



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การตรวจวัดกลูตาไธโอนด้วยคัลลอร์ิเมตริกเซนเซอร์โดยใช้สารประกอบเชิงซ้อน  
ไดนิวเคลียร์ของคอปเปอร์ (II) กับอินดิเคเตอร์ไพโรแกลลอล เรด  
Colorimetric sensing of glutathione by copper (II) complex  
with pyrogallol red indicator

โดย

ดร.สรายุทธ เวชสิทธิ์ (หัวหน้าโครงการ)

ผศ.ดร.จอมใจ สุกใส (ผู้ร่วมวิจัย)

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

สนับสนุนโดยทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทเงินรายได้  
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2563 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้นำสารประกอบเชิงซ้อนไดนิวเคลียร์ของคอปเปอร์ (II) กับลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของเมตาไซลีน ( $\text{Cu}_2\text{L}_2$ ) มาศึกษาการเลือกจับกับแอนไอออนชนิดต่าง ๆ โดยใช้ไพโรแกลลอล เรด เป็นหน่วยให้สัญญาณในสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 พบว่าแอนิเมเบิลที่เตรียมจากสารประกอบ  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  และอินดิเคเตอร์ไพโรแกลลอล เรด (pyrogallol red หรือ PGR) มีความจำเพาะในการตรวจวัดกลูตาไรโอน เนื่องจากมีเพียงกลูตาไรโอนเท่านั้นที่สามารถเปลี่ยนสีสารละลายของแอนิเมเบิล [ $\text{Cu}_2\text{L}_2\cdot\text{PGR}$ ] จากสีน้ำเงินไปเป็นสีส้มซึ่งเป็นสีของอินดิเคเตอร์ PGR ชีตจำกัดการตรวจวัดกลูตาไรโอนด้วยแอนิเมเบิล [ $\text{Cu}_2\text{L}_2\cdot\text{PGR}$ ] มีค่าเท่ากับ 0.85  $\mu\text{M}$  นอกจากนี้ยังสามารถนำเอาแอนิเมเบิลดังกล่าวมาใช้ในการตรวจวัดหาปริมาณกลูตาไรโอนในยาประเภทแคปซูลได้

**คำสำคัญ :** ไพโรแกลลอล เรด, สารประกอบเชิงซ้อนไดนิวเคลียร์ของคอปเปอร์ (II), กลูตาไรโอน, แอนิเมเบิล

## Abstract

In this research, the dinuclear copper (II) complex containing m-xylene units ( $\text{Cu}_2\text{L}_2$ ) was applied to study the sensing abilities towards anions using Pyrogallol Red (**PGR**) as sensory unit in 10 mM HEPES buffer pH 6. The results demonstrated that the  $[\text{Cu}_2\text{L}_2\cdot\text{PGR}]$  ensemble can be able to sense glutathione (**GSH**) selectively over than other anions, the color of  $[\text{Cu}_2\text{L}_2\cdot\text{PGR}]$  change from blue to orange color of **PGR** in the present of **GSH**. The detection limit of **GSH** was  $0.85 \mu\text{M}$ . The proposed ensemble was successfully applied to determination of glutathione in drug capsule.

**Keyword** : Pyrogallol Red, dinuclear copper (II) complex, glutathione , ensemble

## ประกาศคุณูปการ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยตลอดทั้งโครงการ จาก ทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2563 ของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย บูรพา หมายเลขสัญญา SC11/2563 ขอขอบคุณผู้ทรงคุณวุฒิที่ให้การประเมินข้อเสนอโครงการ ขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ในการดำเนิน โครงการวิจัย ขอขอบพระคุณคณาจารย์ผู้เคยให้ความรู้และอบรมสั่งสอนที่ผ่านมาทุกท่าน

สุดท้ายนี้ผู้เขียนต้องขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา รวมไปถึงพี่น้องและเพื่อนๆ ทุกคนที่คอยให้ คำแนะนำ และให้กำลังใจตลอดระยะเวลาในการดำเนินโครงการวิจัยนี้ จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สรายุทธ เวชสิทธิ์

มิถุนายน 2564

## สารบัญ

	หน้า
<b>บทนำ</b>	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา	2
1.3 ขอบเขตการศึกษา	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
<b>ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b>	4
2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	4
2.1.1 ความสำคัญของกลูตาไธโอน	4
2.1.2 เคมีซูปราโมเลกุล (Supramolecular chemistry)	5
2.1.3 ทฤษฎีการดูดกลืนแสงของเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี	7
2.1.4 การเปลี่ยนแปลงระดับพลังงาน (Electronic transition) ของสารอินทรีย์	8
2.1.5 อิทธิพลที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเฉดสี	9
2.1.6 กฎของบีเยร์-แลมเบิร์ต (Beer and Lambert's Law)	10
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	11
<b>วิธีดำเนินการทดลอง</b>	17
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์	17
3.2 สารเคมี	17
3.3 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน $\text{Cu}_2\text{L}_2$	19
3.4 การเตรียมสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6	20
3.5 การศึกษาความจำเพาะในการตรวจวัดแอนไอออนชนิดต่างๆ ของแอนิเมเบิลที่เตรียมจากสารประกอบ $\text{Cu}_2\text{L}_2$ กับอินดิเคเตอร์ PGR โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี	20

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.5.1 การเตรียมสารละลาย $\text{Cu}_2\text{L}_2$ ความเข้มข้น 20 $\mu\text{M}$ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร	20
3.5.2 การเตรียมสารละลาย PGR ความเข้มข้น 400 $\mu\text{M}$ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร	21
3.5.3 การเตรียมสารละลายแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร	21
3.5.4 วิธีการทดลอง	22
3.6 การหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนไซม์ของสารประกอบ $\text{Cu}_2\text{L}_2$ กับอินดิเค-เตอร์ PGR โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน	23
3.6.1 เตรียมสารละลาย $\text{Cu}_2\text{L}_2$ ความเข้มข้น 400 $\mu\text{M}$ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร	23
3.6.2 เตรียมสารละลาย PGR ความเข้มข้น 20 $\mu\text{M}$ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร	23
3.6.3 วิธีการทดลอง	23
3.7 การหาอัตราส่วนในการเกิดเอนไซม์ของสารประกอบ $\text{Cu}_2\text{L}_2$ กับ PGR โดยวิธี Job's method	23
3.7.1 การเตรียมสารละลาย $\text{Cu}_2\text{L}_2$ ความเข้มข้น 20 $\mu\text{M}$ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร	23
3.7.2 การเตรียมสารละลาย PGR ความเข้มข้น 20 $\mu\text{M}$ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร	24
3.7.3 วิธีการทดลอง	24
3.8 การศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง $\text{Cu}_2\text{L}_2$ กับ GSH โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน	25
3.8.1 การเตรียมเอนไซม์ของสารประกอบ $\text{Cu}_2\text{L}_2$ กับ PGR ความเข้มข้น 20 $\mu\text{M}$ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร	25
3.8.2 การเตรียมสารละลาย GSH ความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร	25

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.8.3 วิธีการทดลอง	25
3.9 การศึกษาการตรวจวัด GSH ด้วยเอนไซม์เบิล [Cu <sub>2</sub> L <sub>2</sub> •PGR] โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมทรีภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและปราศจากออกซิเจน	27
3.9.1 ศึกษาการตรวจวัด GSH ด้วยเอนไซม์เบิล [Cu <sub>2</sub> L <sub>2</sub> •PGR] โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรีภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน	27
3.9.2 ศึกษาการตรวจวัด GSH ด้วยเอนไซม์เบิล [Cu <sub>2</sub> L <sub>2</sub> •PGR] โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรีภายใต้สภาวะที่ปราศจากออกซิเจน	28
3.9.3 วิธีการทดลอง	29
3.10 การศึกษาผลการรบกวนของไอออนชนิดต่าง ๆ ต่อการตรวจวัด GSH ด้วยเอนไซม์-เบิล [Cu <sub>2</sub> L <sub>2</sub> •PGR] โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี	29
3.10.1 การเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง [Cu <sub>2</sub> L <sub>2</sub> •PGR] + GSH ความเข้มข้น 20 µM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร	29
3.10.2 การเตรียมสารละลายไอออนชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 1 mM	30
3.10.3 วิธีการทดลอง	30
3.11 การวิเคราะห์ปริมาณกลูตาไธโอนในตัวอย่างยาแคปซูลโดยใช้ยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี	30
3.11.1 การเตรียมเอนไซม์เบิลของสารประกอบ Cu <sub>2</sub> L <sub>2</sub> กับ PGR ความเข้มข้น 20 µM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร	30
3.11.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน GSH ความเข้มข้น 500 µM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร	30
3.11.3 การเตรียมตัวอย่าง	30
3.11.4 วิธีการทดลอง	31
<b>ผลการทดลองและอภิปรายผล</b>	<b>32</b>
4.1 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน Cu <sub>2</sub> L <sub>2</sub>	32

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2 การศึกษาความจำเพาะในการตรวจวัดแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ของแอน เชมเบิลที่เตรียมจากสารประกอบ $\text{Cu}_2\text{L}_2$ กับอินดิเคเตอร์ PGR โดยใช้ เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี	34
4.3 การหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดแอนเชมเบิลของสารประกอบ $\text{Cu}_2\text{L}_2$ กับอินดิเคเตอร์ PGR โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน	36
4.4 การหาอัตราส่วนในการเกิดแอนเชมเบิลของสารประกอบ $\text{Cu}_2\text{L}_2$ กับ PGR โดยวิธี Job's method	37
4.5 การศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง $\text{Cu}_2\text{L}_2$ กับ GSH โดยใช้ เทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน	39
4.6 การศึกษาการรบกวนของไอออนชนิดต่าง ๆ ต่อการตรวจวัด GSH ด้วย แอนเชมเบิล $[\text{Cu}_2\text{L}_2\cdot\text{PGR}]$ โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี	42
4.7 การหาขีดจำกัดการในการตรวจวัด GSH ด้วยแอนเชมเบิล $[\text{Cu}_2\text{L}_2\cdot\text{PGR}]$ โดยใช้เทคนิค ยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี	43
4.8 การวิเคราะห์หาปริมาณกลูตาไธโอนในตัวอย่างยาแคปซูลด้วยยูวี- วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมทรี	44
<b>สรุปผลการทดลอง</b>	45



## สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1.1 โครงสร้างของ $\text{Cu}_2\text{L}_2$ , PGR และ GSH	2
รูปที่ 2.1 กลไกของ GSH ที่ถูกออกซิไดซ์ไปเป็น GSSG	4
รูปที่ 2.2 หลักการพื้นฐานของเคมีซูพราโมเลกุล	6
รูปที่ 2.3 หลักการทำงานของเซ็นเซอร์ทางเคมีเชิงแสง	7
รูปที่ 2.4 กระบวนการเปลี่ยนแปลงระดับพลังงานของอิเล็กตรอนจากสถานะพื้นไป ยังสถานะกระตุ้น (ก) การดูดกลืนโฟตอน และ (ข) การเปล่งโฟตอนของ อะตอมหรือโมเลกุล	8
รูปที่ 2.5 แผนภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงระดับพลังงานของสารอินทรีย์	9
รูปที่ 2.6 การเปลี่ยนแปลงความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสง และปริมาณการดูดกลืนแสง จากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของโมเลกุลของสาร	10
รูปที่ 2.7 ขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของคาร์บอนไดออกไซด์ ( $\text{CO}_2$ ) และ โครงสร้างของสารประกอบ $\text{Cu}_2\text{L}_2$	12
รูปที่ 2.8 (A) กลไกของ $1\text{-Cu}^{2+}$ และ Cys/Hcy/GSH (B) สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ สารละลาย $1\text{-Cu}^{2+}$ ที่มีกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ในตัวทำละลาย EtOH-HEPE buffer (3:7 v/v) ความเข้มข้น 0.02M pH 7.4	13
รูปที่ 2.9 (A) ความจำเพาะของ TPE-DCV ต่อ GSH (B) สเปกตรัมฟลูออเรสเซนซ์ของ สารละลาย TPE-DCV ที่มีกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ในตัวทำละลายผสม $\text{H}_2\text{O}/\text{ethanol}$ (68:32, v/v) และ (C) ปฏิกิริยาของ TPE-DCV กับ thiol	14
รูปที่ 2.10 โครงสร้างของสารประกอบ ADS และสเปกตรัมฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลาย ADS ที่มีแอนไอออนชนิดต่างๆ ในตัวทำละลาย PBS/ $\text{CH}_3\text{CN}$	15
รูปที่ 2.11 โครงสร้าง EQR-S และกราฟความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของ EQR-S ใน HEP buffer ความเข้มข้น 50 mM pH 7.4 ที่ทำการเติมแอนไอออนชนิดต่างๆ ลง (1=GSH, 2=Cys, 3=Hcy, 4=glycine, 5=leucine, 6=alanine, 7=tyrosine, 8=proline, 9=methionine, 10=glutamine, 11=tryptophan, 12=OCl 13= $\text{H}_2\text{O}_2$ , 14=OH)	15

## สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 2.12 โครงสร้าง $L-Cu^{2+}$ และสเปกตรัมฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลาย $L-Cu^{2+}$ ที่มีแอนไอออนชนิดต่างๆ ในตัวทำละลาย $CH_3CN/HEPES$ (3/2 V/V, pH 7.2-7.4)	16
รูปที่ 3.1 แผนภาพการสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน $Cu_2L_2$	19
รูปที่ 4.1 แผนภาพการสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน $Cu_2L_2$	32
รูปที่ 4.2 $^1H-NMR$ สเปกตรัมของลิแกนด์ $L$ ในตัวทำละลาย $CDCl_3$	33
รูปที่ 4.3 $^{13}C-NMR$ สเปกตรัมของลิแกนด์ $L$ ในตัวทำละลาย $CDCl_3$	34
รูปที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเอนไซม์เบิล $[Cu_2L_2 \cdot PGR]$ ในสภาวะที่มีแอนไอออนชนิดต่างๆ ในสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6	35
รูปที่ 4.5 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายเอนไซม์เบิล $[Cu_2L_2 \cdot PGR]$ (20 $\mu M$ ) ที่มีแอนไอออนชนิดต่างๆ (1 mM) ในสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6	36
รูปที่ 4.6 ยูวี-วิสิเบิลไทเทรชันสเปกตรัมของสารละลาย PGR (20 $\mu M$ ) ด้วยสารละลาย $Cu_2L_2$ (400 $\mu M$ ) ในสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6	37
รูปที่ 4.7 การหาอัตราส่วนในการเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสารละลาย $Cu_2L_2$ (20 $\mu M$ ) กับสารละลาย PGR (20 $\mu M$ ) ในสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 โดยวิธี Job's Method	38
รูปที่ 4.8 โครงสร้างที่เป็นไปได้ของสปีชีส์ $[Cu_2L_2 \cdot PGR]$	38
รูปที่ 4.9 ยูวี-วิสิเบิลไทเทรชันสเปกตรัมของสารละลายเอนไซม์เบิล $[Cu_2L_2 \cdot PGR]$ (20 $\mu M$ ) ด้วยสารละลาย GSH (1 mM) ในสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6	39
รูปที่ 4.10 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับเวลา (นาที) ของสารละลาย $[Cu_2L_2 \cdot PGR]$ (20 $\mu M$ ) ที่มีสารละลาย GSH (1 mM) ในสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 (a) ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน (b) ภายใต้สภาวะที่ปราศจากออกซิเจน และ (c) กลไกการตรวจวัดกลูตาไธโอนด้วยเอนไซม์เบิล $[Cu_2L_2 \cdot PGR]$ ในสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH6 ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน	41

## สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

- รูปที่ 4.11 การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเอนไซม์เบิล  $[\text{Cu}_2\text{L}_2\cdot\text{PGR}]$  เมื่อเติม สารละลาย GSH เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะ (a) ที่มีออกซิเจน และ (b) ที่ปราศจากออกซิเจน ในสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 41
- รูปที่ 4.12 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย  $[\text{Cu}_2\text{L}_2\cdot\text{PGR}]+\text{GSH}$  (20  $\mu\text{M}$ ) กับ สารละลายแอนไอออนชนิดต่างๆ (1 mM) ในสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 ที่ความยาวคลื่น 567 nm 42
- รูปที่ 4.13 การหาขีดจำกัดในการตรวจวัดสารละลาย GSH โดยใช้เอนไซม์เบิล  $[\text{Cu}_2\text{L}_2\cdot\text{PGR}]$  43

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1 น้ำหนักและปริมาตรของแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการเตรียมสารละลาย	21
ตารางที่ 3.2 สภาวะการทดลองสำหรับการหาอัตราส่วนในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง $\text{Cu}_2\text{L}_2$ กับ PGR	24
ตารางที่ 3.3 สภาวะการทดลองสำหรับการศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง GSH กับ $[\text{Cu}_2\text{L}_2\cdot\text{PGR}]$	26
ตารางที่ 3.4 สภาวะการทดลองเพื่อวิเคราะห์ปริมาณกลูตาไธโอนในตัวอย่างยาแคปซูลโดยใช้วิธี Standard addition	31
ตารางที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณกลูตาไธโอนในตัวอย่างยาแคปซูลโดยใช้ยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรีเทียบกับปริมาณที่วิเคราะห์ได้จากวิธีมาตรฐานโดยใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรโฟโตเมทรี	44

## บทที่ 1

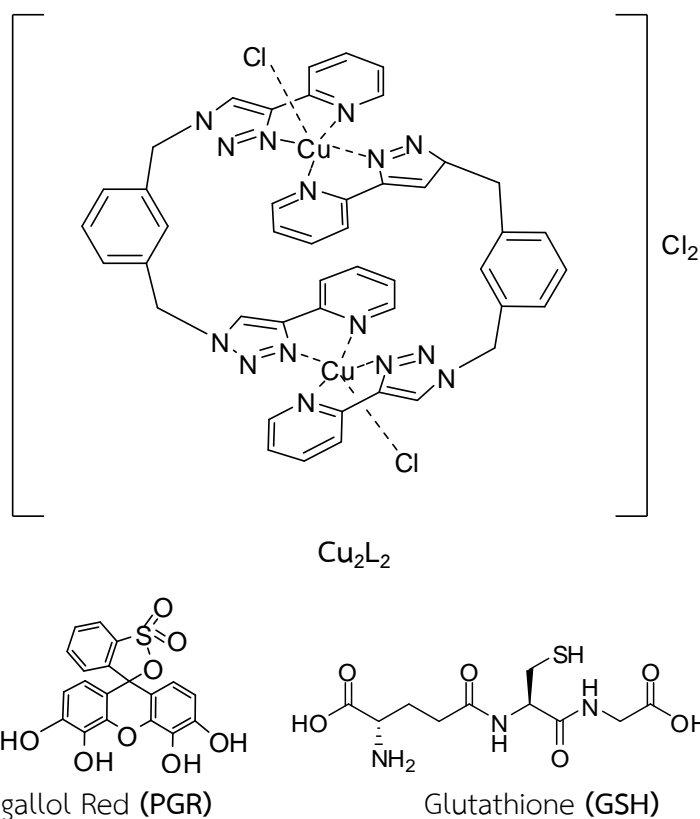
### บทนำ

#### 1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันกลูตาไธโอน (Glutathione หรือ GSH) ได้รับความสนใจจากศาสตร์มากมายหลายแขนง เนื่องจากมีบทบาทสำคัญในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Gaucher *et al.*, 2018) สามารถพบได้ทั่วไปในเซลล์ต่างๆ ของร่างกายโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเซลล์ตับ ในภาวะการเกิดโรคหรือภาวะความผิดปกติของร่างกาย บางอย่าง เช่น โรคพาร์กินสัน โรคอัลไซเมอร์โรคเบาหวาน (Mischley *et al.*, 2016) โรคมะเร็ง (Kennedy *et al.*, 2020) การได้รับรังสีสารพิษ สารเคมี โลหะหนักบางชนิด เป็นต้น ภาวะเหล่านี้จะทำให้ร่างกายเข้าสู่ภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) ซึ่งจะนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระ กลูตาไธโอนจึงมีความสำคัญในบทบาทของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น นอกจากนี้ยังมีแนวคิดในการนำกลูตาไธโอนมาใช้ในด้านความสวยงามและช่วยให้ผิวขาว อันเนื่องมาจากได้มีการค้นพบโดยบังเอิญว่าผู้ป่วยโรคมะเร็งระยะสุดท้ายที่ได้รับการฉีดกลูตาไธโอนเพื่อเพิ่ม ภูมิคุ้มกันกลับพบว่าผิวขาวขึ้นและสีผิวอ่อนลง ซึ่งอธิบายได้จากการที่ร่างกายมีปริมาณกลูตาไธโอนสูงกว่าภาวะปกติมีผลยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่เกี่ยวข้องกับเม็ดสีผิว ทำให้เม็ดสีผิวเปลี่ยนจากสีน้ำตาลดำเป็น สีขาวชมพู ซึ่งจะมองดูผิวพรรณออกขาวชมพูมากขึ้น (Villarama and Maibach, 2005) แต่ปัจจุบันยังไม่พบงานวิจัยทางการแพทย์ที่น่าเชื่อถือใดๆ ที่สามารถยืนยันได้ว่ากลูตาไธโอนสามารถทำให้ผิวขาวขึ้นได้จริง ซึ่งเทคนิคที่นิยมใช้ในการตรวจวัด กลูตาไธโอน ได้แก่ Resonance Elastic Light Scattering (RELS) Spectroscopy (Stobiecka *et al.*, 2010), Electrochemiluminescence (ECL) method (Xu *et al.*, 2016) และ High-performance Liquid Chromatography, HPLC (Yu *et al.*, 2016) แต่การตรวจวัดด้วยเทคนิคดังกล่าวนี้ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง หรือในบางเทคนิคจำเป็นต้องอาศัยขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยาก

ดังนั้นในปัจจุบันนิยมนำเทคนิคเซนเซอร์ทางเคมีเชิงแสง มาใช้ในการตรวจวัดกลูตาไธโอนซึ่งข้อดีของการใช้เทคนิคนี้คือ ตรวจวัดได้ง่ายและรวดเร็ว สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า มีสภาพไวและความจำเพาะที่ดี ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ต่ำ สามารถประยุกต์ใช้ตรวจวัดในภาคสนามและไม่จำเป็นต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ (จอมใจ สุกใส, 2009)

ในงานวิจัยนี้ได้นำสารประกอบ  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  มาใช้เป็นหน่วยรีเซปเตอร์ในการตรวจวัดกลูตาไธโอน และใช้อินดิเคเตอร์ Pyrogallol Red (PGR) ทำหน้าที่เป็นหน่วยให้สัญญาณ ซึ่งโครงสร้างของสารประกอบ  $\text{Cu}_2\text{L}_2$ , PGR และ Glutathione (GSH) แสดงได้ในรูปที่ 1.1



รูปที่ 1.1 โครงสร้างของ  $Cu_2L_2$ , PGR และ GSH

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำสารประกอบ  $Cu_2L_2$  และอินดิเคเตอร์ PGR มาใช้ในการตรวจวัด GSH ด้วยเทคนิคคัลลอร์ิเมตริกเซนเซอร์

## 1.3 ขอบเขตการศึกษา

1. ศึกษาการนำสารประกอบ  $Cu_2L_2$  และอินดิเคเตอร์ PGR มาใช้ในการตรวจวัด GSH ด้วยเทคนิคคัลลอร์ิเมตริกเซนเซอร์ในสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6
2. ศึกษาค่าทางการวิเคราะห์ ได้แก่ ช่วงความเป็นเส้นตรง (Linear range) และขีดจำกัดของการตรวจวัด (Limit of detection, LOD)
3. ศึกษาประสิทธิภาพในการวิเคราะห์กลูตาไธโอนในตัวอย่างยาแคปซูล ด้วยเทคนิคคัลลอร์ิเมตริกเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นเทียบกับวิธีมาตรฐาน

#### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถนำสารประกอบ  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  มาใช้ในการตรวจวัด GSH โดยใช้เทคนิคัลลอริเมตริกเซนเซอร์และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัด GSH ในตัวอย่างจริงได้

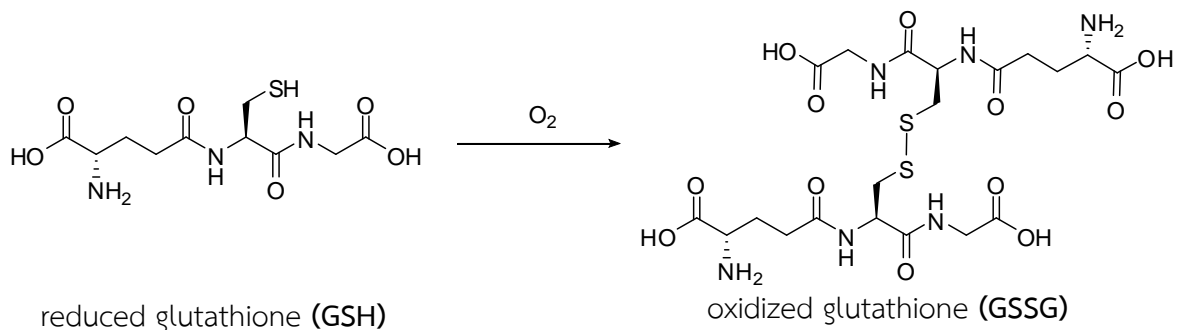
## บทที่ 2

## ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## 2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

## 2.1.1 ความสำคัญของกลูตาไธโอน (คีโรมิล และคณะ, 2555)

กลูตาไธโอน (Glutathione) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เซลล์ในร่างกายมนุษย์สามารถสังเคราะห์ได้เอง มีคุณสมบัติเป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง ทำหน้าที่ปกป้องเนื้อเยื่อไม่ให้เกิดการทำลายโดยสารอนุมูลอิสระที่สะสมอยู่ตามส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย กระตุ้นภูมิคุ้มกันและที่สำคัญยังช่วยดับในการทำลายและขจัดสารพิษออกจากร่างกาย ซึ่งกลูตาไธโอนประกอบด้วยกรดอะมิโน 3 ตัว ได้แก่ L-cysteine, L-glutamate และ glycine ที่จับกับพันธะเปปไทด์ ตามธรรมชาติมี 2 รูปแบบ ได้แก่ reduced glutathione (GSH) และ oxidized glutathione (GSSG) ซึ่งการต้านอนุมูลอิสระในร่างกายมนุษย์นั้น GSH จะถูกออกซิไดซ์ด้วยอนุมูลอิสระ ยกตัวอย่างเช่น เนื้อเยื่อที่อยู่ในภาวะออกซิเดชัน (oxidation stress) จะเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) ภายในเนื้อเยื่อ ร่างกายจะอาศัย GSH เข้าไปสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้กลายเป็นโมเลกุลน้ำ โดย GSH ที่ถูกออกซิไดซ์ด้วยอนุมูลอิสระจะกลายเป็นรูป GSSG ดังรูปที่ 2.1 นอกจากนี้ในปัจจุบันได้มีการนำกลูตาไธโอนรูปแบบ reduced glutathione (GSH) มาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมในรูปยาเม็ดเพื่อเพิ่มความยาวแก่ผู้บริโภคร (Moine *et al.*, 2018) ซึ่ง GSH จะเข้าไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโร-ซิเนส สำหรับการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน ด้วยการจับที่บริเวณที่มีทองแดงเป็นส่วนประกอบ และตามประกาศของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาฉบับราชกิจจานุเบกษา 18 ตุลาคม 2549 ที่ได้กำหนดให้ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมควรมีสัดส่วนประกอบของแอล-กลูตาไธโอน (L-glutathione) ไม่เกิน 250 มิลลิกรัม และเป็นผลิตภัณฑ์ที่แนะนำให้รับประทานได้ไม่เกิน 250 มิลลิกรัม/วัน



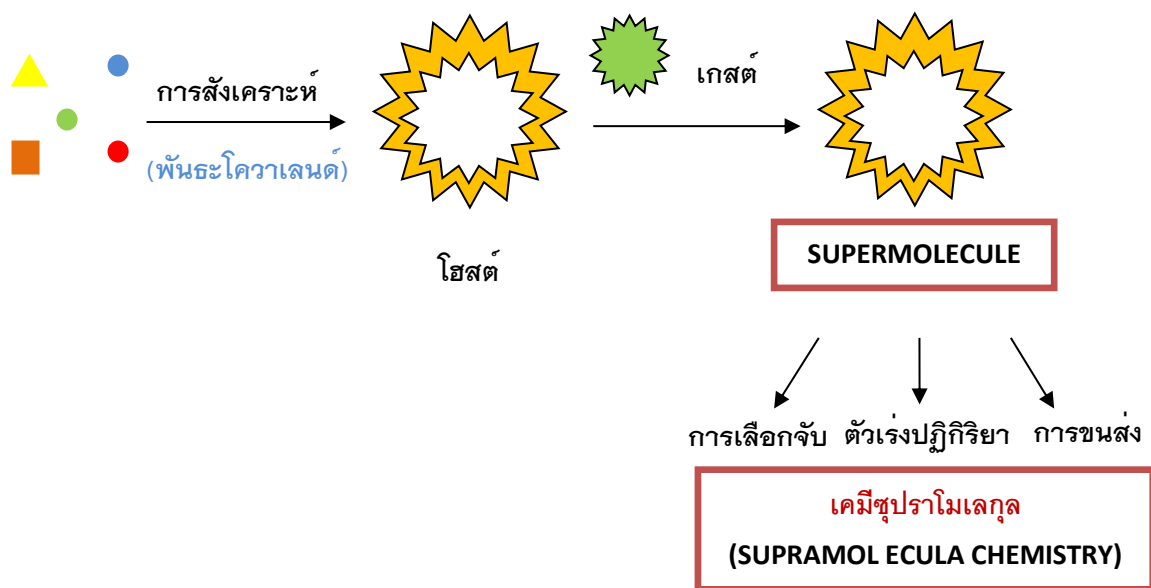
รูปที่ 2.1 กลไกของ GSH ที่ถูกออกซิไดซ์ไปเป็น GSSG



ผลกระทบในระยะสั้นจากการได้รับสารกลูตาไธโอนในปริมาณมาก ได้แก่ ผิวหนังแดง ความดันโลหิตต่ำ หอบหืดเฉียบพลัน (Woelflingseder *et al.*, 2018) และอาจเกิดอาการแพ้ Anaphylactic Reaction จากการปนเปื้อนหรือความไม่บริสุทธิ์ของยา นอกจากนี้ในระยะยาวอาจส่งผลทำให้กระบวนการต้านอนุมูลอิสระของร่างกายเสียสมดุล กลายเป็นอนุมูลอิสระกลับมาทำร้ายร่างกายได้ และการที่ร่างกายได้รับสารกลูตาไธโอนเป็นเวลานานๆ จะทำให้เม็ดสีเมลานินที่จอตาลดลง ทำให้จอตารับแสงได้น้อยลง อาจส่งผลกระทบต่อสายตาได้ในอนาคต และการที่เม็ดสีเมลานินที่ผิวหนังลดลงทำให้ผิวหนังได้รับแสง ultraviolet มากขึ้น ซึ่งอาจเกิดริ้วรอยเหี่ยวย่นได้ง่ายกว่าเดิมและเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งผิวหนัง

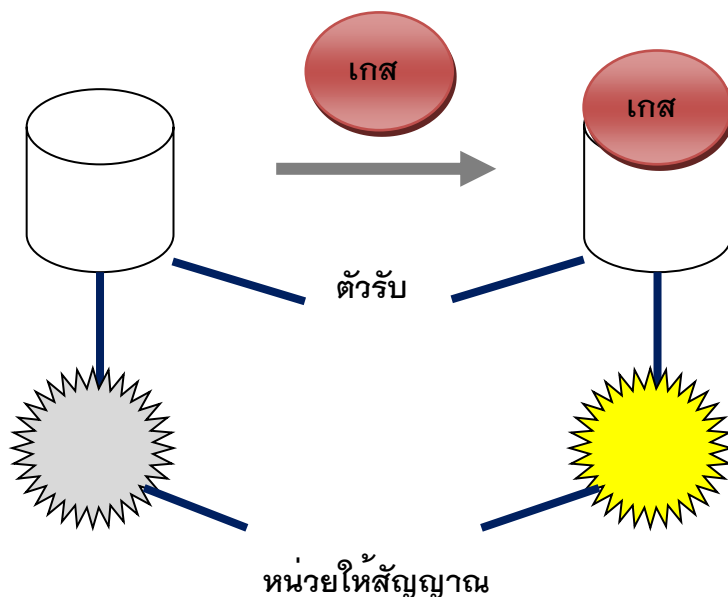
### 2.1.2 เคมีซูพราโมเลกุล (Supramolecular chemistry) (จอมใจ สุกใส, 2009)

เคมีซูพราโมเลกุลหรือเคมีของโฮสต์กับเกสต์ เป็นการศึกษาการเกิดอันตรกิริยาแบบนอนโควาเลนต์ (non-covalent bond) ระหว่างโมเลกุลของตัวรับหรือโฮสต์กับโมเลกุลหรือไอออนที่ต้องการตรวจวัดหรือเกสต์ ตัวอย่างของอันตรกิริยาแบบนอนโควาเลนต์ (non-covalent bond) ได้แก่ พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) แรงดึงดูดทางไฟฟ้า (electrostatic interaction) แคทไอออน-ไพ (cation- $\pi$  interaction) ไพ-ไพ ( $\pi$ - $\pi$  interaction) หลักการพื้นฐานของเคมีซูพราโมเลกุล แสดงดังรูปที่ 2.2 เมื่อโมเลกุลของโฮสต์มาจับกับโมเลกุลของเกสต์แล้ว จะได้ซูเปอร์โมเลกุล (supermolecule) เป็นสารผลิตภัณฑ์ ในปัจจุบันความรู้ทางเคมีซูพราโมเลกุลได้ถูกนำมาศึกษา และพัฒนาประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวางในด้านต่างๆ เช่น การพัฒนาในด้านการแพทย์และสาธารณสุข การพัฒนาตัวเร่งในอุตสาหกรรม และพัฒนาทางด้านนาโนเทคโนโลยี ซึ่งนักเคมีสามารถสังเคราะห์โมเลกุลให้มีโครงสร้างและสมบัติที่เหมาะสมในการนำมาใช้เป็นตัวตรวจจับ (chemical receptor) กับไอออนชนิดต่างๆ



รูปที่ 2.2 หลักการพื้นฐานของเคมีซูพราโมเลกุล (Steed *et al.*, 2009)

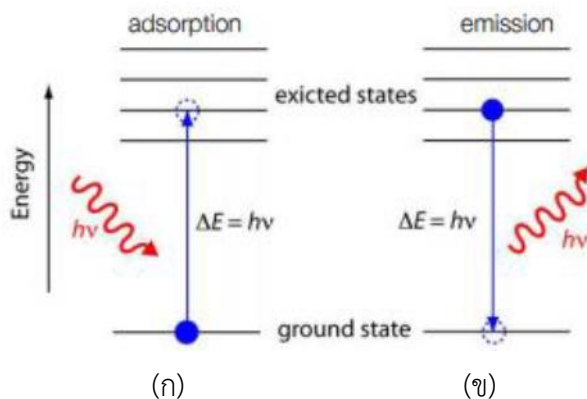
สำหรับโมเลกุลที่นำมาใช้เป็นเซ็นเซอร์ทางเคมีนั้นต้องประกอบด้วย ส่วนที่สำคัญ 2 ส่วน คือ ส่วนที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับ (receptor) เพื่อใช้ในการเลือกจับโมเลกุลเกสต์ที่เราสนใจ และอีกส่วนหนึ่งเป็นตัวทำหน้าที่ให้สัญญาณ (sensory unit) ซึ่งมีสมบัติทางเคมีที่แตกต่างกันออกไป เช่น ให้สัญญาณทางเคมีไฟฟ้า หรือ ให้สีที่แตกต่าง เมื่อโมเลกุลของเกสต์มาจับโมเลกุลโฮสต์โดยเกิดอันตรกิริยาที่ตำแหน่งของตัวรับ ก็ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณในส่วนที่เป็นตัวให้สัญญาณ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณดังกล่าว สามารถตรวจวัดได้โดยใช้เทคนิคทางเคมีวิเคราะห์ เช่น เคมีไฟฟ้า และสเปกโตรโฟโตเมทรี เป็นต้น การทำงานของเซ็นเซอร์ทางเคมีเชิงแสง แสดงได้ดังรูปที่ 2.3 จากรูปจะเห็นได้ว่าเมื่อโมเลกุลของโฮสต์มีการจับกับโมเลกุลของเกสต์จะเกิดการเปลี่ยนแปลงสีในส่วนของหน่วยให้สัญญาณ



รูปที่ 2.3 หลักการทำงานของเซ็นเซอร์ทางเคมีเชิงแสง

### 2.1.3 ทฤษฎีการดูดกลืนแสงของเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี (แมน อมรสิทธิ์ และคณะ, 2554)

เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรีเป็นการศึกษาการดูดกลืนพลังงานของโมเลกุลในช่วงรังสีอัลตราไวโอเล็ตและวิสิเบิล อยู่ในช่วงความยาวคลื่น 190-800 nm ซึ่งเป็นช่วงคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่เรียกว่าช่วงยูวี-วิสิเบิล (UV-Visible) และเนียร์อินฟราเรด (near-infrared) เมื่ออะตอมหรือโมเลกุลดูดกลืนโฟตอน (พลังงาน) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับพลังงาน (transition) จากสถานะพลังงานต่ำ หรือที่เรียกว่าสถานะพื้น (ground state) ไปสู่สถานะพลังงานสูงหรือที่เรียกว่า สถานะกระตุ้น (excited state) ดังรูปที่ 2.4 โดยชนิดการเปลี่ยนแปลงระดับพลังงานขึ้นอยู่กับพลังงานของโฟตอน เมื่ออิเล็กตรอนดูดกลืนพลังงานโฟตอนของแสงย่าน UV-Vis การเปลี่ยนแปลงระดับพลังงานจะเป็นการเลื่อนอิเล็กตรอนวงนอกสุดของอะตอมหรือโมเลกุลจากสถานะพื้นไปยังสถานะกระตุ้น แต่ถ้ากรณีอะตอมหรือโมเลกุลนั้นดูดกลืนรังสีย่าน IR พันธะใดพันธะหนึ่งของโมเลกุล จะเกิดการเปลี่ยนแปลงพลังงานโดยการสั่น (vibration)



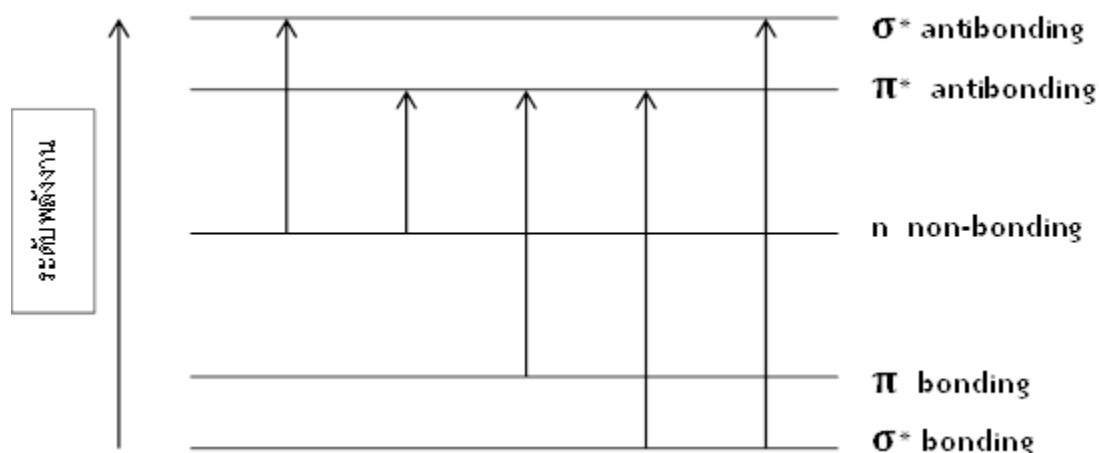
รูปที่ 2.4 กระบวนการเปลี่ยนแปลงระดับพลังงานของอิเล็กตรอนจากสถานะพื้นไปยังสถานะกระตุ้น (ก) การดูดกลืนโฟตอน และ (ข) การปล่อยโฟตอนของอะตอมหรือโมเลกุล

จากรูปที่ 2.4 (ก) แสดงแผนภาพการดูดกลืน (absorption) เมื่อพลังงานโฟตอน ( $h\nu$ ) ชนกับอะตอมหรือโมเลกุล การดูดกลืนจะเกิดขึ้นได้เมื่อความแตกต่างของพลังงาน ( $\Delta E$ ) ระหว่างสถานะพื้นกับสถานะกระตุ้นเท่ากับพลังงานโฟตอน โดยอะตอมหรือโมเลกุลของสารที่สนใจจะถูกกระตุ้นด้วยแหล่งกำเนิดรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าจากภายนอก

สเปกโทรสโกปีแบบเปล่งออก (emission spectroscopy) เป็นการวัดพลังงานของรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าที่คายออกมา เมื่ออะตอมหรือโมเลกุลเกิดการเปลี่ยนแปลงระดับพลังงาน (transition) จากสถานะกระตุ้นไปสู่สถานะพื้น ดังรูปที่ 2.4 (ข) แสดงแผนภาพการเปล่งพลังงาน (emission) อะตอมหรือโมเลกุลในสถานะกระตุ้นจะปลดปล่อยโฟตอนออกมาแล้วกลับสู่สถานะพื้น การเปล่งพลังงานจะเกิดขึ้นได้เมื่อพลังงานโฟตอน ( $h\nu$ ) เท่ากับความแตกต่างของพลังงานระหว่างสถานะพื้นและสถานะกระตุ้นเช่นเดียวกัน

#### 2.1.4 การเปลี่ยนแปลงระดับพลังงาน (Electronic transition) ของสารอินทรีย์ (แมน อมรสิทธิ์ และคณะ, 2554)

สารอินทรีย์เป็นสารกลุ่มใหญ่ที่สามารถตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลได้ ซึ่งการเปลี่ยนระดับพลังงานที่เกี่ยวข้องกับ  $\sigma$ ,  $\pi$  และ  $n$  โดยอิเล็กตรอนของโมเลกุลาร์ออร์บิทัลที่เป็นพันธะระหว่างอะตอม C, H, N และ O จะพบในสารประกอบอินทรีย์ ลักษณะสเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่ได้นี้ ในบางกรณีจะสามารถบอกได้ว่าฟิสิกส์หรือช่วงการดูดกลืนคลื่นแถบใดเป็นของโมเลกุลาร์ออร์บิทัล (Molecular Orbital, MO) ได้นอกจากนี้ค่าคงที่การดูดกลืนแสง  $\epsilon$  ( $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ ) ของแต่ละสาร สามารถคำนวณได้จากค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นหนึ่ง ๆ ( $\lambda$ ) โดยการเปลี่ยนระดับพลังงานของสารอินทรีย์ จะมีอยู่ 4 แบบ ดังแสดงในรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 แผนภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงระดับพลังงานของสารอินทรีย์

1. การทรานซิชันชนิด  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  เกิดจากการดูดกลืนแสงในช่วง far UV (190-250 nm) ซึ่งมีพลังงานมากพอที่จะทำให้อิเล็กตรอนในพันธะเดี่ยวเปลี่ยนสถานะจาก  $\sigma$  bonding MO ไปยัง  $\sigma^*$  Anti-bonding MO ดังนั้นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัวที่มีแต่พันธะเดี่ยวจึงไม่ดูดกลืนแสงในช่วง near UV (250-350 nm) ได้
2. การทรานซิชันชนิด  $n \rightarrow \sigma^*$  เป็นการกระตุ้นอิเล็กตรอนที่ไม่เกิดพันธะของอะตอม O, N, S และ Cl ใน non-bonding MO ไปยัง Anti-bonding  $\sigma^*$  MO
3. การทรานซิชันจาก  $n \rightarrow \pi^*$  เกิดจากอิเล็กตรอนใน non-bonding MO เปลี่ยนสถานะไปอยู่ที่ระดับพลังงานสูงขึ้น Anti-bonding  $\pi^*$  MO เป็นการดูดกลืนแสงในช่วงพลังงานต่ำ ส่วนใหญ่เกิดกับสารประกอบอินทรีย์ที่มีอะตอมหลายชนิด และเป็นสารประกอบที่มีพันธะคู่ และอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยว
4. การทรานซิชันจาก  $\pi \rightarrow \pi^*$  เกิดจากอิเล็กตรอนเปลี่ยนสถานะจาก  $\pi$ -bonding MO ไปยัง Anti-bonding  $\pi^*$  MO การทรานซิชันชนิดนี้ต้องมีหมู่หรือพันธะที่ไม่อิ่มตัว

### 2.1.5 อิทธิพลที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเฉดสี (แม้น อมรสิทธิ์ และคณะ, 2554)

สีที่เกิดจากการคายพลังงานแสงที่อิเล็กตรอนดูดเข้าไป จากสถานะกระตุ้นสู่สถานะพื้น โดยสารแต่ละชนิดมีสีที่แตกต่างกันได้เพราะมีการดูดและคายพลังงานของอิเล็กตรอนไม่เท่ากัน และให้สเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่แตกต่างกันขึ้นกับลักษณะโครงสร้างของโมเลกุล โดยเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลของสาร จะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสง และปริมาณการดูดกลืนแสง

รวมถึงความเข้มของสี ซึ่งสิ่งเหล่านี้ส่งผลถึงสีที่ปรากฏให้เห็น โดยอิทธิพลที่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงความยาวคลื่นของสาร คือ

อิทธิพลที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเฉดสี แบ่งเป็น 2 ประเภท ดังนี้

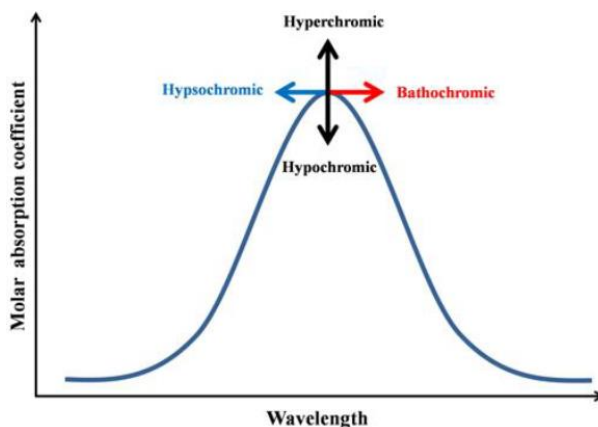
1. Bathochromic (red shift) คืออิทธิพลที่ทำให้โมเลกุลดูดกลืนแสงเลื่อนไปทางความยาวคลื่นยาวขึ้น ( $\lambda_{max}$  เพิ่ม)

2. Hypsochromic (blue shift) คืออิทธิพลที่ทำให้โมเลกุลดูดกลืนแสงเลื่อนไปทางความยาวคลื่นสั้นลง ( $\lambda_{max}$  ลด)

และอิทธิพลที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความเข้มสี แบ่งเป็น 2 ดังนี้

1. Hyperchromic คืออิทธิพลที่ทำให้โมเลกุลดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น ( $\epsilon_{max}$  เพิ่ม)

2. Hypochromic คืออิทธิพลที่ทำให้โมเลกุลดูดกลืนแสงลดลง ( $\epsilon_{max}$  ลด)



**รูปที่ 2.6** การเปลี่ยนแปลงความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสง และปริมาณการดูดกลืนแสงจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของโมเลกุลของสาร

### 2.1.6 กฎของบีเยร์-แลมเบิร์ต (Beer and Lambert's Law) (วิสุทธิ กังวานตระกูล, 2546)

กฎของแลมเบิร์ต (Lambert's law) กล่าวว่า “ถ้าเพิ่มความกว้างของของระยะทางที่แสงเดินทางผ่านสารละลาย ค่าการดูดกลืนแสงจะมากขึ้นตามอย่างเปนสัดส่วน” สรุปคือ ค่าดูดกลืนแสงของสารละลายจะแปรผันตามความกว้างของสารละลายที่แสงผ่าน

กฎของบีเยร์ (Beer's law) กล่าวว่า “ถ้าสารละลายมีความเข้มข้นมากขึ้นค่าดูดกลืนแสงของสารละลายจะมากขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น ในทางกลับกันถ้าสารละลายมีความเข้มข้นลดลงค่าการดูดกลืนแสงจะลดลงเช่นกัน” สรุปคือ ค่าดูดกลืนแสงของสารละลายจะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารละลาย

เมื่อรวมกฎของเบียร์กับกฎของแลมเบิร์ตจะได้ว่า ปริมาณความเข้มของแสงที่ถูกดูดกลืน จะขึ้นอยู่กับทั้งความเข้มข้นของสารละลายและความหนาของสารละลายที่ลำแสงต้องผ่าน เรียกว่า “กฎของเบียร์และแลมเบิร์ต” (Beer and Lamberts' law)

$$A = \epsilon bc \quad (2.1)$$

- เมื่อ
- A = ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance)
  - $\epsilon$  = ค่า molar absorptivity ( $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ )
  - b = ความหนาของตัวกลางที่แสงผ่าน (cm)
  - c = ความเข้มข้นของสารดูดกลืน ( $mol/L$ )

จากสมการที่ 2.1 เรียกสั้นๆ ว่า กฎของเบียร์ (Beer's law) สามารถใช้คำนวณค่าสภาพดูดกลืน เป็นโมลาร์ (molar absorptivity) ของสปีชีส์ที่สามารถดูดกลืนแสงได้ ในกรณีที่ทราบความเข้มข้นของสปีชีส์นั้น ๆ หรือในทำนองกลับกัน กฎของเบียร์สามารถใช้หาความเข้มข้นของสปีชีส์เมื่อทราบสภาพดูดกลืนเป็นโมลาร์ ( $\epsilon$ ) และความหนาของตัวกลาง (b)

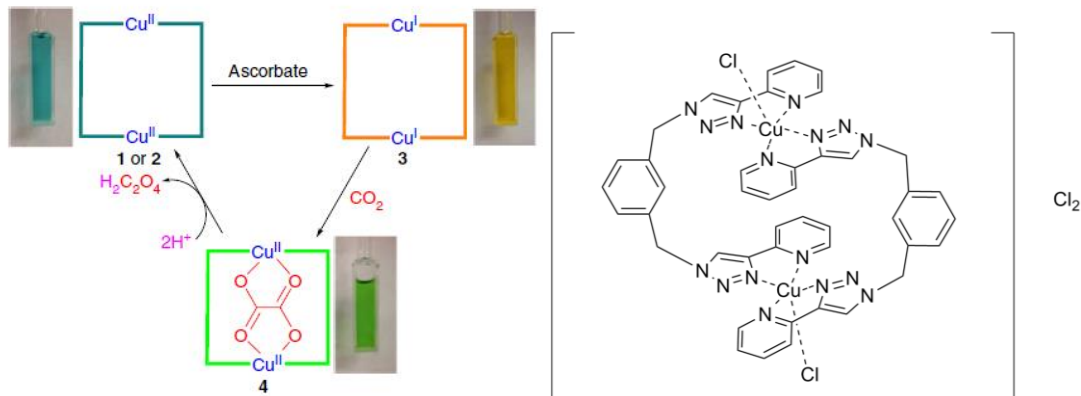
หลักการดูดกลืนแสงของสารใดๆ ตามกฎของเบียร์เป็นดังนี้

1. รังสีเป็นรังสีชนิดลำแสงขนาน และความยาวคลื่นเดียว (parallel monochromatic radiation)
2. รังสีตั้งฉากกับพื้นผิว
3. สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneous solution) และต้องไม่ทำให้เกิดการกระเจิงแสง
4. ใช้สารละลายมีความเข้มข้นที่เจือจาง (น้อยกว่า  $0.01 \text{ mol/L}$ )

## 2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Uttam R. Pokharel และคณะ ศึกษาปฏิกิริยารีดักชันของคาร์บอนไดออกไซด์ ( $CO_2$ ) เพื่อให้ได้ออกซาเลต (oxalate) ในรูปไอออนโดยใช้สารประกอบเชิงซ้อน  $Cu_2L_2$  ซึ่งในการเกิดปฏิกิริยามีทั้งหมด 3 ขั้นตอน โดยในขั้นตอนแรก  $Cu^{2+}$  ไอออน (1 or 2) ในสารประกอบเชิงซ้อน  $Cu_2L_2$  จะถูกรีดิวซ์ไปเป็น  $Cu^+$  ไอออน (3) โดยใช้ Sodium ascorbate เป็นตัวออกซิไดซ์ ซึ่งสารประกอบเชิงซ้อนที่ได้จะเกิดปฏิกิริยากับ  $CO_2$  ในอากาศ

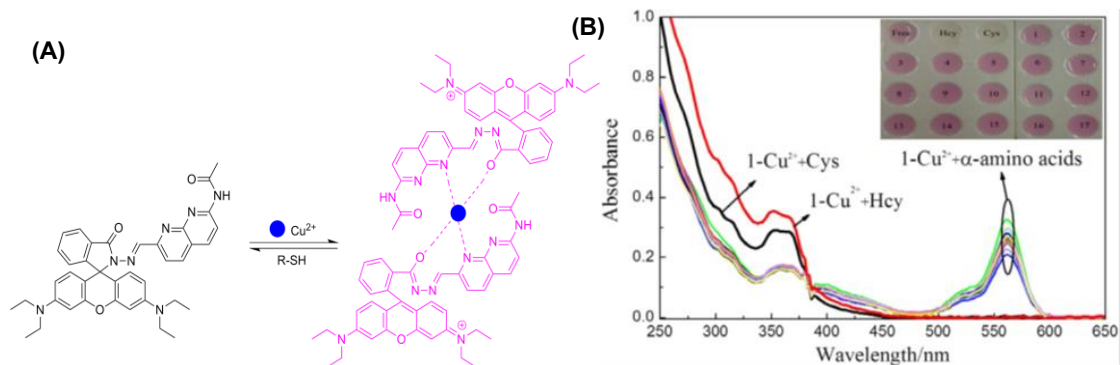
ทำให้อะตอมคอปเปอร์ทั้ง 2 อะตอมเกิดการจับกับไอออนออกซาเลต (4) จากนั้นไอออนออกซาเลตจะถูกปล่อยออกมาในรูปของกรดออกซาลิกด้วยการเติมกรด นอกจากนี้ยังได้สารประกอบเชิงซ้อน  $\text{Cu}^{2+}$  ไอออนกลับมามีเดิม ตามกลไกในรูปที่ 2.7 ซึ่งในงานวิจัยนี้ถือว่าประสบความสำเร็จในการนำสารประกอบเชิงซ้อน  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  มาใช้จับไอออนออกซาเลต



รูปที่ 2.7 ขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของคาร์บอนไดออกไซด์ ( $\text{CO}_2$ ) และโครงสร้างของสารประกอบ  $\text{Cu}_2\text{L}_2$

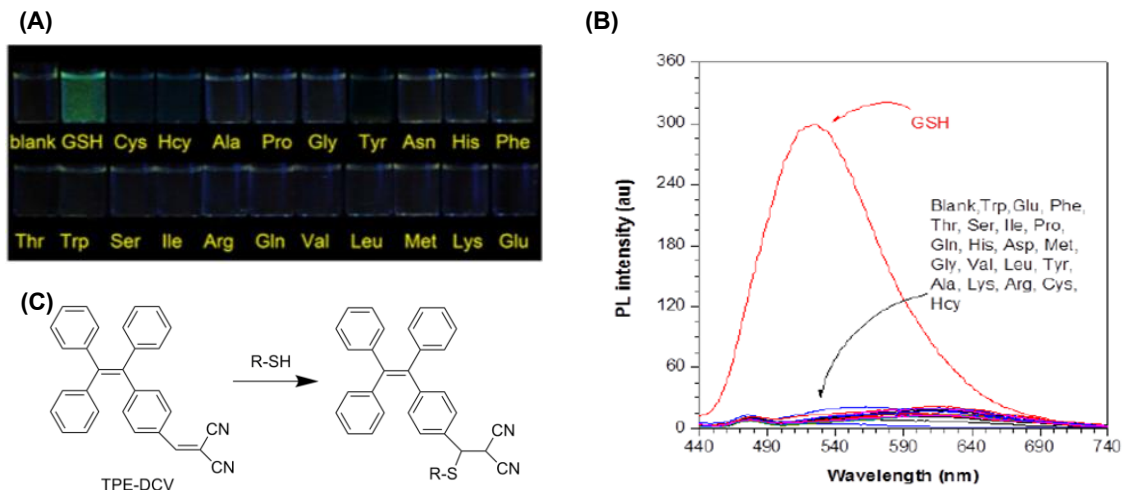
Jun Feng Zhang และคณะ (Duan *et al.*, 2012) ได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ rhodamine B ที่มีหมู่ 1,8-naphthyridine เป็นองค์ประกอบ (1) จากการศึกษาพบว่าสารประกอบ 1 สามารถเกิดเป็นสารเชิงซ้อนกับ  $\text{Cu}^{2+}$  ไอออนได้ในระบบตัวทำละลาย EtOH-HEPES buffer (3:7 v/v) ความเข้มข้น 0.02 M pH 7.4 โดยมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 562 nm และสีของสารละลายเปลี่ยนจากใสไม่มีสีเป็นสีชมพู เนื่องมาจากการเปิดวงของ rhodamine B จากนั้นเมื่อนำสารเชิงซ้อน  $1\text{-Cu}^{2+}$  มาศึกษาความจำเพาะกับกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ในระบบตัวทำละลายเดียวกัน พบว่ามีเพียงแค่ว่า Cys, Hcy และ GSH ที่ส่งผลให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 nm ลดลง และสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีชมพูไปเป็นใสไม่มีสี ดังแสดงในรูปที่ 2.8





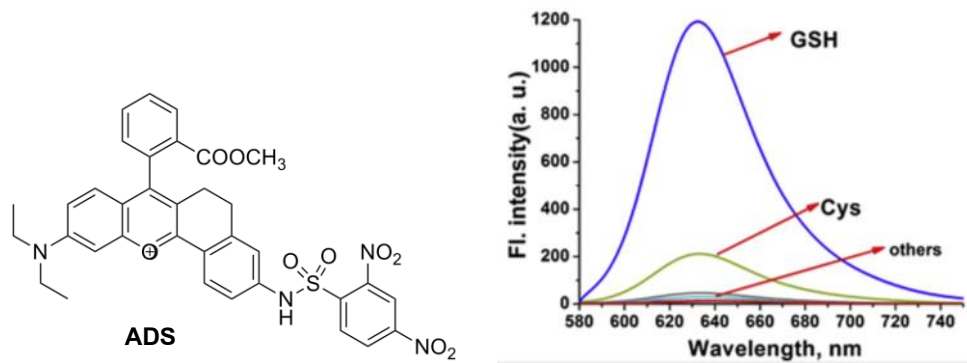
รูปที่ 2.8 (A) กลไกของ  $1\text{-Cu}^{2+}$  และ Cys/Hcy/GSH (B) สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลาย  $1\text{-Cu}^{2+}$  ที่มีกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ในตัวทำละลาย EtOH-HEPES buffer (3:7 v/v) ความเข้มข้น 0.02M pH 7.4

Xiaoding Lou และคณะ (Lou *et al.*, 2014) ได้ทำการออกแบบและสังเคราะห์อนุพันธ์ของ TPE ให้ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อน TPE-DCV เพื่อนำไปเป็นตัวตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ที่ใช้ในการตรวจวัด GSH ในระบบตัวทำละลายผสม  $\text{H}_2\text{O}$ /ethanol (68:32, v/v) ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเมื่อกระตุ้นสารละลายที่มีความยาวคลื่น 415 nm ไม่ปรากฏสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารประกอบ TPE-DCV แต่เมื่อทำการเติม GSH ลงไปในสารละลาย TPE-DCV และกระตุ้นสารละลายที่มีความยาวคลื่น 415 nm จะปรากฏสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่มีความยาวคลื่น 523 nm ในขณะที่กรดอะมิโนอื่น ๆ ทั้งหมดรวมถึง Cys และ Hcy ไม่ทำให้เกิดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่มีความยาวคลื่นดังกล่าวแต่อย่างใด ดังแสดงในรูปที่ 2.9 นอกจากนี้ยังได้นำระบบการตรวจวัด GSH ดังกล่าวไปประยุกต์ใช้เป็นตัวตรวจวัด GSH ในเซลล์สิ่งมีชีวิตได้อีกด้วย



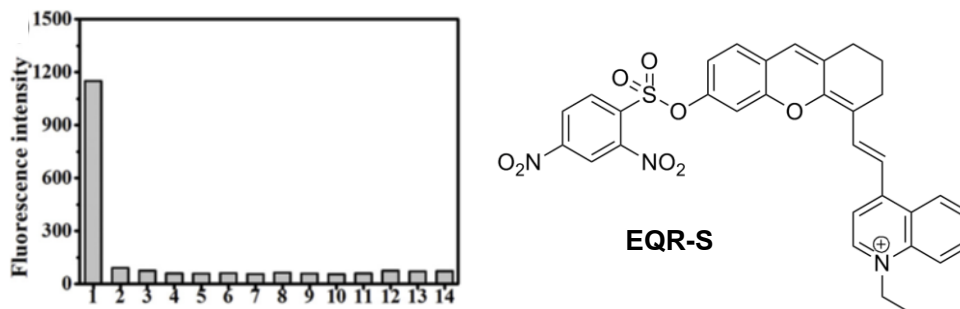
รูปที่ 2.9 (A) ความจำเพาะของ TPE-DCV ต่อ GSH (B) สเปกตรัมฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลาย TPE-DCV ที่มีกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ในตัวทำละลายผสม H<sub>2</sub>O/ethanol (68:32, v/v) และ (C) ปฏิกิริยาของ TPE-DCV กับ thiol

Yichao Wan และคณะ (Wan *et al.*, 2019) ได้ทำการสังเคราะห์สารประกอบ ADS ขึ้นมา เพื่อนำไปเป็นตัวตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ที่ใช้ในการตรวจวัด GSH ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์เซนเซอร์แบบกลไก PET ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเมื่อกระตุ้นที่ความยาวคลื่น 550 nm พบว่าสารประกอบ ADS ในตัวทำละลาย PBS/CH<sub>3</sub>CN (8/2 V/V, pH 7.4) ให้สัญญาณที่ต่ำ แต่เมื่อทำการเติม GSH ลงไปในสารละลาย ADS ส่งผลให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เพิ่มขึ้นที่ความยาวคลื่น 630 nm ดังแสดงในรูปที่ 2.10 การตรวจวัด GSH ในระบบนี้มีช่วงความเป็นเส้นตรงเท่ากับ 1-6 mM และมีขีดจำกัดการตรวจวัด 13.1  $\mu$ M แต่อย่างไรก็ตามจากงานวิจัยนี้ยังคงพบการรบกวนของ Cys ที่ความยาวคลื่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังได้มีการนำไปประยุกต์ใช้เป็นตัวตรวจวัด GSH ในเซลล์สิ่งมีชีวิต ซึ่งถ้าในเซลล์มี GSH อยู่จะทำให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์สีแดงออกมา



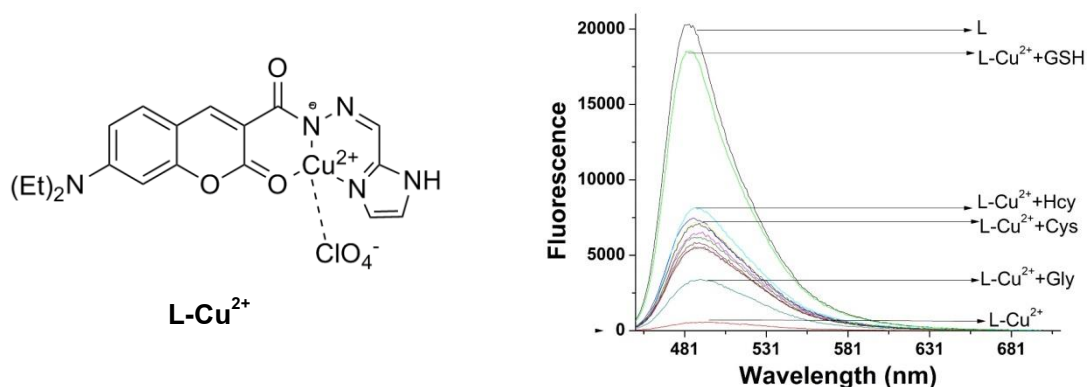
รูปที่ 2.10 โครงสร้างของสารประกอบ ADS และสเปกตรัมฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลาย ADS ที่มี แอนไอออนชนิดต่างๆ ในตัวทำละลาย PBS/CH<sub>3</sub>CN (8/2 V/V, pH 7.4)

Pinyi Ma และคณะ (Liang *et al.*, 2019) ได้ทำการสังเคราะห์สารประกอบ EQR-S เพื่อนำไปเป็นตัวตรวจวัด GSH ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์เซนเซอร์ย่านใกล้อินฟราเรดแบบกลไก ICT ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารประกอบ EQR-S ในตัวทำละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 50 mM pH 7.4 มีความจำเพาะกับ GSH เมื่อทำการกระตุ้นที่ความยาวคลื่น 585 nm จะมีการให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์สีแดงที่ความยาวคลื่นที่ 728 nm ดังแสดงในรูปที่ 2.11 การตรวจวัด GSH ในระบบนี้มีช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ที่ 0-5  $\mu$ M และขีดจำกัดในการตรวจวัดเท่ากับ 69 nM นอกจากนี้ในงานวิจัยยังได้นำไปประยุกต์ใช้เพื่อตรวจวัด GSH ในเซลล์สิ่งมีชีวิตภายใต้อุณหภูมิสูง ซึ่งจะให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์สีแดง



รูปที่ 2.11 โครงสร้าง EQR-S และกราฟความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของ EQR-S ใน HEPES buffer ความเข้มข้น 50 mM pH 7.4 ที่ทำการเติมแอนไอออนชนิดต่างๆ ลงไป (1=GSH, 2=Cys, 3=Hcy, 4=glycine, 5=leucine, 6=alanine, 7=tyrosine, 8=proline, 9=methionine, 10=glutamine, 11=tryptophan, 12=OCl<sup>-</sup>, 13=H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 14=OH)

Liguo Ji และคณะ (He *et al.*, 2019) ได้ทำการสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อน  $L-Cu^{2+}$  จากอนุพันธ์ของคู-มารินเพื่อเป็นตัวตรวจวัด  $GSH$  ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์เซนเซอร์ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารประกอบเชิงซ้อน  $L-Cu^{2+}$  ในตัวทำละลาย  $CH_3CN:HEPES$  buffer (3/2 v/v) pH 7.2-7.4 ให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ต่ำ แต่เมื่อทำการเติม  $GSH$  ลงไปในสารละลายสารประกอบเชิงซ้อน  $L-Cu^{2+}$  ส่งผลให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 2.12 เมื่อพิจารณาสเปกตรัมฟลูออเรสเซนซ์ Cys และ Hcy ก็ให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน การตรวจวัด  $GSH$  ในระบบนี้มีช่วงความเป็นเส้นตรง 0-30  $\mu M$  และมีขีดจำกัดในการตรวจวัด 0.12  $\mu M$  นอกจากนี้ในงานวิจัยยังได้นำไปประยุกต์ใช้เพื่อตรวจวัด  $GSH$  ในเซลล์สิ่งมีชีวิต ซึ่งถ้าในเซลล์มี  $GSH$  จะให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์สีเขียวเข้มขึ้นจากเดิมที่เมื่อมีแค่สารประกอบเชิงซ้อน  $L-Cu^{2+}$



รูปที่ 2.12 โครงสร้าง  $L-Cu^{2+}$  และสเปกตรัมฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลาย  $L-Cu^{2+}$  ที่มีแอนไอออนชนิดต่างๆ ในตัวทำละลาย  $CH_3CN/HEPES$  (3/2 V/V, pH 7.2-7.4)

### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินการทดลอง

##### 3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

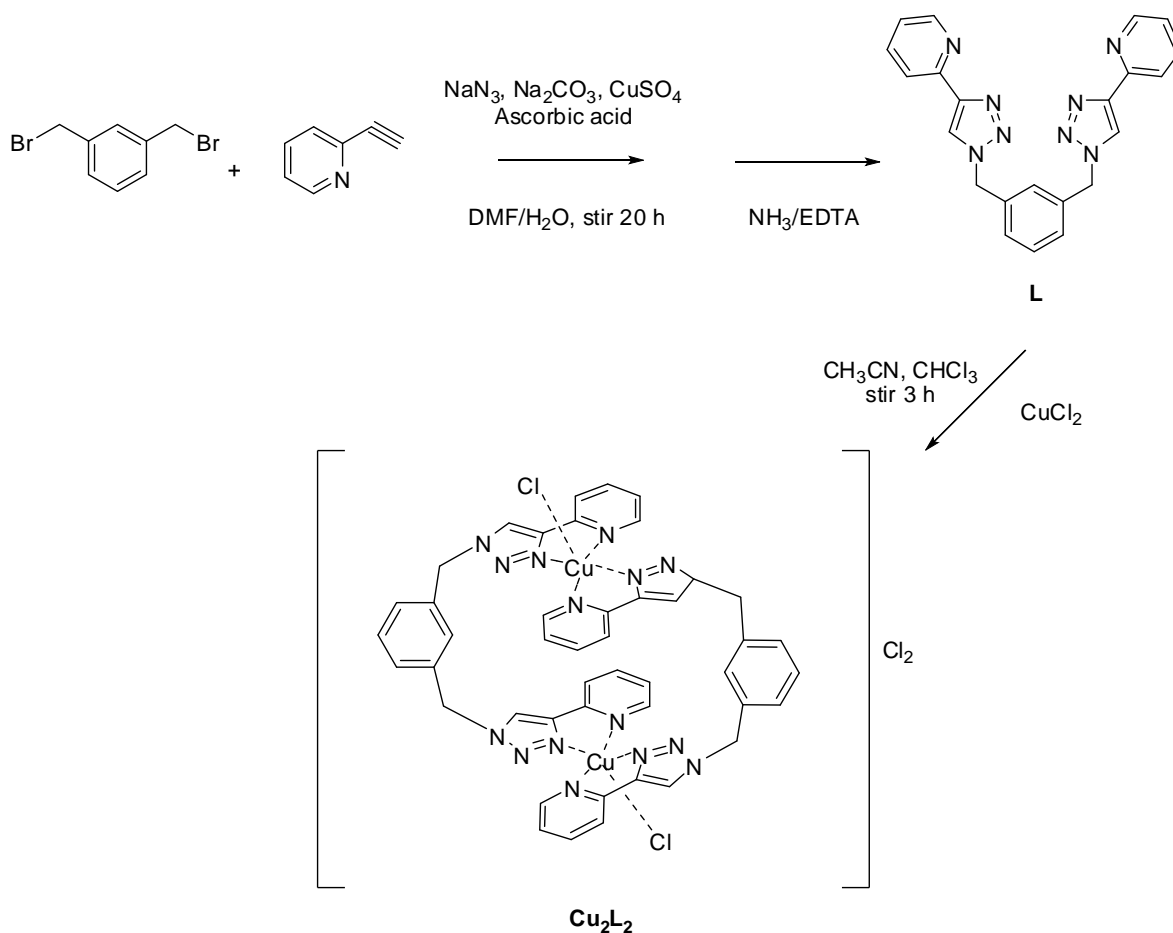
1. เครื่องระเหยตัวทำละลายแบบลดความดัน (Heidolph Laborota 4000 efficient)
2. ยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรมิเตอร์ (Agilent 8453)
3. ฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Agilent Cary Eclipse)
4. เครื่องวัดค่า pH (Mettler toledo)
5. นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรมิเตอร์ (Bruker 400 MHz Ultra shield AVANCE III HD 400)

##### 3.2 สารเคมี

1. Acetonitrile	$C_2H_3N$	A.R.Grade (QRec)
2. Adenosine 5'-diphosphate	$C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2$	A.R.Grade (Sigma Aldrich)
3. Adenosine 5'-monophosphate	$C_{10}H_{14}N_5O_7P$	A.R.Grade (Sigma Aldrich)
4. Adenosine 5'-triphosphate disodium	$C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$	A.R.Grade (Sigma Aldrich)
5. Disodium DL-malate Hydrate	$C_4H_4Na_2O_5 \cdot H_2O$	A.R.Grade (TCI)
6. Disodium Fumarate	$C_4H_2Na_2O_4$	A.R.Grade (TCI)
7. Disodium glutarate	$C_5H_6Na_2O_4$	A.R.Grade (TCI)
8. Disodium hydrogen phosphate	$Na_2HPO_4$	A.R.Grade (May & Baker)
9. Disodium L-(+)-tartrate Dihydrate	$C_4H_4Na_2O_6 \cdot 2H_2O$	A.R.Grade (TCI)
10. Disodium malonate	$C_3H_2Na_2O_4$	A.R.Grade (TCI)
11. Disodium succinate Hexahydrate	$C_4H_4Na_2O_4 \cdot 6H_2O$	A.R.Grade (TCI)
12. Disodium terephthalate	$C_8H_4Na_2O_4$	A.R.Grade (Sigma Aldrich)
13. Glutathione, Reduced, Free Acid	$C_{10}H_{17}N_3O_6S$	A.R.Grade (MERCK)
14. L-Aspartic acid	$C_4H_7NO_4$	A.R.Grade (Sigma Aldrich)
15. L-Glutamic acid	$C_5H_9NO_4$	A.R.Grade (MERCK)
16. L-Histidine	$C_6H_9N_3O_2$	A.R.Grade (Sigma Aldrich)

17. Pyrogallol Red	$C_{19}H_{12}O_8S$	A.R.Grade (Sigma Aldrich)
18. Sodium acetate	$C_2H_3NaO_2$	A.R.Grade (TCI)
19. Sodium citrate dihydrate	$C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$	A.R.Grade (Sigma Aldrich)
20. Sodium cyanide	$NaCN$	A.R.Grade (MERCK)
21. Sodium DL-lactate (60% in water)	$C_3H_5NaO_3$	A.R.Grade (TCI)
22. Sodium formate	$CHNaO_2$	A.R.Grade (TCI)
23. Sodium glycolate	$C_2H_3NaO_3$	A.R.Grade (TCI)
24. Sodium L-ascorbate	$C_6H_7NaO_6$	A.R.Grade (MERCK)
25. Sodium pyrophosphate	$Na(P_2O_7)_4$	A.R.Grade (Sigma Aldrich)
26. Sodium triphosphate	$Na_5P_3O_{10}$	A.R.Grade (MERCK)
27. Sodium oxalate	$Na_2C_2O_4$	A.R.Grade (CARLO ERBA)
28. Urea	$CO(NH_2)_2$	A.R.Grade (QRec)
29. น้ำเกลือ NSS 0.9% ยี่ห้อ GHP		

### 3.3 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน $\text{Cu}_2\text{L}_2$



รูปที่ 3.1 แผนภาพการสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน  $\text{Cu}_2\text{L}_2$

สำหรับสารประกอบ  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  ทำการสังเคราะห์ตามกระบวนการในงานวิจัยของ Pokharel และคณะ (Pokharel *et al.*, 2013) โดยขั้นแรกทำการเตรียมสารประกอบลิแกนด์ L โดยทำการละลาย  $\alpha, \alpha'$ -dibromo-m-xylene (792 mg, 3.0 mmol) ในตัวทำละลายผสมระหว่าง DMF/ $\text{H}_2\text{O}$  ในอัตราส่วน 4:1 ปริมาตร 15 mL จากนั้นเติม  $\text{NaN}_3$  (410 mg, 6.30 mmol) ตามด้วย  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (312 mg, 3.0 mmol),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (300 mg, 1.2 mmol), ascorbic acid (420 mg, 2.4 mmol) และ 2-ethynylpyridine (640 mg, 6.0 mmol) ทำการคนสารละลายผสมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 ชั่วโมง จากนั้นทำการเติมสารละลาย  $\text{NH}_3/\text{EDTA}$  ( $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2 g ใน 28% aqueous 5 mL และปรับปริมาตรเป็น 100 mL ด้วย  $\text{H}_2\text{O}$ ) ลงในสารละลายผสมดังกล่าว ทำการสกัดสารละลายผสมด้วย chloroform (2 x 100 mL) และเก็บชั้นตัวทำละลายอินทรีย์มาทำให้น้ำด้วย Anhydrous  $\text{MgSO}_4$  ทำการระเหยตัวทำละลายออกแล้วตกผลึกจะได้ของแข็งสีขาว จากนั้นทำการกรองผลึกและล้างผลึกด้วย diethyl ether เย็น จะได้ลิแกนด์ L (910 mg, 77%)

เมื่อได้ลิแกนด์ L แล้วจะนำมาเตรียมสารประกอบโคออร์ดิเนชัน  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  โดยทำการละลายลิแกนด์ L (200 mg, 0.51 mmol) ใน Chloroform (25 mL) จากนั้นค่อยๆ หยดละลายลิแกนด์ L ดังกล่าวลงในสารละลายของ  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (86 mg, 0.51 mmol) ใน  $\text{CH}_3\text{CN}$  (25 mL) ทำการคนสารละลายผสมเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จะเกิดของแข็งสีขาวขึ้น ทำการกรองของแข็งดังกล่าวและล้างด้วย  $\text{CH}_3\text{CN}$  และ  $\text{CHCl}_3$  ตามลำดับ จะได้สารประกอบโคออร์ดิเนชัน  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  (242 mg, 90.2%)

### 3.4 การเตรียมสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6

ชั่ง 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazynyl]-ethanesulfonic (HEPES) Acid น้ำหนัก 1.1940 กรัม ละลายด้วยน้ำปริมาตร 400 มิลลิลิตร วัดค่า pH ของสารละลาย HEPES buffer ด้วยเครื่อง pH meter ทำการปรับค่า pH ด้วยสารละลาย NaOH จนสารละลาย HEPES buffer มีค่า pH เท่ากับ 6 จากนั้นเทสารละลาย HEPES buffer (pH 6) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ จะได้สารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6

### 3.5 การศึกษาความจำเพาะในการตรวจวัดแอนไอออนชนิดต่างๆ ของเอนไซม์เบิลท์ที่เตรียมจากสารประกอบ $\text{Cu}_2\text{L}_2$ กับอินดิเคเตอร์ PGR โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี

#### 3.5.1 การเตรียมสารละลาย $\text{Cu}_2\text{L}_2$ ความเข้มข้น 20 $\mu\text{M}$ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่งสาร  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  น้ำหนัก 4.23 มิลลิกรัม ลงในขวดแก้ว ละลายด้วยสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร ทำการปรับปริมาตรจนถึงขีดบอกปริมาตร จะได้สารละลาย  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  ความเข้มข้น 800  $\mu\text{M}$  จากนั้นปิเปตสารละลาย  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  จากความเข้มข้น 800  $\mu\text{M}$  ปริมาตร 2.50 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 จนถึงขีดบอกปริมาตร จะได้สารละลาย  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  ความเข้มข้น 20  $\mu\text{M}$

#### 3.5.2 การเตรียมสารละลาย PGR ความเข้มข้น 400 $\mu\text{M}$ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ชั่ง PGR น้ำหนัก 1.60 มิลลิกรัม ลงในขวดแก้ว ละลายด้วยสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร ทำการปรับปริมาตรจนถึงขีดบอกปริมาตร จะได้สารละลาย PGR ความเข้มข้น 800  $\mu\text{M}$  จากนั้นปิเปตสารละลาย PGR จากความเข้มข้น 800  $\mu\text{M}$  มา 2.50 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร ทำการปรับปริมาตรด้วยสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 จนถึงขีดบอกปริมาตร จะได้สารละลาย PGR ความเข้มข้น 400  $\mu\text{M}$



### 3.5.3 การเตรียมสารละลายแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ซั่งแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ตามน้ำหนักที่แสดงไว้ในตารางที่ 3.1 ละลายด้วยน้ำใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนถึงขีดบอกปริมาตร จะได้สารละลายแอนไอออนชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 10 mM จากนั้นปิเปตสารละลายแอนไอออนชนิดต่าง ๆ จากความเข้มข้น 10 mM ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 จนถึงขีดบอกปริมาตร จะได้สารละลายแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 1 mM

ตารางที่ 3.1 น้ำหนักและปริมาตรของแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการเตรียมสารละลาย

ลำดับที่	ชนิดของแอนไอออน	มวลโมเลกุล (g/mol)	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)
1	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	141.96	14.20
2	Na(P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ) <sub>4</sub>	265.9	26.59
3	NaTPP	367.86	36.79
4	AMP	391.18	39.12
5	ADP	427.20	42.72
6	ATP	551.14	55.11
7	NaCN	49.01	4.90
8	Sodium oxalate	133.998	13.40
9	Glutathione	307.3	30.73
10	Sodium L-ascorbate	198.11	19.81
11	Sodium acetate	82.03	8.20
12	L-Aspartic acid	133.10	13.31
13	Sodium citrate dihydrate	294.10	29.41
14	Sodium formate	68.01	6.80
15	Sodium fumarate dibasic	160.04	16.00
16	L-Glutamic acid	147.13	14.71
17	Disodium glutarate	176.08	17.61
18	Sodium glycolate	98.03	9.80
19	Lactic acid	90.089	9.01

ตารางที่ 3.1 (ต่อ) น้ำหนักและปริมาตรของแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการเตรียมสารละลาย

ลำดับที่	ชนิดของแอนไอออน	มวลโมเลกุล (g/mol)	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)
20	Sodium malate	178.05	17.81
21	Disodium malonate	148.02	14.80
22	Disodium succinate	162.052	16.21
23	Sodium tartrate	194.05	19.41
24	Disodium terephthalate	210.09	21.01
25	L-Histidine	155.16	15.52
26	Urea	60.06	60.06
25	L-Histidine	155.16	15.52
26	Urea	60.06	60.06

#### 3.5.4 วิธีการทดลอง

ปิเปตสารละลาย  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  ความเข้มข้น 20  $\mu\text{M}$  ปริมาตร 2.00 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้ว และปิเปตสารละลาย PGR ความเข้มข้น 400  $\mu\text{M}$  ปริมาตร 100.00 ไมโครลิตร (0.10 มิลลิลิตร) ลงในขวดแก้วดังกล่าว คนสารละลายให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นปิเปตสารละลายแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 350.00 ไมโครลิตร (0.35 มิลลิลิตร) ลงไปในขวดแก้วที่มีสารละลาย  $[\text{Cu}_2\text{L}_2 \cdot \text{PGR}]$  คนสารละลายให้เข้ากันเป็นเวลา 3 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเชิงซ้อน  $[\text{Cu}_2\text{L}_2 \cdot \text{PGR}]$  ในสถานะที่มีแอนไอออนชนิดต่าง ๆ อยู่ในระบบ

ในการพิจารณาว่าสารละลาย  $[\text{Cu}_2\text{L}_2 \cdot \text{PGR}]$  ว่างมีความจำเพาะต่อแอนไอออนชนิดใดนั้น นอกจากการสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายแล้ว ยังสามารถทำได้โดยการสังเกตว่าแอนไอออนชนิดใดที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมมากที่สุด โดยนำสารละลาย  $[\text{Cu}_2\text{L}_2 \cdot \text{PGR}]$  ในขณะที่ยังไม่เติมสารละลายแอนไอออนชนิดต่าง ๆ และในขณะที่เติมแล้ว นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 250-900 nm จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความยาวคลื่น

### 3.6 การหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนไซม์ของสารประกอบ $\text{Cu}_2\text{L}_2$ กับอินดิเคเตอร์ PGR โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลโทเทรชัน

#### 3.6.1 เตรียมสารละลาย $\text{Cu}_2\text{L}_2$ ความเข้มข้น 400 $\mu\text{M}$ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ชั่งสารประกอบ  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  น้ำหนัก 3.70 มิลลิกรัม ลงในขวดแก้ว ละลายด้วยสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 แล้วถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนถึงขีดบอกปริมาตร จะได้สารละลาย  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  ความเข้มข้น 700  $\mu\text{M}$  จากนั้นปิเปตสารละลาย  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  จากความเข้มข้น 700  $\mu\text{M}$  ปริมาตร 2.86 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 จนถึงขีดบอกปริมาตร จะได้สารละลาย  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  ที่ความเข้มข้น 400  $\mu\text{M}$

#### 3.6.2 เตรียมสารละลาย PGR ความเข้มข้น 20 $\mu\text{M}$ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ชั่งสาร PGR น้ำหนัก 1.60 มิลลิกรัม ลงในขวดแก้ว ละลายด้วยสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนถึงขีดบอกปริมาตร จะได้สารละลาย PGR ความเข้มข้น 400  $\mu\text{M}$  จากนั้นปิเปตสารละลาย PGR จากความเข้มข้น 400  $\mu\text{M}$  ปริมาตร 0.50 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 จนถึงขีดบอกปริมาตร จะได้สารละลาย PGR ความเข้มข้น 20  $\mu\text{M}$

#### 3.6.3 วิธีการทดลอง

ปิเปตสารละลาย PGR ที่มีความเข้มข้น 20  $\mu\text{M}$  ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในคิวเวทและทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง จากนั้นทำการไทเทรตด้วยสารละลายสารประกอบเชิงซ้อน  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  ความเข้มข้น 400  $\mu\text{M}$  ครั้งละ 5.00 ไมโครลิตร (0.05 equivalent) คนสารละลายเป็นเวลา 1 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความยาวคลื่น

### 3.7 การหาอัตราส่วนในการเกิดเอนไซม์ของสารประกอบ $\text{Cu}_2\text{L}_2$ กับ PGR โดยวิธี Job's method

#### 3.7.1 การเตรียมสารละลาย $\text{Cu}_2\text{L}_2$ ความเข้มข้น 20 $\mu\text{M}$ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เตรียมเหมือนข้อ 3.5.1

### 3.7.2 การเตรียมสารละลาย PGR ความเข้มข้น 20 $\mu\text{M}$ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ซังสาร PGR น้ำหนัก 1.60 มิลลิกรัม ลงในขวดแก้ว ละลายด้วยสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนถึงขีดบอกปริมาตร จะได้สารละลาย PGR ที่ความเข้มข้น 400  $\mu\text{M}$  ปิเปตสารละลาย PGR จากความเข้มข้น 400  $\mu\text{M}$  ปริมาตร 5.00 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 จนถึงขีดบอกปริมาตร จะได้สารละลาย PGR ความเข้มข้น 20  $\mu\text{M}$

### 3.7.3 วิธีการทดลอง

บรรจุสารละลาย  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  และสารละลาย PGR จากข้อ 3.6.1 และ 3.6.2 ลงในบิวเรต จากนั้นทำการไขสารละลายทั้งสองชนิดลงในขวดวัดปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร ปริมาตรที่ขีดแสดงในตารางที่ 3.2 เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 567 nm จากนั้นนำข้อมูลมาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 567 nm กับเศษส่วนโมลของ  $\text{Cu}_2\text{L}_2$

ตารางที่ 3.2 สภาวะการทดลองสำหรับการหาอัตราส่วนในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  กับ PGR

ขวดที่	ปริมาตร 20 $\mu\text{M}$ $\text{Cu}_2\text{L}_2$ (มิลลิลิตร)	ปริมาตร 20 $\mu\text{M}$ PGR (มิลลิลิตร)	เศษส่วนโมลของ $\text{Cu}_2\text{L}_2$
1	0	10.00	0
2	1.00	9.00	0.1
3	2.00	8.00	0.2
4	3.00	7.00	0.3
5	4.00	6.00	0.4
6	5.00	5.00	0.5
7	6.00	4.00	0.6
8	7.00	3.00	0.7
9	8.00	2.00	0.8
10	9.00	1.00	0.9
11	10.00	0	1

### 3.8 การศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง $\text{Cu}_2\text{L}_2$ กับ GSH โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน

#### 3.8.1 การเตรียมเอนไซม์ของสารประกอบ $\text{Cu}_2\text{L}_2$ กับ PGR ความเข้มข้น 20 $\mu\text{M}$ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่งสาร  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  น้ำหนัก 4.23 มิลลิกรัม ลงในขวดแก้ว ละลายด้วยสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนถึงขีดบอกปริมาตร จะได้สารละลาย  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  ความเข้มข้น 800  $\mu\text{M}$  จากนั้นปิเปตสารละลาย  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  จากความเข้มข้น 800  $\mu\text{M}$  มา 2.50 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 จนเกือบถึงขีดบอกปริมาตร

ชั่ง PGR น้ำหนัก 1.60 มิลลิกรัม ลงในขวดแก้ว ละลายด้วยสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนถึงขีดบอกปริมาตร จะได้สารละลาย PGR มีความเข้มข้น 800  $\mu\text{M}$  จากนั้นปิเปตสารละลาย PGR จากความเข้มข้น 800  $\mu\text{M}$  ปริมาตร 2.50 มิลลิลิตร ลงไปในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ที่มีสารละลาย  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  อยู่ ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 จนถึงขีดบอกปริมาตร จะได้สารละลายเอนไซม์ของสารประกอบ  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  กับ PGR ความเข้มข้น 20  $\mu\text{M}$

#### 3.8.2 การเตรียมสารละลาย GSH ความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ชั่ง Glutathione น้ำหนัก 15.365 มิลลิกรัม ลงในขวดแก้ว ละลายด้วยสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนถึงขีดบอกปริมาตร จะได้สารละลาย GSH ความเข้มข้น 10 mM จากนั้นปิเปตสารละลาย GSH จากความเข้มข้น 10 mM ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 จนถึงขีดบอกปริมาตร จะได้สารละลาย GSH ความเข้มข้น 1 mM

#### 3.8.3 วิธีการทดลอง

ปิเปตสารละลายเอนไซม์ของสารประกอบ  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  กับ PGR ความเข้มข้น 20  $\mu\text{M}$  ปริมาตร 2.00 มิลลิลิตร ลงในคิวเวทและทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง จากนั้นปิเปตสารละลาย GSH ความเข้มข้น 1 mM ครั้งละ 0.025 มิลลิลิตร (0.625 equivalent) ลงในคิวเวทที่มีสารละลาย  $[\text{Cu}_2\text{L}_2\cdot\text{PGR}]$  และทำการปรับปริมาตรให้ปริมาตรรวมเท่ากับ 0.350 มิลลิลิตรด้วยสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 คนสารละลายให้เข้ากัน จับเวลา 3 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงทุกครั้งที่มีการเติมสารละลาย

GSH ลงไป จนกระทั่งไทเทรตครบ 0.35 มิลลิลิตร (8.75 equivalent) นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความยาวคลื่น

ตารางที่ 3.3 สภาวะการทดลองสำหรับการศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง GSH กับ  $[\text{Cu}_2\text{L}_2\cdot\text{PGR}]$

ครั้งที่	ปริมาตร 20 $\mu\text{M}$ [ $\text{Cu}_2\text{L}_2\cdot\text{PGR}$ ] (มิลลิลิตร)	ปริมาตร 1 mM GSH (มิลลิลิตร)	จำนวนโมล [ $\text{Cu}_2\text{L}_2\cdot\text{PGR}$ ]	จำนวนโมล GSH	อัตราส่วนโมลของ GSH ต่อโมลของ [ $\text{Cu}_2\text{L}_2\cdot\text{PGR}$ ]
1	2.00	0	$4 \times 10^{-8}$	0	0
2	2.00	0.025	$4 \times 10^{-8}$	$2.50 \times 10^{-8}$	0.625
3	2.00	0.050	$4 \times 10^{-8}$	$5.00 \times 10^{-8}$	1.250
4	2.00	0.075	$4 \times 10^{-8}$	$7.50 \times 10^{-8}$	1.875
5	2.00	0.100	$4 \times 10^{-8}$	$1.00 \times 10^{-7}$	1.875
6	2.00	0.125	$4 \times 10^{-8}$	$1.25 \times 10^{-7}$	2.500
7	2.00	0.150	$4 \times 10^{-8}$	$1.50 \times 10^{-7}$	3.750
8	2.00	0.175	$4 \times 10^{-8}$	$1.75 \times 10^{-7}$	4.375
9	2.00	0.200	$4 \times 10^{-8}$	$2.00 \times 10^{-7}$	5.000
10	2.00	0.225	$4 \times 10^{-8}$	$2.25 \times 10^{-7}$	5.625
11	2.00	0.250	$4 \times 10^{-8}$	$2.50 \times 10^{-7}$	6.250
12	2.00	0.275	$4 \times 10^{-8}$	$2.75 \times 10^{-7}$	6.875
13	2.00	0.300	$4 \times 10^{-8}$	$3.00 \times 10^{-7}$	7.500
14	2.00	0.325	$4 \times 10^{-8}$	$3.25 \times 10^{-7}$	8.125
15	2.00	0.350	$4 \times 10^{-8}$	$3.50 \times 10^{-7}$	8.750

3.9 การศึกษาการตรวจวัด GSH ด้วยเอนไซม์เบิล  $[Cu_2L_2 \cdot PGR]$  โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมทรีภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและปราศจากออกซิเจน

3.9.1 ศึกษาการตรวจวัด GSH ด้วยเอนไซม์เบิล  $[Cu_2L_2 \cdot PGR]$  โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรีภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน

3.9.1.1 การเตรียมเอนไซม์เบิลของสารประกอบ  $Cu_2L_2$  กับ PGR ความเข้มข้น 20  $\mu M$  ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ชั่งสาร  $Cu_2L_2$  น้ำหนัก 4.23 มิลลิกรัม ลงในขวดแก้ว ละลายด้วยสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนถึงขีดบอกปริมาตร จะได้สารละลาย  $Cu_2L_2$  ความเข้มข้น 800  $\mu M$  จากนั้นปิเปตสารละลาย  $Cu_2L_2$  จากความเข้มข้น 800  $\mu M$  ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 เล็กน้อย

ชั่ง PGR น้ำหนัก 1.60 มิลลิกรัม ลงในขวดแก้ว ละลายด้วยสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนถึงขีดบอกปริมาตร จะได้สารละลาย PGR ความเข้มข้น 800  $\mu M$  จากนั้นปิเปตสารละลาย PGR จากความเข้มข้น 800  $\mu M$  ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ลงไปขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตรที่มีสารละลาย  $Cu_2L_2$  อยู่ ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 จนถึงขีดบอกปริมาตร

3.9.1.2 การเตรียมสารละลาย GSH ความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

เตรียมเหมือนข้อ 3.7.2

3.9.1.3 วิธีการทดลอง

ปิเปตสารละลายเอนไซม์เบิลของสารประกอบ  $Cu_2L_2$  กับ PGR ความเข้มข้น 20  $\mu M$  ปริมาตร 2.00 มิลลิลิตร ลงในคิวเวทแล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง จากนั้นปิเปตสารละลาย GSH ความเข้มข้น 1 mM 0.35 มิลลิลิตร ลงในคิวเวทที่มีสารละลาย  $[Cu_2L_2 \cdot PGR]$  คนสารละลายให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงทุก ๆ 30 วินาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับเวลา (นาที)

### 3.9.2 ศึกษาการตรวจวัด GSH ด้วยแอนิเมเบล [Cu<sub>2</sub>L<sub>2</sub>•PGR] โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรีภายใต้สภาวะที่ปราศจากออกซิเจน

#### 3.9.2.1 การเตรียมแอนิเมเบลของสารประกอบ Cu<sub>2</sub>L<sub>2</sub> กับ PGR ความเข้มข้น 20 µM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ชั่งสาร Cu<sub>2</sub>L<sub>2</sub> น้ำหนัก 3.17 มิลลิกรัม ลงในขวดแก้ว ละลายด้วยสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนถึงขีดบอกปริมาตร จะได้สารละลาย Cu<sub>2</sub>L<sub>2</sub> ความเข้มข้น 600 µM จากนั้นปิเปตสารละลาย Cu<sub>2</sub>L<sub>2</sub> จากความเข้มข้น 600 µM ปริมาตร 0.67 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 เล็กน้อย

ชั่ง PGR น้ำหนัก 1.60 มิลลิกรัม ลงในขวดแก้ว ละลายด้วยสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนถึงขีดบอกปริมาตร จะได้สารละลาย PGR ความเข้มข้น 400 µM จากนั้นปิเปตสารละลาย PGR จากความเข้มข้น 400 µM ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ลงไปขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตรที่มีสารละลาย Cu<sub>2</sub>L<sub>2</sub> อยู่ ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 จนถึงขีดบอกปริมาตร จะได้สารละลายแอนิเมเบลของสารประกอบ Cu<sub>2</sub>L<sub>2</sub> กับ PGR ความเข้มข้น 40 µM

ปิเปตสารละลายแอนิเมเบลของสารประกอบ Cu<sub>2</sub>L<sub>2</sub> กับ PGR ความเข้มข้น 40 µM ปริมาตร 5.00 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 จนเกือบถึงขีดวัดปริมาตรและนำสารละลาย [Cu<sub>2</sub>L<sub>2</sub>•PGR] ไปกำจัดออกซิเจนโดยการพ่นแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นปรับปริมาตรจนถึงขีดบอกปริมาตร จะได้สารละลาย [Cu<sub>2</sub>L<sub>2</sub>•PGR] ความเข้มข้น 20 µM

#### 3.9.2.2 การเตรียมสารละลาย GSH ความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

ชั่ง Glutathione น้ำหนัก 15.365 มิลลิกรัม ลงในขวดแก้ว ละลายด้วยสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร ทำการปรับปริมาตรจนถึงขีดบอกปริมาตร จะได้สารละลาย GSH ความเข้มข้น 10 mM จากนั้นปิเปตสารละลาย GSH จากความเข้มข้น 10 mM ปริมาตร 2.50 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 จนถึงเกือบขีดบอกปริมาตรและนำสารละลาย GSH ไปกำจัดออกซิเจนโดยการพ่นแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นปรับปริมาตรจนถึงขีดบอกปริมาตร จะได้สารละลาย GSH ความเข้มข้น 1 mM



### 3.9.2.3 วิธีการทดลอง

ปิเปตสารละลาย GSH ความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 1.75 มิลลิลิตร ใส่ลงในสารละลายเอนไซม์ของสารประกอบ  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  กับ PGR ความเข้มข้น 20  $\mu\text{M}$  ปริมาตร 10 มิลลิลิตรในข้อที่ 3.9.2.1 โดยทำที่ภายใต้สภาวะไนโตรเจน เขย่าสารละลายให้เข้ากัน เทสารละลายใส่ควิเวทและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงทุก ๆ 30 วินาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับเวลา (นาที)

## 3.10 การศึกษาผลการรบกวนของไอออนชนิดต่าง ๆ ต่อการตรวจวัด GSH ด้วยเอนไซม์-เบิล $[\text{Cu}_2\text{L}_2\cdot\text{PGR}]$ โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี

### 3.10.1 การเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง $[\text{Cu}_2\text{L}_2\cdot\text{PGR}] + \text{GSH}$ ความเข้มข้น 20 $\mu\text{M}$ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่งสาร  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  น้ำหนัก 4.23 มิลลิกรัม ลงในขวดแก้ว ละลายด้วยสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนถึงขีดบอกปริมาตร จะได้สารละลาย  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  ความเข้มข้น 800  $\mu\text{M}$  จากนั้นปิเปตสารละลาย  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  จากความเข้มข้น 800  $\mu\text{M}$  ปริมาตร 2.50 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 เล็กน้อย

ชั่ง PGR น้ำหนัก 1.60 มิลลิกรัม ลงในขวดแก้ว ละลายด้วยสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนถึงขีดบอกปริมาตร จะได้สารละลาย PGR ความเข้มข้น 800  $\mu\text{M}$  ปิเปตสารละลาย PGR จากความเข้มข้น 800  $\mu\text{M}$  ปริมาตร 2.50 มิลลิลิตร ลงไปขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ที่มีสารละลาย  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  อยู่ แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 จนเกือบถึงขีดบอกปริมาตร

จากนั้นปิเปตสารละลาย GSH จากความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 2.00 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ที่มีสารละลาย  $[\text{Cu}_2\text{L}_2\cdot\text{PGR}]$  เขย่าให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 จนถึงขีดบอกปริมาตร จะได้สารละลาย  $[\text{Cu}_2\text{L}_2\cdot\text{PGR}] + \text{GSH}$  ที่มีความเข้มข้น 20  $\mu\text{M}$

### 3.10.2 การเตรียมสารละลายแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

เตรียมเหมือนข้อ 3.5.2

### 3.10.3 วิธีการทดลอง

ปีเปตสารละลายเชิงซ้อน  $[Cu_2L_2 \cdot PGR] + GSH$  ความเข้มข้น  $20 \mu M$  ปริมาตร 2.00 มิลลิลิตร ลงในคิวเวท จากนั้นปีเปตสารละลายแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 350.00 ไมโครลิตร ลงในคิวเวทที่มีสารละลายเชิงซ้อน  $[Cu_2L_2 \cdot PGR] + GSH$  คนให้เข้ากันเป็นเวลา 3 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 567 nm ในสภาวะที่มีแอนไอออนชนิดต่าง ๆ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 567 nm กับแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ที่เติมลงไป

## 3.11 การวิเคราะห์ปริมาณกลูตาไธโอนในตัวอย่างยาแคปซูลโดยใช้วิธี-วิลิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี

### 3.11.1 การเตรียมแอนิเมเบลของสารประกอบ $Cu_2L_2$ กับ PGR ความเข้มข้น $20 \mu M$ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เตรียมเหมือนข้อ 3.8.1

### 3.11.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน GSH ความเข้มข้น $500 \mu M$ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ชั่ง Glutathione น้ำหนัก 15.365 มิลลิกรัม ลงในขวดแก้ว ละลายด้วยสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนถึงขีดบอกปริมาตร จะได้สารละลาย GSH ความเข้มข้น 10 mM จากนั้นปีเปตสารละลาย GSH จากความเข้มข้น 10 mM ปริมาตร 0.50 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 จนถึงขีดบอกปริมาตร จะได้สารละลาย GSH ความเข้มข้น  $500 \mu M$

### 3.11.3 การเตรียมตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างยา 3 เม็ด โดยไม่รวมเปลือกแคปซูล นำยาทั้งหมดผสมให้เข้ากัน จากนั้นทำการชั่งยาให้ได้น้ำหนัก 1 ใน 4 ของน้ำหนักเฉลี่ย ละลายด้วยสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 แล้วถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ทำการปรับปริมาตรจนถึงขีดบอกปริมาตรและนำไปกรองด้วย Syringe filter nylon ขนาด  $0.22 \mu M$  จากนั้นปีเปตสารละลายที่กรองแล้วมา 0.60 มิลลิลิตร ใส่ลงใน

ขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร ทำการปรับปริมาตรด้วยสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 จนถึงขีดบอกปริมาตร

### 3.11.4 วิธีการทดลอง

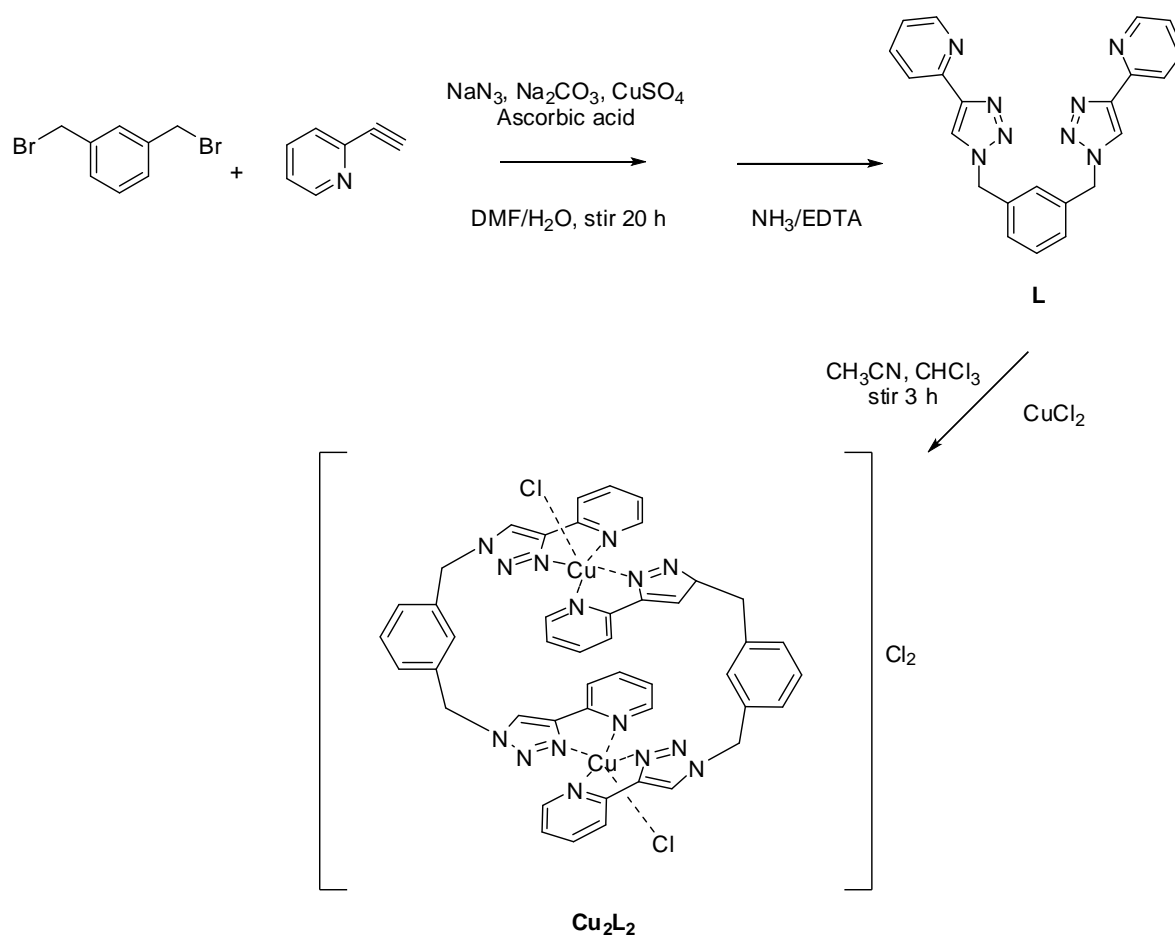
ปิเปตสารละลายเอนไซม์ของสารประกอบ  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  กับ PGR ความเข้มข้น  $20 \mu\text{M}$  ปริมาตร 2.00 มิลลิลิตร ลงในคิวเวท แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่างลงในคิวเวทที่มีสารละลาย  $[\text{Cu}_2\text{L}_2 \cdot \text{PGR}]$   $0.1$  มิลลิลิตร และทำการเติมสารละลายมาตรฐาน GSH ความเข้มข้น  $500 \mu\text{M}$  ปริมาตรต่างกันตามลำดับให้ได้ความเข้มข้น  $1, 3, 5$  และ  $7 \mu\text{M}$  ดังตารางที่ 3.4 ปรับปริมาตรให้ปริมาตรรวมเท่ากับ 2.35 มิลลิลิตรด้วยสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 คนสารละลายให้เข้ากัน จับเวลา 3 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น  $420 \text{ nm}$  กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน GSH ( $\mu\text{M}$ )

ตารางที่ 3.4 สภาวะการทดลองเพื่อวิเคราะห์ปริมาณกลูตาไธโอนในตัวอย่างยาแคปซูลโดยใช้วิธี Standard addition

ครั้งที่	ปริมาตรของสารละลาย เอนไซม์เบิล $[\text{Cu}_2\text{L}_2 \cdot \text{PGR}]$ $20 \mu\text{M}$ (มิลลิลิตร)	ปริมาตรของ สารละลาย ตัวอย่าง (มิลลิลิตร)	ปริมาตรของสารละลาย มาตรฐาน GSH $500 \mu\text{M}$ (มิลลิลิตร)	ปริมาตรสุทธิ (มิลลิลิตร)
1	2	0.1	0	2.35
2	2	0.1	0.0047	2.35
3	2	0.1	0.0140	2.35
4	2	0.1	0.0235	2.35
5	2	0.1	0.0330	2.35

## บทที่ 4

## ผลการทดลองและอภิปรายผล

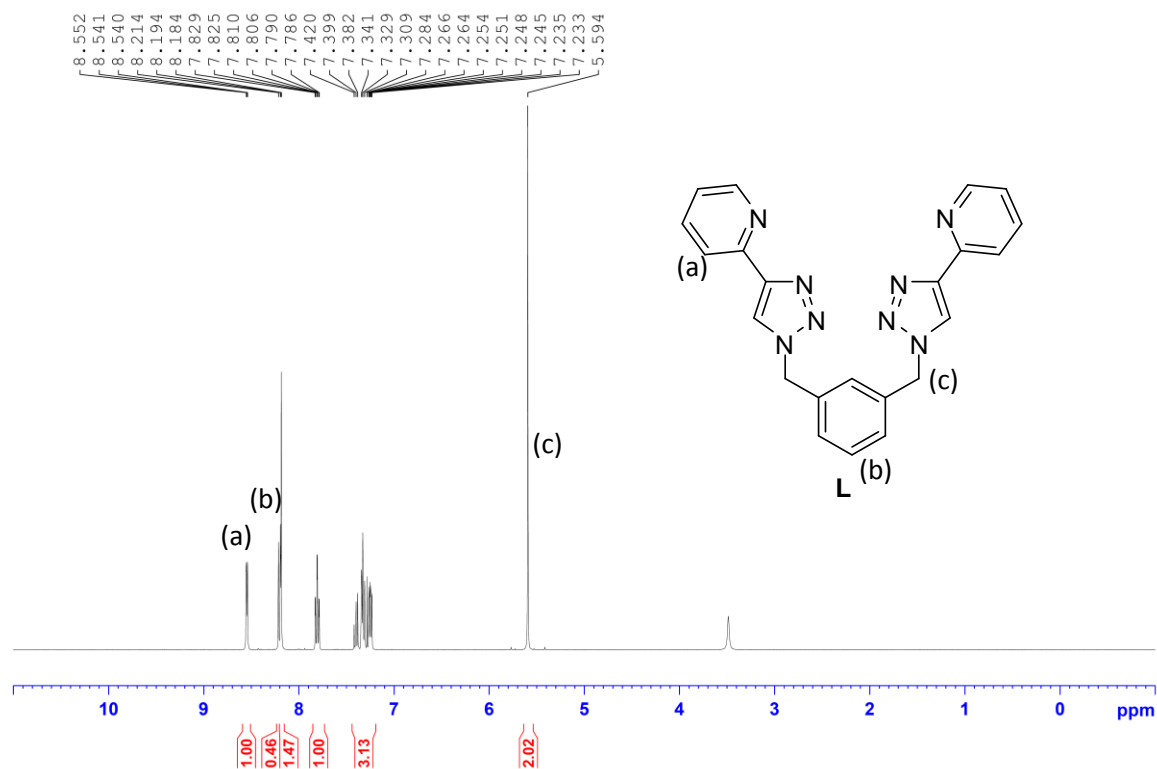
4.1 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน  $\text{Cu}_2\text{L}_2$ รูปที่ 4.1 แผนภาพการสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน  $\text{Cu}_2\text{L}_2$ 

ลิแกนด์ L ที่จะนำมาใช้ในการเตรียมสารประกอบโคออร์ดิเนชัน  $\text{Cu}(\text{II})$  สามารถเตรียมได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่าง  $\alpha, \alpha'$ -dibromo-m-xylene กับ 2-ethynylpyridine ในตัวทำละลาย DMF :  $\text{H}_2\text{O}$  อัตราส่วน 4:1 และทำการคนสารละลายที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน ได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาวร้อยละของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 77 โดยปฏิกิริยาดังแสดงในรูปที่ 4.1 จากการพิสูจน์โครงสร้างของลิแกนด์ L โดยใช้เทคนิค  $^1\text{H-NMR}$  พบว่าปรากฏพีคของ -ArH (a) ของวง pyridine ที่มีลักษณะเป็น doublet ที่  $\delta$  เท่ากับ 8.55 ppm มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 2 โปรตอน พีค -ArH (b) ที่มีลักษณะเป็น

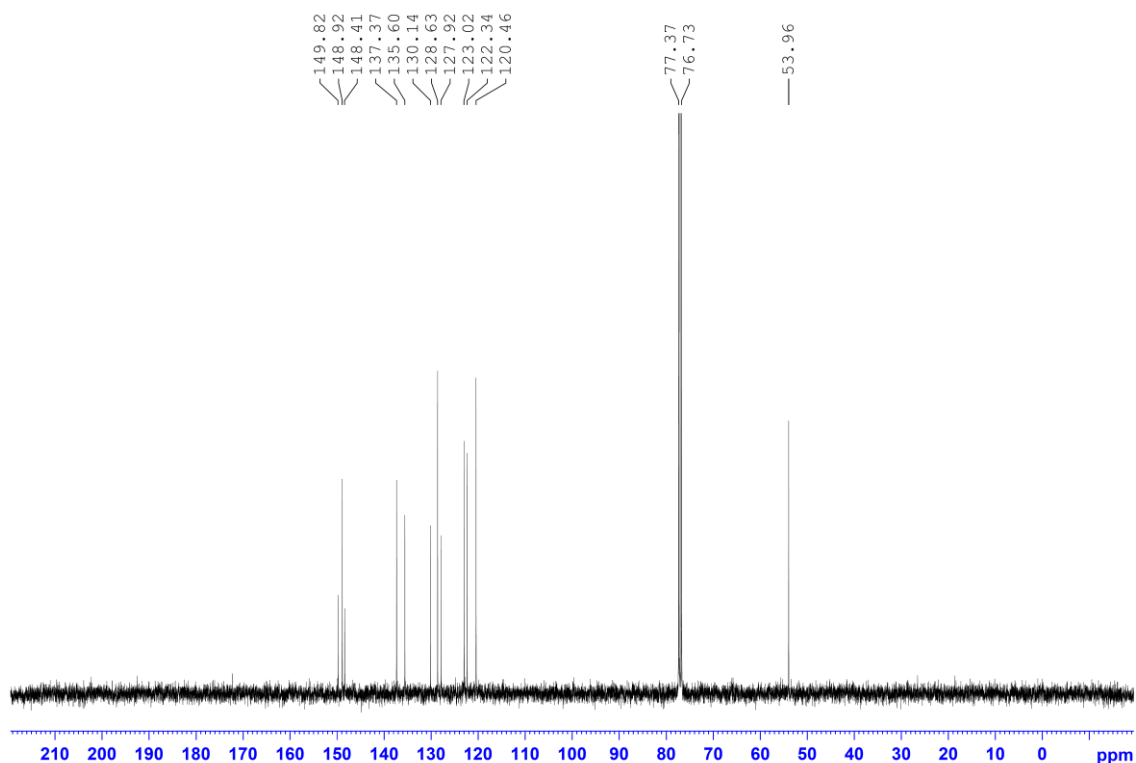
multiplet ที่  $\delta$  เท่ากับ 8.21 ppm มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 1 โปรตอน และพีค  $-\text{CH}_2-$  (c) ที่มีลักษณะเป็น singlet ที่  $\delta$  เท่ากับ 5.59 ppm มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 4 โปรตอน ซึ่งเป็นการยืนยันได้ว่าเป็นลิแกนด์ L ขึ้น นอกจากนั้นเมื่อทำการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค  $^{13}\text{C-NMR}$  ก็ปรากฏสัญญาณของอะตอมคาร์บอนทั้ง 22 ตำแหน่ง ดังแสดงในรูปที่ 4.2 และ 4.3

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.55 (d,  $J = 4.8$  Hz, 2H, ArH), 8.21-8.18 (m, 4H, ArH), 7.83-7.79 (m, 2H, ArH), 7.42-7.23 (m, 6H, ArH), 5.59 (s, 4H,  $-\text{CH}_2-$ )

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  149.82, 148.92, 148.41, 137.37, 135.60, 130.14, 128.63, 127.92, 123.02, 122.34, 120.46, 53.96



รูปที่ 4.2  $^1\text{H-NMR}$  สเปกตรัมของลิแกนด์ L ในตัวทำละลาย  $\text{CDCl}_3$

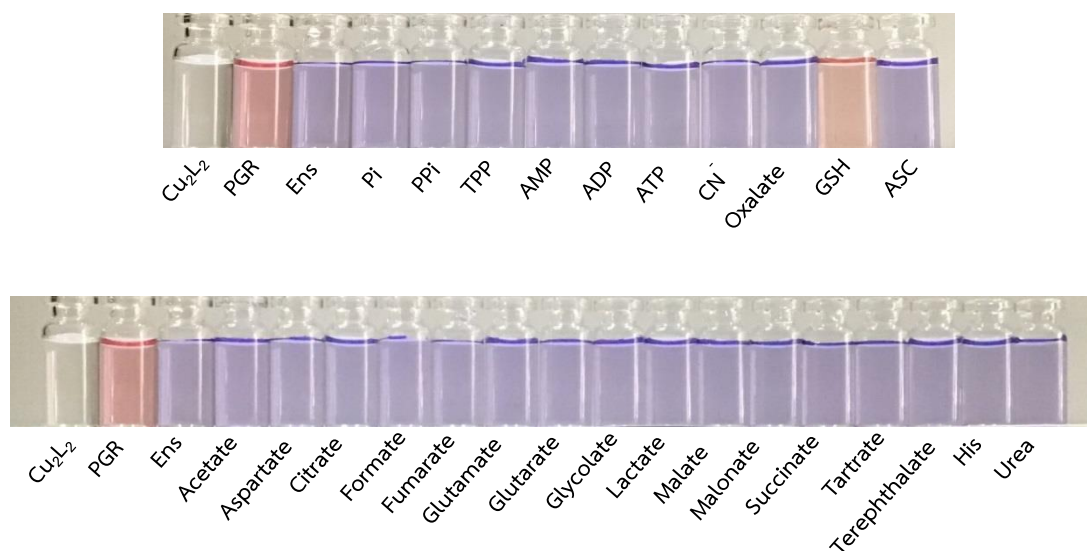


รูปที่ 4.3  $^{13}\text{C}$ -NMR สเปกตรัมของลิแกนด์ L ในตัวทำละลาย  $\text{CDCl}_3$

สำหรับสารประกอบ  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  ทำการสังเคราะห์ตามกระบวนการในงานวิจัยของ Pokharel และคณะ (Pokharel *et al.*, 2013) โดยเตรียมจากการทำปฏิกิริยาระหว่างลิแกนด์ L และ  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ได้สารประกอบโคออร์ดิเนชัน  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  ที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีเขียว ร้อยละของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 90.2

#### 4.2 การศึกษาความจำเพาะในการตรวจวัดแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ของเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบ $\text{Cu}_2\text{L}_2$ กับอินดิเคเตอร์ PGR โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรี

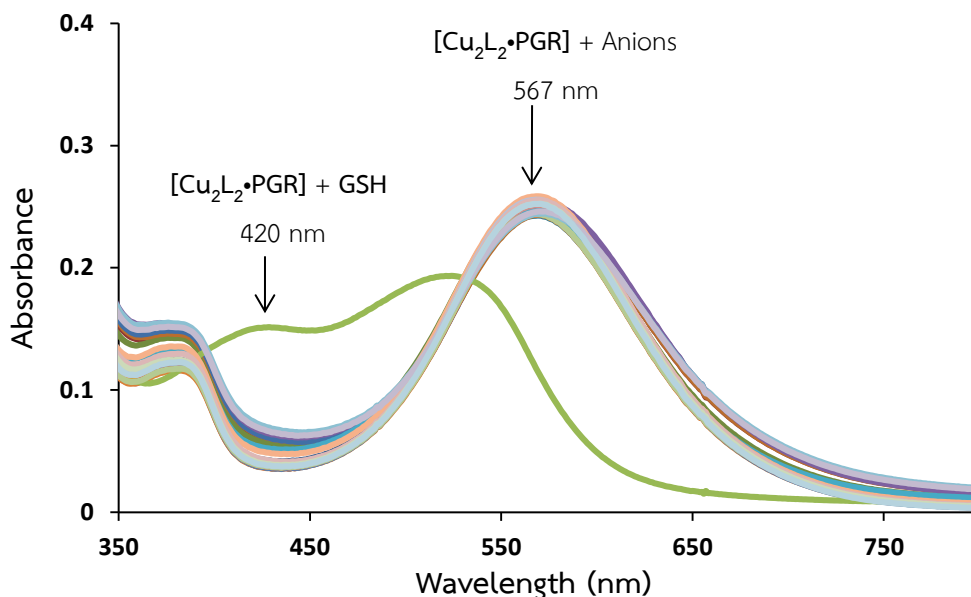
จากการศึกษาความจำเพาะของแอนไอออนชนิดต่างๆ ต่อสารประกอบ  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  ในสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 โดยทำการปิเปตสารละลาย  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  ความเข้มข้น 20  $\mu\text{M}$  ปริมาตร 2.00 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้วและปิเปตสารละลาย PGR ความเข้มข้น 400  $\mu\text{M}$  ปริมาตร 0.10 มิลลิลิตร ตามลงในขวดดังกล่าว คนสารละลายให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากใสไม่มีสีไปเป็นสีน้ำเงิน จากนั้นทำการปิเปตแอนไอออนชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 1mM ปริมาตร 0.35 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้วที่มีสารละลายของเอนไซม์เบิล [ $\text{Cu}_2\text{L}_2 \cdot \text{PGR}$ ] คนสารละลายให้เข้ากันเป็นเวลา 3 นาที และสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย ผลการทดลองที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.4



**รูปที่ 4.4** การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเอนไซม์เบิล  $[\text{Cu}_2\text{L}_2\cdot\text{PGR}]$  ในสถานะที่มีแอนไอออนชนิดต่างๆ ในสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6

จากรูปที่ 4.3 ในการตรวจวัดแอนไอออนชนิดต่างๆ ต่อสารประกอบ  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  จะเห็นได้ว่าสารละลายเอนไซม์เบิล  $[\text{Cu}_2\text{L}_2\cdot\text{PGR}]$  มีความจำเพาะกับแอนไอออน  $\text{GSH}$  เพียงชนิดเดียว เนื่องจากมีเพียง  $\text{GSH}$  เท่านั้นที่ทำให้สีของสารละลายเปลี่ยนจากสีน้ำเงินไปเป็นสารละลายสีแดงของ  $\text{PGR}$  ในขณะที่แอนไอออนชนิดอื่นๆ ไม่ส่งผลต่อการตรวจวัดแต่อย่างใด

จากรูปที่ 4.5 เมื่อนำสารละลายเอนไซม์เบิล  $[\text{Cu}_2\text{L}_2\cdot\text{PGR}]$  ในสถานะที่มีแอนไอออนชนิดต่างๆ มาวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรี พบว่ามีเพียง  $\text{GSH}$  ที่ส่งผลทำให้สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายเอนไซม์เบิล  $[\text{Cu}_2\text{L}_2\cdot\text{PGR}]$  ที่ความยาวคลื่น 567 nm มีค่าลดลงและที่ความยาวคลื่น 420 nm มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ในขณะที่แอนไอออนชนิดอื่นๆ สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของเอนไซม์เบิล  $[\text{Cu}_2\text{L}_2\cdot\text{PGR}]$  มีค่าลดลงเพียงเล็กน้อย

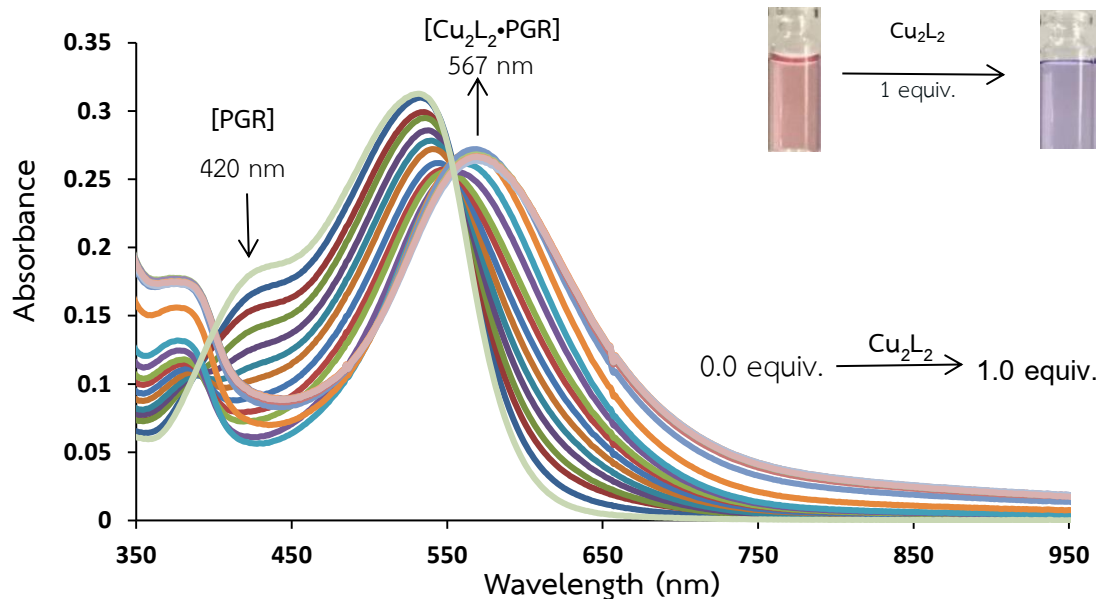


รูปที่ 4.5 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายเอนไซม์เบิล  $[\text{Cu}_2\text{L}_2\cdot\text{PGR}]$  ( $20\ \mu\text{M}$ ) ที่มีแอนไอออนชนิดต่างๆ ( $1\ \text{mM}$ ) ในสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น  $10\ \text{mM}$  pH 6

#### 4.3 การหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนไซม์เบิลของสารประกอบ $\text{Cu}_2\text{L}_2$ กับอินดิเคเตอร์ PGR โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน

การหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนไซม์เบิลของสารประกอบ  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  กับอินดิเคเตอร์ PGR โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน ทำได้โดยนำสารละลาย PGR ความเข้มข้น  $20\ \mu\text{M}$  ปริมาตร  $2.00$  มิลลิลิตร มาไทเทรตด้วยสารละลาย  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  ความเข้มข้น  $400\ \mu\text{M}$  ครึ่งละ  $5.00$  ไมโครลิตร ( $0.05$  equivalent) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี โดยทำการทดลองจนครบ  $0.10$  มิลลิลิตร ( $1$  equivalent) จากรูปที่ 4.6 เมื่อเติมสารละลาย  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  ลงไป  $0$  ถึง  $1.0$  equivalent จะสังเกตเห็นได้ว่าสีของสารละลายเปลี่ยนจากสารละลายสีแดงไปเป็นสารละลายสีน้ำเงิน โดยพบว่าที่ความยาวคลื่น  $567\ \text{nm}$  มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นและที่ความยาวคลื่น  $420\ \text{nm}$  มีค่าการดูดกลืนแสงลดลง เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการทำยูวี-วิสิเบิลไทเทรชันไปคำนวณหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนไซม์เบิลระหว่างสารประกอบ  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  กับอินดิเคเตอร์ PGR โดยใช้โปรแกรม SPECFIT พบว่ามีค่า  $\log K = 4.32 \pm 0.21$  ซึ่งสอดคล้องกับการเกิดสปีชีส์  $[\text{Cu}_2\text{L}_2\cdot\text{PGR}]$

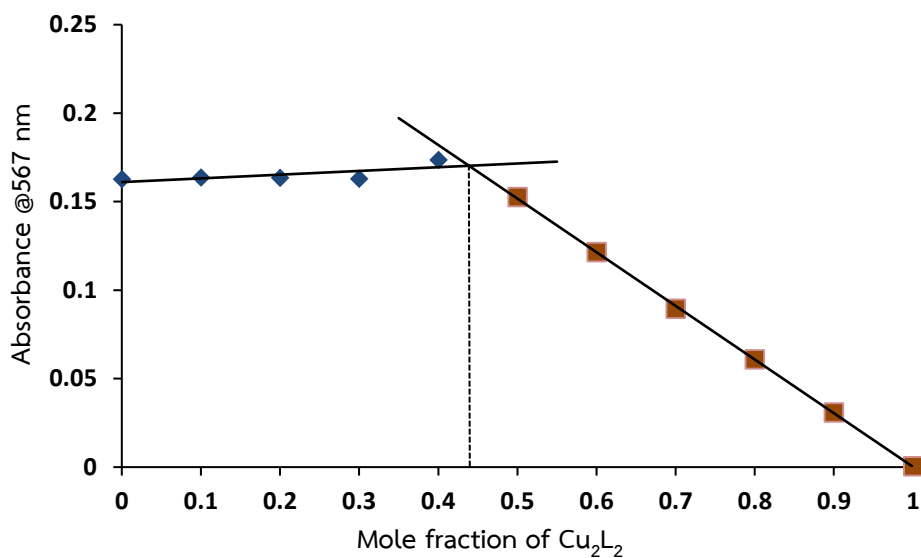




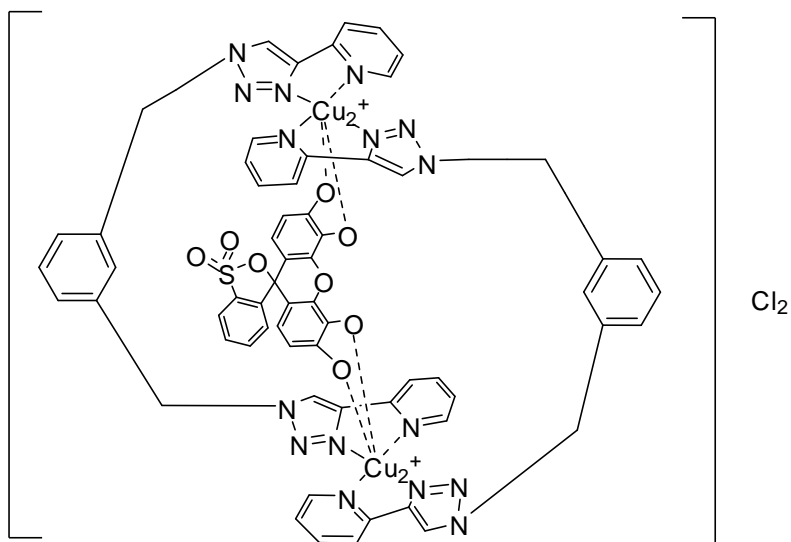
รูปที่ 4.6 ยูวี-วิสิเบิลไทเทรชันสเปกตรัมของสารละลาย PGR (20  $\mu\text{M}$ ) ด้วยสารละลาย  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  (400  $\mu\text{M}$ ) ในสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6

#### 4.4 การหาอัตราส่วนในการเกิดเอนไซม์ของสารประกอบ $\text{Cu}_2\text{L}_2$ กับ PGR โดยวิธี Job's method

การหาอัตราส่วนในการเกิดเอนไซม์ของสารประกอบ  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  กับ PGR โดยวิธี Job's method โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี ทำได้โดยเตรียมสารละลายผสมระหว่างสารละลาย  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  และสารละลาย PGR ที่เศษส่วนโมลต่างกัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 567 nm จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 567 nm กับเศษส่วนโมลของ  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  จากรูปที่ 4.7 พบว่าเมื่อทำการลากเส้นสัมผัสจะเกิดจุดตัดที่เศษส่วนโมลของ  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  ที่ประมาณ 0.44 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า PGR เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับ  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  ด้วยอัตราส่วน 1:1 โครงสร้างที่เป็นไปได้ของสี่ซี่ที่เกิดขึ้นแสดงได้ดังรูปที่ 4.8



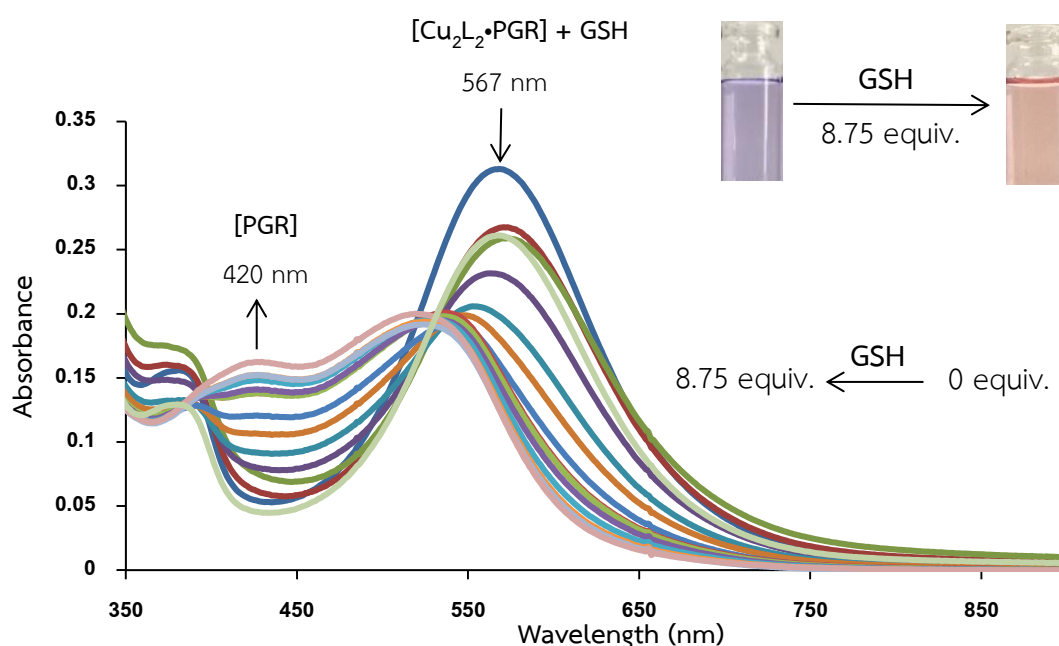
รูปที่ 4.7 การหาอัตราส่วนในการเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสารละลาย  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  (20  $\mu\text{M}$ ) กับสารละลาย PGR (20  $\mu\text{M}$ ) ในสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 โดยวิธี Job's Method



รูปที่ 4.8 โครงสร้างที่เป็นไปได้ของสปีชีส์  $[\text{Cu}_2\text{L}_2\cdot\text{PGR}]$  (มโนญ พิชิ และคณะ, 2557)

#### 4.5 การศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง $\text{Cu}_2\text{L}_2$ กับ GSH โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน

การศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  กับ GSH โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน ทำได้โดยไทเทรตสารละลายเอนไซม์เปปไทด์  $[\text{Cu}_2\text{L}_2\cdot\text{PGR}]$  ความเข้มข้น  $20\ \mu\text{M}$  2.00 มิลลิลิตร ด้วยสารละลาย GSH ความเข้มข้น  $1\ \text{mM}$  ครั้งละ  $0.025$  มิลลิลิตร ( $0.625$  equivalent) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงจนครบ  $0.35$  มิลลิลิตร ( $8.75$  equivalent) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้นำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความยาวคลื่น ดังรูปที่ 4.8 จากรูปจะเห็นได้ว่าเมื่อเติมสารละลาย GSH ลงไป สารละลายจะค่อย ๆ เปลี่ยนจากสีน้ำเงินไปเป็นสีส้ม และค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเอนไซม์เปปไทด์  $[\text{Cu}_2\text{L}_2\cdot\text{PGR}]$  ที่ความยาวคลื่น  $567\ \text{nm}$  มีค่าลดลง ในขณะที่ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น  $420\ \text{nm}$  มีค่าเพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.9



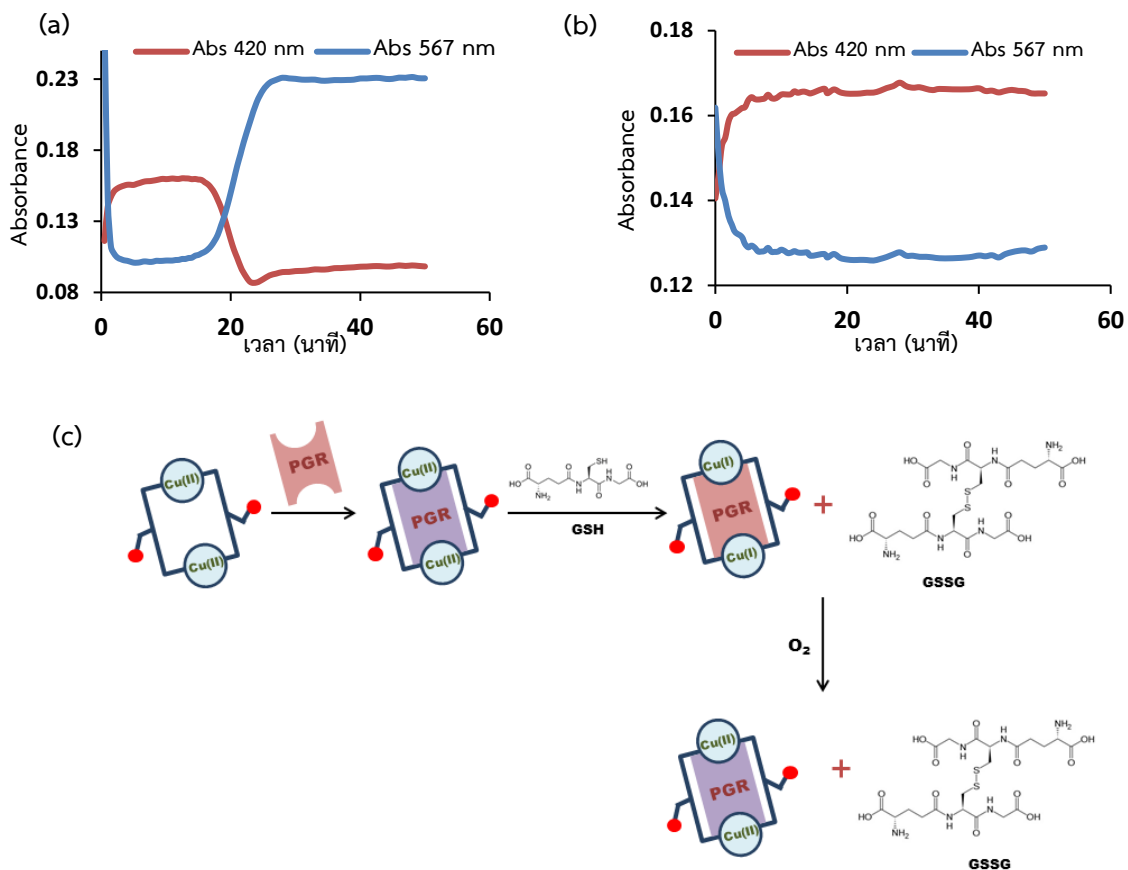
รูปที่ 4.9 ยูวี-วิสิเบิลไทเทรชันสเปกตรัมของสารละลายเอนไซม์เปปไทด์  $[\text{Cu}_2\text{L}_2\cdot\text{PGR}]$  ( $20\ \mu\text{M}$ ) ด้วยสารละลาย GSH ( $1\ \text{mM}$ ) ในสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น  $10\ \text{mM}$  pH 6

แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 15 นาที พบว่าสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีส้มกลับมาเป็นสีน้ำเงินคล้ายกับสีของเอนไซม์เปปไทด์อีกครั้ง จากปรากฏการณ์ดังกล่าวผู้วิจัยจึงคาดเดาว่าเป็นไปได้ที่ เมื่อทำการเติม GSH เข้าไปในระบบ GSH จะไปรีดิวซ์  $\text{Cu}^{2+}$  ไอออนในโครงสร้างของสารประกอบ  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  ไปเป็น  $\text{Cu}^+$  ไอออนและเมื่อ GSH ถูกออกซิไดซ์ด้วยแก๊สออกซิเจนในอากาศกลายเป็น GSSG นอกจากนี้ออกซิเจนยังมีผล

ทำให้  $\text{Cu}^+$  ไอออนเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกลายเป็น  $\text{Cu}^{2+}$  ไอออนกลับมาดังเดิม ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาการตรวจวัด GSH ด้วยเอนไซม์เบิล  $[\text{Cu}_2\text{L}_2\text{-PGR}]$  ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและปราศจากออกซิเจน โดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงทุกๆ 30 วินาที จนครบ 1 ชั่วโมง สังเกตสีของสารละลายและนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับเวลา (นาที่)

จากรูปที่ 4.10 ภาพ (a) พบว่าในสภาวะที่มีออกซิเจน ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 และ 567 nm มีค่าคงที่ในช่วง 3-15 นาที และสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีส้ม จากนั้นเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาทีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 nm จะลดลงและที่ 567 nm จะเพิ่มขึ้นก่อนจะคงที่ทั้งสองความยาวคลื่น โดยสีของสารละลายเริ่มเปลี่ยนจากสีส้มไปเป็นสีน้ำเงินของเอนไซม์เบิลจนเมื่อครบ 1 ชั่วโมง สีของสารละลายจะเปลี่ยนกลับไปเป็นสีน้ำเงินของเอนไซม์เบิล ดังรูปที่ 4.11 และภาพ (b) เมื่อทำการทดลองภายใต้สภาวะที่ปราศจากออกซิเจน พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 3 นาทีค่าการดูดกลืนแสงทั้งสองความยาวคลื่นจะค่อนข้างคงที่ สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินไปเป็นสีส้มและเมื่อครบ 1 ชั่วโมงสีของสารละลายจะเปลี่ยนไปเพียงเล็กน้อย ดังรูปที่ 4.11

จากผลการทดลองดังที่ได้กล่าวมาแล้วจึงเป็นไปได้ว่าเมื่อทำการเติม GSH ลงไปยังสารละลายของเอนไซม์เบิล GSH จะไปทำการรีดิวซ์  $\text{Cu}^{2+}$  ไอออนในโครงสร้างของสารประกอบ  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  ไปเป็น  $\text{Cu}^+$  ไอออนและสีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินของเอนไซม์เบิลไปเป็นสีแดงของอินดิเคเตอร์ PGR ในขณะเดียวกัน GSH จะถูกออกซิไดซ์ไปเป็นกลูตาไธโอนในรูป GSSG โดยในสภาวะที่มีออกซิเจนอยู่ในระบบ ออกซิเจนจะไปออกซิไดซ์  $\text{Cu}^+$  ไอออนในโครงสร้างของ  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  ไปเป็น  $\text{Cu}^{2+}$  ไอออนส่งผลให้สีของสารละลายกลับมาเป็นสีน้ำเงินของสารละลายเอนไซม์เบิลอีกครั้ง ตามกลไกที่แสดงดังรูปที่ 4.10 ภาพ (c)



รูปที่ 4.10 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับเวลา (นาที) ของสารละลาย  $[\text{Cu}_2\text{L}_2\cdot\text{PGR}]$  ( $20 \mu\text{M}$ ) ที่มีสารละลาย  $\text{GSH}$  ( $1 \text{ mM}$ ) ในสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น  $10 \text{ mM}$  pH 6 (a) ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน (b) ภายใต้สภาวะที่ปราศจากออกซิเจน และ (c) กลไกการตรวจวัดกลูตาไธโอนด้วยแอนเซนเบ็ด  $[\text{Cu}_2\text{L}_2\cdot\text{PGR}]$  ในสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น  $10 \text{ mM}$  pH6 ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน



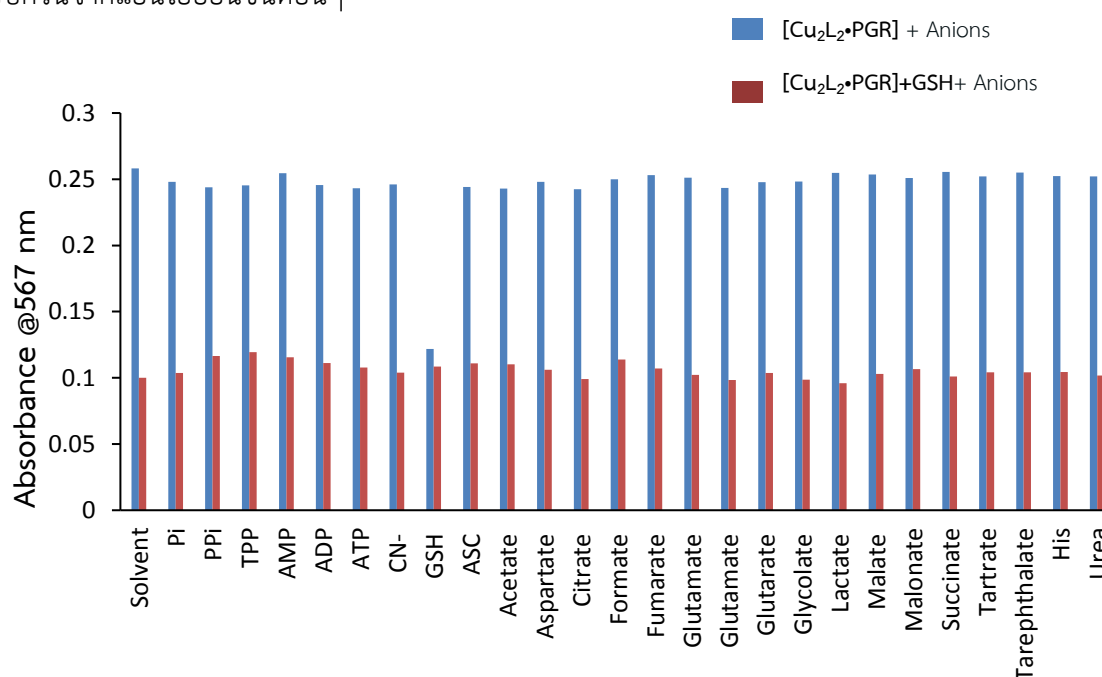
Ens PGR a b

รูปที่ 4.11 การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายแอนเซนเบ็ด  $[\text{Cu}_2\text{L}_2\cdot\text{PGR}]$  เมื่อเติมสารละลาย  $\text{GSH}$  เป็นเวลา  $1$  ชั่วโมง ภายใต้สภาวะ (a) ที่มีออกซิเจน และ (b) ที่ปราศจากออกซิเจน ในสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น  $10 \text{ mM}$  pH 6

#### 4.6 การศึกษาการรบกวนของไอออนชนิดต่าง ๆ ต่อการตรวจวัด GSH ด้วยแอนิเมเบิล $[Cu_2L_2 \cdot PGR]$ โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี

การศึกษามลการรบกวนของแอนไอออนชนิดต่างๆ ต่อการตรวจวัด GSH ด้วยแอนิเมเบิล  $[Cu_2L_2 \cdot PGR]$  โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรีแสดงได้ดังรูปที่ 4.12 เมื่อพิจารณากราฟแท่งสีน้ำเงิน พบว่าเมื่อทำการเติมแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ลงไปในสารละลายแอนิเมเบิล  $[Cu_2L_2 \cdot PGR]$  มีเพียงแค่ GSH เท่านั้นที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 567 nm ลดลง จากนั้นเมื่อพิจารณากราฟแท่งสีแดงที่ทำการเติมแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ลงไปในระบบที่มี GSH อยู่ด้วย พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 567 nm มีแนวโน้มที่ลดลง

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าไม่มีแอนไอออนชนิดใดที่สามารถรบกวนการตรวจวัด GSH ด้วยสารละลายของแอนิเมเบิล  $[Cu_2L_2 \cdot PGR]$  ในสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 แสดงให้เห็นว่าสารละลายแอนิเมเบิล  $[Cu_2L_2 \cdot PGR]$  สามารถนำมาใช้เป็นเซ็นเซอร์ทางเคมีในการตรวจวัด GSH ได้เป็นอย่างดีโดยไม่ถูกรบกวนจากแอนไอออนชนิดอื่นๆ



รูปที่ 4.12 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย  $[Cu_2L_2 \cdot PGR]+GSH$  (20  $\mu M$ ) กับสารละลายแอนไอออนชนิดต่างๆ (1 mM) ในสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 ที่ความยาวคลื่น 567 nm

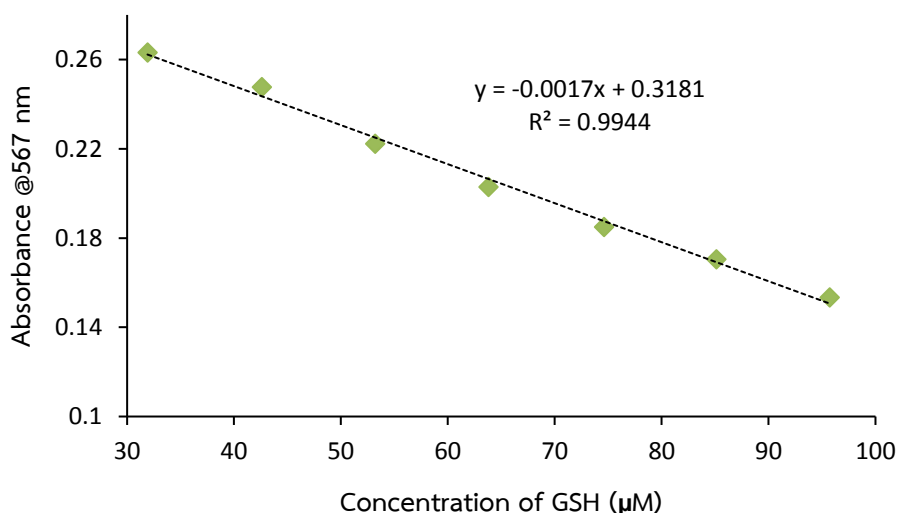
#### 4.7 การหาขีดจำกัดการในการตรวจวัด GSH ด้วยเอนไซม์เบิล $[Cu_2L_2 \cdot PGR]$ โดยใช้เทคนิค ยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี

การหาขีดจำกัดในการตรวจวัด GSH ด้วยเอนไซม์เบิล  $[Cu_2L_2 \cdot PGR]$  โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี สามารถคำนวณหาค่าขีดจำกัดการตรวจวัด ดังสมการที่ (4.1)

$$\text{Detection of limit} = 3 \sigma / k \quad (4.1)$$

โดยที่  $\sigma$  คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard derivation) ของค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย

$k$  คือ ความชันของกราฟที่จากการสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 567 nm กับความเข้มข้น GSH ( $\mu\text{M}$ )



รูปที่ 4.13 การหาขีดจำกัดในการตรวจวัดสารละลาย GSH โดยใช้เอนไซม์เบิล  $[Cu_2L_2 \cdot PGR]$

จากการทดลองหาค่าขีดจำกัดการตรวจวัดของสารละลาย GSH โดยใช้เอนไซม์เบิล  $[Cu_2L_2 \cdot PGR]$  ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี เมื่อค่า  $\sigma$  เท่ากับ 0.00048 พบว่ามีค่าขีดจำกัดในการตรวจวัด GSH เท่ากับ 0.85  $\mu\text{M}$  หรือ 0.26 ppm

#### 4.8 การวิเคราะห์หาปริมาณกลูตาไธโอนในตัวอย่างยาแคปซูลด้วยวิธียูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมทรี

จากการทดลองวิเคราะห์หาปริมาณกลูตาไธโอนในตัวอย่างยาแคปซูลโดยทำการเพิ่มสารละลายมาตรฐานลงไปในการวิเคราะห์ตัวอย่างและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน ( $\mu\text{M}$ ) พบว่าสามารถวิเคราะห์หาปริมาณกลูตาไธโอนได้แสดงดังตารางที่ 4.1

**ตารางที่ 4.1** ผลการวิเคราะห์ปริมาณกลูตาไธโอนในตัวอย่างยาแคปซูลด้วยวิธียูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี เทียบกับปริมาณที่วิเคราะห์ได้จากวิธีมาตรฐานโดยใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรโฟโตเมทรี

ตัวอย่าง	Fluorescence Spectrophotometry*		UV-Visible spectrophotometry	
	ปริมาณที่พบ (mg/เม็ด)	% Recovery	ปริมาณที่พบ (mg/เม็ด)	% Recovery
G01	332.81	101.0-135.0	326.50	101.0-111.3
G02	208.29	100.8-117.5	199.48	99.8-109.2
G03	229.73	72.52-98.75	230.05	81.6-102.8

\*ใช้วิธีตามมาตรฐานของ Roman Kandari (Kandari *et al.*, 2007)

จากตารางที่ 4.1 แสดงให้เห็นว่าปริมาณกลูตาไธโอนที่วิเคราะห์ได้จากวิธีที่พัฒนาขึ้นมามีค่าใกล้เคียงกับปริมาณที่วิเคราะห์ได้จากวิธีมาตรฐาน และเมื่อทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีโดยใช้หลักทางสถิติ t-Test: Paired Two Sample for Means ที่ความเชื่อมั่น 95 % พบว่าค่า t ที่ได้จากการทดลองเท่ากับ 1.68 ซึ่งน้อยกว่าค่า t ทางทฤษฎีที่เท่ากับ 4.30 ( $t_{\text{cal}} < t_{\text{crit}}$ ) แสดงให้เห็นว่าข้อมูลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นวิธีการหาปริมาณกลูตาไธโอนด้วยเทคนิคเซนเซอร์ทางเคมีเชิงแสงที่พัฒนาขึ้นมาจึงสามารถใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณกลูตาไธโอนในยาแคปซูลได้



## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้นำสารประกอบ  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  และอินดิเคเตอร์ PGR มาใช้สำหรับตรวจวัด glutathione (GSH) โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี ในสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 จากการศึกษาการเกิดเอนไซม์ของสารประกอบ  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  กับอินดิเคเตอร์ PGR นั้นพบว่าเมื่อเติมสารละลายสีแดงของอินดิเคเตอร์ PGR ลงไปยังสารละลายใสไม่มีสีของสารละลายสารประกอบ  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 567 nm จากการหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนไซม์ระหว่าง  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  กับ PGR ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน โดยใช้โปรแกรม SPECFIT พบว่ามีค่าคงที่ความเสถียรเท่ากับ  $\log K = 4.32 \pm 0.21$  ซึ่งสอดคล้องกับการเกิดเอนไซม์  $[\text{Cu}_2\text{L}_2 \cdot \text{PGR}]$  จากการศึกษาหาอัตราส่วนในการเกิดเอนไซม์ระหว่างสารประกอบ  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  และอินดิเคเตอร์ PGR โดยวิธี Job's method พบว่ามีอัตราส่วนของการเกิดเอนไซม์ คือ 1:1

เมื่อนำเอนไซม์  $[\text{Cu}_2\text{L}_2 \cdot \text{PGR}]$  มาศึกษาความจำเพาะในการตรวจวัดแอนไอออนชนิดต่าง ๆ พบว่ามีเพียง GSH เท่านั้นที่ทำให้สีน้ำเงินของสารละลายเอนไซม์เปลี่ยนเป็นสีส้มของอินดิเคเตอร์ PGR แสดงว่ามีเพียงแค่ว่า GSH เท่านั้นที่จำเพาะกับเอนไซม์  $[\text{Cu}_2\text{L}_2 \cdot \text{PGR}]$  โดยคาดว่าเมื่อเติม GSH เข้าไปในระบบ GSH จะทำการรีดิวซ์  $\text{Cu}^{2+}$  ไอออนในโครงสร้างของสารประกอบ  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  ไปเป็น  $\text{Cu}^+$  ไอออนและสีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินของเอนไซม์ไปเป็นสีแดงของอินดิเคเตอร์ PGR ในขณะเดียวกัน GSH จะถูกออกซิไดซ์ไปเป็นกลูตาไธโอนในรูป GSSG โดยในสภาวะที่มีออกซิเจนอยู่ในระบบ ออกซิเจนจะออกซิไดส์  $\text{Cu}^+$  ไอออนในโครงสร้างของ  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  ไปเป็น  $\text{Cu}^{2+}$  ไอออนส่งผลให้สีของสารละลายกลับมาเป็นสีน้ำเงินของสารละลายเอนไซม์อีกครั้ง

เมื่อทำการศึกษาผลการรบกวนของแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ต่อการตรวจวัด GSH ด้วยเอนไซม์  $[\text{Cu}_2\text{L}_2 \cdot \text{PGR}]$  พบว่าไม่มีแอนไอออนชนิดใดส่งผลรบกวนต่อการตรวจวัด GSH เนื่องจากไม่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 567 nm มีค่าลดลง แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์  $[\text{Cu}_2\text{L}_2 \cdot \text{PGR}]$  สามารถนำมาใช้เป็นเซนเซอร์ทางเคมีเชิงแสงในการตรวจวัด GSH ได้เป็นอย่างดี และการตรวจวัด GSH ด้วยสารละลายเอนไซม์  $[\text{Cu}_2\text{L}_2 \cdot \text{PGR}]$  ชีดจำกัดการตรวจวัดเท่ากับ  $0.85 \mu\text{M}$

นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ยังได้ประสบความสำเร็จในการนำเอนไซม์  $[\text{Cu}_2\text{L}_2 \cdot \text{PGR}]$  มาใช้ตรวจวิเคราะห์ปริมาณกลูตาไธโอนในตัวอย่างยารูปแบบแคปซูล ซึ่งปริมาณกลูตาไธโอนที่วิเคราะห์ได้จากวิธีที่พัฒนาขึ้นมามีค่าใกล้เคียงกับปริมาณที่วิเคราะห์ได้จากวิธีมาตรฐาน และเมื่อทำการตรวจสอบความถูกต้องของ

วิธีโดยใช้หลักทางสถิติ t-Test: Paired Two Sample for Means ที่ความเชื่อมั่น 95 % แสดงให้เห็นว่าข้อมูลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นวิธีการหาปริมาณกลูตาไธโอนด้วยเทคนิคเซนเซอร์ทางเคมีเชิงแสงที่พัฒนาขึ้นมาจึงสามารถใช้ได้ในการวิเคราะห์หาปริมาณกลูตาไธโอนในยาแคปซูลได้

#### ข้อเสนอแนะ

1. ทำการยืนยันโครงสร้างที่เป็นไปได้ของเอนไซม์เบิล [ $\text{Cu}_2\text{L}_2\cdot\text{PGR}$ ] และสปีชีส์ที่เป็นไปได้ของการเกิดสารเชิงซ้อนระหว่าง  $\text{Cu}_2\text{L}_2$  และ GSH ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี
2. การนำเอนไซม์เบิล [ $\text{Cu}_2\text{L}_2\cdot\text{PGR}$ ] มาใช้ในตรวจวัดกลูตาไธโอนควรทำในสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6

## บรรณานุกรม

- Duan, Y. L., Shi, Y. G., Chen, J. H., Wu, X. H., Wang, G. K., Zhou, Y. and Zhang, J. F. (2012). 1,8-Naphthyridine Modified Rhodamine B Derivative and  $\text{Cu}^{2+}$  Complex: Colorimetric Sensing of Thiols in Aqueous Media. *Tetrahedron Letters*, *53*, 6544-6547.
- Gao, W., Liu, Z., Qi, L., Lai, J., Kite, S. A. and Xu, G. (2016). Ultrasensitive Glutathione Detection Based on Lucigenin Cathodic Electrochemiluminescence in the Presence of  $\text{MnO}_2$  Nanosheets. *Analytical Chemistry*, *88*, 7654-7659.
- Gaucher, C., Boudier, A., Bonetti, J., Clarot, I., Leroy, P. and Parent, M. (2018). Glutathione: Antioxidant Properties Dedicated to Nanotechnologies. *Antioxidants*, *7*, 62.
- He, G., Hua, X., Yang, N., Li, L., Xu, J., Yang, L., Wang, Q. and Ji, L. (2019). Synthesis and Application of a “Turn on” Fluorescent Probe for Glutathione Based on a Copper Complex of Coumarin Hydrazone Schiff base Derivative. *Bioorganic Chemistry*, *91*, 103176.
- Kandar, R., Zakova, P., Lotkova, H., Kucera, O., & Cervinkova, Z. (2007). Determination of Reduced and Oxidized Glutathione in Biological Samples Using Liquid Chromatography with Fluorimetric Detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *43(4)*, 1382–1387.
- Kennedy, L., Sandhu, J. K., Harper, M.-E., and Cuperlovic-Culf, M. (2020). Role of Glutathione in Cancer: From Mechanisms to Therapies. *Biomolecules*, *10*, 1429.
- Liang, F., Jiao, S., Jin, D., Dong, L., Lin, S., Song, D. and Ma, P. (2019). A Novel Near-infrared Fluorescent Probe for the Dynamic Monitoring of the Concentration of Glutathione in Living Cells. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *224*, 117403.
- Lou, X., Hong, Y., Chen, S., Leung, C. W. T., Zhao, N., Situ, B., Lam, J. W. Y. and Tang, B. Z. (2014). A selective Glutathione Probe Based on AIE Fluorogen and Its Application in Enzymatic Activity Assay. *Scientific Reports*, *4*, 4272.

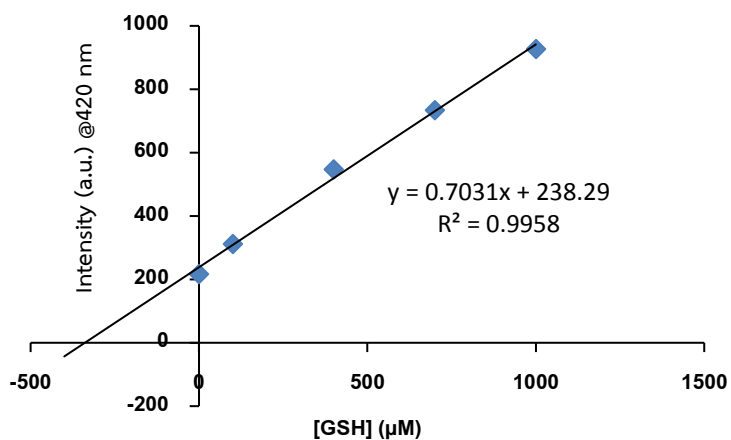
- Mischley, L. K., Standish, L. J., Weiss, N. S., Padowski, J. M., Kavanagh, T. J., White, C. C., and Rosenfeld, M. E. (2016). Glutathione as a Biomarker in Parkinson's Disease: Associations with Aging and Disease Severity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.
- Moine, L., Rivoira, M., Barboza, G. D., Pérez, A. and Talamoni, N. T. (2018). Glutathione Depleting Drugs, Antioxidants and Intestinal calcium absorption. *World Journal of Gastroenterology*, 24, 4979-4988.
- Pokharel, U. R., Fronczek, F. R., & Maverick, A. W. (2014). Reduction of carbon dioxide to oxalate by a binuclear copper complex. *Nature Communications*, 5.
- Steed, J. W. and Atwood, J. L. (2009). *Supramolecular chemistry*. John Wiley & Sons.
- Stobiecka, M., Coopersmith, K. and Hepel, M. (2010). Resonance Elastic Light Scattering (RELS) Spectroscopy of Fast non-Langmuirian Ligand-Exchange in Glutathione-Induced Gold Nanoparticle Assembly. *Journal of Colloid and Interface Science*, 350, 168-177.
- Villarama, C. D. and Maibach, H. I. (2005). Glutathione as a Depigmenting Agent: An Overview. *International Journal of Cosmetic Science*, 27, 147-153.
- Wan, Y., Li, Y., Liao, Z., Tang, Li, Y., Zhao, Y. and Xiong, B. (2019). A New Xanthene-based Fluorescent Probe with A Red Light Emission for Selectively Detecting Glutathione and Imaging in Living Cells. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 223, 117265.
- Woelflingseder, L., Favero, G. D., Blažević, T., Heiss, E. H., Haider, M., Warth, B., Adam, G. and Marko, D. (2018). Impact of Glutathione Modulation on the Toxicity of the *Fusarium* Mycotoxins Eoxynivalenol (DON), NX-3 and Butenolide in Human Liver Cells. *Toxicology Letters*, 299, 104-117.
- Yu, Y., Shi, J., Zhao, X., Yuan, Z., Lu, C. and Lu, J. (2016). Electrochemiluminescence Detection of Reduced and Oxidized Glutathione Ratio by Quantum Dot-layered Double Hydroxide Film. *Analyst*, 141. 3305-3312.
- จอมใจ สุกใส. (2009). เคมีซูพราโมเลกุล : เซ็นเซอร์ทางเคมี *Supramolecular Chemistry : Chemical Sensors. Burapha Science Journal, special volume 2009*, 109-118.
- มัญญ พิษิ, สรายุทธ เวชสิทธิ์, ธวัชชัย ต้นทุลลานิ และ จอมใจ สุกใส. (2557). เคมีโคซิมิเตอร์ชนิดใหม่ สำหรับการตรวจวัดไซยาไนด์ไอออน. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 408-414.

แม่น อมรสิทธิ์, อมร เพชรสม, ยุวดี เชี่ยววัฒนา, อติทยา ศิริภิญญานนท์, ศรีวิไล โอมอภิญญาณ และ  
อุมพร สุขม่วง. (2554). หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ  
: โรงพิมพ์ชวนพิมพ์ 50

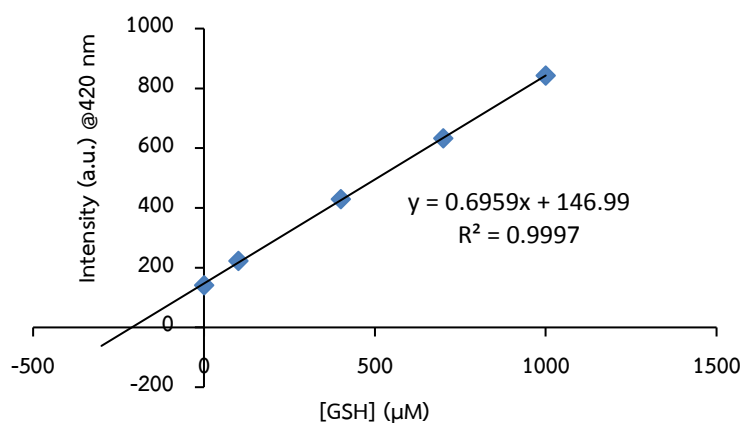
วิสุทธิ กังวานตระกูล และลิมทอง พรหมดี (2546). *ปฏิบัติการเคมีคลินิก*, พิมพ์ครั้งที่ 2.

ศศิวิมล พัฒเสมา, สิริภาพ สินติเทพ และสุรชนี เสวตศิลา. (2555). กลูตาไธโอน (Glutathione). *จดหมายข่าว  
ศูนย์รวบรวมปัญหาคุณภาพยา*, ปีที่ 15(1).

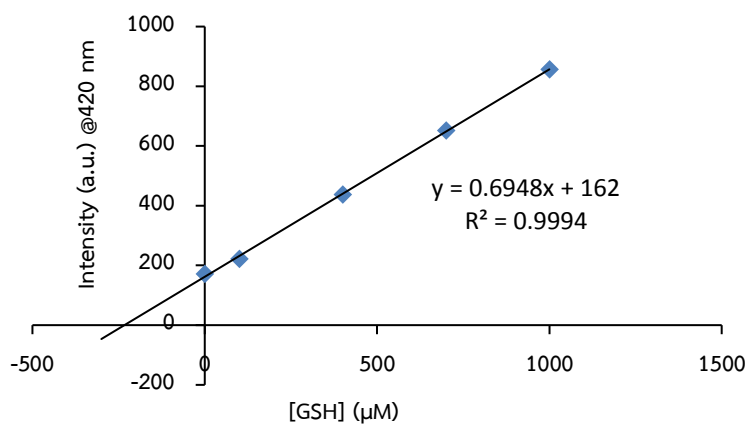
ภาคผนวก



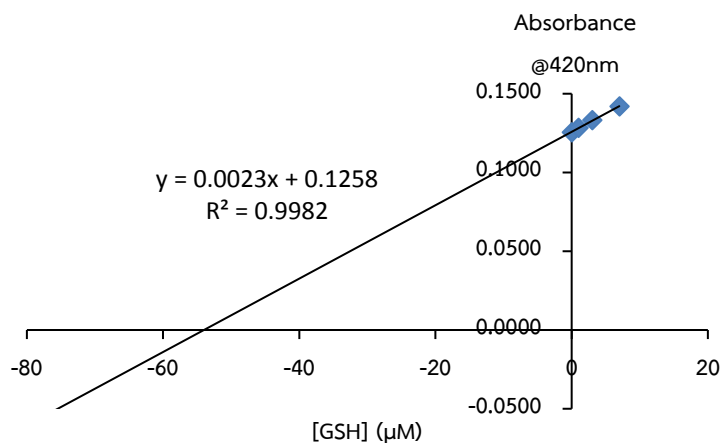
รูปภาพ S1. กราฟ Standard addition ในการวิเคราะห์หาปริมาณ GSH ของตัวอย่าง GO1 โดยใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรโฟโตเมทรี



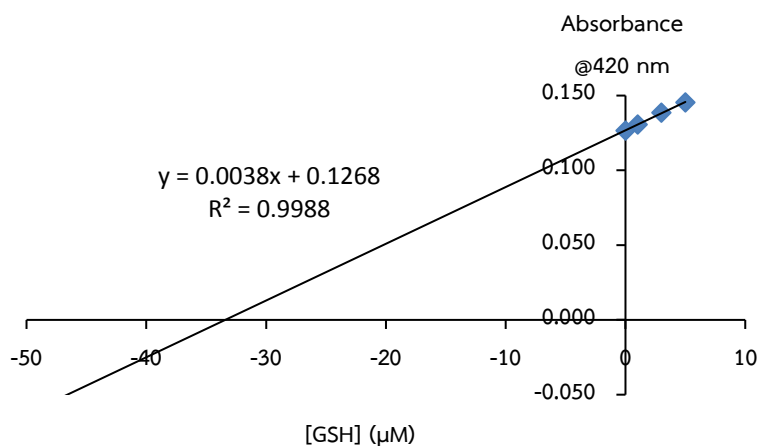
รูปภาพ S2. กราฟ Standard addition ในการวิเคราะห์หาปริมาณ GSH ของตัวอย่าง GO2 โดยใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรโฟโตเมทรี



รูปภาพ S3. กราฟ Standard addition ในการวิเคราะห์หาปริมาณ GSH ของตัวอย่าง GO3 โดยใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรโฟโตเมทรี

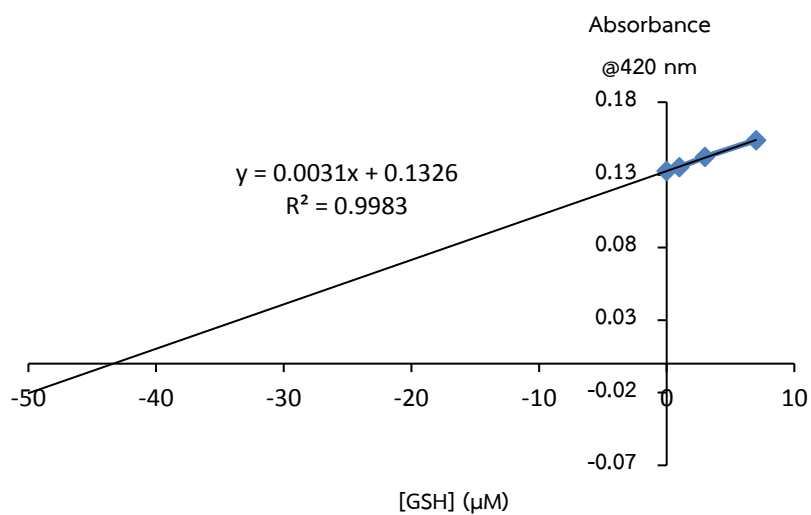


รูปภาพ S4. กราฟ Standard addition ในการวิเคราะห์หาปริมาณ GSH ของตัวอย่าง GO1 โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี



รูปภาพ S5. กราฟ Standard addition ในการวิเคราะห์หาปริมาณ GSH ของตัวอย่าง GO2 โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี





รูปภาพ S6. กราฟ Standard addition ในการวิเคราะห์หาปริมาณ GSH ของตัวอย่าง GO3 โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี