



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การสังเคราะห์ การพิสูจน์โครงสร้าง และการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของไอโอโนฟอร์
ชนิดใหม่ที่เป็นอนุพันธ์ของคาลิกซ์[4] สำหรับการพัฒนาเมมเบรนอิเล็กโทรดที่มี
ความจำเพาะเจาะจงสำหรับการตรวจวัดไอออนของแคดเมียม (II)

โดย

ผศ. ดร. จอมใจ สุกใส

มิถุนายน 2555

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การสังเคราะห์ การพิสูจน์โครงสร้าง และการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของไอโอโนฟอร์
ชนิดใหม่ที่เป็นอนุพันธ์ของคาลิกซ์[4] สำหรับการพัฒนาเมมเบรนอิเล็กโทรดที่มี
ความจำเพาะเจาะจงสำหรับการตรวจวัดไอออนของแคดเมียม (II)

โดย

ผศ. ดร. จอมใจ สุกใส

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Project Code : MRG5380064

Project Title : การสังเคราะห์ การพิสูจน์โครงสร้าง และการศึกษาความจำเพาะ
เจาะจงของไอโอโนฟอร์ชนิดใหม่ที่เป็นอนุพันธ์ของคาลิกซ์[4] สำหรับ
การพัฒนาเมมเบรนอิเล็กโทรดที่มีความจำเพาะเจาะจงสำหรับการ
ตรวจวัดไอออนของแคดเมียม (II)

Investigator : ผศ. ดร. จอมใจ สุกใส
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จ. ชลบุรี

E-mail Address : c.suksai@yahoo.com

Project Period : 2 ปี

Abstract

Fabrication of PVC membrane electrodes incorporating selective neutral carriers for Cd^{2+} was reported. The ionophores were designed to have different topologies, donor atoms and lipophilicity by attaching tripodal amine (TPA) units to the lipophilic anthracene (ionophore **L1**) and *p*-*tert*-butylcalix[4]arene (ionophores **L2**, **L3** and **L4**). The synthesized ionophores were incorporated to the plasticized PVC membranes to prepare Cd(II) ion selective electrodes (ISEs). The membrane electrodes were optimized by changing types and amounts of ionic sites and plasticizers. The selectivity of the membranes fabricated from the synthesized ionophores was evaluated, the relationship between structures of ionophores and membrane characteristics were explored. The ionophore **L4** which composed of two opposites TPA units on the calix[4]arene compartment showed the best selectivity toward Cd^{2+} . The Cd-ISE fabricated from ionophore **L4** exhibited good properties with a Nernstian response of $29.4 \pm 0.6 \text{ mV decade}^{-1}$ of activity for Cd^{2+} ions and a working concentration range of $1.6 \times 10^{-6} - 1.0 \times 10^{-2} \text{ M}$. The sensor has a fast response time of 10 s and can be used for at least 1 week without any divergence in potential. The electrode can be used in the pH range of 6.0–9.0. The proposed electrodes using ionophores **L3** and **L4** were employed as a probe for determining Cd^{2+} from the oxidation of CdS QDs solution and the real treatment waste water sample with excellent results.

Mono- and dinuclear Cu(II) complexes of *p*-*tert*-butylcalix[4]arene (**CuL2** and **Cu₂L4**, respectively) were synthesized, and their anion recognition abilities were explored. Recognition is efficiently signaled through the displacement of pyrocatechol violet bound to the receptor. For **Cu₂L4**, recognition selectivity is ascribed to the tuning of the distance between donor atoms of anion guests and their ability to encompass the Cu²⁺ - Cu²⁺ distance within the cleft of **Cu₂L4**. In addition, the preorganization of calix[4]arene in the cone conformation and steric hindrance of two bulky tripodal amine moieties are important factors in controlling the Cu²⁺ - Cu²⁺ distance. These factors caused **Cu₂L4** to recognize pyrophosphate selectively with respect to other inorganic anions in 80/20 (%v/v) MeCN/H₂O solution buffered with 10 mM HEPES at pH 6.4.

Keywords : Ionophore, Ion selective electrode, Indicator displacement assay,
Pyrophosphate anion

บทคัดย่อ

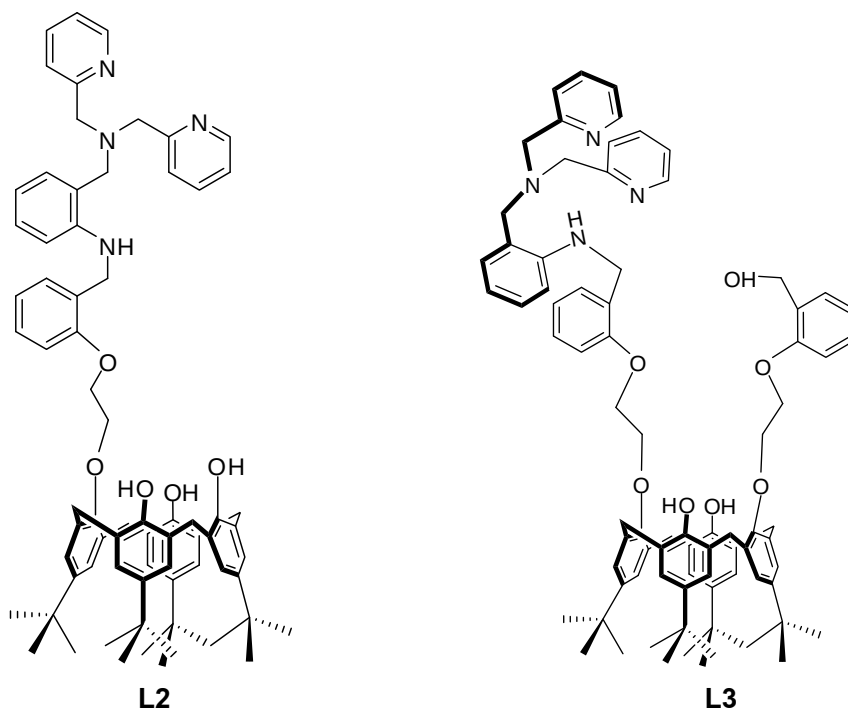
ได้มีการสังเคราะห์ไอโอโนฟอร์ที่เป็นอนุพันธ์ของ *p-tert-butylcalix[4]arene* ที่มีหมู่ไทรพอดเอมีน (TPA) เป็นองค์ประกอบภายในโมเลกุล (**L2-L4**) เพื่อนำมาเตรียมเป็นอิเล็กโทรดที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจวัดไอออนแคะเดเมียม (II) โดยทำการหาสภาวะการทดลองที่เหมาะสมในการเตรียมเมมเบรน จากการศึกษาพบว่าความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดไอออนแคะเดเมียม (II) มีความสัมพันธ์กับโครงสร้างของไอโอโนฟอร์ที่ใช้เตรียม โดยที่พบว่าเมมเบรนอิเล็กโทรดที่เตรียมจากไอโอโนฟอร์ **L4** มีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดมากที่สุด เนื่องจากมีค่า Nernstian response ในการตรวจวัดไอออนแคะเดเมียม (II) เท่ากับ 29.4 ± 0.6 mV decade⁻¹ สามารถตรวจวัดได้ในช่วงของค่า pH 6.0 – 9.0 ความเข้มข้นของไอออนแคะเดเมียม (II) ที่สามารถตรวจวัดได้อยู่ในช่วง 1.6×10^{-6} – 1.0×10^{-2} M และมีอายุการใช้งาน 1 สัปดาห์ นอกจากนี้แล้วยังนำอิเล็กโทรดที่เตรียมได้มาใช้ในการตรวจวัดไอออนแคะเดเมียม (II) ที่ได้จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ CdS quantum dot และตรวจวัดไอออนแคะเดเมียม (II) ในน้ำทิ้ง

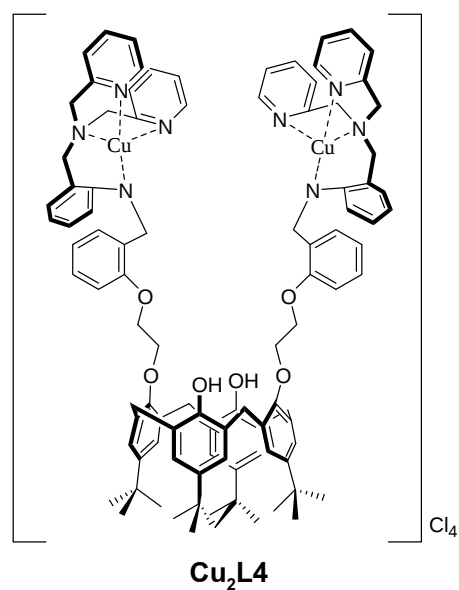
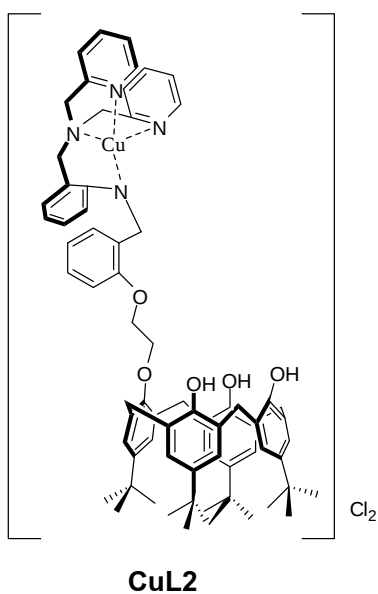
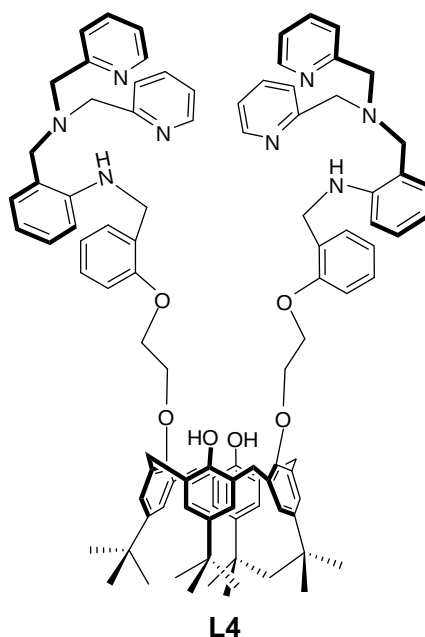
ได้มีการสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโนนิวเคลียร์และไดนิวเคลียร์ของคอปเปอร์ (II) กับลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของ *p-tert-butylcalix[4]arene* (**CuL2** และ **Cu₂L4**) เพื่อนำมาใช้เป็นตัวตรวจวัดแอนไอออนด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์และใช้อินดิเคเตอร์ pyrocatechol violet หรือ **PV** เป็นหน่วยให้สัญญาณ โดยใช้สารละลายผสมของ 80/20 (%v/v) MeCN/H₂O ในบัฟเฟอร์ HEPES ความเข้มข้น 10 mM ที่ pH 6.4 เป็นตัวทำละลาย จากการศึกษพบว่า มีเพียงสารประกอบ **Cu₂L4** เท่านั้นที่มีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดโรฟอสเฟตแอนไอออนได้เป็นอย่างดี ทั้งนี้เนื่องจากสารประกอบ **Cu₂L4** มีช่องว่างระหว่างไอออนของ Cu²⁺ - Cu²⁺ ที่เหมาะสมในการเกิดพันธะโคออร์ดิเนตโควาเลนต์กับแอนไอออนมากกว่าสารประกอบ **CuL2** นอกจากนี้แล้วโครงสร้างที่แข็งแรงของคาลิกซ์[4]แอรีนประกอบกับความเกาะของหมู่ไทรพอดเอมีนทั้ง 2 หมู่ที่อยู่ในโครงสร้างของสารประกอบ **Cu₂L4** ยังเป็นส่วนที่สำคัญในการควบคุมระยะห่างระหว่างไอออนของ Cu²⁺ - Cu²⁺

Keywords : ไอโอโนฟอร์, เมมเบรนอิเล็กโทรดสำหรับการตรวจวัดไอออน, เทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์, ไพโรฟอสเฟตแอนไอออน

Executive Summary

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการสังเคราะห์ไอโอโนฟอร์ที่เป็นอนุพันธ์ของคาลิกซ์[4]แอรีนที่มีหมู่ไพโรพอดเอมีน (TPA) เป็นองค์ประกอบภายในโมเลกุล (**L2-L4**) เพื่อนำมาเตรียมเป็นอิเล็กโทรดที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจวัดไอออนแควตเมียม (II) นอกจากนี้แล้วยังได้นำสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโนนิวเคลียร์และไดนิวเคลียร์ของคอปเปอร์ (II) กับลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของคาลิกซ์[4]แอรีน (**CuL2** และ **Cu₂L4**) มาใช้เป็นตัวตรวจวัดไฟโรฟอสเฟต แอนไอออนด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์และใช้อินดิเคเตอร์ pyrocatechol violet หรือ **PV** เป็นหน่วยให้สัญญาณ โครงสร้างของไอโอโนฟอร์ **L2 – L4** และสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **CuL2** และ **Cu₂L4** แสดงได้ดังรูป





ดังนั้นในรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์นี้จึงประกอบไปด้วยงานวิจัย 2 เรื่องคือ

1. การสังเคราะห์ และการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของไอโอโนฟอร์ชนิดใหม่ที่เป็นอนุพันธ์ของคาลิกซ์[4]แอรีน สำหรับการพัฒนาเมมเบรนอิเล็กทรอนิกส์ที่มีความจำเพาะเจาะจงสำหรับการตรวจวัดไอออนของแคดเมียม (II)
2. การนำสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์ของคอปเปอร์ (II) กับลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของคาลิกซ์[4]แอรีนมาใช้เป็นเซ็นเซอร์ทางเคมีสำหรับการตรวจวัดไพโรฟอสเฟตแอนไอออนด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์

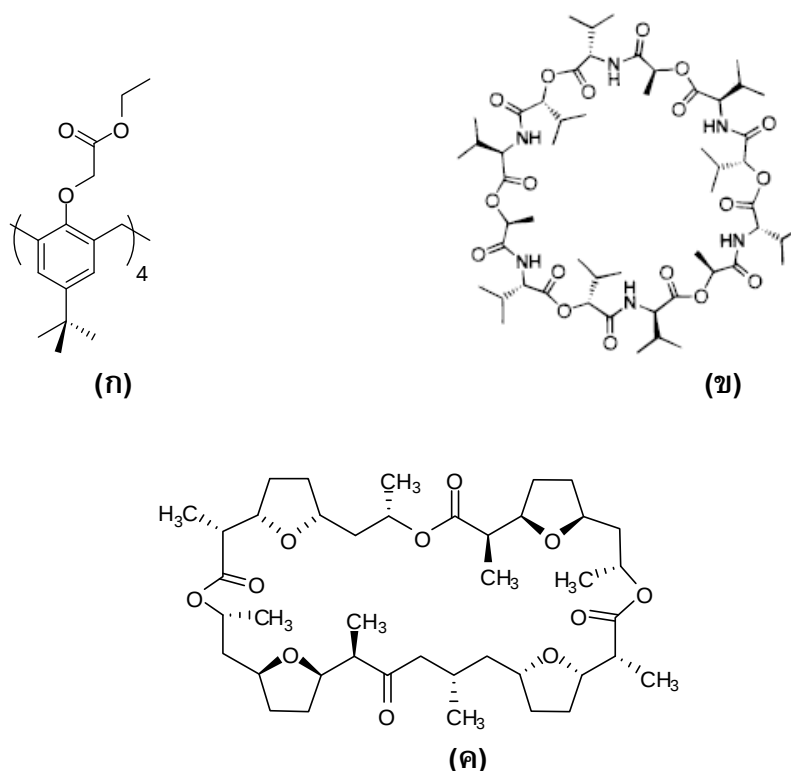
บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันโมเลกุลรีเซปเตอร์ (molecular receptor) ได้รับการพัฒนาและสังเคราะห์ขึ้นมาเป็นจำนวนมากเพื่อนำมาศึกษาอันตรกิริยาและความจำเพาะเจาะจงกับไอออนหรือโมเลกุลที่ต้องการตรวจวัด¹⁻³ ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการพัฒนางานวิจัยทางชีวภาพและทางการแพทย์ เช่นการออกแบบตัวรับยังการทำงานของเอนไซม์⁴ การออกแบบ stationary phase เพื่อแยกโปรตีนให้มีความบริสุทธิ์สูงในเทคนิคโครมาโทกราฟี⁵ นอกจากนี้แล้วยังได้มีการนำเอาโมเลกุลรีเซปเตอร์มาพัฒนาต่อยอดเป็นอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์เพื่อนำไปใช้งานในการตรวจวัดได้จริงเพื่อเป็นการเพิ่มคุณค่าของตัวเลือกจับดังกล่าว ซึ่งหนึ่งในอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ที่ได้รับความสนใจและมีการพัฒนาเป็นอย่างมากในปัจจุบันคือเมมเบรนอิเล็กโทรดที่มีความจำเพาะเจาะจงกับไอออน (membrane ion selective electrode)⁶ เพราะการตรวจวัดไอออนด้วยเทคนิคดังกล่าวนี้ทำได้ง่าย มีสภาพไวในการวิเคราะห์สูง มีความจำเพาะเจาะจงต่อไอออนที่ต้องการตรวจวัดเป็นอย่างดี และยังไม่มีผลกระทบจากสีหรือความขุ่นของสารตัวอย่าง และที่สำคัญคือเทคนิคดังกล่าวนี้ยังสามารถตรวจวัดได้ทั้งไอออนบวกและไอออนลบขึ้นอยู่กับชนิดของโมเลกุลรีเซปเตอร์ (หรือที่เรียกว่าไอโอโนฟอร์) ที่นำมาเตรียมเป็นอิเล็กโทรด

ในการวิเคราะห์ไอออนบวกนั้นโมเลกุลที่นิยมนำมาเตรียมเป็นไอโอโนฟอร์ได้แก่อนุพันธ์ของ *p-tert-butyl-calix[n]arene*⁶ ซึ่งในปัจจุบันนี้สารประกอบ *p-tert-butyl-calix[4]arene tetraethylester*⁷ ได้ถูกผลิตขึ้นมาขายทางการค้าเพื่อใช้เป็นไอโอโนฟอร์สำหรับการวิเคราะห์ Na^+ (sodium ionphore X ผลิตภัณฑ์ของบริษัท FLUKA) นอกจากอนุพันธ์ของ calix[4]arene แล้วอนุพันธ์ของควาโนอีเธอร์⁶ และยาปฏิชีวนะ (antibiotics) ตัวอย่างเช่น valinomycin^{8,9} และ nonactin¹⁰ และโมเลกุลของลิแกนด์ที่เป็นที่รู้จักกันดี เช่น 1,10-phenanthroline¹¹ และ 2,2-bipyridine¹² ก็นิยมนำมาทำเป็นไอโอโนฟอร์สำหรับไอออนของโลหะด้วยเช่นกัน ซึ่งอิเล็กโทรดที่เตรียมได้จากไอโอโนฟอร์ตามที่ได้กล่าวมาแล้วบางชนิดนั้นได้ถูกนำไปใช้งานในด้านการแพทย์อยู่ในปัจจุบัน⁶ โครงสร้างของไอโอโนฟอร์สำหรับการตรวจวัดไอออนของโลหะแสดงได้ดังรูปที่ 1 สำหรับไอโอโนฟอร์ที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ไอออนลบนั้นโมเลกุลที่นิยมนำมาเตรียมได้แก่สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดต่าง ๆ เช่น สารประกอบโคออร์ดิเนชันของ Rh(III) กับลิแกนด์ bipyridine¹³ และสารประกอบโคออร์ดิเนชันของ Cd(II) กับลิแกนด์ประเภท Schiff-base¹⁴

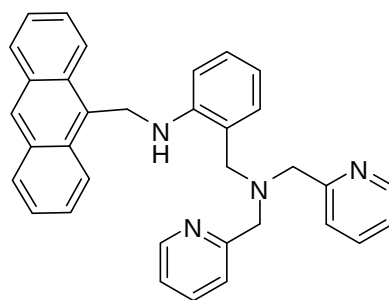
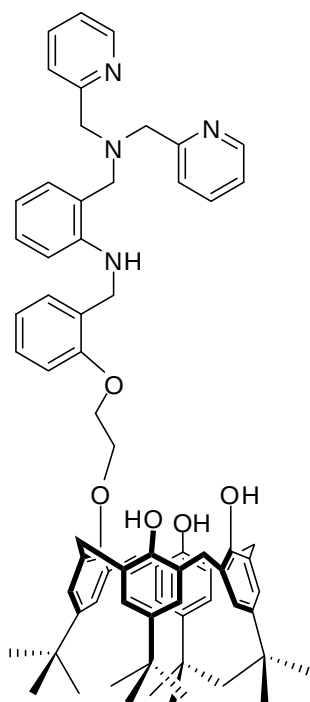
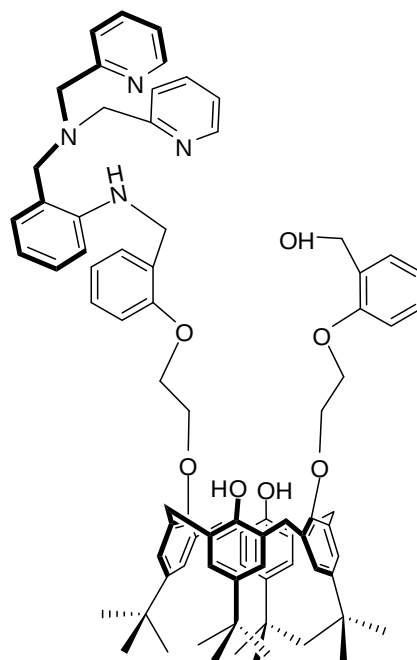
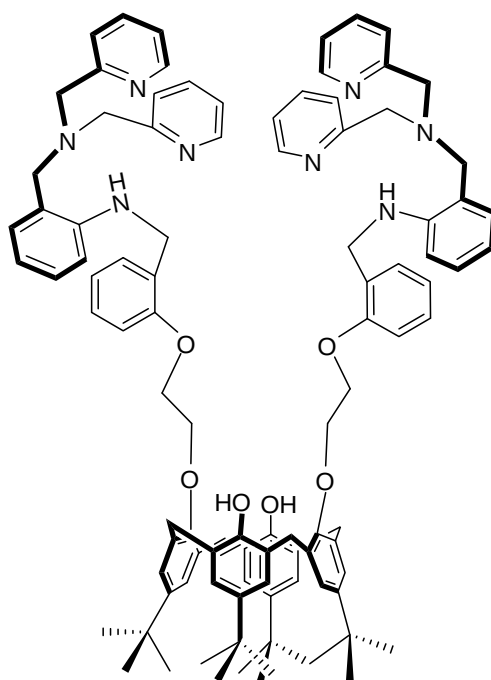


รูปที่ 1 โครงสร้างของไอโอโนฟอร์ที่ถูกนำมาใช้สำหรับการตรวจวัดไอออนของโลหะ (ก) *p*-*tert*-butyl-calix[4]arene tetraethylester (ข) valinomycin และ (ค) nonactin

การเตรียมเมมเบรนอิเล็กโทรดที่มีความจำเพาะเจาะจงกับไอออนนั้นกระทำได้โดยการนำเอาไอโอโนฟอร์ที่สังเคราะห์ได้มาผสมกับพอลิเมอร์ plasticizer และ ion exchanger ซึ่งพอลิเมอร์ที่นิยมใช้คือ poly(vinyl chloride) หรือ PVC หลังจากนั้นจึงนำเมมเบรนที่เตรียมได้ไปประกอบกับขั้วไฟฟ้าเพื่อเตรียมเป็นอิเล็กโทรดสำหรับการตรวจวัด ดังนั้นทั้งไอโอโนฟอร์และ plasticizer ต้องมีความสามารถในการละลายน้ำที่ต่ำหรือมีความเป็นไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) ที่สูงพอที่จะละลายอยู่ในเมมเบรนซึ่งจะทำให้อิเล็กโทรดที่เตรียมขึ้นมามีความเสถียรและมีประสิทธิภาพในการตรวจวัดที่ดี ซึ่งปัญหาที่สำคัญในการเตรียมเมมเบรนเพื่อนำมาใช้เป็นอิเล็กโทรดนั้นคือการที่ไอโอโนฟอร์และ plasticizer ที่ใช้มีความเป็นไฮโดรโฟบิกที่ไม่เพียงพอ¹⁵ ดังนั้นเมื่อนำอิเล็กโทรดดังกล่าวมาใช้งานในการวิเคราะห์สารตัวอย่างจริงซึ่งอยู่ในตัวทำละลายที่เป็นน้ำนั้น ไอโอโนฟอร์หรือ plasticizer ดังกล่าวที่ละลายอยู่ในเมมเบรนจะสามารถละลายออกมาได้ ซึ่งส่งผลให้ประสิทธิภาพ เสถียรภาพและสภาพไวของอิเล็กโทรดดังกล่าวมีค่าต่ำลง ในปัจจุบันนี้การแก้ปัญหาดังกล่าวกระทำโดยการสังเคราะห์ plasticizer และไอโอโนฟอร์ให้มีความสามารถในการละลายน้ำที่ต่ำลง^{16,17} แต่อย่างไรก็ตามในการสังเคราะห์ plasticizer ให้มีความเป็นไฮโดรโฟบิกที่เพิ่มขึ้นนั้นยังมีปัญหาในขั้นตอนของการสังเคราะห์ ดังนั้นทางแก้ไขปัญหาดังกล่าวจึงมุ่งความสนใจมาที่การเพิ่มความเป็นไฮโดรโฟ

บิกให้กับโมเลกุลของไอโอโนฟอร์ โดยการสังเคราะห์ไอโอโนฟอร์ที่เป็นอนุพันธ์ของโมเลกุลที่มีความเป็นไฮโดรโฟบิกที่ค่อนข้างสูงโดยมีส่วนของหน่วยเลือกจับกับไอออนที่ต้องการวิเคราะห์เป็นส่วนประกอบของไอโอโนฟอร์ ซึ่งโมเลกุลที่นิยมนำมาใช้เป็นโครงสร้างหลักของไอโอโนฟอร์ ได้แก่ calix[n]arene นอกจากนี้การเพิ่มสมบัติความเป็นไฮโดรโฟบิกให้กับไอโอโนฟอร์อีกวิธีหนึ่งที่นิยมคือการเพิ่มหมู่ที่มีความสามารถในการละลายน้ำได้น้อย เช่น สารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดที่เป็นวง^{18,19} หรือสารประกอบอะโรมาติก²⁰ เช่น แอนทราซีนและแนฟทาลีนเข้าไปในโมเลกุลของไอโอโนฟอร์

จากงานวิจัยที่ทางคณะผู้วิจัยได้รับทุนส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่ของ สกว (MRG5080149) ซึ่งได้ทำการสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนต์เซนเซอร์สำหรับกรดอะมิโนโดยใช้ลิแกนด์ที่มีแอนทราซีนเป็นองค์ประกอบนั้น พบว่าฟลูออเรสเซนต์เซนเซอร์โมเลกุล **L1** ที่มีหน่วยให้สัญญาณคือ แอนทราซีนและมีหน่วยของ tripodal amine เป็นหน่วยเลือกจับกับไอออนของโลหะ สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นไอโอโนฟอร์และมีแนวโน้มที่จะนำไปพัฒนาเป็นเมมเบรนอิเล็กโทรดที่มีความจำเพาะเจาะจงกับไอออนของ Cd^{2+} ได้ แต่ปัญหาที่พบคือเมื่อไอโอโนฟอร์ **L1** จับกับไอออนของโลหะแล้วจะเกิดเป็นไอออนเชิงซ้อนที่สามารถละลายน้ำได้ ดังนั้นไอออนเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นในขณะทำการวิเคราะห์จึงสามารถละลายออกมาจากเมมเบรน ซึ่งจะส่งผลต่อประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ไอออนโลหะของอิเล็กโทรดดังกล่าวโดยตรง ดังนั้นทางกลุ่มผู้วิจัยจึงมีความคิดที่จะเพิ่มความเป็นไฮโดรโฟบิกของโมเลกุลของไอโอโนฟอร์ **L1** โดยการนำหน่วยของ tripodal amine มาเป็นส่วนประกอบบนโมเลกุลที่มีความเป็นไฮโดรโฟบิกที่มากยิ่งขึ้น ซึ่งโมเลกุลของไอโอโนฟอร์ที่ต้องการพัฒนาขึ้นมาใหม่ในงานวิจัยนี้ได้แก่อนุพันธ์ของ *p-tert-butyl-calix[4]arene* **L2 – L4** ที่มีหมู่ tripodal amine เป็นหน่วยเลือกจับไอออนของโลหะ หลังจากการสังเคราะห์ไอโอโนฟอร์ชนิดใหม่ดังกล่าวได้แล้วจึงนำไปศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการเตรียมเป็นเมมเบรนเพื่อนำมาใช้เป็นอิเล็กโทรดที่มีความจำเพาะเจาะจงกับไอออนของโลหะต่อไป องค์ความรู้ใหม่ที่จะได้จากงานวิจัยนี้คือได้เมมเบรนอิเล็กโทรดที่มีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดไอออนของ Cd^{2+}

**L1****L2****L3****L4**

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อสังเคราะห์และศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกับไอออนของโลหะของไอโอโนฟอร์ **L2 – L4** ในการนำมาพัฒนาเป็นเมมเบรนอิเล็กโทรดชนิดใหม่สำหรับการตรวจวัดไอออนของโลหะ

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 สังเคราะห์และพิสูจน์โครงสร้างลิแกนด์ **L2 – L4** ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติก เรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (NMR) และแมสสเปกโตรเมตรี

1.3.2 ศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกับไอออนของโลหะของไอโอโนฟอร์ทั้งสามชนิดด้วยเทคนิคเมมเบรนอิเล็กโทรดที่มีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัด

1.4 ประโยชน์ที่จะได้รับการวิจัย

ได้ไอโอโนฟอร์ชนิดใหม่ที่สามารถนำไปพัฒนาเป็นอิเล็กโทรดที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจวัดไอออนของโลหะ Cd^{2+}

บทที่ 2

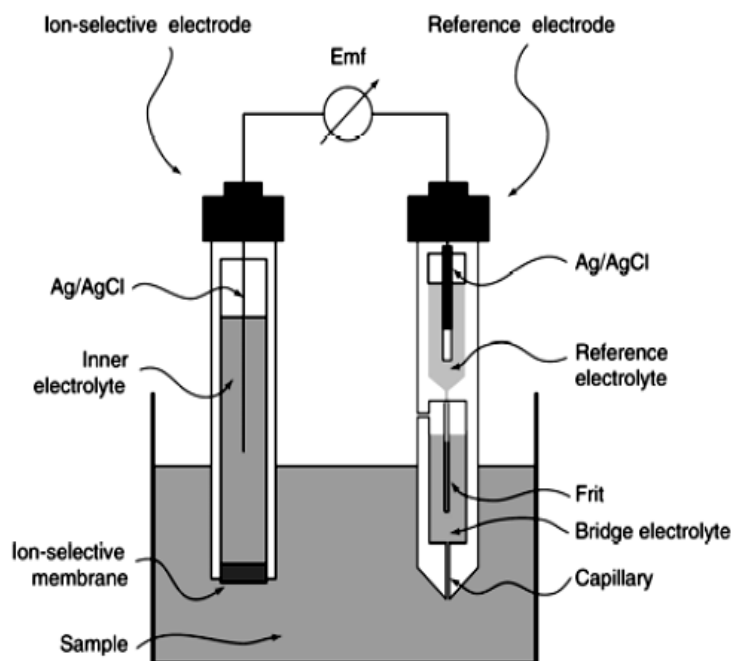
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1.1 การวิเคราะห์ไอออนด้วยเทคนิคโพเทนชิโอเมตรี²¹

เทคนิคการตรวจวัดทางโพเทนชิโอเมตรีเป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็ว สะดวกสบาย ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ต่ำ ให้ความเที่ยงและความแม่นยำที่ดี อีกทั้งไม่ต้องการความชำนาญของผู้วิเคราะห์มากนัก เทคนิคโพเทนชิโอเมตรีที่ตรวจวัดด้วยอิเล็กโทรดทำงาน (working electrode) ที่มีความเลือกจำเพาะต่อไอออนอาจเรียกว่าอิเล็กโทรดชี้วัดเฉพาะไอออน (Ion Selective Electrode, ISE) อิเล็กโทรดชี้วัดเฉพาะไอออนนี้เป็นอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ไอออนของสารที่สนใจจะวิเคราะห์ โดยสามารถตรวจวัดได้เฉพาะสารตัวอย่างที่มีประจุเท่านั้น หลักการของเทคนิคนี้จะเป็นการวัดค่าความต่างศักย์ที่เกิดขึ้นบริเวณผิวหน้าของอิเล็กโทรดชี้วัดเฉพาะไอออนเทียบกับอิเล็กโทรดอ้างอิง (reference electrode)

ส่วนประกอบที่สำคัญของการตรวจวัดด้วยเทคนิคโพเทนชิโอเมตรีประกอบไปด้วย อิเล็กโทรดชี้วัดเฉพาะไอออน อิเล็กโทรดอ้างอิง และเครื่องวัดความต่างศักย์ที่สามารถวัดความต่างศักย์ในระดับมิลลิโวลต์ ดังแสดงในรูปที่ 2.1 โดยอิเล็กโทรดอ้างอิงควรที่จะให้ศักย์ไฟฟ้าที่คงที่ ตลอดช่วงเวลาที่ใช้ในการวัด อิเล็กโทรดชี้วัดเฉพาะไอออนทำหน้าที่เป็นอิเล็กโทรดทำงาน ต้องมีความสามารถในการเลือกจำเพาะต่อการตรวจวัดแอกทีวิตีของไอออนที่สนใจได้ ซึ่งลักษณะที่สำคัญของอิเล็กโทรดนี้คือสามารถตอบสนองได้อย่างรวดเร็ว ให้ช่วงความเข้มข้นที่จะตรวจวัดที่กว้างมาก สามารถใช้งานได้แม้กระทั่งสารละลายที่ขุ่นหรือมีสี ไม่ทำลายสารที่จะวิเคราะห์ และราคาไม่แพง

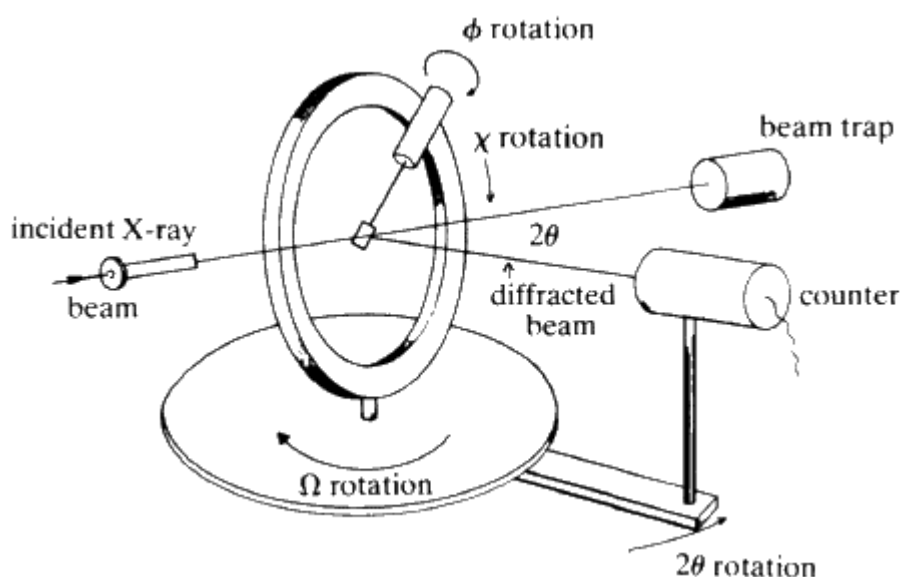


รูปที่ 2.1 แสดงส่วนประกอบของเทคนิคโพเทนชิโอเมตรี

อิเล็กโทรดชนิดเฉพาะไอออนมีส่วนประกอบสำคัญคือ ส่วนของเมมเบรนนั้นประกอบไปด้วยโมเลกุลที่มีความจำเพาะเจาะจงของสารที่ทำการตรวจวัด (ไอโอโนฟอร์) และด้วยวัสดุที่ให้ความสามารถในการเลือกผ่านเข้าออกของไอออน (permselective ion-conducting materials) ที่ใช้แยกระหว่างตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ออกจากสารละลายที่บรรจุไว้ภายในอิเล็กโทรด หรือเรียกว่า สารละลายอ้างอิงภายใน (inner filling solution) ซึ่งประกอบด้วยสารละลายที่มีแอกทิวิตีที่คงที่ของไอออนของสิ่งที่จะวิเคราะห์อยู่ลักษณะทั่วไปของเมมเบรนมักจะไม่มีรูพรุน ไม่ละลายน้ำหรือละลายได้ยากมาก และทนต่อแรงภายนอก ส่วนประกอบของเมมเบรนถูกออกแบบมาเพื่อให้สามารถวัดศักย์ไฟฟ้าอันเกิดเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงแอกทิวิตีของไอออนได้ด้วยกระบวนการที่เกิดความจำเพาะเจาะจงได้ที่ผิวของเมมเบรนกับสารละลาย เช่น การเกิดการแลกเปลี่ยนไอออน การเกิดสารเชิงซ้อน การเกิดเป็นสารประกอบที่ละลายได้ยาก เป็นต้น การแสวงหาเมมเบรนที่ให้ความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจวัดไอออนอาจทำได้โดยการเปลี่ยนชนิดของวัสดุที่นำมาทำเมมเบรน หรืออาจเปลี่ยนโมเลกุลของไอโอโนฟอร์

2.1.2 การวิเคราะห์โครงสร้างของสารประกอบด้วยเทคนิคเอกซ์เรย์คริสตัลโลกราฟี²²

เทคนิคเอกซ์เรย์คริสตัลโลกราฟีเป็นเทคนิคที่ใช้ศึกษาโครงสร้างของโมเลกุลโดยการฉายรังสีเอกซ์ไปยังผลึกของสารที่ต้องการศึกษา เมื่อผลึกถูกยิงด้วยรังสีเอกซ์สิ่งที่เกิดขึ้นคือรังสีเอกซ์จะชนเข้ากับอิเล็กตรอนที่อยู่ในโมเลกุลของสาร ทำให้เกิดการกระเจิงของรังสีและเกิดการหักเหของรังสีซึ่งมีทิศทางที่แตกต่างกันไปตามมุมและระนาบที่ตกกระทบ ดังนั้นทำให้เกิดโอกาสที่รังสีจะรวมตัวกันหรือหักล้างกันซึ่งเป็นคุณสมบัติทั่วไปของคลื่น หากรังสีเกิดการรวมตัวกันจะทำให้ได้เป็นรังสีที่มีความเข้มสูงมากพอและวิ่งผ่านไปตกกระทบบนดีเทคเตอร์ของเครื่องมือ ทำให้เกิดเป็นจุดสีดำบนดีเทคเตอร์ซึ่งจุดแต่ละจุดก็คือ ความเข้มของรังสีที่เป็นผลลัพธ์จากแสงย่อย ๆ รวมตัวกัน จุดหลาย ๆ จุดบนดีเทคเตอร์ เรียกรวมกันว่า diffraction pattern และสำหรับรังสีที่หักล้างกันจะหายไปและไม่ตกกระทบบนดีเทคเตอร์ เมื่อได้ diffraction pattern แล้วจะนำข้อมูลไปคำนวณว่าจุดแต่ละจุดเกิดจากตกกระทบของรังสีที่มาจากอิเล็กตรอนใดซึ่งหมายความว่าแต่ละจุดบน diffraction pattern เปรียบได้กับแผนที่บอกให้ทราบว่ามาจากอิเล็กตรอนตัวใดในโมเลกุล ดังนั้นถ้าเราทราบตำแหน่งอิเล็กตรอนในโมเลกุลได้แล้วก็จะเท่ากับทราบว่ารูปร่างของโมเลกุลเป็นอย่างไร เนื่องจากโมเลกุลสร้างมาจากอะตอมและอะตอมมีอิเล็กตรอนเป็นองค์ประกอบเปรียบเสมือนการวาดภาพต่อจุดที่ให้เรลากเส้นจากจุด 1 ไป 2 และไปยังจุดต่อ ๆ ไป จนถึงจุดสุดท้ายเราก็จะทราบว่าเราได้ภาพอะไร จุดในภาพวาดที่ได้ ก็คือตำแหน่งของอิเล็กตรอนในโมเลกุล โดยหลักการทำงานของเครื่องเอกซ์เรย์คริสตัลโลกราฟีแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 หลักการทำงานของเครื่องเอกซ์เรย์คริสตัลโลกราฟี⁽⁸⁾

เทคนิคที่ใช้หลักการการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์นี้สามารถแบ่งได้เป็น 2 เทคนิค ได้แก่

1. เทคนิคการวิเคราะห์แบบผลึกเดี่ยว (Single-Crystal Methods)

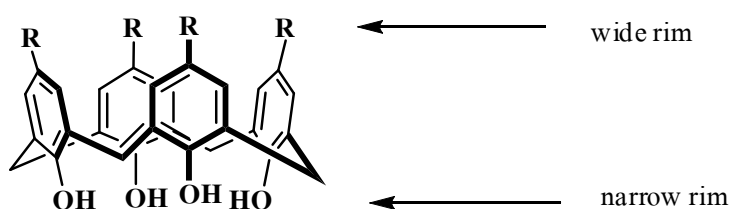
เทคนิคนี้ใช้ในการพิสูจน์โครงสร้างของสารประกอบ โดยที่สารตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์นั้นต้องอยู่ในรูปของผลึกเดี่ยวที่สมบูรณ์ ซึ่งวิธีการดั้งเดิมนั้นจะทำได้โดยการยัดให้ผลึกติดอยู่กับที่และทำการเปลี่ยนแปลงค่าความยาวคลื่นของรังสีเอ็กซ์ แต่สำหรับในปัจจุบันนั้นทำได้โดยการหมุนผลึกไปเป็นมุมต่าง ๆ กัน และใช้รังสีเอ็กซ์ที่มีความยาวคลื่นค่าเดียว ซึ่งให้ผลการทดลองที่มีความแม่นยำมากกว่าวิธีแรก

2. เทคนิคการวิเคราะห์แบบผง (Powder Methods)

การวิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้วิธีนี้นั้น สารตัวอย่างต้องเป็นของแข็งที่มีลักษณะเป็นผงละเอียด ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้จะใช้บอกองค์ประกอบและตรวจวัดความสัมพันธ์ของธาตุที่มีอยู่ในสารผสม

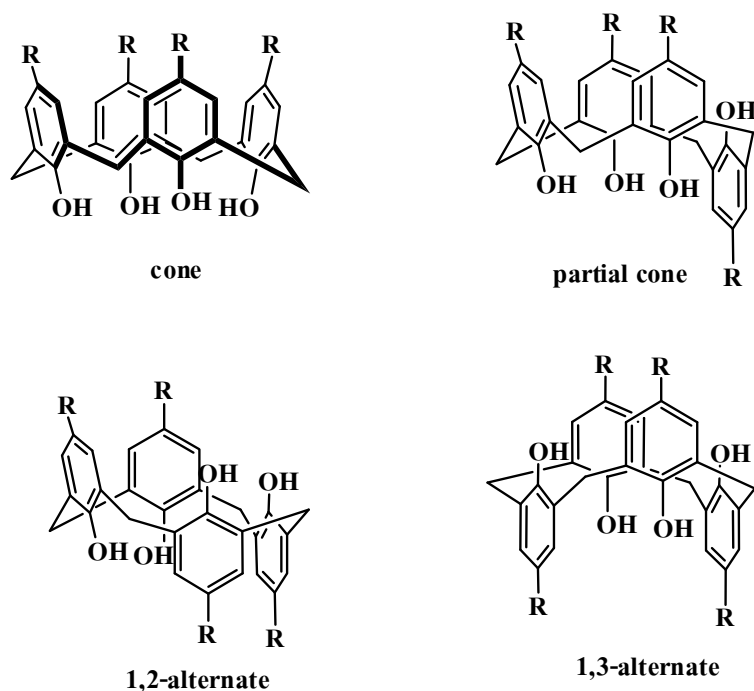
2.1.3 คาลิกซ์[n]เอรีน (calix[n]arene) ²³

คาลิกซ์[n]เอรีน (calix[n]arene) เป็นสารประกอบแมโครไซคลิกที่ประกอบด้วยหน่วยของหมู่ฟีนอลจำนวน n หน่วยเชื่อมต่อกันด้วยสะพานเมทิลีน (methylene bridge) ในตำแหน่งออร์โธกับหมู่ฟีนอลิกไฮดรอกซีและส่งผลให้โครงสร้างของคาลิกซ์[n]เอรีนมีช่องว่างอยู่ภายใน โมเลกุลโครงสร้างของคาลิกซ์[n]เอรีน แบ่งออกได้เป็น 2 ส่วน คือส่วน wide rim ซึ่งเป็นส่วนที่มีหมู่ฟังก์ชันใด ๆ ที่ต่ออยู่กับวงฟีนอลในตำแหน่งพาราและส่วนของ narrow rim คือ ส่วนที่หมู่ฟีนอลิกไฮดรอกซีเป็นองค์ประกอบ ดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของคาลิกซ์[4]เอรีน แสดงส่วนของ wide rim และ narrow rim

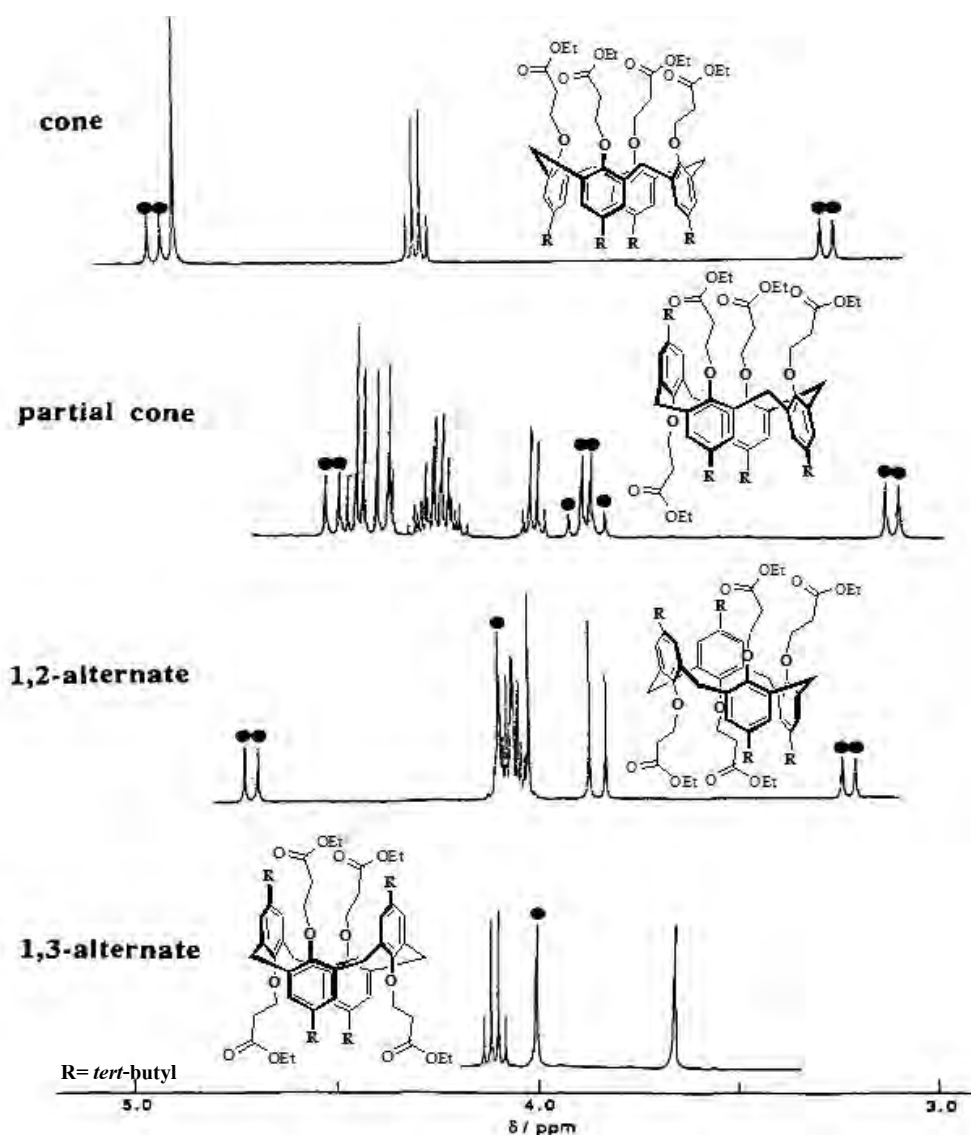
พาราเทอร์เชียรีบิวทิลคาลิกซ์[4]เอรีน (*p*-*tert*-butyl-calix[4]arene) เป็นคาลิกซ์[n]เอรีนที่มีผู้นิยมศึกษากันมาก เนื่องจากสามารถเตรียมได้ง่ายจากปฏิกิริยาคอนเดนเซชันของ *p*-*tert*-butyl-phenol และฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde) สารประกอบคาลิกซ์[4]เอรีนมีโครงสร้างที่แตกต่างกันทั้งหมด 4 ไอโซเมอร์ ได้แก่ cone, partial cone, 1,2-alternate และ 1,3-alternate ดังแสดงในรูปที่ 2.4 โดยที่โครงสร้างของไอโซเมอร์แบบ cone จะเป็นโครงสร้างที่เสถียรมากที่สุด เนื่องจากเกิดพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุลระหว่างหมู่ฟีนอลิกไฮดรอกซีทั้ง 4 หมู่



รูปที่ 2.4 โครงสร้างชนิดต่าง ๆ ของคาลิกซ์[4]เอเร็น

การพิสูจน์โครงสร้างของของคาลิกซ์[4]เอเร็นทั้ง 4 ไอโซเมอร์นั้น สามารถทำได้โดยอาศัยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ โดยการพิจารณาจากทั้งสัญญาณของโปรตอนของหมู่เมทิลลีนที่เชื่อมวงฟีนอล (methylene bridge, $\text{Ar-CH}_2\text{-Ar}$) และค่า coupling constant (J) ของโปรตอนของหมู่ดังกล่าว เนื่องจากโปรตอนทั้งสองของหมู่ดังกล่าวในโครงสร้างของคาลิกซ์[4]เอเร็นจะไม่สมมาตรซึ่งกันและกัน ดังนั้นพีคของโปรตอนใน $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของจึงมีลักษณะเป็น doublet ที่เกิดจากการ coupling กันของโปรตอนทั้งสองที่อยู่ในตำแหน่ง equatorial และ axial โดยโปรตอนตำแหน่ง axial เป็นโปรตอนที่อยู่ใกล้กับหมู่ไฮดรอกซีจึงปรากฏพีคของ H_{ax} ที่ค่า chemical shift (δ) ไปทางตำแหน่ง down field ส่วนโปรตอนตำแหน่ง equatorial นั้นอยู่ไกลจากหมู่ไฮดรอกซี มากกว่าจึงทำให้ปรากฏพีค H_{eq} ที่ค่า δ ไปทางตำแหน่ง up field สำหรับโครงสร้างของไอโซเมอร์ที่เป็นแบบ cone นั้นพีคของ $^1\text{H-NMR}$ ของหมู่เมทิลลีนที่เชื่อมวงฟีนอลทั้ง 4 หมู่จะมีลักษณะเป็นแบบ doublet จำนวน 2 ชุด ที่ค่า δ อยู่ที่ตำแหน่งประมาณ 3.49 และ 4.26 ppm และมีค่า J อยู่ในช่วงประมาณ 12.6 - 14 Hz ตัวอย่างเช่นเมื่อพิจารณา $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของสารประกอบ 5, 11, 17, 23-tetra-tert-butyl-25, 26, 27, 28-tetrakis-((ethoxycarbonyl)methoxy)calix[4]arene ที่มีโครงสร้างได้ทั้งหมด 4 ไอโซเมอร์ ดังแสดงในรูปที่ 2.5 พบว่าโครงสร้างของไอโซเมอร์ที่เป็นแบบ cone นั้น โปรตอนของหมู่เมทิลลีนปรากฏเป็นพีคที่มีลักษณะเป็น doublet 2 ชุด โดยที่โปรตอนในตำแหน่ง equatorial จะปรากฏที่ค่า δ 3.13 ppm และโปรตอนตำแหน่ง axial จะปรากฏที่ 4.50 ppm ส่วนโครงสร้างของไอโซเมอร์แบบ partial-cone นั้นพีคโปรตอนของหมู่ดังกล่าวจะปรากฏเป็น doublet จำนวน 4 ชุด โดยที่

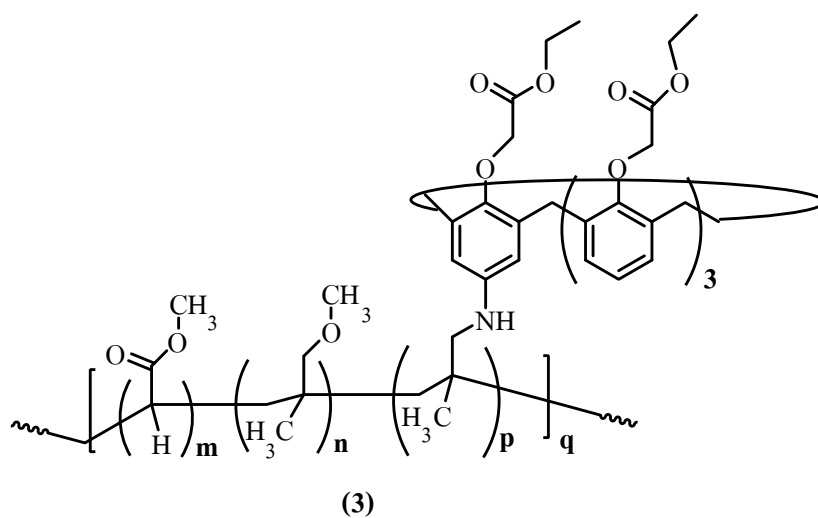
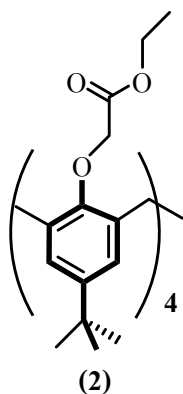
2 ชุดแรกจะปรากฏที่ค่า δ ที่มีค่าแตกต่างกันมากคือที่ 3.05 และ 4.50 ppm ส่วนอีก 2 ชุดจะปรากฏที่ค่า δ ที่มีค่าแตกต่างกันน้อยคือที่ 3.85 และ 3.91 ppm ในขณะที่โครงสร้างของไอโซเมอร์แบบ 1,2-alternate พิคโปรตอนของหมู่ดังกล่าวจะปรากฏเป็นแบบ doublet จำนวน 2 ชุด และ singlet 1 ชุด โดยที่พิกที่มีลักษณะเป็น doublet นั้นจะมีค่า δ ที่แตกต่างกันมากคือที่ 3.23 และ 4.71 ppm ส่วนพิกที่เป็น singlet จะปรากฏที่ค่า δ 4.10 ppm สำหรับโครงสร้างของไอโซเมอร์แบบ 1,3-alternate พิคโปรตอนของเมทิลลีนทั้ง 4 หมู่จะปรากฏเป็นพิกเดี่ยวแบบ singlet ที่ค่า δ ประมาณ 4.00 ppm เนื่องจากไอโซเมอร์ดังกล่าวมีสมมาตรที่สูง จึงทำให้โปรตอนของหมู่เมทิลลีนอยู่ในสิ่งแวดล้อมเดียวกัน



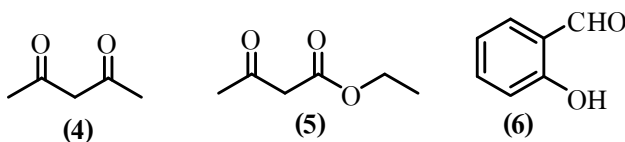
รูปที่ 2.5 เปรียบเทียบ $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมโครงสร้างของ 5, 11, 17, 23-tetra-tert-butyl-25, 26, 27, 28-tetrakis-((ethoxycarbonyl)methoxy)calix[4]arene ที่มีไอโซเมอร์แบบ cone, partial cone, 1,2-alternate และ 1,3-alternate²⁴

2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

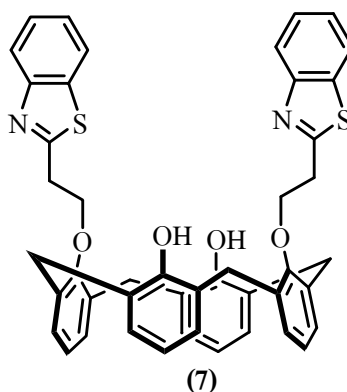
Diamond และคณะ⁶ ได้นำสารประกอบ *p-tert-butyl-calix[4]arene tetraethylester* (**2**) มาเตรียมเมมเบรนอิเล็กโทรดที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจวัด Na^+ โดยการนำไอโอโนฟอร์ดังกล่าวมาผสมกับ PVC และใช้ 2-nitrophenyloctyl ethyl (NPOE) เป็น plasticizer ซึ่งจากการทดลองพบว่าค่าขีดจำกัดของการตรวจวัด Na^+ อยู่ที่ 10^{-5} M นอกจากนี้ยังพบว่าอิเล็กโทรดที่เตรียมขึ้นมาใหม่นี้มีสภาพไว ความเสถียรและอายุการใช้งานที่สูงกว่าอิเล็กโทรดที่มีความจำเพาะเจาะจงกับ Na^+ ที่มีขายทางการค้าอยู่ในขณะนั้น ต่อมาในปี พ.ศ. 2543 Malinowska และคณะ⁽¹²⁾ ได้พัฒนาเมมเบรนอิเล็กโทรดที่มีความจำเพาะเจาะจงกับ Na^+ ขึ้นมาใหม่ โดยการนำอนุพันธ์ของไอโอโนฟอร์ (**2**) มาทำปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันกับ isodecyl acrylate (IDA) และ methyl metacrylate (MM) เพื่อที่จะได้ไอโอโนฟอร์ (**3**) ที่เป็นพอลิเมอร์ และมี calix[4]arene tetraethylester เป็นองค์ประกอบ หลังจากนั้นจึงนำไอโอโนฟอร์ (**3**) ที่เตรียมได้มาเตรียมเป็นเมมเบรนอิเล็กโทรดที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจวัด Na^+ ซึ่งจากการทดลองพบว่าความจำเพาะเจาะจงและสภาพไวของการตรวจวัดของอิเล็กโทรดที่เตรียมจากไอโอโนฟอร์ (**3**) มีค่าใกล้เคียงกับอิเล็กโทรดที่เตรียมได้จากไอโอโนฟอร์ (**2**) แต่อายุการใช้งานของอิเล็กโทรดที่เตรียมขึ้นมาใหม่นี้มีค่านานถึง 7 เดือน ในขณะที่อิเล็กโทรดที่เตรียมจากไอโอโนฟอร์ (**2**) มีอายุการใช้งานเพียง 2 เดือน



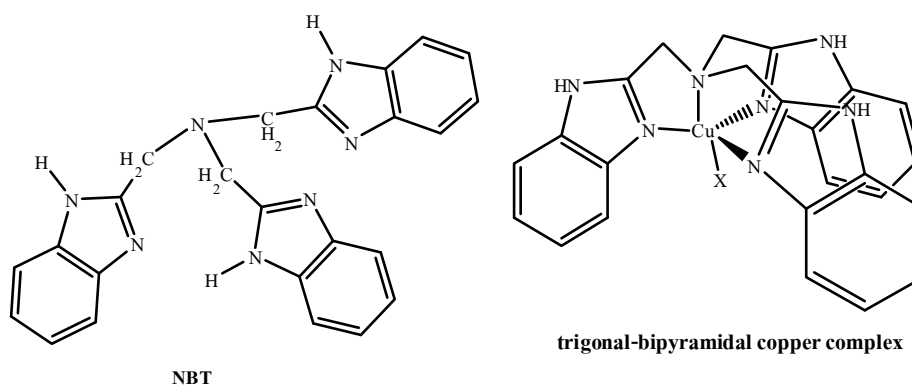
Gupta และคณะ²⁵ ได้นำลิแกนด์ 3 ชนิดที่มีค่าคงที่การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่สูงกับไอออนของ Cu^{2+} ซึ่งได้แก่ acetylacetone (4) ethylacetoacetate (5) และ salicylaldehyde (6) มาเป็นไอโอโนฟอร์และเตรียมเป็น PVC-เมมเบรนอิเล็กโทรดที่มีความจำเพาะเจาะจงกับไอออนของ Cu^{2+} โดยใช้ TBP เป็น plasticizer จากการศึกษาพบว่าไอโอโนฟอร์ที่ให้ผลการทดลองที่ดีที่สุดคือ ไอโอโนฟอร์ (4) โดยพบว่าอิเล็กโทรดที่เตรียมขึ้นจาก ไอโอโนฟอร์ดังกล่าวสามารถใช้งานได้ในช่วง pH 2.6 - 6.0 มีช่วงการวิเคราะห์ที่ให้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง (linear working range) คือ 2×10^{-6} ถึง 1×10^{-1} M มีค่า Nernstian slope เท่ากับ $29.3 \text{ mV decade}^{-1}$ มีขีดจำกัดของการตรวจวัดประมาณ 0.1 ppm และมีอายุการใช้งานประมาณ 3 เดือน ซึ่งอิเล็กโทรดที่เตรียมขึ้นมานี้สามารถนำไปใช้เป็น indicator electrode สำหรับการทำการ potentiometric titration ของ Cu^{2+} กับ EDTA และนอกจากนี้ยังสามารถนำไปใช้ตรวจวัดปริมาณของ Cu^{2+} ในอาหารเสริมได้เช่นกัน



Tuntulani และคณะ²⁶ ได้สังเคราะห์ไอโอโนฟอร์ชนิดใหม่คือ benzothiazole calix[4]arene (7) โดยมีปริมาณผลิตภัณฑ์สูงถึงร้อยละ 81 และเมื่อนำไอโอโนฟอร์ดังกล่าวไปเตรียมเป็นอิเล็กโทรดชนิด macro-electrode และ micro-electrode ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับไอออนของโลหะ พบว่า อิเล็กโทรดที่เตรียมขึ้นทั้งสองชนิดมีความจำเพาะเจาะจงกับ Ag^+ โดยมีค่า Nernstian slope ใกล้เคียงกับค่าทางทฤษฎีคือ $59.7 \pm 0.8 \text{ mV decade}^{-1}$ และ $59.8 \pm 10 \text{ mV decade}^{-1}$ สำหรับ macro-electrode และ micro-electrode ตามลำดับ มีค่าขีดจำกัดของการตรวจวัดอยู่ที่ 5×10^{-7} M และมีช่วงการวิเคราะห์ที่ให้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง (linear working range) คือ $10^{-6} - 10^{-2}$ M และสามารถนำไปประยุกต์กับการวิเคราะห์รูปแบบทางเคมีของสารละลายนาโนซิลเวอร์ โดยสามารถวิเคราะห์ปริมาณของ Ag^+ ที่เหลือในสารละลายนาโนซิลเวอร์ได้ และนอกจากนี้ยังสามารถวิเคราะห์หาปริมาณของซิลเวอร์ทั้งหมดในสารละลายนาโนซิลเวอร์ได้โดยการออกซิไดซ์สารละลายนาโนซิลเวอร์ด้วย H_2O_2 ซึ่งนาโนซิลเวอร์จะถูกออกซิไดซ์กลายเป็น Ag^+ หลังจากนั้นจึงทำการตรวจวัดปริมาณของ Ag^+ ที่อยู่ในสารละลายด้วยอิเล็กโทรดที่พัฒนาขึ้น ซึ่งหลักการดังกล่าวนี้ได้ถูกนำมาพัฒนาใช้ร่วมกับระบบการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในสารตัวอย่างด้วย glucose biosensor

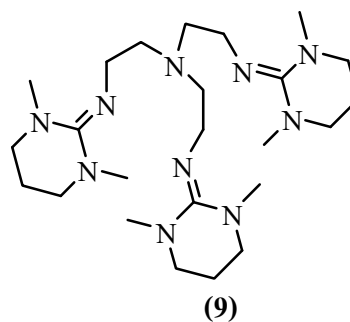
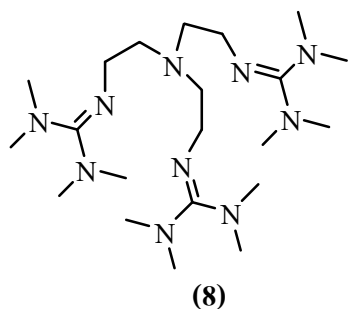


Anthony และคณะ²⁷ ได้สังเคราะห์และพิสูจน์โครงสร้างของสารประกอบโคออร์ดิเนชันของคอปเปอร์ (II) ซึ่งสารประกอบดังกล่าวเตรียมได้จากการทำปฏิกิริยากับลิแกนด์ tris(2-benzimidazolylmethyl)amine หรือ NTB และลิแกนด์ดังกล่าวมีโครงสร้างเป็นแบบไพระมิดจากการศึกษาพบว่าสารประกอบโคออร์ดิเนชันที่เกิดขึ้นทั้ง 5 ชนิดนั้นมีโครงสร้างอยู่ 2 แบบ คือปริมาตรฐานสามเหลี่ยม (trigonal bipyramid) และแบบ pseudooctahedral โดยมีลิแกนด์ที่เข้ามาเกิดพันธะโคออร์ดิเนชันกับไอออนของคอปเปอร์ในตำแหน่งที่ 5 และ 6 เป็นตัวกำหนดโครงสร้างของสารประกอบดังกล่าว อย่างไรก็ตามลิแกนด์ NBT ที่อยู่ในโครงสร้างของสารประกอบโคออร์ดิเนชันทั้ง 5 ชนิดนั้นประพฤติตัวเป็นเตตระเดนเตตลิแกนด์โดยใช้ไนโตรเจนทั้ง 4 อะตอมเป็นอะตอมผู้ให้อิเล็กตรอนแก่ไอออนของคอปเปอร์ (II) ส่วนลิแกนด์ในตำแหน่งที่ 5 และ 6 นั้น อาจเป็นลิแกนด์ที่มาจากแอนไอออนของเกลือคอปเปอร์(II) ที่ใช้เป็นสารตั้งต้น เช่น NO_3^- และ BF_4^- หรืออาจเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีโครงสร้างขนาดเล็กและประพฤติตัวเป็นลิแกนด์ได้ เช่น N-methylimidazole และ N_3^-



รูปที่ 2.6 แสดงโครงสร้างของลิแกนด์ NBT และโครงสร้าง trigonal-bipyramidal copper complex กับ ลิแกนด์ NBT

Volker และคณะ²⁸ ได้ทำการศึกษาและพิสูจน์โครงสร้างของสารประกอบโคออร์ดิเนชันของ Cu^+ และ Cu^{2+} กับไตรโทดอลลิแกนด์ 2 ชนิดคือ TMG_3tren (tetramethylguanidino-tren) **(8)** และ DMPG_3tren (dimethylpropyleneguanidino-tren) **(9)** โดยที่ลิแกนด์ทั้งสองมีหมู่กวินิดีน 3 หมู่เป็นองค์ประกอบภายในโมเลกุล จากการศึกษาพบว่าสารประกอบโคออร์ดิเนชันของ Cu^{2+} กับลิแกนด์ทั้งสองจะมีโครงสร้างเป็นแบบปิรามิดคู่ฐานสามเหลี่ยม (trigonal bipyramid) ซึ่งลิแกนด์ทั้งสองต่างก็ประพฤติตัวเป็นเทระเดนเตตลิแกนด์ โดยใช้อะตอมของ tertiary ไนโตรเจนและไนโตรเจนอีก 3 อะตอมของหมู่กวินิดีนทั้ง 3 หมู่เป็นอะตอมผู้ให้อิเล็กตรอน ส่วนลิแกนด์ในตำแหน่งที่ห้านั้นขึ้นอยู่กับชนิดของแอนไอออนของเกลือของคอปเปอร์ที่ใช้เป็นสารตั้งต้น ในขณะที่สารประกอบโคออร์ดิเนชันของ Cu^+ กับลิแกนด์ทั้งสองนั้น จะมีโครงสร้างเป็นไตรโกนอล (trigonal) โดยที่ ลิแกนด์ทั้งสองเกิดพันธะโคออร์ดิเนชันในลักษณะเดียวกันกับสารประกอบโคออร์ดิเนชันของ Cu^{2+}



บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์

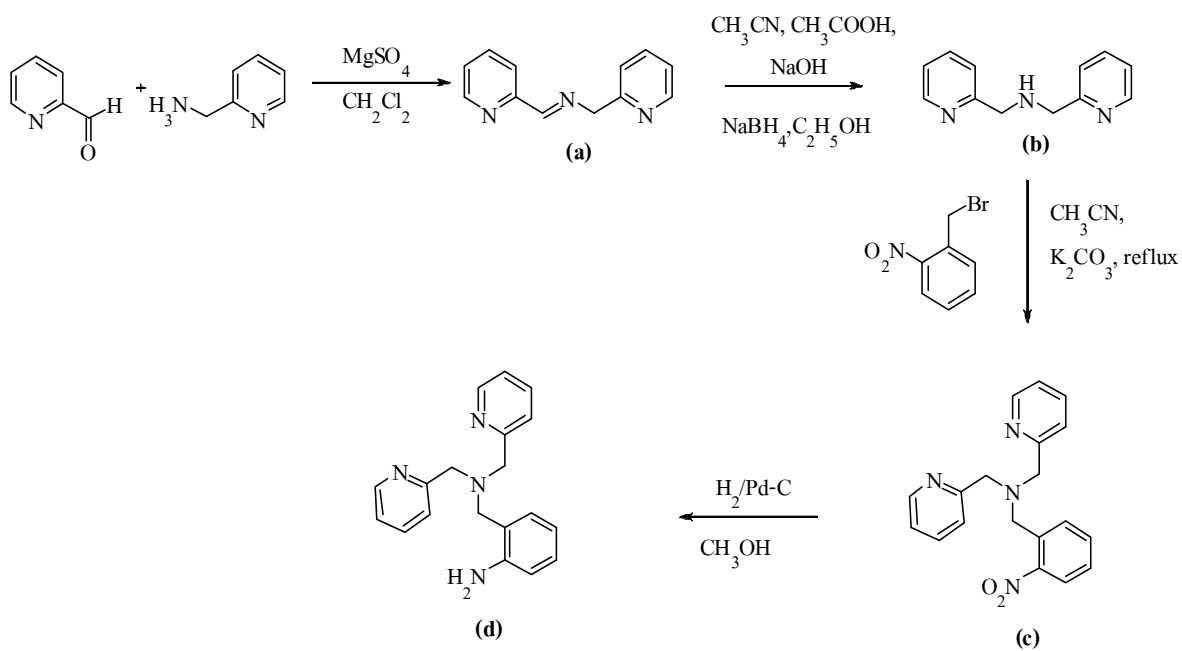
1. เครื่องกลั่นตัวทำละลายแบบลดความดัน (BUCHI R-200)
2. เอกซ์เรย์คริสตัลโลกราฟี BRUKER APEX CCD diffractometer (graphite monochromated Mo-K α radiation, λ = 0.71073 Å) (ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)
3. นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรมิเตอร์ (Bruker 400 MHz Ultra Shield AVANCE 400)
4. แมสสเปกโตรมิเตอร์ (Bruker microTOF) (ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล)

3.2 สารเคมี

Acetone	(Lab-Scan)
2-(aminomethyl)-pyridine	(MERCK)
Chloroform-D1	(Merck)
Dichloromethane	(Lab-Scan)
Diethyl ether	(Panreac)
Ethyl acetate	(Lab-Scan)
Magnesium sulfate anhydrous	(Lab-Scan)
2-Nitro-benzylbromide	(Riedel-deHaën)
Palladium/charcoal activated	(MERCK)
Potassium carbonate	(CARLO ERBA)
Pyridin-2-aldehyde	(Aldrich)
Salicylaldehyde	(MERCK)
Sodiumsulfate anhydrous	(Riedel-deHaën)
Sodiumborohydride	(FLUKA)

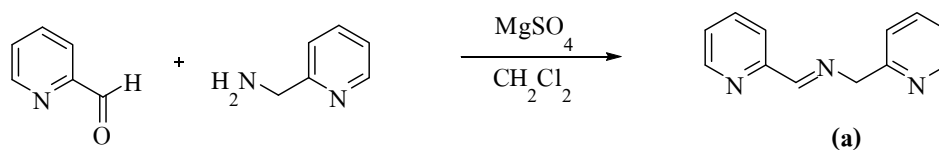
3.3 การสังเคราะห์ไทโรโพลเอมีน

การสังเคราะห์สารประกอบไทโรพอลเอมีน (x) สามารถสังเคราะห์ได้ตามวิธีที่แสดงในรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 การสังเคราะห์สารประกอบ (d)

3.3.1 การสังเคราะห์สารประกอบ pyridine-2-ylmethylpyridine-2-ylmethyleneamine (a)

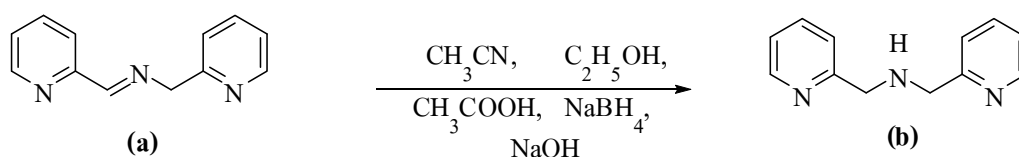


ชั่ง MgSO_4 anhydrous 11 กรัม (91.4 มิลลิโมล) ใส่ขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร และเติม CH_2Cl_2 ที่ปราศจากน้ำปริมาตร 24 มิลลิลิตร ลงไปในขวดดังกล่าว หลังจากนั้นเติม pyridin-2-aldehyde 1.76 มิลลิลิตร (16.4 มิลลิโมล) และ 2-(aminomethyl)-pyridine 1.84 มิลลิลิตร (17 มิลลิโมล) ลงไป คนของผสมที่อุณหภูมิห้องภายใต้สภาวะบรรยากาศแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 4 ชั่วโมง กรองและนำชั้น CH_2Cl_2 ไปล้างน้ำ (3×100 มิลลิลิตร) จากนั้นนำชั้น CH_2Cl_2 มากำจัดน้ำโดยการเติม Na_2SO_4 anhydrous หลังจากนั้นกรองและระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นแบบ ลดความดัน ได้ของเหลวสีเหลืองของสารประกอบ (a) ร้อยละของผลิตภัณฑ์ที่ได้เท่ากับ 96 (1.56 กรัม)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , ppm) : δ 8.65 (s, 1 H, ArH), 8.55 (s, 1 H, =CH-), 8.05 (d, 1 H, $J = 7.6$ Hz, ArH), 7.68 (t, 1 H, $J = 1.6$ Hz, ArH), 7.62 (t, 1 H, $J = 1.8$ Hz, ArH), 7.42 (d, 1 H, $J = 7.6$ Hz, ArH), 7.35 (t, 1H, $J = 1.2$ Hz, ArH), 7.12 (t, 1H, $J = 3.7$ Hz, ArH), 5.03 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , ppm) : δ 163.94, 158.74, 154.74, 149.50, 149.37, 136.68, 136.55, 124.92, 122.38, 122.13, 121.49, 66.58

3.3.2 การสังเคราะห์สารประกอบ bis-pyridin-2-ylmethanamine (b)



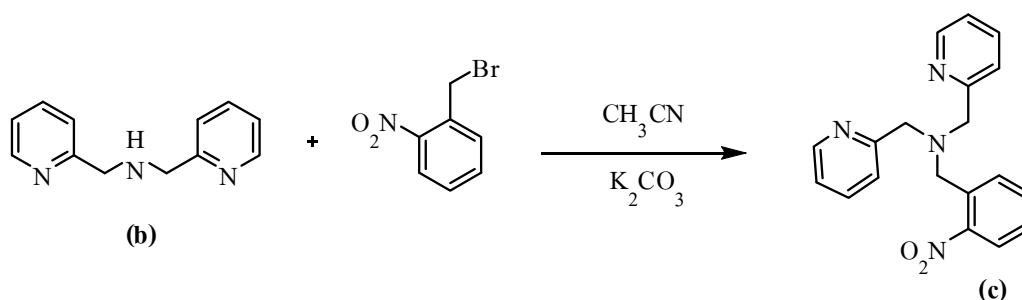
นำสารประกอบ (a) 1.56 กรัม (7.9 มิลลิโมล) ใส่ขวดก้นกลมหนึ่งคอขนาด 250 มิลลิลิตร เติม CH_3CN 15 มิลลิลิตร กรดอะซิติก 1 มิลลิลิตร และเอทานอล 20 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นกลมดังกล่าว หลังจากนั้นทำสารละลายให้เย็นที่อุณหภูมิ -5 องศาเซลเซียส แล้วจึงค่อย ๆ เติม NaBH_4 1 กรัม (25.8 มิลลิโมล) ลงไป และคนของผสมต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำของผสมไปทำให้เย็น แล้วจึงค่อย ๆ เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 10 มิลลิลิตรจะได้ของแข็งสีขาวเกิดขึ้น นำของผสมไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นกรองและนำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกจนเกือบหมด และเติมน้ำ 10 มิลลิลิตร นำสารละลายไปทำให้เย็นแล้วจึงค่อย ๆ เติม NaOH 4 กรัม (100 มิลลิโมล) ลงไปในสารละลายดังกล่าว คนสารละลายที่อุณหภูมิห้องต่ออีกเป็นเวลาครึ่งชั่วโมง แล้วจึงนำมาสกัดด้วย Et_2O (3×100 มิลลิลิตร) แล้วนำชั้น Et_2O มากำจัดน้ำด้วย Na_2SO_4 anhydrous กรองและนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นแบบลดความดันได้ของเหลวสีเหลืองเข้มของสารประกอบ (b) ร้อยละของผลิตภัณฑ์ที่ได้เท่ากับ 69 (1.09 กรัม)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , ppm) : δ 8.59 (d, 2H, $J = 1.2$ Hz, ArH), 7.67 (t, 2H, $J = 2.0$ Hz, ArH), 7.38 (d, 2H, $J = 7.6$ Hz, ArH), 7.18 (t, 2H, $J = 1.6$ Hz, ArH), 4.00 (s, 2H, - CH_2 -)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , ppm) : δ 159.63, 149.31, 136.51, 122.34, 121.99, 54.74

3.3.3 การสังเคราะห์สารประกอบ 2-[bis(2-pyridylmethyl)aminomethyl]

nitrobenzene (c)



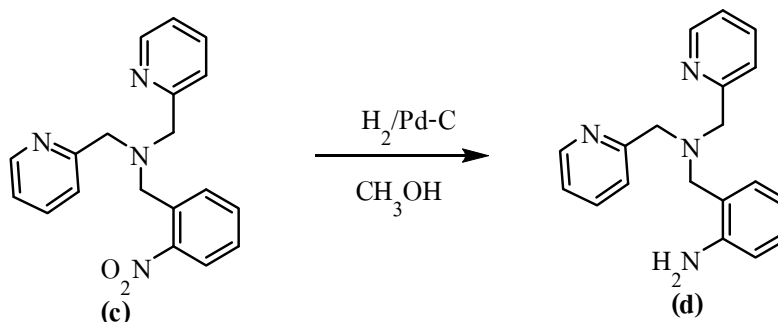
สังเคราะห์สารประกอบ (b) 2 กรัม (10.05 มิลลิโมล) K_2CO_3 14 กรัม (100 มิลลิโมล) 2-nitrobenzylbromide 2.17 กรัม (10.05 มิลลิโมล) และ molecular sieves 4 กรัม ใส่ขวดกันกลมสองคอขนาด 250 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติม CH_3CN ที่ปราศจากน้ำ ปริมาตร 50 มิลลิลิตรลงในขวดกันกลมดังกล่าว คนของผสมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมงภายใต้สภาวะบรรยากาศไนโตรเจน เมื่อครบกำหนดแล้วจึงนำของผสมมากรองและนำของเหลวที่ได้จากการกรองไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องกลั่นตัวทำละลายแบบลดความดัน แล้วจึงนำส่วนที่เหลือจากการระเหยมาละลายด้วย CH_2Cl_2 100 มิลลิลิตรและนำสารละลายดังกล่าวมาล้างด้วยน้ำ (3×100 มิลลิลิตร) แล้วจึงนำชั้น CH_2Cl_2 มากำจัดน้ำด้วย Na_2SO_4 anhydrous จากนั้นกรองและนำสารละลายไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นแบบลดความดัน ได้ของเหลวสีเหลืองเข้มของสารประกอบ (c) มี ร้อยละของผลิตภัณฑ์ที่ได้เท่ากับ 71 (2.40 กรัม)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , ppm) : δ 8.55 (d, 2 H, $J = 2.8$ Hz, ArH), 7.78 (t, 2 H, $J = 6.8$ Hz, ArH), 7.68 (d, 2 H, $J = 1.6$ Hz, ArH), 7.50 (t, 2 H, $J = 3.6$ Hz, ArH), 7.14 (t, 2 H, $J = 2.4$ Hz, ArH), 3.8 (s, 2 H, $-\text{CH}_2-$), 3.65 (s, 2 H, $-\text{CH}_2-$), 3.5 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , ppm) : δ 158.62, 149.96, 149.12, 148.92, 136.46, 134.38, 132.35, 131.39, 124.31, 123.28, 122.13, 60.39, 60.14, 55.87

3.3.4 การสังเคราะห์สารประกอบ 2-[bis(2-pyridylmethyl)aminomethyl]aniline

(d)



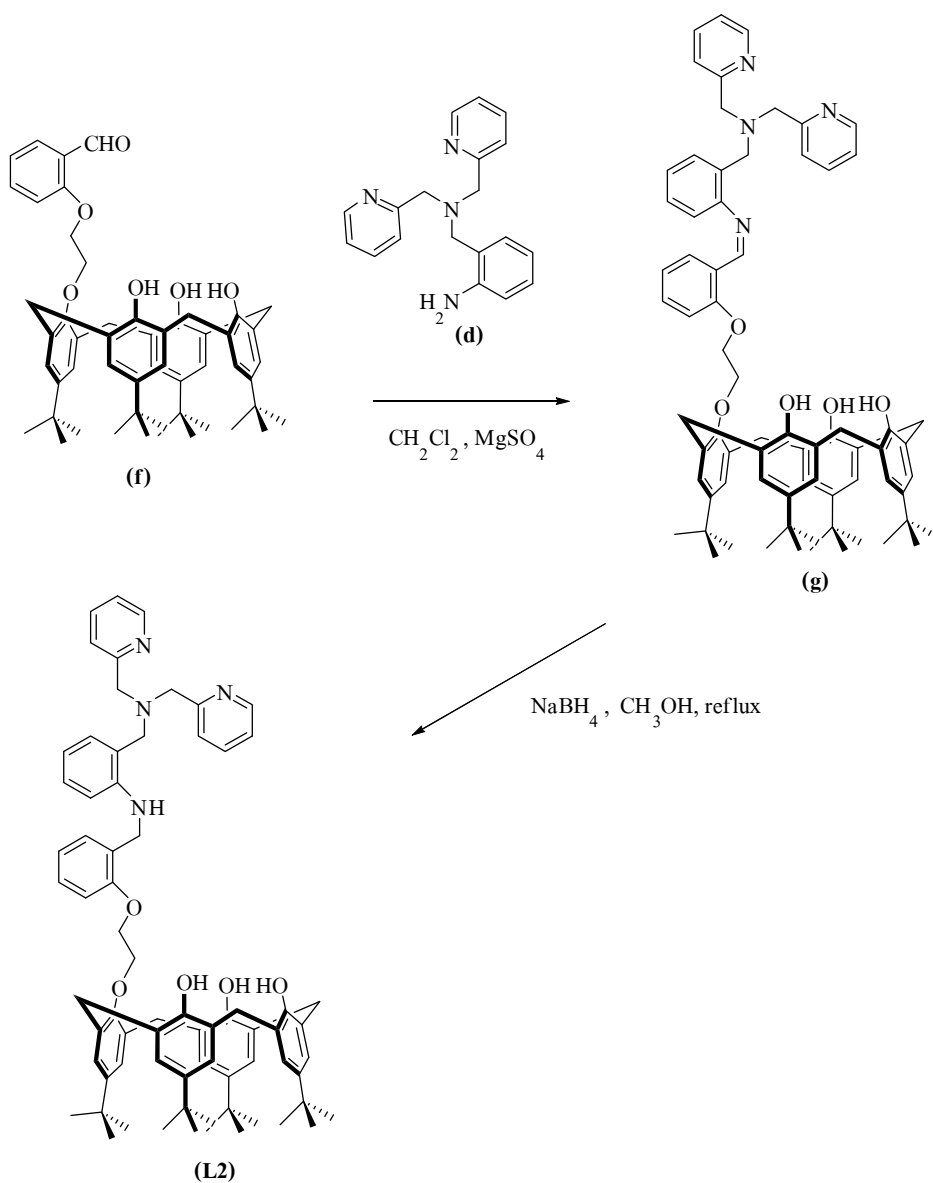
ละลายสารประกอบ (c) 2.40 กรัม ด้วยเมทานอลที่ปราศจากน้ำ 100 มิลลิลิตรใส่ขวดกั่นกลมสองคอขนาด 250 มิลลิลิตร และค่อย ๆ เติม 10 % Pd/charcoal activate 0.2 กรัมลงไป หลังจากนั้นคนของผสมดังกล่าวภายใต้สภาวะบรรยากาศไฮโดรเจนเป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำของผสมมากรองด้วย celite นำสารละลายที่ได้จากการกรองไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นแบบลดความดัน ได้ของเหลวสีเหลืองเข้มของสารประกอบ (d) ร้อยละของผลิตภัณฑ์ที่ได้เท่ากับ 85 (1.86 กรัม)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , ppm) : δ 8.56 (d, 2 H, $J = 4.0$ Hz, ArH), 7.63 (t, 2 H, $J = 6.0$ Hz, ArH), 7.39 (d, 2 H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 7.16 (t, 2 H, $J = 2.8$ Hz, ArH), 7.06 (t, 2 H, $J = 3.0$ Hz, ArH), 6.64 (m, 2 H, ArH), 3.8 (s, 2 H, $-\text{CH}_2-$), 3.65 (s, 2 H, $-\text{CH}_2-$), 3.5 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$)

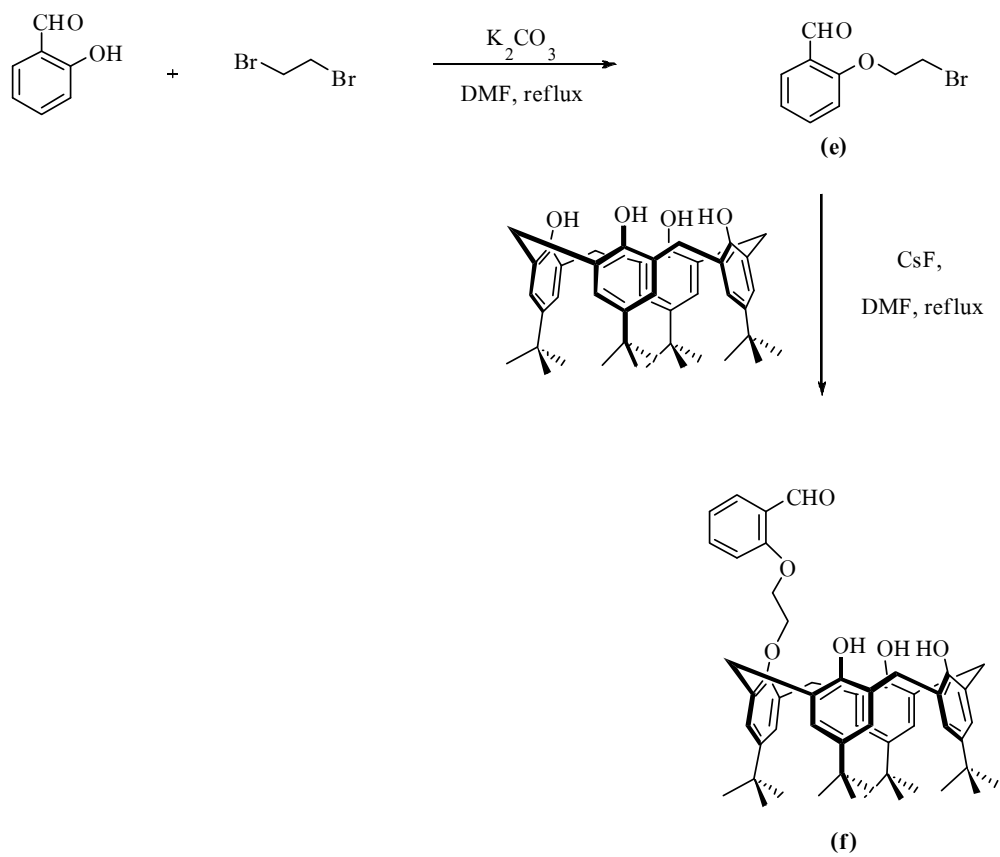
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , ppm) : δ 159.10, 149.01, 147.01, 136.54, 131.18, 128.50, 123.53, 122.16, 117.22, 115.45, 60.14, 57.92

3.4 การสังเคราะห์ไอโอโนฟอร์ L2

การสังเคราะห์ไอโอโนฟอร์ **L2** เตรียมได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบเอมีน **(d)** และสารประกอบอัลดีไฮด์ **(f)** ดังแสดงในรูปที่ 3.1 การสังเคราะห์สารประกอบเอมีน **(d)** และสารประกอบอัลดีไฮด์ **(f)** แสดงได้ดังรูปที่ 3.2 และ 3.3 ตามลำดับ

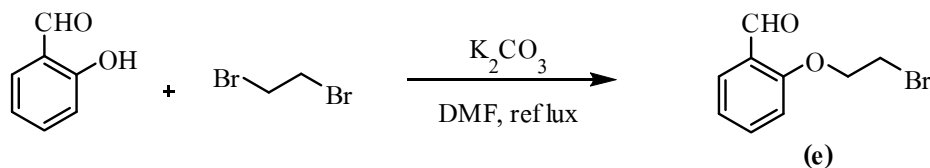


รูปที่ 3.2 การสังเคราะห์ไอโอโนฟอร์ **L2**



รูปที่ 3.3 การสังเคราะห์สารประกอบ (f)⁽²⁰⁻²¹⁾

3.4.1 การสังเคราะห์สารประกอบ 2- (2-bromoethoxy) benzaldehyde (e)

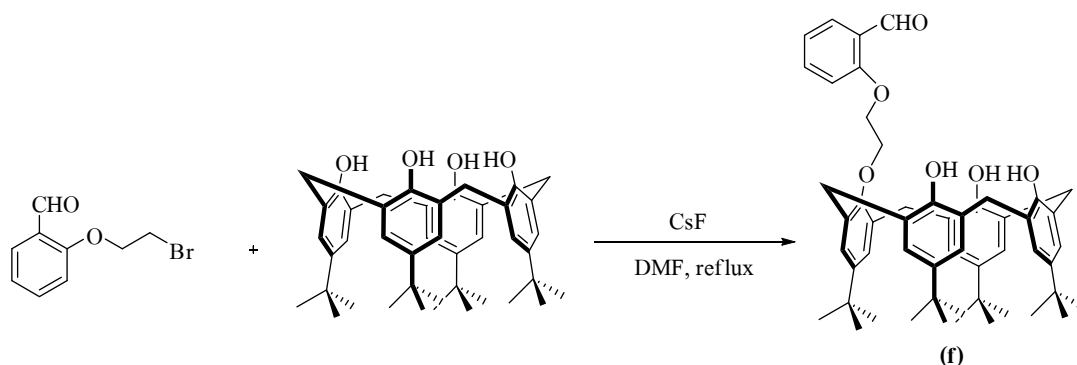


ตวง salicaldehyde 6.4 มิลลิลิตร (52.4 มิลลิโมล) 1,2-dibromoethane 20.2 มิลลิลิตร (107.5 มิลลิโมล) และชั่ง K_2CO_3 22 กรัม (160 มิลลิโมล) ใส่ขวดก้นกลมหนึ่งคอ ขนาด 500 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติม dimethylformamide (DMF) 100 มิลลิลิตร ลงไปในขวด ก้นกลมดังกล่าว แล้วนำของผสมมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิไม่เกิน 60°C ภายใต้สภาวะ บรรยากาศแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นทิ้งสารละลายให้เย็นที่อุณหภูมิห้องและเติมสารละลาย NaOH เข้มข้น 10% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำของผสมมาสกัดด้วย EtOAc (3×100 มิลลิลิตร) และนำชั้น EtOAc มาล้างน้ำ (3×100 มิลลิลิตร) หลังจากนั้นนำชั้น EtOAc มากำจัดน้ำโดยการเติม Na_2SO_4 anhydrous แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นแบบลดความดัน จากนั้นนำส่วนที่เหลือจากการระเหย มาทำการแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีบน SiO_2 โดยใช้ 60 : 40 CH_2Cl_2 /hexane เป็นตัวชะ ได้สารประกอบ (e) มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวและร้อยละของผลิตภัณฑ์ที่ได้ เท่ากับ 40 (4.87 กรัม)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , ppm) : δ 10.57 (s, 1 H, HC=O), 7.88 (m, 1 H, ArH), 7.57 (m, 1 H, ArH), 7.11 (m, 1 H, ArH), 6.99 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, ArH), 4.44 (t, 2 H, $J = 6.0$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{O}$), 3.73 (t, 2 H, $J = 6.0$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{Br}$)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , ppm) : δ 189.44, 160.37, 135.99, 128.13, 125.04, 121.37, 112.83, 68.21, 29.30

3.4.2 การสังเคราะห์สารประกอบ 28-2-(2-ethoxybenzaldehyde)-*p*-*tert*-butyl calix[4]arene
(f)



ซึ่ง *p*-*tert*-butylcalix[4]arene 9.79 กรัม (15 มิลลิโมล) CsF 2.73 กรัม (18 มิลลิโมล) และสารประกอบ (e) 6.95 กรัม (30 มิลลิโมล) ใส่ขวดก้นกลมสองคอขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นเติม DMF 300 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นกลมดังกล่าว นำของผสมไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิไม่เกิน 60 °C ภายใต้สภาวะบรรยากาศแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นหึ่งสารละลายให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้องแล้วจึงค่อย ๆ เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 3 M ปริมาตร 200 มิลลิลิตร นำของผสมมาทำการสกัดด้วย CH₂Cl₂ (3 × 100 มิลลิลิตร) และนำชั้น CH₂Cl₂ มาล้างด้วยน้ำ (3 × 100 มิลลิลิตร) แล้วจึงนำชั้น CH₂Cl₂ ดังกล่าวมากำจัดน้ำโดยการเติม MgSO₄ anhydrous จากนั้นกรองแล้วนำสารละลายไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นแบบลดความดัน และนำส่วนที่เหลือจากการระเหยไปแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีบน SiO₂ โดยใช้ 50 : 50 CH₂Cl₂/ hexane เป็นตัวชะ ได้สารประกอบ (f) ซึ่งมีลักษณะเป็นของแข็งมีร้อยละของผลิตภัณฑ์ที่ได้เท่ากับ 23 (2.79 กรัม)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm) : δ 10.68 (s, 1H, HC=O) , 10.05 (s, 1H, -OH), 9.46 (s, 2H, -OH), 7.97 (d, 1 H, *J* = 7.6 Hz, ArH), 7.67 (t, 1H, *J* = 0.8 Hz, ArH), 7.24 (d, 2 H, *J* = 8.4 Hz ArH), 7.72 (s, 2H, ArH), 7.14 (s, 2H, ArH), 7.09 (s, 2H, ArH), 7.02 (d, 2H, *J* = 1.2 Hz, ArH), 4.82 (d, *J* = 4.0 Hz, 2 H, -CH₂-O-), 4.69 (d, 2 H, *J* = 4.0 Hz, -CH₂-O-), 4.47 (d, 2H, *J* = 12.8 Hz, Ar-CH₂-Ar), 4.20 (d, 2H, *J* = 13.6 Hz, Ar-CH₂-Ar), 3.47 (d, 2 H, *J* = 13.2 Hz, Ar-CH₂-Ar), 3.45 (d, 2 H, *J* = 13.6 Hz, Ar-CH₂-Ar), 1.26 (s, 36 H, -CH₃)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, ppm) : δ 189.74, 160.65, 149.09, 148.63, 148.17, 147.74, 143.57, 143.26, 136.03, 133.47, 128.67, 128.06, 127.85, 127.82, 126.63, 125.89, 125.72, 125.64, 125.13, 121.40, 112.26, 74.11, 67.34, 32.93, 32.26, 31.48, 31.25

3.4.3 การสังเคราะห์ไอโอโนฟอร์ 2-(Bis(2-pyridylmethyl)aminomethyl)aniline-N-(2-ethoxybenzyl)aniline))-*p*-*tert*-butyl calix[4]arene (L2)

ซังสารประกอบ (f) 2.38 กรัม (3.05 มิลลิโมล) MgSO_4 anhydrous 3.67 กรัม (30.39 มิลลิโมล) และสารประกอบ (d) 1.86 กรัม (6.10 มิลลิโมล) ใส่ขวดก้นกลมสองคอ ขนาด 250 มิลลิลิตร และเติม CH_2Cl_2 ที่ปราศจากน้ำปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงไปในขวดก้นกลมดังกล่าว คนของผสมภายใต้สภาวะบรรยากาศแก๊สไนโตรเจนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำของผสมมากรองและนำส่วนที่ได้จากการกรองไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นแบบลดความดัน จะได้ของเหลวสีเหลืองของสารประกอบอิมมีน (g) หลังจากนั้นนำสารประกอบ (g) มาละลายด้วย เมทานอลปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วทำให้สารละลายเย็นที่อุณหภูมิ 0°C แล้วจึงค่อย ๆ เติม NaBH_4 0.55 กรัม (14.56 มิลลิโมล) ลงไปในสารละลายดังกล่าว คนของผสมที่อุณหภูมิห้องต่อจนกระทั่งฟองแก๊สหมด แล้วจึงนำของผสมดังกล่าวไปรีฟลักซ์ภายใต้สภาวะบรรยากาศแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นตั้งสารละลายให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วจึงเติมน้ำปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไประเหยเอาเมทานอลออกด้วยเครื่องกลั่นแบบลดความดัน นำของผสมมาสกัดด้วย CH_2Cl_2 (3×100 มิลลิลิตร) จากนั้นนำชั้น CH_2Cl_2 มาล้างด้วยน้ำ (3×100 มิลลิลิตร) แล้วนำชั้น CH_2Cl_2 มากำจัดน้ำด้วย MgSO_4 anhydrous กรองสารละลายแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นแบบลดความดัน นำส่วนที่เหลือจากการระเหยไปแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโต กราฟีน Al_2O_3 โดยใช้ EtOAc เป็นตัวชะ ไอโอโนฟอร์ L1 ที่ได้มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว และมีร้อยละของผลิตภัณฑ์ที่ได้เท่ากับ 20 (0.67 กรัม)

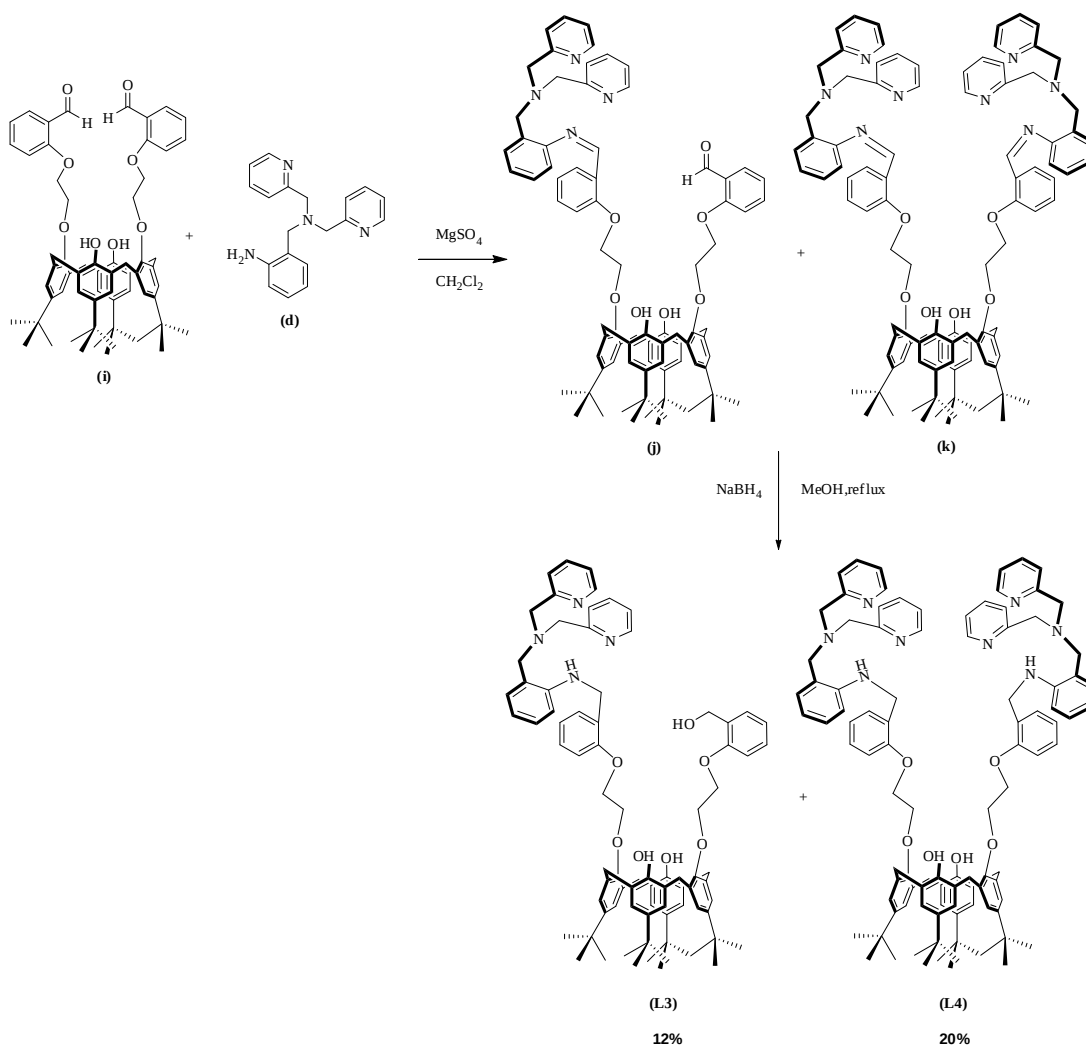
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , ppm) : δ 10.20 (s, 1H, -OH), 9.49 (s, 2H, -OH), 8.44 (d, 2H, $J = 4.0$ Hz, ArH), 7.49 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz, ArH), 7.37 (d, 2H, $J = 4.0$ Hz, ArH), 7.34 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 7.13 (s, 2H, ArH), 7.12 (s, 1H, ArH), 7.07 (d, 2H, $J = 2.0$ Hz, ArH), 7.05 (s, 2H, ArH), 7.03 (s, 2H, ArH), 7.02 (s, 2H, ArH), 6.94 (m, 2H, ArH), 6.54 (t, 1H, $J = 7.6$ Hz, ArH), 6.40 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 4.70 (d, 2H, $J = 3.2$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{NH}-$), 4.64 (s, 4H, $-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-$), 4.53 (d, 2H, $J = 12.8$ Hz, Ar- CH_2 -Ar), 4.24 (d, 2H, $J = 13.6$ Hz, Ar- CH_2 -Ar), 3.83 (s, 4H, $-\text{CH}_2-$), 3.69 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 3.40 (dd, 4H, $J = 12.8$ Hz, 14.0 Hz, Ar- CH_2 -Ar), 1.23 (s, 36H, $-\text{CH}_3$)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , ppm) : δ 159.24, 156.11, 149.12, 149.04, 148.39, 148.29, 148.09, 147.85, 143.50, 143.12, 136.30, 133.61, 130.94, 128.74, 128.12, 128.07, 127.69, 126.56, 125.82, 125.71, 125.66, 123.18, 121.90, 121.51, 121.10, 115.32, 110.80, 110.20, 77.37, 77.05, 76.73, 74.78, 66.72, 60.13, 58.47, 41.73, 33.00, 32.10, 31.50, 31.25

ESI-MS (positive mode) : m/z : 1085.67 $[\text{M}+\text{H}]^+$

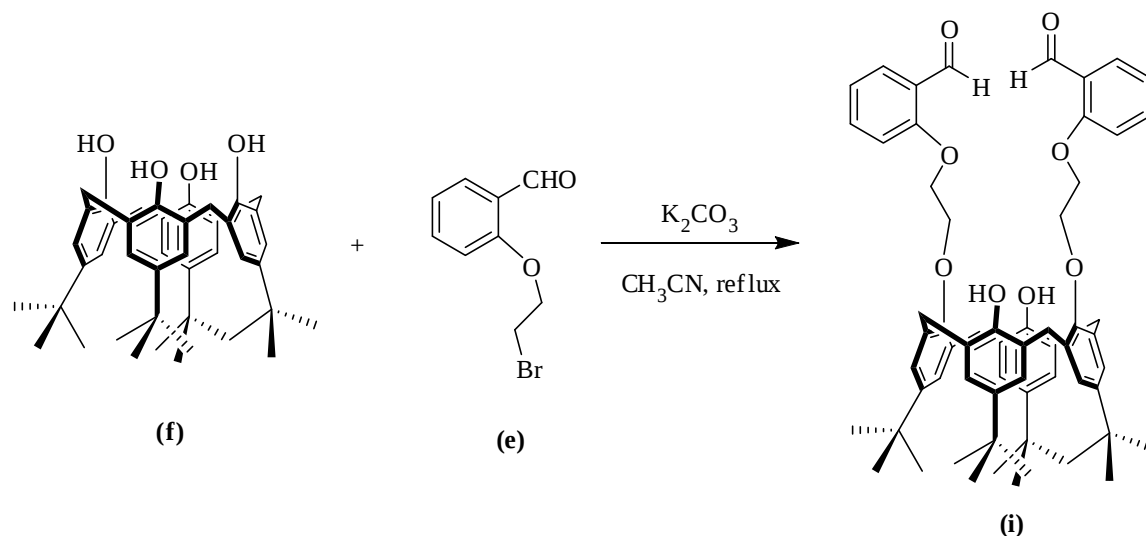
3.5 การสังเคราะห์ไอโอโนฟอร์ L3 และ L4

การสังเคราะห์ไอโอโนฟอร์ L3 และ L4 เตรียมได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบเอมีน (d) และสารประกอบอัลดีไฮด์ (f) ดังแสดงในรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.4 การสังเคราะห์ไอโอโนฟอร์ L3 และ L4

3.5.1 การสังเคราะห์สารประกอบ 25,27-(4,4'-bis(ethoxybenzaldehyde))-*p*-*tert*-butyl calix[4]arene (i)

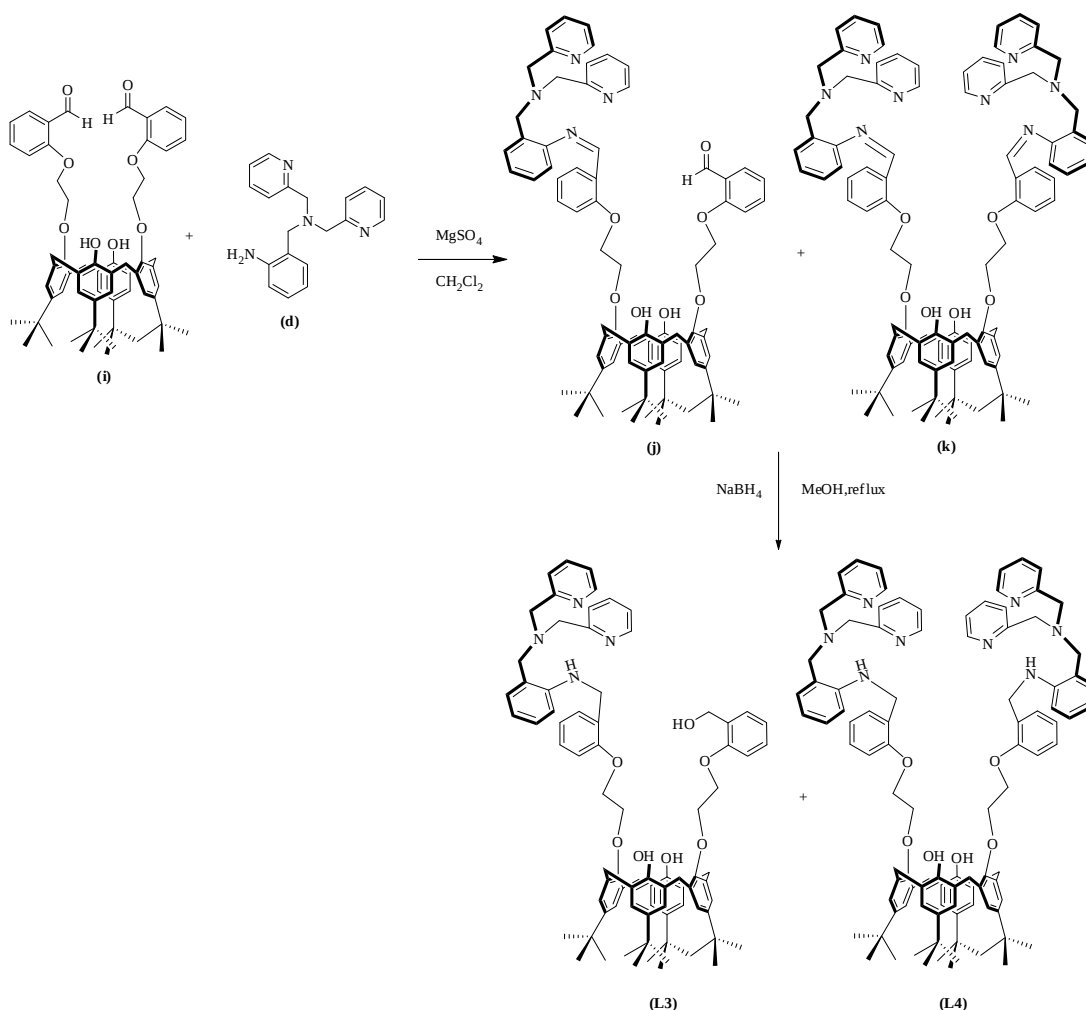


ซึ่ง *p*-*tert*-butylcalix[4]arene (**f**) (10.17 กรัม, 15.73 mmol) และ anhydrous K_2CO_3 (21.74 กรัม, 157.3 mmol) ในขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร และเติม CH_3CN (300 มิลลิลิตร) ลงในขวดดังกล่าว รีฟลักซ์สารละลายผสมเป็นเวลา 30 นาทีภายใต้บรรยากาศแก๊สไนโตรเจน หลังจากนั้นค่อย ๆ เติมสารละลายของ 2-(2-bromoethoxy)benzaldehyde (**e**) (7.21 กรัม, 31.46 mmol) ที่อยู่ใน CH_3CN (100 มิลลิลิตร) ลงไปยังสารละลายผสมในข้างต้น และทำการรีฟลักซ์สารละลายต่อไปเป็นเวลา 53 ชั่วโมง เมื่อสารละลายให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ให้กรองสารละลายเพื่อกำจัด K_2CO_3 ด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ นำสารละลายที่ได้จากการกรองไประเหยให้แห้งด้วยการกลั่นแบบลดความดัน นำส่วนที่เหลือจากการระเหยไปทำการแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีบน SiO_2 โดยใช้ CH_2Cl_2 เป็นตัวชะ เมื่อทำการตกผลึกด้วยเฮกเซนได้สารประกอบ **i** ที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวและมีร้อยละของผลิตภัณฑ์ที่ได้เท่ากับ 50 (7.47 กรัม)

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 10.52 (s, 2H, -CHO), 7.86 (m, 2H, ArH), 7.53 (t, 2H, J = 5 Hz, ArH), 7.46 (s, 2H, ArH), 7.06 (d, 4H, J = 2.8 Hz, ArH), 7.02 (s, 2H, ArH), 7.00 (s, 2H, ArH), 6.89 (s, 4H, ArH), 4.46 (t, 4H, J = 2.8 Hz, -CH₂-O-), 4.41 (t, 4H, J = 2.4 Hz, -CH₂-O-), 4.36 (d, 4H, J = 13.2 Hz, Ar-CH₂-Ar), 3.36 (d, 4H, J = 13.2 Hz, Ar-CH₂-Ar), 1.29 (s, 18H, -*tert*-butyl), 1.04 (s, 18H, -*tert*-butyl).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 190.17, 160.85, 150.35, 149.84, 147.29, 141.67, 135.76, 132.58, 128.25, 127.75, 125.77, 125.21, 121.04, 112.46, 73.67, 67.55, 34.01, 33.84, 31.67, 31.05.

3.5.2 การเตรียมไอโอโนฟอร์ L3 และ L4



ค่อย ๆ เติมสารประกอบ (i) (2.65 กรัม, 2.8 mmol) ที่ละลายอยู่ใน CH_2Cl_2 ที่ปราศจากน้ำ (50 มิลลิลิตร) ลงไปยังสารละลายแขวนลอยของ anhydrous MgSO_4 (6.76 กรัม, 56 mmol) และสารประกอบเอมีน (2.13 กรัม, 7 mmol) ใน CH_2Cl_2 ที่ปราศจากน้ำ (70 มิลลิลิตร) คนสารละลายผสมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมงภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน หลังจากนั้นกรองเพื่อกำจัด MgSO_4 นำสารละลายที่ได้จากการกรองไประเหยด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน นำส่วนที่ได้จากการระเหยซึ่งเป็นของผสมระหว่างสารประกอบอิมิน (j) และ (k) มาละลายด้วยเมทานอล (50 มิลลิลิตร) และนำสารละลายไปทำให้เย็นที่อุณหภูมิ -5°C หลังจากนั้นค่อย ๆ เติม NaBH_4 (2.12 กรัม, 56 mmol) ลงไปยังสารละลายดังกล่าวและทำการรีฟลักซ์สารละลายเป็นเวลา 12 ชั่วโมงภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน เมื่อครบเวลาทั้งสารละลายให้เย็นที่อุณหภูมิห้องและค่อย ๆ เติมน้ำ (150 มิลลิลิตร) ลงไปหลังจากนั้นระเหยเมทานอลออกด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน นำส่วนที่เหลือจากการระเหยมาละลายด้วย CH_2Cl_2 (150 มิลลิลิตร) ล้างชั้น CH_2Cl_2 ด้วยน้ำ (3×50

mL) แล้วนำชั้น CH_2Cl_2 มากำจัดน้ำด้วย MgSO_4 anhydrous กรองสารละลายแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นแบบลดความดัน นำส่วนที่เหลือจากการระเหยไปแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีบน SiO_2 โดยใช้ EtOAc เป็นตัวชะ ได้ไอโซเมอร์ **L3** และ **L4** ที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว และมีร้อยละของผลิตภัณฑ์ที่ได้เท่ากับ 12 (0.67 กรัม) และ 20 (0.85 กรัม)

L3 : ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.43 (d, 2H, $J = 4.8$ Hz, ArH), 7.48-7.46 (m, 4H, 2ArOH + 2ArH), 7.34-7.31 (m, 8H, $J = 1.6$ Hz, ArH), 7.34-7.32 (m, 6H, ArH), 7.10 (m, 6H, ArH), 6.98 (m, 6H, ArH), 6.58 (s, 2H, ArH), 6.45 (d, 2H, $J = 4.4$ Hz, ArH), 5.24 (s, 4H, Ar- CH_2 -OH), 4.53 (d, 2H, $J = 5.2$ Hz, - CH_2 -NH-), 4.45-4.34 (m, 12H, Ar- CH_2 -Ar + -O- CH_2CH_2 -O-), 3.80 (s, 4H, - CH_2 -Ar) 3.67 (s, 2H, Ar- CH_2 -Ar), 3.37 (d, 2H, $J = 13.2$ Hz, Ar- CH_2 -Ar), 3.36 (d, 2H, $J = 13.2$ Hz, Ar- CH_2 -Ar) 1.27 (s, 18H, -*tert*-butyl), 1.02 (s, 18H, -*tert*-butyl).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 171.10, 159.30, 156.70, 156.50, 150.56, 149.84, 149.50, 148.23, 147.03, 141.48, 136.34, 136.29, 132.79, 130.95, 129.75, 129.44, 128.81, 128.64, 128.59, 127.94, 127.90, 127.65, 125.71, 125.23, 125.17, 123.24, 121.92, 121.53, 120.82, 120.79, 115.38, 111.54, 110.92, 110.36, 74.25, 74.12, 66.98, 66.84, 61.56, 60.15, 58.50, 41.77, 33.99, 33.85, 31.52, 31.08.

HRMS-ESI (positive mode, m/z) : $[\text{L3}+\text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_{81}\text{H}_{94}\text{N}_4\text{O}_7$, 1235.7123; Found, 1235.7182.

L4 : ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) : δ 8.42 (d, 4H, $J = 4$ Hz, ArH), 7.91 (s, 2H, ArOH), 7.65 (d, 2H, $J = 2.4$ Hz, ArH), 7.46 (m, 4H, ArH), 7.35 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, ArH), 7.30 (s, 4H, ArH), 7.19 (m, 2H, ArH), 7.06 (m, 8H, ArH), 7.05 (m, 2H, ArH), 6.95 (d, 4H, $J = 8.4$ Hz, ArH), 6.89 (s, 4H, ArH) 6.86 (d, 2H, $J = 7.2$ Hz, ArH), 6.72 (s, 2H, -NH-), 6.54 (m, 2H, ArH), 6.44 (d, 2H, $J = 8$ Hz, ArH), 4.53 (d, 4H, $J = 4.8$ Hz, - CH_2 -NH-), 4.44 (d, 4H, $J = 12.8$ Hz, Ar- CH_2 -Ar), 4.35 (s, 8H, - CH_2 -O-), 3.80 (s, 8H, - CH_2 -), 3.68 (s, 4H, - CH_2 -), 3.33 (d, 4H, $J = 13.2$ Hz, Ar- CH_2 -Ar), 1.26 (s, 18H, -*tert*-butyl), 1.03 (s, 18H, -*tert*-butyl).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 159.23, 156.24, 150.35, 149.73, 149.07, 148.21, 147.34, 141.69, 136.29, 133.12, 130.97, 128.77, 128.56, 128.52, 127.93, 127.63,

125.72, 125.20, 123.20, 121.91, 121.55, 120.71, 115.35, 110.78, 110.32, 74.16, 66.65, 60.16, 58.47, 41.76, 34.04, 33.84, 31.83, 31.66, 31.10.

HRMS-ESI (positive mode, m/z) : $[L4+H]^+$ Calcd for $C_{100}H_{112}N_8O_6$, 1521.8705; Found, 1521.8698.

3.6 การเตรียมเมมเบรนอิเล็กโทรดจากไอโอโนฟอร์ L2 – L4

เตรียมอิเล็กโทรด โดยการละลายไอโอโนฟอร์ (10 มิลลิโมล/กิโลกรัม) ไอออนเอกเซนจ์เจอร์ NaTFPB หรือ KTpCIPB พลาสติกไซเซออร์ NPOE หรือ DOS (66 wt.%) และ PVC (33 wt.%) ใน THF (2 มิลลิลิตร) องค์กรประกอบทุกส่วนจะผสมให้มีน้ำหนักรวมกันเป็น 220 มิลลิกรัม เทของผสมลงในแบบพิมพ์แก้วรูปวงกลม ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 มิลลิเมตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ตัวทำละลาย THF ระเหยออกไป ตัดเมมเบรนที่แห้งแล้วให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.5 มิลลิเมตร และแช่เมมเบรนที่ตัดออกมาในสารละลายแคดเมียมไนเตรด $Cd(NO_3)_2$ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 1 คีน จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนมาประกอบเข้ากับตัวอิเล็กโทรด ใช้สารละลายแคดเมียมไนเตรด $Cd(NO_3)_2$ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ เป็นสารละลายอ้างอิงภายใน องค์กรประกอบต่างๆ ของเมมเบรนอิเล็กโทรดแสดงในตารางที่ 1

3.7 การวัดแรงเคลื่อนไฟฟ้า

แช่เมมเบรนอิเล็กโทรดในสารละลายแคดเมียมไนเตรด $Cd(NO_3)_2$ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง วงจรการวัดแรงเคลื่อนไฟฟ้าแสดงดังแผนภาพ

Ag, AgCl/3 M KCl//1M LiOAc//sample solution/membrane/IFS/AgCl, Ag อิเล็กโทรดอ้างอิงใช้เป็น Ag/AgCl double junction โดยใช้สารละลายลิเทียมอะซิเตด (LiOAc) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ เป็นสะพานเกลือ วัดแรงเคลื่อนไฟฟ้าที่อุณหภูมิห้องโดยใช้เครื่องโพเทนชิโอมิเตอร์ (Lawson Labs Inc.) ใช้สมการของ Debye-Hückel คำนวณแอกติวิตีของสารละลาย ขีดจำกัดของการตรวจวัดสามารถหาได้โดยอาศัยวิธีการที่อ้างอิงมาจาก IUPAC

3.8 การหาองค์ประกอบที่เหมาะสมของเมมเบรน

ทำการศึกษาผลของปริมาณขององค์ประกอบต่าง ๆ ของอิเล็กโทรด ได้แก่ ไอออนเอกเซนจ์เจอร์ (KTPCIPB และ NaTFPB) พลาสติกไซเซอร์ (o-NPOE และ DOS) เพื่อให้ได้องค์ประกอบที่เหมาะสม สำหรับการเตรียมเมมเบรนอิเล็กโทรดสำหรับตรวจวัดแคดเมียม (II) ไอออน โดยใช้ปริมาณของไอโอโนฟอร์ **L2 – L4** ให้คงที่ที่ 10 มิลลิโมล/กิโลกรัม

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของเมมเบรนและการตอบสนองของอิเล็กโทรด

ไอโอโน-ฟอร์	องค์ประกอบของเมมเบรน						ความชัน (mV/decade) (±SD, n=3)	ช่วงความเป็น เส้นตรง (ไมลาร์)	ขีดจำกัดการ ตรวจวัด (ไมลาร์)
	PVC มก. (wt%)	พลาสติกไซเซออร์		ตัวแลกเปลี่ยนไอออน		ไอโอโนฟอร์ มก. (มล. /กก.)			
		DOS มก. (wt%)	o-NPOE มก. (wt%)	KTpClPB มก. (mol%)	NaTFPB มก. (mol %)				
II	72.10 (32.6)	145.12 (65.5)	144.87 (65.6)	0.79 (71.1)	1.48 (75.2)	2.41 (10.0)	25.2 (0.6)	10 ⁻⁵ to 10 ⁻²	3.5× 10 ⁻⁶
	72.45 (32.8)		144.97 (65.7)			2.43 (10.1)	25.5 (0.8)	10 ⁻⁵ to 10 ⁻²	3.6× 10 ⁻⁶
	72.20 (32.7)		144.87 (65.6)		1.45 (73.4)	2.42 (10.1)	26.2 (0.2)	10 ⁻⁵ to 10 ⁻²	4.2× 10 ⁻⁶
	72.51 (32.7)				1.48 (74.9)	2.42 (10.1)	27.8 (0.1)	10 ⁻⁵ to 10 ⁻²	4.3× 10 ⁻⁶
	72.18 (32.5)		145.62 (65.7)		1.47 (73.2)	2.46 (10.2)	26.9 (0.2)	10 ⁻⁵ to 10 ⁻²	3.8× 10 ⁻⁶
	75.95 (33.0)		151.12 (65.6)		0.94 (48.2)	2.39 (9.6)	30.2 (0.2)	10 ⁻⁵ to 10 ⁻²	5.5× 10 ⁻⁶
	73.01 (33.0)		145.66 (65.7)		0.49 (24.6)	2.44 (10.1)	26.6 (0.3)	10 ⁻⁵ to 10 ⁻³	5.5× 10 ⁻⁶

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของเมมเบรนและการตอบสนองของอิเล็กโทรด (ต่อ)

ไอโอโน-ฟอร์	องค์ประกอบของเมมเบรน						ความชัน (mV/decade) (±SD, n=3)	ช่วงความเป็น เส้นตรง (ไมลาร์))	ขีดจำกัดของ การตรวจวัด (ไมลาร์))
	PVC มก. (wt%)	พลาสติกไซเซออร์		ตัวแลกเปลี่ยนไอออน		องค์ประกอบของเมม เบรน มก. (มล. /กก.)			
		DOS มก.(wt%)	o-NPOE มก. (wt%)	KTpClPB มก. (mol%)	NaTFPB มก. (mol%)				
III	72.53 (32.9)	144.38 (65.5)		0.82 (73.2)		2.82 (10.2)	28.5 (0.8)	10 ⁻⁵ to 10 ⁻³	3.6 × 10 ⁻⁶
	72.61 (32.9)		144.48 (65.5)	0.79 (71.6)		2.78 (10.1)	31.9 (0.8)	10 ⁻⁵ to 10 ⁻²	6.2 × 10 ⁻⁶
	72.66 (32.9)		144.82 (65.5)	0.82 (73.3)		2.82 (10.2)	26.6 (1.6)	10 ⁻⁵ to 10 ⁻²	3.8 × 10 ⁻⁶
	72.69 (32.7)		145.16 (65.4)		1.42 (71.8)	2.79 (10.1)	26.9 (0.2)	10 ⁻⁵ to 10 ⁻²	2.9 × 10 ⁻⁶
	72.43 (32.7)		145.56 (65.8)		0.47 (23.8)	2.79 (10.1)	32.8 (1.1)	10 ⁻⁵ to 10 ⁻²	7.9 × 10 ⁻⁶
	72.11 (32.6)		145.14 (65.7)		0.98 (49.4)	2.80 (10.1)	30.6 (0.5)	10 ⁻⁵ to 10 ⁻²	5.5 × 10 ⁻⁶
	72.69 (32.7)		145.16 (65.4)		1.42 (71.8)	2.79 (10.1)	25.2 (0.2)	10 ⁻⁵ to 10 ⁻²	3.2 × 10 ⁻⁶

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของเมมเบรนและการตอบสนองของอิเล็กโทรด (ต่อ)

ไอโอโนฟอร์	องค์ประกอบของเมมเบรน						ความชัน (mV/decade) (±SD, n=3)	ช่วงความเป็น เส้นตรง (โมลาร์))	ขีดจำกัดของ การตรวจวัด (โมลาร์))
	PVC มก. (wt%)	พลาสติกไซเซอร์		ตัวแลกเปลี่ยนไอออน		องค์ประกอบของเมม เบรน มก. (มล. /กก.)			
		DOS มก.(wt%)	o-NPOE มก. (wt%)	KTpClPB มก. (mol%)	NaTFPB มก. (mol%)				
IV	72.14 (32.6)		144.59 (65.4)		0.92 (46.0)	3.47 (10.2)	29.3 (0.5)	10 ⁻⁵ to 10 ⁻³	3.2× 10 ⁻⁶
	72.04 (32.7)	143.90 (65.3)			0.97 (48.0)	3.50 (10.3)	31.0 (0.5)	10 ⁻⁶ to 10 ⁻²	3.8× 10 ⁻⁶
	72.40 (32.8)	144.47 (65.5)			0.45 (22.9)	3.41 (10.1)	32.5 (0.4)	10 ⁻⁶ to 10 ⁻²	1.7× 10 ⁻⁶
	72.45 (32.7)	144.48 (65.3)			0.95 (48.2)	3.42 (10.1)	30.8 (0.2)	10 ⁻⁶ to 10 ⁻²	2.5× 10 ⁻⁶
	73.65 (32.3)	146.42 (65.1)			1.42 (72.0)	3.42 (9.9)	25.4 (0.5)	10 ⁻⁶ to 10 ⁻²	1.8× 10 ⁻⁶
	72.13 (32.7)	147.19 (66.0)		0.27 (24.5)		3.41 (10.0)	33.1 (0.2)	10 ⁻⁶ to 10 ⁻²	1.4× 10 ⁻⁶
	72.54 (32.7)	145.32 (65.5)		0.56 (50.1)		3.46 (10.2)	29.4 (0.6)	10 ⁻⁶ to 10 ⁻²	1.6× 10 ⁻⁶
	72.44 (32.7)	144.61 (65.3)		0.83 (75.4)		3.41 (10.0)	27.9 (0.6)	10 ⁻⁶ to 10 ⁻²	1.6× 10 ⁻⁶

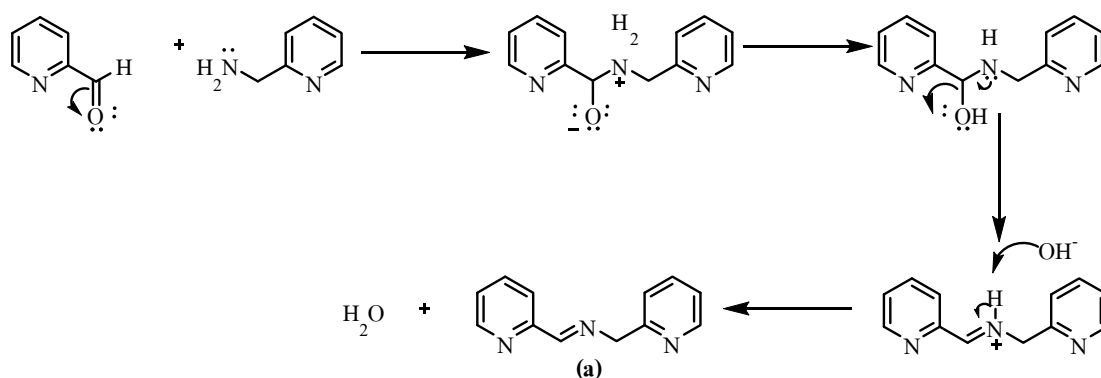
บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

4.1 การสังเคราะห์ไอโอโนฟอร์ L2

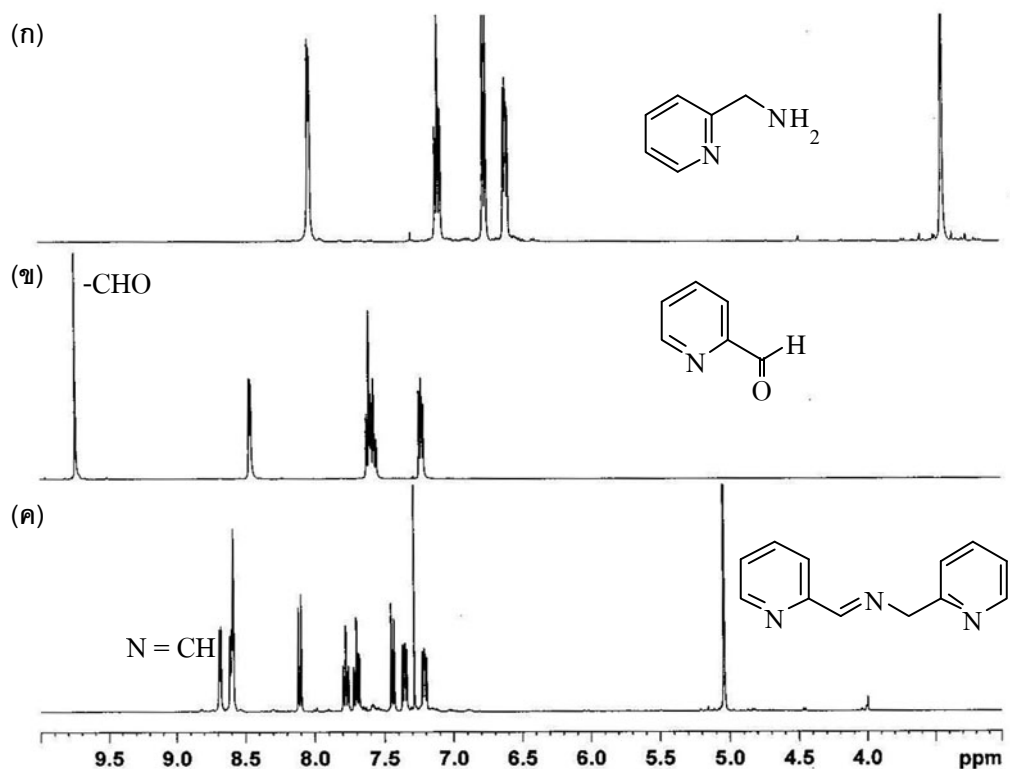
การสังเคราะห์สารประกอบ (d) ประกอบด้วยปฏิกิริยาทั้งหมด 4 ขั้นตอน ซึ่งมีกลไกของการเกิดปฏิกิริยาดังนี้

ขั้นที่ 1 การสังเคราะห์สารประกอบ (a) ปฏิกิริยาที่ใช้ในการเตรียมสารประกอบดังกล่าวคือปฏิกิริยา Schiff-base ระหว่าง pyridin-2-aldehyde และ 2-(aminomethyl)-pyridine โดยที่สารผลิตภัณฑ์ที่ได้คือสารประกอบอิมีน (a) ซึ่งมีลักษณะเป็นของเหลวสีเหลืองและมีร้อยละของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 96 โดยมีกลไกการเกิดปฏิกิริยาแสดงดังในรูปที่ 4.1



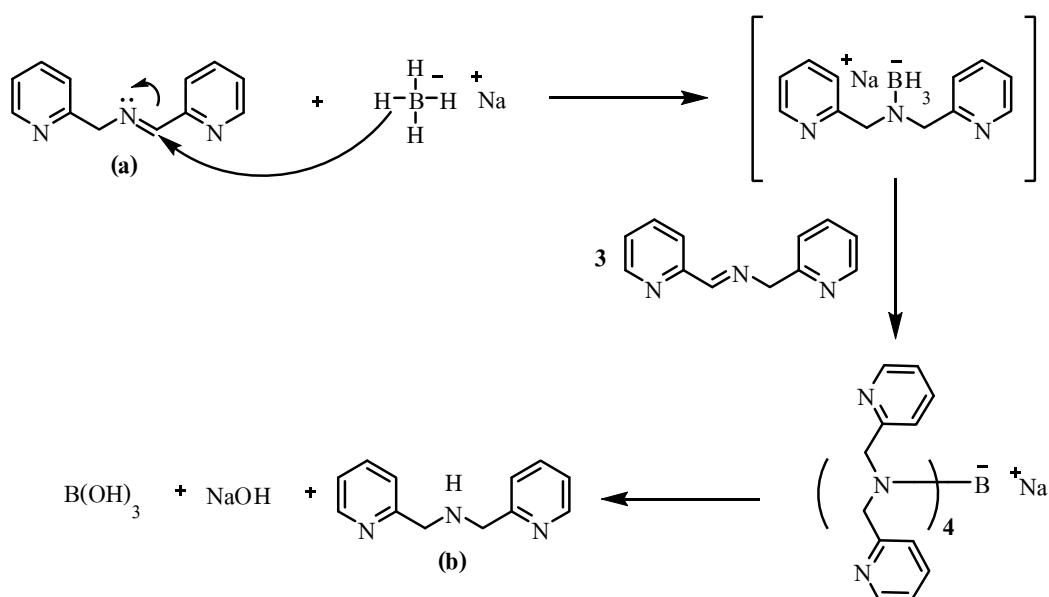
รูปที่ 4.1 กลไกการเกิดปฏิกิริยา Schiff-base

จากรูปที่ 4.1 จะเห็นได้ว่าการเกิดปฏิกิริยาเกิดจากการที่อิเล็กตรอนคู่ของไนโตรเจนในโมเลกุลของ 2-(aminomethyl)-pyridine เข้าไปสร้างพันธะที่หมู่คาร์บอนิลของ pyridin-2-aldehyde ทำให้พันธะคู่ระหว่างคาร์บอนกับออกซิเจนแตกออก โปรตอนที่เกี่ยวข้องกับไนโตรเจนเกิดการย้ายไปที่ออกซิเจน อิเล็กตรอนคู่ของไนโตรเจนจะเข้าสร้างพันธะกับคาร์บอน เกิดเป็นพันธะคู่ ซึ่งเป็นผลให้พันธะระหว่างคาร์บอนกับออกซิเจนแตกออก และไฮดรอกไซด์จะเข้าไปดึงโปรตอนออกได้เป็นสารประกอบอิมีน (a) จากการพิสูจน์โครงสร้างของสารประกอบ (a) โดยใช้เทคนิค ¹H-NMR พบว่ามีการหายไปของพีคโปรตอนของหมู่อัลดีไฮด์ -CHO ของ pyridin-2-aldehyde ที่ค่า chemical shift (δ) 9.72 ppm และปรากฏพีคของหมู่อิมีนที่มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 1 โปรตอน ค่า δ 8.69 ppm ดังแสดงในรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 เปรียบเทียบ $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของสารประกอบ (a) และสารตั้งต้น

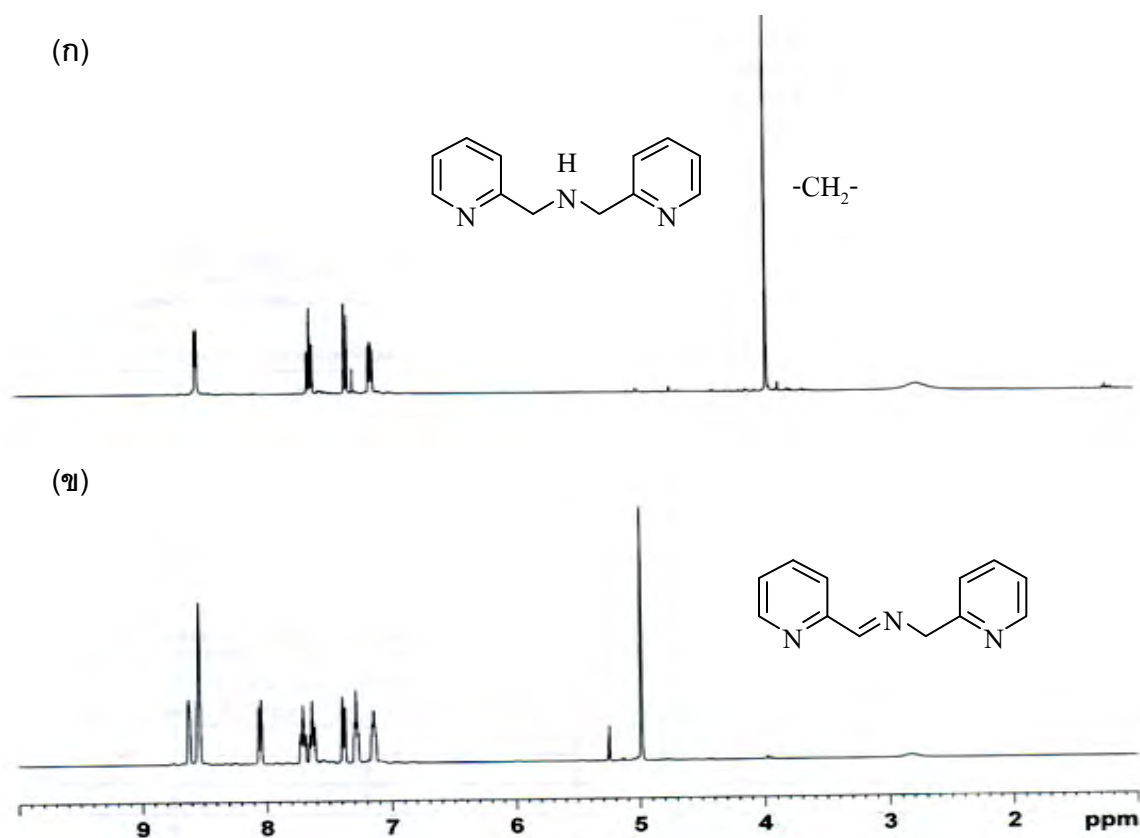
ขั้นที่ 2 การสังเคราะห์สารประกอบ (b) จากสารประกอบ (a) ปฏิกริยาที่ใช้เตรียมสารประกอบ (b) คือ ปฏิกริยารีดักชันของหมู่คาร์บอนิลให้เป็นเอมีน โดยใช้ NaBH_4 เป็นตัวรีดิวซ์ และใช้ CH_3CN เป็นตัวทำละลาย ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นของเหลวสีเหลืองและมีร้อยละของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 69 โดยกลไกการเกิดปฏิกิริยาแสดงดังรูปที่ 4.3



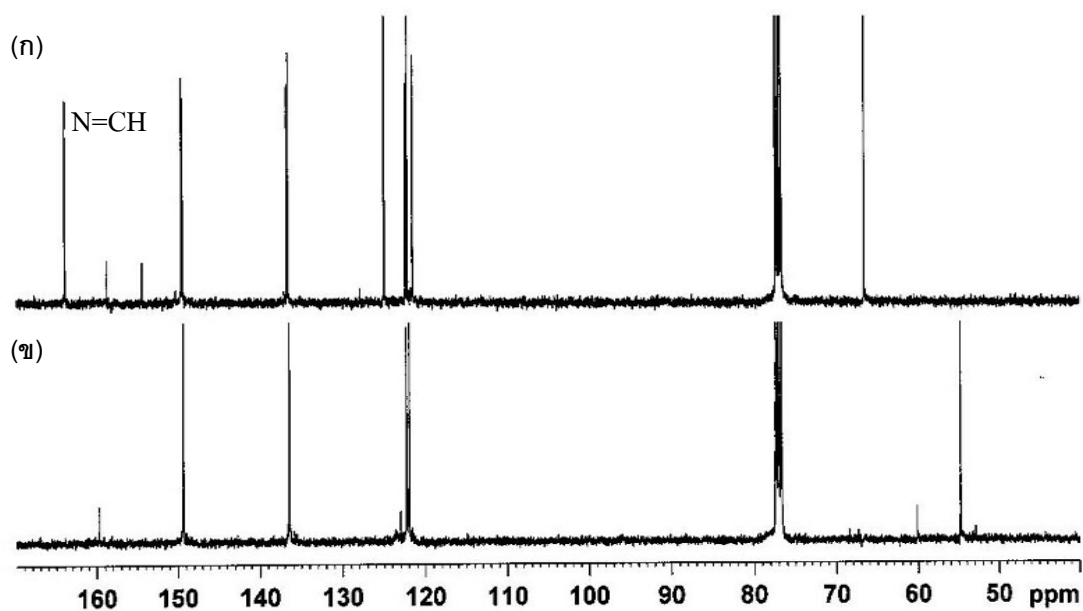
รูปที่ 4.3 กลไกการเกิดปฏิกิริยารีดักชัน

จากรูปที่ 4.3 กลไกของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นสามารถอธิบายได้ดังนี้ ไฮโดรเจนอะตอมของ NaBH₄ เข้าไปสร้างพันธะกับคาร์บอนของหมู่ 이민 และเกิดการสร้างพันธะระหว่างไนโตรเจนอะตอมของสารตั้งต้น (a) และโบรอนอะตอมของโบเรตได้เป็นสารตัวกลางเกิดขึ้น หลังจากนั้นไฮโดรเจนอะตอมที่เหลือในไอออนของโบเรตจะเข้าไปสร้างพันธะกับคาร์บอนของหมู่ 이민ของสารตั้งต้น (a) ในลักษณะเดียวกันอีก 3 ครั้ง และเกิดเป็นสารประกอบ (b) ในขั้นสุดท้าย

จากการพิสูจน์โครงสร้างของสารประกอบ (b) โดยใช้เทคนิค ¹H-NMR ปรากฏว่ามีการหายไปของพีคโปรตอนของหมู่ 이민 (-N=CH-) ของสารประกอบ (a) ที่ค่า δ 8.65 ppm และปรากฏพีคของหมู่ methylene (-CH₂-) ที่ค่า δ 4.00 ppm ซึ่งมีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 4 โปรตอน นอกจากนี้ยังพบว่า ¹H-NMR สเปกตรัมของสารประกอบ (b) มีจำนวนพีคที่น้อยกว่า ¹H-NMR สเปกตรัมของสารประกอบ (a) แสดงว่าเมื่อสารประกอบ (a) ถูกรีดิวซ์เป็นสารประกอบ (b) แล้วทำให้เกิดสมมาตรทางโมเลกุลมากขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.4 และสำหรับ ¹³C-NMR สเปกตรัม ปรากฏว่ามีการหายไปของพีคคาร์บอนของหมู่ 이민 (-N=CH-) ที่ค่า δ 165 ppm เช่นกัน ซึ่งเป็นการยืนยันว่าสารประกอบ (a) ถูกรีดิวซ์เป็นสารประกอบ (b) ดังรูปที่ 4.5

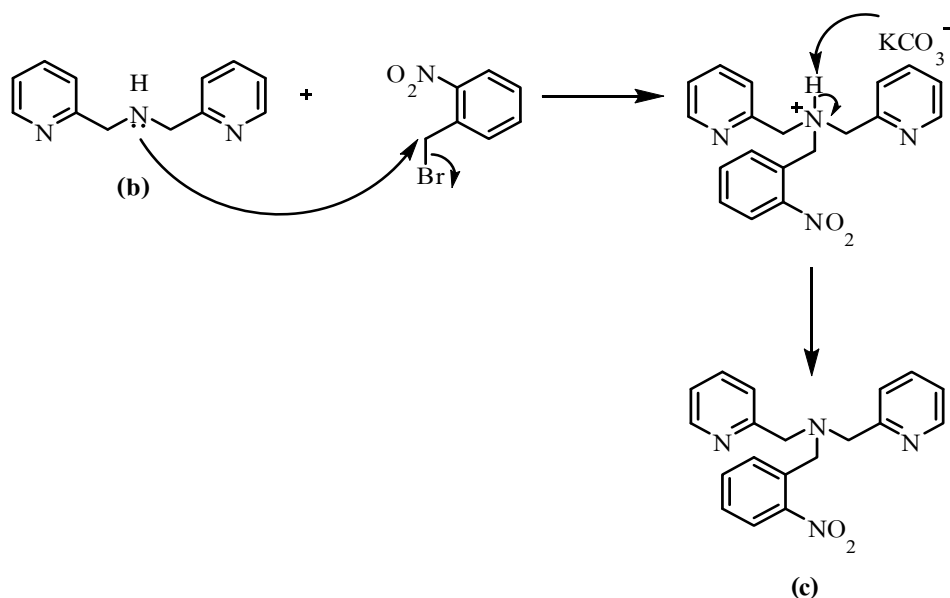


รูปที่ 4.4 เปรียบเทียบ ^1H -NMR สเปกตรัมของ (ก) สารประกอบ (b) และ (ข) สารประกอบ (a) ใน CDCl_3



รูปที่ 4.5 เปรียบเทียบ ^{13}C -NMR สเปกตรัมของ (ก) สารประกอบ (a) และ (ข) สารประกอบ (b) ใน CDCl_3

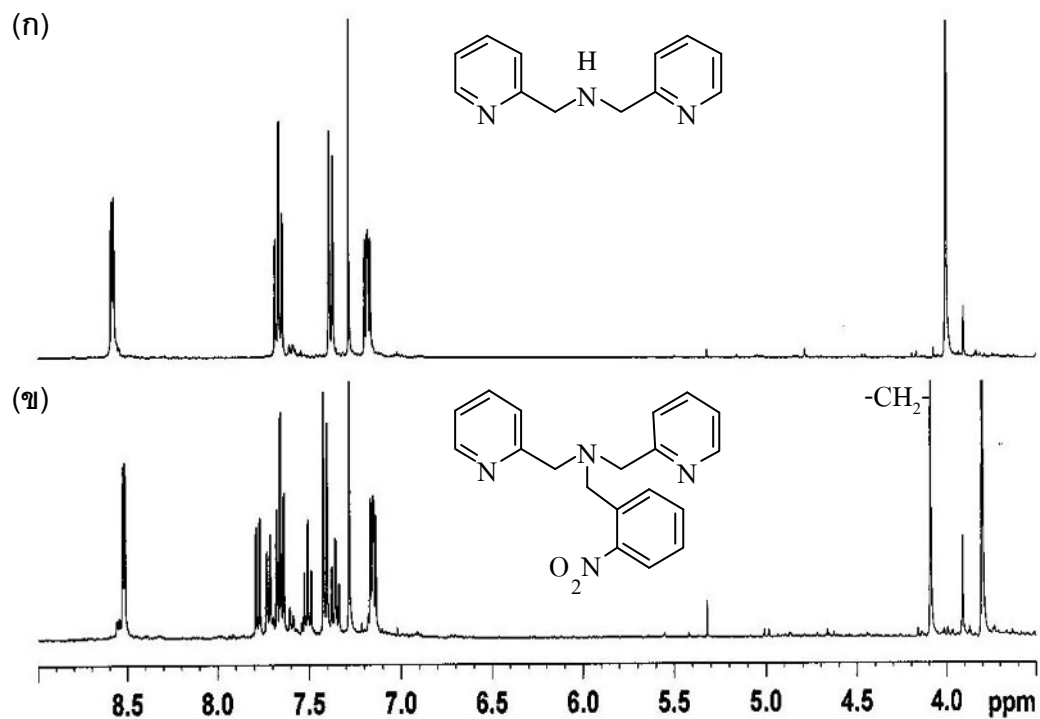
ขั้นที่ 3 การสังเคราะห์สารประกอบ (c) จากสารประกอบ (b) ปฏิกริยาที่ใช้ในการสังเคราะห์สารประกอบ (c) คือ ปฏิกริยาอัลคิเลชันเอมีน โดยใช้อัลคิลเฮไลด์ของ 2-nitrobenzylbromide ทำปฏิกิริยากับหมู่เอมีนของสารประกอบ (b) ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นของเหลวสีเหลืองเข้ม มีร้อยละของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 71 โดยมีกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังรูปที่ 4.6



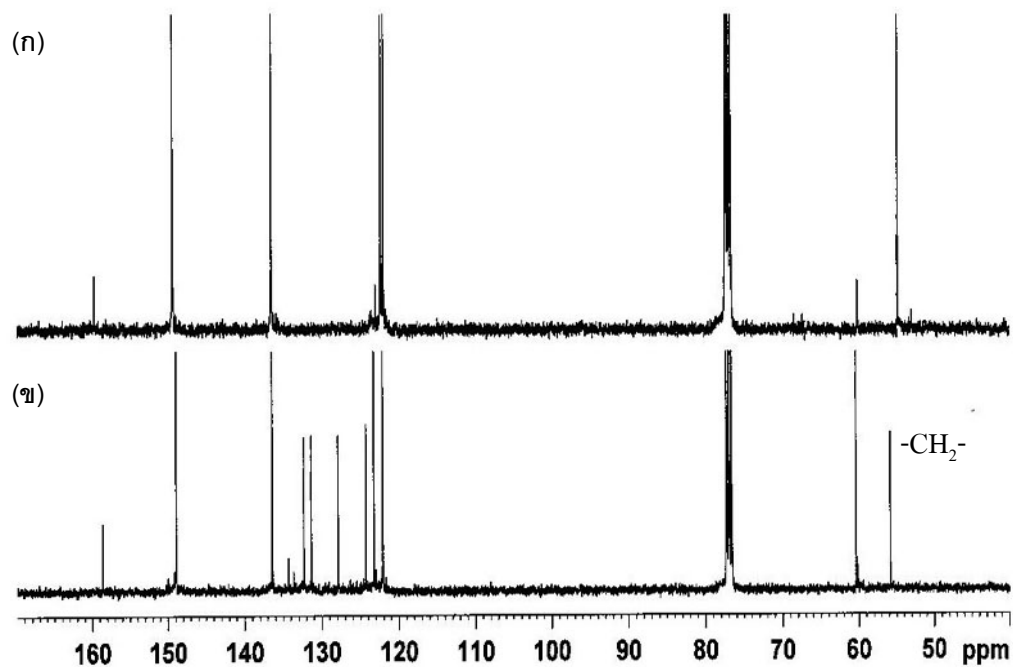
รูปที่ 4.6 กลไกการเกิดปฏิกิริยาอัลคิเลชันของอัลคิลเฮไลด์⁽²³⁾

จากรูปที่ 4.6 สามารถอธิบายกลไกการเกิดปฏิกิริยาได้ดังนี้ อิเล็กตรอนที่ตำแหน่งหมู่เอมีนของสารประกอบ (b) เข้าไปทำปฏิกิริยาที่ตำแหน่งของหมู่เมทิลลีนของ 2-nitrobenzylbromide พร้อมกับโบรไมด์แตกออกจากโมเลกุลได้เป็นสารประกอบไนโตรเนียมไอออน หลังจากนั้นโพแทสเซียมคาร์บอเนตเข้ามาดึงไฮโดรเจนที่ตำแหน่งของไนโตรเนียมไอออนได้ ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบ (c)

จากการพิสูจน์โครงสร้างของสารประกอบ (c) โดยใช้เทคนิค $^1\text{H-NMR}$ ปรากฏว่ามีการเพิ่มขึ้นของฟิสิกโปรตอนของหมู่เมทิลลีนที่ค่า δ 4.09 ppm ซึ่งมีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 2 โปรตอน ซึ่งแสดงดังในรูปที่ 4.7 และ $^{13}\text{C-NMR}$ สเปกตรัม ปรากฏว่ามีฟิสิกคาร์บอนของเมทิลลีนที่ค่า δ 60.39 ppm เพิ่มขึ้นมา ดังแสดงในรูปที่ 4.8

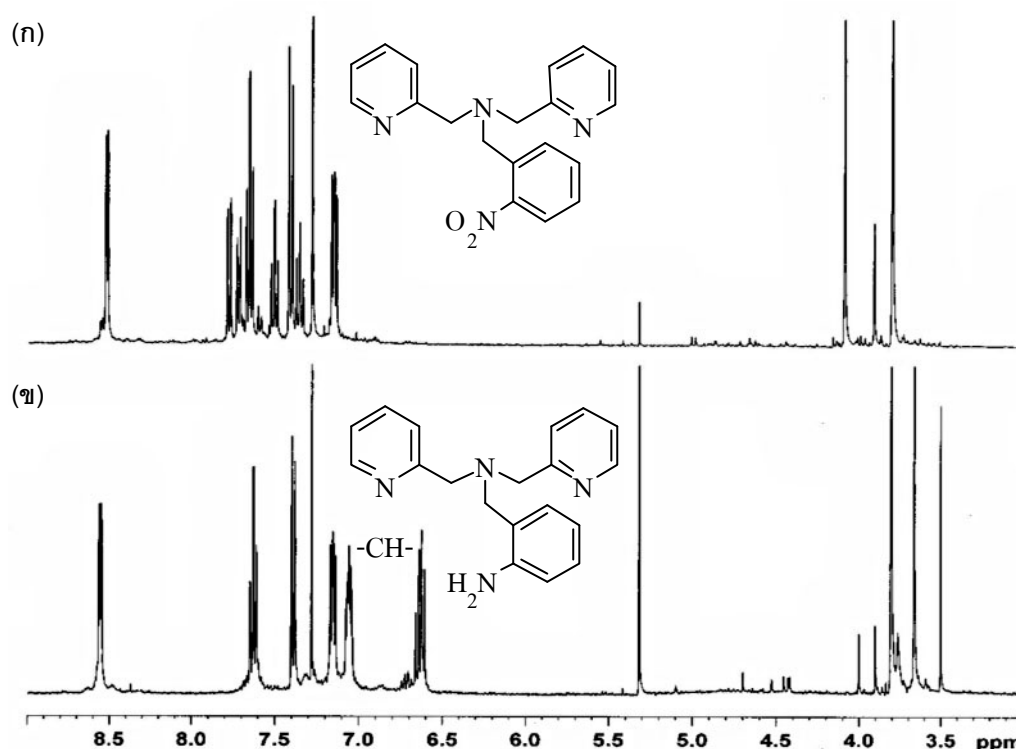


รูปที่ 4.7 เปรียบเทียบ ^1H -NMR สเปกตรัมของ (ก) สารประกอบ (ค) และ (ข) สารประกอบ (บ) ใน CDCl_3



รูปที่ 4.8 เปรียบเทียบ ^{13}C -NMR สเปกตรัมของ (ก) สารประกอบ (ค) และ (ข) สารประกอบ (บ) ใน CDCl_3

ขั้นที่ 4 การสังเคราะห์สารประกอบ (d) จากสารประกอบ (c) ปฏิบัติที่ใช้ในการสังเคราะห์สารประกอบ (d) คือ ปฏิบัติไฮโดรจิเนชันภายใต้สภาวะบรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน โดยมีโลหะ palladium เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งจากการทดลองพบว่า หมู่ไนโตรในสารประกอบ (c) ถูกรีดิวซ์เป็นหมู่อะมีนของสารประกอบ (d) ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นของเหลวสีเหลืองเข้มและมีร้อยละของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 85 จากการพิสูจน์โครงสร้างของสารประกอบ (d) โดยใช้เทคนิค $^1\text{H-NMR}$ ปรากฏว่าโปรตอนของสารประกอบ (d) พบว่ามีการเลื่อนตำแหน่งไปทาง up field มากขึ้น โดยเกิดขึ้นมาจากการรีดิวซ์หมู่ไนโตรซึ่งเป็นหมู่ดึงอิเล็กตรอนในสารประกอบ (c) ไปเป็นสารหมู่อะมีนในสารประกอบ (d) ดังรูปที่ 4.9

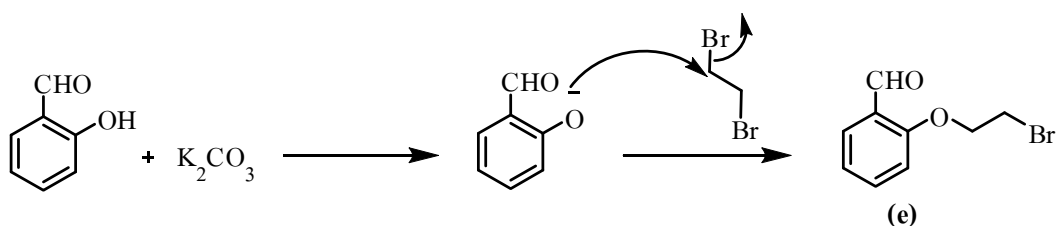


รูปที่ 4.9 เปรียบเทียบ $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของ (ก) สารประกอบ (c) และ (ข) สารประกอบ (d) ใน CDCl_3

สำหรับสารประกอบ **L1** สามารถเตรียมได้จากปฏิกิริยาทั้งสิ้น 4 ขั้นตอน โดยกลไกของการเกิดปฏิกิริยาสามารถอธิบายได้ดังนี้

ขั้นที่ 1 การสังเคราะห์สารประกอบ **(e)** ปฏิกิริยาที่ใช้ในการสังเคราะห์คือ Williamson ether synthesis ซึ่งเป็นการทำปฏิกิริยาระหว่าง salicaldehyde กับ 1,2-dibromoethane และมี K_2CO_3 ทำหน้าที่เป็นเบส สารผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีลักษณะเป็นของเหลวสีเหลืองและมีร้อยละของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 40

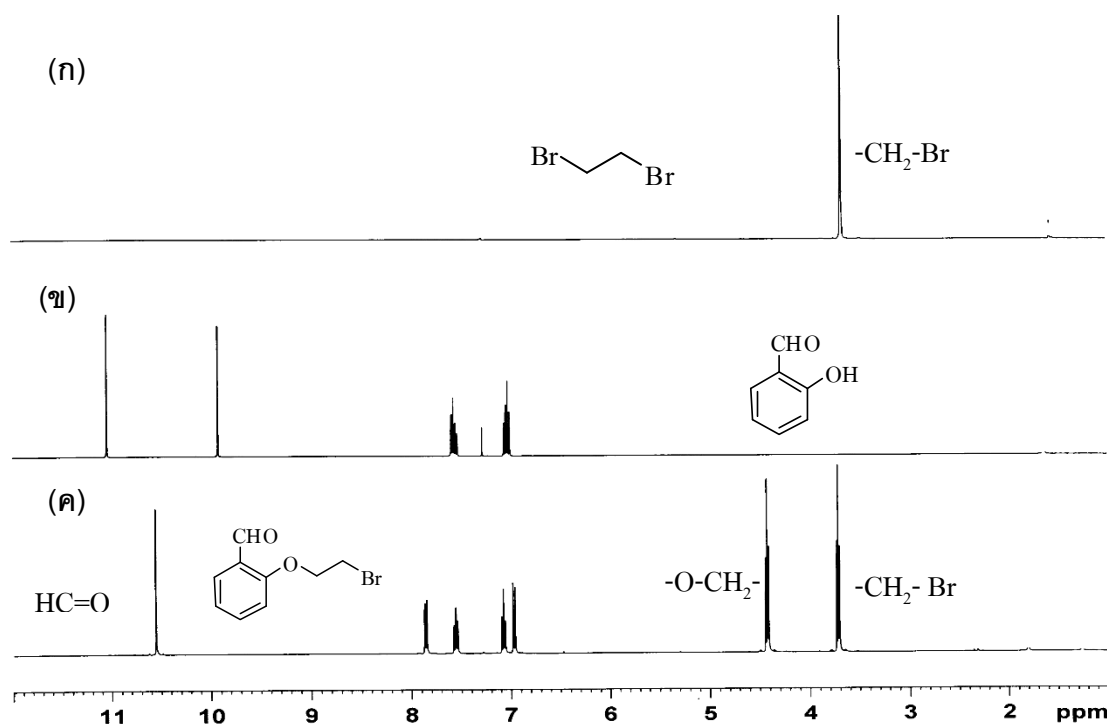
ปฏิกิริยา Williamson ether synthesis เป็นปฏิกิริยาการแทนที่ด้วยนิวคลีโอไฟล์ ซึ่งมีกลไกการเกิดปฏิกิริยาผ่านกลไกแบบ S_N2 ดังแสดงในรูปที่ 4.10



รูปที่ 4.10 กลไกการเกิดปฏิกิริยา Williamson ether synthesis

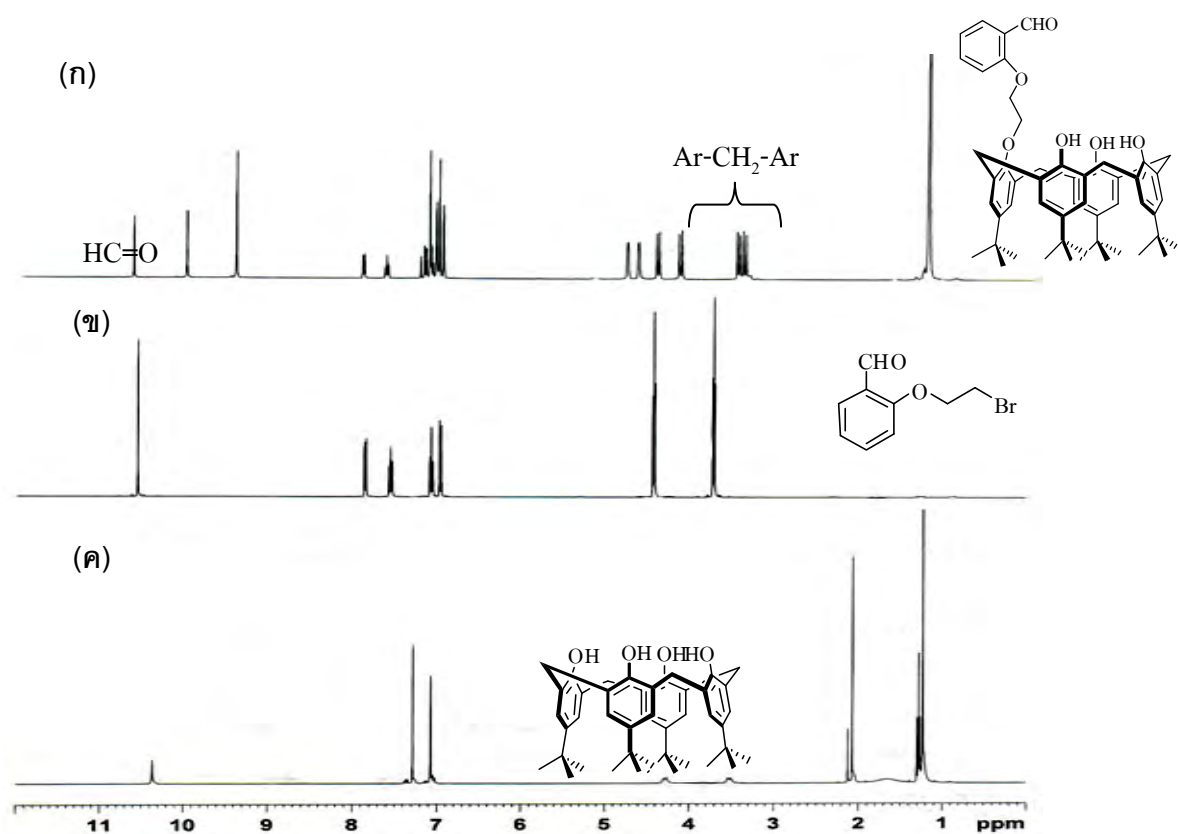
จากรูปที่ 4.10 สามารถอธิบายกลไกการเกิดปฏิกิริยาได้ดังนี้ K_2CO_3 ทำปฏิกิริยากับ salicaldehyde โดย K_2CO_3 จะไปดึงโปรตอนของหมู่ไฮดรอกซิลของ salicaldehyde ให้หลุดออก หลังจากนั้นอิเล็กตรอนของหมู่ไฮดรอกซิลที่เกิดขึ้นจะเข้าไปทำปฏิกิริยาที่อะตอมของคาร์บอนในโมเลกุลของ 1,2-dibromoethane และเกิดการหลุดออกของโบรมีนอะตอมในขั้นสุดท้าย เกิดเป็นสารประกอบ **(e)**

จากการพิสูจน์โครงสร้างโดยใช้เทคนิค ^1H-NMR พบว่ามีการหายไปของพีคโปรตอนของหมู่ไฮดรอกซิล $-OH$ ที่ค่า δ 9.92 ppm และมีการเพิ่มขึ้นของพีคโปรตอนของหมู่เมทิลีนที่มีลักษณะเป็น triplet ที่ค่า δ 3.73 และ 4.44 ppm และมีจำนวนโปรตอนของแต่ละตำแหน่งเท่ากับ 2 โปรตอน ดังแสดงในรูปที่ 4.11

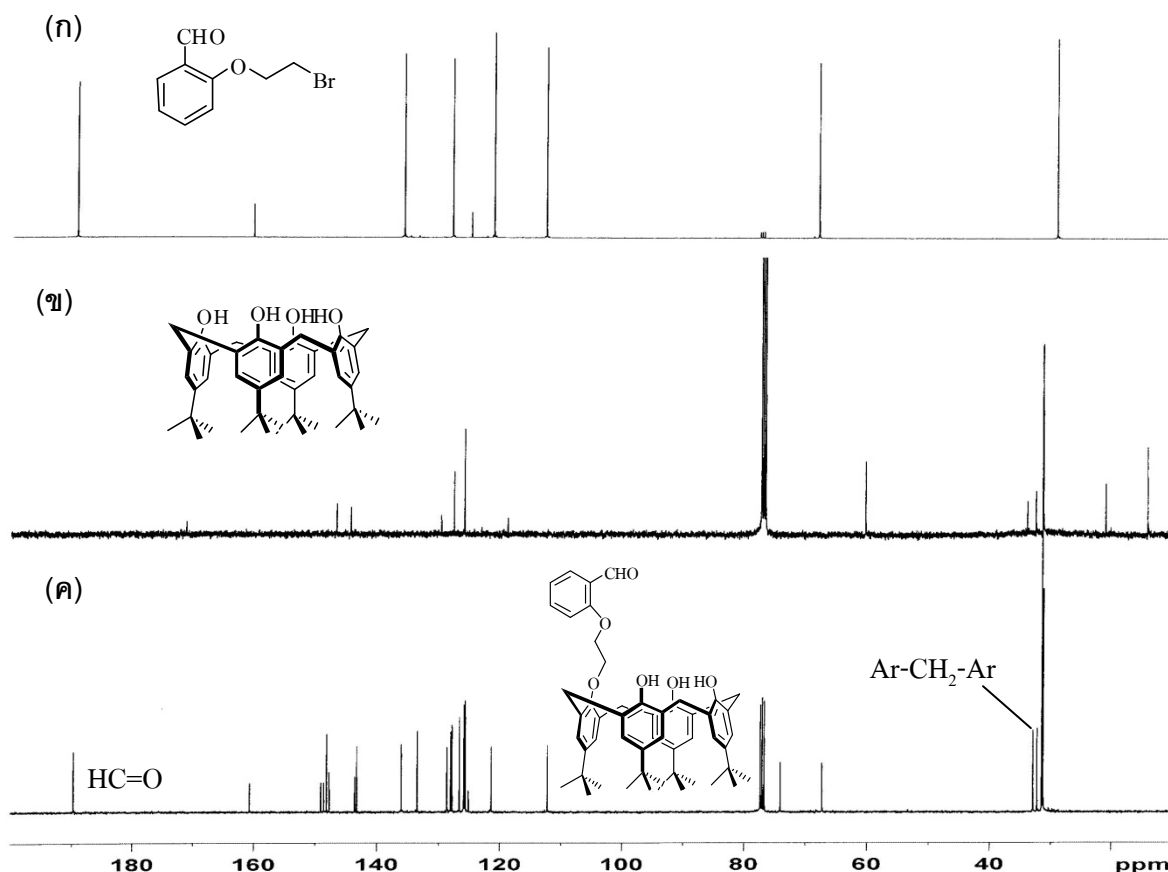


รูปที่ 4.11 เปรียบเทียบ $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของ (ก) 1,2 dibromoethane, (ข) salicylaldehyde และ (ค) สารประกอบ (e) ใน CDCl_3

ขั้นที่ 2 การสังเคราะห์สารประกอบ (f) ปฏิกริยาที่ใช้ในการสังเคราะห์ คือ Williamson ether เช่นกัน โดยเป็นการทำปฏิกิริยาระหว่าง *p-tert-butylcalix[4]arene* กับ สารประกอบ (e) โดยใช้ CsF เป็นเบส สารผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว และมีร้อยละของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 23 จากการพิสูจน์โครงสร้างสารประกอบ (f) ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ พบว่า มีการเพิ่มมาของฟิคโปรตอนของหมู่เมทิลีน ($\text{Ar}-\text{CH}_2-\text{Ar}$) ของ *p-tert-butylcalix[4]arene* ที่มีลักษณะเป็น doublet เพิ่มขึ้น 4 ตำแหน่งที่ค่า δ 3.45, 3.47, 4.20 และ 4.47 ppm โดยมีค่า $J = 13.6, 13.2, 13.6$ และ 12.8 Hz ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.12 จากผลการทดลองที่ได้แสดงว่าโมเลกุลของคาลิกซ์[4]เอรีนที่สังเคราะห์ได้มีโครงสร้างของไอโซเมอร์เป็นแบบ cone ซึ่งสอดคล้องกับ $^{13}\text{C-NMR}$ สเปกตรัม ที่ปรากฏว่ามีฟิคคาร์บอนของหมู่ดังกล่าว ปรากฏที่ค่า δ 32.93 ppm และ 32.36 ppm แสดงดังรูปที่ 4.13 นอกจากนี้ใน $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมยังปรากฏฟิคโปรตอนของหมู่อัลดีไฮด์ที่ค่า δ 10.68 ppm ซึ่งสอดคล้องกับ $^{13}\text{C-NMR}$ สเปกตรัม ที่ปรากฏฟิคคาร์บอนของหมู่อัลดีไฮด์ที่ค่า δ 189.74 ppm



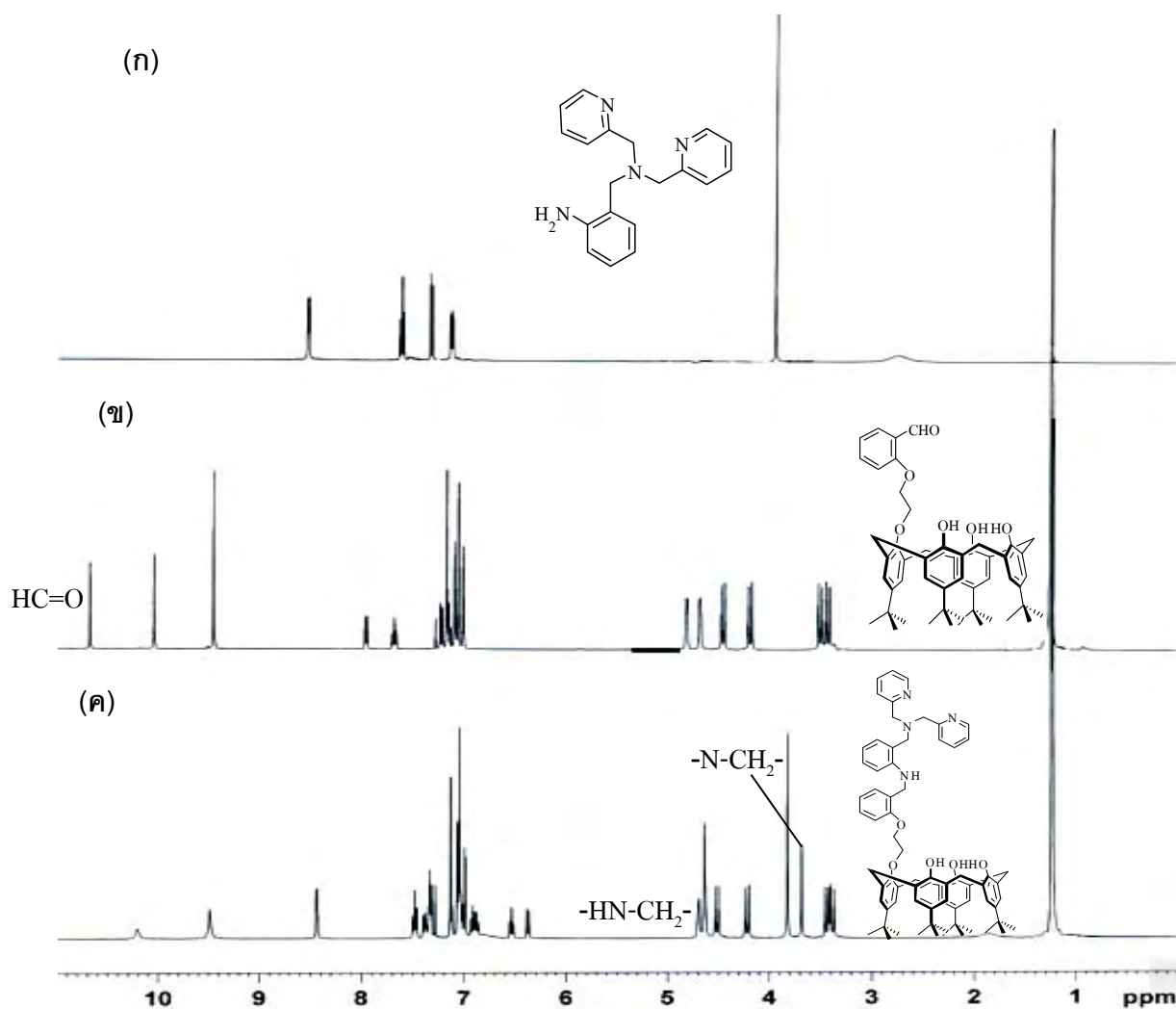
รูปที่ 4.12 เปรียบเทียบ ^1H -NMR สเปกตรัมของ (ก) สารประกอบ (f), (ข) สารประกอบ (e) และ (ค) p -*tert*-butylcalix[4]arene ใน CDCl_3



รูปที่ 4.13 เปรียบเทียบ ^{13}C -NMR สเปกตรัมของ (ก) สารประกอบ (e) (ข) *p*-*tert*-butyl calix[4]arene และ(ค) สารประกอบ (f) ใน CDCl_3

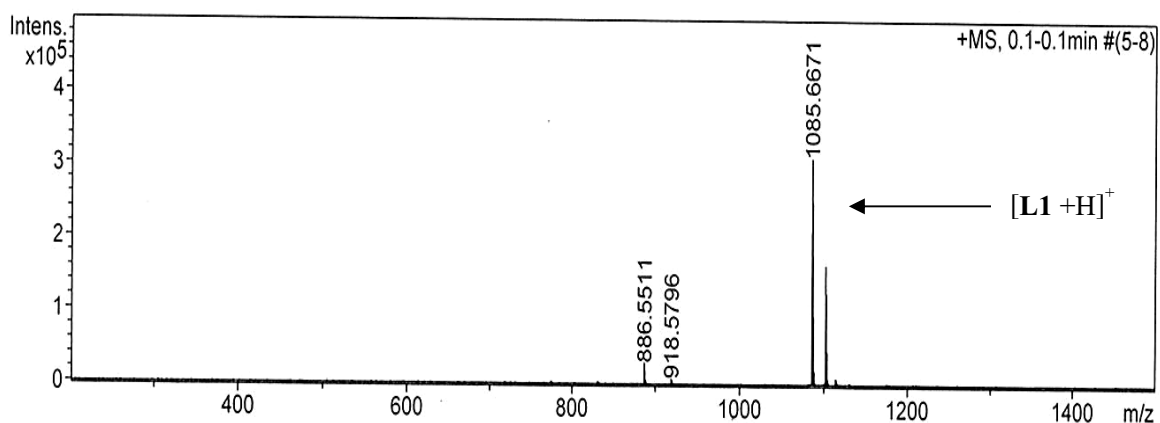
ขั้นที่ 3 เป็นการสังเคราะห์สารไอโอโนฟอร์ **L1** ในขั้นแรกเป็นการเกิดสารประกอบอิมมีนปฏิกิริยาที่ใช้ในการสังเคราะห์ คือปฏิกิริยา Schiff-base ระหว่างสารประกอบ (d) กับสารประกอบ (f) โดยพบว่าสารผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นของเหลวสีเหลือง หลังจากนั้นจึงนำสารประกอบอิมมีนดังกล่าวไปทำปฏิกิริยารีดักชัน โดยใช้ NaBH_4 เป็นตัวรีดิวซ์ ได้สารผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว และร้อยละของผลิตภัณฑ์ที่ได้เท่ากับ 20

จากการพิสูจน์โครงสร้างของสารประกอบ **L1** ด้วยเทคนิค ^1H -NMR พบว่าพีคของโปรตอนของหมู่แอลดีไฮด์ของสารประกอบ (f) หายไปและมีการเพิ่มมาของพีคโปรตอนของหมู่เมทิลีนที่ติดอยู่กับหมู่เอมีน ($-\text{CH}_2\text{NH}-$) ของสารประกอบ (f) ที่ค่า δ 4.70 ppm ซึ่งมีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 2 โปรตอน ดังแสดงดังรูปที่ 4.14



รูปที่ 4.14 เปรียบเทียบ ^1H -NMR สเปกตรัมของ (ก) สารประกอบ (ด), (ข) สารประกอบ (ฟ) และ (ค) ไอโอโนฟอร์ **L1** ใน CDCl_3

จากการพิสูจน์น้ำหนักโมเลกุลของไอโอโนฟอร์ **L1** ด้วยเทคนิคแมสสเปคโตรเมตรี พบว่าพีคที่มีค่าความเข้มสูงที่สุดคือพีคที่มีค่า m/z เท่ากับ 1085.67 ซึ่งตรงกับสปีชีส์ของ ไอออนของ $[\text{L1}+\text{H}]^+$ ดังแสดงในรูปที่ 4.15 ดังนั้นจึงคาดว่าสารผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1084.67 และมีสูตรโมเลกุลคือ $\text{C}_{72}\text{H}_{84}\text{N}_4\text{O}_5$ ทั้งนี้เนื่องจากการวิเคราะห์โครงสร้างเป็น ESI positive mode ทำให้ค่า m/z ของสารผลิตภัณฑ์ที่มีประจุเป็น +1 ดังนั้นจากสูตรโมเลกุลของสารผลิตภัณฑ์ $\text{C}_{72}\text{H}_{84}\text{N}_4\text{O}_5$ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1085.67 แต่เมื่ออยู่ในรูปของประจุ +1 จึงมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1084.67 ซึ่งเป็นน้ำหนักโมเลกุลที่สอดคล้องกับน้ำหนักโมเลกุลของไอโอโนฟอร์ **L1**

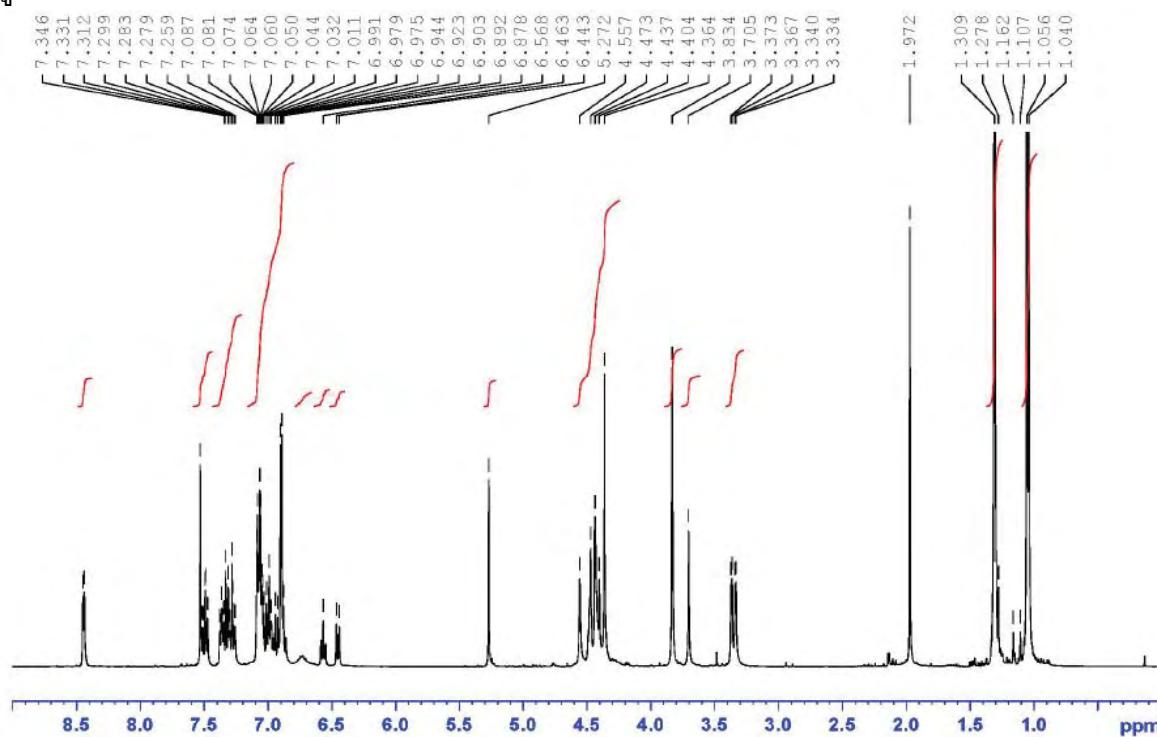


รูปที่ 4.15 แมสสเปกตรัมของไอโอโนฟอร์ L1

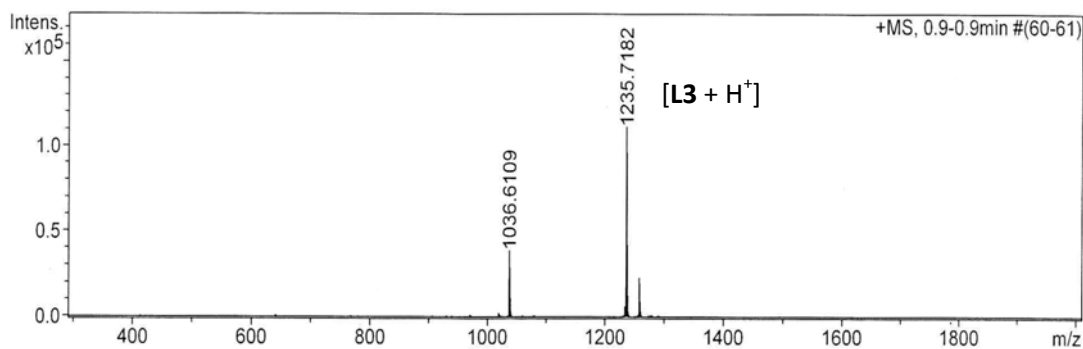
4.2 การสังเคราะห์ไอโอโนฟอร์ L3 และ L4

$^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมและแมสสเปกตรัม (HRMS-ESI) ของไอโอโนฟอร์ L3 แสดงได้ดัง

รูปที่ 4.16 และ 4.17 ตามลำดับ

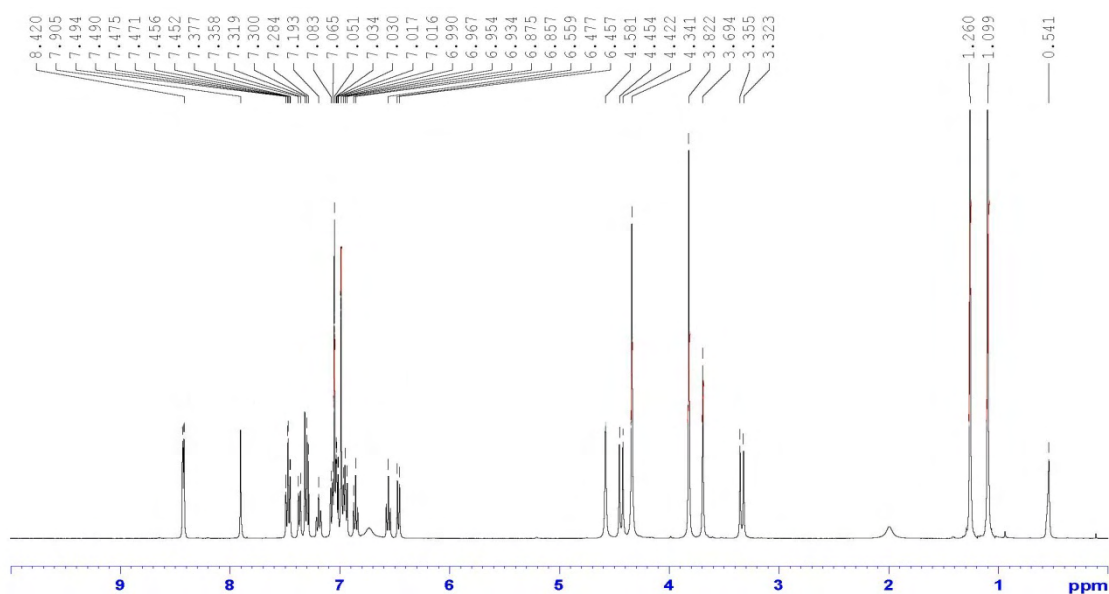


รูปที่ 4.16 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของไอโอโนฟอร์ L3 ใน CDCl_3

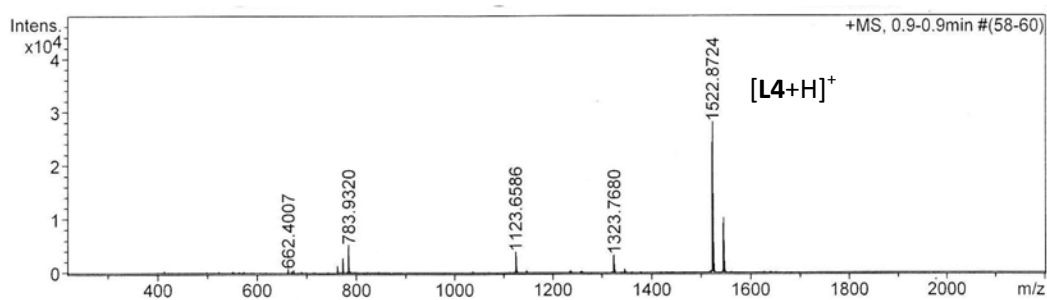


รูปที่ 4.17 HRMS-ESI (positive mode) สเปกตรัมของไอโอโนฟอร์ **L3**

$^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมและแมสสเปกตรัม (HRMS-ESI) ของไอโอโนฟอร์ **L4** แสดงได้ดังรูปที่ 4.18 และ 4.19 ตามลำดับ



รูปที่ 4.18 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของไอโอโนฟอร์ **L4** ใน CDCl_3



รูปที่ 4.19 HRMS-ESI (positive mode) สเปกตรัมของไอโอโนฟอร์ L4

4.3 การหาค่าประกอบที่เหมาะสมของเมมเบรน

สภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมเมมเบรนอิเล็กโทรดโดยใช้ไอโอโนฟอร์ L2 – L4 แสดงได้ในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 สภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมเมมเบรนอิเล็กโทรดโดยใช้ไอโอโนฟอร์ L2 – L4

Ionophore	Ionophore L_T (mmol kg ⁻¹)	Anionic sites R_T (mmol kg ⁻¹)	Plasticizer	Membrane potential E_M (mV)	Formation constant $\log \beta_{Ln}$
II	9.99	NaTFPB (4.74)	NPOE	385 ± 8	15.15 ± 0.29
III	10.01	NaTFPB (4.82)	NPOE	480 ± 9	18.29 ± 0.31
IV	9.80	KTpClPB (4.59)	DOS	463 ± 5	17.79 ± 0.16

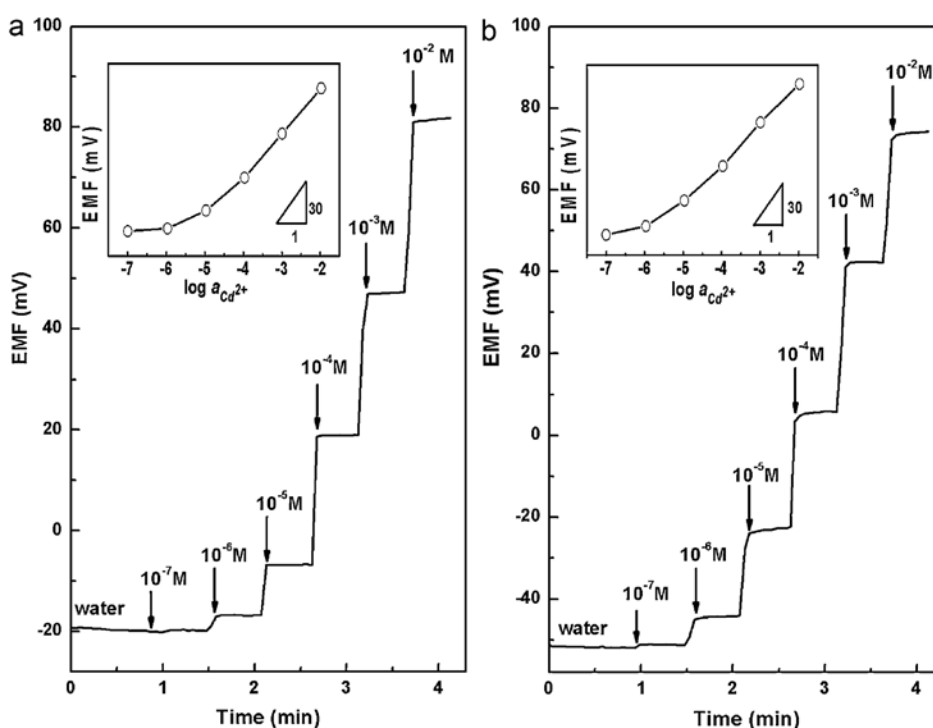
จากการทดลองจะเห็นว่าไอโอโนฟอร์ L2 และ L3 แสดงพฤติกรรมที่ดีเมื่อใช้พลาสติกไซเซอร์เป็น *o*-NPOE ในขณะที่ไอโอโนฟอร์หมายเลข L4 จะให้ค่าความชันใกล้เคียงกับค่าความชันตามสมการของเนินสต์ (29.4 ± 0.6 mV decade⁻¹) เมื่อใช้ DOS เป็นพลาสติกไซเซอร์ ซึ่งผลที่ได้แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างความเป็นขั้วของเมมเบรน และความไม่ชอบน้ำของสารเชิงซ้อนระหว่างแคตเมียม (II) ไอออนกับไอโอโนฟอร์ พลาสติกไซเซอร์ชนิด *o*-NPOE มีขั้วสูงกว่า DOS ดังนั้นสารเชิงซ้อนระหว่างแคตเมียม (II) ไอออนกับไอโอโนฟอร์ L2 และ L3 จะมีขั้วสูงกว่าสารเชิงซ้อนระหว่างแคตเมียม (II) ไอออนกับไอโอโนฟอร์ L4 ซึ่งความเป็นขั้วที่สูงกว่านี้ เป็นผลมาจากความไม่สมมาตรของโครงสร้างของไอโอโนฟอร์ทั้งสอง เมื่อเปรียบเทียบกับโครงสร้างของไอโอโนฟอร์ L4 ดังนั้นลักษณะของเมมเบรนสามารถปรับปรุงให้ดีขึ้นได้ โดยเลือกใช้พลาสติกไซเซอร์ที่มีความเป็นขั้วที่เหมาะสม

ไอโอโนฟอร์ L4 ประกอบด้วยหมู่ไทรโพลีเอมีนสองหมู่ที่สามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับแคตเมียม (II) ไอออน เกิดเป็นโครงสร้างแบบออกตะฮีดรอล โดยเกิดการโคออร์ดิเนตที่ตำแหน่งอะตอมไนโตรเจนของไอโอโนฟอร์ การวางตัวของตำแหน่งที่เกิดโคออร์ดิเนชันของหมู่ไทรโพลีเอมีนทั้งสองหมู่ของไอโอโนฟอร์ L4 ส่งผลให้เกิดการโคออร์ดิเนชันกับแคตเมียม (II) ไอออนได้ดีกว่าไอโอโนฟอร์ L2 และ L3

ไอโอโนฟอร์ L3 มีความจำเพาะเจาะจงกับแคตเมียม (II) ไอออนดีกว่าไอโอโนฟอร์ L2 อาจเป็นผลมาจากหมู่ไฮดรอกซีเมธิลฟีโนลที่ตำแหน่งตรงข้ามกับหมู่ไทรโพลีเอมีนของไอโอโนฟอร์ L3 หมู่ฟังก์ชันนี้อาจโคออร์ดิเนตกับแคตเมียม (II) ไอออนทำให้ได้สารเชิงซ้อนที่เสถียรขึ้น และจากการศึกษาลำดับความจำเพาะเจาะจงของเซนเซอร์ จะเห็นว่าการมีหมู่ไทรโพลีเอมีนเพียงหนึ่งหมู่นั้นไม่เพียงพอต่อการโคออร์ดิเนตกับแคตเมียม (II) ไอออน และยังต้องการให้มีตำแหน่งโคออร์ดิเนชันตำแหน่งอื่นเพิ่มเข้ามาเพื่อปรับปรุงความสามารถในการจับแคตเมียม (II) ไอออนในเมมเบรน

4.4 การตอบสนองของเมมเบรนที่ใช้ไอโอโนฟอร์ L3 และ L4

เนื่องจากเมมเบรนที่สร้างจากไอโอโนฟอร์ **L1** และ **L2** นั้นมีข้อจำกัดด้านความจำเพาะเจาะจง และมีช่วงการใช้งานที่แคบ จึงใช้ไอโอโนฟอร์ **L3** และ **L4** เตรียมเป็นไอออนซีเล็กทีฟอิเล็กโทรด (ISE) เพื่อใช้ในการศึกษาการตอบสนองต่อแคดเมียม (II) ไอออนของเซนเซอร์จากการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.20 นั้นพบว่าแรงเคลื่อนไฟฟ้าของอิเล็กโทรดที่เตรียมจากไอโอโนฟอร์ทั้งสองชนิดนั้นจะมีค่าสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของแคดเมียม (II) ไอออนเพิ่มขึ้น ISE ทั้งสองชนิดมีการตอบสนองที่รวดเร็ว สามารถให้สัญญาณตอบสนองต่อแคดเมียม (II) ไอออน ในเวลาไม่ถึง 10 วินาที แรงเคลื่อนไฟฟ้าจะเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อความเข้มข้นของแคดเมียม (II) ไอออนสูงกว่า 1.0×10^{-6} โมลาร์ กราฟมาตรฐานของแคดเมียม (II) ไอออน ซึ่งมีความชันสอดคล้องกับความชันของเนิสต์ คือ 30.6 ± 0.5 และ 29.4 ± 0.6 และมีขีดจำกัดของการตรวจวัดอยู่ที่ 5.5×10^{-6} และ 1.6×10^{-6} โมลาร์ สำหรับ ISE ที่ใช้ไอโอโนฟอร์ **L3** และ **L4** ตามลำดับ เซนเซอร์ทั้งสองชนิดสามารถใช้ตรวจวัดแคดเมียม (II) ไอออนได้ในช่วงความเข้มข้นที่กว้าง (10^{-6} - 10^{-2} โมลาร์) จากการตอบสนองข้างต้นสามารถกล่าวได้ว่า เมมเบรนอิเล็กโทรดจากไอโอโนฟอร์ **L3** และ **L4** เป็นเซนเซอร์ที่มีสมบัติที่ดีเหมาะสำหรับการตรวจวัดแคดเมียม (II) ไอออน



รูปที่ 4.20 การตอบสนองต่อ Cd^{2+} ของเมมเบรนที่เตรียมจาก (a) ไอโอโนฟอร์ **L3** และ (b) ไอโอโนฟอร์ **L4**³⁰

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการสังเคราะห์ไอโอโนฟอร์ **L2 – L4** ที่เป็นอนุพันธ์ของ calix[4]arene ที่มีหน่วยไทรพอดเอมีนเป็นหน่วยเลือกจับกับไอออนของโลหะนั้น พบว่าไอโอโนฟอร์ทั้ง 3 ชนิดมีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีร้อยละของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 20 (**L2**), 12 (**L3**) และ 20 (**L4**) ตามลำดับ จากการพิสูจน์โครงสร้างของไอโอโนฟอร์ทั้งสามชนิดด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ พบว่า calix[4]arene ที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุลของลิแกนด์มีลักษณะเป็น cone formation โดยมีพันธะไฮโดรเจนแบบภายในโมเลกุลเป็นปัจจัยหลักในการกำหนดโครงสร้างดังกล่าว

เมื่อนำไอโอโนฟอร์ทั้งสามที่สังเคราะห์ได้มาใช้เตรียมเป็นเมมเบรนอิเล็กโทรดที่มีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดไอออนของโลหะนั้นพบว่า อิเล็กโทรดที่เตรียมขึ้นได้มีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดไอออนแคดเมียม (II) และยังพบว่าความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดไอออนแคดเมียม (II) นั้นมีความสัมพันธ์กับโครงสร้างของไอโอโนฟอร์ที่ใช้เตรียม โดยที่เมมเบรนอิเล็กโทรดที่เตรียมจากไอโอโนฟอร์ **L4** มีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดมากที่สุด เนื่องจากมีค่า Nernstian response ในการตรวจวัดไอออนแคดเมียม (II) เท่ากับ $29.4 \pm 0.6 \text{ mV decade}^{-1}$ สามารถตรวจวัดได้ในช่วงของค่า pH 6.0 – 9.0 ความเข้มข้นของไอออนแคดเมียม (II) ที่สามารถตรวจวัดได้อยู่ในช่วง 1.6×10^{-6} – $1.0 \times 10^{-2} \text{ M}$ และมีอายุการใช้งาน 1 สัปดาห์ นอกจากนี้แล้วยังนำอิเล็กโทรดที่เตรียมได้มาใช้ในการตรวจวัดไอออนแคดเมียม (II) ที่ได้จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ CdS quantum dot และตรวจวัดไอออนแคดเมียม (II) ในน้ำทิ้ง

บรรณานุกรม

1. Han, M. S., & Kim, D. H. (2002). Naked-eye detection of phosphate ions in water at physiological pH: A remarkably selective and easy-to-assemble colorimetric phosphate-sensing probe. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 41(20), 3809-3811.
2. Jang, H. H., Yi, S., Kim, M. H., Kim, S., Lee, N. H., & Han, M. S. (2009). A simple method for improving the optical properties of a dimetallic coordination fluorescent chemosensor for adenosine triphosphate. *Tetrahedron Letters*, 50, 6241-6243.
3. Nguyen, B. T., & Anslyn, E. V. (2006). Indicators-displacement assays. *Coordination Chemistry Review*, 250, 3118-3127.
4. Kim, S. Y., & Hong, J.-I. (2009). Dual signal (color change and fluorescence ON–OFF) ensemble system based on bis (Dpa-CuII) complex for detection of PPi in water. *Tetrahedron Letters*, 50, 1951-1953.
5. Lee, J. H., Park, J., Lah, M. S., Chin, J., & Hong, J.-I. (2007). High-affinity pyrophosphate receptor by a synergistic effect between metal coordination and hydrogen bonding in water. *Organic Letters*, 9(19), 3729-3731.
6. Lee, D. H., Kim, S. Y., & Hong, J.-I. (2007). Quencher-fluorophore ensemble for detection of pyrophosphate in water. *Tetrahedron Letters*, 48, 4477-4480.
7. Morgan, B. P., He, S., & Smith, R. C. (2007). Zinc enzyme model/complexometric indicator pairs in indicator displacement assays for inorganic phosphates under physiological conditions. *Inorganic Chemistry*, 46, 9262-9266.
8. Moragues, M. E., Martínez-Máñez, R., & Sancenón, F. (2011). Chromogenic and fluorogenic chemosensors and reagents for anions. A comprehensive review of the year 2009. *Chem. Soc. Rev*, 40, 2593-2643.
9. Suksai, C. (2009). Supramolecular chemistry: Chemical sensors. *Burapha Sci. Special*, 109-118.
10. Anslyn, E. V. & Zhang, T., (2007). Using an Indicator Displacement Assay to monitor glucose oxidase activity in blood serum. *Organic Letters*, 9(9), 1627-1629.
11. Lee, D. H., Kim, S. Y., & Hong, J.-I. (2007). Quencher-fluorophore ensemble for detection of pyrophosphate in water. *Tetrahedron Letters*, 48, 4477-4480.

12. สุรวุฒิ ปรีชานนท์. (2555). โรคเก๊าท์เทียม. วันที่ค้นข้อมูล 10 มกราคม 2555, เข้าถึงได้จาก <http://www.thaiarthritis.org/article23.php>
13. สรชัย ศรีสุขะ. (2555). *Energy metabolism*. วันที่ค้นข้อมูล 10 มกราคม 2555, เข้าถึงได้จาก www.ps.si.mahidol.ac.th/Courseware/storeResources/51_SS_Energy%20Metabolism.pdf
14. แม้น อมรสิทธิ์. (2534). *หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ* (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชวนพิมพ์
15. Han, M. S., Kim, D. H., Angew. (2002). Naked-eye detection of phosphate ions in water at physiological pH: A remarkably selective and easy-to-Assemble colorimetric phosphate-sensing probe. *Angewandte Chemie International Edition*, 41, 3809
16. Hong, J. I., Hoon, D. L., Kim, S. Y., (2007). Qunecher-fluorophore ensemble for detection of pyrophosphate in water. *Tetrahedron Letters*, 48, 4477-4480
17. Hanshaw, R. G., Hilker, S. M., Jiang, H. & Smith, B. D. (2004). An indicator displacement system for fluorescent detection of phosphate oxyanions under physiological conditions. *Tetrahedron Letter*, 45, 8721-8724
18. Watchasit, S., Kaowliw, A., Suksai, C., Tuntulani, T., Ngeontae, W., & Pakawatchai, C. (2010). Selective detection of pyrophosphate by new tripodal amine calix[4]arene- based Cu(II) complexes using indicator displacement strategy. *Tetrahedron Letters*, 51, 3398-3402.
19. Hortal, M. A., Fabbri, L., Marcotte, N., Stomeo, F., & Taglietti, A. (2002). Designing the selectivity of the fluorescent detection of amino acids: A chemosensing ensemble for Histidine. *Journal of the American Chemical Society*, 125, 20-21

การนำสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์ของ
คอปเปอร์ (II) กับลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของคาลิกซ์ [4]เอรีน
มาใช้เป็นเซ็นเซอร์ทางเคมีสำหรับการตรวจวัด
ไพโรฟอสเฟตแอนไอออนด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์

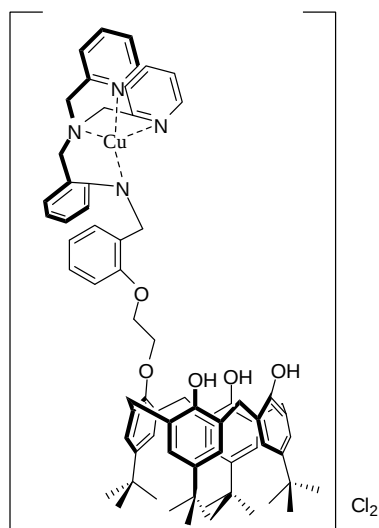
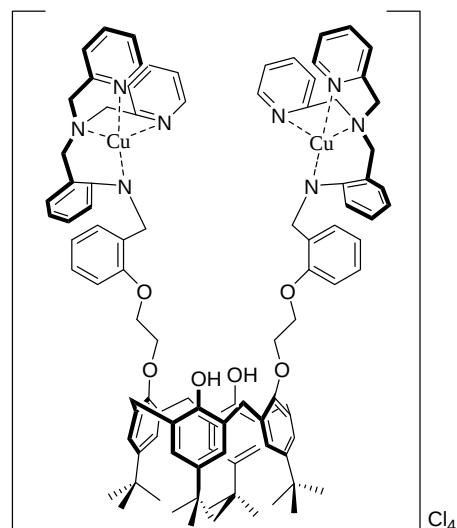
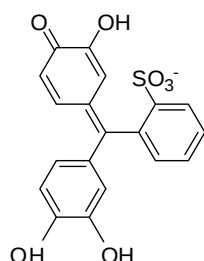
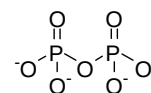
บทที่ 1

บทนำ

ไพโรฟอสเฟตแอนไอออน ($P_2O_7^{4-}$ หรือ **PPI**) เป็นแอนไอออนที่เกิดจากการสลายตัวของ Adenosine triphosphate หรือ ATP เพื่อให้ได้พลังงานสำหรับสิ่งมีชีวิตใช้ในการดำรงชีพ นอกจากนี้แล้วในทางการแพทย์ PPI ยังถูกนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพสำหรับการวินิจฉัยผู้ป่วยที่มีภาวะ โรคเก๊าท์เทียม (pseudogout) เนื่องจากผู้ป่วยดังกล่าวจะมีปริมาณของผลึกแคลเซียมไพโรฟอสเฟตไดไฮเดรต (calcium pyrophosphate dihydrate หรือ CPPD) สะสมอยู่ในไขข้อในปริมาณที่มากกว่าปกติ¹ การวินิจฉัยโรคเก๊าท์เทียมในปัจจุบันนั้นทำได้โดยการเจาะเอาน้ำในข้อไปตรวจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดพิเศษ (compensated polarized light) เพื่อตรวจดูผลึก CPPD ใน ไขข้อ หรือการใช้เทคนิคเอ็กซเรย์ไขข้อเพื่อดูเงาของแคลเซียมที่จับที่กระดูกอ่อน (chondrocalcinosis)² ซึ่งวิธีการดังกล่าวต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาสูง และอาศัยผู้ที่มีความเชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการพัฒนาเซ็นเซอร์ทางเคมีสำหรับตรวจวัด PPI ที่สามารถทำการวิเคราะห์ได้ง่าย รวดเร็ว มีสภาพไว และมีความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจวัด PPI เป็นอย่างดี

ในปัจจุบันการตรวจวัดโดยใช้เทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ (Indicator Displacement Assays หรือ IDAs)³ เป็นวิธีการตรวจวัดที่กำลังได้รับการสนใจเป็นอย่างมาก การตรวจวัดด้วยวิธีดังกล่าวนี้จะมีโมเลกุลที่มีความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกับสารที่ต้องการตรวจวัดทำหน้าที่เป็นหน่วยเลือกจับ และจะมีอินดิเคเตอร์เป็นหน่วยให้สัญญาณในการตรวจวัด หลักการตรวจวัดด้วยวิธีนี้นั้นอาศัยหลักการแข่งขันในการเลือกจับระหว่างอินดิเคเตอร์ และสารที่ต้องการตรวจวัดกับหน่วยเลือกจับในโมเลกุลของรีเซปเตอร์ ซึ่งเราจะสามารถติดตาม อันตรกิริยาที่เกิดขึ้นได้ด้วยตาเปล่าจากการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย ดังนั้นการตรวจวัดด้วยวิธีนี้จึงไม่ยุ่งยาก และไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง นอกจากนี้แล้วยังมีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อสารที่ต้องการตรวจวัด

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะนำเทคนิค IDAs มาใช้ในการตรวจวัด PPI โดยนำสารประกอบโคออร์ดิเนชันของคอปเปอร์ (II) ชนิดโมโนนิวเคลียร์ (**CuL2**) และชนิดไดนิวเคลียร์ (**Cu₂L4**) ที่มีลิแกนด์เป็นอนุพันธ์ของคาลิกซ์[4]แอรีนมาใช้เป็นโมเลกุลในการตรวจวัด โดยใช้โมเลกุลของอินดิเคเตอร์ pyrocatechol violet หรือ **PV** มาเป็นหน่วยให้สัญญาณในการตรวจวัด PPI ซึ่งโครงสร้างของโมเลกุลที่ใช้ในงานวิจัยนี้แสดงได้ดังรูปที่ 1.1

**CuL2****Cu₂L4****pyrocatechol violet (PV)****pyrophosphate (PPI)**

รูปที่ 1.1 สารประกอบโคออร์ดิเนชันของคอปเปอร์ (II) ชนิดโมโนนิวเคลียร์ (**CuL2**) และชนิดไดนิวเคลียร์ (**Cu₂L4**) ที่มีลิแกนด์เป็นอนุพันธ์ของคาลิกซ์[4]เอรีน , อินดิเคเตอร์ **Pyrocatechol Violet (PV)** และ ไพโรฟอสเฟตแอนไอออน(**PPI**)

1.1 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อหาอินดิเคเตอร์ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัด PPI ด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของ อินดิเคเตอร์ โดยใช้สารประกอบโคออร์ดิเนชัน **CuL2** และ **Cu₂L4** ป็นโมเลกุลที่ใช้ในการเลือกจับ

1.2 ขอบเขตการศึกษา

1. ศึกษาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนเซมเบิลระหว่าง **Cu₂L4** กับอินดิเคเตอร์ **PV** โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน
2. ศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ของเอนเซมเบิล
3. ศึกษาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **Cu₂L4** กับไฟโรฟอสเฟต แอนไอออนโดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ระบบของเซ็นเซอร์ทางเคมีชนิดใหม่ ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจวัดไฟโรฟอสเฟตแอนไอออนด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ในสภาวะการทดลองที่มีความใกล้เคียงกับร่างกายของสิ่งมีชีวิต ซึ่งคาดว่าจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านการแพทย์ต่อไป

บทที่ 2

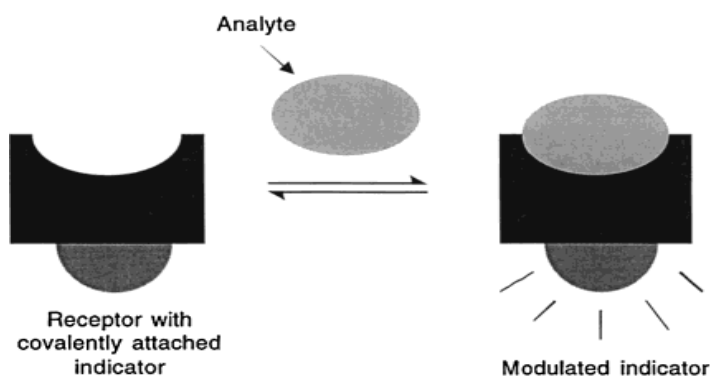
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1.1 รีเซปเตอร์และเซนเซอร์ทางเคมี⁴

ปัจจุบันนี้นักเคมีสามารถออกแบบ และสังเคราะห์โมเลกุลที่สามารถนำมาใช้เป็นตัวตรวจจับ (chemical receptor) หรือใช้งานทางด้านเคมีเซนเซอร์ (chemical sensor) ได้เป็นจำนวนมาก โดยที่โมเลกุลนำมาตรวจวัดนั้น ได้แก่ โมเลกุลของไอออนชนิดต่างๆ หรืออาจเป็นโมเลกุลที่เป็นกลางก็ได้ โดยอาศัยอันตรกิริยาพื้นฐานแบบนอน-โควาเลนต์ (non-covalent interaction) เช่น พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonding) อันตรกิริยาอิเล็กโตรสแตติก (electrostatic interaction) อันตรกิริยาแคทไอออน-ไพ (cation- π interaction) และอันตรกิริยาไพ-ไพ (π - π interaction) เป็นต้น โดยทั่วไปจะเรียกโมเลกุลที่ใช้เป็นตัวรับว่า โฮสต์ (host) และโมเลกุลที่เป็นตัวถูกจับว่า เกสต์ (guest) ถึงแม้ว่าอันตรกิริยาระหว่างโฮสต์กับเกสต์ที่ใช้จะเป็นแรงที่เกิดขึ้นอย่างอ่อนแต่ก็ถือว่ามีความจำเพาะสูงในการเลือกเกสต์ซึ่งเราสามารถนำความรู้ดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้ 3 แนวทางใหญ่ คือ ใช้ในการเลือกจับเกสต์ (recognition) ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) และใช้ในการขนส่ง (transport)

โมเลกุลที่สามารถนำมาใช้เป็นเซนเซอร์ทางเคมีนั้น ประกอบด้วยส่วนสำคัญ 2 ส่วน คือ ส่วนที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับ (recognition unit) ซึ่งเป็นส่วนที่ใช้ในการจับเกสต์ที่สนใจศึกษา และอีกส่วนหนึ่งสำคัญคือส่วนที่ทำหน้าที่เป็นตัวให้สัญญาณ (sensory unit) ซึ่งมีสมบัติในการให้สัญญาณทางเคมีที่แตกต่างกันออกไป เช่น ให้สัญญาณทางไฟฟ้าหรือให้สีที่แตกต่างกัน เมื่อโมเลกุลของเกสต์มาจับโมเลกุลของโฮสต์โดยเกิดอันตรกิริยาที่ตำแหน่งของตัวรับก็จะส่งผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณที่เป็นส่วนตัวให้สัญญาณ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณดังกล่าวสามารถตรวจวัดได้โดยใช้เทคนิคทางเคมีวิเคราะห์ เช่น เคมีไฟฟ้า และสเปกโทรโฟโตเมทรี เป็นต้น ดังแสดงในรูปที่ 2.1 สำหรับโมเลกุลของเซนเซอร์ที่มีหมู่โครโมฟอร์เป็นหน่วยให้สัญญาณนั้น เมื่อโมเลกุลดังกล่าวเกิดอันตรกิริยากับเกสต์แล้วทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของระบบที่สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่าเรียกว่า โครโมจีนิกเซนเซอร์ “chromogenic sensor” และเรียกโมเลกุลของเซนเซอร์ที่มีหมู่ฟลูออโรฟอร์เป็นหน่วยให้สัญญาณว่า ฟลูออโรจีนิกเซนเซอร์ “fluorogenic sensor”



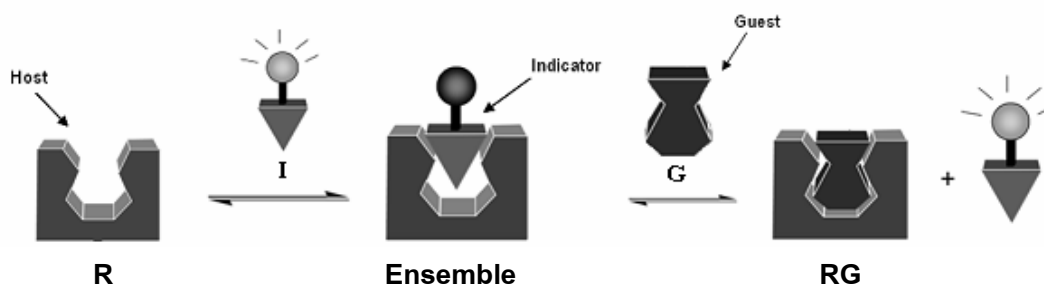
รูปที่ 2.1 การทำงานของเซนเซอร์ทางเคมี⁽¹⁾

การออกแบบโมเลกุลของโฮสต์เพื่อให้มีความสามารถในการจับโมเลกุลของเกสต์ได้อย่างจำเพาะเจาะจงนั้น จะต้องพิจารณาถึงความเหมาะสม ทั้งในด้านอิเล็กทรอนิกส์และโครงสร้างโดยองค์ประกอบสำคัญที่มีผลต่อการจับของสารประกอบ ได้แก่ ขนาดและรูปร่างของเกสต์ ขนาดช่องว่างภายในโมเลกุลของโฮสต์ ทิศทางของโมเลกุลในการจัดเรียงตัวเพื่อใช้เกสต์ โดยมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างให้น้อยที่สุดหลังจากการจับกับเกสต์ (preorganize) อะตอมที่ทำหน้าที่ในการเกิดอันตรกิริยาและอิทธิพลของตัวทำละลายเป็นต้นนอกจากนี้การออกแบบโมเลกุลของโฮสต์จะขึ้นกับความต้องการในการนำไปใช้งานด้วยเช่นกัน

2.1.2 การตรวจวัดโดยใช้เทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ (Indicator Displacement Assays)³

การตรวจวัดด้วยวิธีการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ (IDAs) นี้จัดเป็นรูปแบบหนึ่งของเซนเซอร์ทางเคมีที่ใช้โมเลกุลของอินดิเคเตอร์เป็น sensory unit โดยที่โมเลกุลของอินดิเคเตอร์นั้นไม่จำเป็นต้องเชื่อมติดกับโมเลกุลของโฮสต์ด้วยพันธะโควาเลนต์แต่ใช้อันตรกิริยาที่เกิดขึ้นแบบผันกลับได้ เช่น การเกิดอันตรกิริยาแบบไดโพลระหว่างอินดิเคเตอร์กับโมเลกุลของโฮสต์ ซึ่งเป็นข้อดีของการตรวจวัดด้วยวิธีนี้เมื่อเทียบกับการใช้โมเลกุลที่เป็นเซนเซอร์ทางเคมี โดยทั่วไปที่ต้องใช้เวลาในการสังเคราะห์ หลักการทำงานของ การตรวจวัดด้วยวิธีการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์นั้นเป็นการแข่งขันระหว่างอินดิเคเตอร์และสารที่ต้องการวิเคราะห์ในการเกิดอันตรกิริยากับโมเลกุลของโฮสต์ โดยที่อินดิเคเตอร์ดังกล่าวต้องเกิดอันตรกิริยากับโมเลกุลโฮสต์แบบผันกลับได้และเมื่อมีสารที่ต้องการวิเคราะห์ต้องสามารถเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ที่เกิดอันตรกิริยากับโฮสต์ได้ การติดตามอันตรกิริยาของการแข่งขันที่เกิดขึ้นนี้สามารถดูได้จาก การเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ที่เกิดขึ้นเมื่อมีสารที่ต้องการตรวจวัดอยู่ในระบบ โดยสีที่เกิดขึ้นในขั้นแรกนั้นจะเป็นสีของสารประกอบระหว่างโฮสต์และอินดิเคเตอร์หรือที่เรียกว่าเอนเซมเบิล (ensemble) โดยสีของเอนเซมเบิลที่เกิดขึ้นนั้นจะต้องมีความแตกต่างอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับสีของอินดิเคเตอร์อิสระ และเมื่อมีการเติมเกสต์โมเลกุลหรือสารที่ต้องการตรวจวัดลง

ในเอนไซม์เบิลดังกล่าว แล้วถ้าสีของสารละลายเปลี่ยนไปเป็นสีของอินดิเคเตอร์ที่อยู่ในรูปอิสระ แสดงว่าสารที่เราสนใจเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ที่อยู่ในเอนไซม์เบิลได้หรืออาจกล่าวได้ว่าสารที่เราสนใจมีค่าคงที่ของการเกิดเป็นสารประกอบ หรือ $K(RG)$ ได้ดีกว่าค่าคงที่ของการเกิดเป็นเอนไซม์เบิล หรือ $K(RI)$ นั่นเอง กลไกการทำงานของ การตรวจวัดด้วยวิธีนี้แสดงในรูปที่ 2.2 ปัจจุบันได้มีการนำวิธีการตรวจวัดสารด้วยวิธีนี้ไปตรวจวัดปริมาณไพโรฟอสเฟตแอนไอออน⁵⁻⁹ และปริมาณน้ำตาลกลูโคสในเลือดได้¹⁰

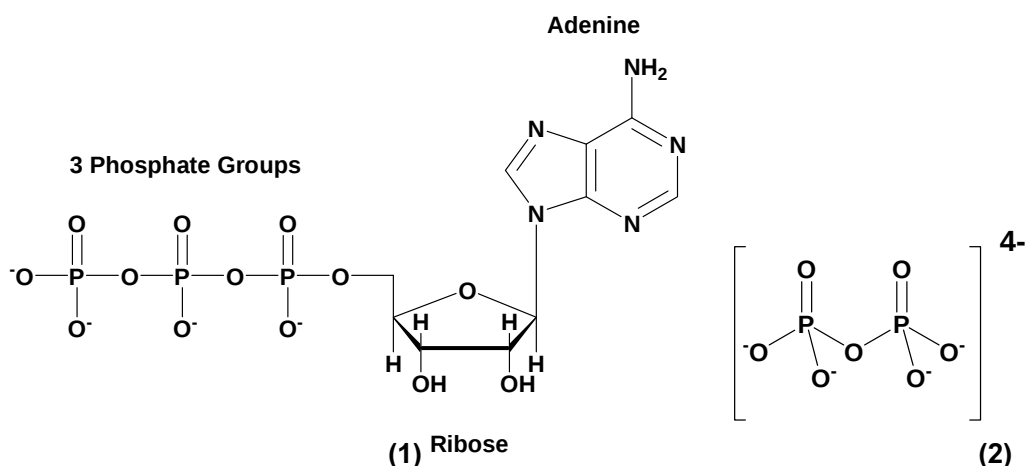


รูปที่ 2.2 การทำงานของการตรวจวัดด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์

2.1.3 ความสำคัญของไพโรฟอสเฟตแอนไอออนและการเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ¹¹

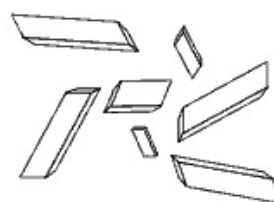
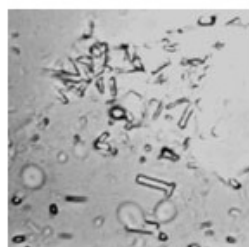
ไพโรฟอสเฟตแอนไอออน ($P_2O_7^{4-}$ หรือ **PPi**) เป็นแอนไอออนที่เกิดจากการสลายตัวของ Adenosine triphosphate หรือ ATP เพื่อให้ได้พลังงานสำหรับการดำรงชีพของสิ่งมีชีวิต โครงสร้างของ ATP นั้นเป็นพอลิเมอร์ของนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide) ซึ่งประกอบไปด้วยส่วนที่สำคัญ 3 ส่วน คือ เบสอะดีนีน น้ำตาลไรโบส และหมู่ฟอสเฟต 3 หมู่ แสดงดังรูปที่ 2.3 เมื่อกลุ่มฟอสเฟตถูกสลายออกจาก ATP จะทำให้เกิดพลังงานขึ้นมา ซึ่งพลังงานที่ได้จากการสลาย ATP หรือ ATP hydrolysis นี้จะเป็นตัวขับเคลื่อนปฏิกิริยาทางเคมีต่างๆ ที่ต้องการใช้พลังงานได้ นอกจากพลังงานแล้วผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาดังกล่าวได้แก่ Adenosine monophosphate หรือ AMP และไพโรฟอสเฟตแอนไอออนหรือ PPi ดังแสดงในสมการที่ 2.1





รูปที่ 2.3 โครงสร้างของ Adenosine triphosphate (1) และไพโรฟอสเฟตแอนไอออน (2)

PPi ตรวจพบได้ในไขข้อ (synovial fluid) น้ำเลือด (blood plasma) และปัสสาวะ นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ที่มีระดับของ PPi ในไขข้อสูงนั้น จะมีการสะสมของผลึกแคลเซียมไพโรฟอสเฟต ไดไฮเดรต (calcium pyrophosphate dihydrate หรือ CPPD) ในข้อทำให้เกิดการคั่งและสะสมของผลึกส่งผลให้ข้อเสื่อมสภาพเร็ว และบางครั้งทำให้เกิดการอักเสบเฉียบพลันของข้อเป็นพัก ๆ ซึ่งอาการดังกล่าวนี้คล้ายกับอาการของโรคเก๊าท์จึงเรียกว่าโรคเก๊าท์เทียม รูปร่างของผลึก CPPD แสดงได้ดังรูปที่ 2.4 การอักเสบที่รุนแรงของโรคเก๊าท์เทียมนั้นมักเกิดที่ข้อเข่า ทำให้เจ็บปวดและอักเสบที่ข้อทำให้เดินไม่ได้หลายวันหรือหลายสัปดาห์ ข้อที่พบการอักเสบได้บ่อยในโรคเก๊าท์เทียมคือ ข้อเข่า ข้อมือ ข้อไหล่ ข้อศอก ข้อเท้า และข้อนิ้วมือ เป็นต้น สำหรับโรคเก๊าท์แท้ หรือโรคเก๊าท์ที่ประชาชนทั่วไปรู้จักนั้นเกิดจากการคั่งและสะสมของผลึกยูเรทหรือกรดยูริกที่ไขข้อ ข้อที่พบอักเสบได้บ่อยคือ ข้อโคนนิ้วแม่เท้า ข้อโคนนิ้วเท้า ข้อเท้า เอ็นร้อยหวาย ข้อเข่า เป็นต้น ทุกคนมีโอกาสเป็นโรคเก๊าท์เทียมได้ แต่ความเสี่ยงของการเกิดจะเพิ่มขึ้นตามอายุและจะสามารถพบในเพศชายได้เท่าๆกับเพศหญิง



รูปที่ 2.4 ลักษณะของผลึกแคลเซียมไพโรฟอสเฟตซึ่งมีลักษณะป้าน แตกต่างจากผลึกของยูเรทที่พบในโรคเก๊าท์ซึ่งแหลมกว่า (ไม่ได้แสดงไว้ในรูป)¹²

สาเหตุที่ทำให้เกิดโรคเก๊าท์เทียม ดังที่กล่าวมาแล้วในข้างต้นว่าเกิดจากการคั่งและสะสมของผลึกแคลเซียมไพโรฟอสเฟตไดไฮเดรต ซึ่งผลึกนี้โดยทั่วไปจะเกาะอยู่ที่กระดูกอ่อนในข้อ (Cartilage และ meniscus) บางครั้งจะกระจายไปอยู่ที่เยื่อข้อ ผลึกที่เกาะที่กระดูกอ่อนสามารถดูได้จากภาพเอ็กซเรย์ พบเป็นเงาของผลึกแคลเซียมไพโรฟอสเฟต (chondrocalcinosis) แสดงได้ดังรูปที่ 2.5 ผลึกแคลเซียมไพโรฟอสเฟตพบได้ร้อยละ 3 ในคนที่อายุ 60 ปีขึ้นไป แต่ก็ไม่ใช่ทุกคนที่มีผลึกนี้สะสมอยู่ในข้อจะเกิดมีอาการข้ออักเสบขึ้นมาเมื่ออายุมากขึ้นก็พบผลึกนี้มากขึ้น และพบได้ถึงประมาณร้อยละ 50 ของคนอายุตั้งแต่ 90 ปีขึ้นไป แต่ก็ไม่ใช่ทุกคนจะเป็นโรคข้ออักเสบ



รูปที่ 2.5 เอ็กซเรย์ของข้อเข่า แสดงถึงผลึกแคลเซียมไพโรฟอสเฟตที่เกาะอยู่ในกระดูกอ่อนในข้อ¹³

สำหรับการวินิจฉัยโรคเก๊าท์เทียมในปัจจุบันนั้นทำได้โดยการเจาะเอาน้ำในข้อไปตรวจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดพิเศษ (compensated polarized light) เพื่อตรวจดูผลึก CPPD ในไขข้อ หรือตรวจโดยวิธีการเอ็กซเรย์ข้อเพื่อดูเงาของแคลเซียมที่จับที่กระดูกอ่อน (chondrocalcinosis) ซึ่งวิธีการดังกล่าวนี้ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาสูง และอาศัยผู้ที่มีความเชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการพัฒนาเซ็นเซอร์ทางเคมีเพื่อใช้สำหรับตรวจวัด PPI โดยที่เซ็นเซอร์ทางเคมีดังกล่าวนี้ควรจะตรวจวัด PPI ได้ง่ายและรวดเร็ว และที่สำคัญคือต้องมีความจำเพาะเจาะจง ต่อการตรวจวัด PPI เป็นอย่างดี

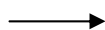
2.1.5 หลักการของยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโคปี¹⁴

เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโคปี เป็นการวิเคราะห์โดยการวัดการดูดกลืนของสารที่มีสี ซึ่งเกี่ยวข้องกับการให้แสงในช่วงอัลตราไวโอเล็ตและช่วงวิสิเบิล ที่มีช่วงความยาวคลื่นอยู่ที่ 190-800 nm ผ่านเข้าไปในโมเลกุลของสารที่สนใจโดยสารนั้นจะดูดกลืนแสงเฉพาะบางช่วง ซึ่งขึ้นกับชนิดของสารที่ละลายในสารละลายชนิดนั้น ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับพลังงานของอิเล็กตรอน (electron transition) จากสภาวะพื้น (ground state) ไปยังสภาวะกระตุ้น (excited state) ดังแสดงในรูปที่ 2.6 และได้มีการนำสมบัติดังกล่าวนี้มาใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ทั้งในเชิง ปริมาณและในเชิงคุณภาพอย่างกว้างขวางเนื่องจากเป็นวิธีที่มีความถูกต้องแม่นยำ นอกจากนั้นยังมีสเปกโฟโตมิเตอร์



รูปที่ 2.6 กระบวนการเกิดการกระตุ้นของอิเล็กตรอนจากสภาวะพื้นไปยังสภาวะกระตุ้น

การเปลี่ยนแปลงระดับพลังงานของอิเล็กตรอนที่พบในสารอินทรีย์มีดังนี้



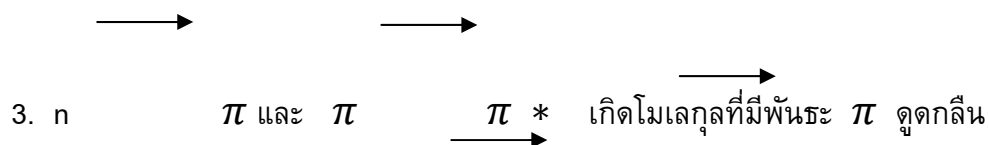
1. σ σ^* transition เกิดในโมเลกุลที่มีพันธะเดี่ยว (single bond)

เช่น C-C และ C-H เป็นต้น มักดูดกลืนที่มีความยาวคลื่นต่ำกว่าช่วงยูวี-วิสิเบิล



2. n σ^* transition เกิดในโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนอิสระ (unshared

pair of electron pair) เช่น H_2O , CH_3Cl และ CH_3NH_2 เป็นต้น

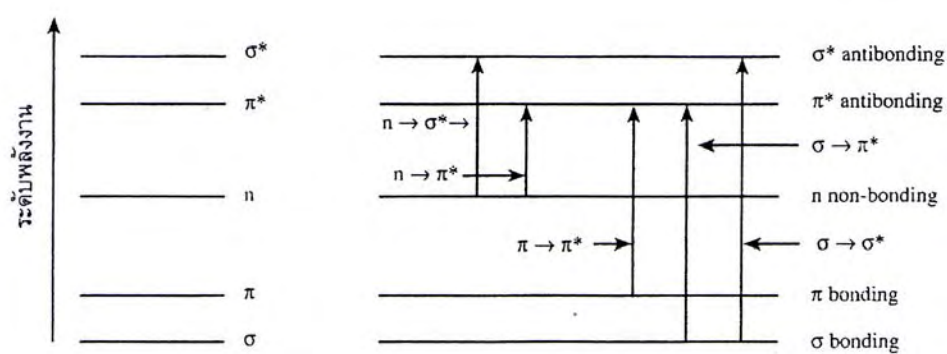


แสงช่วง 200-700 nm ค่า ϵ ประมาณ $1000-10000 \text{ M}^{-1}$ สำหรับ π π^*

และค่า ϵ ประมาณ $10-100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ สำหรับ n π

การเกิด electronic transition ในช่วงยูวี ของระดับพลังงาน π , σ และ n ที่เกิดขึ้นมี

3 ชนิด แสดงดังรูป 2.7



รูปที่ 2.7 การเกิด electronic transition ของระดับพลังงาน π , σ และ n

สำหรับการเปลี่ยนแปลงระดับพลังงานของอิเล็กตรอนในสารประกอบโคออร์ดิเนชันมีดังต่อไปนี้

1. การเปลี่ยนแปลงสถานะของอิเล็กตรอนจาก π ไป π^* พบในโมเลกุลของลิแกนด์

ที่มีพันธะ π โดยไม่มีอิเล็กตรอนใน π^* และไม่มีผลกระทบจาก π acceptor เมื่อเกิดพันธะ

โค ออร์ดิเนชัน การดูดกลืนแสงในช่วงยูวีที่มีความยาวคลื่นมากกว่า $5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

2. การเปลี่ยนแปลงสถานะของอิเล็กตรอนใน d-d ออบิทัล จะดูดกลืนแสงในช่วงที่มองเห็นได้ขึ้นกับค่าความแตกต่างของระดับพลังงานที่สภาวะพื้นกับระดับพลังงานที่สูงกว่า และการแยกออกของระดับพลังงานตามโครงสร้างของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน แสดงดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 การดูดกลืนแสงตามโครงสร้างของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน

โครงสร้าง	ความยาวคลื่นในการดูดกลืนแสง	
	(nm)	ค่า $\epsilon (\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$
ทรงเหลี่ยมสี่หน้า	500 – 1200	100 – 1000
ทรงเหลี่ยมแปดหน้า	200 – 1200	1 – 50
เหลี่ยมแบนราบ	200 – 900	50 - 400

3. การเปลี่ยนสถานะของอิเล็กตรอนแบบการถ่ายเทประจุ (charge transfer) มีการ

ดูดกลืนพลังงานอยู่ในช่วงวิสิเบิล ที่มีความยาวคลื่นมากกว่า 500 nm ค่า ϵ สูงสุดอยู่ในช่วง

$1000 - 10000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ โดยแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ

3.1 การเปลี่ยนสภาวะของอิเล็กตรอนจากลิแกนด์ไปยังไอออนโลหะ ; LMCT (Ligand to metal charge transfer) เกิดกับสารประกอบโคออร์ดิเนชันที่ไอออนของโลหะมีเลข

ออกซิเดชันสูงๆ กับลิแกนด์ที่มีลักษณะเป็น π -donor

3.2 การเปลี่ยนสภาวะของอิเล็กตรอนจากไอออนโลหะไปยังลิแกนด์ ; MLCT (Metal to ligand charge transfer) เกิดกับสารประกอบโคออร์ดิเนชันที่ไอออนของโลหะมีเลข

ออกซิเดชันต่ำๆ กับลิแกนด์ที่มีลักษณะเป็น π -acceptor

2.1.7 อิทธิพลที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเจดสี

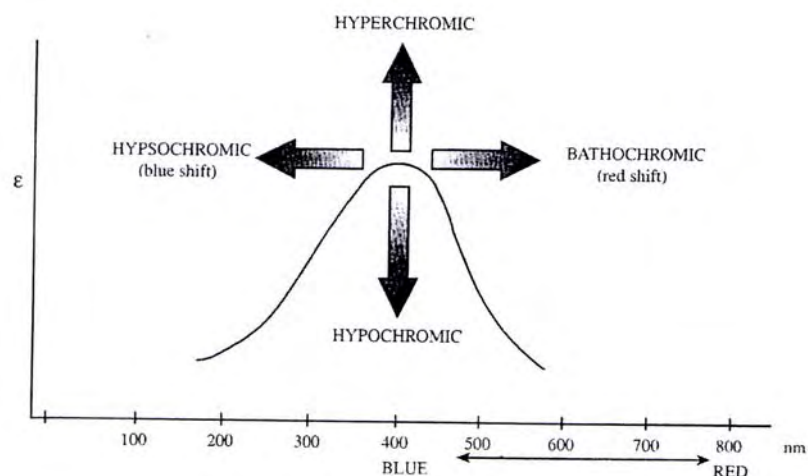
สีเกิดจากการคายพลังงานแสงของอิเล็กตรอนที่ดูดเข้าไป จากสภาวะกระตุ้นสู่สภาวะพื้น โดยสารแต่ละชนิดมีสีที่แตกต่างกันได้เพราะว่ามีการดูดและคายพลังงานของอิเล็กตรอนไม่เท่ากันและให้สเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่แตกต่างกัน ขึ้นกับลักษณะโครงสร้างของโมเลกุล เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลของสารจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสง และปริมาณการดูดกลืนแสง รวมถึงความเข้มของแสง สิ่งเหล่านี้ส่งผลถึงสีที่ปรากฏให้เห็น โดยอิทธิพลที่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงความยาวคลื่นของสาร คือ อิทธิพลที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเจดสีโดยแบ่งได้เป็น 2 ประเภทดังนี้

1. Hypsochromic shifts คือ อิทธิพลที่ทำให้โมเลกุลดูดกลืนคลื่นแสงที่มีความยาวคลื่นต่ำลง

2. Bathochromic shifts คือ อิทธิพลที่ทำให้โมเลกุลดูดกลืนคลื่นแสงที่มีความยาวคลื่นสูงขึ้นและอิทธิพลที่มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มแสง แบ่งเป็น 2 ประเภทดังนี้

1) Hyperchromic effect คือ อิทธิพลที่ทำให้โมเลกุลดูดกลืนคลื่นแสงที่มีความยาวคลื่นหนึ่งในปริมาณดูดกลืนแสงที่มากขึ้น

2) Hypochromic effect คือ อิทธิพลที่ทำให้โมเลกุลดูดกลืนคลื่นแสงที่มีความยาวคลื่นหนึ่งในปริมาณการดูดแสงที่ลดลง แสดงดังรูปที่ 2.8

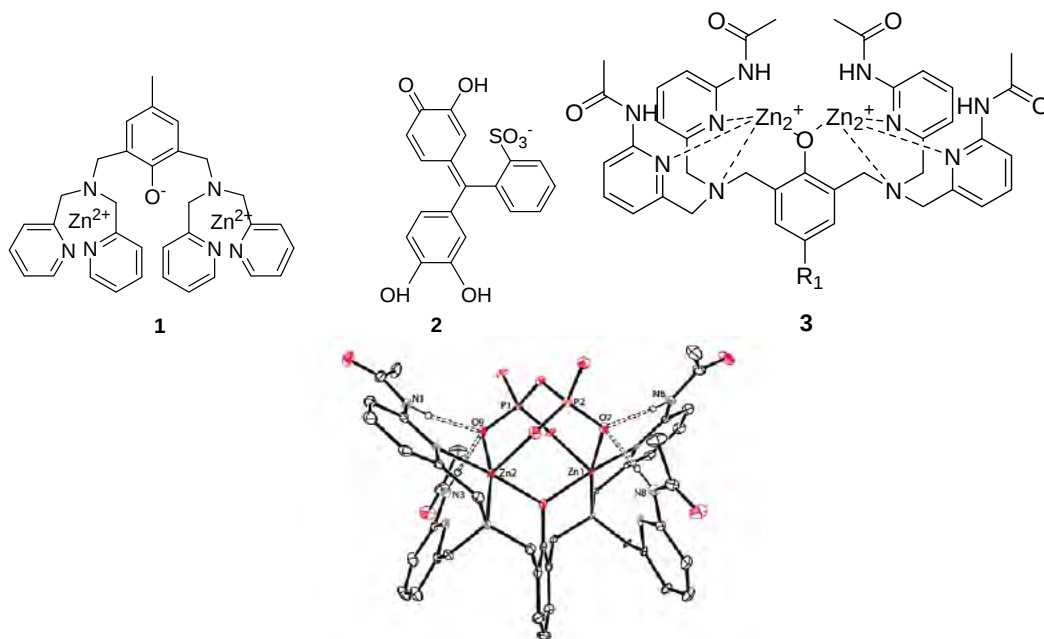


รูปที่ 2.8 การเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสง

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

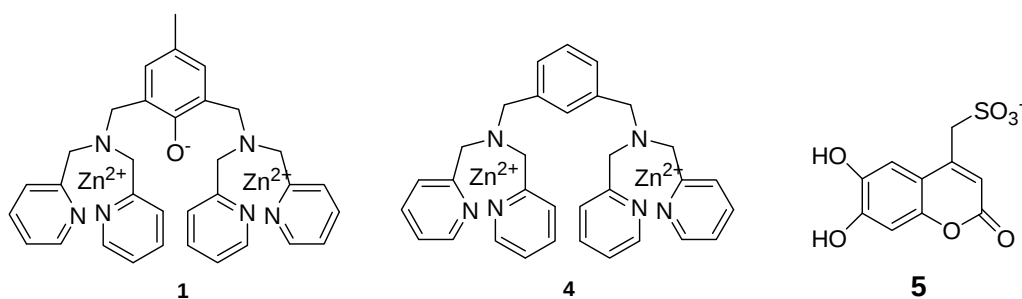
Kim และคณะ (2002, 3809)¹⁵ ได้ใช้สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์ของสังกะสี (1) เป็นโมเลกุลของโฮสต์ในการตรวจวัดไฟโรฟอสเฟตแอนไอออน ($P_2O_7^{4-}$ หรือ PPI) ด้วยวิธีการแทนที่ของอินดิเคเตอร์ pyrocatechol violet หรือ **PV (2)** ที่ pH 7.4 จากการทดลองพบว่าสารละลายของ PV เมื่ออยู่ในรูปอิสระจะมีสีเหลืองแต่เมื่อเกิดเป็นเอนแซมเบิลกับสารประกอบ (1) จะได้เป็นสารละลายสีฟ้า และเมื่อเติม PPI ลงไปในสารละลายของเอนแซมเบิลจะได้สารละลายสีเหลืองกลับคืนมาในขณะที่แอนไอออนชนิดอื่น ๆ ไม่ทำให้สารละลายเปลี่ยนสีได้ แสดงว่ามีเพียง PPI เท่านั้นที่สามารถเข้าไปแทนที่ PV ในเอนแซมเบิลได้ โดยมีค่าคงที่ของการเกิดสารประกอบโคออร์ดิเนชันของ (1) กับ PPI มีค่าเท่ากับ $1.4 \times 10^5 M^{-1}$

ต่อมาในปี 2007 **Hong และคณะ¹⁶** ได้ศึกษาการตรวจวัด PPI ด้วยวิธีการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ PV เช่นเดียวกันโดยใช้สารประกอบโคออร์ดิเนชัน (3) ซึ่งมีโครงสร้างที่คล้ายกับสารประกอบ (1) เป็นโมเลกุลของโฮสต์ จากการศึกษพบว่า PPI สามารถเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ PV ในเอนแซมเบิลของ [3•2] ได้เช่นเดียวกันค่าคงที่ความเสถียรของสารประกอบ (3) กับ PPI มีค่าเท่ากับ $5.39 \times 10^{10} M^{-1}$ ซึ่งมีค่ามากกว่าสารประกอบ (1) กับ PPI ทั้งนี้เนื่องจากสารประกอบ (3) สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับ PPI ได้เพราะมีหมู่ acetyl amide อยู่ในโครงสร้าง จึงทำให้สารประกอบที่เกิดขึ้นมีความเสถียรสูง โครงสร้างของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน PPI-3•2Zn ดังแสดงในรูปที่ 2.9



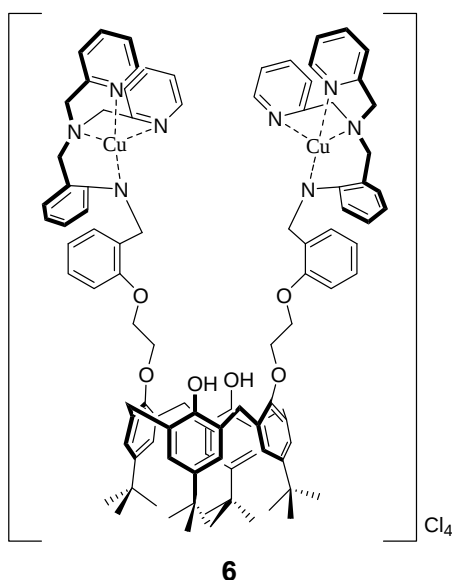
รูปที่ 2.9 โครงสร้างสารประกอบโคออร์ดิเนชันไดนิวเคลียร์ของสังกะสี (1 และ 3) อินดิเคเตอร์ PV (2) และโครงสร้างของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน PPI-3•2Zn⁽¹⁶⁾

Smith Bradley D. และคณะ (2004, 8721–8724)¹⁷ ได้ใช้สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์ของสังกะสี (1 และ 4) เป็นโมเลกุลของโฮสต์ในการตรวจวัดไฟโรฟอสเฟต แอนไอออน ($P_2O_7^{4-}$ หรือ PPI) ด้วยวิธีการแทนที่ของอินดิเคเตอร์ coumarin sulfonate (5) ซึ่งเป็นฟลูออเรสเซนต์อินดิเคเตอร์ จากการศึกษพบว่าสารประกอบ (1) มีค่าคงที่ของการเกิดสารประกอบกับ PPI คือ $67 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ซึ่งน้อยกว่าค่าคงที่ของการเกิดสารประกอบ (4) กับ PPI ที่มีค่าเท่ากับ $152 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ซึ่งคาดว่าเป็นผลเนื่องมาจากการที่สารประกอบ (1) มีความเป็นประจุบวกมากกว่าคือ +4 ในขณะที่สารประกอบ (4) มีความเป็นประจุบวกเพียง +3

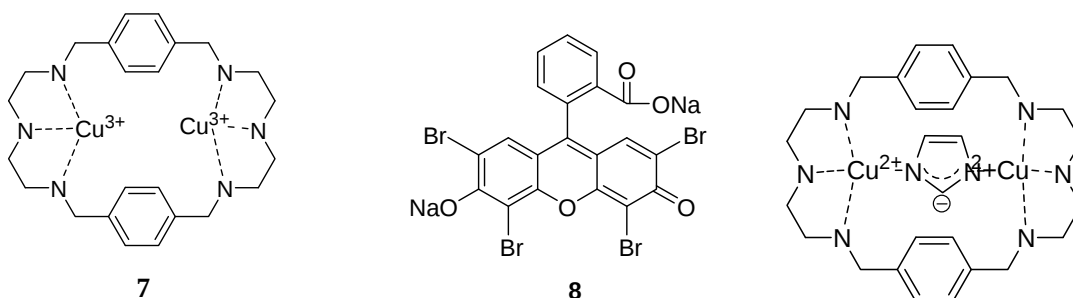


Watchasit, S และคณะ (2010, 3398-3402)¹⁸ ได้นำสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์ของคอปเปอร์ (II) กับลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของคาลิกซ์[4]เอรีน (6) มาใช้ในการตรวจวัด PPI ด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์และใช้ PV เป็นอินดิเคเตอร์ในสารละลายบัฟเฟอร์ 80/20(v/v) MeCN/H₂O ใน 10 mM HEPES pH 6.4 จากการศึกษา

พบว่า เอนเซมเบิลของ **[6•2]** มีความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกับ PPI ได้เป็นอย่างดี โดยค่าคงที่ความเสถียรของเอนเซมเบิลและค่าคงที่ความเสถียรสารประกอบ **(6)** กับ PPI มีค่าเท่ากับ $1.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ และ $5.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ตามลำดับ



Hortala, M. A. และคณะ (2002, 20-21)¹⁹ ได้นำวิธีการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ eosine Y (**8**) ซึ่งเป็นฟลูออเรสเซนต์อินดิเคเตอร์มาใช้ในการตรวจวัดกรดอะมิโนและใช้สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์ของคอปเปอร์ (II) เป็นโมเลกุลโฮสต์ (**7**) ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.05 M HEPES ที่ pH 7 จากการศึกษพบว่าเอนเซมเบิลของ **[7•8]** มีความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกับกรดอะมิโนฮิสทีดีนมากที่สุด ซึ่งคาดว่ากรดอะมิโนดังกล่าวเกิดพันธะโคออร์ดิเนชันกับอะตอมของคอปเปอร์ (II) ทั้งสองอะตอมโดยใช้ไนโตรเจนในวงอิมิดาโซลเป็นอะตอมผู้ให้อิเล็กตรอน ดังแสดงในรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 โครงสร้างสารประกอบโคออร์ดิเนชันไดนิวเคลียร์ของคอปเปอร์ (II) (**7**) อินดิเคเตอร์ eosine Y (**8**) และโครงสร้างที่เป็นไปได้ของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน (**7**) กับกรดอะมิโนฮิสทีดีน

บทที่ 3

การทดลอง

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ยูวีวิสิเบิลสเปกโตรมิเตอร์ (HP Hewlett Packard G1103A)

3.2 สารเคมีและอุปกรณ์

Acetonitrile	A.R. Grade (FLUKA)
Hydroxyethyl piperazineethane sulfonic acid (HEPES)	A.R. Grade (FLUKA)
Adenosine monophosphate (AMP)	A.R. Grade (ALDRICH)
Adenosine diphosphate (ADP)	A.R. Grade (ALDRICH)
Adenosine triphosphate (ATP)	A.R. Grade (ALDRICH)
Sodium phosphate	A.R. Grade (ALDRICH)
Sodium acetate	A.R. Grade (ALDRICH)
Sodium benzoate	A.R. Grade (ALDRICH)
Sodium iodide	A.R. Grade (ALDRICH)
Sodium bromide	A.R. Grade (ALDRICH)
Sodium chloride	A.R. Grade (ALDRICH)
Sodium fluoride	A.R. Grade (ALDRICH)
Sterile water	General Hospital Products Public Co., Ltd
Tetrasodium pyrophosphate	A.R. Grade (ALDRICH)
Pyrocatechol violet	A.R. Grade (FLUKA)

3.3 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน CuL2

ค่อย ๆ หยดสารละลายของ $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (24 มิลลิกรัม, 0.14 mmol) ในเมทานอล ลงไปในสารละลายแขวนลอยของลิแกนด์ **L2** (0.108 กรัม, 0.09 mmol) ในเมทานอล จะได้ สารละลายสีเขียวเข้ม หลังจากนั้นตั้งสารละลายเอาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จะได้ ผลึกเดี่ยวสีเขียวของสารประกอบ **CuL2** กรองและล้างผลึกด้วยเมทานอล ได้ร้อยละของ ผลิตภัณฑ์เท่ากับ 73 (80 มิลลิกรัม)

HRMS-ESI: $[\text{M}+\text{Cl}]^+$ calcd for $\text{C}_{72}\text{H}_{84}\text{ClCuN}_4\text{O}_5$, 1182.5426: found 1182.5424.

3.4 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน $\text{Cu}_2\text{L4}$

ค่อย ๆ หยดสารละลายของ $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (26 มิลลิกรัม, 0.15 mmol) ในเมทานอล ลงไปในสารละลายแขวนลอยของลิแกนด์ **L4** (0.110 กรัม, 0.06 mmol) ในเมทานอล จะได้ สารละลายสีเขียวเข้ม หลังจากนั้นตั้งสารละลายเอาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 สัปดาห์ กรองและล้างตะกอนสีเขียวของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **Cu₂L4** ที่เกิดขึ้น ได้ร้อยละของ ผลิตภัณฑ์เท่ากับ 42 (80 มิลลิกรัม)

HRMS-ESI: $[\text{M}+\text{Cl}]^+$ calcd for $\text{C}_{100}\text{H}_{112}\text{Cl}_3\text{Cu}_2\text{N}_8\text{O}_6$, 1751.6362: found 1751.6365.

3.5 การศึกษาการเกิดเอนไซม์และการหาค่าคงที่ของการเกิดเอนไซม์ที่เตรียม จาก สารประกอบโคออร์ดิเนชัน $\text{Cu}_2\text{L4}$ กับอินดิเคเตอร์ PV ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโคปี

3.5.1 การเตรียมสารละลาย $\text{Cu}_2\text{L4}$ ความเข้มข้น 400 μM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ชั่ง **Cu₂L4** 3.5 มิลลิกรัม ละลายด้วยอะซิโตนไทรล์และนำสารละลายใส่ขวด วัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยอะซิโตนไทรล์

3.5.2 การเตรียมสารละลาย PV ความเข้มข้น 400 μM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ชั่ง **PV** 2.5 มิลลิกรัม ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 80/20 (%v/v) $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ ใน 10 mM HEPES pH 6.4 และนำสารละลายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร และ ปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 80/20(v/v) $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ ใน 10 mM HEPES pH 6.4

3.5.3 การเตรียมสารละลาย PV ความเข้มข้น 20 μM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลาย **PV** ความเข้มข้น 400 μM (จากข้อ 3.5.2) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 80/20 (%v/v) $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ ใน 10 mM HEPES pH 6.4

3.5.4 วิธีการทดลอง

ปิเปตสารละลาย **PV** ความเข้มข้น 20 μM ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และค่อย ๆ โทเทตสารละลาย **Cu₂L₄** ความเข้มข้น 400 μM โดยใช้ปริมาตรตลับที่แสดงในตารางที่ 3.1 จากนั้นคนสารละลายให้เข้ากัน นำสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 250-900 nm และนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนไซม์

ตารางที่ 3.1 การศึกษาการเกิดเอนไซม์และการหาค่าคงที่ของการเกิดเอนไซม์ที่เตรียมจาก สารประกอบโคออร์ดิเนชัน **Cu₂L₄** กับอินดิเคเตอร์ **PV** ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโคปี

ครั้งที่	ปริมาตร PV (มิลลิลิตร)	ปริมาตร Cu₂L₄ (มิลลิลิตร)	โมลของ PV	โมลของ Cu₂L₄	อัตราส่วน โมลของ Cu₂L₄ ต่อโมลของ PV
1	2.0	0.00	4×10^{-8}	0.0	0.0
2	2.0	0.01	4×10^{-8}	4×10^{-9}	0.1
3	2.0	0.02	4×10^{-8}	8×10^{-9}	0.2
4	2.0	0.03	4×10^{-8}	1.2×10^{-8}	0.3
5	2.0	0.04	4×10^{-8}	1.6×10^{-8}	0.4
6	2.0	0.05	4×10^{-8}	2×10^{-8}	0.5
7	2.0	0.06	4×10^{-8}	2.4×10^{-8}	0.6
8	2.0	0.07	4×10^{-8}	2.8×10^{-8}	0.7
9	2.0	0.08	4×10^{-8}	3.2×10^{-8}	0.8
10	2.0	0.09	4×10^{-8}	3.6×10^{-8}	0.9
11	2.0	0.10	4×10^{-8}	4×10^{-8}	1.0
12	2.0	0.11	4×10^{-8}	4.4×10^{-8}	1.1
13	2.0	0.12	4×10^{-8}	4.8×10^{-8}	1.2

3.6 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ของเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบโคออร์ดิเนชัน $\text{Cu}_2\text{L4}$ กับอินดิเคเตอร์ PV

3.6.1 การเตรียมสารละลาย $\text{Cu}_2\text{L4}$ ความเข้มข้น $20\ \mu\text{M}$ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลาย $\text{Cu}_2\text{L4}$ ความเข้มข้น $400\ \mu\text{M}$ (จากข้อ 3.5.1) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 80/20 (%v/v) $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ ใน 10 mM HEPES pH 6.4

3.6.2 การเตรียมสารละลายของแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.6.2.1 การเตรียมสารละลายของแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 10 mM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ชั่งเกลือของแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ตามน้ำหนักที่แสดงในตารางที่ 3.2 ละลายด้วยน้ำกลั่นยาฉีด จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นยาฉีดจนถึงขีดบอกปริมาตร

3.6.2.2 การเตรียมสารละลายของแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลายของแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 10 mM (จากข้อ 3.6.2.1) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 80/20 (%v/v) $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ ใน 10 mM HEPES pH 6.4 จนถึงขีดบอกปริมาตร

3.6.3. วิธีการทดลอง

ปิเปตสารละลาย $\text{Cu}_2\text{L4}$ ความเข้มข้น $20\ \mu\text{M}$ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ในคิวเวท จากนั้น ปิเปตสารละลาย PV ความเข้มข้น $400\ \mu\text{M}$ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร (จากข้อ 3.5.2) ใส่ลงไป ในคิวเวทดังกล่าว คนสารละลายให้เข้ากันและนำสารละลายดังกล่าวไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 250-900 nm หลังจากนั้นเติมสารละลายของกรดอะมิโนชนิด ความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ลงไปในคิวเวทคนสารละลายให้เข้ากัน และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง นำข้อมูลที่ได้ มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเอนไซม์เบิลอิสระ และสารละลายของเอนไซม์เบิลเมื่อเติมกรดอะมิโนแต่ละชนิดกับความยาวคลื่นที่ใช้ในการทดลองการพิจารณาว่ากรดอะมิโนชนิดใดสามารถแทนที่ PV ได้นั้นสังเกตได้จากการเปลี่ยนสีสารละลายของเอนไซม์เบิลจากสีเขียวไปเป็นสีเหลืองของ PV อิสระ

ตารางที่ 3.2 น้ำหนักเกลือของแอนไอออนชนิดต่างๆที่ใช้ในการเตรียมเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้น 10 mM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ลำดับที่	ชนิดของแอนไอออน	ชนิดเกลือของแอนไอออน	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)
1	H_2PO_4^-	NaH_2PO_4	6.90
2	AcO^-	NaOAc	6.80
3	$\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ หรือ PPi	$\text{Na}_4(\text{P}_2\text{O}_7)$	13.30
4	BzO^-	NaOBz	7.21
5	I^-	NaI	7.47
6	Br^-	NaBr	5.14
7	Cl^-	NaCl	2.92
8	F^-	NaF	2.10
9	AMP	AMP	18.26
10	ADP	ADP	22.06
11	ATP	ATP	27.56

3.7 การศึกษาผลของแอนไอออนที่มีผลต่อการแทนที่อินดิเคเตอร์ PV ในเอนไซม์เบิลที่เกิดจากสารประกอบโคออร์ดิเนชัน $\text{Cu}_2\text{L4}$ และอินดิเคเตอร์ PV ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน

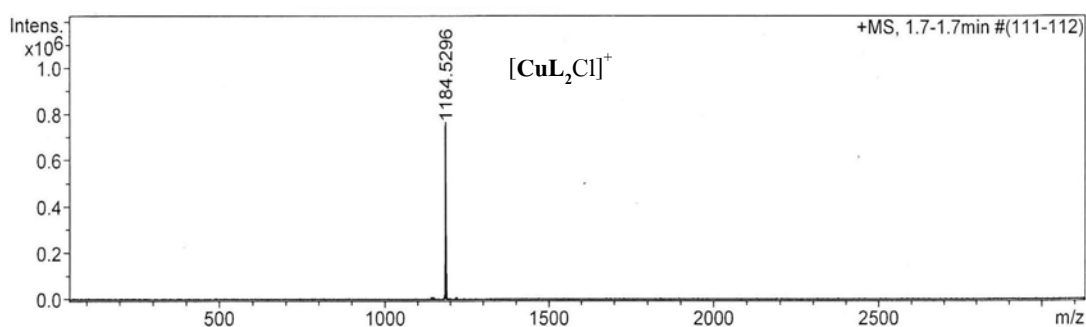
ปิเปตสารละลาย $\text{Cu}_2\text{L4}$ ความเข้มข้น 20 μM ปริมาตร 2 มิลลิลิตรใส่ในคิวเวท จากนั้น ปิเปตสารละลาย PV ความเข้มข้น 400 μM ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในคิวเวทดังกล่าว คนสารละลายให้เข้ากันและนำสารละลายดังกล่าวไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 250-900 nm จากนั้นเติมนำสารละลายของกรดอะมิโนฮิสทีดินความเข้มข้น 1 mM ครั้งละ 0.05 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในคิวเวทดังกล่าว คนสารละลายให้เข้ากันและนำสารละลายดังกล่าวไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 250-900 nm

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

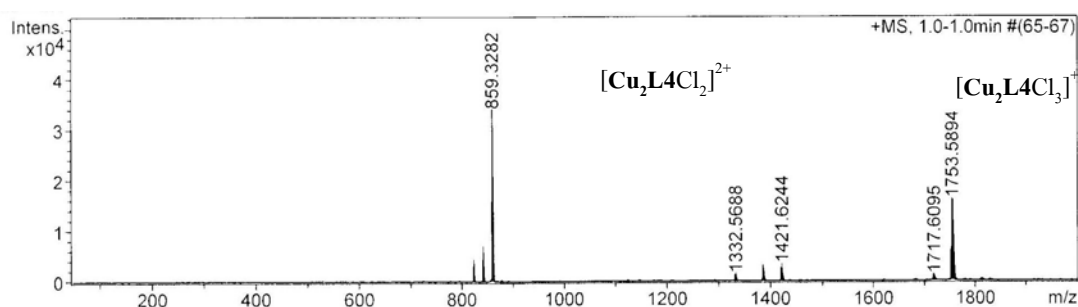
4.1 การสังเคราะห์และการพิสูจน์โครงสร้างสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **CuL2** และ **Cu₂L4**

จากการสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน **CuL2** และ **Cu₂L4** โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายพบว่าสารประกอบทั้งสองมีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีร้อยละของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 73 และ 42 ตามลำดับ เมื่อนำสารประกอบทั้งสองไปพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิค HRMS-ESI (positive mode) พบว่าแมสสเปกตรัมของสารประกอบ **CuL2** ให้สัญญาณที่มีความเข้มสูงที่สุดที่ค่า m/z คือ 1184.5296 amu ซึ่งตรงกับไอออนของ $[\text{CuL}_2\text{Cl}]^+$ ดังแสดงในรูปที่ 4.1 แสดงว่าสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **CuL2** มีอัตราส่วนระหว่างลิแกนด์ **L2**: Cu^{2+} คือ 1:1 และมี Cl^- จำนวน 2 ไอออนทำหน้าที่ในการดุลประจุของไอออนเชิงซ้อนที่เกิดขึ้น



รูปที่ 4.1 HRMS-ESI (positive mode) สเปกตรัมของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **CuL2**

ในกรณีของ **Cu₂L4** นั้นพบว่าแมสสเปกตรัมของสารประกอบดังกล่าวให้ค่าความเข้มของสัญญาณสูงสุดที่ค่า m/z คือ 1755.6520 amu และ 859.3282 amu ซึ่งตรงกับไอออนของ **[Cu₂L4Cl₃]⁺** และ **[Cu₂L4Cl₂]²⁺** ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.2 แสดงว่าสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **Cu₂L4** มีอัตราส่วนระหว่างลิแกนด์ **L4** : Cu²⁺ คือ 1:2 และมี Cl⁻ จำนวน 4 ไอออนทำหน้าที่ในการดุลประจุของไอออนเชิงซ้อนที่เกิดขึ้น



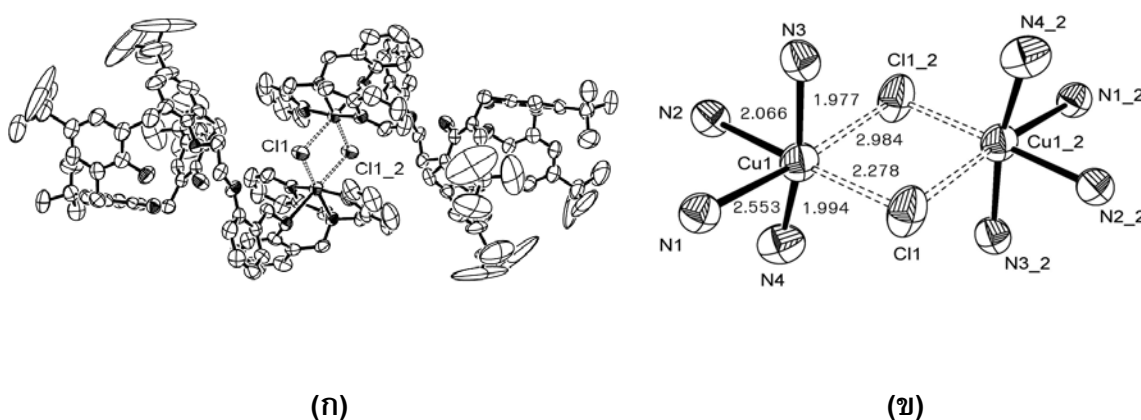
รูปที่ 4.2 HRMS-ESI (positive mode) สเปกตรัมของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **Cu₂L4**

4.2 การพิสูจน์โครงสร้างสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **CuL2** ด้วยเทคนิคเอ็กซ์เรย์คริสตัลโลกราฟีแบบผลึกเดี่ยว

ผลึกเดี่ยวที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการพิสูจน์โครงสร้างของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **CuL2** ด้วยเทคนิคเอกซเรย์คริสตัลโลกราฟี สามารถเตรียมได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างไอโอโนฟอร์ **L2** และ CuCl₂ โดยมีเมทานอลเป็นตัวทำละลาย ซึ่งโครงสร้างของสารประกอบที่เกิดขึ้นแสดงได้ในรูปที่ 4.3 จากรูปจะเห็นได้ว่าสารประกอบโคออร์ดิเนชันที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นไดนิวเคลียร์โดยมีคลอไรด์ไอออนประพติดตัวเป็นลิแกนด์ที่ทำหน้าที่เป็นสะพานเชื่อม (bridging ligand) อะตอมของ Cu²⁺ เอาไว้ด้วยกัน นอกจากนี้แล้วควาลิซ์[4] เอรีนที่อยู่ภายในโมเลกุลมีโครงสร้างของไอโซเมอร์ที่เป็นแบบ cone โดยมีพันธะไฮโดรเจน 3 พันธะที่เกิดจากหมู่ฟีนอลิกไฮดรอกซีทั้งสามหมู่ที่ตำแหน่ง narrow rim เป็นปัจจัยในการช่วยเพิ่มเสถียรภาพของโมเลกุล ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้จาก ¹H-NMR

ซึ่งเมื่อพิจารณาการเกิดพันธะโคออร์ดิเนชันของ Cu²⁺ กับไอโอโนฟอร์ **L2** แล้วจะพบว่า ไทโรโอดอลเอมีนประพติดตัวเป็นเทตระเดนเตตลิแกนด์ โดยใช้ไนโตรเจนทั้ง 4 อะตอมเป็นอะตอมผู้ให้อิเล็กตรอนแก่อะตอมของ Cu²⁺ และมีคลอไรด์ไอออนอีก 2 ไอออนเกิดพันธะโคออร์ดิเนชันกับ Cu²⁺ แต่ละอะตอม ดังนั้นจึงส่งผลให้โครงสร้างของสารประกอบที่เกิดขึ้นเป็นแบบโครงสร้างทรงแปดหน้าแบบบิดเบี้ยว (distorted octahedral geometry) ทั้งนี้เนื่องจากมีความยาวของพันธะในแนว axial ของ Cu1-Cl1_2 และ Cu1-N1 เท่ากับ 2.984 และ 2.553(4) Å ตามลำดับ ซึ่งมีค่าที่สูงกว่าความยาวพันธะในแนว equatorial ของ Cu1-Cl1_2, Cu1-N2, Cu1-N3 และ Cu1-N4 ที่มีค่าเท่ากับ 2.278(12), 2.066(3), 1.977(4) และ 1.994(4) Å

ตามลำดับ ซึ่งการที่ความยาวพันธะในแนว axial มีค่ามากกว่าในแนว equatorial นี้เป็นผลเนื่องมาจากการเกิดปรากฏการณ์ Jahn-Teller Effect⁽²⁵⁾ และทำให้โครงสร้างของทรงแปดหน้ามีการผิดรูปไป นอกจากนี้แล้วยังมีสิ่งที่น่าสนใจอีกประการหนึ่งคือ จากผลการทดลองที่ได้จากแมสสเปกโตรเมทรีนั้น **CuL2** จะสอดคล้องกับสารประกอบชนิดโมโนนิวเคลียร์ แต่ผลจากการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิคเอกซเรย์คริสตัลโล กราฟฟีนพบว่าเป็นสารประกอบดังกล่าวเป็นสารประกอบชนิดไดนิวเคลียร์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารประกอบโคออร์ดิเนชันแบบโมโนนิวเคลียร์เป็นสปีชีส์ที่เสถียรเมื่ออยู่ในสารละลาย ในขณะที่สารประกอบโคออร์ดิเนชันแบบไดนิวเคลียร์เป็นสปีชีส์ที่เสถียรในสภาวะของแข็ง

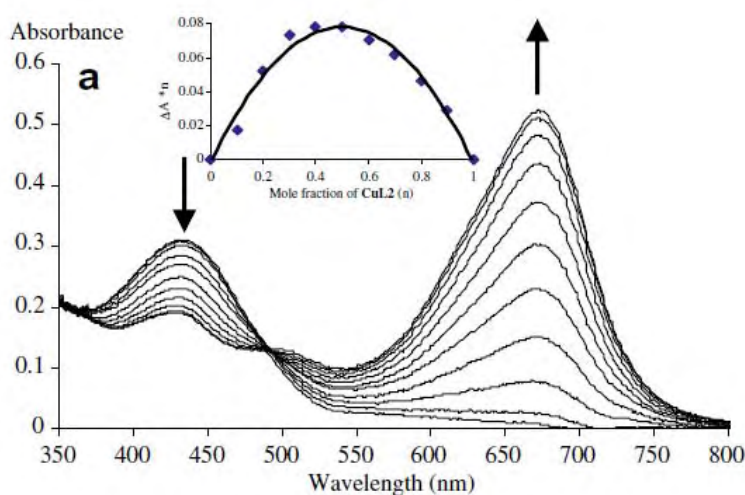


รูปที่ 4.3 (ก) โครงสร้างแบบ ORTEP ของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **CuL2** และ (ข) แสดงเฉพาะอะตอมผู้ให้อิเล็กตรอนที่เกิดพันธะโคออร์ดิเนชันกับไอออน Cu^{2+}

4.3 การหาค่าคงที่ของการเกิดเอนเซมเบิลที่เตรียมจาก สารประกอบโคออร์ดิเนชัน **Cu₂L4** กับอินดิเคเตอร์ **PV** ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโคปี

จากการศึกษาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนเซมเบิลระหว่างสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **Cu₂L4** กับอินดิเคเตอร์ **PV** ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโคปีนั้นทำได้โดยการไทเทรตสารละลายของอินดิเคเตอร์ที่มีความเข้มข้น 20 μM ที่เตรียมในสารละลาย 80/20 (%v/v) MeCN/H₂O ใน 10 mM HEPES บัฟเฟอร์ที่ pH 6.4 ด้วยสารละลายของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **Cu₂L4** ความเข้มข้น 400 μM ที่เตรียมในตัวทำละลายชนิดเดียวกัน และวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายผสมหลังจากเติมสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **Cu₂L4** ทุกครั้ง หลังจากนั้นจึงนำข้อมูลที่ได้จากการไทเทรชันไปคำนวณหาค่าคงที่ความเสถียร (K) ของการเกิดเอนเซมเบิล

ในการทดลองนี้เมื่อนำสารละลายสีเหลืองของ **PV** ที่ความเข้มข้น 20 μM ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง พบว่าสารละลายดังกล่าวมีค่าการดูดกลืนแสงที่สูงที่สุดในช่วงของแสงวิสิเบิลที่ความยาวคลื่น 430 nm และเมื่อค่อย ๆ โทเทรตสารละลายของสารประกอบโคออร์ดิเนชันของ **Cu₂L4** ที่มีความเข้มข้น 400 μM ลงไป พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นดังกล่าวมีค่าลดลง ในขณะที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 670 nm มีค่าเพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.4 และนอกจากนี้แล้วยังพบว่าสีของสารละลายสีเหลืองของ **PV** เปลี่ยนเป็นสีเขียวซึ่งเป็นสีของสารละลายเอนแซมเบิล [**Cu₂L4**•**PV**] ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันว่าอินดิเคเตอร์ **PV** เข้าไปเกิดพันธะโคออร์ดิเนตโควาลেন্টกับอะตอมของคอปเปอร์(II) ทั้งสองของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **Cu₂L4** จากการคำนวณพบว่าค่าคงที่ของการเกิดเอนแซมเบิลดังกล่าวมีค่าเท่ากับ $1.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$



รูปที่ 4.4 ยูวีวิสิเบิลไทเทรชันสเปกตรัมของอินดิเคเตอร์ **PV** ความเข้มข้น 20 μM ด้วยสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **Cu₂L4** ความเข้มข้น 400 μM ในตัวทำละลายบัพเฟอร์ 80/20 (%v/v) MeCN/H₂O ใน 10 mM HEPES pH 6.4

จากรูปที่ 4.4 จะเห็นได้ว่าเมื่อความเข้มข้นของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **Cu₂L4** มีค่าเพิ่มขึ้นค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 670 nm ก็มีค่าเพิ่มขึ้นตามไปด้วยเช่นกัน และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นดังกล่าวจะมีค่าคงที่เมื่อจำนวนโมลของสารประกอบ **Cu₂L4** มีค่าเท่ากับจำนวนโมลของ **PV** ในสารละลาย

4.4 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกับแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ของเอนเซมเบิล $[Cu_2L4 \bullet PV]$

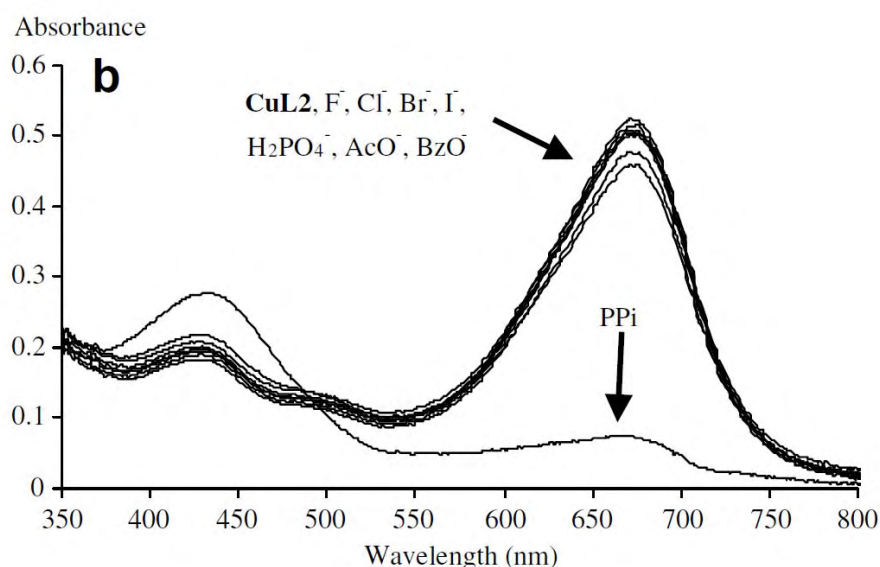
จากการศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกับแอนไอออนชนิดต่างๆของเอนเซมเบิล $[Cu_2L4 \bullet PV]$ ในสารละลาย 80/20 (%v/v) MeCN/H₂O ใน 10 mM HEPES บัฟเฟอร์ ที่ pH 6.4 ในเบื้องต้นนั้นสามารถสังเกตได้จากการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเอนเซมเบิลไปเป็นสีของ **PV** ในรูปอิสระเมื่อมีแอนไอออนชนิดต่างๆอยู่ในระบบ ผลการทดลองแสดงได้ดังรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 การเปลี่ยนสีของสารละลาย ensemble ในสถานะที่มีแอนไอออนชนิดต่าง ๆ (เรียงลำดับสารละลายขวดจากซ้ายไปขวา ดังนี้ : Cu_2L4 , **PV**, ensemble, $H_2PO_4^-$, AcO^- , **PPi**, BzO^- , I^- , Cl^- , Br^- และ F^-)

จากรูปที่ 4.5 จะเห็นได้ว่าเอนเซมเบิล $[Cu_2L4 \bullet PV]$ นั้นมีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัด **PPi** เป็นอย่างดี เนื่องจากมีเพียง **PPi** เท่านั้นที่ทำให้สีของสารละลายเอนเซมเบิลเปลี่ยนจากสีเขียวไปเป็นสีเหลือง แสดงว่าค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนเซมเบิลมีค่าต่ำกว่าค่าคงที่ของการเกิดสารประกอบโคออร์ดิเนชันระหว่าง Cu_2L4 กับแอนไอออน **PPi**

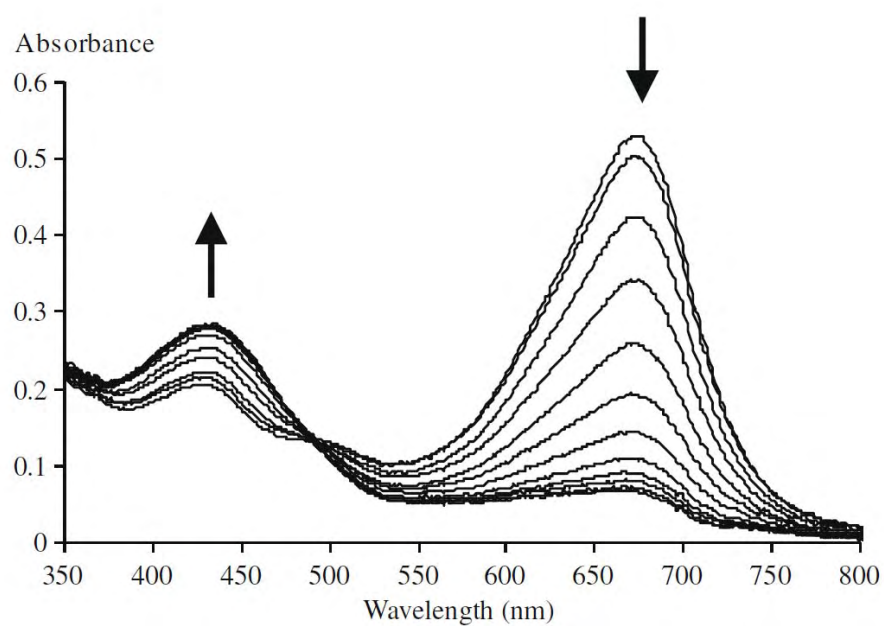
จากสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายเอนเซมเบิล $[Cu_2L4 \bullet PV]$ ที่มีแอนไอออนชนิดต่าง ๆ อยู่ในระบบดังแสดงในรูปที่ 4.6 จะเห็นได้ว่ามีเพียง **PPi** เท่านั้นที่ทำให้สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของเอนเซมเบิลเกิดการเปลี่ยนแปลงแบบ hypsochromic shift เนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 670 นาโนเมตรของสารละลายเอนเซมเบิลมีค่าลดลง และเกิดการเลื่อนไปปรากฏที่ความยาวคลื่นประมาณ 430 นาโนเมตร ซึ่งตรงกับความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงของอินดิเคเตอร์ในรูปอิสระ แสดงว่า **PPi** สามารถเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ **PV** ในโครงสร้างของเอนเซมเบิลดังกล่าวได้จริง



รูปที่ 4.6 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายเอนเซมเบิล $[\text{Cu}_2\text{L4}\bullet\text{PV}]$ ความเข้มข้น 20 μM เมื่อเติมแอนไอออนชนิดต่าง ๆ (4 equivalent) ในสารละลาย 80/20 (%v/v) $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ ใน 10 mM HEPES บัฟเฟอร์ที่ pH 6.4

4.5 การหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดสารประกอบโคออร์ดิเนชันระหว่างสารประกอบโคออร์ดิเนชัน $\text{Cu}_2\text{L4}$ กับ ไพรออสเฟตแอนไอออน (PPI) ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน

เมื่อทำการไทเทรตสารละลายของ PPI ความเข้มข้น 400 μM ลงไปในสารละลายของเอนเซมเบิล $[\text{Cu}_2\text{L4}\bullet\text{PV}]$ ความเข้มข้น 20 μM จะเห็นได้ว่าค่าการดูดกลืนแสงของเอนเซมเบิลที่ความยาวคลื่น 670 นาโนเมตร จะค่อย ๆ ลดลง และในขณะเดียวกันพบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นประมาณ 430 นาโนเมตรจะมีค่าเพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.7 และพบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นดังกล่าวจะมีค่าคงที่เมื่อทำการไทเทรต PPI ลงไปเป็นจำนวน 4 equivalent โดยเกิดการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายจากสีเขียวของสารละลายเอนเซมเบิลไปเป็นเหลือง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอินดิเคเตอร์ PV สามารถถูกแทนที่ได้ด้วย PPI เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการทำยูวี-วิสิเบิลไทเทรชันไปคำนวณหาค่าคงที่ความเสถียร (K) ของการเกิดสารประกอบโคออร์ดิเนชันระหว่างสารประกอบโคออร์ดิเนชัน $\text{Cu}_2\text{L4}$ กับ PPI พบว่ามีค่าเท่ากับ $5.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ซึ่งตรงกับสปีชีส์ของโคออร์ดิเนชันที่อัตราส่วนของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน $\text{Cu}_2\text{L4}$: PPI คือ 1:1 $[\text{Cu}_2\text{L4}\bullet\text{PPI}]$



รูปที่ 4.9 ยูวี-วิสิเบิลไทเทรชันสเปกตรัมของสารละลายเอนเซมเบิล $[\text{Cu}_2\text{L}_4\cdot\text{PV}]$ ความเข้มข้น $20\ \mu\text{M}$ ด้วย PPI ความเข้มข้น $400\ \mu\text{M}$ ในสารละลายบัฟเฟอร์ 80/20(v/v) MeCN/H₂O ใน 10 mM HEPES pH 6.4

บทที่ 5

สรุป และข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาความเป็นไปได้ในการตรวจวัดไฟโรฟอสเฟตแอนไอออนหรือ PPI ด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ โดยการใช้สารประกอบโคออร์ดิเนชันของคอปเปอร์ (II) ชนิดโมโนนิวเคลียร์ (CuL2) และไดนิวเคลียร์ ($\text{Cu}_2\text{L4}$) กับลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของ คาลิกซ์[4]เอรีน โดยใช้อินดิเคเตอร์ pyrocatechol violet หรือ PV เป็นหน่วยให้สัญญาณนั้น พบว่าสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์ $\text{Cu}_2\text{L4}$ เท่านั้นที่มีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัด PPI ได้ เนื่องจากเมื่อมี PPI อยู่ในระบบนั้นจะสามารถเปลี่ยนสีของสารละลายเอน เซมเบลจากสีเขียวไปเป็นสารละลายสีเหลืองของ PV ที่อยู่ในรูปอิสระได้ แสดงให้เห็นว่า PPI สามารถเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ PV ที่เกิดพันธะโคออร์ดิเนตโควาเลนต์กับสารประกอบโค ออร์ดิเนชัน $\text{Cu}_2\text{L4}$ ได้ โดยปัจจัยที่เป็นตัวควบคุมให้เกิดความจำเพาะเจาะจงดังกล่าวคือ โครงสร้างที่แข็งแรงของคาลิกซ์[4]เอรีนและความเกะกะของหมู่เอมีนที่มีหมู่ไทรพอดเป็นตัว ควบคุมระยะห่างระหว่างอะตอมของคอปเปอร์ (II) ทั้งสองอะตอม

ข้อเสนอแนะ

ควรใช้อินดิเคเตอร์ที่มีสมบัติเป็นหมู่ฟลูออโรฟอร์เพื่อที่จะสามารถตรวจวัด PPI ได้ด้วยเทคนิค ฟลูออเรสเซนส์ ซึ่งคาดว่าจะสามารถตรวจวัด PPI ที่มีความเข้มข้นที่ต่ำกว่าที่ตรวจวัดได้ด้วย เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรสโคปี

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

1. Watchasit, S. Kaowliew, A. **Suksai, C*** Tuntulani, T. Ngeontae, W. Pakawatchai, C.
Selective detection of pyrophosphate by new tripodal amine calix[4]arene-based Cu(II) complexes using indicator displacement strategy. *Tetrahedron Letters*, **2010**, 51, 3398-3402.
2. Khamjumphol, U., Watchasit, S., **Suksai, C.**, Janrungroatsakul, W.,
Boonchiangmaa, S., Tuntulani, T., & Ngeontae, W.* New polymeric membrane cadmium(II)-selective electrodes using tripodal amine based ionophores. *Analytica Chimica Acta*, **2011**, 704, 83-86.



Selective detection of pyrophosphate by new tripodal amine calix[4]arene-based Cu(II) complexes using indicator displacement strategy

Sarayut Watchasit^a, Arpadsara Kaowliw^a, Chomchai Suksai^{a,*}, Thawatchai Tuntulani^b, Wittaya Ngeontae^c, Chaveng Pakawatchai^d

^a Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand

^b Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

^c Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Khon Kean University, Khon Kean 40002, Thailand

^d Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla 90112, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 February 2010

Revised 12 April 2010

Accepted 23 April 2010

Available online 28 April 2010

ABSTRACT

Mono- and dinuclear Cu(II) complexes of *p*-tert-butylcalix[4]arene (**CuL1** and **CuL2**, respectively) were synthesized, and their anion recognition abilities were explored. Recognition is efficiently signaled through the displacement of pyrocatechol violet bound to the receptor. For **CuL2**, recognition selectivity is ascribed to the tuning of the distance between donor atoms of anion guests and their ability to encompass the Cu²⁺–Cu²⁺ distance within the cleft of **CuL2**. In addition, the preorganization of calix[4]arene in the cone conformation and steric hindrance of two bulky tripodal amine moieties are important factors in controlling the Cu²⁺–Cu²⁺ distance. These factors caused **CuL2** to recognize pyrophosphate selectively with respect to other inorganic anions in 80/20 (v/v%) MeCN/H₂O solution buffered with 10 mM HEPES at pH 6.4.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Significant attention has been given to the development of anion sensing by indicator displacement assays (IDAs).¹ This method is a simple, convenient, and increasingly popular approach to naked-eye anion sensors because an indicator is bound to a receptor by non-covalent interactions. IDAs rely upon competition between the indicator and the analyte in the host cavity. Consequently, a receptor is designed to bind a target analyte with a desired affinity, and an indicator must have a weaker affinity with the receptor than the analyte. Importantly, the indicator must absorb or emit light differently upon binding to the host and being in free form in solution.

Generally, anion recognition in the aqueous system is very challenging due to the strong hydration effects of anions. The utilization of a metal complex as a binding site for anions has been found to be the most successful strategy.² Therefore, metal complexes are often used as IDA receptors.³ Normally, metal-bound ligands can bind anions more efficiently than water, allowing the detection of anions in aqueous solution. The metal center must have an unsaturated coordination sphere to accommodate the incoming anion guest.

IDA receptors for pyrophosphate (P₂O₇⁴⁻, PPI), the product of ATP hydrolysis and involved in DNA polymerization in biological reactions,⁴ have been developed by many research groups utilizing dinuclear zinc complexes of phosphotriesterase enzyme as the

receptor module.⁵ Recently, Hong and Fabbri reported that dinuclear Cu²⁺–DPA complexes can be employed as PPI fluorescence sensors using the IDA concept.⁶ The metal–metal distance is found to play a key role in analyte preference. In order to obtain the selectivity toward PPI over other anions, especially phosphate anion (PO₄³⁻), the metal–metal distance should not be less than 3.4 Å which is the Zn–Zn distance in phosphotriesterase.⁷

Our group is currently working on the synthesis of calix[4]arenes containing tripodal amine as the recognition unit for use as ionophores for ion selective electrodes (ISEs). The rigidity of calix[4]arenes in the cone conformation plays an important role by providing a specific cavity to recognize specific guest molecules, due to preorganization of its skeleton.⁸ The transannular distances in the lower rim of original calix[4]arene and its derivatives are in the range of 3.74–4.20 Å,⁹ which are longer than the Zn–Zn distance in the dinuclear zinc enzyme. Therefore, calix[4]arenes may be a suitable building block for PPI using IDA strategies. In addition, the side arms attached to the calix[4]arene can control the size and shape of the recognition cavity of calix[4]arene derivatives.¹⁰

In this work, calix[4]arenes containing a tripodal amine have been chosen as IDA receptors for PPI. Furthermore, we expected that steric interactions between the tripodal amine and the rigidity of the calix[4]arene framework would play crucial roles in optimizing the metal–metal distance and provide more selectivity toward PPI. Herein, we report the synthesis and characterization of ionophores based on calix[4]arenes **L1** and **L2** and their mononuclear and dinuclear complexes with CuCl₂ (**CuL1** and **CuL2**). We also

* Corresponding author. Tel.: +66 038 103067; fax: +66 038 393494.
E-mail address: jomjai@buu.ac.th (C. Suksai).

demonstrate that the dinuclear complex, **CuL2**, is a suitable receptor for indicator displacement assay of PPI.

Ionophores **L1** and **L2** were synthesized in two steps according to Scheme 1. The mono-calixaldehyde¹¹ and bis-calixaldehyde¹² (for **L1** and **L2**, respectively) were reacted with 2-[bis(2-pyridylmethyl)aminomethyl]aniline¹³ in dichloromethane, followed by in situ reduction with NaBH₄ in methanol to yield **L1** in 12% and **L2** in 20%, respectively. The HRMS-ESI spectra of **L1** and **L2** show parent peaks at *m/z* 1085.6671 and 1521.8715 assigned to the molecular ions [L+H]⁺ and provide evidence that the calix[4]arene derivatives are the 1:1¹⁴ and 1:2¹⁵ condensation products. The two calix[4]arene derivatives are in the cone conformation, as supported by their NMR spectra (Figs. S1–S4, Supplementary data). The ¹H NMR spectrum of **L1** was consistent with an asymmetric calix[4]arene structure. In particular, two pairs of doublets for the protons of the methylene bridges were observed.

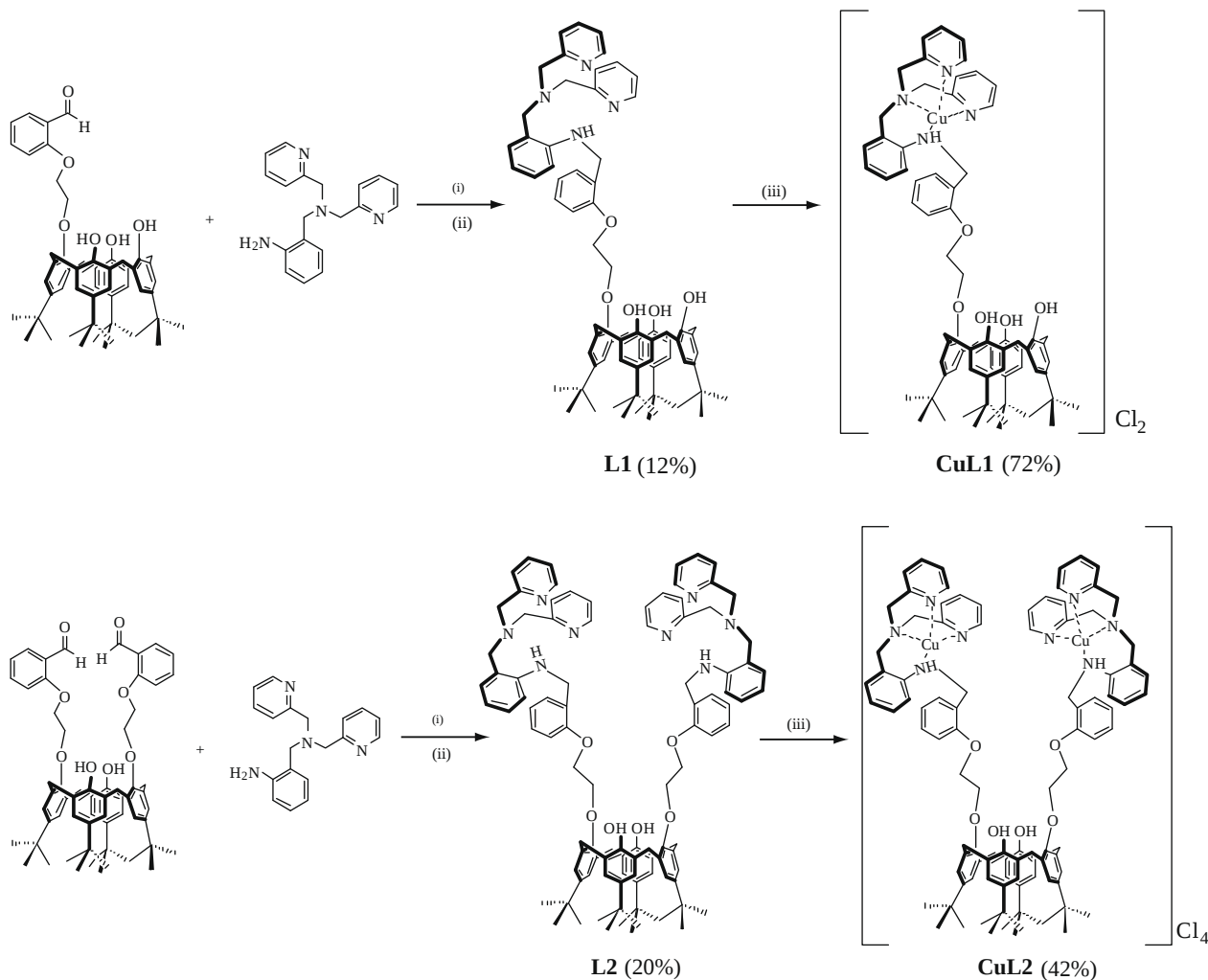
Two OH singlets were observed for **L1** at low field, 9.47 and 10.18 ppm (ratio 2:1). These strong downfield shifts for the OH protons are indicative of a circular hydrogen bond at the lower rim of these derivatives, in agreement with the results reported by Frkanec et al.¹⁶ The ¹H NMR spectrum of **L2** features a pair of doublets at 3.32 ppm and 4.43 ppm corresponding to the equatorial and the axial protons of the methylene bridging groups, respectively. We deduce that the cone structure is the major conformation of **L1** and **L2** in solution.

Addition of CuCl₂ to methanolic solutions of **L1** and **L2** gave green complexes of **CuL1** and **CuL2** in 72%¹⁷ and 42%¹⁸ yields,

respectively. The mass spectrum of **CuL1** shows the parent peak at *m/z* 1182.5424 which is assigned to the molecular ion of the mononuclear complex [CuL1Cl]⁺. For **CuL2**, the parent peak at *m/z* 1751.6365 corresponds to the molecular ion of the dinuclear complex [Cu₂L2Cl₃]⁺. A crystal of **CuL1** was obtained upon slow evaporation of a methanolic solution and the structure was determined by X-ray crystallography, Figure 1.¹⁹ It is clearly seen that the calixarene skeleton adopts a cone conformation. It should be noted that the phenolic hydrogen atoms are involved in strong intramolecular O–H···O hydrogen bonding with the neighboring oxygen atoms to stabilize the cone conformation, in agreement with the solution structure deduced from the ¹H NMR spectrum.

The crystal structure of **CuL1** also shows that two Cu(II) centers coordinate with four nitrogen donors from the tripodal amine unit and two chloride bridging ligands to give a distorted octahedral geometry. The substantial elongation of the axial Cu1–Cl1₂ and Cu1–N1 bonds [2.984 and 2.553(4) Å, respectively] compared to the equatorial Cu1–Cl1, Cu1–N2, Cu1–N3, and Cu1–N4 [2.278(12), 2.066(3), 1.977(4), and 1.994(4) Å, respectively] is caused by the active Jahn–Teller distortion of the Cu²⁺ ion. Interestingly, the mass spectrum of the **CuL1** complex suggests that it is a mononuclear complex in solution. This implies that the mononuclear complex of **CuL1** is the most stable species in solution while the dinuclear complex is the most stable species in the solid state.

In light of the crystal structure of **CuL1**, we expect that the dye and anions might occupy the bimetallic cleft of dinuclear complex **CuL2**. In this work, we chose pyrocatechol violet (PV) as a



Scheme 1. Synthetic procedures for **L1**, **L2**, **CuL1**, and **CuL2**. Reagents and conditions: (i) anhyd CH₂Cl₂, anhyd MgSO₄, rt; (ii) NaBH₄, CH₃OH, reflux; (iii) CuCl₂, MeOH, rt.

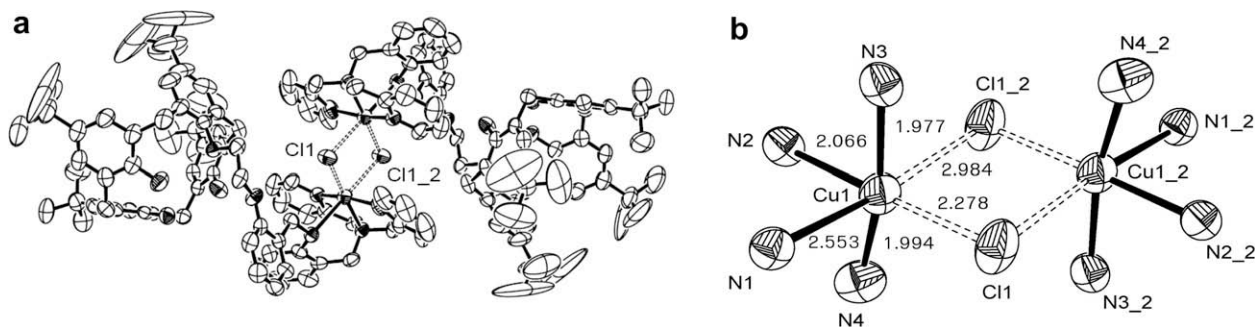


Figure 1. (a) ORTEP representation of the solid state structure of the dinuclear complex of **CuL1** with two bridging chloride ligands and (b) the coordination environment of Cu^{2+} in the complex. Thermal ellipsoids are drawn at 50% probability level (CCDC 767461).

competitive indicator.²⁰ The yellow solution of PV was prepared in 80% acetonitrile aqueous solution buffered with 10 mM HEPES pH 6.4, which was then titrated with increasing amounts of **CuL2** using the same solvent at 25 °C. It was found that addition of **CuL2** led to the disappearance of the absorption band of PV at 430 nm, with the simultaneous appearance of a new band at 670 nm and a color change from yellow to green (Fig. 2a). In addition, an isosbestic point was found at 488 nm, suggesting the presence of two equilibrium species. A Job plot (at 670 nm) was also obtained and suggested that the complex between **CuL2** and PV was formed with a 1:1 stoichiometry (inset of Fig. 2a). Using the Benesi–Hildebrand method, the association constant (K_a) between PV and **CuL2** was found to be $1.30 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.²¹

Upon addition of various anions (as tetrabutylammonium salts, 3 equiv) to the ensemble [**CuL2**·PV] solutions, only PPI was able to turn the color from green to yellow of the unbound dye, while other anions did not give rise to UV–vis spectral changes (Fig. 2b) or any color changes (Fig. 2c). Moreover, we also carried out displacement of PV from the **CuL2** cavity by phosphate containing biomolecules (AMP, ADP, and ATP). Results showed that both ADP and ATP were able to displace PV from the cleft of **CuL2**, whereas AMP was not (Fig. S5, Supplementary data). Therefore, **CuL2** possessed high selectivity toward PPI over other anions. We tried to change the dye from PV to fluorescein. However,

results of this ensemble did not show specific selectivity to any anions (Fig. S6, Supplementary data).

Titration of PPI with an ensemble solution [**CuL2**·PV] caused an absorbance increase around 430 nm and an absorbance decrease around 670 nm (hypsochromic shift), with a color change to yellow, revealing that the indicator was displaced from the cleft of **CuL2** by the analyte (Fig. 3). The UV–vis spectrum at 670 nm was completely saturated at 1.5 equiv of PPI. The binding constant between **CuL2** and PPI was estimated by the competitive spectrophotometric method²² and found to be $5.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. The electrospray ionization mass spectrum (positive mode) of **CuL2** complex with PPI showed a molecular ion peak at $m/z = 1824.57$ (Fig. S7, Supplementary data). The result thus confirmed the 1:1 complex species of **CuL2**:PPI.

Xu et al. have characterized crystallographically a ternary system complex of PPI with a mononuclear Cu^{2+} ion and a 2,2'-dipyridylamine (hdpa) ligand, $[\text{Cu}(\text{hdpa})]^{2+}$.²³ In this case, one PPI anion acted as the bridging ligand to bring two units of $[\text{Cu}(\text{hdpa})]$ together, forming a dinuclear complex. Simultaneously, two PPI ions coordinating to the oxygen atoms of a discrete dinuclear complex also acted as the bridging atoms to hold those two discrete dimeric species together to form a tetranuclear complex. Compared to our system, we assume that PPI is bound within the bimetallic cleft of **CuL2**. Two oxygen atoms on each phosphorus of PPI coordinated

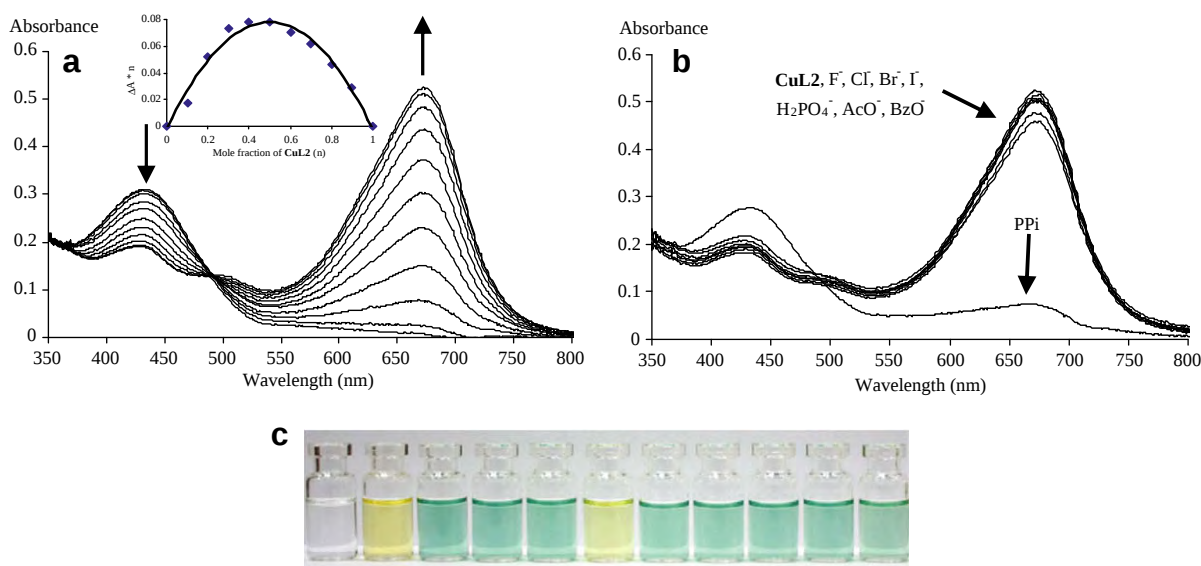


Figure 2. (a) UV–vis spectra obtained by addition of **CuL2** (400 μM) to PV (20 μM) solution; (b) UV–vis spectra obtained by addition of various anions (3 equiv of tetrabutylammonium salts) to an ensemble solution [**CuL2**·PV] (20 μM); and (c) color changes of the ensemble [**CuL2**·PV] 20 μM after addition of various anions (3 equiv of tetrabutylammonium salts). From left to right: **CuL2**, PV, [**CuL2**·PV], H_2PO_4^- , AcO^- , PPI, BzO^- , I^- , Br^- , Cl^- , and F^- . All experiments were carried out in 80/20 (v/v) MeCN/ H_2O solution buffered with 10 mM HEPES at pH 6.4.

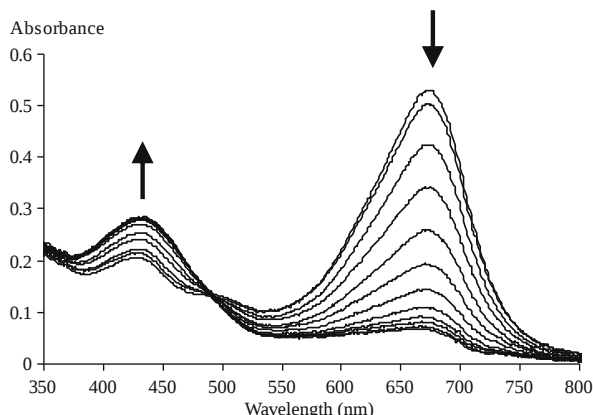


Figure 3. UV-vis spectra obtained by addition of PPI (400 μ M) to an ensemble solution of [CuL2-PV] (20 μ M) in 80/20 (v/v) MeCN/H₂O solution buffered with 10 mM HEPES at pH 6.4.

through one Cu²⁺ ion, which was similar to the binding mode of PPI with the dinuclear DPA-2Zn²⁺ derivatives reported by Yoon and co-workers²⁴ and Hong and co-workers.^{5b}

Similar experiments have been run with the mononuclear CuL1 complex. The results showed that in the presence of any anions in an ensemble solution of [CuL1-PV] the yellow solution of the unbound dye was not observed (Fig. S8, Supplementary data). This result strongly supports the fact that the cooperative action of two Cu²⁺ ions in solution is required for selective sensing of PPI.

In conclusion, we have successfully synthesized mono- and dinuclear Cu(II) complexes of calix[4]arene containing a tripodal amine, CuL1 and CuL2. CuL2 was demonstrated to be a remarkable IDA receptor for PPI. A rationale to account for the selectivity of CuL2 toward PPI requires matching of the distance between the donor atoms of PPI with the Cu²⁺–Cu²⁺ distance in the CuL2 cavity. In addition, the preorganization of calix[4]arene in the cone conformation and steric hindrance between the two bulky tripodal amine parts are the most important factors controlling the Cu²⁺–Cu²⁺ distance. This resulted in selective recognition of CuL2 toward PPI over other anions. Further studies are underway in our laboratory to prepare anion selective electrodes from CuL2.

Acknowledgments

Financial support from The Thailand Research Fund (MRG5380064 and RTA5080006), a Grant from the Faculty of Science, Burapha University, and Center for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC) and Commission on Higher Education, Ministry of Education, are gratefully acknowledged.

Supplementary data

Supplementary data (additional ¹H and ¹³C NMR spectra of L1 and L2, and displacement results of CuL1 with various anions are available) associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.tetlet.2010.04.095.

References and notes

- (a) Wiskur, S. L.; Ait-Haddou, H.; Lavigne, J. J.; Anslyn, E. V. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 963–972; (b) Nguyen, B. T.; Anslyn, E. V. *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3118–3127.
- (a) Kruppa, M.; König, B. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3520–3560; (b) Suksai, C.; Tuntulani, T. *Chem. Soc. Rev.* **2003**, *32*, 192–202; (c) Martinez-Manez, R.; Sancenon, F. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 4419–4476; (d) Suksai, C.; Tuntulani, T. *Top. Curr. Chem.* **2005**, *255*, 163–198; (e) Kruppa, M.; Mandl, C.; Miltischky, S.; König, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3362–3365; (f) Lim, M. H.; Wong, B. A.; Pitcock, W. H.; Mokshagundam, D.; Baik, M.-H.; Lippard, S. J. *Am. Chem. Soc.*

- 2006**, *128*, 14364–14373; (g) Salo, T. M.; Helaja, J.; Koskinen, A. M. P. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 2977–2980; (h) Lee, D. H.; Im, J. H.; Son, S. U.; Chung, Y. K.; Hong, J.-I. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7752–7753; (i) Guo, Z.; Zhu, W.; Tian, H. *Macromolecules* **2010**, *43*, 739–744.
- (a) Amendola, V.; Bergamaschi, G.; Buttafava, A.; Fabbri, L.; Monzani, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 264–268; (b) Zhang, T.; Anslyn, E. A. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 11117–11124; (c) Hanshaw, R. G.; Hilkert, S. M.; Jiang, H.; Smith, B. D. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 8721–8724; (d) Zhang, T.; Anslyn, E. V. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1627–1629; (e) Swamy, K. M. K.; Kwon, S. K.; Lee, H. N.; Kumar, S. M. S.; Kim, J. S.; Yoon, J. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 8683–8686; (f) Jang, H. H.; Yi, S.; Kim, M. H.; Kim, S.; Lee, N. H.; Han, M. S. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 6241–6243; (g) Zhang, S.; Glass, T. E. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 112–114; (h) Yin, C.; Huo, F.; Yang, P. *Sens. Actuators, B* **2005**, *109*, 291–299; (i) Fabbri, L.; Marcotte, N.; Stomeo, F.; Taglietti, A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 3811–3814; (j) McDonough, M. J.; Reynolds, A. J.; Lee, W. Y. G.; Jolliffe, K. A. *Chem. Commun.* **2006**, 2971–2973.
- Ronaghi, M.; Karamohamed, S.; Pettersson, B.; Uhlén, M.; Nyrén, P. *Anal. Biochem.* **1996**, *242*, 84–89.
- (a) Kim, S. K.; Lee, D. H.; Hong, J.-I.; Yoon, J. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 23–31; (b) Lee, J. H.; Park, J.; Lah, M. S.; Chin, J.; Hong, J.-I. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3729–3731; (c) Morgan, P. B.; He, S.; Smith, R. C. *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 9262–9266; (d) Cho, H. K.; Lee, D. H.; Hong, J.-I. *Chem. Commun.* **2005**, 1690–1692; (e) Mangalum, A.; Smith, R. C. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 4298–4303; (f) Lee, D. H.; Kim, S. Y.; Hong, J.-I. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 4477–4480.
- (a) Hong, J.-I.; Kim, S. Y. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 1951–1953; (b) Fabbri, L.; Marcotte, N.; Stomeo, F.; Taglietti, A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 3811–3814.
- Benning, M. M.; Shim, H.; Raushel, F. M.; Holden, H. M. *Biochemistry* **2001**, *40*, 2712–2722.
- (a) Gutsche, C. D.; Reddy, P. A. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4783–4791; (b) Dijkstra, P. J.; Brunink, J. A. J.; Bugge, K.-E.; Reinhoudt, D. N.; Harkema, S.; Ungaro, R.; Ugozzoli, F.; Ghidini, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 7567–7575; (c) Froidevaux, P.; Harrowfield, J. M.; Sobolev, A. N. *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 4678–4687.
- Lipkowitz, K. B.; Pearl, G. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 6729–6736.
- (a) Scheeder, J.; van Duynhoven, J. P. M.; Engbersen, J. F. J.; Reinhoudt, D. N. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1996**, *35*, 1092–1093; (b) Kim, S. K.; Kim, S. H.; Kim, H. J.; Lee, S. H.; Ko, J.; Bartsch, R. A.; Kim, J. S. *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 7866–7875; (c) Chang, K.-C.; Su, I. -H.; Senthilvelan, A.; Chung, W.-S. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3363–3366.
- Groenen, L. C.; Ruël, B. H. M.; Casnati, A.; Verboom, W.; Pochini, A.; Ungaro, R.; Reinhoudt, D. N. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 8379–8384.
- Navakun, K.; Tuntulani, T.; Ruangpornvisuti, V. *J. Inclusion Phenom.* **2000**, *38*, 113–122.
- Burdette, S. C.; Frederickson, C. J.; Bu, W.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1778–1787.
- Ionophore L1, ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm): δ 10.20 (s, 1H, –OH), 9.49 (s, 2H, –OH), 8.44 (d, 2H, J = 4.0 Hz, ArH), 7.49 (t, 2H, J = 6.0 Hz, ArH), 7.37 (d, 2H, J = 4.0 Hz, ArH), 7.34 (d, 2H, J = 8.0 Hz, ArH), 7.13 (s, 2H, ArH), 7.12 (s, 1H, ArH), 7.07 (d, 2H, J = 2.0 Hz, ArH), 7.05 (s, 2H, ArH), 7.03 (s, 2H, ArH), 7.02 (s, 2H, ArH), 6.94 (m, 2H, ArH), 8.82 (s, 1H, –NH–), 6.54 (t, 1H, J = 7.6 Hz, ArH), 6.40 (d, 1H, J = 8.0 Hz, ArH), 4.70 (d, 2H, J = 3.2 Hz, –CH₂–NH–), 4.64 (s, 4H, –O–CH₂–O–), 4.53 (d, 2H, J = 12.8 Hz, Ar–CH₂–Ar), 4.24 (d, 2H, J = 13.6 Hz, Ar–CH₂–Ar), 3.83 (s, 4H, –CH₂–N), 3.69 (s, 2H, –CH₂–N), 3.41 (dd, 4H, J = 12.8, 13.6 Hz, Ar–CH₂–Ar), 1.23 (s, 36H, p -tert-butyl); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, ppm): δ 159.24, 156.11, 149.12, 149.04, 148.39, 148.29, 148.09, 147.85, 143.50, 143.12, 136.30, 133.61, 130.94, 128.74, 128.53, 128.12, 128.07, 127.75, 127.69, 126.56, 125.82, 125.71, 125.66, 123.18, 121.90, 121.51, 121.10, 115.32, 110.80, 110.20, 74.78, 60.13, 58.47, 41.73, 34.26, 33.99, 33.93, 33.00, 32.18, 31.50, 31.25; HRMS-ESI: [M+H]⁺ calcd for C₇₂H₈₄N₄O₈, 1085.6670; found 1085.6671.
- Ionophore L2, ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm): δ 8.42 (d, 4H, J = 4.0 Hz, ArH), 7.65 (d, 2H, J = 2.4 Hz, ArH), 7.46 (m, 4H, ArH), 7.35 (d, 2H, J = 7.6 Hz, ArH), 7.30 (s, 4H, ArH), 7.19 (m, 2H, ArH), 7.06 (m, 8H, ArH), 7.05 (m, 2H, ArH), 6.95 (d, 4H, J = 8.4 Hz, ArH), 6.89 (s, 4H, ArH), 6.86 (d, 2H, J = 7.2 Hz, ArH), 6.72 (s, 2H, –NH–), 6.54 (m, 2H, ArH), 6.44 (d, 2H, J = 8.0 Hz, ArH), 4.53 (d, 4H, J = 4.8 Hz, –CH₂–NH–), 4.44 (d, 4H, J = 12.8 Hz, Ar–CH₂–Ar), 4.35 (s, 8H, –CH₂–O–), 3.80 (s, 8H, –CH₂–N), 3.68 (s, 4H, –CH₂–N), 3.33 (d, 4H, J = 13.2 Hz, Ar–CH₂–Ar), 1.26 (s, 18H, p -tert-butyl), 1.03 (s, 18H, p -tert-butyl); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, ppm): δ 159.23, 156.24, 150.35, 149.73, 149.07, 148.21, 147.34, 141.69, 136.29, 133.12, 130.97, 128.77, 128.56, 128.52, 127.93, 127.63, 125.72, 125.20, 123.20, 121.91, 121.55, 120.71, 115.35, 110.78, 110.32, 74.16, 66.65, 60.16, 58.47, 41.76, 34.04, 33.84, 31.83, 31.66, 31.10; HRMS-ESI: [M+H]⁺ calcd for C₁₀₀H₁₁₂N₈O₆, 1521.8705; found 1521.8715.
- Frkanec, L.; Višnjevac, A.; Kojić-Prodić, B.; Žinić, M. *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 442–453.
- CuL1: A methanolic solution of CuCl₂·2H₂O (24 mg, 0.14 mmol) in 5 mL CH₃OH was added to a suspension of L1 (0.108 g, 0.09 mmol) in methanol giving a deep-green solution. The solution was allowed to stand at room temperature. After 1 week, green block-shaped X-ray diffraction quality single crystals of CuL1 were obtained (80 mg, 73%). HRMS-ESI: [M+Cl]⁺ calcd for C₇₂H₈₄ClCuN₄O₈, 1182.5426; found 1182.5424.
- CuL2: A methanolic solution of CuCl₂·2H₂O (26 mg, 0.15 mmol) was added to a methanolic suspension of ionophore L2 (110.9 mg, 0.06 mmol); the color of the solution changed to deep-green immediately. After standing the green solution at room temperature for 1 week, the deep-green solid appeared. This was filtered and washed with MeOH to give CuL2 in 42% yield (111 mg). HRMS-ESI: [M+Cl]⁺ calcd for C₁₀₀H₁₁₂Cl₃Cu₃N₈O₆, 1751.6362; found 1751.6365.

19. Crystal data for **CuL1**: $C_{146}H_{180}Cl_2Cu_2N_8O_{14}$, $M_r = 2539.99$, $T = 293(2)$ K, triclinic, space group $P\bar{1}$ $a = 13.3699(10)$, $b = 15.5074(12)$, $c = 17.9970(13)$ Å, $\alpha = 94.853^\circ$ (2), $\beta = 90.013^\circ$ (2), $\gamma = 99.694^\circ$ (2), $V = 3664.5(5)$ Å³, $\rho_{\text{calcd}} = 1.151$ g cm⁻³, $\mu = 0.422$ mm⁻¹, $Z = 1$, reflections collected: 50619, independent reflections: 17717 ($R_{\text{int}} = 0.0556$), final R indices [$I > 2\sigma I$]: $R1 = 0.0974$, $wR2 = 0.2936$, R indices (all data): $R1 = 0.1511$, $wR2 = 0.3344$. Crystallographic data for **CuL1** are available upon request from the Cambridge Crystallographic Data Base (CCDC 767461).
20. All spectrophotometric titrations were performed in 80/20 (v/v) MeCN/H₂O solution buffered with 10 mM HEPES at pH 6.4, thermostated at 25 °C. Receptor/indicator affinity constants were determined by adding aliquots of a 400 μM **CuL2** complex solution to a 20 μM solution of PV. After each addition, the UV–vis absorption spectra of the indicator solution were recorded in a quartz cuvette. Similar titration experiments were performed with PPI. In typical titrations, aliquots of PPI (400 μM) were added to an ensemble solution (20 μM) of [**CuL2**:PV].
21. Roy, P.; Dhara, K.; Manassero, M.; Ratha, J.; Banerjee, P. *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 6405–6412.
22. Niikura, K.; Bisson, A. P.; Anslyn, E. V. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1999**, 1111–1114.
23. Xu, J.-Y.; Tian, J.-L.; Zhang, Q.-W.; Zhao, J.; Yan, S.-P.; Liao, D.-Z. *Inorg. Chem. Commun.* **2008**, *11*, 69–72.
24. Jang, Y. J.; Jun, E. J.; Lee, Y. J.; Kim, Y. S.; Kim, J. S.; Yoon, J. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 9603–9606.



New polymeric membrane cadmium(II)-selective electrodes using tripodal amine based ionophores

Utisawadee Khamjumhol^a, Sarayut Watchasit^e, Chomchai Suksai^d, Wanwisa Janrungroatsakul^e, Suthasinee Boonchiangma^a, Thawatchai Tuntulani^e, Wittaya Ngeontae^{a,b,c,*}

^a Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

^b Research Center for Environmental and Hazardous Substance Management, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

^c National Center of Excellence for Environmental and Hazardous Waste Management, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

^d Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand

^e Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 June 2011

Received in revised form 29 July 2011

Accepted 2 August 2011

Available online 10 August 2011

Keywords:

Cadmium

Poly(vinylchloride) membrane

Ion selective electrode

Tripodal amine

Calix[4]arene

Ionophore

ABSTRACT

Fabrication of PVC membrane electrodes incorporating selective neutral carriers for Cd^{2+} was reported. The ionophores were designed to have different topologies, donor atoms and lipophilicity by attaching tripodal amine (TPA) units to the lipophilic anthracene (ionophore **I**) and *p*-*tert*-butylcalix[4]arene (ionophores **II**, **III** and **IV**). The synthesized ionophores were incorporated to the plasticized PVC membranes to prepare Cd(II) ion selective electrodes (ISEs). The membrane electrodes were optimized by changing types and amounts of ionic sites and plasticizers. The selectivity of the membranes fabricated from the synthesized ionophores was evaluated, the relationship between structures of ionophores and membrane characteristics were explored. The ionophore **IV** which composed of two opposites TPA units on the calix[4]arene compartment showed the best selectivity toward Cd^{2+} . The best membrane electrode was fabricated from ionophore **IV** ($10.2 \text{ mmol kg}^{-1}$) with KTpClPB (50.1 mol% related to the ionophore) as an ion exchanger incorporated in the DOS plasticized PVC membrane (1:2; PVC:DOS). The Cd-ISE fabricated from ionophore **IV** exhibited good properties with a Nernstian response of $29.4 \pm 0.6 \text{ mV decade}^{-1}$ of activity for Cd^{2+} ions and a working concentration range of 1.6×10^{-6} – $1.0 \times 10^{-2} \text{ M}$. The sensor has a fast response time of 10 s and can be used for at least 1 week without any divergence in potential. The electrode can be used in the pH range of 6.0–9.0. The proposed electrodes using ionophores **III** and **IV** were employed as a probe for determining Cd^{2+} from the oxidation of CdS QDs solution and the real treatment waste water sample with excellent results.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Cadmium, one of the transition metals, occurs as a minor component in most zinc ores [1]. It has been used as a pigment and corrosion resistant plating on steel [2]. Cadmium compounds have been used widely in electroplating, battery industry and chemical industry for stabilizing plastics [2]. Cadmium is a component of semiconductors such as cadmium sulfide [3], cadmium selenide [4] and cadmium telluride [5] which are used for light detection or solar cell [6]. Exposure of cadmium can contaminate food and water. Cadmium can accumulate, store in living organisms and may lead to cancer [7]. Therefore, the determination of cadmium has become

increasingly important because its toxicity and the increasing level of extended use in industry.

There are many analytical techniques for determination of cadmium in samples such as atomic absorption spectrometry [8–11], inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry [12–14], inductively coupled plasma-mass spectrometry [15–17], stripping voltammetry [18–21], spectrophotometry [22–24] and ion chromatography [25–28]. These methods required expensive instruments and time-consuming sample preparation. During the past three decades, ion selective electrodes (ISEs) were developed to use in many fields including clinical chemistry, cosmetics, process control, agriculture and environmental analysis. Membrane ion selective electrodes containing ionophores are successfully used for monitoring and determination of several metal ions [29,30] with many advantages such as good selectivity, high sensitivity, good reversibility, convenient, inexpensive and rapid for analysis [31].

Extensive efforts were put into the synthesis of ionophores with high selectivity for Cd^{2+} recognition [32–43]. The sensors were

* Corresponding author at: Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand. Tel.: +66 432 02222x12243; fax: +66 432 02373.

E-mail address: wittayange@kku.ac.th (W. Ngeontae).

used successfully in various fields such as water monitoring and waste water treatment. Many researchers used crown ethers as ionophores in Cd^{2+} selective electrodes. Gupta and co-workers prepared membrane potentiometric sensors based on crown ethers that showed good membrane characteristics [32–34]. The sensors showed selectivity toward Cd^{2+} upon adding benzene or cyclohexane constituents to the flexible crown ethers leading to their stiffening and altering the binding strength to complex Cd^{2+} selectively. The selectivity also depended on the size of the crown ether ring. Other crown ethers were also demonstrated as ionophores for Cd^{2+} . Monoaza-18-crown-6 [35] and benzo-15-crown-5 [36] were used as neutral carriers in plasticized PVC membrane with good selectivity toward Cd^{2+} over other studied interfering ions. Shamsipur and Mashhadizadeh reported the successful use of tetrathia-12-crown-4 in fabrication of a membrane ion selective electrode for cadmium [37]. The electrode displayed low detection limit, fast response, wide pH range and lifetime for at least 6 weeks. A potentiometric sensor for cadmium based on tetrol compound was prepared by the same research group [38]. The ligand tetrol with flexible tri-dimensional structure and four hydroxyl groups can bind Cd^{2+} to form a stable 1:1 tetrol- Cd^{2+} complex.

Later on Gupta and coworker prepared Cd^{2+} -ISE using Schiff base ionophores [39]. The selectivity of the Cd^{2+} electrode systems increased to a larger extent with the increase of amounts of anionic additives in the membrane. Moreover, they reported the use of two neutral ionophores, Schiff base-based *o*-phthalaldehyde (**L1**) and 4-hydroxynaphthalaldehyde (**L2**), for fabrication of Cd-ISE. The electrodes fabricated from ionophore **L1** exhibited a remarkable low detection limit in nanomolar concentration level with a fast response time (11 s) [40]. Ensafi et al. employed 4-hydroxy salophen, a good complexing ligand for metal ions, as an ionophore in a Cd^{2+} PVC membrane potentiometric sensor [41]. This Cd^{2+} -ISE showed a good characteristic of the membrane sensor in term of reproducible results and good selectivity. Rezaei and co-workers explored *N,N'*-(4-methyl-1,2-phenylene)diquinoline-2-carboxamide as a new neutral carrier for the recognition site of cadmium(II)-PVC membrane electrode [42]. The prepared Cd^{2+} -ISEs exhibited a response for Cd^{2+} over a wide concentration range with good selectivity. Ionophores based on three dimensional lipophilic compounds such as calixarene were also reported. Gupta and colleague reported the used of *t*-butyl thiacalix[4]arene and thiacalix[4]arene as Cd^{2+} ionophores. The electrode membrane incorporated thiacalix[4]arene showed better characteristics than the other. The sensor gave a linear potential response for Cd^{2+} over a wide activity range with Nernstian compliance (29.5 mV decade⁻¹ of activity) and a fast response time of ~8 s [43].

Thus far, there are a few Cd^{2+} ionophores based on coordination bonding from nitrogen donating ligands. To construct ISEs for Cd^{2+} , choosing the appropriate recognition unit to recognize Cd^{2+} selectively is very challenging. Recently, tripodal ligands such as tris(2-pyridylmethyl)amine (TPA) have been employed as chemosensors for Zn^{2+} [44,45]. The selectivity of this type of ligand toward metal ions depends on the preorganization of its structures. Both Zn^{2+} and Cd^{2+} are d^{10} metal ions and have similar coordination chemistry [46]. However, Cd^{2+} is a bigger ion than Zn^{2+} , and the metal center can accommodate 4–6 ligands. Therefore, we have designed 4 new ionophores containing a different number of the TPA units. Ionophore **I** contained one TPA group linked to the anthracene unit. Ionophores **II**, **III** and **IV** have been designed to have a different number of the TPA unit connected to the calix[4]arene framework. Ionophores **II–IV** are expected to form complexes with Cd^{2+} to a different extent.

In this work, electrode characteristics such as the formation constant of each ionophore toward Cd^{2+} , membrane composition optimization, selectivity, working pH range, reversibility of the sensor and the electrode life time were fully examined. Moreover,

the relationship between the membrane characteristics and the topology of the ligands, the number of the donor atoms and the lipophilicity of ionophores was explored. The use of the proposed electrode as the sensor for Cd^{2+} releasing from nanocrystalline CdS quantum dots solution and Cd^{2+} in the real treatment water sample was also carried out.

2. Experimental

2.1. Reagents

Anthracene-9-carbaldehyde was purchased from Aldrich. The precursor compounds, 2-(bis(2-pyridylmethyl)-aminomethyl)aniline (**1**), 25-2(2-ethyloxybenzaldehyde)-26,27,28-trihydroxy *p*-*tert*-butylcalix[4]arene (**2**), 25,27-(4,4'-bis(ethoxybenzaldehyde))-26,28-dihydroxy *p*-*tert*-butylcalix[4]arene (**3**) were synthesized using the previously published procedure [44,47,48]. High molecular weight poly(vinylchloride) (PVC), tetrakis[3,5-bis(trifluoro-methyl)phenyl]borate (NaTFPB), potassium tetrakis(*p*-chlorophenyl)borate (KTPCIPB), bis(2-ethylhexyl)sebacate (DOS), 2-nitro phenyl octyl ether (*o*-NPOE) and tetrahydrofuran (THF), which were obtained from Fluka, were used to prepare the PVC membranes. The nitrate and chloride salts of all cations were obtained from Carlo Erbar, Ajax Finechem, Riedel-de Haën, Fluka and J.T. Baker. Nitric acid and sodium hydroxide were obtained from QReC and Carlo Erba, respectively. All aqueous solutions were prepared in deionized water with the specific resistivity of 18.2 MΩ cm from RiO_sTM Type I Simplicity 185 (Millipore water). Working solutions of different concentrations were prepared by dilution of 1.0 M stock solutions.

2.2. Instrumentation

Fluorescence spectra were recorded using a RF-5301PC spectrofluorophotometer (Shimadzu). The slit width used for excitation and emission was 5 nm. The pH of the solution was measured with Denver Instrument UB-10 DELUXEBIO Series. The determination of cadmium concentrations in QDs solution was performed on a Perkin-Elmer PE100 flame atomic absorption spectrometry using air-acetylene flame. The concentration of cadmium in treatment waste water samples was determined using inductively coupled plasma optical emission spectrometer (model iCAP 6500, Thermo Scientific). Other instrumental parameters were used as recommended by manufacturers.

2.3. Synthesis of tripodal amine ionophores

2.3.1. Synthesis of *N*-(anthracene-9-yl methyl)-2-(((pyridin-2-yl methyl)(pyridin-3-yl methyl)amino)methyl)aniline (**I**)

Anthracene-9-carbaldehyde (0.96 g, 6.47 mmol) was mixed with 2-(bis(2-pyridylmethyl)aminomethyl)aniline (1.41 g, 4.65 mmol) in dried CH_3CN (100 mL), and the solution was refluxed for 24 h. The solvent was then removed by evaporation. The remaining oil was dissolved in CH_3OH . The solution was treated with NaBH_4 (0.57 g, 15.48 mmol) in small portions at 0 °C and subsequently refluxed for 16 h under nitrogen atmosphere. At room temperature, water (50 mL) was added into the mixture, and the solvent was concentrated in vacuo. The organic layer was dried over anhydrous Na_2SO_4 , and the solvent was removed under reduced pressure giving a red-brown oil. Ionophore **I** was obtained by precipitating the crude product using a mixture of CH_3OH and diethyl ether as a bright yellow solid (0.35 g, 55%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 8.60 (s, 2H, ArH), 8.28 (d, *J*=8.8 Hz, 2H, ArH), 8.15 (d, *J*=8.4 Hz, 2H, ArH), 8.04 (d, *J*=4.0 Hz, 2H, ArH), 7.57 (d, *J*=7.2 Hz, 2H, ArH), 7.50 (m, 2H, ArH), 7.06 (s, 2H, ArH), 6.74 (q, *J*=4.0 Hz, 2H, ArH), 6.62 (m, 2H, ArH), 6.44 (d,

$J=8.0$ Hz, 2H, ArH), 6.09 (s, 1H, -NH-), 5.15 (s, 2H, -CH₂-NH-), 3.56 (s, 2H, -CH₂-), 3.50 (s, 2H, -CH₂-). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, ppm): δ 158.44, 148.46, 148.07, 135.90, 131.65, 131.42, 130.94, 129.98, 129.05, 129.05, 127.70, 126.34, 125.26, 124.79, 122.48, 121.77, 121.47, 116.57, 109.56, 58.51, 40.59. ESI-MS (positive mode, m/z): $[M+H]^+$ Calcd for C₃₄H₃₁N₄, 495.25; Found, 495.25.

2.3.2. Synthesis of 25-ethyl-2-(bis(2-pyridylmethyl)aminomethyl)aniline-26,27,28-trihydroxy *p*-tert-butylcalix[4]arene (II)

25-2(2-Ethoxybenzaldehyde) *p*-tert-butylcalix[4]arene (2) (7.19 g, 9 mmol) in CH₂Cl₂ (25 mL) was added to a suspension of anhydrous MgSO₄ (10.87 g, 90 mmol) in CH₂Cl₂ (20 mL) containing 2-(bis(2-pyridylmethyl)aminomethyl)aniline (1) (2.75 g, 9 mmol). The mixture was stirred for 12 h under nitrogen atmosphere. Then, MgSO₄ was removed by filtration. After the solvent was removed, the imine product was obtained as a dark solid (quantitative yield) and used in the next step without further purification. The imine was dissolved in MeOH (50 mL) and the solution was cooled to -5 °C. NaBH₄ (3.4 g, 90 mmol) was added and the reaction was refluxed for 3 h under nitrogen atmosphere. Then water was added to the reaction and the solvent was evaporated to remove MeOH. CH₂Cl₂ (200 mL) was then added to the mixture. The organic phase was washed with water (3 × 50 mL) and dried with anhydrous MgSO₄. After removing solvent, the crude product was then purified by column chromatography (SiO₂) using EtOAc as eluent. Compound II was further purified by precipitation using hexane and was obtained as a white solid (1.95 g, 20%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm): δ 10.20 (s, 1H, -OH), 9.49 (s, 2H, -OH), 8.44 (d, 2H, $J=4$ Hz, ArH), 7.49 (t, 2H, $J=6$ Hz, ArH), 7.37 (d, 2H, $J=4$ Hz, ArH), 7.34 (d, 2H, $J=8$ Hz, ArH), 7.13 (s, 2H, ArH), 7.12 (s, 1H, ArH), 7.07 (d, 2H, $J=2$ Hz, ArH), 7.05 (s, 2H, ArH), 7.03 (s, 2H, ArH), 7.02 (s, 2H, ArH), 6.94 (m, 2H, ArH), 6.54 (t, 1H, $J=7.6$ Hz, ArH), 6.40 (d, 1H, $J=8$ Hz, ArH), 4.70 (d, 2H, $J=3.2$ Hz, -CH₂-NH-), 4.64 (s, 4H, -O-CH₂-O-), 4.53 (d, 2H, $J=12.8$ Hz, Ar-CH₂-Ar), 4.24 (d, 2H, $J=13.6$ Hz, Ar-CH₂-Ar), 3.83 (s, 4H, -CH₂-), 3.69 (s, 2H, -CH₂-), 3.45 (d, 2H, $J=12.8$ Hz, Ar-CH₂-Ar), 3.40 (d, 2H, $J=12.8$ Hz, Ar-CH₂-Ar), 1.23 (s, 36H, -tert-butyl). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, ppm): δ 159.24, 156.11, 149.12, 149.04, 148.39, 148.29, 148.09, 147.85, 143.50, 143.12, 136.30, 133.61, 130.94, 128.74, 128.53, 128.12, 128.07, 127.75, 127.69, 126.56, 125.82, 125.71, 125.66, 123.18, 121.90, 121.51, 121.10, 115.32, 110.80, 110.20, 74.78, 60.13, 58.47, 41.73, 33.00, 32.18, 31.50, 31.25. HRMS-ESI (positive mode, m/z): $[L2+H]^+$ Calcd for C₇₂H₈₄N₄O₅, 1085.6442; Found, 1085.6671.

2.3.3. Synthesis of

25-ethyl-2-hydroxymethylphenol-27-ethyl-2-(bis(2-pyridylmethyl)aminomethyl)aniline-26,28-dihydroxy *p*-tert-butylcalix[4]arene (III) and 25,27-bis(ethyl-2-(bis(2-pyridylmethyl)aminomethyl)aniline)-26,28-dihydroxy *p*-tert-butylcalix[4]arene (IV)

25,27-(4,4'-Bis(ethoxybenzaldehyde))-26,28-dihydroxy *p*-tert-butylcalix[4]arene (3) (2.65 g, 2.8 mmol) in dried CH₂Cl₂ (50 mL) was added to a suspension of anhydrous MgSO₄ (6.76 g, 56 mmol) in CH₂Cl₂ (70 mL) with 2-(bis(2-pyridylmethyl)aminomethyl)aniline (1) (2.13 g, 7 mmol). The reaction mixture was stirred for 12 h under nitrogen atmosphere. Then solid MgSO₄ was removed by filtration. After the solvent was removed, the imine product was obtained as a dark solid in a quantitative yield. The imine was dissolved in MeOH (50 mL), and the solution was cooled to -5 °C. Subsequently, NaBH₄ (2.12 g, 56 mmol) was added to the brown solution, and the mixture was refluxed for 12 h under nitrogen atmosphere. At room temperature, water (150 mL) was added, and the mixture was evaporated to remove MeOH. CH₂Cl₂ (150 mL) was added to the mixture. The organic layer was washed with water (3 × 50 mL), dried with

anhydrous MgSO₄, and evaporated. The crude product was then purified by column chromatography (SiO₂) using EtOAc as eluent to obtain ionophore III as a yellow oil. Then, the eluent was changed to 20% MeOH in EtOAc to obtain ionophore IV as a yellow oil. Ionophore III was recrystallized in hexane as a white solid (0.4 g, 12%). Ionophore IV was obtained as a white solid (0.85 g, 20%) after recrystallizing in diethyl ether.

For III: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.43 (d, 2H, $J=4.8$ Hz, ArH), 7.48–7.46 (m, 4H, 2ArOH + 2ArH), 7.34–7.31 (m, 8H, $J=1.6$ Hz, ArH), 7.34–7.32 (m, 6H, ArH), 7.10 (m, 6H, ArH), 6.98 (m, 6H, ArH), 6.58 (s, 2H, ArH), 6.45 (d, 2H, $J=4.4$ Hz, ArH), 5.24 (s, 4H, Ar-CH₂-OH), 4.53 (d, 2H, $J=5.2$ Hz, -CH₂-NH-), 4.45–4.34 (m, 12H, Ar-CH₂-Ar + -O-CH₂CH₂-O-), 3.80 (s, 4H, -CH₂-Ar), 3.67 (s, 2H, Ar-CH₂-Ar), 3.37 (d, 2H, $J=13.2$ Hz, Ar-CH₂-Ar), 3.36 (d, 2H, $J=13.2$ Hz, Ar-CH₂-Ar), 1.27 (s, 18H, -tert-butyl), 1.02 (s, 18H, -tert-butyl). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, ppm): δ 171.10, 159.30, 156.70, 156.50, 150.56, 149.84, 149.50, 148.23, 147.03, 141.48, 136.34, 136.29, 132.79, 130.95, 129.75, 129.44, 128.81, 128.64, 128.59, 127.94, 127.90, 127.65, 125.71, 125.23, 125.17, 123.24, 121.92, 121.53, 120.82, 120.79, 115.38, 111.54, 110.92, 110.36, 74.25, 74.12, 66.98, 66.84, 61.56, 60.15, 58.50, 41.77, 33.99, 33.85, 31.52, 31.08. HRMS-ESI (positive mode, m/z): $[III+H]^+$ Calcd for C₈₁H₉₄N₄O₇, 1235.7123; Found, 1235.7182.

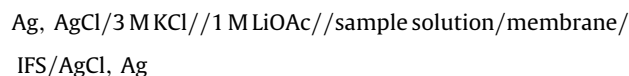
For IV: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.42 (d, 4H, $J=4$ Hz, ArH), 7.91 (s, 2H, ArOH), 7.65 (d, 2H, $J=2.4$ Hz, ArH), 7.46 (m, 4H, ArH), 7.35 (d, $J=7.6$ Hz, 2H, ArH), 7.30 (s, 4H, ArH), 7.19 (m, 2H, ArH), 7.06 (m, 8H, ArH), 7.05 (m, 2H, ArH), 6.95 (d, 4H, $J=8.4$ Hz, ArH), 6.89 (s, 4H, ArH), 6.86 (d, 2H, $J=7.2$ Hz, ArH), 6.72 (s, 2H, -NH-), 6.54 (m, 2H, ArH), 6.44 (d, 2H, $J=8$ Hz, ArH), 4.53 (d, 4H, $J=4.8$ Hz, -CH₂-NH-), 4.44 (d, 4H, $J=12.8$ Hz, Ar-CH₂-Ar), 4.35 (s, 8H, -CH₂-O-), 3.80 (s, 8H, -CH₂-), 3.68 (s, 4H, -CH₂-), 3.33 (d, 4H, $J=13.2$ Hz, Ar-CH₂-Ar), 1.26 (s, 18H, -tert-butyl), 1.03 (s, 18H, -tert-butyl). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, ppm): δ 159.23, 156.24, 150.35, 149.73, 149.07, 148.21, 147.34, 141.69, 136.29, 133.12, 130.97, 128.77, 128.56, 128.52, 127.93, 127.63, 125.72, 125.20, 123.20, 121.91, 121.55, 120.71, 115.35, 110.78, 110.32, 74.16, 66.65, 60.16, 58.47, 41.76, 34.04, 33.84, 31.83, 31.66, 31.10. HRMS-ESI (positive mode, m/z): $[IV+H]^+$ Calcd for C₁₀₀H₁₁₂N₈O₆, 1521.8705; Found, 1521.8698.

2.4. Preparation of the electrode

The PVC based membranes were prepared by dissolving of the ionophores (10 mmol kg⁻¹), NaTFPB or KTpCIPB, NPOE or DOS (66 wt.%) and PVC (33 wt.%) in THF (2 mL). The compositions were mixed according to weight percentages to give a total mass of 220 mg. The mixture was transferred into a glass ring (30 mm i.d.) placed on a glass plate, and the THF solvent is allowed to evaporate at room temperature over a period of 24 h. The transparent membranes were obtained and punched into small sizes (7.5 mm i.d.) then conditioned overnight in 10 mM Cd(NO₃)₂ solutions. The conditioned membrane was assembled into Philips body electrodes. The CdCl₂ solution (10 mM) was used as the inner filling solution. The compositions of the membrane electrodes are summarized in Table 1.

2.5. The EMF measurements

The membrane electrodes were conditioned for 12 h in 10 mM Cd(NO₃)₂ solution. All EMF measurements were carried out with the following cell assembly:



The Ag/AgCl double junction reference electrode was used (type 6.0726.100, Metrohm AG, CH-9010 Herisau, Switzerland) with 1 M

Table 1
Membrane compositions and electrode response properties.

Ionophore	Membrane composition					Slope (mV decade ⁻¹) (±SD, n = 3)	Linear range (M)	Detection limit (M)	
	PVCmg (wt%)	Plasticizer		Ion exchanger					Ionophore mg (mmol kg ⁻¹)
		DOS, mg (wt%)	o-NPOE, mg (wt%)	KTpClPB, mg (mol%)	NaTFPB, mg (mol%)				
I	74.54 (32.5)	145.69 (65.7)	152.42 (66.4)	0.80 (71.2)	1.45 (72.9)	1.11 (9.8)	26.2 (0.2)	10 ⁻⁵ to 10 ⁻²	4.5 × 10 ⁻⁶
	72.75 (32.8)		147.36 (66.4)		1.12 (10.2)	26.4 (0.3)	10 ⁻⁵ to 10 ⁻²	4.8 × 10 ⁻⁶	
	73.01 (33.0)		145.58 (65.9)		1.40 (74.4)	1.05 (9.6)	26.6 (0.1)	10 ⁻⁵ to 10 ⁻²	4.0 × 10 ⁻⁶
	73.28 (33.1)		151 (75.9)		1.11 (10.1)	26.3 (0.3)	10 ⁻⁵ to 10 ⁻²	3.4 × 10 ⁻⁶	
	73.01 (33.0)		145.58 (65.9)		1.40 (74.4)	1.05 (9.6)	25.2 (0.4)	10 ⁻⁵ to 10 ⁻²	3.4 × 10 ⁻⁶
	76.07 (32.8)		153.98 (66.3)		0.98 (46.8)	1.17 (10.2)	26.8 (0.3)	10 ⁻⁵ to 10 ⁻²	2.9 × 10 ⁻⁶
	73.23 (33.3)		145.22 (66.0)		0.50 (24.9)	1.12 (10.3)	26.7 (0.2)	10 ⁻⁵ to 10 ⁻²	3.3 × 10 ⁻⁶
II	72.10 (32.6)	145.12 (65.5)	144.87 (65.6)	0.79 (71.1)	1.48 (75.2)	2.41 (10.0)	25.2 (0.6)	10 ⁻⁵ to 10 ⁻²	3.5 × 10 ⁻⁶
	72.45 (32.8)		144.97 (65.7)		2.43 (10.1)	25.5 (0.8)	10 ⁻⁵ to 10 ⁻²	3.6 × 10 ⁻⁶	
	72.20 (32.7)		144.87 (65.6)		1.45 (73.4)	2.42 (10.1)	26.2 (0.2)	10 ⁻⁵ to 10 ⁻²	4.2 × 10 ⁻⁶
	72.51 (32.7)		148 (74.9)		2.42 (10.1)	27.8 (0.1)	10 ⁻⁵ to 10 ⁻²	4.3 × 10 ⁻⁶	
	72.18 (32.5)		145.62 (65.7)		1.47 (73.2)	2.46 (10.2)	26.9 (0.2)	10 ⁻⁵ to 10 ⁻²	3.8 × 10 ⁻⁶
	75.95 (33.0)		151.12 (65.6)		0.94 (48.2)	2.39 (9.6)	30.2 (0.2)	10 ⁻⁵ to 10 ⁻²	5.5 × 10 ⁻⁶
	73.01 (33.0)		145.66 (65.7)		0.49 (24.6)	2.44 (10.1)	26.6 (0.3)	10 ⁻⁵ to 10 ⁻³	5.5 × 10 ⁻⁶
III	72.53 (32.9)	144.38 (65.5)		0.82 (73.2)		2.82 (10.2)	28.5 (0.8)	10 ⁻⁵ to 10 ⁻³	3.6 × 10 ⁻⁶
	72.61 (32.9)		144.48 (65.5)	0.79 (71.6)	2.78 (10.1)	31.9 (0.8)	10 ⁻⁵ to 10 ⁻²	6.2 × 10 ⁻⁶	
	72.66 (32.9)		144.82 (65.5)	0.82 (73.3)	2.82 (10.2)	26.6 (1.6)	10 ⁻⁵ to 10 ⁻²	3.8 × 10 ⁻⁶	
	72.69 (32.7)		145.16 (65.4)		1.42 (71.8)	2.79 (10.1)	26.9 (0.2)	10 ⁻⁵ to 10 ⁻²	2.9 × 10 ⁻⁶
	72.43 (32.7)		145.56 (65.8)	0.47 (23.8)	2.79 (10.1)	32.8 (1.1)	10 ⁻⁵ to 10 ⁻²	7.9 × 10 ⁻⁶	
	72.11 (32.6)		145.14 (65.7)	0.98 (49.4)	2.80 (10.1)	30.6 (0.5)	10 ⁻⁵ to 10 ⁻²	5.5 × 10 ⁻⁶	
	72.69 (32.7)		145.16 (65.4)	1.42 (71.8)	2.79 (10.1)	25.2 (0.2)	10 ⁻⁵ to 10 ⁻²	3.2 × 10 ⁻⁶	
IV	72.14 (32.6)	143.90 (65.3)	144.59 (65.4)		0.92 (46.0)	3.47 (10.2)	29.3 (0.5)	10 ⁻⁵ to 10 ⁻³	3.2 × 10 ⁻⁶
	72.04 (32.7)		144.48 (65.3)	0.97 (48.0)	3.50 (10.3)	31.0 (0.5)	10 ⁻⁶ to 10 ⁻²	3.8 × 10 ⁻⁶	
	72.40 (32.8)		144.47 (65.5)	0.45 (22.9)	3.41 (10.1)	32.5 (0.4)	10 ⁻⁶ to 10 ⁻²	1.7 × 10 ⁻⁶	
	72.45 (32.7)		144.48 (65.3)	0.95 (48.2)	3.42 (10.1)	30.8 (0.2)	10 ⁻⁶ to 10 ⁻²	2.5 × 10 ⁻⁶	
	73.65 (32.3)		146.42 (65.1)	1.42 (72.0)	3.42 (9.9)	25.4 (0.5)	10 ⁻⁶ to 10 ⁻²	1.8 × 10 ⁻⁶	
	72.13 (32.7)		147.19 (66.0)		3.41 (10.0)	33.1 (0.2)	10 ⁻⁶ to 10 ⁻²	1.4 × 10 ⁻⁶	
	72.54 (32.7)		145.32 (65.5)	0.56 (50.1)	3.46 (10.2)	29.4 (0.6)	10 ⁻⁶ to 10 ⁻²	1.6 × 10 ⁻⁶	
	72.44 (32.7)	144.61 (65.3)		0.83 (75.4)		3.41 (10.0)	27.9 (0.6)	10 ⁻⁶ to 10 ⁻²	1.6 × 10 ⁻⁶

LiOAc as salt bridge electrolyte. A Lawson Labs, Inc 16-channel potentiometer (Lawson Labs Inc., Malvern, PA 19355, USA) was used for the potential measurements at ambient temperature. The activities were calculated according to the Debye–Hückel approximation [49]. The detection limit was determined according to IUPAC recommendations.

2.6. Preparation of sandwich membranes

In order to determine ion-ionophore complex formation constants in the solvent polymeric membrane, it requires membrane potential measurements on two-layer sandwich membranes, where only one side contains the ionophore. The PVC membranes were cast by dissolving the ionophore and the lipophilic ion exchanger (NaTFPB or KTpClPB), PVC and plasticizer (DOS or NPOE) (1:2 by weight), to give a total cocktail mass of 220 mg in 2.0 mL of THF and pouring it into a glass ring affixed onto glass plate. The solvent THF was left to evaporate overnight. The membrane compositions and the formation constant are shown in Table 2.

The sandwich membrane was visibly checked for air bubbles and immediately placed on a Philips body electrode (membrane with ionophore facing the sample solution) and immersed into the Cd²⁺ solution. The time needed from mounting the membrane until the potential measurement was less than 1 min. The EMF signals were recorded continuously for several hours. All membrane electrode potential measurements were performed at ambient temperature in unstirred solutions.

Membrane potential values, E_M , were determined by subtracting the cell potential for a membrane without ionophore from that

of the sandwich membrane. The formation constants were calculated using Eq. (1).

$$\log \beta_{Ln} = \left(\frac{E_M z_i F}{2.303 RT} \right) - n \log \left(L_T - \frac{n R_T}{z_i} \right) \quad (1)$$

L_T is the total concentration of the ionophore. R_T is the concentration of lipophilic ion exchanger. R , T , F , n and z_i are the gas constant, the absolute temperature, the Faraday constant, the complex stoichiometry and the charge of the tested ion, respectively.

2.7. Selectivity

The potentiometric selectivity coefficients were determined by fixed interference method. The interfering ions studied were Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Pb²⁺, Hg²⁺, Cr³⁺ and Fe³⁺. The interfering ions were fixed at appropriate concentrations between 1.0 × 10⁻⁶ and 1.0 × 10⁻² M depending on the interfering level of each ion. The stock solution of Cd²⁺ was added into the solution containing an interfering ion in order to make the final concentration between 1.0 × 10⁻⁷ and 1.0 × 10⁻² M, and the EMF was measured continuously. The lower detection limit was calculated as recommended by IUPAC. The selectivity coefficients were calculated from the mean value of triplicate experiments with the standard deviation.

2.8. Effects of the solution pH

The solution pH and the electrode signal were parallel measured. A pH electrode, a reference electrode and the proposed ISE

Table 2

Experimental membrane potentials and corresponding ionophore complex formation constants determined with segmented sandwich membranes for ionophore **II–IV** in PVC membrane assuming 1:1 stoichiometry of their complexes with Cd^{2+} .

Ionophore	Ionophore L_T (mmol kg ⁻¹)	Anionic sites R_T (mmol kg ⁻¹)	Plasticizer	Membrane potential E_M (mV)	Formation constant $\log \beta_{\text{ILn}}$
II	9.99	NaTFPB (4.74)	NPOE	385 ± 8	15.15 ± 0.29
III	10.01	NaTFPB (4.82)	NPOE	480 ± 9	18.29 ± 0.31
IV	9.80	KTpCIPB (4.59)	DOS	463 ± 5	17.79 ± 0.16

were immersed in the solution contained Cd^{2+} 1.0×10^{-4} M (or 1.0×10^{-3} M). The pH of the solution was adjusted to pH 3 by HNO_3 . The pH of the solution was varied from 3 to 10 by gradually adding 0.01–0.10 M NaOH.

2.9. Reversibility

The membrane reversibility was examined by measuring the EMF of Cd-ISE in a 10^{-4} M Cd^{2+} solution. Subsequently, the electrode was rinsed and dipped into a 10^{-3} M Cd^{2+} solution. The cycle was repeated four times.

2.10. Electrode life time

After conditioning a membrane overnight in 10 mM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, Cd-ISE's response were recorded over the concentration range of 10^{-7} – 10^{-2} M Cd^{2+} . This procedure was repeated several times. The slopes and response potentials were recorded with the same electrode until the significant diversity of signals and slopes was observed.

2.11. Application to determine the oxidization product of CdS QDs

TGA-capped CdS QDs were prepared and purified using a procedure from the literature with modification [50]. The properties of the synthesized quantum dots were reported in the previous report [51]. The original CdS QDs solution (1000 ppm) of 100 μL was diluted into 10.00 mL of water. The Cd^{2+} -ISE and the reference electrode were directly immersed to the diluted solution. The EMF was recorded, and this corresponded to free Cd^{2+} in the solution. Total amount of Cd^{2+} in CdS QDs was then determined by adding 0.03%v/v H_2O_2 (50 μL) into the solution, and the EMF of the solution was measured. The procedure was repeated several times. The calibration curve was tested before and after each experiment.

2.12. Application to determine Cd^{2+} in the real treatment waste water sample

In order to demonstrate the applicability of the fabricated Cd-ISE sensors (ionophores **III** and **IV**), the treatment waste water sample was used as the representative of the environmental sample. The water sample was collected from Chulalongkorn University's treatment waste water pond using polyethylene bottles and was used immediately. The sample was filtered through the nylon 0.45 μm membrane. The accuracy and precision of measurement were evaluated by spiking Cd^{2+} in to the sample to have the concentration of 1.0×10^{-5} M and 3.0×10^{-5} M (corresponding to 1.124 and 3.372 mg L⁻¹, respectively), and the results obtained were compared with the results from a standard ICP-AES.

3. Results and discussion

3.1. Design and synthesis of ionophores

Recently, many researchers have employed calix[4]arene as a three-dimensional molecular building block to attach

particular functional units to their skeleton for selective binding with different metal ions. Reinhoudt and co-workers reported the use of calix[4]arenes substituted with dithioamide functionalities to prepare chemically modified field effect transistors (CHEMFETs) possessing high selectivity toward Cd^{2+} [52,53]. Therefore, we attached the TPA unit to our modified anthracene and calix[4]arenes to obtain ionophores **I**, **II**, **III** and **IV**. Ionophore **I** consisted of one TPA group connected to anthracene. Ionophore **II** contained calix[4]arene attaching with only one TPA moiety. Ionophore **III** is similar to the structure of **II** but the opposite site of TPA unit was attached with benzyl alcohol unit to coordinate with metal center. Ionophore **IV** contained two TPA molecules on the opposite sites. Therefore, the binding properties of each ionophore toward metal ions in membranes definitely depend on the topology, the donor atoms and lipophilicity of the ligands.

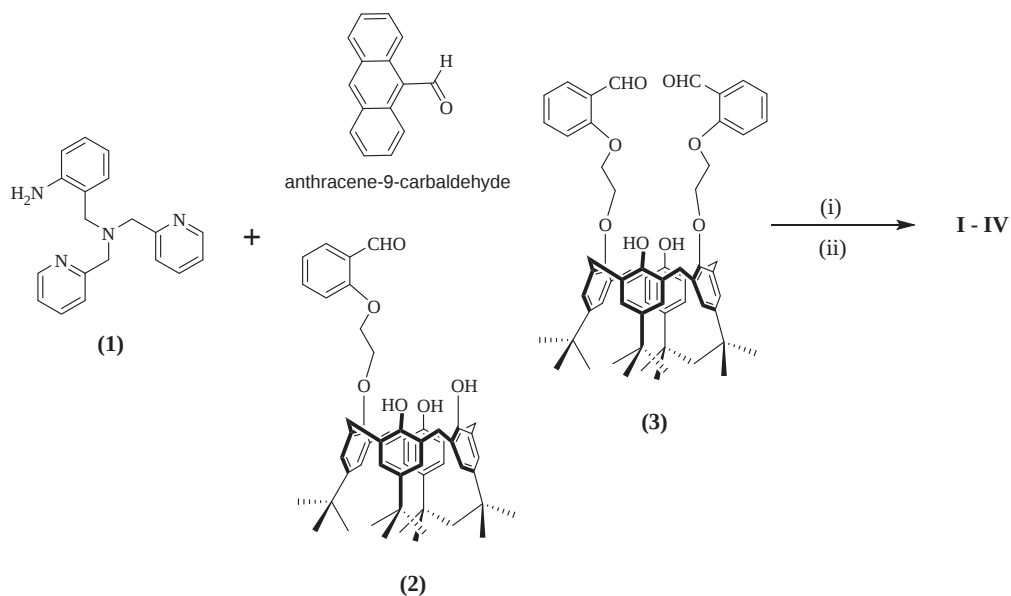
Generally, the synthetic procedure for ionophores **I–IV** shown in Scheme 1 employed the condensation reactions between the amine and the aldehyde functional groups to yield the Schiff base compounds. Reduction of the Schiff bases with NaBH_4 resulted in the desired ionophores.

Structures of ionophores **I–IV** are illustrated in Fig. 1. Ionophore **I** was synthesized from the reaction between anthracene-9-carbaldehyde and 2-(bis(2-pyridylmethyl)aminomethyl)aniline (**1**) in anhydrous CH_3CN to yield the Schiff base derivative. Upon reacting the Schiff base with NaBH_4 , the reaction in CH_3OH yielded ionophore **I** in 55% yield after precipitation with diethylether. Ionophore **II** was synthesized from the condensation reaction between compound **1** and 25-(2-ethoxybenzaldehyde)-26,27,28-trihydroxy *p*-tert-butylcalix[4]arene (**2**) in anhydrous CH_2Cl_2 to give the Schiff base derivative which was reduced by NaBH_4 in CH_3OH to yield ionophore **I** in 20% yield. Ionophores **III** and **IV** were prepared from the reaction of 25,27-(4,4'-bis(ethoxybenzaldehyde))-26,28-dihydroxy *p*-tert-butylcalix[4]arene (**3**) with compound **1**. After reaction with NaBH_4 , the crude products were separated by column chromatography. Ionophore **III** and **IV** were obtained in 12% and 20% yields, respectively.

Recently, **II** and **IV** have been found to form complexes with Cu^{2+} which can detect pyrophosphate using indicator displacement strategy [54]. We think that the synthesized ionophores can also bind with other transition metal ions. With appropriate membrane compositions, we expect that these ionophores would response selectively toward Cd^{2+} with good membrane characteristics. We also expect to see the relationship between the structure and the selectivity of ionophores as well as good ISE characteristics.

3.2. Optimization of membrane compositions

It is well known that for PVC membrane electrodes the type and percentage of each composition are critical parameters that affected the sensing characteristic of the fabricated electrode such as the working concentration range, lifetime, selectivity, sensitivity and chemical stability. However, the ratio between PVC and plasticizer are already optimized at 1:2 ratio by weigh which is provided the best component in many reports [55]. The dielectric constant of the membrane phase, the mobility of the ionophore and its metal complexes can improve the response characteristics



Scheme 1. Synthetic procedures for ionophores **I–IV**. Reagents and conditions: (i) anhydrous CH_2Cl_2 or CH_3CN , rt; (ii) NaBH_4 , CH_3OH , reflux.

[31]. In this work, the type of ionophores (ionophores **I–IV**), ionic additives (KTpClPB and NaTFPB) and plasticizers (*o*-NPOE and DOS) were studied in order to obtain the best membrane characteristics of Cd^{2+} -ISE. The concentration of the ionophore in the membrane was fixed at ca. 10 mmol kg^{-1} .

The decision for choosing the optimal composition was based on how well the slope of the plot between EMF and logarithm of activity of Cd^{2+} behaved close to the theoretical predicted by Nernst's equation ($29.6 \text{ mV decade}^{-1}$). Moreover, the lower limit of detection is an important characteristic of an ISE. The lower detection limit resulted from the good selectivity of the ISE toward Cd^{2+} rather than other presented cations. In addition, the working concentration range and the response reproducibility (from standard deviation of 3 measurements) are also important characteristics to be examined. The membrane compositions and the characteristic parameters were summarized in Table 1.

In the case of the membrane fabricated from ionophore **I**, the slopes of the plots of EMF vs. $\log a_{\text{Cd}^{2+}}$ were lower than Nernstian's slope when varying the membrane compositions (Table 1). This result showed that the ionophore **I** was not suitable for fabrication of Cd -ISE. The lipophilicity of the ionophore **I** containing anthracene was not high enough to retain the ionophore in the membrane phase especially when forming complexes with Cd^{2+} .

It can be seen that ionophores **II** and **III** in the plasticized PVC membranes gave well-behaved slope using *o*-NPOE as plasticizer while PVC membranes incorporating ionophore **IV** gave the Nernstian's slope ($29.4 \pm 0.6 \text{ mV decade}^{-1}$) when the membranes composed of DOS as the plasticizer. This result indicated the relationship between the polarity of the solvent membrane and the lipophilicity of the Cd^{2+} -ionophore complexes. The plasticizer *o*-NPOE is more polar than DOS is. This suggested that the polarity of the Cd^{2+} complexes of ionophores **II** and **III** are higher than that

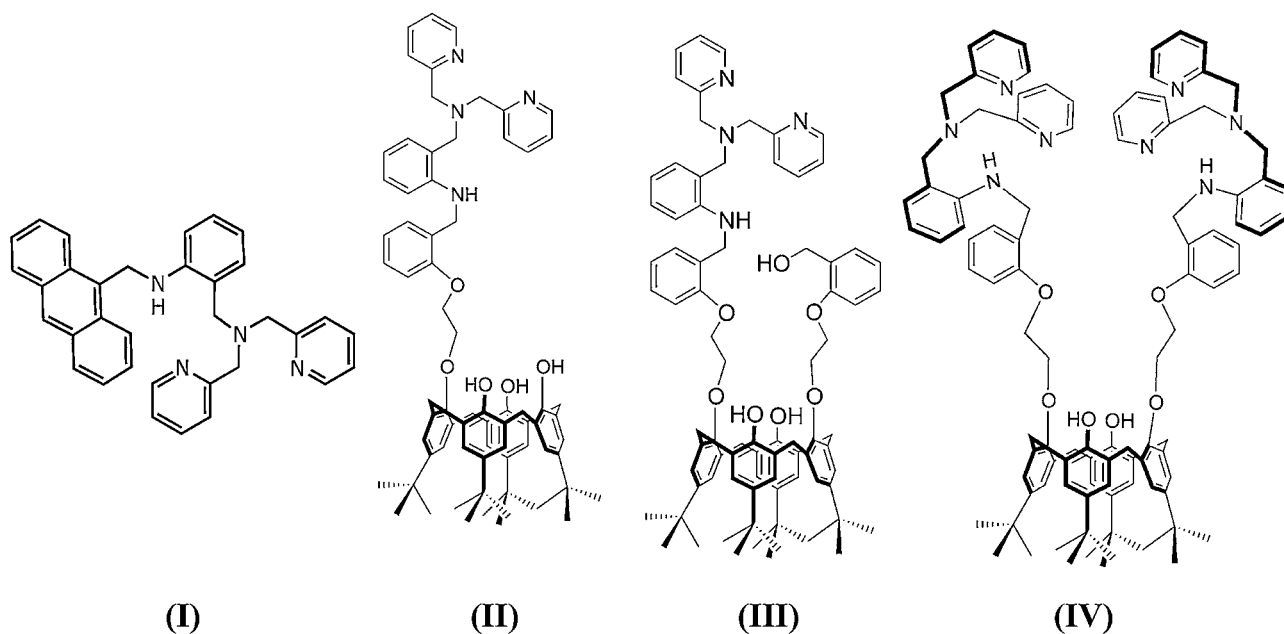


Fig. 1. Chemical structures of ionophores **I–IV**.

of Cd^{2+} complexes of **IV**. The higher polarity of Cd^{2+} complexes of **II** and **III** resulted from the unsymmetrical structures of these ionophores as compared to the symmetrical structure of **IV**. The results demonstrated that the response characteristics of the membrane can be tuned by choosing a suitable polarity of the plasticizer.

Moreover, type and mole percentage (related to the mole of ionophores) of ionic additives were also optimized. From Table 1, two kinds of the ion exchanger, KTpClPB and NaTFPB gave insignificant different results for the membrane incorporating ionophores **II** and **III**. Therefore, the type of the ionic site may not be the critical parameter that affected the response characteristics of the membranes containing **II** and **III**. However, to avoid the leaching of the ionic site to a highly lipophilic medium such as blood or aqueous solution, a higher lipophilicity ion exchanger, NaTFPB, was chosen for membrane fabricated from ionophores **II** and **III**. For ionophore **VI**, KTpClPB was used as ionic additive because the lower detection limit was obtained when using NaTFPB as the ionic site.

3.3. Potentiometric selectivity coefficient

Potentiometric selectivity is the ability of the electrode to measure primary ions in the presence of foreign ions without biased signals. Potentiometric selectivity can be expressed by the selectivity coefficient (K_{ij}^{pot}). This characteristic is the most important property for ion selective electrodes. Several methods can be used to determine the selectivity coefficient as recommended by IUPAC such as separated solution method (SSM) and fix interference method (FIM). Moreover, match potential method (MPM) which gave empirically meaningful results is also used [31]. In this work, the selectivity coefficients were determined by fixed interference method (FIM). In this method, an entire calibration curve is measured for the primary ion in a constant interfering ion background ($a_{j,\text{BG}}$). The fixed interference method is based on semi empirical Nicolskii–Eisenman formalism, and the selectivity is usually described in terms of selectivity coefficients (K_{ij}^{pot}) as shown in Eq. (2).

$$\text{EMF} = E^0 + \frac{RT}{z_i F} \ln \left[a_i + \sum K_{ij}^{\text{pot}} a_j^{z_i/z_j} \right] \quad (2)$$

EMF is measured potential, E^0 is the standard cell potential, and a_i and a_j are the activity of primary and interfering ion, respectively. In addition, z_i and z_j are the charge of the primary and interfering ions, respectively. The selectivity coefficient, K_{ij}^{pot} , can be calculated according to Eq. (3).

$$\log K_{ij}^{\text{pot}} = \log \left(\frac{a_{i,\text{DL}}}{a_{j,\text{BG}}^{z_i/z_j}} \right) \quad (3)$$

In Eq. (3), $a_{i,\text{DL}}$ and $a_{j,\text{BG}}$ are the activity of the primary ion at lower detection limit and the activity of background interfering ions, respectively. The resulting logarithmic selectivity coefficients are summarized in Fig. 2. The diagram clearly showed that all ionophores can be used as the selective molecular receptors toward Cd^{2+} . Most of the studied interfering ions have logarithmic selectivity coefficient lower than Cd^{2+} . Alkaline earth metal ions showed lowest interfering level that benefited the detection of Cd^{2+} in the hard water. Moreover, from selectivity diagram, it should be noted that ionophore **IV** showed the best selectivity toward Cd^{2+} compared to ionophore **III**, **II** and **I**.

Ionophore **IV** possesses two tripodal amine (TPA) groups that can facilitate the formation of a stable octahedral complex with Cd^{2+} via the N donor atoms. The orientation of the donor sites of both TPA units on calix[4]arene based structure of ionophore **IV** could give a more flexible coordination sphere to accommodate Cd^{2+} as compared to that in ionophores **II** and **III**. Ionophore **III** also

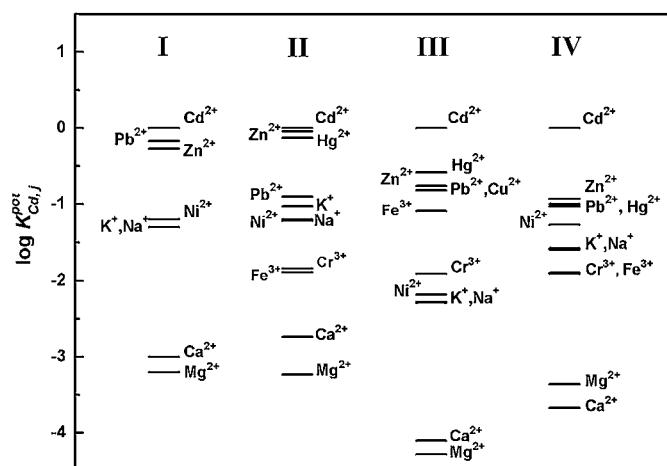


Fig. 2. A comparison of selectivity coefficient ($\log K_{\text{Cd},j}^{\text{pot}}$) of ionophores **I**, **II**, **III** and **IV**.

gave higher selectivity toward Cd^{2+} than ionophore **II**. This may result from the hydroxymethylphenol group on the opposite site of the TPA group. This group may coordinate to Cd^{2+} to give a stable complex. From the selectivity order, the results implied that one TPA group may not be enough to coordinate Cd^{2+} , and other donor sites were needed to improve the binding ability toward Cd^{2+} in the membrane.

Considering the coordination chemistry of TPA ligand [54], Cu^{2+} can be a potential interfering ion for our fabricated membranes. From the experimental observation, when the membrane contacted with a Cu^{2+} solution, the response behaviors were not reproducible and the slopes of the calibration graph are lower than expected ($\sim 10 \text{ mV decade}^{-1}$). Further experiments were carried out to use ionophores **II–IV** as Cu-ISEs. The results showed that all membranes showed the time trace line in a negative EMF direction (data shown in the supporting material). The synthesized ionophores **II–IV** may form very strong and non-reversible complexes with Cu^{2+} and converted from the neutral ionophore to the positive charge ionophore inside the membrane [56]. The membrane may then respond to NO_3^- (from $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$) or other anions to give a negative response. From this observation, we are currently developing anion selective electrodes using Cu^{2+} -TPA-Calix[4]arene as a carrier. The result will be reported in due course.

3.4. Response characteristic of the membrane fabricated from ionophore **III** and **IV**

Due to selectivity and limited working abilities of the membranes fabricated from ionophores **I** and **II**, we explored characteristics of the ISEs prepared from ionophores **III** and **IV** in details. The optimized membrane compositions for ionophores **III** and **IV** were used to study the response characteristics of the sensors. As shown in Fig. 3a and b for the response of ISEs prepared from ionophores **III** and **IV**, respectively, the EMF increased upon increasing the Cd^{2+} concentration with very stable potentials. Both ISEs could respond to the Cd^{2+} very rapidly with the response time less than 10 s, and the significant increasing of the EMF was observed at the concentration of Cd^{2+} higher than $1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$. The insets showed the corresponding calibration curves that provided Nernstian slopes of 30.6 ± 0.5 and $29.4 \pm 0.6 \text{ mV decade}^{-1}$ and lower detection limits of 5.5×10^{-6} and $1.6 \times 10^{-6} \text{ M}$ for ISEs using **III** and **IV**, respectively. Both sensors could be used in a wide concentration range of Cd^{2+} (10^{-6} – 10^{-2} M). The response characteristics of both sensors showed that the membrane electrodes fabricated from ionophores **III** and **IV** were very good Cd^{2+} sensors.

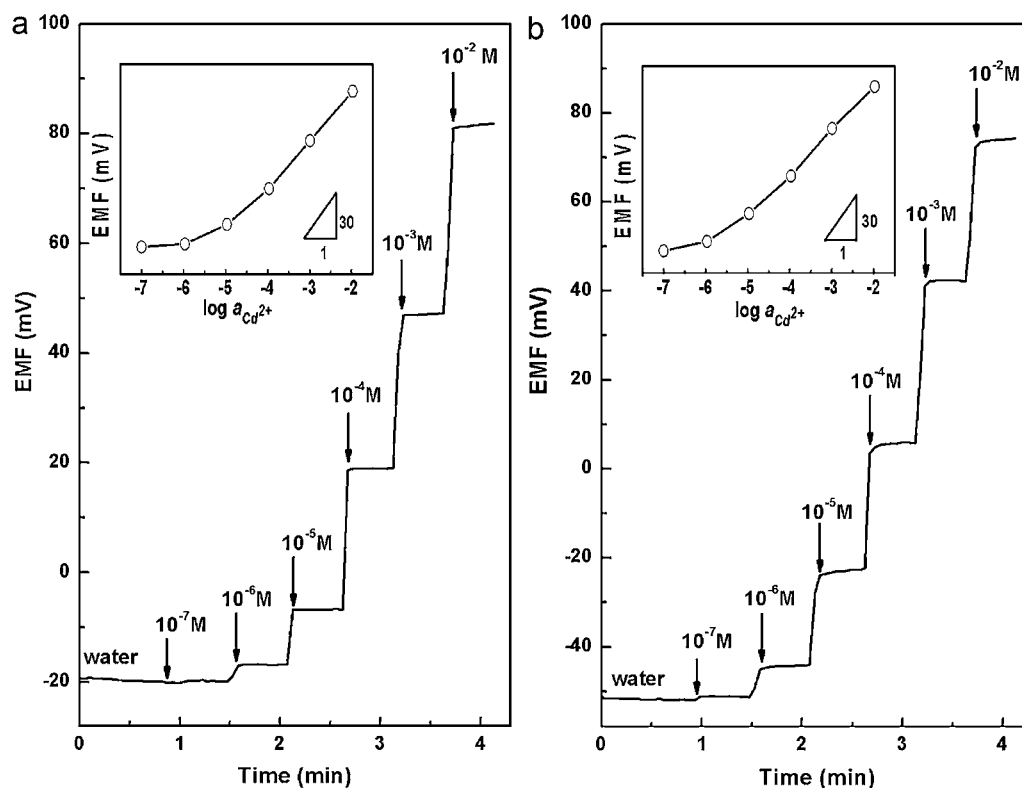


Fig. 3. (a) Response of the Cd-ISE using ionophore **III** (b) Response of the Cd-ISE using ionophore **IV**.

3.5. pH effect on the potential response

The aim of this experiment is to explore the working pH range in which the fabricated ISEs can be used without any biased signals from the solution pH. The experiment was conducted at Cd²⁺ concentrations of 1.0×10^{-4} M, 1.0×10^{-3} M and 1.0×10^{-2} M over the pH range of 3.0–10.0. The EMF signals as a function of the solution pH are shown in Fig. 4a and b for electrode fabricated from ionophores **III** and **IV**, respectively. The electrode response remained constant at the pH range of 5.0–8.0 and 6.0–9.0 for electrode fabricated from ionophores **III** and **IV**, respectively. This is a basic behavior of the ISE for transition and heavy metal ions that widely reported in the literatures [32,37,39,41]. At lower pH, the solution become acidic, an increasing in the potential was observed. The limit at the lower pH range was due to the membrane response to high H⁺ concentration. Moreover, at higher pH values (highly concentration of OH⁻), the potential decreased due to the formation of cadmium hydroxide that reduced the amount of free Cd²⁺ in the solution. Although, the pH working range seems to be limited, the electrodes can be used in the range of 3 orders pH range which is good enough for real applications.

3.6. Measurement of complex formation constants

Basically, the ISE applications did not require a high value of the complex formation constant between ionophores and primary ions. However, the formation constant should be high enough to differentiate the recognition of primary and interfering ions. A suitable complex formation constant can affect both the selectivity toward the primary ion and the lower detection limit of the ISE. Therefore, determination of the complex formation constant would give useful information to evaluate the characteristics of the synthesized ionophores. Bakker and co-workers have invented the method for evaluate the complex formation constant between primary ions and ionophores in plasticized PVC membrane electrodes

employing the segmented sandwich membrane approach [57–59]. This method required a determination of the membrane potential on two-layer sandwich membranes, where only one membrane contained the ionophore.

The membrane potential values, E_M , are determined by subtracting the cell potential for a membrane without ionophore from that of the other membrane. The formation constant was then calculated according to Eq. (3).

$$\log \beta_{ILn} = \left(\frac{E_M z_i F}{2.303 RT} \right) - n \log \left(\frac{L_T - nR_T}{z_i} \right) \quad (4)$$

L_T is the total concentration of the ionophore in the membrane segment. R_T is the concentration of lipophilic ionic additives. R , T and F are the gas constant, the absolute temperature, and the Faraday constant, respectively. The charge of primary ion and the ion-ionophore complex stoichiometry are designated as z_i and n , respectively.

The experiments were carried out to determine the formation constant between Cd²⁺ and ionophores **II**, **III** and **IV** assuming a 1:1 ion-ionophore stoichiometry. The observed time response behavior of a two-layer sandwich membrane containing ionophores **II**, **III** and **IV** in the segment facing the sample over the first 10 h after the initial contact is shown in Fig. 5, and the Cd²⁺-ionophore complex formation constants are shown in Table 2. The results showed that all of ionophores formed very strong and stable complexes with Cd²⁺ giving logarithmic complex formation constants of 15.15 ± 0.29 , 18.29 ± 0.31 and 17.79 ± 0.16 for ionophores **II**, **III** and **IV**, respectively. However, the complex formation constant strongly depended on membrane compositions. Therefore, only membranes from ionophores **II** and **III** containing the same membrane compositions (PVC-*o*-NPOE) can be compared while the membrane using ionophore **IV** containing DOS as plasticizer cannot. The logarithmic complex formation constant of the ionophore **III** (18.29 ± 0.31) was higher than that of ionophore **II** (15.15 ± 0.29) for about 3 orders of magnitude, and this agreed well with the

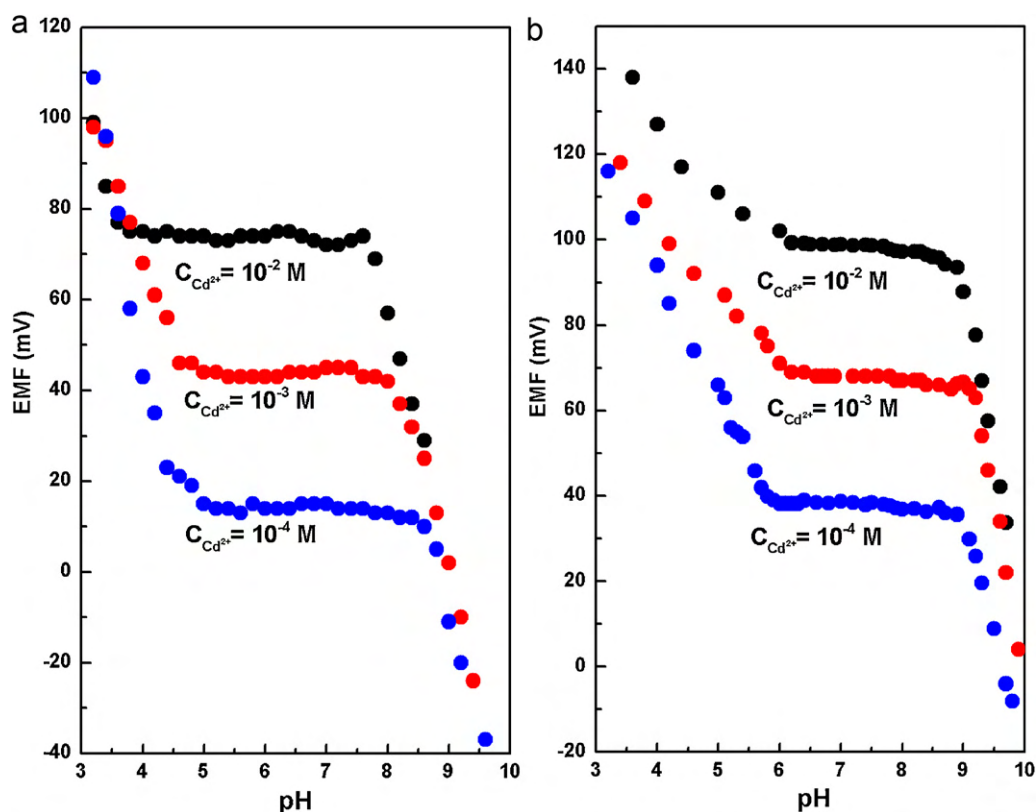


Fig. 4. Effect of pH on response of the Cd-ISEs using ionophores III (a) and IV (b).

selectivity coefficient which was better for the membrane fabricated from ionophore III. This result also implied the important role of the hydroxymethylphenol group in assisting the TPA group to coordinate Cd²⁺. Moreover, the membrane fabricated from ionophore IV (in PVC-DOS) showed a high complex formation value in the same order with ionophore III. This was corresponding to the selectivity results that the membrane fabricated from ionophore IV showed the best selectivity toward Cd²⁺. This characteristic may be attributed to the two symmetrical tripodal amine groups on the calix[4]arene that could rearrange in a suitable geometry for complexing Cd²⁺ rather than other interfering ions. From the formation constants, it can be concluded that only one group of tripodal amine

on calixarene framework was not enough to coordinate Cd²⁺, and the better ionophore needed other donor sites in order to obtain the ISE with a good selectivity pattern.

3.7. Reversibility and lifetime of the fabricated electrodes

The reversibility of the electrode signal, when changing and returning to the same concentration, is another important property to be examined for new fabricated sensors. This property also represents to the precision of the detection. The reversibility of the sensor was investigated by alternatively measured EMF's of two different concentrations, 10⁻⁴ and 10⁻³ M Cd²⁺. From Fig. 6, the

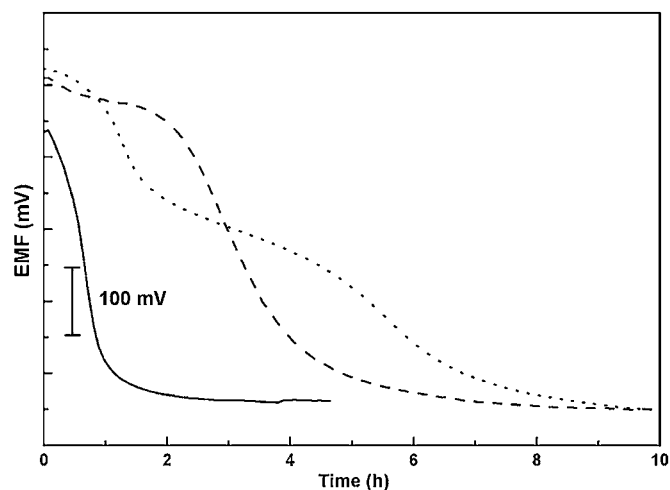


Fig. 5. Observed time response behavior of sandwich membranes to Cd²⁺ (0.01 M CdCl₂) using different ionophores; II (solid line), III (dot line), and IV (dash line).

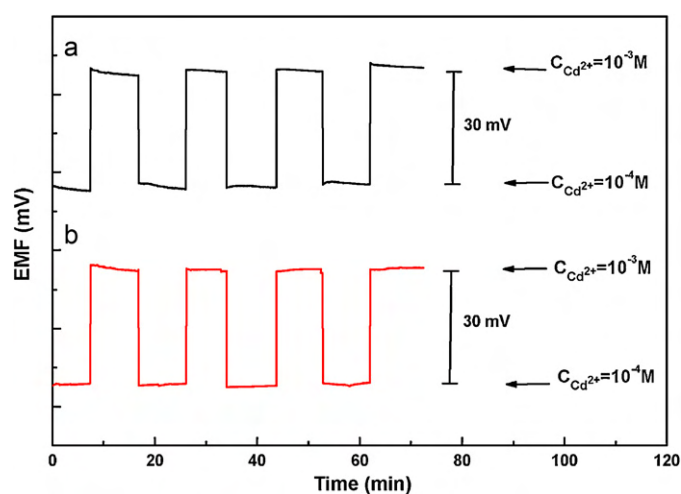


Fig. 6. Reversibility of the Cd-ISEs using ionophores III (a) and IV (b) at different concentrations between 10⁻³ M and 10⁻⁴ M.

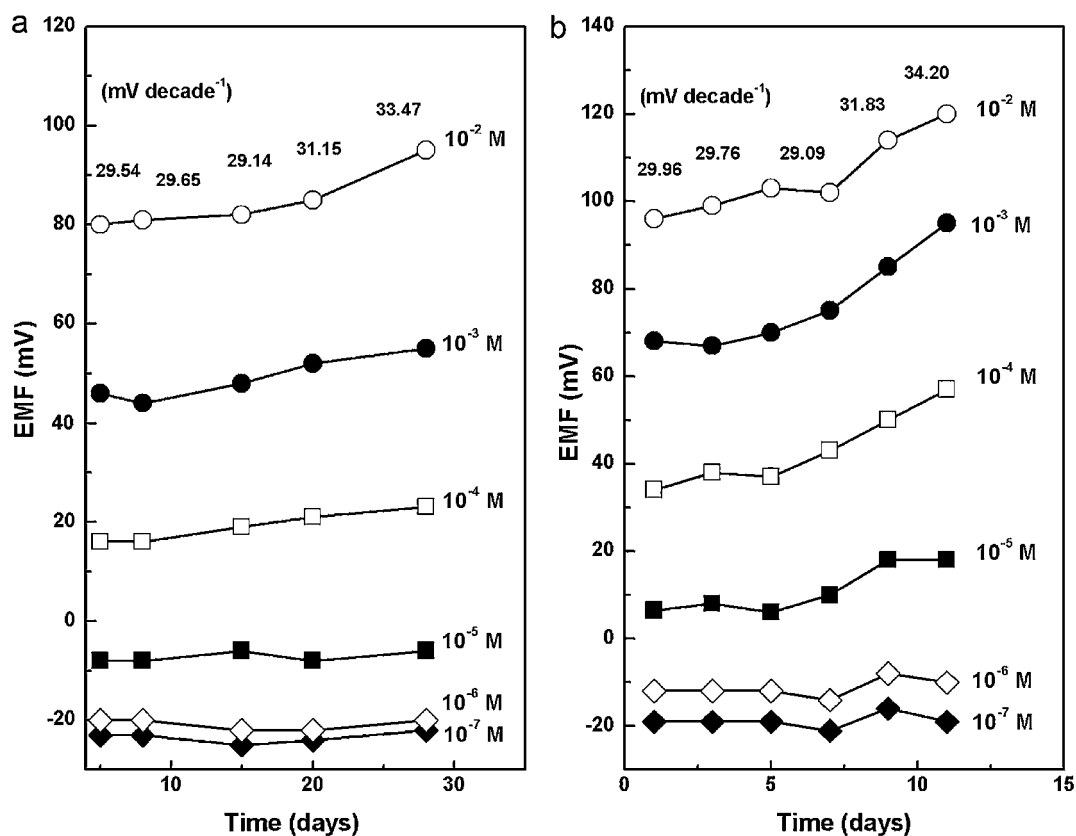


Fig. 7. Lifetime of the Cd-ISEs using ionophores III (a) and IV (b).

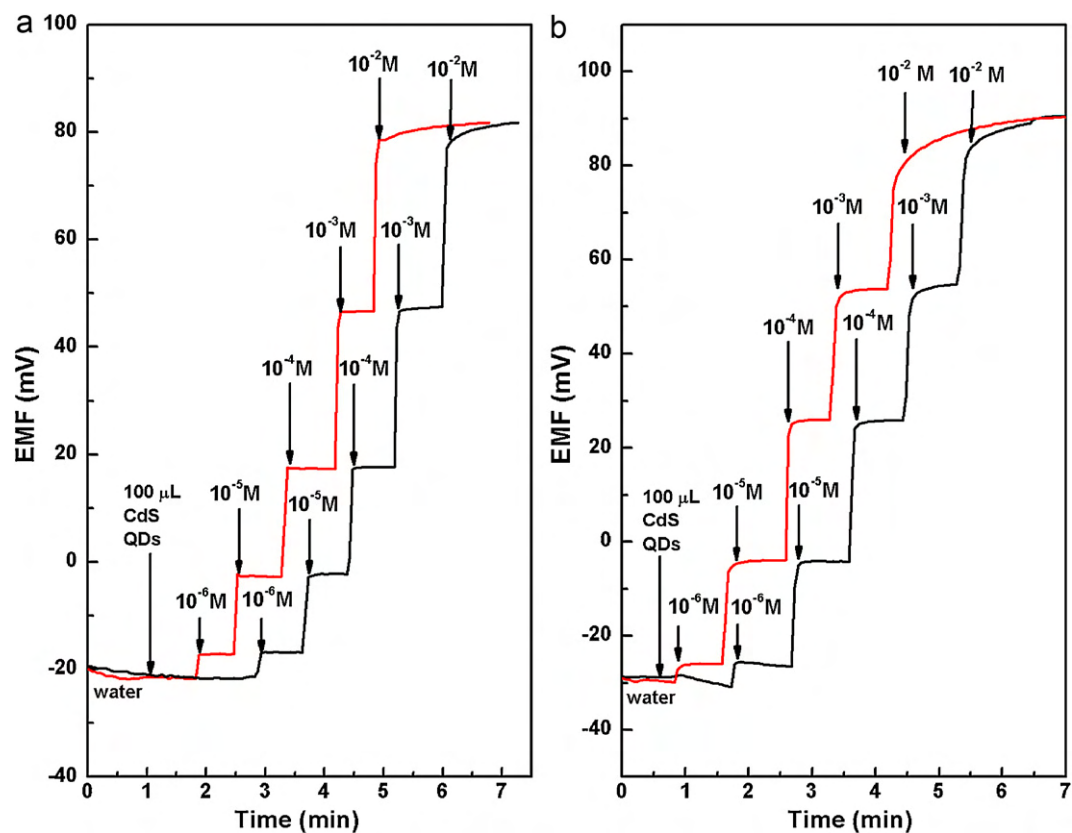


Fig. 8. Comparison of response of the Cd-ISEs using ionophores III (a) and IV (b) between without (black line) and in the presence of 100 μL of CdS QDs diluted with 10.00 mL of water (red line).

EMF signals were found to be restored at the same concentration of Cd^{2+} in every measuring cycle. Therefore, the electrode can be used to detect the Cd^{2+} concentration with excellent reversibility.

The duration of the useful period of the polymeric membrane electrode is always examined due to the membrane compositions may leach or decompose by contact with measuring or conditioned solutions. The experiments were evaluated by frequent calibration the same electrode until potential and slope values significantly diverse from the first time measurement. As shown in Fig. 7, the EMF responses showed no significant drift and slopes of the calibration graphs still approached the Nernstian value for 20 and 7 days for the membranes fabricated from ionophores **III** and **IV**, respectively. However, when storing time was longer than those values, it was found that at the higher concentration of Cd^{2+} , the potential increased more rapidly than expected by the Nernst's equation. This result may stem from the fact that the membrane has lost its preselectivity over the time.

3.8. Analytical applications

3.8.1. Determination of Cd^{2+} releasing from the oxidation of quantum dots

Recently, nanoparticles and quantum dots have been used extensively as marker in biosensors [60–65]. Our group fabricated polymeric membrane Ag-ISE from the synthesized ionophore based on calix[4]arene [66,67]. The fabricated electrode was successfully used for speciation analysis of silver species in silver nanoparticles. Later on, we demonstrated the use of the prepared Ag-ISE as a probe for monitoring Ag^+ from oxidized silver nanoparticles caused by H_2O_2 releasing from the reaction between glucose and glucose oxidase [68]. The detected EMF signal was corresponding to the amount of glucose presented in the solution. Using the same

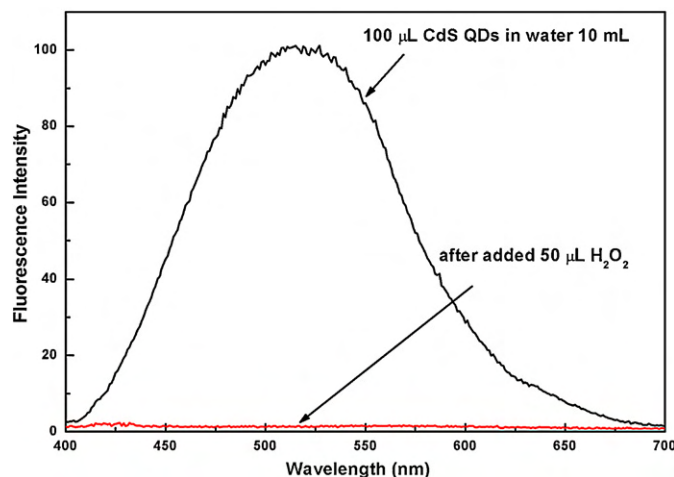


Fig. 9. Fluorescence spectrum of CdS QDs before and after adding 50 μL of 0.03% H_2O_2 .

analogy, the proposed Cd-ISE, therefore, was applied as Cd^{2+} probe for potentiometric monitoring of the Cd^{2+} releasing from CdS quantum dots (CdS QDs).

The determination of free Cd^{2+} in the quantum dots solution was first carried out by direct potentiometry. The calibration curves were constructed by the electrode fabricated from ionophores **III** and **IV**. Then, the same electrodes were immersed in the solution of CdS QDs which was adjusted to pH 6.5, and the EMF was recorded with respect to Ag/AgCl reference electrode. It was found that the EMF did not differ from the blank level (showed in Fig. 8). The result suggested that there were no significant free Cd^{2+} in the

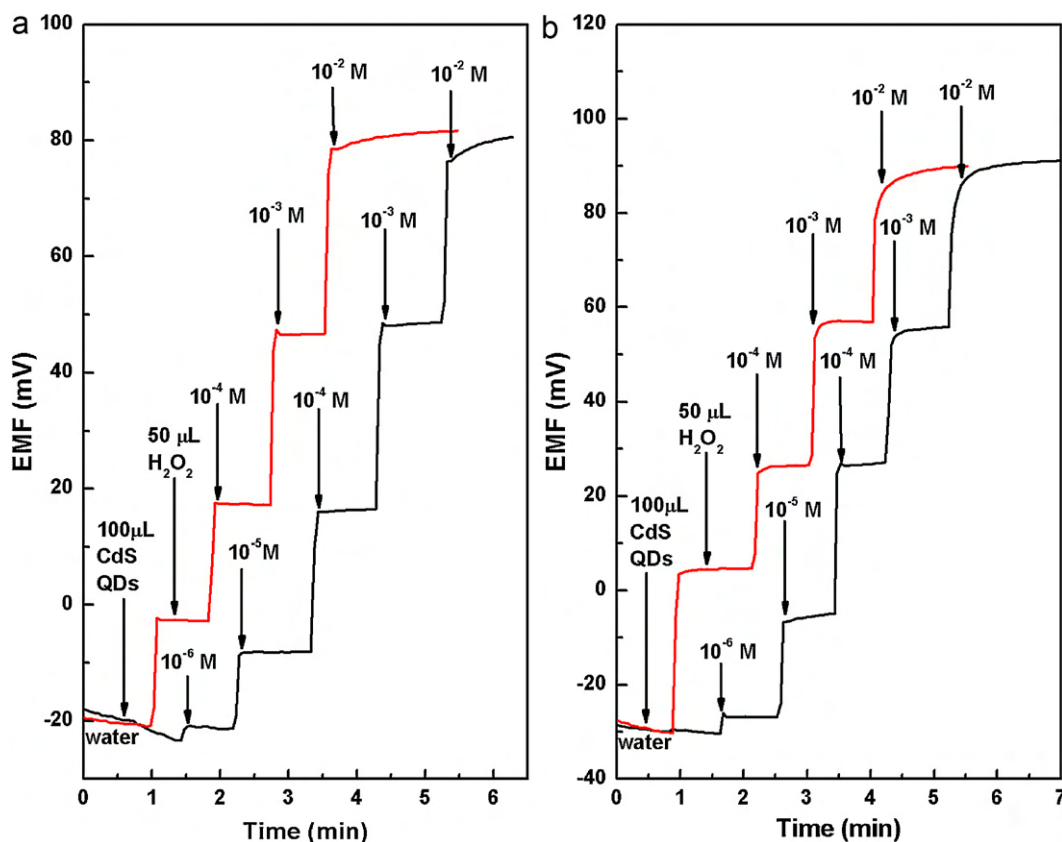


Fig. 10. Comparison of response of the Cd-ISEs using ionophores **III** (a) and **IV** (b) between the calibration curve (black line) and the system containing 100 μL of CdS QDs diluted with 10.00 mL of water following by adding 50 μL of 0.03% H_2O_2 solution (red line).

Table 3
Determination of Cd²⁺ in the real sample (*n* = 5) using the proposed electrodes.

Cd ²⁺ added	Cd-ISE (Ionophore III)			Cd-ISE (Ionophore IV)			Found by ICP-AES (mg L ⁻¹ ±SD)
	Cd ²⁺ found (mg L ⁻¹ ±SD)	%Recovery ±SD	%RSD	Cd ²⁺ found (mg L ⁻¹ ±SD)	%Recovery ±SD	%RSD	
–	n.d.	–	–	n.d.	–	–	n.d.
1.124 mg L ⁻¹ (1.0 × 10 ⁻⁵ M)	1.14 ± 0.02	102 ± 2	1.9	1.13 ± 0.05	98 ± 5	5.6	1.157 ± 0.013
3.372 mg L ⁻¹ (3.0 × 10 ⁻⁵ M)	3.35 ± 0.03	99 ± 1	0.8	3.30 ± 0.07	98 ± 2	2.2	3.463 ± 0.031

n.d. = not detectable.

quantum dots solution. This may stem from the synthesis of CdS QDs requiring high pH (pH ~10). Therefore, the excess free Cd²⁺ may form hydroxide complexes and precipitated from the solution. Moreover, the CdS QDs were purified by precipitation in ethanol to remove the impurities. This workup procedure differed from the preparation of silver nanoparticles that did not require the precipitation step. Therefore, free Ag⁺ was found in the solution of silver nanoparticles [66]. To test whether the matrix of quantum dots solution could possibly interfere the signal of the proposed Cd-ISEs, the standard solutions of Cd²⁺ were successively added into the solution contained CdS QDs to construct regular calibration curve and compared with the solution without quantum dots. The EMF signal obtained from both solutions showed insignificant difference as showed in Fig. 8. This confirmed that the matrix of quantum dots solution did not bias the measuring signals.

When the quantum dots were used as the marker in the sensing assay, it was always dissolved by an oxidizing agent such as H₂O₂. The concentration of Cd²⁺ would correspond to the analyte concentration. Therefore, to demonstrate the feasibility of the proposed ISE, the CdS QDs were oxidized by H₂O₂ to convert to the potentiometric detectable form, Cd²⁺. The amount of H₂O₂ was first optimized to avoid the excess H₂O₂ in the solution that will cause the membrane damage. The volume of 0.03% H₂O₂ was varied from 5 to 50 µL, and the reaction time was also studied in the range of

15–90 min. The reaction was monitored with a spectrofluorometer, the disappearance of the fluorescence intensity was assumed as the complete dissolution of the quantum dots solution. The results showed that 50 µL of 0.03% H₂O₂ and the reaction time of 60 min were the optimum condition as shown in Fig. 9. The solution pH after reaction completed was measured to make sure that it was in the working pH range of each electrode. The concentration of the oxidized CdS QDs was determined by direct potentiometry as showed in Fig. 10. It was found that after adding H₂O₂ the EMF increased due to the increasing of Cd²⁺ in the solution and the concentration of Cd²⁺ was in the linear working range of both electrodes. To check the biased signal that may occur from the matrix of oxidation reaction, the standard Cd²⁺ was added to compare the EMF value with the signal developed from only standard Cd²⁺. Both sensors showed that the EMF from both situations was not significantly different. This confirmed that the fabricated ISE could be used to determine the oxidized quantum dots without matrix interference.

3.8.2. Analytical merit of the Cd²⁺ releasing from the quantum dots assay

The concentration of the Cd²⁺ from the oxidation of CdS QDs solution was calculated by direct calibration method and found to be 2.02 ± 0.11 ppm and 1.83 ± 0.06 ppm for the electrodes

Table 4
Comparison of the potentiometric parameters of the proposed Cd-ISE with Cd-ISEs reported previously.

Ref.	Ionophore	Linear working range (M)	Life time	Slope (mV decade ⁻¹)	Working pH range	Possible interference	Response time (s)
[32]	Dibenzo-24-crown-8	3.9 × 10 ⁻⁵ –1.00 × 10 ⁻¹	5 months	30.0 ± 1.0	3.2–7.5	Na ⁺ , Ba ²⁺	25
[33]	Dicyclohexano-18-crown-6	2.1 × 10 ⁻⁵ –1.0 × 10 ⁻¹	6 months	29.0 ± 1.0	1.9–7.0	Na ⁺ , Pb ²⁺	17
[34]	Dicyclohexano-24-crown-8	3.0 × 10 ⁻⁵ –1.0 × 10 ⁻¹	5 months	30.0 ± 1.0	2.0–5.4	Na ⁺ , Ca ²⁺	23
[35]	Monoaza-18-crown-6	1.0 × 10 ⁻⁵ –1.0 × 10 ⁻¹	3 months	29	5.0–7.7	Ca ²⁺ , Cr ³⁺	<8
[36]	Benzo-15-crown-5	3.16 × 10 ⁻⁵ –1.00 × 10 ⁻¹	2 months	20	3.8–7.0	Cu ²⁺ , Hg ²⁺	<30
[37]	Tetrathia-12-crown-4	4.0 × 10 ⁻⁷ –1.0 × 10 ⁻¹	6 weeks	29.0 ± 1.0	2.5–8.5	Cu ²⁺ , Ag ⁺	<10
[38]	[1,1'-bicyclohexyl]-1,1', 2,2'-tetrol	1.0 × 10 ⁻⁵ –1.0 × 10 ⁻¹	2 months	27.8	4.0–7.0	Zn ²⁺	<15
[39]	<i>N,N'</i> -[bis(pyridin-2-yl)formylidene]butane-1, 4-diamine	7.9 × 10 ⁻⁸ –1.0 × 10 ⁻¹	2 months	30.0	2.0–8.0	NH ₄ ⁺	10
[40]	<i>o</i> -Phthalaldehyde based Schiff base	5.0 × 10 ⁻⁹ –1.0 × 10 ⁻¹	2.5 months	30.0 ± 0.2	2.0–8.5	–	11
[41]	4-Hydroxy salophen	1.0 × 10 ⁻⁶ –1.0 × 10 ⁻¹	8 weeks	30.1 ± 1.0	2.8–8.1	–	20
[42]	<i>N,N'</i> -(4-methyl-1,2-phenylene) diquinoline-2-carboxamide (Mebqb)	1.0 × 10 ⁻⁶ –1.0 × 10 ⁻¹	8 weeks	29.9 ± 0.5	4.0–9.0	Cu ²⁺	3–8
[43]	Thiacalix[4]arene	3.2 × 10 ⁻⁶ –1.0 × 10 ⁻¹	3 months	29.5	4.5–6.5	–	~8
This work	25,27-bis(Ethyl-2-(bis(2-pyridylmethyl)aminomethyl)aniline)-26,28-dihydroxy <i>p</i> -tert-butylcalix[4]arene (Ionophore IV)	1.6 × 10 ⁻⁶ –1.0 × 10 ⁻²	1 week	29.4 ± 0.6	6.0–9.0	Cu ²⁺	10

fabricated from ionophores **III** and **IV**, respectively. Moreover, to confirm the accuracy of our Cd-ISEs, the concentration of Cd²⁺ of the aforementioned solution was determined by the standard flame atomic absorption spectrometry (FAAS) and found to be 2.03 ± 0.03 ppm. The concentrations obtained from both proposed ISEs were insignificantly different from FAAS results at 95% confidence level.

3.8.3. Applicability of the proposed sensors to measure Cd²⁺ in the real treatment waste water sample

The proposed Cd-ISEs fabricated from ionophores **III** and **IV** were used to determine the cadmium concentration (strictly, the cadmium activity) in the treatment waste water sample and the results are summarized in Table 3. It can be seen that free cadmium ions in the sample was not detectable by both Cd-ISEs. However, after spiking at different 2 levels of standard Cd²⁺ (1.0×10^{-5} and 3.0×10^{-5} M, corresponding to 1.124 and 3.372 mg L⁻¹, respectively) into the water sample, the %recovery obtained by both electrodes ranging from 98 to 102% which confirmed the accuracy of the sensors. In the precision point of view, the %R.S.D. of 5 measurements were less than 1.9% and 5.6%, for Cd-ISEs fabricated from ionophores **III** and **IV**, respectively. These results showed that the proposed method provide good precisions. The same spiked Cd²⁺ level of the sample was determined using ICP-AES in parallel with our Cd-ISEs and found to be 1.157 ± 0.013 and 3.463 ± 0.031 mg L⁻¹, for lower and upper spiked concentration levels, respectively. Therefore, the cadmium content obtained from potentiometric measurements was in close agreement with those obtained by using the standard ICP-AES method. The results showed that the proposed electrode could be used to determine Cd²⁺ in real samples successfully.

3.9. Comparison to other reported Cd-ISEs

The comparison of characteristics of the proposed electrode with other cadmium-selective polymeric membrane electrodes using neutral carrier ionophores reported previously is summarized in Table 4. It can be seen that the electrode characteristics of our proposed Cd²⁺-ISE are comparable with other reported. The detection limit around a micromolar level is generally obtained from regular polymeric membrane ion-selective electrodes due to the outward Cd²⁺ flux to the surface of the membrane electrode. The response time was fast and comparable with others reported. However, in this work Cu²⁺ seems to be a serious poisonous ion that has not been reported by other researchers. The superior of this work can be accredited to the systematically synthesized ionophores that display the structure and selectivity relationship. Therefore, this work contains useful concepts that may be used to construct future potent polymeric membrane Cd²⁺ selective electrodes.

4. Conclusion

New four neutral carriers based on tripodal amine units were successfully incorporated to plasticized PVC membranes for detection of Cd²⁺. The membrane compositions such as type of plasticizer and ionic additive, percentage of ionic additive, were optimized to obtain the best characteristic Cd-ISE. The optimized membrane showed response to the change of the activity of Cd²⁺ with Nernstian's slope except the membrane fabricated from ionophore **I** which is not a calix[4]arene based ionophore. The membrane fabricated from ionophore **IV** showed the best selectivity toward Cd²⁺ rather than other interfering ions. Therefore, topology of the ionophores was found to play an important role in the characteristics of the fabricated membranes. Ionophores based on calixarene can provide better membrane characteristics than the ionophore

using an anthracene derivative. For ionophores containing calixarene derivatives, the presence of only one group of the tripodal amine receptor cannot provide good selectivity toward Cd²⁺. The suitable structure of ionophores needed more donor sites to accommodate Cd²⁺ as found in ionophores **III** and **IV**. The electrode fabricated from ionophores **III** and **IV** exhibited good ISE characteristics for the sensing of Cd²⁺ and can be employed in the pH range 5–8 and 6–9, respectively with very good reversibility. The electrode membranes life time after first conditioned were about 3 weeks and 1 week for electrodes from ionophores **III** and **IV**, respectively. The application of the proposed electrodes as the sensing probes for determination of Cd²⁺ from the oxidation of CdS QDs by H₂O₂ were successfully demonstrated with satisfied results comparable to those measured by FAAS. The proposed electrodes could be used potentially for fabrication of the biosensors assay that used QDs as the potentiometric marker. In addition, the proposed Cd-ISE could also be employed to determine free Cd²⁺ in the waste water sample and gave good accuracy and precision results as those obtained from the expensive ICP-AES.

Acknowledgements

This research was financially supported by the Thailand Research Fund (RTA5380003 and MRG5380064), the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission, through the Advanced Functional Materials Cluster of Khon Kaen University and the Center for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Commission on Higher Education, Ministry of Education. SW is a Ph.D. student under support of the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (PHD/0236/2552).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.aca.2011.08.005.

References

- [1] V.M. Fthenakis, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 8 (2004) 303–334.
- [2] G. Bertin, D. Averbek, *Biochimie* 88 (2006) 1549–1559.
- [3] P.V. Kamat, N.M. Dimitrijević, *J. Phys. Chem.* 93 (1989) 4259–4263.
- [4] B. Pejova, A. Tanuševski, I. Grozdanov, *J. Solid State Chem.* 172 (2003) 381–388.
- [5] M.J. Bowers II, J.R. McBride, S.J. Rosenthal, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 15378–15379.
- [6] H.J. Lee, J.-H. Yum, H.C. Leventis, S.M. Zakeeruddin, S.A. Haque, P. Chen, S.I. Seok, M. Grätzel, K. Md.Nazeeruddin, *J. Phys. Chem. C* 112 (2008) 11600–11608.
- [7] K. Robards, P. Worsfold, *Analyst* 116 (1991) 549–568.
- [8] E.M.M. Flores, J.N.G. Paniz, A.F. Martins, V.L. Dressler, E.I. Müller, A.B. Costa, *Spectrochim. Acta B* 57 (2002) 2187–2193.
- [9] S. Han-wen, Z. De-qiang, Y. Li-li, S. Jian-min, *Spectrochim. Acta B* 52 (1997) 727–734.
- [10] J.J. Ma, X. Du, J.W. Zhang, J.C. Li, L.Z. Wang, *Talanta* 80 (2009) 980–984.
- [11] M. Yaman, *Anal. Biochem.* 339 (2005) 1–8.
- [12] A.C. Davis, C.P. Calloway, B.T. Jones, *Microchem. J.* 84 (2006) 31–37.
- [13] S. Tao, T. Kumamaru, *Anal. Chim. Acta* 310 (1995) 369–375.
- [14] A.C. Davis, C.P. Calloway, B.T. Jones, *Talanta* 71 (2007) 1144–1149.
- [15] W.J. McShane, R.S. Pappas, V. Wilson-McElprang, D. Paschal, *Spectrochim. Acta B* 63 (2008) 638–644.
- [16] Y. Hong-Xia, L. Wei, L. Bing, W. Wei, Z. Hui-Juan, C. Deng-Yun, *Chin. J. Anal. Chem.* 37 (2009) 1511–1514.
- [17] C.D. Palmer, M.E. Lewis Jr., C.M. Geraghty, F. Barbosa Jr., P.J. Parsons, *Spectrochim. Acta B* 61 (2006) 980–990.
- [18] A. Manivannan, R. Kawasaki, D.A. Tryk, A. Fujishima, *Electrochim. Acta* 49 (2004) 3313–3318.
- [19] W. Zhang, Z. Liu, S. Zhu, J. Chen, G. Xu, *Electrochem. Commun.* 12 (2010) 1291–1293.
- [20] F.L. Coco, L. Ceccon, L. Ciraolo, V. Novelli, *Food Control* 14 (2003) 55–59.
- [21] C. Collado-Sánchez, J. Pérez-Peña, M.D. Gelado-Caballero, J.A. Herrera-Melian, J.J. Hernández-Brito, *Anal. Chim. Acta* 320 (1996) 19–30.
- [22] P.F. Zhang, H.W. Gao, Y. Li, *Talanta* 47 (1998) 355–359.
- [23] E.Y. Hashem, *Spectrochim. Acta A* 58 (2002) 1401–1410.
- [24] J.A.G. Neto, A.P. Oliveira, G.P.G. Freshi, C.S. Dakuzaku, M. Moraes, *Talanta* 53 (2000) 497–503.

- [25] T. Yamane, Y. Yamaguchi, *Anal. Chim. Acta* 345 (1997) 139–146.
- [26] S. Tanikkul, J. Jakmunee, S. Lapanantnoppakhun, M. Rayanakorn, P. Sooksamiti, R.E. Synovec, G.D. Christian, K. Grudpan, *Talanta* 64 (2004) 1241–1246.
- [27] A. Błażewicz, W. Dolliver, S. Sivsammie, A. Deol, R. Randhawa, G. Orlicz-Szczęśna, R. Błażewicz, *J. Chromatogr. B* 878 (2010) 34–38.
- [28] A.W. Al-Shawi, R. Dahl, *Anal. Chim. Acta* 391 (1999) 35–42.
- [29] V.K. Gupta, *Chimia* 59 (2005) 209–217.
- [30] A.K. Singh, V.K. Gupta, B. Gupta, *Anal. Chim. Acta* 585 (2007) 171–178.
- [31] E. Bakker, P. Buhlmann, E. Pretsch, *Chem. Rev.* 97 (1997) 3083–3132.
- [32] V.K. Gupta, P. Kumar, *Anal. Chim. Acta* 389 (1999) 205–212.
- [33] V.K. Gupta, S. Chandra, R. Mangla, *Electrochim. Acta* 47 (2002) 1579–1586.
- [34] V.K. Gupta, A.K. Jain, P. Kumar, *Electrochim. Acta* 52 (2006) 736–741.
- [35] V.K. Gupta, P. Kumar, R. Mangla, *Electroanalysis* 12 (2000) 752–756.
- [36] S.K. Srivastava, V.K. Gupta, S. Jain, *Electroanalysis* 8 (1996) 938–940.
- [37] M. Shamsipur, M.H. Mashhadizadeh, *Talanta* 53 (2001) 1065–1071.
- [38] M. Javanbakht, A. Shabani-Kia, M.R. Darvich, M.R. Ganjali, M. Shamsipur, *Anal. Chim. Acta* 408 (2000) 75–81.
- [39] V.K. Gupta, A.K. Singh, B. Gupta, *Anal. Chim. Acta* 583 (2007) 340–348.
- [40] V.K. Gupta, M. Al Khayat, A.K. Singha, M.K. Pal, *Anal. Chim. Acta* 634 (2009) 36–43.
- [41] A.A. Ensafi, S. Meghdadi, S. Sedighi, *Desalination* 242 (2009) 336–345.
- [42] B. Rezaei, S. Meghdadi, R.F. Zarandi, *J. Hazard. Mater.* 153 (2008) 179–186.
- [43] V.K. Gupta, A.K. Jain, R. Ludwig, G. Maheshwari, *Electrochim. Acta* 53 (2008) 2362–2368.
- [44] S.C. Burdette, C.J. Frederickson, W. Bu, S.J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 1778–1787.
- [45] E.M. Nolan, S.C. Burdette, J.H. Harvey, S.A. Hilderbrand, S.J. Lippard, *Inorg. Chem.* 43 (2004) 2624–2635.
- [46] N.N. Greenwood, A. Earnshaw, *Chemistry of the Elements*, Pergamon Press, New York, 1990, pp. 1411–1412.
- [47] L.C. Groenen, B.H.M. Ruël, A. Casnati, W. Verboom, A. Pochini, R. Ungaro, D.N. Reinhoudt, *Tetrahedron* 47 (1991) 8379–8384.
- [48] K. Navakun, T. Tuntulani, V. Ruangpornvisuti, *J. Inclusion Phenom.* 38 (2000) 113–122.
- [49] P.C. Meier, *Anal. Chim. Acta* 136 (1982) 363–368.
- [50] J. Chen, A. Zheng, Y. Gao, C. He, G. Wu, Y. Chen, X. Kai, C. Zhu, *Spectrochim. Acta A* 69 (2008) 1044–1052.
- [51] T. Noipa, S. Martwiset, N. Butwong, T. Tuntulani, W. Ngeontae, *J. Fluoresc.* (2011), doi:10.1007/s10895-011-0893-4.
- [52] P.L.H.M. Cobben, R.J.M. Egberink, J.G. Bomer, P. Bergveld, W. Verboom, D.N. Reinhoudt, *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 10573–10582.
- [53] R.J.W. Lugtenberg, R.J.M. Egberink, J.F.J. Engbersen, D.N. Reinhoudt, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* (1997) 1353–1358.
- [54] S. Watchasit, A. Kaowliw, C. Suksai, T. Tuntulani, W. Ngeontae, C. Pakawatchai, *Tetrahedron Lett.* 51 (2010) 3398–3402.
- [55] G.J. Moody, R.B. Oke, J.D.R. Thomas, *Analyst* 95 (1970) 910–918.
- [56] R. Prasad, V.K. Gupta, A. Kumar, *Anal. Chim. Acta* 508 (2004) 61–70.
- [57] Y. Mi, E. Bakker, *Anal. Chem.* 71 (1999) 5279–5287.
- [58] E. Bakker, M. Willer, M. Lerchi, K. Seiler, E. Pretsch, *Anal. Chem.* 66 (1994) 516–521.
- [59] Y. Qin, Y. Mi, E. Bakker, *Anal. Chim. Acta* 421 (2000) 207–220.
- [60] A. Numnuam, K.Y. Chumbimuni-Torres, Y. Xiang, R. Bash, P. Thavarungkul, P. Kanatharana, E. Pretsch, J. Wang, E. Bakker, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 410–411.
- [61] R. Thüner, T. Vigassy, M. Hirayama, J. Wang, E. Bakker, E. Pretsch, *Anal. Chem.* 79 (2007) 5107–5110.
- [62] K.Y. Chumbimuni-Torres, Z. Dai, N. Rubinova, Y. Xiang, E. Pretsch, J. Wang, E. Bakker, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 13676–13677.
- [63] A. Numnuam, K.Y. Chumbimuni-Torres, Y. Xiang, R. Bash, P. Thavarungkul, P. Kanatharana, E. Pretsch, J. Wang, E. Bakker, *Anal. Chem.* 80 (2008) 707–712.
- [64] E. Sharon, R. Freeman, I. Willner, *Anal. Chem.* 82 (2010) 7073–7077.
- [65] L. Shi, V.D. Paoli, N. Rosenzweig, Z. Rosenzweig, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 10378–10379.
- [66] W. Ngeontae, W. Janrungratsakul, N. Morakot, W. Aeungmaitrepirom, T. Tuntulani, *Sens. Actuat. B-Chem.* 134 (2008) 377–385.
- [67] N. Morakot, W. Ngeontae, W. Aeungmaitrepirom, T. Tuntulani, *Bull. Korean Chem. Soc.* 29 (2008) 221–224.
- [68] W. Ngeontae, W. Janrungratsakul, P. Maneewattanapinyo, S. Ekgasit, W. Aeungmaitrepirom, T. Tuntulani, *Sens. Actuat. B-Chem.* 137 (2009) 320–326.