

การพัฒนาวิธีตรวจวัดปริมาณสารหนูในน้ำด้วยเทคนิคการตรวจวัดสีโดยใช้ออนุภาคเงินนาโน

ภัทรกร ปรกาศพิชญ์^{1*}, ทิพย์วรรณ รุ่งสว่าง¹ และบุญเดช เบิกฟ้า¹

¹ภาควิชาวิทยาศาสตร์กายภาพและวัสดุศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
*phattharakorn.p@ku.th

บทคัดย่อ

การปนเปื้อนของสารหนู (Arsenic, As) ในสิ่งแวดล้อมส่งผลกระทบต่อร่างกายและเป็นสาเหตุของการเกิดโรค โดยเฉพาะโรคมะเร็งผิวหนัง สารหนูที่ปนเปื้อนในน้ำผิวดินส่วนใหญ่พบได้สองรูปแบบ คือ As(III) และ As(V) เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของสารหนูในน้ำ งานวิจัยนี้มุ่งเน้นพัฒนาวิธีตรวจวัดปริมาณสารหนูด้วยวิธีตรวจวัดสี (Colorimetric method) ด้วยอนุภาคเงินนาโน (AgNPs) ที่ดัดแปลง โดยการสังเคราะห์ AgNPs ด้วยปฏิกิริยารีดักชัน ทำการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมสำหรับตรวจจับสารหนู พบว่า AgNPs ที่ดัดแปลงโดยใช้ L-Cysteine เข้มข้น 0.001 โมลาร์ ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 10 นาทีที่เหมาะสมที่สุด โดยสีของสารละลาย AgNPs เปลี่ยนจากเหลืองไปเป็นชมพูม่วงซึ่งสอดคล้องกับค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนจาก 402 ไปเป็น 522 nm จากการศึกษาอันตรกิริยาของ Cysteine บน As(III) ที่อยู่เหนือ Ag₄ คลัสเตอร์ ด้วยทฤษฎีฟังก์ชันนอลความหนาแน่น (DFT) โดยใช้ M06-L ชุดฟังก์ชันพื้นฐาน 6-311+G(2df,2p) และ LANL2TZ พบว่าพันธะที่เกิดขึ้นคือ As-Ag และ S-As พลังงานการดูดซับที่คำนวณได้มีค่าเท่ากับ -16.1 และ -23.7 kcal/mol ตามลำดับ การวิเคราะห์พันธะ (NBO) พบว่า พันธะ As-Ag และ As-S มีพลังงานเท่ากับ -0.50036 และ -0.50281 eV ตามลำดับ คำนวณสถานะกระตุ้นของสารเชิงซ้อนด้วย TD-DFT พบว่าความยาวคลื่นสำหรับสภาวะกระตุ้นครั้งแรกคำนวณได้เท่ากับ 723.6 nm ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้เป็นวิธีตรวจวัดปริมาณสารหนูในตัวอย่างน้ำได้

คำสำคัญ: สารหนู การตรวจวัดสี อนุภาคเงินนาโน ทฤษฎีฟังก์ชันนอลความหนาแน่น

Development of colorimetric method for arsenic determination in water using silver nanoparticles

Phattharakorn Pakaihuek^{1*}, Tipawan Rungsawang¹ and Bundet Boekfa¹

¹Department of Physical and Material Sciences, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University (Kamphaeng Saen Campus)

*phattharakorn.p@ku.th

Abstract

Arsenic contamination in the environment affects the body and causes disease, especially skin cancer. Arsenic contamination in the surface water is mainly found in two forms: As(III) and As(V). To monitor for arsenic in water, we have developed a colorimetric method for arsenic measurement using modified silver nanoparticles (AgNPs). With synthesizing AgNPs by a reduction reaction and optimization condition study for arsenic detection, AgNPs modified with *L*-Cysteine as a ligand were found to be the most suitable as reaction time at 10 minutes. The color solution of AgNPs changed from yellow to purplish pink, this corresponds to the absorption peak intensity decrease to redshift from 402 to 522 nm. The interaction of Cysteine on As(III) on Ag₄ cluster was calculated with the M06-L density functional theory. The basis set was 6-311+G(2df,2p) and LANL2TZ. The As-Ag and S-As bonds were calculated, the adsorption energies were -16.1 and -23.7 kcal/mol, respectively. The NBO analysis found that the As-Ag and As-S bonds have energies of -0.50036 and -0.50281 eV, respectively. The excited states of complexes were calculated with TD-DFT. The wavelength for the first excited states was calculated to be 723.6 nm. The results of this study indicate that the developed method can be used for measuring arsenic content in water samples.

Keywords: Arsenic, Colorimetric method, Silver nanoparticles, Density functional theory

1. บทนำ

สารหนู (Arsenic, As) เป็นโลหะมีพิษที่พบได้ตามธรรมชาติในเปลือกโลก ปัญหาการปนเปื้อนของสารหนูในสิ่งแวดล้อมเป็นปัญหาสำคัญที่องค์กรระดับโลกอย่าง WHO และ USEPA ให้ความสนใจ โดยสารหนูส่งผลกระทบต่อร่างกาย ทั้งระบบประสาท ระบบทางเดินอาหาร ปอด และเป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรคมะเร็งผิวหนัง สารหนูมีทั้งที่เป็นสารหนูอนินทรีย์และสารหนูอินทรีย์ สารหนูในรูปธาตุบริสุทธิ์และสารประกอบอนินทรีย์จะมีความเป็นพิษมากกว่าสารหนูในรูปสารประกอบอินทรีย์ สารหนูที่ปนเปื้อนในน้ำผิวดินส่วนใหญ่เป็นสารหนูอนินทรีย์มี 2 รูป คือ As(III) และ As(V) โดย As(III) จะมีพิษมากกว่า As(V) ปัจจุบันการตรวจวัดปริมาณสารหนูสามารถทำได้แบบเรียลไทม์ มีการนำโลหะนาโนมาดัดแปลงเพื่อพัฒนาวิธีตรวจวัด ที่น่าสนใจคืออนุภาคเงินนาโน (Silver nanoparticles, AgNPs) โดย AgNPs มีสมบัติเชิงแสงที่เรียกว่า Local surface plasmon resonance (LSPR) เกิดขึ้นเมื่อแสง (ซึ่งมีความยาวคลื่น) ตกกระทบบนอนุภาคนาโนโลหะทำให้พลาสมาของอิเล็กตรอนนำไฟฟ้าเกิดการสั่นคลอนรวมกัน ความถี่ของ LSPR ค่อนข้างว่องไวต่อลักษณะเฉพาะของอนุภาค ทั้งขนาด รูปร่าง ส่วนประกอบ และระยะห่างระหว่างอนุภาค ส่งผลให้สีและค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคเงินนาโนแตกต่างกัน

นอกจากนี้ การนำทฤษฎีคำนวณทางควอนตัม (Quantum) หรือ เคมีคอมพิวเตอร์ (Computational Chemistry) มาใช้ในการวิเคราะห์วัสดุนาโนจะทำให้เข้าใจสมบัติของโมเลกุลและกลไกการเกิดปฏิกิริยา ปัจจุบันมีการใช้ทฤษฎีฟังก์ชันนอลความหนาแน่น (density functional theory, DFT) แบบต่างๆ ที่พัฒนาขึ้นมาเพื่อเปรียบเทียบการทดลองหรือการคำนวณฟังก์ชันที่มีความถูกต้องสูง ได้แก่ B3LYP, M06-2X เป็นต้น สำหรับการคำนวณโดยใช้ทฤษฎีฟังก์ชันนอลความหนาแน่น

ที่ขึ้นกับเวลา (Time-dependent density functional theory, TDDFT) ให้ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับสถานะกระตุ้นของอนุภาค ซึ่งให้ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับสถานะการกระตุ้นของโมเลกุลที่มีพลังงานสูงสุดที่มีอิเล็กตรอนบรรจุอยู่ (Highest occupied molecular orbital, HOMO) และโมเลกุลที่มีพลังงานต่ำที่สุดที่ไม่มีอิเล็กตรอนบรรจุอยู่ (Lowest unoccupied molecular orbital, LUMO) การคำนวณเหล่านี้ถูกนำมาใช้กับ Ag ด้วยเช่นกัน [1-3] การศึกษาเชิงโมเลกุลสำหรับกลไกการดูดซับอนุภาคเงินที่เชื่อมต่อดัวยลิแกนด์ต่างๆ ทำให้เข้าใจสถานะกระตุ้นและพันธะที่สารหนูมีความไวในการทดสอบ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นพัฒนาวิธีตรวจวัดปริมาณสารหนูด้วยวิธีตรวจวัดสีด้วยอนุภาคเงินนาโนที่ดัดแปลง และศึกษาอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นโดยใช้ทฤษฎีฟังก์ชันนัลความหนาแน่น

2. วิธีศึกษาวิจัย

2.1 การสังเคราะห์ AgNPs

ทำการสังเคราะห์ AgNPs ด้วยปฏิกิริยารีดักชัน [4] โดยผสมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท เข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 100 μ L กับสารละลายไตรโซเดียมซิเตรท เข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 1 mL ในน้ำปราศจากไอออน ถ่ายสารละลายลงในขวดภาพพมฟูนขนาด 250 mL นำไปกวนด้วยเครื่อง magnetic stirrer ที่ความเร็ว \sim 1,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลายโซเดียมโบโรไฮไดรด์เข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 1 mL ลงไป (ค่อยๆ เติมโดยไม่ลดความเร็วการกวน) จากนั้นกวนสารละลายต่อเนื่องเป็นเวลา 15 นาที สารละลายที่ได้มีปริมาตร 100 mL เพื่อป้องกันการออกซิไดซ์จากแสงจนทำให้สีของสารละลาย AgNPs เปลี่ยนไป (จางลง) ให้เก็บรักษาสารละลาย AgNPs ในที่มืด อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ C ในสถานะต่างที่ pH 8

2.2 การศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการตรวจจับสารหนู

2.2.1 การศึกษาชนิดของลิแกนด์ที่เหมาะสม

ศึกษาชนิดของลิแกนด์ที่เหมาะสม โดยทดสอบประสิทธิภาพของลิแกนด์ทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ L-Cysteine, 3-Mercaptopropionic acid (3-MPA) และ Iminodiacetic acid (IDA) ที่ระดับความเข้มข้น 0.0001 0.001 และ 0.01 M ในการตรวจจับสารหนูเข้มข้น 1.00 ppm โดยปิเปตสารละลาย AgNPs ปริมาตร 1,000 μ L น้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 960 μ L สารละลายลิแกนด์เข้มข้น 0.01 0.1 และ 1 M ปริมาตร 20 μ L และสารละลายมาตรฐานสารหนูเข้มข้น 100 ppm ปริมาตร 20 μ L ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันด้วย vertex mixer จับเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis spectrometer ที่ความยาวคลื่น 300-800 nm ทำการศึกษาความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

2.2.2 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของลิแกนด์

ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของลิแกนด์ โดยการทดสอบประสิทธิภาพของลิแกนด์ในการตรวจจับสารหนูเข้มข้น 1.00 ppm ที่ระดับความเข้มข้นของลิแกนด์ 0.0001 0.0005 0.001 0.005 และ 0.1 M โดยปิเปตสารละลาย AgNPs ปริมาตร 1,000 μ L น้ำปราศจากไอออนปริมาตร 960 μ L สารละลายลิแกนด์เข้มข้น 0.01 0.05 0.1 0.5 และ 1 M ปริมาตร 20 μ L และสารละลายมาตรฐานสารหนูเข้มข้น 100 ppm ปริมาตร 20 μ L ใส่หลอดทดลอง ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วย vertex mixer จับเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis spectrometer ที่ความยาวคลื่น 402 และ 522 nm ทำการศึกษาความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

2.2.3 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา ด้วยการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาในการตรวจจับสารหนูเข้มข้น 1.00 ppm โดยปิเปตสารละลาย AgNPs ปริมาตร 1,000 μ L น้ำปราศจากไอออนปริมาตร 960 μ L สารละลาย L-Cysteine เข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 20 μ L และสารละลายมาตรฐานสารหนูเข้มข้น 100 ppm ปริมาตร 20 μ L ใส่หลอดทดลอง ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วย vertex mixer วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis spectrometer ที่ความยาวคลื่น 402 และ 522 nm ที่เวลา 1 3 5 7 10 15 และ 30 นาที ทำการศึกษาช่วงเวลาละ 3 ซ้ำ

2.3 การคำนวณทางเคมีคอมพิวเตอร์โดยใช้ทฤษฎีฟังก์ชันนัลความหนาแน่น

ทำการศึกษาอันตรกิริยาของ As อะตอม บนอนุภาคเงิน (Ag_4) โดยมี N-acetylcysteine เป็นตัวแทนของ L-Cysteine ซึ่งเป็นลิแกนด์ที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการทดลอง ทำการศึกษาการดูดซับโดยใช้ทฤษฎีฟังก์ชันนัลความหนาแน่น M06-L เพื่อศึกษาโครงสร้างที่เหมาะสมโดยโครงสร้างที่คำนวณ ได้แก่ N-acetylcysteine-As(OH)₂-Ag₄ ทำการวิเคราะห์อันตรกิริยาระหว่าง As(OH)₃ บนอนุภาค Ag และการทำปฏิกิริยาการกำจัดน้ำ (Dehydrate) ของ N-acetylcysteine ที่บริเวณเร่ง

ของอะตอม As โดยจะได้โครงสร้าง $C_5H_8NO_3S-As(OH)_2-Ag_4$ นอกจากนี้ยังได้ทำการวิเคราะห์พันธะ As-S และพันธะ As-Ag ด้วยการศึกษา NBO [5] โดยใช้ฟังก์ชัน M06-L ซึ่งสามารถอธิบายอุณหเคมี จลนศาสตร์ อันตรกิริยา สภาวะกระตุ้น และการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของโครงสร้างได้ ทั้งนี้ ได้ใช้ชุดพื้นฐาน LANL2TZ สำหรับ Ag และใช้ 6-311+G(2df,2p) สำหรับอะตอมอื่นที่เหลือ ตรวจสอบคุณสมบัติทางสเปกโทรสโกปีด้วยการคำนวณสถานะกระตุ้น โดยใช้ทฤษฎีฟังก์ชันนอลความหนาแน่นที่ขึ้นกับเวลาในระดับการคำนวณเดียวกัน คำนวณพลังงานการดูดซับของ $As(OH)_3$ และพลังงานปฏิกิริยาของ N-acetylcysteine ดังนี้

พลังงานการดูดซับ (Adsorption energy)

$$= E[As(OH)_3-Ag_4] - E[As(OH)_3] - E[Ag_4] \quad (1)$$

พลังงานการเกิดปฏิกิริยา (Reaction energy)

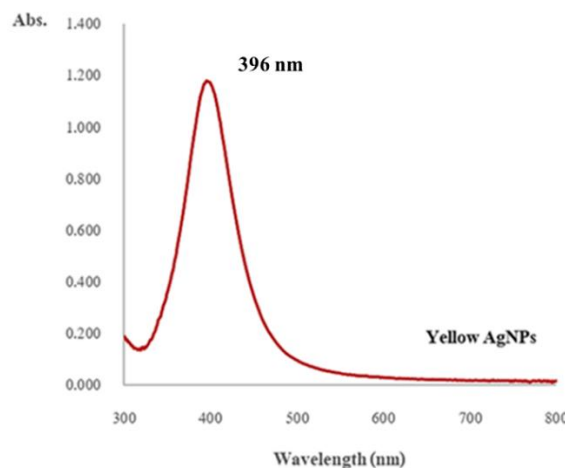
$$= E[C_5H_8NO_3S-As(OH)_2-Ag_4] - E[C_5H_8NO_3SH] - E[As(OH)_3-Ag_4] + E[H_2O] \quad (2)$$

คำนวณ Band Gap ของสารเชิงซ้อนด้วย TD-DFT (M06-L/6-311+G(2df,2p) + LANL2TZ) วิเคราะห์พลังงานที่ HOMO และ LUMO ออร์บิทัล โดยใช้โปรแกรม Gaussian 09 สำหรับการคำนวณทั้งหมด

3. ผลการศึกษาวิจัยและอภิปรายผล

3.1 การสังเคราะห์ AgNPs

จากการสังเคราะห์ AgNPs ด้วยปฏิกิริยารีดักชัน โดยมี $AgNO_3$ เป็นสารตั้งต้น (precursor) $NaBH_4$ เป็นตัวรีดิวซ์ (reducing agent) และ trisodium citrate เป็นสารทำให้เสถียร ปฏิกิริยารีดักชันที่เกิดขึ้นทำให้ Ag^+ เปลี่ยนเป็น Ag^0 เกิดเป็นเมล็ดอนุภาคนาโนเงิน (silver nanoparticle seed) จากนั้นถูกหุ้ม (caped) ด้วย trisodium citrate เพื่อป้องกันการรวมตัวกัน (aggregation) รายงานศึกษาวิจัยหลายฉบับแสดงให้เห็นว่า AgNPs ดูดกลืนรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าในช่วงที่มองเห็นได้ ตั้งแต่ 380-450 nm ซึ่งเป็นที่รู้จักว่าเป็นการกระตุ้นของ LSPR [6] คุณสมบัติเชิงแสงของ AgNPs ขึ้นกับขนาดและรูปร่าง โดย AgNPs ทรงกลม (spherical) มีแถบการดูดกลืน plasmon อยู่ที่ ~ 400 nm [7] และมีสีเหลือง เช่น สีเหลืองอ่อน สีเหลืองทอง หรือสีเหลืองอมน้ำตาล แตกต่างกันขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้ในการสังเคราะห์ [8] จากการทดลอง AgNPs ที่สังเคราะห์ได้ (ภาพที่ 1) มีสีเหลืองและมีแถบการดูดกลืน plasmon ที่ 396 nm จึงอาจกล่าวได้ว่า AgNPs ที่สังเคราะห์ได้เป็น AgNPs ทรงกลม

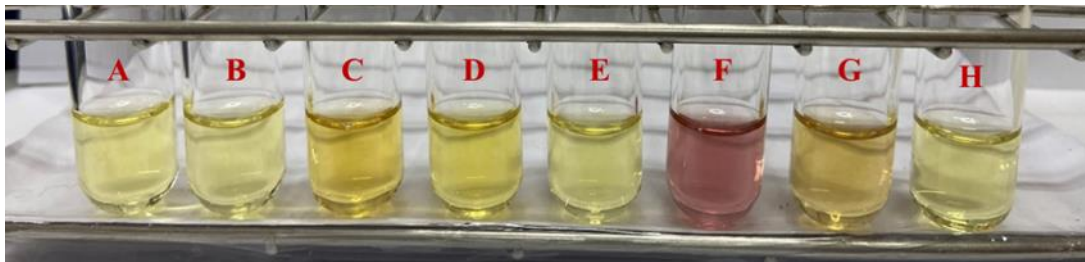


ภาพที่ 1 AgNPs ที่สังเคราะห์ได้และสเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่ 396 nm

3.2 การศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการตรวจจับสารหนู

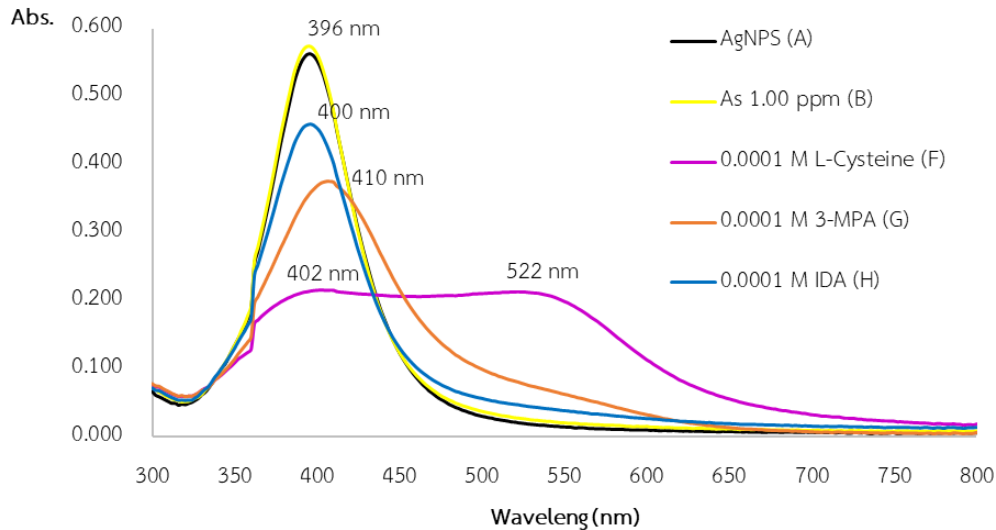
3.2.1 การศึกษาชนิดของลิแกนด์ที่เหมาะสม

จากการศึกษาชนิดที่ของสารลิแกนด์ที่เหมาะสม ด้วยการทดสอบการตรวจจับสารหนูที่ระดับความเข้มข้น 1.00 ppm โดยใช้สารลิแกนด์ 3 ชนิด ได้แก่ L-Cysteine 3-Mercaptopropionic acid (3-MPA) และ Iminodiacetic acid (IDA) การทดลองแบ่งเป็น 3 ชุด คือ ชุดแรกตรวจจับสารหนูโดยไม่เติมสารลิแกนด์ (ภาพที่ 2 A, B) ชุดที่สอง เติมสารลิแกนด์โดยปราศจากสารหนู (ภาพที่ 2 C-E) และชุดที่สาม ตรวจจับสารหนูโดยเติมสารลิแกนด์แต่ละชนิด (ภาพที่ 2 F-H) จากการทดลองชุดแรก พบว่า สีของสารละลาย AgNPs ก่อนและหลังทดสอบการตรวจจับสารหนูไม่มีการเปลี่ยนแปลง การทดลองชุดที่สอง พบว่า สีของสารละลาย AgNPs เปลี่ยนแปลงเล็กน้อย มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 394-406 nm และการทดลองชุดที่สาม พบว่า สีของสารละลาย AgNPs เกิดการเปลี่ยนแปลงแตกต่างกัน โดยสารละลาย AgNPs ที่มี L-Cysteine เป็นสารลิแกนด์เปลี่ยนสีจากเหลืองไปเป็นชมพูม่วง ส่วนสารละลาย AgNPs ที่มี 3-MPA และ IDA เป็นสารลิแกนด์ เปลี่ยนสีจากเหลืองไปเป็นเหลืองคล้ำและเหลืองอมเขียวตามลำดับ ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 สีของ AgNPs ก่อนและหลังทดสอบการตรวจจับสารหนู

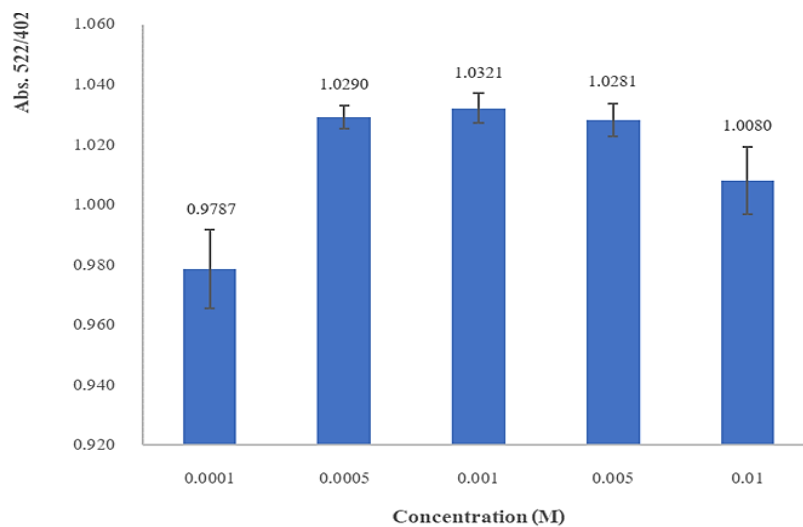
พิจารณาสูตรโครงสร้างของลิแกนด์ทั้ง 3 ชนิด L-Cysteine เป็นกรดอะมิโนมีหมู่คาร์บอกซิล (-COOH) และไฮดรอกซิล (-SH) เป็นหมู่ฟังก์ชัน 3-MPA เป็นสารประกอบออร์แกโนซิลเฟอรัลมีหมู่คาร์บอกซิล (-COOH) และไฮดรอกซิล (-SH) เป็นหมู่ฟังก์ชัน และ IDA เป็นกรดอะมิโนมีหมู่คาร์บอกซิล (-COOH) เป็นหมู่ฟังก์ชันด้วยกัน 2 หมู่ หลักการเลือกของไอออนโลหะ ถูกกำหนดด้วยความแรงและอ่อนตามทฤษฎีกรดและเบส แสดงให้เห็นว่าลิแกนด์ที่มีออกซิเจนอะตอมจำนวนมากมีแนวโน้มที่จะจับกับไอออนของโลหะอัลคาไลน์เอิร์ธสูง และลิแกนด์ที่มีไนโตรเจนและซัลเฟอร์อะตอมปริมาณมากมีแนวโน้มที่จะจับกับไอออนของโลหะทรานซิชันและโลหะหนักสูง [9] จากโครงสร้างของลิแกนด์ทั้ง 3 ชนิด IDA ประกอบด้วยอะตอมออกซิเจนมากถึง 4 อะตอม มีความเป็นกรดสูงมีแนวโน้มที่จะเลือกไอออนของโลหะอัลคาไลน์เอิร์ธมากกว่า ในขณะที่ 3-MPA และ L-Cysteine มีจำนวนออกซิเจนอะตอมน้อยกว่าเท่ากับ 2 อะตอม และมีจำนวนซัลเฟอร์อะตอมเท่ากับ 1 อะตอม มีแนวโน้มที่จะเลือกไอออนของโลหะทรานซิชันและโลหะหนัก และเมื่อพิจารณาโครงสร้างของ 3-MPA และ L-Cysteine แม้ว่าจะมีลักษณะคล้ายกัน แต่ทว่า L-Cysteine มีหมู่ฟังก์ชันที่ 3-MPA ไม่มี คือ หมู่เอมีน (NH₂) ซึ่งมีไนโตรเจนอะตอมเป็นองค์ประกอบช่วยให้ L-Cysteine มีความสามารถในการจับไอออนสารหนูได้ดีกว่า เหนียวน้ำให้ AgNPs เกิดการรวมตัวกัน ทำให้ขนาดและระยะห่างระหว่างอนุภาคเปลี่ยนแปลงไป ส่งผลให้สีและการดูดกลืนแสงของสารละลาย AgNPs เปลี่ยนแปลงไปด้วย โดยสีของสารละลาย AgNPs เปลี่ยนจากสีเหลืองไปเป็นชมพูม่วง และค่าการดูดกลืนแสงเคลื่อน (shifts) สูงขึ้นไปในทางแถบสีแดง (red shifts) จาก 402 ไปเป็น 522 nm ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงสรุปได้ว่า L-Cysteine เป็นลิแกนด์ที่เหมาะสมที่สุด โดยสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ AgNPs ก่อนและหลังตรวจจับสารหนูแสดงดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ AgNPs ก่อนและหลังการตรวจจับสารหนู

3.2.2 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของลิแกนด์

จากการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของลิแกนด์ โดยศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลาย L-Cysteine ที่ระดับความเข้มข้น 0.0001 0.0005 0.001 0.005 และ 0.01 M ด้วยการตรวจจับสารหนูที่ความเข้มข้น 1.00 ppm วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 402 และ 522 nm พบอัตราส่วนการดูดกลืนแสงของ AgNPs (Abs.522/402) ตั้งแต่ 0.0978-1.0321 โดย L-Cysteine ที่ระดับความเข้มข้น 0.0001 M มี Abs. 522/402 ต่ำที่สุด ขณะที่ L-Cysteine เข้มข้น 0.001 M มี Abs. 522/402 สูงที่สุด (1.0321 ± 0.0050) ดังภาพที่ 4 ที่ระดับความเข้มข้นนี้ทำให้ AgNPs เกิดการรวมตัวกันมากที่สุด ยืนยันได้จากค่า Abs. 522/402 ที่สูงสุด ดังนั้น ในการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ L-Cysteine คือ 0.001 M

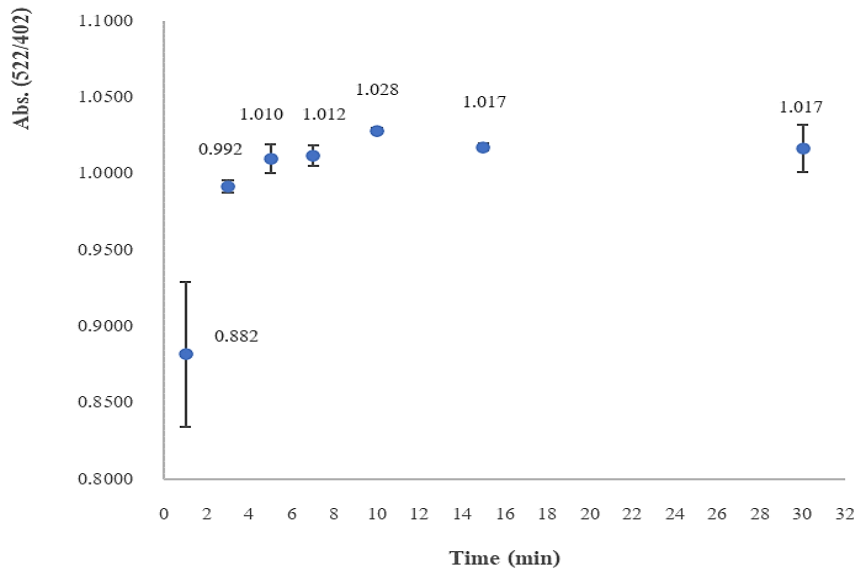


ภาพที่ 4 อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงของ AgNPs (Abs. 522/402) เมื่อใช้ L-Cysteine ที่ระดับความเข้มข้น 0.0001 0.0005 0.001 0.005 และ 0.01 M เป็นลิแกนด์

3.2.3 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

จากการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาสำหรับตรวจวัดสารหนู ด้วยการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาในช่วง 1-30 นาที โดยใช้สารละลาย L-Cysteine เข้มข้น 0.001 M เป็นลิแกนด์ ทำการตรวจวัดปริมาณสารหนูที่ความเข้มข้น 1.00 ppm วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 402 และ 522 nm พบว่า

ที่ระยะเวลา 1 นาที ปฏิภานเกิดขึ้นเล็กน้อยและเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในนาทีที่ 3 จากนั้นค่อยๆ เพิ่มขึ้นทีละน้อยจนกระทั่งถึงนาทีที่ 10 ซึ่งมีการทำปฏิภานมากที่สุด ให้อัตราส่วนการดูดกลืนแสงสูงที่สุดเท่ากับ 1.028 ± 0.0015 จากนั้นค่อยๆ ลดลงในนาทีที่ 15 จนกระทั่งคงที่ในนาทีที่ 30 (ภาพที่ 6) จะเห็นได้ว่าที่เวลา 10 นาที เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการทำปฏิภาน เนื่องจาก AgNPs เกิดการรวมตัวกันมากที่สุด ส่งผลให้ค่า Abs. 522/402 สูงที่สุด ดังนั้น ในการศึกษาจึงเลือกใช้ระยะเวลาในการทำปฏิภานที่ 10 นาที



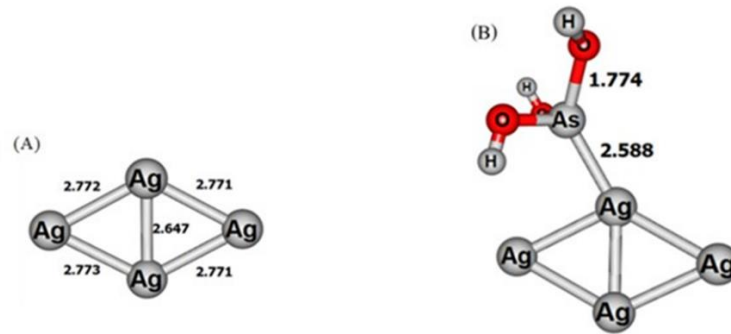
ภาพที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของ AgNPs (Abs. 522/402) กับระยะเวลาในการในการทำปฏิภาน

นอกจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจจับสารหนูแล้ว ในงานศึกษาวิจัยนี้ได้มีการทดสอบความใช้ได้ของวิธี (Method validation) ที่พัฒนาขึ้น พบช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีตรวจวัด (Linearity range) เท่ากับ 0.00 - 1.00 ppm ขีดจำกัดของการตรวจวัด (Limit of detection, LOD) และขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ) เท่ากับ 0.02 และ 0.07 ppm ตามลำดับ ผลการทดสอบความเที่ยง (Precision) ของวิธี โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของ AgNPs ที่มีสารละลายมาตรฐานสารหนูความเข้มข้น 0.1 0.5 และ 1.0 ppm ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ พบว่า AgNPs ที่เติมสารละลายมาตรฐานสารหนูที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1.0 ppm มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 4.48 3.18 และ 2.17 ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้นั้นเป็นค่าที่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ตามมาตรฐานของ AOAC (Association of Official Analytical Chemists) ดังนั้น วิธีตรวจวัดนี้จึงเป็นวิธีที่มีความเที่ยงในการวิเคราะห์สูง การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธีด้วยการศึกษาตัวอย่างน้ำ 2 ชนิด ได้แก่ น้ำดื่มและน้ำคลอง โดยนำตัวอย่างน้ำแต่ละชนิดมาเติมสารละลายมาตรฐานสารหนูที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1.0 ppm แล้วคำนวณหาค่าร้อยละการคืนกลับ (% recovery) พบอยู่ในช่วง 92.09-103.73 ซึ่งค่าที่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ตามมาตรฐาน AOAC ดังนั้น วิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจวัดปริมาณสารหนูได้ในตัวอย่างจริงทั้งในตัวอย่างน้ำดื่มและน้ำคลอง

3.3 การคำนวณทางเคมีคอมพิวเตอร์โดยใช้ทฤษฎีฟังก์ชันนอลความหนาแน่น

3.3.1 การศึกษาโครงสร้างที่เหมาะสมของอนุภาคนาโน Ag_4

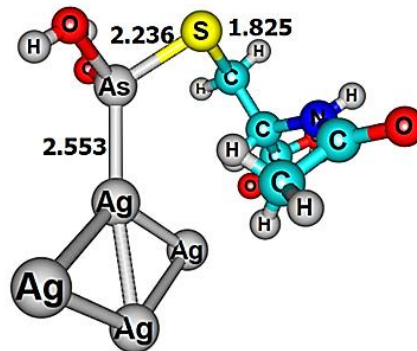
จากการศึกษาโครงสร้างที่เหมาะสมของอนุภาคนาโน Ag_4 โดยใช้ M06-L ฟังก์ชัน ในการคำนวณ พบว่าโครงสร้างที่เหมาะสมของ Ag_4 อยู่ในแนวระนาบ ดังภาพที่ 6 (A) โดยระยะห่างระหว่างพันธะ Ag-Ag เฉลี่ย เท่ากับ 2.747 Å ซึ่งใกล้เคียงกับการคำนวณที่รายงานก่อนหน้านี้คือ 2.79 Å [10] การดูดซับของ $As(OH)_3$ บนอนุภาค Ag_4 ดังภาพที่ 6 (B) ระยะห่างระหว่างพันธะ As-Ag บนอนุภาค $Ag_4-As(OH)_3$ ที่คำนวณได้ เท่ากับ 2.588 Å โดยคำนวณพลังงานการดูดซับมีค่าเท่ากับ -16.1 kcal/mol สอดคล้องกับการถ่ายโอนประจุจาก Ag ไปยัง $As(OH)_3$ มีค่าเท่ากับ 0.077 |e|



ภาพที่ 6 โครงสร้างที่เหมาะสมของ (A) Ag_4 และ (B) สารเชิงซ้อน $As(OH)_3-Ag_4$ ที่ใช้ M06-L ฟังก์ชัน ในการคำนวณระยะพันธะมีหน่วยเป็น Å

3.3.2 การศึกษาอันตรกิริยาของสารหนู (As) อะตอม บนอนุภาคนาโนโลหะเงิน (Ag_4)

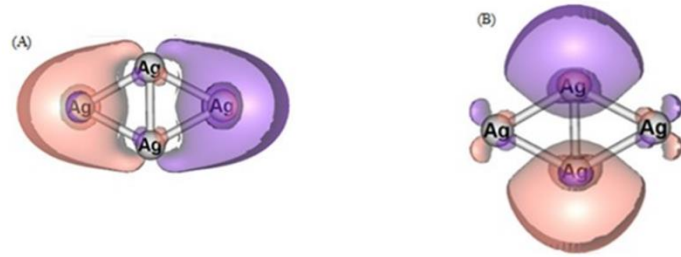
จากการศึกษาอันตรกิริยาของ *N*-acetylcysteine บน $As-Ag$ คลัสเตอร์ จากข้อมูลการศึกษา ก่อนหน้านี้รายงานว่าปฏิกิริยา dehydration เป็นขั้นตอนหนึ่งของการดูดซับซิสเตอีนบน As ที่อยู่บน Au ผ่านพันธะที่แข็งแรงของ S-As [3] การศึกษาการดูดซับที่ปราศจากน้ำของสารเชิงซ้อน *N*-acetylcysteine บน $As(OH)_3$ บน Ag คลัสเตอร์ พบว่า สารเชิงซ้อนมีพันธะ S-As ที่แข็งแรง ดังภาพที่ 7 มีระยะห่างระหว่างพันธะ As-S ซึ่งเป็นพันธะโคเวเลนต์ เท่ากับ 2.236 Å คำนวณพลังงานปฏิกิริยาของ *N*-acetylcysteine บน $As(OH)_3-Ag_4$ เท่ากับ -23.7 kcal/mol ซึ่งพลังงานปฏิกิริยานี้สอดคล้องกับระยะห่างระหว่างพันธะ As-S



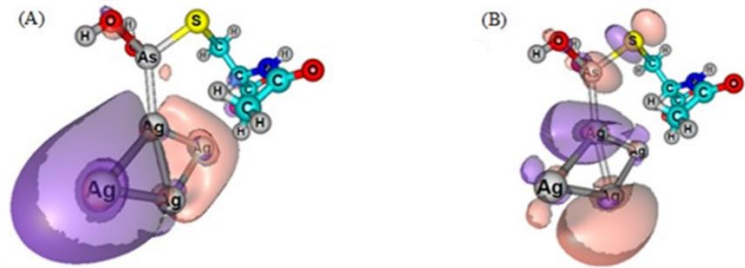
ภาพที่ 7 โครงสร้างที่เหมาะสมของคลัสเตอร์สารเชิงซ้อน *N*-acetylcysteine- $As(OH)_2-Ag_4$ ที่ใช้ M06-L ฟังก์ชัน ในการคำนวณระยะพันธะมีหน่วยเป็น Å

3.3.3 การศึกษาสภาวะกระตุ้นของ Cysteine บน As ที่อยู่เหนือ Ag

จากการศึกษาสภาวะกระตุ้น *N*-acetylcysteine บน As ที่อยู่เหนือ Ag โดยใช้ทฤษฎีฟังก์ชันนอล ความหนาแน่นที่ขึ้นกับเวลาด้วยชุดพื้นฐาน M06-L/6-311+G(2df,2p)+LANL2TZ ในการศึกษาสภาวะกระตุ้นของ Ag_4 พบว่า ออร์บิทัลของโมเลกุลที่มีพลังงานสูงที่สุดที่มีอิเล็กตรอนบรรจุอยู่ (HOMO) ไปยังออร์บิทัลของโมเลกุลที่มีพลังงานต่ำที่สุดที่ไม่มีอิเล็กตรอนบรรจุอยู่ (LUMO) ดังภาพที่ 8 พลังงานที่สภาวะกระตุ้น เท่ากับ 1.119 eV ที่ความยาวคลื่น 1108.0 nm สำหรับการดูดซับบน Ag คลัสเตอร์ โดยสภาวะกระตุ้นของ *N*-acetylcysteine- $As(OH)_2-Ag_4$ พบได้จากออร์บิทัลของโมเลกุลที่มีพลังงานสูงที่สุดที่มีอิเล็กตรอนบรรจุอยู่ (HOMO) ไปยังออร์บิทัลของโมเลกุลที่มีพลังงานต่ำที่สุดที่ไม่มีอิเล็กตรอนบรรจุอยู่ (LUMO) การวิเคราะห์ออร์บิทัลแสดงให้เห็นการกระตุ้นของอิเล็กตรอนจากโมเลกุลโลหะไปยังพันธะ As-S ดังภาพที่ 9 พลังงานการกระตุ้น เท่ากับ 1.713 eV ที่ความยาวคลื่น 723.6 nm สำหรับการดูดซับบน Ag คลัสเตอร์



ภาพที่ 8 ออร์บิทัลโมเลกุลของคลัสเตอร์เชิงซ้อน (A) HOMO และ (B) LUMO ของ Ag_4 ที่ M06-L ฟังก์ชัน



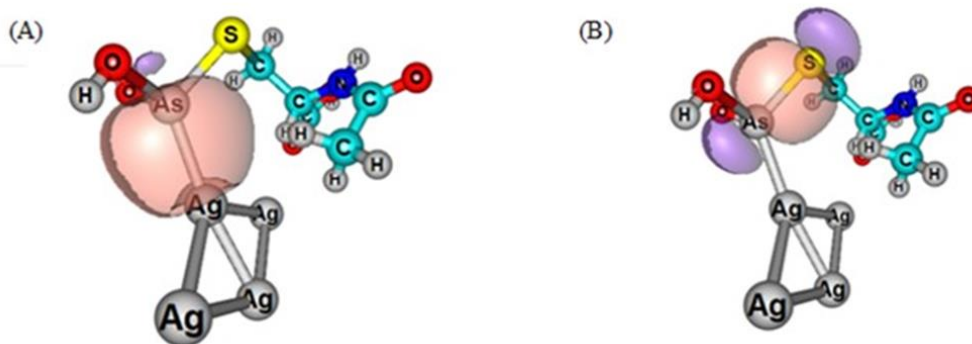
ภาพที่ 9 ออร์บิทัลโมเลกุลของคลัสเตอร์เชิงซ้อน (A) HOMO และ (B) LUMO ของ N -acetylcysteine- $As(OH)_2-Ag_4$ ที่ M06-L ฟังก์ชัน

3.3.4 การศึกษา Natural Bond Orbital

จากการวิเคราะห์ NBO สำหรับ N -acetylcysteine- $As(OH)_2-Ag_4$ คลัสเตอร์ ซึ่งให้ความเป็นไปได้สูงสุด ดังนี้ พันธะในออร์บิทัลสำหรับพันธะ As-Ag มีส่วนมาจาก s orbital (48%) และ p orbital (52%) ของ As อะตอม และ s orbital (60%) p orbital (38%) และ d orbital (2 %) ของ Ag อะตอม แสดงดังภาพที่ 10 (A) พันธะ As-S มีส่วนมาจาก s orbital (15%) และ p orbital (84%) ของ As อะตอม และ s orbital (10%) และ p orbital (89%) ของ S อะตอม พลังงาน NBO เท่ากับ -0.50036 และ -0.50281 eV ตามลำดับ จากการคำนวณระบุได้ว่าอนุภาค Ag มีความเป็นไปได้มากสำหรับการตรวจจับ As ด้วย N -acetylcysteine ในน้ำ โดย NBO คำนวณมาจาก valence orbital ของแต่ละอะตอม A และ B ดังสมการ

$$\sigma_{AB} = c_A h_A + c_B h_B$$

สำหรับ bonding orbital พันธะจะเปลี่ยนแปลงอย่างราบรื่นตั้งแต่พันธะโควาเลนต์ ($c_A = c_B$) ไปจนถึงพันธะไอออนิก ($c_A \gg c_B$) ค่า % ที่ได้ มีค่าสัมพันธ์กับ coefficient ของ Atomic orbital



ภาพที่ 10 NBO ของพันธะในอนุภาคเชิงซ้อน (A) As-Ag (B) As-S ของ N -acetylcysteine- $As(OH)_2-Ag_4$ คำนวณด้วย M06-L

4. สรุปผลการศึกษาวิจัย

จากการศึกษาพัฒนาวิธีตรวจวัดปริมาณสารหนูในน้ำด้วยเทคนิคการตรวจวัดสี โดยดัดแปลงอนุภาคเงินนาโนที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยปฏิกิริยารีดักชัน โดยมี AgNO_3 เป็นสารตั้งต้น NaBH_4 เป็นตัวรีดิวซ์ และ trisodium citrate เป็นสารทำให้เสถียร AgNPs ที่สังเคราะห์ได้มีสีเหลืองและมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 396 nm จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจจับสารหนูที่ระดับความเข้มข้น 1.00 ppm เป็นระยะเวลา 10 นาที พบว่า L-Cysteine เข้มข้น 0.001 M เป็นลิแกนด์ที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจาก AgNPs เกิดการรวมตัวกันทำให้สีของสารละลายเปลี่ยนจากเหลืองไปเป็นชมพูอมม่วง ซึ่งสอดคล้องกับค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนจาก 402 ไปเป็น 522 nm เพื่อให้เข้าใจโครงสร้างและอันตรกิริยาที่เกิดขึ้น จึงทำการศึกษอันตรกิริยาของ Cysteine (ในที่นี้ใช้ N-acetylcysteine) บน As(III) ที่ดัดแปลงด้วยอนุภาคโลหะด้วยทฤษฎีฟังก์ชันนอลความหนาแน่น (DFT) ที่ M06-L/6-311+G(2df,2p) + LANL2TZ ฟังก์ชัน พลังงานการดูดซับของ $\text{As}(\text{OH})_3$ บนอนุภาค Ag_4 คำนวณได้เท่ากับ -16.1 kcal/mol การดูดซับที่ปราศจากน้ำของ N-acetylcysteine บนอนุภาค As-Ag แสดงให้เห็นถึงพันธะ S-As ที่แข็งแรง พลังงานปฏิกิริยาของ N-acetylcysteine บน $\text{As}(\text{OH})_3\text{-Ag}_4$ คำนวณได้เท่ากับ -23.7 kcal/mol คำนวณสภาวะกระตุ้นของสารเชิงซ้อนด้วย TD-DFT ความยาวคลื่นสำหรับสภาวะกระตุ้นครั้งแรกคำนวณได้เท่ากับ 723.6 nm ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า AgNPs สามารถดัดแปลงพัฒนาวิธีตรวจวัดสารหนูในน้ำได้

5. เอกสารอ้างอิง

- [1] Boekfa, B., Pahl, E., Gaston, N., Sakurai, H., Limtrakul, J., & Ehara, M. (2014, 2014/09/25). C-Cl Bond Activation on Au/Pd Bimetallic Nanocatalysts Studied by Density Functional Theory and Genetic Algorithm Calculations. *The Journal of Physical Chemistry C*, 118(38), 22188-22196. <https://doi.org/10.1021/jp5074472>
- [2] Dale, B. B., Senanayake, R. D., & Aikens, C. M. (2017). Research Update: Density functional theory investigation of the interactions of silver nanoclusters with guanine. *APL Materials*, 5(5). <https://doi.org/10.1063/1.4977795>
- [3] Das, M., Singh, K. K., Khan, E., Sinha, R. K., Singh, R. K., Tandon, P., & Gangopadhyay, D. (2021, 2021/10/15/). N-Acetylcysteine versus arsenic poisoning: A mechanistic study of complexation by molecular spectroscopy and density functional theory. *Journal of Molecular Liquids*, 340, 117168. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.117168>
- [4] Panzarasa, G. (2015, 2015/11/10). Just What Is It That Makes Silver Nanoprisms so Different, so Appealing? *Journal of Chemical Education*, 92(11), 1918-1923. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.5b00320>
- [5] Weinhold, F., Landis, C. R., & Glendening, E. D. (2016, 2016/07/02). What is NBO analysis and how is it useful? *International Reviews in Physical Chemistry*, 35(3), 399-440. <https://doi.org/10.1080/0144235X.2016.1192262>
- [6] Lee, S. H., & Jun, B.-H. (2019). Silver Nanoparticles: Synthesis and Application for Nanomedicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4), 865. <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/4/865>
- [7] Chouhan, N. (2018). Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Applications. In. <https://doi.org/10.5772/intechopen.75611>
- [8] Badi' ah, H. I., Seede, F., Supriyanto, G., & Zaidan, A. H. (2019, 2019/01/01). Synthesis of Silver Nanoparticles and the Development in Analysis Method. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 217(1), 012005. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/217/1/012005>
- [9] Oliveira, E., Núñez, C., Santos, H. M., Fernández-Lodeiro, J., Fernández-Lodeiro, A., Capelo, J. L., & Lodeiro, C. (2015, 2015/06/01/). Revisiting the use of gold and silver functionalised nanoparticles as colorimetric and fluorometric chemosensors for metal ions. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 212, 297-328. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.02.026>
- [10] Cui, Y., Wang, Y., & Zhao, L. (2015, Oct). Cysteine-Ag Cluster Hydrogel Confirmed by Experimental and Numerical Studies. *Small*, 11(38), 5118-5125. <https://doi.org/10.1002/sml.201501245>