



รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ชุดตรวจสอบสะอาดจากเคอร์คูมินสำหรับการตรวจวัดมล
สารในสิ่งแวดล้อมภาคสนามบนโทรศัพท์เคลื่อนที่

โดย รองศาสตราจารย์ ดร.อารีย์ ชูดำ

เมษายน 2562 เสร็จโครงการ

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ชุดตรวจสอบสะอาดจากเคอร์คิวมินสำหรับการตรวจวัดมล
สารในสิ่งแวดล้อมภาคสนามบนโทรศัพท์เคลื่อนที่

ผู้วิจัย

รศ.ดร.อารีย์ ชูดำ

คณะเทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
วิทยาเขตภูเก็ต

สนับสนุนโดย

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
คณะเทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตภูเก็ต

(ความเห็นในรายงานฉบับนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง ชุดตรวจสอบอากาศจากเคอร์คิวมินสำหรับการตรวจวัดมลสารในสิ่งแวดล้อมภาคสนามบนโทรศัพท์เคลื่อนที่ สามารถดำเนินการสำเร็จลุล่วงโดยการสนับสนุนของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และคณะเทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตภูเก็ต

ขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัยนางสาวชนิตา บุญกานนท์ นางสาวคริสฐา พัฒนาวีวัฒน์ นางสาวธราวี ทวีกาญจน์และนางสาวนฤมล ลำธกรกิจ ที่ตั้งใจทำวิจัยตลอดระยะเวลาวิจัยของโครงการวิจัยนี้

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรวิทย์ วงศ์นิรามัยกุลที่ช่วยเหลือการอภิปรายผลการวิจัย และช่วยตรวจแก้ไขต้นฉบับผลงานวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และบุคลากรของคณะเทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อมและวิทยาเขตภูเก็ตทุกท่านที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยของโครงการวิจัยนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง นางสาววรรณชญาณศักดิ์ และนางสาวจิตรลดา เอสุจินต์ ที่ให้ความช่วยเหลือเรื่องการเบิกจ่ายเงินทุนวิจัยและการดำเนินการเรื่องเอกสาร

ขอขอบคุณคณะเทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตภูเก็ตที่อนุญาตให้ใช้เวลาในการทำวิจัยและเอื้อเฟื้อสถานที่ทำวิจัย รวมทั้งสนับสนุนวัสดุ อุปกรณ์ที่จำเป็น

อารีย์ ชูดำ

หัวหน้าโครงการวิจัย

Abstract

Project Title: Curcumin-based green colorimetric sensor for on-site and on-mobile detection of environmental pollutants

Investigator: Assoc. Prof. Dr.Aree Choodum

E-mail Address: aree.c@phuket.psu.ac.th; choodum@gmail.com

Project Period: 2 years

This project successfully developed colorimetric sensors based on natural polymer and curcumin for detection of environmental pollutants. The tapioca starch was preliminary applied as natural substrate to fabricate a phenanthroline-doped film for detection of ferrous in water sample. This biodegradable thin film was successfully applied in conjunction with digital image colorimetric method for on-site and on-mobile quantification of ferrous with excellence performance. Limit of detection was achieved less than the maximum concentration limit of ferrous in drinking water. The tapioca starch was then used to fabricate a green colorimetric films for ferrous and boron by doping curcumin nanoparticle (30-90 nm) extracted from turmeric powder. The film for ferrous was fabricated on wax-coated filter paper as a paper-based sensor, while the film for boron was fabricated on plastic spoon. Both films showed good characteristic with selective property on such analytes at different pH and they were successfully applied for surface water and wastewater. Due to the films cost only <0.10 THB, the sensors (film and substrates, *i.e.* plastic spoon and waxed filter paper) are then cost effective (<1.5 THB). A novel starch based cryogel-colorimetric sensor was also developed for ferric detection by doping curcumin nanoparticle within gel matrice. The macroporous cryogel showed good characteristic with selective property for ferric at pH 2. This cryogel based sensor was fabricated without any substrate making it was cheaper than others (~0.5 THB). Therefore, three green and one biodegradable colorimetric sensors were developed in this work. They were successfully applied for on-site environmental pollutant detection in conjunction with an on-mobile digital image colorimetry. All sensors have a potential to be further developed as a prototype for commercial. However, standard color chart was recommended for semi-quantitative analysis rather than smartphone application as it is easier.

Keywords: Curcumin; Environmental pollutant; Green sensor; On-site sensor

บทคัดย่อ

ชื่อผลงานวิจัย: ชุดตรวจสะอาดจากเคอร์คูมินสำหรับการตรวจวัดมลสารในสิ่งแวดล้อม
ภาคสนามบนโทรศัพท์เคลื่อนที่

ชื่อหัวหน้าผู้วิจัย: รองศาสตราจารย์ ดร.อารีย์ ชูดำ

E-mail Address: aree.c@phuket.psu.ac.th; choodum@gmail.com

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

โครงการวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการพัฒนาเซนเซอร์แบบเปรียบเทียบสีโดยใช้พอลิเมอร์จากธรรมชาติ ได้แก่ แป้ง และใช้เคอร์คูมินขนาดนาโนที่สกัดจากผงขมิ้นชันเป็นรีเอเจนต์ที่ทำให้เกิดสีการศึกษาเบื้องต้นโดยการประยุกต์เตรียมแผ่นฟิล์มจากแป้งมันสำปะหลังที่ผสมสารฟิแนโนทรินมีประสิทธิภาพในการตรวจวัดเฟอรัสในตัวอย่างน้ำภาคสนาม การประยุกต์ใช้แผ่นฟิล์มดังกล่าวร่วมกับเทคนิคการวิเคราะห์ภาพดิจิทัลสำหรับการวิเคราะห์เชิงปริมาณพบว่า ชีตจำกัดการตรวจวัดต่ำกว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่อนุญาตให้มีเหล็กเฟอรัสในน้ำดื่มและสามารถวิเคราะห์เหล็กเฟอรัสในตัวอย่างจริงได้โดยให้ผลวิเคราะห์ไม่แตกต่างกับเทคนิคมาตรฐาน หลังจากนั้นจึงได้นำแป้งมันสำปะหลังมาใช้ร่วมกับสารสกัดเคอร์คูมินขนาดนาโน (30-90 นาโนเมตร) จากผงขมิ้นชันในลักษณะของแผ่นฟิล์ม 2 แบบ ได้แก่ แผ่นฟิล์มที่เคลือบบนกระดาษกรองในลักษณะของเซนเซอร์จากกระดาษสำหรับตรวจวัดเฟอรัส และแผ่นฟิล์มบางที่เคลือบบนชิ้นพลาสติกสำหรับตรวจวัดโบรอน ฟิล์มทั้งสองแบบมีลักษณะเฉพาะตัวดีเยี่ยมและมีความจำเพาะกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่ pH แตกต่างกัน และสามารถประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิคการวิเคราะห์ภาพดิจิทัลสำหรับวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำและน้ำเสียได้อย่างมีประสิทธิภาพและให้ผลการวิเคราะห์ไม่แตกต่างกับเทคนิคมาตรฐาน แผ่นฟิล์มที่พัฒนาขึ้นทั้งสองแบบนี้มีราคาต่ำกว่า 10 สตางค์ ดังนั้นชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นจึงมีราคาต่ำกว่า 1.5 บาท นอกจากนี้แล้วงานวิจัยนี้ได้พัฒนาเซนเซอร์แบบครีโอลเจลที่สังเคราะห์จากแป้งสำหรับตรวจวัดเฟอริกโดยการผสมเคอร์คูมินขนาดนาโน ผลการศึกษาพบว่า ครีโอลเจลที่ได้มีลักษณะเป็นรูปพุ่มสูงและทำปฏิกิริยาจำเพาะกับเฟอริกที่ pH 2 ซึ่งเซนเซอร์แบบครีโอลเจลที่พัฒนาขึ้นนี้มีลักษณะเป็นเม็ดได้ จึงไม่จำเป็นต้องมีภาชนะบรรจุทำให้มีต้นทุนการผลิตต่ำกว่าเซนเซอร์แบบแผ่นฟิล์ม (0.5 บาท) ดังนั้นโครงการนี้ประสบความสำเร็จในการพัฒนาชุดตรวจสะอาดจำนวน 2 ชุดและชุดตรวจที่ย่อยสลายได้ จำนวน 1 ชุดเพื่อประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิคการวิเคราะห์ภาพดิจิทัลเพื่อใช้ตรวจวัดมลสารในสิ่งแวดล้อม ชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นทั้งหมดมีศักยภาพที่จะพัฒนาต่อเป็นต้นแบบเพื่อการจำหน่ายเชิงพาณิชย์ต่อไปในอนาคต อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์เชิงปริมาณนั้นแนะนำให้ใช้ควบคู่กับแถบสีมาตรฐานมากกว่าการใช้แอปพลิเคชันบนโทรศัพท์เคลื่อนที่เนื่องจากง่ายกว่า

คำหลัก: เคอร์คูมิน; มลพิษทางสิ่งแวดล้อม; ชุดตรวจสะอาด; ชุดทดสอบภาคสนาม

Executive summary

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

เนื่องจากการใช้เทคนิคการวิเคราะห์สารในปัจจุบันมักก่อปัญหาของเสียที่เกิดจากกระบวนการวิเคราะห์ที่สามารถส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมหลายด้าน บางครั้งสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์มีความเป็นพิษมากกว่าสารที่สนใจจะวิเคราะห์ [1] ดังนั้นในหลายปีที่ผ่านมาเทคนิคการวิเคราะห์ที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมจึงมีความสำคัญมากขึ้น โดยหลักการที่สำคัญที่จะสามารถทำให้เทคนิคการวิเคราะห์เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมากขึ้น ได้แก่ การใช้สารอื่นทดแทนสารที่มีความเป็นพิษสูงและการทำกระบวนการวิเคราะห์ให้มีขนาดเล็กลง เพื่อลดปริมาณการใช้สารเคมีและลดปริมาณของเสียที่เกิดขึ้นด้วย เพื่อให้สามารถลดผลกระทบที่เกิดจากกระบวนการวิเคราะห์ได้

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิคสะอาดสำหรับการตรวจวัดมลสารในสิ่งแวดล้อมในรูปแบบของเซนเซอร์แบบเปรียบเทียบสี (Colorimetric sensor) ที่สามารถประยุกต์ใช้สำหรับการทดสอบหามลสารภาคสนามเพื่อคัดกรองและลดจำนวนตัวอย่างที่จำเป็นต้องนำเข้าสู่กระบวนการวิเคราะห์ ส่งผลให้สามารถลดปริมาณตัวทำละลายและของเสียที่เกิดขึ้น ทำให้กระบวนการวิเคราะห์มลสารส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยลง โดยการนำพอลิเมอร์และรีเอเจนต์จากธรรมชาติ มาใช้ในการสังเคราะห์เซนเซอร์ ได้แก่ การใช้แป้ง (Starch) ซึ่งมีสมบัติที่ดีหลายประการ เช่น สามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ หาได้ง่าย มีราคาถูก [2-4] และใช้เคอร์คูมินจากขมิ้นเป็นรีเอเจนต์สำหรับปฏิกิริยาการเกิดสีทดแทนการใช้สารเคมีที่เป็นพิษ โดยจะสังเคราะห์ชุดตรวจสะอาดนี้ให้มีขนาดเล็กเพื่อให้การตรวจวัดสามารถลดของเสียที่จะเกิดขึ้นได้ และจะประยุกต์ใช้ชุดตรวจสะอาดดังกล่าวร่วมกับเทคนิคการวิเคราะห์เชิงปริมาณที่ไม่จำเป็นต้องมีกระบวนการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยากหลายขั้นตอนและใช้สารเคมีปริมาณน้อย ได้แก่ เทคนิคการวิเคราะห์ภาพดิจิทัล เพื่อให้สามารถหาปริมาณของมลสารในตัวอย่างจริงได้โดยมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยที่สุด

2. วัตถุประสงค์

- 2.1. เพื่อพัฒนาชุดตรวจสะอาดและแอปพลิเคชันบนโทรศัพท์เคลื่อนที่สำหรับตรวจมลสารในสิ่งแวดล้อมภาคสนาม
- 2.2. ประเมินความเป็นไปได้ของชุดตรวจและแอปพลิเคชันที่พัฒนาขึ้นเพื่อการจำหน่ายชุดตรวจฯ ในเชิงพาณิชย์

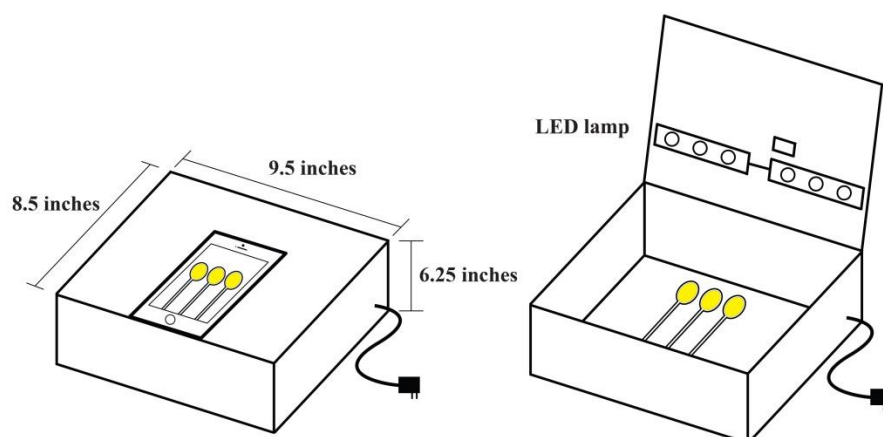
3. ระเบียบวิธีวิจัย

- 3.1. พัฒนาระบบตรวจความเข้มข้นสำหรับการวิเคราะห์ภาคสนาม
- 3.2. พัฒนาแอปพลิเคชันสำหรับตรวจปริมาณสารบนโทรศัพท์เคลื่อนที่สำหรับการใช้งานบนระบบแอนดรอยด์ (Android) และไอโอเอส (iOS)

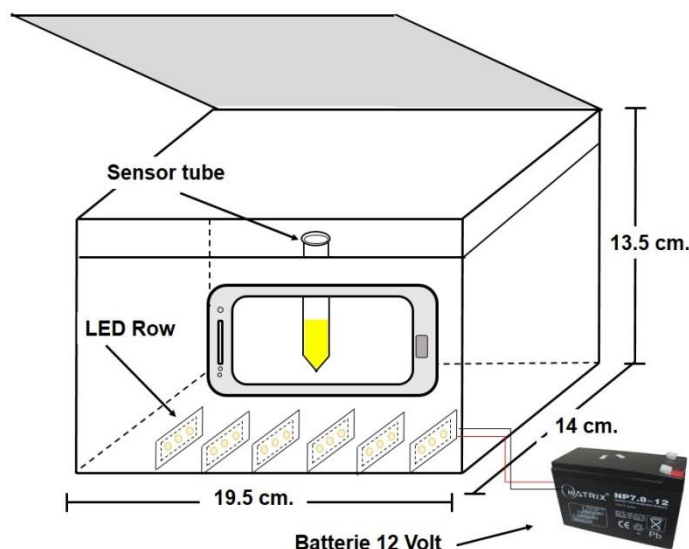
- 3.3. ศึกษาความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาชุดตรวจแบบเปรียบเทียบสีที่อาศัยหลักการกักรีเอเจนต์ไว้ในฟิล์มบางของพอลิเมอร์ธรรมชาติ ได้แก่ มันสำปะหลัง โดยใช้รีเอเจนต์มาตรฐาน ได้แก่ ฟีนแธโทรลีน สำหรับการตรวจวัดมลสารในสิ่งแวดล้อม ได้แก่ เหล็กเฟอรัส
- 3.4. ศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เคอร์คูมินเป็นรีเอเจนต์จากธรรมชาติเพื่อพัฒนาเซนเซอร์แบบเปรียบเทียบสีสำหรับตรวจวัดมลสารในสิ่งแวดล้อม ได้แก่ เหล็กเฟอรัส เหล็กเพอริกโบรอน
- 3.5. ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการพัฒนาชุดตรวจสะอาดสำหรับตรวจวัดมลสารในสิ่งแวดล้อมโดยอาศัยหลักการกักเคอร์คูมินไว้ในโครงข่ายของพอลิเมอร์จากธรรมชาติในรูปแบบฟิล์มบางหรือครีโอล
- 3.6. ศึกษาลักษณะพื้นผิวและหมู่ฟังก์ชันของชุดตรวจสะอาด
- 3.7. ศึกษาสมรรถนะของชุดตรวจและพิสูจน์การใช้ได้ของวิธี
- 3.8. ศึกษาผลของตัวรบกวน
- 3.9. ประยุกต์ใช้ชุดตรวจและระบบตรวจวัดที่พัฒนาขึ้นสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างจริง
- 3.10. ประเมินต้นทุนของชุดตรวจ และศึกษาความเป็นไปได้ในการจำหน่ายเชิงพาณิชย์

4. ผลการวิจัย/ผลผลิตที่ได้รับ

- 4.1. ได้ระบบตรวจความเข้มสีภาคสนามมีลักษณะเป็นกล่องสี่เหลี่ยม ขนาดกว้าง 19.5 ซม ยาว 14 ซม สูง 13.5 ซม (ขนาดของกล่องเปลี่ยนแปลงตามลักษณะการใช้งาน) ทำด้วยวัสดุพลาสติกชนิดพอลิคาร์บอเนตที่มีลักษณะทึบแสง ภายในตกแต่งด้วยสีขาว และติดตั้ง LED จำนวน 18 ดวง เพื่อทำหน้าที่เป็นแหล่งกำเนิดแสง พร้อมกับติดตั้งแบตเตอรี่ ขนาด 12 โวลต์สำหรับการใช้ภาคสนามหรือมีสายไฟสำหรับใช้งานในห้องปฏิบัติการ การออกแบบที่วางตัวอย่างจะแตกต่างกันตามลักษณะการใช้งาน เช่น ระบบตรวจความเข้มสีจากด้านบนสำหรับตรวจวัดโบรอน (รูปที่ 1) ระบบตรวจความเข้มสีจากด้านข้างสำหรับตรวจวัดเหล็กเฟอรัส



รูปที่ 1 ระบบตรวจวัดความเข้มสีสำหรับตรวจวัดโบรอน



รูปที่ 2 ระบบตรวจวัดความเข้มข้นสำหรับตรวจวัดโบรอน

- 4.2. ได้แอปพลิเคชันสำหรับตรวจปริมาณสารบนโทรศัพท์เคลื่อนที่สำหรับการใช้งานบนระบบแอนดรอยด์ (Andriod) และไอโอเอส (iOS) แต่พบว่า การใช้งานบนระบบแอนดรอยด์ประยุกต์ใช้และติดตั้งง่ายและไม่ยุ่งยาก
- 4.3. ได้ชุดตรวจแบบเปรียบเทียบสีแบบฟิล์มบางจากแป้งมันสำปะหลังสำหรับตรวจหาเหล็กเฟอรัสที่มีต้นทุนการผลิต (เฉพาะวัสดุ) ประมาณ 20 สตางค์/ชุด สามารถนำไปประยุกต์ใช้งานสำหรับวิเคราะห์เหล็กละลายน้ำในตัวอย่างน้ำดื่ม น้ำผิวดิน น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรม น้ำในนาข้าว และตัวอย่างดิน ทำให้ทราบผลการทดสอบทันทีและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และได้ตีพิมพ์ผลการวิจัยในวารสารวิชาการระดับนานาชาติจากการศึกษาเบื้องต้น
- 4.4. ได้วิธีการและสภาวะในการสกัดเคอร์คูมินขนาดนาโนจากผงขมิ้นชัน ได้แก่ การใช้ผงขมิ้น 0.15 กรัม เอทานอล 4.5 มิลลิลิตร สกัดด้วยเทคนิคอัลตราโซนิก ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เคอร์คูมินที่สกัดได้มีขนาด 30-90 นาโนเมตรและสามารถนำไปประยุกต์ใช้งานได้อย่างหลากหลาย
- 4.5. ได้ชุดตรวจสะอาดแบบเปรียบเทียบสีจากเคอร์คูมินสำหรับตรวจวัดมลสารในสิ่งแวดล้อมจำนวน 3 แบบ ได้แก่
 - ฟิล์มบางสำหรับตรวจวัดโบรอนแบบจุ่มลงในตัวอย่าง ซึ่งจะทดสอบในสภาวะที่เป็นเบส (pH 9) มีต้นทุนการผลิต (เฉพาะวัสดุ) ประมาณ 10 สตางค์/ชุด ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้งานสำหรับวิเคราะห์โบรอนในตัวอย่างที่หลากหลาย เช่น น้ำดื่ม น้ำผิวดิน น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรม และตัวอย่างอาหาร และได้ตีพิมพ์ผลการวิจัยสำหรับเสนอตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ
 - ฟิล์มบางบนกระดาษสำหรับตรวจวัดเหล็กเฟอรัสแบบหยด ซึ่งจะทดสอบในสภาวะที่เป็นกรด (pH 4) มีต้นทุนการผลิต (เฉพาะวัสดุ) ประมาณ 1 บาท/ชุด สามารถนำไป

ประยุกต์ใช้งานสำหรับวิเคราะห์เหล็กละลายน้ำในตัวอย่างน้ำดื่ม น้ำผิวดิน น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรม น้ำในนาข้าว และตัวอย่างดิน ทำให้ทราบผลการทดสอบทันทีและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และกำลังเตรียมต้นฉบับผลการวิจัยในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

- เม็ดครีโอลเจลจากแป้งสำหรับตรวจวัดเหล็กเฟอริกแบบแช่หรือหยด ซึ่งจะทดสอบในสถานะที่เป็นกรด (pH 2) มีต้นทุนการผลิต (เฉพาะวัสดุ) ประมาณ 50 สตางค์/ชุด และสามารถนำไปประยุกต์ใช้งานสำหรับวิเคราะห์เหล็กได้อย่างหลากหลาย และกำลังเตรียมต้นฉบับผลการวิจัยในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

4.6. ชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นมีศักยภาพที่จะนำไปพัฒนาต่อเป็นต้นแบบภาคสนามเพื่อการจำหน่ายเชิงพาณิชย์ต่อไปในอนาคต แต่ผู้ใช้นิยมใช้ร่วมกับแถบสีมาตรฐานมากกว่าการวิเคราะห์ภาพดิจิทัล

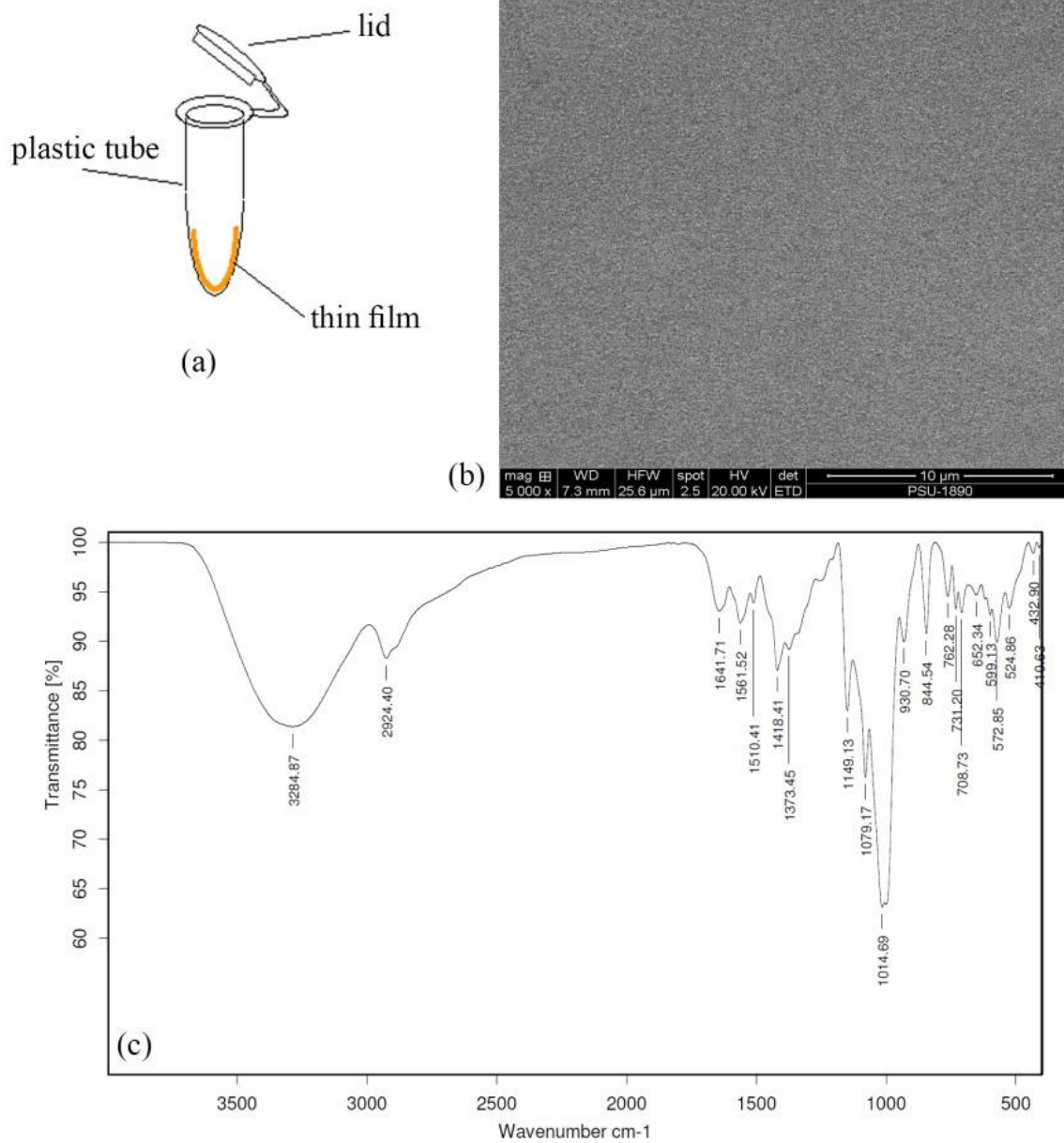
เนื้อหางานวิจัย

การพัฒนาชุดตรวจแบบฟิล์มบางจากแป้งสำหรับตรวจเหล็กเฟอร์รัส

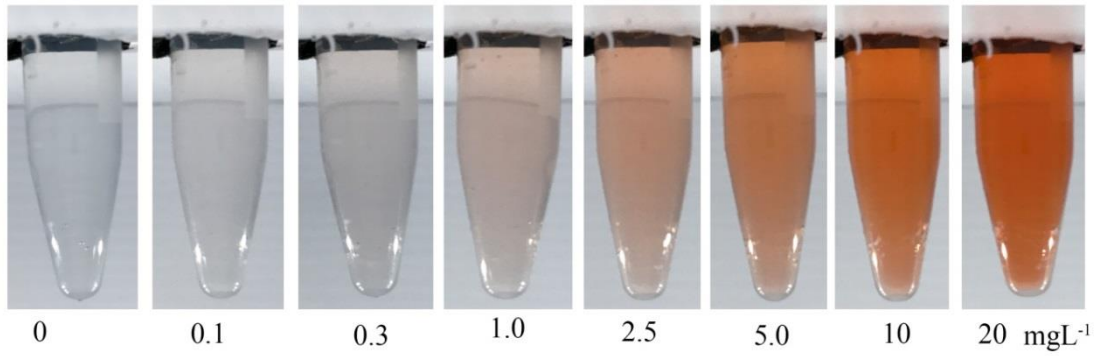
ชุดตรวจเหล็กเฟอร์รัสแบบฟิล์มบางจากแป้งสังเคราะห์ขึ้นโดยอาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยาการเกิดสีระหว่างเหล็กเฟอร์รัสและสารเคมีที่จำเพาะกับเหล็กเฟอร์รัส ได้แก่ ฟีนแอนโทรอลีน (1,10-phenanthroline) เกิดเป็นผลิตภัณฑ์สีแดงของ $[(C_{12}H_8N_2)_3Fe]^{2+}$ ชุดตรวจนี้สังเคราะห์ได้โดยการเตรียมสารละลายแป้งมันสำปะหลัง (แป้ง 0.5 กรัมต่อน้ำ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร) และให้ความร้อนจนได้สารละลายหนืดใส ไม่มีสี หลังจากนั้นเติมสารเชื่อมขวาง (Crosslinker) ที่สามารถเพิ่มสมบัติการเป็นพลาสติก (Plasticizer) ได้แก่ กลีเซอรอล (Glycerol) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ก่อนนำมาผสมกับสารที่ทำให้เกิดปฏิกิริยากับเหล็กละลายน้ำ ได้แก่ สารฟีนแอนโทรอลีน หนัก 0.1 กรัม จากนั้นจึงนำสารละลายพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรไปบรรจุลงในภาชนะบรรจุ และนำไปให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที จึงได้แผ่นฟิล์มบางในลักษณะของการเคลือบอยู่ที่ผิวภายในของบริเวณก้นของหลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร (รูปที่ 3a) ซึ่งจะเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างเหล็กเฟอร์รัสในตัวอย่างกับสารที่ทำให้เกิดสีซึ่งถูกกักไว้ในฟิล์มบางของพอลิเมอร์ธรรมชาติ ฟิล์มบางดังกล่าวมีลักษณะเรียบและเป็นเนื้อเดียวกัน (รูปที่ 3b) และตรวจพบพีคของการดูดกลืนแสงที่แสดงถึงหมู่ฟังก์ชันของฟีนแอนโทรอลีนบริเวณเลขคลื่น 1562, 1510, and 845 cm^{-1} (รูปที่ 3c) จึงยืนยันได้ว่า ฟีนแอนโทรอลีนถูกกักไว้ในฟิล์มบางของแป้ง

เมื่อเติมตัวอย่างที่เป็นของเหลวลงในหลอดพลาสติกและเขย่า จะทำให้ฟีนแอนโทรอลีนที่ถูกกักอยู่ในฟิล์มละลายออกมาทำปฏิกิริยากับเหล็กเฟอร์รัสที่ละลายอยู่ในตัวอย่าง เกิดเป็นสารประกอบสีส้มแดง (รูปที่ 4) หากในตัวอย่างมีปริมาณของเฟอร์รัสสูง สารประกอบสีส้มแดงซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาจะมีปริมาณสูง จึงให้สีส้มแดงเข้ม ในทางกลับกัน หากในตัวอย่างมีปริมาณของเฟอร์รัสต่ำ สารประกอบสีส้มแดงจะมีปริมาณต่ำด้วย จึงให้สีส้มจาง ชุดตรวจนี้มีความจำเพาะต่อเหล็กเฟอร์รัสสูง โดยไม่พบผลของไอออนรบกวน (รูปที่ 5)

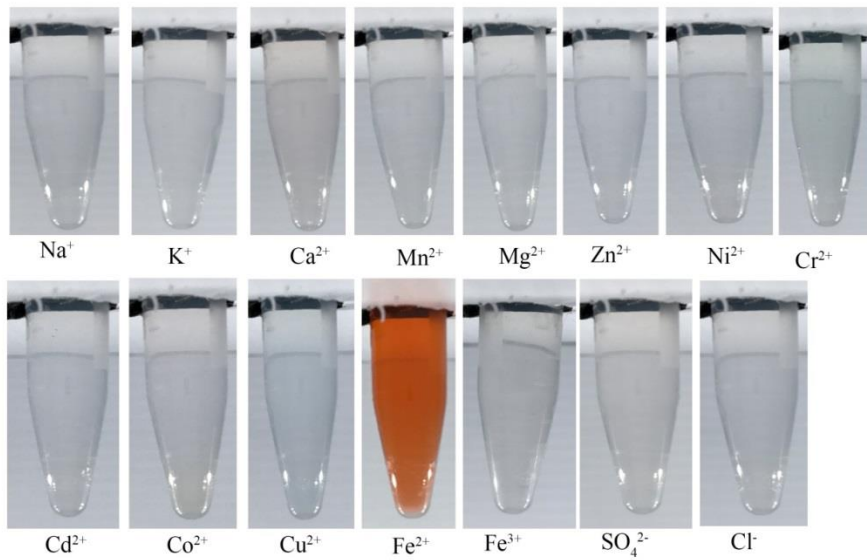
ชุดตรวจเหล็กเฟอร์รัสแบบฟิล์มบางจากแป้งนี้สามารถเก็บรักษาได้นานอย่างน้อย 3 เดือน ทั้งภายในตู้เย็นและสภาวะปกติ โดยให้ผลแตกต่างจากวันแรกที่สังเคราะห์น้อยกว่า 4.8% (รูปที่ 6) การประยุกต์ใช้ชุดตรวจนี้ร่วมกับเทคนิคการวิเคราะห์ภาพดิจิทัลจากโทรศัพท์เคลื่อนที่สำหรับวิเคราะห์ปริมาณเหล็กเฟอร์รัส พบว่า เทคนิคดังกล่าวให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง แม่นยำสูง สามารถตรวจวัดเหล็กเฟอร์รัสได้ในช่วงความเข้มข้นที่กว้าง (0 ถึง 10 มิลลิกรัมต่อลิตร) (รูปที่ 7) มีขีดจำกัดในการตรวจวัดต่ำ ($0.085 \pm 0.001 \text{ mgL}^{-1}$ ถึง $0.40 \pm 0.01 \text{ mgL}^{-1}$) เมื่อประยุกต์ใช้เทคนิคที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างดินจากสวนปาล์มและตัวอย่างน้ำจากแปลงนา จำนวนทั้งหมด 11 ตัวอย่าง พบว่า เทคนิคดังกล่าวให้ร้อยละการได้กลับคืน (%Recovery) จากการสกัดตัวอย่างดิน 98.7 – 99.7% และ 96.2 – 97.3% เมื่อประยุกต์ใช้กับตัวอย่างน้ำ และให้ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างจริงทั้งหมดแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญกับเทคนิคมาตรฐานอะตอมมิก แอ็บซอร์ปชัน สเปกโตรโฟโตเมทรีที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



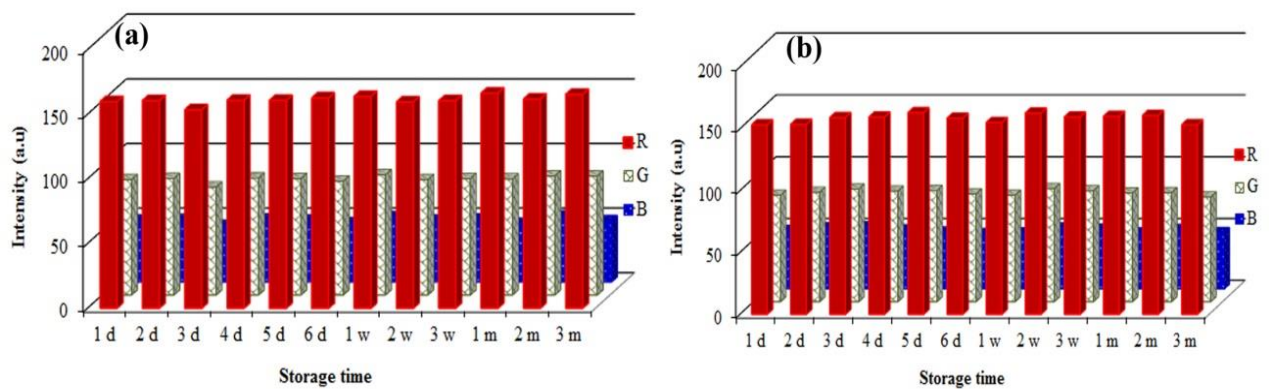
รูปที่ 3 (a) ลักษณะของชุดตรวจเหล็กเฟอร์รัสแบบฟิล์มบางจากแป้ง (b) ลักษณะพื้นผิวของชุดตรวจจากการวิเคราะห์โดยเครื่อง SEM (c) สเปกตรัมของชุดตรวจที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FTIR



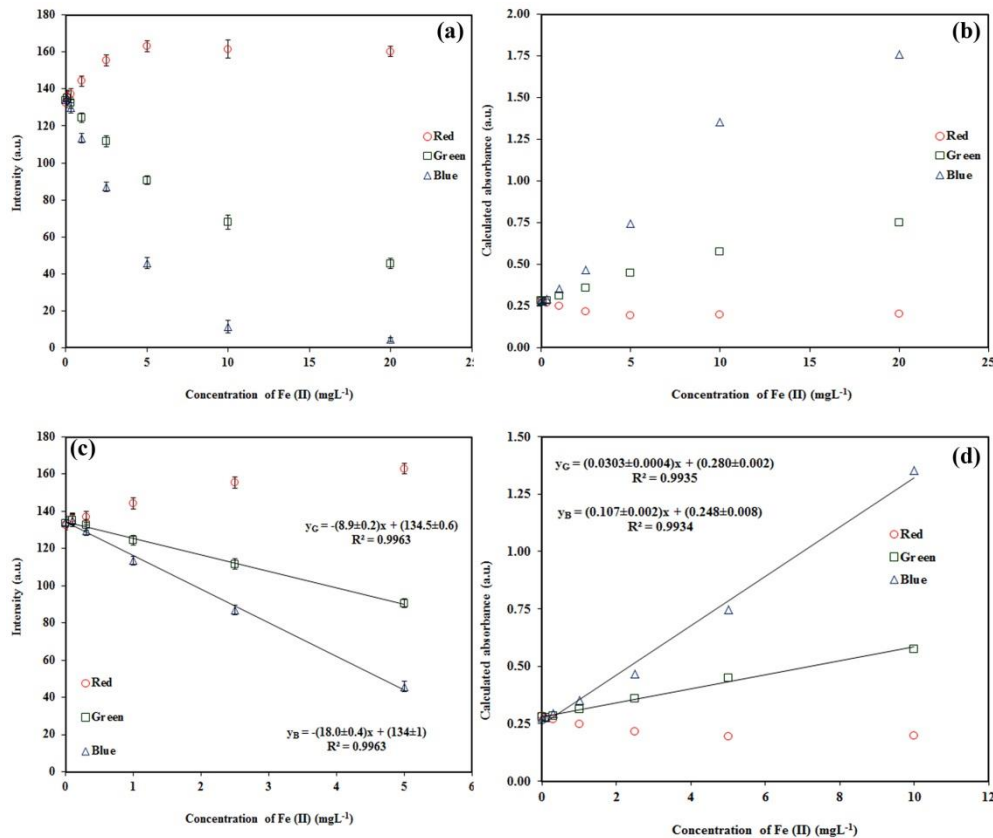
รูปที่ 4 ผลิตกัณห์สีที่ได้จากการทดสอบเฟอร์ริกกับชุดตรวจเหล็กเฟอร์แบบฟิล์มบางจากแป้ง



รูปที่ 5 ผลของไอออนรบกวนของชุดตรวจเหล็กเฟอร์แบบฟิล์มบางจากแป้ง



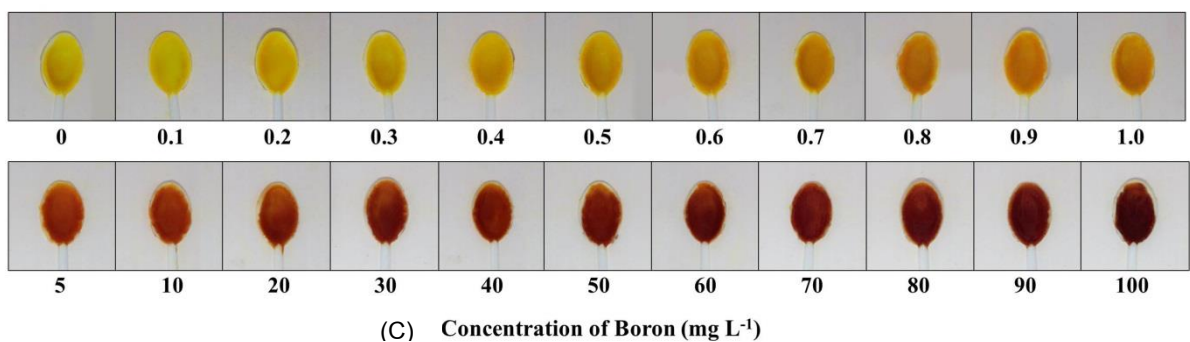
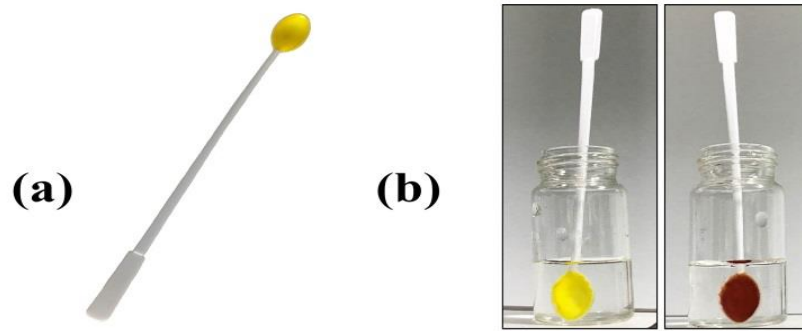
รูปที่ 6 ความเสถียรของชุดตรวจเหล็กเฟอร์แบบฟิล์มบางจากแป้ง (a) ในตู้เย็น (b) ที่อุณหภูมิห้อง



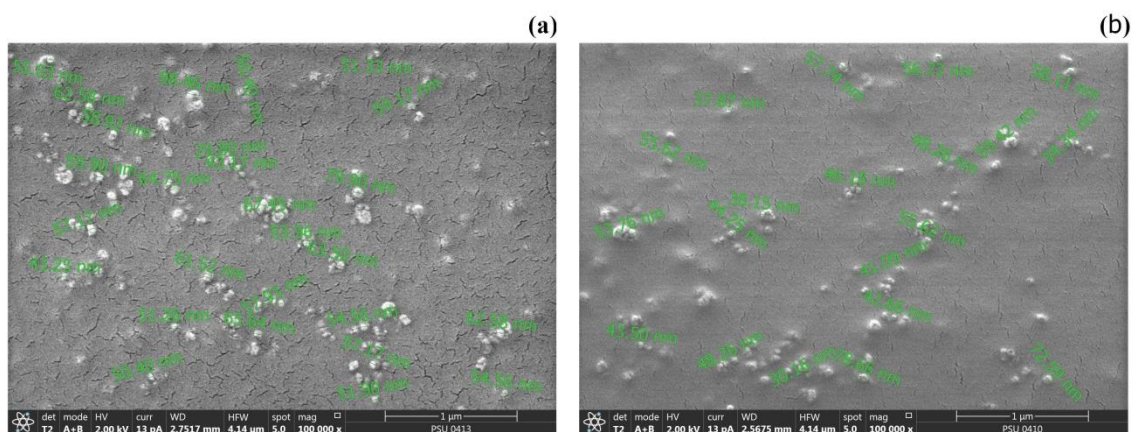
รูปที่ 7 ความสัมพันธ์ของ (a,c) ค่าความเข้มสี (b,d) ค่าการดูดกลืนแสงของภาพดิจิทัลของผลิตภัณฑ์สีที่ได้จากชุดตรวจเหล็กเฟอร์แบบฟิล์มบางกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเหล็กเฟอร์

การพัฒนาชุดตรวจจากเคอร์คูมินขนาดนาโนแบบจุ่มสำหรับตรวจโบรอน

ชุดตรวจโบรอนสังเคราะห์ขึ้นโดยอาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยาการเกิดสีระหว่างโบรอนและเคอร์คูมินขนาดนาโนเกิดเป็นผลิตภัณฑ์สีน้ำตาลแดง (rosocyanin complex) [5, 6] สังเคราะห์ได้โดยการเตรียมสารละลายแป้งมันสำปะหลัง (5% w/v) และให้ความร้อนจนได้สารละลายหนืด สี ไม่มีสี หลังจากนั้นเติมกลีเซอรอลปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ก่อนนำมาผสมกับเคอร์คูมินขนาดนาโน (ในเอทานอล) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำสารละลายผสมปริมาตร 200 ไมโครลิตรหยดลงบนชั้นพลาสติก (ใช้แล้ว) และนำไปให้ความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที จึงได้แผ่นฟิล์มบางสีเหลืองเคลือบอยู่บนชั้นพลาสติก (รูปที่ 8a) ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดงเมื่อนำไปจุ่มในสารละลายมาตรฐานโบรอน (รูปที่ 8b) และจะมีสีเข้มขึ้นตามความเข้มข้นของสารละลายโบรอน (รูปที่ 8c)



รูปที่ 8 (a) ลักษณะชุดตรวจโบรอน (b-c) ผลลัพธ์ที่ได้จากการทดสอบสารละลายโบรอนกับชุดตรวจ



รูปที่ 9 ภาพ SEM ของ (a) เกอร์คูมินขนาดนาโนที่ได้จากการสกัดผงมันชัน (b) ฟิล์มบางของชุดตรวจ

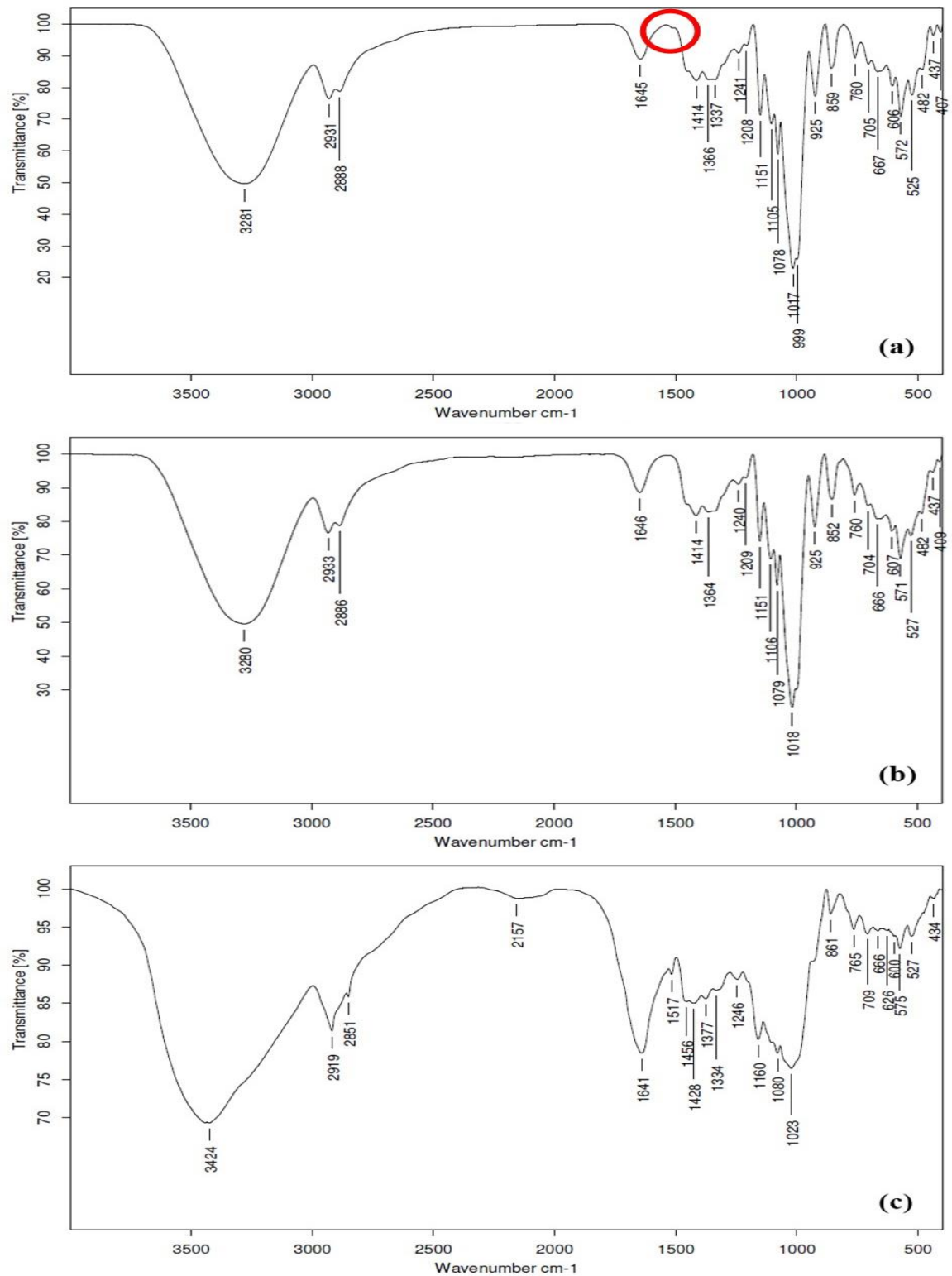
การศึกษาลักษณะพื้นผิวของชุดตรวจฯ ด้วยกล้อง SEM พบเกอร์คูมินขนาดนาโน (30-90 นาโนเมตร) กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ (รูปที่ 9b) และมีขนาดไม่แตกต่างกับเกอร์คูมินที่สกัดได้จากผงมันชัน (รูปที่ 9a) เมื่อตรวจสอบหมู่ฟังก์ชันของฟิล์มโดยใช้เทคนิค FTIR พบว่า พีคของการดูดกลืนแสงของแป้ง (รูปที่ 10b) เกิดการเลื่อนตำแหน่งไปเล็กน้อยเมื่อมีเกอร์คูมินประกอบอยู่ด้วย (รูปที่ 10a) ได้แก่ การสั่นของพันธะ O-H ที่เลขคลื่น 3280 ไปยัง 3281 cm^{-1} พันธะ C-O ของ amylopectin [7, 8] ที่เลขคลื่น 1106

ไปยัง 1105 cm^{-1} , 1079 ไปยัง 1078 cm^{-1} , และ 1018 ไปยัง 1017 cm^{-1} นอกจากนี้แล้วสเปกตรัม FTIR ของฟิล์มบางของชุดตรวจฯ ยังปรากฏพีคของการดูดกลืนแสงที่เลขคลื่น 1513 cm^{-1} สอดคล้องกับสเปกตรัมของสารสกัดเคอร์คูมิน (รูปที่ 10c) ซึ่งน่าจะเป็นพีคที่เกิดจากการสั่นของพันธะ C=C ภายในโมเลกุลของเคอร์คูมิน จึงสามารถยืนยันได้ว่า เคอร์คูมินถูกกักไว้ภายในฟิล์มบางของแบง

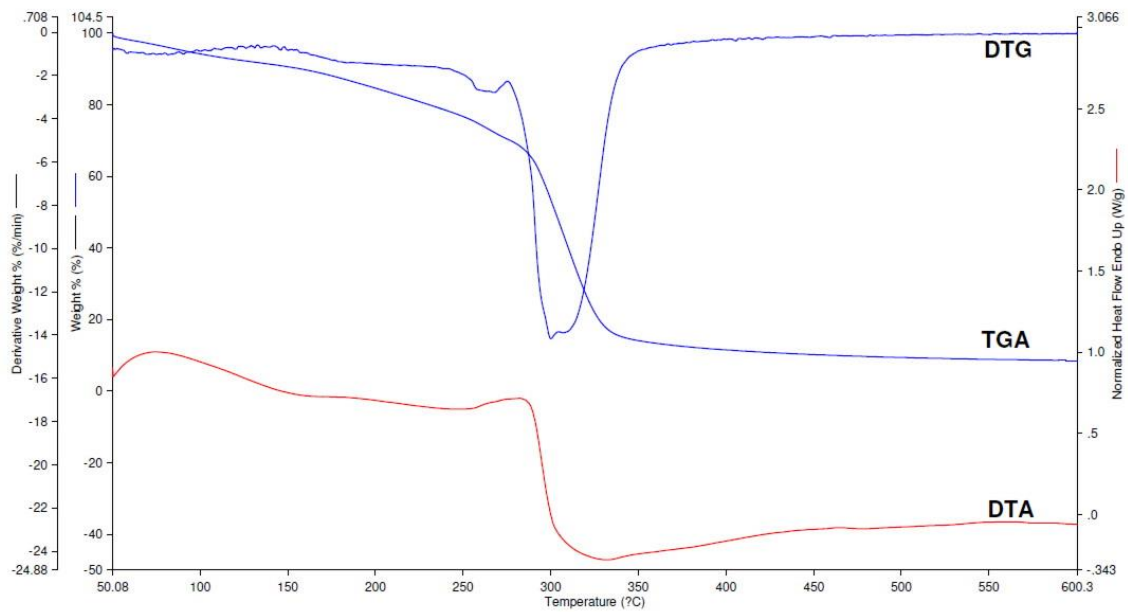
การศึกษา TGA ของฟิล์มบางของแบงที่ผสมเคอร์คูมิน พบว่า เคอร์คูมินจะเกิดการสลายตัวที่อุณหภูมิ $250\text{--}275$ องศาเซลเซียส (รูปที่ 11) สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ซึ่งตรวจพบว่า เคอร์คูมินจะเริ่มสลายตัวที่ 193 องศาเซลเซียส [9] แต่จะเสถียรต่ออุณหภูมิมากขึ้นเมื่อถูกกักไว้ในพอลิเมอร์โดยจะเริ่มสลายตัวที่ 228 องศาเซลเซียสในมอลโตเด็คตริน [9] 270 องศาเซลเซียสในพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ [10] และ 321 องศาเซลเซียสในไคโตแซน [11] การศึกษา DTG แสดงให้เห็นว่า DTG Value ที่ 270 องศาเซลเซียสน่าจะเป็นของเคอร์คูมิน ตามรายงานก่อนหน้านี้ที่รายงาน DTG value ของเคอร์คูมินที่ 277 องศาเซลเซียส และ 310 , 330 องศาเซลเซียสในสารผสมเคอร์คูมิน [12] นอกจากนี้แล้วการศึกษา DTA ยังพบ endothermic peak ที่ประมาณ 75 องศาเซลเซียส ซึ่งคาดว่า น่าจะเกี่ยวข้องกับเคอร์คูมินขนาดนาโนตามรายงานก่อนหน้านี้ซึ่งตรวจพบพีคดังกล่าวที่ 72.4 องศาเซลเซียสจาก nanotized curcumin [13]

จากการศึกษาผลของ pH พบว่า ฟิล์มบางสีเหลืองของชุดตรวจจะเกิดการเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลแดงเมื่อทดสอบกับสารละลายโบรอนที่ pH $8\text{--}13$ (รูปที่ 12a แถวล่าง) อย่างไรก็ตามเมื่อนำชุดตรวจฯ ทดสอบกับสารละลายแบลงค์ (น้ำปราศจากไอออนที่ปรับ pH ตามกำหนด) พบว่า เกิดการเปลี่ยนสีแบบเดียวกันที่ pH มากกว่า 10 (รูปที่ 12a แถวบน) ทั้งนี้เนื่องจากเคอร์คูมินมีสมบัติการเป็น pH indicator ได้ [14-16] ดังนั้นการใช้งานชุดตรวจโบรอนที่พัฒนาขึ้นนี้ควรทำการทดสอบในสารละลายตัวอย่างที่ pH 9 โดยจากการศึกษาพบว่า ที่ pH 9 นี้ จะไม่เกิดการรบกวนจากไอออนอื่นๆ (รูปที่ 12b)

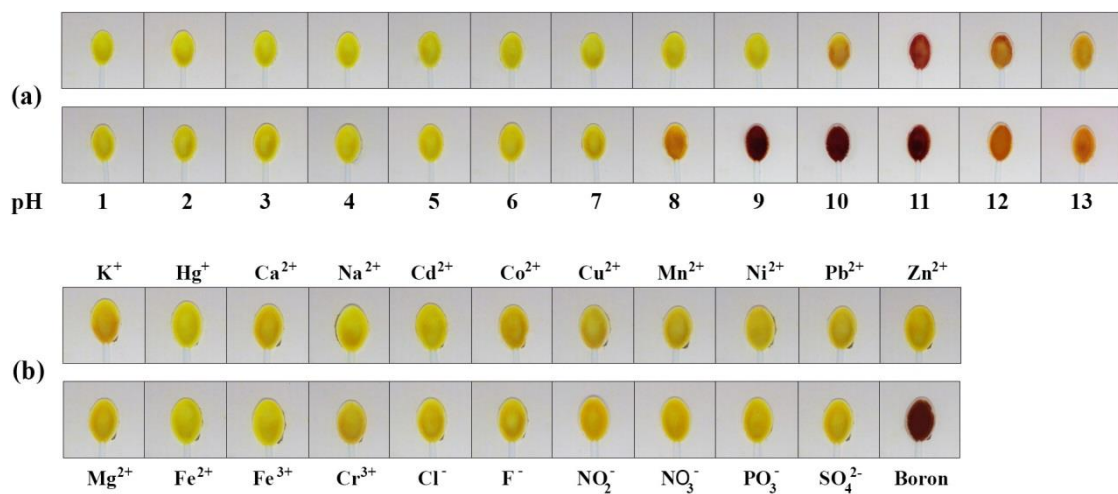
การศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาของชุดตรวจกับสารละลายโบรอนพบว่า ผลิตภัณฑ์สีที่ได้จากการทดสอบจะมีสีเข้มที่สุดหลังการเกิดปฏิกิริยา 15 นาที (รูปที่ 13) ซึ่งให้เห็นว่า ปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นระหว่างเคอร์คูมินและโบรอนสมบูรณ์ที่ 15 นาที ซึ่งเร็วกว่าวิธีมาตรฐานที่ใช้สำหรับตรวจวัดโบรอน (curcumin method) [6, 17] ซึ่งน่าจะเกี่ยวข้องกับขนาดของเคอร์คูมินที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีขนาดเล็ก (ขนาดนาโน) จึงสามารถเกิดปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว



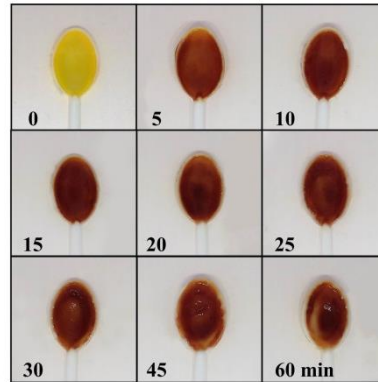
รูปที่ 10 สเปกตรัม FTIR ของ (a) ฟิล์มบางของชุดตรวจโบรอน (a) ฟิล์มแบ่งที่ไม่เติมเคอร์คูมิน (c) สารสกัดเคอร์คูมิน



รูปที่ 11 ผลการศึกษา TGA, DTG, และ DTA ของฟิล์มบางสีเหลืองของชุดตรวจโบรอน



รูปที่ 12 (a) ผลของ pH ต่อผลิตภัณฑ์สีที่ได้จากสารละลายแบลงค์ (บน) สารละลายโบรอน (ล่าง) (b) ผลการทดสอบไอออนรบกวนโดยใช้สารละลายมาตรฐานของไอออนที่ 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ยกเว้นโบรอน (100 มิลลิกรัมต่อลิตร)



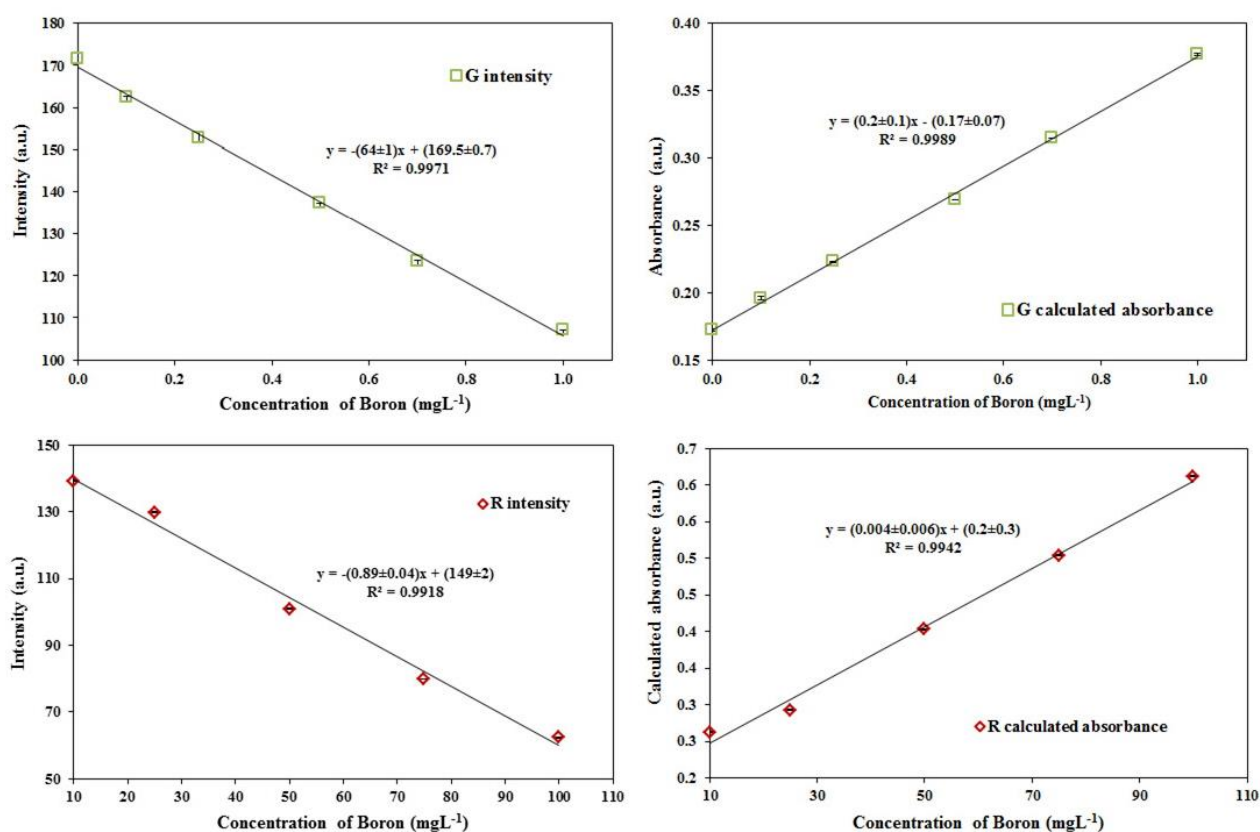
รูปที่ 13 ผลลัพธ์สีที่ได้จากการทดสอบชุดตรวจกับสารละลายมาตรฐานโบรอนที่เวลา 0-60 นาที

เมื่อนำชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นมาใช้ร่วมกับเทคนิคการวิเคราะห์ภาพดิจิทัลสำหรับวิเคราะห์โบรอนเชิงปริมาณ พบว่า ค่าความเข้มแสงสีเขียวและสีแดงมีความสัมพันธ์แบบเป็นเส้นตรงกับความเข้มข้นของโบรอน (รูปที่ 14) ในช่วงความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ได้แก่ 0 ถึง 1 มิลลิกรัมต่อลิตรสำหรับสีเขียว และ 10 ถึง 100 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับสีแดง ความสัมพันธ์ดังกล่าวสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณโบรอนในตัวอย่างได้ จากการศึกษาพบว่า ชุดตรวจสะอาดที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ตรวจวัดโบรอนได้ด้วยความเข้มข้นต่ำสุด (Limit of detection) 0.052 ± 0.001 มิลลิกรัมต่อลิตร และจะให้การตอบสนองเป็นเส้นตรงในช่วง 0 ถึง 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ($R^2 = 0.9971$) และมีค่าความไววิเคราะห์ 64 ± 1 a.u./mgL⁻¹ สมรรถนะของเทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้สรุปไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สมรรถนะสำหรับการวิเคราะห์โบรอนเชิงปริมาณโดยใช้ชุดตรวจโบรอนที่พัฒนาขึ้นร่วมกับเทคนิคการวิเคราะห์ภาพดิจิทัล

ความสัมพันธ์	ความไววิเคราะห์ (a.u. Lmg ⁻¹)	ช่วงความเป็น เส้นตรง (mgL ⁻¹)	ค่าความ เป็นเส้นตรง (R^2)
I _R	0.89 ± 0.04	0 – 100	0.9918
I _G	64 ± 1	0 – 1	0.9971
A _R	0.004 ± 0.006	0 – 100	0.9942
A _G	0.2 ± 0.1	0 – 1	0.9989

เมื่อนำชุดตรวจไปประยุกต์ใช้สำหรับตรวจหาปริมาณโบรอนในตัวอย่างน้ำพบว่า วิธีที่พัฒนาขึ้นให้ผลการวิเคราะห์แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญกับเทคนิคมาตรฐาน (ICP-OES) ดังแสดงในตารางที่



รูปที่ 14 ความสัมพันธ์ของค่าความเข้มสีของผลิตภัณฑ์สีและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโบรอน

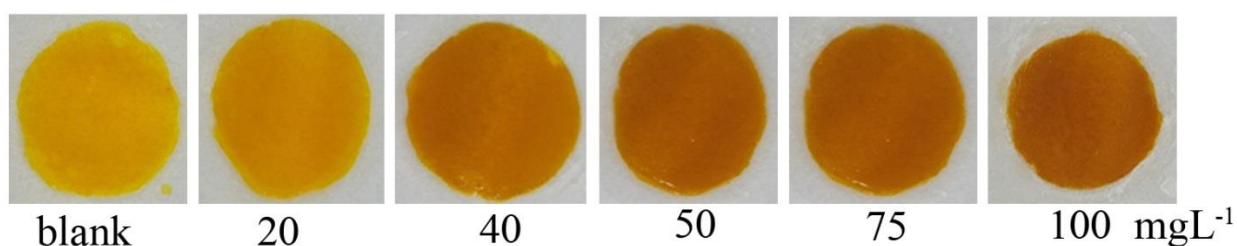
ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโบรอนในตัวอย่างจริง

ตัว อย่าง	วิธีที่พัฒนาขึ้น (mgL ⁻¹)	เทคนิค ICP (mgL ⁻¹)	%Recovery
S1	5397±606	4870±13	112
S2	<0.052*	0.013± 0.001	83
S3	<0.052*	<0.010	91
S4	<0.052*	0.021±0.001	109
S5	<0.052*	0.015±0.0013	107

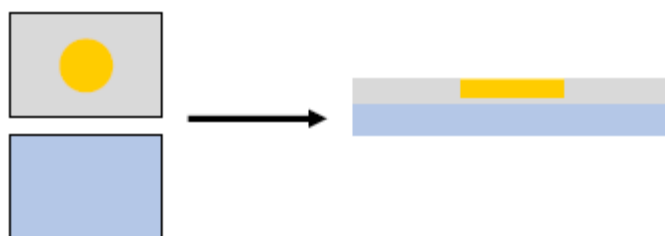
*LOD = 0.052±0.001 mgL⁻¹

การพัฒนาชุดตรวจจากเคอร์คูมินบนกระดาษสำหรับตรวจเหล็กเฟอรัส

ชุดตรวจสะอาดสำหรับตรวจวัดไอออนเหล็กบนกระดาษพัฒนาขึ้นโดยอาศัยหลักการกักสารสกัดเคอร์คูมินไว้ในฟิล์มบางของแป้งมันสำปะหลังและขึ้นรูปในรูปแบบของเซนเซอร์แบบกระดาษเพื่อให้สามารถทดสอบตัวอย่างได้ง่ายโดยการหยดสารละลายตัวอย่างลงบนแผ่นฟิล์มบางโดยตรง ฟิล์มบางสีเหลืองอ่อนจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดงเมื่อทำปฏิกิริยากับไอออนของเหล็กเฟอรัสและมีสีเข้มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเหล็กเฟอรัสมากขึ้น (รูปที่ 15) ชุดตรวจนี้สามารถเตรียมได้โดย 2 ขั้นตอน ได้แก่ การเตรียมกระดาษ และการเตรียมสารผสมสำหรับทำปฏิกิริยา กระดาษซึ่งจะเป็นฐานสำหรับหยดตัวอย่างสามารถเตรียมได้โดยการเคลือบไขบนกระดาษขนาดกว้าง 2.4 ซม ยาว 2.5 ซม จำนวน 2 ชั้น (เว้นบริเวณตรงกลางไว้สำหรับสร้างฟิล์มสำหรับเกิดปฏิกิริยา) (รูปที่ 16) ในขณะที่การเตรียมสารผสมสำหรับทำปฏิกิริยาสามารถทำได้โดยการผสมสารละลายแป้งและเคอร์คูมินขนาดนาโนในอัตราส่วน (3: 0.4 มิลลิกรัม) แล้วหยดสารละลายผสมปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงบนกระดาษที่เตรียมไว้และทิ้งให้แห้งประมาณ 2-3 ชั่วโมง จะได้ฟิล์มบางสีเหลืองอ่อนบนกระดาษ

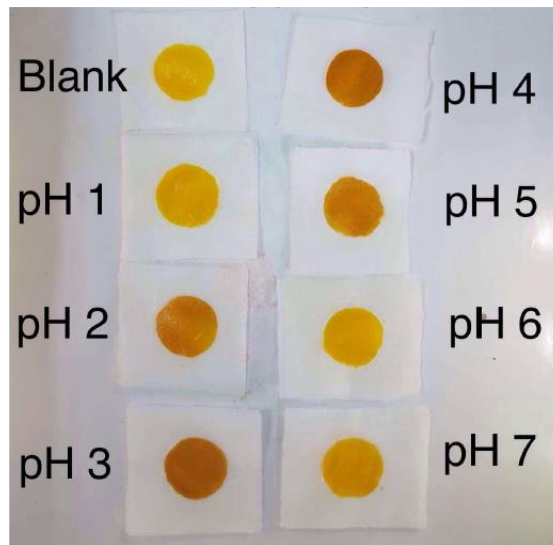


รูปที่ 15 ผลิตกัณฑ์สีจากการทดสอบเฟอรัสโดยใช้ชุดตรวจสะอาดจากเคอร์คูมินแบบกระดาษ

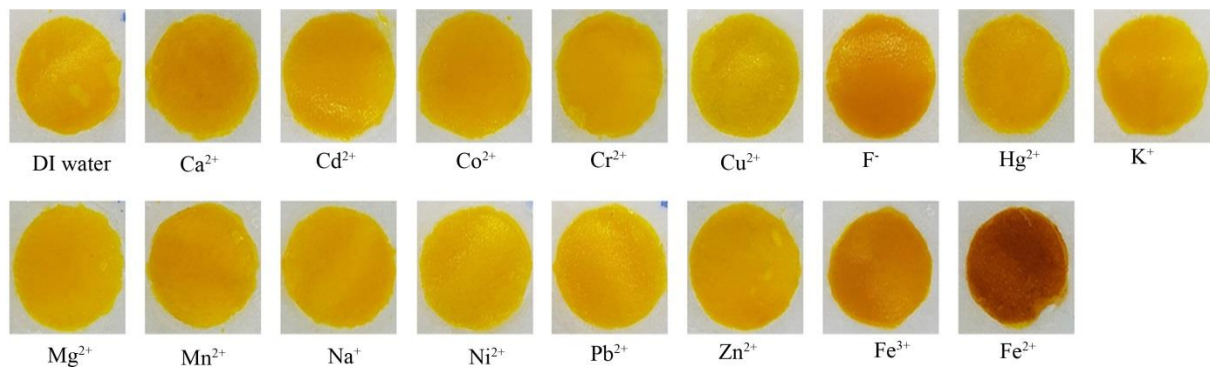


รูปที่ 16 ลักษณะของเซนเซอร์แบบกระดาษซึ่งสร้างจากกระดาษกรอง 2 ชั้น และเคลือบไขทั้งหมด ยกเว้นบริเวณสีเหลืองซึ่งเป็นบริเวณที่ใช้สร้างฟิล์มและหยดตัวอย่าง

ชุดตรวจแบบกระดาษนี้สามารถเกิดปฏิกิริยากับเหล็กเฟอรัสได้ดีที่ pH 3 และ 4 (รูปที่ 17) อย่างไรก็ตามเนื่องจาก Fe^{3+} สามารถเกิดผลิตกัณฑ์สีเดียวกันที่ pH 3 ด้วย ดังนั้นหากต้องการทราบเฉพาะความเข้มข้นของเหล็กเฟอรัสในตัวอย่างจริง ควรทำการทดสอบที่ pH 4 หากต้องการทราบเหล็กทั้งหมด ($\text{Fe}^{2+} + \text{Fe}^{3+}$) ควรปรับ pH ของตัวอย่างเป็น pH 3 นอกจากนี้แล้วชุดตรวจแบบกระดาษยังไม่เกิดปฏิกิริยากับไอออนอื่นๆ ได้แก่ Ca^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Cr^{3+} , Cu^{2+} , Hg^+ , K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} และ Fe^{3+} แม้ว่าจะมีความเข้มข้นสูงกว่า Fe^{2+} 1,000 เท่า (รูปที่ 18)



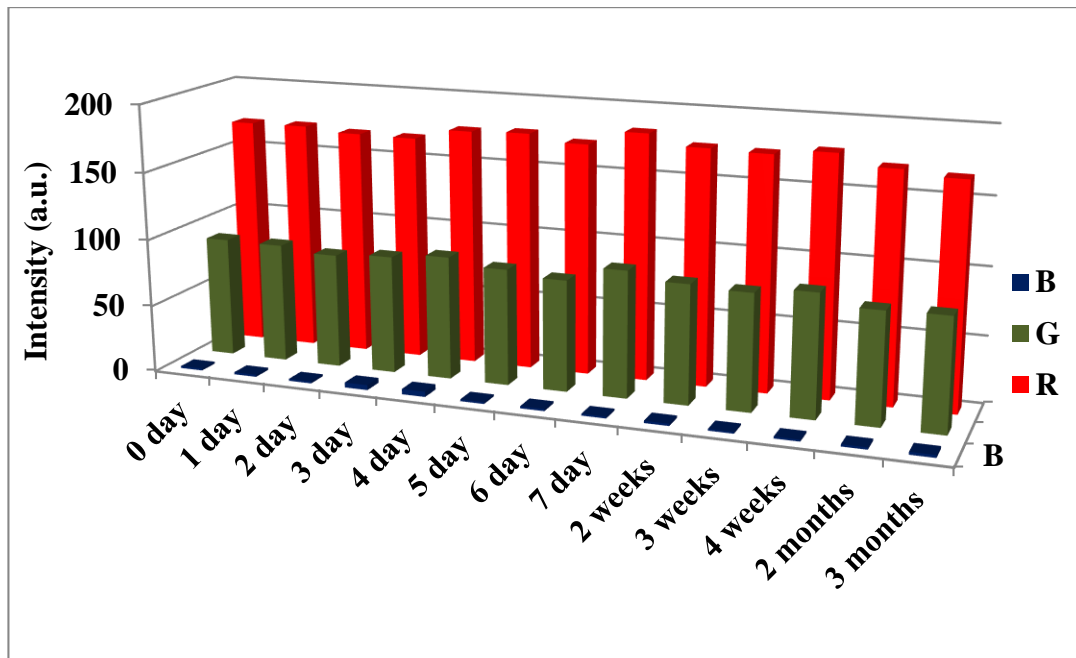
รูปที่ 17 ผลิตกัณฑ์สีจากชุดตรวจแบบกระดาษที่เมื่อทดสอบกับสารละลายเฟอร์รัสที่ pH 1-7



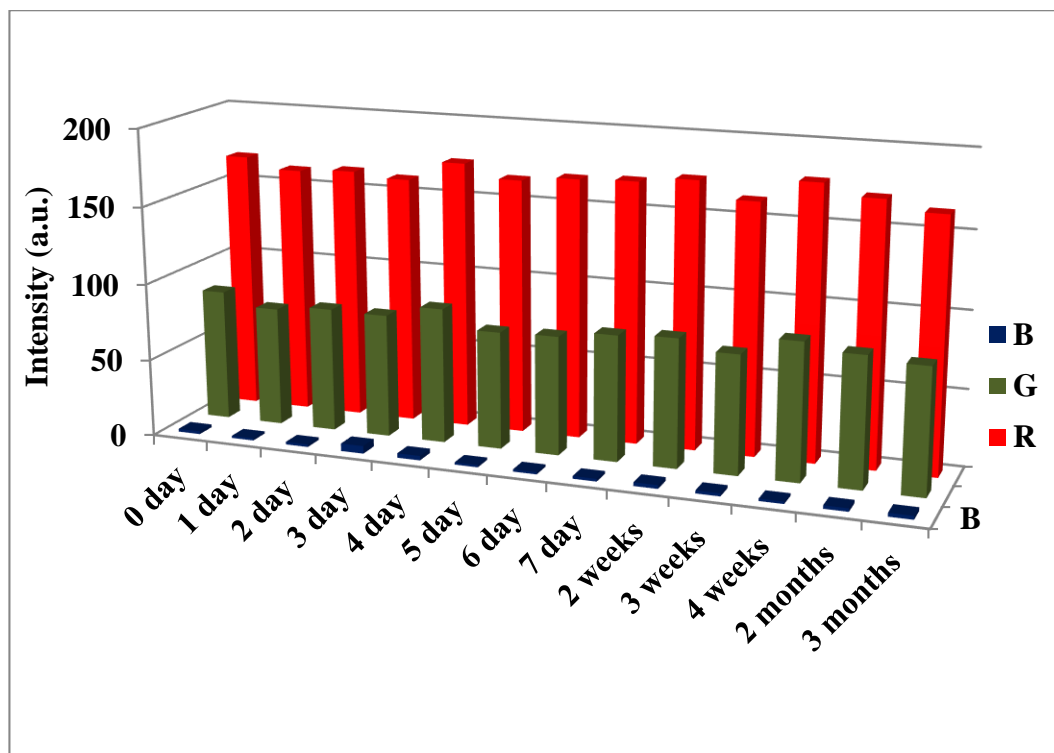
รูปที่ 18 ผลของไอออนรบกวน (ความเข้มข้น 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ยกเว้นเหล็กเฟอร์รัส 100 มิลลิกรัมต่อลิตร)

การศึกษาสภาวะและระยะเวลาการเก็บรักษาทั้งในสภาวะปกติและในตู้เย็น พบว่า ค่าความเข้มแสงสีเขียวและสีแดงของผลิตภัณฑ์สีที่ได้จากทดสอบชุดตรวจด้วยสารละลายมาตรฐานโบรอนในวันที่เตรียมชุดตรวจ (วันที่ 0) และหลังเก็บไว้ที่สภาวะปกตินาน 84 วัน (ประมาณ 3 เดือน) ให้ผลแตกต่างกันเพียง -2.46% และ 5.85% (รูปที่ 19) ในขณะที่การเก็บรักษาในตู้เย็นให้ผลแตกต่างกัน -2.49% และ 4.57% (รูปที่ 20)

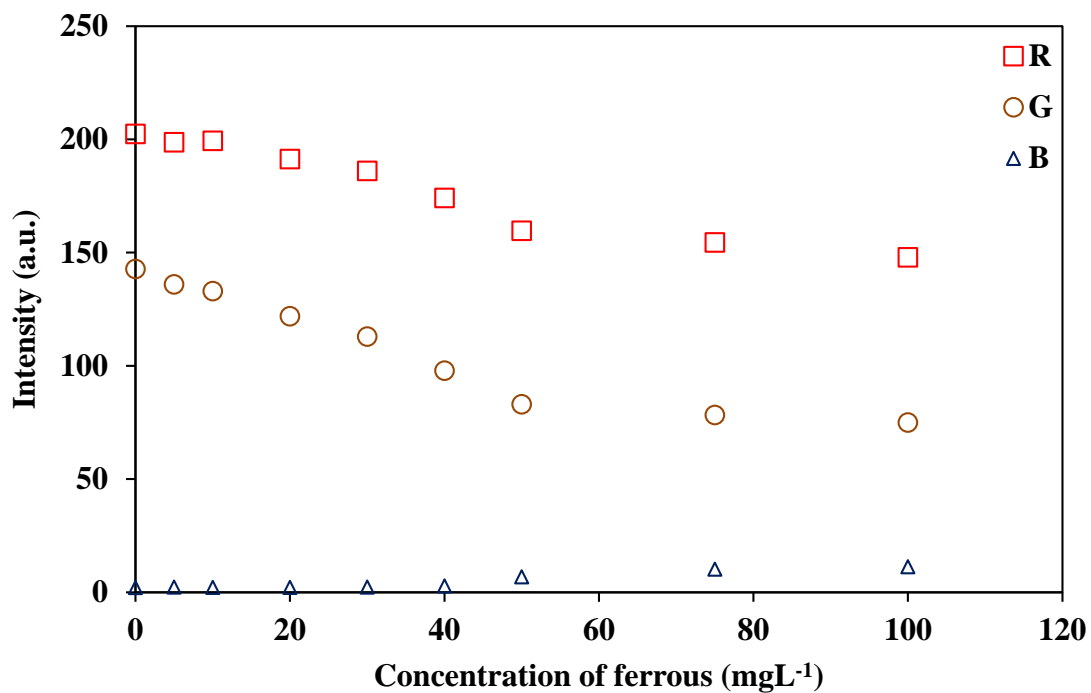
เมื่อใช้ชุดตรวจฯ ร่วมกับการวิเคราะห์ภาพถ่ายดิจิทัลพบว่า ความสัมพันธ์ของค่าความเข้มสี RGB กับความเข้มข้นของเหล็กเฟอร์รัส (รูปที่ 21) มีช่วงที่ให้การตอบสนองเป็นเส้นตรงระหว่าง 0 ถึง 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วย $R^2 = 0.9907$ (รูปที่ 22) จึงสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ โดยมีค่าความไววิเคราะห์ $1.08 \text{ a.u./mgL}^{-1}$



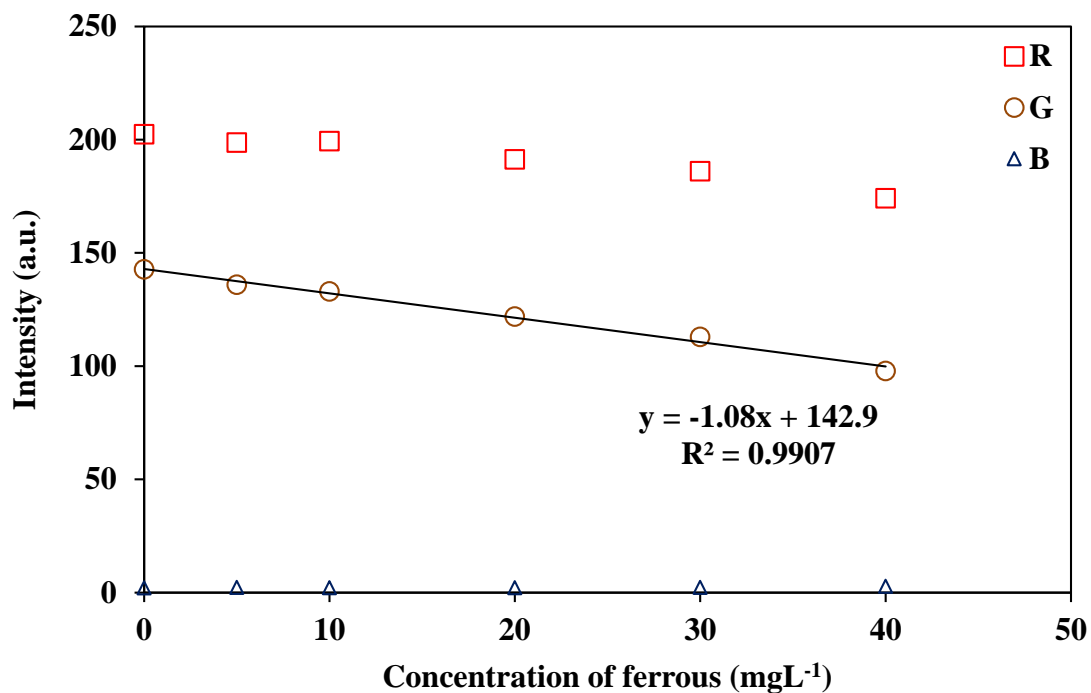
รูปที่ 19 ค่าความเข้มแสงของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทดสอบสารละลายโปรอนกับชุดตรวจแบบกระดาษ ที่ระยะเวลาเก็บรักษา 0 วัน ถึง 3 เดือน ที่สภาวะปกติ



รูปที่ 20 ค่าความเข้มแสงของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทดสอบสารละลายโปรอนกับชุดตรวจแบบกระดาษ ที่ระยะเวลาเก็บรักษา 0 วัน ถึง 3 เดือนในตู้เย็น



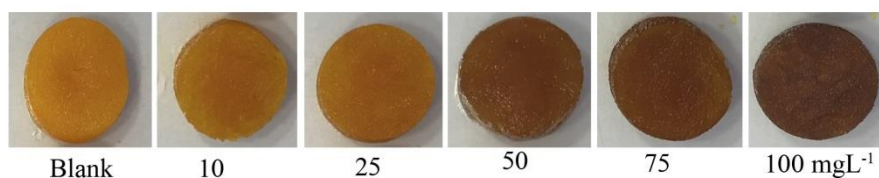
รูปที่ 21 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มสี RGB และความเข้มข้นของเฟอร์รัสที่ได้จากการชุดตรวจแบบกระดาษ



รูปที่ 22 ช่วงความเป็นเส้นตรงและสมการความสัมพันธ์ที่สามารถนำไปวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยใช้ชุดตรวจแบบกระดาษ

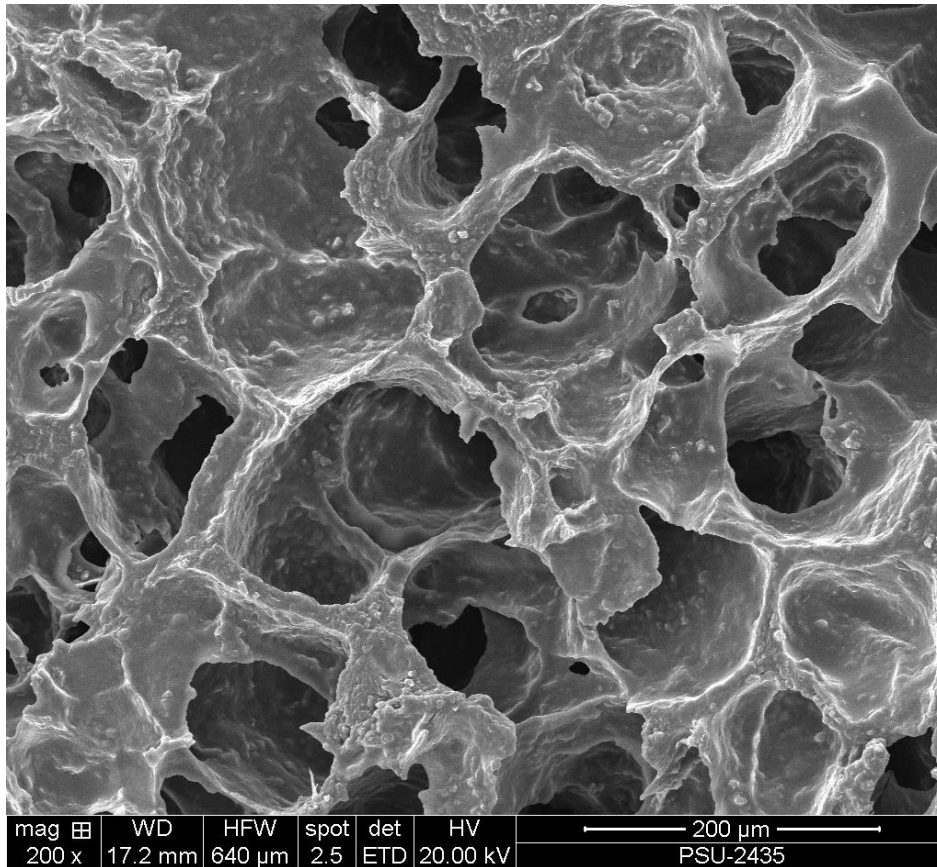
การพัฒนาชุดตรวจแบบเม็ดครีโอลเจลจากเคอร์คูมินสำหรับตรวจวัดเหล็กเฟอริก

ชุดตรวจจะอาศัยแบบเม็ดครีโอลเจลจากเคอร์คูมินขนาดนาโนสังเคราะห์ขึ้นโดยอาศัยการกักเคอร์คูมินขนาดนาโนไว้ภายในผนังบางของครีโอลเจล (เนื้อพอลิเมอร์) ในขณะที่รูปพรุนของครีโอลเจลทำให้อัตว์อย่างสามารถสัมผัสกับเคอร์คูมินได้ใกล้ชิดขึ้น จึงเกิดปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว ครีโอลเจลหรือชุดตรวจจะอาศัยนี้สังเคราะห์จากแป้งมันสำปะหลังและสร้างรูปพรุนที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จึงได้เม็ดครีโอลเจลสีเหลืองอ่อนที่มีความเป็นรูปพรุนสูง (คล้ายฟองน้ำ) เมื่อทำปฏิกิริยากับไอออนของเหล็กเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดง (รูปที่ 23) ชุดตรวจนี้สามารถสังเคราะห์ได้ 2 แบบ ได้แก่ การผสมเคอร์คูมินขนาดนาโนของในสารละลายแป้งและนำไปแช่แข็งหรือการเตรียมเม็ดครีโอลเจลก่อนแล้วจึงนำไปแช่ในเคอร์คูมินขนาดนาโน ผลการศึกษาพบว่า ชุดตรวจที่สังเคราะห์โดยใช้แบบที่ 2 จะเกิดปฏิกิริยากับสารละลายที่สนใจจะวิเคราะห์เร็วกว่า จึงเลือกใช้ในการสังเคราะห์แบบดังกล่าวสำหรับพัฒนาชุดตรวจ สมภาวะที่ใช้ในการเตรียมชุดตรวจ ได้แก่ การกวนสารละลายแป้ง (13.3%w/v ในแคลเซียมไฮดรอกไซด์) จนได้สารผสมหนืดแล้วจึงนำไปบรรจุเข็มฉีดยาขนาด 3 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำมาคายการแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำแท่งครีโอลเจลออกจากหลอดฉีดยาและแบ่งเป็นชิ้นตามขนาดที่ต้องการ (ความหนาที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ 5 มิลลิเมตร) จากนั้นจึงนำเม็ดครีโอลเจลที่ได้ไปแช่ในสารสกัดเคอร์คูมินขนาดนาโนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดคืบเม็ดครีโอลเจลออกมาและนำไปวางบนกระดาษฟิลท์และอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จึงได้เป็นเม็ดครีโอลเจลเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร หนา 3-4 มิลลิเมตร ซึ่งจะคืนตัวตามขนาดเดิมเมื่อนำไปแช่น้ำหรือตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐานโบรอน

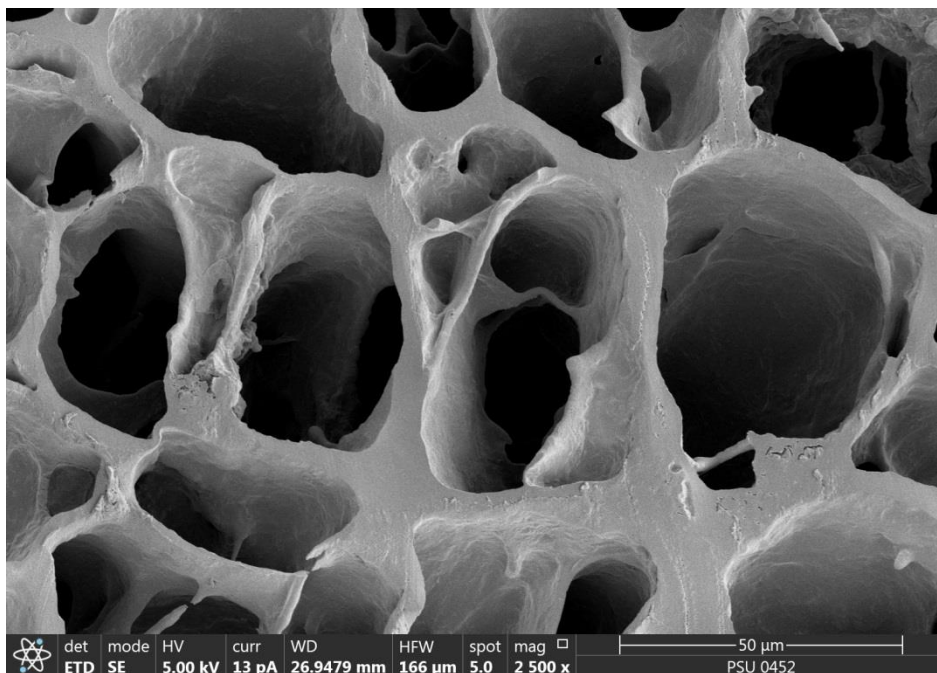


รูปที่ 23 ผลิตกษณ์สีที่ได้จากการทดสอบสารละลายเฟอริกกับชุดตรวจจะอาศัยแบบเม็ดครีโอลเจล

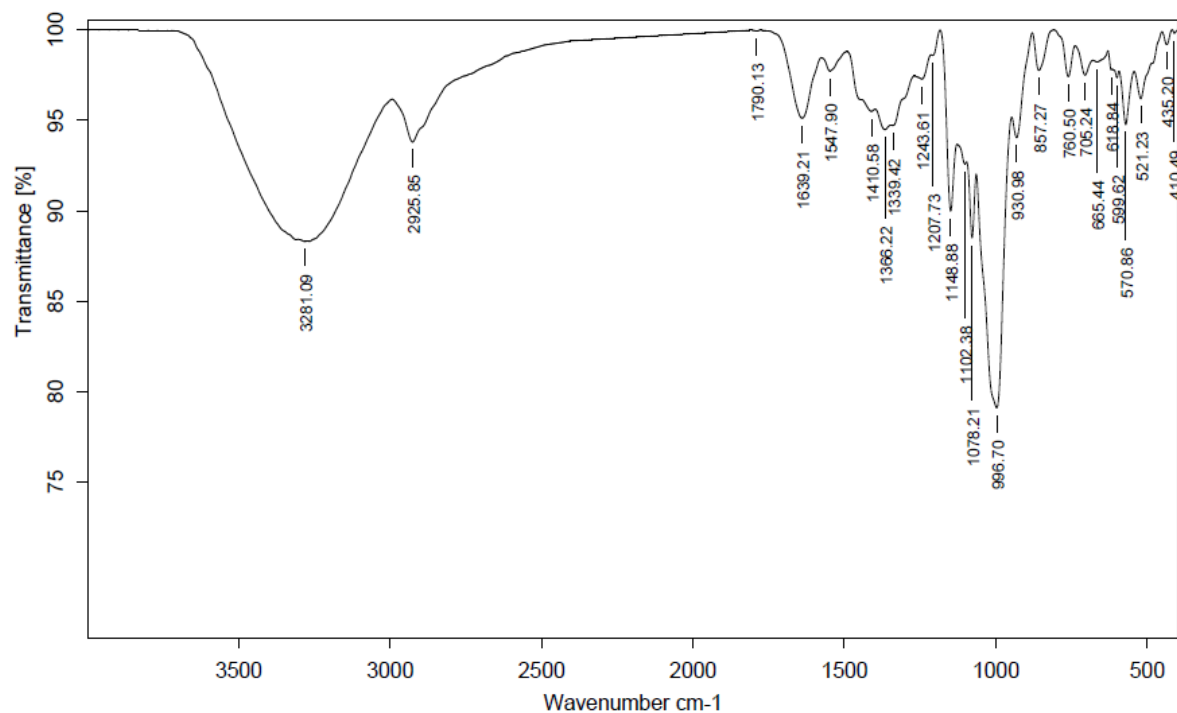
การศึกษาลักษณะพื้นผิวของเม็ดครีโอลเจลโดยใช้เทคนิค SEM พบว่า เคอร์คูมินขนาดนาโนกระจายตัวอยู่ภายในผนังของครีโอลเจลอย่างสม่ำเสมอ (รูปที่ 24) แตกต่างจากครีโอลเจลที่ไม่ผสมสารสกัดเคอร์คูมินซึ่งมีลักษณะพื้นผิวเรียบกว่า (รูปที่ 25) การศึกษาหมู่ฟังก์ชันโดยใช้เทคนิค FTIR พบว่าสเปกตรัม FTIR ของเม็ดครีโอลเจลที่มีเคอร์คูมินขนาดนาโนผสมอยู่ด้วย (รูปที่ 26) มีความแตกต่างกับสเปกตรัมเม็ดครีโอลเจลแบบลงค์ (รูปที่ 27) ที่เลขคลื่น 2854, 1512 และ 1452 cm⁻¹ ซึ่งเกิดจากการสั่นของพันธะภายในโมเลกุลของเคอร์คูมิน



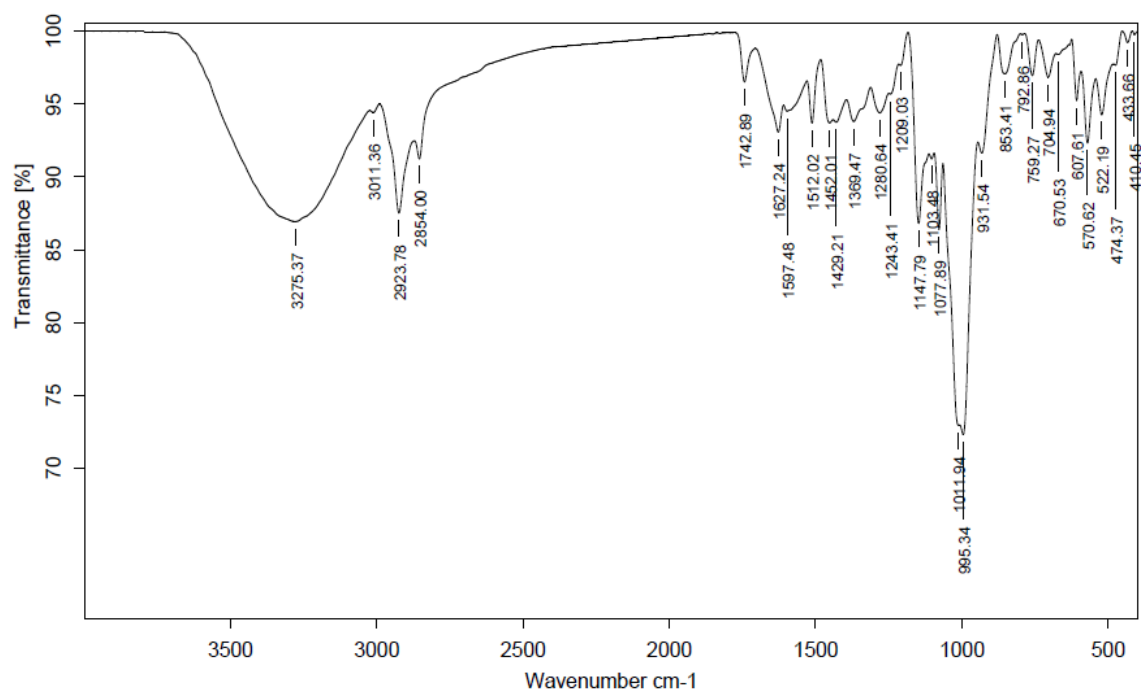
รูปที่ 24 ลักษณะพื้นผิวของชุดตรวจสะอาดแบบครีโوجلที่มีอนุภาคนาโนของเคอร์คูมินอยู่ภายใน



รูปที่ 25 ลักษณะพื้นผิวของชุดตรวจสะอาดแบบครีโوجلที่ไม่ผ่านการแช่ด้วยสารสกัดเคอร์คูมิน



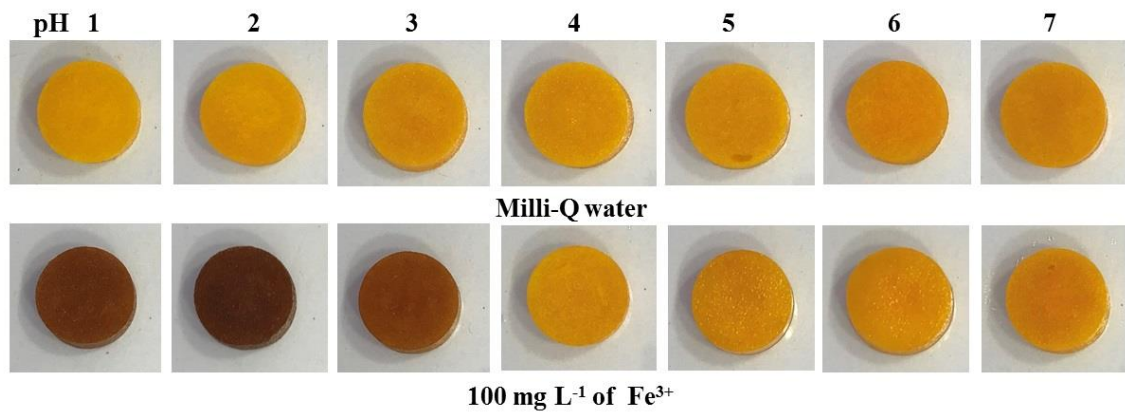
รูปที่ 26 ลักษณะหมู่ฟังก์ชันของชุดตรวจสอบกรดแบบครีโอลเจลแบลงค์ (ไม่มีเคอร์คูมิน)



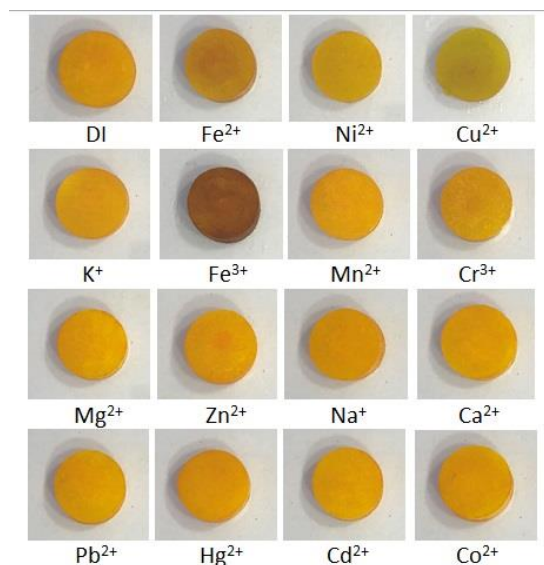
รูปที่ 27 ลักษณะหมู่ฟังก์ชันของชุดตรวจสอบกรดแบบครีโอลเจลที่มีเคอร์คูมินประกอบอยู่ด้วย

ชุดตรวจแบบเม็ดครีโอลเจลนี้เกิดปฏิกิริยากับเหล็กเฟอริกได้ดีที่ pH 2 (รูปที่ 28) โดยไม่มีผลการรบกวนจากไอออนชนิดอื่น (รูปที่ 29) การศึกษาความเสถียรของชุดตรวจแบบเม็ดครีโอลเจล พบว่า ชุด

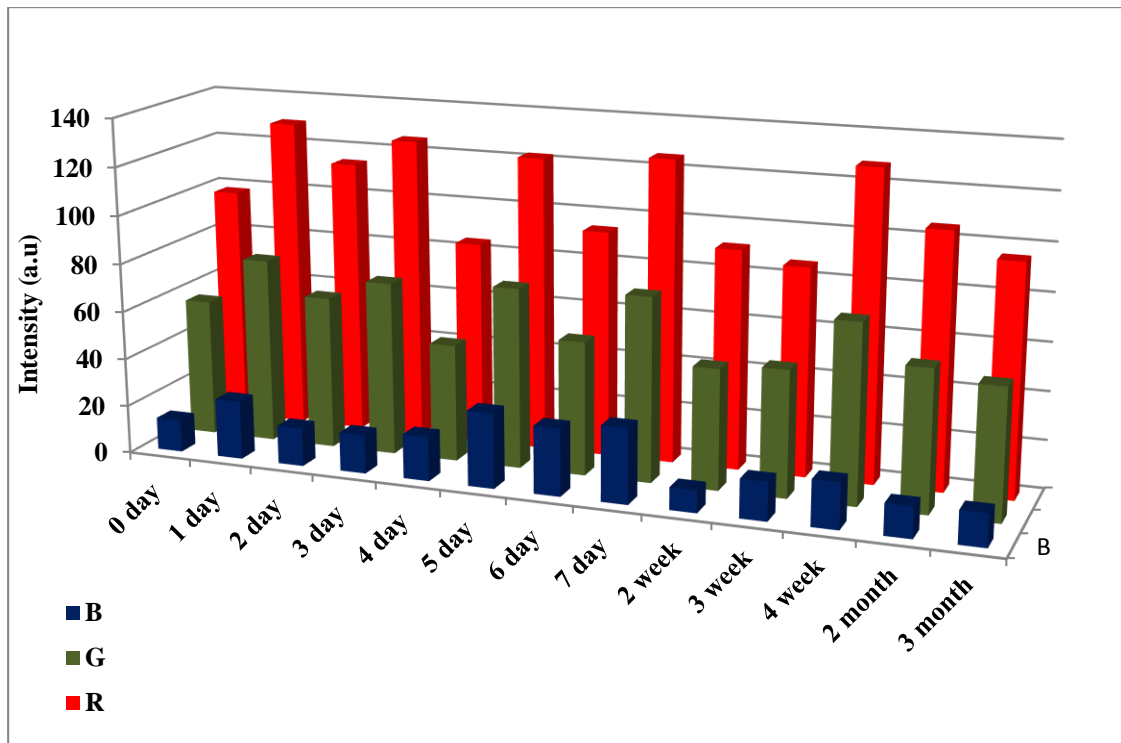
ตรวจไม่สามารถเก็บในตู้เย็นได้เนื่องจากจะทำให้ขึ้นและเสื่อมประสิทธิภาพอย่างรวดเร็ว จึงให้ผลการทดสอบที่ไม่คงที่ (รูปที่ 30) การเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจะมีความเสถียรมากกว่าโดยความเข้มแสงสีเขียวของผลิตภัณฑ์สีที่ได้จากการทดสอบชุดตรวจภายหลังจากเก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลา 3 เดือนแตกต่างจากผลการทดสอบในวันที่เตรียม (0 วัน) เพียง +1.26% (รูปที่ 31)



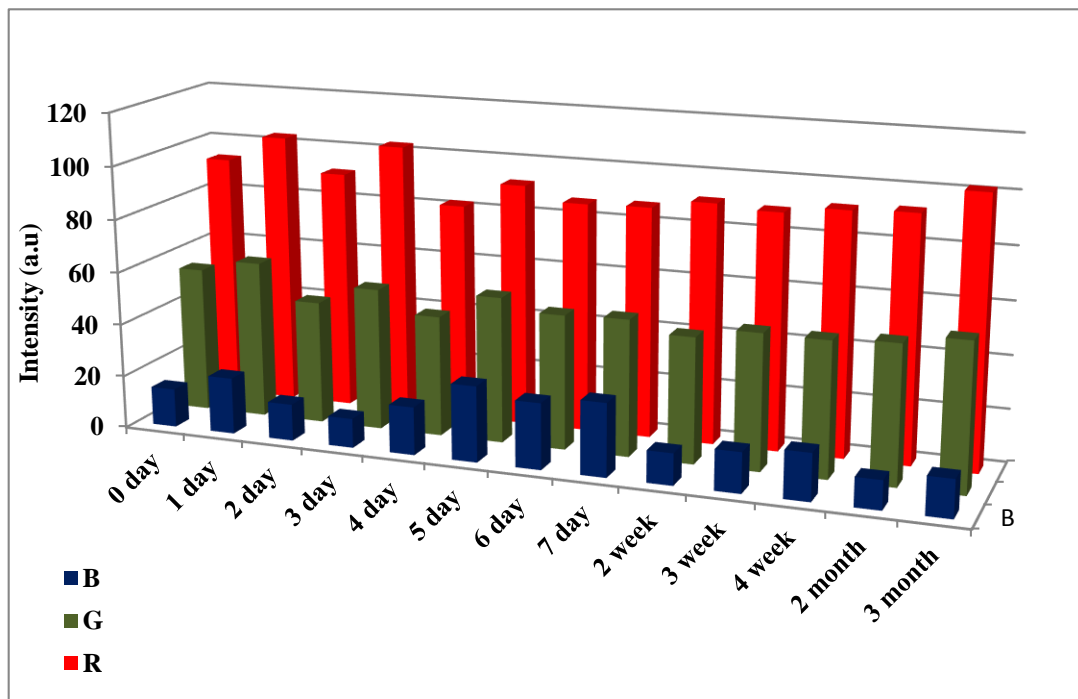
รูปที่ 28 ผลของ pH



รูปที่ 29 ผลการศึกษาไอออนรบกวน (ความเข้มข้นของสารละลาย 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ยกเว้น เหล็กเฟอริกที่ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร)

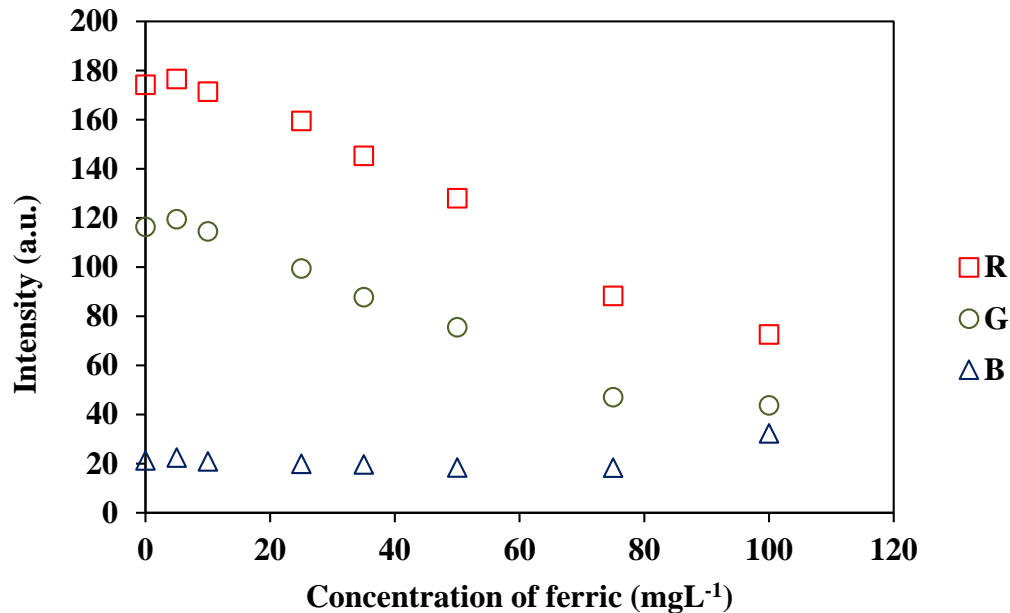


รูปที่ 30 ค่าความเข้มแสงของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทดสอบสารละลายโปรนกับชุดตรวจแบบ เม็ดครีโยเจลที่ระยะเวลาเก็บรักษา 0 วัน ถึง 3 เดือนในตู้เย็น

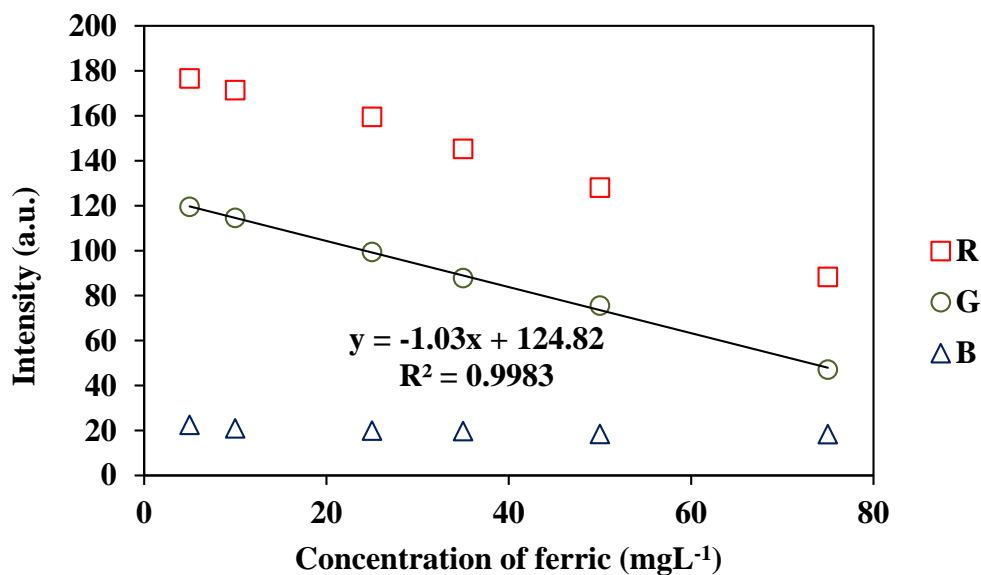


รูปที่ 31 ค่าความเข้มแสงของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทดสอบสารละลายโปรนกับชุดตรวจแบบ เม็ดครีโยเจลที่ระยะเวลาเก็บรักษา 0 วัน ถึง 3 เดือนที่สภาวะปกติ

เมื่อใช้ชุดตรวจฯ ร่วมกับการวิเคราะห์ภาพถ่ายดิจิทัลพบว่า ความสัมพันธ์ของค่าความเข้มสี RGB กับความเข้มข้นของเหล็กเฟอริก (รูปที่ 32) มีช่วงที่ให้การตอบสนองเป็นเส้นตรงระหว่าง 5 ถึง 75 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วย $R^2 = 0.9983$ (รูปที่ 33) จึงสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ โดยมีค่าความไววิเคราะห์ $1.03 \text{ a.u./mgL}^{-1}$



รูปที่ 32 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มสี RGB และความเข้มข้นของเฟอรัสที่ได้จากการชุดตรวจแบบกระดาษ



รูปที่ 32 ช่วงความเป็นเส้นตรงและสมการความสัมพันธ์ที่สามารถนำไปวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยใช้ชุดตรวจแบบกระดาษ

เอกสารอ้างอิง

1. Armenta, S., Garrigues, S., and de la Guardia, M., Green Analytical Chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 27(6) (2008) 497-511.
2. Chiellini, E. and Solaro, R., Biodegradable polymeric materials. . *Advanced Materials*. 4 (1996) 305-313.
3. Araújo, M. A., Cunha, A., and Mota, M., Enzymatic degradation of starch-based thermoplastic compounds used in prostheses: Identification of the degradation products in solution. . *Biomaterials*. 25 (2004) 2687-2693.
4. Zhang, J.-F. and Sun X, Z., Mechanical properties of PLA/starch composites compatibilized by maleic anhydride. . *Biomacromolecules*. 5 (2004) 1446-1451.
5. Dyrssen, D. W., Novikov, Y. P., and Uppström, L. R., Studies on the chemistry of the determination of boron with curcumin. *Analytica Chimica Acta*. 60(1) (1972) 139-151.
6. Liu, Y.-M. and Lee, K., Modifications of the curcumin method enabling precise and accurate measurement of seawater boron concentration. *Marine Chemistry*. 115 (1) (2009) 110-117.
7. Deeyai, P., Suphantharika, M., Wongsagonsup, R., et al., Characterization of Modified Tapioca Starch in Atmospheric Argon Plasma under Diverse Humidity by FTIR Spectroscopy. *Chinese Physics Letters*. 30 (2013) 0181031-0181034.
8. Sutjarittangtham, K., Jaiturong, P., Intatha, U., et al., Fabrication of Natural Tapioca Starch Fibers by a Modified Electrospinning Technique. *Chiang Mai Journal of Science*. 41 (2014) 213-223.
9. Delgado, A. Y. C., Velásquez, H. J. C., and Molina, D. A. R., Thermal and thermodynamic characterization of a dye powder from liquid turmeric extracts by spray drying. *Rev.Fac.Nac.Agron*. 69(1) (2016) 7845-7854.
10. Sun, X. Z., Williams, G. R., Hou, X. X., et al., Electrospun curcumin-loaded fibers with potential biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*. 94(1) (2013) 147-153.
11. Parize, A., Stulzer, H., Marghetti, M., et al., Evaluation of chitosan microparticles containing curcumin and crosslinked with sodium tripolyphosphate produced by spray drying. . *Quimica Nova*. 35 (2012) 1127-1132.
12. Priya, P., Mohan Raj, R., Vasanthakumar, V., et al., Curcumin-loaded layer-by-layer folic acid and casein coated carboxymethyl cellulose/casein nanogels for treatment of skin cancer. *Arabian Journal of Chemistry*. (2017).

13. Ghosh, A., Banerjee, T., Bhandary, S., et al., Formulation of nanotized curcumin and demonstration of its antimalarial efficacy. *International Journal of Nanomedicine*. 9 (2014) 5373-5387.
14. Pourreza, N. and Golmohammadi, H., Application of curcumin nanoparticles in a lab-on-paper device as a simple and green pH probe. *Talanta*. 131 (2015) 136-141.
15. Pourreza, N. and Golmohammadi, H., Green colorimetric recognition of trace sulfide ions in water samples using curcumin nanoparticle in micelle mediated system. *Talanta*. 119 (2014) 181-186.
16. Musso, Y. S., Salgado, P. R., and Mauri, A. N., Smart edible films based on gelatin and curcumin. *Food Hydrocolloids*. 66 (2017) 8-15.
17. Uppström, L. R., A modified method for determination of boron with curcumin and a simplified water elimination procedure. *Analytica Chimica Acta*. 43 (1968) 475-486.

Output ที่ได้จากโครงการ

ผลงานตีพิมพ์

1. **Choodum A.** Sriprom W., Wongniramaikul W., Portable and selective colorimetric film and digital image colorimetry for detection of iron, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2019 (208) 40-47., ISI Q1, IF₂₀₁₇ 2.880
2. Boonkanon C, Phatthanawiwat K., Wongniramaikul W., **Choodum A.**, Curcumin nanoparticles doped starch film as a green colorimetric sensor for on-site boron detection, submitted to Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy
3. **Choodum A.**, Boonkanon C, Lumtornkit N., Phatthanawiwat K., Taweekarn T., Wongniramaikul W., Green synthesis of a novel cryogel from starch, under preparation and will be submitted to Carbohydrate polymer in May 2019.
4. **Choodum A.**, Boonkanon C, Phatthanawiwat K., Wongniramaikul W., Comparison of a novel green curcumin- and phenanthroline- based colorimetric sensors for detection of iron, under preparation and will be submitted to Sensors and Actuators B: Chemical in May 2019.

ผลิตภัณฑ์

5. ชุดตรวจเหล็กเฟอร์รีภาคสนามแบบแผ่นฟิล์มพีแนโนไทรลีน
6. แผ่นฟิล์มจากเคอร์คูมินสำหรับตรวจเหล็กเฟอร์รีภาคสนามแบบหยด
7. แผ่นฟิล์มจากเคอร์คูมินสำหรับตรวจโบรอนภาคสนามแบบจุ่ม
8. เม็ดครีเอเจลสำหรับตรวจเหล็กเฟอร์รีภาคสนาม

ภาคผนวก



Portable and selective colorimetric film and digital image colorimetry for detection of iron

Aree Choodum^{a,*}, Wilasinee Sriprom^a, Worawit Wongniramaikul^{a,b}

^a Integrated Science and Technology Research Center, Faculty of Technology and Environment, Prince of Songkla University, Phuket Campus, Kathu, Phuket 83120, Thailand

^b Research Program: The Development of Management System for Reduction and Control of Water Contamination and Distribution in Songkhla Lake Basin and the Western Coastline of the South of Thailand, Center of Excellence on Hazardous Substance Management (HSM), Bangkok 10330, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 July 2018

Received in revised form 3 September 2018

Accepted 30 September 2018

Available online 02 October 2018

Keywords:

Iron sensing

Tapioca film

Phenanthroline film

Digital image colorimetry

iPhone

ABSTRACT

Iron is an important trace element in environmental and biological systems, the development of simple and selective methods for the determination of iron is important. In this work, completely biodegradable tapioca starch was introduced as the substrate to entrap standard chromogenic probes (1,10-phenanthroline) for fabrication of a novel colorimetric sensor for ferrous. A clear plasticized thin film from tapioca starch was fabricated inside a small plastic tube as a portable test kit. A red complex was obtained by exposing the film to a ferrous solution, while no color changes were obtained with various other ions, indicating excellent selectivity. The developed films were applied in conjunction with a digital image colorimetry for quantification of ferrous. Calculated molecular absorption of the red complex showed the widest linear range (0 to 10 mg L⁻¹) with good linearity ($R^2 < 0.9934$) with ferrous concentrations. The developed method provided good inter-day precision (1.75 to 3.97% RSD, 5 days 15 sensors), good accuracy (+2.35% to +4.57% relative error), and low detection limit (0.09 ± 0.01 mg L⁻¹). The concentrations of ferrous ion in soil and water samples quantified by the developed method were not significantly different from atomic absorption spectrophotometry at 95% confidence level. The films were stable for at least three months.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Iron (Fe) is an important trace element in environmental and biological systems. Although iron is a naturally occurring element, commonly present in rock and soil, large concentrations of reduced iron (Fe²⁺) in solution may be toxic to plants [1]. Iron is also an essential transition metal involved in various human metabolic pathways, e.g. the oxygen-transport mechanism and acting as a cofactor. Iron deficiency may cause loss of motor skills [2], while deposition of it in the central nervous system is involved in a number of diseases [3,4]. Ferrous iron also causes the formation of hydroxyl radicals [5], contributing to lipid peroxidation [6], and DNA damage [7]. Therefore, the development of simple and selective methods for the determination of iron has received particular attention.

Recently, a number of chemosensors have been developed for the detection of iron [8–20] to overcome the disadvantages of conventional instrumental methods, such as cumbersome and expensive optical equipment, complicated operating procedures, and tedious pre-treatment of samples. Various selective reagents have been reported for the detection of ferric ions, e.g. curcumin [15], D-penicillamine-

functionalized graphene quantum dots [19], alcohol-soluble poly(9-fluorene-carboxylic acid) [20], triazole [17], rhodamine G [21]; as well as for ferrous ions, e.g. phenanthroline and bathophenanthroline [12,22], 2-(2'-pyridyl)imidazole [13], ferrozine [22], and ferene S [22]. These selective reagents may be trapped within filter paper to fabricate selective test strips [23], while polymer materials have also been reported as substrates to entrap and avoid leakage of these selective reagents, e.g. electrospun nanofiber [13], and hydrogel [12,21]. These materials, e.g. poly-vinylbenzene chloride used to fabricate nanofiber [13], are synthetic polymers and may be toxic to the environment due to resisting degradation. The organic solvents commonly used to dissolve such materials, e.g. dimethylformamide and tetrahydrofuran [13], are also toxic. The use of biodegradable natural polymers as substrate in fabrication of selective iron sensors could overcome this drawback.

Recently, natural polymers have been receiving growing attention due to their inherent biodegradability [24]. Starch is the most abundant polysaccharide in plants, and is composed of two homopolymers of D-glucose, amylose and amylopectin [24–26]. Due to its film-forming properties and other advantages that include low cost and wide availability, starch has been widely used to fabricate renewable and biodegradable films for various applications [24,27]. The ratio of amylose and amylopectin influences mechanical properties of the starch films,

* Corresponding author.

E-mail address: aree.c@phuket.psu.ac.th (A. Choodum).

and amylose is preferable for good film properties [28]. Due to hydrophilic nature and brittleness of starch films, plasticizers such as glycerol may be used [29–31].

In this work, natural biodegradable polymers were used for the first time as the substrate to fabricate environmentally friendly colorimetric films for the detection of ferrous ions. The ferrous-selective reagent, 1,10-phenanthroline (phen), was entrapped within biodegradable films from tapioca starch. The films were then used in conjunction with digital image analysis, instead of conventional spectrophotometric measurement, to facilitate on-site detection. Digital image technology is increasingly used in the quantification of analytes [32–40]. It is based on analysis of the basic red/green/blue (RGB) color layers in a digital image of the colorimetric product. The RGB data were calibrated for the quantification of analytes. In this work, the on-site quantification of ferrous ions employed a common smartphone, which is more convenient and cost effective than a spectrophotometer.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Ferrous (II) sulfate heptahydrate was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Tapioca starch was purchased from a supermarket in Kathu, Phuket, while glycerol was obtained from Ajax Finechem Pty Ltd. 1,10-Phenanthroline monohydrate was purchased from Fisher

scientific UK Limited (Leicestershire, UK). Ultrapure water (type I) was obtained from Merck water purification system (Elix Essential 5).

2.2. Preparation of the Phenanthroline-based Tapioca Starch Colorimetric Films (Phen-film)

The phen-films were prepared by entrapment of phen within thin films of tapioca starch. Tapioca starch (0.5 g) was dispersed in ultrapure water (10 mL) before heating on a hotplate (~120 °C) under continuous stirring until a clear viscous solution was obtained. Glycerol (0.10 mL) was added with stirring for 3–4 min to obtain a homogenous solution. After the resultant solution was cooled to room temperature, phen (0.1 g) was added and stirred for 4–5 min. One hundred microliters of the mixture was then transferred into a 1.5 mL plastic tube and vertically incubated at 100 °C for 90 min in an oven. After the tube was cooled to room temperature it was quickly closed to avoid any contamination before storage in a refrigerator prior to further use.

2.3. Preparation of the Acidic Tapioca Starch Thin Films (Acidic-film) for Sample Preparation

As acidic conditions are required in sample preparation for ferrous detection, acidic-films were prepared to facilitate on-site use. The acidic-film was prepared using similar preparation procedure as for the colorimetric thin films (Section 2.2). Hydrochloric acid (5 mL, 6 M) was used instead of the colorimetric reagent. The mixture

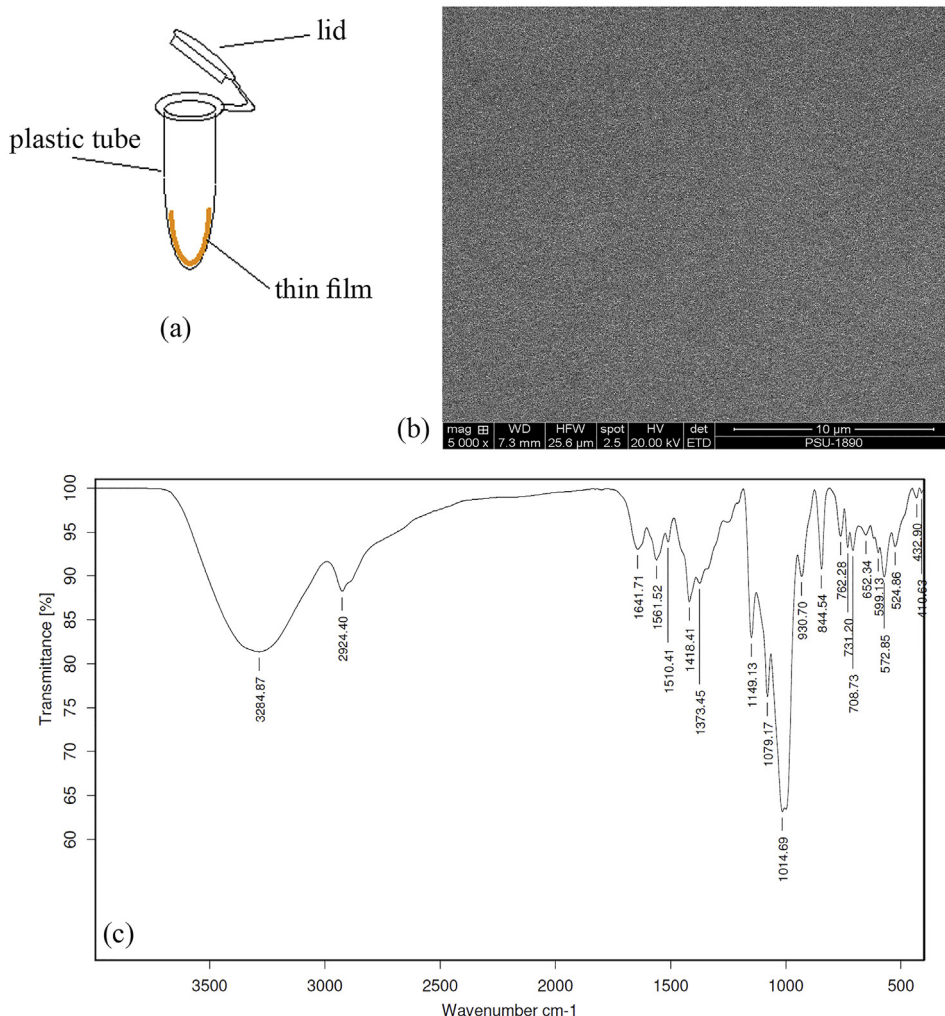


Fig. 1. (a) The phen-film cast in a small plastic tube, (b) SEM images, and (c) FTIR spectrum of the phen-film.

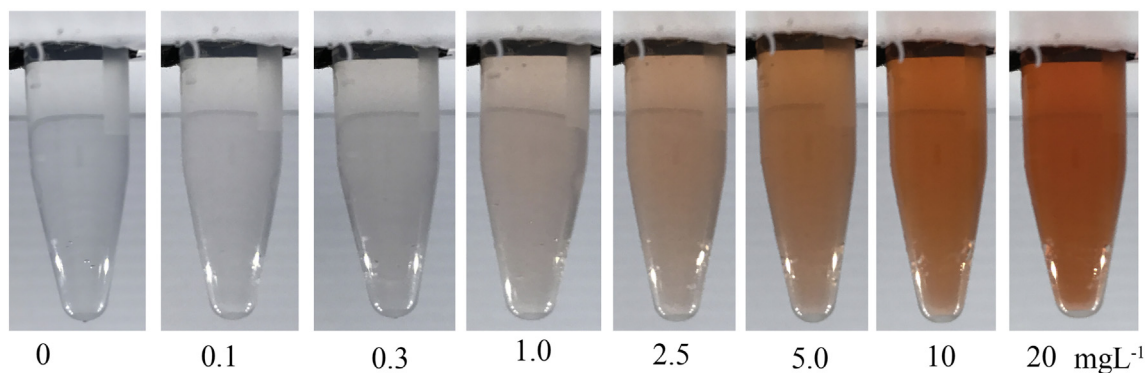


Fig. 2. Red complexes obtained from testing the phen-films with ferrous standard solution at various concentrations. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

(0.75 mL) was used to fabricate the acidic thin film by placing on the lid of a 20 mL plastic bottle and incubating at 60 °C for 2 h. The lids were quickly placed in sealed plastic bags until use. Blank acidic-films were also fabricated using the same procedure but without hydrochloric acid.

2.4. Characterization of the Phen-film

The morphology of the phen-film was investigated using scanning electron microscopy (SEM; Quanta400, FEI, Czech Republic), while its functional groups were studied by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) (Equinox55, Bruker, Germany). The FTIR spectra of the films were investigated from 4000 to 400 cm^{-1} with a resolution of 4 cm^{-1} using KBr pellet method.

2.5. Stability of the Tapioca Starch Films

The phen-films ($n = 79$) and acidic-films ($n = 25$) were prepared at the same time using the same ingredients and similar procedures, to evaluate the stability of both films. One acidic-film was used to condition the ferrous standard solution (10 mg L^{-1} , 10 mL) before testing the

conditioned solution with three phen-films to detect ferrous, on the day of preparation. The remaining sensors (76 phen-films and 24 acidic-films) were split into two groups and stored in a refrigerator (4 °C, 38 phen-films and 12 acidic-films in separate zip locked plastic bags) and in the laboratory (ambient conditions at 29 °C). To test stability of the phen-films, three colorimetric sensors were subsequently removed from the storage for testing with a ferrous solution that was pre-conditioned using a freshly prepared acidic-film. This routine was performed each day for one week, and then the testing was done on a weekly basis for a further 3 weeks, and finally after 2 and 3 months. The stability of the acidic-films was also investigated using a similar procedure for 1 film at each time but using three freshly prepared colorimetric films.

2.6. Digital Image Colorimetry (DIC) for On-site Quantification of Ferrous

A series of ferrous standard solutions (0.1 to 20 mg L^{-1}) was freshly prepared. Each standard solution (10 mL) was conditioned using an acidic-film before completely filling three plastic tubes (1.5 mL) containing phen-films with shaking. These colorimetric sensors placed on-site in a custom-built detection box (6.5 × 6.5 × 8.0 in.) for

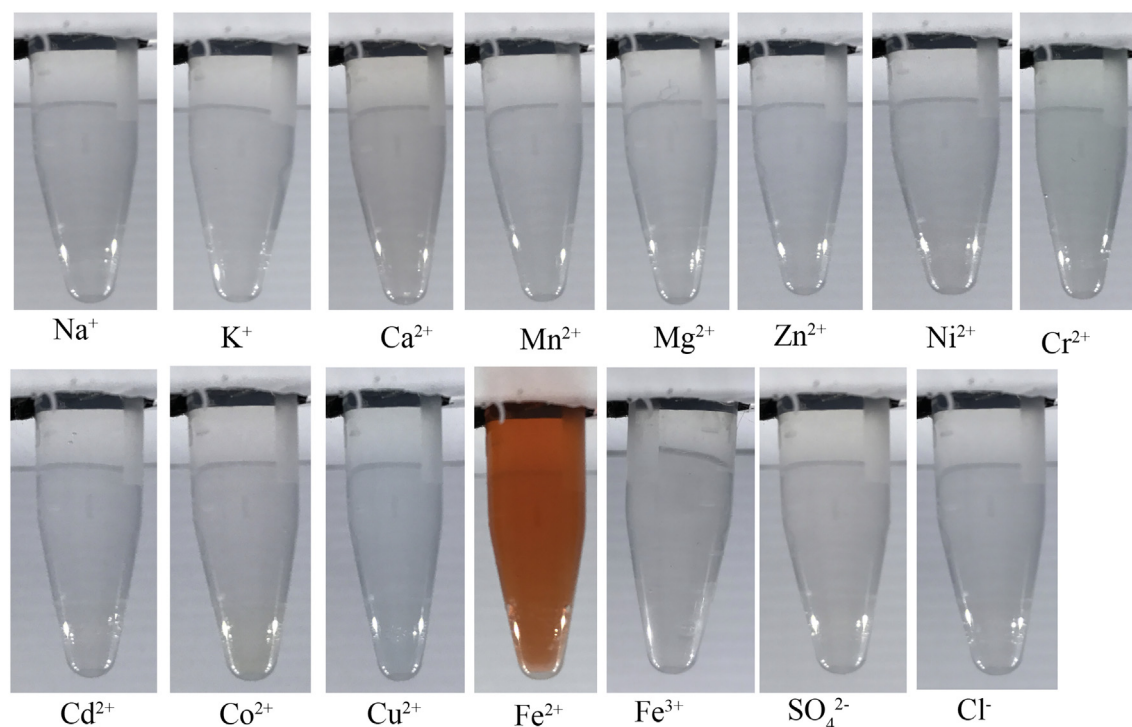


Fig. 3. Colorimetric products obtained from testing the phen-films with various ions.

photography. The resultant color products in three colorimetric sensors were photographed using the digital camera of an iPhone 7.0 (12 MP, backside illuminated CMOS, f/1.8 aperture, 1/17 s exposure time, ISO 50, no flash) for 6 images. Each image was saved as a JPEG file (4032 × 3024 pixels, 1.33 MB). The average intensities of the red, green and blue layers were investigated using a custom-built RGB analysis program [36]. The average RGB values of all 6 images of the 3 sensor films (18 values in total) were used as a single data point for each standard concentration to fit calibration curves.

2.7. System Performance and Method Validation

The system performance of the phen-film with DIC for ferrous detection was investigated. Accuracy of the method is reported as relative error (%RE) in quantifying control standard solutions of known concentration (2.5 mg L^{-1}). Precision (%RSD) was determined from 6 images of 3 sensors ($n = 18$). The limit of detection (LOD) was estimated using a standard method, $y_{\text{LOD}} = y_B + 3S_B$, where y_{LOD} is the limit of detection, y_B is the y-axis intercept, and S_B is the standard deviation of slope of the calibration graph [41].

2.8. Analysis of Real Samples

The phen-films were used to determine the amounts of acid soluble ferrous in 5 soil samples and 6 paddy field water samples. Acidic-films were used to extract the water soluble ferrous from soil samples and

to acidify the water samples. All soil samples were air-dried and ground ($<2 \text{ mm}$ particle size). Soil samples (5.0 g) were extracted in plastic bottles (60 mL; containing acidic-film on the lid) filled with ultrapure water before sonication for 30 min. The supernatant was filtered using $0.45 \mu\text{m}$ cellulose acetate membrane before completely filling 1.5 mL plastic tubes containing the phen-film. The amount of ferrous in the sample was then quantified using the developed DIC method and compared with atomic absorption spectrophotometric method (AAS; Pinnacle 900F Series, Perkin Elmer, USA).

3. Results and Discussion

3.1. Preparation and Characterization of the Phen-film

The phen-films were successfully prepared to cover the bottoms of 1.5 mL plastic tubes (Fig. 1a). The sample solution could be directly added into the tube for in-tube detection. To fabricate the starch film, the polymer mixture was prepared first. This mixture consisted of starch solution, plasticizer, and phen as the colorimetric reagent. This mixture was then cast on the substrate, namely the inner wall of a small plastic tube, by temperature casting. Due to the preliminary study showed that tapioca starch provided a clear thin film, while the glutinous, rice flour, and their composites with various proportions provided brownish films. The tapioca starch was then selected as a natural substrate. Parameters affecting on the properties of the phen-film were systematically optimized. Concentrations of starch (aqueous) solutions

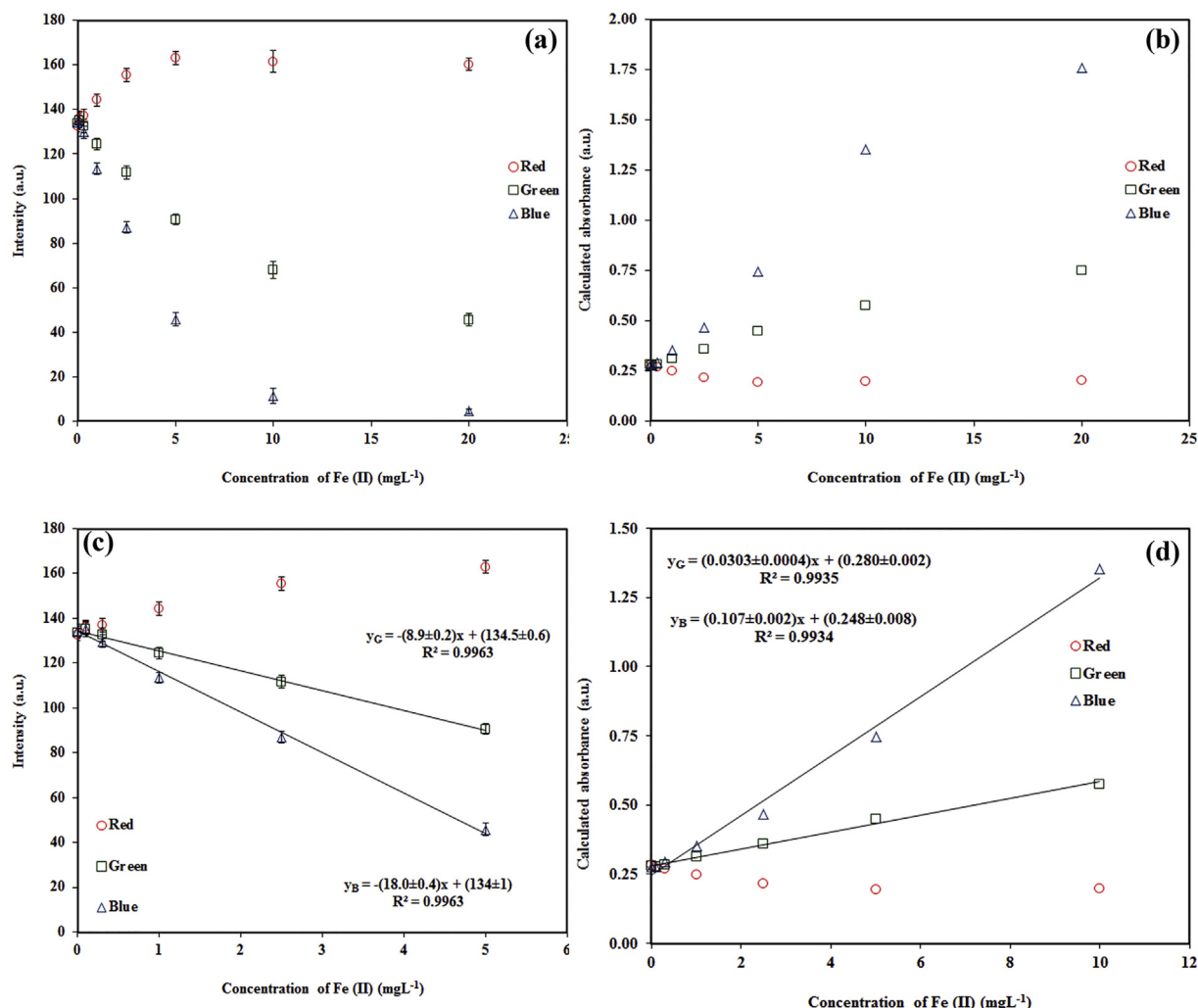


Fig. 4. (a) I_R , I_G , and I_B vs. ferrous concentration, (b) A_R , A_G , and A_B vs. ferrous concentration, and linear portions of (c) RGB intensity, and (d) calculated absorbance.

in the range of 2.5 to 10% w/v were investigated. It was found that the higher concentration, the longer casting time. The films from 7.5 and 10% tapioca starch solutions showed a brownish thicker film after incubation at 100 °C for 120 min, 5% starch solution was thus chosen. The optimum amount of plasticizer was studied by varying amount of glycerol from 0 to 0.5 mL. Although the film was completely casted within 60 min by no addition of glycerol (0 mL), it was very fragile. Glycerol was then added for 0.1 mL to prevent the film brittleness [42]. The amounts of phen in polymer mixture (10 mL) were varied from 0.05 to 0.20 g. The colorimetric products by testing ferrous solution with the film of 0.10, 0.15, and 0.20 g phen were darker than 0.05 g, 0.1 g phen was thus selected. The use of 10 mL 5% w/v tapioca starch solution with 0.1 mL glycerol and 0.1 g phen was an appropriate polymer mixture. Casting temperature (80 to 120 °C) and time (30 to 150 min) were also investigated. It was found that when the mixture (100 μ L) was cured at 100 °C for 90 min, a clear thin film was obtained. Using these appropriate conditions, phen-films were reproducibly prepared with 1.4–3.5%RSD from three lots of preparation.

SEM images of the phen-films showed very smooth surfaces indicating homogenously distributed phen particles within the starch film (Fig. 1b). The entrapment of phen within the thin film could also be confirmed from the absorption peaks at 1562, 1510, and 845 cm^{-1} in the FTIR spectrum (Fig. 1c), which are assigned to the vibrations of phen. The large absorption peaks at 3284 and 2928 cm^{-1} are assigned to O–H and CH_2 symmetrical stretching vibrations in tapioca starch [43]. The C–O vibrations in amylopectin from tapioca were also observed

from 1150 to 926 cm^{-1} , while the skeletal stretching of starch appeared at 849 and 761 cm^{-1} [44,45].

3.2. Colorimetric Test of Ferrous by the Phen-film and its Selectivity

When ferrous solution was added into a small plastic tube containing phen-film, phen moieties were dissolved out of the tapioca starch into solution, so a red product was produced within the solution (Fig. 2). The red complex, $[(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)_3\text{Fe}]^{2+}$, could be observed with bare eyes at 1 mg L^{-1} of ferrous ion, so this fabricated film had good sensitivity for ferrous ion. When the concentration of ferrous ion was increased, the darkness of the red complex increased. In contrast, when the films were tested with various other cations and anions ($\sim 10,000 \text{ mg L}^{-1}$), namely ferric nitrate, sodium nitrate, calcium chloride, potassium chloride, chromium (III) chloride, sodium chloride, sodium fluoride, sodium sulfate, cadmium disulfate, zinc acetate, manganese sulfate, and cobalt (II) nitrate, clear products (no color change) were observed (Fig. 3). These results indicate that the phen-films provided excellent selectivity for ferrous solution.

3.3. Quantification of Ferrous Using the Phen-films and DIC

Quantification of ferrous ions using the phen-film was achieved by coupling with DIC. The red complexes obtained from testing ferrous solutions with the thin film were photographed using iPhone 7.0, and the images were then analyzed by custom-built RGB analysis program to

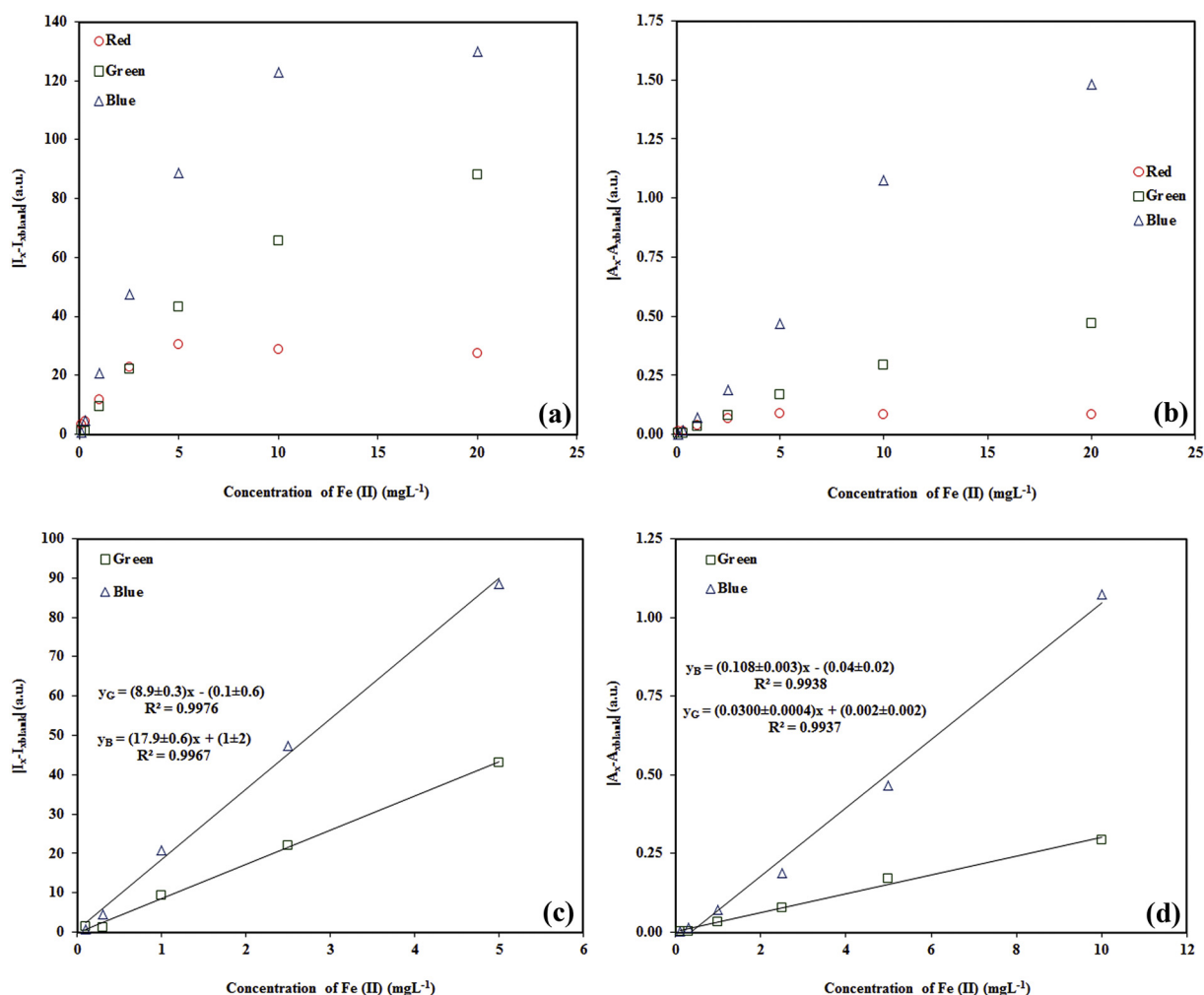


Fig. 5. Zero-calibrated (a) RGB intensities, (b) corresponding absorbances, and linear portion of (c) zero-calibrated RGB intensities, and (d) corresponding absorbances.

Table 1

Analytical performance of the phenanthroline-based starch film and DIC for the detection of ferrous ions.

Feature from image analysis	Sensitivity (a.u. L mg ⁻¹)	Linear range (mg L ⁻¹)	Linearity	LOD ^a (mg L ⁻¹)
I _G	8.9 ± 0.20	0–5	0.9963	0.35 ± 0.02
I _B	18 ± 0.40	0–5	0.9963	0.31 ± 0.02
A _G	0.03 ± 0.01	0–10	0.9935	0.25 ± 0.01
A _B	0.11 ± 0.01	0–10	0.9934	0.09 ± 0.01
I _G –I _{GBlank}	8.90 ± 0.30	0.1–5	0.9976	0.37 ± 0.01
I _B –I _{BBlank}	17.9 ± 0.60	0.1–5	0.9967	0.40 ± 0.01
A _G –A _{GBlank}	0.03 ± 0.01	0.1–10	0.9937	0.38 ± 0.02
A _B –A _{BBlank}	0.11 ± 0.01	0.1–10	0.9938	0.16 ± 0.01

^a $y_{LOD} = y_B + 3S_B$ [41].

obtain the RGB intensities (I_R, I_G, I_B). The relationships between RGB values, which relate to light reflected from the red complexes, and ferrous concentrations is shown in Fig. 4a. The digital images had highest I_R as expected for the red complexes. I_R seemed to be slightly increased until 5 mg L⁻¹ ferrous ion and to stay constant after that, while I_G and I_B decreased. So the red layer response became saturated as more red complexes were produced, while the green and blue layers still showed changes.

When the molecular absorbance of the red complexes was calculated (A_R, A_G, A_B) [35–37], A_B (400–500 nm) and A_G (500–580 nm) had higher absorbance than A_R (Fig. 4b). These results indicate that the red complexes absorbed light in the blue and green ranges, while they reflected red light. This is in good agreement with spectrophotometric results having the maximum absorbance at 510 nm, while 490–510 nm [46], 518 [47] and 525 nm [22] are reported in the literature. When the concentration of ferrous ion increased, the calculated absorbance increased. These responses from DIC had linear portions in their dependences on concentration of ferrous ion, for I_G and I_B in the range from 0 to 5 mg L⁻¹, while the wider linear range from 0 to 10 mg L⁻¹ was obtained for A_G and A_B (Fig. 4c–d).

The relationships of blank subtracted intensities (|I_x–I_{xBlank}|) and absorbances (|A_x–A_{xBlank}|) were also investigated as the color of the sample may affect the RGB values of the red complex. Both |I_x–I_{xBlank}| and |A_x–A_{xBlank}| increased with ferrous concentration (Fig. 5a–b). The |I_x–I_{xBlank}| had linear portions from 0.1 to 5.0 mg L⁻¹ of ferrous ion (Fig. 5c), and from 0.1 to 10 mg L⁻¹ from |A_x–A_{xBlank}| (Fig. 5d) with good linearity (R² > 0.9937).

3.4. System Performance and Method Validation

The analytical performance of the phen-film and DIC for quantification of ferrous is summarized in Table 1. The I_B from digital images of red complex provided the highest 18 ± 0.40 a.u. L mg⁻¹ sensitivity. A_G and A_B provided the widest linear range (0–10 mg L⁻¹). A_B also provided the lowest detection limit (0.09 ± 0.01 mg L⁻¹), while the other relationships provided detection limits in the range from 0.16 ± 0.01 to 0.40 ± 0.01 mg L⁻¹. Both A_G and A_B provided detection limit below the maximum allowed ferrous concentration in drinking water (0.3 mg L⁻¹) recommended by WHO [48] and EPA [49]. The intra-day precision (%RSD) was in the range from 0.28 to 1.75%RSD, while from 1.75 to 3.97%RSD was obtained for 15 films over five days (inter-day precision). %RE in control samples (2.5 mg L⁻¹ ferrous solution) was +2.35% and +4.57% for the green and the blue intensities, respectively.

3.5. Analysis of Real Samples

High concentrations of ferrous in the soil may be toxic to plants (iron toxicity) [1], so the phen-films and DIC were applied to determining ferrous in agricultural soil and water samples. Five soil samples were randomly collected around the base of palm oil plants, while 6 water samples were randomly collected from a paddy field. The acidic-film was used in sample preparation before colorimetric testing with the phen-film. The hydrochloric acid entrapped within tapioca starch thin

film could acidify the samples to pH 3.0, which facilitated ferrous ion extraction to solution from soil samples. The extraction was done with hydrochloric acid at room temperature [50] using sonication.

Due to the lack of iron-zero soil standard, the sample soil and water extracts were diluted 100-fold before spiking with a ferrous standard solution (2.5 mg L⁻¹) to investigate matrix effects. Recoveries in the range 98.7–99.7% were obtained for the soil samples and 96.2–97.3% for the water samples, indicating no interference from the sample matrices. The water soluble ferrous was quantified using the phen-film and DIC (I_G) in the range from 0.68 ± 0.19 to 5.10 ± 0.60 mg kg⁻¹ for the soil samples, and from 0.35 ± 0.03 to 0.83 ± 0.01 mg L⁻¹ for water samples (Table 2). When AAS was applied to the samples, soluble iron was found in the range from 0.13 ± 0.03 to 5.86 ± 0.06 mg kg⁻¹ for the soil samples and from 0.04 ± 0.01 to 0.83 ± 0.01 mg L⁻¹ for the water samples. The results from the developed method were not significantly different with the AAS at 95% confidence level (calculated *t*-value = 1.12, critical *t*-value = 3.18, degrees of freedom = 3). This indicates excellent performance of the phen-film combined with DIC for the analysis of ferrous in complex samples.

3.6. Stability of the Phen-film and Acidic-film

The stability of the phen-film and acidic-film was investigated by storing the prepared films in zip-lock plastic bags, both in a refrigerator and in the ambient laboratory conditions. After storage of the phen-film in a refrigerator for three months, I_R, I_G, and I_B on testing ferrous solution (10 mg L⁻¹) had shifted by +3.5%, +3.2%, and –0.8%, respectively (Fig. 6a). For the phen-film stored at the ambient laboratory temperature, I_R, I_G, and I_B had shifted by –2.1%, –0.3%, and +4.8% in three months.

The stability of the acidic-film was also tested by conditioning freshly prepared ferrous solutions (10 mg L⁻¹, 10 mL) with these acidic films after storage. The conditioned ferrous solution was then tested using freshly prepared phen-film. I_R, I_G, and I_B had shifted by +0.05%, –1.7%, and –4.0% using the films stored in refrigerator for three months (Fig. 6b), and by –1.3%, –2.6%, and –0.1% with ambient condition storage.

Table 2

Concentration of water soluble ferrous ions in real samples.

Sample	Developed method	AAS	
S1	0.91 ± 0.08	0.94 ± 0.06	mg kg ⁻¹
S2	nd ^a	nd	
S3	nd	0.13 ± 0.03	mg kg ⁻¹
S4	5.10 ± 0.60	5.86 ± 0.06	mg kg ⁻¹
S5	0.68 ± 0.19	0.66 ± 0.05	mg kg ⁻¹
W1	nd	nd	
W2	nd	0.04 ± 0.01	mg L ⁻¹
W3	nd	nd	
W4	0.35 ± 0.03	0.39 ± 0.01	mg L ⁻¹
W5	0.83 ± 0.01	0.83 ± 0.01	mg L ⁻¹
W6	nd	nd	

^a nd = not detectable.

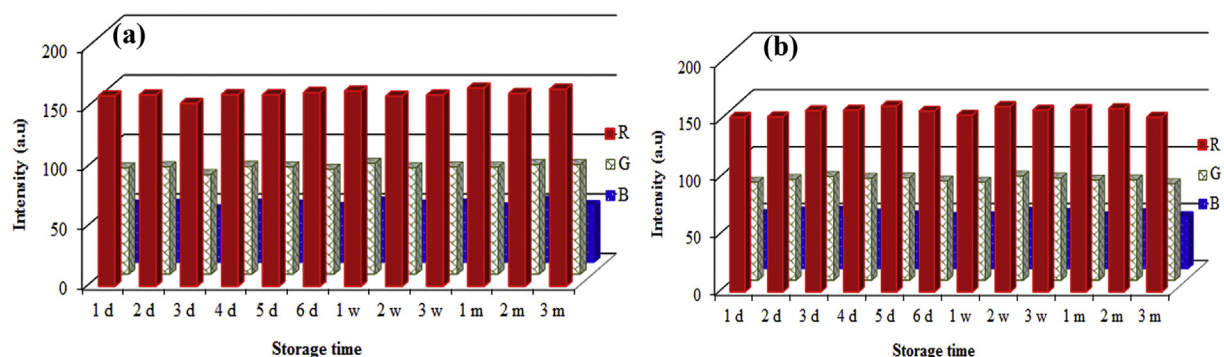


Fig. 6. Stability of (a) the phen-film stored in a refrigerator, and (b) the acidic-film stored in the refrigerator.

These results indicate good stability of both developed films that retained good performance for three months of storage.

4. Conclusions

Tapioca starch thin films with entrapped phenanthroline colorimetric indicator were successfully developed for the colorimetric detection of ferrous ions in aqueous solution. The phen-film was *in-situ* fabricated to the bottoms of small plastic tubes, so the sample solutions could be directly added into such tubes. The phen in the starch films selectively reacted with ferrous ions producing red complexes. The colorimetric thin film was tested in combination with DIC for rapid quantitative analysis of ferrous with a portable low-cost kit. A wide linear range with good linearity in the calibration graph was obtained, along with low detection limit. Good accuracy and good precision were also obtained on testing control samples with the developed method. When the method was applied to soil and water samples, the results did not significantly differ from a standard laboratory method (AAS), which is impractical for portable field use. The developed phen-films were stable over 3 months of storage either in a refrigerator or in ambient conditions.

Acknowledgements

This work was supported by the Prince of Songkla University (no. 2560IA1150006) and by the Faculty of Technology and Environment, Prince of Songkla University, Phuket Campus. A partial financial support was received from the Thailand Research Fund (no. RSA6080036) and the Office of Higher Education Commission (OHEC) and the S&T Post-graduate Education and Research Development Office (PERDO). The authors are also thankful for English correction service from PSU Publication Clinic by Prof. Dr. Seppo Karilla.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- [1] M. Becker, F. Asch, Iron toxicity in rice—conditions and management concepts, *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 168 (2005) 558–573.
- [2] B.T. Felt, B. Lozoff, Brain iron and behavior of rats are not normalized by treatment of iron deficiency anemia during early development, *J. Nutr.* 126 (1996) 693–701.
- [3] J.R. Burdo, J.R. Connor, Brain iron uptake and homeostatic mechanisms: an overview, *Biomaterials* 16 (2003) 63–75.
- [4] T.A. Rouault, The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease, *Nat. Chem. Biol.* 2 (8) (2006) 406–414.
- [5] P. Aisen, C. Enns, M. Wessling-Resnick, Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33 (2001) 940–959.
- [6] C. Smith, M.J. Mitchinson, O.I. Aruoma, et al., Stimulation of lipid peroxidation and hydroxyl-radical generation by the contents of human atherosclerotic lesions, *Biochem. J.* 286 (1992) 901–905.
- [7] R. Meneghini, Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage, *Free Radic. Biol. Med.* 23 (1997) 783–792.
- [8] M.L. Firdaus, W. Alwi, F. Trinoveldi, et al., Determination of chromium and iron using digital image-based colorimetry, *Procedia Environ. Sci.* 20 (2014) 298–304.
- [9] M. Lin, D. Pan, X. Hu, et al., Titanium carbide nanoparticles/ion-exchange polymer-based sensor for catalytic stripping determination of trace iron in coastal waters, *Sensors Actuators B Chem.* 219 (2015) 164–170.
- [10] Y. Ma, X. Kong, V. Abbate, et al., Synthesis and characterization of novel iron-specific bicyclic fluorescent probes, *Sensors Actuators B Chem.* 213 (2015) 12–19.
- [11] K. Mahesh, S. Karpagam, Thiophene-thiazole functionalized oligomers—excellent fluorescent sensing and selective probe for copper and iron ion, *Sensors Actuators B Chem.* 251 (2017) 9–20.
- [12] M.V. Martínez, C.R. Rivarola, M.C. Miras, et al., A colorimetric iron sensor based on the partition of phenanthroline complexes into polymeric hydrogels. Combinatorial synthesis and high throughput screening of the hydrogel matrix, *Sensors Actuators B Chem.* 241 (2017) 19–32.
- [13] D.A. Ondigo, Z.R. Tshentu, N. Torto, Electrospun nanofiber based colorimetric probe for rapid detection of Fe^{2+} in water, *Anal. Chim. Acta* 804 (2013) 228–234.
- [14] G.J. Park, G.R. You, Y.W. Choi, et al., A naked-eye chemosensor for simultaneous detection of iron and copper ions and its copper complex for colorimetric/fluorescent sensing of cyanide, *Sensors Actuators B Chem.* 229 (2016) 257–271.
- [15] A. Saithongdee, N. Praphairaksit, A. Imyim, Electrospun curcumin-loaded zein membrane for iron(III) ions sensing, *Sensors Actuators B Chem.* 202 (2014) 935–940.
- [16] A.M. Senol, Y. Onganer, K. Meral, An unusual “off-on” fluorescence sensor for iron (III) detection based on fluorescein-reduced graphene oxide functionalized with polythiopheneimine, *Sensors Actuators B Chem.* 239 (2017) 343–351.
- [17] K. Shah, N. Ain, F. Ahmed, et al., A new highly selective chemosensor for the detection of iron ion in aqueous medium based on click generated triazole, *Sensors Actuators B Chem.* 249 (2017) 515–522.
- [18] V. Singh, A.K. Mishra, Green and cost-effective fluorescent carbon nanoparticles for the selective and sensitive detection of iron (III) ions in aqueous solution: mechanistic insights and cell line imaging studies, *Sensors Actuators B Chem.* 227 (2016) 467–474.
- [19] W. Xuan, L. Ruiyi, F. Saiying, et al., D-penicillamine-functionalized graphene quantum dots for fluorescent detection of Fe^{3+} in iron supplement oral liquids, *Sensors Actuators B Chem.* 243 (2017) 211–220.
- [20] H. Zhang, G. Zhang, J. Xu, et al., Novel highly selective fluorescent sensor based on electrosynthesized poly(9-fluorene-2-carboxylic acid) for efficient and practical detection of iron (III) and its agricultural application, *Sensors Actuators B Chem.* 230 (2016) 123–129.
- [21] H. Ozay, O. Ozay, Rhodamine based reusable and colorimetric naked-eye hydrogel sensors for Fe^{3+} ion, *Chem. Eng. J.* 232 (2013) 364–371.
- [22] N. Rybkowska, K. Strzelak, R. Koncki, A comparison of photometric methods for serum iron determination under flow analysis conditions, *Sensors Actuators B Chem.* 254 (2018) 307–313.
- [23] G. Gao, W. Qu, B. Shi, et al., A reversible fluorescent chemosensor for iron ions based on 1H-imidazo [4,5-b] phenazine derivative, *Sensors Actuators B Chem.* 213 (2015) 501–507.
- [24] D.R. Lu, C.M. Xiao, S.J. Xu, Starch-based completely biodegradable polymer materials, *Express Polym. Lett.* 3 (6) (2009) 366–375.
- [25] R. Pareta, M.J. Edirisinghe, A novel method for the preparation of starch films and coatings, *Carbohydr. Polym.* 63 (3) (2006) 425–431.
- [26] A.A. Karim, M.H. Norziah, C.C. Seow, Methods for the study of starch retrogradation, *Food Chem.* 71 (1) (2000) 9–36.
- [27] J. Isaad, A. El Achari, F. Malek, Bio-polymer starch thin film sensors for low concentration detection of cyanide anions in water, *Dyes Pigments* 97 (1) (2013) 134–140.
- [28] D. Lourdin, G.D. Valle, P. Colonna, Influence of amylose content on starch films and foams, *Carbohydr. Polym.* 27 (4) (1995) 261–270.
- [29] K. Krogars, J. Heinämäki, M. Karjalainen, et al., Enhanced stability of rubbery amylose-rich maize starch films plasticized with a combination of sorbitol and glycerol, *Int. J. Pharm.* 251 (1–2) (2003) 205–208.
- [30] D. Lourdin, L. Coignard, H. Bizot, et al., Influence of equilibrium relative humidity and plasticizer concentration on the water content and glass transition of starch materials, *Polymer* 38 (21) (1997) 5401–5406.
- [31] R. Sothornvit, J.M. Krochta, Plasticizer effect on mechanical properties of β -lactoglobulin films, *J. Food Eng.* 50 (3) (2001) 149–155.

- [32] A. Choodum, P. Boonsamran, N. Nicdaeid, et al., On-site semi-quantitative analysis for ammonium nitrate detection using digital image colourimetry, *Sci. Justice* 55 (6) (2015) 437–445.
- [33] A. Choodum, P. Kanatharana, W. Wongniramaikul, et al., Using the iPhone as a device for a rapid quantitative analysis of trinitrotoluene in soil, *Talanta* 115 (0) (2013) 143–149.
- [34] A. Choodum, P. Kanatharana, W. Wongniramaikul, et al., Rapid quantitative colourimetric tests for trinitrotoluene (TNT) in soil, *Forensic Sci. Int.* 222 (1–3) (2012) 340–345.
- [35] A. Choodum, P. Kanatharana, W. Wongniramaikul, et al., A sol–gel colorimetric sensor for methamphetamine detection, *Sensors Actuators B Chem.* 215 (2015) 553–560.
- [36] A. Choodum, P. Kanatharana, W. Wongniramaikul, et al., Polyvinyl alcohol cryogel as a selective test kit for pre and post blast trinitrotoluene, *Sensors Actuators B Chem.* 222 (2016) 654–662.
- [37] A. Choodum, J. Keson, P. Kanatharana, et al., Selective pre and post blast trinitrotoluene detection with a novel ethylenediamine entrapped thin polymer film and digital image colorimetry, *Sensors Actuators B Chem.* 252 (2017) 463–469.
- [38] A. Choodum, K. Malathong, N. Nicdaeid, et al., A cost effective hydrogel test kit for pre and post blast trinitrotoluene, *Forensic Sci. Int.* 266 (2016) 202–208.
- [39] A. Choodum, N. Nicdaeid, Rapid and semi-quantitative presumptive tests for opiate drugs, *Talanta* 86 (0) (2011) 284–292.
- [40] A. Choodum, N. Nicdaeid, Digital image-based colourimetric tests for amphetamine and methamphetamine, *Drug Test. Anal.* 3 (2011) 277–282.
- [41] J.N. Miller, J.C. Miller, *Statistic and Chemometric for Analytical Chemistry*, 5th ed. Pearson Education Limited, Essex, 2005.
- [42] T. Karbowiak, H. Herve, L. Léger, et al., Effect of plasticizers (water and glycerol) on the diffusion of a small molecule in iota-carrageenan biopolymer films for edible coating application, *Biomacromolecules* 7 (2006) 2011–2019.
- [43] R.A. Ali, W.A.W.A. Rahman, R.M. Kasmani, et al., Tapioca starch biocomposite for disposable packaging ware, *Chem. Eng. Trans.* 32 (2013) 1711–1716.
- [44] P. Deeyai, M. Supphantharika, R. Wongsagonsup, et al., Characterization of modified tapioca starch in atmospheric argon plasma under diverse humidity by FTIR spectroscopy, *Chin. Phys. Lett.* 30 (2013) 0181031–0181034.
- [45] K. Sutjarittangtham, P. Jaiturong, U. Intatha, et al., Fabrication of natural tapioca starch fibers by a modified electrospinning technique, *Chiang Mai J. Sci.* 41 (2014) 213–223.
- [46] Z. Wang, K.L. Cheng, Spectrophotometric determination of iron with 1,10-phenanthroline in the presence of copper, *Microchim. Acta* 78 (1) (1982) 115–124.
- [47] B. Oktavia, L. Lim, T. Takeuchi, Simultaneous determination of Fe (III) and Fe (II) ions via complexation with salicylic acid and 1,10-phenanthroline in microcolumn ion chromatography, *Anal. Sci.* 24 (11) (2008) 1487–1492.
- [48] World Health Organization, *Guidelines for Drinking-water Quality: Fourth Edition Incorporating the First Addendum*, Geneva, 2017.
- [49] US Environmental Protection Agency, *Drinking Water Regulations and Contaminants*, 2017.
- [50] K. Kumada, T. Asami, A new method for determining ferrous iron in paddy soil, *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 3 (1958) 187–193.

Manuscript Number: SAA-D-19-00661

Title: Curcumin nanoparticle doped starch thin film as a green colorimetric sensor for detection of boron

Article Type: Full Length Article

Section/Category: Analytical Spectroscopy and New Methods

Keywords: Boron; Curcumin nanoparticles; Tapioca film; Green sensor; Digital image colorimetry

Corresponding Author: Dr. Aree Choodum, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Prince of Songkla University

First Author: Chanita Boonkanon

Order of Authors: Chanita Boonkanon; Kharittha Phatthanawiwat; Worawit Wongniramaikul; Aree Choodum, Ph.D.

Abstract: A tapioca starch film doped with curcumin nanoparticles was successfully fabricated and applied as a novel green colorimetric sensor for detection of boron in wastewater. Curcumin nanoparticles (curn, 30-90 nm) extracted from turmeric powder were used as a green probe, while tapioca starch was used as a natural support substrate. A yellow thin film (51 μm thick) fabricated on a used plastic spoon turned red-brown after immersion in boron solution (pH 9) for 15 min with excellent selectivity. The film costs only 0.0007 USD, while the cost of the sensor (curn-film on new plastic spoon) was 0.004 USD. After use the film could be completely washed from the plastic, it being biodegradable, while the used plastic spoon could be re-used to fabricate a new sensor at least 5 times. The good 1.52%RSD precision was obtained across three lots fabricated. When the curn-film was used in conjunction with digital image colorimetry (DIC), a simple and rapid quantification of boron was achieved. The green color layer in reflected light image of the red-brown product (IG) provided the highest sensitivity ($64 \pm 1 \text{ a.u. Lmg}^{-1}$) and the lowest detection limit of $0.052 \pm 0.001 \text{ mgL}^{-1}$. The intra-day testing (9 films) had 2.41 to 4.34%RSD, while the inter-day testing had 2.37 to 7.46%RSD (27 films, 6 days). Accuracy in terms of relative error for control samples (0.25 mgL^{-1}) was +3.21%. Wastewater samples from Para-rubber wood processing plant were quantified by curn-film and DIC, giving $5397 \pm 606 \text{ mgL}^{-1}$ boron concentration with no significant difference to ICP determination at 95% confidence level. The sensors after storage in a desiccator for three months gave readings changed by only +2.1 to -6.2% relative to freshly prepared sensors.

Suggested Reviewers: Frank Davis

University of Chichester

F.Davis@chi.ac.uk

He has published the work about optical sensor

Farshid Mostowfi

Schlumberger - Doll Research
FMostowfi@slb.com
He has published the work about determination of boron

José Paulo Farinha
Universidade de Lisboa
farinha@tecnico.ulisboa.pt
He has published the work about determination of boron

Dear Editors

I am enclosing herewith a manuscript entitled “Curcumin nanoparticle doped starch thin film as a green colorimetric sensor for detection of boron” by C. Boonkanon and coworkers.

In this paper, a tapioca starch film doped with curcumin nanoparticles was successfully fabricated and applied as a novel green colorimetric sensor for detection of boron in wastewater. The curcumin nanoparticle (30-98 nm) was simultaneously extracted and prepared by ultrasonic extraction of turmeric powder in ethanol at 70°C for the first time. These curcumin nanoparticles were used as green probe to be reacted boron, while tapioca starch was used as a natural support substrate to fabricate a colorimetric green film for boron detection. A yellow thin film (51 μm thick) fabricated on a used plastic spoon turned red-brown after immersion in boron solution (pH 9) for 15 min. No color change was observed when tested with various other ions, indicating excellent selectivity for boron. The film costs only 0.0007 USD, while the cost of the sensor (curn-film on new plastic spoon) was 0.004 USD. After use the film could be completely washed from the plastic, it being biodegradable, while the used plastic spoon could be re-used to fabricate a new sensor at least 5 times. The sensor was used in combination with a digital image colorimetry for rapid determination of boron in water and wastewater samples. The concentrations of boron detected by the sensor were not significantly different to values obtained from ICP. Because both reagent and substrate used to fabricate this sensor are natural materials, the green film developed could be a novel green choice to avoid the use of synthetic polymer. It thus provided an ideal novel green platform for the rapid quantitative analysis of boron.

The paper is unpublished and has not been submitted for publication elsewhere. We would be grateful if the manuscript is reviewed and considered for publication in *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and biomolecular spectroscopy*.

Thank you very much for your kind assistance.

Yours sincerely,

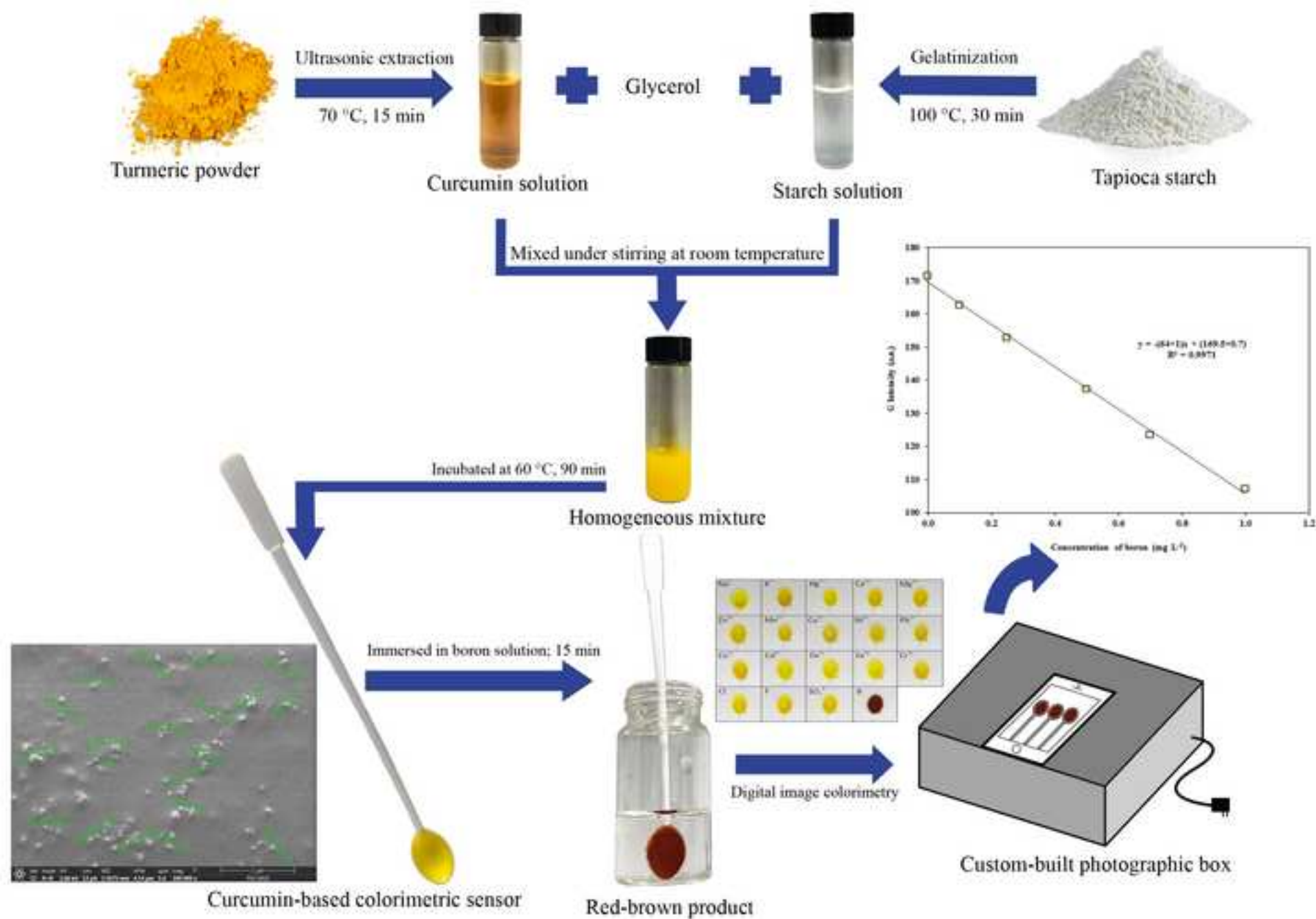
Aree Choodum

Associate Professor at Faculty of Technology and Environment,
Prince of Songkla University, Phuket Campus,
Phuket 83120, Thailand

Tel.: +66 76276481

Fax: +66 76276102

E-mail address: aree.c@phuket.psu.ac.th; choodum@gmail.com



Highlights:

- Curcumin nanoparticle doped starch film was developed for boron detection.
- A cost effective probe was highly sensitive and selective to boron at pH 9.
- Rapid quantitation of boron was achieved within 15 min.
- The detection limit of 0.052 mgL^{-1} boron was obtained.
- Amount of boron in wastewater was not significantly different from ICP.

Curcumin nanoparticle doped starch thin film as a green colorimetric sensor for detection of boron

Chanita Boonkanon^a Kharittha Phatthanawiwat^a Worawit Wongniramaikul^a and Aree Choodum^{a1}

^aIntegrated Science and Technology Research Center, Faculty of Technology and Environment, Prince of Songkla University, Phuket Campus, Kathu, Phuket 83120 Thailand

Abstract

A tapioca starch film doped with curcumin nanoparticles was successfully fabricated and applied as a novel green colorimetric sensor for detection of boron in wastewater. Curcumin nanoparticles (curn, 30-90 nm) extracted from turmeric powder were used as a green probe, while tapioca starch was used as a natural support substrate. A yellow thin film (51 μm thick) fabricated on a used plastic spoon turned red-brown after immersion in boron solution (pH 9) for 15 min with excellent selectivity. The film costs only 0.0007 USD, while the cost of the sensor (curn-film on new plastic spoon) was 0.004 USD. After use the film could be completely washed from the plastic, it being biodegradable, while the used plastic spoon could be re-used to fabricate a new sensor at least 5 times. The good 1.52%RSD precision was obtained across three lots fabricated. When the curn-film was used in conjunction with digital image colorimetry (DIC), a simple and rapid quantification of boron was achieved. The green color layer in reflected light image of the red-brown product (I_G) provided the highest sensitivity ($64 \pm 1 \text{ a.u.} \cdot \text{Lmg}^{-1}$) and the lowest detection limit of $0.052 \pm 0.001 \text{ mgL}^{-1}$. The intra-day testing (9 films) had 2.41 to 4.34%RSD, while the inter-day testing had 2.37 to 7.46%RSD (27 films, 6 days). Accuracy in terms of relative error for control samples (0.25 mgL^{-1}) was +3.21%. Wastewater samples from Para-rubber wood processing plant were quantified by curn-film and DIC, giving $5397 \pm 606 \text{ mgL}^{-1}$ boron concentration with no significant difference to ICP determination at 95% confidence level. The sensors after storage in a desiccator for three months gave readings changed by only +2.1 to -6.2% relative to freshly prepared sensors.

Keywords: Boron; Green sensor; Curcumin nanoparticles; Tapioca film; Digital image colorimetry

¹Corresponding author. Tel.: +66(0)7627 6481; fax: +66 (0) 7627 6102. Email address:aree.c@phuket.psu.ac.th (A. Choodum)

1. Introduction

Boron (B) is one of the most important elements for plants, animals and humans [1, 2]. Its deficiency affects plant growth and yield and limits crop productivity, while over-doses ($>2 \text{ mgL}^{-1}$) may be toxic to some plants and reduce plant yield [3-5]. For humans and animals, boron can maintain the normal functions of bones, prevent osteoporosis efficiently, and improve brain function or reaction capability [4, 6, 7].

Boron in natural water is in the form of free boric acid (H_3BO_3) [4]. Its concentrations in surface water vary widely (*e.g.* $10\text{-}1,000 \text{ }\mu\text{gL}^{-1}$ in Europe [8]) because of both natural factors (*e.g.* weathering of rocks and leaching of salt deposits) and anthropogenic factors. Boron is widely used in the forms of boric acid and salt of borate in many industries [1, 3] (*e.g.* chemical, nuclear, glass, ceramic, and food industries, metal welding, and rubber wood processing), wastewater discharges of these industries could release boron to the environment. High levels of pollution are possible due to the highly solubility of boron in water [9, 10]. Environmental regulations regarding boron vary from country to country. Parks and Edward [11] reported that boron in drinking water has come to attention of the U.S. Environmental Protection Agency (EPA) as a contaminant potentially needing regulation. The World Health Organization (WHO) suggests boron concentration bound of 2.4 mgL^{-1} in drinking water [12] and 1.0 mgL^{-1} limit has been set for the European Union (EU) [13].

The removal of boron is costly with varied efficiency, so early measurement of boron concentration is preferable as this could help identify potential pollution sources, reduce the stress on remedial treatments, or determine whether the treatment has been sufficient [14]. A number of analytical methods have been reported for the determination of boron, including inductively couple plasma (ICP) spectrometry [7, 15-17], atomic absorption spectrometry (AAS) [18, 19], and spectrophotometry with various chromogenic reagents [4, 6, 14]. The ICP and AAS methods suffer from spectral interferences and memory effects [11, 17, 18], while some chromogenic reagents required for spectrophotometry are difficult to synthesize, unstable, sensitive to temperature or pH or reagent concentrations [6]. These instrumental methods also rely on expensive and bulky instruments with high running costs and complicated steps. Therefore, it is difficult to be used these analytical methods for on-site rapid detection of boron.

Colorimetric sensors are an attractive choice for rapid on-site detection of a pollutant. A number of such sensors are known to recent reviews [20-23], but no boron sensor among them. Most of them involved the use of the liquid colorimetric/fluorometric reagents as the signaling unit. This could limit the use in on-site detection due to the hazards on carrying liquid chemicals. To overcome this drawback, some colorimetric sensors have been developed with the colorimetric reagent trapped within a polymer matrix, for the detection of various analytes like nitrite ion [24], iron [25], explosives [26-29], and methamphetamine [30]. However, synthetic polymers were used in these prior studies, namely poly vinyl alcohol [27, 28], poly vinyl chloride [26], or acrylamide [25], which cause their own environmental concerns. Some polymer substrates involve the use of toxic solvents, *e.g.* tetrahydrofuran for poly vinyl chloride [28, 29]. Recently, tapioca starch has been used as the substrate to develop sensors for the detection of formalin in food [31] or of iron [32]. Although a natural polymer was used in this work, synthetic chemical reagents were used as the colorimetric reagents.

In this work, a green colorimetric sensor based on entrapped curcumin nanoparticles (curn) within a tapioca starch film was developed for boron detection, for the first time. Curcumin is a chromogenic reagent commonly used for boron determination in spectrophotometry [11, 33-35]. This method (the curcumin method) has been widely used as a standard method for measuring boron concentrations in water and wastewater [34] due to being more sensitive and reliable than other spectrophotometric methods [35, 36]. In this work, curn was entrapped within thin tapioca starch films as the green colorimetric reagent to react with boron producing the rosocyanin complex [35, 36]. Tapioca starch was selected as the natural polymer substrate due to its film-forming properties [37], complete biodegradability [38], low cost, and renewability [39]. It can be hydrolyzed by microorganisms or enzymes into glucose, which is then metabolized into carbon dioxide and water [40] that are converted to starch again by the photosynthesis in plants. The quantification of boron was achieved by digital image colorimetry (DIC) instead of spectrophotometry. The colorimetric product from the reaction of developed sensor (rosocyanin complex) was photographed using a smart phone digital camera before analyzing its red, green, and blue intensities (color layers) by a custom-

built color analysis program. This made the quantitative analysis possible without the need of an expensive and bulky spectrophotometer. This scheme has been used to quantify various analytes [26-28, 30, 31, 41].

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Tapioca starch (Erawan Brand, Cho Heng, Nakhon Pathom, Thailand) and turmeric powder were purchased from a local supermarket in Kathu, Phuket, Thailand. Curcumin ($\geq 80\%$) was purchased from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany), while sodium tetraborate and glycerol were produced by Ajax (Sydney, Australia). Ethanol, hydrochloric acid, and sodium hydroxide were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Stock solution of standard boron (100 mgL^{-1}) was prepared by dissolving sodium tetraborate in ultrapure water purified by a Water Purification System (Merck, Darmstadt, Germany). All standard solutions were freshly prepared by diluting the stock solution with ultrapure water to appropriate concentrations.

2.2. Preparation and extraction of curn

Curn was prepared by modifying previous methods reported [41-44]. Curcumin from turmeric powder (0.15 g) was extracted in ethanol under sonication (350 W, 40 KHz, Powersonic 405, Korea). Extraction conditions, *i.e.* solvent volume (3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, or 6.0 mL), temperature (40, 50, 60, or 70°C), and time (5, 10, 15, or 20 min) were optimized. After extraction the yellow supernatant was collected and stored at ambient conditions in a brown bottle for further use. The light absorption spectrum of curcumin extract was determined using a spectrophotometer (Dynamica, United Kingdom).

2.3. Fabrication and characterization of the curn-based colorimetric sensor (curn-film)

The curn-film was developed based on our previous reports [31, 32]. The starch solution (5% w/v) was prepared by dispersing tapioca starch in ultrapure water. It was heated at 100°C with stirring for 30 min to gelatinize the starch. After a clear viscous solution was obtained, it was cooled to room temperature before

adding curcumin extract. The curcumin extract (0.5, 1.0, 1.5 or 2.0 mL) was mixed with the starch solution (2, 3, 4, or 5 mL) under stirring at room temperature. Glycerol (25, 50, 100, 150, or 200 μ L) was then added as plasticizer and stirred further to obtain a homogeneous mixture. The mixture (200 μ l) was then dropped on a used plastic spoon and incubated at 60°C in an oven for 90 min. After the spoon was cooled to room temperature, it was stored in ziplock plastic bag in a desiccator for further use.

Also films from commercial curcumin ($\geq 80\%$) were fabricated using the same procedure, for comparison. Curcumin (28 mg) was dissolved in ethanol (3 mL) and sonicated for 15 min at 70°C. The supernatant was then diluted until its maximum absorption at 425 nm was the same as that of the curcumin extract. The curcumin standard solution (~ 27 mM) was then used to fabricate the film instead of the curcumin extract.

The functional groups of fabricated colorimetric film were investigated using Fourier transform infrared spectrometry (FTIR; Bruker, Germany). The morphology of the film was studied using a scanning electron microscope, Quanta 400 (SEM; FEI, Czech Republic). The simultaneous thermal analyzer 8000 (Perkin Elmer, USA) was used to characterize thermal properties of the fabricated film.

2.4. Colorimetric test and quantification of boron using curcumin-film and DIC

Standard working solutions of boron were prepared in the range from 0 to 100 mgL^{-1} by diluting a stock solution (100 mgL^{-1}) with ultrapure water. A plastic spoon with the film in it was immersed to each standard solution (10 mL) for an appropriate time (15 min) at room temperature. Three repeats were done at each concentration of boron standard. In DIC used for quantification of boron, three films were in sample holders of a custom-built photography box (Figure 1) and photographed six times using the built-in digital camera of an iPhone 5S. The average intensities of red, green and blue colors (RGB values) across the 6 images of three sensors (18 values in total) at each boron concentration were investigated using a custom-built RGB analysis program [26-28, 31] and the average was used as a single data point to establish calibration curves.

Insert figure 1

A custom-built photography box modified from previous design [26-28, 31] was used throughout the experiment to eliminate any effects of environmental light. After three sensors were placed in the sample holders inside the box, they were photographed in top view with the digital camera of iPhone 5S with a fixed aperture setting. The controlled illumination and fixed photo settings helped achieve reproducible results from imaging and image analysis.

The colorimetric products were imaged by setting the digital camera of the iPhone 5S to flash off and automatic white balance with the high dynamic range (HDR) off. JPEG images (24-bits, 0.98 MB, 3264×2448 pixels) were saved to the iPhone's memory before transfer to a computer for color analysis. RGB data of each image were analyzed with a custom-built RGB analysis program [26-28, 31]. Briefly, an initial 80×80 pixels image patch from one of the six recorded images of three sensors for each test was manually selected for color analysis. An equivalent image patch of the remaining 5 digital images was then automatically selected by the image analysis program. The average RGB values were then reported for further use.

2.5. Analytical performance and method validation

Analytical performance of the curn-film and DIC combination in quantifying boron was investigated. The performance indicators included sensitivity, linearity, linear range, limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ). LOD, which is the boron concentration providing an RGB intensity equal to the blank intensity plus three standard deviations of the blank, was calculated using a standard method ($y_{LOD}=y_B+3S_B$ where y_{LOD} is y-value at the limit of detection, y_B is the y-axis intercept, and S_B is the standard deviation of slope of the calibration graph [45]). The same method was used to calculate LOQ, whose signal matches the blank signal plus ten standard deviations. Precision was expressed in terms of relative standard deviation (%RSD) for each color component of the six images of three sensors (n=18). Both intra-day and inter-day

precision are reported. The accuracy was assessed in terms of relative error (%RE) evaluated by analyzing a known concentration boron standard (0.25 mgL^{-1}) against the established standard curve.

2.6. Analysis of real samples

Five real samples were analyzed by using the curn-films and DIC for quantification of boron. These consisted of four water samples randomly grab sampled from the abundant tin mines in Phuket, Thailand, and one wastewater sample from a rubber wood processing plant. All the water samples were preliminarily tested using the curn-film in order to assess the boron concentrations approximately. They were then diluted with ultrapure water and adjusted to pH 9. The solution was then detected with the curn-film and DIC. Absorption spectra of boron-curn products from real samples were also investigated using a spectrophotometer. Real samples were also analyzed using inductively coupled plasma-optical emission spectrophotometer (ICP-OES; PerkinElmer, USA) for comparison.

2.7. Stability of the curn-films

The stability of the green colorimetric sensors was evaluated by preparing 111 sensors using the optimum conditions, in one batch. Three of them were tested with boron solution (1 mgL^{-1}) on the day of preparation, while the others were kept to evaluate their stability. They were vacuum sealed in packs of three sensors (36 packs in total). Twelve packs in one ziplock plastic bag were then stored in the refrigerator (-18°C), and in desiccator (Acrylic D50-A, Northman, Thailand), as well as at ambient conditions. One pack (three sensors) was taken from each storage condition for boron test every day for one week, and monitoring then continued on a weekly basis to 3 weeks, and thereafter at 2 and at 3 months of storage.

3. Results and discussion

3.1. Extraction and characterization of curn

Since curcumin is a chromogenic reagent commonly used for boron determination [11, 33-35] and provides more sensitive and reliable methods than other spectrophotometric methods [35, 36], it was selected as the green colorimetric probe for developing the green sensor for boron. In this work, curcumin was extracted from turmeric powder that is commonly sold as a herbal medicine in Thailand, at a much lower price (1USD/100g) than commercial curcumin (10USD/5g). Solvent extraction under sonication was used to extract curcumin because this was expected to provide better extraction efficiency than conventional liquid extraction. From the optimization (see section 2.2.), turmeric powder (0.15 g) was extracted using 4.5 mL ethanol under ultrasonic power of 350 W, 40 KHz at 70°C for 15 min. This extraction method not only provided good extraction efficiency, but also reduced the size of curcumin particles. Curcumin particles in the range of 30-98 nm were prepared and extracted by this method (Fig. 2a), and these are smaller than curcumin particles dissolved in solvent (500-800 nm) [42], but larger than the particles prepared by wet milling (2-40 nm) [42]. However, wet-milling would involve the use of toxic dichloromethane with complicated procedures, so ultrasonic extraction at optimized conditions was preferred to extract the green colorimetric probe reagent. When five lots of turmeric powder were extracted at these optimum conditions, the precisions obtained were in the range from 1.12 to 4.17%RSD, indicating good consistency of extraction and of preparing green probes by this method.

Insert figure 2

The maximum absorption of the extracted curcumin was observed at 420 nm, which matches previous studies, *i.e.* 416-421 nm [46], 418-421 nm [2], and 428 nm [47]. When boron standard solution was tested with the extracted curcumin, the yellow curcumin solution became red-brown with maximum absorption at 510 nm. However, the rosocyanin complex (red-brown product) has been detected at 543 nm [35, 36] and at 545 nm [48]. The appropriate absorption wavelength is known to depend on the solvent used: the absorption spectra of curcumin and its metal derivatives are solvent dependent [46, 49].

3.2. Fabrication of the curn-film

Fabrication of the curn-film was based on entrapping curcumin extract within a thin film of tapioca starch. Tapioca starch was chosen as the natural polymer substrate due to its film-forming properties [37], complete biodegradability [38], low cost, and renewability [39]. A clear homogenous thin film from tapioca starch also has good tolerance for elevated temperature during casting [31].

Optimal fabrication conditions (see section 2.3) were investigated to obtain a green colorimetric sensor with good characteristics, including the performance in boron detection. The use of 5% (w/v) tapioca starch solution at 3 mL with 0.5 mL curcumin extract and 50 μ L glycerol provided the best homogenous mixture. When the mixture (200 μ L) was dropped on a used plastic spoon and incubated at 60°C in an oven for 90 min, a yellow thin film was obtained (Fig. 3a). This yellow thin film turned to a dark red-brown film when dipped in boron standard solution (Fig. 3b) due to the reaction between boron and entrapped curn. These fabrication conditions were then used as optimal conditions. The good 1.52%RSD precision was obtained from three fabricated lots, using these conditions. Films from commercial curcumin were also fabricated using these same conditions for comparison. Although that volume of commercial-curns that provided the same absorbance as our curn extract (at 425 nm) was used to fabricate the commercial-curn-films, the curn-film from curn extracted from turmeric powder provided darker films with darker red-brown products than the commercial curn-film (Fig. 3c). This might be because commercial curcumin contains ~80% curcumin, while the curn extract may be more concentrated.

Insert figure 3

When prepared using these optimum conditions, each film costs only 0.024 THB (~0.0007 USD), while the cost of the whole sensor (curn-film and a new plastic spoon) was 0.149 THB (~0.004 USD): the costs are much lower than those of alternative detection methods. Moreover, plastic spoons used as the sensor holder in this work were re-used as film carrying substrate further lowering the material costs to below 0.004 USD. It was found that a new and a used plastic spoon provided had a difference in sensors readings, in the range from +0.06 to -1.61% with no significant difference at 95% confidence level. After use

the film could be completely washed away from the plastic, it being biodegradable, while the used plastic spoon could be re-used for fabrication of a new sensor at least for 4 recycles. Intensities of red (I_R) and green (I_G) channels on testing boron standard solution (1 mgL^{-1}) with the curn-films on 5th time used spoon had shifted by +1.6% and -7.5%, respectively.

3.3. Characterization of the curn-film

The SEM images of the curn-film show a homogeneous distribution of curcumin particles within the film ($\sim 51 \text{ }\mu\text{m}$ thickness: Fig. 2b) and a film fabricated without curcumin was also imaged (Fig. 2c). The size of entrapped curcumin nanoparticles was in the range 30-79 nm, which matches the size of extracted particles. Some aggregation of curn was observed within the film.

FTIR spectra of the curn-film, the starch film without curn (blank), and extracted curcumin are presented in Fig.4. A large band assigned to O-H vibrations was observed at 3281 cm^{-1} for the sensor with curcumin (Fig.4a) and at 3280 cm^{-1} for the blank (Fig. 4b). This peak was also observed in the spectrum of extracted curcumin at 3424 cm^{-1} (Fig. 4c). It seems that curn in tapioca starch film had a slight shift of the wave number from 3280 to 3281 cm^{-1} . It should be noted that since less curcumin solution (0.5 mL) was added to the dominant starch solution (3 mL), the peak at 3281 cm^{-1} might relate to the vibrations of O-H functional groups in tapioca starch rather than curcumin. The entrapped curn also caused a shift of CH_2 symmetrical stretching vibrations peak at 2933 cm^{-1} for tapioca starch (Fig. 4b) to 2931 cm^{-1} (Fig. 4a), and it appeared at 2919 cm^{-1} for the curcumin extract (Fig. 4c). These two peaks have been reported as characteristic for tapioca starch [50, 51]. Some C-O vibration peaks of amylopectin in the starch appeared at 1151 to 925 cm^{-1} [52, 53] and were slightly shifted by added curn, *i.e.* 1106 to 1105 cm^{-1} , 1079 to 1078 cm^{-1} , and 1018 to 1017 cm^{-1} , while the skeletal stretching of starch at 852 cm^{-1} shifted to 859 cm^{-1} . The vibration peak at 1513 cm^{-1} appeared in the spectra of curn-film (Fig.4a) and of extracted curcumin (Fig. 4c), and this was assigned to C=C bond in curcumin.

Insert figure 4

Thermal gravimetric analysis (TGA) of the curn-film showed ~10% weight loss from room temperature to 150°C (Fig. 5), which was attributed to moisture loss. Desorption or decomposition of curcumin within the starch matrix was expected to show as a weight loss from 250 to 275°C. The initial temperature of mass loss from turmeric extract has been reported at 193°C [54], and it is more stable when encapsulated with maltodextrin (228°C) [54], polyvinyl alcohol (270°C) [55], or chitosan (321°C) [56]. The interaction between curcumin and starch thus contributed to its thermal stability. The major weight loss appeared from 290 to 340°C and was attributed to decomposition of tapioca starch [57]. A residual ~10% weight remains at 600°C, indicating incomplete degradation of the composite. DTG peak of the film at ~270°C was expected for curcumin, which corresponds to previous reports of DTG peak at 277°C for curcumin, and at 310 °C and 330 °C for curcumin composites [58]. DTG peak at ~302-310°C was expected for the tapioca starch [57]. An endothermic peak at ~75°C was observed in DTA thermogram of the film, which corresponded to nanosized curcumin as reported previously (72.4°C) [59].

Insert figure 5

3.4. Colorimetric boron determination with the curn-film

Colorimetric determination of boron with the curn-film is based on the reaction of entrapped curn in the sensor with a boron standard solution. The interaction between boron and curcumin has been recognized in many studies [35, 36, 46]. A negatively charged tetrahedral complex (rosocyanin complex) is produced by the reaction. In this work, the red-brown complexes were produced within a thin film (Fig. 3b). When the concentration of boron increased, more products were produced resulting in darker red-brown film (Fig. 3d).

The reaction time of boron with the film was investigated by dipping the colorimetric sensor in the boron standard solution for 0 to 60 min (Fig. 3e). It was found that it required 15 min for boron to be completely reacted with entrapped curcumin inside the starch film. This was faster than the reaction times reported by Uppström (2 h) [60] and Liu and Lee (70 min-24 h) [35] for determination of boron by curcumin method. This difference might be caused by the small particle size of curcumin extract in the current study.

The influence of pH on the reaction of entrapped curcumin and boron was also investigated. Test solutions were adjusted to the desired pH in the range from 1 to 13 by adding dilute HCl or NaOH. The red-brown complexes were produced with pH from 8 to 13 (Fig. 6a). Within this pH range, curcumin is predominantly in its enol form and acts as an electron donor to boron. The red to brown complex was also observed for blanks tested at pH 10 to 13, due to pH dependence of curcumin color [41, 43, 61]. Although the darkest red-brown products were obtained at pH 10, pH 9 was selected for further investigation as no red-brown product was observed with the blank solution. When the developed sensor was tested with various ions ($\sim 10,000 \text{ mgL}^{-1}$) at pH 9, red-brown products were observed for boron ions only (Fig. 6b). This indicates excellent selectivity of the developed sensor for boron at pH 9.

Insert figure 6

3.5. System performance and method validation of curc-film and DIC in the quantification of boron

DIC was applied in conjunction with the developed curc-film for rapid quantification of boron. Red-brown complexes obtained from testing boron with the curc-film were imaged using iPhone 5S. The images were then analyzed by a custom-built RGB analysis program to obtain the RGB intensities (I_R , I_G , I_B). The relationships of boron concentration and RGB intensities are shown in Fig. 7a. The highest of I_R was observed as expected for the red-brown complexes. I_R seemed to be constant until 1 mgL^{-1} and decreased until 100 mgL^{-1} boron, due to the darkening of red-brown coloring. I_G was dramatically changed when boron concentration increased from 0 to 10 mgL^{-1} and became constant after 50 mgL^{-1} , while I_B showed the lowest intensity that was nearly constant and independent of boron concentration. At concentrations of boron from 0 to 1 mgL^{-1} , I_G was much greater than I_B as the complex appeared orange and absorbed blue light (so less reflection of this). When the concentration of boron was above 10 mgL^{-1} , the products became red-brown and showed slightly more reflected green light than blue light.

Insert figure 7

When the absorbances of the red-brown complexes were estimated for the ranges of red, blue and green color (A_R , A_G , and A_B) [26-28, 30], as expected A_B was higher than A_G and A_R , especially at concentrations of boron below 10 mgL^{-1} (Fig. 7b). A_G showed the largest increase with the concentration of boron, which could indicate that more red-brown complexes produced increased absorption of light in the green range (500-580 nm). This is in good agreement with spectrophotometric results having the maximum absorbance at 510 nm, although previously reported at 543 nm [35, 36] and at 545 nm [48].

The responses from DIC had linear portions in their dependencies on concentration of boron for I_G in the range from 0 to 1.0 mgL^{-1} with good linearity ($R^2 = 0.9971$), and for I_R in the range of 30 to 100 mgL^{-1} ($R^2 = 0.9918$) (Fig. 7c-d). The A_G and A_R showed linear portions in the ranges from 0 to 1 mgL^{-1} , and from 10 to 100 mgL^{-1} , respectively. These linear portions could be applied in the quantification of boron for real samples.

The analytical performance of the curn-film and DIC for quantification of boron is summarized in Table 1. The I_G provided the highest sensitivity ($64 \pm 1 \text{ a.u.Lmg}^{-1}$) and the highest linearity ($R^2 = 0.9971$). Quantification of boron could be achieved in two alternative concentration ranges, *i.e.* at low concentrations from 0.1 to 1 mgL^{-1} using I_G and A_G , and at high concentrations of 10 to 100 mgL^{-1} using I_R . I_G also provided the lowest detection limit of $0.052 \pm 0.001 \text{ mgL}^{-1}$, which was lower than the boron concentration limit in drinking water suggested by WHO (2.4 mg L^{-1}) [12] or the 1.0 mg L^{-1} limit for the EU [13]. The intra-day precision of 9 films was in the range from 2.41 to 4.34%RSD, while an inter-day precision from 2.37 to 7.46%RSD was obtained for 27 films over six days. %RE in the analysis of 0.25 mgL^{-1} control samples was +3.21%.

Insert table 1

3.6. Analysis of water samples

Five real samples were analyzed by using the curn-films in conjunction with DIC, and with ICP-OES for comparison. All the water samples were diluted 100-fold before spiking with a boron standard solution (0.5 mgL^{-1}) to investigate matrix effects. Recoveries in the range 83 – 112% were obtained. Wastewater

sample from Para-rubber wood processing plant was quantified by curn-film and DIC (I_G) to have boron concentration of $5397 \pm 606 \text{ mgL}^{-1}$ (Table 2), while $4870 \pm 13 \text{ mgL}^{-1}$ was obtained with the ICP. These alternative results were not significantly different at 95% confidence level (calculated t -value = 1.50, critical t -value = 2.78, degrees of freedom = 4). The concentrations of boron in all water samples from tin mines in Phuket were below the LOD ($0.052 \pm 0.001 \text{ mgL}^{-1}$) also matching the results from ICP.

Insert table 2

3.7. Stability of the curn-film

The stability of the green colorimetric sensors was evaluated for various storage conditions. When the sensors were kept in the plastic bags (without vacuum seal) and stored in the refrigerator (-18°C) for one month, the curn-films peeled off the plastic spoons. In contrast, the curn-films of sensors kept in desiccator or in ambient conditions remained in position on the plastic spoons, but provided paler colored boron reaction products. The sensors were then vacuum sealed in packs of three before putting in ziplock plastic bags for storage in alternative conditions. It was found that the curn-films peeled off from the plastic spoons after storage in ambient conditions for one week, or for one month in the refrigerator. In contrast, the sensors kept in desiccator remained usable after storage for three months. I_R and I_G , on testing with boron solution (1 mgL^{-1}), of these curn-films had shifted by +2.1% and -6.2%, respectively.

4. Conclusion

A novel curn-film was successfully developed from tapioca starch and extracted curn for colorimetric determinations of boron. The yellow film turned red-brown after dipping in a boron standard solution for 15 min, which is faster than in other reports due to the smaller sized curcumin nanoparticles of the green probe. When the curn-film was used in conjunction with DIC method, quantification of boron was achieved. The quantification could be done using I_G at concentrations up to 1.0 mgL^{-1} with a good correlation coefficient ($R > 0.99$) of response to concentration in the calibration data. The use of the novel

green colorimetric sensor together with DIC enables a simple, portable, and cost effective approach to the quantification of boron in field conditions.

Acknowledgments

This work was supported by the Thailand Research Fund [no. RSA6080036] and the Royal Golden Jubilee (RGJ) Ph.D. Programme [no. 2.NM.PS/59/AN.1]. The authors are also thankful for English correction service from PSU Publication Clinic by Prof.Dr.Seppo Karilla.

References

- [1] S. Alves, C. Santos, A.P. da Costa, M. Silva, C. Baleizão, J.P.S. Farinha, Smart polymeric nanoparticles for boron scavenging, *Chem. Eng. J.* 319 (2017) 31-38.
- [2] A. Alharati, Y. Swesi, K. Fiaty, C. Charcosset, Boron removal in water using a hybrid membrane process of ion exchange resin and microfiltration without continuous resin addition, *J. Water Process. Eng.* 17 (2017) 32-39.
- [3] N. Öztürk, D. Kavak, Adsorption of boron from aqueous solutions using fly ash: Batch and column studies, *J. Hazard. Mater.* 127 (2005) 81-88.
- [4] A. Economou, D.G. Themelis, H. Bikou, P.D. Tzanavaras, P.G. Rigas, Determination of boron in water and pharmaceuticals by sequential-injection analysis and fluorimetric detection, *Anal. Chim. Acta.* 510 (2004) 219-224.
- [5] A.E. Yilmaz, R. Boncukcuoğlu, M.M. Kocakerim, M.T. Yilmaz, C. Paluluoğlu, Boron removal from geothermal waters by electrocoagulation, *J. Hazard. Mater.* 153 (2008) 146-151.
- [6] L. Ma, Z. Zhang, Q. Li, Spectrophotometric determination of boron based on charge transfer reaction, *Spectrochim. Acta, Part A.* 79 (2011) 599-602.
- [7] A. Krejčová, T. Černohorský, The determination of boron in tea and coffee by ICP–AES method, *Food Chem.* 82 (2003) 303-308.

- [8] A.J. Wyness, R.H. Parkman, C. Neal, A summary of boron surface water quality data throughout the European Union, *Sci. Total Environ.* 314-316 (2003) 255-269.
- [9] H.R. Flores, L.E. Mattenella, L.H. Kwok, Slow release boron micronutrients from pelletized borates of the northwest of Argentina, *Miner. Eng.* 19 (2006) 364-367.
- [10] M.F. Chong, K.P. Lee, H.J. Chieng, I.I. Syazwani Binti Ramli, Removal of boron from ceramic industry wastewater by adsorption–flocculation mechanism using palm oil mill boiler (POMB) bottom ash and polymer, *Water Res.* 43 (2009) 3326-3334.
- [11] J.L. Parks, M. Edwards, Boron in the Environment, *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.* 35 (2005) 81-114.
- [12] W.H. Organization, Guidelines for drinking-water quality, World Health Organization, Geneva, (2016).
- [13] C. Directive, 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption, *Off. J. Eur. Communities.* 5 (2014) 98.
- [14] C.F.A. Floquet, V.J. Sieben, B.A. MacKay, F. Mostowfi, Determination of boron concentration in oilfield water with a microfluidic ion exchange resin instrument, *Talanta.* 154 (2016) 304-311.
- [15] A. Sabarudin, K. Oshita, M. Oshima, S. Motomizu, Synthesis of cross-linked chitosan possessing N-methyl-d-glucamine moiety (CCTS-NMDG) for adsorption/concentration of boron in water samples and its accurate measurement by ICP-MS and ICP-AES, *Talanta.* 66 (2005) 136-144.
- [16] Y.Q. Ma, Z.K. Peng, J. Yang, Y.K. Xiao, Y.L. Zhang, Determination of boron content and isotopic composition in gypsum by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy and positive thermal ionization mass spectrometry using phase transformation, *Talanta.* 175 (2017) 250-255.
- [17] A.S. Al-Ammar, E. Reitznerová, R.M. Barnes, Feasibility of using beryllium as internal reference to reduce non-spectroscopic carbon species matrix effect in the inductively coupled plasma–mass spectrometry (ICP-MS) determination of boron in biological samples, *Spectrochim. Acta, Part B.* 54 (1999) 1813-1820.

- [18] M. Burguera, J.L. Burguera, C. Rondón, P. Carrero, Determination of boron in blood, urine and bone by electrothermal atomic absorption spectrometry using zirconium and citric acid as modifiers, *Spectrochim. Acta, Part B*. 56 (2001) 1845-1857.
- [19] M. Resano, J. Briceño, M. Aramendía, M.A. Belarra, Solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry for the direct determination of boron in plant tissues, *Anal. Chim. Acta*. 582 (2007) 214-222.
- [20] B. Kaur, N. Kaur, S. Kumar, Colorimetric metal ion sensors – A comprehensive review of the years 2011–2016, *Coord. Chem. Rev.* 358 (2018) 13-69.
- [21] P.A. Gale, C. Caltagirone, Fluorescent and colorimetric sensors for anionic species, *Coord. Chem. Rev.* 354 (2018) 2-27.
- [22] A. Ghosh, D.A. Jose, R. Kaushik, Anthraquinones as versatile colorimetric reagent for anions, *Sens. Actuators, B*. 229 (2016) 545-560.
- [23] A. Piriya V.S, P. Joseph, K. Daniel S.C.G, S. Lakshmanan, T. Kinoshita, S. Muthusamy, Colorimetric sensors for rapid detection of various analytes, *Mater. Sci. Eng., C*. 78 (2017) 1231-1245.
- [24] J. Nam, I.-B. Jung, B. Kim, S.-M. Lee, S.-E. Kim, K.-N. Lee, D.-S. Shin, A colorimetric hydrogel biosensor for rapid detection of nitrite ions, *Sens. Actuators, B*. 270 (2018) 112-118.
- [25] M.V. Martínez, C.R. Rivarola, M.C. Miras, C.A. Barbero, A colorimetric iron sensor based on the partition of phenanthroline complexes into polymeric hydrogels. Combinatorial synthesis and high throughput screening of the hydrogel matrix, *Sens. Actuators, B*. 241 (2017) 19-32.
- [26] A. Choodum, J. Keson, P. Kanatharana, W. Limsakul, W. Wongniramaikul, Selective pre and post blast trinitrotoluene detection with a novel ethylenediamine entrapped thin polymer film and digital image colorimetry, *Sens. Actuators, B*. 252 (2017) 463-469.
- [27] A. Choodum, K. Malathong, N. NicDaeid, W. Limsakul, W. Wongniramaikul, A cost effective hydrogel test kit for pre and post blast trinitrotoluene, *Forensic Sci. Int.* 266 (2016) 202-208.

- [28] A. Choodum, P. Kanatharana, W. Wongniramaikul, N. NicDaeid, Poly vinyl alcohol cryogel as a selective test kit for pre and post blast trinitrotoluene, *Sens. Actuators, B.* 222 (2016) 654-662.
- [29] E. Erçağ, A. Üzer, R. Apak, Selective spectrophotometric determination of TNT using a dicyclohexylamine-based colorimetric sensor, *Talanta.* 78 (2009) 772-780.
- [30] A. Choodum, P. Kanatharana, W. Wongniramaikul, N. NicDaeid, A sol-gel colorimetric sensor for methamphetamine detection, *Sens. Actuators, B.* 215 (2015) 553-560.
- [31] W. Wongniramaikul, W. Limsakul, A. Choodum, A biodegradable colorimetric film for rapid low-cost field determination of formaldehyde contamination by digital image colorimetry, *Food Chem.* 249 (2018) 154-161.
- [32] A. Choodum, W. Sriprom, W. Wongniramaikul, Portable and selective colorimetric film and digital image colorimetry for detection of iron, *Spectrochim. Acta, Part A.* 208 (2019) 40-47.
- [33] D.H. Youssef, Distribution of Boron in Some Egyptian Aquatic Environments, *J. Oceanogr.* 59 (2003) 537-544.
- [34] American Public Health Association, *Standard Methods for the Examination of Water and WasteWater*, American Public Health Association Inc., New York. (1999).
- [35] Y.-M. Liu, K. Lee, Modifications of the curcumin method enabling precise and accurate measurement of seawater boron concentration, *Mar. Chem.* 115 (2009) 110-117.
- [36] D.W. Dyrssen, Y.P. Novikov, L.R. Uppström, Studies on the chemistry of the determination of boron with curcumin, *Anal. Chim. Acta.* 60 (1972) 139-151.
- [37] J. Isaad, A. El Achari, F. Malek, Bio-polymer starch thin film sensors for low concentration detection of cyanide anions in water, *Dyes Pigm.* 97 (2013) 134-140.
- [38] M.A. Araújo, A. Cunha, M. Mota, Enzymatic degradation of starch-based thermoplastic compounds used in prostheses: Identification of the degradation products in solution, *Biomater.* 25 (2004) 2687-2693.
- [39] J.-F. Zhang, X.Z. Sun, Mechanical properties of PLA/starch composites compatibilized by maleic anhydrid, *Biomacro.* 5 (2004) 1446-1451.

- [40] D. Primarini, Y. Ohta, Some enzyme properties of raw starch digesting amylases from streptomyces sp. No.4, *Starch*. 52 (2000) 28-32.
- [41] N. Pourreza, H. Golmohammadi, Application of curcumin nanoparticles in a lab-on-paper device as a simple and green pH probe, *Talanta*. 131 (2015) 136-141.
- [42] Bhawana, R.K. Basniwal, H.S. Buttar, V.K. Jain, N. Jain, Curcumin Nanoparticles: Preparation, Characterization, and Antimicrobial Study, *J. Agric. Food. Chem.* 59 (2011) 2056-2061.
- [43] N. Pourreza, H. Golmohammadi, Green colorimetric recognition of trace sulfide ions in water samples using curcumin nanoparticle in micelle mediated system, *Talanta*. 119 (2014) 181-186.
- [44] S. Himesh, P.S. Sharan, K. Mishra, N. Govind, A. Singhai, Qualitative and quantitative profile of curcumin from ethanolic extract of *Curcuma longa*, *Int. Res. J. Pharm.* 2 (2011) 180-184.
- [45] J.N. Miller, J.C. Miller, *Statistic and Chemometric for Analytical Chemistry*, 5th ed., Pearson Education Limited, Essex, 2005.
- [46] F. Mohammed, F. Rashid-Doubell, S. Cassidy, F. Henari, A comparative study of the spectral, fluorometric properties and photostability of natural curcumin, iron- and boron- complexed curcumin, *Spectrochim. Acta, Part A*. 183 (2017) 439-450.
- [47] P.H. Bong, Spectral and photophysical behaviors of curcumin and curcuminoids. *Bull. Korean Chem. Soc.* 21 (2000) 81-86.
- [48] G. Griffith, R. Laird, A method for the spectrophotometric determination of borate in aqueous solution with curcumin, *Anal. Chim. Acta*. 59 (1972) 302-303.
- [49] S.M. Khopde, K.I. Priyadarsini, D.K. Palit, T. Mukherjee, Effect of solvent on the excited-state photophysical properties of curcumin, *Photochem. Photobiol.* 72 (2000) 625-631.
- [50] R.R. Ali, W.A.W.A. Rahman, R.M. Kasmani, N. Ibrahim, S.N.H. Mustapha, H. Hasbullah, Tapioca starch biocomposite for disposable packaging ware, *Chem. Eng. Trans.* 32 (2013) 1711-1716.
- [51] R. Sacithraa, M. MadhanMohan, S. Vijayachitra, Quantitative analysis of tapioca starch using FT-IR spectroscopy and partial least squares, *Int. J. Comput. App.* (2013) 29-33.

- [52] P. Deeyai, M. Supphantharika, R. Wongsagonsup, S. Dangtip, Characterization of Modified Tapioca Starch in Atmospheric Argon Plasma under Diverse Humidity by FTIR Spectroscopy, *Chin. Phys. Lett.* 30 (2013) 0181031-0181034.
- [53] K. Sutjarittangtham, P. Jaiturong, U. Intatha, K. Pengpat, S. Eitssayeam, J. Sirithunyalug, Fabrication of Natural Tapioca Starch Fibers by a Modified Electrospinning Technique. *Chiang Mai J. Sci.* 41 (2014) 213-223.
- [54] A.Y.C. Delgado, H.J.C. Velásquez, D.A.R. Molina, Thermal and thermodynamic characterization of a dye powder from liquid turmeric extracts by spray drying, *Rev. Fac. Nac. Agron.* 69 (2016) 7845-7854. .
- [55] X.Z. Sun, G.R. Williams, X.X. Hou, L.M. Zhu, Electrospun curcumin-loaded fibers with potential biomedical applications, *Carbohydr. Polym.* 94 (2013) 147-153.
- [56] A. Parize, H. Stulzer, M. Marghetti, I. Da Costa, T. Rozzone, Evaluation of chitosan microparticles containing curcumin and crosslinked with sodium tripolyphosphate produced by spray drying, *Quim. Nova.* 35 (2012) 1127-1132.
- [57] B. Janković, Thermal characterization and detailed kinetic analysis of Cassava starch thermo-oxidative degradation, *Carbohydr. Polym.* 95 (2013) 621-629.
- [58] P. Priya, R. Mohan Raj, V. Vasanthakumar, V. Raj, Curcumin-loaded layer-by-layer folic acid and casein coated carboxymethyl cellulose/casein nanogels for treatment of skin cancer, *Arabian J. Chem.* (2017).
- [59] A. Ghosh, T. Banerjee, S. Bhandary, A. Surolia, Formulation of nanotized curcumin and demonstration of its antimalarial efficacy, *Int. J. Nanomed.* 9 (2014) 5373-5387.
- [60] L.R. Uppström, A modified method for determination of boron with curcumin and a simplified water elimination procedure, *Anal. Chim. Acta.* 43 (1968) 475-486.
- [61] Y.S. Musso, P.R. Salgado, A.N. Mauri, Smart edible films based on gelatin and curcumin, *Food Hydrocolloids.* (2017) 66: 8-15.

Figure caption

- Figure 1** A custom-built photography box
- Figure 2** SEM images of (a) curn extracted from turmeric powder, (b) curn-film, and (c) starch film without curn
- Figure 3** (a) Curn-film, (b) a red-brown product from curn-film, (c) commercial-curn-film and its red-brown product, (d) red brown product for various concentrations of boron, and (e) effect of reaction time (immersion time) on the darkness of red-brown product
- Figure 4** FTIR spectrums of (a) curn-film, (b) starch film without curn, and (c) extracted curcumin
- Figure 5** TGA, DTG, and DTA of the curn-film
- Figure 6** Influence of (a) pH, and (b) type of ions on the darkness of red-brown product
- Figure 7** Relationships of boron concentration with (a) RGB intensities, (b) calculated absorbance, (c) linear portion of RGB intensities, and (d) linear portion of calculated absorbance

Table 1 Analytical performance of the curn-film and DIC for the detection of boron.

Feature from image analysis	Sensitivity(a.u.Lmg ⁻¹)	Linear range (mgL ⁻¹)	Linearity
I _R	0.89±0.04	0 – 100	0.9918
I _G	64±1	0 – 1	0.9971
A _R	0.004±0.006	0 – 100	0.9942
A _G	0.2±0.1	0 – 1	0.9989

Table 2 Concentrations of boron in real samples.

Sample	Developed method (mgL ⁻¹)	ICP (mgL ⁻¹)	%Recovery
S1	5397±606	4870±13	112
S2	<0.052 [*]	0.013± 0.001	83
S3	<0.052 [*]	<0.010	91
S4	<0.052 [*]	0.021±0.001	109
S5	<0.052 [*]	0.015±0.0013	107

^{*}LOD = 0.052±0.001 mgL⁻¹

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

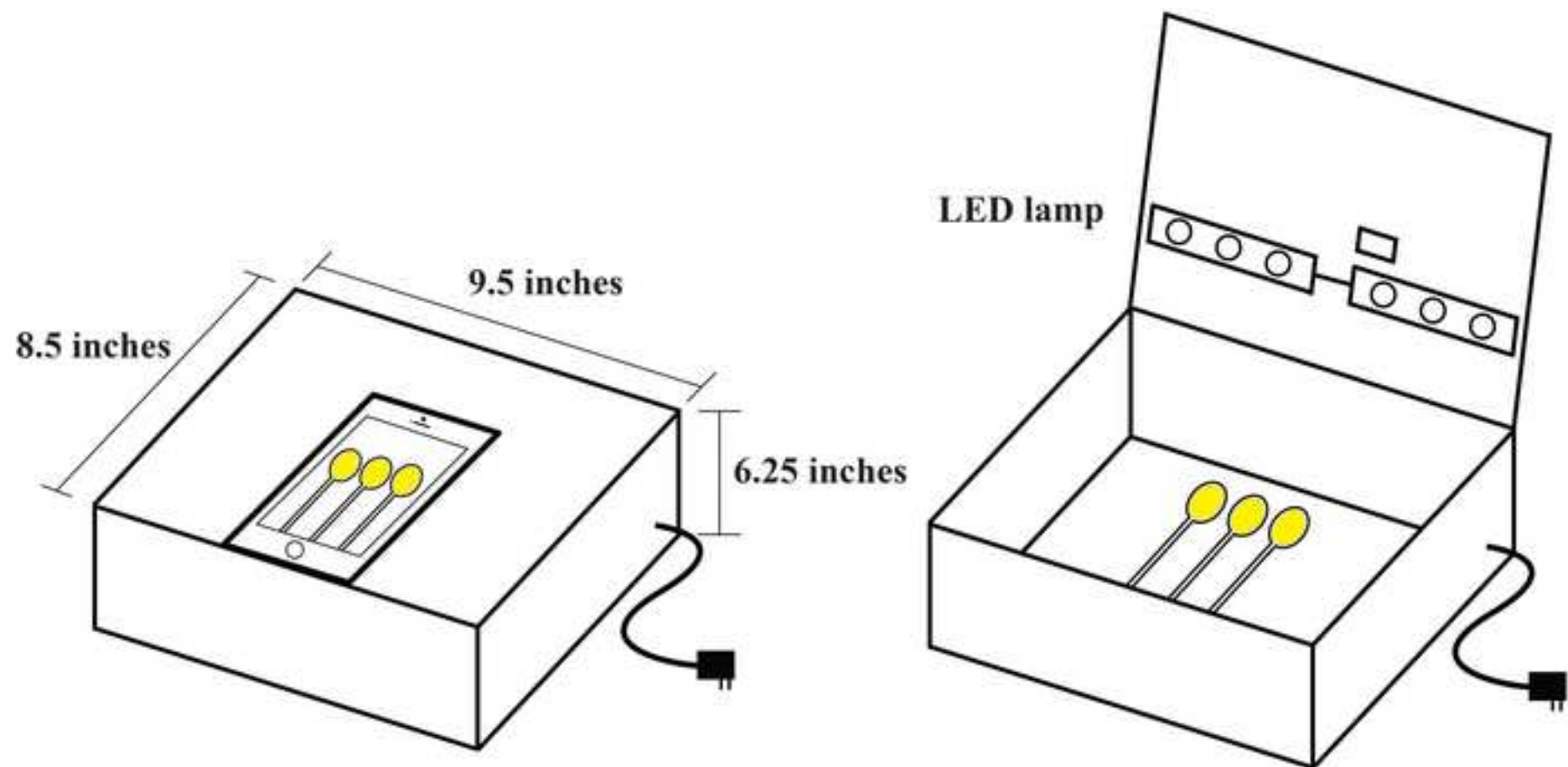


Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)

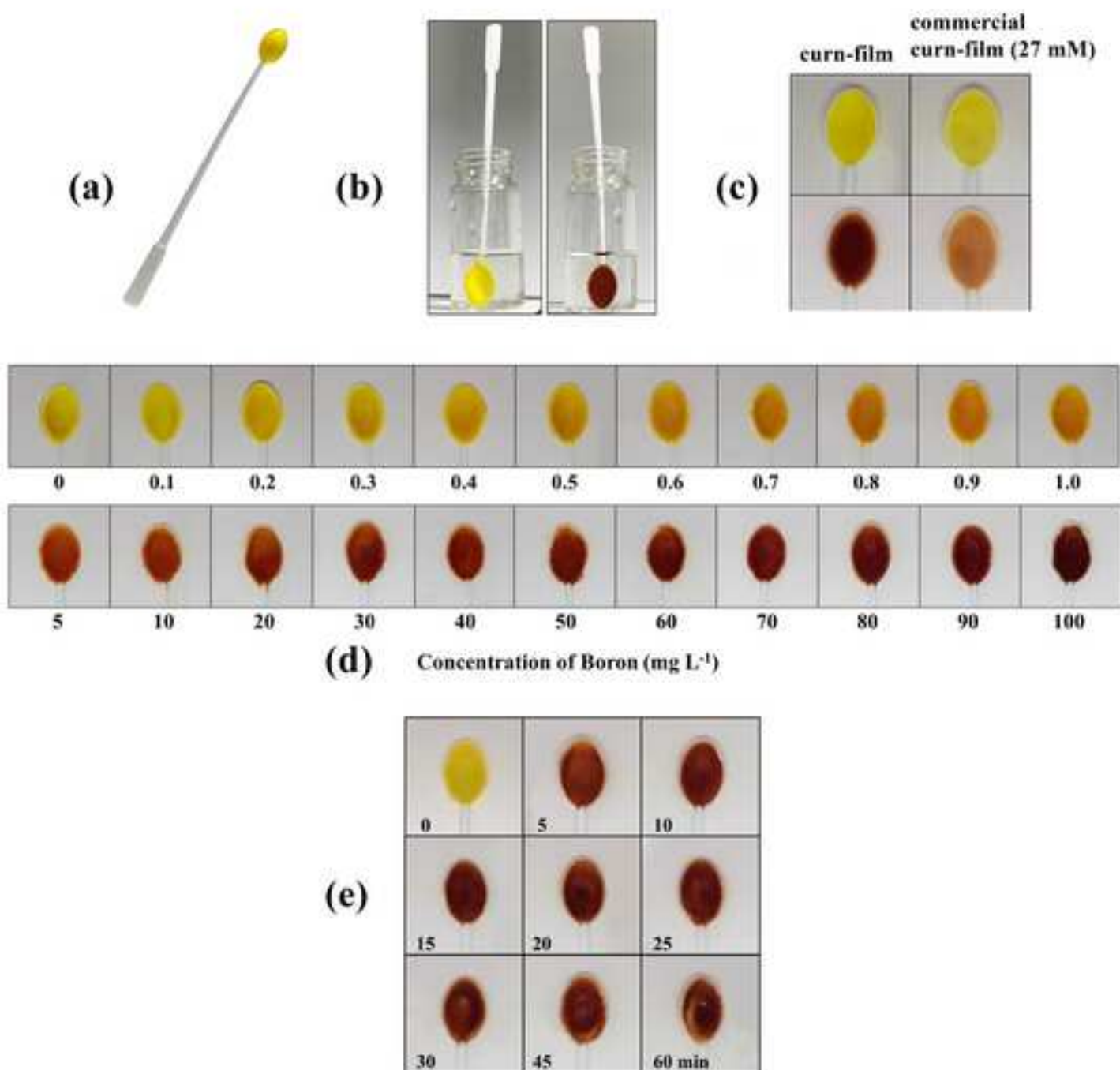


Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)

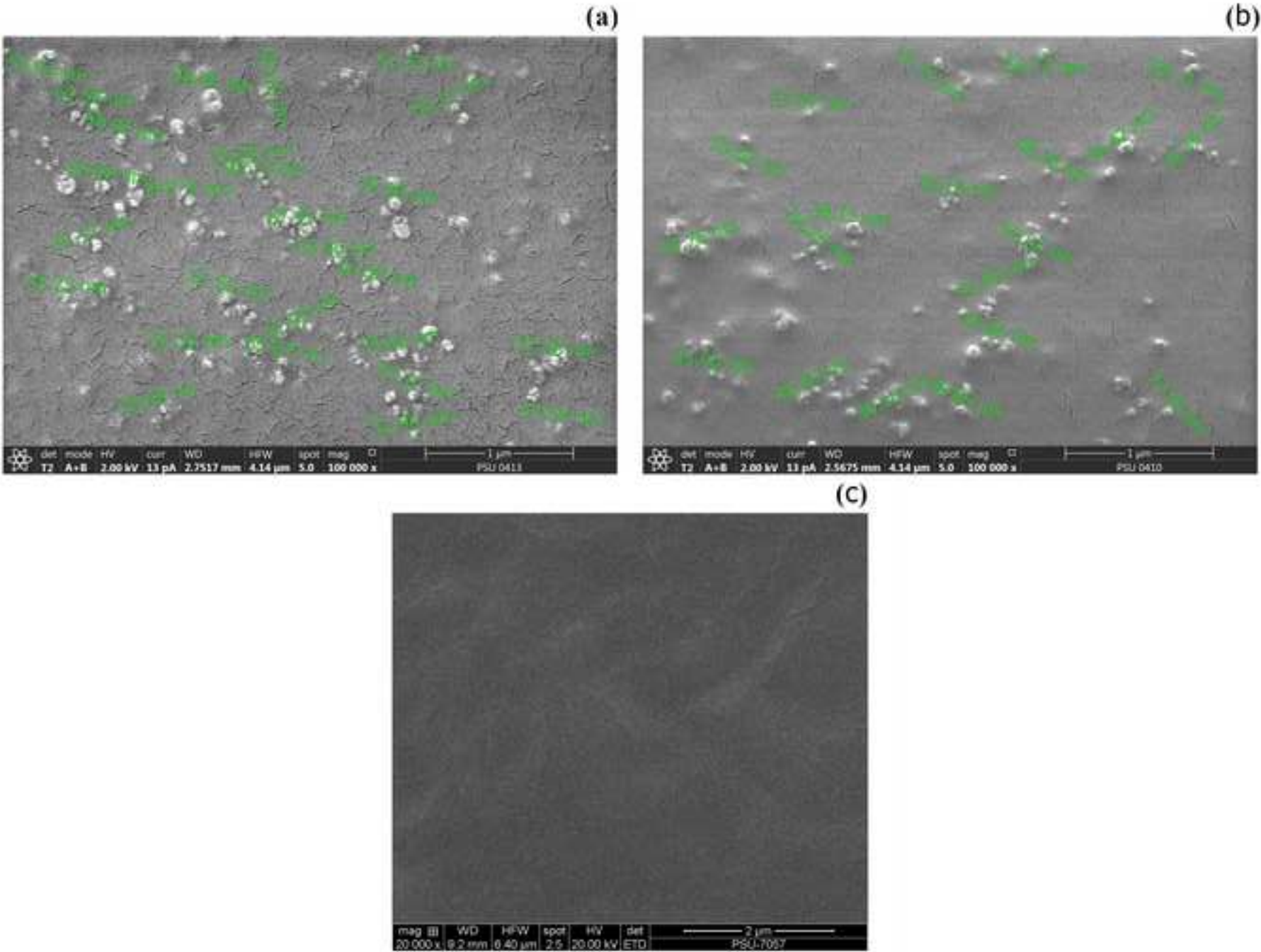


Figure 4
[Click here to download high resolution image](#)

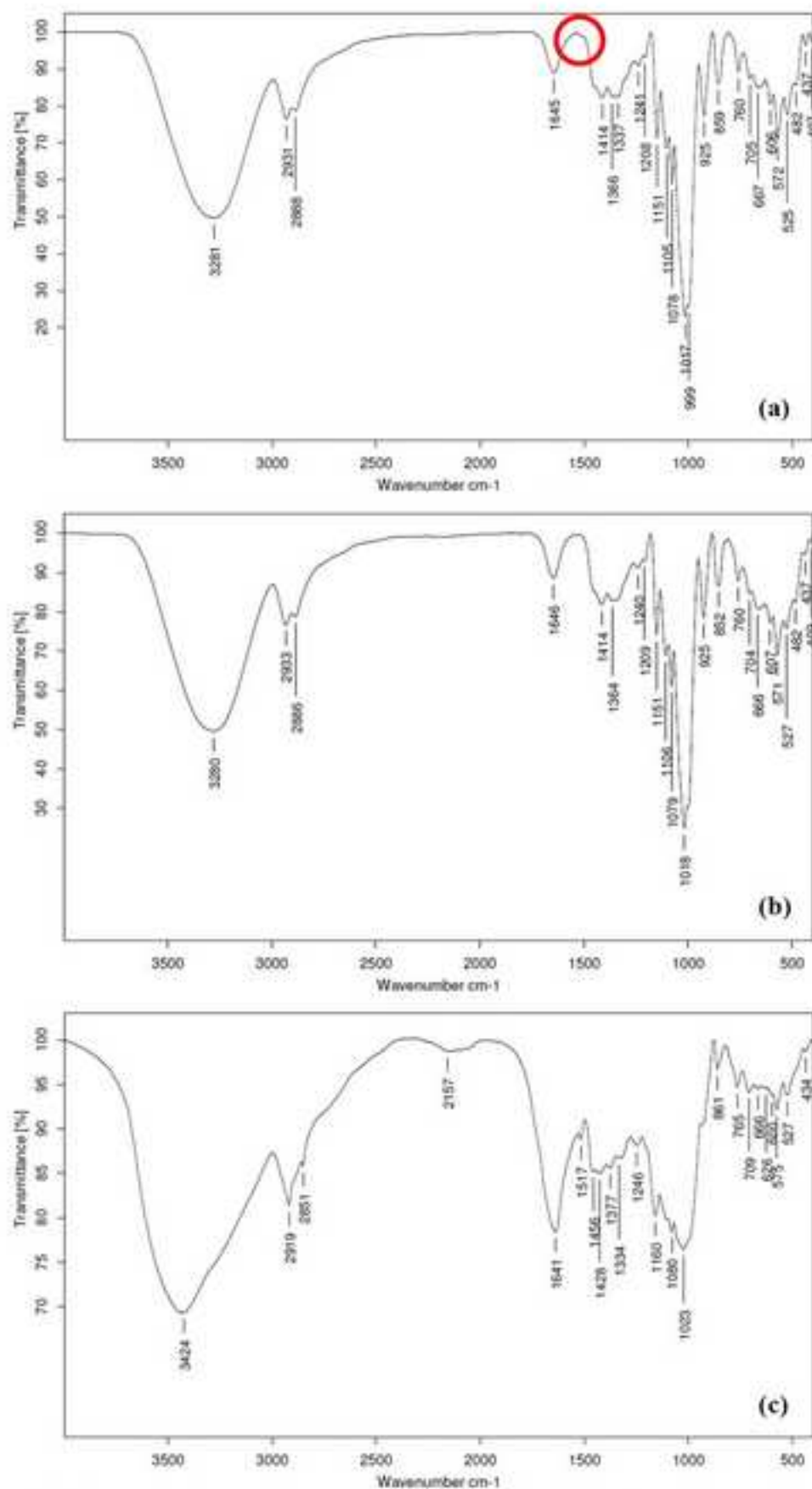


Figure 5
[Click here to download high resolution image](#)

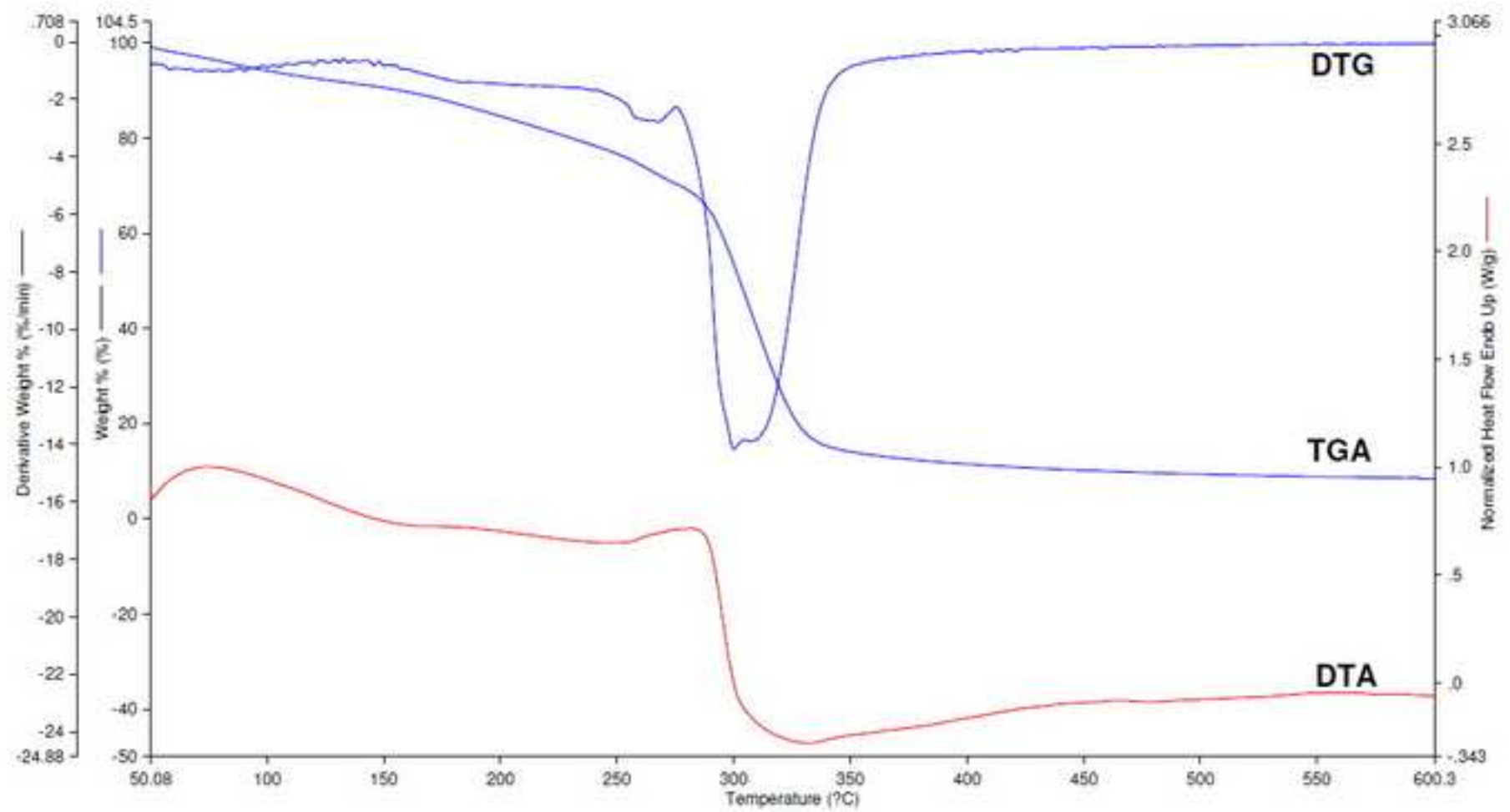


Figure 6
[Click here to download high resolution image](#)

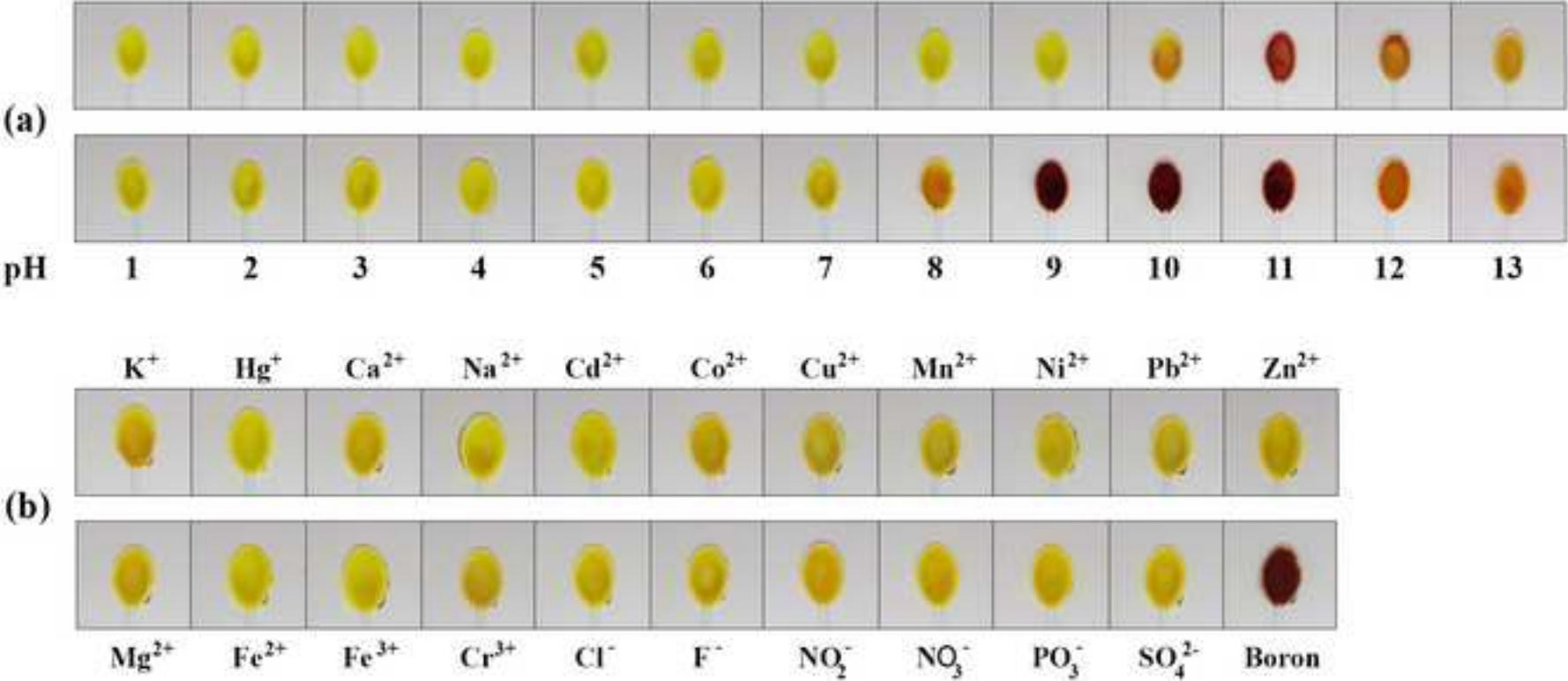
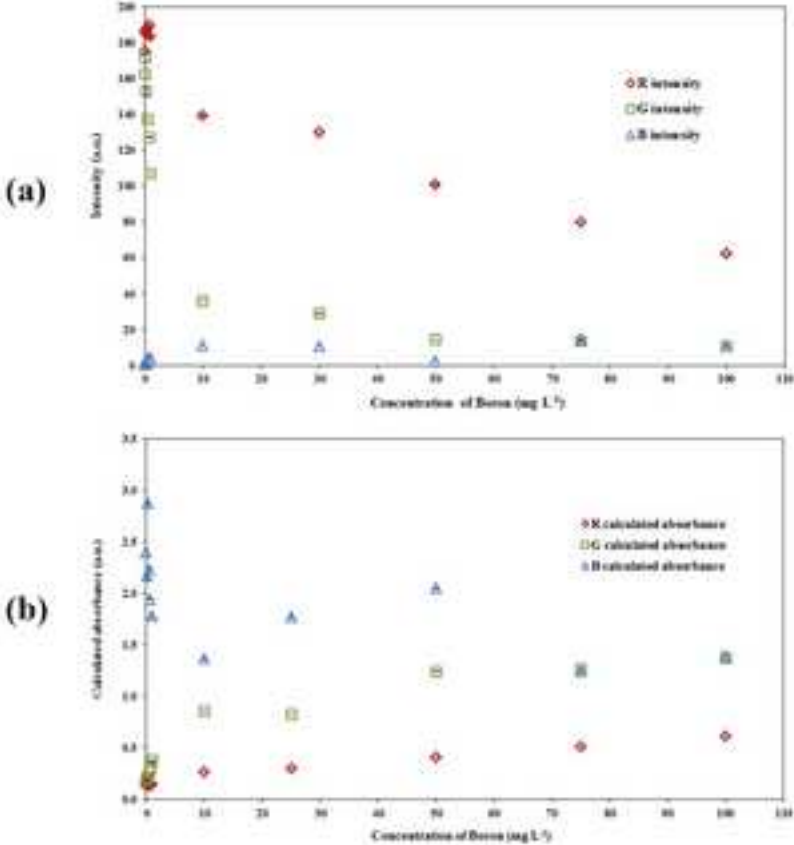


Figure 7
[Click here to download high resolution image](#)



(c)

