



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง

การพัฒนาการตรวจวัดกรดอะมิโนฮิสทีดีนด้วยเทคนิค

การถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์บนอุปกรณ์แบบกระดาษ

Development of Histidine Determination by Using
Indicator Displacement Assay on Paper-Based Device

จอมใจ สุกใส

และ

ยุภาพร สมีน้อย

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
(เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561
มหาวิทยาลัยบูรพา

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง

การพัฒนาการตรวจวัดกรดอะมิโนฮิสทีดีนด้วยเทคนิค
การถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์บนอุปกรณ์แบบกระดาษ

Development of Histidine Determination by Using
Indicator Displacement Assay on Paper-Based Device

จอมใจ สุกใส

และ

ยุภาพร สมีน้อย

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่
สัญญา 105/2561

Acknowledgement

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 105/2561).

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้ใช้สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์ของคอปเปอร์ (II) กับลีแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของคาลิกซ์[4]แอรีน (CuL) มาใช้ในการตรวจวัดกรดอะมิโนฮิสทีดีนด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ pyrocatechol violet (PV) ในสารละลายบัฟเฟอร์ของ HEPES ที่ pH 7.4 ในตัวทำละลายผสมของ 80:20 CH₃CN/H₂O ความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดฮิสทีดีนด้วยวิธีนี้เป็นผลเนื่องมาจากการที่มีระยะห่างที่เหมาะสมระหว่าง Cu²⁺ ทั้งสองอะตอม เนื่องจากการที่สารประกอบ CuL มีโครงสร้างที่ไม่ยืดหยุ่นเนื่องจากมีคาลิกซ์[4]แอรีนที่มีรูปทรงแบบโคนเป็นองค์ประกอบภายในโมเลกุล นอกจากนี้แล้วความเกาะกัของหมู่ไพโรคาเทคอลเอมีนยังมีส่วนช่วยในการควบคุมระยะห่างระหว่างอะตอมของคอปเปอร์ทั้งสองอะตอมอีกด้วย นอกจากนี้ยังสามารถตรวจวัดกรดอะมิโนฮิสทีดีนบนอุปกรณ์กระดาษโดยใช้เอนไซม์เบิล [CuL•PV] ได้

Abstract

Using a dinuclear copper(II) complex of *p-tert*-butylcalix[4]arene, **CuL**, that was found to have high affinity for histidine in 80:20 MeCN/water HEPES buffer solution at pH 7.4 by a colorimetric indicator displacement assay (IDA). Sensing is efficiently signaled through the displacement of the indicator pyrocatecholviolet (**PV**) from the ensemble [**CuL**•**PV**] cavity, monitoring its yellow color. Recognition selectivity is thus ascribed to the tuning of the distance between Cu^{2+} - Cu^{2+} distance in the **CuL** structure by the inflexible structure of calix[4]arene scaffold in the cone conformation and steric hindrance between the two bulky tripodal amine parts. Moreover, the determination of **His** on paper based device using [**CuL**•**PV**] ensemble was also reported.

สารบัญเรื่อง

บทที่	เรื่อง	หน้า
	กิตติกรรมประกาศ	i
	Acknowledgement	ii
	บทคัดย่อภาษาไทย	iii
	บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
	สารบัญเรื่อง	v
	สารบัญตาราง	vii
	สารบัญรูป	viii
1	บทนำ	
1.1	ที่มาและความสำคัญ	1
1.2	ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	2
1.3	การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง	6
1.4	วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	10
1.5	ขอบเขตของโครงการวิจัย	10
1.6	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	10
2	วิธีดำเนินการวิจัย	
2.1	เครื่องมือและอุปกรณ์	11
2.2	สารเคมี	11
2.3	วิธีการทดลอง	12
3	ผลการวิจัยและอภิปราย	
3.1	การสังเคราะห์ลิแกนด์ L และสารประกอบโคออร์ดิเนชัน CuL	22
3.2	การศึกษาความเป็นไปได้และหาสภาวะของการทดลองที่เหมาะสมในการนำสารประกอบโคออร์ดิเนชันมาใช้ในการตรวจวัดฮิสทีดินในระบบแบ็คซ์	22
3.3	การศึกษาการเกิดเอนเซมเบิลระหว่างสารประกอบโคออร์ดิเนชัน CuL และ PV ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมทรี	23
3.4	การศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกับกรดอะมิโนของเอนเซมเบิล [CuL•PV] ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมทรี	25
3.5	การตรวจวัดกรดอะมิโนฮิสทีดินบนอุปกรณ์กระดาษด้วยเอนเซมเบิล [CuL•PV]	26

บทที่	เรื่อง	หน้า
4	สรุปผลการวิจัย	
	4.1 สรุปผลการวิจัย	28
	4.2 ข้อเสนอแนะ	28
	บรรณานุกรม	29
	ประวัตินักวิจัยและคณะ	31

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	ระดับความเข้มข้นของ HGR ในพลาสมา	5
2.1	น้ำหนักของกรดอะมิโนชนิดต่างๆที่ใช้ในการเตรียมเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้น 5 mM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร	19

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	โครงสร้างของ (ก) สารประกอบโคออร์ดิเนชันที่ใช้ในงานวิจัยนี้และ (ข) กรดอะมิโนฮิสทีดิน (His)	2
1.2	กลไกการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ด้วยโมเลกุลสารที่สนใจ	3
1.3	โครงสร้างของอินดิเคเตอร์ PV, PGR, ZC, FLR และ MB9	3
1.4	(ก) การออกแบบอุปกรณ์กระดาษที่ใช้ในงานวิจัยของ Xu และ (ข) อุปกรณ์กระดาษที่ใช้ในงานวิจัยของ Xu ภายหลังจากการนำไปอบที่อุณหภูมิ 80° C เป็นเวลา 15 นาที	9
3.1	โครงสร้างของ L และสารประกอบโคออร์ดิเนชัน CuL ที่สังเคราะห์ได้	22
3.2	การเปลี่ยนสีของสารละลายแอนิเมเบิลที่เตรียมจากสารประกอบ CuL กับอินดิเคเตอร์ PV ในตัวทำละลายผสม 80% (v/v) CH ₃ CN-H ₂ O ในสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 7.4 เมื่อ (1) = CuL, (2) = indicators, (3) = ensemble, (4) = alanine, (5) = arginine, (6) = asparagine, (7) = aspartic acid, (8) = glutamic acid, (9) = glutamine, (10) = glycine, (11) = histidine, (12) = isoleucine, (13) = leucine, (14) = lysine, (15) = methionine, (16) = phenylalanine, (17) = proline, (18) = serine, (19) = threonine, (20) = tryptophan, (21) = tyrosine, (22) = valine และ (23) = cysteine	23
3.3	สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลาย PV เมื่อทำการไทเทรตสารละลาย CuL ลงไปยังสารละลายดังกล่าว	24
3.4	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความต่างของค่าการดูดกลืนแสงกับเศษส่วนโมลของ CuL : PV ที่ความยาวคลื่น 670 nm	24
3.5	สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของแอนิเมเบิล [CuL•PV] ที่มีกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ อยู่ในระบบ	25
3.6	สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลาย [CuL•PV] เมื่อเติมสารละลาย His ความเข้มข้น 1 mM ที่มีปริมาตรต่าง ๆ	26
3.7	การเปลี่ยนสีของสารละลายแอนิเมเบิลบนกระดาษกรองในสภาวะที่มีกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ	27

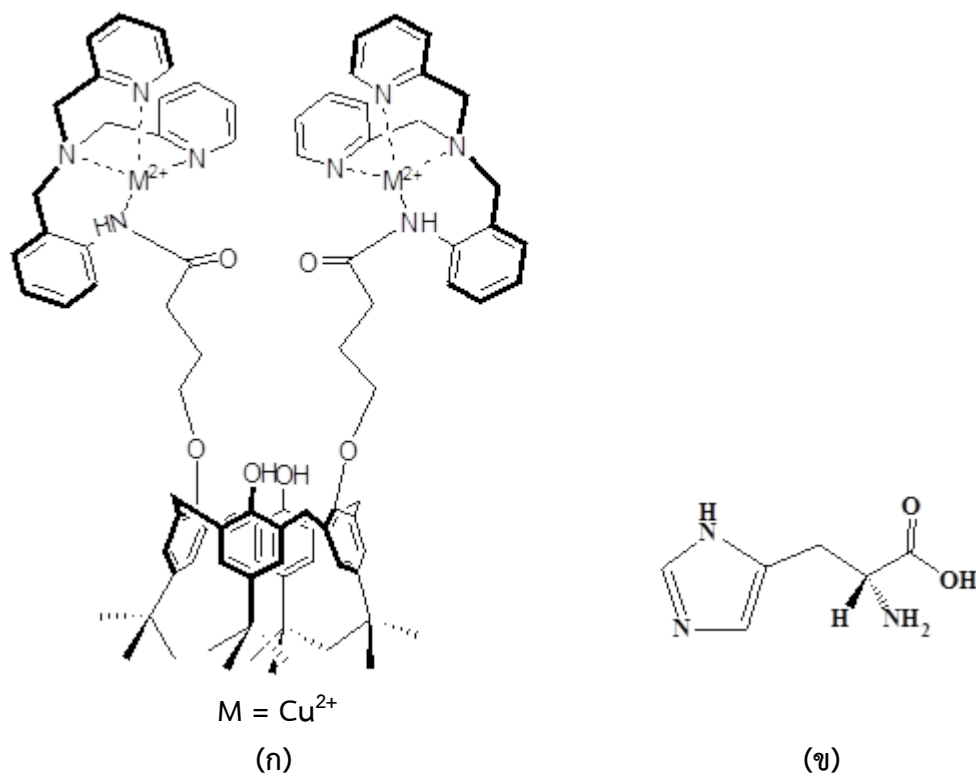
บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

เทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ (Indicator Displacement Assays หรือ IDAs) ⁽¹⁻²⁾ เป็นวิธีการหนึ่งที่ยอมรับใช้ในงานทางเซ็นเซอร์เคมีในปัจจุบัน โดยอาศัยการเกิดอันตรกิริยาแบบนอน-โควาเลนต์ระหว่างตัวรับ (receptor) กับอินดิเคเตอร์ที่ทำหน้าที่เป็นหน่วยให้สัญญาณ (sensory unit) การตรวจวัดสารที่สนใจ (analyte) ด้วยวิธีการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์นั้น จะมีการแข่งขันกันระหว่างสารที่สนใจกับอินดิเคเตอร์ ซึ่งการตรวจวัดจะเกิดขึ้นเมื่อสารที่สนใจสามารถเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ที่เชื่อมต่อกับโมเลกุลของรีเซปเตอร์ได้ โดยสามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงการเกิดอันตรกิริยาระหว่างรีเซปเตอร์กับโมเลกุลของสารที่สนใจ ได้จากการเปลี่ยนแปลงสัญญาณในรูปแบบต่างๆ โดยใช้เครื่องมือวิเคราะห์ที่ไม่ยุ่งยาก หรืออาจสังเกตได้จากการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายด้วยตาเปล่า ซึ่งการตรวจวัดสารที่สนใจด้วยวิธีการดังกล่าวจะมีความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจวัดได้เป็นอย่างดี และเทคนิคที่กล่าวมาข้างต้นสามารถนำมาใช้ในการตรวจวัดแอนไอออนที่มีความสำคัญต่อกระบวนการทางชีวภาพต่างๆ ได้ เช่น การตรวจวัดปริมาณไฟโรฟอสเฟตแอนไอออน⁽³⁻⁵⁾

ในปี พ.ศ. 2553 ได้มีการรายงานว่ากรดอะมิโนฮิสทีดิน (His) สามารถนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในร่างกายของหญิงที่มีภาวะความดันโลหิตสูงขณะตั้งครรภ์ได้ ซึ่งภาวะดังกล่าวนั้นจะมีปริมาณของไกลโคโปรตีนที่มีกรดอะมิโนฮิสทีดินเป็นองค์ประกอบหลัก (Histidine-Rich Glycoprotein หรือ HRG) อยู่ในสถานะที่ต่ำกว่าปกติ ⁽⁶⁾ ในปัจจุบันวิธีการที่ใช้ตรวจวัดกรดอะมิโนฮิสทีดินในทางการแพทย์ ได้แก่ เทคนิค High Performance Liquid Chromatography หรือ HPLC ซึ่งเทคนิคดังกล่าวจำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง เนื่องจากผู้วิจัยมีความชำนาญในการสังเคราะห์ลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของคาลิกซ์ [4] แอร์ริน ^(5,7-10) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเสนอวิธีการตรวจวัดกรดอะมิโนฮิสทีดินด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ โดยใช้สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์ของคอปเปอร์ (II) กับลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของคาลิกซ์[4]แอร์รินเป็นโมเลกุลรีเซปเตอร์ และใช้อินดิเคเตอร์ชนิดต่าง ๆ ที่มีความเหมาะสมในการตรวจวัดเป็นหน่วยให้สัญญาณ โครงสร้างของสารประกอบโคออร์ดิเนชันที่ใช้ในงานวิจัยนี้และโครงสร้างของกรดอะมิโนฮิสทีดิน แสดงได้ดังรูปที่ 1.1 นอกจากนี้ทางกลุ่มผู้วิจัยยังสนใจที่จะพัฒนาวิธีการตรวจวัดกรดอะมิโนฮิสทีดินด้วยแอนิเมเบิลที่เตรียมขึ้นจากสารประกอบโคออร์ดิเนชันดังกล่าวบนอุปกรณ์กระดาษ เนื่องจากข้อดีของการตรวจวัดบนอุปกรณ์ดังกล่าวคือใช้รีเอเจนต์และสารตัวอย่างในปริมาณน้อย และที่สำคัญคือในปัจจุบันนี้ยังไม่มีกรรมนำเทคนิคการตรวจวัดด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์มาประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดแกสตีโมเลกุลบนอุปกรณ์กระดาษ

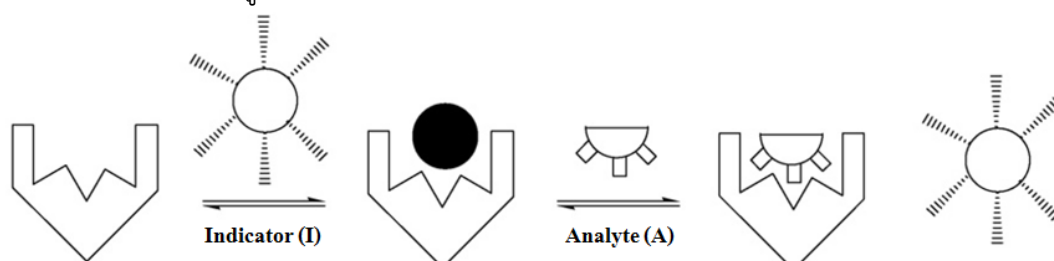


รูปที่ 1.1 โครงสร้างของ (ก) สารประกอบโคออร์ดิเนชันที่ใช้ในงานวิจัยนี้และ (ข) กรดอะมิโนฮิสทีดิน (His)

1.2 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

1.2.1 เทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์

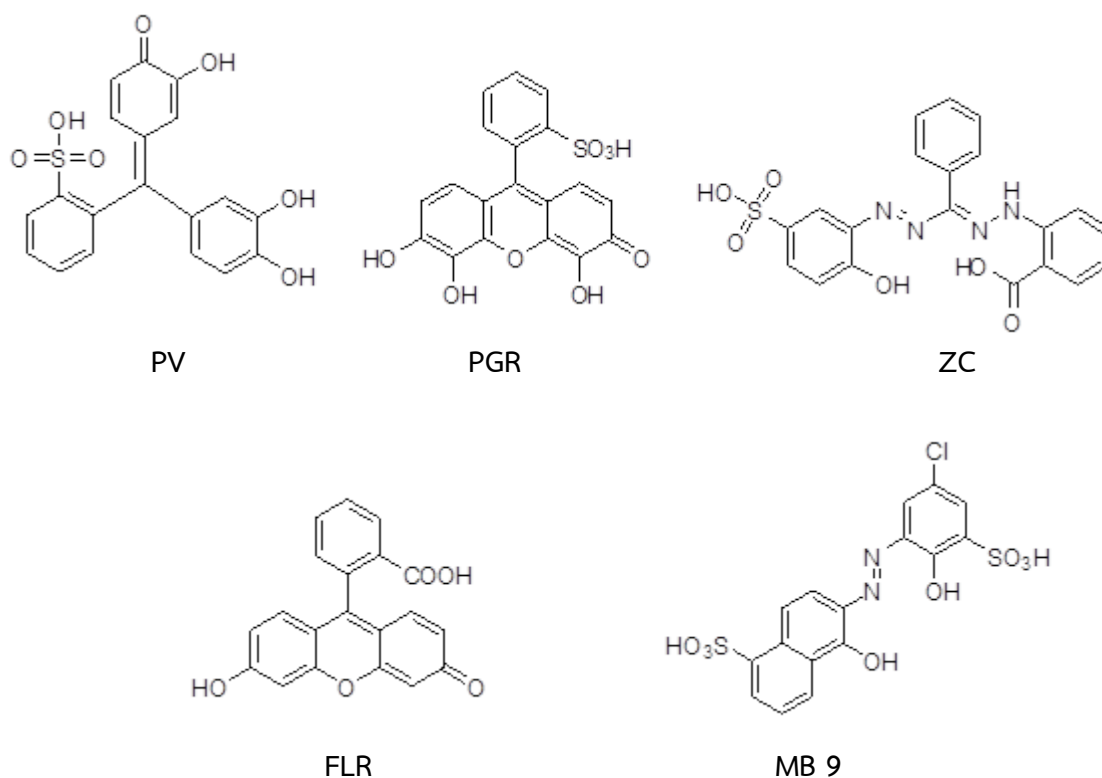
เทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ (IDAs) ⁽¹⁻²⁾ เป็นวิธีหนึ่งที่ยอมรับใช้ในงานทางเซ็นเซอร์เคมีในปัจจุบัน โดยอาศัยการเกิดอันตรกิริยาแบบนอน-โควาเลนต์ระหว่างตัวรับ (receptor) กับอินดิเคเตอร์ (indicator) ที่ทำหน้าที่เป็นหน่วยให้สัญญาณโดยที่อันตรกิริยาดังกล่าวสามารถเกิดการผันกลับได้ การตรวจวัดสารที่สนใจ (analyte) ด้วยวิธีการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์นั้น จะมีการแข่งขันกันระหว่างสารที่สนใจกับอินดิเคเตอร์ ซึ่งการตรวจวัดจะเกิดขึ้นเมื่อสารที่ต้องการทำการตรวจวัดสามารถเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ที่เชื่อมต่อกับโมเลกุลของรีเซปเตอร์ได้ โดยสามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงการเกิดอันตรกิริยาระหว่างรีเซปเตอร์กับโมเลกุลของสารที่สนใจได้จากการเปลี่ยนแปลงสัญญาณในรูปแบบต่างๆ ขึ้นอยู่กับชนิดของอินดิเคเตอร์ หรืออาจสังเกตได้จากการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย ซึ่งสีของสารละลายที่เกิดขึ้นในขั้นแรกจะเป็นสีของสารละลายระหว่างรีเซปเตอร์กับอินดิเคเตอร์ หรือที่เรียกว่า เอนเซมเบิล (ensemble) โดยสีของสารละลายเอนเซมเบิลจะต้องมีความแตกต่างจากสีของอินดิเคเตอร์ในรูปอิสระอย่างชัดเจน เมื่อโมเลกุลสารที่สนใจเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ในสารละลายเอนเซมเบิลได้ จะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนสีของสารละลายจากสีของเอนเซมเบิลไปเป็นสีของอินดิเคเตอร์อิสระ สิ่งที่สำคัญคือโอกาสที่โมเลกุลของสารที่สนใจสามารถเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ได้นั้นค่าคงที่ความเสถียรของสารประกอบระหว่างสารที่สนใจกับหน่วยเลือกจับ (K_{RA}) จะต้องมีค่ามากกว่าค่าคงที่ความเสถียรของสารประกอบของเอนเซมเบิล (K_{RI}) ซึ่งกลไกการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ด้วยโมเลกุลสารที่สนใจแสดงได้ดังรูปที่ 1.2



รูปที่ 2 กลไกการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ด้วยโมเลกุลสารที่สนใจ

รูปที่ 1.2 กลไกการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ด้วยโมเลกุลสารที่สนใจ

ตัวอย่างของอินดิเคเตอร์ที่นำมาใช้ในเทคนิค IDA ได้แก่ Pyrocatechol Violet (PV), Pyrogallol Red (PGR), Zincon (ZC), fluorescein (FLR), Mordant Blue 9 (MB 9) เป็นต้น โครงสร้างของอินดิเคเตอร์ดังกล่าวแสดงดังรูปที่ 1.3



รูปที่ 1.3 โครงสร้างของอินดิเคเตอร์ PV, PGR, ZC, FLR และ MB9

เทคนิค IDA เป็นวิธีการที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจวัดสารที่สนใจได้ทั้งแคโทดไอออนและแอนไอออน ซึ่งเทคนิคดังกล่าวเป็นวิธีการตรวจวัดที่มีข้อดีกว่าการใช้โมเลกุลทางเซ็นเซอร์เคมีในการตรวจวัดโดยตรง เนื่องจาก IDA เป็นเทคนิคที่อาศัยการเกิดอันตรกิริยาแบบนอน-โควาเลนต์ในการเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลของรีเซปเตอร์กับอินดิเคเตอร์ จึงทำให้ง่ายและไม่เสียเวลามากในการเตรียมเซ็นเซอร์เพื่อใช้ในการตรวจวัด รวมทั้งยังสามารถเปลี่ยนชนิดของอินดิเคเตอร์ที่นำมาใช้ในการเชื่อมต่อกับโมเลกุลของรีเซปเตอร์ชนิดเดียวกันได้ ด้วยประโยชน์และข้อดีต่างๆที่กล่าวมาข้างต้นจึงทำให้เป็นที่นิยมใช้เทคนิค IDA ในการตรวจวัดแอนไอออนที่มีความสำคัญต่อกระบวนการทางชีวภาพต่างๆ ได้แก่ การตรวจวัดปริมาณโพโรฟอสเฟตแอนไอออน เป็นต้น

1.2.2 อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ⁽¹¹⁾

เทคโนโลยีของไหลจุลภาค (microfluidic technology) เป็นเทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับการจัดการของไหลปริมาณน้อยระดับนาโนลิตรถึงไมโครลิตรที่ไหลในท่อ(หรืออย่างน้อยด้านใดด้านหนึ่งของท่อ) ที่มีขนาดระดับไมโครเมตรถึงนาโนเมตร ในปัจจุบันเทคโนโลยีของไหลจุลภาคได้มีการศึกษาและพัฒนาเพื่อนำมาใช้เป็นทางเลือกใหม่ในการวิเคราะห์สาร โดยการย่อขนาดของกระบวนการวิเคราะห์แบบดั้งเดิม มาไว้ในอุปกรณ์ตรวจวัดขนาดเล็กที่เรียกว่า อุปกรณ์ตรวจวัดของไหลจุลภาค (microfluidic device) จุดประสงค์ของอุปกรณ์ดังกล่าวคือเพื่อให้การวิเคราะห์ทุกขั้นตอนเกิดภายในอุปกรณ์เดียว ใช้ปริมาณสารตัวอย่างและรีเอเจนต์น้อย สามารถพกพาเป็นอุปกรณ์ภาคสนาม และมีราคาถูก โดยวัสดุที่นิยมใช้ในการสร้างอุปกรณ์ดังกล่าวได้แก่ ซิลิกอน แก้ว หรือพลาสติก ในปัจจุบันกระดาษกรอง (filter paper) เป็นวัสดุที่ได้รับความสนใจนำมาสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดเป็นอย่างมากและเรียกอุปกรณ์ชนิดนี้ว่า อุปกรณ์ตรวจวัดของไหลจุลภาคแบบกระดาษ หรืออุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ (microfluidic paper-based analytical device) ซึ่งอุปกรณ์ตรวจวัดชนิดนี้มีวิธีการผลิตที่ไม่ยุ่งยาก ผู้ทำการทดลองไม่จำเป็นต้อง เป็นผู้ชำนาญการ เนื่องจากกระดาษกรองมีราคาถูกดังนั้นค่าใช้จ่ายในการผลิตจึงมีค่าต่ำในการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษนั้นทำได้โดยการนำกระดาษมาสร้างขอบเขตเป็นบริเวณขอบน้ำกับบริเวณไม่ชอบน้ำ เพื่อให้มีการไหลของสารตัวอย่างบนกระดาษในบริเวณที่ขอบน้ำด้วยแรงคาพิลลารีและเกิดปฏิกิริยากับรีเอเจนต์ที่ถูกตรึงอยู่บนกระดาษ

1.2.3 ความสำคัญของกรดอะมิโนฮิสทีดิน

กรดอะมิโนเป็นหน่วยที่เล็กที่สุดของโปรตีน มีสูตรเคมีทั่วไปคือ $\text{NH}_2\text{-CHR-COOH}$ กรดอะมิโนที่จำเป็นในร่างกายมีอยู่ด้วยกันทั้งหมด 20 ชนิด โดยแต่ละชนิดจะแตกต่างกันที่หมู่ R จึงทำให้มีคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีที่แตกต่างกัน ปริมาณของกรดอะมิโนในร่างกายถ้ามีมากหรือน้อยเกินไป จะมีผลต่อการเกิดโรค เช่น ปริมาณของไกลโคโปรตีนที่มีกรดอะมิโนฮิสทีดิน (Histidine – Rich Glycoprotein หรือ HRG) พบว่าเมื่อหญิงตั้งครรภ์มีปริมาณ HGR ต่ำจะก่อให้เกิดภาวะความดันโลหิตสูงขณะตั้งครรภ์ได้ ความเข้มข้นของ HGR ในพลาสมาของหญิงตั้งครรภ์แสดงได้ในตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 ระดับความเข้มข้นของ HGR ในพลาสมา

หญิงตั้งครรภ์	ความเข้มข้น HGR ($\mu\text{g/L}$)				
	อายุครรภ์ 10 สัปดาห์	อายุครรภ์ 25 สัปดาห์	อายุครรภ์ 28 สัปดาห์	อายุครรภ์ 33 สัปดาห์	อายุครรภ์ 37 สัปดาห์
ปกติ	55.91	42.76	33.76	29.15	28.37
ความดันโลหิตสูง	40.13	30.12	25.64	26.19	27.00

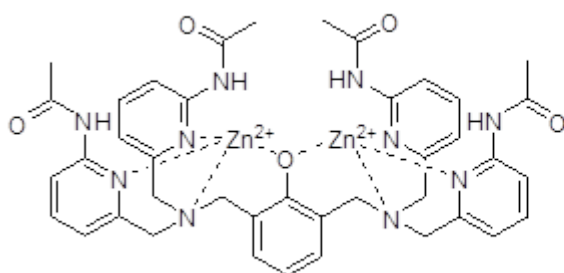
ภาวะความดันโลหิตสูงขณะตั้งครรภ์ (Pregnancy Induced Hypertension) หมายถึงการมีความดันโลหิตที่สูงขณะตั้งครรภ์ 20 สัปดาห์ ภาวะดังกล่าวนี้เป็นภาวะแทรกซ้อนที่พบบ่อยและสามารถเกิดได้ทุกระยะของการตั้งครรภ์ ทั้งก่อนคลอด ระยะคลอด และหลังคลอด ถ้าเกิดในระยะก่อนคลอดอาจพบภาวะแทรกซ้อน เช่น ภาวะชัก รกลอกตัวก่อนกำหนด และในระยะหลังคลอดจะพบภาวะแทรกซ้อน เช่น ภาวะชัก ตกเลือดหลังคลอด อันเป็นสาเหตุการตายทั้งของมารดาและทารก ฉะนั้นการป้องกันและแก้ไขเพื่อไม่ให้เกิดภาวะแทรกซ้อนเหล่านี้จึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง ปัจจุบันพบว่าอัตราการเกิดภาวะความดันโลหิตสูงขณะตั้งครรภ์มีแนวโน้มสูงขึ้น ทำให้ตระหนักถึงความสำคัญของปัญหาที่เกิดขึ้น

สาเหตุสำคัญของการเกิดภาวะดังกล่าวนี้คือ การหดเกร็งของหลอดเลือด (Vasospasm) เป็นพยาธิสภาพประการแรกที่เกิดขึ้นในภาวะความดันโลหิตสูงในหญิงตั้งครรภ์ ซึ่งมีผลทำให้แรงต้านการไหลเวียนของโลหิตมีมากขึ้น ส่งผลให้เส้นเลือดมีการหดรัดตัวเพิ่มขึ้น และยังส่งผลให้เกิดเลือดและ fibrinogen ซึ่งอุดมไปด้วยไกลโคโปรตีนที่มีกรดอะมิโนฮิสทีดิน (Histidine – Rich Glycoprotein หรือ HRG) ถูกทำลายจนลดน้อยลง ทำให้พลาสมารั่วไหลออกนอกเส้นเลือดมากขึ้น จากการศึกษาพบว่าหญิงที่มีภาวะความดันโลหิตสูงระดับของ HRG จะลดลงในขณะตั้งครรภ์ ในขณะที่หญิงที่ไม่มีภาวะความดันโลหิตสูงนั้นปริมาณ HRG จะอยู่ในสภาวะปกติ ดังนั้นจึงสามารถใช้ปริมาณของ HRG มาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของผู้ป่วยที่อยู่ในภาวะความดันโลหิตสูงขณะตั้งครรภ์

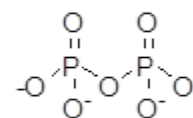
1.3 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

1.3.1 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวัดด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์

Jae Han Lee และคณะ⁽⁴⁾ ได้นำสารประกอบโคออร์ดิเนชัน (1) และ อินดิเคเตอร์ pyrocatechol violet (PV) มาพัฒนาเป็นระบบที่ใช้ในการตรวจวัดไพโรฟอสเฟตแอนไอออน หรือ PPI ด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ จากการศึกษาพบว่าสารละลาย PV เมื่ออยู่ในรูปอิสระจะมีสีเหลือง แต่เมื่อเกิดเป็นเอนไซม์เบิลกับสารประกอบโคออร์ดิเนชัน (1) จะเปลี่ยนเป็นสีฟ้า และมีค่าคงที่ความเสถียรของเอนไซม์เบิล [1·PV] เท่ากับ $(1.4 \pm 0.1) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ นอกจากนี้ยังพบว่าสารละลายเอนไซม์เบิลที่เกิดขึ้นสามารถใช้ในการตรวจวัด PPI ได้อย่างมีความจำเพาะเจาะจง เนื่องจาก PPI สามารถเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ PV ในเอนไซม์เบิลดังกล่าวได้ และเกิดการเปลี่ยนสีของสารละลายจากสีฟ้ากลับมาเป็นสีเหลืองดั้งเดิมของ PV ในรูปอิสระ โดยจากการคำนวณค่าคงที่ความเสถียรระหว่างสารประกอบโคออร์ดิเนชัน (1) กับ PPI มีค่าเท่ากับ $(5.39 \pm 0.03) \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ ซึ่งมีความมากกว่าค่าคงที่ความเสถียรของเอนไซม์เบิล

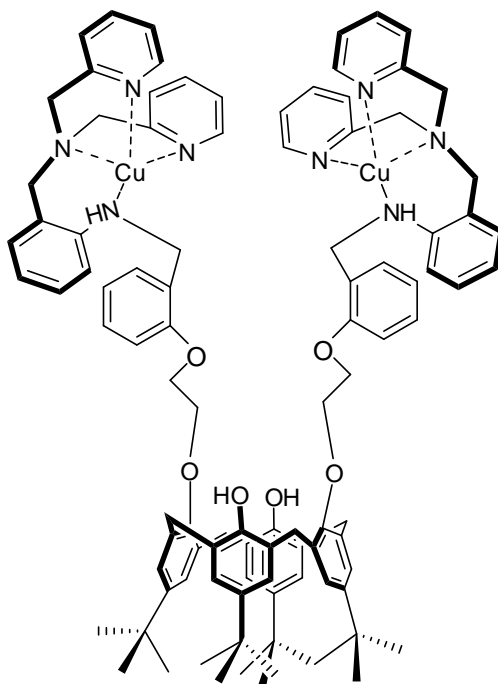


(1)



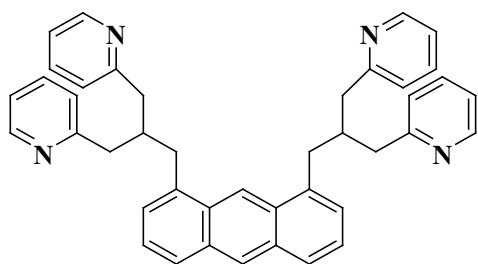
PPI

Sarayut Watchasit และคณะ⁽⁵⁾ ได้นำสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์คอปเปอร์ (II) กับ ลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของคาลิกซ์ [4] แอรีน (2) มาใช้เป็นโมเลกุลของรีเซ็ปเตอร์ในการตรวจวัด PPI ด้วยเทคนิค IDA โดยใช้ PV เป็นอินดิเคเตอร์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ 80/20 (%v/v) MeCN/H₂O ใน 10 mM HEPES ที่ pH 6.4 จากการทดลองพบว่าสารละลาย PV เมื่ออยู่ในรูปอิสระจะมีสีเหลือง แต่เมื่อเกิดเอนไซม์เบิลกับสารประกอบโคออร์ดิเนชัน (2) จะเปลี่ยนเป็นสีเขียว และมีค่าคงที่ความเสถียรของเอนไซม์เบิลเท่ากับ $1.30 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์เบิลดังกล่าวสามารถนำมาใช้ในการตรวจวัด PPI ได้อย่างมีความจำเพาะเจาะจง โดยพบว่าเมื่อมี PPI อยู่ในระบบ PPI สามารถเกิดพันธะโคออร์ดิเนตโควาเลนต์กับสารประกอบ (2) โดยเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ PV ทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของสารละลายจากสีเขียวกลับไปเป็นสีเหลืองของ PV ในรูปอิสระได้ โดยมีค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดสารประกอบเท่ากับ $5.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$

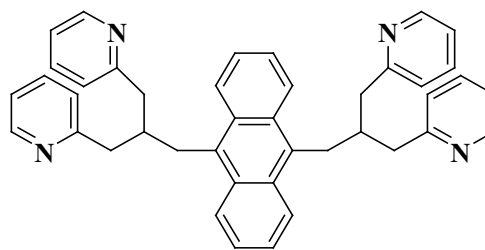


(2)

Ojida และคณะ⁽¹²⁾ ได้ศึกษาการสังเคราะห์ลิแกนด์ที่มีแอนทราซีนเป็นหน่วยให้สัญญาณ และมี dipicolylamine (DPA) เป็นหน่วยเลือกจับ (3) และ (4) จากการศึกษาพบว่าโมเลกุลของลิแกนด์ดังกล่าวสามารถเกิดพันธะโคออร์ดิเนชันได้กับไอออนของโลหะ Zn^{2+} ได้ และยังสามารถนำสารประกอบดังกล่าวมาใช้เป็นฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ สำหรับเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนฮิสทีดีนหรือกรดอะมิโนที่มีหมู่ฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบภายในโมเลกุล โดยที่โมเลกุลเปปไทด์ดังกล่าวใช้อะตอมของไนโตรเจนในหมู่ของอิมิดาโซลของกรดอะมิโนฮิสทีดีน และอะตอมของออกซิเจนของหมู่ฟอสเฟตในสายเปปไทด์เกิดพันธะโคออร์ดิเนตโควาเลนต์กับไอออน Zn^{2+} โดยสามารถติดตามอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นจากสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของสารประกอบที่เพิ่มขึ้น



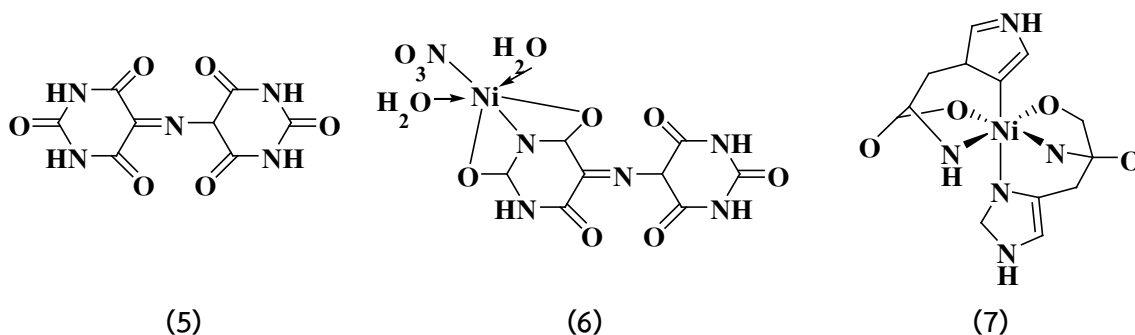
(3)



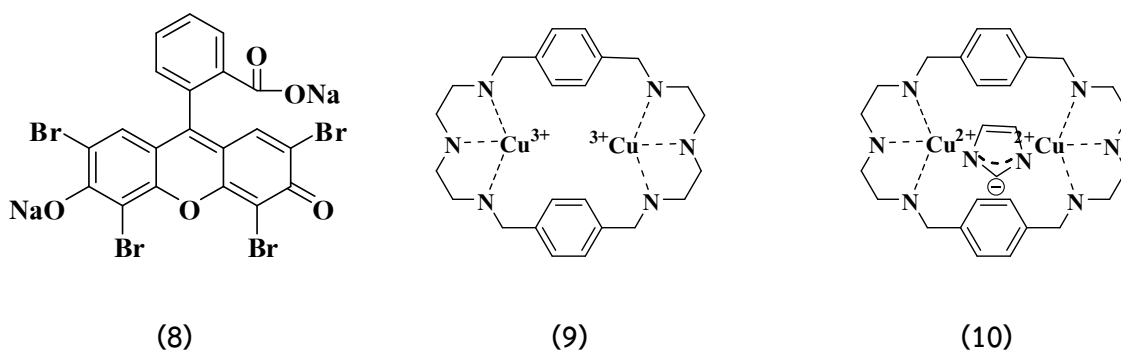
(4)

Sun และคณะ⁽¹³⁾ ได้นำสารประกอบโคออร์ดิเนชันของ Ni^{2+} และอินดิเคเตอร์ murexide (3) มาพัฒนาเป็นระบบที่ใช้ในการตรวจวัดกรดอะมิโนฮิสทีดีนที่สามารถมองเห็นการเปลี่ยนแปลงได้ด้วยตาเปล่า โดยใช้เทคนิคการถูกแทนที่ จากการศึกษาพบว่าสารละลาย murexide (5) เมื่ออยู่ในรูป

อิสระจะมีสีม่วง แต่เมื่อเกิดเป็นแอนไฮดรอกซ์โคออร์ดิเนชันกับ Ni^{2+} จะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และมีค่าคงที่ความเสถียรของแอนไฮดรอกซ์โคออร์ดิเนชัน $[\text{Ni}\cdot\text{murexide}]$ (6) เท่ากับ $1.83 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ นอกจากนี้ยังพบว่าสารละลายแอนไฮดรอกซ์โคออร์ดิเนชันสามารถใช้ในการตรวจวัดฮิสทีดีน ได้อย่างมีความจำเพาะเจาะจง เนื่องจากฮิสทีดีนสามารถเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ **murexide** ในแอนไฮดรอกซ์โคออร์ดิเนชันดังกล่าวได้ และเกิดการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายจากสีเหลืองกลับมาเป็นสีม่วงของ **murexide** ในรูปอิสระ โดยจากการคำนวณค่าคงที่ความเสถียรระหว่างสารประกอบโคออร์ดิเนชันกับฮิสทีดีน $[\text{Ni}\cdot(\text{Histidine})_2]$ (7) พบว่ามีค่าเท่ากับ $3.06 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$ และการศึกษาผลของ pH พบว่าการเปลี่ยนแปลง pH นั้นมีผลน้อยมากต่อการตรวจวัด โดยช่วงของ pH ที่เหมาะสมในการตรวจวัดนั้นอยู่ในช่วง (pH 7.5–8.0)



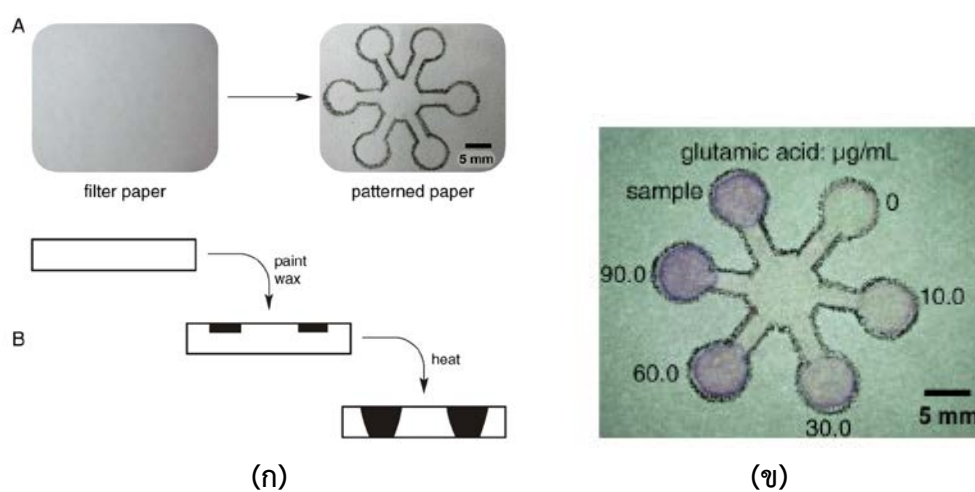
Hortala และคณะ ⁽¹⁴⁾ ได้นำวิธีการถูกแทนที่ของฟลูออเรสเซนส์อินดิเคเตอร์ **eosine Y** (8) มาใช้ในการตรวจวัดกรดอะมิโน และใช้สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์ของคอปเปอร์ (II) เป็นโมเลกุลของรีเซปเตอร์ (9) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ 0.05 M HEPES ที่ pH 7 เป็นตัวทำละลาย จากการศึกษาค้นพบว่าแอนไฮดรอกซ์โคออร์ดิเนชันของ $[(8)\cdot(9)]$ มีความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกับกรดอะมิโนฮิสทีดีนมากที่สุด ซึ่งคาดว่ากรดอะมิโนฮิสทีดีนเกิดพันธะโคออร์ดิเนตโควาเลนต์กับอะตอมของคอปเปอร์ (II) ทั้งสองอะตอม โดยใช้ไนโตรเจนในวงอิมิดาโซลเป็นอะตอมผู้ให้อิเล็กตรอนได้เป็นสารประกอบ (10)



1.3.2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์มาพัฒนาบนอุปกรณ์กระดาษ

ในปัจจุบันยังไม่พบการรายงานการนำเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์มาพัฒนาบนอุปกรณ์กระดาษแต่อย่างใด ซึ่งผู้วิจัยขอเสนอตัวอย่างการรายงานการตรวจวัดปริมาณกรดอะมิโนรวมที่ได้จากสารสกัดจากใบชาบนอุปกรณ์กระดาษ ⁽¹⁵⁾ โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาของสารประกอบนินไฮดรินกับหมู่ฟังก์ชัน เอมีนที่อยู่ในโครงสร้างของกรดอะมิโนได้เป็นสารประกอบสีม่วง ในงานวิจัย

ดังกล่าวนี้ทางคณะผู้วิจัยได้เตรียมอุปกรณ์กระดาษแบบง่ายโดยใช้อุปกรณ์คือกระดาษกรอง และ wax pen โดยนำ wax pen มาวาดลวดลายบนกระดาษกรอง ดังแสดงในรูปที่ 1.4(ก) หลังจากนั้นนำกระดาษกรองที่วาดลวดลายแล้วมาให้ความร้อน ซึ่งไขที่อยู่บนกระดาษจะทำหน้าที่เป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ การตรวจวัดนั้นในขั้นแรกจะทำการหยดสารประกอบนินไฮดรินเข้มข้น 2% ปริมาตร 15 μL ลงบนหลุมกลมทั้ง 6 ช่องที่อยู่ตรงส่วนปลายของอุปกรณ์และทิ้งให้แห้งเป็นเวลา 9 นาที หลังจากนั้นทำการหยดสารละลายมาตรฐานของสารตัวอย่าง (ในงานวิจัยนี้ได้นำกรดกลูตามิกมาใช้เป็นสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง) ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันลงไปในหลุมดังกล่าวจำนวน 5 ช่อง หลุมละ 1 μL ส่วนในช่องสุดท้ายให้หยดสารละลายของสารตัวอย่างที่สกัดจากใบชา หลังจากนั้นนำอุปกรณ์ดังกล่าวไปให้ความร้อนในตู้อบที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 15 นาที จะปรากฏสีม่วงที่มีความเข้มของสีที่แตกต่างกันขึ้นกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่ใช้ ดังแสดงในรูปที่ 1.4(ข)



รูปที่ 1.4 (ก) การออกแบบอุปกรณ์กระดาษที่ใช้ในงานวิจัยของ Xu และ (ข) อุปกรณ์กระดาษที่ใช้ในงานวิจัยของ Xu ภายหลังจากการนำไปอบที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 15 นาที

1.4 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อพัฒนาการตรวจวัดกรดอะมิโนฮิสทีดีนด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์บนอุปกรณ์กระดาษ

1.5 ขอบเขตของโครงการวิจัย

1.5.1 สังเคราะห์และพิสูจน์โครงสร้างของลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของคาลิกซ์ [4] แอรินที่มีหมู่ไทโรโพลอลเอไมด์เป็นองค์ประกอบ (L)

1.5.2 สังเคราะห์และพิสูจน์โครงสร้างของสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์ของคอปเปอร์ (II) กับลิแกนด์ L (CuL)

1.5.3 ศึกษาความเป็นไปได้และหาสภาวะของการทดลองที่เหมาะสมในการนำสารประกอบโคออร์ดิเนชันที่สังเคราะห์ได้มาใช้เป็นเซนเซอร์ทางเคมีเชิงแสงสำหรับการตรวจวัดกรดอะมิโนในระบบแบตช์ (batch system)

1.5.4 ศึกษาความเป็นไปได้และหาสภาวะของการทดลองที่เหมาะสมในการนำสารประกอบโคออร์ดิเนชันที่สังเคราะห์ได้มาใช้เป็นเซนเซอร์ทางเคมีเชิงแสงสำหรับการตรวจวัดกรดอะมิโนฮิสทีดีนบนอุปกรณ์กระดาษ โดยนำแอนิเมชันที่ได้จากหัวข้อ (1.5.3) มาพัฒนาการตรวจวัดบนอุปกรณ์กระดาษ

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ด้านวิชาการ : ได้ชุดตรวจวัดกรดอะมิโนฮิสทีดีนบนอุปกรณ์กระดาษด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

ด้านสังคมและชุมชน : อุปกรณ์ตรวจวัดที่จะพัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้สามารถนำมาใช้เป็นประโยชน์ในทางการแพทย์

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

2.1.1 ยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรมิเตอร์ (HP Hewlett Packard G1103A)

2.1.2 เครื่อง Nuclear magnetic Resonance, NMR (broker, Advance Ultrashield 400 MHz)

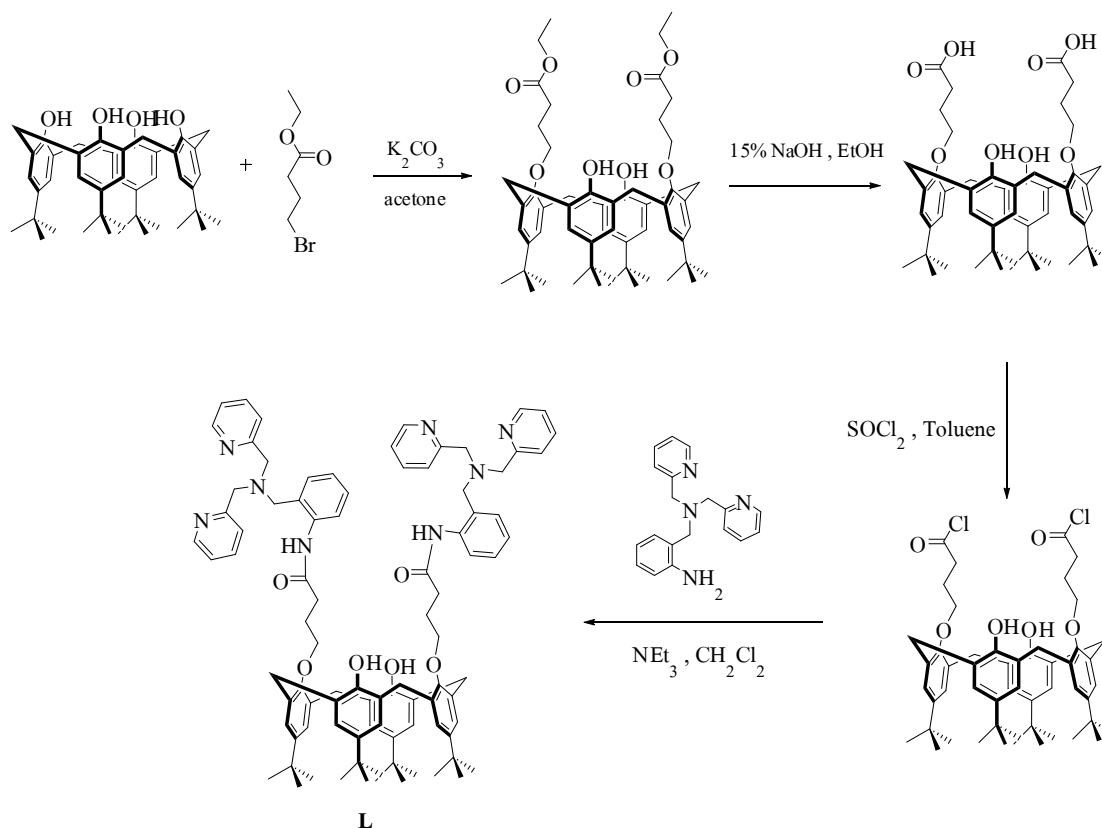
2.1.3 เครื่องระเหยตัวทำละลายแบบสูญญากาศ

2.2 สารเคมี

Acetonitrile	CH ₃ CN	A.R.Grade (FLUKA)
Hydroxyethyl piperazineethane sulfonic acid (HEPES)	C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	A.R.Grade (FLUKA)
L-Alanine	C ₃ H ₇ NO ₂	A.R.Grade (ALDRICH)
L-Arginine	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	A.R.Grade (ALDRICH)
L-Asparagine	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	A.R.Grade (ALDRICH)
L-Aspartic acid	C ₄ H ₇ NO ₄	A.R.Grade (ALDRICH)
L-Glutamic acid	C ₅ H ₉ NO ₄	A.R.Grade (ALDRICH)
L-Glutamine	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	A.R.Grade (ALDRICH)
Glycine	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	A.R.Grade (ALDRICH)
L-Histidine	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	A.R.Grade (ALDRICH)
L-Isoleucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	A.R.Grade (ALDRICH)
L-Leucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	A.R.Grade (ALDRICH)
L-Lysine	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	A.R.Grade (ALDRICH)
L-Methionine	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	A.R.Grade (ALDRICH)
L-Phenylalanine	C ₉ H ₁₁ NO ₂	A.R.Grade (ALDRICH)
L-Proline	C ₅ H ₉ NO ₂	A.R.Grade (ALDRICH)
L-Serine	C ₃ H ₇ NO ₃	A.R.Grade (ALDRICH)
L-Threonine	C ₄ H ₉ NO ₃	A.R.Grade (ALDRICH)
L-Tryptophan	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	A.R.Grade (ALDRICH)
L-Tyrosine	C ₉ H ₁₁ NO ₃	A.R.Grade (ALDRICH)
L-Valine	C ₅ H ₁₁ NO ₂	A.R.Grade (ALDRICH)
N-acetyl Histidine	C ₈ H ₁₁ N ₃ O ₃	A.R.Grade (ALDRICH)
Pyrocatechol violet	C ₁₉ H ₁₄ O ₇ S	A.R.Grade (FLUKA)

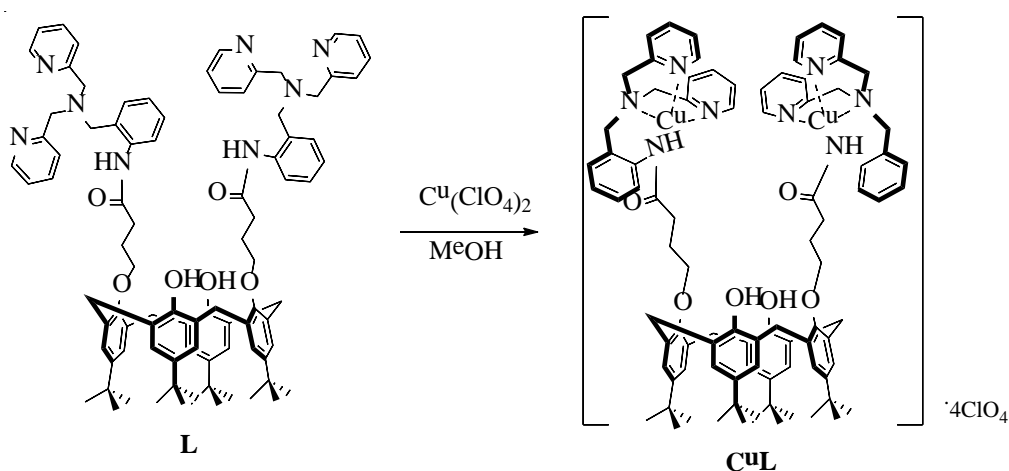
2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 สังเคราะห์และพิสูจน์โครงสร้างของลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของคาลิกซ์ [4] แอร์รินที่มีหมู่ไฮดรอกซิลเป็นองค์ประกอบ (L) การสังเคราะห์ลิแกนด์ L แสดงได้ดังรูปที่ 2.1 ⁽⁷⁾



รูปที่ 2.1 การสังเคราะห์ลิแกนด์ L

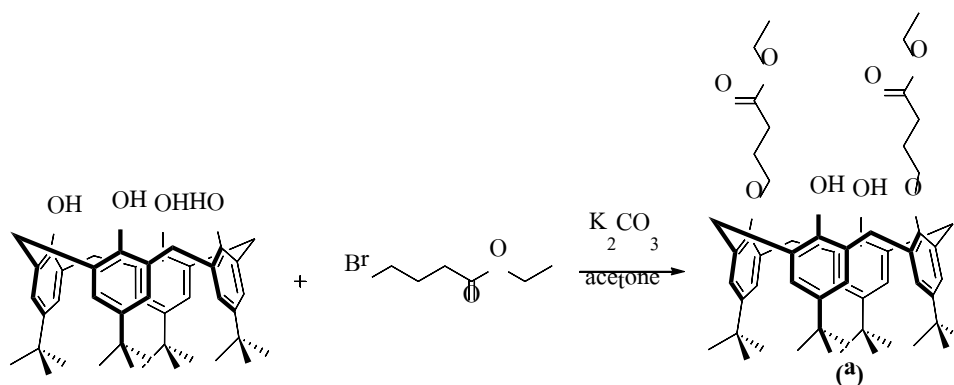
2.3.2 สังเคราะห์และพิสูจน์โครงสร้างของสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์ของคอปเปอร์ (II) กับ ลิแกนด์ L (CuL) การสังเคราะห์สารประกอบ CuL แสดงได้ดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน CuL

2.3.3 การสังเคราะห์ลิแกนด์ L

การสังเคราะห์สารประกอบ 25,27-(4,4'-bis(ethyl-3-butanoate))-*p*-*tert*-butylcalix [4]arene (**a**) (Joseph, Ramanujam, Acharya, Khutia, & Chebrolu, 2008, p. 5745)



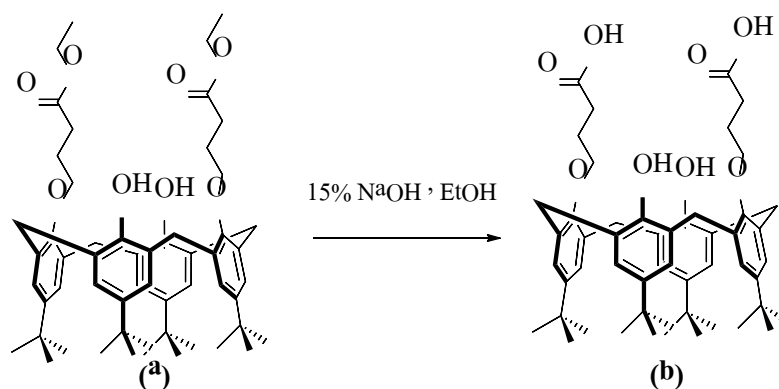
นำสารประกอบ *p*-*tert*-butylcalix-[4]arene (10.0 g, 15.4 mmol) ผสมกับ K_2CO_3 (21.3 g, 154 mmol) และสารประกอบ ethyl 4-bromobutyrate (88.2 ml, 0.616 mol) ในตัวทำละลายอะซิโตนปริมาตร 100 มิลลิลิตรและทำการรีฟลักซ์ของผสมดังกล่าวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดให้ระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบสุญญากาศ นำส่วนที่เหลือจากการระเหยมาละลายด้วย CH_2Cl_2 และล้างสารละลายดังกล่าวด้วยสารละลาย 1 M HCl ครึ่งละ 100 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง และตามด้วยสารละลายของน้ำเกลืออิ่มตัวครึ่งละ 100 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง หลังจากเติม anhydrous $MgSO_4$ ในสารละลาย CH_2Cl_2 เพื่อกำจัดน้ำและระเหยสารละลายด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบสุญญากาศ นำส่วนที่เหลือจากการระเหยมาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกา และใช้สารละลายผสมของ hexane/ CH_2Cl_2 (50 : 50, v/v) เป็นตัวชะ ได้ของแข็งสีขาวของสารประกอบ (**a**) (10.5 g, 78%).

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ 7.77 (d, 2H, Ar-OH), 7.09 (s, 4H, ArH), 6.90 (s, 4H, ArH), 4.29 (d, 4H, $J = 13.2$ Hz, Ar- CH_2 -Ar), 4.19 (q, 4H, $J = 14.4$ Hz, -O- CH_2 - CH_3), 4.08 (t, 4H, $J = 6$ Hz, - CH_3), 3.36 (d, 4H, $J = 13.2$ Hz, Ar- CH_2 -Ar), 2.91 (t, 4H, $J = 7.2$ Hz, - CH_2 -), 2.36 (t, 4H, $J = 6.8$ Hz, - CH_2 -), 1.30 (s, 18H, *p*-*tert*-butyl), 1.06 (s, 18 H, *p*-*tert*-butyl).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 173.46, 150.78, 149.61, 147.00, 141.47, 132.75, 127.71, 125.60, 125.13, 75.14, 60.40, 32.51, 31.72, 30.76, 30.59, 25.49, 14.25.

การสังเคราะห์สารประกอบ 25,27-(4,4'-bis(butanoic acid))-*p*-*tert*-butyl calix[4]arene

(b) (Joseph, Ramanujam, Acharya, Khutia, & Chebrolu, 2008, p. 574

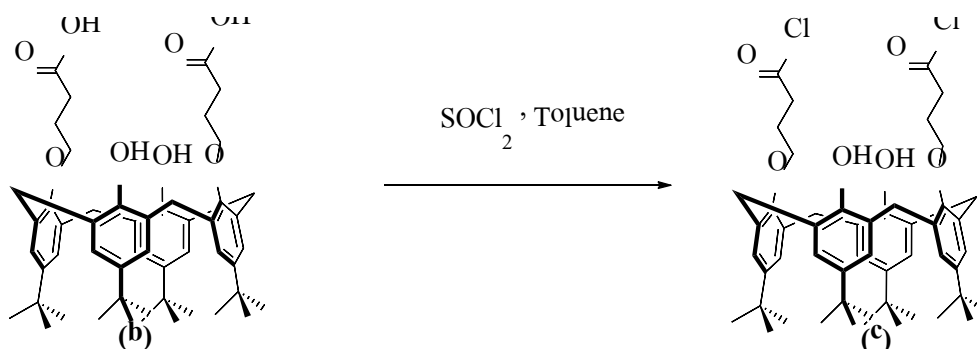


นำสารประกอบ (a) (10.0 g, 11.4 mmol) มาละลายในสารละลาย 15% w/v NaOH ในตัวทำละลาย EtOH (500 mL) ทำการรีฟลักซ์ของผสมดังกล่าวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาตามที่กำหนดให้ระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบสุญญากาศจนแห้งได้เป็นของแข็งสีขาว หลังจากนั้นเติมน้ำเย็นปริมาตร 300 มิลลิลิตรลงไปยังของแข็งดังกล่าวและปรับ pH ของสารละลายเป็น 1 ด้วยสารละลาย 3M HCl กรองและล้างของแข็งที่ได้ด้วยน้ำ ได้ของแข็งสีขาวของสารประกอบ (b) (1.87 g, 20%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm) : δ 7.07 (s, 4H, ArH), 6.76 (s, 4H, ArH), 4.28 (d, 4H, $J = 12.8$ Hz, Ar-CH₂-Ar), 3.94 (s, 4H, -CH₂-), 3.32 (d, 4H, $J = 13.2$ Hz, -CH₂-), 2.86 (s, 4H, -CH₂-), 2.36 (s, 4H, -CH₂-), 1.31 (s, 18H, *p*-*tert*-butyl), 0.96 (s, 18H, *p*-*tert*-butyl)

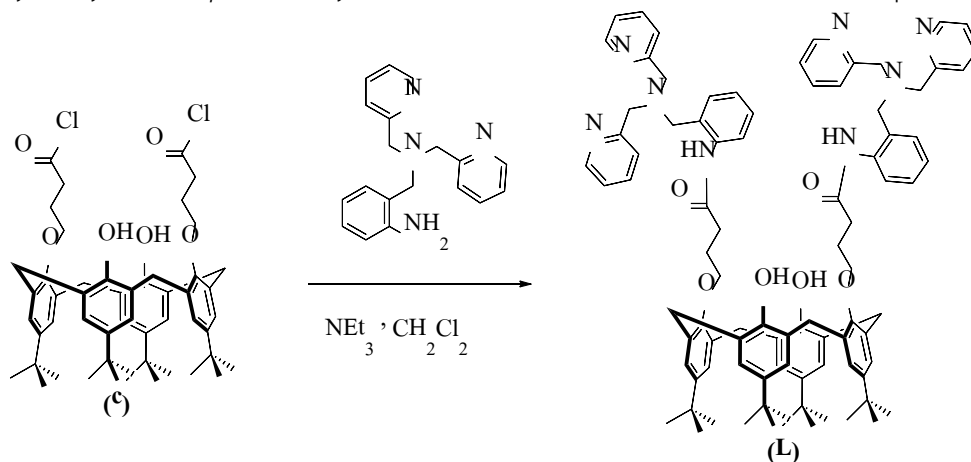
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, ppm): δ 179.92, 150.68, 149.69, 147.03, 132.74, 127.67, 125.58, 125.20, 74.87, 34.01, 33.84, 32.11, 30.65, 25.44.

การสังเคราะห์สารประกอบ 25,27-(4,4'-bis(butanoyl chloride))-*p-tert*-butylcalix [4]arene (**c**) (Joseph, Ramanujam, Acharya, Khutia, & Chebrolu, 2008, p. 5745)



ผสมสารประกอบ (b), (10.0 g, 1.2 mmol) และ SOCl_2 (7 mL) ในตัวทำละลาย toluene ที่ปราศจากน้ำ (150 mL) และรีฟลักซ์สารละลายดังกล่าวเป็นเวลา 4 ชั่วโมงภายใต้บรรยากาศแก๊สไนโตรเจน เมื่อครบเวลาที่กำหนดให้ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบสูญญากาศ ได้ของแข็งของสารประกอบ (c)

การสังเคราะห์ลิแกนด์ 25,27-(4,4'-bis(N-(2-((bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)methyl)phenyl)butyramide)-*p-tert*-butylcalix[4]arene (L) (Kunthadee et al., 2013, p. 4010)



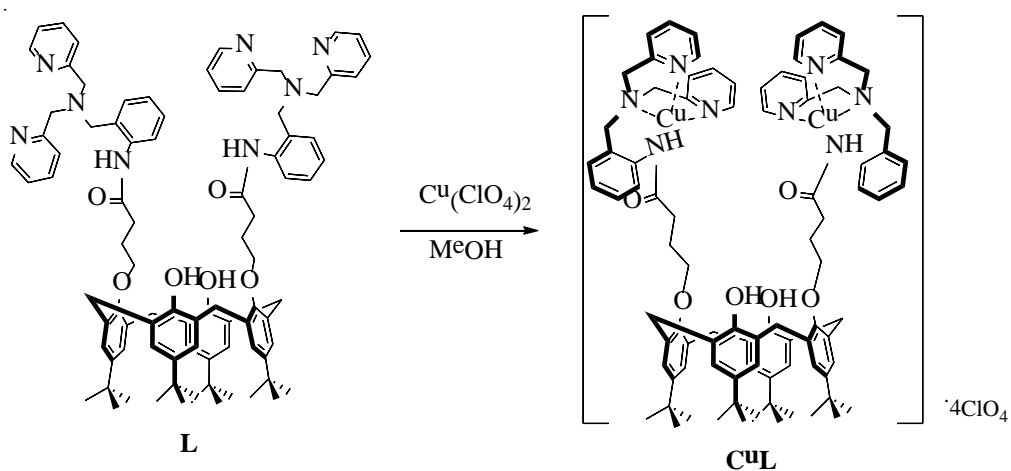
ผสมสารประกอบเอมีน (11.0 g, 36.0 mmol) และ Et_3N (6 mL, 36.2 mmol) ในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 ที่ปราศจากน้ำปริมาตร 100 มิลลิลิตร มิลลิลิตรภายใต้บรรยากาศแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นค่อย ๆ หยดสารละลายของสารประกอบ (c) ที่ละลายใน (10.0 g, 11.2 mmol) ในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 ที่ปราศจากน้ำปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงไปยังสารละลายดังกล่าว หลังจากนั้นคนสารละลายผสมดังกล่าวที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมงภายใต้บรรยากาศแก๊สไนโตรเจน เมื่อครบเวลาที่กำหนดกรองของแข็งสีขาวที่เกิดขึ้นและนำสารละลายที่ได้จากการกรองประเหยด้วยด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบสุญญากาศ ละลายส่วนที่เหลือจากการระเหยด้วย CH_2Cl_2 ปริมาตร 200 มิลลิลิตรและล้างสารละลายดังกล่าวด้วยสารละลายอิมัลชันของน้ำเกลือ 3 ครั้ง ๆ ละ 200 ปริมาตร เติม anhydrous MgSO_4 ลงไปยังชั้นของ CH_2Cl_2 เพื่อกำจัดน้ำและระเหยสารละลายด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบสุญญากาศ นำส่วนที่เหลือจากการระเหยมาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกา และใช้สารละลายผสมของ 2% MeOH ใน CH_2Cl_2 เป็นตัวชะ ได้ของแข็งสีขาวของสารประกอบ (L) (1.85 g, 15%)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm) : δ 10.75 (s, 2H, -NH-), 8.54 (d, 4H, $J = 0.8$ Hz, ArH), 8.33 (d, 2H, $J = 8$ Hz, ArH), 7.52 (m, 4H, ArH), 7.42 (s, 2H, -OH), 7.22 (d, 6H, $J = 7.6$ Hz, ArH), 7.15 (d, 2H, $J = 7.2$ Hz, ArH), 7.06 (m, 8H, ArH), 6.99 (m, 2H, ArH), 6.79 (s, 4H, ArH), 4.33 (d, $J = 12.8$ Hz, 4H, Ar- CH_2 -Ar), 4.10 (t, $J = 6.4$ Hz, 4H, - CH_2 -), 3.76 (s, 12H, - CH_2 -), 3.31 (d, $J = 12.8$ Hz, 4H, Ar- CH_2 -Ar), 2.92 (t, $J = 7.2$ Hz, 4H, - CH_2 -), 2.44 (t, $J = 6.8$ Hz, 4H, - CH_2 -), 1.31 (s, 18H, *p-tert*-butyl), 0.97 (s, 18H, *p-tert*-butyl)

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 171.32, 158.20, 150.66, 150.00, 149.22, 146.76, 141.47, 138.63, 136.51, 132.50, 130.48, 128.33, 127.94, 126.11, 125.50, 125.13, 123.48, 123.11, 122.28, 121.33, 76.20, 59.78, 58.15, 33.92, 33.84, 33.80, 31.81, 31.75, 31.04, 25.99

HRMS-ESI (positive mode, m/z) : $[\text{L} + \text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_{90}\text{H}_{105}\text{N}_8\text{O}_6$, 1393.8079; Found, 1393.8086.

การสังเคราะห์สารประกอบ CuL



ค่อย ๆ หยดสารละลายของลิแกนด์ L (5 mmol) ในเมทานอลลงไปยังสารละลายของ $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ (15 mmol) หรือ $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2$ (15 mmol) ที่ละลายอยู่ในเมทานอล The methanolic solution of $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.13 g, 0.36 mmol) หลังจากนั้นคนสารละลายผสมดังกล่าวที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองและล้างตอนที่ได้ด้วยเมทานอลเย็น ได้ของแข็งสีฟ้าของ CuL (80 %)

2.3.4 การศึกษาความความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ของเอนไซม์ [CuL•PV]

◆ การเตรียมสารละลาย CuL ความเข้มข้น 20 μM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย CuL ความเข้มข้น 400 μM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ชั่ง CuL มา 3.5 มิลลิกรัม ละลายด้วยอะซิโตนไตรไฮไดรด์และนำสารละลายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยอะซิโตนไตรไฮไดรด์

เตรียมสารละลาย CuL ความเข้มข้น 20 μM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลาย CuL ความเข้มข้น 400 μM (จากข้อ 2.5.1.1) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 80/20(v/v) MeCN/H₂O ใน 10 mM HEPES pH 6.4

◆ การเตรียมสารละลาย PV ความเข้มข้น 20 μM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย PV ความเข้มข้น 400 μM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ชั่ง PV 2.5 มิลลิกรัม ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 80/20(v/v) MeCN/H₂O ใน 10 mM HEPES pH 7.4 และนำสารละลายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 80/20(v/v) MeCN/H₂O ใน 10 mM HEPES pH 7.4

เตรียมสารละลาย PV ความเข้มข้น 20 μM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลาย PV ความเข้มข้น 400 μM ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 80/20(v/v) MeCN/H₂O ใน 10 mM HEPES pH 7.4

◆ การเตรียมสารละลายของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 5 mM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ชั่งกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ตามน้ำหนักที่แสดงในตารางที่ 2.1 จากนั้นนำไปละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 80/20(v/v) MeCN/H₂O ใน 10 mM HEPES pH 6.4 และนำสารละลายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 80/20(v/v) MeCN/H₂O ใน 10 mM HEPES pH 7.4

เตรียมสารละลายกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ปิเปตกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 5 mM ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 80/20(v/v) MeCN/H₂O ใน 10 mM HEPES pH 7.4

ตารางที่ 2.1 น้ำหนักของกรดอะมิโนชนิดต่างๆที่ใช้ในการเตรียมเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้น 5 mM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ลำดับที่	กรดอะมิโน	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)
1	L-Alanine	2.23
2	L-Arginine	4.36
3	L-Asparagine	3.30
4	L-Aspartic acid	3.33
5	L-Glutamic acid	3.03
6	L-Glutamine	6.15
7	Glycine	1.88
8	L-Histidine	3.88
9	L-Isoleucine	3.28
10	L-Leucine	3.28
11	L-Lysine	4.57
12	L-Methionine	3.73
13	L-Phenylalanine	4.13
14	L-Proline	2.88
15	L-Serine	2.63
16	L-Threonine	2.98
17	L-Tryptophan	5.11
18	L-Tyrosine	4.53
19	L-Valine	2.93
20	N-acetyl Histidine	4.93

วิธีการทดลอง

ปิเปตสารละลาย CuL ความเข้มข้น 20 μ M ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ในคิวเวท จากนั้นปิเปตสารละลาย PV ความเข้มข้น 400 μ M ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในคิวเวทดังกล่าว คนสารละลายให้เข้ากันและนำสารละลายดังกล่าวไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 250-900 nm หลังจากนั้นเติมสารละลายของกรดอะมิโนชนิดความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ลงไปในคิวเวทคนสารละลายให้เข้ากัน และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเอนไซม์เบิลอิสระ และสารละลายของเอนไซม์เบิลเมื่อเติมกรดอะมิโนแต่ละชนิดกับความยาวคลื่นที่ใช้ในการทดลอง การพิจารณาว่ากรดอะมิโนชนิดใดสามารถแทนที่ PV ได้นั้นสังเกตได้จากการเปลี่ยนสีสารละลายของเอนไซม์เบิลจากสีเขียวไปเป็นสีเหลืองของ PV อิสระ

◆ การหาอัตราส่วนโมลของ CuL กับ PV ที่ใช้ในการเกิดเอนไซม์เอนไซม์ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโคปี

เตรียมสารละลาย CuL ความเข้มข้น 400 μM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ชั่ง CuL 3.5 มิลลิกรัม ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 80/20(v/v) MeCN/H₂O ใน 10 mM HEPES pH 7.4 และนำสารละลายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 80/20(v/v) MeCN/H₂O ใน 10 mM HEPES pH 7.4

เตรียมสารละลาย PV ความเข้มข้น 400 μM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ชั่ง PV 2.5 มิลลิกรัม ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 80/20(v/v) MeCN/H₂O ใน 10 mM HEPES pH 7.4 และนำสารละลายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 80/20(v/v) MeCN/H₂O ใน 10 mM HEPES pH 7.4

เตรียมสารละลาย PV ความเข้มข้น 20 μM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลาย PV ความเข้มข้น 400 μM (จากข้อ 2.5.1.2) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 80/20(v/v) MeCN/H₂O ใน 10 mM HEPES pH 7.4

วิธีการทดลอง

ปิเปตสารละลาย PV ความเข้มข้น 20 μM ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และค่อย ๆ ไทเทรตสารละลาย CuL ความเข้มข้น 400 μM ตามปริมาตรต่าง ๆ กันเพื่อให้ได้เศษส่วนโมลตามที่กำหนด จากนั้นคนสารละลายให้เข้ากัน นำสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 250-900 nm นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับอัตราส่วนโมลของ CuL : PV

◆ การศึกษาผลของกรดอะมิโนฮิสทีดีนที่มีผลต่อการแทนที่ PV ในเอนไซม์เอนไซม์ [CuL•PV] ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน

เตรียมสารละลาย CuL ความเข้มข้น 20 μM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย CuL ความเข้มข้น 400 μM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ชั่ง ZnL 3.5 มิลลิกรัม ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 80/20(v/v) MeCN/H₂O ใน 10 mM HEPES pH 7.4 และนำสารละลายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 80/20(v/v) MeCN/H₂O ใน 10 mM HEPES pH 7.4

เตรียมสารละลาย CuL ความเข้มข้น 20 μM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลาย CuL ความเข้มข้น 400 μM ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 10 mM HEPES pH 7.4

เตรียมสารละลาย PV ความเข้มข้น 20 μ M ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย PV ความเข้มข้น 400 μ M ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ซึ่ง PV 2.5 มิลลิกรัม ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 10 mM HEPES pH 7.4 และนำสารละลายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 10 mM HEPES pH 7.4

เตรียมสารละลาย PV ความเข้มข้น 20 μ M ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลาย PV ความเข้มข้น 400 μ M ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 10 mM HEPES pH 7.4

เตรียมสารละลาย L-Histidine ความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ปิเปตกรดอะมิโนชนิดต่างๆที่ความเข้มข้น 5 mM ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 10 mM HEPES pH 7.4

วิธีการทดลอง

ปิเปตสารละลาย CuL ความเข้มข้น 20 μ M ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ในคิวเวทจากนั้น ปิเปตสารละลาย PV ความเข้มข้น 400 μ M ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงไปนในคิวเวทดังกล่าว คนสารละลายให้เข้ากันและนำสารละลายดังกล่าวไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 250-900 nm จากนั้นเติมนำสารละลายของกรดอะมิโนฮิสทีดีนความเข้มข้น 1 mM ครั้งละ 0.05 มิลลิลิตร ใส่ลงไปนในคิวเวทดังกล่าว คนสารละลายให้เข้ากันและนำสารละลายดังกล่าวไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 250-900 nm

◆การเตรียมอุปกรณ์กระดาษสำหรับใช้ตรวจวัดกรดอะมิโนฮิสทีดีนด้วยเอนไซม์เบิล

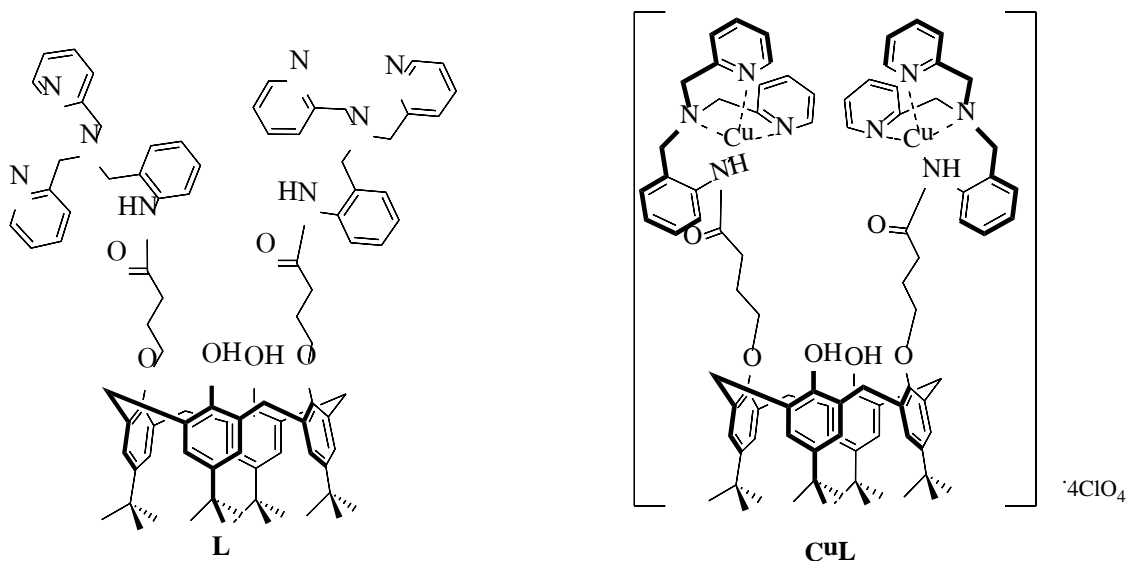
[CuL•PV]

ตัดกระดาษกรองให้มีขนาด 1.5 × 1.5 cm หลังจากนั้นหยดสารละลายของเอนไซม์เบิลที่มีความเข้มข้น 0.25 mM ครั้งละ 4 μ L ลงไปบนกระดาษกรองที่เตรียมไว้ เมื่อกระดาษกรองแห้งให้หยดสารละลายของกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 5.6 mM ลงไปบนกระดาษกรองและสังเกตการเปลี่ยนสีของกระดาษกรอง

บทที่ 3 ผลการวิจัยและอภิปรายผล

3.1 การสังเคราะห์ลิแกนด์ L และสารประกอบโคออร์ดิเนชัน CuL

ได้ทำการสังเคราะห์และพิสูจน์โครงสร้างลิแกนด์ L และสารประกอบโคออร์ดิเนชัน CuL ได้เป็นผลสำเร็จ โครงสร้างของสารประกอบทั้ง 2 ชนิดแสดงได้ในรูปที่ 3.1

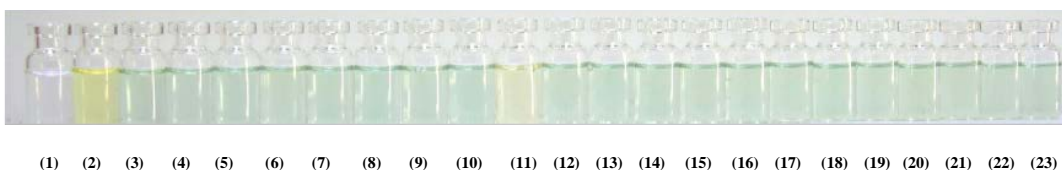


รูปที่ 3.1 โครงสร้างของ L และสารประกอบโคออร์ดิเนชัน CuL ที่สังเคราะห์ได้

3.2 การศึกษาความเป็นไปได้และหาสภาวะของการทดลองที่เหมาะสมในการนำสารประกอบโคออร์ดิเนชันมาใช้ในการตรวจวัดฮิสทีดีนในระบบแบ็คซ์

เมื่อนำสารประกอบโคออร์ดิเนชัน CuL มาศึกษาความเป็นไปได้ในการตรวจวัด His ด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ และใช้สารละลายผสม 80% (v/v) CH₃CN-H₂O ในสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 7.4 โดยนำสารประกอบ CuL มาเตรียมเป็นเอนไซม์กับอินดิเคเตอร์ไพโรแคทีคอลไวโอเลต (pyrocatechol violet หรือ PV) ผลการทดลองแสดงได้ดังรูปที่ 3.2 จะเห็นได้ว่าสารละลายของสารประกอบ CuL สารละลายไซไมมีซี (ขวดที่ 1, cpx) สารละลาย PV ในรูปอิสระ สารละลายมีซีเขียว (ขวดที่ 2, PV) และสารละลายเอนไซม์มีซีเขียว (ขวดที่ 3, ens)

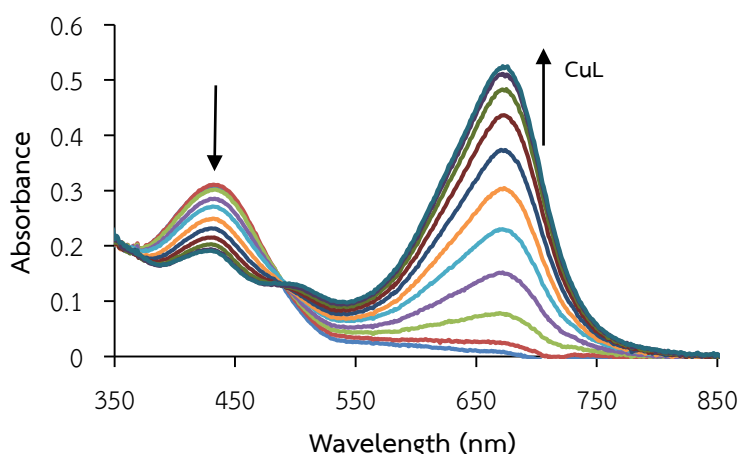
จากรูปที่ 3.2 จะเห็นได้ว่าเอนไซม์เบิลที่เตรียมได้มีความจำเพาะเจาะจงกับ His ได้เป็นอย่างดี เนื่องจากมีเพียง His เท่านั้นที่ทำให้สีของสารละลายเอนไซม์เบิลของ [CuL•PV] เปลี่ยนจากสีเขียวไปเป็นสีเหลืองของอินดิเคเตอร์ PV ในรูปอิสระ (รูปที่ 3.2ง) ในขณะที่กรดอะมิโนชนิดอื่น ๆ ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของสารละลายแต่อย่างใด แสดงว่าอินดิเคเตอร์ PV ในโครงสร้างของเอนไซม์เบิล [CuL•PV] สามารถถูกแทนที่ด้วย PPI ส่งผลให้ได้อินดิเคเตอร์ PV ในรูปอิสระกลับคืนมา ดังนั้นจึงสามารถนำเอนไซม์เบิล [CuL•PV] ไปตรวจวัด His ในตัวอย่างจริงได้แม้ในสภาวะที่มีกรดอะมิโนชนิดอื่นอยู่ในระบบ



รูปที่ 3.2 การเปลี่ยนสีของสารละลายเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบ CuL กับอินดิเคเตอร์ PV ในตัวทำละลายผสม 80% (v/v) CH₃CN-H₂O ในสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 7.4 เมื่อ (1) = CuL, (2) = indicators, (3) = ensemble, (4) = alanine, (5) = arginine, (6) = asparagine, (7) = aspartic acid, (8) = glutamic acid, (9) = glutamine, (10) = glycine, (11) = histidine, (12) = isoleucine, (13) = leucine, (14) = lysine, (15) = methionine, (16) = phenylalanine, (17) = proline, (18) = serine, (19) = threonine, (20) = tryptophan, (21) = tyrosine, (22) = valine และ (23) = cysteine

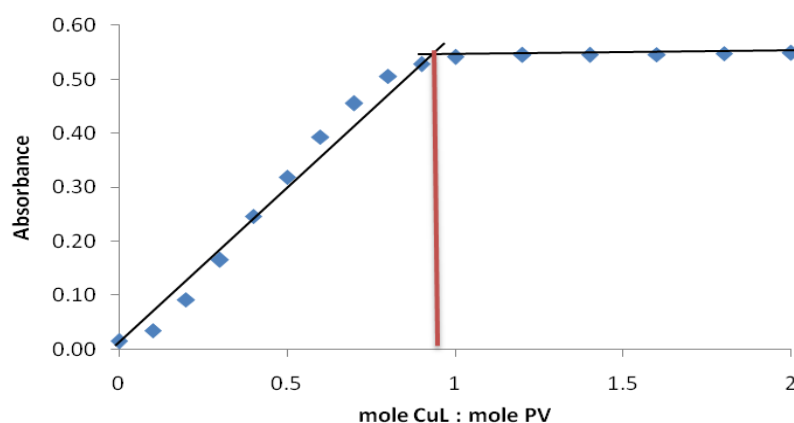
3.3 การศึกษาการเกิดเอนไซม์เบิลระหว่างสารประกอบโคออร์ดิเนชัน CuL และ PV ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมทรี

เมื่อนำสารละลาย PV ที่มีความเข้มข้น 20 μ M ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทำการไทเทรตกับสารละลายประกอบเชิงซ้อน CuL ความเข้มข้น 400 μ M ครั้งละ 0.01 มิลลิลิตร (0.1 equivalent) แล้วนำสารละลายดังกล่าวไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมทรี โดยทำการทดลองจนครบ 1.0 equivalent พบว่าสารละลาย PV ในรูปอิสระมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 430 nm และเมื่อค่อย ๆ ไทเทรตสารละลาย CuL ลงไปยังสารละลายดังกล่าวพบว่าสีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีฟ้า โดยมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 670 nm ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันว่าอินดิเคเตอร์ PV เข้าไปโคออร์ดิเนทกับอะตอมของคอปเปอร์(II) ทั้งสองของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน CuL ดังแสดงในรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลาย PV เมื่อทำการไทเทรตสารละลาย CuL ลงไปยังสารละลายดังกล่าว

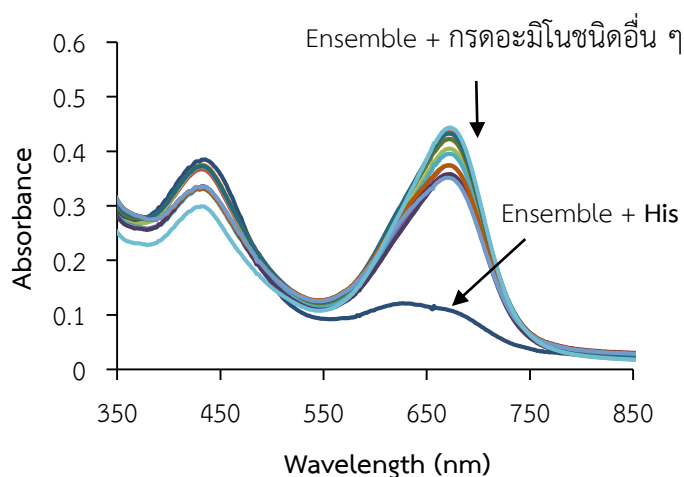
จากรูปที่ 3.3 จะเห็นได้ว่าเมื่อความเข้มข้นของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน CuL มีค่าเพิ่มขึ้น ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 670 nm ก็มีค่าเพิ่มขึ้นตามไปด้วยเช่นกัน และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นดังกล่าวจะมีค่าคงที่เมื่อจำนวนโมลของสารประกอบ CuL มีค่าเท่ากับจำนวนโมลของ PV ในสารละลาย เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 670 nm กับอัตราส่วนโมลของ CuL : PV ที่ใช้ในการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.4 จะเห็นว่ากราฟดังกล่าวมีจุดหักของกราฟอยู่ที่อัตราส่วนโมลของ CuL : PV คือ 1:1 ซึ่งก็คืออัตราส่วนโมลที่ใช้ในการเกิดเอนแซมเบิล [CuL•PV] นั่นเอง



รูปที่ 3.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความต่างของค่าการดูดกลืนแสงกับเศษส่วนโมลของ CuL : PV ที่ความยาวคลื่น 670 nm

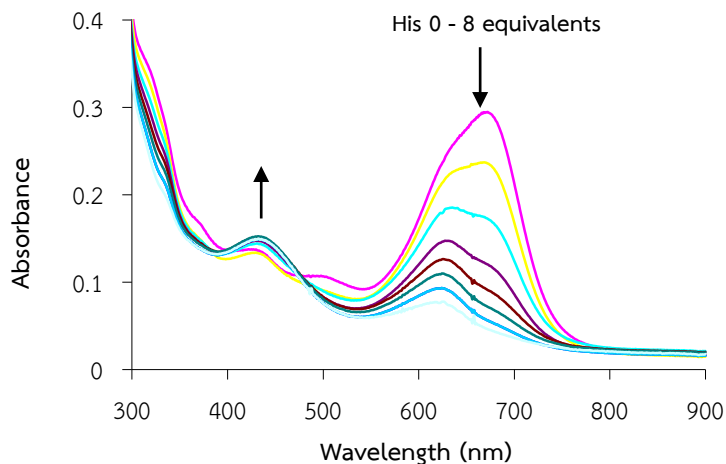
3.4 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกับกรดอะมิโนของเอนแซมเบิล [CuL•PV] ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมทรี

เมื่อนำสารละลายของเอนไซม์เบิล $[CuL \cdot PV]$ ที่อยู่ในรูปอิสระและในสถานะที่มีกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ที่มากเกินพอในสารละลายที่มี pH 7.4 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงพบว่าผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับผลการทดลองในรูปที่ 3.2 กล่าวคือ สารละลายสีเขียวของเอนไซม์เบิลอิสระมีค่าการดูดกลืนแสงที่สูงที่สุดที่ความยาวคลื่น 670 nm สำหรับสารละลายสีเหลืองของเอนไซม์เบิลในสถานะที่มี His อยู่ด้วยนั้นค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นดังกล่าวจะมีค่าลดลงแต่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 430 nm ของ PV มีค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นการยืนยันว่า His สามารถเข้าไปแทนที่อินเคเตอร์ PV ได้เพียงชนิดเดียว สำหรับกรดอะมิโนชนิดอื่น ๆ นั้นทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 670 nm เปลี่ยนแปลงไปเพียงเล็กน้อยเท่านั้นและสีของสารละลายก็ยังคงเป็นสีเขียวคล้ายกับสีของสารละลายเอนไซม์เบิลอิสระ ดังแสดงในรูปที่ 3.5



รูปที่ 3.5 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของเอนไซม์เบิล $[CuL \cdot PV]$ ที่มีกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ อยู่ในระบบ

เมื่อค่อย ๆ ไทเทรตสารละลายกรด His ความเข้มข้น 400 μM ลงไปในสารละลายของเอนไซม์เบิล $[CuL \cdot PV]$ ความเข้มข้น 20 μM พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 670 nm จะค่อย ๆ ลดลง ในขณะที่เดียวกันค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 430 nm จะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นและสีของสารละลายจะค่อย ๆ เปลี่ยนจากสีเขียวไปเป็นสีเหลือง ดังแสดงในรูปที่ 4.9 ซึ่งแสดงว่า His สามารถเข้าไปแทนที่ PV ในเอนไซม์เบิลได้จึงทำให้ PV ออกมาอยู่ในรูปของ PV อิสระที่มีสีเหลือง และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 430 nm จะมีค่าคงที่เมื่อความเข้มข้นของ His มากกว่าเอนไซม์เบิล 6 เท่า

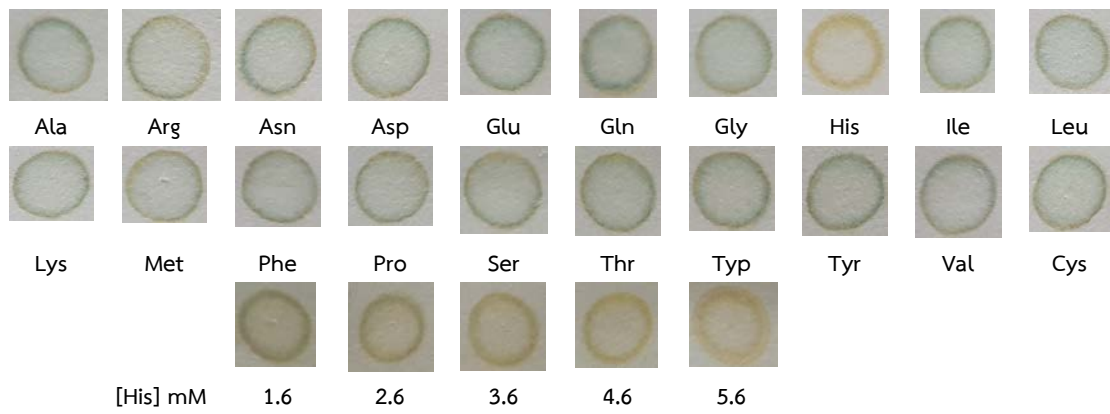


รูปที่ 3.6 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลาย $[CuL\bullet PV]$ เมื่อเติมสารละลาย His ความเข้มข้น 1 mM ที่มีปริมาตรต่าง ๆ

3.5 การตรวจวัดกรดอะมิโนฮิสทีดินบนอุปกรณ์กระดาษด้วยเอนไซม์เบิล $[CuL\bullet PV]$

จากการนำเอนไซม์เบิล $[CuL\bullet PV]$ ที่มีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัด His มาพัฒนาเป็นชุดตรวจวัดบนอุปกรณ์กระดาษ โดยตัดกระดาษกรองให้มีขนาด 1.5×1.5 cm และหยดสารละลายของ CuL, PV และเอนไซม์เบิล $[CuL\bullet PV]$ ลงไปบนกระดาษกรองดังกล่าว ให้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.7 (ก) จะเห็นได้ว่าหยดของสารละลาย CuL บนกระดาษกรองจะไม่มีสี หยดของสารละลาย PV บนกระดาษกรองจะมีสีเหลือง และหยดของสารละลายเอนไซม์เบิลมีสีเขียวอมฟ้า เมื่อหยดสารละลายของกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ลงไปยังหยดของสารละลายเอนไซม์เบิลที่แห้งแล้วพบว่า มีเพียงกรดอะมิโนฮิสทีดินเท่านั้นที่ทำให้สีของหยดสารละลายเอนไซม์เบิลเปลี่ยนจากสีเขียวอมฟ้าไปเป็นสีเหลืองของ PV ในรูปอิสระอย่างชัดเจน ดังแสดงในรูปที่ 3.7 (ข) แสดงว่าเราอุปกรณ์กระดาษกรองที่เตรียมได้จากเอนไซม์เบิล $[CuL\bullet PV]$ สามารถนำมาใช้ในการตรวจวัดกรดอะมิโนฮิสทีดินได้ และเมื่อค่อย ๆ เพิ่มความเข้มข้นของกรดอะมิโนฮิสทีดินลงไปยังหยดของสารละลายเอนไซม์เบิลที่อยู่บนกระดาษกรองพบว่า เมื่อความเข้มข้นของฮิสทีดินมีค่าเพิ่มขึ้นสีเหลืองที่ปรากฏอยู่บนกระดาษกรองก็จะมีค่าเข้มข้นตามไปด้วยดังแสดงในรูปที่ 3.7 (ค)





รูปที่ 3.7 การเปลี่ยนสีของสารละลายเอนไซม์เบิลบนกระดาษกรองในสถานะที่มีกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ

บทที่ 4. สรุปผลการวิจัย

4.1 สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้สังเคราะห์ลิแกนด์ L และสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์ของคอปเปอร์ (II) กับลิแกนด์ L ได้เป็นผลสำเร็จ (CuL) จากการหาอัตราส่วนโมลของสารประกอบโคออร์ดิเนชันของ CuL กับ PV ที่ใช้ในการเกิดเอนไซม์โดยวิธีการหาอัตราส่วนโมล พบว่ามีอัตราส่วนโมลของ CuL ต่อ PV คือ 1:1 และค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนไซม์ [CuL•PV] มีค่าเท่ากับ $1.20 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ โดยสีของสารละลายเอนไซม์ดังกล่าวมีสีเขียวมีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดที่ความยาวคลื่น 670 nm ซึ่งแตกต่างจากสีของสารละลายของ PV อิสระที่มีสีเหลือง แสดงว่า PV สามารถเข้าไปเกิดพันธะโคออร์ดิเนชันกับคอปเปอร์ (II) ทั้งสองอะตอมในโครงสร้างของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน CuL

เมื่อศึกษาความสามารถในการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ PV ด้วยกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ที่ pH 7.4 พบว่ามีเพียงกรดอะมิโนฮิสทีดินเพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่สามารถแทนที่ PV ได้แสดงว่าค่าคงที่ความเสถียรของกรดอะมิโนฮิสทีดินกับสารประกอบโคออร์ดิเนชันมีค่ามากกว่าค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนไซม์ ปัจจัยสำคัญที่ทำให้เอนไซม์ของ [CuL•PV] มีความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกรดอะมิโนฮิสทีดินคือ โครงสร้างที่แข็งแรงของคาลิกซ์[4]แอรีนและความกะกะของหมู่เอมีนที่มีลักษณะเป็นไทรพอดที่เป็นตัวควบคุมระยะห่างระหว่างอะตอมของคอปเปอร์ (II) เพื่อใช้ในการเกิดพันธะโคออร์ดิเนชันกับอินดิเคเตอร์ PV นอกจากนี้ยังสามารถตรวจวัดกรดอะมิโนฮิสทีดินโดยใช้เอนไซม์ [CuL•PV] บนอุปกรณ์กระดาษอย่างง่ายได้

4.2 ข้อเสนอแนะ

พัฒนาอุปกรณ์กระดาษสำหรับการตรวจวัดกรดอะมิโนฮิสทีดินที่สามารถสังเกตการเปลี่ยนสีของเอนไซม์บนกระดาษกรองที่ชัดเจนกว่านี้

บรรณานุกรม

1. Nguyen, B. T. and Anslyn, E. V. (2006) Indicator-displacement assays. *Coordination Chemistry Reviews*. 250 : 3118-3127.
2. Wiskur, S. L., Lavigne, J. J., Ait-Haddou, H., & Anslyn, E. V. (2001). Teaching old indicators new tricks. *Accounts of Chemical Research*, 34(12), 963-972.
3. Lee, J. H., Park, J., Lah, M. S., Chin, J. and Hong, J. -I. (2007) High-affinity pyrophosphate receptor by a synergistic effect between metal coordination and hydrogen bonding in water." *Organic letters*. 9(19) : 3792-3731.
4. Chen, Z., Lu, Y., He, Y. and Huang, X. (2010) Recognition of pyrophosphate anion in aqueous solution using the competition displacement method." *Sensors and Actuators B*. 149 : 407-412.
5. Watchasit, S., Kaowliew, A., Suksai, C., Thawatchai, T. Ngeontae, W., and Pakawatchai, C. (2010). Selective detection of pyrophosphate by new tripodal amine calix[4]arene-based Cu(II) complexes using indicator displacement strategy. *Tetrahedron Letter*, 51, 3398-3402.
6. Bolin, M., Akerud, P., Hansson, A. and Akerud, H. (2011), Histidine-rich glycoprotein as an early biomarker of preeclampsia. *American Journal of Hypertension*, 1-6.
7. Kunthadee, P., Watchasit, S., Kaowliew, A., Suksai, C., Wongsan, W., Ngeontae, W., Chailapakul, O., Aeungmaitrepirom, W. and Tuntulani T. (2013) Intriguing sensing properties of a di-tripodal amine calix[4]arene ionophore towards anions from Donnan failure in ion-selective membranes induced by Cu²⁺. *New Journal of Chemistry*, 37, 4010-4017.
8. Khamjumphol, U., Watchasit, S., Suksai, C., Janrungratsakul, W., Boonchiangma, S., Tuntulani, T. (2011) New polymeric membrane cadmium(II)-selective electrodes using tripodal amine based ionophores. *Analytica Chimica Acta*, 704(1), 73-86.
9. Nerngchamnong, N., Chailap, B., Leeladee, P., Chailapakul, O., Suksai, C. and Tuntulani, T. (2011) Topological and metal ion effects on the anion binding abilities of new heteroditopic receptors derived from *p*-tert-butylcalix[4]arene. *Tetrahedron Letters*, 52(22), 2914-2917.
10. Suksai, C.; Leeladee, P.; Jainuknan, D.; Tuntulani, T.; Muangsinsin, N.; Chailapakul, O.; Kongsaree, P.; Pakavatchai, C. (2005) A new heteroditopic receptor and sensor highly selective for bromide in the presence of a bound cation" *Tetrahedron Letters*, 46, 2765-2769.

11. Yetisen, A.K., Akram, M.S., Lowe, C.R. (2013) Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices. *Lab on a Chip*, 13(12), 2210-2251.
12. Ojida, A., Mito-oka, Y., Sada, K., & Hamachi, I. (2004), Molecular recognition and fluorescence sensing of monophosphorylated peptides in aqueous solution by bis(zinc(II)-dipicolylamine)-based artificial receptors. *Journal of the American Chemical Society*, 126, 2454-2463.
13. Sun, S. K., Tu, K. X., & Yan, X. P. (2012), An indicator-displacement assay for naked-eye detection and quantification of histidine in human urine. *Analyst*, 137, 2124-2128.
14. Hortala, M. A., Fabbrizzi, L., Marcotte, N., Stomeo, F., Taglietti, A. (2002). Designing the selectivity of the fluorescent detection of amino acids: A chemosensing ensemble for histidine. *Journal of the American Chemical Society*, 125, 20-21.
15. Cai, L., Wu, Y., Xu, C., Chen, Z. (2013) A simple paper-based microfluidic device for the determination of the total amino acid content in a tea leaf extract. *Journal of Chemical Education*. 90, 232–234.