ชนิดใหม่จะสามารถตรวจจับไอออนได้อย่างจำเพาะเจาะจง รวมทั้งดูดกลืนและคายแสงในช่วง visible และ near infrared ซึ่งง่ายต่อการพัฒนาหรือประยุกต์เป็นเครื่องมือที่มีราคาไม่แพงต่อไปได้ในอนาคต อีกทั้งยังได้พัฒนาเครื่องมือสำหรับตรวจสอบการชำระภาษีของน้ำมันเชื้อเพลิงให้ถูกต้อง โดยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดใหม่ถูกออกแบบในมีความสามารถในการละลายได้ดีในน้ำมันเชื้อเพลิง มีเสถียรและไม่ส่งผลกระทบต่อคุณสมบัติของน้ำมันเชื้อเพลิง

โดยเป็นการพัฒนาเครื่องมือในวิทยานิพนธ์นี้เป็นไปตามแนวทางของแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่สิบสอง พ.ศ. 2560-2564 ยุทธศาสตร์การเติบโตและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมเพื่อการพัฒนาอย่างยั่งยืน และยุทธศาสตร์การพัฒนาวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี วิจัยและนวัฒกรรม

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) เพื่อออกแบบและสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ที่มีคุณสมบัติในการเรืองแสงเพื่อตรวจจับไอออน ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์ในเชิงปริมาณและคุณภาพได้ด้วยวิธีทางฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรสโกปี (Fluorescencespectroscopy)
2) เพื่อออกแบบและสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ให้มีความว่องไวสูง (Sensitivity) และมีความจำเพาะเจาะจงสูง (Selectivity) ต่อไอออนปรอท ไซยาไนด์ เหล็ก
3) เพื่อออกแบบและสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์สำหรับประยุกต์ใช้เป็นสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิงที่สามารถสังเคราะห์ขึ้นได้โดยใช้เส้นทางการสังเคราะห์ที่สั้นและใช้สารตั้งต้นราคาประหยัด เพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิงในเชิงพาณิชย์ต่อไป

สมมติฐานของงานวิจัย

คาดว่าสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดใหม่ที่ออกแบบและสังเคราะห์จะสามารถดักจับไอออนปรอท เหล็กและไซยาไนด์ได้อย่างมีความจำเพาะเจาะจงและความว่องไวสูง รวมทั้งยังสามารถสังคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดใหม่ที่ใช้เป็นสารทำเครื่องน้ำมันเชื้อเพลิงได้ด้วย

ขอบเขตของงานวิจัย

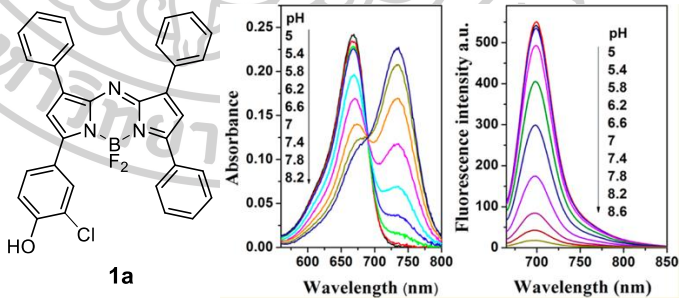
1) ออกแบบสังเคราะห์และแยกสารบริสุทธิ์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดใหม่ 4 ชนิด
2) นำสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดใหม่ที่สังเคราะห์ได้ไปทดสอบประสิทธิภาพการทำงานสำหรับการตรวจวัดไอออนและการใช้เป็นสารทำเครื่องน้ำมันเชื้อเพลิง

มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรม

ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้มีผู้วิจัยหลายกลุ่มให้ความสนใจที่จะพัฒนาคุณสมบัติของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ ให้มีความจำเพาะเจาะจงและความว่องไวสำหรับตรวจจับไอออนชนิดต่างๆ โดยใช้สารเรืองแสงชนิด Aza-BODIPY ซึ่งเป็นฟลูออโรฟอร์ที่มีการดูดกลืนและคายแสงในช่วงความยาวคลื่นใกล้อินฟราเรด (near-infrared region) ซึ่งมีประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้ในงานด้านต่างๆ เช่น ด้านชีวภาพ และวิทยาศาสตร์ทางยา เป็นต้น นอกจากนี้ความยาวคลื่นในช่วงใกล้รังสีอินฟราเรด ยังมีประโยชน์ในการศึกษาทางด้านระบบสิ่งมีชีวิต เนื่องจากแสงในช่วงนี้มีพลังงานน้อยกว่าเมื่อเทียบกับความยาวคลื่นในช่วงแสงที่ตามองเห็น (visible region) ทำให้ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต ช่วยให้ง่ายต่อการศึกษาระบบภายในเซลล์สิ่งมีชีวิตมากขึ้น รวมถึงการปรับเปลี่ยนโครงสร้างได้ง่ายเหมาะสำหรับการนำมาใช้งาน ซึ่งมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาสารเรืองแสง Aza-BODIPY ดังนี้

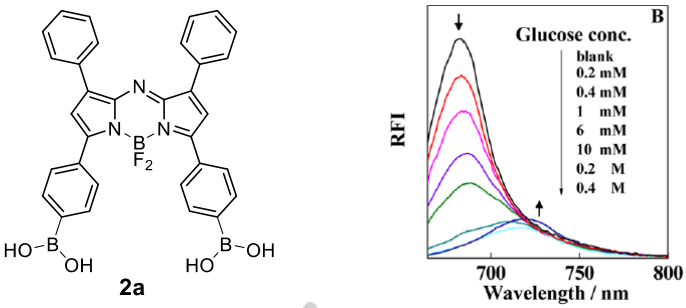
ปี ค.ศ. 2012 Jokic และคณะ [11] ได้เสนอการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Aza-BODIPY (**1a**) พบว่าเซ็นเซอร์ชนิดนี้มีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนโปรตอนในสารละลายผสมระหว่าง EtOH:buffer ในอัตราส่วน 1:1 v/v โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ในการดูดกลืนแสงสูงโดยมีค่าเท่ากับ 80000 $M^{-1}cm^{-1}$ เหมาะสำหรับนำมาประยุกต์ใช้เป็น pH probe ได้ ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 แสดงโครงสร้างและประสิทธิภาพการทำงานของเซ็นเซอร์ **1a**

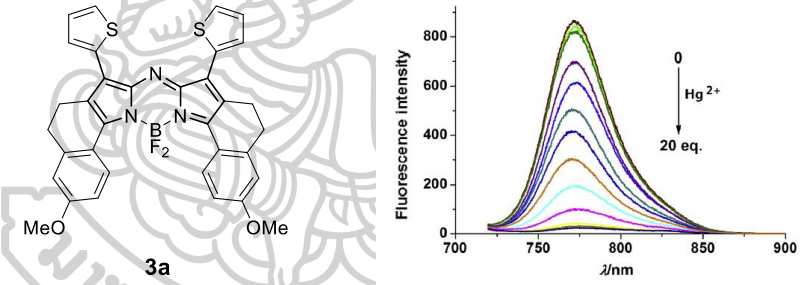
ต่อมาในปี ค.ศ. 2015 Liu และคณะ [12] ได้เสนอการสังเคราะห์สารประกอบโดยใช้ Aza-BODIPY โดยมีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างด้วยหมู่ boronic acid (**2a**) พบว่าสารประกอบชนิดนี้มีความสามารถในการตรวจวัดน้ำตาลกลูโคสในเลือดได้อย่างจำเพาะเจาะจง โดยที่สามารถวัดระดับน้ำตาลกลูโคสได้ต่ำกว่าระดับน้ำตาลกลูโคสที่มีอยู่ในเลือดของคนปกติ 40 เท่า ซึ่งสารชนิดนี้คายแสง

ในช่วงความยาวคลื่นใกล้รังสีอินฟราเรดส่งผลให้ interference ที่มีอยู่ในเลือดไม่มีการรบกวนการวิเคราะห์ทำให้ผลการวิเคราะห์มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือมากขึ้น ดังภาพที่ 5



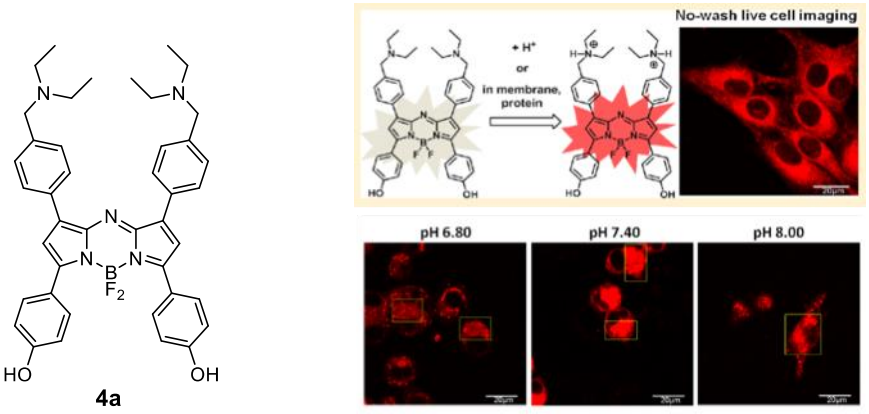
ภาพที่ 5 แสดงโครงสร้างและประสิทธิภาพการทำงานของเซ็นเซอร์ **2a**

ในปี ค.ศ. 2016 jiang และคณะ [13] ได้เสนอการสังเคราะห์อนุพันธ์ Aza-BODIPY (**3a**) โดยทำปฏิกริยากับ 3-(thiophen-2-yl)-2H-azirine พบว่าเซ็นเซอร์ชนิดนี้มีความสามารถในการตรวจวัดไอออนปรอทได้อย่างจำเพาะเจาะจง อีกทั้งผู้วิจัยได้นำเซ็นเซอร์ชนิดนี้ไปประยุกต์ใช้เพื่อตรวจสอบและติดตามปริมาณไอออนปรอทภายในเซลล์สิ่งมีชีวิต MCF-7 ได้ ดังภาพที่ 6



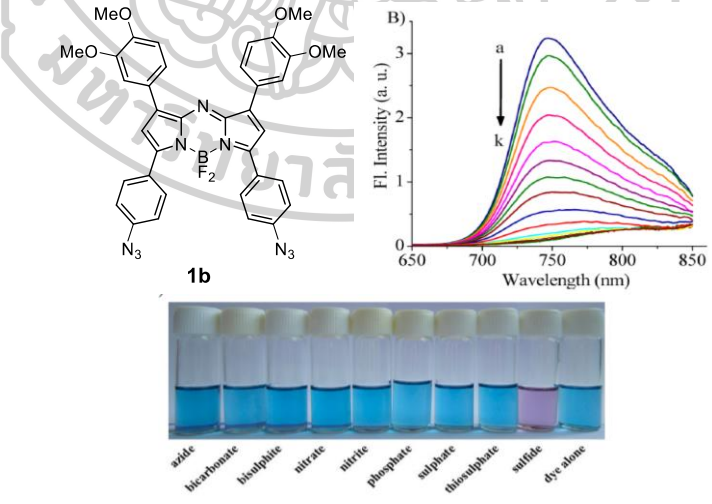
ภาพที่ 6 แสดงโครงสร้างและประสิทธิภาพการทำงานของเซ็นเซอร์ **3a**

ในปี ค.ศ. 2013 Chen และคณะ [14] ได้เสนอการสังเคราะห์อนุพันธ์ Aza-BODIPY เพื่อประยุกต์ใช้เป็น pH-Sensitive Fluorescent Dyes (**4a**) ใน Micelles และ Liposomes รวมถึงการทำ Live-Cell Imaging ดังภาพที่ 7

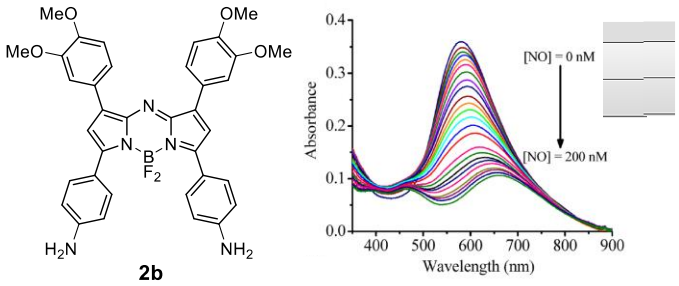


ภาพที่ 7 แสดงโครงสร้างและประสิทธิภาพการทำงานของเซ็นเซอร์ **4a**

ในปี ค.ศ. 2014 Adarsh และคณะ [15] ได้เสนอการสังเคราะห์เซ็นเซอร์สำหรับ hydrogen sulfide and nitric oxide (**1b และ 2b**) ในระบบที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ โดยการแทนที่โปรตอนบน phenyl ด้วยหมู่ azido และ amino พบว่ามีความจำเพาะเจาะจงต่อ hydrogen sulfide และ nitrile ion ตามลำดับ โดยมี detection limit สำหรับตรวจวัด hydrogen sulfide เท่ากับ 0.5 ppm และ detection limit สำหรับตรวจวัด nitric oxide เท่ากับ 20 ppb โดยที่สารละลายจะมีการเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีฟ้า ในสภาวะที่มี hydrogen sulfide และสารละลายจะมีการเปลี่ยนสีจากสีฟ้าเป็นสีเขียว ในสภาวะที่มีไอออน nitric oxide สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าเหมาะสำหรับการตรวจวิเคราะห์เบื้องต้น และสามารถนำมาฉาบลงบนผิวของกระจกหรือ solid-state ได้ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานภาคสนามได้ ดังภาพที่ 8 และ9

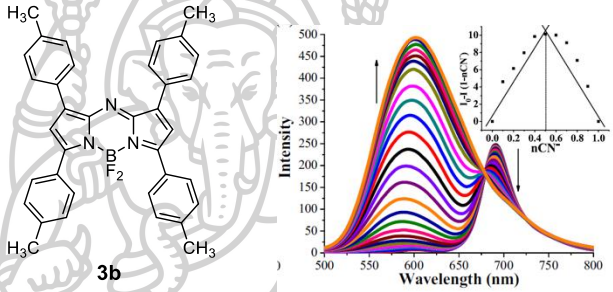


ภาพที่ 8 แสดงโครงสร้างและประสิทธิภาพการทำงานของเซ็นเซอร์ **1b**



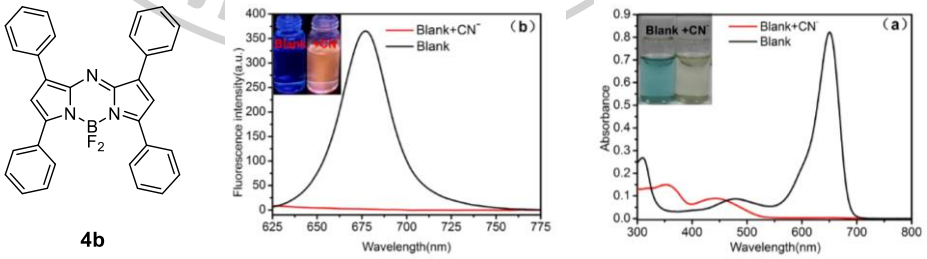
ภาพที่ 9 แสดงโครงสร้างและประสิทธิภาพการทำงานของเซ็นเซอร์ **2b**

ในปี ค.ศ. 2016 Ravikanth และคณะ [16] ได้เสนอการสังเคราะห์เซ็นเซอร์สำหรับตรวจจับไซยาไนด์ไอออน (**3b**) โดยมีการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซ็นต์เมื่อมีการเติมไอออนไซยาไนด์ที่ความยาวคลื่นสูงสุด 602 nm ในตัวทำละลาย acetonitrile มี detection limit เท่ากับ 8.6×10^{-7} M ดังภาพที่ 10



ภาพที่ 10 แสดงโครงสร้างและประสิทธิภาพการทำงานของเซ็นเซอร์ **3b**

ในปี ค.ศ. 2016 Zhu และคณะ [17] ได้เสนอการสังเคราะห์เซ็นเซอร์สำหรับตรวจจับไซยาไนด์ไอออน (**4b**) โดยมีการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซ็นต์เมื่อมีการเติมไอออนไซยาไนด์ที่ความยาวคลื่นสูงสุด 680 nm ในตัวทำละลาย Tetrahydrofuran ดังภาพที่ 11

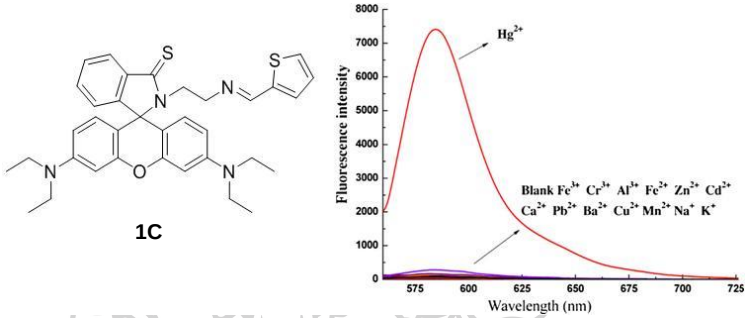


ภาพที่ 11 แสดงโครงสร้างและประสิทธิภาพการทำงานของเซ็นเซอร์ **4b**

นอกจากนี้ในปัจจุบันได้มีงานวิจัยที่รายงานการพัฒนาและสังเคราะห์เซ็นเซอร์สำหรับการตรวจวัดไอออนต่างๆ จำนวนมาก โดยการใช้ rhodamine หรือสารประกอบพวก indole ซึ่งเป็นฟลูออโรฟอร์ที่มีการดูดกลืนและคายแสงในช่วงความยาวคลื่นยูวี-วิสิเบล (UV-visible region) ซึ่งเป็นช่วงความยาวคลื่นที่มีพลังงานมากสามารถสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงได้อย่างชัดเจนจึงมีความ

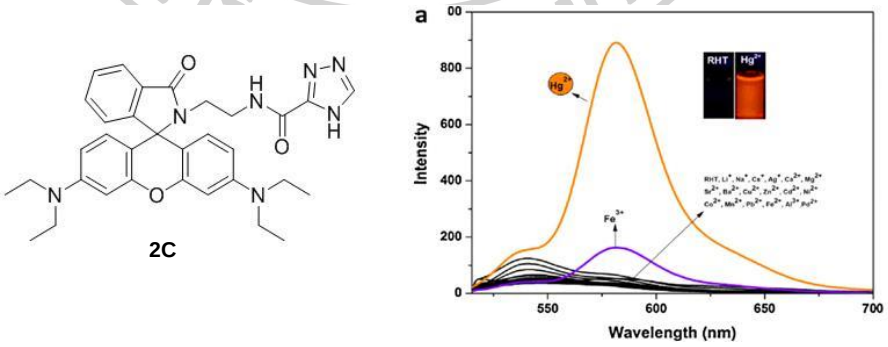
เหมาะสมสำหรับการนำไปพัฒนาเป็นเครื่องมือแบบพกพาขนาดเล็กสำหรับใช้ในภาคสนามได้จริง ซึ่งมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาสารเรืองแสง rhodamine หรือสารประกอบพวก indole ดังนี้

ในปีค.ศ. 2015 Wang และคณะ [18] สังเคราะห์เซ็นเซอร์ **1C** จากปฏิกิริยาเคมีระหว่าง rhodamine B และ 2-thiophenecarboxaldehyde พบว่าเซ็นเซอร์ **1C** สามารถใช้เป็นปรอทเซ็นเซอร์ได้ในสารละลายผสม methanol และสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES เข้มข้น 20 mM pH 7.2 (7:3 v/v) โดยมีค่า detection limit เท่ากับ 0.19 μM ดังภาพที่ 12



ภาพที่ 12 แสดงโครงสร้างและประสิทธิภาพการทำงานของเซ็นเซอร์ **1C**

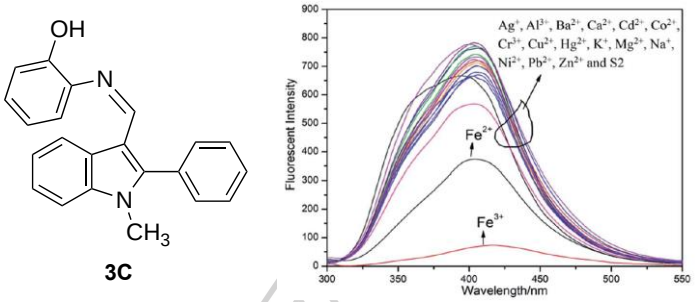
ในปีค.ศ. 2015 Erdemir และคณะ [19] สังเคราะห์เซ็นเซอร์ **2C** ที่ประกอบด้วย rhodamine จำนวน 1 หมู่เชื่อมต่อกับส่วน triazole ในสารละลายผสม DMF และสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES เข้มข้น 5 mM pH 6.5 (1:1 v/v) พบว่าเมื่อมีการจับไอออนปรอท สารละลายเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพู และแสดงความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์มากที่สุดที่ความยาวคลื่น 580 nm โดยมีค่า detection limit เท่ากับ 1.7×10^{-6} M ดังภาพที่ 13



ภาพที่ 13 แสดงโครงสร้างและประสิทธิภาพการทำงานของเซ็นเซอร์ **2C**

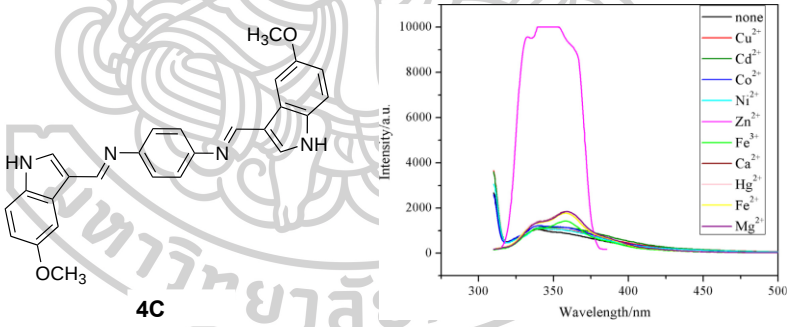
ในปีค.ศ. 2017 Pan และคณะ [20] สังเคราะห์เซ็นเซอร์ **3C** บนพื้นฐานของสารประกอบ indole พบว่าเมื่อมีการจับไอออนเหล็กในตัวทำละลาย tetrahydrofuran จะแสดงความเข้มของ

สัญญาณฟลูออเรสเซนต์ต่ำลงที่สุดที่ความยาวคลื่น 400 nm โดยมีค่า detection limit เท่ากับ 3.37×10^{-6} M ดังภาพที่ 14



ภาพที่ 14 แสดงโครงสร้างและประสิทธิภาพการทำงานของเซ็นเซอร์ **3C**

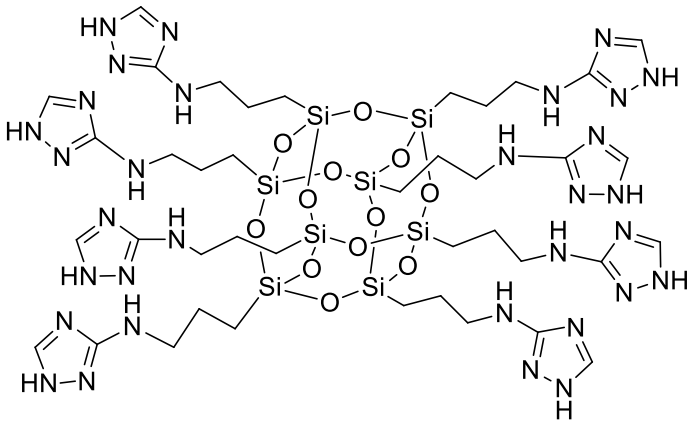
ในปีค.ศ. 2015 Xu และคณะ [21] สังเคราะห์เซ็นเซอร์ **4C** บนพื้นฐานของสารประกอบ indole พบว่าเมื่อมีการจับไอออนสังกะสีในตัวทำละลาย DMF จะแสดงความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์สูงที่สุดที่ความยาวคลื่น 350 nm โดยมีค่า detection limit เท่ากับ 1.0×10^{-7} M ดังภาพที่ 15



ภาพที่ 15 แสดงโครงสร้างและประสิทธิภาพการทำงานของเซ็นเซอร์ **4C**

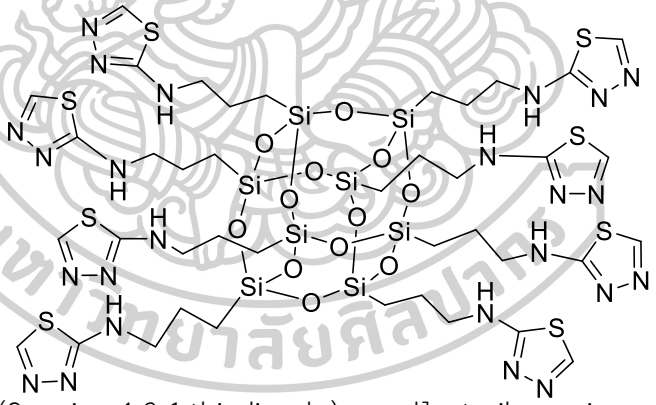
นอกจากนี้ได้มีงานวิจัยที่รายงานการนำสารประกอบ silsesquioxane ซึ่งเป็นสารประกอบซิลิกอนที่มีขนาดนาโนเมตรมาพัฒนาสำหรับใช้ในการดักจับไอออนชนิดต่างๆ ซึ่งมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องดังนี้

ค.ศ. 2007 Dias Filho และคณะ [22] ได้มีการสังเคราะห์ octakis[3-(3-amino-1,2,4-triazole)propyl]octasilsesquioxane (ภาพที่ 16) ซึ่งเป็นอนุภาคระดับนาโนโมเลกุลที่สามารถดักจับไอออนต่างๆเช่น ทองแดง, นิกเกล, แคดเมียม, สังกะสีและเหล็ก ในสารละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบได้



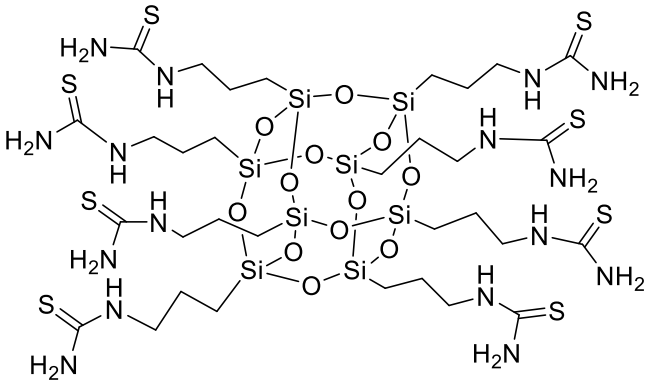
ภาพที่ 16 octakis[3-(3-amino-1,2,4-triazole)propyl]octasilsesquioxane

ค.ศ. 2013 Dias Filho และคณะ [23] ได้มีการสังเคราะห์ octakis[3-(2-amino-1,3,4-thiadiazole)propyl]octasilsesquioxane (ภาพที่ 17) ซึ่งเป็นอนุภาคระดับนาโนโมเลกุลที่สามารถดักจับไอออนต่างๆเช่น ทองแดง, นิกเกล, และโคบอลต์ ในสารละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบได้



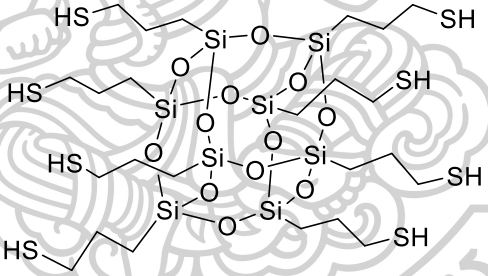
ภาพที่ 17 octakis[3-(2-amino-1,3,4-thiadiazole)propyl]octasilsesquioxane

ค.ศ. 2015 Dias Filho และคณะ [24] ได้มีการสังเคราะห์ Octakis[(thiourea)propyl] octasilsesquioxane (ภาพที่ 18) ซึ่งเป็นอนุภาคระดับนาโนโมเลกุลที่สามารถดักจับไอออนต่างๆเช่น เหล็ก, โครเมียม, วาเนเดียมและสังกะสี ในสารละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบได้



ภาพที่ 18 Octakis[(thiourea)propyl] octasilsesquioxane

ค.ศ. 2014 Wang และคณะ [25] ได้มีการสังเคราะห์ Thiol-rich polyhedral oligomeric silsesquioxane (ภาพที่ 19) ซึ่งเป็นอนุภาคระดับนาโนโมเลกุลที่สามารถดักจับไอออนต่างๆเช่น ปรอทและเมทิลเมอคิวรี ในสารละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบได้



ภาพที่ 19 Thiol-rich polyhedral oligomeric silsesquioxane

จากบทความวิจัยข้างต้นจะเห็นได้ว่า โครงสร้างโมเลกุลของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ประกอบด้วย 2 ส่วนหลัก ส่วนแรกจะเป็นส่วนที่ใช้ในการดักจับไอออน (ไอโอโนฟอร์) ซึ่งจะต้องมีความจำเพาะเจาะจงโดยการมีอะตอมหรือหมู่ฟังก์ชันที่สามารถเกิดปฏิกิริยาเฉพาะกับไอออนที่สนใจได้ดี และส่วนที่สอง คือส่วนที่แสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ (ฟลูออโรฟอร์) ซึ่งเป็นสารประกอบอะโรมาติกที่มีคอนจูเกชัน (conjugation) จำนวนมาก เพื่อให้โมเลกุลสามารถเกิดการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ได้ดี อีกทั้งจะเห็นได้ว่าการปรับเปลี่ยนโครงสร้างเพียงส่วนใดส่วนหนึ่งของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ก็สามารถทำให้สารโมเลกุลนั้นมีความสามารถในการประยุกต์ใช้งานได้อย่างหลากหลายอีกด้วย

ดังนั้นในงานวิทยานิพนธ์นี้จึงสนใจการพัฒนาเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ที่มีความสามารถในการตรวจวัดไอออนที่ความเข้มข้นต่ำได้ดี มีความจำเพาะเจาะจงมากที่สุด สามารถวิเคราะห์ได้ในระบบที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ อีกทั้งสามารถคายแสงฟลูออเรสเซนต์ในช่วงความยาวคลื่น UV-visible และ near-infrared ซึ่งมีประโยชน์ต่อการนำไปพัฒนาใช้ในอุปกรณ์ตรวจสอบไอออนในภาคสนามและสำหรับการประยุกต์ในต่อระบบสิ่งมีชีวิต นอกจากนั้นยังได้สนใจการพัฒนาเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์สำหรับใช้เป็นสารทำเครื่องหมายในน้ำมันเชื้อเพลิง ที่สามารถคายแสงฟลูออเรสเซนต์ในช่วงความยาวคลื่น near-infrared เนื่องจากเป็นบริเวณที่ไม่ถูกรบกวนด้วยความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์ของน้ำมันเชื้อเพลิงด้วย

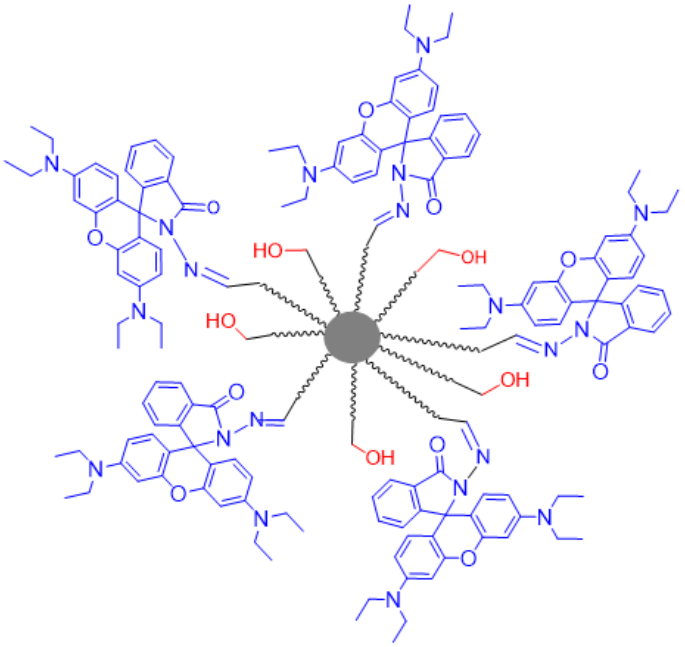
มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทที่ 3
วิธีการทดลอง

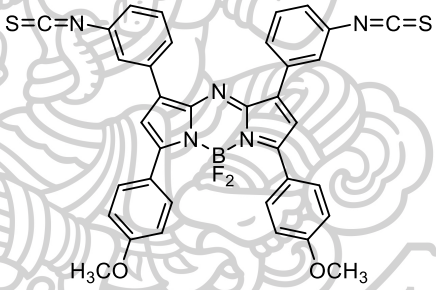
1. การสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดใหม่

งานวิจัยนี้ได้ทำการสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดใหม่ 4 ชนิด ที่มีโรดามีนบี (rhodamine B) เอซาโบดิปี (aza-BODIPY) และสารประกอบ indole เป็นส่วนของฟลูออโรฟอร์สำหรับประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดไอออนและใช้เป็นสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิง สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 1 (**T_{10}Rh**) ประกอบด้วยไฮดราซีน ซึ่งทำหน้าที่เป็นไอโอโนฟอร์เชื่อมต่อกับส่วนของโรดามีนบี (rhodamine B group) จำนวน 5 หมู่ซึ่งทำหน้าที่เป็นฟลูออโรฟอร์ และถูกเชื่อมต่อกับ polyhedral oligomeric silsesquioxanes (POSS) หรือ cage-like silsesquioxanes (SQ) ซึ่งเป็นอนุภาคซิลิกาที่มีขนาดนาโนเมตร ประกอบด้วยใจกลางโมเลกุลที่เป็นสารอนินทรีย์ (Si-O) และ หมู่ฟังก์ชันที่เป็นสารอินทรีย์อยู่บนพื้นผิว สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 2 (**AzaBDP-NCS**) ประกอบด้วยหมู่ไอโซไทโอไซยาเนต (isothiocyanate) ซึ่งทำหน้าที่เป็นไอโอโนฟอร์ เชื่อมต่อกับเอซาโบดิปีซึ่งทำหน้าที่เป็นฟลูออโรฟอร์ สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 3 (**Iheyamine 1-3**) เป็นสารประกอบ indole ที่มีโครงสร้างเลียนแบบสารประกอบทางธรรมชาติที่ประกอบด้วยอะตอมไนโตรเจน ซึ่งทำหน้าที่เป็นไอโอฟอร์และส่วนของวงอะโรมาติกซึ่งทำหน้าที่เป็นฟลูออโรฟอร์ และสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 4 (**AzaBDP-C16**) ประกอบด้วยเอซา-โบดิบปีซึ่งทำหน้าที่ในการคายแสงฟลูออเรสเซนต์เชื่อมต่อกับสายโซ่ไฮโดรคาร์บอนเพื่อช่วยให้สามารถละลายได้ดีในน้ำมันเชื้อเพลิง โครงสร้างทางเคมีของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดทั้ง 4 ชนิดแสดงดังภาพที่ 16

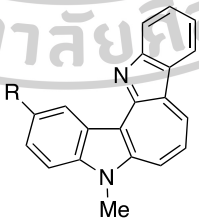
มหาวิทยาลัยศิลปากร



สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 1 (T_{10}RhO)

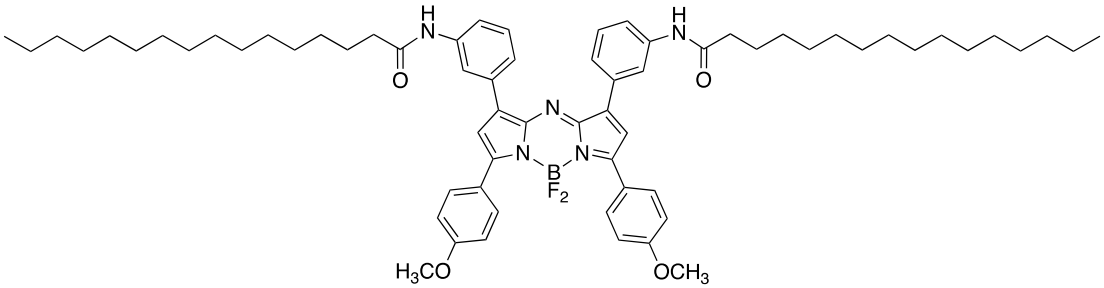


สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 2 (Aza-BODIPY-NCS)



3a; Iheyamine 1 R = H
3b; Iheyamine 2 R = OMe
3c; Iheyamine 3 R = Br

สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 3 (Iheyamine 1-3)



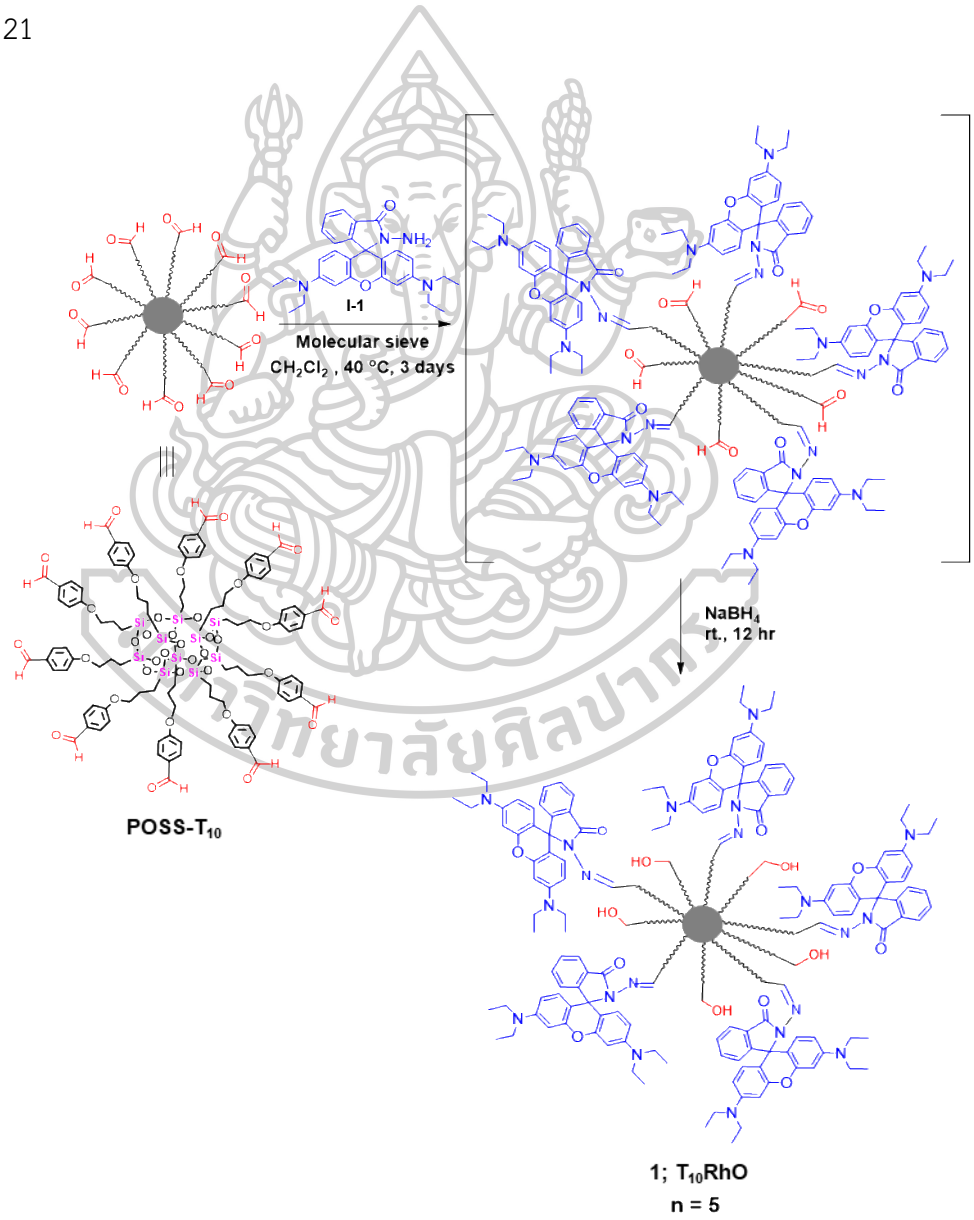
สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 4 (Aza-BODIPY-C_{16})

ภาพที่ 20 โครงสร้างทางเคมีของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดใหม่ 4 ชนิด

มหาวิทยาลัยศิลปากร

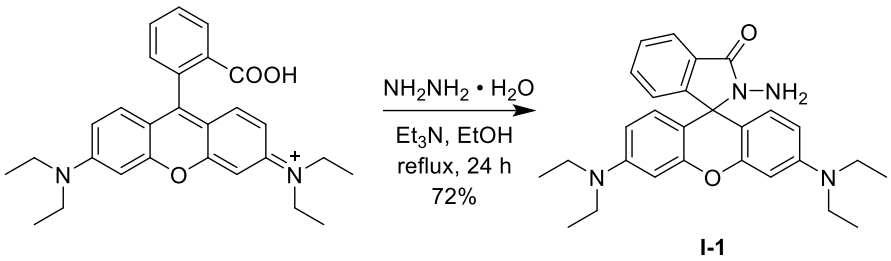
1.1 การสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 1 (T_{10}RhO)

ในการสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 1 (T_{10}RhO) เริ่มจากการเชื่อมต่อ decakis(3-proproxy-p-oxybenzaldehyde)decasilsesquioxane (POSS-T_{10}) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารประกอบไฮบริดอินทรีย์-อนินทรีย์ กับโรดามีนบีไฮดราไซด์ (rhodamine B hydrazide) ผ่านปฏิกิริยา Schiff base (hydrazone) formation และตามด้วยปฏิกิริยา reduction ด้วย $NaBH_4$ เพื่อเปลี่ยนหมู่ benzaldehyde เป็นหมู่ benzyl alcohol ช่วยในการละลายน้ำให้ดีขึ้น ซึ่งการสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดนี้ได้ทำการสังเคราะห์โดย นางสาว รุ่งทิพย์ ขันถม นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เส้นทางการสังเคราะห์แสดงดังรูปที่ 21



ภาพที่ 21 เส้นทางการสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 1 (T_{10}RhO)

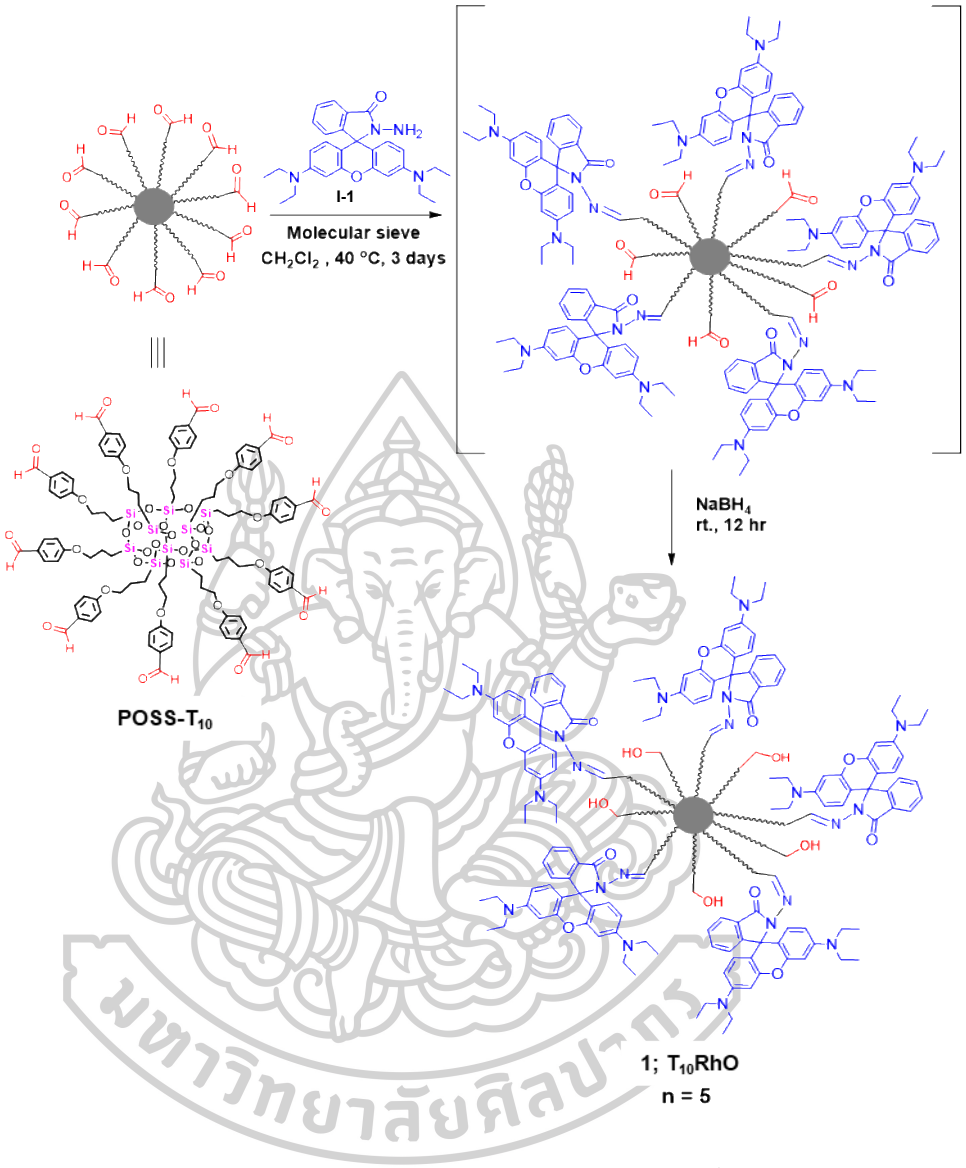
1.1.1 การสังเคราะห์สารประกอบ rhodamine B hydrazide (I-1)



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

การสังเคราะห์โรดามีนบีไฮดราไซด์ (rhodamine B hydrazide; **I-1**) [26] แสดงดังภาพที่ 22 ชั่งสารโรดามีนบี (rhodamine B) ปริมาณ 0.20 กรัม (0.42 มิลลิโมล) ใส่ขวดก้นกลมขนาด 25 มิลลิลิตร จากนั้นละลายด้วยตัวทำละลายเอทานอล (ethanol; EtOH) ปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร และเติมสารไตรเอทิลเอมีน (Et_3N) ซึ่งทำหน้าที่เป็นเบส ปริมาตร 0.20 มิลลิลิตร (3.40 มิลลิโมล) กวนปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศอาร์กอนที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 30 นาที แล้วเติมสารไฮดราซีนไฮเดรต (hydrazine hydrate) ปริมาตร 0.13 มิลลิลิตร (2.10 มิลลิโมล) จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 78 องศาเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาทิ้งให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำไปกรองและกำจัดเอทานอลด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) หลังจากนั้นเติมตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (dichloromethane; CH_2Cl_2) ปริมาตร 30.0 มิลลิลิตร ลงในส่วนที่เหลือข้างต้น แล้วนำไปสกัดด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ปริมาตร 30.0 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง โดยเลือกเก็บสารละลายชั้นไดคลอโรมีเทนมากำจัดน้ำออกโดยเติมโซเดียมซัลเฟต (anh. Na_2SO_4) ลงไปปริมาณเล็กน้อย และนำไปกำจัดตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator จากนั้นแยกบริสุทธิ์สารที่ได้ด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนและเมทานอล (CH_2Cl_2:CH_3OH) ในอัตราส่วนร้อยละโดยปริมาตร 97:3 (v/v) ตามลำดับ เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) โดยการแยกด้วยเทคนิคนี้มีอัตราการเคลื่อนที่ของสารบนตัวดูดซับ (Retention factor; R_f) เท่ากับ 0.44 พบว่าได้สาร **I-1** มีลักษณะเป็นของแข็งสีชมพูอ่อนปริมาณ 138 มิลลิกรัม (0.303 มิลลิโมล) คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ร้อยละผลผลิตเท่ากับ 72

1.1.2 การสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 1 (T_{10}RhO)



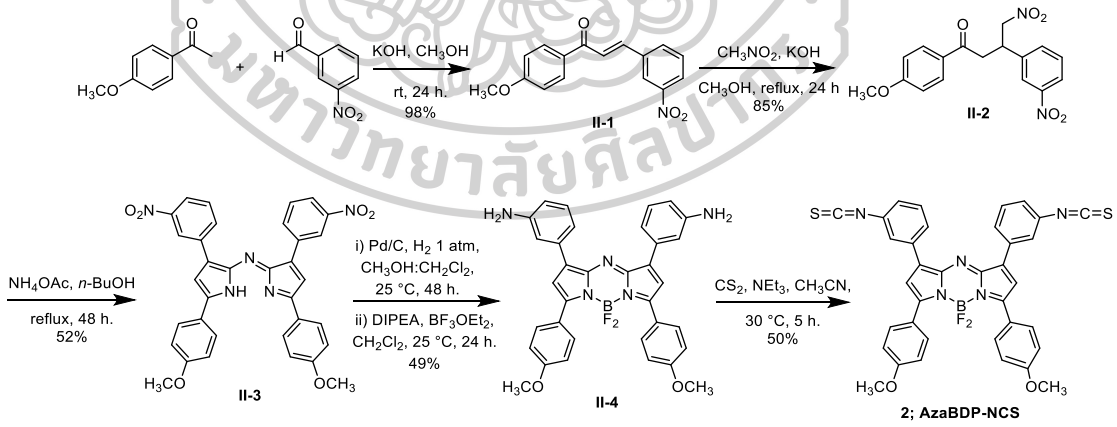
ภาพที่ 23 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ **1** (T_{10}**RhO**)

การสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ **1** (**T10RhO**) แสดงดังภาพที่ 23 ชั่งสาร decakis(3-proproxy-p-oxybenzaldehyde)decasilsesquioxane (**2**) ปริมาณ 0.10 กรัม (0.0468 มิลลิโมล) และสาร rhodamine B hydrazide (**I-1**) ปริมาณ 0.43 กรัม (0.942 มิลลิโมล) และ molecular sieve 4Å ปริมาณ 0.10 กรัม ใส่ลงใน thick-wall reaction-tube ภายใต้สุญญากาศ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อทำให้แห้ง จากนั้นเติมตัวทำละลาย CH_2Cl_2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงไปภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน หลังจากนั้นกวนสารละลายและให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 3 วัน เมื่อครบเวลาเติม sodium borohydride ($NaBH_4$) ปริมาณ 0.10 กรัม ลงไปในสารละลายและกวนสารละลายต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12

ชั่วโมง หลังจากนั้นกรอง molecular sieve ออกและนำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้สุญญากาศจะได้ crude product ปริมาณ 0.5 กรัม จากนั้นแยกสารให้บริสุทธิ์โดย dialysis membrane ที่ molecular weight cut-off of 2000 Da ด้วยตัวทำละลายเตตระไฮโดรฟูแรน (tetrahydrofuran; THF) ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่บริสุทธิ์ซึ่งจะถูกทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศ จะได้สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ **1 (T_{10}RhO)** มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว ปริมาณ 0.20 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ร้อยละผลผลิตได้เท่ากับ 98 ซึ่งการสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ **1 (T_{10}RhO)** ในขั้นตอนนี้ ทำการสังเคราะห์โดย นางสาว รุ่งทิพย์ ขันถม นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

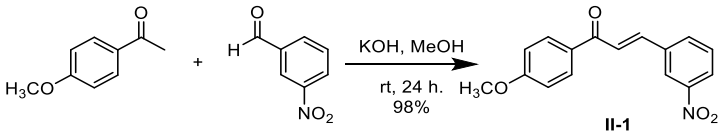
1.2 การสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 2 (Aza-BODIPY-NCS)

การสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ **2** (**Aza-BODIPY-NCS**) เริ่มจากการสังเคราะห์ในส่วนของฟลูออโรฟอร์ชนิด Aza-BODIPY โดยเริ่มจากการสังเคราะห์สารประกอบชนิด **chalcone** (**II-1**) โดยผ่านปฏิกิริยา aldol condensation จากนั้นทำปฏิกิริยา Michael addition ได้สารประกอบ **nitro-ketone** (**II-2**) ตามด้วยการสร้างวง **dipyrrolemethene** (**II-3**) และทำปฏิกิริยา complexation กับ BF_3OEt_2 เพื่อสร้างเป็นสารประกอบโบรอนเรียกว่า **Aza-BODIPY-amine** (**II-4**) ในขั้นตอนสุดท้ายนำมาทำปฏิกิริยา condensation กับสารประกอบ carbon disulfide จะได้สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 2 เส้นทางการสังเคราะห์แสดงดังรูปที่ 24



ภาพที่ 24 เส้นทางการสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 2 (**Aza-BODIPY-NCS**)

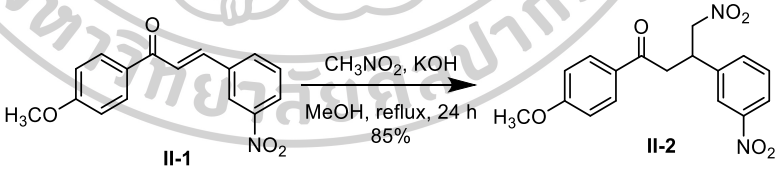
1.2.1 การสังเคราะห์สารประกอบ chalcone (II-1)



ภาพที่ 25 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารประกอบ **chalcone** (**II-1**)

การสังเคราะห์สารประกอบ **chalcone** (**II-1**) ตามวิธีที่มีการรายงานมาก่อน [27] แสดงดังภาพที่ 25 ชั่งสาร 4-methoxy acetophenone ปริมาณ 5.00 กรัม (33.30 มิลลิโมล) และสาร 3-nitrobenzaldehyde ปริมาณ 5.00 กรัม (33.09 มิลลิโมล) ใส่ขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร ละลายด้วยเมทานอลปริมาตร 150 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมเบสโพแทสเซียมไอดรอกไซด์ (KOH) ปริมาณ 1.83 กรัม (45.00 มิลลิโมล) ลงในสารละลายผสม จากนั้นกวนปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จะสังเกตเห็นตะกอนผลิตภัณฑ์ลักษณะของแข็งสีเหลืองอ่อนตกลงมา เมื่อครบกำหนดเวลาทำการแยกส่วนที่ไม่ละลายออกจากสารละลายด้วยการกรองแบบลดความดัน และล้างตะกอนด้วยตัวทำละลายเมทานอลที่เย็น จะได้สารประกอบ **chalcone** (**II-1**) เป็นของแข็งสีขาว ปริมาณ 9.18 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตได้เท่ากับ 98 (นำไปใช้ในปฏิกิริยาขั้นตอนต่อไปโดยไม่ผ่านการแยกบริสุทธิ์)

1.2.2 การสังเคราะห์สารประกอบ nitro-chalcone (II-2)

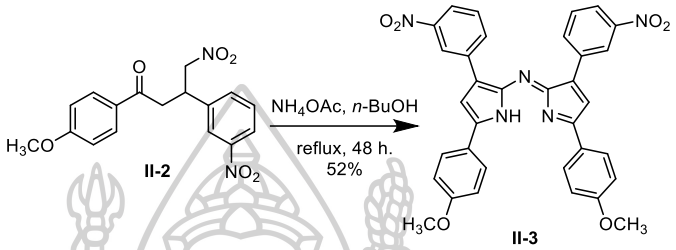


ภาพที่ 26 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารประกอบ **nitro-chalcone** (**II-2**)

การสังเคราะห์สารประกอบ **nitro-chalcone** (**II-2**) [27] แสดงดังภาพที่ 26 ชั่งสาร **chalcone** (**II-1**) ปริมาณ 10.41 กรัม (36.75 มิลลิโมล) ใส่ขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร ละลายด้วยเมทานอลปริมาตร 150 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมเบสโพแทสเซียมไอดรอกไซด์ ปริมาณ 3.01 กรัม (53.64 มิลลิโมล) และสาร nitromethane ปริมาตร 50.0 กรัม (0.93 มิลลิโมล) ลงในสารละลาย จากนั้นกวนปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 78 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จะสังเกตเห็นตะกอนผลิตภัณฑ์ลักษณะของแข็งสีน้ำตาลอ่อนตกลงมา เมื่อครบกำหนดเวลาทำการแยกส่วนที่ไม่ละลายออกจากสารละลายด้วยการกรองแบบลดความดัน และล้างตะกอนด้วยตัวทำละลาย

เมทานอลที่เย็น จะได้สารประกอบ **nitro-chalcone** (**II-2**) เป็นของแข็งสีน้ำตาล ปริมาณ 10.81 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตได้เท่ากับ 85 (นำไปใช้ในปฏิกิริยาขั้นตอนต่อไปโดยไม่ผ่านการแยกบริสุทธิ์)

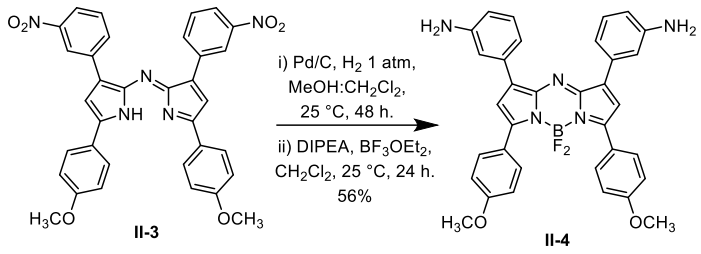
1.2.3 การสังเคราะห์สารประกอบ dipyrrolemethene (II-3)



ภาพที่ 27 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารประกอบ **dipyrrolemethene** (**II-3**)

การสังเคราะห์สารประกอบ **dipyrrolemethene** (**II-3**) [27] แสดงดังภาพที่ 27 ชั่งสาร **nitro-chalcone** (**II-2**) ปริมาณ 5.12 กรัม (14.87 มิลลิโมล) ใส่ขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร ละลายด้วยบิวทานอล (buthanol) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมเบสแอมโมเนียมอะซิเตต (NH_4OAc) ปริมาณ 20.20 กรัม (0.26 โมล) ลงในสารละลายผสม จากนั้นกวนปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาทำให้สารละลายเย็นตัวลงเท่ากับอุณหภูมิ 40 องศา และนำไปกำจัดตัวทำละลายด้วยการกลั่นแบบลดความดันด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้นเติมตัวทำละลายเมทานอลที่เย็นลงในส่วนที่เหลือเพื่อตกตะกอนสารผลิตภัณฑ์ กรองตะกอนที่ได้แบบลดความดันและล้างด้วยเมทานอลเย็น จะได้สารประกอบ **dipyrrolemethene** (**II-3**) เป็นของแข็งสีดำ ปริมาณ 2.34 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตได้เท่ากับ 52 (นำไปใช้ในปฏิกิริยาขั้นตอนต่อไปโดยไม่ผ่านการแยกบริสุทธิ์)

1.2.4 การสังเคราะห์สารประกอบ Aza-BODIPY-amine (II-4)



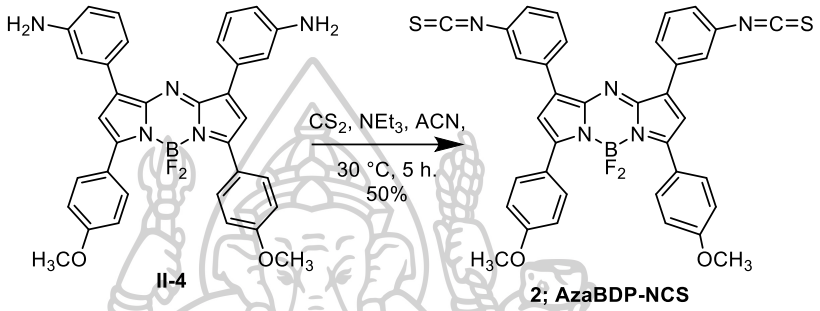
ภาพที่ 28 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารประกอบ **Aza-BODIPY-amine** (**II-4**)

การสังเคราะห์สารประกอบ **Aza-BODIPY-amine** (**II-4**) [27] แสดงดังภาพที่ 28 ชั่งสาร **dipyrrolemethene** (**II-3**) ปริมาณ 0.80 กรัม (1.33 มิลลิโมล) ใส่ขวดก้นกลมขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง CH_2Cl_2:CH_3OH ในอัตราส่วน 1:1 v/v โดยมีปริมาตรรวม 40 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Pd/C ปริมาณ 0.19 กรัม (1.79 มิลลิโมล) กวนปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศของก๊าซไฮโดรเจน (hydrogen atmosphere) ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จะสังเกตเห็นว่าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้ม เมื่อครบกำหนดเวลาจึงทำการกรองผงคาร์บอนออก จากนั้นล้างด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง CH_2Cl_2:CH_3OH ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร จนสารละลายเป็นสีฟ้าอ่อน กำจัดตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ได้สารประกอบเป็นของแข็งสีน้ำเงินเข้ม ปริมาณ 0.67 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตได้เท่ากับ 92 (นำไปใช้ในปฏิกิริยาขั้นตอนต่อไป โดยไม่ผ่านการแยกบริสุทธิ์)

จากนั้นชั่งผลิตภัณฑ์ที่ได้ปริมาณ 0.24 กรัม (0.44 มิลลิโมล) ใส่ขวดก้นกลมขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายด้วยตัวทำละลายไดคลอมีเทนปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสาร *N,N*-diisopropylethylamine (*i*Pr_2EtN; DIPEA) ปริมาณ 0.8 มิลลิลิตร (4.58 มิลลิโมล) ทำการกวนปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศอาร์กอนที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 20 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาเติมสาร boron trifluoride etherate 48% w/v (BF_3OEt_2) ลงในสารละลายปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร (6.76 มิลลิโมล) จากนั้นทำการกวนปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศอาร์กอนที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง สารละลายจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเข้มเป็นสีเขียวเข้ม เมื่อครบกำหนดเวลานำไปสกัดด้วยสารละลายอิ่มตัวของโซเดียมไบคาร์บอเนต (sat.$NaHCO_3$) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง ตามด้วยสารละลายอิ่มตัวของโซเดียมคลอไรด์ (sat.brine) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร จำนวน 1 ครั้ง โดยเก็บสารละลายชั้นตัวทำละลายไดคลอมีเทนที่ได้กำจัดน้ำออกโดยการเติม anh.Na_2SO_4 ลงไปปริมาณเล็กน้อย และนำไปกำจัดตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator และทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนและเอทิลอะซิเตต (hexane:EtOAc) ในอัตราส่วน 1:1 v/v เป็น mobile phase โดยมีค่า R_f เท่ากับ

0.30 จะได้สารประกอบ **Aza-BODIPY-amine** (**II-4**) เป็น ของแข็งสีเขียวเข้ม ปริมาณ 0.19 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตได้เท่ากับ 74

1.2.5 การสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 2 (Aza-BODIPY-NCS)

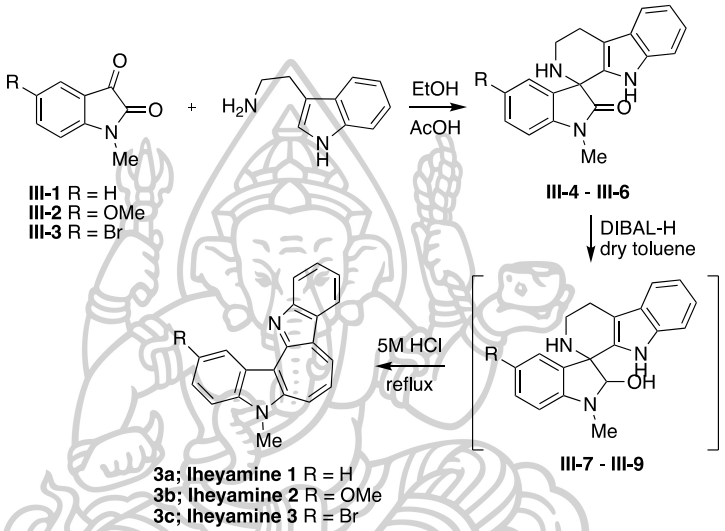


ภาพที่ 29 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ **2** (**Aza-BODIPY-NCS**)

การสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ **2** (**Aza-BODIPY-NCS**) แสดงดังภาพที่ 29 ชั่งสาร **Aza-BODIPY-amino** (**II-4**) ปริมาณ 0.100 กรัม (0.26 มิลลิโมล) ใส่ขวดก้นกลมขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายด้วยตัวทำละลายอะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile; CH_3CN) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารไตรเอทิลเอมีน (Triethylamine; NEt_3) ปริมาตร 0.07 มิลลิลิตร (0.55 มิลลิโมล) และสาร คาร์บอนไดซัลไฟด์ (carbondisulfide; CS_2) ลงในสารละลายปริมาตร 0.06 มิลลิลิตร (1.01 มิลลิโมล) จากนั้นทำการกวนปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศอาร์กอนที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการกำจัดตัวทำละลายอะซิโตไนไตรล์ออกด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้นเติมตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนลงไปปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปสกัดด้วยสารละลาย sat.$NaHCO_3$ ปริมาตร 15 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเก็บสารละลายชั้นไดคลอโรมีเทนที่ได้กำจัดน้ำออกโดยเติม anh.Na_2SO_4 ลงไปปริมาณเล็กน้อย และนำไปกำจัดทำละลายไดคลอโรมีเทนออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator จากนั้นทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง EtOAc:Hexane อัตราส่วน 2:1 v/v ทำหน้าที่เป็น mobile phase โดยมีค่า R_f เท่ากับ 0.6 ได้สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ **2** (**Aza-BODIPY-NCS**) เป็นของเหลวสีเขียวเข้ม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตได้เท่ากับ 50

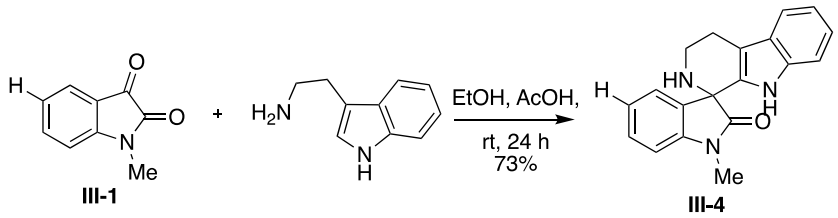
1.3 การสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 3 (Iheyamine 1-3)

ในการสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ **3** (**Iheyamine 1-3**) เริ่มจากสารตั้งต้นอนุพันธ์ของ *N*-methylisatin ทำปฏิกิริยา condensation กับสารประกอบ tryptamine (2) ตามด้วยปฏิกิริยา reduction ด้วย DIBAL-H เพื่อเปลี่ยนหมู่คาร์บอนิลเป็นหมู่แอลกอฮอล์ และขั้นตอนสุดท้ายทำปฏิกิริยา rearrangement โดยมีกรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งการสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดนี้ได้ทำการสังเคราะห์โดย นางสาว โสภิตา รัตโนภาส นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร เส้นทางการสังเคราะห์แสดงดังรูปที่ 30



ภาพที่ 30 เส้นทางการสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ **3** (**Iheyamine 1-3**)

1.3.1 การสังเคราะห์สารประกอบ spiro-indole (III-4)

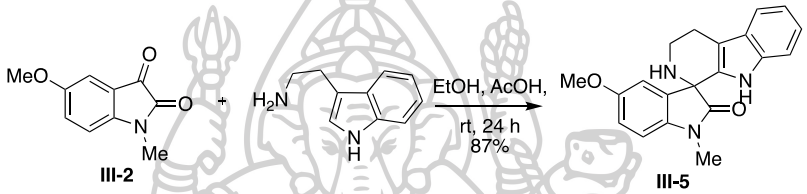


ภาพที่ 31 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารประกอบ **spiro-indole** (**III-4**)

การสังเคราะห์สารประกอบ **spiro-indole** (**III-4**) แสดงดังภาพที่ 31 ชั่งสารประกอบ *N*-methylisatin ปริมาณ 0.16 กรัม (0.99 มิลลิโมล) ใส่ขวดก้นกลมขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายด้วยตัวทำละลายเอทานอล (ethanol; EtOH) ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารประกอบ tryptamine

ปริมาณ 0.16 มิลลิลิตร (1.00 มิลลิโมล) และกรดแกลเชียลแอซีติก ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร แล้วกวนปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศอาร์กอนที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาจะสังเกตเห็นตะกอนผลิตภัณฑ์ตกลงมา ทำการแยกส่วนที่ไม่ละลายออกจากสารละลายด้วยการกรองแบบลดความดันและล้างตะกอนด้วยตัวทำละลายน้ำ จะได้สารประกอบ **spiro-indole** (**III-4**) เป็นของแข็งสีครีม ปริมาณ 0.22 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตได้เท่ากับ 73 (นำไปใช้ในปฏิกิริยาขั้นตอนต่อไปโดยไม่ผ่านการแยกบริสุทธิ์)

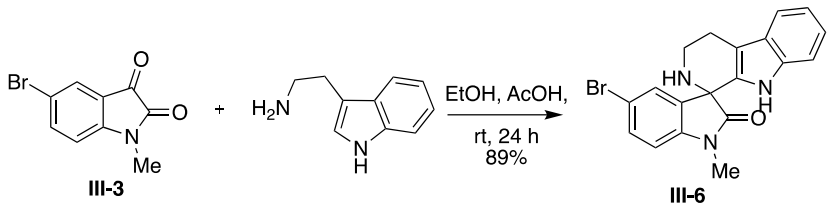
1.3.2 การสังเคราะห์สารประกอบ spiro-indole (III-5)



ภาพที่ 32 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารประกอบ **spiro-indole** (**III-5**)

การสังเคราะห์สารประกอบ **spiro-indole** (**III-5**) แสดงดังภาพที่ 32 ชั่งสารประกอบ5-methoxy-*N*-methylisatin ปริมาณ 0.17 กรัม (0.90 มิลลิโมล) ใส่ขวดก้นกลมขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายด้วยตัวทำละลายเอทานอล (ethanol; EtOH) ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารประกอบ tryptamine ปริมาณ 0.16 มิลลิลิตร (1.00 มิลลิโมล) และกรดแกลเชียลแอซีติก ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร แล้วกวนปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศอาร์กอนที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลากรองสารละลายที่ได้แบบลดความดันและล้างด้วยเอทานอล จากนั้นนำสารละลายที่ได้จากการกรองไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้สุญญากาศและทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง EtOAc:Hexane อัตราส่วน 1:2 v/v ทำหน้าที่เป็น mobile phase ได้สารประกอบ **spiro-indole** (**III-5**) เป็นของแข็งสีเบจ ปริมาณ 0.26 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตได้เท่ากับ 87

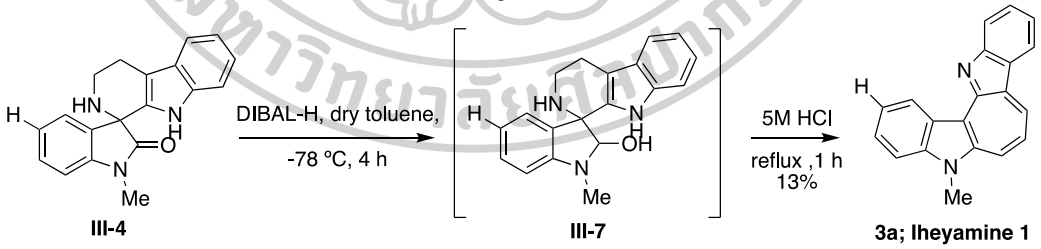
1.3.3 การสังเคราะห์สารประกอบ spiro-indole (III-6)



ภาพที่ 33 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารประกอบ **spiro-indole** (**III-6**)

การสังเคราะห์สารประกอบ **spiro-indole** (**III-6**) แสดงดังภาพที่ 33 ชั่งสารประกอบ 5-bromo-*N*-methylisatin ปริมาณ 0.12 กรัม (0.50 มิลลิโมล) ใส่ขวดก้นกลมขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายด้วยตัวทำละลายเอทานอล (ethanol; EtOH) ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารประกอบ tryptamine ปริมาณ 0.10 มิลลิลิตร (0.62 มิลลิโมล) และกรดแกลเซียลแอซีติก ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร แล้วกวนปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศอาร์กอนที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลากรองสารละลายที่ได้แบบลดความดันและล้างด้วยเอทานอล จากนั้นนำสารละลายที่ได้จากการกรองไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้สุญญากาศและทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง EtOAc:Hexane อัตราส่วน 1:2 v/v ทำหน้าที่เป็น mobile phase ได้สารประกอบ **spiro-indole** (**III-6**) เป็นของแข็งสีเบจ ปริมาณ 0.17 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตได้เท่ากับ 89

1.3.4 การสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 3a (Iheyamine 1)



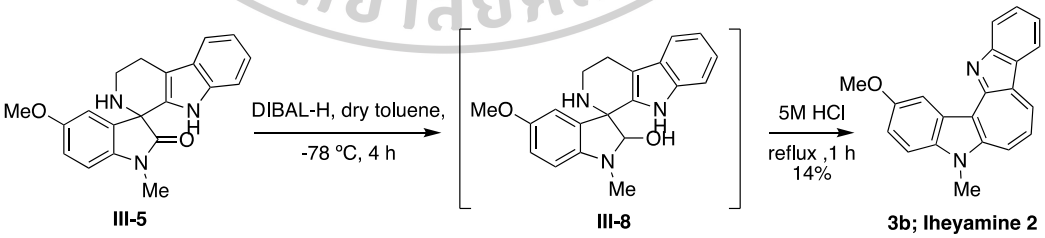
ภาพที่ 34 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ **3a** (**Iheyamine 1**)

การสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ **3a** (**Iheyamine 1**) แสดงดังภาพที่ 34 ชั่งสารประกอบ **spiro-indole** (**III-4**) ปริมาณ 0.10 กรัม (0.33 มิลลิโมล) ใส่ขวดก้นกลมขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายด้วยตัวทำละลายโทลูอีน (toluene) ปริมาตร 6.0 มิลลิลิตร จากนั้นทำสารละลายให้เย็นลงที่อุณหภูมิ -78 องศา ภายใต้บรรยากาศอาร์กอน แล้วค่อยๆเติมสาร DIBAL-H ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (3.02 มิลลิโมล) ลงในสารละลาย แล้วกวนปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศอาร์กอนที่อุณหภูมิ -

78 องศาเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (5% aqueous NaOH solution) ปริมาตร 8 มิลลิลิตร และทำการสกัดกับตัวทำละลายเอทิลอะซีเตต (EtOAc) จำนวน 1 ครั้ง ตามด้วยนำสารละลายชั้นตัวทำละลายอินทรีย์มาสกัดกับสารละลายอิ่มตัวของโซเดียมคลอไรด์ (sat.brine) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง โดยเก็บสารละลายชั้นตัวทำละลายเอทิลอะซีเตตที่ได้กำจัดน้ำออกโดยการเติม anh.Na_2SO_4 ลงไปปริมาณเล็กน้อย และนำไปกำจัดตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator จะได้สารประกอบ **oxyindoline** (**III-7**) ซึ่งนำไปใช้ในปฏิกิริยาขั้นตอนต่อไป โดยไม่ผ่านการแยกบริสุทธิ์

ชั่งสารประกอบ **oxyindoline** (**III-7**) ปริมาณ 0.09 กรัม (0.29 มิลลิโมล) ใส่ขวดก้นกลมขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 5 โมลาร์ (5M HCl) ปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร จากนั้นกวนปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 90 องศาเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาทำสารละลายให้เย็นลงถึงอุณหภูมิห้อง แล้วปรับ pH ของสารละลายด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (25% KOH solution) จนกระทั่ง pH ของสารละลายมากกว่า 12 จะพบตะกอนตกลงมา จากนั้นกรองตะกอนที่ได้และนำมาทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง EtOAc:Hexane อัตราส่วน 1:2 v/v ทำหน้าที่เป็น mobile phase ได้สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ **3a** (**Iheyamine 1**) เป็นของแข็งสีเขียว ปริมาณ 0.012 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตได้เท่ากับ 13 โดยคำนวณจากการสังเคราะห์จำนวน 2 ขั้นตอน

1.3.5 การสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 3b (Iheyamine 2)



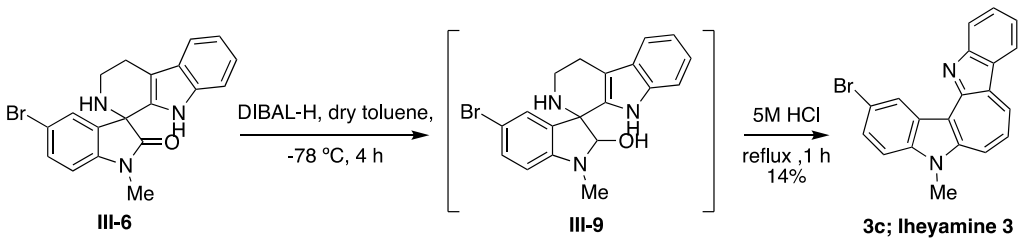
ภาพที่ 35 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ **3b** (**Iheyamine 2**)

การสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ **3b** (**Iheyamine 2**) แสดงดังภาพที่ 35 ชั่งสารประกอบ **spiro-indole** (**III-5**) ปริมาณ 0.11 กรัม (0.33 มิลลิโมล) ใส่ขวดก้นกลมขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายด้วยตัวทำละลายโทลูอีน (toluene) ปริมาตร 6.0 มิลลิลิตร จากนั้นทำสารละลายให้เย็นลงที่อุณหภูมิ -78 องศา ภายใต้บรรยากาศอาร์กอน แล้วค่อยๆเติมสาร DIBAL-H ปริมาตร 0.5

มิลลิลิตร (3.02 มิลลิโมล) ลงในสารละลาย แล้วกวนปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศอาร์กอนที่อุณหภูมิ -78 องศาเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (5% aqueous NaOH solution) ปริมาตร 8 มิลลิลิตร และทำการสกัดกับตัวทำละลายเอทิลอะซีเตต (EtOAc) จำนวน 1 ครั้ง ตามด้วยนำสารละลายชั้นตัวทำละลายอินทรีย์มาสกัดกับสารละลายอิ่มตัวของโซเดียมคลอไรด์ (sat.brine) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง โดยเก็บสารละลายชั้นตัวทำละลายเอทิลอะซีเตตที่ได้กำจัดน้ำออกโดยการเติม anh.Na_2SO_4 ลงไปปริมาณเล็กน้อย และนำไปกำจัดตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator จะได้สารประกอบ **oxyindoline** (**III-8**) ซึ่งนำไปใช้ในปฏิกิริยาขั้นตอนต่อไป โดยไม่ผ่านการแยกบริสุทธิ์

ชั่งสารประกอบ **oxyindoline** (**III-8**) ปริมาณ 0.10 กรัม (0.30 มิลลิโมล) ใส่ขวดก้นกลมขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 5 โมลาร์ (5M HCl) ปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร จากนั้นกวนปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 90 องศาเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาทำสารละลายให้เย็นลงถึงอุณหภูมิห้อง แล้วปรับ pH ของสารละลายด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (25% KOH solution) จนกระทั่ง pH ของสารละลายมากกว่า 12 จะพบตะกอนตกลงมา จากนั้นกรองตะกอนที่ได้และนำมาทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง EtOAc:Hexane อัตราส่วน 1:2 v/v ทำหน้าที่เป็น mobile phase ได้สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ **3b** (**Iheyamine 2**) เป็นของแข็งสีเขียว ปริมาณ 0.014 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตได้เท่ากับ 14 โดยคำนวณจากการสังเคราะห์จำนวน 2 ขั้นตอน

1.3.6 การสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 3c (Iheyamine 3)



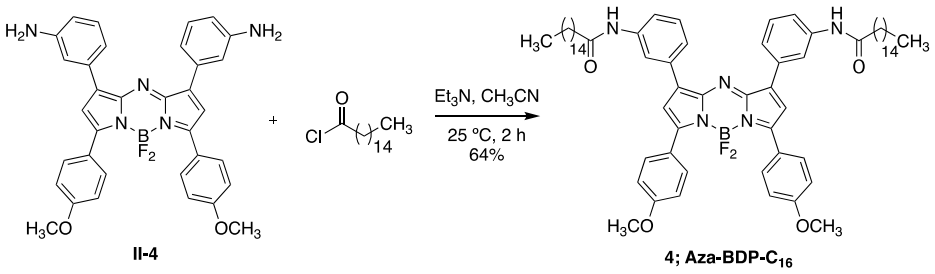
ภาพที่ 36 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ **3c** (**Iheyamine 3**)

การสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ **3c** (**Iheyamine 3**) แสดงดังภาพที่ 36 ชั่งสารประกอบ **spiro-indole** (**III-6**) ปริมาณ 0.10 กรัม (0.26 มิลลิโมล) ใส่ขวดก้นกลมขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายด้วยตัวทำละลายโทลูอีน (toluene) ปริมาตร 6.0 มิลลิลิตร จากนั้นทำสารละลายให้เย็นลงที่อุณหภูมิ -78 องศา ภายใต้บรรยากาศอาร์กอน แล้วค่อยๆเติมสาร DIBAL-H ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (3.02 มิลลิโมล) ลงในสารละลาย แล้วกวนปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศอาร์กอนที่อุณหภูมิ -78 องศาเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (5% aqueous NaOH solution) ปริมาตร 8 มิลลิลิตร และทำการสกัดกับตัวทำละลายเอทิลอะซีเตต (EtOAc) จำนวน 1 ครั้ง ตามด้วยนำสารละลายชั้นตัวทำละลายอินทรีย์มาสกัดกับสารละลายอิ่มตัวของโซเดียมคลอไรด์ (sat.brine) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง โดยเก็บสารละลายชั้นตัวทำละลายเอทิลอะซีเตตที่ได้กำจัดน้ำออกโดยการเติม anh.Na_2SO_4 ลงไปปริมาณเล็กน้อย และนำไปกำจัดตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator จะได้สารประกอบ **oxyindoline** (**III-9**) ซึ่งนำไปใช้ในปฏิกิริยาขั้นตอนต่อไป โดยไม่ผ่านการแยกบริสุทธิ์

ชั่งสารประกอบ **oxyindoline** (**III-9**) ปริมาณ 0.10 กรัม (0.30 มิลลิโมล) ใส่ขวดก้นกลมขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 5 โมลาร์ (5M HCl) ปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร จากนั้นกวนปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 90 องศาเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาทำสารละลายให้เย็นลงถึงอุณหภูมิห้อง แล้วปรับ pH ของสารละลายด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (25% KOH solution) จนกระทั่ง pH ของสารละลายมากกว่า 12 จะพบตะกอนตกลงมา จากนั้นกรองตะกอนที่ได้และนำมาทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง EtOAc:Hexane อัตราส่วน 1:2 v/v ทำหน้าที่เป็น mobile phase ได้สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ **3b** (**Iheyamine 2**) เป็นของแข็งสีเขียว ปริมาณ 0.011 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตได้เท่ากับ 14 โดยคำนวณจากการสังเคราะห์จำนวน 2 ขั้นตอน

1.4 การสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 4 (Aza-BODIPY-C_{16})

การสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ **4** (**Aza-BODIPY-C_{16}**) สามารถสังเคราะห์ได้จากสารประกอบ **Aza-BODIPY-amine** ซึ่งถูกสังเคราะห์ผ่านกระบวนการสังเคราะห์ตามหัวข้อที่ 1.2 นำมาทำปฏิกิริยา amide formation กับสารประกอบ palmitoyl chloride จะได้สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 4 **Aza-BODIPY-C_{16}** โดยเส้นทางการสังเคราะห์แสดงดังรูปที่ 37



ภาพที่ 37 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ **4** (**Aza-BODIPY-C_{16}**)

1.4.1 การสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 4 (Aza-BODIPY- C_{16})

ชั่งสารตั้งต้น Aza-BDP-amine (**II-4**) ปริมาณ 0.050 กรัม (0.085 มิลลิโมล) ละลายด้วยอะซีโตไนไตรล์ (acetonitrile; CH_3CN) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติมไตรเอทิลเอมีน (Et_3N) ปริมาตร 0.70 มิลลิลิตร (10.97 มิลลิโมล) กวนปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศอาร์กอนที่ 0 องศาเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารประกอบปาล์มมิโตอิลคลอไรด์ (palmitoyl chloride) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร (0.33 มิลลิโมล) และกวนปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศอาร์กอนที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการระเหยตัวทำละลายออกภายใต้การลดความดัน แล้วเติมตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนในส่วนที่เหลือ ให้มีปริมาตรโดยรวมประมาณ 20 มิลลิลิตร นำสารละลายผสมมาสกัดด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง เก็บชั้นตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนมากำจัดน้ำออกโดยใช้ anh. Na_2SO_4 จากนั้นนำไปกำจัดตัวทำละลายโดยการระเหยแบบลดความดัน จะได้สารผลิตภัณฑ์ที่ยังไม่บริสุทธิ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีเขียว จากนั้นทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง EtOAc:Hexane อัตราส่วน 2:1 v/v ทำหน้าที่เป็น mobile phase โดยมีค่า R_f เท่ากับ 0.6 ได้สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ **4** (**Aza-BODIPY-C_{16}**) เป็นของเหลวสีเขียวเข้ม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตได้เท่ากับ 64 โดยเส้นทางการสังเคราะห์แสดงดังรูปที่ 37

2. การทดสอบประสิทธิภาพการทำงานสำหรับตรวจวัดไอออนปรอทของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 1 (T_{10}RhO)

เมื่อสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 1 ที่สังเคราะห์ได้ผ่านปฏิกิริยาเคมีได้รับการยืนยันโครงสร้างที่เคมีด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีต่างๆ แล้วนั้น สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดใหม่ที่ได้จะถูกนำมาศึกษาคุณสมบัติทางแสงทั้งการดูดกลืนแสงและการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ เริ่มต้นโดยการตรวจสอบความสามารถในการดูดกลืนแสง (absorption) และการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (emission) ในตัวทำละลายอินทรีย์ จากนั้นทำการหาตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์การดักจับไอออนปรอท (Hg^{2+}) ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ โดยทำการทดสอบทั้งในตัวทำละลายอินทรีย์และสารละลายผสมของตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ เมื่อได้ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการทำงานของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์สำหรับการดักจับไอออนปรอทแล้ว ขั้นตอนต่อมาคือการศึกษาประสิทธิภาพในการทำงานเกี่ยวกับการตรวจวัดไอออนปรอทด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีเพื่อทดสอบหาความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) ความจำเพาะเจาะจงกับไอออนปรอท (selectivity) ความสามารถในการตรวจวัดไอออนปรอทในภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ (competitive) ประสิทธิภาพการทำงานในสภาวะที่ pH ต่างๆ (pH effect) รวมทั้งการศึกษาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบไอออนเชิงซ้อน (Job's plot) ค่าความสามารถในการตรวจวัดต่ำสุดไอออนปรอท (detection limit) ค่าคงที่สมดุลของการเกิดสารประกอบไอออนเชิงซ้อน (Association constant; K_{assoc}) รวมถึงการประยุกต์ใช้สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์สำหรับการตรวจวัดไอออนปรอทในตัวอย่างจริงทางสิ่งแวดล้อม โดยค่าพารามิเตอร์ต่างๆ สำหรับการตรวจวัดไอออนปรอทด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปีแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1
ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ สำหรับการตรวจวัดไอออนปรอทด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปีของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **T_{10}RhO**

พารามิเตอร์	สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **T_{10}RhO**
	ระบบสารละลาย H_2O:EtOH (10:90 v/v)
ความยาวคลื่นกระตุ้น; λ_{ex} (nm)	520
ความเร็วในการสแกน (nm/min)	300
ความกว้างของช่องแสง (nm)	5.0
ช่วงความยาวคลื่นที่ศึกษา (nm)	530-650

2.1 การทดสอบความไว (sensitivity)

การทดสอบความไวของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **T_{10}RhO** สำหรับการตรวจวัดไอออนปรอทด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีนั้น จะทำการศึกษาสัญญาณการดูดกลืนแสง (absorption) โดยวิธียูวีวิ-สิเบล สเปกโทสโกปีและการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ โดยวิธีฟลูออเรสเซนต์สเปกโทสโกปีของสารละลาย **T_{10}RhO** ที่เปลี่ยนไป เมื่อมีการเติมไอออนปรอทเพิ่มขึ้น โดยการนำสารละลาย **T_{10}RhO** ที่ถูกเตรียมขึ้นไปวัดสัญญาณการดูดกลืนแสงหรือสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้นก่อนและหลังการเติมไอออนปรอทด้วยวิธีการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนที่เตรียมไว้ในแต่ละครั้ง โดยใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) และสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ (spectrofluorometer) ตามลำดับ

2.1.1 การเตรียมสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์

สารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **T_{10}RhO** สำหรับการทดสอบถูกเตรียมขึ้น โดยการนำ **T_{10}RhO** ที่สังเคราะห์ได้มาละลายด้วยเอทานอลให้มีความเข้มข้น 1 mM จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวมาเจือจางด้วยวิธี serial dilution ให้มีความเข้มข้น 13.0 μM สำหรับการไตเตรตด้วยไอออนปรอทโดยวิธียูวีวิ-สิเบล สเปกโทสโกปี และความเข้มข้น 1.33 μM สำหรับการไตเตรตด้วยไอออนปรอทโดยวิธีฟลูออเรสเซนต์สเปกโทสโกปี โดยปรับปริมาตรด้วยสารละลายผสมระหว่าง H_2O:EtOH (10:90 v/v)

2.1.2 การเตรียมสารละลายไอออนปรอท

สารละลายไอออนปรอทเปอร์คลอเรตถูกเตรียมที่ความเข้มข้น 1.0×10^{-2} M ในตัวทำละลายน้ำ DI ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายไอออนปรอทด้วยวิธี serial dilution เช่นเดียวกับการเตรียมสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ โดยให้ความเข้มข้นลดลงครั้งละ 10 เท่า จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0×10^{-4} M ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

2.1.3 วิธีการทดสอบ

ปิเปตสารละลาย **T_{10}RhO** ที่ถูกเตรียมขึ้น 3.0 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดสัญญาณการดูดกลืนแสงหรือสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้นก่อนการเติมไอออนปรอท จากนั้นจึงทำการเติมไอออนปรอทด้วยวิธีการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนที่เตรียมไว้ แล้ววัดสัญญาณการดูดกลืนแสงหรือสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของ **T_{10}RhO** ที่เกิดขึ้นภายหลังการเติมไอออนปรอทในแต่

ละครั้ง โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณการดูดกลืนหรือฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้นเมื่อมีการไตเตรตสารละลายไอออนปรอท แล้วทำการไตเตรตจนกระทั่งไม่สังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลง

นอกจากนี้ผลการทดลองที่ได้จากการทดสอบความไวนี้ สามารถนำไปใช้ในการคำนวณหาค่าความสามารถต่ำสุดในการตรวจวัดไอออนปรอท (detection limit) และค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออน (K_{assoc}) จากสมการ Benesi-Hildebrand [28, 29]

2.1.4 การคำนวณหาค่าความสามารถต่ำสุดในการตรวจวัดไอออนปรอท (detection limit)

การหาค่าความสามารถต่ำสุดในการตรวจวัด คำนวณได้จากการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์และความเข้มข้นของไอออน และค่า 3 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์เมื่อไม่มีการเติมไอออนปรอท [30-32] โดยการนำผลการทดลองที่ได้จากการไตเตรตเพื่อหาความไวมาสร้างกราฟมาตรฐานการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ $T_{10}RhO$ เมื่อมีการดักจับกับไอออนปรอทกับความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมลงไป โดยกำหนดแกน Y แทนความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่ 580 nm ส่วนแกน X แทน ความเข้มข้นต่างๆ ของไอออนปรอทที่เติมลงไป และนำค่าความชันของกราฟ (slope) ที่ได้มาคำนวณตามสมการ (1)

$$3SD = slope \bullet [Hg^{2+}] \qquad (1)$$

เมื่อกำหนดให้

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์เมื่อไม่มีการเติมไอออนปรอท

slope คือ ค่าความชันของกราฟ

$[Hg^{2+}]$ คือ ความเข้มข้นของไอออนปรอทต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้

2.1.5 การคำนวณหาค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออน (K_{assoc}) จากสมการ Benesi-Hildebrand

นำผลการทดลองที่ได้จากการไตเตรตเพื่อหาความไวมาการสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{1}{(I-I_0)}$ ในแนวแกน y และ $\frac{1}{[Hg^{2+}]^n}$ ในแนวแกน x เพื่อหาค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออนปรอทได้ตามสมการ Benesi-Hildebrand (2) ซึ่งมีลักษณะความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง

สมการ Benesi-Hildebrand;

$$\frac{1}{(I-I_0)} = \frac{1}{K\bullet(I_{max}-I_0)\bullet[Hg^{2+}]^n} + \frac{1}{(I_{max}-I_0)} \quad (2)$$

เมื่อกำหนดให้

I_0 คือ ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์เริ่มต้น

I คือ ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์หลังเติมไอออนที่ความเข้มข้นใดๆ

I_{max} คือ ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์มากที่สุด

n คือ จำนวนเต็มใดๆ เช่น 1, 2 และ 3

โดยพบว่าค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออนคำนวณได้จากความชันของกราฟที่สร้างขึ้น ดังนี้

$$slope = \frac{1}{K\bullet(I_{max}-I_0)} \quad (3)$$

$$K = \frac{1}{slope\bullet(I_{max}-I_0)} \quad (4)$$

2.2 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (selectivity)

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ $T_{10}RhO$ นั้น ได้ศึกษาด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปี โดยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์จากการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนปรอทลงในสารละลายของ $T_{10}RhO$ เปรียบเทียบกับสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้นจากการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนอื่นๆ แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ระหว่างการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนปรอทและการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนรบกวนอื่นๆ นอกจากนี้การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ $T_{10}RhO$ ยังสามารถศึกษาได้ด้วยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายภายใต้แสงธรรมชาติได้ด้วยตาเปล่าอีกด้วย

2.2.1 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (selectivity) ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปี

2.2.1.1 การเตรียมสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์

เตรียมสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **T_{10}RhO** ในสารละลายผสม H_2O:EtOH (10:90 v/v) โดยมีความเข้มข้น $1.0x10^{-3}$ M ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **T_{10}RhO** ด้วยวิธี serial dilution โดยให้ความเข้มข้นลดลงครั้งละ 10 เท่า จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ $1.0x10^{-6}$ M ซึ่งการเจือจางทุกครั้งปรับปริมาตรด้วยสารละลายผสมระหว่าง H_2O:EtOH (10:90 v/v)

2.2.1.2 การเตรียมสารละลายไอออนปรอทและไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ

สารละลายไอออนปรอทและไอออนเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ ถูกเตรียมในน้ำ DI ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น $1.0x10^{-2}$ M จากนั้นเจือจางสารละลายไอออนปรอทและไอออนเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ ด้วยวิธี serial dilution เช่นเดียวกับการเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ โดยให้ความเข้มข้นลดลงครั้งละ 10 เท่า จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ $1.0x10^{-4}$ M ปริมาตร 10 มิลลิลิตร สำหรับการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **T_{10}RhO** โดยไอออนที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้ได้แก่

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

2.2.1.3 วิธีการทดสอบ

ปิเปตสารละลาย **T_{10}RhO** ที่ถูกเตรียมขึ้น 3.0 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้นก่อนการเติมไอออน จากนั้นจึงทำการเติมไอออนแต่ละชนิดด้วยวิธีการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนที่เตรียมไว้ แล้ววัดสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของ **T_{10}RhO** ที่เกิดขึ้นภายหลังการเติมไอออนในแต่ละครั้ง โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้น แล้วทำการไตเตรตจนกระทั่งไม่สังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลง โดยเปรียบเทียบระหว่างการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนปรอทกับการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นเดียวกัน โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการทดสอบตามตารางที่ 1

2.2.2 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (selectivity) ด้วยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายภายใต้แสงธรรมชาติด้วยตาเปล่า

2.2.2.1 การเตรียมสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์

เตรียมสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **T_{10}RhO** ในสารละลายผสม H_2O:EtOH (10:90 v/v) โดยมีความเข้มข้น $1.0x10^{-3}$ M ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **T_{10}RhO** ด้วยวิธี serial dilution โดยให้ความเข้มข้นลดลงครั้งละ 10 เท่า จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ $1.0x10^{-6}$ M ซึ่งการเจือจางทุกครั้งปรับปริมาตรด้วยสารละลายผสมระหว่าง H_2O:EtOH (10:90 v/v)

2.2.2.2 การเตรียมสารละลายไอออนปรอทและไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ

สารละลายไอออนปรอทและไอออนเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ ถูกเตรียมในน้ำ DI ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น $1.0x10^{-2}$ M จากนั้นเจือจางสารละลายไอออนปรอทและไอออนเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ ด้วยวิธี serial dilution เช่นเดียวกับการเตรียมสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ โดยให้ความเข้มข้นลดลงครั้งละ 10 เท่า จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ $1.0x10^{-4}$ M ปริมาตร 10 มิลลิลิตร สำหรับการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **T_{10}RhO** โดยไอออนที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้ได้แก่

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

2.2.2.3 วิธีการทดสอบ

ปิเปตสารละลาย **T_{10}RhO** ที่ถูกเตรียมขึ้นใส่ใน vial จากนั้นจึงทำการเติมไอออนชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นเดียวกันลงใน vial ที่เตรียมไว้ และสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของละลายด้วยตาเปล่าแล้วทำการบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายรูป

2.3 การทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนปรอทในภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ (competitive)

การทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนปรอทในภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ถูกศึกษาด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปี โดยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของ

สารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ในขณะก่อนเติมและหลังเติมสารละลายไอออนปรอท จนสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ชัดเจนที่ความเข้มค่าหนึ่ง จากนั้นเติมสารละลายไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ในปริมาณ 10 เท่าของความเข้มข้นของสารละลายไอออนปรอทที่เติมลงไป และวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ภายหลังการเติมไอออนรบกวนอื่นๆ อีกครั้ง จำนวน 3 ครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและมาสร้างกราฟเปรียบเทียบ

2.3.1 การเตรียมสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์

สารละลาย $T_{10}RhO$ จะเตรียมขึ้นในลักษณะเดียวกับการทดสอบความจำเพาะเจาะจง โดยทำการเจือจางสารละลายด้วยวิธี serial dilution ให้มีความเข้มข้นเดียวกันคือ $1.0x10^{-6}$ M ในระบบสารละลายผสมระหว่าง H_2O:EtOH (10:90 v/v)

2.3.2 การเตรียมสารละลายไอออนปรอทและไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ

สารละลายไอออนปรอทและไอออนเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ ถูกเตรียมขึ้นด้วยวิธีเช่นเดียวกับการเตรียมเพื่อใช้ทดสอบความจำเพาะเจาะจง

2.3.3 วิธีการทดสอบ

นำสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ที่เตรียมขึ้นปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร ไปวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ก่อนการเติมไอออน จากนั้นเติมสารละลายไอออนปรอทแล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้นชัดเจนที่ความเข้มค่าหนึ่ง หลังจากนั้นทำการเติมสารสารละลายไอออนเกลือเปอร์คลอเรตชนิดอื่นๆ ลงในสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ที่มีสารละลายไอออนปรอทอยู่เป็นจำนวน 10 เท่าของความเข้มข้นของสารละลายไอออนปรอทที่เติมลงไป โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการทดสอบตามตารางที่ 1 เช่นเดียวกับการทดสอบความไว จากนั้นสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า I_F/I_0 ที่ความยาวคลื่นของการคายแสงที่ความเข้มมากที่สุดในแนวแกน y และชนิดของไอออนเปอร์คลอเรตต่างๆ ในแนวแกน x เมื่อกำหนดให้

I_0 = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ก่อนเติมไอออน

I_F = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์หลังเติมไอออน

2.4 การทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนปรอทในภาวะที่ pH ต่างๆ (pH effect)

การทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนปรอทในภาวะที่ pH ต่างๆ ถูกศึกษาด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปี โดยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายสารเรืองแสง

ฟลูออเรสเซนต์ในขณะก่อนเติมและหลังเติมสารละลายไอออนปรอทในระบบสารละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES : EtOH (10:90 v/v) ที่ pH ต่างๆ

2.4.1 การเตรียมสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์

สารละลาย $T_{10}RhO$ จะเตรียมขึ้นในลักษณะเดียวกับการทดสอบความจำเพาะเจาะจง โดยทำการเจือจางสารละลายด้วยวิธี serial dilution ให้มีความเข้มข้นเดียวกันคือ $1.0x10^{-6}$ M ในระบบสารละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES : EtOH (10:90 v/v) ที่ pH ต่างๆ ตั้งแต่ pH 4-10 อย่างละปริมาตร 10 มิลลิลิตร

2.4.2 การเตรียมสารละลายไอออนปรอท

สารละลายไอออนปรอทถูกเตรียมขึ้นด้วยวิธีเช่นเดียวกับการเตรียมเพื่อใช้ทดสอบความไว

2.4.3 วิธีการทดสอบ

นำสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ในภาวะ pH ต่างๆ ที่เตรียมขึ้นปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร ไปวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ก่อนการเติมไอออน จากนั้นเติมสารละลายไอออนปรอทแล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้น โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการทดสอบตามตารางที่ 1 เช่นเดียวกับการทดสอบความไว จากนั้นสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มแสงที่ความยาวคลื่นของการคายแสงที่มากที่สุด (580 nm) ในแนวแกน y และ pH ต่างๆ ของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ในแนวแกน x

2.5 การทดสอบเพื่อหาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์กับไอออนปรอท ด้วยวิธี Job's plot

การทดสอบเพื่อหาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโมเลกุลของของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ $T_{10}RhO$ กับไอออนปรอทถูกศึกษาด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปี โดยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ในขณะก่อนเติมและหลังเติมสารละลายไอออนปรอทในระบบสารละลายผสมระหว่าง H_2O:EtOH (10:90 v/v) โดยสารละลายที่เตรียมมีอัตราส่วนโดยโมลของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ตั้งแต่ 0 ถึง 1 จากนั้นสังเกตการเปลี่ยนแปลงภายหลังการเติมไอออนปรอทแล้วนำมาสร้างกราฟตามวิธี Job's plot

2.5.1 การเตรียมสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์

สารละลาย $T_{10}RhO$ เตรียมขึ้นโดยการเจือจางจากขวดสารละลายความเข้มข้น $1.0x10^{-4}$ M มายังแต่ละขวดปริมาตรให้มีอัตราส่วนโดยโมลของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ตั้งแต่ 0 ถึง 1 ในปริมาตรรวม 10 มิลลิลิตร ในระบบสารละลายผสมระหว่าง H_2O:EtOH (10:90 v/v)

2.5.2 การเตรียมสารละลายไอออนปรอท

สารละลายไอออนปรอทถูกเตรียมขึ้นด้วยวิธีเช่นเดียวกับการเตรียมเพื่อใช้ทดสอบความไว

2.5.3 วิธีการทดสอบ

นำสารละลายที่มีอัตราส่วนโดยโมลของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ตั้งแต่ 0 ถึง 1 ที่เตรียมขึ้นไปวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ก่อนการเติมไอออน จากนั้นเติมสารละลายไอออนปรอทตามจำนวนโมลที่แตกต่างๆ กัน เพื่อให้มีความเข้มข้นของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์และไอออนปรอทรวมกันสุทธิเท่ากับ 10 μM ในปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายหลังการเติมไอออนปรอทไปวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้น โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการทดสอบตามตารางที่ 1 เช่นเดียวกับการทดสอบความไว จากนั้นสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความแตกต่างของความเข้มของแสงที่ความยาวคลื่นของการคายแสงที่มากที่สุด (580 nm) ระหว่างก่อนเติมและหลังเติมไอออนปรอทในแนวแกน y และอัตราส่วนโดยโมลของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ในแนวแกน x เมื่อกำหนดให้

I_0 คือ ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ก่อนเติมไอออน

I คือ ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์หลังเติมไอออน

2.6 การทดสอบเพื่อประยุกต์ใช้สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์สำหรับการตรวจวัดไอออนปรอทในตัวอย่างจริงทางสิ่งแวดล้อม

การศึกษาความสามารถของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์สำหรับการตรวจวัดไอออนปรอทในตัวอย่างจริงทางสิ่งแวดล้อมถูกทดสอบด้วยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายด้วยตาเปล่าในขณะก่อนเติมและหลังเติมสารละลายไอออนปรอทในระบบสารละลายผสมระหว่าง H_2O:EtOH (10:90 v/v)

2.6.1 การเตรียมสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์

สารละลาย $T_{10}RhO$ จะเตรียมขึ้นในลักษณะเดียวกับการทดสอบความจำเพาะเจาะจง โดยทำการเจือจางสารละลายด้วยวิธี serial dilution ให้มีความเข้มข้นเดียวกันคือ $1.0x10^{-6}$ M ในระบบสารละลายผสมระหว่าง H_2O:EtOH (10:90 v/v)

2.6.2 การเตรียมสารละลายไอออนปรอท

สารละลายไอออนปรอทถูกเตรียมขึ้นด้วยวิธีเช่นเดียวกับการเตรียมเพื่อใช้ทดสอบความไว

2.6.3 วิธีการทดสอบ

2.6.3.1 การทดสอบในตัวอย่างน้ำแร่และน้ำดื่ม

นำสารละลายที่เตรียมขึ้นเติมลงในสารละลายตัวอย่างน้ำ จากนั้นทำการเติมสารละลายไอออนปรอทลงไปแล้วทำการสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายที่เกิดขึ้น หลังจากนั้นบันทึกผลการทดลองที่ได้ด้วยการถ่ายภาพด้วยกล้องถ่ายรูป

2.6.3.2 การทดสอบในตัวอย่างครีมบำรุงผิวกายขาว

นำสารละลายที่เตรียมขึ้นเติมลงในตัวอย่างครีมบำรุงผิวกายขาว จากนั้นทำการเติมสารละลายไอออนปรอทลงไปแล้วทำการสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของครีมบำรุงผิวกายขาวที่เกิดขึ้น หลังจากนั้นบันทึกผลการทดลองที่ได้ด้วยการถ่ายภาพด้วยกล้องถ่ายรูป

มหาวิทยาลัยศิลปากร

3. การทดสอบประสิทธิภาพการทำงานสำหรับตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 2 (AzaBDP-NCS)

เมื่อสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ **2** ที่สังเคราะห์ได้ผ่านปฏิกิริยาเคมีได้รับการยืนยันโครงสร้างที่เคมีด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีต่างๆ แล้วนั้น สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดใหม่ที่ได้จะถูกนำมาศึกษาคุณสมบัติทางแสงทั้งการดูดกลืนแสงและการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ เริ่มต้นโดยการตรวจสอบความสามารถในการดูดกลืนแสง (absorption) และการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (emission) ในตัวทำละลายอินทรีย์ จากนั้นทำการหาตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์การดักจับไอออนไซยาไนด์ (CN^-) ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ โดยทำการทดสอบทั้งในตัวทำละลายอินทรีย์และสารละลายผสมของตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ เมื่อได้ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการทำงานของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์สำหรับการดักจับไอออนไซยาไนด์แล้วขั้นตอนต่อมา คือ การศึกษาประสิทธิภาพในการทำงานเกี่ยวกับการตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี เพื่อทดสอบหาความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) ความจำเพาะเจาะจงกับไอออนไซยาไนด์ (selectivity) ความสามารถในการตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ในภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ (competitive) ความสามารถในการตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ในระบบตัวทำละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบในอัตราส่วนต่างๆ (water effect) คุณสมบัติทางเคมีไฟฟ้าของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ด้วยวิธี cyclic voltammetry (electrochemical property) รวมทั้งการศึกษาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบไอออนเชิงซ้อน (Job's plot) ค่าความสามารถต่ำสุดในการตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ (detection limit) ค่าคงที่สมดุลของการเกิดสารประกอบไอออนเชิงซ้อน (Association constant; K_{assoc}) ตำแหน่งของการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์และไอออนไซยาไนด์ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy และการคำนวณทางคอมพิวเตอร์ด้วยวิธี DFT calculation รวมถึงการประยุกต์ใช้สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์สำหรับการตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ในตัวอย่างจริงทางระบบสิ่งมีชีวิต โดยค่าพารามิเตอร์ต่างๆ สำหรับการตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปีแสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2

ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ สำหรับการตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปีของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS**

พารามิเตอร์	สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS**
	ระบบสารละลายผสมระหว่าง 5 mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.2) : acetonitrile (50:50 v/v) + triton X 100
ความยาวคลื่นกระตุ้น; λ_{ex} (nm)	680
ความเร็วในการสแกน (nm/min)	300
ความกว้างของช่องแสง (nm)	10.0
ช่วงความยาวคลื่นที่ศึกษา (nm)	700-780

3.1 การทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ในระบบตัวทำละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบในอัตราส่วนต่างๆ (water effect)

การทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ในระบบตัวทำละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบในอัตราส่วนต่างๆ ถูกศึกษาด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปี โดยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ในขณะก่อนเติมและหลังเติมไอออนไซยาไนด์ในระบบสารละลายผสมระหว่าง H_2O:CH_3CN ที่อัตราส่วนต่างๆ

3.1.1 การเตรียมสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์

สารละลาย **AzaBDP-NCS** จะเตรียมขึ้นโดยการนำ **AzaBDP-NCS** ที่สังเคราะห์ได้มาละลายด้วยตัวทำละลาย acetonitrile ให้มีความเข้มข้น 1 mM จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวมาเจือจางด้วยวิธี serial dilution ให้มีความเข้มข้น 20.00 μM โดยปรับปริมาตรด้วยสารละลายผสมระหว่าง 5 mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.2) : acetonitrile (50:50 v/v) + triton X 100

3.1.2 การเตรียมสารละลายไอออนไซยาไนด์

สารละลายไอออนโพแทสเซียมไซยาไนด์เตรียมที่ความเข้มข้น 1.0×10^{-2} M ในตัวทำละลายน้ำ DI ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายไอออนไซยาไนด์ด้วยวิธี serial dilution

เช่นเดียวกับการเตรียมสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ โดยให้ความเข้มข้นลดลงครั้งละ 10 เท่า จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ $1.0x10^{-4}$ M ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.1.3 วิธีการทดสอบ

นำสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ในระบบสารละลายผสมระหว่าง H_2O:CH_3CN ที่อัตราส่วนต่างๆ ที่เตรียมขึ้นปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร ไปวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ก่อนมีการเติมไอออน จากนั้นเติมสารละลายไอออนไซยาไนด์แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้น โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการทดสอบตามตารางที่ 2 จากนั้นสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มแสงที่ความยาวคลื่นของการคายแสงที่มากที่สุด (718 nm) ก่อนและหลังเติมสารละลายไอออนในแนวแกน y และอัตราส่วนต่างๆ ของระบบสารละลายผสมระหว่าง H_2O:CH_3CN ในแนวแกน x

3.2 การทดสอบความไว (sensitivity)

การทดสอบความไวของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** สำหรับการตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีนั้น จะทำการศึกษาสัญญาณการดูดกลืนแสง (absorption) โดยวิธียูวีวิ-สิเบล สเปกโทสโกปีและการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ โดยวิธีฟลูออเรสเซนต์สเปกโทสโกปีของสารละลาย **AzaBDP-NCS** ที่เปลี่ยนไป เมื่อมีการเติมไอออนไซยาไนด์เพิ่มขึ้น โดยการนำสารละลาย **AzaBDP-NCS** ที่ถูกเตรียมขึ้นไปวัดสัญญาณการดูดกลืนแสงหรือสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้นก่อนและหลังการเติมไอออนไซยาไนด์ด้วยวิธีการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนที่เตรียมไว้ในแต่ละครั้ง โดยใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) และสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ (spectrofluorometer) ตามลำดับ

3.2.1 การเตรียมสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์

สารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** สำหรับการทดสอบถูกเตรียมขึ้นโดยการนำ **AzaBDP-NCS** ที่สังเคราะห์ได้มาละลายด้วย acetonitrile ให้มีความเข้มข้น 1 mM จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวมาเจือจางด้วยวิธี serial dilution ให้มีความเข้มข้น 13.00 μM สำหรับการไตเตรตด้วยไอออนไซยาไนด์โดยวิธียูวีวิ-สิเบล สเปกโทสโกปี และความเข้มข้น 20.00 μM สำหรับการไตเตรตด้วยไอออนไซยาไนด์โดยวิธีฟลูออเรสเซนต์สเปกโทสโกปี โดยปรับปริมาตรด้วยสารละลายผสมระหว่าง 5 mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.2) : acetonitrile (50:50 v/v) + triton X 100

3.2.2 การเตรียมสารละลายไอออนไซยาไนด์

สารละลายไอออนโพแทสเซียมไซยาไนด์เตรียมที่ความเข้มข้น 1.0×10^{-2} M ในตัวทำละลายน้ำ DI ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายไอออนไซยาไนด์ด้วยวิธี serial dilution เช่นเดียวกับการเตรียมสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ โดยให้ความเข้มข้นลดลงครั้งละ 10 เท่า จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0×10^{-4} M ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.2.3 วิธีการทดสอบ

ปิเปตสารละลาย **AzaBDP-NCS** ที่ถูกเตรียมขึ้น 3.0 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดสัญญาณการดูดกลืนแสงหรือสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้นก่อนการเติมไอออนไซยาไนด์ จากนั้นจึงทำการเติมไอออนไซยาไนด์ด้วยวิธีการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนที่เตรียมไว้ แล้ววัดสัญญาณการดูดกลืนแสงหรือสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของ **AzaBDP-NCS** ที่เกิดขึ้นภายหลังการเติมสารละลายไอออนไซยาไนด์ในแต่ละครั้ง โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณการดูดกลืนแสงหรือฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้นเมื่อมีการไตเตรตสารละลายไอออนไซยาไนด์ แล้วทำการไตเตรตจนกระทั่งไม่สังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลง

นอกจากนี้ผลการทดลองที่ได้จากการทดสอบความไวนี้ สามารถนำไปใช้ในการคำนวณหาค่าความสามารถต่ำสุดในการตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ (detection limit) และค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออน (K_{assoc}) จากสมการ Benesi-Hildebrand [28, 29]

3.2.4 การคำนวณหาค่าความสามารถต่ำสุดในการตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ (detection limit)

การหาค่าความสามารถต่ำสุดในการตรวจวัด คำนวณได้จากการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์และความเข้มข้นของไอออน และค่า 3 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์เมื่อไม่มีการเติมไอออนไซยาไนด์ [30-32] โดยนำผลการทดลองที่ได้จากการไตเตรตเพื่อหาความไวมาสร้างกราฟมาตรฐานการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** เมื่อมีการดักจับกับไอออนไซยาไนด์กับความเข้มข้นของไอออนไซยาไนด์ที่เติมลงไป โดยกำหนดแกน Y แทนความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่ 718 nm ส่วนแกน X แทน ความเข้มข้นต่างๆ ของไอออนไซยาไนด์ที่เติมลงไป จากนั้นนำค่าความชันของกราฟ (slope) ที่ได้มาคำนวณตามสมการ (5)

$$\text{Blank-3SD} = \text{slope} \bullet [CN^-] + c \qquad (5)$$

เมื่อกำหนดให้

Blank คือ ค่าความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์เมื่อไม่มีการเติมไอออนไซยาไนด์

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์เมื่อไม่มีการเติมไอออนไซยาไนด์

slope คือ ค่าความชันของกราฟ

[CN^-] คือ ความเข้มข้นของไอออนไซยาไนด์ต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้

c คือ จุดตัดบนแกน y

3.2.5 การคำนวณหาค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออน (K_{assoc}) จากสมการ Benesi-Hildebrand

นำผลการทดลองที่ได้จากการไตเตรตเพื่อหาความไวมาการสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{1}{(I_0-I)}$ ในแนวแกน y และ $\frac{1}{[CN^-]^n}$ ในแนวแกน x เพื่อหาค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออนไซยาไนด์ได้ตามสมการ Benesi-Hildebrand (6) ซึ่งมีลักษณะความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง

สมการ Benesi-Hildebrand;

$$\frac{1}{(I_0-I)} = \frac{1}{K\bullet(I_{max}-I_{min})\bullet[CN^-]^n} + \frac{1}{(I_{max}-I_{min})} \quad (6)$$

เมื่อกำหนดให้

I_0 คือ ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์เริ่มต้น

I คือ ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์หลังเติมไอออนที่ความเข้มข้นใดๆ

I_{max} คือ ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์มากที่สุด

I_{min} คือ ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์น้อยที่สุด

n คือ จำนวนเต็มใดๆ เช่น 1, 2 และ 3

โดยพบว่าค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออนคำนวณได้จากความชันของกราฟที่สร้างขึ้น ดังนี้

$$slope = \frac{1}{K\bullet(I_{max}-I_{min})} \quad (7)$$

$$K = \frac{1}{slope\bullet(I_{max}-I_{min})} \quad (8)$$

3.3 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (selectivity)

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** นั้น ได้ศึกษาด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปี โดยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์จากการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนไซยาไนด์ลงในสารละลายของ **AzaBDP-NCS** เปรียบเทียบกับสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้นจากการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนอื่นๆ แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ระหว่างการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนไซยาไนด์และการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนรบกวนอื่นๆ นอกจากนี้การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** ยังสามารถศึกษาได้ด้วยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายภายใต้แสงธรรมชาติและการเรืองแสงของสารละลายภายใต้แสง UV ด้วยตาเปล่าได้อีกด้วย

3.3.1 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (selectivity) ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปี

3.3.1.1 การเตรียมสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์

เตรียมสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** ในสารละลายผสมระหว่าง 5 mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.2) : acetonitrile (50:50 v/v) + triton X 100 โดยมีความเข้มข้น $1.0\text{x}10^{-3}$ M ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** ด้วยวิธี serial dilution โดยให้ความเข้มข้นลดลงครั้งละ 10 เท่า จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ $2.0\text{x}10^{-5}$ M ซึ่งการเจือจางทุกครั้งปรับปริมาตรด้วยสารละลายผสมระหว่าง 5 mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.2) : acetonitrile (50:50 v/v) + triton X 100

3.3.1.2 การเตรียมสารละลายไอออนไซยาไนด์และไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ

สารละลายไอออนไซยาไนด์และไอออนเกลือโพแทสเซียมชนิดต่างๆ ถูกเตรียมในน้ำ DI ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น $1.0\text{x}10^{-2}$ M จากนั้นเจือจางสารละลายไอออนไซยาไนด์และไอออนเกลือโพแทสเซียมชนิดต่างๆ ด้วยวิธี serial dilution เช่นเดียวกับการเตรียมสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ โดยให้ความเข้มข้นลดลงครั้งละ 10 เท่า จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ $1.0\text{x}10^{-4}$ M ปริมาตร 10 มิลลิลิตร สำหรับการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** โดยไอออนที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้ได้แก่

ไอออนไซยาไนด์ (CN^-) ไอออนฟลูออไรด์ (F^-) ไอออนซัลเฟต (SO_4^{2-}) ไอออนเปอร์คลอเรต (ClO_4^-) ไอออนไฮโดรเจนซัลเฟต (HSO_4^-) ไอออนอะซีเตต ($C_2H_3O_2^-$) ไอออนคาร์บอเนต (CO_3^{2-})

ไอออนไนเตรต (NO_3^-) ไอออนคลอไรด์ (Cl^-) ไอออนฟอสเฟต (HPO_4^-) ไอออนโบรไมด์ (Br^-) ไอออนไอโอไดด์ (I^-) และกรดอะมิโนฟินิลอะลานีน (Phe)

3.3.1.3 วิธีการทดสอบ

ปิเปตสารละลาย **AzaBDP-NCS** ที่ถูกเตรียมขึ้น 3.0 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้นก่อนการเติมไอออน จากนั้นจึงทำการเติมไอออนแต่ละชนิดด้วยวิธีการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนที่เตรียมไว้ แล้ววัดสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของ **AzaBDP-NCS** ที่เกิดขึ้นภายหลังการเติมไอออนในแต่ละครั้ง โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้น แล้วทำการไตเตรตจนกระทั่งไม่สังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลง โดยเปรียบเทียบระหว่างการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนไซยาไนด์กับการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนเกลือโพแทสเซียมชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นเดียวกัน โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการทดสอบตามตารางที่ 2

3.3.2 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (selectivity) ด้วยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายภายใต้แสงธรรมชาติและการเรืองแสงของสารละลายภายใต้แสง UV ด้วยตาเปล่า

3.3.2.1 การเตรียมสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์

เตรียมสารละลายสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** ในสารละลายผสมระหว่าง 5 mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.2) : acetonitrile (50:50 v/v) + triton X 100 โดยมีความเข้มข้น 1.0×10^{-3} M ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** ด้วยวิธี serial dilution โดยให้ความเข้มข้นลดลงครั้งละ 10 เท่า จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.3×10^{-5} M ซึ่งการเจือจางทุกครั้งปรับปริมาตรด้วยสารละลายผสมระหว่าง 5 mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.2) : acetonitrile (50:50 v/v) + triton X 100

3.3.2.2 การเตรียมสารละลายไอออนไซยาไนด์และไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ

สารละลายไอออนไซยาไนด์และไอออนเกลือโพแทสเซียมชนิดต่างๆ ถูกเตรียมเช่นเดียวกันกับการเตรียมเพื่อใช้ทดสอบความจำเพาะเจาะจง

3.3.2.3 วิธีการทดสอบ

ปิเปตสารละลาย **AzaBDP-NCS** ที่ถูกเตรียมขึ้นใส่ใน vial จากนั้นจึงทำการเติมไอออนชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นเดียวกันลงใน vial ที่เตรียมไว้ และสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายภายใต้แสงธรรมชาติและการเรืองแสงของสารละลายภายใต้แสง UV ด้วยตาเปล่าแล้วทำการบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายรูป

3.4 การทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ในภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ (competitive)

การทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ในภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ถูกศึกษาด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปี โดยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ในขณะก่อนเติมและหลังเติมสารละลายไอออนไซยาไนด์จนสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ชัดเจนที่ความเข้มค่าหนึ่ง จากนั้นเติมสารละลายไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ในปริมาณ 3 เท่าของความเข้มข้นของสารละลายไอออนไซยาไนด์ที่เติมลงไป และวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ภายหลังการเติมไอออนรบกวนอื่นๆ อีกครั้งจำนวน 3 ครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและมาสร้างกราฟเปรียบเทียบ

3.4.1 การเตรียมสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์

สารละลาย **AzaBDP-NCS** จะเตรียมขึ้นในลักษณะเดียวกับการทดสอบความจำเพาะเจาะจง โดยทำการเจือจางสารละลายด้วยวิธี serial dilution ให้มีความเข้มข้นเดียวกันคือ 2.0×10^{-5} M ในระบบสารละลายผสมระหว่าง 5 mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.2) : acetonitrile (50:50 v/v) + triton X 100

3.4.2 การเตรียมสารละลายไอออนไซยาไนด์และไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ

สารละลายไอออนไซยาไนด์และไอออนเกลือโพแทสเซียมชนิดต่างๆ ถูกเตรียมขึ้นด้วยวิธีเช่นเดียวกับการเตรียมเพื่อใช้ทดสอบความจำเพาะเจาะจง

3.4.3 วิธีการทดสอบ

นำสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ที่เตรียมขึ้นปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร ไปวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ก่อนมีการเติมไอออน จากนั้นเติมสารละลายไอออนไซยาไนด์แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้นชัดเจนที่ความเข้มค่าหนึ่ง หลังจากนั้นทำการเติมสารสารละลายไอออนเกลือโพแทสเซียมชนิดอื่นๆ ลงในสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ที่มี

สารละลายไอออนไซยาไนด์อยู่ เป็นจำนวน 3 เท่าของความเข้มข้นของสารละลายไอออนไซยาไนด์ที่เติมลงไป โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการทดสอบตามตารางที่ 2 เช่นเดียวกับการทดสอบความไว จากนั้นสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า I_F/I_0 ที่ความยาวคลื่นของการคายแสงที่ความเข้มมากที่สุดในแนวแกน y และชนิดของไอออนเกลือโพแทสเซียมต่างๆ ในแนวแกน x เมื่อกำหนดให้

I_0 = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ก่อนเติมไอออน

I_F = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์หลังเติมไอออน

3.5 การทดสอบเพื่อหาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์กับไอออนไซยาไนด์ด้วยวิธี Job's plot

การทดสอบเพื่อหาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโมเลกุลของของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** กับไอออนไซยาไนด์ถูกศึกษาด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปี โดยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ในขณะก่อนเติมและหลังเติมสารละลายไอออนไซยาไนด์ในระบบสารละลายผสมระหว่าง 5 mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.2) : acetonitrile (50:50 v/v) + triton X 100 โดยสารละลายที่เตรียมมีอัตราส่วนโดยโมลของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ตั้งแต่ 0 ถึง 1 จากนั้นสังเกตการเปลี่ยนแปลงภายหลังการเติมไอออนไซยาไนด์แล้วนำมาสร้างกราฟตามวิธี Job's plot

3.5.1 การเตรียมสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์

สารละลาย **AzaBDP-NCS** เตรียมขึ้นโดยการเจือจางจากขวดสารละลายความเข้มข้น 1.0×10^{-4} M มายังแต่ละขวดปริมาตรให้มีอัตราส่วนโดยโมลของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ตั้งแต่ 0 ถึง 1 ในปริมาตรรวม 10 มิลลิลิตร ในระบบสารละลายผสมระหว่าง 5 mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.2) : acetonitrile (50:50 v/v) + triton X 100

3.5.2 การเตรียมสารละลายไอออนไซยาไนด์

สารละลายไอออนไซยาไนด์ถูกเตรียมขึ้นด้วยวิธีเช่นเดียวกับการเตรียมเพื่อใช้ทดสอบความไว

3.5.3 วิธีการทดสอบ

นำสารละลายที่มีอัตราส่วนโดยโมลของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ตั้งแต่ 0 ถึง 1 ที่เตรียมขึ้นไปวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ก่อนการเติมไอออน จากนั้นเติมสารละลายไอออนไซยาไนด์ตาม

จำนวนโมลที่แตกต่างๆ กัน เพื่อให้มีความเข้มข้นของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์และไอออนไซยาไนด์รวมกันสุทธิเท่ากับ 10 μM ในปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายหลังการเติมไอออนไซยาไนด์ไปวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้น โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการทดสอบตามตารางที่ 2 เช่นเดียวกับการทดสอบความไว จากนั้นสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความแตกต่างของความเข้มของแสงที่ความยาวคลื่นของการคายแสงที่มากที่สุด (718 nm) ระหว่างก่อนเติมและหลังเติมไอออนไซยาไนด์ในแนวแกน y และอัตราส่วนโดยโมลของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ในแนวแกน x เมื่อกำหนดให้

I_0 คือ ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ก่อนเติมไอออน

I_F คือ ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์หลังเติมไอออน

3.6 การทดสอบเพื่อศึกษาตำแหน่งของการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์และไอออนไซยาไนด์ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy

การทดสอบเพื่อศึกษาตำแหน่งของการเกิดปฏิกิริยาของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** กับไอออนไซยาไนด์ถูกศึกษาด้วยเทคนิค NMR spectroscopy ทั้งการศึกษา ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR โดยการวัดสัญญาณโปรตอนหรือคาร์บอนของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ในขณะก่อนและหลังเติมสารละลายไอออนไซยาไนด์ในระบบตัวทำละลาย $CDCl_3$

3.6.1 การเตรียมสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์

สารละลาย **AzaBDP-NCS** เตรียมขึ้นโดยการละลายในตัวทำละลาย $CDCl_3$

3.6.2 การเตรียมสารละลายไอออนไซยาไนด์

สารละลายไอออนไซยาไนด์เตรียมขึ้นโดยการละลายในตัวทำละลาย $CDCl_3$

3.6.3 วิธีการทดสอบ

นำสารละลาย **AzaBDP-NCS** ไปวัดสัญญาณโปรตอนหรือคาร์บอนด้วยเทคนิค NMR spectroscopy ก่อนมีการเติมไอออน จากนั้นเติมสารละลายไอออนไซยาไนด์ตามจำนวนอัตราส่วนที่ต้องการศึกษา แล้วนำไปวัดสัญญาณโปรตอนหรือคาร์บอนอีกครั้ง สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณที่เกิดขึ้นและนำผลที่ได้ก่อนและหลังการเติมสารละลายไอออนไซยาไนด์มาศึกษาตำแหน่งบนโครงสร้างของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** ที่เกิดปฏิกิริยากับไอออนไซยาไนด์

3.7 การทดสอบเพื่อศึกษาตำแหน่งของการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์และไอออนไซยาไนด์โดยการคำนวณทางคอมพิวเตอร์ด้วยวิธี DFT calculation

การทดสอบเพื่อศึกษาตำแหน่งของการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** และไอออนไซยาไนด์ถูกศึกษาโดยการคำนวณทางคอมพิวเตอร์ด้วยวิธี DFT calculation โดยการใช้โปรแกรม Gaussian 09 บนระบบพื้นฐาน B3LYP/6-311G** ของโครงสร้างของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** ก่อนและหลังการเกิดปฏิกิริยากับไอออนไซยาไนด์ระบบสารละลายผสมระหว่าง H_2O:acetonitrile (50:50 v/v)

3.8 การทดสอบเพื่อศึกษาคุณสมบัติทางเคมีไฟฟ้าของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ด้วยวิธี cyclic voltammetry (electrochemical property)

การทดสอบเพื่อศึกษาคุณสมบัติทางเคมีไฟฟ้าของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** ถูกศึกษาด้วยเทคนิค cyclic voltammetry โดยการวัดค่ากระแสไฟฟ้าของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ในระบบตัวทำละลาย CH_2Cl_2

3.8.1 การเตรียมสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์

สารละลาย **AzaBDP-NCS** เตรียมขึ้นโดยการละลายในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 ให้มีความเข้มข้น $1.0x10^{-3}$ M

3.8.2 วิธีการทดสอบ

นำสารละลาย **AzaBDP-NCS** ไปวัดค่ากระแสไฟฟ้าด้วยเทคนิค cyclic voltammetry โดยมีการใช้ขั้ว platinum ทำหน้าที่เป็น counter electrode ขั้ว glassy carbon ทำหน้าที่เป็น working electrode ขั้ว Ag/AgCl ทำหน้าที่เป็น reference electrode และ *n*-Bu_4NPF_6 ทำหน้าที่เป็น supporting electrolyte ในสารละลาย CH_2Cl_2 จากนั้นนำผลที่ได้มีสร้างกราฟ voltammogram

3.9 การทดสอบเพื่อศึกษาการประยุกต์ใช้สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์สำหรับการตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ในตัวอย่างจริงทางระบบสิ่งมีชีวิต

3.9.1 ศึกษาความสามารถการตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ภายในเซลล์สิ่งมีชีวิต

การศึกษาความสามารถของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์สำหรับการตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ในตัวอย่างจริงทางระบบสิ่งมีชีวิต ถูกทดสอบภายในเซลล์ 4T1 (ซึ่งเป็นเซลล์ human breast cancer) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเป็นเวลา 30 นาที ภายในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต

(phosphate-buffered saline) และใช้ไอออนไซยาไนด์ในรูปของเกลือโพแทสเซียม ซึ่งติดตามสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** ก่อนและหลังการดักจับไอออนไซยาไนด์ด้วยเทคนิค Confocal Fluorescence Imaging

3.9.2 ศึกษาความเป็นพิษของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต

การศึกษาความเป็นพิษของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** ที่อาจส่งผลต่อเซลล์สิ่งมีชีวิตถูกทดสอบภายในเซลล์ 4T1 โดยการบ่มเซ็นเซอร์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศา เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ภายในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (phosphate-buffered saline) เพื่อติดตามการมีชีวิตของเซลล์ (Cell viability)

มหาวิทยาลัยศิลปากร

4. การทดสอบประสิทธิภาพการทำงานสำหรับตรวจวัดไอออนเหล็กของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 3 (Iheyamine 1-3)

เมื่อสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ **3** ที่สังเคราะห์ได้ผ่านปฏิกิริยาเคมีได้รับการยืนยันโครงสร้างที่เคมีด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีต่างๆ แล้วนั้น สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดใหม่ที่ได้จะถูกนำมาศึกษาคุณสมบัติทางแสงทั้งการดูดกลืนแสงและการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ เริ่มต้นโดยการตรวจสอบความสามารถในการดูดกลืนแสง (absorption) และ การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (emission) ในตัวทำละลายอินทรีย์ จากนั้นทำการหาตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์การดักจับไอออนเหล็กเฟอรัส (Fe^{2+}) และไอออนเหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ โดยทำการทดสอบทั้งในตัวทำละลายอินทรีย์และสารละลายผสมของตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ เมื่อได้ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการทำงานของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์สำหรับการดักจับไอออนเหล็ก แล้วขั้นตอนต่อมา คือ การศึกษาประสิทธิภาพในการทำงานเกี่ยวกับการตรวจวัดไอออนเหล็กด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี เพื่อทดสอบหาความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) ความจำเพาะเจาะจงกับไอออนเหล็ก (selectivity) ความสามารถในการตรวจวัดไอออนเหล็กในภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ (competitive) รวมทั้งการศึกษาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบไอออนเชิงซ้อน (Job's plot) ค่าความสามารถต่ำสุดในการตรวจวัดไอออนเหล็ก (detection limit) ค่าคงที่สมดุลของการเกิดสารประกอบไอออนเชิงซ้อน (Association constant; K_{assoc}) และการคำนวณทางคอมพิวเตอร์ด้วยวิธี DFT calculation รวมถึงการประยุกต์ใช้สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์สำหรับการตรวจวัดไอออนเหล็กในตัวอย่างจริงทางระบบสิ่งมีชีวิต โดยค่าพารามิเตอร์ต่างๆ สำหรับการตรวจวัดไอออนเหล็กด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปีแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3

ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ สำหรับการตรวจวัดไอออนเหล็กด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปีของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3**

พารามิเตอร์	สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3**
	ระบบสารละลายผสมระหว่าง 5 mM HEPES (pH 7.2) : methanol (90:10 v/v)
ความยาวคลื่นกระตุ้น; λ_{ex} (nm)	275
ความเร็วในการสแกน (nm/min)	300
ความกว้างของช่องแสง (nm)	5.0
ช่วงความยาวคลื่นที่ศึกษา (nm)	300-550

4.1 การทดสอบความไว (sensitivity)

การทดสอบความไวของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3** สำหรับการตรวจวัดไอออนเหล็กด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีนั้น จะทำการศึกษาสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์โดยวิธีฟลูออเรสเซนต์สเปกโทสโกปีของสารละลาย **Iheyamine 1-3** ที่เปลี่ยนไป เมื่อมีการเติมไอออนเหล็กเพิ่มขึ้น โดยการนำสารละลาย **Iheyamine 1-3** ที่ถูกเตรียมขึ้นไปวัดสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้นก่อนและหลังการเติมไอออนเหล็กด้วยวิธีการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนที่เตรียมไว้ในแต่ละครั้ง โดยใช้เครื่องสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ (spectrofluorometer)

4.1.1 การเตรียมสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์

สารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3** สำหรับการทดสอบถูกเตรียมขึ้นโดยการนำ **Iheyamine 1-3** ที่สังเคราะห์ได้มาละลายด้วย methanol ให้มีความเข้มข้น 1 mM จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวมาเจือจางด้วยวิธี serial dilution ให้มีความเข้มข้น 20.00 μM โดยปรับปริมาตรด้วยสารละลายผสมระหว่าง 5 mM HEPES (pH 7.2) : methanol (90:10 v/v)

4.1.2 การเตรียมสารละลายไอออนเหล็ก

สารละลายไอออนเหล็กคลอไรด์ ($FeCl_2$ และ $FeCl_3$) เตรียมที่ความเข้มข้น $1.0x10^{-2}$ M ในตัวทำละลายน้ำ DI ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายด้วยวิธี serial dilution

เช่นเดียวกับการเตรียมสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ โดยให้ความเข้มข้นลดลงครั้งละ 10 เท่า จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0×10^{-4} M ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

4.1.3 วิธีการทดสอบ

ปิเปตสารละลาย **Iheyamine 1-3** ที่ถูกเตรียมขึ้น 3.0 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้นก่อนการเติมไอออนเหล็ก จากนั้นจึงทำการเติมสารละลายไอออนเหล็กด้วยวิธีการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนที่เตรียมไว้ แล้ววัดสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของ **Iheyamine 1-3** ที่เกิดขึ้นภายหลังการเติมไอออนเหล็กในแต่ละครั้ง โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้นเมื่อมีการไตเตรตสารละลายไอออนเหล็กแล้วทำการไตเตรตจนกระทั่งไม่สังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลง

4.1.4 การทดสอบความความสามารถในการตรวจวัดปริมาณไอออนเหล็กรวมของไอออนเหล็กเฟอรัส (Fe^{2+}) และไอออนเหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) โดยวิธีฟลูออเรสเซนต์สเปกโทสโกปี

สารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3** สำหรับการทดสอบถูกเตรียมขึ้นด้วยวิธี serial dilution ให้มีความเข้มข้น 20.00 μM ในสารละลายผสมระหว่าง 5 mM HEPES (pH 7.2) : methanol (90:10 v/v) สำหรับไอออนเหล็กเฟอรัส (Fe^{2+}) และไอออนเหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) เตรียมในน้ำ DI จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0×10^{-4} M ปริมาตร 10 มิลลิลิตร สำหรับสารละลายไอออนเหล็กเฟอรัส (Fe^{2+}) ที่ผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (oxidation) ทำได้ด้วยการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงในสารละลายจนไอออนเหล็กเฟอรัส (Fe^{2+}) เปลี่ยนเป็นไอออนเหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) ทั้งหมด แล้ววัดสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของ **Iheyamine 1-3** ที่เกิดขึ้นภายหลังการเติมไอออนเหล็กทั้ง 3 ชนิดที่ความเข้มข้นเดียวกัน โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้น

นอกจากนี้ผลการทดลองที่ได้จากการทดสอบความไวนี้ สามารถนำไปใช้ในการคำนวณหาค่าความสามารถต่ำสุดในการตรวจวัดไอออนเหล็ก (detection limit) และค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออน (K_{assoc}) จากสมการ Benesi-Hildebrand [28, 29]

4.1.5 การคำนวณหาค่าความสามารถต่ำสุดในการตรวจวัดไอออนเหล็ก (detection limit)

การหาค่าความสามารถต่ำสุดในการตรวจวัด คำนวณได้จากการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์และความเข้มข้นของไอออน และค่า 3 เท่าของค่าเบี่ยงเบน

มาตรฐานของความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์เมื่อไม่มีการเติมไอออนเหล็ก [30-32] โดยนำผลการทดลองที่ได้จากการไตเตรตเพื่อหาความไวมาสร้างกราฟมาตรฐานการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3** เมื่อมีการดักจับกับไอออนเหล็กกับความเข้มข้นของไอออนเหล็กที่เติมลงไป โดยกำหนดแกน Y แทนความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่ 385 nm สำหรับ **Iheyamine 1** 420 nm สำหรับ **Iheyamine 2** 405 nm สำหรับ **Iheyamine 3** ส่วนแกน X แทน ความเข้มข้นต่างๆ ของไอออนเหล็กที่เติมลงไป จากนั้นนำค่าความชันของกราฟ (slope) ที่ได้มาคำนวณตามสมการ (9)

$$\text{Blank-3SD} = \text{slope} \bullet [\text{Fe}] + c \qquad (9)$$

เมื่อกำหนดให้

Blank คือ ค่าความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์เมื่อไม่มีการเติมไอออนเหล็ก

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์เมื่อไม่มีการเติมไอออนเหล็ก

slope คือ ค่าความชันของกราฟ

[Fe] คือ ความเข้มข้นของไอออนเหล็กต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้

c คือ จุดตัดบนแกน y

4.2 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (selectivity)

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3** นั้น ได้ศึกษาด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปี โดยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์จากการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนเหล็กลงในสารละลายของ **Iheyamine 1-3** เปรียบเทียบกับสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้นจากการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนอื่นๆ แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ระหว่างการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนเหล็กและการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนรบกวนอื่นๆ

4.2.1 การเตรียมสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์

เตรียมสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3** ในสารละลายผสมระหว่าง 5 mM HEPES (pH 7.2) : methanol (90:10 v/v) โดยมีความเข้มข้น $1.0x10^{-3}$ M ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3** ด้วยวิธี serial dilution โดยให้ความเข้มข้นลดลงครั้งละ 10 เท่า จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ $2.0x10^{-5}$ M ซึ่งการเจือจางทุกครั้งปรับปริมาตรด้วยสารละลายผสมระหว่าง 5 mM HEPES (pH 7.2) : methanol (90:10 v/v)

4.2.2 การเตรียมสารละลายไอออนเหล็กและไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ

สารละลายไอออนเหล็กและไอออนเกลือคลอไรด์ชนิดต่างๆ ถูกเตรียมในน้ำ DI ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น $1.0x10^{-2}$ M จากนั้นเจือจางสารละลายไอออนเหล็กและไอออนเกลือคลอไรด์ชนิดต่างๆ ด้วยวิธี serial dilution เช่นเดียวกับการเตรียมสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ โดยให้ความเข้มข้นลดลงครั้งละ 10 เท่า จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ $1.0x10^{-4}$ M ปริมาตร 10 มิลลิลิตร สำหรับการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3** โดยไอออนที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้ได้แก่

ไอออนปรอท (Hg^{2+}) ไอออนซิลเวอร์ (Ag^{+}) ไอออนอะลูมิเนียม (Al^{3+}) ไอออนแบเรียม (Ba^{2+}) ไอออนแคลเซียม (Ca^{2+}) ไอออนแคดเมียม (Cd^{2+}) ไอออนทองแดง (Cu^{2+}) ไอออนเหล็กเฟอรัส (Fe^{2+}) และไอออนเหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) ไอออนโคบอลต์ (Co^{2+}) ไอออนสังกะสี (Zn^{2+}) ไอออนโพแทสเซียม (K^{+}) ไอออนแมกนีเซียม (Mg^{2+}) ไอออนแมงกานีส (Mn^{2+}) ไอออนโซเดียม (Na^{+}) ไอออนลิเทียม (Li^{+}) ไอออนนิกเกิล (Ni^{2+}) ไอออนโครเมียม (Cr^{2+}) และไอออนตะกั่ว (Pb^{2+})

4.2.3 วิธีการทดสอบ

ปิเปตสารละลาย **Iheyamine 1-3** ที่ถูกเตรียมขึ้น 3.0 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้นก่อนการเติมไอออน จากนั้นจึงทำการเติมไอออนแต่ละชนิดด้วยวิธีการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนที่เตรียมไว้ แล้ววัดสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของ **Iheyamine 1-3** ที่เกิดขึ้นภายหลังการเติมไอออนในแต่ละครั้ง โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้น แล้วทำการไตเตรตจนกระทั่งไม่สังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลง โดยเปรียบเทียบระหว่างการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนเหล็กกับการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนเกลือคลอไรด์ชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นเดียวกัน โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการทดสอบตามตารางที่ 3

4.3 การทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนเหล็กในภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ (competitive)

การทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ในภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ถูกศึกษาด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปี โดยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ในขณะก่อนเติมและหลังเติมสารละลายไอออนเหล็ก (Fe^{3+}) จนสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ชัดเจนที่ความเข้มค่าหนึ่ง จากนั้นเติมสารละลายไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ในปริมาณ 1 เท่าของความเข้มข้นของสารละลายไอออนเหล็ก (Fe^{3+}) ที่เติมลงไป และวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ภายหลังการเติมไอออนรบกวนอื่นๆ อีกครั้ง จำนวน 3 ครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและมาสร้างกราฟเปรียบเทียบ

4.3.1 การเตรียมสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์

สารละลาย **Iheyamine 1-3** จะเตรียมขึ้นในลักษณะเดียวกับการทดสอบความจำเพาะเจาะจง โดยทำการเจือจางสารละลายด้วยวิธี serial dilution ให้มีความเข้มข้นเดียวกันคือ 2.0×10^{-5} M ในระบบสารละลายผสมระหว่าง 5 mM HEPES (pH 7.2) : methanol (90:10 v/v)

4.3.2 การเตรียมสารละลายไอออนเหล็กและไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ

สารละลายไอออนเหล็กและไอออนเกลือคลอไรด์ชนิดต่างๆ ถูกเตรียมขึ้นด้วยวิธี เช่นเดียวกับการเตรียมเพื่อใช้ทดสอบความจำเพาะเจาะจง

4.3.3 วิธีการทดสอบ

นำสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ที่เตรียมขึ้นปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร ไปวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ก่อนการเติมไอออน จากนั้นเติมสารละลายไอออนเหล็ก (Fe^{3+}) แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้นชัดเจนที่ความเข้มค่าหนึ่ง หลังจากนั้นทำการเติมสารสารละลายไอออนเกลือคลอไรด์ชนิดอื่นๆ ลงในสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ที่มีสารละลายไอออนคลอไรด์อยู่ เป็นจำนวน 1 เท่าของความเข้มข้นของสารละลายไอออนเหล็กที่เติมลงไป โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการทดสอบตามตารางที่ 3 เช่นเดียวกับการทดสอบความไว จากนั้นสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า I_F/I_0 ที่ความยาวคลื่นของการคายแสงที่ความเข้มมากที่สุดในแนวแกน y และชนิดของไอออนเกลือคลอไรด์ต่างๆ ในแนวแกน x เมื่อกำหนดให้

I_0 = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ก่อนเติมไอออน

I_F = ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์หลังเติมไอออน

4.4 การทดสอบเพื่อหาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์กับไอออนเหล็ก (Fe^{3+}) ด้วยวิธี Job's plot

การทดสอบเพื่อหาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโมเลกุลของของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3** กับไอออนเหล็กถูกศึกษาด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปี โดยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ในขณะก่อนเติมและหลังเติมสารละลายไอออนเหล็กในระบบสารละลายผสมระหว่าง 5 mM HEPES (pH 7.2) : methanol (90:10 v/v) โดยสารละลายที่เตรียมมีอัตราส่วนโดยโมลของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ตั้งแต่ 0 ถึง 1 จากนั้นสังเกตการเปลี่ยนแปลงภายหลังการเติมไอออนเหล็กแล้วนำมาสร้างกราฟตามวิธี Job's plot

4.4.1 การเตรียมสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์

สารละลาย **Iheyamine 1-3** เตรียมขึ้น โดยการเจือจางจากสารละลายความเข้มข้น 1.0×10^{-4} M มายังแต่ละขวดปริมาตรให้มีอัตราส่วนโดยโมลของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ตั้งแต่ 0 ถึง 1 ในปริมาตรรวม 10 มิลลิลิตร ในระบบสารละลายผสมระหว่าง 5 mM HEPES (pH 7.2) : methanol (90:10 v/v)

4.4.2 การเตรียมสารละลายไอออนเหล็ก

สารละลายไอออนเหล็กถูกเตรียมขึ้นด้วยวิธีเช่นเดียวกับการเตรียมเพื่อใช้ทดสอบความไว

4.4.3 วิธีการทดสอบ

นำสารละลายที่มีอัตราส่วนโดยโมลของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ตั้งแต่ 0 ถึง 1 ที่เตรียมขึ้นไปวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ก่อนมีการเติมไอออน จากนั้นเติมสารละลายไอออนเหล็กตามจำนวนโมลที่แตกต่างๆ กัน เพื่อให้มีความเข้มข้นของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์และไอออนเหล็กรวมกันสุทธิเท่ากับ 10 μM ในปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายหลังการเติมไอออนเหล็กไปวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้น โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการทดสอบตามตารางที่ 3 เช่นเดียวกับการทดสอบความไว จากนั้นสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความแตกต่างของความเข้มของแสงที่ความยาวคลื่นของการคายแสงที่มากที่สุดระหว่างก่อนเติมและหลังเติมไอออนเหล็กในแนวแกน y และอัตราส่วนโดยโมลของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ในแนวแกน x เมื่อกำหนดให้

I_0 คือ ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ก่อนเติมไอออน

I_F คือ ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์หลังเติมไอออน

4.5 การทดสอบเพื่อศึกษาลักษณะการดักจับไอออนเหล็กของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์โดยการคำนวณทางคอมพิวเตอร์ด้วยวิธี DFT calculation

การทดสอบเพื่อศึกษาลักษณะการดักจับไอออนเหล็กของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3** ถูกศึกษาโดยการคำนวณทางคอมพิวเตอร์ด้วยวิธี DFT calculation โดยการใช้โปรแกรม Gaussian 09 บนระบบพื้นฐาน B3LYP/6-311G** ของโครงสร้างของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3** ก่อนและหลังการเกิดปฏิกิริยากับไอออนไซยาไนด์ระบบสารละลายผสมระหว่าง H_2O:methanol (90:10 v/v)

4.6 การทดสอบเพื่อศึกษาการประยุกต์ใช้สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์สำหรับการตรวจวัดไอออนเหล็กในตัวอย่างจริงทางระบบสิ่งมีชีวิต

4.6.1 ศึกษาความสามารถการตรวจวัดไอออนเหล็กของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ภายในเซลล์สิ่งมีชีวิต

การศึกษาความสามารถของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์สำหรับการตรวจวัดไอออนเหล็กในตัวอย่างจริงทางระบบสิ่งมีชีวิตถูกทดสอบภายในเซลล์ HeLa โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเป็นเวลา 30 นาที ภายในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (phosphate-buffered saline) และใช้ไอออนเหล็กในรูปของเกลือคลอไรด์ ซึ่งติดตามสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3** ก่อนและหลังการดักจับไอออนเหล็กด้วยเทคนิค fluorescence microscope Imaging

4.6.2 การทดสอบความเป็นพิษของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต

การศึกษาความเป็นพิษของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3** ที่อาจส่งผลต่อเซลล์สิ่งมีชีวิตถูกทดสอบภายในเซลล์ HeLa โดยการบ่มเซ็นเซอร์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศา เป็นเวลา 30 นาที ภายในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (phosphate-buffered saline) เพื่อติดตามการมีชีวิตของเซลล์ (Cell viability)

5. การทดสอบประสิทธิภาพการทำงานสำหรับการประยุกต์ใช้เป็นสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิงของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 4 (AzaBDP-C16)

เมื่อสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 4 ที่สังเคราะห์ได้ผ่านปฏิกิริยาเคมีได้รับการยืนยันโครงสร้างที่เคมีด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีต่างๆ แล้วนั้น สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดใหม่ที่ได้จะถูกนำมาศึกษาคุณสมบัติทางแสงในการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ จากนั้นจึงทำการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานสำหรับประยุกต์ใช้สารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิง โดยการทดสอบการตรวจวัดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารทำเครื่องหมายที่เหมาะสมในน้ำมันเชื้อเพลิง การทดสอบความคงตัวของสารทำเครื่องหมายในน้ำมันเชื้อเพลิง และการทดสอบผลกระทบของสารทำเครื่องหมายต่อสมบัติทางกายภาพของน้ำมันเชื้อเพลิงที่มีสารทำเครื่องหมาย โดยค่าพารามิเตอร์ต่างๆ สำหรับศึกษาด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปีแสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4
ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ สำหรับการศึกษาด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปีของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-C16**

พารามิเตอร์	สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-C16**
ความยาวคลื่นกระตุ้น; λ_{ex} (nm)	650
ความเร็วในการสแกน (nm/min)	300
ความกว้างของช่องแสง (nm)	15.0
ช่วงความยาวคลื่นที่ศึกษา (nm)	650-800

5.1 การทดสอบการตรวจวัดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารทำเครื่องหมายที่เหมาะสมในน้ำมันเชื้อเพลิง

การทดสอบการเรืองแสงของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-C16** สำหรับเป็นสารทำเครื่องหมายในน้ำมันเชื้อเพลิงด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีนั้น จะทำการศึกษาสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ โดยวิธีฟลูออเรสเซนต์สเปกโทสโกปีของสารละลาย **AzaBDP-C16** ในน้ำมันเชื้อเพลิง 3 ชนิด ได้แก่ น้ำมันดีเซล น้ำมันแก๊สโซฮอล์อี 10 ออกเทน 91 และน้ำมันแก๊สโซฮอล์อี 10 ออกเทน 95 ที่ความเข้มข้นต่างโดยใช้เครื่องสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ (spectrofluorometer) เพื่อสร้างเป็นกราฟสอบเทียบมาตรฐานการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-C16** สำหรับการตรวจวัดในน้ำมันเชื้อเพลิง

5.1.1 การเตรียมสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์

นำสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-C16** ที่สังเคราะห์ได้มาละลายด้วยไดคลอโรมีเทน ให้มีความเข้มข้น 1 mM จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวมาเจือจางให้มีความเข้มข้น 100 ppm โดยปรับปริมาตรด้วยน้ำมันเชื้อเพลิงแต่ละชนิด แล้วจึงทำการเจือจางสารละลายน้ำมันเชื้อเพลิงชนิดนั้นๆ ให้มีความเข้มข้น 1, 2, 4, 6, 8 และ 10 ppm ตามลำดับ

5.1.2 การทดสอบ

นำสารละลายน้ำมันเชื้อเพลิงแต่ละชนิด ที่มีการเติมสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-C16** มาวัดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ในช่วงความยาวคลื่น 650-800 nm โดยค่าความยาวคลื่นสูงสุดของการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (λ_{em}) เท่ากับ 710 nm ซึ่งกำหนดค่าความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสง (λ_{ex}) เท่ากับ 650 nm โดยใช้เครื่องสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ (spectrofluorometer) ในการตรวจวัดแล้วค่าความเข้มการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ที่ได้มาสร้างกราฟสอบเทียบมาตรฐาน

5.2 การทดสอบความคงตัวของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ในน้ำมันเชื้อเพลิง

การทดสอบความคงตัวของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-C16** ในน้ำมันเชื้อเพลิงถูกศึกษาโดยการวิเคราะห์ปริมาณของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-C16** ที่เติมลงไปในน้ำมันเชื้อเพลิงแต่ละชนิดทุกเดือนเป็นระยะเวลา 3 เดือน จากนั้นนำมาวัดค่าการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ แล้วเปรียบเทียบค่าการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ที่ได้กับกราฟสอบเทียบมาตรฐาน เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-C16** ที่มีในน้ำมันเชื้อเพลิง

5.2.1 การเตรียมสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์

นำสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-C16** ที่สังเคราะห์ได้มาละลายด้วยไดคลอโรมีเทน ให้มีความเข้มข้น 1 mM จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวมาเจือจางให้มีความเข้มข้น 2 ppm โดยปรับปริมาตรด้วยน้ำมันเชื้อเพลิงแต่ละชนิด

5.2.2 การทดสอบ

นำสารละลายน้ำมันเชื้อเพลิงแต่ละชนิดที่มีการเติมสารทำเครื่องหมาย **AzaBDP-C16** ความเข้มข้น 2 ppm มาวัดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ในช่วงความยาวคลื่น 650-800 nm โดยค่าความยาวคลื่นสูงสุดของการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (λ_{em}) เท่ากับ 710 nm โดยใช้เครื่องสเปกโทรฟลูออ

โรมิเตอร์ (spectrofluorometer) ในการตรวจวัดทุกเดือนเป็นเวลา 3 เดือน แล้วนำค่าการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ที่ได้มาเปรียบเทียบค่าการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ที่ได้กับกราฟสอบเทียบมาตรฐาน

5.3 การทดสอบผลกระทบของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ต่อสมบัติทางกายภาพของน้ำมันเชื้อเพลิงที่มีสารทำเครื่องหมาย

การทดสอบผลกระทบของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-C16** ในน้ำมันเชื้อเพลิงถูกศึกษาโดยการวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพของน้ำมันเชื้อเพลิงด้วยวิธีมาตรฐาน ASTM ซึ่งทำการเปรียบเทียบสมบัติทางกายภาพของน้ำมันเชื้อเพลิงที่มีการเติมสารทำเครื่องหมายกับน้ำมันเชื้อเพลิงที่ไม่มีการเติมสารทำเครื่องหมาย

5.3.1 การเตรียมสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์

นำสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-C16** ที่สังเคราะห์ได้มาละลายด้วยไดคลอโรมีเทนให้มีความเข้มข้น 1 mM จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวมาเจือจางให้มีความเข้มข้น 2 ppm โดยปรับปริมาตรด้วยน้ำมันเชื้อเพลิงแต่ละชนิด

5.3.2 การทดสอบ

นำสารละลายน้ำมันเชื้อเพลิงแต่ละชนิดที่มีการเติมสารทำเครื่องหมาย **AzaBDP-C16** ความเข้มข้น 2 ppm วิเคราะห์สมบัติทางกายภาพของน้ำมันเชื้อเพลิงด้วยวิธีมาตรฐาน ASTM ได้แก่ ค่าความถ่วงจำเพาะ ค่าออกเทนจากการคำนวณ (calculated cetane index) ค่าความหนืดไคเมแมติก (kinematic viscosity) ค่าจุดไหลเท ค่าจุดวาบไฟ ค่าการกลั่น ปริมาณกำมะถัน และสีของน้ำมัน

บทที่ 4
ผลการดำเนินงานวิจัย

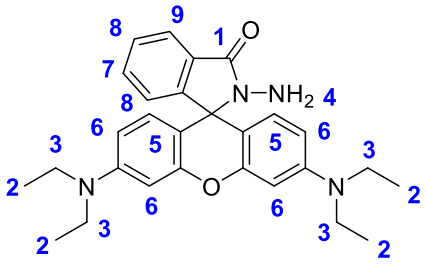
สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดใหม่ที่ทำการสังเคราะห์ผ่านปฏิกิริยาเคมีได้นั้น จะถูกนำมาศึกษาเพื่อยืนยันโครงสร้างทางเคมีของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดใหม่ที่ได้ด้วยเทคนิค nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) และ high resolution mass spectroscopy (HR-ESI MS) ภายหลังจากการยืนยันโครงสร้างทางเคมีอย่างถูกต้องแล้วนั้น สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ใหม่ชนิดที่ 1-3 จะถูกนำมาทดสอบประสิทธิภาพสำหรับการตรวจวัดไอออนที่มีความจำเพาะเจาะจงกับไอโอโนฟอร์ที่ได้ออกแบบไว้ในแต่ละชนิดของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ โดยทำการศึกษาคุณสมบัติทางแสงของสารเรืองแสง เช่น การดูดกลืนแสง (absorption) และการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence emission) เป็นต้น ศึกษาความไวในการตรวจวัดไอออน (sensitivity) ศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดไอออน (selectivity) ความสามารถในการตรวจวัดไอออนเหล็กในภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ (competitive) รวมทั้งการศึกษาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน (Job's plot) ค่าความสามารถต่ำสุดในการตรวจวัดไอออนเหล็ก (detection limit) ค่าคงที่สมดุลของการเกิดไอออนเชิงซ้อน (Association constant; K_{assoc}) และการศึกษาลักษณะการดักจับโดยการคำนวณทางคอมพิวเตอร์ด้วยวิธี DFT calculation นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาการประยุกต์ใช้สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์เหล่านี้ในตัวอย่างจริงทั้งในทางสิ่งแวดล้อมและระบบสิ่งชีวิต สำหรับสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ใหม่ชนิดที่ 4 ถูกนำมาทดสอบประสิทธิภาพสำหรับการใช้เป็นสารทำเครื่องหมายในน้ำมันเชื้อเพลิง ได้แก่ น้ำมันดีเซล น้ำมันแก๊สโซฮอล์อี 10 ออกเทน 91 และน้ำมันแก๊สโซฮอล์อี 10 ออกเทน 95 ศึกษาสมบัติทางกายภาพของน้ำมันเมื่อมีการเติมสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์และความคงตัวของสารทำเครื่องหมายในน้ำมันเชื้อเพลิง

1. ผลการยืนยันโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิคทางสเปกโทสโกปี

จากผลการสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์แต่ละชนิดตามวิธีการทดลองที่ได้กล่าวไว้แล้วนั้น พบว่าได้สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์สำหรับตรวจจับไอออนชนิดใหม่ 3 ชนิด และสารทำเครื่องหมายในน้ำมันเชื้อเพลิงชนิดใหม่ 1 ชนิด ซึ่งสามารถวิเคราะห์และยืนยันโครงสร้างของสารที่สังเคราะห์ได้แต่ละชนิดด้วยวิธีทางสเปกโทรสโกปีดังนี้

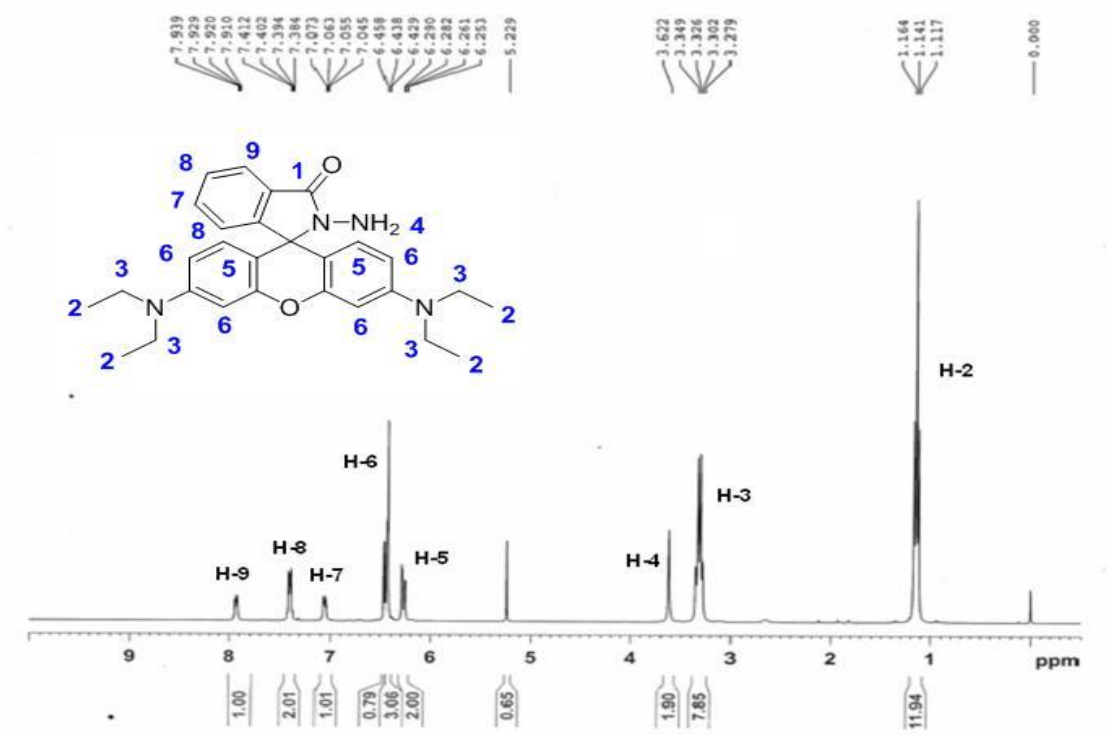
1.1 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบต่างๆ สำหรับการสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 1

1.1.1 โครงสร้างของสารประกอบ rhodamine hydrazide (I-1)

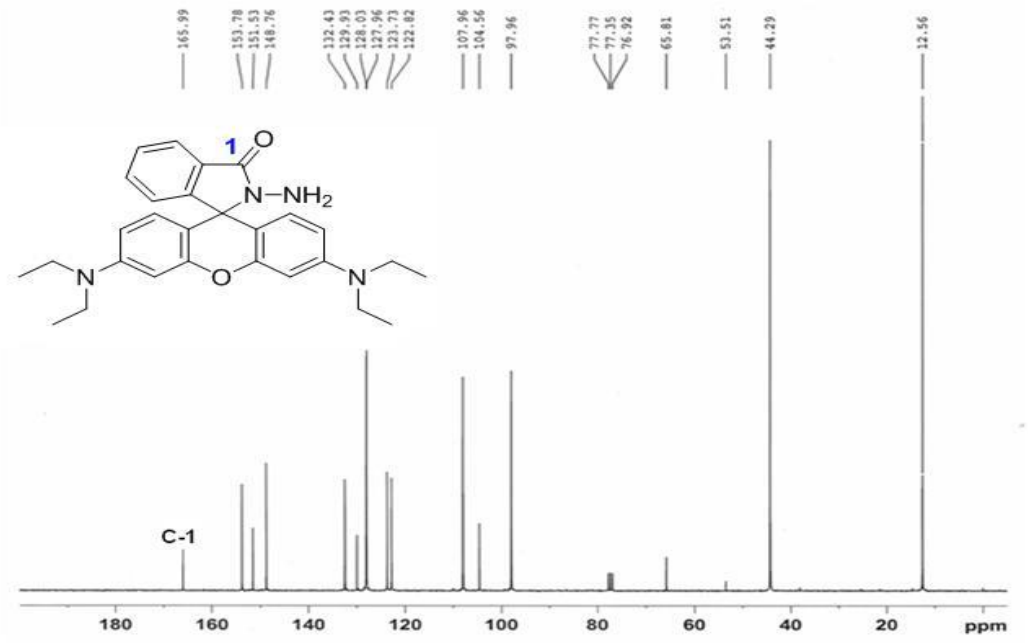


ภาพที่ 38 โครงสร้างทางเคมี **rhodamine hydrazide** (**I-1**)

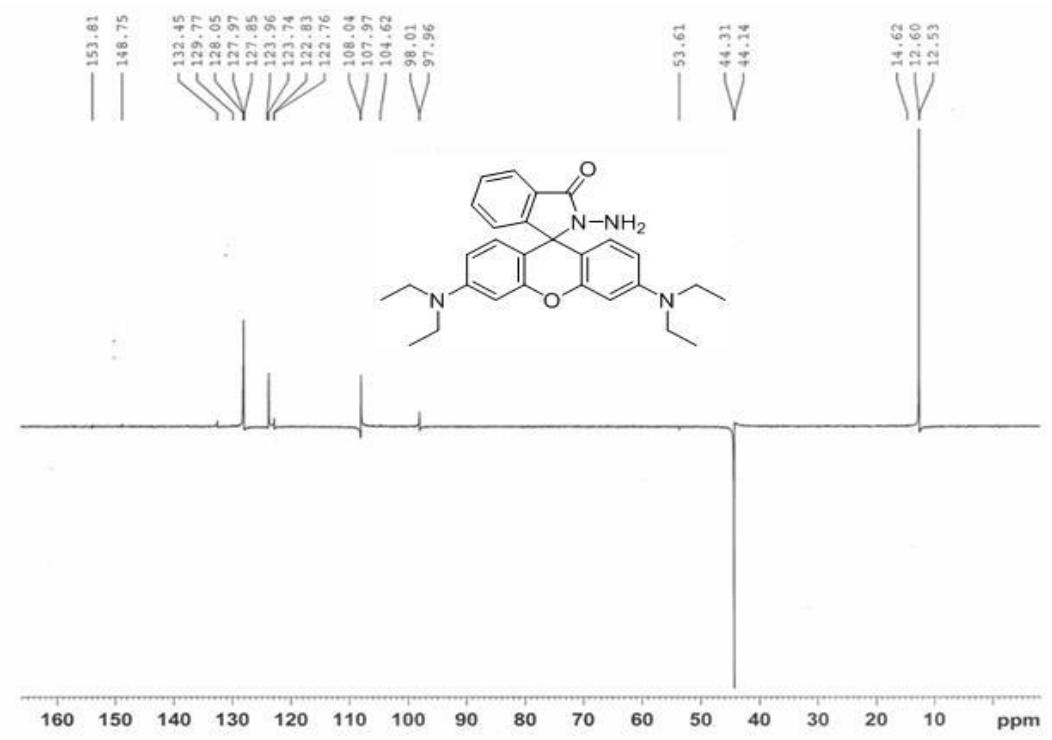
จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของ **rhodamine hydrazide** (**I-1**) สามารถยืนยันโครงสร้างทางเคมีได้โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีได้ดังนี้ ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 1.14 (t, *J* = 6.9 Hz, 12H), 3.31 (q, *J* = 6.9 Hz, 8H), 3.62 (br s, 2H, NH_2), 6.27 (dd, *J* = 8.7, 2.4 Hz, 2H), 6.43-6.46 (m, 4H), 7.06 (dd, *J* = 5.4, 3.0 Hz, 1H), 7.39 (dd, *J* = 5.4, 3.6 Hz, 2H), 7.92 (dd, *J* = 5.7, 3.0 Hz, 1H) ppm (ภาพที่ 39); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 12.6 ($4CH_3$), 44.3 ($4CH_2$), 65.8 (C), 98.0 (2CH), 104.6 (2C), 108.0 (2CH), 122.8 (CH), 123.7 (CH), 127.9 (CH), 128.0 (2CH), 129.9 (2C), 132.4 (CH), 148.8 (2C),151.5 (C), 153.8 (C), 166.0 (C) ppm (ภาพที่ 40-41); HR-ESI MS ของสูตรโมเลกุล $C_{28}H_{33}N_2O_2$ $(M+H)^+$ จากการคำนวณ 457.2604 m/z, จากการทดสอบ 457.2366 m/z (ภาพที่ 42).



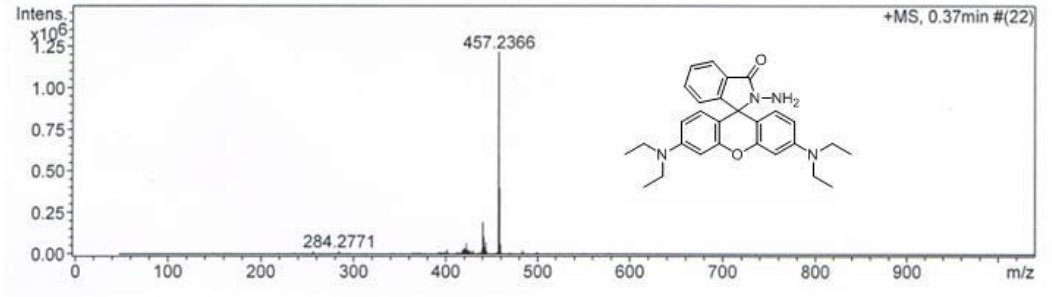
ภาพที่ 39 ^{1}H NMR สเปกตรัมของ **rhodamine hydrazide (I-1)**



ภาพที่ 40 ^{13}C NMR สเปกตรัมของ **rhodamine hydrazide (I-1)**



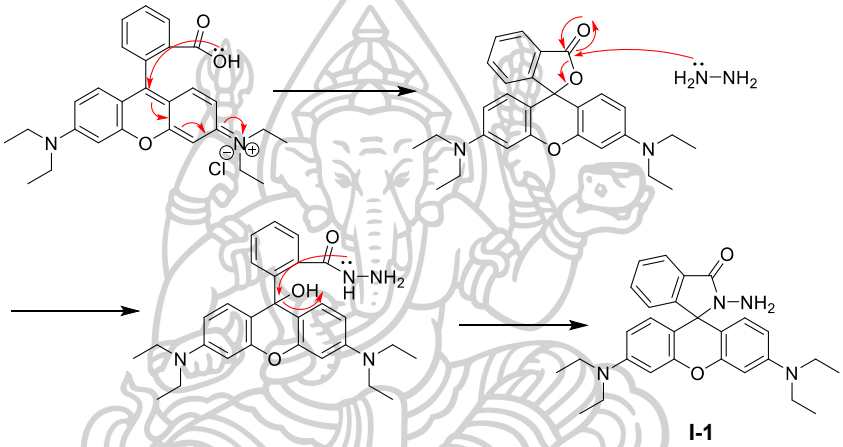
ภาพที่ 41 ^{13}C Dept 135 สเปกตรัมของ **rhodamine hydrazide** (**I-1**)



ภาพที่ 42 HR-ESI MS สเปกตรัมของ **rhodamine hydrazide** (**I-1**)

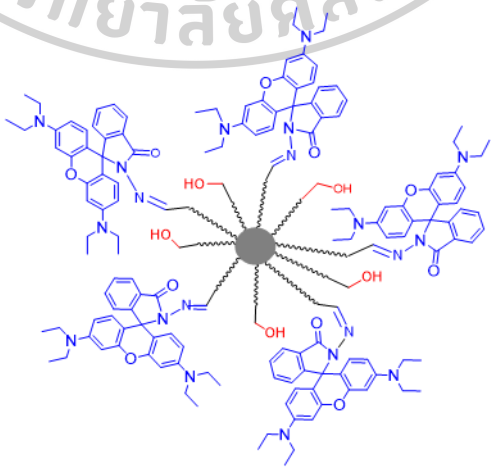
เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ **I-1** ที่สังเคราะห์ได้ (ภาพที่ 38) สามารถยืนยันโครงสร้างทางเคมีได้จาก ^{1}H NMR สเปกตรัม (ภาพที่ 39) ซึ่งแสดงให้เห็นสัญญาณของโปรตอน 8 ชนิดที่แตกต่างกัน โดยพีคสัญญาณจาก ^{1}H NMR สเปกตรัมสามารถระบุตำแหน่งของโปรตอนบนโครงสร้างได้อย่างชัดเจนแต่ไม่ยังสามารถยืนยันโครงสร้างที่แน่นอนได้อย่างชัดเจน เนื่องจากโครงสร้างทางเคมีของสารตั้งต้น rhodamine B chloride แสดงผล ^{1}H NMR สเปกตรัมซึ่งคาดว่ามีความใกล้เคียงกับ ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ **I-1** ซึ่งจะเห็นเพียงแค่สัญญาณของหมู่เอมีนในตำแหน่ง chemical shift เท่ากับ 3.62 ppm ที่แตกต่างกันเท่านั้น ดังนั้นจึงต้องอาศัยผล

ของ ^{13}C NMR สเปกตรัม (ภาพที่ 40-41) มาอธิบายเพิ่มเติม โดยสัญญาณที่สามารถระบุได้ชัดเจนคือสัญญาณที่ปรากฏตำแหน่ง chemical shift เท่ากับ 166.0 ppm ซึ่งเกิดจากสัญญาณคาร์บอนของหมู่คาร์บอนิล (C=O) ที่เกิดพันธะกับอะตอมไนโตรเจนในลักษณะของหมู่ฟังก์ชันเอไมด์ (N-C=O; C-1) โดยสามารถใช้ผลของ ^{13}C Dept 135 สเปกตรัม ในการสนับสนุนได้อีกด้วย อีกทั้งยังสามารถยืนยันโครงสร้างทางเคมีจากการตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี High Resolution Mass Spectrometry (HRMS) (ภาพที่ 42) โดยพิจารณาจากสูตรโมเลกุลของโครงสร้าง $C_{28}H_{33}N_2O_2$ $(M+H)^+$ พบผลการทดสอบได้เท่ากับ 457.2366 *m/z* มีค่าใกล้เคียงจากการคำนวณที่มีค่าเท่ากับ 457.2604 *m/z* จากผลการทดสอบทั้งหมดจึงยืนยันได้ว่าสารผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาเคมีเป็นสารประกอบ **rhodamine hydrazide** (**I-1**) ตามที่ต้องการ โดยสามารถเสนอกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังภาพที่ 43



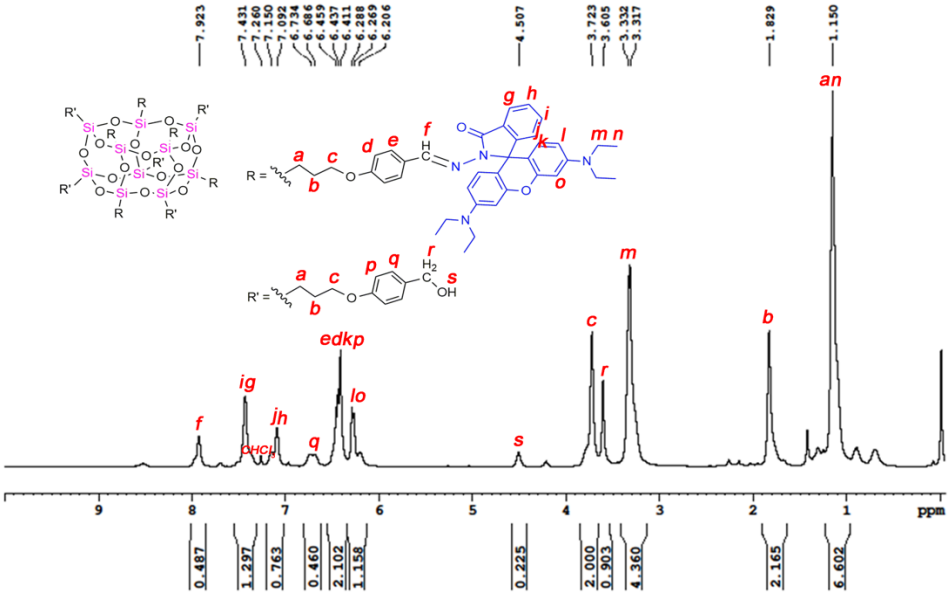
ภาพที่ 43 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของสารประกอบ **rhodamine hydrazide** (**I-1**)

1.1.2 โครงสร้างของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 1 (T_{10}RhO)

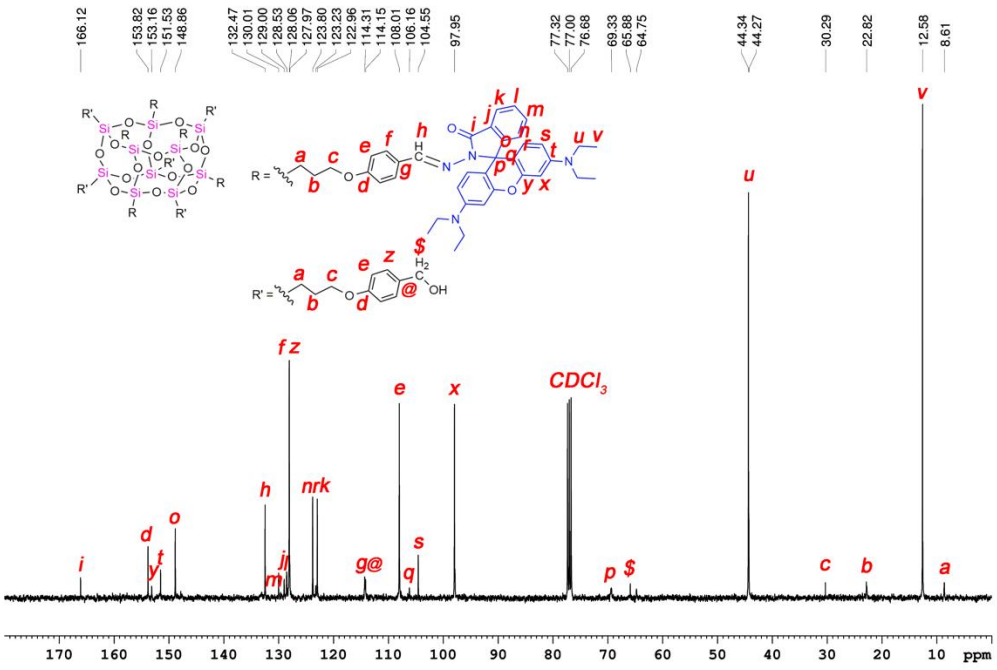


ภาพที่ 44 โครงสร้างทางเคมีของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 1 (T_{10}RhO)

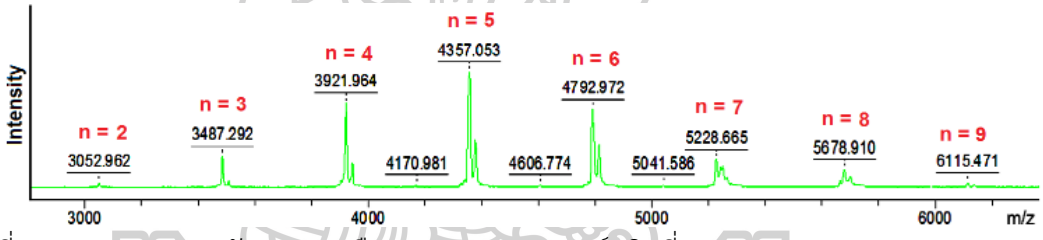
จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 1 (T_{10}RhO) สามารถยืนยันโครงสร้างทางเคมีได้โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีได้ดังนี้ ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 1.15 (m, 80H), 1.83 (m, 20H), 3.32-3.33 (m, 40H), 3.61 (m, 10H), 3.72 (m, 20H), 4.51 (bs, 5H), 6.21-6.29 (m, 20H), 6.41-6.46 (m, 40H), 6.69-6.73 (m, 5H), 7.09-7.26 (m, 10H), 7.43 (m, 10H), 7.92 (m, 5H) ppm (ภาพที่ 45); ^{13}C{^{1}H} NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.61, 12.58, 22.82, 30.29, 44.34, 64.75, 65.88, 69.33, 97.95, 104.55, 106.16, 108.01, 114.15, 114.31, 122.96, 123.23, 123.80, 127.97, 128.06, 128.53, 129.00, 130.01, 132.47, 148.86, 151.53, 153.16, 153.82, 166.12 ppm (ภาพที่ 46); ^{29}Si{^{1}H} NMR (79 MHz, $CDCl_3$, TMS): δ -68.43, -68.53 ppm; MALDI-TOF MS สำหรับ n = 5, m/z ของสูตรโมเลกุล $C_{240}H_{271}N_{20}O_{40}Si_{10}$; [M+H^{+}] จากการคำนวณ 4354.75 m/z จากการทดสอบ 4357.05 m/z (ภาพที่ 47) โดยสังเคราะห์ในขั้นตอนนี้ได้รับความร่วมมือจากนางสาว รุ่งทิพย์ ขันถม นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล



ภาพที่ 45 ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 1 (T_{10}RhO)



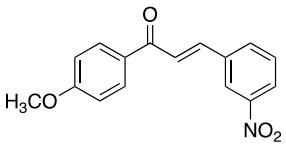
ภาพที่ 46 ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 1 (T_{10}RhO)



ภาพที่ 47 MALDI สเปกตรัมของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 1 (T_{10}RhO)

1.2 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบต่างๆ สำหรับการสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 2

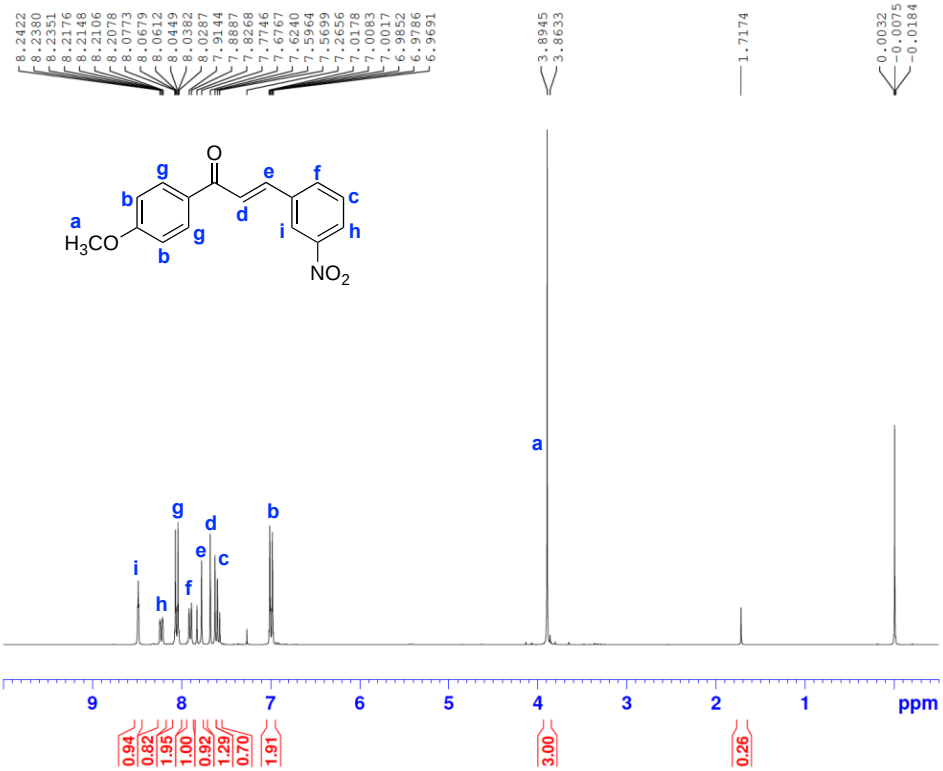
1.2.1 โครงสร้างของสารประกอบ chalcone (II-1)



ภาพที่ 48 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ **chalcone** (**II-1**)

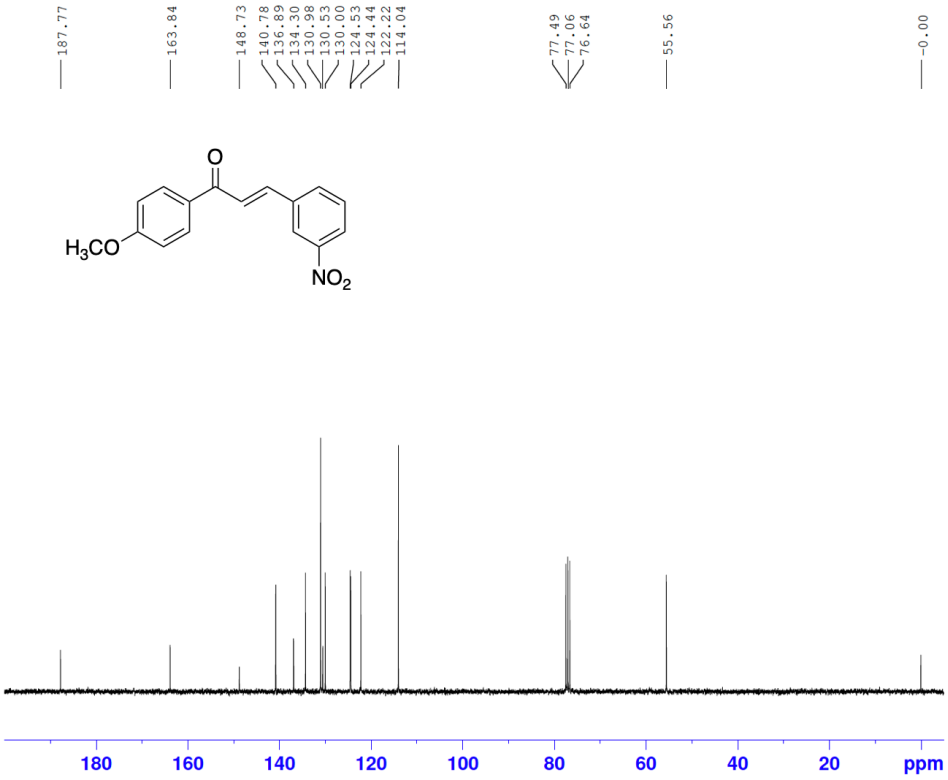
จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ **chalcone** (**II-1**) สามารถยืนยันโครงสร้างทางเคมีได้โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีได้ดังนี้ ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 3.90 (s, 3H), 7.01 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.61 (t, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.67 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.91 (d, *J* = 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 49); ^{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 (C=O) ppm (ภาพที่ 50)



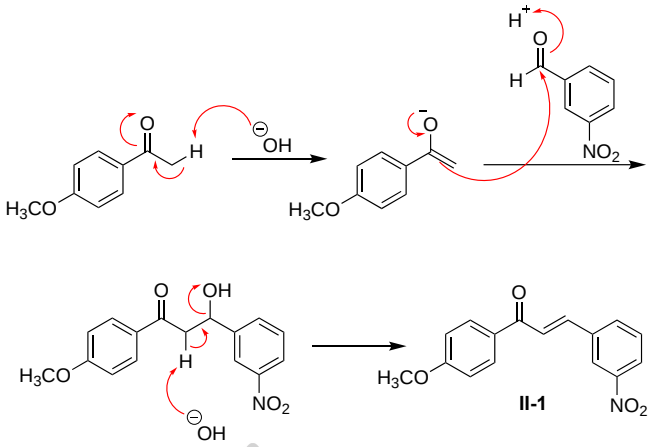
ภาพที่ 49 ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ **chalcone (II-1)**

มหาวิทยาลัยศิลปากร



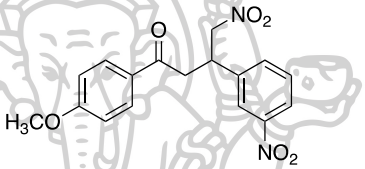
ภาพที่ 50 ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารประกอบ **chalcone** (**II-1**)

เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ **II-1** ที่สังเคราะห์ได้ (ภาพที่ 48) สามารถยืนยันโครงสร้างทางเคมีได้จาก ^{1}H NMR สเปกตรัม (ภาพที่ 49) ซึ่งแสดงให้เห็นสัญญาณของโปรตอน 9 ชนิดที่แตกต่างกัน โดยพีคสัญญาณจาก ^{1}H NMR สเปกตรัมสามารถระบุตำแหน่งของโปรตอนบนโครงสร้างและยืนยันโครงสร้างได้อย่างชัดเจนได้แก่ สัญญาณที่ปรากฏ chemical shift 7.67 และ 7.81 ppm ซึ่งเป็นโปรตอนตำแหน่ง **d** และ **e** ตามลำดับ แสดงสัญญาณลักษณะ doublet โดยโปรตอนทั้งสองตัวนี้เป็นโปรตอนบนพันธะของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา aldol condensation ระหว่างสารตั้งต้น aldehyde และ ketone โปรตอนทั้งสองตัวเกิดการ coupling ซึ่งกันและกันโดยมีค่า *J* coupling เท่ากับ 16.2 และ 15.9 Hz ตามลำดับ รวมทั้งสามารถอาศัยผลของ ^{13}C NMR สเปกตรัม (ภาพที่ 50) มาอธิบายเพิ่มเติม โดยสัญญาณที่สามารถระบุได้ชัดเจนคือสัญญาณที่ปรากฏตำแหน่ง chemical shift เท่ากับ 122.2 และ 140.8 ppm ซึ่งเกิดจากสัญญาณของคาร์บอนตำแหน่งพันธะคู่ เนื่องจากอิทธิพลของหมู่คาร์บอนิลและไนโตรบนวงเบนซีนส่งผลให้คาร์บอนทั้งสองตัวปรากฏตำแหน่ง chemical shift ที่บริเวณสนามแม่เหล็กต่ำกว่าอะลิฟาติกคาร์บอนบนพันธะคู่ทั่วไปซึ่งสอดคล้องกับผลของ ^{1}H NMR โดยจากผลการทดสอบทั้งหมดจึงยืนยันได้ว่าสารผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาเคมีเป็นสารประกอบ **chalcone** (**II-1**) ตามที่ต้องการ โดยสามารถเสนอกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังภาพที่ 51



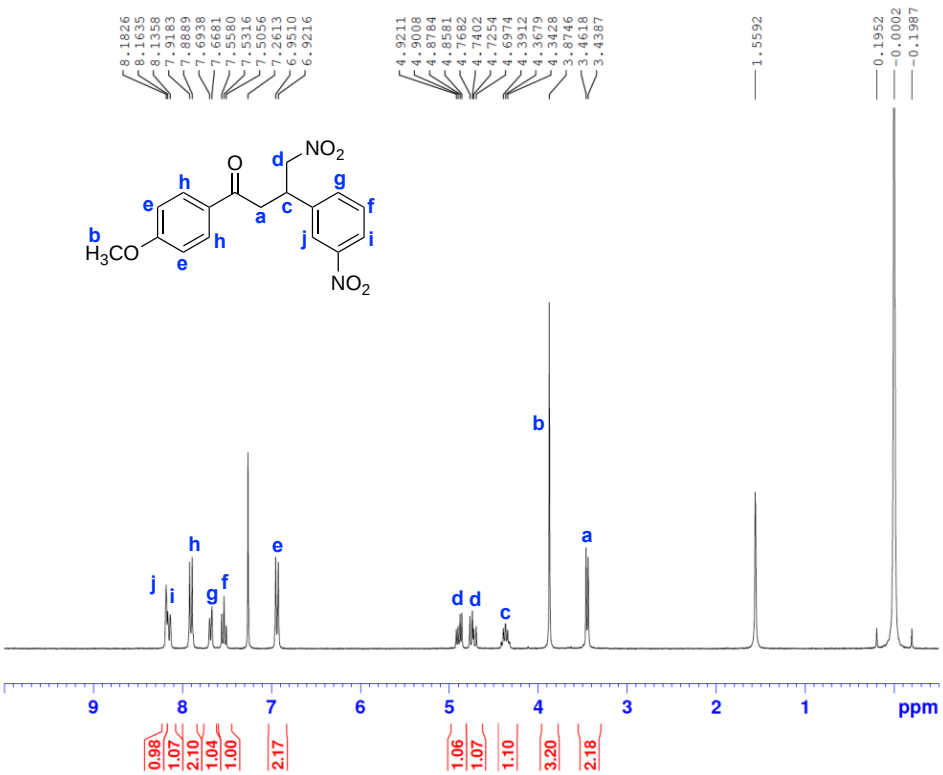
ภาพที่ 51 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของสารประกอบ **chalcone** (**II-1**)

1.2.2 โครงสร้างของสารประกอบ nitro-chalcone (II-2)

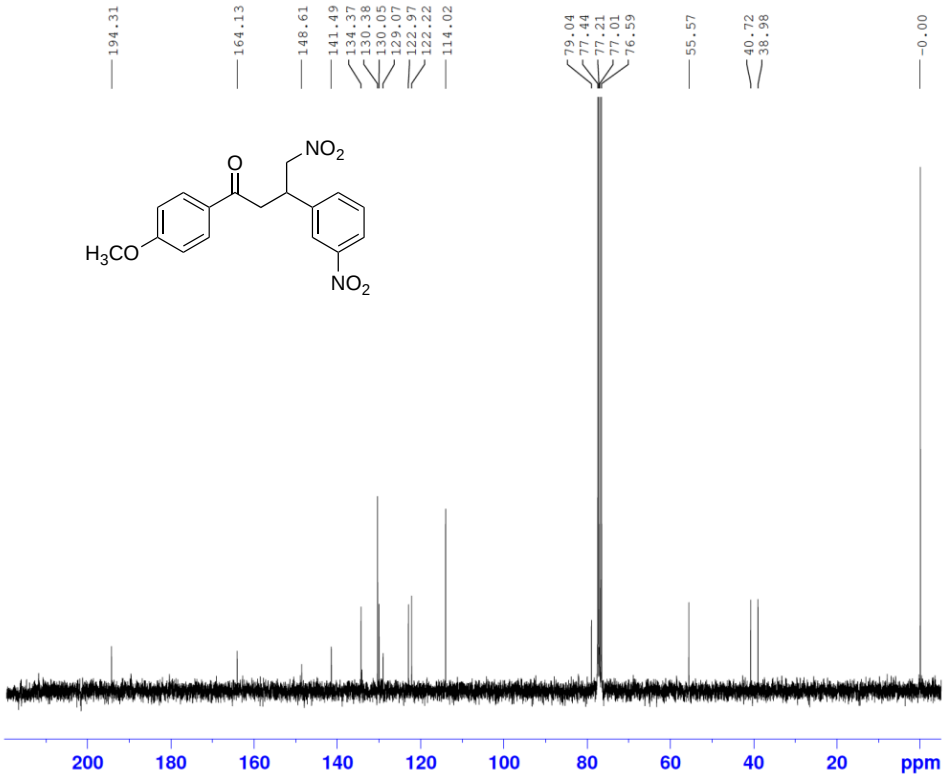


ภาพที่ 52 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ **nitro-chalcone** (**II-2**)

จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ **nitro-chalcone** (**II-2**) สามารถยืนยันโครงสร้างทางเคมีได้โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีได้ดังนี้ ^{1}H 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 53); ^{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 54)

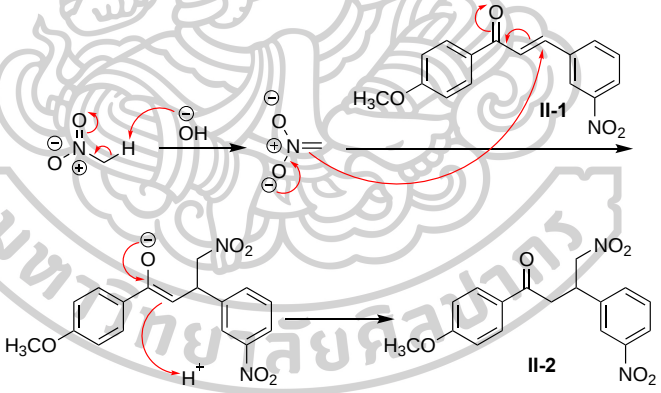


ภาพที่ 53 ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ **nitro-chalcone** (**II-2**)



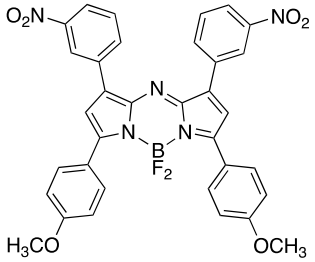
ภาพที่ 54 ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารประกอบ **nitro-chalcone** (**II-2**)

เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ **II-2** ที่สังเคราะห์ได้ (ภาพที่ 52) สามารถยืนยันโครงสร้างทางเคมีได้จาก ^{1}H NMR สเปกตรัม (ภาพที่ 53) ซึ่งแสดงให้เห็นสัญญาณของโปรตอน 11 ชนิดที่แตกต่างกัน โดยพีคสัญญาณจาก ^{1}H NMR สเปกตรัมสามารถระบุตำแหน่งของโปรตอนบนโครงสร้างและยืนยันโครงสร้างได้อย่างชัดเจนได้แก่ สัญญาณของอะลิฟาติกโปรตอนที่ปรากฏ chemical shift เท่ากับ 3.45 เป็นโปรตอนตำแหน่ง **a** แสดงสัญญาณลักษณะ doublet ที่เกิดจากการ coupling กับโปรตอน **c** 1 ตัว โดยมีค่า *J* coupling เท่ากับ 6.9 Hz ตำแหน่ง chemical shift เท่ากับ 4.32-4.42 เป็นโปรตอนตำแหน่ง **c** แสดงสัญญาณลักษณะ multiplet ที่เกิดจากการ coupling กับโปรตอน **a** และ **d** ตำแหน่ง chemical shift เท่ากับ 4.70-4.75 และ 4.86-4.93 เป็นโปรตอนตำแหน่ง **d** แสดงสัญญาณลักษณะ multiplet ที่เกิดจากการ coupling กับโปรตอน **c** 1 ตัว และโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่ง **d** ด้วยกันเอง รวมทั้งสามารถอาศัยผลของ ^{13}C NMR สเปกตรัม (ภาพที่ 54) มาอธิบายเพิ่มเติม โดยสัญญาณที่สามารถระบุได้ชัดเจนคือ สัญญาณที่ปรากฏตำแหน่ง chemical shift เท่ากับ 79.0 ppm ซึ่งเกิดจากสัญญาณของคาร์บอนตำแหน่ง **d** เนื่องจากอิทธิพลของหมู่ไนโตรส่งผลให้คาร์บอนนี้ปรากฏตำแหน่ง chemical shift ที่บริเวณสนามแม่เหล็กต่ำกว่าอะลิฟาติกคาร์บอนทั่วไป ซึ่งสอดคล้องกับผลของ ^{1}H NMR โดยจากผลการทดสอบทั้งหมดจึงยืนยันได้ว่าสารผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาเคมีเป็นสารประกอบ **nitro-chalcone** (**II-2**) ตามที่ต้องการ โดยสามารถเสนอกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังภาพที่ 55



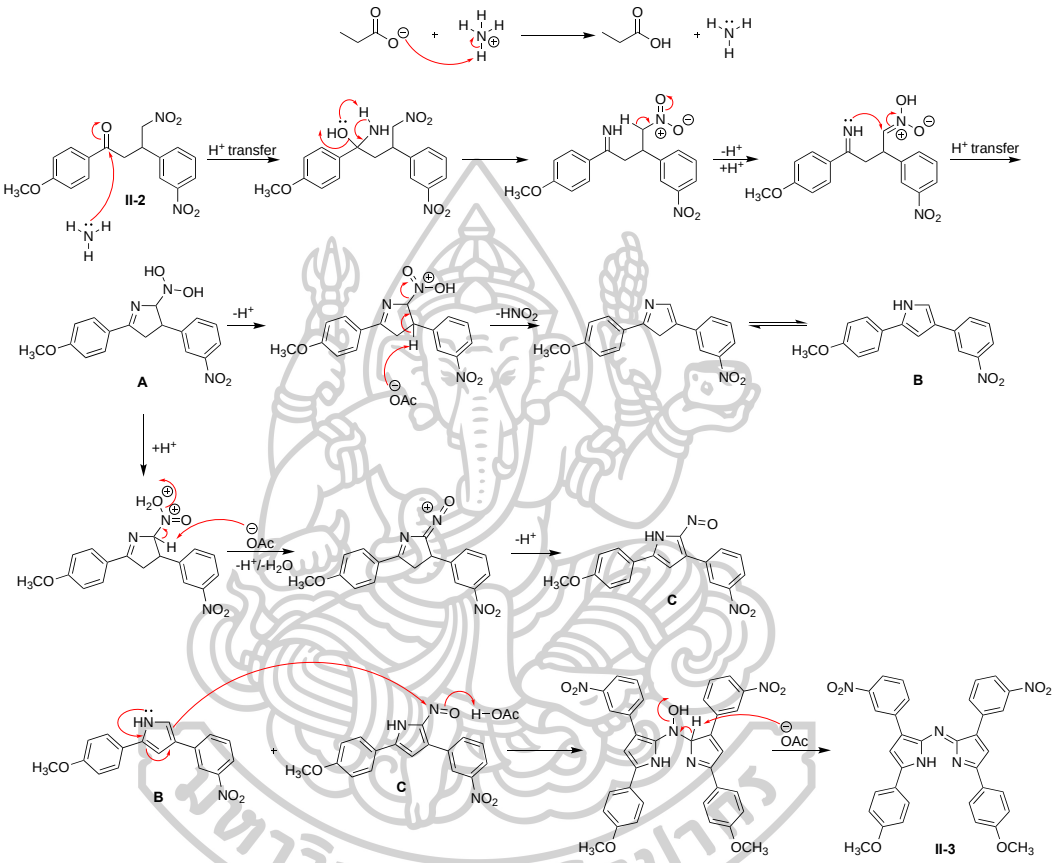
ภาพที่ 55 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของสารประกอบ **nitro-chalcone** (**II-2**)

1.2.3 โครงสร้างของสารประกอบ dipyrrolemethene (II-3)



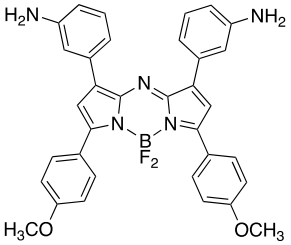
ภาพที่ 56 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ **dipyrrolemethene** (**II-3**)

สารประกอบนี้ไม่สามารถยืนยันโครงสร้างทางเคมีได้ด้วยวิธี NMR เนื่องจากความสามารถในการละลายในตัวทำละลายที่น้อยมากจึงไม่ได้แสดงผลการวิเคราะห์ในที่นี้ โดยเส้นทางการสังเคราะห์สารเรืองแสง Aza-BODIPY ชนิดนี้ได้ทำตามขั้นตอนการสังเคราะห์ที่มีรายงานในก่อนหน้านี้ ซึ่งสารผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเช่นเดียวกับที่มีรายงาน จึงสามารถยืนยันโครงสร้างของสารประกอบชนิดนี้ได้โดยการอ้างอิงจากงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ [27] โดยสามารถเสนอกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังภาพที่ 57



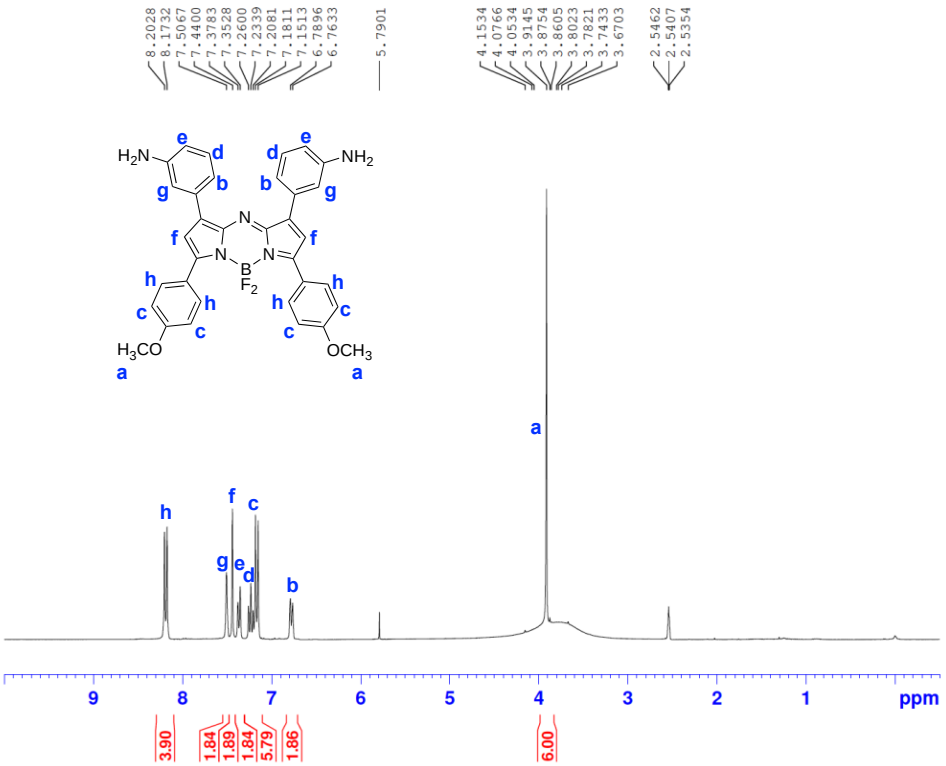
ภาพที่ 57 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของสารประกอบ **dipyrrolemethene (II-3)**

1.2.4 โครงสร้างของสารประกอบ Aza-BODIPY-amine (II-4)

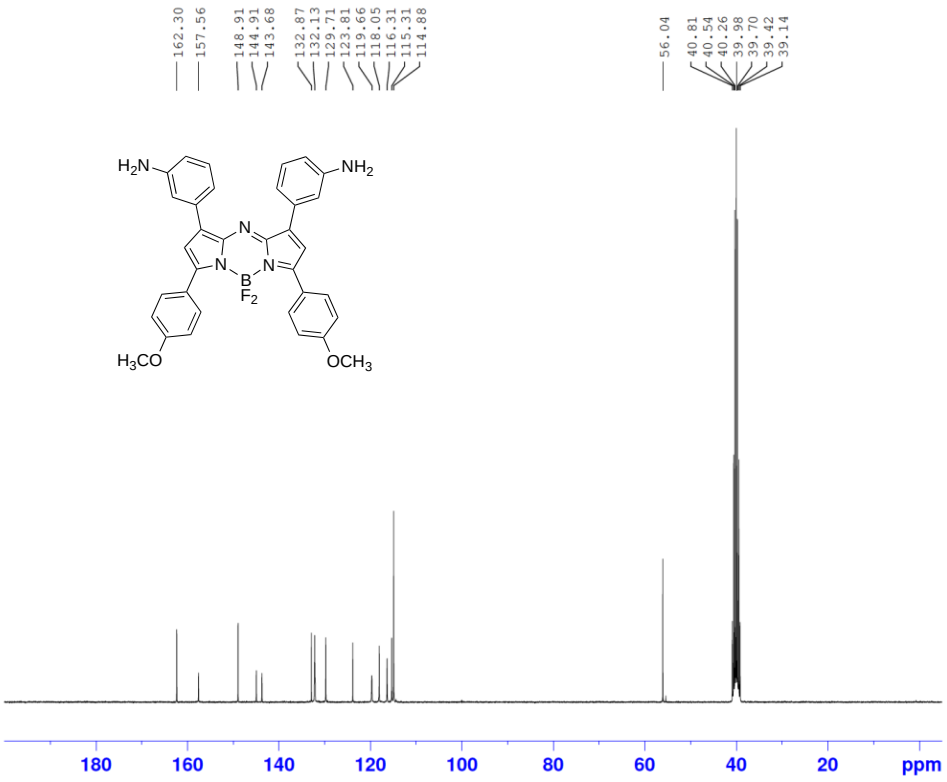


ภาพที่ 58 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ **Aza-BODIPY-amine (II-4)**

จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ **Aza-BODIPY-amine (II-4)** สามารถยืนยันโครงสร้างทางเคมีได้โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีได้ดังนี้ ^{1}H 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 59); ^{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 60)

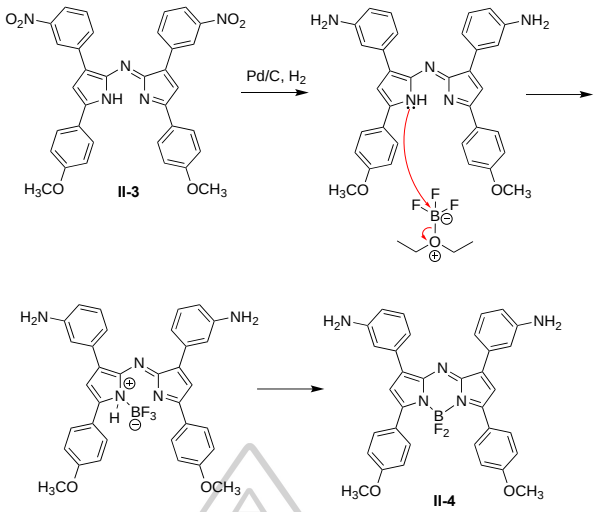


ภาพที่ 59 ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ **Aza-BODIPY-amine (II-4)**



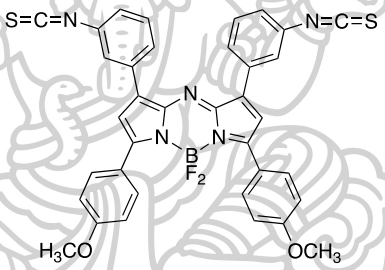
ภาพที่ 60 ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารประกอบ Aza-BODIPY-amine (II-4)

เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ **II-4** ที่สังเคราะห์ได้ (ภาพที่ 58) สามารถยืนยันโครงสร้างทางเคมีได้จาก ^{1}H NMR สเปกตรัม (ภาพที่ 59) ซึ่งแสดงให้เห็นสัญญาณของโปรตอน 8 ชนิดที่แตกต่างกัน โดยพีคสัญญาณจาก ^{1}H NMR สเปกตรัมสามารถระบุตำแหน่งของโปรตอนบนโครงสร้างและยืนยันโครงสร้างได้อย่างชัดเจนได้แก่ สัญญาณของอะโรมาติกโปรตอนที่ปรากฏ chemical shift เท่ากับ 7.44 เป็นโปรตอนตำแหน่ง **f** แสดงสัญญาณลักษณะ singlet เนื่องจากไม่มีโปรตอนบนคาร์บอนข้างเคียง และสัญญาณของอะโรมาติกโปรตอนที่ปรากฏ chemical shift เท่ากับ 7.51 เป็นโปรตอนตำแหน่ง **g** แสดงสัญญาณลักษณะ singlet ที่ไม่เกิดการ coupling กับโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่งใด แต่ได้รับอิทธิพลจากหมู่ amino ทำให้แสดงสัญญาณในตำแหน่ง chemical shift ที่บริเวณสนามแม่เหล็กต่ำกว่าอะโรมาติกโปรตอนทั่วไป รวมทั้งสามารถอาศัยผลของ ^{13}C NMR สเปกตรัม (ภาพที่ 60) มาอธิบายเพิ่มเติม โดยเปรียบเทียบสัญญาณที่ได้กับผลการยืนยันโครงสร้างนี้ที่มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ พบว่าได้ผลการทดลองที่เหมือนกัน โดยจากผลการทดสอบทั้งหมดจึงยืนยันได้ว่าสารผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาเคมีเป็นสารประกอบ **Aza-BODIPY-amine (II-4)** ตามที่ต้องการ โดยสามารถเสนอกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังภาพที่ 61



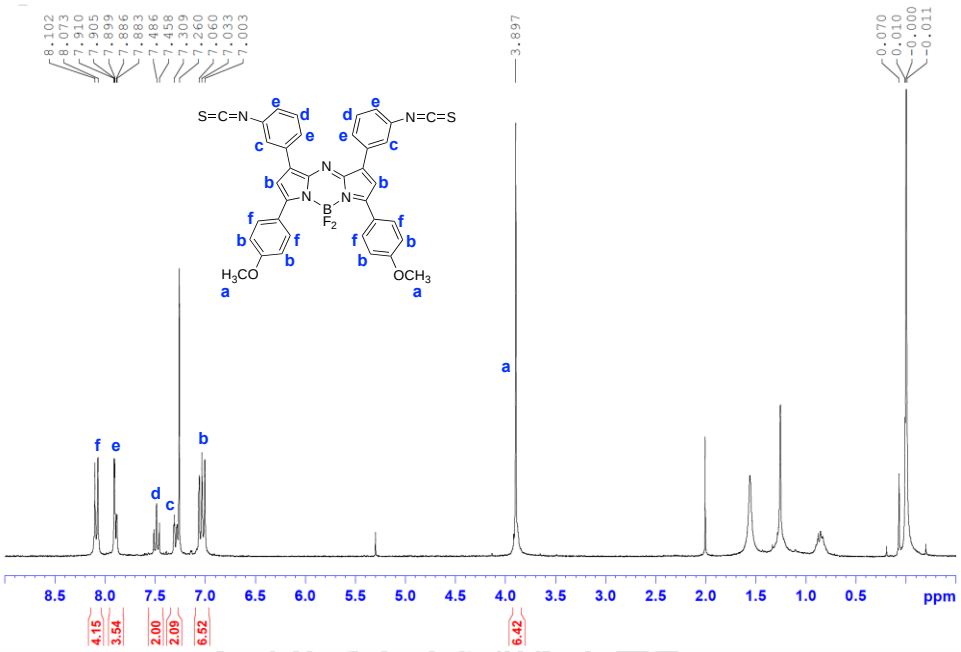
ภาพที่ 61 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของสารประกอบ **Aza-BODIPY-amine** (**II-4**)

1.2.5 โครงสร้างของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 2 (Aza-BODIPY-NCS)

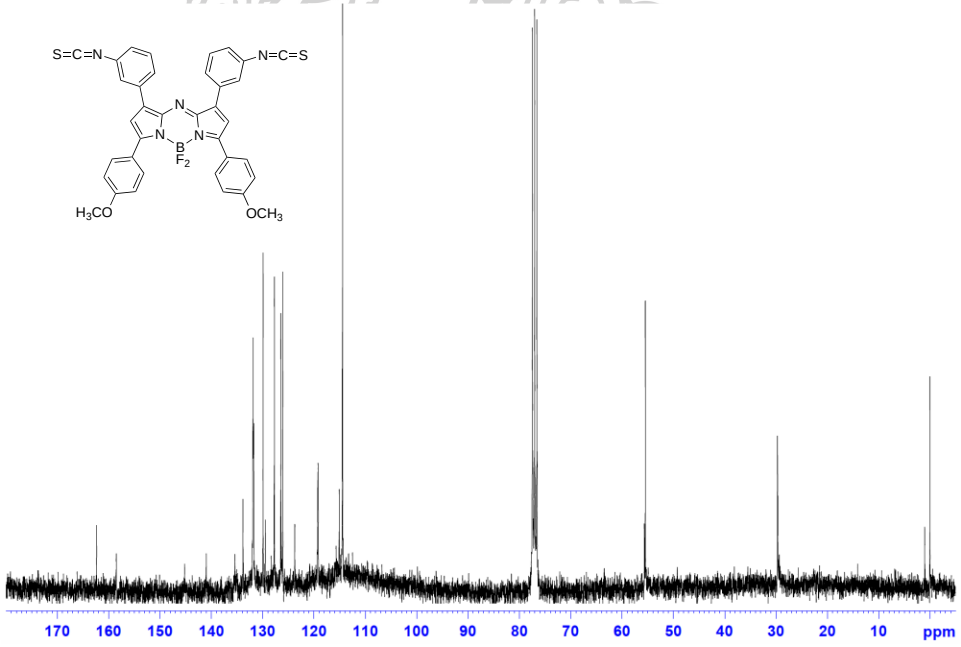


ภาพที่ 62 โครงสร้างทางเคมีของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 2 (**Aza-BODIPY-NCS**)

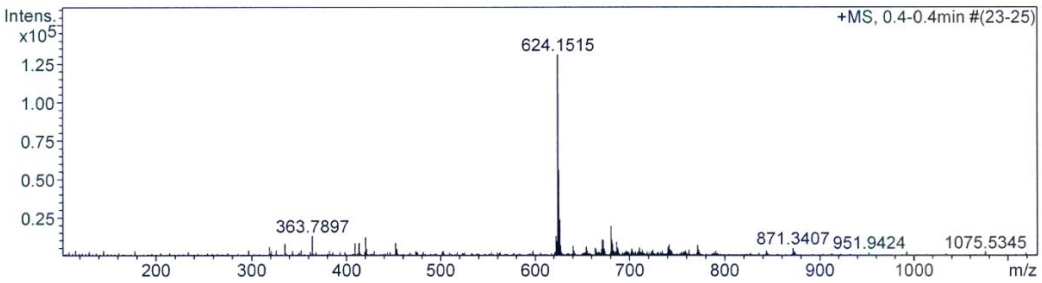
จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 2 (**Aza-BODIPY-NCS**) สามารถยืนยันโครงสร้างทางเคมีได้โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีได้ดังนี้ ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 3.90 (s, 6H), 7.00-7.06 (m, 6H), 7.26-7.30 (m, 2H), 7.49 (t, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.88-7.91 (m, 4H), 8.09 (d, *J* = 9.0 Hz, 4H) ppm (ภาพที่ 63); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 55.6 ($2CH_3$), 114.4 (5CH), 119.2 (CH), 123.7 (2C), 126.1 (2CH), 126.5 (2CH), 127.72 (2CH), 129.5 (2C), 129.9 (4CH), 131.8 (2CH), 133.8 (2C), 135.4 (2C), 140.9 (2C), 144.9 (2C), 158.5 (2C), 162.3 (2C) ppm (ภาพที่ 64); HR-ESI MS ของสูตรโมเลกุล $C_{36}H_{25}BF_2N_5O_2S_2^+$ $(M+H)^+$ จากการคำนวณ 672.1511 m/z จากการทดสอบ 672.1505 m/z (ภาพที่ 65).



ภาพที่ 63 ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 2 (Aza-BODIPY-NCS)

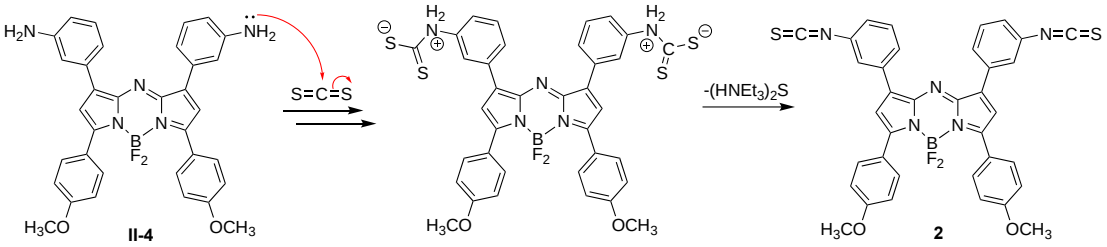


ภาพที่ 64 ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 2 (Aza-BODIPY-NCS)



ภาพที่ 65 HR-ESI MS สเปกตรัมของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 2 (**Aza-BODIPY-NCS**)

เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างทางเคมีของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 2 ที่สังเคราะห์ได้ (ภาพที่ 62) สามารถยืนยันโครงสร้างทางเคมีได้จาก ^{1}H NMR สเปกตรัม (ภาพที่ 63) ซึ่งแสดงให้เห็นสัญญาณของโปรตอน 6 ชนิดที่แตกต่างกัน โดยพีคสัญญาณจาก ^{1}H NMR สเปกตรัมสามารถระบุตำแหน่งของโปรตอนบนโครงสร้างและยืนยันโครงสร้างได้อย่างชัดเจนได้แก่ สัญญาณของอะโรมาติกโปรตอนที่ปรากฏ chemical shift เท่ากับ 7.49 เป็นโปรตอนตำแหน่ง **d** แสดงสัญญาณลักษณะ triplet ที่เกิดจากการ coupling กับโปรตอน **e** 2 ตัว ที่อยู่ข้างเคียง โดยมีค่า *J* coupling เท่ากับ 8.1 Hz ตำแหน่งที่ chemical shift เท่ากับ 8.09 เป็นโปรตอนตำแหน่ง **f** แสดงสัญญาณลักษณะ doublet ที่เกิดจากการ coupling กับโปรตอน **b** 1 ตัว ที่อยู่ข้างเคียง โดยมีค่า *J* coupling เท่ากับ 9.0 Hz รวมทั้งสามารถอาศัยผลของ ^{13}C NMR สเปกตรัม (ภาพที่ 64) มาอธิบายเพิ่มเติม โดยสัญญาณที่สามารถระบุได้ชัดเจนคือ สัญญาณที่ปรากฏตำแหน่ง chemical shift เท่ากับ 129.5 ppm ซึ่งเกิดจากสัญญาณของคาร์บอนบนวงอะโรมาติกตำแหน่งที่ติดกับหมู่แทนที่ isothiocyanate และสัญญาณที่ปรากฏตำแหน่ง chemical shift เท่ากับ 133.8 ppm ซึ่งเกิดจากสัญญาณของคาร์บอนหมู่แทนที่ isothiocyanate อีกทั้งยังสามารถยืนยันโครงสร้างทางเคมีจากการตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี High Resolution Mass Spectrometry (HRMS) (ภาพที่ 65) โดยพิจารณาจากสูตรโมเลกุลของโครงสร้าง $C_{36}H_{25}BF_2N_5O_2S_2^+$ $(M+H)^+$ พบผลการทดสอบได้เท่ากับ 672.1505 m/z, มีค่าใกล้เคียงจากการคำนวณที่มีค่าเท่ากับ 672.1511 m/z โดยจากผลการทดสอบทั้งหมดจึงยืนยันได้ว่าสารผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาเคมีเป็นสารประกอบสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 2 (**Aza-BODIPY-NCS**) ตามที่ต้องการ โดยสามารถเสนอกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังภาพที่ 66

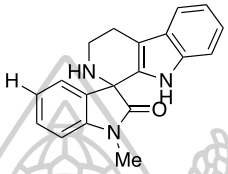


ภาพที่ 66 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 2 (**Aza-BODIPY-NCS**)

1.3 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบต่างๆ สำหรับการสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 3

การสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 3 (**Iheyamine 1-3**) นี้ได้รับความร่วมมือจากนางสาว โสภิตา รัตโนภาส นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ดังนั้นสเปกตรัมจากการวิเคราะห์โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีของสารประกอบที่สังเคราะห์ได้เหล่านี้จึงไม่ได้แสดงในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

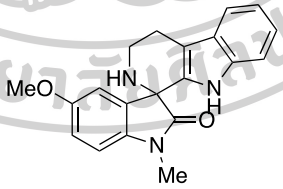
1.3.1 โครงสร้างของสารประกอบ spiro-indole (III-4)



ภาพที่ 67 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ **spiro-indole** (**III-4**)

จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ **spiro-indole** (**III-4**) สามารถยืนยันโครงสร้างทางเคมีได้โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีได้ดังนี้ ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 2.95 (t, *J* =5.7 Hz, 2H), 3.24 (s, 3H), 3.31 (dt, *J* = 13.3, 5.4 Hz, 1H), 3.81 (dt, *J* = 13.3, 6.1 Hz, 1H), 6.91 (d, *J* =7.8 Hz, 1H), 7.03 (td, *J* = 0.9, 7.5 Hz, 1H), 7.08–7.12 (m, 3H), 7.17 (dd, *J* = 7.8, 0.8 Hz, 1H), 7.36 (td, *J* = 7.7, 1.3 Hz, 1H), 7.46 (br s, 1H), 7.51–7.58 (m, 1H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 21.1, 25.6, 39.0, 60.5, 107.7, 110.0, 111.5, 117.5, 118.6, 121.4, 122.3, 123.7, 126.2, 128.9, 129.1, 130.5, 135.2, 142.6, 175.6 ppm

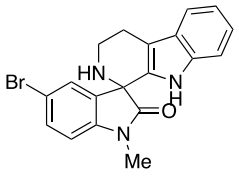
1.3.2 โครงสร้างของสารประกอบ spiro-indole (III-5)



ภาพที่ 68 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ **spiro-indole** (**III-5**)

จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ **spiro-indole** (**III-5**) สามารถยืนยันโครงสร้างทางเคมีได้โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีได้ดังนี้ ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 2.98 (t, *J* =5.7 Hz, 2H), 3.25 (s, 3H), 3.34 (dt, *J* = 13.2, 5.4 Hz, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.88 (dt, *J* = 13.2, 6.3, Hz, 1H), 6.81–6.91 (m, 3H), 7.08–7.19 (m, 3H), 7.29 (br s, 1H), 7.57 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 22.0, 26.6, 40.0, 55.9, 62.0, 109.4, 111.2, 111.6, 111.9, 114.7, 118.4, 119.4, 122.3, 127.0, 129.9, 132.7, 136.4, 136.9, 156.6, 176.7 ppm

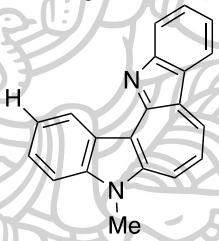
1.3.3 โครงสร้างของสารประกอบ spiro-indole (III-6)



ภาพที่ 69 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ **spiro-indole** (**III-6**)

จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ **spiro-indole** (**III-6**) สามารถยืนยันโครงสร้างทางเคมีได้โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีได้ดังนี้ ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 2.98 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.25 (s, 3H), 3.32 (dt, *J* = 13.2, 5.5 Hz, 1H), 3.83 (dt, *J* = 13.2, 5.9 Hz, 1H), 6.82 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.09–7.20 (m, 3H), 7.30 (s, br, 1H), 7.34 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H),7.50 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 1H), 7.56 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 19.8, 24.4, 37.8, 59.3, 108.0, 108.8, 110.6, 113.7, 116.4, 117.5, 120.5, 124.8, 125.7, 126.9, 130.4, 131.2, 134.0, 140.3, 173.9 ppm

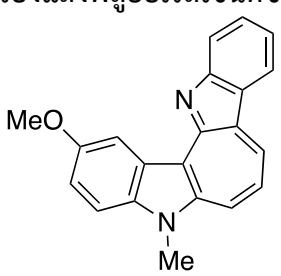
1.3.4 โครงสร้างของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 3a (Iheyamine 1)



ภาพที่ 70 โครงสร้างทางเคมีของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 3a (**Iheyamine 1**)

จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ **3a** (**Iheyamine 1**) สามารถยืนยันโครงสร้างทางเคมีได้โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีได้ดังนี้ ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 4.25 (s, 3H), 7.45 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.57–7.72 (m, 2H), 7.75 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.83 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.13 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.35 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.48 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H), 9.03 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H), 9.46 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 28.8, 109.4, 112.3, 119.5, 121.6 (2C), 122.3, 122.8, 126.0, 126.5, 127.6, 128.7, 132.6, 139.9, 145.5, 147.2, 147.4, 156.2, 160.2 ppm; HR-ESI MS ของสูตรโมเลกุล $C_{20}H_{16}N_3^+$ $(M+H)^+$ จากการคำนวณ 284.1182 m/z จากการทดสอบ 284.1178 m/z

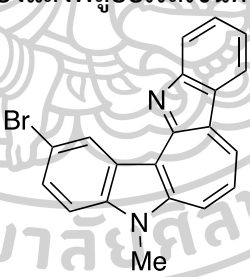
1.3.5 โครงสร้างของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 3b (Iheyamine 2)



ภาพที่ 71 โครงสร้างทางเคมีของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 3b (**Iheyamine 2**)

จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ **3b** (**Iheyamine 2**) สามารถยืนยันโครงสร้างทางเคมีได้โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีได้ดังนี้ ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 4.15 (s, 3H), 4.23 (s, 3H), 7.42 (dd, *J* = 8.9, 2.6 Hz, 1H), 7.43 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.60 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.81 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 8.11 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.32 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 8.43 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 8.97 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H), 9.12 (d, J = 2.5 Hz, 1H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 26.7, 54.1, 105.1, 108.1, 109.5, 116.9, 117.7, 118.2, 119.2, 119.5, 120.5, 123.4, 130.2, 132.9, 142.8, 143.9, 145.3, 153.0, 153.8, 156.4 ppm; HR-ESI MS ของสูตรโมเลกุล $C_{19}H_{14}N_3O^+$ $(M+H)^+$ จากการคำนวณ 314.1288 m/z จากการทดสอบ 314.1286 m/z

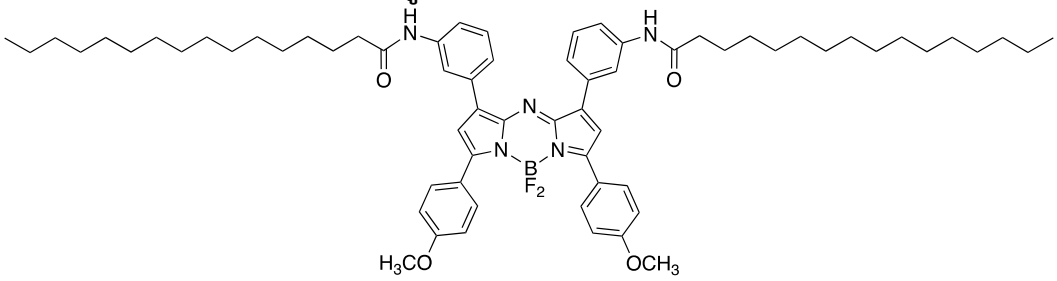
1.3.6 โครงสร้างของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 3c (Iheyamine 3)



ภาพที่ 72 โครงสร้างทางเคมีของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 3c (**Iheyamine 3**)

จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ **3c** (**Iheyamine 3**) สามารถยืนยันโครงสร้างทางเคมีได้โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีได้ดังนี้ ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 4.18 (s, 3H), 7.45 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.49 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.79 (dd, *J* = 8.7, 2.0 Hz, 1H), 7.83 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 8.10 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.30 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.37 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 8.98 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 9.70 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 27.0, 108.8, 113.3, 117.7, 117.8, 118.5, 119.8, 120.0, 120.9, 121.9, 123.9, 125.6, 127.4, 129.3, 130.9, 136.2, 144.4, 145.3 ppm; HR-ESI MS ของสูตรโมเลกุล $C_{19}H_{13}BrN_3^+$ $(M+H)^+$ จากการคำนวณ 362.0287 m/z จากการทดสอบ 362.0283 m/z

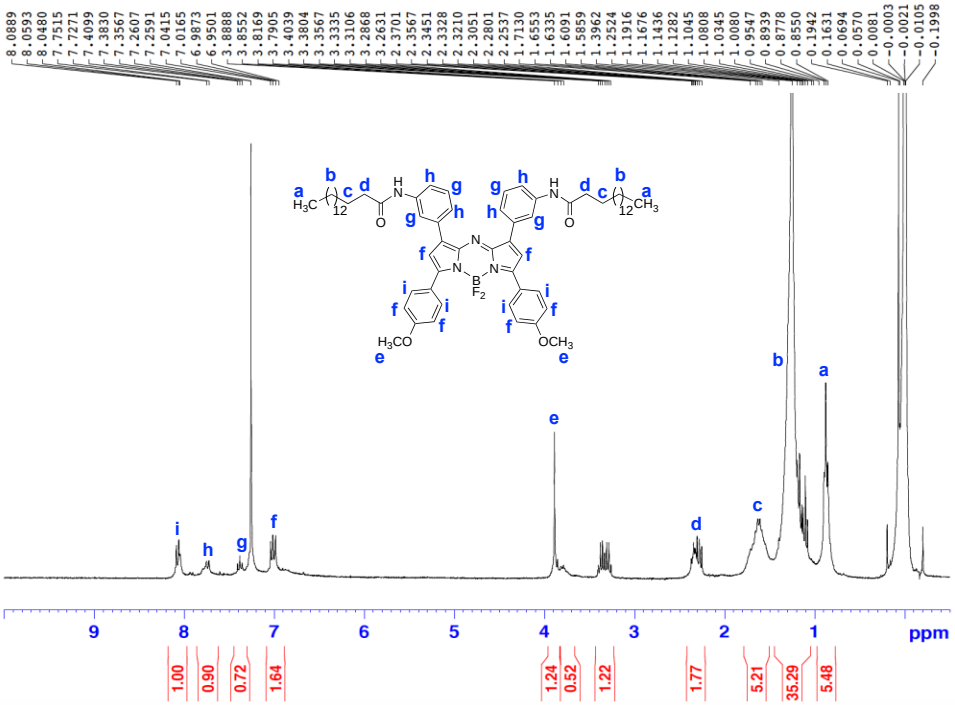
1.4 โครงสร้างของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 4 (Aza-BODIPY-C_{16})



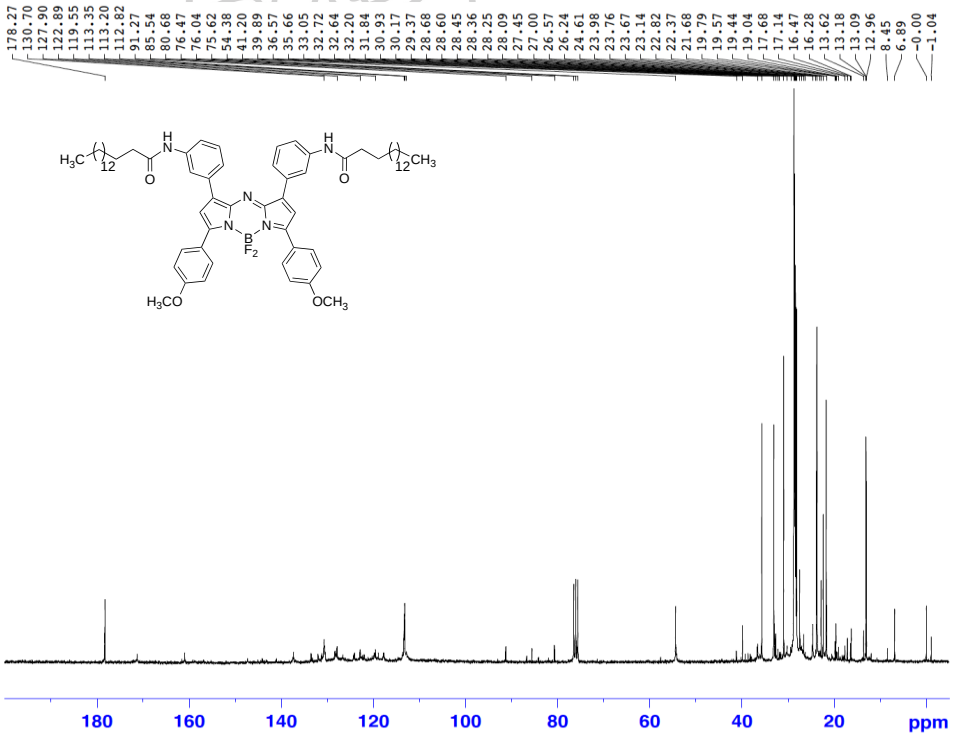
ภาพที่ 73 โครงสร้างทางเคมีของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 4 **(Aza-BODIPY-C_{16})**

จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 4 (**Aza-BODIPY-C_{16}**) สามารถยืนยันโครงสร้างทางเคมีได้โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีได้ดังนี้ ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 0.80-0.98 (m, 6H), 1.00-1.46 (m, 48H), 1.48-1.82 (m, 4H), 2.23-2.45 (m, 4H), 3.90 (s, 6H), 6.97-7.06 (m, 6H), 7.37 (t, *J* =8.0 Hz, 4H), 7.72-7.80 (m, 4H), 8.09 (d, *J* = 9.0 Hz, 4H) ppm (ภาพที่ 74); ^{13}C NMR, 75 MHz, $CDCl_3$): δ 13.2 ($2CH_3$), 21.7 ($2CH_2$), 23.8 ($2CH_2$), 27.4 ($2CH_2$), 28.7 ($16CH_2$), 30.9 ($2CH_2$), 33.1 ($2CH_2$), 35.7 ($2CH_2$), 54.38 ($2CH_3$), 113.4 (4CH), 117.8 (2CH), 119.6 (2CH), 122.9 (2CH), 124.3 (2CH), 127.9 (2CH), 130.7 (2CH), 132.0 (2C) 133.5 (2CH), 137.3 (2C), 140.3 (2C), 144.9 (2C), 147.1 (2C), 162.0 (2C), 171.3 (2C), 178.2 (2C=O) ppm (ภาพที่ 75). HR-ESI MS (ภาพที่ 76) ที่ได้จากการคำนวณ $C_{66}H_{89}BF_2N_5O_4^+$, $(M-H)^+$ 1064.6976 m/z ที่ได้จริง 1064.6978 m/z.

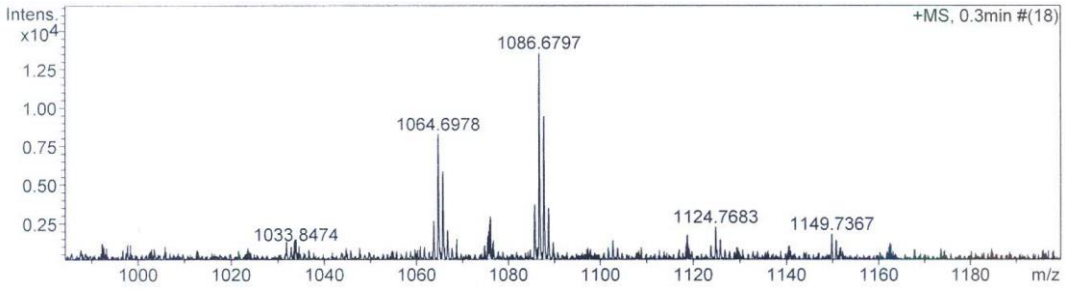
มหาวิทยาลัยศิลปากร



ภาพที่ 74 ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 4 (Aza-BODIPY-C_{16})

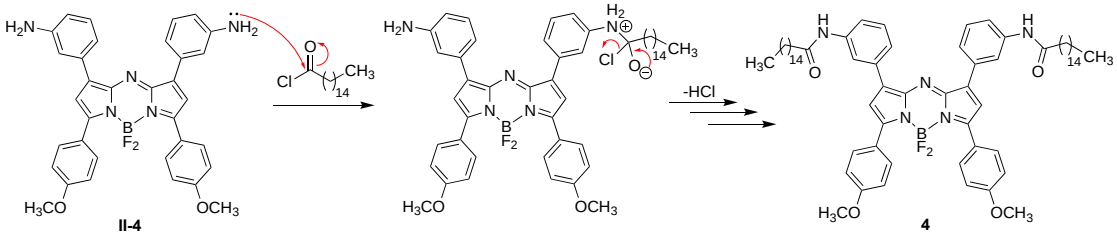


ภาพที่ 75 ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 4 (Aza-BODIPY-C_{16})



ภาพที่ 76 HR-ESI MS สเปกตรัมของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 4 (Aza-BODIPY-C_{16})

เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างทางเคมีของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 4 ที่สังเคราะห์ได้ (ภาพที่ 73) สามารถยืนยันโครงสร้างทางเคมีได้จาก ^{1}H NMR สเปกตรัม (ภาพที่ 74) ซึ่งแสดงให้เห็นสัญญาณของโปรตอน 9 ชนิดที่แตกต่างกัน โดยพีคสัญญาณจาก ^{1}H NMR สเปกตรัมสามารถระบุตำแหน่งของโปรตอนบนโครงสร้างและยืนยันโครงสร้างได้อย่างชัดเจนได้แก่ สัญญาณของอะลิฟาติกโปรตอนที่ปรากฏ chemical shift เท่ากับ 0.80-0.98 1.00-1.46 1.48-1.82 และ 2.23-2.45 ซึ่งเป็นโปรตอนตำแหน่ง **a b c** และ **d** ตามลำดับ แสดงสัญญาณลักษณะ multiplet ที่เกิดจากการ coupling กับโปรตอนที่อยู่ข้างเคียงและเนื่องจากเป็นบริเวณของโครงสร้างที่มีโปรตอนบนคาร์บอนจำนวนมากจึงทำให้สามารถเกิดการ coupling จนแสดงสัญญาณที่ซ้อนทับได้และสัญญาณของอะโรมาติกโปรตอนที่แสดง chemical shift บริเวณสนามแม่เหล็กต่ำเป็นโปรตอนบนวงเบนซีนของสารประกอบ aza-BODIPY รวมทั้งสามารถอาศัยผลของ ^{13}C NMR สเปกตรัม (ภาพที่ 75) มาอธิบายเพิ่มเติม โดยสัญญาณที่สามารถระบุได้ชัดเจนคือ สัญญาณที่ปรากฏตำแหน่ง chemical shift เท่ากับ 13.2 21.7 23.8 27.4 28.7 30.9 33.1 และ 35.7 ppm ซึ่งเกิดจากสัญญาณของอะลิฟาติกคาร์บอนบนสายโซ่ยาวไฮโดรคาร์บอน และสัญญาณที่ปรากฏตำแหน่ง chemical shift เท่ากับ 178.2 ppm ซึ่งเกิดจากสัญญาณของคาร์บอนิลคาร์บอนหมู่เอไมด์ อีกทั้งยังสามารถยืนยันโครงสร้างทางเคมีจากการตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี High Resolution Mass Spectrometry (HRMS) (ภาพที่ 76) โดยพิจารณาจากสูตรโมเลกุลของโครงสร้าง $C_{66}H_{89}BF_2N_5O_4^+$, $(M\text{-}H)^+$ พบผลการทดสอบได้เท่ากับ 1064.6978 m/z มีค่าใกล้เคียงจากการคำนวณที่มีค่าเท่ากับ 1064.6976 m/z โดยจากผลการทดสอบทั้งหมดจึงยืนยันได้ว่าสารผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาเคมีเป็นสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 4 (**Aza-BODIPY-C_{16}**) ตามที่ต้องการ โดยสามารถเสนอกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังภาพที่ 77



ภาพที่ 77 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 4 (**Aza-BODIPY-C_{16}**)

2. ผลการทดสอบประสิทธิภาพการทำงานสำหรับตรวจวัดไอออนปรอทของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 1 (T_{10}RhO)

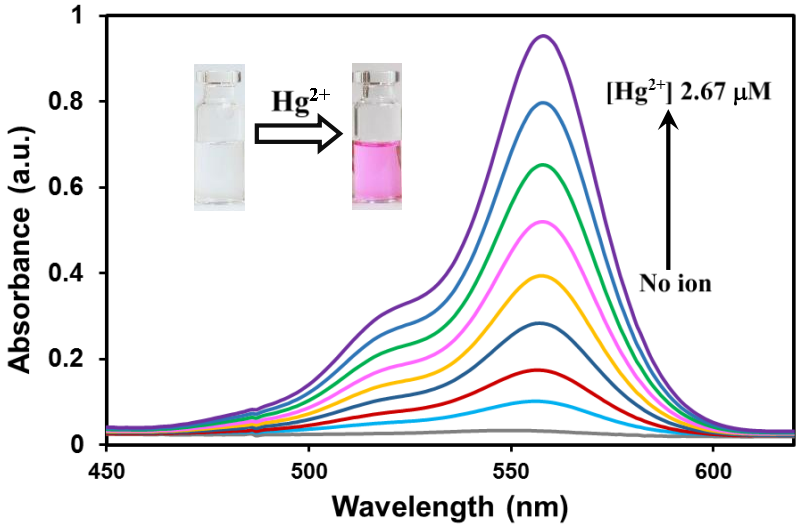
เมื่อสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ **1** (**T_{10}RhO**) ที่สังเคราะห์ได้ผ่านปฏิกิริยาเคมีได้รับการยืนยันโครงสร้างที่เคมีด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีต่างๆแล้วนั้น สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดใหม่ที่ได้จะถูกนำมาศึกษาคุณสมบัติทางแสงทั้งการดูดกลืนแสงและการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ เริ่มต้นโดยการตรวจสอบความสามารถในการดูดกลืนแสง (absorption) และการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (emission) ในตัวทำละลายอินทรีย์ จากนั้นทำการหาตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์การดักจับไอออนปรอท (Hg^{2+}) ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ ขั้นตอนต่อมา คือ การศึกษาประสิทธิภาพในการทำงานเกี่ยวกับการตรวจวัดไอออนปรอทด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี เพื่อทดสอบหาความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) ความจำเพาะเจาะจงกับไอออนปรอท (selectivity) ความสามารถในการตรวจวัดไอออนปรอทในภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ (competitive) ประสิทธิภาพการทำงานในสภาวะที่ pH ต่างๆ (pH effect) รวมทั้งการศึกษาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน (Job's plot) ค่าความสามารถต่ำสุดในการตรวจวัดไอออนปรอท (detection limit) ค่าคงที่สมดุลของการเกิดสารประกอบไอออนเชิงซ้อน (Association constant; K_{assoc}) รวมถึงการประยุกต์ใช้สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์สำหรับการตรวจวัดไอออนปรอทในตัวอย่างจริงทางสิ่งแวดล้อม โดยค่าพารามิเตอร์ต่างๆ สำหรับการตรวจวัดไอออนปรอทด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปีแสดงดังตารางที่ 1

2.1 ผลการทดสอบความไว (sensitivity)

การทดสอบความไวของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **T_{10}RhO** สำหรับการตรวจวัดไอออนปรอทด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีนั้น จะทำการศึกษาสัญญาณการดูดกลืนแสง (absorption) โดยวิธียูวีวิ-สิเบลสเปกโทสโกปีและการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ โดยวิธีฟลูออเรสเซนต์สเปกโทสโกปีของสารละลาย **T_{10}RhO** ที่เปลี่ยนไป เมื่อมีการเติมไอออนปรอทเพิ่มขึ้น โดยศึกษาในสารละลายผสมระหว่าง H_2O:EtOH (10:90 v/v) โดยติดตามสเปกตรัมของการดูดกลืนแสง (absorption spectra) และการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence emission spectra) ก่อนและหลังการเติมไอออนปรอท เมื่อทำการกระตุ้นที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 520 nm และใช้ไอออนปรอทในรูปของเกลือเปอร์คลอเรต

2.1.1 ผลการทดสอบความไวจากความสามารถการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตโดยวิธียูวีวิ-สิเบลสเปกโทสโกปีของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ T_{10}RhO ในสภาวะที่มีไอออนปรอทในสารละลาย

ความสามารถการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **T_{10}RhO** ถูกศึกษาโดยเตรียมสารละลาย **T_{10}RhO** เข้มข้น 13.0 μM ในสารละลายผสมระหว่าง H_2O:EtOH (10:90 v/v) ใช้ไอออนปรอทในรูปของเกลือปรอทเปอร์คลอเรต เพื่อติดตามสัญญาณการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตของ **T_{10}RhO** ผลการทดลองแสดงผลดังภาพที่ 78

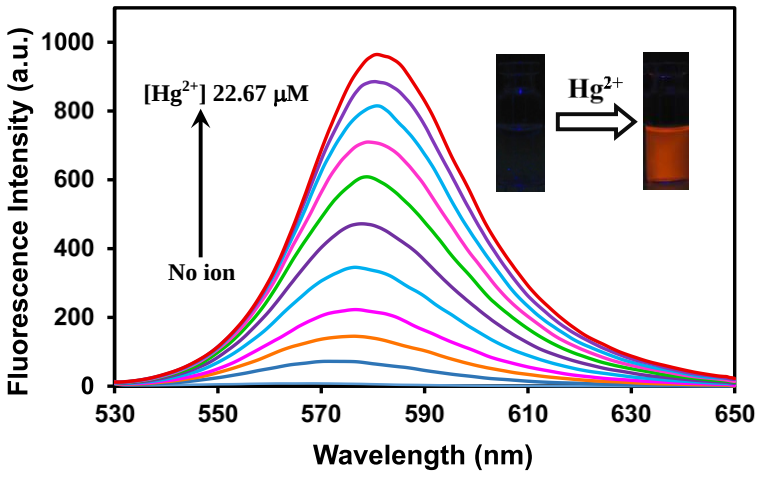


ภาพที่ 78 การดูดกลืนแสง UV-Vis ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **T_{10}RhO** (13.0 μM) ในสารละลายผสมระหว่าง H_2O:EtOH (10:90 v/v) ก่อนและหลังเติมไอออนปรอทเปอร์คลอเรตที่ความเข้มข้นต่างๆ a: 0 μM, b: 3.33 μM, c: 6.67 μM, d: 1.00 μM, e: 1.33 μM, f: 1.67 μM, g: 2.00 μM, h: 2.33 μM, i: 2.67 μM

จากผลการทดลองพบว่าในสภาวะที่ไม่มีไอออนปรอท สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **T_{10}RhO** ไม่แสดงการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต แต่เมื่อเติมไอออนปรอทเปอร์คลอเรตลงในสารละลาย ส่งผลให้ความสามารถการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **T_{10}RhO** มีค่าเพิ่มขึ้นที่ความยาวคลื่น 560 ในลักษณะแปรผันตรงกับปริมาณไอออนปรอทที่เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นลักษณะการทำงานแบบระบบปิด-เปิด สัญญาณ (OFF-ON switch system) และในขณะเดียวกันพบว่าเมื่อทำการเติมความเข้มข้นของไอออนปรอทเพิ่มมากขึ้นจะทำให้สีของสารละลาย **T_{10}RhO** เปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพูซึ่งสามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่าอีกด้วย จากผลการทดลองนี้จึงทำให้เห็นว่าสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **T_{10}RhO** สามารถตรวจวัดไอออนปรอทได้ด้วยเทคนิคยูวีวิ-สิเบลสเปกโทสโกปี

2.1.2 ผลการทดสอบความไวจากความสามารถการคายแสงฟลูออเรสเซนต์โดยวิธีฟลูออเรสเซนต์สเปกโทสโกปีของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ T_{10}RhO ในสภาวะที่มีไอออนปรอทในสารละลาย

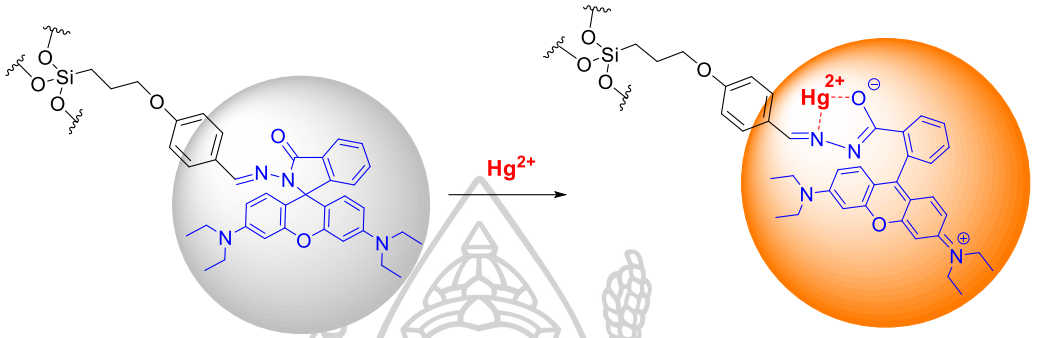
ความสามารถการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ T_{10}RhO ถูกศึกษาโดยเตรียมสารละลาย T_{10}RhO เข้มข้น 1.33 μM ในสารละลายผสมระหว่าง H_2O:EtOH (10:90 v/v) ใช้ไอออนปรอทในรูปของเกลือปรอทเปอร์คลอเรต และกำหนดค่าความยาวคลื่นกระตุ้น (excitation wavelength: λ_{ex}) เท่ากับ 520 nm เพื่อติดตามสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของ T_{10}RhO ผลการทดลองแสดงผลดังภาพที่ 79



ภาพที่ 79 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (λ_{ex} = 520 nm และ λ_{em} = 580 nm) ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ T_{10}RhO (1.33 μM) ในสารละลาย H_2O:EtOH (10:90 v/v) ก่อนและหลังเติมไอออนปรอทเปอร์คลอเรตที่ความเข้มข้นต่างๆ a: 0 μM, b: 8 μM, c: 12.00 μM, d: 13.33 μM, e: 14.67 μM, f: 16.00 μM, g: 17.33 μM, h: 18.67 μM, i: 20.00 μM, j: 21.33 μM, k: 22.67 μM.

จากผลการทดลอง (ภาพที่ 79) พบว่าในสภาวะที่ไม่มีการเติมไอออนปรอท สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ T_{10}RhO ไม่แสดงการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ในช่วงความยาวคลื่น 530-650 nm แต่เมื่อเติมไอออนปรอทเปอร์คลอเรตลงในสารละลาย ส่งผลให้ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ T_{10}RhO มีค่าเพิ่มขึ้น โดยมีความยาวคลื่นของการคายแสงฟลูออเรสเซนต์สูงสุด (λ_{em}) เท่ากับ 580 nm ในลักษณะแปรผันตรงกับปริมาณไอออนปรอทที่เพิ่มขึ้น สามารถวัดค่า quantum yield (Φ_f) ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ภายหลังดักจับไอออนปรอทได้เท่ากับ 0.17 (ใช้ rhodamine B เป็นสารอ้างอิง) ซึ่งมีลักษณะการทำงานแบบระบบปิด-เปิด สัญญาณ (OFF-ON switch system) โดยการเพิ่มขึ้นของสัญญาณฟลูออเรสเซ็นต์เมื่อมีการดักจับไอออนปรอทเกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของส่วน rhodamine B ซึ่งทำหน้าที่ในการแสดงสัญญาณ

อัลตราไวโอเลตและฟลูออเรสเซนต์ของ T_{10}RhO จากในลักษณะที่มี conjugate ที่สั้นในรูปการปิดวง spirolactam เป็นโครงสร้างที่มีการเปิดวง spirolactam ซึ่งมีระบบเป็น fully conjugate ลักษณะที่มี conjugate ที่ยาวขึ้น จึงสามารถแสดงสัญญาณอัลตราไวโอเลตและฟลูออเรสเซนต์ โดยกลไกการดักจับไอออนปรอทของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ T_{10}RhO แสดงดังภาพที่ 80



ภาพที่ 80 แสดงกลไกการดักจับไอออนปรอทของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ T_{10}RhO ก่อนการดักจับ (ซ้าย) และหลังการดักจับไอออนปรอท (ขวา)

2.1.3 ผลการคำนวณหาค่าความสามารถต่ำสุดในการตรวจวัดไอออนปรอทของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ T_{10}RhO (detection limit)

การคำนวณค่าความสามารถต่ำสุดของการตรวจวัด (detection limit) ทำได้โดยสร้างกราความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่ 580 nm (แกน Y) กับความเข้มข้นต่างๆ ของไอออนปรอทที่เติมลงไป (แกน X) จากนั้นนำค่าความชันของกราฟ (slope) ที่ได้มาคำนวณตามสมการ (1)

$$3SD = slope \bullet [Hg^{2+}] \quad (1)$$

เมื่อกำหนดให้

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์เมื่อไม่มีการเติมไอออนปรอท

slope คือ ค่าความชันของกราฟ

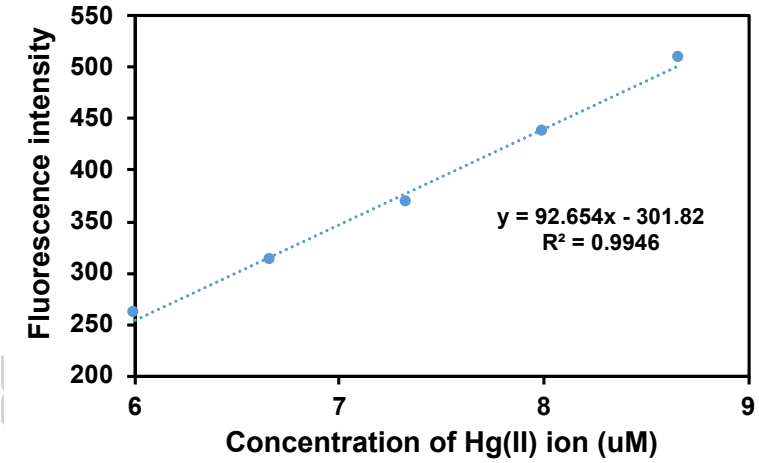
$[Hg^{2+}]$ คือ ความเข้มข้นของไอออนปรอทต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้

ข้อมูลค่าความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติม (μM) และความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ (λ_{ex} = 520 nm และ λ_{em} = 580 nm) สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ T_{10}RhO สำหรับการคำนวณแสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5

ค่าความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติม (μM) และ ความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ T_{10}RhO

$[Hg^{2+}]$, (μM)	6	6.67	7.33	8	8.67
Intensity, (a.u)	261.64	312.76	368.36	437.11	508.31



ภาพที่ 81 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติมกับความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ T_{10}RhO

การคำนวณ

จากกราฟได้สมการเส้นตรงคือ y = 92.654x – 301.82; R^2 = 0.9946

แทนค่าในสมการ (1) เมื่อ SD = 0.097 และ slope = 92.654

$$3SD = slope \bullet [Hg^{2+}] \quad (1)$$

$$0.29 = 92.654 \bullet [Hg^{2+}]$$

$$[Hg^{2+}] = 0.29/92.654$$

ดังนั้น $[Hg^{2+}]$ = 0.0031 μM หรือ 0.63 ppb

ดังนั้นจากการทดลองพบว่าค่า detection limit ในการตรวจจับไอออนปรอทของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ $T_{10}RhO$ เท่ากับ 0.0031 μM หรือ 0.63 ppb ซึ่งมีค่าต่ำกว่าค่ามาตรฐานของปริมาณไอออนปรอทในน้ำดื่มซึ่งกำหนดโดย US Environmental Protection Agency (U.S. EPA) มีค่าเท่ากับ 2.0 ppb [33, 34]

2.1.4 ผลการคำนวณหาค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออน (K_{assoc}) จากสมการ Benesi-Hildebrand

นำผลการทดลองที่ได้จากการไตเตรตเพื่อหาความไวมาการสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{1}{(I-I_0)}$ ในแนวแกน y และ $\frac{1}{[Hg^{2+}]^n}$ ในแนวแกน x เพื่อหาค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออนปรอทได้ตามสมการ Benesi-Hildebrand (2) ซึ่งมีลักษณะความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง

สมการ Benesi-Hildebrand;

$$\frac{1}{(I-I_0)} = \frac{1}{K\bullet(I_{max}-I_0)\bullet[Hg^{2+}]^n} + \frac{1}{(I_{max}-I_0)} \quad (2)$$

เมื่อกำหนดให้

I_0 คือ ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์เริ่มต้น

I คือ ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์หลังเติมไอออนที่ความเข้มข้นใดๆ

I_{max} คือ ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์มากที่สุด

n คือ จำนวนเต็มใดๆ เช่น 1, 2 และ 3

โดยพบว่าค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออนคำนวณได้จากความชันของกราฟที่สร้างขึ้น ดังนี้

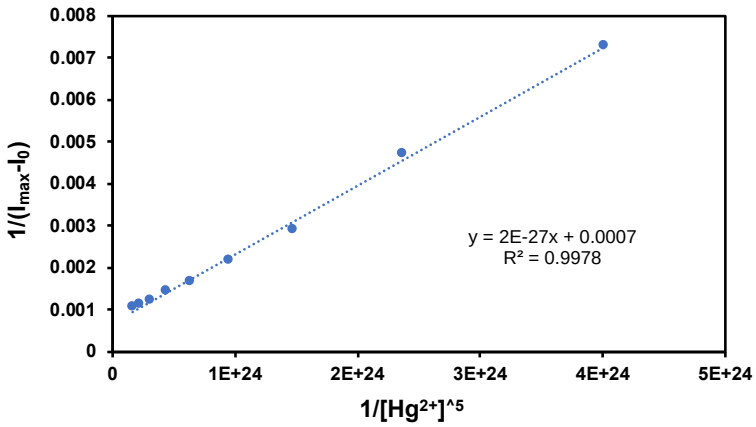
$$\text{slope} = \frac{1}{K\bullet(I_{max}-I_0)} \quad (3)$$

$$K = \frac{1}{\text{slope}\bullet(I_{max}-I_0)} \quad (4)$$

ตารางที่ 6

ค่าความเข้มข้นของไอออนปรอทที่เติม (μM) และค่าความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ $T_{10}RhO$

$[Hg^{2+}]$, (μM)	Intensity, (a.u)	$1/[Hg^{2+}]^{\wedge 5}$	$1/(I_{max}-I_0)$
12.00	143.92	4.01×10^{24}	0.0072
13.33	219.75	2.37×10^{24}	0.0046
14.67	351.77	1.47×10^{24}	0.0028
16.00	467.39	9.53×10^{23}	0.0021
17.33	610.75	6.39×10^{23}	0.0016
18.67	704.24	4.41×10^{23}	0.0014
20.00	831	3.12×10^{23}	0.0012
21.33	896.72	2.26×10^{23}	0.0011
22.67	973.02	1.67×10^{23}	0.0010



ภาพที่ 82 กราฟจากการคำนวณตามสมการ Benesi-Hildebrand ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ $T_{10}RhO$ เมื่อ n= 5

การคำนวณ

จากกราฟได้สมการเส้นตรงคือ $y = 2.0 \times 10^{-27}x + 0.0007$; $R^2 = 0.9978$

แทนค่าในสมการ (4) เมื่อ slope = 2.0×10^{-27} $I_{max} = 973.02$ $I_0 = 143.92$

$$K = \frac{1}{slope \bullet (I_{max} - I_0)} \quad (4)$$

$$K = 1/(2.0 \times 10^{-27} (973.02\text{-}143.92))$$

ดังนั้น $K = 6.03 \times 10^{23}\ M^{-5}$

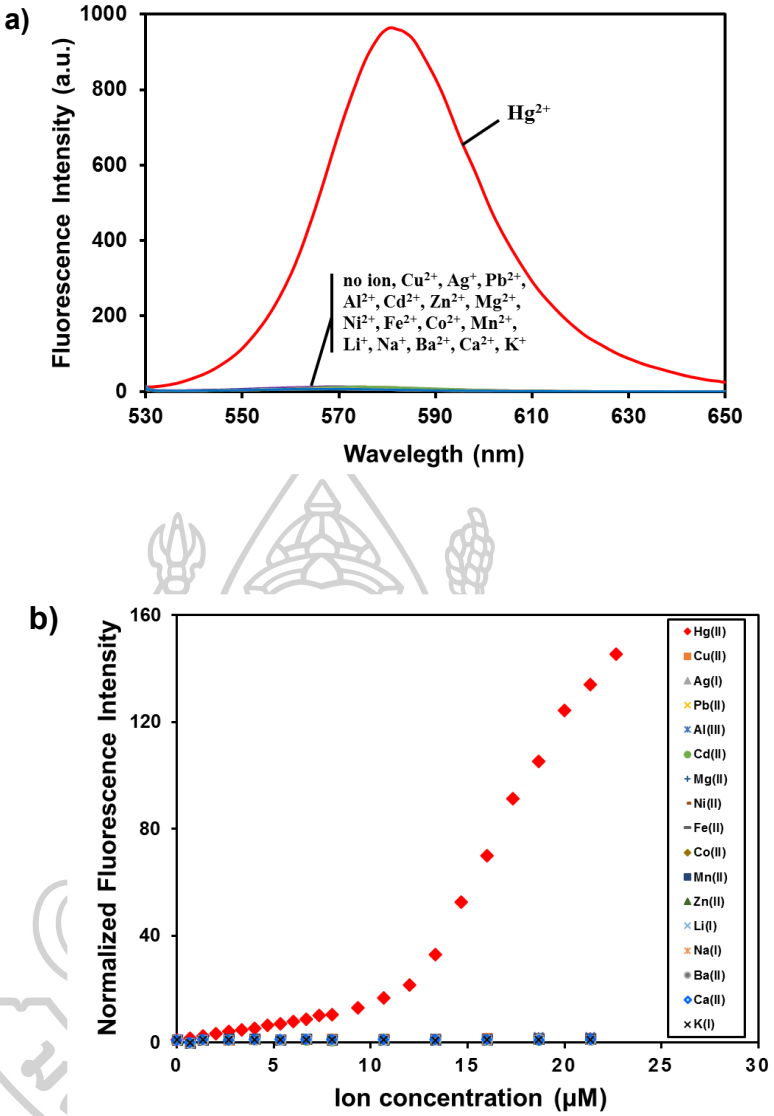
ดังนั้น ค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออน (K_{assoc}) คงที่สมดุลของการเกิดสารประกอบไอออนเชิงซ้อน ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **T10RhO** ในการดักจับไอออนปรอท ได้เท่ากับ $6.03 \times 10^{23}\ M^{-5}$

2.2 ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจง (selectivity)

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **T_{10}RhO** นั้น ได้ศึกษาด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปี โดยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์จากการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนปรอทลงในสารละลายของ **T_{10}RhO** เปรียบเทียบกับสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้นจากการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนอื่นๆ แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ระหว่างการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนปรอทและการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนรบกวนอื่นๆ นอกจากนี้การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **T_{10}RhO** ยังสามารถศึกษาได้ด้วยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายภายใต้แสงธรรมชาติได้ด้วยตาเปล่าอีกด้วย

2.2.1 ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจง (selectivity) ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปี

การทดสอบความจำเพาะเจาะจง ศึกษาจากความสามารถการคายแสงของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **T_{10}RhO** ในสารละลายผสม H_2O:EtOH (10:90 v/v) ในสภาวะที่มีไอออนเกลือเปอร์คลอเรตต่างๆ ได้แก่ ไอออนปรอท (Hg^{2+}) ไอออนซิลเวอร์ (Ag^{+}) ไอออนอะลูมิเนียม (Al^{3+}) ไอออนแบเรียม (Ba^{2+}) ไอออนแคลเซียม (Ca^{2+}) ไอออนแคดเมียม (Cd^{2+}) ไอออนทองแดง (Cu^{2+}) ไอออนเหล็ก (Fe^{2+}) ไอออนโคบอลต์ (Co^{2+}) ไอออนสังกะสี (Zn^{2+}) ไอออนโพแทสเซียม (K^{+}) ไอออนแมกนีเซียม (Mg^{2+}) ไอออนแมงกานีส (Mn^{2+}) ไอออนโซเดียม (Na^{+}) ไอออนลิเทียม (Li^{+}) ไอออนนิกเกิล (Ni^{2+}) และไอออนตะกั่ว (Pb^{2+}) ผลการทดลองแสดงดังในภาพที่ 83



ภาพที่ 83 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (λ_{ex} = 520 nm) ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ T_{10}RhO (20.0 μM) ในสารละลายผสม H_2O:EtOH (10:90 v/v) ในสภาวะที่มีไอออนต่างๆ ได้แก่ Hg^{2+} Cu^{2+} Ag^{+} Pb^{2+} Al^{3+} Cd^{2+} Mg^{2+} Ni^{2+} Fe^{2+} Co^{2+} Mn^{2+} Zn^{2+} Li^{+} Na^{+} Ba^{2+} Ca^{2+} และ K^{+} ในสภาวะที่มีไอออนปรอทของเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 21.3 μM (ภาพ a) และที่ความเข้มข้นต่างกัน (ภาพ b)

ผลการทดลองพบว่าจากภาพที่ 83a เมื่อมีการเติมไอออนเกลือเปอร์คลอเรตที่ความเข้มข้นเดียวกัน สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ T_{10}RhO จะแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนต์สูงสุดเฉพาะที่มีการเติมไอออนปรอทเท่านั้น ในขณะที่ไอออนชนิดอื่นๆ ไม่ส่งผลให้สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ T_{10}RhO มีการแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ สอดคล้องกับผลการทดลองจากรูปที่ 83b ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า normalized fluorescence intensity (แกน y) และความเข้มข้นของไอออนชนิดต่างๆ (แกน x) พบว่าเมื่อมีการเติมไอออนปรอทที่ความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น ค่า normalized fluorescence

intensity ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **T_{10}RhO** มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน ในขณะที่ภายหลังการเติมไอออนทองแดง (Cu^{2+}) ไอออนโซเดียม (Na^{+}) ไอออนโพแทสเซียม (K^{+}) ไอออนตะกั่ว (Pb^{2+}) ไอออนเฟอริก (Fe^{3+}) ไอออนเฟอรัส (Fe^{2+}) ไอออนแมงกานีส (Mn^{2+}) ไอออนนิกเกิล (Ni^{2+}) ไอออนโคบอลล์ (Co^{2+}) ไอออนเงิน (Ag^{+}) ไอออนแมกนีเซียม (Mg^{2+}) ไอออนแคลเซียม (Ca^{2+}) ไอออนอะลูมิเนียม (Al^{3+}) ไอออนแบเรียม (Ba^{2+}) ไอออนสังกะสี (Zn^{2+}) และไอออนแคดเมียม (Cd^{2+}) ในความเข้มข้นเดียวกันกับไอออนปรอท สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **T_{10}RhO** ไม่แสดงการเปลี่ยนแปลงการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ หรือมีการเปลี่ยนแปลงน้อยกว่า $\pm$5% ของความเข้มของสัญญาณเริ่มต้น (เมื่อไม่มีไอออนใดๆเจือปนในสารละลาย **T_{10}RhO**) จากผลการทดลองทั้งหมดนี้จึงสรุปได้ว่า สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **T_{10}RhO** มีความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจวัดไอออนปรอทสูงมากในภาวะที่มีไอออนอื่นปนอยู่

2.2.2 ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจง (selectivity) เปรียบเทียบกับไอออนรบกวนอื่นๆ ด้วยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายภายใต้แสงธรรมชาติด้วยตาเปล่า

การทดสอบความจำเพาะเจาะจง ศึกษาจากการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **T_{10}RhO** ในสารละลายผสม H_2O:EtOH (10:90 v/v) ในสภาวะที่มีไอออนเกลือเปอร์คลอเรตอื่นๆ ละลายอยู่ในน้ำ ได้แก่ ไอออนปรอท (Hg^{2+}) ไอออนซิลเวอร์ (Ag^{+}) ไอออนอะลูมิเนียม (Al^{3+}) ไอออนแบเรียม (Ba^{2+}) ไอออนแคลเซียม (Ca^{2+}) ไอออนแคดเมียม (Cd^{2+}) ไอออนทองแดง (Cu^{2+}) ไอออนเหล็ก (Fe^{2+}) ไอออนโคบอลต์ (Co^{2+}) ไอออนสังกะสี (Zn^{2+}) ไอออนโพแทสเซียม (K^{+}) ไอออนแมกนีเซียม (Mg^{2+}) ไอออนแมงกานีส (Mn^{2+}) ไอออนโซเดียม (Na^{+}) ไอออนลิเทียม (Li^{+}) ไอออนนิกเกิล (Ni^{2+}) และไอออนตะกั่ว (Pb^{2+}) โดยสามารถสังเกตผลการทดลองได้ภายใต้แสงธรรมชาติด้วยตาเปล่า ผลการทดลองแสดงดังในภาพที่ 76



ภาพที่ 84 ภาพถ่ายการเปลี่ยนสีของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **T_{10}RhO** ในภาวะที่ไม่มีและมีไอออนต่างๆ ได้แก่ Hg^{2+} Cu^{2+} Ag^{+} Pb^{2+} Al^{3+} Cd^{2+} Mg^{2+} Ni^{2+} Fe^{2+} Co^{2+} Mn^{2+} Zn^{2+} Li^{+} Na^{+} Ba^{2+} Ca^{2+} และ K^{+} ที่ความเข้มข้น 1.00 μM

จากผลการทดลองพบว่าถ่ายภาพที่ 84 แสดงให้เห็นว่าสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **T_{10}RhO** มีจำเพาะเจาะจงกับไอออนปรอทสูงเมื่อเทียบกับไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ โดยพบมีการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **T_{10}RhO** จากสารละลายไม่มีสีเป็นสารละลายสีชมพูเข้ม

เมื่อมีการเติมไอออนปรอทลงในสารละลายเท่านั้น ในขณะที่เมื่อมีการเติมไอออนชนิดอื่นได้แก่ Cu^{2+} Ag^{+} Pb^{2+} Al^{3+} Cd^{2+} Mg^{2+} Ni^{2+} Fe^{2+} Co^{2+} Mn^{2+} Zn^{2+} Li^{+} Na^{+} Ba^{2+} Ca^{2+} และ K^{+} ลงในสารละลาย พบว่าสีของสารละลายที่มีการเติมไอออนชนิดอื่นๆยังคงไม่มีสีเช่นเดิม โดยสามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงนี้ได้ด้วยตาเปล่า จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **T_{10}RhO** มีความจำเพาะเจาะจงสูงในการตรวจวัดไอออนปรอทเมื่อเปรียนเทียบกับไอออนอื่นๆ

2.3 ผลการทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนปรอทในภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ (competitive)

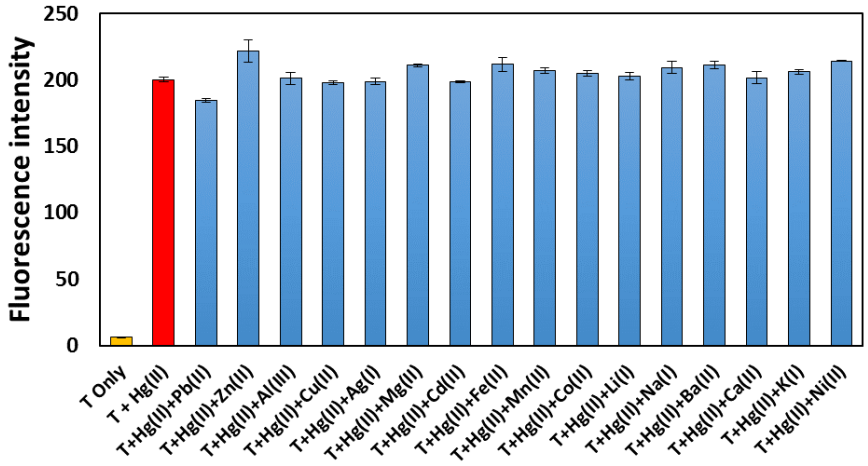
การทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนปรอทในภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ศึกษาจากความสามารถการคายแสงของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **T_{10}RhO** ในสารละลายผสม H_2O:EtOH (10:90 v/v) ในสภาวะที่มีไอออนเกลือเปอร์คลอเรตอื่นๆ ได้แก่ ไอออนซิลเวอร์ (Ag^{+}) ไอออนอะลูมิเนียม (Al^{3+}) ไอออนแบเรียม (Ba^{2+}) ไอออนแคลเซียม (Ca^{2+}) ไอออนแคดเมียม (Cd^{2+}) ไอออนทองแดง (Cu^{2+}) ไอออนเหล็ก (Fe^{2+}) ไอออนโคบอลต์ (Co^{2+}) ไอออนสังกะสี (Zn^{2+}) ไอออนโพแทสเซียม (K^{+}) ไอออนแมกนีเซียม (Mg^{2+}) ไอออนแมงกานีส (Mn^{2+}) ไอออนโซเดียม (Na^{+}) ไอออนลิเทียม (Li^{+}) ไอออนนิกเกิล (Ni^{2+}) และไอออนตะกั่ว (Pb^{2+}) ในสารละลายที่มีปริมาณความเข้มข้นของไอออนรบกวนชนิดอื่นๆมากกว่าความเข้มข้นของไอออนปรอท 10 เท่า โดยแสดงผลการทดลองในรูปกราฟความสัมพันธ์ความเข้มข้นแสงฟลูออเรสเซนต์ ระหว่างค่า I_F/I_0 (แกน y) และชนิดของไอออนเกลือเปอร์คลอเรตชนิดต่างๆ (แกน x)

เมื่อกำหนดให้

I_0 = Fluorescence Intensity ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **T_{10}RhO** ก่อนเติมไอออน

I_F = Fluorescence Intensity ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **T_{10}RhO** หลังเติมไอออน

ผลการทดลองแสดงดังในภาพที่ 85



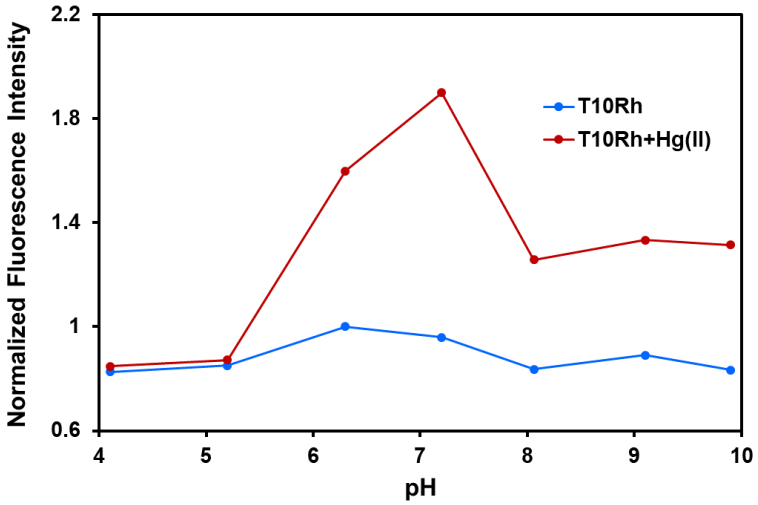
ภาพที่ 85 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (λ_{ex} = 520 nm และ λ_{em} = 580 nm) ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **T_{10}RhO** (1.00 μM) ในสารละลาย H_2O:EtOH (10:90 v/v) ในสภาวะที่มีไอออนรบกวนเข้มข้น 1.00 μM เจือปนในสารละลายที่มีไอออนปรอทเข้มข้น 0.10 μM

ผลการทดลองพบว่าจากภาพที่ 85 สังเกตได้ว่า เมื่อทำการเติมไอออนปรอทรวมกับไอออนรบกวนอื่นๆ ได้แก่ ไอออนทองแดง (Cu^{2+}) ไอออนโซเดียม (Na^{+}) ไอออนโพแทสเซียม (K^{+}) ไอออนตะกั่ว (Pb^{2+}) ไอออนเฟอริก (Fe^{3+}) ไอออนเฟอรัส (Fe^{2+}) ไอออนแมงกานีส (Mn^{2+}) ไอออนนิกเกิล (Ni^{2+}) ไอออนโคบอลล์ (Co^{2+}) ไอออนเงิน (Ag^{+}) ไอออนแมกนีเซียม (Mg^{2+}) ไอออนแคลเซียม (Ca^{2+}) ไอออนอะลูมิเนียม (Al^{3+}) ไอออนแบเรียม (Ba^{2+}) ไอออนสังกะสี (Zn^{2+}) และไอออนแคดเมียม (Cd^{2+}) ที่ความเข้มข้น 10 เท่าของความเข้มข้นไอออนปรอท พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงน้อยกว่า ±10% ของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **T_{10}RhO** เมื่อเปรียบเทียบกับหลังการเติมไอออนปรอทเพียงชนิดเดียว นั่นแสดงให้เห็นว่าหากในระบบที่ตรวจวัดมีไอออนชนิดอื่นๆเจือปนประมาณ 10 เท่าของปริมาณไอออนปรอท สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **T_{10}RhO** ยังคงแสดงสัญญาณ OFF-ON fluorescence ได้อย่างถูกต้องและสามารถดักจับไอออนปรอทอย่างจำเพาะเจาะจงสูง

2.4 ผลการทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนปรอทในภาวะที่ pH ต่างๆ (pH effect)

การทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนปรอทในภาวะที่ pH ต่างๆ ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **T_{10}RhO** ศึกษาในสารละลายผสม H_2O:EtOH (10:90 v/v) ที่ pH ในช่วง 4-10 โดยติดตามสเปกตรัมของการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence emission spectra) ก่อนและหลัง

การเติมไอออนปรอท ในช่วงความยาวคลื่น 580 nm เมื่อทำการกระตุ้นที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 520 nm ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 86



ภาพที่ 86 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (λ_{ex} = 520 nm และ λ_{em} = 580 nm) ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ T_{10}RhO (1.00 μM) ในสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES : EtOH (10:90 v/v) ที่ pH ต่างๆ ก่อนและหลังเติมไอออนปรอทคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 16.7 mM

จากผลการทดลองภาพที่ 86 พบว่าที่ pH ต่างๆ ของสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES : EtOH (10:90 v/v) ความสามารถการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ T_{10}RhO มีความแตกต่างกันเล็กน้อย และจากการศึกษาประสิทธิภาพในการตรวจวัดไอออนปรอทที่ pH ต่างๆ ของสารละลายพบว่าที่แต่ละ pH สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ T_{10}RhO สามารถตรวจวัดไอออนปรอทได้แตกต่างกัน โดยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ T_{10}RhO ยังคงตรวจวัดไอออนปรอทได้ในช่วง pH 6-10 ซึ่งช่วง pH ที่สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ T_{10}RhO สามารถทำงานได้ดีที่สุดคือ pH 6-7 โดยพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์มากที่สุด ดังนั้นสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดนี้จะสามารถประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาไอออนปรอทในตัวอย่างจริงทางสิ่งแวดล้อมได้

2.5 ผลการทดสอบเพื่อหาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์กับไอออนปรอท ด้วยวิธี Job's plot

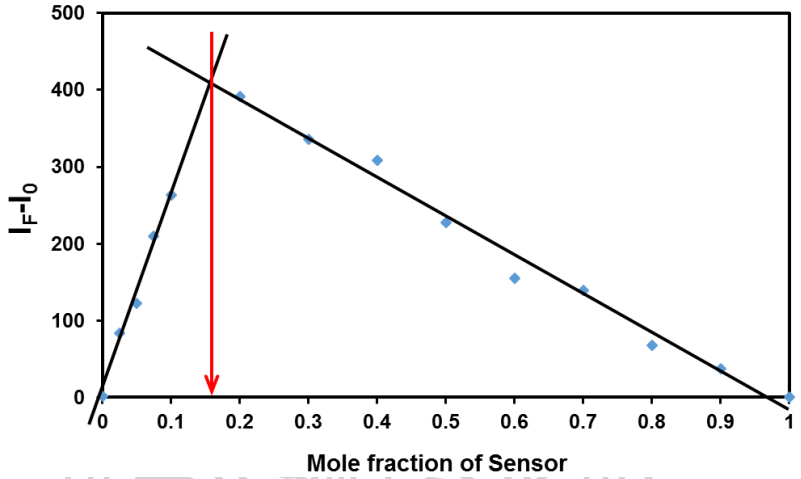
การทดสอบเพื่อหาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโมเลกุลของของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ T_{10}RhO กับไอออนปรอทถูกศึกษาด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปี โดย

การวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ในขณะก่อนเติมและหลังเติมสารละลายไอออนปรอทที่อัตราส่วนโดยโมลต่างๆ ในระบบสารละลายผสมระหว่าง H_2O:EtOH (10:90 v/v) แล้วสร้างกราฟตามวิธี Job's plot ผลการทดลองแสดงดังในภาพที่ 87

เมื่อกำหนดให้

I_0 = Fluorescence Intensity ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **T_{10}RhO** ก่อนเติมไอออน

I_F = Fluorescence Intensity ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **T_{10}RhO** หลังเติมไอออน

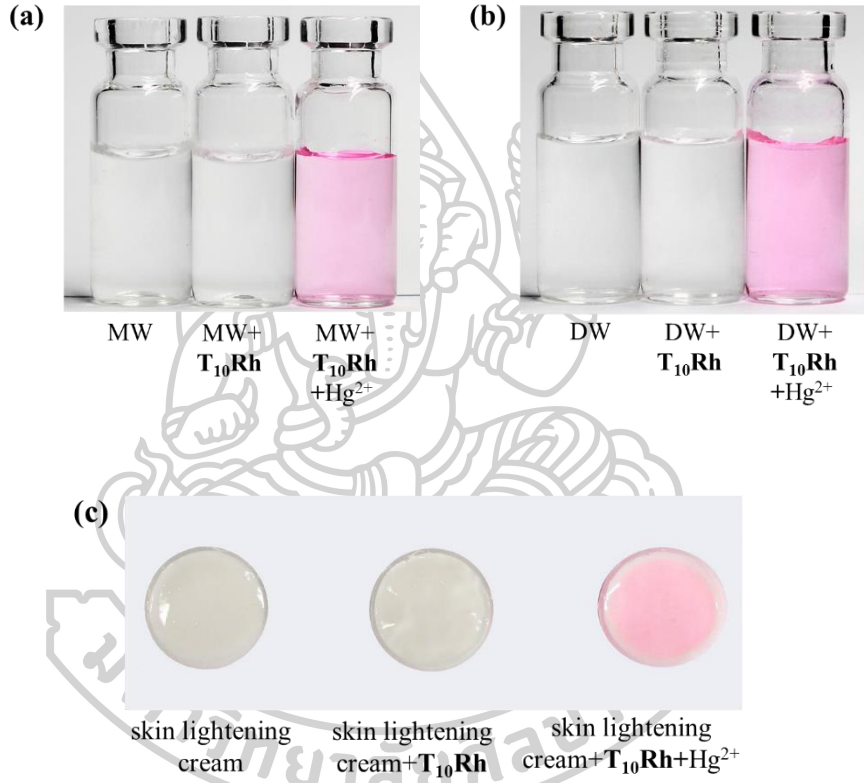


ภาพที่ 87 Job's plot ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **T_{10}RhO** กับไอออนปรอทเกลือเปอร์คลอเรต

จากผลการทดลองตามวิธี Job's plot ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **T_{10}RhO** ดังภาพที่ 87 แสดงการเปลี่ยนแปลงสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนต์มากที่สุดที่ 0.16 ของอัตราส่วนโดยโมลของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **T_{10}RhO** แสดงให้เห็นว่าสาร **T_{10}RhO** กับไอออนปรอทสามารถเกิดแรงกระทำระหว่างกันแบบ 1:5 ในสารละลายผสม H_2O:EtOH (10/90 v/v) แสดงให้เห็นว่าสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **T_{10}RhO** 1 โมเลกุลสามารถดักจับไอออนปรอทได้ 5 โมเลกุล ซึ่งสอดคล้องกับจำนวนของโมเลกุล rhodamine B hydrazide 5 โมเลกุล ที่อยู่บนโครงสร้างของ POSS ซึ่งจากความสามารถนี้ทำให้สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **T_{10}RhO** นี้มีค่าความสามารถต่ำสุดในการตรวจวัดไอออนปรอท (detection limit) ที่ต่ำมากในระดับ ppb

2.6 ผลการทดสอบเพื่อประยุกต์ใช้สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์สำหรับการตรวจวัดไอออนปรอทในตัวอย่างจริงทางสิ่งแวดล้อม

จากความสามารถของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ T_{10}RhO ในการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่าเมื่อดักจับไอออนปรอทในระบบตัวทำละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ จึงได้มีการนำสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ T_{10}RhO มาประยุกต์ใช้ตรวจหาไอออนปรอทที่มีการเติมลงไปในตัวอย่างจริงได้แก่ น้ำแร่ น้ำดื่ม และครีมบำรุงผิวกายขาว แล้วสังเกตการเปลี่ยนสีของสารละลายด้วยตา โดยผลการทดลองแสดงดังในภาพที่ 88



ภาพที่ 88 ภาพถ่ายของตัวอย่างจริงที่มีการเติมสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ T_{10}RhO ในภาวะที่ไม่มีและมีไอออนปรอทที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่า (a) น้ำแร่ (MW) (b) น้ำดื่ม (DW) (c) ครีมบำรุงผิวกายขาว

จากผลการทดลองการดักจับไอออนปรอทของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ T_{10}RhO ในตัวอย่างจริงได้แก่ น้ำแร่ น้ำดื่ม และครีมบำรุงผิวกายขาว (ภาพที่ 88) พบว่าตัวอย่างจริงที่มีการเติมสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ T_{10}RhO ในสภาวะที่ไม่มีไอออนปรอทจะไม่มีสีเช่นเดียวกับตัวอย่างจริงที่ยังไม่มีการเติมสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ T_{10}RhO และเมื่อมีการเติมไอออนปรอทลงไปตัวอย่างจริง พบว่าจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนสีเป็นสีชมพูที่สังเกตเห็นอย่างชัดเจน

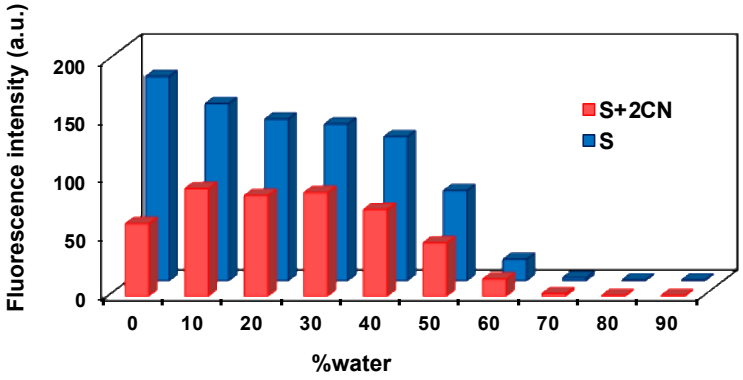
ได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสามารถของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ $T_{10}RhO$ ที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้อย่างมีประสิทธิภาพในการตรวจหาไอออนปรอทได้ในตัวอย่างจริง

3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการทำงานสำหรับตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 2 (AzaBDP-NCS)

เมื่อสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ **2** (**AzaBDP-NCS**) ที่สังเคราะห์ได้ผ่านปฏิกิริยาเคมีได้รับการยืนยันโครงสร้างที่เคมีด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีต่างๆแล้วนั้น สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดใหม่ที่ได้จะถูกนำมาศึกษาคุณสมบัติทางแสงทั้งการดูดกลืนแสงและการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ เริ่มต้นโดยการตรวจสอบความสามารถในการดูดกลืนแสง (absorption) และ การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (emission) ในตัวทำละลายอินทรีย์ จากนั้นทำการหาตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์การดักจับไอออนไซยาไนด์ (CN^-) ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ ขั้นตอนต่อมาคือการศึกษาประสิทธิภาพในการทำงานเกี่ยวกับการตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี เพื่อทดสอบหาความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) ความจำเพาะเจาะจงกับไอออนไซยาไนด์ (selectivity) ความสามารถในการตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ในภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ (competitive) ความสามารถในการตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ในระบบตัวทำละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบในอัตราส่วนต่างๆ (water effect) คุณสมบัติทางเคมีไฟฟ้าของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ด้วยวิธี cyclic voltammetry (electrochemical property) รวมทั้งการศึกษาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบไอออนเชิงซ้อน (Job's plot) ค่าความสามารถต่ำสุดในการตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ (detection limit) ค่าคงที่สมดุลของการเกิดสารประกอบไอออนเชิงซ้อน (Association constant; K_{assoc}) ตำแหน่งของการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์และไอออนไซยาไนด์ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy และการคำนวณทางคอมพิวเตอร์ด้วยวิธี DFT calculation รวมถึงการประยุกต์ใช้สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์สำหรับการตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ในตัวอย่างจริงทางระบบสิ่งมีชีวิต โดยค่าพารามิเตอร์ต่างๆ สำหรับการตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปีแสดงดังตารางที่ 2

3.1 ผลการทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ในระบบตัวทำละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบในอัตราส่วนต่างๆ (water effect)

การทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ในระบบตัวทำละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบในอัตราส่วนต่างๆ ศึกษาด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปี โดยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ในขณะก่อนเติมและหลังเติมสารละลายไอออนไซยาไนด์ในระบบสารละลายผสมระหว่าง H_2O:CH_3CN ที่อัตราส่วนต่างๆ ในช่วงความยาวคลื่น 718 nm เมื่อทำการกระตุ้นที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 680 nm ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 89



ภาพที่ 89 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (λ_{ex} = 680 nm และ λ_{em} =718 nm) ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** (20.0 μM) ในสารละลายผสมระหว่าง H_2O:CH_3CN ในอัตราส่วนต่างๆ

จากผลการทดลอง (ภาพที่ 89) พบว่าที่อัตราส่วนต่างๆ ของสารละลายผสมระหว่าง H_2O:CH_3CN ตั้งแต่ 0%H_2O:CH_3CN ถึง 90%H_2O:CH_3CN ความสามารถการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** ก็มีความแตกต่างกัน โดยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** สามารถคายแสงฟลูออเรสเซนต์ได้ดีในช่วงอัตราส่วนของน้ำในสารละลายต่ำกว่า 50% H_2O:CH_3CN รวมทั้งยังมีประสิทธิภาพในการตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ได้ดีในอัตราส่วนนี้ โดยพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์มากที่สุด ในขณะที่ช่วงอัตราส่วนของน้ำในสารละลายสูงกว่า 50% H_2O:CH_3CN สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** สามารถคายแสงฟลูออเรสเซนต์ได้ไม่ดี อาจเนื่องจากความสามารถของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** ในการละลายได้ไม่ดีในสารละลายที่มีน้ำจำนวนมากจึงทำให้ไม่สามารถตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ได้ ดังนั้นระบบ 50% H_2O:CH_3CN จึงเป็นระบบที่ดีที่สุดที่ถูกเลือกใช้สำหรับการตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดนี้

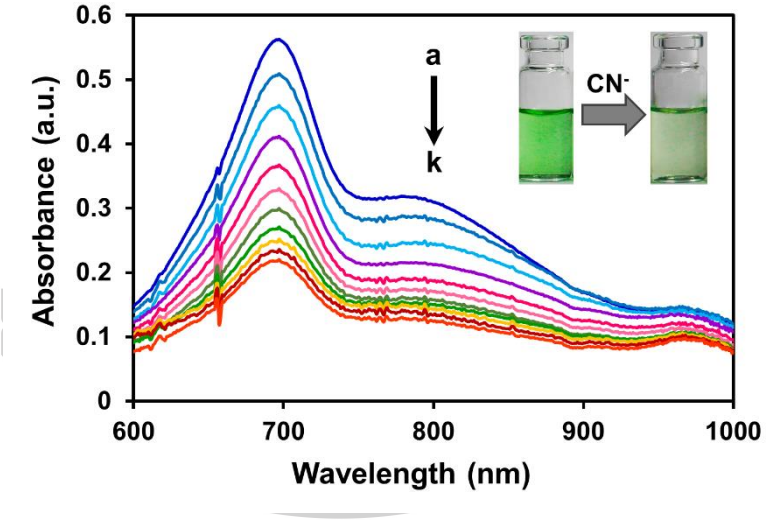
3.2 ผลการทดสอบความไว (sensitivity)

การทดสอบความไวของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** สำหรับการตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีนั้น จะทำการศึกษาสัญญาณการดูดกลืนแสง (absorption) โดยวิธียูวีวิ-สิเบลสเปกโทสโกปีและการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ โดยวิธีฟลูออเรสเซนต์สเปกโทสโกปีของสารละลาย **AzaBDP-NCS** ที่เปลี่ยนไป เมื่อมีการเติมไอออนไซยาไนด์เพิ่มขึ้น โดยศึกษาในสารละลายผสมระหว่าง 5 mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.2) :

acetonitrile (50:50 v/v) + triton X 100 ด้วยการติดตามสเปกตรัมของโดยติดตามสเปกตรัมของการดูดกลืนแสง (absorption spectra) และการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence emission spectra) ก่อนและหลังการเติมไอออนไซยาไนด์ เมื่อทำการกระตุ้นที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 680 nm และใช้ไอออนไซยาไนด์ในรูปของเกลือโพแทสเซียม

3.2.1 ผลการทดสอบความไวจากความสามารถการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตโดยวิธียูวีวิ-สิเบลสเปกโทสโกปีของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ AzaBDP-NCS ในสภาวะที่มีไอออนไซยาไนด์ในสารละลาย

ความสามารถการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** ถูกศึกษาโดยเตรียมสารละลาย **AzaBDP-NCS** เข้มข้น 13.0 μM ในสารละลายผสมระหว่าง 5 mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.2) : acetonitrile (50:50 v/v) + triton X 100 ใช้ไอออนไซยาไนด์ในรูปของเกลือโพแทสเซียม เพื่อติดตามสัญญาณการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตของ **AzaBDP-NCS** ผลการทดลองแสดงผลดังภาพที่ 90



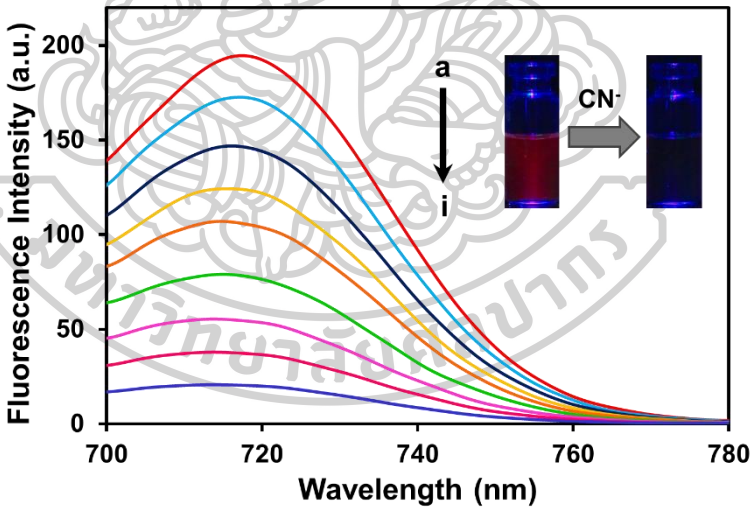
ภาพที่ 90 การดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** (13.0 μM) ในสารละลายผสมระหว่าง 5 mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.2) : acetonitrile (50:50 v/v) + triton X 100 ก่อนและหลังเติมไอออนไซยาไนด์

จากผลการทดลอง (ภาพที่ 90) พบว่าในสภาวะที่ไม่มีไอออนไซยาไนด์ สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** จะแสดงสัญญาณการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตอย่างชัดเจน แต่เมื่อเติมไอออนไซยาไนด์ในสารละลาย ส่งผลให้ความสามารถการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** มีค่าลดลงได้สูงสุดที่ช่วงความยาวคลื่น 690 nm ในลักษณะแปรผกผันกับปริมาณไอออนไซยาไนด์ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นลักษณะการทำงานแบบระบบเปิด-ปิด

สัญญาณ (ON-OFF switch system) และในขณะเดียวกันพบว่าเมื่อทำการเติมความเข้มข้นของไอออนไซยาไนด์เพิ่มมากขึ้นจะทำให้สีของสารละลาย **AzaBDP-NCS** เปลี่ยนจากสีเขียวเข้มเป็นสีเขียวจางลงอย่างชัดเจนซึ่งสามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่าอีกด้วย จากผลการทดลองนี้จึงทำให้เห็นว่าสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** สามารถตรวจวัดไอออนปรอทได้ด้วยเทคนิคยูวีวิ-สิเบลสเปกโทสโกปี

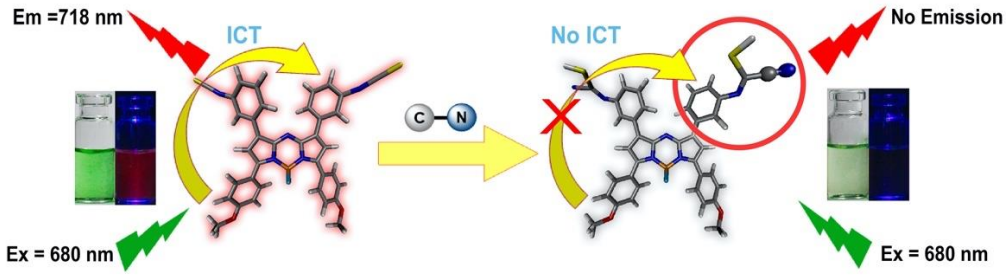
3.2.2 ผลการทดสอบความไวจากความสามารถการคายแสงฟลูออเรสเซนต์โดยวิธีฟลูออเรสเซนต์สเปกโทสโกปีของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ AzaBDP-NCS ในสภาวะที่มีไอออนไซยาไนด์ในสารละลาย

ความสามารถการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** ถูกศึกษาโดยเตรียมสารละลาย **AzaBDP-NCS** เข้มข้น 20.0 μM ในสารละลายผสมระหว่าง 5 mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.2) : acetonitrile (50:50 v/v) + triton X 100 ใช้ไอออนไซยาไนด์ในรูปของเกลือโพแทสเซียม และกำหนดค่าความยาวคลื่นกระตุ้น (excitation wavelength: λ_{ex}) เท่ากับ 680 nm เพื่อติดตามสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของ **AzaBDP-NCS** ผลการทดลองแสดงผลดังภาพที่ 91



ภาพที่ 91 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (λ_{ex} = 680 nm และ λ_{em} =718 nm) ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** (20.0 μM) ในสารละลายผสมระหว่าง 5 mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.2) : acetonitrile (50:50 v/v) + triton X 100 ก่อนและหลังเติมไอออนไซยาไนด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ a: 0 M, b: 0.03 mM, c: 0.07 mM, d: 0.10 mM, e: 0.13 mM, f: 0.20 mM, g: 0.27 mM, h: 0.30 mM, i: 0.33 mM.

จากผลการทดลองภาพที่ 91 พบว่าในสภาวะที่ไม่มีการเติมไอออนไซยาไนด์ สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** จะแสดงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ในช่วงความยาวคลื่น 700-780 nm โดยมีความยาวคลื่นของการคายแสงฟลูออเรสเซนต์สูงสุด (λ_{em}) เท่ากับ 718 nm แต่เมื่อเติมไอออนไซยาไนด์ลงในสารละลาย ส่งผลให้ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** มีค่าลดลงอย่างชัดเจน ในลักษณะแปรผกผันกับปริมาณไอออนไซยาไนด์ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นลักษณะการทำงานแบบระบบเปิด-ปิด สัญญาณ (ON-OFF switch system) โดยการลดลงของสัญญาณฟลูออเรสเซ็นต์เกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของส่วนไอโอโนฟอร์ isothiocyanate ซึ่งทำหน้าที่เป็นหมู่อิเล็กโทรไฟล์ในการเกิดปฏิกิริยากับไอออนไซยาไนด์ซึ่งเป็นนิวคลีโอไฟล์ผ่านปฏิกิริยาการเติม (Nucleophilic addition) โดย **AzaBDP-NCS** สามารถแสดงสัญญาณอัลตราไวโอเลตและฟลูออเรสเซนต์ได้ผ่านกระบวนการ intramolecular charge transfer (ICT process) จากหมู่แทนที่ที่ให้อิเล็กตรอน methoxy ($-OCH_3$) ไปยังหมู่แทนที่ที่รับอิเล็กตรอน isothiocyanate (-SCN) แต่เมื่อหมู่ isothiocyanate เกิดปฏิกิริยากับไอออนไซยาไนด์ ส่งผลทำให้ **AzaBDP-NCS** ไม่สามารถเกิดกระบวนการ ICT ในโมเลกุลได้ จึงทำให้ความสามารถในการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตและการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ลดลง โดยกลไกการดักจับไอออนไซยาไนด์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** แสดงดังภาพที่ 92



ภาพที่ 92 แสดงกลไกการดักจับไอออนไซยาไนด์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** ก่อนการดักจับ (ซ้าย) และหลังการดักจับไอออนไซยาไนด์ (ขวา)

3.2.3 ผลการคำนวณหาค่าความสามารถต่ำสุดในการตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ AzaBDP-NCS (detection limit)

การคำนวณค่าความสามารถต่ำสุดของการตรวจวัด (detection limit) ทำได้โดยสร้างกราความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่ 718 nm (แกน Y) กับความเข้มข้นต่างๆ ของไอออนไซยาไนด์ที่เติมลงไป (แกน X) จากนั้นนำค่าความชันของกราฟ (slope) ที่ได้มาคำนวณตามสมการ (5)

$$\text{Blank-3SD} = \text{slope} \bullet [CN^-] + c \qquad (5)$$

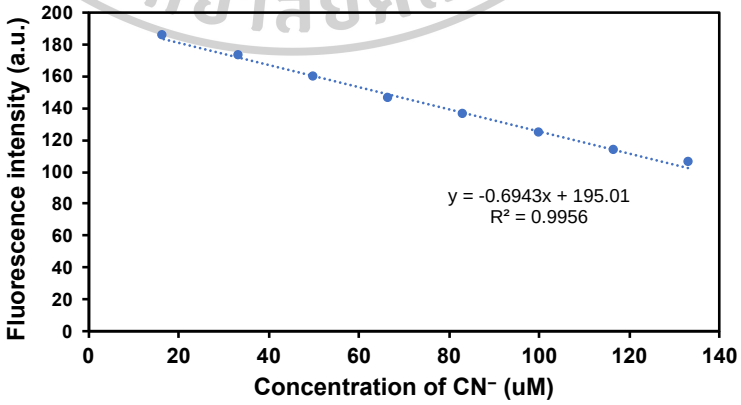
เมื่อกำหนดให้

Blank	คือ ค่าความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์เมื่อไม่มีการเติมไอออนไซยาไนด์
SD	คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์เมื่อไม่มีการเติมไอออนไซยาไนด์
slope	คือ ค่าความชันของกราฟ
$[CN^-]$	คือ ความเข้มข้นของไอออนไซยาไนด์ต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้
c	คือ จุดตัดบนแกน y

ข้อมูลค่าความเข้มข้นของไอออนไซยาไนด์ที่เติม (μM) และความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ (λ_{ex} = 670 nm และ λ_{em} = 718 nm) สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ AzaBDP-NCS สำหรับการคำนวณแสดงดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7
ค่าความเข้มข้นของไอออนไซยาไนด์ที่เติม (μM) และ ความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ AzaBDP-NCS

$[CN^-]$, (μM)	16.67	33.33	50	66.67	83.33	100.00	116.67	133.33
Intensity, (a.u)	185.39	172.80	159.72	146.38	135.98	124.01	113.55	105.64



ภาพที่ 93 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไอออนไซยาไนด์ที่เติมกับความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ AzaBDP-NCS

การคำนวณ

จากกราฟได้สมการเส้นตรงคือ y = -0.6943x + 195.01; R^2 = 0.9956

แทนค่าในสมการ (5) เมื่อ SD = 0.316 slope = -0.6943 Blank = 195.44 c = 195.01

$$\text{Blank-3SD} = \text{slope}\bullet[CN^-] + c \quad (5)$$

$$195.44\text{-}3(0.316) = -0.6943[CN^-] + 195.01$$

$$[CN^-] = (195.44\text{-}3(0.316))\text{-}195.01/\text{-}0.6943$$

ดังนั้น $[CN^-]$ = 0.75 µM หรือ 19 ppb

ดังนั้นจากการทดลองพบว่าค่า detection limit ในการตรวจจับไอออนไซยาไนด์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** เท่ากับ 0.75 µM หรือ 19 ppb ซึ่งมีค่าต่ำกว่าค่ามาตรฐานของปริมาณไอออนไซยาไนด์ในน้ำดื่ม ซึ่งกำหนดโดย World Health Organization (WHO) ที่มีค่าเท่ากับ 49.4 ppb [35]

3.2.4 ผลการคำนวณหาค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออน (K_{assoc}) จากสมการ Benesi-Hildebrand

นำผลการทดลองที่ได้จากการไตเตรตเพื่อหาความไวมาการสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{1}{(I_0-I)}$ ในแนวแกน y และ $\frac{1}{[CN^-]^n}$ ในแนวแกน x เพื่อหาค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออนไซยาไนด์ได้ตามสมการ Benesi-Hildebrand (6) ซึ่งมีลักษณะความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงสมการ Benesi-Hildebrand;

$$\frac{1}{(I_0\text{-}I)} = \frac{1}{K\bullet(I_{max}-I_{min})\bullet[CN^-]^n} + \frac{1}{(I_{max}-I_{min})} \quad (6)$$

เมื่อกำหนดให้

I_0 คือ ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์เริ่มต้น

I คือ ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์หลังเติมไอออนที่ความเข้มข้นใดๆ

I_{max} คือ ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์มากที่สุด

I_{min} คือ ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์น้อยที่สุด

n คือ จำนวนเต็มใดๆ เช่น 1, 2 และ 3

โดยพบว่าค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออนคำนวณได้จากความชันของกราฟที่สร้างขึ้น ดังนี้

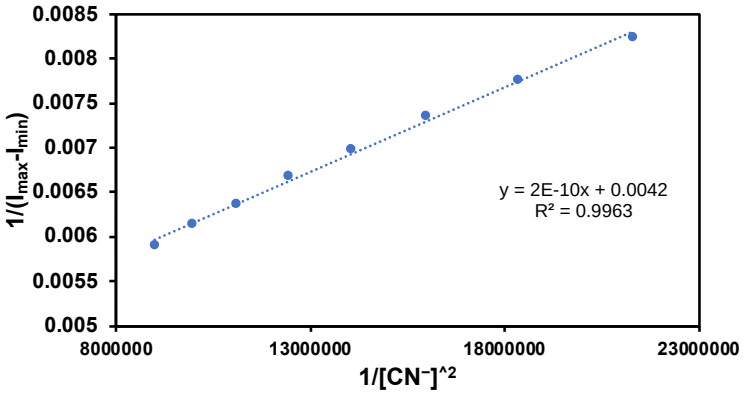
$$slope = \frac{1}{K \bullet (I_{max} - I_{min})} \quad (7)$$

$$K = \frac{1}{slope \bullet (I_{max} - I_{min})} \quad (8)$$

ตารางที่ 8

ค่าความเข้มข้นของไอออนไซยาไนด์ที่เติม (μM) และค่าความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS**

$[CN^-]$, (μM)	Intensity, (a.u)	$1/[CN^-]^{\wedge 2}$	$1/(I_{max}-I_{min})$
216.67	73.85	21301775	0.008242
233.33	66.42	18367347	0.007766
250.00	59.13	16000000	0.00735
266.67	51.87	14062500	0.006978
283.33	45.36	12456747	0.006675
300.00	37.91	11111111	0.006358
316.67	32.42	9972299	0.006144
333.33	25.5	9000000	0.005893



ภาพที่ 94 กราฟจากการคำนวณตามสมการ Benesi-Hildebrand ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** เมื่อ n = 2

การคำนวณ

จากกราฟได้สมการเส้นตรงคือ $y = 2.0 \times 10^{-10}x + 0.0042$; $R^2 = 0.9963$

แทนค่าในสมการ (8) เมื่อ slope = 2.0×10^{-10} $I_{max} = 73.85$ $I_{min} = 25.50$

$$K = \frac{1}{slope \bullet (I_{max} - I_{min})} \quad (8)$$

$$K = 1/(2.0 \times 10^{-10}(73.85-25.50))$$

ดังนั้น $K = 1.03 \times 10^{8}\ M^{-2}$

ดังนั้น ค่าคงที่สมดุลของการจับกับไอออน (K_{assoc}) คงที่สมดุลของการเกิดสารประกอบไอออนเชิงซ้อนของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** ในการดักจับไอออนไซยาไนด์ได้เท่ากับ $1.03 \times 10^{8}\ M^{-2}$

3.3 ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจง (selectivity)

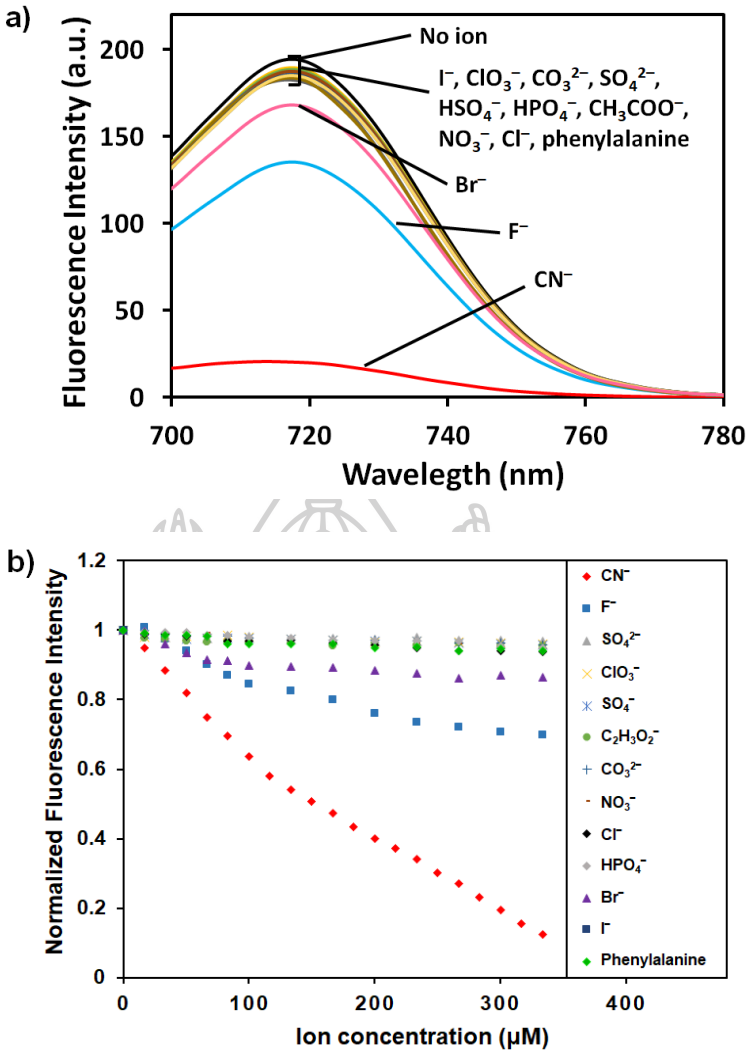
การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** นั้น ได้ศึกษาด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปี โดยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์จากการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนไซยาไนด์ลงในสารละลายของ **AzaBDP-NCS** เปรียบเทียบกับสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้นจากการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนอื่นๆ แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ระหว่างการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนไซยาไนด์และการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนรบกวนอื่นๆ นอกจากนี้การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของสารเรืองแสงฟลูออเรส

เซนต์ **AzaBDP-NCS** ยังสามารถศึกษาได้ด้วยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายภายใต้แสงธรรมชาติและการเรืองแสงของสารละลายภายใต้แสง UV ด้วยตาเปล่าได้อีกด้วย

3.3.1 ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจง (selectivity) ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปี

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงศึกษาจากความสามารถการคายแสงของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** ในสารละลายผสมระหว่าง 5 mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.2) : acetonitrile (50:50 v/v) + triton X 100 ในสภาวะที่มีไอออนเกลือโพแทสเซียมอื่นๆ ได้แก่ ไอออนไซยาไนด์ (CN^-) ไอออนฟลูออไรด์ (F^-) ไอออนซัลเฟต (SO_4^{2-}) ไอออนเปอร์คลอเรต (ClO_4^-) ไอออนไฮโดรเจนซัลเฟต (HSO_4^-) ไอออนอะซีเตต ($C_2H_3O_2^-$) ไอออนคาร์บอเนต (CO_3^{2-}) ไอออนไนเตรต (NO_3^-) ไอออนคลอไรด์ (Cl^-) ไอออนฟอสเฟต (HPO_4^-) ไอออนโบรไมด์ (Br^-) ไอออนไอโอไดด์ (I^-) และกรดอะมิโนฟินิลอะลานีน (Phe) ผลการทดลองแสดงดังในภาพที่ 95

มหาวิทยาลัยศิลปากร



ภาพที่ 95 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** (20.0 μM) ในสารละลายผสมระหว่าง 5 mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.2) : acetonitrile (50:50 v/v) + triton X 100 ในสภาวะที่มีไอออนต่างๆได้แก่ CN^- F^- Br^- I^- ClO_3^- CO_3^{2-} SO_4^{2-} HSO_4^- HPO_4^- CH_3COO^- NO_3^- Cl^- และ phenylalanine ที่ความเข้มข้น 0.33 mM (ภาพ a) และที่ความเข้มข้นต่างๆ (ภาพ b)

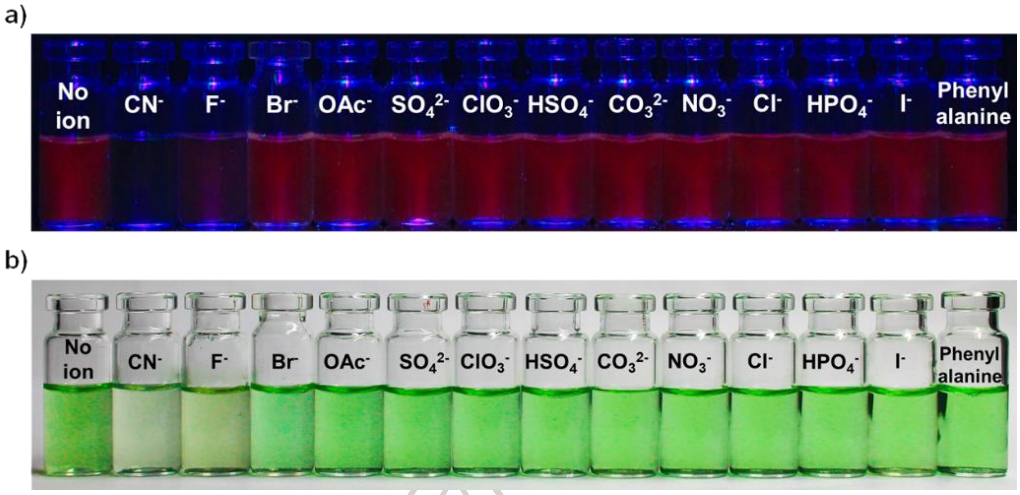
ผลการทดลองพบว่าจากภาพที่ 95a เมื่อมีการเติมไอออนเกลือโพแทสเซียมที่ความเข้มข้นเดียวกัน สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** จะแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ต่ำสุดเฉพาะที่มีการเติมไอออนไซยาไนด์เท่านั้น ในขณะที่ไอออนชนิดอื่นๆ ไม่ส่งผลต่อการแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** สอดคล้องกับผลการทดลองจากภาพที่ 95b แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า normalized fluorescence intensity (แกน y) และความเข้มข้นของไอออนชนิดต่างๆ (แกน x) พบว่าเมื่อความเข้มข้นของไอออนไซยาไนด์เพิ่มมากขึ้น ค่า normalized fluorescence intensity มีแนวโน้มลดลงอย่างชัดเจน ในขณะที่หลังเติม ไอออนฟลูออไรด์ (F^-) ไอออนโปรไมด์ (Br^-) ไอออนไอโอไดด์ (I^-) ไอออน เปอร์คลอเรต (ClO_3^-) ไอออน

คาร์บอเนต (CO_3^{2-}) ไอออนซัลเฟต (SO_4^{2-}) ไอออนไฮโดรเจนซัลเฟต (HSO_4^-) ไอออนไฮโดรเจนฟอสเฟต (HPO_4^-) ไอออนอะซิเตท (CH_3COO^-) ไอออนไนเตรต (NO_3^-) ไอออนคลอไรด์ (Cl^-) และฟีนิลอะลานีน (Phe) ในความเข้มข้นเดียวกันกับไอออนไซยาไนด์ ไม่แสดงการเปลี่ยนแปลงการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ หรือมีการเปลี่ยนแปลงน้อยกว่า ± 20% ของความเข้มของสัญญาณเริ่มต้น (เมื่อไม่มีไอออนใดๆเจือปนในสารละลายเซ็นเซอร์) จากผลการทดลองทั้งหมดนี้จึงสรุปได้ว่าสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** มีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนไซยาไนด์สูงมาก

3.3.2 ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจง (selectivity) เปรียบเทียบกับไอออนรบกวนอื่นๆ ด้วยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายภายใต้แสงธรรมชาติและการเรืองแสงของสารละลายภายใต้แสง UV ด้วยตาเปล่า

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงศึกษาจากความสามารถการคายแสงของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** ในสารละลายผสมระหว่าง 5 mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.2) : acetonitrile (50:50 v/v) + triton X 100 ในสภาวะที่มีไอออนเกลือโพแทสเซียมอื่นๆ ได้แก่ ไอออนไซยาไนด์ (CN^-) ไอออนฟลูออไรด์ (F^-) ไอออนซัลเฟต (SO_4^{2-}) ไอออนเปอร์คลอเรต (ClO_4^-) ไอออนไฮโดรเจนซัลเฟต (HSO_4^-) ไอออนอะซีเตต ($C_2H_3O_2^-$) ไอออนคาร์บอเนต (CO_3^{2-}) ไอออนไนเตรต (NO_3^-) ไอออนคลอไรด์ (Cl^-) ไอออนฟอสเฟต (HPO_4^-) ไอออนโบรไมด์ (Br^-) ไอออนไอโอไดด์ (I^-) และกรดอะมิโนฟินิลอะลานีน (Phe) โดยสามารถสังเกตผลการทดลองสีของสารละลายภายใต้แสงธรรมชาติและการเรืองแสงของสารละลายภายใต้แสง UV ด้วยตาเปล่า ผลการทดลองแสดงดังในภาพที่ 96

มหาวิทยาลัยศิลปากร



ภาพที่ 96 ภาพถ่ายการเปลี่ยนสีของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** ในภาวะที่ไม่มีและมีไอออนต่างๆ ได้แก่ CN^-, F^-, Br^-, I^-, ClO_3^-, CO_3^{2-}, SO_4^{2-}, HSO_4^-, HPO_4^-, CH_3COO^-, NO_3^-, Cl^- และ phenylalanine ที่ความเข้มข้น 0.3 mM

จากภาพถ่าย (ภาพที่ 96) แสดงให้เห็นว่าสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** มีจำเพาะเจาะจงกับไอออนไซยาไนด์สูงเมื่อเทียบกับไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ โดยสามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงการคายแสงฟลูออเรสเซนต์และสีของสารละลายนี้ได้ด้วยตาเปล่า โดยการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ภายใต้แสง UV ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** จะลดลงเมื่อมีการเติมไอออนไซยาไนด์ลงในสารละลาย (ภาพที่ 88a) ในขณะที่เมื่อมีการเติมไอออนชนิดอื่นได้แก่ F^-, Br^-, I^-, ClO_3^-, CO_3^{2-}, SO_4^{2-}, HSO_4^-, HPO_4^-, CH_3COO^-, NO_3^-, Cl^- และ phenylalanine ลงในสารละลาย การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** ไม่มีการเปลี่ยนแปลง อีกทั้งยังสามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายได้โดยมีการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายจากสีเขียวเมื่อไม่มีไอออนไซยาไนด์ จากนั้นเกิดการเปลี่ยนสีจางลงจนเกือบไม่มีสีเมื่อทำการเติมไอออนไซยาไนด์ลงในสารละลาย ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบสีของสารละลายที่มีการเติมไอออนชนิดอื่นๆพบว่าสารละลายยังคงมีสีเขียวเช่นเดิม (ภาพที่ 88b) แสดงให้เห็นว่าสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** มีความจำเพาะเจาะจงสูงในการดักจับไอออนไซยาไนด์

3.4 ผลการทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ในภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ปนอยู่ (competitive)

การทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ในภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ศึกษาจากความสามารถการคายแสงของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** ในสารละลายผสมระหว่าง 5 mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.2) : acetonitrile (50:50 v/v) + triton X 100 ในสภาวะที่มีไอออนไซยาไนด์รวมกับไอออนรบกวนอื่นๆ ได้แก่ ไอออนฟลูออไรด์ (F^-) ไอออนโปรไมด์ (Br^-) ไอออนไอโอไดด์ (I^-) ไอออน เปอร์คลอเรต (ClO_3^-) ไอออนคาร์บอเนต (CO_3^{2-}) ไอออนซัลเฟต (SO_4^{2-}) ไอออนไฮโดรเจนซัลเฟต (HSO_4^-) ไอออนไฮโดรเจนฟอสเฟต (HPO_4^-) ไอออนอะซิเตท (CH_3COO^-) ไอออนไนเตรต (NO_3^-) ไอออนคลอไรด์ (Cl^-) และ ฟีนิลอะลานีน (Phe) ในสารละลายที่มีปริมาณความเข้มข้นไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ มากกว่าความเข้มข้นของไอออนไซยาไนด์ 5 เท่า โดยแสดงผลการทดลองในรูปกราฟความสัมพันธ์ความเข้มข้นแสงฟลูออเรสเซนต์ ระหว่างค่า I_F/I_0 (แกน y) และชนิดของไอออนเกลือโพแทสเซียมชนิดต่างๆ (แกน x)

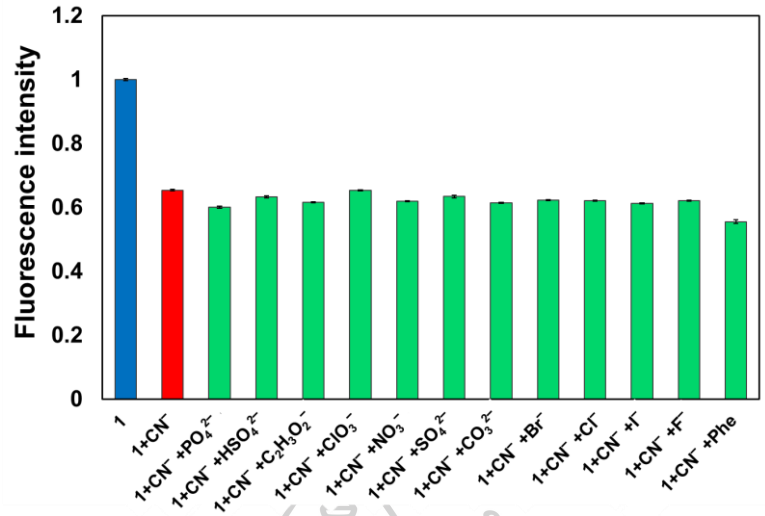
เมื่อกำหนดให้

I_0 = Fluorescence Intensity ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** ก่อนเติมไอออน

I_F = Fluorescence Intensity ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** หลังเติมไอออน

ผลการทดลองแสดงดังในภาพที่ 97

มหาวิทยาลัยศิลปากร



ภาพที่ 97 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (λ_{ex} = 680 nm และ λ_{em} = 718 nm) ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** (20.0 μM) ในสารละลายผสมระหว่าง 5 mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.2) : acetonitrile (50:50 v/v) + triton X 100 ในสภาวะที่มีไอออนรบกวนเข้มข้น 0.50 mM เจือปนในสารละลายที่มีไอออนไซยาไนด์เข้มข้น 0.167 mM

ผลการทดลองพบว่าจากภาพที่ 97 สังเกตได้ว่า เมื่อทำการเติมไอออนไซยาไนด์รวมกับไอออนรบกวนอื่นๆ ได้แก่ ไอออนฟลูออไรด์ (F^-) ไอออนโปรไมด์ (Br^-) ไอออนไอโอไดด์ (I^-) ไอออนเปอร์คลอเรต (ClO_3^-) ไอออนคาร์บอเนต (CO_3^{2-}) ไอออนซัลเฟต (SO_4^{2-}) ไอออนไฮโดรเจนซัลเฟต (HSO_4^-) ไอออนไฮโดรเจนฟอสเฟต (HPO_4^-) ไอออนอะซิเตท (CH_3COO^-) ไอออนไนเตรต (NO_3^-) ไอออนคลอไรด์ (Cl^-) และ ฟีนิลอะลานีน (Phe) ที่ความเข้มข้น 5 เท่าของความเข้มข้นไอออนไซยาไนด์ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงน้อยกว่า ±5% ของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** เมื่อเปรียบเทียบกับหลังการเติมไอออนไซยาไนด์เพียงชนิดเดียว นั่นแสดงให้เห็นว่าหากในระบบที่ตรวจวัดมีไอออนชนิดอื่นๆเจือปนประมาณ 5 เท่าของปริมาณไอออนไซยาไนด์ สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** ยังคงแสดงสัญญาณ ON-OFF fluorescence ได้อย่างถูกต้องและสามารถดักจับไอออนไซยาไนด์อย่างจำเพาะเจาะจงสูง

3.5 ผลการทดสอบเพื่อหาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์กับไอออนไซยาไนด์ ด้วยวิธี Job's plot

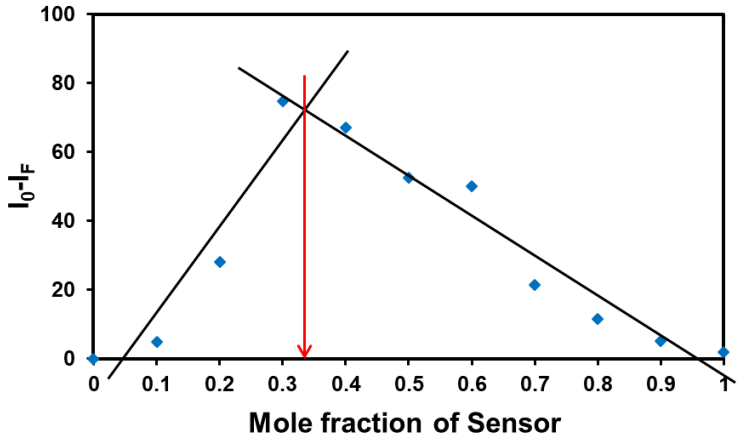
การทดสอบเพื่อหาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโมเลกุลของของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** กับไอออนไซยาไนด์ถูกศึกษาด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโก

ปี โดยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ในขณะก่อนเติมและหลังเติมสารละลายไอออนไซยาไนด์ที่อัตราส่วนโดยโมลต่างๆ ในระบบสารละลายผสมระหว่าง 5 mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.2) : acetonitrile (50:50 v/v) + triton X 100 แล้วสร้างกราฟตามวิธี Job's plot ผลการทดลองแสดงดังในภาพที่ 98

เมื่อกำหนดให้

I_0 = Fluorescence Intensity ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** ก่อนเติมไอออน

I_F = Fluorescence Intensity ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** หลังเติมไอออน

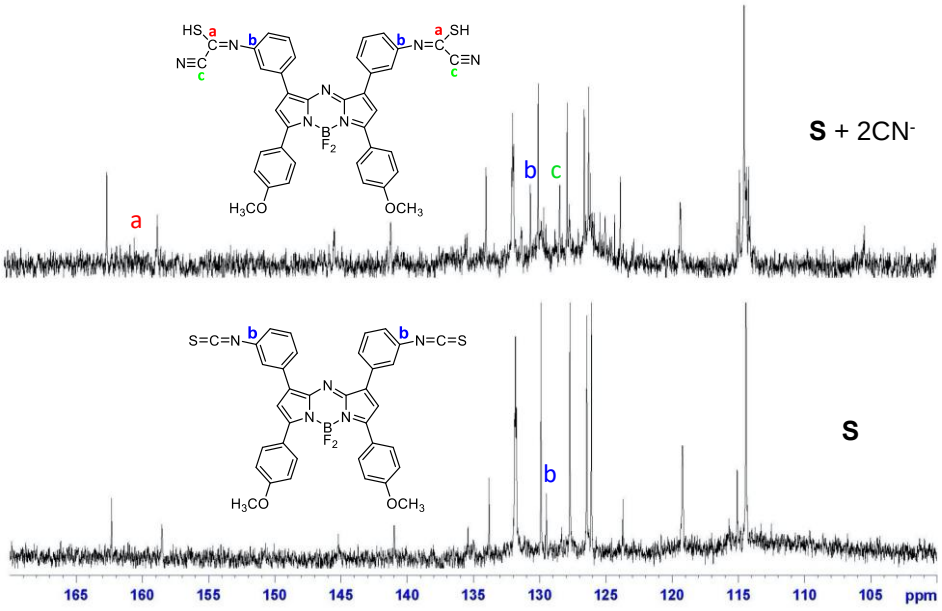


ภาพที่ 98 Job's plot ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** กับไอออนไซยาไนด์

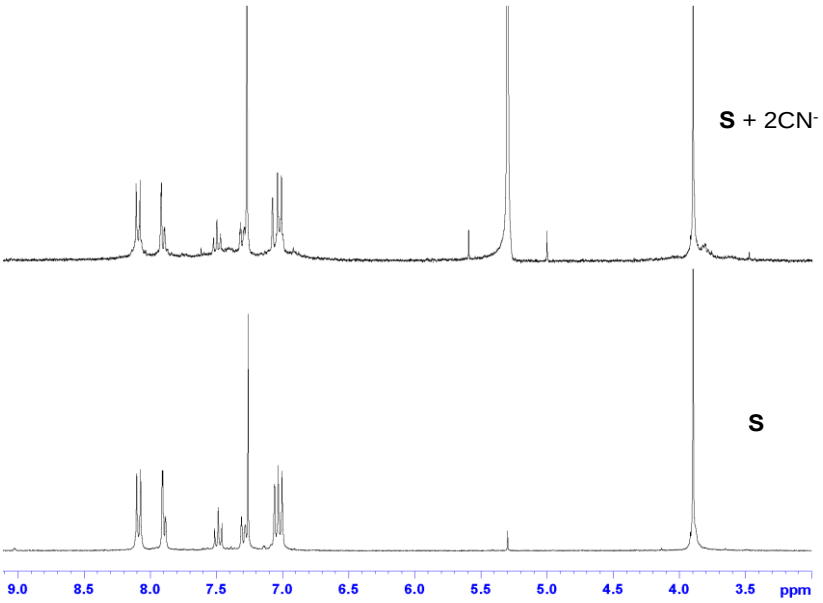
จากผลการทดลองตามวิธี Job's plot ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** ดังภาพที่ 98 แสดงการเปลี่ยนแปลงสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนต์มากที่สุดที่ 0.33 ของอัตราส่วนโดยโมลของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** แสดงให้เห็นว่าสาร **AzaBDP-NCS** กับไอออนไซยาไนด์สามารถเกิดแรงกระทำระหว่างกันแบบ 1:2 ในสารละลายผสมระหว่าง 5 mM phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.2) : acetonitrile (50:50 v/v) + triton X 100 โดยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** 1 โมเลกุลสามารถดักจับไอออนไซยาไนด์ได้ 2 โมเลกุล เป็นผลจากหมู่แทนที่ isothiocyanate 2 หมู่บนโครงสร้างของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** สามารถเกิดปฏิกิริยากับไอออนไซยาไนด์ได้อย่างจำเพาะเจาะจง

3.6 ผลการทดสอบเพื่อศึกษาตำแหน่งของการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์และไอออนไซยาไนด์ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy

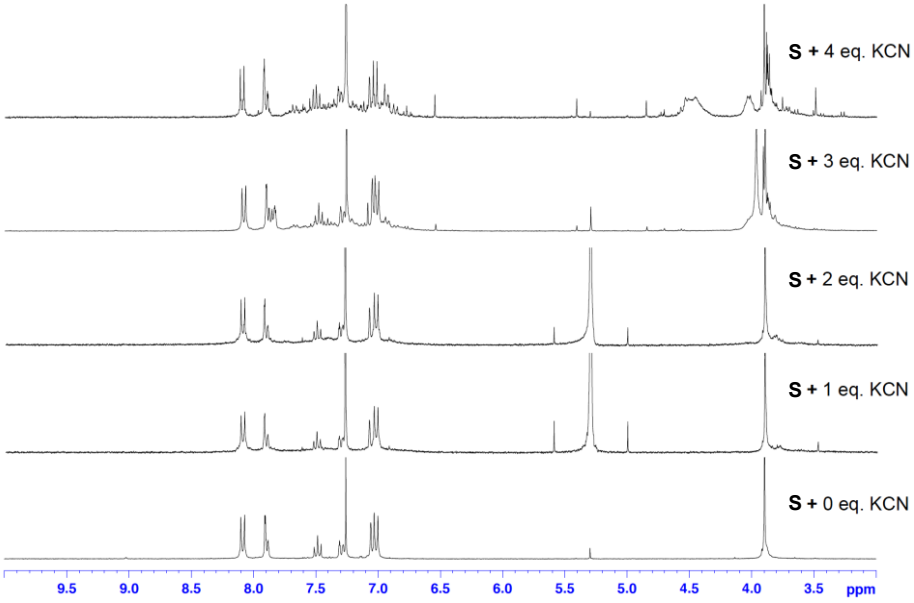
การทดสอบเพื่อศึกษาตำแหน่งของการเกิดปฏิกิริยาของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** กับไอออนไซยาไนด์ถูกศึกษาด้วยเทคนิค NMR spectroscopy ทั้งการศึกษา ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR โดยการวัดสัญญาณโปรตอนหรือคาร์บอนของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ในขณะก่อนและหลังเติมสารละลายไอออนไซยาไนด์ในระบบตัวทำละลาย $CDCl_3$ ผลการทดลองแสดงดังในภาพที่ 99-101



ภาพที่ 99 ^{13}C-NMR spectra (75 MHz, $CDCl_3$) ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** ก่อนและหลังการดักจับไอออนไซยาไนด์



ภาพที่ 100 ^{1}H-NMR spectra (300 MHz, $CDCl_3$) ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** ก่อนและหลังการดักจับไอออนไซยาไนด์



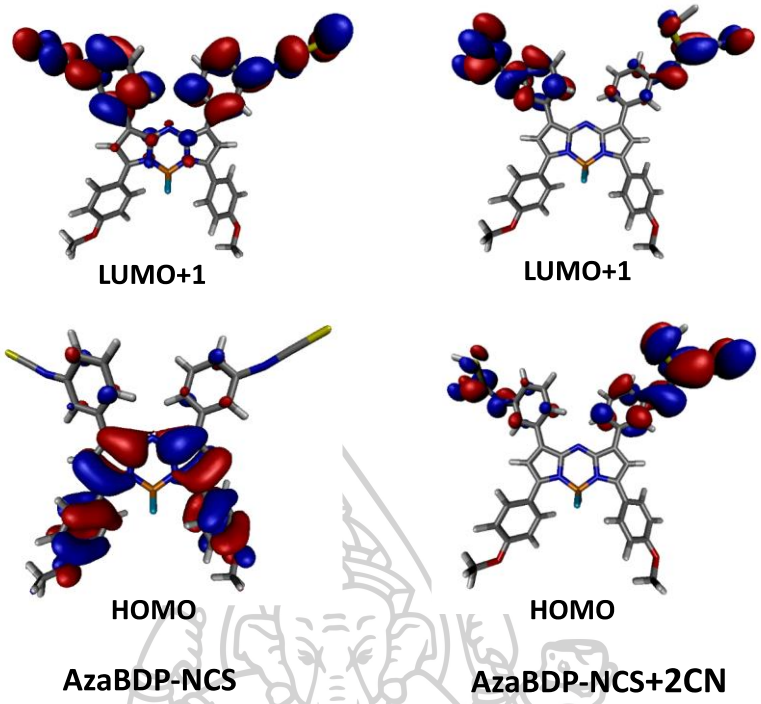
ภาพที่ 101 ^{1}H-NMR spectra (300 MHz, $CDCl_3$) ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** ในภาวะที่ไม่มีและมีไอออนไซยาไนด์ 0-4 เท่า

จากผลการทดลอง ^{13}C-NMR ดังภาพที่ 99 พบว่าเมื่อสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** ดักจับไอออนไซยาไนด์แล้วจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณ ^{13}C-NMR โดยเกิดการเลื่อนแบบลดลง (downfield shifted) ของพีค quaternary carbon (C_b) จาก chemical shift 129.5 ppm เป็น 130.5 ppm และในขณะเดียวกันมีการเกิดพีคใหม่ 2 พีค ที่ chemical shift 160.6 ppm (C_a) และ 128.0 ppm (C_c) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไอออนไซยาไนด์เข้าทำปฏิกิริยาที่ตำแหน่งหมู่แทนที่

isothiocyanate ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** และการทดลอง ^{1}H-NMR ดังแสดงภาพที่ 100 พบว่าสัญญาน^{1}H-NMR ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อมีการเติมไอออนไซยาไนด์ ซึ่งแสดงว่าให้เห็นว่าไอออนไซยาไนด์เข้าทำปฏิกิริยาที่หมู่ isothiocyanate ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** ที่ไม่มีโปรตอนในบนอะตอมข้างเคียงและไม่ได้เข้าทำปฏิกิริยาที่ตำแหน่ง pyrrole เช่นเดียวกับที่มีรายงานในวิจัยที่ตีพิมพ์ก่อนหน้านี้ จึงไม่พบการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณ ^{1}H-NMR เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของหมู่ isothiocyanate ไม่ส่งอิทธิพลต่อการแสดงสัญญาณของโปรตอนบนโครงสร้างของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** โดยสอดคล้องกับผลการทดลอง ^{1}H-NMR ดังแสดงภาพที่ 101 ที่ทำการไตเตรตไอออนไซยาไนด์ในอัตราส่วน 0-4 เท่าของความเข้มข้นสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** ซึ่งพบว่าสัญญาณ ^{1}H-NMR เมื่อเติมไอออนไซยาไนด์ 1-2 เท่า ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณ ^{1}H-NMR แต่เมื่อทำการเติมไอออนไซยาไนด์เพิ่มมากขึ้น 3-4 เท่า ทำให้ไอออนไซยาไนด์ที่มากเกินพอสามารถเข้าทำปฏิกิริยาในตำแหน่ง pyrrole ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** ส่งผลทำให้สัญญาณ ^{1}H-NMR ของโปรตอนในตำแหน่งนั้นมีการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากได้รับอิทธิพลจากหมู่ไซยาไนด์ จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** สามารถดักจับไอออนไซยาไนด์ได้โดยการเกิดปฏิกิริยา nucleophilic addition โดยมีหมู่ isothiocyanate ทำหน้าที่เป็นอิเล็กโทรไฟล์ของการเกิดปฏิกิริยานี้

3.7 ผลการทดสอบเพื่อศึกษาตำแหน่งของการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์และไอออนไซยาไนด์โดยการคำนวณทางคอมพิวเตอร์ด้วยวิธี DFT calculation

การทดสอบเพื่อศึกษาตำแหน่งของการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** และไอออนไซยาไนด์ถูกศึกษาโดยการคำนวณทางคอมพิวเตอร์ด้วยวิธี DFT calculation โดยการใช้โปรแกรม Gaussian 09 บนระบบพื้นฐาน B3LYP/6-311G** ของโครงสร้างของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** ก่อนและหลังการเกิดปฏิกิริยากับไอออนไซยาไนด์ระบบสารละลายผสมระหว่าง H_2O:acetonitrile (50:50 v/v) ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 102

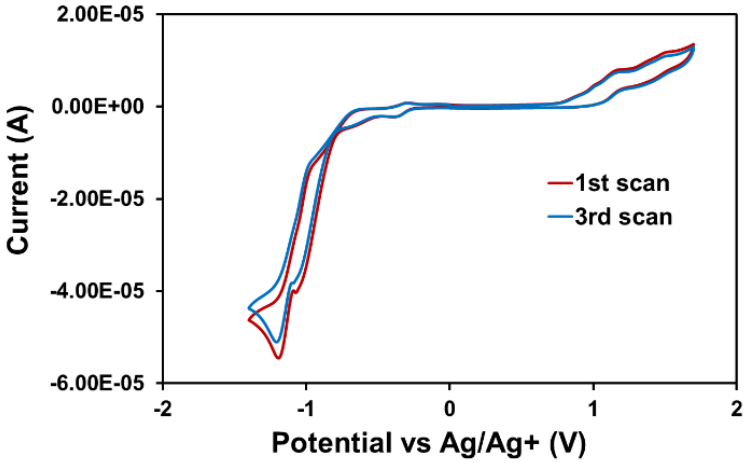


ภาพที่ 102 ความหนาแน่นของอิเล็กตรอนใน HOMO และ LUMO+1 ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** และสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** ที่เกิดปฏิกิริยากับไอออนไซยาไนด์

จากผลการทดลอง ดังภาพที่ 102 พบว่าระดับพลังงาน LUMO+1 ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** มีความหนาแน่นของอิเล็กตรอนจำนวนมากในตำแหน่งของหมู่แทนที่ isothiocyanate ซึ่งแสดงให้เห็นว่าหมู่แทนที่ดังกล่าวมีความเป็นอิเล็กโทรไฟล์ ดังนั้นไอออนไซยาไนด์ซึ่งเป็นนิวคลีโอไฟล์จึงสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** โดยการเกิดปฏิกิริยา nucleophilic addition ที่หมู่แทนที่นี้ทั้ง 2 หมู่ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** ได้อย่างเหมาะสมในสารละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ

3.8 ผลการทดสอบเพื่อศึกษาคุณสมบัติทางเคมีไฟฟ้าของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ด้วยวิธี cyclic voltammetry (electrochemical property)

การทดสอบเพื่อศึกษาคุณสมบัติทางเคมีไฟฟ้าของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** ศึกษาด้วยเทคนิค cyclic voltammetry โดยการวัดค่ากระแสไฟฟ้าของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ในระบบตัวทำละลาย CH_2Cl_2 ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 103



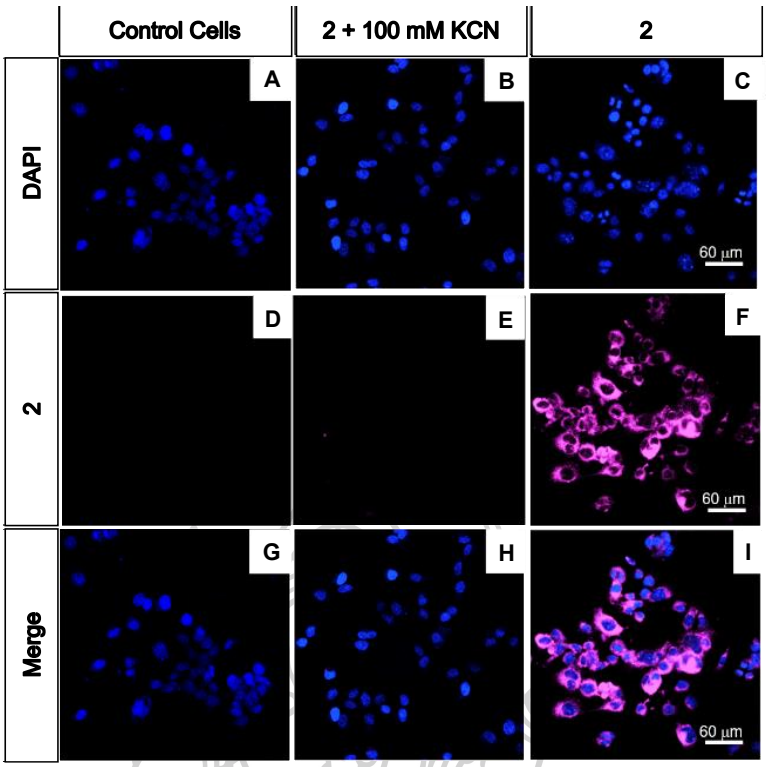
ภาพที่ 103 ไซคลิกโวลแทมโมแกรมของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ AzaBDP-NCS ในสารละลายไดคลอโรมีเทน

จากผลการทดลองภาพที่ 103 พบว่าสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ AzaBDP-NCS สามารถเกิดกระบวนการปฏิกิริยา oxidation และปฏิกิริยา reduction ไปมาได้หลายครั้ง แสดงให้เห็นว่าสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ AzaBDP-NCS เป็นโมเลกุลที่มีคุณสมบัติทางไฟฟ้าเคมีที่เสถียร

3.9 ผลการทดสอบเพื่อศึกษาการประยุกต์ใช้สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์สำหรับการตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ในตัวอย่างจริงทางระบบสิ่งมีชีวิต

3.9.1 ผลการศึกษาความสามารถการตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ภายในเซลล์สิ่งมีชีวิต

จากความสามารถการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ AzaBDP-NCS ที่ให้ค่าความว่องไวและความจำเพาะเจาะจงที่สูงต่อไอออนไซยาไนด์ จึงได้มีการนำสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ AzaBDP-NCS มาทดสอบประสิทธิภาพการตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ในตัวอย่างจริงทางระบบสิ่งมีชีวิต โดยทำการศึกษาในเซลล์ 4T1 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเต้มนมของมนุษย์ (human breast cancer cell) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเป็นเวลา 30 นาที ภายในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (phosphate-buffered saline) ใช้ไอออนไซยาไนด์ในรูปของเกลือโพแทสเซียมเพื่อติดตามสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ AzaBDP-NCS ผลการทดลองแสดงดังในภาพที่ 104

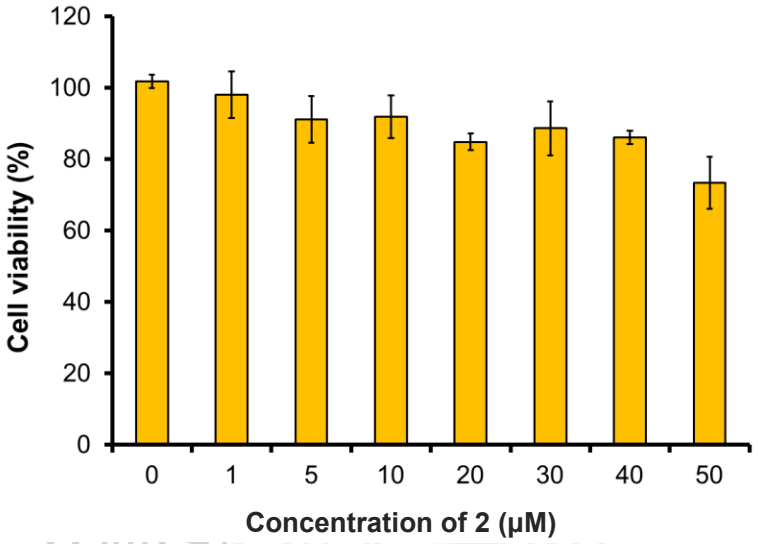


ภาพที่ 104 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ ภายในเซลล์ 4T1 ด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ AzaBDP-NCS (50 µM) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเป็นเวลา 30 นาที ภายในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (phosphate-buffered saline) กับไอออนไซยาไนด์ในรูปของเกลือโพแทสเซียมที่ความเข้มข้น 0 mM และ 100 mM

จากผลการทดลองการตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ AzaBDP-NCS ภายในเซลล์ 4T1 พบว่าเซลล์ที่มีการบ่มด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ AzaBDP-NCS จะแสดงการคายแสงฟลูออเรสเซนต์สีแดงออกมาดังภาพ 96F และเมื่อมีการเติมไอออนไซยาไนด์ที่ความเข้มข้น 100 mM จะส่งผลให้การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ลดลงดังภาพ 96E ซึ่งมีผลใกล้เคียงกับเซลล์ที่ไม่ได้การเติมสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ AzaBDP-NCS หรือไอออนไซยาไนด์ (control cell) ดังรูป 104A, 104D, 104G และเมื่อทำการ overlay ภาพเซลล์ที่มีการเติมสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ AzaBDP-NCS กับสีย้อม DAPI ซึ่งเป็นสีย้อมเซลล์มาตรฐาน ดังภาพ 104I พบว่าสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ AzaBDP-NCS สามารถเข้าไปอยู่ภายใน cytoplasm รอบๆ nucleus ของเซลล์ ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่าสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ AzaBDP-NCS สามารถนำมาประยุกต์ใช้สำหรับการตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ภายในเซลล์สิ่งมีชีวิตได้

3.9.2 ผลศึกษาความเป็นพิษของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต

จากความสามารถการตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** ภายในเซลล์สิ่งมีชีวิต 4T1 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมสำหรับการทดสอบความเป็นพิษของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ที่อาจส่งผลกระทบต่อเซลล์ 4T1 โดยการบ่มสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ภายในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (phosphate-buffered saline) เพื่อติดตามการมีชีวิตของเซลล์ (Cell viability) ผลการทดลองแสดงดังในภาพที่ 105



ภาพที่ 105 Cell viability values (%) เปรียบเทียบกับ ความเข้มข้นต่างๆ ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS**

จากผลการทดลองภาพที่ 105 พบว่าสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** ที่ความเข้มข้น 0-40 μM มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ (Cell viability) มากกว่า 90% และที่ความเข้มข้น 50 μM มีเปอร์เซ็นต์ Cell viability มากกว่า 70% แสดงให้เห็นว่าสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-NCS** มีความเป็นพิษต่อเซลล์ 4T1 น้อยมาก ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดไอออนไซยาไนด์ภายในเซลล์สิ่งมีชีวิตได้

4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการทำงานสำหรับตรวจวัดไอออนเหล็กของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 3 (Iheyamine 1-3)

เมื่อสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 3 (**Iheyamine 1-3**) ที่สังเคราะห์ได้ผ่านปฏิกิริยาเคมีได้รับการยืนยันโครงสร้างที่เคมีด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีต่างๆแล้วนั้น สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดใหม่ที่ได้จะถูกนำมาศึกษาคุณสมบัติทางแสงทั้งการดูดกลืนแสงและการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ เริ่มต้นโดยการตรวจสอบความสามารถในการดูดกลืนแสง (absorption) และ การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (emission) ในตัวทำละลายอินทรีย์ จากนั้นทำการหาตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์การดักจับไอออนเหล็กเฟอรัส (Fe^{2+}) และไอออนเหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ ขั้นตอนต่อมาคือ การศึกษาประสิทธิภาพในการทำงานเกี่ยวกับการตรวจวัดไอออนเหล็กด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี เพื่อทดสอบหาความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) ความจำเพาะเจาะจงกับไอออนเหล็ก (selectivity) ความสามารถในการตรวจวัดไอออนเหล็กในภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ (competitive) รวมทั้งการศึกษาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบไอออนเชิงซ้อน (Job's plot) ค่าความสามารถต่ำสุดในการตรวจวัดไอออนเหล็ก (detection limit) ค่าคงที่สมดุลของการเกิดสารประกอบไอออนเชิงซ้อน (Association constant; K_{assoc}) ตำแหน่งของการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์และไอออนเหล็กการคำนวณทางคอมพิวเตอร์ด้วยวิธี DFT calculation รวมถึงการประยุกต์ใช้สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์สำหรับการตรวจวัดไอออนเหล็กในตัวอย่างจริงทางระบบสิ่งมีชีวิต โดยค่าพารามิเตอร์ต่างๆ สำหรับการตรวจวัดไอออนเหล็กด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปีแสดงดังตารางที่ 3

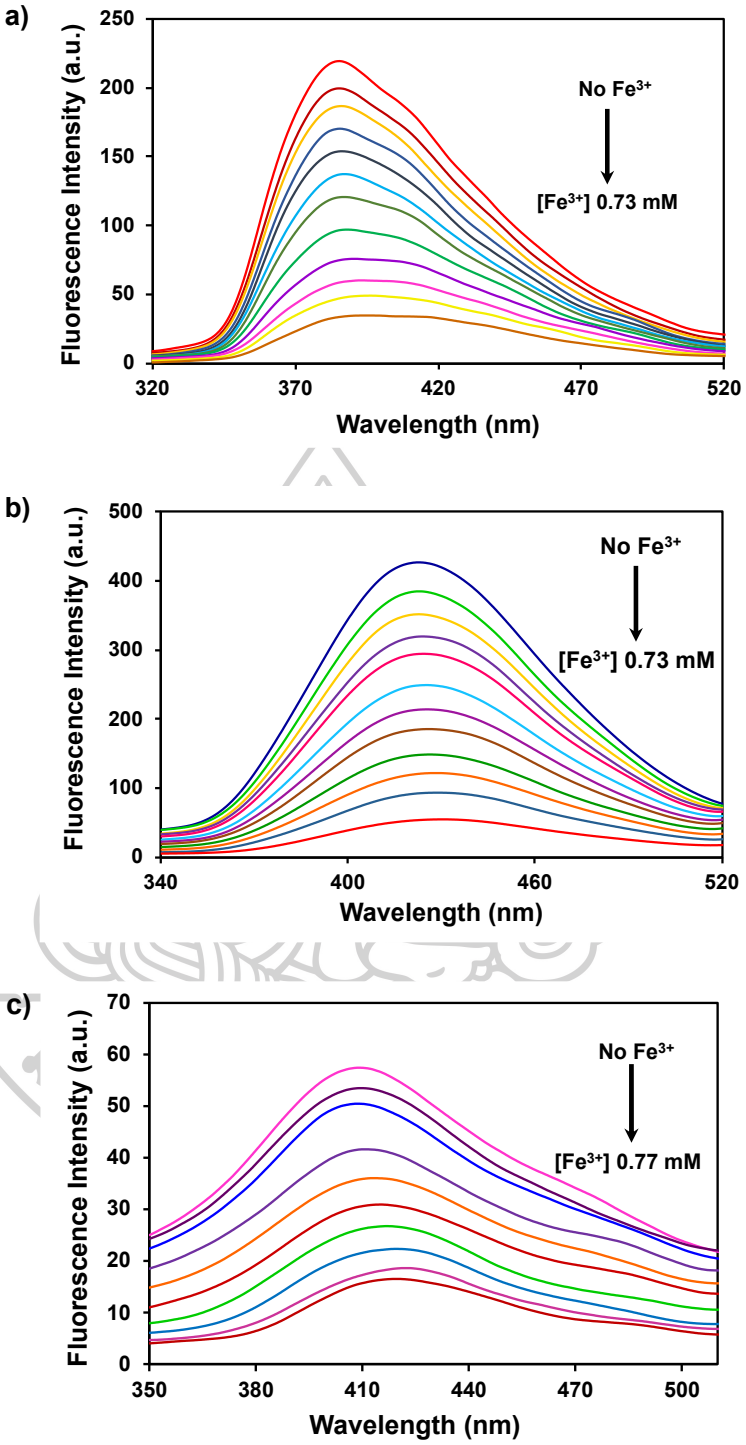
4.1 ผลการทดสอบความไว (sensitivity)

การทดสอบความไวของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3** สำหรับการตรวจวัดไอออนเหล็กด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีนั้น จะทำการศึกษาสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์โดยวิธีฟลูออเรสเซนต์สเปกโทสโกปีของสารละลาย **Iheyamine 1-3** ที่เปลี่ยนไป เมื่อมีการเติมไอออนเหล็กเพิ่มขึ้น โดยศึกษาในสารละลายผสมระหว่าง 5 mM HEPES (pH 7.2) : methanol (90:10 v/v) โดยติดตามสเปกตรัมของโดยติดตามสเปกตรัมของการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence emission spectra) ก่อนและหลังการเติมไอออนเหล็ก เมื่อทำการกระตุ้นที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 275 nm และใช้ไอออนเหล็กในรูปของเกลือคลอไรด์

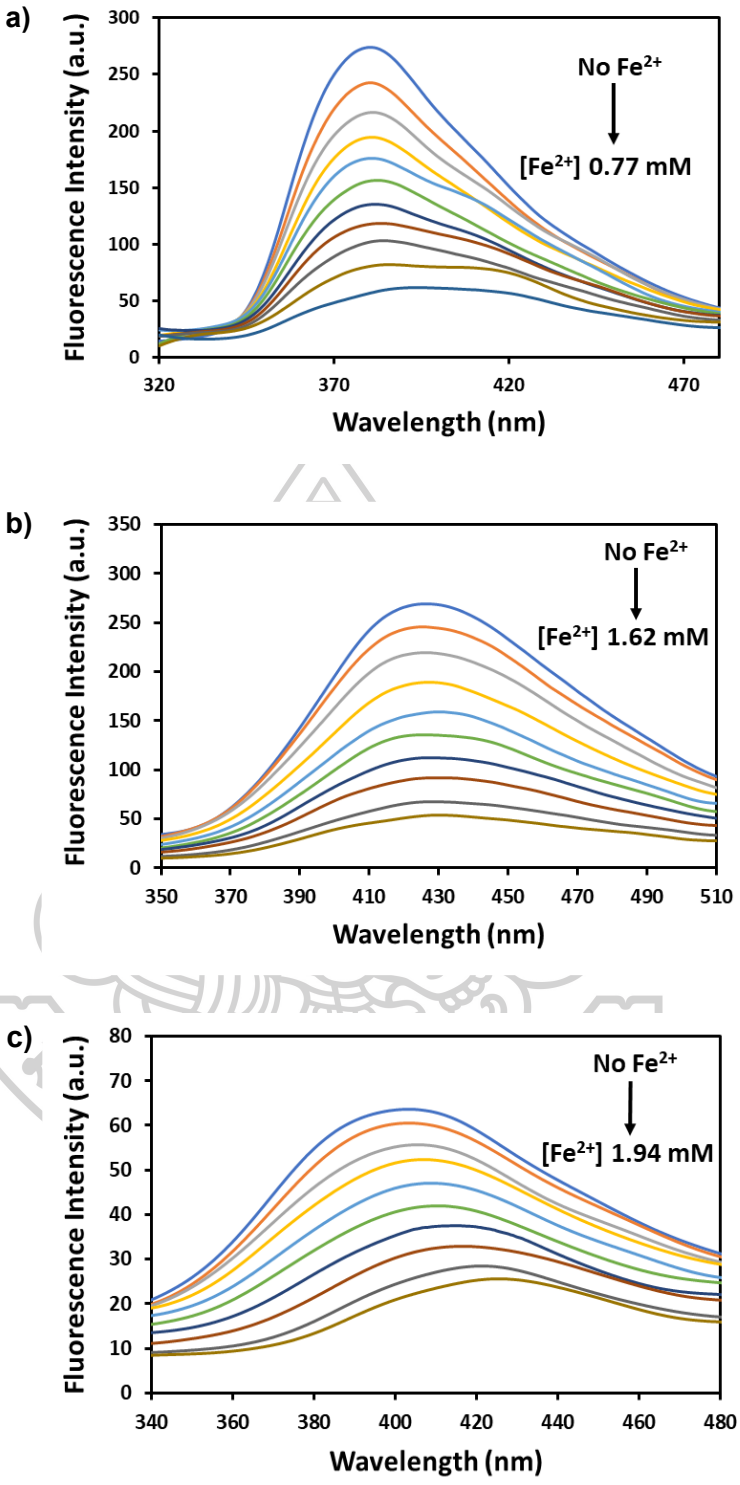
4.1.1 ผลการทดสอบความไวจากความสามารถการคายแสงฟลูออเรสเซนต์โดยวิธีฟลูออเรสเซนต์สเปกโทสโกปีของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ Iheyamine 1-3 ในสภาวะที่มีไอออนเหล็กในสารละลาย

ความสามารถการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3** ถูกศึกษาโดยเตรียมสารละลาย **Iheyamine 1-3** เข้มข้น 20.0 μM ในสารละลายผสมระหว่าง 5

mM HEPES (pH 7.2) : methanol (90:10 v/v) ใช้ไอออนเหล็กในรูปของเกลือคลอไรด์ และกำหนดค่าความยาวคลื่นกระตุ้น (excitation wavelength: λ_{ex}) เท่ากับ 275 nm เพื่อติดตามสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของ **Iheyamine 1-3** ผลการทดลองแสดงผลดังภาพที่ 106



ภาพที่ 106 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (λ_{ex} = 275 nm) ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1** (รูป a) **Iheyamine 2** (รูป b) **Iheyamine 3** (รูป c) ความเข้มข้น 20.0 μM ในสารละลายผสมระหว่าง 5 mM HEPES (pH 7.2) : methanol (90:10 v/v) ก่อนและหลังเติมไอออนเหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

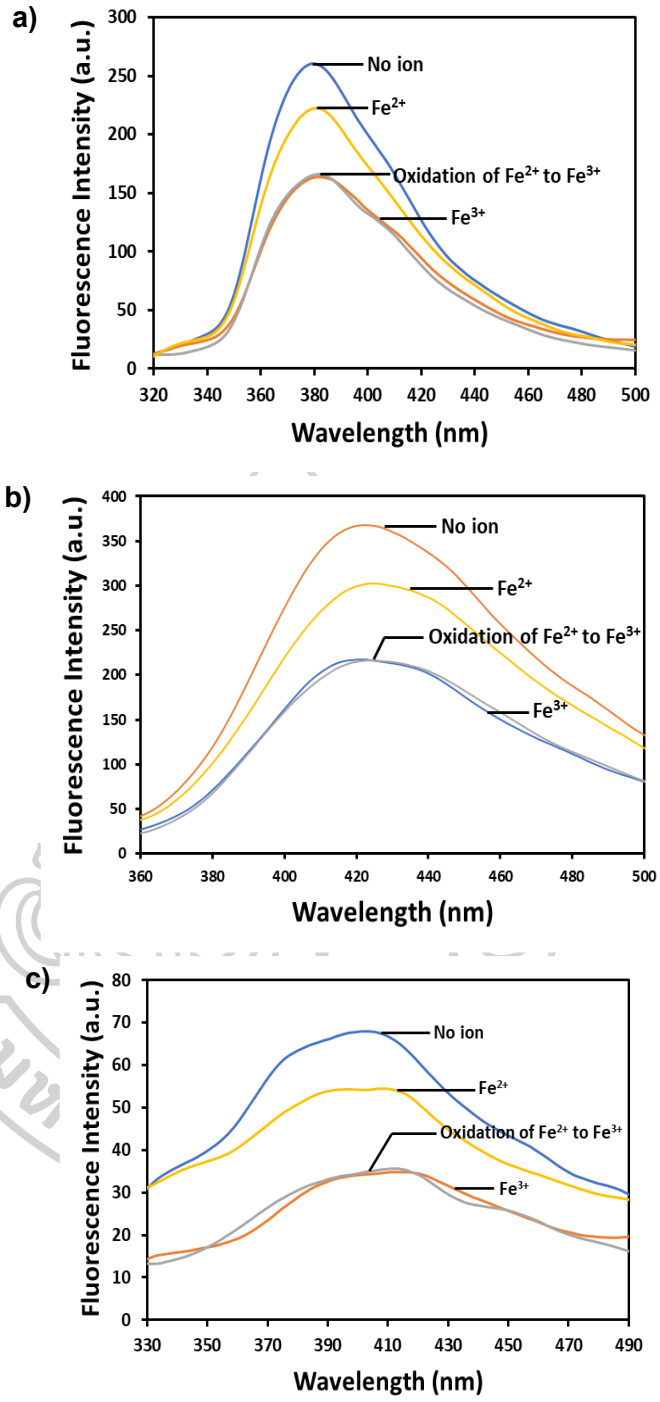


ภาพที่ 107 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (λ_{ex} = 275 nm) ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1** (รูป a) **Iheyamine 2** (รูป b) **Iheyamine 3** (รูป c) ความเข้มข้น 20.0 μM ในสารละลายผสมระหว่าง 5 mM HEPES (pH 7.2) : methanol (90:10 v/v) ก่อนและหลังเติมไอออนเหล็กเฟอรัส (Fe^{2+}) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

จากผลการทดลองภาพที่ 106 และ 107 พบว่าในสภาวะที่ไม่มีการเติมไอออนเหล็กเฟอรัส (Fe^{2+}) หรือไอออนเหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ Iheyamine ทั้ง 3 ชนิด (**Iheyamine 1-3**) จะแสดงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ในช่วงความยาวคลื่น 300-520 nm โดยมีความยาวคลื่นของการคายแสงฟลูออเรสเซนต์สูงสุด (λ_{em}) เท่ากับ 385 nm สำหรับ **Iheyamine 1** 420 nm สำหรับ **Iheyamine 2** และ 405 nm **Iheyamine 3** แต่เมื่อเติมไอออนเหล็กลงในสารละลาย ส่งผลให้ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3** มีค่าลดลงอย่างชัดเจน ในลักษณะแปรผกผันกับปริมาณไอออนเหล็กที่เพิ่มขึ้น สามารถวัดค่า quantum yield (Φ_f) ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ได้เท่ากับ 0.11 สำหรับ **Iheyamine 1** และ 0.12 สำหรับ **Iheyamine 2** ส่วน **Iheyamine 3** ไม่สามารถหาได้เนื่องจากมีความสามารถในการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ไม่สูงนัก (ใช้ cyclohexane เป็นสารอ้างอิง) ซึ่งเป็นลักษณะการทำงานแบบระบบเปิด-ปิด สัญญาณ (ON-OFF switch system) โดยการลดลงของสัญญาณฟลูออเรสเซ็นต์เกิดจากกระบวนการ the photo induced electron transfer (PET) เนื่องจากเมื่อสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3** เกิดการดักจับกับไอออนเหล็กในรูปของสารประกอบเชิงซ้อน ไอออนเหล็กสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนชั้นพลังงานกระตุ้นของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์มายังระดับชั้นพลังงานที่ว่างของไอออนเหล็กได้ จึงทำให้ไม่มีอิเล็กตรอนจากชั้นพลังงานกระตุ้นของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ตกกลับมายังระดับชั้นพลังงานสถานะพื้น ดังนั้นความสามารถการคายแสงของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์จึงลดลง และ/หรือไม่เกิดการคายแสงฟลูออเรสเซนต์

4.1.2 ผลการทดสอบความความสามารถในการตรวจวัดปริมาณไอออนเหล็กรวมของไอออนเหล็กเฟอรัส (Fe^{2+}) และไอออนเหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) โดยวิธีฟลูออเรสเซนต์สเปกโทสโกปีของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ Iheyamine 1-3

ความสามารถในการตรวจวัดปริมาณรวมของไอออนเหล็กเฟอรัส (Fe^{2+}) และไอออนเหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3** ถูกศึกษาโดยเตรียมสารละลาย **Iheyamine 1-3** เข้มข้น 20.0 μM ในสารละลายผสมระหว่าง 5 mM HEPES (pH 7.2) : methanol (90:10 v/v) ใช้ไอออนเหล็กในรูปของเกลือคลอไรด์ที่ความเข้มข้นเดียวกันทั้งไอออนเหล็กเฟอรัส (Fe^{2+}) ไอออนเหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) และไอออนเหล็กเฟอรัส (Fe^{2+}) ที่ผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (oxidation) และกำหนดค่าความยาวคลื่นกระตุ้น (excitation wavelength: λ_{ex}) เท่ากับ 275 nm เพื่อติดตามสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของ **Iheyamine 1-3** ผลการทดลองแสดงผลดังภาพที่ 108



ภาพที่ 108 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (λ_{ex} = 275 nm) ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1** (รูป a) **Iheyamine 2** (รูป b) **Iheyamine 3** (รูป c) ความเข้มข้น 20.0 μM ในสารละลายผสมระหว่าง 5 mM HEPES (pH 7.2) : methanol (90:10 v/v) ก่อนและหลังเติมไอออนเหล็กเฟอรัส (Fe^{2+}) ไอออนเหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) และไอออนเหล็กเฟอรัส (Fe^{2+}) ที่ผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (oxidation) ที่ความเข้มข้นเดียวกัน

จากผลการทดลอง (ภาพที่ 108) พบว่าในสภาวะที่ไม่มีการเติมไอออนเหล็กเฟอรัส (Fe^{2+}) หรือไอออนเหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine** ทั้ง 3 ชนิด (**Iheyamine 1-3**) จะแสดงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์อย่างชัดเจนที่ค่าหนึ่ง และเมื่อเติมไอออนเหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) ลงในสารละลาย ส่งผลให้ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3** มีค่าลดลงอย่างชัดเจน ในขณะเมื่อเติมไอออนเหล็กเฟอรัส (Fe^{2+}) ลงในสารละลาย จะส่งผลให้ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3** มีค่าลดลงไม่มากเมื่อเทียบกับการเติมไอออนเหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) ที่ความเข้มข้นเดียวกัน แต่เมื่อเติมสารละลายไอออนเหล็กเฟอรัส (Fe^{2+}) ที่ผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (oxidation) ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นไอออนเหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) พบว่าส่งผลให้ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3** มีค่าลดลงอย่างชัดเจนเท่ากับเมื่อเติมด้วยไอออนเหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3** สามารถวิเคราะห์ในการตรวจวัดปริมาณรวมของไอออนเหล็กได้จริง เพียงแค่ทำปฏิกิริยา oxidation ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพื่อเปลี่ยนไอออนเหล็กเฟอรัส (Fe^{2+}) เป็นไอออนเหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) ทั้งหมด

4.1.3 ผลการคำนวณหาค่าความสามารถต่ำสุดในการตรวจวัดไอออนเหล็กของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ Iheyamine 1-3 (detection limit)

การคำนวณค่าความสามารถต่ำสุดของการตรวจวัด (detection limit) ทำได้โดยสร้างกราความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่ 385 nm สำหรับ **Iheyamine 1** 420 nm สำหรับ **Iheyamine 2** 405 nm และ 405 nm **Iheyamine 3** (แกน Y) กับความเข้มข้นต่างๆ ของไอออนเหล็กที่เติมลงไป (แกน X) จากนั้นนำค่าความชันของกราฟ (slope) ที่ได้มาคำนวณตามสมการ (9)

$$\text{Blank-3SD} = \text{slope} \bullet [\text{Fe}] + c \qquad (10)$$

เมื่อกำหนดให้

Blank คือ ค่าความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์เมื่อไม่มีการเติมไอออนเหล็ก

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์เมื่อไม่มีการเติมไอออนเหล็ก

slope คือ ค่าความชันของกราฟ

[Fe] คือ ความเข้มข้นของไอออนเหล็กต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้

c คือ จุดตัดบนแกน y

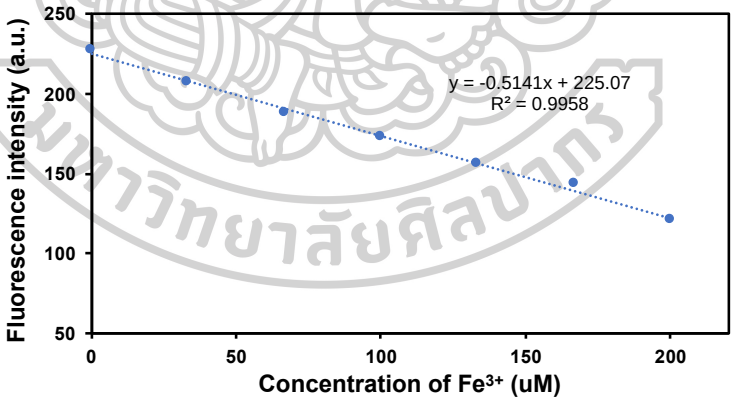
โดยจะแสดงวิธีการคำนวณของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1** สำหรับการตรวจวัดไอออนเหล็กเฟอรัส (Fe^{3+}) เป็นตัวอย่างเดียว เนื่องจากสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 2-3** มีวิธีการคำนวณในลักษณะเดียวกัน

ข้อมูลค่าความเข้มข้นของไอออนเหล็กที่เติม (μM) และความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ (λ_{ex} = 275 nm และ λ_{em} = 385 nm) สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1** สำหรับการคำนวณแสดงดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9

ค่าความเข้มข้นของไอออนเหล็กที่เติม (μM) และ ความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1**

$[Fe^{3+}]$, (μM)	0	33.33	66.67	100	133.33	166.67	200
Intensity, (a.u)	227.29	207.29	187.85	173.17	156.06	143.51	120.47



ภาพที่ 109 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไอออนเหล็กที่เติมกับความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1**

การคำนวณ

จากกราฟได้สมการเส้นตรงคือ y = -0.5141x + 225.07; R^2 = 0.9958

แทนค่าในสมการ (9) เมื่อ SD = 0.343 slope = -0.5141 Blank = 227.23 c = 225.07

$$\text{Blank-3SD} = \text{slope}\bullet[\text{Fe}] + c \qquad (9)$$

$$227.23\text{-}3(0.343) = -0.5141[\text{Fe}] + 225.07$$

$$[\text{Fe}] = (227.23\text{-}3(0.343))\text{-}225.07/\text{-}0.5141$$

ดังนั้น [Fe] = 2.19 μM หรือ 0.12 ppm

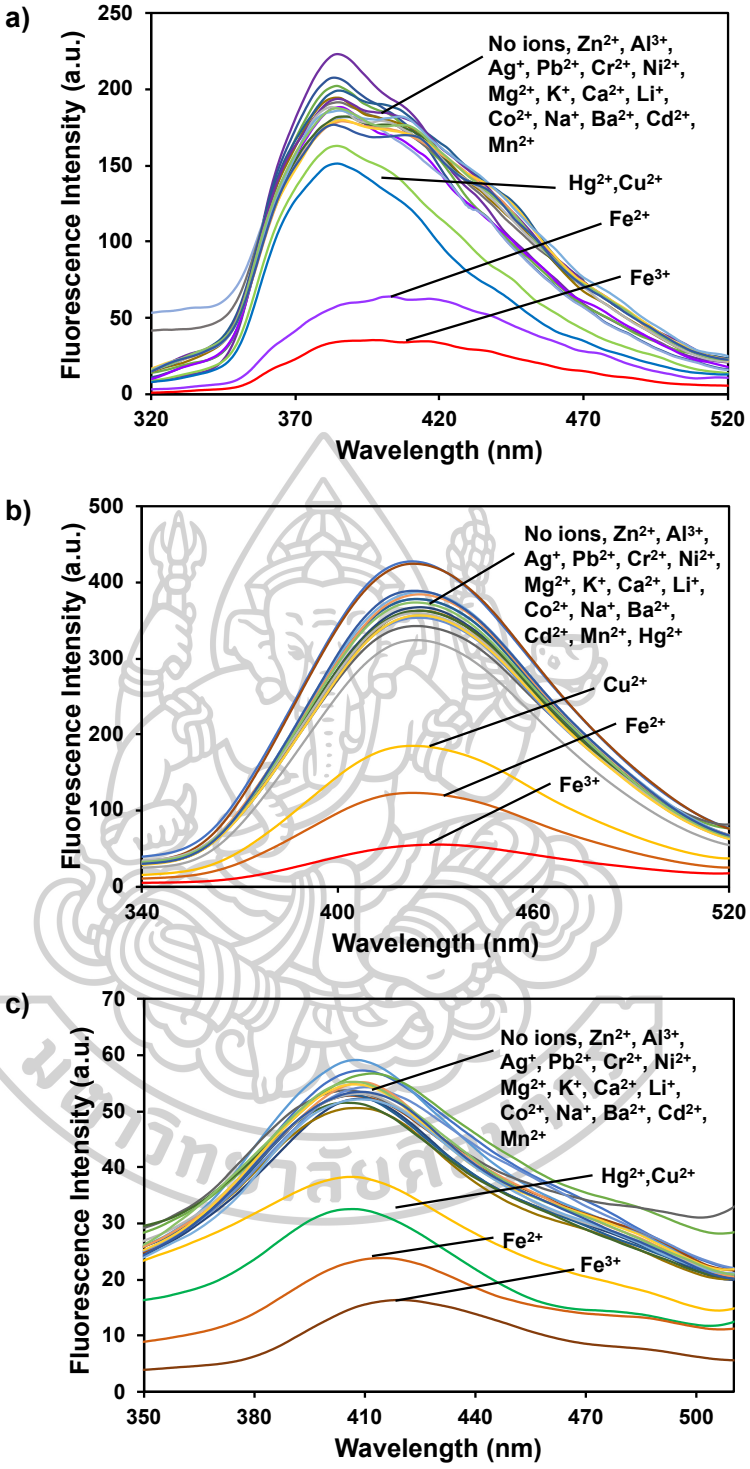
ดังนั้นจากการทดลองพบว่าค่า detection limit ในการตรวจจับไอออนเหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1** เท่ากับ 2.19 μM หรือ 0.12 ppm และจากคำนวณค่า detection limit ในทำนองเดียวกันพบว่าค่า detection limit ในการตรวจจับไอออนเหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 2** เท่ากับ 0.56 μM หรือ 0.03 ppm และ **Iheyamine 3** เท่ากับ 15.8 μM หรือ 0.88 ppm โดยค่าความสามารถต่ำสุดของการตรวจวัดของ **Iheyamine 1** และ **Iheyamine 2** พบว่ามีค่าต่ำกว่าค่ามาตรฐานของปริมาณไอออนเหล็กในน้ำดื่ม ซึ่งกำหนดโดย US Environmental Protection Agency (U.S. EPA) และ World Health Organization (WHO) มีค่าเท่ากับ 0.3 ppm [33, 35]

สำหรับการหาค่าความสามารถต่ำสุดของการตรวจวัดของ **Iheyamine 1-3** ในการตรวจจับไอออนเหล็กเฟอรัส (Fe^{2+}) สามารถคำนวณได้จากวิธีการเช่นเดียวกันโดยใช้สมการ (9) ซึ่งผลที่ได้พบว่าค่า detection limit **ของ Iheyamine 1** มีค่าเท่ากับ 21.4 μM หรือ 1.20 ppm **Iheyamine 2** มีค่าเท่ากับ 28.3 μM หรือ 1.58 ppm และ **Iheyamine 3** มีค่าเท่ากับ 85.1 μM หรือ 4.75 ppm

4.2 ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจง (selectivity)

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3** นั้น ได้ศึกษาด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปี โดยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์จากการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนเหล็กลงในสารละลายของ **Iheyamine 1-3** เปรียบเทียบกับสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้นจากการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนอื่นๆ แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ระหว่างการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนเหล็กและการไตเตรตด้วย

สารละลายไอออนรบกวนอื่นๆ โดยผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงถูกศึกษาจากความสามารถการคายแสงของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3** ในสารละลายผสมระหว่าง 5 mM HEPES (pH 7.2) : methanol (90:10 v/v) ในสภาวะที่มีไอออนเกลือคลอไรด์อื่นๆ ละลายอยู่ในน้ำ ได้แก่ ไอออนปรอท (Hg^{2+}) ไอออนซิลเวอร์ (Ag^{+}) ไอออนอะลูมิเนียม (Al^{3+}) ไอออนแบเรียม (Ba^{2+}) ไอออนแคลเซียม (Ca^{2+}) ไอออนแคดเมียม (Cd^{2+}) ไอออนทองแดง (Cu^{2+}) ไอออนเหล็ก (Fe^{2+} และ Fe^{3+}) ไอออนโคบอลต์ (Co^{2+}) ไอออนสังกะสี (Zn^{2+}) ไอออนโพแทสเซียม (K^{+}) ไอออนแมกนีเซียม (Mg^{2+}) ไอออนแมงกานีส (Mn^{2+}) ไอออนโซเดียม (Na^{+}) ไอออนลิเทียม (Li^{+}) ไอออนนิกเกิล (Ni^{2+}) ไอออนโครเมียม (Cr^{2+}) และไอออนตะกั่ว (Pb^{2+}) ผลการทดลองแสดงดังในภาพที่ 110



ภาพที่ 110 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1** (รูป a) **Iheyamine 2** (รูป b) **Iheyamine 3** (รูป c) (20.0 μM) ในสารละลายผสมระหว่าง 5 mM HEPES (pH 7.2) : methanol (90:10 v/v) ในสภาวะที่มีไอออนต่างๆได้แก่ Hg^{2+} Ag^{+} Al^{3+} Ba^{2+} Ca^{2+} Cd^{2+} Cu^{2+} Fe^{2+} Fe^{3+} Co^{2+} Zn^{2+} K^{+} Mg^{2+} Mn^{2+} Na^{+} Li^{+} Ni^{2+} Cr^{2+} และ Pb^{2+} ในสภาวะที่มีไอออนเกลือคลอไรด์ชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 0.7 mM

ผลการทดลองภาพที่ 110 พบว่าเมื่อมีการเติมไอออนเกลือคลอไรด์ที่ความเข้มข้นเดียวกัน สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3** จะแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ต่ำสุดเฉพาะที่มีการเติมไอออนเหล็กเฟอรัส (Fe^{2+}) หรือไอออนเหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) เท่านั้น ในขณะที่ไอออนชนิดอื่นๆ ไม่ส่งผลต่อการแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3** โดยจากการทดลองพบว่า **Iheyamine 1** มีความจำเพาะเจาะจงสูงกับไอออนเหล็กมากกว่าไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ในขณะที่ **Iheyamine 2** และ **Iheyamine 3** สามารถถูกรบกวนจากไอออนชนิดอื่นๆ ได้ เช่น ไอออนทองแดง (Cu^{2+}) และ ไอออนทองแดง (Cu^{2+}) หรือไอออนปรอท (Hg^{2+}) ตามลำดับ จากผลการทดลองทั้งหมดนี้จึงสรุปได้ว่าสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3** มีประสิทธิภาพในการตรวจวัดไอออนเหล็กอย่างมีความจำเพาะเจาะจง

4.3 ผลการทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนเหล็กในภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆปนอยู่ (competitive)

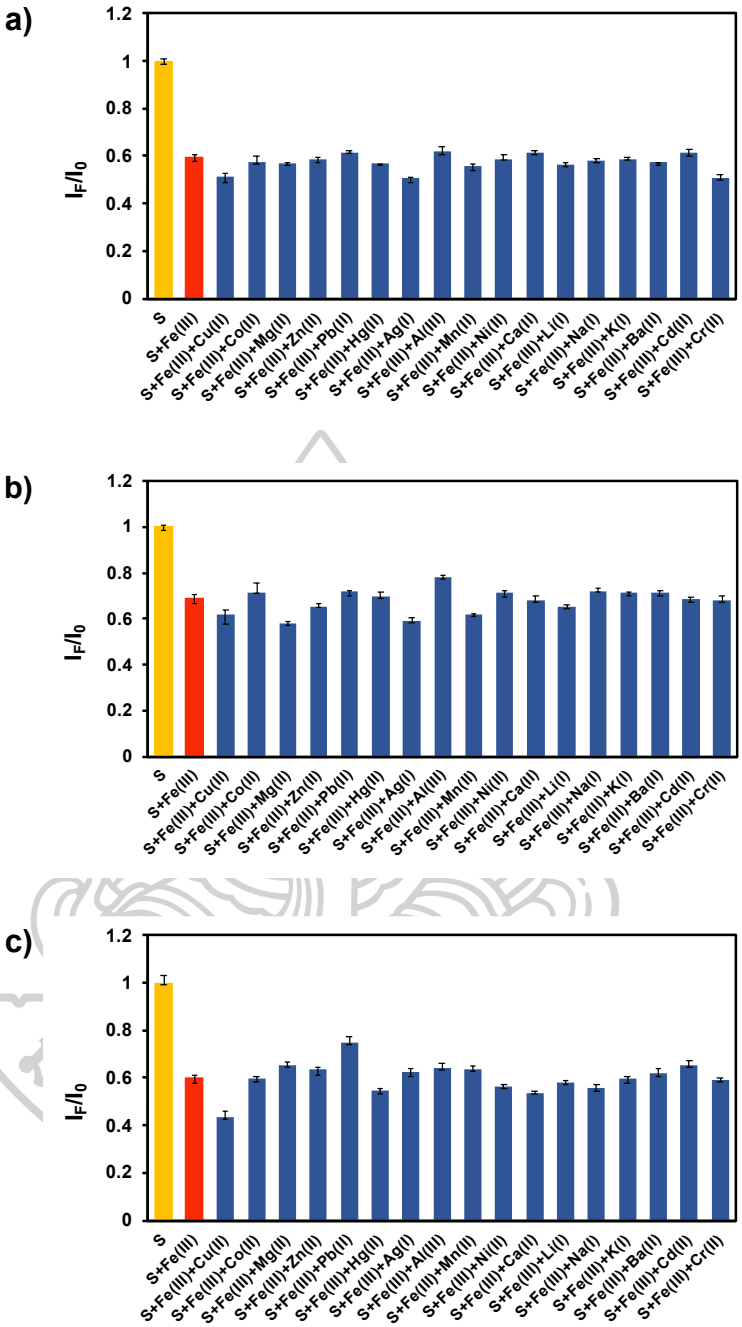
ผลการทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนเหล็กในภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ศึกษาจากความสามารถการคายแสงของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3** ในสารละลายผสมระหว่าง 5 mM HEPES (pH 7.2) : methanol (90:10 v/v) ในสภาวะที่มีไอออนเหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) หรือไอออนเหล็กเฟอรัส (Fe^{2+}) รวมกับไอออนรบกวนอื่นๆ ได้แก่ ไอออนปรอท (Hg^{2+}) ไอออนซิลเวอร์ (Ag^{+}) ไอออนอะลูมิเนียม (Al^{3+}) ไอออนแบเรียม (Ba^{2+}) ไอออนแคลเซียม (Ca^{2+}) ไอออนแคดเมียม (Cd^{2+}) ไอออนทองแดง (Cu^{2+}) ไอออนโคบอลต์ (Co^{2+}) ไอออนสังกะสี (Zn^{2+}) ไอออนโพแทสเซียม (K^{+}) ไอออนแมกนีเซียม (Mg^{2+}) ไอออนแมงกานีส (Mn^{2+}) ไอออนโซเดียม (Na^{+}) ไอออนลิเทียม (Li^{+}) ไอออนนิกเกิล (Ni^{2+}) ไอออนโครเมียม (Cr^{2+}) และไอออนตะกั่ว (Pb^{2+}) ในสารละลายที่มีความเข้มข้นของไอออนรบกวนชนิดอื่นๆปริมาณ 1 เท่าของความเข้มข้นของไอออนเหล็กเฟอริก โดยแสดงผลการทดลองในรูปกราฟความสัมพันธ์ความเข้มข้นแสงฟลูออเรสเซนต์ระหว่างค่า I_F/I_0 (แกน y) และชนิดของไอออนเกลือคลอไรด์ชนิดต่างๆ (แกน x)

เมื่อกำหนดให้

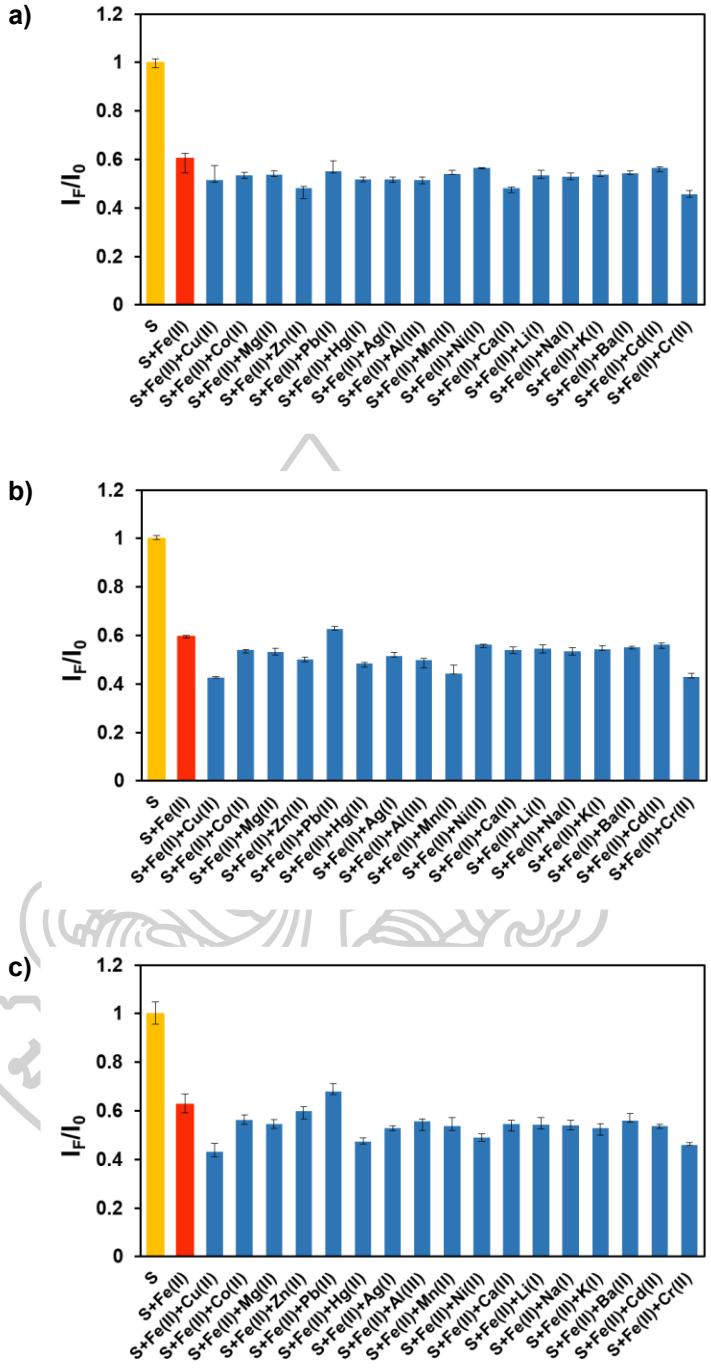
I_0 = Fluorescence Intensity ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3** ก่อนเติมไอออน

I_F = Fluorescence Intensity ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3** หลังเติมไอออน

ผลการทดลองแสดงดังในภาพที่ 111



ภาพที่ 111 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (λ_{ex} = 275 nm) ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1** (รูป a, λ_{em} = 385 nm) **Iheyamine 2** (รูป b, λ_{em} = 420 nm) **Iheyamine 3** (รูป c, λ_{em} = 405 nm) ความเข้มข้น 20.0 μM ในสารละลายผสมระหว่าง 5 mM HEPES (pH 7.2) : methanol (90:10 v/v) ในสภาวะที่มีไอออนรบกวนเข้มข้น 0.10 mM เจือปนในสารละลายที่มีไอออนไอออนเหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) เข้มข้น 0.10 mM



ภาพที่ 112 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (λ_{ex} = 275 nm) ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1** (รูป a, λ_{em} = 385 nm) **Iheyamine 2** (รูป b, λ_{em} = 420 nm) **Iheyamine 3** (รูป c, λ_{em} = 405 nm) ความเข้มข้น 20.0 μM ในสารละลายผสมระหว่าง 5 mM HEPES (pH 7.2) : methanol (90:10 v/v) ในสภาวะที่มีไอออนรบกวนเข้มข้น 0.10 mM เจือปนในสารละลายที่มีไอออนเหล็กเฟอรัส (Fe^{2+}) เข้มข้น 0.10 mM

ผลการทดลองภาพที่ 111 สังเกตได้ว่า เมื่อทำการเติมไอออนเหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) รวมกับไอออนรบกวนอื่นๆ ได้แก่ ไอออนปรอท (Hg^{2+}) ไอออนซิลเวอร์ (Ag^{+}) ไอออนอะลูมิเนียม (Al^{3+}) ไอออนแบเรียม (Ba^{2+}) ไอออนแคลเซียม (Ca^{2+}) ไอออนแคดเมียม (Cd^{2+}) ไอออนทองแดง (Cu^{2+}) ไอออนโคบอลต์ (Co^{2+}) ไอออนสังกะสี (Zn^{2+}) ไอออนโพแทสเซียม (K^{+}) ไอออนแมกนีเซียม (Mg^{2+}) ไอออนแมงกานีส (Mn^{2+}) ไอออนโซเดียม (Na^{+}) ไอออนลิเทียม (Li^{+}) ไอออนนิกเกิล (Ni^{2+}) ไอออนโครเมียม (Cr^{2+}) และไอออนตะกั่ว (Pb^{2+}) ที่ความเข้มข้น 1 เท่าของความเข้มข้นไอออนเหล็ก พบว่า **Iheyamine 1** มีความสามารถในดักจับกับไอออนเหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) อย่างจำเพาะเจาะจงสูงมากกว่าไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ โดยมีการเปลี่ยนแปลงน้อยกว่า ±10% ของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1** เมื่อเปรียบเทียบกับหลังการเติมไอออนเหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) เพียงชนิดเดียว ในขณะที่ **Iheyamine 2** และ **Iheyamine 3** สามารถถูกรบกวนจากไอออนชนิดอื่นๆได้ เช่น ไอออนทองแดง (Cu^{2+}) และ ไอออนปรอท (Hg^{2+}) ในทำนองเดียวกันการศึกษาความสามารถในการตรวจวัดไอออนเหล็กเฟอรัส (Fe^{2+}) ในภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ พบว่าจากภาพที่ 112 แสดงให้เห็นผลการทดลองที่ใกล้เคียง โดย **Iheyamine 1** มีความสามารถในดักจับกับไอออนเหล็กเฟอรัส (Fe^{2+}) อย่างจำเพาะเจาะจงสูงมากกว่าไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ โดยมีการเปลี่ยนแปลงน้อยกว่า ±10% ของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1** เมื่อเปรียบเทียบกับหลังการเติมไอออนเหล็กเฟอรัส (Fe^{2+}) เพียงชนิดเดียว ในขณะที่ **Iheyamine 2** และ **Iheyamine 3** สามารถถูกรบกวนจากไอออนชนิดอื่นๆได้ เช่น ไอออนทองแดง (Cu^{2+}) และไอออนปรอท (Hg^{2+}) นั่นแสดงให้เห็นว่าหากในระบบที่ตรวจวัดมีไอออนชนิดอื่นๆเจือปนประมาณ 1 เท่าของความเข้มข้นไอออนเหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3** ยังคงแสดงสัญญาณ ON-OFF fluorescence ได้อย่างถูกต้องและสามารถดักจับไอออนเหล็กอย่างจำเพาะเจาะจง

4.4 ผลการทดสอบเพื่อหาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์กับไอออนเหล็ก ด้วยวิธี Job's plot

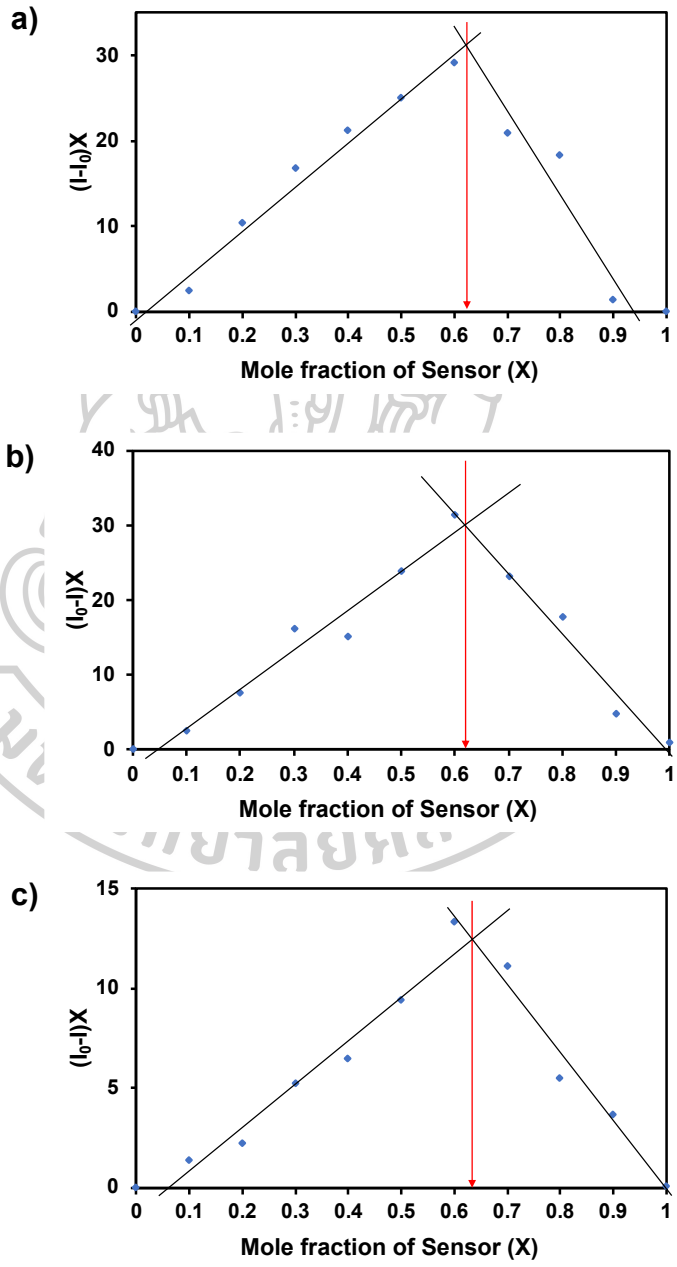
ผลการทดสอบเพื่อหาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโมเลกุลของของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3** กับไอออนเหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) ถูกศึกษาด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปี โดยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ในขณะก่อนเติมและหลังเติมสารละลายไอออนเหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) ที่อัตราส่วนโดยโมลต่างๆ ในระบบสารละลายผสมระหว่าง 5 mM HEPES (pH 7.2) : methanol (90:10 v/v) แล้วสร้างกราฟตามวิธี Job's plot ผลการทดลองแสดงดังในภาพที่ 113

เมื่อกำหนดให้

I_0 = Fluorescence Intensity ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3** ก่อนเติมไอออน

I_F = Fluorescence Intensity ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3** หลังเติมไอออน

X = อัตราส่วนโดยโมลต่างๆของ **Iheyamine 1-3**

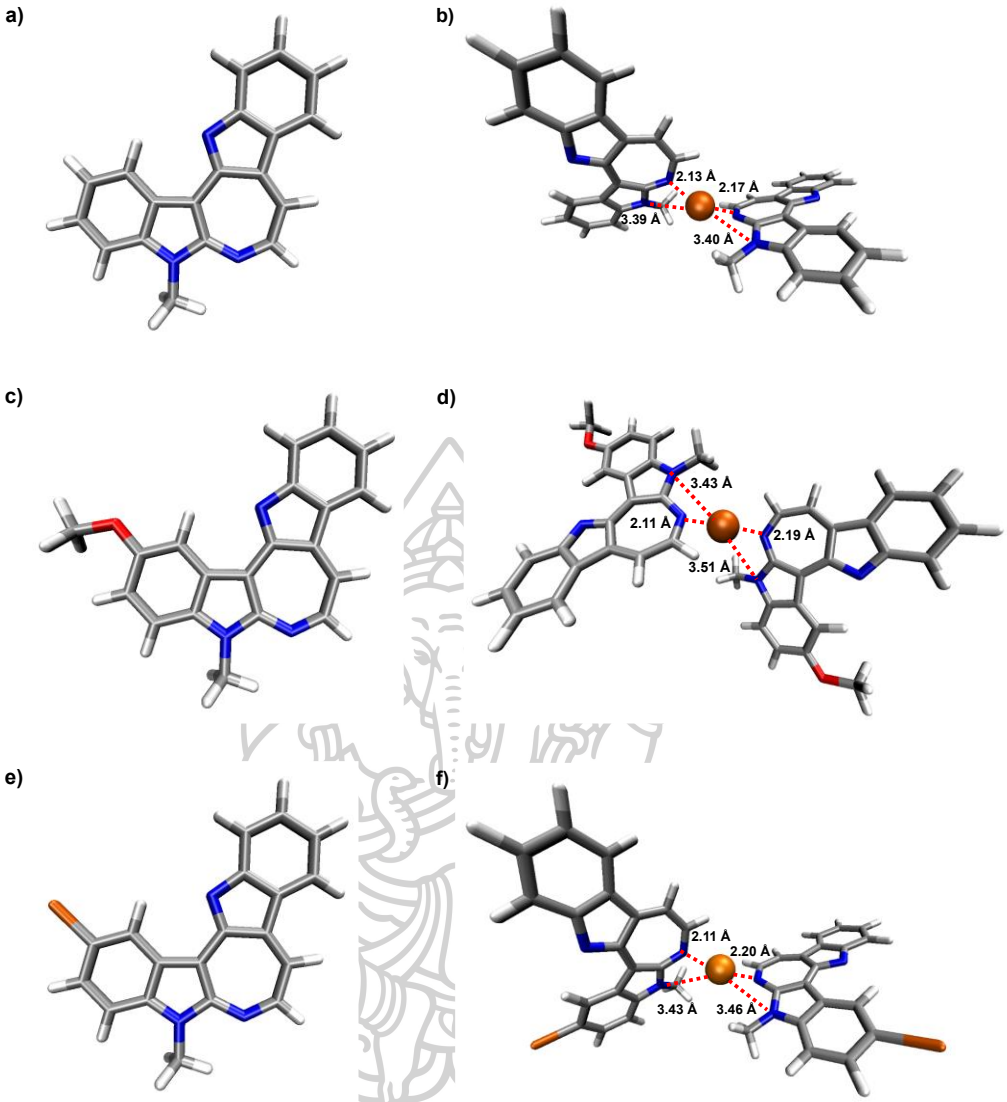


ภาพที่ 113 Job's plot ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1** (รูป a) **Iheyamine 2** (รูป b) **Iheyamine 3** (รูป c) กับไอออนเหล็กเฟอริก (Fe^{3+})

จากผลการทดลองตามวิธี Job's plot ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3** ดังภาพที่ 113 แสดงการเปลี่ยนแปลงสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนต์มากที่สุดที่ 0.65 ของอัตราส่วนโดยโมลของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3** แสดงให้เห็นว่าสาร **Iheyamine 1-3** กับไอออนเหล็กสามารถเกิดแรงกระทำระหว่างกันแบบ 2:1 ในสารละลายผสมระหว่าง 5 mM HEPES (pH 7.2) : methanol (90:10 v/v) แสดงให้เห็นว่าสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3** 2 โมเลกุลสามารถดักจับไอออนเหล็กได้ 1 โมเลกุล เนื่องจากการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของไอออนปรอทจะมีลักษณะรูปทรง tetrahedral ที่การสร้างพันธะระหว่าง ligand กับไอออนจำนวน 4 พันธะ ซึ่งจากโครงสร้างทางเคมีของ **Iheyamine 1-3** พบว่า 1 โมเลกุลของ **Iheyamine 1-3** ประกอบด้วยอะตอมไนโตรเจน 2 อะตอมที่สามารถเกิดแรงกระทำกับไอออนเหล็กได้ ดังนั้นการดักจับไอออนเหล็กของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3** จึงต้องใช้ **Iheyamine 1-3** จำนวน 2 โมเลกุลสำหรับการดักจับไอออนเหล็ก 1 โมเลกุล โดยการสร้างพันธะระหว่างอะตอมไนโตรเจนกับไอออนเหล็กจำนวน 4 พันธะในลักษณะรูปทรง tetrahedal ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีความเสถียรสำหรับสารประกอบเชิงซ้อนของไอออนเหล็ก โดยได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยการคำนวณทางคอมพิวเตอร์วิธี DFT calculation เพื่อศึกษาลักษณะการสร้างพันธะเคมีระหว่างสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์และไอออนเหล็ก ซึ่งผลการทดลองแสดงในหัวข้อ 4.5

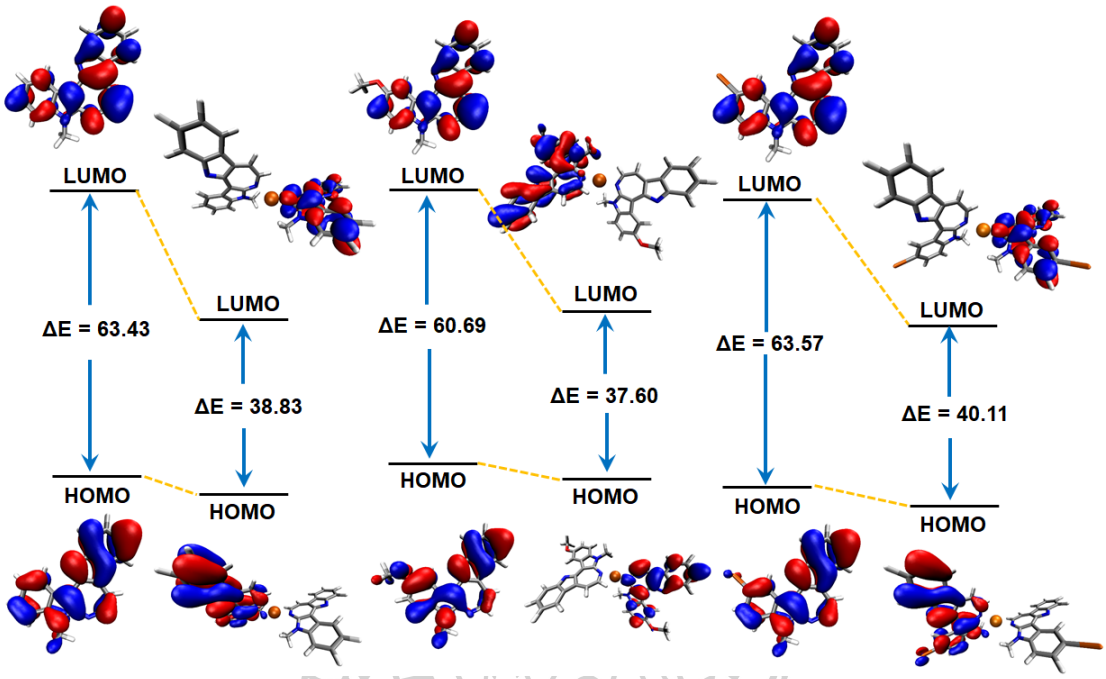
4.5 ผลการทดสอบเพื่อศึกษาลักษณะการดักจับไอออนเหล็กของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์โดยการคำนวณทางคอมพิวเตอร์ด้วยวิธี DFT calculation

ผลการทดสอบเพื่อศึกษาตำแหน่งและลักษณะของการสร้างพันธะเคมีระหว่างสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3** และไอออนเหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) ถูกศึกษาโดยการคำนวณทางคอมพิวเตอร์ด้วยวิธี DFT calculation โดยการใช้โปรแกรม Gaussian 09 บนระบบพื้นฐาน B3LYP/6-311G** ของโครงสร้างของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3** ก่อนและหลังการเกิดดักจับกับไอออนเหล็กระบบสารละลายผสมระหว่าง H_2O:methanol (90:10 v/v) ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 114



ภาพที่ 114 ลักษณะโครงสร้างของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ก่อนและหลังการดักจับกับไอออนเหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) **Iheyamine 1** (รูป a และ b) **Iheyamine 2** (รูป c และ d) **Iheyamine 3** (รูป e และ f) โดยใช้โปรแกรม Gaussian 09 บนระบบพื้นฐาน B3LYP/6-311G**

จากภาพที่ 114 พบว่าในการเกิดอันตรกิริยาระหว่างไอออนเหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) กับโมเลกุล **Iheyamine 1-3** จะเกิดพันธะโคออร์ดิเนตโคเวเลนต์ระหว่างอะตอมไนโตรเจน 4 อะตอมจาก 2 โมเลกุลของ **Iheyamine 1-3** ด้วยแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลแบบไอออนกับขั้ว (Ion-dipole interaction) โดยมีระยะห่างระหว่างอะตอมไนโตรเจนของกับไอออนเหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) เท่ากับ 2.13 Å 2.17 Å 3.39 Å และ 3.40 Å สำหรับสารประกอบเชิงซ้อน **Iheyamine 1-Fe^{3+}** 2.11 Å 2.19 Å 3.43 Å และ 3.51 Å สำหรับสารประกอบเชิงซ้อน **Iheyamine 2-Fe^{3+}** และ 2.11 Å 2.20 Å 3.43 Å และ 3.46 Å สำหรับสารประกอบเชิงซ้อน **Iheyamine 3-Fe^{3+}**



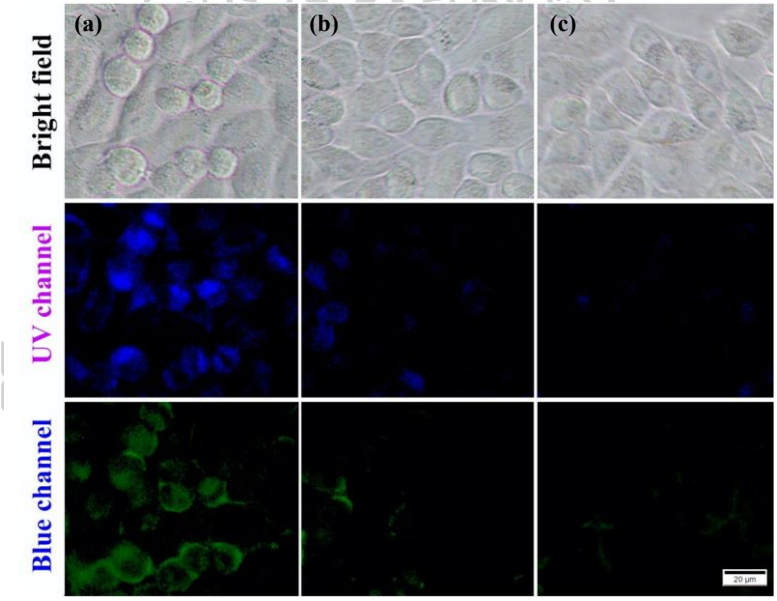
ภาพที่ 115 ความหนาแน่นของอิเล็กตรอนในระดับชั้นพลังงาน HOMO และ LUMO และช่องว่างระหว่างแถบพลังงาน (energy gaps; kcal/mol) ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3** ก่อนและหลังการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของไอออนเหล็กเฟอริก (Fe^{3+})

ผลการทดลองดังภาพที่ 115 แสดงความหนาแน่นของอิเล็กตรอนในระดับชั้นพลังงาน HOMO (highest occupied molecular orbital) และ LUMO (the lowest unoccupied molecular orbital) ของโครงสร้างสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1-3** โดยพบว่าความหนาแน่นของอิเล็กตรอนในระดับชั้นพลังงาน HOMO ของ **Iheyamine 2** มากที่สุดบริเวณของวง indole ซึ่งสามารถเคลื่อนที่มาจากหมู่แทนที่ methoxy ($-OCH_3$) ที่เป็นหมู่ให้อิเล็กตรอนบนวง indole จากเหตุผลนี้จึงทำให้ **Iheyamine 2** มีความสามารถในการดักจับไอออนเหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) ได้ดีกว่า สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1** ที่ไม่มีหมู่แทนที่บนวง indole อีกทั้งจากผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าช่องว่างระหว่างแถบพลังงาน (energy gaps; kcal/mol) ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 2** มีค่าน้อยที่สุดซึ่งสอดคล้องกับสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ที่พบในช่วงความยาวคลื่นที่ยาวกว่าสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 1** และ **Iheyamine 3**

4.6 ผลการทดสอบเพื่อศึกษาการประยุกต์ใช้สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์สำหรับการตรวจวัดไอออนเหล็กในตัวอย่างจริงทางระบบสิ่งมีชีวิต

4.6.1 ผลการศึกษาความสามารถการตรวจวัดไอออนเหล็กของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ภายในเซลล์สิ่งมีชีวิต

จากความสามารถการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 2** ที่ให้ค่าความว่องไวและความจำเพาะเจาะจงที่สูงต่อไอออนเหล็ก จึงได้มีการนำสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 2** มาทดสอบประสิทธิภาพการตรวจวัดไอออนเหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) ในตัวอย่างจริงทางระบบสิ่งมีชีวิต โดยทำการศึกษาในเซลล์ HeLa ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ (human cervical cancer cell) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเป็นเวลา 30 นาที ภายในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (phosphate-buffered saline) ใช้ไอออนเหล็กในรูปของเกลือคลอไรด์เพื่อติดตามสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 2** ผลการทดลองแสดงดังในภาพที่ 116



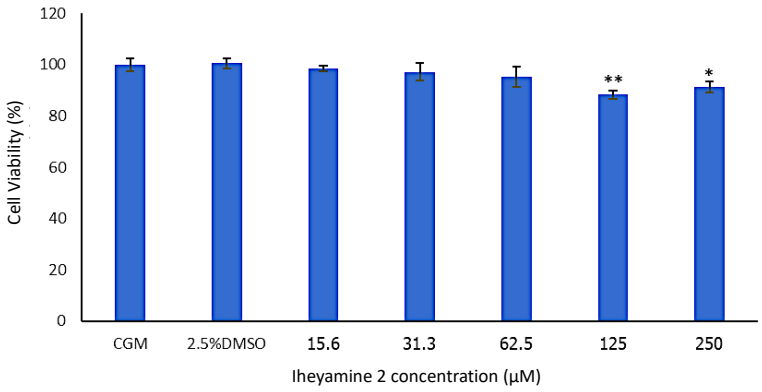
ภาพที่ 116 ภาพการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ภายในเซลล์ HeLa ด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 2** (125 μM) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเป็นเวลา 30 นาที ภายในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (phosphate-buffered saline) กับไอออนเหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) ในรูปของเกลือคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 50 μM และ 100 μM

จากผลการทดลองการตรวจวัดไอออนเหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 2** ภายในเซลล์ HeLa พบว่าเซลล์ที่มีการบ่มด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 2** จะแสดงการคายแสงฟลูออเรสเซนต์สีน้ำเงินเมื่อกระตุ้นด้วยแสงที่ความยาวคลื่นน้อยกว่า 405 nm และสีเขียวเมื่อเมื่อกระตุ้นด้วยแสงที่ความยาวคลื่น 490 nm และเมื่อมีการเติมไอออน

เหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) ที่ความเข้มข้น 50 μM และ 100 μM จะส่งผลให้การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ลดลงอย่างชัดเจนตามลำดับดังภาพ 116b และ 116c ซึ่งมีผลใกล้เคียงกับเซลล์ที่ไม่ได้การเติมสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 2** ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่าสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 2** สามารถนำมาประยุกต์ใช้สำหรับการตรวจวัดไอออนเหล็กภายในเซลล์สิ่งมีชีวิตได้

4.6.2 ผลศึกษาความเป็นพิษของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต

จากความสามารถการตรวจวัดไอออนเหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 2** ภายในเซลล์สิ่งมีชีวิต HeLa ได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมสำหรับการทดสอบความเป็นพิษของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ที่อาจส่งผลกระทบต่อเซลล์ HeLa โดยการบ่มสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 2** ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเป็นเวลา 30 นาที ภายในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (phosphate-buffered saline) เพื่อติดตามการมีชีวิตของเซลล์ (Cell viability) ผลการทดลองแสดงดังในภาพที่ 117



ภาพที่ 117 Cell viability values (%) เปรียบเทียบกับความเข้มข้นต่างๆ ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 2**

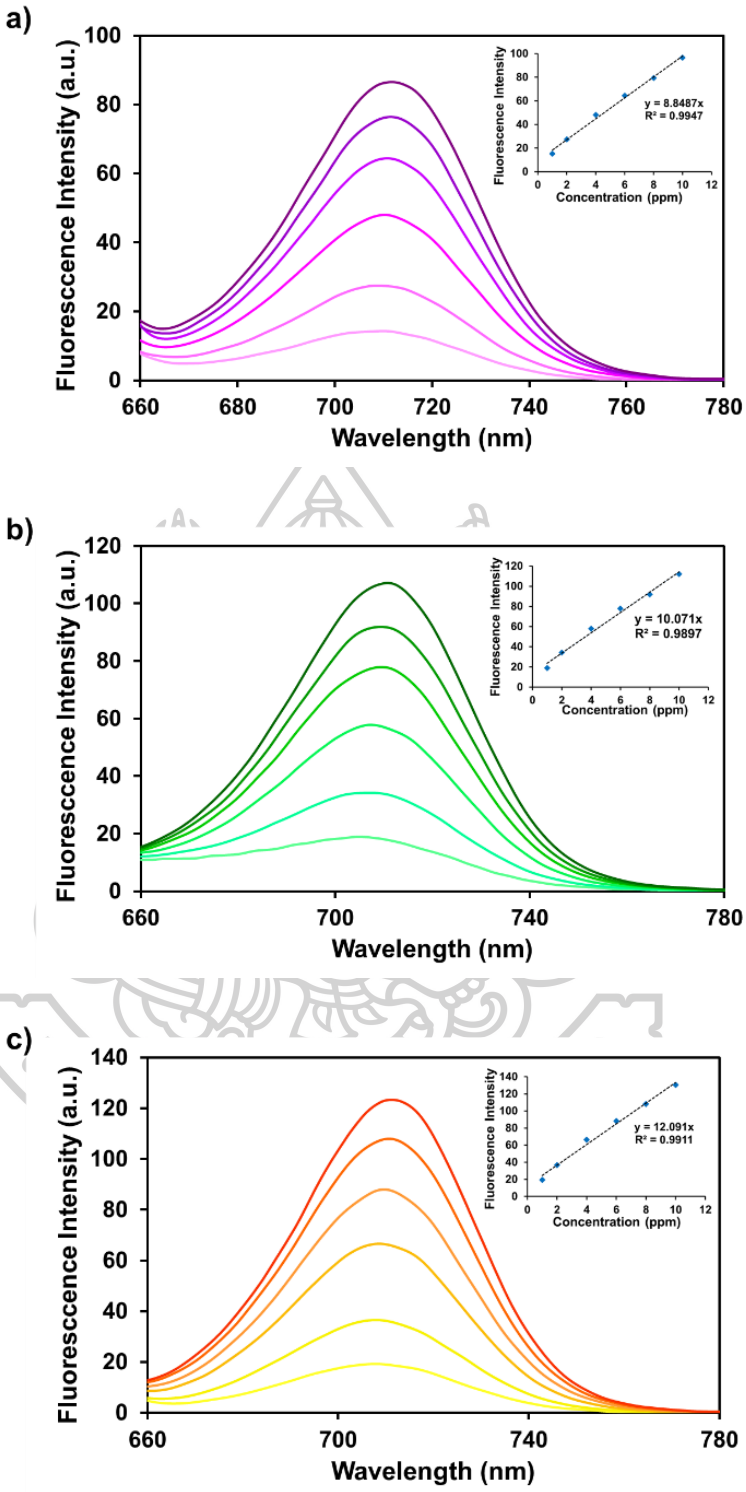
จากผลการทดลองดังภาพที่ 117 พบว่าสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 2** ที่ความเข้มข้น 0-62.5 μM มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ต่ำและไม่ส่งผลกระทบต่อการมีชีวิตของเซลล์ โดยมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ (Cell viability) ที่สูงใกล้เคียงเซลล์ที่ไม่ได้มีการบ่มด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ และที่ความเข้มข้นของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ 50 μM พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ Cell viability มากกว่า 90% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **Iheyamine 2** มีความเป็นพิษต่อเซลล์ HeLa น้อยมาก จึงเป็นสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดไอออนเหล็กภายในเซลล์สิ่งมีชีวิตได้

5 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการทำงานสำหรับการประยุกต์ใช้เป็นสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิงของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 4 (AzaBDP-C16)

เมื่อสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 4 ที่สังเคราะห์ได้ผ่านปฏิกิริยาเคมีได้รับการยืนยันโครงสร้างที่เคมีด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีต่างๆ แล้วนั้น สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดใหม่ที่ได้จะถูกนำมาศึกษาคุณสมบัติทางแสงในการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ จากนั้นจึงทำการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานสำหรับประยุกต์ใช้สารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิง โดยการทดสอบการตรวจวัดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารทำเครื่องหมายที่เหมาะสมในน้ำมันเชื้อเพลิง การทดสอบความคงตัวของสารทำเครื่องหมายในน้ำมันเชื้อเพลิง การทดสอบผลกระทบของสารทำเครื่องหมายต่อสมบัติทางกายภาพของน้ำมันเชื้อเพลิงที่มีสารทำเครื่องหมาย โดยค่าพารามิเตอร์ต่างๆ สำหรับศึกษาด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปีแสดงดังตารางที่ 4

5.1 ผลการทดสอบการตรวจวัดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารทำเครื่องหมายที่เหมาะสมในน้ำมันเชื้อเพลิง

การทดสอบการเรืองแสงของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-C16** สำหรับเป็นสารทำเครื่องหมายในน้ำมันเชื้อเพลิงด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีนั้น จะทำการศึกษาสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ โดยวิธีฟลูออเรสเซนต์สเปกโทสโกปีของสารละลาย **AzaBDP-C16** ในน้ำมันเชื้อเพลิง 3 ชนิด ได้แก่ น้ำมันดีเซล น้ำมันแก๊สโซฮอล์อี 10 ออกเทน 91 และน้ำมันแก๊สโซฮอล์อี 10 ออกเทน 95 ที่ความเข้มข้นต่างโดยใช้เครื่องสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ (spectrofluorometer) เพื่อสร้างเป็นกราฟสอบเทียบมาตรฐานการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-C16** สำหรับการตรวจวัดในน้ำมันเชื้อเพลิง ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 118

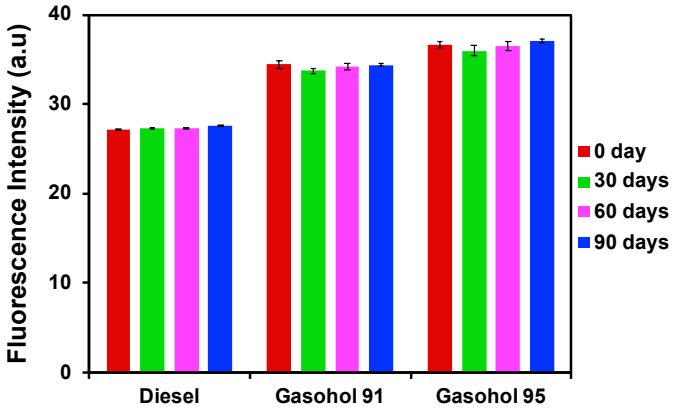


ภาพที่ 118 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (λ_{ex} = 650 nm) ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ AzaBDP-C16 และกราฟสอบเทียบมาตรฐาน ในน้ำมันดีเซล (รูป a) น้ำมันแก๊สโซฮอล์อี 10 ออกเทน 91 (รูป b) น้ำมันแก๊สโซฮอล์อี 10 ออกเทน 95 (รูป c) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

จากผลการทดลองภาพที่ 118 แสดงการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (λ_{ex} = 650 nm) ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-C16** ในน้ำมันดีเซล น้ำมันแก๊สโซฮอล์อี 10 ออกเทน 91 และน้ำมันแก๊สโซฮอล์อี 10 ออกเทน 95 ตามลำดับ โดยพบว่าสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-C16** สามารถแสดงการคายแสงได้ดีในน้ำมันเชื้อเพลิงซึ่งเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของสาร **AzaBDP-C16** ค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์มีค่าเพิ่มขึ้นในลักษณะแปรผันตรงด้วยเช่นกัน จึงสามารถนำค่าเหล่านี้มาสร้างกราฟสอบเทียบมาตรฐานการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสารทำเครื่องหมาย เมื่อกำหนดให้แกน Y แทนความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ 710 nm ส่วนแกน X แทน ความเข้มข้นต่างๆ ของสารทำเครื่องหมาย จากภาพที่ 110a กราฟมาตรฐานที่ได้มีความเป็นเส้นตรง มีค่า R^2 = 0.9947 ภาพที่ 110b กราฟมาตรฐานที่ได้มีความเป็นเส้นตรง มีค่า R^2 = 0.9897 และภาพที่ 110c กราฟมาตรฐานที่ได้มีความเป็นเส้นตรง มีค่า R^2 = 0.9911 แสดงให้เห็นว่าสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-C16** ที่สังเคราะห์ได้สามารถใช้เป็นสารทำเครื่องได้ในความเข้มข้น 1-10 ppm ในน้ำมันดีเซลน้ำมันแก๊สโซฮอล์อี 10 ออกเทน 91 และน้ำมันแก๊สโซฮอล์อี 10 ออกเทน 95 ตามลำดับ

5.2 ผลการทดสอบความคงตัวของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ในน้ำมันเชื้อเพลิง

การทดสอบความคงตัวของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-C16** ในน้ำมันเชื้อเพลิงถูกศึกษาโดยการวิเคราะห์ปริมาณของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-C16** ที่เติมลงไปในน้ำมันเชื้อเพลิงแต่ละชนิดทุกเดือนเป็นระยะเวลา 3 เดือน จากนั้นนำมาวัดค่าการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ แล้วเปรียบเทียบค่าการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ที่ได้กับกราฟสอบเทียบมาตรฐาน เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-C16** ที่มีในน้ำมันเชื้อเพลิง ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 119 และตารางที่ 10



ภาพที่ 119 ค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์ (λ_{ex} = 650 nm) ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-C16** ในน้ำมันดีเซล, น้ำมันแก๊สโซฮอล์อี 10 ออกเทน 91 และ น้ำมันแก๊สโซฮอล์อี 10 ออกเทน 95 ตลอดระยะเวลา 3 เดือน

ตารางที่ 10

ความคงตัวของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-C16** ในน้ำมันดีเซล น้ำมันแก๊สโซฮอล์อี 10 ออกเทน 91 และ น้ำมันแก๊สโซฮอล์อี 10 ออกเทน 95

เดือนที่	**ความเข้มข้นของสาร AzaBDP-C16 (ppm)[a]**		
	น้ำมันดีเซล	น้ำมันแก๊สโซฮอล์อี 10 ออกเทน 91	น้ำมันแก๊สโซฮอล์อี 10 ออกเทน 95
1	2.02 ± 0.004	2.02 ± 0.030	1.99 ± 0.010
2	2.02 ± 0.006	2.06 ± 0.030	2.01 ± 0.040
3	2.04 ± 0.006	2.08 ± 0.010	2.03 ± 0.030

[a]ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยนจากการวิเคราะห์ 3 ครั้ง

ผลการทดสอบดังภาพที่ 111 พบว่าค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-C16** ในน้ำมันแต่ละชนิดมีที่ใกล้เคียงกันตลอดระยะเวลา 3 เดือน รวมทั้งความคงตัวของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-C16** ในน้ำมันเชื้อเพลิงดังตารางที่ 10 แสดงให้เห็นปริมาณของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-C16** ที่วิเคราะห์ในน้ำมันดีเซล, น้ำมันแก๊สโซฮอล์อี 10 ออกเทน 91 และน้ำมันแก๊สโซฮอล์อี 10 ออกเทน 95 ไม่มีความแตกต่างภายในระยะเวลา 3

เดือน ซึ่งโดยทั่วไปแล้วน้ำมันเชื้อเพลิงแต่ละรุ่นที่ผลิตจะถูกจำหน่ายภายใน 3 เดือนนับจากวันที่ออกสู่ตลาด ดังนั้นสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-C16** นี้จึงมีความเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิงได้

5.3 ผลการทดสอบผลกระทบของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ต่อสมบัติทางกายภาพของน้ำมันเชื้อเพลิงที่มีสารทำเครื่องหมาย

การทดสอบผลกระทบของสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-C16** ในน้ำมันเชื้อเพลิงถูกศึกษาโดยการวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพของน้ำมันเชื้อเพลิงด้วยวิธีมาตรฐาน ASTM ซึ่งทำการเปรียบเทียบสมบัติทางกายภาพของน้ำมันเชื้อเพลิงที่มีการเติมสารทำเครื่องหมายกับน้ำมันเชื้อเพลิงที่ไม่มีการเติมสารทำเครื่องหมาย ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 11-13

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตารางที่ 11

สมบัติทางกายภาพของน้ำมันดีเซลที่มี[a] และไม่มีสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-C16**

สมบัติทางกายภาพ	วิธีการวิเคราะห์[b] (ASTM)	น้ำมันดีเซลที่ไม่มีสารทำเครื่องหมาย	น้ำมันดีเซลที่มีสารทำเครื่องหมาย
ค่าความถ่วง API @ 15.6 °C	D 4052	38.1	37.8
ค่าความถ่วงจำเพาะ @ 15.6/15.6 °C	D 4052	0.8342	0.8356
ดัชนีซีเทน	D 976	57.43	56.91
ความหนืด @ 40 °C (cSt)	D 445	3.296	3.258
จุดไหลเท (°C)	D 5950	0	3
จุดวาบไฟ (°C)	D 93	68.0	68.0
ปริมาณกำมะถัน (mg/kg)	D 2622	34.0	33.2
การกลั่น	D 86-12		
เริ่มเดือด (°C)		174.1	170.5
อุณหภูมิของส่วนที่กลั่นได้โดยปริมาตรในอัตราร้อยละ 10 (°C)		218.7	219.6
อุณหภูมิของส่วนที่กลั่นได้โดยปริมาตรในอัตราร้อยละ 50 (°C)		291.1	290.7
อุณหภูมิของส่วนที่กลั่นได้โดยปริมาตรในอัตราร้อยละ 90 (°C)		353.1	351.6
ความเข้มของสี	D 1500	L1.0	L1.0

[a]น้ำมันดีเซลถูกเติมสารทำเครื่องหมาย (2 ppm)

[b]American Society for Testing and Materials (ASTM)

ตารางที่ 12

สมบัติทางกายภาพของน้ำมันแก๊สโซฮอล์อี 10 ออกเทน 91 ที่มี[a] และไม่มีสารทำเครื่องหมาย

สมบัติทางกายภาพ	วิธีการวิเคราะห์[b] (ASTM)	น้ำมันแก๊สโซฮอล์ อี 10 ออกเทน 91 ที่ไม่มีสารทำเครื่องหมาย	น้ำมันแก๊สโซฮอล์ อี 10 ออกเทน 91 ที่มีสารทำเครื่องหมาย
ค่าความถ่วงจำเพาะ @ 15.6/15.6 °C	D 4052	0.7461	0.7483
ปริมาณกำมะถัน (mg/kg)	D 5453	19	19
การกลั่น			
เริ่มเดือด (°C)		34.3	37.9
การระเหยในอัตราร้อยละ 10 โดยปริมาตร (°C)		52.8	53.7
การระเหยในอัตราร้อยละ 50 โดยปริมาตร (°C)	D 86-16a	82.4	86.8
การระเหยในอัตราร้อยละ 90 โดยปริมาตร (°C)		152.0	151.4
จุดเดือดสุดท้าย (°C)		184.5	184.8
Recovery (% vol)		98.4	98.1
กากน้ำมัน (% vol)		1.0	1.0

[a]น้ำมันแก๊สโซฮอล์อี 10 ออกเทน 91 ถูกเติมสารทำเครื่องหมาย (2 ppm)

[b]American Society for Testing and Materials (ASTM)

ตารางที่ 13

สมบัติทางกายภาพของน้ำมันแก๊สโซฮอล์อี 10 ออกเทน 95 ที่มี[a] และไม่มีสารทำเครื่องหมาย

สมบัติทางกายภาพ	วิธีการวิเคราะห์[b] (ASTM)	น้ำมันแก๊สโซฮอล์ อี 10 ออกเทน 95 ที่ไม่มีสารทำเครื่องหมาย	น้ำมันแก๊สโซฮอล์ อี 10 ออกเทน 95 ที่มีสารทำเครื่องหมาย
ค่าความถ่วงจำเพาะ @ 15.6/15.6 °C	D 4052	0.7545	0.7565
ปริมาณกำมะถัน (mg/kg)	D 5453	13	14
การกลั่น	D 86		
เริ่มเดือด (°C)		34.9	35.0
การระเหยในอัตราร้อยละ 10 โดยปริมาตร (°C)		51.5	52.0
การระเหยในอัตราร้อยละ 50 โดยปริมาตร (°C)		81.3	84.8
การระเหยในอัตราร้อยละ 90 โดยปริมาตร (°C)		159.6	160.0
จุดเดือดสุดท้าย (°C)		186.6	188.3
Recovery (% vol)		98.0	98.0
กากน้ำมัน (% vol)		1.0	1.0

[a]น้ำมันแก๊สโซฮอล์อี 10 ออกเทน 95 ถูกเติมสารทำเครื่องหมาย (2 ppm)

[b]American Society for Testing and Materials (ASTM)

จากผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 11 พบว่าสมบัติทางกายภาพของน้ำมันดีเซลที่มีการเติมสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-C16** ไม่มีความแตกต่างที่เป็นนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันดีเซลที่ไม่มีสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-C16** โดยค่าต่างๆ เช่น ค่าความถ่วงจำเพาะ ค่าออกเทนจากการคำนวณ (calculated cetane index) ค่าความหนืดไคเมแมติก (kinematic viscosity) ค่าจุดไหลเท ค่าจุดวาบไฟ ค่าการกลั่น ปริมาณกำมะถัน และสีของน้ำมันดีเซลทั้งสองชนิดมีค่าที่ไม่แตกต่างกัน เช่นเดียวกันผลการทดลองการวิเคราะห์สมบัติทางกายของน้ำมันแก๊สโซฮอล์อี 10 ออกเทน 91 และน้ำมันแก๊สโซฮอล์อี 10 ออกเทน 95 ที่มีการเติมสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-C16** ดังตารางที่ 12 และ 13 ตามลำดับ พบว่าน้ำมันแก๊สโซฮอล์อี 10 ออกเทน 91 และน้ำมันแก๊สโซฮอล์อี 10 ออกเทน 95 ที่มีการเติมสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-C16** ไม่มีความแตกต่างที่เป็นนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันเชื้อเพลิงที่ไม่มีสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-C16** โดยค่าต่างๆ เช่น ค่าความถ่วงจำเพาะ ปริมาณกำมะถัน และค่าการกลั่น ของน้ำมันแก๊สโซฮอล์อี 10 ออกเทน 91 ทั้งสองชนิดมีค่าที่ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ **AzaBDP-C16** สามารถนำมาใช้เป็นสารทำเครื่องหมายในน้ำมันเชื้อเพลิงได้



บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

วิทยานิพนธ์นี้ได้ออกแบบและสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดใหม่ 4 ชนิดจากปฏิกิริยาเคมีที่ไม่ซับซ้อน มีเส้นทางการสังเคราะห์สั้น ใช้สารตั้งต้นที่มีราคาถูกและมีเปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์สูง ซึ่งทำให้สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์มีต้นทุนในการผลิตไม่สูงมากนัก โดยจากการศึกษาพบว่าสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดใหม่ทั้ง 4 ชนิด ประกอบด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ที่มีประสิทธิภาพการทำงานสำหรับเป็นเซ็นเซอร์ตรวจวัดไอออน 3 ชนิด และสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์สำหรับใช้เป็นสารทำเครื่องหมายน้ำมันเชื้อเพลิงได้เป็นอย่างดี

สำหรับสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ ชนิดที่ 1 (**T_{10}Rh**) ซึ่งประกอบด้วยไฮดราซีน ทำหน้าที่เป็นไอโอโนฟอร์ เชื่อมต่อกับส่วนของโรดามีนบี (rhodamine B) จำนวน 5 หมู่ทำหน้าที่เป็นฟลูออโรฟอร์ และถูกเชื่อมต่อลงบนพื้นผิวของ polyhedral oligomeric silsesquioxanes (POSS) หรือ cage-like silsesquioxanes (SQ) ซึ่งเป็นอนุภาคซิลิกาที่มีขนาดนาโนเมตร ประกอบด้วยใจกลางโมเลกุลที่เป็นสารอนินทรีย์ (Si-O) และ หมู่ฟังก์ชันที่เป็นสารอินทรีย์ โดยพบว่าเซ็นเซอร์ชนิดนี้มีความจำเพาะเจาะจงกับไอออนปรอทมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับไอออนรบกวนอื่นๆ ได้แก่ Cu^{2+} Ag^{+} Pb^{2+} Al^{3+} Cd^{2+} Mg^{2+} Ni^{2+} Fe^{2+} Co^{2+} Mn^{2+} Zn^{2+} Li^{+} Na^{+} Ba^{2+} Ca^{2+} และ K^{+} โดยแสดงการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนและการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายจากสารละลายไม่มีสีเป็นสีชมพูที่สังเกตได้ง่ายด้วยตาเปล่าเมื่อตรวจจับไอออนปรอท มีค่า detection limit ของการตรวจวัดเท่ากับ 0.63 ppb ซึ่งมีค่าต่ำกว่าค่ามาตรฐานของปริมาณไอออนปรอทในน้ำดื่มซึ่งกำหนดโดย United State Environmental Protection Agency (U.S. EPA) นอกจากนี้เซ็นเซอร์ชนิดนี้สามารถใช้ตรวจวัดปริมาณไอออนปรอทในตัวอย่างจริงได้แก่ น้ำแร่ น้ำดื่ม และครีมบำรุงผิวกายขาวได้

สำหรับสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 2 (**AzaBDP-NCS**) ประกอบด้วยหมู่ไอโซไทโอไซยาเนต (isothiocyanate) ซึ่งทำหน้าที่เป็นไอโอโนฟอร์ เชื่อมต่อกับเอซาโบดิปีซึ่งทำหน้าที่เป็นฟลูออโรฟอร์ โดยพบว่าเซ็นเซอร์ชนิดนี้มีความจำเพาะเจาะจงกับไอออนไซยาไนด์มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับไอออนรบกวนอื่นๆ ได้แก่ F^{-} Br^{-} I^{-} ClO_3^{-} CO_3^{2-} SO_4^{2-} HSO_4^{-} HPO_4^{-} CH_3COO^{-} NO_3^{-} Cl^{-} และ phenylalanine โดยแสดงการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ลดลงอย่างชัดเจนและการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายจากสารละลายสีเขียวเข้มเป็นสีเขียวจางลงภายใต้แสงธรรมชาติและสารละลายเรืองแสงสีแดงเป็นสารละลายที่ไม่มีการเรืองแสงภายใต้แสงยูวีซึ่งสังเกตได้ง่ายด้วยตาเปล่าเมื่อตรวจจับไอออนไซยาไนด์ มี detection limit ของการตรวจวัดเท่ากับ 19 ppb ซึ่งมีค่าต่ำกว่าค่ามาตรฐานของปริมาณไอออนไซยาไนด์ในน้ำดื่ม ซึ่งกำหนดโดย World Health

Organization (WHO) นอกจากนี้เซ็นเซอร์ชนิดนี้สามารถใช้ตรวจวัดปริมาณไอออนไซยาไนด์ในเซลล์สิ่งมีชีวิต 4T1 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ได้

สำหรับสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 3 (**Iheyamine 1-3**) เป็นสารประกอบ indole ที่มีโครงสร้างเลียนแบบสารประกอบทางธรรมชาติที่ประกอบด้วยอะตอมไนโตรเจน ซึ่งทำหน้าที่เป็นไอออโนฟอร์และส่วนของวงอะโรมาติกซึ่งทำหน้าที่เป็นฟลูออโรฟอร์ พบว่าเซ็นเซอร์ชนิดนี้มีความจำเพาะเจาะจงกับไอออนเหล็ก (Fe^{2+} และ Fe^{3+}) มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับไอออนรบกวนอื่นๆ ได้แก่ Hg^{2+} Ag^{+} Al^{3+} Ba^{2+} Ca^{2+} Cd^{2+} Cu^{2+} Fe^{2+} Fe^{3+} Co^{2+} Zn^{2+} K^{+} Mg^{2+} Mn^{2+} Na^{+} Li^{+} Ni^{2+} Cr^{2+} Pb^{2+} โดยแสดงการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ลดลงอย่างชัดเจนเมื่อตรวจจับไอออนเหล็ก มี detection limit ของการตรวจวัดในระดับ ppm ซึ่งมีค่าต่ำกว่าค่ามาตรฐานของปริมาณไอออนเหล็กในน้ำดื่ม ซึ่งกำหนดโดย World Health Organization (WHO) นอกจากนี้เซ็นเซอร์ชนิดนี้สามารถใช้ตรวจวัดปริมาณไอออนเหล็ก (Fe^{3+}) ในเซลล์สิ่งมีชีวิต HeLa ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ได้ โดยตารางสรุปผลการทำงานของเซ็นเซอร์ทั้ง 3 ชนิดแสดงได้ดังตารางที่ 14

สำหรับสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิดที่ 4 (**AzaBDP-C16**) ประกอบด้วยเอซา-โบดิบปีซึ่งทำหน้าที่ในการคายแสงฟลูออเรสเซนต์เชื่อมต่อกับสายโซ่ไฮโดรคาร์บอนเพื่อช่วยให้สามารถละลายได้ดีในน้ำมันเชื้อเพลิง โดยพบว่าสารทำเครื่องหมายนี้สามารถใช้ทำเครื่องหมายในน้ำมันเชื้อเพลิง ได้แก่ น้ำมันดีเซล น้ำมันแก๊สโซฮอล์อี 10 ออกเทน 91 และน้ำมันแก๊สโซฮอล์อี 10 ออกเทน 95 ที่ระดับความเข้มข้น 2 ppm โดยสามารถตรวจวัดได้ด้วยการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ซึ่งสามารถวิเคราะห์หาปริมาณสารทำเครื่องหมายได้ด้วยวิธีการทางสเปกโตรสโกปี มีความคงตัวในน้ำมันเชื้อเพลิงอย่างน้อย 3 เดือน และไม่ส่งผลกระทบต่อคุณสมบัติทางกายภาพของน้ำมันเชื้อเพลิงอีกด้วย

ตารางที่ 14 สรุปผลการทำงานของเซ็นเซอร์ชนิดใหม่ทั้ง 3 ชนิด

sensor	$T_{10}Rh$	AzaBDP-NCS	Iheyamine 1-3
Working system	H_2O : EtOH (10:90 v/v)	5 mM phosphate buffered saline(pH 7.2) : acetonitrile (50:50 v/v) + triton X 100	5 mM HEPES (pH 7.2) : methanol (90:10 v/v)
Ion selectivity	Hg^{2+}	CN^-	Fe^{3+} และ Fe^{2+}
λ_{ex} (nm)	520	680	275
λ_{em} (nm)	580	718	**Iheyamine 1** = 385 nm **Iheyamine 2** = 420 nm **Iheyamine 3** = 405 nm
Detection limit (ppb)	0.63 ppb	19 ppb	สำหรับ Fe^{3+} **Iheyamine 1** = 0.12 ppm **Iheyamine 2** = 0.03 ppm **Iheyamine 3** = 0.88 ppm สำหรับ Fe^{2+} **Iheyamine 1** = 1.20 ppm **Iheyamine 2** = 1.58 ppm **Iheyamine 3** = 4.75 ppm
K_{assoc}	6.03×10^{23} M^{-5}	1.03×10^{8} M^{-2}	-
quantum yield: Φ_f	0.17	-	**Iheyamine 1** = 0.11 **Iheyamine 2** = 0.12 **Iheyamine 3** = -
Ratio[sensor:ion]	1:5	1:2	2:1

ภาคผนวก



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-55B
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: Finnpipette, HH10711 ขนาด 1-10 µL
1.13 TLC Silica gel 60 F_{254} 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 Argon gas: Masser Specialty Gas Co., Ltd. (99.999 %)
2.3 Barium acetate: Sigma-Aldrich (99 %, M_W = 255.43 g/mol)
2.4 Barium chloride dehydrate: Sigma-Aldrich (M_w = 244.27 g/mol)
2.5 Barium perchlorate trihydrate: Strem chemical (99.9 %, M_w = 336.24 g/mol)
2.6 Cadmium acetate dehydrate: Fluka (98 %, M_W = 266.53 g/mol)
2.7 Anhydrous cadmium chloride: Fluka (M_w = 183.31 g/mol)
2.8 Cadmium perchlorate hexahydrate: Strem chemical (99 %, M_w = 311.30 g/mol)
2.9 Calcium chloride dehydrate: Carlo erba (M_w = 147.01 g/mol)
2.10 Calcium acetate: Fluka (M_W = 158.17 g/mol)
2.11 Calcium perchlorate tetrahydrate: Sigma-Aldrich (99 %, M_w = 311.04 g/mol)
2.12 Chloroform-*d* (contains 1% v/v of TMS): Sigma-Aldrich (99.8 atom %D)
2.13 Cobalt acetate tetrahydrate: Fluka (M_W = 249.08 g/mol)
2.14 Cobalt perchlorate hexahydrate: Sigma-Aldrich (M_w = 365.93 g/mol)
2.15 Copper acetate monohydrate: Fluka (M_W = 199.65 g/mol)
2.16 Copper perchlorate hexahydrate: Sigma-Aldrich (98 %, M_w = 370.54 g/mol)
2.17 Cupric chloride dehydrate: Fluka (M_w = 170.48 g/mol)
2.18 Cysteamine hydrochloride: Fluka (≥ 97.0 %, M_w = 113.61 g/mol)
2.19 De-ionized water: Departmentment of chemistry, Silpakorn University
2.20 1,4-Dibromobupane: Fluka (> 99%, d = 1.989 g/mL, M_w = 201.89 g/mol)
2.21 Dichloromethane (distillation)
2.22 Dichloromethane (for analysis): MERCK (99.8 %)
2.23 Dimethyl sulfoxide: Ridel-de-Haen (99.5 %, d = 1.10 g/mL, M_w = 78.13 g/mol)
2.24 Di-Potassium hydrogen Phosphate: Fluka (Mw = 174.2 g/mol)
2.25 Ethanol (distillation)
2.26 Ethanol (absolute for analysis): MERCK
2.27 Ethylacetate (distillation)
2.28 Anhydrous ferric chloride: Fluka (M_w = 162.21 g/mol)Hexane (distillation)
2.29 Fluorescein dibenzoate: Strem chemical (M_w = 726.36 g/mol)
2.30 Fluorescein standard: BDH (M_w = 332.31 g/mol)
2.31 Hydrazine hydrate (80 %, d = 1.03 g/mL, M_w = 50.06 g/mol)
2.32 Hydrochloric acid: J.T. Baker (37% , d = 1.18 g/mL, M_w = 36.46 g/mol)
2.33 Iron acetate: Fluka (M_W = 232.98 g/mol)
2.34 Iron perchlorate hydrate: Sigma-Aldrich (98 %, M_w = 354.20 g/mol)

2.35 Lead acetate: Carlo (M_W = 235.29 g/mol)
2.36 Lead chloride: Unilab (M_w = 278.10 g/mol)
2.37 Lead perchlorate hydrate: Sigma-Aldrich (98 %, M_w = 406.09 g/mol)
2.38 Anhydrous lithium chloride: Fluka (M_w = 42.39 g/mol)
2.39 Lithium perchlorate trihydrate: Strem chemical (99 %, M_w = 311.30 g/mol)
2.40 Magnesium perchlorate hydrate: Fluka (98 %, M_w = 223.21 g/mol)
2.41 Magnesium chloride hexahydrate: Fluka (M_w = 203.31 g/mol)
2.42 Manganese acetate tetrahydrate: Fluka (M_W = 245.09 g/mol)
2.43 Manganese chloride monohydrate: Sigma-Aldrich (M_w = 143.86 g/mol)
2.44 Manganese perchlorate hexahydrate: Strem chemical (99 %, M_w = 253.84 g/mol)
2.45 Mercuric acetate: Fluka (M_W = 318.68 g/mol)
2.46 Mercuric chloride: Carlo erba (M_w = 471.50 g/mol)
2.47 Mercuric perchlorate hydrate: Sigma-Aldrich (98 %, M_w = 372.06 g/mol)
2.48 Mercuric perchlorate trihydrate: Strem chemical (99+ %, M_w = 399.46 g/mol)
2.49 Methanesulfonylchloride: KANTO CHEMICAL (M_W = 114.56 g/mol)
2.50 Methanol (distillation)
2.51 Methanol (for analysis): MERCK (99.9 %)
2.52 Nickel acetate tetrahydrate: BDH (M_W = 248.84 g/mol)
2.53 Nickel chloride hexahydrate: Fluka (M_w = 237.71 g/mol)
2.54 Nickel perchlorate hexahydrate: Fluka (≥ 98.0 %, M_w = 365.69 g/mol)
2.55 Potassium acetate: Fluka (M_W = 98.14 g/mol)
2.56 Potassium bromide: Merck (Mw = 119.002 g/mol)
2.57 Potassium chlorate: Fluka (Mw = 122.55 g/mol)
2.58 Potassium chloride: Fluka (M_w = 74.55 g/mol)
2.59 Potassium perchlorate: Sigma-Aldrich (99+ %, M_w = 138.55 g/mol)
2.60 Potassium cyanide: KCN (Mw = 65.12 g/mol), Fluka
2.61 Potassium fluoride: Fluka (Mw = 58.0967 g/mol)
2.62 Potassium hydroxide: Fluka (Mw = 56.11 g/mol)
2.63 Potassium iodide: Ajax (Mw = 166.003 g/mol)
2.64 Potassium nitrate: Merck (Mw = 101.1032 g/mol)
2.65 Potassium sulfate: Merck (Mw = 174.259 g/mol)
2.1 Rhodamine B: Fluka (M_w = 479.02 g/mol)
2.2 Silica gel 60 (0.063-0.200 mm) สำหรับ column chromatography, Merck
2.3 Silica gel 60 F_{254} containing gypsum สำหรับ preparative thin layer chromatography, Merck

2.4 Silver acetate: BDH (M_W = 166.91 g/mol)
2.5 Silver perchlorate monohydrate: Strem chemical (99 %, M_w = 207.32 g/mol)
2.6 Sulfuric acid: LAB-SCAN (98% w/w, 1.84 g/mL, Mw = 98.08 g/mol)
2.7 Sodium acetate: Fluka (M_W = 82.03 g/mol)
2.8 Sodium bicarbonate: Sigma-Aldrich (M_w = 84.01 g/mol)
2.9 Sodium chloride (M_w = 58.5 g/mol)
2.10 Sodium hydroxide: Fluka (≥ 98.0 %, M_w = 40.00 g/mol)
2.11 Sodium methoxide: Fluka (≥ 98.0 %, M_w = 54.02 g/mol)
2.12 Sodium perchlorate: Fluka (98 %, M_w = 82.03 g/mol)
2.13 Sodium sulfate anhydrous: Sigma-Aldrich (99.0 %)
2.14 Tetrahydrofuran (Analytical reagent; A.R.): LAB-SCAN (99.8 %)
2.15 Triethanolamine: CARLO (M_W = 149.19 g/mol)
2.16 Triethylamine: Ridel-de-Haen (99 %, d = 0.73 g/mL, M_w = 101.19 g/mol)
2.17 Tris(hydroxymethyl)aminomethane buffer: Sigma-Aldrich (M_w = 121.41 g/mol)
2.18 Zinc acetate dehydrate: Fluka (M_W = 219.51 g/mol)
2.19 Zinc perchlorate hexahydrate: Sigma-Aldrich (M_w = 372.36 g/mol)

มหาวิทยาลัยศิลปากร

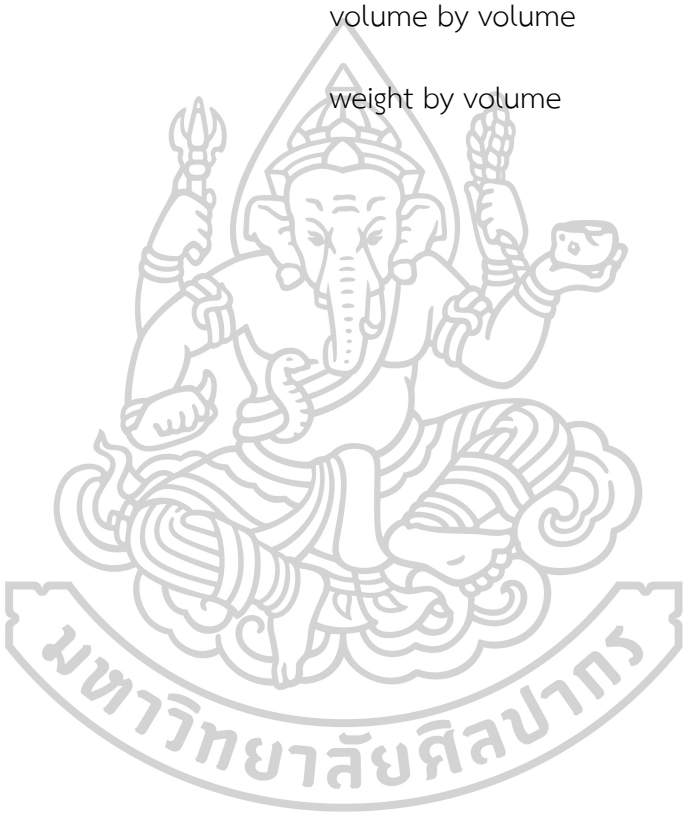
รายชื่ออักษรย่อ

คำย่อ	คำเต็ม
ϕ_f	fluorescence quantum yield
°C	degree Celsius
λ	Wavelength
µL	microlitter
µM	micromolar
AAS	atomic absorption spectrometry
anh.	Anhydrous
br	board (NMR spectroscopy)
CH_2Cl_2	dichloromethane
^{13}C NMR	carbon 13 nuclear magnetic resonance Spectroscopy
d	doublet (NMR spectroscopy)
dd	doublet of doublet (NMR spectroscopy)
DFT	density functional theory
DI	deionized
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNP	double numerical polarization

EAP	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
^{1}H 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	mill 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	Retention factor
s	singlet (NMR spectroscopy)
t	triplet (NMR spectroscopy)
THF	tetrahydrofuran
v/v	volume by volume
w/v	weight by volume



ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์



งานวิจัยเรื่องที่ 1

Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 356 (2018) 248–255

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry

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

Cage-like silsesequioxanes bearing rhodamines as fluorescence Hg^{2+} sensors

Rungthip Kunthom[a], Pornthip Piyanuch[b], Nantanit Wanichacheva[b,*], Vuthichai Ervithayasuporn[a,*]

[a] Department of Chemistry, Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), and Center for Inorganic and Materials Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, 272 RAMA VI Road, Ratchathewi District, Bangkok 10400, Thailand
[b] Department of Chemistry, Faculty of Science, Silpakorn University, Nakorn Pathom 73000, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:
Received 23 October 2017
Received in revised form 18 December 2017
Accepted 24 December 2017
Available online 26 December 2017

Keywords:
Colorimetric sensor
Fluorescence sensor
Mercury
POSS
Silica
Silsesquioxane

ABSTRACT

Polyhedral oligomeric silsesquioxane (POSS) was ultilized as a core and functionalized with the rhodamine hydrazide receptors for incresing the sensitivity of Hg^{2+} sensing. The POSS sensor (**T_{10}Rh**) was synthesised, and its sensing behaviors toward metal ions were investigated by UV/Vis and fluorescence spectroscopy. The sensor provided chromogenic and fluorogenic changes upon Hg^{2+} detection as well as served as a "naked-eye" indicator by a noticeable color change of the aqueous solutions (from colorless to pink-red color). The selective binding resulted in the change in the structures from the spirolactams (non-fluorescent forms) to the non-cyclic forms (fluorescent forms) of **T_{10}Rh** as indicated by the OFF-ON fluorescence signal upon Hg^{2+} binding and was shown to discriminate Cu^{2+}, Ag^{+}, Pb^{2+}, Al^{3+}, Cd^{2+}, Mg^{2+}, Ni^{2+}, Fe^{2+}, Co^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, Li^{+}, Na^{+}, Ba^{2+}, Ca^{2+} and K^{+}, with ultra detection limit of 0.63 ppb which was lower than drinking water permission concentrations by the United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA) and World Health Organization (WHO).

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Over the past decades, toxic heavy metal ion contamination has an enormous influence on the environment, human health and other living species upon exposure even at low concentrations. Mercury has been considered as one of the most hazardous heavy metal [1–3]. The accumulation of mercury in humans can lead to the permanent damage of tissues, DNA, and central nervous system as well as Minamata disease [3]. Accordingly, monitoring of Hg^{2+} concentrations in biological and environmental samples is a field of prime importance.

Fluorescence chemosensors can provide rapid and prompt detections as well as real time tracking of several analytes including cations [4–6], anions [7,8], and small molecules [9–11]. Rhodamine B fluorophore have been intensively used as fluorescence chemosensors for mercury ions detections. However, many of them have drawbacks in terms of selectivity, sensitivity, high detection limits or they could not operate in aqueous solutions due to high hydrophobicity of the rhodamine [12–14]. Nevertheless, the utilization of the configurational change from rhodamine B spirolactam (non-fluorescence) to the ring opened amide (fluorescence) process upon ion binding could provide valuable information, and could be observed as both "turn-on" fluorescence emission and visually colorimetric change.

Recently, organic-inorganic hybrid materials can be used as a colorimetric sensor for Hg^{2+} preliminary screening in aqueous samples such as organosilicate and nanoparticles [15–19]. However, incorporation of the sensing molecules, which contained rhodamine B hydrazide, on the surface of silica support, resulted in limited sensitivity due to the surface area dependent effect for metal ion detection. Alternatively, immobilization of the rhodamine-based receptor (RB-Si) on the high surface area and large open pores of flexible fibrous silica spheres could significantly improve the Hg^{2+} detection sensitivity [20]. Potentially, these types of chemical sensors may allow a real-time measurement of metal ion in various applications (e.g. medicine and environment).

Meanwhile, polyhedral oligomeric silsesquioxanes (POSS) or cage-like silsesquioxanes (SQ) are well known as the smallest nanosilica in a cage-like hybrid framework, consisting of inorganic (Si-O) core and reactive organic functional groups [21–24]. Moreover, their organic substituents on POSS can be further modified by conventional organic reactions [25–27]. The formation of POSS can be directly prepared through the hydrolytic

* Corresponding authors.
E-mail addresses: wanichacheva_n@su.ac.th (N. Wanichacheva), vuthichai.erv@mahidol.ac.th (V. Ervithayasuporn).

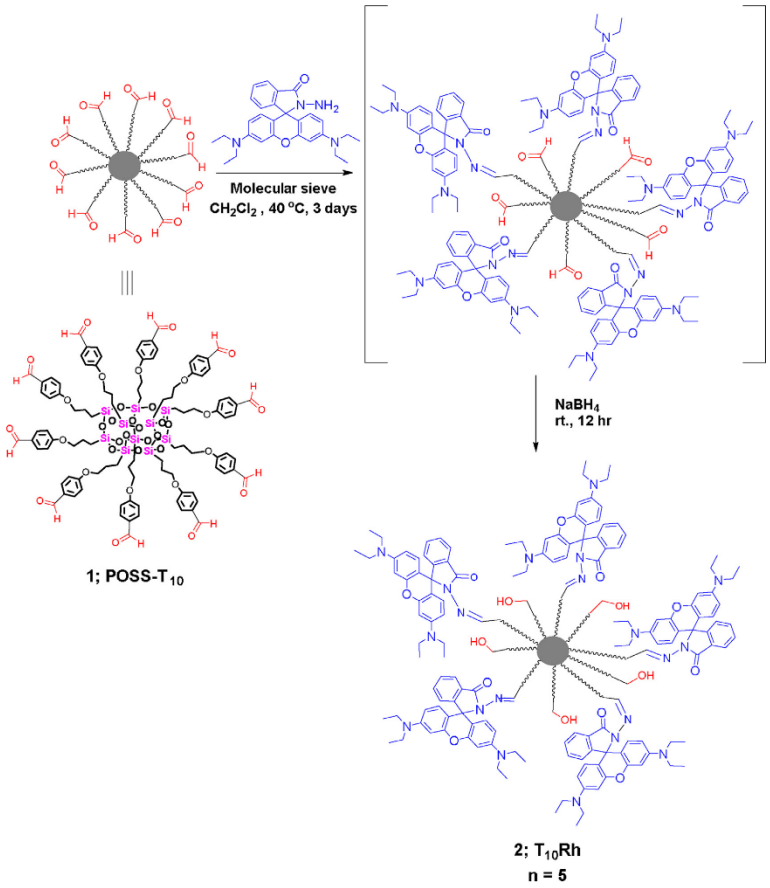
https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2017.12.033
1010-6030/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

condensation reactions or sol-gel processes of organosilanes [28–30]. In a particular application involving those functionalized POSS, they have been already used in catalysis [31–33], nanomedicines [34,35], biomaterials [36,37], and nanocomposites [38–40]. However, examples of self-assembled sensor units on those POSS materials are still rare [41–43]. In addition, a direct incorporation of rhodamine-based sensor into POSS system is not found. By functionalizing the surface of POSS, our desired material is highly soluble in aqueous ethanol solutions and has a distinct feature for detection of mercury (II) ion with highly selective and sensitive in very low detection limit (3.14×10^{-9} M or 0.63 ppb) which is lower than the maximum allowed level of inorganic mercury in drinking water (2 ppb) specified by the United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA). To the best of our knowledge, decakis(3-proproxy-*p*-oxybenzaldehyde) decasilses quioxane; **POSS-T_{10}** (**1**), freshly prepared according to our previous report [44], has never been functionalized until this study. Moreover, this is the first work that shows a direct incorporation of fluorescence Hg^{2+} sensors on POSS by using rhodamine B hydrazide *via* a Schiff base (hydrazone) formation.

2. Experimental

2.1. Materials

Decakis(3-proproxy-*p*-oxybenzaldehyde)decasilsesquioxane (**1**) [44] and rhodamine B hydrazide [45] were prepared according to literature reports. Molecular sieve 4 Å and sodium borohydride were purchased from Sigma Aldrich, while dicholoromethane was bought from Honeywell B&J. The solvents were purchased from Merck while all of the metal salts were purchased from Strem chemicals.



Scheme 1. A synthetic approach for POSS-functionalized with rhodamine B hydrazide (**2**; **T_{10}Rh**).

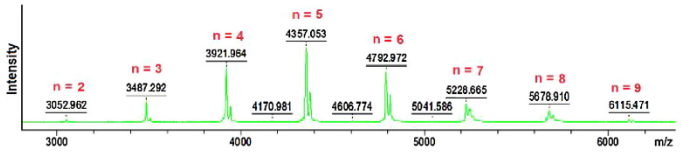


Fig. 1. MALDI spectrum for $\mathbf{T_{10}Rh}$.

2.2. Analytical instruments

Fourier transform nuclear magnetic resonance spectra were obtained by using a Bruker-Ascend™ 400 high-resolution nuclear magnetic resonance spectrometer for ^{1}H (400 MHz), $^{13}C\{^{1}H\}$ (100 MHz) and $^{29}Si\{^{1}H\}$ (79 MHz) nuclei. Chemical shifts were reported in δ units (parts per million) relative to tetramethylsilane and residual solvents peaks were used as a reference. For matrix assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) MS analysis (Bruker Daltonics-Autoflex II) analysis, the matrix of 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHBA) was dissolved in THF (10 mg/mL), which was mixed with an analytical sample (0.5 ~ 1.0 mg/mL in THF) in a ratio of 1:1 *v/v*. Absorption spectra were determined on a single beam Hewlett Packard 8453 spectrophotometer. Fluorescence spectra were measured using Perkin Elmer Luminescence spectrometer LS 55B. The excitation and emission slit widths used in fluorescence measurements were 5.0 nm with a scan rate of 300 nm/min.

2.3. Synthesis of decakis(3-proproxy-parabenzaldehyde) decasilsesquioxane functionalized with rhodamine B hydrazide ($T_{10}Rh$)

A solid mixture of decakis(3-proproxy-*p*-oxybenzaldehyde) decasilsesquioxane; **1** (0.10 g, 0.0468 mmol) [44], rhodamine B hydrazide (0.43 g, 0.942 mmol) [45], and molecular sieve 4 Å (0.10 g) were dried at room temperature for an overnight under vacuum in thick-wall reaction-tube. Then, dried dichloromethane (2 mL) was transferred *via* syringe into the reaction portion under nitrogen atmosphere. After stirring and heating at 40 °C for 3 days, sodium borohydride (0.10 g) was subsequently added into the solution mixture and further stirred at room temperature for additional 12 h. Then, molecular sieve was filtered out and evaporation of solvent under vacuum gave a crude product (0.5 g). Then, the crude product was purified by using a dialysis membrane at the molecular weight cut-off of 2000 Da with THF solvent. The purified product in a dialysis bag was kept and further dried in vacuum to afford the white solid of $\mathbf{T_{10}Rh}$ in 0.20 g (0.0459 mmol, 98.0% yield).; $\mathbf{T_{10}Rh}$ for $n = 5$: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 25 °C): 1.15 (m, 80H), 1.83 (m, 20H), 3.32-3.33 (m, 40H), 3.61 (m, 10H), 3.72 (m, 20H), 4.51 (bs, 5H), 6.21-6.29 (m, 20H), 6.41-6.46 (m, 40H), 6.69-6.73 (m, 5H), 7.09-7.26 (m, 10H), 7.43 (m, 10H), 7.92 (m, 5H) ppm; $^{13}C\{^{1}H\}$ NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 25 °C): 8.61, 12.58, 22.82, 30.29, 44.34, 64.75, 65.88, 69.33, 97.95, 104.55, 106.16, 108.01, 114.15, 114.31, 122.96, 123.23, 123.80, 127.97, 128.06, 128.53, 129.00, 130.01, 132.47, 148.86, 151.53, 153.16, 153.82, 166.12 ppm; $^{29}Si\{^{1}H\}$ NMR (79 MHz, $CDCl_3$, 25 °C, TMS): −68.43, −68.53 ppm; MALDI-TOF MS for $n = 5$, m/z calcd for $C_{240}H_{271}N_{20}O_{40}Si_{10}$: 4354.75 $[M + H^+]$; found: 4357.05.

2.4. Binding studies

The binding studies of sensor $\mathbf{T_{10}Rh}$ were carried out in 10% aqueous ethanol solutions. The perchlorate salt solutions (1.0×10^{-2} M) were prepared by dissolving the desired amount of salts in deionized water. The fluorescence titration was performed using solutions of $\mathbf{T_{10}Rh}$ (1.33 μM) and the fluorescence spectra were measured as a function of metal ions concentration over a fixed wavelength range (530 – 650 nm) with the excitation wavelength (λ_{ex}) = 520 nm.

3. Results and discussion

3.1. Synthesis and characterization

Compound **1** (**POSS-T_{10}**) bearing multi aldehyde functional groups, simply reacted with rhodamine B hydrazide under dried atmosphere at 40 °C for 3 days as shown in Scheme 1. In a chemical reaction of a Schiff base (hydrazone) formation, molecular sieve was used to drive the equilibrium forward by absorbing the water molecule, which is a by-product from condensation reaction. Interestingly, the solubility of our desired sensor in aqueous ethanol solution can be enhanced, after sodium borohydride was added for reducing any unreacted benzaldehyde groups on POSS

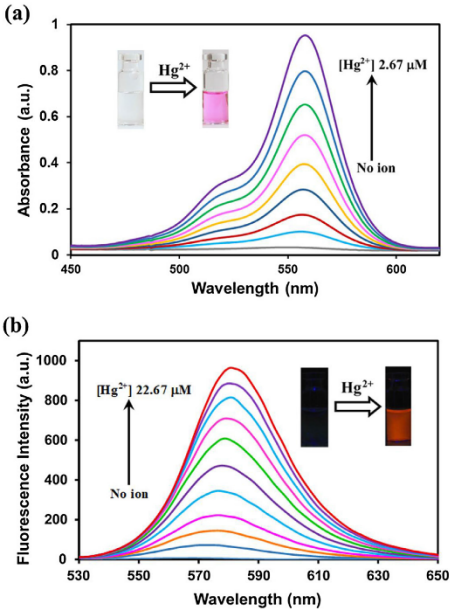
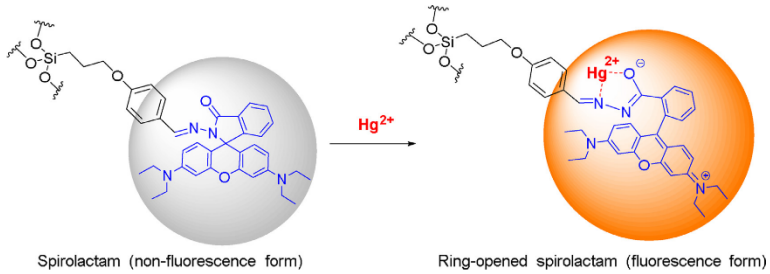


Fig. 2. (a) Absorption spectra (13.00 μM) and (b) Fluorescence emission spectra (λ_{ex} 520 nm) of $\mathbf{T_{10}Rh}$ (1.33 μM) in 10% aqueous ethanol solutions as a function of $[Hg^{2+}]$.



Scheme 2. A proposed operation of **T_{10}Rh** sensor: before binding Hg^{2+} (left) and after binding Hg^{2+} (right).

that can efficiently lead to the formation of higher polarity of benzyl alcohol. Rhodamine B-functionalized POSS (**2**; **T_{10}Rh**) was successfully purified by using a dialysis membrane at the molecular weight cut-off of 2000 Da under THF solvent to yield a target material in 98% yield. Matrix assisted laser desorption ionization-time-of-flight (MALDI-TOF) analysis using 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHBA) as a matrix revealed functionalization patterns of 2 9 (5 most abundant) for compound **2** as shown in Fig. 1. Moreover, the resulting ^{1}H NMR spectrum (Fig. S1) of **2** shows the complete disappearance of a singlet peak of aldehyde groups at 9.80 ppm, while the key signal of CH=N- protons newly appears at 7.92 ppm, confirming a successful incorporation of C—N formation through a Schiff base synthesis to obtain hydrazone linkages. The broad ^{1}H NMR signals of the compound are possibly due to the result of narrow distribution of large-sized molecular sensors ($n = 2 - 9$). Thus, its ^{29}Si{^{1}H} NMR spectrum (Fig. S3) also displays two singlet signals at 68.43 and 68.53 ppm, confirming the existence of two different organic substituents (rhodamine B hydrazine moieties and unfunctionalized parts of benzyl alcohols) on a pentagonal prism of T_{10}.

3.2. Sensitivity studies

The absorption and fluorescence responses of sensor **T_{10}Rh** towards mercury ion were investigated in the 10% aqueous ethanol solutions by the UV–vis spectroscopy and fluorescence spectroscopy. The results in Fig. 2a showed the titration in aqueous ethanol solutions of **T_{10}Rh** by the addition of increasing amount of Hg^{2+} ions. The original absorption band of **T_{10}Rh** was changed and new absorption band was significantly appeared at approximately 555 nm when concentrations of Hg^{2+} ions were increased. The addition of Hg^{2+} to a solution of **T_{10}Rh** led to a color change from colorless to pink, which could be clearly observed by the naked eye. The fluorescence emission of **T_{10}Rh** was demonstrated in the presence of Hg^{2+} ions as shown the details in Fig. 2b. The solution of **T_{10}Rh** showed weak fluorescence signal or "turn off" when excited at 520 nm. Upon addition of increasing concentration of Hg^{2+} ions, the intensity of the fluorescence emission was rapidly enhanced and "turn on" fluorescence signals in the visible region at 580 nm corresponding to the spirolactam ring opened-form of rhodamine fluorophores, as suggested by our previous report [45]. The fluorescence enhancement behavior of **T_{10}Rh** clearly demonstrated the "OFF-ON" switching mechanism of that occurred in response toward Hg^{2+} ions complexation (Scheme 2).

Herein, **T_{10}Rh** sensor consisted of rhodamine B fluorophores from functionalized POSS was involved in the chelation to five Hg^{2+} based on Job's plot analysis (Fig. 3) [55] and resulted in the significant improvement in the sensitivity of **T_{10}Rh** sensor.

The association constant (K_{assoc}) of **T_{10}Rh** with Hg^{2+} was found to be 6.03×10^{23} M^{-5} by the Benesi–Hildebrand plot of the signal changes of the fluorescence emissions from the fluorescence titration results and Hg^{2+} concentration. In addition, the 1:5 complex formation of **T_{10}Rh**-Hg^{2+} was consistent to the result from Job's plot analysis. Meanwhile, **T_{10}Rh** is highly soluble in both aqueous (e.g. ethanol/water) and organic solvents (e.g. THF, chloroform, dichloromethane). Fluorescence quantum yield (Φ_f) of **T_{10}Rh** with Hg^{2+} ion was determined to be 0.17 when excited at 520 nm, using rhodamine B standard with Φ_f of 0.69 in ethanol as a reference [56,57].

Herein, the effects of pH on the fluorescence emissions of **T_{10}Rh** in the absence and presence of Hg^{2+} were systematically

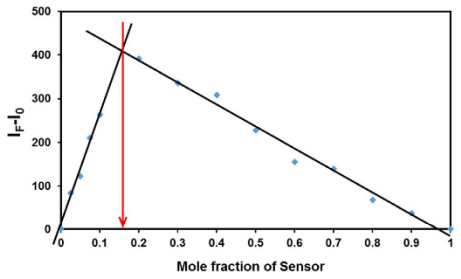


Fig. 3. Job's plots for **T_{10}Rh** with Hg^{2+} in 10% aqueous ethanol solutions. The total concentrations of [**T_{10}Rh**] + [Hg^{2+}] are 10 μM.

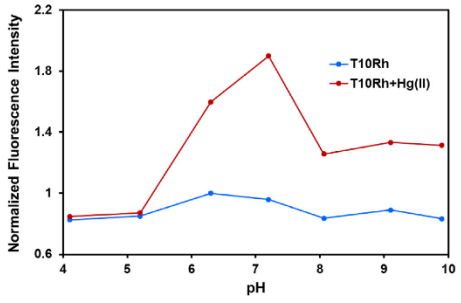
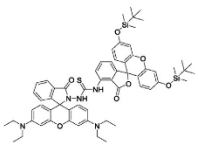
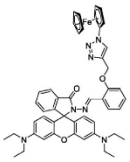
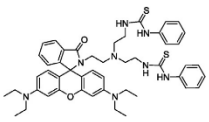
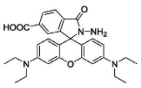
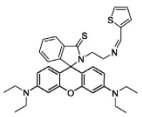
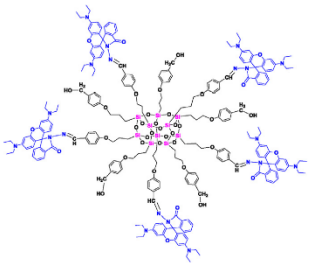


Fig. 4. Fluorescence emissions (580 nm) of **T_{10}Rh** (1.00 μM) and after addition of Hg^{2+} (16.7 μM) in 10:90 HEPES buffer:EtOH as function of pH (λ_{ex} 520 nm).

investigated in HEPES buffered solutions. As shown in Fig. 4, the fluorescence emissions of **T_{10}Rh** were increased upon Hg^{2+} binding when pH of the buffer is approximately 6 to 10. However, the response behavior of **T_{10}Rh** toward Hg^{2+} was performed well in the neutral pH range (6.0 – 7.0), which was utilized in this study and revealed its high potential for environmental samples.

In this work, the sensor was self-assembled on the polyhedral oligomeric silsesquioxanes (POSS) material upon Hg^{2+} binding. Functionalizing the surface of POSS by the rhodamine sensor and the benzyl alcohol functional groups increased the solubility in aqueous solution of our designed sensor and led to a distinct feature of Hg^{2+} detection with high sensitivity and very low

Table 1
Comparison of recently reported rhodamine sensors for determination of Hg^{2+}.

Hg^{2+}-Sensor	Working System	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ (nm)	Detection Limit	References
	CH_3CN/Tris-HCl buffer (pH 7.4, 1:1 v/v)	480/592	5.4×10^{-9} M (1.1 ppb)	[50]
	CH_3CN/HEPES buffer (pH 7.3, 2:8 v/v)	495/585	1.7×10^{-8} M (3.4 ppb)	[51]
	CH_3CN/H_2O (1:99, v/v)	520/586	60.78×10^{-9} M (12.2 ppb)	[52]
	100% aqueous solution	520/573	9.7×10^{-8} M (19.5 ppb)	[53]
	MeOH/HEPES buffer (20 mM, pH 7.2, 7:3, v/v)	550/582	1.9×10^{-7} M (38.0 ppb)	[54]
	10% aqueous ethanol solutions	520/580	3.14×10^{-9} M (0.63 ppb)	This work

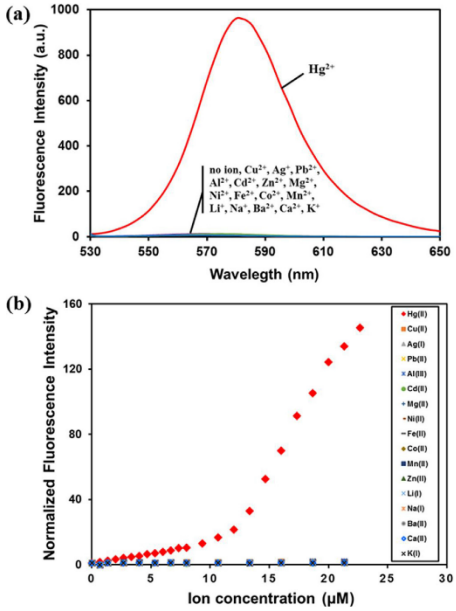


Fig. 5. (a) Fluorescence spectra (λ_{ex} 520 nm) of **T_{10}Rh** (1.00 μM) in 10% aqueous ethanol solutions with addition of perchlorate salts of Hg^{2+}, Cu^{2+}, Ag^{+}, Pb^{2+}, Al^{3+}, Cd^{2+}, Mg^{2+}, Ni^{2+}, Fe^{2+}, Co^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, Li^{+}, Na^{+}, Ba^{2+}, Ca^{2+} and K^{+} (21.3 μM). (b) Normalized emission intensity (λ_{ex} 520 nm) of **T_{10}Rh** (1.00 μM) in 10% aqueous ethanol solutions versus the concentration of various metal ions: Hg^{2+}, Cu^{2+}, Ag^{+}, Pb^{2+}, Al^{3+}, Cd^{2+}, Mg^{2+}, Ni^{2+}, Fe^{2+}, Co^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, Li^{+}, Na^{+}, Ba^{2+}, Ca^{2+} and K^{+}.

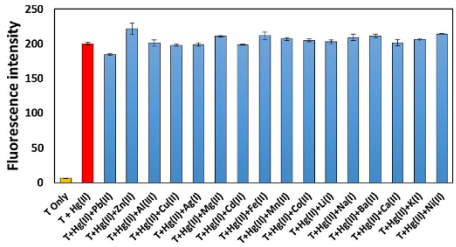


Fig. 6. Competitive experiments (λ_{em} at 580 nm) in the **T_{10}Rh**-Hg^{2+} system with common foreign metal ions: [**T_{10}Rh**] = 1.00 μM, [Hg^{2+}] = 0.10 μM and [M^{n+}] = 1.00 μM in 10% aqueous ethanol solutions (λ_{ex} 520 nm). The error bars represent the standard deviation.

detection limit. The detection limit of **T_{10}Rh** was determined from the plot of fluorescence intensity as a function of the concentration of Hg^{2+}, and calculated from threefold standard deviation of the lowest concentration of the calibration curve [46–49]. Under optimal condition, the detection limit for the analysis of Hg^{2+} was found to be 3.14×10^{-9} M or 0.63 ppb, which was lower value, compared to reported rhodamine B-based Hg^{2+} sensors (Table 1) [50–54] and was lower than the maximum allowed level (2 ppb) specified by the U.S. EPA. It should be noted that the detection limit of sensor **T_{10}Rh** was significantly improved compared to single molecule of rhodamine B hydrazide (49 ppb) [45].

3.3. Selectivity studies

The selectivity behavior of **T_{10}Rh** was investigated by recording the change of fluorescence intensity of the sensors using a similar method to the Separate Solution Method (SSM) in ion-selective electrode applications [58]. The fluorescence changes of **T_{10}Rh** in the presence of $Hg^{2+}$and other transition, alkali and alkaline earth ions were showed in Fig. 5. The selectivity studies clearly demonstrated the high selectivity of **T_{10}Rh** toward Hg^{2+} over other foreign ions. The drastically enhanced fluorescence emission at 580 nm was observed when Hg^{2+} was added to a solution. **T_{10}Rh** showed that the fluorescence response only rapidly increased as a function of added Hg^{2+} concentrations. In low concentrations region of Hg^{2+}, the slope of the graph was small and became greater around the concentration 12 μM. This is probably due to the incomplete formation of the absorbing and emitting species in the solution [59]. On the other hand, the fluorescence emission of **T_{10}Rh** did not distinctly enhance after the addition of Cu^{2+}, Ag^{+}, Pb^{2+}, Al^{3+}, Cd^{2+}, Mg^{2+}, Ni^{2+}, Fe^{2+}, Co^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, Li^{+}, Na^{+}, Ba^{2+}, Ca^{2+} and K^{+} under identical concentrations and conditions.

The selectivity of **T_{10}Rh** as Hg^{2+} sensor in the presence of competitive background metal ions was also performed. The fluorescence spectra of **T_{10}Rh** (1.33 μM) were monitored after the addition of Hg^{2+} (0.10 μM) and 10 eq. (1.00 μM) of various metal ions. The results in Fig. 6 illustrated that **T_{10}Rh** was selective to Hg^{2+} ion and provided high fluorescence enhancement even in the presence of 10 eq. interfering ions which indicated that the relatively consistent Hg^{2+}-induced fluorescence enhancement was observed in the competing background metal ions. The competitive studies clearly showed that the fluorescence emission of **T_{10}Rh** in the presence of Hg^{2+} was still remarkable and the selective sensing ability for Hg^{2+} ion which was hardly interfered by competitive metal ions.

Moreover, **T_{10}Rh** also exhibited chromogenic changes (Fig. 7). When the addition of Hg^{2+} to the solution of **T_{10}Rh**, the color clearly change from colorless to pink which could be easily seen by the visual-eye. Under similar conditions, the other metal ions did not provide color change of solutions which demonstrated the selectivity of the complex formation of **T_{10}Rh** with Hg^{2+} ion.

Furthermore, the practical application of **T_{10}Rh** was investigated for detection of Hg^{2+} in real samples including mineral water, drinking water and skin lightening cream [60]. The results in Fig. 8 shows the colorimetric responses of **T_{10}Rh** from colorless to pink for the Hg^{2+} spiked samples which indicated that the sensor



Fig. 7. Chromogenic change of **T_{10}Rh** (1.00 μM) in the absence and presence of Hg^{2+}, Cu^{2+}, Ag^{+}, Pb^{2+}, Al^{3+}, Cd^{2+}, Mg^{2+}, Ni^{2+}, Fe^{2+}, Co^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, Li^{+}, Na^{+}, Ba^{2+}, Ca^{2+} and K^{+} (1.00 μM).



Fig. 8. The color of $\mathbf{T_{10}Rh}$ in real samples (a) mineral water (MW), (b) drinking water (DW), and (c) skin lightening cream without and with the spiked by Hg^{2+}.

provided high potential for practical applications in environmental samples.

4. Conclusion

In conclusion, we have used the idea of supramolecular chemistry for design and synthesis of a new fluorescent POSS for Hg^{2+} detection. The sensor is based on a POSS as a core construction covalently bound to several rhodamine B fluorophores as absorbing units. The sensor exhibits high sensitivity and selectivity toward Hg^{2+} among interfering metal ions in aqueous ethanol solutions. The selective binding of $\mathbf{T_{10}Rh}$ to Hg^{2+} affords the dual optical sensing through both fluorescence enhancement and concurrent color change from colorless to pink, which can easily detect by naked eyes with the low detection limit of 0.63 ppb for Hg^{2+}. The obvious chromogenic change of the sensor upon Hg^{2+} binding can be applied for the on-site determination of Hg^{2+}. In near future, by using this concept, POSS as a core sensor could be widely used to detect with other metal ions and become more effectively used as both absorbent and sensor at the same time than those conventional silica absorbents.

Acknowledgments

This research was financially supported by Grants from the Thailand Research Fund and Faculty of Science, Mahidol University: RSA5980018 and IRG5980007 (for Ervithayasuporn, V.) and the Thailand Research Fund and Faculty of Science, Silpakorn University: RSA6080058 (for Wanichacheva, N.). Piyanuch, P. thanks to the Royal Golden Jubilee (RGJ) Ph.D. Program, Grant No. PHD/0079/2558. Authors also gratefully acknowledge the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH—CIC), Office of the Higher Education Commision (OHEC), Ministry of Education.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2017.12.033.

References

[1] K.H. Kim, E. Kabir, S.A. Jahan, A review on the distribution of Hg in the environment and its human health impacts, J. Hazard. Mater. 306 (2016) 376–385.
[2] X. Wang, C.W.N. Feng, Y. Anderson, Remediation of mercury contaminated sites-A review, J. Hazard. Mater. 221–222 (2012) 1–18.
[3] P.B. Tchounwou, N. Ayensu, D. Sutton, Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic implications for public health, Environ. Toxicol. 18 (2003) 149–175.
[4] Y. Tachapermpon, S. Chaneam, A. Charoenpanich, J. Sirirak, N. Wanichacheva, Highly Cu^{2+}-sensitive and selective colorimetric and fluorescent probes: utilizations in batch, flow analysis and living cell imaging, Sens. Actuators B Chem. 241 (2017) 868–878.
[5] P. Piyanuch, S. Watpathomsub, V.S. Lee, H.A. Nienaber, N. Wanichacheva, Highly sensitive and selective Hg^{2+}-chemosensor based on dithia-cyclic fluorescein for optical and visual-eye detections in aqueous buffer solution, Sens. Actuators B Chem. 224 (2016) 201–208.
[6] J. Chen, Y. Lia, K. Lva, W. Zhonga, H. Wanga, Z. Wub, P. Yia, J. Jiang, Cyclam-functionalized carbon dots sensor for sensitive and selective detection of copper(II) ion and sulfide anion in aqueous media and its imaging in live cells, Sens. Actuator B: Chem. 224 (2016) 298–306.
[7] D. Buckland, S.V. Bhosale, S.J. Langford, A chemodosimer based on a core-substituted naphthalene diimide for fluoride ion detection, Tetrahedron Lett. 52 (2011) 1990–1992.
[8] S.Y. Xu, X. Sun, H. Ge, R.L. Arrowsmith, J.S. Fossey, S.I. Pascu, Y.B. Jiang, T.D. James, Synthesis and evaluation of a boronate-tagged 1, 8-naphthalimide probe for fluoride recognition, Org. Biomol. Chem. 13 (2015) 4143–4148.
[9] R. Sodkhomkhum, M. Masik, S. Watchasit, C. Suksai, J. Boonmak, S. Youngme, N. Wanichacheva, V. Ervithayasuporn, Imidazolylmethylpyrene sensor for dual optical detection of explosive chemical: 2,4,6-Trinitrophenol, Sens. Actuators B Chem. 245 (2017) 665–673.
[10] D. Shi, D. Zhou, Y. Zang, J. Li, G. Chen, T.D. James, X. He, H. Tian, Selective fluorogenic imaging of hepatocellular H_2S by a galactosyl azidonaphthalimide probe, Chem. Commun. 51 (2015) 3653–3655.
[11] Y. Ooyama, A. Matsugasako, T. Nagano, K. Oka, K. Kushimoto, K. Komaguchi, I. Imae, Y. Harima, sFluorescence PET (photo-induced electron transfer) sensor for water based on anthracene-amino acid, J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 222 (2011) 52–55.

[12] N. Wanichacheva, K. Setthakarn, N. Prapawattanapol, O. Hanmeng, V.S. Lee, K. Grudpan, Rhodamine B-based turn-on fluorescent and colorimetric chemosensors for highly sensitive and selective detection of mercury (II) ions, J. Lumin. 132 (2012) 35–40.

[13] N. Wanichacheva, O. Hanmeng, S. Kraithong, K. Sukrat, Dual optical Hg^{2+}-selective sensing through FRET system of fluorescein and rhodamine B fluorophores, J. Photochem Photobiol. A 278 (2014) 75–81.

[14] R. Bhalla, Rhodamine appended terphenyl: A reversible off?on fluorescent chemosensor for mercury ions, Sens. Actuator B Chem. 151 (2010) 180–185.

[15] P. Praikaew, T. Duangdeetip, N. Chimpalee, C. Wainiphithapong, P. Swanglap, N. Wanichacheva, Colorimetric sensor for detection of Hg^{2+} in aqueous samples utilizing rhodamine B hydrazide-modified silica, Mater. Express. 5 (2015) 300–308.

[16] Y. Ding, S. Wang, J. Li, L. Chen, Nanomaterial-based optical sensors for mercury ions, Trends Anal, Chem 82 (2016) 175–190.

[17] T. Lou, Z. Chen, Y. Wang, L. Chen, Blue-to-Red colorimetric sensing strategy for Hg^{2+} and Ag^{+} via redox-Regulated surface chemistry of gold nanoparticles, ACS Appl. Mater. Interfaces. 3 (2011) 1568–1573.

[18] L. Chen, J. Li, L. Chen, Colorimetric detection of mercury species based on functionalized gold nanoparticles, ACS Appl. Mater. Interfaces. 6 (2014) 15897–15904.

[19] L. Chen, X. Fu, W. Lu, L. Chen, Highly sensitive and selective colorimetric sensing of Hg^{2+} based on the morphology transition of silver nanoprisms, ACS Appl. Mater. Interfaces. 5 (2013) 284–290.

[20] Z. Sun, D. Guo, L. Zhang, H. Li, B. Yang, S. Yan, Multifunctional fibrous silica composite with high optical sensing performance and effective removal ability toward Hg^{2+} ions, J. Mater. Chem. B 3 (2015) 3201–3210.

[21] N. Oguri, Y. Egawa, N. Takeda, M. Unno, Janus-cube octasilsesquioxane: facile synthesis and structure elucidation, Angew. Chem. Int. Ed. 55 (2016) 9336–9339.

[22] M. Rzonsowska, B. Dudziec, B. Marciniec, Synthesis of a new class of silsesquioxanes with alkynyl and germyl functionality, Dalton Trans. 45 (2016) 17187–17194.

[23] T. Maegawa, O. Miyashita, Y. Irie, H. Imoto, K. Naka, Synthesis and properties of polyimides containing hexaisobutyl-substituted T_8 cages in their main chains, RSC Adv. 6 (2016) 31751–31757.

[24] R. Sodkhomkhum, V. Ervithayasuporn, Synthesis of poly(Siloxane/Double-Decker silsesquioxane) via dehydrocarbonative condensation reaction and its functionalization, Polymer 86 (2016) 113–119.

[25] S. Hanprasit, N. Tungkijanansin, A. Prompawilai, S. Eangpayung, V. Ervithayasuporn, Synthesis and isolation of non-Chromophore cage-Rearranged silsesquioxanes from base-catalyzed reactions, Dalton Trans. 45 (2016) 16117–16120.

[26] V. Ervithayasuporn, S. Chimjarn, Synthesis and isolation of methacrylate- and acrylate-Functionalized polyhedral oligomeric silsesquioxanes (T_8, T_{10}, and T_{12}) and characterization of the relationship between their chemical structures and physical properties, Inorg. Chem. 52 (2013) 13108–13112.

[27] T. Jaroentomeechai, P.K. Yingsukkamol, C. Phurat, E. Somsook, T. Osotchan, V. Ervithayasuporn, Synthesis and reactivity of nitrogen nucleophiles-induced cage-rearrangement silsesquioxanes, Inorg. Chem. 51 (2012) 12266–12272.

[28] K. Imai, Y. Kaneko, Preparation of ammonium-Functionalized polyhedral oligomeric silsesquioxanes with high proportions of cagelike decamer and their facile separation, Inorg. Chem. 56 (2017) 4133–4140.

[29] N. Hurkes, C. Bruhn, F. Belaj, R. Pietschnig, Silanetriols as powerful starting materials for selective condensation to bulky POSS cages, Organometallics 33 (2014) 7299–7306.

[30] V. Ervithayasuporn, R. Sodkhomkhum, T. Teerawatananond, C. Phurat, P. Phinyocheep, E. Somsook, T. Osotchan, Unprecedented formation of cis- and trans-di[(3-chloropropyl)isopropoxysilyl]-bridged double-decker octaphenylsilsesquioxanes, Eur. J. Inorg. Chem. (2013) 3292–3296.

[31] R. Kunthom, T. Jaroentomeechai, V. Ervithayasuporn, Polyhedral oligomeric silsesquioxane (POSS) containing sulfonic acid groups as a metal-free catalyst to prepare polycaprolactone, Polymer 108 (2017) 173–178.

[32] V. Ervithayasuporn, K. Kwanplod, J. Boonmak, S. Youngme, P. Sangtrirutnugul, Homogeneous and heterogeneous catalysts of organopalladium functionalized-polyhedral oligomeric silsesquioxanes for suzuki-miyaura reaction, J. Catal. 332 (2015) 62–69.

[33] S. Mohapatra, T. Chaiprasert, R. Sodkhomkhum, R. Kunthom, S. Hanprasit, P. Sangtrirutnugul, V. Ervithayasuporn, Solid-state synthesis of polyhedral oligomeric silsesquioxane-supported N-heterocyclic Carbenes/Imidazolium salts on palladium nanoparticles: highly active and recyclable catalyst, ChemistrySelect 1 (2016) 5353–5357.

[34] S. Hörner, S. Knauer, C. Uth, M. Jöst, V. Schmidts, H. Frauendorf, C.M. Thiele, O. Avrutina, H. Kolmar, Nanoscale biodegradable organic-inorganic hybrids for efficient cell penetration and drug delivery, Angew. Chem. Int. Ed. 55 (2016) 14842–14846.

[35] J. Nakamura, G. Poologasundarampillai, J.R. Jones, T. Kasuga, Tracking the formation of vaterite particles containing aminopropyl-functionalized silsesquioxane and their structure for bone regenerative medicine, J. Mater. Chem. B 1 (2013) 4446–4454.

[36] K. Tanaka, Y. Chujo, Advanced functional materials based on polyhedral oligomeric silsesquioxane (POSS), J. Mater. Chem. 22 (2012) 1733–1746.

[37] B.P. Nair, D. Vaikkath, P.D. Nair, Polyhedral oligomeric silsesquioxane-F68 hybrid vesicles for folate receptor targeted anti-cancer drug delivery, Langmuir 30 (2014) 340–347.

[38] P. Sangtrirutnugul, T. Chaiprasert, W. Hunsiri, T. Jitjaroendee, P. Songkhum, K. Laohhasurayotin, T. Osotchan, V. Ervithayasuporn, Tunable porosity of cross-linked-polyhedral oligomeric silsesquioxane supports for palladium-catalyzed aerobic alcohol oxidation in water, ACS Appl Mater. Interfaces 9 (2017) 12812–12822.

[39] M. Ge, H. Liu, A silsesquioxane-based thiophene-bridged hybrid nanoporous network as a highly efficient adsorbent for wastewater treatment, J. Mater. Chem. A 4 (2016) 16714–16722.

[40] H. Zhou, Q. Ye, J. Xu, Polyhedral oligomeric silsesquioxane-based hybrid materials and their applications, Mater. Chem. Front. 1 (2017) 212–230.

[41] S. Chanmungkalakul, V. Ervithayasuporn, S. Hanprasit, M. Masik, N. Prigyai, S. Kiatkamjornwong, Silsesquioxane cages as fluoride sensors, Chem. Commun. 53 (2017) 12108–12111.

[42] Y. Zhang, H.Y. Shen, X. Hai, X.W. Chen, J.H. Wang, Polyhedral oligomeric silsesquioxane polymer-caged silver nanoparticle as a smart colorimetric probe for the detection of hydrogen sulfide, Anal. Chem. 89 (2017) 1346–1352.

[43] X. Ge, L. Dong, L. Sun, Z. Song, R. Wei, L. Shi, H. Chen, New nanoplatforms based on UCNPs linking with polyhedral oligomeric silsesquioxane (POSS) for multimodal bioimaging, Nanoscale 7 (2015) 7206–7215.

[44] S. Chimjarn, R. Kunthom, P. Chancharone, R. Sodkhomkhum, P. Sangtrirutnugul, V. Ervithayasuporn, Synthesis of aromatic functionalized cage-rearranged silsesquioxanes (T_8, T_{10}, and T_{12}) *via* nucleophilic substitution reactions, Dalton Trans. 44 (2015) 916–919.

[45] S. Kraithong, P. Damrongsak, K. Suwatpipat, J. Sirirak, P. Swanglap, N. Wanichacheva, Highly Hg^{2+}-sensitive and selective fluorescent sensors in aqueous solution and sensors-Encapsulated polymeric membrane, RSC Adv. 6 (2016) 10401–10411.

[46] Y. Li, H. Yu, G. Shao, F. Gan, A tetraphenylethylene-based turn on fluorescent sensor for the rapid detection of Ag^{+} ions with high selectivity, J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 301 (2015) 14–19.

[47] P. Venkatesan, S.P. Wu, A turn-on fluorescent pyrene-based chemosensor for Cu(II) with live cell application, RSC Adv. 5 (2015) 42591–42596.

[48] National Secondary Drinking Water Regulations, Washington. US EPA, EPA816-F-09-0004, May 2009, (2009) .

[49] K.N. Kim, M.G. Choi, J.H. Noh, S. Ahn, S.K. Chang, Rhodamine B hydrazide revisited: chemodosimetric Hg^{2+}-selective signaling behavior in aqueous environments, Bull. Korean Chem. Soc. 29 (2008) 571–574.

[50] N.R. Chereddy, P. Nagaraju, M.V.N. Raju, K. Saranraj, S. Thennarasu, V.J. Rao, A two fluorophore embedded probe for collective and ratiometric detection of Hg^{2+} and F ions, Dyes. Pigments. 112 (2015) 201–209.

[51] C. Arivazhagan, R. Borthakur, S. Ghosh, Ferrocene and triazole-appended rhodamine based multisignaling sensors for Hg^{2+} and their application in live cell imaging, Organometallics 34 (2015) 1147–1155.

[52] M. Hong, X. Lu, Y. Chen, D. Xu, A novel rhodamine-based colorimetric and fluorescent sensor for Hg^{2+} in water matrix and living cell, Sens. Actuators B Chem. 232 (2016) 28–36.

[53] D. Li, C.Y. Li, Y.F. Li, Z. Li, F. Xu, Rhodamine-based chemodosimeter for fluorescent determination of $Hg^{(2+)}$ in 100% aqueous solution and in living cells, Anal. Chim. Acta. 934 (2016) 218–225.

[54] F.H. Wang, C.W. Cheng, L.C. Duan, W. Lei, M.Z. Xia, F.Y. Wang, Highly selective fluorescent sensor for Hg^{2+} ion based on a novel rhodamine B derivative, Sens. Actuators B Chem. 206 (2015) 679–683.

[55] H.A. Benesi, J.H. Hildebrand, A spectrophotometric investigation of the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons, J. Am. Chem. Soc. 71 (1949) 2703–2707.

[56] Y. Shiraishi, S. Sumiya, Y. Kohno, T. Hirai, A rhodamine-cyclen conjugate as a highly sensitive and selective fluorescent chemosensor for Hg(II), J. Org. Chem. 73 (2008) 8571–8574.

[57] M. Li, H.Y. Lu, R.L. Liu, J.D. Chen, C.F. Chen, Turn-On fluorescent sensor for selective detection of Zn^{2+}, Cd^{2+}, and Hg^{2+} in water, J. Org. Chem. 77 (2012) 3670–3673.

[58] P. Bakker, Carrier-based ion-selective electrodes and bulk optodes. 1. general characteristics, Chem. Rev. 97 (1997) 3083–3132.

[59] D. Chlmpalee, R. Chlmpalee, S. Jarungpattananon, Spectrofluorimetric flow-injection determination of calcium using Calcein, Anal. Chim. Acta 271 (1993) 247–251.

[60] US FDA, 2017. Prohibited & Restricted Ingredients [Online]. Available: (http://www.fda.gov/Cosmetics/GuidanceRegulation/LawsRegulations/ucm127406.htm) [Accessed 16 Oct. 2017].

งานวิจัยเรื่องที่ 2

ChemPubSoc Europe
DOI: 10.1002/cplu.201800574
CHEMPLUSCHEM Full Papers



A Near-Infrared Fluorescence Chemosensor Based on Isothiocyanate-Aza-BODIPY for Cyanide Detection at the Parts per Billion Level: Applications in Buffer Media and Living Cell Imaging

Pornthip Piyanuch,[a] Jitnapa Sirirak,[a] Anyanee Kamkaew,[b] Oratai Weeranantanapan,[c] Vinich Promarak,[d] Kevin Burgess,[e] and Nantanit Wanichacheva*[a]

A near-infrared chemodosimeter based on an aza-BODIPY dye was designed and synthesized. The sensor contains isothiocyanate groups for cyanide ion sensing. The sensing function was illustrated via the fluorescence changes in near-infrared frequencies as well as chromogenic changes which could be easily visualized with a detection limit of 19 ppb. The sensor provides high selectivity to CN^- and discriminates other anions such as CH_3COO^-, HPO_4^-, HSO_4^-, ClO_3^-, CO_3^{2-}, SO_4^{2-}, NO_3^-, Cl^-, F^-, Br^-, I^-, and phenylalanine (Phe) in 50% PBS buffer/acetonitrile at physiological pH. The potential of the sensor for CN^- detection in both aqueous buffer solutions and living cells imaging was demonstrated.

Introduction

Cyanide is one of the most important chemical reagents in several industrial processes, for example, metallurgy, gold mining, electroplating, plastics manufacturing, and production of chemicals.[1] Cyanide-containing substances can also be found in soil, vehicle exhaust, polluted air as well as gas from burning of cigarettes.[1] However, compared with different anions, cyanide ion (CN^-) has been considered as the most toxic inorganic anion for living organisms. Cyanide contamination in the environment, even at low concentrations has a significant impact on human health and other living species. Cyanide ion can bind strongly with the Fe^{3+} in heme, decreasing of oxygen supply to the respiratory system. Accumulation of cyanide in human body can also lead to a state of histotoxic anoxia and various types of physiological disorders including convulsions, loss of consciousness, and eventually death.[2] The World Health Organization (WHO) specifies a standard for the maximum allowed level of CN^- in drinking water at concentration of 1.9 μM or 49.4 ppb,[3] hence development of efficient techniques for monitoring CN^- is important.

Methods for detection of CN^- tend to be based on voltammetric and electrometric techniques.[4] However, these techniques are unsuitable for bioimaging applications and do not allow visual detection of CN^-. Alternatively, fluorescence sensors can offer qualitative and quantitative analyses of several analytes for example, protons (H^+),[5] cations,[6] small molecules,[7] biological molecules,[8] and anions[9] including CN^-. Although there are some reports of cyanide fluorescence sensors, many of them only facilitate CN^- detection in pure organic solvents[10] which can be problematic in bioimaging applications and analysis of CN^- in real samples. Moreover, UV-Visible excitation can damage living cells, therefore near-infrared (NIR) frequencies are desirable for detection of CN^- in biological samples.[11] Additionally, NIR fluorescence imaging had low interference from auto-fluorescence of biomolecules. Nevertheless, there are only few NIR fluorescence sensors, which exhibit response toward CN^- in the aqueous solution and biological systems, and the purpose of our work was to make one.[12]

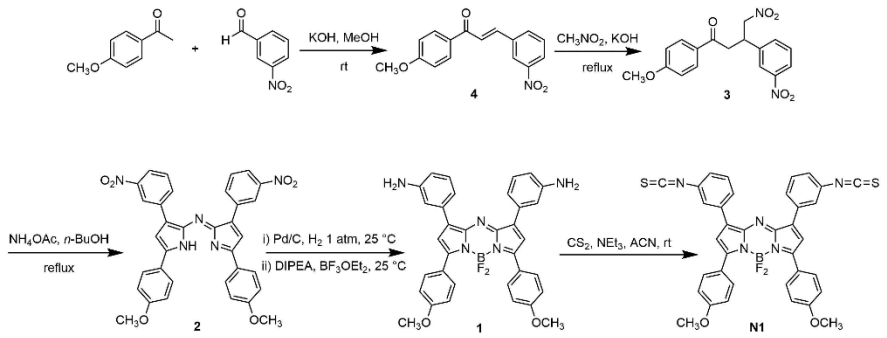
There are several approaches for specific recognition of CN^- sensors such as via of hydrogen bonding interactions, boron derivatives, nucleophilic addition reactions, and complex formations with metal ions.[13] Herein, our designed sensor (N1) was based on aqueous soluble isothiocyanate functional group, which could be specific ionophore for CN^- in aqueous solution via nucleophilic addition reaction. However, other possible electron deficient functional groups such as oxazine, dicyanovinyl, trifluoroacetamide, pyridinium, salicylaldehyde, acridinium, trifluoroacetophenone and imidazole[14] could be potential ionophores for cyanide reaction, most of them tend to be less compatible with water solubility.

[a] P. Piyanuch, Prof. J. Sirirak, Prof. N. Wanichacheva
Department of Chemistry, Faculty of Science, Silpakorn University
Nakhon Pathom 73000 (Thailand)
E-mail: wanichacheva.nantanit@gmail.com
wanichacheva_n@su.ac.th
[b] Dr. A. Kamkaew
School of Chemistry, Institute of Science
Suranaree University of Technology
Nakhon Ratchasima 30000 (Thailand)
[c] Dr. O. Weeranantanapan
School of Preclinical Science, Institute of Science
Suranaree University of Technology
Nakhon Ratchasima 30000 (Thailand)
[d] Prof. V. Promarak
School of Molecular Science and Engineering
Vidyasirimedhi Institute of Science and Technology
Wangchan, Rayong 21210 (Thailand)
[e] Prof. K. Burgess
Department of Chemistry
Texas A & M University
College Station, TX 77842 (USA)

Supporting information for this article is available on the WWW under https://doi.org/10.1002/cplu.201800574

© 2019 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

ChemPubSoc Europe
CHEMPLUSCHEM Full Papers



Scheme 1. Synthesis of **N1**.

In this present work, the new NIR fluorescence CN^- sensor (**N1**) based on isothiocyanate receptor and aza-BODIPY fluorophore was prepared and its potential for CN^- sensing in buffer media and living cell imaging was investigated. **N1** provided high sensitivity toward CN^- with a low detection limit and high selectivity over other anions and amino acid (*i.e.* phenylalanine). Sensor **N1** offered absorption and fluorescence in the NIR region (λ_{ex} = 680 nm, λ_{em} = 718 nm), and its colorimetric change upon CN detection was apparent to the eye in daylight and under generated UV light.

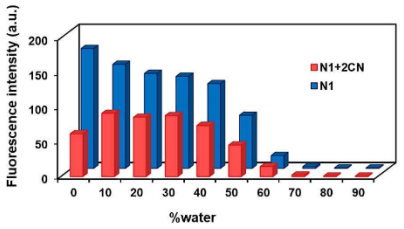


Figure 1. Plot of the fluorescence intensity of **N1** (10 μM) versus percentage of water in acetonitrile/water solutions λ_{ex} = 680 nm, λ_{em} = 718 nm, with and without of CN^- (3.3 eq.).

Results and Discussion

Synthesis of N1

N1 was prepared from aza-BODIPY amine (**1**) with carbon disulfide in the presence of trimethylamine by condensation reaction at room temperature and received 50% yield (Scheme 1). Sensor **N1** was fully characterized by ^1H, ^{13}C NMR, and HR-ESI mass spectrometry (as can be seen in Supplementary Information). Herein, the target sensor **N1** was prepared directly from the amine compound and carbon disulfide under basic condition via the formation of the stable intermediate dithiocarbamate salts.[15] Only di-substituted isothiocyanate compound **N1** was obtained as a product due to the excess addition of carbon disulfide in the reaction.

Effects of Water on the Fluorescence Emission

To explore the condition for suitable CN^- determination in the environmental and biological systems, the change of fluorescence emission intensity of **N1** in different percentages of water before and after the addition of CN^- was observed and the results were illustrated in Figure 1.

The result showed that the employed ratio of water in acetonitrile systems strongly effect on the sensing ability of **N1** toward CN .The fluorescence emission of **N1** was reduced with the increase of the ratio of water in acetonitrile systems. The pronounced differences of fluorescence emissions with and without CN were observed at 10–50% of water content in acetonitrile solutions. According to this observation along with consideration for utilization of the sensor in real samples, 50% water/acetonitrile was chosen as the optimum condition of **N1**.

Sensitivity Studies

The sensing capability of **N1** toward CN^- was investigated by the determination of UV/Visible absorption and fluorescence emission changes with and without of CN^- (Figure 2). In order to consider the application of the sensor in biological samples, the sensitivity of **N1** was explored in 50% PBS buffer (5 mM, pH 7.2) /acetonitrile+Triton X 100 at physiological pH (pH = 7.2). Herein, the amount of hydroxide anion (OH^-) was also controlled by using buffer solutions. The result showed that **N1** had a strong absorption band in the near-infrared region at 690 nm with a molar extinction coefficient of $2.27\times10^4\ M^{-1}$. As shown in Figure 2, the absorption of **N1** was reduced proportionally upon the addition of CN . The chromogenic change

© 2019 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

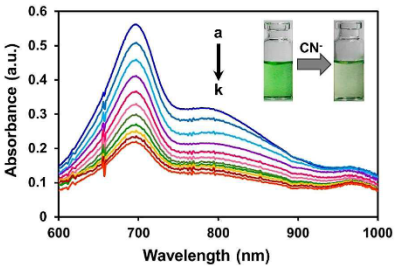


Figure 2. Absorption spectra of **N1** (13.0 μM) in 50% PBS buffer (5 mM, pH 7.2)/CH_3CN + Triton X 100 as a function of [KCN] within 10 min after the addition of potassium salts of CN^-. (a) 0 mM (0 eq.), (b) 0.03 mM (2.3 eq.), (c) 0.10 mM (7.7 eq.), (d) 0.23 mM (17.7 eq.), (e) 0.30 mM (23.1 eq.), (f) 0.43 mM (33.1 eq.), (g) 0.56 mM (43.1 eq.), (h) 0.70 mM (53.8 eq.), (i) 0.83 mM (63.8 eq.), (j) 1.03 mM (79.2 eq.), (k) 1.23 mM (94.6 eq.).

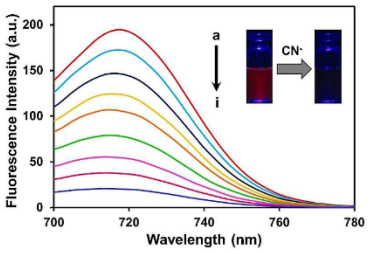
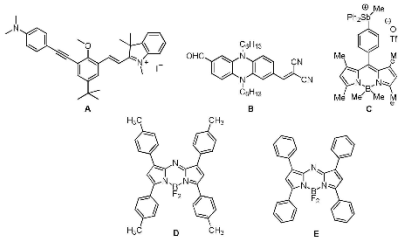


Figure 3. Fluorescence emission spectra (λ_{ex} = 680 nm) of **N1** (20.0 μM) in 50% PBS buffer (5 mM, pH 7.2)/CH_3CN + Triton X 100 as a function of [KCN] within 10 min after the addition of potassium salts of CN^-. (a) 0 mM (0 eq.), (b) 0.03 mM (1.5 eq.), (c) 0.07 mM (3.5 eq.), (d) 0.10 mM (5.0 eq.), (e) 0.13 mM (6.5 eq.), (f) 0.20 mM (10.0 eq.), (g) 0.27 mM (13.5 eq.), (h) 0.30 mM (15.0 eq.), (i) 0.33 mM (16.5 eq.).

Table 1. Comparison of recently reported CN^- sensors with **N1**.



CN^- sensor	Operation system	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ [nm]	Detection limit	Ref.
A	HEPES buffer pH 6.0 with TritonX-100	385/440	5.4×10^{-10} M	[16a]
B	acetonitrile	540/720	2.3×10^{-8} M	[16b]
C	acetonitrile	475/515	3.1×10^{-7} M	[16c]
D	acetonitrile	410/602	8.6×10^{-7} M	[16d]
E	tetrahydrofuran	590/680	no data	[16e]
N1	50% PBS buffer (5 mM, pH 7.2)/CH_3CN + Triton × 100	680/718	7.52×10^{-7} M	this work

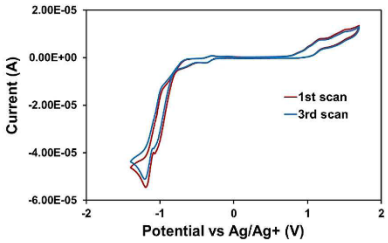


Figure 4. CV curves measured in CH_2Cl_2 solution with n-Bu_4NPF_6 as a supporting electrolyte at a scan rate of 50 mV/s.

after addition of CN^- was observed by changing the color from deep green to light green, which could be easily detected by visual eyes.

In fluorescence studies (Figure 3) **N1** revealed the fluorescence emission at approximately 718 nm when excited at 680 nm. With the increase of the concentration of CN^-, the fluorescence intensity at 718 nm was decreased. The detection limit of **N1** as a CN^--fluorescence sensor was obtained from the 3SD/slope, and found to be 7.52×10^{-7} M or 19 ppb CN^- in 50% PBS buffer/acetonitrile, which was significantly lower than the detection of CN^- in drinking water (the WHO specified the contaminant level in drinking water to be lower than 49.4 ppb). The detection limit of **N1** to determine CN^- was more or less the same as those of other recently reported CN -sensors as illustrated in Table 1. Although there were some reported CN^--sensors with lower detection limits, they operated in UV/visible regions or in organic solvents such as acetonitrile and THF,[16] which would limit utilization of the sensor in bio-imaging applications and the analysis of CN in environmental samples.

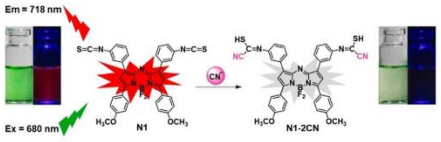
The electrochemical property of **N1** was also investigated using cyclic voltammetry (CV) in CH_2Cl_2 solution. As depicted in Figure 4, CV traces exhibited multiple oxidation and reduction processes. The repeated CV scans displayed identical CV traces proving that this compound is electrochemically stable molecule.

Binding Studies

The observed fluorogenic and chromogenic changes of **N1** could be attributed to the diminishing of the ICT from $-OCH_3$ groups (the electron donating groups) to isothiocyanate groups (the electron withdrawing groups) of the aza-BODIPY sensor system, which was caused by the perturbation of the ICT system upon addition of CN^-. The proposed sensing mechanism in Scheme 2 features the isothiocyanate moieties as electrophilic site of **N1** for nucleophilic addition of CN^-, which is a strong nucleophile, to obtain **N1-2CN** complex.

© 2019 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

ChemPubSoc Europe
CHEMPLUSCHEM Full Papers



Scheme 2. Proposed sensing mechanism of **N1** with cyanide anion.

Using the Benesi-Hildebrand plot of the changes of the fluorescence emissions,[17] the association constant (K_{assoc}) of **N1** with CN^- determined from the fluorescence titration results was $1.03\times10^8\ M^{-2}$, indicating 1:2 complex formation of **N1**:CN^-. Moreover, to explore the binding and stoichiometry ratio between **N1** and CN^-, the Job's plot analysis was also conducted. As shown in Figure 5, the fluorescence intensity

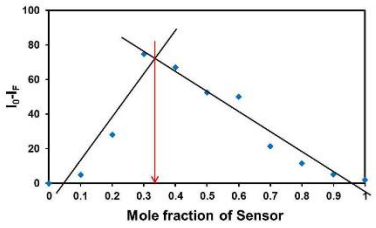


Figure 5. Job's plots for **N1** with CN^- in 50% PBS buffer (5 mM, pH 7.2)/CH_3CN | Triton X 100. The total concentration of [**N1**] + [CN^-] is10 μM.

change after **N1** bound to CN^- offered maximum fluorescence intensity when the mole fraction of **N1** is 0.33. This indicated 1:2 complex formations of **N1**:CN^- which was consistent with the Benesi-Hildebrand plot result. This result demonstrated that two isothiocyanate groups of aza-BODIPY **N1** acted as the receptors for two CN^- recognitions.

Herein, it should be noted that sensor **N1** based on aza-BODIPY and two isothiocyanate groups offered selective addition reaction at the isothiocyanate groups in PBS buffer/acetonitrile condition. This result was different from the previous studies reported from Dvivedi et al.[16d] and Wu et al.,[16e] in which the CN^- was found to undergo nucleophilic addition to a pyrrole ring of aza-BODIPY dye in pure organic solvents such as acetonitrile and tetrahydrofuran, respectively (sensor D and E of Table 1). In addition, these previous studies showed the 1:1 stoichiometry between the sensor and CN^- in their Job's plots analysis. In the present work, however, the isothiocyanate groups in aza-BODIPY **N1** sensor offered stronger electrophilic site compared to the pyrrole ring of aza-BODIPY dye, which was supported by the DFT calculation. Using Gaussian 09, the frontier molecular orbitals of **N1** were also investigated with DFT calculations at the B3LYP/6-311G** level. For LUMO+1 of **N1** electron was resided extensively on phenylisothiocyanate group (Figure 6). Therefore, the selective

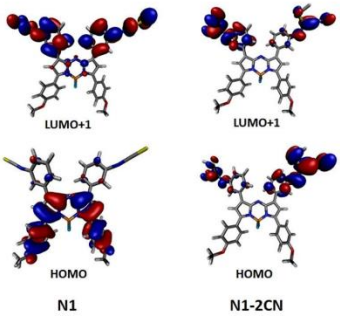


Figure 6. HOMO and LUMO of **N1** and **N1-2CN**.

addition of CN^- could take place at the two isothiocyanate groups on **N1** in aqueous acetonitrile solutions. Moreover, the electronic absorption spectra of **N1** and **N1-2CN** were obtained using TD-DFT calculations at the same level of theory (Figure S2 and Table S1). It was found that there was an intense band at 654 nm corresponding to the observed band at 698 nm. Additionally, the calculated transition at 654 nm with an oscillator strength of f=0.9148 and f=0.9059 for **N1** and **N1-2CN**, respectively corresponds to a HOMO→LUMO transition.

The ^{13}C-NMR experiment was performed to observe the binding mechanism of **N1** toward CN^- (Figure 7). After the addition of CN^-, the quaternary carbon (C_b) peak was shifted downfield (129.5 to 130.5 ppm), while concomitantly two new signals were appeared at 160.6 ppm (C_a) and 128.0 ppm (C_c).[18] This result supported and confirmed that nucleophilic addition of CN^- was taken place at the isothiocyanate moieties of the **N1** sensor. Additionally, ^{1}H-NMR spectra of the **N1** at the position of pyrrole (chemical shift 7.06 ppm)[16d,19] with and without CN did not exhibit a significant shift, which indicated that the binding of CN^- did not occur at the pyrrole (Figure 8). This evident strongly indicated that the CN^- did not react to pyrrole ring of aza BODIPY **N1**, otherwise the significant change of ^{1}H-

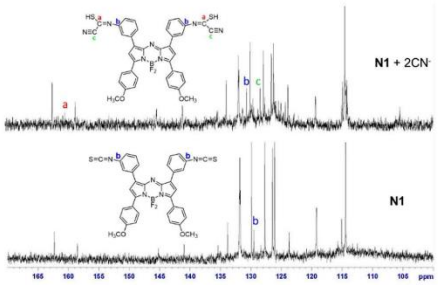


Figure 7. ^{13}C-NMR spectra (75 MHz, $CDCl_3$) of **N1** and **N1** with 2 eq. KCN.

© 2019 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

ChemPubSoc Europe
CHEMPLUSCHEM Full Papers

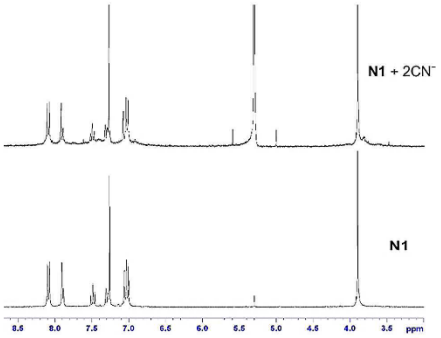


Figure 8. ^{1}H-NMR spectra (300 MHz, $CDCl_3$) of **N1** and **N1** with 2 eq. KCN.

NMR spectra must be observed due to the change of conjugated system of the pyrrole ring after nucleophilic addition of CN^-.[16d] Moreover, ^{1}H-NMR titration spectra of the **N1** with KCN in 0–4 equivalent were evaluated as shown in Figure 9. The results revealed that upon the addition of 1 and 2 equivalents of CN^-, there was no change observed in ^{1}H-NMR spectra. This can confirm the nucleophilic addition mechanism at the isothiocyanate moieties of **N1**. On the other hand, when 3 and 4 equivalents of CN^- were added, ^{1}H-NMR spectra showed significant changes which were affected from the addition of CN^- to the pyrrole group due to excess equivalents of CN^-. These observations indicated that CN^- selectively attacked the isothiocyanate groups of the **N1** sensor rather than the pyrrole groups.

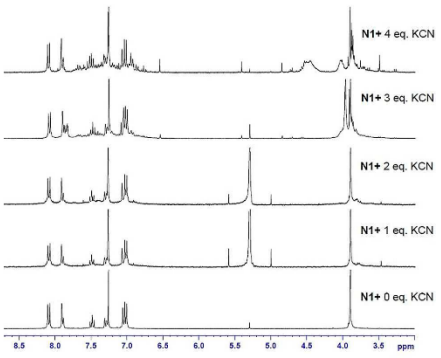


Figure 9. ^{1}H-NMR spectra (300 MHz, $CDCl_3$) of N1 with KCN (0–4 eq.).

Selectivity Studies

For the investigation of the selectivity of **N1** toward CN^-, the Separate Solution Method (SSM)[20] was used to explore the fluorescence emission spectral change of **N1** after addition of each various anions and amino acid (phenylalanine) and the results were demonstrated in Figure 10. At the same concentration, **N1** had the high selectivity for detection of CN^- over other interfering substances. Fluorescence of **N1** was 80% quenched when excess CN^- was added. Instead, the fluorescence emission of **N1** showed insignificant changes upon the addition of F^-, Br^-, I^-, ClO_3^-, CO_3^{2-}, SO_4^{2-}, HSO_4^-, HPO_4^-, CH_3COO^-, NO_3^-, Cl^- and phenylalanine under the same concentrations and conditions. The result suggested that only CN^- could selectively react to isothiocyanate groups and perturbed the ICT of the sensor system, which led to the quenching of **N1**.

Competition experiments were also conducted to explore the selectivity of **N1** as CN^- sensor, The fluorescence signal of **N1** before and after the addition of CN^- (0.17 mM) and 3

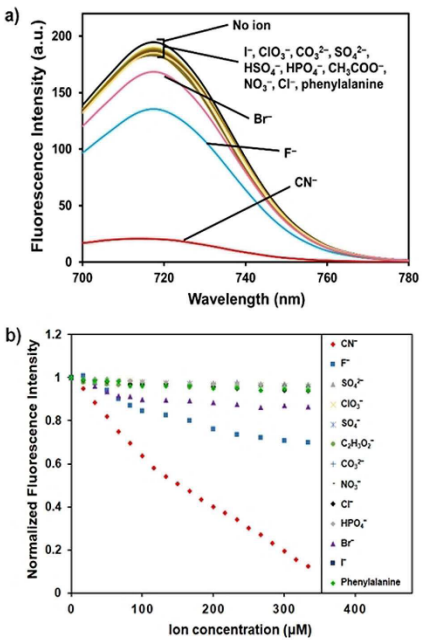


Figure 10. a) Fluorescence spectra (λ_{ex} = 680 nm) of **N1** (20.0 μM; 1.0 eq.) in 50% PBS buffer (5 mM, pH 7.2)/CH_3CN + Triton X 100 with addition of potassium salts of CN^-, F^-, Br^-, I^-, ClO_3^-, CO_3^{2-}, SO_4^{2-}, HSO_4^-, HPO_4^-, CH_3COO^-, NO_3^-, Cl^- and phenylalanine (0.33 mM; 16.5 eq.). b) Normalized emission intensity (λ_{ex} = 680 nm) of **N1** (20.0 μM) in 50% PBS buffer/CH_3CN – Triton X 100 versus the concentration of various anions within 10 min after the addition of potassium salts of anions and phenylalanine.

© 2019 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

ChemPubSoc Europe
CHEMPLUSCHEM Full Papers

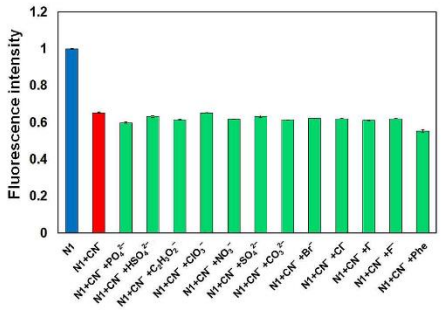


Figure 11. Competition experiments (λ_{em} = 718 nm) with other interfering substances: [**N1**] = 20.0 μM (1.0 eq.), [KCN] = 0.167 mM (8.4 eq.) and [interfering substances of potassium salts and phenylalanine] = 0.50 mM (25.0 eq.) in 50% PBS buffer (5 mM, pH 7.2)/CH_3CN – Triton X 100 (λ_{ex} = 680 nm). The standard deviation was represented with the error bars.

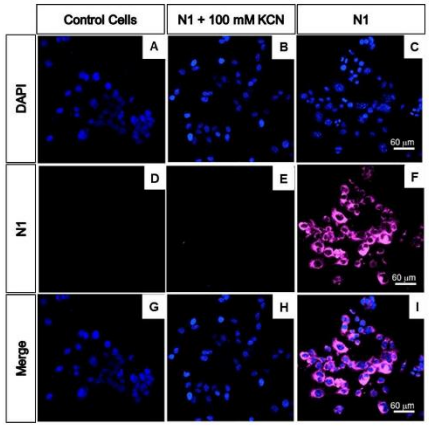


Figure 13. (A–I) Confocal laser scanning microscopy (CLSM) images of 4T1 cells. DAPI channel of (A) 4T1 cells only, (B) 4T1 cells incubated with **N1** in the presence of 100 μM CN^- for 30 min at 37 °C and (C) 4T1 cells incubated with **N1**. Red fluorescence signal from (D) 4T1 cells only, (E) 4T1 cells incubated with **N1** in the presence of 100 μM CN^- for 30 min at 37 °C and (F) 4T1 cells incubated with **N1**. Overlay images of DAPI and **N1** signals are shown in (G), (H) and (I). (DAPI: λ_{ex} = 405 nm, λ_{em} = 450 ± 25 nm; **N1**: λ_{ex} = 640 nm, λ_{em} = 700 ± 40 nm).

eq (0.50 mM) of different anions including CH_3COO^-, HPO_4^-, HSO_4^-, ClO_3^-, CO_3^{2-}, SO_4^{2-}, NO_3^-, Cl^-, F^-, Br^-, I^-, and phenylalanine (Phe) were recorded. As shown in Figure 11, it clearly illustrated that even with the high equivalents commonly competitive anions and phenylalanine (Phe), the **N1** was selective to CN^- and considerable fluorescence quenching was observed. Upon the addition of CN^-, the interfering anions and amino acid could not disturb the reduction of fluorescence intensity, illustrating the high selectivity of **N1** for CN^- over potential competitors. It should be noted that in the 50% PBS buffer/CH_3CN at physiological pH, isothiocyanate receptor in aza-BODIPY **N1** sensor could selectively react to CN^- even in the solutions contained high concentration of phenylalanine or other interfering anions.

Moreover, Figure 12 illustrated that addition of CN^- to **N1** altered the solution color and emissive properties, and these changes could be observed by eye. When CN^- was added, the paler of green **N1** solution as well as the decrease of red fluorescence emission under UV lamp were observed. In contrast, there was no change in the color and visual emission of sensor solutions when other ions and phenylalanine were added.

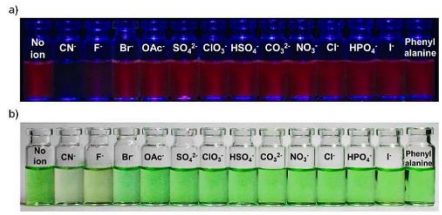


Figure 12. Comparison of a) visual emission under UV lamp and b) color of **N1** (13.0 μM; 1.0 eq.) in the presence and absence of various potassium salts of anions and phenylalanine (0.3 mM; 23.1 eq.).

Cellular Imaging

Using confocal laser scanning microscopy (CLSM), application of **N1** as intracellular CN^- concentration detector was conducted. Without CN^-, a red fluorescence signal from **N1** was clearly seen inside the 4T1 breast cancer cells (Figure 13F). Overlay of the red fluorescence and the blue signal from DAPI suggested that **N1** was mostly located in the cytoplasm over the nucleus (Figure 13I). On the other hand, no significant red fluorescence signal from **N1** was observed from cells incubated with 100 μM of KCN at 37 °C for 30 min (Figure 13E,F) which is similar to the signal from the control cells in which the cells did not exposed to both KCN/**N1** (Figures 13A,D,G). The results suggested that **N1** could be utilized as a CN^- sensor in cancer cells.

Using a standard MTT assay, the toxicity of **N1** on 4T1 cells was explored. Cells were cultured with various concentration of **N1** (0–50 μM) in PBS at 37 °C for 3 h. Figure 14 demonstrated that more than 90% of cell viabilities were observed after cells were cultured with **N1** (0–40 μM). Moreover, when 50 μM of **N1** was used, cell viabilities were more than 70%. This indicated that cytotoxicity of **N1** was rather low.

© 2019 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

ChemPubSoc Europe

CHEMPLUSCHEM Full Papers

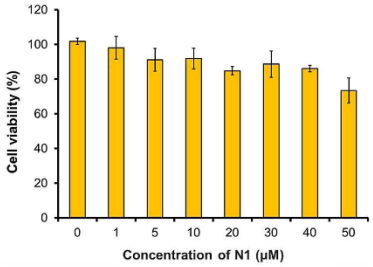


Figure 14. Plot of concentration of **N1** against cell viability value (%).

Conclusion

In conclusion, sensor aza-BODIPY **N1** responds to cyanide via dual optical responses through both NIR fluorogenic change and concurrent chromogenic change from deep green to pale green, which can be clearly detected. The detection of CN^- using NIR fluorescence sensor in buffer solution is rare. In aqueous PBS buffer/CH_3CN solution, **N1** is a highly sensitive and selective NIR sensor for CN^- with fluorescence detection limit of 0.75 μM (or 19 ppb), while, in living cells, it had high sensitivity for CN^-. Because of the low detection limit of **N1**, it has potential for the detection of CN^- in drinking water (the WHO specified the contaminant level in drinking water to be lower than 49.4 ppb).

Experimental Section

Materials: All reagents and solvents used in this work were purchased from Sigma-Aldrich Corporation and Fluka Chemical Corporation. They were also used without further purification. Anion salts (potassium salts) were also purchased from Sigma-Aldrich Corporation.

Methods: Bruker Avance 300 spectrometer operating at 300 MHz and 75 MHz for ^1H and ^{13}C, respectively, were used to obtain NMR spectra in $CDCl_3$ and DMSO-d_6. Absorption spectra and Fluorescence spectra were obtained from a single beam Hewlett Packard 8453 spectrophotometer and Perkin Elmer Luminescence spectrometer LS 55B, respectively. The excitation and emission slit widths of 10.0 nm/20.0 nm were used in fluorescence measurements with a scan rate of 500 nm/min. For mass spectra, Thermo-Electron LCQ-DECA-XP, ESI-Ion trap mass spectrometer was used.

Cyclic voltammetry (CV): Cyclic voltammetry (CV) measurements were performed on an Autolab potentiostat PGSTAT 12 equipped with platinum counter electrode, glassy carbon working electrode, Ag/AgCl reference electrode and n-Bu_4NPF_6 as a supporting electrolyte in CH_2Cl_2 under Ar atmosphere at scan rate of 50 mV s^{-1}. The concentration of analytical materials and the electrolyte were 10^{-3} M and 0.1 M, respectively.

Confocal Fluorescence Imaging: The 4T1 cell lines were grown in RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute's Medium) supplemented with 10% FBS (Fetal Bovine Serum) and 1% penicillin-streptomycin at 37 °C and 5% CO_2. The fluorescence cell imaging was performed after the cells were incubated with **N1** (10 μM) for 1 h. The cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) for 3 times, followed by the addition of 100 μM KCN to the cells and incubation for another 30 min. After that, the cells were then washed again with PBS for 3 times and fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 20 min. The cells were washed with PBS for 3 times and then mounted with fluorescence mounting media contained DAPI before the fluorescence cell imaging. A Nikon A1 confocal microscope equipped with a 40x objective lens was used to record confocal imaging of cells. A laser was used to excite DAPI at 405 nm, where the emission was recorded at 450±25 nm, while cells incubated with **N1** were excited at 640 nm laser, where the emission was collected at 700±40 nm.

Cell viability assay: To explore in vitro cytotoxicity, methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assays on the 4T1 cells was conducted. Cells were seeded into a 96-well cell culture plate at 7×10^4/well, and were cultured at 37 °C and 5% CO_2 for 24 h; different concentrations of **N1** (0, 1, 5, 10, 20, 30, 40 and 50 μmol/L, diluted in RPMI 1640) were then added to the wells. Thereafter, cells were incubated for 3 h at 37 °C under 5% CO_2. The plate was incubated for an additional 3 h at 37 °C under 5% CO_2 after the addition of MTT (5 mg/mL) to each well. Using a MG Labtech microplate reader, the optical density OD570 value (Abs.) of each well, with background subtraction at 690 nm was recorded and the inhibition of cell growth was determined with cell viability (%), where cell viability (%) = mean of Abs. value of treatment group/mean Abs. value of control) × 100%.

Synthesis of compounds 1–4: Using the similar procedure from previous work, the title compounds were prepared. The synthetic steps were demonstrated in Scheme 1.[19]

Synthesis of N1: In a round bottom flask, compound 1 (0.10 g, 0.26 mmol) was dissolved in acetonitrile (15 mL), followed by the addition of carbon disulfide (0.06 mL, 1.01 mmol) and triethylamine (0.07 mL, 0.55 mmol). The mixture was then stirred at 30 °C for 5 h. Using a rotary evaporator, the solvent was removed and 20 mL of dichloromethane was then added to the residue. After that, the solution was extracted three times, each with 15 mL of sat. $NaHCO_3$ solution and the organic portions were removed under vacuum. The product was finally purified by silica gel column chromatography where EtOAc/hexane (2:1, Rf = 0.60) was used as the mobile phase to provide N1 which appeared as the green oil with 50% yield. ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 3.90 (s, 6H), 7.00–7.06 (m, 6H), 7.26–7.30 (m, 2H), 7.49 (t, J = 8.1 Hz, 2H), 7.88–7.91 (m, 4H), 8.09 (d, J = 9.0 Hz, 4H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 55.6 ($2CH_3$), 114.4 (5CH), 119.2 (CH), 123.7 (2C), 126.1 (2CH), 126.5 (2CH), 127.72 (2CH), 129.5 (2C), 129.9 (4CH), 131.8 (2CH), 133.8 (2C), 135.4 (2C), 140.9 (2C), 144.9 (2C), 158.5 (2C), 162.3 (2C) ppm. HR-ESI MS calcd for $C_{36}H_{25}BF_2N_3O_2S_2^+$ $(M-H)^+$ 672.1511 m/z, found 672.1505 m/z.

Acknowledgements

N.W. thanks the Thailand Research Fund and Faculty of Science, Silpakorn University (grant number RSA 6080058), as well as Faculty of Science, Silpakorn University, Thailand (grant number SRF-JRG-2561-02) for funding this research. J.S. thanks the DPST Research grant 005/2557. N.W. and V.P. thank the Thailand Research Fund (grant number RTA 6080005). P.P. also thanks the Royal Golden Jubilee (RGJ) Ph.D. Program (grant No. PHD/0079/2558).

 © 2019 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

ChemPubSoc Europe

CHEMPLUSCHEM Full Papers

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords: aza-BODIPY dyes · cyanide · near-infrared fluorescence · selectivity · sensors

[1] a) J. F. Xu, H. H. Chen, Y. Z. Chen, Z. J. Li, L. Z. Wu, C. H. Tung, Q. Z. Yang, *Sens. Actuators B Chem.* **2012**, *168*, 14–19; b) J. L. Gerberding, Toxicological Profile for Cyanide, U. S. Department of Health and Human Services; Atlanta, GA, **2006**.

[2] a) M. Tomasulo, S. Sortino, A. J. P. White, F. M. Raymo, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 744–753; b) P. Kulling, *Toxicol. Lett.* **1992**, *64*, 283–289; c) B. Vennesland, E. E. Comm, C. J. Knownles, J. Westly, F. Wissing, Cyanide in biology. Academic Press, London, **1981**.

[3] Guidelines for Drinking-Water Quality, 3rd ed.; World Health Organization: Geneva, Switzerland, **2004**.

[4] a) W. C. Blackledge, C. W. Blackledge, A. Griesel, S. B. Mahon, M. Brenner, R. B. Pilz, G. R. Boss, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 4216–4221; b) M. K. Chahal, M. Sankar, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 99028–99036; c) T. T. Christison, J. S. Rohrer, *J. Chromatogr. A.* **2007**, *1155*, 31–39.

[5] a) H. F. Higginbotham, R. P. Cox, S. Sandanayake, B. A. Graystone, S. J. Langford, T. D. M. Bell, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 5061–5063; b) R. P. Cox, H. F. Higginbotham, B. A. Graystone, S. Sandanayake, S. J. Langford, T. D. M. Bell, *Chem. Phys. Lett.* **2012**, *521*, 59–63; c) J. Han, A. Loudet, R. Barhoumi, R. C. Burghardt, K. Burgess, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*,1642–1643.

[6] a) A. Petdum, W. Panchan, P. Swanglap, J. Sirirak, T. Sooksimuang, N. Wanichacheva, *Sens. Actuators B Chem.* **2018**, *259*, 862–870; b) B. Sui, X. Yue, B. Kim, K. D. Belfield, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **2015**, *7*, 17565–17568; c) M. Kao, T. Chen, Y. Cai, C. Hu, Y. Liu, Y. Jhong, A. Wu, *J. Lumin.* **2016**, *169*, 156–160.

[7] a) Y. Huang, W. Ouyang, X. Wu, Z. Li, J. S. Fossey, T. D. James, Y. Jiang, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1700–1703; b) M. Li, X. Wu, Y. Wang, Y. Li, W. Zhu, T. D. James, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 1751–1753; c) D. Shi, D. Zhou, Y. Zang, J. Li, G. Chen, T. D. James, X. He, H. Tian, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 3653–3655.

[8] a) Z. Qiu, J. Shu, Y. He, Z. Lin, K. Zhang, S. Lv, D. Tang, *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *87*, 18–24; b) Q. Zhou, Y. Lin, M. Xu, Z. Gao, H. Yang, D. Tang, *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 8886–8892; c) Z. Qiu, J. Shu, D. Tang, *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 5152–5160.

[9] a) S. Rivadehi, E. F. Reid, C. F. Hogan, S. V. Bhosale, S. J. Langford, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 705–709; b) S. Wang, S. Xu, G. Hu, X. Bai, T. D. James, L. Wang, *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 1434–1439.

[10] a) X. Cheng, Y. Zhou, J. Qin, Z. Li, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **2012**, *4*, 2133–2138; b) J. Yoshino, N. Kano, T. Kawashima, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 7496–7503; c) J. L. Fillaut, H. A. Kilig, E. Dean, C. Latouche, A. Boucekkine, *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 4890–4897. d) E. Ramachandran, S. A. A. Vandarkuzhali, G. Sivaraman, R. Dhamodharan, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 11042–11050.

[11] a) X. Cheng, R. Tang, H. Jia, J. Feng, J. Qin, Z. Li, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **2012**, *4*, 4387–4392; b) S. Y. Chung, S. W. Nam, J. Lim, S. U. Park, J. Yoon, *Chem. Commun.* **2009**, *0*, 2866–2868; c) L. Yuan, W. Lin, K. Zheng, L. He, W. Huang, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 622–661;

[12] X. Chen, S. W. Nam, G. H. Kim, N. Song, Y. Jeong, I. Shin, S. K. Kim, J. Kim, S. Park, J. Yoon, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 8953–8955.

[13] a) M. E. Moragues, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2593–2643; b) A. K. Shaily, N. Ahmed, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2017**, *56*, 6358–6368; c) Y. Shiraishi, M. Nakamura, T. Kogure, T. Hirai, *New J. Chem.* **2016**, *40*, 1237–1243; d) K. H. Jung, K. H. Lee, *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 9308–9314; e) T. W. Hudnall, F. P. Gabbaï, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11978–11986; f) R. R. Nair, M. Raju, K. Jana, D. Mondal, E. Suresh, B. Ganguly, P. B. Chatterjee, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 10721–10731.

[14] a) J. Li, J. Gao, W. W. Xiong, P. Z. Li, H. Zhang, Y. Zhao, Q. Zhang, *Chem. Asian J.* **2014**, *9*, 121–125; b) H. Miyaji, D. S. Kim, B. Y. Chang, E. Park, S. M. Park, K. H. Ahn, *Chem. Commun.* **2008**, *0*, 753–755; c) P. B. Pati, S. S. Zade, *RSC Adv.* **2013**, *3*, 13457–13462; d) A. Dvivedi, P. Rajakannu, M. Ravikanth, *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 4054–4062; e) D. S. Kim, Y. M. Chung, M. Jun, K. H. Ahn, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 4849–4854; f) H. Yu, Q. Zhao, Z. Jiang, J. Qin, Z. Li, *Sens. Actuators B Chem.* **2010**, *148*, 110–116; g) R. Manivannan, A. Satheshkumar, K. P. Elango, *New J. Chem.* **2013**, *37*, 3152–3160.

[15] a) H. Munch, J. S. Hansen, M. Pittelkow, J. B. Christensen, U. Boas, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 3117–3119; b) Z. Zhang, H. H. Wu, Y. J. Tan, *RSC Adv.* **2013**, *3*, 16940–16944.

[16] a) A. Promchat, P. Rashatasakhon, M. Sukwattanasinitt, *J. Hazard. Mater.* **2017**, *329*, 255–261; b) L. Yang, X. Li, J. Yang, Y. Qu, J. Hua, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **2013**, *5*, 1317–1326; c) A. M. Christianson, F. P. Gabbaï, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 2471–2474; d) A. Dvivedi, S. Kumar, M. Ravikanth, *Sens. Actuators B Chem.* **2016**, *224*, 364–371; e) F. Wu, H. Liu, C. Zhong, L. Zhu, *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 5120–5123.

[17] a) H. A. Benesi, J. H. Hildebrand, *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 2703–2707; b) M. Li, H. Y. Lu, R. L. Liu, J. D. Chen, C. F. Chen, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 3670–3673.

[18] W. F. Bailey, E. A. Gioffi, *Magn. Reson. Chem.* **1987**, *25*, 181–183.

[19] A. Kamkaew, K. Burgess, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 10664–10667.

[20] E. Bakker, P. Buhlmann, E. Pretsch, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 3083–3132.

Manuscript received: November 5, 2018
Revised manuscript received: December 27, 2018
Accepted manuscript online: January 11, 2019

© 2019 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

งานวิจัยเรื่องที่ 3

Journal of Photochemistry & Photobiology A: Chemistry 377 (2019) 138–148

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Photochemistry & Photobiology A: Chemistry

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

Indole-based fluorescent sensors for selective sensing of Fe^{2+} and Fe^{3+} in aqueous buffer systems and their applications in living cells

Sopita Rattanopas[a], Pornthip Piyanuch[a], Kawintip Wisansin[b], Adisri Charoenpanich[b], Jitnapa Sirirak[a], Waya Phutdhawong[a,*], Nantanit Wanichacheva[a,*]

[a] Department of Chemistry, Faculty of Science, Silpakorn University, Nakhon Pathom, 73000, Thailand
[b] Department of Biology, Faculty of Science, Silpakorn University, Nakhon Pathom, 73000, Thailand

ARTICLE INFO

Keywords:
Fe^{2+}-sensor
Fe^{3+}-sensor
Isomeric iheyamine
Fluorescent sensors

ABSTRACT

New series of indole-based chemosensors; isomeric Iheyamines **5a**–**5c** were synthesized and their fluorescence sensing behaviors toward various metal ions in aqueous buffer systems (90% HEPES buffered/MeOH, pH 7.2) were explored. The results revealed that isomeric Iheyamine **5a**–**5c** could act as Fe^{2+} and Fe^{3+} chemosensors, in which their sensitivity and selectivity for Fe^{2+} and Fe^{3+} sensing depended on their substituent on benzene ring at position 5. The isomeric Iheyamine **5c** containing electron withdrawing group exhibited nonselective toward Fe^{2+} and Fe^{3+} and its sensitivity toward Fe^{2+} and Fe^{3+} was much lower than those of **5a** and **5b**. For the isomeric Iheyamine **5a**, it exhibited "turn-off" fluorescent response upon the addition of Fe^{2+} and Fe^{3+} with the discrimination of other metal ions such as Hg^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Al^{3+}, Ag^{2+}, Pb^{2+}, Cr^{2+}, Ni^{2+}, Mg^{2+}, K^{+}, Ca^{2+}, Li^{+}, Co^{2+}, Na^{+}, Ba^{2+}, Cd^{2+} and Mn^{2+}. Moreover, although the isomeric Iheyamine **5b** showed higher sensitivity than **5a**, the Fe^{2+} and Fe^{3+} binding of **5b** could be interfered by Cu^{2+}. In addition, the Fe^{2+} could be completely oxidized to Fe^{3+} by simple H_2O_2 oxidation, consequently, the total concentration of Fe could be determined. The detection limits of isomeric Iheyamines **5a** and **5b** for Fe^{3+} were found to be 0.12 ppm and 0.03 ppm, respectively, which were lower than the maximum allowed level of Fe^{3+} in drinking water specified U.S. Environmental Protection Agency (U.S.EPA) and World Health Organization (WHO). In addition, isomeric Iheyamine **5b** showed the potential for the detection of Fe^{3+} in HeLa cellular system and could be the good candidate for Fe^{3+} sensor used in biological system.

1. Introduction

Over recent decade, heavy metal ion contamination has been a serious environmental pollution [1,2]. Among heavy metal, Fe^{3+} is one of the most essential metals in biological systems. Fe^{3+} also plays diverse function in organic and biological processes such as hemoglobin formation, oxygen transport, cellular metabolism, various biosyntheses and as cofactor enzymatic reactions [3]. Deficiency in Fe^{3+} can cause anemia disease and can affect the process of cell metabolism. However, excessive amount of Fe^{3+} in human can lead to various diseases, such as cancer, osteoporosis, liver and kidney damages, heart diseases, Alzheimer's disease and hemochromatosis [4–6]. Accordingly, the detection of Fe^{3+} in drinking water and natural water resources are crucial in respect of human health and environmental impact.

Fluorescent technique is an alternative method for the detection of several analyzing agents and it can not only be applied for determination of cations including Fe^{3+} [7–9] but also for the detection of anions [10,11], protons (H^{+}) [12,13] and small molecules [14–16]. This technique allows rapid, highly sensitive and selective as well as non-destructive and real time tracking for the detection of Fe^{3+}. In recent years, although there were many Fe^{3+} fluorescent sensors reported, most of them required organic solvents as working media [17,18]. Consequently, the development of the highly Fe^{3+} selective fluorescent sensor with water soluble property remains important and necessary.

Indole alkaloids are one of a large class of natural products found in animals, plants, fungi and a diversity of marine sources and possess various bioactive properties [19–22]. The electron rich with π-excessive system of indole alkaloids showed inherent fluorescence property. The

* Corresponding authors.
E-mail addresses: sopita249@gmail.com (S. Rattanopas), pornthippiyanuch@gmail.com (P. Piyanuch), wisansin_k@silpakorn.edu (K. Wisansin), acharoe@gmail.com (A. Charoenpanich), jitnapasirirak@gmail.com (J. Sirirak), waya.sengpracha@gmail.com (W. Phutdhawong), wanichacheva.nantanit@gmail.com, wanichacheva_n@su.ac.th (N. Wanichacheva).

https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2019.02.036
Received 20 October 2018; Received in revised form 26 February 2019; Accepted 28 February 2019
Available online 28 February 2019
1010-6030/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

nitrogen donor atom in indole alkaloid structure could also serve as metal ion binding site. In the past years, someindole-based fluorescent sensors were designed and synthesized for metal ions and inorganic anions detection. For example, in 2009, Hu et al. reported the fluorescent sensor for fluoride based on an anthracene diamine derivative incorporating two indole units with a highly selective turn-on response toward F^- with five hydrogen bonding interactions between ligand and F^- ion [23]. In 2016, Cosut et al. reported that the fluorescent sensor based on indole-boradiazaindacene (BODIPY) conjugate behaved as a turn-off sensor for highly selective and sensitive detection of Cu^{2+} with a chromogenic change from purple to yellow color and showed the stoichiometric ratio of 2:1 for [sensor]-Cu^{2+}complex [24]. However, the indole-based fluorescent sensor for the Fe^{3+}detection is still rare.

In this work, we reported new indole-based fluorescent sensors, isomeric Iheyamines, for Fe^{3+} sensitive and selective sensing. The isomeric Iheyamines are the bis-indole alkaloid containing fully conjugated system with a number of nitrogen atoms. The supramolecular host-guest chemistry and Hard and Soft Acids and Bases (HSAB) Theory prompted us to investigate the sensing properties of the isomeric Iheyamine sensors. Interestingly, despite many isomeric Iheyamines were prepared for biomedical proposes, the fluorescent sensing ability of the isomeric Iheyamines were not investigated. Herein, three isomeric Iheyamine derivatives **5a**–**5c**, which are different in their substituent groups on the benzene ring, were synthesized and their sensitivities to various metal cations were explored in 90% HEPES buffered/MeOH using fluorescence spectroscopy. Additionally, the application of the sensor for Fe^{3+} detection in HeLa cells was demonstrated.

2. Experiment

2.1. Materials and methods

Reagents and solvents were purchased from Sigma–Aldrich Corporation and Fluka Chemical Corporation, and were used as received. Melting points were determined on a Stuart Scientific SMP 2 melting point apparatus and were uncorrected. ^{1}H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker Advance 300 spectrometer (300 MHz for ^{1}H, 75 MHz for ^{13}C) in $CDCl_3$ using tetramethylsilane (TMS) as internal standard. Mass spectra were recorded on a POLARIS Q or HEWLETT PACKARD 5973 mass spectrometer. Reactions were monitored by thin-layer chromatography (TLC) using aluminium sheets pre-coated with silica gel 60 F_{254}. Preparative TLC was performed using Merck silica gel F_{254}. Column chromatography was performed using Merck Kieselgel 60. Fluorescence spectra were obtained using a 1 × 1 cm quartz cuvette on a Perkin Elmer Luminescence spectrometer LS 55. The excitation and emission slit widths were 5.0 nm and the scan rate was 300 nm/min. For computational calculation, the geometries optimization were obtained at the DFT-B3LYP level with 6-311G** basis set using Gaussian 09. VMD was utilized to generate the structures of sensors and sensor:Fe^{3+} complexes.

2.2. Syntheses

2.2.1. Synthesis of spiro[(1-methyl-3H-indole-2(1 H)-one)- 3,1′-(1′2′3′4′-tetrahydro-9H-pyrido[[3,4-b]indol)] (3a)

A mixture of *N*-methylisatin **1a** (0.16 g, 0.99 mmol) and tryptamine **(2)** (0.16 g, 1.00 mmol) in EtOH (5 mL) in the presence of glacial acetic acid (0.2 mL) and 4 Å molecular seive were stirred at room temperature for 24 h. The reaction mixture was filtered and washed with H_2O to give spiro **3a** (0.22 g, 73%) as cream solid; m.p. 232–233 °C (lit. [25] 239–241 °C); ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 2.95 (t, J = 5.7 Hz, 2H, CH_2), 3.24 (s, 3H, CH_3), 3.31 (dt, J = 5.4 Hz, 13.3, 1H, CH_2), 3.81 (dt, J = 6.1, 13.3 Hz, 1H, CH_2), 6.91 (d, J = 7.8 Hz, 1H, ArH), 7.03 (td, J = 0.9, 7.5 Hz, 1H, ArH), 7.08–7.12 (m, 3H, ArH), 7.17 (dd, J = 0.8, 7.8 Hz, 1H, ArH), 7.36 (td, J = 1.3, 7.7 Hz, 1H, ArH), 7.46 (br s, 1H, NH), 7.51–7.58 (m, 1H, ArH); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 21.1, 25.6, 39.0, 60.5, 107.7, 110.0, 111.5, 117.5, 118.6, 121.4, 122.3, 123.7, 126.2, 128.9, 129.1, 130.5, 135.2, 142.6, 175.6.

2.2.2. Synthesis of spiro [(5-methoxy-1-methyl-3H-indole-2(1 H)-one)- 3, 1′ -(1′2′3′4′-tetrahydro-9H-pyrido[[3,4-b]indol)] (3b)

A mixture of 5-methoxy-*N*-methylisatin **1b** (0.17 g, 0.90 mmol) and tryptamine **(2)** (0.16 g, 1.00 mmol) in EtOH (5 mL) in the presence of glacial acetic acid (0.2 mL) and 4 Å molecular seive were stirred at room temperature for 24 h. The reaction mixture was filtered and washed with EtOH. The filtrate was concentrated and the residue was purified by column chromatography on silica gel using hexane:EtOAc (2:1) as an eluent to give spiro **3b** (0.26 g, 87%) as beige solid; m.p. 243–245 °C (lit. [25] 255–256 °C); ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 2.98 (t, J = 5.7 Hz, 2H, CH_2), 3.25 (s, 3H, CH_3), 3.34 (dt, J = 5.4, 13.2 Hz, 1H, CH_2), 3.72 (s, 3H, OCH_3), 3.88 (dt, J = 6.3, 13.2 Hz, 1H, CH_2), 6.81–6.91 (m, 3H, ArH), 7.08–7.19 (m, 3H, ArH), 7.29 (br s, 1H, NH), 7.57 (d, J = 5.9 Hz, 1H, ArH); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 22.0, 26.6, 40.0, 55.9, 62.0, 109.4, 111.2, 111.6, 111.9, 114.7, 118.4, 119.4, 122.3, 127.0, 129.9, 132.7, 136.4, 136.9, 156.6, 176.7.

2.2.3. Synthesis of spiro[(5-bromo-1-methyl-3H-indole-2(1 H)-one)- 3, 1′ -(1′2′3′4′-tetrahydro-9H-pyrido[[3,4-b]indol)] (3c)

A mixture of 5-bromo-*N*-methylisatin **1c** (0.12 g, 0.50 mmol) and tryptamine **(2)** (0.10 g, 0.62 mmol) in EtOH (5 mL) in the presence of glacial acetic acid (0.2 mL) and 4 Å molecular seive were stirred at room temperature for 24 h. The reaction mixture was filtered and washed with EtOH. The filtrate was concentrated and the residue was purified by column chromatography on silica gel using hexane:EtOAc (2:1) as an eluent to give spiro **3c** (0.17 g, 89%) as beige solid; m.p. 240–242 °C; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 2.98 (t, J = 5.7 Hz, 2H, CH_2), 3.25 (s, 3H, CH_3), 3.32 (dt, J = 5.5, 13.2 Hz, 1H, CH_2), 3.83 (dt, J = 5.9, 13.2 Hz, 1H, CH_2), 6.82 (d, J = 8.3 Hz, 1H, ArH), 7.09–7.20 (m, 3H, ArH), 7.30 (br s, 1H, NH), 7.34 (d, J = 1.9 Hz, 1H, ArH),7.50 (dd, J = 2.0, 8.3 Hz, 1H, ArH), 7.56 (d, J = 6.5 Hz, 1H, ArH); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 19.8, 24.4, 37.8, 59.3, 108.0, 108.8, 110.6, 113.7, 116.4, 117.5, 120.5, 124.8, 125.7, 126.9, 130.4, 131.2, 134.0, 140.3, 173.9.

2.2.4. Synthesis of 5-methyl-5H-azepino[2,3-b:4,5-b′]diindole (5a)

To a solution of spiro compound **3a** (0.10 g, 0.33 mmol) in dry toluene (6 mL), DIBAL-H (0.5 mL, 3.02 mm0l) was added dropwise at −78 °C under argon atmosphere and the mixture was stirred for 4 h. The resulting mixture was quenched with a solution of 5% aqueous NaOH (8 mL) and extracted with EtOAc (3 × 15 mL). The combined organic extracts were wash with brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated to give oxyindoline**(4a)** (0.09 g), which was used in the following step without further purification.^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 2.86 (t, J = 5.6 Hz, 2H, CH_2), 2.93 (s, 3H, CH_3), 3.07 (dt, J = 6.3, 12.8 Hz, 1H, CH_2), 3.42 (dt, J = 5.0, 12.9 Hz, 1H, CH_2), 4.92 (s, 1H, CH), 6.60 (d, J = 7.8 Hz, 1H, ArH), 6.69 (td, J = 0.8, 7.4 Hz, 1H, ArH), 6.92 (dd, J = 0.9, 7.4 Hz, 1H, ArH), 7.07–7.16 (m, 2H, ArH), 7.17–7.23 (m, 2H, ArH), 7.52 (dd, J = 1.7, 6.6 Hz, 1H, ArH), 7.72 (br s, 1H, NH).

The oxyindolin **(4a)** (0.09 g, 0.29 mmol) in 5 M HCl (10 mL) was reflux at 90 °C for 1 h and then basified until the pH was more than 12 with 25% KOH. The reaction mixture was filtered and the solid was

purified by column chromatography on silica gel using hexane:EtOAc (2:1) as an eluent to give diindole **5a** (12 mg, 13% over two steps from **4a** as a green solid; m.p. 194–197 °C (lit. [25] 193–195 °C), ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.25 (s, 3H, CH_3), 7.45 (t, J = 7.8 Hz, 1H, ArH), 7.57–7.72 (m, 2H, ArH), 7.75 (d, J = 8.1 Hz, 1H, ArH), 7.83 (t, J = 8.1 Hz, 1H, ArH), 8.13 (d, J = 8.3 Hz, 1H, ArH), 8.35 (d, J = 7.8 Hz, 1H, ArH), 8.48 (d, J = 5.8 Hz, 1H, ArH), 9.03 (d, J = 5.8 Hz, 1H, ArH), 9.46 (d, J = 7.9 Hz, 1H, ArH); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 28.8, 109.4, 112.3, 119.5, 121.6 (2C), 122.3, 122.8, 126.0, 126.5, 127.6, 128.7, 132.6, 139.9, 145.5, 147.2, 147.4, 156.2, 160.2; HRMS (ESI) calcd for $C_{20}H_{16}N_3O^+$ $(M+H)^+$ 284.1182 *m/z*, found 284.1178 *m/z*.

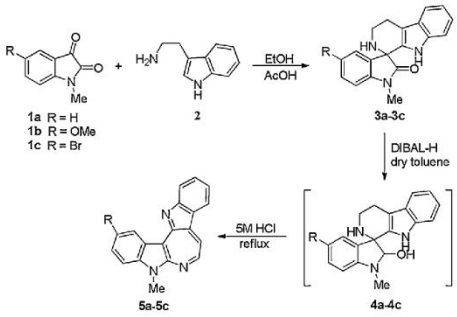
2.2.5. Synthesis of 2-methoxy-5-methyl-5H-azepino[2,3-b:4,5-b′]diindole (5b)

To a solution of spiro compound **3b** (0.11 g, 0.33 mmol) in dry toluene (6 mL), DIBAL-H (0.5 mL, 3.02 mm0l) was added dropwise at −78 °C under argon atmosphere and the mixture was stirred for 4 h. After that the mixture was quenched with a solution of 5% aqueous NaOH (8 mL) and extracted with EtOAc (3 × 15 mL). The combined organic extracts were wash with brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated to give oxyindoline **4b** (0.10 g), which was used in the following step without further purification.^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 2.86 (t, J = 4.9 Hz, 2H, CH_2), 2.87 (s, 3H, CH_3), 3.08 (dt, J = 6.1, 12.7 Hz, 1H, CH_2), 3.39 (dt, J = 5.2, 12.8 Hz, 1H, CH_2), 3.66 (s, 3H, OCH_3), 4.86 (s, 1H, CH), 6.53 (d, J = 8.7 Hz, 1H, ArH), 6.56 (d, J = 2.5 Hz, 1H, ArH), 6.79 (dd, J = 2.6, 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.09–7.23 (m, 3H, ArH), 7.52 (d, J = 7.5 Hz, 1H, ArH), 7.79 (br s, 1H, NH)

The oxyindolin **4b** (0.10 g, 0.30 mmol) in 5 M HCl (10 mL) was reflux at 90 °C for 1 h and then basified until the pH was more than 12 with 25% KOH. The reaction mixture was filtered and the solid was purified by column chromatography on silica gel using hexane:EtOAc (2:1) as an eluent to give diindole **5b** (14 mg, 14% over two steps from **4b** as a burgundy solid; m.p. 148–151 °C (lit. [25] 147–148 °C); ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.15 (s, 3H, CH_3), 4.23 (s, 3H, OCH_3), 7.42 (dd, J = 2.6, 8.9 Hz, 1H, ArH), 7.43 (t, J = 7.5 Hz, 1H, ArH), 7.60 (d, J = 8.9 Hz, 1H, ArH), 7.81 (t, J = 7.7 Hz, 1H, ArH), 8.11 (d, J = 8.0 Hz, 1H, ArH), 8.32 (d, J = 7.7 Hz, 1H, ArH), 8.43 (d, J = 5.7 Hz, 1H, ArH), 8.97 (d, J = 5.8 Hz, 1H, ArH), 9.12 (d, J = 2.5 Hz, 1H, ArH); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 26.7, 54.1, 105.1, 108.1, 109.5, 116.9, 117.7, 118.2, 119.2, 119.5, 120.5, 123.4, 130.2, 132.9, 142.8, 143.9, 145.3, 153.0, 153.8, 156.4; HRMS (ESI) calcd for $C_{19}H_{14}N_3^+$ $(M+H)^+$ 314.1288 *m/z*, found 314.1286 *m/z*.

2.2.6. Synthesis of 2-bromo-5-methyl-5H-azepino[2,3-b:4,5-b′]diindole (5c)

To a solution of spiro compound **3c** (0.10 g, 0.26 mmol) in dry toluene (6 mL), DIBAL-H (0.5 mL, 3.02 mm0l) was added dropwise at −78 °C under argon atmosphere and the mixture was stirred for 4 h. The mixture was then quenched with a solution of 5% aqueous NaOH (8 mL) and extracted with EtOAc (3 × 15 mL). The combined organic extracts were wash with brine, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated to give oxyindoline **4c** (0.10 g), which was used in the



Scheme 1. Syntheses of isomeric Iheyamines **5a–5c**.

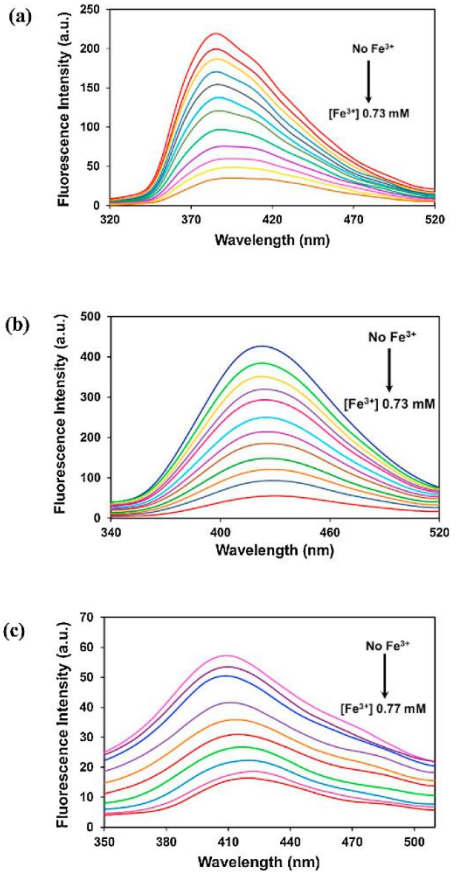


Fig. 1. Fluorescence emission spectra (λ_{ex} 275 nm) of **5a** (a) **5b** (b) and **5c** (c) 20.0 μM in 90% HEPES buffered/MeOH (5 mM, pH 7.2) as a function of [Fe^{3+}].

following step without further purification. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 2.86 (t, J = 5.6 Hz, 2H, CH_2), 2.90 (s, 3H, CH_3), 3.06 (dt, J = 6.3, 12.8 Hz, 1H, CH_2), 3.39 (dt, J = 5.0, 12.9 Hz, 1H, CH_2), 4.91 (s, 1H, CH), 6.46 (d, J = 8.3 Hz, 1H, ArH), 7.01 (d, J = 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.11 (td, J = 1.4, 7.1 Hz, 1H, ArH), 7.16 (td, J = 1.5, 7.3 Hz, 1H, ArH), 7.23 (d, J = 7.0 Hz, 1H, ArH), 7.31 (dd, J = 2.0, 8.3 Hz, 1H, ArH), 7.53 (d, J = 7.2 Hz, 1H, ArH), 7.70 (br s, 1H, ArH).

The oxyindolin **4c** (0.10 g, 0.30 mmol) in 5 M HCl (10 mL) was reflux at 90 °C for 1 h and then basified until the pH was more than 12 with 25% KOH. The reaction mixture was filtered and the solid was purified by column chromatography on silica gel using hexane:EtOAc (2:1) as an eluent to give diindole **5c** (11.2 mg), 14% over two steps from **4c** as a green solid; m.p. 213–215 °C, ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.18 (s, 3H, CH_3), 7.45 (t, J = 7.9 Hz, 1H, ArH), 7.49 (d, J = 8.8 Hz, 1H, ArH), 7.79 (dd, J = 2.0, 8.7 Hz, 1H, ArH), 7.83 (t, J = 7.7 Hz, 1H, ArH), 8.10 (d, J = 8.1 Hz, 1H, ArH), 8.30 (d, J = 7.8 Hz, 1H, ArH), 8.37 (d, J = 5.7 Hz, 1H, ArH), 8.98 (d, J = 5.7 Hz, 1H, ArH), 9.70 (d, J = 2.0 Hz, 1H, ArH); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 27.0, 108.8, 113.3, 117.7, 117.8, 118.5, 119.8, 120.0, 120.9, 121.9, 123.9, 125.6, 127.4, 129.3, 130.9, 136.2, 144.4, 145.3; HRMS (ESI) calcd for $C_{19}H_{13}BrN_3^+$ $(M+H)^+$ 362.0287 m/z, found 362.0283 m/z.

2.3. Binding studies

The binding studies of **5a–5c** were carried out in 90% HEPES buffered/MeOH (5 mM, pH 7.2). The metal chloride solutions (1.0×10^{-2} M) were prepared by dissolving metal salts in deionized water. The fluorescence titration was performed with solutions of **5a–5c** (20 μM)

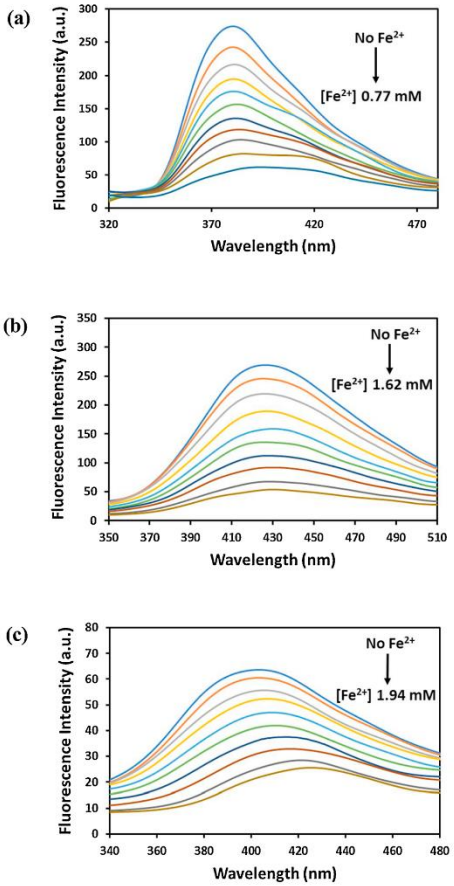


Fig. 2. Fluorescence emission spectra (λ_{ex} 275 nm) of **5a** (a) **5b** (b) and **5c** (c) 20.0 μM in 90% HEPES buffered/MeOH (5 mM, pH 7.2) as a function of $[Fe^{2+}]$.

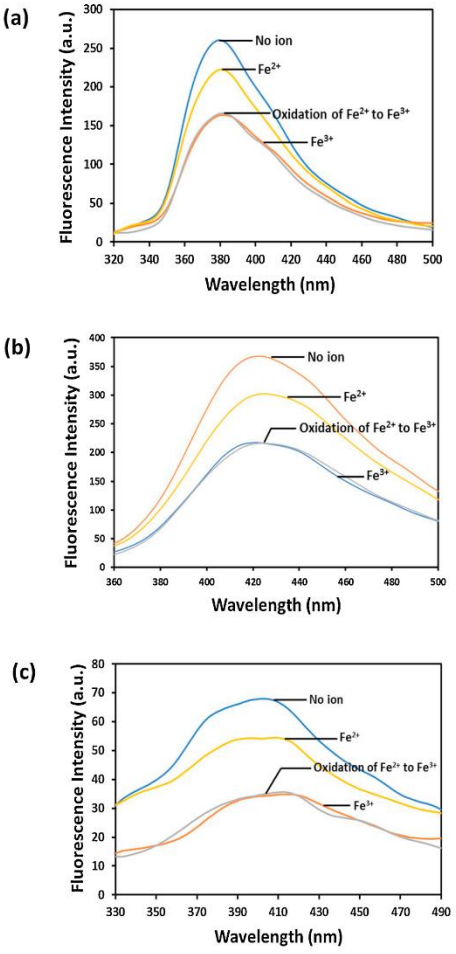


Fig. 3. Fluorescence emission spectra (λ_{ex} 275 nm) of **5a** (a), **5b** (b) and **5c** (c) (20 μM) in 90% HEPES buffered/MeOH (5 mM, pH 7.2) with addition of $FeCl_3$, $FeCl_2$ and $FeCl_2$ after oxidized with H_2O_2 at the same concentration.

and measured as a function of metal ions concentration over a fixed wavelength range (320–520 nm) with the excitation wavelength (λ_{ex}) at 275 nm.

2.4. Oxidation of Fe^{2+} to Fe^{3+}

The oxidation of Fe^{2+} was carried out by the addition of 4.5×10^{-2} M of H_2O_2 (1 mL, 1.5 eq.) to 1.5×10^{-2} M of $FeCl_2$ solution (2 mL, 1eq.) and stirred for 30 min at room temperature to give 1×10^{-2} M of Fe^{3+} solution.

3. Results and discussion

3.1. Syntheses of designed sensors

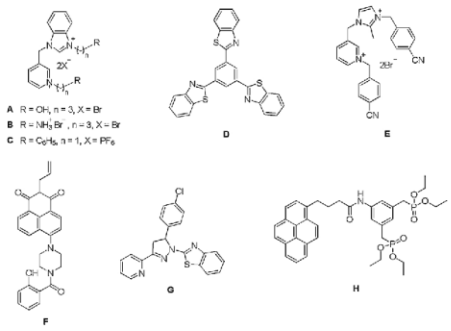
The syntheses of isomeric Iheyamine derivatives **5a**–**5c**, were shown in Scheme 1. The precursor **1a**–**1c** were synthesized with previously described method [26]. The condensation reaction of *N*-substituted isatin derivatives **1a**–**1c** with tryptamine **(2)** under acidic conditions provided spiro-compounds **3a**–**3c**, followed by the partial reduction with DIBAL-H providing carbinol amine **4a**–**4c**, which underwent acid catalyzed rearrangement to the designed sensors, isomeric Iheyamines **5a**–**5c**. The structures of the designed compounds were confirmed by ^{1}H NMR, ^{13}C NMR and HRMS.

3.2. Sensitivity studies

The sensitivity studies of isomeric Iheyamine sensors (**5a**–**5c**) toward Fe^{3+} were investigated by fluorescence titration experiments which were carried out by monitoring of fluorescence intensity changes upon the addition of various concentrations of Fe^{3+} (from 0 to 0.77 mM) to **5a**–**5c** in 90% HEPES buffered/MeOH solutions at an excitation wavelength of 275 nm (Fig. 1). In the absence of Fe^{3+}, the solutions of **5a**, **5b** and **5c** showed strong fluorescence emission signals at 385 nm, 420 nm and 405 nm, respectively. When higher concentration of Fe^{3+} was added, lower fluorescence emission intensity was observed with the turn off response from initial fluorescence and reached the saturation state at Fe^{3+} concentrations of 0.73 mM for **5a** and **5b** and 0.77 mM for **5c**. The fluorescence quenching of these compounds could be occurred by the photo induced electron transfer (PET) process [27,28]. These results clearly demonstrated that the "ON-OFF" switching mechanism of **5a–5c** occurred in response to Fe^{3+} complexation.

The detection limits of **5a–5c** were determined from the plot of the fluorescence intensity as a function of the concentration of Fe^{3+} and calculated from threefold standard deviation of the lowest concentration of the calibration curve [29]. The results showed that the detection limits of **5a** and **5b** were 2.19 μM (0.12 ppm) and 0.56 μM (0.03 ppm), respectively, which were lower than the maximum allowed level of

Table 1
Comparison of isomeric Iheyamine probes **5a** and **5b** with other literatures reported Fe^{3+} fluorescence probes.



Entry	Operation mode	Working system	λ_{ex}/ λ_{em} (nm)	Detection limit (μM)	Ref.
A–C	Turn-OFF	H_2O for A and B H_2O : CH_3CN (9:1 v/v) for C	264/370, 296	2.81 (0.16 ppm) for A 5.6 (0.31 ppm) for B 14.8 (0.83 ppm) for C	[31] (2017)
D	Turn-OFF	H_2O : THF (4:6 v/v)	300/387, 374	3.05 (0.17 ppm)	[32] (2018)
E	Turn-OFF	H_2O : CH_3CN (9:1 v/v)	262/297	28.1 (1.57 ppm)	[33] (2018)
F	Turn-OFF	EtOH : Tris–HCl buffer (1:1 v/v)	408/521	4.5 (0.25 ppm)	[34] (2013)
G	Turn-OFF	THF : HEPES buffer (95:5 v/v)	352/462	1.4 (0.09 ppm)	[35] (2013)
H	Turn-OFF	H_2O : CH_3CN (1:1 v/v)	280/384, 420	0.99 (0.06 ppm)	[36] (2017)
5a and 5b	Turn-OFF	HEPES buffer : MeOH (9:1 v/v)	275/385 for 5a 275/420 for 5b	2.19 (0.12 ppm) for 5a 0.56 (0.03 ppm) for 5b	This work

Fe^{3+} in drinking water (0.3 ppm) specified U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA) and World Health Organization (WHO) [30]. For **5c**, its detection limit (15.8 μM, 0.88 ppm) was higher than those of **5a** and **5b.** This might be because the electron withdrawing group (Br group) at 5-position of indole ring caused the deceasing in electron density at nitrogen atoms, resulted in lower binding ability of isomeric Iheyamine sensor **5c** to Fe^{3+}.

In addition, isomeric Iheyamines **5a–5c** also bound to Fe^{2+} and their fluorescence titration spectra was shown in Fig. 2. It was found that Iheyamines **5a–5c** exhibited "ON-OFF" responses toward Fe^{2+} and their fluorescence emission intensities reached the saturation state at Fe^{2+} concentrations of 0.77 mM for **5a**, 1.62 mM for **5b** and 1.94 mM for **5c**, respectively.

It should be noted that all isomeric Iheyamines **5a–5c** could also detect Fe^{2+}. However, the sensors provided lower sensitivity toward Fe^{2+} with moderate detection limits for Fe^{2+} (21.4 μM, 1.20 ppm for **5a**, 28.3 μM, 1.58 ppm for **5b** and 85.1 μM, 4.75 ppm for **5c**). Although the isomeric Iheyamines **5a–5c** could bind to both Fe^{2+} and Fe^{3+}, Fe^{2+} could be converted to Fe^{3+} by the treatment with H_2O_2 [31], therefore, it is possible to determine the total iron in the sample that contained both Fe^{2+} and Fe^{3+}. The complete oxidation of Fe^{2+} to Fe^{3+} was confirmed by the comparable intensities of fluorescence emissions of **5a**–**5c** at the same concentration in the presence of Fe^{3+} from $FeCl_3$ and when the $Fe^{2+}$from $FeCl_2$ were oxidized by H_2O_2 (Fig. 3). This result indicated that the added Fe^{2+} from $FeCl_2$ were completely converted to Fe^{3+}. Therefore, oxidation of Fe^{2+} by H_2O_2 could be used to determine the total concentration of Fe in term of ions.

The sensitivity for the determination of Fe^{3+} in terms of the detection limits of isomeric Iheyamines, especially **5a** and **5b**, were comparable to or lower than those of previous reported Fe^{3+}-fluorescent sensors [32–37] shown in Table 1. In addition, most of the reported literatures of Fe^{3+} fluorescence sensors were operated in the high percentage of organic solvent as the working systems. Therefore, it should be noted that the small percentage organic solvent and physiological pH buffer conditions, 90% HEPES buffered/MeOH (5 mM, pH 7.2), was employed for our sensors as a working media, which led to more practical use of our sensors in the biological samples.

Fluorescence quantum yields (Φ_f) of **5a** and **5b** were determined to be 0.11 and 0.12, respectively when excited at 270 nm, using naphthalene standard with Φ_f of 0.23 in cyclohexane as a reference [38]. Whereas the fluorescence quantum yield of **5c** could not be evaluated due to its low fluorescence emission ability.

The stoichiometry of each sensors and Fe^{3+} was determined by Job's plot generated by continuously varying the mole fractions of isomeric Iheyamine sensors **5a–5c** from 0 to 1 in the solutions of [Sensor] + [Fe^{3+}] with a total concentration of 10 μM. The approximately maximum fluorescence intensities of **5a–5c** were observed approximately at 0.65 mol fraction, which indicated 2:1 stoichiometry of the sensors and Fe^{3+} complex in 90% HEPES buffered/MeOH solutions (Fig. 4).

To better understand the coordination of isomeric Iheyamine sensors **5a–5c** to Fe^{3+}, **5a–5c** and their complexes were optimized at the B3LYP/6-311G** level using Gaussian 09. As shown in Fig. 5, the DFT optimized structures of **5a**-Fe^{3+}, **5b**-Fe^{3+} and **5c**-Fe^{3+} complexes showed the coordinating of two bidentate isomeric Iheyamine ligands to a single Fe^{3+} center, where the Fe^{3+} was coordinated with four nitrogen atoms in tetrahedral geometry [39] with the respective distances of 2.13 Å, 2.17 Å, 3.39 Å and 3.40 Å for **5a**-Fe^{3+} complex, 2.11 Å, 2.19 Å, 3.43 Å and 3.51 Å for **5b**-Fe^{3+} complex and 2.11 Å, 2.20 Å, 3.43 Å and 3.46 Å for **5c**-Fe^{3+} complex.

The electron density distributions and energy gap between the highest occupied molecular orbital (HOMO) and the lowest unoccupied molecular orbital (LUMO) of isomeric Iheyamine sensors **5a–5c** and their complexes with Fe^{3+} were also investigated and shown in Fig. 6. The results indicated that the electron density of the HOMO of **5b** exhibited the highest electron density at the indole ring moiety, which was delocalized from electron donor group (OCH_3) on benzene ring. Accordingly, **5b** exhibited stronger binding ability to Fe^{3+}compared to **5a** which has no substituent group on the indole ring. This result was consistent to the sensitivity testing resulted in the above section, which indicated that isomeric Iheyamine **5b** showed highest sensitivity with the detection limit of 0.03 ppm. In addition, the HOMO-LUMO energy gap of **5b**-Fe^{3+} complex was smaller than those of **5a**-Fe^{3+} and **5c**-Fe^{3+} complex, which was consistent to the longer wavelength of fluorescence emission of **5b**-Fe^{3+} complex.

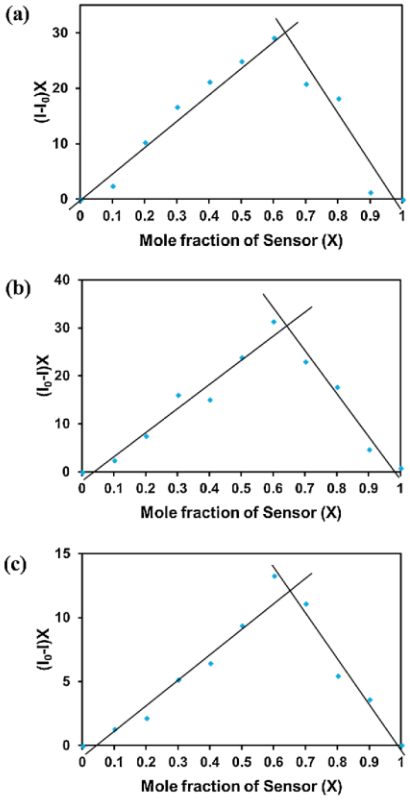


Fig. 4. Job's plot of **5a** (a), **5b** (b) and **5c** (c) in 90% HEPES buffered/MeOH (5 mM, pH 7.2) with a total concentration of each isomeric Iheyamine sensor and Fe^{3+} at 10 μM.

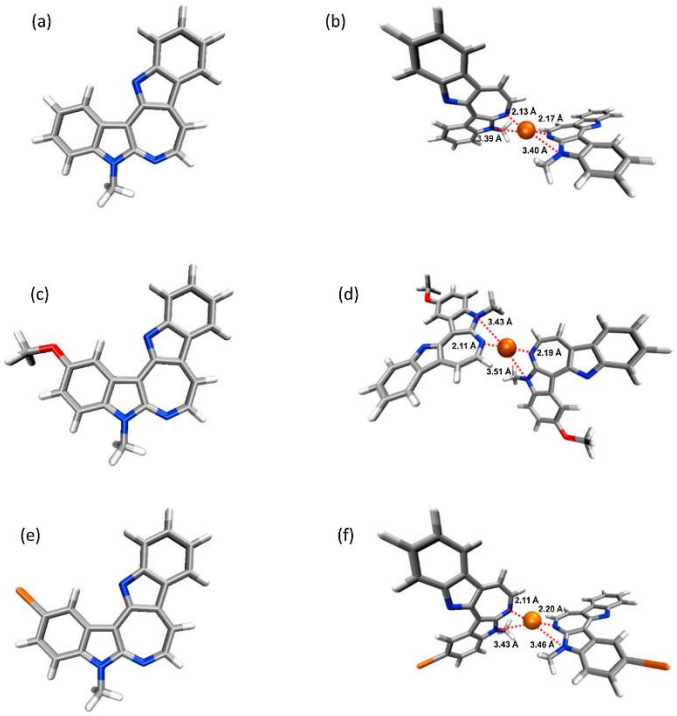


Fig. 5. Optimized structures of **5a** (a), **5a**-Fe^{3+} complex (b), **5b** (c), **5b**-Fe^{3+} complex (d), **5c** (e) and **5c**-Fe^{3+} complex (f).

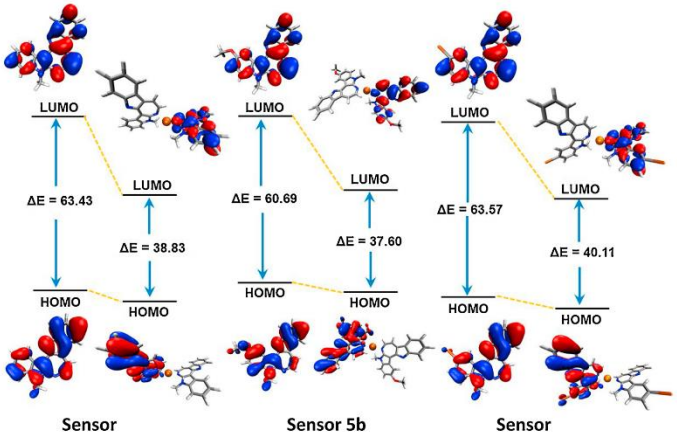


Fig. 6. HOMOs, LUMOs and energy gaps (kcal/mol) of the **5a**, **5a**-Fe^{3+} complex, **5b**, **5b**-Fe^{3+} complex, **5c** and **5c**-Fe^{3+} complex.

3.3. Selectivity studies

The selectivity studies of sensors **5a**, **5b** and **5c** were examined by a similar method to the Separate Solution Method (SSM) in ion-selective electrode applications [40], which was performed by observing the change of fluorescence intensities of the isomeric Iheyamine sensors in each solution containing only the considered ion. The fluorescence intensities of each isomeric Iheyamine sensor **5a**–**5c** containing different metal ions, including Fe^{3+}, Fe^{2+}, Hg^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Al^{3+}, Ag^{+}, Pb^{2+}, Cr^{2+}, Ni^{2+}, Mg^{2+}, K^{+}, Ca^{2+}, Li^{+}, Co^{2+}, Na^{+}, Ba^{2+}, Cd^{2+} and Mn^{2+}, were investigated in 90% HEPES buffered/MeOH solutions. As shown in Fig. 5, the fluorescence emission intensities of sensors **5a**–**5c** gradually decreased with the increase of Fe^{2+} and Fe^{3+} concentrations. Especially, isomeric Iheyamine sensor **5a** offered high selectivity to Fe^{3+} and Fe^{2+} compared to Hg^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Al^{3+}, Ag^{+}, Pb^{2+}, Cr^{2+}, Ni^{2+}, Mg^{2+},K^{+}, Ca^{2+}, Li^{+}, Co^{2+}, Na^{+}, Ba^{2+}, Cd^{2+} and Mn^{2+} under identical concentrations and conditions (Fig. 6a). However, the Fe^{2+}/Fe^{3+} selectivity of isomeric Iheyamine sensors **5b** and **5c** were slightly interfered with Cu^{2+} as well as $Cu^{2+}$and Hg^{2+}, respectively (Fig. 7b and 7c).

The selectivity of the isomeric Iheyamine **5a**–**5c** for Fe^{3+}-selective fluorescent sensors were further determined by the competition experiments in background of various competing metal ions, as shown in Fig. 8. The fluorescence spectra of **5a**–**5c** were investigated after the addition of Fe^{3+} and other metal ions (Cu^{2+}, Co^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}, Pb^{2+}, Hg^{2+}, Ag^{+}, Al^{3+}, Mn^{2+}, Ni^{2+}, Ca^{2+}, Li^{+}, Na^{+}, K^{+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Cr^{2+}) in the same concentration. It was found that the relatively consistent Fe^{3+}-induced fluorescence quenching was observed in background competitive ions (0.1 mM of each Cu^{2+}, Co^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}, Pb^{2+}, Hg^{2+}, Ag^{2+}, Al^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+}, Ca^{2+}, Li^{+}, Na^{+}, K^{+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Cr^{2+} and Fe^{3+}). High selectivity of **5a** for Fe^{3+}over other metal ions was observed. On the other hand, **5b** and **5c** were inferior sensors in

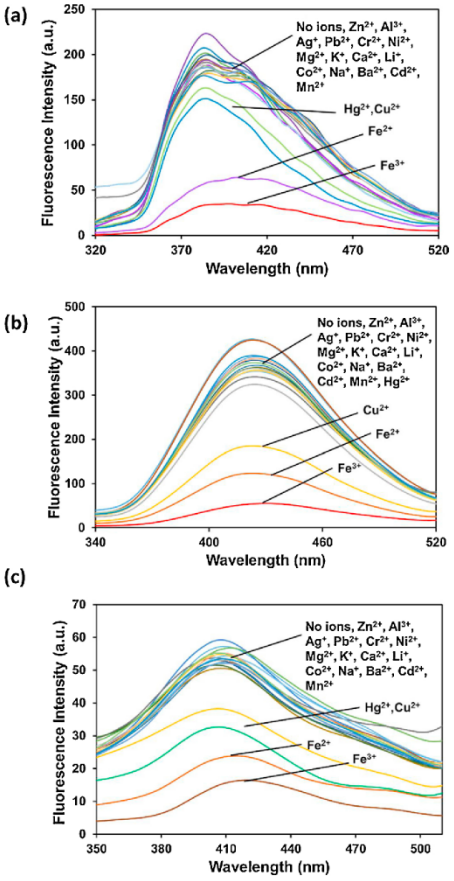


Fig. 7. Fluorescence spectra (λ_{ex} 275 nm) of each sensors (20.0 μM) in 90% HEPES buffered/MeOH (5 mM, pH 7.2) with addition of chloride salts of Fe^{3+}, Fe^{2+}, Hg^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Al^{3+}, Ag^{+}, Pb^{2+}, Cr^{2+}, Ni^{2+}, Mg^{2+}, K^{+}, Ca^{2+}, Li^{+}, Co^{2+}, Na^{+}, Ba^{2+}, Cd^{2+} and Mn^{2+} (0.7 mM); (a) **5a**, (b) **5b**, (c) **5c**.

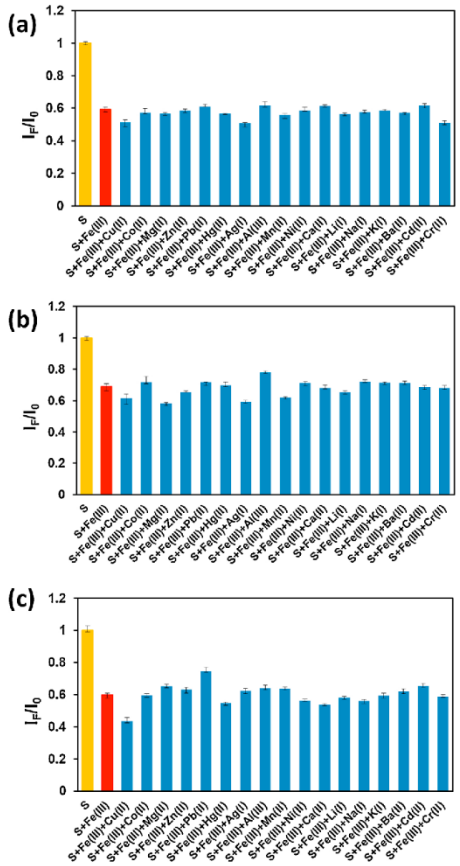


Fig. 8. Competitive selectivities of **5a** (a), **5b** (b) and **5c** (c) toward Fe^{3+} in the presence of other metal ions in 90% HEPES buffered/MeOH (5 mM, pH 7.2).

terms of selectivity compared to **5a** since they were interfered with some ions such as Cu^{2+} and Hg^{2+}. Similarly, the competitive selectivity of **5a**–**5c** toward Fe^{2+} showed high selective for Fe^{2+} over other metal ions, including Cu^{2+}, Co^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}, Pb^{2+}, Hg^{2+}, Ag^{+}, Al^{3+}, Mn^{2+}, Ni^{2+}, Ca^{2+}, Li^{+}, Na^{+}, K^{+}, Ba^{2+}, Cd^{2+} and Cr^{2+}. (Supplementary data, Fig. S8).

3.4. Fluorescence imaging in living cells

To investigate the applicability of isomeric Iheyamine sensor to detect Fe^{3+} ion in living cells, fluorescence imaging experiment was carried out in human cervical cancer HeLa cells and monitored under the fluorescent microscope (Fig. 9). Initially, HeLa cells were incubated with isomeric Iheyamine sensor **5b** at concentrations of 125 μM (2.5% DMSO/PBS buffers) for 30 min at 37 °C. In the absence of additional Fe^{3+}, it was found that isomeric Iheyamine sensor **5b** showed intracellular fluorescence upon excitation in UV and blue channels (Fig. 9a). The fluorescence imaging indicated that isomeric Iheyamine **5b** could permeate through the cells membrane. When HeLa cells were exposed to 50 and 100 μM of Fe^{3+} for 2 h, the results showed the decreasing of fluorescence intensity from the intracellular area in the UV and blue channels (Fig. 9b and 9c). Cytotoxicity test of isomeric Iheyamine **5b** also performed with PrestoblueTM assay. After 30 min exposure to isomeric Iheyamine **5b**, cells were further cultured in complete growth media (CGM) for 24 h before the assay. The results showed that isomeric Iheyamine **5b** had low cytotoxicity and did not affect cell viability up to the concentration of 62.5 μM (Fig. 10). At higher concentration of 125–250 μM, HeLa cells still maintained about 90% cell viability (Fig. 10). According to this result, isomeric Iheyamine **5b** could show the potential for the detection of Fe^{3+} in HeLa cellular system and could be the good candidate as a Fe^{3+} tracker for biological system.

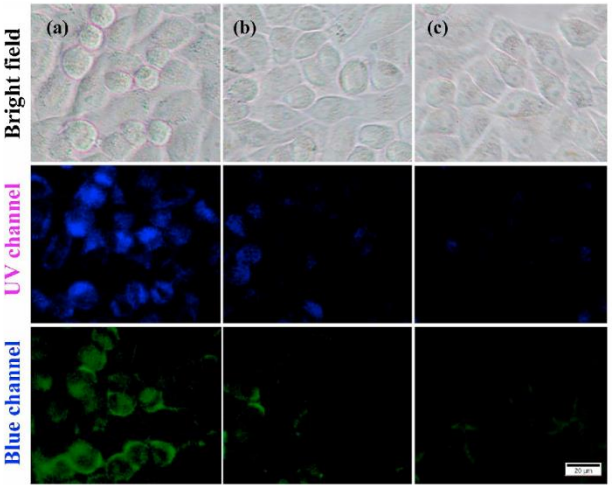


Fig. 9. Fluorescence microscopic images of HeLa cells incubated with sensor 5b (125 μM) at 37 °C in PBS with 2.5% DMSO in each concentration of Fe^{3+}: (a) 0 μM, (b) 50 μM, (c) 100 μM, respectively. Imaging was performed by using an inverted fluorescence microscope (Olympus CKX53/ DP27-2, 100 W mercury burner) with the excitation wavelengths of < 405 nm (UV channel) and 490 nm (blue channel).

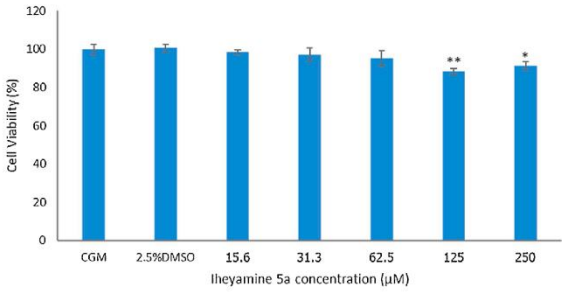


Fig. 10. Cytotoxicity test of isomeric Iheyamine **5b**. HeLa cells were incubated with isomeric Iheyamine **5b** in 2.5% DMSO in PBS for 30 min, and further cultured in complete growth media (CGM) for 24 h before the cell viability assay. (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$).

4. Conclusion

In conclusion, we reported three new indole-based fluorescent sensors (isomeric Iheyamines **5a**–**5c**), which exhibited fluorescence responses toward Fe^{2+} and Fe^{3+} sensing in aqueous buffer systems. It was found that the different substituent at the 5-position of isomeric Iheyamine structures showed the effect on the response of sensors. Electron-withdrawing substituent at the 5-position of isomeric Iheyamine structure could decrease Fe^{2+} and Fe^{3+} sensing properties of sensor, **5c**. Isomeric Iheyamine **5b** containing electron-donating substituent showed excellent fluorescent properties with the highest fluorescence intensity and had the lowest detection limit, however the detection of Fe^{2+} and Fe^{3+} of **5b** was interfered with Cu^{2+}. In contrast, isomeric Iheyamine **5a** provides high sensitivity for Fe^{2+} and Fe^{3+} with the detection limit of 0.12 ppm and showed very high selectivity for Fe^{2+} and Fe^{3+} over other metal ions. Although the isomeric Iheyamines 5a-5c also bind to Fe^{2+}, the one-step treatment with H_2O_2 could be used to oxidize Fe^{2+} to Fe^{3+}, and the total iron ion can be determined from the concentration of Fe^{3+}. In addition, isomeric Iheyamine **5a** especially showed the potential for Fe^{3+} detection in living cell, and therefore **5a** can be the good candidate as a Fe^{3+} tracker in the biological systems.

Acknowledgments

We thank the Department of Chemistry, Faculty of Science, Silpakorn University for the financial support for Rattanopas, S. Wanichacheva, N. would like to thank the funding from Grant RSA 6080058 from the Thailand Research Fund and Faculty of Science, Silpakorn University. Piyanuch, P. thanks to the Royal Golden Jubilee (RGJ) Ph.D. Program, Grant No. PHD/0079/2558. Sirirak, J. was supported by the Development and Promotion of Science and Technology Talents Project (DPST Research Grant 005/2557). We also thanks The Chulabhorn Research Institute for HRMS spectroscopy.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2019.02.036.

References

[1] A. Singh, R. Pal, C. Gangwar, A. Gupta, A. Tripathi, Release of heavy metals from industrial waste and E-waste burning and its effect on human health and environment, IJERMT 4 (2015) 51–56.
[2] F. Akbal, S. Camci, Copper, chromium and nickel removal from metal plating wastewater by electrocoagulation, Desalination 269 (2011) 214–222.
[3] J. Wang, K. Pantopoulos, Regulation of cellular iron metabolism, Biochem. J. 434 (2011) 365–381.
[4] N. Abbaspour, R. Hurrell, R. Kelishadi, Review on iron and its importance for human health, J. Res. Med. Sci. 19 (2014) 164–174.
[5] M.D. Beaton, C.P. Adams, The myths and realities of hemochromatosis, Can. J. Gastroenterol. 21 (2007) 101–104.
[6] J.R. Connor, E.A. Milward, S. Moalem, M. Sampietro, P. Boyer, M.E. Percy, C. Vergani, R.J. Scott, M. Chorney, Is hemochromatosis a risk factor for alzheimer's disease? J. Alzheimers Dis. 3 (2001) 471–477.
[7] J.H. Xu, Y.M. Hou, Q.J. Ma, X.F. Wu, X.J. Wei, A highly selective fluorescent sensor for Fe^{3+} based on covalently immobilized derivative of naphthalimide, Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc. 112 (2013) 116–124.
[8] Y. Hu, F. Zhao, S. Hu, Y. Dong, D. Li, Z. Su, A novel turn-on colorimetric and fluorescent sensor for Fe^{3+} and its application in living cells, J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 322 (2017) 351–356.
[9] B. Li, J. Tian, D. Zhang, F. Tian, A novel colorimetric fluorescence sensor for Fe^{3+} based on quinoline Schiff base, J. Biol. Chem. Lumin. 32 (2017) 1567–1573.
[10] D. Buckland, S.V. Bhosale, S.J. Langford, A chemodosimer based on a core-substituted naphthalene diimide for fluoride ion detection, Tetrahedron Lett. 52 (2011) 1990–1992.
[11] X.Y. Xu, X. Sun, H. Ge, R.L. Arrowsmith, J.S. Fossey, S.I. Pascu, Y.B. Jiang, T.D. James, Synthesis and evaluation of a boronate-tagged 1,8-naphthalimide probe for fluoride recognition, Org. Biomol. Chem. 13 (2015) 4143–4148.
[12] C. Thivierge, J. Han, R.M. Jenkins, K. Burgess, Fluorescent proton sensors based on energy transfer, J. Org. Chem. 76 (2011) 5219–5228.
[13] R.P. Cox, H.F. Higginbotham, B.A. Graystone, S. Sandanayake, S.J. Langford, T.D.M. Bell, A new fluorescent H^+ sensor based on core-substituted naphthalene diimide, Chem. Phys. Lett. 521 (2012) 59–63.
[14] D. Shi, D. Zhou, Y. Zang, J. Li, G. Chen, T.D. James, X. He, H. Tian, Selective fluorogenic imaging of hepatocellular H_2S by a galactosylazidonaphthalimide probe, Chem. Commun. 51 (2015) 3653–3655.
[15] T.D. James, P. Linnane, S. Shinkai, Fluorescent saccharide receptors: a sweet solution to the design, assembly and evaluation of boronic acid derived PET sensors, Chem. Commun. (1996) 281–288.
[16] Y. Ooyama, A. Matsugasako, T. Nagano, K. Oka, K. Kushimoto, K. Komaguchi, I. Imae, Y. Harima, Fluorescence PET (photo-induced electron transfer) sensor for water based on anthracene-amino acid, J. Photochem. Photobiol. A: Chem 222 (2011) 52–55.
[17] S. Lee, H. Jang, J. Lee, S.H. Jeon, Y. Sohn, C.S. Ra, Selective and sensitive morpholine-type rhodamine B-based colorimetric and fluorescent chemosensor for Fe (III) and Fe(II), Sens. Actuators B 248 (2017) 646–656.
[18] S. Hasan, N.A. Hamedan, A.A.A. Razali, N.H. Uyup, H.M. Zaki, Synthesis and characterization of *p*-dimethylaminobenzaldehydebenzoylthiourea and study towards selective and sensitive fluorescent sensor for detection of iron (III) cation in aqueous solution, IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng. 172 (2017) 1–7.
[19] M. Fabbri, G. Delp, O. Schmidt, U. Theopold, Animal and plant members of a gene family with similarity to alkaloid-synthesizing enzymes, Biochem. Biophys. Res. Commun. 271 (2000) 191–196.
[20] H.A. Hamid, A.N.M. Ramli, M.M. Yusoff, Indole alkaloids from plants as potential leads for antidepressant drugs: a mini review, Front Pharmacol. 8 (2017) 96.
[21] X. Gao, Y.-H. Chooi, B.D. Ames, P. Wang, C.T. Walsh Y. Tang, Fungal indole alkaloid biosynthesis: genetic and biochemical investigation of the tryptoquialanine pathway in penicilliumaethiopicum, J. Am. Chem. Soc. 133 (2011) 2729–2741.
[22] N. Netz, T. Opatz, Marine indole alkaloids, Mar. Drugs 13 (2015) 4814–4914.
[23] Z.-Q. Hua, C.-L. Cui, H.-Y. Lub, L. Dinga, X.-D. Yang, A highly selective fluorescent chemosensor for fluoride based on an anthracenediamine derivative incorporating indole, Sens. Actuators B: Chem. 141 (2009) 200–204.
[24] S.O. Tumaya, E. Okutana, I.F. Sengula, E. Ozcana, H. Kandemirb, T. Dorukc, M. Cetinc, B. Cosuta, Naked-eye fluorescent sensor for Cu (II) based on indole conjugate BODIPY dye, Polyhedron 117 (2016) 161–171.
[25] J. Bremner, W. Sengpracha, B. Skelton, a compact approach to an isomeric iheyamine a system and X-rey crystal structure of 5-methyl-5H-azepino[3,2-b:4,5-b']-diindole, Synth. Commun. 38 (2008) 1931–1939.
[26] P. Yu, Y. Teng, H. Zhao, J. Wang, H. Liu, M. Gao, Y. Zhou, K. Han, Z. Fan, Y. Zhang, H. Sun, Synthesis and anti-cancer activity evaluation of 5-(2-carboxyethenyl)-isatin derivatives, Eur. J. Med. Chem. 112 (2016) 145–156.
[27] U. Fegade, S. Attaede, A. Kuwar, Fluresecent recognition of Fe^{3+} ion with photo-induced electron transfer (PET) sensor, Chem. Phys. Lett. 584 (2013) 165–171.
[28] T. Puthiyedath, D. Bahulayan, A click derived triazole-coumarin derivative as fluorescence on-off PET based sensor for Ca^{2+} and Fe^{3+} ions, Sens. Actuators B: Chem. 272 (2018) 110–117.
[29] P. Venkatesan, S. Wu, A turn-on fluorescent pyrene-based chemosensor for Cu(II) with live cell application, RCS Adv. 5 (2015) 42591–42596.
[30] (a) US EPA, National Primary Drinking Water Regulations, (2009) EPA 812-Z-94-001, May;
(b) WHO, Guidelines for Drinking Water Quality, World Health Organization, Geneva, 2008.
[31] S. Dehghani, A.J. Jafari, M. Farzadkia, M. Gholami, Sulfonamide antibiotic reduction in aquatic environment by application of fenton oxidation process, Iran. J. Environ. Health Sci. Eng. 10 (2013) 29.
[32] S. Bishnoi, M.D. Milton, Selective and sensitive novel benzimidazolium-based fluorescent probes for micromolar detection of Fe^{3+} ions in pure aqueous media, J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 335 (2017) 52–58.
[33] K. Jiang, Y.-C. Wu, H.-Q. Wu, S.-L. Li, S.-H. Luo, Z.-Y. Wang, A highly selective, pH-tolerable and fast-response fluorescent probe for Fe^{3+} based on star-shape benzothiazole derivative, J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 350 (2018) 52–58.
[34] S. Chaudhary, M.D. Milton, Dicationic imidazolium salts as fluorescent probes for selective detection of Fe^{3+} ion in pure aqueous media, J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 356 (2018) 595–602.
[35] J.-H. Xu, Y.-M. Hou, Q.-J. Ma, X.-F. Wu, X.-J. Wei, A highly selective fluorescent sensor for Fe^{3+} based on covalently immobilized derivative of naphthalimide, Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc. 112 (2013) 116–124.
[36] S. Hu, S. Zhang, C. Gao, C. Xu, Q. Gao, A new selective fluorescent sensor for Fe^{3+} based on a pyrazoline derivative, Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc. 113 (2013) 325–331.
[37] S.D. Padghan, R.S. Bhosale, S.V. Bhosale, F. Antolasic, M.A. Kobaisi, S.V. Bhosale, Pyrene-phosphonate conjugate: aggregation-induced enhanced emission, and selective Fe^{3+} ions sensing properties, Molecules 22 (2017) 1417.
[38] A.M. Brouwer, Standards of photoluminescence quantum yield measurement in solution (IUPAC technical report)*, Pure Appl. Chem. 83 (2011) 2213–2228.
[39] M. Zhang, W. Lu, J. Zhou, G. Du, L. Jiang, J. Ling, A simple effective fluorescent chemosensor for the cascade recognition of Zn^{2+} and H_2PO^{4-} ions in protic media, Tetrahedron 70 (2014) 1011–1015.
[40] E. Bakker, P. Buhlmann, E. Pretsch, Carrier-based ion-selective electrodes and bulk optodes. 1. General characteristics, Chem. Rev 97 (1997) 3083–3132.



Sopita Rattanopas is currently a M.Sc. student in organic chemistry at Silpakorn University under supervision of Assistant Professor Dr. Waya Phutdhawong. Her research interests involve synthesis, biological activity evaluation and fluorescence sensing studies of isomeric lheyamine derivatives.



Jitnapa Sirirak received her Ph.D. in Computational Chemistry from University of Bristol, UK in 2011 based on QM/MM study of fatty acid amide hydrolase. Currently, she is a lecturer at Department of Chemistry, Silpakorn University, Thailand. Her research area includes molecular docking, sensors, and chemical structure investigation of natural lake pigments.



Pornthip Piyanuch received her M.Sc. degree in chemistry from Silpakorn University, Thailand, in 2016. She is currently a Ph.D. student in organic chemistry at Silpakorn University under supervision of Associate Professor Dr. Nantanit Wanichacheva. Her research interests involve design and development of fluorescence chemosensors.



Waya Phutdhawong is an Assistant Professor in Department of Chemistry at Silpakorn University, Thailand. She received her Ph.D. in Chemistry from The University of Wollongong, Australia. Her current research is focused on synthetic heterocyclic chemistry and natural products chemistry and the development of new pharmaceutical agents for the treatment of diseases.



Kawintip Wisansin received her B.Sc. Degree in Biology from Silpakorn University (Thailand) in 2018. Her research interest is about utilization of fluorescent sensors for measuring metal ions in living cells.



Nantanit Wanichacheva is an Associate Professor in Department of Chemistry at Silpakorn University, Thailand. She received her Ph.D. in Chemistry from Worcester Polytechnic Institute, Massachusetts, USA. Her current research interests include design, syntheses and development of new fluorescence sensors for metal ions and anion detections, such as Hg^{2+}, Cu^{2+}, Ag^{+}, Zn^{2+}, CN^{-}, and their utilization in solutions, solid support-strip tests and portable monitoring devices.



Adisri Charoenpanich received her Ph.D. in Biomedical Engineering from North Carolina State University (USA) in 2013. She is now an assistant professor at the Department of Biology at Silpakorn University, Thailand. Her current research is focused on cellular responses of cancer cells and mesenchymal stem cells to toxins, drugs, and natural products.

รายการอ้างอิง

1. Tchounwou, P.B., et al., *Review: Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic implications for public health.* Environmental Toxicology, 2003. **18**(3): p. 149-175.
2. Davidson, P.W., et al., *Longitudinal neurodevelopmental study of Seychellois children following in utero exposure to methylmercury from maternal fish ingestion: outcomes at 19 and 29 months.* Neurotoxicology, 1995. **16**(4): p. 677-688.
3. Grandjean, P., et al., *Cognitive performance of children prenatally exposed to "safe" levels of methylmercury.* Environmental research, 1998. **77**(2): p. 165-172.
4. Harada, M., *Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution.* Critical reviews in toxicology, 1995. **25**(1): p. 1-24.
5. Fraker, P.J. and L.E. King, *Reprogramming of the immune system during zinc deficiency.* Annu. Rev. Nutr., 2004. **24**: p. 277-298.
6. Wang, J. and K. Pantopoulos, *Regulation of cellular iron metabolism.* Biochemical Journal, 2011. **434**(3): p. 365-381.
7. Abbaspour, N., R. Hurrell, and R. Kelishadi, *Review on iron and its importance for human health.* Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences, 2014. **19**(2): p. 164.
8. Beaton, M.D. and P.C. Adams, *The myths and realities of hemochromatosis.* Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2007. **21**(2): p. 101-104.
9. Connor, J., et al., *Is hemochromatosis a risk factor for Alzheimer's disease?* Journal of Alzheimer's disease, 2001. **3**(5): p. 471-477.
10. Kulling, P., *Hospital treatment of victims exposed to combustion products.* Toxicology letters, 1992. **64**: p. 283-289.
11. Jokic, T., et al., *Highly photostable near-infrared fluorescent pH indicators and sensors based on BF2-chelated tetraarylazadipyrromethene dyes.* Analytical chemistry, 2012. **84**(15): p. 6723-6730.

12. Liu, Y., et al., *Boronic acid functionalized aza-Bodipy (azaBDPBA) based fluorescence optodes for the analysis of glucose in whole blood.* ACS applied materials & interfaces, 2015. **7**(21): p. 11141-11145.
13. Jiang, X.-D., et al., *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**: p. 136-141.
14. Zhang, X.-X., et al., *pH-sensitive fluorescent dyes: are they really pH-sensitive in cells?* Molecular pharmaceutics, 2013. **10**(5): p. 1910-1917.
15. Adarsh, N., M.S. Krishnan, and D. Ramaiah, *Sensitive naked eye detection of hydrogen sulfide and nitric oxide by aza-BODIPY dyes in aqueous medium.* Analytical chemistry, 2014. **86**(18): p. 9335-9342.
16. Dvivedi, A., S. Kumar, and M. Ravikanth, *Nucleophilic addition of CN− ion to CN bond of aza-BODIPY leading to turn-on fluorescence sensor.* Sensors and Actuators B: Chemical, 2016. **224**: p. 364-371.
17. Wu, F., et al., *Revealing a nucleophilic addition reaction between aza-BODIPY and cyanide anion.* Tetrahedron Letters, 2016. **57**(46): p. 5120-5123.
18. Wang, F.-H., et al., *Highly selective fluorescent sensor for Hg2+ ion based on a novel rhodamine B derivative.* Sensors and Actuators B: Chemical, 2015. **206**: p. 679-683.
19. Erdemir, S., O. Kocyigit, and S. Malkondu, *Detection of Hg2+ ion in aqueous media by new fluorometric and colorimetric sensor based on triazole–rhodamine.* Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2015. **309**: p. 15-21.
20. Pan, C., et al., *Schiff base derived Fe 3+-selective fluorescence turn-off chemsensors based on triphenylamine and indole: synthesis, properties and application in living cells.* RSC advances, 2017. **7**(57): p. 36007-36014.
21. Xu, T., et al., *Fluorescence sensors for Zn2+ based on conjugated indole Schiff base.* Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2015. **138**: p. 603-608.
22. Dias Filho, N.L., et al., *Nanoparticles of octakis [3-(3-amino-1, 2, 4-triazole) propyl] octasilsesquioxane as ligands for Cu (II), Ni (II), Cd (II), Zn (II), and Fe (III)*

in aqueous solution. Journal of colloid and interface science, 2007. **316**(2): p. 250-259.

23. Soares, I.V., et al., *Adsorption of heavy metal ions and epoxidation catalysis using a new polyhedral oligomeric silsesquioxane.* Chemical engineering journal, 2013. **218**: p. 405-414.
24. Vieira, E.G., et al., *Study on determination and removal of metallic ions from aqueous and alcoholic solutions using a new POSS adsorbent.* Chemical Engineering Journal, 2015. **264**: p. 77-88.
25. Wang, W., et al., *Thiol-rich polyhedral oligomeric silsesquioxane as a novel adsorbent for mercury adsorption and speciation.* Chemical Engineering Journal, 2014. **242**: p. 62-68.
26. Kraithong, S., et al., *Highly Hg 2+-sensitive and selective fluorescent sensors in aqueous solution and sensors-encapsulated polymeric membrane.* RSC advances, 2016. **6**(13): p. 10401-10411.
27. Kamkaew, A. and K. Burgess, *Aza-BODIPY dyes with enhanced hydrophilicity.* Chemical Communications, 2015. **51**(53): p. 10664-10667.
28. Benesi, H.A. and J. Hildebrand, *A spectrophotometric investigation of the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons.* Journal of the American Chemical Society, 1949. **71**(8): p. 2703-2707.
29. Li, M., et al., *Turn-on fluorescent sensor for selective detection of Zn2+, Cd2+, and Hg2+ in water.* The Journal of organic chemistry, 2012. **77**(7): p. 3670-3673.
30. Li, Y., et al., *A tetraphenylethylene-based "turn on" fluorescent sensor for the rapid detection of Ag+ ions with high selectivity.* Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2015. **301**: p. 14-19.
31. Venkatesan, P. and S.-P. Wu, *A turn-on fluorescent pyrene-based chemosensor for Cu (II) with live cell application.* RSC Advances, 2015. **5**(53): p. 42591-42596.
32. Kim, K.-N., et al., *Rhodamine B hydrazide revisited: chemodosimetric Hg 2+-selective signaling behavior in aqueous environments.* Bulletin of the Korean Chemical Society, 2008. **29**(3): p. 571-574.
33. Epa, U., *National Secondary Drinking Water Regulations.* USEP Agency (Ed.). Washington, 2008.

34. Kim, K.-H., E. Kabir, and S.A. Jahan, *A review on the distribution of Hg in the environment and its human health impacts.* Journal of hazardous materials, 2016. **306**: p. 376-385.

35. Edition, F., *Guidelines for drinking-water quality.* WHO chronicle, 2011. **38**(4): p. 104-8.

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	น.ส.พรทิพย์ ปิยะนุช
วัน เดือน ปี เกิด	1 กันยายน 2534
สถานที่เกิด	จังหวัดสระบุรี
วุฒิการศึกษา	ปริญญาบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับ 2) สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ปริญญามหาบัณฑิต สาขาเคมีอินทรีย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
ที่อยู่ปัจจุบัน	52/287 ม.10 ต.ห้วยบง อ.เฉลิมพระเกียรติ จ.สระบุรี
ผลงานตีพิมพ์	1.Tachapermpon, Y., Piyanuch, P., Prapawattanapol, N., Sukrat, K., Suwatpipat, K., Wanichacheva, N.* “Synthesis of Novel Fluorescent Sensors Based on Naphthalimide Fluorophores for the Highly Selective Hg2+-Sensing” Journal of Chemistry (2015) 1-9. 2.Piyanuch, P., Watpathomsub, S., Lee, V. S., Nienaber, H. A., Wanichacheva, N.* “Highly sensitive and selective Hg2+-chemosensor based on dithia-cyclic fluorescein for optical and visual-eye detections in aqueous buffer solution” Sensors and Actuators B: Chemical (2016) 224, 201–208. 3.Kunthom, R., Piyanuch, P., Wanichacheva, N.*, Ervithayasuporn, V.* “Cage-like silsesequioxanes bearing rhodamines as fluorescence Hg2+ sensors” Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry (2018) 356, 248–255. 4.Rattanopas, S., Piyanuch, P., Wisansin, K., Charoenpanich, A., Sirirak, J., Phutdhawong, W., Wanichacheva, N.* “Indole-based fluorescent sensors for selective sensing of Fe2+ and Fe3+ in aqueous buffer systems and their applications in living cells” Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry (2019) 377, 138–148.

5.Piyanuch, P., Sirirak, J., Kamkaew, A., Weeranantanapan, O., Promarak, V., Burgess, K., Wanichacheva, N.* “Near-Infrared fluorescence chemosensor based on isothiocyanate-aza-BODIPY for cyanide detection in ppb level: Applications in buffer media and living cell imaging” ChemPlusChem (2019) 84, 252–259.

รางวัลที่ได้รับ -