



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการรีเชบเตอร์จากสเตอรอยด์ที่มีหมู่คาร์บาไซล
สำหรับใช้จับไอออนลบและกรดอะมิโน

โดย นางสาวอัญชลี สิริกุลขจร

กรกฎาคม 2559

สัญญาเลขที่ MRG5580242

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการรีเชมเตอร์จากสเตอรอยด์ที่มีหมู่คาร์บาโซลสำหรับ
ใช้จับไอออนลบและกรดอะมิโน

นางสาวอัญชลี สิริกุลขจร มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รีเซปเตอร์จากสเตรอยด์ที่มีการต่อหมู่ NH-คาร์บาโมซิลโฟนาไมด์ (**S1**) และที่มีหมู่คาร์บาโซล (**S2**) ที่ตำแหน่ง C7 และ C12 ถูกสังเคราะห์และนำมาใช้ศึกษาความสามารถในการจับกับเกสต์ชนิดต่างๆ คือ ไอออนลบ (F^- , Cl^- , Br^- , I^- , AcO^- , BzO^- , CN^- , $H_2PO_4^-$, HSO_4^- , ClO_4^- และ NO_3^-) กรดอะมิโน และนิวคลีโอไทด์ (ATP, GDP, GMP, CMP, ADP, UMP และ UDP) ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ และโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติเรโซแนนซ์ เทคนิคยูวี-วิสิเบิล และการคำนวณทางคอมพิวเตอร์ ผลการศึกษาพบว่า **S1** ด้วยเทคนิคโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติเรโซแนนซ์พบว่าไอออนลบเข้าไปเกิดพันธะไฮโดรเจนกับ **S1** ที่ตำแหน่ง NH-คาร์บาโมซิลโฟนาไมด์ ส่วนผลจากเทคนิคยูวี-วิสิเบิล และการคำนวณทางคอมพิวเตอร์พบการหลุดออกของโปรตอนที่มีหมู่ NH-คาร์บาโมซิลโฟนาไมด์เมื่อจับกับไอออนลบที่มีความเป็นเบสสูงได้แก่ CN^- , F^- , AcO^- , BzO^- และ $H_2PO_4^-$ อัตราส่วนการจับกันระหว่างรีเซปเตอร์กับไอออนลบพบว่าจับกันในอัตราส่วน 1:1 ผลการคำนวณค่าคงที่การจับกันระหว่างรีเซปเตอร์กับไอออนลบพบว่าไซยาไนด์จะให้ค่าสูงสุดที่ $\log K = 6.08$ ส่วนผลการศึกษาความสามารถในการจับไอออนลบของ **S2** พบว่า **S2** จับกับไอออนลบผ่านการเกิดพันธะไฮโดรเจนที่มีหมู่ NH-คาร์บาเมตโดยผลจาก F^- จะให้ค่า $\log K$ มากที่สุด แต่ผลการศึกษาการจับกับกรดอะมิโนพบว่าไม่มีความเลือกจำเพาะในการจับกับเกสต์ ส่วนผลการศึกษาเกี่ยวกับนิวคลีโอไทด์พบว่าตัวกลางที่ใช้ในการศึกษาที่ดีที่สุดคือระบบบัฟเฟอร์ Tris ใน DMSO โดย **S2** ให้ความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกับ GMP และ GDP ได้ดีที่สุด การจับกันระหว่าง **S2** กับนิวคลีโอไทด์จะเกิดผ่านการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ฟอสเฟตของนิวคลีโอไทด์กับหมู่คาร์บาเมตของรีเซปเตอร์ โดยเมื่อเกิดการจับกันจะทำให้เกิดการระงับการคายแสงของ **S2** ที่ความยาวคลื่น 303 nm โดยการลดลงของการคายแสงจะพบมากสุดในกรณีของ GMP และสามารถคำนวณหาค่าคงที่การจับกับ GMP ได้ค่า $\log K = 3.85$

คำสำคัญ: รีเซปเตอร์จากสเตรอยด์ ไอออนลบ กรดอะมิโน นิวคลีโอไทด์ การจับกันระหว่างโฮสต์-เกสต์

Abstract

Steroidal receptors possessing NH-carbamosulfonamide (**S1**) and carbazole (**S2**) at C7 and C12 positions were synthesized and investigated their binding abilities toward various anions (F^- , Cl^- , Br^- , I^- , AcO^- , BzO^- , CN^- , H_2PO_4^- , HSO_4^- , ClO_4^- and NO_3^-), amino acids and nucleotides (ATP, GDP, GMP, CMP, ADP, UMP and UDP) using fluorescence, UV-vis, ^1H -NMR and computational simulation techniques. Results from changes in the ^1H -NMR spectra of **S1** revealed the binding with anions occurring at the NH-carbamosulfonamide binding sites via hydrogen bonds formation. The studies from UV-vis and optimized structures of **S1**-halide anion complexes exhibited a possibility to deprotonation at one of the NH-carbamosulfonamide in the case of the binding with strong basic anions (F^-). Job plot analysis indicated the formation of 1:1 host-guest complexation. The highest binding constant was calculated from CN^- ($\log K = 6.08$). In the case of the binding ability of **S2** with anions, the forming of hydrogen bonds at NH-carbamate binding sites was observed. F^- anion showed the strongest binding with **S2** by showing the highest $\log K$ value. Unfortunately, no specific binding with amino acids was found. In addition, experimental results from the studies with nucleotides indicated that the optimum media is DMSO : Tris buffer solution and **S2** showed a selectivity for GMP and GDP. The binding between **S2** and nucleotide occurred via a hydrogen bonding interaction of nucleotide phosphate group with NH-carbamate binding unit. The complex formation caused a decreasing in emission intensity ($\lambda_{\text{max}} = 303 \text{ nm}$) of **S2**. The highest quenching in fluorescence intensity was observed in the case of GMP. The binding constant in term $\log K$ which equal to 3.85 was calculated.

Keyword: Steroid receptor, Anions, Amino acids, Nucleotide, Host-guest binding

บทสรุปผู้บริหาร

Project Code : MRG5580242
Project Title : รีเซปเตอร์จากสเตอรอยด์ที่มีหมู่คาร์บาโซลสำหรับใช้จับไอออนลบและกรดอะมิโน
Steroidal-Based Carbazole Receptors for Anions and Amino Acids Recognition
Investigator : นางสาวอัญชลี สิริกุลขจร มหาวิทยาลัยนเรศวร
E-mail Address : anchaleesi@nu.ac.th
Project Period : 2 กรกฎาคม 2555 ถึง 1 กรกฎาคม 2557

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการนำรีเซปเตอร์จากสเตอรอยด์ในกลุ่มคอลิกเอซิดมาใช้ในการจับกับเกสต์กลุ่มต่างๆ เช่น ไอออนลบ กรดอะมิโน และนิวคลีโอไทด์ การออกแบบรีเซปเตอร์จะทำการต่อหมู่ฟังก์ชันจำนวนสองหมู่เข้าไปที่ตำแหน่ง C7 และ C12 บนโมเลกุลคอลิกเอซิดเพื่อใช้เป็นตำแหน่งที่จับกับเกสต์ผ่านการเกิดพันธะไฮโดรเจน รีเซปเตอร์ในงานวิจัยนี้มี 2 ชนิดคือ **S1** และ **S2** โดยการทำวิจัยมุ่งหวังให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับลักษณะการจับกันระหว่างรีเซปเตอร์กับเกสต์ และหาความจำเพาะเจาะจงในการจับกับเกสต์ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาออกแบบรีเซปเตอร์จากคอลิกเอซิดให้มีประสิทธิภาพที่ดียิ่งขึ้นต่อไป

วิธีการทดลองเริ่มต้นจากการสังเคราะห์รีเซปเตอร์ให้ได้ตามที่ออกแบบไว้ เมื่อทำการพิสูจน์โครงสร้างจนแน่ใจแล้วจะนำรีเซปเตอร์มาศึกษาความสามารถในการจับกับเกสต์ด้วยเทคนิคต่างๆ ดังนี้

1. เทคนิค $^1\text{H-NMR}$ เพื่อดูอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นในระหว่างที่รีเซปเตอร์จับกับเกสต์ และหาอัตราส่วนการจับกันระหว่างรีเซปเตอร์กับเกสต์
2. เทคนิคยูวี-วิสิเบิล และฟลูออเรสเซนซ์ เพื่อเป็นข้อมูลยืนยันการเกิดการจับกันระหว่างรีเซปเตอร์กับเกสต์ และใช้ข้อมูลมาคำนวณค่า binding constant เพื่อเปรียบเทียบว่ารีเซปเตอร์จับกับเกสต์ได้ดีที่สุด
3. การหาโครงสร้างด้วยการคำนวณทางคอมพิวเตอร์ เพื่อคำนวณหาโครงสร้าง และใช้เป็นข้อมูลเสริมในการอธิบายผลที่ได้จากการทดลองที่เกี่ยวกับการเกิดอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างรีเซปเตอร์กับเกสต์

โดยในการทดลองนั้นรีเซปเตอร์ **S1** จะศึกษาการจับกับไอออนลบเพียงอย่างเดียว ส่วนรีเซปเตอร์ **S2** จะศึกษากับทั้งไอออนลบ กรดอะมิโน และนิวคลีโอไทด์

ผลการทดลองพบว่ารีเซปเตอร์ **S1** จะจับกับไอออนลบผ่านการเกิดพันธะไฮโดรเจน โดยในกลุ่มไอออนลบที่มีความเป็นเบสสูงเช่น ฟลูออไรด์ ไฮยาไนด์ อะซิเตด เบนโซเอต และไดไฮโดรเจน ฟอสเฟตจะพบการหลุดโปรตอนของหมู่จับบนโมเลกุล **S1** ไอออนลบที่จับกับ **S1** ได้ค่า binding constant สูงสุดคือ ฟลูออไรด์ ส่วนผลการทดลองกับรีเซปเตอร์ **S2** พบว่าการจับกับไอออนลบจะเกิดผ่านพันธะไฮโดรเจน โดยฟลูออไรด์จะจับกับ **S2** ได้ดีที่สุด ส่วนผลจากการศึกษากับกรดอะมิโนพบว่า **S2** จับกับกรดอะมิโนไม่ดีนัก และไม่ให้ความจำเพาะเจาะจงในการจับ ในส่วนสุดท้ายการศึกษาการจับกับนิวคลีโอไทด์พบว่า **S2** จะจับกับนิวคลีโอไทด์ผ่านการเกิดพันธะไฮโดรเจน โดยเมื่อเกิดการจับจะทำให้การคายแสงของ **S2** ลดลง นิวคลีโอไทด์ที่ทำให้เกิดการลดลงของความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์มากที่สุดคือ GMP

ผลที่ได้จากการทำวิจัยนี้ได้มีการนำไปเสนอในที่ประชุมวิชาการระดับชาติ 2 แห่ง และอยู่ในระหว่างการพิจารณาการลงตีพิมพ์ลงวารสาร 1 เรื่อง รายละเอียดดังนี้

1. วทท.ครั้งที่ 40 จ.ขอนแก่น วันที่ 2-4 ธันวาคม พ.ศ. 2557 เป็นการนำเสนอผลงานแบบ oral presentation ซึ่งนำผลการทดลองการจับกับไอออนลบของรีเซปเตอร์ **S1** และ **S2** ไปนำเสนอ
2. symposium “The 3rd Advanced Materials for ASEAN Network Symposium” ในที่ประชุมวิชาการ นเรศวรวิจัยครั้งที่ 12 จ.พิษณุโลก วันที่ 22 กรกฎาคม พ.ศ. 2559 เป็นการนำเสนอผลงานแบบ poster presentation ซึ่งนำผลการทดลองการจับนิวคลีโอไทด์ของรีเซปเตอร์ **S2** ไปนำเสนอ
3. ผลงานวิจัยที่กำลังอยู่ในระหว่างพิจารณาการลงตีพิมพ์ในวารสารวิทยาศาสตร์ มข. จำนวน 1 เรื่อง ซึ่งเป็นผลงานวิจัยที่เกี่ยวกับรีเซปเตอร์ **S1**

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคตที่เกี่ยวข้องกับรีเซปเตอร์จากคอลิกเอซิดประเด็นสำคัญอยู่ที่การออกแบบโมเลกุลให้มีหมู่จับกับเกสต์ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น ในงานวิจัยนี้เลือกใช้หมู่ NH-คาร์บาเมตเป็นหมู่จับกับเกสต์ซึ่งจัดว่าเป็นหมู่ฟังก์ชันที่เกิดพันธะไฮโดรเจนกับเกสต์ได้จำนวน 1 พันธะต่อหนึ่งหมู่ แต่ถ้าเปลี่ยนมาเป็นหมู่ยูเรีย หรือไทโอยูเรียจะทำให้ได้หมู่ฟังก์ชันที่เกิดพันธะไฮโดรเจนกับเกสต์ได้ 2 พันธะต่อหนึ่งหมู่จะช่วยทำให้จับกับเกสต์ได้แข็งแรงมากขึ้น แต่จะทำให้ขั้นตอนการสังเคราะห์ยุ่งยากมากขึ้น นอกจากนี้อาจเลือกใช้หน่วยให้สัญญาณทางแสงที่สามารถให้สัญญาณได้ดีขึ้นโดยเปลี่ยนจากหมู่คาร์บาโซลเป็นหมู่ฟลูออรีนซึ่งให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ได้ดีกว่าคาร์บาโซล

Output ที่ได้จากโครงการ

ผลที่ได้จากการทำวิจัยนี้ได้มีการนำไปเสนอในที่ประชุมวิชาการระดับชาติ 2 แห่ง และอยู่ในระหว่างการพิจารณาการลงตีพิมพ์ลงวารสาร 1 เรื่อง รายละเอียดดังนี้

1. วทท.ครั้งที่ 40 จ.ขอนแก่น วันที่ 2-4 ธันวาคม พ.ศ. 2557 เป็นการนำเสนอผลงานแบบ oral presentation ซึ่งนำผลการทดลองการจับกับไอออนลบของรีเซปเตอร์ **S1** และ **S2** ไปนำเสนอ
2. Symposium “The 3rd Advanced Materials for ASEAN Network Symposium” ในที่ประชุมวิชาการ นเรศวรวิจัยครั้งที่ 12 จ.พิษณุโลก วันที่ 22 กรกฎาคม พ.ศ. 2559 เป็นการนำเสนอผลงานแบบ poster presentation ซึ่งนำผลการทดลองการจับนิวคลีโอไทด์ของรีเซปเตอร์ **S2** ไปนำเสนอ
3. ผลงานวิจัยที่กำลังอยู่ในระหว่างการพิจารณาการลงตีพิมพ์ในวารสารวิทยาศาสตร์ มข. จำนวน 1 เรื่อง ซึ่งเป็นผลงานวิจัยที่เกี่ยวกับรีเซปเตอร์ **S1**

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาแนวทางในการสังเคราะห์โมเลกุลรีเซปเตอร์จากคอลิกเอซิดและคาร์บาโซล
2. เพื่อศึกษาความจำเพาะของโมเลกุลรีเซปเตอร์ในการจับกับไอออนลบ กรดอะมิโน และนิวคลีโอไทด์ ด้วยเทคนิค ^1H NMR, ยูวี – วิสเปิล และฟลูออเรสเซนซ์

ขอบเขตของงานวิจัย

เพื่อให้งานวิจัยสำเร็จไปตามวัตถุประสงค์ทางผู้วิจัยได้กำหนดขอบเขตของงานวิจัยไว้ดังต่อไปนี้

1. การสังเคราะห์โมเลกุลรีเซปเตอร์เป้าหมายจากคอลิกเอซิด และคาร์บาโซลที่มีหน่วยจับกับเกสต์ ผ่านการเกิดพันธะไฮโดรเจน
2. ศึกษาความสามารถของรีเซปเตอร์เป้าหมายในการจับกับไอออนลบ กรดอะมิโน และนิวคลีโอไทด์ ด้วยเทคนิคสเปกโตรสโกปีคือ ^1H NMR, ยูวี – วิสเปิล และฟลูออเรสเซนซ์
3. ศึกษาโครงสร้าง การเกิดอันตรกิริยาระหว่างรีเซปเตอร์กับเกสต์ชนิดต่างๆ ด้วยการจำลองโมเลกุลทางคอมพิวเตอร์

เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เคมีซูปราโมเลกุล

เคมีซูปราโมเลกุล (Supramolecular chemistry) เป็นองค์ความรู้หนึ่งที่สนใจอันตรกิริยาแบบนอนโควาเลนต์ (Non – covalent) ระหว่างโมเลกุลโฮสต์ (Host) กับโมเลกุลเกสต์ (Guest) โดยเป็นการศึกษาเพื่อให้เกิดความเข้าใจพฤติกรรมที่โมเลกุลต่างๆ มีต่อกัน ตัวอย่างของอันตรกิริยาแบบนอนโควาเลนต์ได้แก่ พันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bonding) แรงดึงดูดทางไฟฟ้า (Electrostatic interaction) อันตรกิริยาแคทไอออน – ไพ (Cation - π interaction) และอันตรกิริยาไพ-ไพ (π - π Interaction) เป็นต้น (Beer *et al*, 2001) งานวิจัยทางด้านเคมีซูปราโมเลกุลจะต้องอาศัยความรู้ความชำนาญของผู้วิจัยในหลายๆ ด้าน เช่น ด้านการสังเคราะห์รีเซปเตอร์ต้องอาศัยความรู้ทางด้านเคมีอินทรีย์ การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างรีเซปเตอร์กับเกสต์ชนิดต่างๆ ต้องอาศัยความรู้ทางด้านเคมีอนินทรีย์ เป็นต้น โดยทั่วไปแล้วงานวิจัยด้านเคมีซูปราโมเลกุลจัดเป็นงานวิจัยประเภทสหสาขาวิชา (Interdisciplinary research) ดังนั้นต้องอาศัยความร่วมมือดังต่อไปนี้

1. การออกแบบและการจำลองแบบ (Molecular modeling) การวิจัยด้านนี้จำเป็นต้องออกแบบโครงสร้างของโมเลกุลโฮสต์ให้มีรูปร่าง และลักษณะเหมาะสมกับโมเลกุลเกสต์ที่สนใจ วิธีที่นิยมใช้กันในปัจจุบันคือ การสร้างแบบจำลองโดยใช้เทคนิคทางเคมีควอนตัมและคอมพิวเตอร์เข้ามาช่วย งานในลักษณะเช่นนี้ต้องการบุคลากรที่มีความชำนาญทางด้านเคมีคำนวณทางคอมพิวเตอร์มาร่วมงานด้วย

2. การสังเคราะห์และการพิสูจน์ทราบ (Synthesis and characterization) เมื่อได้โครงสร้างของโฮสต์ที่เหมาะสมจากการคำนวณทางเคมีควอนตัมแล้ว การสังเคราะห์เพื่อให้ได้โฮสต์ที่มีโครงสร้างและลักษณะเป็นดังที่คำนวณไว้ต้องอาศัยพื้นฐานความรู้ทางด้านเคมีอินทรีย์สังเคราะห์

3. การศึกษาอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลและปฏิกิริยาเชิงซูพราโมเลกุลแบบอื่นๆ ต้องอาศัยความรู้ทางด้านเคมีอินทรีย์เข้ามาช่วย นอกจากนี้ต้องอาศัยผู้ที่มีความเชี่ยวชาญเทคนิคการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ต่างๆ เช่น NMR ยูวี-วิสิเบิล mass spectrometer และอื่น ๆ

4. การสร้างเครื่องมือระดับโมเลกุล ขั้นตอนนี้ถือเป็นขั้นตอนที่สำคัญและจะต้องมีการร่วมมือร่วมใจจากผู้ชำนาญการในแต่ละด้าน เป็นต้นว่าต้องทำการออกแบบศึกษาสมบัติของโมเลกุลที่สังเคราะห์ขึ้น และในที่สุดนำไปประยุกต์ใช้งานจริง ดังนั้นจะเห็นได้ว่างานวิจัยทางด้านเคมีซูพราโมเลกุลเป็นงานวิจัยแบบสหสาขาวิชาโดยธรรมชาติ และยังสามารถนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้จริงทั้งทางด้านการแพทย์และทางด้านสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังเป็นความรู้พื้นฐานที่สำคัญสำหรับการเป็นเทคโนโลยีแห่งอนาคตคือ นานาเทคโนโลยี

โมเลกุลโฮสต์ – เกสต์

การออกแบบโมเลกุลโฮสต์หรือรีเซปเตอร์ ให้สามารถเลือกจับกับโมเลกุลเกสต์อย่างจำเพาะเจาะจง ถือว่าเป็นงานยาก เนื่องจากต้องออกแบบให้บริเวณหมู่จับนั้นมีโครงสร้างที่เหมาะสมต่อการจับกับเกสต์โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าโมเลกุลเกสต์เป็นสารอินทรีย์ซึ่งมีโครงสร้างซับซ้อนและเป็นสามมิติ จะทำให้การจับกันระหว่างรีเซปเตอร์กับเกสต์มีความยุ่งยากมากขึ้น ดังนั้นการออกแบบโมเลกุลรีเซปเตอร์จึงต้องคำนึงถึงชนิดของเกสต์ รูปร่างของเกสต์และอันตรกิริยาที่ใช้ในการจับกันระหว่างโมเลกุล ในปัจจุบันเคมีซูพราโมเลกุลได้รับความสนใจเป็นอย่างมากเพราะเป็นการนำความรู้ที่ได้ศึกษามานำไปพัฒนาและประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวางในด้านต่างๆ เช่น การพัฒนายารักษาโรค การพัฒนาตัวเร่งปฏิกิริยา และยังมีการพัฒนาเป็นเซนเซอร์ทางเคมีได้อีกด้วย (Beer *et al*, 1999) โมเลกุลรีเซปเตอร์หรือโฮสต์นั้น จะประกอบไปด้วยส่วนที่สำคัญ 2 ส่วน คือ ส่วนที่ทำหน้าที่เป็นหมู่จับ (Binding unit) เพื่อใช้ในการเลือกจับกับโมเลกุลของเกสต์ที่สนใจ และอีกส่วนหนึ่งคือส่วนที่ทำหน้าที่เป็นตัวให้สัญญาณ (Sensory unit) ซึ่งจะเกิดการเปลี่ยนแปลงสัญญาณที่แตกต่างกันไปเช่น การให้สัญญาณทางเคมีไฟฟ้า หรือการให้สัญญาณของแสง เมื่อโมเลกุลของเกสต์มาจับกับโมเลกุลของโฮสต์ที่ตำแหน่งหมู่จับ (Mahapatra *et al*, 2010) จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณประเภทต่างๆ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณดังกล่าวสามารถวัดได้โดยใช้เทคนิคทางเคมีเช่น เทคนิคทางเคมีไฟฟ้า และเทคนิคทางสเปกโตรโฟโตเมตรี เป็นต้น

การศึกษาการจับไอออนลบ (Anion recognition)

การออกแบบรีเซปเตอร์สำหรับไอออนลบเป็นงานที่ทำหาย เนื่องจากไอออนลบมีขนาดใหญ่กว่าไอออนบวกที่มีจำนวนอิเล็กตรอนเท่ากัน ข้อมูลเปรียบเทียบขนาดของไอออน ดังตาราง 1

ตาราง 1 การเปรียบเทียบรัศมีอะตอมระหว่างไอออนบวกกับไอออนลบ (Beer *et al*, 2001)

ไอออนบวก	รัศมี (อังสตรอม)	ไอออนลบ	รัศมี (อังสตรอม)
Na^+	1.16	F^-	1.19
K^+	1.52	Cl^-	1.67
Rb^+	1.66	Br^-	1.82
Cs^+	1.81	I^-	2.06

ด้วยเหตุผลหลายอย่างจึงทำให้การออกแบบรีเซปเตอร์สำหรับจับกับไอออนลบได้อย่างจำเพาะเจาะจงเป็นเรื่องที่มีความซับซ้อนมากกว่าการจับไอออนบวก ดังนี้

1. ขนาดประจุต่อรัศมีของไอออนลบมีค่าต่ำทำให้การจับไอออนลบโดยอาศัยแรงระหว่างประจุ (Electrostatic interaction) ให้ผลไม่ดีนัก
2. ไอออนลบว่องไวต่อการเปลี่ยนค่า pH นั่นคือไอออนลบจะสามารถถูกโปรตอนเนต (Protonate) ได้ที่ค่า pH ต่ำ
3. ไอออนลบมีรูปร่างหลากหลาย แสดงดังภาพ 1

Spherical shape		$\text{F}^-, \text{Cl}^-, \text{Br}^-, \text{I}^-$
Linear shape		$\text{N}_3^-, \text{CN}^-, \text{SCN}^-, \text{OH}^-$
Trigonal planar and Y shape		$\text{CO}_3^{2-}, \text{NO}_3^-, \text{COO}^-$
Tetrahedral shape		$\text{PO}_4^{3-}, \text{SO}_4^{2-}, \text{MnO}_4^-$
Octahedral shape		$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$

ภาพ 1 รูปร่างโมเลกุลของไอออนลบ (Beer *et al*, 2001)

นอกจากนี้พบว่า ตัวทำละลายก็มีผลต่อความสามารถในการจับไอออนลบ อันตรกิริยาหลักระหว่างรีเซปเตอร์กับไอออนลบคือ แรงระหว่างประจุ (Electrostatic force) ซึ่งพบว่าอันตรกิริยานี้จะสามารถถูกแข่งขันกับการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างไอออนลบกับตัวทำละลายที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxylic solvents) เช่น เมทานอล น้ำ ดังนั้นรีเซปเตอร์จะจับกับไอออนลบได้ดีแค่ไหนก็ขึ้นอยู่กับความสามารถในการแข่งขันกับตัวทำละลาย

การออกแบบรีเซปเตอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับไอออนลบนั้น นอกจากการคำนึงถึงรูปร่างของไอออนลบ ความเป็นเบส (Basicity) และชนิดของตัวทำละลายที่ใช้แล้ว อันตรกิริยาแบบ Non-covalent ระหว่างรีเซปเตอร์กับไอออนลบถือว่าเป็นเรื่องที่สำคัญที่ต้องพิจารณา ตัวอย่างของ

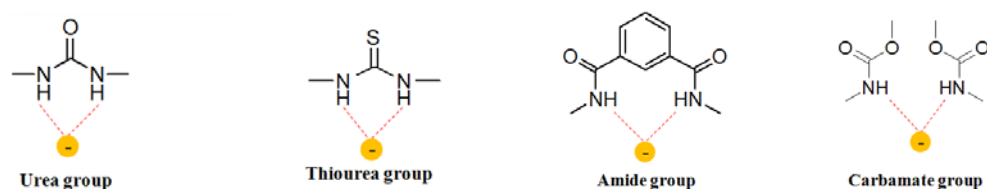
อันตรกิริยาเหล่านี้ได้แก่ แรงระหว่างประจุ และพันธะไฮโดรเจน ซึ่งพันธะไฮโดรเจนเป็นอันตรกิริยาระหว่างรีเซบเตอร์กับไอออนลบที่นิยมใช้กันมากเนื่องจากเป็นอันตรกิริยาที่ค่อนข้างแข็งแรง และมีทิศทางที่แน่นอน (Steed and Atwood, 2002)

ตาราง 2 ค่า pK_a และค่า pK_b ของคูกรด-คู่เบส

Acid	pK_a	Base	pK_b
HClO_4	~ -7	ClO_4^-	~ 21
HCl	~ -3	Cl^-	~ 17
H_2SO_4	~ -3	HSO_4^-	~ 17
HNO_3	-1	NO_3^-	15
H_3O^+	0	H_2O	14
H_2SO_3	1.8	HSO_3^-	12.2
HSO_4^-	1.9	SO_4^{2-}	12.1
H_3PO_4	2.12	H_2PO_4^-	11.88
$[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$	2.10	$[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_5\text{OH}]^{3+}$	11.90
HF	3.2	F^-	10.8
CH_3COOH	4.7	CH_3COO^-	9.3
$[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$	4.9	$[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_5\text{OH}]^{2+}$	9.1
H_2CO_3	6.3	HCO_3^-	7.7
H_2S	7.04	HS^-	6.96
H_2PO_4^-	7.2	$\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$	6.8
HSO_3^-	7.21	SO_3^{2-}	6.79
HOCl	8.0	OCl^-	6.0
HCN	9.2	CN^-	4.8
H_3BO_4	9.30	$\text{B}(\text{OH})_4^-$	4.70
NH_4^+	9.25	NH_3	4.75
$\text{Si}(\text{OH})_4$	9.50	$\text{SiO}(\text{OH})_3^-$	4.50
HCO_3^-	10.33	CO_3^{2-}	3.67
HPO_4^{2-}	12.32	PO_4^{3-}	1.67
$\text{SiO}(\text{OH})_3^-$	12.6	$\text{SiO}_2(\text{OH})_2^{2-}$	1.4
H_2O	14	OH^-	0
HS^-	~ 19	S^{2-}	~ 5
NH_3	~ 23	NH_2^-	~ 9
OH^-	~ 24	O^{2-}	~ 10

(http://www.chem.wisc.edu/areas/reich/pkatable/pKa_compilation-1-Williams.pdf)

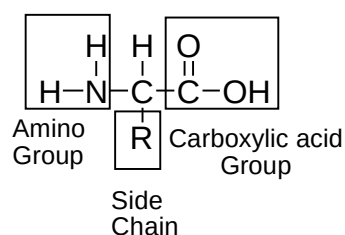
สำหรับงานวิจัยนี้สนใจการเกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจน หมู่ฟังก์ชันภายในโมเลกุลรีเซพเตอร์ที่สามารถจับกับไอออนลบผ่านการเกิดพันธะไฮโดรเจนมีหลายชนิด อันตรกิริยาแต่ละชนิดจะเลือกใช้หมู่ฟังก์ชันที่มีความแตกต่างกันไป ตัวอย่างเช่น อันตรกิริยาชนิดแรงระหว่างประจุจะต้องใช้หมู่จับที่มีประจุบวกอยู่ในโครงสร้าง เช่น ใช้ไอออนบวกของโลหะหรือหมู่ Guanidinium ส่วนหมู่ฟังก์ชันที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับไอออนลบ ได้แก่ หมู่อูเรีย หมู่อิธูเรีย หมู่อไมด์ และหมู่คาร์บาเมต เป็นต้น (Jurczak *et al*, 2004) หมู่ฟังก์ชันเหล่านี้เป็นหมู่ฟังก์ชันที่เป็นกลางที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจน (Neutral H – bond donor) แสดงภาพ 2



ภาพ 2 การเกิดพันธะไฮโดรเจนของหมู่ฟังก์ชันต่างๆ กับไอออนลบรูปร่างทรงกลม

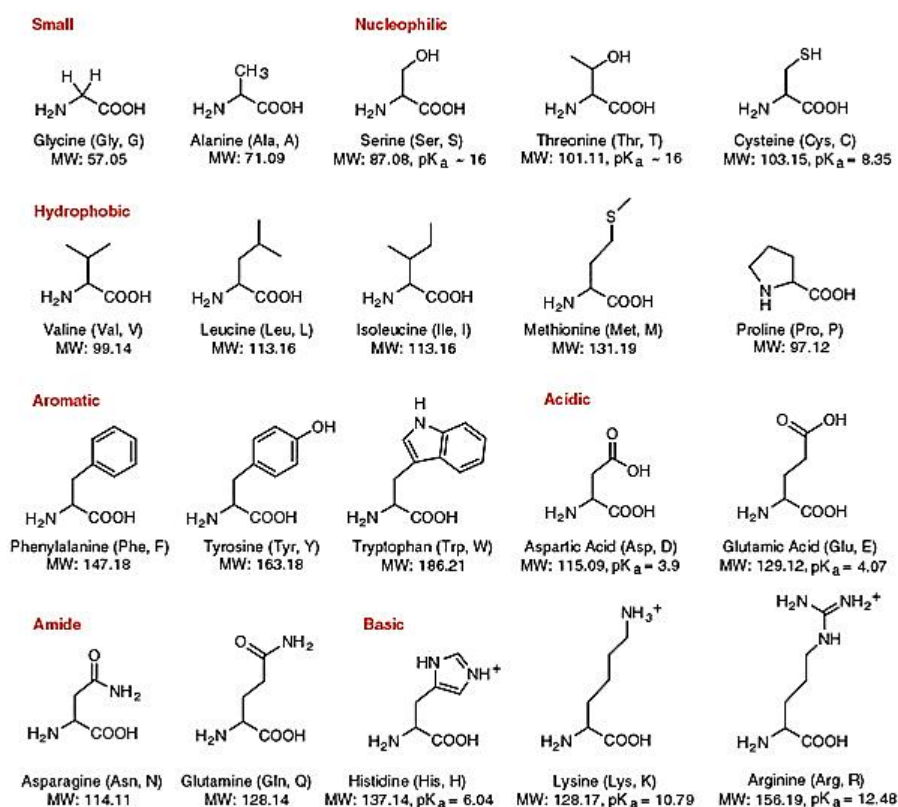
การศึกษาการจับกรดอะมิโน (Amino acid recognition)

กรดอะมิโนเป็นหน่วยที่เล็กที่สุดที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีน กรดอะมิโนที่พบบ่อยมากในสิ่งมีชีวิตมีอยู่ประมาณ 20 ชนิด ส่วนประกอบหลักของกรดอะมิโนแต่ละชนิดประกอบด้วยหมู่อะมิโน ($-NH_2$) กับหมู่คาร์บอกซิล ($-COOH$) และหมู่ R ดังนั้นกรดอะมิโนมีสูตรทั่วไปแสดงดังภาพ 3



ภาพ 3 โครงสร้างพื้นฐานของกรดอะมิโน (OpenStax College, 2013)

หมู่ R อาจเป็นไฮโดรเจน ไฮโดรคาร์บอน หรือโมเลกุลอื่น ดังแสดงในภาพที่ 4 กรดอะมิโนที่พบในโปรตีนจะต่างกันที่หมู่ R (หรือ Side chain) ดังนั้นกรดอะมิโนทั้ง 20 ชนิดอาจแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ตามลักษณะของหมู่ R คือกรดอะมิโนที่หมู่ R ไม่มีขั้ว และกรดอะมิโนที่หมู่ R มีขั้ว



ภาพ 4 ชนิดของกรดอะมิโน 20 ชนิด

(<https://www.neb.com/~media/NebUs/Page%20Images/Tools%20and%20Resources/Usage%20Guidelines/aminoAcids.jpg>)

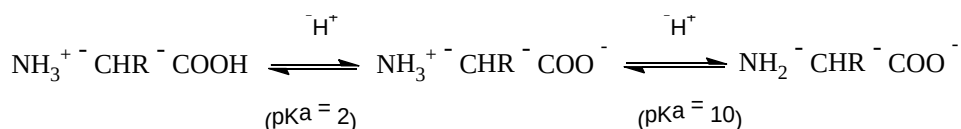
กรดอะมิโน 20 ชนิด ถ้าพิจารณาในแง่ของความจำเป็นต่อร่างกายของคน หรือสัตว์ชั้นสูง สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทคือ

1. กรดอะมิโนจำเป็น (Essential amino acids) คือ กรดอะมิโนที่ร่างกายไม่สามารถสร้างได้ จำเป็นต้องได้จากอาหารที่รับประทาน หรือร่างกายสร้างได้แต่ไม่พอ กรดอะมิโนจำเป็นสำหรับมนุษย์มีอยู่ 8 ชนิด คือ ไอโซลิวซีน (Isoleucine) ลิวซีน (Leucine) ไลซีน (Lysine) เมไท-โอนีน (Methionine) เฟนิลอะลานีน (Phenylalanine) ทรีโอนีน (Threonine) ทริฟโตเฟน (Tryptophane) และแวลีน (Valine) กรณีเด็กทารกต้องการฮิสติดีน (Histidine) ด้วยจึงมีทั้งหมด 9 ชนิด

2. กรดอะมิโนที่ไม่จำเป็น (Nonessential amino acids) คือ กรดอะมิโนที่ร่างกายสามารถสร้างได้ไม่จำเป็นต้องได้จากอาหาร กรดอะมิโนพวกนี้ได้แก่ กรดอะมิโนที่เหลือจากกลุ่ม 1 (McDonald *et al*, 2011)

การออกแบบรีเซปเตอร์ให้สามารถจับกับกรดอะมิโนได้อย่างมีประสิทธิภาพ จำเป็นจะต้องมีโครงสร้างของบริเวณหมู่จับที่เหมาะสม เนื่องจากกรดอะมิโนเมื่ออยู่ในตัวทำละลายที่มีขั้วจะอยู่ในรูป

Zwitterion หรือ Dipolar ion ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยาได้กับทั้งกรดและเบส โดยเมื่อทำปฏิกิริยากับเบส หมู่แอมโมเนียมไอออน ($-\text{NH}_3^+$) จะเปลี่ยนไปเป็นหมู่เอมีน ($-\text{NH}_2$) แต่เมื่อทำปฏิกิริยากับกรด หมู่คาร์บอกซิเลต ($-\text{COO}^-$) จะเปลี่ยนไปเป็นหมู่คาร์บอกซิลิก ($-\text{COOH}$) (Spurlock, 2014)



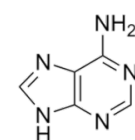
ภาพ 5 การแตกตัวของกรดอะมิโน

การศึกษาการจับกับนิวคลีโอไทด์

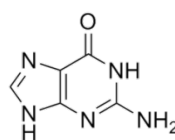
นิวคลีโอไทด์ (Nucleotide) คือ หน่วยย่อยของดีเอ็นเอ (DNA) และอาร์เอ็นเอ (RNA) นิวคลีโอไทด์ (Nucleotide) ประกอบไปด้วย 3 องค์ประกอบหลัก คือ

1 ไนโตรจีนัสเบส (Nitrogenous Base; มักจะถูกเรียกสั้นๆ ว่าเบส) เป็นเบสที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ไนโตรจีนัสเบส (Nitrogenous Base) มี 2 ประเภท คือ

1.1 พิวรีน (Purines) ได้แก่ อะดีนีน (A), กวานีน (G)

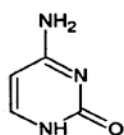


Adenine

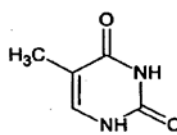


Guanine

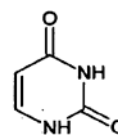
1.2 ไพริมิดีน (Pyrimidines) ได้แก่ ไซโตซีน (C), ไทมีน (T) และยูราซิล (U) ซึ่งพบในอาร์เอ็นเอ (RNA) แทนเบสไทมีน (T)



Cytosine



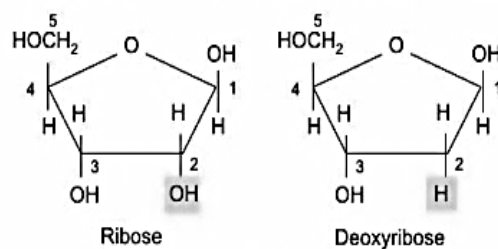
Thymine



Uracil

เบสเหล่านี้ทำให้ดีเอ็นเอ (DNA) หรืออาร์เอ็นเอ (RNA) มีคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตได้ที่มีความยาวคลื่น 260-280 นาโนเมตร

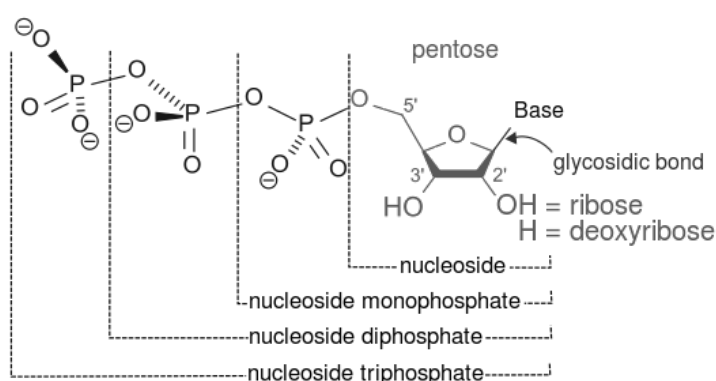
2. น้ำตาลเพนโทส (Pentose sugar) คือ น้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม มี 2 ชนิด คือ น้ำตาลไรโบส (Ribose sugar) ซึ่งพบในอาร์เอ็นเอ (RNA) และ น้ำตาลดีออกซีไรโบส (Deoxyribose Sugar) ซึ่งพบในดีเอ็นเอ (DNA)



ภาพ 6 น้ำตาลไรโบสและน้ำตาลดีออกซีไรโบส

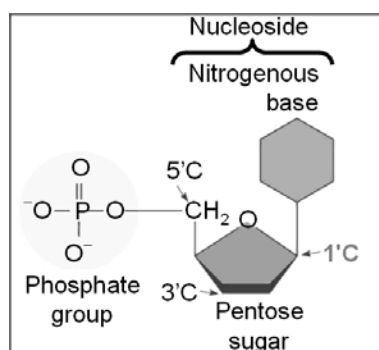
(<http://www.ipesp.ac.th/learning/biocheme/html/bt6.pdf>)

3. หมู่ฟอสเฟต (Phosphate Group)



ภาพ 7 หมู่ฟอสเฟต (วิกิพีเดีย, 2557)

ในการรวมตัวของนิวคลีโอไซด์ (Nucleoside) กับหมู่ฟอสเฟตให้เป็นนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide) โดยเบสจะต่อกับคาร์บอนตัวที่ 1 ของน้ำตาลเพนโทส (Pentose sugar) และฟอสเฟตต่อกับคาร์บอนตัวที่ 5 ของน้ำตาลเพนโทส (Pentose sugar) เมื่อนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide) มาต่อรวมกันหลายๆ โมเลกุลจะเรียกว่า โพลินิวคลีโอไทด์ (Polynucleotide)



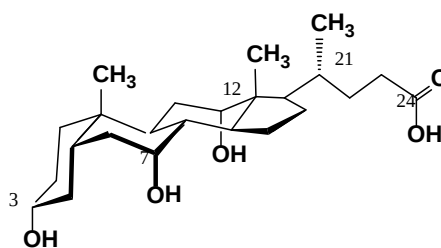
ภาพ 8 โครงสร้างของนิวคลีโอไทด์ (เทคโนโลยีชีวภาพ, 2014)

นิวคลีโอไทด์เป็นส่วนสำคัญของการสร้าง DNA และ RNA ดังที่กล่าวไว้ในข้างต้น และมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตต่อการทำงานของอวัยวะต่างๆ ทำหน้าที่ซ่อมแซมเซลล์ที่ถูกทำลาย นิวคลีโอไทด์เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเซลล์ต่างๆ ที่อยู่ภายในร่างกาย นอกจากนี้นิวคลีโอไทด์มีหน้าที่ในขบวนการเผาผลาญพลังงานระดับเซลล์ มีหน้าที่สลายอาหารเพื่อให้ได้เป็นพลังงาน มีบทบาทช่วยในการสังเคราะห์สารอาหารที่จำเป็นสำหรับการดำรงชีวิต ได้แก่ ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และโปรตีน

นิวคลีโอไทด์จะสามารถถูกสร้างขึ้นเองภายในร่างกายอย่างสม่ำเสมอ ส่วนมากนิวคลีโอไทด์จะอยู่ในเนื้อเยื่อต่างๆ ที่สำคัญในร่างกาย ตัวอย่างเช่น ผิวเซลล์เม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และระบบภูมิคุ้มกันโรค ร่างกายสามารถสร้างนิวคลีโอไทด์ได้ด้วยตัวเองจากตับ แต่ร่างกายต้องการจากแหล่งภายนอกด้วยโดยการรับประทานอาหารที่มีประโยชน์ (Kim, 2011)

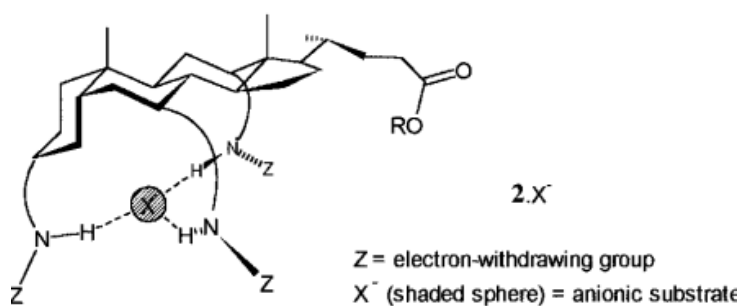
คอลิกเอซิด (Cholic acid)

สารกลุ่มสเตอรอยด์จัดว่ามีโมเลกุลขนาดใหญ่ และมีโครงสร้างที่แน่นอนเนื่องจากภายในโครงสร้างประกอบไปด้วยวงหกเหลี่ยม 3 วง และวงห้าเหลี่ยม 1 วงเชื่อมต่อกัน (ภาพ 9) การเติมหมู่แทนที่ลงบนวงหกเหลี่ยมสามารถเติมได้ 2 แบบ คือ Axial และ Equatorial ทำให้เกิดผลดีต่อการออกแบบโมเลกุลให้ได้รีเซบเตอร์ที่หลากหลาย สารกลุ่มสเตอรอยด์ยังพบว่ามีคุณสมบัติเป็น homochiral ด้วยข้อดีหลายๆ อย่างทำให้สารกลุ่มสเตอรอยด์ได้รับความสนใจในการใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์เป็นรีเซบเตอร์ สารกลุ่มสเตอรอยด์มีด้วยกันหลายชนิด แต่ชนิดที่น่าสนใจคือ คอลิกเอซิด เนื่องจากมีราคาถูก โครงสร้างมีลักษณะที่มีวงหกเหลี่ยมและห้าเหลี่ยมในโมเลกุลเป็นพันธะเดี่ยวทั้งหมดจึงทำให้เกิดลักษณะโครงสร้างที่โค้ง บนวงหกเหลี่ยมและห้าเหลี่ยมยังมีหมู่ฟังก์ชัน 4 หมู่กระจายอยู่รอบๆ โมเลกุลประกอบไปด้วย หมู่ไฮดรอกซิล 3 หมู่ที่ตำแหน่ง C3, C7 และ C12 โดย C3-OH มีการแทนที่ในลักษณะ Equatorial ส่วน C7-OH และ C12-OH แทนที่แบบ Axial ลักษณะการแทนที่แบบนี้ทำให้หมู่ไฮดรอกซิลทั้งสามชี้เข้าหากันซึ่งเมื่อเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลไปเป็นหมู่ฟังก์ชันอื่นๆ ที่เหมาะสมต่อการจับกับเกสต์แล้วก่อให้เกิดโพรงตรงกลางที่มีหมู่ฟังก์ชันล้อมรอบแบบสามมิติจึงเหมาะสมแก่การใช้จับกับโมเลกุลเกสต์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่วนหมู่แทนที่อีกชนิดหนึ่ง คือหมู่คาร์บอกซิลิกที่ บริเวณปลายด้านหนึ่งของวงห้าเหลี่ยมสามารถแทนที่ด้วยหมู่ฟังก์ชันอื่นๆ ได้เช่นเดียวกับหมู่ไฮดรอกซิล (Davis, 1993) การที่คอลิกเอซิดมีรูปร่างที่โค้ง และหมู่ไฮดรอกซิลชี้เข้าหากันจึงทำให้โครงสร้างเกิดลักษณะไม่มีขั้วบริเวณด้านนอก และเกิดลักษณะมีขั้วบริเวณด้านใน คุณสมบัติตรงนี้มีประโยชน์ต่อการนำรีเซบเตอร์จากคอลิกเอซิดไปใช้ในการสกัดเกสต์ที่อยู่ในชั้นน้ำออกมา ด้วยเหตุนี้จึงมีงานวิจัยมากมายที่ออกแบบรีเซบเตอร์จากคอลิกเอซิดเพื่อนำไปใช้ศึกษาการจับไอออนลบและกรดอะมิโน (Davis *et al*, 2003)



ภาพ 9 โครงสร้างโมเลกุลของคอเลสเตอรอล (Davis *et al*, 2003)

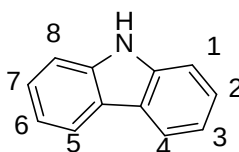
จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าหมู่ฟังก์ชันที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับไอออนลบอย่างมีประสิทธิภาพ เช่น หมู่เอไมด์ หมู่ยูเรีย และหมู่ไทโอยูเรีย ซึ่งล้วนแล้วแต่เป็นหมู่ฟังก์ชันที่ให้พันธะไฮโดรเจนที่เป็นกลาง (Neutral H - bond donor) โดยสามารถจับกับไอออนลบทั้งที่มีรูปร่างเป็นทรงกลมคือ เฮไลด์ และไอออนลบที่มีรูปร่างตัววายคือ กลุ่มคาร์บอกซิเลตไอออน อย่างไรก็ตามได้พบปัญหาตามมาคือ นอกจากการเป็นหมู่ให้พันธะไฮโดรเจนหมู่ฟังก์ชันเหล่านี้ยังเป็นหมู่รับพันธะไฮโดรเจนด้วย ดังนั้นจึงมักพบการเกิดพันธะไฮโดรเจนกันเองระหว่างหมู่ฟังก์ชันเหล่านี้ภายในโมเลกุลรีเซปเตอร์ ซึ่งส่งผลให้ประสิทธิภาพในการจับไอออนลบด้อยลงไป งานวิจัยจำนวนมากได้เลือกใช้คอเลสเตอรอลเป็นรีเซปเตอร์สำหรับไอออนลบโดยการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง C3 C7 และ C12 ไปเป็นหมู่ให้พันธะไฮโดรเจน เช่น เอไมด์ ซัลโฟนาไมด์ คาร์บาเมต ยูเรีย หรือไทโอยูเรีย จากการศึกษาพบว่าโครงสร้างของคอเลสเตอรอลสามารถแก้ไขปัญหการเกิดพันธะไฮโดรเจนกันเองได้ เนื่องจากระยะห่างของหมู่แทนที่ในตำแหน่ง C3 C7 และ C12 นั้นอยู่ห่างกันมากพอที่ไม่เกิดสร้างพันธะไฮโดรเจนกันเองระหว่างหมู่แทนที่ในตำแหน่งดังกล่าว นอกจากนี้การมีหมู่แทนที่จำนวนมากบนโครงสร้างส่งผลให้รีเซปเตอร์สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนจำนวนหลายๆ พันธะพร้อมกันในการจับไอออนลบที่เข้ามาอยู่บริเวณตรงกลางระหว่างหมู่ฟังก์ชันที่ยื่นออกมาจากตำแหน่ง C3 C7 และ C12 ดังภาพ 10 (Davis *et al*, 1997)



ภาพ 10 โครงสร้างของรีเซปเตอร์ที่มาจากคอเลสเตอรอลที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับไอออนลบจำนวนหลายพันธะพร้อมๆ กันได้

คาร์บาโซล (Carbazole)

คาร์บาโซล เป็นสารอินทรีย์ที่จัดอยู่ในประเภท Heterocyclic aromatic compound ที่มีโครงสร้างเป็นไตรไซคลิกมีวงเบนซีนอยู่ทั้ง 2 ข้างของวงห้าเหลี่ยมมีไนโตรเจนบรรจุอยู่ คาร์บาโซลเป็นสารผลึกที่มีสีขาวไม่ละลายในน้ำ คาร์บาโซลมีคุณสมบัติทางด้านการให้แสงฟลูออเรสเซนส์ที่มีความเข้มสูง นอกจากนี้คาร์บาโซลสามารถเกิดปฏิกิริยาการแทนที่บนวงอะโรมาติกของคาร์บาโซลที่ตำแหน่ง 1, 3, 6 และ 8 (ภาพ 11) ได้อย่างง่ายดาย คาร์บาโซลถูกนำมาใช้ในงานต่างๆ อย่างหลากหลาย อย่างเช่น ในงานเกี่ยวกับสีย้อม งานทางด้านเภสัชกรรม งานด้านวัสดุที่ไวต่อแสงทางด้านพอลิเมอร์ (Shufen *et al*, 1995) นอกจากนี้อนุพันธ์ของคาร์บาโซลถูกนำไปใช้ทางการแพทย์ในด้านต่างๆ เช่น สารต้านจุลินทรีย์ สารต้านเนื้องอก สารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านการติดเชื้อ เป็นต้น (Flammengo *et al*, 2003) การที่โครงสร้างของคาร์บาโซลมี Hetero atom (N) อยู่ในโครงสร้างจึงทำให้อิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวที่อะตอมดังกล่าวเข้าไปมีส่วนร่วมกับระบบไพ - อิเล็กตรอนของวงอะโรมาติกจึงส่งผลต่อการดูดกลืนแสงของคาร์บาโซล จากการศึกษาการดูดกลืนแสงของคาร์บาโซลในตัวทำละลายเฮกเซนที่ 300 K ให้สเปกตรัมการดูดกลืนแสงจำนวน 3 ตำแหน่ง ดังนี้ $\lambda_{\max} = 232 \text{ nm}$, $\lambda_{\max} = 292 \text{ nm}$ และ $\lambda_{\max} = 332 \text{ nm}$ นอกจากนี้การแทนที่ NH ด้วย N-R พบว่าเมื่อ R เป็นหมู่ให้อิเล็กตรอนจะทำให้เกิดการเลื่อนตำแหน่งของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงไปในทางความยาวคลื่นสูงขึ้น แต่เมื่อ R เป็นหมู่ดึงอิเล็กตรอนจะทำให้เกิดการเลื่อนตำแหน่งของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงไปทางความยาวคลื่นต่ำลง (Volkava *et al*, 1976)

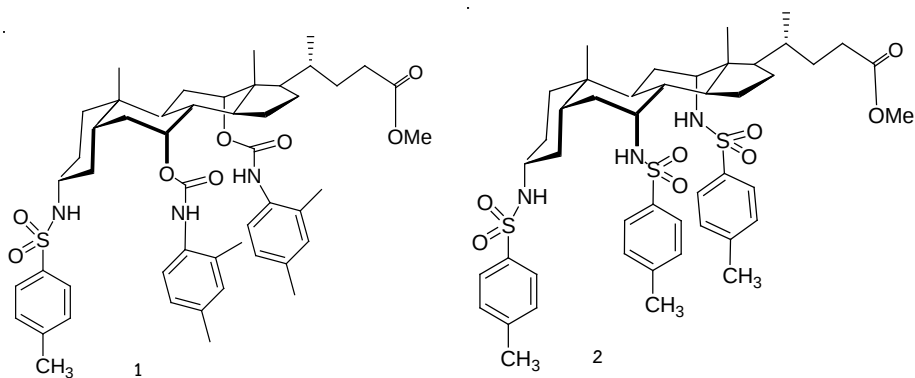


ภาพ 11 โครงสร้างโมเลกุลของคาร์บาโซล

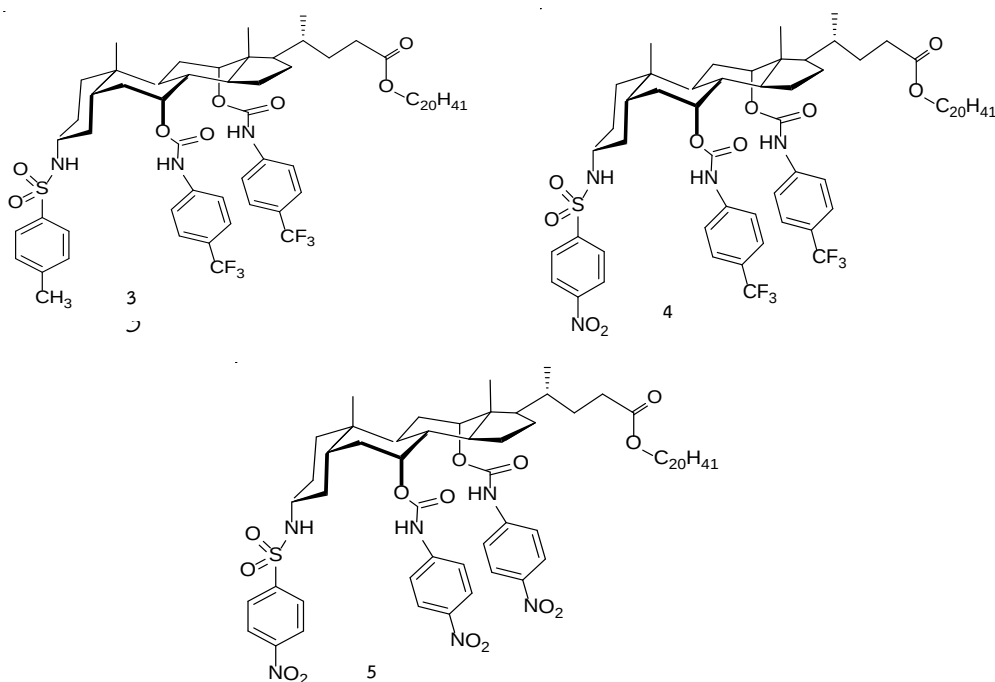
งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับรีเซปเตอร์จากคอลิกเอซิดสำหรับไอออนลบ

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารกลุ่มคอลิกเอซิดส่วนใหญ่เน้นศึกษาการจับกับไอออนลบ โดยอาศัยการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลไฮสโตกับเกสต์ ตัวอย่างของงานวิจัยบางส่วนที่เกี่ยวกับการจับกับไอออนลบมีดังต่อไปนี้

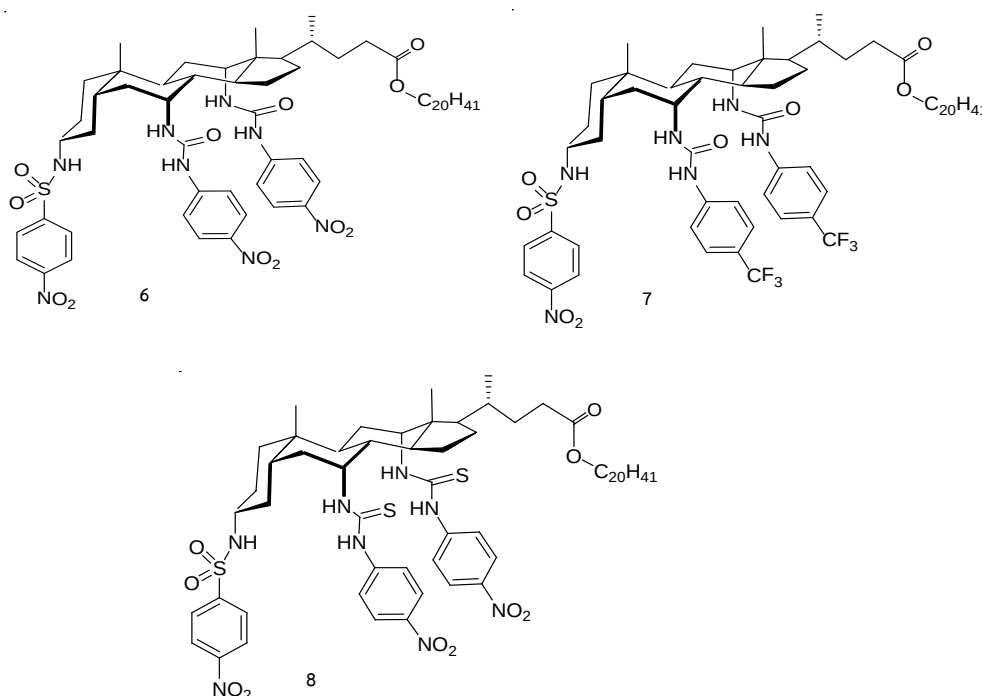
ปี 1997 Davis A. P. และคณะ ทำการสังเคราะห์รีเซปเตอร์จากคอลิกเอซิดสองตัวคือ รีเซปเตอร์ 1 ที่มีหมู่ฟังก์ชันของหมู่จับเป็นคาร์บาเมตที่ C7 และ C12 ส่วนที่ C3 มีหมู่ฟังก์ชันเป็นซิลโฟนาไมด์ ส่วนรีเซปเตอร์ 2 มีหมู่ฟังก์ชันเป็นซิลโฟนาไมด์ทั้ง 3 ตำแหน่ง รีเซปเตอร์ทั้งสองถูกนำไปใช้ในการจับกับไอออนลบ 5 ตัว F^- , Cl^- , Br^- , I^- และ TsO^- โดยทำการศึกษาค่า binding constant (K) ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ titration ในตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม พบว่ารีเซปเตอร์ 2 จับกับไอออนลบได้ดีกว่ารีเซปเตอร์ 1 และทั้งสองรีเซปเตอร์จับกับ F^- ได้ดีที่สุด



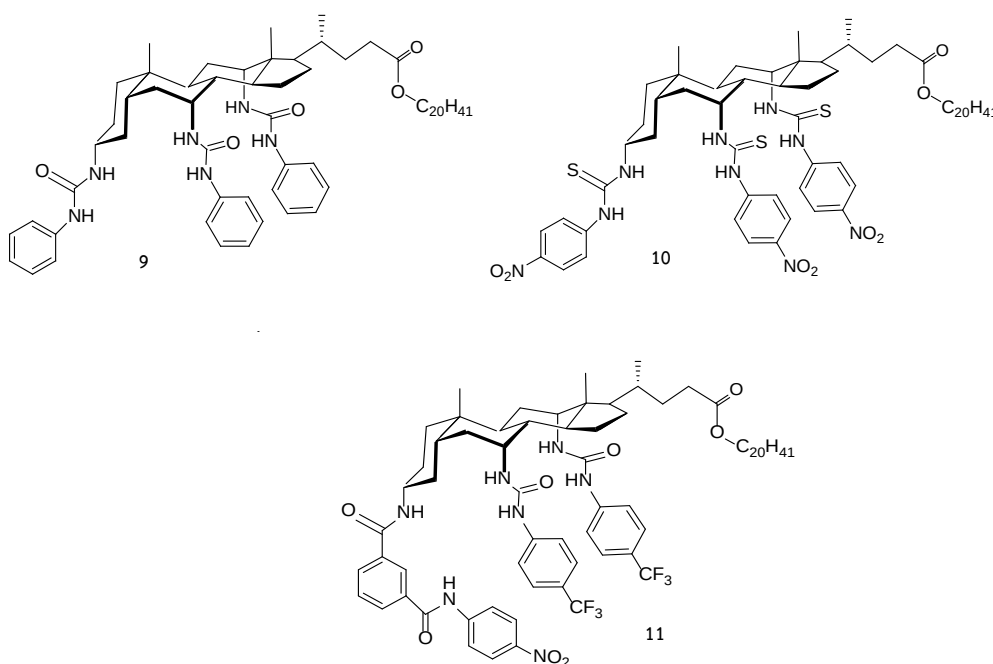
ปี 2002 Davis A. P. และคณะได้ทำการศึกษารีเซปเตอร์ **3-5** ซึ่งมีการเติมหมู่ดิง (-NO₂, -CF₃) อิเล็กตรอนเข้าไปบนวงเบนซีนของหมู่จับ ที่ตำแหน่ง C3, C7 และ C12 สำหรับจับกับไอออนลบ Cl⁻ และ Br⁻ ด้วยเทคนิค ¹H-NMR titration เพื่อเปรียบเทียบกับรีเซปเตอร์ **1** และ **2** ผลที่ได้พบว่าการมีหมู่ดิงอิเล็กตรอนช่วยให้มีการจับกับไอออนลบได้ดีถึง 10 เท่า (จากการเปรียบเทียบระหว่างรีเซปเตอร์ **1** และ **3**) การแทนที่หมู่ Tosyl ด้วย *p* - Nitrophenylsulfonyl จะช่วยให้รีเซปเตอร์จับกับไอออนลบได้ดีขึ้นโดยเฉพาะถ้ามี *p* - Nitro บนวงอะโรมาติกของหมู่จับที่ตำแหน่ง C3, C7 และ C12 จะจับกับไอออนลบได้ดีที่สุดดูได้จากค่า Binding constant (K) ของรีเซปเตอร์ **5** ที่มีค่ามากที่สุด (K = 3.2 × 10⁻⁷ M⁻¹)



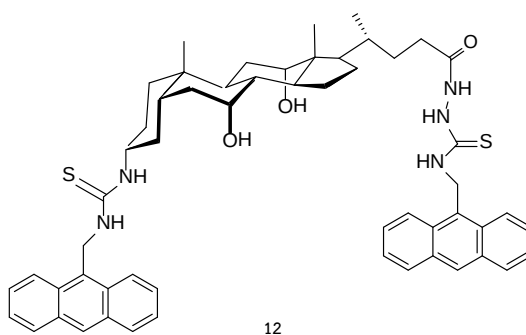
ในปี 2001 Davis A. P. และคณะ ได้ออกแบบโมเลกุลรีเซปเตอร์จากคอลิกเอซิดที่มีหมู่ฟังก์ชันที่ตำแหน่ง C7 และ C12 เป็นหมู่ยูเรีย และหมู่ไทโอยูเรียซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับไอออนลบได้มากกว่าหมู่คาร์บาเมต ได้รับรีเซปเตอร์จำนวน 3 ตัวคือ **6-8** โดยนำมาทำการศึกษาการจับกับไอออนลบ Cl^- และ Br^- โดยใช้เทคนิค $^1\text{H-NMR}$ titration ผลการศึกษาพบว่าหมู่ไทโอยูเรียจับกับไอออนลบได้ดีกว่าหมู่ยูเรีย และรีเซปเตอร์ที่จับกับไอออนลบแล้วให้ค่า Binding constant (K) สูงสุดคือรีเซปเตอร์ **8** ซึ่งให้ค่าสูงสุดถึง 10^{11} M^{-1} เมื่อจับกับ Cl^- ถือได้ว่าเป็นค่า Binding constant ที่พบมากที่สุดเท่าที่พบมาสำหรับรีเซปเตอร์ในกลุ่มนี้



ในปี 2003 Smith B. กับ Davis A.P. และคณะได้สังเคราะห์โมเลกุลรีเซปเตอร์จากคอลิกเอซิด **9-11** ให้มีหมู่จับที่ตำแหน่ง C3, C7 และ C12 เป็นหมู่ยูเรีย เอไมด์ และไทโอยูเรีย ที่สามารถใช้ในการจับกับไอออนลบผ่านการเกิดพันธะไฮโดรเจนได้ถึง 6 พันธะต่อรีเซปเตอร์ 1 ตัว รีเซปเตอร์ทั้งสามตัวถูกนำไปใช้ในการศึกษาการจับกับไอออนลบ 7 ชนิดที่มีรูปร่างแตกต่างกันคือ Cl^- , Br^- , I^- , NO_3^- , AcO^- , ClO_4^- และ EtSO_3^- โดยใช้เทคนิค $^1\text{H-NMR}$ titration จากผลการศึกษาการจับไอออนลบพบว่ารีเซปเตอร์ **9-11** จับกับ Cl^- และ AcO^- ได้ดีที่สุด แสดงว่ารีเซปเตอร์ในกลุ่มนี้มีความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกับไอออนลบที่มีรูปร่างเป็นทรงกลมกับรูปร่างตัววาย

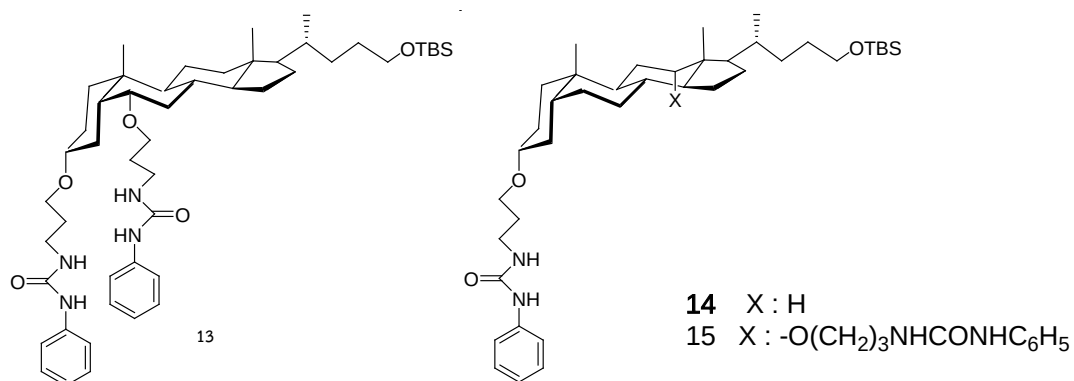


ในปี 2005 Yang R.H. และคณะ ทำการศึกษาฟลูออเรสเซนต์เซนเซอร์ **12** ในการจับกับ ไอออนลบกลุ่ม dicarboxylate ได้แก่ Malonate, Succinate, Glutalate, Adipate, Suberate, Sebate, Isophthalate, Terephthalate, Citrate, L-Aspartate และ L-Glutamate ซึ่งเป็นไอออนลบที่มีความยาวแตกต่างกันโดยอาศัยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์ รีเซปเตอร์นี้มีหมู่ฟังก์ชันไทโอเอยูเรีย 2 หมู่ เป็นหน่วยจับกับไอออนลบที่ปลายทั้งสองข้างคือที่ตำแหน่ง C3 กับตำแหน่ง C23 และมีหมู่แอนทราซีนเป็นหน่วยให้สัญญาณ ผลที่ได้พบว่ารีเซปเตอร์จับกับ L-glutamate ได้ดีที่สุด เนื่องจากเป็น ไอออนลบที่มีความยาวพอดีระหว่างหน่วยจับที่ปลายทั้งสองข้าง

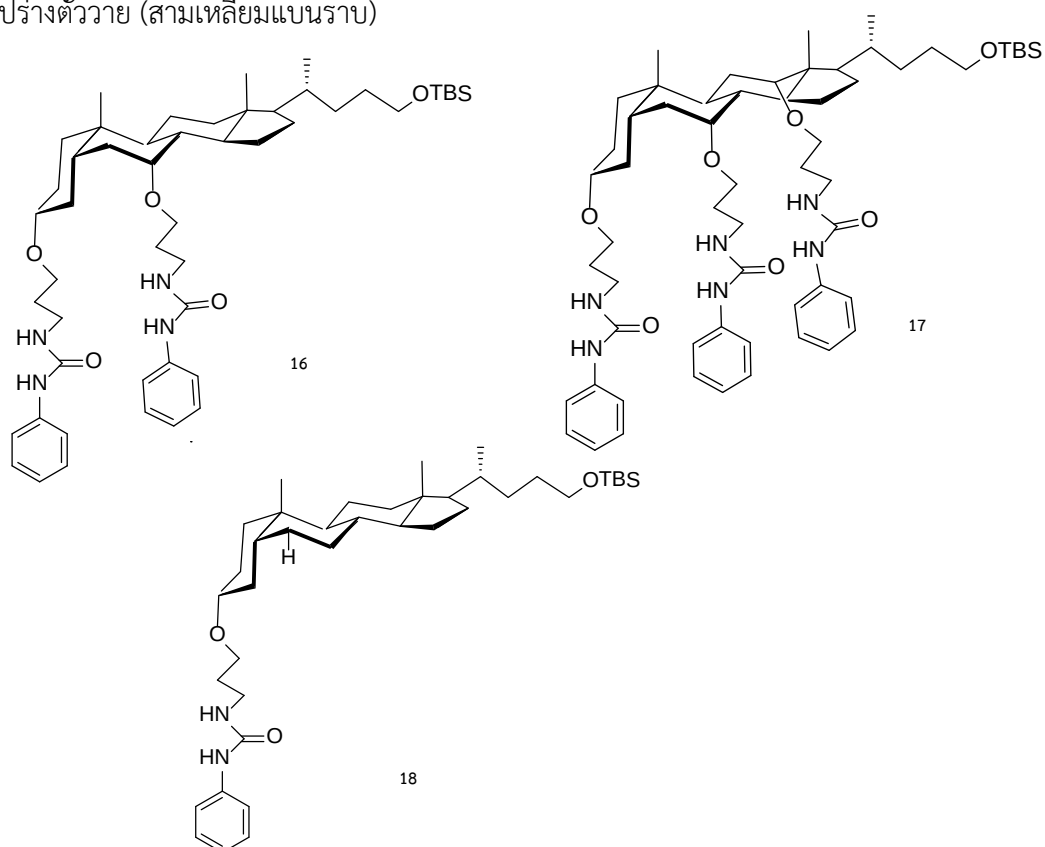


ในปี 2005 Kim K. S. กับ Kim H. S. ได้ศึกษารีเซปเตอร์จากคอลิกเอซิด **13 – 15** ซึ่งมีการเติมหมู่ฟังก์ชันที่ตำแหน่งต่างกัน และมีหมู่ยูเรียเป็นหมู่จับเพื่อใช้สำหรับการเกิดพันธะไฮโดรเจนกับ ไอออนลบทั้งหมด 4 ตัว คือ F⁻, Cl⁻, Br⁻, I⁻, H₂PO₄⁻ โดยใช้เทคนิค ¹H-NMR titration ในการศึกษา การจับกับไอออนลบ จากผลการทดลองพบว่ารีเซปเตอร์ **13** มีความสามารถในการจับกับ F⁻ ได้ดี

ที่สุด โดยให้ค่า Binding constant สูงที่สุด ($K_a = 15,300 \text{ M}^{-1}$) เนื่องจากหมู่จับทั้งสองหมู่อยู่ใกล้กัน ทำให้สามารถช่วยกันจับกับไอออนลบโดยการเกิดพันธะไฮโดรเจนหลายๆ พันธะพร้อมๆ กัน

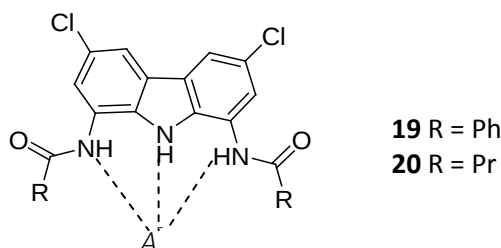


ในปี 2006 Kim H. S. และคณะได้ทำการศึกษารีเซปเตอร์ **16 – 18** ที่มีการเติมหมู่ฟังก์ชันในตำแหน่งที่แตกต่างกัน และมีหมู่ยูเรียเพื่อใช้ในการเกิดพันธะไฮโดรเจนกับไอออนลบทั้งหมด 5 ตัว คือ Cl^- , Br^- , I^- , H_2PO_4^- และ AcO^- โดยศึกษาหาค่า Binding constant (K) ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ titration ผลการศึกษาพบว่ารีเซปเตอร์ **16** มีค่า Binding constant สูงสุดเมื่อจับกับ Cl^- ($K_a = 7,640 \text{ M}^{-1}$) และรีเซปเตอร์ **17** มีค่า Binding constant สูงสุดเมื่อจับกับ H_2PO_4^- ($K_a = 4,270 \text{ M}^{-1}$) แสดงว่ารีเซปเตอร์กลุ่มนี้มีความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกับไอออนลบที่มีรูปร่างเป็นทรงกลมกับรูปร่างตัววาย (สามเหลี่ยมแบนราบ)

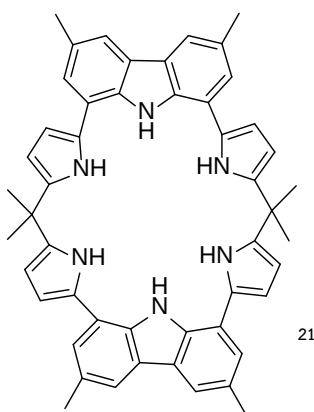


ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการออกแบบรีเซบเตอร์จากคาร์บาโซลเพื่อใช้ศึกษาการจับกับไอออนลบมีดังนี้

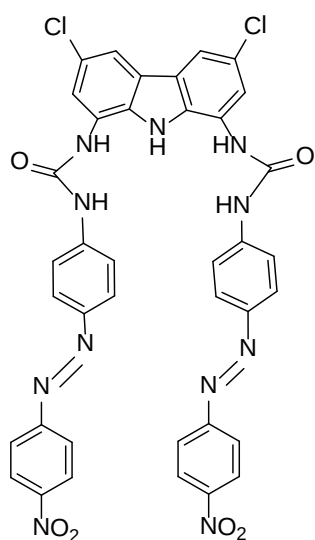
ในปี 2004 Jurczak J. และคณะ ทำการออกแบบและสังเคราะห์รีเซบเตอร์ **19** และ **20** ซึ่งสังเคราะห์มาจากปฏิกิริยาการแทนที่ตำแหน่ง 1 และ 8 บนวงอะโรมาติกของคาร์บาโซล จนได้รีเซบเตอร์ที่มีหน่วยจับเป็นหมู่เอไมด์ หลังจากนั้นได้นำรีเซบเตอร์ทั้ง 2 นี้ ไปศึกษาการจับกับไอออนลบ 3 ชนิดคือ Cl^- , BzO^- และ H_2PO_4^- ด้วยเทคนิค $^1\text{H} - \text{NMR}$ titration และ X - ray diffraction ผลที่ได้พบว่าการจับกันระหว่างรีเซบเตอร์กับไอออนลบเกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจน โดยรีเซบเตอร์ใช้ตำแหน่ง NH ของหมู่เอไมด์และ NH ของคาร์บาโซลในการสร้างพันธะกับไอออนลบ อัตราส่วนการจับกันระหว่างรีเซบเตอร์กับไอออนลบเป็นแบบ 1:1 รีเซบเตอร์ทั้งสองจับกับ H_2PO_4^- ได้ดีที่สุด นอกจากนี้พบว่ารีเซบเตอร์ **20** มีความสามารถในการจับกับไอออนลบได้ดีกว่ารีเซบเตอร์ **19** ($K_a = 19,800 \text{ M}^{-1}$)



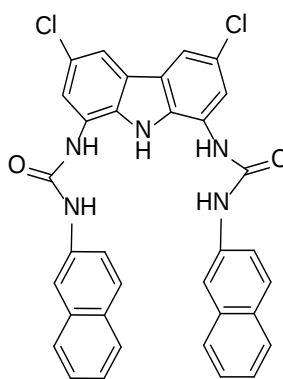
ปี 2004 Sessler J. L. และคณะ ทำการสังเคราะห์รีเซบเตอร์ **21** จากการใช้หมู่คาร์บาโซลร่วมกับหมู่ไพโรลได้รีเซบเตอร์กลุ่มใหม่ที่มีชื่อว่า Calix [4]pyrrole [2]carbazole ซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีรูปร่างคล้ายปีก (winglike structure) และนำมาศึกษาความสามารถในการจับกับไอออนลบ 3 กลุ่มคือ กลุ่มเฮไลต์ (Cl^- และ Br^-) กลุ่มคาร์บอกซิเลต (AcO^- , BzO^- , oxalate, succinate) และกลุ่มสุดท้ายคือ H_2PO_4^- ศึกษาโดยใช้เทคนิค $^1\text{H} - \text{NMR}$ และฟลูออเรสเซนส์ ผลที่ได้พบว่ารีเซบเตอร์นี้จับกับไอออนลบในอัตราส่วน 1:1 เมื่อเกิดการจับกันกับไอออนลบด้วยพันธะไฮโดรเจนจะทำให้เกิดการระงับการคายแสงของหมู่ที่ให้สัญญาณทางแสง ส่วนผลจากการคำนวณค่า binding constant จากเทคนิคฟลูออเรสเซนส์ พบว่า Cl^- เป็นไอออนลบในกลุ่มเฮไลต์ที่จับกับรีเซบเตอร์ได้ดีที่สุด ($K_a = 1,910 \text{ M}^{-1}$) ส่วนในกลุ่มคาร์บอกซิเลตจับกับ AcO^- ได้ดีที่สุด ($K_a = 1,680 \text{ M}^{-1}$)



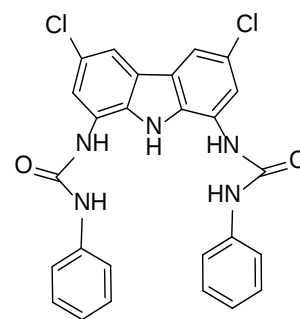
ปี 2007 Thangadurai T. และคณะได้ทำการสังเคราะห์รีเซบเตอร์ 1,8-Di(4-nitroazo benzene)-3,6-dichlorocarbazole (**22**), 1,8-Di(naphthylurea)-3,6-dichlorocarbazole (**23**) และ 1,8-Di(phenylurea)-3,6-dichlorocarbazole (**24**) โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงสัญญาณของรีเซบเตอร์เมื่อเติมไอออนลบ โดยไอออนลบที่ใช้ในการศึกษามีดังนี้ OH^- , F^- , Cl^- , Br^- , I^- , SCN^- , NO_3^- , ClO_4^- , HSO_4^- , BzO^- , AcO^- , H_2PO_4^- , CN^- , Glu^{2-} , Adi^{2-} , Oxa^{2-} , $\text{HP}_2\text{O}_7^{3-}$, Suc^{2-} และ Mal^{2-} ด้วยเทคนิค UV – visible, Fluorescence และ ^1H – NMR titration จากผลการศึกษาด้วยเทคนิคต่างๆ พบว่าไอออนลบที่มีความเป็นเบสสูงจะมีการเปลี่ยนสัญญาณมากที่สุดคือ OH^- , F^- , Suc^{2-} และ Mal^{2-} ตามลำดับ รีเซบเตอร์ทั้งสามจับกับไอออนลบผ่านการเกิดอันตรกิริยาแบบพันธะไฮโดรเจนตรงตำแหน่ง NH ของหมู่คาร์บาโซลและยูเรีย



22

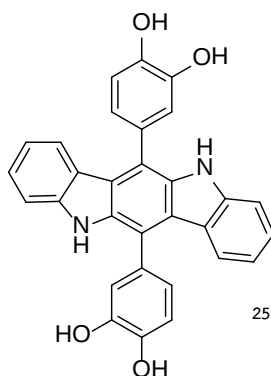


23

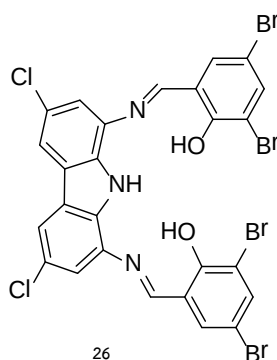


24

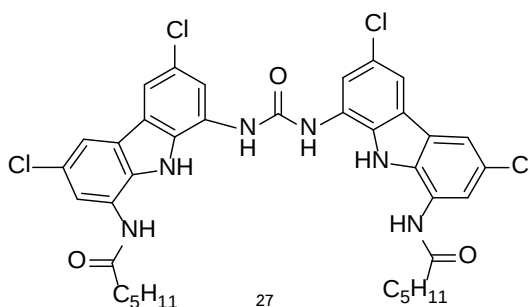
ในปี 2010 Mahapatra A. K. และคณะ ได้สังเคราะห์รีเซบเตอร์ **25** โดยสังเคราะห์มาจากอินโดคาร์บาโซล เพื่อนำไปศึกษาหาความจำเพาะเจาะจงในการเป็นเซนเซอร์สำหรับไอออนลบ ซึ่งไอออนลบที่ใช้ในการศึกษามีอยู่ 3 รูปร่าง นั่นคือ รูปร่างทรงกลม (F^- , Cl^- , Br^- , และ I^-) รูปร่างตัววาย (AcO^-) และรูปทรงสี่หน้า (HSO_4^- , H_2PO_4^-) การศึกษาการจับกันระหว่างโฮสต์กับเกสต์ โดยใช้การไทเทรตด้วยเทคนิค ^1H – NMR, UV – visible, Fluorescence และการสังเกตได้ด้วยตาเปล่า ผลที่ได้พบว่าการจับกันระหว่างรีเซบเตอร์กับไอออนลบเกิดอันตรกิริยาชนิดพันธะไฮโดรเจน โดยในเรื่องของการเปลี่ยนสีที่สามารถมองได้ด้วยตาเปล่านั้น เมื่อมีการเติม F^- และ AcO^- ลงไปในสารละลายรีเซบเตอร์ พบว่ามีการเปลี่ยนสีจากสีม่วงอ่อนเป็นสีส้มเข้ม และสีชมพูอ่อน ตามลำดับ และจากเทคนิคทางสเปกโตรโฟโตเมตรี พบว่ารีเซบเตอร์ใช้ตำแหน่งของ OH – ฟิโนลิกของรีเซบเตอร์ในการสร้างพันธะกับไอออนลบและเกิดการ Deprotonation ที่ตำแหน่งดังกล่าว อัตราส่วนการจับกันระหว่างรีเซบเตอร์กับไอออนลบเป็นแบบ 1:2 รีเซบเตอร์ทั้งสองจับกับ F^- ได้ดีที่สุดอาจเป็นผลเนื่องมาจากความเป็นเบสที่แรงของ F^-



ในปี 2011 Shang X. และคณะได้ออกแบบโมเลกุลเซนเซอร์จากคาร์บาโซลสำหรับไอออนลบ โดยเซนเซอร์ดังกล่าวมีหมู่ฟีนอล และ NH ของคาร์บาโซลเป็นหมู่จับกับไอออนลบผ่านการเกิดพันธะไฮโดรเจน ความสามารถในการเป็นเซนเซอร์ของโมเลกุล **26** สำหรับ F^- , Cl^- , Br^- , I^- , AcO^- และ $H_2PO_4^-$ ศึกษาโดยใช้การไทเทรตด้วยเทคนิค 1H -NMR, UV-visible และ Fluorescence พบว่าเมื่อมีการเติมไอออนลบจำนวนมากเกินพอ รีเซปเตอร์ **26** จะมีความสามารถในการจับกับ F^- , $H_2PO_4^-$ และ AcO^- ได้ดีกว่าไอออนลบอื่นๆ และเมื่อคำนวณค่า Affinity constant พบว่ารีเซปเตอร์สามารถจับ $H_2PO_4^-$ ได้ดีที่สุด ($K_a = 2.13 \times 10^4 M^{-1}$)



ในปี 2012 Cruz C. และคณะได้ทำการออกแบบและศึกษารีเซปเตอร์ **27** โดยกำหนดให้มีหมู่ NH ภายในโครงสร้างสำหรับใช้เกิดพันธะไฮโดรเจนทั้งหมด 6 ตำแหน่ง นั่นคือ คาร์บาโซล 2 ตำแหน่ง หมู่ยูเรีย 1 ตำแหน่ง และหมู่เอไมด์ 2 ตำแหน่ง จากนั้นได้นำรีเซปเตอร์นี้ไปศึกษาคุณสมบัติในการจับกับไอออนลบกลุ่มไดคาร์บอกซิเลต (Oxalate, Malonate และ Succinate) โดยใช้เทคนิค 1H - NMR titration และ X - ray diffraction จากการทดลองพบว่า รีเซปเตอร์ **27** มีความสามารถในการจับกับ malonate ได้ดีที่สุดเนื่องจากเป็นไอออนลบที่มีขนาดความยาวพอดีกับหน่วยจับในโครงสร้าง

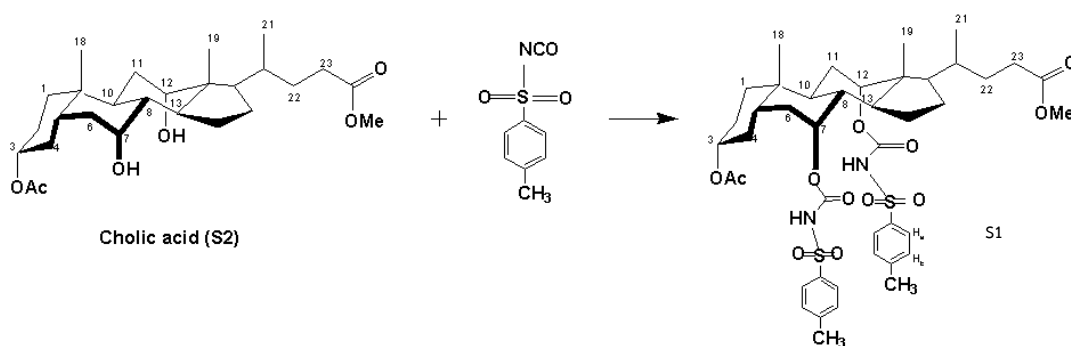


วิธีการทดลอง

การทดลองสามารถแบ่งงานออกเป็น 3 ส่วน ดังนี้

1. การสังเคราะห์รีเซปเตอร์จากคอลิกเอซิด 2 ตัวคือ **S1** และ **S2** (ดังภาพ 12) ซึ่งเป็นรีเซปเตอร์จากคอลิกเอซิดที่ตำแหน่ง C7 และ C12 มีการต่อหมู่ *p*-toluenesulfonyl และคาร์บาโซล ตามลำดับ โดยรีเซปเตอร์ **S1** มีหมู่จับเป็นหมู่คาร์บาโมซิลโฟนาไมด์ ส่วน **S2** มีหมู่จับเป็นหมู่คาร์บาเมต ตามลำดับ
2. การศึกษาความสามารถในการจับกับเกสต์ซึ่งมี 3 กลุ่มคือ ไอออนลบ กรดอะมิโน และนิวคลีโอไทด์ โดยทำการศึกษาด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ ยูวี-วิสิเบิล และฟลูออเรสเซนส์
3. การศึกษาโครงสร้าง และการเกิดอันตรกิริยาระหว่างรีเซปเตอร์กับเกสต์ที่น่าสนใจบางตัว ด้วยการจำลองโมเลกุลทางคอมพิวเตอร์

การสังเคราะห์รีเซปเตอร์ S1

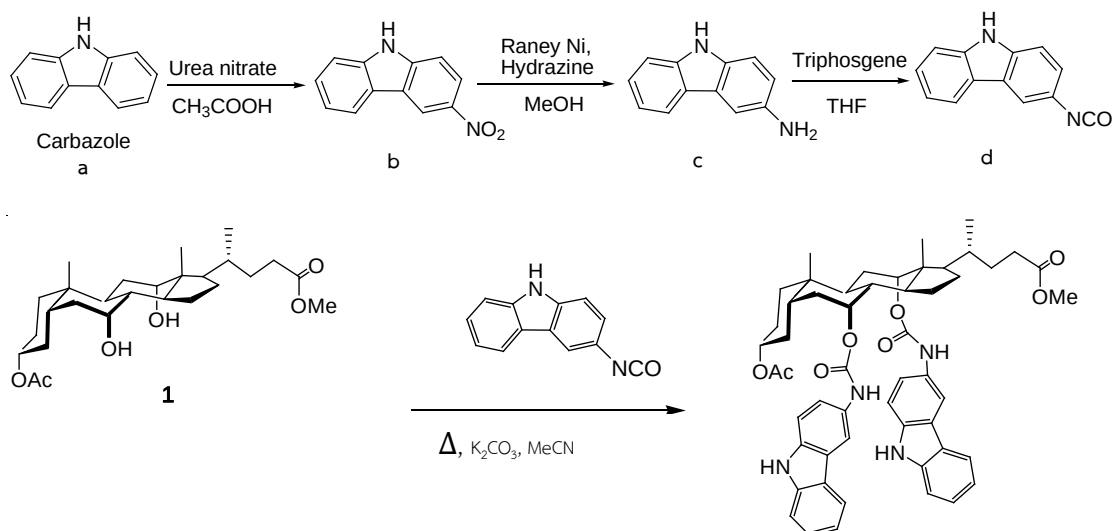


ภาพ 12 ขั้นตอนการสังเคราะห์รีเซปเตอร์ S1

ละลายสารตั้งต้นคอลิกเอซิดจำนวน 0.50 กรัม (1.08 mmol) ใน CH_2Cl_2 จำนวน 50 mL บรรจุลงในขวดกันกลม 2 คอขนาด 100 mL ทำการเติม *p*-toluenesulfonyl isocyanate 0.40 mL (2.69 mmol) และคนสารผสมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการระเหยตัวทำละลายและแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วย silica gel column chromatography โดยใช้ eluent เป็นตัวทำละลายผสมระหว่าง Ethyl acetate : hexane = 2:1 จะได้ผลิตภัณฑ์ **S1** ซึ่งมีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวเป็นผลิตภัณฑ์ (31.52 %yield)

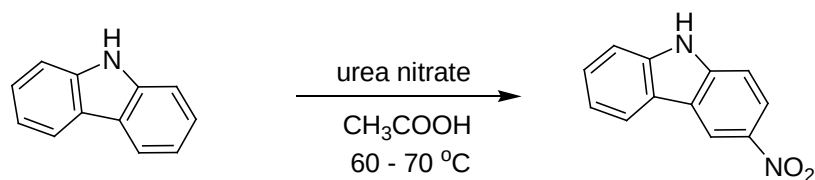
การสังเคราะห์รีเซปเตอร์ S2

รีเซปเตอร์ **S2** มีแนวทางในการสังเคราะห์แสดงดังภาพที่ 13



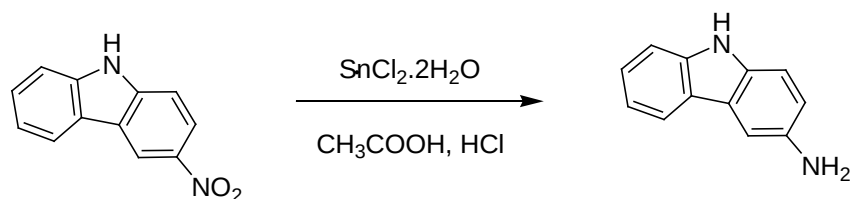
ภาพ 13 ขั้นตอนการสังเคราะห์รีเซปเตอร์ S2

การสังเคราะห์ไนโตรคาร์บาโซล (b)



ละลายคาร์บาโซล 0.88 g (5.28 mmol) ในกรดอะซิติกปริมาตร 60 mL ใส่ในขวดก้นกลม ขนาด 250 mL ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 60 – 70 °C พร้อมคนจนได้สารละลายสีเหลือง จากนั้นเติม urea nitrate 0.65 กรัม (5.28 mmol) สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีดำ หลังจากตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง นำสารละลายออกมาตั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วเติมน้ำกลั่น จะเกิดตะกอนสีเหลือง ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน นำไปกรองแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น ของแข็งสีเหลืองที่ได้นำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ตัวทำละลายผสม Hexane : EtOAc = 3:1 จะได้ของแข็งสีส้มของไนโตรคาร์บาโซล

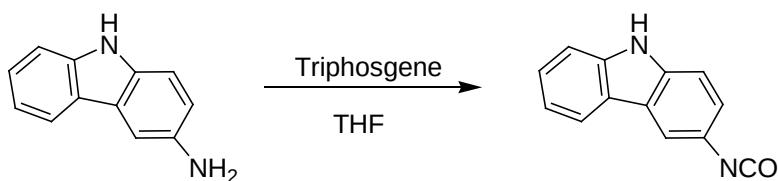
การสังเคราะห์อะมิโนคาร์บาโซล (c)



ละลายไนโตรคาร์บาโซล 0.31 g (1.5 mmol) ในกรดผสมระหว่างกรดอะซิติก : กรดไฮโดรคลอริก (15 : 3 v/v) ใส่ลงในขวดก้นกลม 250 mL จากนั้นเติม SnCl₂·2H₂O 1.69 g (7.5 mmol) คนสารผสมที่อุณหภูมิประมาณ 115 – 120 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน เมื่อ

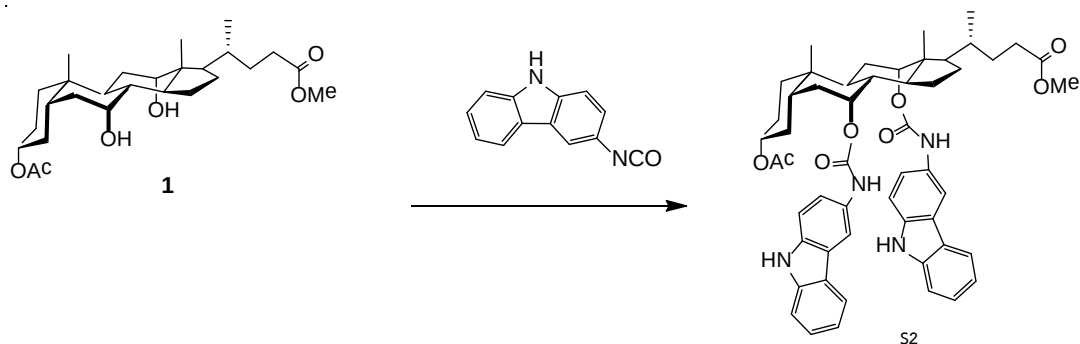
สารตั้งต้นหมดจึงหยุดให้ความร้อนและตั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ทำการตกตะกอนโดยเติมสารละลาย 20% NaOH แล้วเติมน้ำกลั่น ทิ้งให้ตกตะกอนแล้วนำไปกรองแบบสุญญากาศจะได้สารผลิตภัณฑ์อะมินโนคาร์บาโซลเป็นของแข็งสีขาว

การสังเคราะห์ไอโซไซยาเนตคาร์บาโซล (d)



นำอะมินโนคาร์บาโซล 0.88 g (5.28 mmol) มาละลายใน THF ปริมาตร 15 mL เติม Triphosgene 0.6 g (2.02 mmol) จากนั้นคนสารตั้งที่ไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ติดตามสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิค FT – IR ซึ่งจะพบการปรากฏแบนของ NCO ที่ 2257 cm^{-1} และแบน NHCOCl ที่ 1734 cm^{-1} ผลิตภัณฑ์ไอโซไซยาเนตที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นของแข็งสีอ่อน จากนั้นนำสารที่ได้ไปทำปฏิกิริยาต่อทันทีในขั้นตอนการสังเคราะห์รีเซปเตอร์ S2

การสังเคราะห์รีเซปเตอร์ S2



นำไอโซไซยาเนตคาร์บาโซล ที่ได้ก่อนหน้านี้ (5.28 mmol) มาทำปฏิกิริยาต่อทันทีกับคอลลิเกซิด (0.53 g, 0.33 mmol) โดยมาทำปฏิกิริยากันในตัวทำละลาย acetonitrile ปริมาตร 25 mL จากนั้นเติม K_2CO_3 (0.30 g, 4.00 mmol) ผสมลงในสารละลาย และนำไปให้ความร้อนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาระเหยตัวทำละลายและนำสารที่เหลือมาละลายใน dichloromethane และล้างด้วยสารละลายอิ่มตัว NaHCO_3 แยกชั้นตัวทำละลายอินทรีย์และนำมากำจัดน้ำโดยการเติม MgSO_4 นำของเหลวชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ไปกำจัดตัวทำละลายและทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ ethyl acetate : hexane = 1: 1 v/v เป็นตัวชะจะได้สารผลิตภัณฑ์ S2 เป็นของแข็งสีเทาอ่อน (0.22 g, 31.4% yield)

การศึกษาการจับไอออนลบของรีเซปเตอร์ S1

การศึกษาความสามารถในการจับไอออนลบ 9 ชนิด คือ AcO^- , BzO^- , NO_3^- , HSO_4^- , CN^- , ClO_4^- , H_2PO_4^- , OH^- และ F^- ของรีเซปเตอร์ S1 ทำการศึกษาด้วย 2 เทคนิคคือ เทคนิคยูวี-วิสิเบิล และเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ การศึกษาด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลจะทำการเตรียมสารละลายในตัวทำละลาย Acetonitrile ส่วนเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ titration จะทำการเตรียมสารละลายในตัวทำละลาย acetone- d_6

ศึกษาความจำเพาะในการจับไอออนลบด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล

ทำการเตรียมสารละลายรีเซปเตอร์ S1 ความเข้มข้น 4.5×10^{-4} M ในตัวทำละลาย 0.01 M NBu_4PF_6 ใน Acetonitrile ปริมาตร 10 mL ส่วนไอออนลบเตรียมสารละลายในตัวทำละลายเดียวกันที่ปริมาตร 10 mL โดยใช้ปริมาณไอออนลบ 0.0045 mol (10 equivalent ของรีเซปเตอร์) น้ำหนักที่ซึ่งแสดงดังตารางที่ 3

ปีเปตสารละลายรีเซปเตอร์ S1 ปริมาตร 2.00 mL ลงในคิวเวตนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 200 – 450 nm จากนั้นค่อยๆ เติมสารละลายของไอออนลบปริมาตรเป็นไปตามตารางที่ 4 ลงไปในสารละลาย S1 ในคิวเวต ในทุกครั้งที่เติมไอออนลบจะนำสารผสมไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นเดียวกันเพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงไปของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของรีเซปเตอร์ S1

ตารางที่ 3 น้ำหนักของไอออนลบที่ใช้เตรียมสารละลายในการศึกษาด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล

ไอออนลบ	น้ำหนัก (g)
Tetrabutylammonium fluoride trihydrate	0.0284
Tetrabutylammonium benzoate	0.0327
Tetrabutylammonium acetate	0.0271
Tetrabutylammonium hydroxide	0.0719
Tetrabutylammonium nitrate	0.0274
Tetrabutylammonium cyanide	0.0242
Tetrabutylammonium bisulfate	0.0305
Tetrabutylammonium phosphate	0.0305
Tetrabutylammonium perchlorate	0.0308

ตารางที่ 4 ปริมาตรและจำนวน equivalent ของไอออนลบที่ใช้ในการไทเทรตด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล

จุดที่	ความเข้มข้นของ ไอออนลบ (mol/dm^3)	ปริมาตรไอออนลบที่เติม		ปริมาตรรวมของ สารละลาย (mL)
		mL	Equivalents	
1	0	0.00	0.0	2.00
2	4.28×10^{-4}	0.10	1.0	2.10
3	8.18×10^{-4}	0.20	2.0	2.20
4	1.17×10^{-3}	0.30	3.0	2.30
5	1.50×10^{-3}	0.40	4.0	2.40
6	1.80×10^{-3}	0.50	5.0	2.50
7	2.08×10^{-3}	0.60	6.0	2.60
8	2.33×10^{-3}	0.70	7.0	2.70
9	2.57×10^{-3}	0.80	8.0	2.80
10	2.79×10^{-3}	0.90	9.0	2.90
11	3.00×10^{-3}	1.00	10.0	3.00

การศึกษาความจำเพาะในการจับไอออนลบโดยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$

ทำการเตรียมสารละลายของรีเซปเตอร์ **S1** ความเข้มข้น 3.00×10^{-3} M ในตัวทำละลาย acetone- d_6 ปริมาตรของสารละลาย 0.5 mL ส่วนไอออนลบเตรียมในตัวทำละลายเดียวกันที่ ปริมาตร 3.5 mL คิดเป็นเนื้อสารเท่ากับ 3.5 equivalent ของจำนวนโมลของรีเซปเตอร์ที่ 0.5 mL ซึ่งข้อมูลการซึ่งสารเป็นดังตารางที่ 5

นำสารละลายรีเซปเตอร์ **S1** ปริมาตร 0.5 mL ใส่ลงในหลอด NMR นำไปวัดสเปกตรัมเริ่มต้นของรีเซปเตอร์ จากนั้นค่อยๆ เติมสารละลายของไอออนลบปริมาตรเป็นไปตามตารางที่ 6 ลงไปในสารละลาย **S1** ในหลอด NMR ในทุกครั้งที่เติมไอออนลบจะนำสารผสมไปวัดสเปกตรัม NMR เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงไปของสัญญาณโปรตอนของรีเซปเตอร์ **S1**

ตารางที่ 5 น้ำหนักของไอออนลบที่ใช้เตรียมสารละลายในการศึกษาด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$

ไอออนลบ	น้ำหนัก (g)
Tetrabutylammonium cyanide	0.0023
Tetrabutylammonium fluoride trihydrate	0.0027
Tetrabutylammonium acetate	0.0026
Tetrabutylammonium nitrate	0.0026

ตารางที่ 6 ปริมาตรและจำนวน equivalent ของไอออนลบที่ใช้ในการไทเทรตด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$

จุดที่	อัตราส่วนโดยมวล S1 : ไอออนลบ	ปริมาตรไอออนลบที่เติม		ปริมาตรรวมของสารละลาย (mL)
		equivalent	ปริมาตร (mL)	
0	1 : 0.0	0.0	0.00	0.50
1	1 : 0.1	0.1	0.01	0.51
2	1 : 0.2	0.2	0.02	0.52
3	1 : 0.3	0.3	0.03	0.53
4	1 : 0.4	0.4	0.04	0.54
5	1 : 0.5	0.5	0.05	0.55
6	1 : 0.6	0.6	0.06	0.56
7	1 : 0.7	0.7	0.07	0.57
8	1 : 0.8	0.8	0.08	0.58
9	1 : 0.9	0.9	0.09	0.59
10	1 : 1.0	1.0	0.10	0.60
11	1 : 1.2	1.2	0.12	0.62
12	1 : 1.5	1.5	0.15	0.65
13	1 : 2.0	2.0	0.20	0.70
14	1 : 2.5	2.5	0.25	0.75
15	1 : 3.0	3.0	0.30	0.80

ศึกษาการจับกับไอออนลบด้วยการจำลองโมเลกุลทางคอมพิวเตอร์

การจำลองรูปร่างโมเลกุลทางคอมพิวเตอร์ของรีเซปเตอร์ **S1** และเมื่อ **S1** เกิดการจับกับไอออนลบกลุ่มเฮไลต์ (F^- , Cl^- , Br^- , I^-) ทำการศึกษาควบคู่ไปกับข้อมูลจากผลการทดลองจริง ซึ่งขบวนการทางคอมพิวเตอร์ที่ใช้ในการศึกษาคือ semi-empirical methods (AM1, PM6 และ PM7) การจำลองโมเลกุลเริ่มต้นด้วยการหาโครงสร้างที่เหมาะสมของ **S1** จากนั้นทำการคำนวณหาโครงสร้างของ complex ที่เกิดจากการจับกันระหว่าง **S1** กับไอออนลบโดยทำการใส่ไอออนลบเข้าไปตรงกลางระหว่างหมู่ NH-คาร์บาเมตซึ่งเป็นตำแหน่งที่ใช้ในการจับกับไอออนลบผ่านการเกิดพันธะไฮโดรเจน โดยค่าพลังงานแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุล (Interaction energies) คำนวณจากสมการ

$$E_{\text{int}} = E_{\text{S-A}} - (E_{\text{S}} + E_{\text{A}})$$

เมื่อ E_{int} = interaction energy (kJ/mol)

$E_{\text{S-A}}$ = heat of formation of anion-receptor complexes (kJ/mol)

E_{S} = heat of formation of receptors (kJ/mol)

E_{A} = heat of formation of anions (kJ/mol)

นอกจากนี้ ข้อมูลความเลือกจำเพาะในการจับกับไอออนลบกลุ่มเฮไลด์สามารถคำนวณได้จากการค่า Interaction energies ของแต่ละ complex หาค่าด้วยค่า Interaction energies ของ complex ที่มีค่าพลังงานต่ำที่สุด การคำนวณทั้งหมดทำโดยใช้โปรแกรม MOPAC 2012 ส่วนการหาโครงสร้างโมเลกุล (Molecular geometries) ทำโดยใช้โปรแกรม MOLDEN

ศึกษาความเลือกจำเพาะในการจับกับเกสต์ชนิดต่างๆ ของโมเลกุลรีเซปเตอร์ S2

ศึกษาความเลือกจำเพาะของโมเลกุลรีเซปเตอร์ S2 ในการจับกับไอออนลบ

ศึกษาความเลือกจำเพาะโดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิล

เตรียมสารละลายต่างๆ ดังนี้ 0.01 M ของ NBu_4PF_6 ใน acetonitrile เพื่อใช้เป็นตัวทำละลายในการทดลอง สารละลายของรีเซปเตอร์ S2 ที่ความเข้มข้น 2.0×10^{-5} M ปริมาตร 10.00 mL และสารละลายของไอออนลบที่ความเข้มข้น 2.0×10^{-3} M ปริมาตร 10.00 mL (คิดเป็น 50 equivalent ของรีเซปเตอร์) โดยน้ำหนักของไอออนลบแต่ละตัวแสดงดังตารางที่ 7

ปิเปตสารละลายรีเซปเตอร์ S2 ปริมาตร 2.00 mL ลงในคิวเวตนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 200 – 450 nm จากนั้นค่อยๆ เติมสารละลายของไอออนลบปริมาตรเป็นไปตามตารางที่ 8 ลงไปในสารละลาย S2 ในคิวเวต ในทุกครั้งที่เติมไอออนลบจะนำสารผสมไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นเดียวกันเพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงไปของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของรีเซปเตอร์ S2

ตารางที่ 7 น้ำหนักของไอออนลบสำหรับเตรียมสารละลายปริมาตร 10.00 mL สำหรับการไทเทรตด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลของรีเซปเตอร์ S2

ไอออนลบ	น้ำหนัก (g)
Tetrabutylammonium fluoride trihydrate	0.0063
Tetrabutylammonium chloride	0.0056
Tetrabutylammonium bromide	0.0065
Tetrabutylammonium benzoate	0.0073

ตารางที่ 8 ปริมาตรและจำนวน equivalent ของไอออนลบที่เติมลงไปไนรีเซบเตอร์ **S2** สำหรับการไทเทรตด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล

จุดที่	ความเข้มข้นของ ไอออนลบ (mol/L)	ปริมาตรไอออนลบที่เติม		ปริมาตรรวมของ สารละลาย (mL)
		mL	Equivalents	
1	0	0.00	0.0	2.00
2	4.88×10^{-5}	0.05	2.5	2.05
3	9.52×10^{-5}	0.10	5.0	2.10
4	1.40×10^{-4}	0.15	7.5	2.15
5	1.82×10^{-4}	0.20	10.0	2.20
6	2.22×10^{-4}	0.25	12.5	2.25
7	2.61×10^{-4}	0.30	15.0	2.30
8	2.98×10^{-4}	0.35	17.5	2.35
9	3.33×10^{-4}	0.40	20.0	2.40
10	3.67×10^{-4}	0.45	22.5	2.45
11	4.00×10^{-4}	0.50	25.0	2.50
12	4.31×10^{-4}	0.55	27.5	2.55
13	4.62×10^{-4}	0.60	30.0	2.60
14	4.91×10^{-4}	0.65	32.5	2.65
15	5.19×10^{-4}	0.70	35.0	2.70
16	5.45×10^{-4}	0.75	37.5	2.75
17	5.71×10^{-4}	0.80	40.0	2.80
18	5.96×10^{-4}	0.85	42.5	2.85
19	6.21×10^{-4}	0.90	45.0	2.90
20	6.44×10^{-4}	0.95	47.5	2.95
21	6.67×10^{-4}	1.00	50.0	3.00

ศึกษาความเลือกจำเพาะโดยใช้เทคนิค ^1H – NMR spectroscopy

เตรียมสารละลายรีเซบเตอร์ **S2** ที่ความเข้มข้น 2.5×10^{-3} M โดยชั่งสาร 0.0013 g ละลายใน CDCl_3 ปริมาตร 0.6 mL ใส่ในหลอด NMR

เตรียมสารละลายไอออนลบความเข้มข้น 1.5×10^{-2} M ละลายใน CDCl_3 ปริมาตร 0.5 mL (คิดเป็นเนื้อสารเท่ากับ 5 equivalent) น้ำหนักของไอออนลบที่ใช้ในการทดลองแสดงตาราง 9

นำสารละลายรีเซบเตอร์ **S2** ปริมาตร 0.6 mL ใส่ลงในหลอด NMR นำไปวัดสเปกตรัมเริ่มต้นของรีเซบเตอร์ จากนั้นค่อยๆ เติมสารละลายของไอออนลบปริมาตรเป็นไปตามตารางที่ 10 ลงไปในสารละลาย **S2** ในหลอด NMR ในทุกครั้งที่เติมไอออนลบจะนำสารผสมไปวัดสเปกตรัม NMR เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงไปของสัญญาณโปรตอนของรีเซบเตอร์ **S2**

ตารางที่ 9 น้ำหนักไอออนลบที่ใช้เตรียมสารละลายในการศึกษาด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$

ไอออนลบ	น้ำหนัก (g)
Tetrabutylammonium fluoride trihydrate	0.0041
Tetrabutylammonium chloride	0.0034
Tetrabutylammonium bromide	0.0035
Tetrabutylammonium benzoate	0.0040

ตาราง 10 ปริมาตรและจำนวน equivalent ของไอออนลบที่ใช้ในการไทเทรตด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$

จุดที่	อัตราส่วนโดยโมล S2 : ไอออนลบ	ปริมาตรไอออนลบที่เติม		ปริมาตรรวมของ สารละลาย (mL)
		mL	Equivalents	
1	1 : 0.0	0.00	0.0	0.60
2	1 : 0.1	0.01	0.1	0.61
3	1 : 0.2	0.02	0.2	0.62
4	1 : 0.3	0.03	0.3	0.63
5	1 : 0.4	0.04	0.4	0.64
6	1 : 0.5	0.05	0.5	0.65
7	1 : 0.6	0.06	0.6	0.66
8	1 : 0.7	0.07	0.7	0.67
9	1 : 0.8	0.08	0.8	0.68
10	1 : 0.9	0.09	0.9	0.69
11	1 : 1.0	0.10	1.0	0.70
12	1 : 1.2	0.12	1.2	0.72
13	1 : 1.4	0.14	1.4	0.74
14	1 : 1.6	0.16	1.6	0.76
15	1 : 1.8	0.18	1.8	0.78
16	1 : 2.0	0.20	2.0	0.80
17	1 : 2.5	0.25	2.5	0.85

18	1 : 3.0	0.30	3.0	0.90
19	1 : 3.5	0.35	3.5	0.95
20	1 : 4.0	0.40	4.0	1.00

ศึกษาความจำเพาะของโมเลกุลรีเซปเตอร์ S2 ในการจับกับกรดอะมิโน

รีเซปเตอร์ S2 ถูกนำมาใช้ศึกษาความสามารถในการจับกับกรดอะมิโน 10 ตัวคือ Tryptophan, Phenylalanine, Glycine, Alanine, Lysine, Lucine, Gutamic acid, Aspartic acid และ β - Alanine โดยจะทำการศึกษาด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล และ $^1\text{H-NMR}$

ศึกษาความเลือกจำเพาะโดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิล

เตรียมสารละลายของรีเซปเตอร์ S2 ความเข้มข้น 2.0×10^{-5} M ปริมาตร 25.00 mL ในตัวทำละลาย 0.01 M NBu_4PF_6 ในตัวทำละลายผสม $\text{H}_2\text{O} : \text{MeOH}$ (25 : 75 v/v)

เตรียมสารละลายของกรดอะมิโนในตัวทำละลายเดียวกันที่ปริมาตร 10.00 mL (ที่ความเข้มข้นนี้สารละลายกรดอะมิโน 1.50 mL มีปริมาณกรดอะมิโนเท่ากับ 75 equivalents ของจำนวนโมลรีเซปเตอร์ปริมาตร 2.00 mL) น้ำหนักของกรดอะมิโนที่ซึ่งแสดงดังตารางที่ 11

ปิเปตสารละลายของรีเซปเตอร์ S2 ปริมาตร 2.00 mL ใส่ลงในคิวเวต นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของรีเซปเตอร์ จากนั้นค่อยๆ เติมสารละลายของกรดอะมิโนปริมาณเล็กน้อย (ดังตารางที่ 12) ลงไปในสารละลายของรีเซปเตอร์จนให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที ทุกๆ ครั้งหลังจากการเติมกรดอะมิโนลงไปจะทำการวิเคราะห์สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ S2 เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น

ตารางที่ 11 น้ำหนักกรดอะมิโนสำหรับเตรียมสารละลายในปริมาตร 10.00 mL สำหรับการไทเทรตด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล

กรดอะมิโน	น้ำหนัก (g)
Glycine	0.0012
Alanine	0.0014
β - Alanine	0.0018
Leucine	0.0023
Phenylalanine	0.0029
Tryptophan	0.0037
Tyramine	0.0027
Aspartic acid	0.0023
Glutamic acid	0.0026
Lysine	0.0026

ตารางที่ 12 ปริมาตรและจำนวน equivalents ของกรดอะมิโนที่เติมลงไปในการไทเทรตด้วยเทคนิค ยูวี-วิสิเบิล

จุดที่	อัตราส่วนโดยโมล S2 : กรดอะมิโน	ปริมาตรกรดอะมิโนที่เติม		ปริมาตรรวมของสารละลาย (mL)
		mL	equivalent	
1	1 : 1	0.00	0	2.0
2	1 : 5	0.10	5	2.1
3	1 : 10	0.20	10	2.2
4	1 : 15	0.30	15	2.3
5	1 : 20	0.40	20	2.4
6	1 : 25	0.50	25	2.5
7	1 : 30	0.60	30	2.6
8	1 : 35	0.70	35	2.7
9	1 : 40	0.80	40	2.8
10	1 : 45	0.90	45	2.9
11	1 : 50	1.00	50	3.0
12	1 : 55	1.10	55	3.1
13	1 : 60	1.20	60	3.2
14	1 : 65	1.30	65	3.3
15	1 : 70	1.40	70	3.4
16	1 : 75	1.50	75	3.5

ศึกษาความเลือกจำเพาะโดยใช้เทคนิค ^1H – NMR spectroscopy

เตรียมสารละลายรีเซปเตอร์ S2 ความเข้มข้น 2.5×10^{-3} M โดยการชั่ง S2 น้ำหนัก 0.0013 g ละลายใน DMSO – d_6 ปริมาตร 0.6 mL

เตรียมสารละลายกรดอะมิโนความเข้มข้น 1.5×10^{-2} M ปริมาตร 0.5 mL (คิดเป็นเนื้อสารเท่ากับ 5 equivalent ของรีเซปเตอร์ S2) ในตัวทำละลาย DMSO – d_6 โดยน้ำหนักที่ซึ่งแสดงดังตาราง 13

นำสารละลายรีเซปเตอร์ S2 ปริมาตร 0.6 mL ใส่ลงในหลอด NMR นำไปวัดสเปกตรัมเริ่มต้นของรีเซปเตอร์ จากนั้นค่อยๆ เติมสารละลายของกรดอะมิโนปริมาตรเป็นไปตามตารางที่ 14 ลงไปในสารละลาย S2 ในหลอด NMR ในทุกครั้งที่เติมไอออนลบจะนำสารผสมไปวัดสเปกตรัม NMR เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงไปของสัญญาณโปรตอนของรีเซปเตอร์ S2

ตารางที่ 13 น้ำหนักของกรดอะมิโนที่ใช้เตรียมสารละลายสำหรับการไทเทรตด้วย ^1H – NMR

กรดอะมิโน	น้ำหนัก (g)
Phenylalanine	0.0018
Tryptophan	0.0021

ตารางที่ 14 ปริมาตรและจำนวน equivalent ของกรดอะมิโนที่เติมลงไปในรีเซปเตอร์ S2 สำหรับการไทเทรตด้วยเทคนิค ^1H – NMR

จุดที่	อัตราส่วนโดยโมล	ปริมาตรกรดอะมิโนที่เติม		ปริมาตรรวมของสารละลาย (mL)
	S2 : กรดอะมิโน	mL	Equivalents	
1	1 : 0.0	0.00	0.0	0.60
2	1 : 0.1	0.01	0.1	0.61
3	1 : 0.2	0.02	0.2	0.62
4	1 : 0.3	0.03	0.3	0.63
5	1 : 0.4	0.04	0.4	0.64
6	1 : 0.5	0.05	0.5	0.65
7	1 : 0.6	0.06	0.6	0.66
8	1 : 0.7	0.07	0.7	0.67
9	1 : 0.8	0.08	0.8	0.68
10	1 : 0.9	0.09	0.9	0.69
11	1 : 1.0	0.10	1.0	0.70
12	1 : 1.2	0.12	1.2	0.72
13	1 : 1.4	0.14	1.4	0.74
14	1 : 1.6	0.16	1.6	0.76
15	1 : 1.8	0.18	1.8	0.78
16	1 : 2.0	0.20	2.0	0.80
17	1 : 2.5	0.25	2.5	0.85
18	1 : 3.0	0.30	3.0	0.90
19	1 : 3.5	0.35	3.5	0.95
20	1 : 4.0	0.40	4.0	1.00

ศึกษาความเลือกจำเพาะของรีเซปเตอร์ S2 ในการจับกับนิวคลีโอไทด์

รีเซปเตอร์ S2 ถูกนำมาใช้ในการศึกษาการศึกษาความสามารถในการจับนิวคลีโอไทด์ 8 ชนิด คือ ATP, GDP, GMP, CMP, UMP, UDP, UTP และ ADP ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์ และ $^1\text{H-NMR}$

ศึกษาความเลือกจำเพาะในการจับกับนิวคลีโอไทด์โดยใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนส์

เตรียมสารละลายของรีเซปเตอร์ S2 ความเข้มข้น 1.0×10^{-5} M โดยเริ่มต้นซึ่ง S2 น้ำหนัก 2.93 กรัม มาละลายใน DMSO ปริมาตร 3.33 mL จากนั้นปิเปตสารละลายนี้ปริมาตร 0.02 mL ใส่ลงในคิวเวต และเติมสารละลายบัฟเฟอร์ Tris ปริมาตร 1.98 mL ผสมให้เข้ากัน นำไปวิเคราะห์สเปกตรัมการคายแสงเริ่มต้นของรีเซปเตอร์ S2

เตรียมสารละลายนิวคลีโอไทด์ให้มีความเข้มข้น 1.0×10^{-2} M โดยปริมาตรของบัฟเฟอร์ และน้ำหนักของนิวคลีโอไทด์ที่ซึ่งแสดงดังตาราง 15 นิวคลีโอไทด์ที่ซึ่งได้จะนำมาละลายและปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Tris pH 7.4 ความเข้มข้น 0.1 M

การไทเทรตเริ่มต้นจากค่อยๆ เติมสารละลายของนิวคลีโอไทด์ลงไปปริมาณเล็กน้อย (ดังตาราง 16) ลงไปในสารละลายของรีเซปเตอร์ คนให้เข้ากันเป็นเวลา 5 นาที ทุกๆ ครั้งหลังจากการเติมสารละลายของนิวคลีโอไทด์ลงไป จะทำการวิเคราะห์สเปกตรัมการคายแสงของ S2 เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น

ตารางที่ 15 น้ำหนักนิวคลีโอไทด์และปริมาตรบัฟเฟอร์ Tris pH 7.4 เข้มข้น 0.1 M ที่ใช้สำหรับการไทเทรตกับรีเซปเตอร์ S2 ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์

นิวคลีโอไทด์	น้ำหนัก (mg)	ปริมาตร (mL)
GDP	16.70	0.377
GMP	31.09	0.763
ATP	20.57	0.375
CMP	12.13	0.330
ADP	35.26	0.825
UMP	20.12	0.546
UTP	22.45	0.383
UDP	16.54	0.292

ตารางที่ 16 ปริมาตรและจำนวน equivalents ของนิวคลีโอไทด์ที่ใช้สำหรับการไทเทรตด้วยเทคนิค ฟลูออเรสเซนส์

จุดที่	อัตราส่วนโดยโมล	ปริมาตรนิวคลีโอไทด์		ปริมาตรรวมของสารละลาย
	S2 : นิวคลีโอไทด์	(mL)	(eq)	(mL)
1	1 : 0	0.00	0	2.00
2	1 : 5	0.01	5	2.01
3	1 : 10	0.02	10	2.02
4	1 : 15	0.03	15	2.03
5	1 : 20	0.04	20	2.04
6	1 : 25	0.05	25	2.05
7	1 : 30	0.06	30	2.06
8	1 : 35	0.07	35	2.07
9	1 : 40	0.08	40	2.08
10	1 : 45	0.09	45	2.09
11	1 : 50	0.10	50	2.10

ศึกษาความเลือกจำเพาะในการจับกับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค ^1H – NMR

เตรียมสารละลายรีเซบเตอร์ **S2** ความเข้มข้น 5×10^{-3} M โดยชั่ง **S2** น้ำหนัก 0.0022 g ละลายใน $\text{DMSO} - d_6$ ปริมาตร 0.5 mL ใส่ลงในหลอด NMR

เตรียมสารละลายนิวคลีโอไทด์ (GMP) ให้มีความเข้มข้น 5×10^{-2} M โดยชั่ง GMP น้ำหนัก 0.0046 กรัมมาละลายในตัวทำละลายผสม D_2O : $\text{DMSO} - d_6$ (0.125 : 0.1 mL) ปริมาตรรวม 0.225 mL (คิดเป็นเนื้อสารเท่ากับ 4.5 equivalent ของรีเซบเตอร์ **S2**)

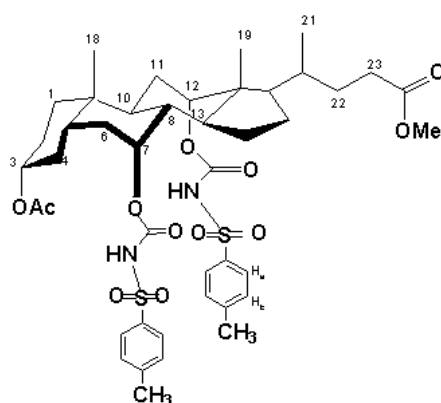
นำสารละลายรีเซบเตอร์ **S2** ปริมาตร 0.5 mL ใส่ลงในหลอด NMR นำไปวัดสเปกตรัมเริ่มต้นของรีเซบเตอร์ จากนั้นค่อยๆ เติมสารละลายของ GMP ปริมาตรเป็นไปตามตารางที่ 17 ลงไปในสารละลาย **S2** ในหลอด NMR ในทุกครั้งที่เติมนิวคลีโอไทด์จะนำสารผสมไปวัดสเปกตรัม NMR เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงไปของสัญญาณโปรตอนของรีเซบเตอร์ **S2**

ตารางที่ 17 ปริมาตรและจำนวน equivalent ของ GMP ที่เติมลงไปในรีเซปเตอร์ S2 สำหรับการไทเทรตด้วยเทคนิค ^1H – NMR

จุดที่	อัตราส่วนโดยโมล S2 : GMP	ปริมาตร GMP ที่เติม		ปริมาตรรวมของ สารละลาย (mL)
		mL	Equivalents	
1	1 : 0.0	0.000	0.0	0.500
2	1 : 0.1	0.005	0.1	0.505
3	1 : 0.2	0.010	0.2	0.510
4	1 : 0.3	0.015	0.3	0.515
5	1 : 0.4	0.020	0.4	0.520
6	1 : 0.5	0.025	0.5	0.525
7	1 : 0.6	0.030	0.6	0.530
8	1 : 0.7	0.035	0.7	0.535
9	1 : 0.8	0.040	0.8	0.540
10	1 : 1.0	0.050	1.0	0.545
11	1 : 1.5	0.075	1.5	0.575
12	1 : 2.0	0.100	2.0	0.600
13	1 : 3.0	0.150	3.0	0.650

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของรีเซปเตอร์ S1 ด้วยเทคนิค ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, Mass และ FT-IR



^1H -NMR (CDCl_3) δ = 8.61 (1H, bs, NH- carbamosulfonamide), 7.90 (4H, dd, J = 23, 8.6 Hz, aromatic H_a), 7.62 (1H, bs, NH-carbamosulfonamide), 7.39 (4H, dd, J = 24, 8.6 Hz, aromatic H_b), 5.01 (1H, bs, H₁₂), 4.85 (1H, bs, H₇), 4.52 (1H, m, H₃), 3.67 (3H, s,

COOCH₃), 2.44 (6H, d, J = 6 Hz, aromatic CH₃), 2.11 (3H, s, CH₃COO), 0.86 (1H, s, H₂₁), 0.60 (3H, s, H₁₉), 0.54 (3H, d, J = 6.8 Hz, H₁₈); ¹H-NMR (acetone-d₆) δ = 10.19 (1H, bs, NH- carbamosulfonamide), 7.92 (3H, t, J = 8.4 Hz, aromatic H_a), 7.77 (1H, d, J = 8.4 Hz, aromatic H_a), 7.45 (3H, dd, J = 8.0, 3.6 Hz, aromatic H_b), 7.36 (1H, d, J = 8.4 Hz, aromatic H_b), 6.55 (1H, bs, NH- carbamosulfonamide), 4.91 (1H, bs, H₁₂), 4.78 (1H, bs, H₇), 4.45 (1H, m, H₃), 3.64 (3H, s, COOCH₃), 2.46 (6H, d, J = 2 Hz, aromatic CH₃), 2.03 (3H, s, CH₃COO), 0.94 (1H, s, H₂₁), 0.68 (3H, s, H₁₉), 0.47 (3H, 2s, H₁₈)

¹³C-NMR (CDCl₃) δ = 12.05, 17.48, 21.73, 21.82, 22.39, 22.74, 25.28, 26.66, 27.28, 28.34, 30.67, 31.41, 34.43, 34.61, 34.85, 38.14, 40.73, 42.76, 45.05, 47.26, 51.66, 74.11, 74.27, 79.48, 126.64, 127.92, 128.31, 129.75, 129.91, 130.13, 136.10, 136.14, 145.51, 149.96, 150.46, 170.89, 174.45

FT-IR (KBr, cm⁻¹) ν = 3593, 3234, 2955, 2872, 1739, 1162

MS (ESI) m/z calcd for C₄₃H₅₈N₂O₁₂S₂ [M + Na]⁺ 881, found 881.273

การศึกษาการจับไอออนลบของรีเซปเตอร์ S1

การศึกษาการจับไอออนลบด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล

จากการทดลองศึกษาการจับกันระหว่างรีเซปเตอร์ S1 กับไอออนลบทั้ง 9 ชนิด คือ AcO⁻, BzO⁻, NO₃⁻, HSO₄⁻, CN⁻, ClO₄⁻, H₂PO₄⁻, OH⁻ และ F⁻ ด้วยการไทเทรตด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล โดยใช้ Acetonitrile เป็นตัวทำละลายพบว่า เมื่อทำการไทเทรตสารละลายไอออนลบที่แตกต่างกันไปลงในสารละลายรีเซปเตอร์ S1 จะเกิดการเปลี่ยนแปลงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่แตกต่างกัน 3 รูปแบบตามกลุ่มไอออนลบดังนี้

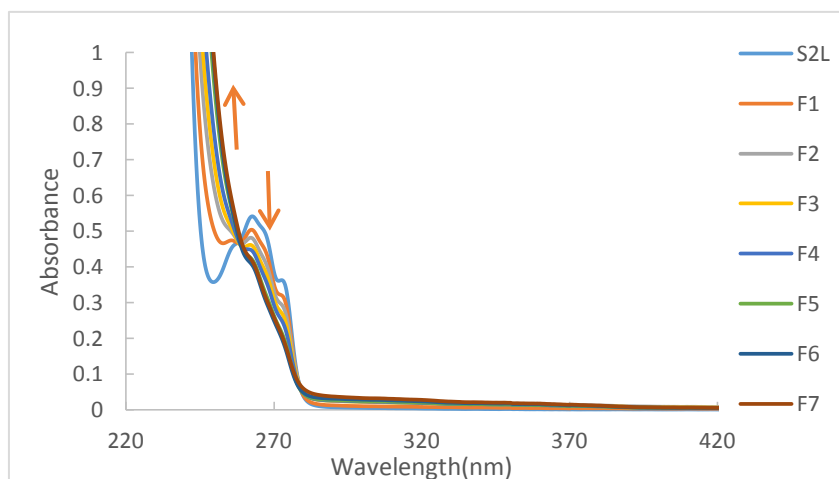
กลุ่ม 1 AcO⁻, CN⁻, H₂PO₄⁻, OH⁻ และ F⁻

กลุ่ม 2 BzO⁻

กลุ่ม 3 NO₃⁻, HSO₄⁻ และ ClO₄⁻

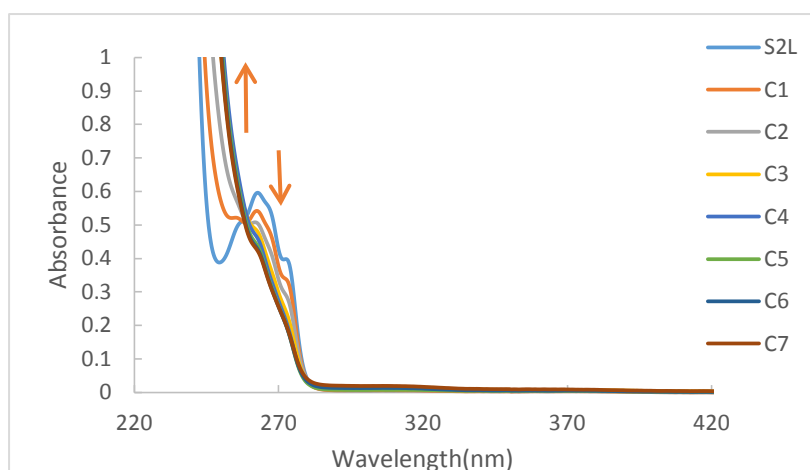
ผลการไทเทรตรีเซปเตอร์ S1 ด้วยไอออนลบกลุ่ม 1 คือ AcO⁻, CN⁻, H₂PO₄⁻, OH⁻ และ F⁻ จะให้การเปลี่ยนแปลงสเปกตรัมแสดงดังภาพ 14 ซึ่งเป็นผลของการไทเทรตกับ F⁻ ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) ของรีเซปเตอร์ S1 อยู่ที่ 263 nm เมื่อทำการเติมไอออนลบกลุ่ม 1 ลงไปจะทำให้สเปกตรัมการดูดกลืนแสงตำแหน่งนี้ลดลงอย่างต่อเนื่องในขณะเดียวกันพบการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนในช่วงความยาวคลื่นที่ต่ำกว่า 250 nm และพบการเกิด Isosbestic point ที่ 254 nm ได้อย่างชัดเจน การพบจุด Isosbestic บ่งชี้ให้ทราบว่าระบบมีการเกิดขึ้นของสารชนิดใหม่ที่เป็นเช่นนี้อาจจะเป็นผลมาจากการที่ไอออนลบกลุ่ม 1 มีความเป็นเบสที่แรงกว่าไอออนลบกลุ่มอื่นๆ เมื่อเกิดอันตรกิริยากับรีเซปเตอร์ ไอออนลบกลุ่ม 1 จะเข้าไปที่ binding site ของรีเซปเตอร์และไปดึงโปรตอนของหมู่ N-H คาร์

บาเมต แทนที่จะสร้างพันธะไฮโดรเจนกับรีเซปเตอร์ ดังนั้นโมเลกุล **S1** จึงเปลี่ยนไปอยู่ในรูป deprotonation form ซึ่งสอดคล้องกับข้อสันนิษฐานว่ามีการเกิดขึ้นของสปีชีส์ใหม่



ภาพ 14 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของรีเซปเตอร์ **S1** เมื่อทำการไทเทรตกับไอออนลบ F^- โดยใช้ Acetonitrile เป็นตัวทำละลาย

เพื่อเป็นการยืนยันการเกิด deprotonation ของ **S1** เมื่อเติมไอออนลบที่มีความเป็นเบสแรง จึงได้ทำการทดลองโดยไทเทรตกับ CN^- และ OH^- ซึ่งเป็นเบสที่แรงกว่า F^- ผลที่ได้คือการเปลี่ยนแปลงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของรีเซปเตอร์ **S1** เมื่อเติม CN^- (ดังภาพที่ 15) และ OH^- จะมีลักษณะที่เหมือนกับของ F^-

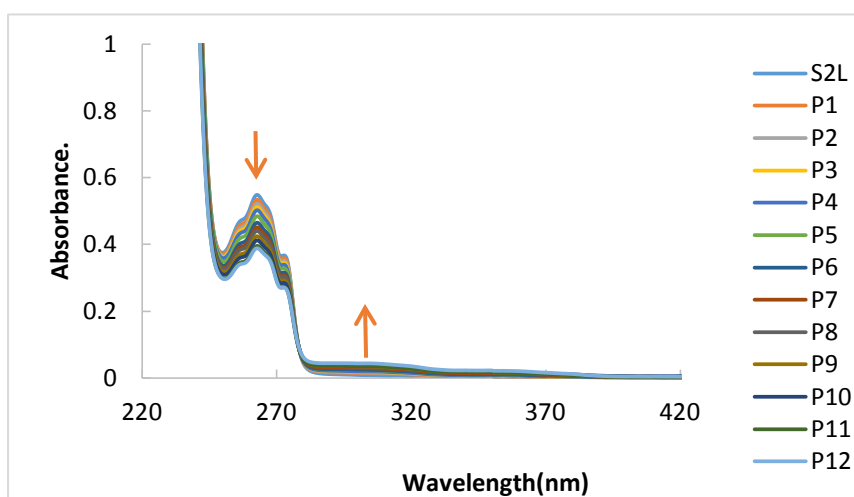


ภาพ 15 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของรีเซปเตอร์ **S1** เมื่อทำการไทเทรตกับไอออนลบ CN^- โดยใช้ Acetonitrile เป็นตัวทำละลาย

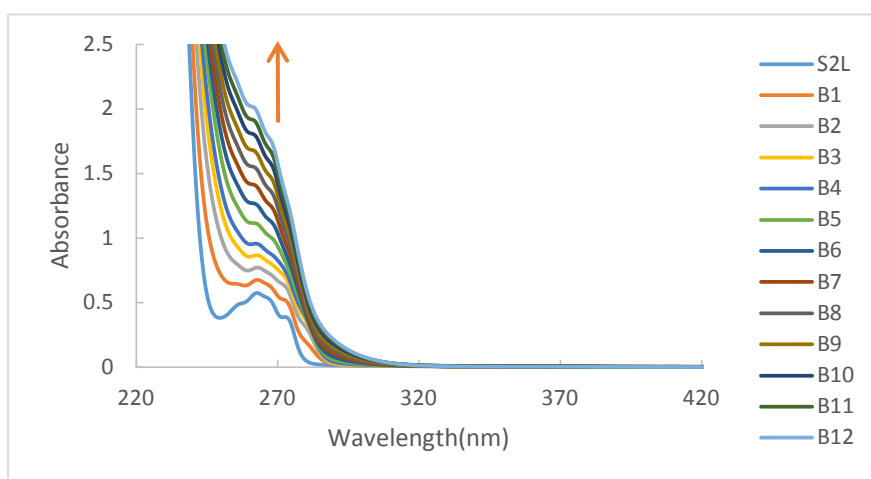
กรณีของไอออนลบกลุ่ม 2 คือ NO_3^- , HSO_4^- และ ClO_4^- จะพบการเปลี่ยนแปลงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ **S1** ในลักษณะแตกต่างจากการเติมไอออนลบกลุ่ม 1 ดังนั้น ค่าการดูดกลืนแสงของ

S1 ที่ 263 nm จะต่ำลงเรื่อยๆ เมื่อเพิ่มปริมาณไอออนลบลงไป และไม่พบการเกิดจุด Isosbestic ดังนั้นไอออนลบ NO_3^- , HSO_4^- และ ClO_4^- (ดังภาพที่ 16) น่าจะเกิดอันตรกิริยากับรีเซปเตอร์ในลักษณะที่ต่างกับ F^- และ CN^- นั่นคือ ไม่ทำให้เกิดการ deprotonation ของ N-H คาร์บาเมตแต่เป็นการเข้าไปเกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่คาร์บาเมตของ **S1**

ไอออนลบกลุ่ม 3 คือ BzO^- (ดังภาพที่ 17) เมื่อทำการเติมไอออนลบ BzO^- ลงไปในรีเซปเตอร์ **S1** จะไม่พบการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ 263 nm แต่กลับพบการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงเฉพาะของ BzO^-



ภาพ 16 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของรีเซปเตอร์ **S1** เมื่อทำการไทเทรตกับไอออนลบ ClO_4^- โดยใช้ Acetonitrile เป็นตัวทำละลาย



ภาพ 17 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของรีเซปเตอร์ **S1** เมื่อทำการไทเทรตกับไอออนลบ BzO^- โดยใช้ Acetonitrile เป็นตัวทำละลาย

การไทเทรตโดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลเมื่อนำมาคำนวณค่า bonding constant ($\log K$) ด้วย Benesi – Hilder brand method เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการจับกับไอออนลบ ผลการคำนวณแสดงดังตารางที่ 18 รีเซปเตอร์ **S1** มีความสามารถในการจับกับไอออนลบกลุ่มที่มีความเป็นเบสสูง (Strong basic anion) ได้ดีกว่า โดยไอออนลบ CN^- จะให้ค่า $\log K$ มากที่สุดแสดงว่า **S1** จับกับ CN^- ได้ดีที่สุด เนื่องจากเมื่อพิจารณาความเป็นเบสของไอออนลบทั้ง 9 ตัว พบว่าลำดับความเป็นเบสของไอออนลบเป็นดังนี้ $\text{OH}^- > \text{CN}^- > \text{OAc}^- > \text{F}^- > \text{BzO}^- > \text{H}_2\text{SO}_4^- > \text{NO}_3^- > \text{HSO}_4^- > \text{Cl}^- > \text{ClO}_4^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$ ไอออนลบที่เป็นเบสแรงที่สุดคือ OH^- และ CN^- เมื่อเข้าไปจับกับรีเซปเตอร์ตรงตำแหน่ง NH คาร์บาเมตซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีความกรดเล็กน้อย (acidic proton) ไอออนลบที่มีความเป็นเบสสูงจะสามารถเข้าไปจับกับ NH ได้อย่างแข็งแกร่งกว่า ส่วนกรณีของไอออนลบอื่นๆ AcO^- , BzO^- , NO_3^- , HSO_4^- , ClO_4^- , H_2PO_4^- และ F^- ให้ค่า binding constant ที่ต่ำกว่า OH^- และ CN^- เนื่องจากค่าความเป็นเบสต่ำกว่าและมีขนาดใหญ่กว่า จึงทำให้ไม่เหมาะสมในการเข้าไปเกิดพันธะกับ NH คาร์บาเมต

ตาราง 18 ค่า Binding constant ของรีเซปเตอร์ **S1** คำนวณจากวิธี Benesi-hildebrand (1:1 stoichiometry) เมื่อศึกษาการจับไอออนลบทั้ง 9 ชนิดด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล

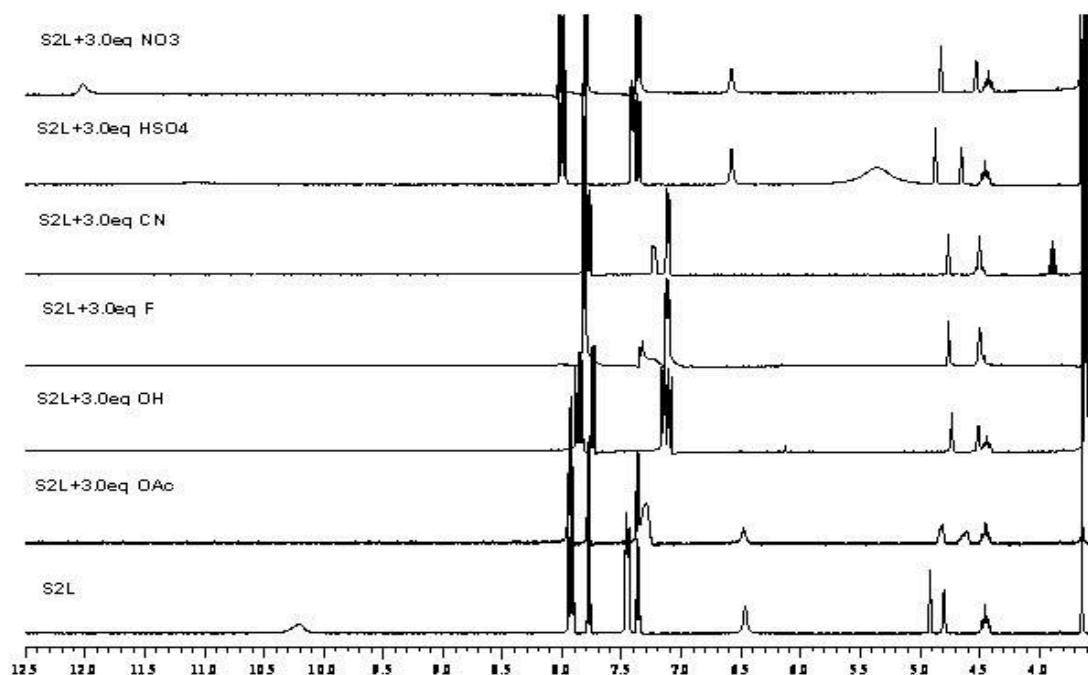
ไอออนลบ	Binding constant ($\log K$)
AcO^-	5.16
BzO^-	4.11
NO_3^-	4.24
HSO_4^-	4.62
CN^-	6.08
ClO_4^-	5.36
H_2PO_4^-	5.43
OH^-	5.95
F^-	5.57

การศึกษาการจับไอออนลบด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$

การศึกษาการเปลี่ยนแปลง $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของรีเซปเตอร์ **S1** ภายหลังการเติมไอออนลบ 9 ชนิด คือ AcO^- , BzO^- , NO_3^- , HSO_4^- , CN^- , ClO_4^- , H_2PO_4^- , OH^- และ F^- โดยใช้ Acetone $-d_6$ เป็นตัวทำละลาย ผลที่ได้จากภาพที่ 18 จะสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณโปรตอนตำแหน่ง 7.00-8.00 ppm และ 4.50-5.00 ppm ซึ่งเป็นสัญญาณของอะโรมาติกโปรตอน (H_a , H_b)

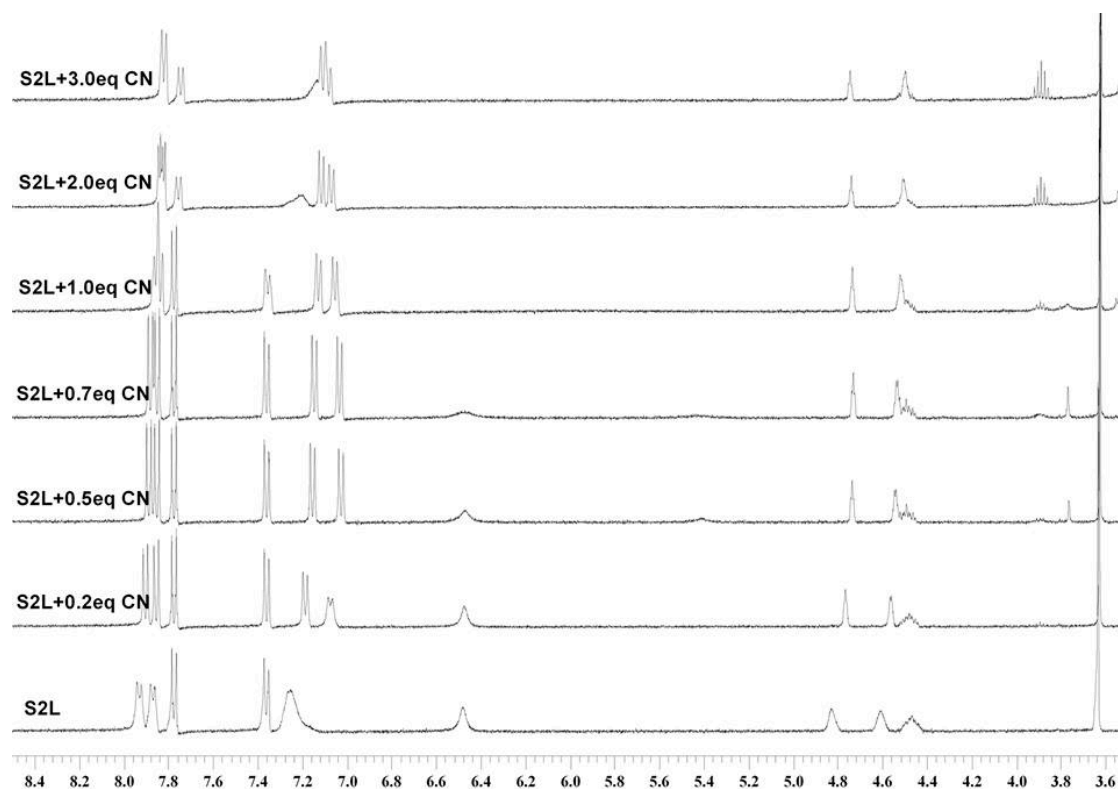
และอะลิฟาติกโปรตอน (H_3 , H_7 , H_{12}) ตามลำดับ โปรตอนเหล่านี้เป็นโปรตอนที่อยู่ในตำแหน่งใกล้ binding site (N-H คาร์บาเมต) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ใช้ในการจับกับไอออนลบ ดังนั้นโปรตอนเหล่านี้จะเกิดการเปลี่ยนแปลงสัญญาณได้ชัดมากกว่าโปรตอนตำแหน่งอื่น เมื่อพิจารณาสัญญาณอะโรมาติกโปรตอนของ **S1** จะพบว่าตำแหน่งสัญญาณของ H_a จะปรากฏที่ ppm สูงกว่า เนื่องจากเป็นโปรตอนที่อยู่ใกล้หมู่ดึงอิเล็กตรอนนั่นคือหมู่ซัลโฟนิล ทำให้โปรตอน H_a มีความหนาแน่นของอิเล็กตรอนน้อย ส่วนสัญญาณของ H_b ซึ่งเป็นอะโรมาติกโปรตอนที่อยู่ใกล้หมู่ให้อิเล็กตรอนนั่นคือหมู่ CH_3 จะมีความหนาแน่นของอิเล็กตรอนมากกว่าจึงเห็นสัญญาณปรากฏที่ ppm ต่ำ ส่วนสัญญาณของ NH-คาร์บาเมตโปรตอนจะปรากฏที่ 2 ตำแหน่งคือ 10.19 และ 6.45 ppm การที่ NH โปรตอนปรากฏที่ต่างกัน เนื่องจากการเกิด intramolecular hydrogen bond ระหว่างหมู่ NH และหมู่คาร์บาไมลของ binding site ทั้งสอง ดังนั้นจึงทำให้ NH ตัวที่เกิดพันธะไฮโดรเจนจะปรากฏที่ตำแหน่ง ppm ที่สูงกว่า

การเปลี่ยนแปลงสัญญาณโปรตอนของ **S1** เมื่อเติมไอออนลบชนิดต่างๆ จำนวน 3 equivalent (ภาพที่ 18) จะพบการหายไปของ NH โปรตอนที่ตำแหน่ง 10.19 ppm เมื่อเติมไอออนลบกลุ่มที่เป็นเบสแก่ (OH^- , CN^- , F^- , OAc^-) แสดงถึงการเกิด deprotonation ของ NH โปรตอนโดยไอออนลบที่เป็นเบสแก่ ส่วนไอออนลบกลุ่มอื่นๆ (HSO_4^- , NO_3^-) จะพบแค่การเลื่อนไปทาง downfield แสดงถึงการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างไอออนลบกับหมู่ NH-คาร์บาเมต



ภาพ 18 1H -NMR สเปกตรัมของรีเซปเตอร์ **S1** เมื่อทำการเติมไอออนลบชนิดต่างๆ จำนวน 3 equivalent โดยใช้ Acetone $-d_6$ เป็นตัวทำละลาย

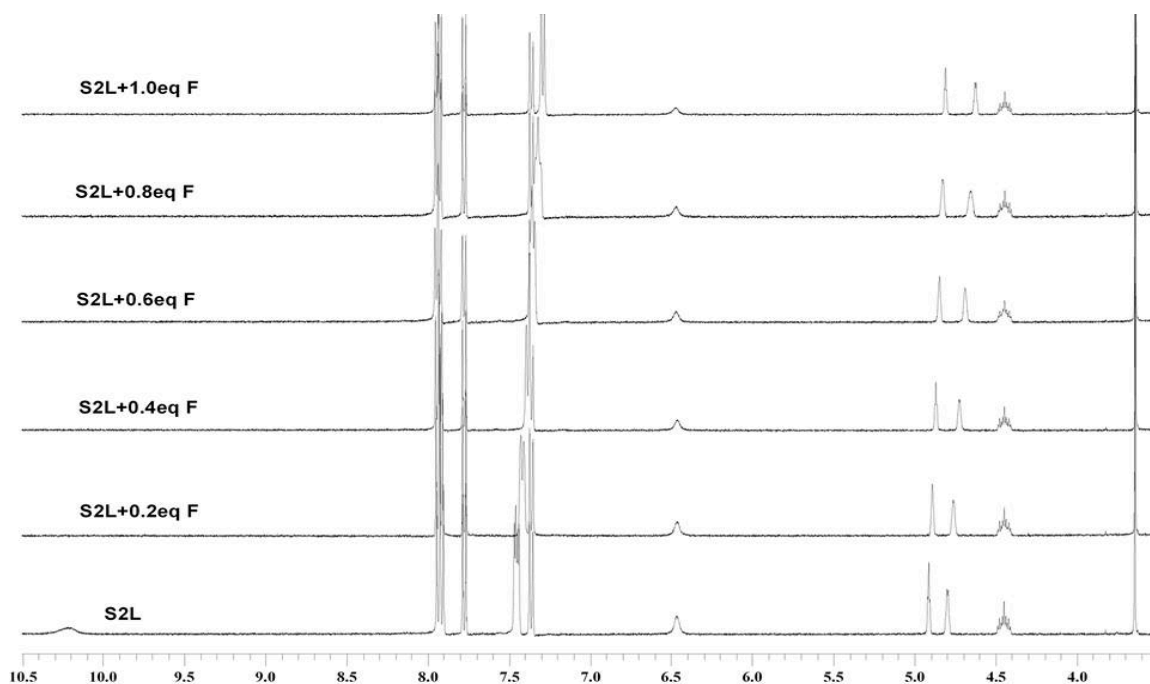
ผลการไทเทรตรีเซปเตอร์ **S1** ด้วยไอออนลบ CN^- (ภาพที่ 19) พบว่านอกจากจะเกิดการหายของหมู่ NH คาร์บาเมต ยังพบการเลื่อนตำแหน่งของโปรตอน H_7 , H_{12} , H_a และ H_b ไปทาง upfield (ppm ต่ำลง) การเลื่อนตำแหน่งไปทาง upfield ของโปรตอนตำแหน่งต่างๆ น่าจะเป็นผลมาจากประจุลบที่เกิดขึ้นที่หมู่ NH คาร์บาเมตภายหลังการเกิด deprotonation ทำให้เกิดการบดบัง (Shielding effect) โปรตอนอื่นๆ ที่อยู่ใกล้เคียง นอกจากนี้ CN^- เป็นไอออนลบชนิดเดียวที่ทำให้ NH โปรตอนทั้งสองตำแหน่ง (10.19 ppm และ 6.45 ppm) หายไปภายหลังการเติม CN^- 1.0 equivalent เมื่อเปรียบเทียบกับกรณี F^- (ภาพที่ 20) ที่พบการหายไปของ NH โปรตอนเพียงตำแหน่งเดียว นอกจากนี้ยังพบการเลื่อนโปรตอน H_3 ไปที่ upfield อย่างเห็นได้ชัด ผลที่เกิดขึ้นอธิบายได้จากการที่ CN^- มีความเป็นเบสแรงจึงสามารถ deprotonation หมู่คาร์บาเมตได้อย่างรวดเร็ว และการที่ CN^- มีรูปร่างเป็นเส้นตรงจึงทำให้ CN^- เข้าไปใกล้โปรตอน H_3 และเกิดการบดบังขึ้น



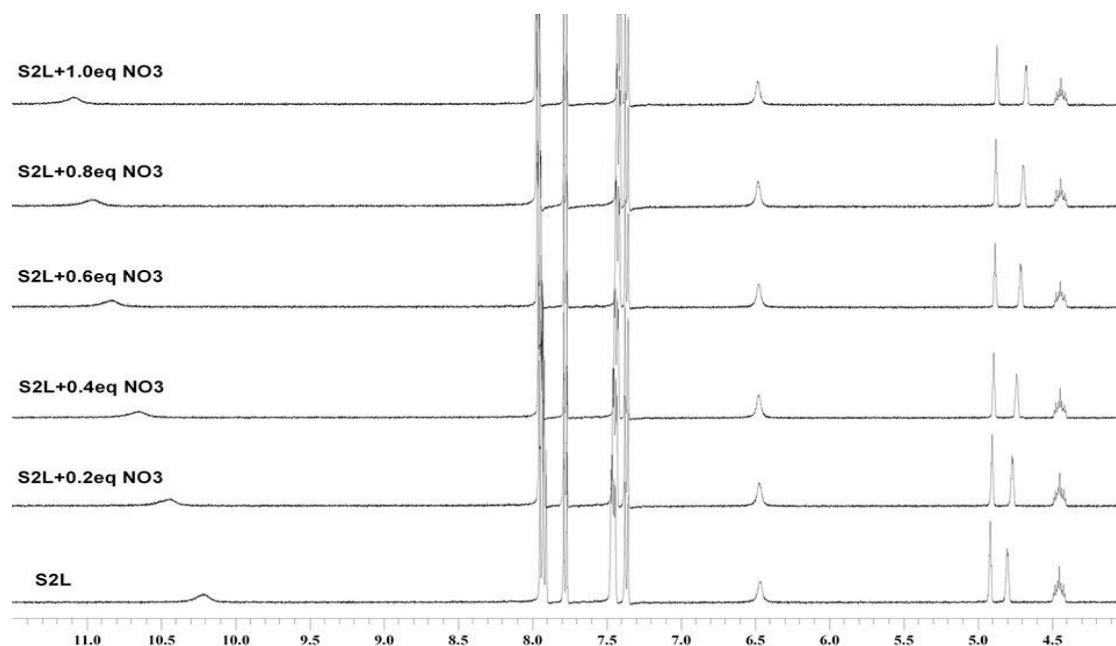
ภาพ 19 ^1H -NMR สเปกตรัมของรีเซปเตอร์ **S1** เมื่อทำการไทเทรตกับไอออนลบ CN^- (0-3.0 equivalent) โดยใช้ Acetone- d_6 เป็นตัวทำละลาย

กรณีของการไทเทรตกับไอออนลบ F^- (ภาพที่ 20) พบการเลื่อนตำแหน่งของสัญญาณโปรตอนในลักษณะเดียวกับ CN^- นั่นคือการเติม F^- จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสัญญาณโปรตอนที่ H_7 , H_{12} , H_a และ H_b ไปทาง upfield ส่วนผลการไทเทรตกับไอออน NO_3^- (ภาพที่ 21) ตั้งแต่ 0-1.0 equivalent จะพบแค่การเลื่อนไปทาง downfield ของ NH โปรตอนที่ 10.19 ppm และการเลื่อน

ตำแหน่งโปรตอนไปทาง upfield ของ H_7 เท่านั้น ผลดังกล่าวบอกให้รู้ว่า NO_3^- ซึ่งเป็นเบสอ่อนจะเข้าไปเกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ NH คาร์บาเมตมากกว่าจะเป็นการ deprotonation

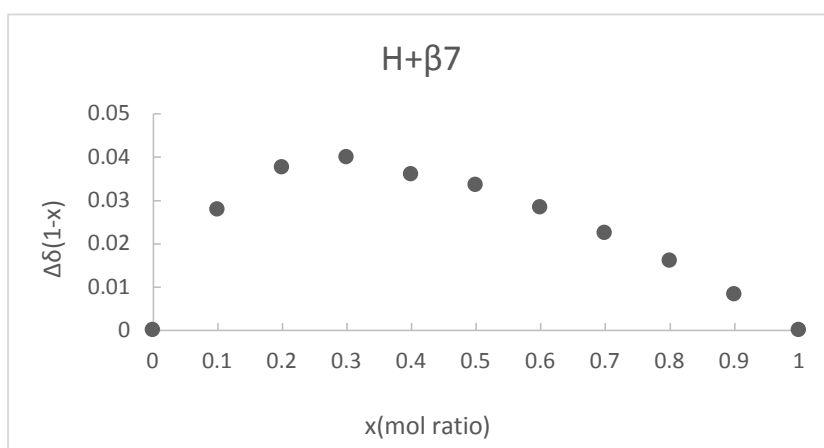


ภาพ 20 ^1H -NMR สเปกตรัมของรีเซปเตอร์ **S1** เมื่อทำการไทเทรตกับไอออนลบ F^- (0-1.0 equivalent) โดยใช้ Acetone- d_6 เป็นตัวทำละลาย

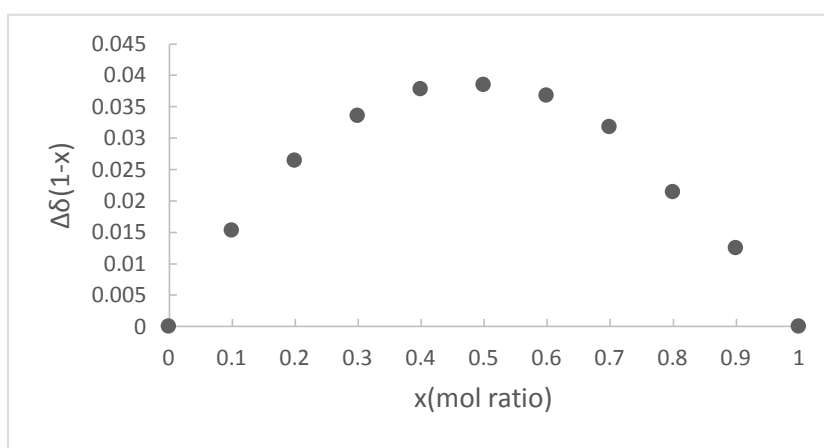


ภาพ 21 ^1H -NMR สเปกตรัมของรีเซปเตอร์ **S1** เมื่อทำการไทเทรตกับไอออนลบ NO_3^- (0-1.0 equivalent) โดยใช้ Acetone- d_6 เป็นตัวทำละลาย

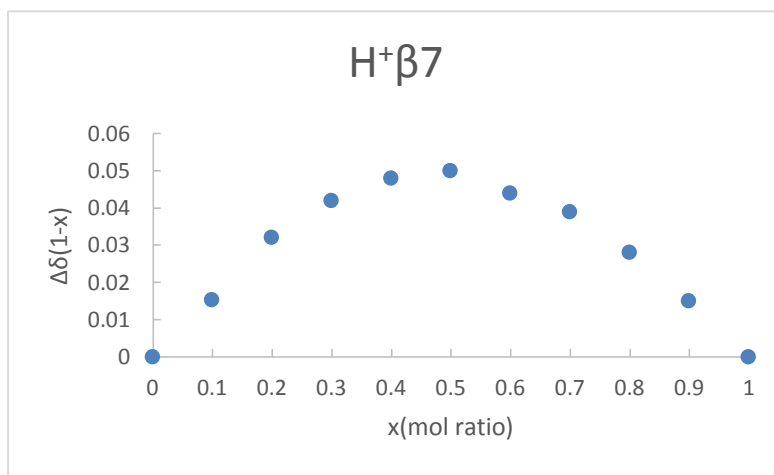
ผลจากการไทเทรตกับไอออนลบด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ ถูกนำมาใช้ในการหาอัตราส่วนการจับกับไอออนลบ (Stoichiometry) ด้วยเทคนิค Job's method โดยการติดตามโปรตอนตำแหน่ง H_7 จะได้กราฟการหาอัตราส่วนระหว่าง **S1** กับไอออนลบ CN^- แสดงดังภาพที่ 22 จากกราฟที่ได้พบว่า จุดสูงสุดของกราฟตัดแกน x ที่ตำแหน่ง $x = 0.33$ แสดงว่าอัตราส่วนการจับกันของ **S1** กับไอออนลบ CN^- เป็นแบบ 2:1 ส่วนกราฟ Job's plot ของ **S1** กับไอออน NO_3^- พบจุดสูงสุดของกราฟตัดแกน x ที่ตำแหน่ง $x = 0.5$ แสดงว่าอัตราส่วนการจับกันเป็นแบบ 1:1 (ภาพที่ 23) ส่วนไอออนลบชนิดอื่นๆ พบว่าได้อัตราส่วนเป็นแบบ 1:1 (ภาพที่ 24 – 25)



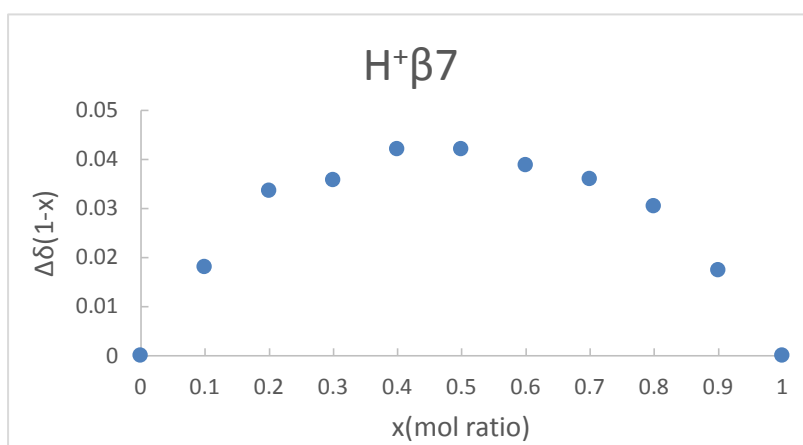
ภาพ 22 กราฟ Job's plot สำหรับการหาอัตราส่วนการจับกันระหว่าง **S1** กับ CN^- โดยใช้ข้อมูลการไทเทรตจากเทคนิค $^1\text{H-NMR}$



ภาพ 23 กราฟ Job's plot สำหรับการหาอัตราส่วนการจับกันระหว่าง **S1** กับ NO_3^- โดยใช้ข้อมูลการไทเทรตจากเทคนิค $^1\text{H-NMR}$



ภาพ 24 กราฟ Job's plot สำหรับการหาอัตราส่วนการจับกันระหว่าง **S1** กับ F^- โดยใช้ข้อมูลการไทเทรตจากเทคนิค 1H -NMR

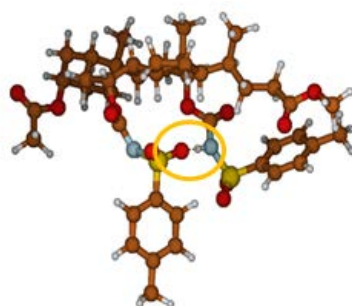


ภาพ 25 กราฟ Job's plot สำหรับการหาอัตราส่วนการจับกันระหว่าง **S1** กับ AcO^- โดยใช้ข้อมูลการไทเทรตจากเทคนิค 1H -NMR

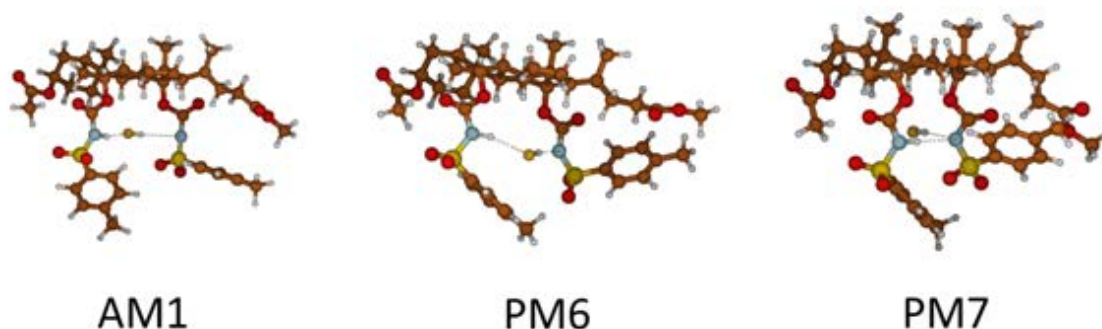
ศึกษาการจับกับไอออนลบด้วยการจำลองโมเลกุลทางคอมพิวเตอร์

โครงสร้างที่เหมาะสมของรีเซพเตอร์ **S1** แสดงดังภาพ 26 ซึ่งจะพบการเกิดพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุลรีเซพเตอร์ระหว่างหมู่ซัลโฟนาไมด์ทั้งสอง ($S=O \cdots H-N$) ส่วนโครงสร้างของ complex ระหว่าง **S1** กับไอออนลบ (ภาพที่ 27) พบว่าหมู่ซัลโฟนาไมด์ทั้งสองจะถูกใช้การเกิดพันธะไฮโดรเจนกับไอออนลบที่เข้าไปอยู่ตรงกลางระหว่างหน่วยจับในโมเลกุลรีเซพเตอร์ นอกจากนี้ กรณีของ F^- พบว่าการจับกับฟลูออไรด์จะทำให้เกิดหลุดของโปรตอนมาจาก N-H ของหมู่คาร์บาเมตหนึ่งหมู่ ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับสมมุติฐานที่ได้จากผลการทดลองจริงที่ว่าไอออนลบที่มีความเป็นเบสสูงจะสามารถเข้าไปดึงโปรตอนจากหมู่ N-H ของหมู่คาร์บาเมต ส่วนการจับกับไอออนลบเฮไลด์อื่นๆ จะปรากฏแค่การเกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ N-H คาร์บาเมตเท่านั้น

ข้อมูลจากตาราง 19 แสดงค่าพลังงานแรงยึดเหนี่ยวใน complex กับไอออนลบแต่ละชนิด ผลการคำนวณพบว่าค่าพลังงานที่ได้จาก AM1 method จะให้ผลการคำนวณที่ไม่สอดคล้องกับผลการคำนวณจาก PM6 และ PM7 method และเมื่อนำค่าพลังงานมาหาสัดส่วนเพื่อดูความเลือกจำเพาะในการจับกับไอออนลบพบว่า complex กับ F^- จะให้ค่าสัดส่วนสูงสุด นั่นแสดงว่าการจับกับ F^- จะได้ complex ที่เสถียรที่สุด และความเสถียรจะลดลงไปเรื่อยๆ เมื่อขนาดของไอออนลบเฮไลด์เพิ่มขึ้น ผลดังกล่าวสอดคล้องกับผลจากการทดลองด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลซึ่งพบว่า รีเซปเตอร์ S1 เมื่อจับกับ F^- จะให้ค่า binding constant ที่สูงกว่าเฮไลด์ไอออนอื่นๆ



ภาพ 26 โครงสร้างของรีเซปเตอร์ S1 ที่ได้จากการคำนวณด้วยโปรแกรม semi-empirical โดยใช้ PM7 method, ตรงที่วงกลมไว้แสดงตำแหน่งที่เกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ซัลโฟนาไมด์ภายในโมเลกุลรีเซปเตอร์

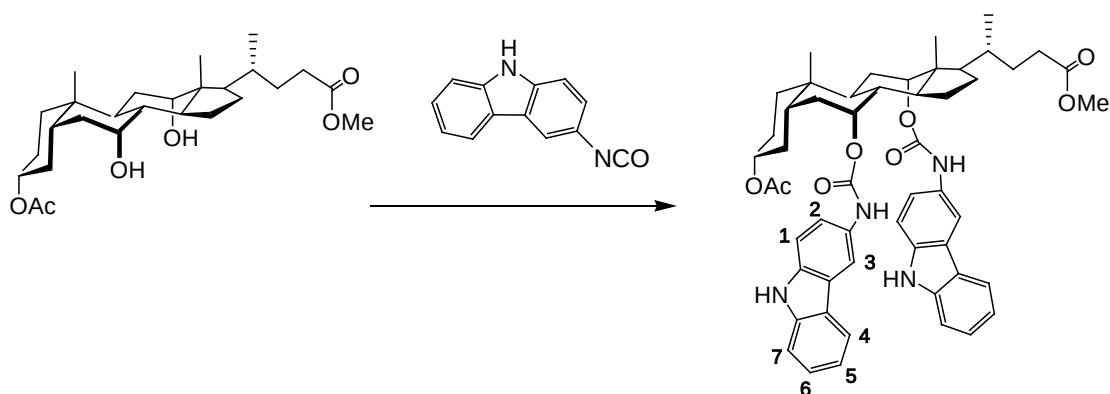


ภาพ 27 โครงสร้างของ complex ระหว่าง S1 กับฟลูออไรด์ที่ได้จากการคำนวณด้วยโปรแกรม semi-empirical โดยใช้ AM1, PM6, PM7 method ซึ่งทั้งสามโครงสร้างจะพบการหลุดโปรตอนที่หมู่ NH-คาร์บาเมต

ตารางที่ 19 ค่าพลังงานแรงยึดเหนี่ยว และค่าความจำเพาะในการจับกับไอออนลบที่ได้จากการคำนวณด้วยโปรแกรม semi-empirical โดยใช้ AM1, PM6, PM7 method

Complexes	Interaction energy (kJ/mol)			Selectivity		
	AM1	PM6	PM7	AM1	PM6	PM7
S1-F	-575.07	-260.68	-279.50	1.00	1.00	1.00
S1-Cl	-194.98	-146.76	-147.74	0.34	0.56	0.53
S1-Br	-184.05	-164.77	-84.00	0.32	0.63	0.30
S1-I	-160.44	-129.41	-63.99	0.28	0.50	0.23

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของรีเซปเตอร์ S2 ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, Mass และ FT-IR



รีเซปเตอร์ S2 สังเคราะห์จากปฏิกิริยาการ coupling ระหว่างไอโซไซยานาตคาร์บาโซลกับคลอลิกเอซิดโดยมี K_2CO_3 ทำหน้าที่เป็นเบสเพื่อช่วยในการเพิ่มความว่องไวของหมู่ $-\text{OH}$ ทั้งสองหมู่ของคลอลิกเอซิดให้เข้าทำปฏิกิริยากับไอโซไซยานาต และเกิดเป็นหมู่คาร์บาเมตจะได้รีเซปเตอร์ S2 เป็นของแข็งสีขาว (0.22 g, 31.4% yield, $R_f = 0.74$ ในระบบตัวทำละลาย Hexane : Ethyl acetate = 3:1)

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ = 11.10 (bs, 2H; NH-carbazole), 9.31, 9.25 (two singlet, 2H, NH-carbamate), 8.27 (s, 2H, H_3 -carbazole), 8.01 (d, 2H, $J = 7.6$ Hz, H_2 -carbazole), 7.51 (d, 2H, $J = 7.9$ Hz, H_1 -carbazole), 7.40 (m, 4H, H_4 , H_7 – carbazole), 7.16 (broad, 2H, H_6 -carbazole), 7.11 (broad, 2H, H_5 -carbazole), 4.95 (s, 1H, $12\beta\text{-H}$), 4.90 (m, 1H, $7\beta\text{-H}$), 4.44 (m, 1H, $3\beta\text{-H}$), 3.52 (s, 3H, COOCH_3), 0.97 (s, 3H, 19-H_3), 0.86 (bs, 3H, 21-H_3), 0.74 (s, 3H, 18-H_3)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ = 0.95 (s, 3H; 18-H_3), 1.086 (s, 3H; 19-H_3), 1.133 (s, 3H; 21-H_3), 1.646 (s, 3H, CH_3COO), 3.624 (s, 3H; COOCH_3), 4.62 (m, 1H; $3\beta\text{-H}$), 4.99 (bs,

1H; 7 β -H), 5.14 (bs, 1H; 12 β -H), 6.88 (bs, 1H; NH-carbamate), 7.20 (m, 2H; H₅-carbazole), 7.38 (m, 8H; H₁, H₄, H₆, H₇-carbazole), 8.07 (m, 2H; H₂-carbazole), 8.10 (bs, 2H, H₃-carbazole), 8.20 (bs, 1H; NH-carbamate)

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ = 12.31, 17.62, 21.38, 22.50, 22.97, 25.90, 26.95, 27.23, 29.07, 30.79, 30.97, 31.55, 34.41, 34.72, 38.05, 40.92, 43.68, 45.39, 47.45, 51.50, 74.26, 71.84, 76.37, 77.23, 110.63, 110.80, 119.46, 120.45, 123.07, 123.66, 126.16, 130.09, 136.46, 140.18, 154.03, 170.44, 174.68

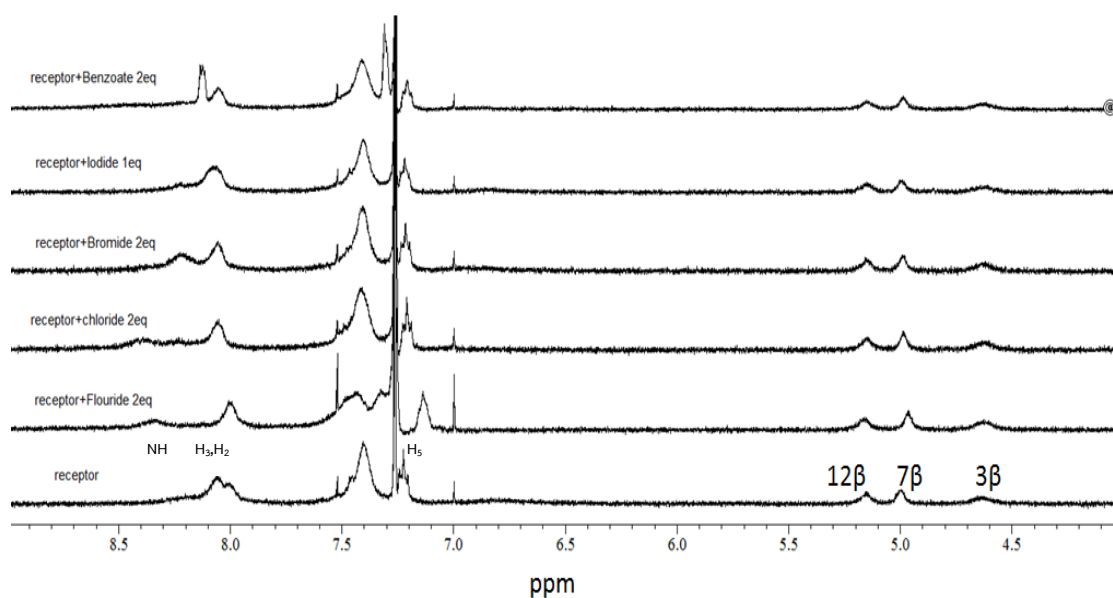
FT-IR (KBr, cm⁻¹) ν = 3397 (N-H stretching), 2943 (alkane C-H stretching), 1704 (C=O stretching), 1496 (C-H bending), 1222 (C-N stretching)

Mass (ESI) : m/z for C₅₃H₆₀N₄O₈ = 903.42 (M+Na⁺)

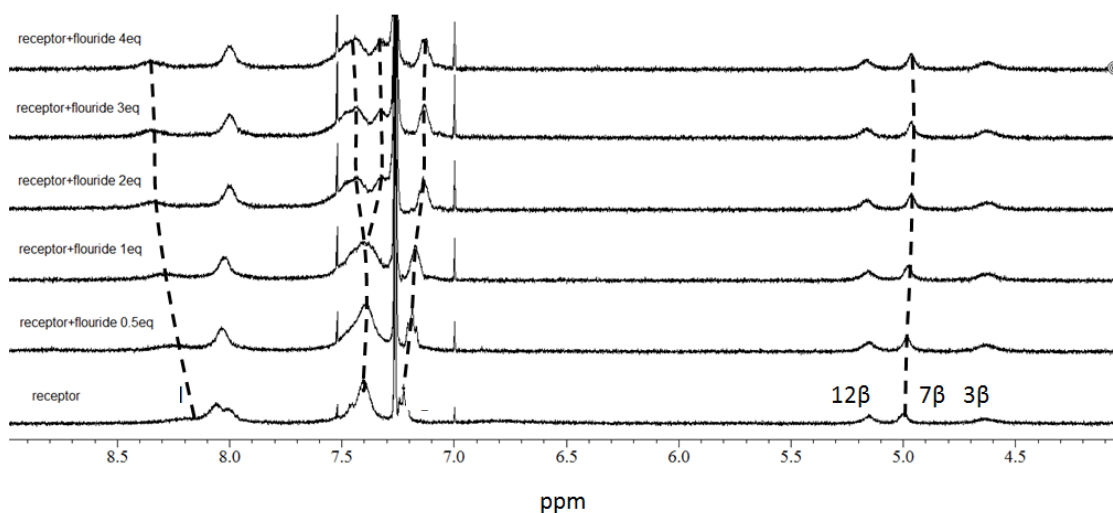
การศึกษาการจับกับไอออนลบของโมเลกุลรีเซปเตอร์ S2

การศึกษาความเลือกจำเพาะในการจับกับไอออนลบโดยใช้เทคนิค ¹H-NMR

จากการศึกษาการจับกับไอออนลบ 5 ชนิดคือ F⁻, Cl⁻, Br⁻, I⁻ และ BzO⁻ โดยใช้ CDCl₃ เป็นตัวทำละลายด้วยเทคนิค ¹H-NMR titration พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงสัญญาณโปรตอนของรีเซปเตอร์ S2 เมื่อมีการเติมไอออนลบลงไป (ภาพที่ 28) ดังนั้นคือการเลื่อนตำแหน่งของสัญญาณโปรตอนที่ค่า chemical shift 4.50-5.20 ppm ซึ่งเป็นสัญญาณของอะลิฟาติกโปรตอนของคลอกลีเอสิต (3 β , 7 β และ 12 β) และค่า chemical shift ที่ 7.00-8.50 ppm ซึ่งเป็นสัญญาณโปรตอนของวงอะโรมาติกของหมู่คาร์บาโซล (H₁-H₇) โดยที่ตำแหน่งโปรตอนที่เกิดการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเป็นตำแหน่งของโปรตอนที่อยู่ใกล้ binding site (NH คาร์บาเมต) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ใช้ในการจับกับไอออนลบ ดังนั้นเมื่อทำการเติมไอออนลบมากขึ้นในการไทเทรตจะทำให้การเปลี่ยนสัญญาณโปรตอนมากขึ้นและไอออนลบที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสัญญาณมากที่สุดคือ F⁻



ภาพ 28 ^1H -NMR สเปกตรัมของรีเซปเตอร์ **S2** (2.5×10^{-3} M) เมื่อทำการไทเทรตด้วยไอออนลบชนิดต่างๆ (2.0 equivalent) โดยใช้ CDCl_3 เป็นตัวทำละลาย



ภาพ 29 ^1H -NMR สเปกตรัมของรีเซปเตอร์ **S2** (2.5×10^{-3} M) เมื่อทำการไทเทรตด้วยไอออนลบ F^- (0-4 equivalents) โดยใช้ CDCl_3 เป็นตัวทำละลาย

การเติมไอออนลบ F^- (ภาพ 29) จะทำให้เกิดการเลื่อนตำแหน่งของ NH-โปรตอนไปทาง downfield ส่วนสัญญาณที่ตำแหน่ง 8 ppm ของโปรตอน H_3 จะเลื่อนไปทาง upfield และเกิดการรวมกับโปรตอน H_2 เป็นพีคเดียว จากนั้นสัญญาณเลื่อนไปทาง upfield ส่วนโปรตอน $\text{H}_1, \text{H}_4, \text{H}_{6-7}$ ที่ตำแหน่ง 7.38 ppm พบเกิดการแยกของสัญญาณออกเป็น 2 พีค โดยหนึ่งพีคเลื่อนไปทาง downfield และอีกหนึ่งพีคเลื่อนไปทาง upfield ส่วนสัญญาณโปรตอน H_5 และ 7β จะเกิดการเลื่อนไปทาง upfield กรณีการเติมไอออนลบ $\text{Cl}^-, \text{Br}^-, \text{I}^-$ พบการเปลี่ยนสัญญาณที่คล้ายคลึงกับ

ของ F^- แต่การเลื่อนตำแหน่งเกิดน้อยกว่า นั่นคือพบการเลื่อน NH-คาร์บาเมตไปทาง downfield และสัญญาณของโปรตอน H_5 เลื่อนไปทาง upfield แต่ไม่พบการแยกสัญญาณที่ตำแหน่ง 7.38 ppm

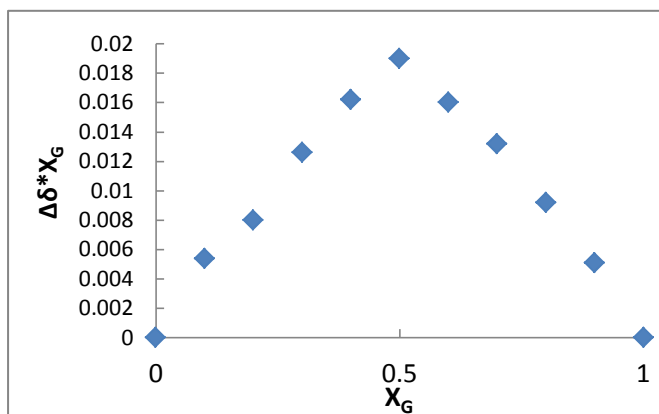
ข้อมูลจากการไทเทรตด้วยเทคนิค 1H -NMR ทำให้ทราบว่าไอออนลบที่เข้าไปเกิดอันตรกิริยากับ **S2** จะเข้าไปเกิดอันตรกิริยาที่ตำแหน่ง NH ของหมู่คาร์บาเมต โดยเกิดผ่านพันธะไฮโดรเจน ยืนยันได้จากพบการเลื่อนสัญญาณโปรตอนของ NH ที่หมู่คาร์บาเมตไปทาง downfield เมื่อนำข้อมูลจากการไทเทรตไปคำนวณค่า binding constant ($\log K$) เพื่อหาความสามารถในการจับกับไอออนลบ ผลการคำนวณแสดงดังตารางที่ 20 ซึ่งผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า **S2** จับกับไอออนลบได้อย่างไม่มีความจำเพาะเจาะจงเพราะให้ค่า $\log K$ ที่ใกล้เคียงกัน

ตาราง 20 ค่า Binding constant ของ **S2** กับไอออนลบคำนวณจากข้อมูล 1H -NMR titration

ไอออนลบ	Binding constant ($\log K$)
Fluoride	2.11
Chloride	1.26
Bromide	2.23
Iodide	#
Benzoate	2.54

คือ ไม่สามารถคำนวณได้

นอกจากนี้การหาอัตราส่วนการจับกันระหว่างโฮสต์และเกสต์ (stoichiometry) ด้วยเทคนิค Job's plot จากข้อมูลการทำ 1H -NMR titration โดยการติดตามโปรตอนตำแหน่ง H_5 พบว่าได้กราฟของ Job's plot ดังภาพ 30 จากกราฟที่ได้พบว่าจุดสูงสุดของกราฟตัดแกน X ที่ตำแหน่ง $X = 0.5$ แสดงว่าอัตราส่วนการจับกันระหว่างรีเซปเตอร์ **S2** กับไอออนลบเป็นแบบ 1 : 1 นอกจากนี้การหา stoichiometry ด้วยเทคนิค Job's plot ในกรณีของ Cl^- และ BzO^- จะได้ลักษณะของกราฟคล้ายของ F^- นั้นแสดงว่า Cl^- และ BzO^- มีอัตราส่วนการจับกันระหว่างรีเซปเตอร์กับเกสต์เป็น 1:1 ส่วน Br^- และ I^- ข้อมูลจากการไทเทรตไม่สามารถนำมาหาอัตราส่วนในการจับกับ **S2** แต่เนื่องจาก Br^- และ I^- มีรูปร่างโมเลกุลเหมือน F^- และ Cl^- จึงน่าจะมีอัตราส่วนในการจับกันเหมือนกัน (ภาคผนวก)

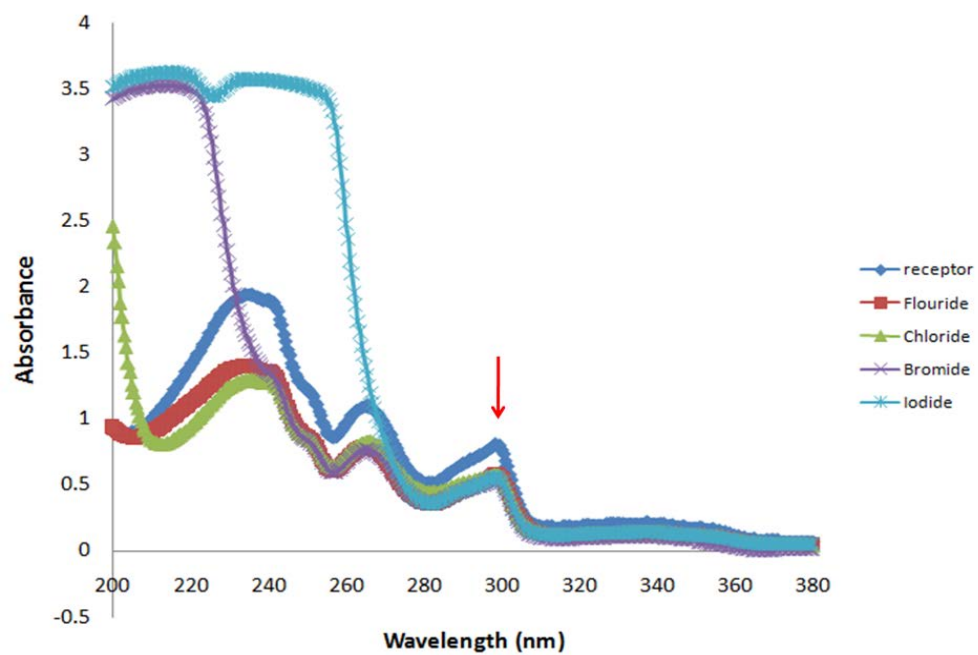


ภาพ 30 กราฟ Job's plot จากการติดตามสัญญาณโปรตอน H_5 ของ **S2** เมื่อทำการไทเทรตด้วยไอออนลบ F^-

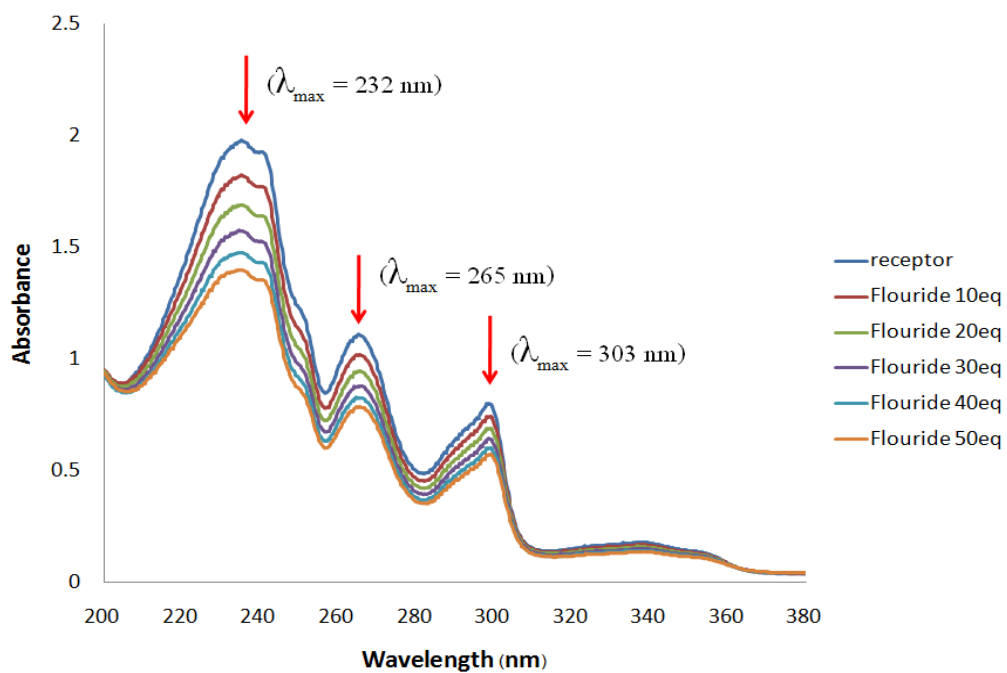
การศึกษาความเลือกจำเพาะในการจับไอออนลบโดยใช้วิธี-วิลเลียม

จากการศึกษาการจับกันระหว่างรีเซปเตอร์ **S2** กับไอออนลบกลุ่มเฮไลต์ F^- , Cl^- , Br^- และ I^- โดยใช้ acetonitrile เป็นตัวทำละลาย พบว่าเมื่อทำการไทเทรตสารละลายไอออนลบที่แตกต่างกันลงในสารละลายรีเซปเตอร์ **S2** จะทำให้สเปกตรัมการดูดกลืนแสงเกิดการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างกันดังภาพ 31

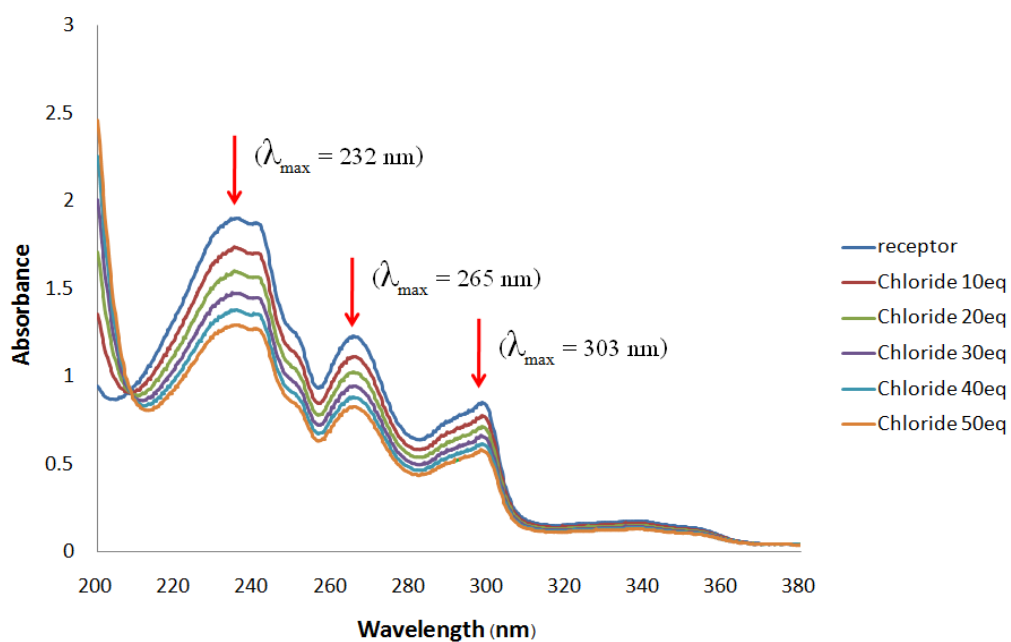
ผลการไทเทรต **S2** กับไอออนลบ F^- , Cl^- , Br^- และ I^- จะพบการเปลี่ยนแปลงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงดังนี้ การเติม F^- จะทำให้สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ **S2** ลดลงอย่างต่อเนื่องที่ทุกๆ ความยาวคลื่น (ภาพ 32) ส่วนการเติม Cl^- , Br^- และ I^- จะพบการเพิ่มขึ้นและการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงที่บางความยาวคลื่นและพบจุด Isosbestic โดยที่ Cl^- จะมีการลดลงของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น (λ_{max}) 235, 265 และ 303 nm โดยจะพบการเกิด Isosbestic point ที่ความยาวคลื่น 208 nm (ภาพ 33) ส่วนกรณีของ Br^- จะมีการลดลงของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น (λ_{max}) 265 และ 303 nm โดยจะพบการเกิด Isosbestic point ที่ความยาวคลื่น 232 nm และเกิดความยาวคลื่นใหม่ (λ_{max}) 217 nm (ภาพ 34) และ I^- จะมีการลดลงของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น (λ_{max}) 303 nm และพบการเกิด Isosbestic point ที่ความยาวคลื่น 268 nm และที่ความยาวคลื่นต่ำกว่า 268 nm สเปกตรัมการดูดกลืนแสงจะเพิ่มขึ้นและเกิดความยาวคลื่นใหม่ (λ_{max}) 243 และ 209 nm (ภาพ 35) การปรากฏของความยาวคลื่นใหม่หลังจากการเติม Br^- และ I^- เพิ่มขึ้นน่าจะเกิดจากการเป็น λ_{max} การดูดกลืนแสงของ Br^- และ I^-



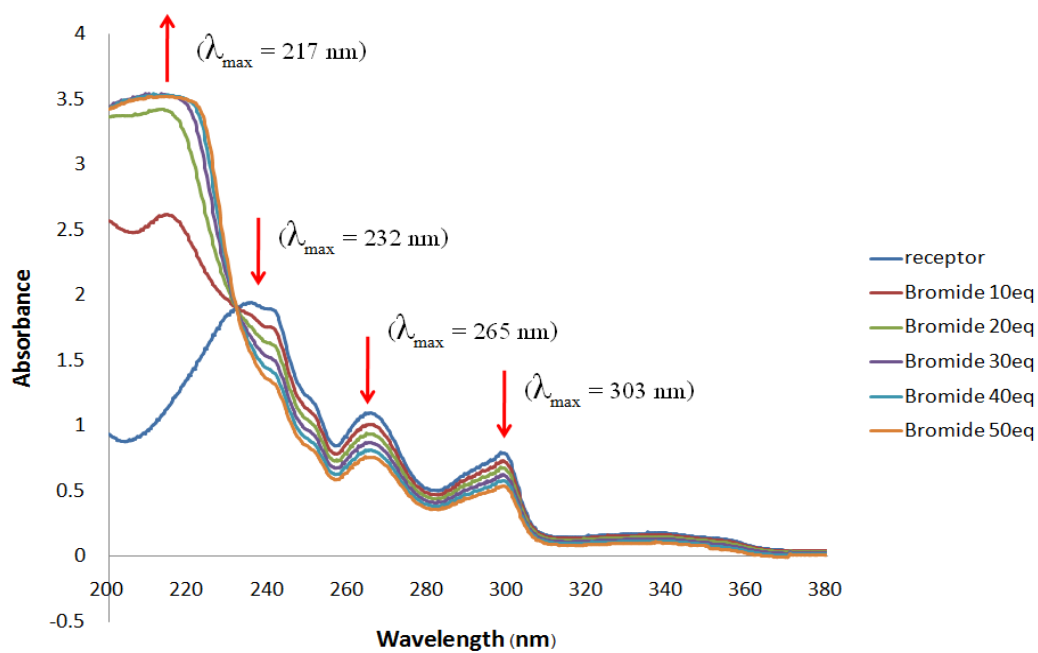
ภาพ 31 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของรีเซปเตอร์ S2 (2.0×10^{-5} M) เมื่อทำการไทเทรตกับ F^- , Cl^- , Br^- และ I^- ที่ 50 equivalents



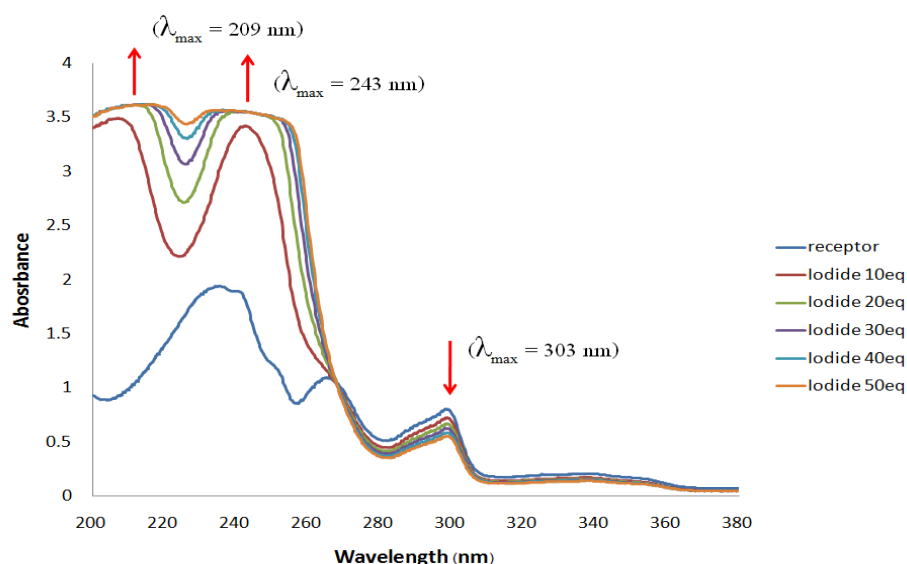
ภาพ 32 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของรีเซปเตอร์ S2 (2.0×10^{-5} M) เมื่อทำการไทเทรตกับ F^- ที่ 0-50 equivalents



ภาพ 33 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของรีเซปเตอร์ **S2** (2.0×10^{-5} M) เมื่อทำการไทเทรตกับ Cl^- ที่ 0-50 equivalents

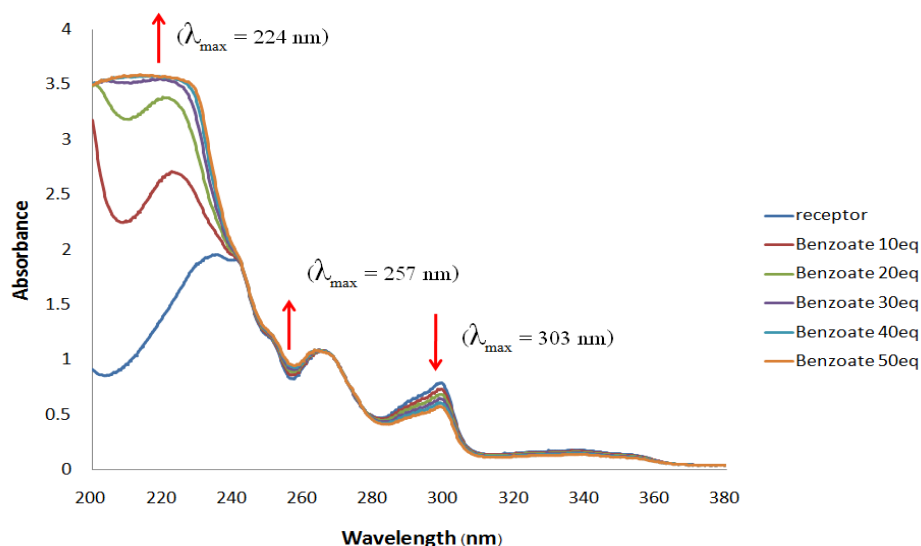


ภาพ 34 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของรีเซปเตอร์ **S2** (2.0×10^{-5} M) เมื่อทำการไทเทรตกับ Br^- ที่ 0-50 equivalents



ภาพ 35 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของรีเซพเตอร์ **S2** (2.0×10^{-5} M) เมื่อทำการไทเทรตกับ I^- ที่ 0-50 equivalents

จากการทดลองศึกษาการจับกันของ **S2** กับ BzO^- โดยใช้ acetonitrile เป็นตัวทำละลาย พบว่าเมื่อทำการไทเทรตสารละลาย BzO^- ลงในสารละลาย **S2** จะทำให้สเปกตรัมการดูดกลืนแสงเกิดการเปลี่ยนแปลงดังภาพ 36 นั่นคือค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น (λ_{max}) 303 nm ของ **S2** ลดลงอย่างต่อเนื่อง และพบการเกิด Isosbestic point ที่ความยาวคลื่น 277 และพบการปรากฏของ λ_{max} ใหม่ที่ 224 nm ซึ่งจะมีค่าการดูดกลืนเพิ่มมากขึ้นตามปริมาณ benzoate ที่เพิ่มขึ้น



ภาพ 36 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของรีเซพเตอร์ **S2** (2.0×10^{-5} M) เมื่อทำการไทเทรตกับ BzO^- ที่ 0 – 50 equivalents

ข้อมูลจากการไทเทรตด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลถูกนำไปใช้ในการคำนวณค่า binding constant (log K) เพื่อหาความสามารถในการจับกับไอออนลบ ผลการคำนวณแสดงดังตารางที่ 21

ตารางที่ 21 ค่า Binding constant ของการจับกันระหว่าง **S2** กับไอออนลบจากเทคนิคยูวี-วิสิเบิล โดยการติดตามที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น ($\lambda_{\max}$) 303 nm โดยการคำนวณด้วยโปรแกรม Specfit 32

ไอออนลบ	Binding constant (log K)
Fluoride	5.1
Chloride	3.6
Bromide	#
Iodide	#
Benzoate	4.48

พบ error > 10 %

จากค่า binding constant ที่คำนวณได้จากโปรแกรม Specfit 32 จะพบว่า F^- , Cl^- และ BzO^- ให้ค่า log K ไม่แตกต่างกันมาก โดย F^- จะให้ค่า binding constant สูงที่สุด เนื่องจาก F^- มีความเป็นเบสสูงสุดซึ่งส่งผลให้เกิดพันธะไฮโดรเจนได้แข็งแรงที่สุด ส่วน BzO^- ได้ค่า binding constant รองลงมาคือ 4.48 เนื่องจาก BzO^- สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนและมีวงอะโรมาติกที่สามารถทำให้เกิด π - π interaction กับรีเซปเตอร์ได้

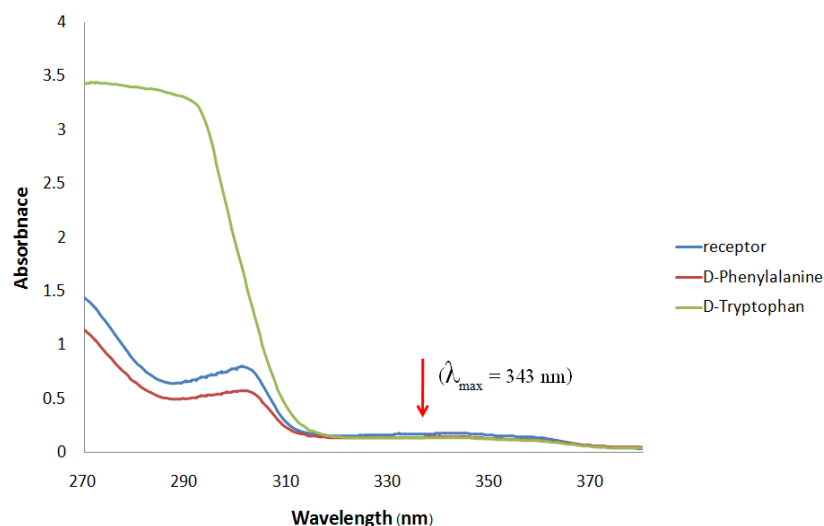
การศึกษาความจำเพาะของโมเลกุลรีเซปเตอร์ **S2** ในการจับกับกรดอะมิโน

การศึกษาความจำเพาะในการจับกับกรดอะมิโนโดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิล

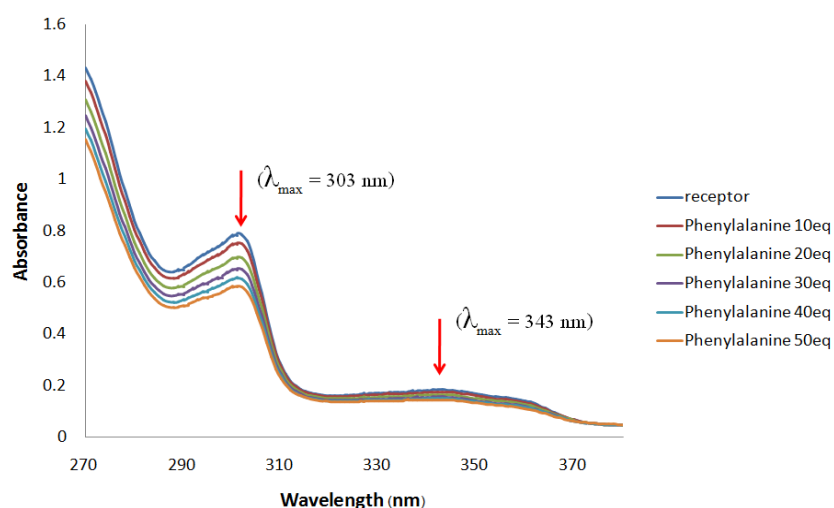
จากการศึกษาความจำเพาะเจาะจงระหว่างรีเซปเตอร์ **S2** กับกรดอะมิโน 10 ชนิด คือ Tryptophan, Phenylalanine, Glycine, Alanine, Lysine, Leucine, Glutamic acid, Aspartic acid และ β - alanine โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย การทดลองเริ่มต้นศึกษากับกรดอะมิโน Phenylalanine และ Tryptophan เนื่องจากว่าเป็นกรดอะมิโนที่มีวงอะโรมาติกอยู่ในโมเลกุลซึ่งจะทำให้เกิดได้ทั้งพันธะไฮโดรเจนและพันธะ π - π ในการจับกับรีเซปเตอร์ ผลการศึกษาพบว่าเมื่อทำการไทเทรตสารละลายกรดอะมิโน Phenylalanine และ Tryptophan ลงไปในสารละลายรีเซปเตอร์ **S2** จะทำให้สเปกตรัมการดูดกลืนแสงเกิดการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างกันดังภาพ 37

ผลการไทเทรตรีเซปเตอร์ **S2** ด้วย Phenylalanine พบว่าให้สเปกตรัมการดูดกลืนแสงเกิดการลดลงอย่างต่อเนื่องทุกๆ ความยาวคลื่น (ภาพ 38) ส่วน Tryptophan จะทำให้เกิดการลดลงของ

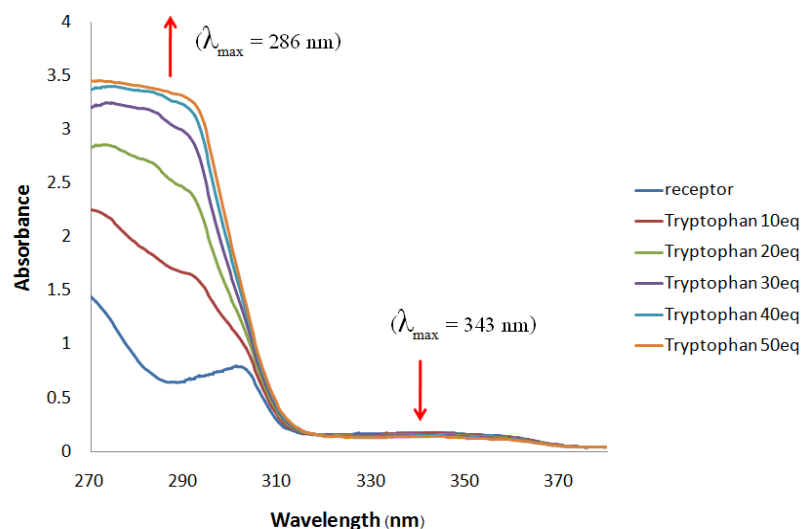
สเปกตรัมการดูดกลืนแสงอย่างต่อเนื่องที่ความยาวคลื่น ($\lambda_{\max}$) 343 nm และพบการเกิด Isosbestic point ที่ความยาวคลื่น 318 nm และความยาวคลื่นที่ต่ำกว่า 318 nm จะพบการเพิ่มขึ้นของสเปกตรัมการดูดกลืนแสง (ภาพ 39) ทั้งนี้เนื่องจากผลจากการดูดกลืนแสงของ Tryptophan เอง ส่วนในกรณีของกรดอะมิโนอีก 7 ชนิดคือ Glycine, Alanine, Lysine, Leucine, Glutamic acid, Aspartic acid และ β - alanine ไม่พบการเปลี่ยนแปลงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงหรือเปลี่ยนแปลงน้อยมาก (ภาคผนวก)



ภาพ 37 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของรีเซปเตอร์ S2 (2.0×10^{-5} M) เมื่อทำการไทเทรตกับ Phenylalanine และ Tryptophan ที่ 50 equivalents



ภาพ 38 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของรีเซปเตอร์ S2 (2.0×10^{-5} M) เมื่อทำการไทเทรตกับ Phenylalanine ที่ 0-50 equivalents



ภาพ 39 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของรีเซปเตอร์ S2 (2.0×10^{-5} M) เมื่อทำการไทเทรตกับ Tryptophan ที่ 0-50 equivalents

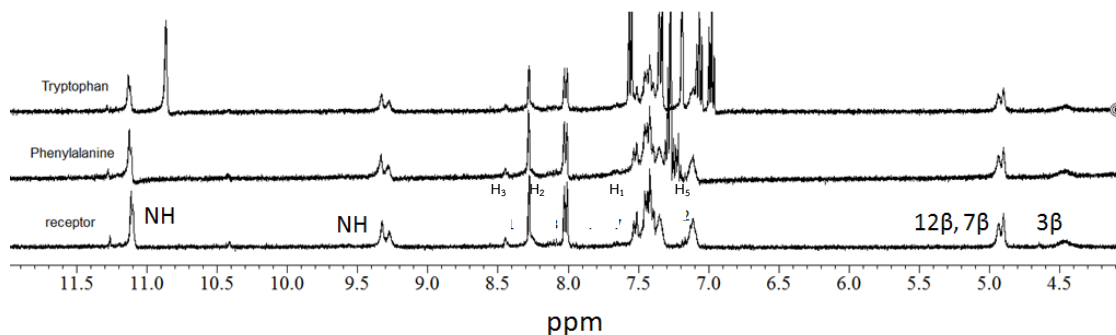
ข้อมูลจากการไทเทรตกับกรดอะมิโนด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลเมื่อนำมาใช้ในการคำนวณค่า binding constant เพื่อหาความสามารถในการจับกับกรดอะมิโนได้ผลแสดงดังตาราง 22 ซึ่งจะเห็นว่าเมื่อเปรียบเทียบค่า $\log K$ ที่คำนวณได้จากกรดอะมิโนแต่ละชนิดพบว่ามีความใกล้เคียงกัน นั่นแสดงว่ารีเซปเตอร์ S2 ไม่มีความจำเพาะในการจับกับกรดอะมิโน

ตาราง 22 ค่า Binding constant ของการจับกันระหว่าง S2 กับกรดอะมิโน จากเทคนิคยูวี-วิสิเบิล โดยการติดตามค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 303 และ 343 nm และคำนวณจากสมการของ Benesi-hildebrand (1:1 stoichiometry) (# ไม่สามารถคำนวณได้)

Amino acids	$\log K$ 303	$\log K$ 343
Glycine	2.299	2.5073
Alanine	2.4539	2.2812
Leucine	2.3388	1.4698
Aspartic acid	2.3946	2.2894
Glutamic acid	2.7647	2.658
β -alanine	3.0011	2.2682
Lysine	2.5119	#
Tyramine	2.4954	#
Phenylalanine	2.1612	2.2537
Tryptophan	#	2.8468

ผลการศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการจับกับกรดอะมิโนโดยใช้เทคนิค ^1H - NMR

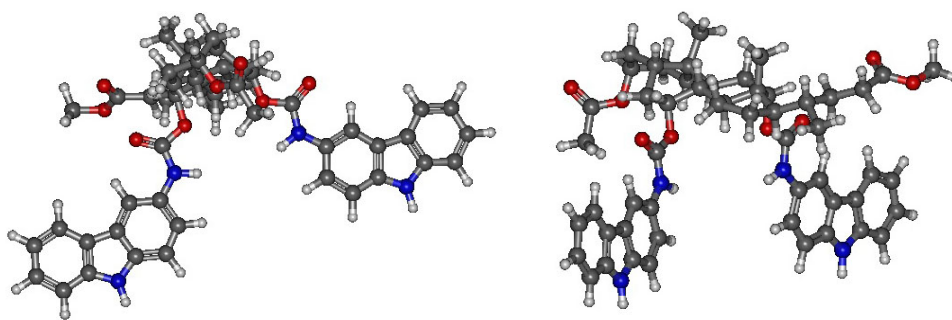
จากการศึกษาความจำเพาะในการจับกับกรดอะมิโน โดยเลือกใช้กรดอะมิโนที่มีวงอะโรมาติก 2 ชนิด คือ D-Phenylalanine และ D-Tryptophan ในระบบตัวทำละลาย DMSO- d_6 ผลการศึกษาจากด้วยเทคนิค ^1H -NMR titration (ภาพ 40) พบว่ามีการเปลี่ยนสัญญาณโปรตอนของ **S2** น้อยมาก เมื่อเทียบกับผลที่ได้จากไอออนลบ ดังนั้นข้อมูลจากเทคนิค ^1H -NMR titration ของ D-Phenylalanine และ D-Tryptophan ไม่สามารถบ่งบอกได้ว่ารีเซปเตอร์จับกับกรดอะมิโน



ภาพ 40 ^1H -NMR สเปกตรัมของ **S2** (2.5×10^{-3} M) เมื่อทำเติมกรดอะมิโน Phenylalanine และ Tryptophan (ที่ 4 equivalents) โดยใช้ DMSO- d_6 เป็นตัวทำละลาย

การศึกษาโครงสร้างของรีเซปเตอร์ **S2** ด้วยการคำนวณโครงสร้างด้วยโปรแกรมทางคอมพิวเตอร์

จากการคำนวณโครงสร้างของรีเซปเตอร์ **S2** ด้วยโปรแกรม Gaussian 09 program package, PM6 method ได้โครงสร้างดังภาพ 41 ซึ่งจะเห็นว่าหมู่คาร์บาโซลที่แขนทั้งสองของหน่วยจับจะพยายามจัดเรียงโมเลกุลให้ห่างออกจากกันเนื่องจากความเกะกะ ส่งผลให้หมู่คาร์บาเมตทั้งสองที่ใช้เป็นหมู่จับกับแกสต์ผ่านการเกิดพันธะไฮโดรเจนอยู่ห่างจากกัน โดยสามารถวัดระยะห่างระหว่างหมู่ NH-คาร์บาเมตทั้งสองข้างอยู่ที่ 4.47 อังสตรอม การที่หมู่ NH-คาร์บาเมตอยู่ห่างกันจึงทำให้ไม่สามารถทำงานร่วมกันในการจับกับแกสต์ที่มีรูปร่างทรงกลมขนาดเล็กผ่านการเกิดพันธะไฮโดรเจน เช่น เฮไลต์ ไอออน แต่พอเป็นแกสต์กลุ่มกรดอะมิโนซึ่งมีขนาดใหญ่ การจับกันระหว่างรีเซปเตอร์ **S2** กับกรดอะมิโนเกิดได้ไม่ตึงอาจเนื่องมาจากความเกะกะ นอกจากนี้สิ่งที่คาดหวังว่าจะพบการเกิดอันตรกิริยาชนิด π - π ระหว่างวงคาร์บาโซลของ **S2** กับวงอะโรมาติกของกรดอะมิโน เช่น Phe หรือ Typ จึงไม่น่าจะเกิดขึ้น ดังนั้นผลจากการศึกษากับกรดอะมิโนจึงพบว่าไม่พบความจำเพาะในการจับกับแกสต์



ภาพ 41 โครงสร้างของรีเซปเตอร์ S2 ที่ได้จากการคำนวณโครงสร้างด้วยโปรแกรม Gaussian 09 โดยใช้ PM6 method

การศึกษาความเลือกจำเพาะของโมเลกุลรีเซปเตอร์ S2 ในการจับกับนิวคลีโอไทด์

การหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาความเลือกจำเพาะกับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโกปี

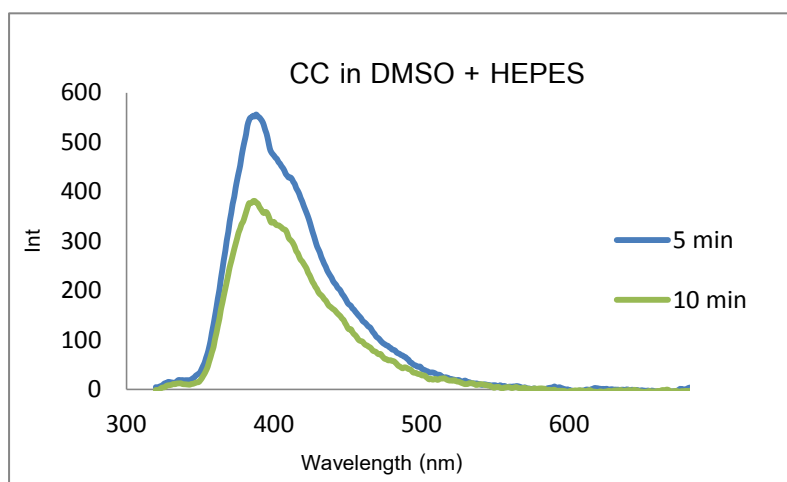
รีเซปเตอร์ S2 ได้ลองนำมาใช้ศึกษาความเลือกจำเพาะในการจับกับนิวคลีโอไทด์ 8 ชนิด คือ ATP, ADP, CMP, GDP, GMP, UMP, UDP และ UMP โดยการศึกษาเริ่มต้นจากการหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการทดลอง ระบบตัวทำละลายที่เลือกใช้มี 3 ระบบดังนี้

- DMSO : HEPES
- MeOH : HEPES
- MeOH : H₂O

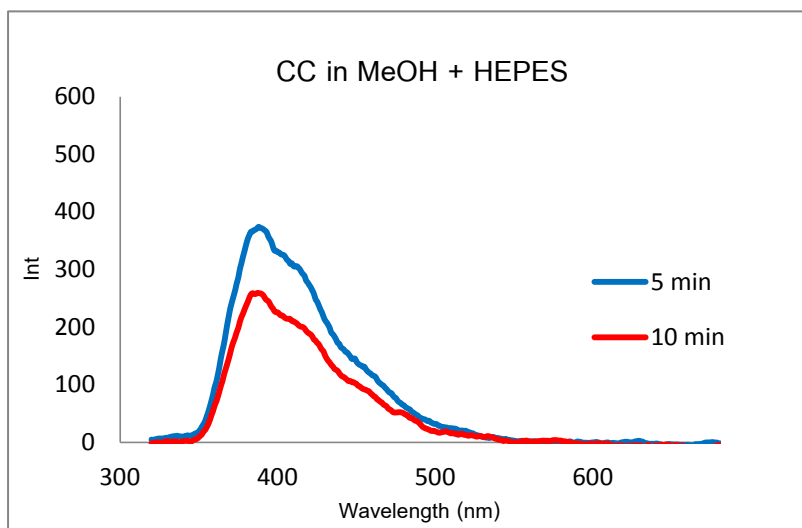
การหาตัวทำละลายที่เหมาะสมจะดูจากความเสถียรของสเปกตรัมการคายแสงของ S2 ที่เตรียมในตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด โดยปรับ pH เป็น 7.4 เมื่อเวลาผ่านไป 0 - 20 นาที ผลการทดลองแสดงดังภาพ 42-44 จะเห็นว่ารีเซปเตอร์ S2 คายแสงสูงสุดที่ $\lambda_{\max}$ เท่ากับ 303 nm เมื่อเตรียมสารละลายของ S2 ทั้งไว้ ที่เวลา 5 และ 10 นาที พบว่าค่าความเข้มแสงจะค่อยๆ ลดลงในระบบตัวทำละลาย DMSO : HEPES และ MeOH : HEPES แต่สำหรับระบบ MeOH : H₂O ไม่พบการเปลี่ยนแปลงความเข้มแสงมากนักจึงน่าจะเป็นระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม แต่อาจมีผลต่อการเลือกจับระหว่างรีเซปเตอร์กับนิวคลีโอไทด์ แต่เนื่องจาก MeOH มีตำแหน่งที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้ง่าย ดังนั้นจึงเลือกใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย เพราะถึงแม้จะทำให้ค่าการคายแสงลดลงเมื่อเวลาผ่านไปแต่การใช้ DMSO เป็นตัวทำละลายกลับให้ค่าความเข้มแสงที่สูงที่สุด

สำหรับระบบตัวทำละลาย DMSO : HEPES ที่พบการเปลี่ยนแปลงความเข้มแสงเมื่อดังทั้งไว้ อาจเป็นผลมาจากบัฟเฟอร์ที่ใช้ยังไม่เหมาะสม ดังนั้นการทดลองถัดมาจึงทำการศึกษาเพื่อหาบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับการทดลอง โดยเลือกใช้บัฟเฟอร์ 4 ชนิด คือ MOPS, Tris, PBS และ HEPES ซึ่งถูกนำมาเตรียมในตัวทำละลาย DMSO และทำการวัดสเปกตรัมการคายแสงของรีเซปเตอร์ S2 และ

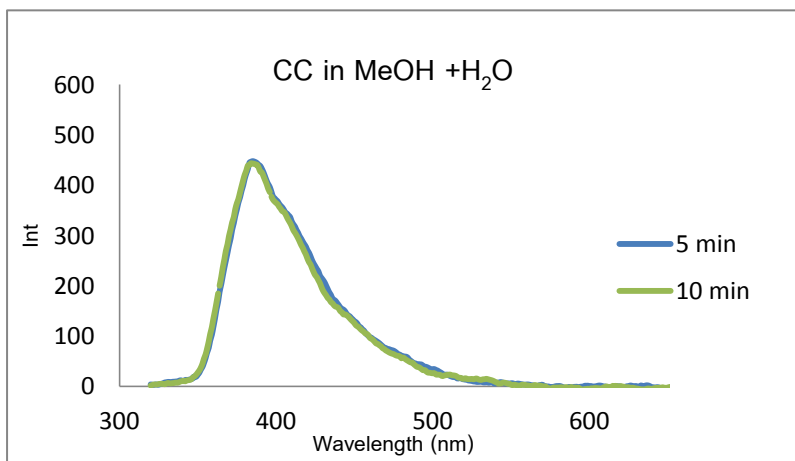
ติดตามสเปกตรัมที่เวลาต่างๆ จนถึง 40 นาที (ภาพ 45) ผลการทดลองพบว่าในทุกๆ ระบบบัฟเฟอร์ pH 7.4 เมื่อตั้งสารละลาย S2 ทิ้งไว้ 1 นาที จะทำให้การคายแสงลดลง แต่เมื่อทิ้งไว้นานขึ้นที่ 20-40 นาที จะมีแค่ระบบบัฟเฟอร์ MOPS และ Tris เท่านั้น (ภาพ 45 (c) และ (d)) ที่ค่าการคายแสงไม่ลดลงอีก และระบบบัฟเฟอร์ที่ดีที่สุดคือ DMSO : Tris เพราะให้ค่าความเข้มแสงที่สูงกว่าระบบ DMSO : MOPS



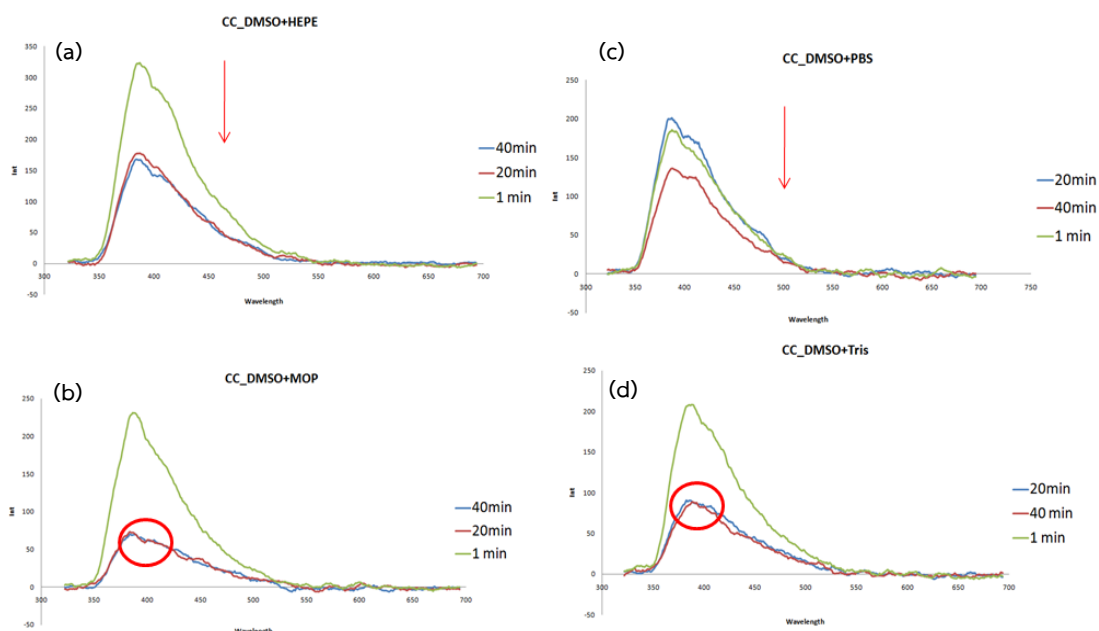
ภาพ 42 สเปกตรัมการคายแสงของรีเซปเตอร์ S2 (1×10^{-5} M) ในระบบตัวทำละลาย DMSO : HEPES หลังการเตรียมสารละลายทิ้งไว้เป็นเวลา 5 และ 10 นาที



ภาพ 43 สเปกตรัมการคายแสงของรีเซปเตอร์ S2 (1×10^{-5} M) ในระบบตัวทำละลาย MeOH : HEPES หลังการเตรียมสารละลายทิ้งไว้เป็นเวลา 5 และ 10 นาที



ภาพ 44 สเปกตรัมการคายแสงของรีเซบเตอร์ S2 (1×10^{-5} M) ในระบบตัวทำละลาย MeOH หลังการเตรียมสารละลายทิ้งไว้เป็นเวลา 5 และ 10 นาที

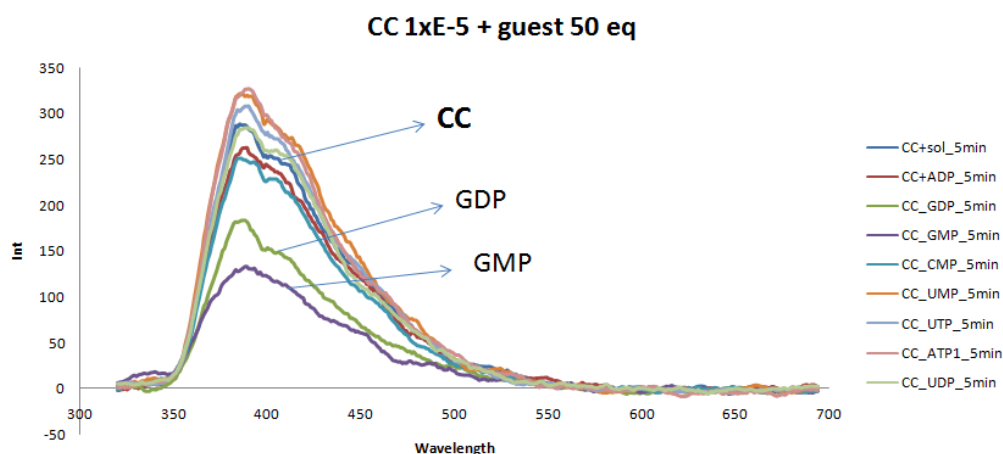


ภาพ 45 สเปกตรัมการคายแสงของรีเซบเตอร์ S2 (1×10^{-5} M) ในระบบบัฟเฟอร์ (a) DMSO : HEPES, (b) DMSO : PBS, (c) DMSO : MOPS, (d) DMSO : Tris

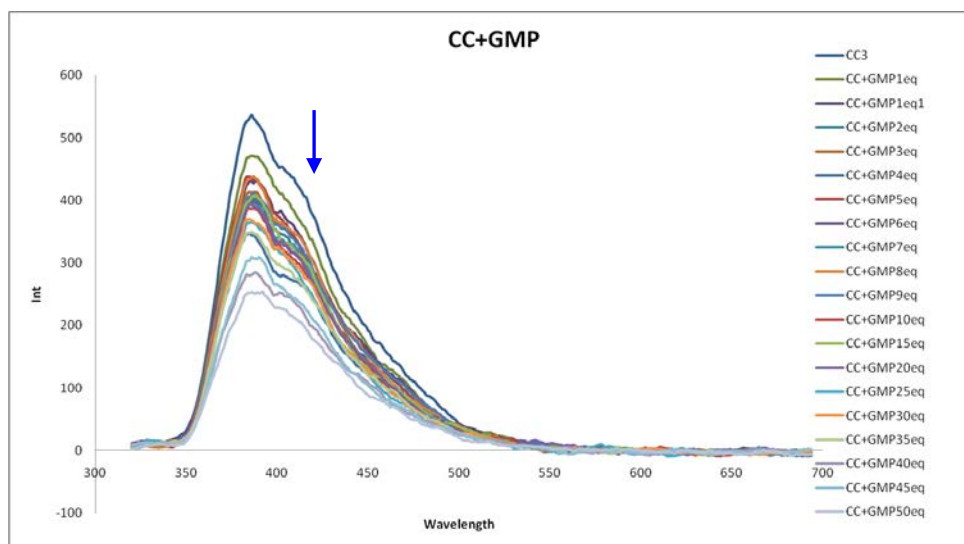
ศึกษาความเลือกจำเพาะในการจับกับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์

เมื่อได้ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้วสารละลายของรีเซบเตอร์ S2 ซึ่งเตรียมที่ความเข้มข้น 1×10^{-5} M ในระบบตัวทำละลาย DMSO : Tris ถูกนำมาศึกษาความเลือกจำเพาะในการจับกับนิวคลีโอไทด์ 8 ชนิดคือ ATP, ADP, CMP, GDP, GMP, UMP, UDP และ UMP ด้วยเทคนิคฟลูออเรส

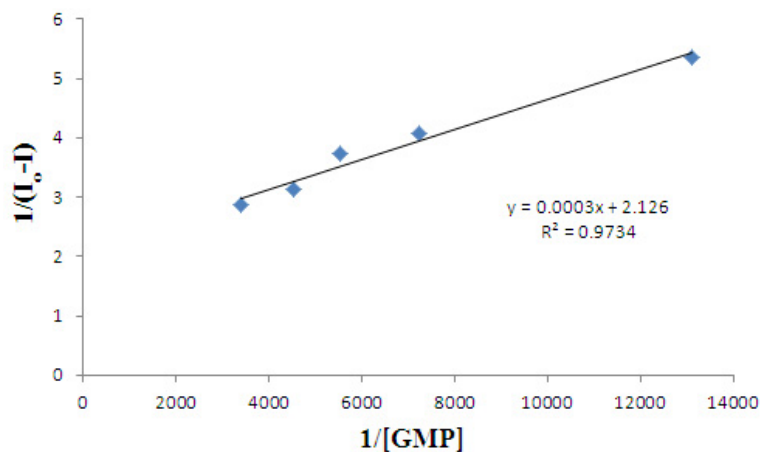
เซนต์ โดยทำการเติมนิวคลีโอไทด์จำนวน 50 equivalent ลงไปในสารละลายของ **S2** ผลการทดลองพบว่า การเติมนิวคลีโอไทด์จะทำให้ค่าการคายแสงของ **S2** ลดลง (ภาพ 46) โดยนิวคลีโอไทด์ที่ทำให้การคายแสงลดลงมากที่สุดคือ GDP และ GMP จากนั้นจึงทำการไทเทรตระหว่างรีเซปเตอร์ **S2** กับ GMP (0-50 equivalents) พบว่าการคายแสงของ **S2** จะค่อยๆ ลดลงเมื่อเติม GMP เพิ่มขึ้น (ภาพ 47) จากข้อมูลการไทเทรตเมื่อนำมาคำนวณค่า binding constant ($\log K$) ตามสมการของ Benesi-Hilderbrand (ภาพ 48) สามารถคำนวณได้ค่า $\log K$ เท่ากับ 3.85



ภาพ 46 การเปรียบเทียบสเปกตรัมการคายแสงของรีเซปเตอร์ **S2** (1×10^{-5} M) ในระบบตัวทำละลาย DMSO : Tris เมื่อเติมนิวคลีโอไทด์ชนิดต่างๆ จำนวน 50 equivalents



ภาพ 47 สเปกตรัมการคายแสงของรีเซปเตอร์ **S2** (1×10^{-5} M) ในระบบตัวทำละลาย DMSO : Tris เมื่อทำการไทเทรตกับ GMP จำนวน 0-50 equivalents

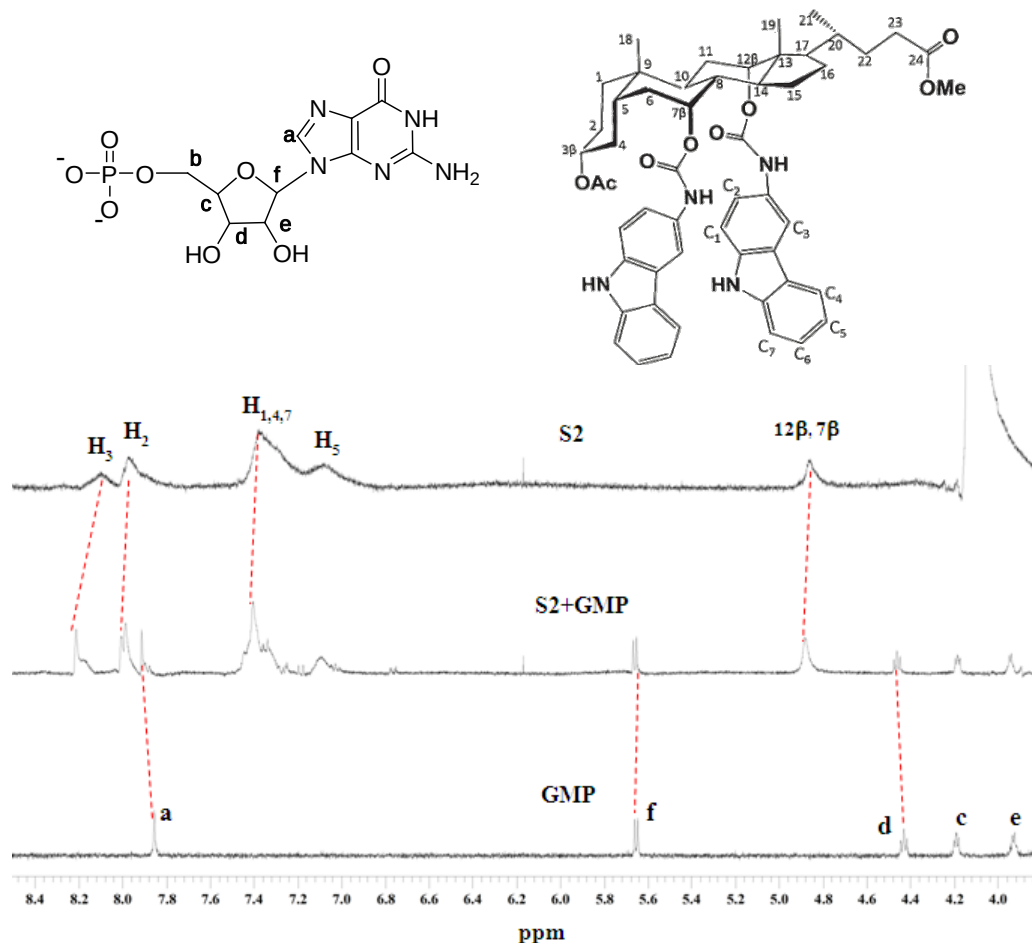


ภาพ 48 กราฟเส้นตรงที่ได้จากผลการไทเทรตของรีเซบเตอร์ S2 กับ GMP เพื่อใช้ในการคำนวณหาค่า binding constant ($\log K$)

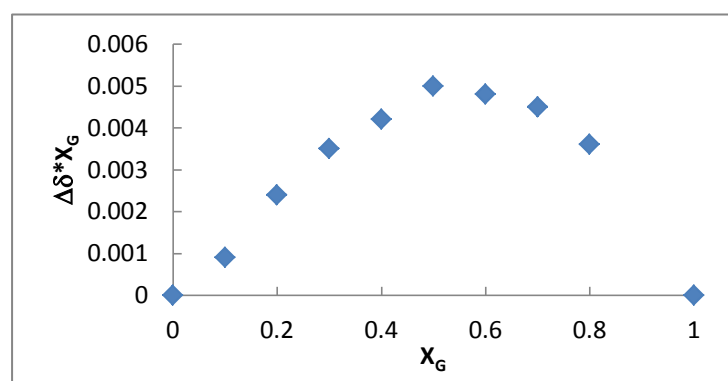
ศึกษาความเลือกจำเพาะในการจับกับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ titration

เมื่อทำการไทเทรตสารละลาย GMP ลงในสารละลาย S2 ในระบบตัวทำละลาย DMSO - d_6 : D_2O (7:0.5 v/v) จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสัญญาณโปรตอนทั้งของ GMP และ S2 ดังภาพ 49 สัญญาณโปรตอนของ GMP จะเกิดการเลื่อนไปทาง downfield เล็กน้อย นั่นคือสัญญาณโปรตอน H_a (7.83 ppm) และ H_d (4.42 ppm) โดยตำแหน่ง H_a จะเกิดการเลื่อนตำแหน่งไปทาง downfield มากที่สุด (เลื่อนจาก 7.83 ไปที่ 7.91 ppm) ส่วนกรณีของรีเซบเตอร์ S2 นั้นจะพบการเคลื่อนที่ไปทาง downfield ของโปรตอนบนวงคาร์บาโซล H_3 , H_2 , H_1 , H_4 , H_7 ส่วนโปรตอนของ $12\beta\text{-H}$ และ $7\beta\text{-H}$ จะเคลื่อนที่ไปทาง downfield เล็กน้อย โดยตำแหน่งที่พบการเลื่อนมากที่สุดคือ H_3 (เลื่อนจาก 8.11 ไปที่ 8.21 ppm) นอกจากนี้จากการติดตามสัญญาณโปรตอน H_3 และนำข้อมูลไปศึกษาด้วยเทคนิค Job' plot เพื่ออัตราส่วนการจับกันระหว่าง S2 กับ GMP (ภาพ 50) พบว่าจุดสูงสุดของกราฟตัดแกน x ที่ 0.5 แสดงว่าการจับกันระหว่าง S2 : GMP เป็นแบบ 1 : 1 เพื่อให้เข้าใจการจับกันระหว่าง S2 กับ GMP จึงทำการศึกษาโครงสร้างดังกล่าวด้วยการคำนวณทางคอมพิวเตอร์ด้วยโปรแกรม DFT ชนิด B3LYP/6-31G ได้ผลการจำลองโครงสร้างดังภาพ 51 ซึ่งพบว่าระยะห่างระหว่างหมู่ NH-คาร์บาเมตและหมู่ฟอสเฟตของ GMP อยู่ในช่วง 1.6-1.9 Å แสดงว่าหมู่ฟอสเฟตของ GMP เข้าไปเกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ NH-คาร์บาเมตทั้งสองของ S2 แต่ผลจาก $^1\text{H-NMR}$ ไม่สามารถเห็นโปรตอนในตำแหน่งนี้ได้เนื่องจากระบบตัวทำละลายที่ใช้เป็น DMSO- d_6 : D_2O (7:0.5) ซึ่งการที่มี D_2O ส่งผลทำให้สัญญาณโปรตอนของ NH-คาร์บาเมตหายไป ข้อมูลจากการคำนวณพบว่าหมู่ฟอสเฟตของ GMP ไม่ได้แค่เข้าไปสร้างพันธะไฮโดรเจนกับ NH-คาร์บาเมตเท่านั้น แต่พบการสร้างพันธะโควาเลนต์กับวงเบนซินของคาร์บาโซลที่ตำแหน่ง C_2 (ตำแหน่งที่วงกลมสีแดงในโครงสร้าง) ทำให้ความเป็นอะโรมาติกของวงคาร์บาโซลลดลงตรงตำแหน่งที่เกิดพันธะ ดังนั้นจึงทำให้เมื่อ S2 จับกับ GMP จะเกิดการลดลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ นอกจากนี้ยังพบว่าหมู่ฟอสเฟตกับ H_a ของเบส Guanine ในโครงสร้าง

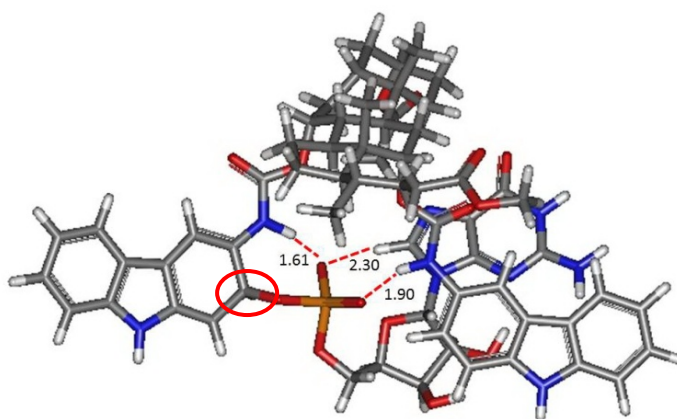
ของ GMP น่าจะเกิดการสร้างอันตรกิริยาอ่อนๆ ระหว่างกัน (ระยะห่าง 2.3 Å) จึงทำให้พบการเลื่อนตำแหน่งโปรตอน H_a ของ GMP ไปทาง downfield



ภาพ 49 การเปรียบเทียบ ^1H - NMR สเปกตรัมช่วง 8.5-3.8 ppm ของรีเซปเตอร์ **S2** (5×10^{-5} M) เมื่อทำการไทเทรตด้วย GMP (3 equivalents) ใน $\text{DMSO}-d_6 : \text{D}_2\text{O}$ (7:0.5, v/v)



ภาพ 50 กราฟ Job's plot ที่ได้จากการติดตามสัญญาณโปรตอน H_3 ของรีเซปเตอร์ **S2** เมื่อทำการไทเทรตกับ GMP



ภาพ 51 โครงสร้างแสดงการจับกันระหว่างรีเซปเตอร์ **S2** กับ GMP ที่ได้จากการคำนวณโครงสร้างด้วยโปรแกรม DFT ชนิด B3LYP/6-31G บริเวณวงกลมสีแดงแสดงตำแหน่งที่เกิดการสร้างพันธะโคเวเลนต์ระหว่างหมู่ฟอสเฟตของ GMP กับวงเบนซีนของคาร์บาไซลจาก **S2**

สรุปผล

รีเซปเตอร์จากคอลิกเอซิดสองโมเลกุล (**S1** และ **S2**) ถูกสังเคราะห์เพื่อนำมาศึกษาความสามารถในการจับกับไอออนลบ กรดอะมิโน และนิวคลีโอไทด์ ด้วยเทคนิคต่างๆ ดังนี้ $^1\text{H-NMR}$, ยูวี-วิสิเบิล ฟลูออเรสเซนส์ และการจำลองโมเลกุลด้วยคอมพิวเตอร์ ผลจากการศึกษาพบว่ารีเซปเตอร์ **S1** เมื่อจับกับ F^- ซึ่งเป็นไอออนลบที่มีความเป็นเบสสูงจะทำให้เกิดการหลุดโปรตอนหมู่ NH-คาร์บาเมต ส่วนไอออนลบอื่นๆ พบการเกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ NH-คาร์บาเมต อัตราส่วนการจับกันระหว่าง **S1**:ไอออนลบเป็นแบบ 1:1 ส่วนรีเซปเตอร์ **S2** พบว่าการศึกษาการจับกับไอออนลบและกรดอะมิโนไม่พบความจำเพาะในการเลือกจับกับเกสต์เนื่องจากการจัดเรียงโมเลกุลบริเวณหมู่จับกับเกสต์มีความเกะกะทำให้หมู่ NH-เอไมด์ แยกห่างออกจากกัน แต่เมื่อลองศึกษาการจับกับนิวคลีโอไทด์พบว่ามีความจำเพาะในการจับกับ GMP มากที่สุดโดยทำให้เกิดการลดลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนส์มากที่สุด

เอกสารอ้างอิง

- Beer, P. D., Hesek, D., Nam, K. C. and Drew, M. G. B. (1999). Anion recognition properties of new upper-rim cobaltocenium calix[4]arene receptors. **Organometallics**, 18(19), 3933-3943.
- Beer, P. D., Gale, P. A. (2001). Anion recognition and sensing: The state of the art and future perspectives. **Angew. Chem. Int. Ed.**, 40, 486-516.
- Cruz, M. C., Alcazar, V. and Pleaez, R. (2012). Bis-amidocarbazolyl urea receptor for short-chain dicarboxylate anions. **Org. Biomol. Chem.**, 10, 1181-1185.
- Davis, A. P. (1993). Steroids as structural components in molecular engineering. **Chem. Soc. Rev.**, 243-253.
- Davis, A. P., Ayling, A. J. and Perez, P. (2001). New cholapod anionophores; high-affinity halide receptors derived from cholic acid. **J. Am. Chem. Soc.**, 123(50), 12716-12717.
- Davis, A. P., Ayling, A. J., Broderick, S. and Clare, J. P. (2002). An extraction-based assay for neutral anionophores: the measurement of high binding constants to steroidal receptors in a nonpolar solvent. **Eur. J.**, 8, 2197-2203.
- Davis, A. P. and Joos, J. B. (2003). Steroids as organizing elements in anion receptors. **Coord. Chem. Rev.** 240, 143-156.
- Flammengo, R., Crego-Calama, M., Timmerman, P. and Reinhoudt, D. N. (2003). Recognition of caffeine in aqueous solutions. **Chem. Eur. J.**, 9, 784-792.
- Jurczak, J., Chmielewski, M. J. and Charon, M. (2004). 1,8-Diamino-3,6-dichlorocarbazole: a promising building block for anion receptors. **Org. Lett.**, 6, 3501-3504.
- Kim, H. S. and Kim, K. S. (2005). A hyodeoxycholic acid-based molecular tweezer: a highly selective fluoride anion receptor. **Tetrahedron**, 61, 12366-12370.
- Kim, H. S., Kim, K. S. and Cho, N. J. (2006). Synthesis and anion recognition of cholic acid-based tripodal receptor: a chloride selective anion receptor. **Bull. Korean Chem. Soc.**, 27(5), 739-743.
- Kim, H. N., Moon, J. H., Kim, S. K., Kwon, J. Y., Jang, Y. J. and Lee, J. Y. (2011). Fluorescent sensing of triphosphate nucleotides via anthracene derivatives. **J. Org. Chem.**, 76, 3805-3811.
- Mahapatra, A. K., Sahoo, P. and Hazra, G. (2010). Synthesis of indolo[3,2-b]carbazole-

- based new colorimetric receptor for anions: a unique color change for fluoride ions. **Beilstein. Org. Chem.**, 6(12), 1-8.
- McDonald, P., Edwards, R. A., Greenhalgh, J. F. D., Morgan, C. A., Sinclair, L. A. and Wilkinson, R. G. (2011). **Animal Nutrition** (7th ed.). England: Pearson, Harlow.
- Sessler, J. L., Piatek, P. and Lynch, V. M. (2004). Calix[4]pyrrole[2]carbazole: a new kind expanded calixpyrrole. **J. Am. Chem. Soc.**, 126(49), 16073-16076.
- Shang, X., Li, X., Han, J., Jia, S., Zhang, J. and Xu, X. (2012). Colorimetric and fluorescence turn-on sensor for biologically important anions based on carbazole derivative. **Inorg. Chem. Commun.**, 16, 37-42.
- Shufen, Z., Danhong, Z. and Jinzong, Y. (1995). Nitration of carbazole and *N*-alkylcarbazole. **Dyes and Pigments**, 27(4), 287-296.
- Smith, B. D. and Davis, A. P. (2003). Chloride transport across vesicle and cell membranes by steroid-based receptors. **Angew. Chem. Int. Ed.**, 42, 4931-4933.
- Steed, J. W. and Atwood, J. L. (2002). Supramolecular Chemistry. **J. Am. Chem. Soc.**, 32, 192-202.
- Thangadurai, T. D., Singh, N. J. and Hwang, I. C. (2007). 2-Dimensional analytic approach for anion differentiation with chromofluorogenic receptors. **J. Org. Chem.**, 72, 5461-5464.
- Volkara, V. P., Dmitrieva, I. L., Klimova, L. A. and Milliaresi, E. E. (1976). Electronic spectra of carbazole and its *N*-ethyl and *N*-acetyl derivatives. **J. App. Spectrosc.**, 25(2), 1054-1057.
- Yang, R. H., Lui, S. Y. and Cheng, Y. K. (2005). Cholic acid-based fluorescent sensor for dicarboxylates and acidic amino acids in aqueous solutions. **Org. Lett.**, 26, 5825-5828.

การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 40



The 40th CONGRESS ON SCIENCE AND TECHNOLOGY OF THAILAND
(STT40)

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สู่วิถึพัฒนาอาเซียน
"Science and Technology towards ASEAN Development"

December 2-4, 2014
Hotel Pullman Khon Kaen Raja Orchid

Abstracts



PROGRAM FOR INVITED LECTURES AND ORAL PRESENTATIONS
4th December 2014

SESSION A (MATHEMATICS / STATISTICS / COMPUTER SCIENCE)
ROOM: Iyara

Chair Person: Assoc.Prof.Dr. Satit Saejung
Co-chair Person: Dr. Farida Chamchod

Time	ID	Title	Speaker
09:00-09:20	A_A0005	FIXED POINT THEOREMS FOR PARTIAL α - ϕ CONTRACTIVE MAPPINGS IN GENERALIZED METRIC SPACES	Aphinat Ninsri
09:20-09:40	A_A0006	SOME FIXED POINT RESULTS WITH CYCLIC (ALPHA,BETA)-ADMISSIBLE MAPPINGS IN b-METRIC SPACES	Oratai Yamaod
09:40-10:00	A_A0012	USING mHEALTH AS BIG DATA COLLECTION FOR PUBLIC HEALTH INFORMATION WITH GPS IN SARAPHI DISTRICT, CHIANG MAI, THAILAND	Ekkarat Boonchieng

SESSION C2 (INORGANIC CHEMISTRY)
ROOM: Erawan 2

Chair Person: Prof.Dr. Thawatchai Tuntulani
Co-chair Person: Prof.Dr. Sujittra Youngmee

Time	ID	Title	Speaker
08:40-09:00	C2_C0018	STEROID BASED RECEPTOR CONTAINING ACIDIC NH-CARBAMATE BINDING UNITS FOR ANION RECOGNITION	Anchalee Sirikulakajorn
09:00-09:20	C2_C0099	A NAKED-EYE FLUORIDE SENSOR FROM CARBAZOLE CONTAINING TOLUENESULFONYLUREA	Wanna Kunchonchot
09:20-09:40	C2_C0043	NEW CUBIC SELENIUM NANOPARTICLES FOR TARGETED CANCER CELLS	Urarika Luesakul
09:40-10:00	C2_C0044	GREEN SYNTHESIS OF PULLULAN STABILIZED GOLD NANOPARTICLES FOR DRUG DELIVERY	Sakchai Laksee

C2_C0018: STEROID BASED RECEPTOR CONTAINING ACIDIC NH-CARBAMATE BINDING UNITS FOR ANION RECOGNITION

Anchalee Sirikulkaorn,^{1,*} Boosayarat Tomapatanaget,² Piyatida Yunyong,¹ Wikorn Punyain¹

¹Department of Chemistry, Faculty of Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

²Supramolecular Chemistry Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

*e-mail: anchaleesi@nu.ac.th

Abstract: A synthetic anion receptor (**S2L**) based on steroid consisting of cholic acid and NH-carbamate proton at C7 and C12 positions as the binding site was designed and synthesized. The binding abilities toward anions (F^- , Cl^- , Br^- , I^- and Bz^-) and aromatic amino acids (Phe and Trp) were investigated using 1H -NMR spectroscopy, UV-vis spectrophotometry, and computer simulations. The optimized structures of the **S2L**-halide anion complexes revealed that F^- leads to the deprotonation at one of the NH-carbamate binding sites as shown in Figure 1, whereas the other halide anions bind with **S2L** using hydrogen bonding. In addition, binding of Bz^- , Phe and Trp with the receptor is based both on hydrogen bonding as well as π - π stacking interactions. The binding constants ($\log K$) which calculated from the UV-vis titration technique showed that F^- has the strongest binding affinity towards **S2L** over the other anions. (abstract only)

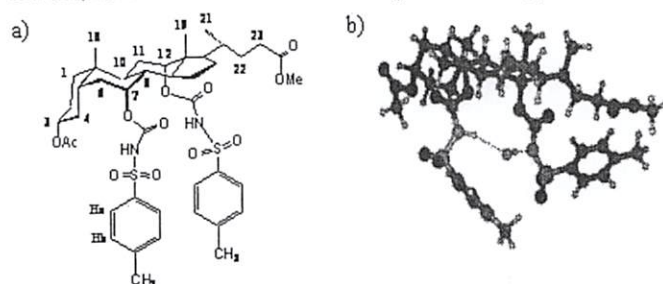


Figure 1. a) Structure of **S2L** receptor and b) The optimized geometry of the fluoride-**S2L** based complex using semi-empirical methods (PM6) showing the deprotonation at one of NH-carbamate binding site by F^- .

C2_C0019: A HIGHLY SELECTIVE SENSING FOR HISTIDINE BY MONONUCLEAR COPPER(II) COMPLEX BASED CHEMOSENSING ENSEMBLE

Sarayut Watchasit,¹ Thawatchai Tuntulani,¹ Chomchai Suksai^{2,*}

¹Supramolecular Chemistry Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

²Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand

*e-mail: c.suksai@yahoo.com

Abstract: Histidine (**His**) is an essential amino acid for human growth. It can also act as a neurotransmitter in the central nervous system of mammals. Histidine-rich proteins are found to play many important roles in humans and their abnormal level could indicate a variety of diseases. Therefore, detection of **His** in biological fluids has become an important goal and a number of methods have been developed for this purpose. In this research, the novel chemosensing ensemble between the mononuclear copper(II) complex **CuL** with azo dye indicator 4-(2-pyridylazo)resorcinol **PAR**, [**CuL**·**PAR**] was prepared and its sensing abilities towards α -amino acids was investigated under ligand displacement strategy in 20% (v/v) H_2O/CH_3CN buffered at pH 7.4 with HEPES. Results from UV-visible titration showed that [**CuL**·**PAR**] ensemble could discriminate **His** selectively from the other α -amino acids by changing the red color of ensemble to yellow color of free **PAR**. The limit of detection ($3\sigma/k$) for **His** was $0.7 \mu M$. The analytical utility of the [**CuL**·**PAR**] ensemble for the analysis of **His** was tested using spiked **His** to urine sample. It was found that the recoveries

for spiking generally sa

C2_C0022: COPPER(I) BIOLOGIC

Tossapon Pi
Department
Pathumthan
*e-mail: che

Abstract: T
5,7,7,12,14,
7,14-diethyl
rate, have
structure of
spectroscop
the electron
complexes
microorgani
staphylococ
complexes
inhibition th

C2_C0023: OF METAL

Mn(III), Fe
Natthakorn J
Pornsan Lua
¹Department
Pathumthani
²National Sc
*E-mail: che

Abstract: T
acetylacetone
synthesized.
,Mass and U
agreement
spectroscopy
compare wit
from 429 n
solvent show
for, the Cu(ε
(635 nm, Me
been screened
exhibited ap
complexes a
for *E. coli* a
Co(acac)₃, c
zone=1.825±
than penicill
S. aureus as
CD)

Abstract Book



โครงการ Symposium
เรื่อง The 3rd Advanced Materials for
ASEAN Network Symposium

22 กรกฎาคม 2559

ณ ห้อง SC1-207 อาคารเลขานุการคณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก

สารบัญ

รายชื่อผู้นำเสนอผลงาน	หน้า
ศาสตราจารย์ ดร.สนอง เอกสิทธิ์	6
รองศาสตราจารย์ ดร. วรงค์ ปวรจารย์	8
ดร.วิกร ปัญญาอินทร์	10
ดร.ดวงดาว จันทรเนย	11
ดร.พิสันต์ เกตุโกมล	13
ดร.อัญชลี สิริกุลขจร	14
<i>Poster presentation</i>	
รองศาสตราจารย์ ดร. ปริญญา มาสวัสต์	16
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิภารัตน์ เชื้อขาว ชัยสิทธิ์	18
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ยุทธพงษ์ อุดแน่น	22
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เจือโทหญิง ดร. นิภาภัทร เจริญไทย	24
ดร.จุฑาทิพย์ นมะหุด	28
ดร.อัญชลี สิริกุลขจร	33
ดร. อนุสรณ์ วรสิงห์	35

นที

olomite

โตรเคมี และวัสดุขั้นสูง
มูลโลก

um, Petrochemical and Advanced
anulok 65000
nu.ac.th



ดร.อัญชลี สิริกุลขจร
(Anchalee Sirikulajorn, Ph.D.)
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
E-mail address: anchaleesi@nu.ac.th

นโทไนท์ โดยใช้อัตราส่วนของ ซี
้นงานด้วยการอัดแบบแห้ง ด้วย
00 และ 1100 °C ในบรรยากาศ
ษาสมบัติทางกายภาพเช่น สีของ
ราส่วนซีโอไลท์:โดโลไมท์:เบนโท
วมแข็งแกร่ง และมีการดูดซึมน้ำ
ของวัสดุเซรามิกพูนโดยเทคนิค

teolite, dolomite, and bentonite.
):10. These mixture specimens
IPa for 1 minute, and then fired
tion atmosphere and soaked at
r, percentage of shrinkage and
aterial should be prepared from
and 30:60:10. These porous
er adsorption of 30% and 41%,
determined by XRD, FTIR and

รีเซปเตอร์จากสเตอรอยด์ที่ต่อคาร์บาโซลสำหรับจับนิวคลีโอไทด์
วรรณ ขุนซอนโชติ¹, บุษยรัตน์ ธรรมพัฒน์กิจ² และอัญชลี สิริกุลขจร^{1*}

Steroid Receptor Containing Carbazole for Nucleotides Recognition
Wanna Kunchonchot¹, Boosayarat Tomapatanaget² and Anchalee Sirikulajorn^{1*}

¹ภาควิชาเคมี สถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการด้านปิโตรเลียม ปิโตรเคมี และวัสดุขั้นสูง
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก
²ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

¹Department of Chemistry, Research Center for Academic Excellence in Petroleum, Petrochemical and Advanced
Materials, Faculty of Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000
²Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330

*Corresponding Author: E-mail address: anchaleesi@nu.ac.th

บทคัดย่อ

รีเซปเตอร์จากสเตอรอยด์ที่มีหมู่คาร์บาโซล (CC) ถูกนำมาใช้ศึกษาความสามารถในการจับกับนิวคลีโอไทด์ (ATP, GDP, GMP, CMP, ADP, UMP และ UDP) ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ และโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ ผลการศึกษาพบว่าตัวกลางที่ใช้ในการศึกษาที่ดีที่สุดคือระบบบัฟเฟอร์ Tris ใน DMSO โดยรีเซปเตอร์ให้ความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกับ GMP และ GDP ได้ดีที่สุด การจับกันระหว่าง CC กับนิวคลีโอไทด์จะเกิดผ่านการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ฟอสเฟตของนิวคลีโอไทด์กับหมู่คาร์บาเมตของรีเซปเตอร์ โดยเมื่อเกิดการจับกันจะทำให้เกิดการระงับการคายแสงของ CC ที่ความยาวคลื่น 303 nm โดยการลดลงของการคายแสงจะพบมากสุดในกรณีของ GMP และสามารถคำนวณหาค่าคงที่การจับกับ GMP ได้ค่า $\log K = 3.85$

คำสำคัญ สเตอรอยด์/ นิวคลีโอไทด์/ ฟลูออเรสเซนซ์/ การระงับการคายแสง

Abstract

Steroidal receptor possessing carbazole (CC) was investigated the binding ability with nucleotides (ATP, GDP, GMP, CMP, ADP, UMP and UDP) by using fluorescence and $^1\text{H-NMR}$ techniques. Experimental results indicated that the optimum media is DMSO : Tris buffer solution and CC showed a selectivity for GMP and GDP. The binding between CC and nucleotide occurred via a hydrogen bonding interaction of nucleotide phosphate group with NH-carbamate binding unit in CC. The complex formation caused a decreasing in emission intensity ($\lambda_{\text{max}} = 303 \text{ nm}$) of CC receptor. The highest quenching in fluorescence intensity was observed in the case of GMP. The binding constant in term $\log K$ which equal to 3.85 was calculated.

Keywords: Steroid/ nucleotides/ fluorescence/ emission intensity quenching



การสังเคราะห์สารใน

High Efficient Synthe

ภาควิชาเคมี
Department of Chem
สถานวิจัยเพื่อค
Research Center for Academic
Sc

*Corresp

การศึกษาวิธีการแบบมี
โดยใช้สารตั้งต้นในกลุ่มของไฮโดร
reaction) ในขวดแก้วทดลอง และ
วิธี คือวิธีที่ 1 ใช้ไฮโดรไอโอได
ละลาย และใช้ไตรฟีนิลฟอสเฟตเป็น
อุณหภูมิ 80-120 °C เป็น เวลา 24
51 และวิธีที่ 2 ใช้ไฮโดรไอโอไ
มายด์เป็น ตัวทำละลาย ไตรฟีนิลฟ
ปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 120 °C เป็นเว

คำสำคัญ: ไตรเบนโซเฮกซะดีไฮโดร

รีเซปเตอร์สำหรับไอออนลบจากคอลิกเอซิดที่มี NH-คาร์บาโมซัลโฟนาไมด์เป็นหน่วยจับไอออนลบ

Cholic Acid Based Anion Receptor Containing NH-Carbamosulfonamide Binding Sites

อัญชลี สิริกุลขจร,^{1*} กฤตฐศาสตร์ สิงห์พา,² ศศิวิมล ขำโอด,² ปิยธิดา ยันยงค์,² วิกร ปัญญาอินทร์,¹
Anchalee Sirikulakajorn,¹ Krittasart Singhapha,² Sasiwimol Khamoad,² Piyatida Yunyong,² Wikorn
Punyain¹

บทคัดย่อ

รีเซปเตอร์จากคอลิกเอซิด (**S2L**) ที่มีการต่อหมู่ NH-คาร์บาโมซัลโฟนาไมด์จำนวน 2 หมู่ที่ตำแหน่ง C7 และ C12 บนโมเลกุลคอลิกเอซิดได้ถูกออกแบบและสังเคราะห์ขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาความสามารถในการจับกับไอออนลบชนิดต่างๆ ประกอบด้วยฟลูออไรด์ คลอไรด์ โบรไมด์ อะซิเตด เบนโซเอต ไซยาไนด์ ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ไบซัลเฟต เปอร์คลอเรต และไนเตรด ด้วยเทคนิคโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ ยูวี-วิสิเบิล และการคำนวณทางคอมพิวเตอร์ ผลจากเทคนิคโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์พบว่าไอออนลบเข้าไปเกิดพันธะไฮโดรเจนกับรีเซปเตอร์ที่ตำแหน่ง NH-คาร์บาโมซัลโฟนาไมด์ซึ่งเป็นหน่วยจับไอออนลบ ส่วนผลจากเทคนิคยูวี-วิสิเบิลและการคำนวณทางคอมพิวเตอร์พบการหลุดออกของโปรตอนหมู่ NH-คาร์บาโมซัลโฟนาไมด์เมื่อจับกับไอออนลบที่มีความเป็นเบสสูงได้แก่ ไซยาไนด์ ฟลูออไรด์ อะซิเตด เบนโซเอต และไดไฮโดรเจนฟอสเฟต อัตราส่วนการจับกันระหว่างรีเซปเตอร์กับไอออนลบพบว่าจับกันในอัตราส่วน 1:1 ผลการคำนวณค่าคงที่การจับกันระหว่างรีเซปเตอร์กับไอออนลบพบว่าไซยาไนด์จะให้ค่าสูงสุดที่ $\log K = 6.08$

คำสำคัญ: คอลิกเอซิด รีเซปเตอร์ การจับไอออนลบ

Abstract

A synthetic receptor (**S2L**) based on cholic acid and possessing two NH - carbamosulfonamide binding sites at C7 and C12 positions was designed and synthesized. The binding abilities toward various anions (F^- , Cl^- , Br^- , I^- , AcO^- , BzO^- , CN^- , $H_2PO_4^-$, HSO_4^- , ClO_4^- and NO_3^-) were investigated using 1H -NMR spectroscopy, UV-Vis spectrophotometry, and computer simulations. Changes in the 1H -NMR spectra revealed the binding with anions occurring at the NH - carbamosulfonamide binding sites via a hydrogen

¹ อาจารย์, ² นิสิตปริญญาตรี, ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์ ต.ท่าโพธิ์ อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000

¹ Lecturer, ² Bachelor degree student, Department of Chemistry, Faculty of Science, Naresuan University, Thapho Subdistrict, Muang District, Phitsanulok 65000, Thailand.

* Corresponding Author; Anchalee Sirikulakajorn, Department of Chemistry, Faculty of Science, Naresuan University, Thapho Subdistrict, Muang District, Phitsanulok 65000, Thailand. anchaleesi@nu.ac.th.

bonding formation. Results from UV-vis spectra, and optimized structures of the **S2L**-halide anion complexes exhibited a possibility to deprotonation at one of the NH-carbamoylsulfonamide group in the case of the binding with strong basic anions (CN^- , F^- , AcO^- , BzO^- and H_2PO_4^-). Job plot analysis indicated the formation of 1:1 host-guest complexation. The highest binding constant was obtained from CN^- ($\log K = 6.08$)

Keywords: Cholic acid, Receptor, Anion binding

Introduction

Cholic acid, a member of steroid group of compounds, has been explored as a potential scaffold in receptor design and guest recognition for many years.¹⁻⁴ Due to their structural preorganization receptors based on cholic acid are endowed with well-defined shape and complementary binding sites for binding with various guests. One advantage of cholic acid as a scaffold in host-guest chemistry, especially in the area of anion recognition, is its structure containing polar functional groups suitable for anion binding sites. Furthermore, cholic acid possesses lipophilic surfaces, which permit solubility of the receptors in non-polar media.⁵ The second advantage is a good framework for multiple binding sites. Three secondary hydroxyl groups ($3\alpha\text{-OH}$, $7\alpha\text{-OH}$ and $12\alpha\text{-OH}$) on the cholic acid building block were substituted with a variety of functional groups to provide two distinct classes of anion receptors; (a) electroneutral anion receptors and (b) positively charged receptors. The electroneutral anion receptors are gaining increasing attention⁶ because they have several potential applications for example membrane transport,⁷ phase transfer,⁸ and sensing devices.⁹ Hydrogen bonding is the main interaction for the anion binding in the electroneutral receptors. The binding units, which act as neutral hydrogen bond donor groups, may be amide,¹⁰ urea,¹¹

thiourea,¹² sulfonamide¹³ or carbamate¹⁴ based. The positively charged receptors for anion binding containing ammonium, guanidinium, and pyridinium groups have been reported.¹⁵

Receptors based on cholic acid are prepared by attaching electroneutral H-bond donor groups to $3\alpha\text{-OH}$, $7\alpha\text{-OH}$, and $12\alpha\text{-OH}$ moieties. Modifications of binding sites at both $7\alpha\text{-OH}$ and $12\alpha\text{-OH}$ groups have been shown to be beneficial for anion recognition because they are co-directed for guest binding. When all of the hydroxyl groups were modified, multiple H-bond donor units could be incorporated resulting in an improvement of guest binding ability. Davis group and many researchers have reported the introduction of urea and thiourea as NH hydrogen bond donors for anion recognition and shown their higher efficiency for anion binding in comparison to amide and carbamate. This has been rationalized by the higher number of hydrogen bond donors in the urea and thiourea systems.¹⁶ Although cholic acid receptors have been used for the recognition of anions, they can also be applied to recognize of both N-acetyl modified and unprotected amino acids.¹⁷

Deprotonation of relatively acidic protons of the receptor binding unit after binding with basic anions such as F^- , H_2PO_4^- , AcO^- and OH^- has been reported for various types of artificial receptors. This phenomenon is accompanied by visual color

changes of the receptor resulting in selective recognition of these anions. Phenol group and urea group are frequently used as binding units, which can be deprotonated by basic anions. The characteristic change in photochemical properties can be used for “naked-eye” detection.¹⁸

In the present work, our aim is to synthesize a receptor based on cholic acid containing NH-carbamoylsulfonamide binding site for anions. The NH-carbamate groups at positions 7 α - and 12 α - of the receptor were expectedly more acidic by attachment of the *p*-toluenesulfonyl group. The effect of the NH-carbamoylsulfonamide groups on the binding ability with anions was investigated by using both experimental and computational methods.

Materials and Methods

General

All reactions were carried out under nitrogen atmosphere. Unless otherwise noted, materials were obtained from commercial suppliers and used without further purification. All solvents used in column chromatography were distilled from their commercial grade. Dichloromethane and acetonitrile were used in AR grade without further distillation. ¹H and ¹³C-NMR spectra were recorded on 400 MHz NMR spectrometer, model Ultrashield Advance 400 from Bruker and chemical shifts were given in ppm relative to tetramethylsilane (TMS). All NMR spectra were measured in either CDCl₃ or acetone-*d*₆. FT-IR was recorded on Fourier Transform Infrared Spectroscopy, model Spectrum GX from Perkin Elmer using KBr as a matrix. Mass spectrum (ESI) was recorded on Bruker Daltonics Maldi-TOF. UV-Vis spectra were recorded on UV-

Vis Spectrophotometer, model Jasco V-650 (double beam). All spectra were recorded in acetonitrile.

Synthesis of methyl 3 α -acetoxy-7 α , 12 α -bis[toluenesulfonylcarbamate]-5 β -cholan-24-oate (**S2L**)

In a 100 mL two-necked round-bottomed flask, methyl 3 α -acetoxy-7 α , 12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-oate (**C1**) (0.50 g, 1.08 mmol) was dissolved in dichloromethane (50 mL). Then *p*-toluenesulfonylisocyanate (0.40 mL, 2.69 mmol) was added and the mixture was stirred at room temperature for 24 h. The solvent in the reaction mixture was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography, eluting with ethyl acetate : hexane = 2:1 to provide the desired product as a white solid (*R*_f = 0.61)

Compound **S2L** Yield 31.52%. ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 8.61 (1H, *bs*, NH- carbamoylsulfonamide), 7.90 (4H, *dd*, *J* = 23, 8.6 Hz, aromatic H_a), 7.62 (1H, *bs*, NH-carbamoylsulfonamide), 7.39 (4H, *dd*, *J* = 24, 8.6 Hz, aromatic H_b), 5.01 (1H, *bs*, H₁₂), 4.85 (1H, *bs*, H₇), 4.52 (1H, *m*, H₃), 3.67 (3H, *s*, COOCH₃), 2.44 (6H, *d*, *J* = 6 Hz, aromatic CH₃), 2.11 (3H, *s*, CH₃COO), 0.86 (1H, *s*, H₂₁), 0.60 (3H, *s*, H₁₉), 0.54 (3H, *d*, *J* = 6.8 Hz, H₁₈). ¹H-NMR (acetone-*d*₆) δ 10.19 (1H, *bs*, NH- carbamoylsulfonamide), 7.92 (3H, *t*, *J* = 8.4 Hz, aromatic H_a), 7.77 (1H, *d*, *J* = 8.4 Hz, aromatic H_a), 7.45 (3H, *dd*, *J* = 8.0, 3.6 Hz, aromatic H_b), 7.36 (1H, *d*, *J* = 8.4, Hz, aromatic H_b), 6.55 (1H, *bs*, NH- carbamoylsulfonamide), 4.91 (1H, *bs*, H₁₂), 4.78 (1H, *bs*, H₇), 4.45 (1H, *m*, H₃), 3.64 (3H, *s*, COOCH₃), 2.46 (6H, *d*, *J* = 2 Hz, aromatic CH₃), 2.03 (3H, *s*, CH₃COO), 0.94 (1H, *s*, H₂₁), 0.68 (3H, *s*, H₁₉), 0.47 (3H, *2s*, H₁₈). ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 12.05, 17.48, 21.73, 21.82, 22.39, 22.74,

25.28, 26.66, 27.28, 28.34, 30.67, 31.41, 34.43, 34.61, 34.85, 38.14, 40.73, 42.76, 45.05, 47.26, 51.66, 74.11, 74.27, 79.48, 126.64, 127.92, 128.31, 129.75, 129.91, 130.13, 136.10, 136.14, 145.51, 149.96, 150.46, 170.89, 174.45. FT-IR (KBr); 3593, 3234, 2955, 2872, 1739, 1162 cm^{-1} . MS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{43}\text{H}_{58}\text{N}_2\text{O}_{12}\text{S}_2$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 881, found 881.273.

Anion recognition studies

Anions recognition abilities of **S2L** were investigated using ^1H -NMR and UV-vis titration experiments. A study of the binding with anions by ^1H -NMR was performed using solutions of **S2L** in acetone- d_6 . The solution of **S2L** for UV-vis titration with all guests was prepared in acetonitrile. The concentrations of **S2L** solutions are 3.0×10^{-3} M and 4.5×10^{-4} M for NMR and UV-vis experiments, respectively. All anions are in a form of tetrabutylammonium salts.

Halide anion recognition by computational method

All possible starting geometries of steroidal-based receptor for anion substrates were constructed using experimental data. Anion targets were located in the middle of two functional groups, which are electron deficient and can form hydrogen bonds. Semi-empirical methods (AM1, PM6 and PM7) were used in the geometry optimizations for all steroidal-based receptors and complexes with anion guests.

The interaction energies were calculated follow the equation

$$E_{\text{int}} = E_{\text{S-A}} - (E_{\text{S}} + E_{\text{A}})$$

Where E_{int} = interaction energy (kJ/mol)

$E_{\text{S-A}}$ = heat of formation of anion-receptor complexes (kJ/mol)

E_{S} = heat of formation of receptors (kJ/mol)

E_{A} = heat of formation of anions (kJ/mol)

The selectivity was calculated using the interaction energy of each complex divided by the interaction energy of the complex with lowest interaction energy. All calculations were performed with the program package MOPAC2012.¹⁹ The molecular geometries were drawn with the program MOLDEN.²⁰

Results and Discussion

Synthesis of **S2L** receptor (Scheme 1)

Compound **C1** was prepared according to literature procedures^{16b,21} by simultaneous esterification of both the hydroxyl group at position C_3 and carboxylic group at position C_{24} of cholic acid using *p*-toluenesulfonic acid and methyl acetate. The coupling reaction between **C1** and toluenesulfonyl isocyanate at room temperature for 24 h afforded the desired product (**S2L**) in 31.52% yield after purification by column chromatography using ethyl acetate : hexane = 2:1 as eluent. The reaction of two hydroxyl groups at positions C_7 and C_{12} with isocyanate group of *p*-toluenesulfonyl isocyanate compound yielded two carbamosulfonamide groups, which were designed as binding sites for anion recognition. The final product was characterized by ^1H -NMR and ^{13}C -NMR spectroscopy, FT-IR and high resolution mass spectrometry.

Anions Recognition Studies by ^1H -NMR

Titration

The binding of **S2L** with anions (F^- , Cl^- , Br^- , I^- , AcO^- , BzO^- , CN^- , H_2PO_4^- , HSO_4^- , ClO_4^- and NO_3^-) was investigated using ^1H -NMR titration. As shown in Fig 1, the aromatic protons (H_a and H_b) at 7.00-

8.00 ppm were displayed. The signals of H_3 , H_7 and H_{12} were observed in the range of 4.40 – 5.00 ppm. The aliphatic protons, H_7 and H_{12} on carbons were adjacent to the carbamate binding sites. Two peaks at 10.19 and 6.55 ppm were assigned to NH-carbamatosulfonamide. One NH peak appeared at more downfield position due to a formation of intramolecular hydrogen bond between the near two adjacent carbamatosulfonamide groups. This intramolecular bond can be proven by a computational optimization of **S2L** structure using PM7 method as shown in Fig 7.

Considerably, binding affinity of **S2L** with anions remarkably exhibited the spectral changes of aromatic protons (H_a and H_b) and aliphatic protons (H_7 and H_{12}) as shown in Fig 1. In the case of NO_3^- and HSO_4^- , the peak of NH at 10.19 ppm exhibited a large downfield shift to 12.10 ppm while another NH peak at 6.55 ppm showed a small shift to downfield. The aromatic H_a and H_b protons at 7.00 – 8.00 ppm were also shifted to downfield while the aliphatic protons (H_7 and H_{12}) at 4.70 and 4.90 ppm shifted to upfield. These results indicated the formation of hydrogen bonding interactions occurred between NH-carbamatosulfonamide and the anions. In the case of Cl^- , Br^- and I^- which studied in $CDCl_3$ solution, the signal of H_a was shifted to downfield while the signal of H_b showed the upfield shift. These changes suggested the host-guest binding via hydrogen bond formation at the NH-carbamatosulfonamide binding sites. Unfortunately, the expected downfield shift of the NH-carbamatosulfonamide proton has not been detected in $CDCl_3$ solvent.

Compared to other anions, the different changes of **S2L** protons including NH, H_a , H_b , H_7 ,

H_{12} and H_3 were observed upon the addition of strong basic anions (F^- , AcO^- , BzO^- , CN^- and $H_2PO_4^-$), for instance a disappearance of the NH proton at 10.19 ppm and an upfield shift of H_a , H_b , H_7 , H_{12} signals. The observation of the different changes in 1H -NMR signals of **S2L** implied that the binding properties of **S2L** toward strong basic anions are different from those with other halide anions, NO_3^- and HSO_4^- . Results from 1H -NMR titration showed that strong bases of CN^- and F^- could strongly affect to the shifts of all protons, neighboring the anion binding site. This means that **S2L** binds strongly with CN^- and F^- . In case of CN^- (Fig 2), the peak of NH proton at 10.19 ppm simultaneously disappeared after adding 0.1 equivalents of CN^- but another NH proton at 6.55 ppm exhibited a downfield shift upon the addition of 0.1 – 0.7 equiv of CN^- and then thoroughly disappeared with the increase of CN^- to 1.0 equiv. The disappearance of both NH protons could not observe in the case of 1.0 equiv. F^- addition (Fig 3). This means that CN^- which is a stronger base than F^- , deprotonated both NH-carbamatosulfonamide groups. Interestingly, a significant upfield shift of aliphatic proton (H_3) at 4.45 ppm was also found. The reason may be electron density increasing of the deprotonated form of **S2L** induced shielding effect. Job's plot based on the 1H -NMR titration data obtained by monitoring H_7 proton signal supports a 1:1 host-guest stoichiometric ratio in all cases (Fig 4a and 4b).

Anions Recognition Studies by UV-Vis Titration

The studies of binding of **S2L** with anions were performed in acetonitrile. The titration studies of **S2L** with all anions demonstrated the spectral

changes in UV-Vis spectra in three different regions. In acetonitrile, the spectrum of **S2L** showed a peak with λ_{max} at 263 nm. Titration with CN^- , F^- , AcO^- and H_2PO_4^- caused a decreasing in the absorption band at 263 nm while a new band at λ_{max} of 250 nm was developed. An isosbestic point at 254 nm was observed (Fig 5). This indicates the formation of a new product, which was proposed to be the deprotonated form of **S2L**. This result was in agreement with a computational simulation result, which indicated the deprotonation at NH-carbamate binding site after the addition of F^- . To confirm the deprotonation of **S2L** at the NH-carbamate binding site by strong basic anion, a titration with OH^- , was performed. Similar changes in the UV-Vis spectra of **S2L**, upon the increment of CN^- , F^- , AcO^- and H_2PO_4^- , were obtained.

Unlikely, the UV-Vis spectral change of **S2L** in the case of Cl^- , Br^- and ClO_4^- (Fig 6a) displayed a slow decrease of the absorption band at 263 nm without a new absorption band and isosbestic point but a new band around 300 nm was observed upon increase amount of NO_3^- and HSO_4^- . In the presence of I^- , the characteristic absorption band at 263 nm of **S2L** remained unchanged but we found an appearance of the characteristic band of I^- and BzO^- at 250 nm and 265 nm, respectively. Concerning the aromatic guests; BzO^- (Fig 6b), the absorbance at 263 nm of **S2L** was slightly increased possibly caused by the complementary $\pi - \pi$ stacking interactions with the receptor.

To investigate the binding affinity of **S2L**, the log K values calculated using the Specfit 32 program and according to the Benesi-Hilderbrand equation of 1:1 host-guest complexation²² from UV-vis titration data, were evaluated. As shown in Table

1, the highest log K value of 6.08 was obtained for the complex with CN^- . The low log K values obtained in the case of Cl^- , Br^- , I^- , BzO^- , NO_3^- , HSO_4^- and ClO_4^- binding related to a low anion basicity and large ionic radii. These properties indicated that these anions did not prefer to bind with **S2L**. Surprisingly, the induced-fit binding involving both H-bonds and $\pi - \pi$ stacking interactions in the complexe of **S2L** with BzO^- , provided the lowest log K values of 4.11. From all results, it can be explained that a large size and steric guest gave the promising influence of binding affinity.

Anions Recognition Studies by Computational Simulation

The optimized structure of **S2L** (Fig 7) was observed the intramolecular hydrogen bonds between the near sulfonamide group and NH group. The optimized geometries of halide-**S2L** complexes showed that two NH-carbamosulfonamide binding sites in **S2L** formed hydrogen bond with the halide anions. The halide anions located in the middle of two NH-carbamosulfonamide groups and were stabilized by the hydrogen bond. Interestingly, it was found that fluoride anion removed one of hydrogen from one NH-carbamosulfonamide group in the fluoride-**S2L** complex, shown in Fig 8. This simulated complex structure supported our hypothesis about the possibility of deprotonation at the NH-carbamate of the receptor by basic anions such as fluoride. Similar results have been reported by many research groups [18]. They have synthesized the hydoxycholic acid-based receptor for studying the binding properties with anions; F^- , Cl^- , Br^- , I^- , and H_2PO_4^- . The optimized structures of **S2L** complexes with Cl^- , Br^- , and I^- , revealed that

they preferentially formed only hydrogen bonds with both NH-carbamosulfonamide binding sites.

Table 2 showed the binding energy and the selectivity of halide-steroid base complexes. It was found that AM1 method yielded the overestimated binding energies when compared to the PM6 and PM7 methods. The calculated binding energies from all three semi-empirical methods showed a dramatic increase in the series from the fluoride-complex to the iodide-complex. This demonstrated that the halide complex became less stable with the increasing size of the halide anion. As anticipated, the calculated selectivity further supports the results obtained by ^1H -NMR and UV-Vis spectroscopy that **S2L** offered a high stability with F^- over other halide ions.

Conclusions

The cholic acid receptor **S2L** containing two NH-carbamosulfonamide binding sites has been successfully designed and synthesized. Its recognition properties toward anions were investigated. The interaction with cyanide, fluoride, acetate and dihydrogenphosphate displayed deprotonation at the NH-carbamosulfonamide binding site. These complexes also exhibited highest binding strength. The stoichiometry of 1:1 was determined using Job's method from the ^1H -NMR data for all anions. The optimized geometry of the fluoride-**S2L** complex revealed the formation of hydrogen bonding and deprotonation at one side of the NH-carbamosulfonamide binding unit while other halide anions formed only hydrogen bonding with the NH-carbamosulfonamide of **S2L**. The receptor **S2L** bound with aromatic guests; BzO^- using both H-bonds and $\pi - \pi$ stacking interactions. Distinct

changes in the UV-vis spectra of **S2L** could define the performance of guests in three categories such as deprotonating anion (CN^- , F^- , AcO^- and H_2PO_4^-), $\pi - \pi$ stacking binding guests (BzO^-), and H-bond forming guests (Cl^- , Br^- , I^- , NO_3^- , HSO_4^- and ClO_4^-). In the presence of the deprotonating anions, a gradual decrease in the absorption band at 263 nm with a concomitant of increase in the new absorption band at 250 nm was significantly observed. This new band reasonably corresponds to the deprotonated form of the receptor.

Acknowledgements

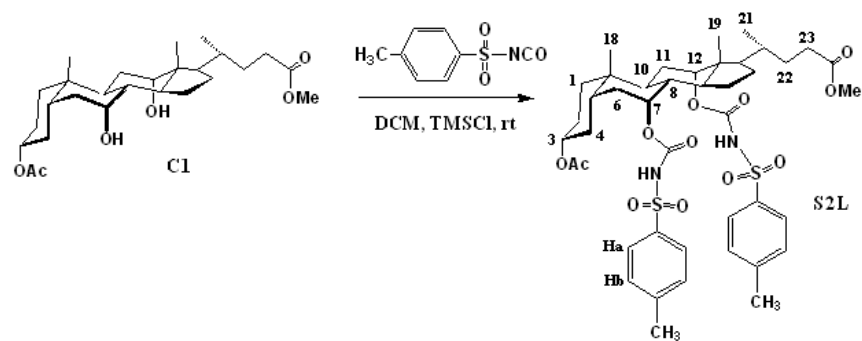
This work was supported by the Thailand Research Fund (TRF), the Commission on Higher Education (CHE) (MRG 5580242 and RSA 5680015) and the Naresuan University, Thailand for a short-term research working abroad grant in year 2012.

References

1. Davis AP. Cholesterols *et al.*; steroids as structural components in molecular engineering. *Chem Soc Rev* 1993;22:243-53.
2. Li YX, Dias JR. Dimeric and oligomeric steroids. *Chem Rev* 1997;97(1):283-304.
3. Wallimann P, Marti T, Furer A, Diederich F. Steroids in molecular recognition. *Chem Rev* 1997;97(5):1567-1608.
4. Davis AP, Joos J-B. Steroids as organising elements in anion receptors. *Coord Chem Rev* 2003;240:143-156.
5. Davis AP, Wareham RS. Carbohydrate recognition through noncovalent interactions: a challenge for biomimetic and supramolecular chemistry. *Angew Chem Int Ed Engl* 1999; 38(20):2978-96.
6. (a) Gale PA, Sessler JL, Kral V. Calixpyrroles. *Chem Commun* 1998:1-8. (b) Antonisse MMG, Reinhoudt DN. Neutral anion receptors: design and application. *Chem Commun* 1998:443-8. (c) Jagessar RC, Shang M, Scheidt WR, Burns DH. Neutral ligands for selective chloride anion complexation: ($\alpha,\alpha,\alpha,\alpha$)-5,10,15,20-Tetrakis(2-(aryluore)phenyl)porphyrins. *J Am Chem Soc* 1998;120(45):11684-92. (d) Buhlmann P, Nishizawa S, Xiao KP, Umezawa Y. Strong hydrogen bond-mediated complexation of H_2PO_4^- by neutral bis-thiourea hosts. *Tetrahedron* 1997;53:1647-54. (e) Kavallieratos K, Bertao CM, Crabtree RH. Hydrogen bonding in anion recognition: a family of versatile, nonpreorganized neutral and acyclic receptors. *J Org Chem* 1999;64(5):1675-83.
7. (a) Lambert TN, Boon JM, Smith BD, Perez-Payan MN, Davis AP. Facilitated phospholipid flip-flop using synthetic steroid-derived translocases. *J Am Chem Soc* 2002;124(19):5276-7. (b) McNally BA, Koulov AV, Smith BD, Joos J-B, Davis AP. A fluorescent assay for chloride transport; identification of a synthetic anionophore with improved activity. *Chem Commun* 2005:1087-9. (c) Davis AP, Sheppard DN, Smith BD. Development of synthetic membrane transporters for anions. *Chem Soc Rev* 2007;36:348-57.
8. Ayling AJ, Broderick S, Clare JP, Davis AP, Perez-Payan MN, Lahtinen M, Nissinen MJ, Rissanen K. An extraction-based assay for neutral anionophores: the measurement of high binding constants to steroidal receptors in a nonpolar solvent. *Chem Eur J* 2002;8(9):2197-2203.
9. Buhlmann P, Pretsch E, Bakker E. Carrier-based ion-selective electrodes and bulk optodes. 2. ionophores for potentiometric and optical sensors. *Chem Rev* 1998;98(4):1593-1688.
10. (a) Choi K, Hamilton AD. Selective anion binding by a macrocycle with convergent hydrogen bonding functionality. *J Am Chem Soc* 2001;123(10):2456-7. (b) Chmielewski MJ, Charon M, Jurczak J. 1,8-Diamino-3,6-dichlorocarbazole: a promising building block for anion receptors. *Org Lett* 2004;6(20):3501-4. (c) Bondy CR, Loeb SJ. Amide based receptors for anions. *Coord Chem Rev* 2003;240:77-99.
11. (a) Koulov AV, Lambert TN, Shukla R, Jain M, Boon JM, Smith BD, Li H, Sheppard DN, Joos J-B, Clare JP, Davis AP. Chloride transport across vesicle and cell membranes by steroid-based receptors. *Angew Chem Int Ed* 2003;42:4931-3. (b) McNally BA, Koulov AV, Smith BD, Joos J-B, Davis

- AP. A fluorescent assay for chloride transport; identification of a synthetic anionophore with improved activity. *Chem Commun* 2005:1087-9.
12. Nie L, Li Z, Han J, Zhang X, Yang R, Liu W-X, Wu F-Y, Xie J-W, Zhao Y-F, Jiang Y-B. Development of *N*-benzamidothioureas as a new generation of thiourea-based receptors for anion recognition and sensing. *J Org Chem* 2004;69(19):6449-54.
13. (a) Shang X-F, Lin H, Lin H-K. The synthesis and recognition properties of colorimetric fluoride receptors bearing sulfonamide. *J Fluorine Chem* 2007;128:530-4. (b) Shin-ichi K, Takashi S, Yumihiko Y. Effect of hydroxyl groups in receptors bearing disulfonamide on anion recognition in acetonitrile- d_3 . *Tetrahedron Lett* 2002;43:7059-61. (c) Kavallieratos K, Bertao CM, Crabtree RH. Hydrogen bonding in anion recognition: a family of versatile, nonpreorganized neutral and acyclic receptors. *J Org Chem* 1999;64:1675-83. (d) Mammoliti O, Allasia S, Dixon S, Kilburn JD. Synthesis and anion-binding properties of new disulfonamide-based receptors. *Tetrahedron* 2009;65:2184-95.
14. (a) Siracusa L, Hurley FM, Dresen S, Lawless LJ, Perez-Payan MN, Davis AP. Steroidal ureas as enantioselective receptors for an *N*-acetyl α -amino carboxylate. *Org Lett* 2002;4(26):4639-42. (b) Kavallieratos K, deGala SR, Austin DJ, Crabtree RH. A readily available non-preorganized neutral acyclic halide receptor with an unusual nonplanar binding conformation. *J Am Chem Soc* 1997;119(9):2325-26. (c) Fang L, Chan W-H, He Y-B, Kwong DWJ, Lee AWM. Fluorescent anion sensor derived from cholic acid: the use of flexible side chain. *J Org Chem* 2005;70(19):7640-6.
15. (a) Haj-Zaboubi M, Mitzel P-DNW, Schmidtchen FP. The rational design of anion host compounds: an exercise in subtle energetics. *Angew Chem Int Ed* 2002;41(1):104-7. (b) Best MD, Tobey SL, Anslyn EV. Abiotic guanidinium containing receptors for anionic species. *Coord Chem Rev* 2003;240(1-2):3-15. (c) Llinares JM, Powell D, Bowman-James K. Ammonium based anion receptors. *Coord Chem Rev* 2003;240:57-75. (d) Khatri VK, Chahar M, Pavani K, Pandey PS. Bile acid-based cyclic bisbenzimidazolium receptors for anion recognition: highly improved receptors for fluoride and chloride ions. *J Org Chem* 2007;72(26):10224-6.
16. (a) del Amo V, Siracusa L, Markidis T, Baragana B, Bhattarai KM, Galobardes M, Naredo G, Perez-Payan MN, Davis AP. Differentially-protected steroidal triamines; scaffolds with potential for medicinal, supramolecular, and combinatorial chemistry. *Org Biomol Chem* 2004;2:3320-8. (b) Davis AP, Perry JJ, Williams RP. Anion recognition by tripodal receptors derived from cholic acid. *J Am Chem Soc* 1997;119:1793-4. (c) Ayling AJ, Perez-Payan MN, Davis AP. New cholapod anionophores; high-affinity halide receptors derived from cholic acid. *J Am Chem Soc* 2001;123(50):12716-7. (d) Clare JP, Ayling AJ, Joos J-B, Sisson AL, Magro G, Perez-Payan MN, Lambert TN, Shukla R, Smith BD, Davis AP. Substrate discrimination by cholapod anion receptors: geometric effects and the "affinity-selectivity principle". *J Am Chem Soc* 2005;127(30):10739-46.

17. (a) Liu S-Y, Fang L, He Y-B, Chan W-H, Yeung K-T, Cheng Y-K, Yang R-H. Cholic-acid-based fluorescent sensor for dicarboxylates and acidic amino acids in aqueous solutions. *Org Lett* 2005;7(26):5825-8. (b) Davis AP, Lawless LJ. Steroidal guanidinium receptors for the enantioselective recognition of *N*-acyl α -amino acids. *Chem Commun* 1999:9-10. (c) Lawless LJ, Blackburn AG, Ayling AJ, Perez-Payan MN, Davis AP. Steroidal guanidines as enantioselective receptors for *N*-acyl α -amino acids. Part 1. 3 α -Guanylated carbamates derived from cholic acid. *J Chem Soc Perkin Trans 1* 2001:1329-41. (d) Sirikulajorn A, Duanglaor P, Ruangpornvisuti V, Tomapatanaget B, Tuntulani T. Tryptophan receptors containing acridine-based thiourea. *Supramol Chem* 2009;21(6):486-94. (e) Sirikulajorn A, Tuntulani T, Ruangpornvisuti V, Tomapatanaget B, Davis AP. A steroid-based receptor for unprotected amino acids: the enantioselective recognition of L-tryptophan. *Tetrahedron* 2010;66(37):7243-7248.
18. (a) Kim KS, Kim H-S. A hydoxycholic acid-based molecular tweezer: a highly selective fluoride anion receptor. *Tetrahedron* 2005;61(52):12366-70. (b) Shang X, Li X, Han J, Jia S, Zhang J, Xu X. Colorimetric and fluorescence turn-on sensor for biologically important anions based on carbazole derivative. *Inorg Chem Commun* 2012;16:37-42. (c) Bhardwaj VK, Sharma S, Singh N, Hundal MS, Hundal G. New tripodal and dipodal colorimetric sensors for anions based on tris/bis-urea/thiourea moieties. *Supramol Chem* 2011;23:790-800. (d) Lin Z-H, Ou S-J, Duan C-Y, Zhang B-G, Bai Z-P. Naked-eye detection of fluoride ion in water: a remarkably selective easy-to-prepare test paper. *Chem Commun* 2006:624-6. (e) Camiolo S, Gale PA, Hursthouse MB, Light ME. Nitrophenyl derivatives of pyrrole 2,5-diamides: structural behaviour, anion binding and colour change signalled deprotonation. *Org Biomol Chem* 2003;1:741-4. (f) Panzella L, Pezzella A, Arzillo M, Manini P, Napolitano A, d'Ischia M. A novel fluoride-sensing scaffold by a peculiar acid-promoted trimerization of 5,6-dihydroxyindole. *Tetrahedron* 2009;65(10):2032-6.
19. MOPAC2012, James JP, Stewart Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA.
20. Schaftenaar G, Noordik JH. Molden: a pre- and post-processing program for molecular and electronic structures. *J Comput.-Aided Mol Design* 2000;14:123-34.
21. Davis AP, Perez-Payan MN. The "triamino-analogue" of methyl cholate: a practical, large-scale synthesis. *Synlett* 1999:991-3.
22. Hirose K. A practical guide for the determination of binding constants. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 2001;39:193-209.



Scheme 1. Synthesis and numbering system for receptor **S2L**.

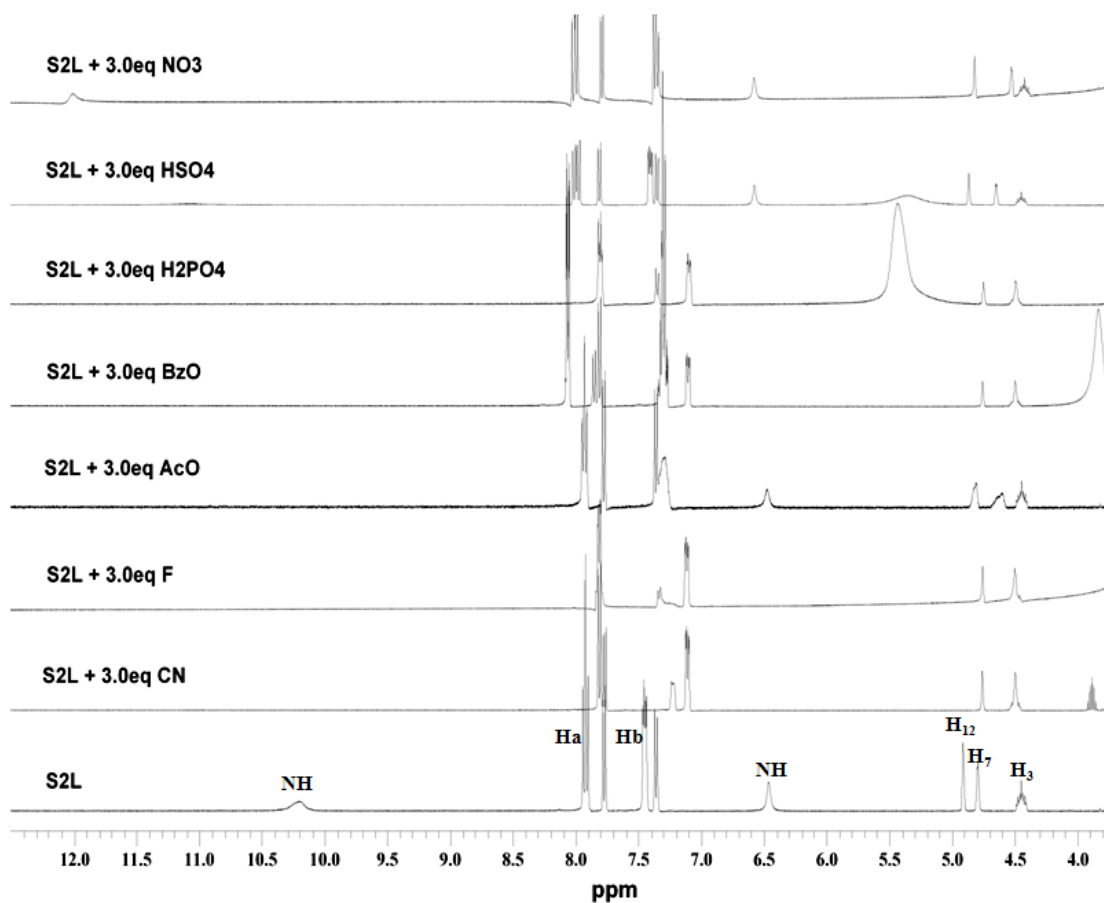


Fig. 1 Partial ^1H -NMR spectra of **S2L** in acetone- d_6 with 3 equivalents of anions

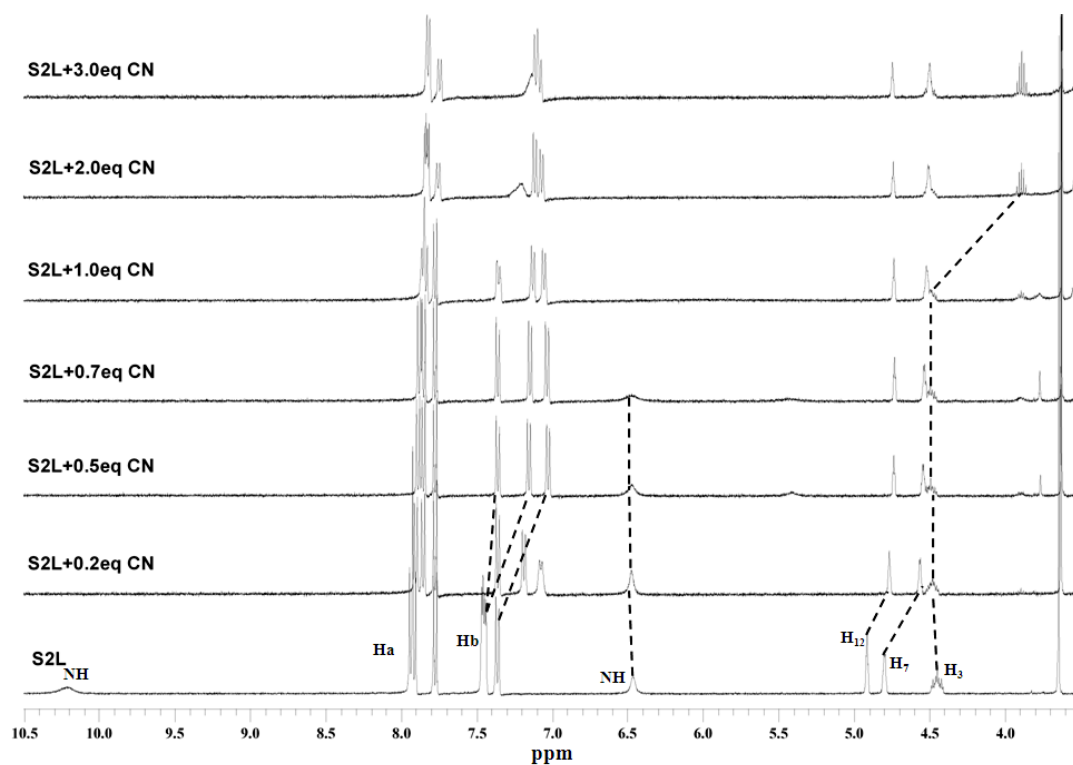


Fig. 2 Partial ^1H NMR titration spectra of **S2L** in $\text{acetone-}d_6$ upon adding cyanide ion from 0.2 to 3.0 equivalents

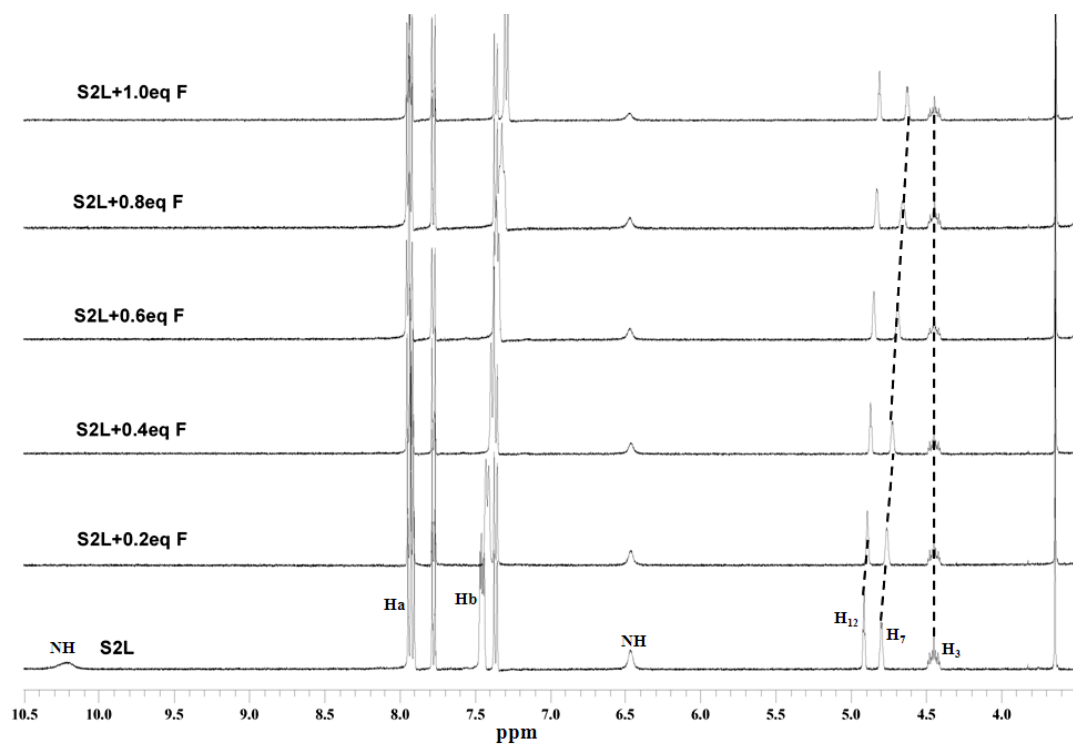


Fig. 3 Partial ^1H NMR titration spectra of **S2L** in $\text{acetone-}d_6$ upon adding fluoride ion from 0.2 to 1.0 equivalents.

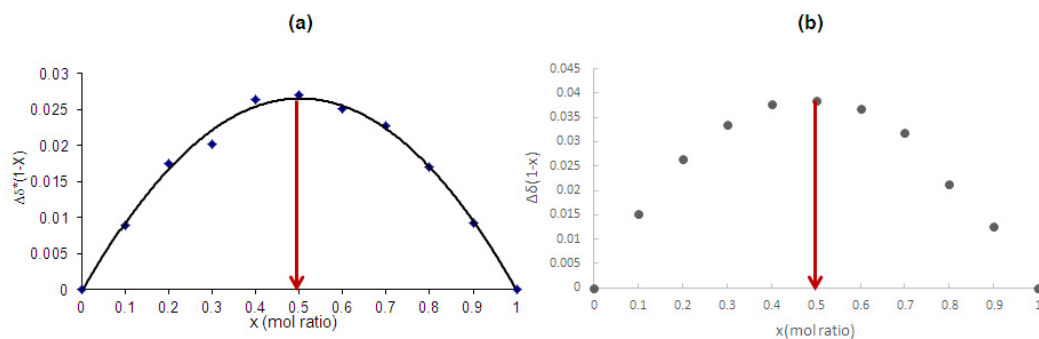


Fig. 4 Job plot for the complex between **S2L** and (a) fluoride ion and (b) cyanide ion (^1H NMR experiments by monitoring the shift of H_7 proton).

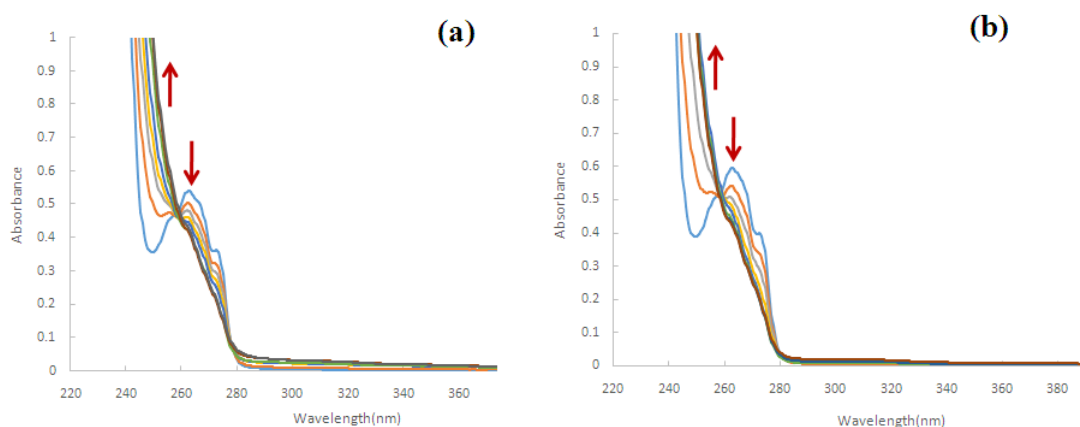


Fig. 5 Changes in the absorption spectra of **S2L** ($4.5 \times 10^{-4} \text{ M}$) upon addition of (a) fluoride ion and (b) cyanide ion (0-10 equiv) in acetonitrile

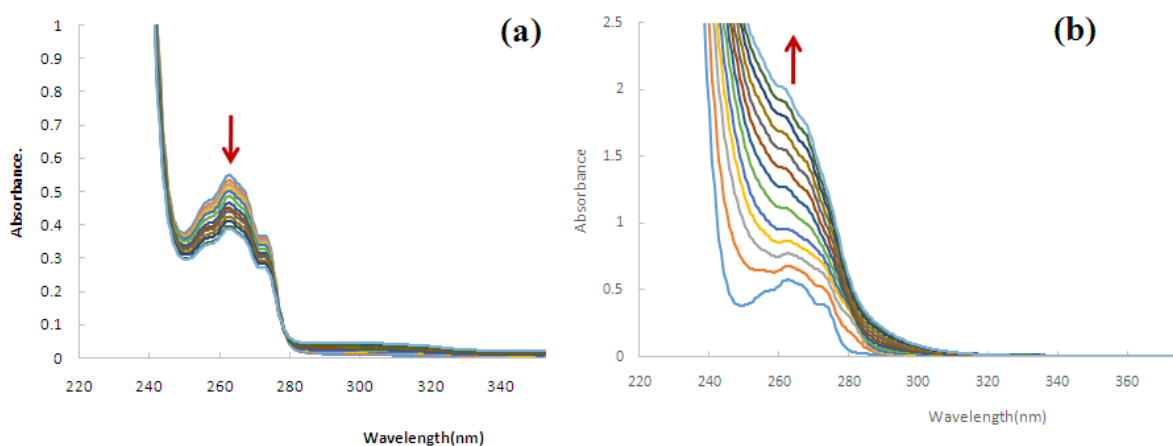


Fig. 6 Changes in the absorption spectra of **S2L** ($4.5 \times 10^{-4} \text{ M}$) upon addition of (a) perchlorate ion and (b) benzoate ion (0-10 equiv) in acetonitrile

Table 1. Binding constants calculated from UV-vis titration of receptor **S2L** for all anions

Anions	Log K ^a	Log K ^b
CN ⁻	-	6.08
F ⁻	5.82	5.57
Cl ⁻	4.05	-
Br ⁻	2.69	-
AcO ⁻	-	5.16
BzO ⁻	-	4.11
H ₂ PO ₄ ⁻	-	5.43
HSO ₄ ⁻	-	4.62
ClO ₄ ⁻	-	5.36
NO ₃ ⁻	-	4.24

^a log K values are calculated from Specfit32 program.

^b log K values are calculated from Benesi-Hilderbrand equation

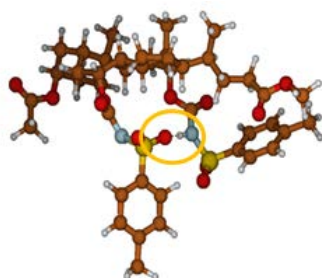


Fig. 7 The optimized geometry of the receptor **S2L** using semi-empirical methods PM7 showing an intramolecular hydrogen bonding between two carbamosulfonamide binding units

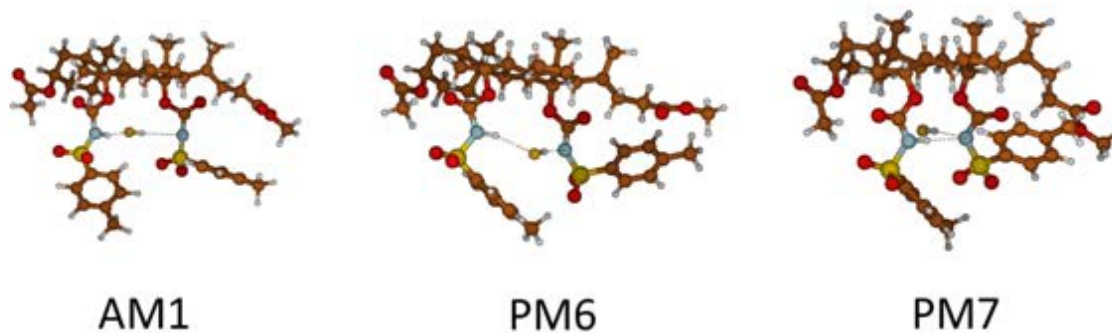


Fig. 8 The optimized geometry of the fluoride-**S2L** based complex using semi-empirical methods (AM1, PM6 and PM7) showing the deprotonation at one of NH-carbamosulfonamide binding unit by F⁻.

Table 2. The interaction energy and the selectivity of steroid-based receptor complexes by semi-empirical methods

Complexes	Interaction energy (kJ/mol)			Selectivity		
	AM1	PM6	PM7	AM1	PM6	PM7
S2L-F	-575.07	-260.68	-279.50	1.00	1.00	1.00
S2L-Cl	-194.98	-146.76	-147.74	0.34	0.56	0.53
S2L-Br	-184.05	-164.77	-84.00	0.32	0.63	0.30
S2L-I	-160.44	-129.41	-63.99	0.28	0.50	0.23