

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง การศึกษาผลของลิแกนด์ในสารประกอบเชิงซ้อน
ของรูทีเนียมต่อการจับกับ DNA และต่อประสิทธิภาพ
ในการเป็นสารต้านมะเร็ง

โดย

ผศ.ดร. ขนิษฐา หาญสูงเนิน
หัวหน้าโครงการวิจัย

TRF: Grant No. BRG 4680018

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ

บทคัดย่อ ภาษาไทย และภาษาอังกฤษ พร้อมคำหลัก

บทที่ 1 การสังเคราะห์ 1

บทที่ 2 การยืนยันโครงสร้างของสารที่สังเคราะห์ 6

บทที่ 3 การทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านมะเร็ง 37

บทที่ 4 การศึกษาอันตรกิริยาของสารประกอบเชิงซ้อนกับ DNA 41

กิตติกรรมประกาศ

ในปัจจุบันทางการแพทย์พบว่าคนเสียชีวิตจากโรคมะเร็งมีเป็นจำนวนมาก มะเร็ง คือ เซลล์ที่เปลี่ยนสภาพไปเป็นเนื้อร้าย เติบโตและขยายตัวในหลอดเลือด และน้ำเหลือง กระจายไปยัง อวัยวะอื่น ๆ ในร่างกาย โดยมีสารเคมีที่เรียกว่าคาร์ซิโนเจน (Carcinogen) เป็นตัวแปรสำคัญ ที่ทำให้โครโมโซมในนิวเคลียสของเซลล์ผิดปกติไป จนกลายเป็นมะเร็งที่มีการแบ่งตัวขยายออกไปมากขึ้น มะเร็งสามารถเกิดได้เกือบทุกส่วนของร่างกาย แต่ที่พบมากในประเทศไทย ได้แก่ มะเร็งเต้านม มะเร็งปากมดลูก มะเร็งปอด (ข้อมูลจาก <http://www.room30.net/health/data2/cancer.htm>)

ทางคณะผู้วิจัยได้เล็งเห็นความสำคัญของปัญหาโรคมะเร็ง และสนใจในการหาสารหรือ อาจเป็นยาตัวใหม่ที่ใช้ในการรักษา เพราะยาที่ใช้รักษาโรคส่วนใหญ่มักเป็นยาที่ผลิตจากต่างประเทศและอาจมีราคาสูง จึงได้เสนอโครงการวิจัยเกี่ยวกับสารต้านมะเร็ง ชื่อโครงการคือ “ การศึกษาผลของลิแกนด์ในสารประกอบเชิงซ้อนของรูทีเนียมต่อการจับกับ DNA และต่อประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านมะเร็ง” กับทาง สกว. ทางคณะผู้วิจัยได้เสนอการศึกษา สารประกอบเชิงซ้อนของโลหะรูทีเนียม ซึ่งมีทั้งหมด 12 ตัว และได้ทดสอบการออกฤทธิ์ของสาร ดังกล่าวกับเซลล์มะเร็งที่ศูนย์ BIOTECH ซึ่งทางศูนย์รับทดสอบมีอยู่ 3 ชนิด คือ lung cancer breast cancer และ mouth cancer เพื่อทดสอบว่าสารเหล่านี้ที่มีโครงสร้างแตกต่างกันจะให้ผลการ ทดสอบเป็นอย่างไรบ้าง นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาการจับกับดีเอ็นเอ (calf thymus DNA) ของ สารประกอบของรูทีเนียมบางตัวในกลุ่มนี้ ได้มีการทดลองเพิ่มเกี่ยวกับ DNA พบว่าสารดังกล่าว บางตัวสามารถตัดสาย pBIND DNA ได้ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ รศ. ดร. อติสร รัตนพันธ์ ที่ให้ ความช่วยเหลือในการทดลองเกี่ยวกับ pBIND DNA มา ณ ที่นี้ด้วย ทางคณะผู้วิจัยหวังอย่างยิ่งว่า ผลจากการศึกษาและการวิจัยของงานชิ้นนี้ จะเป็นประโยชน์ต่อวงการการศึกษา การวิจัยของประเทศ ไทย และอาจนำไปศึกษาเพิ่มเติม ขยายผลเพื่อการรักษาหรือยับยั้งการเติบโตของมะเร็งในผู้ป่วย หรือนำไปใช้ประโยชน์แก่ประเทศชาติในทางอื่นได้ในอนาคต

ดิฉันในฐานะหัวหน้าโครงการวิจัยขอขอบพระคุณ สกว. ที่ให้การสนับสนุนในทุกด้าน เกี่ยวกับงานวิจัยนี้ และขอขอบพระคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ตลอดจนมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ มา ณ ที่นี้ด้วย ที่มีส่วนช่วยเหลือและสนับสนุนให้งานสำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ไปได้ ด้วยดี

ผศ. ดร.ชนิษฐา หาญสูงเนิน

หัวหน้าโครงการวิจัย

Title: Study Effect of Ligands in Ruthenium(II) complexes to DNA-binding and Cytotoxicity

Abstract:

Ruthenium(II) complexes of the types, $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{L}]^{2+}$ $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{L}]^{2+}$ and $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{L}]^{2+}$ L = 2-(phenylazo)pyridine (azpy), 2-(phenylazo)pyrimidine (azpym), 2,2'-bipyridine (bpy), 1,10-phenanthroline (phen) were synthesized and characterized by elemental analyses, NMR spectroscopic methods. The DNA-binding properties of the complexes were investigated by absorption spectroscopy, competitive binding, viscosity and cyclic voltammetry. The ruthenium(II) complexes were found to be able of cleavage of plasmid pBIND DNA. The biological properties have also been studied with 3 cell lines, Anti-NCI-H187 (Human small cell lung cancer), BC (Breast cancer), and KB (Oral human epidermal carcinoma). The results show that $[\text{Ru}(\text{azpy})_2(\text{L})]^{2+}$ ions have greater activities than the $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{L}]^{2+}$ complexes. Meanwhile, the $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{L}]^{2+}$ complexes are inactive in those cell lines.

KEYWORDS: Ruthenium(II) complexes, 2-(phenylazo)pyridine, DNA-Binding, cytotoxicity

ชื่อเรื่อง การศึกษาผลของลิแกนด์ในสารประกอบเชิงซ้อนของรูทีเนียมต่อการจับกับ DNA และต่อประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านมะเร็ง

บทคัดย่อ

มีการสังเคราะห์และศึกษาสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะรูทีเนียม $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{L}]^{2+}$ $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{L}]^{2+}$ และ $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{L}]^{2+}$ เมื่อ L คือ 2-(phenylazo)pyridine (azpy) 2-(phenylazo)pyrimidine (azpym) 2,2'-bipyridine (bpy) และ 1,10-phenanthroline (phen) โดยเทคนิคการวิเคราะห์หาปริมาณธาตุที่เป็นองค์ประกอบ และ นิวเคลียร์ แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโทรสโกปี ศึกษาคุณสมบัติการจับของสารประกอบเชิงซ้อนกับดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิค absorption spectroscopy competitive binding viscosity และ cyclic voltammetry ผลจากการศึกษากับ plasmid pBIND DNA พบว่าสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะรูทีเนียมสามารถตัดสาย ดีเอ็นเอได้ ในงานวิจัยชิ้นนี้มีการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะรูทีเนียมต่อเซลล์มะเร็ง 3 ชนิดคือ Anti-NCI-H187 (Human small cell lung cancer) BC (Breast cancer) และ KB (Oral human epidermal carcinoma) ผลจากการทดลองแสดงว่า สารในกลุ่ม $[\text{Ru}(\text{azpy})_2(\text{L})]^{2+}$ มีความเป็นฤทธิ์ในการเป็นสารต้านมะเร็งมากกว่า สารในกลุ่ม $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{L}]^{2+}$ ในขณะที่สารในกลุ่ม $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{L}]^{2+}$ ไม่มีฤทธิ์ในการเป็นสารต้านมะเร็งเลย

คำหลัก: Ruthenium(II) complexes, 2-(phenylazo)pyridine, DNA-Binding, cytotoxicity

บทที่ 1 การสังเคราะห์

งานสังเคราะห์เป็นงานที่สำคัญส่วนหนึ่งในงานวิจัยเรื่อง การศึกษาผลของลิแกนด์ในสารประกอบเชิงซ้อนของรูทีเนียมต่อการจับกับ DNA และต่อประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านมะเร็ง การเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนของรูทีเนียมที่ต้องการเพื่อไปใช้ทดสอบทางชีวภาพนั้น จะต้องมีการเตรียมลิแกนด์บางชนิดที่ต้องสังเคราะห์เอง เพราะเป็นสารที่เฉพาะและไม่สามารถซื้อได้จากบริษัทสารเคมี จากนั้นจึงนำลิแกนด์ที่สังเคราะห์ได้มาทำปฏิกิริยากับรูทีเนียมเพื่อให้ได้สารประกอบเชิงซ้อนที่ต้องการ

การสังเคราะห์แบ่งเป็น 3 ตอน คือ

1. การสังเคราะห์ลิแกนด์ 2 ตัวคือ 2-(phenylazo)pyridine (azpy) และ 2-(phenylazo)pyrimidine (azpym)
2. การสังเคราะห์สารตั้งต้น 3 ตัวคือ
 1. $cis-[Ru(bpy)_2Cl_2]$
 2. $cis-[Ru(phen)_2Cl_2]$
 3. $ctc-[Ru(azpy)_2Cl_2]$
3. สังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อน 12 ตัว คือ
 1. $[Ru(bpy)_3]Cl_2 \cdot 6H_2O$
 2. $[Ru(bpy)_2phen]Cl_2 \cdot 7H_2O$
 3. $[Ru(bpy)_2azpy]Cl_2 \cdot 5H_2O$
 4. $[Ru(bpy)_2azpym]Cl_2 \cdot 5H_2O$
 5. $[Ru(phen)_3]Cl_2 \cdot 7H_2O$
 6. $[Ru(phen)_2bpy]Cl_2 \cdot 5H_2O$
 7. $[Ru(phen)_2azpy]Cl_2 \cdot 6H_2O$
 8. $[Ru(phen)_2azpym]Cl_2 \cdot 5H_2O$
 9. $[Ru(azpy)_3](NO_3)_2 \cdot 4H_2O$
 10. $[Ru(azpy)_2bpy]Cl_2 \cdot 5H_2O$
 11. $[Ru(azpy)_2phen]Cl_2 \cdot 5H_2O$
 12. $[Ru(azpy)_2azpym](NO_3)_2 \cdot 6H_2O$

1. การสังเคราะห์ลิแกนด์

1.1 สังเคราะห์ลิแกนด์ 2-(phenylazo)pyridine (azpy)

วิธีการทดลอง

ทำการทดลองตามวิธีการของ Krause (1): ละลาย 2-aminopyridine 0.400 g ด้วย benzene เมื่อสารละลายหมด เติม 20 M NaOH 13 mL จากนั้นเติม nitrosobenzene 0.450 g จนหมด คนตลอดเวลา ให้ความร้อนสารละลายด้วย water bath จนสารละลายข้นบนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล นำสารมาสกัดด้วยเบนซีน โดยสกัดด้วยเบนซีน 3 ครั้ง ๆ ละ 5 mL ระเหยเบนซีนออกด้วยเครื่อง rotary evaporator แล้วแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Column Chromatography เก็บสารสีส้มคือ 2-phenyl azo)pyridine (azpy) ได้ yield = 50.2%

1.2 สังเคราะห์ลิแกนด์ 2-(phenylazo)pyrimine (azpym)

วิธีการทดลอง

ทำการทดลองคล้ายการเตรียม azpy โดยเปลี่ยนจาก 2-aminopyridine เป็น 2-aminopyrimidine เมื่อเติม NaOH และ nitrosobenzene จนหมด reflux สารละลาย 5 ชั่วโมง สกัดสารด้วยเบนซีน 3 ครั้ง ๆ ละ 5 mL ระเหยเบนซีนออกด้วยเครื่อง rotary evaporator แล้วแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Column Chromatography เก็บสารสีส้ม 2-(phenylazo)pyrimidine (azpym) ได้ yield = 40.3%

2. การสังเคราะห์สารตั้งต้น

2.1 การสังเคราะห์ *cis*-[Ru(bpy)₂Cl₂]

วิธีการทดลอง

เตรียมตามเอกสารอ้างอิง (2): ใส่ RuCl₃·3H₂O 0.200 g 2,2'-bipyridine 0.400 g และ LiCl 0.600 g ในขวดก้นกลม เติม Dimethyl formamide (DMF) 15 mL reflux 3 ชั่วโมง พร้อมคนสารตลอดเวลา สารละลายเป็นสีดำนํ้าตาลหลังจากนั้นตั้งสารให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วเทสารใส่ในปิกเกอร์ เติม Acetone 200 mL ตั้งสารไว้ข้ามคืนในที่มืด ของแข็งจะตกตะกอนออกมา ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น นำตะกอนที่ได้อบให้แห้ง ได้ของแข็งสีดำ yield = 53%

2.2 การสังเคราะห์ *cis*-[Ru(phen)₂Cl₂]

วิธีการทดลอง

เตรียมคล้ายกับ *cis*-[Ru(bpy)₂Cl₂] โดยใช้ 1,10-phenanthroline แทน 2,2'-bipyridine ได้ของแข็งสีดำ yield = 43%

2.3 การสังเคราะห์ ctc -[Ru(azpy)₂Cl₂]

วิธีการทดลอง

เติม RuCl₃·3H₂O 0.060 g azpy 0.110 g ใน ตัวทำละลาย DMF 25 mL Reflux 5 ชั่วโมง พร้อมทั้งคนตลอดเวลาสารละลายจะเปลี่ยนจากสีดำ เป็นสีน้ำเงินเข้ม ระเหยตัวทำละลายจนแห้ง นำสารที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิค Column Chromatography โดยใช้ silica gel และมี เฟสเคลื่อนที่เป็นตัวทำละลายผสม อัตราส่วนที่ใช้เป็น CH₂Cl₂ : EtOAc (9 : 1) ได้สารสีน้ำเงินเข้ม และสารสีม่วงแดงมีลักษณะเป็นของแข็ง สีม่วงแดง yield = 15% สีน้ำเงินเข้ม yield = 60% สารที่ต้องการนำมาใช้คือ สีน้ำเงินเข้ม (ctc -[Ru(azpy)₂Cl₂])

3. การสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อน 12 ตัว ดังนี้

3.1 การสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อน [Ru(bpy)₂L]²⁺

เมื่อ L คือ 2-(phenylazo)pyridine (azpy), 2-(phenylazo)pyrimidine (azpym) ,

1,10-phenanthroline (phen), 2,2'-bipyridine (bpy)

การสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อน [Ru(bpy)₂azpy]Cl₂·5H₂O

เติมสารประกอบเชิงซ้อน cis -[Ru(bpy)₂Cl₂] 0.050 g AgNO₃ 0.040 g และ azpy 0.030 g ในขวดก้นกลม ที่มีตัวทำละลาย MeOH 50 mL reflux เป็นเวลา 5 ชั่วโมง สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอมส้มและมีตะกอนสีขาวเกิดขึ้น กรองสารแบบลดความดัน จะได้สารละลายสีแดงอมส้ม เติม NH₄PF₆ กรองตะกอน อบ ของแข็งที่ได้มีสีน้ำตาลแดงคือ [Ru(bpy)₂azpy](PF₆)₂ yield = 75% จากนั้น นำสารประกอบเชิงซ้อน [Ru(bpy)₂azpy](PF₆)₂ มาละลายด้วย acetone และเติม tetra-*n*-butylammonium chloride จะได้ตะกอนของสารประกอบเชิงซ้อน [Ru(bpy)₂azpy]Cl₂ yield = 90 %

การสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อน [Ru(bpy)₂azpym]Cl₂·5H₂O

สังเคราะห์ตามวิธีการของ [Ru(bpy)₂azpy]Cl₂·5H₂O แต่เปลี่ยนจากลิแกนด์ azpy เป็นลิแกนด์ azpym จะได้สารประกอบเชิงซ้อน [Ru(bpy)₂azpym]Cl₂·5H₂O yield = 75%

การสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อน [Ru(bpy)₂phen]Cl₂·7H₂O

สังเคราะห์ตามวิธีการของ [Ru(bpy)₂azpy]Cl₂·5H₂O แต่เปลี่ยนจากลิแกนด์ azpy เป็นลิแกนด์ phen จะได้สารประกอบเชิงซ้อน [Ru(bpy)₂phen]Cl₂·7H₂O yield = 75%

การสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อน $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

สังเคราะห์ตามวิธีการของ $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{azpy}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ แต่เปลี่ยนจากลิแกนด์ azpy เป็นลิแกนด์ bpy จะได้สารประกอบเชิงซ้อน $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ yield = 85%

3.2 การสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อน $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{L}]^{2+}$

เมื่อ L คือ 2-(phenylazo)pyridine (azpy), 2-(phenylazo)pyrimidine (azpym), 1,10-phenanthroline (phen), 2,2'-bipyridine (bpy)

การสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อน $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{azpy}]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

เติมสารประกอบเชิงซ้อน $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]$ 0.050 g AgNO_3 0.040 g azpy 0.021 g ในขวดก้นกลม ที่มีตัวทำละลาย MeOH 50 mL reflux เป็นเวลา 8 ชั่วโมง สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอมส้มและมีตะกอนสีขาวเกิดขึ้น กรองสารแบบลดความดัน จะได้สารละลายสีแดงอมส้ม เติม NH_4PF_6 จะได้ของแข็งสีน้ำตาลแดงของ $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{azpy}](\text{PF}_6)_2$

จากนั้นนำสารประกอบเชิงซ้อน $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{azpy}](\text{PF}_6)_2$ มาละลายด้วย acetone และเติม tetra-*n*-butylammonium chloride จะได้ตะกอนของสารประกอบเชิงซ้อน $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{azpy}]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ yield = 82%

การสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อน $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{azpym}]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

สังเคราะห์ตามวิธีการของ $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{azpy}]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ แต่เปลี่ยนจากลิแกนด์ azpy เป็นลิแกนด์ azpym จะได้สารประกอบเชิงซ้อน $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{azpym}]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ yield = 85%

การสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อน $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{bpy}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

สังเคราะห์ตามวิธีการของ $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{azpy}]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ แต่เปลี่ยนจากลิแกนด์ azpy เป็นลิแกนด์ bpy จะได้สารประกอบเชิงซ้อน $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{bpy}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ yield = 80%

การสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อน $[\text{Ru}(\text{phen})_3]\text{Cl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

สังเคราะห์ตามวิธีการของ $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{azpy}]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ แต่เปลี่ยนจากลิแกนด์ azpy เป็นลิแกนด์ phen จะได้สารประกอบเชิงซ้อน $[\text{Ru}(\text{phen})_3]\text{Cl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ yield = 90%

3.3 การสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อน $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{L}]^{2+}$

เมื่อ L คือ 2-(phenylazo)pyridine (azpy), 2-(phenylazo)pyrimidine (azpym), 1,10-phenanthroline (phen), 2,2'-bipyridine (bpy)

การสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อน $[\text{Ru}(\text{azpy})_3](\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

เติม *ctc*- $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{Cl}_2]$ 0.035 g AgNO_3 0.024 g และ *azpy* 0.018 g ในขวดก้นกลม ที่มี MeOH 30 mL reflux เป็นเวลา 8 ชั่วโมง คนสารตลอดเวลา มีตะกอนสีขาวเกิดขึ้น กรองตะกอนสีขาวของ AgCl ออก สารละลายที่ได้มีสีน้ำตาล ระบายตัวทำละลายออกจนแห้ง เติม EtOH ตามด้วย *hexane* อัตราส่วน (1:2) วางสารทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 คืนสารที่ได้เป็นของแข็งสีดำ ล้างตะกอนด้วย *Hexane* ได้ yield = 74%

การสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อน $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{azpym}](\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

ใช้วิธีการเหมือนกับการสังเคราะห์ $[\text{Ru}(\text{azpy})_3](\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ โดยเปลี่ยนจากลิแกนด์ *azpy* เป็น *azpym* ได้ yield = 72%

การสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อน $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{bpy}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

เติม *ctc*- $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{Cl}_2]$ 0.075 g AgNO_3 0.054 g และ *bpy* 0.026 g ลงในขวดก้นกลม reflux เป็นเวลา 15 ชั่วโมง คนสารตลอดเวลา มีตะกอนสีขาวเกิดขึ้น กรองตะกอนสีขาวของ AgCl ออก สารละลายที่ได้มีสีน้ำตาลเติม NH_4PF_6 reflux เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ระบายตัวทำละลายออกจนแห้ง เติม EtOH วางสารทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 คืนสารที่ได้เป็นของแข็งสีดำ ล้างตะกอนด้วย *Hexane* นำสารที่ได้มาละลายด้วยอะซิโตน เติม *tetra-n-butylammonium chloride* ได้ตะกอนของ $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{bpy}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ได้ yield = 73%

การสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อน $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{phen}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

ใช้วิธีการเหมือนกับการสังเคราะห์ $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{bpy}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ โดยเปลี่ยนจากลิแกนด์ *bpy* เป็น *phen* ได้ yield = 71%

References

1. R. A. Krause, and K. Krause, *Inorg. Chem.*, **1980**, 19, 2600.
2. B.P. Sullivan, D.J. Salmon, T.J. Meyer, *Inorg. Chem.*, **1978**, 17, 3334.

บทที่ 2 การยืนยันโครงสร้างของสารที่สังเคราะห์

การยืนยันโครงสร้างของสารที่สังเคราะห์ใช้เทคนิคการวิเคราะห์หาปริมาณธาตุที่เป็นองค์ประกอบ (Elemental analysis) เทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy) และเทคนิคการเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์บนผลึกเดี่ยวของสารประกอบเชิงซ้อน $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{bpy}]^{2+}$

2.1 เทคนิค การวิเคราะห์หาปริมาณธาตุที่เป็นองค์ประกอบ (Elemental analysis)

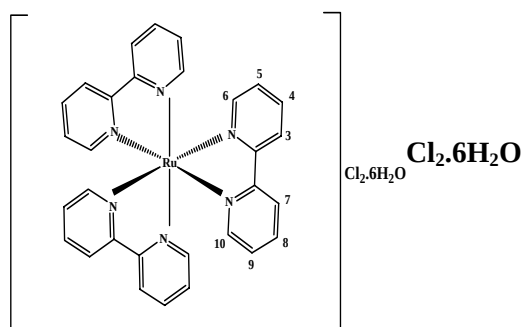
ตารางที่ 2.1 ข้อมูลการหาปริมาณธาตุคาร์บอน ไนโตรเจน และไฮโดรเจน ในสารประกอบเชิงซ้อน 12 ตัว

สาร	%C		%N		%H	
	Calc.	Found	Calc.	Found	Calc.	Found
$[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $\text{RuC}_{30}\text{H}_{36}\text{N}_6\text{Cl}_2\text{O}_6$	48.13	47.84	11.23	10.55	4.85	4.51
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{phen}]\text{Cl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{RuC}_{32}\text{H}_{38}\text{N}_6\text{Cl}_2\text{O}_7$	48.60	48.40	10.63	9.91	4.84	4.43
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{azpy}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $\text{RuC}_{31}\text{H}_{35}\text{N}_7\text{Cl}_2\text{O}_5$	49.80	49.27	13.11	12.29	3.37	4.14
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{azpym}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $\text{RuC}_{30}\text{H}_{34}\text{N}_8\text{Cl}_2\text{O}_5$	47.50	47.63	14.77	14.57	4.52	4.05
$[\text{Ru}(\text{phen})_3]\text{Cl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{RuC}_{36}\text{H}_{38}\text{N}_6\text{Cl}_2\text{O}_7$	51.54	51.10	10.01	9.54	4.56	4.02
$[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{bpy}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $\text{RuC}_{34}\text{H}_{34}\text{N}_6\text{Cl}_2\text{O}_5$	52.45	52.90	10.79	10.29	4.40	4.13
$[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{azpy}]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $\text{RuC}_{35}\text{H}_{37}\text{N}_7\text{Cl}_2\text{O}_6$	51.04	50.32	11.90	11.23	4.52	4.11
$[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{azpym}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $\text{RuC}_{34}\text{H}_{34}\text{N}_8\text{Cl}_2\text{O}_5$	50.63	49.65	13.89	13.54	4.22	3.42
$[\text{Ru}(\text{azpy})_3](\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $\text{RuC}_{33}\text{H}_{35}\text{N}_{11}\text{O}_4$	46.77	45.53	18.56	18.56	3.19	3.10
$[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{bpy}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $\text{RuC}_{32}\text{H}_{36}\text{N}_8\text{Cl}_2\text{O}_5$	48.97	48.00	14.28	13.41	4.62	4.33
$[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{phen}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $\text{RuC}_{34}\text{H}_{36}\text{N}_8\text{Cl}_2\text{O}_5$	50.49	50.88	13.80	13.47	4.48	3.97
$[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{azpym}](\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $\text{RuC}_{32}\text{H}_{38}\text{N}_{12}\text{O}_6$	43.05	43.49	19.96	19.02	3.58	4.33

2.2 เทคนิค ^1H Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy

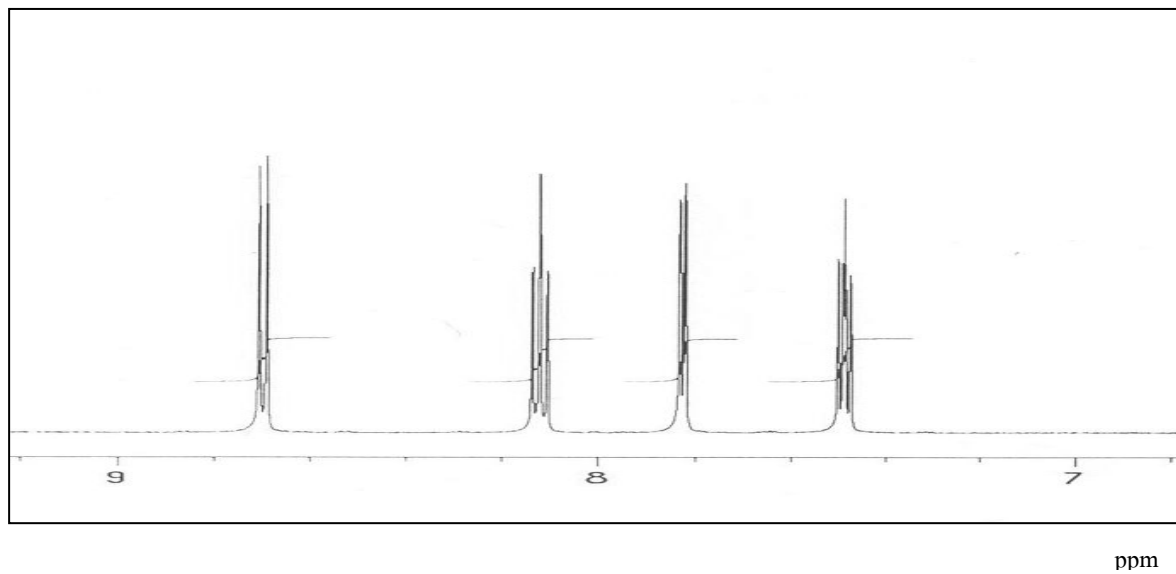
ศึกษาโครงสร้างสารประกอบเชิงซ้อนโดยใช้เครื่องมือ Varian UNITY SNOVA 500 MHz FT NMR spectrometer และ Internal standard คือ Tetramethyl silane
เทคนิค ต่าง ๆ ที่ใช้ คือ ^1H , ^{13}C NMR, ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HMQC แต่ในที่นี้จะเสนอเฉพาะ
เทคนิค ^1H NMR ในตัวทำละลาย CD_3OD

2.2.1 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$



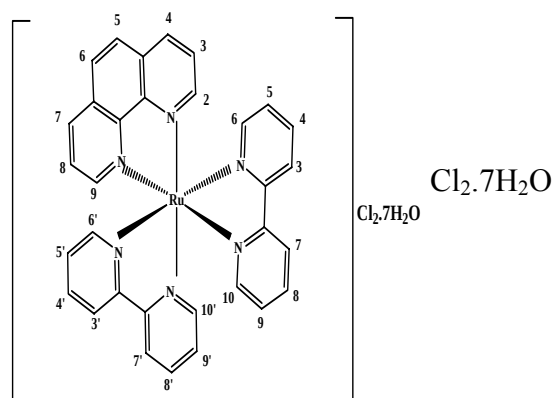
ตารางที่ 2.2.1 แสดงข้อมูล ^1H NMR ของ $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ในตัวทำละลาย CD_3OD

H-position	^1H NMR			^{13}C NMR
	δ (ppm)	J (Hz)	Number of H	δ (ppm)
3, 7	8.70 (d)	8.5	2	125.60
4, 8	8.12 (d)	8.5, 4.5	2	139.20
5, 9	7.82 (d)	7.5, 5.0	2	152.64
6, 10	7.5 (d)	8.0	2	128.91
Quarternary carbon				
158.51				



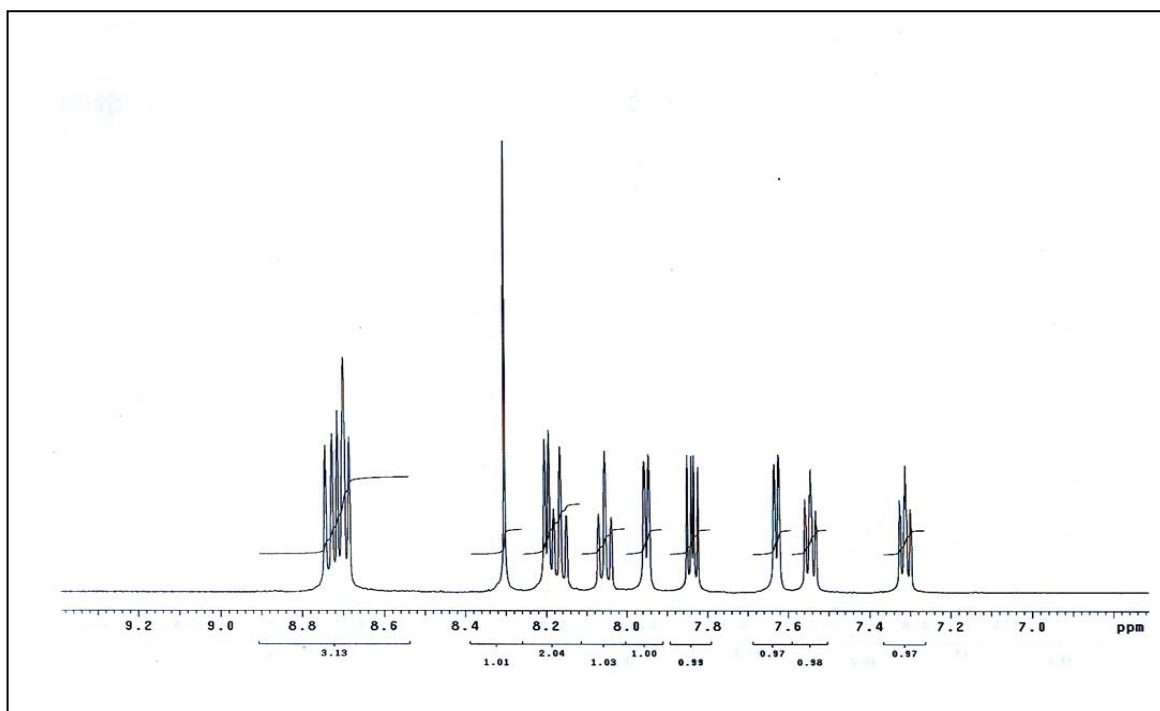
รูปที่ 2.2.1 ^1H NMR spectrum ของ $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ในตัวทำละลาย CD_3OD

2.2.2 [Ru(bpy)₂phen]Cl₂·7H₂O

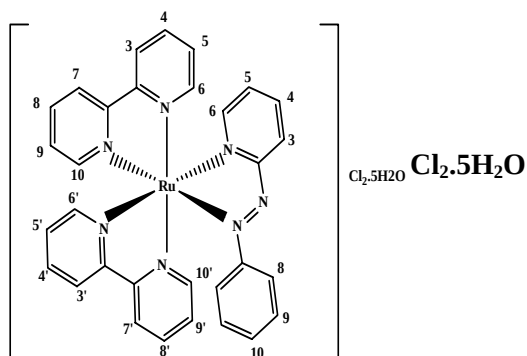


ตารางที่ 2.2.2 แสดงข้อมูล ¹H NMR ของ [Ru(bpy)₂phen]Cl₂·7H₂O ในตัวทำละลาย CD₃OD

H-position	¹ H NMR			¹³ C NMR
	δ (ppm)	J (Hz)	Number of H	δ (ppm)
7 bpy, 7' bpy	8.73 (d)	8.5	2	125.60
4, 7 phen	8.70 (d)	8.5	2	125.54
3 bpy, 3' bpy	8.69 (d)	8.5	2	138.25
5, 6phen	8.30 (s)	-	2	129.42
2, 9 phen	8.20 (d)	5.0	2	153.54
8 bpy, 8' bpy	8.16 (dd)	8.0, 8.0	2	139.23
4 bpy, 4' bpy	8.05 (dd)	8.0, 8.0	2	139.11
10 bpy, 10' bpy	7.95 (d)	5.0	2	152.72
3, 8 phen	7.83 (m)	-	2	127.42
6 bpy, 6' bpy	7.63 (d)	5.5	2	152.95
9 bpy, 9' bpy	7.54 (dd)	8.0, 5.0	2	128.87
5 bpy, 5' bpy	7.31 (dd)	8.0, 5.0	2	128.77
Quarternary carbon				
158.79, 158.56, 148.82, 132.49				



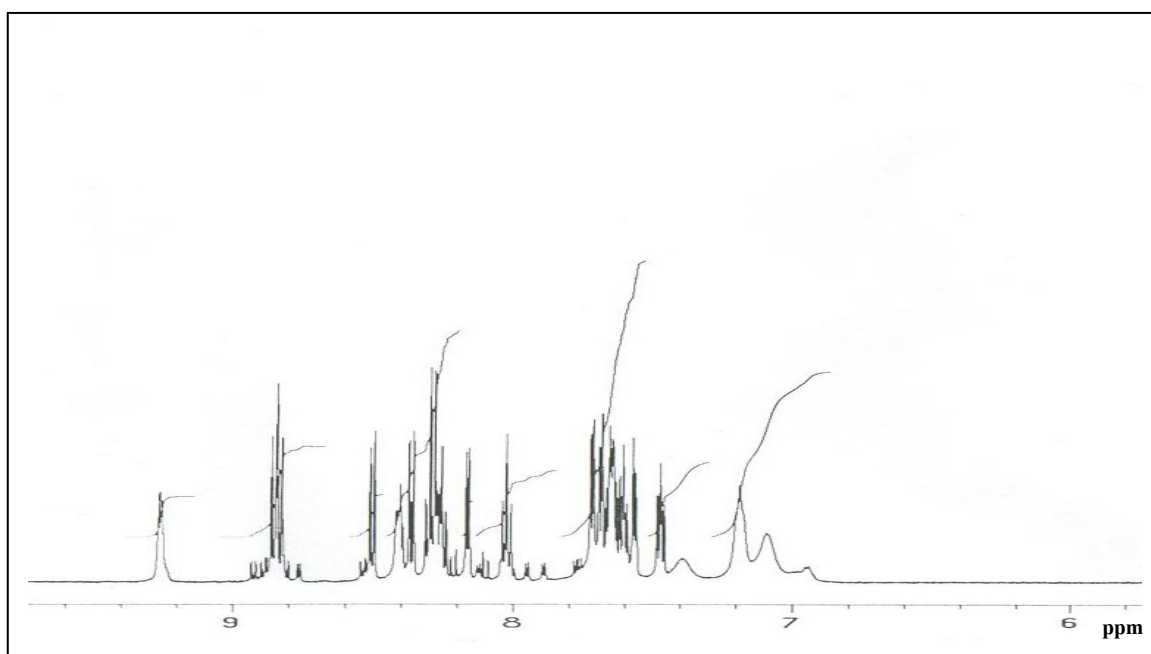
รูปที่ 2.2.2 ^1H NMR spectrum ของ $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{phen}]\text{Cl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ในตัวทำละลาย CD_3OD

2.2.3. $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{azpy}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 

ตารางที่ 2.2.3 แสดงข้อมูล ^1H NMR ของ $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{azpy}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ในตัวทำละลาย CD_3OD

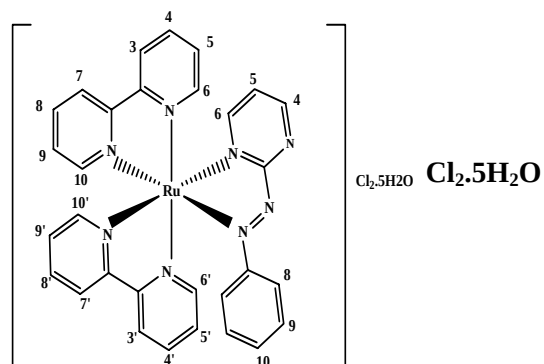
H-position	^1H NMR			^{13}C NMR
	δ (ppm)	J (Hz)	number of H	δ (ppm)
3 azpy	9.26 (s)	-	1	161.9
7 bpy	8.85 (d)	8.0	1	160.29
3 bpy	8.84 (d)	8.0	1	155.77
3' bpy	8.50 (d)	8.5	1	154.96
4 azpy	8.41 (d)	8.0	1	154.20
7' bpy	8.36 (d)	8.0	1	153.65
6' bpy, 4 bpy, 4' bpy	8.29 (m)	-	3	153.58, 152.86, 152.48
6 azpy	8.16 (d)	5.5	1	151.65
8 bpy	8.02 (dd)	8.0, 8.0	1	141.75
5 bpy, 5 azpy, 5' bpy, 9' bpy, 10' bpy, 10 bpy 8' bpy	7.65 (m)	-	7	141.35, 140.77, 140.63, 140.42, 139.37, 141.51
9 bpy	7.50 (dd)	8.0, 5.5	1	132.98
10 azpy, 6 bpy	7.20 (m)	-	2	132.87, 132.50
9 azpy	7.09 (m)	-	2	132.30
8 azpy	6.94 (m)	-	2	132.16

H-position	¹ H NMR			¹³ C NMR
	δ (ppm)	<i>J</i> (Hz)	number of H	δ (ppm)
Quarternary carbon				
173.99, 160.69, 147.60, 157.91, 157.22, 147.55, 157.19, 156.79, 146.43, 155.88, 148.18, 122.59				



รูปที่ 2.2.3 ¹H NMR spectrum ของ [Ru(bpy)₂azpy]Cl₂·5H₂O ในตัวทำละลาย CD₃OD

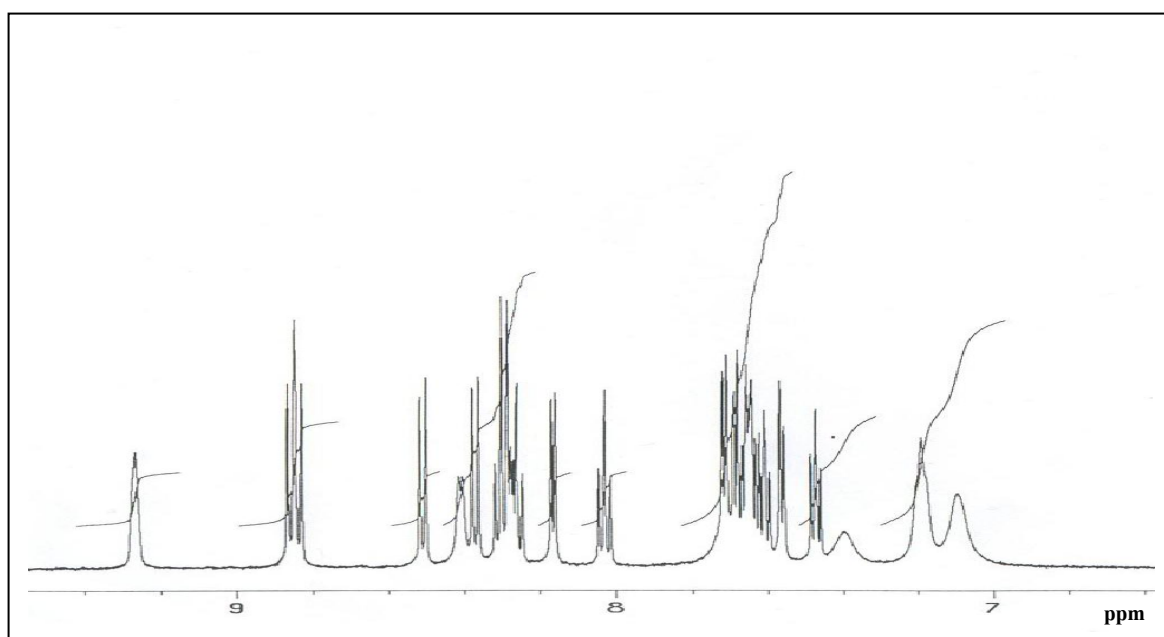
2.2.4. $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{azpym}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$



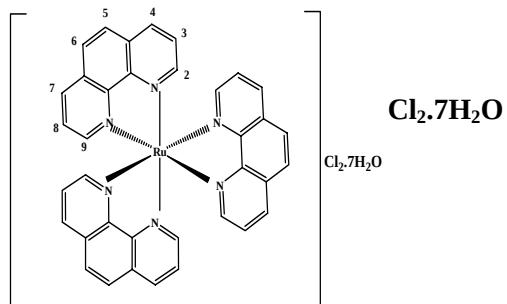
ตารางที่ 2.2.4 แสดงข้อมูล ^1H NMR ของ $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{azpym}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ในตัวทำละลาย CD_3OD

H-position	^1H NMR			^{13}C NMR
	δ (ppm)	J (Hz)	Number of H	δ (ppm)
6 azpym	9.26 (s)	-	1	161.93
7 bpy	8.86 (d)	9.0	1	126.60
7' bpy	8.84 (d)	9.0	1	126.29
3 bpy	8.51 (d)	8.0	1	125.66
5 azpym	8.41 (dd)	4.5, 4.5	1	160.28
3' bpy	8.37 (d)	8.5	1	141.77
8 bpy, 8' bpy, 4 bpy	8.29 (m)	-	3	154.20, 141.53, 141.37
6 bpy	8.16 (d)	5.5	1	140.65
4' bpy	8.03 (dd)	8.0, 8.0	1	123.14
4 azpym	7.71 (d)	4.5	1	151.65
6' bpy	7.68 (d)	5.5	1	123.14
9 bpy, 9' bpy, 5 bpy, 10 bpy, 10' bpy	7.65 (m)	-	5	129.97, 129.63, 129.33, 152.45, 153.65
5' bpy	7.47 (dd)	8.0, 1.0	1	130.04

H-position	^1H NMR			^{13}C NMR
	δ (ppm)	J (Hz)	Number of H	δ (ppm)
10 azpym	7.40 (m)	-	1	132.88
9 azpym	7.19 (m)	-	2	130.31
Quarternary carbon				
173.99, 157.91, 157.22, 157.19, 156.79, 155.88				

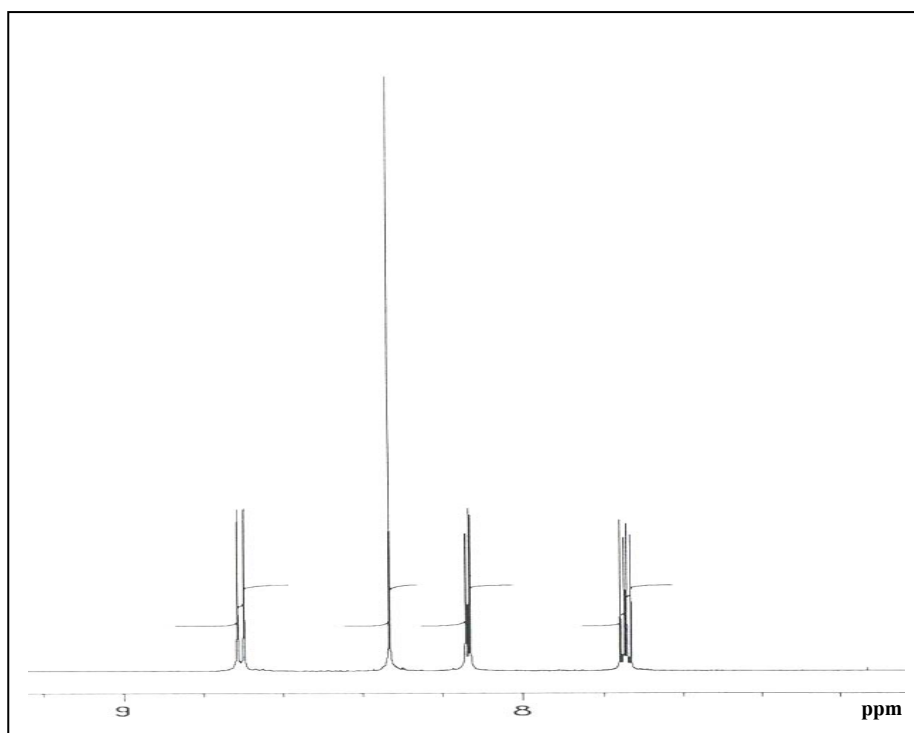


รูปที่ 2.2.4 ^1H NMR spectrum ของ $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{azpym}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ในตัวทำละลาย CD_3OD

2.2.5 $[\text{Ru}(\text{phen})_3]\text{Cl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 

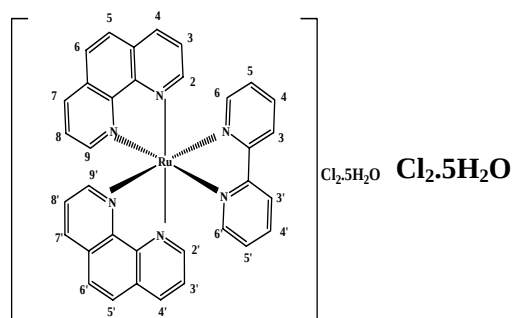
ตารางที่ 2.2.5 แสดงข้อมูล ^1H NMR ของ $[\text{Ru}(\text{phen})_3]\text{Cl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ในตัวทำละลาย CD_3OD

H-position	^1H NMR			^{13}C NMR
	δ (ppm)	J (Hz)	Number of H	δ (ppm)
2, 9	8.71 (dd)	8.0, 1.5	2	138.29
3, 8	8.33 (s)	-	2	129.44
4, 7	8.14 (dd)	5.0, 1.0	2	153.88
5, 6	7.74 (m)		2	127.35
Quarternary carbon				
149.22 , 132.50				



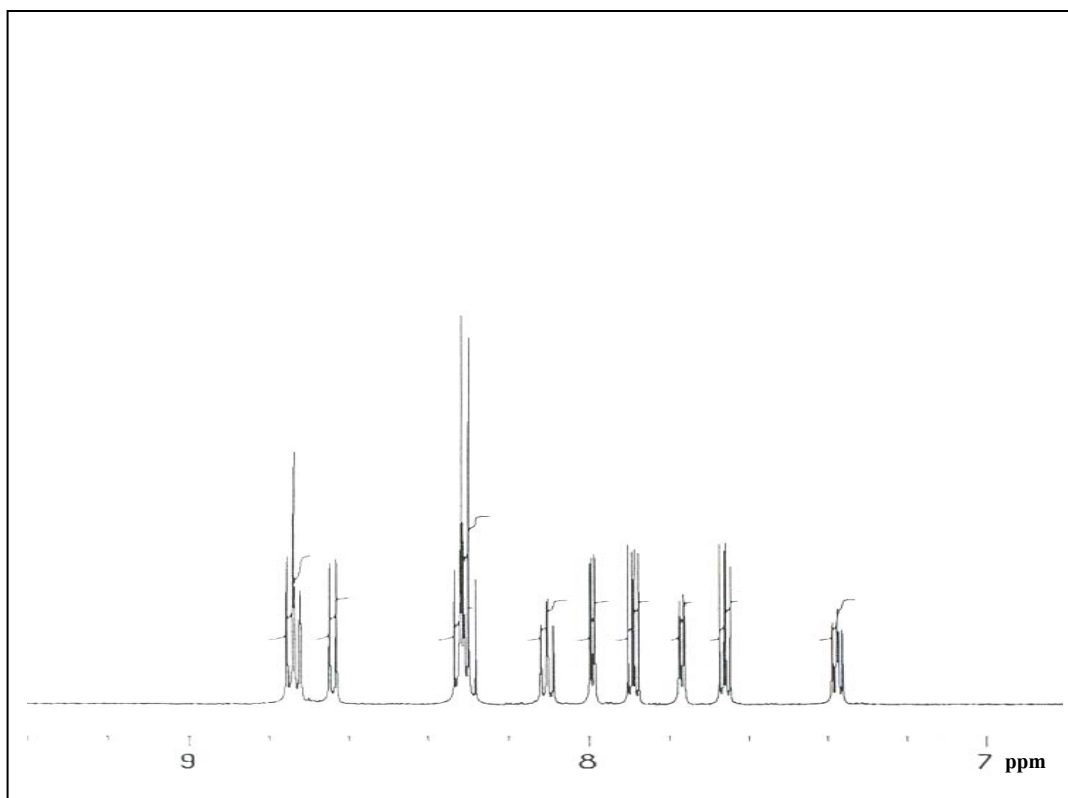
รูปที่ 2.2.5 ^1H NMR spectrum ของ $[\text{Ru}(\text{phen})_3]\text{Cl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ในตัวทำละลาย CD_3OD

2.2.6 [Ru(phen)₂bpy]Cl₂·5H₂O



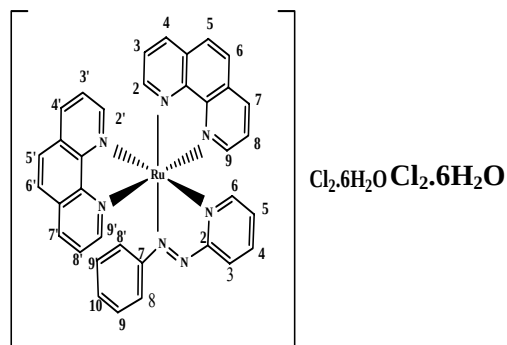
ตารางที่ 2.2.6 แสดงข้อมูล ¹H NMR ของ [Ru(phen)₂bpy]Cl₂·5H₂O ในตัวทำละลาย CD₃OD

H-position	¹ H NMR			¹³ C NMR
	δ (ppm)	<i>J</i> (Hz)	Number of H	δ (ppm)
3 bpy	8.75 (dd)	8.0, 1.0	1	138.30
4 phen	8.73 (dd)	8.0, 1.0	1	125.55
7 phen	8.64 (dd)	8.0, 1.0	1	138.18
2 phen	8.32 (dd)	5.5, 1.0	1	153.85
5 phen	8.33 (s)	9.0	1	129.41
6 phen	8.29 (s)	9.0	1	129.41
4 bpy	8.10 (dd)	8.0, 1.0	1	139.18
9 phen	7.99 (dd)	5.0, 1.5	1	153.55
3 phen	7.89 (dd)	8.5, 5.5	1	127.41
6 bpy	7.76 (d)	5.0	1	153.23
8 phen	7.66 (dd)	9.0, 5.5	1	127.31
5 bpy	7.38 (dd)	7.5, 5.5	1	128.76
Quarternary carbon				
158.86, 149.14, 148.89, 132.51, 132.46				



รูปที่ 2.2.6 ^1H NMR spectrum ของ $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{bpy}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ในตัวทำละลาย CD_3OD

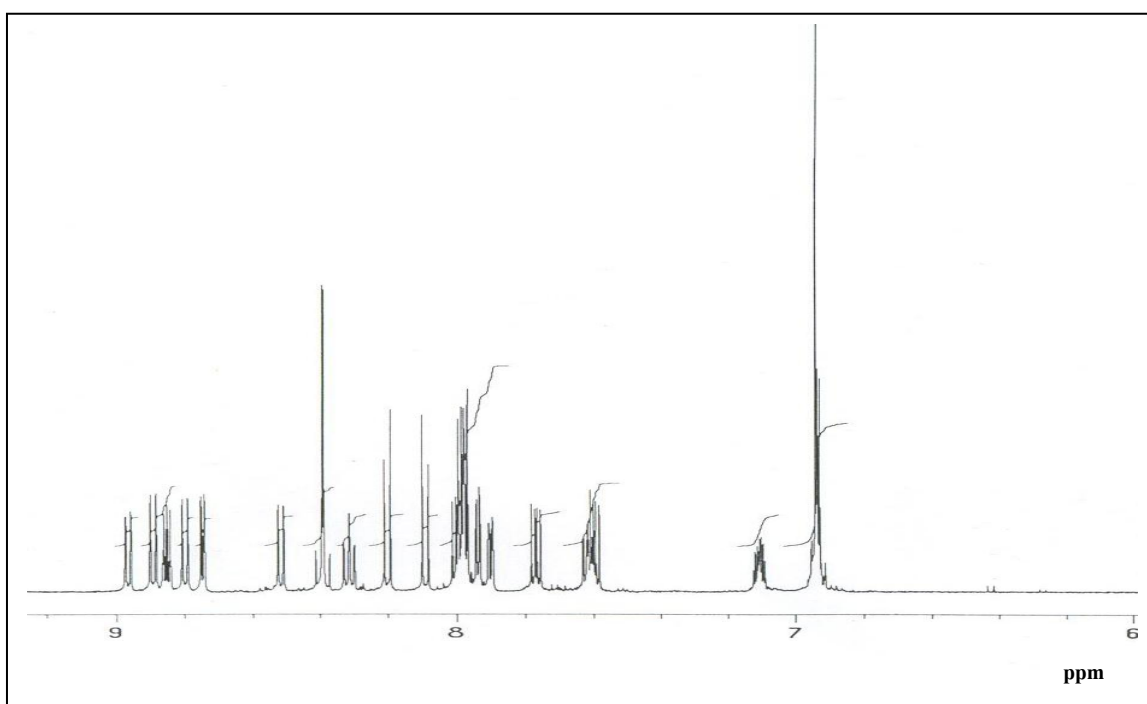
2.2.7 [Ru(phen)₂azpy]Cl₂·6H₂O



ตารางที่ 2.2.7 แสดงข้อมูล ¹H NMR ของ [Ru(phen)₂azpy]Cl₂·6H₂O ในตัวทำละลาย CD₃OD

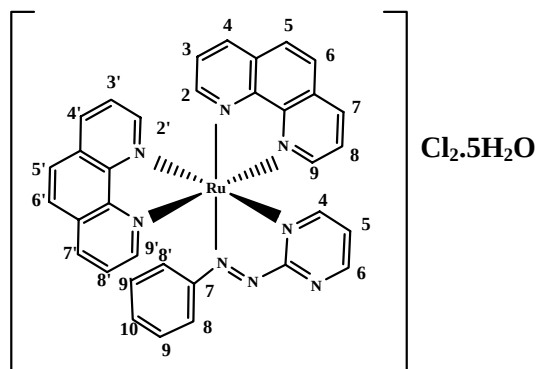
H-position	¹ H NMR			¹³ C NMR
	δ (ppm)	<i>J</i> (Hz)	number of H	δ (ppm)
3azpy	8.96 (d)	8.0	1	155.53
2phen	8.90 (dd)	4.0, 1.0	1	154.45
4'phen	8.85 (d)	7.5	1	153.57
4 phen	8.80 (d)	8.0	1	152.86
9' phen	8.75 (dd)	5.0, 1.5	1	151.13
7 phen	8.52 (d)	7.5	1	141.32
5,6 phen	8.39 (d)	8.0	2	140.31, 140.03
4azpy	8.31 (ddd)	8.0, 5.0, 1.5	1	139.99
6' phen	8.20 (d)	9.0	1	131.00
5' phen	8.09 (d)	9.0	1	131.87
3' phen	8.01 (dd)	8.0, 5.5	1	129.74
8' phen	7.98 (dd)	7.5, 4.5	1	129.70
2 phen	7.98 (d)	5.0	1	129.68
9 phen	7.94 (d)	5.5	1	129.56
6 azpy	7.90 (d)	5.0	1	129.55

H-position	^1H NMR			^{13}C NMR
	δ (ppm)	J (Hz)	number of H	δ (ppm)
3 phen	7.77 (dd)	7.5, 4.5	1	129.34
5 azpy	7.60 (ddd)	8.0, 5.0, 1.0	1	129.00
8 phen	7.60 (dd)	7.5, 4.5	1	128.04
10 azpy	7.11 (t)	8.0, 8.0, 8.0	1	127.99
8, 8' azpy	6.95 (d)	8.0, 7.5	2	127.69
9, 9' azpy	6.94 (dd)	8.0, 8.0	2	127.45
Quarternary carbon				
168.02, 155.93, 148.41, 147.83, 132.87, 132.77, 132.24, 132.11				



รูปที่ 2.2.7 ^1H NMR spectrum ของ $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{azpy}]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ในตัวทำละลาย CD_3OD

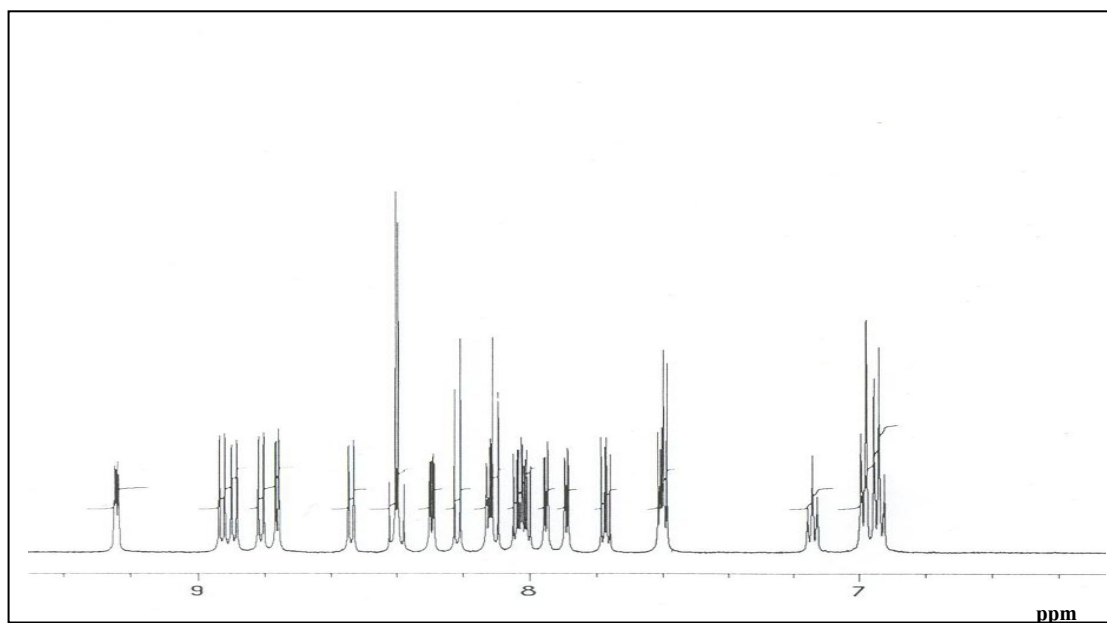
2.2.8 [Ru(phen)₂azpym]Cl₂·5H₂O



ตารางที่ 2.2.8 แสดงข้อมูล ¹H NMR ของ [Ru(phen)₂azpym]Cl₂·5H₂O ในตัวทำละลาย CD₃OD

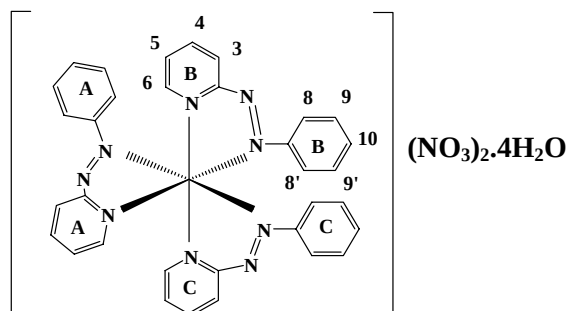
H-position	¹ H NMR			¹³ C NMR
	δ (ppm)	J (Hz)	number of H	δ (ppm)
4 azpym	9.24 (dd)	4.5, 1.0	1	161.82
4 phen	8.93 (dd)	8.5, 1.0	1	140.78
4' phen	8.90 (dd)	8.5, 1.0	1	140.42
7 phen	8.81 (dd)	8.0, 1.5	1	140.43
2 phen	8.76 (dd)	5.5, 1.0	1	155.77
7' phen	8.54 (dd)	8.0, 1.0	1	139.39
5 phen	8.41 (d)	9.0	1	129.77
6 phen	8.39 (d)	9.0	1	129.58
6 azpym	8.29 (dd)	6.0, 2.0	1	160.68
5' phen	8.22 (d)	9.0	1	129.09
2' phen	8.12 (d)	5.5	1	154.96
6' phen	8.10 (d)	9.0	1	129.39
3 phen	8.03 (m)	-	1	128.28
3' phen	8.01 (m)	-	1	128.13
9 phen	7.95 (dd)	5.5, 1.5	1	153.55
9' phen	7.89 (d)	5.5, 1.5	1	152.89

H-position	¹ H NMR			¹³ C NMR
	δ (ppm)	<i>J</i> (Hz)	number of H	δ (ppm)
8 phen	7.77 (dd)	8.0, 5.5	1	127.77
8' phen	7.61 (dd)	8.0, 5.5	1	127.53
5 azpym	7.59 (d)	5.50	1	129.32
10 azpym	7.14 (t)	8.0	1	132.52
8, 8' azpym	6.99 (dd)	8.5, 1.5	2	122.59
9, 9' azpym	6.94 (dd)	7.5, 7.5	2	129.85
Quarternary carbon				
174.275, 156.712, 148.193, 147.614, 147.537, 146.442, 132.991, 132.884, 132.316, 132.179				



รูปที่ 2.2.8 ¹H NMR spectrum ของ [Ru(phen)₂azpym]Cl₂.5H₂O ในตัวทำละลาย CD₃OD

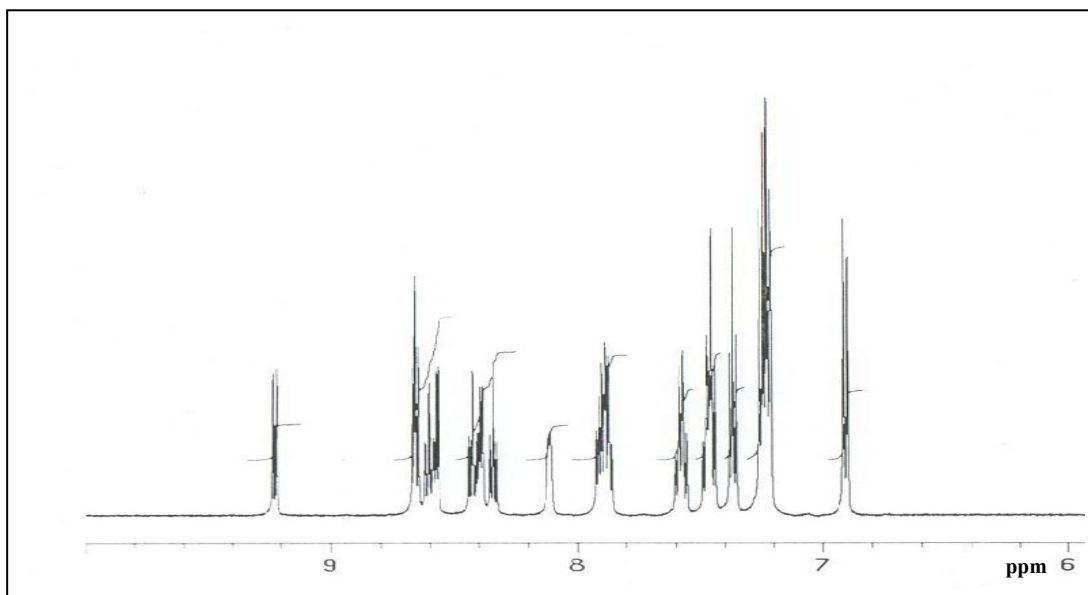
2.2.9 $[\text{Ru}(\text{azpy})_3](\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$



ตารางที่ 2.2.9 แสดงข้อมูล ^1H NMR ของ $[\text{Ru}(\text{azpy})_3](\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ในตัวทำละลาย CD_3OD

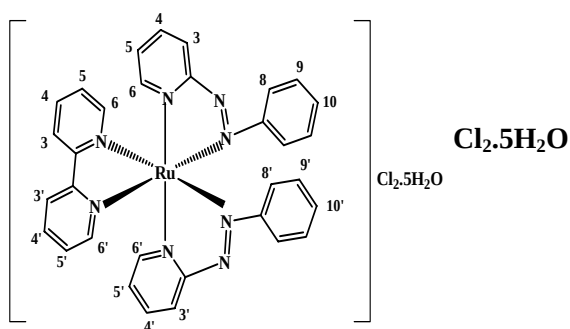
H-Position	^1H NMR			^{13}C NMR
	δ (ppm)	J (Hz)	number of H	δ (ppm)
3A	9.23 (d)	8.0	1	133.10
4A	8.66 (t)	7.0, 7.0, 7.0	1	132.46
3B	8.61 (d)	7.5	1	143.79
3C	8.59 (d)	8.5	1	153.88
6A	8.57 (d)	6.0	1	152.29
4B	8.43 (t)	8.0, 7.5, 8.0	1	143.67
6B	8.39 (d)	5.5	1	134.92
4C	8.34 (t)	9.5, 8.0, 7.5	1	143.40
6C	8.11 (m)	-	1	153.16
5A	7.92 (dd)	8.0, 6.5	1	132.40
5B	7.90 (dd)	7.5, 6.5	1	132.36
5C	7.87 (dd)	7.5, 6.5	1	134.86
10A	7.46 (t)	8.0	1	131.98
10B	7.46 (t)	8.0	1	131.94
10C	7.46 (t)	8.0	1	131.34
8,8' A	6.91 (d)	8.5	2	123.85

H-Position	^1H NMR			^{13}C NMR
	δ (ppm)	J (Hz)	number of H	δ (ppm)
8,8' B	7.58 (d)	8.0	2	135.10
8,8' C	7.36 (d)	8.0	2	131.03
9,9' A	7.24 (dd)	8.0, 7.5	2	130.83
9,9' B	7.24 (dd)	8.0, 8.0, 7.5	2	123.78
9,9' C	7.24 (dd)	8.0, 8.0, 7.5	2	123.73
Quarternary carbon				
165.883,165.421,164.841,157.303,153.687,153.660				



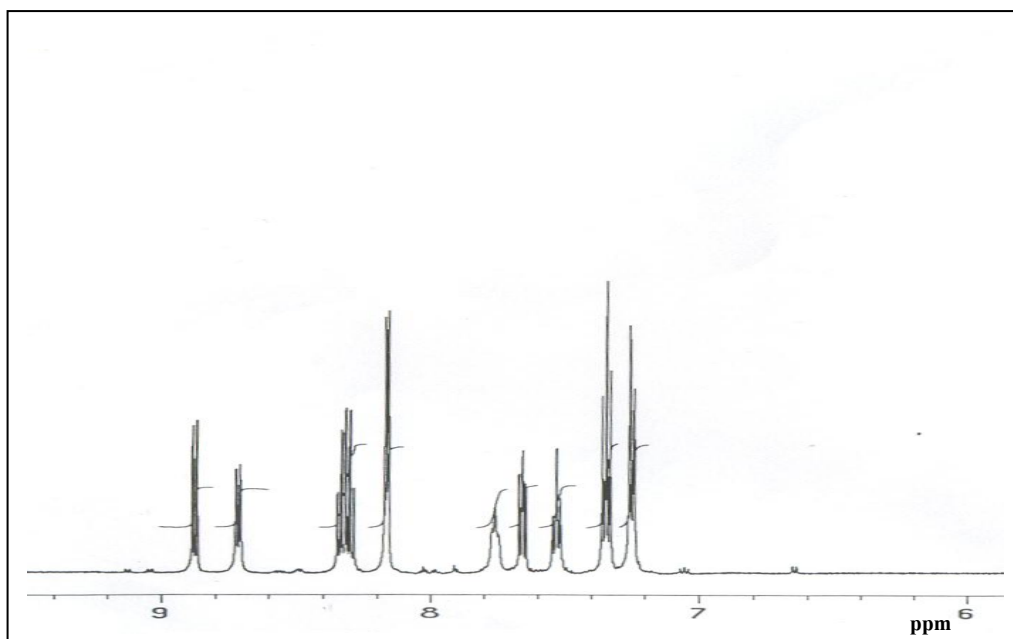
รูปที่ 2.2.9 ^1H NMR spectrum ของ $[\text{Ru}(\text{azpy})_3](\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ในตัวทำละลาย CD_3OD

2.2.10 [Ru(azpy)₂bpy]Cl₂·5H₂O

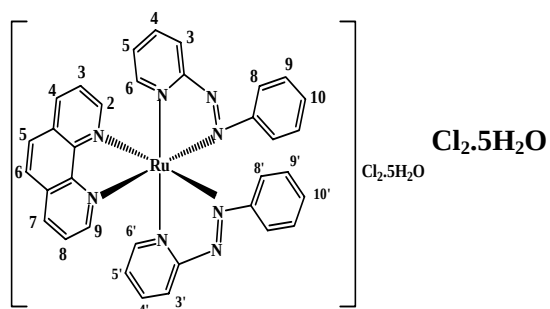


ตารางที่ 2.2.10 แสดงข้อมูล ¹H NMR ของ [Ru(azpy)₂bpy]Cl₂·5H₂O ในตัวทำละลาย CD₃OD

H - Position	¹ H NMR			¹³ C NMR
	δ (ppm)	J (Hz)	number of H	δ (ppm)
6, 6' bpy	8.87 (d)	8.0	2	126.72
3, 3' azpy	8.71 (d)	8.0	2	130.68
5, 5' bpy	8.33 (d)	1.0	2	142.14
4, 4'azpy	8.30 (d)	7.5	2	144.86
3, 3'bpy	8.16 (d)	5.5	2	151.35
6, 6' azpy	8.16 (d)	8.0	2	154.62
5, 5'azpy	7.75 (d)	6.0	2	130.68
4, 4' bpy	7.65 (d)	6.5	2	130.11
10, 10'azpy	7.53 (d)	7.0	2	134.20
9, 9' azpy	7.34 (d)	7.5	4	131.20
8, 8' azpy	7.24 (d)	8.0	4	123.81
Quarternary carbon				
166.40, 156.43, 153.84				

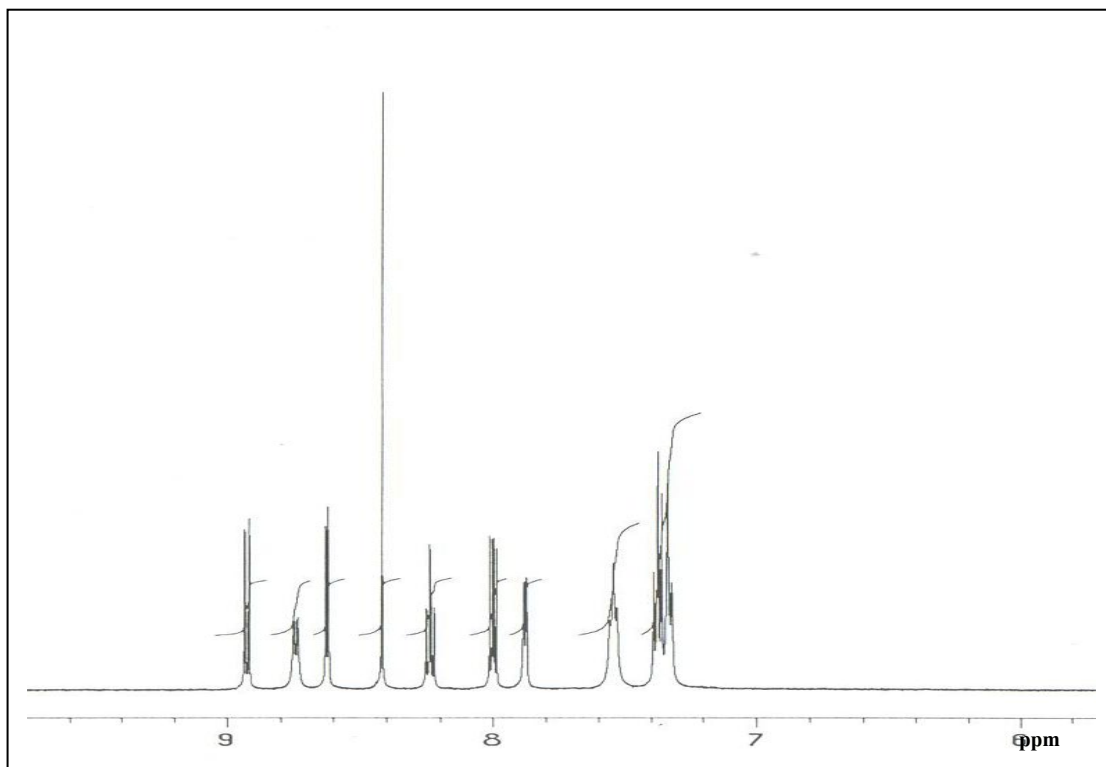


รูปที่ 2.2.10 ^1H NMR spectrum ของ $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{bpy}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ในตัวทำละลาย CD_3OD

2.2.11 [Ru(azpy)₂phen]Cl₂·5H₂O

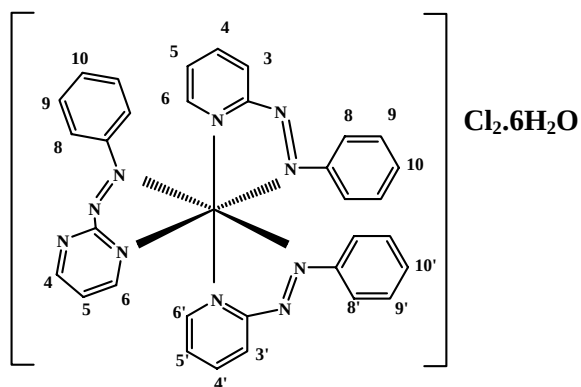
ตารางที่ 2.2.11 แสดงข้อมูล ¹H NMR ของ [Ru(azpy)₂phen]Cl₂·5H₂O ในตัวทำละลาย CD₃OD

H - Position	¹ H NMR			¹³ C NMR
	δ (ppm)	J (Hz)	number of H	δ (ppm)
2,9 phen	8.92 (dd)	5.0, 1.0	2	104.94
3, 3' azpy	8.74 (d)	8.0	2	131.27
4,7 phen	8.62 (dd)	5.0, 1.0	2	155.00
5,6 phen	8.42 (s)	-	2	129.78
4, 4' azpy	8.24 (ddd)	7.5, 8.0, 1.5	2	142.05
3,8 phen	8.00 (dd)	8.0, 6.5	2	128.37
6, 6' azpy	7.72 (d)	5.0	2	151.44
5, 5',10, 10' azpy	7.54 (m)	-	4	134.3, 131.03
8, 8', 9, 9' azpy	7.35 (m)	-	8	130.74, 132.86
Quarternary carbon				
166.4, 154.8, 146.69, 133.1				



รูปที่ 2.2.11 ^1H NMR spectrum ของ $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{phen}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ในตัวทำละลาย CD_3OD

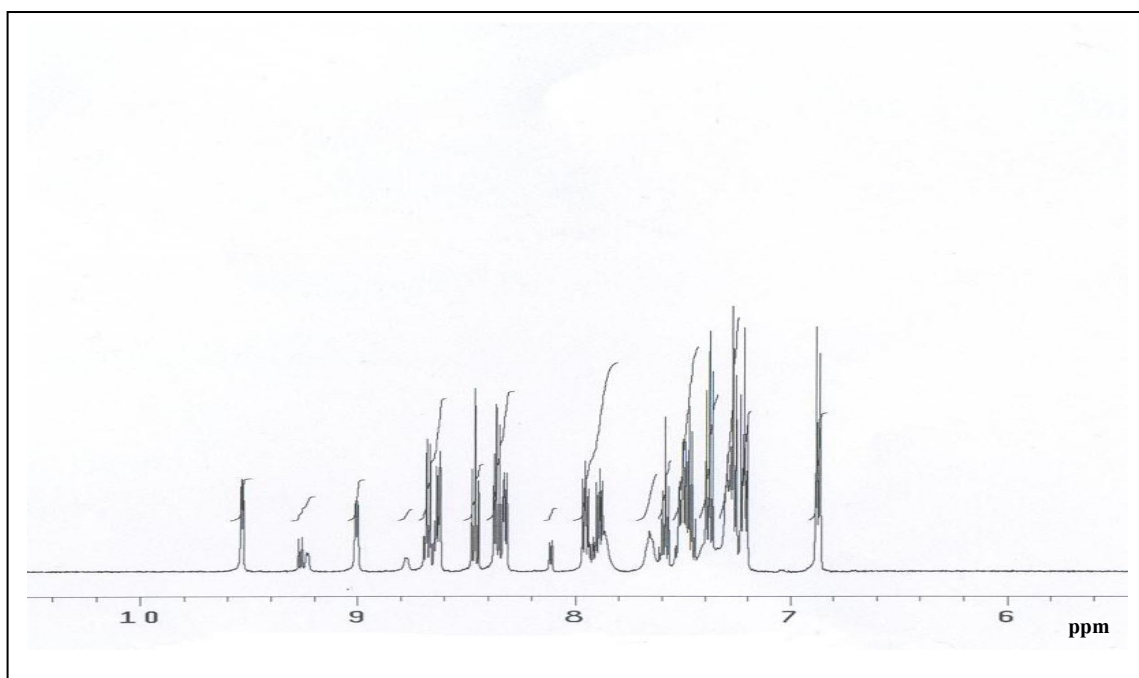
2.2.12 [Ru(azpy)₂azpym](NO₃)₂·6H₂O



ตารางที่ 2.2.12 แสดงข้อมูล ¹H NMR ของ [Ru(azpy)₂azpym](NO₃)₂·6H₂O ในตัวทำละลาย CD₃OD

H - Position	¹ H NMR			¹³ C NMR
	δ (ppm)	J (Hz)	number of H	δ (ppm)
6 azpym, 6'	9.53 (d)	4.5	2	163.57
6	9.50 (d)	4.5	1	162.30
5 azpym	8.65 (dd)	4.5, 4.5	1	132.51
3	8.63 (d)	8.0	1	143.94
4 azpym	8.45 (d)	4.5	1	153.47
3	8.35 (d)	8.0	1	143.57
4	8.34 (dd)	8.0, 8.0	1	153.01
4	8.32 (dd)	8.0, 8.0	1	152.27
5	7.95 (dd)	8.0, 4.5	1	132.66
5	7.89 (dd)	8.0, 4.5	1	132.55
10	7.58 (t)	8.0	1	135.41
10, 9, 10	7.49 (m)	-	5	135.44, 131.07, 135.13
9 (dd)	7.38	8.0, 7.5	2	131.05
8, 9	7.27 (m)	-	4	123.82, 130.85

H-Position	¹ H NMR			¹³ C NMR
	δ (ppm)	<i>J</i> (Hz)	number of H	δ (ppm)
8	7.22 (d)	8.0	2	123.72
8	7.20 (d)	8.0	2	123.67
Quarternary carbon				
165.74, 165.68, 165.20, 152.99, 152.85, 152.58				

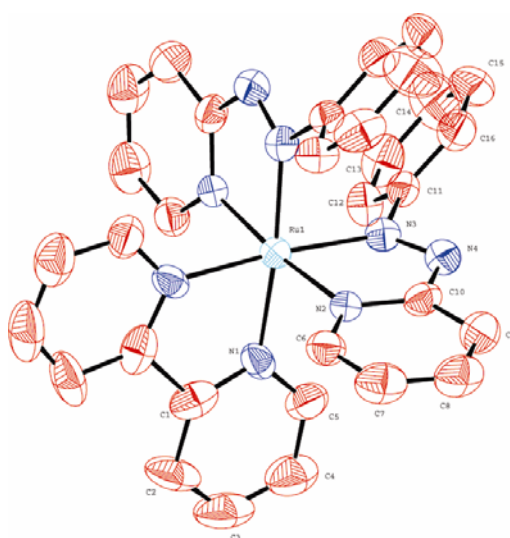


รูปที่ 2.2.12 ¹H NMR spectrum ของ [Ru(azpy)₂azpym](NO₃)₂.6H₂O ในตัวทำละลาย CD₃OD

ผลของการวิเคราะห์ธาตุที่เป็นองค์ประกอบของสารประกอบเชิงซ้อนทั้ง 12 ตัว ยืนยันสูตรโมเลกุลของสารตามที่ต้องการ และผลจากเทคนิค NMR สนับสนุนโครงสร้างเป็นไปตามรูปที่เสนอ แต่ในการยืนยันโครงสร้างโดยผลึกเดี่ยวของสารในกลุ่มนี้ทำได้ยาก เนื่องจากสารที่ต้องการเตรียมนั้นสามารถละลายน้ำได้ดีมาก ผลึกที่เตรียมจะสูญเสียความเป็น single crystal ได้ง่ายเมื่อสัมผัสอากาศ

2.3 เทคนิค X-ray crystallography

จากการสังเคราะห์สารทั้งหมดมีเพียง $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{bpy}](\text{NO}_3)_3\text{Cl}$ ที่ได้ single crystal โดยได้จากการตกผลึกโดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง เอทานอล และ เฮกเซน ข้อมูลทาง X-ray ที่ได้แสดงดังรูปที่ 2.3.1 และ ตารางที่ 2.3.1-2.3.3



ตารางที่ 2.3.1 แสดงข้อมูลผลึกของ $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{bpy}]_2(\text{NO}_3)_3\text{Cl}$

Empirical formula : $\text{H}_{52} \text{Cl}_1 \text{N}_{21} \text{O}_{15} \text{Ru}_2$

Formula weight = 1592.96

Crystal system : Monoclinic

$Z = 4$

Space group : $C_{2/c}$

$a = 19.2723(12) \text{ \AA}$

$b = 31.932(2) \text{ \AA}$

$c = 13.0585(8) \text{ \AA}$

$\alpha = 90.00^\circ$

$\beta = 124.8280(10)^\circ$

$\gamma = 90.00^\circ$

Temperature = 293(2) K

Wavelength = $0.71073 \text{ \AA}$

$V = 6596.6(7) \text{ \AA}^3$

Density (calculated) : 1.604 Mg/m^3

Absorption coefficient : 0.584 mm^{-1}

$F(000) = 3232$

Independent reflections 4049 [$R(\text{int}) = 0.0189$]

Completeness to $\theta = 24.71^\circ$ 100.0 %

Refinement method Full-matrix least-squares on F^2

Data / restraints / parameters 4049 / 0 / 387

Goodness-of-fit on F^2 2.535

Final R indices [$I > 2\sigma(I)$] $R1 = .081, wR2 = 0.0563$

R indices (all data) $R1 = .123, wR2 = 0.06$

Largest diff. peak and hole 0.253 and $-0.287 \text{ e. \AA}^{-3}$

Measurement : Bruker SMART CCD

Structure determination: heavy atom method (Xtal 3.7.1)

Refinement: full matrix least-squares (Xtal 3.7.1)

ตารางที่ 2.3.2 แสดง Atomic coordinates และ equivalent isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2$) ของ $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{bpy}]_2(\text{NO}_3)_3\text{Cl}$

Atom	x	y	z	U(eq)
Ru1	1.00000	.65807(2)	.25000	.0344(4)
Ru2	.50000	.59530(2)	.25000	.0413(4)
Cl1	1.00000	.62985(13)	.75000	.163(3)
O11a	.8202(5)	.6293(2)	.5212(7)	.146(5)
O11b	.9049(5)	.6781(2)	.5796(7)	.138(5)
O11c	.7871(4)	.6818(2)	.4030(7)	.129(5)
O21a	1.1011(4)	.6244(2)	.6716(5)	.119(5)
O21b	1.0582(4)	.56827(17)	.7025(5)	.091(4)
O21c	1.1468(5)	.5660(2)	.6536(7)	.128(5)
O31a	.50000	.3547(3)	.25000	.146(7)
O31b	.5541(5)	.4095(3)	.2582(8)	.203(7)
N1	.9685(3)	.60761(15)	.3165(5)	.043(3)
N11	.8357(6)	.6641(3)	.5007(9)	.096(6)
N2	.8743(3)	.66132(15)	.1069(5)	.041(3)
N21	1.1039(6)	.5860(3)	.6766(7)	.089(6)
N3	.9555(3)	.70403(14)	.3028(5)	.038(3)
N31	.50000	.3877(4)	.25000	.138(8)
N4	.8786(3)	.71624(14)	.2300(5)	.045(3)
N5	.5607(3)	.55353(15)	.3869(5)	.043(3)
N6	.5709(3)	.59196(15)	.1808(5)	.042(3)
N7	.5633(3)	.64656(16)	.3669(5)	.049(3)
N8	.5392(3)	.54795(15)	.4621(5)	.050(4)
C1	.9813(4)	.5690(2)	.2858(6)	.044(4)
C10	.8324(4)	.6919(2)	.1232(6)	.042(4)
C11	1.0058(4)	.7302(2)	.4135(6)	.041(4)
C12	1.0591(4)	.7109(2)	.5271(7)	.051(4)
C13	1.1072(4)	.7356(3)	.6317(7)	.063(5)
C14	1.1050(5)	.7787(3)	.6230(8)	.070(6)
C15	1.0527(5)	.7969(2)	.5092(8)	.065(5)
C16	1.0017(4)	.7734(2)	.4041(7)	.053(4)
C17	.6367(4)	.53085(19)	.4210(7)	.043(4)

ตารางที่ 2.3.2 (ต่อ)

Atom	x	y	z	U(eq)
C18	.7091(5)	.5338(2)	.5387(7)	.066(5)
C19	.7813(5)	.5141(3)	.5650(8)	.088(6)
C2	.9607(5)	.5332(2)	.3224(7)	.067(5)
C20	.7798(5)	.4897(3)	.4780(10)	.081(6)
C21	.7067(6)	.4857(2)	.3624(8)	.072(5)
C22	.6342(4)	.5071(2)	.3319(6)	.058(5)
C23	.5361(4)	.5685(2)	.0778(7)	.045(4)
C24	.5711(5)	.5622(2)	.0107(7)	.063(5)
C25	.6481(5)	.5799(2)	.0556(8)	.069(5)
C26	.6862(4)	.6031(2)	.1644(8)	.064(5)
C27	.6466(5)	.60837(18)	.2249(6)	.052(4)
C28	.6309(5)	.6444(2)	.4876(7)	.067(5)
C29	.6730(5)	.6787(3)	.5595(7)	.081(6)
C3	.9243(5)	.5362(3)	.3845(8)	.077(6)
C30	.6441(6)	.7167(3)	.5052(10)	.084(6)
C31	.5755(5)	.7206(2)	.3811(8)	.070(5)
C32	.5359(4)	.6848(2)	.3146(6)	.050(5)
C4	.9087(4)	.5750(3)	.4134(7)	.072(5)
C5	.9316(4)	.6099(2)	.3776(7)	.055(4)
C6	.8298(4)	.63655(18)	.0050(6)	.048(4)
C7	.7432(5)	.6421(2)	-.0802(6)	.065(5)
C8	.7011(4)	.6730(2)	-.0625(7)	.066(5)
C9	.7464(4)	.6983(2)	.0391(7)	.061(4)

$$U_{eq} = (1/3)\Sigma\Sigma U_{ij}a_i*a_j*(a_i\cdot a_j).$$

ตารางที่ 2.3.3 แสดง ความยาวพันธะ [Å] และ มุมพันธะ [°]

Ru2-N5	1.989(5)	Ru2-N6	2.026(8)
Ru2 -N7	2.090(5)	Ru2-N5	1.989(5)
Ru2 -N6	2.026(8)	Ru2 -N7	2.090(5)
N5-N8	1.276(11)	N5- C17	1.458(10)
N6 -C23	1.338(9)	N6-C27	1.332(10)
N7 -C28	1.356(8)	N7-C32	1.352(8)
N8 -C23	1.396(10)	O31a -N31	1.053(16)
O31b- N31	1.208(12)	O31b-O31b	1.972(15)
Ru1-N1	2.079(6)	Ru1-N2	2.050(4)
Ru1-N3	2.011(6)	Ru1-N1	2.079(6)
Ru1-N2	2.050(4)	Ru1-N3	2.011(6)
N1-C1	1.363(9)	N1-C5	1.339(13)
N2 -C10	1.358(10)	N2-C6	1.352(8)
N3-N4	1.282(7)	N3-C11	1.457(8)
N4 -C10	1.387(8)		
N5-Ru2-N6	99.5(3)	N5-Ru2-N7	94.0(2)
N5-Ru2-N5	95.8(2)	N5-Ru2-N6	76.3(3)
N5-Ru2-N7	168.5(3)	N6-Ru2-N7	96.1(3)
N6-Ru2-N5	76.3(3)	N6-Ru2-N6	174.0(2)
N6-Ru2-N7	88.7(3)	N7-Ru2-N5	168.5(3)
N7-Ru2-N6	88.7(3)	N7-Ru2-N7	76.9(2)
N5-Ru2-N6	99.5(3)	N5-Ru2-N7	94.0(2)
N6 -Ru2-N7	96.1(3)	N1-Ru1-N2	86.8(2)
N1-Ru1-N3	98.0(3)	N1-Ru1-N1	78.4(3)
N1-Ru1-N2	97.7(2)	N1-Ru1-N3	173.2(2)
N2-Ru1-N3	76.2(2)	N2-Ru1-N1	97.7(2)
N2 -Ru1-N2	174.2(2)	N2-Ru1-N3	99.4(2)
N3-Ru1-N1	173.16(19)	N3-Ru1-N2	99.4(2)
N3-Ru1- N3	86.2(3)	N1-Ru1-N2	86.8(2)
N1-Ru1-N3	98.0(3)	N2-Ru1-N3	76.2(2)

สารประกอบเชิงซ้อน $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{bpy}]_2(\text{NO}_3)_3\text{Cl}$ โมเลกุลมีรูปร่างแบบทรงเหลี่ยมแปดหน้าที่ยึดเป็นคู่ โดยรูทีเนียมเกิดพันธะกับ ไนโตรเจน 6 อะตอม โดยที่ 4 อะตอมมาจากลิแกนด์ azpy 2 ลิแกนด์ และ 2 อะตอม มาจาก bpy 1 ลิแกนด์ วงพรีดีนของลิแกนด์ azpy 2 ลิแกนด์อยู่ในตำแหน่งที่ trans กัน มุมในตำแหน่งที่ trans กันรอบรูทีเนียม มีค่า $173.16(19)$ ถึง $174.2(2)^\circ$ นั้นแสดงให้เห็นว่า มีการบิดเบี้ยวของโมเลกุลเกิดขึ้น และมุมของวงคีเลตรอบรูทีเนียมของ azpy และ bpy มีค่า $99.4(2)$, and $78.4(3)^\circ$ ตามลำดับ ความยาวพันธะในลิแกนด์ azpy มี Ru1-N(azo) ($2.011(6) \text{ \AA}$) สั้นกว่า Ru1-N(pyridine) ($2.050(4) \text{ \AA}$) ผลดังกล่าวอาจเนื่องมาจาก π -backbonding จาก $d\pi(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{azo})$ ของลิแกนด์ azpy ในสารประกอบนี้ ความยาวพันธะ Ru1-N(azo) ($2.011(6) \text{ \AA}$) สั้นกว่าที่พบในสารประกอบของรูทีเนียมที่มีลิแกนด์เป็น azpy เหมือนกัน เช่น $[\text{Ru}(\text{azpy})_3](\text{ClO}_4)_2$ ($2.042 \text{ \AA}$) (1) $[\text{Ru}(\text{tazpy})_3](\text{PF}_6)_2$ ($2.045 \text{ \AA}$) (2) และ $\text{mer-}[\text{Ru}(\text{azpy})_3](\text{PF}_6)_2$ ($2.049(19) \text{ \AA}$) (2) ในสารประกอบนี้ความยาวพันธะ N=N ของ azpy มีค่า $1.282(7) \text{ \AA}$ ซึ่งยาวกว่าในลิแกนด์ azpy อิสระ (N=N $1.248(2) \text{ \AA}$) (3) การเกิดพันธะของลิแกนด์ azpy กับรูทีเนียมทำให้ bond order ของ N=N ลดลง ทั้งนี้เนื่องจากลิแกนด์ azpy มีคุณสมบัติความเป็น σ -donor และ π -acceptor นอกจากนี้ ความยาวพันธะ Ru-N(pyridine) ของลิแกนด์ bpy มีค่า $2.079(6) \text{ \AA}$ ยาวกว่า Ru-N(pyridine) ในลิแกนด์ azpy นั้นแสดงให้เห็นว่า azpy มีคุณสมบัติความเป็น π -acceptor ที่ดีกว่าลิแกนด์ bpy

References

1. D. Chayan, S. Amrita, H. Chen-Hsiung, L. Gene-Hsiang, P. Shie-Ming and G. Sreebrata, *Inorg. Chem.*, **2003**, 42, 198.
2. A. C. G., Hotze, E. P. L Van der Geer, H. Kooijman, A. L. Spek, J. G. Haasnoot, and J. Reedijk, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2005**, 2648.
3. K. Panneerselvam, K. Hansongnern, N. Rattanawit, F.-L. Liao and T.-H. Lu, *Anal. Sci.* **2000**, 16, 1107.

บทที่ 3 การทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านมะเร็ง

ในการทดสอบฤทธิ์ของสารประกอบเชิงซ้อนที่สังเคราะห์ 12 ตัว กับเซลล์มะเร็ง 3 ชนิด คือ Human small cell lung cancer (Anti-NCI H187) Breast cancer (BC) และ Oral human epidermal carcinoma (KB) ที่ Bioassay Laboratory, BIOTEC ที่ NSTDA ได้มีการทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์ปกติ (vero cell) ด้วย ถ้าสารที่สังเคราะห์ได้มีฤทธิ์เป็นสารต้านมะเร็ง (IC_{50} ; $\mu\text{g/mL}$) นอกจากนี้ได้มีการสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนในกลุ่ม $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{Cl}_2]$ ด้วยเพื่อนำมาทดสอบเปรียบเทียบค่าความเป็นพิษในเซลล์มะเร็งต่างๆ ผลที่ได้แสดงใน ตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงผลการทดสอบการฤทธิ์ของสารประกอบเชิงซ้อนที่สังเคราะห์ได้ 12 ตัวกับเซลล์มะเร็ง 3 ชนิด คือ Human small cell lung cancer (Anti-NCI H187) Breast cancer (BC) และ Oral human epidermal carcinoma (KB)

สาร	Breast Cancer	KB	anti-NCI-H187	VERO
	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
<i>etc</i> - $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{Cl}_2]$	strong 4.28	inactive	strong 1.27	Cytotoxic 48.18
$[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	inactive	inactive	inactive	-
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{phen}]\text{Cl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	inactive	inactive	inactive	-
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{azpy}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	inactive	inactive	inactive	-
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{azpym}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	inactive	inactive	inactive	-
$[\text{Ru}(\text{phen})_3]\text{Cl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	inactive	inactive	inactive	-
$[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{bpy}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	inactive	inactive	inactive	-
$[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{azpy}]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	inactive	weak 19.31	weak 10.34	-
$[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{azpym}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	inactive	inactive	inactive	-
$[\text{Ru}(\text{azpy})_3](\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	inactive	strong 4.93	inactive	>50
$[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{bpy}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	inactive	moderate 7.94	inactive	>50
$[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{phen}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	inactive	moderate 6.38	weak 10.474	>50
$[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{azpym}](\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	weak 18.44	strong 3.83	inactive	>50

หมายเหตุ IC_{50} = 50 % inhibitory concentration

การแปลผลทดสอบของสารกับเซลล์มะเร็ง

Positive control

Anti-NCI –H187 ใช้

Ellipticine เป็น positive control มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.521 $\mu\text{g/mL}$

Doxorubicine เป็น positive control มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.290 $\mu\text{g/mL}$

Anti-cancer Breast cancer: BC ใช้

Ellipticine เป็น positive control มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.138 $\mu\text{g/mL}$

Doxorubicine เป็น positive control มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.176 $\mu\text{g/mL}$

Anti-cancer Oral human epidermal carcinoma: KB ใช้

Ellipticine เป็น positive control มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.248 $\mu\text{g/mL}$

Doxorubicine เป็น positive control มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.203 $\mu\text{g/mL}$

การแปลผลการทดสอบ

ค่า IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) Activity

> 20	Inactive
> 10-20	Weakly active
5 – 10	Moderately active
< 5	Strongly active

การแปลผลทดสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์ปกติ (Cytotoxicity test against vero cells)

Ellipticine เป็น positive control มีค่า IC_{50} เท่ากับ $0.5 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$

ในการแปลผล

- final concentration ของสารที่ใช้ทดสอบ เท่ากับ 50 $\mu\text{g/mL}$
- ในการแปลผลจะพิจารณาจากค่า % Cell viability ตามหลักเกณฑ์ดังนี้
 - ถ้า % Cell viability ≥ 50 % รายงานผลเป็นค่า $IC_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$
 - ถ้า % Cell viability < 50 % รายงานผลเป็นค่า IC_{50} ที่หาได้จากการทำ 2-fold serial dilution

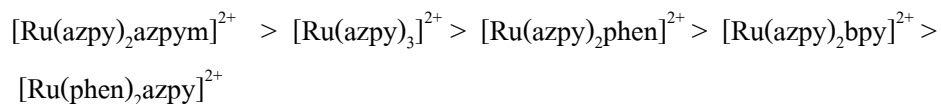
สรุปผลการทดสอบ

เนื่องจาก ในปี 2000 Velders และคณะ ได้ศึกษาสารประกอบเชิงซ้อน $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{Cl}_2]$ ซึ่งมีสมบัติที่น่าสนใจ กล่าวคือ มีความสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ผิดปกติได้ โดยมีการทดสอบใน cell line ดังต่อไปนี้ คือ cell line ของ มะเร็งเต้านม (Breast cancer, MCF-7, EVSA-T) มะเร็งลำไส้ (colon cancer, WIDR) มะเร็งรังไข่ (ovarian cancer, IGROV) มะเร็งปอด (non small cell lung cancer, H226) มะเร็งที่ไต (renal cancer, A498) และ มะเร็งผิวหนัง (melanoma, M19 MEL) (Velders และคณะ 2000) ดังนั้นในงานวิจัยชิ้นนี้ จึงมีการสังเคราะห์ $\text{ctc-}[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{Cl}_2]$ เพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบกับสารใหม่ที่กำลังเคราะห์ได้ในงานวิจัยชิ้นนี้และสรุปผลได้ดังนี้

1. สารประกอบเชิงซ้อนในกลุ่มที่เป็น $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{L}]^{2+}$ ($\text{L} = \text{bpy}, \text{phen}, \text{azpy}, \text{azpym}$) พบว่าไม่มีฤทธิ์เป็นสารต้านมะเร็งต่อเซลล์มะเร็ง 3 ชนิด คือ Oral human epidermal carcinoma (KB) Breast cancer (BC) และ Human small cell lung cancer (Anti-NCI H187)
2. สารประกอบเชิงซ้อนในกลุ่มที่เป็น $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{L}]^{2+}$ ($\text{L} = \text{bpy}, \text{phen}, \text{azpy}, \text{azpym}$) พบว่า $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{azpy}]^{2+}$ มีสมบัติ weakly active ต่อ Oral human epidermal carcinoma (KB) และ Human small cell lung cancer (Anti-NCI H187)
3. สารประกอบเชิงซ้อนในกลุ่มที่เป็น $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{L}]^{2+}$ ($\text{L} = \text{bpy}, \text{phen}, \text{azpy}, \text{azpym}$) พบว่า
 - $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{bpy}]^{2+}$ มีสมบัติ moderately active ต่อ Oral human epidermal carcinoma (KB) แต่ inactive ต่อ Breast cancer (BC) และ Human, small cell lung cancer (Anti-NCI H187)
 - $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{phen}]^{2+}$ สมบัติ moderately active ต่อ Oral human epidermal carcinoma (KB) และ weakly active ต่อ Human, small cell lung cancer (Anti-NCI H187) แต่ inactive ต่อ Breast cancer (BC)
 - $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{azpym}]^{2+}$ สมบัติ strongly active ต่อ Oral human epidermal carcinoma (KB) และ weakly active ต่อ Breast cancer (BC) แต่ inactive ต่อ Human small cell lung cancer (Anti-NCI H187)
 - $[\text{Ru}(\text{azpy})_3]^{2+}$ สมบัติ strongly active ต่อ Oral human epidermal carcinoma (KB) แต่ inactive ต่อ Breast cancer (BC) และ Human small cell lung cancer (Anti-NCI H187)

จากผลการทดสอบกับเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิด พบว่า โครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อนของรูทีเนียมมีผลต่อการออกฤทธิ์กับเซลล์มะเร็ง กล่าวคือ เมื่อรูทีเนียมมีลิแกนด์เป็น polypyridine (bpy, phen) ไม่มีฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็ง ในขณะที่เมื่อเปลี่ยนลิแกนด์หนึ่งตัวเป็น azpy (ซึ่งมีความเป็นขั้วมากกว่ากลุ่มลิแกนด์ polypyridine) คือ $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{azpy}]^{2+}$ มีฤทธิ์เพียงเล็กน้อยต่อ KB ถ้ารูทีเนียมมีลิแกนด์เป็น azpy 2 ตัว เช่น $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{phen}]^{2+}$ จะมีฤทธิ์ปานกลางต่อ KB แสดงว่าการมี

azpy 2 ตัวในโครงสร้างนี้มีผลต่อเซลล์มะเร็งชนิดนี้มากกว่าลิแกนด์ phen ถ้ารูทีเนียมมีลิแกนด์เป็น azoimine (azpy, azpym) ทั้ง 3 ตัว คือ $[\text{Ru}(\text{azpy})_3]^{2+}$ และ $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{azpym}]^{2+}$ จะมีฤทธิ์สูงต่อ KB และดีกว่า $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{phen}]^{2+}$ $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{bpy}]^{2+}$ และ $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{azpy}]^{2+}$ โดยลำดับความแรงในการออกฤทธิ์จากมากไปน้อย ดังนี้



แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อนของรูทีเนียมที่มีลิแกนด์ต่างชนิดกันมีผลต่อการออกฤทธิ์กับเซลล์มะเร็งต่างกัน โดยขึ้นอยู่กับความเป็นขั้วของลิแกนด์ ซึ่งลิแกนด์ในกลุ่ม azoimine มีความเป็น ขั้วมากกว่าลิแกนด์ในกลุ่ม polypyridine

นอกจากนี้ ยังพบว่าสารประกอบเชิงซ้อนของรูทีเนียม $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{azpym}]^{2+}$ $[\text{Ru}(\text{azpy})_3]^{2+}$ มีฤทธิ์เป็นสารต้านมะเร็ง KB (Oral human epidermal carcinoma) ที่ดีและ มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ปกติน้อยกว่า $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{Cl}_2]$ ซึ่งเป็นสารต้นแบบและมีความเป็นพิษสูง คุณสมบัติข้อนี้อาจจะนำไปใช้ประโยชน์ได้ในอนาคต

References

1. A. H. Velders, H. Kooijman, A. L. Spek, J.G. Haasnoot, D. De Vos, and J. Reedijk, *Inorg. Chem.*, **2000**, 39, 2966.

บทที่ 4 การศึกษาอันตรกิริยาของสารประกอบเชิงซ้อนกับ DNA

เทคนิคที่ศึกษาอันตรกิริยาของสารประกอบเชิงซ้อนกับ DNA มีดังนี้

1. เทคนิคการวัดการดูดกลืนแสง (Absorption titration)
2. เทคนิคการหาค่าความหนืด (Viscosity measurement)
3. เทคนิคการวัดการเปลี่ยนแปลงแสง (Competitive binding study)
4. เทคนิคทางไฟฟ้าเคมี (Cyclic voltammetry)
5. เทคนิคทางชีวเคมี (gel electrophoresis)

4.1 เทคนิคการวัดการดูดกลืนแสง (Absorption titration)

เป็นการศึกษาเกี่ยวกับคุณลักษณะการดูดกลืนแสงของสาร สามารถดำเนินการได้อย่างรวดเร็ว และใช้สารปริมาณน้อย ในการศึกษาเพื่อติดตามอันตรกิริยาระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนตัวใหม่กับ DNA สามารถทำได้โดยการเพิ่มปริมาณของ DNA และพิจารณาการลดลงของความเข้มของสเปกตรัมไปพร้อม ๆ กับการเลื่อนของค่าความยาวคลื่น เพื่อที่จะอธิบายความสามารถในการจับของสารประกอบเชิงซ้อนกับ CT-DNA จึงมีการหาค่าคงที่การจับ (K_b) ตามแบบของ Wolf (1) โดยใช้สมการ

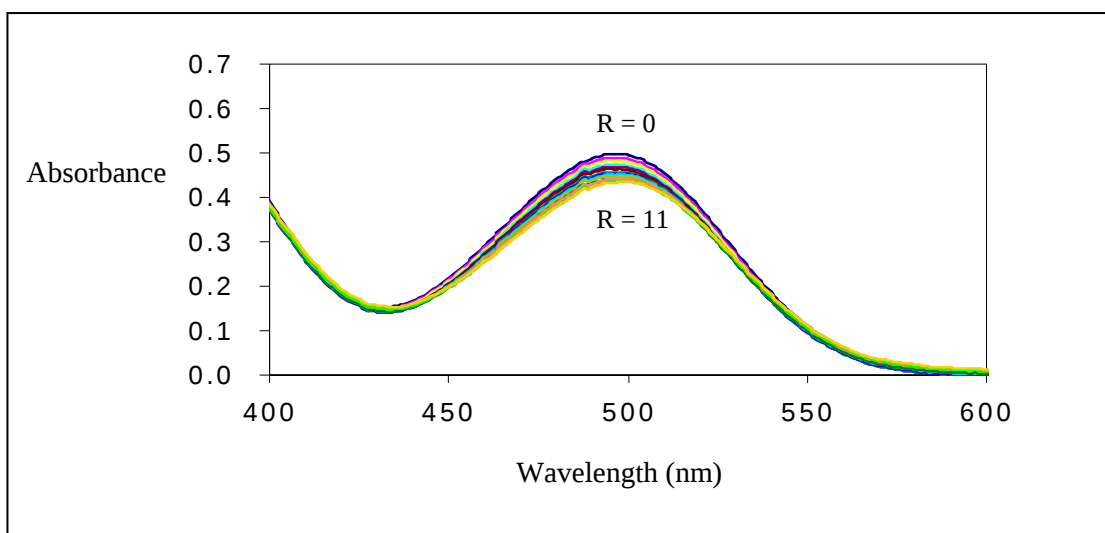
$$[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f) = [DNA]/(\epsilon_b - \epsilon_f) + 1/[K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)]$$

เมื่อ ϵ_a = molar extinction coefficient ใดๆ

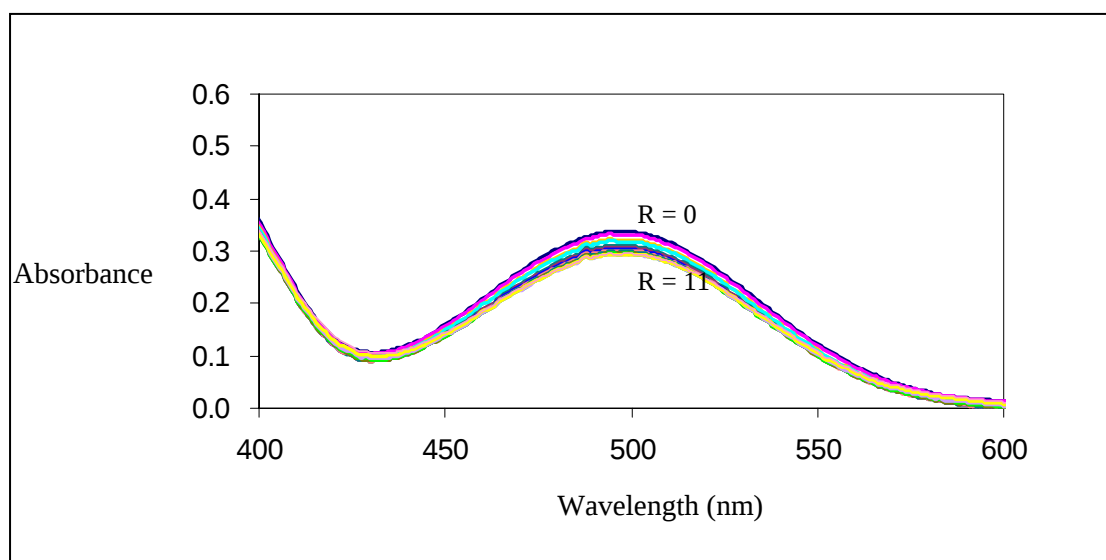
ϵ_b = molar extinction coefficient เมื่อสารประกอบเชิงซ้อนจับกับ DNA ที่จุดอิ่มตัว

ϵ_f = molar extinction coefficient เมื่อไม่มี DNA

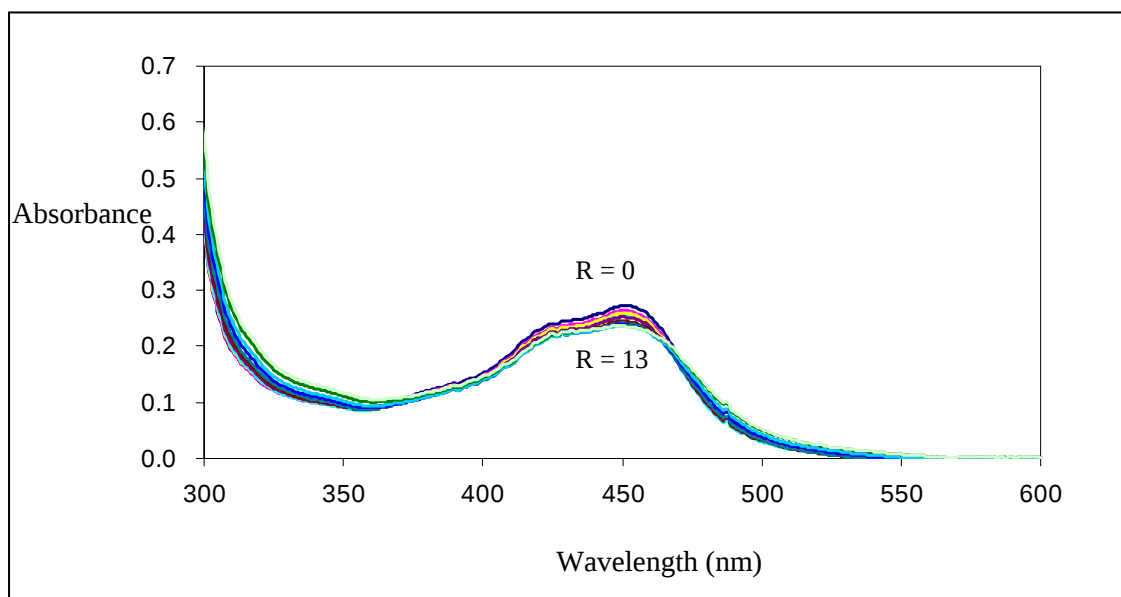
ผลจากการศึกษา absorption titration แสดงดังรูปที่ 4.1.1 - 4.1.12 และ ตารางที่ 4.1.1



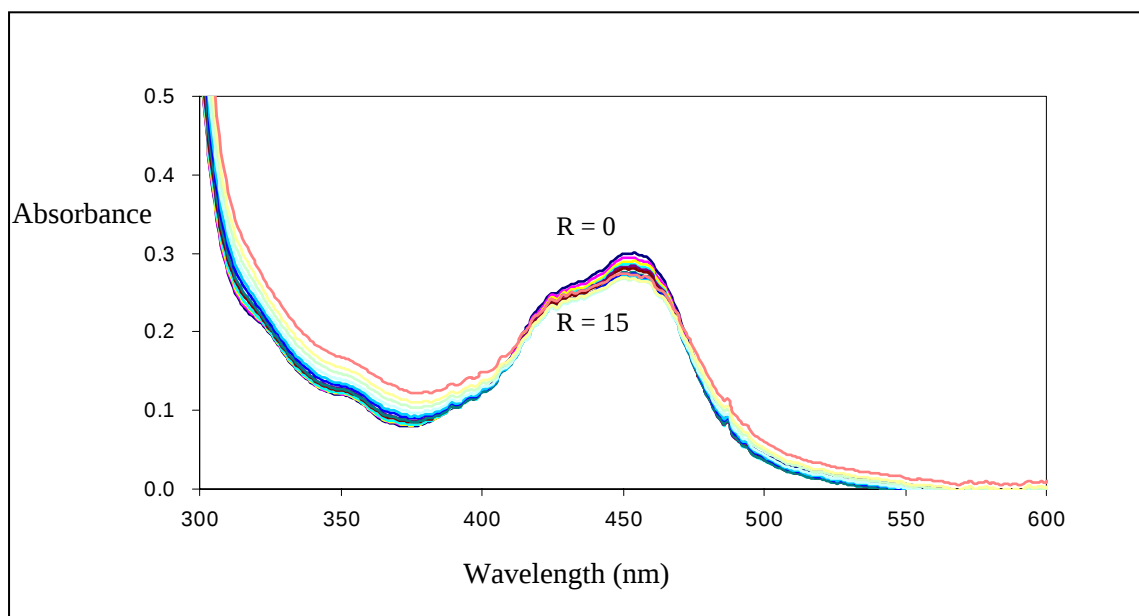
รูปที่ 4.1.1 แสดง absorption spectra เมื่อมีการเติม DNA ลงใน 40 mM $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{azpy}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ใน Tris-buffer pH 7.4



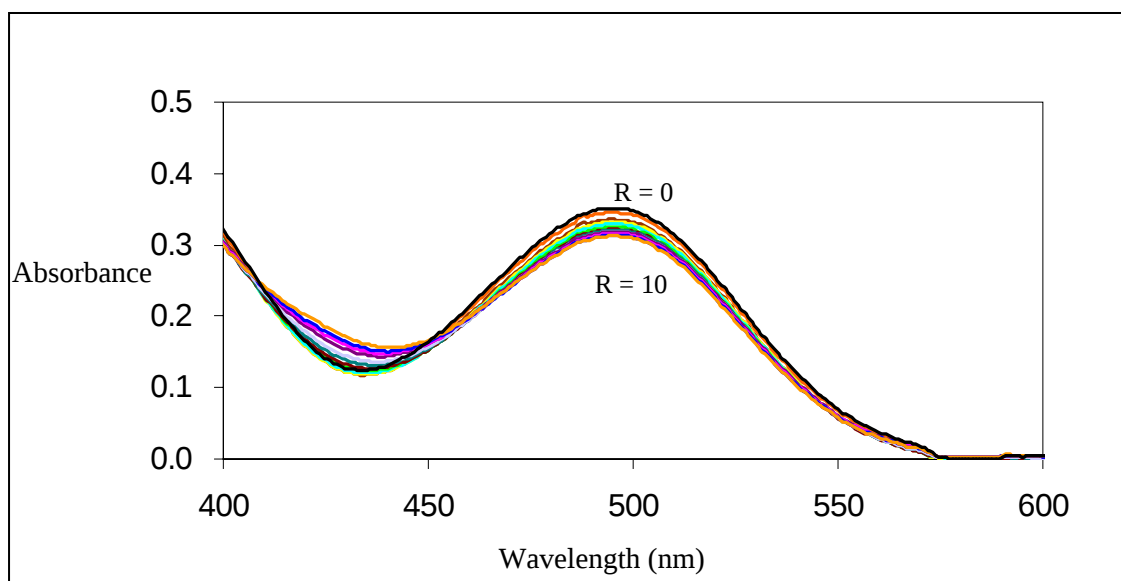
รูปที่ 4.1.2 แสดง absorption spectra เมื่อมีการเติม DNA ลงใน 40 mM $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{azpym}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ใน Tris-buffer pH 7.4



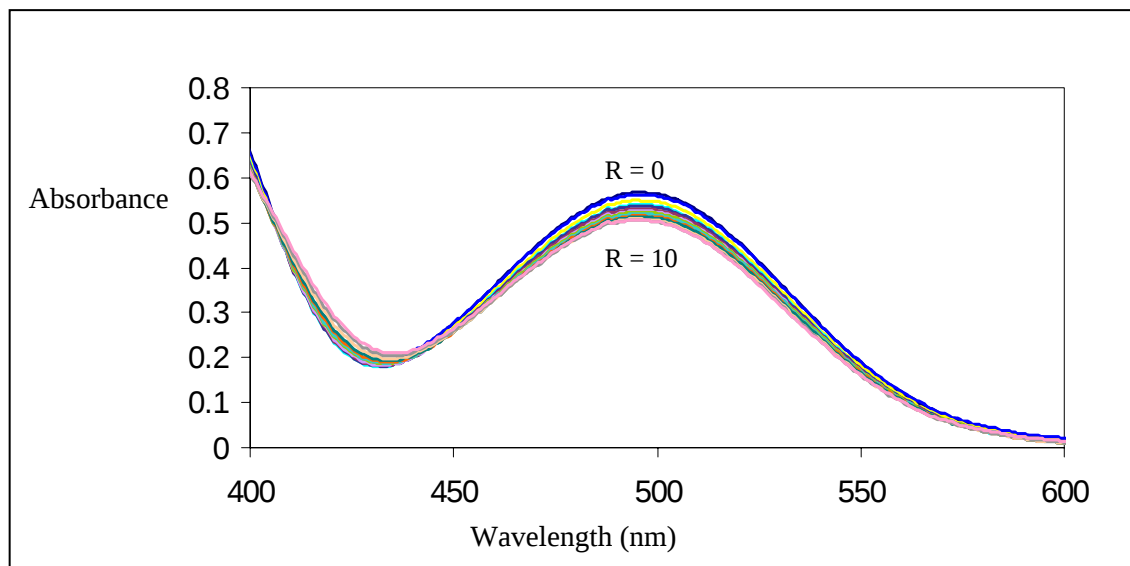
รูปที่ 4.1.3 แสดง absorption spectra เมื่อมีการเติม DNA ลงใน 40 mM $[Ru(bpy)_2phen]Cl_2 \cdot 7H_2O$ ใน Tris-buffer pH 7.4



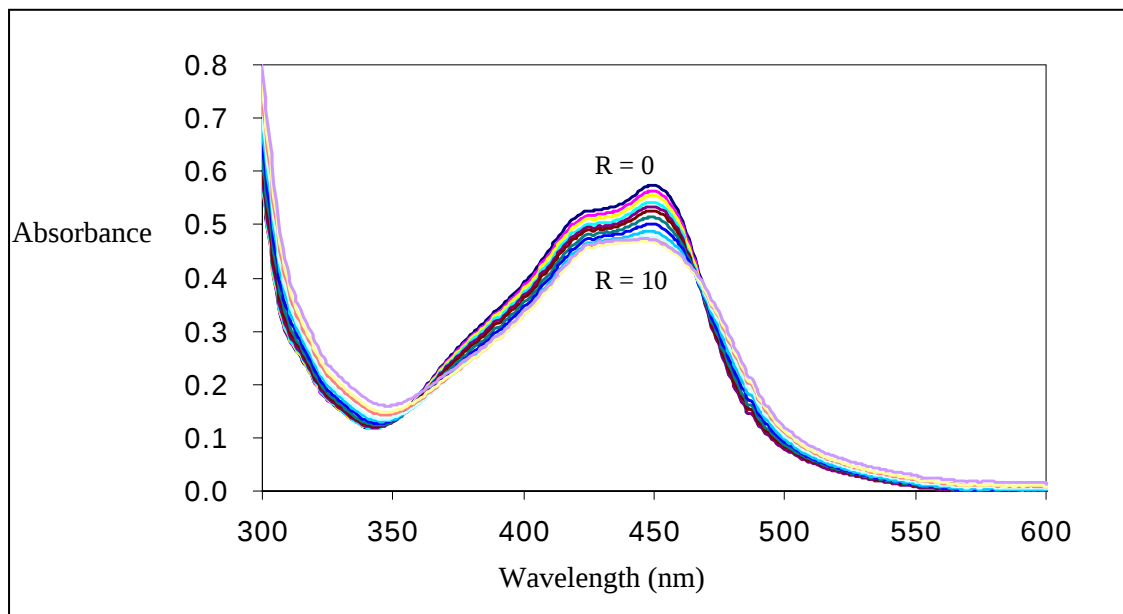
รูปที่ 4.1.4 แสดง absorption spectra เมื่อมีการเติม DNA ลงใน 40 mM $[Ru(bpy)_3]Cl_2 \cdot 6H_2O$ ใน Tris-buffer pH 7.4



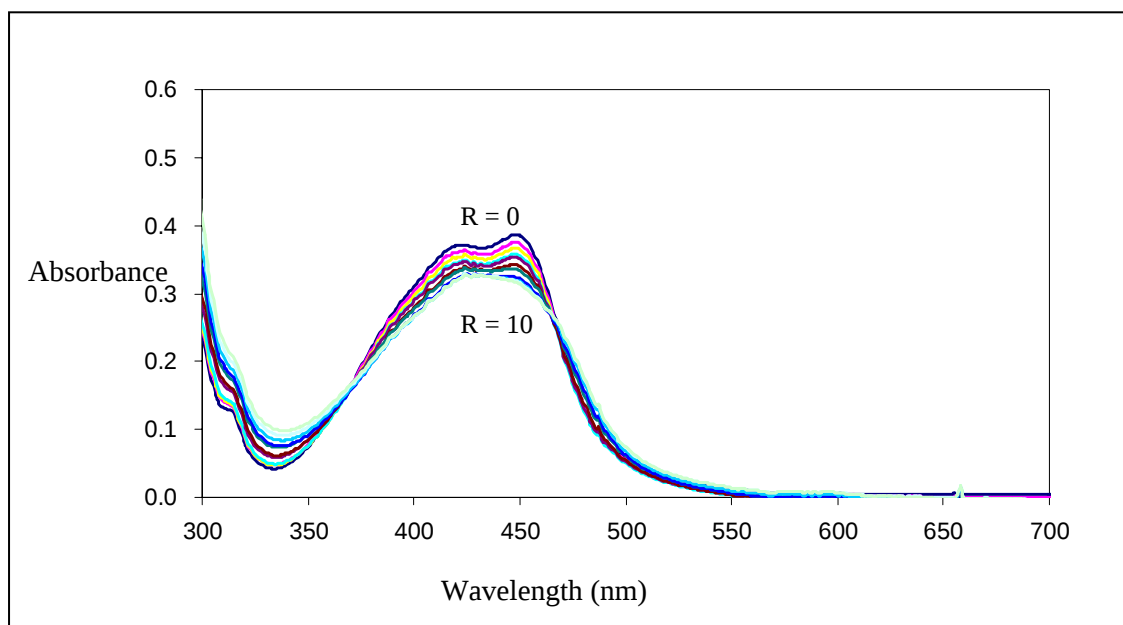
รูปที่ 4.1.5 แสดง absorption spectra เมื่อมีการเติม DNA ลงใน 40 mM $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{azpy}]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ใน Tris-buffer pH 7.4



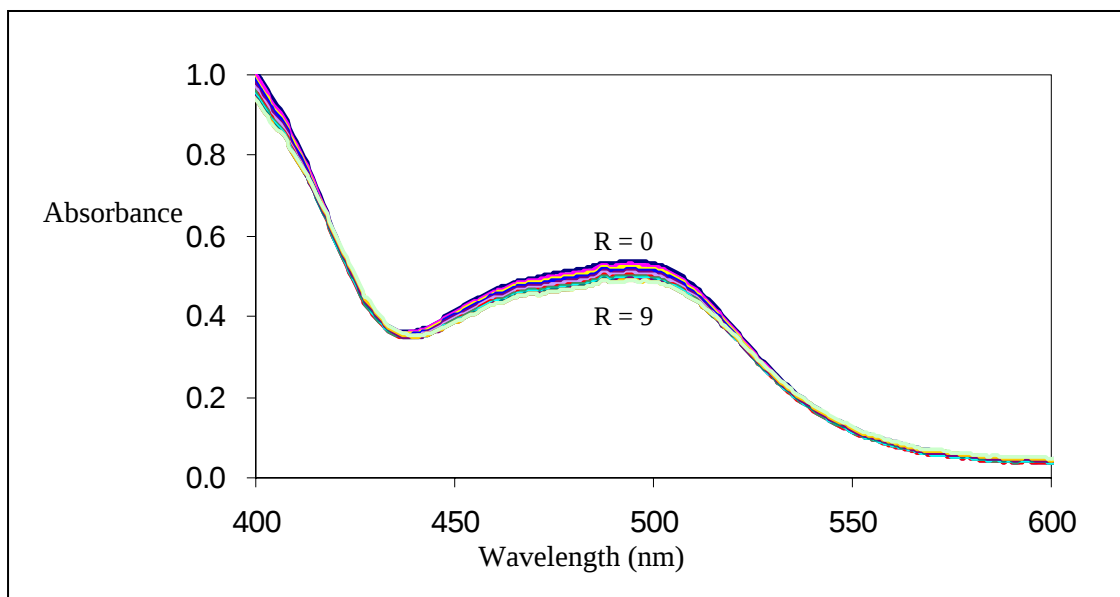
รูปที่ 4.1.6 แสดง absorption spectra เมื่อมีการเติม DNA ลงใน 40 mM $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{azpym}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ใน Tris-buffer pH 7.4



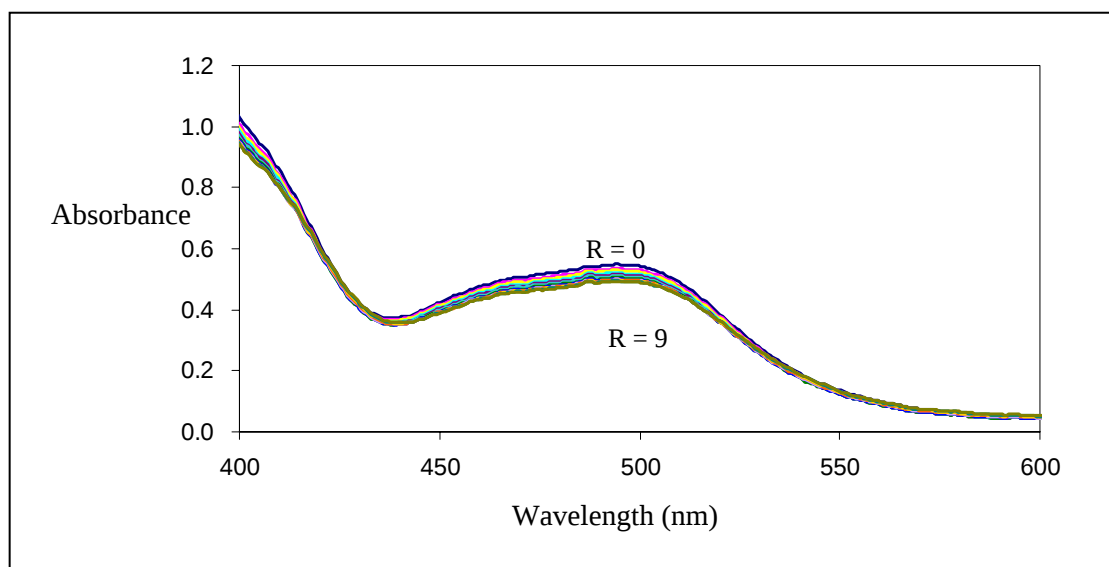
รูปที่ 4.1.7 แสดง absorption spectra เมื่อมีการเติม DNA ลงใน 40 mM $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{bpy}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ใน Tris-buffer pH 7.4



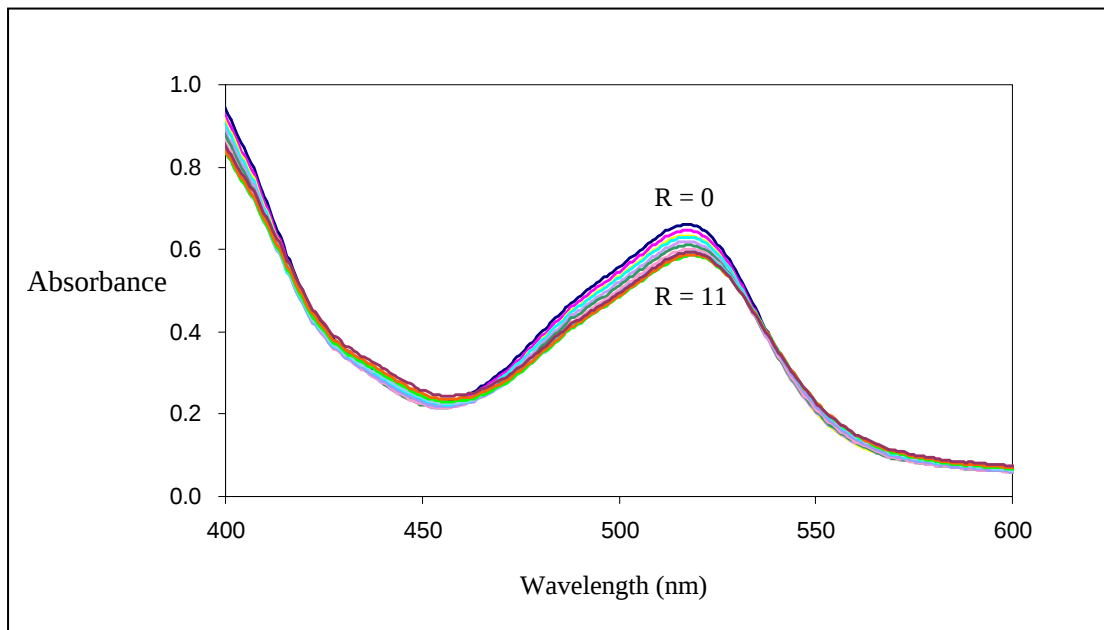
รูปที่ 4.1.8 แสดง absorption spectra เมื่อมีการเติม DNA ลงใน 40 mM $[\text{Ru}(\text{phen})_3]\text{Cl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ใน Tris-buffer pH 7.4



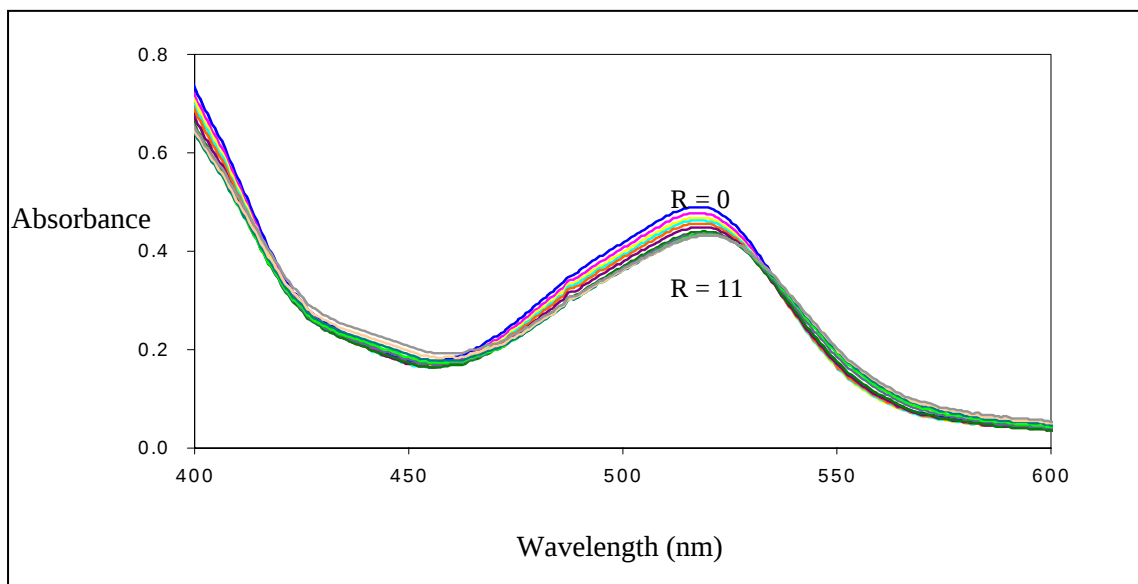
รูปที่ 4.1.9 แสดง absorption spectra เมื่อมีการเติม DNA ลงใน 40 mM $[\text{Ru}(\text{azpy})_3](\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ใน Tris-buffer pH 7.4



รูปที่ 4.1.10 แสดง absorption spectra เมื่อมีการเติม DNA ลงใน 40 mM $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{azpym}](\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ใน Tris-buffer pH 7.4



รูปที่ 4.1.11 แสดง absorption spectra เมื่อมีการเติม DNA ลงใน 40 mM $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{phen}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ใน Tris-buffer pH 7.4



รูปที่ 4.1.12 แสดง absorption spectra เมื่อมีการเติม DNA ลงใน 40 mM $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{bpy}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ใน Tris-buffer pH 7.4

ตารางที่ 4.1.1 แสดงผลจากเทคนิค absorption titration ใน Tris-buffer pH 7.4

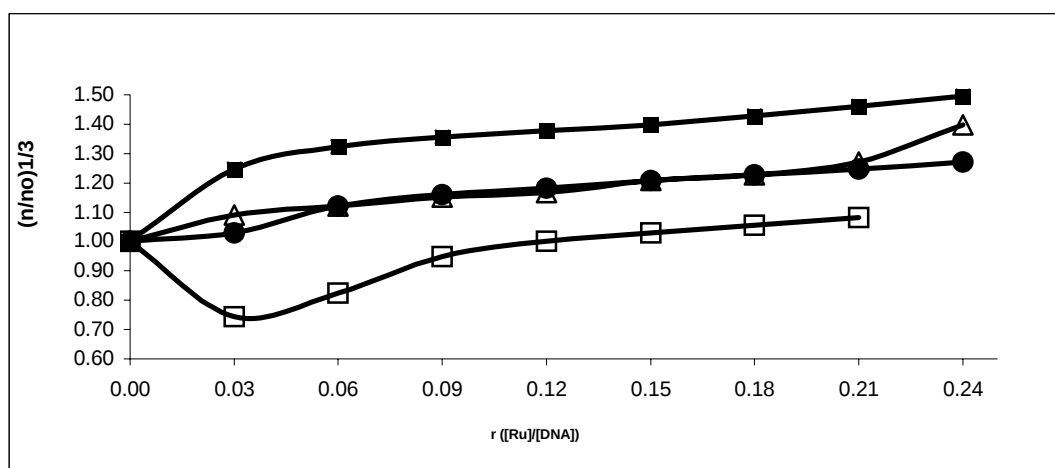
สาร	$\pi \rightarrow \pi^*$ ($\lambda_{\max}$, nm)	MLCT ($\lambda_{\max}$, nm)	การเปลี่ยนแปลง การดูดกลืนแสง (%H)	K_b (M^{-1})
[Ru(bpy) ₂ azpy]Cl ₂ ·5H ₂ O	262, 348	494	13.2	$(2.5 \pm 0) \times 10^4$
[Ru(bpy) ₂ azpym]Cl ₂ ·5H ₂ O	272, 357	495	12.7	$(4.8 \pm 0.6) \times 10^4$
[Ru(bpy) ₂ phen]Cl ₂ ·7H ₂ O	263, 285	450	13.3	$(2.1 \pm 0.2) \times 10^4$
[Ru(bpy) ₃]Cl ₂ ·6H ₂ O	243, 284	454	9.1	$(3.1 \pm 0.1) \times 10^4$
[Ru(phen) ₂ azpy]Cl ₂ ·6H ₂ O	261, 349	494	10.2	$(4.4 \pm 0.7) \times 10^4$
[Ru(phen) ₂ azpym]Cl ₂ ·5H ₂ O	267, 342	495	11.5	$(3.3 \pm 0.5) \times 10^4$
[Ru(phen) ₃]Cl ₂ ·7H ₂ O	222, 262	447	17.3	$(2.5 \pm 0.2) \times 10^4$
[Ru(phen) ₂ bpy]Cl ₂ ·5H ₂ O	222, 262	449	18.5	$(2.5 \pm 0.2) \times 10^4$
[Ru(azpy) ₂ azpym](NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	277, 371	494	9.1	$(8.7 \pm 1.0) \times 10^4$
[Ru(azpy) ₃](NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	276, 370	494	9.2	$(4.8 \pm 0.4) \times 10^4$
[Ru(azpy) ₂ bpy]Cl ₂ ·5H ₂ O	281, 370	517	12.9	$(6.9 \pm 1.3) \times 10^4$
[Ru(azpy) ₂ phen]Cl ₂ ·5H ₂ O	259, 369	517	11.7	$(7.3 \pm 1.2) \times 10^4$

4.2 เทคนิคการหาค่าความหนืด (Viscosity measurement)

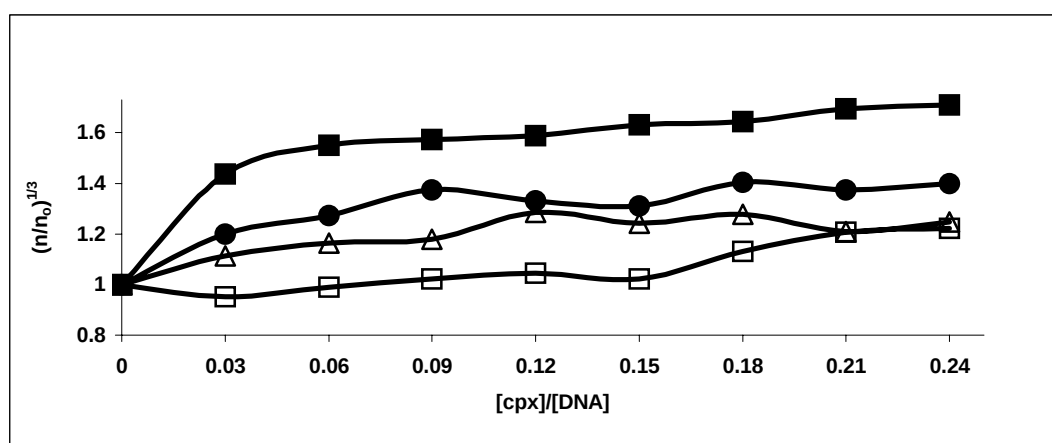
เทคนิคการหาค่าความหนืด เป็นเทคนิคที่ติดตามอันตรกิริยาระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนตัวใหม่กับ DNA ได้อีกวิธี เนื่องจากความหนืดของสารละลายโมเลกุลใหญ่จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับขนาดและลักษณะไม่สมมาตรของโมเลกุล ในธรรมชาติสารละลาย DNA มีความหนืดสูง เมื่อมีการเติมสารประกอบเชิงซ้อนปริมาณต่างกันไปในสารละลาย DNA จะส่งผลต่อค่าความหนืดของ DNA แตกต่างออกไป ข้อมูลที่ได้จากการศึกษา เสนอโดยการ สร้างกราฟ ที่มี แกน Y เป็น $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ เมื่อ η คือ relative viscosity ของ ดีเอ็นเอ เมื่อมีสารประกอบเชิงซ้อน และ η_0 คือ relative viscosity เมื่อไม่มีสารประกอบเชิงซ้อน แกน X เป็น อัตราส่วนของความเข้มข้นของสารประกอบต่อความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (2)

งานวิจัยนี้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงความหนืดของดีเอ็นเอ เมื่อเกิดอันตรกิริยากับ [Ru(bpy)₃]²⁺ EB (ethidium bromide) และ สารประกอบเชิงซ้อนของโลหะรูทีเนียม ซึ่งมีทั้งหมด 8

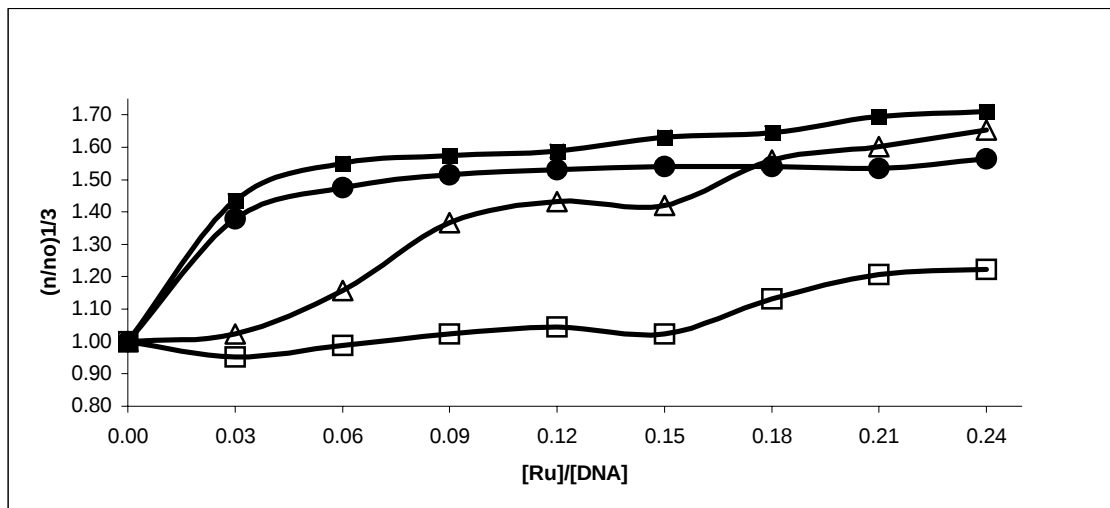
ตัว คือ $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{bpy}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{phen}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $[\text{Ru}(\text{azpy})_3](\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
 $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{azpym}](\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{azpy}]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{azpym}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{azpy}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ และ $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{azpym}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ เราทราบมาว่า EB เป็นสารที่สามารถแทรกเข้าไปในสายดีเอ็นเอได้ โดยมีผลทำให้ความหนืดของดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น และ $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ เป็นสารที่เกิดอันตรกิริยากับดีเอ็นเอ แบบ electrostatic ซึ่ง ไม่มีผลต่อความหนืดของดีเอ็นเอ ซึ่ง จากรูปที่ 4.2.1 – 4.2.4 สารประกอบเชิงซ้อนของโลหะรูทีเนียม ทั้งหมด 8 ตัว จะมีผลต่อความหนืดของดีเอ็นเอ โดยผลที่ได้จะมีน้อยกว่า EB แต่ มากกว่า $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$



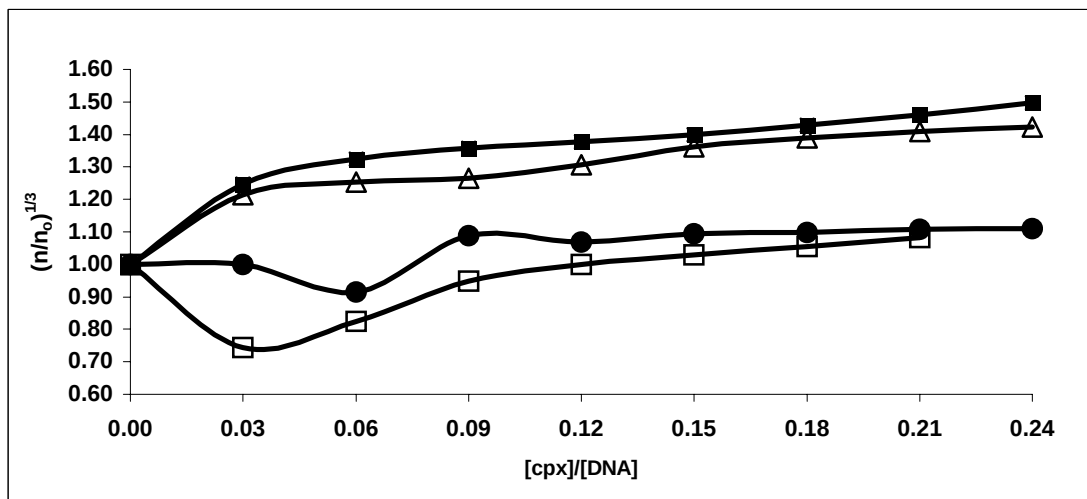
รูปที่ 4.2.1 แสดงผลของการเพิ่มปริมาณของ $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{bpy}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Δ) $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{phen}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (●) $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (□) EB (■) เทียบกับความหนืดของ CT-DNA ที่ 29° $[\text{DNA}] = 3 \times 10^{-4} \text{ M}$



รูปที่ 4.2.2 แสดงผลของการเพิ่มปริมาณของ $[\text{Ru}(\text{azpy})_3](\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Δ) $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{azpym}](\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (●) $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (□) EB (■) เทียบกับความหนืดของ CT-DNA ที่ 29° $[\text{DNA}] = 3 \times 10^{-4} \text{ M}$



รูปที่ 4.2.3 แสดงผลของการเพิ่มปริมาณของ $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{azpy}]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($\triangle$) $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{azpym}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($\bullet$) $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($\square$) EB ($\blacksquare$) เทียบกับความหนืดของ CT-DNA ที่ 29° $[\text{DNA}] = 3 \times 10^{-4} \text{ M}$



รูปที่ 4.2.4 แสดงผลของการเพิ่มปริมาณของ $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{azpy}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($\triangle$) $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{azpym}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($\bullet$) $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($\square$) EB ($\blacksquare$) เทียบกับความหนืดของ CT-DNA ที่ 29° $[\text{DNA}] = 3 \times 10^{-4} \text{ M}$

4.3 เทคนิคการวัดการเปล่งแสง (Competitive binding study)

เทคนิคการวัดการเปล่งแสง เป็นเทคนิคที่ใช้ติดตามการจับของสารประกอบ เจริญซ้อน กับ DNA อย่างไรก็ตามสารประกอบเจริญซ้อนที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ ไม่เกิดการเรืองแสงที่อุณหภูมิห้อง จึงไม่สามารถติดตามการลดการเปล่งแสงเมื่อจับกับ DNA ได้โดยตรงจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า ethidium bromide (EB) สามารถเปล่งแสงฟลูออเรสเซนส์ได้เมื่อมี DNA เนื่องจาก EB เข้าไปแทรกในสายดีเอ็นเอ และนอกจากนี้ แสงฟลูออเรสเซนส์สามารถถูกระงับได้โดย โมเลกุลของ quencher (3) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ จึงติดตามการลดลงของความเข้มของการเปล่งแสงของ EB ที่จับกับ DNA โดยเติมสารประกอบเจริญซ้อนที่สังเคราะห์ได้ในงานวิจัยนี้ลงไป ซึ่งสารประกอบเจริญซ้อนนี้ จะทำหน้าที่เป็น quencher

ในงานวิจัยชิ้นนี้ สารละลายที่ประกอบด้วย DNA และ Ethidium Bromide [EB] ใน บัฟเฟอร์ pH 7.1 (5 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl) ถูกกระตุ้น ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร และพบการเปล่งแสงที่ 500-670 นาโนเมตร เมื่อมีการเติมสารประกอบเจริญซ้อนของโลหะรูทีเนียม ลงไปในสารละลายของดีเอ็นเอและ EB ทำให้ การเปล่งแสงของ สารละลายลดลง แสดงให้เห็นว่า EB ที่แทรกอยู่ในสายดีเอ็นเอถูกแทนที่ด้วยสารประกอบเจริญซ้อนของโลหะรูทีเนียม การระงับการเปล่งแสงมีมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารประกอบเจริญซ้อนของโลหะรูทีเนียมเพิ่มขึ้น จากข้อมูลสามารถหาค่าคงที่สารประกอบเจริญซ้อนจับกับ DNA โดยอาศัย สมการดังต่อไปนี้ (4)

$$I_0/I = 1 + Kr$$

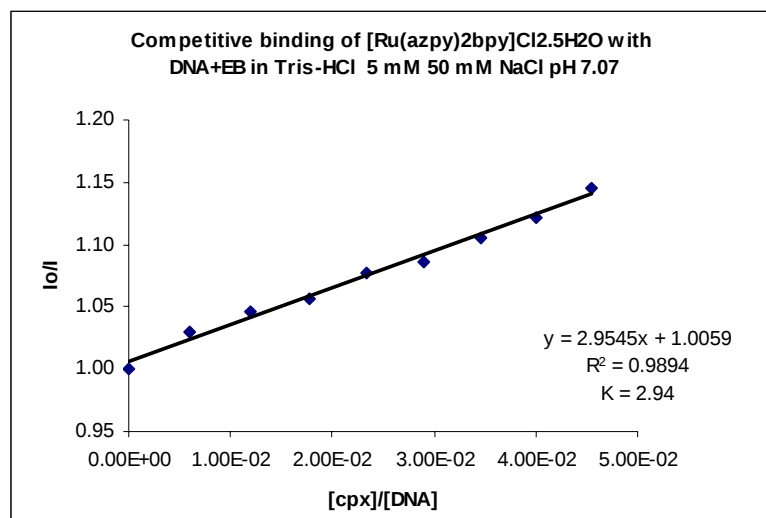
เมื่อ I_0 = ความเข้มของการเปล่งแสงเมื่อไม่มีสารประกอบเจริญซ้อน

I = ความเข้มของการเปล่งแสงเมื่อมีสารประกอบเจริญซ้อน

K = ค่าคงที่ linear Stern-Volmer quenching

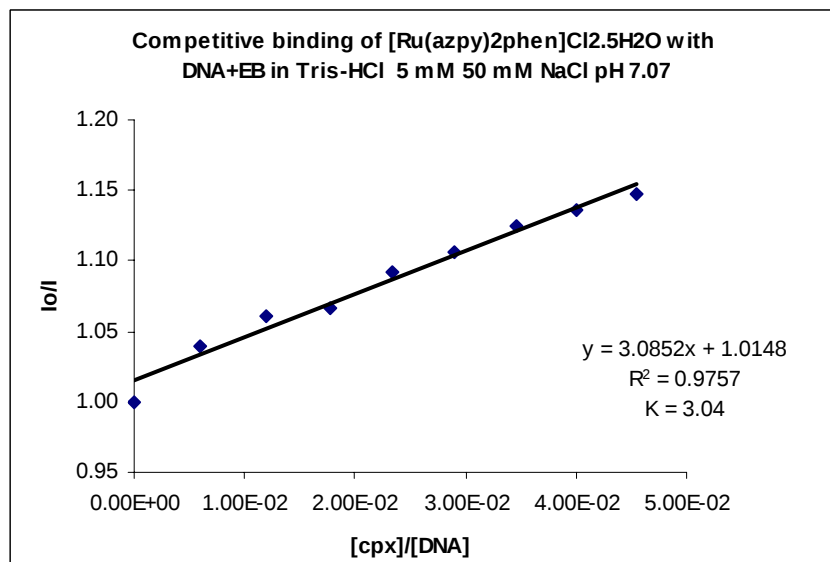
r = อัตราส่วนความเข้มข้นของสารประกอบเจริญซ้อนต่อความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

ผลแสดงดังรูปที่ 4.3.1-4.3.4 และตารางที่ 4.3.1



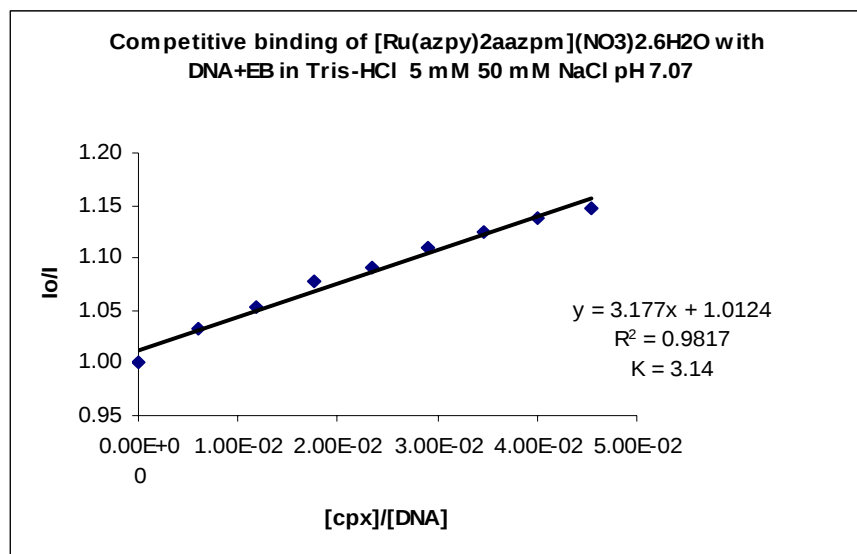
รูปที่ 4.3.1 กราฟแสดง fluorescence quenching ของ EB ที่จับกับ ดีเอ็นเอ โดย

$$[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{bpy}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O} [\text{EB}] = 2 \mu\text{M} [\text{DNA}] = 40 \mu\text{M}$$



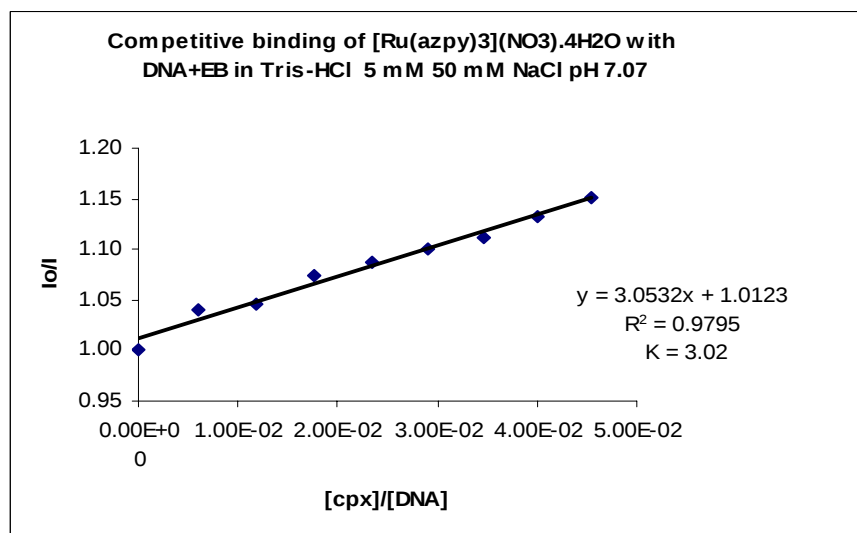
รูปที่ 4.3.2 กราฟแสดง fluorescence quenching ของ EB ที่จับกับ ดีเอ็นเอ โดย

$$[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{phen}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O} [\text{EB}] = 2 \mu\text{M} [\text{DNA}] = 40 \mu\text{M}$$



รูปที่ 4.3.3 กราฟแสดง fluorescence quenching ของ EB ที่จับกับ ดีเอ็นเอ โดย

$[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{azpym}](\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ [EB] = 2 μM [DNA] = 40 μM



รูปที่ 4.3.4 กราฟแสดง fluorescence quenching ของ EB ที่จับกับ ดีเอ็นเอ โดย

$[\text{Ru}(\text{azpy})_3](\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ [EB] = 2 μM [DNA] = 40 μM

ตารางที่ 4.3.1 สรุปผลการทดลองการวัดการเปล่งแสง

สารประกอบเชิงซ้อน	C (μ M)	pH buffer	E _m (nm)	ผลการทดลอง
[Ru(bpy) ₂ azpy]Cl ₂ ·5H ₂ O	50	7.07	589	y = 1.5323x + 1.0015 R ² = 0.9922; K = 1.53
[Ru(bpy) ₂ azpym]Cl ₂ ·5H ₂ O	40	7.07	588	y = 1.7679x + 1.0068 R ² = 0.9794; K = 1.76
[Ru(phen) ₂ azpy]Cl ₂ ·6H ₂ O	50	7.07	588	y = 2.105x + 1.0049 R ² = 0.9923; K = 2.09
[Ru(phen) ₂ azpym]Cl ₂ ·6H ₂ O	40	7.07	586	y = 2.8785x + 1.0001 R ² = 0.9962; K = 2.88
[Ru(azpy) ₂ bpy]Cl ₂ ·5H ₂ O	30	7.07	588	y = 2.9545x + 1.0059 R ² = 9894; K = 2.94
[Ru(azpy) ₂ phen]Cl ₂ ·5H ₂ O	30	7.07	586	y = 3.0852x + 1.0148 R ² = 0.9757; K = 3.04
[Ru(azpy) ₂ azpym](NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	30	7.07	587	y = 3.177x + 1.0124 R = 9817; K = 3.14
[Ru(azpy) ₃](NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	30	7.07	590	y = 3.0532x + 1.0123 R ² = 0.9795; K = 3.02

4.4 เทคนิคทางไฟฟ้าเคมี (Cyclic voltammetry)

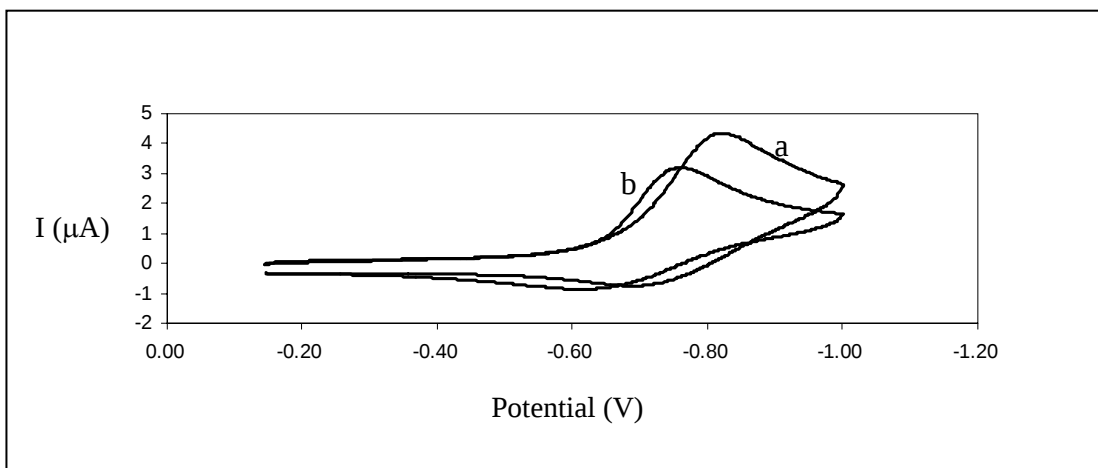
เทคนิคไซคลิกโวลแทมเมตรี เป็นเทคนิคทางไฟฟ้าเคมีที่ศึกษาการถ่ายโอนอิเล็กตรอนของสารหรือการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนกับ DNA ได้ โดยที่อันตรกิริยาที่เกิดขึ้นจะส่งผลให้กระแสไฟฟ้ามีค่าลดลงจากเดิม เมื่อเทียบกับสารละลายของสารประกอบเชิงซ้อนอย่างเดียว ในงานวิจัยนี้สนใจศึกษาเฉพาะสารประกอบเชิงซ้อนที่มีอันตรกิริยากับดีเอ็นเอ ได้แก่ [Ru(bpy)₂azpy]Cl₂·5H₂O [Ru(bpy)₂azpym]Cl₂·5H₂O [Ru(phen)₂azpy]Cl₂·6H₂O [Ru(phen)₂azpym]Cl₂·5H₂O [Ru(azpy)₂azpym](NO₃)₂·6H₂O [Ru(azpy)₃](NO₃)₂·4H₂O [Ru(azpy)₂bpy]Cl₂·5H₂O [Ru(azpy)₂phen]Cl₂·5H₂O โดยเตรียมให้มีความเข้มข้น 5 × 10⁻⁴ M และเตรียม สารละลายของ CT-DNA ให้มีความเข้มข้น 2.5 × 10⁻⁴ M โดยใช้ตัวทำละลายเป็น บัฟเฟอร์ (10mM Tris base + 50 mM NaCl) pH 7.2 และ DMSO อัตราส่วน 100:5 โดยปริมาตร เทคนิคทาง

ไฟฟ้าเคมีที่ใช้คือ cyclic voltammetry โดยใช้ working electrode เป็น glassy carbon quasi reference electrode เป็น platinum wire และ auxiliary electrode เป็น platinum disc และใช้ internal reference เป็น ferrocenemethanol ค่าของศักย์ไฟฟ้าของสารประกอบเชิงซ้อนที่ไม่มีดีเอ็นเอ และมีดีเอ็นเอ เทียบกับคู่ฟิคของ internal reference (โดยให้ค่า $E_{1/2}$ ของ ferrocenemethanol เป็น ศูนย์)

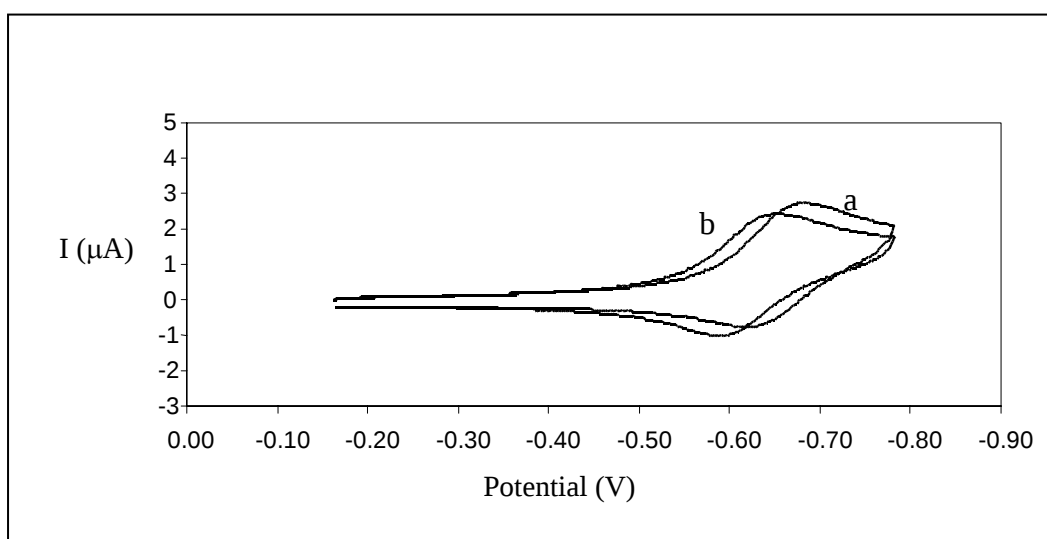
ในสภาวะ การทดลองนี้แสดงเฉพาะ ligand base reduction อยู่ในช่วง -0.3 ถึง -0.9 V ซึ่งผลที่ได้สามารถแบ่งเป็นสองกลุ่ม กล่าวคือ กลุ่มแรกแสดงลักษณะเฉพาะ cathodic peak ซึ่งมีสารประกอบเชิงซ้อนดังต่อไปนี้ $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{azpy}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{azpy}]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{azpym}](\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ และ $[\text{Ru}(\text{azpy})_3](\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ และกลุ่มที่สอง ลักษณะ ฟิคเป็น reversible couple ซึ่งมีสารประกอบเชิงซ้อนดังต่อไปนี้ $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{azpym}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{azpym}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{bpy}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ และ $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{phen}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

ในการเปรียบเทียบศักย์ไฟฟ้าในกลุ่มของ $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{L}]^{2+}$ L คือ azpy และ azpym ก็จะพบว่า $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{azpym}]^{2+}$ ให้ค่า ligand base reduction มากกว่าใน $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{azpy}]^{2+}$ นั้นแสดงว่า azpym เป็นลิแกนด์ที่รับอิเล็กตรอนได้ดีกว่า azpy ผลการทดลองทำนองเดียวกับพบในกลุ่มของ $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{L}]^{2+}$ เมื่อ L คือ azpy และ azpym นอกจากนี้แล้ว เมื่อสารประกอบเชิงซ้อนของรูทีเนียมที่มีลิแกนด์ทั้งสามตัวเป็นลิแกนด์ในกลุ่มเอโซอิมิน จะเกิด ligand base reduction ได้ง่ายกว่าลิแกนด์ในกลุ่มโพลีพริดีน นั่นคือสารประกอบเชิงซ้อนในกลุ่มที่มีลิแกนด์เอโซอิมิน สามารถเกิดอันตรกิริยากับดีเอ็นเอได้ดีกว่านั้นคือเกิดการเปลี่ยนแปลงค่าศักย์ไฟฟ้าที่มากกว่า เรียงลำดับการเปลี่ยนแปลงของศักย์ไฟฟ้าเมื่อมีดีเอ็นเอ จากมากไปน้อยในกลุ่มของเกลือ NO_3^- พบว่า $[\text{Ru}(\text{azpy})_3](\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ มีค่ามากกว่า $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{azpym}](\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ในกลุ่มของเกลือ Cl^- พบว่า $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{azpy}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O} > [\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{bpy}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O} > [\text{Ru}(\text{phen})_2\text{azpy}]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} > [\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{azpym}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O} > [\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{phen}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O} > [\text{Ru}(\text{phen})_2\text{azpym}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

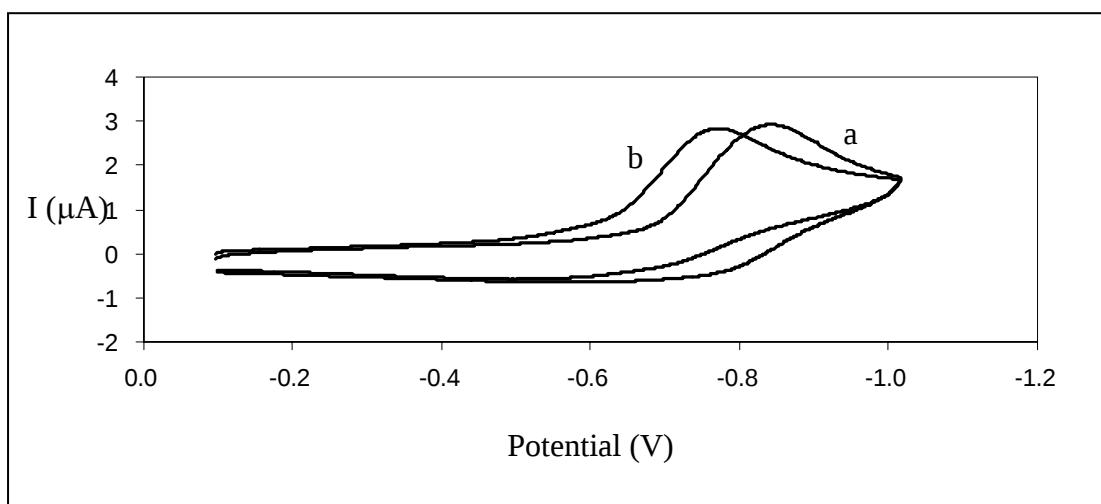
นอกจากนี้เมื่อเติมดีเอ็นเอลงในสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะรูทีเนียม ค่า E_{pa} E_{pc} และ $E_{1/2}$ เลื่อนไปทางศักย์ไฟฟ้าที่เป็นบวกมากขึ้น และค่า voltammetric current ของสารละลายลดลงอย่างมาก เมื่อเปรียบเทียบกับกรณีไม่มีดีเอ็นเอ เนื่องจากการแพร่ของสารประกอบเชิงซ้อนที่จับกับดีเอ็นเอเคลื่อนที่ช้าลง ผลจากการทดลองแสดง cyclic voltammograms ของสารประกอบเชิงซ้อน ดังรูปที่ 4.4.1-4.4.8 และ สรุปผลการศึกษาอันตรกิริยาของสารประกอบเชิงซ้อนของ รูทีเนียม (II) กับ CT-DNA ดังแสดงในตารางที่ 4.4.1



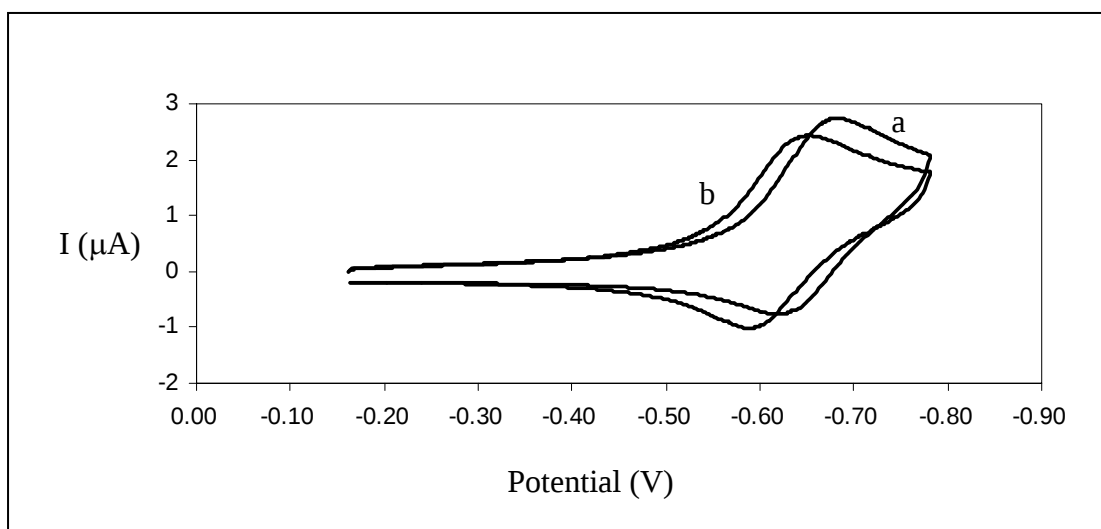
รูปที่ 4.4.1 แสดง cyclic voltammograms ของ 0.5 mM $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{azpy}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ เมื่อไม่มี DNA (a) และมี 2.5 mM DNA (b) ใน 5mM Tris base + 50 mM NaCl pH 7.2 (น้ำ : DMSO 100:5)



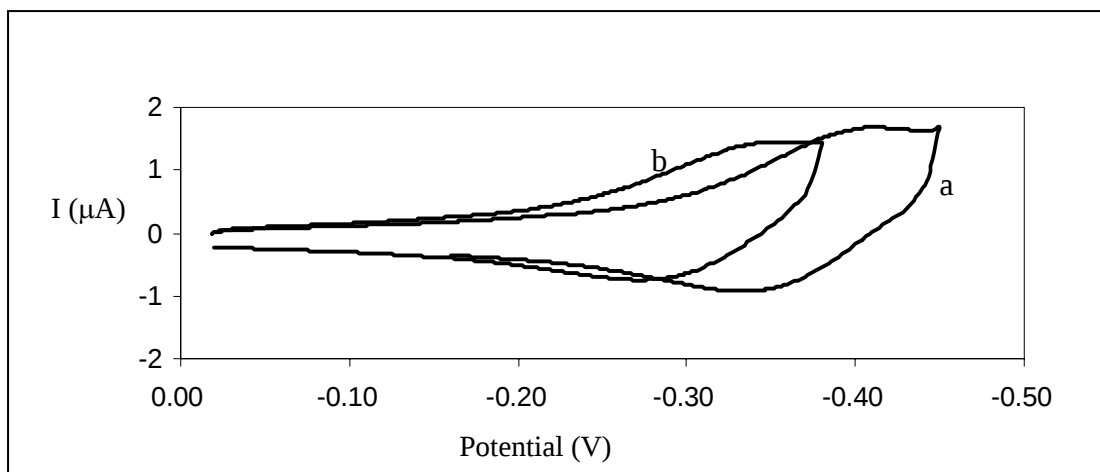
รูปที่ 4.4.2 แสดง cyclic voltammograms ของ 0.5 mM $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{azpym}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ เมื่อไม่มี DNA (a) และมี 2.5 mM DNA (b) ใน 5mM Tris base + 50 mM NaCl pH 7.2 (น้ำ : DMSO 100:5)



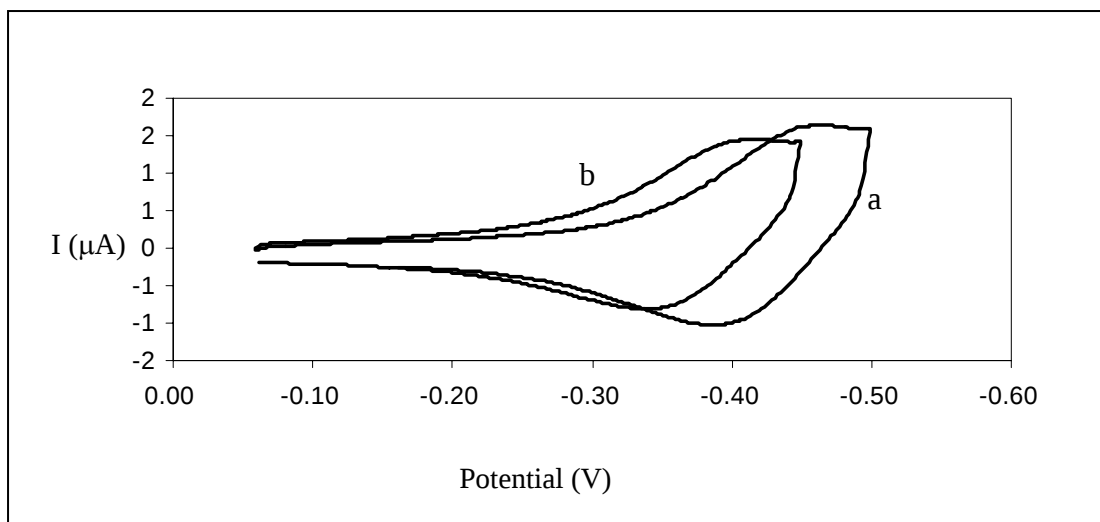
รูปที่ 4.4.3 แสดง cyclic voltammograms ของ $0.5 \text{ mM } [\text{Ru}(\text{phen})_2\text{azpy}]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ เมื่อไม่มี DNA (a) และ มี 2.5 mM DNA (b) ใน $5 \text{ mM Tris base} + 50 \text{ mM NaCl}$ pH 7.2 (น้ำ : DMSO 100:5)



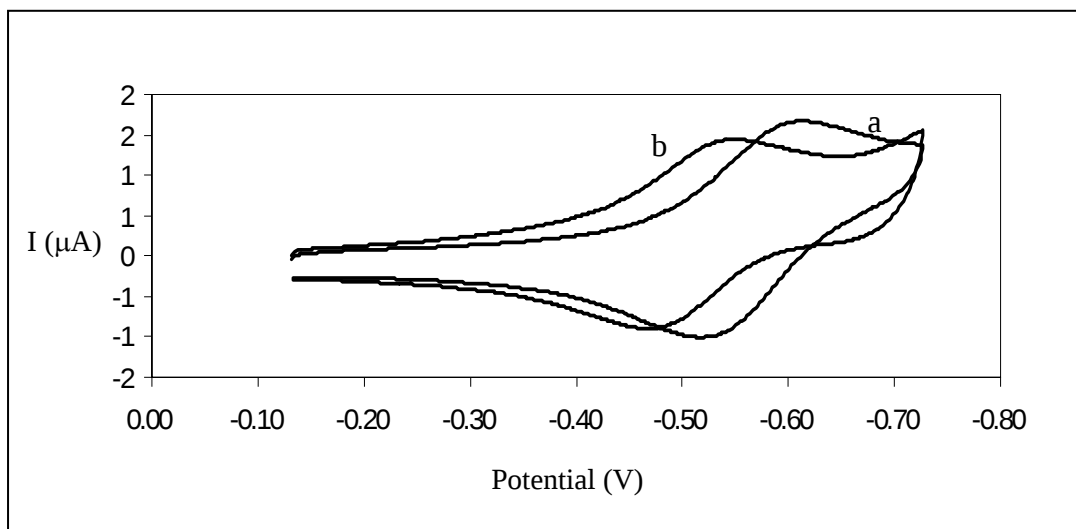
รูปที่ 4.4.4 แสดง cyclic voltammograms ของ $0.5 \text{ mM } [\text{Ru}(\text{phen})_2\text{azpym}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ เมื่อไม่มี DNA (a) และ มี 2.5 mM DNA (b) ใน $5 \text{ mM Tris base} + 50 \text{ mM NaCl}$ pH 7.2 (น้ำ : DMSO 100:5)



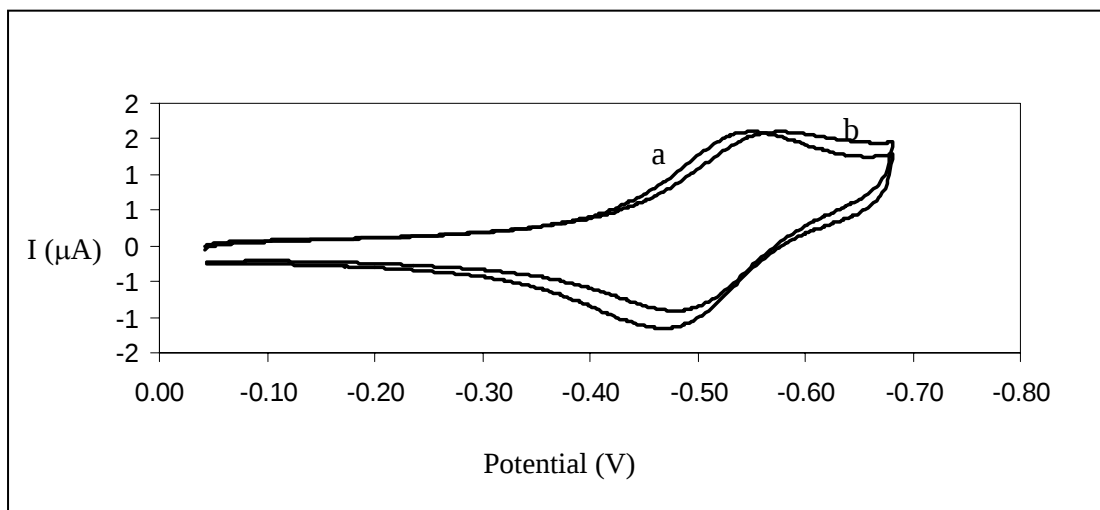
รูปที่ 4.4.5 แสดง cyclic voltammograms ของ $0.5 \text{ mM } [\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{azpym}](\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ เมื่อ ไม่มี DNA (a) และมี 2.5 mM DNA (b) ใน $5 \text{ mM Tris base} + 50 \text{ mM NaCl}$ pH 7.2 (น้ำ : DMSO 100:5)



รูปที่ 4.4.6 แสดง cyclic voltammograms ของ $0.5 \text{ mM } [\text{Ru}(\text{azpy})_3](\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ เมื่อ ไม่มี DNA (a) และมี 2.5 mM DNA (b) ใน $5 \text{ mM Tris base} + 50 \text{ mM NaCl}$ pH 7.2 (น้ำ : DMSO 100:5)



รูปที่ 4.4.7 แสดง cyclic voltammograms ของ 0.5 mM $[Ru(azpy)_2bpy]Cl_2 \cdot 5H_2O$ เมื่อ ไม่มี DNA (a) และมี 2.5 mM DNA (b) ใน 5mM Tris base + 50 mM NaCl pH 7.2 (น้ำ : DMSO 100:5)



รูปที่ 4.4.8 แสดง cyclic voltammograms ของ 0.5 mM $[Ru(azpy)_2phen]Cl_2 \cdot 5H_2O$ เมื่อ ไม่มี DNA (a) และมี 2.5 mM DNA (b) ใน 5mM Tris base + 50 mM NaCl pH 7.2 (น้ำ : DMSO 100:5)

ตารางที่ 4.4.1 แสดงผลจากเทคนิค cyclic voltammetry ของสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะ
รูทีเนียม ที่มี และ ไม่มี DNA

สาร	R [DNA]/[Ru]	E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	ΔE_p (mV)	$E_{1/2}$ (V)	$i_{pc}/i_{pc}(R=0)$
[Ru(bpy) ₂ azpy]Cl ₂ ·5H ₂ O	0	-	-0.827	58	-	1.30
	5	-	-0.769		-	
[Ru(bpy) ₂ azpym]Cl ₂ ·5H ₂ O	0	-0.616	-0.678	62	-0.647	1.08
	5	-0.590	-0.650	60	-0.620	
[Ru(phen) ₂ azpy]Cl ₂ ·6H ₂ O	0	-	-0.846	34	-	1.04
	5	-	-0.812		-	
[Ru(phen) ₂ azpym]Cl ₂ ·5H ₂ O	0	-0.634	-0.761	82	-0.675	1.22
	5	-0.626	-0.688	62	-0.657	
[Ru(azpy) ₂ azpym](NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0	-	-0.412	44	-	1.31
	5	-	-0.368		-	
[Ru(azpy) ₃](NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0	-	-0.450	58	-	1.50
	5	-	-0.392		-	
[Ru(azpy) ₂ bpy]Cl ₂ ·5H ₂ O	0	-0.527	-0.619	82	-0.573	1.44
	5	-0.447	-0.563	106	-0.520	
[Ru(azpy) ₂ phen]Cl ₂ ·5H ₂ O	0	-0.476	-0.558	82	-0.517	1.00
	5	-0.484	-0.590	106	-0.537	

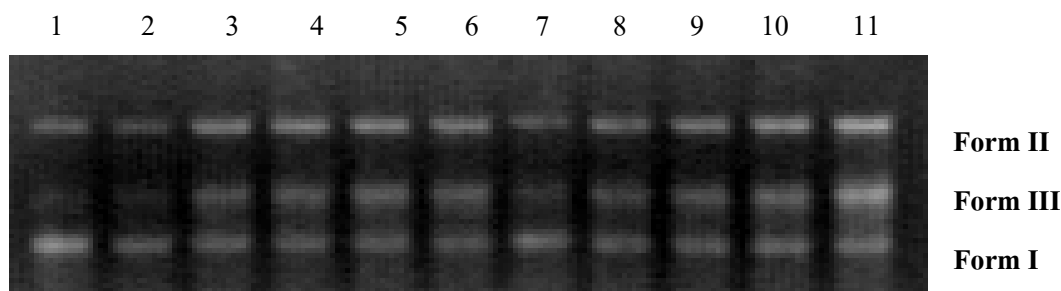
R = 0 เป็นสภาวะที่ไม่เติมดีเอ็นเอ

R = 5 เป็นสภาวะที่เติมดีเอ็นเอ

4.5 เทคนิคทางชีวเคมี (Electrophoresis)

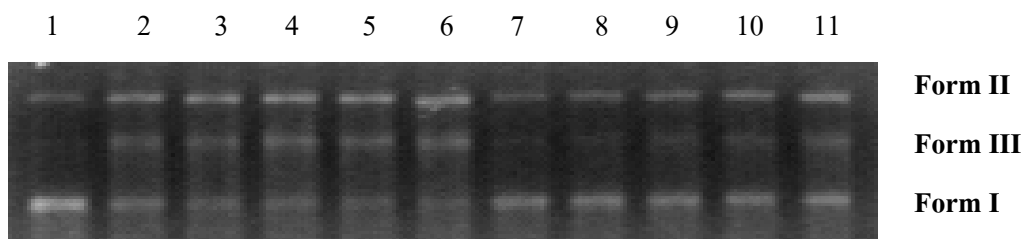
เทคนิคทางชีวเคมีที่ใช้แยกโมเลกุลต่าง ๆ ออกจากกันที่นิยม คือ อิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) ซึ่งสามารถแยกโมเลกุลต่าง ๆ ออกจากกันตามขนาดของโมเลกุล สำหรับการศึกษการตัดสายดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค agarose gel electrophoresis รูปของดีเอ็นเอ แบบ supercoiled หรือ Form I เคลื่อนที่เร็วที่สุด แต่เมื่อสายหนึ่งของดีเอ็นเอ ถูกตัด จะเกิดเป็น open circular หรือ Form II ซึ่งเคลื่อนที่ช้าลง แต่ถ้าทั้งสองสายของดีเอ็นเอ ถูกตัด จะเกิดเป็น linear หรือ Form III ซึ่งจะเคลื่อนที่อยู่ระหว่าง Form I และ Form II (5)

เตรียมสารประกอบเชิงซ้อนให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นที่ $500\ \mu\text{M}$ จากนั้นทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นดังต่อไปนี้ $20\ 40\ 60\ 80$ และ $100\ \mu\text{M}$ และเตรียมดีเอ็นเอ ให้มีความเข้มข้น $0.5\ \mu\text{g}/8\ \mu\text{L}$ ผ่านกระแสไฟฟ้า โดยกำหนดสภาวะของการ run gel คือ $70\ \text{V}$ ประมาณ 1 ชั่วโมง ใน tris-acetate บัฟเฟอร์ หลังจาก run gel เสร็จแล้ว ให้นำแผ่นเจลไปย้อมสีใน Ethidium bromide (EB) จากนั้นนำไปถ่ายภาพด้วยภายใต้แสงยูวี ผลที่ได้แสดงดังรูป 4.5.1-4.5.4



รูปที่ 4.5.1 แสดง electrophoresis ของ pBIND DNA เมื่อมีสารประกอบเชิงซ้อน $[\text{Ru}(\text{azpy})_3](\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ และ $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{azpym}](\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ lane 1 DNA lane 2-6 เป็นสารประกอบ $[\text{Ru}(\text{azpy})_3](\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ที่ความเข้มข้นต่างกัน ดังนี้ (2) 20 (3) 40 (4) 60 (5) 80 (6) $100\ \mu\text{M}$ lane 7-11 เป็นสารประกอบ $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{azpym}](\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ที่ความเข้มข้นต่างกัน ดังนี้ (7) 20 (8) 40 (9) 60 (10) 80 (11) $100\ \mu\text{M}$

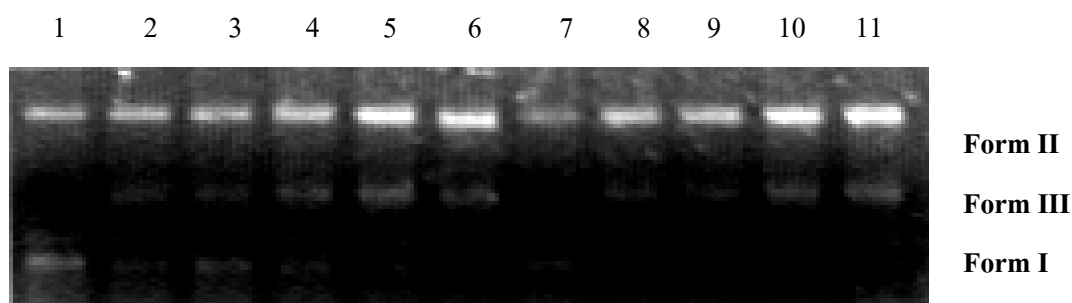
จากรูปแสดงให้เห็นว่าสารประกอบเชิงซ้อน $[\text{Ru}(\text{azpy})_3](\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ และ $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{azpym}](\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ สามารถตัดสายดีเอ็นเอได้และสามารถตัดสายได้มากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารเพิ่มขึ้น ซึ่งจากผล $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{azpym}](\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ มีความสามารถในการตัดสายดีเอ็นเอได้มากกว่า $[\text{Ru}(\text{azpy})_3](\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ เมื่อความเข้มข้นเท่ากัน



รูปที่ 4.5.2 แสดง electrophoresis ของ pBIND DNA เมื่อมีสารประกอบเชิงซ้อน

$[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{phen}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ และ $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{bpy}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ lane 1 DNA lane 2-6 เป็นสารประกอบ $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{phen}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ดังนี้ (2) 20 (3) 40 (4) 60 (5) 80 (6) 100 μM lane 7-11 เป็นสารประกอบ $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{bpy}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ดังนี้ (7) 20 (8) 40 (9) 60 (10) 80 (11) 100 μM

เมื่อพิจารณา จากรูปแสดงให้เห็นว่าสารประกอบเชิงซ้อน $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{phen}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ และ $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{bpy}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ สามารถตัดสายดีเอ็นเอได้ และสามารถตัดสายได้มากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารเพิ่มขึ้น ซึ่งจากข้อมูล $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{phen}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ มีความสามารถในการตัดสายดีเอ็นเอได้มากกว่า $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{bpy}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ เมื่อความเข้มข้นเท่ากัน

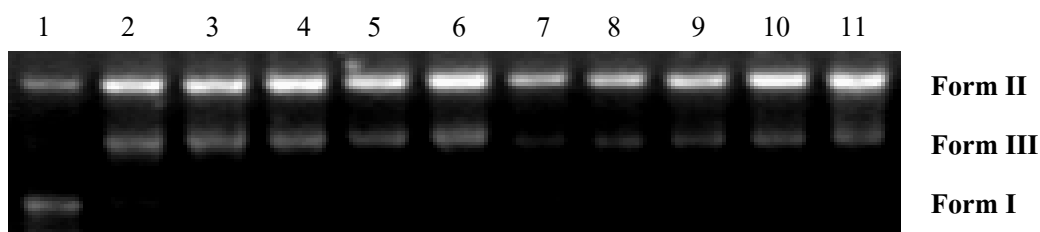


รูปที่ 4.5.3 แสดง electrophoresis ของ pBIND DNA เมื่อมีสารประกอบเชิงซ้อน

$[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{azpy}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ และ $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{azpym}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ lane 1 DNA lane 2-6 เป็นสารประกอบ $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{azpy}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ดังนี้ (2) 20 (3) 40 (4) 60 (5) 80 (6) 100 μM lane 7-11 เป็นสารประกอบ $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{azpym}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ดังนี้ (7) 20 (8) 40 (9) 60 (10) 80 (11) 100 μM

จากรูปเมื่อพิจารณาสารประกอบเชิงซ้อน $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{azpy}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ และ $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{azpym}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ จะเห็นว่าสารประกอบเชิงซ้อนทั้งสอง สามารถตัดสายดีเอ็นเอได้มากขึ้นเมื่อความ

เข้มข้นของสารเพิ่มขึ้น และสารทั้งสองสามารถตัดสายดีเอ็นเอได้เกือบเท่ากันเมื่อความเข้มข้นเท่ากัน



รูปที่ 4.5.4 แสดง electrophoresis ของ pBIND DNA เมื่อมีสารประกอบเชิงซ้อน $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{azpy}]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ และ $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{azpym}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ lane 1 DNA lane 2-6 เป็นสารประกอบ $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{azpy}]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ที่ความเข้มข้นต่างกัน ดังนี้ (2) 20 (3) 40 (4) 60 (5) 80 (6) 100 μM lane 7-11 เป็นสารประกอบ $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{azpym}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ที่ความเข้มข้นต่างกัน ดังนี้ (7) 20 (8) 40 (9) 60 (10) 80 (11) 100 μM

จากรูปแสดงให้เห็นว่าสารประกอบเชิงซ้อน $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{azpy}]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ และ $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{azpym}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ สามารถตัดสายดีเอ็นเอได้และสามารถตัดสายได้มากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารเพิ่มขึ้น ซึ่งจากข้อมูลเมื่อเทียบกับ lane ที่เป็นดีเอ็นเอ คือ lane 1 ทำให้เห็นว่า สารประกอบ $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{azpy}]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ และ $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{azpym}]\text{Cl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ มีความสามารถในการตัดสายดีเอ็นเอได้พอๆ กัน เมื่อความเข้มข้นเท่ากัน

References

- 1 A. Wolf, G. H. Shimer Jr., and T. Meehan, *Biochemistry*, **1987**, 26, 6392.
2. G. Cohen, H. Esisenberg, *Biopolymers*, **1969**, 8, 45.
3. C.L. Liu, J.Y. Zhou, H.B. Xu, *J. Inorg. Biochem.*, **1998**, 71, 1.
4. J.R. Lakowicz, G. Webber, *Biochemistry*, **1973**, 12, 4161.
5. J.K. Barton, A.L., Raphael, *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, 106, 2466.

การนำเสนอผลงาน

1. เสนอผลงานในที่ประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. วันที่ 13-15 ตุลาคม 2548 ณ โรงแรมริเจนท์ ซะอ่า จังหวัด เพชรบุรี

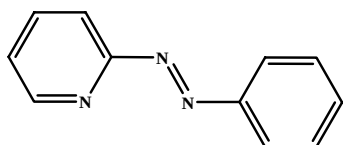
เรื่อง

Synthesis and DNA-Binding Studies of $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{azpy}]^{2+}$ and $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{azpym}]^{2+}$

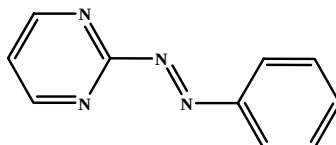
Kanidtha Hansongnern^a, Uraiwan Changsaluk^a, Luksamee Sahavisit^a, Waraporn Sirinawin^a, Walailak Puetpaiboon^a and Chaveng Pakawatchai^a,

^a Department of Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat-Yai, Songkhla 90112 Thailand

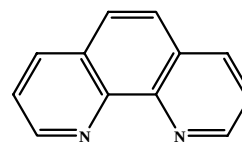
Mixed-ligand complexes of $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{azpy})]^{2+}$ (1) and $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{azpym})]^{2+}$ (2) (phen = 1,10-phenanthroline, azpy = 2-(phenylazo)pyridine, azpym = 2-(phenylazo)pyrimidine) have been synthesized and characterized by mass spectrometry. The interaction of two complexes with calf thymus DNA (CT-DNA) was investigated by spectroscopic methods. The intrinsic binding constants of 1 and 2 are $2.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ and $1.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, respectively.



azpy



azpym



phen

Keywords: Ruthenium(II) complexes, 1,10-phenanthroline, 2-(phenylazo)pyridine, 2-(phenylazo)pyrimidine, DNA binding

2. เสนอผลงานในที่ประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. วันที่ 12-14 ตุลาคม 2549 ณ โรงแรมริเจนท์ ซะอ่า จังหวัด เพชรบุรี

เรื่อง

Synthesis, characterization and DNA-binding studies of $[\text{Ru}(\text{azpy})_3]^{2+}$ and $[\text{Ru}(\text{azpy})_2(\text{azpym})]^{2+}$

Hansongnern, K.^a, Changsaluk, U.^a, Sahavisit, L.^a, Sirinawin, W.^a, Puetpaiboon, W.^a, Pakawatchai, C.^a

^a Department of Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat-Yai, Songkhla 90112 Thailand

Two new water-soluble complexes of $[\text{Ru}(\text{azpy})_3]^{2+}$ (1) and $[\text{Ru}(\text{azpy})_2(\text{azpym})]^{2+}$ (2) (azpy = 2-(phenylazo)pyridine, azpym = 2-(phenylazo)pyrimidine) have been synthesized and characterized by elemental analysis, UV-Vis and IR spectroscopies. The interaction of these complexes with calf-thymus DNA (CT-DNA) was investigated by spectroscopic methods and viscosity measurements. Absorption titrations of both complexes with CT-DNA were carried out and give similar results. However, the effects of complexes 1 and 2 together with $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ (phen = 1,10-phenanthroline) and ethidium bromide (EB) on the viscosity were observed. The results show that the increased degree of viscosity to DNA follow the order of $\text{EB} > 2 > 1 > [\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$. Based on the shape difference of ligands, we found that azpym gives stronger interaction with DNA than azpy.

Keywords: Ruthenium(II) complexes, pyridine, pyrimidine, 1,10-phenanthroline, DNA-binding