



การสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์จากอนุพันธ์ของเพนตะเฮลิซีนสำหรับตรวจจับไอออน

สังกะสี

โดย

นายเปรมศักดิ์ ปทะวานิช



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมี แผน ก แบบ ก 2 ปริญญามหาบัณฑิต

ภาควิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2564

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

การสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์จากอนุพันธ์ของเพนตะเฮลิซีนสำหรับตรวจจับ  
ไอออนสังกะสี



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเคมี แผน ก แบบ ก 2 ปริญญามหาบัณฑิต  
ภาควิชาเคมี  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร  
ปีการศึกษา 2564  
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

SYNTHESIS OF FLUORESCENCE COMPOUND BASED ON [5]HELICENE  
DERIVATIVES FOR ZINC(II) SENSING



By

MR. Pramsak PATAWANICH

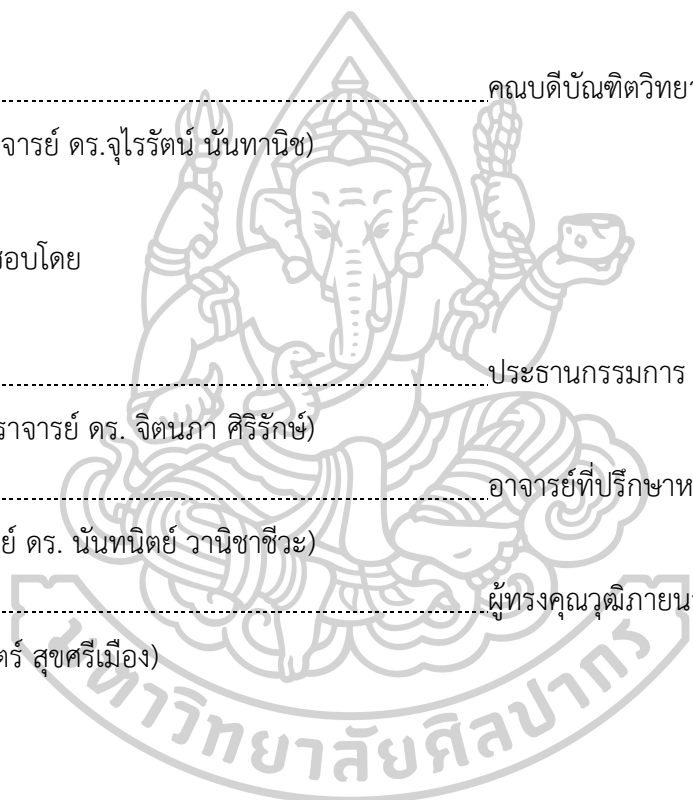
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for Master of Science (CHEMISTRY)  
Department of CHEMISTRY  
Graduate School, Silpakorn University  
Academic Year 2021  
Copyright of Silpakorn University

หัวข้อ	การสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์จากอนุพันธ์ของเพนตะเฮลิซีนสำหรับตรวจจับไอออนสังกะสี
โดย	นายเปรมศักดิ์ ปทะวานิช
สาขาวิชา	เคมี แผน ก แบบ ก 2 ปริญญามหาบัณฑิต
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	ศาสตราจารย์ ดร. นันทนิตย์ วานิชชีวะ

---

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....	คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.จุไรรัตน์ นันทานิช)	
พิจารณาเห็นชอบโดย	
.....	ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตนภา ศิริรักษ์)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ศาสตราจารย์ ดร. นันทนิตย์ วานิชชีวะ)	
.....	ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(ดร. ชนศาสตร์ สุขศรีเมือง)	



630720007 : เคมี แผน ก แบบ ก 2 ปริญญามหาบัณฑิต

คำสำคัญ : ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์, ไอออนสังกะสี, เพนตะเฮลิซีน, การถ่ายภาพเซลล์สิ่งมีชีวิต

นาย เปรมศักดิ์ ปทะวานิช: การสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์จากอนุพันธ์ของเพนตะเฮลิซีนสำหรับตรวจจับไอออนสังกะสี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ศาสตราจารย์ ดร. นันทนิตย์ วานิชชาชีวะ

สังกะสีเป็นหนึ่งในแร่ธาตุที่มีความจำเป็นต่อร่างกายมนุษย์และการเจริญเติบโตของพืช นอกจากนี้สังกะสียังถูกใช้อย่างแพร่หลายในกระบวนการทางอุตสาหกรรม ทำให้มีโอกาสปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ แล้วก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม การใช้ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ในการตรวจวัดไอออนสังกะสีเป็นวิธีที่มีความสะดวก และรวดเร็ว ในงานวิจัยนี้ได้นำเสนอการออกแบบและการสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ชนิดใหม่สำหรับตรวจวัดไอออนสังกะสีอย่างจำเพาะเจาะจงโดยใช้อนุพันธ์ของ [5]helicene ที่สามารถคายแสงฟลูออเรสเซนต์ได้ในช่วงยูวี-วิสิเบิล ทำให้สามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงได้ด้วยตาเปล่า และเชื่อมต่อกับไอโอโนฟอร์ชนิด 1-(6-(aminomethyl)pyridin-2-yl)-N,N-bis(pyridine-2-ylmethyl)methanamine โดยเซ็นเซอร์ MT สามารถตรวจจับไอออนสังกะสีอย่างจำเพาะเจาะจงในระบบตัวทำละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES และเมทานอล แม้ในภาวะที่มีไอออนรบกวนอื่นๆ โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดของการตรวจวัดไอออนสังกะสีเท่ากับ 29 นาโนโมลาร์ (1.91 ppb) ซึ่งต่ำกว่าค่ามาตรฐานในน้ำดื่มที่องค์การอนามัยโลกได้กำหนดไว้ นอกจากนี้เซ็นเซอร์ MT สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจจับไอออนสังกะสีในเซลล์มะเร็งสมองและมะเร็งตับของมนุษย์ได้

630720007 : Major (CHEMISTRY)

Keyword : FLUORESCENCE SENSOR, ZINC ION, [5]HELICENE, CELL IMAGING

MR. PRAMSAK PATAWANICH : SYNTHESIS OF FLUORESCENCE COMPOUND  
BASED ON [5]HELICENE DERIVATIVES FOR ZINC(II) SENSING THESIS ADVISOR : PROFESSOR  
NANTANIT WANICHACHEVA, Ph.D.

Zinc is one of the most important trace elements in human body and plant growth. Moreover, it is also commonly utilized in various industrial purposes resulting in the contamination to environment. Fluorescence-based sensors play a fundamental role in metal ion sensing due to its rapid response and sensitivity. In this thesis, a novel fluorescence sensor was designed and synthesized for the selective detection of zinc ion. The [5]helicene derivative, a UV-visible emitting fluorophore, was connected with 1-(6-(aminomethyl)pyridin-2-yl)-N,N-bis(pyridine-2-ylmethyl)methanamine. The sensor MT exhibited highly selective toward  $Zn^{2+}$  over other interfering ions in aqueous methanol solution with detection limit as low as 29 nM (1.91 ppb), which is below the limit recommended by the WHO for safe drinking water. In addition, MT can apply for intracellular  $Zn^{2+}$ -tracking application in human hepatoma (HepG2) and glioblastoma astrocytoma (U251) cells.



## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. นันทินิตย์ วานิชชีวะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ เป็นอย่างสูง สำหรับความกรุณาที่มีให้ ทั้งการอบรมสั่งสอนด้วยความรัก ความเมตตาปราณี ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ความรู้ รวมไปถึงคอยช่วยเหลืออันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการทำวิทยานิพนธ์นี้ ตลอดจน กำลังใจ โอกาส และประสบการณ์ดีๆ ที่มอบให้ตลอดมา

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตนภา ศิริรักษ์ ประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความรู้ และความช่วยเหลือด้านเคมีเชิงคำนวณ สั่งสอนประสบการณ์ต่างๆ ตลอดจน คำปรึกษา และคำแนะนำต่างๆ อันเป็นประโยชน์ต่อวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร. ชาญศาสตร์ สุขศรีเมือง ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ให้คำแนะนำ คำปรึกษา และอนุเคราะห์สารเคมี ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำวิทยานิพนธ์นี้ให้ราบรื่นเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่าน ที่กรุณาประสิทธิ์ประสาทความรู้ต่างๆ ทั้งความรู้ในด้านวิชาการและด้านการดำเนินชีวิต และภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร สำหรับความรู้และประสบการณ์ที่ดี ในขณะที่ได้ศึกษาอยู่ ณ สถาบันการศึกษาแห่งนี้

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่ชาย ที่เป็นกำลังใจ ให้ความรักความอบอุ่น และให้การสนับสนุนในทุกๆ เรื่อง ตลอดจนคำปรึกษาที่ดีในด้านต่างๆ มาโดยตลอด

ขอขอบคุณพี่ น้อง และเพื่อนในกลุ่มวิจัยของศาสตราจารย์ ดร. นันทินิตย์ วานิชชีวะ สำหรับคำปรึกษาในการแก้ปัญหาต่างๆ และไม่ตรีจิตอันดีที่มอบให้แก่กันมาโดยตลอด

สุดท้ายขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาเคมีทุกท่าน อีกทั้งขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเคมีทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือด้านอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำวิทยานิพนธ์ด้วยความเอื้อเฟื้อตลอดมา

ประโยชน์อันใดที่เกิดจากการทำวิทยานิพนธ์นี้ ย่อมเป็นผลมาจากความกรุณาของทุกท่าน ดังกล่าว ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งและระลึกถึงความกรุณาเป็นอย่างยิ่ง จึงใคร่ขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

นาย เปรมศักดิ์ ปะวะวานิช

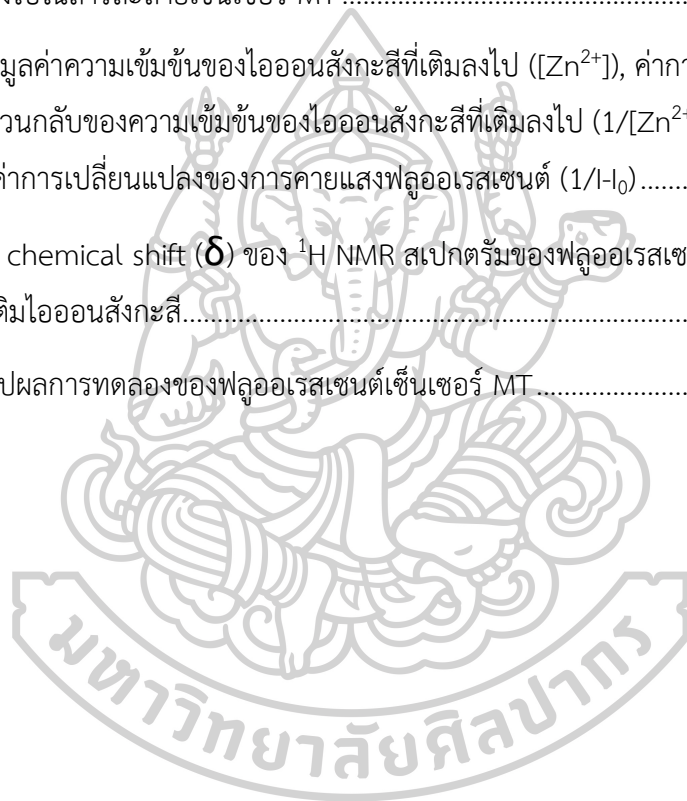
## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ซ
สารบัญรูปภาพ.....	ฌ
บทที่ 1.....	1
บทนำ.....	1
บทที่ 2.....	6
ทบทวนวรรณกรรม.....	6
บทที่ 3.....	14
อุปกรณ์และสารเคมี.....	14
บทที่ 4.....	17
วิธีดำเนินงานวิจัย.....	17
บทที่ 5.....	31
ผลการดำเนินงานวิจัย.....	31
บทที่ 6.....	72
สรุปผลการทดลอง.....	72
รายการอ้างอิง.....	74
ประวัติผู้เขียน.....	78



## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงค่าพารามิเตอร์ที่ใช้ในการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ MT .....	23
ตารางที่ 2 แสดงการหาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของเซ็นเซอร์ด้วยวิธี Job's plot....	27
ตารางที่ 3 ข้อมูลค่าเฉลี่ยของสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ และความเข้มข้นของไอออนสังกะสีที่เติมลงไปในการละลายเซ็นเซอร์ MT .....	58
ตารางที่ 4 ข้อมูลค่าความเข้มข้นของไอออนสังกะสีที่เติมลงไป ( $[Zn^{2+}]$ ), ค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ (I), ค่าส่วนกลับของความเข้มข้นของไอออนสังกะสีที่เติมลงไป ( $1/[Zn^{2+}]$ ) และค่าส่วนกลับของค่าการเปลี่ยนแปลงของการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ( $1/I-I_0$ ) .....	65
ตารางที่ 5 ค่า chemical shift ( $\delta$ ) ของ $^1H$ NMR สเปกตรัมของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ MT ก่อนและหลังการเติมไอออนสังกะสี.....	67
ตารางที่ 6 สรุปผลการทดลองของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ MT .....	72



## สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 การเปลี่ยนแปลงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์แบบปิด-เปิด (off-on system).....	3
ภาพที่ 2 การเปลี่ยนแปลงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์แบบปิด-เปิด (off-on system).....	3
ภาพที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ชนิดใหม่ .....	4
ภาพที่ 4 โครงสร้างเซ็นเซอร์ 1 (ซ้าย) และสเปกตรัมการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนสังกะสี (ขวา).....	7
ภาพที่ 5 โครงสร้างเซ็นเซอร์ 2 (ซ้าย) สเปกตรัมการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนสังกะสีในปริมาณต่างๆ (กลาง) และภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) ในภาวะที่มีไอออนสังกะสี .....	7
ภาพที่ 6 โครงสร้างเซ็นเซอร์ 3 (ซ้าย) และสเปกตรัมการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนสังกะสีในปริมาณต่างๆ (ขวา).....	8
ภาพที่ 7 โครงสร้างเซ็นเซอร์ 4 (ซ้าย) และสเปกตรัมการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนทองแดง (ขวาบน) และไอออนสังกะสี (ขวาล่าง) ที่ปริมาณต่างๆ .....	9
ภาพที่ 8 โครงสร้างเซ็นเซอร์ 5 (ซ้าย) สเปกตรัมการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนสังกะสีในปริมาณต่างๆ (กลาง) และภาพถ่ายใต้แสง UV ของแผ่นทดสอบสำหรับตรวจจับไอออนสังกะสี (ขวา).....	10
ภาพที่ 9 โครงสร้างเซ็นเซอร์ 6 (ซ้าย) สเปกตรัมการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนสังกะสีในปริมาณต่างๆ (ขวาบน) และภาพถ่ายใต้แสง UV ของสารละลายเซ็นเซอร์ในภาวะที่มีไอออนต่างๆ .....	10
ภาพที่ 10 โครงสร้างเซ็นเซอร์ 7 (ซ้าย) สเปกตรัมการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนสังกะสีในปริมาณต่างๆ (ขวาบน) และภาพถ่ายใต้แสง UV ของแผ่นทดสอบสำหรับตรวจจับไอออนสังกะสี (ขวาล่าง).....	11
ภาพที่ 11 โครงสร้างเซ็นเซอร์ 8 (ซ้าย) และสเปกตรัมการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนต่างๆ (ขวา) .....	12

ภาพที่ 12 โครงสร้างเซ็นเซอร์ 9 (ซ้าย) สเปกตรากการคายแสงฟลูออเรสเซนส์ในภาวะที่มีไอออน สังกะสีในปริมาณต่างๆ (กลาง) และสเปกตรากการคายแสงฟลูออเรสเซนส์ในภาวะที่มี ไอออนไฮดรอกไซด์ (ขวา).....	13
ภาพที่ 13 โครงสร้างเซ็นเซอร์ 10 (ซ้าย) และสเปกตรากการคายแสงฟลูออเรสเซนส์ในภาวะที่มีไอออน สังกะสีในปริมาณต่างๆ (ขวา).....	13
ภาพที่ 14 โครงสร้างฟลูออเรสเซนส์เซ็นเซอร์ MT.....	17
ภาพที่ 15 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์ 2,6-bis(chloromethyl)pyridine (I-2).....	17
ภาพที่ 16 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์ 2-((6-(chloromethyl)pyridine-2-yl)methyl) isoindoline-1,3-dione (I-3).....	18
ภาพที่ 17 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์ 2-((6-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)methyl)pyridin- 2-yl)methyl)isoindoline-1,3-dione (I-4).....	19
ภาพที่ 18 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์ 1-(6-(aminomethyl)pyridin-2-yl)-N,N-bis(pyridin-2- ylmethyl)methanamine (TMPA).....	20
ภาพที่ 19 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนส์เซ็นเซอร์ MT.....	21
ภาพที่ 20 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ I-2.....	31
ภาพที่ 21 <sup>1</sup> H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ I-2.....	32
ภาพที่ 22 <sup>13</sup> C NMR สเปกตรัมของสารประกอบ I-2.....	32
ภาพที่ 23 <sup>13</sup> C DEPT 135 NMR สเปกตรัมของสารประกอบ I-2.....	33
ภาพที่ 24 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของสารประกอบ I-2.....	34
ภาพที่ 25 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ I-3.....	34
ภาพที่ 26 <sup>1</sup> H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ I-3.....	35
ภาพที่ 27 <sup>13</sup> C NMR สเปกตรัมของสารประกอบ I-3.....	35
ภาพที่ 28 <sup>13</sup> C DEPT 135 NMR สเปกตรัมของสารประกอบ I-3.....	36
ภาพที่ 29 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของสารประกอบ I-3.....	37
ภาพที่ 30 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ I-4.....	37

ภาพที่ 31 <sup>1</sup> H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ I-4 .....	38
ภาพที่ 32 <sup>13</sup> C NMR สเปกตรัมของสารประกอบ I-4 .....	39
ภาพที่ 33 <sup>13</sup> C DEPT 135 NMR สเปกตรัมของสารประกอบ I-4 .....	39
ภาพที่ 34 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของสารประกอบ I-4 .....	41
ภาพที่ 35 โครงสร้างทางเคมีของไอโอโนฟอร์ชนิด TMPA .....	41
ภาพที่ 36 <sup>1</sup> H NMR สเปกตรัมของไอโอโนฟอร์ชนิด TMPA.....	42
ภาพที่ 37 <sup>13</sup> C NMR สเปกตรัมของไอโอโนฟอร์ชนิด TMPA .....	42
ภาพที่ 38 <sup>13</sup> C DEPT 135 NMR สเปกตรัมของไอโอโนฟอร์ชนิด TMPA.....	43
ภาพที่ 39 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของไอโอโนฟอร์ชนิด TMPA.....	45
ภาพที่ 40 โครงสร้างทางเคมีของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ MT.....	46
ภาพที่ 41 <sup>1</sup> H NMR สเปกตรัมของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ MT .....	47
ภาพที่ 42 <sup>13</sup> C NMR สเปกตรัมของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ MT .....	47
ภาพที่ 43 <sup>13</sup> C DEPT 135 NMR สเปกตรัมของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ MT .....	48
ภาพที่ 44 HR ESI-TOF MS สเปกตรัมของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ MT .....	48
ภาพที่ 45 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ MT .....	51
ภาพที่ 46 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ ( $\lambda_{ex} = 373$ nm และ $\lambda_{em} = 456$ nm) ของเซ็นเซอร์ MT (5.0 $\mu$ M) ในตัวทำละลายเมทานอล ที่ปริมาณน้ำต่างกัน ก่อนและหลังเติมไอออนสังกะสี ที่ความเข้มข้น 2.5 $\mu$ M.....	53
ภาพที่ 47 การคายแสงฟลูออเรสเซนต์ ( $\lambda_{ex} = 373$ nm และ $\lambda_{em} = 456$ nm) ของเซ็นเซอร์ MT (10 $\mu$ M) ที่ pH ต่างๆ ก่อนและหลังเติมไอออนสังกะสีที่ความเข้มข้น 2.5 $\mu$ M .....	54
ภาพที่ 48 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ ( $\lambda_{ex} = 373$ nm และ $\lambda_{em} = 456$ nm) ที่เวลาใดๆ ของเซ็นเซอร์ MT (10 $\mu$ M) เมื่อเติมไอออนสังกะสีเข้มข้น 2.5 $\mu$ M.....	55
ภาพที่ 49 สเปกตรากการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ ( $\lambda_{ex} = 373$ nm) ของเซ็นเซอร์ MT (10 $\mu$ M) ก่อนและหลังเติมไอออนสังกะสีที่ความเข้มข้นต่างๆ (a) 0 $\mu$ M, (b) 0.5 $\mu$ M, (c) 1.0 $\mu$ M, (d) 1.5 $\mu$ M, (e) 2.0 $\mu$ M, (f) 2.5 $\mu$ M, (g) 3.0 $\mu$ M, (h) 3.5 $\mu$ M, (i) 4.0 $\mu$ M. ....	56

ภาพที่ 50 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยของสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ MT (10 $\mu$ M) และความเข้มข้นของไอออนสังกะสีที่เติมลงไป .....	58
ภาพที่ 51 สเปกตรากการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ( $\lambda_{ex} = 373$ nm) ของเซ็นเซอร์ MT (10 $\mu$ M) ในภาวะที่มีไอออนสังกะสี และไอออนรบกวนอื่นๆ (5.0 $\mu$ M).....	60
ภาพที่ 52 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ( $\lambda_{ex} = 373$ nm และ $\lambda_{em} = 456$ nm) ของเซ็นเซอร์ MT (10 $\mu$ M) และความเข้มข้นของไอออนรบกวนอื่นๆ.....	60
ภาพที่ 53 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ( $\lambda_{ex} = 373$ nm และ $\lambda_{em} = 456$ nm) ของเซ็นเซอร์ MT (10 $\mu$ M) ในภาวะที่มีไอออนสังกะสี (2.5 $\mu$ M) ร่วมกับไอออนอื่นๆ (12.5 $\mu$ M).....	62
ภาพที่ 54 การเปลี่ยนแปลงแสงฟลูออเรสเซนซ์ของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ MT (10 $\mu$ M) ในภาวะที่มีไอออนโลหะชนิดต่างๆ (5.0 $\mu$ M) ภายใต้แสง UV.....	62
ภาพที่ 55 กราฟแสดงอัตราส่วนของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเซ็นเซอร์ MT กับไอออนสังกะสี โดยใช้วิธี Job's plot analysis.....	63
ภาพที่ 56 การศึกษาค่าคงที่สมดุลของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนโดยใช้สมการ Benesi-Hildebrand เมื่อ $n = 1$ .....	66
ภาพที่ 57 $^1$ H NMR สเปกตราของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ MT ก่อน (ล่าง) และหลัง (บน) เติมไอออนสังกะสีใน methanol- $d_4$ .....	68
ภาพที่ 58 แบบจำลองโมเลกุลของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ MT (ซ้าย) และสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ MT กับไอออนสังกะสี (ขวา) โดยความยาวพันธะแสดงในหน่วย Å.....	69
ภาพที่ 59 ภาพถ่ายเซลล์มะเร็งระดับของมนุษย์ (บน) และเซลล์มะเร็งสมองของมนุษย์ (ล่าง) ที่สภาวะการทดลองต่างๆ (มาตราส่วน 20 ไมครอน).....	70

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ที่มาและความสำคัญของปัญหา

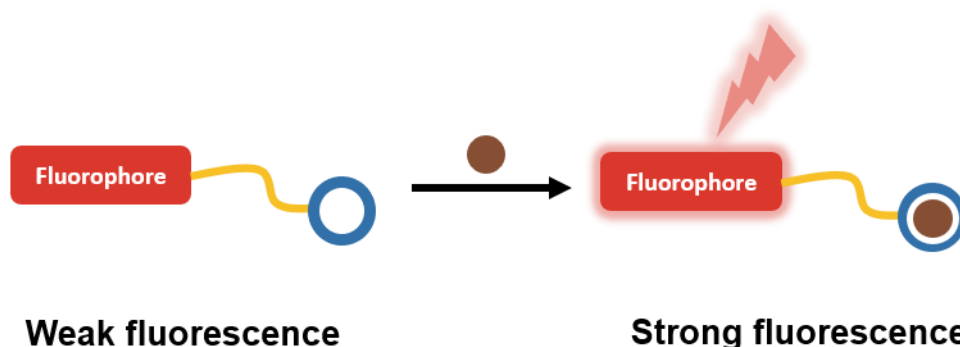
ปัจจุบันอุตสาหกรรมเป็นภาคส่วนที่มีบทบาทสำคัญในการพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศ เนื่องจากความเจริญก้าวหน้าทางวิศวกรรมเคมีและเทคโนโลยีอุตสาหกรรมทำให้มีการใช้สารเคมีเพื่อควบคุมการใช้ทรัพยากรอย่างคุ้มค่า รวมถึงเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการผลิตอย่างชาญฉลาด โดยของเสียจากกระบวนการผลิตเหล่านี้เป็นสาเหตุหลักของปัญหามลพิษทางสิ่งแวดล้อมในวงกว้าง ซึ่งส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนของสารเคมี และไอออนโลหะหนักที่เป็นอันตรายลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ดิน จนกระทั่งกลับเข้าสู่ห่วงโซ่อาหาร แล้วก่อให้เกิดผลกระทบต่อร่างกายทั้งในระยะสั้นและระยะยาว

โลหะสังกะสีถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรมอย่างแพร่หลาย เช่น ใช้เป็นส่วนประกอบของโลหะผสม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและปรับปรุงคุณสมบัติของโลหะ ใช้ในงานเคลือบโลหะ เพื่อป้องกันสนิมและการกัดกร่อน ใช้เป็นส่วนผสมในอุตสาหกรรมยา โดยใช้ในรูปของเกลือบซิงค์คาร์บอเนต ( $ZnCO_3$ ) เพื่อรักษาอาการคันบริเวณผิวหนัง ใช้ในการเคลือบฉากเรืองแสงของหลอดฟลูออเรสเซนต์และสีพรายน้ำ โดยใช้ในรูปของเกลือบซิงค์ซัลไฟด์ ( $ZnS$ ) และสามารถใช้เป็นสารป้องกันเชื้อราในอุตสาหกรรมกระดาษ โดยใช้ในรูปเกลือบซิงค์คลอไรด์ ( $ZnCl_2$ ) นอกจากนี้โลหะสังกะสีสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมแล้ว สังกะสีถือเป็นแร่ธาตุที่มีความจำเป็นต่อร่างกายมนุษย์ และต้องได้รับอย่างสม่ำเสมอ เนื่องจากเป็นแร่ธาตุที่มีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของร่างกาย เช่น ช่วยกระตุ้นการสร้าง และการซ่อมแซมหนังกำพวด ช่วยกระตุ้นการสังเคราะห์คอลลาเจน ช่วยในกระบวนการสร้างเอนไซม์ ระบบภูมิคุ้มกัน การสร้างสารพันธุกรรม และการซ่อมแซมบาดแผล [1-3] โดยปริมาณสังกะสีที่ร่างกายควรได้รับต่อวันจะแตกต่างกันออกไปตามช่วงอายุ สำหรับผู้ใหญ่เพศชายและผู้ใหญ่เพศหญิง ควรได้รับวันละ 8 และ 11 มิลลิกรัม ตามลำดับ [4] หากร่างกายได้รับสังกะสีไม่เพียงพอจะส่งผลกระทบต่อการทำงานของร่างกาย เกิดภาวะโลหิตจาง หัวล้าน และต่อมสร้างเชื้ออสุจิน้อยกว่าปกติ (hypogonadism) ในขณะที่การได้รับปริมาณสังกะสีมากกว่าที่ร่างกายต้องการจะส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของระดับคอเลสเตอรอล เสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจ และโรคที่เกี่ยวข้องกับหลอดเลือด ระบบประสาทและสมอง เช่น โรคพาร์กินสัน และโรคอัลไซเมอร์ [5, 6] โดย

องค์การอนามัยโลก (World Health Organization; WHO) ได้กำหนดให้มีปริมาณสังกะสีในน้ำดื่มสูงสุดไม่เกิน 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 76 ไมโครโมลาร์ [7]

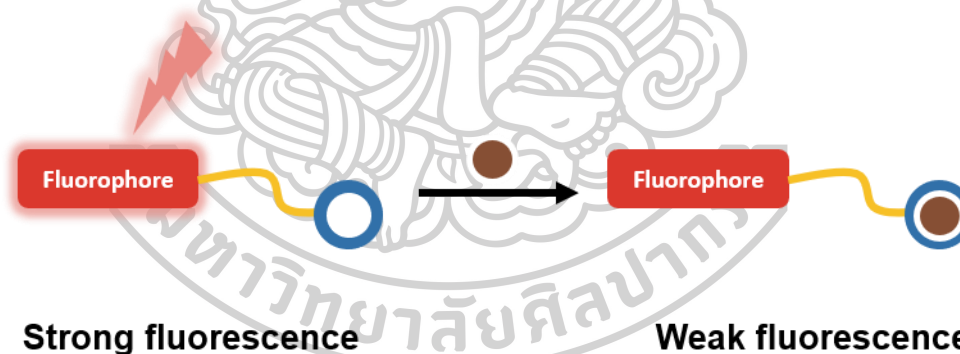
การวิเคราะห์ปริมาณไอออนสังกะสีนิยมใช้เทคนิคทางสเปกโตรสโกปี เช่น Flame Atomic Absorption Spectrometry (FAAS) และ Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) [8, 9] เทคนิคทางไฟฟ้าเคมี เช่น Anodic Stripping Voltammetry [10] หรือแม้กระทั่งการวิเคราะห์โดยน้ำหนักและปริมาตรวิเคราะห์ เช่น วิธีการตกตะกอน (precipitation method) วิธีการไตเตรต (titrimetric method) แต่เทคนิคเหล่านี้มีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างมีความซับซ้อน เครื่องมือมีขนาดใหญ่ และราคาสูง ใช้สารตัวอย่างปริมาณมาก ทำให้ไม่เหมาะกับการพัฒนาเป็นอุปกรณ์วิเคราะห์ภาคสนาม ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรสโกปีในการวิเคราะห์ปริมาณไอออนสังกะสี โดยใช้ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ใช้งานได้ง่าย การเตรียมตัวอย่างไม่ซับซ้อน ราคาถูก และสามารถวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้อง รวดเร็วและแม่นยำ

โมเลกุลของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ประกอบด้วยส่วนสำคัญ 2 ส่วน ได้แก่ ฟลูออโรฟอร์ (fluorophore) ที่ทำหน้าที่แสดงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อมีการดักจับไอออน โดยฟลูออโรฟอร์แต่ละชนิดจะมีช่วงความยาวคลื่นในการดูดกลืนแสงและการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่แตกต่างกันออกไป และไอโอโนฟอร์ (ionophore) ซึ่งทำหน้าที่ในการดักจับไอออนเป้าหมายอย่างจำเพาะเจาะจง โดยใช้อะตอมที่มีอิเล็กตรอนหนาแน่นในการเกิดอันตรกิริยากับไอออนเป้าหมาย เช่น ไนโตรเจน ออกซิเจน และซัลเฟอร์ เป็นต้น การออกแบบฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ให้สามารถตรวจจับไอออนเป้าหมายได้อย่างจำเพาะเจาะจงจำเป็นต้องอาศัยการออกแบบด้วยหลักการลูกกุญแจกับแม่กุญแจ (lock and key theory) [11] และการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลโฮสต์-เกสต์ (host-guest recognition) [12, 13] แล้วเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ หรือการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงในช่วงต่างๆ ซึ่งกระบวนการเปลี่ยนแปลงการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ สามารถอธิบายได้ 2 รูปแบบ ได้แก่



ภาพที่ 1 การเปลี่ยนแปลงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์แบบปิด-เปิด (off-on system)

1. การเปลี่ยนแปลงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์แบบปิด-เปิด (off-on system) จะมีรูปแบบการทำงานแสดงดังภาพที่ 1 โดยในภาวะที่ไม่มีไอออนโลหะ ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์จะมีการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์เพียงเล็กน้อย หรือไม่มีการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ในขณะที่เมื่อฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์มีการดักจับไอออนโลหะจะเหนี่ยวนำให้เกิดการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์เพิ่มมากขึ้น ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณไอออนที่เติมลงไป

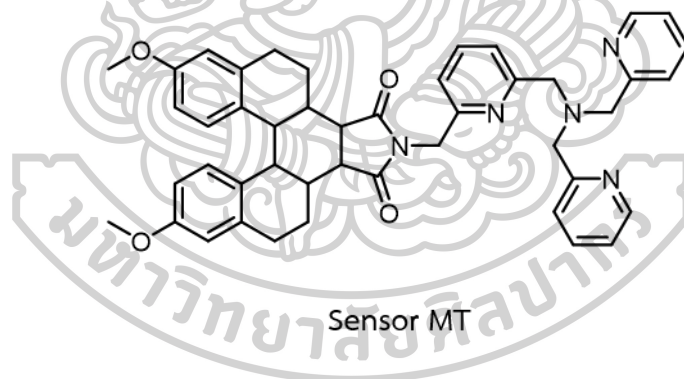


ภาพที่ 2 การเปลี่ยนแปลงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์แบบเปิด-ปิด (on-off system)

2. การเปลี่ยนแปลงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์แบบเปิด-ปิด (on-off system) จะมีรูปแบบการทำงานแสดงดังภาพที่ 2 โดยในภาวะที่ไม่มีไอออนโลหะ ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์จะมีการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ในขณะที่เมื่อฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์มีการดักจับไอออนโลหะจะเหนี่ยวนำให้เกิดการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ลดลง ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณไอออนที่เติมไป



ในวิทยานิพนธ์นี้ได้ศึกษาการออกแบบและสังเคราะห์โมเลกุลฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์สำหรับตรวจจับไอออนสังกะสี โดยใช้อนุพันธ์ของ [5]helicene เป็นฟลูออโรฟอร์ ซึ่งมีค่าการคายแสงที่ดี และมีค่า Stokes shift ที่กว้าง แล้วเชื่อมต่อกับหมู่ 1-(6-(aminomethyl)pyridin-2-yl)-N,N-bis(pyridine-2-ylmethyl)methanamine ทำหน้าที่เป็นไอโอโนฟอร์ ซึ่งประกอบด้วยอะตอมไนโตรเจนของวงไพริดีนจำนวน 3 อะตอม เพื่อใช้สำหรับดักจับไอออนสังกะสีตามหลักของ Pearson's theory หรือ Hard and Soft Acids and Bases (HSAB) [14] โดยมีโครงสร้างแสดงดังภาพที่ 3 เซ็นเซอร์ชนิดใหม่สำหรับตรวจจับไอออนสังกะสีสามารถสังเคราะห์ได้ผ่านปฏิกิริยาที่ไม่ซับซ้อน และราคาต้นทุนถูก โดยฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ที่ได้จะมีความไว และความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนสังกะสี เมื่อเปรียบเทียบกับไอออนโลหะอื่นๆ ที่สามารถพบได้ในตัวอย่างจริง นอกจากนี้เซ็นเซอร์ที่ได้อังยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดไอออนสังกะสีในเซลล์มะเร็งสมองและมะเร็งตับของมนุษย์ โดยใช้ร่วมกับเทคนิคการถ่ายภาพฟลูออเรสเซนต์ แสดงให้เห็นว่าฟลูออเรสเซนต์ที่สังเคราะห์ได้มีประสิทธิภาพที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในตัวอย่างจริง และสามารถพัฒนาเป็นอุปกรณ์ภาพสนามได้



ภาพที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ชนิดใหม่

### วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาการออกแบบและการสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ชนิดใหม่ที่มีความไว และความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนสังกะสี ซึ่งสามารถสังเคราะห์ผ่านขั้นตอนที่น้อย ไม่ซับซ้อน รวมถึงสามารถใช้ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ และปริมาณวิเคราะห์ร่วมกับเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรสโกปีในระบบตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดไอออนสังกะสีในตัวอย่างสิ่งมีชีวิตได้

### ขอบเขตของการศึกษา

1. ออกแบบ สังเคราะห์ และแยกบริสุทธิ์ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ชนิดใหม่
2. นำฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ที่สังเคราะห์ได้ไปศึกษาสมบัติการเรืองแสงในระบบตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ
3. นำฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ที่สังเคราะห์ได้ไปศึกษาความสามารถในการดักจับไอออนด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

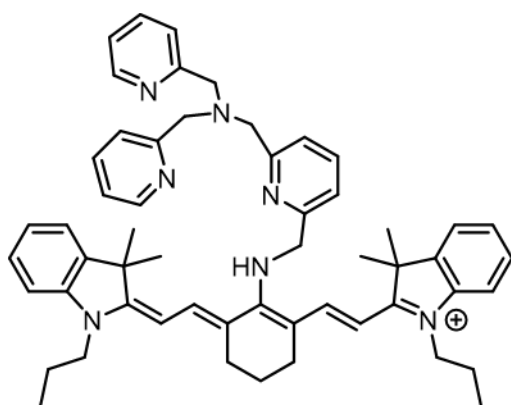
1. สามารถสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ชนิดใหม่ที่มีต้นทุนในการสังเคราะห์ต่ำ มีความไว และความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจวัดไอออนสังกะสี
2. สามารถพัฒนาเป็นเซ็นเซอร์สังกะสีชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการติดตามปริมาณไอออนในเซลล์สิ่งมีชีวิตได้

## บทที่ 2

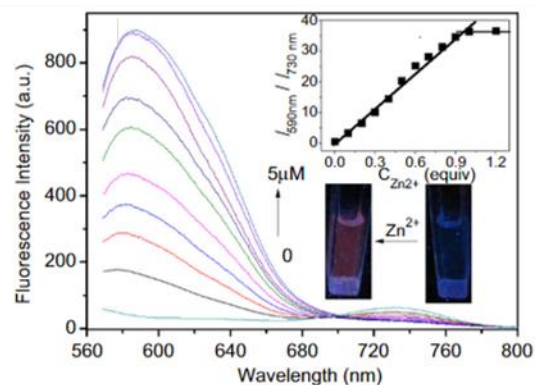
### ทบทวนวรรณกรรม

การใช้ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ร่วมกับเทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรสโกปีในการติดตามและวิเคราะห์หาปริมาณไอออนโลหะหนักเป็นเทคนิคที่ได้รับความสนใจจากนักวิจัยทั่วโลก เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความสะดวก แม่นยำ เครื่องมือไม่มีความซับซ้อน ทำให้นักวิจัยมุ่งเน้นพัฒนาฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ที่มีประสิทธิภาพในการตรวจจับไอออนโลหะหนักทั้งในเชิงความไว (sensitivity) ความจำเพาะเจาะจง (selectivity) รวมไปถึงการนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ภาคสนามและตัวอย่างทางชีวภาพ โดยจะแสดงตัวอย่างบทความ และงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ เพื่อใช้ในการตรวจจับไอออนโลหะสังกะสีและนำไปประยุกต์ใช้ในตัวอย่างจริง ดังนี้

ในปี ค.ศ. 2012 Guo และคณะ [15] ได้พัฒนาฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ที่คายแสงในช่วงใกล้อินฟราเรดจากอนุพันธ์ของ cyanine เชื่อมต่อกับไอโอโนฟออร์ชนิด tris(methyl-2-pyridyl)amine ได้เป็นฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ 1 ที่สามารถตรวจจับไอออนสังกะสีในระบบตัวทำละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ 4-(2-hydroxy ethyl)-1-piperazineethane sulfonic acid (HEPES) ที่ pH 7.4 และอะซิโตไนไทรล์ (acetonitrile) ในอัตราส่วน 9:1 แล้วเปลี่ยนแปลงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์แบบ off-on และมีการเปลี่ยนแปลงความยาวคลื่นของการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์แบบ hypsochromic shift หรือ blue shift จากที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ไปยัง 590 นาโนเมตร โดยเซ็นเซอร์ 1 สามารถตรวจจับไอออนสังกะสีในเซลล์กล้ามเนื้อของหนู (C2C12 และ NIH3T3) และตัวอย่างของปลาฆ่าตาย

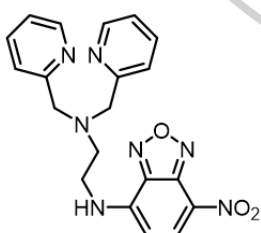


เซ็นเซอร์ 1

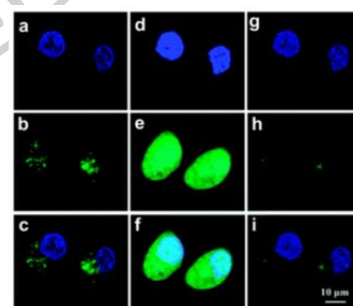
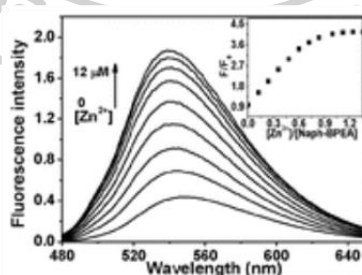


ภาพที่ 4 โครงสร้างเซ็นเซอร์ 1 (ซ้าย) และสเปกตรัมการคายแสงฟลูออเรสเซนส์ในภาวะที่มีไอออนสังกะสี (ขวา)

ในปี ค.ศ. 2013 Zhang และคณะ [16] ได้นำไอโอโนฟอร์ชนิด di(2-picoly)amine มาเชื่อมต่อกับอนุพันธ์ของ nitrobenzoxadiazole (NBD) ทำหน้าที่เป็นฟลูออโรฟอร์ ได้เป็นฟลูออเรสเซนส์เซ็นเซอร์ 2 ซึ่งสามารถดักจับไอออนสังกะสีได้อย่างจำเพาะเจาะจงในตัวทำละลายบัฟเฟอร์ 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethane sulfonic acid (HEPES) ที่ pH 7.2 แล้วเปลี่ยนแปลงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนส์แบบ off-on โดยมีค่า detection limit เท่ากับ  $5.7 \times 10^{-8}$  M (3.86 ppb) นอกจากนี้เซ็นเซอร์ 2 ยังสามารถตรวจวัดไอออนสังกะสีได้เซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) และตัวอ่อนของปลาหมึก

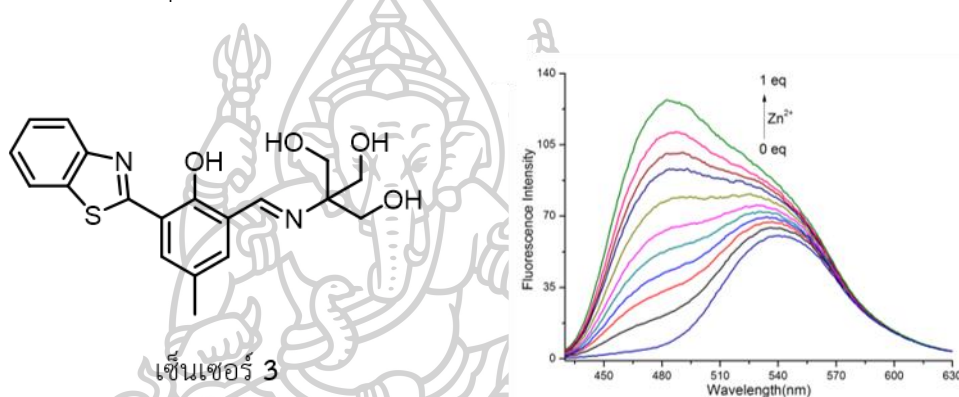


เซ็นเซอร์ 2



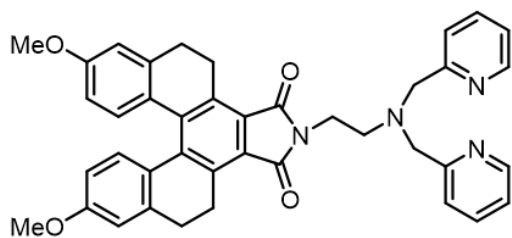
ภาพที่ 5 โครงสร้างเซ็นเซอร์ 2 (ซ้าย) สเปกตรากการคายแสงฟลูออเรสเซนส์ในภาวะที่มีไอออนสังกะสีในปริมาณต่างๆ (กลาง) และภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์ของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) ในภาวะที่มีไอออนสังกะสี

ในปี ค.ศ. 2017 Chang และคณะ [17] ได้ใช้อนุพันธ์ของ benzothiazole ทำหน้าที่เป็นฟลูออโรฟอร์ เชื่อมต่อกับไอโอโนฟอร์ชนิด tris(hydroxymethyl)aminomethane ได้เป็นฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ 3 ที่สามารถดักจับไอออนสังกะสีได้ในสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES ที่ pH 7.4 ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์แบบ off-on และมีการเปลี่ยนแปลงความยาวคลื่นของการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์แบบ hypsochromic shift หรือ blue shift จากที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร ไปยัง 417 นาโนเมตร หลังการเติมไอออนสังกะสี โดยมีค่า detection limit เท่ากับ  $7.0 \times 10^{-9}$  M (0.46 ppb) นอกจากนี้เซ็นเซอร์ 3 ยังสามารถตรวจวัดไอออนสังกะสีในเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) และสามารถประยุกต์ใช้เป็นแผ่นทดสอบสำหรับตรวจวัดไอออนสังกะสี

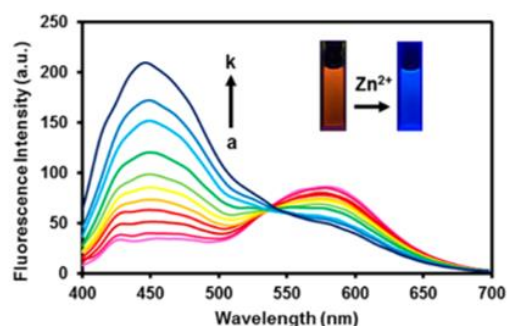
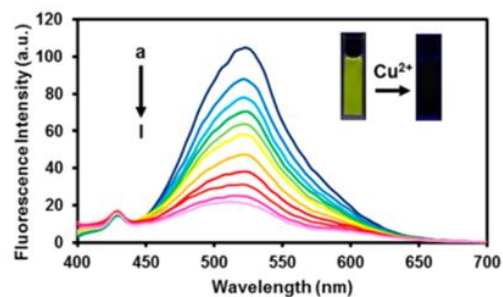


ภาพที่ 6 โครงสร้างเซ็นเซอร์ 3 (ซ้าย) และสเปกตรากการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนสังกะสีในปริมาณต่างๆ (ขวา)

ในปี ค.ศ. 2018 Sakunkaewkasem และคณะ [18] ได้พัฒนาฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ที่สามารถตรวจจับไอออนสังกะสีและไอออนทองแดงในระบบตัวทำละลายที่ต่างกัน โดยใช้อนุพันธ์ของ [5]helicene เป็นฟลูออโรฟอร์ เชื่อมต่อกับไอโอโนฟอร์ชนิด di(2-picolyl)amine ซึ่งในระบบตัวทำละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) ที่ pH 7.2 และเมทานอล (methanol) ที่อัตราส่วน 1:1 เซ็นเซอร์ 5 จะสามารถดักจับไอออนสังกะสีได้อย่างจำเพาะเจาะจง ในขณะที่ตัวทำละลายสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES ที่ pH 7.2 เซ็นเซอร์ 5 จะสามารถดักจับไอออนทองแดงได้อย่างจำเพาะเจาะจง โดยมีค่า detection limit เท่ากับ  $5.8 \times 10^{-8}$  M (3.79 ppb) และ  $8.9 \times 10^{-8}$  M (5.65 ppb) สำหรับไอออนสังกะสีและไอออนทองแดง ตามลำดับ โดยเซ็นเซอร์ 4 สามารถใช้ตรวจวัดปริมาณไอออนสังกะสีและทองแดงในตัวอย่างน้ำดื่มได้ นอกจากนี้ยังสามารถดักจับไอออนสังกะสีและทองแดงในเซลล์มะเร็งตับ (HepG2)

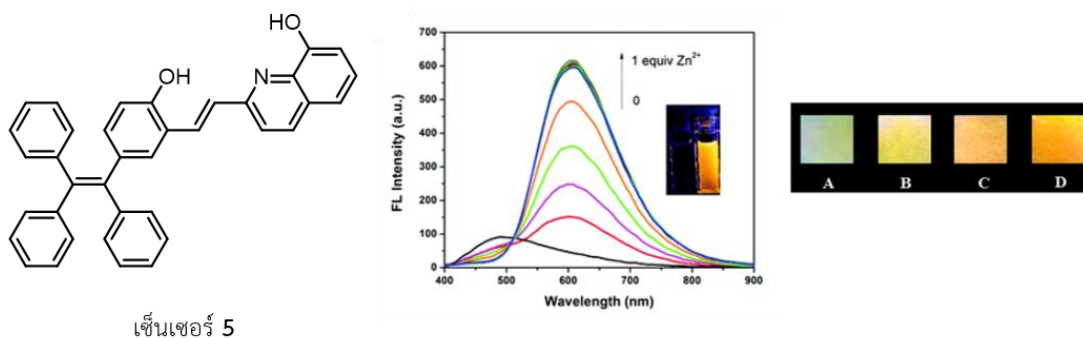


เซ็นเซอร์ 4



ภาพที่ 7 โครงสร้างเซ็นเซอร์ 4 (ซ้าย) และสเปกตรากายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนทองแดง (ขวาบน) และไอออนสังกะสี (ขวาล่าง) ที่ปริมาณต่างๆ

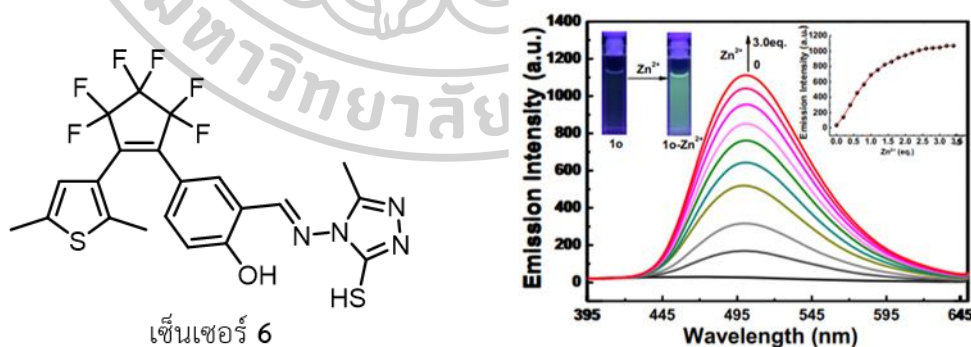
ในปี ค.ศ. 2020 Xu และคณะ [19] ได้พัฒนาฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์สำหรับดักจับไอออนสังกะสี โดยใช้ไอโอโนฟอรัลชนิด 8-hydroxyquinoline ซึ่งประกอบด้วยอะตอมออกซิเจนและไนโตรเจน มาเชื่อมต่อกับสารเรืองแสงกลุ่ม hydroxytetraphenylethene ได้เป็นฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ 5 ซึ่งสามารถดักจับไอออนสังกะสีในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำในอัตราส่วน 9:1 โดยปริมาตร แล้วเปลี่ยนแปลงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์แบบ off-on และมีการเปลี่ยนแปลงความยาวคลื่นของการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์แบบ bathochromic shift หรือ red shift โดยมีค่า detection limit เท่ากับ  $1.6 \times 10^{-7}$  M (10.5 ppb) นอกจากนี้เซ็นเซอร์ 5 ยังสามารถดักจับไอออนสังกะสีในเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) และนำมาประยุกต์ใช้เป็นแผ่นทดสอบสำหรับตรวจวัดไอออนสังกะสีทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ



เซ็นเซอร์ 5

ภาพที่ 8 โครงสร้างเซ็นเซอร์ 5 (ซ้าย) สเปกตรากายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนสังกะสีในปริมาณต่างๆ (กลาง) และภาพถ่ายได้แสง UV ของแผ่นทดสอบสำหรับตรวจจับไอออนสังกะสี (ขวา)

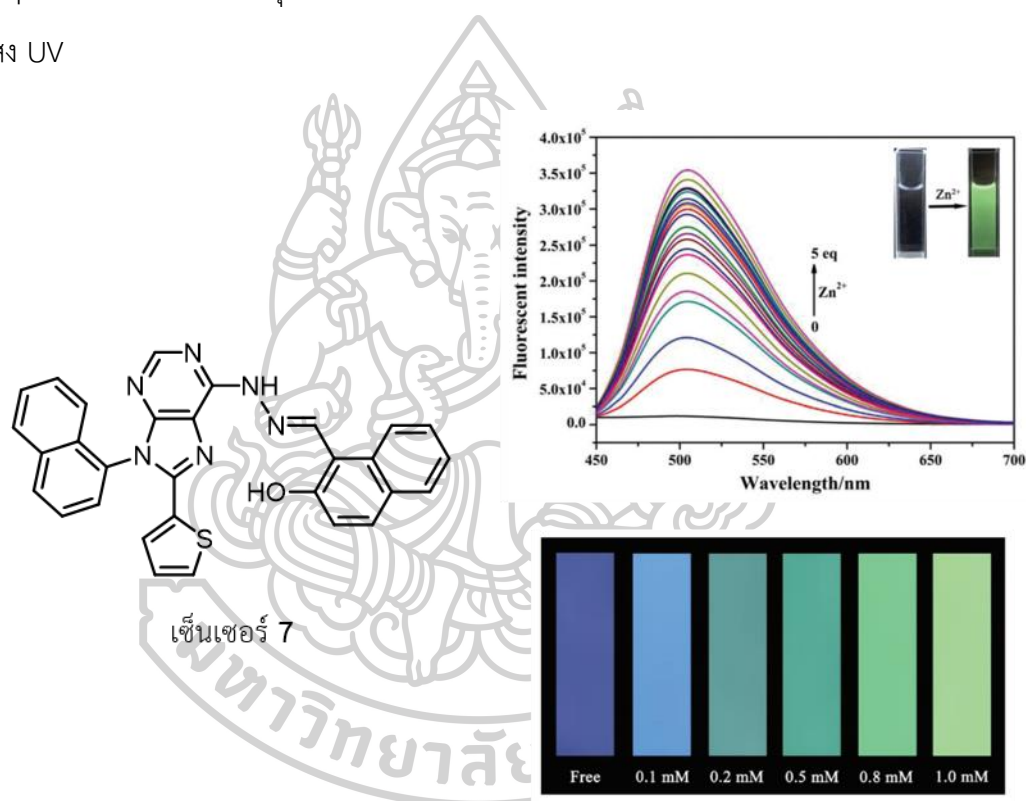
ในปี ค.ศ. 2020 Jiang และคณะ [20] ได้นำอนุพันธ์ของ hexafluorocyclopentene เชื่อมต่อกับไอโอโนฟอร์ชนิด aminomercapto-1,2,4-triazole ได้เป็นฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ 6 ที่สามารถตรวจจับไอออนสังกะสีได้อย่างจำเพาะเจาะจงในตัวทำละลายอะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile) ซึ่งเปลี่ยนแปลงการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์แบบ off-on ทำให้สามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายหลังเติมไอออนสังกะสีภายใต้แสง UV โดยมีค่า detection limit เท่ากับ  $2.8 \times 10^{-9}$  M (0.18 ppb) นอกจากนี้เซ็นเซอร์ 6 ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นแผ่นทดสอบสำหรับตรวจวัดไอออนสังกะสีในเชิงคุณภาพ



เซ็นเซอร์ 6

ภาพที่ 9 โครงสร้างเซ็นเซอร์ 6 (ซ้าย) สเปกตรากายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนสังกะสีในปริมาณต่างๆ (ขวบน) และภาพถ่ายได้แสง UV ของสารละลายเซ็นเซอร์ในภาวะที่มีไอออนต่างๆ

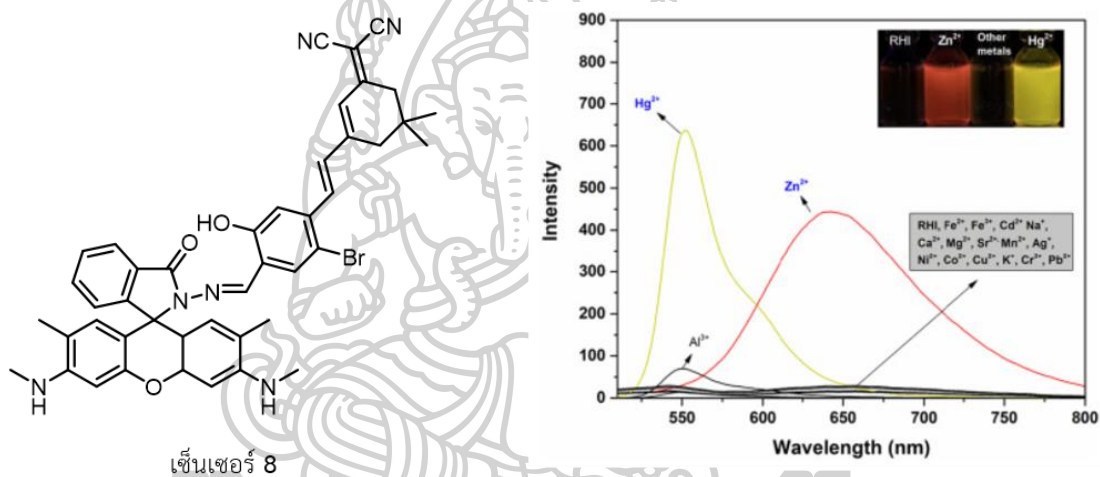
ในปี ค.ศ. 2020 Xu และคณะ [21] ได้ใช้สารเรืองแสงกลุ่ม hydroxynaphthaldehyde เชื่อมต่อกับไอโอโนฟอร์ที่เป็นอนุพันธ์ของ purine ซึ่งประกอบด้วยอะตอมไนโตรเจน ได้เป็นฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ 7 ที่สามารถตรวจจับไอออนสังกะสีได้ในระบบตัวทำละลายผสมระหว่างไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide, DMSO) และสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES ที่ pH 7.4 ในอัตราส่วน 9:1 ซึ่งเปลี่ยนแปลงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์แบบ off-on โดยมีค่า detection limit เท่ากับ  $6.2 \times 10^{-8}$  M (4.03 ppb) นอกจากนี้เซ็นเซอร์ 7 ยังสามารถตรวจจับไอออนสังกะสีในเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) และสามารถประยุกต์ใช้เป็นแผ่นทดสอบสำหรับตรวจวัดไอออนสังกะสีในเชิงปริมาณภายใต้แสง UV



ภาพที่ 10 โครงสร้างเซ็นเซอร์ 7 (ซ้าย) สเปกตรากการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนสังกะสีในปริมาณต่างๆ (ขวาบน) และภาพถ่ายใต้แสง UV ของแผ่นทดสอบสำหรับตรวจจับไอออนสังกะสี (ขวาล่าง)



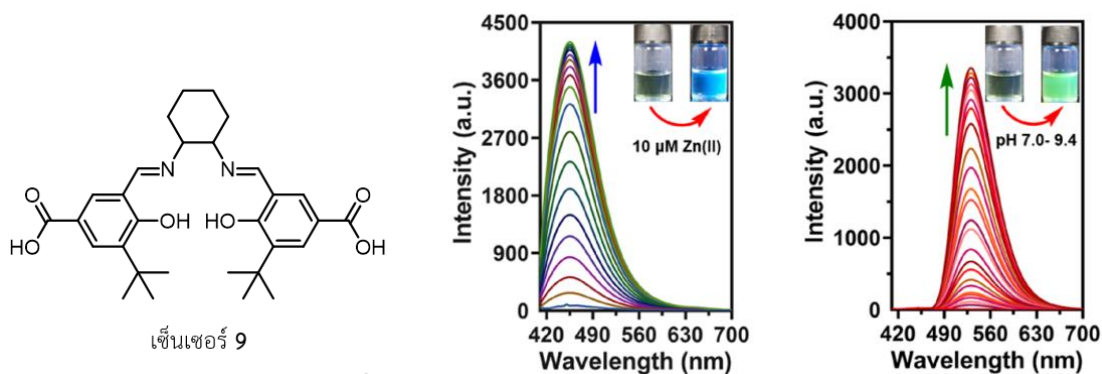
ในปี ค.ศ. 2021 Erdemir และคณะ [22] ได้พัฒนาเซ็นเซอร์สำหรับตรวจจับไอออนสังกะสีและไอออนปรอท โดยใช้อนุพันธ์ของ rhodamine 6G เป็นฟลูออโรฟอร์ เชื่อมต่อกับไอโคโนฟอร์ชนิด isophorone ได้เป็นฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ **8** ที่สามารถดักจับไอออนสังกะสีและไอออนปรอทในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอล และน้ำ ที่อัตราส่วน 8:2 โดยปริมาตร แล้วเปลี่ยนแปลงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์แบบ off-on ที่ความยาวคลื่น 648 นาโนเมตร สำหรับไอออนสังกะสี และที่ความยาวคลื่น 553 นาโนเมตร สำหรับไอออนปรอท โดยมีค่า detection limit เท่ากับ  $8.2 \times 10^{-8}$  M (5.37 ppb) และ  $1.1 \times 10^{-6}$  M (221 ppb) สำหรับไอออนสังกะสีและปรอท ตามลำดับ นอกจากนี้ เซ็นเซอร์ **8** ยังสามารถดักจับไอออนสังกะสีในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (DDL-1)



ภาพที่ 11 โครงสร้างเซ็นเซอร์ **8** (ซ้าย) และสเปกตรากการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนต่างๆ (ขวา)

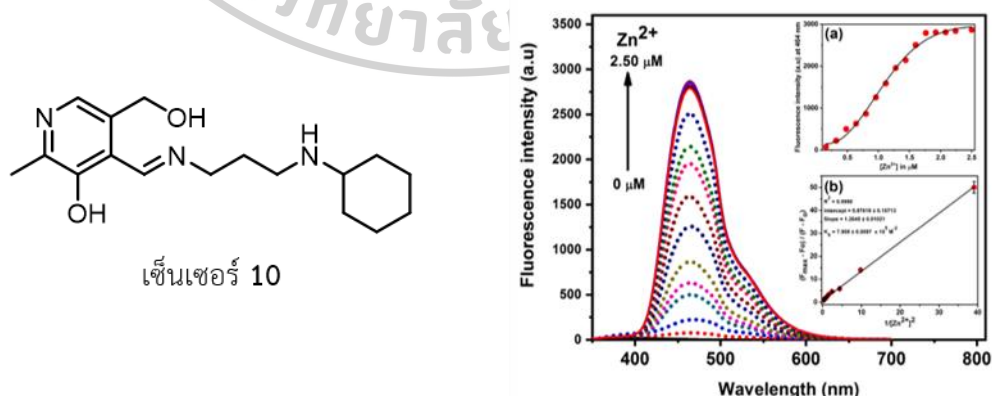
ใน ค.ศ. 2021 He และคณะ [23] ได้พัฒนาฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์สำหรับตรวจจับไอออนสังกะสีอย่างจำเพาะเจาะจงที่สามารถเตรียมได้จาก cyclohexanediamine และ tert-butylformylhydroxybenzoic acid ได้เป็นเซ็นเซอร์ **9** โดยในระบบตัวทำละลายผสมระหว่างน้ำและไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide, DMSO) ในอัตราส่วน 95:5 โดยปริมาตร จะสามารถดักจับไอออนสังกะสี แล้วคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 455 นาโนเมตร ในขณะที่เมื่อเติมไฮดรอกไซด์ไอออนจนทำให้ pH มีค่าระหว่าง 7.0 ถึง 9.4 จะคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร โดยมีค่า detection limit สำหรับไอออนสังกะสี เท่ากับ  $5.6 \times 10^{-8}$  M (3.66

ppb) นอกจากนี้เซ็นเซอร์ 9 ยังสามารถตรวจจับไอออนสังกะสีในเซลล์เม็ดเลือดขาว (RAW264.7) ตัวอ่อนปลาหมอ และถั่วงอก



ภาพที่ 12 โครงสร้างเซ็นเซอร์ 9 (ซ้าย) สเปกตรากายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนสังกะสีในปริมาณต่างๆ (กลาง) และสเปกตรากายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนไฮดรอกไซด์ (ขวา)

ในปี ค.ศ. 2022 Karthick และคณะ [24] ได้ใช้สารเรืองแสงกลุ่ม pyridoxal เชื่อมต่อกับไอออนฟอรซนิต N-cyclohexylpropanediamine ซึ่งประกอบด้วยอะตอมไนโตรเจน ได้เป็นฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ 10 ที่สามารถดักจับไอออนสังกะสีได้ในระบบตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอล (ethanol) และสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES ที่ pH 7.0 แล้วเกิดการเปลี่ยนแปลงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์แบบ off-on โดยมีค่า detection limit เท่ากับ  $9.6 \times 10^{-9}$  M (0.63 ppb) โดยเซ็นเซอร์ 10 สามารถดักจับไอออนสังกะสีในเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa)



ภาพที่ 13 โครงสร้างเซ็นเซอร์ 10 (ซ้าย) และสเปกตรากายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนสังกะสีในปริมาณต่างๆ (ขวา)

## บทที่ 3

## อุปกรณ์และสารเคมี

## 1. อุปกรณ์

- 1.1. เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance: Bruker Avance 300
- 1.2. เครื่อง UV-visible spectrometer: Agilent Cary 60
- 1.3. เครื่อง Fluorescence spectrometer: Perkin Elmer LS-50B
- 1.4. เครื่อง Mass spectrometer: Bruker Daltonics micrOTOF
- 1.5. เครื่อง Rotary evaporator: Buchi Rotavapor R-114
- 1.6. เครื่อง Vacuum pump: Tokyo Rikakikai Co., Ltd. model A-3S
- 1.7. เครื่อง Hot air oven: Binder model ED115 (E2)
- 1.8. เครื่องชั่งละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง): Denver instrument model S-234
- 1.9. เครื่องชั่งละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง): Mettler Toledo model AB204
- 1.10. เครื่อง Hot plate and stirrer: Framo model M21/1
- 1.11. Micropipette: Finnpiette model HH10711 ขนาด 1-10  $\mu\text{L}$
- 1.12. Thin Layer Chromatography (TLC) silica gel 60 F<sub>254</sub> aluminium sheet: Merck
- 1.13. อุปกรณ์สำหรับเตรียมแผ่น preparative TLC: Desaga Brinkmann
- 1.14. กระดาษกรอง: Advantec ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 110 mm
- 1.15. กระดาษกรอง: Advantec ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 70 mm
- 1.16. เครื่องแก้วพื้นฐาน
- 1.17. ชุดกรองแบบลดความดัน
- 1.18. Clamp และ Clamp holder

## 2. สารเคมี

- 2.1. Acetonitrile: LAB-SCAN
- 2.2. Argon gas: Masser Specialty Gas Co., Ltd. (99.999 %)
- 2.3. Barium perchlorate trihydrate: Strem chemical (99.9 %,  $M_w = 336.24$  g/mol)
- 2.4. Cadmium perchlorate hexahydrate: Strem chemical (99 %,  $M_w = 311.30$  g/mol)
- 2.5. Calcium perchlorate tetrahydrate: Sigma-Aldrich (99 %,  $M_w = 311.04$  g/mol)
- 2.6. Chloroform-*d* (contain 1% v/v of TMS): Sigma-Aldrich (99.8 atom %D)
- 2.7. Cobalt perchlorate hexahydrate: Sigma-Aldrich ( $M_w = 365.93$  g/mol)
- 2.8. Copper perchlorate hexahydrate: Sigma-Aldrich (98 %,  $M_w = 370.54$  g/mol)
- 2.9. Deionized water: Department of Chemistry, Silpakorn University
- 2.10. Dichloromethane (distillation)
- 2.11. N,N-Dimethylformamide: LAB-SCAN (analytical reagent; A.R.)
- 2.12. Ethyl acetate (distillation)
- 2.13. Hexane (distillation)
- 2.14. Iron perchlorate hydrate: Sigma-Aldrich (98 %,  $M_w = 354.20$  g/mol)
- 2.15. Lead perchlorate hydrate: Sigma-Aldrich (98 %,  $M_w = 406.09$  g/mol)
- 2.16. Lithium perchlorate trihydrate: Strem chemical (99 %,  $M_w = 311.30$  g/mol)
- 2.17. 7,12-Dimethoxy-4,5,14,15-tetrahydronaphtho[2',1':3,4]phenanthro[1,2-c]furan-1,3,dione (**M201**): ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. วิชาสาร สุธศรีเมือง (MTEC)
- 2.18. Magnesium perchlorate hydrate: Fluka (98 %,  $M_w = 223.21$  g/mol)
- 2.19. Mercuric perchlorate hydrate: Sigma-Aldrich (98 %,  $M_w = 223.21$  g/mol)
- 2.20. Methanol (distillation)
- 2.21. Potassium carbonate: Fluka
- 2.22. Potassium perchlorate: Sigma-Aldrich (99 %,  $M_w = 138.55$  g/mol)
- 2.23. Silica gel 60 (0.063-0.200 mm) สำหรับ column chromatography, Merck
- 2.24. Silica gel 60 F<sub>254</sub> containing gypsum สำหรับ preparative TLC, Merck
- 2.25. Silver perchlorate monohydrate: Strem chemical (99 %,  $M_w = 207.32$  g/mol)
- 2.26. Sodium hydroxide: Fluka ( $\geq 98$  %,  $M_w = 40.00$  g/mol)

2.27. Sodium perchlorate: Fluka (98 %,  $M_w = 82.03$  g/mol)

2.28. Sodium sulfate anhydrous: Sigma-Aldrich (99.0 %)

2.29. Zinc perchlorate hexahydrate: Sigma-Aldrich ( $M_w = 372.36$  g/mol)

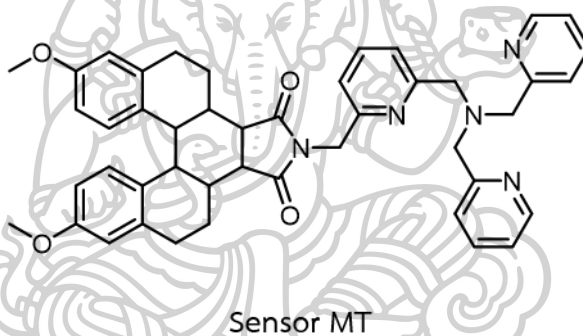


## บทที่ 4

## วิธีดำเนินงานวิจัย

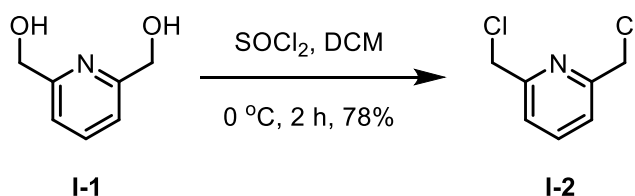
## 1. การสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์

ในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยมุ่งเน้นการออกแบบและสังเคราะห์สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์จากอนุพันธ์ของเพนตะเฮลิซีน ([5]helicene) เพื่อใช้เป็นเซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดไอออนสังกะสี โดยเซ็นเซอร์สังกะสี MT ประกอบด้วยหมู่ 1-(6-(aminomethyl)pyridin-2-yl)-N,N-bis(pyridin-2-yl)methylmethanamine (TMPA) ทำหน้าที่เป็นไอโอโนฟอร์ เชื่อมต่อกับอนุพันธ์ของเพนตะเฮลิซีนชนิด 7,12-dimethoxy-4,5,14,15-tetrahydronaphtho[2',1':3,4]phenanthro[1,2-c]furan-1,3-dione (M201) ทำหน้าที่เป็นฟลูออโรฟอร์ ได้เป็นเซ็นเซอร์ MT ดังแสดงในภาพที่ 14



ภาพที่ 14 โครงสร้างฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ MT

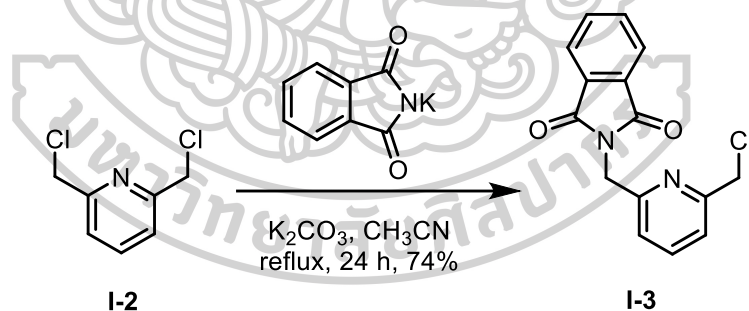
## 1.1. การสังเคราะห์ 2,6-bis(chloromethyl)pyridine (I-2)



ภาพที่ 15 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์ 2,6-bis(chloromethyl)pyridine (I-2)

วิธีการสังเคราะห์ 2,6-bis(chloromethyl)pyridine (I-2) แสดงดังภาพที่ 15 โดยซัง pyridine-2,6-dimethanol (I-1) ปริมาณ 1.0 กรัม (7.2 มิลลิโมล) ใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายด้วย dry dichloromethane (dry DCM) 15 มิลลิลิตร กวนปฏิกิริยาในอ่างน้ำแข็ง เป็นระยะเวลา 10 นาที จากนั้นค่อยๆ เติมสารละลาย thionyl chloride (SOCl<sub>2</sub>) ปริมาณ 4 มิลลิลิตร ในตัวทำละลาย dry DCM ปริมาณ 5 มิลลิลิตร โดยใช้กรวยหยดสาร (dropping funnel) หลังจากเติมสารละลายจนครบให้กวนปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องต่อเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาค่อยๆ เติมน้ำปราศจากไอออน (deionized water) เพื่อกำจัด SOCl<sub>2</sub> ที่เหลือ จากนั้นปรับ pH ของสารละลายให้เป็น 7 ด้วยสารละลาย 1 M NaOH จะเกิดตะกอนสีขาวขึ้น แล้วนำมากรองแบบลดความดันและล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนเย็นปริมาณ 20 มิลลิลิตร ทั้งตะกอนที่ได้ให้แห้ง จะได้สารประกอบ I-2 เป็นผลึกสีขาว คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเท่ากับ 78% นำไปทำปฏิกิริยาขั้นต่อไปโดยไม่ผ่านการแยกบริสุทธิ์

### 1.2. การสังเคราะห์ 2-((6-(chloromethyl)pyridine-2-yl)methyl)isoindoline-1,3-dione (I-3)

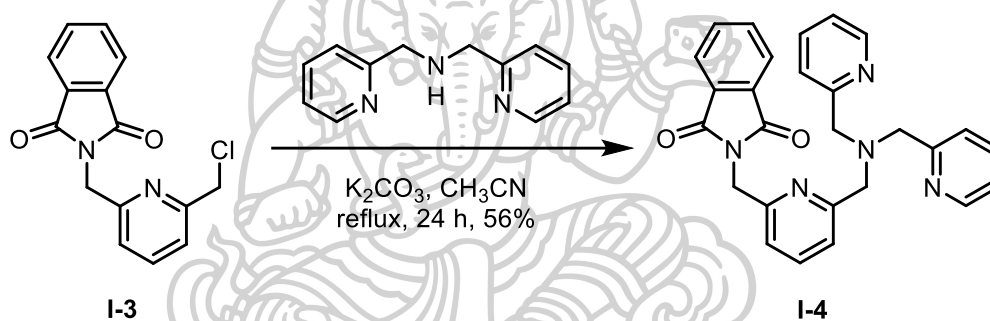


ภาพที่ 16 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์ 2-((6-(chloromethyl)pyridine-2-yl)methyl)isoindoline-1,3-dione (I-3)

วิธีการสังเคราะห์ 2-((6-(chloromethyl)pyridine-2-yl)methyl)isoindoline-1,3-dione (I-3) แสดงดังภาพที่ 16 โดยซัง I-2 ปริมาณ 0.50 กรัม (2.84 มิลลิโมล) ลงในขวดก้นกลมขนาด 25 มิลลิลิตร จากนั้นเติม phthalimide ปริมาณ 0.51 กรัม (3.41 มิลลิโมล) และ potassium carbonate (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) ปริมาณ 0.47 กรัม (3.41 มิลลิโมล) ในตัวทำละลาย dry acetonitrile (dry CH<sub>3</sub>CN) ปริมาณ 15 มิลลิลิตร แล้วจึงกวนปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศอาร์กอนและรีฟลักซ์เป็นเวลา

24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาทิ้งให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง จากนั้นกรองเอา  $K_2CO_3$  ออก แล้วจึงนำไปกำจัดตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้แยกบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane และ ethyl acetate ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร จะได้สารประกอบ I-3 เป็นของแข็งสีขาวปริมาณ 0.6 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเท่ากับ 74% โดยการแยกด้วยเทคนิคนี้มีอัตราการเคลื่อนที่ของสารบนตัวดูดซับ (Retention factor;  $R_f$ ) เท่ากับ 0.40

### 1.3. การสังเคราะห์ 2-((6-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)methyl)pyridin-2-yl)methyl)isoindoline-1,3-dione (I-4)



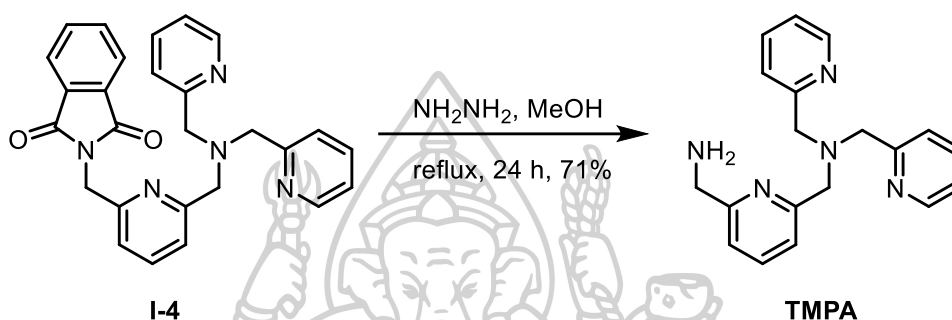
ภาพที่ 17 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์ 2-((6-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)methyl)pyridin-2-yl)methyl)isoindoline-1,3-dione (I-4)

วิธีการสังเคราะห์ 2-((6-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)methyl)pyridin-2-yl)methyl)isoindoline-1,3-dione (I-4) แสดงดังภาพที่ 17 โดยซึ่ง I-3 ปริมาณ 0.55 กรัม (1.92 มิลลิโมล) และ potassium carbonate ( $K_2CO_3$ ) ปริมาณ 0.34 กรัม (2.46 มิลลิโมล) ลงในขวดก้นกลมขนาด 25 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลาย dry acetonitrile (dry  $CH_3CN$ ) ปริมาณ 15 มิลลิลิตร กวนสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม di-(2-picolyl)amine ปริมาณ 0.45 มิลลิลิตร (2.49 มิลลิโมล) แล้วจึงกวนปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศอาร์กอนและรีฟลักซ์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาทิ้งให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง จากนั้นกรองเอา  $K_2CO_3$  ออก แล้วจึงนำไปกำจัดตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้แยกบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง dichloromethane และ methanol ในอัตราส่วน 9:1 โดยปริมาตร จะได้สารประกอบ I-4 เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อนปริมาณ 0.48 กรัม คิด



เป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเท่ากับ 56% โดยการแยกด้วยเทคนิคนี้มีอัตราการเคลื่อนที่ของสารบนตัวดูดซับ (Retention factor;  $R_f$ ) เท่ากับ 0.30

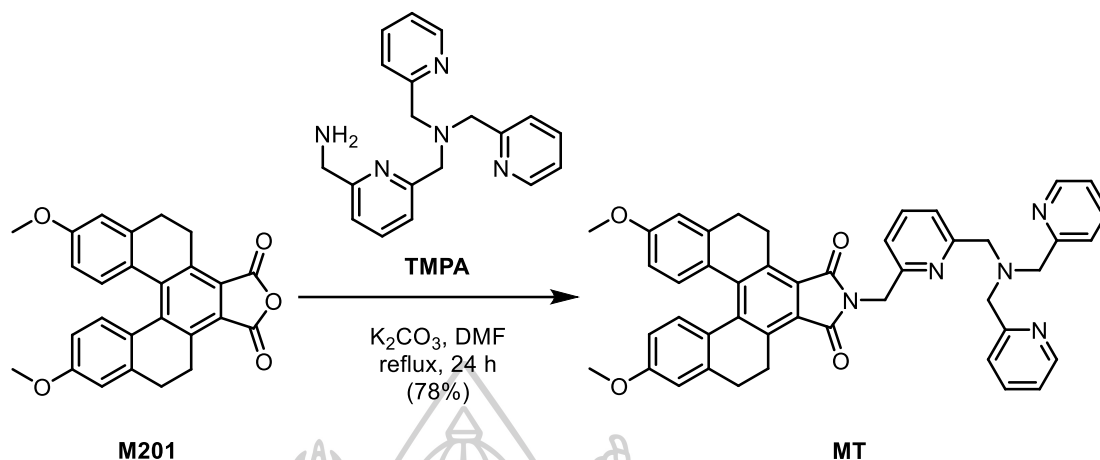
#### 1.4. การสังเคราะห์ไอโอโนฟอร์ชนิด 1-(6-(aminomethyl)pyridin-2-yl)-N,N-bis(pyridin-2-ylmethyl)methanamine (TMPA)



ภาพที่ 18 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์ 1-(6-(aminomethyl)pyridin-2-yl)-N,N-bis(pyridin-2-ylmethyl)methanamine (TMPA)

วิธีการสังเคราะห์ 1-(6-(aminomethyl)pyridin-2-yl)-N,N-bis(pyridin-2-ylmethyl)methanamine (TMPA) แสดงดังภาพที่ 18 โดยซิ่ง I-4 ปริมาณ 0.4 กรัม (4.82 มิลลิโมล) ลงในขวดก้นกลมขนาด 25 มิลลิลิตร จากนั้นเติมตัวทำละลาย methanol (MeOH) ปริมาณ 15 มิลลิลิตร และ hydrazine hydrate ( $\text{NH}_2\text{NH}_2$ ) ปริมาณ 0.15 มิลลิลิตร (4.82 มิลลิโมล) แล้วจึงกวนปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศอาร์กอนและรีฟลักซ์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาที่ให้ยืนยันจนถึงอุณหภูมิห้องแล้วจึงนำไปกำจัดตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้นเติม dichloromethane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) ปริมาณ 10 มิลลิลิตร นำมาสกัดด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ปริมาณ 20 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง และสกัดด้วยสารละลายอิ่มตัวโซเดียมคลอไรด์ (saturated sodium chloride) ปริมาณ 20 มิลลิลิตร จำนวน 1 ครั้ง โดยเก็บสารละลายชั้น  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  นำมากำจัดน้ำโดยเติม sodium sulfate anhydrous ลงไปปริมาณเล็กน้อย และนำไปกำจัดตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator จะได้สารประกอบ TMPA เป็นน้ำมันสีเหลืองปริมาณ 0.2 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเท่ากับ 71%

### 1.5. การสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ MT



ภาพที่ 19 สมการปฏิกิริยาการสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ MT

วิธีการสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ MT แสดงดังภาพที่ 19 โดยละลาย 1-(6-aminomethyl)pyridin-2-yl)-N,N-bis(pyridin-2-ylmethyl)methanamine (TMPA) ปริมาณ 67 มิลลิกรัม (0.21 มิลลิโมล) ด้วย dry N,N-dimethylformamide (dry DMF) ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ในขวดก้นกลมขนาด 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติม potassium carbonate ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) ปริมาณ 29 มิลลิกรัม (0.21 มิลลิโมล) ตามด้วย 7,12-dimethoxy-4,5,14,15-tetrahydronaphtho[2',1':3,4]phenanthro[1,2-c]furan-1,3-dione (M201) ปริมาณ 74 มิลลิกรัม (0.18 มิลลิโมล) กวนปฏิกิริยาและรีฟลักซ์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้บรรยากาศอาร์กอน เมื่อครบกำหนดเวลา นำไปกำจัดตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator ภายใต้สภาวะสุญญากาศ จากนั้นเติม dichloromethane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) ปริมาณ 15 มิลลิลิตร นำมาสกัดด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ปริมาณ 30 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง และสกัดด้วยสารละลายอิ่มตัวโซเดียมคลอไรด์ (saturated sodium chloride) ปริมาณ 30 มิลลิลิตร จำนวน 1 ครั้ง โดยเก็บสารละลายชั้น  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  นำมากำจัดน้ำโดยเติม sodium sulfate anhydrous ลงไปปริมาณเล็กน้อย และนำไปกำจัดตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้แยกบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง dichloromethane และ methanol ในอัตราส่วน 9:1 โดยปริมาตร จะได้สาร MT เป็นของแข็งสีเขียวยอมเหลืองปริมาณ 100 มิลลิกรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเท่ากับ 78% โดยการแยกด้วยเทคนิคนี้มีอัตราการเคลื่อนที่ของสารบนตัวดูดซับ (Retention factor;  $R_f$ ) เท่ากับ 0.24

## 2. การทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจจับไอออนสังกะสีของเซ็นเซอร์ MT

การศึกษาคุณสมบัติเชิงแสงของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ MT เริ่มต้นโดยการใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรสโกปีร่วมกับเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรสโกปีเพื่อศึกษาความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสง ( $\lambda_{ex}$ ) และการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ ( $\lambda_{em}$ ) ของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ในตัวทำละลายอินทรีย์ และระบบตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ เพื่อหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์การตรวจจับไอออนโลหะสังกะสี แล้วนำมาศึกษาความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) ความจำเพาะเจาะจง (selectivity) ต่อการตรวจจับสังกะสี รวมทั้งการศึกษาประสิทธิภาพในการตรวจจับไอออนสังกะสีในสถานะที่มีไอออนรบกวน ค่าคงที่สมดุลของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเซ็นเซอร์กับไอออนสังกะสี (association constant;  $K_{assoc}$ ) และอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน (stoichiometric ratio)

### 2.1. การทดสอบความไว (sensitivity)

การทดสอบความไวในการตรวจจับไอออนสังกะสีของเซ็นเซอร์ MT จะศึกษาด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรสโกปี โดยปิเปตสารละลายเซ็นเซอร์ปริมาตร 2.00 มิลลิลิตร ลงในควอตซ์คิวเวทท์ (quartz cuvette) แล้ววัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ก่อนการเติมไอออนสังกะสี จากนั้นไตเตรตด้วยสารละลายไอออนสังกะสีที่เตรียมไว้ แล้ววัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์หลังการเติมไอออนสังกะสีในแต่ละครั้ง

#### 2.1.1. การเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ MT

เตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ MT ความเข้มข้น  $1.00 \times 10^{-3}$  M ในตัวทำละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES buffer) ความเข้มข้น 5 mM pH 7.2 และ methanol ในอัตราส่วน 3:2 โดยปริมาตร ในขวดปริมาตรขนาด 10.00 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายเซ็นเซอร์ด้วยวิธี serial dilution โดยให้ความเข้มข้นลดลงครั้งละ 10 เท่า จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ  $1.00 \times 10^{-5}$  M ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร

### 2.1.2. การเตรียมสารละลายไอออนสังกะสี

เตรียมสารละลายไอออนสังกะสีเปอร์คลอเรตที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ  $1.00 \times 10^{-2}$  M ในน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายไอออนสังกะสีเปอร์คลอเรตด้วยวิธี serial dilution โดยให้ความเข้มข้นลดลง 10 เท่า จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ  $1.00 \times 10^{-3}$  M ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร โดยปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water)

### 2.1.3. การทดสอบ

นำสารละลายเซ็นเซอร์ MT ที่เตรียมไว้ไปวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อมีการไตเตรตสารละลายไอออนสังกะสี โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ใช้ในการทดสอบดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงค่าพารามิเตอร์ที่ใช้ในการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ MT

$\lambda_{ex}$ (nm)	$\lambda_{em}$ (nm)	Scan speed (nm/min)	Slit width (nm)	ช่วงความยาวคลื่นที่ศึกษา (nm)
373	456	300	5	400-700

## 2.2. การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (selectivity)

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเซ็นเซอร์ MT กับไอออนชนิดต่างๆ จะศึกษาด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรสโกปี โดยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนสังกะสีลงในสารละลายเซ็นเซอร์ที่ถูกเตรียมขึ้นปริมาตร 2.00 มิลลิลิตร เทียบกับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดจากการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ ลงในสารละลายเซ็นเซอร์ที่ถูกเตรียมขึ้นในลักษณะเดียวกัน แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ระหว่างการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนสังกะสีและการไตเตรตด้วยสารละลายไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ

### 2.2.1. การเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ MT

เตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ MT ความเข้มข้น  $1.00 \times 10^{-3}$  M ในตัวทำละลายผสมระหว่าง สารละลายบัฟเฟอร์ 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES buffer) ความเข้มข้น 5 mM pH 7.2 และ methanol ในอัตราส่วน 3:2 โดยปริมาตร ในขวดปริมาตรขนาด 10.00 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายเซ็นเซอร์ด้วยวิธี serial dilution โดยให้ความเข้มข้นลดลง ครั้งละ 10 เท่า จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ  $1.00 \times 10^{-5}$  M ปริมาตร 50.00 มิลลิลิตร

### 2.2.2. การเตรียมสารละลายไอออนสังกะสีและไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ

เตรียมสารละลายจากเกลือของไอออนโลหะเปอร์คลอเรตทั้งหมด 17 ชนิด ได้แก่  $Zn^{2+}$   $Cd^{2+}$   $Cu^{2+}$   $Pb^{2+}$   $Hg^{2+}$   $Ag^+$   $Fe^{2+}$   $Ni^{2+}$   $Co^{2+}$   $Mn^{2+}$   $Al^{3+}$   $Mg^{2+}$   $Ca^{2+}$   $Ba^{2+}$   $Li^+$   $Na^+$  และ  $K^+$  ให้ความเข้มข้น เริ่มต้นเท่ากับ  $1.00 \times 10^{-2}$  M ในน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายไอออนชนิดต่างๆ ด้วยวิธี serial dilution โดยให้ความเข้มข้นลดลง 10 เท่าจนได้ความเข้มข้นเท่ากับ  $1.00 \times 10^{-3}$  M ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร โดยปรับปริมาตรด้วยน้ำ ปราศจากไอออน (deionized water) เช่นเดียวกับการศึกษาความไว (2.1)

### 2.2.3. การทดสอบ

นำสารละลายเซ็นเซอร์ MT ที่เตรียมได้ไปวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อมีการไตเตรตสารละลายไอออนสังกะสีเปรียบเทียบกับ ไอออนของเกลือเปอร์คลอเรตชนิดอื่นๆ โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ใช้ในการทดสอบตาม ตารางที่ 1

### 2.3. การทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนสังกะสีในสภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ (competition studies)

การทดสอบความสามารถในการตรวจวัดไอออนสังกะสีในสภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ จะศึกษาด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรสโกปี โดยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ขณะก่อนและหลังเติมสารละลายไอออนสังกะสีลงในสารละลายเซ็นเซอร์ที่ถูกเตรียมขึ้นในปริมาตร 2.00 มิลลิลิตร จนสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เพิ่มขึ้น 50-60% หลังจากนั้นจึงเติมสารละลายของไอออนรบกวนชนิดต่างๆ ในปริมาตรและความเข้มข้นที่เท่ากับสารละลายไอออนสังกะสีที่เติมลงไปครั้งแรก แล้ววัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์อีกครั้งภายหลังการเติมไอออนรบกวนชนิดต่างๆ

#### 2.3.1. การเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ MT

เตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ MT จะเตรียมในลักษณะเดียวกันกับการศึกษาความไว (2.1) แต่การศึกษาความสามารถในการตรวจวัดไอออนสังกะสีในสภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ จะเตรียมให้มีปริมาตร 50.00 มิลลิลิตร เช่นเดียวกับการเตรียมสารเพื่อทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเซ็นเซอร์ (2.2)

#### 2.3.2. การเตรียมสารละลายไอออนสังกะสีและไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ

เตรียมสารละลายจากเกลือของไอออนโลหะเปอร์คลอเรตทั้งหมด 17 ชนิด ได้แก่  $Zn^{2+}$   $Cd^{2+}$   $Cu^{2+}$   $Pb^{2+}$   $Hg^{2+}$   $Ag^+$   $Fe^{2+}$   $Ni^{2+}$   $Co^{2+}$   $Mn^{2+}$   $Al^{3+}$   $Mg^{2+}$   $Ca^{2+}$   $Ba^{2+}$   $Li^+$   $Na^+$  และ  $K^+$  ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ  $1.00 \times 10^{-2}$  M ในน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายไอออนชนิดต่างๆ ด้วยวิธี serial dilution โดยให้ความเข้มข้นลดลง 10 เท่าจนได้ความเข้มข้นเท่ากับ  $1.00 \times 10^{-3}$  M ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร โดยปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water)

### 2.3.3. การทดสอบ

นำสารละลายเซ็นเซอร์ MT ที่เตรียมได้ไปวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อมีการไตเตรตสารละลายไอออนสังกะสีเปรียบเทียบกับไอออนของเกลือเปอร์คลอเรตชนิดอื่นๆ โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ใช้ในการทดสอบตามตารางที่ 1 จากนั้นสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า normalized fluorescence intensity ( $I_F/I_0$ ) ในแนวแกน y และชนิดของไอออนต่างๆ ที่เติมลงไปแนวแกน x

เมื่อ  $I_0$  คือ ความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์ก่อนเติมไอออน  
 $I_F$  คือ ความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์หลังเติมไอออน

### 2.4. การหาอัตราส่วนของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนด้วยวิธี Job's plot analysis

การหาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนด้วยวิธีของ Job จะศึกษาด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรสโกปี โดยการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของระบบที่มีอัตราส่วนโดยโมล (mole fraction) ระหว่างไอออนสังกะสีและเซ็นเซอร์ในอัตราส่วนต่างๆ การหาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนสามารถทำได้โดยการเตรียมสารละลายเซ็นเซอร์ MT ความเข้มข้น  $1.00 \times 10^{-4}$  M และสารละลายไอออนสังกะสีความเข้มข้น  $1.00 \times 10^{-2}$  M จากนั้นปีเปตสารละลายเซ็นเซอร์ MT และสารละลายไอออนสังกะสีให้ได้ปริมาตรตามตารางที่ 2 ลงในขวดปริมาตรขนาด 10.00 มิลลิลิตร แล้วปรับให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 10.00 มิลลิลิตร ด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES buffer) ความเข้มข้น 5 mM pH 7.2 และ methanol ในอัตราส่วน 3:2 โดยปริมาตร จากนั้นนำสารละลายที่เตรียมได้ไปวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ตามตารางที่ 1 จากนั้นสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างผลคูณของ  $I_F - I_0$  กับเศษส่วนโมลของไอออนสังกะสี (X) ที่ความยาวคลื่นที่แสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์สูงสุดในแนวแกน y และเศษส่วนโมลของไอออนสังกะสี (X) ในแนวแกน x เมื่อกำหนดให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ก่อนเติมไอออนสังกะสี ( $I_0$ ) และสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์หลังการเติมไอออนสังกะสีที่ความเข้มข้นใดๆ ( $I_F$ ) เพื่อหาอัตราส่วนของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเซ็นเซอร์ MT กับไอออนสังกะสี

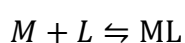
ตารางที่ 2 แสดงการหาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของเซ็นเซอร์ด้วยวิธี Job's plot

ขวดที่	ปริมาตร เซ็นเซอร์ (มิลลิลิตร) ( $1.00 \times 10^{-4}$ M)	ปริมาตร ไอออนสังกะสี (ไมโครลิตร) ( $1.00 \times 10^{-2}$ M)	เศษส่วนโมล ของเซ็นเซอร์	เศษส่วนโมลของ ไอออนสังกะสี (X)
1	0.00	10.00	0	1.0
2	0.10	9.00	0.1	0.9
3	0.20	8.00	0.2	0.8
4	0.30	7.00	0.3	0.7
5	0.40	6.00	0.4	0.6
6	0.50	5.00	0.5	0.5
7	0.60	4.00	0.6	0.4
8	0.70	3.00	0.7	0.3
9	0.80	2.00	0.8	0.2
10	0.90	1.00	0.9	0.1
11	1.00	0.00	1.0	0

### 2.5. การคำนวณหาค่าคงที่สมดุลของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน ( $K_{assoc}$ ) โดยใช้สมการของ Benesi-Hildebrand

สารประกอบเชิงซ้อน คือสารที่เกิดจากไอออนโลหะเกิดพันธะโคออร์ดิเนต-โควาเลนต์ (coordinate-covalent bond) กับลิแกนด์ ซึ่งในที่นี้หมายถึงฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ โดยค่าคงที่สมดุลของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน (complex formation constant,  $K_f$  หรือ association constant,  $K_{assoc}$ ) จะสามารถพิจารณาได้จากสมการ

ที่สภาวะสมดุล



$$K_{assoc} = \frac{[ML]}{[M][L]}$$



- เมื่อ  $M$  คือ ไอออนโลหะ
- $L$  คือ ลิแกนด์ (ในที่นี้หมายถึง ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์)
- $K_{assoc}$  คือ ค่าคงที่สมดุลของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน

จากผลการทดลองการทดสอบความไว (2.1) สามารถนำไปใช้ในการคำนวณหาค่าคงที่สมดุลของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเซ็นเซอร์กับไอออนสังกะสีจากสมการของ Benesi-Hildebrand ตามสมการ

$$\frac{1}{I_F - I_0} = \frac{1}{K_{assoc} \cdot (I_{max} - I_0) \cdot [Zn^{2+}]^n} + \frac{1}{I_{max} - I_0}$$

จากสมการ หากสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง  $\frac{1}{I - I_0}$  กับ  $\frac{1}{[Zn^{2+}]^n}$  จะได้กราฟที่มีความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรง ซึ่งจะสามารถคำนวณหาค่าคงที่สมดุลของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเซ็นเซอร์กับไอออนสังกะสีได้

- เมื่อ  $I_0$  คือ ความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของเซ็นเซอร์ก่อนการเติมไอออนสังกะสี
- $I_F$  คือ ความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของเซ็นเซอร์หลังการเติมไอออนสังกะสีที่ความเข้มข้นใดๆ
- $I_{max}$  คือ ความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์มากที่สุดของเซ็นเซอร์หลังการเติมไอออนสังกะสี
- $n$  คือ จำนวนเต็มใดๆ เช่น 1, 2, 3, ...

จะได้ว่า ค่าคงที่สมดุลของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเซ็นเซอร์กับไอออนสังกะสีสามารถคำนวณได้จากความชันของกราฟความสัมพันธ์ที่สร้างขึ้น

$$slope = \frac{1}{K_{assoc} \cdot (I_{max} - I_0)}$$

$$K_{assoc} = \frac{1}{slope \cdot (I_{max} - I_0)}$$

## 2.6. การศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนด้วยวิธีการสร้างแบบจำลองโมเลกุลทางคอมพิวเตอร์ (computational molecular modeling)

การศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเซ็นเซอร์ MT กับไอออนสังกะสี สามารถวิเคราะห์ได้จากโครงสร้างที่มีความเสถียรและเหมาะสม (optimized structure) ของเซ็นเซอร์ในสภาวะก่อนและหลังการดักจับไอออนสังกะสีด้วยการสร้างแบบจำลองโมเลกุลทางคอมพิวเตอร์ตามระเบียบวิธีทฤษฎีฟังก์ชันความหนาแน่น (density functional theory) ที่ระดับของทฤษฎี B3LYP เบซิสเซต 6-311G\*\* สำหรับธาตุกลุ่มหลักและ LanL2DZ สำหรับไอออนสังกะสี จากนั้นรายงานผลการวิเคราะห์โครงสร้างโมเลกุลที่เหมาะสมของเซ็นเซอร์ MT และสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเซ็นเซอร์ MT กับไอออนสังกะสี ( $MT-Zn^{2+}$ ) ด้วยรูปภาพจากโปรแกรม Visual Molecular Dynamics (VMD)

## 2.7. การศึกษาประสิทธิภาพการตรวจวัดไอออนสังกะสีในเซลล์สิ่งมีชีวิต

การศึกษาประสิทธิภาพการตรวจวัดไอออนสังกะสีในเซลล์สิ่งมีชีวิต ในงานวิจัยนี้เลือกใช้เซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ (Human hepatoma; HepG2) และเซลล์มะเร็งสมองของมนุษย์ (Human glioblastoma astrocytoma; U251) เป็นเซลล์ต้นแบบในการศึกษา

### 2.7.1. การศึกษาประสิทธิภาพการตรวจวัดไอออนสังกะสีในเซลล์มะเร็งตับของมนุษย์

เซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร โดยการเตรียมเซลล์จะเริ่มจากการบ่มเซลล์กับสารละลายไอออนสังกะสีเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.5 mM ในตัวทำละลาย phenol red-free Dulbecco's Modified Eagle Medium (prf-DMEM) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาทำการล้างเซลล์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Phosphate Buffer Saline (PBS) จำนวน 3 ครั้ง แล้วจึงบ่มเซลล์ด้วยสารละลายเซ็นเซอร์ MT ความเข้มข้น 0.05 mM เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการล้างเซลล์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBS จำนวน 2 ครั้ง แล้วนำไปถ่ายภาพเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Inverted fluorescence microscope, Olympus CKX53)

### 2.7.2. การศึกษาประสิทธิภาพการตรวจวัดไอออนสังกะสีในเซลล์มะเร็งสมองของมนุษย์

เซลล์มะเร็งสมองของมนุษย์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากสาขาวิชาเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยการเตรียมเซลล์จะเริ่มจากการบ่มเซลล์กับ สารละลายไอออนสังกะสีเปอร์คลอเรต ความเข้มข้น 0.5 mM ในตัวทำละลาย DMEM ที่มีการเติม 5% Fetal bovine serum (FBS) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาทำการล้างเซลล์ด้วย สารละลายบัฟเฟอร์ PBS จำนวน 3 ครั้ง แล้วจึงบ่มเซลล์ด้วยสารละลายเซินเซอร์ MT ความเข้มข้น 0.05 mM เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการล้างเซลล์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBS จำนวน 3 ครั้ง แล้วนำไปถ่ายภาพเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Laser scanning confocal microscope, Nikon A1Rs



## บทที่ 5

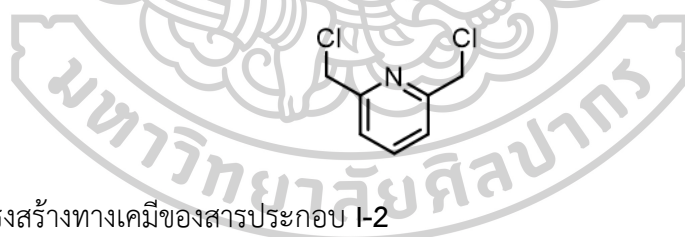
### ผลการดำเนินงานวิจัย

จากการสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ชนิดใหม่ ได้นำมายืนยันโครงสร้างด้วยวิธีทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่ nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) และ high resolution mass spectroscopy (HR-MS) จากนั้นศึกษาความสามารถในการตรวจวัดไอออนสังกะสีในตัวทำละลายอินทรีย์ และในระบบตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ รวมถึงศึกษาความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนสังกะสี และความสามารถในการตรวจจับไอออนสังกะสีในภาวะที่มีไอออนรบกวนชนิดอื่นๆ กลไกในการดักจับ (binding mechanism) และการนำไปประยุกต์ใช้ในตัวอย่างจริง

#### 1. การยืนยันโครงสร้าง

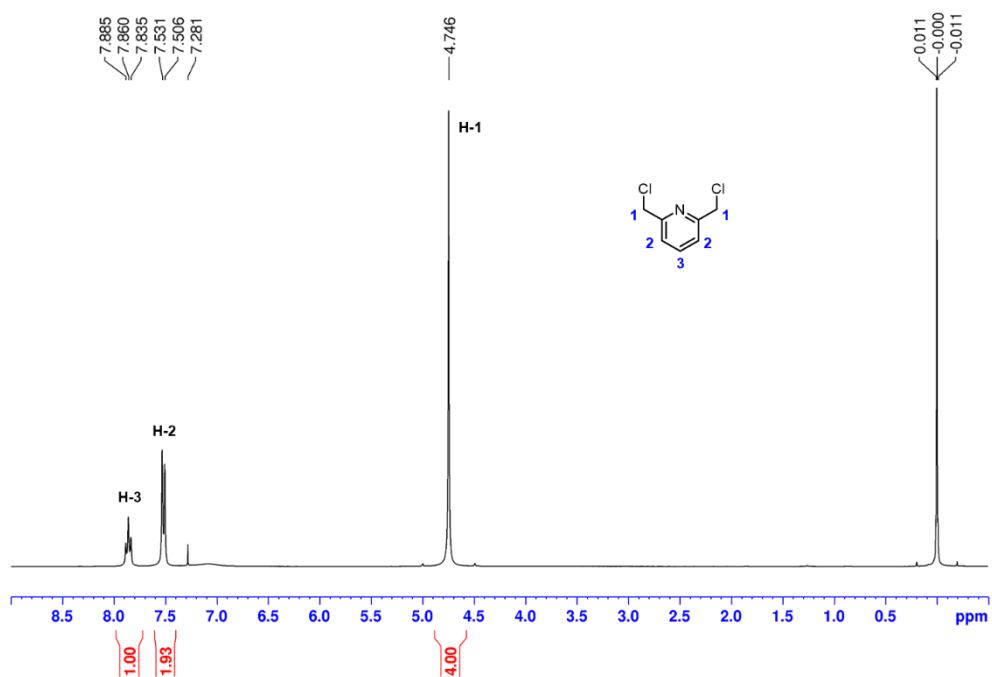
จากผลการสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ตามวิธีการทดลองข้างต้น ซึ่งสามารถวิเคราะห์และยืนยันโครงสร้างของสารที่สังเคราะห์ได้แต่ละชนิดด้วยวิธีทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่ nuclear magnetic resonance (NMR) และ high resolution mass spectroscopy (HR-MS) โดยมีผลการทดลองดังนี้

##### 1.1. โครงสร้างของสารประกอบ 2,6-bis(chloromethyl)pyridine (I-2)

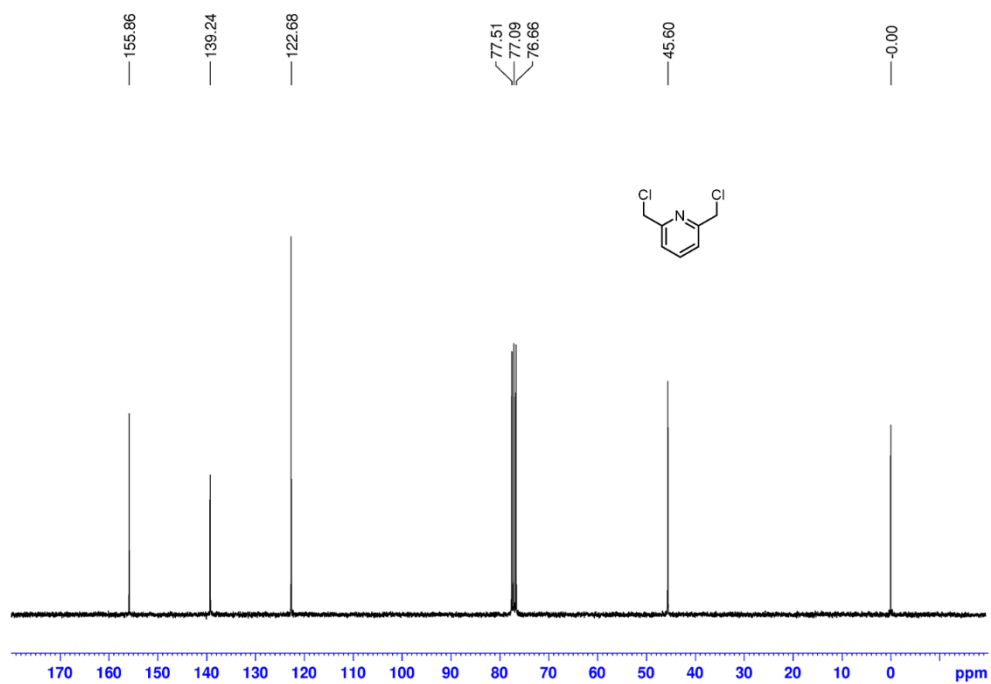


ภาพที่ 20 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ I-2

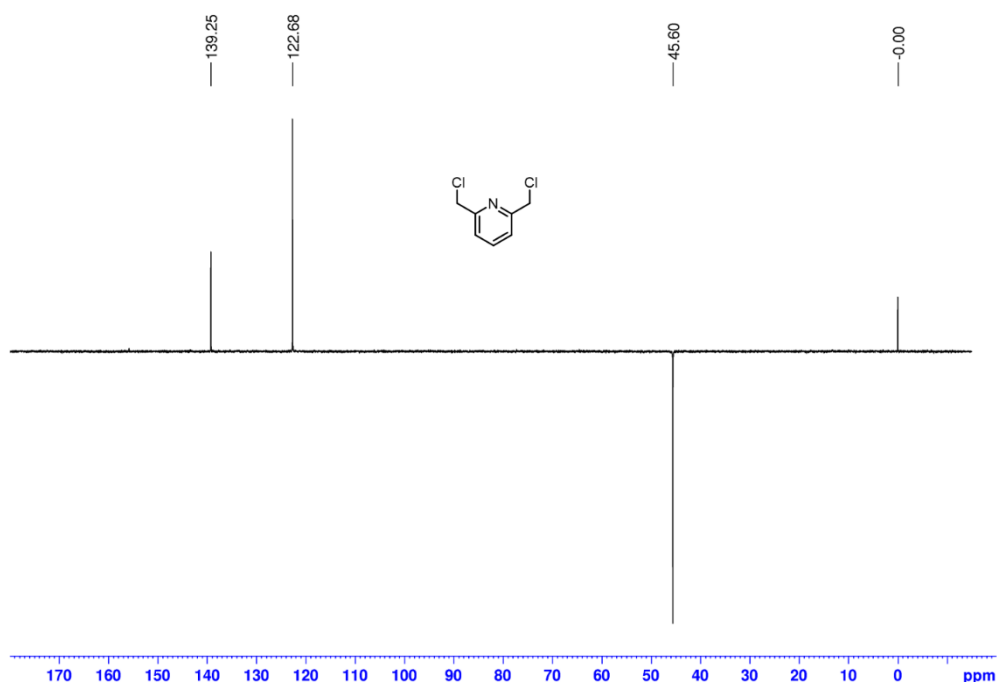
จากผลการพิสูจน์โครงสร้างด้วยวิธีทางสเปกโทรสโกปี แสดงดังนี้  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  (ppm): 4.75 (s, 4H), 7.52 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 7.86 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta$  (ppm): 45.6 ( $2\text{CH}_2$ ), 122.7 ( $2\text{CH}$ ), 139.2 (CH), 155.9 (2C).



ภาพที่ 21  $^1\text{H}$  NMR สเปกตรัมของสารประกอบ I-2



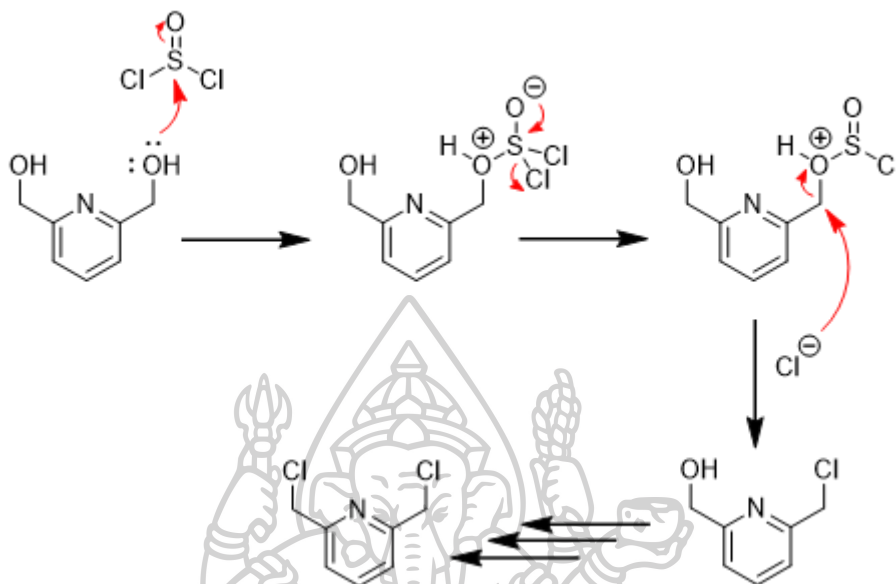
ภาพที่ 22  $^{13}\text{C}$  NMR สเปกตรัมของสารประกอบ I-2



ภาพที่ 23  $^{13}\text{C}$  DEPT 135 NMR สเปกตรัมของสารประกอบ I-2

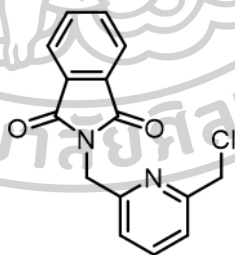
เมื่อพิจารณาโครงสร้างของ 2,6-bis(chloromethyl)pyridine (I-2) และ  $^1\text{H}$  NMR สเปกตรัม พบว่าปรากฏสัญญาณทั้งหมด 3 กลุ่ม ได้แก่ สัญญาณที่มีลักษณะเป็น singlet (s) ที่ตำแหน่ง chemical shift ( $\delta$ ) เท่ากับ 4.75 ppm ซึ่งแสดงถึงสัญญาณโปรตอนของหมู่เมทิลีน (methylene,  $\text{CH}_2$ ) 2 หมู่ มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 4 โปรตอน โดยเมทิลีนโปรตอนในตำแหน่งนี้จะได้รับอิทธิพลการถูกดึงโปรตอนจากอะตอมคลอรีน ทำให้ปรากฏสัญญาณบริเวณที่มีสนามแม่เหล็กต่ำ (down field) ถัดมาเป็นตำแหน่งที่ chemical shift เท่ากับ 7.52 ppm ซึ่งแสดงถึงสัญญาณของโปรตอนบนวงไพริดีน (pyridine) ที่ตำแหน่งโปรตอนที่ 2 มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 2 โปรตอน มีลักษณะเป็น doublet (d) โดยมีค่า coupling constant (J) เท่ากับ 7.5 Hz เนื่องจากได้รับอิทธิพลจากโปรตอนตำแหน่งที่ 3 ถัดมาเป็นตำแหน่ง chemical shift เท่ากับ 7.86 ppm ซึ่งแสดงถึงสัญญาณของโปรตอนบนวงไพริดีนที่ตำแหน่งโปรตอนที่ 3 มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 1 โปรตอน มีลักษณะเป็น triplet (t) โดยมีค่า coupling constant (J) เท่ากับ 7.5 Hz เนื่องจากได้รับอิทธิพลจากโปรตอนตำแหน่งที่ 2 จากผลของ  $^{13}\text{C}$  NMR สเปกตรัม พบว่า มีสัญญาณของคาร์บอนทั้งหมด 4 กลุ่ม

ซึ่งสอดคล้องกับโครงสร้างของ 2,6-bis(chloromethyl)pyridine (I-2) โดยสามารถเสนอกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังภาพที่ 24



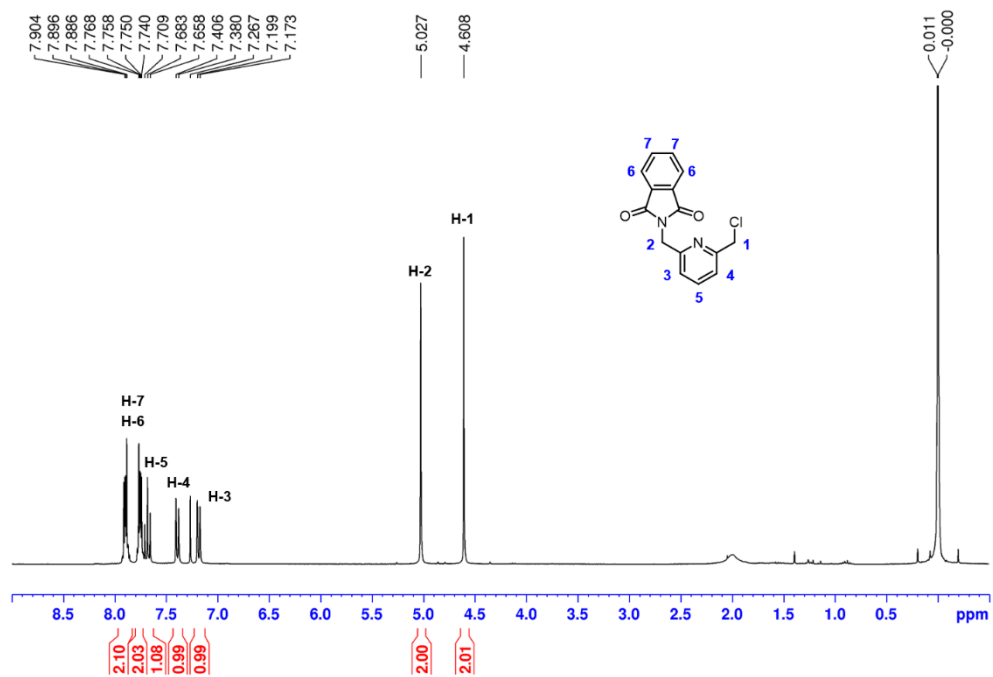
ภาพที่ 24 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของสารประกอบ I-2

## 1.2. โครงสร้างของสารประกอบ 2-((6-(chloromethyl)pyridin-2-yl)methyl)isoindoline-1,3-dione (I-3)

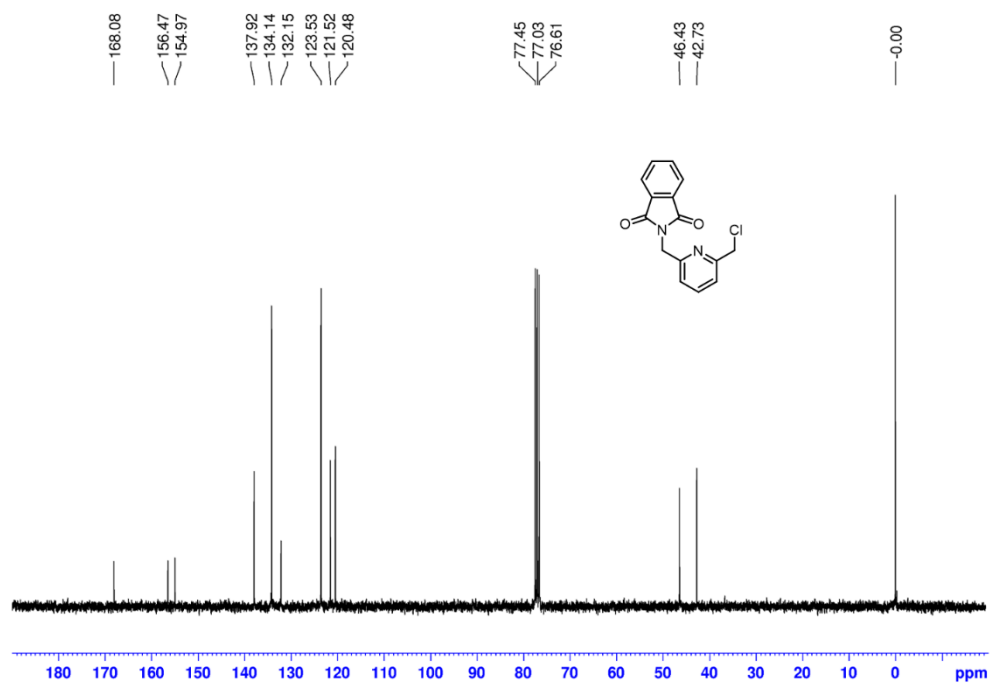


ภาพที่ 25 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ I-3

จากผลการพิสูจน์โครงสร้างด้วยวิธีทางสเปกโทรสโกปี แสดงดังนี้  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  (ppm): 4.61 (s, 2H), 5.03 (s, 2H), 7.19 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.39 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.58 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.74-7.77 (m, 2H), 7.89-7.90 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  (ppm): 42.7 ( $\text{CH}_2$ ), 46.4 ( $\text{CH}_2$ ), 120.5 (CH), 121.5 (CH), 123.5 (CH), 132.2 (C), 134.1 (CH), 137.9 (CH), 155.0 (C), 156.5 (C), 168.1 (C=O).

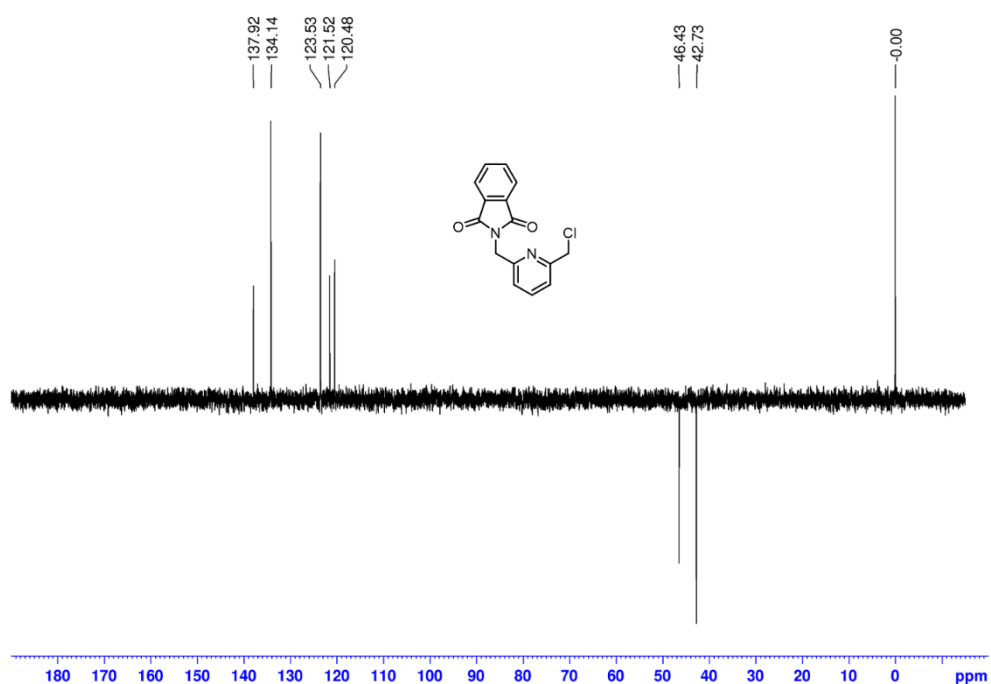


ภาพที่ 26 <sup>1</sup>H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ I-3



ภาพที่ 27 <sup>13</sup>C NMR สเปกตรัมของสารประกอบ I-3

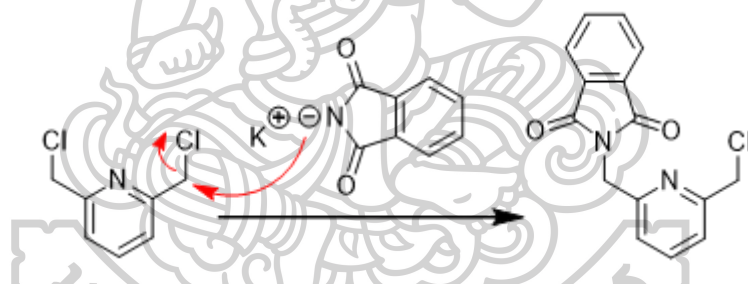




ภาพที่ 28  $^{13}\text{C}$  DEPT 135 NMR สเปกตรัมของสารประกอบ I-3

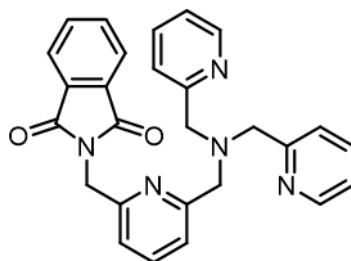
เมื่อพิจารณาโครงสร้างของ 2-((6-(chloromethyl)pyridin-2-yl)methyl)isoindoline-1,3-dione (I-3) และ  $^1\text{H}$  NMR สเปกตรัม พบว่าปรากฏสัญญาณทั้งหมด 7 กลุ่ม ได้แก่ สัญญาณที่มีลักษณะเป็น singlet (s) ที่ตำแหน่ง chemical shift ( $\delta$ ) เท่ากับ 4.61 ppm ซึ่งแสดงสัญญาณของโปรตอนของหมู่เมทิลีน (methylene,  $\text{CH}_2$ ) ที่ตำแหน่งโปรตอนที่ 1 มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 2 โปรตอน โดยเมทิลีนโปรตอนในตำแหน่งนี้จะได้รับอิทธิพลการถูกดึงโปรตอนจากอะตอมคลอรีน ทำให้ปรากฏสัญญาณบริเวณที่มีสนามแม่เหล็กต่ำ (down field) ถัดมาเป็นตำแหน่ง chemical shift เท่ากับ 5.03 ppm ซึ่งแสดงสัญญาณของโปรตอนของหมู่เมทิลีนที่ตำแหน่งโปรตอนที่ 2 มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 2 โปรตอน ถัดมาเป็นตำแหน่งที่ chemical shift เท่ากับ 7.19 ppm ซึ่งแสดงสัญญาณของโปรตอนบนวงไพริดีน (pyridine) ที่ตำแหน่งโปรตอนที่ 3 มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 1 โปรตอน มีลักษณะเป็น doublet (b) โดยมีค่า coupling constant (J) เท่ากับ 7.8 Hz เนื่องจากได้รับอิทธิพลจากโปรตอนที่ตำแหน่งที่ 5 ถัดมาเป็นตำแหน่งที่ chemical shift เท่ากับ 7.39 ppm ซึ่งแสดงสัญญาณของโปรตอนบนวงไพริดีนที่ตำแหน่งโปรตอนที่ 4 มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 1 โปรตอน มีลักษณะเป็น doublet (b) โดยมีค่า coupling constant (J) เท่ากับ 7.8 Hz เนื่องจาก

ได้รับอิทธิพลจากโปรตอนที่ตำแหน่งที่ 5 ถัดมาเป็นตำแหน่งที่ chemical shift เท่ากับ 7.58 ppm ซึ่งแสดงสัญญาณของโปรตอนบนวงไพริดีนที่ตำแหน่งโปรตอนที่ 5 มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 1 โปรตอน มีลักษณะเป็น triplet (t) โดยมีค่า coupling constant (J) เท่ากับ 7.6 Hz เนื่องจากได้รับอิทธิพลจากโปรตอนที่ตำแหน่งที่ 3 และ 4 ถัดมาเป็นตำแหน่งที่ chemical shift อยู่ระหว่าง 7.74-7.77 ppm ซึ่งแสดงสัญญาณของโปรตอนของหมู่ phthalimide ที่ตำแหน่งโปรตอนที่ 6 มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 2 โปรตอน มีลักษณะเป็น multiplet (m) ถัดมาเป็นตำแหน่งที่ chemical shift อยู่ระหว่าง 7.89-7.90 ppm ซึ่งแสดงสัญญาณของโปรตอนของหมู่ phthalimide ที่ตำแหน่งโปรตอนที่ 7 มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 2 โปรตอน มีลักษณะเป็น multiplet (m) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของหมู่ phthalimide ที่จะเกิด complex coupling แล้วปรากฏสัญญาณของโปรตอนที่ตำแหน่ง 6 และ 7 แยกออกจากกัน จากผลของ  $^{13}\text{C}$  NMR สเปกตรัม พบว่า มีสัญญาณของคาร์บอนทั้งหมด 11 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับโครงสร้างของ 2-((6-(chloromethyl)pyridin-2-yl)methyl)isoindoline-1,3-dione (I-3) โดยสามารถเสนอกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังภาพที่ 29



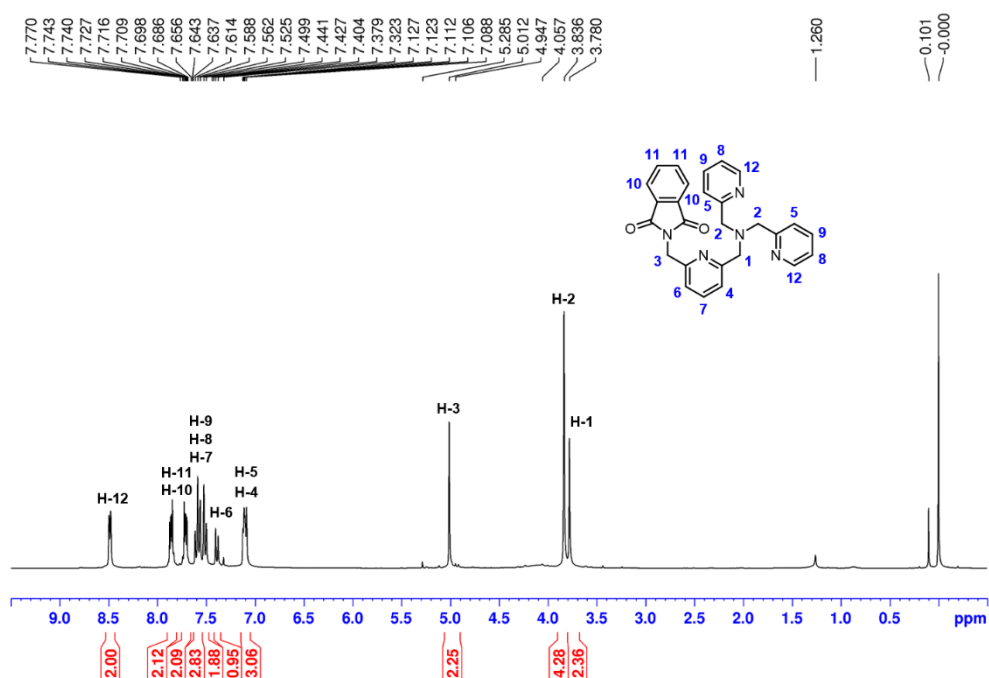
ภาพที่ 29 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของสารประกอบ I-3

### 1.3. โครงสร้างของสารประกอบ 2-((6-((bis(pyridine-2-ylmethyl)amino)methyl)pyridin-2-yl) methyl)isoindoline-1,3-dione (I-4)

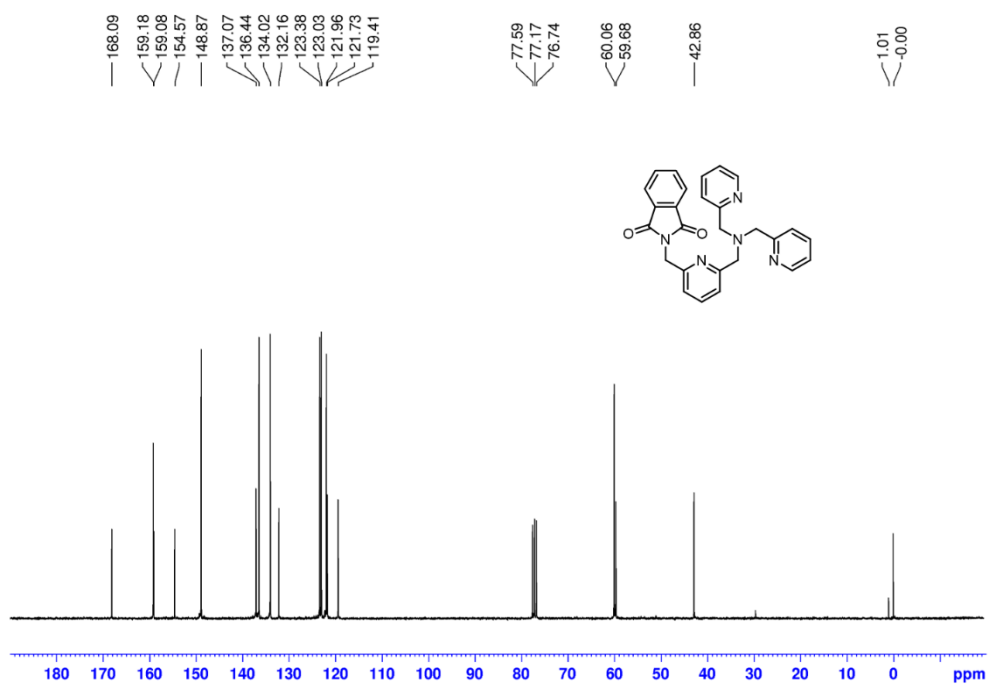


ภาพที่ 30 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ I-4

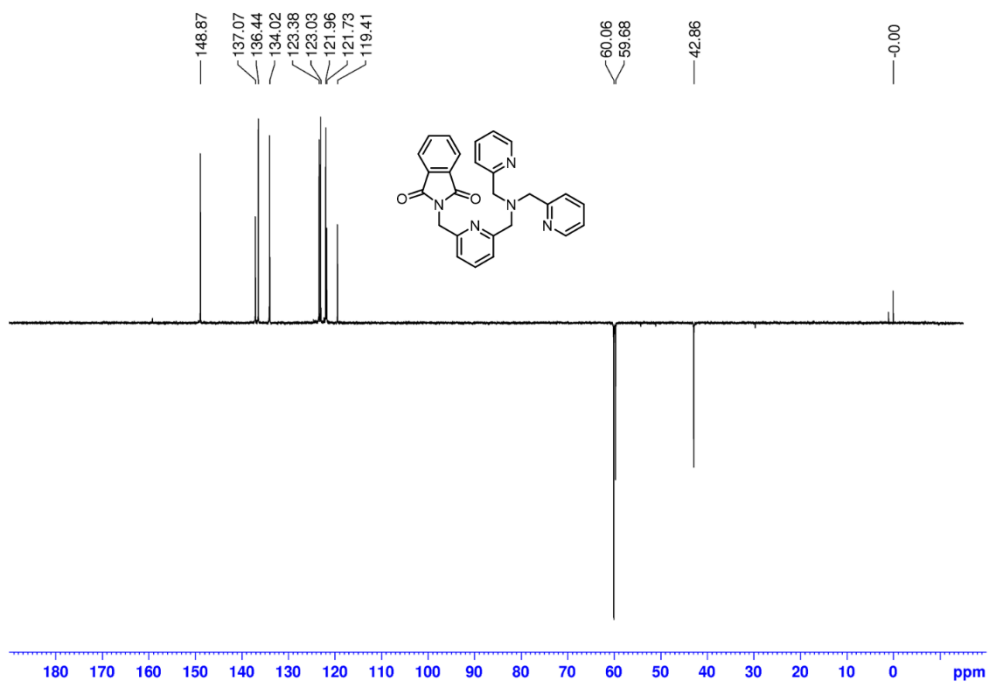
จากผลการพิสูจน์โครงสร้างด้วยวิธีทางสเปกโตรสโกปี แสดงดังนี้  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  (ppm): 3.78 (s, 2H), 3.84 (s, 4H), 5.01 (s, 2H), 7.05-7.16 (m, 3H), 7.39 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 7.48-7.63 (m, 5H), 7.65-7.75 (m, 2H), 7.80-7.91 (m, 2H), 8.49 (d,  $J = 4.6$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  (ppm): 42.9 ( $\text{CH}_2$ ), 59.7 ( $\text{CH}_2$ ), 60.1 ( $2\text{CH}_2$ ), 119.4 (CH), 121.7 (CH), 122.0 (2CH), 123.0 (2CH), 123.4 (2CH), 132.2 (2C), 134.0 (2CH), 136.4 (2CH), 137.1 (CH), 148.9 (2CH), 154.6 (C), 159.1 (C), 159.2 (2C), 168.1 ( $2\text{C}=\text{O}$ ).



ภาพที่ 31  $^1\text{H}$  NMR สเปกตรัมของสารประกอบ I-4

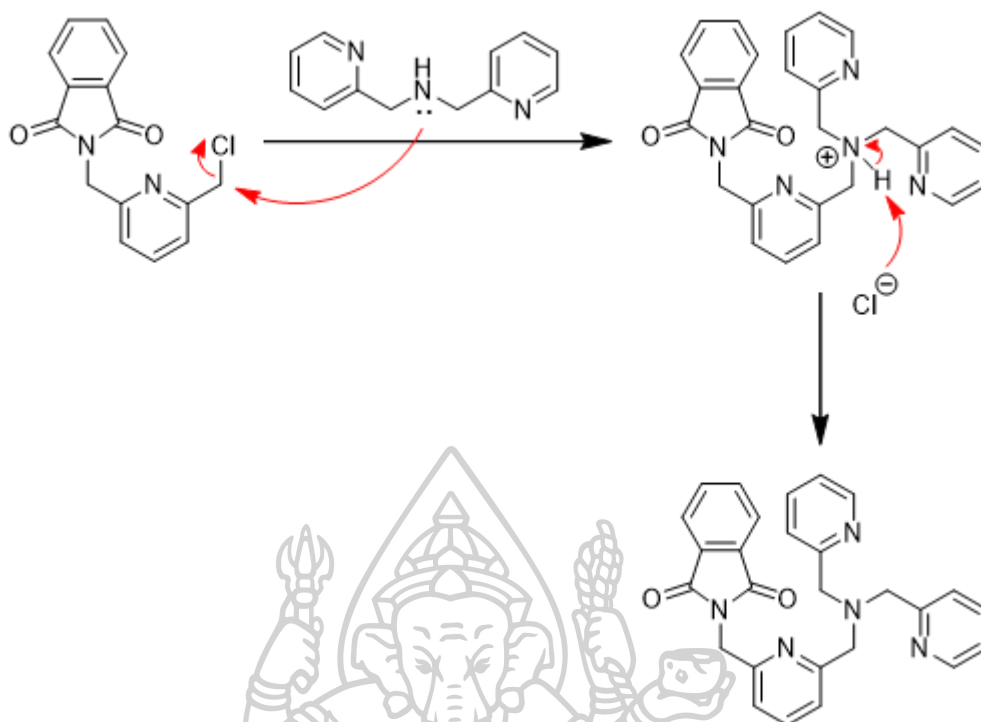


ภาพที่ 32  $^{13}\text{C}$  NMR สเปกตรัมของสารประกอบ I-4



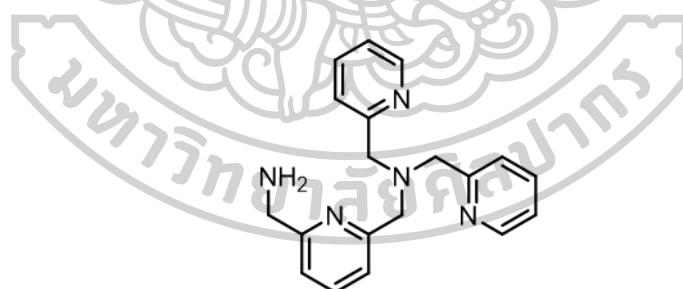
ภาพที่ 33  $^{13}\text{C}$  DEPT 135 NMR สเปกตรัมของสารประกอบ I-4

เมื่อพิจารณาโครงสร้างของ 2-((6-((bis(pyridine-2-ylmethyl)amino)methyl)pyridin-2-yl)methyl)isoindoline-1,3-dione (**I-4**) และผล  $^1\text{H}$  NMR สเปกตรัม พบว่า ปรากฏสัญญาณทั้งหมด 9 กลุ่ม ได้แก่ สัญญาณที่มีลักษณะเป็น singlet (s) ที่ตำแหน่ง chemical shift ( $\delta$ ) เท่ากับ 3.78 ppm ซึ่งแสดงสัญญาณของโปรตอนของหมู่เมทิลีน (methylene,  $\text{CH}_2$ ) ที่ตำแหน่งโปรตอนที่ 1 มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 2 โปรตอน ถัดมาที่ตำแหน่งที่ chemical shift เท่ากับ 3.84 ppm ซึ่งแสดงสัญญาณของโปรตอนของหมู่เมทิลีนของหมู่พิโคลิล (picolyl) จำนวน 2 หมู่ มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 4 โปรตอน ( $2 \times 2$  โปรตอน) มีลักษณะเป็น singlet (s) ถัดมาที่ตำแหน่งที่ chemical shift เท่ากับ 5.01 ppm ซึ่งแสดงสัญญาณของโปรตอนของหมู่เมทิลีน มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 2 โปรตอน มีลักษณะเป็น singlet (s) ถัดไปที่ตำแหน่ง chemical shift ระหว่าง 7.05-7.16 ppm แสดงสัญญาณของโปรตอนบนวงไพริดีน (pyridine) ที่ตำแหน่งโปรตอนที่ 4 และ 5 ซ้อนทับกัน มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 3 โปรตอน ถัดไปที่ตำแหน่ง chemical shift เท่ากับ 7.39 ppm ซึ่งแสดงสัญญาณของโปรตอนบนวงไพริดีนที่ตำแหน่งโปรตอนที่ 6 มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 1 โปรตอน มีลักษณะเป็น doublet (d) โดยมีค่า coupling constant (J) เท่ากับ 7.6 Hz เนื่องจากได้รับอิทธิพลจากโปรตอนที่ตำแหน่งที่ 7 ถัดมาที่ตำแหน่ง chemical shift ระหว่าง 7.48-7.63 ppm ซึ่งแสดงสัญญาณของโปรตอนบนวงไพริดีนที่ตำแหน่งโปรตอนที่ 7, 8 และ 9 ซ้อนทับกัน มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 5 โปรตอน ถัดไปที่ตำแหน่ง chemical shift ระหว่าง 7.65-7.75 ppm ซึ่งแสดงสัญญาณของโปรตอนของหมู่ phthalimide ที่ตำแหน่งโปรตอนที่ 10 มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 2 โปรตอน มีลักษณะเป็น multiplet (m) ถัดไปที่ตำแหน่ง chemical shift ระหว่าง 7.80-7.91 ppm ซึ่งแสดงสัญญาณของโปรตอนของหมู่ phthalimide ที่ตำแหน่งโปรตอนที่ 11 มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 2 โปรตอน มีลักษณะเป็น multiplet (m) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของหมู่ phthalimide ที่จะเกิด complex coupling แล้วปรากฏสัญญาณของโปรตอนที่ตำแหน่ง 10 และ 11 แยกออกจากกัน ถัดมาที่ตำแหน่ง chemical shift เท่ากับ 8.49 ppm ซึ่งแสดงสัญญาณของโปรตอนบนวงไพริดีนของหมู่พิโคลิลที่ตำแหน่งโปรตอนที่ 12 มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 2 โปรตอน โดยมีค่า coupling constant (J) เท่ากับ 7.6 Hz เนื่องจากได้รับอิทธิพลจากโปรตอนที่ตำแหน่งที่ 8 จากผลของ  $^{13}\text{C}$  NMR สเปกตรัม พบว่า มีสัญญาณของคาร์บอนทั้งหมด 17 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับโครงสร้างของ 2-((6-((bis(pyridine-2-ylmethyl)amino)methyl)pyridin-2-yl)methyl)isoindoline-1,3-dione (**I-4**) โดยสามารถเสนอกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังภาพที่ 34



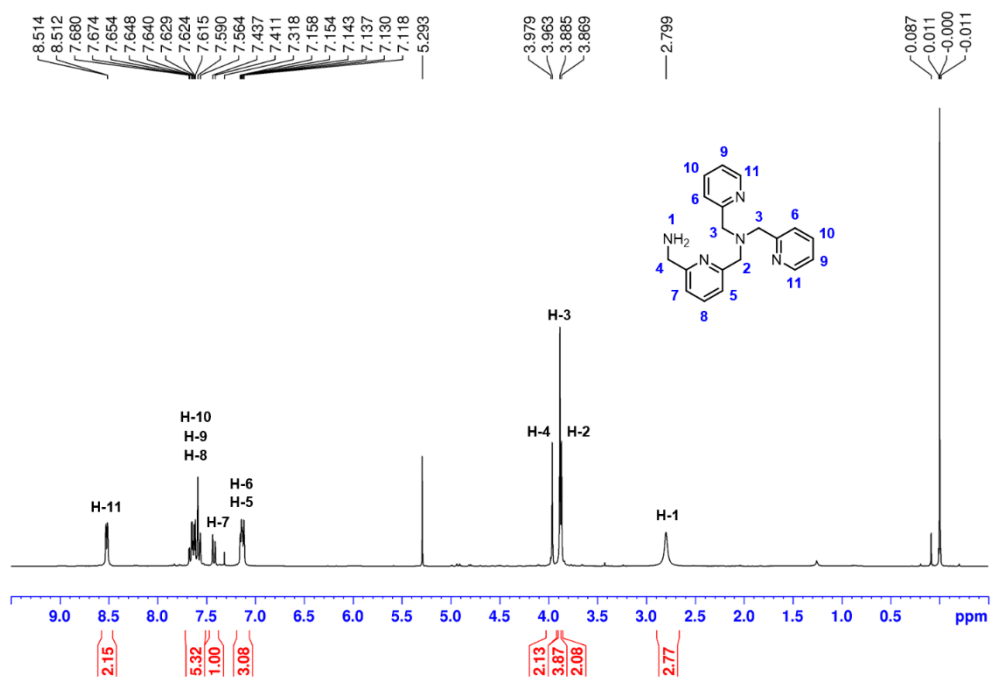
ภาพที่ 34 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของสารประกอบ I-4

#### 1.4. โครงสร้างของ 1-(6-(aminomethyl)pyridin-2-yl)-*N,N*-bis(pyridine-2-yl)methylmethanamine (TMPA)

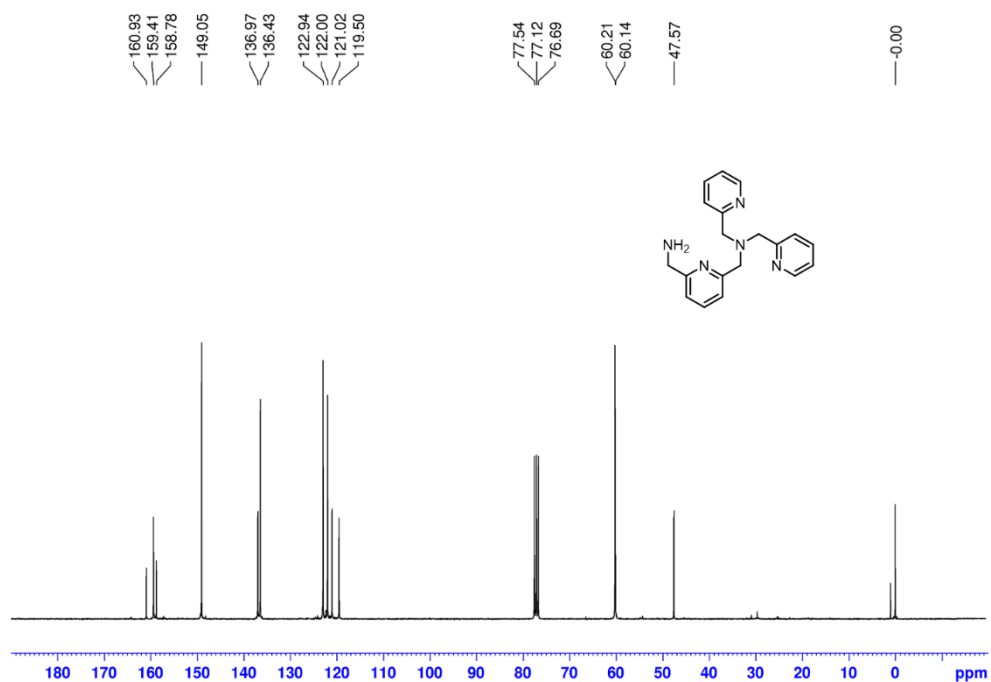


ภาพที่ 35 โครงสร้างทางเคมีของไอโอโนฟอร์ชนิด TMPA

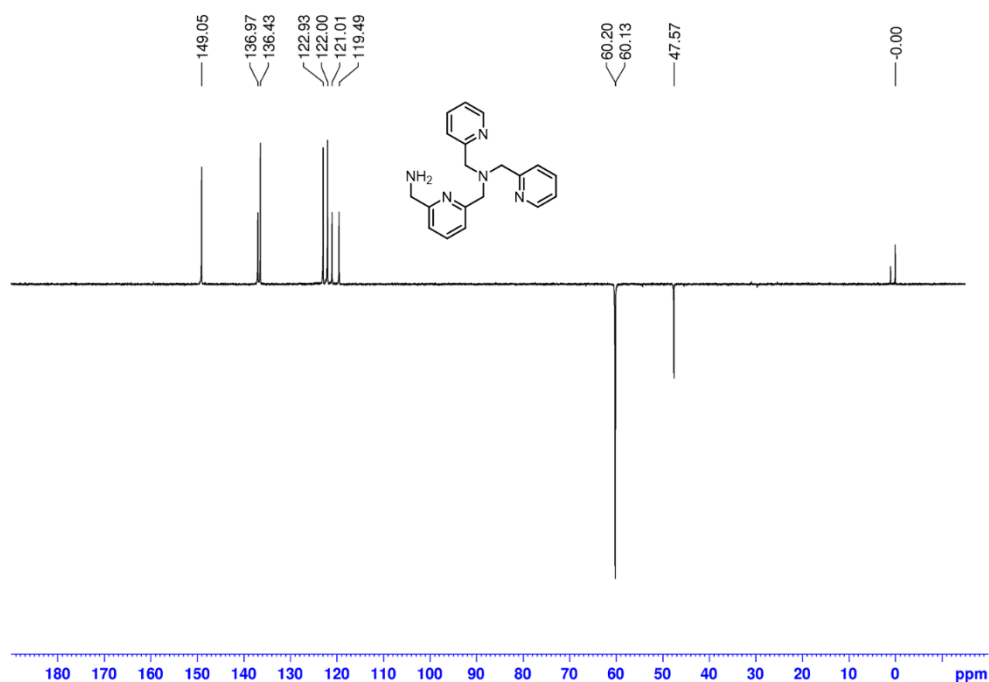
จากผลการพิสูจน์โครงสร้างด้วยวิธีทางสเปกโตรสโกปี แสดงดังนี้  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  (ppm): 2.80 (br-s, 2H), 3.87 (s, 2H), 3.88 (s, 4H), 3.96 (s, 2H), 7.11-7.18 (m, 3H), 7.42 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 7.56-7.65 (m, 5H), 8.52 (d,  $J = 6.5$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta$  (ppm): 47.6 ( $\text{CH}_2$ ), 60.1 ( $\text{CH}_2$ ), 60.2 ( $2\text{CH}_2$ ), 119.5 (CH), 121.0 (CH), 122.0 ( $2\text{CH}$ ), 122.9 ( $2\text{CH}$ ), 136.4 ( $2\text{CH}$ ), 137.0 (CH), 149.0 ( $2\text{CH}$ ), 158.8 (C), 159.4 ( $2\text{C}$ ), 160.9 (C).



ภาพที่ 36  $^1\text{H}$  NMR สเปกตรัมของไอโอโนฟอร์มชนิด TMPA



ภาพที่ 37  $^{13}\text{C}$  NMR สเปกตรัมของไอโอโนฟอร์มชนิด TMPA



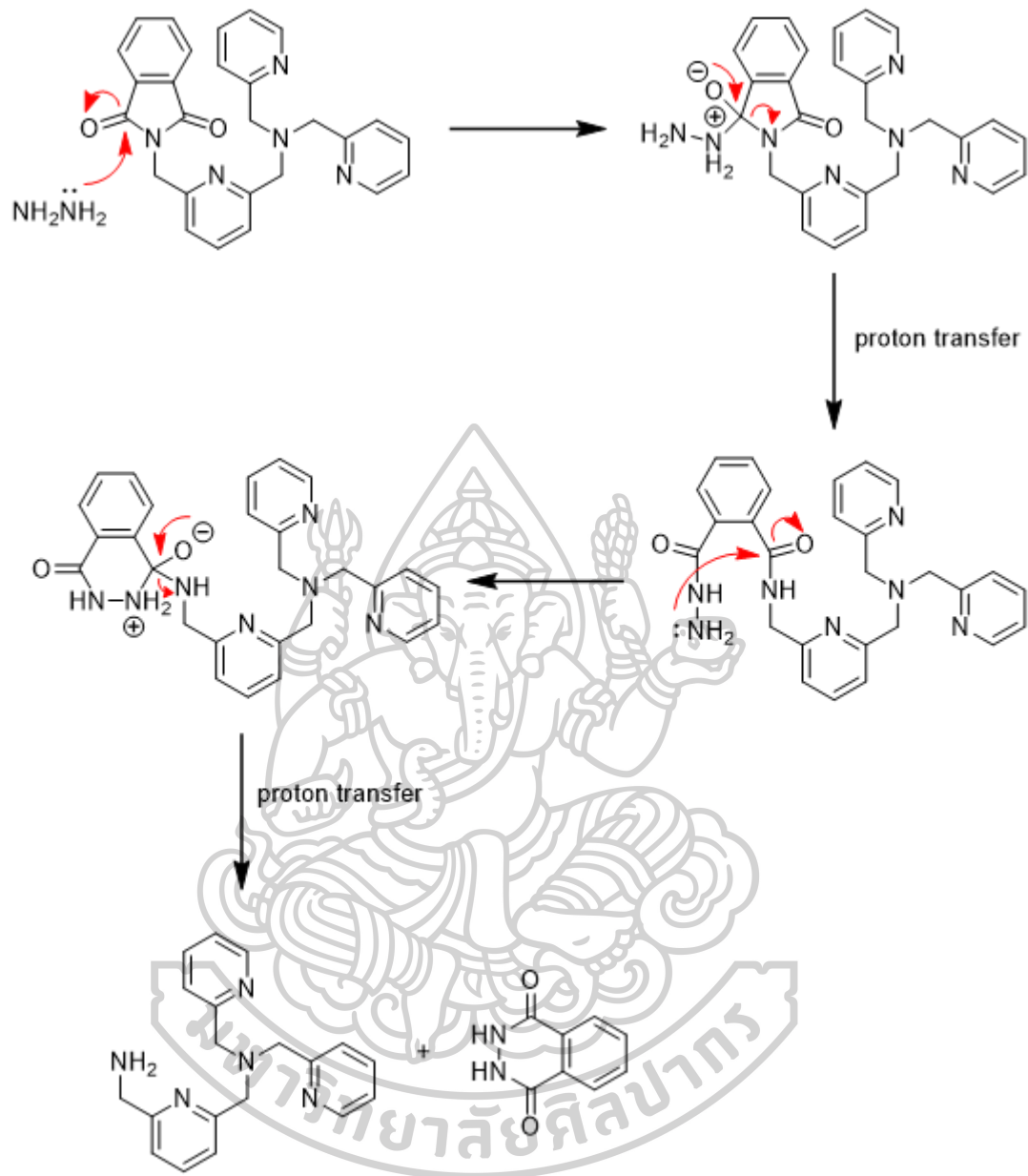
ภาพที่ 38  $^{13}\text{C}$  DEPT 135 NMR สเปกตรัมของไอโอโนฟอร์ชนิด TMPA

เมื่อพิจารณาโครงสร้างของ 1-(6-(aminomethyl)pyridin-2-yl)-*N,N*-bis(pyridine-2-ylmethyl)methanamine (TMPA) และผล  $^1\text{H}$  NMR สเปกตรัม พบว่า ปรากฏสัญญาณทั้งหมด 8 กลุ่ม ได้แก่ สัญญาณที่มีลักษณะเป็น broad-singlet (br-s) ที่ตำแหน่ง chemical shift ( $\delta$ ) เท่ากับ 2.80 ppm ซึ่งแสดงถึงสัญญาณของโปรตอนของหมู่เอมีน (amine) มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 2 โปรตอน ถัดมาเป็นตำแหน่งที่ chemical shift เท่ากับ 3.87 ppm ซึ่งแสดงสัญญาณของโปรตอนของหมู่เมทิลีน (methylene,  $\text{CH}_2$ ) มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 2 โปรตอน โดยที่มีลักษณะเป็น singlet (s) ถัดมาเป็นตำแหน่งที่ chemical shift เท่ากับ 3.88 ppm ซึ่งแสดงสัญญาณของโปรตอนของหมู่เมทิลีนของหมู่พิโคลิล (picoly) จำนวน 2 หมู่ มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 4 โปรตอน มีลักษณะเป็น singlet (s) ถัดมาเป็นตำแหน่งที่ chemical shift ระหว่าง 7.11-7.18 ppm แสดงสัญญาณของโปรตอนบนวงไพริดีน (pyridine) ที่ตำแหน่งโปรตอนที่ 4 และ 5 ซ้อนทับกัน มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 3 โปรตอน ถัดมาเป็นตำแหน่งที่ chemical shift เท่ากับ 7.42 ppm ซึ่งแสดงสัญญาณของโปรตอนบนวงไพริดีนที่ตำแหน่งโปรตอนที่ 5 มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 1 โปรตอน มีลักษณะเป็น doublet (d) โดยมีค่า coupling constant (J) เท่ากับ 7.7 Hz เนื่องจากได้รับอิทธิพลจากโปรตอนที่ตำแหน่งที่ 8



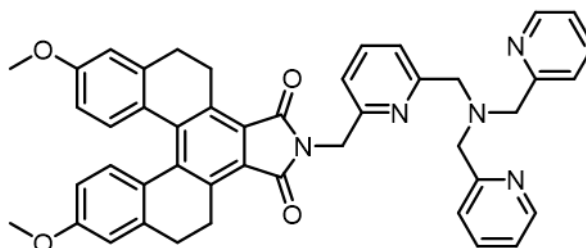
ถัดมาเป็นตำแหน่งที่ chemical shift ระหว่าง 7.56-7.65 ppm ซึ่งแสดงสัญญาณของโปรตอนบนวงไพริดีนที่ตำแหน่งโปรตอนที่ 8, 9 และ 10 ซ้อนทับกัน มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 5 โปรตอน ถัดมาที่ตำแหน่ง chemical shift เท่ากับ 8.52 ppm ซึ่งแสดงสัญญาณของโปรตอนบนวงไพริดีนของหมู่พิโคลิลที่ตำแหน่งโปรตอนที่ 11 มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 2 โปรตอน มีลักษณะเป็น doublet (d) โดยมีค่า coupling constant (J) เท่ากับ 6.5 Hz เนื่องจากได้รับอิทธิพลจากโปรตอนที่ตำแหน่งที่ 9 จากผลของ  $^{13}\text{C}$  NMR สเปกตรัม พบว่า มีสัญญาณของคาร์บอนทั้งหมด 13 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับโครงสร้างของ 1-(6-(aminomethyl)pyridin-2-yl)-N,N-bis(pyridine-2-ylmethyl)methanamine (TMPA) โดยสามารถเสนอกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังภาพที่ 39





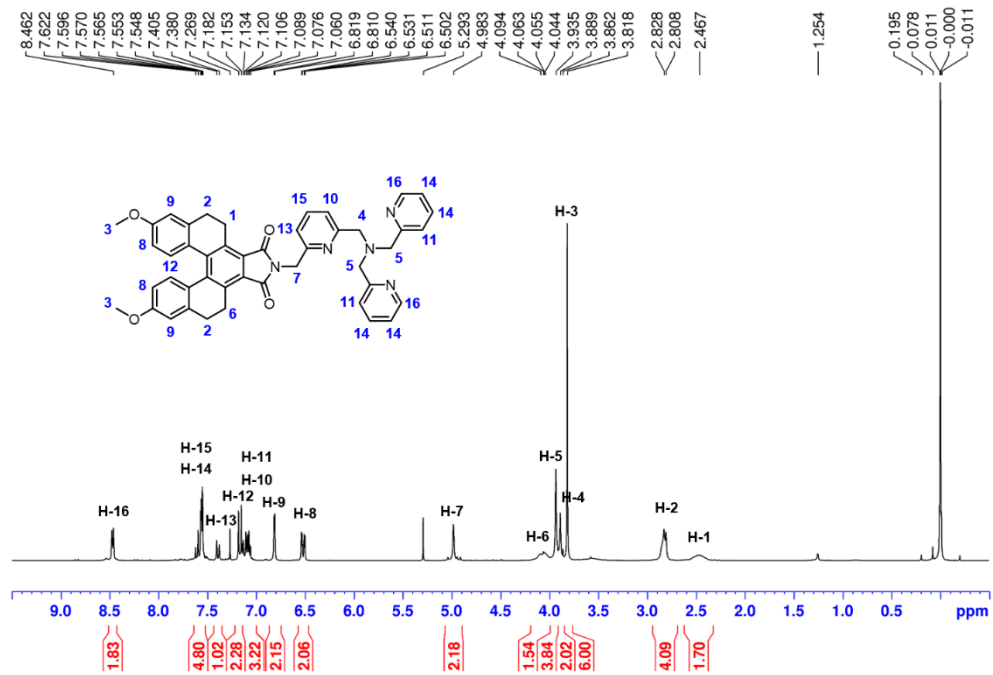
ภาพที่ 39 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของไอโอโนฟอร์ชนิด TPA

### 1.5. โครงสร้างของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ MT

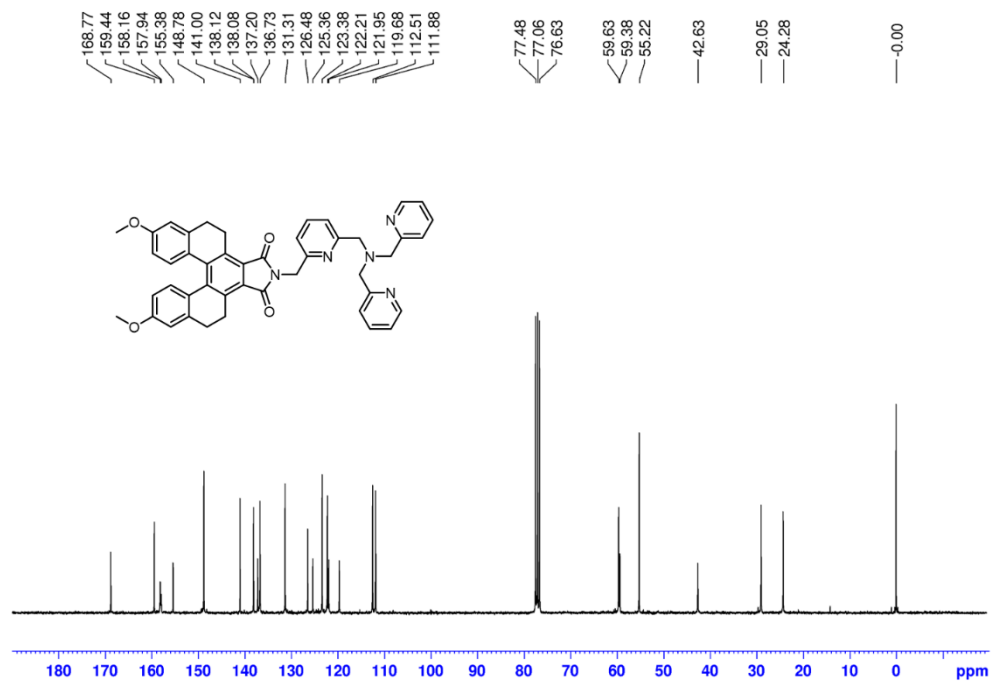


ภาพที่ 40 โครงสร้างทางเคมีของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ MT

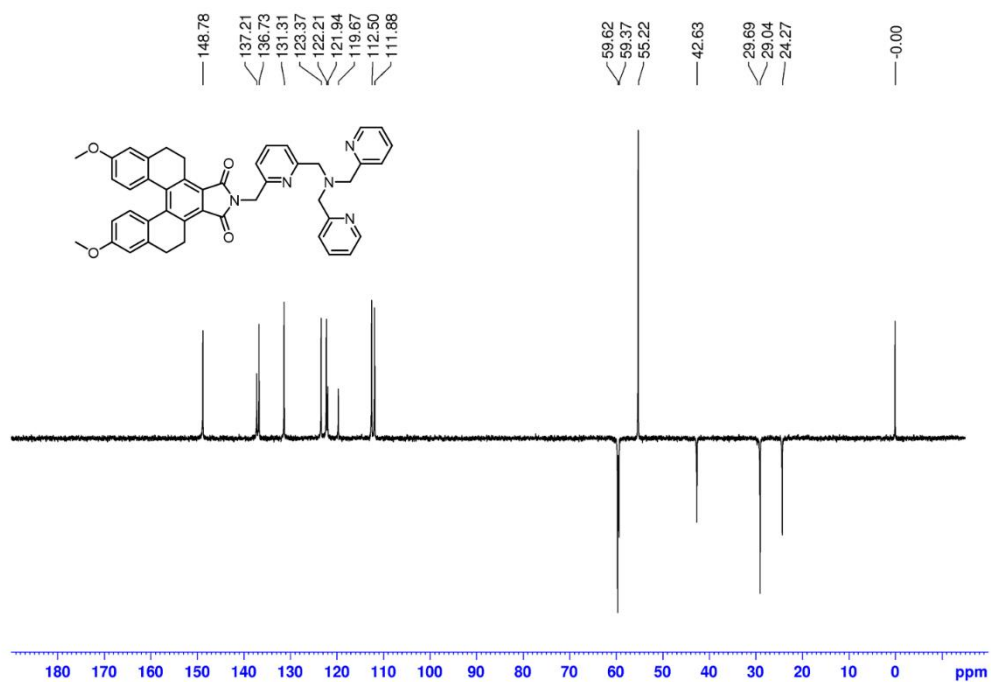
จากผลการพิสูจน์โครงสร้างด้วยวิธีทางสเปกโตรสโกปี แสดงดังนี้  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  (ppm): 2.40-2.60 (br-s, 2H), 2.82 (d,  $J = 6.1$  Hz, 4H), 3.82 (s, 6H), 3.89 (s, 2H), 3.94 (s, 4H), 4.00-4.20 (m, 2H), 4.98 (s, 2H), 6.52 (dd,  $J = 8.7, 2.7$  Hz, 2H), 6.81 (d,  $J = 2.6$  Hz, 2H), 7.01-7.14 (m, 3H), 7.17 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 7.39 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 7.53-7.64 (m, 5H), 8.47 (d,  $J = 4.8$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta$  (ppm): 24.3 ( $2\text{CH}_2$ ), 29.1 ( $2\text{CH}_2$ ), 42.6 ( $\text{CH}_2$ ), 55.2 ( $2\text{CH}_3$ ), 59.4 ( $\text{CH}_2$ ), 59.6 ( $2\text{CH}_2$ ), 111.9 ( $2\text{CH}$ ), 112.5 ( $2\text{CH}$ ), 119.7 ( $\text{CH}$ ), 121.9 ( $\text{CH}$ ), 122.2 ( $2\text{CH}$ ), 123.4 ( $2\text{CH}$ ), 125.4 ( $2\text{C}$ ), 126.5 ( $2\text{C}$ ), 131.3 ( $2\text{CH}$ ), 136.7 ( $2\text{CH}$ ), 137.2 ( $\text{CH}$ ), 138.1 ( $4\text{C}$ ), 141.0 ( $2\text{C}$ ), 148.8 ( $2\text{CH}$ ), 155.4 ( $2\text{C}$ ), 157.9 ( $\text{C}$ ), 158.2 ( $\text{C}$ ), 159.4 ( $2\text{C}$ ), 168.8 ( $2\text{C}=\text{O}$ ). HRMS (ESI-TOF) จากการคำนวณ  $\text{C}_{45}\text{H}_{50}\text{N}_5\text{O}_4^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  เท่ากับ 714.3080  $m/z$  และจากการวิเคราะห์ได้เท่ากับ 714.3077  $m/z$ .



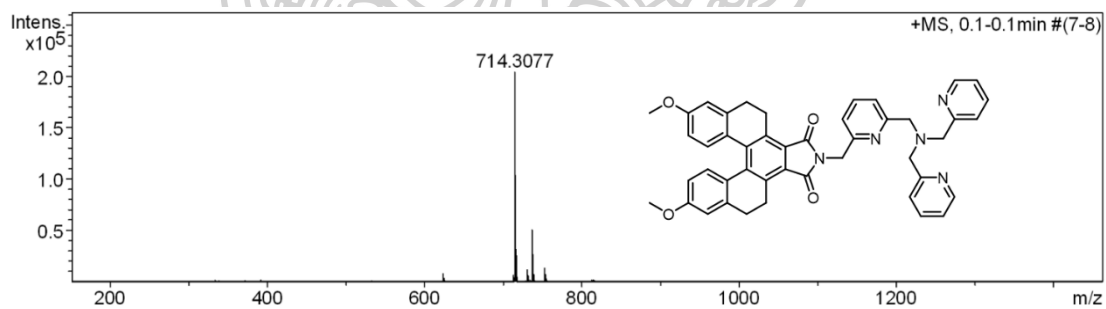
ภาพที่ 41  $^1\text{H}$  NMR สเปกตรัมของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ MT



ภาพที่ 42  $^{13}\text{C}$  NMR สเปกตรัมของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ MT



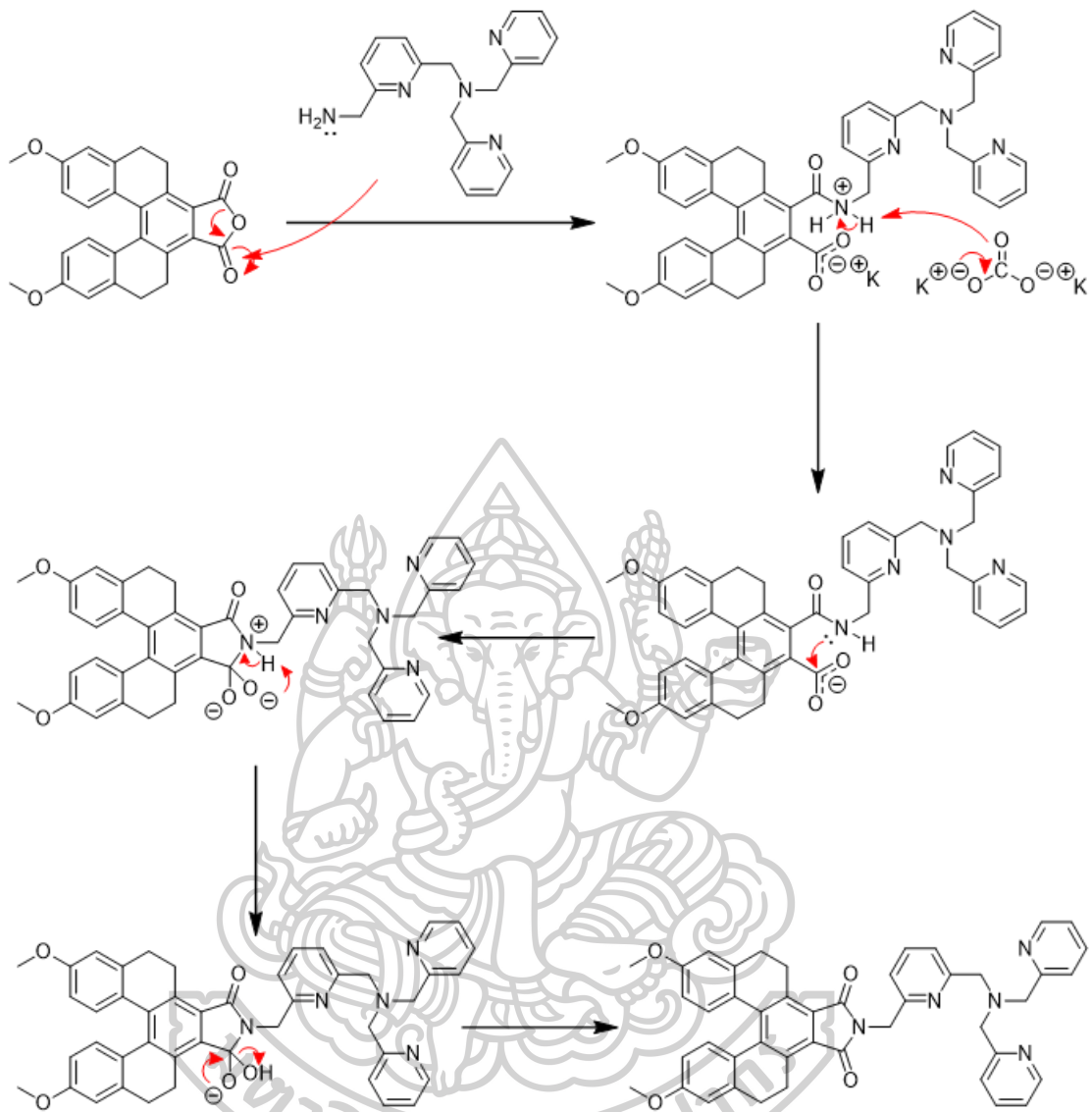
ภาพที่ 43  $^{13}\text{C}$  DEPT 135 NMR สเปกตรัมของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ MT



ภาพที่ 44 HR ESI-TOF MS สเปกตรัมของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ MT

เมื่อพิจารณาโครงสร้างของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ MT และผล  $^1\text{H}$  NMR สเปกตรัม พบว่าปรากฏสัญญาณทั้งหมด 14 กลุ่ม ได้แก่ สัญญาณที่มีลักษณะเป็น broad-singlet (br-s) ที่ตำแหน่ง chemical shift ( $\delta$ ) ระหว่าง 2.40-2.60 ppm ซึ่งแสดงสัญญาณของโปรตอนของหมู่เมทิลีน (methylene,  $\text{CH}_2$ ) ของระบบ helicene มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 2 โปรตอน เมทิลีนโปรตอนกลุ่มนี้เป็นตำแหน่งที่อยู่ห่างจากหมู่ดึงอิเล็กตรอนมากที่สุด ทำให้ปรากฏสัญญาณบริเวณที่มีสนามแม่เหล็กสูงที่สุด (up field) ถัดมาเป็นตำแหน่งที่ chemical shift เท่ากับ 2.82 ppm ซึ่งแสดงถึงสัญญาณของโปรตอนของหมู่เมทิลีนของระบบ helicene ที่ตำแหน่งโปรตอนที่ 2 มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 4 โปรตอน สัญญาณมีลักษณะเป็น broad doublet เนื่องจากได้รับอิทธิพลจากสนามอิเล็กตรอนของวงอะโรมาติกของระบบ helicene ถัดมาเป็นตำแหน่งที่ chemical shift เท่ากับ 3.82 ppm ซึ่งแสดงถึงสัญญาณของโปรตอนของหมู่เมทอกซี (methoxy,  $\text{OCH}_3$ ) จำนวน 2 หมู่ มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 6 โปรตอน สัญญาณมีลักษณะเป็น singlet (s) เนื่องจากหมู่นี้อยู่ใกล้กับอะตอมออกซิเจน ซึ่งมีค่า electronegativity (EN) สูง ส่งผลให้สัญญาณมีค่า chemical shift ที่ไปทาง down field ถัดมาเป็นตำแหน่งที่ chemical shift เท่ากับ 3.93 ppm ซึ่งแสดงสัญญาณของโปรตอนของหมู่เมทิลีนของหมู่พิโคลิล (picoly) มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 2 โปรตอน สัญญาณมีลักษณะเป็น singlet (s) ถัดมาเป็นตำแหน่งที่ chemical shift เท่ากับ 3.94 ppm ซึ่งแสดงสัญญาณของโปรตอนของหมู่เมทิลีนของหมู่พิโคลิล จำนวน 2 หมู่ มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 4 โปรตอน สัญญาณมีลักษณะเป็น singlet (s) ถัดมาที่ตำแหน่ง chemical shift ระหว่าง 4.00-4.20 ppm ซึ่งแสดงถึงสัญญาณของโปรตอนของหมู่เมทิลีนที่ตำแหน่งโปรตอนที่ 6 มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 2 โปรตอน เป็นโปรตอนที่ได้รับอิทธิพลจากสนามอิเล็กตรอนของวงอะโรมาติกของระบบ helicene และอิทธิพลจาก electron shielding จากระบบอะโรมาติก ส่งผลให้สัญญาณโปรตองกลุ่มนี้มีความ down field มากกว่าเมทิลีนโปรตอนของระบบ helicene ถัดมาที่ตำแหน่ง chemical shift เท่ากับ 4.98 ppm ซึ่งแสดงถึงสัญญาณของโปรตอนของหมู่เมทิลีนของหมู่พิโคลิล มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 2 โปรตอน สัญญาณมีลักษณะเป็น singlet (s) โดยหมู่เมทิลีนนี้อยู่ติดกับหมู่อิมิด (imide) ซึ่งเป็นหมู่ดึงอิเล็กตรอน ส่งผลให้สัญญาณของโปรตอนตำแหน่งที่ 7 มีความ down field มากกว่าสัญญาณของโปรตอนตำแหน่งอื่นๆ ของหมู่พิโคลิล ถัดมาที่ตำแหน่ง chemical shift เท่ากับ 6.52 ppm ซึ่งแสดงสัญญาณของโปรตอนบนวงอะโรมาติกของระบบ helicene มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 2 โปรตอน สัญญาณมีลักษณะเป็น doublet of doublet (dd) โดยมีค่า coupling constant (J) เท่ากับ 8.7 Hz และ 2.7 Hz เนื่องจากได้รับอิทธิพล

จากโปรตอนตำแหน่งที่ 9 และ 12 ถัดมาเป็นตำแหน่งที่ chemical shift เท่ากับ 6.81 ppm ซึ่งแสดงสัญญาณของโปรตอนบนวงอะโรมาติกของระบบ helicene มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 2 โปรตอน สัญญาณมีลักษณะเป็น doublet (d) โดยมีค่า coupling constant เท่ากับ 2.6 Hz เนื่องจากได้รับอิทธิพลจากโปรตอนตำแหน่งที่ 12 ถัดมาเป็นตำแหน่งที่ chemical shift ระหว่าง 7.01-7.14 ppm ซึ่งแสดงสัญญาณของโปรตอนบนวงไพริดีน (pyridine) ของหมู่พิโคลิล มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 3 โปรตอน สัญญาณมีลักษณะเป็น multiplet (m) ซึ่งเกิดจากการซ้อนทับกันระหว่างสัญญาณของโปรตอนที่ตำแหน่งที่ 10 และ 11 ถัดมาที่ตำแหน่ง chemical shift เท่ากับ 7.17 ppm ซึ่งแสดงสัญญาณของโปรตอนบนวงอะโรมาติกของระบบ helicene มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 2 โปรตอน สัญญาณมีลักษณะเป็น doublet (d) โดยมีค่า coupling constant เท่ากับ 8.7 Hz เนื่องจากได้รับอิทธิพลจากโปรตอนตำแหน่งที่ 8 ถัดมาที่ตำแหน่ง chemical shift เท่ากับ 7.39 ppm ซึ่งแสดงสัญญาณของโปรตอนบนวงไพริดีนของหมู่พิโคลิลที่ตำแหน่งโปรตอนที่ 13 มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 1 โปรตอน สัญญาณมีลักษณะเป็น doublet (d) โดยมีค่า coupling constant เท่ากับ 7.6 Hz เนื่องจากได้รับอิทธิพลจากโปรตอนตำแหน่งที่ 15 ถัดมาที่ตำแหน่ง chemical shift ระหว่าง 7.53-7.64 ppm ซึ่งแสดงสัญญาณของโปรตอนบนวงไพริดีนของหมู่พิโคลิล มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 5 โปรตอน สัญญาณมีลักษณะเป็น multiplet (m) ซึ่งเกิดจากการซ้อนทับกันระหว่างสัญญาณของโปรตอนที่ตำแหน่งที่ 14 และ 15 ถัดมาที่ตำแหน่ง chemical shift เท่ากับ 8.47 ppm ซึ่งแสดงสัญญาณของโปรตอนบนวงไพริดีนของหมู่พิโคลิล มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 2 โปรตอน สัญญาณมีลักษณะเป็น doublet (d) โดยมีค่า coupling constant เท่ากับ 4.8 Hz เนื่องจากได้รับอิทธิพลจากโปรตอนตำแหน่งที่ 14 โดยโปรตอนตำแหน่งนี้ได้รับอิทธิพลจากการดึงอิเล็กตรอนของอะตอมไนโตรเจนของวงไพริดีน ส่งผลให้สัญญาณของโปรตอนที่ตำแหน่งนี้มีความ down field มากที่สุด จากผลของ  $^{13}\text{C}$  NMR สเปกตรัม พบว่า มีสัญญาณของคาร์บอนทั้งหมดสอดคล้องกับโครงสร้างของ ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ MT นอกจากนี้ได้ยืนยันโครงสร้างด้วย high resolution electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry (HR ESI-TOF MS) ได้ผลจากการวิเคราะห์เท่ากับ 714.3077 m/z จากการคำนวณ  $\text{C}_{45}\text{H}_{50}\text{N}_5\text{O}_4^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  เท่ากับ 714.3080 m/z โดยสามารถเสนอกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังภาพที่ 45



ภาพที่ 45 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ MT



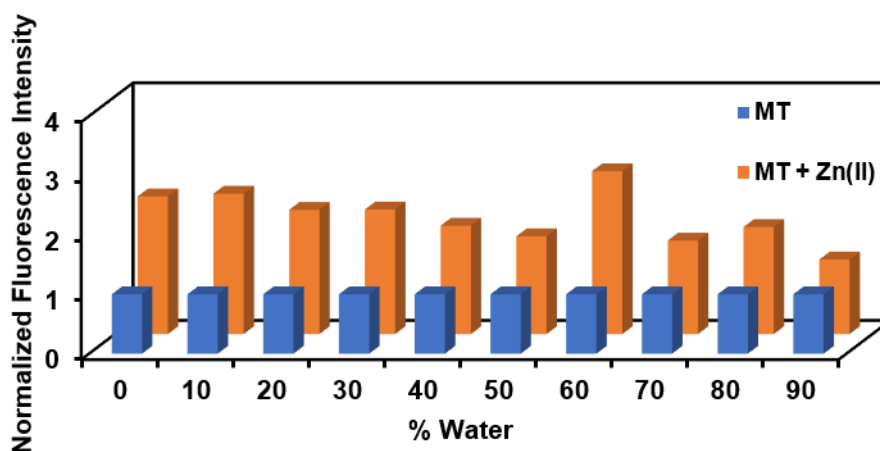
## 2. การทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจวัดไอออนสังกะสีของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ MT

เมื่อฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ MT ได้รับการยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี จากนั้นนำเซ็นเซอร์ที่ได้มาทดสอบความสามารถในการตรวจจับไอออนโลหะสังกะสี ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโทรสโกปีในตัวทำละลายอินทรีย์ และระบบตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ เพื่อศึกษาสมบัติในการดูดกลืนแสง และการคายแสงของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ นอกจากนี้ ศึกษาความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) ความจำเพาะเจาะจง (selectivity) ความสามารถในการดักจับไอออนสังกะสีในภาวะที่มีไอออนรบกวนอื่นๆ (competition study) กลไกในการดักจับ (binding mechanism) และการนำไปประยุกต์ใช้ในเซลล์สิ่งมีชีวิต

การศึกษสมบัติเชิงแสงของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ MT ทำได้โดยศึกษาในระบบตัวทำละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES buffer) ความเข้มข้น 5 mM pH 7.2 และ methanol ในอัตราส่วน 3:2 โดยปริมาตร ซึ่งศึกษาความสามารถในการดักจับไอออนโลหะต่างๆ ที่เตรียมได้จากเกลือเปอร์คลอเรตของโลหะชนิดต่างๆ ได้แก่  $Zn^{2+}$   $Cd^{2+}$   $Cu^{2+}$   $Pb^{2+}$   $Hg^{2+}$   $Ag^{+}$   $Fe^{2+}$   $Ni^{2+}$   $Co^{2+}$   $Mn^{2+}$   $Al^{3+}$   $Mg^{2+}$   $Ca^{2+}$   $Ba^{2+}$   $Li^{+}$   $Na^{+}$  และ  $K^{+}$  ละลายในน้ำปราศจากไอออน

### 2.1. ผลการทดสอบสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ในตัวทำละลายเมทานอล ที่ปริมาณน้ำต่างกันของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ MT

การศึกษากการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ของเซ็นเซอร์ MT จะศึกษาในทำตัวทำละลายเมทานอล ที่ปริมาณน้ำแตกต่างกัน ตั้งแต่ร้อยละ 0 ถึงร้อยละ 90 โดยปริมาตร โดยติดตามค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence intensity) ในช่วงก่อนและหลังการเติมไอออนสังกะสี ที่ความยาวคลื่น 456 นาโนเมตร โดยใช้แสงกระตุ้นที่ความยาวคลื่น 373 นาโนเมตร ความเข้มข้นสารละลายเซ็นเซอร์ MT เท่ากับ 5.0 ไมโครโมลาร์ และความเข้มข้นสารละลายไอออนสังกะสี เท่ากับ 2.5 ไมโครโมลาร์ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 46



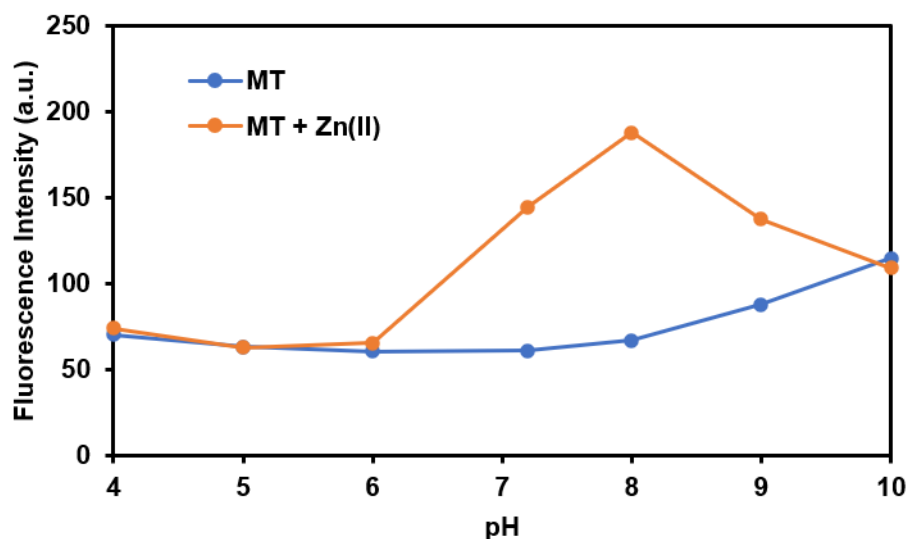
ภาพที่ 46 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ( $\lambda_{\text{ex}} = 373 \text{ nm}$  และ  $\lambda_{\text{em}} = 456 \text{ nm}$ ) ของเซ็นเซอร์ MT (5.0  $\mu\text{M}$ ) ในตัวทำละลายเมทานอล ที่ปริมาณน้ำต่างกัน ก่อนและหลังเติมไอออนสังกะสี ที่ความเข้มข้น 2.5  $\mu\text{M}$

จากผลการศึกษาคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ MT ในตัวทำละลายเมทานอล ที่ปริมาณน้ำระหว่างร้อยละ 0 ถึง ร้อยละ 90 พบว่าหลังการเติมไอออนสังกะสี ค่าสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ MT ที่ความยาวคลื่น 456 นาโนเมตร มีค่าเปลี่ยนแปลงไปในปริมาณน้ำที่แตกต่างกัน โดยที่ปริมาณน้ำร้อยละ 60 โดยปริมาตร แสดงการเพิ่มขึ้นของสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์มากที่สุด ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะศึกษาคายแสงฟลูออเรสเซนซ์อื่น ๆ โดยใช้ระบบตัวทำละลายผสมระหว่างน้ำและเมทานอลที่ร้อยละ 60:40 โดยปริมาตร หรืออัตราส่วน 3:2 โดยปริมาตร

## 2.2. ผลการทดสอบสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ pH ต่างกันของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ MT

การศึกษาคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ MT จะศึกษาในระบบตัวทำละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES buffer ความเข้มข้น 5 mM และ methanol ในอัตราส่วน 3:2 โดยปริมาตร ที่ pH ต่างกัน โดยติดตามค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence intensity) ในช่วงก่อนและหลังการเติมไอออนสังกะสี ที่ความยาวคลื่น 456 นาโนเมตร โดยใช้แสง

กระตุ้นที่ความยาวคลื่น 373 นาโนเมตร ความเข้มข้นสารละลายเซ็นเซอร์ MT เท่ากับ 10 ไมโครโมลาร์ และความเข้มข้นสารละลายไอออนสังกะสี เท่ากับ 2.5 ไมโครโมลาร์ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 47

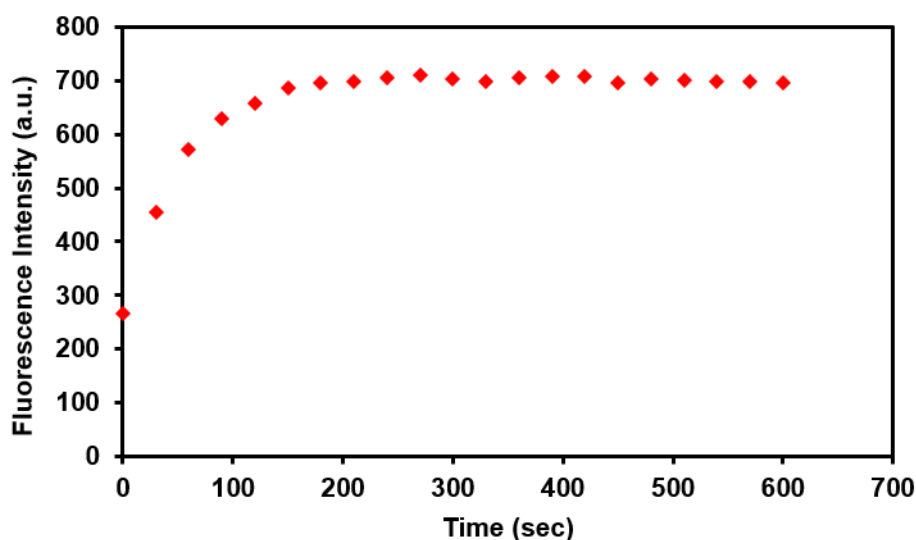


ภาพที่ 47 การคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ( $\lambda_{ex} = 373 \text{ nm}$  และ  $\lambda_{em} = 456 \text{ nm}$ ) ของเซ็นเซอร์ MT (10  $\mu\text{M}$ ) ที่ pH ต่างๆ ก่อนและหลังเติมไอออนสังกะสีที่ความเข้มข้น 2.5  $\mu\text{M}$

จากผลการศึกษาการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ MT ในช่วง pH ระหว่าง 4.0 ถึง 10.0 พบว่าค่าสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ MT ที่ความยาวคลื่น 456 นาโนเมตร มีค่าเปลี่ยนแปลงไปในช่วง pH ที่แตกต่างกัน โดยในช่วง pH ระหว่าง 4.0 ถึง 6.0 จะไม่แสดงการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ เนื่องจากในสภาวะที่เป็นกรด อะตอมไนโตรเจนของวงไพริดีนสามารถเกิดปฏิกิริยา protonation ส่งผลให้ไม่สามารถโคออดิเนตกับไอออนสังกะสีได้ [25-27] ในช่วง pH ระหว่าง 6.0 ถึง 9.0 แสดงการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์อย่างชัดเจน เมื่อมีการเติมไอออนสังกะสีลงในระบบ ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาที่สภาวะการทดลอง pH 7.2 สำหรับการทดลองอื่นๆ ต่อไป เนื่องจากเป็นสภาวะที่เป็นกลาง และมีความเหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้ในเซลล์สิ่งมีชีวิตได้

### 2.3. ผลการทดสอบเวลาที่ใช้ในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างฟลูออเรสเซนต์ เซ็นเซอร์ MT กับไอออนสังกะสี

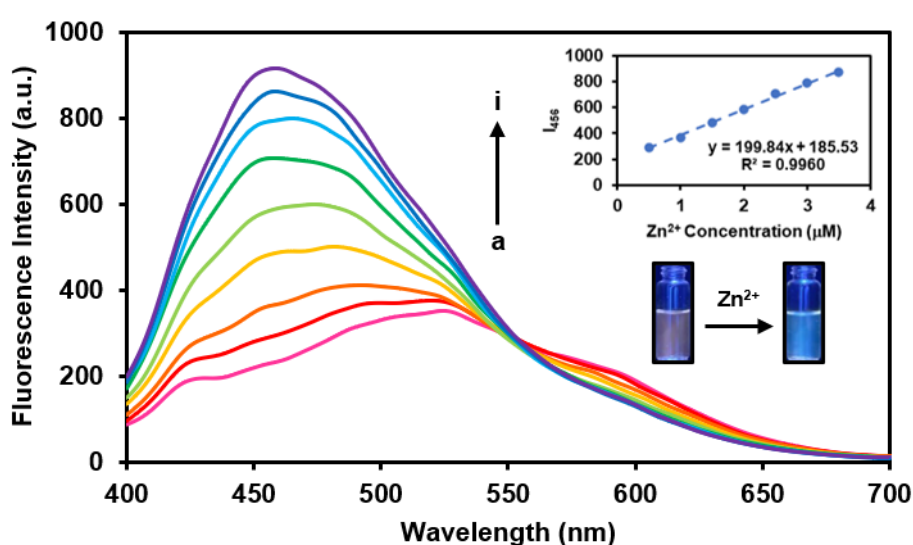
การศึกษาเวลาที่ใช้ในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ MT กับไอออนสังกะสีจะศึกษาในระบบตัวทำละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES buffer ความเข้มข้น 5 mM pH 7.2 และ methanol ในอัตราส่วน 3:2 โดยปริมาตร โดยติดตามค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence intensity) ที่ความยาวคลื่น 456 นาโนเมตร หลังการเติมไอออนสังกะสีที่ความเข้มข้น 2.5 ไมโครโมลาร์ ทุกๆ 30 วินาที จนกระทั่งไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 48



ภาพที่ 48 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ ( $\lambda_{ex} = 373 \text{ nm}$  และ  $\lambda_{em} = 456 \text{ nm}$ ) ที่เวลาใดๆ ของเซ็นเซอร์ MT ( $10 \mu\text{M}$ ) เมื่อเติมไอออนสังกะสีเข้มข้น  $2.5 \mu\text{M}$  ผลการศึกษาเวลาที่ใช้ในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ MT กับไอออนสังกะสี พบว่าเมื่อเติมไอออนสังกะสีที่ความเข้มข้น 2.5 ไมโครโมลาร์ ค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ที่ความยาวคลื่น 456 นาโนเมตร มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนกระทั่งถึงวินาทีที่ 180 ค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนต์มีค่าคงที่ แสดงให้เห็นว่าฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ MT ใช้เวลาอย่างน้อย 180 วินาที จึงเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเซ็นเซอร์ MT กับไอออนสังกะสีได้อย่างสมบูรณ์ ดังนั้นฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ MT จึงมีประสิทธิภาพในการดักจับไอออนสังกะสีได้อย่างรวดเร็ว

## 2.4. ผลการทดสอบสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนสังกะสีของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ MT

การศึกษาการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ MT จะศึกษาในระบบตัวทำละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES buffer ความเข้มข้น 5 mM pH 7.2 และ methanol ในอัตราส่วน 3:2 โดยปริมาตร โดยติดตามค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 456 นาโนเมตร ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 49



ภาพที่ 49 สเปกตรากการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ( $\lambda_{ex} = 373$  nm) ของเซ็นเซอร์ MT ( $10 \mu\text{M}$ ) ก่อนและหลังเติมไอออนสังกะสีที่ความเข้มข้นต่างๆ (a)  $0 \mu\text{M}$ , (b)  $0.5 \mu\text{M}$ , (c)  $1.0 \mu\text{M}$ , (d)  $1.5 \mu\text{M}$ , (e)  $2.0 \mu\text{M}$ , (f)  $2.5 \mu\text{M}$ , (g)  $3.0 \mu\text{M}$ , (h)  $3.5 \mu\text{M}$ , (i)  $4.0 \mu\text{M}$ .

จากผลการศึกษาการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ MT พบว่าการตรวจจับของเซ็นเซอร์ MT กับไอออนสังกะสีมีการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์แบบมีการเรืองแสงเพิ่มขึ้น (turn-ON) ในภาวะที่ไม่มีไอออนสังกะสี สารละลายฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ MT จะมีการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงสุดที่ความยาวคลื่น 531 นาโนเมตร เมื่อไตเตรตสารละลายเซ็นเซอร์ด้วยสารละลายไอออนสังกะสี พบว่า สัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์มีการเปลี่ยนแปลงความยาวคลื่นไปทางใกล้แสงฟ้า (hypsochromic shift หรือ blue shift) จากความยาวคลื่น 531 นาโนเมตร ไปยัง 456 นาโนเมตร และมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มของสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งความเข้มของสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์เพิ่มขึ้นถึง 4 เท่า

ของความเข้มการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์เริ่มต้น โดยความเข้มของสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์จะเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณไอออนสังกะสีที่เพิ่มขึ้นในสารละลาย

## 2.5. ค่าความสามารถต่ำสุดของการตรวจวัดไอออนสังกะสี (detection limit) และช่วงความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรง (linear range)

การคำนวณหาความเข้มข้นต่ำสุด (detection limit) ในการตรวจจับไอออนสังกะสีของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ MT สามารถทำได้โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ เมื่อเติมไอออนสังกะสีที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ( $\sigma$ ) จากนั้นนำค่าเฉลี่ยที่ได้ไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์เฉลี่ยกับความเข้มข้นของไอออนสังกะสี และหาค่าความชันของกราฟความสัมพันธ์ ( $m$ ) แสดงดังสมการดังนี้

$$\text{Detection limit} = 3\sigma/m$$

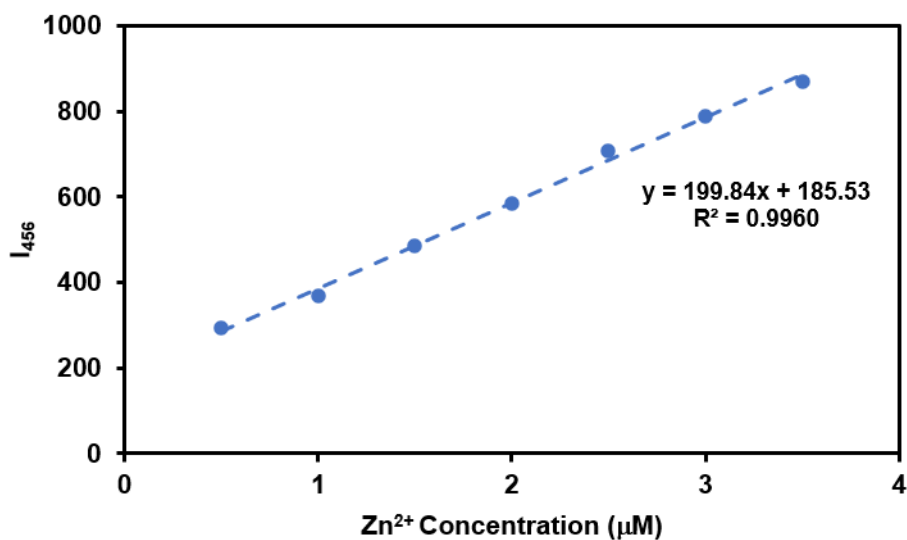
เมื่อ  $\sigma$  คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่ไม่มีไอออนสังกะสี

$m$  คือ ค่าความชันของกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์เฉลี่ยกับความเข้มข้นของไอออนสังกะสี

การหาช่วงความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรง (linear range) เป็นการศึกษาค้นหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ MT กับช่วงความเข้มข้นของไอออนสังกะสี โดยสามารถพิจารณาได้จากลักษณะความเป็นเส้นตรงของกราฟความสัมพันธ์ ซึ่งค่าสัมประสิทธิ์ความเป็นเส้นตรง ( $R^2$ ) ต้องมีค่าเข้าใกล้ 1 จะได้ผลการทดลองที่มีความถูกต้อง (accuracy) และแม่นยำ (precision) ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3 และภาพที่ 50

ตารางที่ 3 ข้อมูลค่าเฉลี่ยของสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ และความเข้มข้นของไอออนสังกะสีที่เติมลงไปในการละลายเซ็นเซอร์ MT

ความเข้มข้นของไอออนสังกะสี ( $\mu\text{M}$ )	ค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ (a.u.)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
0.5	291.84	292.75	292.91	292.50
1.0	365.97	366.26	368.59	366.94
1.5	485.87	484.99	485.22	485.36
2.0	585.44	585.77	585.95	585.72
2.5	706.69	706.96	709.15	707.60
3.0	788.02	787.88	788.43	788.11
3.5	868.79	869.17	872.70	870.22



ภาพที่ 50 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยของสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ MT ( $10 \mu\text{M}$ ) และความเข้มข้นของไอออนสังกะสีที่เติมลงไป

### การคำนวณ

จากกราฟความสัมพันธ์เป็นรูปแบบสมการเส้นตรง ดังสมการ  $y = 199.84x + 185.53$ ;  $R^2 = 0.9960$

พบว่า ค่าความชันของกราฟความสัมพันธ์ (m) เท่ากับ 199.84

ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่ไม่มีไอออนสังกะสี ( $\sigma$ ) เท่ากับ 1.95

จะได้ว่า Detection limit =  $3\sigma/m$

$$= 3(1.95)/199.84$$

$$= 0.029 \mu\text{M}$$

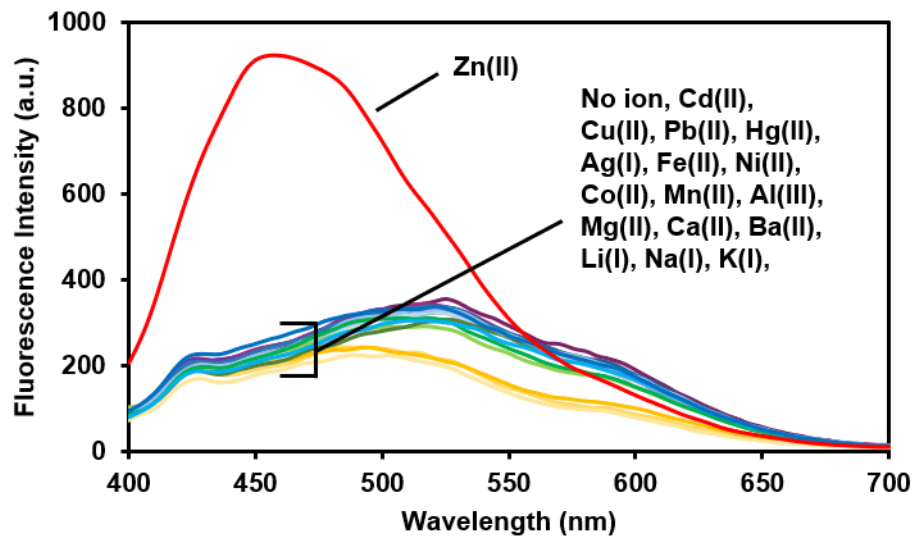
ดังนั้น ค่า detection limit ของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ MT ในการตรวจจับไอออนสังกะสี เท่ากับ  $0.029 \mu\text{M}$  หรือ 1.91 ppb

จากกราฟความสัมพันธ์เป็นรูปแบบสมการเส้นตรงที่อยู่ในช่วง  $0.5 \mu\text{M}$  (33 ppb) ถึง  $3.5 \mu\text{M}$  (228 ppb) มีค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.9960 ซึ่งมีค่าใกล้เคียง 1 ดังนั้น ช่วงความเข้มข้นดังกล่าวจึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณที่ต้องการความถูกต้องและแม่นยำสูง

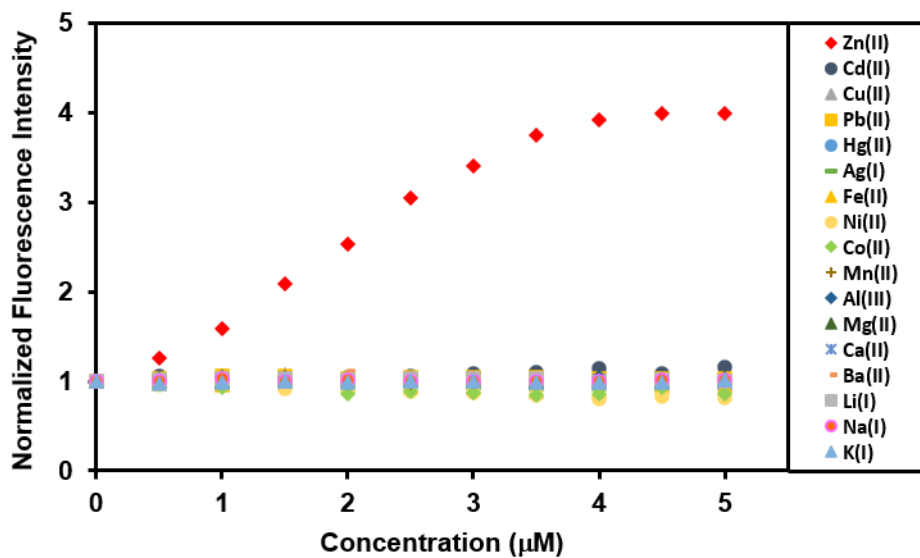
### 2.6. ผลการทดสอบสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนสังกะสีเปรียบเทียบกับไอออนรบกวนอื่นๆ ของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ MT

การศึกษาการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ MT ในภาวะที่มีไอออนสังกะสีเปรียบเทียบกับไอออนรบกวนอื่นๆ ได้แก่  $\text{Cd}^{2+}$   $\text{Cu}^{2+}$   $\text{Pb}^{2+}$   $\text{Hg}^{2+}$   $\text{Ag}^+$   $\text{Fe}^{2+}$   $\text{Ni}^{2+}$   $\text{Co}^{2+}$   $\text{Mn}^{2+}$   $\text{Al}^{3+}$   $\text{Mg}^{2+}$   $\text{Ca}^{2+}$   $\text{Ba}^{2+}$   $\text{Li}^+$   $\text{Na}^+$  และ  $\text{K}^+$  จะศึกษาในระบบตัวทำละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES buffer ความเข้มข้น 5 mM pH 7.2 และ methanol ในอัตราส่วน 3:2 โดยปริมาตร โดยติดตามสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์เปรียบเทียบกับระหว่างไอออนสังกะสี และไอออนรบกวนอื่นๆ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 51 และภาพที่ 52





ภาพที่ 51 สเปกตรากการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ( $\lambda_{\text{ex}} = 373 \text{ nm}$ ) ของเซ็นเซอร์ MT ( $10 \mu\text{M}$ ) ในภาวะที่มีไอออนสังกะสี และไอออนรบกวนอื่นๆ ( $5.0 \mu\text{M}$ )

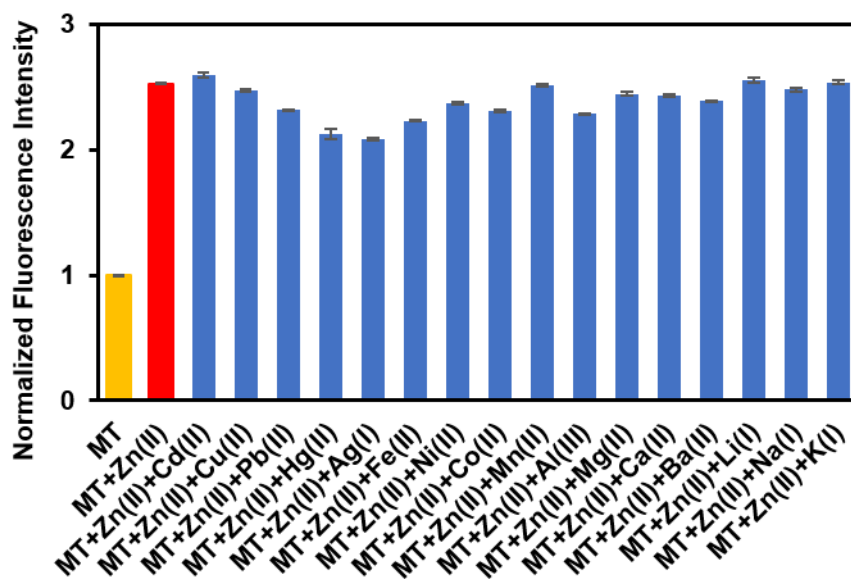


ภาพที่ 52 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ( $\lambda_{\text{ex}} = 373 \text{ nm}$  และ  $\lambda_{\text{em}} = 456 \text{ nm}$ ) ของเซ็นเซอร์ MT ( $10 \mu\text{M}$ ) และความเข้มข้นของไอออนรบกวนอื่นๆ

จากผลการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ MT โดยภาพที่ 51 แสดงการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์หลังการเติมไอออนสังกะสี และไอออนรบกวนอื่นๆ ที่ความเข้มข้น 5.0 ไมโครโมลาร์ พบว่ามีเพียงไอออนสังกะสีเท่านั้น ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์อย่างชัดเจน โดยมีการเปลี่ยนแปลงในลักษณะการเพิ่มขึ้นของสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ และมีการเปลี่ยนความยาวคลื่นของการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ไปทางใกล้แสงฟ้า (hypsochromic shift หรือ blue shift) จากความยาวคลื่น 531 นาโนเมตร ไปยัง 456 นาโนเมตร ในขณะที่ไอออนรบกวนอื่นๆ มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยหรือไม่มีการเปลี่ยนแปลงสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ จากภาพที่ 52 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 456 นาโนเมตร และความเข้มข้นของไอออนรบกวนอื่นๆ พบว่า มีเพียงไอออนสังกะสีเท่านั้นที่มีการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์อย่างชัดเจนในทุกๆ ความเข้มข้น จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ MT ต่อไอออนสังกะสี โดยไม่มีการรบกวนจากไอออนชนิดอื่นๆ

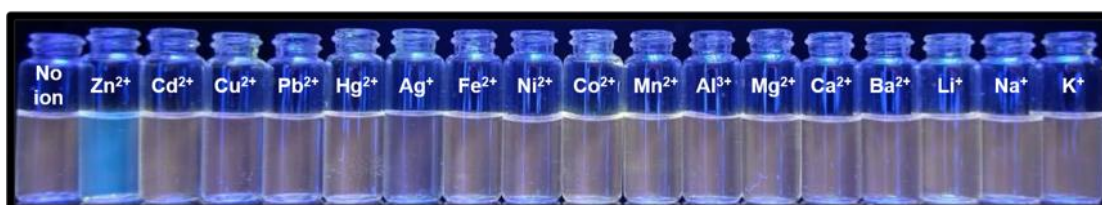
## 2.7. ผลการทดสอบสมบัติการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีไอออนสังกะสีร่วมกับไอออนรบกวนอื่นๆ ของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ MT

การศึกษาการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซ็นเซอร์ MT ในภาวะที่มีไอออนสังกะสีร่วมกับไอออนรบกวนอื่นๆ ได้แก่  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$  และ  $\text{K}^+$  จะศึกษาในระบบตัวทำละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES buffer ความเข้มข้น 5 mM pH 7.2 และ methanol ในอัตราส่วน 3:2 โดยปริมาตร โดยติดตามสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อเติมไอออนรบกวนอื่นๆ ปริมาณ 5 เท่า เปรียบเทียบกับปริมาณไอออนสังกะสี ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 53



ภาพที่ 53 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ( $\lambda_{ex} = 373$  nm และ  $\lambda_{em} = 456$  nm) ของเซ็นเซอร์ MT (10  $\mu$ M) ในภาวะที่มีไอออนสังกะสี (2.5  $\mu$ M) ร่วมกับไอออนอื่นๆ (12.5  $\mu$ M)

จากผลการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ MT ในภาวะที่มีไอออนสังกะสีร่วมกับไอออนรบกวนอื่นๆ พบว่า สัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย หรือไม่มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อเปรียบเทียบกับสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ในภาวะที่มีเพียงไอออนสังกะสีกับในระบบมีไอออนสังกะสีร่วมกับไอออนรบกวนอื่นๆ ที่ปริมาณ 5 เท่าเปรียบเทียบกับปริมาณไอออนสังกะสี แสดงให้เห็นว่า ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ MT มีประสิทธิภาพในการดักจับไอออนสังกะสีที่ดี แม้ในภาวะที่มีไอออนรบกวนอื่นๆ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในตัวอย่างจริงได้

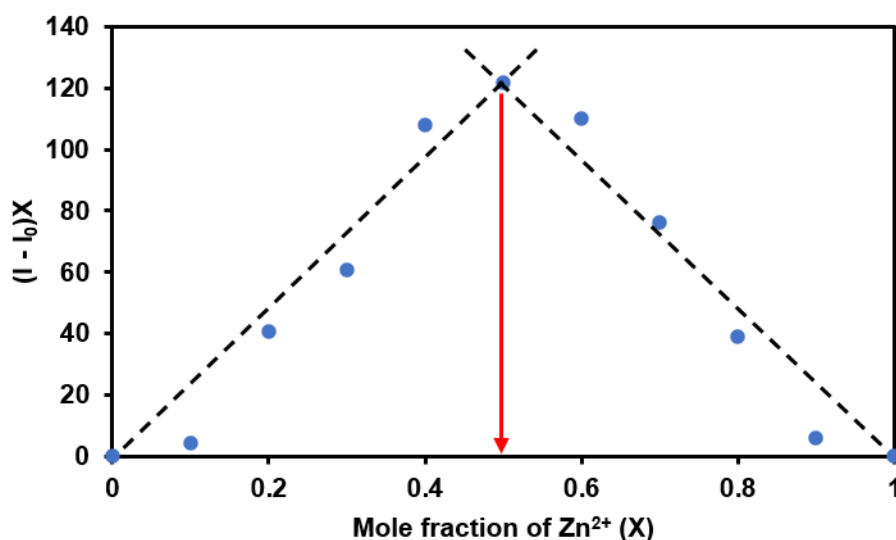


ภาพที่ 54 การเปลี่ยนแปลงแสงฟลูออเรสเซนซ์ของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ MT (10  $\mu$ M) ในภาวะที่มีไอออนโลหะชนิดต่างๆ (5.0  $\mu$ M) ภายใต้แสง UV

จากผลการศึกษาภาพถ่ายของสารละลายฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ MT ในภาวะที่มีไอออนโลหะชนิดต่างๆ ภายใต้แสง UV พบว่า ในภาวะที่ไม่มีไอออน สารละลายเซ็นเซอร์ MT จะคายแสงฟลูออเรสเซนซ์สีส้ม เมื่อเติมไอออนสังกะสีลงไป สารละลายเซ็นเซอร์ MT จะเปลี่ยนจากการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์จากสีส้มเป็นสีฟ้า ในขณะที่การเติมไอออนอื่นๆ จะไม่เปลี่ยนแปลงการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายเซ็นเซอร์ MT แสดงให้เห็นว่า ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ MT มีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อไอออนสังกะสี และสามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงด้วยสายตามภายใต้แสง UV

## 2.8. การศึกษาอัตราส่วนของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนด้วยวิธี Job's plot analysis

การศึกษาอัตราส่วนของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ MT กับไอออนสังกะสี จะศึกษาในระบบตัวทำละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES buffer ความเข้มข้น 5 mM pH 7.2 และ methanol ในอัตราส่วน 3:2 โดยปริมาตร โดยติดตามสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 456 นาโนเมตร เมื่อเติมไอออนสังกะสีที่อัตราส่วนต่างๆ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 55

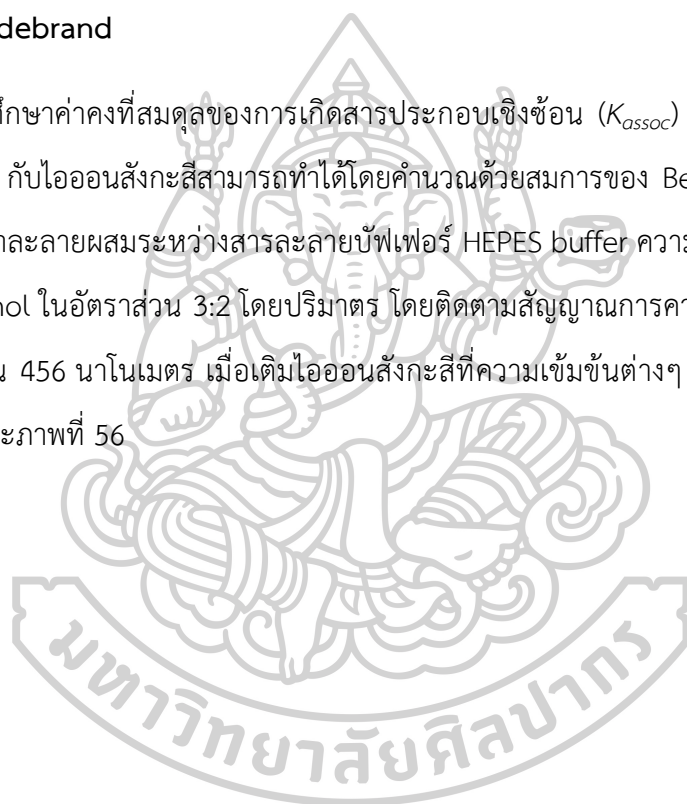


ภาพที่ 55 กราฟแสดงอัตราส่วนของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเซ็นเซอร์ MT กับไอออนสังกะสี โดยใช้วิธี Job's plot analysis

จากผลการศึกษาอัตราส่วนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ MT กับไอออนสังกะสีด้วยวิธี Job's plot analysis พบว่า ค่าการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์มีค่าสูงสุดที่ค่าสัดส่วนโมลเท่ากับ 0.5 แสดงให้เห็นว่า เซ็นเซอร์ MT จำนวน 1 โมเลกุล สามารถดักจับไอออนสังกะสีจำนวน 1 ไอออน แล้วเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนขึ้น

## 2.9. การศึกษาค่าคงที่สมดุลของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนโดยใช้สมการของ Benesi-Hildebrand

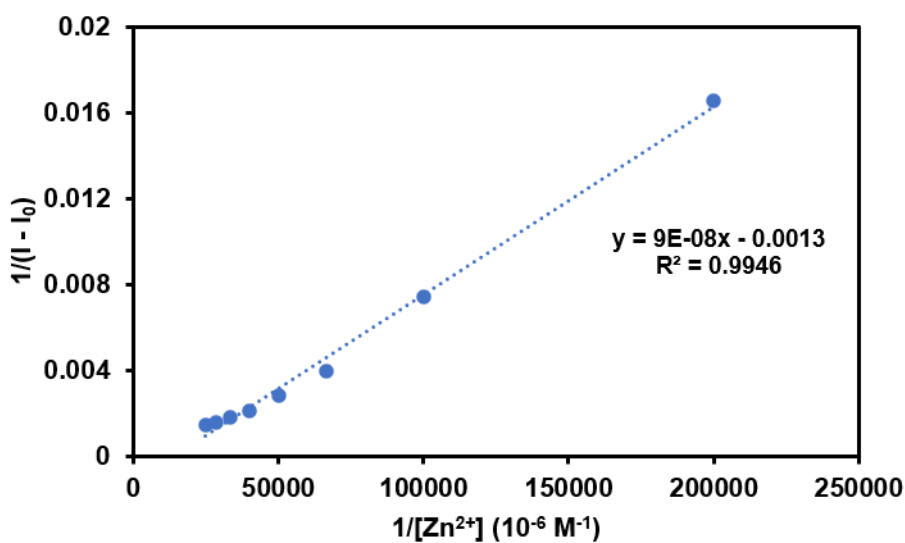
การศึกษาค่าคงที่สมดุลของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน ( $K_{assoc}$ ) ระหว่างฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ MT กับไอออนสังกะสีสามารถทำได้โดยคำนวณด้วยสมการของ Benesi-Hildebrand [28] ในระบบตัวทำละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES buffer ความเข้มข้น 5 mM pH 7.2 และ methanol ในอัตราส่วน 3:2 โดยปริมาตร โดยติดตามสัญญาณการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ที่ความยาวคลื่น 456 นาโนเมตร เมื่อเติมไอออนสังกะสีที่ความเข้มข้นต่างๆ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4 และภาพที่ 56



ตารางที่ 4 ข้อมูลค่าความเข้มข้นของไอออนสังกะสีที่เติมลงไป ( $[Zn^{2+}]$ ), ค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ (I), ค่าส่วนกลับของความเข้มข้นของไอออนสังกะสีที่เติมลงไป ( $1/[Zn^{2+}]$ ) และค่าส่วนกลับของค่าการเปลี่ยนแปลงของการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ( $1/I-I_0$ )

ความเข้มข้นของไอออนสังกะสีที่เติมลงไป ( $[Zn^{2+}]$ )	ค่าการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ (I)	ส่วนกลับของความเข้มข้นของไอออนสังกะสีที่เติมลงไป ( $1/[Zn^{2+}]$ )	ส่วนกลับของค่าการเปลี่ยนแปลงการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ ( $1/I-I_0$ )
$5.00 \times 10^{-6}$	292.50	200000.00	0.01655629
$1.00 \times 10^{-5}$	366.94	100000.00	0.00741619
$1.50 \times 10^{-5}$	485.36	66666.67	0.00394851
$2.00 \times 10^{-5}$	585.72	50000.00	0.00282789
$2.50 \times 10^{-5}$	707.60	40000.00	0.00210304
$3.00 \times 10^{-5}$	788.11	33333.33	0.00179852
$3.50 \times 10^{-5}$	870.22	28571.43	0.00156710
$4.00 \times 10^{-5}$	908.31	25000.00	0.00147883





ภาพที่ 56 การศึกษาค่าคงที่สมดุลของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนโดยใช้สมการ Benesi-Hildebrand เมื่อ  $n = 1$

#### การคำนวณ

จากสมการ Benesi-Hildebrand  $K_{assoc} = 1/[\text{slope} \times (I_{max} - I_{min})]$

จากกราฟความสัมพันธ์  $y = (9 \times 10^{-8})x - 0.0013$

พบว่า ค่าความชันของกราฟความสัมพันธ์ (m) เท่ากับ  $9 \times 10^{-8}$

จากตารางที่ 4 จะได้ว่า  $I_{max} = 908.31$  และ  $I_{min} = 292.50$

จะได้ว่า 
$$K_{assoc} = 1/[(9 \times 10^{-8}) \times (908.31 - 292.50)]$$
  

$$= 1.80 \times 10^4 M^{-1}$$

ดังนั้น ค่าคงที่สมดุลการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน ( $K_{assoc}$ ) ระหว่างฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ MT กับไอออนสังกะสี มีค่าเท่ากับ  $1.80 \times 10^4 M^{-1}$

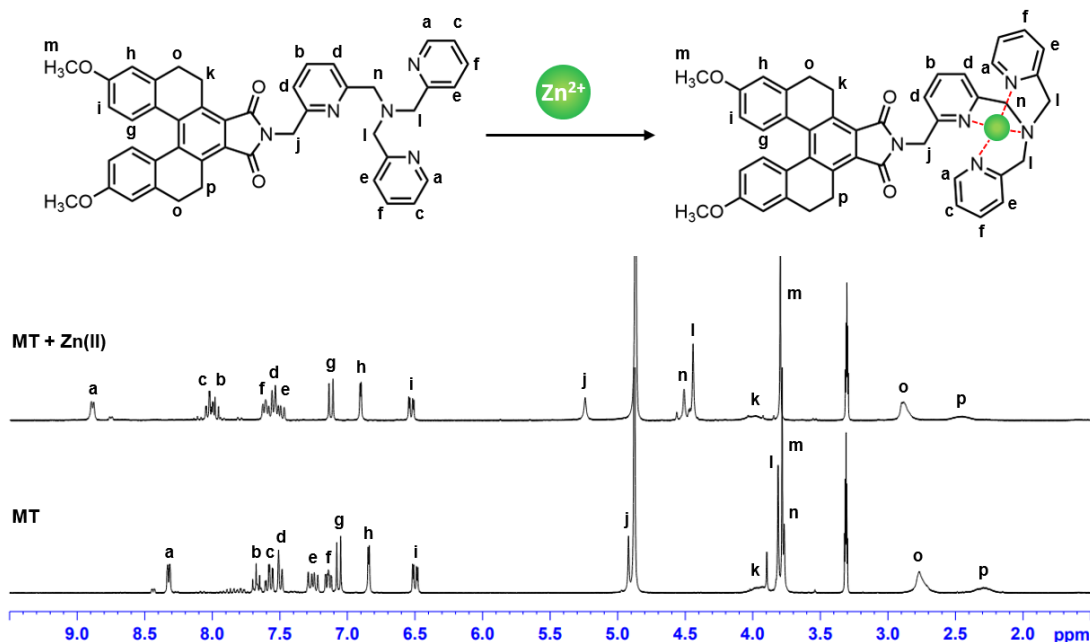
## 2.10. การศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนด้วยเทคนิค NMR Spectroscopy

การศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ MT จะศึกษาในตัวทำละลาย methanol-*d*5 โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงสัญญาณของ  $^1\text{H}$  NMR ก่อนและหลังการเติมไอออนสังกะสี ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 5 และภาพที่ 57

ตารางที่ 5 ค่า chemical shift ( $\delta$ ) ของ  $^1\text{H}$  NMR สเปกตรัมของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ MT ก่อนและหลังการเติมไอออนสังกะสี

ตำแหน่งโปรตอน	$\delta$ ของเซ็นเซอร์ MT (ppm)	$\delta$ ของเซ็นเซอร์ MT ในภาวะที่มีไอออนสังกะสี (ppm)	ผลต่างค่า $\delta$
a	8.31	8.88	0.57
b	7.67	7.97	0.30
c	7.57	8.01	0.44
d	7.49	7.54	0.05
e	7.25	7.48	0.23
f	7.13	7.60	0.47
g	7.06	7.11	0.05
h	6.84	6.90	0.06
i	6.49	6.51	0.02
j	4.91	5.23	0.32
k	3.94	3.99	0.05
l	3.80	4.44	0.64
m	3.77	3.79	0.02
n	3.76	4.50	0.74
o	2.76	2.88	0.12
p	2.28	2.45	0.17



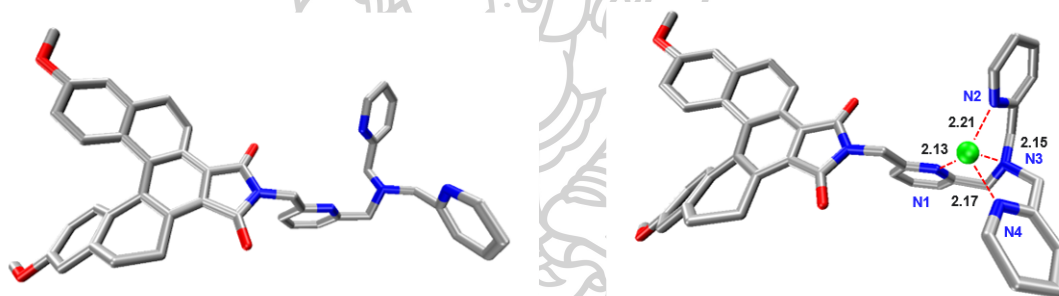


ภาพที่ 57 <sup>1</sup>H NMR สเปกตร้าของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ MT ก่อน (ล่าง) และหลัง (บน) เติมนิออนสังกะสีใน methanol-d<sub>4</sub>

จากผลการศึกษาลักษณะการดักจับไอออนสังกะสีของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ MT โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงสัญญาณของ <sup>1</sup>H NMR พบว่า สัญญาณโปรตอนของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ MT ภายหลังจากเติมนิออนสังกะสีมีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน โดยสัญญาณโปรตอนจะเลื่อนไปทาง downfield แสดงให้เห็นว่า เมื่อไนโตรเจนอะตอมของวงไพรีดีนโคออดิเนตกับไอออนสังกะสี ส่งผลให้ความหนาแน่นของอิเล็กตรอนบริเวณ ionophore ลดลง ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงของสัญญาณโปรตอนจะพบเพียงแคโปรตอนในส่วนของ ionophore ซึ่งใช้ในการดักจับไอออนสังกะสี ในขณะที่สัญญาณโปรตอนของ [5]helicene ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ดังแสดงในตารางที่ 5

## 2.11. การศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนด้วยวิธีการสร้างแบบจำลองโมเลกุลทางคอมพิวเตอร์

การศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ MT กับไอออนสังกะสี สามารถทำได้ด้วยการสร้างแบบจำลองโมเลกุลทางคอมพิวเตอร์ผ่านโปรแกรม Gaussian 09 [29] เพื่อคำนวณหาโครงสร้างที่มีความเสถียรมากที่สุด โดยใช้ฟังก์ชันไฮบริด B3LYP และ basis set 6-311G\*\* สำหรับธาตุเรพรีเซนเททีฟ (representative elements) ในกรณีนี้ ได้แก่ ไฮโดรเจน คาร์บอน ไนโตรเจน และออกซิเจน และ basis set LanL2DZ สำหรับไอออนสังกะสี ในตัวทำละลายเป็นน้ำและเมทานอลในอัตราส่วน 3:2 โดยใช้วิธี Integral Equation Formalism Polarizable Continuum Model (IEFPM) เพื่อจำลองสิ่งแวดล้อมของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ MT ในสารละลาย เมื่อคำนวณโครงสร้างที่มีความเสถียรที่สุดได้ จะนำข้อมูลเชิงตำแหน่งของอะตอมไปจำลองโครงสร้างด้วยโปรแกรม Visual Molecular Dynamics (VMD) [30] ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 58



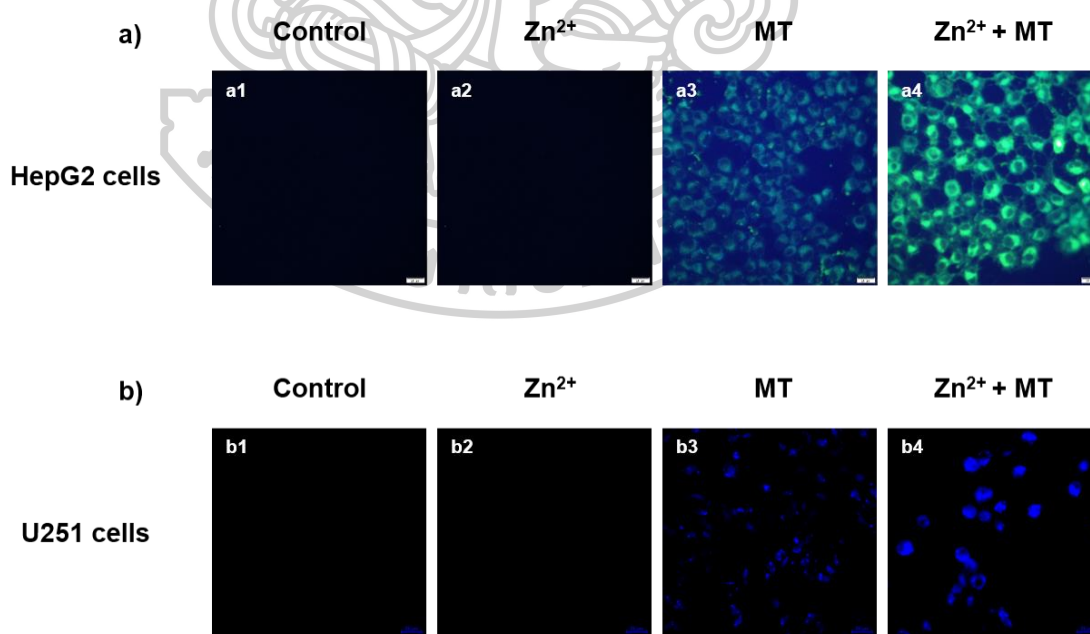
ภาพที่ 58 แบบจำลองโมเลกุลของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ MT (ซ้าย) และสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ MT กับไอออนสังกะสี (ขวา) โดยความยาวพันธะแสดงในหน่วย Å

จากผลการศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ MT กับไอออนสังกะสีด้วยการสร้างแบบจำลองทางคอมพิวเตอร์ พบว่า โครงสร้างของเซ็นเซอร์ MT ในภาวะที่ไม่มีไอออนสังกะสี หมู่พิโคลิล (picolyl) ทั้ง 2 หมู่ จะหันออกจากกัน เพื่อลดความเกะกะ และลดแรงผลักรวมของคู่อิเล็กตรอน เพื่อให้โมเลกุลมีความเสถียรที่สุด ในขณะที่โครงสร้างของเซ็นเซอร์ MT ในภาวะที่มีไอออนสังกะสี หมู่พิโคลิลทั้ง 3 หมู่ จะหันหน้าเข้าหากัน เพื่อใช้อะตอมไนโตรเจนในการโคออดิเนตกับไอออนสังกะสี แล้วเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีความเสถียร โดยระยะห่างระหว่างอะตอมไนโตรเจนกับไอออนสังกะสีมีค่าเท่ากับ 2.21, 2.15, 2.17, และ 2.13 ตามลำดับ [31] จากผล

การศึกษา พบว่า ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ MT สามารถดักจับไอออนสังกะสีในอัตราส่วน 1:1 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาด้วยวิธี Job's plot analysis และการหาค่าคงที่สมดุลการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนด้วยวิธี Benesi-Hildebrand

## 2.12. การศึกษาประสิทธิภาพการตรวจวัดไอออนสังกะสีในเซลล์สิ่งมีชีวิต

การศึกษาประสิทธิภาพการตรวจวัดไอออนสังกะสีในเซลล์สิ่งมีชีวิต เป็นการศึกษาเบื้องต้นเพื่อพิจารณาความเป็นไปได้ในการนำไปประยุกต์ใช้ในตัวอย่างทางชีวภาพ โดยฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ MT ที่สามารถดักจับไอออนสังกะสีได้อย่างจำเพาะจะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจจับไอออนสังกะสี และถ่ายภาพเซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ (Human hepatoma; HepG2) และเซลล์สมองของมนุษย์ (Human glioblastoma astrocytoma; U251) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence microscope) ซึ่งเป็นเซลล์ของอวัยวะในร่างกายมนุษย์ที่มีการสะสมของไอออนสังกะสี แล้วส่งผลให้เกิดโรคร้าย และยับยั้งต่อร่างกาย เช่น โรคพาร์กินสัน โรคอัลไซเมอร์ และโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท [31-35] ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 59



ภาพที่ 59 ภาพถ่ายเซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ (บน) และเซลล์มะเร็งสมองของมนุษย์ (ล่าง) ที่สภาวะการทดลองต่างๆ (มาตราส่วน 20 ไมครอน)

จากผลการศึกษาประสิทธิภาพการตรวจวัดไอออนสังกะสีในเซลล์สิ่งมีชีวิตของฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ MT พบว่า เซ็นเซอร์ MT มีความสามารถในการดักจับไอออนสังกะสีในเซลล์มะเร็งระดับของมนุษย์ และเซลล์มะเร็งสมองของมนุษย์ โดยเปลี่ยนแปลงการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์แบบเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับชุดเซลล์ควบคุม (ภาพ a1 และภาพ b1) ชุดเซลล์ที่บ่มด้วยไอออนสังกะสีเท่านั้น (ภาพ a2 และ ภาพ b2) และชุดเซลล์ที่บ่มด้วยฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ MT เท่านั้น (ภาพ a3 และภาพ b3) แสดงให้เห็นว่าฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ MT มีความสามารถในการดักจับไอออนสังกะสีในเซลล์สิ่งมีชีวิตได้ และสามารถแสดงการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ภายใต้ matrix ในเซลล์ที่มีความซับซ้อนได้



## บทที่ 6

## สรุปผลการทดลอง

วิทยานิพนธ์นี้ได้แสดงเส้นทางการสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ชนิดใหม่จากอนุพันธ์ของ [5]helicene เชื่อมต่อกับไอโอโนเฟอร์ชนิด 1-(6-(aminomethyl)pyridin-2-yl)-N,N-bis(pyridine-2-ylmethyl)methanamine ซึ่งสามารถสังเคราะห์ได้จากสารตั้งต้นที่มีราคาถูก ไม่เป็นพิษกับสิ่งแวดล้อม และได้สารผลิตภัณฑ์ที่มีร้อยละผลผลิตสูง จากผลการทดสอบความสามารถในการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์เมื่อจับกับไอออนสังกะสีแสดงดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 สรุปผลการทดลองของฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ MT

ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์	MT
สภาวะที่ใช้งาน	สารละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES buffer ความเข้มข้น 5 mM pH 7.2 และ methanol ในอัตราส่วน 3:2 โดยปริมาตร
ไอออนเป้าหมาย	Zn <sup>2+</sup>
$\lambda_{ex}$ (nm)	373
$\lambda_{em}$ (nm)	456
Detection limit (ppb)	1.91
$K_{assoc}$ (M <sup>-1</sup> )	$1.80 \times 10^4$

เซ็นเซอร์ MT ที่สังเคราะห์ได้สามารถตรวจจับไอออนสังกะสีในระบบตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบได้อย่างจำเพาะเจาะจงสูง โดยมีการเปลี่ยนแปลงการคายแสงฟลูออเรสเซนต์แบบเพิ่มขึ้น (turn-ON) และมีการเลื่อนของความยาวคลื่นการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ไปทางใกล้แสงฟ้า (hypsochromic shift หรือ blue shift) ทำให้สามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายได้อย่างชัดเจนด้วยสายตาภายใต้แสง UV นอกจากนี้ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์ MT สามารถตรวจวัดไอออนสังกะสีได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำถึง 1.91 ppb ซึ่งต่ำกว่าค่ามาตรฐานในน้ำดื่มที่องค์การอนามัยโลก (World Health Organization; WHO) กำหนดไว้ที่ 5 ppm ซึ่งเซ็นเซอร์ MT ยังแสดงประสิทธิภาพที่ดีในการตรวจจับไอออนสังกะสี แม้ในภาวะที่มีไอออนรบกวนอื่นๆ ได้แก่ Cd<sup>2+</sup> Cu<sup>2+</sup>

$\text{Pb}^{2+}$   $\text{Hg}^{2+}$   $\text{Ag}^+$   $\text{Fe}^{2+}$   $\text{Ni}^{2+}$   $\text{Co}^{2+}$   $\text{Mn}^{2+}$   $\text{Al}^{3+}$   $\text{Mg}^{2+}$   $\text{Ca}^{2+}$   $\text{Ba}^{2+}$   $\text{Li}^+$   $\text{Na}^+$  และ  $\text{K}^+$  นอกจากนี้ฟลูออเรสเซนซ์เซ็นเซอร์ MT ยังสามารถนำประยุกต์ใช้เป็นสารติดตามไอออนสังกะสีในเซลล์สิ่งมีชีวิต ได้แก่ เซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ และเซลล์มะเร็งสมองของมนุษย์



## รายการอ้างอิง

1. Kambe, T., et al., *The Physiological, Biochemical, and Molecular Roles of Zinc Transporters in Zinc Homeostasis and Metabolism*. *Physiological Reviews*, 2015. **95**(3): p. 749-784.
2. Chasapis, C.T., et al., *Zinc and human health: an update*. *Archives of toxicology*, 2012. **86**(4): p. 521-534.
3. Frassinetti, S., et al., *The role of zinc in life: a review*. *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology*, 2006. **25**(3).
4. Vitamin, A., et al., *EDUCATIONAL MATERIALS IN REVIEW*.
5. Brewer, G.J., et al., *Subclinical zinc deficiency in Alzheimer's disease and Parkinson's disease*. *American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias®*, 2010. **25**(7): p. 572-575.
6. Religa, D., et al., *Elevated cortical zinc in Alzheimer disease*. *Neurology*, 2006. **67**(1): p. 69-75.
7. Cotruvo, J.A., *2017 WHO guidelines for drinking water quality: first addendum to the fourth edition*. *Journal-American Water Works Association*, 2017. **109**(7): p. 44-51.
8. Ebrahim, A.M., et al., *Investigation of total zinc contents and zinc-protein profile in medicinal plants traditionally used for diabetes treatment*. *Biometals*, 2020. **33**(1): p. 65-74.
9. Altunay, N. and K.P. Katin, *Ultrasonic-assisted supramolecular solvent liquid-liquid microextraction for determination of manganese and zinc at trace levels in vegetables: Experimental and theoretical studies*. *Journal of Molecular Liquids*, 2020. **310**: p. 113192.
10. Hassan, K.M., et al., *Single and simultaneous voltammetric sensing of lead (II), cadmium (II) and zinc (II) using a bimetallic Hg-Bi supported on poly (1, 2-diaminoanthraquinone)/glassy carbon modified electrode*. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 2020. **29**: p. 100369.

11. Yan, Z., et al., *Fluorescent sensor arrays for metal ions detection: A review*. Measurement, 2022. **187**: p. 110355.
12. Ulatowski, F., et al., *Recognizing the limited applicability of Job plots in studying host–guest interactions in supramolecular chemistry*. The Journal of organic chemistry, 2016. **81**(5): p. 1746-1756.
13. Lemke, E.A. and C. Schultz, *Principles for designing fluorescent sensors and reporters*. Nature chemical biology, 2011. **7**(8): p. 480-483.
14. Hughes, M.N. and R.K. Poole, *Metal speciation and microbial growth—the hard (and soft) facts*. Microbiology, 1991. **137**(4): p. 725-734.
15. Guo, Z., et al., *A cyanine-based fluorescent sensor for detecting endogenous zinc ions in live cells and organisms*. Biomaterials, 2012. **33**(31): p. 7818-7827.
16. Zhang, C., et al., *In vitro and in vivo imaging application of a 1, 8-naphthalimide-derived Zn<sup>2+</sup> fluorescent sensor with nuclear envelope penetrability*. Chemical Communications, 2013. **49**(97): p. 11430-11432.
17. Chang, C., et al., *Benzothiazole-based fluorescent sensor for ratiometric detection of Zn (II) ions and secondary sensing PPI and its applications for biological imaging and PPase catalysis assays*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2017. **56**(31): p. 8797-8805.
18. Sakunkaewkasem, S., et al., *Dual-analyte fluorescent sensor based on [5] helicene derivative with super large Stokes shift for the selective determinations of Cu<sup>2+</sup> or Zn<sup>2+</sup> in buffer solutions and its application in a living cell*. ACS sensors, 2018. **3**(5): p. 1016-1023.
19. Xu, J., et al., *A novel quinolinyl-tetraphenylethene-based fluorescence “turn-on” sensor for Zn<sup>2+</sup> with a large Stokes shift and its applications for portable test strips and biological imaging*. Materials Chemistry Frontiers, 2020. **4**(11): p. 3338-3348.
20. Jiang, G., et al., *A Novel Donor–Acceptor Fluorescent Sensor for Zn<sup>2+</sup> with High Selectivity and its Application in Test Paper*. Journal of Fluorescence, 2020. **30**(6): p. 1567-1574.



21. Xu, H., et al., *A selective purine-based fluorescent chemosensor for the “naked-eye” detection of zinc ions (Zn<sup>2+</sup>): applications in live cell imaging and test strips*. *New Journal of Chemistry*, 2020. **44**(35): p. 15195-15201.
22. Erdemir, S. and S. Malkondu, *Dual-channel responsive fluorescent sensor for the logic-controlled detection and bioimaging of Zn<sup>2+</sup> and Hg<sup>2+</sup>*. *Journal of Molecular Liquids*, 2021. **326**: p. 115279.
23. He, X., et al., *Reversible chemosensor for bioimaging and biosensing of Zn (II) and hpH in cells, larval zebrafish, and plants with dual-channel fluorescence signals*. *Inorganic Chemistry*, 2021. **60**(8): p. 5563-5572.
24. Karthick, K.A., et al., *Novel pyridoxal based molecular sensor for selective turn-on fluorescent switching functionality towards Zn (II) in live cells*. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2022. **428**: p. 113861.
25. Yuan, C., et al., *A sensitive pyridine-containing turn-off fluorescent probe for pH detection*. *Materials Letters*, 2019. **236**: p. 9-12.
26. Xiao, S., et al., *A novel fluorescent sensor based on Imidazo [1, 2-a] pyridine for Zn<sup>2+</sup>*. *RSC advances*, 2016. **6**(32): p. 27119-27125.
27. Gabr, M.T. and F.C. Pigge, *A selective fluorescent sensor for Zn<sup>2+</sup> based on aggregation-induced emission (AIE) activity and metal chelating ability of bis (2-pyridyl) diphenylethylene*. *Dalton Transactions*, 2016. **45**(36): p. 14039-14043.
28. Kuntz Jr, I., et al., *Molecular interactions and the Benesi-Hildebrand equation*. *Journal of the American Chemical Society*, 1968. **90**(18): p. 4778-4781.
29. Frisch, M., et al., *Gaussian 09, Revision A. 02, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016 Search PubMed;*(b) J. Chaia and M. Head-Gordon. *Phys. Chem. Chem. Phys*, 2008. **10**: p. 6615-6620.
30. Humphrey, W., A. Dalke, and K. Schulten, *VMD: visual molecular dynamics*. *Journal of molecular graphics*, 1996. **14**(1): p. 33-38.
31. Singh, R., et al., *Optical-switchable energy transfer controlled by multiple-responsive turn-on fluorescence via metal–ligand and host–guest interactions in diarylethene-based [2] pseudo-rotaxane polymers*. *Materials Chemistry Frontiers*, 2021. **5**(1): p. 438-449.

32. Mohammad, M.K., et al., *Zinc and liver disease*. Nutrition in Clinical Practice, 2012. **27**(1): p. 8-20.
33. Sensi, S.L., et al., *The neurophysiology and pathology of brain zinc*. Journal of neuroscience, 2011. **31**(45): p. 16076-16085.
34. Grüngreiff, K., *Zinc in liver disease*. The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine: The Official Publication of the International Society for Trace Element Research in Humans, 2002. **15**(1): p. 67-78.
35. Takeda, A., *Zinc homeostasis and functions of zinc in the brain*. Biometals, 2001. **14**(3): p. 343-351.



## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	เปรมศักดิ์ ปทะวานิช
วัน เดือน ปี เกิด	1 สิงหาคม 2540
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2562 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเอกเคมี เกียรตินิยมอันดับ 1 จากมหาวิทยาลัยศิลปากร พ.ศ. 2563 ศึกษาต่อระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเอก เคมี บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ที่อยู่ปัจจุบัน	8/1 หมู่ที่ 6 ตำบลบางช้าง อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม 73110
ผลงานตีพิมพ์	P. Piyanuch, P. Patawanich, J. Sirirak, K. Suwatpipat, A. Kamkaew, K. Burgess, N. Wanichacheva, Rapid and visual detection of Cd <sup>2+</sup> based on aza-BODIPY near infrared dye and its application in real and biological samples for environmental contamination screening, Journal of Hazardous Materials 409 (2021) 124487.
รางวัลที่ได้รับ	พ.ศ. 2559-2562 ได้รับทุนการศึกษาระดับปริญญาตรีของโครงการพัฒนา และส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.) พ.ศ. 2563-2564 ได้รับทุนการศึกษาระดับปริญญาโทของโครงการพัฒนา และส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.) พ.ศ. 2565 ได้รับทุนการศึกษาระดับปริญญาเอก ณ ต่างประเทศ ของ โครงการพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยี (พสวท.)