



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การตรวจวัดแอนไอออนและกรดอะมิโนด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์
โดยใช้สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์ของ Cu^{2+} และ Zn^{2+}
กับลิแกนด์ประเภท bis-tripodal amine และสี่ย้อม

โดย

ผศ. ดร. จอมใจ สุกใส

มีนาคม 2560

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การตรวจวัดแอมไพออนและการดะมิโนด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์
โดยใช้สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์ของ Cu^{2+} และ Zn^{2+}
กับลิแกนด์ประเภท bis-tripodal amine และสีย้อม

โดย

ผศ. ดร. จอมใจ สุกใส

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและมหาวิทยาลัยบูรพา
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. และมหาวิทยาลัยบูรพา
ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Project Code : RSA5580031
Project Title : การตรวจวัดแอนไอออนและกรดอะมิโนด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ โดยใช้สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์ของ Cu^{2+} และ Zn^{2+} กับลิแกนด์ประเภท bis-tripodal amine และสีย้อม
Investigator : ผศ. ดร. จอมใจ สุกใส
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จ. ชลบุรี
E-mail Address : c.suksai@yahoo.com
Project Period : 3 ปี

Abstract

The dinuclear Zn(II) complex of anthracene based tripodal tetramine **Zn₂L** was synthesized, and its sensing abilities towards anions was investigated using the indicator displacement assay (IDA) approach with four complexometric indicators: pyrocatechol violet (**PV**), bromopyrogallol red (**BPG**), methylthymol blue (**MTB**) and xylenol orange (**XO**). UV-vis spectrophotometry results indicated that the **Zn₂L –MTB** ensemble sensor could discriminate the pyrophosphate anion (PPi) from other phosphate containing anions. ¹H and ³¹P NMR spectroscopy as well as DFT calculations confirmed that PPi bound to **Zn₂L** in a 2 : 2 manner. Both NMR spectroscopy and UV-vis spectrophotometry suggested that the two bulky tripodal tetramine units in **Zn₂L** played an important role to provide the ensemble cleft for **MTB**, giving rise to an ensemble that could be displaced exclusively by PPi. The detection limit of **PPi** for the reported IDA system was 0.3 μM in 20% (v/v) water–acetonitrile buffered at pH 7.4 with HEPES.

The dinuclear complexes of Cu^{2+} and Zn^{2+} with *p-tert*-butylcalix[4]arenes based ligands containing tripodal amine (**L1** and **L2**), have been synthesized. Two copper(II) chloride complexes of ligand **L1** (**CuL1**) and **L2** (**CuL2**) can be obtained as the green solid in 42 % and 58 % yields, respectively. The zinc(II) perchlorate complexes of ligand **L1** (**ZnL1**) and **L2** (**ZnL2**) can be synthesized and obtained as white solids in 71% and 67% yields, respectively. The sensing applications of **CuL1**, **CuL2**, **ZnL1** and **ZnL2** as M-IDA receptors for anions and α -amino acids have investigated in 80% (v/v) $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ in 10 mM HEPES buffer pH 7.4 . Four complexometric indicators are chosen as the reporting indicators; pyrocatechol violet (**PV**), pyrogallol red (**PGR**), methythymol blue (**MTB**) and 4-(2-pyridylazoresorcinol) (**PAR**). From the screening test results showed that only **ZnL2** could be used as IDA receptors for **PPi** and **His** by changing indicators. It was found that **[ZnL2•PGR]** ensemble could discriminate **PPi** from the other phosphate containing anions in which **PPi** could replace the bound **PGR** from the ensemble structure and form the adduct complex **[ZnL2•PPi]**. Whereas **[ZnL2•2PV]** ensemble could sense **His** selectively in which His could replace the bound **PV** from the ensemble and pull out zinc(II) ions from the **ZnL2** giving the **[Zn(His)₂]** species and liberating free **L2** in the solution. In this research, there are four influence factors to control the selective sensing of anionic guest molecules under IDAs approach; (i) the nature of metal ions, (ii) spacer flexibility, (iii) topological structure of indicators and (iv) the coordination chemistry of receptor and guest molecules.

The di-tripodal amine calix[4]arene, **L1**, was successfully synthesized and used as an ion carrier in poly(vinyl chloride) (PVC) membrane electrodes. Compound **L1** was employed to demonstrate a new concept in anion sensing by preparing an allosteric PVC membrane that can respond selectively to a certain anion in the presence of a metal effector. Membranes containing compounds **L1** and potassium tetrakis(p-chlorophenyl)borate (KTPClPB) as an ionic additive showed Donnan exclusion failure upon measuring the potential (EMF) responses of Cu^{2+} and responded to the co-anion by giving negative EMF changes, while membranes containing compound **L2**, an anthracene-based mono-tripodal amine ligand, gave positive potentials to most metal ions. Upon preconditioning of the membranes containing **L1** and 75 mol% KTPClPB in CuCl_2 , the membranes showed the highest selectivity towards thiocyanate with a near Nernstian slope of $-59.6 \text{ mV decade}^{-1}$, a 10^{-5} to 10^{-2} M linear range, and a detection limit of $4.4 \times 10^{-6} \text{ M}$. The best allosteric membrane can be used in the pH range 3–7 with good reversibility, and also applied to indirectly determine the concentration of Fe^{3+} in aqueous solution.

Keywords : Ionophore, Ion selective electrode, Indicator displacement assay, pyrophosphate anion, histidine, thiocyanate

บทคัดย่อ

ได้สังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์ของลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของแอนทราซีนที่มีหมู่ไทโรโพลอลเอมีนเป็นองค์ประกอบในโมเลกุล (Zn_2L) เพื่อนำมาใช้ในการตรวจวัดแอนไอออนด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ (IDA) และใช้อินดิเคเตอร์ไฟโรแคทีคอลไวโอเลต (PV) โบรโมไฟโรกลลอล เรด (BPG) เมทิลไทมอล บลู (MTB) และไซลีโนล ออเรนจ์ (XO) เป็นหน่วยให้สัญญาณเชิงแสง จากการศึกษาด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลพบว่าเอนไซม์เบิล Zn_2L -MTB สามารถตรวจวัดแอนไอออนไพโรฟอสเฟต (PPi) ได้เป็นอย่างดีโดยไอออนลบฟอสเฟตชนิดอื่น ๆ ไม่สามารถรบกวนการตรวจวัดได้ จากการพิสูจน์โครงสร้างของสารประกอบของ Zn_2L กับ PPi ที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค ^1H , ^{31}P NMR และการคำนวณทางเคมีคอมพิวเตอร์พบว่าสารประกอบโคออร์ดิเนชันที่เกิดขึ้นมีอัตราส่วนของ PPi : Zn_2L คือ 2 : 2 การตรวจวัด PPi ด้วยเอนไซม์เบิล Zn_2L -MTB มีขีดจำกัดของการตรวจวัดคือ $0.3 \mu\text{M}$ โดยใช้สารละลายผสม 20% (v/v) น้ำ-อะซิโตรไนไตรล์ ในสารละลาย HEPES บัฟเฟอร์ pH 7.4 เป็นตัวทำละลาย

ได้สังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์ของไอออน Cu^{2+} และ Zn^{2+} กับลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของคาลิกซ์[4]แอรีนที่มีหมู่ไทโรโพลอลเอมีนเป็นองค์ประกอบในโมเลกุล (CuL1 , CuL2 , ZnL1 และ ZnL2) เพื่อนำมาใช้เป็นรีเซบเตอร์สำหรับการตรวจวัดแอนไอออนและกรดอะมิโนด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ โดยใช้สารละลายผสม 20% (v/v) น้ำ-อะซิโตรไนไตรล์ ในสารละลาย HEPES บัฟเฟอร์ pH 7.4 เป็นตัวทำละลาย และใช้อินดิเคเตอร์ไฟโรแคทีคอลไวโอเลต (PV) โบรโมไฟโรกลลอล เรด (BPG) เมทิลไทมอล บลู (MTB) และ 4-(2-ไพริดีลเอโซเรโซซินอล) (PAR) เป็นหน่วยให้สัญญาณเชิงแสง จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์เบิล $[\text{ZnL2} \cdot \text{PGR}]$ สามารถตรวจวัดไพโรฟอสเฟตแอนไอออน (PPi) ได้อย่างจำเพาะเจาะจง โดย PPi สามารถเข้าไปแทนที่ PGR ในโครงสร้างของเอนไซม์เบิล $[\text{ZnL2} \cdot \text{PGR}]$ และได้สารประกอบ $[\text{ZnL2} \cdot \text{PPi}]$ เป็นผลิตภัณฑ์ ในขณะที่เอนไซม์เบิล $[\text{ZnL2} \cdot 2\text{PV}]$ สามารถตรวจวัดกรดอะมิโนฮิสทีดีน (His) ได้อย่างจำเพาะเจาะจง โดยที่ His สามารถเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ PV ในโครงสร้างของเอนไซม์เบิลได้แล้ว His ยังสามารถเข้าไปแทนที่ลิแกนด์ L2 ในโครงสร้างของสารประกอบ ZnL2 และได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบ $[\text{Zn}(\text{His})_2]$ และลิแกนด์ L2 ในรูปอิสระอยู่ในสารละลาย จากงานวิจัยนี้พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดเกสต์โมเลกุลด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ ได้แก่ ธรรมชาติของไอออนโลหะ ความยืดหยุ่นของสายสเปซเซอร์ โครงสร้างของอินดิเคเตอร์ และสมบัติทางเคมีของสารประกอบโคออร์ดิเนชันระหว่างรีเซบเตอร์และโมเลกุลของเกสต์

ได้ทำการสังเคราะห์สารประกอบที่เป็นอนุพันธ์ของคาลิกซ์[4]แอรีนที่หมู่ไทรโพรดอลเอมีนเป็นองค์ประกอบภายในโมเลกุล (**L1**) เพื่อนำมาพัฒนาเป็นเมมเบรนอิเล็กโทรดสำหรับการตรวจวัดไอออน SCN^- และ Fe^{3+} เมมเบรนอิเล็กโทรดดังกล่าวเตรียมได้จากไอโอโนฟอร์ **L1** โดยมี potassium tetrakis(p-chlorophenyl)borate (KTPCIPB) เป็นไอออนิกแอดดีทีฟ จากการศึกษาพบว่าอิเล็กโทรดที่เตรียมได้แสดงผลของ Donnan exclusion failure ในการตอบสนองการตรวจวัดไอออน Cu^{2+} เมื่อมีไอออนลบอยู่ในระบบเนื่องจากค่าศักย์ไฟฟ้าที่ตรวจวัดมีค่าลดลง เมื่อนำเมมเบรนอิเล็กโทรดที่เตรียมได้จากไอโอโนฟอร์ **L1** กับสารประกอบ CuCl_2 มาใช้ตรวจวัดไอออนลบพบว่ามีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดไอออนไทโอไซยาเนต (SCN^-) ได้เป็นอย่างดี ให้ค่า Nernstian slope เท่ากับ $-59.6 \text{ mV decade}^{-1}$ ช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัดอยู่ที่ความเข้มข้น $10^{-5} - 10^{-2} \text{ M}$ ค่า pH ที่เหมาะสมในการตรวจวัดคือ 3-7 และมีขีดจำกัดของการตรวจวัดเท่ากับ $4.4 \times 10^{-6} \text{ M}$ นอกจากนี้ยังนำอิเล็กโทรดดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดไอออน Fe^{3+} ในสารละลายแบบวิธีทางอ้อมได้อีกด้วย

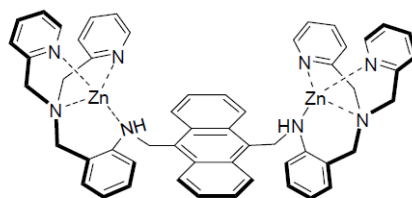
คำสำคัญ : ไอโอโนฟอร์, เมมเบรนอิเล็กโทรดสำหรับการตรวจวัดไอออน, เทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์, โพโรฟอสเฟตแอนไอออน, ฮิสทิดีน, ไทโอไซยาไนด์

Executive Summary

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชันของไอออน Cu^{2+} และ Zn^{2+} กับลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของแอนทราซีนและคาลิกซ์[4]แอรีนที่มีหมู่ไทรโพลดอลเอมีนหรือไทรโพลดอลเอไมด์เป็นองค์ภายในโมเลกุล เพื่อนำมาใช้เป็นรีเซบเตอร์สำหรับการตรวจวัดแอนไอออนและกรดอะมิโนด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ นอกจากนี้ยังพบว่าลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของคาลิกซ์[4]แอรีนที่มีหมู่ไทรโพลดอลเอไมด์เป็นองค์ประกอบในโมเลกุล ยังสามารถนำมาใช้เป็นไอโอโนฟอร์สำหรับการเตรียมเป็นเมมเบรนอิเล็กโทรดที่สามารถตรวจวัดไอออน Fe^{3+} ในสารละลายได้

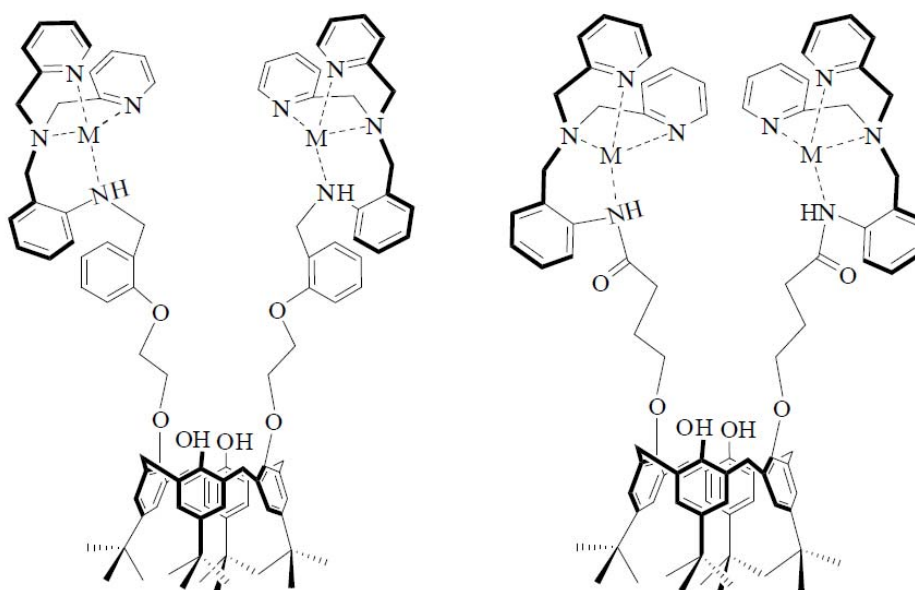
ดังนั้นในรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์นี้จึงประกอบไปด้วยงานวิจัย 3 เรื่องคือ

1. Discriminate sensing of pyrophosphate using a new tripodal tetramine-based dinuclear Zn(II) complex under an indicator displacement assay approach



Zn_2L

2. Investigation of the highly selective sensing of pyrophosphate and histidine by tripodal tetramine-calix[4]arene based dinuclear complexes under displacement assay

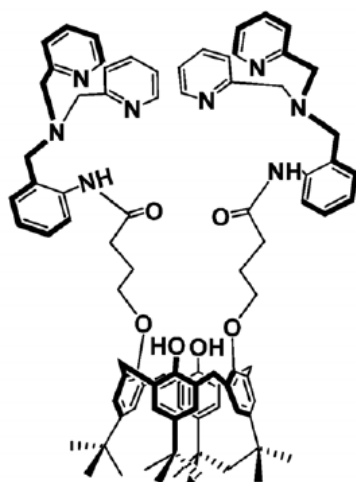
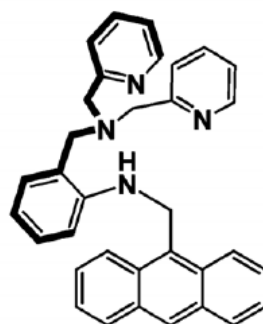


ML1

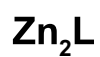
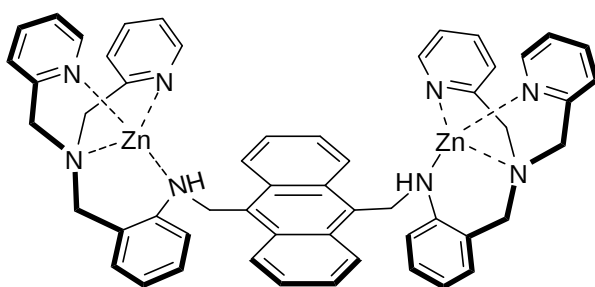
$\text{M} = \text{Cu}^{2+}, \text{Zn}^{2+}$

ML2

3. Intriguing sensing properties of a di-tripodal amine calix[4]arene ionophore towards anions from Donnan failure in ion-selective membranes induced by Cu^{2+}

**L1****L2**

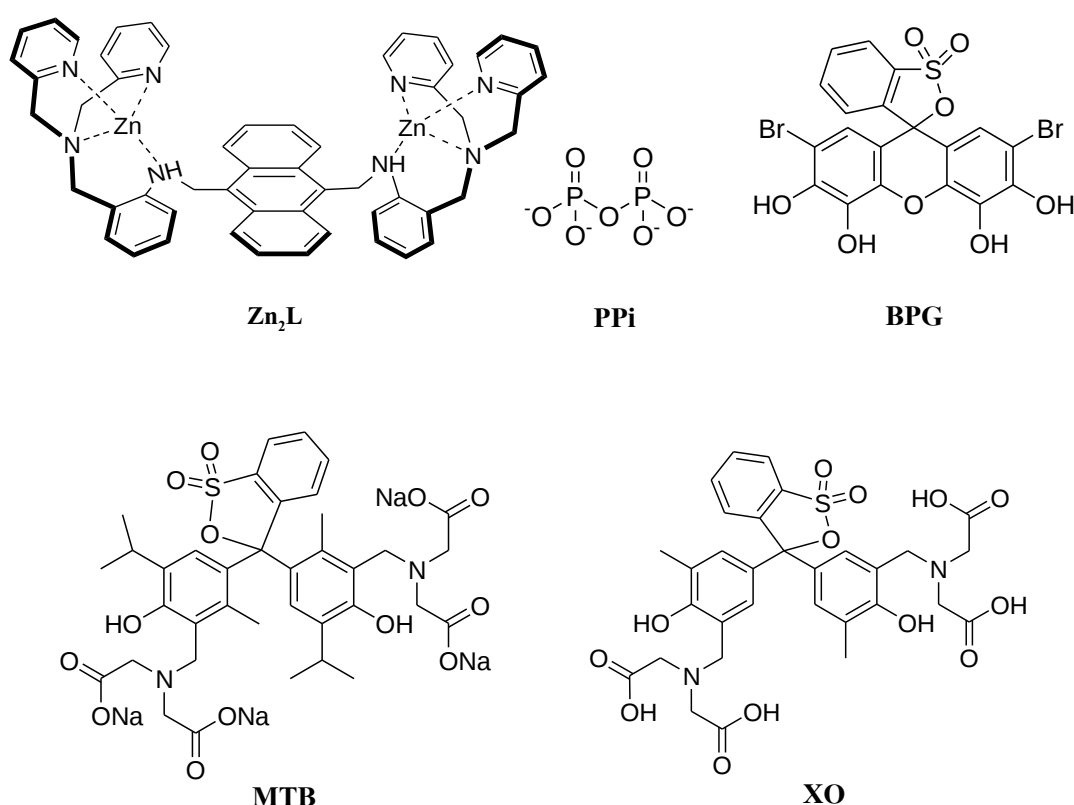
**Discriminate sensing of pyrophosphate using a new
tripodal tetramine-based dinuclear Zn(II) complex
under an indicator displacement assay approach**



ไพโรฟอสเฟตแอนไอออน ($P_2O_7^{4-}$ หรือ **PPi**) เป็นแอนไอออนที่เกิดจากการสลายตัวของ Adenosine triphosphate หรือ ATP เพื่อให้ได้พลังงานสำหรับสิ่งมีชีวิตใช้ในการดำรงชีพ นอกจากนี้แล้วในทางการแพทย์ PPi ยังถูกนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพสำหรับการวินิจฉัยผู้ป่วยที่มีภาวะโรคเก๊าท์เทียม (pseudogout) เนื่องจากผู้ป่วยดังกล่าวจะมีปริมาณของผลึกแคลเซียมไพโรฟอสเฟตไดไฮเดรต (calcium pyrophosphate dihydrate หรือ CPPD) สะสมอยู่ในไขข้อในปริมาณที่มากกว่าปกติ (Lee et al., 2007) การวินิจฉัยโรคเก๊าท์เทียมในปัจจุบันนั้นทำได้โดยการเจาะเอาน้ำในข้อไปตรวจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดพิเศษ (compensated polarized light) เพื่อตรวจดูผลึก CPPD ในไขข้อ หรือการใช้เทคนิคเอ็กซเรย์ไขข้อเพื่อดูเงาของแคลเซียมที่จับที่กระดูกอ่อน (chondrocalcinosis) (สุรวุฒิ ปริชาชนนท์, 2555) ซึ่งวิธีการดังกล่าวต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาสูง และอาศัยผู้ที่มีความเชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการพัฒนาเซ็นเซอร์ทางเคมีสำหรับตรวจวัด PPi ที่สามารถทำการวิเคราะห์ได้ง่าย รวดเร็ว มีสภาพไวและมีความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจวัด PPi เป็นอย่างดี

ในปัจจุบันการตรวจวัดโดยใช้เทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ (Indicator Displacement Assays หรือ IDAs) เป็นวิธีการตรวจวัดที่กำลังได้รับการสนใจเป็นอย่างมาก การตรวจวัดด้วยวิธีดังกล่าวนี้จะมีโมเลกุลที่มีความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกับสารที่ต้องการตรวจวัดทำหน้าที่เป็นหน่วยเลือกจับ และจะมีอินดิเคเตอร์เป็นหน่วยให้สัญญาณในการตรวจวัด หลักการตรวจวัดด้วยวิธีนี้นั้นอาศัยหลักการแข่งขันในการเลือกจับระหว่างอินดิเคเตอร์และสารที่ต้องการตรวจวัดกับหน่วยเลือกจับในโมเลกุลของรีเซปเตอร์ ซึ่งเราจะสามารถติดตามอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นได้ด้วยตาเปล่าจากการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย ดังนั้นการตรวจวัดด้วยวิธีนี้จึงไม่ยุ่งยาก และไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง นอกจากนี้แล้วยังมีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อสารที่ต้องการตรวจวัด (Watchasit et al., 2010)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะนำเทคนิค IDAs มาใช้ในการตรวจวัด PPi โดยนำสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์ของสังกะสี (II) ที่มีลิแกนด์เป็นอนุพันธ์ของแอนทราซีน (Zn_2L) มาใช้เป็นโมเลกุลในการตรวจวัด และหาโมเลกุลของอินดิเคเตอร์ที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นหน่วยให้สัญญาณในการตรวจวัด PPi ในสภาวะที่ใกล้เคียงกับสภาวะของร่างกาย ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้อินดิเคเตอร์ที่มีโครงสร้างคล้ายกัน 3 ชนิด ได้แก่ Bromopyrogallol Red (BPG), Methylthymol Blue (MTB) และ Xylenol Orange (XO) ซึ่งโครงสร้างของโมเลกุลที่ใช้ในงานวิจัยนี้แสดงได้ดังรูปที่ 1.1



รูปที่ 1.1 โครงสร้างของสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์ของสังกะสี (II) ที่มีลิแกนด์เป็นอนุพันธ์ของแอนทราซีน (Zn_2L), ไพโรฟอสเฟตแอนไอออน (PPi), อินดิเคเตอร์ Bromopyrogallol Red (BPG), Methylthymol Blue (MTB) และ Xylenol Orange (XO)

1.1 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อหาอินดิเคเตอร์ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัด PPI ด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ โดยใช้สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์ของสังกะสี (II) ที่มีลิแกนด์เป็นอนุพันธ์ของแอนทราซีน (Zn_2L) เป็นโมเลกุลที่ใช้ในการเลือกจับ

1.2 ขอบเขตการศึกษา

1. ศึกษาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนเชมเบิลระหว่าง Zn_2L กับอินดิเคเตอร์ BPG, MTB และ XO โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน
2. ศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ของเอนเชมเบิล
3. ศึกษาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดสารประกอบโคออร์ดิเนชัน Zn_2L กับไพโรฟอสเฟตแอนไอออนโดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ระบบของเซ็นเซอร์ทางเคมีชนิดใหม่ ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจวัดไพโรฟอสเฟตแอนไอออนด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ในสภาวะการทดลองที่มีความใกล้เคียงกับร่างกายของสิ่งมีชีวิต ซึ่งคาดว่าจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านการแพทย์ต่อไป

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

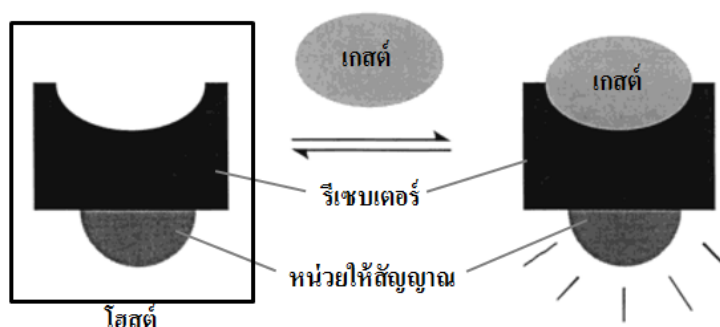
2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1.1 รีเซปเตอร์และเซ็นเซอร์ทางเคมี (Suksai, 2009; Moragues et al., 2011)

เคมีซูปราโมเลกุล (Supramolecular Chemistry) เป็นการศึกษาอันตรกิริยาแบบนอนโควาเลนต์ (non-covalent interaction) ระหว่างโมเลกุลที่มีความสามารถในการเลือกจับหรือที่เรียกว่า โฮสต์ กับโมเลกุลที่สนใจที่เรียกว่า เกสต์ มาพัฒนาการสังเคราะห์โมเลกุลให้มีโครงสร้างและสมบัติที่เหมาะสมในการนำมาใช้เป็นตัวเลือกจับทางเคมี (chemical receptor) และเซ็นเซอร์ทางเคมี (chemical sensor) ตัวอย่างอันตรกิริยาแบบนอนโควาเลนต์ ได้แก่ พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonding) แรงดึงดูดทางไฟฟ้า (electrostatic interaction) อันตรกิริยาแคตไอออน-ไพ (cation - π interaction) และอันตรกิริยาไพ-ไพ (π - π interaction) เป็นต้น ถึงแม้ว่าอันตรกิริยาเหล่านี้จะจัดเป็นแรงกระทำอย่างอ่อน แต่ก็ถือได้ว่ามีความจำเพาะเจาะจงสูงในการที่โมเลกุลของโฮสต์จะเลือกจับกับโมเลกุลของเกสต์ ซึ่งเราสามารถนำความรู้ดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ได้ 3 แนวทางใหญ่ๆ คือ ใช้ในการเลือกจับกับเกสต์ที่สนใจ (recognition) ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) และใช้ในการขนส่งสาร (transport)

โมเลกุลที่สามารถนำมาใช้เป็นตัวเลือกจับทางเคมีนั้นต้องมีโครงสร้าง และสมบัติทางเคมี ที่เหมาะสมในการที่จะเลือกจับกับโมเลกุลของเกสต์ซึ่งอาจเป็นไอออนชนิดต่างๆ หรือโมเลกุลที่เป็นกลางก็ได้ และสำหรับโมเลกุลที่นำมาใช้เป็นเซ็นเซอร์ทางเคมีนั้นต้องประกอบไปด้วยส่วนที่สำคัญ 2 ส่วน คือ ส่วนที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับ (receptor) เพื่อใช้ในการเลือกจับกับโมเลกุลของเกสต์ที่เราสนใจ และอีกส่วนคือส่วนที่ทำหน้าที่เป็นตัวให้สัญญาณ (sensory unit) ซึ่งทั้งสองส่วนนี้อาจเชื่อมติดกันโดยอาศัยพันธะโควาเลนต์ หรืออันตรกิริยาที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนต์ก็ได้ เช่น การเกิดอันตรกิริยาแบบ ไฮโดรเจน-ไฮโดรเจน ระหว่างโมเลกุลของอินดิเคเตอร์กับโมเลกุลของโฮสต์ เป็นต้น ในส่วนของหน่วยให้สัญญาณนี้อาจจะเป็นโมเลกุลที่มีสมบัติเป็นโครโมฟอร์ ฟลูออโรฟอร์ หรือโมเลกุลที่สามารถเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ได้ เมื่อโมเลกุลของเซ็นเซอร์จับกับโมเลกุลของเกสต์โดยเกิดอันตรกิริยาที่ตำแหน่งของตัวรับ ก็จะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณในส่วนที่เป็นตัวให้สัญญาณที่แตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับชนิดของหน่วยให้สัญญาณนั้นๆ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวสามารถตรวจวัดได้โดยใช้เทคนิคทางเคมีวิเคราะห์ เช่น เคมีไฟฟ้า และสเปกโทรโฟโตเมทรี เป็นต้น

การทำงานของเซ็นเซอร์ทางเคมีแสดงได้ดังรูปที่ 2.1 ซึ่งจากรูปจะเห็นได้ว่าเมื่อโมเลกุลของโฮสต์ มีการจับกับ โมเลกุลของเกสต์ จะเกิดการเปลี่ยนแปลงที่หน่วยให้สัญญาณขึ้น



รูปที่ 2.1 การทำงานของเซ็นเซอร์ทางเคมี

ส่วนของหน่วยให้สัญญาณที่แตกต่างกันนั้น สามารถใช้เป็นเกณฑ์ในการแบ่งชนิดของเซ็นเซอร์ทางเคมีออกได้เป็น 3 ชนิด คือ

1. โครโมจีนิกเซ็นเซอร์ (Chromogenic Sensor) คือ โมเลกุลเซ็นเซอร์ที่มีโครโมฟอร์เป็นหน่วยให้สัญญาณ ซึ่งสามารถติดตามอันตรกิริยาระหว่างเซ็นเซอร์และโมเลกุลของเกสต์ได้จากการเปลี่ยนแปลงสีของระบบ ที่สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า และไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือตรวจวัดที่มีราคาแพง

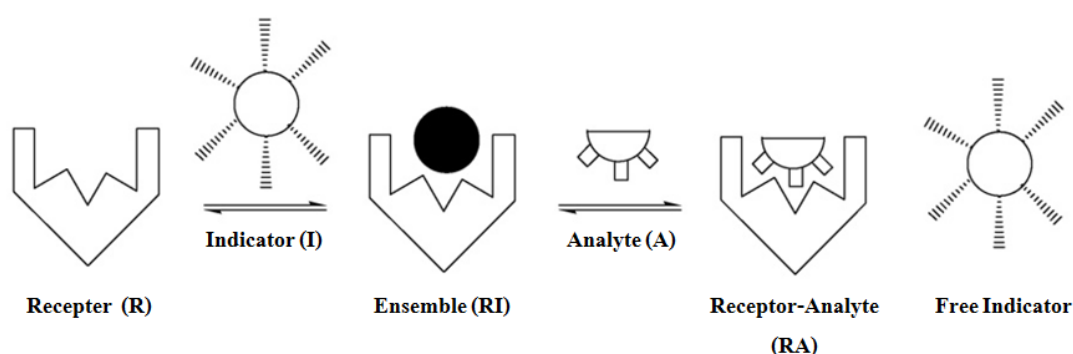
2. ฟลูออโรจีนิกเซ็นเซอร์ (Fluorogenic Sensor) คือ โมเลกุลเซ็นเซอร์ที่มีโมเลกุลที่สามารถให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ (หมู่ฟลูออโรฟอร์) เป็นหน่วยให้สัญญาณ ซึ่งมีขีดจำกัดการตรวจวัดที่ระดับความเข้มข้นต่ำ

3. เซ็นเซอร์ทางเคมีไฟฟ้า (Electrochemical Sensor) คือ โมเลกุลเซ็นเซอร์ที่มีหน่วยให้สัญญาณที่สามารถเกิดปฏิกิริยาที่มีการรับและให้อิเล็กตรอนได้ (ปฏิกิริยารีดอกซ์) ซึ่งสามารถติดตามอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลของโฮสต์กับเกสต์ โดยอาจติดตามจากการเปลี่ยนแปลงปริมาณของกระแสไฟฟ้า หรือค่าความต่างศักย์ที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อมีเกสต์อยู่ในระบบ

ในการออกแบบโมเลกุลของโฮสต์ ให้มีความสามารถในการจับกับโมเลกุลของเกสต์ ได้อย่างจำเพาะเจาะจงนั้น ต้องพิจารณาถึงความเหมาะสมทั้งในด้านสเตอริก และอิเล็กทรอนิกส์ โดยองค์ประกอบสำคัญที่มีผลต่อการเลือกจับ ได้แก่ ขนาด และรูปร่างของเกสต์ ขนาดโพรงของโฮสต์ ทิศทางของโมเลกุลในการจัดเรียงตัวเพื่อจับกับเกสต์ โดยมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างน้อยที่สุดหลังจากจับกับเกสต์ (preorganize) อะตอมที่ทำหน้าที่ในการเกิดอันตรกิริยา และอิทธิพลของตัวทำละลาย เป็นต้น นอกจากนี้การออกแบบโมเลกุลของโฮสต์นั้นยังขึ้นกับความต้องการนำไปใช้งานอีกด้วย

2.1.2 เทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ (Indicator Displacement Assays) (Suksai, 2009; Nguyen, & Anslyn, 2006)

เทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ (IDAs) เป็นเซ็นเซอร์ทางเคมีรูปแบบหนึ่งซึ่งจะใช้โมเลกุลของอินดิเคเตอร์เป็นหน่วยให้สัญญาณ (sensory unit) โดยที่โมเลกุลของอินดิเคเตอร์ดังกล่าวนี้จะเชื่อมต่อกับโมเลกุลที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับ (receptor) โดยอาศัยอันตรกิริยาที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนต์ หลักการทำงานของ การตรวจวัดด้วยวิธีการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์นั้น เป็นการแข่งขันกันระหว่างอินดิเคเตอร์ และสารที่ต้องการตรวจวัดในการเกิดอันตรกิริยากับโมเลกุลของรีเซปเตอร์ โดยที่อินดิเคเตอร์จะเกิดอันตรกิริยาแบบผันกลับได้กับโมเลกุลของรีเซปเตอร์ และจะสามารถทำการตรวจวัดสารที่ต้องการตรวจวัดได้ต่อเมื่อ สารที่ต้องการตรวจวัดสามารถเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ที่เกิดอันตรกิริยากับรีเซปเตอร์ได้ ซึ่งจะสามารถติดตามอันตรกิริยาระหว่างรีเซปเตอร์ และสารที่ต้องการตรวจวัดได้จากการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเมื่อมีสารที่ต้องการตรวจวัดอยู่ในระบบ กลไกการทำงานของ การตรวจวัดด้วยวิธีนี้แสดงได้ดังรูปที่ 2.2 โดยที่สีของสารละลายที่เกิดขึ้นในขั้นแรกนั้นจะเป็นสีของสารประกอบของรีเซปเตอร์ กับอินดิเคเตอร์ หรือที่เรียกว่า เอนเซมเบิล (ensemble) และสีของเอนเซมเบิลที่เกิดขึ้นนี้ต้องมีความแตกต่างอย่างชัดเจนกับสีของอินดิเคเตอร์และสีของรีเซปเตอร์เมื่ออยู่ในรูปอิสระ เมื่อมีโมเลกุลที่ต้องการตรวจวัดที่สามารถแทนที่โมเลกุลของ อินดิเคเตอร์ได้อยู่ในระบบ โมเลกุลของสารที่ต้องการตรวจวัดดังกล่าวจะเข้าไปจับกับโมเลกุลรีเซปเตอร์ และโมเลกุลของอินดิเคเตอร์ก็จะถูกปลดปล่อยออกมาอยู่ในสารละลายในรูปอินดิเคเตอร์อิสระ ซึ่งจะทำให้สีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีของอินดิเคเตอร์อิสระด้วย สิ่งที่สำคัญคือการที่โมเลกุลที่ต้องการตรวจวัดสามารถเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ได้นั้น ค่าคงที่ของการเกิดเป็นสารประกอบระหว่างรีเซปเตอร์กับเกสต์ (K_{RA}) ต้องมีค่าสูงกว่าค่าคงที่ของการเกิดเอนเซมเบิล (K_{RI}) นั่นเอง



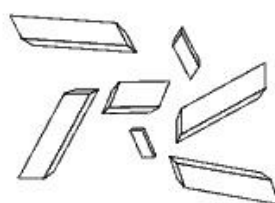
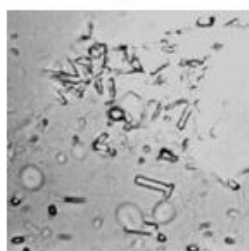
รูปที่ 2.2 การทำงานของการตรวจวัดโดยใช้เทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์

เทคนิค IDAs มีข้อดีกว่าการตรวจวัดโดยใช้โมเลกุลที่เป็นเซ็นเซอร์ทางเคมีทั่วไป คือ ในการนำโมเลกุลของรีเซปเตอร์มาเชื่อมต่อกับหน่วยให้สัญญาณนั้น ไม่จำเป็นต้องใช้พันธะโควาเลนต์ในการเชื่อมต่อจึงทำให้ง่ายต่อการเตรียมเซ็นเซอร์เพื่อใช้ในการตรวจวัด ไม่ต้องใช้เวลามาก และยังสามารถเลือกใช้อินดิเคเตอร์ชนิดที่แตกต่างกันได้กับรีเซปเตอร์เพียงชนิดเดียว นอกจากนี้ยังสามารถใช้ทำการตรวจวัดได้ดีทั้งในตัวทำละลายที่เป็นน้ำ และตัวทำละลายที่เป็นสารอินทรีย์อีกด้วย เทคนิค IDAs สามารถใช้ในการตรวจวัดโมเลกุลที่สนใจได้ทั้งที่เป็นแคทไอออน และแอนไอออน ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้เทคนิคนี้ในการตรวจวัดแอนไอออน เนื่องจากแอนไอออนมีบทบาทที่สำคัญในหลายๆกระบวนการ รวมไปถึงกระบวนการต่างๆทางชีวภาพ เช่น การขนส่งฮอร์โมน การสังเคราะห์โปรตีน และปฏิกิริยาต่างๆของเอนไซม์ เป็นต้น จึงทำให้ในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคการตรวจวัดนี้ไปใช้ในการตรวจวัดแอนไอออนที่มีความสำคัญต่างๆ อย่างเช่น การตรวจวัดปริมาณ ไพรออสเฟตแอนไอออน (Lee et al., 2007; Watchasit et al., 2010; Morgan et al., 2007; Lee et al., 2007) เป็นต้น

2.1.3 ความสำคัญของไพโรฟอสเฟตแอนไอออนและการเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Lee et al., 2007; สุรวุฒิ ปริชานนท์, 2555; Lee et al., 2007; สรชัย ศรีสุมะ, 2555)

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





รูปที่ 2.4 ลักษณะของผลึกแคลเซียมไพโรฟอสเฟตซึ่งมีลักษณะป้าน แตกต่างจากผลึกของยูเรทที่พบในโรคเก๊าท์ซึ่งแหลมกว่า (ไม่ได้แสดงไว้ในรูป) (สุรวุฒิ ปรีханนท์, 2555)

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

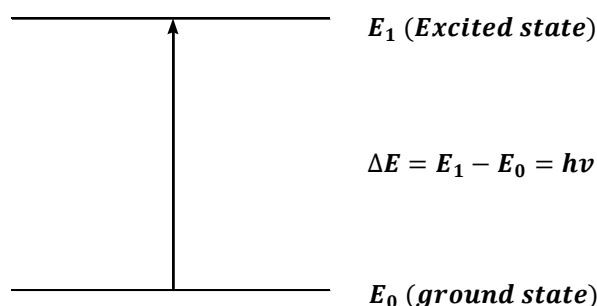


รูปที่ 2.5 เอ็กซเรย์ของข้อเข่า แสดงถึงผลึกแคลเซียมไพโรฟอสเฟตที่เกาะอยู่ในกระดูกอ่อนในข้อ (สุรวุฒิ ปรีханนท์, 2555)

สำหรับการวินิจฉัยโรคเก๊าท์เทียมในปัจจุบันนั้นทำได้โดยการเจาะเอาน้ำในข้อไปตรวจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดพิเศษ (compensated polarized light) เพื่อตรวจดูผลึก CPPD ในไขข้อหรือตรวจโดยวิธีการเอ็กซเรย์ข้อเพื่อดูเงาของแคลเซียมที่จับที่กระดูกอ่อน (chondrocalcinosis) ซึ่งวิธีการดังกล่าวนี้ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาสูง และอาศัยผู้ที่มีความเชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการพัฒนาเซ็นเซอร์ทางเคมีเพื่อใช้สำหรับตรวจวัด PPi โดยที่เซ็นเซอร์ทางเคมีดังกล่าวนี้ควรจะตรวจวัด PPi ได้ง่ายและรวดเร็ว และที่สำคัญคือต้องมีความจำเพาะเจาะจง ต่อการตรวจวัด PPi เป็นอย่างดี

2.1.4 หลักการของยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโคปี (แม้น อมรสิทธิ์, 2534; ขจักษ์ ทิพย์พ่อง, 2545)

เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโคปี เป็นการศึกษาการดูดกลืนแสงของสารในช่วงอัลตราไวโอเล็ต และวิสิเบิลซึ่งอยู่ในช่วงความยาวคลื่นประมาณ 190 – 800 นาโนเมตร (nm) ของสารนั้นๆ ส่วนใหญ่ ได้แก่ พวกละสารอินทรีย์ (organic compound) สารประกอบเชิงซ้อน (complex compound) หรือสารอนินทรีย์ (inorganic compound) ทั้งที่มีสีและไม่มีสี โดยทั่วไปเทคนิคการวิเคราะห์นี้บางครั้งนิยมเรียกว่า ยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตเมทรี แต่ถ้าสารที่ทำการวิเคราะห์ไม่มีสี หรือทำให้เกิดสี สารที่มีสีนั้นจะดูดกลืนแสงในช่วงวิสิเบิล อาจเรียกว่า คัลเลอร์ิเมทรี (colorimetry) ซึ่งจากการให้แสงที่อยู่ในช่วงยูวี-วิสิเบิลผ่านเข้าไปในโมเลกุลของสารที่สนใจ สารนั้นจะดูดกลืนแสงเฉพาะบางช่วง ขึ้นกับชนิดของสารนั้นๆ ซึ่งพลังงานแสงที่ถูกดูดกลืนไปนั้นจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับพลังงานของอิเล็กตรอนภายในโมเลกุลของสารนั้น (electron transition) จากสถานะพื้น (ground state) ไปยังสถานะกระตุ้น (excited state) แสดงได้ดังรูปที่ 2.6 ซึ่งสมบัติของสารดังกล่าวนี้ได้นำมาใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ทั้งในเชิงคุณภาพ และเชิงปริมาณอย่างกว้างขวาง เนื่องจากวิธีนี้ให้ความความเที่ยง และแม่นยำดี รวมไปถึงมีสภาพไว (sensitivity) สูงอีกด้วย



รูปที่ 2.6 กระบวนการเกิดการกระตุ้นของอิเล็กตรอนจากสถานะพื้นไปยังสถานะกระตุ้น

อิเล็กตรอนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนระดับพลังงานนี้ คือ อิเล็กตรอนที่อยู่วงนอกสุด หรืออิเล็กตรอนที่เกิดพันธะแล้ว (bonding electrons) หรืออาจเป็นอิเล็กตรอนที่ยังไม่เกิดพันธะ (non-bonding electrons) ซึ่งแต่ละชนิดจะใช้พลังงานที่แตกต่างกันในการเปลี่ยนแปลงระดับพลังงาน ส่วนอิเล็กตรอนที่ได้รับพลังงานสูงขึ้นนี้จะเรียกว่า antibonding orbitals ซึ่งการเปลี่ยนแปลงระดับพลังงานของอิเล็กตรอนที่พบในสารอินทรีย์ มีดังนี้

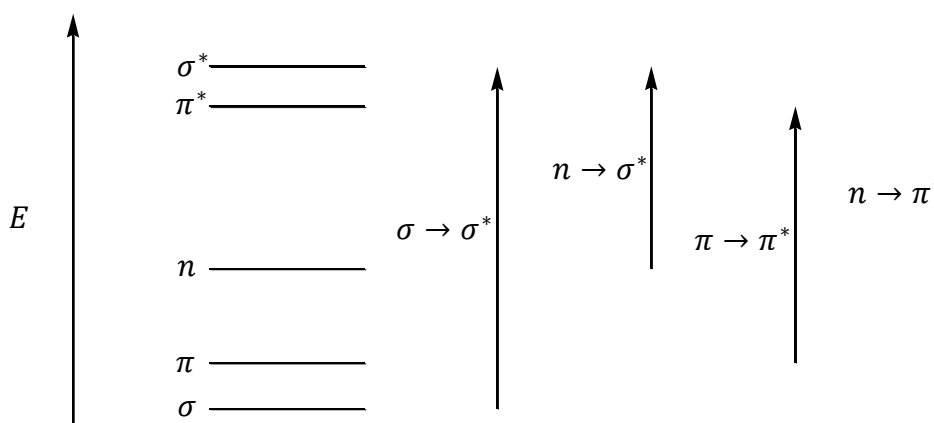
1. $\sigma \rightarrow \sigma^*$ transition เกิดในโมเลกุลที่มีพันธะเดี่ยว (single bond) เช่น C-C และ C-H เป็นต้น มักดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่นต่ำกว่ายูวี-วิสิเบิล

2. $n \rightarrow \sigma^*$ transition เกิดในโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนอิสระ (unshared pair of electron) เช่น H_2O , CH_3Cl และ CH_3NH_2 เป็นต้น

3. $n \rightarrow \pi^*$ และ $\pi \rightarrow \pi^*$ เกิดในโมเลกุลที่มีพันธะ π ดูดกลืนแสงช่วง 200 -700 nm ค่า ϵ ประมาณ $1000 - 10000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ สำหรับ $\pi \rightarrow \pi^*$ และค่า ϵ ประมาณ $10-100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ สำหรับ $n \rightarrow \pi^*$

การเกิด electron transition ของระดับพลังงาน π, σ และ n ที่เกิดขึ้นแสดงได้ดังรูปที่

2.7



รูปที่ 2.7 การเกิด electron transition ของระดับพลังงาน π, σ และ n

สำหรับการเปลี่ยนแปลงระดับพลังงานของอิเล็กตรอน ในสารประกอบโคออร์ดิเนชัน มีดังต่อไปนี้

1. การเปลี่ยนแปลงสถานะของอิเล็กตรอนจาก π ไป π^* พบในโมเลกุลของลิแกนด์ที่มีพันธะ π โดยไม่มีอิเล็กตรอนใน π^* และไม่มีผลกระทบจาก π acceptor เมื่อเกิดพันธะโคออร์ดิเนตโควาเลนต์ การดูดกลืนแสงในช่วงยูวีที่มีความยาวคลื่นมากกว่า 400 nm ค่าสัมประสิทธิ์ของการดูดกลืนแสง (ϵ) สูงสุดมีค่าได้มากกว่า $5000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

2. การเปลี่ยนแปลงสถานะของอิเล็กตรอนใน d-d ออร์บิทัล จะดูดกลืนแสงในช่วงที่มองเห็นได้ขึ้นกับความแตกต่างของระดับพลังงานที่สถานะพื้น กับระดับพลังงานที่สูงกว่าและการแยกออกของระดับพลังงานตามโครงสร้างของสารประกอบโคออร์ดิเนชันแสดงได้ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 การดูดกลืนแสงตามโครงสร้างของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน

โครงสร้าง	ความยาวคลื่นในการดูดกลืนแสง (nm)	ค่า ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)
ทรงเหลี่ยมสี่หน้า	500 -1200	100 -1000
ทรงเหลี่ยมแปดหน้า	200 -1200	1 -50
สี่เหลี่ยมแบนราบ	200 -900	50 -400

3. การเปลี่ยนสถานะของอิเล็กตรอนแบบการถ่ายเทประจุ(charge transfer) มีการดูดกลืนพลังงานอยู่ในช่วงวิสิเบิลที่มีความยาวคลื่นมากกว่า 500 nm ค่า ϵ สูงสุดอยู่ในช่วง 1000-10000 $M^{-1}cm^{-1}$ โดยแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

3.1 การเปลี่ยนสถานะของอิเล็กตรอนจากลิแกนด์ไปยังไอออนโลหะ; LMCT (Ligand to metal charge transfer) เกิดกับสารประกอบโคออร์ดิเนชันที่ไอออนของโลหะ มีเลขออกซิเดชันสูงๆ กับลิแกนด์ที่มีลักษณะเป็น π - donor

3.2 การเปลี่ยนสถานะของอิเล็กตรอนจากไอออนโลหะไปยังลิแกนด์; MLCT (Metal to ligand charge transfer) เกิดกับสารประกอบโคออร์ดิเนชันที่ไอออนของโลหะ มีเลขออกซิเดชันต่ำๆ กับลิแกนด์ที่มีลักษณะเป็น π - acceptor

2.1.5 กฎของเบียร์ (Beer's Law) (แม้น อมรสิทธิ์, 2534; ขจิตกัย ทิพย์พ่อง, 2545)

การวัดปริมาณแสงที่ถูกดูดกลืนด้วยสารละลายตัวอย่าง ทำได้โดยให้ลำแสงผ่านเข้าไปในสารตัวอย่าง (sample solution) แล้ววัดปริมาณแสงที่ผ่านออกมาโดยเปรียบเทียบกับแสงที่ผ่านโดยไม่มีสารตัวอย่าง (blank solution) ปริมาณของแสงที่ผ่านออกมาจะถูกเปลี่ยนเป็นปริมาณของแสงที่ถูกดูดกลืน

ปริมาณแสงที่ถูกดูดกลืนโดยชนิดของสารในสารละลายนั้นจะขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยด้วยกัน ได้แก่ จำนวนไอออน หรือโมเลกุลของสารชนิดนั้นๆ ในทางเดินแสงของลำโฟตอน ระยะทางที่ลำโฟตอนเดินทางผ่านตัวอย่าง และชนิดของสารตัวอย่าง ซึ่งสารต่างชนิดกันนั้นจะดูดกลืนแสงได้ไม่เท่ากัน

เมื่อผ่านลำแสงเข้าไปในสารตัวอย่างแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างพบว่า ปริมาณของแสงที่ถูกดูดกลืนจะแปรผันตรงกับปริมาณความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ในสารตัวอย่าง และระยะทางที่แสงเดินทางผ่านสารละลายตัวอย่างนั้น ซึ่งสอดคล้องกับกฎของเบียร์ ดังแสดงในสมการที่ 2.2

$$A = abc \quad (2.2)$$

โดยที่ A = ค่าการดูดกลืนแสงของสาร (absorbance)

a = ค่าคงที่สัดส่วน เรียกว่า absorptivity เป็นคุณสมบัติเฉพาะสาร ความยาวคลื่นตัวทำละลาย และอุณหภูมิ หน่วยขึ้นกับ b และ c

b = ระยะทางที่แสงผ่านสารตัวอย่าง หรือความกว้างของเซลล์มีหน่วยเป็นเซนติเมตร

c = ความเข้มข้นของสาร

ถ้าความเข้มข้นของสารมีหน่วยเป็น โมล/ลิตร(mole/L) หรือโมลาร์ (M) ให้แทนค่า a ด้วย ϵ ซึ่งเรียกว่า molar absorptivity หรือ molar absorption coefficient มีหน่วยเป็น $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ หรือ $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ แสดงดังสมการที่ 2.3

$$A = \epsilon bc \quad (2.3)$$

2.1.6 อิทธิพลที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเจดสี

สเกิดจากการคายพลังงานแสงที่อิเล็กตรอนดูดเข้าไป จากสถานะกระตุ้นสู่สถานะพื้น โดยสารแต่ละชนิดมีสีที่แตกต่างกันได้เพราะมีการดูด และคายพลังงานของอิเล็กตรอนไม่เท่ากัน และให้สเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่แตกต่างกันขึ้นกับลักษณะโครงสร้างของโมเลกุล เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลของสารจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสง และปริมาณการดูดกลืนแสง รวมถึงความเข้มของสี สิ่งเหล่านี้ส่งผลถึงสีที่ปรากฏให้เห็น โดยอิทธิพลที่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงความยาวคลื่นของสาร คือ

อิทธิพลที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเจดสีโดยแบ่งเป็น 2 ประเภท ดังนี้

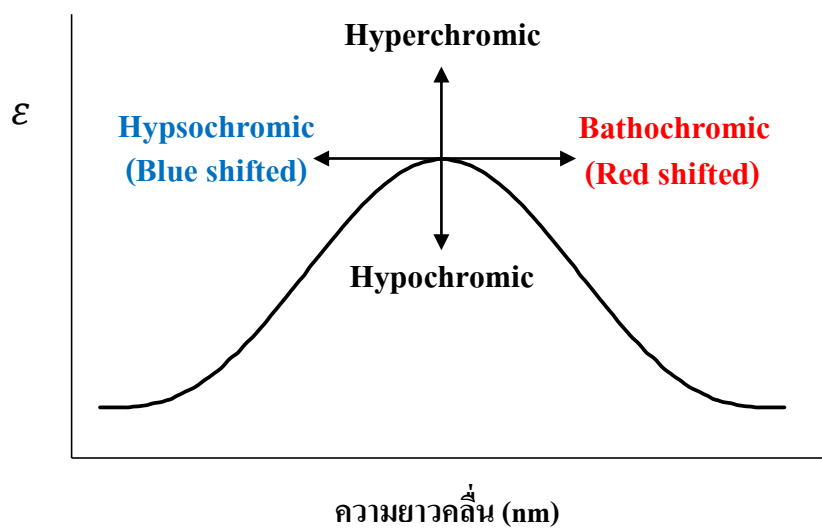
1. Bathochromic shift (red shift) คือ อิทธิพลที่ทำให้โมเลกุลดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงขึ้น

2. Hypsochromic shift (blue shift) คือ อิทธิพลที่ทำให้โมเลกุลดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่ำลง

และอิทธิพลที่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มสี แบ่งเป็น 2 ประเภท ดังนี้

1. Hyperchromic effect คือ อิทธิพลที่ทำให้โมเลกุลดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นหนึ่งในปริมาณการดูดกลืนแสงที่มากขึ้น

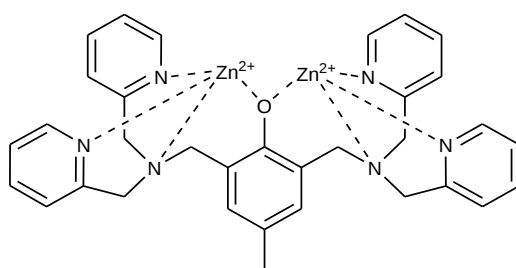
2. Hypochromic effect คือ อิทธิพลที่ทำให้โมเลกุลดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นหนึ่งในปริมาณการดูดกลืนแสงที่ลดลง แสดงดังรูปที่ 2.8



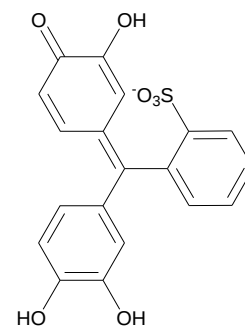
รูปที่ 2.8 การเปลี่ยนแปลงความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสง และปริมาณการดูดกลืนแสงจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของโมเลกุลของสาร

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

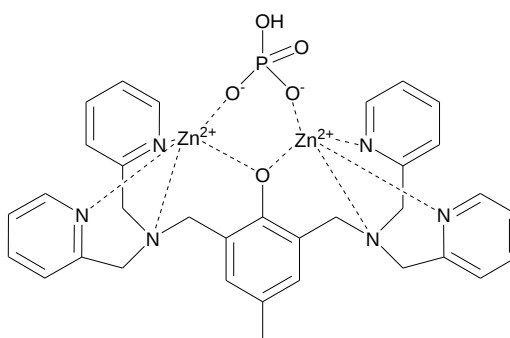
Min Su Han และ Dong H. Kim (Han, & Kim, 2002) ได้นำสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์ของสังกะสี(II)(1) มาใช้เป็นรีเซบเตอร์สำหรับการตรวจวัด HPO_4^{2-} ด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์โดยใช้อินดิเคเตอร์ pyrocatechol violet หรือ PV เป็นหน่วยให้สัญญาณ จากการศึกษพบว่าเมื่อ PV เกิดอันตรกิริยากับสารประกอบ (1) ได้เป็นเอนเซมเบิล [1·PV] นั้นสีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองของ PV ในรูปอิสระกลายเป็นสารละลายสีฟ้าของเอนเซมเบิล และมีค่าคงที่ของการเกิดเอนเซมเบิล (K) เท่ากับ $(5.3 \pm 0.2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ และเมื่อมี HPO_4^{2-} อยู่ในระบบจะทำให้สีของสารละลายเปลี่ยนกลับไปเป็นสีเหลืองของ PV ในขณะที่แอนไอออนชนิดอื่น ๆ ไม่สามารถเปลี่ยนสีของสารละลายได้ แสดงให้เห็นว่าอินดิเคเตอร์ PV สามารถถูกแทนที่ได้ด้วย HPO_4^{2-} โดยที่สารประกอบโคออร์ดิเนชัน (2) ที่เกิดขึ้นมีอัตราส่วนของสารประกอบ (1) : HPO_4^{2-} คือ 1 : 1 และมีค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดสารประกอบเท่ากับ $(11.2 \pm 0.8) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$



(1)

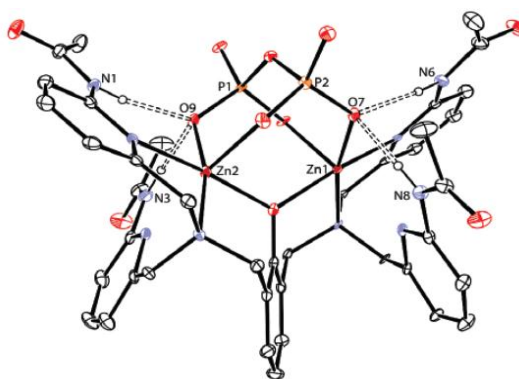
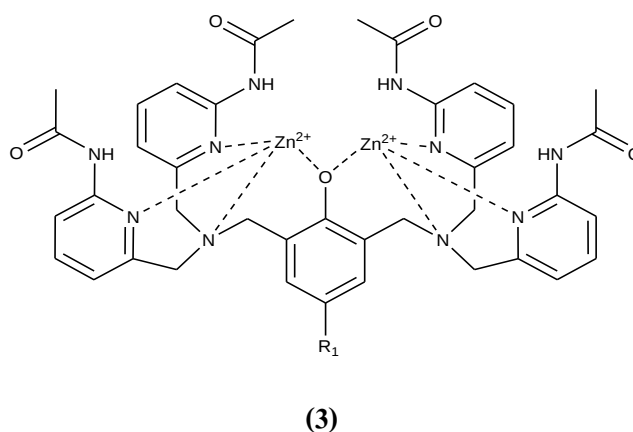


PV



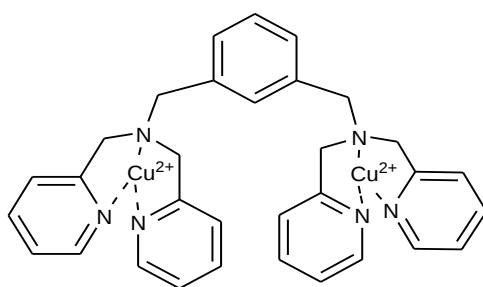
(2)

ต่อมาในปี 2007 **Jae Han Lee และคณะ** (Lee et al., 2007) ได้สังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน (3) ที่เป็นอนุพันธ์ของสารประกอบ (1) โดยการเพิ่มหมู่เอไมด์จำนวน 4 หมู่เข้าไปยังวงไพริดีนทั้ง 4 และได้นำสารประกอบดังกล่าวไปศึกษาความสามารถในการตรวจวัดแอนไอออน ด้วยเทคนิค IDA โดยใช้อินดิเคเตอร์ PV เช่นเดียวกัน จากการศึกษพบว่าสารละลายเอนเซมเบิล [3-PV] มีสีฟ้าและมีค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนเซมเบิล (K) เท่ากับ $(1.4 \pm 0.1) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ นอกจากนี้ยังพบว่าเอนเซมเบิลดังกล่าวมีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัด PPi เพราะเมื่อมี PPi อยู่ในระบบนั้น PPi จะสามารถเข้าไปแทนที่ PV ในเอนเซมเบิลและทำให้สารละลายเปลี่ยนจากสีฟ้าไปเป็นสีเหลืองของ PV ในรูปอิสระ และมีค่าคงที่ความเสถียรของสารประกอบ (3) กับ PPi เท่ากับ $(5.39 \pm 0.03) \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ ซึ่งมีค่ามากกว่าค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดสารประกอบ (2) เนื่องจากสารประกอบ (3) สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับอะตอมของออกซิเจนของ PPi ได้โดยใช้หมู่เอไมด์ทั้ง 4 หมู่ ดังแสดงดังรูปที่ 2.9 จึงทำให้สารประกอบที่เกิดขึ้นมีความเสถียรเพิ่มขึ้น

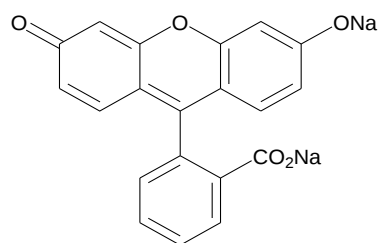


รูปที่ 2.9 โครงสร้างเอ็กซ์เรย์ของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน [3-PPi]

Soon Young Kim และ Jong-In Hong (Kim, & Hong, 2009) ได้พัฒนาระบบการตรวจวัด PPi ที่สามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณได้ทั้งการเปลี่ยนแปลงสี และการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ด้วยเทคนิค IDA โดยใช้สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์ของคอปเปอร์ (II) (4) เป็นหน่วยเลือกจับและใช้อินดิเคเตอร์ PV และ fluoresceine หรือ FLR เป็นหน่วยให้สัญญาณ โดยเอนเซมเบิลของ [4•PV] มีค่าคงที่ความเสถียรเท่ากับ $1.01 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ และสารละลายจะมีสีฟ้าแต่เมื่อมี PPi อยู่ในระบบพบว่าสีของสารละลายเปลี่ยนไปเป็นสีเหลืองของ PV อีตระแสดงว่า PPi สามารถเข้าไปแทนที่ PV ได้ สำหรับในกรณีของอินดิเคเตอร์ FLR นั้นพบว่า FLR ในรูปอีตระนั้นเมื่อทำการกระตุ้นด้วยแสงที่มีความยาวคลื่น 495 nm จะให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่มีความยาวคลื่น 514 nm แต่เมื่อมีสารประกอบ (4) อยู่ในระบบจะทำให้ความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่มีความยาวคลื่นดังกล่าวมีค่าลดลง โดยที่เอนเซมเบิล [4•FLR] ที่เกิดขึ้นมีค่าคงที่ความเสถียรเท่ากับ $5.83 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ เมื่อมี PPi อยู่ในระบบของเอนเซมเบิลดังกล่าวพบว่าความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่มีความยาวคลื่น 514 nm กลับมีค่าสูงขึ้น ซึ่งเป็นการยืนยันว่า PPi สามารถเข้าไปเกิดพันธะโคออร์ดิเนตโควาเลนต์กับสารประกอบ (4) ได้โดยการเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ FLR จากการคำนวณหาค่าคงที่ความเสถียรของสารประกอบโคออร์ดิเนชันระหว่าง (4) กับ PPi นั้นพบว่ามีค่าเท่ากับ $3.93 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ ซึ่งมีค่ามากกว่าค่าคงที่ของการเกิดเอนเซมเบิลทั้ง 2 ชนิด

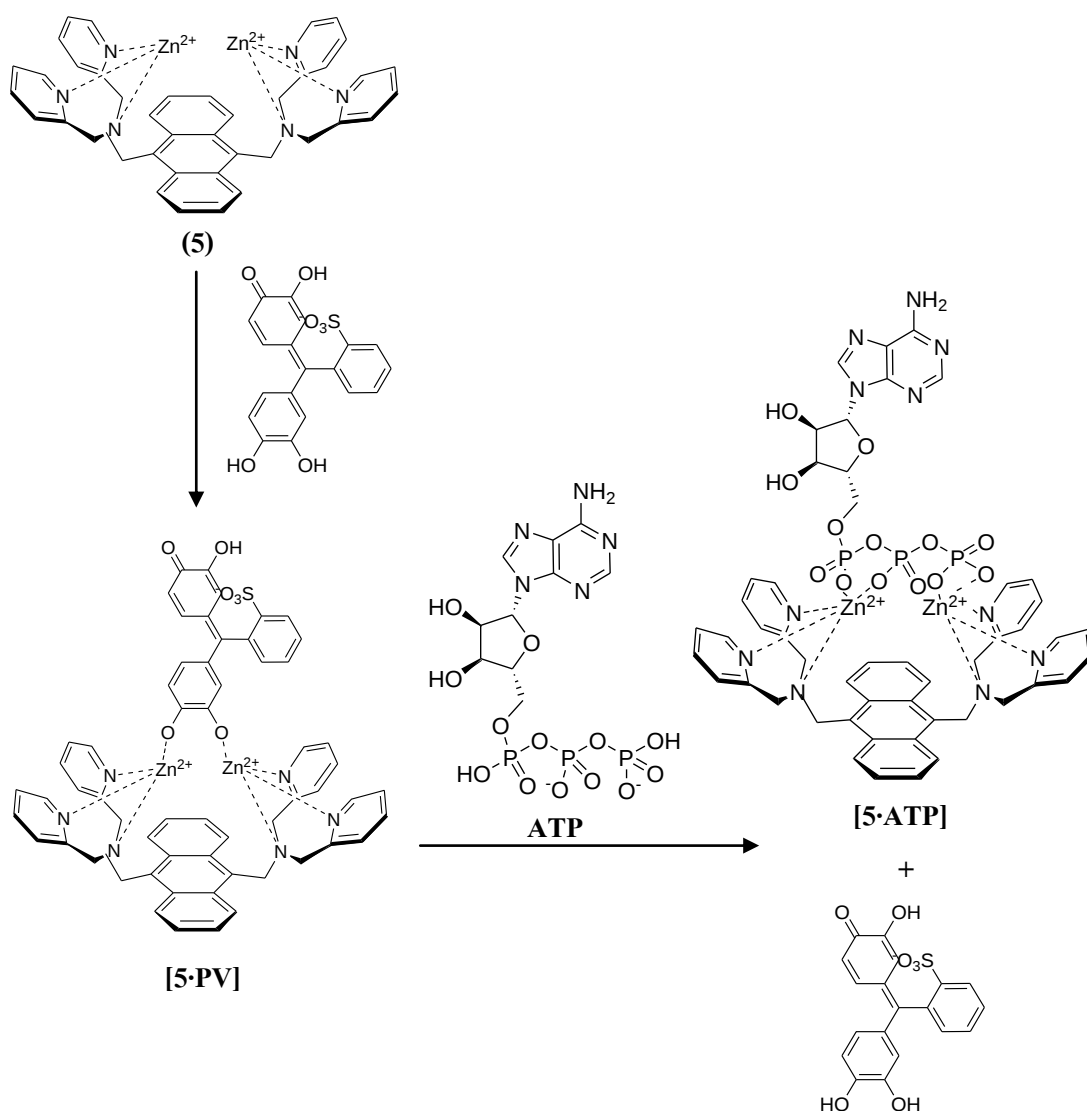


(4)



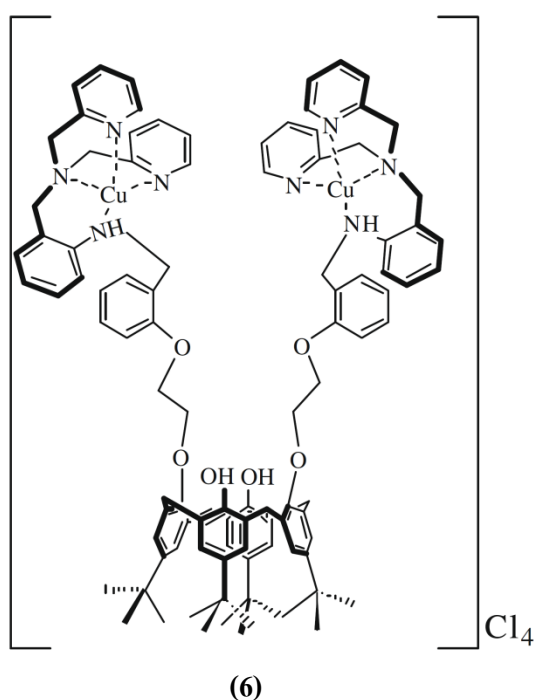
FLR

Hyun Hye Jang และคณะ (Jang et al., 2009) ได้นำโมเลกุลของสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์ของสังกะสี (II) ที่มีอนุพันธ์ของแอนทราซีนเป็นลิแกนด์ (5) มาใช้เป็นรีเซปเตอร์สำหรับการตรวจวัด ATP โดยการเลือกใช้อินดิเคเตอร์ PV เป็นหน่วยให้สัญญาณจากการศึกษาพบว่าเมื่อ PV เกิดอันตรกิริยากับสารประกอบ (5) ได้เป็นเอนเซมเบิล [5·PV] นั้นจะส่งผลให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารประกอบ 5 ที่ความยาวคลื่น 426 nm มีค่าลดลง โดยมีค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนเซมเบิลเท่ากับ $2.98 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ และเมื่อมี ATP อยู่ในระบบของเอนเซมเบิลดังกล่าวพบว่าความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่นดังกล่าวกลับมีค่าสูงขึ้นอีกครั้ง ซึ่งเป็นการยืนยันว่า ATP สามารถเข้าไปเกิดพันธะโคออร์ดิเนตโควาเลนต์กับสารประกอบ (5) ได้โดยการเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ PV ดังแสดงในรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 การถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ PV ในเอนเซมเบิล [5·PV] โดย ATP

Sarayut Watchasit และคณะ (Watchasit et al., 2010) ได้นำสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์ของคอปเปอร์ (II) กับลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของคาลิกซ์[4]แอรีน (6) มาใช้เป็นเซ็นเซอร์ทางเคมีสำหรับการตรวจวัด PPI ด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ โดยใช้อินดิเคเตอร์ PV เป็นหน่วยให้สัญญาณ จากการศึกษพบว่าเมื่อ PV เกิดอันตรกิริยากับสารประกอบ (6) นั้นจะทำให้ สีของสารละลายเปลี่ยนจากสีเหลืองของ PV ในรูปอิสระกลายเป็นสีเขียวของสารละลายเอนแซมเบิล $[6 \cdot PV]$ และมีค่าคงที่ของการเกิดเอนแซมเบิลเท่ากับ $1.30 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ เมื่อมี PPI อยู่ในระบบของเอนแซมเบิลดังกล่าว สารละลายจะเปลี่ยนกลับไปเป็นสีเหลืองของ PV ในขณะที่แอนไอออนชนิดอื่นๆไม่สามารถเปลี่ยนสีของสารละลายได้ แสดงให้เห็นว่า PPI สามารถเกิดพันธะโคออร์ดิเนตโควาลนต์กับสารประกอบ (6) โดยเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ PV และมีค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดสารประกอบเท่ากับ $5.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$



การทดลอง

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ยูวีวิสิเบิลสเปกโทรมิเตอร์ (HP Hewlett Packard G1103A)

3.2 สารเคมี

Acetonitrile	CH_3CN	A.R.Grade (FLUKA)
Adenosine monophosphate (AMP)	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_7\text{P}$	A.R.Grade (ALDRICH)
Adenosine diphosphate (ADP)	$\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2$	A.R.Grade (ALDRICH)
Adenosine triphosphate (ATP)	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3$	A.R.Grade (ALDRICH)
Bromopyrogallol red (BPG)	$\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{Br}_2\text{O}_8\text{S}$	A.R.Grade (FLUKA)
Hydroxyethyl piperazineethane sulfonic acid (HEPES)	$\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$	A.R.Grade (FLUKA)
Methylthymol blue (MTB)	$\text{C}_{37}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_{13}\text{S}$	A.R.Grade (FLUKA)
Sodium phosphate	NaH_2PO_4	A.R.Grade (ALDRICH)
Sodium acetate	NaCH_3CO_2 หรือ NaOAc	A.R.Grade (ALDRICH)
Sodium benzoate	$\text{NaC}_6\text{H}_5\text{CO}_2$ หรือ NaOBz	A.R.Grade (ALDRICH)
Sodium iodide	NaI	A.R.Grade (ALDRICH)
Sodium bromide	NaBr	A.R.Grade (ALDRICH)
Sodium chloride	NaCl	A.R.Grade (ALDRICH)
Sodium fluoride	NaF	A.R.Grade (ALDRICH)
Sterile water	General Hospital Products Public Co., Ltd	
Tetrasodium pyrophosphate	$\text{Na}_4(\text{P}_2\text{O}_7)$	A.R.Grade (ALDRICH)
Xylenol orange (XO)	$\text{C}_{31}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_{13}\text{S}$	A.R.Grade (FLUKA)

3.3 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 80/20 (%v/v) MeCN/H₂O ใน 10 mM HEPES pH 7.4

3.3.1 การเตรียมสารละลาย HEPES pH 7.4 ความเข้มข้น 10 mM ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

ชั่ง HEPES 2.3830 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นยาฉีดและปรับ pH ของสารละลายจนมีค่าเท่ากับ 7.4 หลังจากนั้นนำสารละลายดังกล่าวถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นยาฉีดจนถึงขีดบอกปริมาตร

3.3.2 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 80/20 (%v/v) MeCN/H₂O ใน 10 mM HEPES pH 7.4

ตวงสารละลาย HEPES pH 7.4 ความเข้มข้น 10 mM (จากข้อ 3.3.1) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยอะซิโตนไทรล์ จนถึงขีดบอกปริมาตร

3.4 การหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนไซม์เปปติโดระหว่าง Zn₂L กับอินดิเคเตอร์ BPG, MTB และ XO ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน

3.4.1 การเตรียมสารละลาย Zn₂L ความเข้มข้น 400 μ M ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

3.4.1.1 การเตรียมสารละลาย Zn₂L ความเข้มข้น 2 mM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ชั่ง Zn₂L 13.40 มิลลิกรัม ละลายด้วยสารละลายผสมของอะซิโตนไทรล์และน้ำกลั่นยาฉีด จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยอะซิโตนไทรล์จนถึงขีดบอกปริมาตร

3.4.1.2 การเตรียมสารละลาย Zn₂L ความเข้มข้น 400 μ M ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลาย Zn₂L ความเข้มข้น 2 mM (จากข้อ 3.4.1.1) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 80/20 (%v/v) MeCN/H₂O ใน 10 mM HEPES pH 7.4 จนถึงขีดบอกปริมาตร

3.4.2 การเตรียมสารละลาย BPG ความเข้มข้น 20 μ M ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

3.4.2.1 การเตรียมสารละลาย BPG ความเข้มข้น 2 mM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ชั่ง BPG 5.76 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นยาฉีด จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นยาฉีดจนถึงขีดบอกปริมาตร

3.4.2.2 การเตรียมสารละลาย BPG ความเข้มข้น 20 μM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลาย **BPG** ความเข้มข้น 2 mM (จากข้อ 3.4.2.1) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 80/20 (%v/v) MeCN/H₂O ใน 10 mM HEPES pH 7.4 จนถึงขีดบอกปริมาตร

3.4.3 การเตรียมสารละลาย MTB ความเข้มข้น 20 μM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

3.4.3.1 การเตรียมสารละลาย MTB ความเข้มข้น 2 mM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ชั่ง **MTB** 8.45 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นยาฉีด จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นยาฉีดจนถึงขีดบอกปริมาตร

3.4.3.2 การเตรียมสารละลาย MTB ความเข้มข้น 20 μM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

เตรียมด้วยวิธีเดียวกับการเตรียมสารละลาย **BPG** ความเข้มข้น 20 μM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (จากข้อ 3.4.2.2)

3.4.4 การเตรียมสารละลาย XO ความเข้มข้น 20 μM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

3.4.4.1 การเตรียมสารละลาย XO ความเข้มข้น 2 mM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ชั่ง **XO** 7.61 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นยาฉีด จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นยาฉีดจนถึงขีดบอกปริมาตร

3.4.4.2 การเตรียมสารละลาย XO ความเข้มข้น 20 μM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

เตรียมด้วยวิธีเดียวกับการเตรียมสารละลาย **BPG** ความเข้มข้น 20 μM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (จากข้อ 3.4.2.2)

3.4.5 วิธีการทดลอง

ปิเปตสารละลายอินดิเคเตอร์ ความเข้มข้น 20 μM ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในคิวเวท จากนั้นค่อย ๆ โทเทตสารละลาย **Zn₂L** ความเข้มข้น 400 μM ลงในคิวเวทดังกล่าว โดยใช้ ปริมาตร ดังแสดงในตารางที่ 3.1 หลังจากนั้นคนสารละลายให้เข้ากัน และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 250-900 nm จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความยาวคลื่นที่ใช้ในการทดลองและคำนวณหาค่าคงที่ของการเกิด เอนเซมเบิล โดยใช้โปรแกรม SPECFIT (SPECFIT/32, 2004)

ตารางที่ 3.1 สภาวะการทดลองสำหรับการหาค่าคงที่ของการเกิดเอนไซม์ระหว่าง Zn_2L กับ อินดิเคเตอร์ **BPG, MTB** และ **XO** ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโคปี

อินดิเคเตอร์ ครั้งที่	ปริมาตร Zn_2L (มิลลิลิตร)			จำนวน equivalent ของ Zn_2L
	BPG	MTB	XO	
1	0.00	0.00	0.00	0.0
2	0.01	0.01	0.01	0.1
3	0.02	0.02	0.02	0.2
4	0.03	0.03	0.03	0.3
5	0.04	0.04	0.04	0.4
6	0.05	0.05	0.05	0.5
7	0.06	0.06	0.06	0.6
8	0.07	0.07	0.07	0.7
9	0.08	0.08	0.08	0.8
10	0.09	0.09	0.09	0.9
11	0.10	0.10	0.10	1.0
12	0.11	0.11	0.11	1.1
13	0.12	0.12	0.12	1.2
14	0.13	0.13	0.13	1.3
15	0.14	0.14		1.4
16	0.15	0.15		1.5
17	0.16			1.6
18	0.17			1.7
19	0.18			1.8
20	0.19			1.9
21	0.20			2.0
22	0.22			2.2

3.5 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกับแอนไอออนชนิดต่างๆของ เอนไซม์เปป

3.5.1 การเตรียมสารละลายของแอนไอออนชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.5.1.1 การเตรียมสารละลายของแอนไอออนชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 10 mM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ชั่งเกลือของแอนไอออนชนิดต่างๆ ตามน้ำหนักที่แสดงในตารางที่ 3.2 ละลายด้วยน้ำกลั่นยาฉีด จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นยาฉีดจนถึงขีดบอกปริมาตร

3.5.1.2 การเตรียมสารละลายของแอนไอออนชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลายของแอนไอออนชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 10 mM (จากข้อ 3.5.1.1) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 80/20 (%v/v) MeCN/H₂O ใน 10 mM HEPES pH 7.4 จนถึงขีดบอกปริมาตร

3.5.2 การเตรียมสารละลาย Zn₂L ความเข้มข้น 20 μ M ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3.5.2.1 การเตรียมสารละลาย Zn₂L ความเข้มข้น 2 mM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ชั่ง Zn₂L 13.40 มิลลิกรัม ละลายด้วยสารละลายผสมของอะซิโตนไตรัล และน้ำกลั่นยาฉีด จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยอะซิโตนไตรัลจนถึงขีดบอกปริมาตร

3.5.2.2 การเตรียมสารละลาย Zn₂L ความเข้มข้น 20 μ M ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลาย Zn₂L ความเข้มข้น 2 mM (จากข้อ 3.5.2.1) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 80/20 (%v/v) MeCN/H₂O ใน 10 mM HEPES pH 7.4 จนถึงขีดบอกปริมาตร

3.5.3 การเตรียมสารละลาย BPG ความเข้มข้น 400 μM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.5.3.1 การเตรียมสารละลาย BPG ความเข้มข้น 4 mM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ชั่ง BPG 11.52 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นยาฉีด จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นยาฉีดจนถึงขีดบอกปริมาตร

3.5.3.2 การเตรียมสารละลาย BPG ความเข้มข้น 400 μM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลาย BPG ความเข้มข้น 4 mM (จากข้อ 3.5.3.1) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 80/20 (%v/v) MeCN/H₂O ใน 10 mM HEPES pH 7.4 จนถึงขีดบอกปริมาตร

3.5.4 การเตรียมสารละลาย MTB ความเข้มข้น 400 μM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.5.4.1 การเตรียมสารละลาย MTB ความเข้มข้น 4 mM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ชั่ง MTB 16.90 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นยาฉีด จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นยาฉีดจนถึงขีดบอกปริมาตร

3.5.4.2 การเตรียมสารละลาย MTB ความเข้มข้น 400 μM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

เตรียมด้วยวิธีเดียวกับการเตรียมสารละลาย BPG ความเข้มข้น 400 μM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (จากข้อ 3.5.3.2)

3.5.5 การเตรียมสารละลาย XO ความเข้มข้น 400 μM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.5.5.1 การเตรียมสารละลาย XO ความเข้มข้น 4 mM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ชั่ง XO 15.21 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นยาฉีด จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นยาฉีดจนถึงขีดบอกปริมาตร

3.5.5.2 การเตรียมสารละลาย XO ความเข้มข้น 400 μM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

เตรียมด้วยวิธีเดียวกับการเตรียมสารละลาย BPG ความเข้มข้น 400 μM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (จากข้อ 3.5.3.2)

3.5.6 วิธีการทดลอง

ปีเปตสารละลาย Zn_2L ความเข้มข้น $20\ \mu\text{M}$ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในคิวเวท จากนั้นเติมสารละลายของอินดิเคเตอร์ ความเข้มข้น $400\ \mu\text{M}$ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร (1 equivalent) ลงไปในคิวเวทดังกล่าว คนสารละลายให้เข้ากัน และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 250-900 nm หลังจากนั้นเติมสารละลายของแอนไอออน ความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร (4 equivalent) ลงไปในคิวเวทดังกล่าว คนสารละลายให้เข้ากันและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความยาวคลื่นที่ใช้ในการทดลองกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเอนไซม์เบิลอิสระเปรียบเทียบกับ สารละลายของเอนไซม์เบิลเมื่อเติมสารละลายแอนไอออนแต่ละชนิด

ในการพิจารณาว่าแอนไอออนชนิดใดสามารถแทนที่อินดิเคเตอร์ได้นั้นสามารถสังเกตได้จากการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเอนไซม์เบิล และการพิจารณาว่าเอนไซม์เบิลมีความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกับแอนไอออนชนิดใดนั้น สามารถทำได้โดยสังเกตว่าแอนไอออนชนิดใดทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมมากที่สุด

ตารางที่ 3.2 น้ำหนักเกลือของแอนไอออนชนิดต่างๆที่ใช้ในการเตรียมเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้น 10 mM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

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

3.6 การหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดสารประกอบโคออร์ดิเนชันระหว่างสารประกอบโคออร์ดิเนชัน Zn_2L กับ ไพโรฟอสเฟตแอนไอออน (PPI) ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน

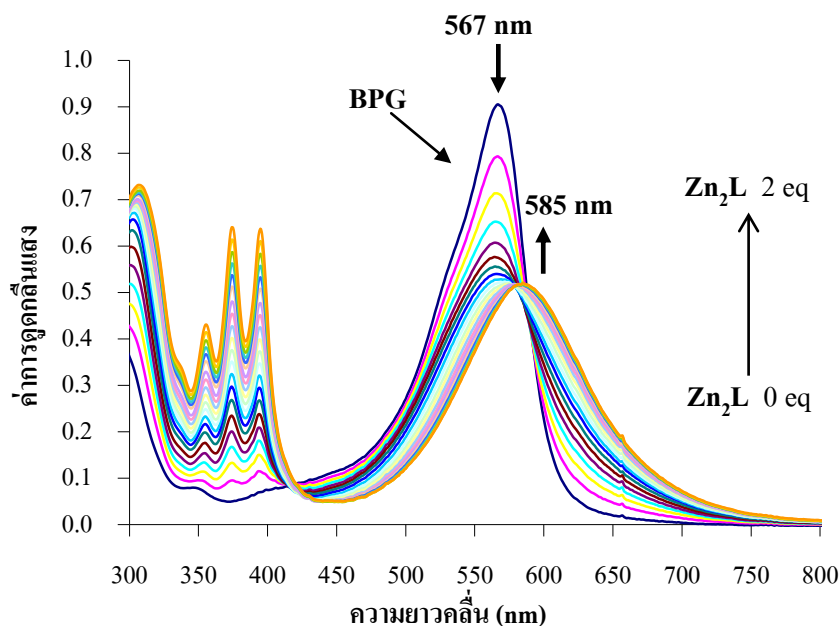
ปีเปตสารละลาย Zn_2L ความเข้มข้น $20\ \mu M$ (จากข้อ 3.5.2.2) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในคิวเวท จากนั้นเติมสารละลายอินดิเคเตอร์ ความเข้มข้น $400\ \mu M$ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร (1 equivalent) ลงไปในคิวเวทดังกล่าว คนสารละลายให้เข้ากัน และนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 250-900 nm จากนั้นจึงทำการไทเทรตสารละลาย PPI ความเข้มข้น 1 mM ลงในคิวเวทที่มีสารละลายดังกล่าวอยู่ ครั้งละ 0.01 มิลลิลิตร โดยในแต่ละครั้งให้คนสารละลายให้เข้ากัน และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 250-900 nm จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความยาวคลื่นที่ใช้ในการทดลอง และคำนวณหาค่าคงที่ของการเกิดเอนเซมเบิลโดยใช้โปรแกรม SPECFIT (SPECFIT/32, 2004)

ผลการทดลองและอภิปราย

4.1 การหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนเชมเบิลระหว่าง Zn_2L กับอินดิเคเตอร์ BPG, MTB และ XO ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน

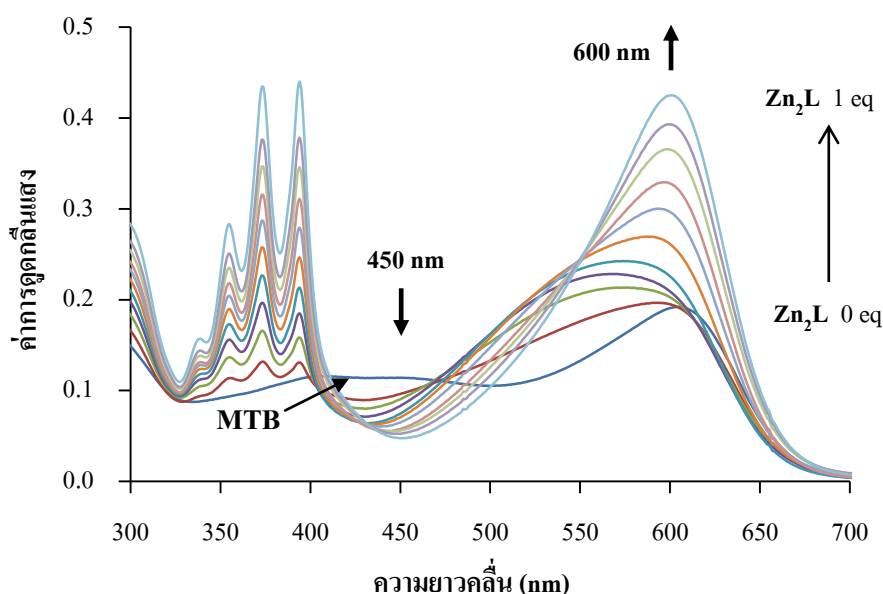
จากการศึกษาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนเชมเบิลระหว่างสารประกอบโคออร์ดิเนชัน Zn_2L กับอินดิเคเตอร์ทั้ง 3 ชนิดได้แก่ Bromopyrogallol Red (BPG), Methylthymol Blue (MTB) และ Xylenol Orange (XO) ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโกปีนั้นทำได้โดยการไทเทรตสารละลายของอินดิเคเตอร์ที่มีความเข้มข้น $20\ \mu M$ ที่เตรียมในสารละลาย 80/20 (%v/v) MeCN/H₂O ใน 10 mM HEPES บัฟเฟอร์ที่ pH 7.4 ด้วยสารละลายของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน Zn_2L ความเข้มข้น $400\ \mu M$ ที่เตรียมในตัวทำละลายชนิดเดียวกัน และวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายผสมหลังจากเติมสารประกอบโคออร์ดิเนชัน Zn_2L ทุกครั้ง หลังจากนั้นจึงนำข้อมูลที่ได้จากการไทเทรชันไปคำนวณหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนเชมเบิล ($\log K$) ด้วยโปรแกรม SPECFIT ดังแสดงในตารางที่ 4.1

จากการทดลองพบว่า เมื่อนำสารละลายสีม่วงของอินดิเคเตอร์ BPG ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดที่ความยาวคลื่น 567 นาโนเมตร และเมื่อทำการไทเทรตสารละลายของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน Zn_2L 0.1 equivalent ลงไปยังสารละลายดังกล่าว พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของ BPG ที่ความยาวคลื่น 567 นาโนเมตรมีค่าลดลงและเมื่อความเข้มข้นของ Zn_2L มีค่าเพิ่มขึ้นพบว่าความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงของสารละลายจะเลื่อนไปปรากฏที่ความยาวคลื่น 585 นาโนเมตร (bathochromic shift) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นดังกล่าวจะมีค่าคงที่เมื่อไทเทรตสารประกอบโคออร์ดิเนชัน Zn_2L จนถึง 2 equivalent ดังแสดงในรูปที่ 4.1 นอกจากนี้ยังพบว่าสีของสารละลาย BPG จะค่อยๆเปลี่ยนจากสีเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีม่วงอมน้ำเงินซึ่งเป็นสีของสารละลายเอนเชมเบิลจึงเป็นการยืนยันว่า BPG สามารถเกิดพันธะโคออร์ดิเนตโคเวเลนต์กับอะตอมของ Zn(II) ทั้งสองอะตอมของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน Zn_2L ได้ จากการคำนวณหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนเชมเบิล ($\log K$) พบว่ามีค่า $\log K_1 = 4.76 \pm 0.26$ และ $\log K_2 = 4.38 \pm 0.26$ ซึ่งตรงกับการเกิดสปีชีส์ของเอนเชมเบิล $[Zn_2L \cdot BPG]$ และ $[Zn_2L \cdot 2BPG]$ ตามลำดับ



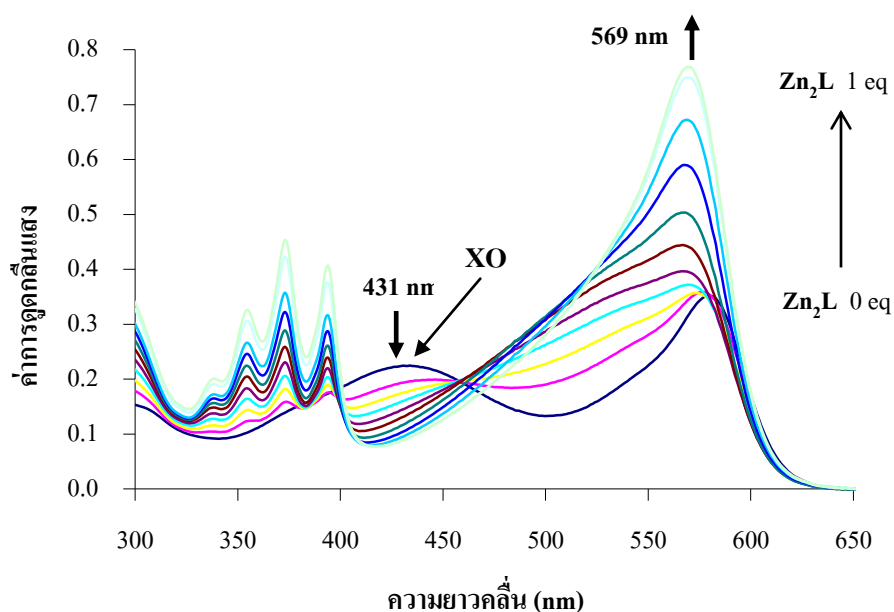
รูปที่ 4.1 ยูวี-วิสิเบิลไทเทรชันสเปกตรัมของอินเคเตอร์ **BPG** ความเข้มข้น 20 μM ด้วยสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **Zn₂L** ความเข้มข้น 400 μM ในตัวทำละลาย 80/20 (%v/v) MeCN/H₂O ใน 10 mM HEPES บัฟเฟอร์ที่ pH 7.4

เมื่อนำสารละลายสีเขียวซีดของอินดิเคเตอร์ **MTB** ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงจะปรากฏแถบการดูดกลืนแสงของ **MTB** ที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร และเมื่อทำการไทเทรตสารละลายของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **Zn₂L** ตั้งแต่ 0 – 1 equivalent ลงไปยังสารละลายดังกล่าวพบว่าค่าการดูดกลืนแสงของ **MTB** ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร มีค่าลดลง และพบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรจะมีค่าเพิ่มขึ้น (bathochromic shift) ดังแสดงในรูปที่ 4.2 โดยที่สีเขียวซีดของ **MTB** จะค่อย ๆ เปลี่ยนไปเป็นสีม่วงและสีน้ำเงินตามลำดับ ซึ่งเป็นการยืนยันว่า **MTB** สามารถเกิดพันธะโคออร์ดิเนตโควาลนต์กับอะตอมของ Zn(II) ทั้งสองอะตอมของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **Zn₂L** ได้ จากการคำนวณหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนเซมเบิล(log K) พบว่ามีค่า $\log K_1 = 6.05 \pm 0.16$ และ $\log K_2 = 4.75 \pm 0.32$ ซึ่งตรงกับการเกิดสปีชีส์ของเอนเซมเบิล [**Zn₂L**·**MTB**] และ [**Zn₂L**·2**MTB**] ตามลำดับ



รูปที่ 4.2 ยูวี-วิสิเบิลไทเทรชันสเปกตรัมของอินดิเคเตอร์ **MTB** ความเข้มข้น 20 μM ด้วยสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **Zn₂L** ความเข้มข้น 400 μM ในตัวทำละลาย 80/20 (%v/v) MeCN/H₂O ใน 10 mM บัฟเฟอร์ที่ HEPES pH 7.4

ในทำนองเดียวกันจากการนำสารละลายของอินดิเคเตอร์ **XO** ที่มีสีม่วงอ่อนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงพบว่า **XO** มีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 431 นาโนเมตร และเมื่อทำการไทเทรตสารละลายของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **Zn₂L** ตั้งแต่ 0 – 1 equivalent ลงไปยังสารละลายดังกล่าว พบว่าแถบการดูดกลืนแสงของ **XO** ที่ความยาวคลื่น 431 นาโนเมตร จะมีค่าลดลง และในทำนองเดียวกันเมื่อความเข้มข้นของ **Zn₂L** เพิ่มขึ้น พบว่าความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงของสารละลายผสมดังกล่าวจะเลื่อนไปปรากฏที่ความยาวคลื่น 569 นาโนเมตร (bathochromic shift) ดังแสดงในรูปที่ 4.3 โดยที่สีของ **XO** จะเปลี่ยนจากสีม่วงอ่อนไปเป็นสีม่วงอมชมพูของสารละลายเอนเซมเบิล ซึ่งเป็นการยืนยันว่า **XO** สามารถเกิดพันธะโคออร์ดิเนตโคเวเลนต์กับอะตอมของ Zn(II) ทั้งสองอะตอมของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **Zn₂L** ได้เช่นเดียวกัน จากการคำนวณหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนเซมเบิล ($\log K$) พบว่ามีค่า $\log K_1 = 7.72 \pm 0.18$ และ $\log K_2 = 5.76 \pm 0.28$ ซึ่งตรงกับการเกิดสปีชีส์ของเอนเซมเบิล [**Zn₂L**·**XO**] และ [**Zn₂L**·2**XO**] ตามลำดับ

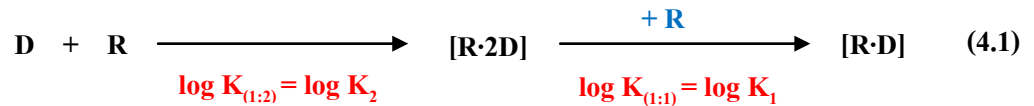


รูปที่ 4.3 ยูวี-วิสิเบิลไทเทรชันสเปกตรัมของอินดิเคเตอร์ **XO** ความเข้มข้น 20 μM ด้วยสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **Zn₂L** ความเข้มข้น 400 μM ในตัวทำละลาย 80/20 (%v/v) MeCN/H₂O ใน 10 mM HEPES บัฟเฟอร์ที่ pH 7.4

ตารางที่ 4.1 ค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนแซมเบิล ($\log K$) ระหว่าง **Zn₂L** และอินดิเคเตอร์ **BPG**, **MTB** และ **XO** และจำนวน equivalent ของ **Zn₂L** ที่ใช้ในการไทเทรต

อินดิเคเตอร์	ค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนแซมเบิล ($\log K$)		จำนวน equivalent
	$\log K_1$	$\log K_2$	
BPG	4.76 ± 0.26	4.38 ± 0.26	2
MTB	6.05 ± 0.16	4.75 ± 0.32	1
XO	7.72 ± 0.18	5.76 ± 0.28	1

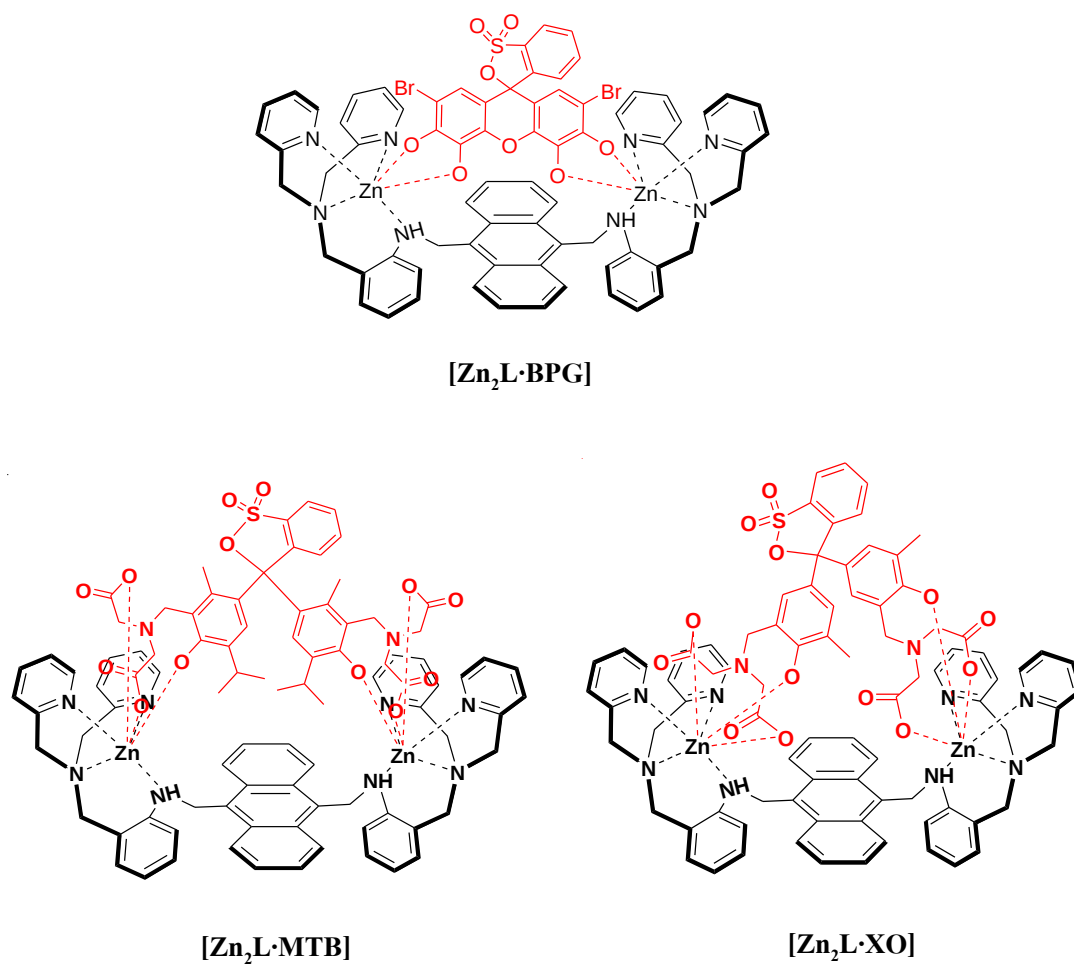
จากค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนเชมเบล (log K) ระหว่าง Zn_2L กับอินดิเคเตอร์ทั้งสามชนิดในตารางที่ 4.1 สามารถเขียนลำดับขั้นของการเกิดเอนเชมเบลทั้ง 2 สปีชีส์ในขณะที่ทำการไทเทรตได้ดังแสดงในสมการที่ 4.1 เมื่อ **D** คืออินดิเคเตอร์ และ **R** คือสารประกอบโคออร์ดิเนชัน Zn_2L



จากสมการที่ 4.1 สามารถอธิบายได้ว่า สปีชีส์ของเอนเชมเบลที่เกิดขึ้นในช่วงแรกของการไทเทรต คือเอนเชมเบลที่มีอัตราส่วนของ Zn_2L : อินดิเคเตอร์ คือ 1:2 $[\text{R} \cdot 2\text{D}]$ เนื่องจากเมื่อเริ่มต้นการไทเทรตนั้นมีความเข้มข้นของอินดิเคเตอร์ที่มากเกินไป และเมื่อทำการเพิ่มความเข้มข้นของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน Zn_2L มากขึ้นพบว่าจะมีการเปลี่ยนสปีชีส์ของเอนเชมเบลจาก $[\text{R} \cdot 2\text{D}]$ ไปเป็นเอนเชมเบลที่มีอัตราส่วนของ Zn_2L : อินดิเคเตอร์ คือ 1:1 $[\text{R} \cdot \text{D}]$ ดังนั้นถ้าสปีชีส์เอนเชมเบล $[\text{R} \cdot \text{D}]$ ใดที่มีค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนเชมเบลมากก็จะใช้จำนวน equivalent ของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน Zn_2L ในการไทเทรตน้อย และในทำนองเดียวกันถ้าสปีชีส์ $[\text{R} \cdot \text{D}]$ ใดที่มีค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนเชมเบลน้อยก็จะใช้จำนวน equivalent ของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน Zn_2L ในการไทเทรตมาก ซึ่งจากตารางที่ 4.1 จะเห็นได้ว่าการเกิดเอนเชมเบลระหว่างสารประกอบโคออร์ดิเนชัน Zn_2L กับอินดิเคเตอร์ **BPG** ใช้จำนวน equivalent ของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน Zn_2L ในการไทเทรตมากที่สุดคือ 2 equivalent แสดงว่าค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนเชมเบล $[\text{Zn}_2\text{L} \cdot \text{BPG}]$ มีค่าต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอินดิเคเตอร์ **XO** และ **MTB**

เมื่อพิจารณาเฉพาะค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนเชมเบลที่มีอัตราส่วนของ Zn_2L : อินดิเคเตอร์ คือ 1:1 นั้น ($\log K_1$) สามารถเรียงลำดับความเสถียรของการเกิดเอนเชมเบลจากมากไปหาน้อยได้ดังนี้ $[\text{Zn}_2\text{L} \cdot \text{XO}] > [\text{Zn}_2\text{L} \cdot \text{MTB}] > [\text{Zn}_2\text{L} \cdot \text{BPG}]$ แสดงให้เห็นว่าขนาดโมเลกุลของอินดิเคเตอร์เป็นปัจจัยในการควบคุมเสถียรภาพของเอนเชมเบลที่เกิดขึ้นในสารละลาย ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการที่อินดิเคเตอร์ **BPG** มีค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนเชมเบลต่ำที่สุดนั้นเนื่องมาจาก **BPG** มีขนาดโมเลกุลที่เล็กที่สุด จึงเกิดพันธะโคออร์ดิเนตโควาเลนต์ที่ไม่แข็งแรงกับอะตอมของ Zn(II) ทั้งสองอะตอมเมื่อเกิดเป็นเอนเชมเบลกับโมเลกุลของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน Zn_2L ในขณะที่อินดิเคเตอร์ **MTB** และ **XO** มีขนาดโมเลกุลที่ใหญ่กว่าอินดิเคเตอร์ **BPG** จึงเกิดพันธะโคออร์ดิเนตโควาเลนต์กับโมเลกุลของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน Zn_2L ได้ดีกว่า จึงมีค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนเชมเบลที่สูงกว่าอินดิเคเตอร์ **BPG** โดยที่อินดิเคเตอร์ **XO** มีขนาดโมเลกุลที่เหมาะสมกับระยะห่างระหว่าง Zn(II) ทั้งสองอะตอมในโครงสร้างของเอนเชมเบลมากที่สุด เนื่องจาก

เอนเซมเบิลที่เกิดขึ้นมีค่าคงที่ความเสถียรมากที่สุด โครงสร้างที่เป็นไปได้ของเอนเซมเบิลทั้งสามชนิดแสดงได้ดังรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 โครงสร้างที่เป็นไปได้ของเอนเซมเบิล [Zn₂L·BPG] [Zn₂L·MTB] และ [Zn₂L·XO]

4.2 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกับแอนไอออนชนิดต่างๆ ของ เอนเซมเบิล

จากการศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกับแอนไอออนชนิดต่างๆ ของเอนเซมเบิล ในสารละลาย 80/20 (%v/v) MeCN/H₂O ใน 10 mM HEPES บัฟเฟอร์ที่ pH 7.4 ในเบื้องต้นนั้น สามารถสังเกตได้จากการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย เอนเซมเบิลไปเป็นสีของอินดิเคเตอร์อิสระ แต่ละชนิดในสภาวะที่มีแอนไอออนชนิดต่างๆ อยู่ในระบบ ผลการทดลองแสดงได้ดังรูปที่ 4.5

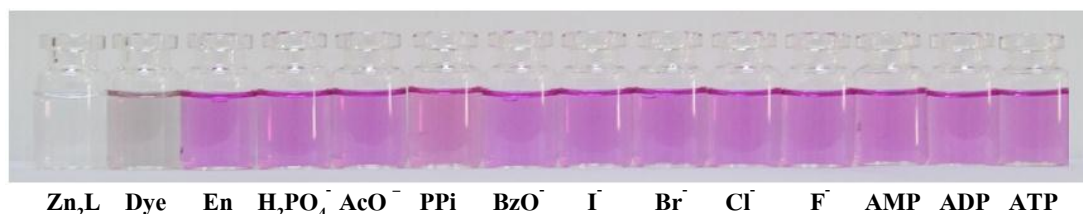
Bromopyrogallol Red (BPG)



Methylthymol Blue (MTB)



Xylenol Orange (XO)



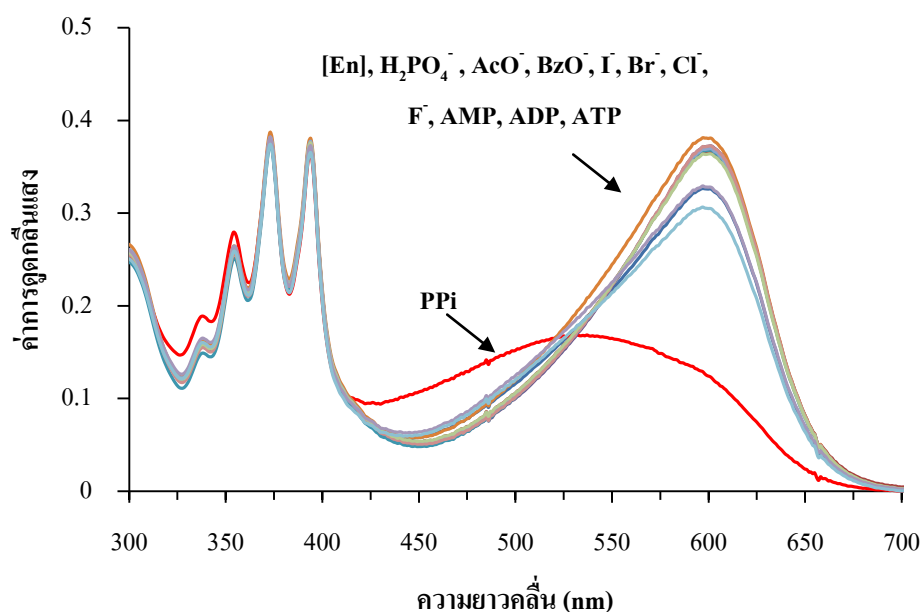
Zn₂L Dye En H₂PO₄⁻ AcO⁻ PPI BzO⁻ I⁻ Br⁻ Cl⁻ F⁻ AMP ADP ATP

รูปที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเอนเซมเบิล (En) ระหว่าง Zn₂L กับอินดิเคเตอร์ BPG, MTB และ XO เมื่อเติมแอนไอออนชนิดต่างๆ จำนวน 4 equivalent ในสารละลาย 80/20 (%v/v) MeCN/H₂O ใน 10 mM HEPES บัฟเฟอร์ที่ pH 7.4

จากรูปที่ 4.5 จะเห็นได้ว่าเอนไซม์เบิลที่เกิดจากอินดิเคเตอร์ทั้งสามชนิดนั้นให้ผลการทดลองที่ต่างกัน โดยเอนไซม์เบิลที่เกิดจากอินดิเคเตอร์ **BPG** นั้นพบว่าไม่มีความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจวัด PPi เนื่องจากเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ ได้แก่ H_2PO_4^- , **AMP**, **ADP** และ **ATP** สามารถเข้าไปแทนที่ **BPG** ในโครงสร้างของเอนไซม์เบิลได้ ซึ่งสังเกตได้จากสีของสารละลายเอนไซม์เบิลที่เปลี่ยนสีจากม่วงอมน้ำเงินไปเป็นสีม่วง แสดงว่าค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนไซม์เบิลของอินดิเคเตอร์ **BPG** นั้นมีค่าต่ำกว่าค่าคงที่ความเสถียรของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน Zn_2L กับแอนไอออนดังกล่าว ในทางตรงกันข้ามในระบบเอนไซม์เบิลที่เกิดจากอินดิเคเตอร์ **XO** นั้นจะเห็นได้ว่าไม่มีแอนไอออนชนิดใดที่สามารถเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ **XO** ได้ แสดงว่าค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนไซม์เบิลของอินดิเคเตอร์ **XO** มีค่าสูงกว่าค่าคงที่ความเสถียรของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน Zn_2L กับแอนไอออนทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองค่อนข้างมาก เนื่องจากในสถานะที่มีแอนไอออนอยู่ในระบบนั้นไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเอนไซม์เบิลจากสีม่วงอมชมพูไปเป็นสีม่วงอ่อนของอินดิเคเตอร์ **XO** ในรูปอิสระ ดังนั้นเอนไซม์เบิลที่เกิดจากอินดิเคเตอร์ **BPG** และ **XO** จึงไม่สามารถนำมาใช้ในการตรวจวัด PPi ด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์

สำหรับเอนไซม์เบิลที่เกิดจากอินดิเคเตอร์ **MTB** นั้นพบว่ามีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัด PPi เป็นอย่างดี เนื่องจากมีเพียง PPi เท่านั้นที่ทำให้สีของสารละลายเอนไซม์เบิลเปลี่ยนจากสีน้ำเงินไปเป็นสีม่วงจาง แสดงว่าค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนไซม์เบิลมีค่าต่ำกว่าค่าคงที่ของการเกิดสารประกอบโคออร์ดิเนชันระหว่าง Zn_2L กับแอนไอออน PPi เพียงชนิดเดียว แต่อย่างไรก็ตามการที่สีของสารละลายที่เกิดขึ้นไม่สอดคล้องกับสีเหลืองของสารละลายของอินดิเคเตอร์ที่อยู่ในรูปอิสระนั้น คาดว่าเกิดจากการที่ PPi ไม่สามารถเข้าไปแทนที่ **MTB** ที่เกิดพันธะโคออร์ดิเนตโคเวเลนต์ได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งหมายความว่าค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนไซม์เบิลดังกล่าวควรจะมีค่าที่ใกล้เคียงกับค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดสารประกอบโคออร์ดิเนชัน Zn_2L กับ PPi

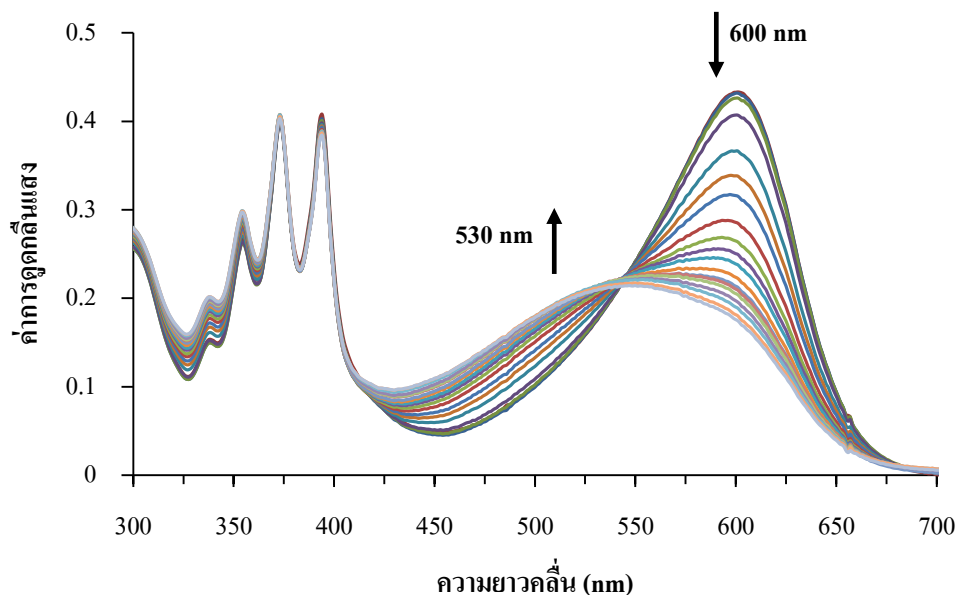
จากสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายเอนไซม์เบิลที่เกิดจากอินดิเคเตอร์ **MTB** ที่มีแอนไอออนชนิดต่าง ๆ อยู่ในระบบดังแสดงในรูปที่ 4.6 จะเห็นได้ว่ามีเพียง PPi เท่านั้นที่ทำให้สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของเอนไซม์เบิลเกิดการเปลี่ยนแปลงแบบ hypsochromic shift เนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรของสารละลายเอนไซม์เบิลมีค่าลดลง และเกิดการเลื่อนไปปรากฏที่ความยาวคลื่นประมาณ 530 นาโนเมตร ซึ่งตรงกับความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงของอินดิเคเตอร์ในรูปอิสระ แสดงว่า PPi สามารถเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ **MTB** ในโครงสร้างของเอนไซม์เบิลดังกล่าวได้จริง



รูปที่ 4.6 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายเอนเซมเบิล (En) ที่เกิดจากอินดิเคเตอร์ MTB ความเข้มข้น 20 μM เมื่อเติมแอนไอออนชนิดต่าง ๆ (4 equivalent) ในสารละลาย 80/20 (%v/v) MeCN/H₂O ใน 10 mM HEPES บัฟเฟอร์ที่ pH 7.4

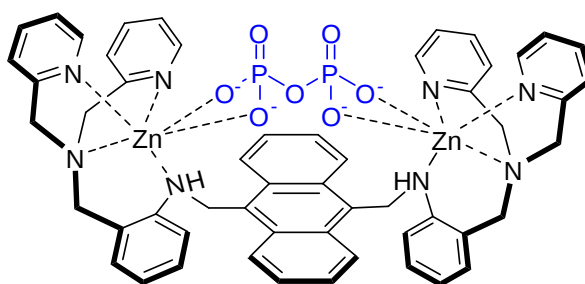
4.3 การหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดสารประกอบโคออร์ดิเนชันระหว่างสารประกอบโคออร์ดิเนชัน Zn_2L กับ ไพโรฟอสเฟตแอนไอออน (PPI) ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน

เมื่อทำการไทเทรตสารละลายของ PPI ความเข้มข้น 400 μM ลงไปในสารละลายของเอนเซมเบิลที่เกิดจากอินดิเคเตอร์ MTB ความเข้มข้น 20 μM จะเห็นได้ว่าค่าการดูดกลืนแสงของเอนเซมเบิลที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จะค่อย ๆ ลดลง และในขณะเดียวกันพบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นประมาณ 530 นาโนเมตรจะมีค่าเพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.7 และพบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นดังกล่าวจะมีค่าคงที่เมื่อทำการไทเทรต PPI ลงไปเป็นจำนวน 4 equivalent โดยเกิดการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายจากสีน้ำเงินของสารละลายเอนเซมเบิลไปเป็นสีม่วงจาง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอินดิเคเตอร์ MTB สามารถถูกแทนที่ได้ด้วย PPI เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการทำยูวี-วิสิเบิลไทเทรชันไปคำนวณหาค่าคงที่ความเสถียร ($\log K$) ของการเกิดสารประกอบโคออร์ดิเนชันระหว่างสารประกอบโคออร์ดิเนชัน Zn_2L กับ PPI พบว่ามีค่า $\log K_1 = 6.00 \pm 0.23$ และ $\log K_2 = 5.60 \pm 0.21$ ซึ่งตรงกับสปีชีส์ของโคออร์ดิเนชันที่อัตราส่วนของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน Zn_2L : PPI คือ 1:1 [$\text{Zn}_2\text{L} \cdot \text{PPI}$] และ 1:2 [$\text{Zn}_2\text{L} \cdot 2\text{PPI}$] ตามลำดับ



รูปที่ 4.7 ยูวี-วิสิเบิลไทเทรชันสเปกตรัมของสารละลายเอนไซม์ที่เกิดจากอินดิเคเตอร์ **MTB** ความเข้มข้น 20 μM ด้วย PPi ความเข้มข้น 400 μM ในสารละลาย 80/20 (%v/v) MeCN/H₂O ใน 10 mM HEPES บัฟเฟอร์ที่ pH 7.4

จากที่ได้กล่าวมาแล้วในข้างต้นว่าสีของสารละลายที่เกิดขึ้นจากการที่อินดิเคเตอร์ **MTB** ถูกแทนที่ด้วย PPi นั้นไม่สอดคล้องกับสีของสารละลาย **MTB** เมื่ออยู่ในรูปอิสระ แสดงให้เห็นว่า PPi ไม่สามารถเข้าไปแทนที่ **MTB** ที่เกิดพันธะโคออร์ดิเนตโควาลนต์ได้อย่างสมบูรณ์ ทั้งนี้เนื่องจากค่า $\log K_1$ ของการเกิดสารประกอบ $[\text{Zn}_2\text{L}\cdot\text{PPi}]$ มีใกล้เคียงกับค่า $\log K_1$ ของการเกิดเอนไซม์ ($\log K_1 = 6.05 \pm 0.16$) จึงทำให้อินดิเคเตอร์ **MTB** ถูกแทนที่ด้วย PPi ได้เพียงบางส่วนเท่านั้น แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ PPi ต่อไปเรื่อย ๆ การถูกแทนที่ดังกล่าวก็ยังสามารถดำเนินต่อไปได้เนื่องจากค่า $\log K_2$ ของ $[\text{Zn}_2\text{L}\cdot 2\text{PPi}]$ มีค่าสูงกว่าค่า $\log K_2$ ของการเกิดเอนไซม์ อย่างมีนัยสำคัญ ($\log K_2 = 4.75 \pm 0.32$) ซึ่งโครงสร้างที่เป็นไปได้ของสารประกอบโคออร์ดิเนชันที่เกิดขึ้น แสดงได้ดังรูปที่ 4.8 โดยที่ PPi ใช้อะตอมของออกซิเจนทั้ง 4 อะตอมในการเกิดพันธะโคออร์ดิเนชันกับ Zn(II) ทั้งสองอะตอม (Watchasit et al., 2010) ทำให้เกิดสารประกอบโคออร์ดิเนชันที่มีอัตราส่วนของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน $\text{Zn}_2\text{L} : \text{PPi}$ คือ 1:1 $[\text{Zn}_2\text{L}\cdot\text{PPi}]$ ซึ่งความเข้มข้นต่ำสุดของ PPi ที่สามารถตรวจวัดได้ มีค่าประมาณ 2.5 μM



รูปที่ 4.8 โครงสร้างที่เป็นไปได้ของสารประกอบโคออร์ดิเนชันระหว่าง Zn_2L และ PPi

เมื่อพิจารณาค่าคงที่ความเสถียร ($\log K_1$) ของการเกิดสารประกอบโคออร์ดิเนชัน $[\text{Zn}_2\text{L}\cdot\text{PPi}]$ กับค่าคงที่ความเสถียรของเกิดเอนเซมเบิลของอินดิเคเตอร์ **BPG** และ **XO** นั้นจะเห็นได้ว่า $[\text{Zn}_2\text{L}\cdot\text{BPG}]$ มีค่า $\log K_1$ (4.76) ที่ต่ำกว่า $\log K_1$ ของ $[\text{Zn}_2\text{L}\cdot\text{PPi}]$ มากและควรจะต่ำกว่าค่า $\log K_1$ ของสารประกอบโคออร์ดิเนชันระหว่าง Zn_2L กับแอนไอออนชนิดอื่น ๆ ด้วยเช่นกัน สำหรับในกรณีของเอนเซมเบิล $[\text{Zn}_2\text{L}\cdot\text{XO}]$ นั้นมีค่า $\log K_1$ ที่สูงกว่าค่า $\log K_1$ ของ $[\text{Zn}_2\text{L}\cdot\text{PPi}]$ ค่อนข้างมาก ดังนั้น PPi จึงไม่สามารถเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ **XO** ในโครงสร้างของเอนเซมเบิลได้

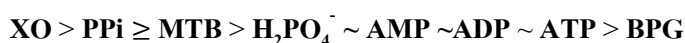
จากผลการทดลองที่ได้ในงานวิจัยนี้จะเห็นได้ว่าการที่อินดิเคเตอร์ **MTB** สามารถใช้เป็นหน่วยให้สัญญาณในการตรวจวัด PPi โดยใช้สารประกอบโคออร์ดิเนชัน Zn_2L ด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์นั้น เนื่องจากมีค่าคงที่ของเกิดเอนเซมเบิลที่เหมาะสมเมื่อเปรียบเทียบกับค่าคงที่ของการเกิดสารประกอบโคออร์ดิเนชันระหว่าง Zn_2L กับ PPi หรืออาจกล่าวได้ว่าอินดิเคเตอร์ **MTB** มีโครงสร้างและขนาดที่เหมาะสมในการใช้เป็นหน่วยให้สัญญาณมากกว่าอินดิเคเตอร์อีก 2 ชนิดคือ **BPG** และ **XO**

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาความเป็นไปได้ในการตรวจวัดไพโรฟอสเฟตแอนไอออนหรือ PPi ด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ โดยการหาคู่ของเอนไซม์เบิลที่เหมาะสมระหว่างสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์ของสังกะสี(II) ที่มีลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของแอนทราซีน (Zn_2L) กับอินดิเคเตอร์ที่มีขนาดของโครงสร้างที่แตกต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ BPG, MTB และ XO ในสารละลาย 80/20 (%v/v) MeCN/H₂O ใน 10 mM HEPES บัฟเฟอร์ที่ pH 7.4 จากการศึกษากการเกิดเอนไซม์เบิลจากอินดิเคเตอร์ทั้ง 3 ชนิดด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทรชันนั้นพบว่าสีของสารละลายเอนไซม์เบิลที่เกิดขึ้นมีความแตกต่างจากสีของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน Zn_2L และอินดิเคเตอร์ในรูปอิสระอย่างชัดเจน เมื่อนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนไซม์เบิล ($\log K$) นั้นพบว่าเอนไซม์เบิลที่เกิดขึ้นในสารละลายมี 2 สปีชีส์ คือ สปีชีส์ที่มีอัตราส่วนของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน Zn_2L : อินดิเคเตอร์ (D) คือ 1 : 1 [$Zn_2L \cdot D$] และ 1 : 2 [$Zn_2L \cdot D$] ซึ่งสามารถเรียงลำดับค่า $\log K_1$ ของเอนไซม์เบิล [$Zn_2L \cdot D$] จากน้อยไปหามากได้ดังนี้ [$Zn_2L \cdot BPG$] < [$Zn_2L \cdot MTB$] < [$Zn_2L \cdot XO$] เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของขนาดของโครงสร้างของอินดิเคเตอร์กับค่า $\log K_1$ นั้นจะเห็นได้ว่าอินดิเคเตอร์ XO ซึ่งมีโครงสร้างใหญ่ที่สุดนั้นมีความเหมาะสมในการเกิดพันธะโคออร์ดิเนชันกับ Zn(II) ทั้งสองอะตอมในโครงสร้างของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน Zn_2L มากที่สุด จึงทำให้ค่า $\log K_1$ ของเอนไซม์เบิล [$Zn_2L \cdot XO$] มีค่ามากที่สุด ส่วนอินดิเคเตอร์ BPG ที่มีขนาดของโครงสร้างที่เล็กที่สุดจึงมีค่า $\log K_1$ ที่ต่ำที่สุด

เมื่อนำเอนไซม์เบิลที่เกิดจากอินดิเคเตอร์ทั้ง 3 ชนิดมาศึกษาความเป็นไปได้ในการนำมาใช้เป็นเซ็นเซอร์ทางเคมีสำหรับตรวจวัด PPi นั้นพบว่าเอนไซม์เบิลที่เกิดจากอินดิเคเตอร์ MTB เท่านั้นที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจวัด PPi มากที่สุด เนื่องจากมีเพียง PPi เท่านั้นที่ทำให้สีน้ำเงินของสารละลายเอนไซม์เบิลเปลี่ยนไปเป็นสีม่วงจาง แสดงให้เห็นว่า PPi สามารถเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ MTB ที่เกิดพันธะโคออร์ดิเนตโควาลนต์กับสารประกอบโคออร์ดิเนชัน Zn_2L ได้ โดยมีค่า $\log K_1$ ของการเกิดสารประกอบ [$Zn_2L \cdot PPi$] ใกล้เคียงกับ $\log K_1$ ของการเกิดเอนไซม์เบิล [$Zn_2L \cdot MTB$]

สำหรับเอนเซมเบิลที่เกิดจากอินดิเคเตอร์ **BPG** นั้น ถึงแม้ว่าจะสามารถถูกแทนที่ได้ด้วย PPi แต่จากการทดลองพบว่ายังมีแอนไอออนชนิดอื่นๆ ก็สามารถเข้าไปแทนที่ **BPG** ในโครงสร้างของเอนเซมเบิลได้ด้วยเช่นกัน แสดงว่าค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนเซมเบิล ($\log K_1$) มีค่าต่ำกว่า $\log K_1$ ของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน Zn_2L กับแอนไอออนชนิดอื่นๆ สำหรับเอนเซมเบิลของ $[\text{Zn}_2\text{L}\cdot\text{XO}]$ ที่มีค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนเซมเบิลมากที่สุดแต่ก็ไม่สามารถนำมาใช้เป็นเซ็นเซอร์สำหรับการตรวจวัด PPi ได้เนื่องจากไม่มีแอนไอออนชนิดใดที่สามารถเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ **XO** ในโครงสร้างของเอนเซมเบิลได้ แสดงว่าค่า $\log K_1$ ของการเกิดเอนเซมเบิล $[\text{Zn}_2\text{L}\cdot\text{XO}]$ มีค่าสูงมาก ดังนั้นเอนเซมเบิลที่เกิดจากอินดิเคเตอร์ **BPG** และ **XO** จึงไม่สามารถนำมาใช้เป็นเซ็นเซอร์ทางเคมีสำหรับการตรวจวัด PPi ได้เนื่องมาจากมีค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนเซมเบิล ($\log K_1$) ที่ไม่เหมาะสม ดังนั้นจึงสามารถเรียงลำดับค่าคงที่ความเสถียร ($\log K_1$) ของแอนไอออนและอินดิเคเตอร์ชนิดต่างๆ ในการเกิดสารประกอบโคออร์ดิเนชันกับ Zn_2L ได้ดังนี้



จากลำดับความเสถียรข้างต้นจึงสามารถสรุปได้ว่า ในระบบของเอนเซมเบิลที่เกิดจากอินดิเคเตอร์ **MTB** นั้นมีความเหมาะสมในการตรวจวัด PPi โดยใช้สารประกอบโคออร์ดิเนชัน Zn_2L ด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์มากที่สุด เนื่องจากมีค่าคงที่ของการเกิดเอนเซมเบิลที่เหมาะสมเมื่อเปรียบเทียบกับค่าคงที่ของการเกิดสารประกอบโคออร์ดิเนชันระหว่าง Zn_2L กับ PPi หรืออาจกล่าวได้ว่าอินดิเคเตอร์ **MTB** มีโครงสร้างที่เหมาะสมมากที่สุดสำหรับการนำมาใช้เป็นหน่วยให้สัญญาณในการตรวจวัด PPi ด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ ซึ่งปัจจัยสำคัญที่ควบคุมความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัด PPi ในงานวิจัยนี้คือ ขนาดโมเลกุลของอินดิเคเตอร์ และระยะห่างระหว่างอะตอมของ Zn(II) ทั้งสองของ Zn_2L (Suksai, 2009)

ข้อเสนอแนะ

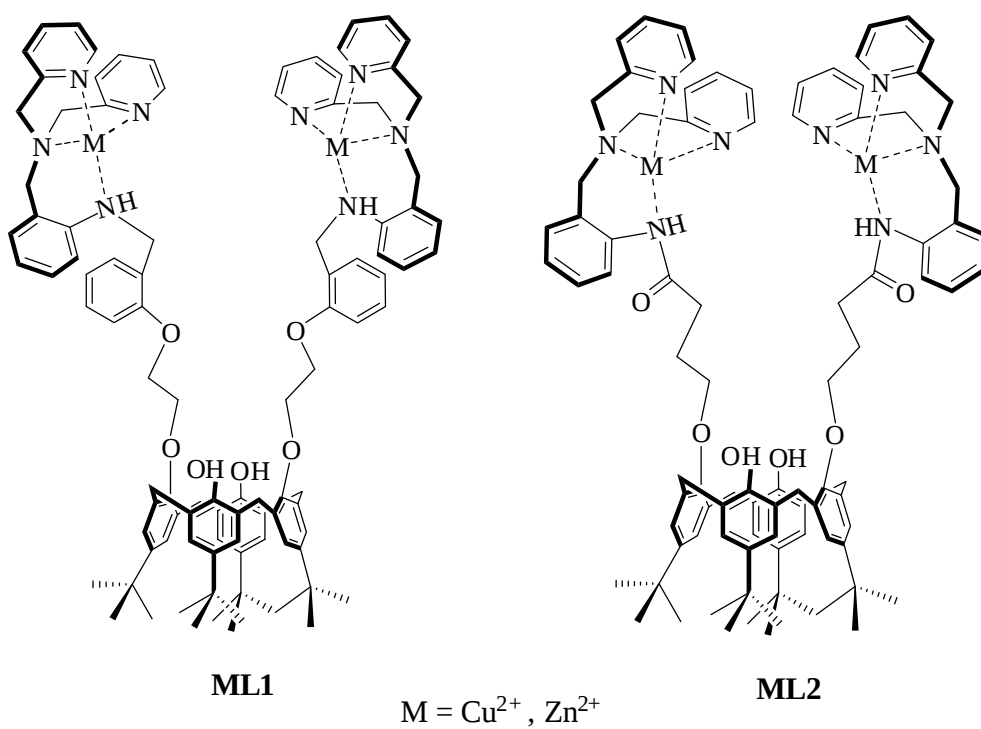
ในงานวิจัยนี้ควรใช้อินดิเคเตอร์ที่มีสมบัติเป็นหมู่ฟลูออโรฟอร์เพื่อที่จะสามารถตรวจวัด PPi ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์เพิ่มเติม โดยใช้เทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ ซึ่งคาดว่าจะสามารถตรวจวัด PPi ที่ความเข้มข้นที่ต่ำกว่าการใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรสโคปี

บรรณานุกรม

- Han, M. S., & Kim, D. H. (2002). Naked-eye detection of phosphate ions in water at physiological pH: A remarkably selective and easy-to-assemble colorimetric phosphate-sensing probe. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 41(20), 3809-3811.
- Jang, H. H., Yi, S., Kim, M. H., Kim, S., Lee, N. H., & Han, M. S. (2009). A simple method for improving the optical properties of a dimetallic coordination fluorescent chemosensor for adenosine triphosphate. *Tetrahedron Letters*, 50, 6241-6243.
- Kim, S. Y., & Hong, J.-I. (2009). Dual signal (color change and fluorescence ON-OFF) ensemble system based on bis (Dpa-CuII) complex for detection of PPI in water. *Tetrahedron Letters*, 50, 1951-1953.
- Lee, J. H., Park, J., Lah, M. S., Chin, J., & Hong, J.-I. (2007). High-affinity pyrophosphate receptor by a synergistic effect between metal coordination and hydrogen bonding in water. *Organic Letters*, 9(19), 3729-3731.
- Lee, D. H., Kim, S. Y., & Hong, J.-I. (2007). Quencher-fluorophore ensemble for detection of pyrophosphate in water. *Tetrahedron Letters*, 48, 4477-4480.
- Morgan, B. P., He, S., & Smith, R. C. (2007). Zinc enzyme model/complexometric indicator pairs in indicator displacement assays for inorganic phosphates under physiological conditions. *Inorganic Chemistry*, 46, 9262-9266.
- Moragues, M. E., Martínez-Máñez, R., & Sancenón, F. (2011). Chromogenic and fluorogenic chemosensors and reagents for anions. A comprehensive review of the year 2009. *Chem. Soc. Rev*, 40, 2593-2643.
- Nguyen, B. T., & Anslyn, E. V. (2006). Indicators-displacement assays. *Coordination Chemistry Review*, 250, 3118-3127.
- SPECFIT/32, Spectrum Software Associates, 197M Boston Post Road West, Marlborough, MA, 01752 USA, 2004.
- Suksai, C. (2009). Supramolecular chemistry: Chemical sensors. *Burapha Sci. Special*, 109-118.
- Watchasit, S., Kaowliew, A., Suksai, C., Tuntulani, T., Ngeontae, W., & Pakawatchai, C. (2010). Selective detection of pyrophosphate by new tripodal amine calix[4]arene-based Cu(II) complexes using indicator displacement strategy. *Tetrahedron Letters*, 51, 3398-3402.

- ขจัตถัย ทิพยพ้อง. (2545). *เอกสารการสอนวิชาเคมีอินทรีย์ 2* (หน้า 119-123). ชลบุรี:
มหาวิทยาลัยบูรพา
- แม่น อมรสิทธิ์. (2534). *หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ* (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ:
โรงพิมพ์ชวนพิมพ์
- สุรวุฒิ ปรีชานนท์. (2555). *โรคเก๊าท์เทียม*. วันที่ค้นข้อมูล 10 มกราคม 2555, เข้าถึงได้จาก
<http://www.thaiarthritis.org/article23.php>
- สรชัย ศรีสุมะ. (2555). *Energy metabolism*. วันที่ค้นข้อมูล 10 มกราคม 2555, เข้าถึงได้จาก
www.ps.si.mahidol.ac.th/Courseware/storeResources/51_SS_Energy%20Metabolism.pdf

**Investigation of the highly selective sensing of
pyrophosphate and histidine by tripodal tetramine-
calix[4]arene based dinuclear complexes under
displacement assay**



CHAPTER 1

INTRODUCTION

1.1 Statements and significance of the problems

The multifaceted role of anions and α -amino acids in biology and the environment has led researchers to develop various means of detecting these species. Anions play fundamental roles in many phenomena (James, 2005, p. 671; Clark, 1980, p. 429; Gomez, Fabbrizzi, Licchelli, & Monzani, 2005, p. 1495), including biological processes such as the transport of hormones, proteins biosynthesis, DNA regulation, and the activity of enzymes. Amino acids are very important markers (Bolin, Åkerud, Hansson, & Åkerud, 2011, p. 496) in biochemistry and molecular biology, with a special regard to determinations which require both temporal and spatial resolution (Czarnik, 1995, p. 423). Therefore, the important roles of those anions and amino acids have inspired chemists to devote significant efforts toward the designs of practical chemosensors for the detection of various anions and amino acids in both qualitatively and quantitatively.

The development of selective colorimetric chemosensors for anions and α -amino acids are traditionally based on a rational design and involves most often multistep chemical synthesis and the subsequent evaluation of an individual compound. This time-consuming process can be accelerated by using indicator displacement assays or IDAs (Wiskur, Haddou, Lavigne, & Anslyn, 2001, p. 963; Nguyen & Anslyn, 2006, p. 3118). IDAs have been used widely in analytical sciences to detect various analytes. In the strategy, an indicator is bound non-covalently to a receptor that can recognize and form a complex with an analyte of interest. The analyte is then allowed to compete for the receptor with the signaling unit. The successful displacement of the receptor-bound signaling unit by the analyte results in displaying a spectral modulation that can be communicated spectroscopically. Thus, the receptor should be chosen in such a way that it can bind both the signaling unit and the analyte, and the spectrum of the indicator in the bound state should be significantly different from that of the indicator in a free form.

We have previously reported that the dinuclear Cu^{2+} complex, **CuL1**, was a good M-IDA receptor for pyrophosphate anion (**PPi**) in HEPES aqueous acetonitrile buffer at pH 7.4 using pyrocatechol violet (**PV**) as colorimetric indicator (Watchasit, Kaowliew, Suksai, Tuntulani, Ngeontae, & Pakawatchai, 2010, p. 3389). Therefore, we expected that **CuL1** could be a good candidate as IDA receptor for α -amino acids. In our continuing endeavor to develop assays for detecting anions and α -amino acids, we decided to investigate whether our two IDA complexes **ML1** and **ML2**, where $\text{M} = \text{Cu}^{2+}$ and Zn^{2+} , would be suitable for achieving the required selectivity for both anions and α -amino acids. **L1** and **L2** are differed only in the spacer between the narrow rim of calix[4]arenes and the binding site of metal ions. The spacer in **L1** is the benzylamine group, whereas the more flexible alkyl amide is the spacer in **L2**. In this study, 4 commercial dyes, pyrocatechol violet (**PV**), pyrogallol red (**PGR**), methylthymol blue (**MTB**) and 4-(2-pyridylazoresorcinol) (**PAR**), which were complexometric indicators for the determination of metal ions were employed (Benamor, Belhamel, & Draa, 2000, p. 1033; Ghasemi & Seifi, 2004, p. 751; Steinberg, Lobnik, & Wolfbeis, 2003, p. 230). Hopefully, the sensing abilities towards anions and α -amino acids would be tuned by the topological differences of ligand spacers and indicator structures. The structures of complex receptors and indicators employed in this work are presented in Figure 1-1. The benefits from this research would be the fundamental knowledge for developing synthetic chemosensors for anions and α -amino acids in the future.

1.2 Objectives

The goal of this work is to develop new receptors for anions and α -amino acids under indicator displacement assay from *p-tert*-butylcalix[4]arene containing tripodal amine **L1** and tripodal amide **L2**.

1.3 Contribution to knowledge

Obtained new dinuclear complexes of copper(II) and zinc(II) of calix[4]arenes based receptors containing tripodal amine and tripodal amide as the recognition unit. We expect that the complexes of the proposed molecules can be employed as anions and α -amino acids receptors by indicator displacement strategy.

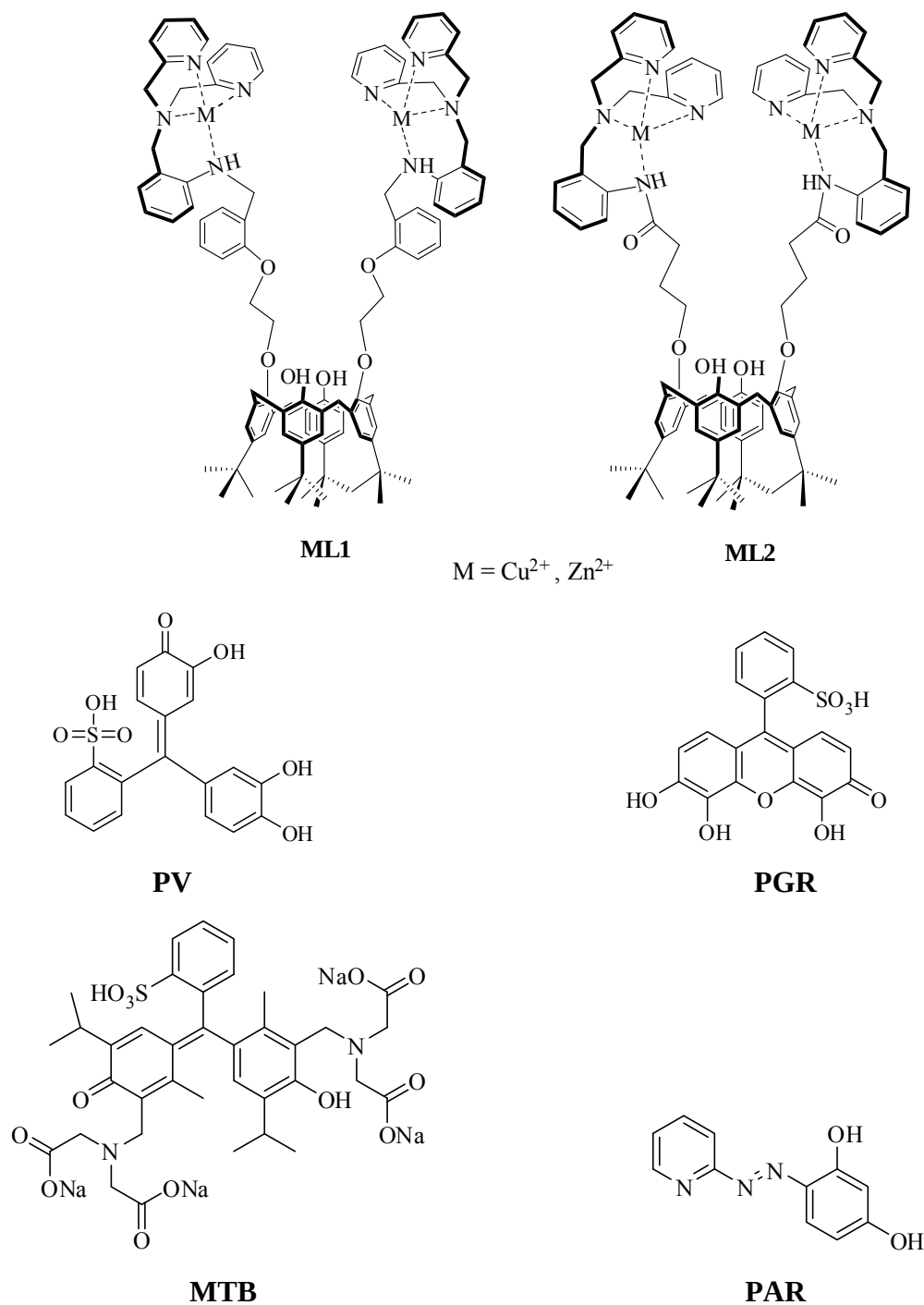


Figure 1-1 Structure of complex receptors and indicators employ in this work

1.4 Scope of study

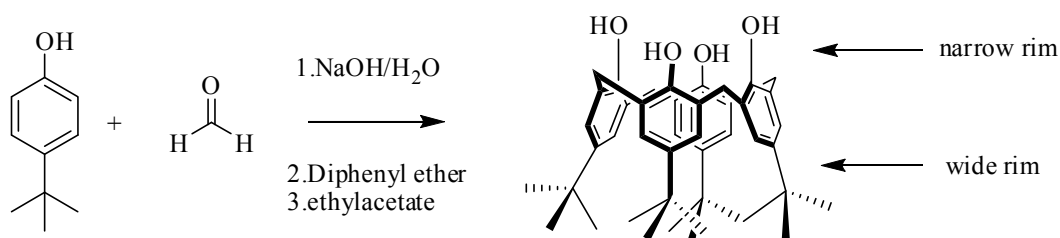
The purpose of this research is to synthesize and characterize Cu^{2+} and Zn^{2+} complexes based on *p*-tert-butyl-calix[4]arenes containing tripodal amine (**L1**) and tripodal amide (**L2**) and investigate their sensing capabilities towards anions and α -amino acids under the indicator displacement approach.

CHAPTER 2

LITERATURE REVIEWS

2.1 Calix[4]arenes

Calix[n]arenes, a family of synthetic macrocyclic receptors consisting of cyclic arrays of n phenol moieties linked by methylene groups, were chosen as the putative hosts. This cyclic oligomer made up of phenols and formaldehydes provides new fascinating platforms. The most famous calixarene is calix[4]arene because it is easiest to prepare. The conventional synthesis of *p*-*tert*-butylcalix[4]arene is shown in Scheme 2-1. This method requires the initial preparation of a precursor by melting *p*-*tert*-butylphenol in the presence of formaldehyde under basic conditions then dissolving the mixture in diphenyl ether (Gutsche & Bauer, 1985, p. 6052). The reaction mixture is then heated under nitrogen to pyrolyse the precursor and the product is isolated by precipitation from ethyl acetate.



Scheme 2-1 Conventional *p*-*tert*-butylcalix[4]arene synthesis

Calix[4]arene can adopt 4 conformations: cone, partial cone, 1,2-alternate and 1,3-alternate as shown in Figure 2-1. Cone conformation is the most stable due to an array of hydrogen bonding between the phenolic-*OH* groups at the narrow rim of the macrocycle. This conformation is particularly useful because of its “bucket” shape leading to the rigidified cavity. This cavity-containing molecule possesses hydroxyl groups on the lower rim and potentially free *para* position on the upper rim. The hydroxyl group provides convenient points for attachment of various moieties, as numerous other researchers have been demonstrated.

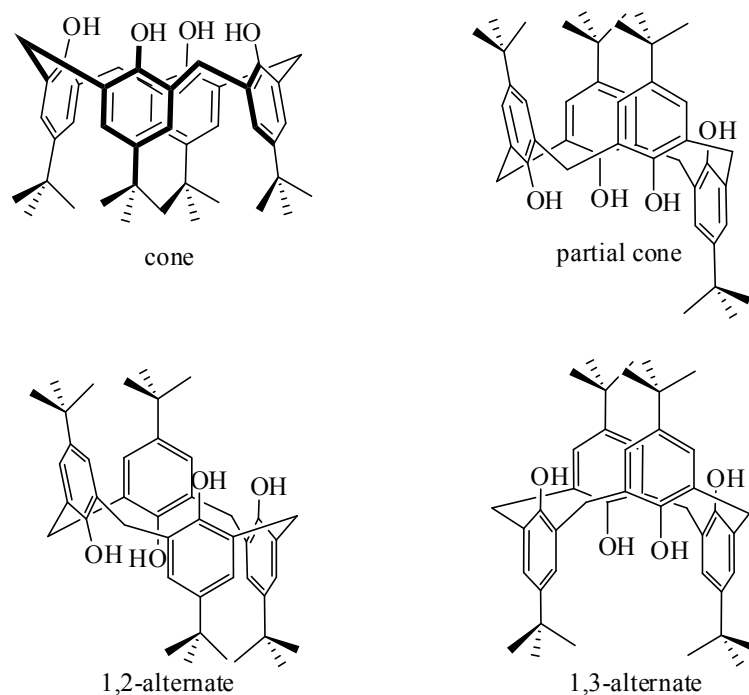


Figure 2-1 Four conformers of *p*-*tert*-butylcalix[4]arene

To distinguish between 4 isomers of calix[4]arene, ^1H NMR is the useful technique to conveniently estimate by characteristic the splitting pattern of the Ar-CH₂-Ar methylene protons (Iwamoto & Shinkai, 1992, p. 7066). For example, the ^1H NMR spectrum of 4 conformers of *p*-*tert*-butylcalix[4]arene tetraethylester (**1**) are presented in Figure 2-2. Generally, cone conformation gave a pair of doublets with a large chemical shift at 3.15 and 4.50 ppm as shown in Figure 2-2(a). For partial conformation showed two pairs of doublets having a large chemical shift difference and another pair of doublets with a small chemical shift difference (3.85 and 3.91 ppm) as shown in Figure 2-2(b). In difference the Ar-CH₂-Ar methylene protons in 1,2-alternate structure gave a pair of doublets with a large chemical shift difference at 4.71 and 3.23 ppm, Figure 2-2(c). Finally, a singlet resonance in 1,3-alternate conformation gave a characteristic singlet resonance because of its high symmetry, Figure 2-2(d).

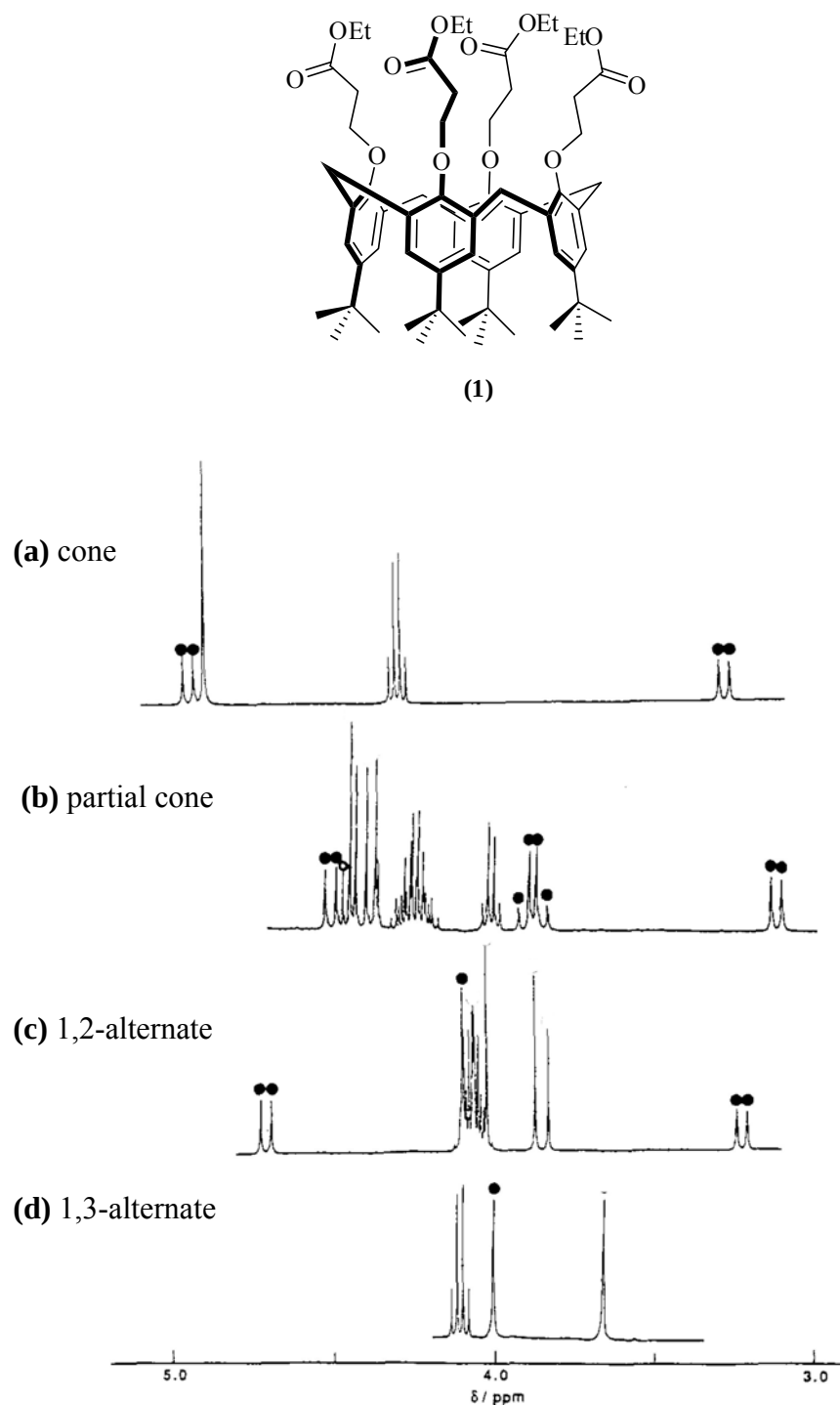


Figure 2-2 Partial ¹H NMR spectra of the four conformers of *p*-*tert*-butylcalix[4]arenetetraethylester (**1**) (CDCl₃, 25 °C, 400 MHz.); (a) cone, (b) partial cone, (c) 1,2-alternate and (d) 1,3-alternate conformations. The filled circles denote the Ar-CH₂-Ar methylene protons of calix[4]arenes

2.2 How important of pyrophosphate anion

Pyrophosphate ($P_2O_7^{4-}$ or **PPi**) participates in ATP hydrolysis and is involved in DNA or RNA polymerase reactions. For example, **PPi** is released in the formation of phosphodiester bonds during DNA polymerization and 3',5'-cyclic adenosine monophosphate (cyclic AMP, second messenger) synthesis and in the formation of activated intermediates (aminoacyl-tRNA) during protein (Limpcombe, & Strater, 1996, p. 2375; Nyrén, 1987, p. 235; Tabary, & Ju, 1992, p. 55). In addition, patients with calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD) crystals and chondrocalcinosis have been shown to have high synovial fluid **PPi** levels (Doherty, Belcher, Regan, Jones, & Ledingham, 1996, p. 432; Timms, Zhang, Russell, Brown, 2002, p. 725). Therefore, selective and sensitive detection of **PPi** is a prerequisite for monitoring the above enzyme reactions and diagnostics of diseases related to the release of certain levels of **PPi**. Interestingly, the ability to detect **PPi** has become important in cancer research (Xu, et. al., 2001, p. 188). Moreover **PPi**, an environment pollutant, is the most common cause of cultural eutrophication (Lund, 1974, p. 797). The structure of **PPi** is shown in Figure 2-3.

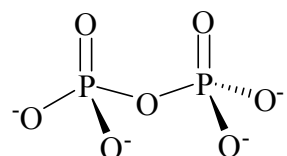


Figure 2-3 Structure of pyrophosphate (**PPi**)

2.3 How important of amino acids

Amino acids, the key constituents of proteins, are small molecules with various functional side chain groups, which result in different roles of amino acids in physiological processes (Shahrokhian, 2001, p. 5972). In this family, lysine (Lys) is closely related to the Krebs–Henseleit cycle and polyamine synthesis, and an appropriate amount of lysine in the diet is essential for the metabolic functions and weight gain of animals (Yoshida, Nakano, Koiso, Nohta, Ishida, & Yamaguchi, 2001, p. 107); histidine (His) is essential for the growth and repair of tissue as well as for the control of metal elements transmission in biological bases (Chen, Wu, Duan, & Chen, 1999, p. 319); tryptophan (Trp) plays a crucial part in biological processes such as protein biosynthesis, animal growth, and plant development (Mackay et al., 2006, p. 30). In addition, the deficiency of some amino acids causes various abnormalities, for example, deficiency of cysteine (Cys) results in slow growth, hair depigmentation, edema, lethargy, liver damage, muscle and fat loss (Refsum, Ueland, Nygard, & Vollset, 1989, p. 31). The structures of lysine, histidine, tryptophan and cysteine are presented in Figure 2-4.

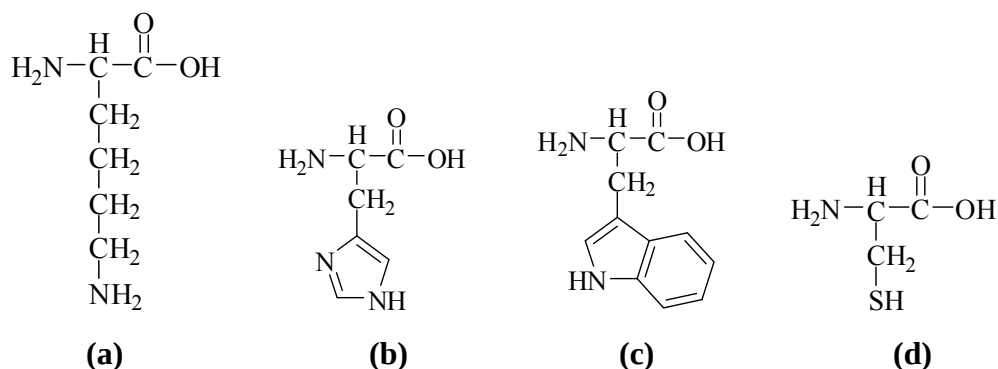


Figure 2-4 Structures of (a) lysine, (b) histidine, (c) tryptophan and (d) cysteine

Histidine (His), an essential bioactive amino acid component of many proteins, controls the transmission of metal elements in biological bases, and acts as a neurotransmitter or neuromodulator in the mammalian central nervous system, including the retina (Creighton, 1999, p. 1147 ; Chen, Wu, Duan, & Chen, 1999, p. 319; Kusakari, Nishikawa, Ishiguro, & Tamai, 1997, p. 600). Metabolism of **His** is

very important in physiology. In the metabolism process of His, histamine (Hst), imidazole acetic acid (Ima) and methyl imidazole acetic acid (Mic) are the main intermediates and products and they are all biologically important compounds (Gajda, Henry, & Delpuech, 1994, p. 157). Detection of histidine in serum and urine samples is associated with the diagnosis of histidine metabolism disorders, particularly 'histidinemia' at elevated levels in physiological fluids, normal level: 130–2100 mM in urine, (Kovach & Meyerhoff, 1982, p. 217). Other diseases like epilepsy, Parkinson's disease, and the failure of normal erythropoiesis develop upon reduction of histidine to below the maintenance requirement (Rao, Stefan, Scheid, Kuttler, & Froscher, 1993, p. 347). A deficiency of histidine in plasma may lead to an impaired nutritional state in patients with chronic kidney disease (Watanabe et al., 2008, p. 1860). In many cases, metabolite analysis in urine is preferred because urine testing is non-invasive and it often has higher concentrations of metabolites than blood (Shojaei, Mirmohseni, & Farbodi, 2008, p. 2875). Thus, the rapid, sensitive and selective detection of histidine in urine is of considerable importance and significant interest.

2.4 Indicator displacement assay

Thus far, most of anions and amino acid chemosensors have been synthesized based on the attachment of a dye, usually colorimetric and fluorescence dye, to an anion-binding site due to the convenient visual "by eye" detection provided by colorimetric assays and the high sensitivity of fluorescence spectroscopy (Matinez & Sancenon, 2003, p. 4419; Suksai & Tuntulani, 2003, p. 192; Suksai & Tuntulani, 2005, p. 163). However, this mechanism does not always work well. Recently, indicator displacement assays (IDA) is employing fluorescence and chromogenic indicators are becoming an increasingly popular method of detecting various analytes. The dyes used in the development of IDA are depicted in Figure 2-5. Many physiologically and environmentally important targets, such as phosphate (Han & Kim, 2002, p. 3809; Hanshaw, Hilkert, Jiang, & Smith, 2004, p. 8721), pyrophosphate (Fabbriizzi, Marcotte, Stomeo, & Taglietti, 2002, p. 3811; Lee, Park, Lah, Chin, & Hong, 2007, p. 3729; Morgan, He, & Smith, 2007, p. 9262; Kim & Hong, 2009, p. 1951; Tang, Li, Zhang, Guo, & Qian, 2009, p. 6844), citrate

(McCleskey, Metzger, Simmons, & Anslyn, 2002, p. 621; Schmuck & Schwegmann, 2006, p. 836), carbonate (Fabbrizzi, Leone, & Taglietti, 2001, p. 3066), amino acids (Aït-Haddou, Wiskur, Lynch, & Anslyn, 2001, p. 11296; Hortala, Fabbrizzi, Marcotte, Stomeo, & Taglietti, 2003, p.20; Bonizzoni, Fabbrizzi, Piovani, & Taglietti, 2004, p. 11159; Buryak & Severin, 2005, p. 3700; Folmer-Anderson, Lynch, & Anslyn, 2005, p. 3700), and biological molecules, (Han & Kim, 2004, p. 1151; Jang, Yi, Kim, Kim, Lee, & Han, 2009, p. 6241), can now be detected and quantified through indicator displacement assays. This approach is somehow employed in displacement reactions in immunoassay protocols (Zhang & Anslyn, 2007, p. 1627).

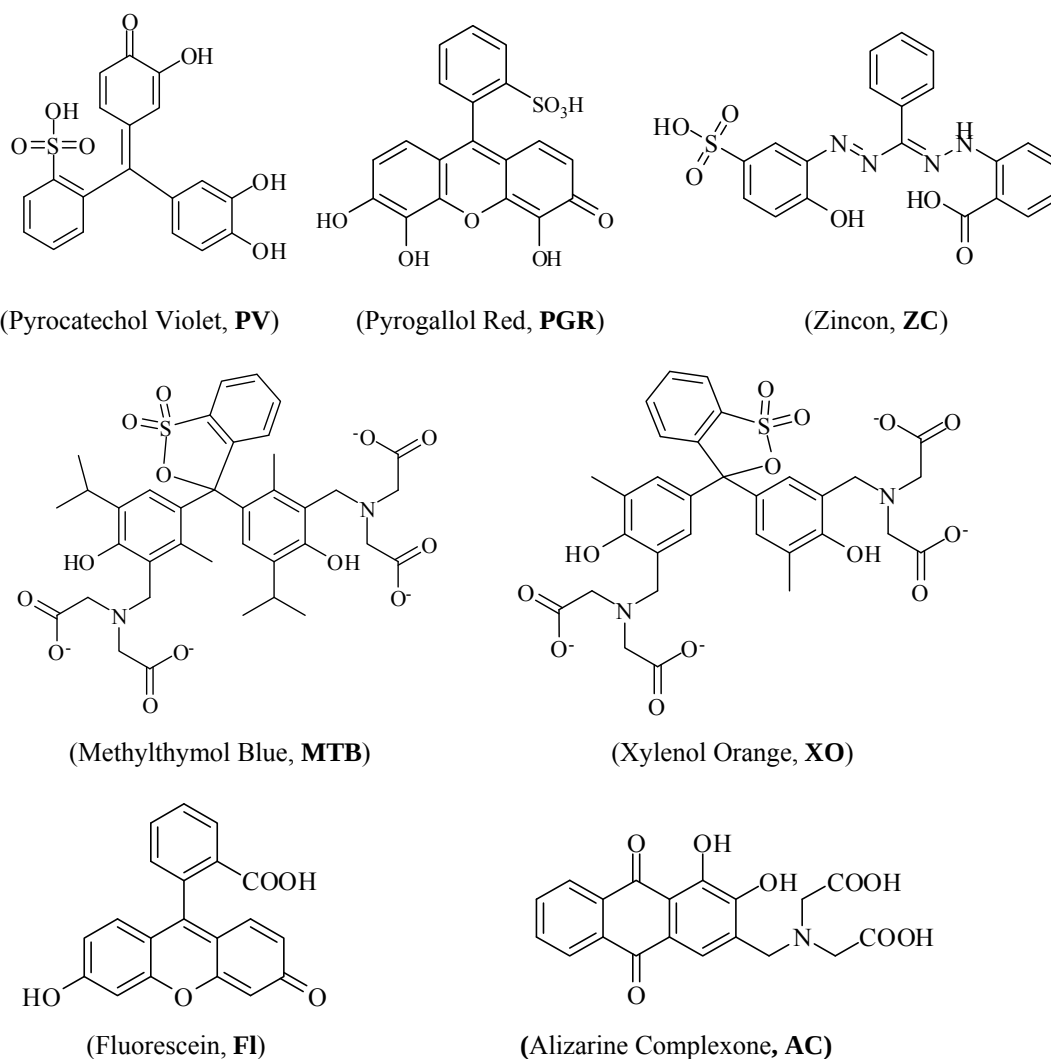
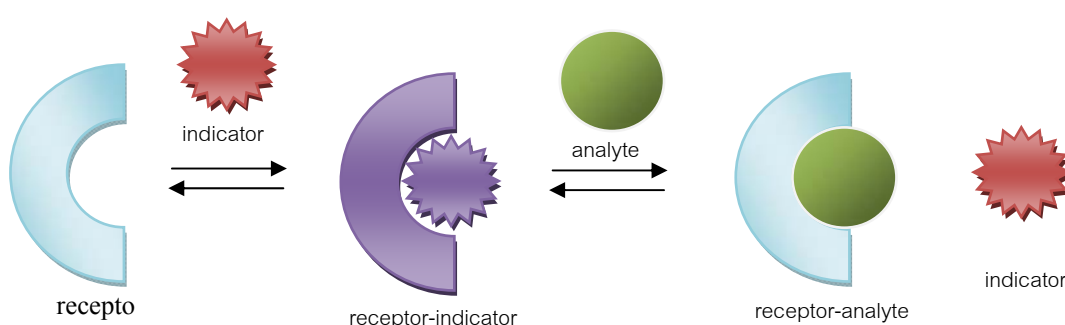


Figure 2-5 Dyes employed in displacement assays for the chromogenic and fluorogenic sensing of anions

Traditionally, the selected receptor (usually a metallic complex) forms an inclusion complex with a dye. Upon addition of the target anionic guest species, the receptor binds to the anion and releases the dye to the solution. Perhaps the most interesting feature of this approach is that the non-covalent anchoring of binding sites and indicator groups allows testing a large number of combinations in order to obtain tuned sensing systems. Additionally, most of the designed ensembles usually display sensing features in water or mixed organic–aqueous solutions allowing the design of realistic sensing protocols. For sensing anions and amino acids usually the metal complexing IDA (M-IDA) are favorable. The advantages of a M-IDA are that it can operate in highly polar and solvating solvents (aqueous ethanol or pure water), and displays strong affinity toward anionic substrates (Kruppa & König, 2006, p. 3520).

As shown in Scheme 2-2, a receptor (**R**) with an affinity for a given analyte forms a reversible complex ensemble with an indicator (**I**). Importantly, upon complexation with the receptor, the spectral properties of the indicator undergo some measurable changes for example fluorescence quenching and UV-Vis absorbance decreases or shift in absorbance maximum. Treatment of this complex ensemble [**R•I**] with the target analyte (**T**) results in displacement of the indicator from the receptor and a restoration of the indicator's original spectral properties. Therefore, a receptor is designed to bind a target analyte with desired affinity, and an indicator must have a weaker affinity with the receptor than the analyte.



Scheme 2-2 Generalized representation of the signal transduction mechanism for IDAs

The IDA offers many advantages over traditional sensing assays. First, the method does not require the indicator to be covalently attached to the receptor. Second, because there are no covalent bonds between the receptor and the indicator, one can employ several different indicators with the same receptor. Third, the assay works well in both organic and aqueous media, and lastly, the assay is easily adapted to different receptors and platforms for quick analysis. Therefore, the IDA strategy has emerged as an attractive alternative to covalently tethered receptor-reporter sensors and to differentiate various analyte by a single sensor.

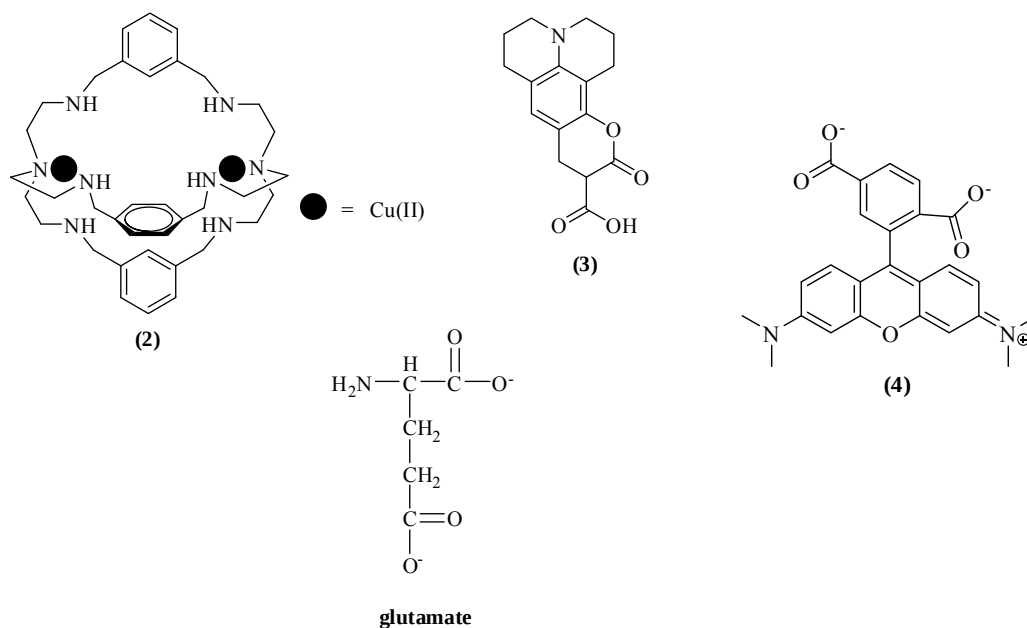
2.5 Metal complexing indicator–displacement assays (M-IDA)

As we mentioned before, in M-IDA strategy an indicator (chromophore or fluorophore) is allowed to coordinate with both the metal center and the receptor. Addition of an analyte to the system causes the displacement of the indicator from the metal and the receptor. This results in optical changes that can be measured to derive binding affinity. The advantages of a M-IDA are that it can operate in highly polar and solvating solvents (aqueous ethanol or pure water), and displays strong affinity toward anionic substrates.

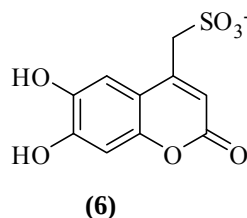
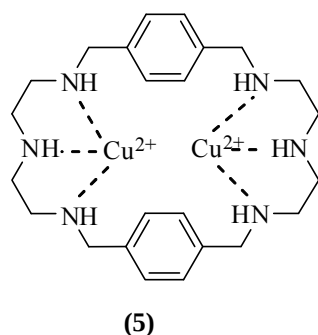
As we mentioned previously regarding metal complex-IDA strategy, an indicator (chromophore or fluorophore) is allowed to coordinate with both the metal center and the receptor. Herein, the following examples employ the traditional displacement approach to detect anions, amino acids and biological molecules.

One of the pioneers of IDA strategy is the Fabbrizzi group has shown that the ensemble system between dicopper (II) cryptate complex (**2**) and fluorescence coumarin (**3**) indicator, possessed the high selectivity to carbonate anion in aqueous solution (Fabbrizzi, Leone, & Taglietti, 2001, p. 3066). The carboxylate group of **3** is capable of bridging the two copper centers of **2**. This coordination quenches the fluorescence of **3**. Addition of carbonate anion to the ensemble solution regenerated the fluorescence due to the displacement of **3** from **2** by carbonate anion. In 2003, the same group has shown that polyamine cage **2** can be successfully used to detect glutamate (a neurotransmitter) in water at pH 7 using 6-carboxy-tetramethylrhodamine (**4**) as fluorescence indicator (Hortala, Fabbrizzi, Marcotte, Stomeo, & Taglietti, 2003, p. 20). In this system, the copper ion in **2** acts as a

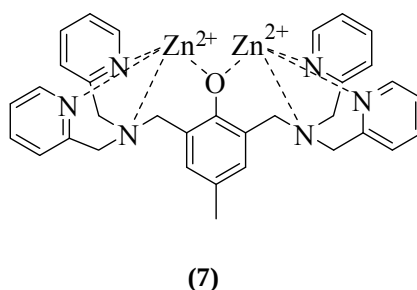
fluorophore quencher due to its partially filled 3d orbitals. When compared to other amino acids (aspartate, glycine, alanine, aminobutyric acid), glutamate was bound best to **2** because it has the right length between carboxylates. These characteristics make the inclusion of glutamate in **2** more favorable than other amino acids.



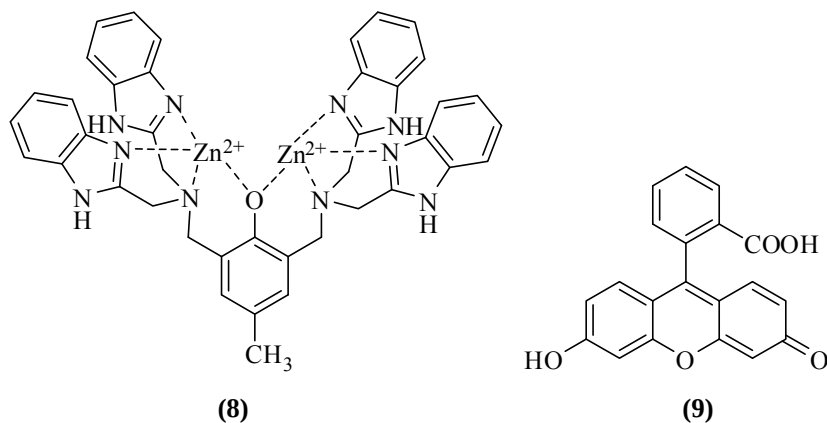
The same strategy was used by Fabbrizzi in the detection of **PPi** and **His** in water (Fabbrizzi, Marcotte, Stomeo, & Taglietti, 2002, p. 3811). Pyrophosphate anions play important roles in bioenergetic and metabolic processes. Receptor **5** was designed to incorporate two copper ions to gain affinity for the analytes. Eosine Y (**6**) was one of the indicators used in this study. Results from these studies showed that **5** binds to **PPi** better than monophosphate due to the ability of pyrophosphate to coordinate the two copper centers. The same sensing ensemble [**5•6**] was also able to discriminate histidine from glycine, phenyl alanine, valine, leucine, and proline. This is because histidine possesses an imidazole residue which coordinates to dicopper centers resulting in higher selectivity.



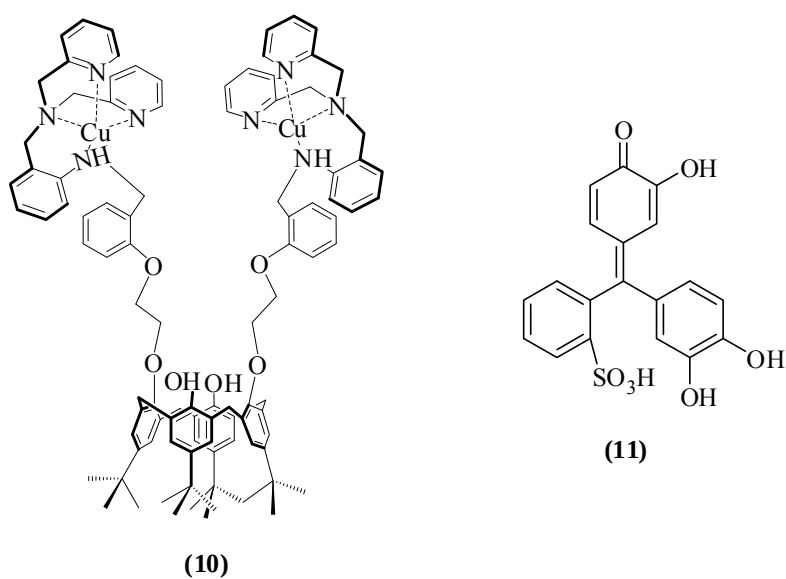
Interestingly, the dinuclear zinc phosphoesterase enzyme models have been exploited as M-IDA receptors. Hanshaw, Hilkert, Jiang, and Smith (2004, p. 8721) have used an ensemble of Zn^{2+} -dipicolylamine complex **(7)** and coumarin **(6)** as anion sensor to detect both Pi and **PPi** under physiological conditions (pH 7.4, 5 mM TES, 145 mM NaCl). It was found that the Zn–Zn distance in complex **6** is 3.0 Å which is less than that in phosphotriesterase enzyme (3.5 Å), this may be the reason why **7** can bind both Pi and **PPi**. Therefore, the Zn–Zn distance played a key role in analyte preference.



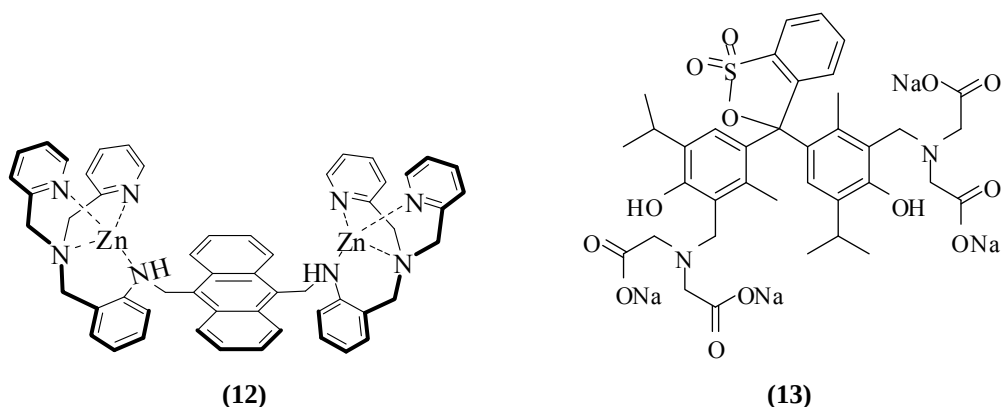
The dinuclear Zn^{2+} complex, **(8)** and fluorescein **(9)** formed a selective ensemble for **PPi** recognition in water at physiological pH (Tang, Li, Zhang, Guo, & Qian, 2009, p. 6844). The fluorescence emission of **[8•9]** ensemble solutions, that were completely quenched in origin, was studied upon addition of $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$, HSO_4^- , PO_4^{3-} , AcO^- , I^- , Br^- , Cl^- , F^- and **PPi**. It was found that only **PPi** was able to displace the indicator **9** from the ensemble and caused significant fluorescence revival.



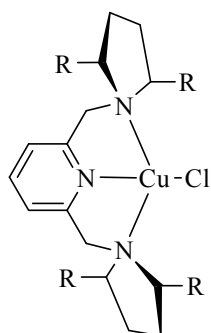
Watchasit, Kaowliew, Suksai, Tuntulani, Ngeontae, and Pakawatchai (2010, p. 3398) have synthesized dinuclear Cu(II) complexes of *p*-tert-butylcalix[4]arene containing two tripodal amine units (**10**) and exploited as **PPi** sensor by IDA approach. It was found that the new ensemble between **10** and pyrocatechol violet (**PV**, **11**) showed the high selectivity to **PPi** than other anions in 80/20 (%v/v) CH₃CN/H₂O solution buffered with 10 mM HEPES at pH 6.4. The sensing selectivity is ascribed to the tuning of the distance between donor atoms of anion guests and their ability to encompass the Cu²⁺-Cu²⁺ distance within the cleft of **10**. In addition, the preorganization of calix[4]arene in the cone conformation and steric hindrance of two bulky tripodal amine moieties are important factors to control the Cu²⁺-Cu²⁺ distance.



Watchasit, Suktanarak, Suksai, Ruangpornvisuti, and Tuntulani (2004, p. 14701) showed that the ensemble formation between dinuclear Zn(II) complex of anthracene based tripodal tetramine (**12**) with methylthymol blue (**MTB**, **13**), [**12**•**13**], could discriminate **PPI** from other phosphate containing anions in 20% (v/v) water–acetonitrile buffered at pH 7.4 with HEPES buffer. ^1H and ^{31}P NMR spectroscopy as well as DFT calculations confirmed that **PPI** bound to **12** in a 2 : 2 manner. Both NMR spectroscopy and UV-vis spectrophotometry suggested that the two bulky tripodal tetramine units in **12** played an important role to provide the ensemble cleft for **MTB**, giving rise to an ensemble that could be displaced exclusively by **PPI**.

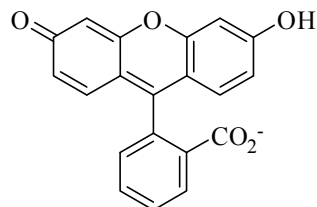


Folmer-Andersen, Lynch, and Anslyn (2005, p. 5319) found that the mononuclear copper(II) complexes, (**14**) – (**15**), were found to discriminate **His** from other zwitterionic α -amino acids by means of indicator-displacement assays using 5(6)-carboxyfluorescein (**16**) as an indicator in buffered methanol/water (3:1) solvent. However, the colorimetric detection of **His** appears to a unique process involving disruption of the host complex to form a 2:1 His/Cu²⁺ complex rather than simple indicator displacement.



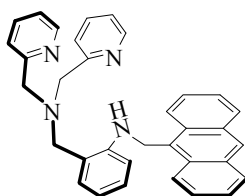
(14) ; R = H

(15) ; R = Me



(16)

The di-tripodal amine calix[4]arene (**L2**) was successfully synthesized and used as an ion carrier in poly(vinyl chloride) (PVC) membrane electrodes (Kunthadee et al., 2013). Compound **L2** was employed to demonstrate a new concept in anion sensing by preparing an allosteric PVC membrane that can respond selectively to a certain anion in the presence of a metal effector. Membranes containing compounds **L2** and potassium tetrakis(*p*-chlorophenyl)borate (KTPClPB) as an ionic additive showed Donnan exclusion failure upon measuring the potential (EMF) responses of Cu^{2+} and responded to the co-anion by giving negative EMF changes, while membranes containing compound **17**, an anthracene-based mono-tripodal amine ligand, gave positive potentials to most metal ions. Upon preconditioning of the membranes containing **L2** and 75 mol% KTPClPB in CuCl_2 , the membranes showed the highest selectivity towards thiocyanate with a near Nernstian slope of $-59.6 \text{ mV decade}^{-1}$, a 10^{-5} to 10^{-2} M linear range, and a detection limit of $4.4 \times 10^{-6} \text{ M}$. The best allosteric membrane can be used in the pH range 3–7 with good reversibility, and also applied to indirectly determine the concentration of Fe^{3+} in aqueous solution.



(17)

CHAPTER 3

RESEARCH METHODOLOGY

3.1 Instruments

Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectra were recorded in CDCl_3 and CD_3CN on a 400 MHz Bruker Ultra Shield AVANCE 400 spectrometer. The UV–Vis spectra were measured on a Hewlett Packard UV–Vis 8453 spectrophotometer. The ESI-MS mass spectra were recorded using a Bruker microTOF mass spectrometer.

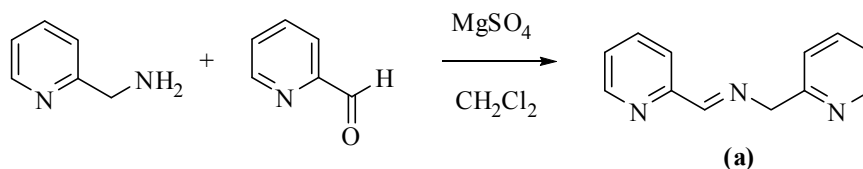
3.2 Chemicals

All the chemicals and reagents were reagent grade from Merck, Fluka and Aldrich. Solvents for synthesis (LABSCAN) were commercially purchased and purified by distillation and stored over molecular sieves 3 or 4 Å. CH_3CN (LABSCAN) was analytical grade and used as received. Column chromatography operations were carried out on silica gel (Kieselegel 60, 0.063-0.200 nm, Merck) and alumina (aluminium oxide 90, 0.063-0.200 nm, Merck).

3.3 Synthesis and characterization of L1 and L2

3.3.1 Preparation of pyridin-2-ylmethypyridin-2-ylmethyleamine (a)

(Incarvito et al., 2001, p. 3478)

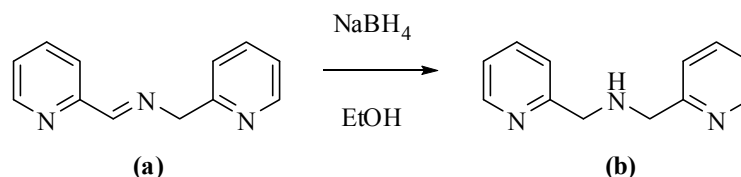


To a suspension of anhydrous MgSO_4 (122 g, 183 mmol) in CH_2Cl_2 (30 mL) was added 2-pyridinecarboxaldehyde (3.96 g, 37 mmol) and 2-(aminomethyl)pyridine (4 g, 37 mmol). The mixture became warm and the color changed to yellow. After being stirred for 3 h at room temperature under nitrogen atmosphere, the suspension was filtered and washed with CH_2Cl_2 (150 mL), and the solvent was removed under vacuum. A yellow oil of (a) was obtained (7.3 g, 100%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 8.67 (d, 1H, $J = 3.6$ Hz, ArH), 8.58 (t, 2H, $J = 3.6$ Hz, ArH), 8.10 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, ArH), 7.76 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz, ArH), 7.67 (m, 1H, ArH), 7.43 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, ArH), 7.34 (m, 1H, ArH), 7.19 (s, 1H, ArH), 5.03 (d, 2H, $J = 0.8$ Hz, $-\text{CH}_2-$).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 163.94, 149.50, 149.37, 136.68, 136.55, 124.92, 122.38, 122.13, 121.49, 66.58.

3.3.2 Preparation of bis-pyridin-2-ylmethamine (b) (Incarvito et al., 2001, p. 3478)



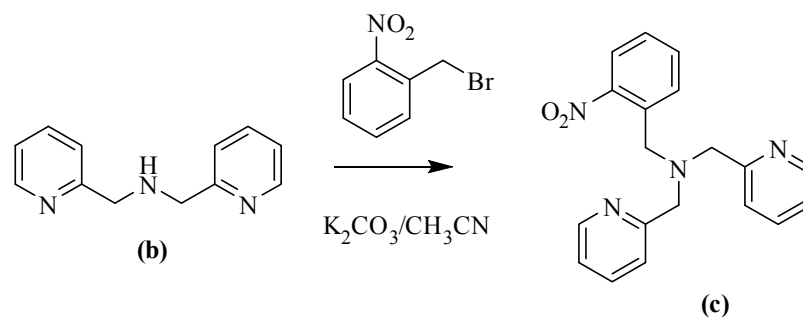
The imine **(a)** (4.02 g, 20 mmol) was dissolved in CH₃CN (45 mL) and was cooled to -5 °C. Glacial acetic acid (1.47 mL, 25 mmol) was added in the portion. To the resulting clear yellow solution was added NaBH₄ (3.78 g, 100 mmol) and EtOH (55 mL). After stirring for 18 h at room temperature, the reaction mixture was quenched with 12 M HCl (28 mL, 80 mmol) and heated at 60 °C for 2 h. The white precipitate was filtered. The filtrate was concentrated in vacuo and then redissolved in water (15 mL). The resulting yellow aqueous solution was basified by addition of solid NaOH pellets (12 g, 300 mmol) with efficient cooling. A red oil appeared immediately. It was extracted with diethyl ether (3 × 200 mL). The ether extracts were dried with anhydrous Na₂SO₄. After solvent removal, compound **(b)** was obtained (3.98 g, 100%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm): δ 8.58 (m, 2H, ArH), 7.66 (m, 2H, ArH), 7.39 (d, 2H, *J* = 7.6 Hz, ArH), 7.18 (m, 2H, ArH), 4.00 (s, 4H, -CH₂-).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, ppm): δ 159.63, 149.31, 136.51, 122.34, 121.99, 54.74.

3.3.3 Preparation of 2-[bis(2-pyridylmethyl)aminomethyl]nitrobenzene

(c) (Burdette, Frederickson, Bu, & Lippard, 2003, p. 1778)



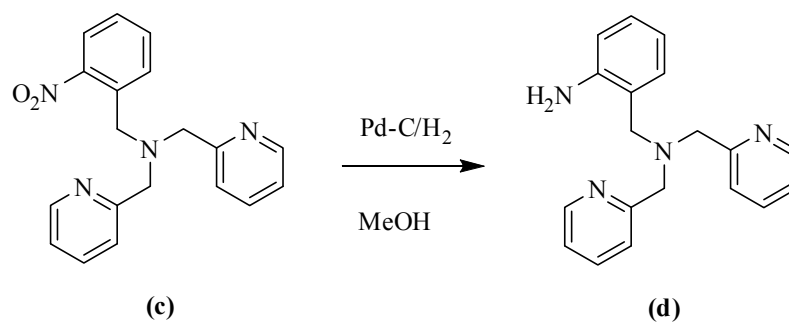
Amine **(b)** (3.86 g, 19.4 mmol), K₂CO₃ (20.8 g, 150 mmol), 2-nitrobenzylbromide (4.19 g, 19.4 mmol), and molecular sieves 3 Å (3.05 g) were mixed in 80 mL of CH₃CN and stirred for 12 h under nitrogen atmosphere. The reaction mixture was filtered through Celite. After solvent removal, a brown oil was obtained. The oil was redissolved in CH₂Cl₂ (200 mL), washed with water (3 × 300 mL) and the solvent was removed. A dark oil of compound **(c)** was obtained (6.04 g, 93%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm): δ 8.52 (m, 2H, ArH), 7.77 (t, 1H, *J* = 6.8 Hz, ArH), 7.71 (s, 1H, ArH), 7.65 (m, 1H, ArH), 7.64 (d, 1H, *J* = 2 Hz, ArH), 7.51 (d, 1H, *J* = 1.6 Hz, ArH), 7.42 (d, 2H, *J* = 8 Hz, ArH), 7.16 (m, 2H, ArH), 4.09 (s, 2H, -CH₂-), 3.79 (s, 4H, -CH₂-).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, ppm): δ 158.62, 148.92, 136.46, 134.38, 132.35, 131.39, 127.92, 124.31, 123.28, 122.13, 60.39, 55.87.

3.3.4 Preparation of 2-[bis(2-pyridylmethyl)aminomethyl]aniline (**d**)

(Burdette et al., 2003, p. 1778)

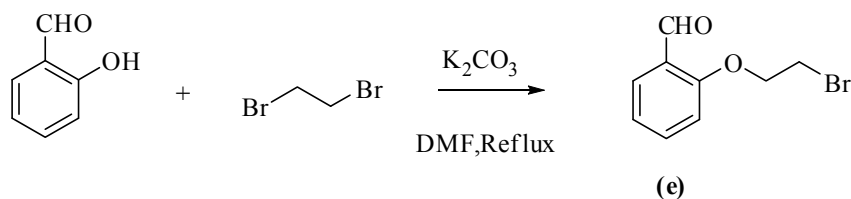


Pd-C (0.3 g) and nitro compound (**c**) (3 g, 8.97 mmol) were mixed in 150 mL of MeOH and stirred under a hydrogen atmosphere for 24 h. The reaction mixture was filtered through Celite to give a dark oil of (**d**) after solvent removal (2.73 g, 100%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 8.55 (m, 2H, ArH), 7.63 (m, 2H, ArH), 7.39 (d, 2H, $J = 7.6$ Hz, ArH), 7.15 (q, 2H, $J = 5.2$ Hz, ArH), 7.07 (m, 2H, ArH), 6.63 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz, ArH), 3.80 (s, 4H, $-\text{CH}_2-$), 3.66 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 159.10, 149.01, 147.01, 136.45, 131.18, 128.50, 123.53, 122.07, 117.22, 115.45, 60.14, 57.92.

3.3.5 Preparation of 2-(2-bromoethoxy)benzaldehyde (e) (Sundriyal et al., 2008, p. 4959).

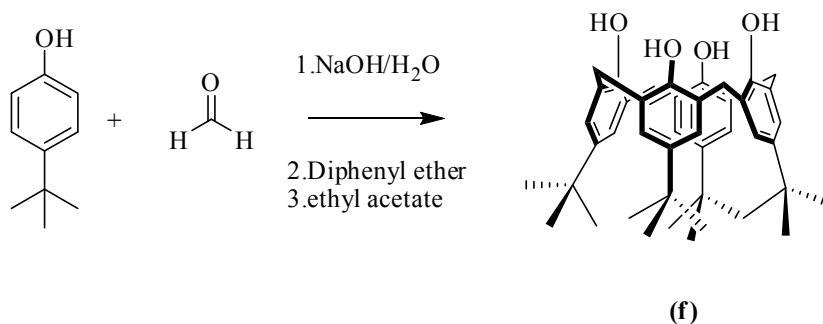


To a suspension of anhydrous K_2CO_3 (22.5 g, 163 mmol) in DMF (100 mL) was added sequentially salicylaldehyde (6.4 mL, 82 mmol) and 1,4-dibromoethane (21.2 mL, 246 mmol). The mixture was heated at 60 °C for 3 h under nitrogen atmosphere. The reaction mixture was quenched with 2 M NaOH (100 mL) and the mixture was extracted with ethyl acetate (3 × 250 mL). The organic phase was combined, washed with water (5 × 250 mL) and dried over anhydrous Na_2SO_4 . After removing solvent, the crude product was then purified by column chromatography (SiO_2) using 50% hexane in CH_2Cl_2 as eluent. A colorless oil of **(e)** (8.28 g, 45%) was obtained.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 10.57 (s, 1H, -CHO), 7.88 (m, 1H, ArH), 7.57 (m, 1H, ArH), 7.11 (m, 1H, ArH), 6.99 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, ArH), 4.44 (t, 2H, $J = 6$ Hz, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 3.73 (t, 2H, $J = 6$ Hz, $-\text{CH}_2\text{Br}$)

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

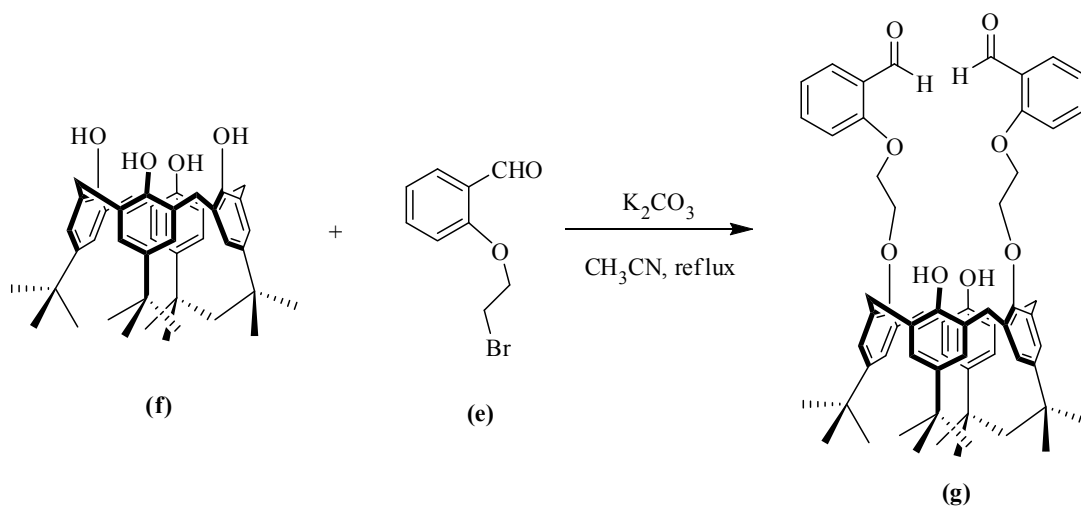
3.3.6 Preparation of *p*-*tert*-butylcalix[4]arene (f) (Gutsche & Bauer, 1985, p. 6052)



To a mixture of *p*-*tert*-butylphenol (25.82 g, 172 mmol) and 37% formaldehyde (17 mL) was added a solution of NaOH (0.25 g, 6.25 mmol) in water 1 mL. The mixture was heated for 3 h to give a pale yellow solid. Subsequently, a yellow solid was heated in diphenyl ether (250 mL) for 3 h with a dean-stark equipment. After cooling at room temperature, ethyl acetate (200 mL) was added to afford a white solid. It was filtered and washed with 50% ethyl acetate in glacial acetic acid to yield **(f)** as a white solid (66.71 g, 60%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 10.36 (s, 4H, -OH), 7.12 (s, 8H, ArH), 4.29 (d, 4H, $J = 13.2$ Hz, Ar- CH_2 -Ar), 3.53 (d, 4H, $J = 12.8$ Hz, Ar- CH_2 -Ar), 1.28 (m, 36H, -*tert*-butyl)

3.3.7 Preparation of 25,27-(4,4'-bis(ethoxybenzaldehyde))-*p*-*tert*-butyl calix[4]arene (g) (Navakun, Tuntulani, & Ruangpornvisuti, 2000, p. 113)

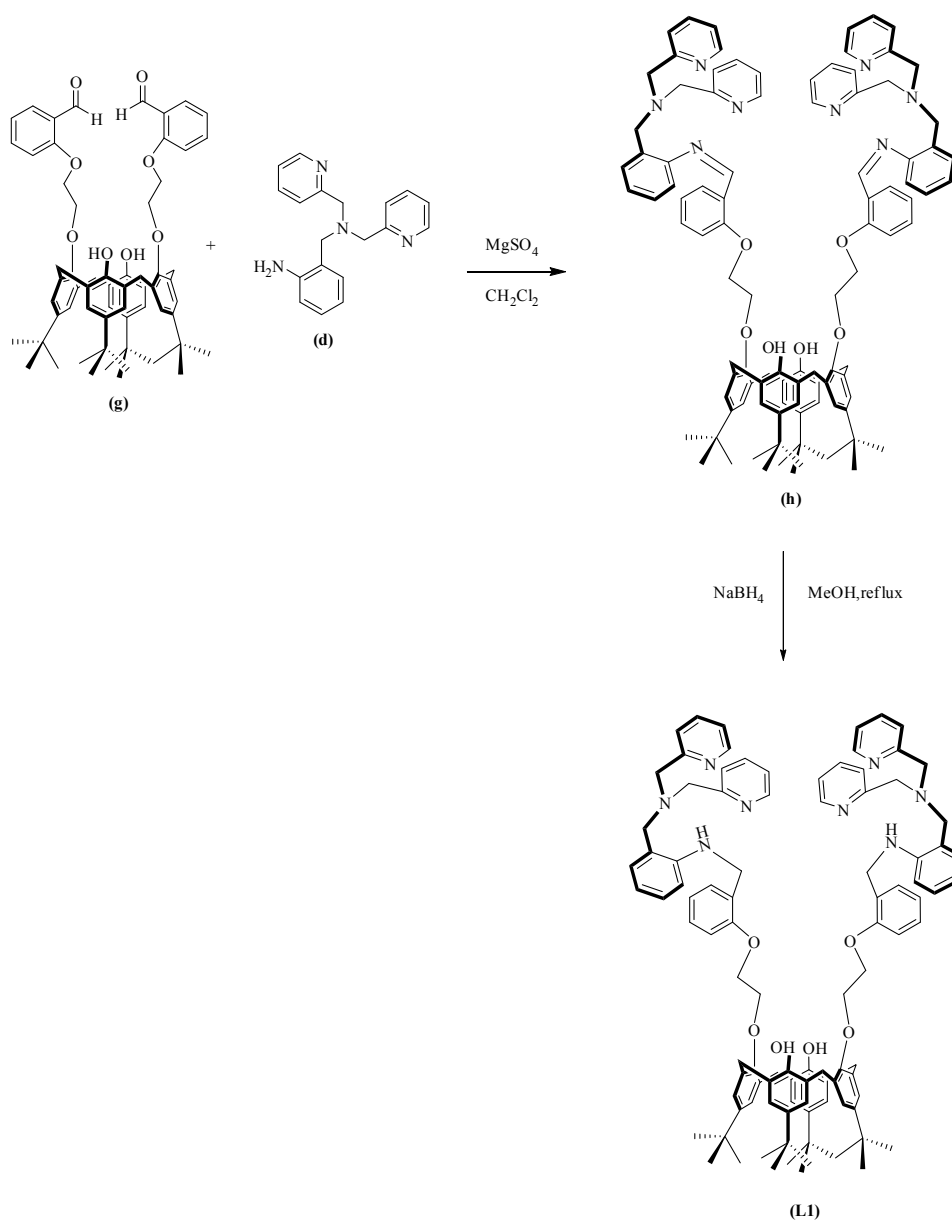


A mixture of *p*-*tert*-butylcalix[4]arene (**f**) (10.17 g, 15.73 mmol) and anhydrous K_2CO_3 (21.74 g, 157.3 mmol) in CH_3CN (300 mL) was refluxed for 30 min under nitrogen atmosphere. 2-(2-Bromoethoxy)benzaldehyde (**e**) (7.21 g, 31.46 mmol) in CH_3CN (100 mL) was added drop wise and the mixture was refluxed for 53 h under nitrogen atmosphere. After cooling to room temperature, K_2CO_3 was removed by filtration and washed with large mount of CH_2Cl_2 . The filtrate was then evaporated to yield a creamy caramel-like residue. The crude product was purified by column chromatography (SiO_2) using CH_2Cl_2 as eluent. The product was precipitated in hexane as a white solid (7.47 g, 50%).

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

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

3.3.8 Preparation of 25,27-(4,4'-bis(2-((bis(pyridin-2-ylmethyl)amino) methyl)-N-(2-ethoxybenzyl)aniline)-*p*-*tert*-butylcalix[4]arene (L1) (Watchasit, Suktanarak, Suksai, Ruangpornvisuti, & Tuntulani, 2004, p. 14701)



A mixture of di-aldehyde calix **(g)** (2.65 g, 2.8 mmol) in dry CH_2Cl_2 (50 mL) was added to a suspension of anhydrous MgSO_4 (6.76 g, 56 mmol) in CH_2Cl_2 (70 mL) with tripodamine **(d)** (2.13 g, 7 mmol). The reaction mixture was stirred for 12 h under nitrogen atmosphere. Then solid MgSO_4 was removed by filtration.

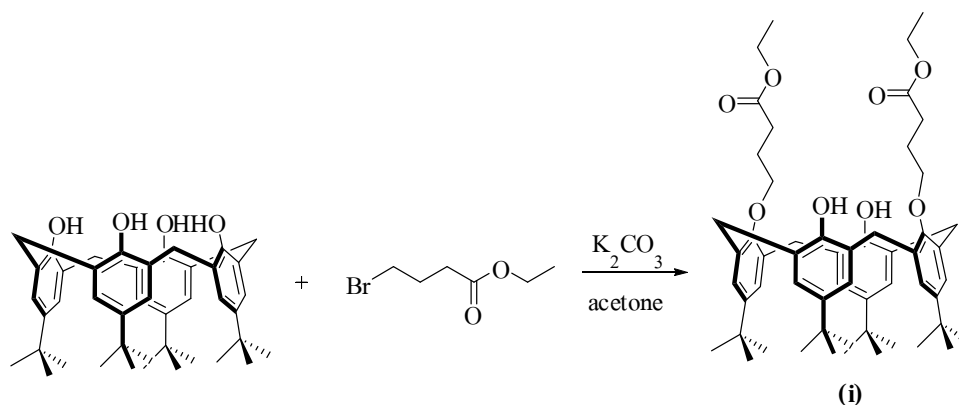
After solvent was removed, the bisimine product (**h**) was obtained as the dark solid (quantitative yield). The crude imine was dissolved in MeOH (50 mL) and the solution was cooled to -5 °C. Subsequently, NaBH₄ (2.12 g, 56 mmol) was added to the brown solution and the mixture was refluxed for 12 h under nitrogen atmosphere. After the mixture had cooled to room temperature, water (150 mL) was added and the mixture was evaporated to remove MeOH. The residue was dissolved in CH₂Cl₂ (150 mL) and the organic layer was washed with water (3 × 50 mL), dried with anhydrous MgSO₄ and evaporated. The resulting crude product was then purified by column chromatography (SiO₂) using 20% MeOH : ethyl acetate giving the fraction of **L1** as the yellow oil. In addition, the solid of **L1** obtained as white solid (0.85 g, 20%) after recrystallization the crude fraction in diethyl ether.

For **L1** : ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.42 (d, 4H, *J* = 4 Hz, Ar*H*), 7.91 (s, 2H, ArOH), 7.65 (d, 2H, *J* = 2.4 Hz, Ar*H*), 7.46 (m, 4H, Ar*H*), 7.35 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, Ar*H*), 7.30 (s, 4H, Ar*H*), 7.19 (m, 2H, Ar*H*), 7.06 (m, 8H, Ar*H*), 7.05 (m, 2H, Ar*H*), 6.95 (d, 4H, *J* = 8.4 Hz, Ar*H*), 6.89 (s, 4H, Ar*H*), 6.86 (d, 2H, *J* = 7.2 Hz, Ar*H*), 6.72 (s, 2H, -NH-), 6.54 (m, 2H, Ar*H*), 6.44 (d, 2H, *J* = 8 Hz, Ar*H*), 4.53 (d, 4H, *J* = 4.8 Hz, -CH₂-NH-), 4.44 (d, 4H, *J* = 12.8 Hz, Ar-CH₂-Ar), 4.35 (s, 8H, -CH₂-O-), 3.80 (s, 8H, -CH₂-), 3.68 (s, 4H, -CH₂-), 3.33 (d, 4H, *J* = 13.2 Hz, Ar-CH₂-Ar), 1.26 (s, 18H, -*tert*-butyl), 1.03 (s, 18H, -*tert*-butyl).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, ppm): δ 159.23, 156.24, 150.35, 149.73, 149.07, 148.21, 147.34, 141.69, 136.29, 133.12, 130.97, 128.77, 128.56, 128.52, 127.93, 127.63, 125.72, 125.20, 123.20, 121.91, 121.55, 120.71, 115.35, 110.78, 110.32, 74.16, 66.65, 60.16, 58.47, 41.76, 34.04, 33.84, 31.83, 31.66, 31.10.

HRMS-ESI (positive mode, *m/z*) : [**L1**+H]⁺ Calcd for C₁₀₀H₁₁₂N₈O₆, 1521.8705; Found, 1521.8698.

3.3.9 Preparation of 25,27-(4,4'-bis(ethyl-3-butanoate))-p-tert-butyl calix[4]arene (i) (Joseph, Ramanujam, Acharya, Khutia, & Chebrolu, 2008, p. 5745)

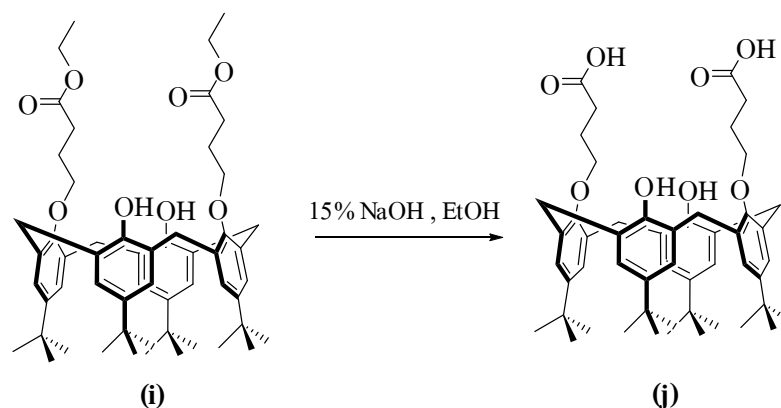


A mixture of p-tert-butylcalix-[4]arene (10.0 g, 15.4 mmol), K_2CO_3 (21.3 g, 154 mmol) and ethyl 4-bromobutyrate (88.2 ml, 0.616 mol) in 100 mL of acetone was refluxed for 24 h. After evaporation of the solvent under vacuum, the residue was dissolved in CH_2Cl_2 and washed with 1 M HCl (3×100 mL) and brine (3×100 mL). The organic phase was dried over anhydrous $MgSO_4$ and concentrated in vacuo. The crude product was subjected to chromatography on a silica gel column, using petroleum hexane/ CH_2Cl_2 (50 : 50, v/v) as eluent, to give a white powder of compound (i) (10.5 g, 78%).

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, ppm) : δ 7.77 (d, 2H, Ar-OH), 7.09 (s, 4H, ArH), 6.90 (s, 4H, ArH), 4.29 (d, 4H, $J = 13.2$ Hz, Ar- CH_2 -Ar), 4.19 (q, 4H, $J = 14.4$ Hz, -O- CH_2 - CH_3), 4.08 (t, 4H, $J = 6$ Hz, - CH_3), 3.36 (d, 4H, $J = 13.2$ Hz, Ar- CH_2 -Ar), 2.91 (t, 4H, $J = 7.2$ Hz, - CH_2 -), 2.36 (t, 4H, $J = 6.8$ Hz, - CH_2 -), 1.30 (s, 18H, *p*-*tert*-butyl), 1.06 (s, 18 H, *p*-*tert*-butyl).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 173.46, 150.78, 149.61, 147.00, 141.47, 132.75, 127.71, 125.60, 125.13, 75.14, 60.40, 32.51, 31.72, 30.76, 30.59, 25.49, 14.25.

3.3.10 Preparation of 25,27-(4,4'-bis(butanoic acid))-*p*-tert-butyl calix[4]arene (j) (Joseph, Ramanujam, Acharya, Khutia, & Chebrolu, 2008, p. 5745)

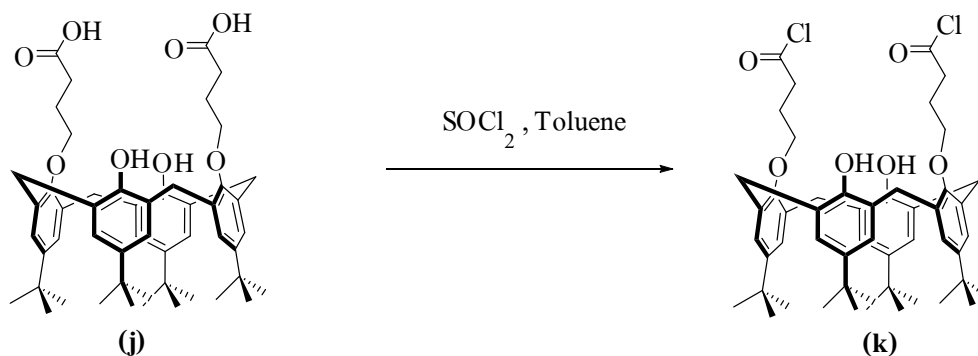


A mixture of diethyl ester calix[4]-arene, **(i)**, (10.0 g, 11.4 mmol) and 15% w/v NaOH in EtOH (500 mL) was stirred and heated at reflux for 24 h and the reaction mixture was then evaporated under reduced pressure to yield a white residue. Cold water (300 mL) was then added to the residue, and the pH was adjusted to 1 using 3 M HCl. The solid was filtered and washed with water to obtain compound **(j)** as a white solid (1.87 g, 20%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm) : δ 7.07 (s, 4H, ArH), 6.76 (s, 4H, ArH), 4.28 (d, 4H, $J = 12.8$ Hz, Ar- CH_2 -Ar), 3.94 (s, 4H, $-\text{CH}_2-$), 3.32 (d, 4H, $J = 13.2$ Hz, $-\text{CH}_2-$), 2.86 (s, 4H, $-\text{CH}_2-$), 2.36 (s, 4H, $-\text{CH}_2-$), 1.31 (s, 18H, *p*-tert-butyl), 0.96 (s, 18H, *p*-tert-butyl)

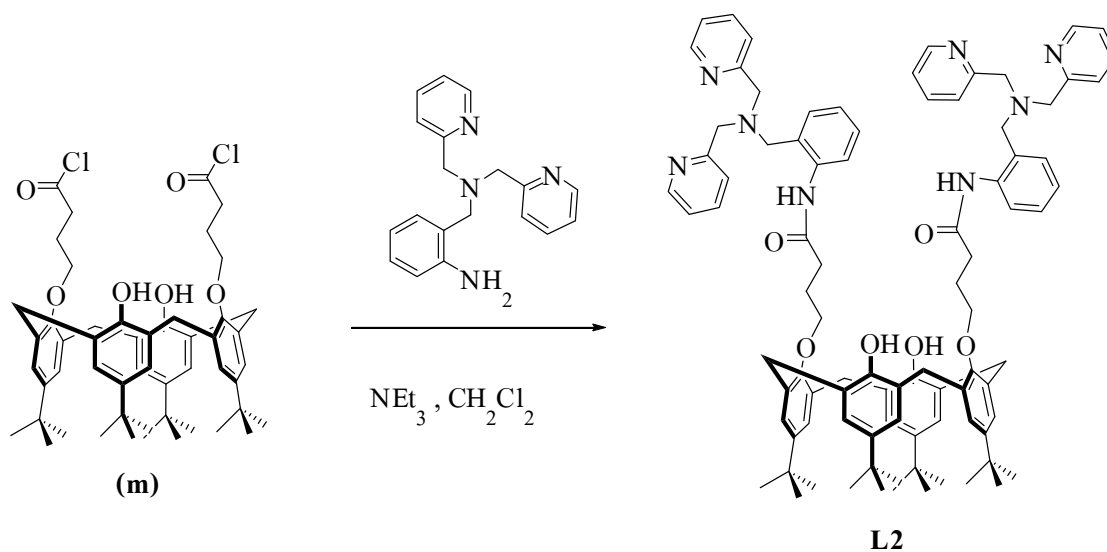
^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 179.92, 150.68, 149.69, 147.03, 132.74, 127.67, 125.58, 125.20, 74.87, 34.01, 33.84, 32.11, 30.65, 25.44.

3.3.11 Preparation of 25,27-(4,4'-bis(butanoyl chloride))-*p*-*tert*-butyl calix[4]arene (k) (Joseph, Ramanujam, Acharya, Khutia, & Chebrolu, 2008, p. 5745)



To dry toluene (150 mL), *p*-*tert*-butylcalix[4]arene diacid, (j), (10.0 g, 1.2 mmol) and SOCl_2 (7 mL) were added and refluxed under nitrogen atmosphere for 4 h. The solvent and residual SOCl_2 were removed under reduced pressure, and this yielded diacid chloride (k) as off white solid and was used in situ for the preparation of L2.

3.3.12 Preparation of 25,27-(4,4'-bis(N-(2-((bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)methyl)phenyl)butyramide))-*p*-*tert*-butylcalix[4]arene (L2) (Kunthadee et al., 2013, p. 4010)



A solution of tripodal amine (11.0 g, 36.0 mmol) and Et₃N (6 mL, 36.2 mmol) was stirred in dry CH₂Cl₂ (100 mL) under nitrogen atmosphere. Diacid chloride, (**k**) (10.0 g, 11.2 mmol) in dry CH₂Cl₂ (50 mL) was added dropwise to this reaction mixture. A white precipitate was formed and stirring was continued for 72 h at room temperature. Filtered the white solid and then the filtrate was concentrated to dryness. Dissolved the crude solid with CH₂Cl₂ (200 mL), washed with water (3 × 200 mL) and then with brine (3 × 200 mL) and the organic layer was dried with anhydrous MgSO₄. Filtrate was concentrated to dryness. The crude product was subjected to chromatography on silica gel, using 2% MeOH in CH₂Cl₂ as eluent, to give a white solid of **L2** in 15 % (1.85 g).

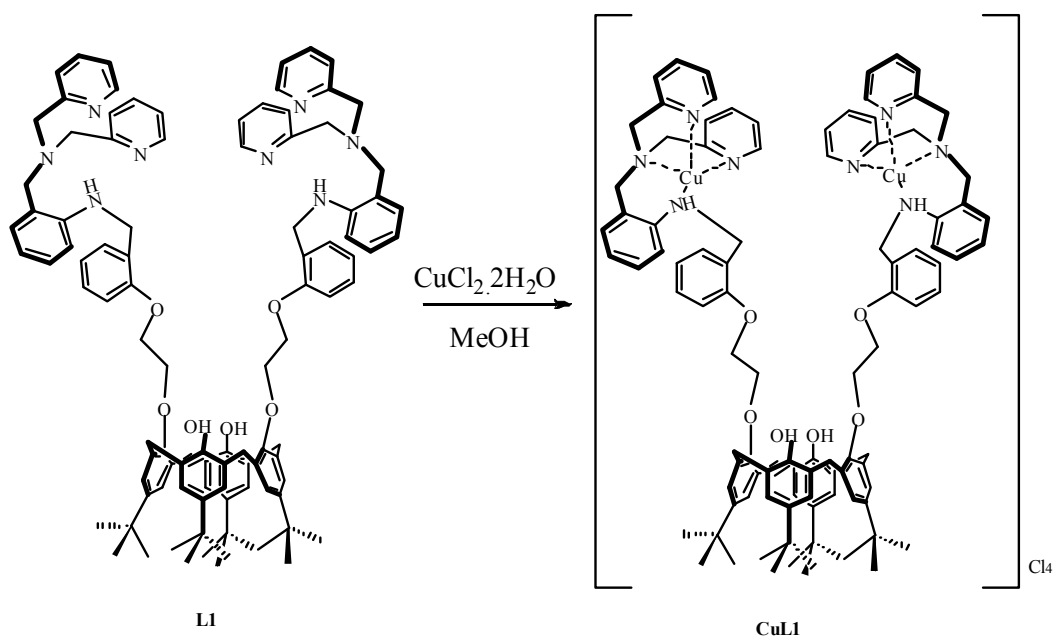
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm) : δ 10.75 (s, 2H, -NH-), 8.54 (d, 4H, *J* = 0.8 Hz, ArH), 8.33 (d, 2H, *J* = 8 Hz, ArH), 7.52 (m, 4H, ArH), 7.42 (s, 2H, -OH), 7.22 (d, 6H, *J* = 7.6 Hz, ArH), 7.15 (d, 2H, *J* = 7.2 Hz, ArH), 7.06 (m, 8H, ArH), 6.99 (m, 2H, ArH), 6.79 (s, 4H, ArH), 4.33 (d, *J* = 12.8 Hz, 4H, Ar-CH₂-Ar), 4.10 (t, *J* = 6.4 Hz, 4H, -CH₂-), 3.76 (s, 12H, -CH₂-), 3.31 (d, *J* = 12.8 Hz, 4H, Ar-CH₂-Ar-), 2.92 (t, *J* = 7.2 Hz, 4H, -CH₂-), 2.44 (t, *J* = 6.8 Hz, 4H, -CH₂-), 1.31 (s, 18H, *p*-*tert*-butyl), 0.97 (s, 18H, *p*-*tert*-butyl)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, ppm): δ 171.32, 158.20, 150.66, 150.00, 149.22, 146.76, 141.47, 138.63, 136.51, 132.50, 130.48, 128.33, 127.94, 126.11, 125.50, 125.13, 123.48, 123.11, 122.28, 121.33, 76.20, 59.78, 58.15, 33.92, 33.84, 33.80, 31.81, 31.75, 31.04, 25.99

HRMS-ESI (positive mode, *m/z*) : [**L2** + H]⁺ Calcd for C₉₀H₁₀₅N₈O₆, 1393.8079; Found, 1393.8086.

3.4 Synthesis and characterization of metal complexes of Cu(II) and Zn(II) with ligand L1 and L2

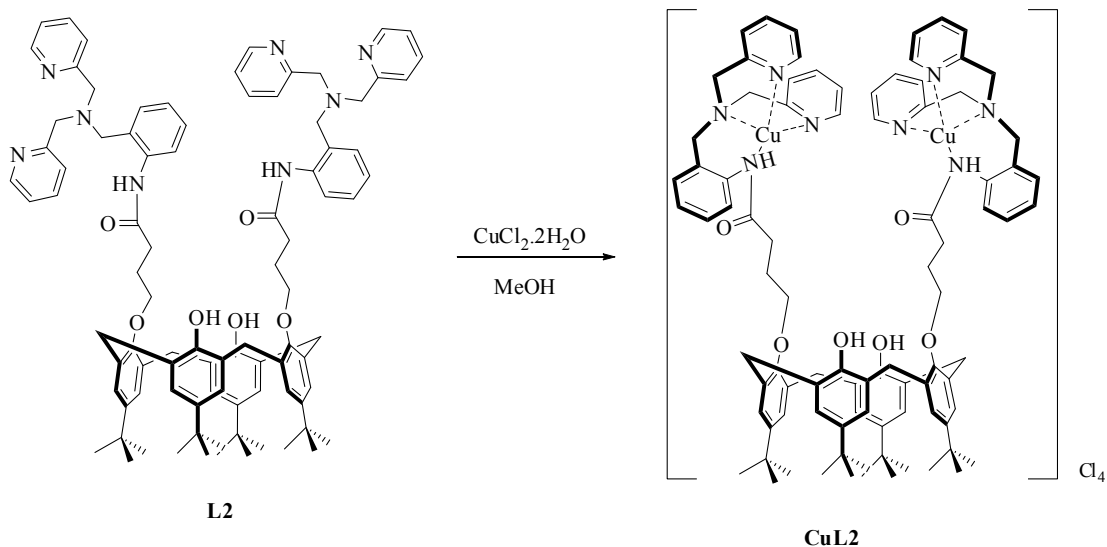
3.4.1 Preparation of CuCl₂ with L1 ; CuL1



The methanolic solution of CuCl₂·2H₂O (26 mg, 0.15 mmol) was added to the methanolic suspension of **L1** (110.9 mg, 0.07 mmol), the color of solution changed to deep green immediately. After the green solution stand at room temperature for 1 week the deep green solid are appeared. The green solid was filter and washed with MeOH to obtained **CuL1** (111 mg, 42%).

HRMS-ESI (positive mode, m/z) : [**CuL1Cl**]⁺ Calcd for C₁₀₀H₁₁₂Cl₃Cu₂N₈O₆, 1751.6362; Found, 1751.6520.

3.4.2 Preparation of CuCl₂ with L2 ; CuL2

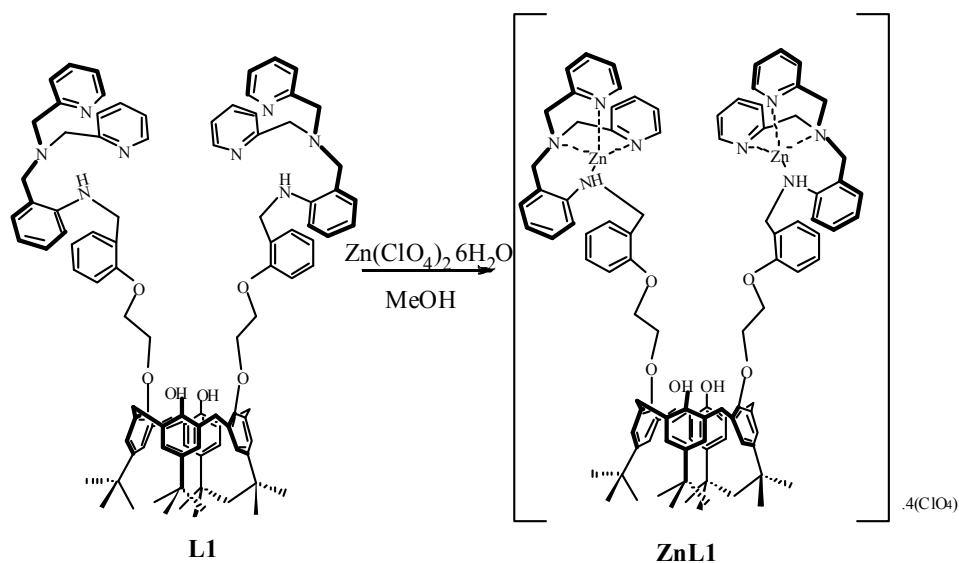


The methanolic solution of CuCl₂·2H₂O (46.0 mg, 0.27 mmol) was added to the methanolic suspension of **L2** (125 mg, 0.09 mmol), the color of solution changed to blue immediately. After the blue solution was left to stand at room temperature for 24 hours, the blue solid that precipitated was filtered and washed with MeOH to yield complex **CuL2** (86.8 mg, 58%).

Elemental analysis calculated for C₉₀H₁₀₆Cl₄Cu₂N₈O₆·4H₂O: C, 62.31; H, 6.51; N, 6.46; found: C, 62.07; H, 6.12; N, 6.60.

HRMS-ESI (positive mode, *m/z*): [**CuL2Cl**]⁺ calculated for C₉₀H₁₀₆Cl₃Cu₂N₈O₆, 1625.5839; found, *m/z* 1625.5339.

3.4.3 Preparation of $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2$ with **L1** ; **ZnL1**



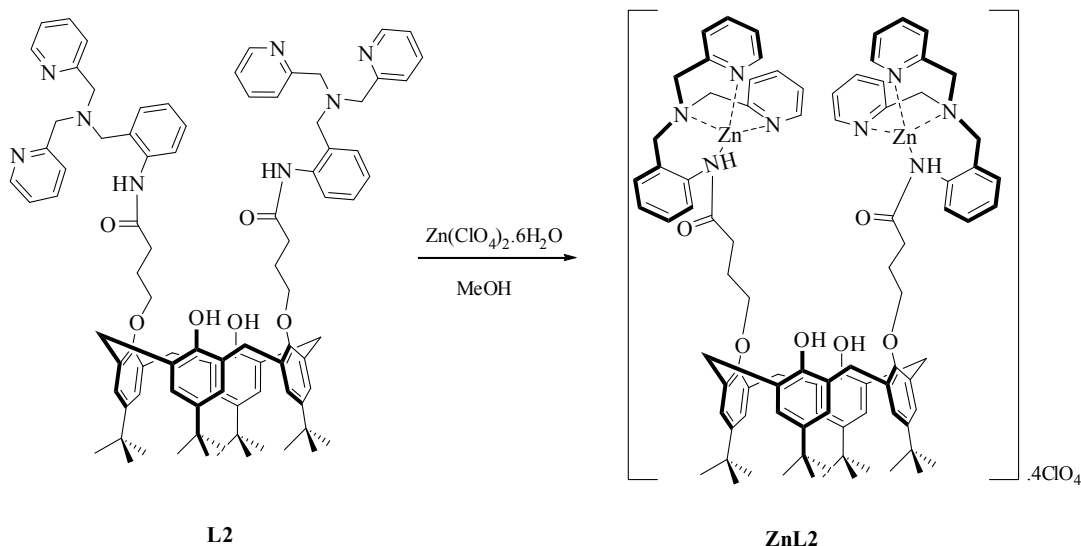
The methanolic solution of $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.10 g, 0.27 mmol) was added to the methanolic suspension of **L1** (100 mg, 0.07 mmol). After stand the colorless solution at room temperature for 24 hours the white solid are precipitated. Filtered and washed the white solid with MeOH obtained **ZnL1** in 71% (100 mg).

^1H NMR (400 MHz, 40% CDCl_3 - CD_3CN , ppm) : δ 8.63 (s, 4H, ArH), 7.89 (t, $J = 6.4$ Hz, 4H, ArH), 7.50 (m, 4H, ArH), 7.29 (m, 4H, ArH), 7.13 (s, 4H, ArH), 7.08 (s, 4H, ArH), 7.00 (t, $J = 7.2$ Hz, 4H, ArH), 6.93 (t, $J = 7.2$ Hz, 4H, ArH), 6.86 (t, $J = 6.0$ Hz, 8H, -ArH), 6.72 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, ArH), 6.34 (d, 2H, $J = 7.6$ Hz, ArH), 5.42 (t, 2H, $J = 8.4$ Hz, -NH-), 4.22 (m, 16H, $-\text{CH}_2-$), 3.97 (m, 8H, Ar- CH_2 -Ar + $-\text{CH}_2-$), 3.74 (bs, 4H, $-\text{CH}_2-$), 3.25 (s, 4H, Ar- CH_2 -Ar and CD_3CN), 1.24 (s, 18H, *p-tert*-butyl), 1.15 (s, 18H, *p-tert*-butyl)

^{13}C NMR (100 MHz, 40% CDCl_3 - CD_3CN , ppm): δ 156.72, 154.50, 149.83, 148.75, 148.32, 148.08, 143.35, 141.95, 141.36, 134.04, 132.95, 132.01, 130.60, 129.97, 128.97, 127.35, 126.64, 125.72, 125.14, 125.03, 124.05, 123.16, 122.00, 117.21, 111.34, 73.85, 66.95, 59.05, 58.63, 49.43, 31.34, 31.19, 30.88

HRMS-ESI (positive mode, m/z) : $[\text{ZnL1}(\text{ClO}_4)_3]^+$ Calcd for $\text{C}_{100}\text{H}_{114}\text{Cl}_3\text{N}_8\text{O}_{18}\text{Zn}_2$, 1947.5900; Found, 1947.4626.

3.4.4 Preparation of $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2$ with **L2** ; **ZnL2**



The methanolic solution of $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.13 g, 0.36 mmol) was added to the methanolic suspension of **L2** (125 mg, 0.09 mmol). After stand the colorless solution at room temperature for 24 hours the white solid are appeared. Filtered and washed the white solid with MeOH obtained **ZnL2** in 67 % (120 mg).

^1H NMR (400 MHz, CD_3CN , ppm) : δ 9.43 (s, 2H, -NH), 8.46 (d, 4H, $J = 3.6$ Hz, ArH), 8.37 (s, 2H, -OH), 8.05 (t, $J = 7.6$ Hz, 4H, ArH), 7.53 (d, $J = 6.8$ Hz, 8H, -ArH), 7.23 (m, 14H, ArH), 7.04 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, ArH), 4.37 (d, $J = 16.4$ Hz, 4H, - CH_2 -), 4.18 (d, $J = 12.8$ Hz, 4H, Ar- CH_2 -Ar), 4.10 (m, 8H, - CH_2 -), 3.95 (s, 4H, - CH_2 -), 3.40 (d, $J = 12.4$ Hz, 4H, Ar- CH_2 -Ar), 2.93 (s, 4H, - CH_2 -), 2.32 (t, $J = 5.6$ Hz, 4H, - CH_2 -), 1.27 (s, 18H, *p*-*tert*-butyl), 1.20 (s, 18H, *p*-*tert*-butyl)

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 176.08, 155.01, 149.47, 149.16, 148.56, 147.69, 143.33, 141.76, 134.12, 134.04, 132.99, 130.20, 129.79, 128.40, 128.03, 127.64, 125.90, 125.38, 125.04, 124.79, 75.20, 58.46, 56.30, 31.88, 30.94, 30.87, 30.50, 25.73

Elemental analysis calculated for $\text{C}_{90}\text{H}_{106}\text{Cl}_4\text{Zn}_2\text{N}_8\text{O}_{22}$: C, 56.17; H, 5.65; N, 5.82; found: C, 56.01; H, 5.69; N, 5.92.

3.5 Screening test studies for anions and amino acids

For the colorimetric detection of anions and amino acids, a solution of each indicator, 400 μM (0.1 mL) in 20% (v/v) water–acetonitrile solution buffered at pH 7.4 with 10 mM HEPES, was added into a solution of each complexes 20 μM (2 mL) in the same solvent system. Subsequently, 0.3 mL of guest molecules (1 mM) was then added to the as-prepared ensemble. The resulting mixtures were allowed to stand still for 5 min and then subjected to UV-vis spectroscopic measurements. Photographs were taken using a digital camera (Canon EOS Kiss X5, Japan).

3.6 Ensemble formation studies between ZnL2 with PV and PGR indicators

All experiments are performed in 20% (v/v) water–acetonitrile solution buffered at pH 7.4 with 10 mM HEPES. Typically, a 2×10^{-5} M solution of each indicators and a 4×10^{-4} M solution of complex **ZnL2** were prepared in volumetric flask. Then 2 mL of each indicators solution was added to quartz cuvette and aliquots of **ZnL2** solution have been added into the cuvette.

3.7 Anion selectivity studies of ensemble [ZnL2•PGR] with anions

All experiments are performed in 20% (v/v) water–acetonitrile solution buffered at pH 7.4 with 10 mM HEPES. An ensemble solution of [ZnL2•PGR] was prepared as described in 3.5 Subsequently, the 0.3 mL of 4×10^{-4} M solution of various anion (3 equivalent as tetrabutylammonium salt) Cl^- , Br^- , I^- , F^- , AcO^- , benzoate, PO_4^{3-} and PPI (pyrophosphate) have been added to the ensemble solution.

3.8 UV-vis titration of the ensemble [ZnL2•PGR] with PPI

All experiments are performed in 20% (v/v) water–acetonitrile solution buffered at pH 7.4 with 10 mM HEPES. An ensemble solution of 2×10^{-5} M [ZnL2•PGR] was prepared as described in 3.5 A liquots of 4×10^{-4} M of PPI solution were added into the quartz cuvette containing 2 mL of an ensemble solution.

3.9 Amino acids selectivity studies of ensemble [ZnL2•PV] with amino acids

All experiments are performed in 20% (v/v) water–acetonitrile solution buffered at pH 7.4 with 10 mM HEPES. An ensemble solution of [ZnL2•PV] was prepared as described in 3.5. Subsequently, the 0.3 mL of 1×10^{-3} M solution of various amino acids have been added to the ensemble solution.

3.10 UV-vis titration of the ensemble [ZnL2•PV] with His

All experiments are performed in 20% (v/v) water–acetonitrile solution buffered at pH 7.4 with 10 mM HEPES. An ensemble solution of 2×10^{-5} M [ZnL2•PV] was prepared as described in 3.5. Then, aliquots of 1×10^{-3} M of His solution were added into the quartz cuvette containing 2 mL of an ensemble solution.

3.11 ^1H -NMR and ^{31}P -NMR titrations studies

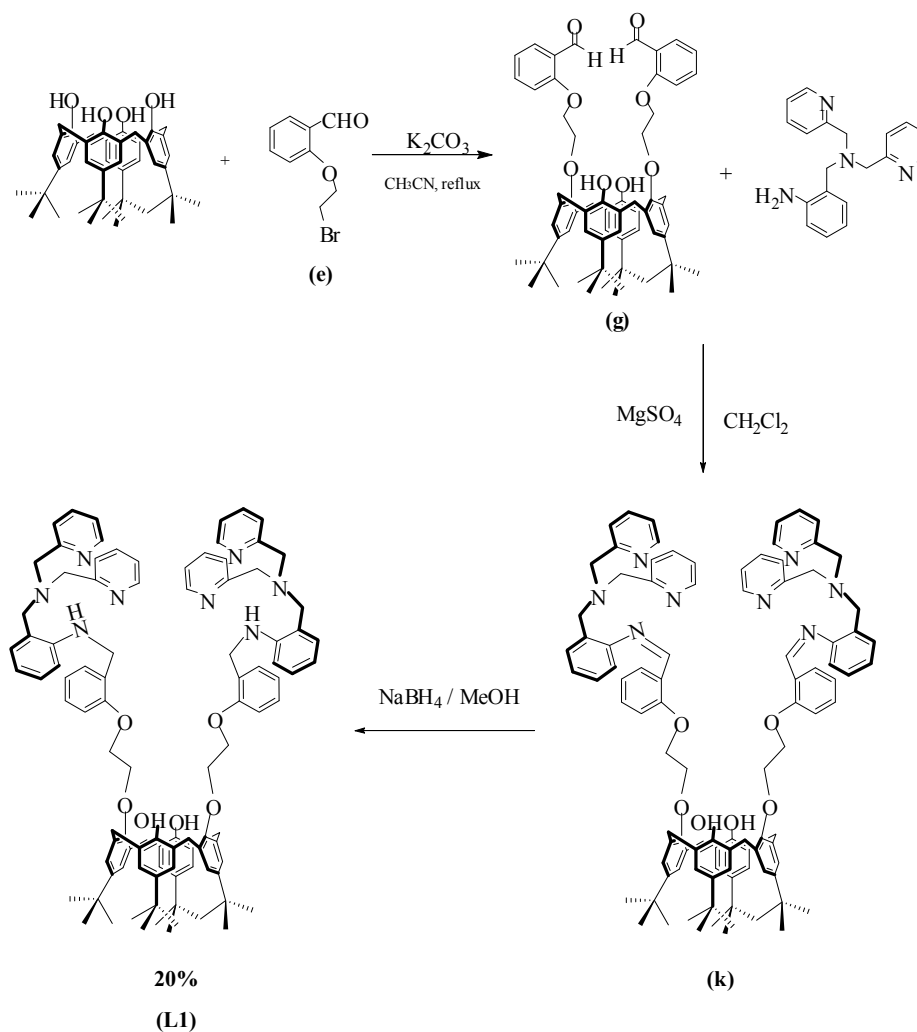
Generally, all reagents in the NMR titration experiments were prepared in 20% (v/v) D_2O – CD_3CN . An aliquot of PPI 0.05 M (5 μL) were added to the 0.5 mL solution of ZnL2 (5 mM) using a syringe. Subsequently, ^{31}P NMR spectra were recorded.

CHAPTER 4

RESULTS AND DISCUSSION

4.1 Synthesis and characterization of ligand L1

The synthesis of ligand **L1** is given in Scheme 4-1. Firstly, *p*-tert-butylcalix[4]arene was functionalized with 2-(2-bromoethoxy)benzaldehyde (**e**) in the presence of K_2CO_3 to obtain the dialdehyde-calix[4]arene (**g**) in 50 %. Then, bisaldehyde (**i**) was reacted with 2.5 equiv of tripodal amine, giving bis-imine (**k**). Reduction of bisimine with $NaBH_4$ in MeOH at reflux gave symmetric **L1** as a white solid in 20%. Ligand **L1** was characterized by 1D-NMR, 2D NMR and mass spectrometry.



Scheme 4-1 Synthesis route of preparation of ligand **L1**

In accordance with the structure of **L1**, the ^1H -NMR spectra showed two symmetry singlet peaks of *tert*-butyl protons at chemical shift 1.01 and 1.25 ppm, as shown in Figure 4-1. The methylenic protons of Ar-CH₂-Ar exhibits two perfect doublet peaks with an AB pattern at chemical shift 3.35 and 4.45 ppm in 1:1 ratio with geminal coupling constants of 13.2 Hz and 12.8 Hz, respectively. The aromatic protons of calix[4]arene appeared as two singlets of equal intensity at chemical shift 7.06 and 6.99 ppm. From these results we can deduce that a cone structure is the major conformation of **L1**. A singlet peak for the -OCH₂CH₂O- group protons at chemical shift 4.34 ppm shows that two ethylene bridges flanking the arene unit with the tripodal group are oriented in the same direction (Talanov, Hwang, & Bartsch, 2001, p. 1103). The singlet peak at chemical shift 4.58 ppm belongs to -CH₂NH- group. The broad singlet peak at chemical shift around 6.7-6.8 ppm belongs to two -NH- amine protons. Moreover, two hydroxyl protons of calix[4]arene are observed at chemical shift 7.90 ppm. HRMS-ESI (positive mode) spectra feature a molecular ion of **L1** at $m/z = 1522.8724$ correspond to [**L1**+H⁺], as shown in Figure 4-2.

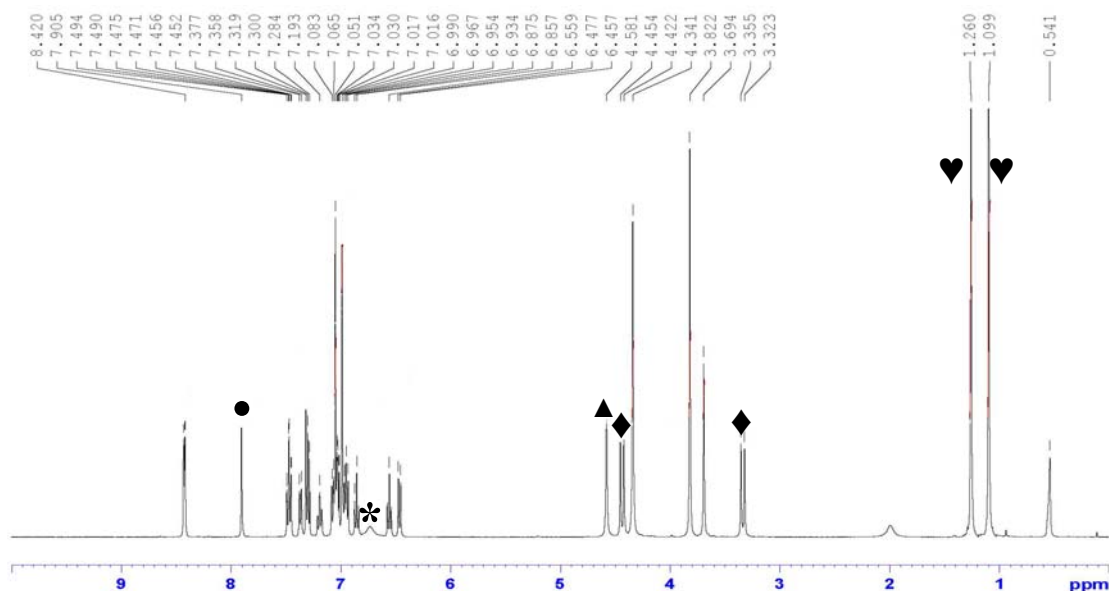


Figure 4-1 ^1H NMR spectrum of **L1** in CDCl_3 , where ● is -OH protons, * is -NH protons, ▲ is -CH₂NH protons, ◆ is Ar-CH₂-Ar protons and ♥ is *tert*-butyl protons

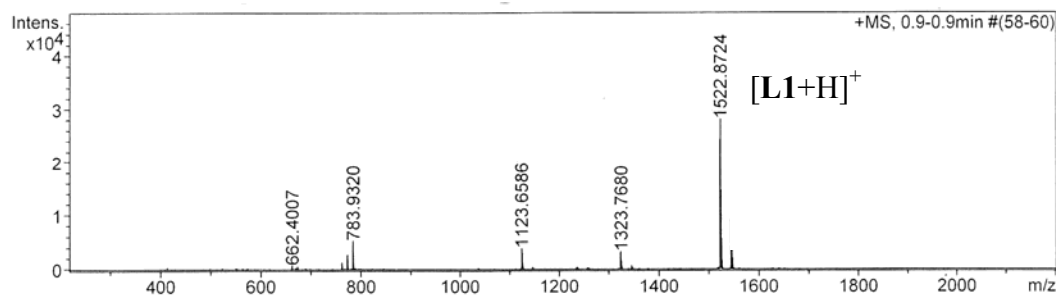
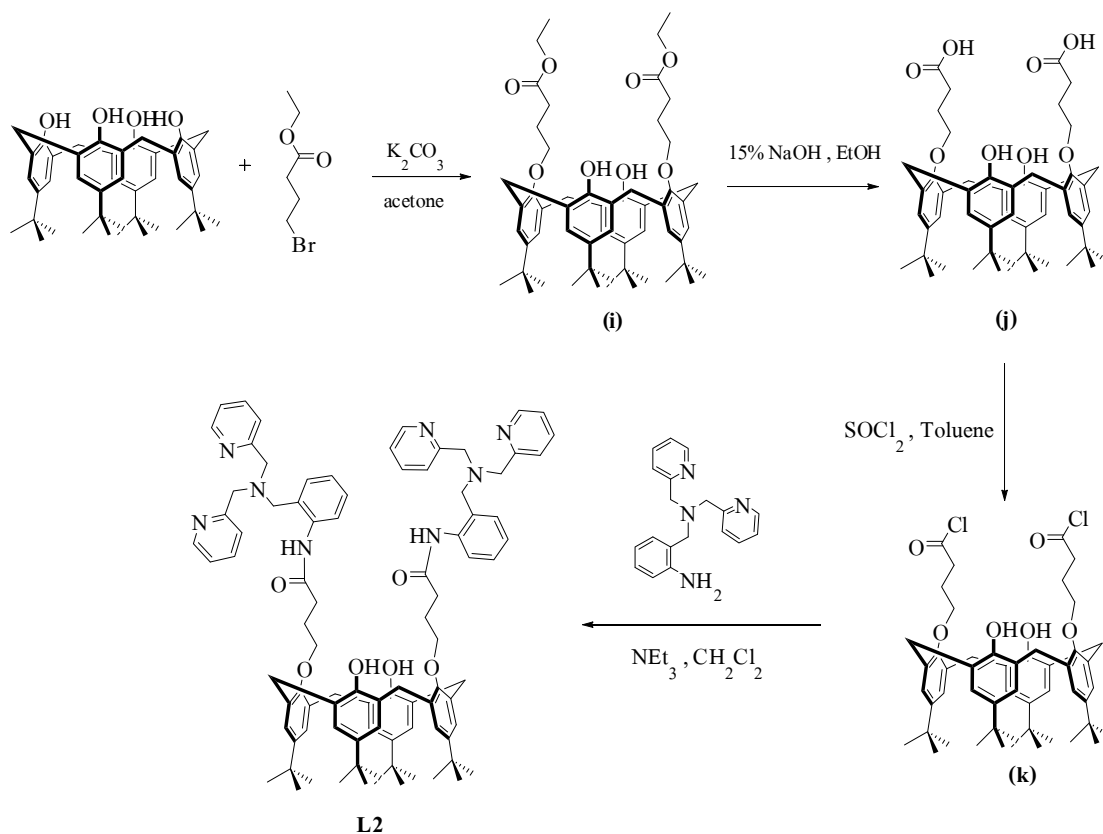


Figure 4-2 HRMS-ESI (positive mode) spectrum of **L1**

4.2 Synthesis and characterization of ligand **L2**

The receptor molecule, **L2**, was synthesized in four steps starting from *p*-tert-butyl calix[4]arene as shown in Scheme 4-2. A reaction of *p*-tert-butyl calix[4]arene with 4 equiv. of ethyl-4-bromobutyrate in the presence of K_2CO_3 in acetone yielded compound (**j**), the diethyl ester derivative, in 78% yield. Upon addition of 15% w/v NaOH into the solution of compound (**j**), the diacid derivative (**j**) was obtained in 20% yield. Compound (**j**) reacted with thionyl chloride and gave the diacid chloride (**k**) in a quantitative yield. Finally, the diacid chloride (**k**) was further reacted with tripodal amine resulted in ligand **L2** in 58% yield. Ligand **L2** was characterized by 1D-NMR, 2D-NMR and mass spectrometry.



Scheme 4-2 Synthesis route of preparation of ligand **L2**

In the ^1H NMR spectrum, a typical AB splitting pattern of bridging methylene protons ($\text{Ar-CH}_2\text{-Ar}$) of calix[4]arene in **L2** showed two pair of doublet peaks at chemical shift 4.33 (4H, $J = 12.8$ Hz) and 3.31 ppm (4H, $J = 12.8$ Hz), Figure 4-3. These observations confirmed the cone conformation of ligand **L2**. Interestingly, the $-\text{NH}-$ amide protons appeared at the downfield region at 10.75 ppm as the one singlet signal, presumably the intramolecular hydrogen bonds between $-\text{NH}$ and oxygen atom of carbonyl group at the opposite side chain are being formed and identical in the CDCl_3 solution (Joseph, Ramanujam, Acharya, Khutia, & Rao, 2008, p. 5745; Acharya, Ramanujam, Chinta, & Rao, 2011, p. 127). The methylene protons of two butyl side chains are presented at chemical shift 4.10, 2.93 and 2.45 ppm. Two OH groups of calix[4]arene was observed at chemical shift 7.42 ppm. Two symmetry singlet peaks of *tert*-butyl protons at chemical shift 0.97 and 1.31 ppm are also investigated. In addition, ^{13}C -NMR spectrum presented the carbon of carbonyl group

at chemical shift 171.32 ppm, Figure A-6 in Appendix A. HRMS-ESI (positive mode) spectra showed a molecular ion of **L2** at $m/z = 1416.7635$ corresponding to $[\mathbf{L2}+\text{Na}^+]$ species, as shown in Figure 4-4.

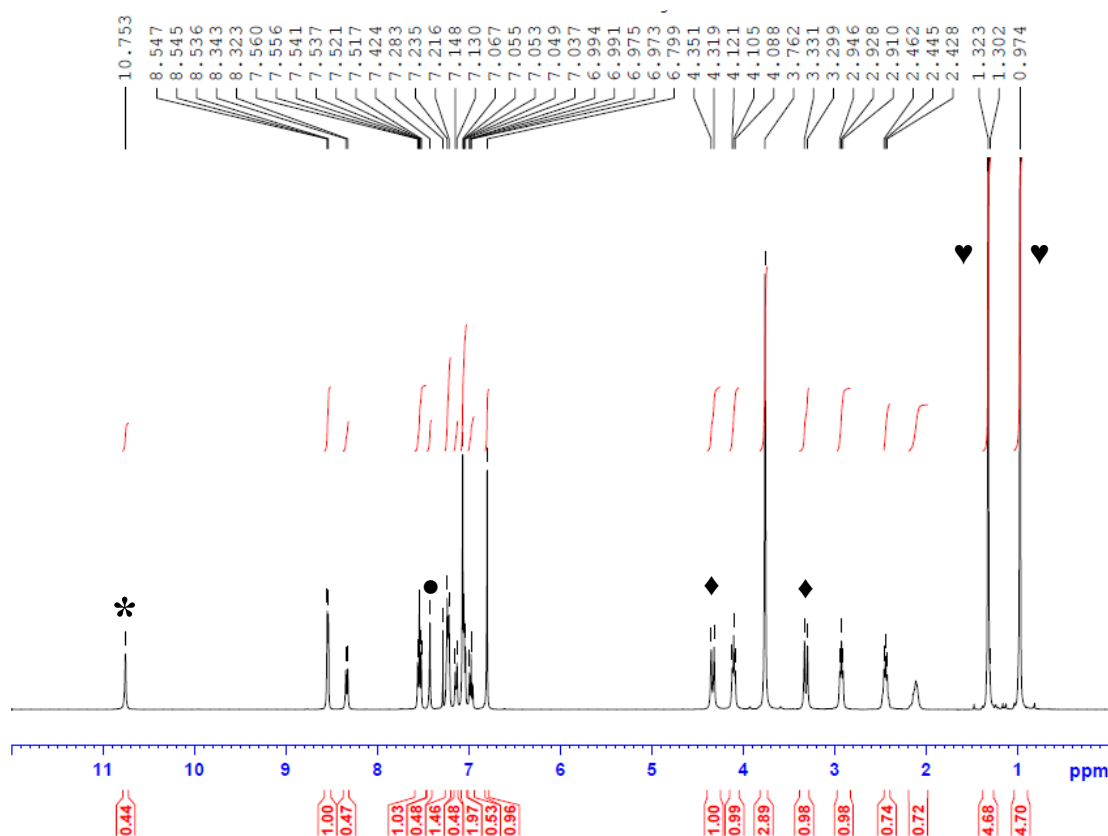


Figure 4-3 ^1H NMR spectrum of **L2** in CDCl_3 , where • is $-\text{OH}$ protons, * is $-\text{NH}$ protons, ♦ is $\text{Ar}-\text{CH}_2-\text{Ar}$ protons and ♥ is *tert*-butyl protons

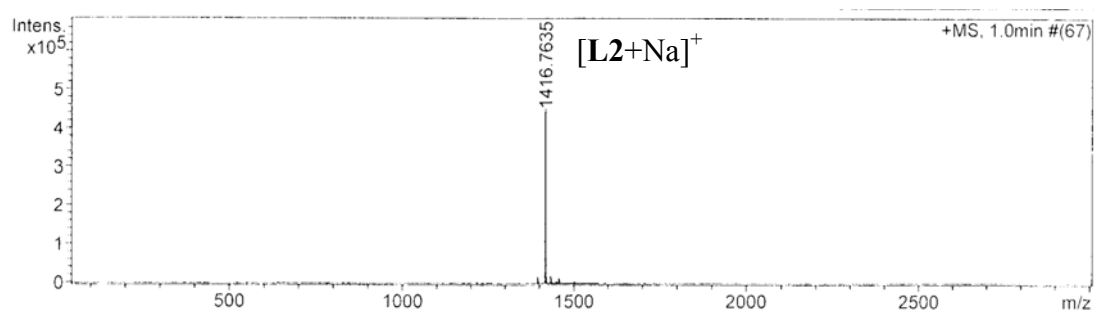


Figure 4-4 HRMS-ESI (positive mode) spectrum of **L2**

4.3 Synthesis and characterization of CuL1 and CuL2

The green complexes of **CuL1** and **CuL2** were synthesized by addition of methanolic solution of CuCl_2 to methanolic solution of **L1** and **L2** gave the green solid of **CuL1** and **CuL2** in 73% and 42% yields, respectively. The HRMS-ESI spectrum of those two complexes in the positive ion mode are structurally enlightening. For **CuL1**, HRMS-ESI mass spectra showed the parent peak at m/z 1755.6520 corresponding to the singly charged molecular ion of $[\text{CuL1Cl}_3]^+$, as presented in Figure 4-7(a). In addition, the doubly charged species of $[\text{CuL1Cl}_2]^{2+}$ was also observed at m/z 859.3282. In the case of **CuL2**, the parent peak at m/z 1625.5339 corresponds to the singly charged molecular ion of $[\text{CuL2Cl}_3]^+$, as presented in Figure 4-7(b).

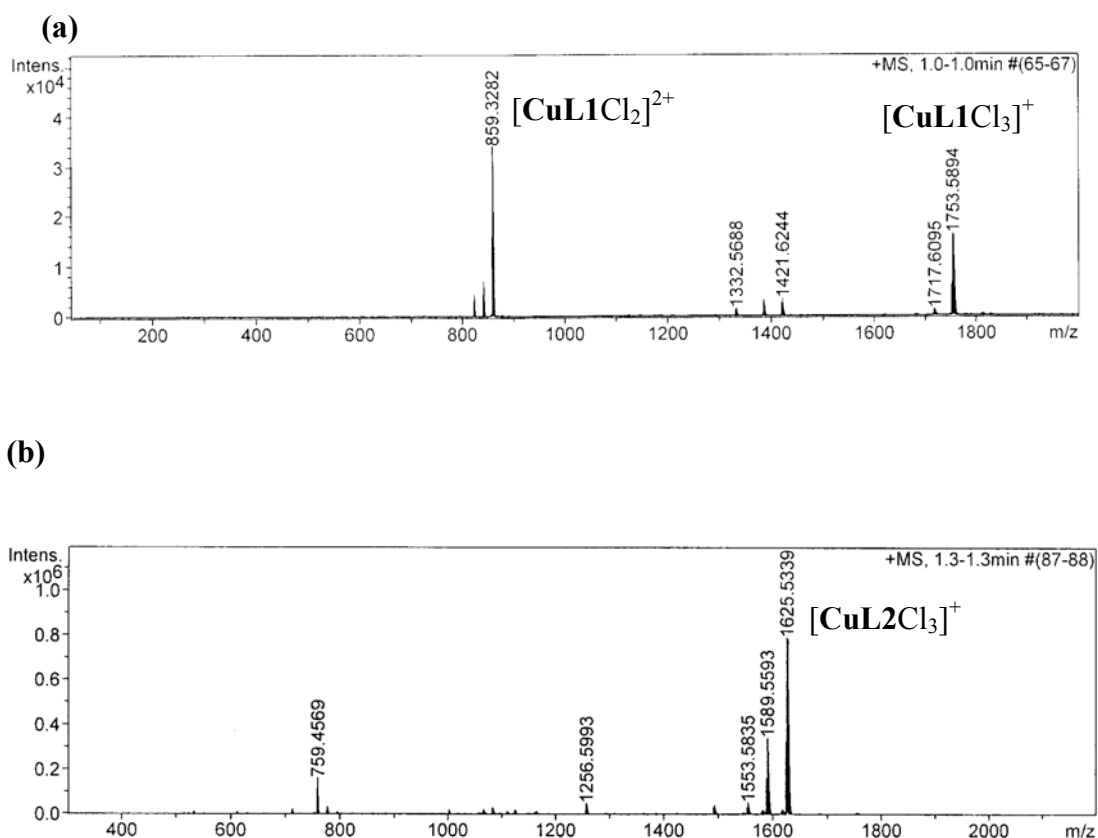


Figure 4-5 HRMS-ESI (positive mode) spectrum of (a) **CuL1** and (b) **CuL2**

4.4 Synthesis and characterization of ZnL1 and ZnL2

The white solid of **ZnL1** and **ZnL2** complexes are given by the reaction between $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2$ with ligands **L1** and **L2** in 71% and 67 % yields, respectively. HRMS-ESI mass spectra of **ZnL1** showed the parent peak at m/z 1947.4626 corresponding to the singly charged molecular ion of $[\text{ZnL1}(\text{ClO}_4)_3]^+$, as presented in Figure 4-6.

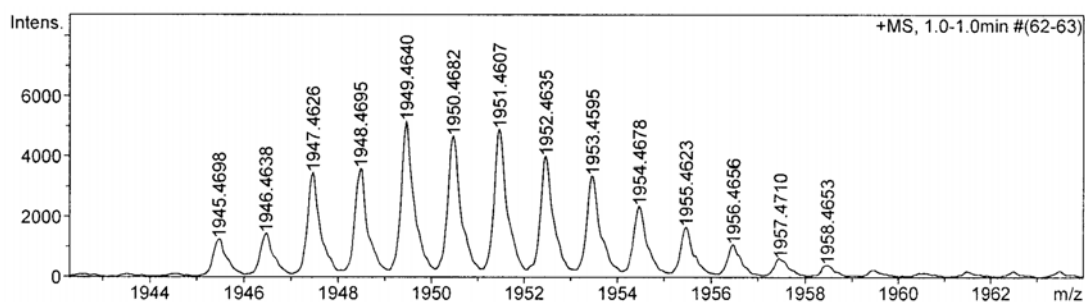


Figure 4-6 HRMS-ESI (positive mode) spectra of **ZnL1**

^1H -NMR spectrum of **ZnL1** in 40% CDCl_3 - CD_3CN showed the broaden peaks, Figure 4-7. Interestingly, two NH amine protons were located at 5.42 ppm upfield shift compared to the free ligand **L1**, suggesting that the breaking of intramolecular hydrogen bonds (NH-N) between NH amine and tertiary nitrogen atom of tripodal amine group upon complexation of Zn^{2+} to ligand **L1** (Watchasit, 2010). These results confirmed that Zn^{2+} coordinate to the tripodal amine in **L1** structure.

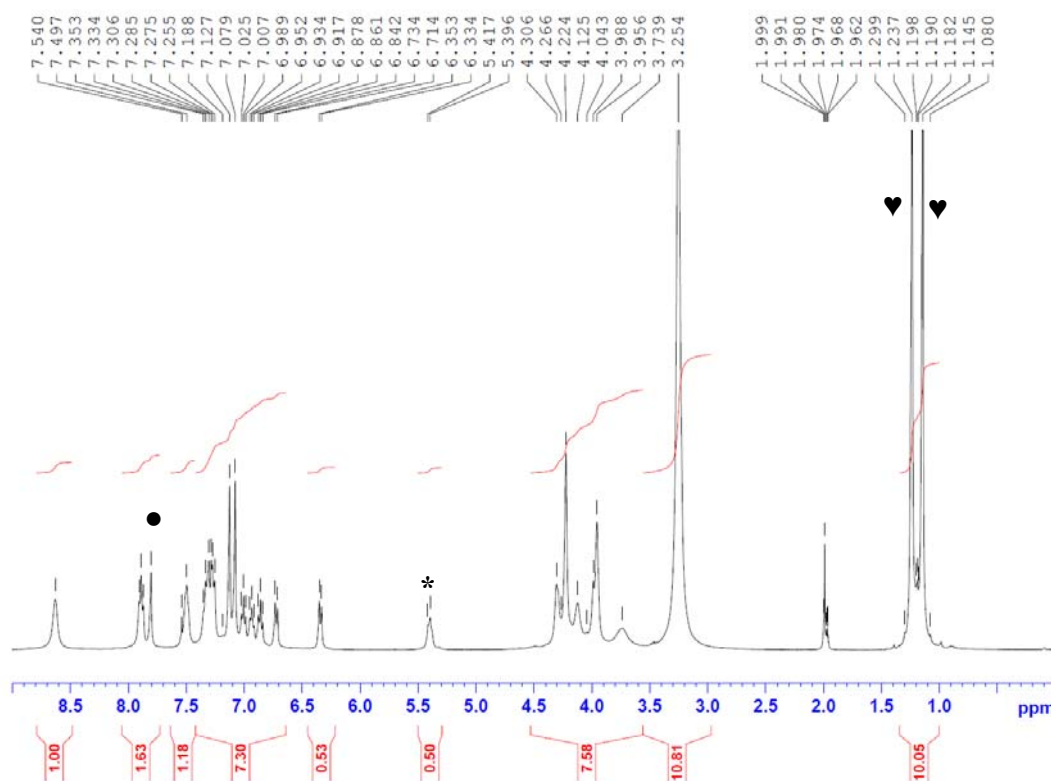


Figure 4-7 ^1H NMR spectrum of **ZnL1** in 40% $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{CN}$, where • is -OH protons, * is -NH protons and ♥ is *tert*-butyl protons

In the case of **ZnL2**, ^1H -NMR spectrum was recorded in CD_3CN clearly indicates the formation of a well-defined Zn(II) complex, Figure 4-8. The NH amide protons showed in the downfield region at 9.43 ppm. The singlet peak of two OH protons located at 8.37 ppm. The methylenic protons of $\text{Ar-CH}_2\text{-Ar}$ presented in two doublet peaks with an AB pattern at chemical shift 4.18 (4H) and 3.40 ppm (4H) with geminal coupling constants of 12.8 Hz and 12.4 Hz, respectively. This indicated the cone conformation of calix[4]arene skeleton. The methylene groups belonging to the two butylate arms displayed three resonances at 2.32 (4H), 2.93 (4H) and 4.37 ppm (4H). Finally, the two singlet peaks of *tert*-butyl protons at chemical shift 1.27 (18H) and 1.20 ppm (18H) are also observed.

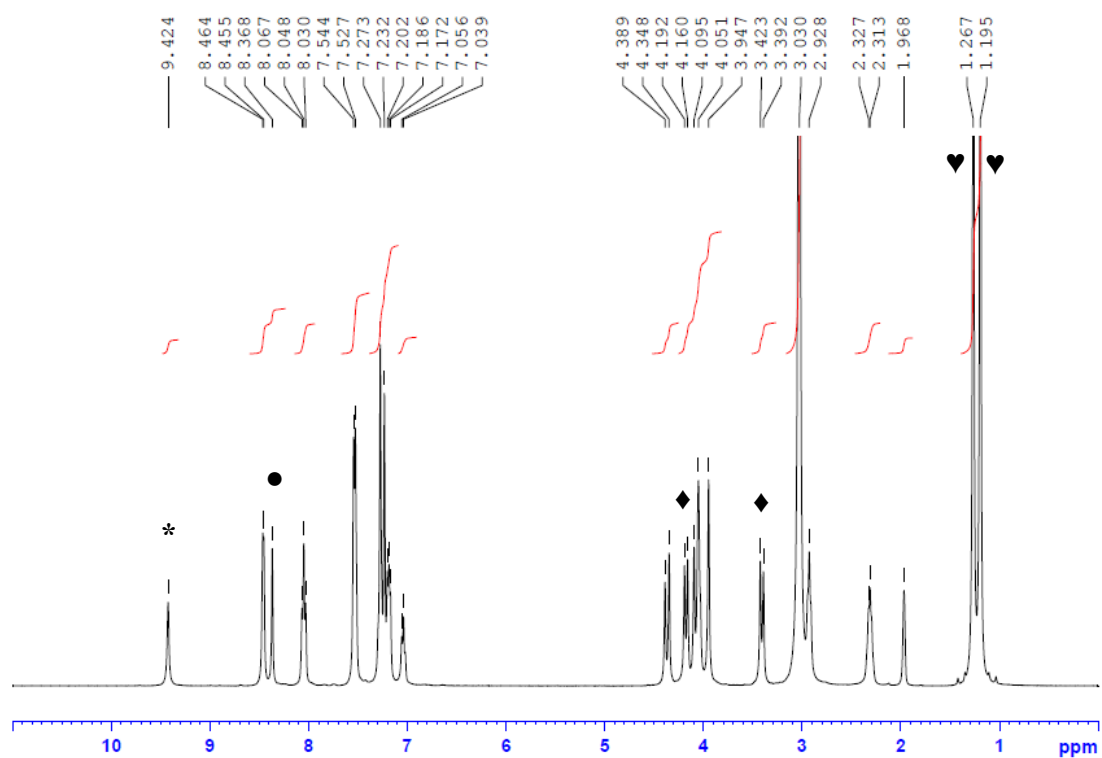


Figure 4-8 ^1H NMR spectra of **ZnL2** in CD_3CN , where • is $-\text{OH}$ protons, * is $-\text{NH}$ protons, ♦ is $\text{Ar}-\text{CH}_2-\text{Ar}$ protons and ♥ is *tert*-butyl protons

4.5 Screening test results for α -amino acids

From the screening test results in Figure B-1 to B-4 in Appendix B, only **PV** and **PAR** based ensembles with all of four complexes **ZnL1**, **ZnL2**, **CuL1** and **CuL2** could discriminate **His** from the other amino acids. Because of **His** could turn the color of those two ensembles to the color of indicator **PV** or **PAR** in the free form, as shown in Figure B-1 and B-4, respectively. Therefore, **His** could replace the bound **PV** or **PAR** from the ensemble cavity. In contrast to what was observed in **MTB** and **PGR** systems, the color of their ensembles did not change in the presence of any amino acids. We can conclude that the ensemble formation constants of **PV** and **PAR** with those four complexes are stronger than that of **MTB** and **PGR** ensembles, Figure B-2 and B-3. According to the results above, the structure of indicators plays an important role to control the selective sensing of **His**.

4.6 Screening test results for anions

From the screening test results in Figure B-7 in Appendix B, it is clearly seen that only ensemble formations between **ZnL2** and **PGR** could discriminate **PPi** from other anions completely under displacement condition. We found that after the addition of **PPi** to the ensemble solution the purple color of ensemble had turned to the pink color of free **PGR**. Therefore, **PPi** could completely displace the bound **PGR** from the ensemble cavity. However, the partial displacement of bound **MTB** in **MTB**-based ensembles were observed, as shown in Figure B-6. All of phosphate containing anions could replace the bound **PV** and **PAR** from the ensemble structures, as shown in Figure B-5 and B-8. More importantly, from the screening test results we envisaged that only **ZnL2** can be employed as IDA receptor for **PPi** and **His** by changing indicator from **PGR** and **PV**. Therefore, in the next topic we focus on understanding the sensing phenomena of **PGR** and **PV** base ensembles with **ZnL2** complex towards **PPi** and **His**, respectively.

4.7 Multi-analyte sensing using the dinuclear zinc(II) complex

The results from screening test of **PV** and **PGR**-based ensembles with **CuL1** and **CuL2** complexes towards anions are depicted in Figure 4-9. It is clearly seen that **PV** ensembles with **CuL1** and **CuL2**, Figure 4-9(a) and 4-9(c), could not sense anions selectively. Because, some of phosphate containing anions especially **PPi** and **ATP** could replace the bound **PV** from the ensembles. Whereas in those two **PGR** systems, Figure 4-9(b) and 4-9(d), any anions could not replace the bound **PGR**. These results indicated that the ensemble formation constants of **PV** with **CuL1** and **CuL2** are lower than that of the ensemble formation constants of **PGR** with those two receptors.

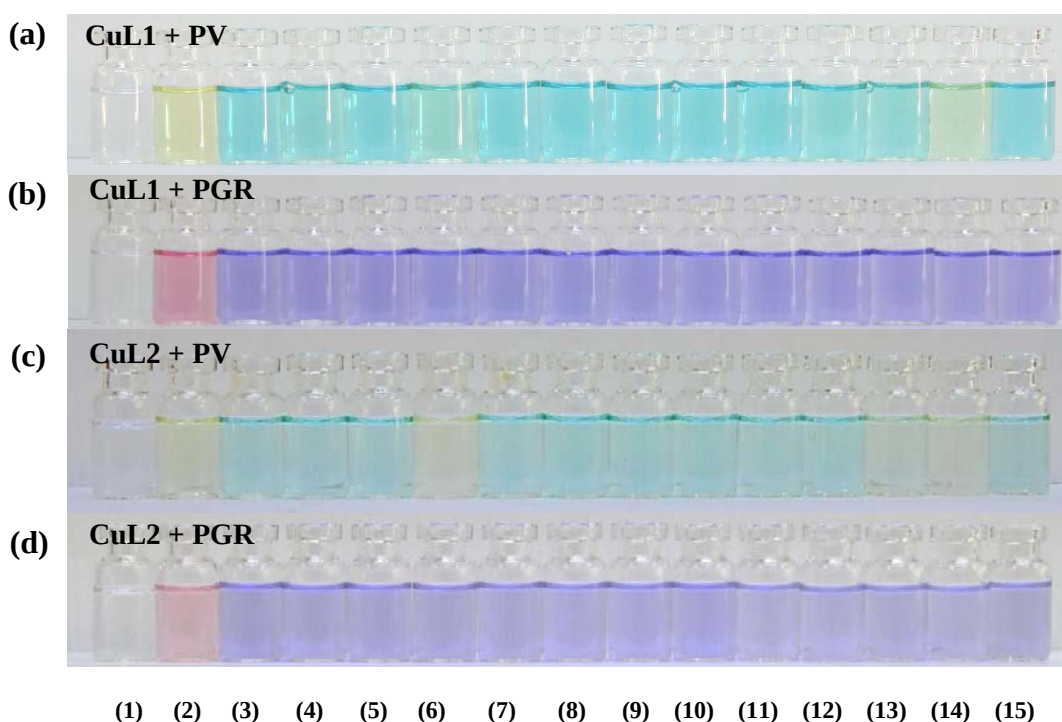


Figure 4-9 The color changes of the ensemble formation between **CuL1** and **CuL2** with **PV** and **PGR** indicators in the presence of anions (7.5 equivalents) 80% (v/v) $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ in 10 mM HEPES buffer pH 7.4. Whereas (1) = complex, (2) = indicator, (3) = ensemble, (4) = H_2PO_4^- , (5) = AcO^- , (6) = **PPi**, (7) = BzO^- , (8) = I^- , (9) = Br^- , (10) = Cl^- , (11) = F^- , (12) = **AMP**, (13) = **ADP**, (14) = **ATP** and (15) = CN^-

Considering in **PGR** ensembles, to obtain the selective sensing results for anions under IDA the ensemble formation constants between **PGR** with the receptors must be lower. After thinking of some candidates, we changed from the dinuclear Cu^{2+} to dinuclear Zn^{2+} , **ZnL1** and **ZnL2**. According to Irving-Williams series, the complex formation constants of Zn^{2+} is lower than that of Cu^{2+} . As we expected, the ensemble of **PGR** with **ZnL2** in Figure 4-10(d) could discriminate **PPi** from the others anions obviously. We found that only **PPi** could change the purple of ensemble to pink of free indicator **PGR**. This result indicates that the ensemble formation between **ZnL2** and **PGR** can serve as a “naked- eye” for **PPi** in the aqueous solution.

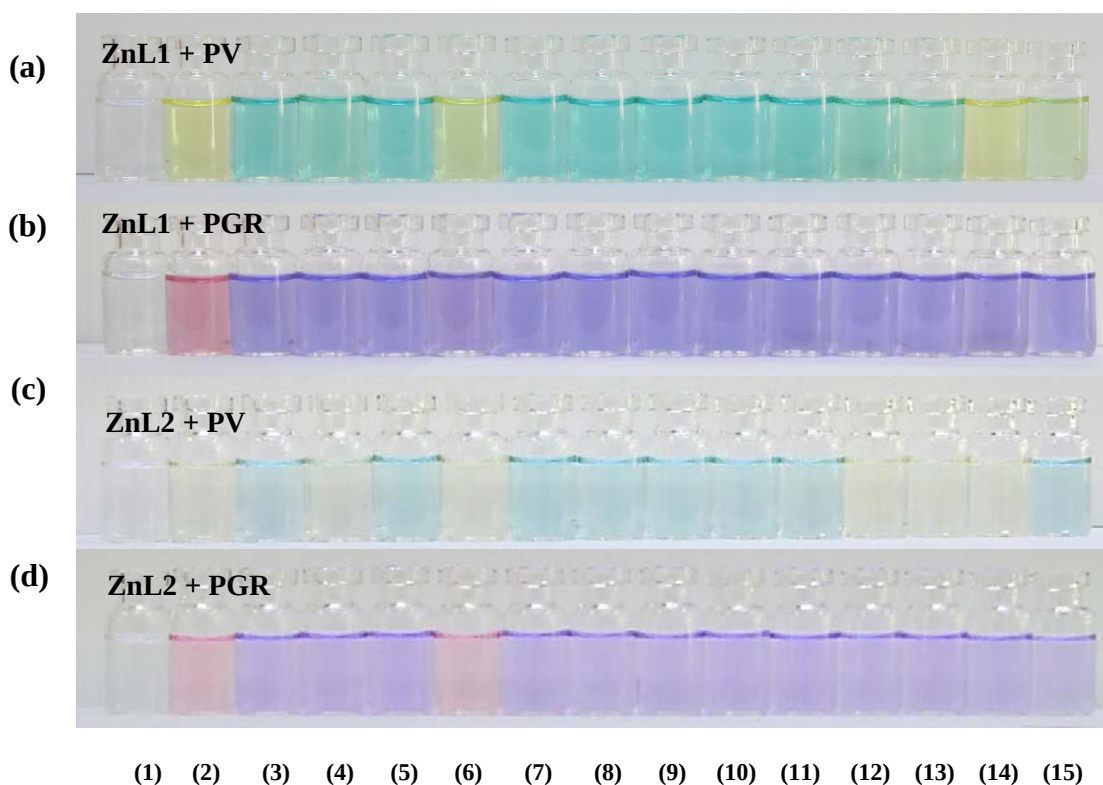


Figure 4-10 The color changes of the ensemble formation between **ZnL1** and **ZnL2** with **PV** and **PGR** indicators in the presence of anions (7.5 equivalents) in 80% (v/v) $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ in 10 mM HEPES buffer pH 7.4. Whereas (1) = complex, (2) = indicators, (3) = ensemble, (4) = H_2PO_4^- , (5) = AcO^- , (6) = **PPi**, (7) = BzO^- , (8) = I^- , (9) = Br^- , (10) = Cl^- , (11) = F^- , (12) = AMP, (13) = ADP, (14) = ATP and (15) = CN^-

In contrast to what was observed in ensemble formation between **ZnL1** with **PGR**, Figure 4-10(b), no anions could change the purple color of the ensemble. Therefore, it could be expected that the ensemble formation constant between **PGR** with **ZnL1** is more stronger than that of **ZnL2** that might be come from the more rigidity of aromatic amine spacer in **ZnL1** compare to alkyl amide spacer in **ZnL2** leads to the tight coordination of **PGR** to two Zn^{2+} ions in **ZnL1** structure. However, in **PV** based ensembles still show the non-selective sensing. From Figure 4-8 and 4-9, it should be noted that the nature of metal ions as well as the binding affinity of metal ions to indicators and the structure of indicators are contribute to the enhance selectivity of **PPI** sensing.

4.7.1 Ensemble formation studies between **ZnL2** with **PV** and **PGR** indicators

From the above results, the ensemble formation of **ZnL2** with **PV** and **PGR** indicators gave the different sensing abilities towards anion results. Therefore, we used the UV-vis titration to study the interaction of **ZnL2** with those two indicators. After the addition of **ZnL2** to the solution of **PV**, the absorption band at 430 nm of free **PV** was decreased and the absorption band at 645 nm was increased resulting to the color change from yellow to blue. The absorption band at 645 nm gradually reached maxima at 1.0 eq. of **ZnL2** as shown in Figure 4-11(a). The ensemble formation constant ($\log \beta$) of **ZnL2** with **PV** was fitted in the 1:2 binding model of **ZnL2:Pv** and the value is calculated to be 11.38 ± 0.16 correspond to the formation of species **[ZnL2·2PV]** in the solution. The Job's plot analysis established a 1:2 binding interaction between **ZnL2** and **PV** indicator, Figure 4-11(b).

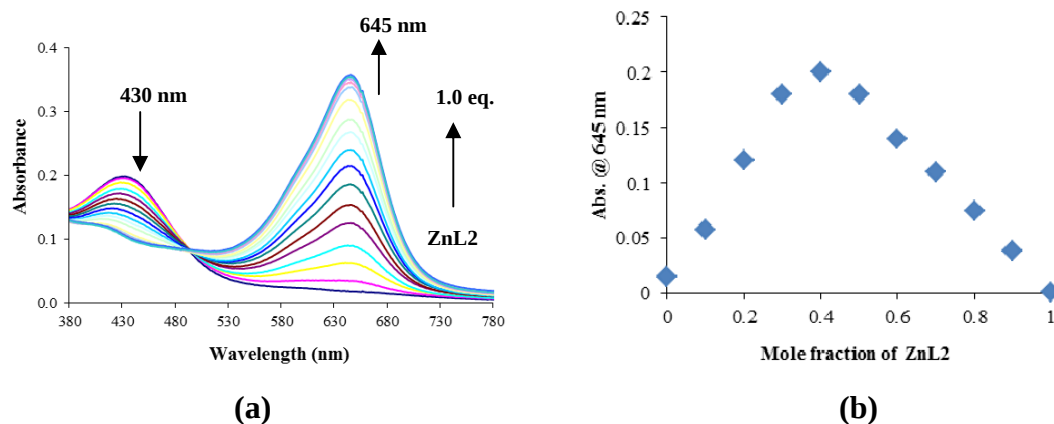


Figure 4-11 (a) UV/vis spectra obtained by addition of **ZnL2** (400 μM) to a solution of **PV** (20 μM) and (b) Job's plot analysis in HEPES buffered pH 7.4 in 80/20 (% v/v) CH₃CN-H₂O solution

Similarly, when **ZnL2** was added sequentially to a solution of **PGR** indicator, the absorption band of free **PGR** at 550 nm was red shifted to 580 nm concomitantly to the color change from pink to purple, Figure 4-12(a). The absorbance at 580 nm was saturated at 1.0 eq. of **ZnL2**. The log β of **ZnL2** with **PGR** was calculated to be 5.22 ± 0.32 corresponding to the formation of 1:1 species of [**ZnL2**·**PGR**].

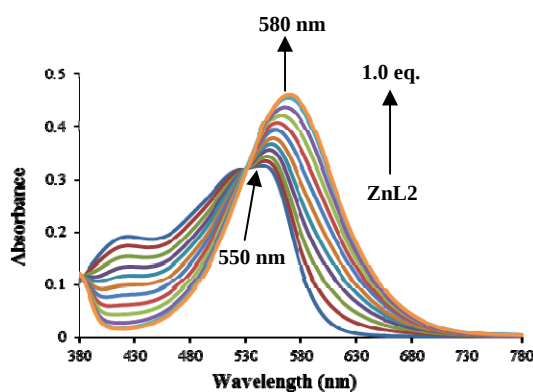


Figure 4-12 UV/vis spectra obtained by addition of **ZnL2** (400 μM) to a solution of **PGR** (20 μM) in HEPES buffered pH 7.4 in 80/20 (% v/v) CH₃CN-H₂O solution

As shown in Figure 4-13, the proposed binding models of **ZnL2** with **PV** and **PGR** indicators are different. This phenomenon could be possibly explained by the structural difference between **PV** and **PGR**. Due to the tetrahedral structure of **PV**, therefore **PV** might not be comfortable enough to sit in the cavity between two Zn^{2+} ions in **ZnL2** structure. Its preferred to form a 1:2 species of **[ZnL2•2PV]** ensemble. Whereas **PGR** has more rigid structure than **PV**, therefore **PGR** might be able to form a stable 1:1 ensemble adduct of **[ZnL2•PGR]** ensemble. Moreover, if we compare the structure of both ensembles with the screening test results above, the bound **PV** acts as the bidentate ligand (Pugia, 2000, p. 142) therefore **PV** could be easily removed by the multidentate phosphate containing ligands. Whereas, **PGR** behaves as tetradentate ligand therefore **PPi** could replace the bound **PGR** from the ensemble cavity. But the question is that why the other phosphate containing anions could not. Presumably, the bound **PGR** in the ensemble cleft could control the dinuclear distance between two Zn^{2+} ions and allow only **PPi** to coordinate to Zn^{2+} ions, whereas the other anions, AMP, ADP and ATP, could not due to the steric hindrance from the moiety part of ribose sugar and adenine in their structures.

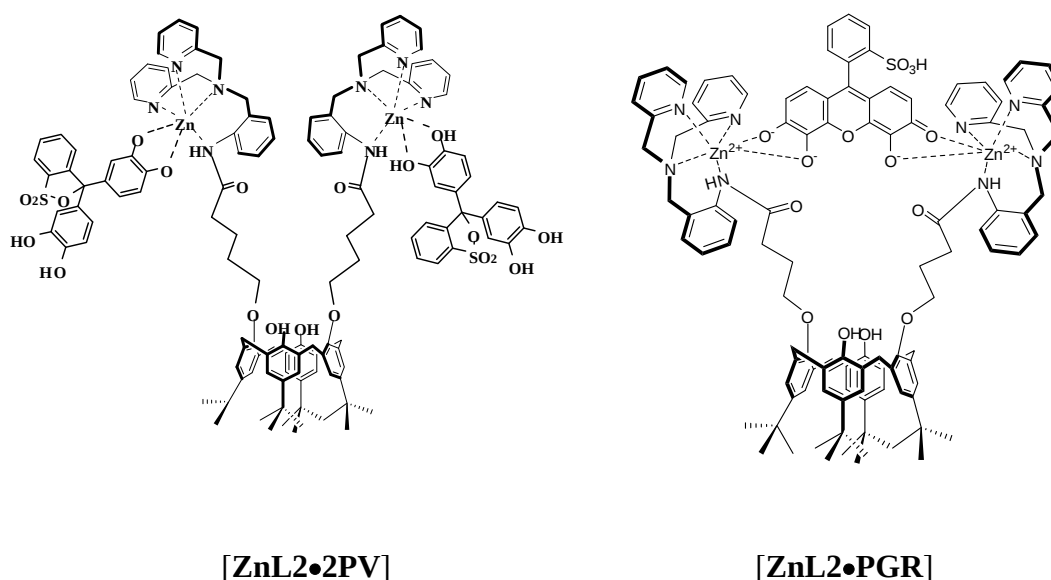


Figure 4-13 The proposed structure of the **[ZnL2•2PV]** and **[ZnL2•PGR]** ensembles

4.7.2 PPI sensing studies by [ZnL2•PGR] ensemble

Next, the sensing processes for the ensemble [ZnL2•PGR] to PPI were investigated by UV-vis spectra, Figure 4-14. As expected, introduction PPI to the ensemble induced spectral changes while the other anions did not. Upon incremental addition of PPI to the purple color solution of [ZnL2•PGR] the absorption band at 570 nm was decreased and also the absorption band at 549 nm gradually increased with the color change to pink color of unbounded PGR. The apparent competitive binding constant ($\log \beta_{app}$) between [ZnL2•PGR] and PPI was calculated to be 5.67 ± 0.12 corresponding to the formation of the 1:1 adduct of [ZnL2•PPI] species. It should be noted that $\log \beta_{app}$ is higher than that of the ensemble formation constant of [ZnL2•PGR]. Therefore, PPI could replace the coordinated PGR from the ensemble binding unit.

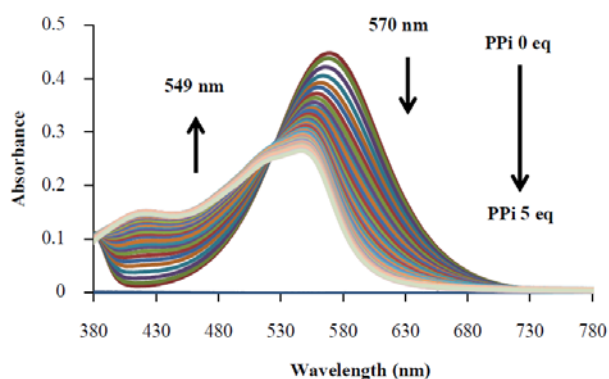
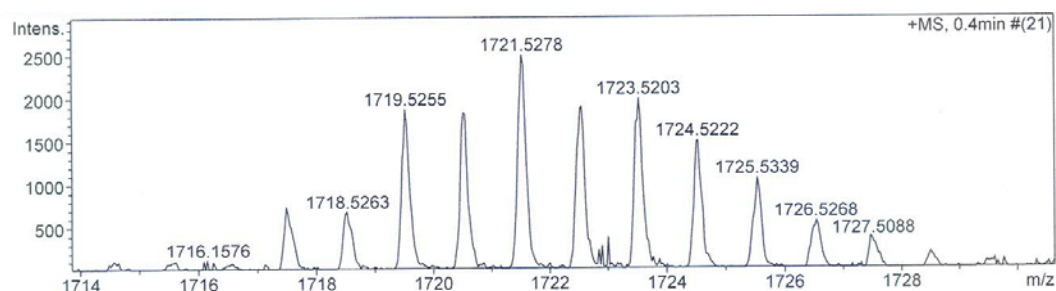


Figure 4-14 UV/vis spectra obtained by addition of PPI (1 mM) to a solution of [ZnL2•PGR] in HEPES buffered pH 7.4 in 80/20 (% v/v) CH₃CN-H₂O solution

Moreover, the 1:1 complex formation between ZnL2 and PPI was confirmed by high-resolution mass spectral analysis : observed m/z 1721.5278 , calculated 1721.5393 for [ZnL2•PPI] , Figure 4-15(a). The proposed structure of the 1:1 adduct was shown in Figure 4-15(b). The detection limit ($3\sigma/k$) of [ZnL2•PGR] ensemble for the analysis of PPI was calculated to be 0.08 ppm.

(a)



(b)

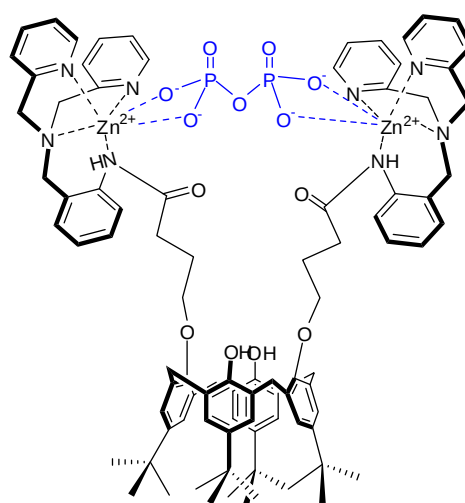


Figure 4-15 (a) HRMS-ESI (positive mode) spectrum of species $[\text{ZnL2} \cdot \text{PPi}]$ and (b) the proposed structure of the 1:1 adduct of $[\text{ZnL2} \cdot \text{PPi}]$

4.7.3 ^1H -NMR and ^{31}P NMR titration studies

To study the interaction of **ZnL2** with **PPi**, ^1H and ^{31}P NMR were carried out in 80/20 (% v/v) $\text{CD}_3\text{CN}-\text{D}_2\text{O}$. Upon addition of **PPi** to the solution of **ZnL2** solution ^1H NMR spectra showed that the complex formation is fast exchange in NMR time scale, as presented in Figure 4-16. All the resulting host-guest complexes $[\text{ZnL2} \cdot \text{PPi}]$ displayed a cone conformation with the coupling constant of $\text{Ar}-\text{CH}_2-\text{Ar}$ at chemical shift 3.40 ppm and 4.26 ppm are 12.8 Hz. Owing to ^1H -NMR titration results, **PPi** did not pull out the Zn^{2+} ions from the **ZnL2** structure.

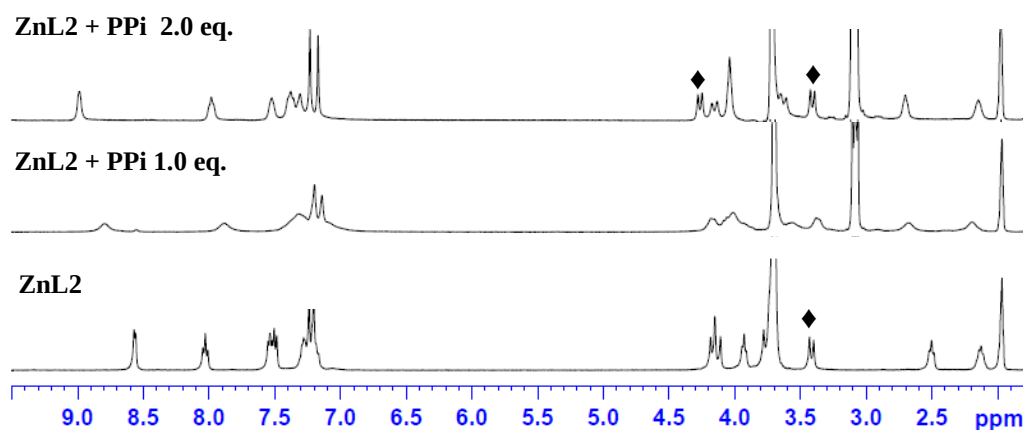


Figure 4-16 Partial ^1H -NMR titrations of **ZnL2** with **PPI** in 80/20 (% v/v) CD_3CN - D_2O , whereas ♦ is $\text{Ar-CH}_2\text{-Ar}$ protons

To further understand the mode of complexation between **ZnL2** and **PPI**, ^{31}P NMR spectroscopy studies were undertaken. As shown in Figure 4-17, both P atoms in **PPI** are magnetically equivalent and show a single signal at -8.3 ppm. However, on binding with **ZnL2**, significant upfield shifts ($\Delta\delta = 4.40$ ppm) were observed for the ^{31}P signal. The presence of a single ^{31}P signal suggests that both P atoms in the metal bound **PPI** are still magnetically equivalent and therefore, the two sets of oxygen anions on each P atom of **PPI** are equally bound to the binuclear zinc complex (Yang, Feng, & Williams, 2012, p. 5606; Liu, Ngo, Ge, Butler, & Jolliffe, 2013, p. 1680).

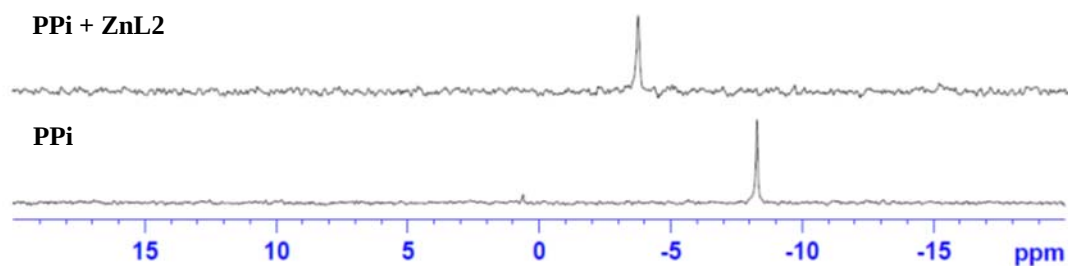


Figure 4-17 ^{31}P -NMR titrations of **PPI** with **ZnL2** in 80/20 (% v/v) CD_3CN - D_2O

4.7.4 Interference studies with other anions

To explore the ability of **[ZnL2•PGR]** ensemble as a colorimetric sensor for **PPi** in the presence of competing anions, competition experiments were performed in the presence of **PPi** mixed with various anions. The coexistent anions had no influence on the color change of **PPi**, Figure 4-18. These results indicate that **[ZnL2•PGR]** ensemble shows an excellent selectivity for **PPi** in the presence of other anions, making it very useful in practical applications.

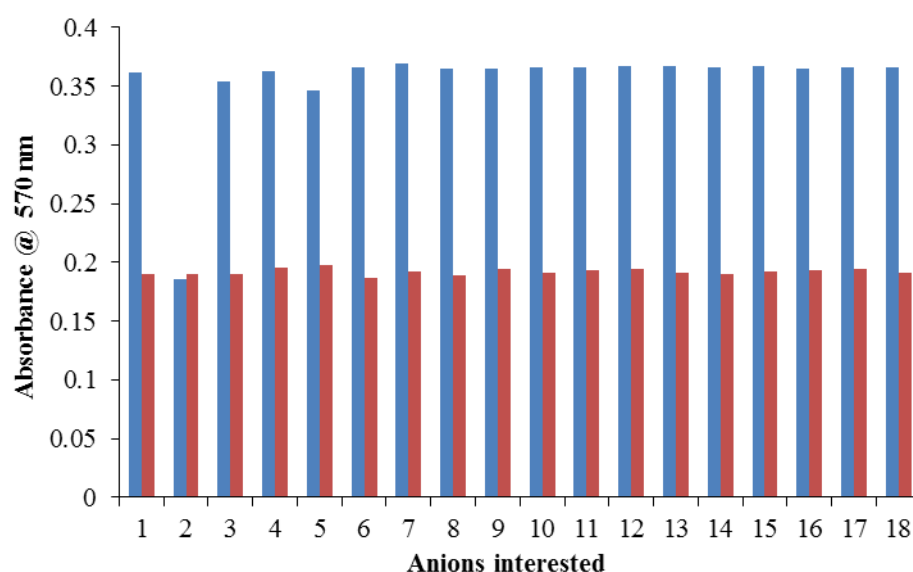


Figure 4-18 Absorption response of **[ZnL2•PGR]** ensemble 20 μM to various anions in HEPES buffer pH 7.4 in 80/20 (%v/v) $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ solution. The blue bars represent the absorption of **[ZnL2•PGR]** ensemble in the presence of anions 12.5 equiv. The red bars represent the change of the absorption that occurs upon the subsequent addition of **PPi** to the solution of **[ZnL2•PGR]** ensemble containing various anions. The intensities were record at 570 nm. Whereas **(1)** = H_2PO_4^- , **(2)** = **PPi**, **(3)** = **ADP**, **(4)** = **AMP**, **(5)** = **ATP**, **(6)** = SO_4^{2-} , **(7)** = SCN^- , **(8)** = OH^- , **(9)** = NO_3^- , **(10)** = F^- , **(11)** = Cl^- , **(12)** = Br^- , **(13)** = I^- , **(14)** = AcO^- , **(15)** = BzO^- , **(16)** = CO_3^{2-} , **(17)** = HCO_3^- and **(18)** = CN^-

4.7.5 His sensing study by ZnL2 ensembles

We also investigated the sensing properties of **ZnL2** ensembles with **PV** and **PGR** towards 20 essential amino acids. In contrast to what was observed in **PPI** sensing, the **[ZnL2•2PV]** ensemble showed the highly selective sensing for **His** over other amino acids whereas the **[ZnL2•PGR]** ensemble did not, as shown in Figure 4-19. These results indicated **His** preferred to replace the bound bidentate **PV** indicator not tetradentate **PGR** indicator. It should be noted that, by using **ZnL2** as IDA receptor for **His**, the structure of indicator plays an important role to control the highly selective sensing.

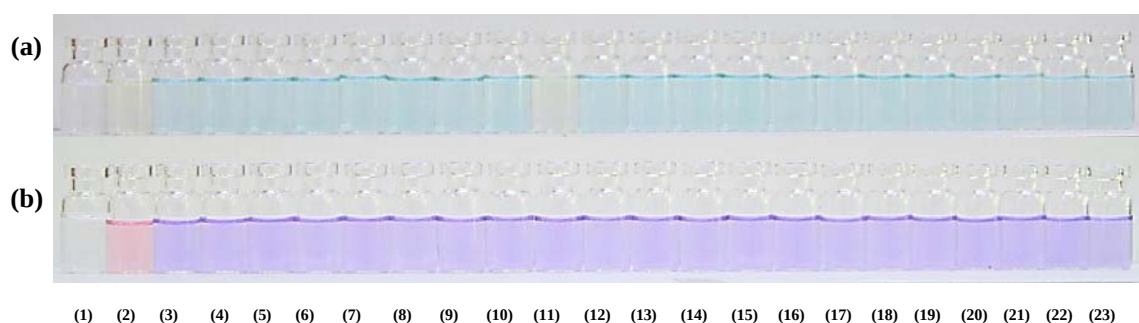


Figure 4-19 The color changes of the ensemble formation between **ZnL2** with (a) **PV** and (b) **PGR** indicators in the presence of anions (7.5 equivalents) in 80% (v/v) $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ in 10 mM HEPES buffer pH 7.4. Whereas (1) = **ZnL2**, (2) = indicators, (3) = ensemble, (4) = alanine, (5) = arginine, (6) = asparagine, (7) = aspartic acid, (8) = glutamic acid, (9) = glutamine, (10) = glycine, (11) = histidine, (12) = isoleucine, (13) = leucine, (14) = lysine, (15) = methionine, (16) = phenylalanine, (17) = proline, (18) = serine, (19) = threonine, (20) = tryptophan, (21) = tyrosine, (22) = valine and (23) = cysteine

Before we study the **His** sensing under displacement approach by using **[ZnL2•2PV]** ensemble, we have investigated the interaction between **ZnL2** with **His**. As we aware, the complex formation constant of bis-histidinatozinc(II) ion, $[\text{Zn}(\text{His})_2]^{2-}$, is $\log K = 12.8$ (Martell & Smith, 1982, p. 2123). Therefore, **His** might be replace the bound **PV** giving the yellow color of unbound **PV** and removed Zn^{2+}

ion from **ZnL2** complex and also release **L2** in the solution. In order to confirm the sensing mechanism ^1H NMR titration have used to study the interaction between **ZnL2** with His in 50% $\text{CD}_3\text{CN-D}_2\text{O}$. We found that after the addition of **His** at 1.5 eq. the solution become clouded and the white solid was observed in NMR tube. After that the white solid was collected and characterized by ^1H NMR spectroscopy. It was found that ^1H NMR spectrum of the white solid is similar to the ^1H NMR spectrum of **L2** in the free form, Figure 4-20. It means that the added **His** could demetallate Zn^{2+} from the dinuclear **ZnL2**, possessing $[\text{Zn}(\text{His})_2]$ species, and release free **L2**.

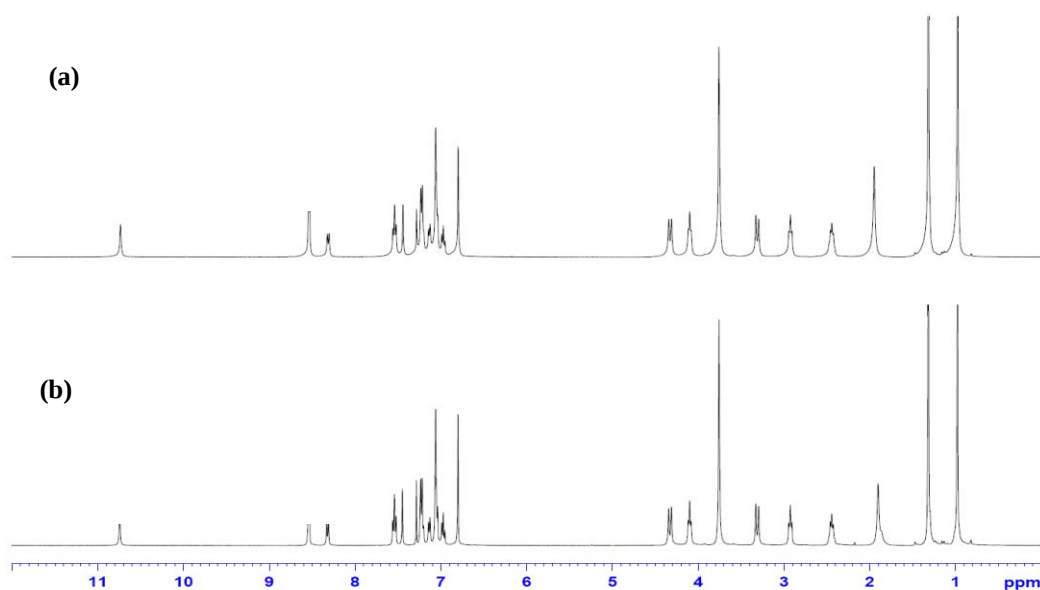


Figure 4-20 ^1H -NMR spectra of (a) white solid from NMR and (b) ligand **L2** in CDCl_3

The colorimetric sensing of **His** by **[ZnL2•2PV]** was further investigated by UV-vis titration. After the addition of **His** 10 eq. to the blue color of **[ZnL2•2PV]** ensemble displayed a sharp variation in the absorption spectra in which the band at 645 nm was decreased gradually with a blue shift ~ 215 nm to appear at 430 nm. The color of solution was changed from blue to yellow of free **PV**, Figure 4-21. The calculated detection limit ($3\sigma/k$) of His by **[ZnL2•2PV]** ensemble was calculated to be $0.5 \mu\text{M}$.

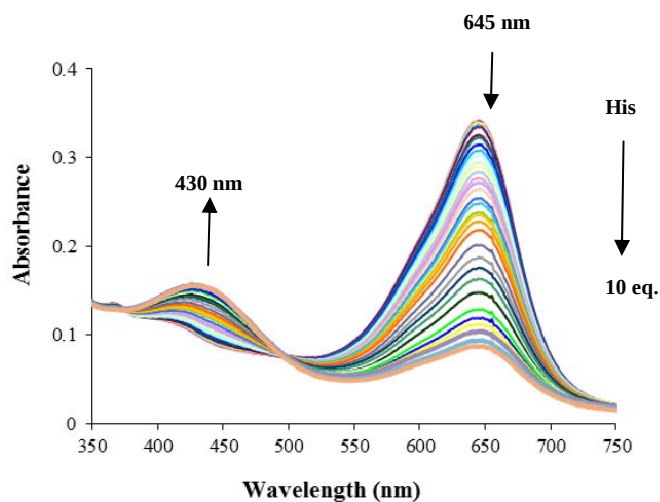
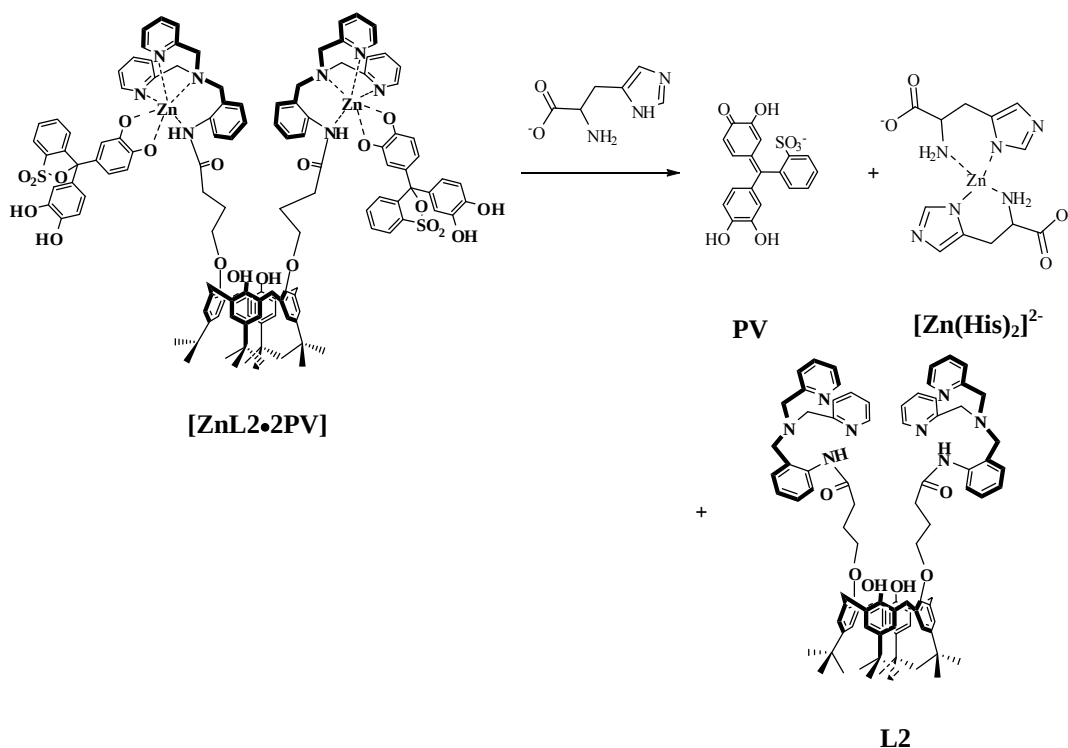


Figure 4-21 UV/vis spectra obtained by addition of **PPI** (1 mM) to a solution of **[ZnL2•PGR]** Inset ; A plot of absorption against concentration of **PPI** titrated in **[ZnL2•PGR]** ensemble in HEPES buffered pH 7.4 in 80/20 (% v/v) $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ solution

According to ^1H NMR titration above, it could be concluded that the added **His** could replace the bounded **PV** from the **[ZnL2•2PV]** ensemble with a color change from blue to yellow and also snatch the Zn^{2+} from the **ZnL2** complex and release free **L2** in the solution as depicted in Scheme 4-3 (Andersen, Lynch, & Anslyn, 2005, p. 5319; Sun, Tu, & Yan, 2012, p. 2124).



Scheme 4-3 The proposed mechanism for **His** sensing by [ZnL2•2PV] ensemble

4.7.6 Interference studies with other amino acids

To evaluate the His-selective nature of [ZnL2•2PV] ensemble, possibly absorption changes caused by other essential amino acids were studied. As shown in Figure 4-22, amino acids other than **His** did not cause significant changes in the absorption intensity. Thus, the selectivity profile for **His** over other amino acids was remarkably high.

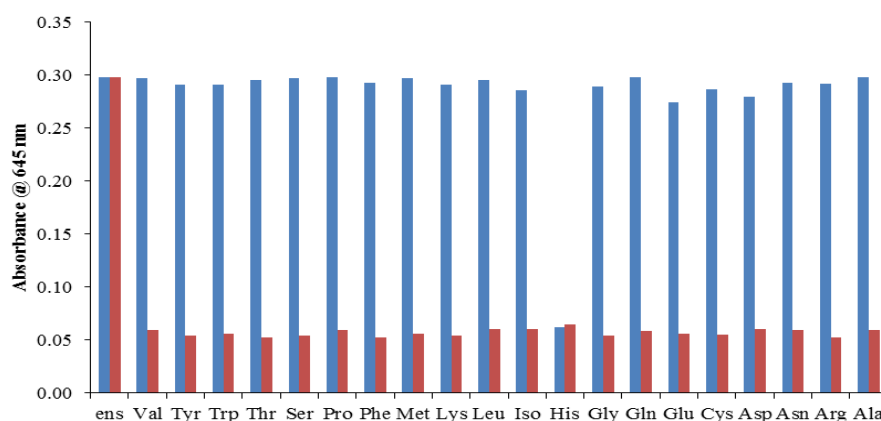


Figure 4-22 Absorption response of **[ZnL2•2PV]** ensemble 20 μ M to various amino acids in HEPES buffer pH 7.4 in 80/20 (%v/v) $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ solution. The blue bars represent the absorption of **[ZnL2•2PV]** ensemble in the presence of amino acids 12.5 equiv. The red bars represent the change of the absorption that occurs upon the subsequent addition of **His** to the solution of **[ZnL2•2PV]** ensemble containing various amino acids. The intensities were recorded at 645 nm

CHAPTER 5

CONCLUSION

In conclusion, we have synthesized two ligands based on calix[4]arene containing tripodal amine (**L1**) and tripodal amide (**L2**) as recognition unit for metal ions in 20 % and 15 % yields, respectively. The calix[4]arene skeleton in those two ligands adopts a cone conformation which can be confirmed by their ^1H NMR spectra. Two copper(II) chloride complexes of ligand **L1** (**CuL1**) and **L2** (**CuL2**) can be obtained as green solids in 42 % and 58 % yields, respectively. The zinc(II) perchlorate complexes of ligand **L1** (**ZnL1**) and **L2** (**ZnL2**) can be obtained as the white solids in 71% and 67% yields, respectively.

The sensing applications of **CuL1**, **CuL2**, **ZnL1** and **ZnL2** as IDA receptors for anions and α -amino acids have been investigated. Four complexometric indicators are chosen to study; pyrocatechol violet (**PV**), pyrogallol red (**PGR**), methythymol blue (**MTB**) and 4-(2-pyridylazoresorcinol) (**PAR**). From the screening test results showed that only **ZnL2** could be used as IDA receptors for **PPi** and **His** by changing indicators. It was found that [**ZnL2**•**PGR**] ensemble could discriminate **PPi** from the other phosphate containing anions in which **PPi** could replace the bound **PGR** from the ensemble structure and form the adduct complex [**ZnL2**•**PPi**]. Whereas [**ZnL2**•**2PV**] ensemble could detect **His** selectively in which **His** could replace the bound **PV** from the ensemble and pull out zinc(II) ions from the **ZnL2** giving the [**Zn**(**His**)₂] species and liberating free **L2** in the solution.

From this research we can conclude that there are four influence factors to control the selective sensing of anionic guest molecules under IDAs approach; (i) the nature of metal ions, (ii) spacer flexibility, (iii) topological structure of indicators and (iv) coordination chemistry of receptor and guest molecules.

Suggestions for future works

Try to obtain the single crystals of all of complexes, ensembles and the product from the displacement conditions.

REFERENCES

- Acharya, A., Ramanujam, B., Chinta, J. P., & Rao, C. P. (2011). 1,3-Diamido-calix[4]arene conjugates of amino acids: Recognition of -COOH side chain present in amino acids, peptides, and proteins by experimental and computational studies. *The Journal of Organic Chemistry*, 76, 127-137.
- Araki, K., Iwamoto, K., Shinkai, S., & Matsuda, T. (1990). "pK_a" of Calixarenes and analogs in nonaqueous solvents. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 63(12), 3480-3485.
- Bazzicalupi, C., Bencini, A., Bianchi, A., Cecchi, M., Escuder, B., Fusi, V., Espana, E. G., Giorgi, C., Luis, S. V., Maccagni, G., Marcelino, V., Paoletti, P., & Valtancoli, B. (1999). Thermodynamics of phosphate and pyrophosphate anions binding by polyammonium receptors. *Journal of the American Chemical Society*, 121(29), 6807-6815.
- Bolin, M., Åkerud, P., Hansson, A., & Åkerud, H. (2011). Histidine-rich glycoprotein as an early biomarker of preeclampsia. *American Journal of Hypertension*, 24, 496-501.
- Bottino, F., Giunta, L., & Pappalardo, S. (1989). Calix[4]arenes with pyridine pendant groups. Regioselective proximal alkylation at the "lower rim". *The Journal of Organic Chemistry*, 54(23), 5407-5409.
- Brewer, G., Brewer, C., Butcher, R. J., & Carpenter, E. E. (2006). Synthesis and characterization of Cu(II) and Ni(II) complexes of a tripodal ligand containing imidazoles. *Inorganica Chimica Acta*, 359, 1263-1268.
- Burdette, S. C., Frederickson, C. J., Bu, W., & Lippard, S. J. (2003). ZP4, an improved neuronal Zn²⁺ sensor of the zinpyr family. *Journal of the American Chemical Society*, 125, 1778-1787.
- Casey, C. P., & Guan, H. (2009). Cyclopentadienone iron alcohol complexes : Synthesis, reactivity, and implications for the mechanism of iron-catalyzed hydrogenation of aldehydes. *Journal of the American Chemical Society*, 131(7), 2499-2507.

- Chen, G. N., Wu, X. P., Duan, J. P., & Chen, H. Q. (1999). A study on electrochemistry of histidine and its metabolites based on the diazo coupling reaction. *Talanta*, 49, 319-330.
- Clarck, J. H. (1980). Fluoride ion as a base in organic synthesis. *Chemical Reviews*, 80, 429-452.
- Creighton, T. E. (1999). *Encyclopedia of Molecular Biology*. New York : Wiley.
- Czarnik, A. W. (1995). Desperately seeking sensors. *Chemistry and Biology*, 2, 423-428.
- Doherty, M., Belcher, C., Regan, M., Jones, A., & Ledingham, J. (1996). Association between synovial fluid levels of inorganic pyrophosphate and short term radiographic outcome of knee osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 55, 432-436.
- Fabbrizzi, L., & Poggi, A. (1995). Sensors and switches from supramolecular chemistry. *Chemical Society Reviews*, 24(3), 197-202.
- Fabbrizzi, L., Leone, A., & Taglietti, A. (2001). A Chemosensing ensemble for selective carbonate detection in water based on metal-ligand interactions. *Angewandte Chemie International Edition*, 40(16), 3066-3069.
- Fabbrizzi, L., Marcotte, N., Stomeo, F., & Taglietti, A. (2002). Pyrophosphate detection in water by fluorescence competition assays: Inducing selectivity through the choice of the indicator. *Angewandte Chemie International Edition*, 41(20), 3811-3814.
- Folmer-Andersen, J. F., Lynch, V. M., & Anslyn, E. V. (2005). "Naked-Eye" Detection of histidine by regulation of Cu(II) coordination modes, *Chemistry European Journal*, 11, 5319-5326.
- Gajda, T., Henry, B., & Delpuech, J. (1994). Multinuclear NMR and potentiometric study on tautomerism during protonation and zinc(II) complex formation of some imidazole-containing peptide derivatives. *Journal of Chemical Society Perkin Transaction*, 2, 157-164.
- Ghasemi, J., & Seifi, S. (2004). β -Correction as a preprocessing method for partial least squares in simultaneous determination of zinc and lead. *Talanta*, 63, 751-756.

- Gutsche, C. D., & Bauer, L. J. (1985). Calixarenes.13.The conformational properties of calix[4]arenes, calix[6]arenes, calix[8]arenes, and oxacalixarenes. *Journal of the American Chemical Society*, 107(21), 6052-6059.
- Han, M. S., & Kim, D. H. (2004). Visual detection of di- and tri-phosphates in aqueous solution of neutral pH. *Bulletin Korean Chemical Society*, 25(8), 1151-1155.
- Harding, M. M., & Cole, S. J. (1963). The crystal structure of di(histidino)zinc pentahydrate. *Acta Crystallography*, 16, 643-650.
- Hanshaw, R. G., Hilkert, S. M., Jiang, H., & Smith, B. D. (2004). An indicator displacement system for fluorescent detection of phosphate oxyanions under physiological conditions. *Tetrahedron Letters*, 45(47), 8721-8724.
- Hortala, M. A., Fabbrizzi, L., Marcotte, N., Stomeo, F., & Taglietti, A. (2003). Designing the selectivity of the fluorescent detection of amino acids: A chemosensing ensemble for histidine. *Journal of the American Chemical Society*, 125, 20-21.
- Incarvito, C., Lam, M., Rhatigan, B., Rheingold, A. L., Qin, J., Gavrilova, A. L., & Bosnich, B. (2001). Bimetallic reactivity. Preparations, properties and structures of complexes formed by unsymmetrical binucleating ligands bearing 4- and 6-coordinate sites supported by alkoxide bridges. *Journal of Chemical Society Dalton Transaction*, 3478-3488.
- Iwamoto, K., & Shinkai, S. (1992). Synthesis and ion selectivity of all conformational isomers of tetrakis[(ethoxycarbonyl)methoxy]calix[4]arene. *The Journal of Organic Chemistry*, 57(26), 7066-7073.
- James, K. B. (2005). Alfred Werner revisited: The coordination chemistry of anions. *Accounts of Chemical Research*, 38(8), 671-678.
- Joseph, R., Ramanujam, B., Acharya, A., Khutia, A., & Chebrolu, P. R. (2008). Experimental and computational studies of selective recognition of Hg^{2+} by amide linked lower rim 1,3-dibenzimidazole derivative of calix[4]arene: Species characterization in solution and that in the isolated complex, including the delineation of the nanostructures. *The Journal of Organic Chemistry*, 73, 5745-5758.

- Joseph, R., Ramanujam, B., Acharya, A., & Rao, C. P. (2009). Fluorescence switch-on sensor for Cu^{2+} by an amide linked lower rim 1,3-bis(2-picolyl)amine derivative of calix[4]arene in aqueous methanol. *Tetrahedron Letters*, 50(23), 2735-2739.
- Kathiravan, A., & Renganathan, R. (2009). Photoinduced interactions between colloidal TiO_2 nanoparticles and calf thymus-DNA. *Polyhedron*, 28(7), 1374-1378.
- Kim, J., Tsai, P. -C., Chen, S. -L., Himo, F., Almo, S. C., & Raushel, F. M. (2001). High resolution X-ray structures of different metal-substituted forms of phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *Biochemistry*, 40(9), 2712–2722.
- Kim, S. Y., & Hong, J. -I. (2009). Dual signal (color change and fluorescence ON–OFF) ensemble system based on bis(Dpa- Cu^{II}) complex for detection of PPI in water. *Tetrahedron Letters*, 50(17), 1951-1953.
- Kovach, P. M., & Meyerhoff, M. E. (1982). Development and application of a histidine-selective biomembrane electrode. *Analytical Chemistry*, 54, 217-220.
- Kretsinger, R. H., & Cotton, F. A. (1963). The crystal and molecular structure of di-(L-histidino)-zinc (II) dihydrate. *Acta Crystallography*, 16, 651-657.
- Kruppa, M., & Konig, B. (2006). Reversible coordinative bonds in molecular recognition. *Chemical Reviews*, 106(9), 3520–3560.
- Kumar, M., Mahajan, R. K., Sharma, V., Singh, H., Sharma, N., & Kaur, I. (2001). Synthesis of new bis-calix[4]arenes with imine linkages. A search for new silver-selective sensors. *Tetrahedron Letters*, 42(31), 5315-5318.
- Kunthadee, P., Watchasit, S., Kaowliw, A., Suksai, C., Wongsan, W., Ngeontae, W., Chailapakul, O., Aeungmaitrepirom, W., & Tuntulani, T. (2013). Intriguing sensing properties of a di-tripodal amine calix[4]arene ionophore towards anions from Donnan failure in ion-selective membranes induced by Cu^{2+} . *New Journal of Chemistry*, 37, 4010-4017.

- Kusakari, Y., Nishikawa, S., Ishiguro, S.-I., & Tamai, M. (1997). Histidine-like immunoreactivity in the rat retina. *Current Eye Research*, 16(6), 600-604.
- Lee, D. H., Im, J. H., Son, S. U., Chung, Y. K., & Hong, J. -I. (2003). An azophenol-based chromogenic pyrophosphate sensor in water. *Journal of the American Chemical Society*, 125(26), 7752-7753.
- Lee, J. H., Park, J., Lah, M. S., Chin, J., & Hong, J. -I. (2007). High-affinity pyrophosphate receptor by a synergistic effect between metal coordination and hydrogen bonding in water. *Organic Letters*, 9(19), 3729-3731.
- Limpcombe, W. N., & Strater, N. (1996). Recent advances in zinc enzymology. *Chemical Reviews*, 96(7), 2375-2434.
- Lavigne, J. J., & Anslyn, E. V. (2001). Sensing a paradigm shift in the field of molecular recognition from selective to differential receptors. *Angewandte Chemie International Edition*, 40(17), 3118-3130.
- Linton, B., & Hamilton, A. D. (1997). Formation of artificial receptors by metal-templated self-assembly. *Chemical Reviews*, 97(5), 1669-1680.
- Liu, X., Ngo, H. T., Ge, Z., Butler, S. J., & Jolliffe, K. A. (2013). Tuning colourimetric indicator displacement assays for naked-eye sensing of pyrophosphate in aqueous media. *Chemical Science*, 4, 1680-1686.
- Lund, J. W. G. (1974). Phosphorous and the eutrophication problem. *Nature(London)*, 249, 797-802.
- Martell, A. E., & Smith, R. M. (1982). *Critical Stability Constants: Amino Acids*, 1. New York : Plenum Press.
- Mackay, G. M., Forrest, C. M., Stoy, N., Christofides, J., Egerton, M., Stone, T. W., & Darlington, L. G. (2006). Tryptophan metabolism and oxidative stress in patients with chronic brain injury. *European Journal of Neurology*, 13(1), 30-42.
- Matinez, R. M., & Sancenon, F. (2003). Fluorogenic and chromogenic chemosensors and reagents for anions. *Chemical Reviews*, 103(11), 4419-4476.
- Navakun, K., Tuntulani, T., & Ruangpornvisuti, V. (2000). *p*-*tert*-butylcalix[4]arene derivatives containing azathiol receptors and their recognition towards Hg(II). *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 38, 113-122.

- Nikura, K., Bisson, A. P., & Anslyn, E. V. (1999). Optical sensing of inorganic anions employing a synthetic receptor and ionic colorimetric dyes. *Journal of Chemical Society Perkin Transaction 2*, 1111-1114.
- Nguyen, B. T., & Anslyn, E. V. (2006). Indicator–displacement assays. *Coordination Chemistry Reviews*, 250(23-24), 3118-3127.
- Nyrén, P. (1987). Enzymatic method for continuous monitoring of DNA polymerase activity. *Analytical Biochemistry*, 167, 235-238.
- Pugia, M. J. (2000). *Reduction of background interferences in the molybdate-dye protein assay*. EP 0658768 B1.
- Rao, M. L., Stefan, H., Scheid, C., Kuttler, A. D. S., & Froscher, W. (1993). Serum amino acids, liver status, and antiepileptic drug therapy in epilepsy. *Epilepsia*, 34, 347-354.
- Refsum, H., Ueland, P.M., Nygard, O., & Vollset, S. E. (1998). Homocysteine and cardiovascular disease. *Annual Review of Medicine*, 49, 31-62.
- Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlen, M., & Nyren, P. (1996). Real-Time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Analytical Biochemistry*, 242(1), 84–89.
- Schmidtchen, F. P., & Berger, M. (1997). Artificial organic host molecules for anions. *Chemical Reviews*, 97(5), 1609-1646.
- Shahrokhian, S. (2001). Lead phthalocyanine as a selective carrier for preparation of a cysteine-selective electrode. *Analytical Chemistry*, 73(24), 5972-5978.
- Shojaei, M., Mirmohseni, A., & Farbodi, M. (2008). Determination of phenanthrene by antibody-coated competitive real-time immuno-PCR assay. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391, 2875-2863.
- Sun, S.-K., Tu, K.-X., & Yan, X.-P. (2012). An indicator-displacement assay for naked-eye detection and quantification of histidine in human urine. *Analyst*, 137, 2124-2128.
- Steinberg, I. M., Lobnik, A., & Wolfbeis, O. S. (2003). Characterization of an optical sensor membrane based on the metal ion indicator pyrocatechol violet. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 90(1-3), 230-235.

- Sun, S.-K., Tu, K.-X., & Yan, X.-P. (2003). An indicator-displacement assay for naked-eye detection and quantification of histidine in human urine. *Analyst*, 137, 2124-2128.
- Suksai, C., & Tuntulani, T. (2003). Chromogenic anion sensors. *Chemical Society Reviews*, 4, 192-202.
- Suksai, C., & Tuntulani, T. (2005). Chromogenic anion sensors. *Topics in Current Chemistry*, 255, 163-198.
- Tabary, T., & Ju, L. (1992). Homogeneous phase pyrophosphate (PPi) measurement (H3PIM) A non-radioactive, quantitative detection system for nucleic acid specific hybridization methodologies including gene amplification. *Journal of Immunological Methods*, 156, 55-60.
- Tang, L., Li, Y., Zhang, H., Guo, Z., & Qian, J. (2009). A new chemosensing ensemble for fluorescent recognition of pyrophosphate in water at physiological pH. *Tetrahedron Letters*, 50(49), 6844-6847.
- Timms, A. E., Zhang, Y., Russell, R. G., & Brown, M. A. (2002). Genetic studies of disorders of calcium crystal deposition. *Rheumatology*, 41, 725-729.
- Trapani, G., Laquintana, V., Latrofa, A., Ma, J., Reed, K., Serra, M., Biggio, G., Liso, G., & Gallo, J. M. (2003). Peripheral benzodiazepine receptor ligand-melphalan conjugates for potential selective drug delivery to brain tumors. *Journal of the American Chemical Society*, 14(4), 830-839.
- Watanabe, M., Suliman, M. E., Qureshi, A. R., Garcia-Lopez, E., Barany, P., Heimbürger, O., Stenvinkel, P., & Lindholm, B. (2008). Consequences of low plasma histidine in chronic kidney disease patients: associations with inflammation, oxidative stress, and mortality. *American Journal of Clinical Nutrition*, 87(6), 1860-1866.
- Watchasit, S. (2010). *Synthesis and characterization of novel calix[4]arenes containing tripodal amine based ionophores using as anionsensors by indicators displacement assay*. Master's thesis, Chemistry, Faculty of Science, Burapha University.

- Watchasit, S., Kaowliew, A., Suksai, C., Tuntulani, T., Ngeontae, W., & Pakawatchai, C. (2010). Selective detection of pyrophosphate by new tripodal amine calix[4]arene-based Cu(II) complexes using indicator displacement strategy. *Tetrahedron Letters*, 51(26), 3398-3402.
- Watchasit, S., Suktanarak, P., Suksai, C., Ruangpornvisuti, V., & Tuntulani, T. (2014). Discriminate sensing of pyrophosphate using a new tripodal tetramine-based dinuclear Zn(II) complex under an indicator displacement assay approach. *Dalton Transactions*, 43, 14701–14709.
- Wiskur, S. L., Haddou, H. A., Lavigne, J. J., & Anslyn, E. V. (2001). Teaching old indicators new tricks. *Accounts of Chemical Research*, 34(12), 963-972.
- Xu, J. -Y., Tian, J. -L., Zhang, Q. -W., Zhao, J., Yan, S. -P., & Liao, D. -Z. (2008). Tetranuclear pyrophosphate-bridged Cu(II) complex with 2,2'-dipyridylamine: Crystal structure, spectroscopy and magnetism. *Inorganic Chemistry Communications*, 11(1), 69-72.
- Xu, S., He, M., Yu, H., Cai, X., Tan, X., Lu, B., & Shu, B. (2001). A quantitative method to measure telomerase activity by bioluminescence connected with telomeric repeat amplification protocol. *Analytical Biochemistry*, 299, 188–193.
- Yang, S., Feng, G., & Williams, N. H. (2012). Highly selective colorimetric sensing pyrophosphate in water by a NBD-phenoxo-bridged dinuclear Zn(II) complex. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 10, 5606-5612.
- Yoshida, H., Nakano, Y., Koiso, K., Nohta, H., Ishida, J., & Yamaguchi, M. (2001). Liquid chromatographic determination of ornithine and lysine based on intramolecular excimer-forming fluorescence derivatization. *Analytical Science*, 17, 107-112.
- Zhou, Y., & Yoon, J. (2012). Recent progress in fluorescent and colorimetric chemosensors for detection of amino acids. *Chemical Society Reviews*, 41, 52–67.

APPENDIX A

1D NMR, 2D NMR SPECTRUM OF LIGAND L1 AND L2

1D NMR, 2D NMR SPECTRUM OF ZnL1 AND ZnL2

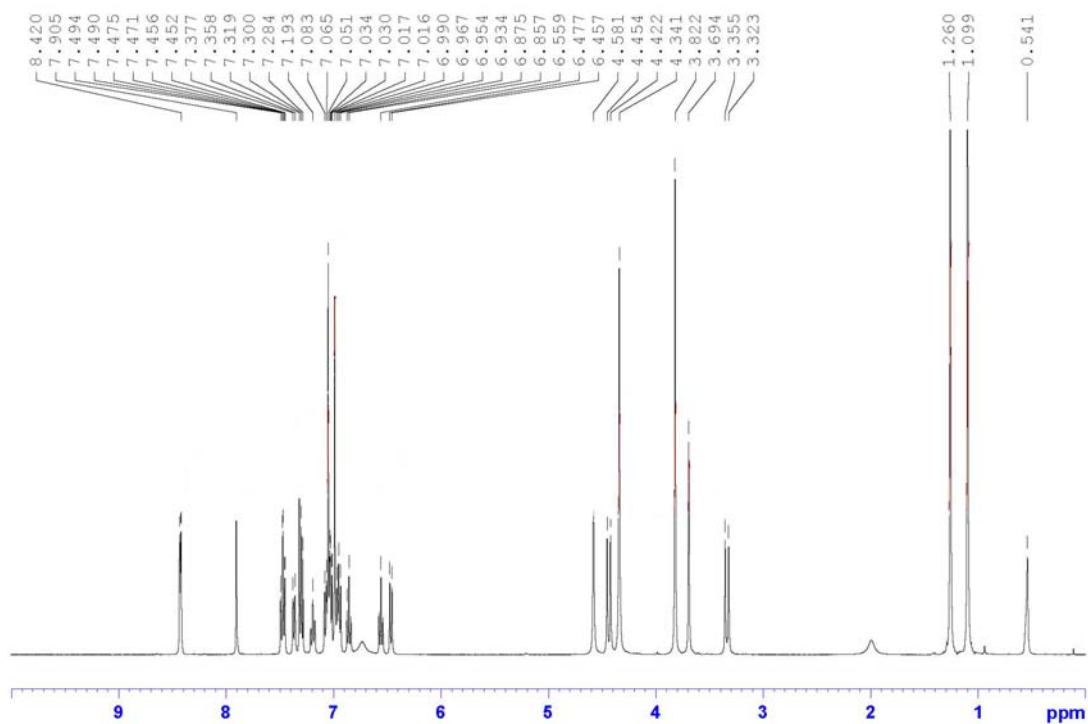


Figure A-1 ¹H NMR spectrum of **L1** in CDCl₃

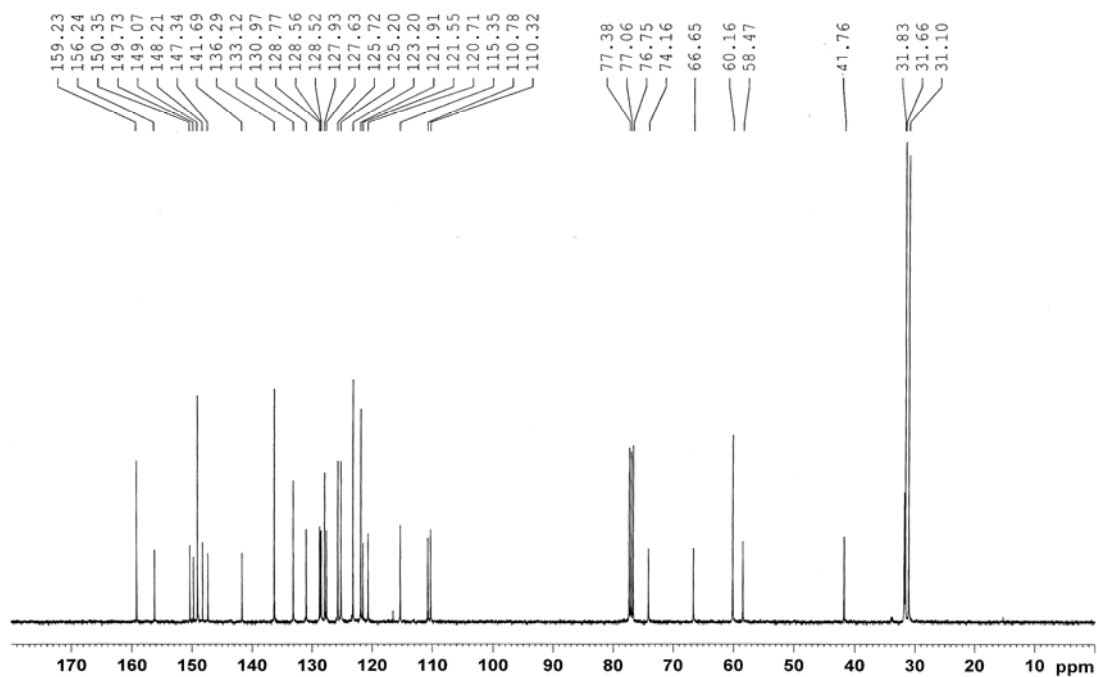


Figure A-2 ¹³C NMR spectrum of **L1** in CDCl₃

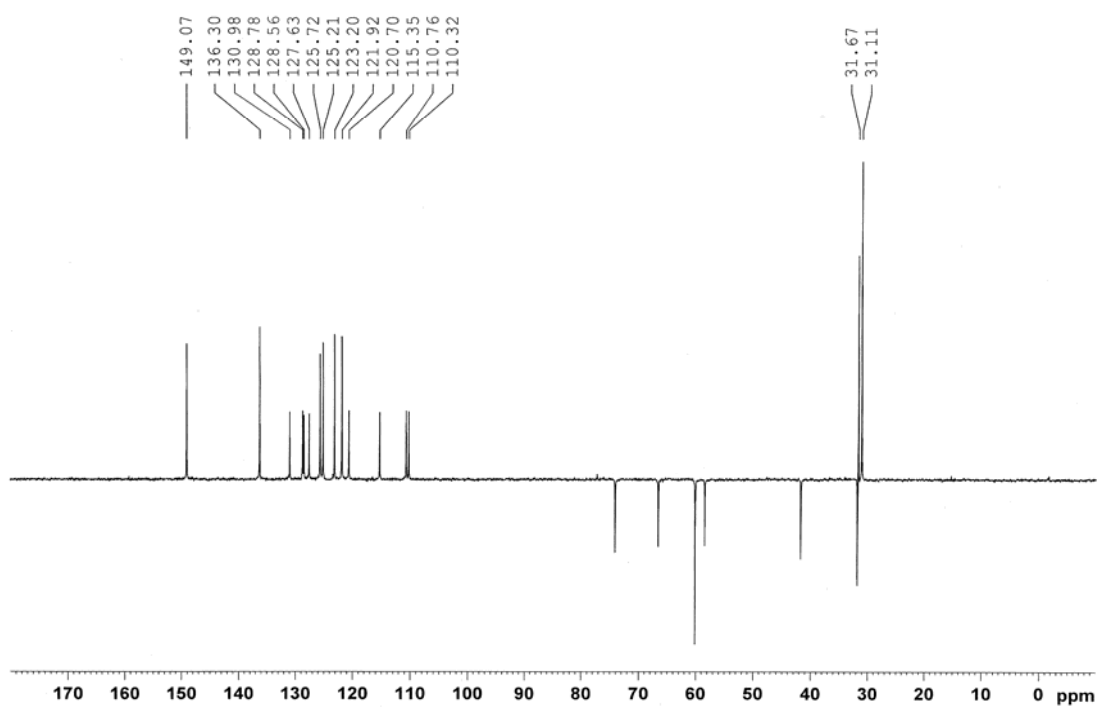


Figure A-3 DEPT 135 NMR spectrum of **L1** in CDCl_3

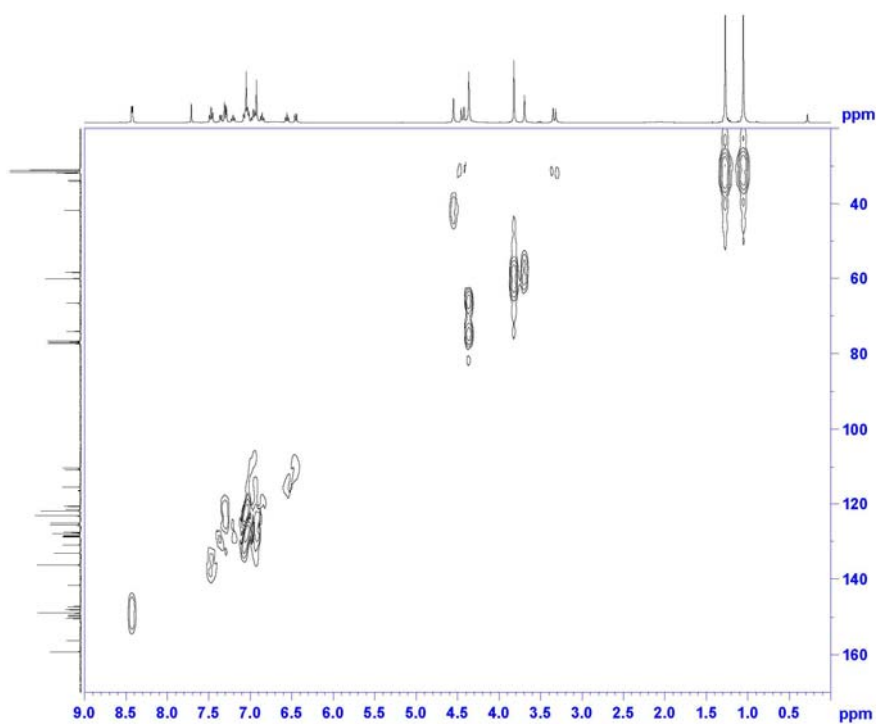


Figure A-4 HMQC NMR spectrum of **L1** in CDCl_3

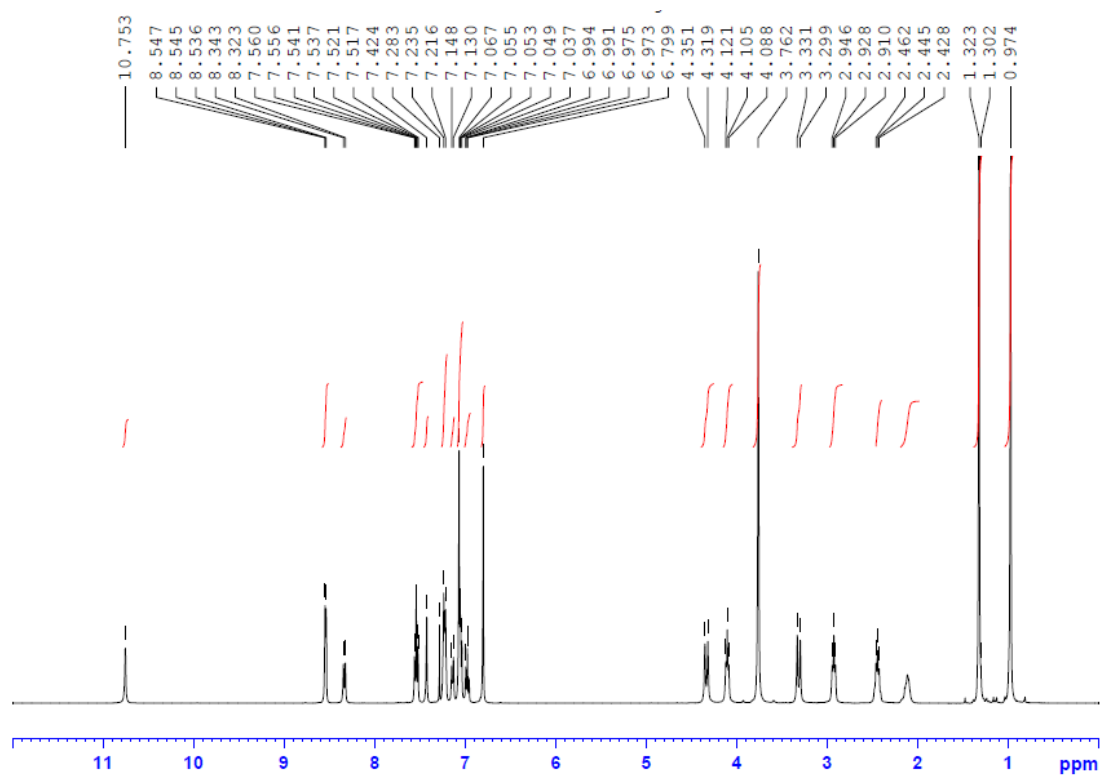


Figure A-5 ¹H NMR spectrum of L2 in CDCl₃

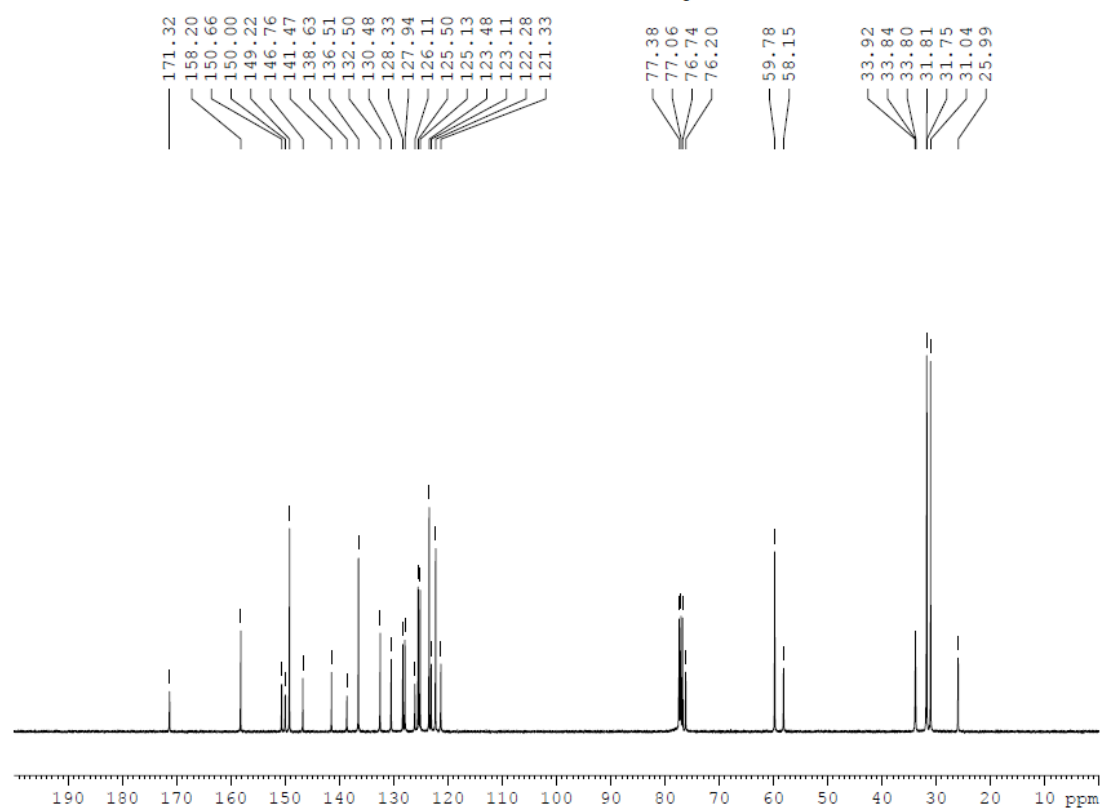
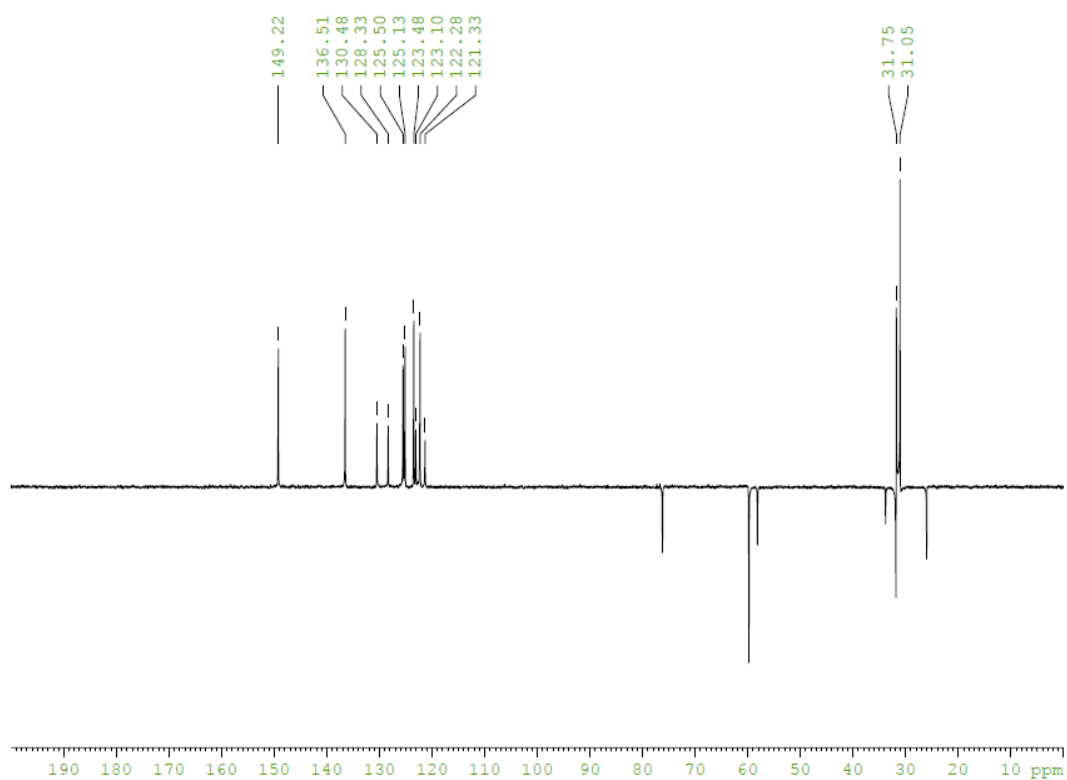
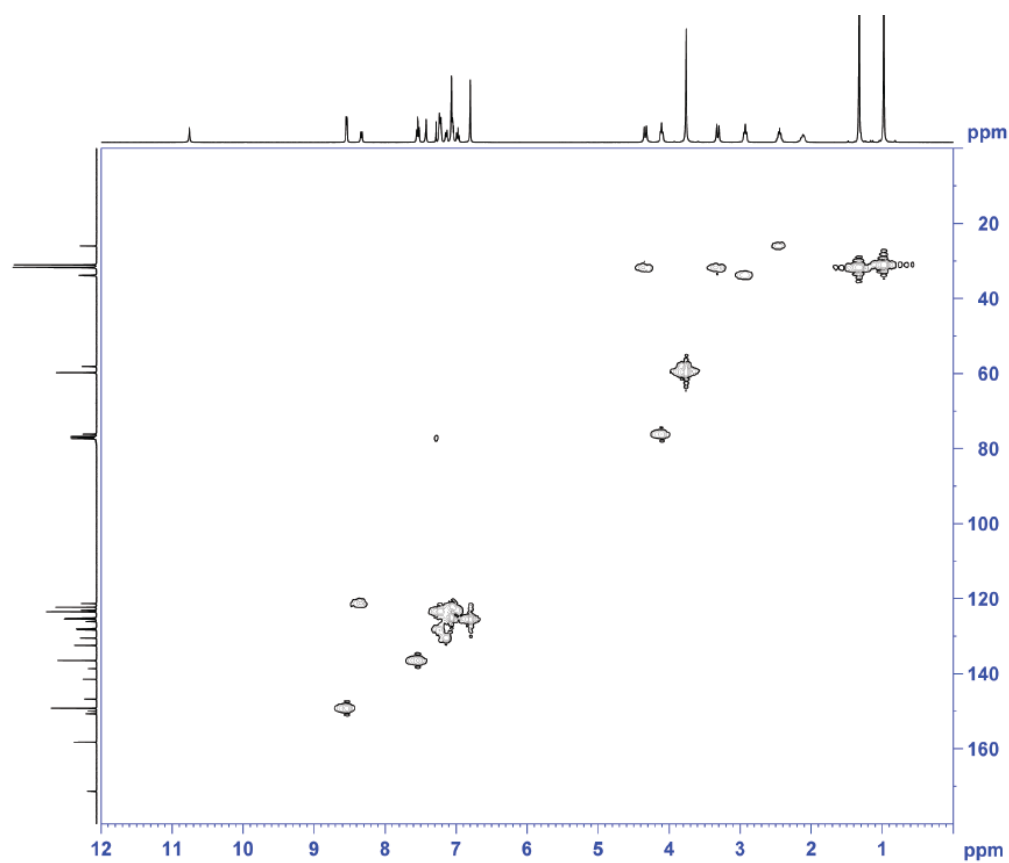


Figure A-6 ¹³C NMR spectrum of L2 in CDCl₃

Figure A-7 DEPT 135 NMR spectrum of L2 in CDCl₃Figure A-8 HMQC NMR spectra of L2 in CDCl₃

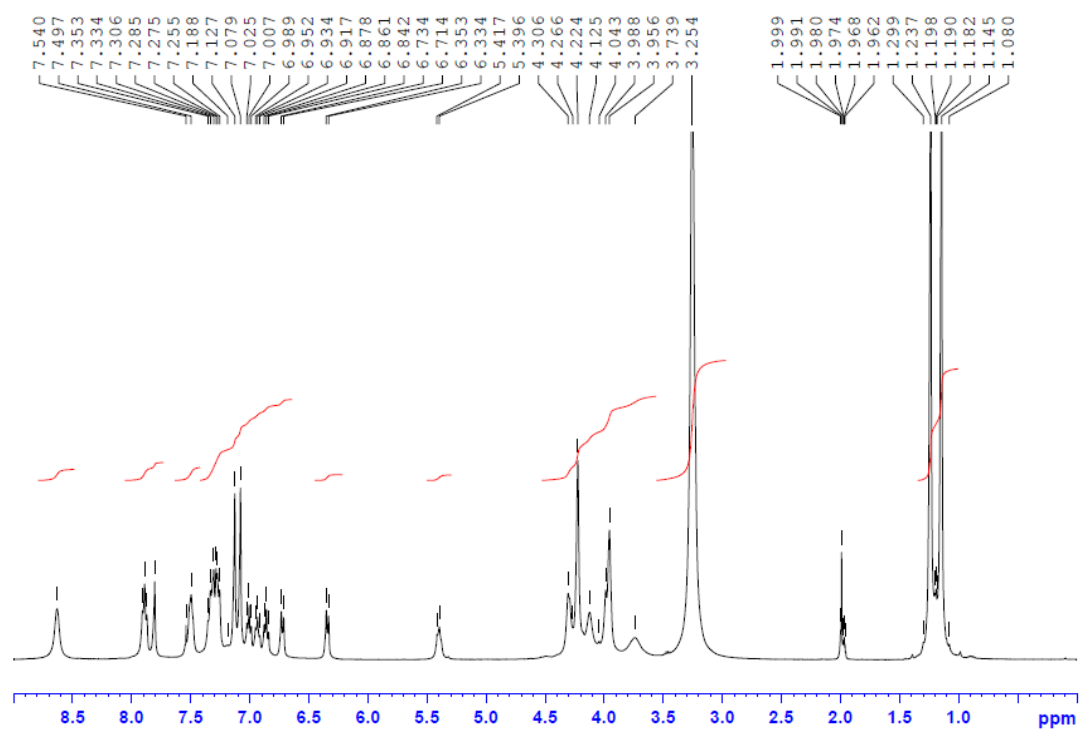


Figure A-9 ¹H NMR spectrum of **ZnL1** in 40% CDCl₃-CD₃CN

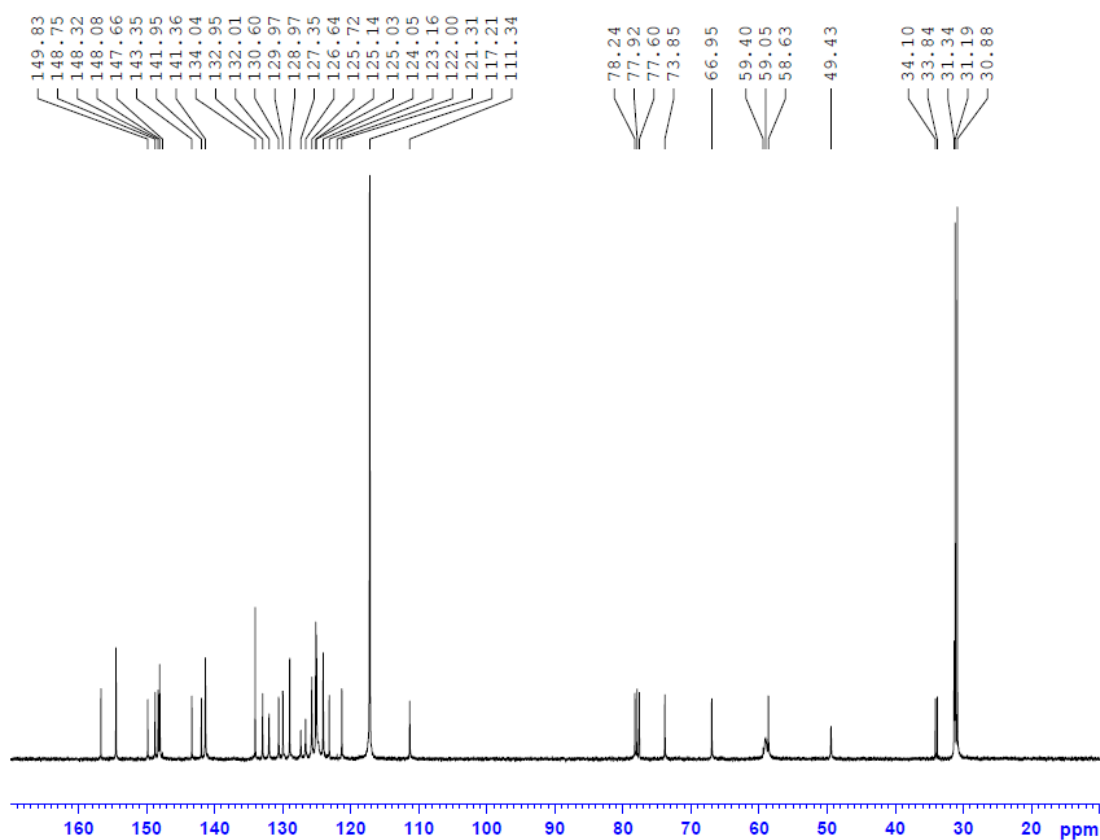


Figure A-10 ¹³C NMR spectrum of **ZnL1** in 40% CDCl₃-CD₃CN

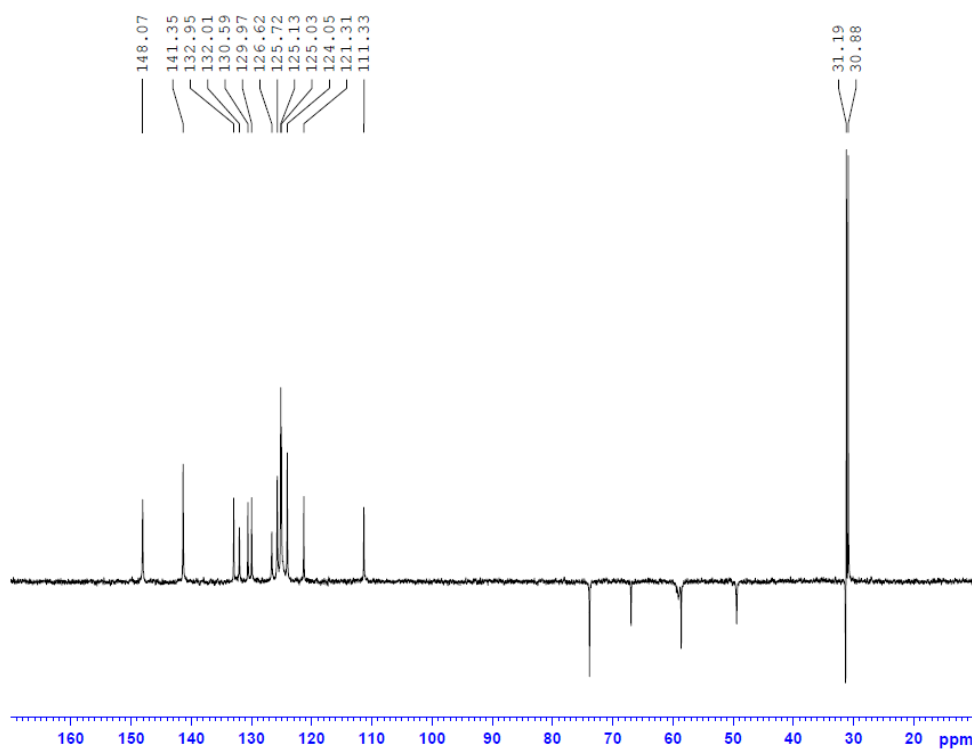


Figure A-11 DEPT 135 NMR spectrum of **ZnL1** in 40% CDCl₃-CD₃CN

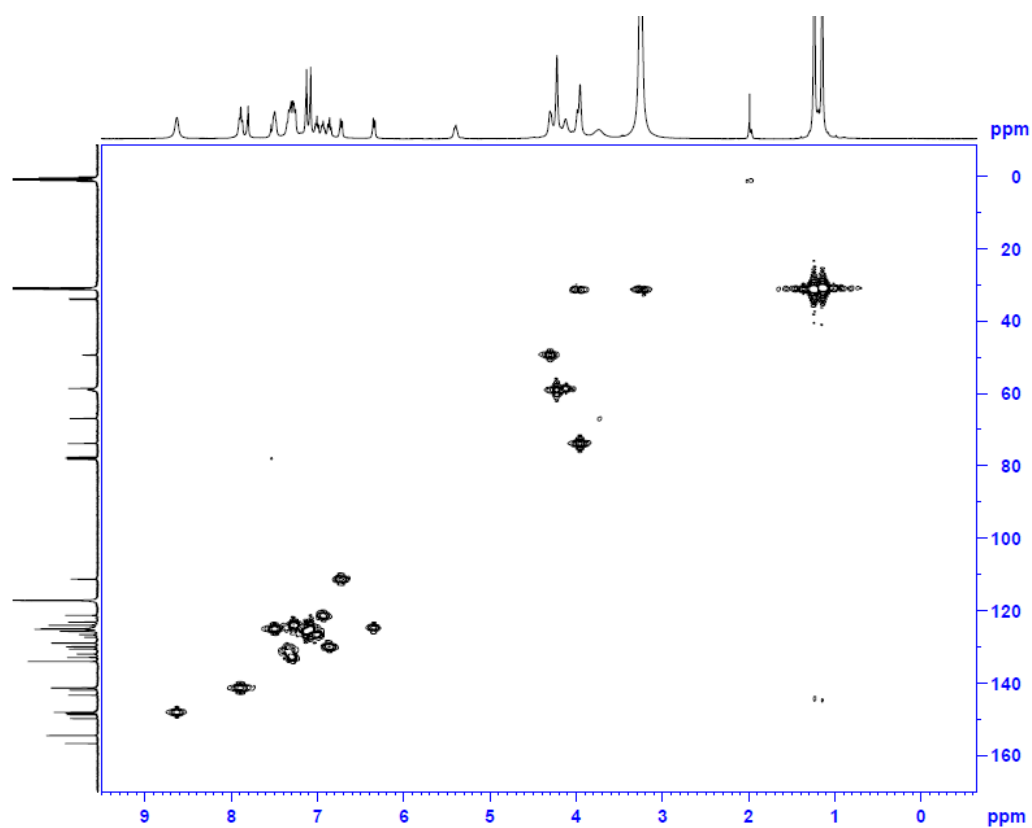


Figure A-12 HMQC NMR spectrum of **ZnL1** in 40% CDCl₃-CD₃CN

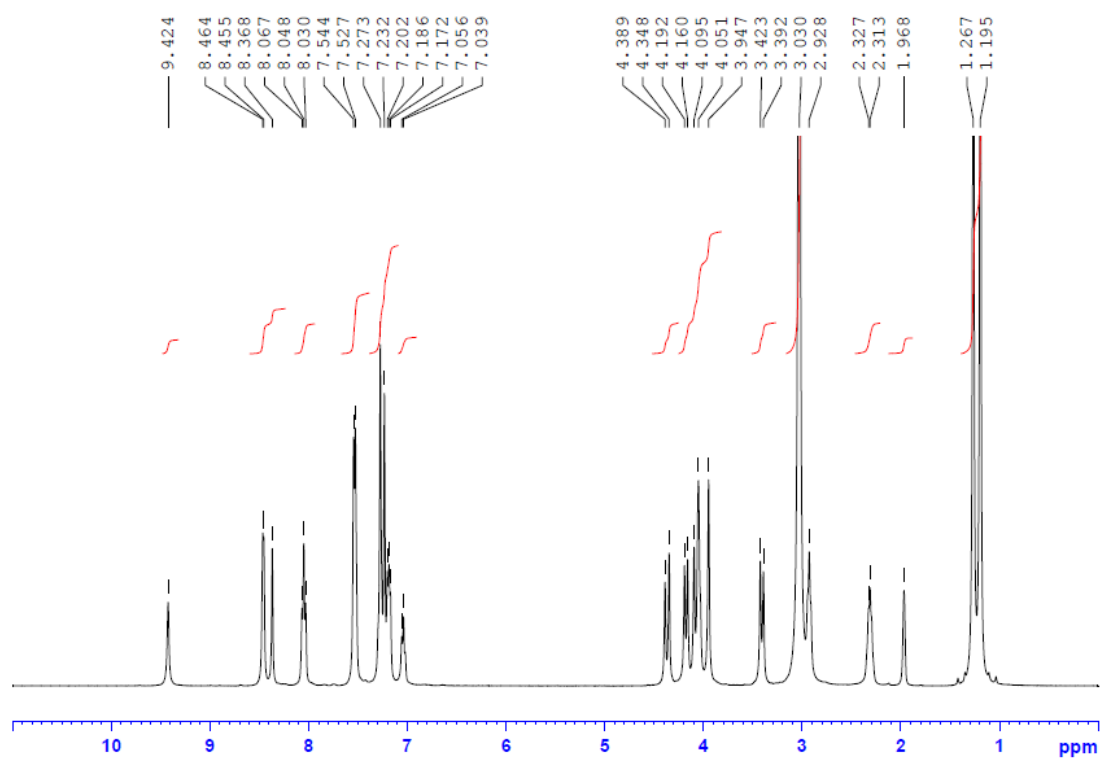


Figure A-13 ¹H NMR spectrum of **ZnL2** in CD₃CN

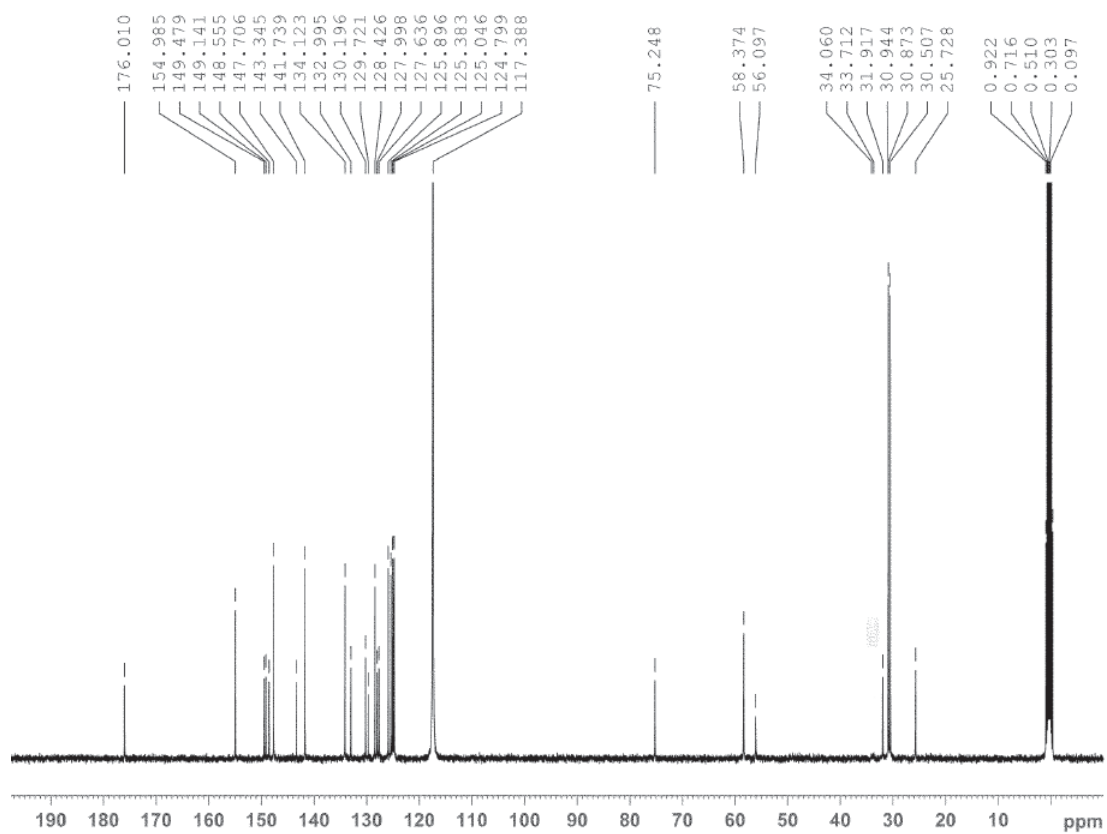


Figure A-14 ¹³C NMR spectrum of **ZnL2** in CD₃CN

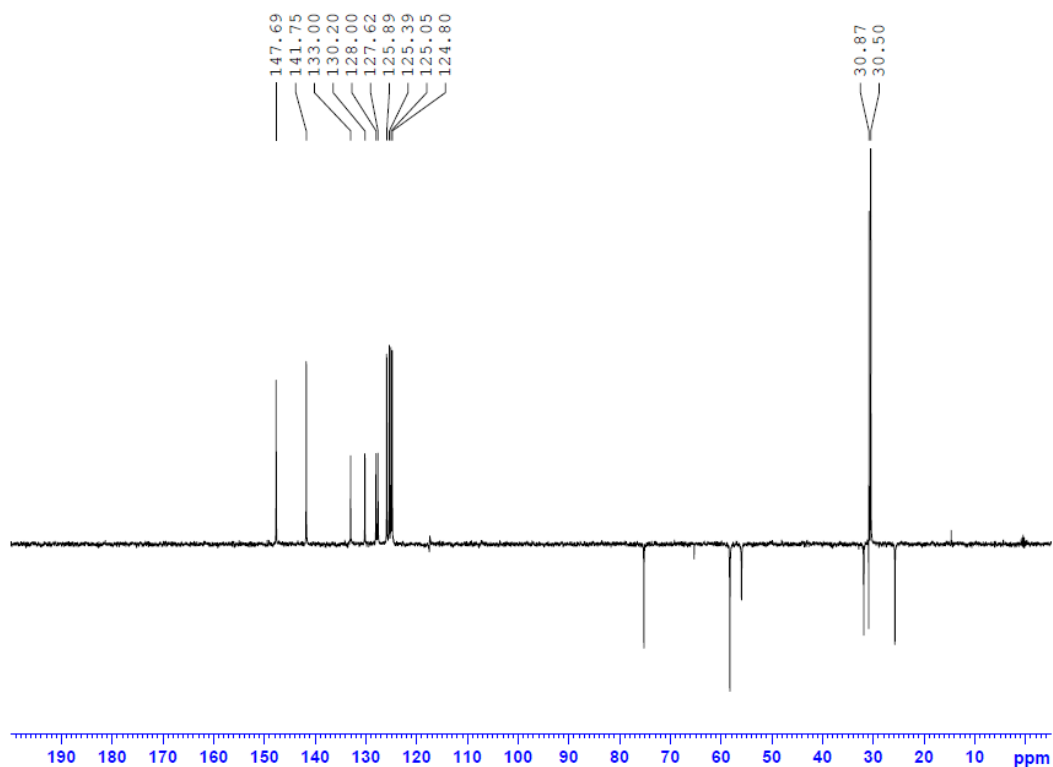


Figure A-15 DEPT 135 NMR spectrum of **ZnL2** in CD_3CN

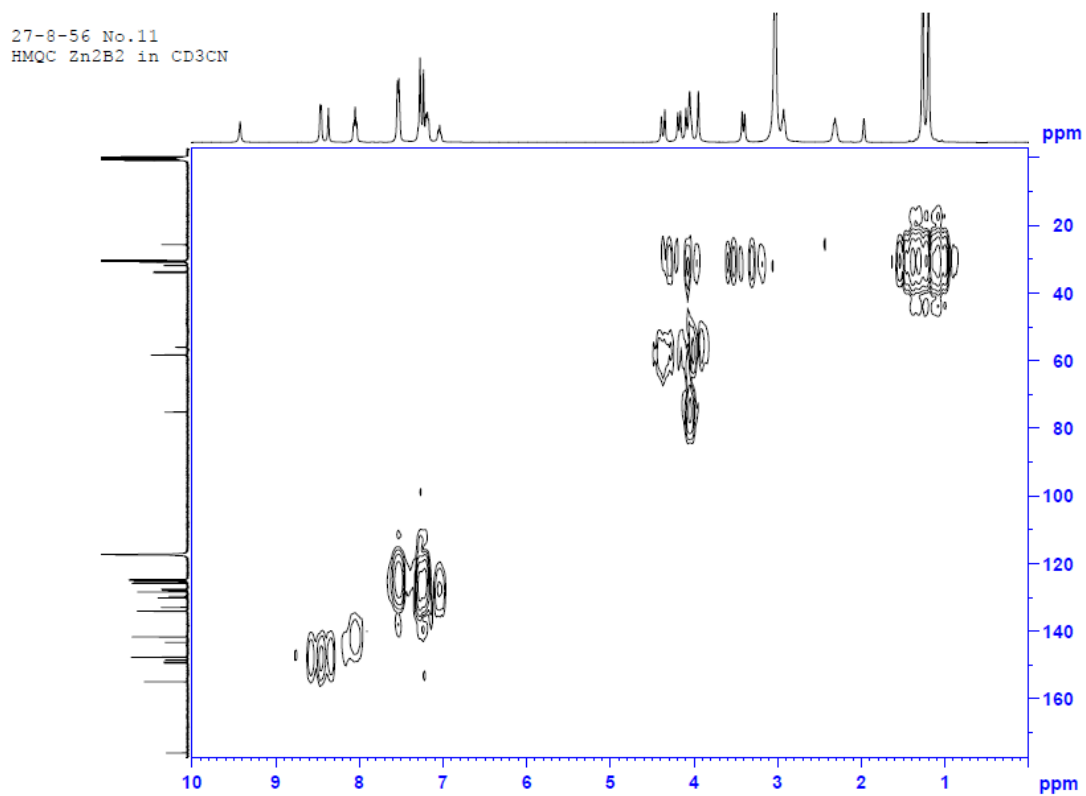


Figure A-16 HMQC NMR spectrum of **ZnL2** in CD_3CN

APPENDIX B
SCREENING TEST RESULTS

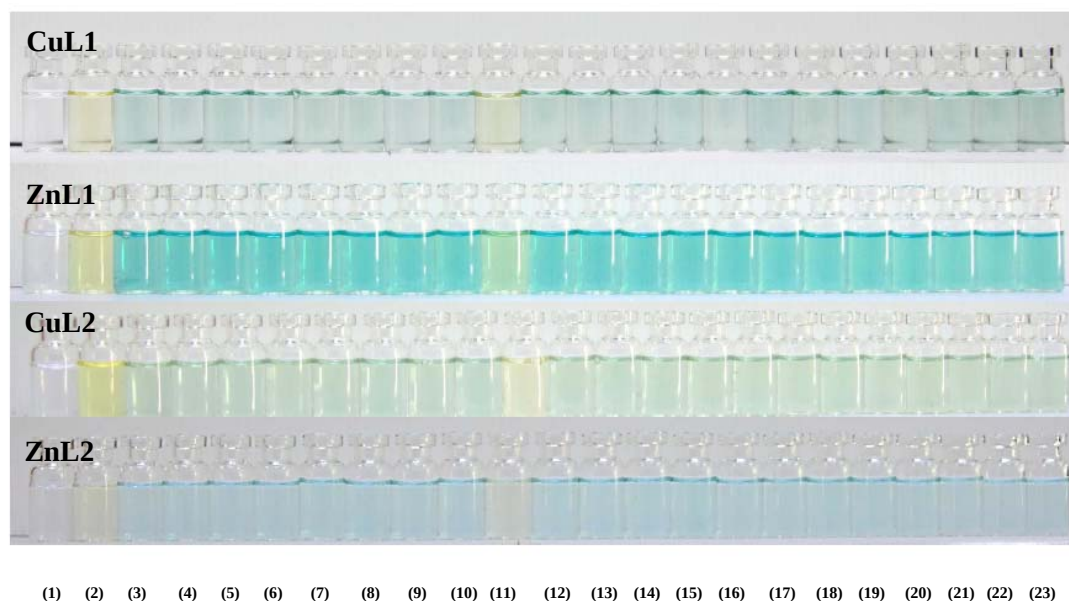


Figure B-1 **PV**-based ensembles with various amino acids, whereas **(1)** = complexes, **(2)** = **PV**, **(3)** = ensemble, **(4)** = alanine, **(5)** = arginine, **(6)** = asparagine, **(7)** = aspartic acid, **(8)** = glutamic acid, **(9)** = glutamine, **(10)** = glycine, **(11)** = histidine, **(12)** = isoleucine, **(13)** = leucine, **(14)** = lysine, **(15)** = methionine, **(16)** = phenylalanine, **(17)** = proline, **(18)** = serine, **(19)** = threonine, **(20)** = tryptophan, **(21)** = tyrosine, **(22)** = valine and **(23)** = cysteine

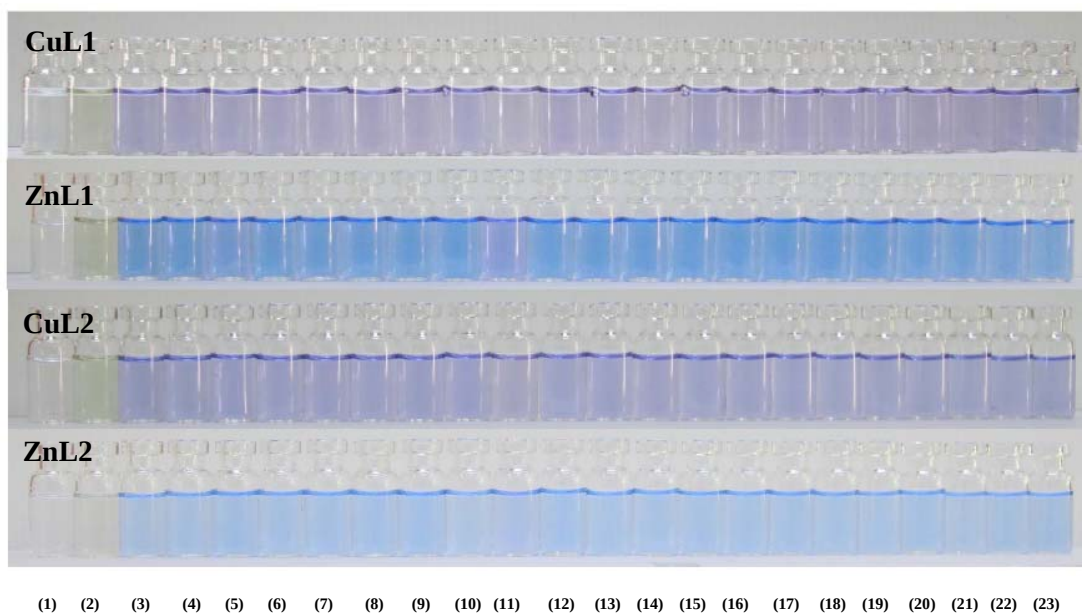


Figure B-2 **MTB**-based ensembles with amino acids, whereas **(1)** = complexes, **(2)** = **MTB**, **(3)** = ensemble, **(4)** = alanine, **(5)** = arginine, **(6)** = asparagine, **(7)** = aspartic acid, **(8)** = glutamic acid, **(9)** = glutamine, **(10)** = glycine, **(11)** = histidine, **(12)** = isoleucine, **(13)** = leucine, **(14)** = lysine, **(15)** = methionine, **(16)** = phenylalanine, **(17)** = proline, **(18)** = serine, **(19)** = threonine, **(20)** = tryptophan, **(21)** = tyrosine, **(22)** = valine and **(23)** = cysteine

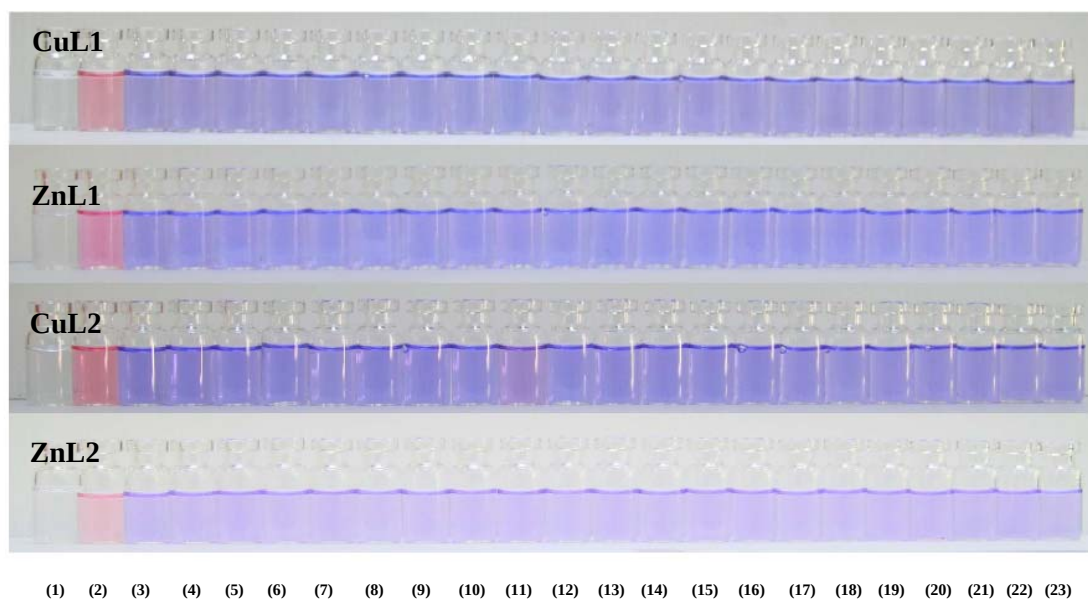


Figure B-3 **PGR**-based ensembles with amino acids, whereas **(1)** = complexes, **(2)** = **PGR**, **(3)** = ensemble, **(4)** = alanine, **(5)** = arginine, **(6)** = asparagine, **(7)** = aspartic acid, **(8)** = glutamic acid, **(9)** = glutamine, **(10)** = glycine, **(11)** = histidine, **(12)** = isoleucine, **(13)** = leucine, **(14)** = lysine, **(15)** = methionine, **(16)** = phenylalanine, **(17)** = proline, **(18)** = serine, **(19)** = threonine, **(20)** = tryptophan, **(21)** = tyrosine, **(22)** = valine and **(23)** = cysteine

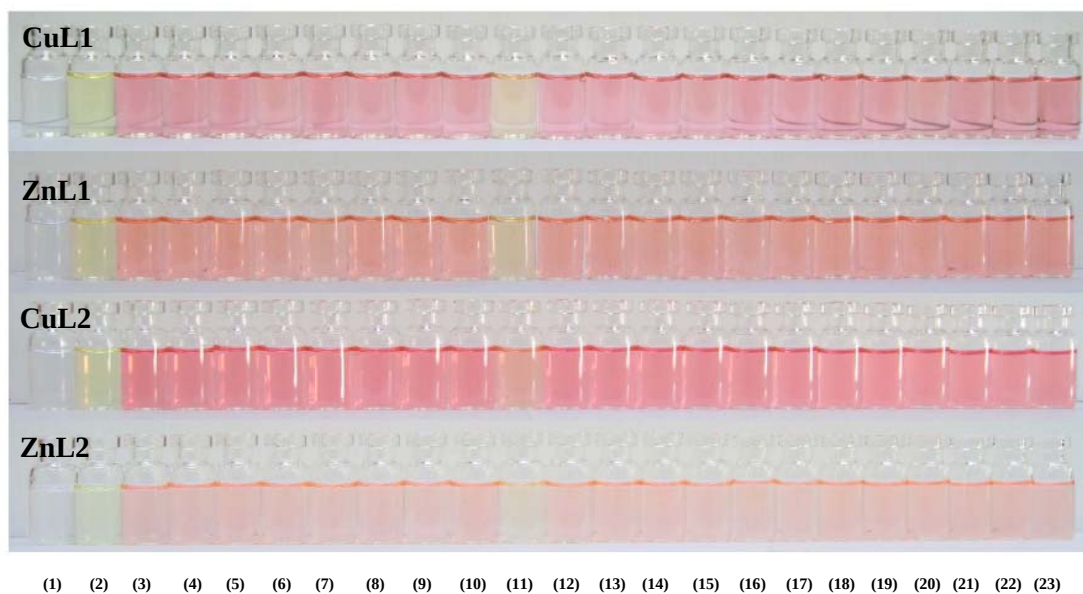


Figure B-4 **PAR**-based ensembles with amino acids, whereas **(1)** = complexes, **(2)** = **PAR**, **(3)** = ensemble, **(4)** = alanine, **(5)** = arginine, **(6)** = asparagine, **(7)** = aspartic acid, **(8)** = glutamic acid, **(9)** = glutamine, **(10)** = glycine, **(11)** = histidine, **(12)** = isoleucine, **(13)** = leucine, **(14)** = lysine, **(15)** = methionine, **(16)** = phenylalanine, **(17)** = proline, **(18)** = serine, **(19)** = threonine, **(20)** = tryptophan, **(21)** = tyrosine, **(22)** = valine and **(23)** = cysteine

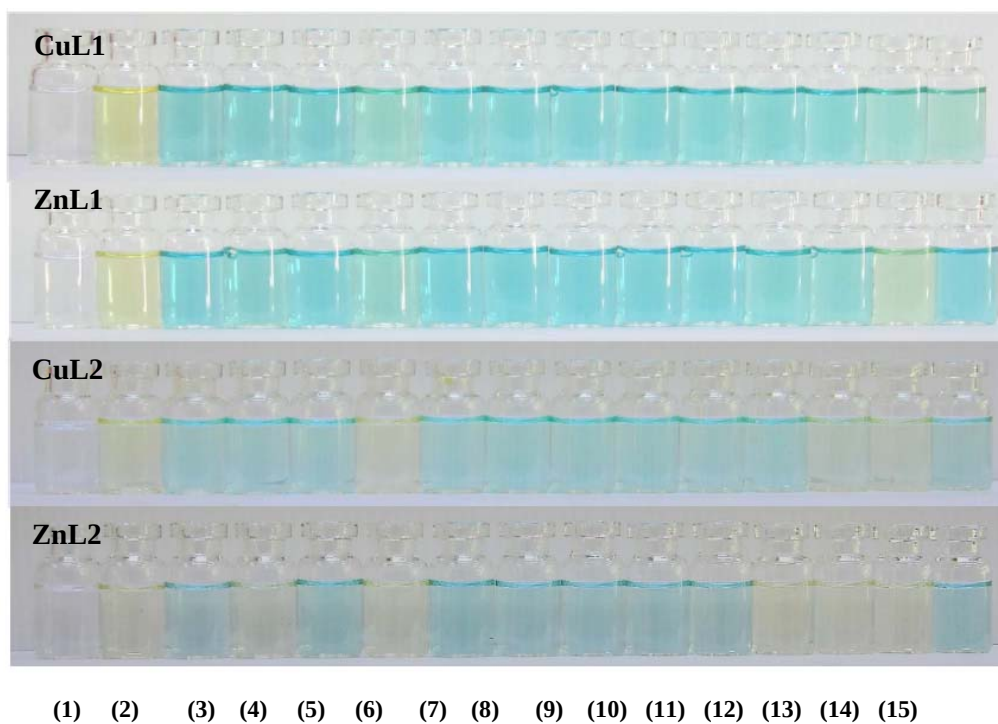


Figure B-5 **PV**-based ensembles with various anions, whereas **(1)** = complexes, **(2)** = **PV**, **(3)** = ensemble, **(4)** = H_2PO_4^- , **(5)** = AcO^- , **(6)** = PPi , **(7)** = BzO^- , **(8)** = I^- , **(9)** = Br^- , **(10)** = Cl^- , **(11)** = F^- , **(12)** = AMP , **(13)** = ADP , **(14)** = ATP and **(15)** = CN^-

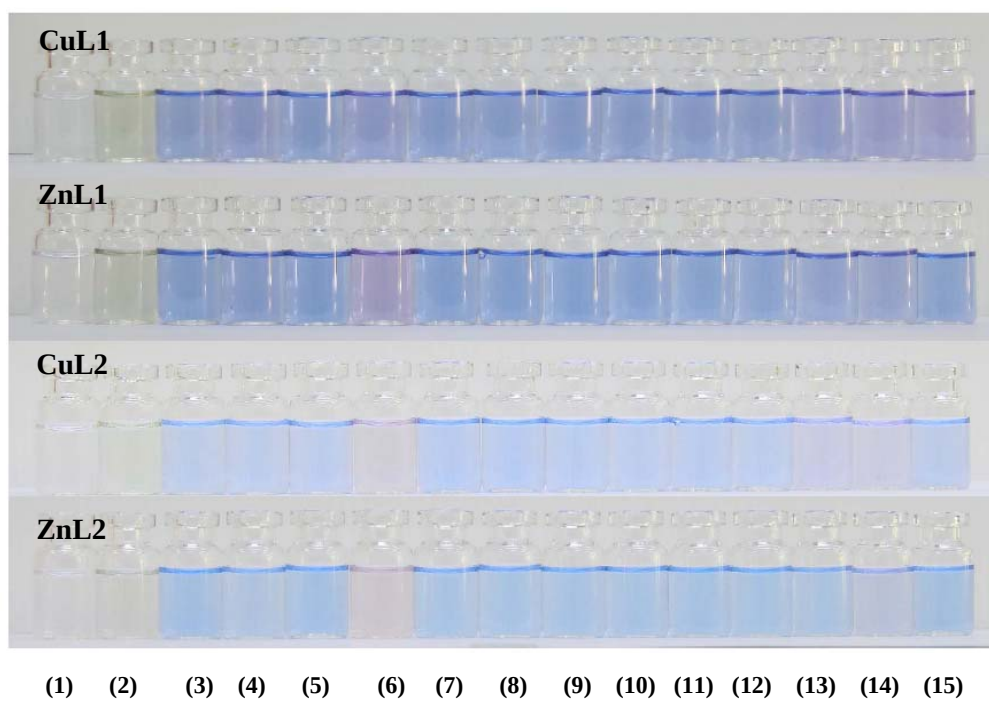


Figure B-6 **MTB** -based ensembles with various anions, whereas **(1)** = complexes, **(2)** = **MTB**, **(3)** = ensemble, **(4)** = H_2PO_4^- , **(5)** = AcO^- , **(6)** = PPi , **(7)** = BzO^- , **(8)** = I^- , **(9)** = Br^- , **(10)** = Cl^- , **(11)** = F^- , **(12)** = AMP , **(13)** = ADP , **(14)** = ATP and **(15)** = CN^-

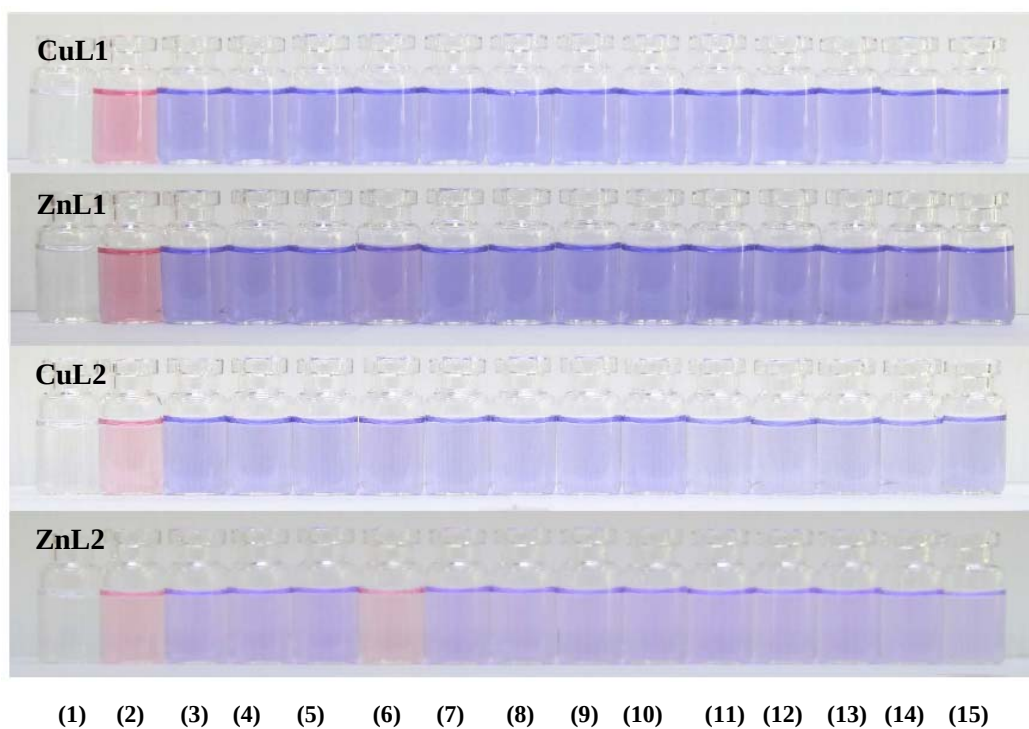


Figure B-7 **PGR**-based ensembles with various anions, whereas **(1)** = complexes, **(2)** = **PGR**, **(3)** = ensemble, **(4)** = H_2PO_4^- , **(5)** = AcO^- , **(6)** = PPi , **(7)** = BzO^- , **(8)** = I^- , **(9)** = Br^- , **(10)** = Cl^- , **(11)** = F^- , **(12)** = AMP , **(13)** = ADP , **(14)** = ATP and **(15)** = CN^-

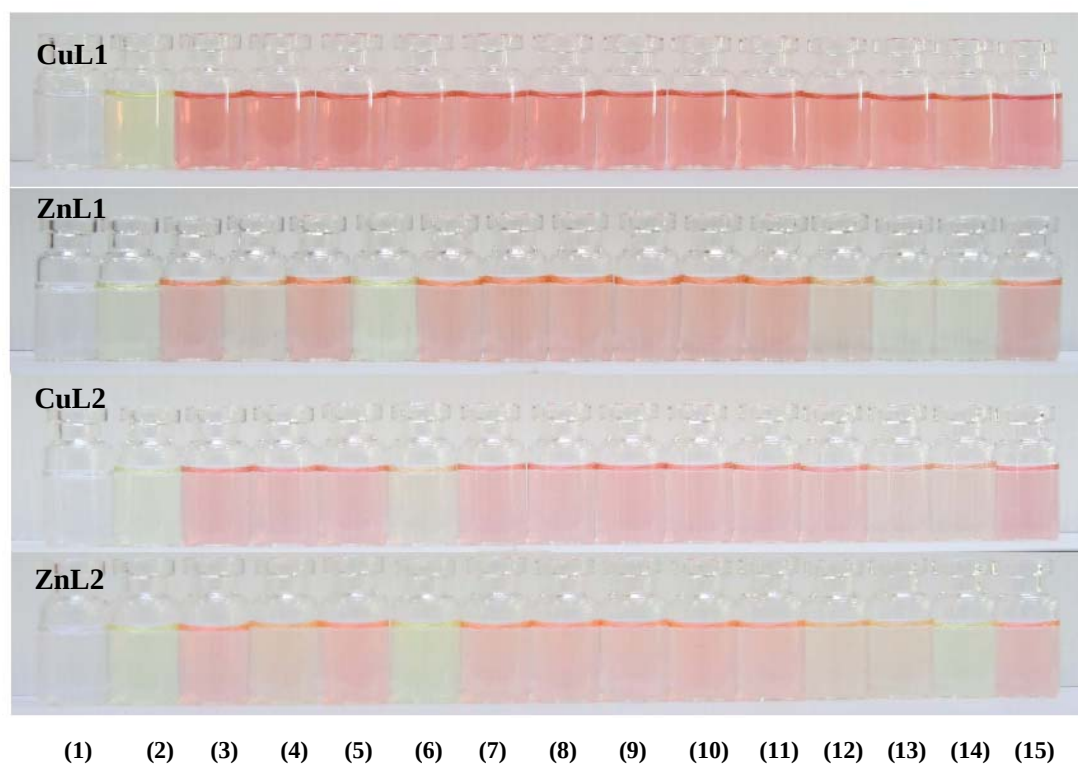
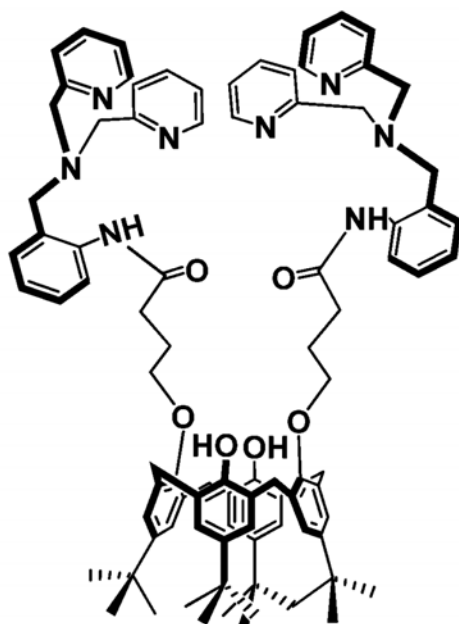
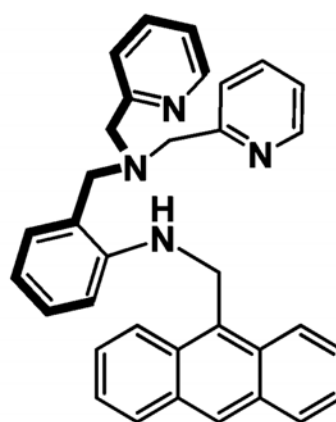


Figure B-8 **PAR**-based ensembles with various anions, whereas **(1)** = complexes, **(2)** = **PAR**, **(3)** = ensemble, **(4)** = H_2PO_4^- , **(5)** = AcO^- , **(6)** = PPi , **(7)** = BzO^- , **(8)** = I^- , **(9)** = Br^- , **(10)** = Cl^- , **(11)** = F^- , **(12)** = AMP , **(13)** = ADP , **(14)** = ATP and **(15)** = CN^-

**Intriguing sensing properties of a di-tripodal amine
calix[4]arene ionophore towards anions from Donnan
failure in ion-selective membranes induced by Cu²⁺**



L1



L2

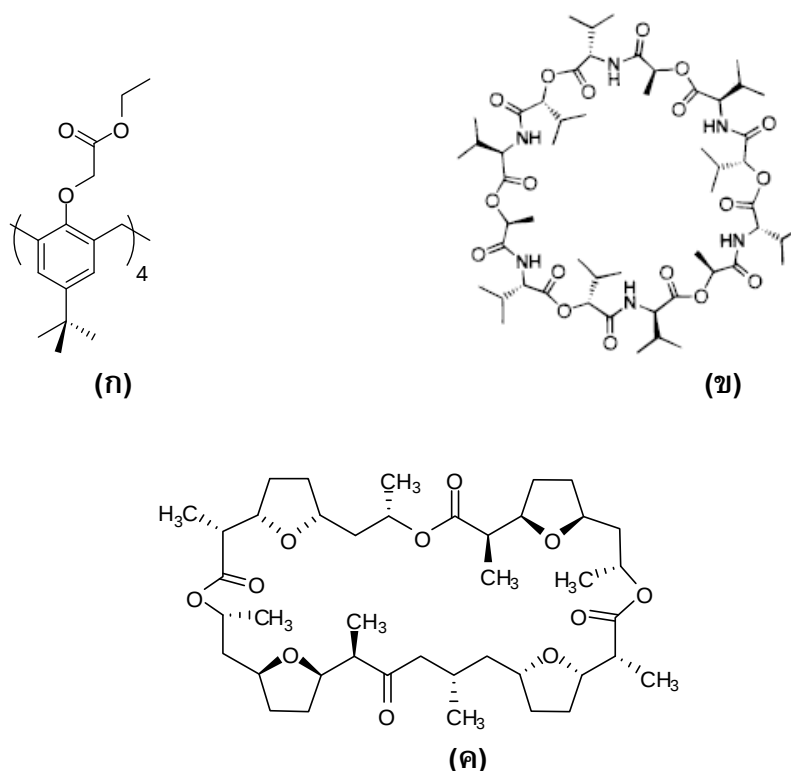
บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

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

ในการวิเคราะห์ไอออนบวกนั้นโมเลกุลที่นิยมนำมาเตรียมเป็นไอโอโนฟอร์ได้แก่อนุพันธ์ของ *p-tert-butyl-calix[n]arene*⁶ ซึ่งในปัจจุบันนี้สารประกอบ *p-tert-butyl-calix[4]arene tetraethylester*⁷ ได้ถูกผลิตขึ้นมาขายทางการค้าเพื่อใช้เป็นไอโอโนฟอร์สำหรับการวิเคราะห์ Na^+ (sodium ionphore X ผลิตภัณฑ์ของบริษัท FLUKA) นอกจากอนุพันธ์ของ calix[4]arene แล้วอนุพันธ์ของควาโนอีเธอร์⁶ และยาปฏิชีวนะ (antibiotics) ตัวอย่างเช่น valinomycin^{8,9} และ nonactin¹⁰ และโมเลกุลของลิแกนด์ที่เป็นที่รู้จักกันดี เช่น 1,10-phenanthroline¹¹ และ 2,2-bipyridine¹² ก็นิยมนำมาทำเป็นไอโอโนฟอร์สำหรับไอออนของโลหะด้วยเช่นกัน ซึ่งอิเล็กโทรดที่เตรียมได้จากไอโอโนฟอร์ตามที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นนั้นได้ถูกนำไปใช้งานในด้านการแพทย์อยู่ในปัจจุบัน⁶ โครงสร้างของไอโอโนฟอร์สำหรับการตรวจวัดไอออนของโลหะแสดงได้ดังรูปที่ 1 สำหรับไอโอโนฟอร์ที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ไอออนลบนั้นโมเลกุลที่นิยมนำมาเตรียมได้แก่สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดต่าง ๆ เช่น สารประกอบโคออร์ดิเนชันของ Rh(III) กับลิแกนด์ bipyridine¹³ และสารประกอบโคออร์ดิเนชันของ Cd(II) กับลิแกนด์ประเภท Schiff-base¹⁴

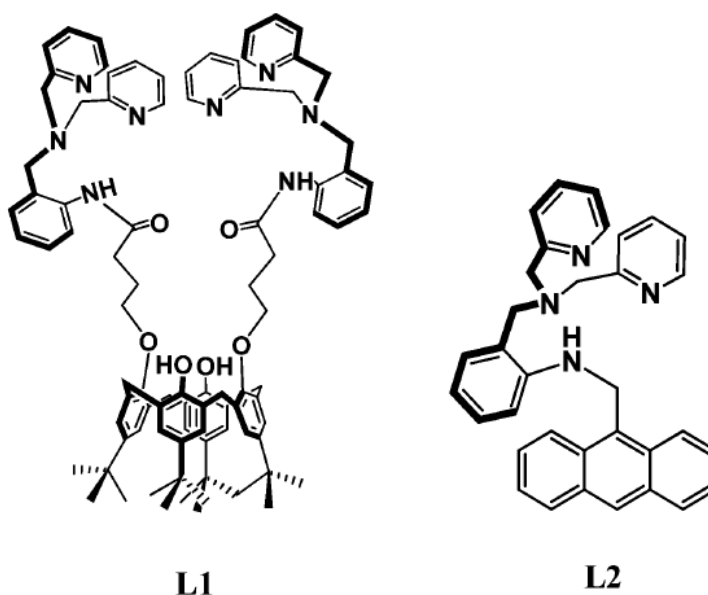


รูปที่ 1 โครงสร้างของไอโอโนฟอร์ที่ถูกนำมาใช้สำหรับการตรวจวัดไอออนของโลหะ (ก) *p*-*tert*-butyl-calix[4]arene tetraethylester (ข) valinomycin และ (ค) nonactin

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

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

ในงานวิจัยนี้ได้นำสารประกอบที่เป็นอนุพันธ์ของคาลิกซ์[4]แอรีนที่มีหมู่ไทรโพลอลเอไมด์ (L1) และสารประกอบของแอนทราซีนที่มีหมู่ไทรโพลิดเอมีน (L2) เป็นองค์ประกอบภายในโมเลกุลมาใช้ในการสร้างอิเล็กโทรดที่มีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดไอออน Cu^{2+}



1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกับไอออนของโลหะของไอโอโนฟอร์ L1 และ L2 ในการนำมาพัฒนาเป็นเมมเบรนอิเล็กโทรดชนิดใหม่สำหรับการตรวจวัดไอออนของโลหะ

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกับไอออนของโลหะของไอโอโนฟอร์ทั้งสามชนิดด้วยเทคนิคเมมเบรนอิเล็กโทรดที่มีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัด

1.4 ประโยชน์ที่จะได้รับการวิจัย

ได้ไอโอโนฟอร์ชนิดใหม่ที่สามารถนำไปพัฒนาเป็นอิเล็กโทรดที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจวัดไอออนของโลหะ Cu^{2+}

บทที่ 2

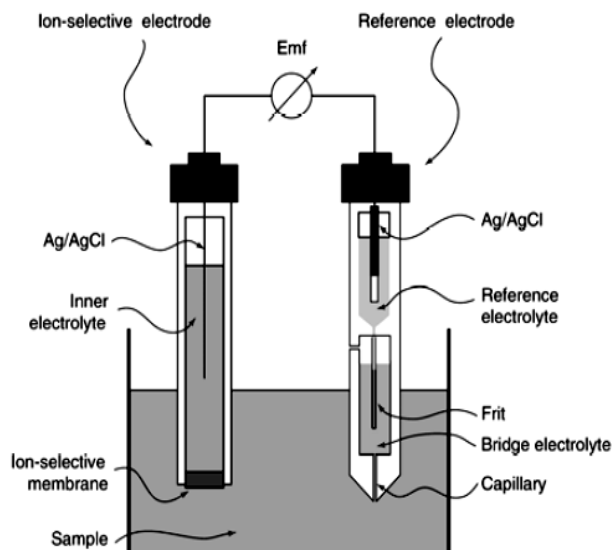
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1.1 การวิเคราะห์ไอออนด้วยเทคนิคโพเทนชิโอเมตรี²¹

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

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

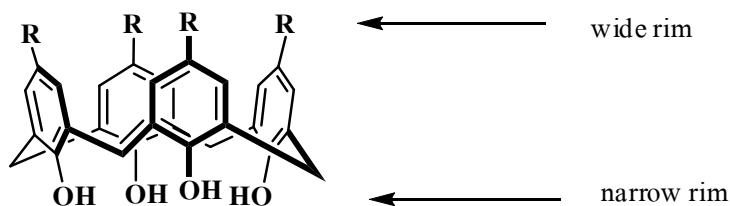


รูปที่ 2.1 แสดงส่วนประกอบของเทคนิคโพเทนชิโอเมทรี

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

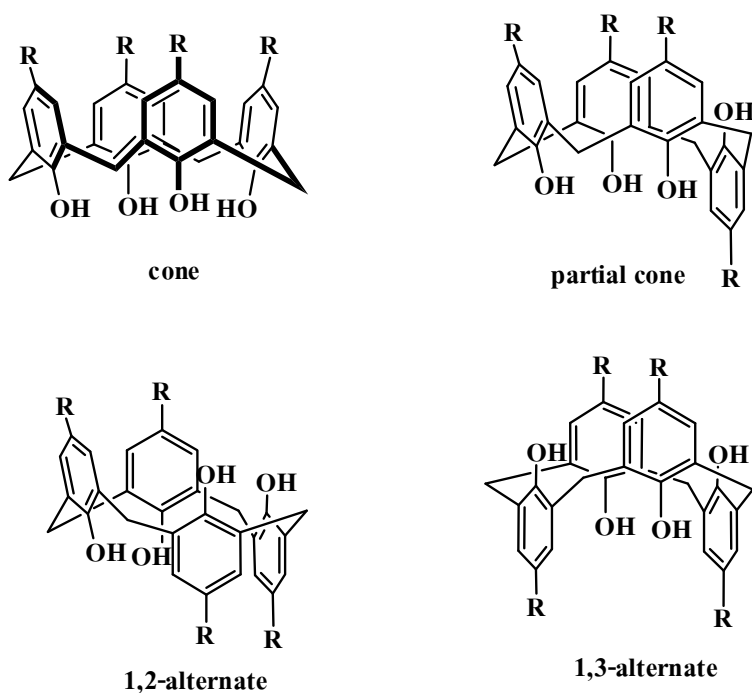
2.1.2 คาลิกซ์[n]เอรีน (calix[n]arene) ²³

คาลิกซ์[n]เอรีน (calix[n]arene) เป็นสารประกอบแมโครไซคลิกที่ประกอบด้วยหน่วยของหมู่ฟีนอลจำนวน n หน่วยเชื่อมต่อกันด้วยสะพานเมทิลีน (methylene bridge) ในตำแหน่งออร์โธกับหมู่ฟีนอลิกไฮดรอกซีและส่งผลให้โครงสร้างของคาลิกซ์[n]เอรีนมีช่องว่างอยู่ภายใน โมเลกุลโครงสร้างของคาลิกซ์[n]เอรีน แบ่งออกได้เป็น 2 ส่วน คือส่วน wide rim ซึ่งเป็นส่วนที่มีหมู่ฟังก์ชันใด ๆ ที่ต่ออยู่กับวงฟีนอลในตำแหน่งพาราและส่วนของ narrow rim คือ ส่วนที่มีหมู่ฟีนอลิกไฮดรอกซีเป็นองค์ประกอบ ดังแสดงในรูปที่ 2.2



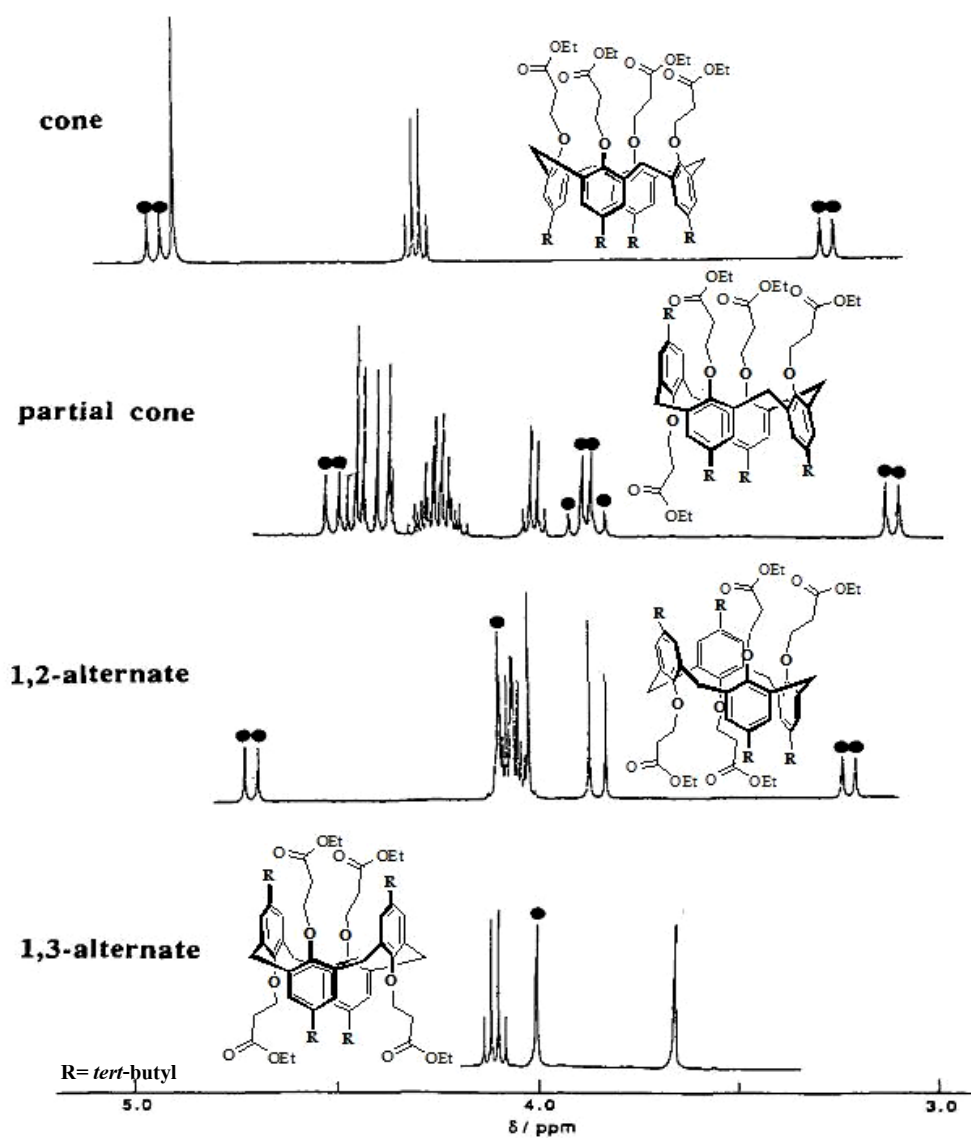
รูปที่ 2.2 โครงสร้างของคาลิกซ์[4]เอรีน แสดงส่วนของ wide rim และ narrow rim

พาราเทอร์เชียรีบิวทิลคาลิกซ์[4]เอรีน (*p-tert-butyl-calix[4]arene*) เป็นคาลิกซ์[n]เอรีนที่มีผู้นิยมศึกษากันมาก เนื่องจากสามารถเตรียมได้ง่ายจากปฏิกิริยาคอนเดนเซชันของ *p-tert-butyl-phenol* และฟอร์มาลดีไฮด์ (formaldehyde) สารประกอบคาลิกซ์[4]เอรีนมีโครงสร้างที่แตกต่างกันทั้งหมด 4 ไอโซเมอร์ ได้แก่ cone, partial cone, 1,2-alternate และ 1,3-alternate ดังแสดงในรูปที่ 2.3 โดยที่โครงสร้างของไอโซเมอร์แบบ cone จะเป็นโครงสร้างที่เสถียรมากที่สุด เนื่องจากเกิดพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุลระหว่างหมู่ฟีนอลิกไฮดรอกซีทั้ง 4 หมู่



รูปที่ 2.3 โครงสร้างชนิดต่าง ๆ ของคาลิกซ์[4]เอรีน

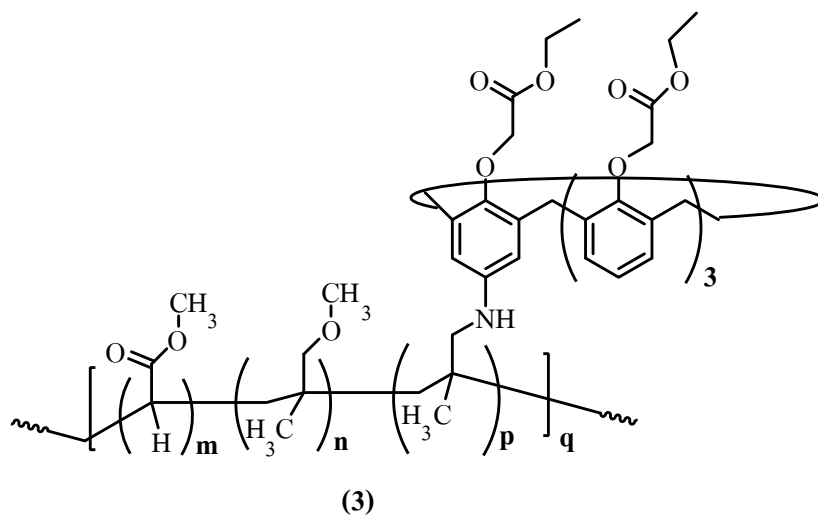
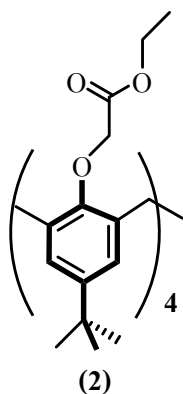
การพิสูจน์โครงสร้างของของคาลิกซ์[4]เอรีนทั้ง 4 ไอโซเมอร์นั้น สามารถทำได้โดยอาศัยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ โดยการพิจารณาจากทั้งสัญญาณของโปรตอนของหมู่เมทิลลีนที่เชื่อมวงฟีนอล (methylene bridge, $\text{Ar-CH}_2\text{-Ar}$) และค่า coupling constant (J) ของโปรตอนของหมู่ดังกล่าว เนื่องจากโปรตอนทั้งสองของหมู่ดังกล่าวในโครงสร้างของคาลิกซ์[4]เอรีนจะไม่สมมาตรซึ่งกันและกัน ดังนั้นพีคของโปรตอนใน $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของจึงมีลักษณะเป็น doublet ที่เกิดจากการ coupling กันของโปรตอนทั้งสองที่อยู่ในตำแหน่ง equatorial และ axial โดยโปรตอนในตำแหน่ง axial เป็นโปรตอนที่อยู่ใกล้กับหมู่ไฮดรอกซีจึงปรากฏพีคของ H_{ax} ที่ค่า chemical shift (δ) ไปทางตำแหน่ง down field ส่วนโปรตอนในตำแหน่ง equatorial นั้นอยู่ไกลจากหมู่ไฮดรอกซี มากกว่าจึงทำให้ปรากฏพีค H_{eq} ที่ค่า δ ไปทางตำแหน่ง up field สำหรับโครงสร้างของไอโซเมอร์ที่เป็นแบบ cone นั้นพีคของ $^1\text{H-NMR}$ ของหมู่เมทิลลีนที่เชื่อมวงฟีนอลทั้ง 4 หมู่จะมีลักษณะเป็นแบบ doublet จำนวน 2 ชุด ที่ค่า δ อยู่ที่ตำแหน่งประมาณ 3.49 และ 4.26 ppm และมีค่า J อยู่ในช่วงประมาณ 12.6 - 14 Hz ตัวอย่างเช่นเมื่อพิจารณา $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของสารประกอบ 5, 11, 17, 23-tetra-tert-butyl-25, 26, 27, 28-tetrakis-((ethoxycarbonyl)methoxy)calix[4]arene ที่มีโครงสร้างได้ทั้งหมด 4 ไอโซเมอร์ ดังแสดงในรูปที่ 2.5 พบว่าโครงสร้างของไอโซเมอร์ที่เป็นแบบ cone นั้น โปรตอนของหมู่เมทิลลีนปรากฏเป็นพีคที่มีลักษณะเป็น doublet 2 ชุด โดยที่โปรตอนในตำแหน่ง equatorial จะปรากฏที่ค่า δ 3.13 ppm และโปรตอนในตำแหน่ง axial จะปรากฏที่ 4.50 ppm ส่วนโครงสร้างของไอโซเมอร์แบบ partial-cone นั้นพีคโปรตอนของหมู่ดังกล่าวจะปรากฏเป็น doublet จำนวน 4 ชุด โดยที่ 2 ชุดแรกจะปรากฏที่ค่า δ ที่มีค่าแตกต่างกันมากคือที่ 3.05 และ 4.50 ppm ส่วนอีก 2 ชุดจะปรากฏที่ค่า δ ที่มีค่าแตกต่างกันน้อยคือที่ 3.85 และ 3.91 ppm ในขณะที่โครงสร้างของไอโซเมอร์แบบ 1,2-alternate พีคโปรตอนของหมู่ดังกล่าวจะปรากฏเป็นแบบ doublet จำนวน 2 ชุด และ singlet 1 ชุด โดยที่พีคที่มีลักษณะเป็น doublet นั้นจะมีค่า δ ที่แตกต่างกันมากคือที่ 3.23 และ 4.71 ppm ส่วนพีคที่เป็น singlet จะปรากฏที่ค่า δ 4.10 ppm สำหรับโครงสร้างของไอโซเมอร์แบบ 1,3-alternate พีคโปรตอนของเมทิลลีนทั้ง 4 หมู่จะปรากฏเป็นพีคเดี่ยวแบบ singlet ที่ค่า δ ประมาณ 4.00 ppm เนื่องจากไอโซเมอร์ดังกล่าวมีสมมาตรที่สูง จึงทำให้โปรตอนของหมู่เมทิลลีนอยู่ในสิ่งแวดล้อมเดียวกัน



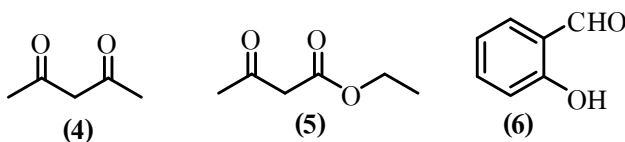
รูปที่ 2.4 เปรียบเทียบ ^1H -NMR สเปกตรัมโครงสร้างของ 5, 11, 17, 23-tetra-*tert*-butyl-25, 26, 27, 28-tetrakis-((ethoxycarbonyl)methoxy)calix[4]arene ที่มีไอโซเมอร์แบบ cone, partial cone, 1,2-alternate และ 1,3-alternate²⁴

2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

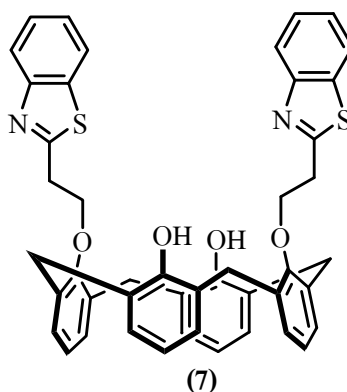
Diamond และคณะ⁶ ได้นำสารประกอบ *p-tert-butyl-calix[4]arene tetraethylester* (**2**) มาเตรียมเมมเบรนอิเล็กโทรดที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจวัด Na^+ โดยการนำไอโอโนฟอร์ดังกล่าวมาผสมกับ PVC และใช้ 2-nitrophenyloctyl ethyl (NPOE) เป็น plasticizer ซึ่งจากการทดลองพบว่าค่าขีดจำกัดของการตรวจวัด Na^+ อยู่ที่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



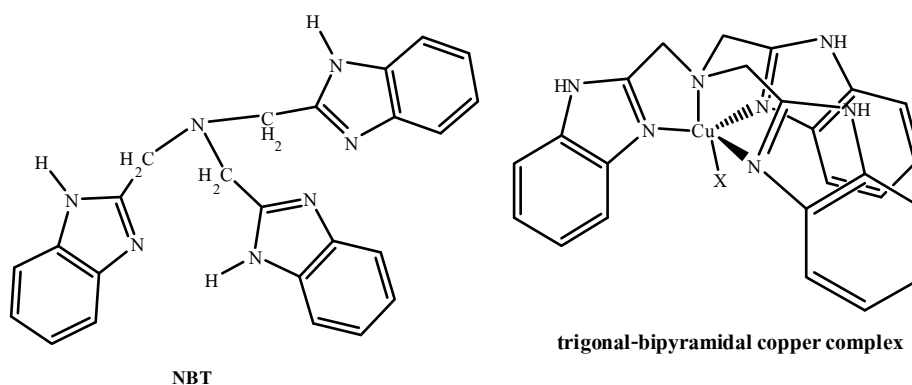
Gupta และคณะ²⁵ ได้นำลิแกนด์ 3 ชนิดที่มีค่าคงที่การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่สูงกับไอออนของ Cu^{2+} ซึ่งได้แก่ acetylacetone (4) ethylacetoacetate (5) และ salicylaldehyde (6) มาเป็นไอโอโนฟอร์และเตรียมเป็น PVC-เมมเบรนอิเล็กโทรดที่มีความจำเพาะเจาะจงกับไอออนของ Cu^{2+} โดยใช้ TBP เป็น plasticizer จากการศึกษาพบว่าไอโอโนฟอร์ที่ให้ผลการทดลองที่ดีที่สุดคือ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



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

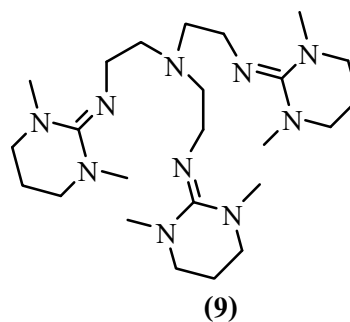
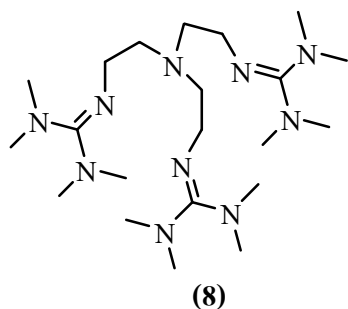


Anthony และคณะ²⁷ ได้สังเคราะห์และพิสูจน์โครงสร้างของสารประกอบโคออร์ดิเนชันของคอปเปอร์ (II) ซึ่งสารประกอบดังกล่าวเตรียมได้จากการทำปฏิกิริยากับลิแกนด์ tris(2-benzimidazolylmethyl)amine หรือ NTB และลิแกนด์ดังกล่าวมีโครงสร้างเป็นแบบไพรพอดจากการศึกษาพบว่าสารประกอบโคออร์ดิเนชันที่เกิดขึ้นทั้ง 5 ชนิดนั้นมีโครงสร้างอยู่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



รูปที่ 2.5 แสดงโครงสร้างของลิแกนด์ NTB และโครงสร้าง trigonal-bipyramidal copper complex กับ ลิแกนด์ NTB

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



บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์

1. Potentiostat (Methrom)

3.2 สารเคมี

Tetrahydrofuran	(Fluka)
Chloroform	(Fluka)
High molecular weight PVC	(Fluka)
o-nitrophenyl octyl ether	(Fluka)
potassium tetrakis(p-chlorophenyl)borate (KTPCIPB)	(Fluka)

3.2 การเตรียมเมมเบรนอิเล็กโทรดจากไอโอโนฟอว์ L1 และ L2

เตรียมอิเล็กโทรด โดยการละลายไอโอโนฟอว์ (10 มิลลิโมล/กิโลกรัม) ไอออนเอกเซนจ์เจอร์ NaTFPB หรือ KTPCIPB พลาสติกไซเซออร์ NPOE หรือ DOS (66 wt.%) และ PVC (33 wt.%) ใน THF (2 มิลลิลิตร) องค์ประกอบทุกส่วนจะผสมให้มีน้ำหนักรวมกันเป็น 220 มิลลิกรัม เทของผสมลงในแบบพิมพ์แก้วรูปวงกลม ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 มิลลิเมตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ตัวทำละลาย THF ระเหยออกไป ตัดเมมเบรนที่แห้งแล้วให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.5 มิลลิเมตร และแช่เมมเบรนที่ตัดออกมาในสารละลายเกลือไนเตรตของไอออนโลหะความเข้มข้น 10^{-2} โมลาร์ เป็นเวลา 1 คีน จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนที่ได้มาแช่ในสารละลายของแอนไอออนที่มีความเข้มข้นของแอนไอออนที่มีความเข้มข้น 10^{-2} โมลาร์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมงแล้วจึงนำไปประกอบเป็นอิเล็กโทรด

3.2 การวัดแรงเคลื่อนไฟฟ้า

นำเมมเบรนที่เตรียมได้มาวัดแรงเคลื่อนไฟฟ้า โดยวงจรการวัดแรงเคลื่อนไฟฟ้าแสดงดังแผนภาพ

Ag, AgCl/3 M KCl//1M LiOAc//sample solution/membrane/IFS/AgCl, Ag

อิเล็กโทรดอ้างอิงใช้เป็น Ag/AgCl double junction โดยใช้สารละลายลิเทียมอะซิเตต (LiOAc) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ เป็นสะพานเกลือ วัดแรงเคลื่อนไฟฟ้าที่อุณหภูมิห้องโดยใช้เครื่องโพเทนชิโอมิเตอร์ (Lawson Labs Inc.) ใช้สมการของ Debye-Hückel คำนวณแอกติวิตีของสารละลาย ขีดจำกัดของการตรวจวัดสามารถหาได้โดยอาศัยวิธีการที่อ้างอิงมาจาก IUPAC

3.3 การศึกษาผลของ pH ที่เหมาะสมในการตรวจวัดไอออนลบ SCN^-

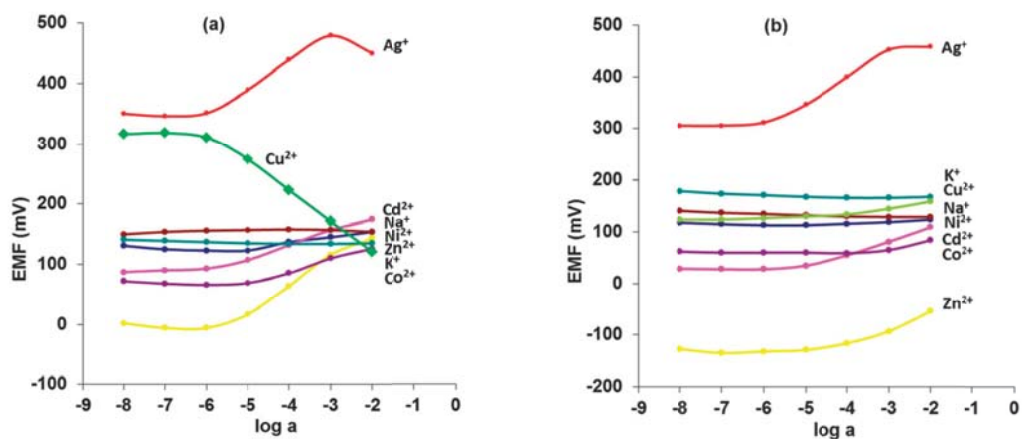
การศึกษาสภาวะ pH ที่เหมาะสมในการตรวจวัดไอออนลบ ทำโดยการตรวจวัดไอออนลบ SCN^- ในสารละลายที่มี pH อยู่ในช่วง 3 - 11 ปรับ pH ของสารละลายโดยใช้สารละลาย 2% HCl หรือ 0.01 – 0.1 M NaOH

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

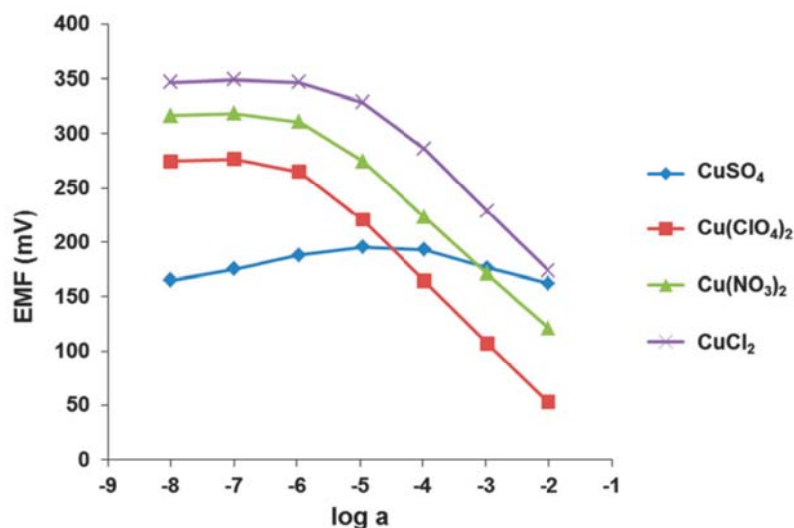
4.1 ความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดไอออนโลหะและไอออนลบชนิดต่าง ๆ

จากการศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดไอออนโลหะชนิดต่าง ๆ ของเมมเบรนอิเล็กโทรดที่เตรียมจากไอโอโนฟอร์ L1 และ L2 พบว่าเมมเบรนอิเล็กโทรดที่เตรียมจากไอโอโนฟอร์ L1 มีการตอบสนองต่อการตรวจวัดเป็นอย่างดีกับไอออน Ag^+ และ Cu^{2+} ในขณะที่เมมเบรนอิเล็กโทรดที่เตรียมจากไอโอโนฟอร์ L2 มีการตอบสนองต่อการตรวจวัดเป็นอย่างดีกับไอออน Ag^+ เพียงอย่างเดียว ดังแสดงในรูปที่ 4.1 นอกจากนี้เมื่อพิจารณาการตอบสนองของเมมเบรนอิเล็กโทรดที่เตรียมจากไอโอโนฟอร์ L1 พบว่าการตอบสนองต่อไอออน Ag^+ และ Cu^{2+} ให้ค่าศักย์ไฟฟ้าในทิศทางที่ตรงข้ามกัน โดยที่ไอออน Ag^+ ให้ค่าศักย์ไฟฟ้าที่เป็นบวก ในขณะที่ไอออน Cu^{2+} ให้ค่าศักย์ไฟฟ้าที่เป็นลบซึ่งเป็นผลมาจากการเกิด Donnan failure



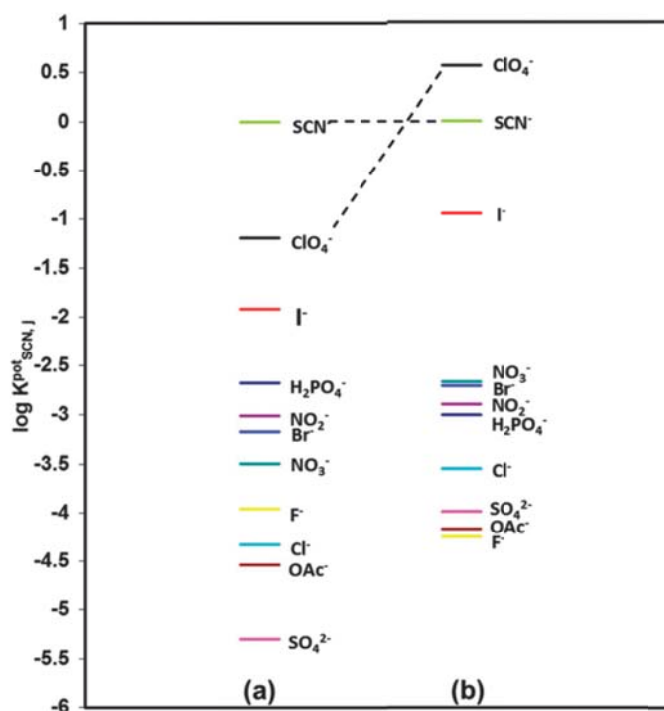
รูปที่ 4.1 การตอบสนองต่อไอออนโลหะชนิดต่าง ๆ ของเมมเบรนอิเล็กโทรดที่เตรียมจากไอโอโนฟอร์ (a) L1 และ (b) L2 ในสถานะที่มี KTpCIPB ความเข้มข้น 75 mol% เป็นองค์ประกอบ

เมื่อศึกษาการตอบสนองของเมมเบรนอิเล็กโทรดที่เตรียมจากไอโอโนฟอร์ **L1** ต่อเกลือชนิดต่าง ๆ ของไอออน Cu^{2+} พบว่าเกลือ $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ และ CuCl_2 ให้ค่า Nernstian slope มีค่าเป็นลบ ในขณะที่เกลือ CuSO_4 ให้ค่า Nernstian slope มีค่าเป็นบวก โดยเกลือ CuCl_2 ให้ค่า Nernstian slope มีค่าเป็นลบน้อยที่สุด

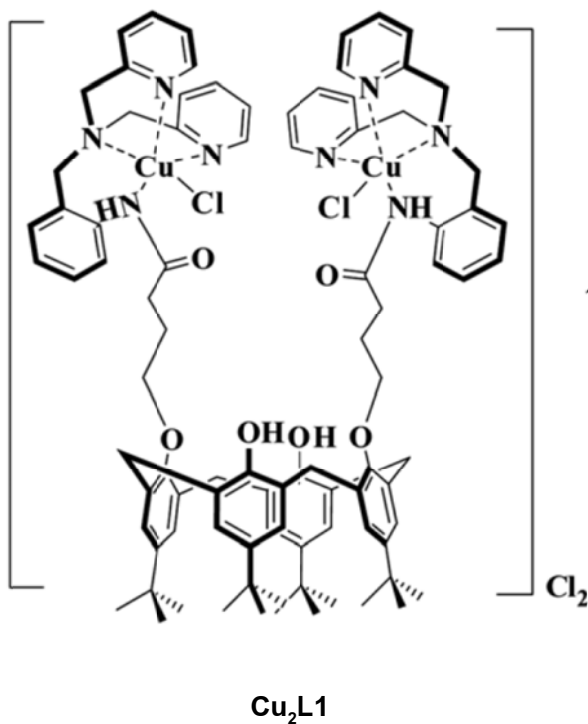


รูปที่ 4.2 การตอบสนองของเมมเบรนอิเล็กโทรดที่เตรียมจากไอโอโนฟอร์ **L1** ต่อเกลือของไอออน Cu^{2+} ชนิดต่าง ๆ ในสภาวะที่มี KTpCIPB ความเข้มข้น 75 mol% เป็นองค์ประกอบ

จากการศึกษาการตอบสนองของเมมเบรนอิเล็กโทรดต่อไอออนลบชนิดต่าง ๆ ของเมมเบรนอิเล็กโทรดที่เตรียมจากไอโอโนฟอร์ **L1** กับสารประกอบ CuCl_2 และสารประกอบโคออร์ดิเนชัน $\text{Cu}_2\text{L1}$ ดังแสดงในรูปที่ 4.3 นั้นพบว่าอิเล็กโทรดที่เตรียมจากไอโอโนฟอร์ **L1** กับสารประกอบ CuCl_2 มีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดไอออน SCN^- มากกว่าอิเล็กโทรดที่เตรียมจากสารประกอบโคออร์ดิเนชัน $\text{Cu}_2\text{L1}$

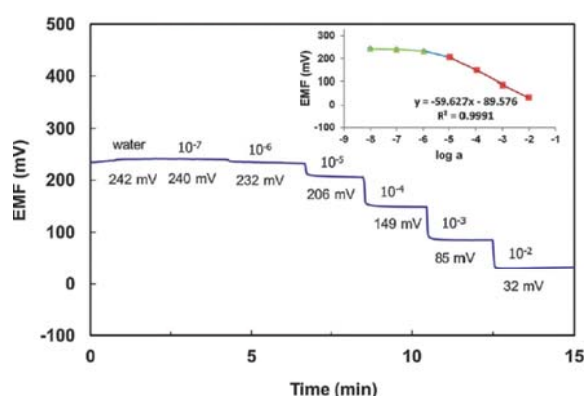


รูปที่ 4.3 การตอบสนองของเมมเบรนอิเล็กโทรดที่เตรียมจาก (a) ไอโอโนฟอร์ **L1** กับสารประกอบ CuCl₂ และ (b) สารประกอบโคออร์ดิเนชัน **Cu₂L1** ต่อไอออนลบชนิดต่าง ๆ ในสถานะที่มี KTpCIPB ความเข้มข้น 75 mol% เป็นองค์ประกอบ



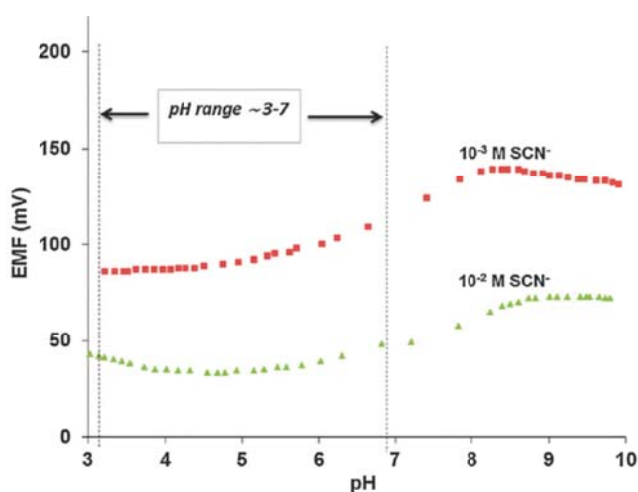
4.2 การศึกษาเวลาที่ใช้ในตอบสนอง ค่า pH ที่เหมาะสม และการนำมาใช้ซ้ำ สำหรับการตรวจวัดไอออนลบ SCN^- ของเมมเบรนอิเล็กโทรดที่เตรียมได้จากไอโอโนฟอร์ L1 กับสารประกอบ CuCl_2

จากการศึกษาเวลาที่ใช้ในตอบสนองการตรวจวัดไอออนลบ SCN^- ของเมมเบรนอิเล็กโทรดที่เตรียมได้จากไอโอโนฟอร์ L1 กับสารประกอบ CuCl_2 พบว่าอิเล็กโทรดที่เตรียมได้ดังกล่าวมีการตอบสนองต่อการตรวจวัดไอออนลบ SCN^- ได้อย่างรวดเร็วคือใช้เวลาเพียง 5 วินาที ดังแสดงในรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 เวลาที่ใช้ในตอบสนองการตรวจวัดไอออนลบ SCN^- ของเมมเบรนอิเล็กโทรดที่เตรียมได้จากไอโอโนฟอร์ L1 กับสารประกอบ CuCl_2 ในสภาวะที่มี KTpCIPB ความเข้มข้น 75 mol% เป็นองค์ประกอบ

จากการศึกษา pH ที่เหมาะสมในการตรวจวัดไอออนลบ SCN^- ของเมมเบรนอิเล็กโทรดที่เตรียมได้ พบว่าค่า pH ที่เหมาะสมมีค่าอยู่ในช่วง pH 3-7 ดังแสดงในรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 ผลของ pH ที่ใช้ในการตรวจวัดไอออนลบ SCN^- ของเมมเบรนอิเล็กโทรดที่เตรียมได้จากไอโอโนฟอร์ L1 กับสารประกอบ CuCl_2 ความเข้มข้นของ SCN^- ที่ใช้อยู่ในช่วง 10^{-3} - 10^{-2} M

การศึกษาการนำเมมเบรนอิเล็กโทรดที่เตรียมได้มาใช้ในการตรวจวัดไอออนลบ SCN^- ช้้นั้นพบว่า อิเล็กโทรดที่เตรียมได้สามารถนำมาใช้ในการตรวจวัดไอออนลบ SCN^- ช้้ได้ โดยให้ค่าศักย์ไฟฟ้าที่มีค่าคงที่ ดังแสดงในรูปที่ 4.6

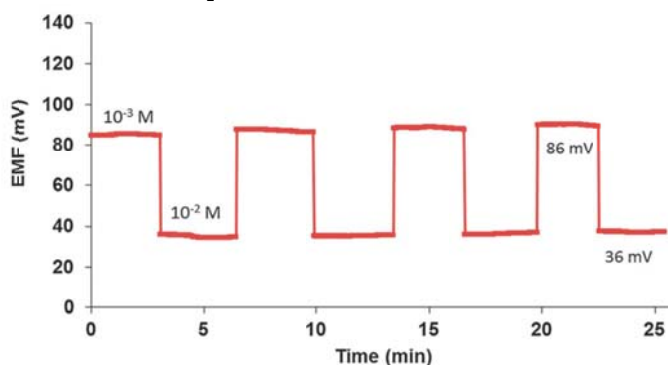
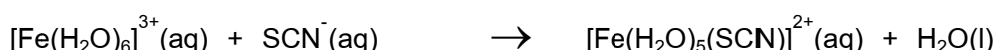


Fig. 7 Reversibility of the optimized thiocyanate-ISEs for 10^{-3} and 10^{-2} M of thiocyanate.

รูปที่ 4.6 การเมมเบรนอิเล็กโทรดที่เตรียมได้จากไอโอโนฟอร์ **L1** กับสารประกอบ CuCl_2 มาใช้ในการตรวจวัดไอออน SCN^- ช้้

4.3 การตรวจวัดไอออน Fe^{3+} ในสารละลาย

จากการศึกษาการนำเมมเบรนอิเล็กโทรดที่เตรียมได้จากไอโอโนฟอร์ **L1** กับสารประกอบ CuCl_2 มาใช้ในการตรวจวัดไอออน Fe^{3+} ในสารละลาย โดยอาศัยความสัมพันธ์จากสมการ



พบว่า การตรวจวัดไอออน Fe^{3+} มีค่าความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง $10^{-5} - 10^{-3}$ M ค่าการตรวจวัดไอออน Fe^{3+} แสดงได้ในตารางที่ 2

Table 2 Indirect determination of Fe^{3+} in $[\text{FeSCN}]^{2+}$ samples ($n = 3$) using the fabricated thiocyanate ion selective electrode

$[\text{SCN}^-]$ (M)	Fe^{3+} added ($\times 10^{-5}$ M)	Fe^{3+} found ($\times 10^{-5}$ M $\pm$ SD)	Recovery (% $\pm$ SD)	RSD (%)
10^{-2}	—	n.d.	—	—
	5.0	5.45 0.31	109 6	5.6
	10	9.09 0.50	91 5	5.5

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

เมื่อนำไอโอโนฟอร์ **L1** มาเตรียมเป็นเมมเบรนอิเล็กโทรดสำหรับการตรวจวัดไอออนโลหะนั้นพบว่าอิเล็กโทรดที่เตรียมได้มีการตอบสนองต่อการตรวจวัดไอออน Cu^{2+} โดยให้ค่าศักย์ไฟฟ้ามีค่าเป็นลบเมื่อมีไอออน Cu^{2+} อยู่ในระบบ เนื่องมาจากการเกิด Donnan failure ซึ่งเป็นผลมาจากไอออนลบที่อยู่ในสารละลายขณะทำการตรวจวัดไอออน Cu^{2+} ในขณะที่เมมเบรนอิเล็กโทรดที่เตรียมได้จากไอโอโนฟอร์ **L2** มีการตอบสนองต่อไอออนโลหะทุกชนิดโดยให้ค่าศักย์ไฟฟ้าที่เพิ่มขึ้นเมื่อมีไอออนโลหะชนิดต่าง ๆ อยู่ในระบบ เมื่อนำเมมเบรนอิเล็กโทรดที่เตรียมจากไอโอโนฟอร์ **L1** กับสารประกอบ CuCl_2 มาตรวจวัดไอออนลบชนิดต่าง ๆ พบว่าอิเล็กโทรดที่เตรียมได้มีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดไอออน SCN^- ได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้แล้วอิเล็กโทรดที่พัฒนาขึ้นมานี้ยังนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดไอออน Fe^{3+} ในสารละลายแบบทางอ้อมได้อีกด้วย

บรรณานุกรม

1. Suksai C.; Tuntulani, T. "Chromogenic Anion Sensors" *Chem. Soc. Rev.* **2003**, 32, 192-202.
2. Martinez-Manez, R.; Sancenon, F. "Fluorogenic and Chromogenic Chemosensors and Reagents for Anions" *Chem. Rev.* **2003**, 103, 4419-4476.
3. Suksai, C.; Tuntulani, T. "Chromogenic Anion Sensors" *Top. Curr. Chem.* **2005**, 255, 163-198.
4. Whittaker, M.; Floyd, C.D.; Brown, P.; Gearing A.J.H. "Design and Therapeutic Application of Matrix Metalloproteinase Inhibitors" *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2735-2776.
5. Babine, R.E.; Bender, S. L. "Molecular Recognition of Protein-Ligand Complexes: Applications to Drug Design" *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1359-1472.
6. Bühlmann, P.; Pretsch, E.; Bakker, E. "Carrier-Based Ion-Selective Electrodes and Bulk Optodes. 2. Ionophores for Potentiometric and Optical Sensors" *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1593-1687.
7. Cadogan, A. M.; Diamond, D.; Smyth, M. R.; Deasy, M.; McKervey, M. A.; Harris, S. J. "Sodium-Selective Polymeric Membrane Electrodes Based on Calix[4]arene Ionophores" *Analyst* **1989**, 114, 1551-1554.
8. Pioda, L. A. R.; Stankova, V.; Simon, W. "Highly Selective Potassium Ion Responsive Liquid-Membrane Electrode" *Anal. Lett.* **1969**, 2, 665-674.
9. Frant, M. S. "Where Did Ion Selective Electrodes Come From? The Story of Their Development and Commercialization" *J. Chem. Educ.* **1997**, 74, 159-167.
10. Pioda, L. A. R.; Wachter, H. A.; Dohner, R. E.; Simon, W. "Komplexe von Nonactin und Monactin mit Natrium-, Kalium-und Ammonium-Ionen" *Helv. Chim. Acta* **1967**, 50, 1373.
11. Shamsipur, M.; Javanbakht, M.; Mousavi, M. F.; Ganjali, M. R.; Lippolis, V.; Garau, A.; Tei, L. "Copper(II)-Selective Membrane Electrodes Based on Some Recently Synthesized Mixed Aza-Thioether Crowns Containing a 1,10-Phenanthroline Sub-Unit" *Talanta* **2001**, 55, 1047-1054.

12. Stevens, A. C.; Freiser, H. "Coated-Wire Cadmium Ion-Selective Electrode Based on the Bidentate Neutral Carrier 4,4'-di(5-nonyl)-2,2'-bipyridine" *Anal. Chim. Acta* **1991**, 248, 315-321.
13. Shamsipur, M.; Ershad, S.; Samadi, N.; Rezvani, A. R.; Haddadzadeh, H. "The First Use of a Rh(III) Complex as a Novel Ionophore for Thiocyanate-Selective Polymeric Membrane Electrodes" *Talanta* 2005, **65**, 991-997.
14. Ardakani, M. M.; Salavati-Niassari, M.; Sadeghi, A. "Novel Selective Thiocyanate PVC Membrane Electrode Based on New Schiff Base Complex of 2,2-[(1,3-Dimethyl-1,3-Propanediylidene)dibitrilo]bis-Benzenethiolato Cadmium(II)" *New. J. Chem.* **2004**, 28, 595-599.
15. Oesch, U.; Simon, W. "Lifetime of Neutral Carrier Based Ion-Selective Liquid-Membrane Electrodes" *Anal. Chem.* **1980**, 52, 692-700.
16. Oesch, U.; Simon, W. "Kinetic Study of the Distribution of Electrically Neutral Ionophores between a Solvent Polymeric Membrane and an Aqueous Phase" *Helv. Chim. Acta* **1979**, 62, 754-759.
17. Dinten, O.; Spichiger, U. E.; Chianiotakis, N.; Ghering, P.; Rusterholz, B.; Morf, W. E.; Simon, W. "Lifetime of Neutral-Carrier-Based Liquid Membranes in Aqueous Samples and Blood and the Lipophilicity of Membrane Components" *Anal. Chem.* **1991**, 63, 596-603.
18. G. Naresh Patwari, G. N.; Lisy, J. M. "Cyclohexane as a Li^+ Selective Ionophore" *J. Phys. Chem. A*, **2007**, 111, 7585-7588.
19. Seguí, M. J.; Lizondo-Sabater, J.; Martínez-Máñez, R.; Pardo, T.; Sancenón, F.; Soto, J. "Ion-Selective Electrodes for Anionic Surfactants Using a New Aza-Oxa-Cycloalkane as Active Ionophore" *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 525, 83-90.
20. Raut, D. R.; Mohapatra, P.K.; Ansari, S.A.; Manchanda, V. K. "Evaluation of a Calix[4]-bis-crown-6 Ionophore-Based Supported Liquid Membrane System for Selective ^{137}Cs Transport from Acidic Solutions" *J. Membr. Sci.* **2008**, 310, 229-236.
21. Zhang, X.; Ju, H.; Wang, J. *Electrochemical Sensors Biosensors and Their Biomedical Applications*. 1st ed. 2008, Elsevier, USA.
22. X-ray Crystallography. (2553). ใน *bloggang*. วันที่ค้นข้อมูล 22 กุมภาพันธ์ 2553, เข้าถึงได้ <http://www.bloggang.com/viewdiary.php?id=hostclub&month=09-2008 &date=08&group=4&gblog=1>

23. Carlos, J.; Javier de, M.; Pilar P.; Pedro M. N.; Concha S. ^{13}C NMR Chemical Shifts. A Single Rule To Determine the Conformation of Calix[4]arenes. *Journal of Organic Chemistry*, **1991**, 56, 3372-3376.
24. Koji, I.; Seiji S. Syntheses and Ion Selectivity of All Conformational Isomers of Tetrakis((*tert*-butoxycarbonyl)methyl)calix[4]arene. *Journal of Organic Chemistry*, **1992**, 57, 7066-7073.
25. Jain, A. K.; Gupta, V. K.; Singh, L. P.; Raison, J.R. Chelating Ionophore Based Membrane Sensors for Copper (II) Ions. *Talanta*, **2005**, 66, 1355-1361.
26. Ngeontae, W.; Janrungroatsakul, W.; Morakot, N.; Aeungmaitrepirom, W.; Tuntulani, T.* "New Silver Selective Electrode Fabricated From Benzothiazole Calix[4]arene: Speciation Analysis of Silver Nanoparticles" *Sens. Actuators B* **2008**, 134, 377-385.
27. Anthony, W. A.; Hugo, M. J. H.; Jan R.; Laurence K. T. Copper Complexes of the "Tripod" Ligand Tris(2-benzimidazolylmethyl)amine: Five and Six-Coordinate Copper(II) Derivatives and Some Copper(I) Derivatives. *Inorganic Chemistry*, **1981**, 20, 103-110.
28. Volker R.; Jennifer K.; Olaf B.; Jorg S. Copper Complexes of Novel Superbasic Peralkylguanidine Derivatives of Tris(2-aminoethyl)amine as Constraint Geometry Ligands. *Inorganic Chemistry*, **2001**, 40, 6964-6971.
29. Khamjumphol, U.; Watchasit, S.; Suksai, C.; Janrungroatsakul, W., Boonchiangma, S.; Tuntulani, T.; Ngeontae, W. New polymeric membrane cadmium(II)-selective electrodes using tripodal amine based ionophores. *Analytica Chimica Acta*, **2011**, 704, 83-86.

PAPER

Intriguing sensing properties of a di-tripodal amine calix[4]arene ionophore towards anions from Donnan failure in ion-selective membranes induced by Cu^{2+} †

Cite this: *New J. Chem.*, 2013, **37**, 4010

Phetlada Kunthadee,^a Sarayut Watchasit,^a Arpadsara Kaowliw,^b Chomchai Suksai,^{*b} Wanlapa Wongsan,^a Wittaya Ngeontae,^c Orawon Chailapakul,^a Wanlapa Aeungmaitrepirom^a and Thawatchai Tuntulani^{*a}

In this paper, di-tripodal amine calix[4]arene, **L1**, was successfully synthesized and used as an ion carrier in poly(vinyl chloride) (PVC) membrane electrodes. Compound **L1** was employed to demonstrate a new concept in anion sensing by preparing an allosteric PVC membrane that can respond selectively to a certain anion in the presence of a metal effector. Membranes containing compounds **L1** and potassium tetrakis(*p*-chlorophenyl)borate (KTPClPB) as an ionic additive showed Donnan exclusion failure upon measuring the potential (EMF) responses of Cu^{2+} and responded to the co-anion by giving negative EMF changes, while membranes containing compound **L2**, an anthracene-based mono-tripodal amine ligand, gave positive potentials to most metal ions. Upon preconditioning of the membranes containing **L1** and 75 mol% KTPClPB in CuCl_2 , the membranes showed the highest selectivity towards thiocyanate with a near Nernstian slope of $-59.6 \text{ mV decade}^{-1}$, a 10^{-5} to 10^{-2} M linear range, and a detection limit of $4.4 \times 10^{-6} \text{ M}$. The best allosteric membrane can be used in the pH range 3–7 with good reversibility, and also applied to indirectly determine the concentration of Fe^{3+} in aqueous solution.

Received (in Montpellier, France)
7th July 2013,
Accepted 27th August 2013

DOI: 10.1039/c3nj00748k

www.rsc.org/njc

Introduction

Allosteric, the term used in biochemistry, can be described as the regulation of an enzyme or a protein by binding an effector molecule at the protein's allosteric site. The enhancement or decrease in the enzyme activity results from either structural or charge changes in the allosteric site caused by the effector. The development of supramolecular host–guest chemistry leads to the design of allosteric receptors in which upon interacting with the guest (similar to an effector in biochemistry) can either enhance or decrease the binding or catalytic efficiency of the molecule.¹ Most recently, several examples of allosteric supramolecular receptors for metal ions and various organic guest molecules have been reported.² Recently, our group has reported

the heteroditopic ion receptors displaying the allosteric behavior of the enhanced binding of anions in the presence of alkali metal ions.^{3,4} We also developed the allosteric polymeric membrane ion selective electrode using phenylboronic acid as an allosteric site and fluoride as an effector.⁵ This allosteric membrane electrode can function as a potentiometric sensor for Na^+ and a impedimetric sensor for F^- .

It is well-known that the potentiometric selectivity of poly(vinyl chloride) or PVC membranes correlates with their transport selectivity and also the extraction selectivity. One of the most important components in a polymeric membrane electrode is the ion carrier or ionophore.⁶ Neutral ionophores can be used in either cation-selective electrodes or anion-selective electrodes. In addition, charged ionophores can be used in anion-selective electrodes.^{6,7} Another important component in polymeric membrane electrodes is the ionic additive. Normally, cation-selective membranes with neutral ionophores are composed of anionic additives such as potassium tetrakis(*p*-chlorophenyl)borate (KTPClPB), while anion-selective membranes compose of either cationic additives such as tri-dodecylmethylammonium chloride (TDMACl) or anionic additives.⁶ The anionic site functions as a counter balance negative charge for metal ions passing through the membrane and limits the co-anions entering the membrane. If the ligand employed binds to the metal ion too tightly, the co-extraction of co-anions

^a Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand. E-mail: tthawatc@chula.ac.th; Fax: +66 2 2187598; Tel: +66 2 2187643

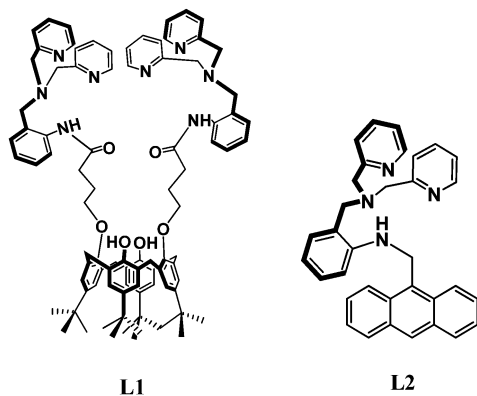
^b Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand. E-mail: jomjai@buu.ac.th

^c Materials Chemistry Research Unit, Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

† Electronic supplementary information (ESI) available: ¹H and ¹³C-NMR spectra of compounds **a**, **b**, and ligand **L1**. See DOI: 10.1039/c3nj00748k

increases and leads to a breakdown of the permselectivity of the membrane and a phenomenon called “Donnan exclusion failure”.^{6,8} Lindner and coworkers found that pH-sensitive membrane electrodes from an aminated-PVC-based membrane showed Donnan exclusion failure in low pH bathing solutions.⁹ The Donnan failure produces fixed positive sites that could be used as an ideal anion sensor.

Due to the high lipophilicity of calix[4]arene, several calix[4]arene derivatives, both neutral and charged including their metal complexes, have been found to be selective ionophores towards a variety of anions such as chloride, perchlorate, and thiocyanate.^{10–15} Herein, we report the synthesis of a di-tripodal amine derivative of calix[4]arene (**L1**) as an ionophore to prepare anion-selective electrodes. Tripodal amine ligands form very stable complexes with Cu^{2+} ions in trigonal bipyramidal geometry.^{16–18} We employed the Donnan failure in a polymeric membrane electrode prepared from **L1** and an anionic additive, potassium tetrakis(*p*-chlorophenyl)borate (KTPClPB) to fabricate an allosteric anion selective electrode using Cu^{2+} as an effector. When the prepared membrane surface interacts with metal ions such as Cu^{2+} in the solution, the Cu^{2+} enters the membrane phase and forms a complex with **L1** with high stability. The membrane then has an imbalance of positive charges and loses its permselectivity toward the metal ions and extracts co-anion species into the membrane phase. To emphasize the importance of di-tripodal amine units in **L1**, the potential response of **L2**, the anthracene-based ligand possessing only one tripodal amine unit, towards metal ions was also studied. In addition, the characteristics of the anion selective electrodes prepared from **L1**, such as response slope, linear range, selectivity coefficients and limit of detection are studied thoroughly, and the application of the fabricated electrode to indirectly detect Fe^{3+} in aqueous solution is demonstrated.



Structures of **L1** and **L2**

Experimental

Reagents

Anthracene-based tripodal amine (**L2**) and tripodal amine (**d**) were synthesized according to the previously published procedures.^{19,20}

Tetrahydrofuran (THF), chloroform (CHCl_3), high molecular weight poly(vinyl chloride) (PVC), *o*-nitrophenyl octyl ether (*o*-NPOE) and potassium tetrakis(*p*-chlorophenyl)borate (KTPClPB) were purchased from Fluka. Potassium and sodium salts of the anions were of analytical grade obtained from BDH, Fluka, Carlo Erba, and Merck. All solutions were prepared with ultra-pure water from Milli-Q (Bedford, MA, USA) water purification system (Millipore).

Synthesis of compound **L1** and complex **Cu₂L1**

Diethyl ester calix[4]arene (a). A mixture of *p*-*tert*-butylcalix[4]arene (10.0 g, 15.4 mmol), K_2CO_3 (21.3 g, 154 mmol) and ethyl 4-bromobutyrate (88.2 ml, 0.616 mol) in 100 mL of acetone was refluxed for 24 h. After evaporation of the solvent under vacuum, the residue was dissolved in CH_2Cl_2 and washed with 1 M HCl (3×100 mL) and brine (3×100 mL). The organic phase was dried over anhydrous MgSO_4 and concentrated *in vacuo*. The crude product was subjected to chromatography on a silica gel column, using petroleum hexane/dichloromethane (50:50, v/v) as eluent, to give a white powder of compound **a** (10.5 g, 78%). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 7.77 (d, 2H, Ar-OH), 7.09 (s, 4H, ArH), 6.90 (s, 4H, ArH), 4.31 (d, 4H, $J = 13.2$ Hz, Ar- CH_2 -Ar), 4.20 (q, 4H, $J = 14.4$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 4.09 (t, 4H, $J = 6$ Hz, $-\text{CH}_3$), 3.39 (d, 4H, $J = 13.2$ Hz, Ar- CH_2 -Ar), 2.91 (t, 4H, $J = 7.2$ Hz, $-\text{CH}_2-$), 2.36 (t, 4H, $J = 6.8$ Hz, $-\text{CH}_2-$), 1.32 (s, 18H, *p*-*tert*-butyl), 1.29 (t, 6H, $J = 7.2$ Hz, $-\text{CH}_3$), 1.06 (s, 18H, *p*-*tert*-butyl). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 173.47, 150.78, 149.61, 147.01, 141.47, 132.76, 132.72, 127.71, 127.67, 125.61, 125.13, 75.15, 60.40, 34.01, 33.84, 31.85, 31.73, 31.08, 30.77, 25.50, 14.26.

Diacid calix[4]arene (b). A mixture of diethyl ester calix[4]arene, **a**, (10.0 g, 11.4 mmol) and 15% w/v sodium hydroxide in ethanol (500 mL) was stirred and heated at reflux for 24 h and the reaction mixture was then evaporated under reduced pressure to yield a white residue. Cold water (300 mL) was then added to the residue, and the pH was adjusted to 1 using 3 M hydrochloric acid. The solid was filtered and washed with water to obtain compound **b** as a white solid (1.87 g, 20%). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 7.08 (s, 4H, ArH), 6.77 (s, 4H, ArH), 4.30 (d, 4H, $J = 12.8$ Hz, Ar- CH_2 -Ar), 3.94 (t, 4H, $J = 5.2$ Hz, $-\text{CH}_2-$), 3.34 (d, 4H, $J = 13.2$ Hz, $-\text{CH}_2-$), 2.87 (t, 4H, $J = 7.2$ Hz, $-\text{CH}_2-$), 2.34 (t, 4H, $J = 6.0$ Hz, $-\text{CH}_2-$), 1.31 (s, 18H, *p*-*tert*-butyl), 0.97 (s, 18H, *p*-*tert*-butyl). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 179.92, 150.68, 149.69, 147.03, 132.74, 127.67, 125.58, 125.20, 74.87, 34.01, 33.84, 32.11, 30.65, 25.44.

Diacid chloride calix[4]arene (c). To dry toluene (150 mL), diacid calix[4]arene, **b**, (0.985 g, 1.20 mmol) and SOCl_2 (0.3 mL) were added and refluxed under nitrogen for 4 hours. The solvent and residual SOCl_2 were removed under reduced pressure. Diacid chloride calix[4]arene **c** was obtained as an off-white solid and was used immediately for the preparation of ligand **L1**.

Ligand **L1.** A solution of tripodal amine, **d**, (1.10 g, 3.60 mmol) and Et_3N (0.5 mL, 3.60 mmol) was stirred in dry CH_2Cl_2 (100 mL) under nitrogen. Diacid chloride calix[4]arene (**c**) in dry CH_2Cl_2 (50 mL) was added dropwise to the reaction mixture. A white

precipitate was formed and stirring was continued for 72 hours at room temperature. The white solid was filtered, and the filtrate was concentrated to dryness. The crude solid was dissolved in CH_2Cl_2 (100 mL), washed with water (3×100 mL) and then with brine (3×100 mL). The organic layer was dried with anhydrous MgSO_4 . The filtrate was concentrated to dryness. The crude product was subjected to chromatography on a silica gel column using 2% MeOH in CH_2Cl_2 as eluent to give a white solid of **L1** (0.251 g, 15%). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 10.75 (s, 2H, -OH), 8.55 (d, 4H, $J = 0.8$ Hz, ArH), 8.33 (d, 2H, $J = 8$ Hz, ArH), 7.52 (m, 4H, ArH), 7.42 (s, 2H, -NH), 7.23 (d, 6H, $J = 7.6$ Hz, ArH), 7.15 (d, 2H, $J = 7.2$ Hz, ArH), 7.05 (m, 8H, ArH), 6.99 (m, 2H, ArH), 6.79 (s, 4H, ArH), 4.35 (d, 4H, $J = 12.8$ Hz, Ar- CH_2 -Ar), 4.10 (t, 4H, $J = 6.4$ Hz, $-\text{CH}_2-$), 3.76 (s, 12H, $-\text{CH}_2-$), 3.33 (d, 4H, $J = 12.8$ Hz, $-\text{CH}_2-$), 2.93 (t, 4H, $J = 7.2$ Hz, $-\text{CH}_2-$), 2.44 (t, 4H, $J = 6.8$ Hz, $-\text{CH}_2-$), 1.31 (s, 18H, *p*-*tert*-butyl), 0.97 (s, 18H, *p*-*tert*-butyl). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 171.32, 158.20, 150.66, 150.00, 149.22, 146.76, 141.47, 138.63, 136.51, 132.50, 130.48, 128.33, 127.94, 126.11, 125.50, 125.13, 123.48, 123.11, 122.28, 121.33, 76.20, 59.78, 58.15, 33.92, 33.84, 33.80, 31.81, 31.75, 31.04, 25.99. Elemental analysis calculated for $\text{C}_{90}\text{H}_{104}\text{N}_8\text{O}_6 \cdot 2\text{CH}_3\text{OH}$: C, 75.79; H, 7.74; N, 7.69; found: C, 76.13; H, 8.27; N, 7.52. ESI MS (positive mode, m/z): [**L1** + Na] $^+$ calcd for $\text{C}_{90}\text{H}_{104}\text{N}_8\text{NaO}_6$, 1415.80; found, 1416.79.

Complex $\text{Cu}_2\text{L1}$. The methanolic solution of $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (46.0 mg, 0.27 mmol) was added to the methanolic suspension of **L1** (125 mg, 0.09 mmol), the color of solution changed to blue immediately. After the blue solution was left to stand at room temperature for 24 hours, the blue solid that precipitated was filtered and washed with MeOH to yield complex $\text{Cu}_2\text{L1}$ (86.8 mg, 58%). Elemental analysis calculated for $\text{C}_{90}\text{H}_{104}\text{Cl}_4 \cdot \text{Cu}_2\text{N}_8\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: C, 62.31; H, 6.51; N, 6.46; found: C, 62.07; H, 6.12; N, 6.60. HRMS-ESI (positive mode, m/z): [$\text{Cu}_2\text{L1} - \text{Cl}$] $^+$ calculated for $\text{C}_{90}\text{H}_{104}\text{Cl}_3\text{Cu}_2\text{N}_8\text{O}_6$, 1623.5736; found, 1623.5339.

Membrane preparation

Polymeric membranes prepared for ISE measurements consisted of ion carriers (10 mmol kg^{-1}), various amounts of ion exchangers (25, 50, and 75 mol% relative to the ionophore), and PVC: *o*-NPOE plasticizer (1:2 w/w), with a total amount of 220 mg. All components were dissolved and stirred in 2.5 mL of THF for an hour, except compound **L1**, which was dissolved in a small volume of chloroform before mixing with the solution of other components in THF, giving a transparent homogeneous pale-blue cocktail solution. In the case of complex $\text{Cu}_2\text{L1}$, it could be dissolved together with other components in THF. The resulting clear mixture was then cast in a 30 mm-i.d. glass ring fixed on a glass plate. The solvent was allowed to slowly evaporate overnight at room temperature to give a transparent membrane (~ 0.2 – 0.3 mm thickness). The membrane was punched into 7.5 mm-i.d. discs and preconditioned before the measurements. To examine the cation response, the membrane was bathed overnight in 10^{-2} M of metal nitrate solution, whereas the membrane was bathed in 10^{-2} M of Cu(II) solution overnight, followed with 10^{-2} M of the primary anion for 3 hours for investigating the anion response.

Potential (EMF) measurements

The preconditioned membrane was attached to an electrode body. The inner filling solutions (IFS) used for measuring the membrane response towards metal cations were 10^{-2} M of metal chlorides (for example, to examine Cu(II) salts, the solution of CuCl_2 (10^{-2} M) was used as an inner filling solution). For EMF measurements of the anion-selective electrodes, a mixed solution of the primary anion (10^{-2} M) and NaCl (10^{-3} M) was employed as an inner filling solution in order to keep the internal potential constant. The potentials that arose between the polymer membrane and aqueous sample solution were measured at ambient temperature with the following galvanic cell:

Ag, AgCl/3 M KCl//1 M LiOAc/sample solution/membrane/inner filling solution (IFS)/AgCl, Ag.

The reference electrode Ag/AgCl with a double junction was used (type 6.0726.100, Metrohm AG, CH-9010 Herisau, Switzerland) with 1 M LiOAc as the salt bridge electrolyte. Continuous potential measurements were carried out with a 16-channel electrode monitor (Lawson Labs Inc., Malvern, PA 19355, USA) in a stirred solution in the concentration range from 10^{-7} M to 10^{-2} M of analyte ions. The activity coefficients of the anions in aqueous solution were calculated according to the Debye–Hückel approximation²¹ and then the calibration curve plotted between EMF values and logarithm of ion activities was obtained.

Selectivity measurements

The selectivity of the proposed electrode towards primary ions (*i*) with respect to other interfering anions (*j*) was considered from the potentiometric selectivity coefficient ($\log K_{i,j}^{\text{pot}}$) that describes the ability of an ion-selective electrode to distinguish a particular ion from others.⁸ In this study, the so-called separate solution method (SSM) was used to determine the selectivity coefficients of the ISEs as recommended by the IUPAC.^{8,22} In SSM, the potentiometric responses were measured in two separate solutions, one containing interfering anions (*j*) at the concentration range from 10^{-7} to 10^{-2} M, followed by the other containing primary anions (*i*) at the same concentration range. The selectivity coefficient, $\log K_{i,j}^{\text{pot}}$, is then calculated from the two observed EMF values as illustrated in eqn (1).^{8,22} In the experiments, the membrane containing **L1** and 75 mol% KTpClPB was preconditioned in 10^{-2} M solutions of different Cu(II) salts, while the membrane containing $\text{Cu}_2\text{L1}$ and 25 mol% KTpClPB was preconditioned in the solution of the interfering anions (sodium or potassium salt, 10^{-2} M) overnight. The mixed solution of the same interfering anion (10^{-2} M) and NaCl (10^{-3} M) was used as an inner filling solution throughout the experiments.

$$\log K_{i,j}^{\text{pot}} = \frac{Z_i F \{E(j) - E(i)\}}{2.303 RT} + \log \left[a_i(i) / a_j(j)^{z_i/z_j} \right] \quad (1)$$

Impedance spectroscopy

A conventional three-electrode cell was used in the EIS studies: the allosteric ISE as the working electrode, a Ag/AgCl reference

electrode, and a platinum counter electrode. All experiments were conducted at room temperature. The membranes containing **L1** and 75 mol% KTpClPB were conditioned in 10^{-2} M CuCl_2 , $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ and $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ overnight, followed with 10^{-2} M KSCN for 3 hours, then using 10^{-2} M KSCN as the inner and outer electrolyte solution. Impedance measurements were carried out using a potentiostat/galvanostat instrument (Autolab PG STAT 30, Eco Chemie B.V., Utrecht, Netherlands) monitored by Frequency Response Analyser. The spectra were recorded within a frequency range 95–45 KHz with an AC voltage amplitude of 0.01 V. The impedance data were analyzed using the fitting program available in the Autolab software.

Effect of pH on membrane potentials

In order to explore the working pH range of the optimized anion-selective electrodes that still exhibited a constant and stable EMF signal, the experiments were carried out simultaneously over the pH range of 3.0–11.0 using thiocyanate concentrations of 10^{-3} and 10^{-2} M. The pH was adjusted by introducing small drops of 2% HCl followed by 0.01–0.10 M NaOH.

Membrane reversibility

The reversibility of the electrode represents the precision of the detection. The EMF signals should be restored and stable at the same concentration of the analyte ion in every measuring cycle. In the experiments, the optimized thiocyanate electrode was used to measure the EMF values of two different concentrations of thiocyanate alternatively. The potential of the optimized ISE was first recorded in a 10^{-3} M thiocyanate solution. Then, the electrode was rinsed and immersed in a 10^{-2} M thiocyanate solution, and the potential was measured continually. The measuring cycle was repeated four times to confirm the reversibility of such an electrode.

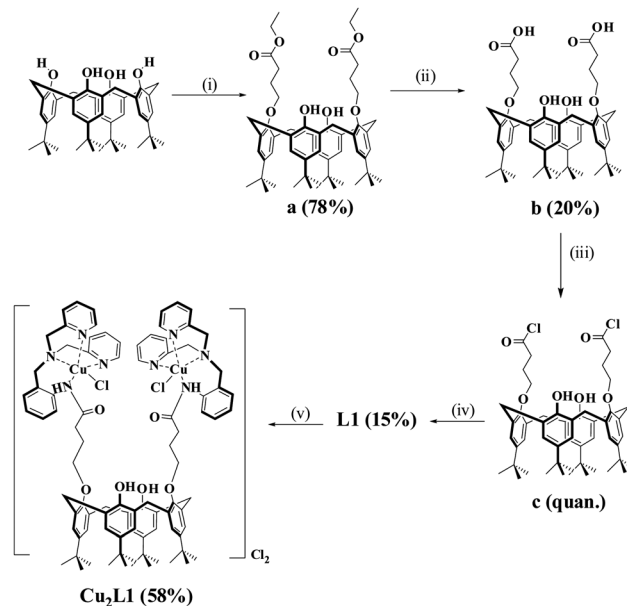
Measurements of Fe^{3+} in aqueous solution

The optimized thiocyanate-ISE was employed for indirectly determining the concentration of $\text{Fe}(\text{III})$ in the $[\text{FeSCN}]^{2+}$ samples. The standard calibration curve of the mixed solution between 10^{-2} M SCN^- and different concentrations of Fe^{3+} was established by recording their EMFs. Subsequently, the samples prepared by spiking Fe^{3+} into the controlled SCN^- solutions, to have the concentrations of 5.0×10^{-5} and 1.0×10^{-4} M, were examined. From the resulting EMF data, the concentrations of Fe^{3+} in the spiked samples were calculated and the percentage recoveries were then obtained.

Results and discussion

Synthesis of compound **L1**

The receptor molecule, **L1**, was synthesized in four steps starting from *p*-tert-butyl calix[4]arene as shown in Scheme 1. A reaction of *p*-tert-butyl calix[4]arene with 4 equiv. of ethyl 4-bromobutyrate in the presence of K_2CO_3 in acetone yields compound **a**, the diethyl ester derivative, in 78% yield. Upon addition of 15% w/v NaOH into the solution of compound **a**, the diacid derivative (**b**) was obtained in 20% yield. The diacid



Scheme 1 Synthetic route to **L1** and **Cu₂L1**. Reagents and conditions: (i) ethyl 4-bromobutyrate, K_2CO_3 , acetone, reflux; (ii) 15% w/v NaOH in EtOH, reflux; (iii) SOCl_2 , toluene, reflux; (iv) tripodal amine **d**, NEt_3 , CH_2Cl_2 , RT, N_2 ; (v) $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, MeOH, RT.

chloride derivative (**c**) was synthesized by reacting the diacid derivative (**b**) with SOCl_2 , followed by coupling with tripodal amine (**d**) to yield **L1** in 15% yield. The methylenic protons of the methylene bridge, $\text{Ar}-\text{CH}_2-\text{Ar}$, exhibited two doublet peaks with an AB pattern at 3.31 and 4.33 ppm with geminal coupling constants of 12.8 Hz, indicating the cone conformation of the calix[4]arene compartment. The sharp singlet peak at 10.75 ppm belonged to two $-\text{NH}-$ amide protons. The ESI (positive mode) MS spectrum featured a molecular ion of **L1** at $m/z = 1416.79$, corresponding to $[\text{L1} + \text{Na}^+]$. The addition of CuCl_2 in CH_3OH to the methanolic suspension of **L1** gave a blue solution, which was then left at room temperature for 24 hours. The blue solid of the **Cu₂L1** complex was obtained in 58% yield. The HRMS-ESI spectrum of **Cu₂L1** showed the parent peak at $m/z = 1623.5339$, which was designated to the molecular ion of the dinuclear complex $[\text{Cu}_2\text{L1} - \text{Cl}]^+$. The elemental analysis results also agreed with the chemical formula of **Cu₂L1**·4H₂O.

Membrane preparation and potentiometric responses to metal ions and anions

The polymeric membranes were prepared by controlling the ratio of PVC:*o*-NPOE plasticizer at 1:2 by weight, and the concentration of ion carriers (ionophores) at ca. 10 mmol kg^{-1} . In addition, potassium tetrakis(*p*-chlorophenyl)borate (KTPClPB), (25, 50 and 75 mol% compared to the mole of the ionophore) was added to the membrane composition. The properties of compounds **L1** and **L2** as ion carriers in PVC membranes were evaluated by measuring their potentiometric responses towards various metal ions. The EMF responses of the membranes containing compounds **L1** and **L2** are shown in Fig. 1. Both membranes were fabricated from **L1** and **L2** and responded to

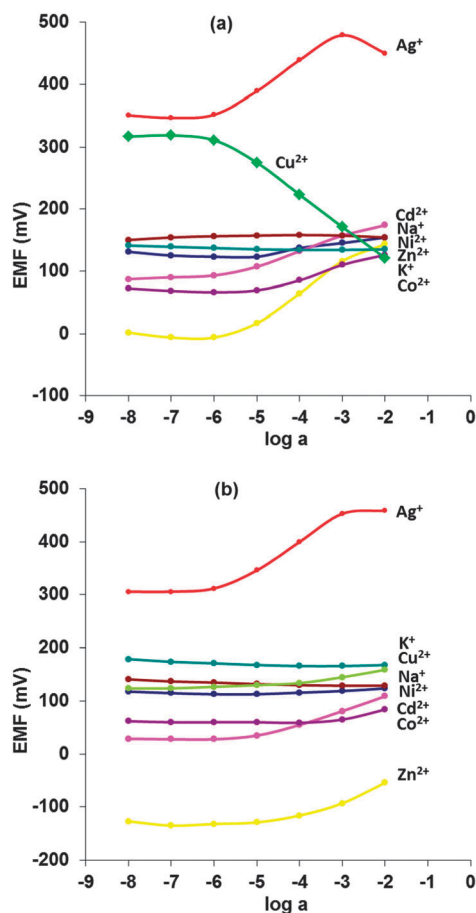


Fig. 1 Potentiometric cation responses of the membranes containing **L1** (a) and **L2** (b) in the presence of 75 mol% of the anionic additive (KTpClPB).

most cations, giving positive EMF responses. The most interesting thing is that the membrane containing **L1** responds negatively to Cu²⁺ at concentrations from 10⁻⁷ to 10⁻² M. This behavior can be described as Donnan exclusion failure. When Cu²⁺ enters the membrane phase, it forms a very stable complex with **L1**. Since **L1** has two units of the tripodal amine receptor, the complexation would result in the tremendous increase of the positive charge in the membrane phase. As a result, the membrane tries to keep its neutrality by extracting co-anions into the membrane, causing the membrane to respond negatively. However, the anthracene-based ionophore **L2**, possessing only one tripodal amine unit, does not give a negative EMF response to Cu²⁺. We also varied the amount of anionic additive to 25 and 50 mol% compared to the ionophore, but the membranes still gave responses to Cu²⁺ ions, positively for **L2** and negatively for **L1**. This signifies the importance of the two tripodal amine units in **L1**, which can bind with two Cu(II) ions and can induce the Donnan failure in the PVC membrane.

We also investigated the effect of co-anions on the EMF response of Cu²⁺. In this case, various salts of Cu²⁺ were introduced as analytes and the inner filling solution was controlled using CuCl₂. The EMF responses of the membrane **L1** with 75% KTpClPB are illustrated in Fig. 2. It was found that

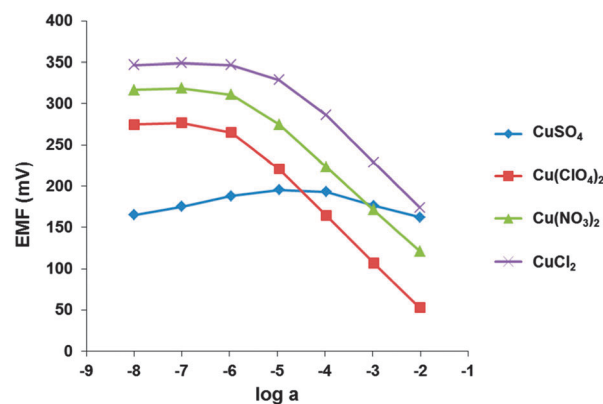


Fig. 2 Potentiometric responses of the membranes containing **L1** + 75 mol% KTpClPB towards different copper(II) salts.

Cu(ClO₄)₂, Cu(NO₃)₂ and CuCl₂ gave negative response slopes near the Nernstian slope of -57.0, -52.3 and -53.0 mV decade⁻¹, respectively while CuSO₄ did not give a Nernstian response. We also compared the selectivity coefficients of these anions using the separate solution method (SSM),²² which was highly recommended if the electrode exhibited a Nernstian response for the studied ions. The results showed that such a membrane had a selectivity in the order of ClO₄⁻ > NO₃⁻ > Cl⁻, which corresponded to the lipophilicity of the anions in the Hofmeister selectivity sequence:^{6,23,24} ClO₄⁻ > SCN⁻ > I⁻ > NO₃⁻ > Br⁻ > NO₂⁻ > OAc⁻ ~ Cl⁻ ~ F⁻ > H₂PO₄⁻ > SO₄²⁻.

In order to develop a membrane that could selectively respond to a certain anion with an anti-Hofmeister sequence, we prepared cocktail solutions of the membrane by mixing PVC, *o*-NPOE and **L1** in the presence of 25, 50 and 75 mol% KTpClPB, and preconditioned membranes in 10⁻² M of Cu(ClO₄)₂, Cu(NO₃)₂ and CuCl₂ overnight. Importantly, we measured the EMF changes upon adding a variety of sodium or potassium salts of the anions: ClO₄⁻, SCN⁻, I⁻, NO₃⁻, Br⁻, NO₂⁻, OAc⁻, Cl⁻, F⁻, H₂PO₄⁻ and SO₄²⁻. We found that all membranes gave negative responses to the anions. To preliminarily find the selectivity of the fabricated membranes to a particular anion, we firstly employed the fixed interference method (FIM)²¹ for competitive studies between two different anions in the same solution by measuring the potentials of the membrane with a solution of a constant concentration of interfering ions and varied concentrations of the primary ion. The results showed that all membranes gave the highest response towards SCN⁻, but with different response slopes, linear ranges and detection limits depending on the membrane composition and the type of bathing Cu(II) solution, as summarized in Table 1.

The best membrane should provide the slope of SCN⁻ response closest to the theoretical Nernstian slope (-59.2 mV decade⁻¹ at 25 °C) and also the lowest detection limit. Since there was no significant difference between the detection limits of our tested membranes, the best membrane from **L1**, considering from the results in Table 1, could be obtained when using 75 mol% of anionic additive, KTpClPB and preconditioning in 10⁻² M CuCl₂, with a detection limit of 4.4 × 10⁻⁶ M. More importantly, our preliminary studies on the selectivity of this membrane towards SCN⁻ was found to be better when

Table 1 Membrane preparation and electrode response properties of **L1** towards thiocyanate

Conditioning solution ($\times 10^{-2}$ M)	Membrane composition		Slope (mV decade $^{-1}$)	Linear range (M)	DL ($\times 10^{-6}$ M)
	L1 (mg (mmol kg $^{-1}$))	Anionic additive (KTPClPB) (mg (mol%))			
Cu(ClO $_4$) $_2$	3.06 (10.0)	0.27 (24.7)	−35.8	10 $^{-5}$ to 10 $^{-2}$	4.8
	3.07 (10.0)	0.53 (48.6)	−40.4	10 $^{-5}$ to 10 $^{-2}$	4.2
	3.06 (10.0)	0.82 (75.1)	−57.6	10 $^{-5}$ to 10 $^{-2}$	3.7
Cu(NO $_3$) $_2$	3.06 (10.0)	0.27 (24.7)	−37.6	10 $^{-5}$ to 10 $^{-2}$	3.2
	3.07 (10.0)	0.53 (48.6)	−56.3	10 $^{-5}$ to 10 $^{-2}$	3.5
	3.06 (10.0)	0.82 (75.1)	−58.3	10 $^{-5}$ to 10 $^{-2}$	3.6
CuCl $_2$	3.06 (10.0)	0.27 (24.7)	−36.1	10 $^{-5}$ to 10 $^{-2}$	2.7
	3.07 (10.0)	0.53 (48.6)	−41.4	10 $^{-5}$ to 10 $^{-2}$	3.9
	3.06 (10.0)	0.82 (75.1)	−59.6	10 $^{-5}$ to 10 $^{-2}$	4.4

preconditioning in CuCl $_2$, compared to Cu(ClO $_4$) $_2$ and Cu(NO $_3$) $_2$ (see Fig. S7, ESI †). This amount of the anionic additive is also suitable to extract more Cu $^{2+}$ into the membrane phase so that the Donnan failure can occur and the membrane functions as an anion selective membrane. Therefore, the PVC membrane electrode containing **L1** and 75 mol% KTPClPB could be used as an allosteric sensor for detecting thiocyanate ions in the presence of the Cu $^{2+}$ effector.

Selectivity of the allosteric anion selective electrode

We then carefully determined the selectivity coefficients of the optimal membranes, preconditioned in CuCl $_2$ solution, towards each anion by the SSM, the most common method for determining the selectivity coefficient of ISEs.^{8,22} We also confirmed the allosteric sensing property and the importance of the Donnan failure of the membrane containing **L1** and 75 mol% KTPClPB by comparing its selectivity coefficients ($\log K_{i,j}^{\text{pot}}$) towards each anion with those of the membrane containing Cu $_2$ **L1** complex and 25 mol% KTPClPB.²⁵ Complex Cu $_2$ **L1** could be isolated from the reaction of CuCl $_2$ and **L1**, as shown in Scheme 1. The results shown in Fig. 3 indicate that the membrane prepared from **L1** and preconditioned with CuCl $_2$ gives the highest selectivity to SCN $^-$ and shows the anti-Hofmeister order for other anions while the membrane prepared from complex Cu $_2$ **L1** gives the highest selectivity towards ClO $_4^-$ and shows the Hofmeister sequence for other anions, suggesting that Cu $_2$ **L1** allows the transport of anions through the membrane by the order of their lipophilicity or the Hofmeister order, not by the role of the carrier. In contrast, the membrane **L1** bathing in CuCl $_2$ solutions shows the ability of **L1**–Cu $_2$ complex in the membrane phase as an anion carrier. A number of neutral selective ionophores for thiocyanate, prepared in the form mononuclear and dinuclear complexes of Cu(II), have been reported in the literature.^{26–28}

We have studied the transport of thiocyanate into the membranes containing **L1** and 75 mol% KTPClPB preconditioned in 10 $^{-2}$ M CuCl $_2$, Cu(NO $_3$) $_2$ and Cu(ClO $_4$) $_2$ using electrochemical impedance spectroscopy. The results depicted in Fig. 4 show the semi-circle Nyquist plots of all membranes, giving the membrane resistance, R_m , of 35–47 K Ω , suggesting the preference of the membranes to allow thiocyanate to pass

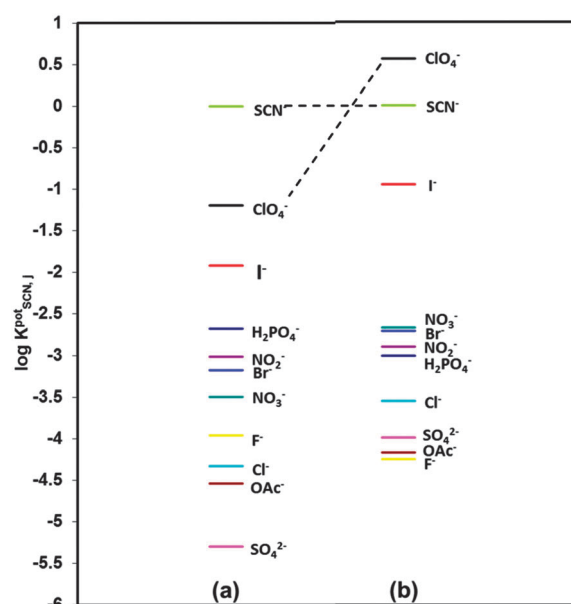


Fig. 3 A comparison of the selectivity coefficients ($\log K_{i,j}^{\text{pot}}$) of the membranes containing **L1** and 75 mol% KTPClPB (a) and of the membranes containing Cu $_2$ **L1** and 25 mol% KTPClPB (b).

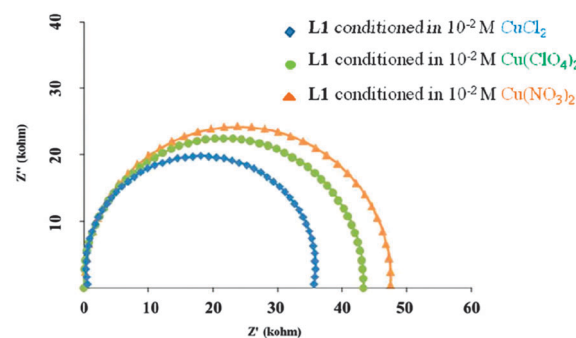


Fig. 4 EIS spectra of the membranes containing **L1** and 75 mol% KTPClPB conditioned in different copper(II) salts using 10 $^{-2}$ M KSCN as the inner and outer solution.

through, especially the one bathing with CuCl $_2$ which gave the lowest resistance. We have also obtained the impedance spectra

of the membrane containing $\text{Cu}_2\text{L1}$ and found out that its membrane resistance is $1.2 \text{ M}\Omega$ (Nyquist plot not shown), which is tremendously different from that of allosteric membranes. The EIS results agree very well with the results from the potentiometric measurements.

Response time, working pH range, and reversibility of the allosteric membranes prepared from compound L1

The response time of an electrode is also an important characteristic of ISEs. The fabricated thiocyanate-ISEs incorporating compound L1 and 75 mol% KTpClPB preconditioned in 10^{-2} M CuCl_2 showed a very fast response time of less than 5 seconds before reaching a stable EMF value for all the studied anions. In addition, the potentials were very stable after changing the concentration, which indicates the good property of the ISE. The time trace line of the optimal ISE is shown in Fig. 5.

The working pH range of the proposed thiocyanate-selective electrodes was explored by carrying out the EMF measurements over the pH range of 3.0–11.0. The results shown in Fig. 6 indicate that the optimal membrane could perform well and give constant signals in the pH range of about 3–7. However, the membrane was unstable in higher concentrations of OH^- .

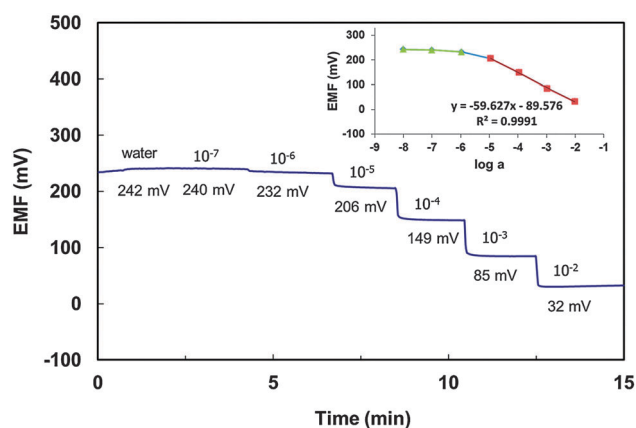


Fig. 5 Time-dependent response of the membranes containing L1 and 75 mol% KTpClPB conditioned in CuCl_2 towards thiocyanate.

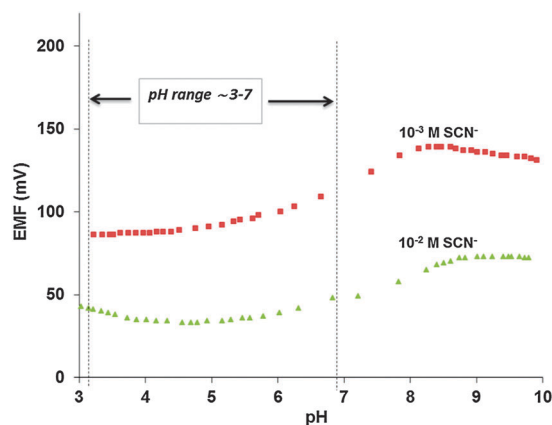


Fig. 6 pH effect on potentiometric responses of the optimized thiocyanate-ISEs towards 10^{-3} and 10^{-2} M of thiocyanate.

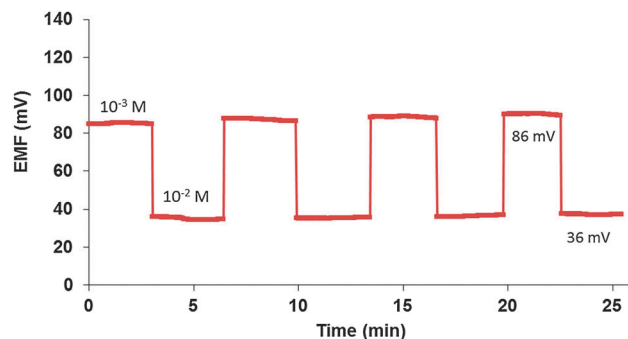


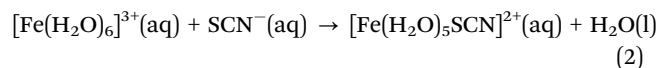
Fig. 7 Reversibility of the optimized thiocyanate-ISEs for 10^{-3} and 10^{-2} M of thiocyanate.

The observed drift could be due to the interference of OH^- on the complex formation between SCN^- and the allosteric ionophore.²⁹ The constant EMF values at $\text{pH} > 8$ should mainly be the potentiometric response of OH^- .

The reversibility of the electrode is another important factor that represents the precision of the detection. In the experiment, the electrodes containing L1 and 75 mol% KTpClPB preconditioned in 10^{-2} M CuCl_2 were used to measure the EMF values of two different concentrations of thiocyanate alternatively. As seen in Fig. 7, the EMF signals could be restored at the same concentration in every measuring cycle.

Measurements of Fe^{3+} in aqueous solution

The possibility of using our allosteric thiocyanate-ISE containing L1 and 75% KTpClPB preconditioned in 10^{-2} M CuCl_2 in determining the amount of Fe^{3+} in aqueous solution was explored. The idea came from the reaction between Fe^{3+} and SCN^- according to eqn (2).



The EMF changes of the thiocyanate solution (10^{-2} M) in the presence of various concentrations of Fe^{3+} were measured by the optimized thiocyanate-ISE and the standard calibration curve of this mixed solution was obtained. It was found that the calibration curve gave a good linearity in the concentration range of 10^{-5} to 10^{-3} M of Fe^{3+} . Then, samples were prepared by spiking two concentrations of Fe^{3+} (5×10^{-5} and $1 \times 10^{-4} \text{ M}$) into the controlled SCN^- solutions and their EMFs were recorded. Experiments were done in three replicates. The Fe^{3+} contents in the spiked samples were calculated from the calibration curve as well as the percentage recoveries are illustrated in Table 2, suggesting that the fabricated thiocyanate-ISE could be

Table 2 Indirect determination of Fe^{3+} in $[\text{FeSCN}]^{2+}$ samples ($n = 3$) using the fabricated thiocyanate ion selective electrode

$[\text{SCN}^-] (\text{M})$	Fe^{3+} added ($\times 10^{-5} \text{ M}$)	Fe^{3+} found ($\times 10^{-5} \text{ M} \pm \text{SD}$)	Recovery (% $\pm \text{SD}$)	RSD (%)
10^{-2}	—	n.d.	—	—
	5.0	5.45 0.31	109 6	5.6
	10	9.09 0.50	91 5	5.5

used to determine the concentration of Fe^{3+} in aqueous solution with satisfactory results.

Conclusions

Di-tripodal amine calix[4]arene, **L1**, was successfully synthesized and used as an ion carrier in polymeric membrane electrodes. Membranes containing compounds **L1** and KTpClPB showed Donnan failure upon measuring the EMF responses towards Cu^{2+} by giving negative EMF changes, signifying the response to anions, while compound **L2** containing mono-tripodal amine attached to anthracene gave positive potential responses to most of the tested metal ions. Upon preconditioning in CuCl_2 , the membranes containing **L1** and 75 mol% KTpClPB behaved as an allosteric thiocyanate-selective membrane using Cu^{2+} as an effector. However, the membrane containing the dinuclear copper(II) complex of **L1** ($\text{Cu}_2\text{L1}$) showed the highest selectivity coefficients towards ClO_4^- , obeying the Hofmeister sequence. The result confirms the significance of the two tripodal amine units and the Donnan failure in the presence of Cu^{2+} ions in the membrane containing **L1** and 75 mol% KTpClPB, as the key element to generate such an allosteric anion sensor. The fabricated allosteric anion sensor can be used to detect thiocyanate in the pH range 3–7 with good reversibility, and can also be applied to indirectly determine the concentration of Fe^{3+} in aqueous solutions.

Acknowledgements

This research was financially supported by the Thailand Research Fund (RTA5380003 and RSA5580031) and the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), and the Office of the Higher Education Commission, Ministry of Education. PK thanks the Royal Thai Government for a PhD scholarship.

Notes and references

- 1 L. Kovbasyuk and R. Krämer, *Chem. Rev.*, 2004, **104**, 3161–3187.
- 2 M. Takeuchi, M. Ikeda, A. Sugasaki and S. Shinkai, *Acc. Chem. Res.*, 2001, **34**, 865–873.
- 3 N. Nerngchamnong, B. Chailap, P. Leeladee, O. Chailapakul, C. Suksai and T. Tuntulani, *Tetrahedron Lett.*, 2011, **52**, 2914–2917.
- 4 B. Chailap and T. Tuntulani, *Org. Biomol. Chem.*, 2012, **10**, 3617–3625.
- 5 W. Wongsan, W. Aeungmaitrepirom, O. Chailapakul, W. Ngeontae and T. Tuntulani, *Electrochim. Acta*, 2013, **111**, 234–241.
- 6 E. Bakker, P. Buhlmann and E. Pretsch, *Chem. Rev.*, 1997, **97**, 3083–3132.
- 7 P. Buhlmann and L. D. Chen, Ion-Selective Electrodes With Ionophore-Doped Sensing Membranes, in *Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials*, John Wiley & Sons, New York, 2012, vol. 5, p. 2539.
- 8 R. P. Buck and E. Lindner, *Pure Appl. Chem.*, 1994, **66**, 2527–2536.
- 9 R. P. Buck, V. V. Cosofret and E. Lindner, *Anal. Chim. Acta*, 1993, **282**, 273–281.
- 10 I. Izzo, S. Licen, N. Maulucci, G. Autore, S. Marzocco, P. Tecilla and F. De Riccardis, *Chem. Commun.*, 2008, 2986–2988.
- 11 J. N. Babu, V. Bhalla, M. Kumar, R. K. Mahajan and R. K. Puri, *Tetrahedron Lett.*, 2008, **49**, 2772–2775.
- 12 W. Wróblewski, E. Malinowska and Z. Brzózka, *Electroanalysis*, 1996, **8**, 75–78.
- 13 R. Pomecko, Z. Asfari, V. H. Bruder, M. Bochenska and F. Arnaud-Neu, *Supramol. Chem.*, 2007, **19**, 459–466.
- 14 H. K. Lee, H. Oh, K. C. Nam and S. Jeon, *Sens. Actuators, B*, 2005, **106**, 207–211.
- 15 S. Erden, A. Demirel, S. Memon, M. Yilmaz, E. Canel and E. Killıç, *Sens. Actuators, B*, 2006, **113**, 290–296.
- 16 A. M. Dittler-Klingemann and F. E. Hahn, *Inorg. Chem.*, 1996, **35**, 1996–1999.
- 17 A. M. Dittler-Klingemann, C. Orvig, F. E. Hahn, F. Thaler, C. D. Hubbard, R. van Eldik, S. Schindler and I. Fábıán, *Inorg. Chem.*, 1996, **35**, 7798–7803.
- 18 R. R. Jacobson, Z. Tyeklar, A. Farooq, K. D. Karlin, S. Liu and J. Zubieta, *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, **110**, 3690–3692.
- 19 U. Khamjumphol, S. Watchasit, C. Suksai, W. Janrungratsakul, S. Boonchiangma, T. Tuntulani and W. Ngeontae, *Anal. Chim. Acta*, 2011, **704**, 73–86.
- 20 S. C. Burdette, C. J. Frederickson, W. Bu and S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 1778–1787.
- 21 P. C. Meier, *Anal. Chim. Acta*, 1982, **136**, 363–368.
- 22 E. Lindner and Y. Umezawa, *Pure Appl. Chem.*, 2008, **80**, 85–104.
- 23 W. Kunz, J. Henle and B. W. Ninham, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2004, **9**, 19–37.
- 24 C. G. Zoski, *Handbook of Electrochemistry*, Elsevier, Amsterdam, 1st edn, 2007.
- 25 Higher amounts of KTpClPB (50 and 75 mol%) were also tested. However, the membrane containing $\text{Cu}_2\text{L1}$ and 50 mol% KTpClPB was not selective to a particular anion. In addition, membranes containing $\text{Cu}_2\text{L1}$ without ionic additive and $\text{Cu}_2\text{L1}$ with 50 mol% cationic additive, tridodecylmethylammonium chloride (TDMACl), showed selectivity coefficients similar to the Hofmeister sequence. In the case of the membrane containing $\text{Cu}_2\text{L1}$ and 75 mol% KTpClPB, its potentiometric response towards anions was completely demolished, but gave a good response to cations instead.
- 26 W.-J. Xu, Y. Zhang, Y.-Q. Chai and R. Yuan, *Desalination*, 2009, **249**, 139–142.
- 27 Y.-Q. Chai, J.-Y. Dai, R. Yuan, X. Zhong, Y. Liu and D.-P. Tang, *Desalination*, 2005, **180**, 207–215.
- 28 R. Yuan, X. L. Wang, L. Xu, Y. Q. Chai, Z. Y. Sun, X. Q. Huang, Q. F. Li, Q. Zhao and L. Zhou, *Electrochem. Commun.*, 2003, **5**, 717–721.
- 29 D. W. Kim, S. H. Lee, J. Kim, J. Kim, J. K. Park and J. S. Kim, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2009, **30**, 2303–2308.

PAPER



Cite this: *Dalton Trans.*, 2014, **43**, 14701

Discriminate sensing of pyrophosphate using a new tripodal tetramine-based dinuclear Zn(II) complex under an indicator displacement assay approach†

Sarayut Watchasit,^a Pattira Suktanarak,^b Chomchai Suksai,^{*b}
Vithaya Ruangpornvisuti^a and Thawatchai Tuntulani^{*a}

In this research, the dinuclear Zn(II) complex of anthracene based tripodal tetramine Zn₂L was synthesized, and its sensing abilities towards anions was investigated using the indicator displacement assay (IDA) approach with four complexometric indicators: pyrocatechol violet (PV), bromopyrogallol red (BPG), methylthymol blue (MTB) and xylenol orange (XO). UV-vis spectrophotometry results indicated that the Zn₂L–MTB ensemble sensor could discriminate the pyrophosphate anion (PPI) from other phosphate containing anions. ¹H and ³¹P NMR spectroscopy as well as DFT calculations confirmed that PPI bound to Zn₂L in a 2 : 2 manner. Both NMR spectroscopy and UV-vis spectrophotometry suggested that the two bulky tripodal tetramine units in Zn₂L played an important role to provide the ensemble cleft for MTB, giving rise to an ensemble that could be displaced exclusively by PPI. The detection limit of PPI for the reported IDA system was 0.3 μM in 20% (v/v) water–acetonitrile buffered at pH 7.4 with HEPES.

Received 30th August 2013,
Accepted 29th July 2014

DOI: 10.1039/c3dt52392f

www.rsc.org/dalton

1. Introduction

Recently, artificial receptors for recognition and sensing of phosphate anions have attracted chemists' attention due to their importance in living systems.¹ Great attention has been given to the design of chemical sensors for the pyrophosphate anion, P₂O₇^{4−} or PPI.² Such an interest stems from the fact that PPI plays an important role in many biological processes. In particular, PPI participates in ATP hydrolysis and is involved in DNA or RNA polymerase reactions.³ Moreover, the amount of PPI has recently been monitored in patients with calcium pyrophosphate dihydrate (CCPD) crystal deposition disease (also known as chondrocalcinosis), as the disease has been shown to cause high synovial fluid PPI levels in patients.⁴ Therefore, discriminate sensing of PPI under physiological conditions remains a significant challenge.

The indicator displacement assay (IDA) is the most simple, convenient and increasingly popular approach for naked-eye sensing of anions.⁵ Recently, Zn(II)–dipicolyl amine (DPA) complexes have been employed in anion recognition and sensing of phosphate species.⁶ However, most of the IDA systems using dinuclear Zn(II)–DPA complexes show low selectivity toward PPI⁷ or encounter interference from other phosphate species such as PO₄^{3−} (Pi) and adenosine triphosphate (ATP).⁸ A few IDA receptors for discriminate sensing of PPI using dinuclear Zn(II)–DPA complexes have been reported.⁹ Jolliffe and coworkers have synthesized a library of anion receptors comprising linear^{9a} and cyclic^{9b} peptide scaffolds bearing dinuclear Zn(II)–DPA units which could be located at different positions on the cyclic peptide. The ensemble cleft of the cyclic peptide receptors and indicators could be varied, and the discrimination between PPI and other phosphate containing anions by the IDA approach was achieved.

Although the sensing ability of chemosensing ensembles formed by the flexible scaffold could be easily tuned by appropriate indicators and may provide effective discrimination of PPI from other anions, the coordination chemistry of the dinuclear Zn(II) could play an important role in selective sensing as well. Recently, Lippard and colleagues have shown that a tripodal tetramine unit on the fluorescein scaffold can be used successfully as a neuronal Zn²⁺ sensor and gives a better sensing property than the precursor one containing DPA binding units.¹⁰ We have prepared an IDA receptor for PPI

^aDepartment of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand. E-mail: tthawac@chula.ac.th; Fax: +66 2 2187598; Tel: +66 2 2187643

^bDepartment of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand. E-mail: jomjai@buu.ac.th; Fax: +66 038 393494; Tel: +66 038 103111

†Electronic supplementary information (ESI) available: Synthetic scheme of Zn₂L, ¹H and ¹³C NMR spectra of L and Zn₂L, ¹H and ³¹P NMR spectra of the Zn₂L–MTB ensembles and replacement with PPI and UV-vis spectra of Zn₂L with various indicators. See DOI: 10.1039/c3dt52392f

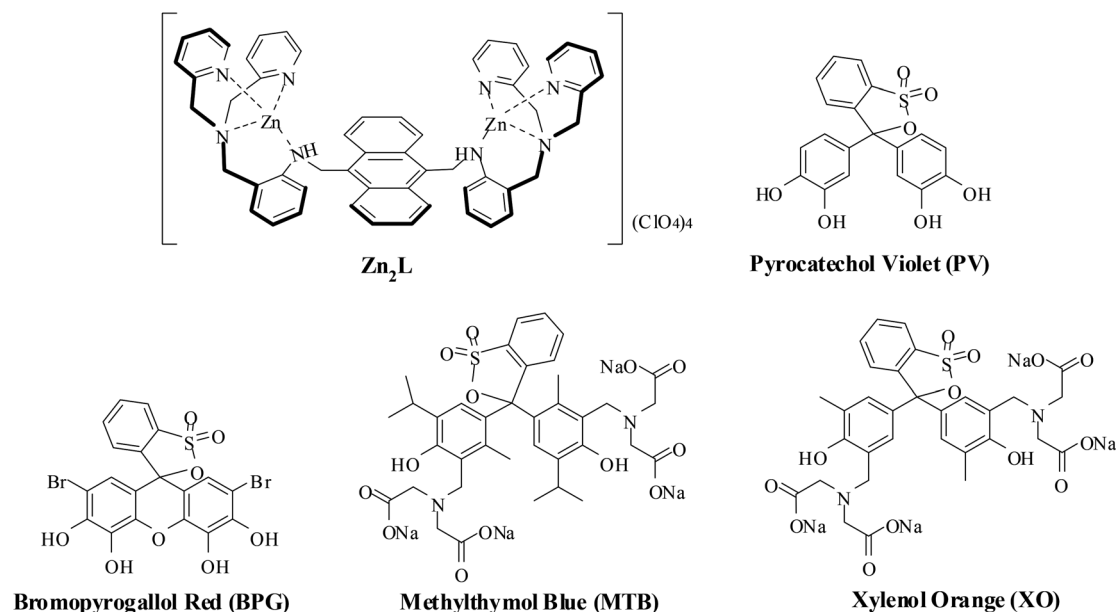


Chart 1 Structures of Zn_2L and indicators employed in the IDA studies.

from the dinuclear $\text{Cu}(\text{II})$ complexes of di-tripodal tetramine units on the calix[4]arene scaffold.¹¹ In this paper, we synthesize a new ligand (**L**) containing two tripodal tetramine units linked to the anthracene scaffold and its dinuclear $\text{Zn}(\text{II})$ complex (Zn_2L). We explore the binding properties of Zn_2L with PPI and an indicator by using ^1H and ^{31}P NMR spectroscopy. The structure of the complex between Zn_2L and PPI is calculated using DFT. The selective sensing ability of Zn_2L toward PPI in aqueous solution using the IDA approach is established using UV-vis spectrophotometry and possible species in the aqueous solution are analyzed from the UV-vis spectra using the SPECFIT32 program.¹² The structures of Zn_2L and various commercially available indicators employed in this study are presented in Chart 1.

2. Experimental

2.1 General method

All chemicals were of analytical grade and used without further purification. Sterile water for injection was obtained from General Hospital Products Public Co., Ltd. (Pathum Thani, Thailand). Zn_2L and indicator solutions were freshly prepared^{10,13} just before the NMR and UV-vis experiments. ^1H -, ^{13}C - and ^{31}P -NMR were carried out using the Bruker AVANCE 400 MHz Ultra Shield spectrometer. All UV-vis absorption spectra were recorded using an Agilent 8453 UV-vis spectrophotometer. Tripodal tetramine (**a**) was synthesized according to the procedure reported previously.^{10,13}

2.2 Synthesis of **L**

A mixture of tripodal tetramine (**a**) (1.93 g, 6.34 mmol) and 9,10-diformylanthracene (**b**) (0.64 g, 2.73 mmol) was dissolved in dry CH_3CN (50 mL) (Scheme S1 in the ESI†). The reaction

mixture was refluxed under nitrogen for 12 h. After the solvent was removed, the product was obtained as a dark solid (quantitative yield). The crude imine was dissolved in MeOH (100 mL) and the solution was cooled to -5°C . Subsequently, NaBH_4 (4.18 g, 110 mmol) was added to the brown solution, and the mixture was refluxed for 12 h under a nitrogen atmosphere. After the mixture cooled to room temperature, water (150 mL) was added and the mixture was evaporated to remove MeOH. The residue was dissolved in CH_2Cl_2 (150 mL) and the organic layer was washed with water (3×100 mL), dried with anhydrous MgSO_4 , and the solvent was removed. The light yellow solid of ligand **L** was obtained after recrystallization of the crude product in MeOH (0.90 g, 41%). ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 8.45 (q, $J = 3.6$ Hz, 4H, ArH), 8.03 (d, $J = 4.4$ Hz, 4H, ArH), 7.58 (q, $J = 3.6$ Hz, 4H, ArH), 7.38 (t, $J = 8$ Hz, 2H, ArH), 7.18 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, ArH), 7.10 (d, $J = 8$ Hz, 2H, ArH), 6.73 (m, 10H, ArH), 6.51 (d, $J = 7.6$ Hz, 4H, ArH), 6.33 (s, 2H, $-\text{NH}-$), 5.28 (s, 4H, $-\text{CH}_2-$), 3.59 (s, 4H, $-\text{CH}_2-$), 3.52 (s, 8H, $-\text{CH}_2-$). ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 158.43, 148.58, 148.05, 135.79, 131.43, 131.01, 130.89, 129.00, 126.13, 125.51, 122.55, 122.24, 121.96, 121.44, 116.69, 109.63, 60.35, 58.50, 40.96. ESI-MS (positive mode); 811.4281 $[\text{M} + \text{H}]^+$. Elemental analysis calculated for $\text{C}_{54}\text{H}_{50}\text{N}_8$: C, 79.97; H, 6.21; N, 13.82; found C, 79.89; H, 6.16; N, 13.87.

2.3 Synthesis of Zn_2L

The ethanolic solution of $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (37.2 mg, 0.1 mmol) was added to the ethanolic suspension of **L** (24.3 mg, 0.03 mmol) (Scheme S1 in the ESI†), the color of the solution changed to yellow immediately. Then, the yellow solution was refluxed under nitrogen for 12 h. After cooling to room temperature, the yellow solids precipitated, and were filtered and washed with CH_2Cl_2 and MeOH to obtain Zn_2L (35.4 mg,

88%). ^1H -NMR (400 MHz, 20% (v/v) D_2O - CD_3CN , ppm): δ 8.70 (bs, 4H, ArH), 7.87 (bm, 8H, ArH), 7.48 (bm, 4H, ArH), 7.34 (bs, 8H, ArH), 7.20 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, ArH-NH-), 6.75 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, ArH-NH-), 6.25 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, ArH-NH-), 5.27 (bd, $J = 7.6$ Hz, 2H, ArH-NH-) 4.98 (bs, 4H, Ar-NH- CH_2 -), 4.29 (m, 12H, Ar- CH_2 -). ^{13}C -NMR (100 MHz, 20% (v/v) D_2O - CD_3CN , ppm): δ 154.76, 147.63, 141.88, 140.97, 133.37, 129.79, 129.09, 128.72, 127.15, 126.23, 125.80, 124.93, 124.56, 124.34, 124.00, 59.02, 27.84, 45.11. ESI-MS (positive mode); 1235.0554 $[\text{M} + 3\text{ClO}_4]^-$. Elemental analysis calculated for $\text{C}_{54}\text{H}_{50}\text{Cl}_4\text{N}_8\text{O}_{16}\text{Zn}_2\cdot\text{H}_2\text{O}\cdot\text{CH}_2\text{Cl}_2$: C, 45.79; H, 3.77; N, 7.77; found C, 45.66; H, 3.76; N, 7.93. **Caution:** perchlorate salts are potentially hazardous and should be handled with care!

2.4 Screening tests of indicators for selective PPI sensing

For the colorimetric detection of PPI, a solution of each indicator, 400 μM (0.2 mL) in 20% (v/v) water-acetonitrile solution buffered at pH 7.4 with HEPES, was added into a solution of Zn_2L 20 μM (2 mL) in the same solvent system. Subsequently, 0.3 mL of the tetrabutylammonium salt of the anion (1 mM) was then added to the as-prepared ensemble. The resulting mixtures were allowed to stand still for 5 min and then subjected to UV-vis spectroscopic measurements. Photographs were taken using a digital camera (Canon EOS Kiss X5, Japan).

2.5 UV-vis titrations under the indicator displacement assay

All spectrometric titrations were performed in 20% (v/v) water-acetonitrile solutions buffered at pH 7.4 with HEPES (10 mM) in quartz cuvettes. Ensemble formation constants were determined by adding aliquots of 400 μM (10 μL) complex solution to 20 μM (2 mL) of each indicator using a syringe. After each addition, the absorption spectra of the indicator solution were recorded. Similar titration experiments were performed with PPI. In a typical titration, aliquots of the solution of PPI 400 μM (10 μL) were added to 20 μM (2 mL) of 1:1 or 1:2 ensemble solution of Zn_2L -MTB. The ensemble formation constants and the apparent competitive binding constants were calculated using the SPECFIT32 program.¹²

2.6 NMR titration experiment

Generally, all reagents in the NMR titration experiments were prepared in 20% (v/v) D_2O - CD_3CN . For PPI titration, aliquots of PPI 0.05 M (5 μL) were added to the 0.5 mL solution of Zn_2L (5 mM) using a syringe. For MTB titration, aliquots of MTB 0.05 M (5 μL) were added to the 0.5 mL solution of Zn_2L (5 mM) using a syringe. For MTB displacement titrations, aliquots of PPI 0.05 M were added to the 0.5 mL solution of 1:1 and 1:2 ensemble (5 mM) solutions of Zn_2L -MTB. Subsequently, ^1H or ^{31}P NMR spectra were recorded.

3. Results and discussion

3.1 Synthesis of L and Zn_2L

Ligand L was straightforwardly synthesized in a moderate yield (41%) by a Schiff base condensation between tripodal tetra-

mine (**a**) and 9,10-diformylanthracene (**b**) in refluxing acetonitrile followed by *in situ* reduction using NaBH_4 in refluxing methanol (Scheme S1 in the ESI†). The dinuclear zinc(II) complex, Zn_2L , was readily obtained by refluxing $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ with L in ethanol in 88% yield. Ligand L and the Zn_2L complex were characterized by standard analytical methods (Fig. S1-S5 in the ESI†). The ^1H NMR spectrum of Zn_2L in 20% D_2O - CD_3CN showed rather broad signals, compared to that of the free ligand. A multiplet signal of methylene protons of the two pyridine groups and the amine group appeared at 4.29 ppm. The aromatic protons of the aryl rings connecting to the amine group appeared at more upfield positions compared to that of L, probably due to the coordination of the N atom to the $\text{Zn}(\text{II})$ center. We proposed that L behaved as a tetradentate ligand to coordinate $\text{Zn}(\text{II})$ using 4 N atoms of the tripodal tetramine unit.¹⁰

3.2 Screening tests of indicators for selective PPI sensing

We first tested the anion sensing capabilities of the receptor Zn_2L by using an indicator displacement assay. In this study, 4 commercial dyes, pyrocatechol violet (PV), bromopyrogallol red (BPG), methylthymol blue (MTB) and xylenol orange (XO), which were complexometric indicators for the determination of metal ions were employed.¹⁴ We prepared both 1:1 and 1:2 receptor to indicator ratios in 20% (v/v) water-acetonitrile solution buffered at pH 7.4 with HEPES to screen the sensing abilities toward PPI over other anions.

After the addition of various anions (7.5 equivalents of tetrabutylammonium salts) to four ensemble solutions, we found that only the MTB based ensemble of Zn_2L was able to discriminate PPI from other anions as indicated by a color change from blue to purple, shown in Fig. 1c. However, the PV- and BPG- Zn_2L ensembles responded to all phosphate containing anions because the color of the corresponding ensembles was converted to the color of the unbound indicators. In the case of the XO- Zn_2L ensemble, there were no significant changes upon addition of all anions. Therefore, the anions were not able to dislodge the XO indicator. Both MTB and XO have a similar core structure, they differ only in the bulky substituents on the rings. We expect that the binding affinity of the Zn_2L -indicator ensemble must play an important role in the displacement of the indicator by an anion. Compared to dinuclear $\text{Zn}(\text{II})$ -DPA receptors which could undergo IDA using the indicator PV,^{6,15} our Zn_2L needed a different indicator due to the change in coordination chemistry around the $\text{Zn}(\text{II})$ center. Therefore, the binding properties of Zn_2L with PPI and the 4 indicators were studied by ^1H and ^{31}P NMR spectroscopy as well as UV-vis spectrophotometry.

3.3 Binding studies of Zn_2L with PPI by ^1H and ^{31}P NMR spectroscopy

Upon adding portions of PPI (in 20% D_2O - CD_3CN) to the solution of Zn_2L , the ^1H NMR spectrum of the Zn_2L starts broaden indicating a fluxional behaviour (Fig. 2). When 2 equiv. of PPI is added, the spectrum becomes resolved. All protons can be assigned by the HMQC technique. Interestingly, in the

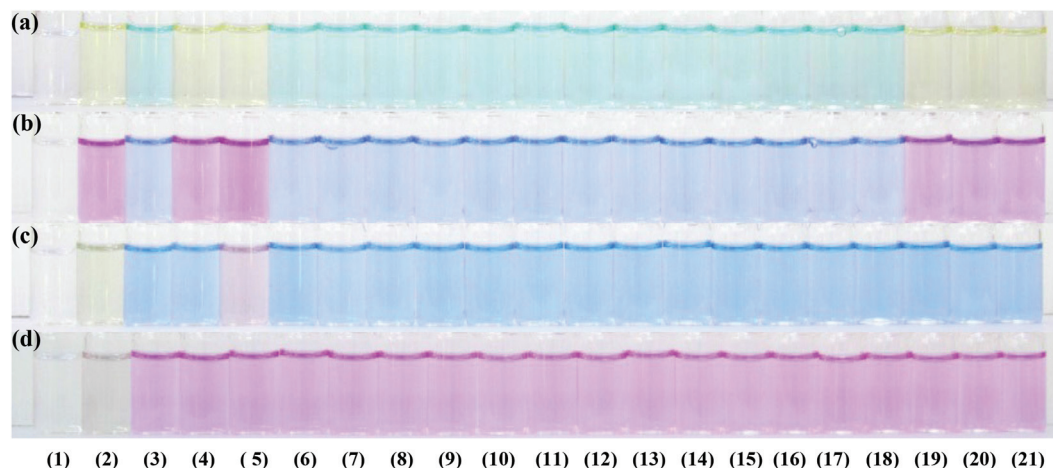


Fig. 1 Color changes of the Zn_2L -based ($20\ \mu\text{M}$, $2\ \text{mL}$) ensembles with various indicators ($400\ \mu\text{M}$, $0.2\ \text{mL}$) at a 1 : 2 receptor to indicator ratio (a) PV, (b) BPG, (c) MTB and (d) XO in the presence of various anions ($1\ \text{mM}$, $0.3\ \text{mL}$), where (1) = Zn_2L , (2) = indicator, (3) = ensemble, (4) = HPO_4^{2-} , (5) = PPI, (6) = SO_4^{2-} , (7) = NO_3^- , (8) = CO_3^{2-} , (9) = HCO_3^{2-} , (10) = AcO^- , (11) = BzO^- , (12) = CN^- , (13) = SCN^- , (14) = OH^- , (15) = I^- , (16) = Br^- , (17) = Cl^- , (18) = F^- , (19) = AMP, (20) = ADP and (21) = ATP, respectively in 20% (v/v) $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN}$ buffered at pH 7.4 with HEPES.

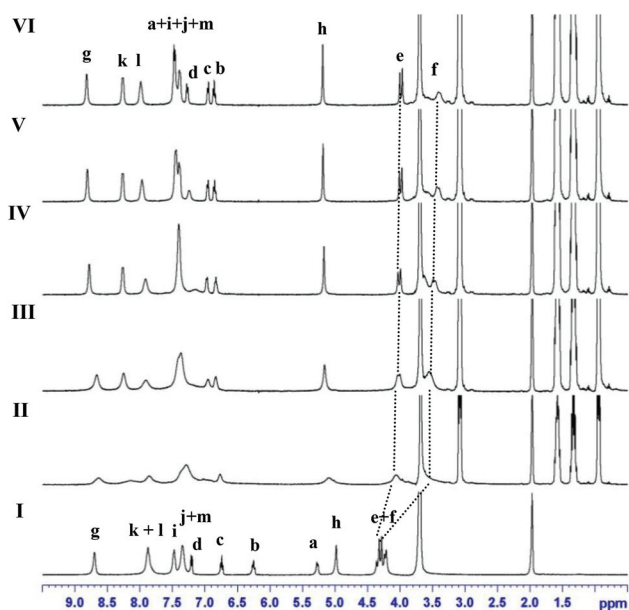
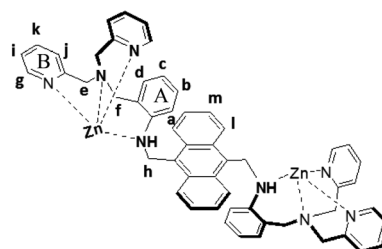


Fig. 2 ^1H NMR spectra of (I) free Zn_2L , (II) Zn_2L + PPI 0.5 equiv., (III) Zn_2L + PPI 1.0 equiv., (IV) Zn_2L + PPI 1.5 equiv., (V) Zn_2L + PPI 2.0 equiv. and (VI) Zn_2L + PPI 2.5 equiv. in 20% (v/v) $\text{D}_2\text{O}-\text{CD}_3\text{CN}$.

absence of PPI the aromatic proton a of the dinuclear complex Zn_2L is present in a higher magnetic field region, at $\delta = 5.3\ \text{ppm}$, probably due to the shielding effect of the ring current of the aromatic anthracene ring. Upon addition of PPI, the proton a disappears from the NMR spectrum and reappears in a more downfield region. The aromatic protons b and c move downfield and the methylene protons e and f move upfield. Therefore, protons on the aromatic ring A generally move significantly while protons g, i, j and k on the aromatic ring B move to a lesser extent. The proton h of the methylene linkage between anthracene and the tripodal tetramine unit, functioning as a pivot of the movement, stays sharp

upon addition of PPI. The results imply that the aromatic ring A probably moves away from the anthracene moiety upon the binding of PPI to the $\text{Zn}(\text{II})$ center.



^{31}P NMR titrations of Zn_2L in 20% $\text{D}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN}$ with portions of PPI were carried out and the spectra are shown in Fig. 3. The free PPI has a signal at $-6.0\ \text{ppm}$. It can be clearly seen that adding up to 1.0 equiv. of PPI to the solution of Zn_2L gave a single broad peak at $-3.0\ \text{ppm}$ due to the formation of a complex between an equivalent amount of Zn_2L and PPI, concomitant with the disappearance of the signal at $-6.0\ \text{ppm}$. The single peak at $-3.00\ \text{ppm}$ implied that the two P atoms in Zn_2L -bound PPI are magnetically equivalent. Upon adding more than 1 equiv. of PPI, a signal at a more upfield position appears in the spectrum. After the addition of 4 equiv. of PPI, this peak shifts to a more downfield position, close to that of the signal of free PPI, and the signal at $-3.0\ \text{ppm}$ becomes more resolved.

The best way to obtain the exact structure of the Zn_2L -PPI complex is from the crystal structure determination. However, we cannot obtain a suitable crystal of the complex for X-ray crystallography, probably due to the mixed solvent system ($\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN}$) used in the preparation of the complex. Based on the several binding modes of PPI toward the metal center reported previously,¹⁶ the density functional theory (DFT) calculations of a possible complex of Zn_2L and PPI in 1 : 1 and 2 : 2 fashions were carried out to find the most stable structure

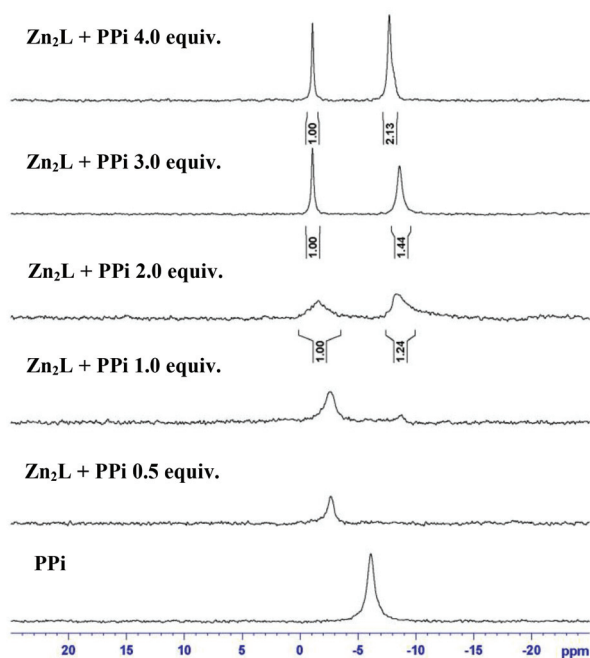


Fig. 3 ^{31}P NMR spectra of Zn_2L (5 mM) upon addition of various concentrations of PPI (0.05 M) in 20% (v/v) $\text{D}_2\text{O}-\text{CD}_3\text{CN}$.

instead. According to computer simulations, the 1 : 1 complex model was not possible due to too much strain in the molecule of the 1 : 1 PPI-bound Zn_2L complex. However, six conformers of dimeric 2 : 2 species represented as $2\text{Zn}_2\text{L} \cdot 2\text{PPI}$ were found and their energies were calculated (Table S1 and Fig. S6–S11 in the ESI†). All optimized structures were obtained by DFT calculations using the B3LYP/LANL2DZ level of theory^{17–19} performed with the GAUSSIAN09 program.²⁰ The most stable structure of $2\text{Zn}_2\text{L} \cdot 2\text{PPI}$ is shown in Fig. 4. The dimeric species is composed of two Zn_2L and two PPI units forming a tetranuclear $\text{Zn}(\text{II})$ complex with PPI as bridging ligands. Two oxygen atoms on each phosphorus of PPI coordinated to one Zn^{2+} ion, the same as the structure reported by Hong *et al.*^{8b} Interestingly, the calculated structure showed a high symmetry structure of the PPI units. This agreed with the result from the ^{31}P NMR spectroscopy where the two phosphorous atoms in PPI appeared as a singlet peak in the ^{31}P -NMR spectrum. In addition, the calculated structure is also relevant to the signals that appeared in the ^1H NMR spectrum shown in Fig. 2. The calculated dimeric structure is similar to the structure of the PPI bound-dinuclear $\text{Zn}(\text{II})$ complex reported by Lee *et al.*²¹

3.4 Binding studies of Zn_2L with MTB and displacement studies with PPI using ^1H NMR spectroscopy

Upon addition of portions of MTB (in 20% $\text{D}_2\text{O}-\text{CD}_3\text{CN}$) to the solution of Zn_2L (in 20% $\text{D}_2\text{O}-\text{CD}_3\text{CN}$), ^1H NMR spectra were obtained and are shown in Fig. 5. The ^1H NMR spectrum of Zn_2L starts to broaden after adding portions of MTB and is too complicated to assign each proton signal. However, it can be clearly seen that upon adding more than 1 equiv. of MTB to Zn_2L , the peak due to free MTB emerges in the spectrum.

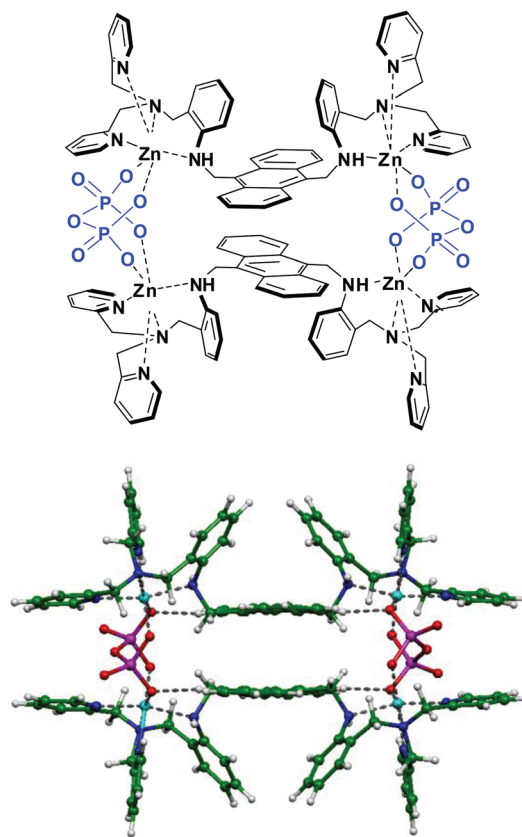


Fig. 4 The most stable DFT-calculated structure of the dimeric 2 : 2 species, $2\text{Zn}_2\text{L} \cdot 2\text{PPI}$ complex.

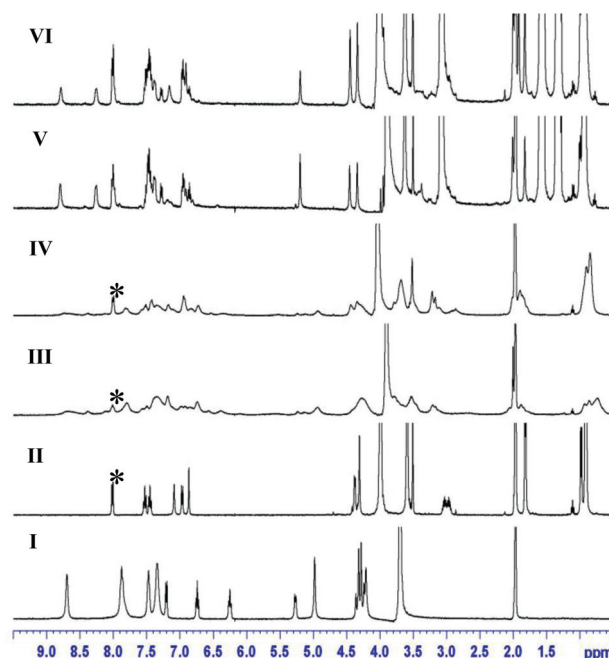


Fig. 5 ^1H NMR titration spectra of (I) Zn_2L (5 mM), (II) MTB, (III) $\text{Zn}_2\text{L} \cdot \text{MTB}$, (IV) $\text{Zn}_2\text{L} \cdot 2\text{MTB}$, (V) $\text{Zn}_2\text{L} \cdot \text{MTB}$ + 2.0 equiv. of PPI and (VI) $\text{Zn}_2\text{L} \cdot 2\text{MTB}$ + 2.0 equiv. of PPI in 20% (v/v) $\text{D}_2\text{O}-\text{CD}_3\text{CN}$, where * is the residue of free MTB present in the ensemble.

Therefore, ^1H NMR titrations of 1 : 1 and 1 : 2 ensembles of Zn_2L and MTB with PPI were carried out in 20% D_2O - CD_3CN (Fig. S12 and S13 in the ESI†). The spectra were too complicated to clearly assign the signal to particular protons. Interestingly, after more than 1 equiv. of PPI was added, the spectra of both 1 : 1 and 1 : 2 ensembles became very similar and were almost the same as those observed for the 1 : 1 species of Zn_2L -PPI shown in Fig. 2. ^{31}P NMR titrations of the 1 : 1 and 1 : 2 ensembles of Zn_2L and MTB with PPI in 20% D_2O - CD_3CN (Fig. S14 and S15 in the ESI†) gave almost identical spectra to the results shown in Fig. 3. These results confirm that MTB can be replaced by PPI, and most of the final species are PPI-bound Zn_2L .

3.5 Studies of Zn_2L -indicator ensembles by UV-vis spectrophotometry

From the above results, we can clearly see that the new Zn_2L complex can be used to detect PPI selectively. Therefore, we studied the binding behaviors in aqueous solution using UV-vis spectrophotometry. To understand the sensing phenomenon of our ensembles, we had to determine the ensemble formation constants ($\log \beta$) by employing the SPECFIT32 program. Typically, an experiment was carried out by the titration of Zn_2L to a solution of each indicator. The addition of 0–0.4 equiv. of Zn_2L to a solution of MTB, resulted in a bathochromic shift of the absorption at 450 nm to 530 nm (Fig. 6a)

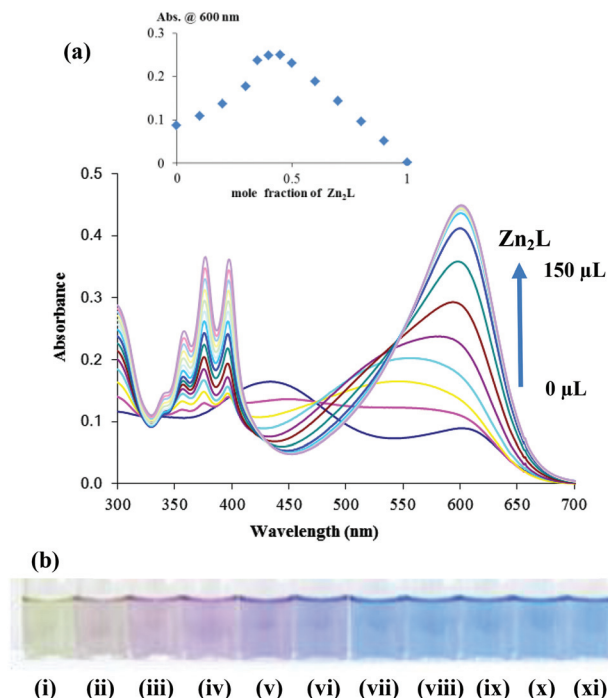


Fig. 6 (a) UV-vis spectra obtained by the addition of Zn_2L (400 μM) to a solution of MTB (20 μM), inset: Job's plot analysis of the MTB-based ensemble and (b) color changes upon increasing the amount of Zn_2L (400 μM) to the MTB (20 μM) solution: (i) free MTB, (ii) 0.1 eq., (iii) 0.2 eq., (iv) 0.3 eq., (v) 0.4 eq., (vi) 0.5 eq., (vii) 0.6 eq., (viii) 0.7 eq., (ix) 0.8 eq., (x) 0.9 eq. and (xi) 1.0 eq.

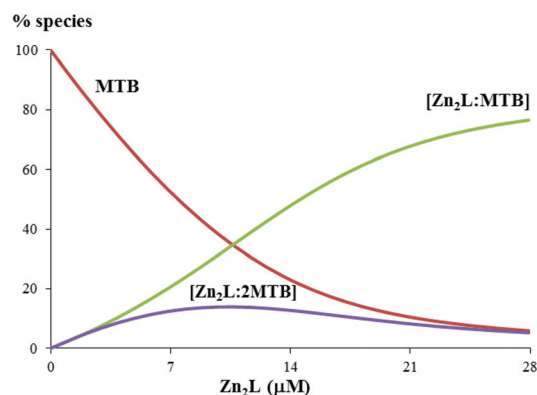


Fig. 7 Concentration profiles of the species present at equilibrium in the UV-vis titration of MTB-base ensemble, where % is referred to the total concentration of MTB.

and the color changed from pale green to violet (Fig. 6b, vials no. i–v), visible to the naked eye. Subsequently, increasing the amount of Zn_2L to the ensemble solutions, caused the bathochromic shift of the absorption at 530 nm to 600 nm and finally the blue color was observed (Fig. 6b, vials no. vi–xi). The UV-vis spectrum at 600 nm was completely saturated around 1.3 equivalents of Zn_2L . The results showed that two species were formed during the titration. From the concentration profile, upon addition of Zn_2L to the MTB solution, a complex of 1 : 2 species of Zn_2L -2MTB was present in a maximum abundance of 15% at 10 μM of Zn_2L . On further addition of Zn_2L , a 1 : 1 species of Zn_2L -MTB could form in 80% abundance, which was much higher than that of the Zn_2L -2MTB species, Fig. 7. The presence of two co-existing ensemble species (1 : 1 and 1 : 2) agreed well with the Job's plot analysis of the ensembles (Fig. 6a inset) and the unresolved ^1H NMR spectra shown in Fig. 5.

Ensembles of Zn_2L and PV, BPG as well as XO were also studied by UV-vis spectrophotometry, and their absorption spectra are shown in Fig. S16–S18 in the ESI†. Stepwise formation constants of all ensembles calculated by SPECFIT32 are tabulated in Table 1. The results showed that two species were formed during the titration. Upon addition of Zn_2L to the indicator (I) solution, the 1 : 2 Zn_2L -2I species occurred because the concentration of I was much higher than that of Zn_2L at the beginning of titration. Further addition of Zn_2L would yield the Zn_2L -I species. Therefore, the Zn_2L -I would exist in high concentration at the end of titrations. The presence of two co-existing ensemble species of those three indicators (1 : 1 and 1 : 2) agreed well with the Job's plots (Fig. S16–S18 in the ESI†).

Table 1 Stepwise ensemble formation constants ($\log \beta$) between Zn_2L and the indicators

	$\log \beta_1$	$\log \beta_2$
PV	3.98 ± 0.38	8.43 ± 0.22
BPG	4.76 ± 0.26	9.14 ± 0.26
MTB	6.05 ± 0.16	10.80 ± 0.32
XO	7.72 ± 0.18	13.48 ± 0.28

XO showed the highest binding constant ($\log \beta_1$) to the Zn_2L receptor compared to PV, BPG and MTB suggesting that XO could sit in the ensemble cleft with the strongest interactions with Zn_2L . The $\log \beta_1$ of MTB to Zn_2L was lower than that of XO. Presumably, the two bulky isopropyl groups of MTB, giving the more steric hindrance than XO, decreased the binding affinity of MTB to the Zn^{2+} metal ions. For PV and BPG indicators, $\log \beta_1$ values were smaller than that of XO and MTB suggesting that their structural scaffolds were less suitable for coordinating to the two metal centers in Zn_2L .

3.6 PPI sensing studies under the IDA approach

The screen test of our IDA system suggests that MTB was the best indicator to be replaced solely by PPI. In addition, results from the NMR and UV studies suggest that upon the addition of excess MTB to Zn_2L , both 1:1 and 1:2 Zn_2L -MTB were formed with the former most dominant in solution. To investigate the sensing ability of PPI under IDA experiments, the chemo-sensing ensembles were prepared by mixing Zn_2L and the MTB indicator in a 1:2 molar ratio in 20% (v/v) water-acetonitrile solution buffered at pH 7.4 with HEPES. The displacement of indicators by anions was carried out by the addition of various anions to those ensemble solutions. Subsequently, colorimetric changes as well as the UV-visible spectra changes were examined. Upon addition of various anions (as tetrabutylammonium salts, 7.5 equivalents) to the MTB- Zn_2L based ensemble solutions, only PPI could turn the color from blue to violet, while other anions did not give rise to either changes in the UV-vis spectra or in color. These results suggest that those anions did not interfere with the PPI sensing. Indeed, the lack of interference may be due to the fact that the binding affinities of the other anions with Zn_2L are weaker than that of MTB with Zn_2L . The results suggested that MTB possessed an appropriate affinity to Zn_2L to facilitate such a selective response to PPI.

The addition of PPI 0–3 equiv. to the 1:2 base ensemble of Zn_2L -2MTB led to the hypsochromic shift corresponding to the disappearance of the absorption band of the ensemble at 600 nm and the appearance of a new absorption band around 530 nm. The UV-vis spectrum at 530 nm was completely saturated at 3 equiv. of PPI (Fig. 8a). In addition, the color of the ensemble turned from blue to violet. The apparent competitive binding constants of PPI with Zn_2L -MTB in the displacement assay were determined by SPECFIT32 to be $\log \beta_1 = 8.97 \pm 0.28$ and $\log \beta_2 = 10.79 \pm 0.28$ corresponding to $[\text{Zn}_2\text{L} \cdot 2\text{PPI}]$ and $[2\text{Zn}_2\text{L} \cdot 2\text{PPI}]$, respectively (Fig. 8b). The presence of the $[2\text{Zn}_2\text{L} \cdot 2\text{PPI}]$ species at the end of titration agreed well with the most stable structure shown in Fig. 4 obtained from DFT calculations. It should be noted that, the observed violet color in the PPI competition experiments was similar to the color observed in the ensemble formation experiments (see Fig. 6b, vial no. iii).

3.7 Studies of interferences and limit of detection

To further explore the effective applications of the Zn_2L -MTB ensemble, the competition experiments were also measured.

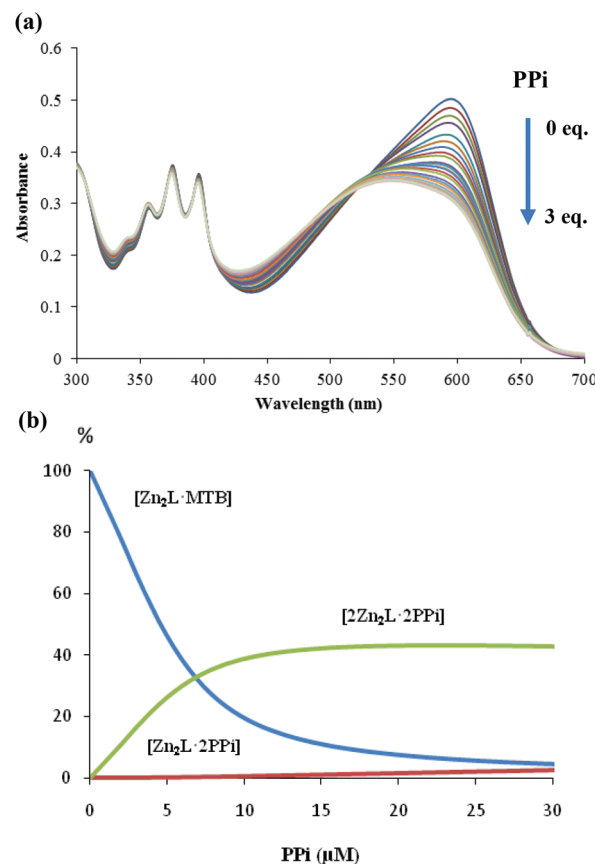


Fig. 8 (a) UV-vis spectra obtained for the addition of PPI (1 mM) to a 1:2 ensemble solution of Zn_2L and MTB (20 μM) and (b) concentration profiles of the species present at equilibrium in the UV-vis titration of PPI displaced $[\text{Zn}_2\text{L} \cdot \text{MTB}]$ ensemble.

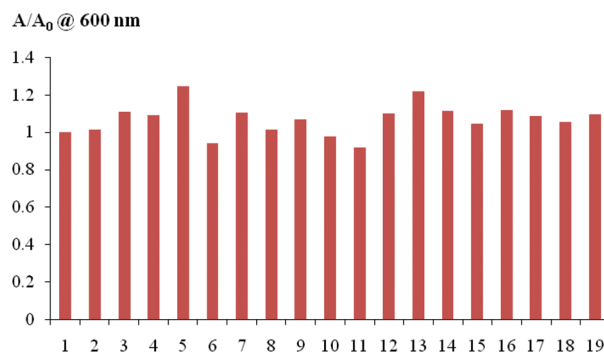


Fig. 9 Sensing of PPI in the presence of competitive anions (7.5 equivalents) in 20% (v/v) water-acetonitrile solution buffered at pH 7.4 with 10 mM HEPES; (1) = Zn_2L -MTB ensemble + PPI, (2) = (1) + AcO^- , (3) = (1) + AMP, (4) = (1) + ADP, (5) = (1) + ATP, (6) = (1) + Br^- , (7) = (1) + Cl^- , (8) = (1) + F^- , (9) = (1) + I^- , (10) = (1) + BzO^- , (11) = (1) + CN^- , (12) = (1) + CO_3^{2-} , (13) = (1) + H_2PO_4^- , (14) = (1) + HCO_3^{2-} , (15) = (1) + PO_4^{3-} , (16) = (1) + NO_3^- , (17) = (1) + OH^- , (18) = (1) + SCN^- and (19) = (1) + SO_4^{2-} .

As shown in Fig. 9, even in the presence of a large excess of other competitive anions, no obvious interference with the detection of PPI was observed. These results clearly indicated

that the Zn₂L-MTB ensemble was useful for selectively sensing PPI even under competition from other related anions, which would fulfill the purpose of real-time monitoring. In addition, the detection limit of the absorption changes calculated on the basis of $3\sigma/K$ was 0.3 μM (Fig. S20, ESI†).²²

4. Conclusions

We demonstrated for the first time that the tripodal tetramine dinuclear Zn(II) complex Zn₂L could be used to discriminate PPI from other phosphate containing anions under the indicator displacement assay using MTB as the indicator. Based on DFT calculations and NMR data, the binding mode of PPI to Zn₂L was the 2 : 2 complex species. It was found that the MTB indicator possessed suitable binding affinities with Zn₂L compared to the previously reported PV indicator found in dinuclear Zn(II)-DPA systems resulting in the high discrimination between PPI and other phosphate containing anions. Therefore, the new Zn₂L-MTB ensemble system could be used to detect PPI selectively with the detection limit of 0.3 μM in 20% (v/v) water-acetonitrile solution buffered at pH 7.4 with HEPES.

Acknowledgements

This work was supported by the Thailand Research Fund (RSA5580031 and RTA5380003) and the Center for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Commission on Higher Education, Ministry of Education are gratefully acknowledged. S.W. is a Ph.D. student supported by the Royal Golden Jubilee Program (PHD/0236/2552). P.S. is a student supported by the Science Achievement Scholarship of Thailand.

Notes and references

- 1 A. E. Hargrove, S. Nieto, T. Zhang, J. L. Sessler and E. V. Anslyn, *Chem. Rev.*, 2011, **111**, 6603.
- 2 (a) S. K. Kim, D. H. Lee, J.-I. Hong and J. Yoon, *Acc. Chem. Res.*, 2009, **42**, 23 and references there in; (b) D. J. Liu, G. M. Credo, X. Su, K. Wu, H. C. Lim, O. H. Elibol, R. Bashir and M. Varma, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 8310; (c) J. F. Zhang, M. Park, W. X. Ren, Y. Kim, S. J. Kim, J. H. Jung and J. S. Kim, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 3568; (d) G. Su, Z. Liu, Z. Xie, F. Qian, W. He and Z. Guo, *Dalton Trans.*, 2009, 7888; (e) C. R. Lohani, J.-M. Kim, S.-Y. Chung, J. Yoon and K.-H. Lee, *Analyst*, 2010, **135**, 2079; (f) P. Sokkalingam, D. S. Kim, H. Hwang, J. L. Sessler and C.-H. Lee, *Chem. Sci.*, 2012, **3**, 1819; (g) S. Yang, G. Feng and N. H. Williams, *Org. Biomol. Chem.*, 2012, **10**, 5606; (h) L. J. Liang, X. J. Zhao and C. Z. Huang, *Analyst*, 2012, **137**, 953.
- 3 (a) P. Nyren, *Anal. Biochem.*, 1987, **167**, 235; (b) M. Ronaghi, S. Karamohamed, B. Pettersson, M. Uhlen and P. Nyren, *Anal. Biochem.*, 1996, **242**, 84; (c) T. Tabary and L. J. Ju, *Immunol. Methods*, 1992, **156**, 55.
- 4 (a) M. Doherty, C. Becher, M. Regan, A. Jones and J. Ledingham, *Ann. Rheum. Dis.*, 1996, **66**, 432; (b) A. E. Timms, Y. Zhang, R. G. Russell and M. A. Brown, *Rheumatology*, 2002, **41**, 275.
- 5 (a) S. L. Wiskur, H. Ait-Haddou, J. J. Lavigne and E. V. Anslyn, *Acc. Chem. Res.*, 2001, **34**, 963; (b) J. J. Lavigne and E. V. Anslyn, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 1999, **38**, 3666; (c) B. T. Nguyen and E. V. Anslyn, *Coord. Chem. Rev.*, 2006, **250**, 3118.
- 6 (a) H. T. Ngo, X. Liu and K. A. Jolliffe, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 4928; (b) A. J. Surman, C. S. Bonnet, M. P. Lowe, G. D. Kenny, J. D. Bell, E. Tóth and R. Vilar, *Chem. – Eur. J.*, 2011, **17**, 223.
- 7 (a) K. M. K. Swamy, S. K. Kwon, H. N. Lee, S. Kumar, J. S. Kim and J. Yoon, *Tetrahedron Lett.*, 2007, **48**, 8683; (b) S. Y. Kim and J.-I. Hong, *Tetrahedron Lett.*, 2009, **50**, 1951; (c) R. G. Hanshaw, S. M. Hilkert, H. Jiang and B. D. Smith, *Tetrahedron Lett.*, 2004, **45**, 8721; (d) J. V. Carolan, S. J. Butler and K. A. Jolliffe, *J. Org. Chem.*, 2009, **74**, 2992; (e) H. H. Jang, S. Yi, M. H. Kim, N. H. Lee and M. S. Han, *Tetrahedron Lett.*, 2009, **50**, 624.
- 8 (a) L. Tang, Y. Li, H. Zhang, Z. Guo and J. Qian, *Tetrahedron Lett.*, 2009, **50**, 6844; (b) J. H. Lee, J. Park, M. S. Lah, J. Chin and J.-I. Hong, *Org. Lett.*, 2007, **9**, 3729; (c) B. P. Morgans, S. He and R. C. Smith, *Inorg. Chem.*, 2007, **46**, 9262; (d) J. Gao, T. Riis-Johannessen, R. Scopelliti, X. Qian and K. Severin, *Dalton Trans.*, 2010, **39**, 7114.
- 9 (a) K. K. Y. Yuen and K. A. Jolliffe, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 4824; (b) X. Liu, H. T. Ngo, Z. G. Stephen, S. J. Butler and K. A. Jolliffe, *Chem. Sci.*, 2013, **4**, 1680; (c) Z.-H. Chen, Y. Lu, Y. B. He and X.-H. Huang, *Sens. Actuators, B*, 2010, **149**, 407.
- 10 C. S. Burdette, W. Bu and J. S. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 1778.
- 11 S. Watchasit, A. Kaowliew, C. Suksai, T. Tuntulani, W. Ngeonate and C. Pakawatchai, *Tetrahedron Lett.*, 2010, **51**, 3398.
- 12 R. A. Binstead, B. Jung and A. D. Zuberbühler, *SPECFIT/32 Global analysis System, 3.0*, Spectrum Software Associates, Marlborough, MA, 2000.
- 13 C. Incarvito, B. Rhatigan, L. A. Rheingold, J. C. Qin, L. A. Gavrilova and B. Bosnich, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2001, 3478.
- 14 (a) M. Benamor, K. Belhamel and M. T. Draa, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2000, **23**, 1033; (b) J. Ghasemi and S. Seifi, *Talanta*, 2004, **63**, 751; (c) I. M. Steinberg, A. Lobnik and O. S. Wolfbeis, *Sens. Actuators, B*, 2003, **90**, 230.
- 15 H. H. Jang, S. Yi, M. H. Kim, S. Kim, N. H. Lee and M. S. Han, *Tetrahedron Lett.*, 2009, **50**, 6241.
- 16 O. F. Ikotun, N. Marino, P. E. Kruger, M. Julve and R. P. Doyle, *Coord. Chem. Rev.*, 2010, **254**, 890.
- 17 A. D. Becke, *J. Chem. Phys.*, 1993, **98**, 5648.
- 18 C. Lee, W. Yang and R. G. Parr, *Phys. Rev. B: Condens. Matter*, 1988, **37**, 785.

- 19 P. J. Hay and W. R. Wadt, *J. Chem. Phys.*, 1985, **82**, 270.
- 20 M. J. Frisch, *et al.*, *GAUSSIAN 09 (Revision D.01)*, Gaussian Inc., Wallingford, CT, 2014.
- 21 H. N. Lee, Z. Xu, S. K. Kim, K. M. K. Swamy, Y. Kim, S.-J. Kim and J. Yoo, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 3828.
- 22 Detection limit is defined by $3\sigma/K$, where σ refers to the standard deviation of the blank solutions and K is the slope of the linear regression curve observed in Fig. S12 in the ESI.† See: M. Hu and G. Feng, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 6951.

อิทธิพลของโครงสร้างลิแกนด์ในการตรวจวัดกรดอะมิโนฮิสทีดิน
ด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ โดยใช้สารประกอบไดนิวเคลียร์คอปเปอร์ (II)
กับลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของแอนทราซีน

Effect of Ligand Structures for Determination of Histidine Using Dinuclear Copper (II)
Complexes with Anthracene Derivative Ligands by Indicator
Displacement Assay Approach

สรายุทธ เวชสิทธิ์¹ ธวัชชัย ตันทุลานี^{1*} และ จอมใจ สุกใส^{2*}

Sarayut Watchasit¹ Thawatchai Tuntulani^{1*} and Chomchai Suksai^{2*}

¹ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

² ศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

¹ Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University

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

Received : 13 September 2016

Accepted : 29 September 2016

Published online : 10 October 2016

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการนำเอนเซมเบิลที่เตรียมจากสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์คอปเปอร์ (II) กับลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของแอนทราซีน Cu₂L1 และ Cu₂L2 กับฟลูออเรสเซนต์อินดิเคเตอร์ Eosin Y มาใช้ในการตรวจวัดกรดอะมิโนฮิสทีดิน (His) ด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ โดยใช้สารละลาย 0.01 M HEPES บัฟเฟอร์ pH 7.4 ใน 80/20 (%v/v) MeCN/H₂O เป็นตัวทำละลาย จากการทดลองพบว่าค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดสารเชิงซ้อนระหว่างสารประกอบ Cu₂L1 และ Cu₂L2 กับอินดิเคเตอร์ Eosin Y มีค่า log K เท่ากับ 3.82 ± 0.25 และ 4.91 ± 0.33 ตามลำดับจากการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำเอนเซมเบิลทั้งสองมาใช้ในการเป็นฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์สำหรับการตรวจวัดกรดอะมิโนฮิสทีดิน พบว่ามีเพียงเอนเซมเบิลที่เตรียมจากสารประกอบ Cu₂L2 และอินดิเคเตอร์ Eosin Y เท่านั้นที่สามารถนำไปใช้ในการตรวจวัด His ได้อย่างจำเพาะเจาะจง ในขณะที่เอนเซมเบิลที่เตรียมจากสารประกอบ Cu₂L1 นั้นสามารถถูกรบกวนได้จากกรดอะมิโนชนิดอื่นๆ ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์คอปเปอร์ (II) Cu₂L2 สามารถใช้เป็นรีเซปเตอร์สำหรับตรวจวัด His โดยใช้ฟลูออเรสเซนต์อินดิเคเตอร์ Eosin Y เป็นหน่วยให้สัญญาณด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์

คำสำคัญ : สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์คอปเปอร์ เทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์
ลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของแอนทราซีน กรดอะมิโนฮิสทีดิน ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์

*Corresponding author. E-mail : thawac@chula.ac.th; jomjai@buu.ac.th

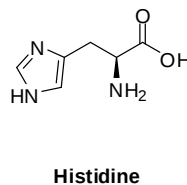
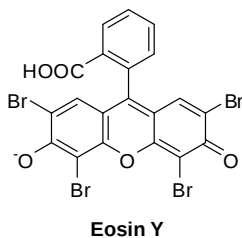
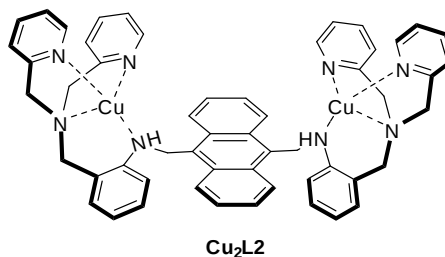
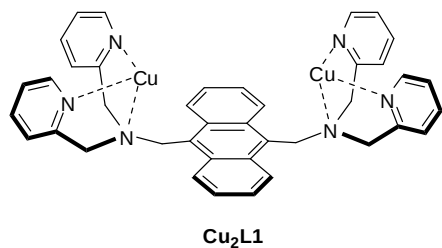
Abstract

The formation of the ensembles between dinuclear copper (II) complexes of anthracene derivative ligands, $\text{Cu}_2\text{L1}$ and $\text{Cu}_2\text{L2}$, with fluorescence indicator Eosin Y was studied, aiming to employ the ensembles to detect histidine (His) by using an indicator displacement assay approach (IDAs). Experiments were carried out in 80/20 (%v/v) MeCN/ H_2O in the presence of 0.01 M HEPES buffer at pH 7.4. The ensemble formation constants ($\log K$) of $\text{Cu}_2\text{L1}$ and $\text{Cu}_2\text{L2}$ with Eosin Y were calculated to be 3.82 ± 0.25 and 4.91 ± 0.33 , respectively. Interestingly, it was found that only $\text{Cu}_2\text{L2}$ ensemble could detect His selectively, whereas the $\text{Cu}_2\text{L1}$ ensemble could respond to other amino acids. Thus, $\text{Cu}_2\text{L2}$ can be used as a receptor to determine His with fluorescence indicator Eosin Y as a signaling unit under an indicator displacement assay approach.

Keywords : dinuclear copper (II) complexes, indicator displacement assay, anthracene derivative ligands, histidine amino acid, fluorescence sensor

บทนำ

ในระยะเวลาประมาณสองทศวรรษที่ผ่านมา นักวิจัยพบว่าการอุบัติใหม่ของภาวะผิดปกติที่มีสาเหตุมาจากความผิดปกติของระดับสารเคมีในร่างกายของมนุษย์มากขึ้น อาทิเช่น ฮิสทีน แอนไอออน และกรดอะมิโน ทำให้นักวิทยาศาสตร์ในปัจจุบันให้ความสนใจในการพัฒนาเทคนิคที่จะใช้สำหรับตรวจวัดปริมาณสารเคมีในเซลล์เหล่านี้มากขึ้น ในกลุ่มของกรดอะมิโนที่จำเป็น 20 ชนิด พบว่ากรดอะมิโนฮิสทีน (His) มีบทบาทต่อกระบวนการต่างๆ ในร่างกายของมนุษย์ เช่น มีบทบาทในกระบวนการนำส่งกระแสประสาท (Sullivan Jr *et al.*, 1996) ในผู้ป่วยโรคพาร์คินสันพบว่าปริมาณฮิสทีนในระดับต่ำกว่าปกติ (Nan *et al.*, 1999) ในขณะที่ผู้ป่วยภาวะบวมน้ำ (histidinemia) จะมีปริมาณ His สูงกว่าปกติ (Kovach & Meyerhoff, 1982) นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยพบว่ากรดอะมิโนฮิสทีนได้ถูกนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในร่างกายของสัตว์ที่มีภาวะความดันโลหิตสูงขณะตั้งครรภ์ ซึ่งภาวะดังกล่าวนี้จะมีปริมาณของไกลโคโปรตีนที่มีกรดอะมิโนฮิสทีนเป็นองค์ประกอบหลัก (Histidine-Rich Glycoprotein หรือ HRG) (Bolin *et al.*, 2011) อยู่ในสภาวะที่ต่ำกว่าปกติ วิธีที่ใช้ในการตรวจวัดกรดอะมิโนฮิสทีนที่ใช้ในปัจจุบันได้แก่ Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) (Kaspar *et al.*, 2008) และ Liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) (Tang *et al.*, 2008) แต่ปัญหาที่พบคือวิธีดังกล่าวนี้มีข้อจำกัดที่ต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาแพงและต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเสนอวิธีการตรวจวัดกรดอะมิโนฮิสทีนด้วยโมเลกุลเซ็นเซอร์ทางเคมีเชิงแสงโดยอาศัยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ (Indicator displacement assay) (Wiskur *et al.*, 2001) โดยใช้สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์ของคอปเปอร์ (II) กับลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของแอนทราซีนที่มีหมู่ไดฟีโกลิลแอมีน ($\text{Cu}_2\text{L1}$) และลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของแอนทราซีนที่มีหมู่ไทโรโพลแอมีน ($\text{Cu}_2\text{L2}$) เป็นโมเลกุลรีเซปเตอร์ และใช้ฟลูออเรสเซนต์อินดิเคเตอร์ Eosin Y เป็นหน่วยให้สัญญาณในการตรวจวัด ซึ่งโครงสร้างของโมเลกุลที่ใช้ในงานวิจัยนี้แสดงได้ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้างของสารประกอบโคออร์ดิเนชันไดนิวเคลียร์ของคอปเปอร์ (II) กับลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของแอนทราซีน ที่มีหมู่ไดฟิโคลิลเอมีน (Cu₂L1) และไทโรฟิดลเอมีน (Cu₂L2) อินดิเคเตอร์ Eosin Y และกรดอะมิโนฮิสทีดีน (His)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สารเคมี

กรดอะมิโนที่จำเป็นชนิดแอลฟา 20 ชนิดและ HEPES บัฟเฟอร์ จากบริษัท Aldrich, EtOH, MeOH, MeCN และ CH₂Cl₂ จากบริษัท Fluka, Eosin Y จากบริษัท Aldrich, น้ำกลั่น จากบริษัท General Hospital Products Public Co., Ltd,

2. อุปกรณ์และเครื่องมือ

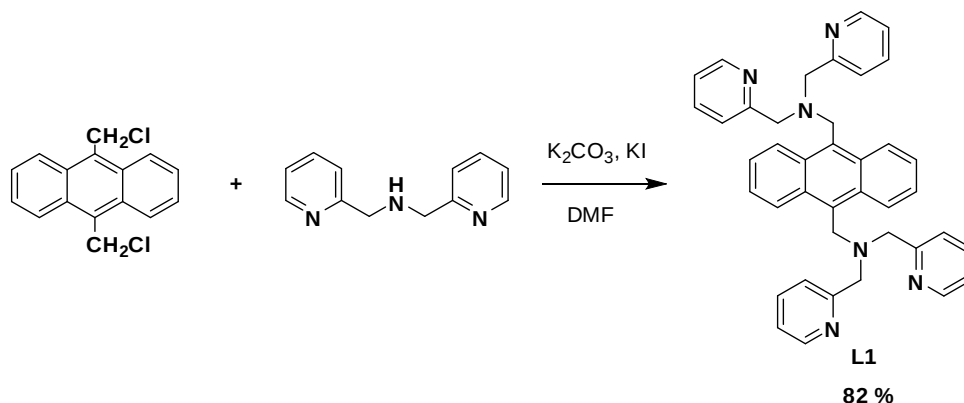
นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรมิเตอร์ ยี่ห้อ Bruker รุ่น AVANCE 400 และฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ Agilent รุ่น Cary Eclipse

3. วิธีการทดลอง

3.1 การสังเคราะห์ลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของแอนทราซีนที่มีหมู่ไดฟิโคลิลเอมีน

ละลาย 9,10-bis(chloromethyl)anthracene 3.01 กรัม กับ Dipicolylamine (Incarvito *et al.*, 2001) และ K₂CO₃ 5.05 กรัม ใน DMF 30 มิลลิลิตร แล้วค่อย ๆ หยดสารละลาย KI 1.80 กรัม ใน DMF 10 มิลลิลิตร แล้วคนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม 1 M HCl จนกระทั่งสารละลายเป็นกรด แล้วสกัดด้วย Ethyl acetate นำชั้นน้ำมาเติม 4 M NaOH จนกระทั่งมีค่า pH เป็นกลาง แล้วทำการสกัดด้วยสารละลายผสม Ethyl acetate : THF (1:1 v/v) แล้วนำเอาชั้นตัวทำละลายอินทรีย์มาล้างน้ำ และกำจัดน้ำออกด้วย MgSO₄ ที่ปราศจากน้ำ นำสารละลายไประเหยตัวทำละลายโดยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบลดความดันจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นของเหลวสีน้ำตาล ทำการตกผลึกด้วย CH₂Cl₂ : diethyl ether : MeOH (1:1:1 v/v) จะได้ผลิตภัณฑ์ผลึกสีเหลืองร้อยละของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 82

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 8.43 (d, J = 5.2 Hz, 4H, ArH), 8.40 (dd, J = 3.2, 3.6 Hz, 4H, ArH), 7.49-7.52 (m, 4H, ArH), 7.43 (dd, J = 3.2, 7.4 Hz, 4H, ArH), 7.28 (d, J = 8.0 Hz, 4H, ArH), 7.03 (dd, J = 5.2, 6.0 Hz, 4H, ArH), 4.64 (s, 4H, $-\text{CH}_2-$), 3.87 (s, 8H, $-\text{CH}_2-$)



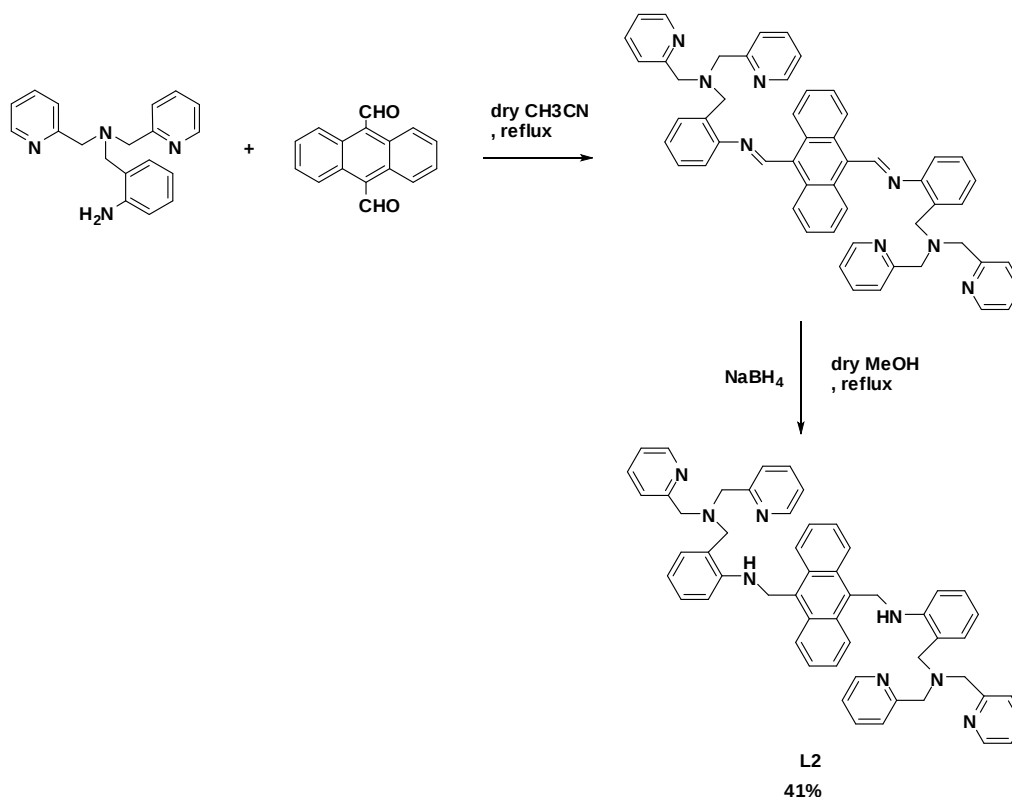
ภาพที่ 2 แผนภาพแสดงวิธีการสังเคราะห์ลิแกนด์ L1

3.2 การสังเคราะห์ลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของแอนทราซีนที่มีหมู่ไทโรโพลด์แอมีน

ละลายสารประกอบไทโรโพลด์แอมีน 1.93 กรัม ด้วย MeCN ที่ปราศจากน้ำ 50 มิลลิลิตร จากนั้นจึงเติม 9,10-diformylanthracene 0.64 กรัม ลงในสารละลายดังกล่าว ทำการรีฟลักซ์สารละลายผสมภายใต้บรรยากาศแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายโดยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบลดความดัน ได้ผลิตภัณฑ์เป็นของเหลวสีน้ำตาลแดง ทำการละลายสารผลิตภัณฑ์ดังกล่าวด้วย MeOH 100 มิลลิลิตร นำสารละลายผสมมาทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ จากนั้นค่อยๆเติม NaBH_4 4.18 กรัม ลงในสารละลายผสม ทำการรีฟลักซ์สารละลายผสมภายใต้บรรยากาศแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำสารละลายมาทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้องและเติมน้ำ 150 มิลลิลิตร ลงในสารละลายดังกล่าว นำสารละลายผสมมาระเหย MeOH โดยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบลดความดัน จากนั้นนำส่วนที่เหลือมาสกัดด้วย CH_2Cl_2 ล้างด้วยน้ำครั้งละ 100 มิลลิลิตร 3 ครั้ง และนำชั้น CH_2Cl_2 มากำจัดน้ำด้วย MgSO_4 ที่ปราศจากน้ำ นำสารละลายผสมที่ได้มาระเหย CH_2Cl_2 โดยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบลดความดัน และทำการตกผลึกด้วย CH_3OH : diethyl ether (1:1 v/v) จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีเหลือง ร้อยละของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 41 (Watchasit *et al.*, 2014)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 8.45 (q, $J = 3.6$ Hz, 4H, ArH), 8.03 (d, $J = 4.4$ Hz, 4H, ArH), 7.58 (q, $J = 3.6$ Hz, 4H, ArH), 7.38 (t, $J = 8$ Hz, 2H, ArH), 7.18 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, ArH), 7.10 (d, $J = 8$ Hz, 2H, ArH), 6.73 (m, 10H, ArH), 6.51 (d, $J = 7.6$ Hz, 4H, ArH), 6.33 (s, 2H, -NH-), 5.28 (s, 4H, -CH₂-), 3.59 (s, 4H, -CH₂-), 3.52 (s, 8H, -CH₂-).

ESI-MS (positive mode); 811.4281 $[\text{M}+\text{H}]^+$.



ภาพที่ 3 แผนภาพแสดงวิธีการสังเคราะห์ลิแกนด์ L2

3.3 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์ของ Cu(II) กับลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของแอนทราซีนที่มีหมู่ไดพิโคลิลเอมีน ($\text{Cu}_2\text{L1}$)

ทำการละลายสารประกอบลิแกนด์ L1 ปริมาณ 0.5 กรัม ใน EtOH 20 มิลลิลิตร จากนั้นค่อยๆ หยดสารละลาย $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ที่ละลายใน EtOH 20 มิลลิลิตร ลงในสารละลายดังกล่าว นำสารละลายผสมที่ได้ไปทำการรีฟลักซ์ภายใต้บรรยากาศแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อสารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้องจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นตะกอนสีเขียว ทำการกรองผลิตภัณฑ์ที่ได้และล้างด้วย CH_2Cl_2 และ EtOH จะได้ของแข็งสีเขียวร้อยละของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 78

ESI-MS (positive mode); 1025.39 $[\text{M}+3\text{ClO}_4]^+$.

3.4 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์ของ Cu(II) กับลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของแอนทราซีนที่มีหมู่ไทโรโพลแอลมีน (Cu₂L2)

ทำการละลายสารประกอบลิแกนด์ L2 ปริมาณ 0.5 กรัม ใน MeOH 20 มิลลิลิตร จากนั้นค่อยๆ หยดสารละลาย Cu(ClO₄)₂·6H₂O ที่ละลายใน MeOH 20 มิลลิลิตร ลงในสารละลายดังกล่าว นำสารละลายผสมที่ได้ไปทำการรีฟลักซ์ภายใต้บรรยากาศแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อสารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้องจะได้ผลึกภัณฑ์เป็นของแข็งสีเขียว ทำการกรองผลึกภัณฑ์ที่ได้และล้างด้วย CH₂Cl₂ และ MeOH ได้ของแข็งสีเขียวร้อยละของผลึกภัณฑ์เท่ากับ 62

ESI-MS (positive mode, m/z): [M + 3ClO₄]⁺ = 1235.0554

3.5 การหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนเซมเบิลระหว่างอินดิเคเตอร์ Eosin Y กับสารประกอบโคออร์ดิเนชัน Cu₂L1 และ Cu₂L2 ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ไทเทรชัน

ปิเปตสารละลายอินดิเคเตอร์ Eosin Y ความเข้มข้น 1 μM ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในควิเวท จากนั้นค่อยๆ โทเทรตสารละลายของสารประกอบโคออร์ดิเนชันแต่ละชนิด ความเข้มข้น 20 μM ลงในควิเวทดังกล่าวด้วยไมโครไซริงค์ หลังจากนั้นคนสารละลายให้เข้ากัน นำสารละลายเอนเซมเบิลที่ได้ไปวัดค่าความเข้มแสง โดยเครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ทำการไทเทรตจนกระทั่งค่าความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์คงที่ นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์กับความยาวคลื่น และคำนวณหาค่าคงที่ของการเกิดเอนเซมเบิลโดยใช้โปรแกรม SPECFIT (Binstead *et al.*, 2000)

3.6 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกับกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ของเอนเซมเบิล

ปิเปตสารละลายอินดิเคเตอร์ Eosin Y ความเข้มข้น 1 μM ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในควิเวท จากนั้นใส่สารละลายโคออร์ดิเนชันแต่ละชนิดที่มีความเข้มข้น 20 μM ปริมาตร 200 ไมโครลิตร คนสารละลายให้เข้ากันและนำสารละลายเอนเซมเบิลดังกล่าวไปวัดค่าความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ จากนั้นใส่กรดอะมิโนที่มีความเข้มข้น 0.1 mM ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงในควิเวทที่มีสารละลายเอนเซมเบิลอยู่ หลังจากนั้นคนสารละลายให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ และทำการทดลองซ้ำเช่นนี้กับกรดอะมิโนชนิดอื่นๆ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์กับความยาวคลื่น การพิจารณาว่ากรดอะมิโนชนิดใดสามารถแทนที่ Eosin Y และการพิจารณาว่าเอนเซมเบิลใดมีความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกับกรดอะมิโนชนิดใดนั้น สามารถทำได้โดยสังเกตว่ากรดอะมิโนชนิดใดทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของค่าความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 545 nm ซึ่งเป็นค่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของ Eosin Y ในรูปอิสระ

3.7 การศึกษาอันตรกิริยาระหว่างการแทนที่ของ His กับสารประกอบของเอนเซมเบิลที่เกิดจากสารประกอบโคออร์ดิเนชัน Cu₂L2 กับอินดิเคเตอร์ Eosin Y

ปิเปตสารละลายอินดิเคเตอร์ Eosin Y ความเข้มข้น 1 μM ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในควิเวท จากนั้นปิเปตสารประกอบโคออร์ดิเนชัน Cu₂L2 ความเข้มข้น 20 μM ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในควิเวทดังกล่าว คนสารละลายให้เข้ากัน นำสารละลายดังกล่าวไปวัดค่าความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ หลังจากนั้นเติมสารละลายของ His ความเข้มข้น

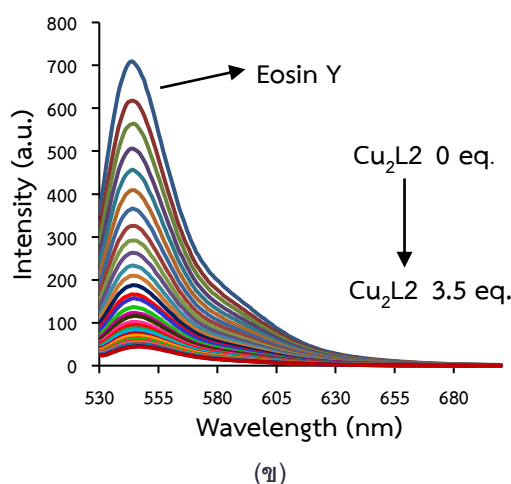
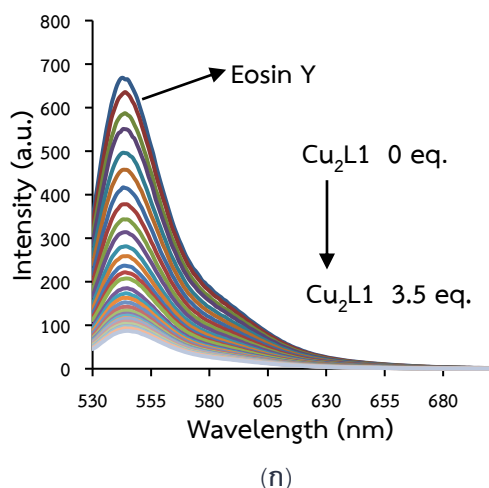
0.1 mM ครั้งละ 10 ไมโครลิตร ลงในคิวเวตดังกล่าว คนสารละลายให้เข้ากัน และนำไปวัดค่าความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ และนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์กับความยาวคลื่น และคำนวณหาค่าคงที่การเกิดของสารประกอบโคออร์ดิเนชันโดยใช้โปรแกรม SPECFIT

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1. การหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนเซมเบิลระหว่างอินดิเคเตอร์ Eosin Y กับสารประกอบ $\text{Cu}_2\text{L1}$ และ $\text{Cu}_2\text{L2}$ ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ไทเทรชัน

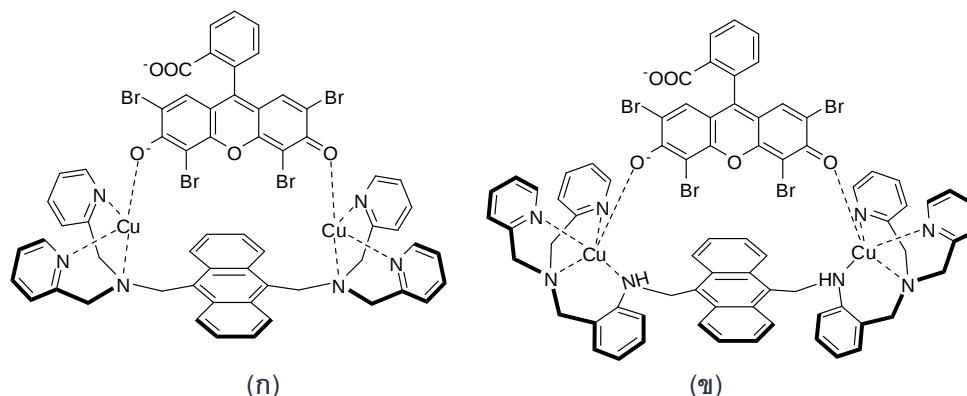
จากการทดลองพบว่าสารละลายอินดิเคเตอร์ Eosin Y มีค่าความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์สูงสุดที่ความยาวคลื่น 545 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 525 \text{ nm}$) และเมื่อทำการไทเทรตสารละลายของสารประกอบโคออร์ดิเนชันของคอปเปอร์ (II) ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนลงไปยังสารละลายอินดิเคเตอร์ดังกล่าว พบว่าค่าความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของอินดิเคเตอร์ในรูปอิสระจะมีค่าลดลงเนื่องจากคอปเปอร์ (II) ไออนเป็นตัว quencher ที่ดี (Liu *et al.*, 2011) ดังนั้นเมื่ออินดิเคเตอร์ Eosin Y เกิดพันธะโคออร์ดิเนชันกับคอปเปอร์ (II) ในสารประกอบโคออร์ดิเนชัน จึงทำให้ความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของอินดิเคเตอร์ Eosin Y มีค่าลดลง หลังจากนั้นนำข้อมูลที่ได้จากการทำฟลูออเรสเซนซ์ไทเทรชันมาคำนวณหาค่าคงที่ความเสถียร (log K) ของการเกิดเอนเซมเบิลโดยใช้โปรแกรม SPECFIT

จากภาพที่ 4-ก จะเห็นได้ว่า เมื่อค่อย ๆ เติมสารละลายของสารประกอบ $\text{Cu}_2\text{L1}$ ลงไปยังสารละลายของอินดิเคเตอร์ Eosin Y ในรูปอิสระจะทำให้ความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 545 nm มีค่าลดลงและเมื่อนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาค่า log K พบว่ามีค่าเท่ากับ 3.82 ± 0.25 ซึ่งสอดคล้องกับการเกิดของสปีชีส์ $[\text{Cu}_2\text{L1} \cdot \text{Eosin Y}]$ ในทำนองเดียวกันจากภาพที่ 4-ข จะเห็นได้ว่า เมื่อค่อย ๆ เติมสารละลายของสารประกอบ $\text{Cu}_2\text{L2}$ ลงไปยังสารละลายของอินดิเคเตอร์ Eosin Y จะทำให้ความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 545 nm มีค่าลดลงเช่นเดียวกันและเมื่อนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาค่า log K พบว่ามีค่าเท่ากับ 4.91 ± 0.33 ซึ่งสอดคล้องกับการเกิดของสปีชีส์ $[\text{Cu}_2\text{L2} \cdot \text{Eosin Y}]$



ภาพที่ 4 ฟลูออเรสเซนซ์ไทเทรชันสเปกตรัมระหว่างอินดิเคเตอร์ Eosin Y และ (ก) สารประกอบ $\text{Cu}_2\text{L1}$ (ข) สารประกอบ $\text{Cu}_2\text{L2}$ ในสารละลาย 0.01 M HEPES pH 7.4 ใน 80/20 (%v/v) $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ ($\lambda_{\text{ex}} = 525 \text{ nm}$)

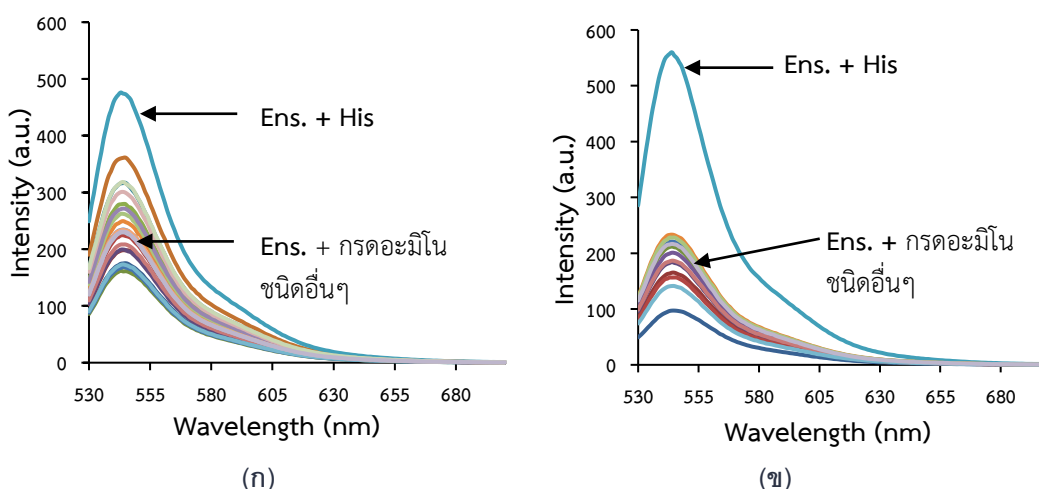
โครงสร้างที่เป็นไปได้ของเอนไซม์เบิลทั้งสองแสดงได้ในภาพที่ 5 จะเห็นว่าอินดิเคเตอร์ Eosin Y ใช้ออกซิเจน 2 อะตอมของหมู่คีโตนและหมู่แอลกอฮอล์ ในการสร้างพันธะโคออร์ดิเนตโควาเลนต์กับ Cu^{2+} แต่ละอะตอมในโครงสร้างของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน (Zhang & Yoshida, 2011)



ภาพที่ 5 โครงสร้างที่เป็นไปได้ของเอนไซม์เบิลระหว่าง (ก) $\text{Cu}_2\text{L1}$ และ Eosin Y กับ (ข) $\text{Cu}_2\text{L2}$ และ Eosin Y

2. การศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกับกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ของเอนไซม์เบิล

จากการศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ของเอนไซม์เบิล $[\text{Cu}_2\text{L1} \cdot \text{Eosin Y}]$ และ $[\text{Cu}_2\text{L2} \cdot \text{Eosin Y}]$ ดังแสดงในภาพที่ 6 พบว่ามีเพียงเอนไซม์เบิล $[\text{Cu}_2\text{L2} \cdot \text{Eosin Y}]$ เท่านั้นที่มีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัด His ได้เป็นอย่างดี โดยผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อมีกรดอะมิโน His อยู่ในระบบจะทำให้ความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ของอินดิเคเตอร์ Eosin Y ในรูปอิสระที่ความยาวคลื่น 545 nm มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเจน ในขณะที่ระบบของเอนไซม์เบิล $[\text{Cu}_2\text{L1} \cdot \text{Eosin Y}]$ ไม่มีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดกรดอะมิโนแต่อย่างใด เนื่องจากมีกรดอะมิโนชนิดอื่น ๆ นั้นสามารถทำให้ความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่ระบบของเอนไซม์เบิล $[\text{Cu}_2\text{L1} \cdot \text{Eosin Y}]$ ที่ความยาวคลื่นดังกล่าวมีค่าเพิ่มขึ้นด้วย

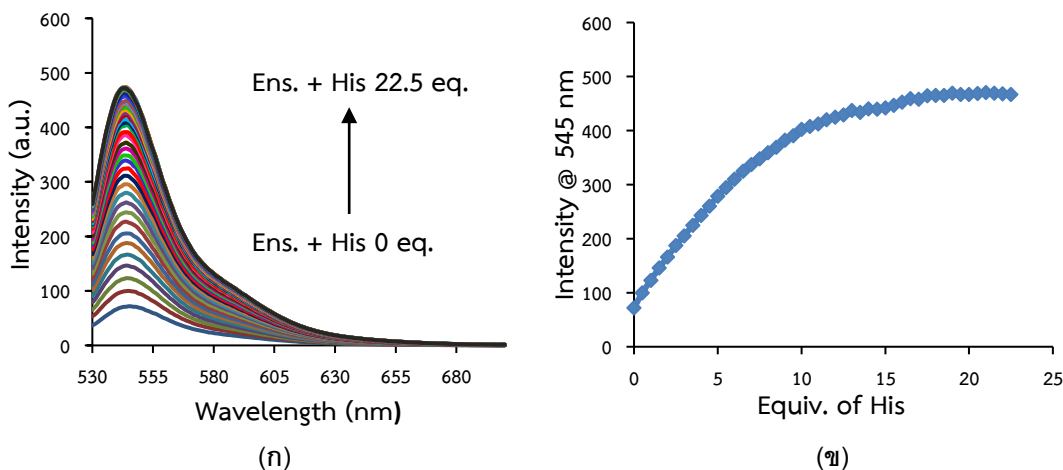


ภาพที่ 6 (ก) ฟลูออเรสเซนส์สเปกตรัมของสารละลายเอนไซม์เบิล $[\text{Cu}_2\text{L1} \cdot \text{Eosin Y}]$ ในสภาวะที่มีกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ

2 equivalents อยู่ในระบบ (ข) ฟลูออเรสเซนส์สเปกตรัมของสารละลายเอนไซม์เบิล $[\text{Cu}_2\text{L2} \cdot \text{Eosin Y}]$

ในสภาวะที่มีกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ 4 equivalents อยู่ในระบบ

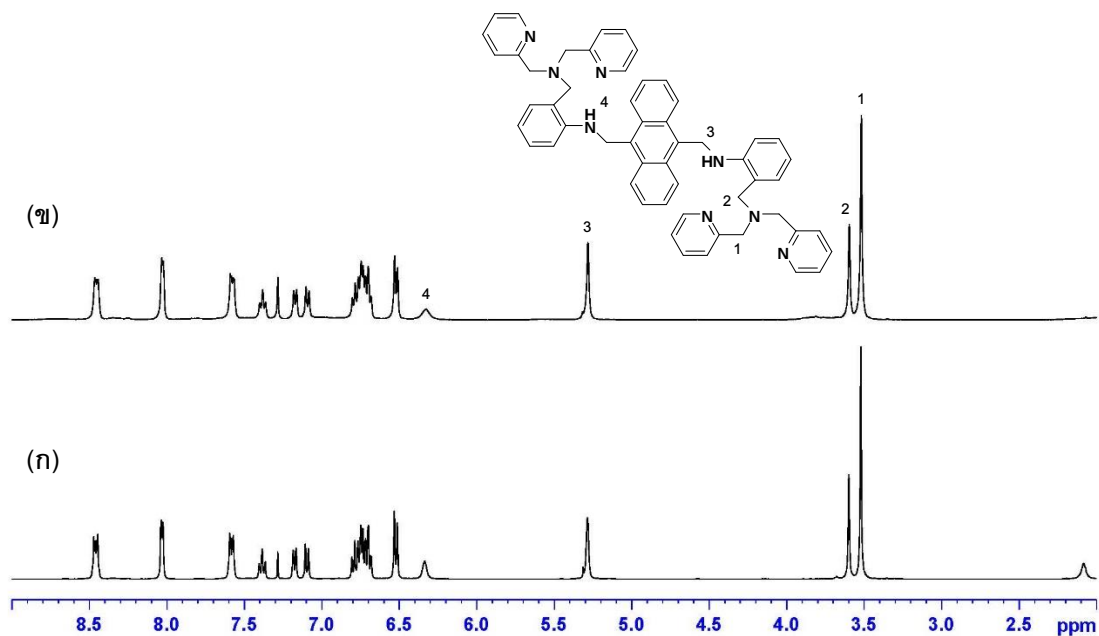
จากภาพที่ 7 จะเห็นได้ว่า เมื่อค่อย ๆ เติม His ลงไปยังสารละลายเอนไซม์เบิล [$\text{Cu}_2\text{L2}\cdot\text{Eosin Y}$] จะส่งผลให้ความเข้มข้นของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 545 nm มีเพิ่มขึ้น ทั้งนี้คาดว่า เป็นผลเนื่องมาจาก His อยู่ในระบบได้เข้าไปแทนที่ Eosin Y ในโครงสร้างเอนไซม์เบิล [$\text{Cu}_2\text{L2}\cdot\text{Eosin Y}$] และทำให้อินดิเคเตอร์ Eosin Y หลุดออกมาอยู่ในรูปอิสระ ส่งผลให้ความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของอินดิเคเตอร์ Eosin Y ในรูปอิสระที่ความยาวคลื่น 545 nm มีค่าเพิ่มขึ้น



ภาพที่ 7 (ก) ฟลูออเรสเซนซ์ไทเทรชัน และ (ข) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 545 nm กับจำนวน equivalent ของ His

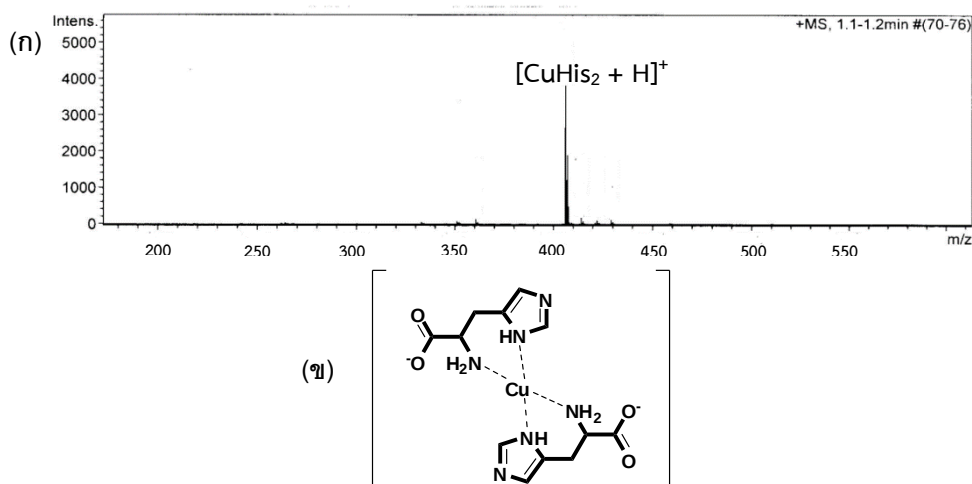
3. การศึกษาอันตรกิริยาระหว่างการแทนที่ของ His กับสารประกอบของเอนไซม์เบิล [$\text{Cu}_2\text{L2}\cdot\text{Eosin Y}$]

จากงานวิจัยของ Folmer-Andersen และคณะ (Folmer-Andersen *et al.*, 2005) ที่พบว่า His สามารถแทนที่อินดิเคเตอร์ 5(6)-carboxyfluorescein และลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของไพรีดีน เกิดเป็นสารประกอบ [$\text{Cu}\cdot\text{His}_2$] ในสารละลาย ซึ่งในงานวิจัยนี้พบว่าเมื่อค่อย ๆ เติมสารละลาย His ลงไปยังสารละลายของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน $\text{Cu}_2\text{L2}$ เข้มข้น 1 mM พบว่ามีของแข็งสีเหลืองเกิดขึ้นในสารละลาย หลังจากนั้นกรองของแข็งที่ได้และนำไปพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ พบว่า $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของของแข็งที่กรองได้มีลักษณะเหมือนกับ $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของลิแกนด์ L2 ในรูปอิสระ โดยที่ค่า δ ที่ 3.52 ppm เป็นโปรตอนของหมู่เมทิลลีน ที่ตำแหน่งโปรตอน 1 ค่า δ ที่ 3.59 ppm เป็นโปรตอนของหมู่เมทิลลีน ที่ตำแหน่งโปรตอน 2 ค่า δ ที่ 5.28 ppm เป็นโปรตอนของหมู่เมทิลลีน ที่ตำแหน่งโปรตอน 3 และค่า δ ที่ 6.33 ppm เป็นโปรตอนของหมู่แอมีนที่ตำแหน่งโปรตอน 4 ผลการทดลองดังกล่าวแสดงว่า His สามารถเข้าไปแทนที่ Eosin Y ลิแกนด์ L2 และได้สารประกอบ [$\text{Cu}\cdot\text{His}_2$] ($\log K = 18.1$) เกิดขึ้นในสารละลายเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Anderson นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อนำสารละลายที่ได้จากการกรองเอาของแข็งสีเหลืองออกไปมาตั้งทิ้งไว้ 1 คืนจะได้ของแข็งสีขาว หลังจากนั้นจึงกรองของแข็งดังกล่าวและนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรีพบว่าพิกที่มีค่า m/z สูงสุดคือพิกที่ตำแหน่ง 404.1112 ซึ่งเป็นน้ำหนักโมเลกุลของสปีชีส์ [$\text{Cu}\cdot\text{His}_2 + \text{H}^+$] ดังแสดงในภาพที่ 9-ก



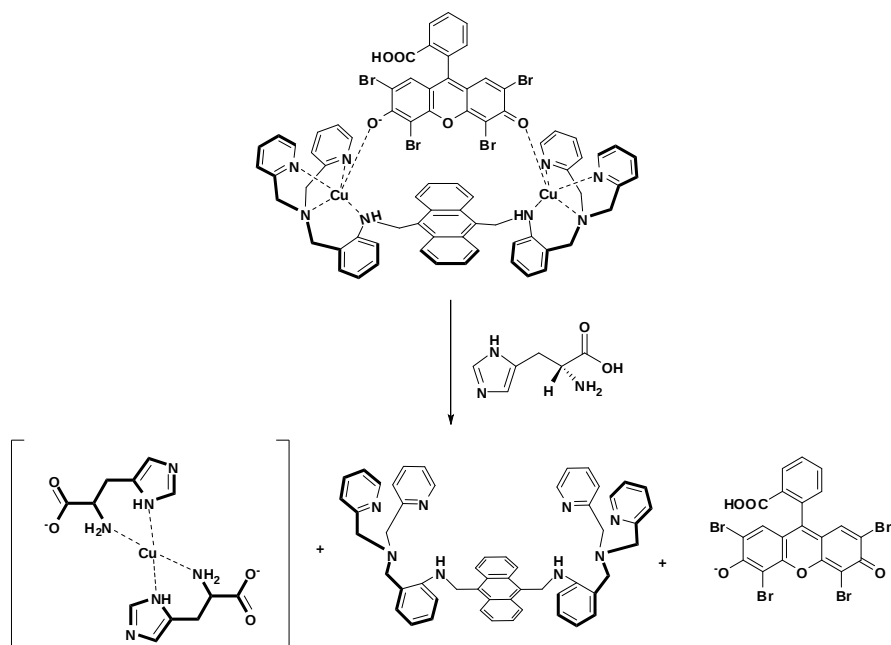
ภาพที่ 8 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของ (ก) ลิแกนด์ L2 ในรูปอิสระและ (ข) ของแข็งที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบ Cu_2L_2 และกรดอะมิโน His

ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่ากลไกในการตรวจวัด His โดยใช้เอนไซม์เบิล $[\text{Cu}_2\text{L}_2\cdot\text{Eosin Y}]$ นั้น His จะเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ Eosin Y ทำให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของอินดิเคเตอร์ในรูปอิสระมีค่าเพิ่มขึ้นและนอกจากนี้ His ยังเข้าไปแทนที่ลิแกนด์ L2 และเกิดเป็นสารประกอบโคออร์ดิเนชัน $[\text{Cu}\cdot\text{His}_2]$ ที่ละลายน้ำได้อยู่ในสารละลาย ดังนั้นจึงสามารถสรุปการเกิดปฏิกิริยาการแทนที่ของ His ดังแสดงได้ในภาพที่ 10



ภาพที่ 9 (ก) แมสสเปกตรัมของสปีชีส์ $[\text{Cu}\cdot\text{His}_2 + \text{H}]^+$ และ (ข) โครงสร้างที่เป็นไปได้ของสารประกอบ $[\text{Cu}\cdot\text{His}_2]$

จากโครงสร้างของสารประกอบ $[\text{Cu} \cdot \text{His}]_2$ จะเห็นได้ว่าเมื่อ His สร้างพันธะโคออร์ดิเนตโควาเลนต์กับไอออนคอปเปอร์ (II) แล้วจะทำให้ได้โครงสร้างที่เลตที่มีลักษณะเป็นวง 6 เหลี่ยม (six-membered rings) จึงส่งผลให้สารประกอบโคออร์ดิเนชันที่เกิดขึ้นมีความเสถียรสูง (Wada & Fernando, 1971) จากเหตุผลดังกล่าวจึงทำให้ His สามารถเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ Eosin Y และลิแกนด์ L2 ในโครงสร้างของเอนไซม์เบิล $[\text{CuL}_2 \cdot \text{Eosin Y}]$ ได้



ภาพที่ 10 ขั้นตอนการแทนที่ของ His กับสารประกอบของเอนไซม์เบิลที่เกิดจากสารประกอบโคออร์ดิเนชัน Cu_2L_2 กับอินดิเคเตอร์ Eosin Y

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาความเป็นไปได้ในการตรวจวัดกรดอะมิโนฮิสทีดีน (His) ด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์โดยใช้เอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์ของคอปเปอร์ (II) กับลิแกนด์ที่มีหมู่ไดฟิซิลแอมีน Cu_2L_1 และหมู่ไทรฟิซิลแอมีน Cu_2L_2 เป็นองค์ประกอบกับอินดิเคเตอร์ Eosin Y ในสารละลายบัฟเฟอร์ 80/20 (%v/v) $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ ใน 0.01 M HEPES pH 7.4 จากการศึกษาการเกิดเอนไซม์เบิลของสารประกอบโคออร์ดิเนชันทั้งสองชนิดด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ไทเทรชัน พบว่าเมื่อทำการไทเทรตสารละลายสารประกอบโคออร์ดิเนชันไดนิวเคลียร์ของคอปเปอร์ (II) ลงไปยังสารละลาย Eosin Y จะทำให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 545 nm มีค่าลดลงเนื่องจากคอปเปอร์ (II) ไอออนเป็นตัว quencher ที่ดี ดังนั้นเมื่ออินดิเคเตอร์ Eosin Y เกิดพันธะโคออร์ดิเนชันกับคอปเปอร์ (II) ในสารประกอบจึงทำให้ความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของอินดิเคเตอร์ Eosin Y มีค่าลดลง โดยสารละลายเอนไซม์เบิลระหว่างสารประกอบโคออร์ดิเนชัน Cu_2L_1 กับ Eosin Y มีค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนไซม์เบิล ($\log K$) $[\text{Cu}_2\text{L}_1 \cdot \text{Eosin Y}]$ มีค่าเท่ากับ 3.82 ± 0.25 ส่วนสารละลายเอนไซม์เบิลระหว่างสารประกอบโคออร์ดิเนชัน Cu_2L_2 กับ Eosin Y มีค่า $\log K$ ของการเกิดเอนไซม์เบิล $[\text{Cu}_2\text{L}_2 \cdot \text{Eosin Y}]$ เท่ากับ 4.91 ± 0.33 จากค่า $\log K$ ของการเกิดเอนไซม์เบิลทั้งสองจะเห็นได้ว่าอินดิเคเตอร์

Eosin Y เกิดอันตรกิริยากับไอออนของ Cu^{2+} ในโครงสร้างของสารประกอบ $\text{Cu}_2\text{L2}$ ได้แข็งแรงกว่าสารประกอบ $\text{Cu}_2\text{L1}$ เนื่องจากในโครงสร้างของ $\text{Cu}_2\text{L1}$ นั้นมีความยืดหยุ่นของโครงสร้างมากกว่า $\text{Cu}_2\text{L2}$ ซึ่งเป็นผลมาจากการที่หมู่ไดฟีโคลิลเอมีน มีความเกะกะน้อยกว่า (steric effect) หมู่ไพโรพิคตอลเอมีน จึงทำให้โครงสร้างของสารประกอบ $\text{Cu}_2\text{L2}$ มีความแข็งแรงของโครงสร้างมากกว่าสารประกอบ $\text{Cu}_2\text{L1}$ ส่งผลให้สามารถควบคุมระยะห่างระหว่างไอออนคอปเปอร์ (II) ได้ดีกว่าในสารประกอบ $\text{Cu}_2\text{L1}$ และส่งผลให้อินดิเคเตอร์ Eosin Y สร้างพันธะโคออร์ดิเนตโควาเลนต์กับไอออนคอปเปอร์ (II) ในโครงสร้างของสารประกอบ $\text{Cu}_2\text{L2}$ ได้อย่างแข็งแรง

เมื่อนำเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบโคออร์ดิเนชัน $\text{Cu}_2\text{L1}$ และ $\text{Cu}_2\text{L2}$ กับอินดิเคเตอร์ Eosin Y มาทำการศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกับกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ พบว่าเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบโคออร์ดิเนชัน $\text{Cu}_2\text{L2}$ กับ Eosin Y มีความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกับกรดอะมิโนฮิสทีดีนได้เป็นอย่างดี ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากลไกการตรวจวัด His นั้นเกิดผ่านปฏิกิริยาการแทนที่ โดยที่ His เข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ Eosin Y และลิแกนด์ L2 ในสารประกอบ $\text{Cu}_2\text{L2}$ เกิดเป็นสารประกอบโคออร์ดิเนชัน $[\text{Cu} \cdot \text{His}_2]$ และลิแกนด์ L2 กับอินดิเคเตอร์ Eosin Y ในรูปอิสระ ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า สารประกอบโคออร์ดิเนชันของคอปเปอร์ (II) ($\text{Cu}_2\text{L2}$) สามารถใช้เป็นรีเซปเตอร์ในการตรวจวัดกรดอะมิโน His ด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ โดยใช้อินดิเคเตอร์ Eosin Y เป็นหน่วยให้สัญญาณ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก (PHD/0236/2552) ศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (RSA5580031 และ RTA5380003) คณะผู้วิจัยตระหนักถึงความมุ่งหวังของทุนวิจัยที่ต้องการสร้างองค์ความรู้เพื่อพัฒนาประเทศไทยเป็นอย่างยิ่ง และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

เอกสารอ้างอิง

- Binstead, R. A., Jung, B., Zuberbühler, A. D., SPECFIT/32 Global analysis System, 3.0, Spectrum Software Associates, Marlborough, MA, 2000.
- Bolin, M., Akerud, P., Hansson, A., & Akerud, H., (2011). Histidine-Rich Glycoprotein as an Early Biomarker of Preeclampsia. *American Journal of Hypertension*, 24, 496-501.
- Folmer-Andersen, J. F., Lynch, V. M., Anslyn, E. V. (2005). "Naked-Eye" Detection of Histidine by Regulation of Cu(II) Coordination Modes. *Chemistry - A European Journal*, 11, 5319-5326.
- Incarvito, C., Lam, M., Rhatigan, B., Rheingold, A. L., Qin, C. J., Gavrilova, A. L., Bosnich, B. (2001). Bimetallic Reactivity. Preparations, Properties and Structures of Complexes Formed by Unsymmetrical Binucleating Ligands Bearing 4- and 6-Coordinate Sites Supported by Alkoxide Bridges. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 23, 3478-3488.
- Kaspar, H., Dettmer, K., Gronwald, W., and Oefner P.J. (2008). Automated GC-MS Analysis of Free Amino Acids in Biological Fluids. *Journal of Chromatography B*, 870, 222-232.

- Kovach, P. M., Meyerhoff, M. E. (1982). Development and Application of a Histidine-Selective Biomembrane Electrode. *Analytical Chemistry*, 54(2), 217-220.
- Liu, Z., Yang, Z., Li, T., Wang, B., Li, Y., Qin, D. Wang, M. Yana, M. (2011). An Effective Cu(II) Quenching Fluorescence Sensor in Aqueous Solution and 1D Chain Coordination Polymer Framework. *Dalton Transactions*, 40, 9370-9373.
- Nan, C. G., Ping, W. X., Ping, D. J., Qing, C. H. (1999). A Study on Electrochemistry of Histidine and Its Metabolites based on the Diazo Coupling Reaction. *Talanta*, 49, 319-330.
- Sullivan Jr, D. J., Gluzman, I. Y., Goldberg, D. E. (1996). Plasmodium Hemozoin Formation Mediated by Histidine-Rich Proteins. *Science*, 271, 219-222.
- Tang, F., Wu, K. K., Nie, Z., Ding, L., Liu, Q., Yuan, J., Guo, M., Yao, S. (2008). Quantification of Amino Acid Ionic Liquids Using Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1208, 175-181.
- Wada, H. & Fernando, Q. (1971). Determination of Formation Constants of Copper(II) Complexes of (Hydroxyethylidene) diphosphonic Acid with Solid State Cupric Ion-Selective Electrode. *Analytical Chemistry*, 43(6), 751–755.
- Watchasit, S., Suktanarak, P., Suksai, C., Ruangpornvisuti, V., Tuntulani, T. (2014). Discriminate Sensing of Pyrophosphate Using a New Tripodal Tetramine-Based Dinuclear Zn(II) Complex Under an Indicator Displacement Assay Approach. *Dalton Transactions*, 43, 14701-14709.
- Wiskur, S.L., Ait-Haddou, H., Lavigne, J.J., Anslyn, E.V. (2001). Teaching Old Indicators New Tricks. *Accounts of Chemical Research*, 34(12), 963-972.
- Zhang, J., Sun L., Yoshida T. (2011). Spectroelectrochemical Studies on Redox Reactions of Eosin Y and Its Polymerization with Zn^{2+} Ions. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 662, 384-395.

Output

จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

1. Kunthadee, P., Watchasit, S., Kaowliew, A., **Suksai, C.** Wongsan, W., Ngeontae, W., Chailapakul, O., Aeungmaitrepirom, A., & Tuntulani, T.
Intriguing sensing properties of a di-tripodal amine calix[4]arene ionophore towards anions from Donnan failure in ion-selective membranes induced by Cu^{2+} . *New Journal of Chemistry*, **2013**, 37, 4010 – 4017.
2. Watchasit, S., Suktanarak, P., **Suksai, C.**, Ruangpornvisuti, V., & Tuntulani, T.
Discriminate sensing of pyrophosphate using a new tripodal tetramine-based dinuclear Zn(II) complex under an indicator displacement assay approach. *Dalton Transactions*, **2014**, 43, 14701-14709.

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับชาติ

1. สรายุทธ เวชสิทธิ์, รัชชัยย์ ตันทุลานี, และ **จอมใจ สุกใส** “อิทธิพลของโครงสร้างลิแกนด์ในการตรวจวัดกรดอะมิโนฮิสทีดิน ด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ โดยใช้สารประกอบไดนิวเคลียร์คอปเปอร์ (II) กับลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของแอนทราซีน” วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 21 (ฉบับที่ 3) กันยายน – ธันวาคม พ.ศ. 2559 หน้า 108 - 120