



รายวิจยฉบับสมบุด

การพัฒนาเคโมเซ็นเซอร์สำหรับสารเคมีกำจัดศัตรูพืช

ออร์กาโนฟอสฟอรัส โดยใช้เทคนิคสเปกโตรเมทรี

Developing of Chemosensors for Organophosphorus

Pesticides using Spectrophotometry Techniques

เมธินี จามกระโทก

โครงการวิจัยประเภทเงินรายได้

จากเงินอุดหนุนจากรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2559A10802095

สัญญาเลขที่ 113/2559

รายวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาเคโมเซ็นเซอร์สำหรับสารเคมีกำจัดศัตรูพืช

ออร์กาโนฟอสฟอรัส โดยใช้เทคนิคสเปกโตรเมทรี

Developing of Chemosensors for Organophosphorus

Pesticides using Spectrophotometry Techniques

ดร. เมธินี จามกระโทก

คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์

มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี

24 กุมภาพันธ์ 2559

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนจากรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 113/2559

Acknowledgement

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through national Research Council of Thailand (Grant no. 113/2559)

บทสรุปผู้บริหาร

(Executive Summary)

ข้าพเจ้า อาจารย์ ดร.เมธิณี จามกระโทก ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัยจาก มหาวิทยาลัยบูรพา ประเภทงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนจากรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) มหาวิทยาลัยบูรพา โครงการวิจัยเรื่อง (ภาษาไทย) การพัฒนาเคโมเซ็นเซอร์สำหรับสารเคมีกำจัดศัตรูพืชออร์กาโนฟอสฟอรัส โดยใช้เทคนิคสเปกโตรเมทรี

(ภาษาอังกฤษ) Developing of Chemosensors for Organophosphorus Pesticides using Spectrophotometry Techniques

รหัสโครงการ 2559A10802095 สัญญาเลขที่ 133/2559 ได้รับงบประมาณทั้งสิ้น 220,000 บาท ระยะเวลาดำเนินการ 3 ปี (ระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม 2559- 30 กันยายน 2562)

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการพัฒนาเคโมเซ็นเซอร์สำหรับวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส ด้วยเทคนิคทางสเปกโตรเมทรี ได้แก่ ยูวี-วิสิเบิล และ ฟลูออโรเรสเซนส์ โดยใช้กลไกตรวจวัดแบบ indicator-displacement assay หรือ IDA เพื่อพัฒนาเคโมเซ็นเซอร์ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาปฏิกิริยาการกีดสารเชิงซ้อนอินดิเคเตอร์สำหรับโลหะ (metal indicator) 5 ชนิด ได้แก่ Calcon Calcion Murexide Calconcarboxylic acid และ Tiron กับไอออนของโลหะ 3 ชนิด ได้แก่ Mg^{2+} Ca^{2+} และ Zn^{2+} และปฏิกิริยาแทนที่ด้วยสารออร์กาโนฟอสฟอรัส 2 ชนิด ได้แก่ chlopyriphos (CFP) และ dichlovos (DDVP) ในระบบของ Tris buffer pH เท่ากับ 8 โดยใช้เทคนิคทางสเปกโตรเมทรี ได้แก่ ยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรเมทรี และ ฟลูออโรเรสเซนส์สเปกโตรเมทรี ผลการศึกษาพบว่าเคโมเซ็นเซอร์ที่พัฒนาขึ้นไม่สามารถใช้เป็นฟลูออโรเรสเซนส์เซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดสารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มสารออร์กาโนฟอสฟอรัสได้ เนื่องจากไม่มีพบการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออโรเรสเซนส์เมื่อเติมสารออร์กาโนฟอสฟอรัส 2 ชนิด CFP และ DDVP แต่อย่างไรก็ตามในการพัฒนาเคโมเซ็นเซอร์โดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมทรี พบว่า สารเชิงซ้อนของอินดิเคเตอร์โลหะ Calcon กับ Mg^{2+} สามารถใช้สำหรับการตรวจวัดสารออร์กาโนฟอสฟอรัสในระบบเอควียสโดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมทรีได้และใช้เป็น naked eye sensor สำหรับสารออร์กาโนฟอสฟอรัส CFP และ DDVP ได้ด้วย โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ 635 นาโนเมตร และสีน้ำเงินของสารละลายจะเพิ่มขึ้นเมื่อเกิดปฏิกิริยาแทนที่ด้วย CFP และ DDVP ทำการศึกษาความเป็นไปได้เพื่อการวิเคราะห์ปริมาณสารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสโดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมทรี พบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมในการใช้สารเชิงซ้อนของอินดิเค

เตอร์ calcon กับ Mg^{2+} ในการวิเคราะห์ปริมาณสารออร์กาโนฟอสฟอรัสคือ 1:1 เคโมเซ็นเซอร์ที่ได้นำไปสร้างกราฟมาตรฐานสารออร์กาโนฟอสฟอรัส CPF และ DDVP ความเข้มข้น 0-20 μM และค่าการดูดกลืนแสงที่ 635 นาโนเมตร พบว่าได้กราฟมาตรฐานที่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงที่ดีโดยให้ค่า correlation coefficient (R^2) = 0.9884 และ 0.9488 สำหรับ CPF และ DDVP ตามลำดับ และได้ค่า detection limit สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ CPF และ DDVP ในระบบเอควียส คือ 1.00 และ 3.72 μM ตามลำดับ

This research attempt to develop new chemosensor for quantification of organophosphorus in pesticides based on indicator-displacement assay or IDA using spectrometry including UV-visible and fluorescence. In order to develop new chemosensor systems for organophosphorus, compleaxation reactions of 5 metal-indicators including Calcon, Calcien, Murexide, Calconcarboxylic acid and Tiron were explored with 3 metal ions as Mg^{2+} , Ca^{2+} and Zn^{2+} using UV-visible and fluorescence spectrometry. In additions, substitution reactions of organophosphorus chlopyriphos (CFP) and dichlovos (DDVP) toward metal-indicator complexes were also studied by UV-visible and fluorescence spectrometry. The results shows that the proposed chemosensor cannot be used as an effective fluorescent sensor for organophosphorus due to non-significant intensities change during substitution reactions. However, good characteristic of chemosensor were found in UV-visible spectrometry studied of substitution reactions of organophosphorus, CFP and DDVP toward metal-indicator complexes. By means of significant change of UV-visible spectrum and colors, the Calcon- Mg^{2+} complex was considered to be an effective chemosensor and naked eye sensor for organophosphorus. By an introduction of organophosphorus, CFP and DDVP toward developed Calcon- Mg^{2+} chemosensor, an increasing of absorbance at 635 nanometer and blue color were observed due to substitution of CFP and DDVP toward metal ion. In order to applied the proposed Calcon- Mg^{2+} chemosensor for the quantification of organophosphorus in pesticides, calibration curves of CFP and DDVP standard solutions were constructed in the range of concentration 0-20 μM using an absorbance at 635 nm of free Calcon. As the results, calibration curves of both organophosphorus shows good analytical characteristics by well linear relation as correlation coefficient (R^2) of 0.9884 and 0.9488 for CFP and DDVP, respectively. Moreover, the proposed chemosensor exhibits an excellent limit

of detection for CFP and DDVP quantification in aqueous system as 1.00 and 3.72 for CFP and DDVP, respectively.

Output/Outcome

1) การวิเคราะห์สารกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสในระบบเอควียสด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเทรี สามารถได้ระดับต่ำในระดับไมโครโมลาร์

2) การวิเคราะห์ปริมาณกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสโดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเทรี สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ในน้ำได้โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการที่ซับซ้อนจึงใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้นและสิ้นเปลืองสารเคมีน้อย

ข้อเสนอแนะ

1) ทำการศึกษาผลกระทบจากตัวรบกวน (interference) ในการวิเคราะห์ เช่น แอนไอออนชนิดต่างๆ

2) ควรทำการวิเคราะห์เปรียบกับวิธีการวิเคราะห์กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสโดยใช้เทคนิคอื่น

3) ควรทำการวิเคราะห์หาปริมาณกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสตัวอย่างจริง

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการพัฒนาเคโมเซ็นเซอร์สำหรับวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส ด้วยเทคนิคทางสเปกโตรเมทรี ได้แก่ ยูวี-วิสิเบิล และ ฟลูออโรเรสเซนส์ โดยใช้กลไกตรวจวัดแบบ indicator-displacement assay หรือ IDA เพื่อพัฒนาเคโมเซ็นเซอร์ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาปฏิกิริยาการกีดกันเชิงซ้อนอินดิเคเตอร์สำหรับโลหะ (metal indicator) 5 ชนิด ได้แก่ Calcon Calcion Murexide Calconcarboxylic acid และ Tiron กับไอออนของโลหะ 3 ชนิด ได้แก่ Mg^{2+} Ca^{2+} และ Zn^{2+} และปฏิกิริยาแทนที่ด้วยสารออร์กาโนฟอสฟอรัส 2 ชนิด ได้แก่ chlopyriphos (CFP) และ dichlovos (DDVP) ในระบบของ Tris buffer pH เท่ากับ 8 โดยใช้เทคนิคทางสเปกโตรเมทรี ได้แก่ ยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรเมทรี และ ฟลูออโรเรสเซนส์สเปกโตรเมทรี ผลการศึกษาพบว่าเคโมเซ็นเซอร์ที่พัฒนาขึ้นไม่สามารถใช้เป็นฟลูออโรเรสเซนส์เซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดสารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มสารออร์กาโนฟอสฟอรัสได้ เนื่องจากไม่มีพบการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออโรเรสเซนส์เมื่อเติมสารออร์กาโนฟอสฟอรัส 2 ชนิด CFP และ DDVP แต่อย่างไรก็ตามในการพัฒนาเคโมเซ็นเซอร์โดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมทรี พบว่า สารเชิงซ้อนของอินดิเคเตอร์โลหะ Calcon กับ Mg^{2+} สามารถใช้สำหรับการตรวจวัดสารออร์กาโนฟอสฟอรัสในระบบเอควีเอสโดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมทรีได้และใช้เป็น naked eye sensor สำหรับสารออร์กาโนฟอสฟอรัส CPF และ DDPV ได้ด้วย โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ 635 นาโนเมตร และสีน้ำเงินของสารละลายจะเพิ่มขึ้นเมื่อเกิดปฏิกิริยาแทนที่ด้วย CPF และ DDPV ทำการศึกษาความเป็นไปได้เพื่อการวิเคราะห์ปริมาณสารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสโดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมทรี พบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมในการใช้สารเชิงซ้อนของอินดิเคเตอร์ calcon กับ Mg^{2+} ในการวิเคราะห์ปริมาณสารออร์กาโนฟอสฟอรัสคือ 1:1 เคโมเซ็นเซอร์ที่ได้นำไปสร้างกราฟมาตรฐานสารออร์กาโนฟอสฟอรัส CPF และ DDPV ความเข้มข้น 0-20 μM และค่าการดูดกลืนแสงที่ 635 นาโนเมตร พบว่าได้กราฟมาตรฐานที่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงที่ดีโดยให้ค่า correlation coefficient (R^2) = 0.9884 และ 0.9488 สำหรับ CFP และ DDVP ตามลำดับ และได้ค่า detection limit สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ CPF และ DDPV ในระบบเอควีเอส คือ 1.00 และ 3.72 μM ตามลำดับ

คำสำคัญ

Organophosphorus, pesticides, spectrometry, chemosensor, indicator-displacement assay

Abstract

This research attempt to develop new chemosensor for quantification of organophosphorus in pesticides based on indicator-displacement assay or IDA using spectrometry including UV-visible and fluorescence. In order to develop new chemosensor systems for organophosphorus, complexation reactions of 5 metal-indicators including Calcon, Calcien, Murexide, Calconcarboxylic acid and Tiron were explored with 3 metal ions as Mg^{2+} , Ca^{2+} and Zn^{2+} using UV-visible and fluorescence spectrometry. In additions, substitution reactions of organophosphorus chloryriphos (CFP) and dichlovos (DDVP) toward metal-indicator complexes were also studied by UV-visible and fluorescence spectrometry. The results shows that the proposed chemosensor cannot be used as an effective fluorescent sensor for organophosphorus due to non-significant intensities change during substitution reactions. However, good characteristic of chemosensor were found in UV-visible spectrometry studied of substitution reactions of organophosphorus, CFP and DDVP toward metal-indicator complexes. By means of significant change of UV-visible spectrum and colors, the Calcon- Mg^{2+} complex was considered to be an effective chemosensor and naked eye sensor for organophosphorus. By an introduction of organophosphorus, CFP and DDVP toward developed Calcon- Mg^{2+} chemosensor, an increasing of absorbance at 635 nanometer and blue color were observed due to substitution of CFP and DDVP toward metal ion. In order to applied the proposed Calcon- Mg^{2+} chemosensor for the quantification of organophosphorus in pesticides, calibration curves of CFP and DDVP standard solutions were constructed in the range of concentration 0-20 μM using an absorbance at 635 nm of free Calcon. As the results, calibration curves of both organophosphorus shows good analytical characteristics by well linear relation as correlation coefficient (R^2) of 0.9884 and 0.9488 for CFP and DDVP, respectively. Moreover, the proposed chemosensor exhibits an excellent limit of detection for CFP and DDVP quantification in aqueous system as 1.00 and 3.72 for CFP and DDVP, respectively.

Keywords

:

Organophosphorus, pesticides, spectrometry, chemosensor, indicator-displacement assay

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ค
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูปภาพ	ณ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	1
1.1.1 โครงสร้างและสมบัติของสารกึ่งตัวนำอินทรีย์กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส	1
1.1.2 การพัฒนาการตรวจจับวัสดุสารออร์กาโนฟอสฟอรัส	2
1.1.3 Indicator displacement chemosensor	4
1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	5
1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	7
1.4 วิธีการดำเนินงานวิจัย	7
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	7
บทที่ 2 วิธีการดำเนินการวิจัย	8
2.1 เครื่องมือและสารเคมี	8
2.1.1 สารเคมี	8
2.1.2 เครื่องฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรมิเตอร์	8
2.1.3 เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์	9
2.2 วิธีการทดลอง	10
2.2.1 ศึกษาปฏิกิริยาการเกิดสารเชิงซ้อนของอินดิเคเตอร์สำหรับโลหะกับไอออนของโลหะ โดยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรเมทรี	10
2.2.2 ศึกษาปฏิกิริยาการแทนที่ของสารออร์กาโนฟอสฟอรัสกับของสารเชิงซ้อนของอินดิเคเตอร์โลหะกับไอออนของโลหะโดยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรเมทรี	10
2.2.3 ศึกษาปฏิกิริยาการเกิดสารเชิงซ้อนของอินดิเคเตอร์โลหะกับไอออนของโลหะโดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมทรี	11
2.2.4 ศึกษาปฏิกิริยาการแทนที่ของสารออร์กาโนฟอสฟอรัสกับของสารเชิงซ้อนของอินดิเคเตอร์โลหะกับไอออนของโลหะโดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมทรี	11
2.2.5 ศึกษาความเป็นไปได้เพื่อการวิเคราะห์ปริมาณสารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสโดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมทรี	11
2.3 วิธีวิเคราะห์ข้อมูล	12

	หน้า
บทที่ 3 ผลการวิจัยและอภิปรายผลการทดลอง	13
3.1 ศึกษาปฏิกิริยาการเกิดสารเชิงซ้อนของอินดิเคเตอร์โลหะกับไอออนของโลหะโดยเทคนิคฟลูออรีเรสเซนส์สเปกโตรเมทรี	14
3.2 ปฏิกิริยาการแทนที่ของสารออร์กาโนฟอสฟอรัสกับของสารเชิงซ้อนของอินดิเคเตอร์โลหะกับไอออนของโลหะโดยเทคนิคโดยเทคนิคฟลูออรีเรสเซนส์สเปกโตรเมทรี	17
3.3 ปฏิกิริยาการเกิดสารเชิงซ้อนของอินดิเคเตอร์โลหะกับไอออนของโลหะโดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมทรี	18
3.4 ปฏิกิริยาการแทนที่ของสารออร์กาโนฟอสฟอรัสกับของสารเชิงซ้อนของอินดิเคเตอร์โลหะกับไอออนของโลหะโดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมทรี	20
3.4.1 ปฏิกิริยาการแทนที่ของสารออร์กาโนฟอสฟอรัสกับของสารเชิงซ้อนของ calcion กับไอออนของโลหะ	20
3.4.2 ปฏิกิริยาการแทนที่ของสารออร์กาโนฟอสฟอรัสกับของสารเชิงซ้อนของ tiron กับไอออนของโลหะ	21
3.4.3 ปฏิกิริยาการแทนที่ของสารออร์กาโนฟอสฟอรัสกับของสารเชิงซ้อนของ calconcarboxylic acid กับไอออนของโลหะ	23
3.4.4 ปฏิกิริยาการแทนที่ของสารออร์กาโนฟอสฟอรัสกับของสารเชิงซ้อนของ merexide กับไอออนของโลหะ	24
3.4.5 ปฏิกิริยาของสารออร์กาโนฟอสฟอรัสกับ 8-hydroxyquinolien copper	25
3.4.6 ปฏิกิริยาการแทนที่ของสารออร์กาโนฟอสฟอรัสกับของสารเชิงซ้อนของ calcon กับไอออนของโลหะ	26
3.5 การศึกษาความเป็นไปได้เพื่อการวิเคราะห์ปริมาณสารเคมีกำจัดศัตรูพืช กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสโดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมทรี	28
3.5.1 การไทเทรตอินดิเคเตอร์ calcon ด้วย Mg^{2+}	29
3.5.2 กราฟมาตรฐานสารละลายออร์กาโนฟอสฟอรัส	29
บทที่ 4 สรุปการวิจัย	31
4.1 การพัฒนาเคมีเซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดสารออร์กาโนฟอสฟอรัสด้วยเทคนิคฟลูออรีเรสเซนส์สเปกโตรเมทรี	31
4.2 การพัฒนาเคมีเซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดสารออร์กาโนฟอสฟอรัสด้วยยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมทรี	31
4.3 การศึกษาความเป็นไปได้เพื่อการวิเคราะห์ปริมาณสารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสโดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมทรี	32
4.3 ข้อเสนอแนะ	32
4.4 การนำไปใช้ประโยชน์	32

รายงานการเงิน	33
บรรณานุกรม	34
ประวัตินักวิจัย	36

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	สัดส่วนของค่าการดูดกลืนแสงในขณะที่ยืดและไม่ยืด 5 equiv. ไอออนของโลหะ (A/A_0) ของอินดิเคเตอร์โลหะ	19
3.2	ตัวแปรในการวิเคราะห์ปริมาณของกราฟมาตรฐาน chlopyrifos และ dichlovos	30

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
1.1	โครงสร้างทั่วไปของสารออร์กาโนฟอสฟอรัสที่ใช้สารกำจัดศัตรูพืช	1
1.2	ตัวอย่างสารกำจัดศัตรูพืช กลุ่มสารออร์กาโนฟอสฟอรัส ประเภท oxons และ thions (The Pesticide Action Network (PAN), 2014)	2
1.3	ตัวอย่างเคโมเซ็นเซอร์สำหรับสารออร์กาโนฟอสฟอรัส	3
1.4	แผนภาพแสดงการกระบวนกร indicator-displacement assay	4
1.5	แผนภาพแสดงแนวโน้มปริมาณการนำเข้าสารเคมีกำจัดศัตรูพืช ของประเทศไทย ตั้งแต่ พ.ศ. 2551-2554 (กรมวิชาการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2557)	6
2.1	เครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ Agilent รุ่น Cary Eclipse fluorescence spectrometer ที่ติดตั้ง Microplate reader	9
2.2	เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ Agilent รุ่น Cary 60 UV-VIS spectrometer ที่ติดตั้ง Microcell	9
3.1	โครงสร้างโมเลกุลของอินดิเคเตอร์โลหะที่ใช้ในการวิจัย	13
3.2	ฟลูออเรสเซนส์สเปกตรัมของอินดิเคเตอร์โลหะ ($\lambda_{ex} = 250 \text{ nm}$) ก) Tiron ข) Calconcarboxylic acid และ ค) Merexide เมื่อเติม 5 equiv. ของ Ca^{2+} Mg^{2+} และ Zn^{2+}	14
3.3	ฟลูออเรสเซนส์สเปกตรัมของอินดิเคเตอร์โลหะ ($\lambda_{ex} = 250 \text{ nm}$) ก) Calcien และ ข) Calcon เมื่อเติม 5 equiv. ของ Ca^{2+} Mg^{2+} และ Zn^{2+}	15
3.4	ฟลูออเรสเซนส์สเปกตรัมของอินดิเคเตอร์โลหะ ก) Tiron ข) Calconcarboxylic acid ค) murexide ง) Calcon จ) Calcien และ ฉ) 8-hydroxyquinolien copper ในขณะที่มี 5 equiv. ของ Zn^{2+} , Mg^{2+} , และ Ca^{2+} และ 5 equiv. ของสารออร์กาโนฟอสฟอรัส chlopyrifos (CPF) และ dichlovos (DDPV)	16
3.5	ยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมของอินดิเคเตอร์โลหะ ก) Calcien ข) Calconcarboxylic acid ค) Calconcarboxylic acid ง) murexide และ จ) Tiron เมื่อเติม 5 equiv. ของไอออนของโลหะ Zn^{2+} Mg^{2+} และ Ca^{2+}	18
3.6	ยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมและสีของสารละลายอินดิเคเตอร์โลหะ Calcien เมื่อเติม 5 equiv. ของไอออนของโลหะ Zn^{2+} Mg^{2+} และ Ca^{2+} และ 5 equiv. ของไอออนของสารออร์กาโนฟอสฟอรัส CPF และ DDPV	20
3.7	ยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมของอินดิเคเตอร์โลหะ Tiron ในขณะที่มี 5 equiv. ของ ไอออนของโลหะ Zn^{2+} Mg^{2+} และ Ca^{2+} และ 5 equiv. ของไอออนของสารออร์กาโนฟอสฟอรัส CPF และ DDPV	22

รูปที่		หน้า
3.8	ยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมและสีของสารละลายของอินดิเคเตอร์โลหะ Calconcarboxylic acid ในขณะที่มี 5 equiv. ของไอออนของโลหะ Zn^{2+} Mg^{2+} และ Ca^{2+} และ 5 equiv. ของไอออนของสารออร์กาโนฟอสฟอรัส CPF และ DDPV	23
3.9	ยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมและสีของสารละลายของอินดิเคเตอร์โลหะ Merexide ในขณะที่มี 5 equiv. ของไอออนของโลหะ Zn^{2+} Mg^{2+} และ Ca^{2+} และ 5 equiv. ของไอออนของสารออร์กาโนฟอสฟอรัส CPF และ DDPV	24
3.10	ก) ยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมและสีของสารละลายของอินดิเคเตอร์ 8-hydroxyquinolien copper (8-HQCu) เมื่อเติม 5 equiv. ของไอออนของสารออร์กาโนฟอสฟอรัส chlopyrifos (CPF) และ dichlovos (DDPV)	25
3.11	ยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมและสีของอินดิเคเตอร์โลหะ Calcon ในขณะที่มี 5 equiv. ของไอออนของโลหะ Zn^{2+} Mg^{2+} และ Ca^{2+} และ 5 equiv. ของไอออนของสารออร์กาโนฟอสฟอรัส CPF และ DDPV	26
3.12	กลไกการ indicator-displacement assay ของ Calcon ในการใช้เป็นเคโมเซ็นเซอร์ในการตรวจวัดสารออร์กาโนฟอสฟอรัส chlopyrifos (CPF) และ dichlovos (DDPV)	27
3.13	ก) ยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมของสารละลายอินดิเคเตอร์ Calcon (25 μ M ในสารละลาย Tris buffer pH =8) เมื่อไทเทรตด้วย Mg^{2+} 0-2 equiv. และ ข) การเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ของ 25 μ M Calcon เมื่อไทเทรตด้วย Mg^{2+} 0-2 equiv.	28
3.14	กราฟมาตรฐานสารละลายออร์กาโนฟอสฟอรัส ก) chlopyrifos และ ข) dichlovos ความเข้มข้น 0-20 μ M (ความเข้มข้น calcol และ Mg^{2+} = 10 μ M ใน Tris buffer pH = 8)	29

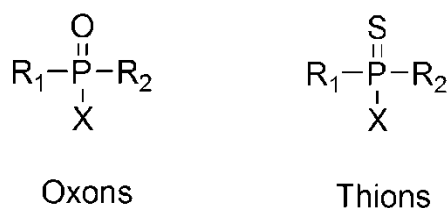
บทที่ 1

บทนำ

1.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.1.1 โครงสร้างและสมบัติของสารกำจัดศัตรูกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส

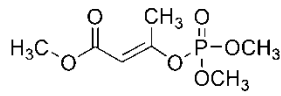
สารกำจัดศัตรูพืช กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส (organophosphorus pesticides, OP) เป็นสารอินทรีย์ประเภท เอสเทอร์ (ester) เอไมด์ (amide) หรือ ไทออล (thiol) ที่เป็นอนุพันธ์ของกรดฟอสฟอริก เมื่อพิจารณาจากหมู่ฟังก์ชันในสารออร์กาโนฟอสฟอรัส ที่อยู่ในสารกำจัดศัตรูพืช สารออร์กาโนฟอสฟอรัส แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ สารกลุ่ม oxons และ thions ซึ่งมีหมู่ฟังก์ชันเป็น oxonate (P=O) และ thionate (P=S) ตามลำดับ โครงสร้างทั่วไป แสดงในรูปที่ 2



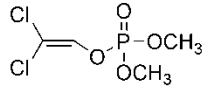
รูปที่ 1.1 โครงสร้างทั่วไปของสารออร์กาโนฟอสฟอรัสที่ใช้สารกำจัดศัตรูพืช

จากโครงสร้างทางเคมี สารกลุ่มออร์โธฟอสฟอรัสจะมีความหลากหลายเกิดจากหมู่แทนที่ R_1 R_2 และ X ที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม โดยทั่วไปหมู่ R_1 และ R_2 ที่พบบ่อยจะเป็นหมู่ alkoxy, aryloxy และ thioalkoxy ในขณะที่ X จะเป็น leaving group ที่ว่องไวในการเกิดปฏิกิริยา ยกตัวอย่างเช่น สารออร์กาโนฟอสฟอรัสที่ถูกห้ามใช้ในประเทศไทย คือ parathion (LD_{50} (mg/kg) = 1) หมู่ R_1 และ R_2 เป็นหมู่ ethoxy และมีหมู่ *p*-nitrophenoxy เป็น leaving group ที่ว่องไวในการเกิดปฏิกิริยามาก ทำให้ P เกิดปฏิกิริยาแทนที่ด้วยนิวคลีโอไฟล์ได้อย่างรวดเร็ว parathion จึงมีพิษที่รุนแรงและเฉียบพลัน จากความว่องไวในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส (acetylcholinesterase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จำเป็นในกระบวนการส่งกระแสประสาท (The Pesticide Action Network (PAN), 2014) ตัวอย่างโครงสร้างสารออร์โธฟอสฟอรัส กลุ่ม oxons และ thions แสดงในรูปที่ 2

Oxons

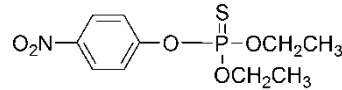


Mevinphos

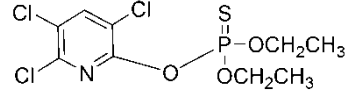


Dichlorvos

Thions



Parathion



Chlorpyrifos

รูปที่ 1.2 ตัวอย่างสารกำจัดศัตรูพืช กลุ่มสารออร์กาโนฟอสฟอรัส ประเภท oxons และ thions (The Pesticide Action Network (PAN), 2014)

นอกจากสมบัติความเป็นนิวคลีโอไฟล์ของหมู่ thionate (P=S) และ oxonate (P=O) แล้วหมู่ thionate และ oxonate สามารถเกิดสารเชิงซ้อนกับไอออนของโลหะหลายชนิด เช่น Cu^{2+} Co^{2+} Mg^{2+} Ca^{2+} เป็นต้น (Murugavel *et al.*, 2008) ซึ่งการโคออร์ดิเนตของไอออนของโลหะกับหมู่ thionate (P=S) และ oxonate (P=O) จะเป็นการเร่งกระบวนการไฮโดรไลซิสสารออร์กาโนฟอสฟอรัสด้วย

1.1.2 การพัฒนาการตรวจจับตัวตรวจวัดสารออร์กาโนฟอสฟอรัส

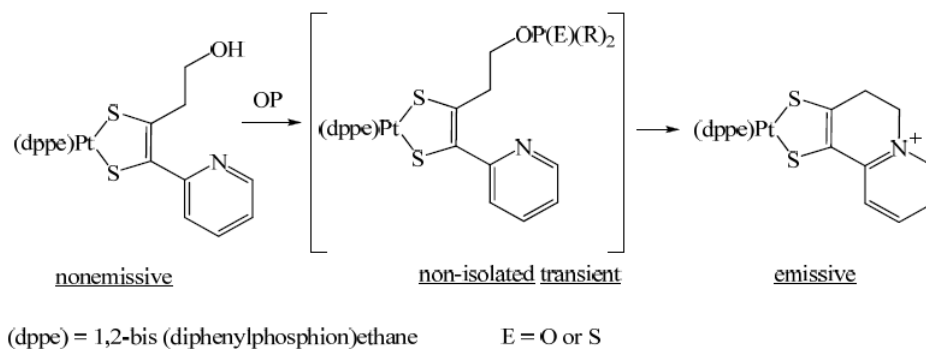
การวิเคราะห์สารออร์กาโนฟอสฟอรัสในตัวอย่างทางสิ่งแวดล้อมและตัวอย่างทางชีวภาพที่ใช้ในห้องปฏิบัติการโดยทั่วไป มีหลากหลายเทคนิค เช่น เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี ลิควิดโครมาโทกราฟี นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรเมทรี และแมสสเปกโตรเมทรี (Survey, U.S.G. , 2000; Steiner *et al.*, 2005) รวมทั้งเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพ ได้แก่ enzyme assay (Russell *et al.*, 2003) จากพื้นฐานความรู้ในทางเคมีซูปรา (supramolecular Chemistry) นำไปสู่การพัฒนาตัวตรวจวัดทางเคมี หรือ เคมีเซ็นเซอร์ (chemosensor) ที่จำเพาะต่อสารที่ต้องการวิเคราะห์ (analyte) ชนิดต่างๆ ได้โดยอาศัยการเกิดแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลหรือปฏิกิริยาที่จำเพาะเจาะจงระหว่างโมเลกุลที่ทำหน้าที่เป็นเคมีเซ็นเซอร์และโมเลกุลของสารที่ต้องการวิเคราะห์ เมื่อโมเลกุลของเคมีเซ็นเซอร์เกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลของสารที่ต้องการวิเคราะห์ โมเลกุลของตัวตรวจวัดก็จะเกิดการเปลี่ยนแปลงที่สมบัติทางกายภาพบางอย่าง เช่น การดูดกลืนแสง สัญญาณฟลูออเรสเซนส์สมบัติการนำไฟฟ้า ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้จะตอบสนองโดยตรงกับปริมาณของสารที่ต้องการวิเคราะห์

ในการพัฒนาเคมีเซ็นเซอร์ (chemosensor) สำหรับสารออร์กาโนฟอสฟอรัส โดยส่วนใหญ่ มักจะเกี่ยวข้องกับเคมีเซ็นเซอร์ที่เป็นออปติคอลเซ็นเซอร์ (optical sensor) ซึ่งจะเกิดการเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงแสงติดตามได้โดยใช้ สายตา (naked-eye sensor) และ/หรือ เครื่องมือทางสเปกโตรโฟโตเมทรี เช่น เครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรมิเตอร์ (UV-Vis spectrometer) และ ฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรมิเตอร์ (fluorescent spectrometer) ซึ่งเป็นเครื่องมือพื้นฐานในห้องปฏิบัติการ

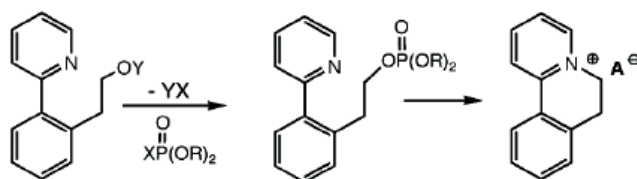
ด้วยสมบัติทางเคมีของหมู่ thionate (P=S) และ oxonate (P=O) ในสารออร์กาโนฟอสฟอรัส เคโมเซ็นเซอร์สำหรับสารออร์กาโนฟอสฟอรัสจะใช้กระบวนการรับรู้จดจำ (recognition) ระหว่างเคโมเซ็นเซอร์และสารออร์กาโนฟอสฟอรัสผ่านกระบวนการแทนที่ด้วยนิวคลีโอไฟล์ (nucleophilic substitution) ที่จำเพาะเจาะจง เกิดการเปลี่ยนแปลงของหน่วยส่งสัญญาณ (signaling unit) ของเคโมเซ็นเซอร์ ตัวอย่างเคโมเซ็นเซอร์สำหรับสารออร์กาโนฟอสฟอรัส แสดงในรูปที่ 1.3

จากรายงานที่ปัญหาที่พบในการใช้เคโมเซ็นเซอร์ตรวจวัดสารออร์กาโนฟอสฟอรัสที่ใช้รูปแบบพื้นฐานของการสร้างเคโมเซ็นเซอร์แบบดั้งเดิมที่มีรูปแบบเป็น reporter-spacer-recognition site หน่วยรับรู้จดจำ (recognition site) ติดกับหน่วยอื่นๆ ด้วยพันธะโคเวเลนต์ ต้องอาศัยกระบวนการทางการสังเคราะห์ที่ซับซ้อน สูญเสียเวลาในการสังเคราะห์ และใช้ค่าใช้จ่ายสูงในการพัฒนา และยังคงมีข้อด้อยของหน่วยรับรู้จดจำ (recognition site) ของการเคโมเซ็นเซอร์สำหรับสารออร์กาโนฟอสฟอรัสที่อาศัย nucleophilic recognition เช่น (1) ระยะเวลาในการตอบสนองนาน (2) ความจำเพาะเจาะจงต่ำ (3) เกิดการตอบสนองต่ำในระบบเอควิวส และ (4) ไม่สามารถเคโมเซ็นเซอร์นำกลับมาใช้ใหม่ได้ เป็นต้น

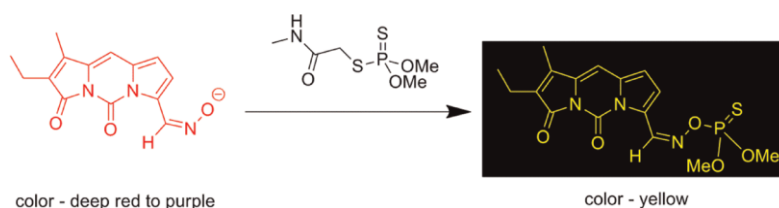
(Van Houten *et.al.* 1998)



(Zhang and Swager, 2003)



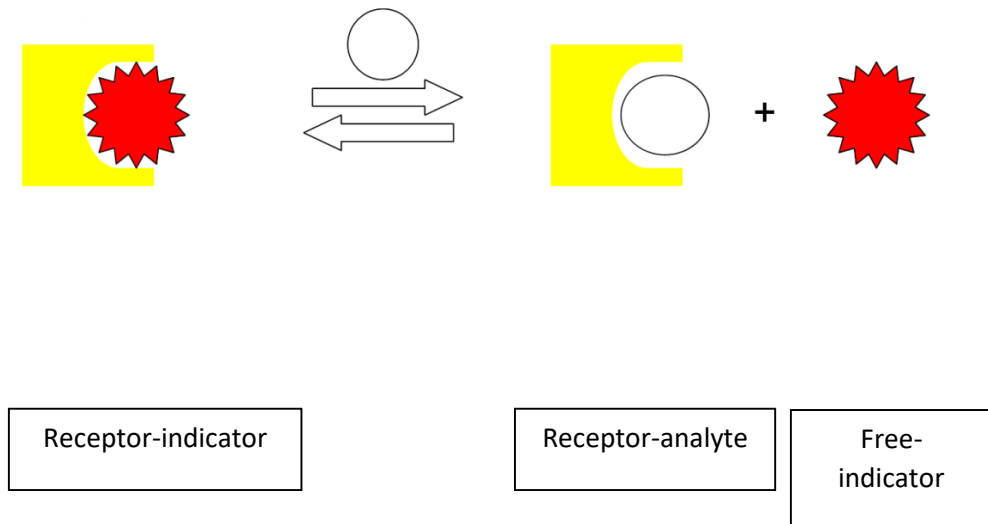
(Wallace, 2012)



รูปที่ 1.3 ตัวอย่างเคโมเซ็นเซอร์สำหรับสารออร์กาโนฟอสฟอรัส

1.1.3 Indicator displacement chemosensor

ดังที่กล่าวมาข้างต้นในการปัญหาในพัฒนาเคมีเซนเซอร์ในรูปแบบดั้งเดิม ที่มีลักษณะ reporter-spacer-recognition site (R-S-R) คือ ปัญหาจากการสังเคราะห์ที่ยุ่งยาก หลายขั้นตอนและต้องอาศัยสารเคมีที่มีราคาแพง ในการเชื่อมต่อ reporter และ recognition ด้วยพันธะโคเวเลนต์ จึงได้มีการพัฒนาการระบบการตรวจวัด ไอออน หรือโมเลกุลที่สนใจ โดยวิธีการ ที่เรียกว่า indicator-displacement assay หรือ IDA เพื่อหลีกเลี่ยงขั้นตอนสังเคราะห์ที่ยุ่งยาก โดยอาศัยปฏิกิริยาแทนที่ของ analyte กับสารเชิงซ้อนระหว่างอินดิเคเตอร์กับโมเลกุลที่ทำหน้าที่เป็น receptor โดยกลไกการส่งสัญญาณ แสดงในรูปที่ 5 ในขณะที่ไม่มี analyte โมเลกุลของอินดิเคเตอร์ก็จะโคออร์ดิเนตอยู่กับ receptor ในขณะที่มี analyte เกิดแทนที่ของ analyte และปลดปล่อยโมเลกุลของอินดิเคเตอร์ออกมา เนื่องจาก analyte จับกับ receptor ได้ดีกว่าอินดิเคเตอร์ การตรวจวัดหรือติดตามก็ทำโดยการติดตามสมบัติทางเชิงแสงที่เปลี่ยนแปลงไปของอินดิเคเตอร์ซึ่งจะแตกต่างกันในขณะที่เกิดสารเชิงซ้อนกับ receptor และในขณะที่เป็นอิสระ (Nguyen and Anslyn, 2006)



รูปที่ 1.4 แผนภาพแสดงการกระบวนการ indicator-displacement assay

indicator-displacement assay หรือ IDA สำหรับการตรวจวัดติดตาม analyte ชนิดต่างๆ มี 3 ประเภท ได้แก่

(1) colorimetric indicator-displacement assay หรือ C-ICA เป็นการพัฒนาเคมีเซนเซอร์เพื่อใช้เป็น naked eye sensor

(2) Fluorescent indicator-displacement assay หรือ F-ICA เป็นพัฒนาระบบ indicator-displacement เพื่อใช้เป็น Fluorescent sensor ซึ่งจะเป็นการตรวจวัดที่มีความที่ละเอียดที่สุดของการติดตาม (detection limit) ในระดับ micromolar

(3) Metal complexing indicator-displacement assay หรือ M-ICA อาศัยสมบัติการเกิดสารเชิงซ้อนของโลหะกับ receptor และการเกิดสารเชิงซ้อนของโลหะกับอินดิเคเตอร์ ทำให้วิธีการนี้สามารถใช้พัฒนาเคมีเซนเซอร์ แบบ colorimetric และ Fluorescent sensor สำหรับแอนไอออนและ analyte ที่เป็นชีวโมเลกุลต่างๆ

ในวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นที่จะพัฒนาเคโมเซ็นเซอร์และเทคนิคการตรวจวัดสารกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสที่ใช้เป็นสารกำจัดศัตรูพืช โดยไม่ต้องใช้กระบวนการสังเคราะห์เคโมเซ็นเซอร์ และเคโมเซ็นเซอร์ที่พัฒนาขึ้นมีสมบัติเป็น optical sensor ที่สามารถตรวจวัดสารออร์โธพอสฟอรัส โดยใช้เทคนิคทางสเปกโตรเมสทรี ได้แก่ ยูวี-วิสิเบิล และ ฟลูออเรสเซนส์ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไวต่อการวิเคราะห์สูง สามารถวิเคราะห์ปริมาณของสารได้ในระดับต่ำ (mM และ μM) ได้

การออกแบบเคโมเซ็นเซอร์สำหรับสารออร์กาโนฟอสฟอรัสในงานวิจัยนี้จะใช้กระบวนการ metal displacement indicator assay หรือ M-IDA จากสมบัติการเกิดสารเชิงซ้อนของหมู่ thionate ($\text{P}=\text{S}$) และ oxonate ($\text{P}=\text{O}$) ของสารออร์กาโนฟอสฟอรัส กับไอออนของโลหะ เช่น Cu^{2+} Co^{2+} Mg^{2+} และ Ca^{2+} (Murugavel *et al.*, 2008) และการเกิดสารเชิงซ้อนของอินดิเคเตอร์สำหรับโลหะ (metal indicator) เช่น murexide, calcon และ alizarin โดยคาดหวังว่าการเกิดสารเชิงซ้อนของสารออร์กาโนฟอสฟอรัสกับโลหะ เช่น Cu^{2+} Co^{2+} Mg^{2+} และ Ca^{2+} จะมีเสถียรภาพสูงเพียงพอที่จะแทนที่การเกิดสารเชิงซ้อนของอินดิเคเตอร์กับไอออนโลหะ และปลดปล่อยอินดิเคเตอร์เป็นอิสระ การเปลี่ยนแปลงสีที่เกิดขึ้น เช่น การดูดกลืนแสง สี หรือสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ สัมพันธ์กับปริมาณสารออร์กาโนฟอสฟอรัส นำไปสู่การใช้เคโมเซ็นเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์ปริมาณสารออร์กาโนฟอสฟอรัสในสารเคมีกำจัดศัตรูพืชได้อย่างแม่นยำ และรวดเร็ว (Khatua *et al.*, 2009; Männel-Croisé *et al.*, 2009)

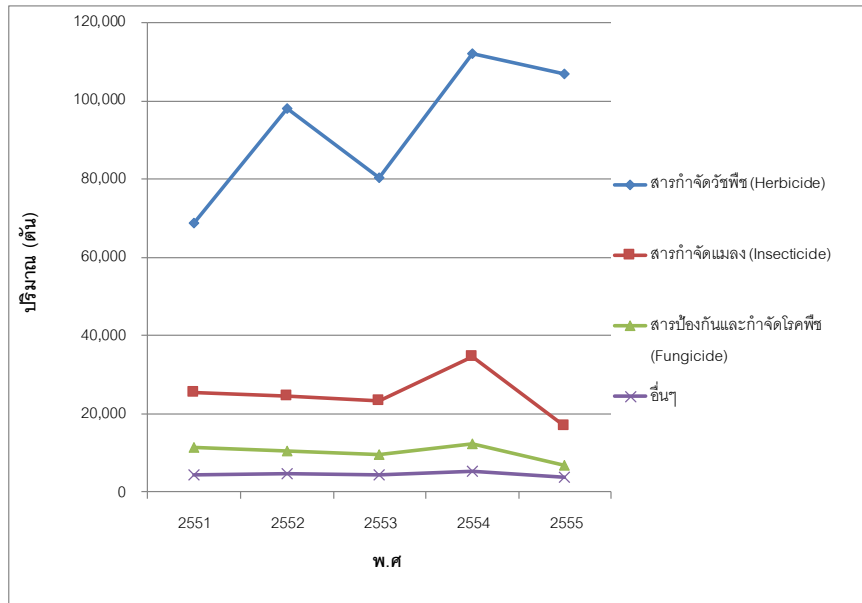
1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

จากข้อมูลของสำนักงานเศรษฐกิจทางเกษตร กระทรวงเกษตร พบว่าในระหว่างปี 2551-2555 ประเทศไทยมีการนำเข้าสารเคมีที่ใช้ในการสารกำจัดศัตรูพืช ทั้ง 4 กลุ่ม ได้แก่ (1) สารกำจัดวัชพืช (Herbicide) (2) สารกำจัดแมลง (Insecticide) (3) สารป้องกันและกำจัดโรคพืช (Fungicide) และ (4) กลุ่มอื่นๆ เพิ่มขึ้นอย่างมาก โดยเฉลี่ยเพิ่มขึ้นร้อยละ 22 ต่อปี และเมื่อคิดเป็นมูลค่าของการนำเข้าของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชจะมีมูลค่าเฉลี่ยปีละ 19,065 ล้านบาท ต่อปี จะเห็นได้ว่าสถานการณ์การใช้สารเคมีเพื่อกำจัดศัตรูพืชของเกษตรกรไทยหรือการใช้สารเคมีในภาคเกษตรกรรมของประเทศไทยมีแนวโน้มที่เพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่ยังคงมีพื้นที่ของการเพาะปลูกเท่าเดิม (กรมวิชาการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2557)

จากข้อมูลเป็นข้อบ่งชี้ว่ามีการใช้สารเคมีเพื่อกำจัดศัตรูพืชต่อไร่ของเกษตรกรสูงขึ้นทุกปี ทำให้ในปัจจุบันปัญหาสุขภาพที่มีความเกี่ยวเนื่องกับการใช้สารเคมีทางการเกษตรกลายเป็นปัญหาใหญ่ และมีรุนแรงมากในประเทศไทย จากรายงานสำนักโรคจากการประกอบอาชีพและสิ่งแวดล้อม กระทรวงสาธารณสุข พบว่าในปี 2550 มีเกษตรกรที่มีความเสี่ยงและไม่ปลอดภัยจากสารเคมีกำจัดศัตรูพืชถึงร้อยละ 39 ซึ่งก็มีแนวโน้มสูงตามปริมาณการใช้งานสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่เพิ่มมากขึ้นของเกษตรกรนั่นเอง (สำนักงานโรคจากการประกอบอาชีพและสิ่งแวดล้อม, 2556 อ้างถึงใน สาคร ศรีमुख, 2556)

ในด้านผลกระทบต่อในด้านสิ่งแวดล้อมปัญหาที่พบ คือ การตกค้างของสารเคมีในสิ่งแวดล้อม จากปริมาณการใช้งานสารเคมีจำนวนและลักษณะการใช้งานที่ส่งเสริมการแพร่กระจายในพื้นที่ดินและน้ำ ทำให้

เกิดปัญหาการแพร่กระจายและตกค้างในสิ่งแวดล้อมซึ่งเป็นที่อยู่ของสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์นำไปสู่การสะสมของสารเคมีในห่วงโซ่อาหาร และส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในทุกระดับ



รูปที่ 1.5 แผนภาพแสดงแนวโน้มปริมาณการนำเข้าสารเคมีกำจัดศัตรูพืช ของประเทศไทย ตั้งแต่ พ.ศ. 2551-2554 (กรมวิชาการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2557)

สารกำจัดศัตรูพืช กลุ่มออร์โงฟอสฟอรัส ถือเป็นสารเคมีที่ใช้ในการเกษตรที่ต้องเฝ้าระวังและบางชนิดห้ามใช้ในประเทศเนื่องจากความเป็นพิษสูงต่อสิ่งมีชีวิต เนื่องจากส่งผลกระทบต่อระบบประสาท โดยองค์กรพิทักษ์สิ่งแวดล้อมของสหรัฐอเมริกา หรือ EPA ได้รายงานว่ามีมากกว่า 70% (U.S. E.P.A., 2014) ของสารกำจัดศัตรูพืช ประเภทฆ่าแมลง ที่ใช้อยู่ในปัจจุบันเป็นสารกลุ่มออร์โงฟอสฟอรัส ทำให้สารกลุ่มนี้มีการกระจายตัวในสิ่งแวดล้อมมากที่สุด ปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืช กลุ่มออร์โงฟอสฟอรัส โดยเทคนิคการวิเคราะห์เคมีและทางเทคโนโลยีชีวภาพต่างๆ จำนวนมาก เช่น แก๊สโครมาโทกราฟี ลิควิดโครมาโทกราฟี อินเลเยอร์โคมาโทกราฟี ไบโอเซนเซอร์ เพื่อให้ได้วิธีการตรวจวัดและติดตามสารกำจัดศัตรูพืช กลุ่มออร์โงฟอสฟอรัส ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด แต่อย่างไรก็ตามวิธีการตรวจวัดที่เป็นที่ยอมรับและใช้งานในห้องปฏิบัติการ ก็ยังคงเป็นเทคนิคการตรวจวัดที่ต้องอาศัยเครื่องมือการวิเคราะห์ราคาแพงและต้องการขั้นตอนการเตรียมสารตัวอย่างมาก เช่น เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี ลิควิดโครมาโทกราฟี นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรเมทรี และแมสสเปกโตรเมทรี (Survey, U.S.G., 2000; Steiner *et al.*, 2005) ทำให้ยังคงมีความพยายามในการพัฒนาวิธีการตรวจวัดสารกลุ่มออร์โงฟอสฟอรัสอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้ได้เทคนิคการตรวจวัดสารกลุ่มออร์โงฟอสฟอรัสที่ง่าย ให้ผลดี สะดวก และสูญเสียค่าใช้จ่ายน้อย

จากรายงานที่ผ่านมาพบว่ามีการพัฒนาตัวตรวจวัดทางเคมี หรือเคมีเซนเซอร์ (chemosensor) เพื่อใช้เป็นการตรวจวัดสารออร์โงฟอสฟอรัสโดยส่วนใหญ่ จะเป็นการพัฒนาเพื่อใช้ในการการตรวจวัดและติดตามสารเคมีที่ใช้เป็นอาวุธสงคราม (warfare agent) เช่น แก๊สซารินและซามิน (Jenkins *et al.* 1997; Jenkins *et al.* 1999; Jenkins *et al.*, 2001; Rudzinski *et al.*, 2002; Russell *et al.*, 2003;

Sohn *et al.*, 2000; Steiner *et al.*, 2000; Minami *et al.*, 2014; Greňu *et al.*, 2014) นอกจากนี้พบว่า รายงานที่เกี่ยวข้องการพัฒนาพัฒนาตัวตรวจวัดทางเคมี หรือเคมีเซ็นเซอร์ (chemosensor) เพื่อใช้เป็น ในการตรวจวัดสารกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสที่เป็นสารเคมีกำจัดศัตรูพืชอยู่น้อยและส่วนใหญ่ยังมี ประสิทธิภาพไม่ดีในระดับความเข้มข้นของการตรวจวัด (detection limit) และ ความจำเพาะเจาะจง (Van Houten *et al.*, 1998; Zhang and Swager 2003; Walton *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2011) ในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นพัฒนาเคมีเซ็นเซอร์สำหรับสารกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส ที่ใช้ ในการเกษตร เพื่อนำไปสู่เทคนิคการวิเคราะห์ที่ถูกต้องแม่นยำ รวดเร็ว สิ้นเปลืองเวลาและสารเคมีน้อย และให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องในระดับความเชื่อมั่นที่ยอมรับได้ โดยพัฒนาเคมีเซ็นเซอร์สำหรับใช้ในการ วิเคราะห์หาปริมาณสารออร์กาโนฟอสฟอรัส โดยเทคนิคทางสเปกโทรเมทรี ได้แก่ ยูวี-วิสิเบิล และ ฟลูออโรเรสเซนส์ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไวต่อการวิเคราะห์ที่สูง สามารถวิเคราะห์ปริมาณของสารได้ในระดับ ต่ำ (mM และ μ M) นอกจากนี้เครื่องมือสเปกโทรเมทรี เช่น ยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรมิเตอร์ (UV-Vis spectrometer) และ ฟลูออโรเรสเซนส์สเปกโตรมิเตอร์ (fluorescent spectrometer) เป็นเครื่องมือที่มี ใช้อย่างแพร่หลายในห้องปฏิบัติการ

1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.3.1 ศึกษาปฏิกิริยาการเกิดสารเชิงซ้อนของอินดิเคเตอร์โลหะ (metal indicator) ชนิดไม่ใช้ฟลูออโร เรสเซนส์และฟลูออโรเรสเซนส์กับไอออนของโลหะและสารออร์กาโน- ฟอสฟอรัส โดยใช้เทคนิคทางสเปก โตรเมทรี ได้แก่ ยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรเมทรี และ ฟลูออโรเรสเซนส์สเปกโตรเมทรี

1.3.2 เพื่อพัฒนาเป็นตัวตรวจวัดทางเคมีหรือเคมีเซ็นเซอร์ (chemosensor) สำหรับการตรวจวัด สารออร์กาโนฟอสฟอรัสในสารตัวอย่างประเภท สารกำจัดศัตรูพืช โดยใช้เครื่องมือ เช่น ยูวี-วิสิเบิล สเปก โตรมิเตอร์ (UV-Vis spectrometer) และ ฟลูออโรเรสเซนส์สเปกโตรมิเตอร์ (fluorescent spectrometer)

1.4 วิธีดำเนินงานวิจัย

1.4.1 ศึกษาปฏิกิริยาการเกิดสารเชิงซ้อนและการแทนที่ของอินดิเคเตอร์สำหรับโลหะ (metal indicator) ไอออนของโลหะ และสารออร์กาโนฟอสฟอรัส โดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรเมทรี ได้แก่ ยูวี- วิสิเบิล สเปกโตรเมทรี และ ฟลูออโรเรสเซนส์สเปกโตรเมทรี

1.4.2 หาสภาวะที่เหมาะสมในการใช้สารเชิงซ้อนของอินดิเคเตอร์สำหรับโลหะ (metal indicator) กับ ไอออนโลหะ เพื่อใช้เป็นตัวตรวจวัดทางเคมีหรือเคมีเซ็นเซอร์ (chemosensor) สำหรับสารกลุ่ม ออร์กาโนฟอสฟอรัส โดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรเมทรี ได้แก่ ยูวี-วิสิเบิล และ ฟลูออโรเรสเซนส์

1.4.3 ศึกษาความเป็นไปได้ในนำตัวตรวจวัดทางเคมีหรือเคมีเซ็นเซอร์ (chemosensor) ที่พัฒนาขึ้น สำหรับการตรวจวัด สารออร์กาโนฟอสฟอรัส ที่ใช้เป็นสารเคมีกำจัดศัตรูพืช กลุ่ม เช่น chlopyrifos และ dichlofos โดยใช้เครื่องมือ เช่น ยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรมิเตอร์ (UV-Vis spectrometer) และ ฟลูออโรเรส เซนส์สเปกโตรมิเตอร์ (fluorescent spectrometer)

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารระดับนานาชาติ เช่น Journal of fluorescence, Analyst, Sensor และ Journal of sensor and actuator A

1.5.2 นำตัวตรวจวัดทางเคมีไปใช้ในการตรวจวัดสารออร์ฟอสฟอรัสในตัวอย่างทางสิ่งแวดล้อมหรือ ตัวอย่างทางชีวภาพ

บทที่ 2 วิธีการดำเนินงานวิจัย

2.1 เครื่องมือและสารเคมี

2.1.1 สารเคมี

สารเคมีประเภทสีย้อมทั้งหมดเป็นเกรดวิเคราะห์โดยปราศจากการทำให้บริสุทธิ์เพิ่มเติม ตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมดใช้ในเกรดสเปกโตรสโกปีโดยปราศจากการทำให้บริสุทธิ์เพิ่มเติม และน้ำที่ใช้เป็นเกรด Ultrapure (MilliQ water)

- Calcon (Sigma-Aldrich)
- Calcien (Sigma-Aldrich)
- Murexide (Sigma-Aldrich)
- Calconcarboxylic acid (Sigma-Aldrich)
- Titron (Sigma-Aldrich)
- 8-hydroxyquinoline zinc (Sigma-Aldrich)
- 8-hydroxyquinoline copper (Sigma-Aldrich)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris buffer (Sigma-Aldrich)
- Magnesium perchlorate (Sigma-Aldrich)
- Calcium perchlorate hexahydrate (Sigma-Aldrich)
- Zinc perchlorate hexahydrate (Sigma-Aldrich)
- DMSO (Sigma-Aldrich)
- Chlopyrifos, CPF (Merck)
- 2,2-Dichlorovinyl dimethyl phosphate, Dichovos, DDVP, Merck
- Commercial Chlopyrifos 40%W/V, CPF, (Linkphos)
- Commercial Dichovos 50%W/V, DDVP, (Pine)

2.1.2 เครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์

การวัดฟลูออเรสเซนส์สเปกตรัมทั้งหมดในงานวิจัยนี้จะใช้เครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ Agilent รุ่น Cary Eclipse fluorescence spectrometer ที่มีแหล่งกำเนิดแสงและตัวตรวจจับ (detector) เป็น Xenon flash lamp และ Photomultiplier tube (PMT) ตามลำดับ การวัดฟลูออเรสเซนส์สเปกตรัมทั้งหมดจะใช้สารละลายตัวอย่างที่มีปริมาตรในระดับไมโครลิตร ดังนั้นในงานวิจัยนี้เครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ใช้จะมีการติดตั้งอุปกรณ์เพิ่มเติม คือ Microplate Reader ตามรูปที่ 2.1

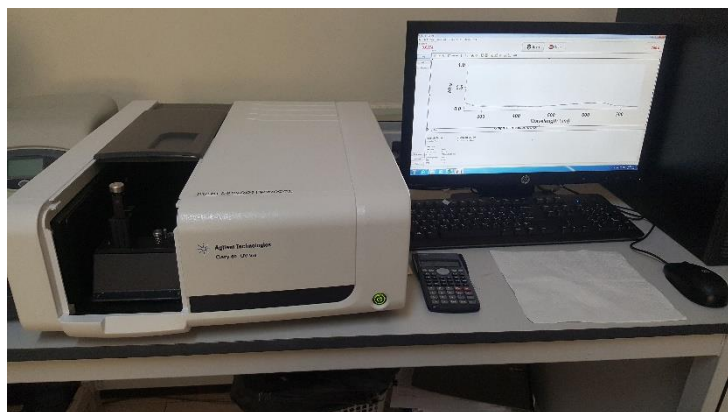


รูปที่ 2.1 เครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ Agilent รุ่น Cary Eclipse fluorescence spectrometer ที่ติดตั้ง Microplate reader

ในการตรวจวัดฟลูออเรสเซนส์สเปกตรัมของสารตัวอย่างจะทำการวัดโดยปิเปตสารละลายตัวอย่าง จำนวน 400 ไมโครลิตร ใส่ลงใน microplate ชนิด 96 well plate ใช้ mode scan ในการวัดทำการวัดแบบ pre-scan ก่อน เพื่อหา *Excitation wavelength* และสภาวะของเครื่องมือ ที่เหมาะสมในการตรวจวัดฟลูออเรสเซนส์สเปกตรัมของสารตัวอย่าง

2.1.3 เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

การวัดยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมทั้งหมดในงานวิจัยนี้จะใช้เครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ Agilent รุ่น Cary 60 UV-VIS spectrometer ที่มีแหล่งกำเนิดแสงและตัวตรวจวัด (detector) เป็น Xenon flash lamp และ Photomultiplier tube (PMT) ตามลำดับ การยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมทั้งหมดจะใช้สารละลายตัวอย่างที่มีปริมาตร 4 ไมโครลิตร โดยใช้ microcell ตามรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ Agilent รุ่น Cary 60 UV-VIS spectrometer ที่ติดตั้ง Microcell

2.2 วิธีการทดลอง

2.2.1 ศึกษาปฏิกิริยาการเกิดสารเชิงซ้อนของอินดิเคเตอร์สำหรับโลหะกับไอออนของโลหะ โดยเทคนิคฟลูออโรเรสเซนส์สเปกโตรเมทรี

2.2.1.1 เตรียมสารละลายอินดิเคเตอร์โลหะ stock ความเข้มข้น 1 mM ในสารละลาย Tris buffer pH = 8 ได้แก่ Calcon Calcien Murexide Calconcarboxylic acid และ Tiron

2.2.1.2 เตรียมสารละลายโลหะ stock ความเข้มข้น 1 mM ในสารละลาย Tris buffer pH = 8 ได้แก่ magnesium perchlorate, calcium perchlorate hexahydrate และ calcium perchlorate hexahydrate

ปิเปตสารละลายอินดิเคเตอร์โลหะ stock 10 ไมโครลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตร ขนาด 5 มิลลิเมตร เติมน้ำกลั่น อินดิเคเตอร์สำหรับโลหะ stock 50 ไมโครลิตร ผสมด้วย vortex เติมน้ำกลั่น Tris buffer pH = 8 จนถึงขีด ทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 400 ไมโครลิตร ใส่ลงใน microplate ชนิด 96 well plate นำไปวัดฟลูออโรเรสเซนส์สเปกโตรเมทรีที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะของเครื่องมือ ดังนี้

Start: 550 nm

End: 750 nm

Excitation wavelength: 250 nm

Excitation Slit: 5.0 nm

Emission Slit: 5.0 nm

Scan rate: 120 nm/min

PMT = 750 voltage

2.2.2 ศึกษาปฏิกิริยาการแทนที่ของสารออร์กาโนฟอสฟอรัสกับของสารเชิงซ้อนของอินดิเคเตอร์โลหะกับไอออนของโลหะโดยเทคนิคฟลูออโรเรสเซนส์สเปกโตรเมทรี

2.2.2.1 เตรียมสารละลายอินดิเคเตอร์โลหะ stock ความเข้มข้น 1 mM ในสารละลาย Tris buffer pH = 8 ได้แก่ Calcon Calcien Murexide Calconcarboxylic acid และ Tiron และ 8-hydroxyquinoline copper

2.2.2.2 เตรียมสารละลายโลหะ stock ความเข้มข้น 1 mM ในสารละลาย Tris buffer pH = 8 ได้แก่ magnesium perchlorate, calcium perchlorate hexahydrate และ calcium perchlorate hexahydrate

2.2.2.3 เตรียมสารละลายสารออร์กาโนฟอสฟอรัส stock ความเข้มข้น 1 mM ในสารละลาย Tris buffer pH = 8 ได้แก่ chlopyriphos (CFP) และ dichovos (DDVP)

2.2.2.4 ปิเปตสารละลายอินดิเคเตอร์โลหะ stock 10 ไมโครลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตร ขนาด 5 มิลลิเมตร เติมน้ำกลั่น อินดิเคเตอร์สำหรับโลหะ stock 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ปิเปตสารละลายสารออร์กาโนฟอสฟอรัส stock ความเข้มข้น 10 mM 50 ไมโครลิตร ผสมด้วย vortex เติมน้ำกลั่น

สารละลาย Tris buffer pH = 8 จนถึงขีด ที่ไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 400 ไมโครลิตร ใส่ลงใน microplate ชนิด 96 well plate นำไปวัดฟลูออเรสเซนส์สเปกตรัมที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะของเครื่องมือ ดังนี้

Start: 550 nm

End: 750 nm

Excitation wavelength: 250 nm

Excitation Slit: 5.0 nm

Emission Slit: 5.0 nm

Scan rate: 120 nm/min

PMT = 750 voltage

2.2.3 ศึกษาปฏิกิริยาการเกิดสารเชิงซ้อนของอินดิเคเตอร์โลหะกับไอออนของโลหะ โดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมทรี

2.2.3.1 เตรียมสารละลายอินดิเคเตอร์โลหะ stock ความเข้มข้น 10 mM ในสารละลาย Tris buffer pH = 8 ได้แก่ Calcon Calcien Murexide Calconcarboxylic acid และ Tiron

2.2.3.2 เตรียมสารละลายโลหะ stock ความเข้มข้น 10 mM ในสารละลาย Tris buffer pH = 8 ได้แก่ magnesium perchlorate, calcium perchlorate hexahydrate และ calcium perchlorate hexahydrate

2.2.3.3 ปิเปตสารละลายอินดิเคเตอร์โลหะ stock 100 ไมโครลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตร ขนาด 5 มิลลิลิตร เติมน้ำอินดิเคเตอร์สำหรับโลหะ stock 500 ไมโครลิตร ผสมด้วย vortex เติมน้ำ Tris buffer pH = 8 จนถึงขีด ที่ไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 5 ไมโครลิตร ใส่ใน microcell วัดยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมช่วง 250 – 750 นาโนเมตร

2.2.4 ศึกษาปฏิกิริยาการแทนที่ของสารออร์กาโนฟอสฟอรัสกับของสารเชิงซ้อนของอินดิเคเตอร์โลหะกับไอออนของโลหะโดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมทรี

2.2.4.1 เตรียมสารละลายอินดิเคเตอร์โลหะ stock ความเข้มข้น 10 mM ในสารละลาย Tris buffer pH = 8 ได้แก่ Calcon Calcien Murexide Calconcarboxylic acid Tiron และ 8-hydroxy quinoline copper

2.2.4.2 เตรียมสารละลายโลหะ stock ความเข้มข้น 10 mM ในสารละลาย Tris buffer pH = 8 ได้แก่ magnesium perchlorate, calcium perchlorate hexahydrate และ calcium perchlorate hexahydrate

2.2.4.3 เตรียมสารละลายสารออร์กาโนฟอสฟอรัส stock ความเข้มข้น 10 mM ในสารละลาย Tris buffer pH = 8 ได้แก่ chlopyriphos (CFP) และ dichovos (DDVP)

2.2.4.4 ปิเปตสารละลายอินดิเคเตอร์โลหะ stock 100 ไมโครลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตร ขนาด 5 มิลลิลิตร เติมน้ำอินดิเคเตอร์สำหรับโลหะ stock 500 ไมโครลิตร ที่ไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ปิเปตสารละลายสารออร์กาโนฟอสฟอรัส stock ความเข้มข้น 10 mM 500 ไมโครลิตร ผสมด้วย vortex เติมน้ำ

สารละลาย Tris buffer pH = 8 จนถึงขีด ทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 5 ไมโครลิตร ใส่ใน microcell วิทยุวี-วิสเปิลสเปกตรัมช่วง 250 – 750 นาโนเมตร

2.2.5 ศึกษาความเป็นไปได้เพื่อการวิเคราะห์ปริมาณสารเคมีกำจัดศัตรูพืช กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส โดยเทคนิคยูวี-วิสเปิลสเปกโตรเมทรี

2.2.5.1 เตรียมสารละลาย Calcon ความเข้มข้น 1 mM ในสารละลาย

2.2.5.2 เตรียมสารละลาย magnesium perchlorate ความเข้มข้น 1 mM ในสารละลาย

Tris buffer pH = 8

2.2.5.3 เตรียมสารละลายสารออร์กาโนฟอสฟอรัส chlopyriphos และ dichovos stock ความเข้มข้น 1 mM ในสารละลาย Tris buffer pH = 8

2.2.5.4 การไทเทรตอินดิเคเตอร์เตอร์โลหะกับไอออนของโลหะ

ปิเปตสารละลายอินดิเคเตอร์โลหะ stock ความเข้มข้น 1 mM 25 ไมโครลิตร ใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร เติมสารละลายไอออนโลหะ stock ความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 0, 10, 20, 30, 40, 50, 75 และ 100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Tris buffer pH = 8 ให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 2000 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 5 ไมโครลิตร ใส่ใน microcell วิทยุวี-วิสเปิลสเปกตรัมช่วง 250 – 750 นาโนเมตร

2.2.5.5 การสร้างกราฟมาตรฐานสารละลายมาตรฐานออร์กาโนฟอสฟอรัส 0-20 μ M

ปิเปตสารละลายอินดิเคเตอร์โลหะ stock ความเข้มข้น 1 mM 10 ไมโครลิตร ใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร เติมสารละลายโลหะ stock ความเข้มข้น 1 mM 10 ไมโครลิตร ผสมด้วย vortex ทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ปิเปตสารละลายออร์กาโนฟอสฟอรัส stock ความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15 และ 20 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Tris buffer pH = 8 ให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1000 ไมโครลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานสารออร์กาโนฟอสฟอรัสความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15 และ 20 μ M ทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 5 ไมโครลิตร ใส่ใน microcell วิทยุวี-วิสเปิลสเปกตรัมช่วง 250 – 750 นาโนเมตร

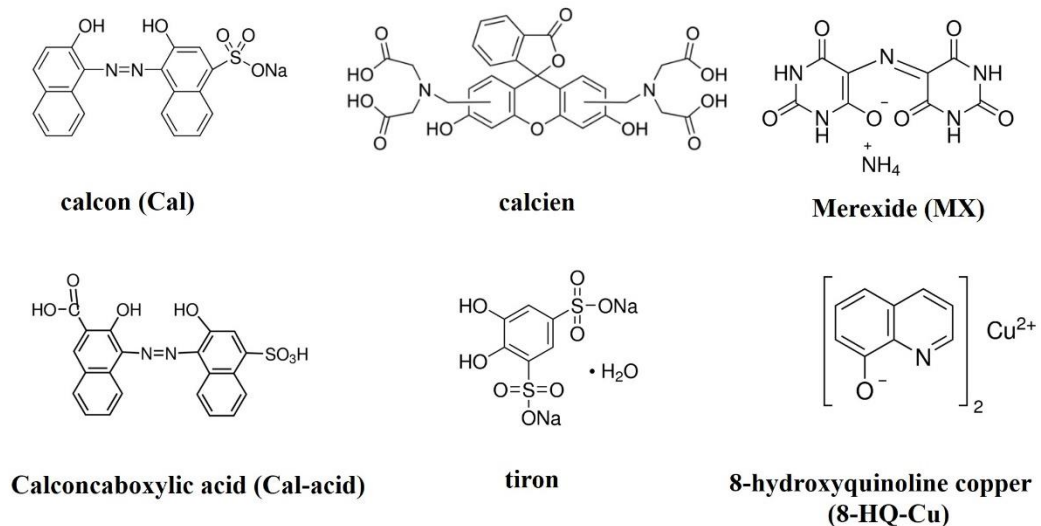
2.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

การทำ Linear regression ด้วยโปรแกรม OringinPro 8

บทที่ 3

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

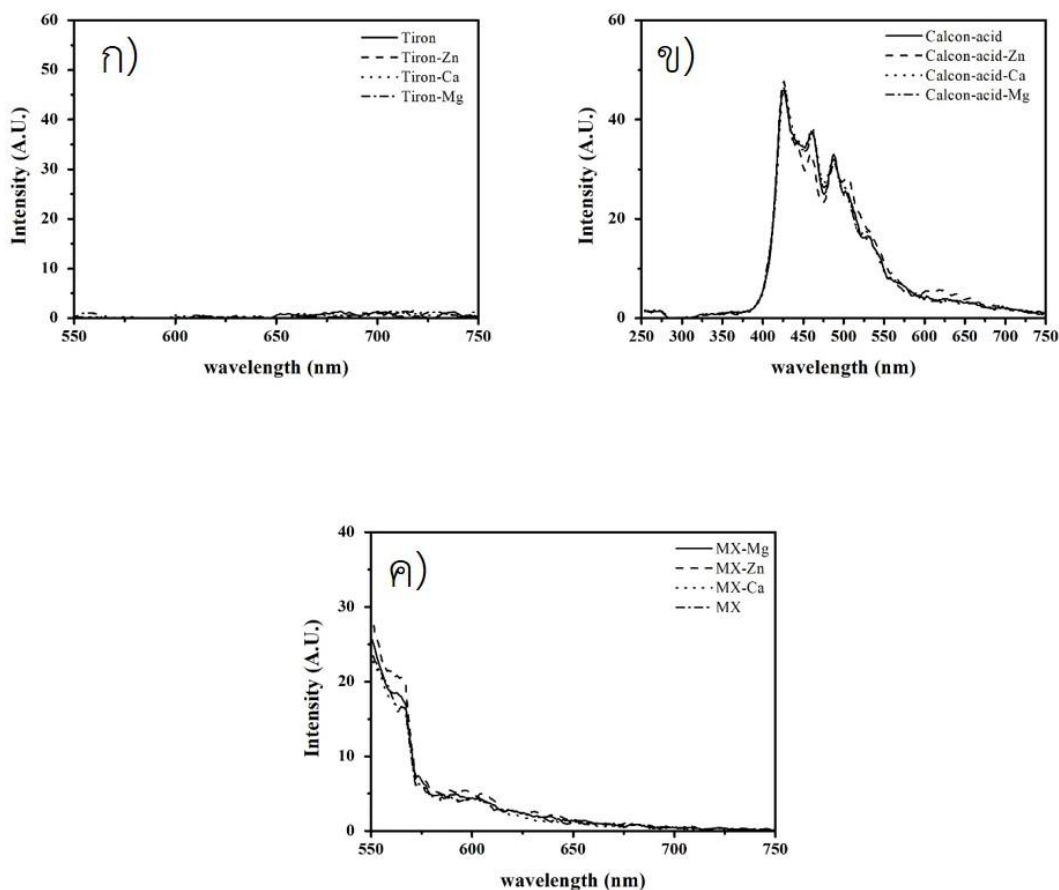
ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาระบบการตรวจวัดหรือเคมีเซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดสารออร์กาโนฟอสฟอรัสในระบบเอควิวสโดยใช้วิธีการ indicator-displacement assay หรือ IDA จากปฏิกิริยาแทนที่ของออร์กาโนฟอสฟอรัสกับสารเชิงซ้อนระหว่างอินดิเคเตอร์โลหะกับไอออนของโลหะ ในงานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษาอินดิเคเตอร์โลหะทั้งหมด 6 ตัว (รูปภาพที่ 3.1) ทำการศึกษาการเกิดสารเชิงซ้อนกับไอออนของโลหะ 3 ชนิด ได้แก่ Ca^{2+} Mg^{2+} และ Zn^{2+} ซึ่งเป็นไอออนสามารถจับกับหมู่ฟอสเฟสได้ ดังนั้นสารกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสกลุ่ม oxons และ thions ที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็น oxonate ($\text{P}=\text{O}$) และ thionate ($\text{P}=\text{S}$) ก็คาดว่าจะสามารถจับกับไอออนของโลหะแล้วปลดปล่อยอินดิเคเตอร์โดยการแทนที่แล้วปลดปล่อยอินดิเคเตอร์เป็นอิสระ อินดิเคเตอร์ที่ถูกปลดปล่อยให้เป็นอิสระให้สัญญาณทางกายภาพ เช่น การดูดกลืนแสง การเกิดฟลูออเรสเซนส์ ที่สัมพันธ์กับปริมาณของ analyte



รูปที่ 3.1 โครงสร้างโมเลกุลของอินดิเคเตอร์โลหะที่ใช้ในการวิจัย

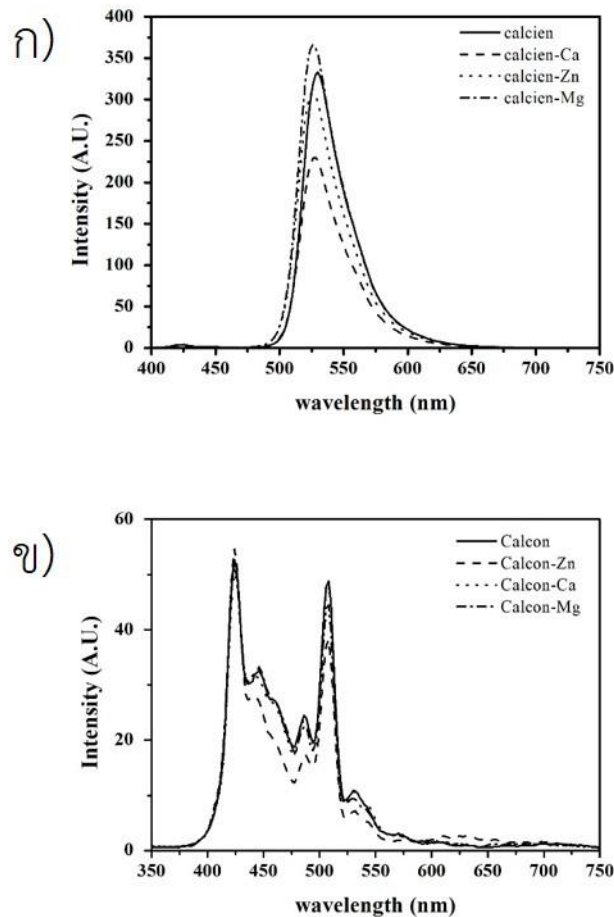
3.1 ศึกษาปฏิกิริยาการเกิดสารเชิงซ้อนของอินดิเคเตอร์โลหะกับไอออนของโลหะโดยเทคนิคฟลูออรีเรสเซนส์สเปกโตรเมทรี

การศึกษาปฏิกิริยาของการเกิดสารเชิงซ้อนของอินดิเคเตอร์โลหะ (metal indicator) 5 ชนิด ได้แก่ 1) Calcon 2) Calconcarboxylic acid 3) Calcien 4) Merexide และ 4) Tiron กับไอออนของโลหะ 3 ชนิด ได้แก่ Ca^{2+} Mg^{2+} และ Zn^{2+} ใน Tris buffer pH = 8 โดยใช้ปริมาณของไอออนของโลหะ มากเกินพอ (5 equiv.) สารละลายผสมของอินดิเคเตอร์โลหะและไอออนของโลหะหลังจากตั้งทิ้งที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดฟลูออรีเรสเซนส์สเปกตรัมโดยใช้ microplate reader โดยใช้ปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง 400 ไมโครลิตร ที่ excitation wavelength เท่ากับ 250 นาโนเมตร สำหรับอินดิเคเตอร์ทุกชนิด ให้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.2 และ 3.3



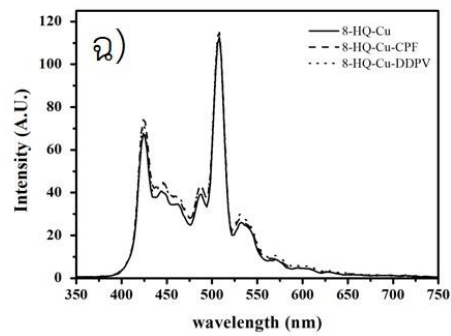
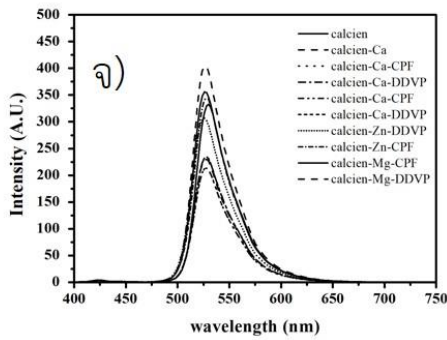
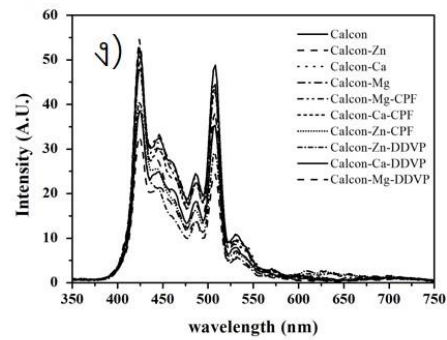
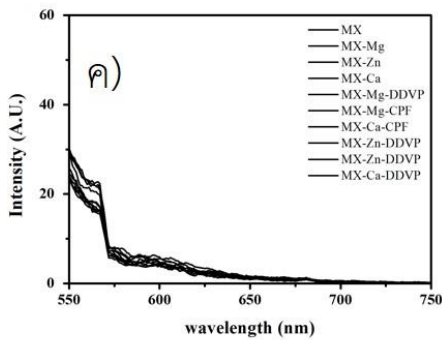
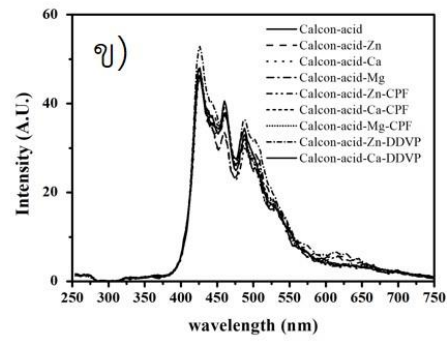
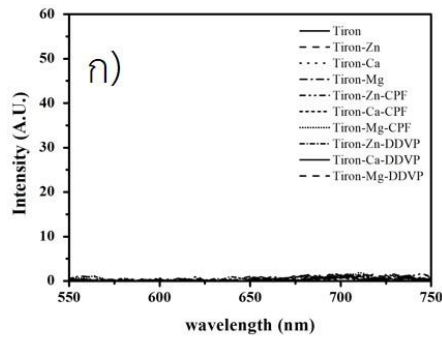
รูปที่ 3.2 ฟลูออรีเรสเซนส์สเปกตรัมของอินดิเคเตอร์โลหะ ($\lambda_{\text{ex}} = 250 \text{ nm}$) ก) Tiron ข) Calconcarboxylic acid และ ค) Merexide เมื่อเติม 5 equiv. ของ Ca^{2+} Mg^{2+} และ Zn^{2+} เมื่อความเข้มข้นของอินดิเคเตอร์โลหะ = $2 \mu\text{M}$ ความเข้มข้นของไอออนโลหะ = $10 \mu\text{M}$ ในสารละลาย Tris buffer pH = 8

จากรูปภาพที่ 3.2 ฟลูออเรสเซนส์สเปกตรัมแสดงให้เห็นว่ามีอินดิเคเตอร์โลหะ 2 ชนิด คือ Tiron และ Merexide มี quantum yield ต่ำ ไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้เป็นฟลูออเรสเซนส์เซ็นเซอร์สำหรับไอออนของโลหะ นอกจากนี้ให้สัญญาณฟลูออเรสเซนส์ต่ำแล้วยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนส์เมื่อเติมไอออนของโลหะอีกด้วย และในกรณีของ Calconcarboxylic acid ถึงแม้ว่าให้สัญญาณฟลูออเรสเซนส์สูงแต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงเมื่อเติมไอออนของโลหะจึงไม่เหมาะสมในการเป็นฟลูออเรสเซนส์เซ็นเซอร์สำหรับไอออนของโลหะเช่นเดียวกัน



รูปที่ 3.3 ฟลูออเรสเซนส์สเปกตรัมของอินดิเคเตอร์โลหะ ($\lambda_{ex} = 250 \text{ nm}$) ก) Calcien และ ข) Calcon เมื่อเติม 5 equiv. ของ Ca^{2+} Mg^{2+} และ Zn^{2+} เมื่อความเข้มข้นของอินดิเคเตอร์โลหะ = $2 \mu\text{M}$ ความเข้มข้นของไอออนโลหะ = $10 \mu\text{M}$ ในสารละลาย Tris buffer pH = 8

ในรูปที่ 3.3 แสดงฟลูออเรสเซนส์สเปกตรัมของอินดิเคเตอร์โลหะที่มีการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนส์เมื่อเติม 5 equiv. ของ Ca^{2+} Mg^{2+} และ Zn^{2+} ได้แก่อินดิเคเตอร์ Calcien และ Calcon โดยที่ Calcien จะมีการลดลงของสัญญาณมากที่สุดเมื่อเกิดการจับกับ Ca^{2+} ในขณะที่ Calcon จะมีการลดลงของสัญญาณมากที่สุดเมื่อเกิดการจับกับ Zn^{2+} แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงของอินดิเคเตอร์โลหะ Calcien และ Calcon ที่มีต่อ Ca^{2+} และ Zn^{2+} ตามลำดับ แสดงว่าอินดิเคเตอร์โลหะ Calcien และ Calcon สามารถนำไปใช้ในการเป็นฟลูออเรสเซนส์เซ็นเซอร์หรือตัวตรวจวัดทางเคมี (chemosensor) สำหรับ Ca^{2+} และ Zn^{2+} ได้



รูปที่ 3.4 ฟลูออเรสเซนส์สเปกตรัมของอินดิเคเตอร์โลหะ ก) Tiron ข) Calconcarboxylic acid ค) murexide ง) Calcon จ) Calcien และ ฉ) 8-hydroxyquinolien copper ในขณะที่มี 5 equiv. ของ Zn^{2+} , Mg^{2+} , และ Ca^{2+} และ 5 equiv. ของสารออร์กาโนฟอสฟอรัส chlopyrifos (CPF) และ dichlovos (DDPV) เมื่อความเข้มข้นของอินดิเคเตอร์โลหะ = 2 μM ความเข้มข้นของไอออนโลหะ = 10 μM ความเข้มข้นของสารออร์กาโนฟอสฟอรัส = 10 μM ในสารละลาย Tris buffer pH = 8

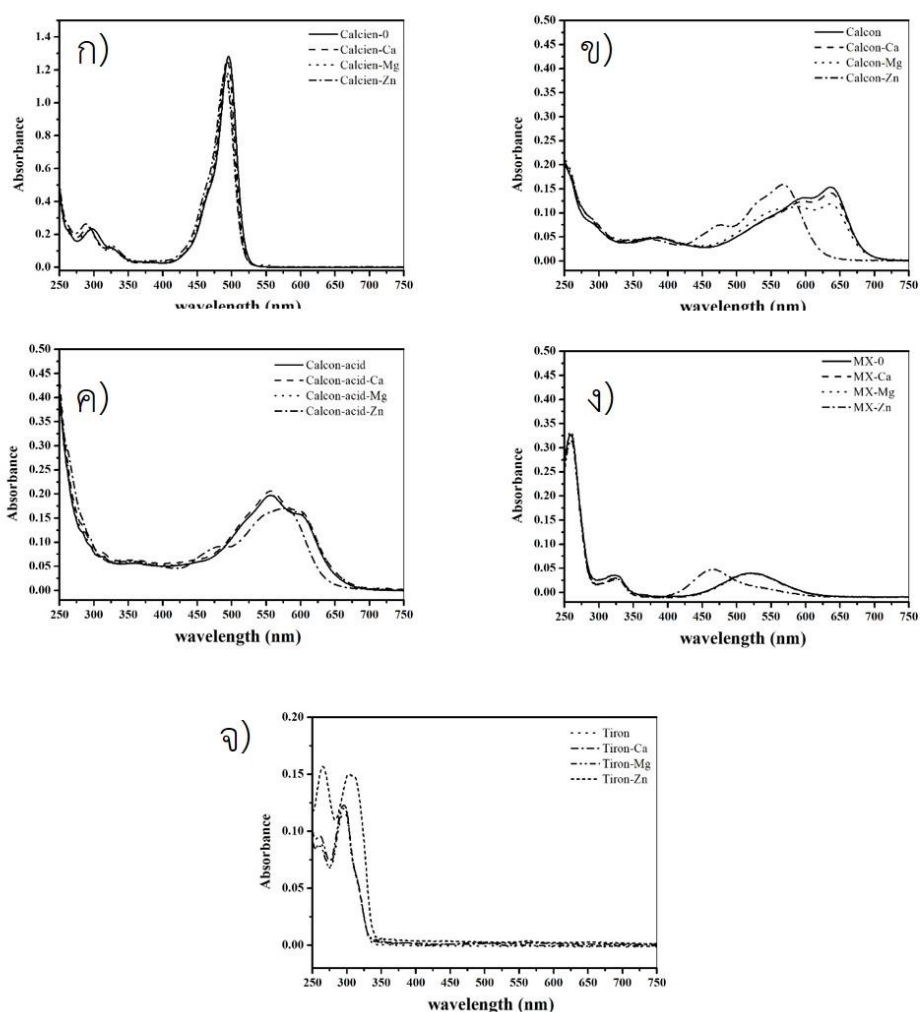
3.2 ปฏิกริยาการแทนที่ของสารออร์กาโนฟอสฟอรัสกับของสารเชิงซ้อนของอินดิเคเตอร์โลหะกับไอออนของโลหะโดยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรเมทรี

จากผลการศึกษาในข้อ 3.1 แสดงให้เห็นว่าอินดิเคเตอร์โลหะมีแนวโน้มในการใช้เป็นฟลูออเรสเซนเซอร์ได้เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงสัญญาณเมื่อเกิดปฏิกริยากับไอออนของโลหะ ในการทดลองนี้ ได้การศึกษาปฏิกริยาการแทนที่ของสารออร์กาโนฟอสฟอรัส ได้แก่ chlopyrifos (CFP) และ dichovos (DDVP) ในสารเชิงซ้อนของอินดิเคเตอร์กับไอออนของโลหะ โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงฟลูออเรสเซนส์สเปกตรัมเมื่อเติมสารออร์กาโนฟอสฟอรัสมากเกินพอ (5 equiv.) ในสารละลายผสมของอินดิเคเตอร์โลหะและไอออนโลหะ

จากรูปที่ 3.4 แสดงให้เห็นว่าอินดิเคเตอร์โลหะทั้ง 6 ชนิดที่ทำการศึกษาไม่มีการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนส์เมื่อเติมสารออร์กาโนฟอสฟอรัส โดยกลุ่มที่ 1 ได้แก่ Tiron Calconcaroxylic acid และ Merexide ซึ่งเป็นอินดิเคเตอร์ที่ไม่ให้สัญญาณฟลูออเรสเซนส์หรือให้สัญญาณฟลูออเรสเซนส์ต่ำอยู่แล้วจะไม่พบการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนส์เลย ซึ่งอาจจะเกิดการที่สารเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นไม่ให้สัญญาณฟลูออเรสเซนส์หรืออินดิเคเตอร์ในกลุ่มนี้ไม่เกิดปฏิกริยาไอออนของโลหะหรือสารออร์กาโนฟอสฟอรัสได้เลย ในกลุ่มที่ 2 ได้แก่ Calcon Calcien และ 8-hydroxyquinolien copper ซึ่งสารที่มี quantum yield สูง และสามารถเกิดสารเชิงซ้อนกับไอออนของโลหะได้แล้วเกิดการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ แต่เมื่อเติม 5 equiv. ของ CFP และ DDVP ฟลูออเรสเซนส์สเปกตรัมที่ได้ยังคงมีลักษณะเหมือนกับในขณะที่เติมเฉพาะ 5 equiv. ของไอออนโลหะ แสดงให้เห็นว่าในสภาวะที่ทำการศึกษาสารเชิงซ้อนของอินดิเคเตอร์กับไอออนโลหะ สารเชิงซ้อนของโลหะและอินดิเคเตอร์สปีयर มากหมู่ oxonate ของ DDPV และหมู่ thionate ของ CFP ไม่สามารถไปจับกับไอออนของโลหะและปลดปล่อยอินดิเคเตอร์เป็นอิสระได้หรือไม่เกิดปฏิกริยาแทนที่ตามกลไกการตรวจวัดแบบ indicator-displacement assay หรือ IDA จึงไม่สามารถนำระบบนี้ไปใช้เพื่อใช้เป็นเคโมเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดสารเคมีกำจัดศัตรูพืชออร์กาโนฟอสฟอรัสโดยใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรเมทรีได้

3.3 ปฏิกริยาการเกิดสารเชิงซ้อนของอินดิเคเตอร์โลหะกับไอออนของโลหะโดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมทรี

การศึกษาปฏิกริยาของการเกิดสารเชิงซ้อนของอินดิเคเตอร์สำหรับโลหะ 5 ชนิด ได้แก่ 1) Calcon 2) Calconcarboxylic acid 3) Calcien 4) Merexide และ 4) Tiron กับไอออนของโลหะ 3 ชนิด ได้แก่ Ca^{2+} Mg^{2+} และ Zn^{2+} ใน Tris buffer pH = 8 โดยใช้ปริมาณของไอออนของโลหะมากเกินไป (5 equiv.) ความเข้มข้นของอินดิเคเตอร์โลหะ = 0.2 mM ความเข้มข้นของไอออนโลหะ = 5 mM ในสารละลาย Tris buffer pH = 8 หลังจากตั้งทิ้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัม โดยใช้ปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง 4 ไมโครลิตร โดยใช้ microcell วัดสเปกตรัมช่วงความยาวคลื่น 250-750 นาโนเมตร ให้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.5



รูปที่ 3.5 ยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมของอินดิเคเตอร์โลหะ ก) Calcien ข) Calconcarboxylic acid ค) Calconcarboxylic acid ง) murexide และ จ) Tiron เมื่อเติม 5 equiv. ของไอออนของโลหะ Zn^{2+} Mg^{2+} และ Ca^{2+} เมื่อความเข้มข้นของอินดิเคเตอร์โลหะ = 0.2 mM ความเข้มข้นของไอออนโลหะ = 5 mM ในสารละลาย Tris buffer pH = 8

จากรูปที่ 3.5 แสดงให้เห็นว่าอินดิเคเตอร์โลหะสามารถเกิดสารเชิงซ้อนกับไอออนที่ทำการศึกษา พบการเปลี่ยนแปลงยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมหลังการเติม 5 equiv. ไอออนของโลหะ โดยการเปลี่ยนแปลงเปลี่ยนแปลงยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัม แสดงให้เห็นว่าอินดิเคเตอร์แต่ละชนิดมีความจำเพาะเจาะจงต่อชนิดของ แคทไอออน เมื่อพิจารณาจากสัดส่วนของค่าการดูดกลืนแสงของพีคที่เกิดขึ้นในขณะที่เติมและไม่เติม 5 equiv. ไอออนของโลหะ (A/A_0) ดังแสดงจากตารางที่ 3.1 จากค่า A/A_0 แสดงให้เห็นความจำเพาะเจาะจงของอินดิเคเตอร์โลหะต่อชนิดของแคทไอออน ดังนี้ Calciem จำเพาะต่อ Ca^{2+} Calcon Calconcarboxylic acid Merexide และ Tiron จำเพาะต่อ Zn^{2+} และเมื่อพิจารณาการที่ค่า A/A_0 และการเปลี่ยนแปลงของ ยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัม พบว่า Merexide แสดงความจำเพาะต่อ Zn^{2+} มากที่สุด โดยจะปรากฏพีคใหม่ 460 นาโนเมตร และสีของสารละลาย Merexide จะเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีเหลืองเมื่อเติม Zn^{2+} เท่านั้น

ตารางที่ 3.1 สัดส่วนของค่าการดูดกลืนแสงในขณะที่เติมและไม่เติม 5 equiv. ไอออนของโลหะ (A/A_0) ของอินดิเคเตอร์โลหะ

อินดิเคเตอร์โลหะ	ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	ค่า A/A_0		
		Ca^{2+}	Mg^{2+}	Zn^{2+}
Calciem	476	1.07*	1.15	1.25
Calcon	560	0.97	1.07	1.53*
Calconcaroxylic acid	550	1.04	1.00	0.82*
Merexide	465	0.98	0.79	5.98*
Tiron	296	1.06	1.04	1.20*

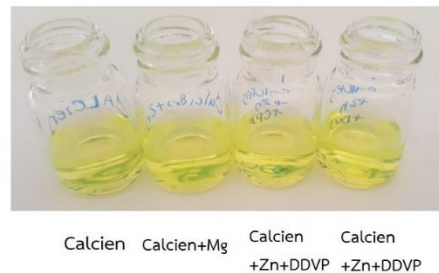
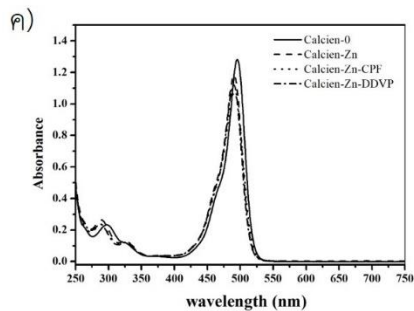
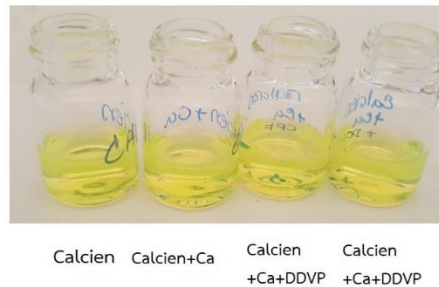
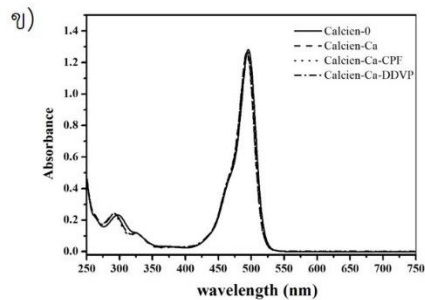
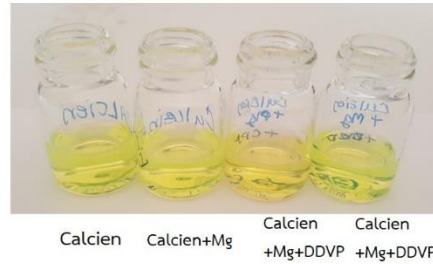
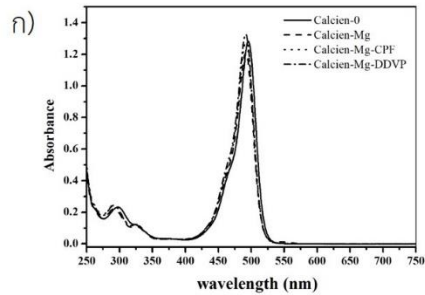
เมื่อพิจารณาอินดิเคเตอร์ Calcon ในรูปที่ 3.5(ข) และ 3.5(ง) พบว่ายูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมของ Calcon มีการเปลี่ยนแปลงทั้งในกรณีเติม Zn^{2+} และ Mg^{2+} โดยการเปลี่ยนแปลงจะเกิดกับ Zn^{2+} มากกว่า Mg^{2+} โดยเมื่อเติม Zn^{2+} ลงในสารละลาย Calcon ยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมของ Calcon จะมีการเกิดเลื่อนตำแหน่งของพีคแบบ blue shift จาก 635 นาโนเมตร มาที่ตำแหน่ง 550 นาโนเมตร สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีชมพู แสดงว่าการเกิดสารเชิงซ้อนระหว่าง Calcon กับ Zn เสถียรมาก ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากการเกิดสารเชิงซ้อนของ Zn^{2+} กับ Calcon จะเกิดผ่าน tetradentate binding site จึงมีความเสถียรและทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่โครงสร้างของ Calcon มากจึงเกิดเลื่อนของพีคไปที่ตำแหน่งพลังงานสูงขึ้น ในกรณีของ Mg^{2+} ยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมของ Calcon มีการเปลี่ยนแปลงน้อยกว่า โดยมีการลดลงของพีคที่ 635 นาโนเมตร และเกิดพีคที่ 550 นาโนเมตร สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีชมพู การเปลี่ยนแปลงที่น้อยกว่าแสดงว่าการเกิดสารเชิงซ้อนของ Mg^{2+} กับ Calcon เสถียรน้อยกว่า Zn^{2+} กับ Calcon

3.4 ปฏิกริยาการแทนที่ของสารออร์กาโนฟอสฟอรัสกับของสารเชิงซ้อนของอินดิเคเตอร์โลหะกับไอออนของโลหะโดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมทรี

จากผลการศึกษาในข้อ 3.3 แสดงให้เห็นว่าอินดิเคเตอร์โลหะมีแนวโน้มในการใช้เคโมเซ็นเซอร์หรือ naked eye sensor ได้เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมได้เมื่อมีการสารเชิงซ้อนกับโลหะได้อย่างจำเพาะเจาะจงและเกิดการเปลี่ยนแปลงในช่วง 400-750 นาโนเมตร ยกเว้น Tiron การเปลี่ยนแปลงเกิดในช่วงยูวี ในการทดลองนี้ได้ศึกษาปฏิกริยาการแทนที่ของสารออร์กาโนฟอสฟอรัส ได้แก่ chlopyrifos (CFP) และ dichovos (DDVP) โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมเมื่อมีการเติมสารออร์กาโนฟอสฟอรัสมากเกินไป (5 equiv.) ในสารละลายผสมของอินดิเคเตอร์โลหะและไอออนของโลหะ โดยในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ microcell สำหรับวัดยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมทำให้ใช้สารปริมาณน้อยในการวัด คือ 5 ไมโครลิตร การศึกษาปฏิกริยาการแทนที่โดยการผสมสารละลายอินดิเคเตอร์โลหะกับอินดิเคเตอร์โลหะ ในอัตราส่วน 1:1.1 ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เกิดสารเชิงซ้อนระหว่างโลหะกับอินดิเคเตอร์โลหะอย่างสมบูรณ์ แล้วค่อยเติมสารละลายสารออร์กาโนฟอสฟอรัสปรับปริมาตรและทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้ววัดยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมช่วง 250 – 750 นาโนเมตร โดยใช้ microcell ซึ่งจะใช้ปริมาตรของสารตัวอย่างเท่ากับ 5 ไมโครลิตร

3.4.1 ปฏิกริยาการแทนที่ของสารออร์กาโนฟอสฟอรัสกับของสารเชิงซ้อนของ Calcion กับไอออนของโลหะ

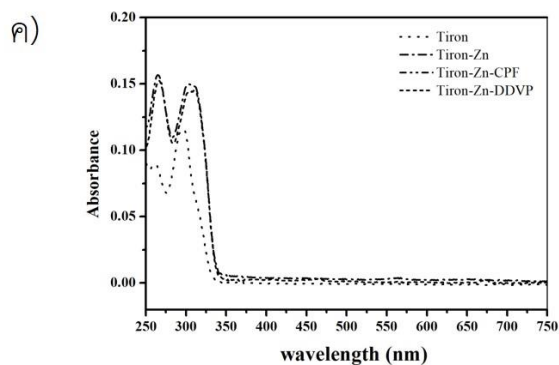
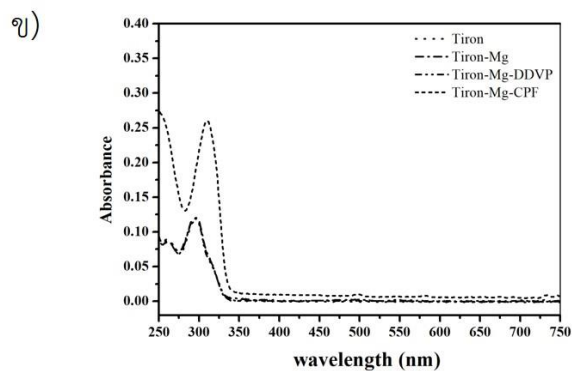
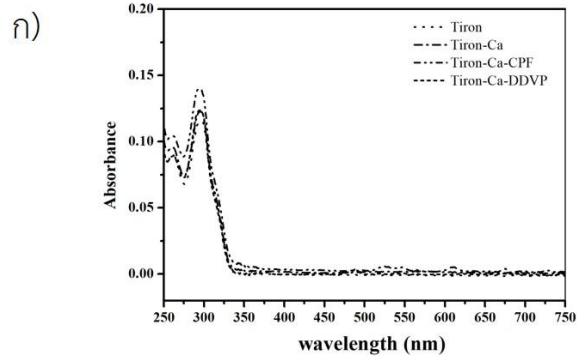
การศึกษาก่อเกิดการสารเชิงซ้อนของ Calcion โดยยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมทรี (รูปที่ 3.6) แสดงให้เห็นจำเพาะต่อ Ca^{2+} แต่มีการเปลี่ยนแปลงไม่มากมีการลดลงของพีคที่ 475 นาโนเมตร เล็กน้อย และสีของสารละลายไม่สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า เมื่อเติมสารออร์กาโนฟอสฟอรัส CPF และ DDPV ลงในสารละลายผสมของ Calcion กับไอออนของโลหะ Zn^{2+} Mg^{2+} และ Ca^{2+} พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับสเปกตรัมและสีของสารละลายผสมของ Calcion กับไอออนของโลหะ แสดงว่าไม่เกิดปฏิกริยาการแทนที่ของสารออร์กาโนฟอสฟอรัสกับ Calcion ที่เกิดสารเชิงซ้อนกับไอออนของโลหะ



รูปที่ 3.6 ยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมและสีของสารละลายอินดิเคเตอร์โลหะ Calcien เมื่อเติม 5 equiv. ของไอออนของโลหะ Zn^{2+} Mg^{2+} และ Ca^{2+} และ 5 equiv. ของไอออนของสารออร์กาโนฟอสฟอรัส CPF และ DDPV เมื่อความเข้มข้นของอินดิเคเตอร์โลหะ = 0.2 mM ความเข้มข้นของไอออนโลหะ = 1 mM ความเข้มข้นของสารออร์กาโนฟอสฟอรัส = 1 mM ในสารละลาย Tris buffer pH = 8

3.4.2 ปฏิกริยาการแทนที่ของสารออร์กาโนฟอสฟอรัสกับของสารเชิงซ้อนของ Tiron กับไอออนของโลหะ

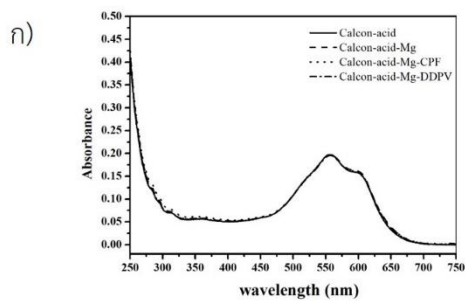
การศึกษาการเกิดการสารเชิงซ้อนของ Tiron โดยยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมทรี (รูปที่ 3.7) แสดงให้เห็นจำเพาะต่อ Zn^{2+} มีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นของพีคที่ 295 นาโนเมตร เมื่อเติมสารออร์กาโนฟอสฟอรัส CPF และ DDPV ลงในสารละลายผสมของ Tiron กับไอออนของโลหะ Zn Mg และ Ca ดังแสดงในรูปที่ 3.8 พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบสเปกตรัมและสีของสารละลายสารละลายผสมของ Tiron กับไอออนของโลหะ แสดงว่าไม่เกิดปฏิกิริยาแทนที่ของสารออร์กาโนฟอสฟอรัสกับ Tiron ที่เกิดสารเชิงซ้อนกับไอออนของโลหะ



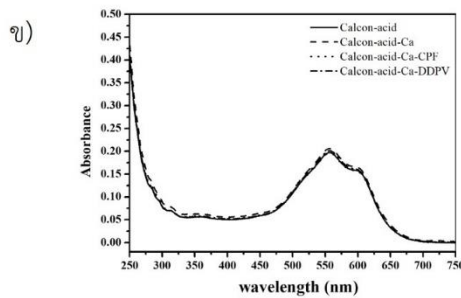
รูปที่ 3.7 ยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมของอินดิเคเตอร์โลหะ Tiron ในขณะที่มี 5 equiv. ไอออนของโลหะ Zn^{2+} Mg^{2+} และ Ca^{2+} และ 5 equiv. ของไอออนของสารออร์กาโนฟอสเฟต CPF และ DDPV เมื่อความเข้มข้นของอินดิเคเตอร์โลหะ = 0.2 mM ความเข้มข้นของไอออนโลหะ = 1 mM ความเข้มข้นของสารออร์กาโนฟอสเฟต = 1 mM ในสารละลาย Tris buffer pH = 8

3.4.3 ปฏิกริยาการแทนที่ของสารออร์กาโนฟอสฟอรัสกับของสารเชิงซ้อนของ Calconcarboxylic acid กับไอออนของโลหะ

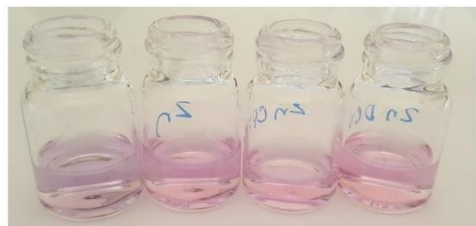
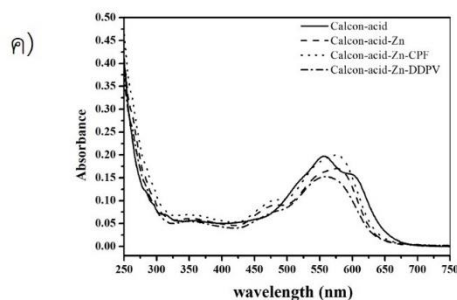
การศึกษาการเกิดการสารเชิงซ้อนของ Calconcarboxylic acid (รูปที่ 3.8) แสดงเห็นจำเพาะต่อ Zn^{2+} มีการเปลี่ยนแปลงเส้นของพีคจาก 550 ไปที่ 575 นาโนเมตร สารละลายมีการเปลี่ยนแปลงสีจากสีม่วงเป็นสีชมพู (รูปที่ 3.8) เมื่อเติมสารออร์กาโนฟอสฟอรัส CPF และ DDPV ลงในสารละลายผสมของ Calconcarboxylic acid กับ Zn^{2+} Mg^{2+} และ Ca^{2+} ดังแสดงในรูปที่ 3.8 พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบสเปกตรัมและสีของสารละลายสารละลายผสมของ Calconcarboxylic acid กับ Zn^{2+} แสดงว่าไม่เกิดปฏิกริยาแทนที่ของสารออร์กาโนฟอสฟอรัสกับ Calconcarboxylic acid ที่เกิดสารเชิงซ้อนกับ Zn^{2+} สารเชิงซ้อนระหว่าง Calconcarboxylic acid กับ Zn^{2+} มีความเสถียรมากทำให้หมู่ oxonate และ thionate ของ DDPV และ CFP ไม่ก็จะสามารถแย่งจับกับไอออนของโลหะแล้วปลดปล่อยอินดิเคเตอร์เป็นอิสระได้



Cal-acid Cal-acid+Mg Cal-acid+Mg+DDPV Cal-acid+Mg+DDPV



Cal-acid Cal-acid+Ca Cal-acid+Ca+DDPV Cal-acid+Ca+DDPV

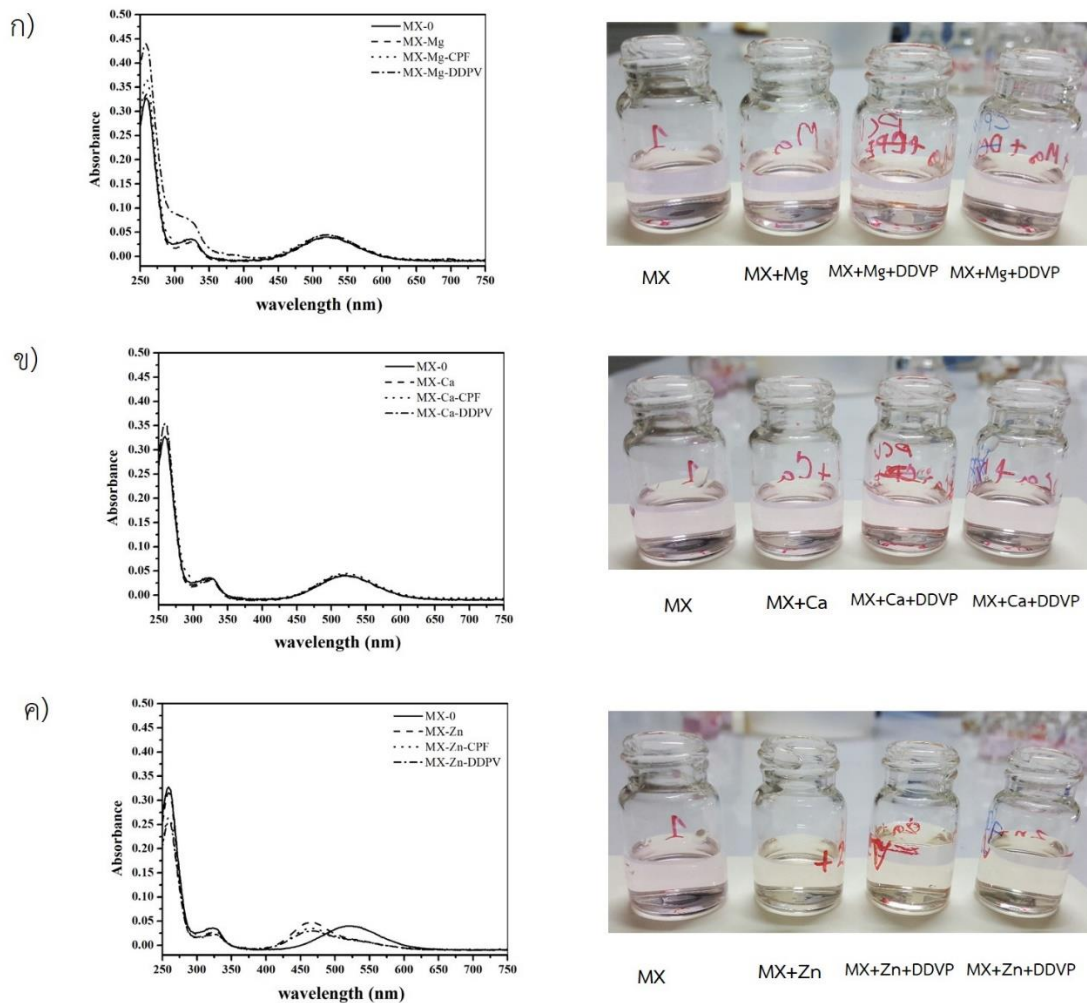


Cal-acid Cal-acid+Zn Cal-acid+Zn+DDPV Cal-acid+Zn+DDPV

รูปที่ 3.8 ยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมและสีของสารละลายของอินดิเคเตอร์โลหะ Calconcarboxylic acid ในขณะที่มี 5 equiv. ของไอออนของโลหะ Zn^{2+} Mg^{2+} และ Ca^{2+} และ 5 equiv. ของไอออนของสารออร์กาโนฟอสฟอรัส CPF และ DDPV เมื่อความเข้มข้นของอินดิเคเตอร์โลหะ = 0.2 mM ความเข้มข้นของไอออนโลหะ = 1 mM ความเข้มข้นของสารออร์กาโนฟอสฟอรัส = 1 mM ในสารละลาย Tris buffer pH = 8

3.4.4 ปฏิกริยาการแทนที่ของสารออร์กาโนฟอสฟอรัสกับของสารเชิงซ้อนของ Merexide กับ ไอออนของโลหะ

การศึกษาการเกิดการสารเชิงซ้อนของ Merexide โดยยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมทรี แสดงเห็น จำเพาะต่อ Zn^{2+} มากที่สุด โดยจะปรากฏพีคใหม่ 460 นาโนเมตร และสีของสารละลาย Merexide จะ เปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีเหลืองเมื่อเติม Zn^{2+} ดังแสดงในรูปที่ 3.9 พบว่าเมื่อเติมสารออร์กาโนฟอสฟอรัส CPF และ DDPV ลงในสารละลายผสมของ Merexide กับ Mg^{2+} และ Ca^{2+} ไม่มีการเปลี่ยนแปลง สเปกตรัมและสีของสารละลายเมื่อเทียบกับขณะที่เป็น Merexide อิสระ แสดงว่า Merexide ไม่เกิดสาร เชิงซ้อนกับ Mg^{2+} และ Ca^{2+} หรือเกิดปฏิกิริยากับสารออร์กาโนฟอสฟอรัส CPF และ DDPV เลย

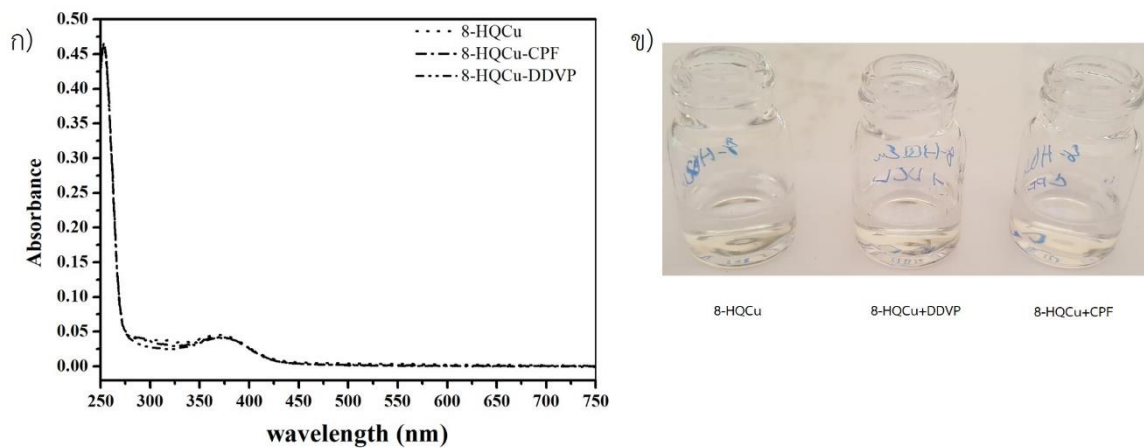


รูปที่ 3.9 ยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมและสีของสารละลายของอินดิเคเตอร์โลหะ Merexide ในขณะที่มี 5 equiv. ของไอออนของโลหะ Zn^{2+} Mg^{2+} และ Ca^{2+} และ 5 equiv. ของไอออนของสารออร์กาโนฟอสฟอรัส CPF และ DDPV เมื่อความเข้มข้นของอินดิเคเตอร์โลหะ = 0.2 mM ความเข้มข้นไอออนโลหะ = 1 mM ความเข้มข้นของสารออร์กาโนฟอสฟอรัส = 1 mM ในสารละลาย Tris buffer pH = 8

ในการศึกษาปฏิกิริยาระหว่างของ DDPV และ CPF กับละลายผสมของ Merexide กับ Zn^{2+} พบว่า ไม่มีการเปลี่ยนแปลงสีและยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมดังแสดงในรูปที่ 3.9(ค) แสดงว่าไม่มีปฏิกิริยาแทนที่ของสารออร์กาโนฟอสฟอรัสกับ Merexide เกิดขึ้น สารเชิงซ้อนที่เสถียรมากระหว่าง Merexide กับ Zn^{2+} ทำให้หมู่ oxonate และ thionate ของ DDPV และ CFP ไม่ก็จะสามารถแย่งจับกับไอออนของโลหะแล้วปลดปล่อยอินดิเคเตอร์เป็นอิสระได้

3.4.5 ปฏิกิริยาของสารออร์กาโนฟอสฟอรัสกับ 8-hydroxyquinolien copper

ในการศึกษาได้ทำการศึกษาปฏิกิริยาของ DDPV และ CPF กับ 8-hydroxyquinolien copper โดยเติม 5 equiv. สารออร์กาโนฟอสฟอรัสลงในสารละลาย 8-hydroxyquinolien copper ใน Tris buffer pH =8 ดังแสดงในรูปที่ 3.10 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงสเปกตรัมและสีของสารละลายแสดงว่าไม่มีเกิดปฏิกิริยาของ DDPV และ CPF กับ 8-hydroxyquinolien copper เช่นเดียวกับสารเชิงซ้อน Merexide กับ Zn^{2+} ซึ่งเป็นสารเชิงซ้อนที่มีเสถียรภาพสูง

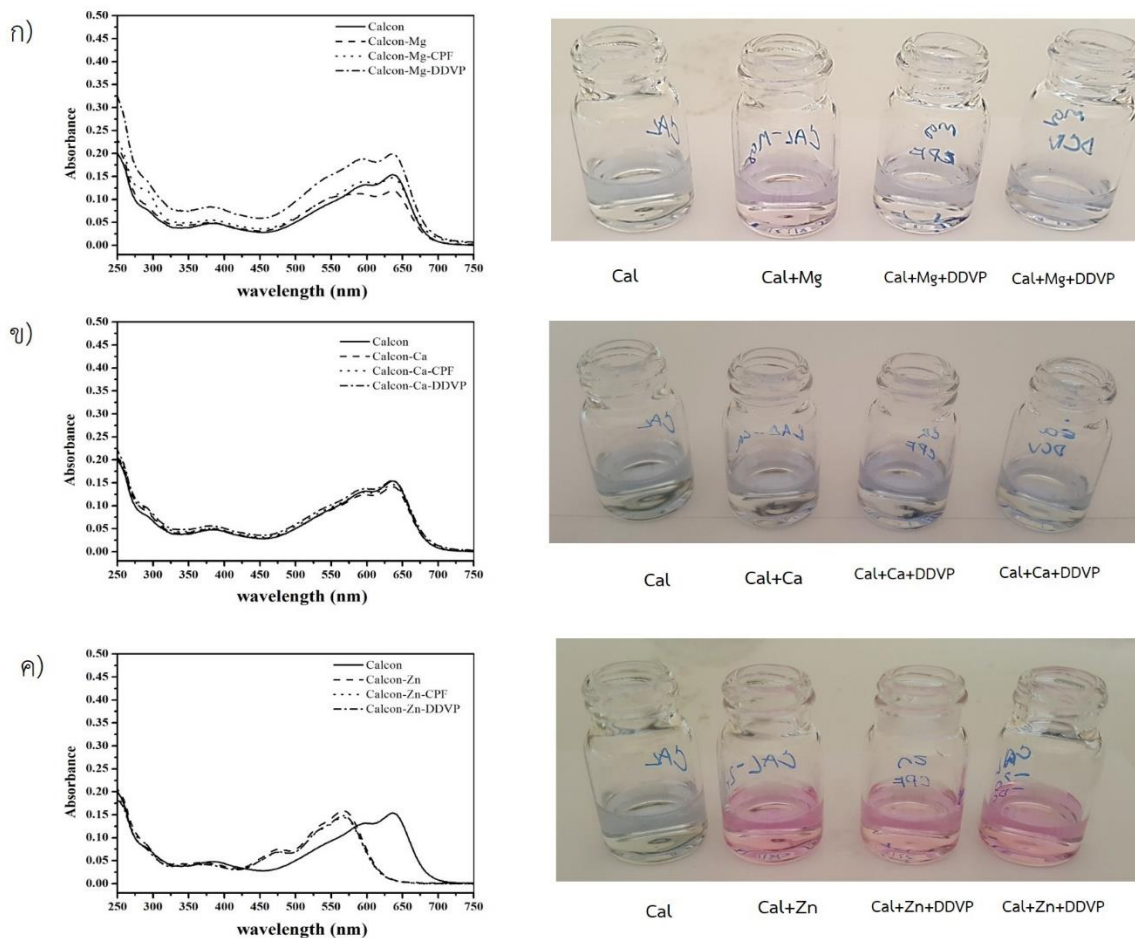


รูปที่ 3.10 ก) ยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมและสีของสารละลายของอินดิเคเตอร์ 8-hydroxyquinolien copper (8-HQCu) เมื่อเติม 5 equiv. ของไอออนของสารออร์กาโนฟอสฟอรัส chlopyrifos (CPF) และ dichlovos (DDPV) เมื่อความเข้มข้นของอินดิเคเตอร์ = 0.2 mM ความเข้มข้นของสารออร์กาโนฟอสฟอรัส = 1 mM ในสารละลาย Tris buffer pH =8

จากผลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าในเคโมเซ็นเซอร์ที่มีกลไกการตรวจวัดแบบ indicator-displacement assay หรือ IDA สารเชิงซ้อนของอินดิเคเตอร์กับโลหะควรมีเสถียรภาพปานกลาง และสารเชิงซ้อนของ analyte กับอินดิเคเตอร์ต้องมีเสถียรภาพสูงเพียงพอที่จะแย่งจับกับกับโลหะได้

3.4.6 ปฏิกริยาการแทนที่ของสารออร์กาโนฟอสฟอรัสกับของสารเชิงซ้อนของ Calcon กับไอออนของโลหะ

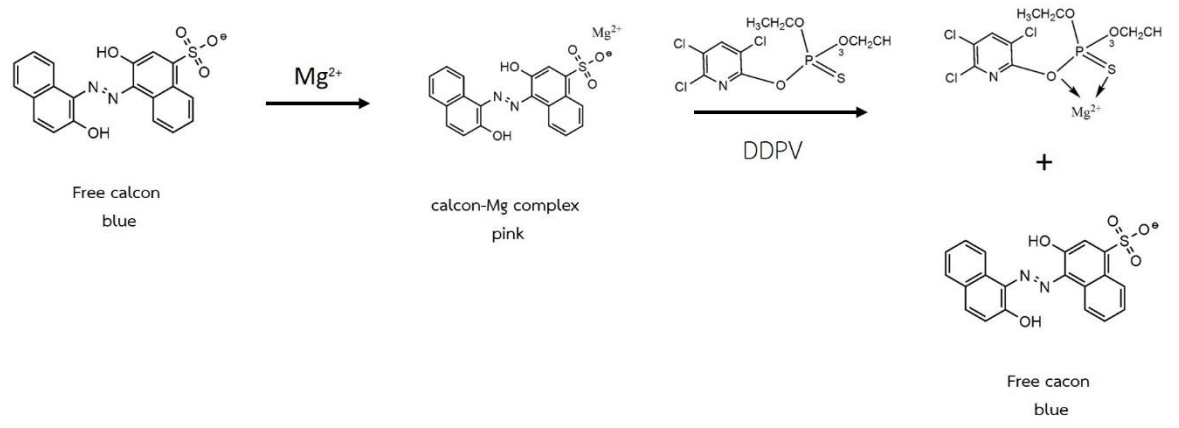
จากที่กล่าวมาในหัวข้อ 3.3 พบว่ายูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมของ Calcon มีการเปลี่ยนแปลงทั้งในกรณี que เติม Zn^{2+} และ Mg^{2+} โดยการเปลี่ยนแปลงจะเกิดกับ Zn^{2+} มากกว่า Mg^{2+} สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีชมพูเข้ม ขณะที่ สีของสารละลาย Calcon เมื่อเติม Mg^{2+} จะเป็นสีม่วง เมื่อทำ แสดงว่าการเกิดสารเชิงซ้อนระหว่าง Calcon กับ Zn^{2+} เสถียรมากกว่า Mg^{2+} (รูปที่ 3.11)



รูปที่ 3.11 ยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมและสีของอินดิเคเตอร์โลหะ Calcon ในขณะที่มี 5 equiv. ของไอออนของโลหะ Zn^{2+} Mg^{2+} และ Ca^{2+} และ 5 equiv. ของไอออนของสารออร์กาโนฟอสฟอรัส CPF และ DDVP เมื่อความเข้มข้นของอินดิเคเตอร์โลหะ = 0.2 mM ความเข้มข้นของไอออนโลหะ = 1 mM ความเข้มข้นของสารออร์กาโนฟอสฟอรัส = 1 mM ในสารละลาย Tris buffer pH = 8

ผลการศึกษาปฏิกิริยาแทนที่ของสารออร์กาโนฟอสฟอรัส DDPV และ CFP กับสารละลายละลายผสมของ Calcon กับ Zn^{2+} พบว่า ไม่มีการเปลี่ยนแปลงสีและยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัม ตามรูปที่ 3.11(ค) ยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมที่ได้ยังคงเหมือนกับสารเชิงซ้อนของ Calcon กับ Zn^{2+} และเมื่อพิจารณาที่สีของสารละลายยังคงเป็นสีชมพูเข้มเหมือนแสดงว่าไม่มีการเกิดปฏิกิริยาของ Zn^{2+} กับ DDPV หรือ CFP และไม่มีปลดปล่อยอินดิเคเตอร์ Calcon เป็นอิสระ ซึ่งก็แสดงให้เห็นว่าการเกิดสารเชิงซ้อนของ Zn^{2+} กับ Calcon เสถียรมาก หมู่ oxonate และ thionate ของ DDPV และ CFP ไม่ก็จะสามารถจับกับ Zn^{2+} แล้วปลดปล่อยอินดิเคเตอร์เป็นอิสระได้ เช่นเดียวกับอินดิเคเตอร์ Merexide ดังนั้นในระบบของ Calcon กับ Zn^{2+} ไม่สามารถพัฒนาเป็นตัวตรวจทางเคมีหรือเคโมเซ็นเซอร์สำหรับสารออร์กาโนฟอสฟอรัสได้เนื่องจากมีเสถียรภาพมากเกินไปที่จะเกิดปฏิกิริยาแทนที่

ผลการศึกษาปฏิกิริยาแทนที่ของสารออร์กาโนฟอสฟอรัส DDPV และ CFP กับสารละลายผสมของ Calcon กับ Mg^{2+} พบว่าสีของสารละลายเปลี่ยนกลับมาเป็นสีน้ำเงินและยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมมีการเพิ่มขึ้นของพีคที่ตำแหน่ง 635 นาโนเมตร เช่นเดียวกับตอนที่อินดิเคเตอร์อิสระ ดังแสดงรูปที่ 3.11(ค) การกลับไปอยู่ตำแหน่งเดิมของพีคและสีที่ย้อนกลับเป็นการยืนยันว่า เมื่อเติมสารออร์กาโนฟอสฟอรัส DDPV และ CFP ลงในสารเชิงซ้อนของ Calcon กับ Mg^{2+} เกิดปฏิกิริยาการแทนที่ตามแบบ indicator-displacement assay หรือ IDA การที่สามารถเข้าแย่งจับของของ DDPV หรือ CFP กับ Mg^{2+} ที่เดิมจับอยู่กับ Calcon สารเชิงซ้อนกับ Mg^{2+} ก็เนื่องมาจากสารเชิงซ้อนระหว่าง Calcon กับ Mg^{2+} มีเสถียรภาพปานกลาง โดย Mg^{2+} ไม่ได้จับกับ Calcon ในตำแหน่ง tetrahedron binding site เหมือนกับ Zn^{2+} ทำให้เกิดสารเชิงซ้อนที่แข็งแรงเหมือนกับ Zn^{2+} การแย่งจับของหมู่ oxonate และ thionate ของ DDPV และ CFP กับ Mg^{2+} จึงเกิดขึ้นได้ Calcon ถูกปลดปล่อยเป็นอิสระ ดังแสดงเป็นแผนภาพตามรูปที่ 3.12



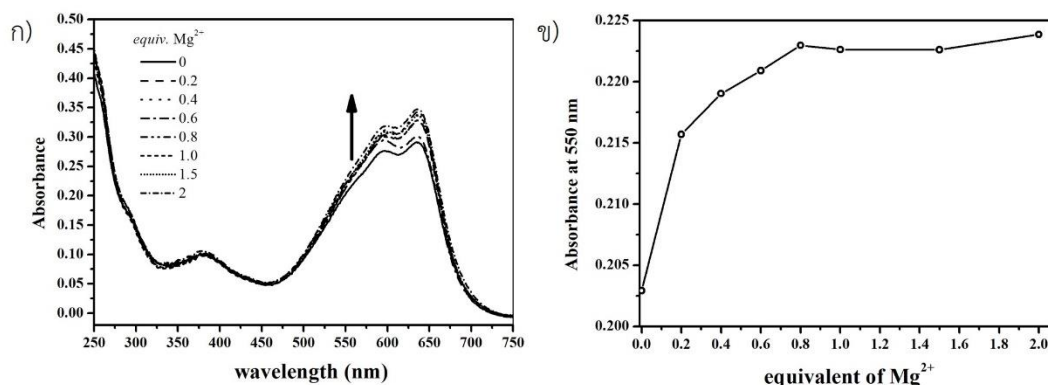
รูปที่ 3.12 กลไกการ indicator-displacement assay ของ Calcon ในการใช้เป็นเคโมเซ็นเซอร์ในการตรวจวัดสารออร์กาโนฟอสฟอรัส chlopyrifos (CPF) และ dichlorvos (DDPV)

จากผลการทดลองข้างต้นแสดงสารเชิงซ้อนของอินดิเคเตอร์โลหะ Calcon กับ Mg^{2+} สามารถใช้เป็นในเคโมเซ็นเซอร์ที่มีกลไกการตรวจวัดแบบ indicator-displacement assay หรือ IDA สำหรับการตรวจวัดสารออร์กาโนฟอสฟอรัสโดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมทรีและใช้เป็น naked eye sensor สำหรับสารออร์กาโนฟอสฟอรัส เช่น CPF และ DDPV ได้

3.5 ศึกษาความเป็นไปได้เพื่อการวิเคราะห์ปริมาณสารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสโดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมทรี

3.5.1 การไทเทรตอินดิเคเตอร์ Calcon ด้วย Mg^{2+}

ในการศึกษาความเป็นไปได้ที่จะเอาสารเชิงซ้อนของอินดิเคเตอร์โลหะ Calcon กับ Mg^{2+} มาใช้เป็นตัวตรวจวัดสำหรับสารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสโดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมทรี จำเป็นต้องอัตราส่วนระหว่าง Calcon กับ Mg^{2+} ที่เหมาะสมเพื่อให้ได้สัญญาณเริ่มต้นที่คงที่ ปริมาณของโลหะต้องไม่มากเกินไป เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการจับกันของโลหะกับ anayte โดยไม่ผ่านกระบวนการ indicator-displacement เพื่อให้สัญญาณของอินดิเคเตอร์สัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณของ anayte โดยในการทดลองนี้ทำการไทเทรตสารละลาย Calcon ความเข้มข้น $25 \mu M$ ด้วยสารละลาย Mg^{2+} 0-2 equiv. วัดยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัม เพื่อติดตามการเปลี่ยนค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ซึ่งเป็นสัญญาณของสารเชิงซ้อน Calcon กับ Mg^{2+} ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.13



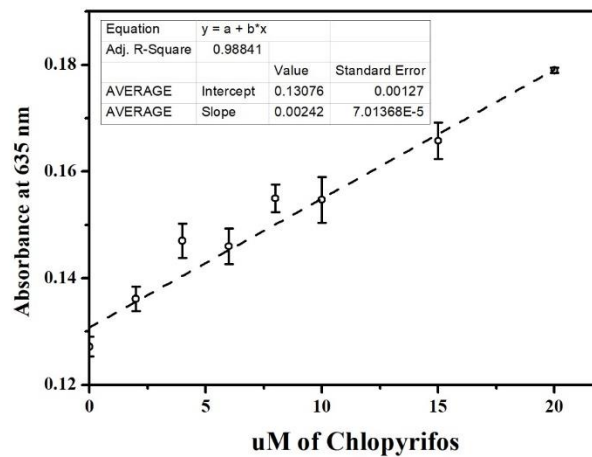
รูปที่ 3.13 ก) ยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมของสารละลายอินดิเคเตอร์ Calcon ($25 \mu M$ ในสารละลาย Tris buffer pH = 8) เมื่อไทเทรตด้วย Mg^{2+} 0-2 equiv. และ ข) การเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ของ $25 \mu M$ Calcon เมื่อไทเทรตด้วย Mg^{2+} 0-2 equiv.

ดังแสดงในรูปที่ 3.13 เมื่อปริมาณของ Mg^{2+} เพิ่มขึ้นค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตรเพิ่มขึ้น และจะคงที่ 1.0 equiv. แสดงว่าการเกิดสารเชิงซ้อนของ Calcon กับ Mg^{2+} เป็นแบบ 1:1 และให้สัญญาณคงที่ ดังนั้นในศึกษาความเป็นไปได้ในการนำเอาสารเชิงซ้อนของ Calcon กับ Mg^{2+} มาใช้วิเคราะห์ปริมาณสารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสโดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมทรีจะใช้ระบบที่มีอัตราส่วนของ ของ Calcon กับ Mg^{2+} 1:1

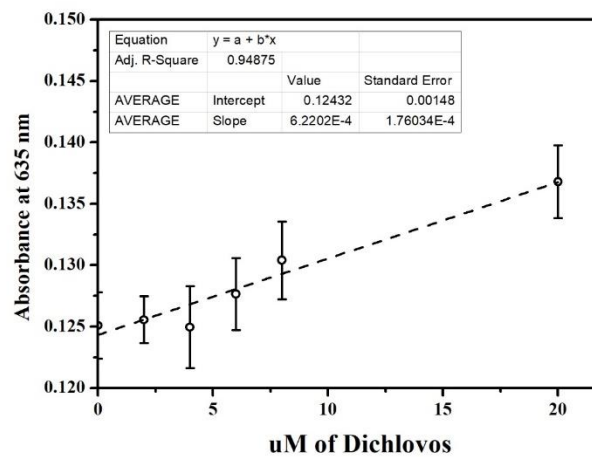
3.5.2 กราฟมาตรฐานสารละลายออร์กาโนฟอสฟอรัส

เพื่อศึกษาความเป็นไปได้การนำเอาระบบของ ของ Calcon กับ Mg^{2+} ปริมาณสารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส จึงได้ทำการสร้างกราฟมาตรฐานสารละลายออร์กาโนฟอสฟอรัส โดยใช้ระบบที่อัตราส่วนของ Calcon กับ Mg^{2+} เป็น 1:1 แล้วเติมสารมาตรฐานสารละลายมาตรฐานสารออร์กาโนฟอสฟอรัส CPF และ DDPV ความเข้มข้น 0 2 4 6 8 10 15 และ 20 μM วัดยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมช่วง 250 – 750 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ 635 นาโนเมตร ไปสร้างกราฟมาตรฐาน ได้กราฟตามรูปที่ 3.14

ก)



ข)



รูปที่ 3.14 กราฟมาตรฐานสารละลายออร์กาโนฟอสฟอรัส ก) chlopyrifos และ ข) dichlofos ความเข้มข้น 0-20 μM (ความเข้มข้น Calcon และ Mg^{2+} = 10 μM ใน Tris buffer pH = 8)

จากกราฟมาตรฐานที่ได้แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงที่ดีของความเข้มข้นของสารละลายออร์กาโนฟอสฟอรัส CPF และ DDVP 0-20 μM โดยให้ค่า correlation coefficient (R^2) = 0.9884 และ 0.9488 ตามลำดับ โดยตัวแปรในการวิเคราะห์ปริมาณของกราฟมาตรฐานแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ตัวแปรในการวิเคราะห์ปริมาณของกราฟมาตรฐาน chlopyrifos และ dichlovos

	สมการเส้นตรง	correlation coefficient (R^2)	Detection limit* (μM)
Chlopyrifos	$y=2.42 \times 10^{-3} C_{\text{CPF}} + 0.134$	0.9884	1.00
Dichlovos	$y=6.22 \times 10^{-4} C_{\text{CPF}} + 0.124$	0.9487	3.72

*detection คำนวณจากความเข้มข้นที่คำนวณมาจาก 3 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณที่จากวัด blank จำนวน 10 ครั้ง

บทที่ 4

สรุปผลการวิจัย

4.3 การพัฒนาเคโมเซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดสารออร์กาโนฟอสฟอรัสด้วยเทคนิคฟลูออโรเรสเซนส์สเปกโตรเมทรี

4.1.1 อินดิเคเตอร์โลหะ Calcion และ Calcon สามารถนำไปใช้ในการเป็นฟลูออโรเรสเซนส์เซ็นเซอร์สำหรับ Ca^{2+} และ Zn^{2+} ได้

4.1.2 อินดิเคเตอร์โลหะ Tiron และ Merexide มี quantum yield ต่ำ ไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ เป็นฟลูออโรเรสเซนส์เซ็นเซอร์สำหรับไอออนของโลหะ

4.1.3 อินดิเคเตอร์โลหะ Calconcarboxylic acid ถึงแม้ว่าให้สัญญาณฟลูออโรเรสเซนส์สูงแต่ไม่พบ การเปลี่ยนแปลงเมื่อเติมไอออนของโลหะจึงไม่เหมาะสมในการเป็นฟลูออโรเรสเซนส์เซ็นเซอร์สำหรับไอออน ของโลหะ

4.1.4 จากการศึกษาปฏิกิริยาการแทนที่ของสารออร์กาโนฟอสฟอรัสกับของสารเชิงซ้อนของอินดิเค เตอร์โลหะกับไอออนโลหะโดยเทคนิคโดยเทคนิคฟลูออโรเรสเซนส์สเปกโตรเมทรี พบว่า สารเชิงซ้อนของ โลหะ Calcion และ Calcon และอินดิเคเตอร์สีย้อมมากหมู่ oxonate ของ DDPV และหมู่ thionate ของ CFP ไม่สามารถไปจับกับไอออนของโลหะและปลดปล่อยอินดิเคเตอร์เป็นอิสระได้จึงไม่เกิด เปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออโรเรสเซนส์ ระบบที่ทำการศึกษานี้จึงไม่สามารถใช้เป็นฟลูออโรเรสเซนส์ เซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดสารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มสารออร์กาโนฟอสฟอรัสได้

4.4 การพัฒนาเคโมเซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดสารออร์กาโนฟอสฟอรัสด้วยยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมทรี

1) อินดิเคเตอร์ Calcion จำเพาะต่อ Ca^{2+} Calcon Calconcarboxylic acid Merexide และ Tiron จำเพาะต่อ Zn^{2+}

2) อินดิเคเตอร์ Calcion และ Merexide สามารถใช้เป็น naked eye sensor สำหรับ Zn^{2+} ได้

3) ระบบของ Calcon กับ Zn^{2+} ไม่สามารถพัฒนาเป็นตัวตรวจทางเคมีหรือเคโมเซ็นเซอร์ สำหรับสารออร์กาโนฟอสฟอรัสได้เนื่องจากมีเสถียรภาพสูง

4) เคโมเซ็นเซอร์ที่มีกลไกการตรวจวัดแบบ indicator-displacement assay หรือ IDA สาร เชิงซ้อนของอินดิเคเตอร์กับโลหะควรมีเสถียรภาพปานกลาง และสารเชิงซ้อนของ analyte กับอินดิเค เตอร์ต้องมีเสถียรภาพสูงเพียงพอที่จะแย่งจับกับโลหะได้

5) สารเชิงซ้อนของอินดิเคเตอร์โลหะ Calcon กับ Mg^{2+} สามารถใช้เป็นในเคโมเซ็นเซอร์ที่มี กลไกการตรวจวัดแบบ indicator-displacement assay หรือ IDA สำหรับการตรวจวัดสาร ออร์กาโนฟอสฟอรัสในระบบเอควิวส์โดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมทรีและใช้เป็น naked eye sensor สำหรับสารออร์กาโนฟอสฟอรัส เช่น CPF และ DDPV ได้

4.5 การศึกษาความเป็นไปได้เพื่อการวิเคราะห์ปริมาณสารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส โดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมทรี

1) อัตราส่วนที่เหมาะสมในการใช้สารเชิงซ้อนของอินดิเคเตอร์ calcon กับ Mg^{2+} เพื่อใช้เป็นตัวตรวจวัดทางเคมีหรือเคมีเซ็นเซอร์ (chemosensor) สำหรับสารกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสโดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมทรี คือ 1:1

2) จากกราฟมาตรฐานของที่ได้แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงที่ดีกับความเข้มข้นของสารละลายออร์กาโนฟอสฟอรัส CPF และ DDPV 0-20 μM โดยให้ค่า correlation coefficient (R^2) = 0.9884 และ 0.9488 ตามลำดับ

3) Detection limit การใช้สารเชิงซ้อน calcon กับ Mg^{2+} 1:1 ใน Tris buffer pH = 8 สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ CPF และ DDPV ในระบบเอควียส คือ 1.00 และ 3.72 μM ตามลำดับ

4.6 ข้อเสนอแนะ

- 1) ทำการศึกษาผลกระทบจากตัวรบกวน (interference) ในการวิเคราะห์ เช่น แอนไอออนชนิดต่างๆ
- 2) ควรทำการวิเคราะห์เปรียบกับวิธีการวิเคราะห์กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสโดยใช้เทคนิคอื่น
- 3) ควรทำการวิเคราะห์หาปริมาณกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสตัวอย่างจริง

4.7 การนำไปใช้ประโยชน์

1) การวิเคราะห์สารกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสในระบบเอควียสด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมทรี สามารถได้ระดับต่ำในระดับไมโครโมลาร์

2) การวิเคราะห์ปริมาณกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสโดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมทรี สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ในน้ำได้โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการที่ซับซ้อนจึงใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้นและสิ้นเปลืองสารเคมีน้อย

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย (NRMS 13 หลัก) 2559A10802095 สัญญาเลขที่ 113/2559

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การพัฒนาเคโมเซ็นเซอร์สำหรับสารเคมีกำจัดศัตรูพืชออร์กาโนฟอสฟอรัส โดยใช้เทคนิคสเปกโตรเมทรี

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน (อ./ดร./ผศ./รศ./ศ.) อาจารย์ ดร. เมธินี จามกระโทก

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ (วัน/เดือน/ปี) 1 ตุลาคม 2558 ถึงวันที่ (วัน/เดือน/ปี) 30 กันยายน 2562

ระยะเวลาดำเนินการ 3 ปี - เดือน ตั้งแต่วันที่ (วัน/เดือน/ปี) 1 ตุลาคม 2562

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ	220,000 บาท
งวดที่ 1 (50%)	110,000 บาท เมื่อวันที่ 24 กุมภาพันธ์ 2559
งวดที่ 2 (40%)	88,000 บาท เมื่อวันที่ 1 ตุลาคม 2562
งวดที่ 3 (10%)	22,000 บาท เมื่อวันที่ 1 ตุลาคม 2562
รวม	220,000 บาท

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/
1. ค่าตอบแทน	22,000	22,000	
2. ค่าจ้าง	0	0	
3. ค่าวัสดุ	160,000	176,000	
4. ค่าใช้สอย	16,000	0	
5. ค่าครุภัณฑ์	0	0	
6. ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ			
ค่าธรรมเนียมสถาบัน	22,000	22,000	
รวม	220,000	220,000	

(นางสาวเมธินี จามกระโทก)

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

บรรณานุกรม

สาคร ศรีสุข. (2556). ผลกระทบจากการใช้สารเคมีทางการเกษตรของประเทศไทย. บทความวิชาการ สำนักวิชาการ สำนักงานเลขาธิการวุฒิสภา. 3(17), 1-25. เข้าถึงได้จาก http://library.senate.go.th/e-library/web/main_document.jsp?DocID=6409657&DocIDOPDC=

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตร. (2557). ตารางปริมาณและมูลค่าการนำเข้าสารกำจัดศัตรูพืช ปี 2551 -2555, เข้าถึงได้จาก http://www.oae.go.th/ewt_news.php?nid=146

Greñu, B. D. de. Moreno, D., Torriba., T., Berg, A., Gunnars, J., Nilson, T., Nyman, R., Persson, T., Petterson, J., Eklind, I., and Wästerby, P. (2014). Fluorescent discrimination trace of chemical warfare agents and their mimics. *J. Am. Chem. Soc.*, 136, 4125-4128.

Guo, W., Engelman, B. J., Haywood, T. L., Blok, N. B., Beaudoin, D. S., and Obare, S. O. (2011) Dual fluorescence and electrochemical detection of the organophosphorus pesticides-Ethion, malathion and fenthion. *Talanta*, 87, 276– 283.

Jenkins, A. L., Uy, O. M., and Murray, G. M. (1997). Polymer based lanthanide luminescent sensors for the detection of nerve agents. *Anal. Commun.*, 34, 221–224.

Jenkins, A. L., Uy, O. M., and Murray, G. M. (1999). Polymer-based lanthanide luminescent sensor for detection of the hydrolysis product of the nerve agent Soman in water. *Anal. Chem.*, 71, 373–378.

Jenkins, A. L., Yin, R., and Jensen, J. L. (2001). Molecularly imprinted polymer sensors for pesticide and insecticide detection in water. *Analyst*, 126, 798–802.

Khatua, S., Choi, S. H., Lee, J., Kim, K., and Do, Y. (2009) Aqueous fluorometric and colorimetric sensing of phosphate ions by a fluorescent dinuclear zinc complex. *Inorg. Chem.*, 48 : 2993-2999.

Männel-Croisé, C., Meister, C., and Zeider, F. (2010). “Naked-eye” screening of metal-based chemosensor for biologically important anions. *Inorg. Chem.*, 49 : 10220-10222.

Minami, T., Liu, Y., Akdeniz, A., Koutnik, P., Espenko, N. A., Nishiyaba, R., Kubo, Y., and Anzenbacher, Jr. P. (2014). Intermolecular indicator displacement assay for anions : supramolecular sensor for glyposate. *J. Am. Chem. Soc.*, 136, 11369-11401.

Murugavel, R., Choudhury, A., Walawalkar, M. G., Pothiraja, R., + and Rao, C. N. R. (2008). Metal complexes of organophosphate esters and open-framework metal phosphates: synthesis, structure, transformations, and applications. *Chem. Rev*, 108, 3549–3655

Nguyen, B. T., and Anslyn, E. V. (2006). Indicator- displacement assay. *Coordination Chemistry Reviews*, 250, 3118-3127.

Rudzinski, C. M., Young, A. M., Nocera, D. G. (2002). A supramolecular microfluidic optical chemosensor. *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 1723–1727.

Russell, A. J., Berberich, J. A., Drevon, G. E., and Koepsel, R. R., (2003). Biomaterials for mediation of chemical and biological warfare agents. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 5, 1–27.

Russell, A. J., Berberich, J. A., Drevon, G. E., and Koepsel, R. R. (2003). Biomaterials for mediation of chemical and biological warfare agents. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 5, 1–27.

Sohn, H., Letant, S., Sailor, M. J., and Trogler, W. C. (2000). Detection of fluorophosphonate chemical warfare agents by catalytic hydrolysis with a porous silicon interferometer. *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 5399–5400.

Steiner, W. E., Klopsch, S. J., English, W. A., Clowers, B. H., and Hill, H. H. (2005). Detection of a chemical warfare agent simulant in various aerosol matrixes by ion mobility time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 77, 4792–4799.

Steiner, W. E., Klopsch, S., English, W. A., Clowers, B. H., and Hill, H. H. (2005). Detection of a chemical warfare agent simulant in various aerosol matrixes by ion mobility time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 77, 4792–4799.

Sun, J., Guo, L., Bao, Y., and Xie, (2011) A simple, label-free AuNPs-based colorimetric ultrasensitive detection of nerve agents and highly toxic organophosphate pesticide. *J. Biosens. Bioelectron.*, 28, 152– 157.

Survey, U.S.G. (2000). Organophosphorus pesticides occurrence and distribution in surface and ground water of the United States. Retrieved from <http://ga.water.usgs.gov/publications/ofr00-187.pdf> .

The Pesticide Action Network (PAN). (2014). *Pesticide Action Network (PAN) pesticide database* Retrieved from <http://www.pesticideinfo.org> .

U.S. EPA. (2014). Pesticides and food: Why children may be especially sensitive to pesticides. Retrieved from <http://www.epa.gov/pesticides/food/pest.htm>

Van Houten, K. A., Heath, D. C., and Pilato, R. S. (1998). Rapid luminescent detection of phosphate esters in solution and the gas phase using (dppe)Pt{S2C2(2-pyridyl)(CH2CH2OH)}. *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 12359–12360.

Walton, I., Davis, M., Munro, I., Catalano, V. J., Cragg, P. J., Huggins, M. T., and Wallace, K. J. (2012) *Org. Lett.* 14, 11: 286-2689.

Zhang, S. W., and Swager, T. M. (2003). Fluorescent detection of chemical warfare agents: Functional group specific ratiometric chemosensors. *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 3420–3421.