โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การพัฒนาอุปกรณ์การวิเคราะห์ฐานกระดาษสำหรับการตรวจวัดแบบเรืองแสงของฟอร์มาลดีไฮด์
Development of paper-based analytical device for fluorescence detection of formaldehyde

ชื่อนิสิต นางสาวณัฏฐาภรณ์ ทองวัฒนา เลขประจำตัว 6033028823
ภาควิชา เคมี
ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การพัฒนาอุปกรณ์การวิเคราะห์ฐานกระดาษสำหรับการตรวจวัด แบบเรืองแสงของฟอร์มาลดีไฮด์

Development of paper-based analytical device for fluorescence detection of formaldehyde

โดย
นางสาวณัฏฐาภรณ์ ทองวัฒนา

รายงานนี้เป็นสวนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2563

โครงการ การพัฒนาอุปกรณ์การวิเคราะห์ฐานกระดาษสำหรับการตรวจวัดแบบเรืองแสงของฟอร์มาลดีไฮด์

โดย   นางสาวณัฏฐาภรณ์ ทองวัฒนา

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

1. รองศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ อิ่มยิ้ม — ประธานกรรมการ
2. ศาสตราจารย์ ดร.ปรีชา ภูวไพรศิริศาล — กรรมการ
3. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พุทธรักษา วรานุศุภากุล — อาจารย์ที่ปรึกษา

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

....	....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พุทธรักษา วรานุศุภากุล)	(รองศาสตราจารย์ ดร. วรวีร์ โฮเว่น)
อาจารย์ที่ปรึกษา	หัวหน้าภาควิชาเคมี

วันที่ 14 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2564

ชื่อโครงการ การพัฒนาอุปกรณ์การวิเคราะห์ฐานกระดาษสำหรับการตรวจวัดแบบเรืองแสงของฟอร์มาลดีไฮด์
ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาวณัฏฐาภรณ์ ทองวัฒนา เลขประจำตัว 6033028823
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พุทธรักษา วรานุศุภากุล
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2563

บทคัดย่อ

ฟอร์มาลดีไฮด์หรือฟอร์มาลินเป็นสารก่อมะเร็งโดยการจัดเป็นสารก่อมะเร็งตามข้อกำหนดขององค์กรวิจัยโรคมะเร็งนานาชาติ (IARC) และไม่อนุญาตให้ใช้ในอาหาร ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาการตรวจวัดปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ที่ง่ายและมีประสิทธิภาพ ในงานวิจัยนี้ได้การพัฒนาการตรวจหาฟอร์มาลดีไฮด์บนอุปกรณ์ฐานกระดาษ (paper-based analytical device) ด้วย hydrazinyl naphthalimide-based fluorescent probe (RBNA probe) โดยความเข้มข้นของ RBNA probe ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดหาฟอร์มาลดีไฮด์ในสารละลาย คือ 50 μM ซึ่งมีความไวในการตรวจวัดที่ดีและให้ขีดจำกัดการตรวจวัดต่ำ (0.545 mg/L) จากนั้นใช้ RBNA probe ความเข้มข้น 50 μM ในการตรวจวัดบนอุปกรณ์ฐานกระดาษ ออกแบบระบบตรวจจับการเรืองแสงแบบประดิษฐ์เอง (Homemade fluorescence detection system) ซึ่งใช้สเปกโตรมิเตอร์ USB 2000+ แบบพกพาในการตรวจวัด เพื่อใช้ในการตรวจวัดการเรืองแสงของอุปกรณ์ฐานกระดาษ แต่ไม่สามารถตรวจวัดสัญญาณฟอร์มาลดีไฮด์บนอุปกรณ์ฐานกระดาษที่มีด้วย RBNA probe ได้ ดังนั้นจึงทำการทดสอบระบบตรวจจับการเรืองแสงแบบประดิษฐ์เองด้วย Rhodamine B พบว่าสามารถใช้ตรวจหา Rhodamine B บนอุปกรณ์ฐานกระดาษที่ความเข้มข้นสูง (25-100 mg/L) ได้ แต่ไม่สามารถตรวจจวัดที่ความเข้มข้นต่ำ (1.0-10 mg/L) ได้ ด้วยเหตุนี้ระบบตรวจวัดการเรืองแสงแบบประดิษฐ์เองจึงสามารถใช้เพื่อตรวจวัดการเรืองแสงบนอุปกรณ์ฐานกระดาษได้ อย่างไรก็ตามความเข้มของการเรืองแสงจากฟอร์มาลดีไฮด์ความเข้มข้น 50 mg/L ที่ตรวจวัดบนอุปกรณ์ฐานกระดาษด้วย 50 μM RBNA probe อาจไม่สูงพอที่จะตรวจวัดโดยระบบตรวจจับการเรืองแสงแบบประดิษฐ์เองได้

คำสำคัญ: ฟอร์มาลดีไฮด์, อุปกรณ์ฐานกระดาษ, ตัวตรวจวัดเรืองแสง, ระบบตรวจจับการเรืองแสงแบบโฮมเมด

Project Title Development of paper-based analytical device for fluorescence detection of formaldehyde

Student Name Miss Natthaporn Thongwattana Student ID 6033028823
Advisor Name Assistant Professor Dr. Puttaruksa Varanusupakul
Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2020

Abstract

Formaldehyde or formalin is known to be a carcinogen by IARC classification and not allowed to use in food according to Food. So that is very necessary to detect harmful formaldehyde with a simple and effective method. In this work, the detection of formaldehyde on a paper-based analytical device by a hydrazinyl naphthylamide-based fluorescent probe (RBNA probe) was developed. The concentration of RBNA probe was first optimized for detection of formaldehyde in solution. 50 µM of RBNA probe gave a good sensitivity and low detection limit (0.545 mg/L). Therefore, 50 µM of RBNA probe was applied on paper-based device for detection of formaldehyde. The homemade fluorescence detection system which used a portable USB 2000+ spectrometer used for detection on paper-based device. Unfortunately, it cannot detect formaldehyde on a paper-based device with 50 µM of RBNA probe. Therefore, a design of the homemade fluorescence detection system was test with Rhodamine B which is a strong fluorescent compound. The design can use to detect Rhodamine B on a paper-based device at high concentration (25-100 mg/L) but cannot detect at low concentration (1.0-10 mg/L). As a result, the homemade fluorescence detection system can use to detect fluorescence on paper-based. Nevertheless, the fluorescence intensity from a paper-based detection formaldehyde with 50 µM of RBNA probe may not high enough to detect by the homemade fluorescence detection system.

Keywords: Formaldehyde, Paper-based detection, Fluorescence probe, Homemade fluorescence detection system

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พุทธรักษา วรานุศุภากุล อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่กรุณาให้ความสนับสนุน ความรู้ ความเมตตา คำแนะนำ และแนวทางในการดำเนินงานวิจัย อีกทั้งสละเวลาเพื่อให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ เป็นอย่างดียิ่งมาโดยตลอด ทำให้งานวิจัยและรายงานเล่มนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ Dr. Waleed Alahmad และ PV lab ที่คอยให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ และสอนการใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ตลอดงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ อิ่มยิ้ม และ ศาสตราจารย์ ดร.ปรีชา ภูวไพรศิริศาล ที่กรุณาสละเวลาในการตรวจทานแก้ไขรายงานฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ตลอดจนให้คำแนะนำ และให้เกียรติมาเป็นคณะกรรมการในการสอบงานวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ “โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมสร้างประสบการณ์” คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนสนับสนุนในการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบพระคุณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ถ่ายทอดความรู้ให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการทำวิจัยครั้งนี้ และต่อยอดการทำงานในอนาคตได้ และรวมถึงกำลังใจจากครอบครัว เพื่อน พี่ และน้องในภาควิชาเคมีทุกคน ที่ได้ช่วยเหลือจนงานวิจัยในครั้งนี้ผ่านลุล่วงไปด้วยดี ผู้วิจัยจะขอระลึกถึงความกรุณาของทุกท่านที่กล่าวถึงมา รวมถึงบุคคลที่มิได้กล่าว ณ ที่นี้ตลอดไป

ณัฏฐาภรณ์ ทองวัฒนา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง (ถ้ามี)	ช
สารบัญรูป (ถ้ามี)	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ	1
1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย	3
1.3 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	3
1.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	9
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	12
บทที่ 2 การทดลอง	13
2.1 รายการเครื่องมือ อุปกรณ์	13
2.2 รายการสารเคมี	13
2.3 วิธีการทดลอง	14
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	17
3.1 การสังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของ RBNA probe	17
3.2 การตรวจวัดฟอร์มาลดีไฮด์ด้วย RBNA probe ในรูปแบบสารละลาย	22
3.3 การตรวจวัดฟอร์มาลดีไฮด์ด้วย RBNA probe บนอุปกรณ์ฐานกระดาษ (paper-based device)	24
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	28
เอกสารอ้างอิง	29
ภาคผนวก	32
ประวัติผู้วิจัย	36

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1.1	ตัวอย่างอาหารที่มีฟอร์มาลดีไฮด์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ	2
ตารางที่ 1.2	สมบัติทางเคมีของฟอร์มาลดีไฮด์	3
ตารางที่ 1.3	ข้อมูลความเป็นพิษอันตรายของฟอร์มาลดีไฮด์	4
ตารางที่ 1.4	เกณฑ์ความปลอดภัยของปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ได้รับประจำวันที่ทนได้	5
ตารางที่ 1.5	เกณฑ์กฎหมายกำหนดปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ตกค้างในอาหาร	5
ตารางที่ 3.1	สารตั้งต้น สารผลิตภัณฑ์และ %yield ในแต่ละขั้นของการสังเคราะห์ RBNA probe	16
ตารางที่ ก1	การไทเทรตและการคำนวนหาความเข้มข้น 0.1 M HCl	33
ตารางที่ ก.2	การไทเทรตและการคำนวนหาความเข้มข้น Formaldehyde(FA)	33
ตารางที่ ก.3	การเตรียม RBNA probe ความเข้มข้น 10, 30, 50 μM	34
ตารางที่ ก.4	แสดงการเตรียมสารมาตรฐานฟอร์มาลดีไฮด์	34
ตารางที่ ก.5	สัญญาณของการตรวจวัด Formaldehyde(FA) ด้วย RBNA probe ที่ความยาวคลื่น 525 nm ใช้เครื่อง Fluorescence spectrometer	34
ตารางที่ ก.6	สัญญาณของการตรวจวัด Rhodamine B ความเข้มข้นสูง ที่ความยาวคลื่น 580 nm ใช้อุปกรณ์การตรวจวัด fluorescence บนอุปกรณ์ฐานกระดาษ	35
ตารางที่ ก.7	สัญญาณของการตรวจวัด Rhodamine B ความเข้มข้นต่ำ ที่ความยาวคลื่น 580 nm ใช้อุปกรณ์การตรวจวัด fluorescence ในรูปสารละลาย	35

สารบัญรูป

หน้า

ภาพที่ 1.1 โครงสร้างทางเคมีของฟอร์มาลดีไฮด์ (Formaldehyde) 1

ภาพที่ 1.2 สเปกตรัมกระตุ้นการเรืองแสงและสเปกตรัมการเปล่งแสง 6

ภาพที่ 1.3 องค์ประกอบของเครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ 6

ภาพที่ 1.4 ตัวอย่างอุปกรณ์การวิเคราะห์บนกระดาษ (Paper-based Analytical Device) 7

ภาพที่ 1.5 กลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง FAP กับฟอร์มาดีไฮด์ 9

ภาพที่ 1.6 กลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง RBNA probe กับฟอร์มาดีไฮด์ 9

ภาพที่ 1.7 กลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง AENO probe ฟอร์มาดีไฮด์ 10

ภาพที่ 1.8 กลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง probe L กับฟอร์มาลดีไฮด์ เมทิลไกลออกซาล และออกซาลดีไฮด์ 10

ภาพที่ 1.9 กลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง Probe 1 กับฟอร์มาลดีไฮด์ 11

ภาพที่ 1.10 สเปกตรัมและกราฟมาตรฐานของการตรวจวัดกฟอร์มาดีไฮด์ ด้วย RBNA probe 11

ภาพที่ 2.1 การสังเคราะห์ RBNA probe ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน 14

ภาพที่ 3.1 กลไกการสังเคราะห์ RBNA probe ขั้นที่ 1 (สารประกอบ1) 18

ภาพที่ 3.2 IR spectrum ของ สารประกอบ1 และ โรดามีน บี (สารตั้งต้น) 18

ภาพที่ 3.3 กลไกการสังเคราะห์ RBNA probe ขั้นที่ 1 (สารประกอบ2) 19

ภาพที่ 3.4 ^{1}H-NMR ของ สารประกอบ 2 ในสารละลาย $CDCl_3$ 20

ภาพที่ 3.5 กลไกการสังเคราะห์ RBNA probe ขั้นที่ 3 (RBNA probe) 21

ภาพที่ 3.6 การจัดตั้งอุปกรณ์การสังเคราะห์ RBNA probe ขั้นที่ 3 (a) ขวดก้นกลม 2 คอต่อกับคอนเด็นเซอร์ (b) ขวดก้นกลม 2 คอ 21

ภาพที่ 3.7 ^{1}H-NMR ของ RBNA probe ในสารละลาย DMSO 22

ภาพที่ 3.8 กลไกการตรวจวัดฟอร์มาลดีไฮด์ ด้วย RBNA probe 22

ภาพที่ 3.9 สเปกตรัมการตรวจวัดฟอร์มาลดีไฮด์ด้วย RBNA probe (λex=446 nm, λem=525 nm) 23

ภาพที่ 3.10 กราฟมาตราฐานของการตรวจวัดปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ด้วย RBNA probe 23

ภาพที่ 3.11 แบบจำลองอุปกรณ์การตรวจวัด fluorescence บนอุปกรณ์ฐานกระดาษ 25

ภาพที่ 3.12 สเปกตรัมของ Rhodamine B จากการตรวจวัดด้วย Homemade fluorescence detection system for paper-based device ที่ (a) ความเข้มข้นต่ำ (b) ความเข้มข้นสูง 26

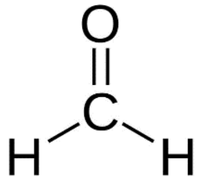
ภาพที่ 3.13 กราฟมาตรฐาน ของ Rhodamine B ความเข้มข้น 25-100 mg/L 26

ภาพที่ 3.14 กราฟความสัมพันธ์และสเปกตรัม(spectrum) ของ Rhodamine B ที่ความเข้มข้นต่ำ ในรูปสารละลาย 27

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา



ภาพที่ 1.1 โครงสร้างทางเคมีของฟอร์มาลดีไฮด์ (Formaldehyde)

ฟอร์มาลดีไฮด์ (formaldehyde) หรือ "ฟอร์มาลิน" (formalin) สูตรทางเคมี CH_2O และมีโครงสร้างทางเคมีเป็นดังภาพที่ 1.1 เป็นสารก่อมะเร็งและจัดอยู่ในประเภทวัตถุอันตรายชนิดที่ 2 (พระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535) ลักษณะทั่วไปของฟอร์มาลดีไฮด์ เป็นของเหลวใส ไม่มีสี มีกลิ่นฉุนเฉพาะตัว[1] มีการใช้งานหลายด้าน เช่น การถนอมสัตว์ อุปกรณ์ฆ่าเชื้อ สิ่งทอ เฟอร์นิเจอร์ เครื่องสำอาง การผลิต และการเกษตร ในทางการแพทย์มีการใช้ในความเข้มข้นตั้งแต่ร้อยละ 10 ขึ้นไป ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการใช้เป็นหลัก เช่น ใช้ฆ่าเชื้อโรค (germicide) และฆ่าเชื้อรา (fungicide) และเป็นน้ำยาดองศพ เป็นต้น นอกจากนี้ในความเข้มข้นประมาณร้อยละ 0.004 ช่วยป้องกันการขึ้นราในการเก็บรักษาข้าวสาลี หรือกันการเน่าเสียในข้าวโอ๊ตหลังจากเก็บเกี่ยว และใช้ป้องกันแมลงในพวกเมล็ดธัญพืชหลังการเก็บเกี่ยว[2]

การปนเปื้อนของฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหาร เป็นประเด็นที่หลายหน่วยงานให้ความสำคัญมาจนถึงปัจจุบัน หากมีการตรวจพบหรือมีการลักลอบใส่ในอาหาร จัดเป็นการผลิตหรือจำหน่ายอาหารไม่บริสุทธิ์ มีโทษจำคุกไม่เกิน 2 ปี หรือปรับไม่เกิน 20,000 บาท[3] สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้สำรวจปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารหลายประเภทซึ่งวางจำหน่ายในท้องตลาด พบว่ามีแนวโน้มการตกค้างฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารเพิ่มขึ้น ซึ่งการได้รับฟอร์มาลดีไฮด์ปริมาณมากเกินไป จะเกิดอาการเป็นพิษโดยเฉียบพลัน ดังนั้นจึงมีกฎหมายควบคุมการใช้ฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหาร โดยองค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) กำหนดเกณฑ์ความปลอดภัยจากการได้รับฟอร์มาลดีไฮด์ต่อวันที่ทนได้ (Tolerable daily intake: TDI) ไม่เกิน 0.15 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน[5] และในประเทศไทยตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 151 (พ.ศ. 2536) กำหนดให้ฟอร์มาลีนเป็นสารห้ามใช้ในอาหาร ซึ่งหมายถึงฟอร์มาลดีไฮด์ที่ตรวจพบต้องมาจากการเติมสารนี้ลงไปในอาหารด้วยวัตถุประสงค์ต่าง ๆ ที่ไม่ใช่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ

ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ที่พบได้ในธรรมชาติของอาหารมีความแตกต่างตามชนิดของอาหาร ดังตัวอย่างในตารางที่ 1.1 โดยกลุ่มอาหารที่มีการพบปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์สูง คือ ผลิตภัณฑ์กลุ่มเนื้อสัตว์แปรรูป[4]

ตารางที่ 1.1 ตัวอย่างอาหารที่มีฟอร์มาลดีไฮด์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ[4]

ชนิดอาหาร	Level (mg/kg)	ชนิดอาหาร	Level (mg/kg)
ผักและผลไม้			
แอปเปิ้ล	6.3 – 22.3	กะหล่ำ	26.9
กล้วย	16.3	องุ่น	22.4
บีทรูท	35	มะเขือเทศ	5.7 – 13.3
ผักที่กลีบเรียงซ้อนกันเป็นชั้นๆ (เช่น หัวหอม)	11	กะหล่ำปลี	31
เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์			
เนื้อ	4.6	สัตว์ปีก	2.5 – 5.7
หมู	5.8 – 20	ลูกชิ้น	6.8
แกะ	8	ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป (รวมแฮมและไส้กรอก)	< 20.7
กุ้ง	1 – 2.4	ตับ	< 11.9
ปลาหมึก	1.8	นมวัว	< 3.3

โดยทั่วไปการหาปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟี เช่น Gas chromatography (GC)[6] หรือ High performance liquid chromatography (HPLC)[7] ซึ่งเทคนิคเหล่านี้มีประสิทธิภาพสูงในการวิเคราะห์ เหมาะสำหรับสารที่มีความเข้มข้นต่ำ แต่เนื่องจากเครื่องมือในการวิเคราะห์มีราคาสูง ในปัจจุบันอุปกรณ์การวิเคราะห์ฐานกระดาษ (paper-based analytical devices) จึงได้รับความสนใจในการใช้เป็นอุปกรณ์ตรวจวัด ซึ่งอุปกรณ์การวิเคราะห์ฐานกระดาษเป็นเทคนิคที่สะดวกในการตรวจวัด พกพาและใช้งานง่าย ใช้สารตัวอย่างปริมาณน้อยระดับไมโครลิตร (µL) [8] โดยเทคนิคนี้ใช้การหยดสารตัวอย่างไปยังอุปกรณ์ เมื่อสารเกิดปฏิกิริยาจะเกิดการเปลี่ยนแปลงสี หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ต่อเพื่อหาปริมาณฟอร์มาดีไฮด์

ปัจจุบันมีการศึกษาตัวตรวจวัดโดยใช้ โพรบเรืองแสง (Fluorescence probe)[9] ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ดูดซับแสงที่มีความยาวคลื่นจำเพาะและเปล่งแสงที่มีความยาวคลื่นต่างกันออกมา หรือที่เรียกว่ากระบวนการเรืองแสง มักใช้ในการศึกษาตัวอย่างทางชีววิทยา โดยโพรบเรืองแสงมีโครงสร้างโมเลกุลที่เรียกว่า fluorophores และสามารถยึดติดกับโมเลกุลเป้าหมาย (Target molecule) และให้แสงฟลูออเรสเซนซ์ นำมาวิเคราะห์ได้

งานวิจัยนี้จึงสนใจการตรวจวัดฟอร์มาดีไฮด์ด้วยอุปกรณ์การวิเคราะห์ฐานกระดาษ (paper-based device) ร่วมกับการตรวจวัดแบบเรืองแสง (fluorescence detection) เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณฟอร์มาดีไฮด์ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะเกิดการเปลี่ยนแปลงสีเมื่อตัวตรวจวัดเรืองแสง[27] ทำปฏิกิริยากับฟอร์มาลดีไฮด์ โดยผ่านกระบวนการ photo-induced electron transfer ที่เกิดปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว มีความจำเพาะต่อฟอร์มาลดีไฮด์สูง สามารถพัฒนาให้อยู่ในรูปของอุปกรณ์การวิเคราะห์ฐานกระดาษ เพื่อความสะดวกในการตรวจวัดและใช้สารตัวอย่างสำหรับการตรวจวัดปริมาณน้อย

1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตของการวิจัย

1. เตรียมอุปกรณ์การวิเคราะห์ฐานกระดาษที่มีโพรบเรืองแสง RBNA สำหรับการตรวจวัดแบบเรืองแสง
2. นำอุปกรณ์การวิเคราะห์ฐานกระดาษที่ได้ทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจวัดฟอร์มาลดีไฮด์

1.3 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

1.3.1 ฟอร์มาลดีไฮด์

1.3.1.1 สมบัติทางเคมี

ฟอร์มาลดีไฮด์ (formaldehyde) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีตามธรรมชาติ มีสูตรเคมี CH_2O หรือ H-CHO ซึ่งเป็นสารประกอบกลุ่มแอลดีไฮด์ (R-CHO)[10]

ฟอร์มาลดีไฮด์ เป็นก๊าซที่มีกลิ่นฉุน ละลายได้ดีในน้ำ แอลกอฮอล์ อีเทอร์ และอะซีโตน ไม่เสถียรในสถานะก๊าซ การซื้อขายและขนส่งจึงอยู่ในรูปของสารละลายที่มีความเข้มข้นร้อยละ 37-55 โดยน้ำหนัก และมีส่วนผสมของเมทานอลอยู่ระหว่างร้อยละ 1-4 เรียกว่า “ฟอร์มาลีน (Formalin)” และมีคุณสามบัติทางเคมี ดังตารางที่ 1.2

ตารางที่ 1.2 สมบัติทางเคมีของฟอร์มาลดีไฮด์ [10]

สมบัติของสาร	ฟอร์มาลดีไฮด์	ฟอร์มาลีน
สภาพที่ปรากฏ	ไม่มีสี	ไม่มีสี
น้ำหนักโมเลกุล	30.03	30.03
จุดเดือด (องศาเซลเซียส)	-19.5 ที่ความดันบรรยากาศ	96 ที่ความดันบรรยากาศ
จุดหลอมเหลว/จุดเยือกแข็ง (องศาเซลเซียส)	-	-92
ความเป็นกรดด่าง	-	2.8 – 4.0
ความหนาแน่นสัมพันธ์	1.08 ที่ 20 องศาเซลเซียส	1.04 ที่ 20 องศาเซลเซียส
ความดันไอปรอท (มม.ปรอท)	3890 ที่ 25 องศาเซลเซียส	1.52 ที่ 20 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิที่ติดไฟได้เอง (องศาเซลเซียส)	424	424

ฟอร์มาลดีไฮด์ สามารถเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชัน (Polymerization) ออกซิเดชัน (Oxidation) และการเติม (Addition) ในรูปของสารละลายและสามารถเกิดปฏิกิริยาโพลีเมอไรเซชัน (Polymerization) การสลาย (decomposition) รีดักชัน (Reduction) ออกซิเดชัน (Oxidation) การเติม (Addition) และคอนเดนเซชัน (Condensation) เมื่อถูกความร้อนจะสลายตัวเป็นกรดฟอร์มิก และหากเกิดการลุกไหม้จะสลายตัวให้ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และไฮโดรเจน (H_2) เกิดหมอกควันพิษ[10] จัดอยู่ในประเภทวัตถุอันตรายชนิดที่ 2 (พระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535)[3] การผลิต การนำเข้า-ส่งออก หรือมีไว้ครอบครอง ต้องแจ้งพนักงานเจ้าหน้าที่ทราบก่อน และต้องปฏิบัติตามเกณฑ์ที่ขึ้นทะเบียนวัตถุอันตรายและ

ห้ามใช้ในอาหาร ในประเทศไทยมีโรงงานผลิตฟอร์มาลดีไฮด์โดยใช้เมทานอลเป็นวัตถุดิบหลักที่นำเข้าจากต่างประเทศ โดยกระบวนการสำคัญ 2 กระบวนการ[10] คือ ซิลเวอร์ โพรเซสและออกไซด์ โพรเซส

1.3.1.2 ข้อมูลความเป็นอันตราย

ความเป็นอันตรายของฟอร์มาลดีไฮด์ตามระบบ GHS (Globally Harmonised System for Classification and labeling of Chemicals)[11] แสดงดังตารางที่ 1.3 โดยระบบ GHS เป็นระบบการจัดกลุ่มสารเคมี การติดฉลาก และการแสดงรายละเอียดบนเอกสารข้อมูลความปลอดภัย (Safety Data Sheet : SDS) เพื่อสื่อสารและเข้าใจข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับอันตรายของสารเคมี ตลอดจนสร้างความเชื่อมั่นว่าการใช้สารเคมีแต่ละประเภทถูกต้องตามวัตถุประสงค์ โดยไม่เกิดผลเสียหรืออันตรายต่อสุขภาพมนุษย์และสิ่งแวดล้อมแต่อย่างใด

ตารางที่ 1.3 ข้อมูลความเป็นพิษอันตรายของฟอร์มาลดีไฮด์[11]

ประเภทความเป็นอันตราย (Hazard Class and category)	สัญลักษณ์ (Pictogram)	รหัสและข้อความแสดงความเป็นอันตราย (Hazard Code and Statement)
ความเป็นพิษเฉียบพลัน ประเภทย่อย 3 (Acute toxicity Category 3)		H301 เป็นพิษเมื่อกลืนกินเข้าไป H311 เป็นพิษเมื่อสัมผัสผิวหนัง H331 เป็นพิษเมื่อหายใจเข้าไป
การก่อมะเร็ง ประเภทย่อย 1B (Carcinogenicity Category 1B)		H350 อาจก่อให้เกิดมะเร็ง
การก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ของเซลล์สืบพันธุ์ ประเภทย่อย 2 (Germ cell mutagenicity Category 2)		H341 มีข้อสงสัยว่าอาจเกิดความผิดปกติต่อพันธุกรรม
การกัดกร่อน และการระคายเคืองต่อผิวหนัง ประเภทย่อย 1B (Skin corrosion/irritation Categories 1B)		H314 ทำให้ผิวหนังไหม้อย่างรุนแรงและทำลายดวงตา
การทำให้ไวต่อการกระตุ้นอาการแพ้ต่อผิวหนัง ประเภทย่อย 1 (Skin sensitisers Category 1)		H317 อาจทำให้เกิดการแพ้ที่ผิวหนัง

1.3.1.3 เกณฑ์ความปลอดภัยและค่ากำหนดตามกฎหมายในอาหารและน้ำดื่ม

ในปัจจุบันมีการตรวจพบปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารชนิดเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติและถูกเติมลงไปในอาหาร เพื่อให้ความคุ้มครองแก่ผู้บริโภค จึงมีการกำหนดเกณฑ์ความปลอดภัยและค่ากำหนดตามกฎหมายในอาหารและน้ำดื่ม ดังตารางที่ 1.4 และ 1.5 ซึ่งหากร่างกายได้รับสารเคมีมากเกินไปก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพอย่างฉับพลันหรือเกิดการสะสมและส่งผลต่อสุขภาพในระยะยาว

ตารางที่ 1.4 เกณฑ์ความปลอดภัยของปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ได้รับประจำวันที่ทนได้ [12,19]

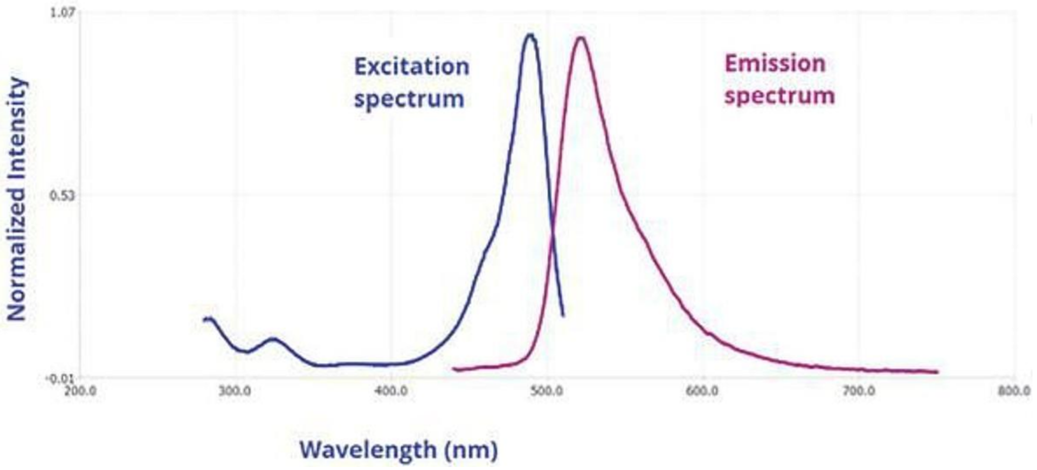
องค์กร	ค่าปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ได้รับประจำวันที่ทนได้ (Tolerable daily intake: TDI)
US EPA: United States Environmental Protection Agency	0.200 mg / หนักตัว 1 กิโลกรัม / วัน
World Health Organization (WHO)	0.150 mg / หนักตัว 1 กิโลกรัม / วัน
FSCJ: The Food Safety Comission of Japan	0.015 mg / หนักตัว 1 กิโลกรัม / วัน

ตารางที่ 1.5 เกณฑ์กฎหมายกำหนดปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ตกค้างในอาหาร[12,19]

ค่าที่กำหนดตามกฎหมาย	ชนิดอาหาร	ค่าฟอร์มาลดีไฮด์ตกค้าง
European Commission Directive (95/2/EC)	เนยแข็ง	< 25 mg/kg
Italian Health Department	ปลาคอด	< 60 mg/kg
	สัตว์น้ำมีเปลือก	< 10 mg/kg
Chinese Ministry of agriculture	ผลิตภัณฑ์อาหารทะเล	< 0 mg/kg
Ministry of Health; MOH. Chinese National Standard	น้ำดื่มและในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์	< 0.9 mg/kg

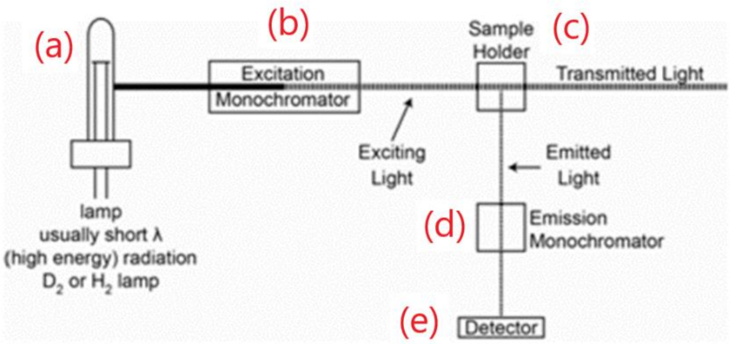
1.3.2 Fluorescence Spectroscopy

ฟลูออเรสเซนต์สเปคโตรสโคปี (fluorescence spectroscopy)[20] เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์คุณสมบัติของสารโดยการอาศัยการดูดกลืนรังสียูวีที่ส่งผลให้โมเลกุลถูกกระตุ้นและมีการสั่นภายในโมเลกุลจากระดับชั้นพลังงานสถานะพื้น (ground state) ไปสู่ระดับชั้นพลังงานที่สูงขึ้น (excited state) เรียกว่าการดูดพลังงาน โมเลกุลที่มีการเคลื่อนที่ไปอยู่ในระดับของชั้นพลังงานที่สูงจะไม่มีความเสถียร จึงมีการปลดปล่อยพลังงานและตกลงมาในชั้นระดับพลังงานที่ต่ำกว่า พลังงานที่โมเลกุลปลดปล่อยจากระดับชั้นพลังงานกระตุ้นชั้นที่หนึ่งสู่ระดับชั้นพลังงานสถานะพื้นจะทำให้เกิดการคายโฟตอน (emission of photon) ทำให้เกิดสเปกตรัมในช่วงฟลูออเรสเซนส์ ณ ค่าพลังงานที่กระตุ้นที่จำเพาะของสารแต่ละชนิด เมื่อโมเลกุลเกิดการกระตุ้น จะเกิดการเปล่งแสงออกมา แสดงดังภาพที่ 1.2



ภาพที่ 1.2 สเปกตรัมกระตุ้นการเรืองแสงและสเปกตรัมการเปล่งแสง[20]

องค์ประกอบของเครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์[21] แสดงดังภาพที่ 1.3 เทคนิคการตรวจวัดโดยใช้ฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรสโกปี มีการใช้งานอย่างแพร่หลายทั้งงานวิจัยต่างๆ และเป็นเทคนิคการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารประกอบแบบหนึ่ง โครงสร้างของสารจะมีความสัมพันธ์กับความยาวคลื่นที่เปล่งแสง โดยสารที่มีพันธะคู่มาก หรือ π-interaction ทำให้ความยาวคลื่นที่แสงเปล่งออกมาเพิ่มขึ้น



ภาพที่ 1.3 องค์ประกอบของเครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ (a) แหล่งกำเนิดแสง (light source) (b) ส่วนแยกความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้น (c) ภาชนะใส่สารละลาย (d) ส่วนแยกความยาวคลื่นที่คาย (e) ตัวตรวจวัด[21]

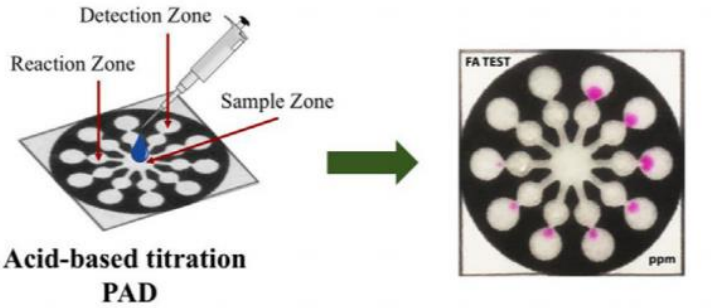
1.3.3 อุปกรณ์การวิเคราะห์ฐานกระดาษ (Paper-based Analytical Device)

อุปกรณ์การวิเคราะห์บนกระดาษ (Paper-based Analytical Device)[22] เป็นอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์รูปแบบใหม่ที่กำลังได้รับความนิยม โดยทำการสร้างช่องไหลของสารลงบนกระดาษ กระดาษเป็นวัสดุที่ชอบน้ำ (hydrophilic) เมื่อหยดน้ำลงบนกระดาษหรือจุ่มกระดาษลงในน้ำ น้ำจะซึมไปตามช่องขนส่งที่ได้สร้างไว้ ซึ่งควบคุมทิศทางการไหลของสารละลายได้

อุปกรณ์การวิเคราะห์บนกระดาษ ที่พบเห็นได้ทั่วไป คือ กระดาษลิตมัส (Litmus Paper) เป็นอุปกรณ์ที่ใช้ตรวจสอบความเป็นกรด-ด่าง หรือค่าพีเอช (pH) ถ้าหากของเหลวมีสภาพเป็นกรด กระดาษจะเปลี่ยนจากสี

น้ำเงินเป็นสีแดง และในทางกลับกันถ้าของเหลวมีสภาพเป็นเบส กระดาษจะเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีน้ำเงิน ถ้าหากเป็นกลาง กระดาษทั้งสองจะไม่เปลี่ยนสี

อุปกรณ์การวิเคราะห์บนกระดาษถูกนำมาใช้ในการตรวจวัดมากมาย เช่น ตัวอย่างทางชีวภาพ ยา ยาฆ่าแมลง และสารเคมีอื่น ๆ ข้อดีของอุปกรณ์นี้คือ มีราคาถูก สามารถมองเห็นและเกิดปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว จึงถูกนำมาประยุกต์ในงานวิจัยหลายด้าน



ภาพที่ 1.4 ตัวอย่างอุปกรณ์การวิเคราะห์บนกระดาษ (Paper-based Analytical Device)[22]

1.3.4 การตรวจสอบความใชไดของวิธีทดสอบ (method validation)

method validation[24] เปนกระบวนการยืนยันความถูกตอง ความเหมาะสมของวิธีการวิเคราะห์ที่ศึกษาเพื่อนำมาใชวิเคราะห์ตัวอยางในหองปฏิบัติการ ใหทราบถึงคุณสมบัติ เงื่อนไข หรือขอจำกัดของวิธีการวิเคราะห์นั้นๆ การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการทดสอบ ประกอบด้วย

1.3.5.1 ความถูกต้อง (Accuracy)[24]

Accuracy คือความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์แสดงโดยความใกล้เคียงกันระหว่างค่าที่ได้จากการวิเคราะห์นั้น เปรียบเทียบกับค่าจริง หรือค่าอ้างอิงที่เป็นที่ยอมรับ accuracy ต้องประเมินตลอดช่วงความเข้มข้นที่ระบุสำหรับวิธีวิเคราะห์นั้น โดยทั่วไปจะวิเคราะห์ อย่างน้อย 9 ซ้ำที่ 3 ความเข้มข้น ที่ครอบคลุม range ที่กำหนด โดยการเติมสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นลงใน sample และหาค่าความต่างของค่าที่วิเคราะห์ได้กับค่าที่แท้จริง แล้วรายงานเป็นค่าร้อยละ การคืนกลับ (percent recovery)

1.3.5.2 ความเที่ยง (precision)[24]

ความเที่ยง (precision) คือ ความใกล้เคียงของค่าที่วิเคราะห์ซ้ำๆ หลายรอบด้วยวิธีวิเคราะห์เดียวกัน ความแตกต่างของค่าที่วิเคราะห์ได้จะแสดงด้วยค่าทางสถิติ คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, S.D.) ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative standard deviation, RSD) หรือค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of variation, CV) ความเที่ยงมี 2 แบบ ได้แก่

1) Repeatability หมายถึง ความสามารถในการทวนซ้ำของเครื่องมือวัด ซึ่งแสดงถึงระดับความถูกต้องใกล้เคียงกันของผลการวัดที่ได้จากการวัดหลาย ๆ ครั้งในช่วงเวลาใกล้เคียงกัน โดยการวัดทั้งหมดต้องอยู่ภายใต้วิธีการวัด ผู้ทำการวัด และสภาวะแวดล้อมเดียวกัน

2) Reproducibility ระดับความใกล้เคียงของค่าที่อ่านได้จากเครื่องมือวัด (instrument) ในเวลาที่แตกต่างกัน หรือค่าความสามารถในการแสดงค่าซ้ำ โดยการวัดครั้งหนึ่ง ๆ สามารถเปลี่ยนแปลงเงื่อนไขดังต่อไปนี้ได้ เช่น วิธีการวัด ผู้วัด รวมถึงสภาวะแวดล้อม

1.3.5.3 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (Limit of detection) และความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (Limit of quantitation)[24]

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ในตัวอย่าง (Limit of detection, LOD) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้โดยมีความแม่น และความเที่ยงที่ยอมรับได้ (Limit of quantitation, LOQ) หาได้จากการวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ไม่มีสารที่สนใจ (Sample blank)

Limit of detection (LOD) = 3.3 x (slope/S.D.)

Limit of quantitation (LOQ) = 10 x (slope/S.D.)

1.3.5.4 ความเป็นเชิงเส้น (linearity) [24]

การหาค่าความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้และกราฟของการวิเคราะห์ยังมีความเป็นเส้นตรง ความแม่น และความเที่ยงที่ยอมรับได้ (Limit of linearity, LOL) หาได้จากความเข้มข้นสูงสุดจากกราฟที่วิเคราะห์ระหว่างค่าสัญญาณกับความเข้มข้นที่ค่าทั้งสองยังมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) ระหว่าง 0.995-1.00

1.3.5.5 ความจำเพาะ (selectivity) [24]

ความสามารถของวิธีวิเคราะห์ที่จะวิเคราะห์เฉพาะสารที่ตองการจะวิเคราะห์ โดยที่สารนั้นเป็นเพียงส่วนประกอบหนึ่งในสารละลายนั้น ๆ หรือวิธีการวิเคราะห์มีความสามารถในการเลือกวัดเฉพาะสารที่ตองการจะวัด จึงกล่าวได้วาวิธีวิเคราะห์นั้นมีความจำเพาะ (specific) การศึกษา specificity ของวิธีการวิเคราะห์ทำได้โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีหรือเติมสารรบกวนอื่น แลวตรวจสอบว่าสารรบกวนเหลานั้นมีผลกระทบตอการวิเคราะห์หรือไม่ และสารรบกวนเหลานั้นทำใหการตรวจวัด หรือการหาปริมาณสารที่ตองการทราบผิดไปหรือไม่

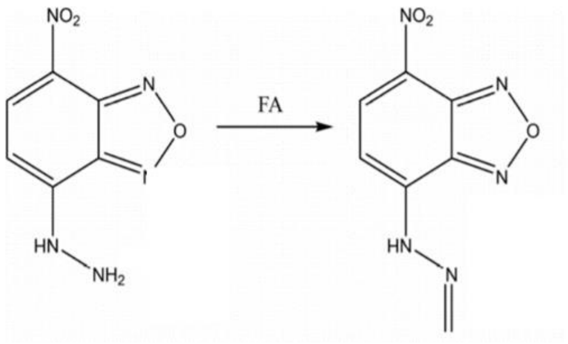
1.3.5.6 ความคงทน (Robustness) [24]

ความคงทนของวิธีการทดสอบที่แม้วาจะทำในหองปฏิบัติการที่ต่างกัน ก็ใหผลการทดสอบที่มีความคลาดเคลื่อนเพียงเล็กน้อยหรืออาจจะไม่มีผลกระทบต่อผลการวิเคราะห์อย่างมีนัยสำคัญ การทดสอบความคงทนของวิธีการวิเคราะห์ทำโดยการเปลี่ยนแปลงวิธีการวิเคราะห์ใหตางไปจากเดิมเล็กนอยและสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นตามมา การเปลี่ยนแปลงวิธีวิเคราะห ไดแก สิ่งแวดลอม เวลา อุณหภูมิ pH เปนตน และการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจะประเมินจากคา ความถูกต้อง (accuracy) และ ความเที่ยง (precision)

1.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

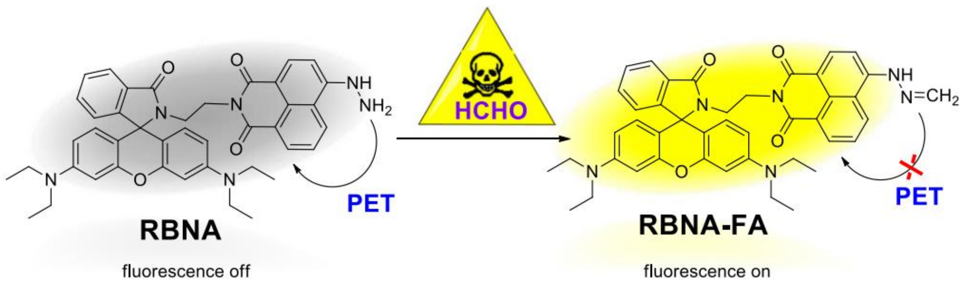
ฟอร์มาลดีไฮด์ (formaldehyde) ถูกนำมาใช้เป็นวัตถุกันเสียอาหารจำพวกเนื้อสัตว์ และอาหารทะเล องค์การอนามัยโลก (World Health Organization) ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ที่มนุษย์สามารถรับเข้าสู่ร่างกายได้ทุกวัน (reference dose) โดยไม่ทำให้เกิดความผิดปกติใด ๆ ต่อสุขภาพอนามัยที่ 0.15 mg/kg ต่อวัน[5]

จากงานวิจัยของ Ge Hongwei และคณะวิจัย[28] ได้ทำการศึกษาหาปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์โดยใช้ โพรบวัดเรืองแสง (fluorescent probes) คือ fluorescence enhancement probe (FAP) ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับฟอร์มาลดีไฮด์โดยตรง ซึ่ง Hydrazine ใน FAP จะทำหน้าที่ดับการเรืองแสงของ probe ผ่านกระบวนการ photo-induced electron transfer (PET) เมื่อ FAP ทำปฏิกิริยากับฟอร์มาลดีไฮด์ จะเกิดยับยั้งกระบวนการ PET ทำให้ FAP เกิดการเรืองแสง กลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง FAP กับฟอร์มาดีไฮด์ ดังภาพที่ 1.5



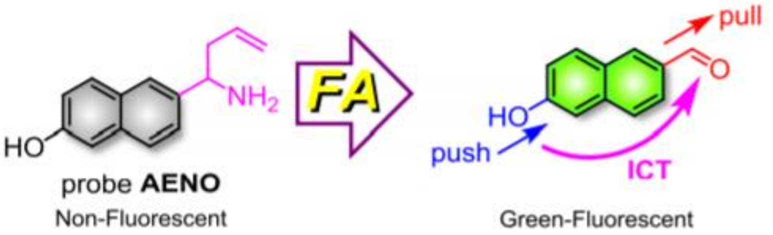
ภาพที่ 1.5 กลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง FAP กับฟอร์มาดีไฮด์

จากงานวิจัยของ Lirong Jiang และคณะวิจัย[27] ได้ทำการศึกษาหาปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์โดยอาศัยเทคนิคคัลเลอริเมตรีและโพรบวัดเรืองแสง (fluorescent probes) โดยทำการสังเคราะห์ โพรบวัดเรืองแสง คือ Hydrazinyl naphthalimide-based fluorescent probe หรือ RBNA probe ซึ่ง Hydrazine ใน RBNA probe จะทำหน้าที่ดับการเรืองแสงของ probe ผ่านกระบวนการ photo-induced electron transfer (PET) เมื่อ RBNA probe ทำปฏิกิริยากับฟอร์มาลดีไฮด์ จะเกิดยับยั้งกระบวนการ PET ทำให้ RBNA probe เกิดการเรืองแสงขึ้น กลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง RBNA probe กับ ฟอร์มาดีไฮด์ ดังภาพที่ 1.6



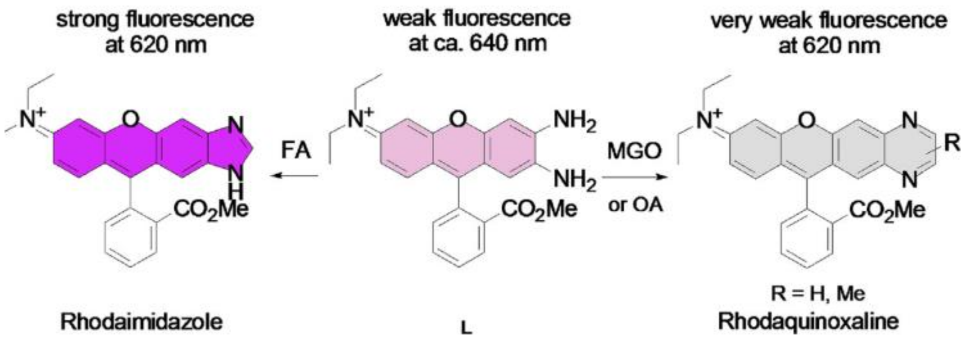
ภาพที่ 1.6 กลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง RBNA probe กับฟอร์มาดีไฮด์

จากงานวิจัยของ Junchao Xu และคณะวิจัย [29] ได้ทำการศึกษาหาปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ลูกอม โดยใช้โพรบวัดเรืองแสง (fluorescent probes) คือ naphthalene-based fluorescent probe (AENO) เมื่อ probe ทำปฏิกิริยากับฟอร์มาลดีไฮด์ จะเกิดกระบวนการ 2-aza-Cope rearrangement ทำให้เกิดการเรืองแสงขึ้น กลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง AENO probe กับฟอร์มาดีไฮด์ ดังภาพที่ 1.7



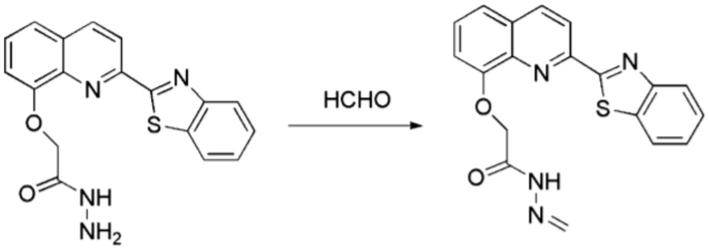
ภาพที่ 1.7 กลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง AENO probe ฟอร์มาดีไฮด์

จากงานวิจัยของ Chang Liu และคณะวิจัย[30] ได้ทำการศึกษาหาปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ เมทิลไกลออกซาล และออกซาลดีไฮด์ โดยทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ ortho-diaminorhodamine คือ probe L เมื่อ probe L ทำปฏิกิริยากับฟอร์มาลดีไฮด์ล เมทิลไกลออกซาลและออกซาลดีไฮด์ จะให้แสงฟลูออเรสเซนซ์ กลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง probe L กับฟอร์มาลดีไฮด์ เมทิลไกลออกซาลและออกซาลดีไฮด์ ดังภาพที่ 1.8



ภาพที่ 1.8 กลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง probe L กับฟอร์มาลดีไฮด์ เมทิลไกลออกซาลและออกซาลดีไฮด์

จากงานวิจัยของ Chunxia Liu และคณะวิจัย[31] ได้ทำการศึกษาหาปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ โดยทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ 8-hydroxyquinoline-based ทำหน้าที่เป็นโพรบวัดเรืองแสง (fluorescent probes) หรือ Probe 1โดยอาศัยกระบวนการ photo-induced electron transfer (PET) กลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง Probe 1 กับฟอร์มาลดีไฮด์ ดังภาพที่ 1.9



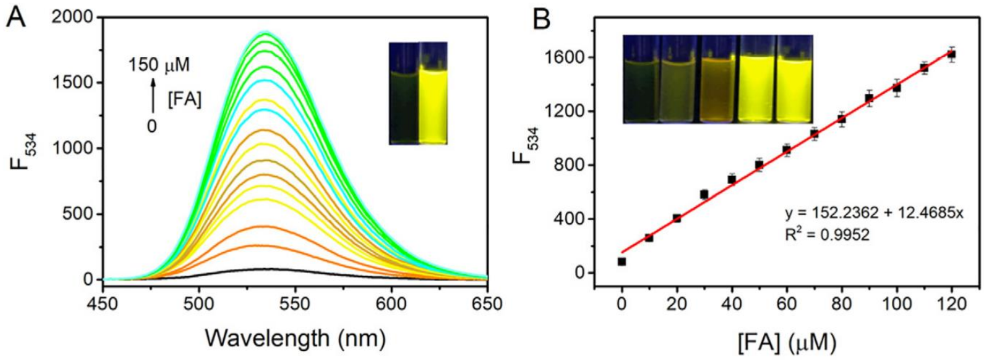
ภาพที่ 1.9 กลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง Probe 1 กับฟอร์มาลดีไฮด์

จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของโพรบที่ใช้ตรวจวัดฟอร์มาลดีไฮด์ทั้ง 5 ชนิด พบว่า RBNA probe ใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยาน้อยที่สุด และให้ขีดจำกัดการตรวจวัดเพียงพอในการตรวจวัดฟอร์มาลดีไฮด์ที่ปนเปื้อนในอาหาร จึงเลือก RBNA probe สำหรับงานวิจัยในครั้งนี้

ตารางที่ 1.6 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของโพรบที่ใช้ตรวจวัดฟอร์มาลดีไฮด์

ชนิดของ probe	เวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา	ช่วงความเข้มข้นฟอร์มาลดีไฮด์ (mg/L)	Limit of detection (μg/L)
FAP probe	50 นาที	0.015–0.8	0.89
RBNA probe	5 นาที	0 – 3.60	6.3
AENO probe	3 ชั่วโมง	0 – 30.03	17
Probe L	30 นาที	30.01-300.31	-
Probe 1	20 ชั่วโมง	0-3.90	0.27

RBNA probe ในการตรวจวัดหาปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์โดย ช่วงความเข้มข้น 0–120 μM ได้กราฟมาตรฐาน ดังภาพที่ 1.10 ให้ค่า R^2 = 0.9952 และมีความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ (limit of detection: LOD) เท่ากับ 0.21 μM



ภาพที่ 1.10 สเปกตรัมและกราฟมาตรฐานของการตรวจวัดฟอร์มาดีไฮด์ ด้วย RBNA probe[27]

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้อุปกรณ์การวิเคราะห์บนกระดาษที่สามารถตรวจวัดฟอร์มาลดีไฮด์ที่ได้อย่างรวดเร็ว มีความจำเพาะและง่ายต่อการตรวจวัด

บทที่ 2

การทดลอง

2.1 รายการเครื่องมือ อุปกรณ์

1) คอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromayography) ขนาด 250 mL
2) เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary Evaporator)
3) เครื่องวัดความเป็นกรดและด่าง (pH meter) รุ่น METTLER TOLDEO
4) เครื่อง portable USB 2000+ spectrometer (Ocean Optics, Ottawa, Canada)
5) หลอด LED
6) เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Fluorescence Spectrophotometer) รุ่น Agilent Technologies
7) เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrometer – FT-IR รุ่น NICOLET iS50
8) เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy – NMR รุ่น JEOL, JNM-ECZR 500 MHz

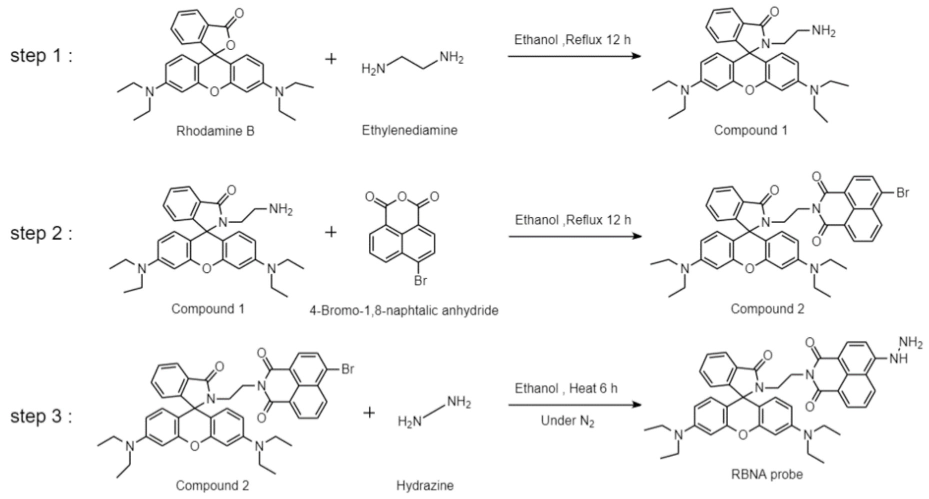
2.2 รายการสารเคมี

สาร	%purify	grade	บริษัท
1) โรดามีน บี (Rhodamine B)	≥95%	HPLC	Sigma Aldrich
2) เอทิลีนไดอามีน (ethylenediamine)	≥99%	Reagent	Sigma Aldrich
3) 4-โบรโม-1,8- แนปทาลิก แอนไฮเดรต (4-Bromo-1,8-naphtalic anhydride)	95%	Laboratory reagent	Sigma Aldrich
4) ไฮดราซีน ไฮเดรต (Hydrazine hydrate)	50-60 %	Reagent	Sigma Aldrich
5) ฟอร์มาดีไฮด์ (Formaldehyde)	37%	Analysis	CARLO ERBA Reagents
6) ซิลิกา เจล (Silica gel)	-	technical	Supelco
7) กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid)	37%	ACS reagent	Sigma Aldrich
8) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium Hydroxide)	≥97.0%	ACS reagent	Sigma Aldrich
9) โซเดียมไบคาร์บอเนต (Sodium bicarbonate)	≥99.7%	ACS reagent	Sigma Aldrich
10) โซเดียมซัลเฟต (Sodium sulfate)	≥99.0%	ACS reagent	Sigma Aldrich
11) โซเดียมซัลไฟต์ (Sodium sulfite)	≥98%	Analysis	Supelco
12) โปแตสเซียมโบรไมด์ (Potassium Bromide)	≥99%	FT-IR	Sigma Aldrich
13) ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane)	95%	technical	Sigma Aldrich
14) เอทานอล (Ethanol)	≥99.5%	ACS reagent	Sigma Aldrich
15) เมทานอล (Methanol)	95%	technical	Sigma Aldrich

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 การสังเคราะห์ RBNA probe [25,-27]

การสังเคราะห์ RBNA probe มีขั้นตอนการสังเคราะห์ 3 ขั้นตอน ดังภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 การสังเคราะห์ RBNA probe ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน[25,-27]

ขั้นที่ 1 การสังเคราะห์สารประกอบ 1 (Compound1)

ชั่ง Rhodamine B 2.40 g (5.01 mmol) ในเอทานอล 60 mL ใส่ในขวดก้นกลมขนาด 250 mL คนสารละลายและเติม Ethylenediamine 0.43 mL (6.43 mmol) ช้าๆ ที่อุณหภูมิห้อง รีฟักซ์ที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง รอสารละลายเย็นลงถึงอุณหภูมิห้องและระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง Rotary Evaporator เติม 0.1 M HCl 100 mL เพื่อกำจัด Ethylenediamine ที่เหลืออยู่ในปฏิกิริยา ปรับ pH ของสารละลายให้อยู่ระหว่าง 9-10 ด้วย 0.1 M NaOH เพื่อให้สารประกอบ 1 เป็นโมเลกุลที่เป็นกลาง (neutral compound) จากนั้นทำสารให้บริสุทธิ์โดยการสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน จากนั้นกำจัดน้ำส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนด้วย Na_2SO_4 ระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง Rotary Evaporator ชั่งน้ำหนัก บันทึกลักษณะของสารประกอบ1 และคำนวนหา %yield

ขั้นที่ 2 การสังเคราะห์สารประกอบ 2 (Compound2)

ชั่งสารประกอบ1 2.52 g (5.19 mmol) ในเอทานอล 60 mL ใส่ในขวดก้นกลมขนาด 250 mL และเติม 4-Bromo-1,8-naphtalic anhydride 1.47 g (5.30mmol) ลงในสารละลาย และคนสาร รีฟักซ์ที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง รอสารละลายเย็นลงถึงอุณหภูมิห้องและระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง Rotary Evaporator ทำสารให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้ ซิลิกา เจล-เฟสคงที่ และ 2% เมทานอลต่อไดคลอโรมีเทน-เฟสเคลื่อนที่ ชั่งน้ำหนัก บันทึกลักษณะของสารประกอบ2 และคำนวนหา %yield

ขั้นที่ 3 การสังเคราะห์ RBNA probe

ชั่งสารประกอบ2 151 mg (0.20 mmol) ในเอทานอล 60 mL ใส่ในขวดก้นกลม 2 คอ ขนาด 50 mL เติม Hydrazine hydrate 0.10 mL (2.15 mmol) ลงในสารละลายช้าๆ ให้ความร้อน 65°C ภายใต้บรรยากาศแก๊สไนโตเจน รอสารละลายเย็นลงถึงอุณหภูมิห้องและระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง Rotary Evaporator ทำสารให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้ ซิลิกา เจล-เฟสคงที่ และ 5% เอทานอลต่อไดคลอโรมีเทน-เฟสเคลื่อนที่ ชั่งน้ำหนัก บันทึกลักษณะของ RBNA probe และคำนวนหา %yield

2.3.2 การเตรียมสารละลาย

2.3.2.1 สารละลาย RBNA probe เข้มข้น 1 mM (stock solution)

ชั่ง RBNA probe 17.7 mg ในเอทานอล 1 mL (คิดเป็นความเข้มข้น 25.47 mM) จากนั้นปิเปตสารละลายนี้ปริมาตร 196 **μL** ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 5.00 mL ปรับปริมาตรด้วยเอทานอล

2.3.2.2 สารละลาย Formaldehyde เข้มข้น 1000 mg/L (stock solution)

ปิเปต 40% m/v Formaldehyde ปริมาตร 625 **μL** ใน DI water 250 mL หาความเข้มข้นแน่นอนของสารละลายฟอร์มาลดีไฮด์ โดยใช้ ASTM method (D6303-98) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.4

2.3.2.3 สารละลาย HCl เข้มข้น 0.1 M

นำสารละลาย 37% Hydrochloric acid ปริมาตร 835 μL เติมในน้ำกลั่น 100.00 mL

2.3.2.4 สารละลาย $NaHCO_3$ เข้มข้น 0.1 M

ชั่ง $NaHCO_3$ 0.84 g ลงในขวดกำหนดปริมาตร 100.00 mL ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

2.3.2.5 สารละลาย Na_2SO_3 เข้มข้น 1.13 M

ชั่ง Na_2SO_3 14.24 g ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100.00 mL ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

2.3.3 การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐาน 0.1 M HCl

ปิเปตสารละลาย 0.1 M HCl 10.00 mL ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 25 mL หยดสารละลายอินดิเคเตอร์ methyl red 3 หยด (สารละลายเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีแดงชมพู) ไทเทรตกับสารละลาย 0.1 M $NaHCO_3$ จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีส้ม บันทึกปริมาตรที่ใช้ทำซ้ำ 2 ครั้ง (ปริมาตร 0.1 M $NaHCO_3$ ที่ใช้แต่ละครั้งต่างกันไม่เกิน 0.2 mL) คำนวนหาความเข้มข้นของสารละลาย HCl

สมการของปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้อง : $HCl + NaHCO_3 \longrightarrow NaCl + H_2CO_3$

2.3.4 การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายฟอร์มาลดีไฮด์ใช้ ASTM method (D6303-98)

ปิเปตสารละลาย 1.13 M Na_2SO_3 10.00 mL ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 25 mL วัด pH ของสารละลายก่อนไทเทรต (pH ควรอยู่ระหว่าง 8.5-10) จากนั้นปิเปตสารละลายฟอร์มาลดีไฮด์ 1000 ppm 10.00 mL เติมลงในสารละลาย คนจน pH สารละลายนิ่ง (ระบบเกิด NaOH pH สารละลายจะค่อยๆสูงขึ้น) วัด pH ของสารละลาย (pH มากกว่า 11) ทำการไทเทรตกับสารละลายมาตรฐาน 0.1 M HCl จน pH กลับมาเท่าก่อนเติมฟอร์มาลดีไฮด์ บันทึกปริมาตร HCl ที่ใช้ ทำซ้ำ 2 ครั้ง (ปริมาตร 0.1 M HCl ที่ใช้แต่ละครั้งต่างกันไม่เกิน 0.2 mL) คำนวนหาความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์

สมการของปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้อง : $HCHO + Na_2SO_3 + H_2O \longrightarrow NaOH + CH_2(NaSO_3)OH$

2.3.5 การทดสอบปฏิกิริยาระหว่าง RBNA probe กับ ฟอร์มาลดีไฮด์ รูปแบบสารละลาย

เตรียมสารละลายฟอร์มาลดีไฮด์ความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40, 50 mg/L ในน้ำกลั่น และสารละลาย RBNA probe ความเข้มข้น 10, 30, 50 μM ในเอทานอล ผสมสารละลายฟอร์มาลดีไฮด์แต่ละความเข้มข้น 1.00 mL กับสารละลาย RBNA probe ความเข้มข้น 10, 30, 50 μM 1.00 mL (อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร) นำสารละลายผสมวัดค่า fluorescent โดยเครื่อง Fluorescent spectrometer ตั้งค่า λ_{ex} เท่ากับ 446 nm และบันทึก emission ในช่วงความยาวคลื่น 470 – 650 nm วัดค่า fluorescent ซ้ำ 3 ครั้ง บันทึกค่า และสร้างกราฟ calibration curve

2.3.6 การทดสอบปฏิกิริยาระหว่าง RBNA probe กับ ฟอร์มาลดีไฮด์ บนอุปกรณ์ฐานกระดาษ (paper-based device)

ปิเปตสารละลาย RBNA probe ความเข้มข้น 50 μM 10.00 μL ลงบนอุปกรณ์ฐานกระดาษรอให้แห้ง จากนั้นปิเปตสารละลายฟอร์มาลดีไฮด์ ความเข้มข้น 50 mg/L 10.00 μL ลงอุปกรณ์ฐานกระดาษรอให้แห้ง นำไปตรวจวัดด้วยระบบตรวจจับการเรืองแสงแบบประดิษฐ์เอง (Homemade fluorescence detection system) และบันทึกสัญญาณ

2.3.8 การทดสอบความใช้ได้ของระบบตรวจจับการเรืองแสงแบบประดิษฐ์เอง (Homemade fluorescence detection system)

เตรียมสารละลาย Rhodamine B 2 ช่วงความเข้มข้น คือ ความเข้มข้นต่ำ (1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10 mg/L) และช่วงความเข้มข้นสูง (25, 50, 75, 100 mg/L) ปิเปตสารละลาย 10 mg/L Rhodamine B 10.00 μL ลงบนอุปกรณ์ฐานกระดาษรอให้แห้ง นำอุปกรณ์ฐานกระดาษไปตรวจวัดด้วยระบบตรวจจับการเรืองแสงแบบประดิษฐ์เอง (Homemade fluorescence detection system) และบันทึก emission ในช่วงความยาวคลื่น 470 – 650 nm วัดค่า fluorescent ซ้ำ 3 ครั้ง บันทึกค่า และสร้างกราฟ calibration curve ทำซ้ำเปลี่ยนความเข้มข้น Rhodamine B

บทที่ 3
ผลการทดลองและการอภิปรายผลการทดลอง

3.1 การสังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของ RBNA probe

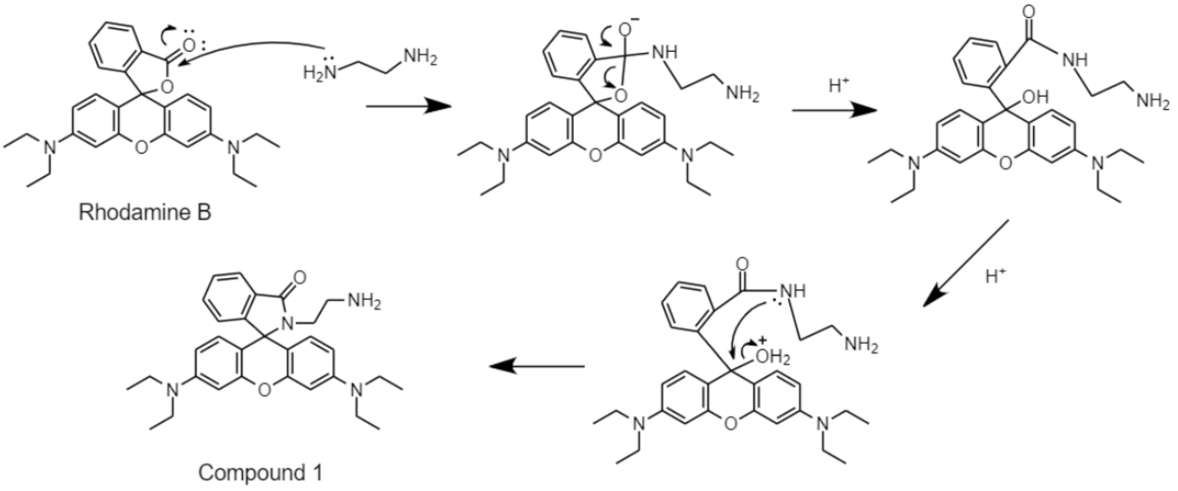
การสังเคราะห์ hydrazinyl naphthylamide-based fluorescent probe (RBNA probe) มี 3 ขั้นตอน ตามภาพที่ 2.1 โดยขั้นที่ 1 สังเคราะห์สารประกอบ1 จาก Rhodamine B ขั้นที่ 2 นำสารประกอบ1 ทำปฏิกิริยากับ 4-Bromo-1,8-naphtalic anhydride ได้สารประกอบ2 และขั้นที่ 3 นำสารประกอบ2 ทำปฏิกิริยากับ hydrazine ได้ RBNA probe โดยตารางที่ 3.1 สรุปสารตั้งต้นที่ใช้ สารผลิตภัณฑ์ที่ได้ และ %yield ของการสังเคราะห์ในแต่ละขั้นตอน

ตารางที่ 3.1 สารตั้งต้น สารผลิตภัณฑ์และ %yield ในแต่ละขั้นของการสังเคราะห์ RBNA probe

ขั้นที่	สารตั้งต้น		สารผลิตภัณฑ์	ลักษณะ	% yield
1	Rhodamine B	5.01 mmol	สารประกอบ1 (2.5171 g, 5.19 mmol)	ของเหลวเหนียวข้น สีชมพูแดง	103.8
	Ethylenediamine	6.43 mmol			
2	สารประกอบ1	5.19 mmol	สารประกอบ2 (2.1025 g, 2.85 mmol)	ของแข็งสีส้ม	54.9
	4-Bromo-1,8-naphtalic anhydride	5.30 mmol			
3	สารประกอบ2	0.20 mmol	RBNA probe (17.7 mg, 0.025 mmol)	ของแข็งสีเหลืองเข้ม	12.5
	Hydrazine hydrate	2.15 mmol			

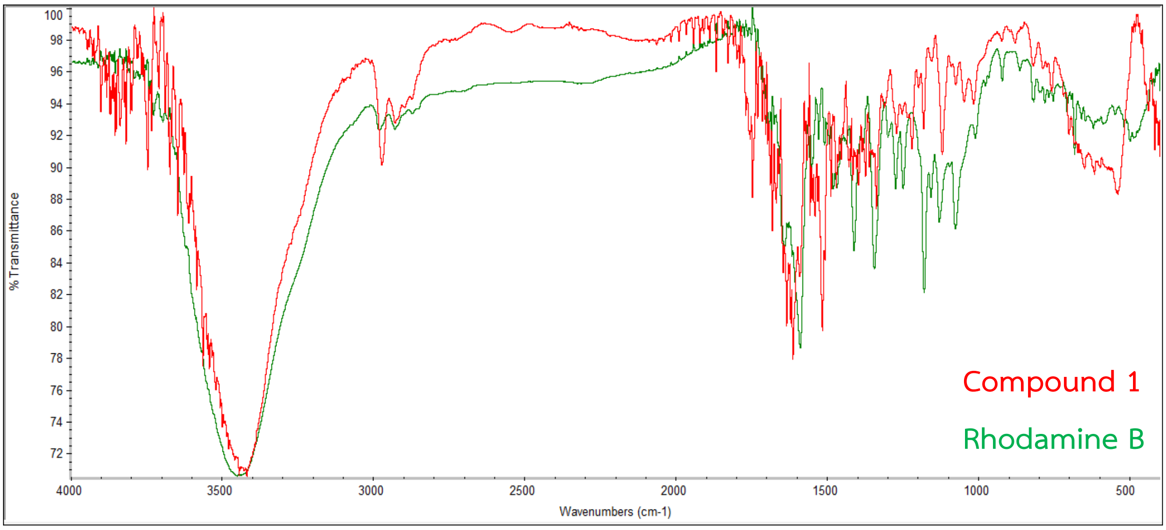
ในขั้นที่ 1 Rhodamine B ทำปฏิกิริยากับ Ethylenediamine ตามกลไกการเกิดปฏิกิริยาภาพที่ 3.1 โดยคาร์บอนที่หมู่ฟังก์ชันคาร์บอนิลของ Rhodamine B มีความเป็นอิเล็กโตรไฟล์ (electrophile) ทำปฏิกิริยากับไนโตรเจนของ Ethylenediamine ซึ่งมีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวเป็นนิวคลีโอไฟล์ (nucleophile) เกิดปฏิกิริยาแบบ S_N2 แล้วเกิดการโปรโตเนต (protonate) ที่หมู่ไฮดรอกซิล เกิดน้ำเป็น Leaving group ได้สารประกอบ1 เป็นผลิตภัณฑ์ ซึ่งสามารถแยกสารประกอบ1 จากสารตั้งต้นที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาได้โดยการสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน ที่ pH ของสารละลายช่วง 9.0-10.0 เพื่อป้องกันการแตกตัวของหมู่เอมีน ได้สารประกอบ1 สกัดแยกอยู่ในชั้นไดคลอโรมีเทน

การสังเคราะห์สารประกอบ1 จากสารตั้งต้น Rhodamine B ได้ %yield ของสารประกอบ 1 (2.5171 g, 5.19 mmol) 103.8 % ซึ่ง %yield ที่ได้มีค่าเกิน 100% อาจเนื่องมาจากน้ำหนักที่ชั่งได้มีค่ามากกว่าที่ควรจะเป็นจากตัวทำละลายที่ระเหยออกได้ไม่หมดเพราะสารประกอบ1 ที่สังเคราะห์ได้ มีลักษณะเป็นของเหลวเหนียวข้น สีชมพูแดงเข้มหรืออาจจะเกิดจากมีสารตั้งต้นเหลืออยู่จากการทำปฏิกิริยา



ภาพที่ 3.1 กลไกการสังเคราะห์ RBNA probe ขั้นที่ 1 (สารประกอบ1)

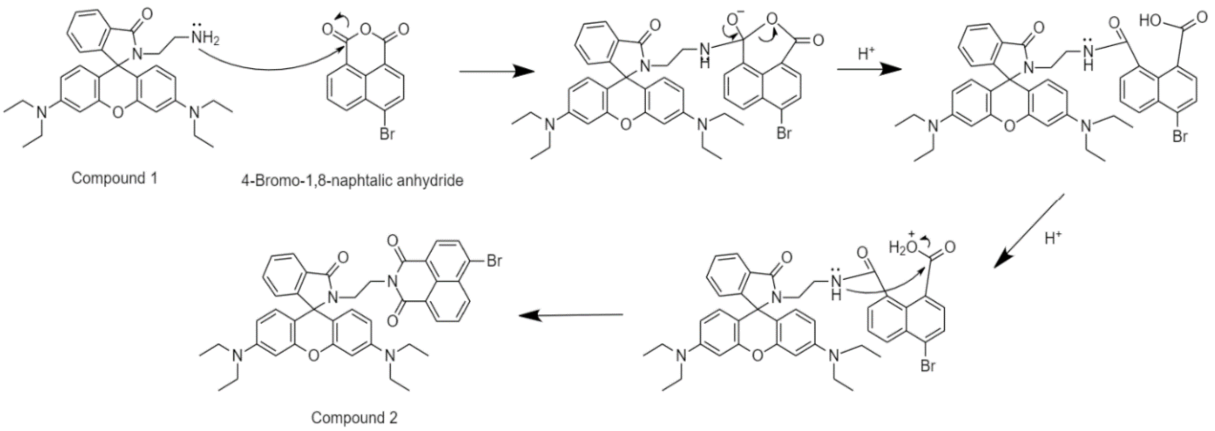
การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารประกอบ1 ที่ได้ด้วยเทคนิค Infrared (IR) Spectroscopy ได้สเปกตรัมของ Rhodamine B และสารประกอบ1 ดังภาพที่ 3.2 โดยหมู่ฟังก์ชัน ester ของ Rhodamine B เป็น amide และ aliphatic amine จากสเปกตรัมของสารประกอบ1 ในภาพที่ 3.2 พบพีคของ C-H stretching ที่ 2,980 cm^{-1} แต่ไม่เห็นพีคของ N-H stretching ที่ 3,500 cm^{-1} อาจเนื่องจากสารประกอบ 1 ที่สกัดแยกได้มีความบริสุทธิ์ไม่เพียงพอ ทำให้เห็นพีคของ O-H stretching และเกิดการ ทับซ้อนของพีคที่ 3,600-3,300 cm^{-1} แต่ช่วง finger print ที่ 1500 - 500 cm^{-1} พบว่าพีคของสารประกอบ1 มีความแตกต่างจาก Rhodamine B ที่เป็นสารตั้งต้นจึงสรุปได้ว่า สามารถสังเคราะห์สารประกอบ1 (มวลโมเลกุล 484.64 g/mol) ได้



ภาพที่ 3.2 IR spectrum ของ สารประกอบ1 และ Rhodamine B (สารตั้งต้น)

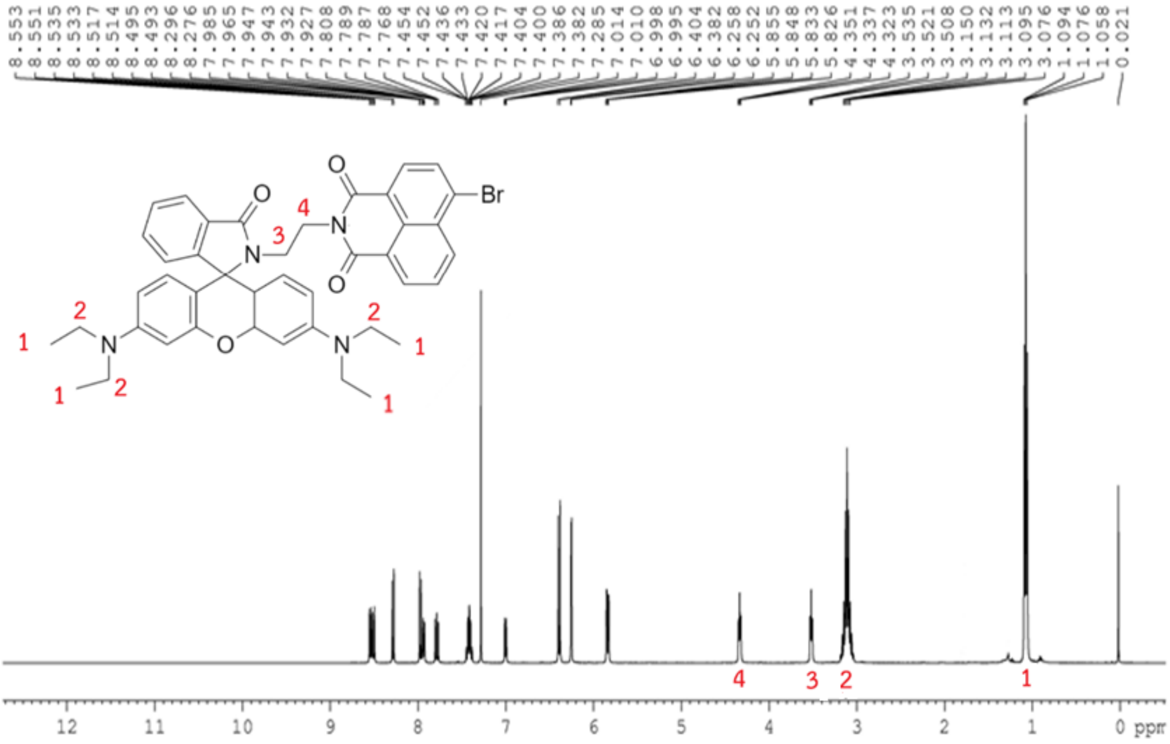
การสังเคราะห์ขั้นที่ 2 ของ RBNA probe นำสารประกอบ1 ทำปฏิกิริยากับ 4-Bromo-1,8-naphthalic anhydride ตามกลไกการเกิดปฏิกิริยาภาพที่ 3.3 โดยคาร์บอนที่หมู่ฟังก์ชั่นคาร์บอนิลของ 4-Bromo-1,8-naphthalic anhydride มีความเป็นอิเล็กโตรไฟล์ (electrophile) ทำปฏิกิริยากับไนโตรเจนของสารประกอบ 1) เกิดปฏิกิริยาแบบ S_N2 แล้วเกิดการโปรโตเนต (protonate) ที่หมู่ออกไซด์ เกิดน้ำเป็น Leaving group ได้สารประกอบ2 เป็นผลิตภัณฑ์ ทำการแยกสารประกอบ2 ให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ที่มีซิลิกาเจล-เฟสคงที่ และใช้ 5% เมทานอลต่อไดคลอโรมีเทน (5% MeOH:DCM) –เฟสเคลื่อนที่ สารประกอบ2 จะเกิดการถ่ายโอนมวลสาร (Mass Transfer) ระหว่างเฟสคงที่กับเฟสเคลื่อนที่ได้ดีกว่าสารประกอบ1 เพราะสภาวะที่ใช้ในการแยกสารเป็น normal phase โดยสารที่มีขั้วมากกว่าจะเกิดอันตรกิริยากับเฟสคงที่ได้ดีกว่าสารที่มีขั้วต่ำกว่า ดังนั้นสารที่มีขั้วต่ำกว่า จะออกจากคอลัมน์ก่อน ดังนั้น สารประกอบ 2 จึงออกจากคอลัมน์ก่อน

การสังเคราะห์ขั้นที่ 2 ได้สารประกอบ 2 (2.1025 g, 2.85 mmol) ลักษณะทางกาพภาพ เป็นของแข็งสีส้ม คิดเป็น %recovery เท่ากับ 54.9% โดยลักษณะของสารประกอบ2 ที่สังเคราะห์ได้เป็นของแข็งสีส้ม



ภาพที่ 3.3 กลไกการสังเคราะห์ RBNA probe ขั้นที่ 1 (สารประกอบ2)

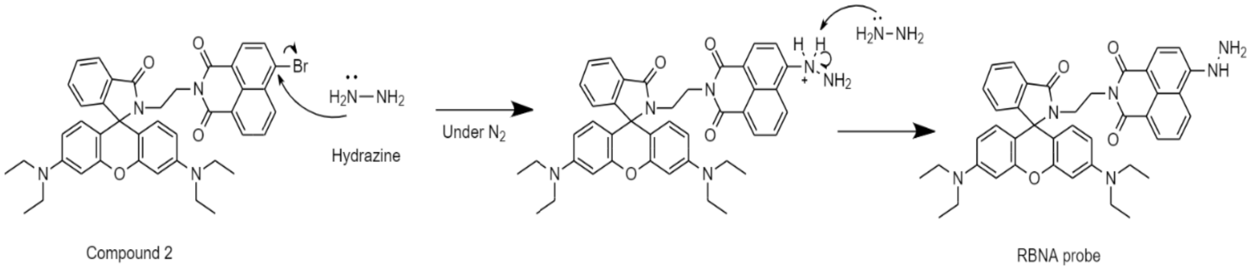
การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารประกอบ2 ที่ได้ด้วยเทคนิค Nuclear magnetic resonance spectroscopy หรือ ^{1}H-NMR ได้สเปกตรัมของสารประกอบ2 ดังภาพที่ 3.4 โดยพบสัญญาณที่ 1.03 ppm ของโปรตอนตำแหน่งที่ 1 (ภาพที่ 3.4) ที่มีค่า Multiplicity เท่ากับ 3 จึงเห็นพีค ณ ตำแหน่งนี้เป็น triplet พบสัญญาณที่ 3.11 ppm ของโปรตอนตำแหน่งที่ 2 (ภาพที่ 3.4) ที่มีค่า Multiplicity เท่ากับ 5 จึงเห็นพีค ณ ตำแหน่งนี้เป็น Quintet พบสัญญาณที่ 4.33 และ 5.33 ppm ของโปรตอนตำแหน่งที่ 3 และ 4 (ภาพที่ 3.4) ตามลำดับ ที่มีค่า Multiplicity เท่ากับ 3 จึงเห็นพีค ณ ตำแหน่งนี้เป็น triplet และสัญญาณที่ 5.8-6.4 เป็นสัญญาณโปรตอนแอโรมาติกของ Naphthalic สัญญาณที่ 7.0-8.5 เป็นสัญญาณโปรตอนแอโรมาติกของ Rhodamine B ดังนั้นจึงได้ว่าสามารถสังเคราะห์สารประกอบ2 (มวลโมเลกุล 743.70 g/mol) ได้



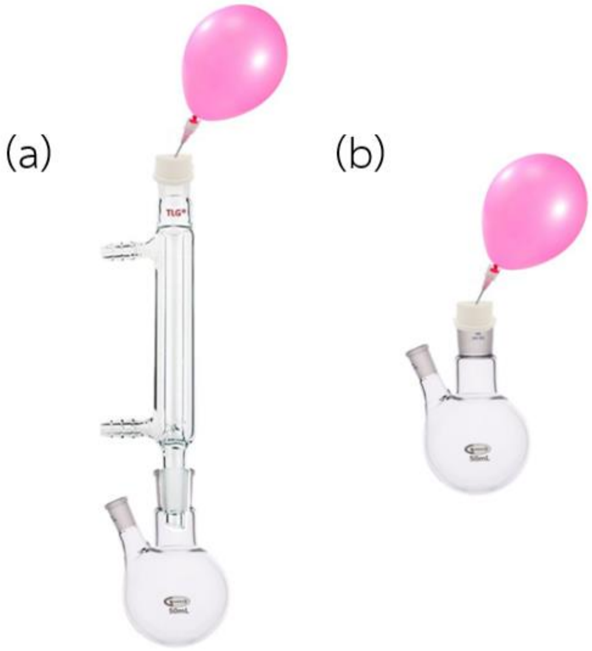
ภาพที่ 3.4 ^{1}H-NMR ของ สารประกอบ 2 ในสารละลาย $CDCl_3$

ขั้นที่ 3 ของการสังเคราะห์ RBNA probe นำสารประกอบ2 ทำปฏิกิริยากับ Hydrazine hydrate ภายใต้สภาวะแก๊สไนโตรเจน ตามกลไกการเกิดปฏิกิริยาภาพที่ 3.5 โดยเอมีนของไฮดราซีน (Nucleophile) ทำปฏิกิริยากับคาร์บอนที่ตำแหน่งโบรมีน (Electrophile) ของสารประกอบ2 เนื่องจากโบรมีนเป็นหมู่ที่ดึงอิเล็กตรอน (Electron withdrawing group: EDG) ทำให้คาร์บอนตำแหน่งที่เกาะมีความเป็นอิเล็กโตรไฟล์ (electrophile) และโบรมีนมีความเป็น leaving group ที่ดี ทำให้เกิดปฏิกิริยาแบบ S_N2 เกิดเป็น RBNA probe จากนั้นทำการแยก RBNA probe ให้บริสุทธิ์ ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ที่มีซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และใช้ 3% เอทานอลต่อไดคลอโรมีเทน (3% EtOH:DCM) เป็นเฟสเคลื่อนที่

การสังเคราะห์ในขั้นที่ 3 มีการตั้งอุปกรณ์ในการสังเคราะห์ 2 แบบ ดังภาพที่ 3.6 โดยแบบที่ 1 จัดตั้งขวดก้นกลม 2 คอ ต่อกับคอนเด็นเซอร์ (Condenser Column) คล้ายการรีฟักซ์ และแบบที่ 2 จัดตั้งขวดก้นกลม 2 คอ เพียงอย่างเดียว พบว่า การตั้งสังเคราะห์ แบบที่ 2 ให้ %yield สูงกว่า แบบที่ 1 เนื่องจากไนโตรเจนแทนที่อากาศได้ดีกว่า ทำให้เกิดปฏิกิริยาดีกว่า แต่การแทนที่แก๊สไนโตรเจนภายในขวดที่ทำปฏิกิริยายังไม่เพียงพอหรืออุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาอาจยังไม่เหมาะสม ทำให้ Hydrazine hydrate เกิดปฏิกิริยาไม่สมบูรณ์ และได้ % yield ของการสังเคราะห์ RBNA probe ในขั้นที่ 3 เพียง 12.5%

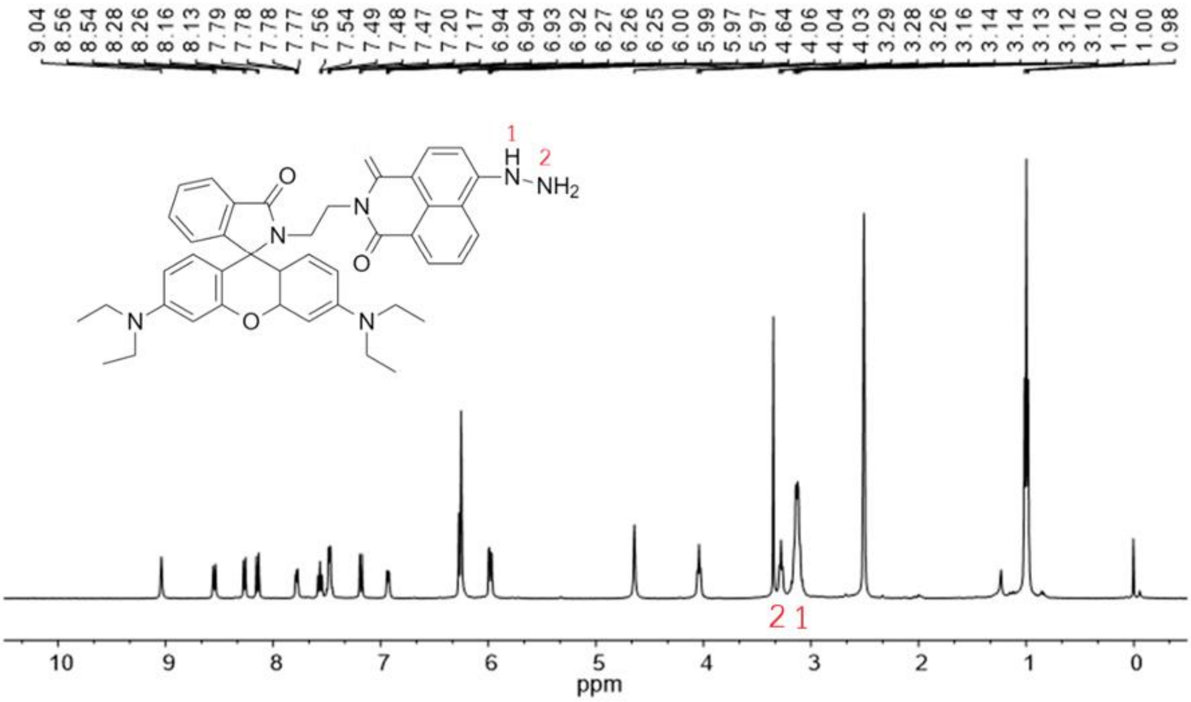


ภาพที่ 3.5 กลไกการสังเคราะห์ RBNA probe ขั้นที่ 3 (RBNA probe)



ภาพที่ 3.6 การจัดตั้งอุปกรณ์การสังเคราะห์ RBNA probe ขั้นที่ 3 (a) ขวดก้นกลม 2 คอต่อกับคอนเด็นเซอร์ (b) ขวดก้นกลม 2 คอ

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารประกอบ RBNA probe ด้วยเทคนิค Nuclear magnetic resonance spectroscopy หรือ ^{1}H-NMR ได้สปกตรัมของ RBNA probe ดังภาพที่ 3.7 เมื่อเปรียบเทียบ ^{1}H-NMR ของ RBNA probe (ภาพที่ 3.8) กับ ^{1}H-NMR ของ สารประกอบ2 (ภาพที่ 3.4) พบสัญญาณที่ 3.11 และ 3.28 ppm ของโปรตอนที่ไนโตรเจนตำแหน่งที่ 1 และ 2 (ภาพที่ 3.7) ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่าสามารถสังเคราะห์ RBNA probe (มวลโมเลกุล 694.83 g/mol) ได้

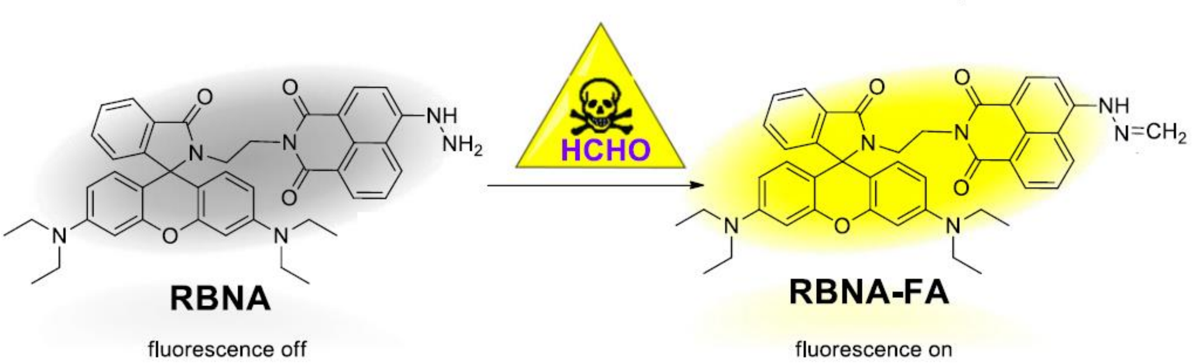


ภาพที่ 3.7 ^{1}H-NMR ของ RBNA probe ในสารละลาย DMSO

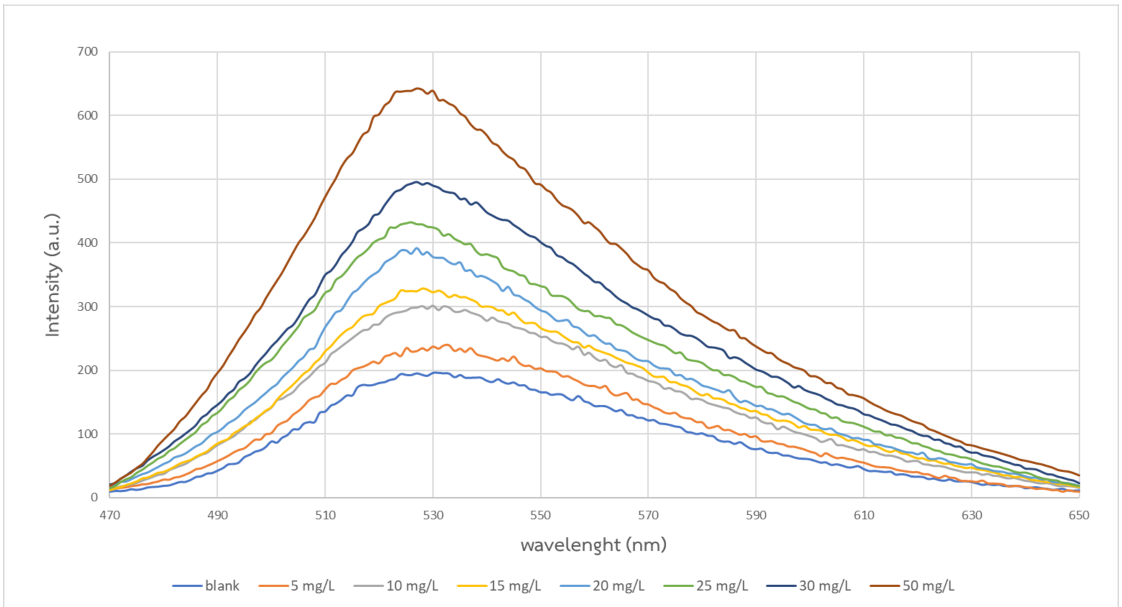
3.2 การตรวจวัดฟอร์มาลดีไฮด์ด้วย RBNA probe ในรูปแบบสารละลาย

3.2.1 Spectral Response ของ RBNA probe ต่อฟอร์มาลดีไฮด์

RBNA probe ทำปฏิกิริยากับฟอร์มาลดีไฮด์ ฟอร์มาลดีไฮด์จะทำการยับยั้งกระบวนการ photo-induced electron transfer (PET) ระหว่าง Hydrazine กับอนุพันธ์ของ Rhodamine B จะพบว่าสัญญาณที่ความยาวคลื่น 525 nm (λex=446 nm, λ_{em}= 525 nm) มีความเข้มของการเรืองแสงเพิ่มขึ้น ซึ่งสัมพันธ์กับความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์ที่เพิ่มขึ้น ดังภาพที่ 3.9



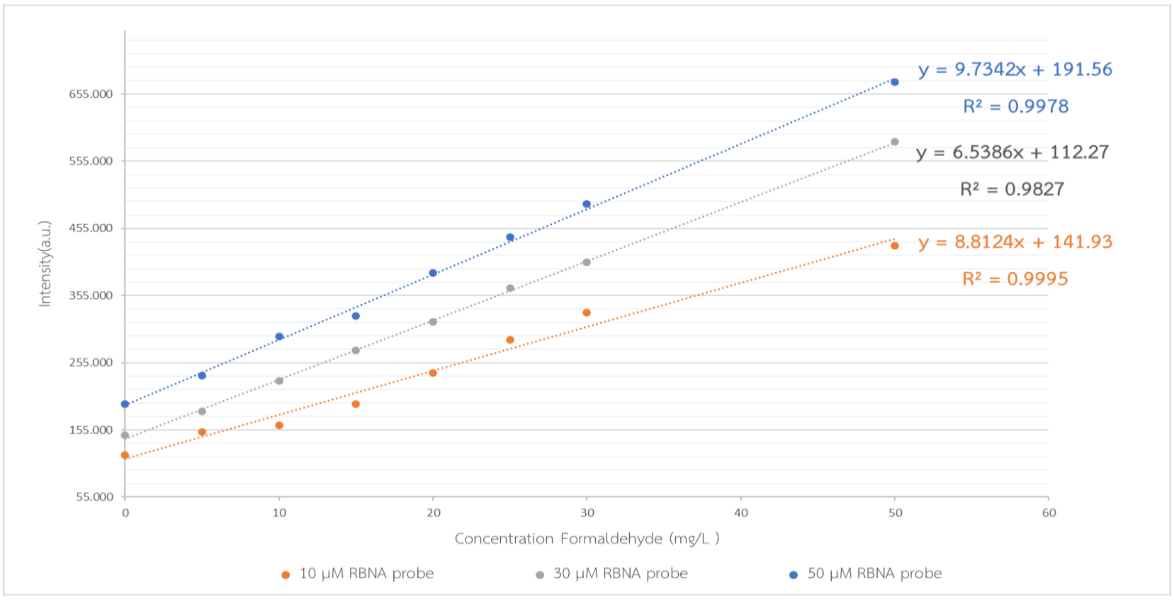
ภาพที่ 3.8 กลไกการตรวจวัดฟอร์มาลดีไฮด์ ด้วย RBNA probe



ภาพที่ 3.9 สเปกตรัมการตรวจวัดฟอร์มาลดีไฮด์ด้วย 50 μM RBNA probe (λ_{ex}=446 nm, λ_{em}=525 nm)

3.2.2 การหาความเข้มข้นของ RBNA probe ที่เหมาะสมในการตรวจวัดฟอร์มาลดีไฮด์

หาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ RBNA probe ในการตรวจวัดฟอร์มาลดีไฮด์ โดยพิจารณาจากสัญญาน fluorescence ของ RBNA probe ที่ทำปฏิกิริยากับฟอร์มาลดีไฮด์ช่วงความเข้มข้น 0 - 50 mg/L (ppm) โดยใช้เครื่อง Fluorescence spectrometer ที่ λ_{ex} = 446 nm และสแกน λ_{em} ในช่วงความยาวคลื่น 470 – 650 nm โดย fluorescence ที่เกิดขึ้นแปรผันกับความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์ที่ทำปฏิกิริยา คือเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์ พีคที่ 525 nm จะสูงขึ้น และเมื่อเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์กับสัญญาน fluorescence ที่ความยาวคลื่น 525 nm (λ_{em}) ของ RBNA probe ที่ความเข้มข้น 10, 30, 50 μM ได้กราฟดังภาพที่ 3.10 ซึ่งมีความเป็นเส้นตรงทั้ง 3 ระดับความเข้มข้นของ RBNA probe



ภาพที่ 3.10 กราฟมาตรฐานของการตรวจวัดปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ด้วย RBNA probe

จากกราฟในภาพที่ 3.10 พบว่า RBNA probe ความเข้มข้น 50 µM ให้กราฟที่มีความชันมากที่สุด แสดงถึงประสิทธิภาพและความไว (Sensitivity) ในการตรวจวัดมากกว่าที่ความเข้มข้น 10 µM และ 30 µM และหากความเข้มข้นของ RBNA probe มากกว่า 50 µM คาดว่าจะไม่เหมาะสำหรับการตรวจวัดปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ ช่วงความเข้มข้น 0-50 mg/L แต่จะเหมาะสมกับช่วงความเข้มข้นฟอร์มาลดีไฮด์ที่สูงขึ้น ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของ RBNA probe ที่ 50 µM ในการทดสอบบนอุปกรณ์ฐานกระดาษ (paper-based device)

3.2.3 Limit of detection (LOD) และ Limit of quantitative (LOQ) ของการตรวจวัดในรูปแบบสารละลาย

จากกราฟในภาพ 3.10 คำนวนหาค่า Limit of detection (LOD) และ Limit of quantitative (LOQ) ของการตรวจวัดฟอร์มาลดีไฮด์ด้วย RBNA probe (ความเข้มข้น 50 µM) ในรูปแบบสารละลายได้เท่ากับ 0.545 mg/L และ 1.652 mg/L ตามลำดับ ซึ่งเพียงพอต่อการตรวจวัดฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารตามเกณฑ์กฎหมาย ดังตารางที่ 1.5

Limit of detection (LOD) = 3.3 x (slope/S.D.)

Limit of quantitation (LOQ) = 10 x (slope/S.D.)

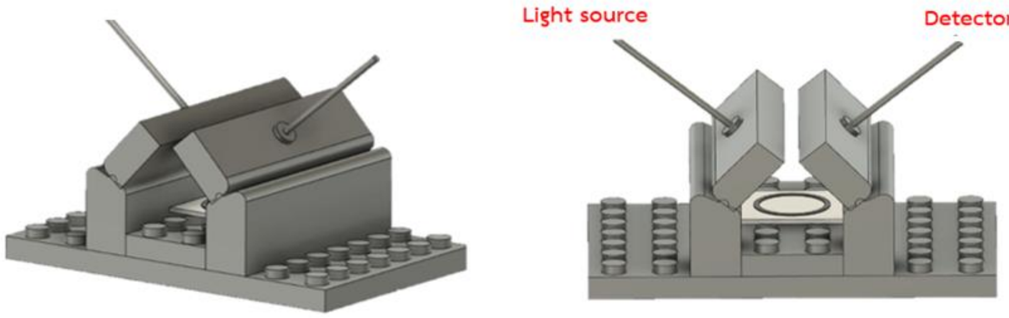
3.3 การตรวจวัดฟอร์มาลดีไฮด์ด้วย RBNA probe บนอุปกรณ์ฐานกระดาษ (paper-based device)

3.3.1 การออกแบบระบบตรวจจับการเรืองแสงแบบประดิษฐ์เอง (Homemade fluorescence detection system) บนอุปกรณ์ฐานกระดาษ

การออกแบบระบบตรวจจับการเรืองแสงแบบประดิษฐ์เอง (Homemade fluorescence detection system) บนอุปกรณ์ฐานกระดาษ (paper-based device) เพื่อให้สะดวกต่อการตรวจวัดหาปริมาณ ส่วนประกอบหลักของตัวตรวจวัด ประกอบด้วย

1) แหล่งกำเนิดแสง (Light source) โดยออกแบบใช้หลอด LED ซึ่งมีขนาดเล็กและสามารถให้แสง ความยาวคลื่นที่สามารถกระตุ้น RBNA probe ได้ โดยการทดลองนี้ใช้ LED 452 nm
2) ตัวตรวจวัด (Detector) เลือกใช้ portable USB2000+ spectrometer ในการเป็นตัวตรวจวัดแสงที่ปล่อยออกมา โดยสแกนช่วงความยาวคลื่น 180-780 nm
3) กระดาษ (Paper-based) เลือกใช้กระดาษกรอง (filter paper) ที่มี RBNA probe

การวางองค์ประกอบต่างๆของระบบตรวจจับการเรืองแสงแบบประดิษฐ์เอง (Homemade fluorescence detection system) เพื่อตรวจวัดฟอร์มาลดีไฮด์บนอุปกรณ์ฐานกระดาษ แสดงดังภาพที่ 3.11 โดยจัดวางให้ตัวตรวจวัดและแหล่งกำเนิดแสงทำมุม 90° ซึ่งสามารถตรวจวัดการเรืองแสง fluorescence ได้ดีที่สุด เนื่องจากเป็นมุมที่มีการกระเจิงแสง fluorescence น้อยที่สุด



ภาพที่ 3.11 แบบจำลองระบบตรวจจับการเรืองแสงแบบประดิษฐ์เอง

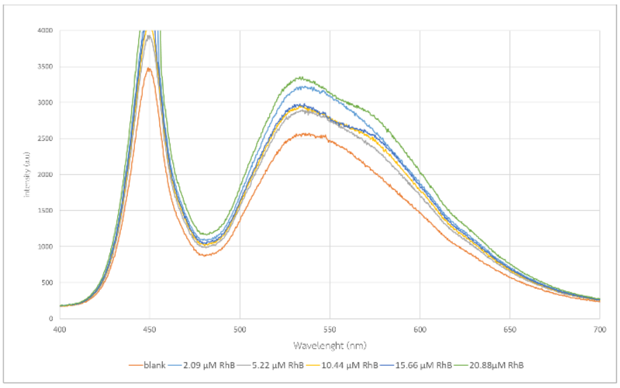
จากการทดสอบตรวจวัดสัญญาณ fluorescence ของปฏิกิริยาระหว่าง RBNA probe (50 µM) กับฟอร์มาลดีไฮด์ (50 mg/L) บนอุปกรณ์ฐานกระดาษ พบว่า ไม่สามารถตรวจวัดได้ เนื่องจากไม่พบสัญญาณที่ความยาวคลื่น 525 nm อาจมีสาเหตุ ดังต่อไปนี้

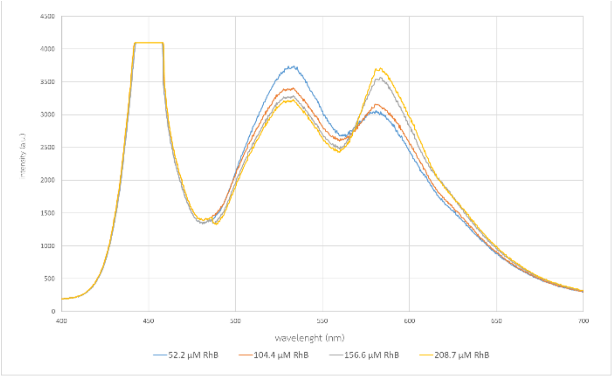
1) การจัดวางส่วนประกอบของอุปกรณ์ที่ออกแบบไม่เหมาะสม
2) เกิดจากแหล่งกำเนิดแสงที่ใช้เป็น LED 453 nm (ใกล้เคียงกับความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้น RBNA probe) เนื่องจาก LED จะให้แสงในช่วงที่จำเพาะ ช่วงความยาวคลื่นแคบๆ ทำให้พลังงานที่ได้จาก LED มีช่วงความยาวคลื่นไม่เหมาะสมต่อการกระตุ้น RBNA probe ให้เกิดการเรืองแสงขึ้น
3) ตัวตรวจวัด (detector) มีกำลังขยายสัญญาณไม่เพียงพอเทียบเท่าเครื่องฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์จึงไม่เห็นสัญญาณการตรวจวัด

ดังนั้นจึงทำการทดสอบความใช้ได้ของอุปกรณ์ที่ออกแบบ (Homemade fluorescence detection system for paper-based device) ด้วย Rhodamine B ซึ่งเป็นสารที่ให้ fluorescence ที่สูง

3.3.2 ทดสอบความใช้ได้ของระบบตรวจจับการเรืองแสงแบบประดิษฐ์เอง (Homemade fluorescence detection system)

ทำการทดสอบความใช้ได้ของอระบบตรวจจับการเรืองแสงแบบประดิษฐ์เองด้วยสารละลายมาตรฐาน Rhodamine B โดย Rhodamine B เนื่องจากเป็นสารที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์สูง ใช้ความยาวคลื่นของการกระตุ้น (λ_{ex}) ที่ 510 nm และเปล่งแสงที่ความยาวคลื่น 580 nm โดยทำการตรวจวัด Rhodamine B ที่ความเข้มข้นสูง (ช่วงความเข้มข้น 52.2-209 µM) และที่ความเข้มข้นต่ำ (ช่วงความเข้มข้น 2.09-20.9 µM) ได้สเปกตรัมของการตรวจวัด ดังภาพที่ 3.12



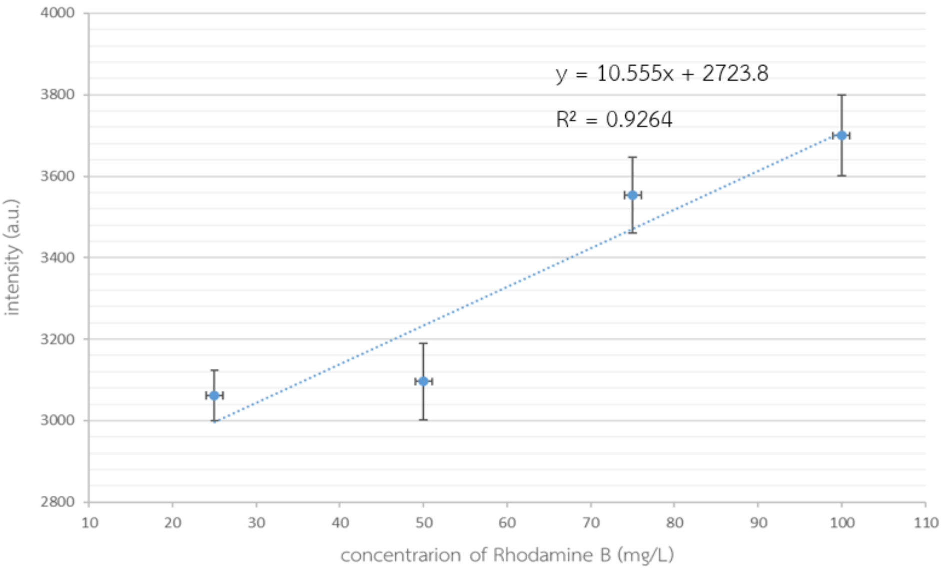


(a) Rhodamine B ความเข้มข้นต่ำ (b) Rhodamine B ความเข้มข้นสูง

ภาพที่ 3.12 สเปกตรัมของ Rhodamine B จากการตรวจวัดด้วย Homemade fluorescence detection system for paper-based device ที่ (a) ความเข้มข้นต่ำ (b) ความเข้มข้นสูง

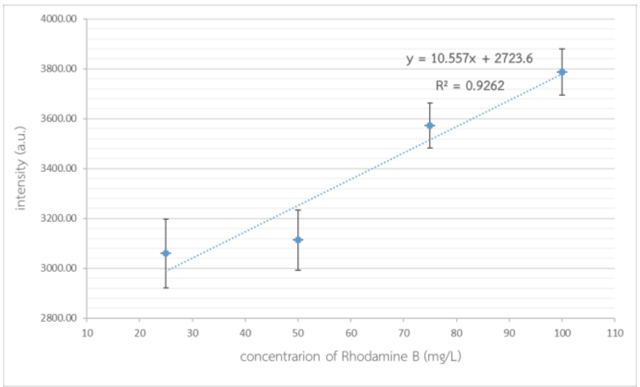
การตรวจวัดสาร Rhodamine B ที่ความเข้มข้นสูง บนอุปกรณ์ฐานกระดาษ ด้วย Homemade fluorescence detection system พบว่าสามารถตรวจวัดได้ ดังภาพที่ 3.12(b) เนื่องจากเห็นจุดสูงสุดของพีคที่ 580 nm แต่ที่ช่วงความเข้มข้นต่ำ (ภาพที่ 3.12(a)) ไม่สามารถตรวจวัดได้ เนื่องจาก พีคที่ความยาวคลื่น 520 nm ของแหล่งกำเนิดแสง เกิดการ overlap กับพีคความยาวคลื่น 580 nm ที่ Rhodamine B ให้แสงฟลูออเรสเซนซ์ ทำให้ไม่สามารถตรวจวัดได้

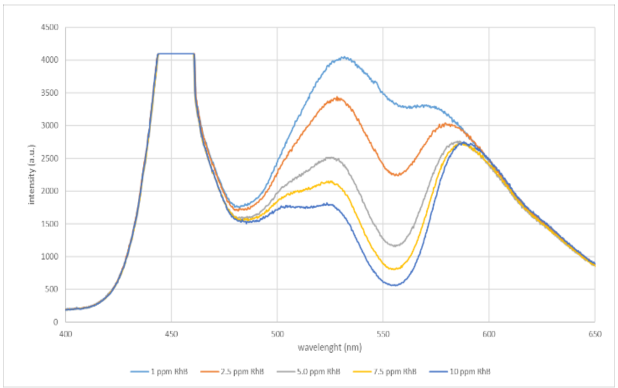
นำสัญญาณที่ตรวจวัดได้ในช่วงความเข้มข้นสูงมาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นสารละลาย Rhodamine B กับสัญญาณการตรวจวัด ได้ความสัมพันธ์ในรูปแบบเส้นตรงที่ดี (R^2=0.9264) และให้ค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.484 mg/L และ 1.466 mg/L ตามลำดับ



ภาพที่ 3.13 กราฟมาตรฐาน ของ Rhodamine B ความเข้มข้นสูง

เมื่อเปรียบเทียบการตรวจวัด Rhodamine B บนอุปกรณ์ฐานกระดาษด้วย Homemade fluorescence detection system กับการตรวจวัดสารละลายมาตรฐาน Rhodamine B ช่วงความเข้มข้น 1.0-10 ppm โดยใช้แหล่งกำเนิดแสงและตัวตรวจวัดที่ใช้ใน Homemade fluorescence detection system (ภาพที่ 3.11) พบว่า การตรวจวัดในรูปแบบสารละลายให้สัญญาณพีคที่ชัดเจนมากกว่าการตรวจวัดบนอุปกรณ์ฐานกระดาษ เนื่องจากการตรวจวัดในรูปแบบสารละลาย (2 mL) มีปริมาณของสาร มากกว่า ปริมาณสารบนอุปกรณ์ฐานกระดาษ (10 µL) ทำให้ความเข้มแสงของแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เปล่งออกมามีความเข้มแสงมากกว่า ทำให้เห็นจุดสูงสุดของพีคที่เปล่งชัดเจนขึ้น





(a) กราฟความสัมพันธ์ของ Rhodamine B (b) สเปกตรัม ของ Rhodamine B ในสารละลาย

ภาพที่ 3.14 กราฟความสัมพันธ์และสเปกตรัม(spectrum) ของ Rhodamine B ที่ความเข้มข้นต่ำในรูปสารละลาย

บทที่ 4
สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้สังเคราะห์ตัวตรวจวัดเรืองแสง ชนิด Hydrazinyl naphthalimide-based fluorescent probe หรือ RBNA probe เพื่อใช้ในการตรวจวัดหาปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ เมื่อ RBNA probe ทำปฏิกิริยากับฟอร์มาลดีไฮด์ และถูกกระตุ้นที่ ความยาวคลื่น 446 nm (λex = 446 nm) แล้วเกิดการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ณ ความยาวคลื่น 525 nm (λem = 525 nm)

ทดสอบด้วยเครื่องฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์หาความเข้มข้นของ RBNA probe ที่ให้ประสิทธิภาพในการตรวจวัดดีที่สุด พิจารณาความเข้มข้น 10, 30, 50 µM RBNA probe กับ 0 - 50 ppm ฟอร์มาลดีไฮด์ ตรวจวัดโดยใช้เครื่อง Fluorescence spectrometer พบว่า 50 µM RBNA probe ให้ประสิทธิภาพในการตรวจวัดดีที่สุด

ทดสอบ 50 µM RBNA probe กับ 0 - 50 ppm ฟอร์มาลดีไฮด์ บนอุปกรณ์ อุปกรณ์การวิเคราะห์บนกระดาษ (Paper-based Analytical Device) โดยใช้ Detection fluorescence paper-based system เป็นตัวตรวจวัด พบว่า ไม่สามารถตรวจวัดได้ เนื่องจากประสิทธิภาพของการตรวจวัดผ่าน Detection fluorescence paper-based system ไม่เพียงพอต่อการตรวจวัด หรือ Light source มีพลังงงานไม่เพียงพอที่จะกระตุ้นให้ RBNA probe เกิดแสงฟลูออเรสเซนส์

ทดสอบความใช้ได้ของ Detection fluorescence paper-based system โดยใช้สารละลายมาตราฐาน Rhodamine B 2 ช่วงความเข้มข้น พบว่า สามารถตรวจวัดRhodamine B ที่ช่วงความเข้มข้นสูง (25-100 mg/L) ได้ แต่ไม่สามารถตรวจวัด Rhodamine B ช่วงความเข้มข้น 1.0-10 ppm (ความเข้มข้นต่ำ) เพราะเกิดการซ้อนทับของพีค fluorescence กับพีคของแหล่งกำเนิด ทำให้ไม่เห็นพีคที่ 580 nm จากนั้น

ข้อเสนอแนะ

1) ศึกษาการตรวจวัดฟอร์มาลดีไฮด์ด้วยตัวตรวจวัดเรืองแสงชนิดอื่น และเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจวัด โดยใช้ Detection fluorescence paper-based system
2) ออกแบบอุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจวัด เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ให้สูงขึ้น

-

เอกสารอ้างอิง

1. Chemical Knowledge Platform. ข้อมูลสารเคมีของฟอร์มาลดีไฮด์. Available from URL: www.chemtrack.org/MSDSSG/Trf/msdst/msdst50-00-0.html (accessed15.12.2004)
2. ผศ.ดร.พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์,ศาสตราจารย์เกียรติคุณ ดร.นิธิยา รัตนาปนนท์. ฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหาร. Available from URL: www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2030 /formaldehyde.
3. ประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 151 (พ.ศ.2536) เรื่อง กำหนดวัตถุที่ห้ามใช้ในอาหาร ประกาศ ณ วันที่ 28 ธันวาคม พ.ศ.2536, ราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศทั่วไป เล่ม 111 ตอนพิเศษ 9ง ลงวันที่ 4 กุมภาพันธ์ พ.ศ.2537
4. Centre for Food Safety. Formaldehyde in Food. Available from URL: www.cfs.gov.hk /english/programme/ (accessed 16.06.2017)
5. ฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหาร. สำนักพิมพ์ บริษัท ศูนย์การพิมพ์แก่นจันทร์ จำกัด, กรุงเทพมหานครฯ. พิมพ์ครั้งที่ 1, หน้า 30
6. Masoud Shariati-Rad, Mohsen Irandoust. Response surface methodology in spectrophoto-metric determination of formaldehyde using chromotropic acid. Analytical and Bioanalytical chemistry research 2016, 3, 149-157.
7. Janet Walkley Cares. Determination of Formaldehyde by the Chromotropic Acid Method in the Presence of Oxides of Nitrogen. American Industrial Hygiene Association Journal 2007, 29, 405-410
8. Chung-An Chen, Peng-Wei Wang, Yu-Chun Yen, Hsin-Lan Lin, Yao-Chung Fan , Shou-Mei Wu, Chien-Fu Chen. Fast analysis of ketamine using a colorimetric immunosorbent assay on a paper-based analytical device. Sensors and Actuators B: Chemical. Elsevier Journal, 2019, 282, 251-258
9. Wu Y., Chen Q., Zhao L., Du D., Guo N., Ren H., Liu W. Spectrofluorometric method for the determination of ascorbic acid in pharmaceutical preparation using l-tyrosine as fluorescence probe. Luminescence, 2020, 35, 7, 1092-1100
10. กรมโรงงานอุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม. คู่มือการจัดการสารเคมีอันตรายสูง ฟอร์มาลดีไฮด์ (Formaldehyde). Available from URL: http://php:diw. go.th/ safety/
11. Safety Data Sheet. Formaldehyde, 37% w/w. Available from URL:http://www.labchem.com /tools/msds/msds/VT310.pdf (accessed 27.02.2004)
12. International Agency for Research on Cancer. Formaldehyde, 2- butoxyethanol and 1-tert-Butoxypropan-2-ol. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 2006, 88, 39-325
13. International Agency for Research on Cancer. Formaldehyde, 2- butoxyethanol and 1-tert-Butoxypropan-2-ol. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 2006, 88, 39-325

14. Food Safety Commission of Japan (FSCJ), Risk Assessment report Formaldehyde(Beverages). Available from URL:http://www.fsc.go.jp/english/ evaluationreports/chemicals/formaldehyde_acid_fs424_2008. pdf.
15. European Parliament and Council. Food additives other than colours and sweetners. Off. J. Eur. Communities 1995, 61, 1-40.
16. Yeh T-S, Lin T-C, Chen C-C, Wen H-M. Analysis of free and bound formaldehyde in squid and squid products by gas chromatography-mass spectrometry. J Food Drug Anal, 2013, 21, 190-7
17. Zhang X, Shen X, Wang Y, Cai Y, Huang D. The research progress of detection method of formaldehyde in food. Available from URL: http://www.atllantis-press.com /proceedings /iccte-17/25878899.
18. Ministry of Health of China Standardization Administration of China. Standard for Drinking Water Quality. Available from URL: https://www.aqsiq.net /pdf/China_GB_5749-2006_Standards_for_Drinking_Water_Quality.pdf
19. USDA Foreign Agricultual Service. China-Peoples Republic of National Food Safety Standard -Fermented Alcoholic Beverage. Available from URL: https://apps.fas. usda.gov/newgainapi
20. HORIBA. Fluorescence Spectroscopy. Available from URL: https://www.horiba.com/en_en /technology/measurement-and controltechniques/spectroscopy/
21. หน่วยบริการนวัตกรรมทางวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา. Instrurment of Fluorescence Spectroscopy. Available from URL: http://science.buu.ac.th/part/sifbuu/index.php/laboratory-instruments.html
22. Natchanon Taprab, Yupaporn Sameenoi. Rapid screening of formaldehyde in food using paper-based titration. Analytica Chimica Acta, 2019, 1069, 66-72
23. ผศ.ดร.วรวิทย์ จันทร์สุวรรณ, หลักหารวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือโดยการสร้างกราฟมาตรฐาน (Instrumental Analysis based on Calibration Method). Available from URL: https://web.rmutp.ac.th /woravith/upload/AnalChem/calibration
24. จุไรรัตน์ มหาเทียน. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (method validation). Available from URL: http://reo06.mnre.go.th/
25. Y L Li, W X Wang, Y Wang, W B Zhang, H M Gong, M X Liu. Synthesis and Characterization of Rhodamine Bethylenediamine-hyaluronan Acid as Potential Biological Functional Materials. Materials Science and Engineering, 2018, 359
26. Cuicui Wang, Yaqi Liu, Junye Cheng, Jianhua Song, Yufen Zhao, Yong Ye. Efficient FRET-based fuorescent ratiometric chemosensorsfor Fe3þand its application in living cells. Journal of Luminescence, 2015, 157, 143-148

27. Lirong Jiang, Qiao Hu, Tianhong Chen, Douyong Min, Hou-Qun Yuan, Guang-Ming Bao. Highly sensitive and rapid responsive fluorescence probe for determination of formaldehyde in seafood and in vivo imaging application. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2020, 228, 117789
28. Ge Hongwei, Liu Guoqiang, Yin Ranhao, Sun Zhenli, Chen Hongxia, Yu Long, Su Pengchen, Sun Mingtai, Khalid A. Alamry, Hadi M. Marwani, Wang Suhu. An aldimine condensation reaction based fluorescence enhancement probefor detection of gaseous formaldehyde. Microchemical Journal, 2020, 156, 104793
29. Junchao Xu, Yue Zhang, Lintao Zeng, Jinbiao Liu, Joseph M. Kinsella, Ruilong Sheng. A simple naphthalene-based fluorescent probe for high selective detection of formaldehyde in toffees and HeLa cells via aza-Cope reaction. Talanta, 2016, 160, 645-652
30. Chang Liu, Xiaojie Jiao, Song He, Liancheng Zhao, Xianshun Zeng. A reaction-based fluorescent probe for the selective detection of formaldehyde and methylglyoxal via distinct emission patterns. Dyes and Pigments, 2017, 138, 23-29
31. Chunxia Liu, Caixia Shi, Haixia Li, Weiwei Du, Zhanxian Li, Liuhe Wei, Mingming Yu. Nanomolar fluorescent quantitative detection of formaldehyde with a 8-hydroxyquinoline derivative in aqueous solution and electrospun nanofibers. Sensors and Actuators B: Chemical, 2015, 219, 185-191

ภาคผนวก

ตารางที่ ก1 การไทเทรตและการคำนวนหาความเข้มข้น 0.1 M HCl

ครั้งที่	ปริมาณ HCl ที่ใช้ (mL)	ปริมาณ $NaHCO_3$ ที่ใช้ (mL)		
		เริ่มต้น	สิ้นสุด	ใช้
1	10.00	0.00	10.30	10.30
2	10.00	10.50	20.85	10.35
3	10.00	0.00	10.30	10.30
			เฉลี่ย	10.32

การคำนวนหาความเข้มข้น

$$\frac{mol}{L}\ HCl = \frac{0.1 mol\ NaHCO_3}{1000\ mL\ NaHCO_3} \times 10.32\ mL\ NaHCO_3 \times \frac{1\ mol\ HCl}{1\ mol\ NaHCO_3} \times \frac{1}{0.010\ L}$$

$$= 0.1032\ M\ HCl$$

ตารางที่ ก.2 การไทเทรตและการคำนวนหาความเข้มข้น Formaldehyde(FA)

ครั้งที่	ปริมาณ และ pH Na_2SO_4	ปริมาณที่เติม FA และ pH หลังเติม	pH หลังไทเทรต	ปริมาตร HCl (mL)		
				เริ่มต้น	สิ้นสุด	ใช้
1	10.00 mL pH = 9.31	10.00 mL pH = 11.62	9.29	1.00	4.20	3.20
2	10.00 mL pH = 9.32	10.00 mL pH = 11.60	9.33	4.50	7.70	3.20
3	10.00 mL pH = 9.31	10.00 mL pH = 11.63	9.30	8.00	11.20	3.20
				เฉลี่ย (mL)		3.20

การคำนวนหาความเข้มข้น Formaldehyde(FA)

$$\frac{\mathrm{mg}}{\mathrm{mL}} FA = \frac{(\mathrm{V_{HCl}}\ ,\mathrm{mL})(\mathrm{C_{HCl}},\mathrm{M}) \times 30.03}{(\mathrm{V_{FA}},\mathrm{mL})}$$

$$= \frac{(3.20)(0.1032\ ) \times 30.03}{10.00} = 0.992\ \mathrm{mg/mL} = 992\ \mathrm{ppm\ FA}$$

ตารางที่ ก.3 การเตรียม 10, 30, 50 µM RBNA probe

สารที่ต้องการเตรียม	Stock solution		ปริมาตรสุทธิ (mL)
	สาร	ปริมาตรที่ใช้ (mL)	
1 mM RBNA probe	25.47 mM RBNA probe	0.625	250.00
10 µM RBNA probe	1 mM RBNA probe	2.020	20.00
30 µM RBNA probe	1 mM RBNA probe	5.000	10.00
50 µM RBNA probe	1 mM RBNA probe	3.000	10.00

ตารางที่ ก.4 การเตรียมสารมาตรฐานฟอร์มาลดีไฮด์

สารที่ต้องการเตรียม	Stock solution		ปริมาตรสุทธิ (mL)
	สาร	ปริมาตรที่ใช้ (mL)	
992 ppm FA	40% (v/v) FA	0.625	250.00
100 ppm FA	992 ppm FA	2.020	20.00
50 ppm FA	100 ppm FA	5.000	10.00
30 ppm FA	100 ppm FA	3.000	10.00
25 ppm FA	100 ppm FA	2.500	10.00
20 ppm FA	100 ppm FA	2.000	10.00
15 ppm FA	100 ppm FA	1.500	10.00
10 ppm FA	100 ppm FA	1.000	10.00
5 ppm FA	100 ppm FA	0.500	10.00

ตารางที่ ก.5 สัญญาณการตรวจวัด Formaldehyde ด้วย RBNA probe ที่ความยาวคลื่น 525 nm ใช้เครื่อง Fluorescence spectrometer

10 µM RBNA probe		30 µM RBNA probe		50 µM RBNA probe	
Conc.FA	intensity	Conc.FA	intensity	Conc.FA	intensity
0	117.163	0	147.317	0	192.994
5	151.858	5	182.759	5	235.537
10	162.301	10	228.273	10	293.959
15	193.297	15	273.338	15	324.193
20	239.725	20	315.491	20	389.193
25	289.387	25	365.825	25	441.846
30	329.124	30	404.551	30	490.841
50	428.775	50	583.789	50	672.762

ตารางที่ ก.6 สัญญาณของการตรวจวัด Rhodamine B ความเข้มข้นสูง ที่ความยาวคลื่น 580 nm ใช้อุปกรณ์การตรวจวัด fluorescence บนอุปกรณ์ฐานกระดาษ

ความเข้มข้น	Intensity (a.u.)				
Rhodamine B	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	S.D.
25	2917.50	3071.00	3192.50	3060.33	137.81
50	2980.50	3143.00	3216.50	3113.33	120.76
75	3573.00	3483.50	3662.50	3573.00	89.50
100	3704.00	3769.50	3887.00	3786.83	92.72

ตารางที่ ก.7 สัญญาณของการตรวจวัด Rhodamine B ความเข้มข้นต่ำ ที่ความยาวคลื่น 580 nm ใช้อุปกรณ์การตรวจวัด fluorescence ในรูปสารละลาย

ความเข้มข้น	Intensity (a.u.)				
Rhodamine B	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	S.D.
1.00	2627.5	2743	2852.5	2741	112.5133
2.50	2891	2913	3059.5	2954.5	91.59558
5.00	3156	3201	3303	3220	75.31932
7.50	3304.5	3527	3503.5	3445	122.2426
10.00	3829.5	3642	3598.5	3690	122.7528

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวณัฏฐาภรณ์ ทองวัฒนา เกิดเมื่อวันที่ 20 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2541 ที่จังหวัด อุทัยธานี สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนหนองฉางวิทยา จังหวัด อุทัยธานี เมื่อปีการศึกษา 2559 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2560 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 61 ตำบลหนองสระ อำเภอทัพทัน จังหวัดอุทัยธานี รหัสไปรษณีย์ 61120 อีเมล o.natthaporn2541@gmail.com