

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส
ในผลผลิตทางการเกษตรด้วยเทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์

โดย

ดร.สรายุทธ เวชสิทธิ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุน
สนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนชนิดโมโนนิวเคลียร์ของไอออนโลหะคอปเปอร์(II) และซิงก์(II) กับลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของไทรพอดัลเอมีน (**CuL3N**, **CuL4N**, **CuL5N**, **CuL5N**, **ZnL3N**, **ZnL4N**, **ZnL5N** และ **ZnL6N**) และทำการพิสูจน์โครงสร้างของสารประกอบที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิคมาตรฐานทางเคมีวิเคราะห์ จากนั้นได้ทำการศึกษาความสามารถในการนำไปใช้ตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสด้วยวิธีการแทนที่อินดิเคเตอร์ จากการศึกษาความเป็นไปได้ในการตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสด้วยสารประกอบเชิงซ้อนชนิดโมโนนิวเคลียร์กับอินดิเคเตอร์ชนิดต่างๆ พบว่าสารประกอบเชิงซ้อนที่เตรียมจากสารประกอบ **CuL6N** กับอินดิเคเตอร์ **XO** สามารถตรวจวัด **ไกลโฟเซต** ได้อย่างจำเพาะเจาะจง จากการศึกษาด้วยเทคนิคทางสเปกโตรโฟโตเมทรี พบว่าโครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นมีอัตราส่วนของ **CuL6N:ไกลโฟเซต** เท่ากับ 1:1 และได้ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด **ไกลโฟเซต** เท่ากับ 0.11 ppm

คำสำคัญ : สารประกอบเชิงซ้อนชนิดโมโนนิวเคลียร์, สารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส, ไกลโฟเซต, วิธีการแทนที่อินดิเคเตอร์

Abstract

In this research, the mononuclear copper(II) and zinc(II) complexes with tripodal amine ligands (**CuL3N**, **CuL4N**, **CuL5N**, **CuL5N**, **ZnL3N**, **ZnL4N**, **ZnL5N** and **ZnL6N**) were synthesized and characterized by standard analytical techniques. The sensing abilities towards organophosphorous pesticide was investigated using the indicator displacement assay (**IDAs**) approach. The result The results indicated that the sensing ensemble [**CuL6N•XO**] could discriminate the **Glyphosate** from other organophosphorous pesticide and common anions. The UV-visible spectrophotometry study confirmed that **Glyphosate** bound to CuL6N in a 1:1 manner. The detection limit of **Glyphosate** for the reported **IDAs** system was 0.11 ppm.

Keyword : Mononuclear complexes, organophosphorous pesticide, Glyphosate, indicator displacement assay

ประกาศคุณูปการ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลงไปได้ด้วยดี ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยทั้งหมดในการดำเนินการวิจัย (เลขที่สัญญา TRG6180008) ขอขอบคุณผู้ทรงคุณวุฒิที่ให้การประเมินข้อเสนอโครงการ ขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.ธวัชชัย ตันกุลานิ ในฐานะนักวิจัยที่ปรึกษาที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำต่างๆ ให้โครงการวิจัยสำเร็จลงด้วยดี ขอขอบคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้คณาจารย์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ในการดำเนินโครงการวิจัย ที่สำคัญขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จอมใจ สุกใส ทั้งในฐานะอาจารย์ที่ปรึกษาตั้งแต่ครั้งเข้าศึกษาตั้งแต่ระดับปริญญาตรี โท และเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมเมื่อครั้งศึกษาระดับปริญญาเอก และในฐานะเพื่อนร่วมงานในปัจจุบัน ที่ได้กรุณาประสิทธิประสาทความรู้ทั้งเชิงวิชาการและทักษะต่างๆ ตลอดจนคอยให้คำแนะนำช่วยเหลือ อีกทั้งยังเป็นแรงผลักดัน และแรงกระตุ้นในการทำงานครั้งนี้ให้ประสบความสำเร็จ ขอขอบพระคุณคณาจารย์ผู้เคยให้ความรู้และอบรมสั่งสอนที่ผ่านมาทุกท่าน

สุดท้ายนี้ผู้เขียนต้องขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา รวมไปถึงพี่น้องและเพื่อนๆ ทุกคนที่คอยให้คำแนะนำ และให้กำลังใจตลอดระยะเวลาในการดำเนินโครงการวิจัยนี้ จนสำเร็จลงไปได้ด้วยดี

สรายุทธ เวชสิทธิ์

พฤษภาคม 2563

สารบัญ

	หน้า
บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	4
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	4
ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	6
2.1.1 ความสำคัญของโกลโฟเซต	6
2.1.2 เซ็นเซอร์ทางเคมีเชิงแสง (optical chemosensor)	6
2.1.3 เทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์ (indicator displacement assays, IDAs)	7
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	9
วิธีการทดลอง	19
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์	19
3.2 สารเคมี	19
3.3 การสังเคราะห์ลิแกนด์ที่ใช้ในการทดลอง	20
3.3.1 การสังเคราะห์ลิแกนด์ L3N	20
3.3.2 การสังเคราะห์ลิแกนด์ L4N	21
3.3.3 การสังเคราะห์ลิแกนด์ L5N	22
3.3.4 การสังเคราะห์ลิแกนด์ L6N	23
3.4 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโนนิวเคลียร์ที่ใช้ในการทดลอง	24
3.4.1 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน CuL3N	24
3.4.2 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน ZnL3N	24
3.4.3 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน CuL4N	25
3.4.4 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน ZnL4N	25
3.4.5 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน CuL5N	26

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4.6 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน ZnL5N	27
3.4.7 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน CuL6N	27
3.4.8 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน ZnL6N	28
3.5 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดสารประกอบ ออร์กาโนฟอสฟอรัสที่ใช้เป็นสารกำจัดศัตรูพืชของสารประกอบโคออร์ดิ เนชันที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์	28
3.5.1 การเตรียมสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 0.05 M pH 6.4	28
3.5.2 การเตรียมสารละลายผสมของ 80:20 % (v/v) DMSO: H ₂ O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM pH 6.4	29
3.5.3 การเตรียมสารละลายแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 1 mM	29
3.5.4 การเตรียมสารละลายสารประกอบโคออร์ดิเนชันทั้ง 8 ความ เข้มข้น 20 µM ใน 80:20 % (v/v) DMSO:H ₂ O HEPES buffer ความ เข้มข้น 10 mM pH 6.4	30
3.5.5 การเตรียมสารละลายอินดิเคเตอร์ความเข้มข้น 400 µM 80:20 % (v/v) DMSO:H ₂ O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM	31
3.5.6 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดสารประกอบ ออร์กาโนฟอสฟอรัสที่ใช้เป็นสารกำจัดศัตรูพืชด้วยเทคนิคการแทนที่อินดิ เคเตอร์	31
3.6 การหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนไซม์ของสารประกอบ โคออร์ดิเนชันกับอินดิเคเตอร์ โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน	31
3.6.1 เตรียมสารละลายของสารประกอบโคออร์ดิเนชันความเข้มข้น 400 µM	31

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.6.2 เตรียมสารละลายอินดิเคเตอร์ความเข้มข้น 20 μM	32
3.6.3 การหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนไซม์ของ สารประกอบโคออร์ดิเนชันกับอินดิเคเตอร์ โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทร ชัน	32
3.7 การหาอัตราส่วนในการเกิดเอนไซม์ระหว่างสารประกอบโคออร์ดิ เนชันกับอินดิเคเตอร์ โดยวิธี Job's method	32
3.7.1 การเตรียมสารละลายสารประกอบโคออร์ดิเนชันความเข้มข้น 20 μM	32
3.7.2 การเตรียมสารละลายอินดิเคเตอร์ความเข้มข้น 20 μM	33
3.7.3 วิธีการทดลอง	33
3.8 การหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง เอนไซม์กับ Glyphosate ด้วยวิธีการแทนที่อินดิเคเตอร์ โดยใช้เทคนิค ยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน	34
3.9 การศึกษาผลการรบกวนของแอนไอออนชนิดต่างๆ ต่อการตรวจวัด Glyphosate ด้วยเอนไซม์โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี	36
3.10 การวัดขีดจำกัดการตรวจวัดไกลโฟเซต (Detection of limit : LOD) ผลการทดลองและอภิปราย	36
4.1 การสังเคราะห์ลิแกนด์ที่ใช้ในการทดลอง	37
4.1.1 การสังเคราะห์ลิแกนด์ L3N	37
4.1.2 การสังเคราะห์ลิแกนด์ L4N	38
4.1.3 การสังเคราะห์ลิแกนด์ L5N	39
4.1.4 การสังเคราะห์ลิแกนด์ L6N	40
4.2 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโนนิวเคลียร์ที่ใช้ใน การทดลอง	41

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2.1 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน CuL3N	41
4.2.2 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน ZnL3N	41
4.2.3 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน CuL4N	41
4.2.4 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน ZnL4N	42
4.2.5 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน CuL5N	43
4.2.6 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน ZnL5N	43
4.2.7 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน CuL6N	44
4.2.8 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน ZnL6N	45
4.3 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดแอนไอออนชนิดต่างๆ ของเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโนนิวเคลียร์ กับอินดิเคเตอร์ต่างๆ	45
4.3.1 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดแอนไอออนชนิด ต่างๆ ของเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบโคออร์ดิเนชัน CuL3N กับอินดิเคเตอร์ต่างๆ	45
4.3.2 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดแอนไอออนชนิด ต่างๆ ของเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบโคออร์ดิเนชัน CuL4N กับอินดิเคเตอร์ต่างๆ	47
4.3.3 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดแอนไอออนชนิด ต่างๆ ของเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบโคออร์ดิเนชัน ZnL4N กับอินดิเคเตอร์ต่างๆ	49
4.3.4 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดแอนไอออนชนิด ต่างๆ ของเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบโคออร์ดิเนชัน CuL5N กับอินดิเคเตอร์ต่างๆ	51

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.3.5 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ของเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบโคออร์ดิเนชัน ZnL5N กับอินดิเคเตอร์ต่าง ๆ	53
4.3.6 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ของเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบโคออร์ดิเนชัน CuL6N กับอินดิเคเตอร์ต่าง ๆ	55
4.3.7 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ของเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบโคออร์ดิเนชัน ZnL6N กับอินดิเคเตอร์ต่าง ๆ	57
4.4 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดแอน Glyphosate ไอออนชนิดต่าง ๆ ของเอนไซม์เบิล ที่เตรียมจากสารประกอบ CuL6N กับอินดิเคเตอร์ XO โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี	59
4.5 การหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนไซม์เบิลของสารประกอบ CuL6N กับอินดิเคเตอร์ XO โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน	60
4.6 การหาอัตราส่วนในการเกิดเอนไซม์เบิลของสารประกอบ CuL6N กับ XO โดยวิธี Job's method	61
4.7 การหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง CuL6N กับ Glyphosate ด้วยวิธีการแทนที่อินดิเคเตอร์ โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน	63
4.8 การศึกษาผลการรบกวนของไอออนชนิดต่าง ๆ ต่อการตรวจวัด Glyphosate ด้วยเอนไซม์เบิล [CuL6N•XO] โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี	65
4.9 การหาขีดจำกัดในการตรวจวัด Glyphosate ด้วยเอนไซม์เบิล [CuL6•XO] โดยใช้เทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์	66

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
สรุปผลการทดลอง	67
เอกสารอ้างอิง	
ภาคผนวก	
ประวัตินักวิจัย	

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1.1 โครงสร้างของสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโนนิวเคลียร์ที่ใช้เป็นรีเซบเตอร์สำหรับการตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส	3
รูปที่ 1.2 โครงสร้างโครโมจีนิกอินดิเคเตอร์ที่ใช้ในการศึกษา	3
รูปที่ 1.3 โครงสร้างของสารกำจัดศัตรูพืชออร์กาโนฟอสฟอรัสที่ใช้ในการศึกษา	4
รูปที่ 2.1 โครงสร้างของ Glyphosate	6
รูปที่ 2.2 แผนภาพแสดงการทำงานของเซ็นเซอร์เคมีเชิงแสง	7
รูปที่ 2.3 แผนภาพแสดงการทำงานของเทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์	8
รูปที่ 2.4 โครงสร้างของรีเซบเตอร์ 1, Glucose และอินดิเคเตอร์ PV	9
รูปที่ 2.5 โครงสร้างของรีเซบเตอร์ Guinidium , อินดิเคเตอร์ 5-carboxy fluorescein และแอนไอออน Citrate	10
รูปที่ 2.6 โครงสร้างของรีเซบเตอร์ 2 อินดิเคเตอร์ coumarin 3	10
รูปที่ 2.7 โครงสร้างของรีเซบเตอร์ 4 อินดิเคเตอร์ Eosin Y 5 Fluorescein 6 แอนไอออน PPi oxalate และกรดอะมิโน Histidine	11
รูปที่ 2.8 โครงสร้างของรีเซบเตอร์ 7 และโครโมจีนิกอินดิเคเตอร์ PV	12
รูปที่ 2.9 โครงสร้างของรีเซบเตอร์ 8 และโครงสร้าง X-ray ของสารประกอบระหว่างรีเซบเตอร์ 8 และ PPi	12
รูปที่ 2.10 โครงสร้างของรีเซบเตอร์ 9 และ 10	13
รูปที่ 2.11 a) กลไกการตรวจวัด Glyphosate ด้วยอนุภาคนาโน Ln-NPs b) โครงสร้างของอินดิเคเตอร์ calcein	11
รูปที่ 2.12 โครงสร้างของรีเซบเตอร์ 12 และ chlorpyrifos	15
รูปที่ 2.13 A) ภาพถ่าย SEM ของเส้นใย copper doped poly (vinyl) alcohol (Cu-PVA) ก่อนตรวจวัด Glyphosate B) การเปลี่ยนสีของเส้นใย Cu-PVA ในสภาวะที่ปราศจาก Glyphosate (ซ้าย) และเมื่อมี Glyphosate (ขวา)	15
รูปที่ 2.14 โครงสร้างของรีเซบเตอร์ Cu₂L1	16

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 2.15 โครงสร้างของโมเลกุลเชิงซ้อนเอนแซมเบล $[Zn_2L2:MTB]$	17
รูปที่ 2.16 โครงสร้างของสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโนนิวเคลียร์ที่ใช้เป็นรีเซปเตอร์สำหรับการตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส	18
รูปที่ 4.1 1H -NMR สเปกตรัมของลิแกนด์ L3N ในตัวทำละลาย CD_3OD	37
รูปที่ 4.2 1H -NMR สเปกตรัมของลิแกนด์ L4N ในตัวทำละลาย $CDCl_3$	38
รูปที่ 4.3 1H -NMR สเปกตรัมของลิแกนด์ L5N ในตัวทำละลาย $DMSO-D_6$	39
รูปที่ 4.4 1H -NMR สเปกตรัมของลิแกนด์ L6N ในตัวทำละลาย $DMSO-D_6$	40
รูปที่ 4.5 แมสสเปกตรัมของสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโนนิวเคลียร์ CuL3N	41
รูปที่ 4.6 แมสสเปกตรัมของสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโนนิวเคลียร์ CuL4N	42
รูปที่ 4.7 แมสสเปกตรัมของสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโนนิวเคลียร์ ZnL4N	42
รูปที่ 4.8 แมสสเปกตรัมของสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโนนิวเคลียร์ CuL5N	43
รูปที่ 4.9 แมสสเปกตรัมของสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโนนิวเคลียร์ ZnL5N	44
รูปที่ 4.10 แมสสเปกตรัมของสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโนนิวเคลียร์ CuL6N	44
รูปที่ 4.11 แมสสเปกตรัมของสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโนนิวเคลียร์ ZnL6N	45

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 4.12 การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบโคออร์ดิเนชัน CuL3N กับอินดิเคเตอร์ชนิดต่าง ในสภาวะที่มีแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ในสารละลายผสม 80:20% (v/v) DMSO:H ₂ O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM	46
รูปที่ 4.13 การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบโคออร์ดิเนชัน CuL4N กับอินดิเคเตอร์ชนิดต่าง ในสภาวะที่มีแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ในสารละลายผสม 80:20% (v/v) DMSO:H ₂ O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM	48
รูปที่ 4.14 การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบ ZnL4N กับอินดิเคเตอร์ชนิดต่าง ในสภาวะที่มีแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ในสารละลายผสม 80:20% (v/v) DMSO:H ₂ O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM	50
รูปที่ 4.15 การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบ CuL5N กับอินดิเคเตอร์ชนิดต่าง ในสภาวะที่มีแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ในสารละลายผสม 80:20% (v/v) DMSO:H ₂ O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM	52
รูปที่ 4.16 การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบ ZnL5N กับอินดิเคเตอร์ชนิดต่าง ในสภาวะที่มีแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ในสารละลายผสม 80:20% (v/v) DMSO:H ₂ O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM	54
รูปที่ 4.17 การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบ CuL6N กับอินดิเคเตอร์ชนิดต่าง ในสภาวะที่มีแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ในสารละลายผสม 80:20% (v/v) DMSO:H ₂ O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM	56

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 4.18 การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบ ZnL6N กับอินดิเคเตอร์ชนิดต่าง ในสภาวะที่มีแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ในสารละลายผสม 80:20% (v/v) DMSO:H ₂ O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM	58
รูปที่ 4.19 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายเอนไซม์เบิล [CuL6N•XO] ความเข้มข้น 20 µM ที่มีแอนไอออนชนิด ต่าง ๆ (1 mM) ในสารละลายผสม 80:20% (v/v) DMSO:H ₂ O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM	59
รูปที่ 4.20 ยูวี-วิสิเบิลไทเทรชันสเปกตรัมของสารละลาย XO (20 µM) ด้วยสารละลาย CuL6N (400 µM) ในสารละลายผสม 80:20% (v/v) DMSO:H ₂ O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM	61
รูปที่ 4.21 การหาอัตราส่วนในการเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสารละลาย CuL6N (20 µM) กับสารละลาย XO (20 µM) ในสารละลายผสม 80:20% (v/v) DMSO:H ₂ O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM โดยวิธี Job's Method	62
รูปที่ 4.22 โครงสร้างที่เป็นไปได้ของสารประกอบ [CuL6N•XO]	63
รูปที่ 4.23 ยูวี-วิสิเบิลไทเทรชันสเปกตรัมของสารละลายเอนไซม์เบิล [CuL6N•XO] (20 µM) ด้วยสารละลาย Glyphosate (1 mM) ในสารละลายผสม 80:20% (v/v) DMSO:H ₂ O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM	64
รูปที่ 4.24 โครงสร้างที่เป็นไปได้ของสารประกอบ [CuL6N:Glyphosate]	64
รูปที่ 4.25 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย [CuL6N•XO] + Glyphosate (20 µM) กับสารละลายแอนไอออนชนิดต่าง ๆ	65
รูปที่ 4.26 การหาขีดจำกัดในการตรวจวัดสารละลาย Glyphosate โดยใช้เอนไซม์เบิล [CuL6N•XO]	66

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1 น้ำหนักของแอนไอออนชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการเตรียมสาร	30
ตารางที่ 3.2 สภาวะการทดลองสำหรับการหาอัตราส่วนในการเกิดสารเชิงซ้อน ระหว่างสารประกอบโคออร์ดิเนชันและอินดิเคเตอร์	33
ตารางที่ 3.3 สภาวะการทดลองสำหรับหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดสาร เชิงซ้อนระหว่าง Glyphosate กับ เอนไซม์บีล	35

บทสรุปงานวิจัย (Executive Summary)

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการสังเคราะห์ลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของไทรพอดัลเอมีน 4 ชนิดคือ **L3N**, **L4N**, **L5N** และ **L6N** และทำการสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโนนิวเคลียร์ของไอออนโลหะคอปเปอร์ (II) และซิงก์ (II) กับลิแกนด์ทั้ง 4 ได้สารประกอบโคออร์ดิเนชัน **CuL3N**, **CuL4N**, **CuL5N**, **CuL6N**, **ZnL3N**, **ZnL4N**, **ZnL5N** และ **ZnL6N** จากนั้นนำมาศึกษาสมบัติการนำมาใช้เป็นเซ็นเซอร์ทางเคมีเชิงแสงในการตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสด้วยวิธีการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์โดยใช้โครโมจีนิกอินดิเคเตอร์ Xylenol Orange (**XO**) Pyrocatechol Violet (**PV**) Zincon (**ZC**) Pyrogallol Red (**PGR**) Bromo Pyrogallol Red (**BPG**) และ 4-(2-Pyridylazo resorcinol) (**PAR**) เป็นอินดิเคเตอร์ที่ให้สัญญาณในการตรวจวัด จากการศึกษาค่าคงที่ความเสถียรของสารละลายเอนแซมเบิลของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **CuL6N** กับอินดิเคเตอร์ **XO** นั้นมีความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืช **Glyphosate** เป็นอย่างดี จากการศึกษาค่าคงที่ความเสถียรของสารละลายเอนแซมเบิล **[CuL6N•XO]** ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน โดยใช้โปรแกรม SPECFIT พบว่ามีค่าคงที่ความเสถียรเท่ากับ $\log K = 4.62 \pm 0.32$ ซึ่งสอดคล้องกับการเกิดสารละลายเอนแซมเบิล **[CuL6N•XO]** จากการศึกษาหาอัตราส่วนในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนเอนแซมเบิล ระหว่างสารประกอบ **CuL6N** กับ อินดิเคเตอร์ **XO** โดยใช้วิธี Job's method พบว่าอัตราส่วนในการเกิดเอนแซมเบิล **[CuL6N•XO]** เป็น 1:1 นอกจากนี้พบว่าการตรวจวัด **Glyphosate** ด้วยสารละลายเอนแซมเบิล **[CuL6N•XO]** มีค่าขีดจำกัดการตรวจวัดเท่ากับ 0.66 μM หรือ 0.11 ppm

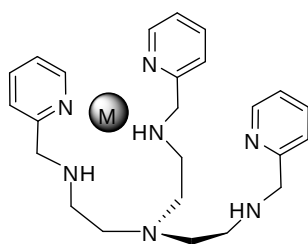
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

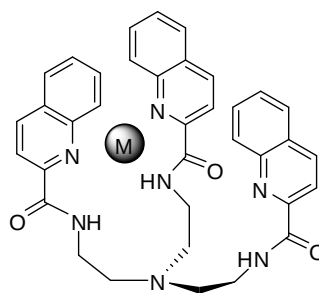
เป็นที่ทราบกันดีว่าสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส (organophosphorus pesticides, **OPP**) ถูกนำมาใช้ทางการเกษตรเพื่อช่วยในการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร (World Health Organization, 1990) ในปริมาณสูงมาก ซึ่งการใช้สารประกอบ **OPP** ในปริมาณมากดังกล่าว ย่อมส่งผลให้เกิดการตกค้างในสิ่งแวดล้อมทั้งในดิน อากาศ และแหล่งน้ำ ซึ่งจะส่งผลเสียโดยตรงกับทั้งสิ่งแวดล้อมและสุขภาพของสิ่งมีชีวิตที่เกี่ยวข้องโดยรอบ (Jeyaratnam, 1990 ; Eddleston and Phillips, 2004) และเป็นสาเหตุที่ทำให้มีผู้เสียชีวิตถึงปีละกว่า 370,000 ราย (Eddleston *et al.*, 2012) โดยสารประกอบกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายทางการเกษตรตัวหนึ่งคือ ไกลโฟเซต (**Glyphosate, GPs**) ซึ่งเป็นแอนไออนที่มีอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต ไกลโฟเซตเป็นสารกำจัดวัชพืชที่ทำให้เกิดพิษ ที่มีคุณสมบัติทางเคมีเป็นกรดอ่อน โดยมีค่า pH อยู่ระหว่าง 4.8 - 6 ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง chlorophyll-related molecule ในพืช (Gomes *et al.*, 2017) ซึ่งกลไกดังกล่าวจะไม่พบในมนุษย์ แต่มีการศึกษาพบว่าเมื่อร่างกายมนุษย์ได้รับ **Glyphosate** เข้าไปสู่ระบบหมุนเวียนโลหิต จะส่งผลให้มีความดันโลหิตต่ำ หัวใจเต้นช้าลง การทำงานของ ventricle ลดลง (Gillezeau *et al.*, 2019) และเป็นอันตรายต่อชีวิตโดยองค์การอนามัยโลกได้กำหนดปริมาณของไกลโฟเซตที่พบอยู่ในน้ำดื่มและอาหารห้ามให้มีปริมาณเกิน 0.9 ppm (เครือข่ายเตือนภัยสารเคมีกำจัดศัตรูพืช สมาเกษตรกรแห่งชาติ, 2560) นอกจากนั้นยังมีความสงสัยว่าไกลโฟเซตอาจมีส่วนก่อให้เกิดมะเร็งกับผู้สัมผัสโดยตรง ดังรายงานที่คณะลูกขุนแห่งศาลนครซานฟรานซิสโก ประเทศสหรัฐอเมริกา มีมติเป็นเอกฉันท์ให้บริษัทมอนซานโต้ ผู้ประกอบธุรกิจด้านเคมีเกษตรและเทคโนโลยีชีวภาพด้านการเกษตรรายใหญ่ของโลก มีความผิด เนื่องจากไม่แสดงคำเตือนอย่างชัดเจนว่าสารไกลโฟเซตซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในสารกำจัดศัตรูพืช "ราวด์อัฟ" (RoundUp) และ "เรngerโปร" (RangerPro) โดยมีนายดีเวย์น จอห์นสัน ผู้ป่วยเป็นโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลือง จากการที่ใช้ผลิตภัณฑ์เรngerโปรเป็นประจำในการทำงาน เป็นโจทก์ยื่นฟ้อง ดังนั้นการตรวจวัดความเข้มข้นของ Glyphosate จึงมีความสำคัญในการหาปริมาณปนเปื้อนที่เกินมาตรฐานในผลิตภัณฑ์ภาคเกษตรในปัจจุบัน โดยในปัจจุบันจำเป็นต้องใช้เทคโนโลยีการตรวจวัดที่มีความรวดเร็ว และเชื่อถือได้เช่น เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี แมสสเปกโตรเมทรี (gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)) (Motojyuku *et al.*, 2008 ; Saito *et al.*, 2011) เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงคู่กับแมสสเปกโตรเมทรี (liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)) (Hanke *et al.*, 2008)

เทคนิค capillary electrophoresis (CE) (Soga and Imaizumi, 2001) และเทคนิคทางไฟฟ้าเคมี (voltammetry) (Songa *et al.*, 2009) ซึ่งเทคนิคดังที่กล่าวมาล้วนมีข้อจำกัดที่แตกต่างกันเช่น ต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาแพง การเตรียมตัวอย่างวิเคราะห์ที่ยุ่งยาก ไม่สามารถตรวจวัดสารปริมาณน้อยๆ ได้ รวมไปถึงไม่สามารถนำไปตรวจวัด ณ แหล่งตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนจริงได้ ซึ่งข้อจำกัดเหล่านี้เป็นปัญหาต่อบุคคลทั่วไปที่ไม่สามารถนำการตรวจวัดดังกล่าวไปใช้ได้อย่างสะดวกมากนัก

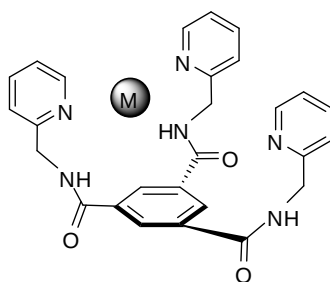
ดังนั้นในปัจจุบันนักวิจัยจึงมีความสนใจในการพัฒนาเทคนิคทางเซ็นเซอร์เคมีเชิงแสง (optical chemosensor) มาใช้ในการตรวจวัดแอนไอออน โดยเทคนิคทางเซ็นเซอร์เคมีเชิงแสงสามารถจำแนกตามการออกแบบโมเลกุลได้ 2 ประเภทคือชนิดที่มีหน่วยให้สัญญาณ (sensory unit) ติดอยู่กับหน่วยเลือกจับ (recognition unit) และชนิดที่ไม่มีหน่วยให้สัญญาณติดอยู่กับหน่วยเลือกจับ โดยในงานวิจัยนี้สนใจที่จะตรวจวัดสารประกอบสารประกอบออร์กาโนฟอสฟอรัสชนิดไกลโฟเซตด้วยเทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์ (indicator displacement assay, **IDAs**) ซึ่งเป็นเซ็นเซอร์เคมีเชิงแสงชนิดที่ไม่มีหน่วยให้สัญญาณติดอยู่กับหน่วยเลือกจับหรือรีเซบเตอร์ ข้อดีของการใช้เทคนิคนี้คือไม่จำเป็นต้องสังเคราะห์ให้โมเลกุลของหน่วยเลือกจับและหน่วยให้สัญญาณเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเคมี ส่งผลให้ลดขั้นตอน เวลา ค่าใช้จ่าย และทรัพยากรในการสังเคราะห์ได้อย่างมาก โดยโมเลกุลของรีเซบเตอร์หนึ่งโมเลกุลสามารถตรวจวัดสารที่สนใจได้มากกว่าหนึ่งชนิดโดยอาศัยการเปลี่ยนชนิดของอินดิเคเตอร์ (Hargrove *et al.*, 2011) หากใช้โครโมจีนิกอินดิเคเตอร์จะสามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาได้ด้วยตาเปล่า และที่สำคัญระบบดังกล่าวสามารถตรวจวัดโมเลกุลที่สนใจได้ดีทั้งในตัวอย่างที่เป็นน้ำ และตัวอย่างอินทรีย์ งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการนำสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโนนิวเคลียร์ ของไอออนโลหะคอปเปอร์ (II) (**CuL3N**, **CuL4N**, **CuL5N** และ **CuL6N**) และซิงก์ (II) (**ZnL3N**, **ZnL4N**, **ZnL5N** และ **ZnL6N**) กับลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของไทรพอดัลเอมีน 4 ชนิดคือ **L3N**, **L4N**, **L5N** และ **L6N** มาใช้ในการตรวจวัด **Glyphosate** ด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ โดยใช้โครโมจีนิกอินดิเคเตอร์ทำหน้าที่เป็นหน่วยให้สัญญาณ ซึ่งโครงสร้างของสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโนนิวเคลียร์ โครโมจีนิกอินดิเคเตอร์ และสารประกอบออร์กาโนฟอสฟอรัสที่ทำการศึกษาแสดงดังรูปที่ 1.1 1.2 และ 1.3



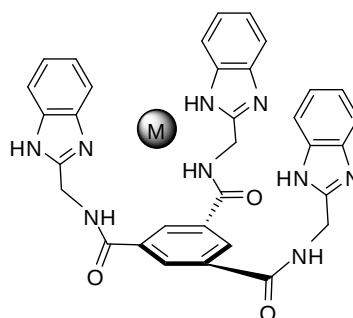
CuL3N : M = Cu²⁺
ZnL3N : M = Zn²⁺



CuL4N : M = Cu²⁺
ZnL4N : M = Zn²⁺

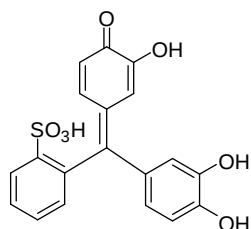


CuL5N : M = Cu²⁺
ZnL5N : M = Zn²⁺

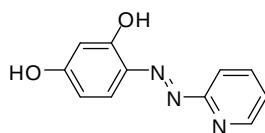


CuL5N : M = Cu²⁺
ZnL5N : M = Zn²⁺

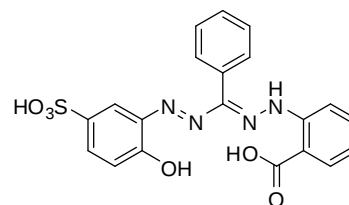
รูปที่ 1.1 โครงสร้างของสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโนนิวเคลียร์ที่ใช้เป็นรีเซบเตอร์สำหรับการตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส



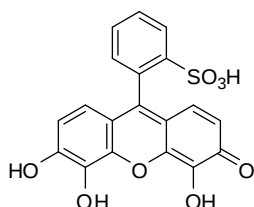
Pyrocatechol Violet (PV)



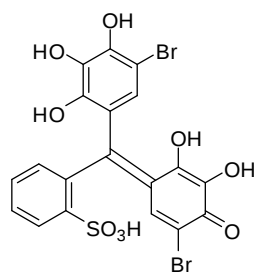
4-(pyridin-2-ylazo)resorcinol (PAR)



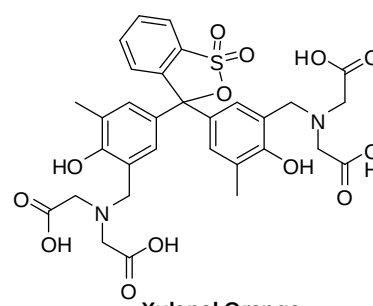
Zincon (ZC)



Pyrogallol Red (PGR)

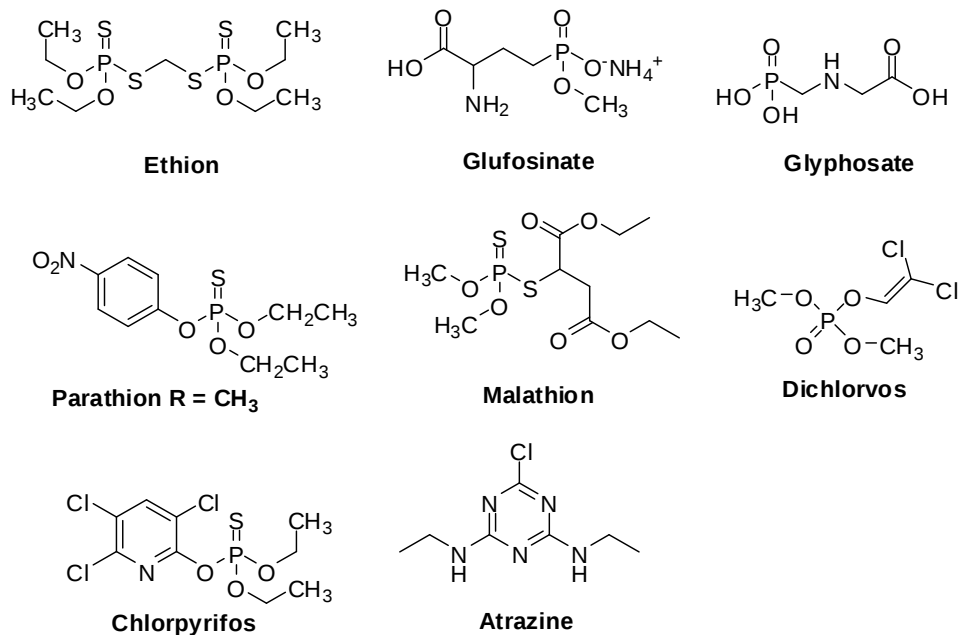


Bromo Pyrogallol Red (BPG)



Xylenol Orange

รูปที่ 1.2 โครงสร้างโครโมเจนิกอินดิเคเตอร์ที่ใช้ในการศึกษา



รูปที่ 1.3 โครงสร้างของสารกำจัดศัตรูพืชออร์กาโนฟอสฟอรัสที่ใช้ในการศึกษา

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อสังเคราะห์สารประกอบลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของไทรพอดัลเอมีน **L3N**, **L4N**,

L5N และ **L6N**

1.2.2 เพื่อสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโนนิวเคลียร์ระหว่างไอออนของโลหะคอปเปอร์ (II) (**CuL3N**, **CuL4N**, **CuL5N** และ **CuL6N**) และซิงก์ (II) (**ZnL3N**, **ZnL4N**, **ZnL5N** และ **ZnL6N**) กับลิแกนด์ **L3N**, **L4N**, **L5N** และ **L6N**

1.2.3 ศึกษาการตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชชนิดออร์กาโนฟอสฟอรัส ด้วยรีเซปเตอร์ที่สังเคราะห์ขึ้น โดยเทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 ทำการสังเคราะห์และพิสูจน์โครงสร้างของลิแกนด์ **L3N**, **L4N**, **L5N** และ **L6N**

จากนั้นทำการพิสูจน์โครงสร้างของสารประกอบที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโคปีและสเปกโทรเมทรี

1.3.2 ทำการสังเคราะห์และพิสูจน์โครงสร้างของสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโนนิวเคลียร์ **CuL3N**, **CuL4N**, **CuL5N**, **CuL6N** **ZnL3N**, **ZnL4N**, **ZnL5N** และ **ZnL6N** จากนั้นทำการพิสูจน์โครงสร้างของสารประกอบที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโคปีและสเปกโทรเมทรี

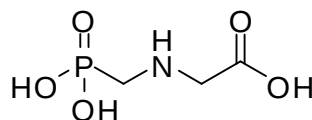
1.3.3 ทำการศึกษาความสามารถในการใช้เป็นเซ็นเซอร์ทางเคมีเชิงแสงสำหรับการ
ตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชชนิดออร์กาโนฟอสฟอรัส ของสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโน
นิวเคลียร์ที่สังเคราะห์ได้ผ่านเทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์

ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1.1 ความสำคัญของไกลโฟเซต

ไกลโฟเซต (**Glyphosate** ; $C_3H_8NO_5P$) เป็นสารประกอบออร์กาโนฟอสฟอรัสที่นิยมใช้ในภาคการเกษตร มีฤทธิ์ในการกำจัดวัชพืช ในปัจจุบันที่ได้มีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในภาคเกษตรกรรม ข้อมูลของสำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตรรายงานว่าประเทศไทยมีการนำเข้า **Glyphosate** มากเป็นอันดับ 1 ในกลุ่มสารกำจัดวัชพืชและมีแนวโน้มนำเข้าเพิ่มมากขึ้นในทุกๆ ปี โดยกลไกการออกฤทธิ์นั้น **Glyphosate** จะไปยับยั้งการสร้างคลอโรฟิลล์ (chlorophyll-related molecule) ในพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชใบกว้างเช่น ต้นไมยราบเครือ ต้นสาบเสือ หญ้าคา เป็นต้น รวมไปถึงวัชพืชอื่นที่เจริญเติบโตกับพืชเกษตรกรรม ซึ่งกลไกดังกล่าวนี้จะไม่พบในมนุษย์ จึงไม่ส่งผลให้เกิดความเป็นพิษในรูปแบบดังกล่าว แต่จะมีกลไกความเป็นพิษต่อร่างกายมนุษย์ที่แตกต่างกันในรูปแบบการได้รับสาร **Glyphosate** โดยเมื่อร่างกายได้รับ **Glyphosate** ทางผิวหนังจะก่อให้เกิดการระคายเคืองบริเวณที่สัมผัส หากเข้าสู่ทางระบบทางเดินหายใจ หรือระบบทางเดินอาหาร และมีการกระจายเข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิต **Glyphosate** จะทำให้เกิดภาวะความดันโลหิตต่ำ หัวใจเต้นช้าลง (Flomenbaum *et al.*, 2006 ; สุดา วรรณประสาธ และกิตติศักดิ์ แสนประเสริฐ, 2558) นอกจากนี้ **Glyphosate** ยังรบกวนการทำงานของผนังไมโทคอนเดรีย (mitochondria) ในเซลล์พืชและเซลล์สัตว์ ซึ่งเป็นแหล่งสร้างพลังงานของเซลล์ และยังพบว่า **Glyphosate** รบกวนการทำงานของโปรตีนที่อยู่ในดีเอ็นเอ Beclin-1 gene ส่งผลให้การทำงานของ apoptosis ล้มเหลวและตามมาด้วยการตายของเซลล์ ดดยโครงสร้างของ **Glyphosate** แสดงดังรูปที่ 2.1



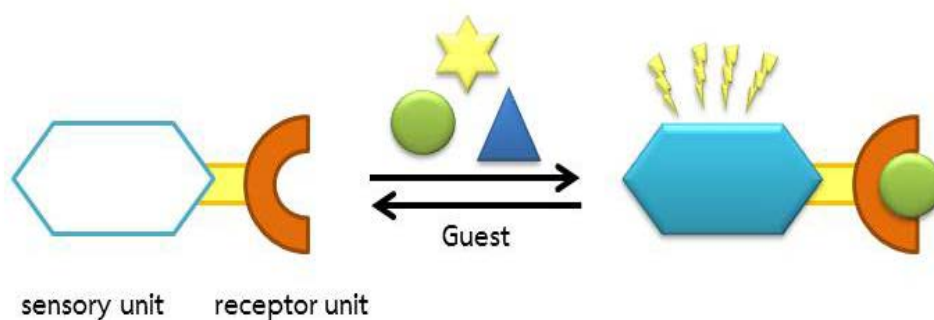
Glyphosate

รูปที่ 2.1 โครงสร้างของ **Glyphosate**

2.1.2 เซ็นเซอร์ทางเคมีเชิงแสง (optical chemosensor)

เซนเซอร์เชิงแสงเป็นเซนเซอร์ทางเคมีชนิดหนึ่ง มีการแสดงสัญญาณการเปลี่ยนแปลงในรูปแบบสมบัติทางแสงของโมเลกุล โดยเซนเซอร์แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ เซนเซอร์ที่อาศัยการ

เปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย (chromogenic/colorimetric sensor) และเซนเซอร์ที่อาศัยการเรืองแสง (fluorogenic sensor) โดยเซนเซอร์ทางเคมีทั้งสองชนิดมีข้อดีข้อเสียที่แตกต่างกันทั้งในด้านการออกแบบโมเลกุล ในส่วนความจำเพาะและส่วนแสดงสัญญาณสภาพไว ความรวดเร็ว ความสามารถในการละลาย และการรบกวนจากไอออนแข่งขัน (competing ions) เป็นต้น เซนเซอร์ทางเคมีอาศัยหลักของการเปลี่ยนแปลงทางเคมีระหว่างโมเลกุลซึ่งอาจเกิดผ่านกลไกการเคลื่อนย้ายประจุระหว่างโมเลกุลหรือการเกิดโคออดิเนชันเป็นต้น เซนเซอร์ทางเคมีประกอบด้วยส่วนพื้นฐานที่สำคัญ 2 ส่วน คือ ส่วนจับโมเลกุลหรือรีเซปเตอร์ (receptor) หรือโมเลกุลของเซนเซอร์ส่วนที่เลือกจับกับสารที่สนใจหรือเกสต์ (guest) ซึ่งส่วนนี้จะต้องมีความจำเพาะสูงกับสารที่สนใจเท่านั้น โดยจะไม่เกิดปฏิกิริยากับไอออนแข่งขันอื่นๆ หรือไม่แสดงผลที่จะรบกวนการวิเคราะห์คือมีการเลือกที่ดี (selectivity) นั่นเอง และอีกส่วนหนึ่งคือส่วนแสดงสัญญาณ (signaling unit) โดยจะทำหน้าที่แสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพที่จะสามารถตรวจวัดได้ อย่างเช่นการเปลี่ยนสีของสารเป็นต้น หลักการทำงานของโมเลกุลตรวจจับหรือตัวรับ (receptor) ที่ทำหน้าที่เป็นโฮสต์ และไอออนซึ่งเป็นเกสต์นั้น จะมีหลักการการทำงานคล้ายกับหลักการของแม่กุญแจและลูกกุญแจ (lock and key principle) คือ โมเลกุลที่เป็นโฮสต์จะต้องมีความจำเพาะ (specific) ในการเลือกจับกับเกสต์ตัวใดตัวหนึ่งชนิดเดียวเท่านั้น ด้วยเหตุนี้จึงเรียกได้ว่าเป็นการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลโฮสต์-เกสต์ (host-guest chemistry) (Suksai and Tuntulani, 2003)

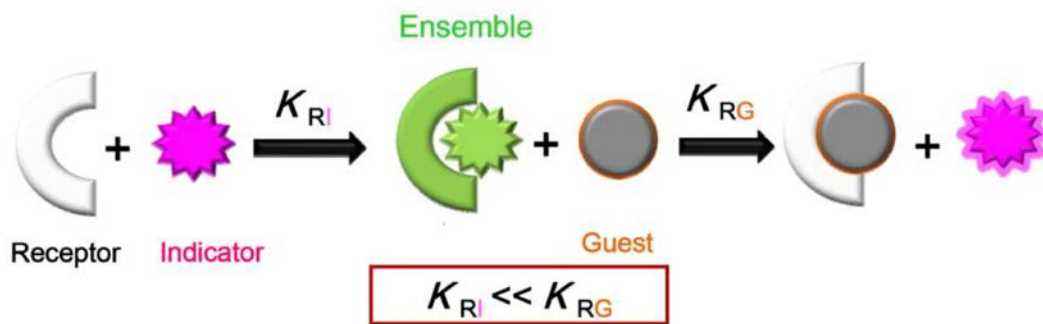


รูปที่ 2.2 แผนภาพแสดงการทำงานของเซนเซอร์เคมีเชิงแสง

2.1.3 เทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์ (indicator displacement assays, IDAs) (สรายุทธ เวชสิทธิ์, 2560)

หลักการทำงานของเทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์นั้นในระบบจะประกอบด้วยโมเลกุลที่ทำหน้าที่เป็นหน่วยเลือกจับหรือรีเซปเตอร์ (receptor) และส่วนที่ทำหน้าที่ให้สัญญาณคืออินดิเคเตอร์ (indicator) ที่สามารถใช้ได้ทั้งฟลูออเรสเซนต์ (fluorophore) และโครโมจีนิก (chromophore) อินดิเคเตอร์ โดยทั้งสองส่วนนี้จะไม่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะโควาเลนต์แต่จะเชื่อมต่อกันด้วยอันตรกิริยาอย่าง

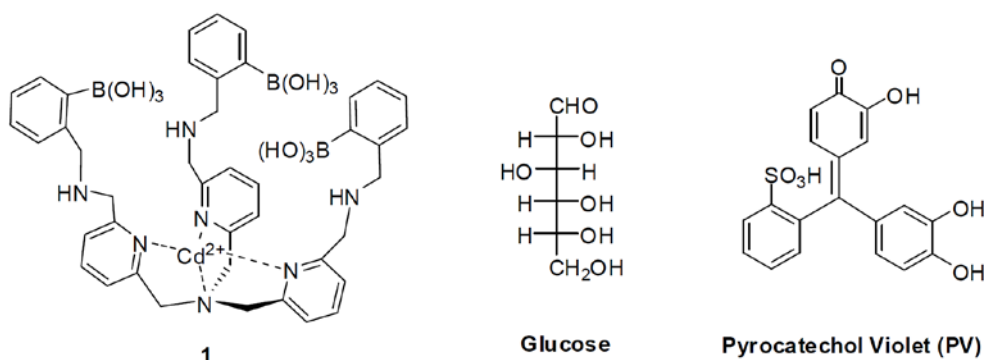
อ่อน เช่น พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonding), แรงดึงดูดทางไฟฟ้า (electrostatic interaction) และพันธะโคออร์ดิเนตโควาเลนต์ (coordinate covalent) (Steed & Atwood, 2002) เป็นต้น เมื่อรีเซปเตอร์และอินดิเคเตอร์จับกันแล้วก็จะได้โมเลกุลเชิงเซอร์ชนิดใหม่เกิดขึ้นซึ่งเราจะเรียกว่าเอนเซมเบิล (ensemble) โดยสมบัติเชิงแสงของเอนเซมเบิลจะแตกต่างไปจากรีเซปเตอร์และอินดิเคเตอร์ที่อยู่ในรูปอิสระ จากนั้นเราจะนำเอนเซมเบิลที่ได้ไปตรวจวัดโมเลกุลที่สนใจ โดยเมื่อมีโมเลกุลที่สนใจ (guest) ในระบบ โมเลกุลดังกล่าวจะเข้าจับกับรีเซปเตอร์แทนที่อินดิเคเตอร์ และปลดปล่อยอินดิเคเตอร์ในรูปอิสระอยู่ในสารละลายอย่างอิสระส่งผลให้สมบัติเชิงแสงของสารละลายนั้นเปลี่ยนกลับมาเป็นของอินดิเคเตอร์ที่อยู่ในรูปอิสระดั้งเดิม ทั้งนี้ระบบการตรวจวัดดังกล่าวจะมีความจำเพาะเจาะจงต่อโมเลกุลที่สนใจก็ต่อเมื่อค่าคงที่การเกิดสารเชิงซ้อน (formation constant, K_{RG}) ระหว่างรีเซปเตอร์กับกับโมเลกุลที่สนใจมีค่ามากกว่าค่าคงที่การเกิดเอนเซมเบิล (K_{RI}) และค่าคงที่การเกิดสารเชิงซ้อนระหว่างของเอนเซมเบิลกับโมเลกุลที่เป็นตัวรบกวน (interference) โดยหลักการทำงานของเทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์แสดงได้ดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 แผนภาพแสดงการทำงานของเทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์ โดยที่ R = รีเซปเตอร์, I = อินดิเคเตอร์ และ G = โมเลกุลที่สนใจตรวจวัด

สำหรับกลไกการเปลี่ยนแปลงสัญญาณเชิงแสงของเทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์นั้นสามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงได้ 2 แบบขึ้นอยู่กับชนิดของอินดิเคเตอร์คือฟลูออเรสเซนต์อินดิเคเตอร์และโครโมจีนิกอินดิเคเตอร์ โดยกลไกของการเปลี่ยนแปลงสัญญาณ อาทิเช่น กระบวนการ photoinduced electron transfer (PET) (Wiskur *et al.*, 2001), fluorescence resonance energy transfer (FRET) (Nguyen & Anslyn, 2006), electronic energy transfer (EET) (Silva *et al.*, 1997) หรือกลไกการเปลี่ยนแปลงสัญญาณของโครโมจีนิกอินดิเคเตอร์เช่น การถ่ายเทประจุ (charge transfer) และการเกิดสารประกอบโคออร์ดิเนชัน (Martínez & Sancenón, 2003)

เทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์ นั้นมีข้อดีกว่าเซ็นเซอร์ ทางเคมีเชิงแสงแบบดั้งเดิม (conventional optical chemosensor) หลายประการอาทิเช่น นักเคมีไม่จำเป็นต้องสังเคราะห์โมเลกุลให้มีส่วนที่ให้สัญญาณ จึงส่งผลให้ลดขั้นตอน เวลา ค่าใช้จ่ายและทรัพยากรในการสังเคราะห์ได้อย่างมาก โมเลกุลรีเซปเตอร์หนึ่งโมเลกุลสามารถตรวจวัดสารที่สนใจได้มากกว่าหนึ่งชนิดโดยอาศัยการเปลี่ยนชนิดของอินดิเคเตอร์ (Hargrove *et al.*, 2011) หากใช้โครโมจีนิกอินดิเคเตอร์ก็จะทำให้สามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาได้ด้วยตาเปล่า และที่สำคัญระบบดังกล่าวสามารถตรวจวัดโมเลกุลที่สนใจได้ดีทั้งในตัวอย่างที่เป็นน้ำและตัวอย่างอินทรีย์ โดยกลุ่มนักวิจัยที่มีชื่อเสียงและมีการพัฒนาเทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์อย่างมากคือกลุ่มวิจัยของ Anslyn (Zhang and Anslyn, 2007) ที่ได้เสนอการนำเทคนิคนำไปใช้ในการตรวจวัดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือด โดยใช้รีเซปเตอร์ที่เป็นสารประกอบโคออร์ดิเนชันของ Cd(II) (1) กับอินดิเคเตอร์ pyrocatechol violet (PV) ดังนั้น จึงมีการประยุกต์นำเทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์ไปใช้ในการตรวจวัดทั้งแคโทไอออนและแอนไอออน ตลอดจนถึงสารชีวโมเลกุลต่างๆ มากมาย (Nguyen & Anslyn, 2006) ทั้งในสิ่งแวดล้อมและในตัวอย่างชีวภาพ



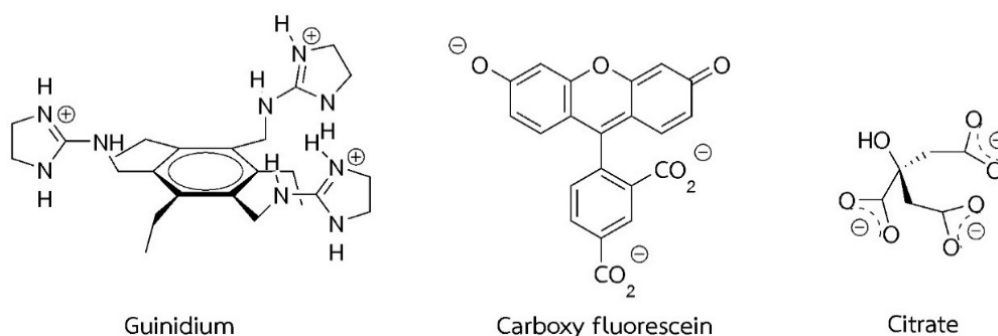
รูปที่ 2.4 โครงสร้างของรีเซปเตอร์ 1, Glucose และอินดิเคเตอร์ PV

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากที่กล่าวมาก่อนหน้านี้แล้วถึงข้อดีของเทคนิค **IDAs** ที่สามารถตรวจชนิดของโมเลกุลที่หลากหลายโดยใช้รีเซปเตอร์เพียงชนิดเดียวและทำการเปลี่ยนชนิดของอินดิเคเตอร์ จึงมีรายงานวิจัยที่มีการนำเอาเทคนิค IDAs ไปใช้ในการวิเคราะห์สารที่สนใจเป็นจำนวนมากโดยจะขอยกตัวอย่างดังต่อไปนี้

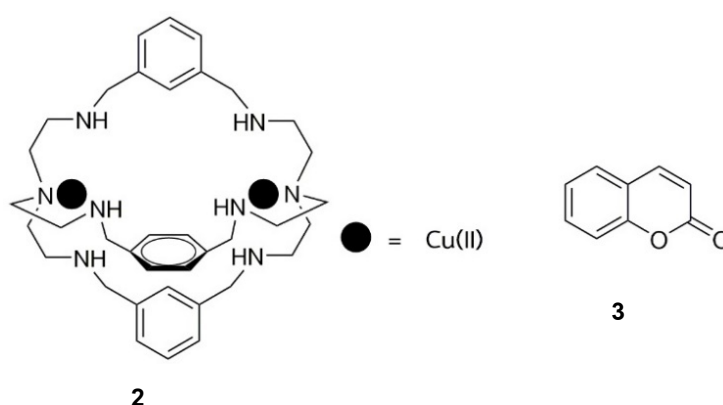
กลุ่มวิจัยที่มีชื่อเสียงและมีการพัฒนาการตรวจวัดไอออนชนิดต่างๆ ด้วยเทคนิค IDAs คือกลุ่มวิจัยของ Anslyn และคณะ โดยกลุ่มวิจัยดังกล่าวได้ค้นพบการนำโมเลกุลสารอินทรีย์ที่มีหมู่

guinidium มาใช้เป็นรีเซบเตอร์ สำหรับตรวจวัดแอนไอออนซิติเรทด้วยเทคนิค IDAs โดยใช้ฟลูออเรสเซนส์อินดิเคเตอร์ 5-carboxy fluorescein เป็นหน่วยให้สัญญาณ และมีการนำระบบการตรวจวัดดังกล่าวไปใช้ในการตรวจวัดแอนไอออนซิติเรทในเครื่องมือได้อีกด้วย (Metzger *et al.*, 1997)



รูปที่ 2.5 โครงสร้างของรีเซบเตอร์ **Guinidium**, อินดิเคเตอร์ 5-carboxy fluorescein และแอนไอออน Citrate

กลุ่มวิจัยอีกกลุ่มที่มีผลงานวิจัยทางด้าน **IDAs** ที่โดดเด่นคือกลุ่มวิจัยของ Fabbrizzi (Fabbrizzi *et al.*, 2001) โดยกลุ่มวิจัยนี้ได้เสนอการนำสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์ของคอปเปอร์ (II) (**2**) มาใช้เป็นรีเซบเตอร์สำหรับการตรวจวัดแอนไอออนคาร์บอเนต (CO_3^{2-}) และใช้ฟลูออเรสเซนส์อินดิเคเตอร์ coumarin (**3**) เป็นหน่วยให้สัญญาณ

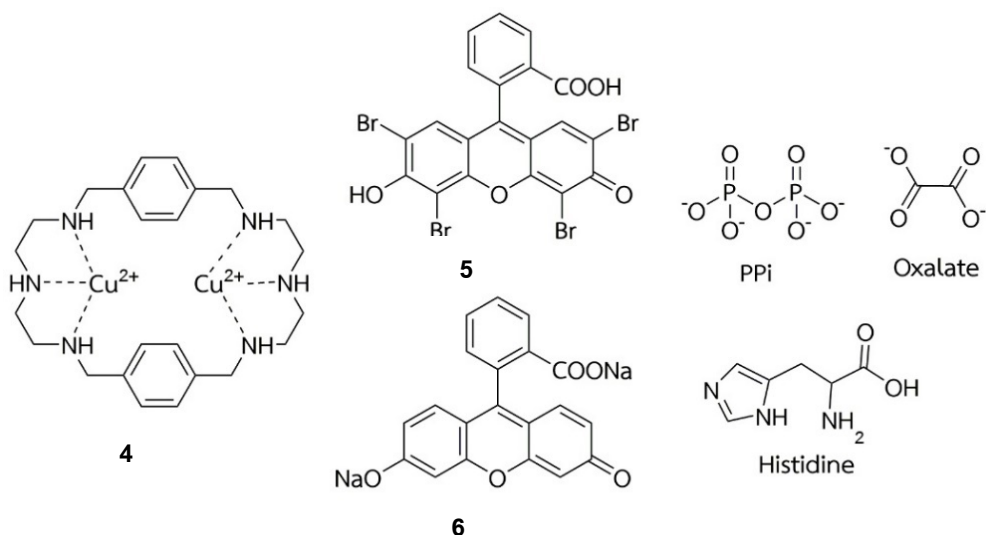


รูปที่ 2.6 โครงสร้างของรีเซบเตอร์ **2** อินดิเคเตอร์ coumarin **3**

นอกจากนั้นแล้วกลุ่มวิจัยของ Fabbrizzi ยังได้ออกแบบรีเซบเตอร์และพัฒนาระบบให้สามารถตรวจวัดแอนไอออนได้หลากหลายชนิดกล่าวคือ ได้ทำการสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์ของคอปเปอร์ (II) (**4**) และนำไปตรวจวัดแอนไอออนไพโรฟอสเฟต

(pyrophosphate, **PPI**) โดยใช้ฟลูออเรสเซนต์อินดิเคเตอร์ Eosin Y (**5**) เป็นหน่วยให้สัญญาณ โดยที่ แอนไอออน PPI จะเข้าไปเกินพันธะโคออร์ดิเนทโควาเลนต์กับอะตอมของคอปเปอร์ (II) ทั้งสองและ ทำให้ Eosin Y หลุดออกมาอยู่ในรูปอิสระ (Fabbrizzi *et al.*, 2002) ระบบดังกล่าวยังสามารถนำไปใช้ ตรวจวัดกรดอะมิโนฮิสทีดีน (Histidine, **His**) ได้อีกด้วย โดย **His** จะเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ Eosin Y โดยใช้อะตอมของไนโตรเจนจากวงอิมิดาโซลไปเกิดพันธะโคออร์ดิเนทโควาเลนต์กับอะตอมของ คอปเปอร์ (II) ของรีเซปเตอร์และทำให้ Eosin Y หลุดออกมาอยู่ในรูปอิสระ (Hortala *et al.*, 2003)

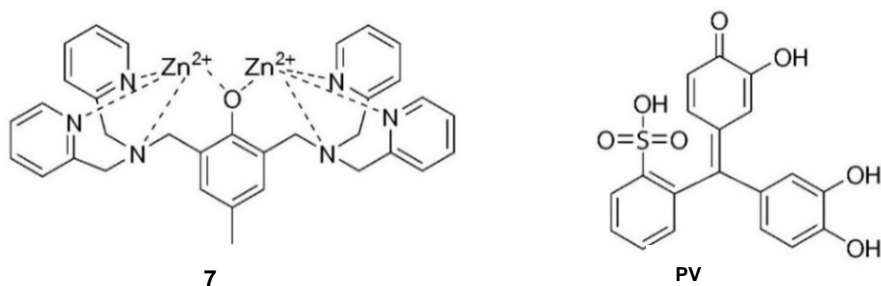
ต่อมาในปี 2012 กลุ่มวิจัยของ Hu (Hu and Feng, 2012) ได้นำรีเซปเตอร์เดียวกันนี้มาใช้ในการตรวจวัดแอนไอออน oxalate ในน้ำ โดยทำเปรียบเทียบการใช้ฟลูออเรสเซนต์อินดิเคเตอร์เพิ่มขึ้น อีกหนึ่งชนิดคือ fluorescein **6** ซึ่งผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าอินดิเคเตอร์ทั้งสองสามารถนำมาใช้เป็นอินดิเคเตอร์สำหรับการตรวจวัด oxalate ในน้ำได้เป็นอย่างดีและให้ค่าขีดจำกัดการตรวจวัดต่ำสุด ถึง 0.079 mM



รูปที่ 2.7 โครงสร้างของรีเซปเตอร์ **4** อินดิเคเตอร์ Eosin Y **5** Fluorescein **6** แอนไอออน **PPI** oxalate และ กรดอะมิโน Histidine

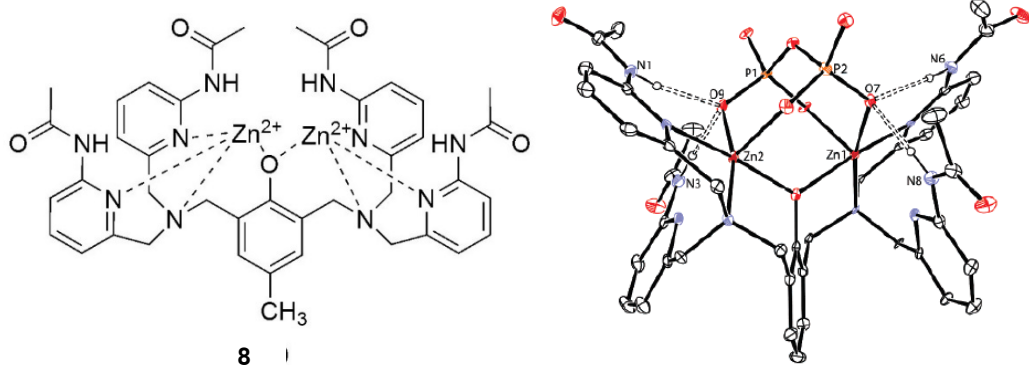
เป็นที่น่าสนใจว่ามีการรายงานการตรวจวัดแอนไอออนกลุ่มฟอสเฟตด้วยเทคนิค IDAs จาก หลายกลุ่มวิจัย โดยในปี 2002 Han (Han and Kim, 2002) ได้เสนอรีเซปเตอร์ชนิดไดนิวเคลียร์ซิงก์ (II) (**7**) ซึ่งทำการออกแบบโครงสร้างรีเซปเตอร์ให้มีลักษณะคล้ายกับเอนไซม์ phosphotriesterase ที่ ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาสลายพันธะ phosphodiester และใช้โครโมจีนิกอินดิเคเตอร์ **PV** เป็นหน่วยให้ สัญญาณที่สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า ระบบดังกล่าวสามารถทำการตรวจวัดได้ทั้งแอนไอออน ฟอสเฟต **Pi** และไพโรฟอสเฟต **PPI** อันเป็นสาเหตุเนื่องมาจากระยะห่างระหว่างไอออนซิงก์ (II) ที่มี ระยะห่างกัน 3.0 Å ซึ่งมีค่าน้อยกว่าใน phosphotriesterase ที่มีค่าเท่ากับ 3.5 Å ซึ่งผลการศึกษา

แสดงว่าระยะห่างระหว่างไอออนซิงก์ (II) เป็นปัจจัยที่มีผลต่อความจำเพาะในการเลือกจับกับแอนไอออนฟอสเฟตกับรีเซปเตอร์



รูปที่ 2.8 โครงสร้างของรีเซปเตอร์ 7 และโครโมจีนิกอินดิเคเตอร์ PV

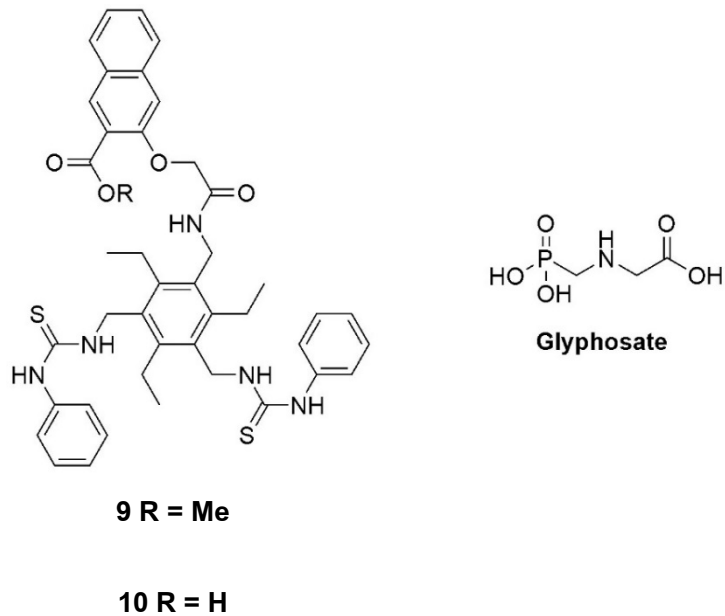
ต่อมา Lee และคณะ (Lee *et al.*, 2007) ได้ทำการปรับปรุงโครงสร้างของรีเซปเตอร์ดังกล่าว โดยทำการออกแบบลิแกนด์ให้มีหมู่ acetyl acetamide เพิ่มขึ้น 4 หมู่ เพื่อให้โครงสร้างมีความเกะกะ (steric) เพิ่มมากขึ้นและยังคงใช้อินดิเคเตอร์ PV เป็นหน่วยให้สัญญาณผ่านกระบวนการตรวจวัดแบบ IDAs ซึ่งผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่ารีเซปเตอร์ดังกล่าวสามารถตรวจวัด **PPi** ได้อย่างจำเพาะเจาะจง โดยโมเลกุล **PPi** จับกับไอออนของซิงก์ (II) โดยใช้อะตอมของออกซิเจนทั้ง 4 อะตอมและยังเกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ acetamide อีกด้วย



รูปที่ 2.9 โครงสร้างของรีเซปเตอร์ 8 และโครงสร้าง X-ray ของสารประกอบระหว่างรีเซปเตอร์ 8 และ **PPi**

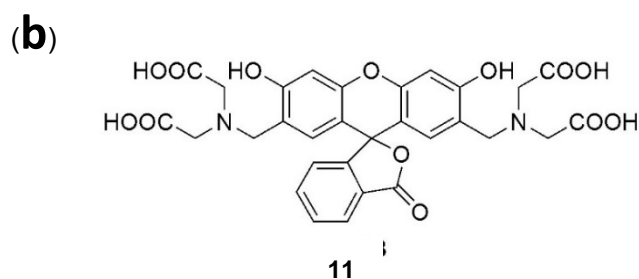
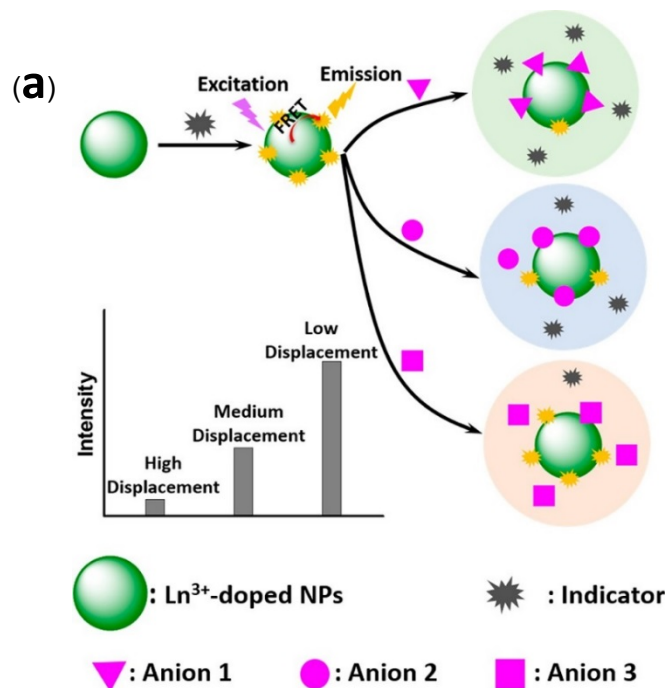
สำหรับการตรวจวัดสารประกอบกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสด้วยเทคนิค IDAs นั้น มีรายงานการศึกษาในปี 2014 ว่ากลุ่มวิจัยของ Anzenbacher (Minami *et al.*, 2014) ได้ทำการสังเคราะห์รีเซปเตอร์ที่มีหมู่เลือกจับและหน่วยให้สัญญาณฟลูออเรสเซนส์อยู่ภายในโมเลกุลเดียวกันสองตัวคือ **9** และ **10** นำมาใช้ในการตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชไกลโฟเซต โดยสามารถทำการตรวจวัดภายใต้สภาวะตัว

ทำละลาย DMSO แต่ก็จำเป็นจะต้องอาศัยเครื่องมือทางสถิติ statistical multivariate analysis method - linear discriminant analysis (LDA) เข้ามาช่วยในการจำแนกชนิดของสารประกอบออร์กาโนฟอสฟอรัส



รูปที่ 2.10 โครงสร้างของรีเซปเตอร์ 9 และ 10

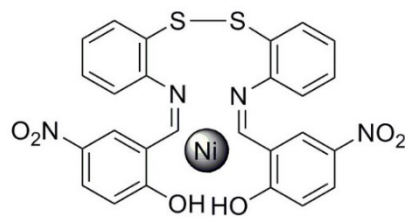
ในปี 2016 กลุ่มวิจัยของ Wang (Wang *et al.*, 2016) ได้นำสารประกอบอนุภาคนาโนที่มีการผสมไอออนโลหะแลนทาไนด์ (III) (Ln-NPs) มาใช้เป็นรีเซปเตอร์ในการตรวจวัด **Glyphosate** ด้วยเทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์โดยใช้ฟลูออเรสเซนส์อินดิเคเตอร์ fluorescein **6** และ calcein **11** โดยกลไกของการตรวจวัดคือเมื่ออนุภาคนาโนจับกับฟลูออเรสเซนส์อินดิเคเตอร์จะทำหน้าที่เป็นตัวปิดสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ (quenching) ของฟลูออเรสเซนส์อินดิเคเตอร์ จากนั้นเมื่อ **Glyphosate** เข้าไปแทนที่ฟลูออเรสเซนส์อินดิเคเตอร์ ก็จะทำให้สัญญาณฟลูออเรสเซนส์กลับมาดังเดิม (enhance) แต่อย่างไรก็ตามก็จำเป็นจะต้องอาศัยเครื่องมือทางสถิติ (LDA) เข้ามาช่วยในการจำแนก **Glyphosate** ออกจากสารประกอบออร์กาโนฟอสฟอรัสอื่นๆ อีกเช่นกัน



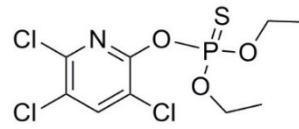
รูปที่ 2.11 a) กลไกการตรวจวัด Glyphosate ด้วยอนุภาคนาโน Ln-NPs

b) โครงสร้างของอินดิเคเตอร์ calcein 11

นอกจาก **Glyphosate** แล้วยังมีการพัฒนาเซ็นเซอร์ทางเคมีเชิงแสงในการตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสอื่นๆ อีก เช่นในปี 2016 กลุ่มวิจัยของ Raj (Raj *et al.*, 2016) โดยกลุ่มวิจัยดังกล่าวได้ทำการสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโนนิวเคลียร์ของ Ni^{2+} (12) ในการตรวจวัด Chlorpyrifos ซึ่งรีเซบเตอร์ดังกล่าวสามารถตรวจวัด Chlorpyrifos ได้อย่างจำเพาะเจาะจงและให้ค่าขีดจำกัดการตรวจวัดต่ำสุดถึง 62 nM



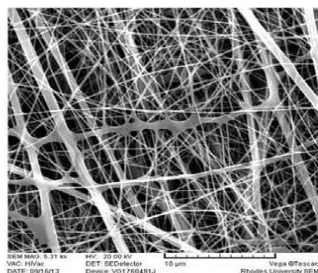
14



Chlorpyrifos

รูปที่ 2.12 โครงสร้างของรีเซปเตอร์ 12 และ chlorpyrifos

นอกจากเทคนิค IDAs แล้วยังมีการพัฒนาชุดตรวจวัด **Glyphosate** รูปแบบอื่นอีก โดยในปี 2015 De Almeida และคณะ (De Almeida *et al.*, 2015) ได้ทำการพัฒนาการตรวจวัด **Glyphosate** ในน้ำ โดยสร้างเป็นตัวตรวจวัดแบบ strip ในการวิจัยนี้ได้เลือกใช้เทคนิค electro spinning ในการสร้างตัวตรวจวัดแบบ strip โดยผู้วิจัยได้เลือกใช้โพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (poly (vinyl) alcohol ; PVA) เป็นสารพอลิเมอร์ จากการศึกษพบว่าการสร้างตัวตรวจวัดแบบ strip สามารถทำได้โดยเตรียมสารละลายผสมระหว่าง PVA กับ **Cu** (copper doped poly (vinyl) alcohol; Cu-PVA) จากนั้นนำไปทำให้เป็นเส้นใยนาโนด้วยเทคนิค Electro spinning เมื่อทำการเติมสารละลาย **Glyphosate** ที่มี pH 12 ลงบนตัวตรวจวัดแบบ strip พบว่าจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของสีจากสีฟ้าไปเป็นสีเหลืองภายในเวลา 3 วินาที และให้ความเสถียรของการเปลี่ยนสีได้ถึง 4 ชั่วโมง ในขณะที่แอนไอออนชนิดอื่น ๆ ไม่สามารถรบกวนการตรวจวัด **Glyphosate** ได้ และมีขีดจำกัดการตรวจวัดเท่ากับ 0.1 µg/ml



A

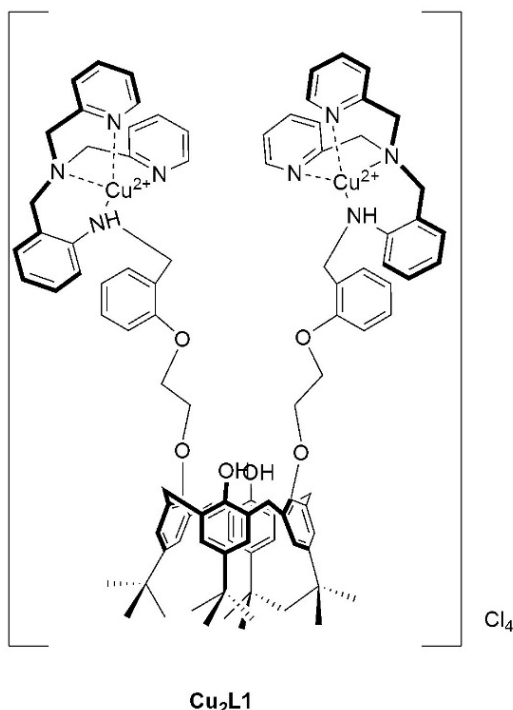


B

รูปที่ 2.13 A) ภาพถ่าย SEM ของเส้นใย copper doped poly (vinyl) alcohol (Cu-PVA) ก่อนตรวจวัด **Glyphosate** B) การเปลี่ยนสีของเส้นใย Cu-PVA ในสภาวะที่ปราศจาก **Glyphosate** (ซ้าย) และเมื่อมี **Glyphosate** (ขวา)

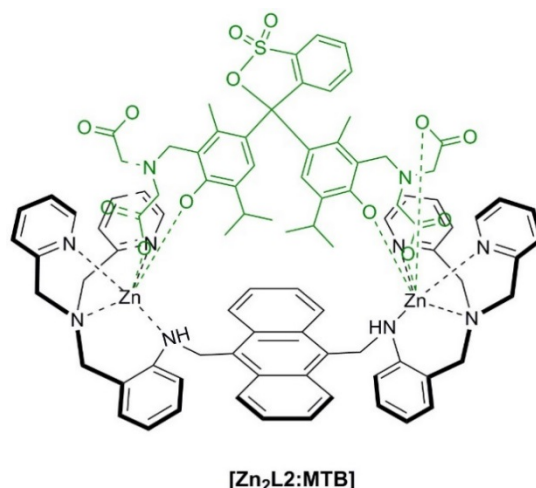
สำหรับงานวิจัยของกลุ่มผู้วิจัยเองได้มีการพัฒนาเทคนิค **IDAs** เพื่อใช้ในการตรวจวัด **PPI** มาตั้งแต่ปี 2010 โดยทำการสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์ของคอปเปอร์ (II) กับ

ลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของ calix[4]arenes (**Cu₂L1**) ที่มีหมู่ไทรฟลูออโรเมทิล (Watchasit *et al.*, 2010) และใช้อินดิเคเตอร์ **PV** เป็นหน่วยให้สัญญาณ โดยผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่ารีเซปเตอร์ดังกล่าวสามารถตรวจวัด **PPI** ได้อย่างจำเพาะเจาะจงเมื่อมีแอนไอออนอื่นๆ รวมอยู่ด้วยในระบบตัวทำละลาย 80/20 (%v/v) CH₃CN/H₂O บัฟเฟอร์ 10 mM HEPES แต่อย่างไรก็ตามระบบดังกล่าวก็ยังไม่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่าง **PPI** และ adenosine triphosphate (**ATP**) ได้



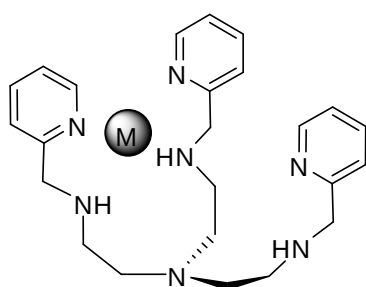
รูปที่ 2.14 โครงสร้างของรีเซปเตอร์ **Cu₂L1**

ดังนั้นกลุ่มวิจัยจึงได้ทำการพัฒนาต่อโดยการออกแบบโมเลกุลรีเซปเตอร์ใหม่เป็นสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์ของซิงก์ (II) (**Zn₂L2**) กับลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของแอนทราซีนที่มีหมู่ไทรฟลูออโรเมทิล (Watchasit *et al.*, 2014) และใช้อินดิเคเตอร์ methyl thymol blue (**MTB**) เป็นหน่วยให้สัญญาณ เกิดเป็นโมเลกุลเชิงซ้อนแอนเซนเซมเบล **[Zn₂L2:MTB]** ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่ารีเซปเตอร์ดังกล่าวสามารถตรวจวัดแอนไอออน **PPI** ได้อย่างจำเพาะเจาะจงในระบบตัวทำละลาย 80/20 (%v/v) CH₃CN/H₂O บัฟเฟอร์ 10 mM HEPES และที่สำคัญสามารถจำแนก **PPI** ได้ ถึงแม้ในระบบจะมีฟอสเฟตแอนไอออนอื่นๆ รวมอยู่ด้วย โดยระบบดังกล่าวให้ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด **PPI** ต่ำสุดถึง 0.3 μ M

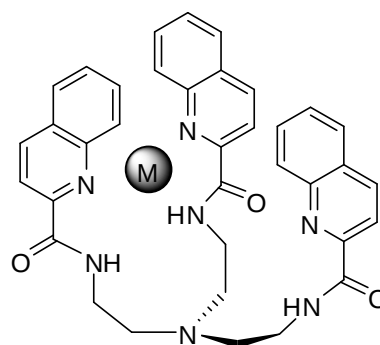


รูปที่ 2.15 โครงสร้างของโมเลกุลเชิงซ้อนเอนเซมเบิล $[Zn_2L_2:MTB]$

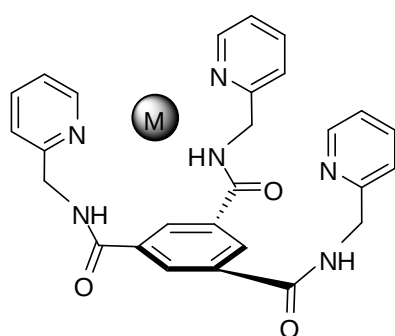
จากความสำเร็จในการพัฒนารีเซบเตอร์สำหรับการตรวจวัด **PPI** ด้วยเทคนิค **IDAs** โดยใช้สารประกอบโคออร์ดิเนชันของคอปเปอร์ (II) และซิงก์ (II) กับลิแกนด์ที่มีส่วนประกอบเป็นหมู่ไทรพอดัลเอมีนของกลุ่มวิจัยนี้เอง จึงทำให้ทราบว่าสารประกอบโคออร์ดิเนชันกับลิแกนด์ที่มีรูปทรงแบบไทรพอดัลนั้นน่าจะสามารถที่จะนำมาพัฒนาให้เป็นลิแกนด์ที่มีศักยภาพในการตรวจวัดสารประกอบออร์กาโนฟอสฟอรัสที่มีหมู่ฟอสเฟตได้ ประกอบกับเป็นที่ทราบกันดีว่าไอออนของโลหะ Cu^{2+} และ Zn^{2+} นั้นสามารถเกิดเป็นสารประกอบโคออร์ดิเนชันกับลิแกนด์ที่มีค่าคงที่การเกิดสารเชิงซ้อนที่สูงตามอนุกรม Irving–Williams ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการออกแบบสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโนนิวเคลียร์ของ Cu^{2+} (**CuL3N**, **CuL4N**, **CuL5N** และ **CuL6N**) และ Zn^{2+} (**ZnL3N**, **ZnL4N**, **ZnL5N** และ **ZnL6N**) กับลิแกนด์ที่มีรูปทรงแบบไทรพอดัล 4 ชนิดคือ **L3N**, **L4N**, **L5N** และ **L6N** เพื่อใช้ในการตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส



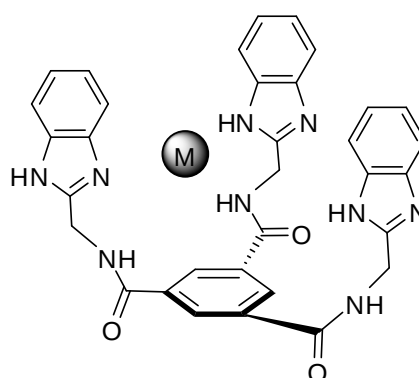
CuL3N : M = Cu²⁺
ZnL3N : M = Zn²⁺



CuL4N : M = Cu²⁺
ZnL4N : M = Zn²⁺



CuL5N : M = Cu²⁺
ZnL5N : M = Zn²⁺



CuL6N : M = Cu²⁺
ZnL6N : M = Zn²⁺

รูปที่ 2.16 โครงสร้างของสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโนนิวเคลียร์ที่ใช้เป็นรีเซปเตอร์สำหรับการตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส

วิธีการทดลอง

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR) Bruker Avance III HD 400

เครื่องยูวี-วิสิเบิลแพกโตรมิเตอร์ Agilent 8453

เครื่องระเหยตัวทำละลายแบบลดความดัน Heidolph Laborota 400 efficient

เครื่องวัดค่า pH Mettler toledo

เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ Bruker microTOF

เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ Bruker Doltonic

3.2 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ลิแกนด์ สารประกอบโคออร์ดิเนชัน และอินดิเคเตอร์เป็นเกรดสำหรับวิเคราะห์ (A.R. Grade) จากบริษัท Sigma Aldrich TCI MERCK และ RCI-LabScan

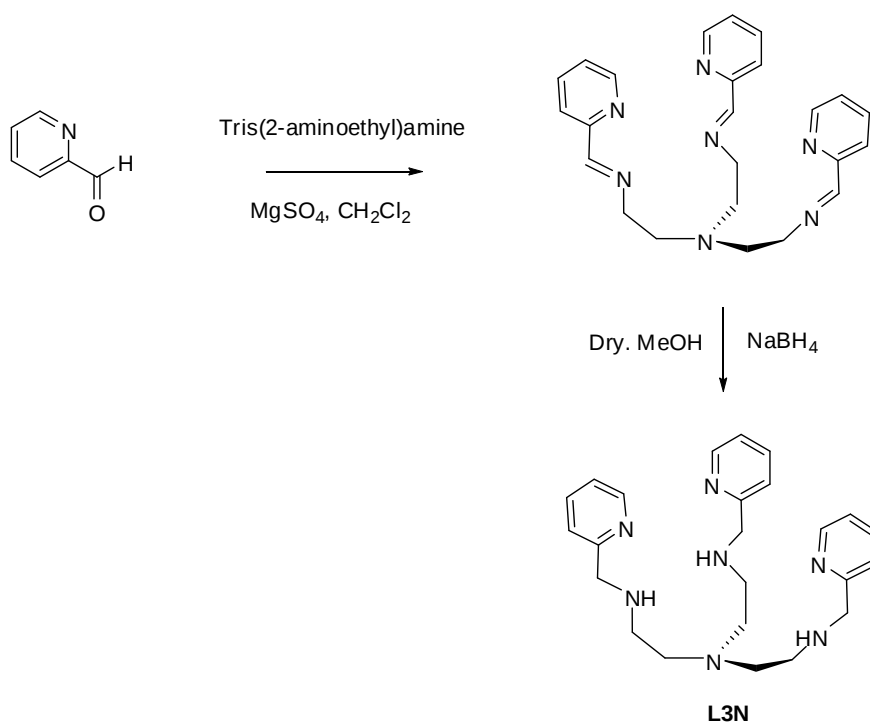
สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาความจำเพาะในการตรวจวัดประกอบด้วยแอนไอออนและสารกำจัดศัตรูพืชมีดังนี้

Adenosine diphosphate	$C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2$	A.R. Grade (TCI)
Acetate	$C_2H_3O_2^-$	A.R. Grade (TCI)
Atrazine	$C_6H_{14}ClN_5$	A.R. Grade (TCI)
Chlorpyrifos	$C_9H_{11}C_{13}NO_3PS$	A.R. Grade (Sigma Aldrich)
Dichlorvos	$C_4H_7Cl_2O_4P$	A.R. Grade (Sigma Aldrich)
Dimethyl Sulphoxide	$CH_3SO \cdot CH_3$	A.R. Grade (Loba Chemie)
Ethion	$C_9H_{12}O_4P_2S_4$	A.R. Grade (Sigma Aldrich)
Glycine	$C_2H_5NO_2$	A.R. Grade (TCI)
Glyphosate	$C_3H_8NO_5P$	A.R. Grade (Sigma Aldrich)
Glufosinate-ammonium	$C_5H_{15}N_2O_4P$	A.R. Grade (TCI)
Malathion	$C_{10}H_{19}O_8PS_2$	A.R. Grade (Sigma Aldrich)
Malonate	$C_{10}H_{19}O_6PS_2$	A.R. Grade (Sigma Aldrich)
Paracquat	$C_{12}H_{14}C_{12}N_2 \cdot XH_2O$	A.R. Grade (Sigma Aldrich)
Parathion	$C_{10}H_{14}NO_3PS$	A.R. Grade (Sigma Aldrich)

Pyrophosphate	$P_2O_7^{4-}$	A.R. Grade (Sigma Aldrich)
Sodium bromide	NaBr	A.R. Grade (MERCK)
Sodium chloride	NaCl	A.R. Grade (MERCK)
Sodium Citrate	$C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$	A.R. Grade (Sigma Aldrich)
Sodium fluoride	NaF	A.R. Grade (MERCK)
Sodium hydroxide	NaOH	A.R. Grade (Sigma Aldrich)
Sodium Iodide	NaI	A.R. Grade (MERCK)

3.3 การสังเคราะห์ลิแกนด์ที่ใช้ในการทดลอง

3.3.1 การสังเคราะห์ลิแกนด์ L3N



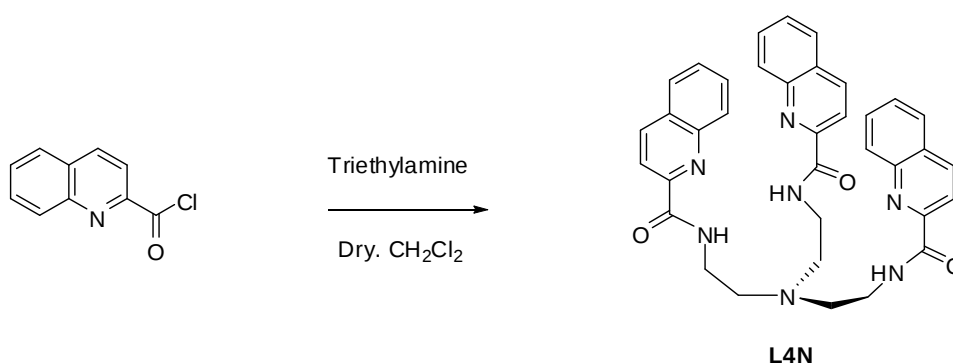
ชั่ง Anhydrous $MgSO_4$ 24.6 กรัม (204.36 มิลลิโมล) ใส่ขวดก้นกลมขนาด 250 mL จากนั้นเติม dichloromethane 50 mL แล้วตามด้วย 2-pyridinecarboxaldehyde 2.92 mL (30.77 มิลลิโมล) และ tris(2-aminoethyl)amine 1.02 mL (6.84 มิลลิโมล) ทำการคนสารละลายที่อุณหภูมิห้องภายใต้บรรยากาศแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 3.5 ชั่วโมง จากนั้นทำการกรองของผสมและเก็บชิ้นตัวทำละลายอินทรีย์ นำมาระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบลดความดันที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารผลิตภัณฑ์ลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาล นำสารผลิตภัณฑ์ที่ได้มาละลายด้วย methanol ปริมาตร 100 mL นำสารละลายที่ได้ไปให้ความเย็นที่อุณหภูมิ 5 °C จากนั้นค่อยๆ เติม $NaBH_4$ 7.71

กรัม (204.36 มิลลิโมล) และคนสารละลายต่อเป็นเวลา 12 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารผสมที่ได้มาทำให้เย็นลงอุณหภูมิ 5 °C และค่อยๆ เติมกรด HCl เข้มข้น 30 mL และนำสารผสมไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 45 นาที กรองสารผสมขณะร้อน นำส่วนสารละลายไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบลดความดัน จากนั้นนำของเหลวที่เหลือมาเติมน้ำปริมาตร 25 mL นำสารละลายที่ได้มาทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 5 °C และค่อยๆ เติม NaOH 2.5 กรัม ทำการสกัดสารผสมด้วย diethyl ether จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 150 mL และล้างชั้น diethyl ether ที่สกัดได้ด้วยน้ำจำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 150 mL จากนั้นนำชั้น diethyl ether ไปกำจัดความชื้นด้วย anhydrous MgSO_4 และระเหย diethyl ether ออกด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบลดความดัน จะได้สารผลิตภัณฑ์ **L3N** เป็นของเหลวสีน้ำตาล 2.02 กรัม (70.39%)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD , ppm): δ 8.75-8.73 (m, 3H, *ArH*), 8.14-8.10 (m, 3H, *ArH*), 7.86 (d, 3H, $J = 7.6$ Hz, *ArH*), 7.66-7.62 (m, 3H, *ArH*), 4.61 (s, 6H, $-\text{CH}_2-$), 3.52 (t, 6H, $J = 6$ Hz, $-\text{CH}_2-$), 3.05 (t, 6H, $J = 5.6$ Hz, $-\text{CH}_2-$)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD , ppm): δ 149.23, 147.26, 140.32, 125.30, 124.93, 50.10, 49.72, 45.22

3.3.2 การสังเคราะห์ลิแกนด์ L4N



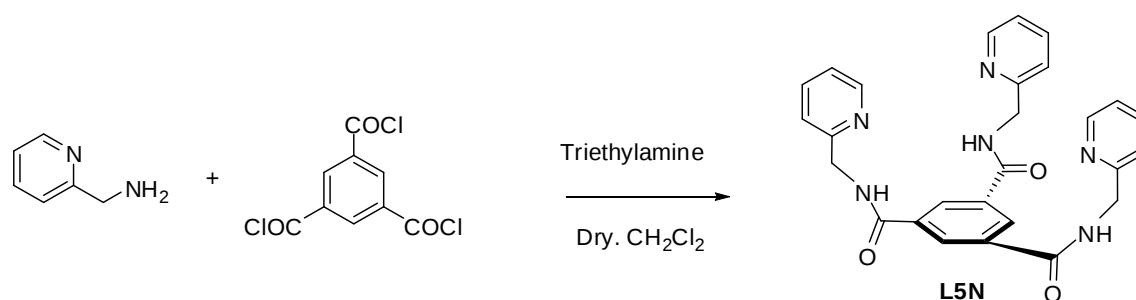
ชั่ง quinaldoyl chloride 2.95 กรัม (15.39 มิลลิโมล) ใส่ขวดกันกลมขนาด 100 mL จากนั้นเติม dichloromethane 15 mL คนจนกระทั่งได้สารละลายใส จากนั้นค่อยๆ เติม tris(2-aminoethyl)amine 0.51 mL (3.42 มิลลิโมล) ทำการคนสารละลายที่อุณหภูมิห้องภายใต้บรรยากาศแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำปริมาตร 50 mL แล้วทำการสกัดสารผสมด้วย

dichloromethane จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 150 mL จากนั้นนำชั้น dichloromethane ไปกำจัดความชื้นด้วย anhydrous MgSO_4 และระเหย CH_2Cl_2 ออกด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบลดความดัน จะได้สารผลิตภัณฑ์ **L4N** เป็นของเหลวสีน้ำตาล 1.71 กรัม (81.87 %)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 8.71 (t, 3H, $J = 5.6$ Hz, -NH-), 8.05 (d, 3H, $J = 6$ Hz, ArH), 7.96 (d, 3H, $J = 8.4$ Hz, ArH), 7.69-7.62 (m, 6H, ArH), 7.43-7.34 (m, 6H, ArH), 3.72 (m, 6H, $-\text{CH}_2-$), 2.98 (t, 6H, $J = 5.6$ Hz, $-\text{CH}_2-$)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 164.78, 149.65, 146.14, 136.92, 129.61, 128.91, 127.56, 127.40, 118.57, 54.07, 38.18

3.3.3 การสังเคราะห์ลิแกนด์ L5N

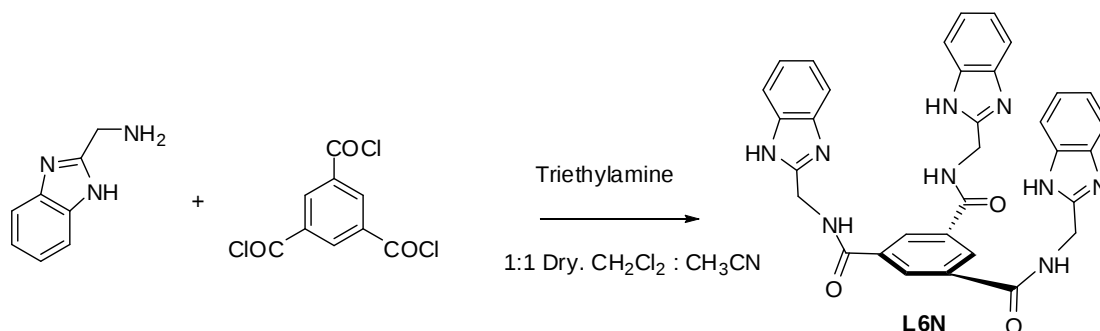


ซึ่ง 1,3,5-benzenetricarbonyl trichloride 0.98 กรัม (3.69 มิลลิโมล) ใส่ขวดกันกลม 2 ขนาด 250 mL จากนั้นเติม dichloromethane 15 mL และทำการผ่านแก๊สไนโตรเจนเข้าสู่ระบบตลอดเวลาเพื่อไล่ความชื้น คนจนกระทั่งได้สารละลายใส จากนั้นค่อยๆ เติม 2-aminomethyl pyridine 1.68 mL (16.60 มิลลิโมล) และ triethylamine 2.31 mL (16.60 มิลลิโมล) ทำการคนสารละลายที่อุณหภูมิห้องภายใต้บรรยากาศแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นทำการกรองสารละลายผสมและเก็บชั้นสารละลายนำมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบลดความดันและนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย column chromatography โดยใช้เฟสคงที่เป็น silica และเฟสเคลื่อนที่เป็น $\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ในอัตราส่วน 1:9 และทำการตกผลึกซ้ำด้วย $\text{CH}_3\text{OH}:\text{Acetone}$ ในอัตราส่วน 1:3 จะได้สารผลิตภัณฑ์ **L5N** เป็นของแข็งสีขาว 0.95 กรัม (53.38 %)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6 , ppm): δ 9.35 (t, 3H, $J = 5.6$ Hz, -NH-), 8.59 (s, 3H, ArH), 8.54-8.52 (m, 3H, ArH), 7.79-7.75 (m, 3H, ArH), 7.38 (d, 3H, $J = 8$ Hz, ArH), 7.29-7.7.27 (m, 3H, ArH), 4.62 (d, 6H, $J = 6$ Hz, $-\text{CH}_2-$)

^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6 , ppm): δ 166.08, 158.95, 149.37, 137.22, 135.28, 129.40, 122.64, 121.54, 45.35

3.3.4 การสังเคราะห์ลิแกนด์ L6N



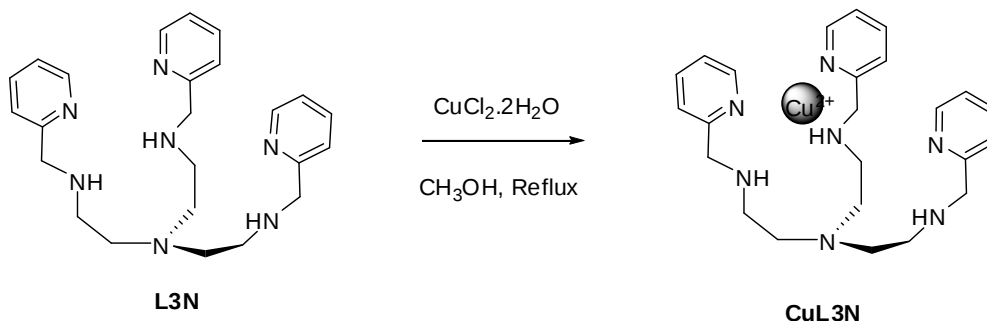
ซึ่ง 2-(aminomethyl)benzimidazole dihydrochloride 3.66 กรัม (16.66 มิลลิโมล) ใส่ขวด ก้นกลม 2 คอขนาด 250 mL จากนั้นเติมสารผสม 1:1 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 50 mL และทำการผ่านแก๊ส ไนโตรเจนเข้าสู่ระบบตลอดเวลาเพื่อไล่ความชื้น จากนั้นค่อยๆ เติม 1,3,5-benzenetricarbonyl trichloride 0.98 กรัม (3.69 มิลลิโมล) ทำการคนสารละลายที่อุณหภูมิห้องภายใต้บรรยากาศแก๊ส ไนโตรเจนเป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นทำการกรองสารละลายผสมและเก็บชั้นสารละลายนำมาระเหย ตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบลดความดันและนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย column chromatography โดยใช้เฟสคงที่เป็น silica และเฟสเคลื่อนที่เป็น 15% (v/v) CH_3OH ใน CH_2Cl_2 และทำการตกผลึกซ้ำด้วย $\text{CH}_3\text{OH}:\text{Acetone}$ ในอัตราส่วน 1:3 จะได้สารผลิตภัณฑ์ L6N เป็นของแข็ง สีขาว 1.03 กรัม (46.61 %)

^1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , ppm): δ 9.65 (t, 3H, $J = 5.2$ Hz, -NH-), 8.77 (s, 3H, ArH), 7.62-7.60 (m, 6H, ArH), 7.30-7.28 (m, 6H, ArH), 4.86 (d, 6H, $J = 5.2$ Hz, $-\text{CH}_2-$)

^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6 , ppm): δ 166.36, 152.53, 136.26, 134.62, 130.14, 123.52, 114.94, 37.71

3.4 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโนนิวเคลียร์ที่ใช้ในการทดลอง

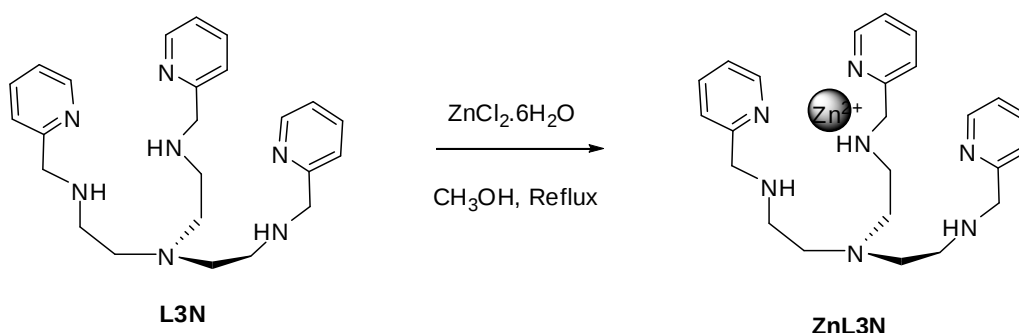
3.4.1 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน CuL3N



ซังลิแกนด์ **L3N** 0.307 กรัม (0.73 มิลลิโมล) ใส่ขวดก้นกลมขนาด 250 mL เติม methanol ปริมาตร 50 mL จากนั้นเติมสารละลายของ $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.62 กรัม (3.66 มิลลิโมล) ใน methanol 15 mL และทำการรีฟลักซ์สารละลายผสมภายใต้สภาวะแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ทำการกรองสารละลายผสมและเก็บของแข็งสีขาวอมฟ้าของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **CuL3N** น้ำหนัก 0.15 กรัม (38.35 %)

HRMS ESI Positive mode, $[\text{CuL3N} + \text{Cl}]^+$ calculated 517.18 found 517.1913

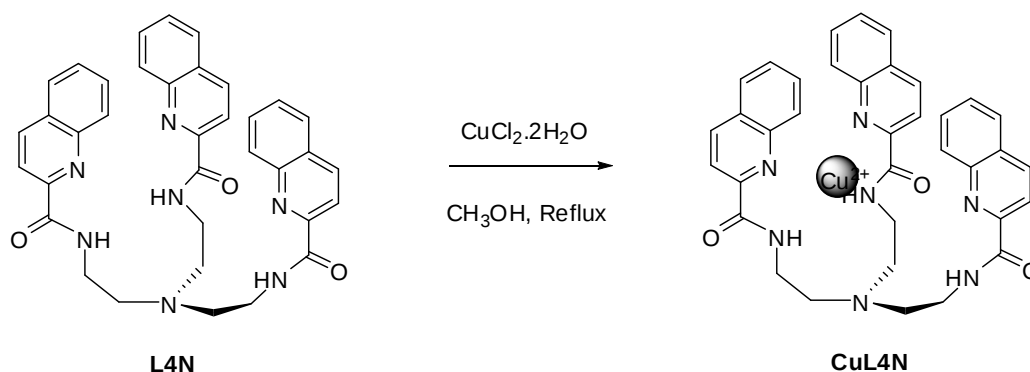
3.4.2 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน ZnL3N



ซังลิแกนด์ **L3N** 0.307 กรัม (0.73 มิลลิโมล) ใส่ขวดก้นกลมขนาด 250 mL เติม CH_3OH ปริมาตร 50 mL จากนั้นเติมสารละลายของ $\text{ZnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.89 กรัม (3.66 มิลลิโมล) ใน CH_3OH 15 mL และทำการรีฟลักซ์สารละลายผสมภายใต้สภาวะแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ทำการกรอง

สารละลายผสมและเก็บของแข็งสีขาวของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **ZnL3N** น้ำหนัก 0.12 กรัม (30.13 %)

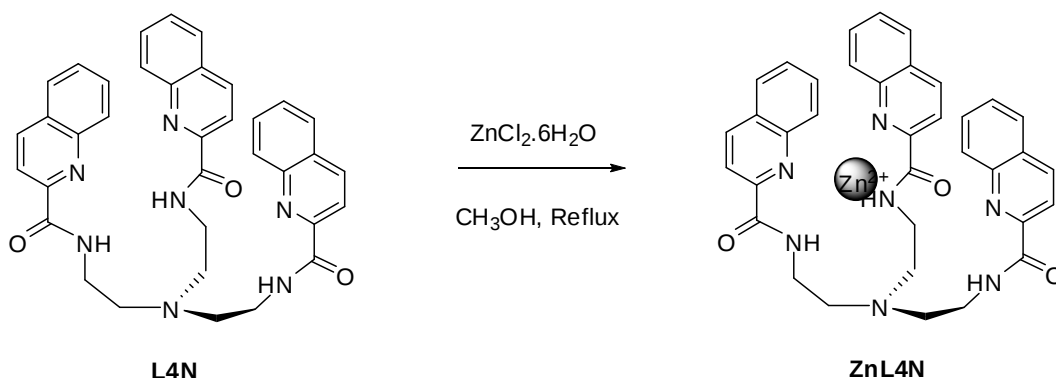
3.4.3 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน **CuL4N**



ซังลิแกนด์ **L4N** 0.25 กรัม (0.41 มิลลิโมล) ใส่ขวดก้นกลมขนาด 250 mL เติม methanol ปริมาตร 50 mL จากนั้นเติมสารละลายของ $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.24 กรัม (1.43 มิลลิโมล) ใน methanol 15 mL และทำการรีฟลักซ์สารละลายภายใต้สภาวะแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ทำการกรองและเก็บของแข็งสีขาวของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **CuL4N** น้ำหนัก 0.13 กรัม (43.90 %)

HRMS ESI Positive mode, $[\text{CuL4N} + \text{Cl}]^+$ calculated 710.6913 found 710.0478

3.4.4 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน **ZnL4N**

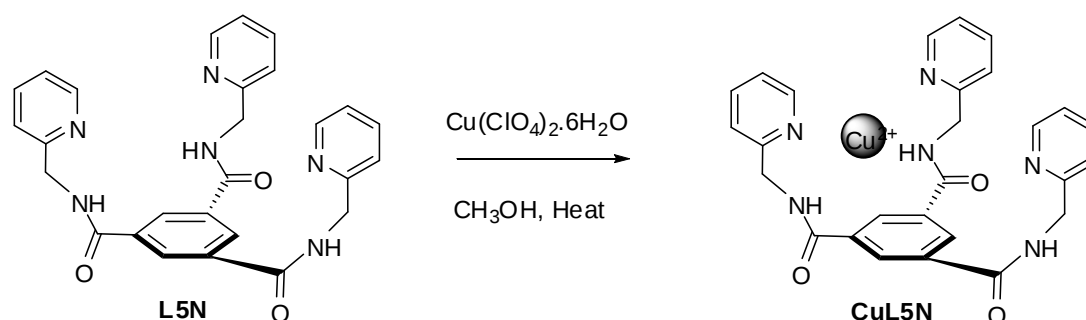


ซังลิแกนด์ **L4N** 0.25 กรัม (0.41 มิลลิโมล) ใส่ขวดก้นกลมขนาด 250 mL เติม CH_3OH ปริมาตร 50 mL จากนั้นเติมสารละลายของ $\text{ZnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.35 กรัม (1.43 มิลลิโมล) ใน CH_3OH 15

mL และทำการรีฟลักซ์สารละลายผสมภายใต้สภาวะแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ทำการกรองสารละลายผสมและเก็บของแข็งสีขาวของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **ZnL4N** น้ำหนัก 82.28 มิลลิกรัม (26.83 %)

HRMS ESI Positive mode, $[\text{ZnL4N} + \text{ClO}_4]^+$ calculated 776.5529 found 776.9756

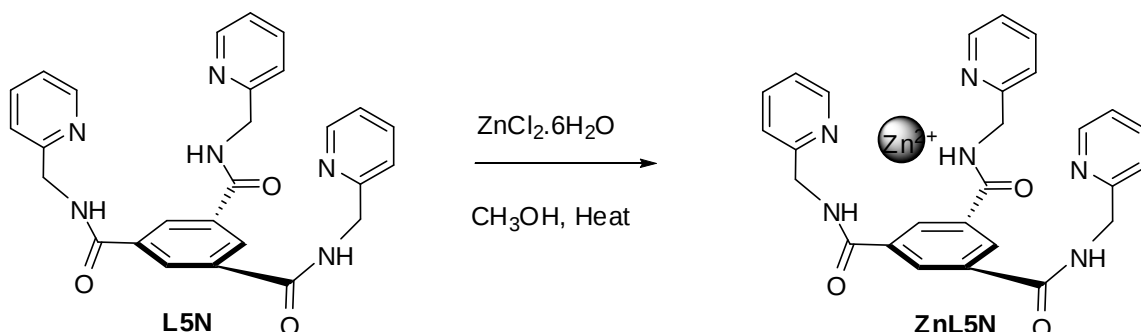
3.4.5 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน **CuL5N**



ซังลิแกนด์ **L5N** 0.7 กรัม (1.46 มิลลิโมล) ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 50 mL เติม methanol ปริมาตร 15 mL จากนั้นเติมสารละลายของ $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.89 กรัม (5.11 มิลลิโมล) ใน methanol 10 mL และทำการให้ความร้อนสารละลายผสมเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทิ้งให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง ทำการกรองสารละลายผสมและเก็บของแข็งสีขาวของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **CuL5N** น้ำหนัก 0.63 กรัม (58.22 %)

HRMS ESI Positive mode, $[\text{CuL6N} + \text{CH}_3\text{CN} + \text{ClO}_4]^+$ calculated 685.0938 found 685.4361

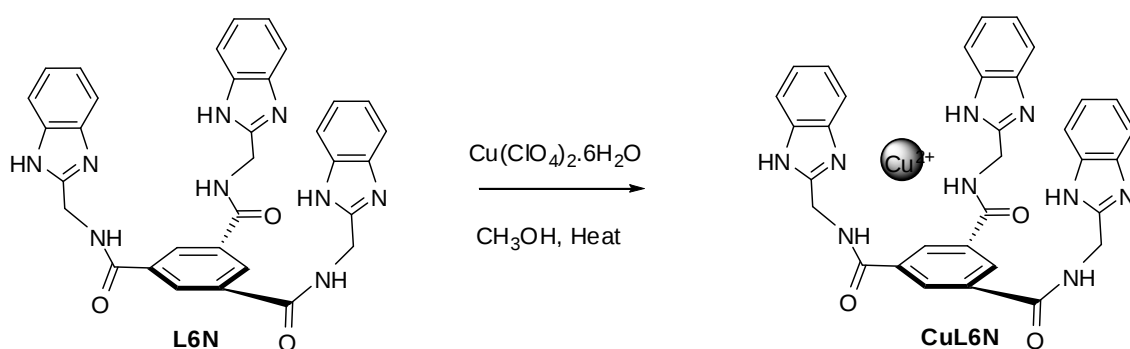
3.4.6 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน ZnL5N



ซังลิแกนด์ **L5N** 0.7 กรัม (1.46 มิลลิโมล) ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 50 mL เติม methanol ปริมาตร 15 mL จากนั้นเติมสารละลายของ $\text{ZnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.25 กรัม (5.11 มิลลิโมล) ใน methanol 10 mL และทำการให้ความร้อนสารละลายผสมเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทิ้งให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง ทำการกรองสารละลายผสมและเก็บของแข็งสีขาวของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **ZnL5N** น้ำหนัก 0.41 กรัม (37.67 %)

HRMS ESI Positive mode, $[\text{ZnL5N} + \text{Cl}]^+$ calculated 581.3809 found 581.1708

3.4.7 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน CuL6N

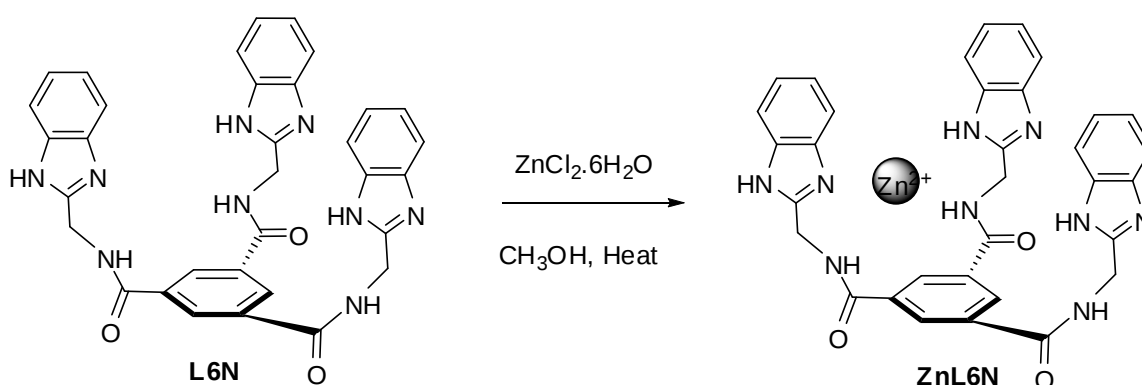


ซังลิแกนด์ **L6N** 0.87 กรัม (1.46 มิลลิโมล) ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 50 mL เติม methanol ปริมาตร 15 mL จากนั้นเติมสารละลายของ $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.89 กรัม (5.11 มิลลิโมล) ใน methanol 10 mL และทำการให้ความร้อนสารละลายผสมเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทิ้งให้เย็นลงที่

อุณหภูมิห้อง ทำการกรองสารละลายผสมและเก็บของแข็งสีเขียวของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **CuL6N** น้ำหนัก 0.75 กรัม (59.59 %)

HRMS ESI Positive mode, $[\text{CuL6N}+\text{ClO}_4]^+$ calculated 760.6226 found 760.0765

3.4.8 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน **ZnL6N**



ซิงลิแกนต์ **L6N** 0.87 กรัม (1.46 มิลลิโมล) ใส่ขวดรูปชมพูนขนาด 50 mL เติม methanol ปริมาตร 15 mL จากนั้นเติมสารละลายของ $\text{ZnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.25 กรัม (5.11 มิลลิโมล) ใน methanol 10 mL และทำการให้ความร้อนสารละลายผสมเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทิ้งให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง ทำการกรองสารละลายผสมและเก็บของแข็งสีขาวของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **ZnL6N** น้ำหนัก 0.53 กรัม (42.46 %)

HRMS ESI Positive mode, $[\text{ZnL6N}+\text{Cl}]^+$ calculated 698.489 found 698.207

3.5 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดสารประกอบออร์กาโนฟอสฟอรัสที่ใช้เป็นสารกำจัดศัตรูพืชของสารประกอบโคออร์ดิเนชันที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์

3.5.1 การเตรียมสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 0.05 M pH 6.4

ซิง 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethanesulfonic (HEPES) Acid น้ำหนัก 5.96 กรัม แล้วนำมาละลายด้วยน้ำที่ปราศจากไอออนปริมาตร 400 mL วัดค่า pH ของสารละลาย HEPES buffer ด้วยเครื่อง pH meter ปรับค่า pH ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น

1 M จนสารละลาย HEPES buffer เท่ากับ pH 6.4 เทสารละลาย HEPES buffer (pH 6.7) ลงใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 500 mL และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

3.5.2 การเตรียมสารละลายผสมของ 80:20 % (v/v) DMSO: H₂O HEPES buffer pH

6.4 ความเข้มข้น 10 mM pH 6.4

ตวงสารละลาย HEPES buffer (pH 6.4) ปริมาตร 200 mL ลงในขวดวัดปริมาตร 1000 mL ปรับปริมาตรด้วยสาร Dimethyl Sulfoxide (DMSO) ในการผสมสารละลาย 80:20 % (v/v) DMSO:H₂O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM หลังปรับปริมาตร จะสังเกตได้ว่าสารละลายจะคายความร้อน ควรรอให้สารละลายเย็น แล้วปรับปริมาตรอีกครั้ง

3.5.3 การเตรียมสารละลายแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 1 mM

ชั่งน้ำหนักแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ตามตารางที่ 3.1 และนำไปละลายด้วยสารละลายผสม 80:20 % (v/v) DMSO:H₂O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM แล้วปรับปริมาตรด้วย 80:20 % (v/v) DMSO:H₂O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM จะได้แอนไอออนชนิดต่าง ๆ ที่มีความเข้มข้น 0.02 M ปริมาตร 5 mL จากนั้นเปิดสารละลายของแอนไอออนชนิดต่าง ๆ มา 0.5 mL ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 mL ปรับปริมาตรด้วย 80:20 % (v/v) DMSO:H₂O HEPES buffer pH 6.4 จะได้สารละลายแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ที่มีความเข้มข้น 1 mM

ตารางที่ 3.1 น้ำหนักของแอนไอออนชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการเตรียมสารในหัวข้อ 3.5.3

ลำดับที่	ชนิดของแอนไอออน	มวลโมเลกุล (g/mol)	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)
1	Atrazine	215.69	24.80
2	Dichlorvos	220.98	27.62
3	Ethion	384.48	36.14
4	Glufosinate	198.16	19.92
5	Glyphosate	169.07	38.21
6	Malathion	330.36	33.86
7	Parathion	291.26	32.62
8	Pi	141.96	14.20
9	Paraquat	257.16	25.84
10	Chlorpyrifos	350.59	39.97
11	PPi	265.9	26.59
12	AMP	391.18	39.12
13	ADP	427.20	42.72
14	Acetate	82.03	8.20
15	Glycine	75.07	7.51
16	Malonate	148.02	14.80
17	Sodium Fluoride	41.9	6.72
18	Sodium Chloride	58.44	8.44
19	Sodium Bromide	102.89	10.55
20	Sodium Iodide	149.89	15.44
21	Citrate	294.10	31.90

3.5.4 การเตรียมสารละลายสารประกอบโคออร์ดิเนชันทั้ง 8 ความเข้มข้น 20 μ M ใน 80:20 % (v/v) DMSO:H₂O HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6.4

ทำการชั่งสารประกอบโคออร์ดิเนชันแต่ละชนิด ใส่ในขวดแก้ว ละลายด้วยสารละลาย 80:20 % (v/v) DMSO:H₂O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตร 5 mL

ปรับปริมาตร ให้ได้สารละลายเข้มข้นประมาณ 2 mM ปิเปตสารละลาย CuL ความเข้มข้นดังกล่าว ปริมาตร 1 mL ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 mL ปรับปริมาตรด้วยสารละลายผสม 80:20 % (v/v) DMSO:H₂O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM จะได้สารละลาย CuL ที่มีความเข้มข้น 20 μ M

3.5.5 การเตรียมสารละลายอินดิเคเตอร์ความเข้มข้น 400 μ M 80:20 % (v/v)

DMSO:H₂O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM

ชั่งอินดิเคเตอร์แต่ละชนิดลงในขวดแก้วแล้วละลายด้วยสารละลาย 80:20 % (v/v) DMSO:H₂O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM จากนั้นถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 5 mL และปรับปริมาตรสารละลาย จะได้สารละลายอินดิเคเตอร์ความเข้มข้น 2 mM จากนั้นปิเปต สารละลายอินดิเคเตอร์ดังกล่าวปริมาตร 2 mL ใส่ในขวดปริมาตรขนาด 10 mL แล้วปรับปริมาตรด้วย 80:20 % (v/v) DMSO:H₂O HEPES buffer pH 6.4 จะได้สารละลายอินดิเคเตอร์ที่มีความเข้มข้น 400 μ M

3.5.6 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดสารประกอบ ออร์กาโนฟอสฟอรัสที่ใช้เป็นสารกำจัดศัตรูพืชด้วยเทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์

ปิเปตสารละลายของสารประกอบโคออร์ดิเนชันเข้มข้น 20 μ M ปริมาตร 2 mL ใส่ในขวดแก้ว แล้วทำการปิเปตสารละลายอินดิเคเตอร์เข้มข้น 400 μ M ปริมาตร 0.1 mL ใส่ในขวดแก้วดังกล่าว เขย่าสารละลายให้เข้ากันจะได้สารละลายเอนไซม์เบิล จากนั้นปิเปตสารละลายเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ปริมาตร 0.35 mL ใส่ในขวดแก้วที่มีสารละลายเอนไซม์เบิลอยู่แล้ว หลังจากนั้นเขย่าสารให้เข้ากัน สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเชิงซ้อน ในสภาวะที่มีเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ อยู่ในระบบ การพิจารณาว่าเอนไซม์ดังกล่าวมีความจำเพาะเจาะจงต่อเอนไซม์ชนิดใด ให้สังเกตการ เปลี่ยนแปลงของสีของสารละลาย

3.6 การหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนไซม์เบิลของสารประกอบโคออร์ดิเนชันกับ อินดิเคเตอร์ โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน

3.6.1 เตรียมสารละลายของสารประกอบโคออร์ดิเนชันความเข้มข้น 400 μ M

ชั่งสารประกอบโคออร์ดิเนชันใส่ในขวดแก้ว และละลายด้วยตัวทำละลาย 80:20 % (v/v) DMSO:H₂O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM แล้วถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 mL ให้ได้สารละลายเข้มข้น 2 mM ปิเปตสารละลายดังกล่าวปริมาตร 2 mL ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด

10 mL ปรับปริมาตรด้วย 80:20 % (v/v) DMSO:H₂O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM จะได้สารละลายของสารประกอบโคออร์ดิเนชันที่มีความเข้มข้น 400 μ M

3.6.2 เตรียมสารละลายอินดิเคเตอร์ความเข้มข้น 20 μ M

ชั่งอินดิเคเตอร์ใส่ในขวดแก้ว ละลายด้วย 80:20 % (v/v) DMSO:H₂O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM แล้วถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 mL ให้ได้สารละลาย **XO** ความเข้มข้น 2 mM ปิเปตสารละลายดังกล่าว 1 mL ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 mL ปรับปริมาตรด้วย 80:20 % (v/v) DMSO:H₂O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM จะได้สารละลายอินดิเคเตอร์ที่มีความเข้มข้น 20 μ M

3.6.3 การหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนเชมเบิลของสารประกอบโคออร์ดิเนชันกับอินดิเคเตอร์ โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน

ปิเปตสารละลายอินดิเคเตอร์ความเข้มข้น 20 μ M ปริมาตร 2 mL ใส่ในคิวเวท แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง หลังจากนั้นไทเทรตด้วยสารละลายของสารประกอบโคออร์ดิเนชันความเข้มข้น 400 μ M ครั้งละ 5 μ M (0.05 equivalent) เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และนำข้อมูลมาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความยาวคลื่น

3.7 การหาอัตราส่วนในการเกิดเอนเชมเบิลระหว่างสารประกอบโคออร์ดิเนชันกับอินดิเคเตอร์ โดยวิธี Job's method

3.7.1 การเตรียมสารละลายสารประกอบโคออร์ดิเนชันความเข้มข้น 20 μ M

ทำการชั่งสารประกอบโคออร์ดิเนชันแต่ละชนิด ใส่ในขวดแก้ว ละลายด้วยสารละลาย 80:20 % (v/v) DMSO:H₂O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตร 5 mL ปรับปริมาตร ให้ได้สารละลายเข้มข้นประมาณ 2 mM ปิเปตสารละลาย CuL ความเข้มข้นดังกล่าว ปริมาตร 1 mL ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 mL ปรับปริมาตรด้วยสารละลายผสม 80:20 % (v/v) DMSO:H₂O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM จะได้สารละลาย CuL ที่มีความเข้มข้น 20 μ M

3.7.2 การเตรียมสารละลายอินดิเคเตอร์ความเข้มข้น 20 μM

ชั่งอินดิเคเตอร์ใส่ในขวดแก้ว ละลายด้วย 80:20 % (v/v) DMSO:H₂O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM แล้วถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 mL ให้ได้สารละลาย XO ความเข้มข้น 2 mM ปิเปตสารละลายดังกล่าว 1 mL ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 mL ปรับปริมาตรด้วย 80:20 % (v/v) DMSO:H₂O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM จะได้สารละลายอินดิเคเตอร์ที่ความเข้มข้น 20 μM

3.7.3 วิธีการทดลอง

นำสารละลายจากข้อ 3.7.1 และจากข้อ 3.7.2 ใส่ลงบิวเรต จากนั้นใสสารละลายสารประกอบโคออร์ดิเนชันและสารละลายอินดิเคเตอร์ปริมาตรตามดังแสดงในตารางที่ 3.2 ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 mL เขย่าเป็นเวลา 1 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง จากนั้นนำข้อมูลมาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด และเศษส่วนโมลของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน

ตารางที่ 3.2 สภาวะการทดลองสำหรับการหาอัตราส่วนในการเกิดสารเชิงซ้อนระหว่างสารประกอบโคออร์ดิเนชันและอินดิเคเตอร์

ขวดที่	ปริมาตรของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน (mL)	ปริมาตรของอินดิเคเตอร์ (mL)	เศษส่วนโมลของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน
1	0	10.00	0
2	1.00	9.00	0.1
3	2.00	8.00	0.2
4	3.00	7.00	0.3
5	4.00	6.00	0.4
6	5.00	5.00	0.5
7	6.00	4.00	0.6
8	7.00	3.00	0.7
9	8.00	2.00	0.8
10	9.00	1.00	0.9
11	10.00	0	1

3.8 การหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์เบิลกับ **Glyphosate** ด้วยวิธีการแทนที่อินดิเคเตอร์ โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน

ปิเปตสารละลายสารประกอบโคออร์ดิเนชันความเข้มข้น 20 μM ปริมาตร 2 mL ลงในคิ่วเวท จากนั้นปิเปตสารละลายอินดิเคเตอร์ความเข้มข้น 400 μM ปริมาตร 100 μL ลงในคิ่วเวทเดียวกัน คนสารละลายให้เข้ากันจะได้สารละลายเอนไซม์เบิล แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้น จากนั้นทำการไทเทรตสารละลาย **Glyphosate** ความเข้มข้น 1 mM ครั้งละ 5 μL (0.05 equivalent) ลงไปในสารละลายเอนไซม์เบิลและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง จนถึง 40 μL (1 equivalent) จึงทำการเพิ่มทีละ 10 μL (0.25 equivalent) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงจนถึง 80 μL (2 equivalents) หลังจากนั้นเพิ่มทีละ 15 μL (0.375 equivalent) จนถึง 140 μL (3.5 equivalents) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง และทำการเพิ่มทีละ 20 μL mL (0.5 equivalent) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง และสุดท้ายจนถึงปริมาตร 240 μL (6 equivalents) เวลาที่ใช้ในการเขย่าแต่ละครั้งเป็นเวลา 1 นาที นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความยาวคลื่น

ตารางที่ 3.3 สภาวะการทดลองสำหรับหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดสารเชิงซ้อนระหว่าง

Glyphosate กับ เอนไซม์เบิล

ครั้งที่	เอนไซม์เบิล ปริมาตรที่ใช้ (mL)	Glyphosate ปริมาตรที่ใช้ (mL)	จำนวนโมล เอนไซม์เบิล	จำนวนโมล Glyphosate	อัตราส่วน โมลของ Glyphosate ต่อโมลของ เอนไซม์เบิล
1	2.00	0	4×10^{-8}	0	0
2	2.00	0.005	4×10^{-8}	5.00×10^{-9}	0.125
3	2.00	0.010	4×10^{-8}	1.00×10^{-8}	0.250
4	2.00	0.015	4×10^{-8}	1.50×10^{-8}	0.375
5	2.00	0.020	4×10^{-8}	2.00×10^{-8}	0.500
6	2.00	0.025	4×10^{-8}	2.50×10^{-8}	0.625
7	2.00	0.030	4×10^{-8}	3.00×10^{-8}	0.750
8	2.00	0.035	4×10^{-8}	3.50×10^{-8}	0.875
9	2.00	0.040	4×10^{-8}	4.00×10^{-8}	1.000
10	2.00	0.050	4×10^{-8}	4.50×10^{-8}	1.250
11	2.00	0.060	4×10^{-8}	6.00×10^{-8}	1.500
12	2.00	0.070	4×10^{-8}	7.00×10^{-8}	1.750
13	2.00	0.080	4×10^{-8}	8.00×10^{-8}	2.000
14	2.00	0.095	4×10^{-8}	9.50×10^{-8}	2.375
15	2.00	0.110	4×10^{-8}	1.10×10^{-7}	2.750
16	2.00	0.125	4×10^{-8}	1.25×10^{-7}	3.125
17	2.00	0.140	4×10^{-8}	1.40×10^{-7}	3.500
18	2.00	0.160	4×10^{-8}	1.60×10^{-7}	4.000
19	2.00	0.180	4×10^{-8}	1.80×10^{-7}	4.500
20	2.00	0.200	4×10^{-8}	2.00×10^{-7}	5.000
21	2.00	0.220	4×10^{-8}	2.20×10^{-7}	5.500
22	2.00	0.240	4×10^{-8}	2.40×10^{-7}	6.000

3.9 การศึกษาผลการรบกวนของแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ต่อการตรวจวัด **Glyphosate** ด้วย เอนไซม์เบิลโดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี

ทำการปิเปตสารประกอบโคออร์ดิเนชันความเข้มข้น 20 μM ปริมาตร 2 มิลลิตร และ สารละลายอินดิเคเตอร์เข้มข้น 400 μM ปริมาตร 0.1 mL ลงในคิ้วเวท จากนั้นทำการคนสารละลาย แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง จากนั้นปิเปตสารละลาย **Glyphosate** ความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 350 μL ลงในคิ้วเวทที่มีเอนไซม์เบิลอยู่แล้ว เขย่าเป็นเวลา 1 นาที ปิเปตสารละลายแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 350 μL ใส่ตามลงไปลงในคิ้วเวทที่มีสารประกอบเชิงซ้อน เอนไซม์เบิล + **Glyphosate** เขย่าเป็นเวลา 1 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ในสภาวะที่มีแอนไอออนชนิดต่าง ๆ จากนั้นนำข้อมูลมาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ที่เติมลงไป

3.10 การวัดขีดจำกัดการตรวจวัดไกลโฟเซต (Detection of limit : LOD)

การหาขีดจำกัดในการตรวจวัด (LOD) **Glyphosate** สามารถหาได้จากการนำข้อมูลการหาความเข้มข้นของสารละลาย **Glyphosate** ที่สามารถตรวจวัดได้ในช่วงที่เป็นเส้นตรงมาสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย **Glyphosate** กับค่าการดูดกลืนแสง และนำไปคำนวณหาค่าขีดจำกัดการตรวจวัดดังสมการที่ 1

$$\text{Detection limit} = 3\sigma/k \quad (1)$$

โดยที่ σ คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ของค่าการดูดกลืนแสงของเอนไซม์เบิลอิสระที่วัดจำนวน 10 ครั้ง

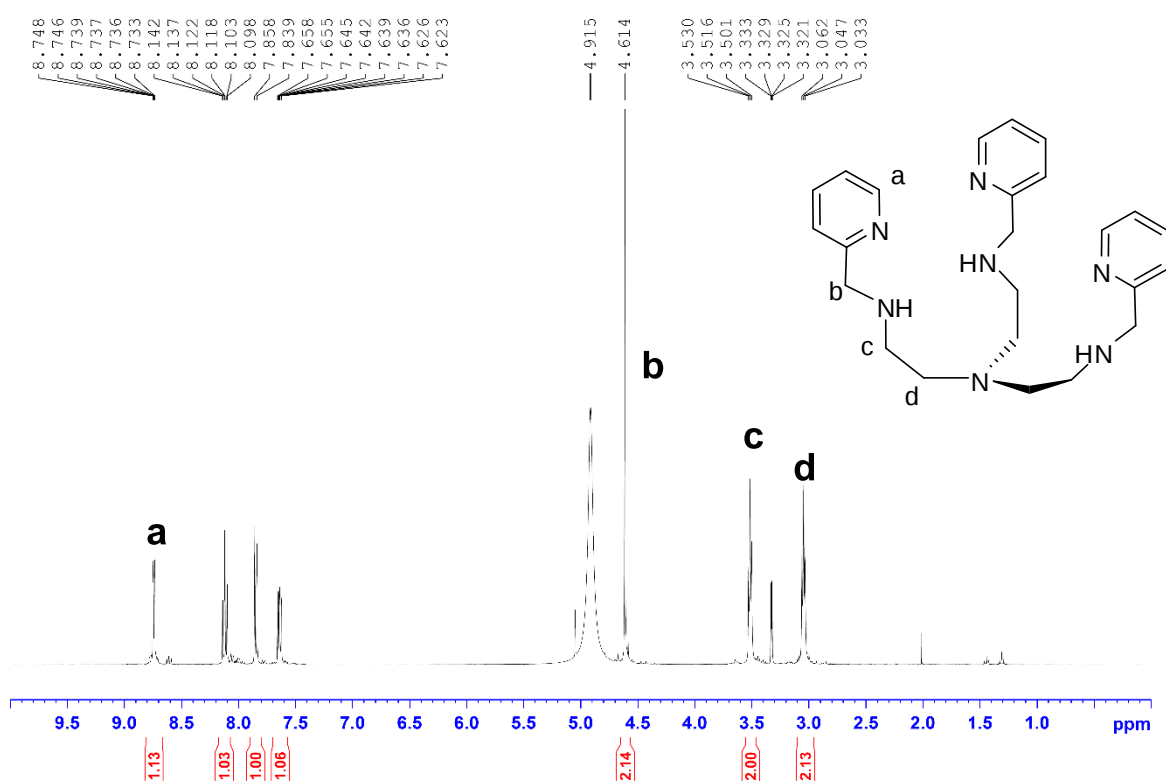
k คือ ความชันของกราฟที่ได้จากการสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลาย **Glyphosate**

ผลการทดลองและอภิปราย

4.1 การสังเคราะห์ลิแกนด์ที่ใช้ในการทดลอง

4.1.1 การสังเคราะห์ลิแกนด์ L3N

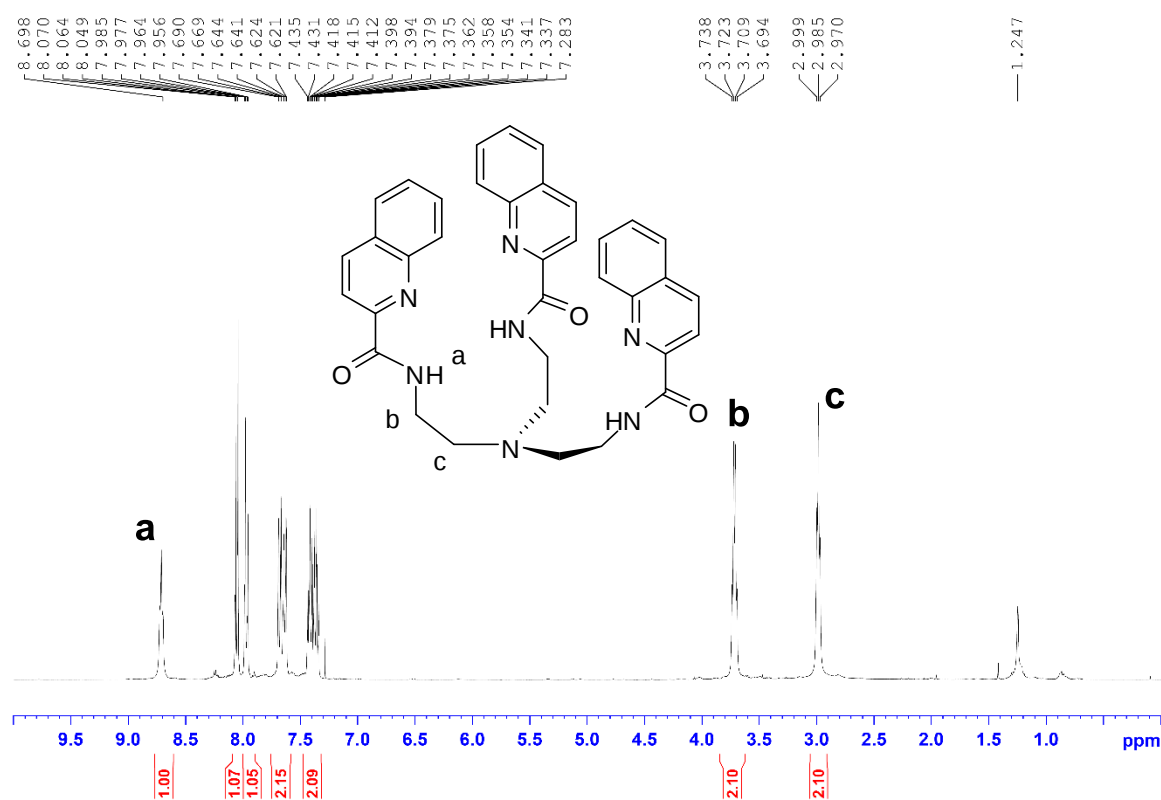
จากการสังเคราะห์ลิแกนด์ **L3N** ด้วยปฏิกิริยา Schiff base reaction ได้ผลิตภัณฑ์เป็นของเหลวสีน้ำตาลและร้อยละของผลิตภัณฑ์ที่ได้เท่ากับ 70.39 จากการพิสูจน์โครงสร้างของลิแกนด์ **L3N** โดยใช้เทคนิค $^1\text{H-NMR}$ โดยให้ผลดังแสดงในภาพที่ 4.1 พบว่าปรากฏสัญญาณของ ArH (a) ที่มีลักษณะเป็น multiplet ที่ค่า chemical shift (δ) เท่ากับ 8.75 ppm มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 3 โปรตอน และสัญญาณของ $-\text{CH}_2-\text{NH}$ (b) ที่มีลักษณะเป็น singlet ที่ δ เท่ากับ 4.61 ppm มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 6 โปรตอน สัญญาณของ $-\text{CH}_2-\text{NH}$ (c) ที่มีลักษณะเป็น triplet ที่ δ เท่ากับ 3.53 ppm มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 6 โปรตอน สัญญาณของ $-\text{CH}_2-\text{N}$ (d) ที่มีลักษณะเป็น triplet ที่ δ เท่ากับ 3.06 ppm มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 6 โปรตอน ซึ่งเป็นการยืนยันได้ว่าเป็นลิแกนด์ **L3N** ขึ้น **L3N** จริง



รูปที่ 4.1 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของลิแกนด์ **L3N** ในตัวทำละลาย CD_3OD

4.1.2 การสังเคราะห์ลิแกนด์ L4N

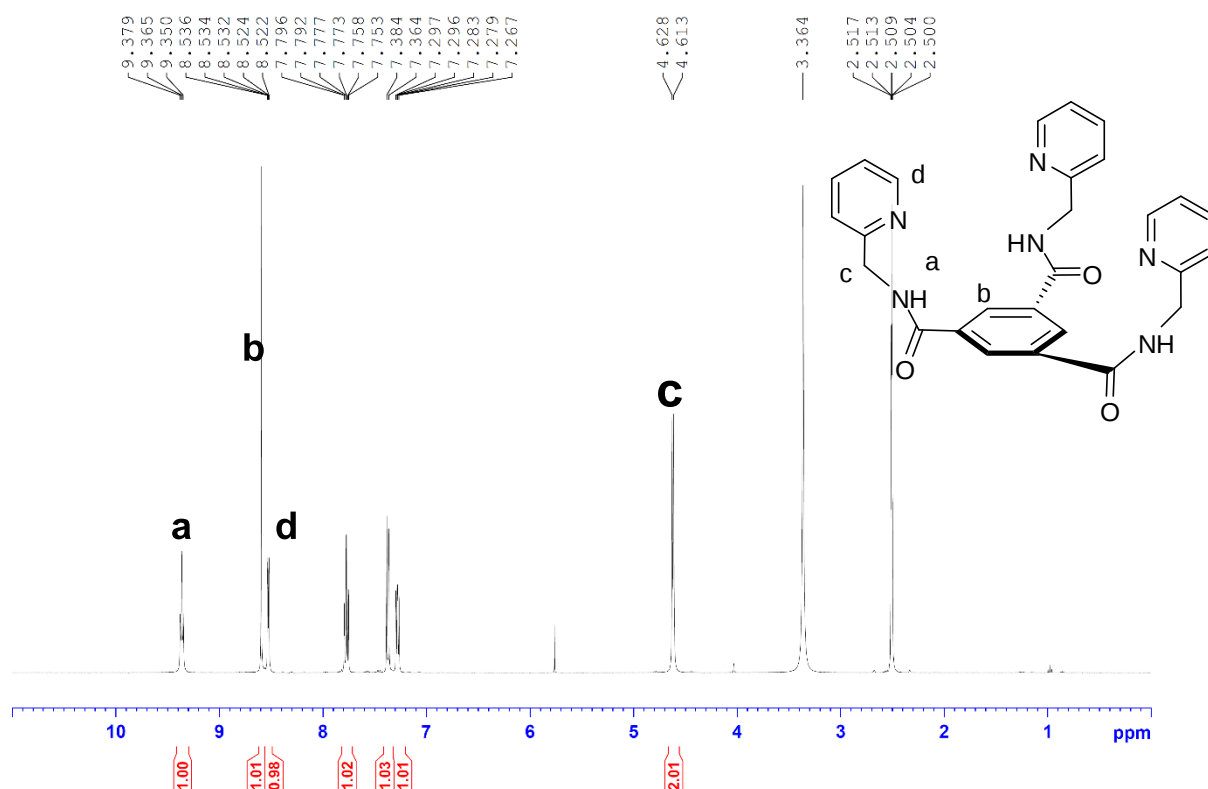
จากการสังเคราะห์ลิแกนด์ **L4N** ด้วยปฏิกิริยาระหว่าง acid chloride กับ amine ได้ผลิตภัณฑ์เป็นของเหลวสีน้ำตาลและร้อยละของผลิตภัณฑ์ที่ได้เท่ากับ 81.87 จากการพิสูจน์โครงสร้างของลิแกนด์ **L4N** โดยใช้เทคนิค $^1\text{H-NMR}$ โดยให้ผลดังแสดงในภาพที่ 4.2 พบว่าปรากฏสัญญาณของ $-\text{NH}$ (a) ที่มีลักษณะเป็น triplet ที่ค่า chemical shift (δ) เท่ากับ 8.70 ppm มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 3 โปรตอน และสัญญาณของ $-\text{CH}_2-\text{NH}$ (b) ที่มีลักษณะเป็น quatet ที่ δ เท่ากับ 3.74 ppm มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 6 โปรตอน สัญญาณของ $-\text{CH}_2-\text{N}$ (c) ที่มีลักษณะเป็น triplet ที่ δ เท่ากับ 2.99 ppm มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 6 โปรตอน ซึ่งเป็นการยืนยันได้ว่าเป็นลิแกนด์ **L4N** จริง



รูปที่ 4.2 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของลิแกนด์ **L4N** ในตัวทำละลาย CDCl_3

4.1.3 การสังเคราะห์ลิแกนด์ L5N

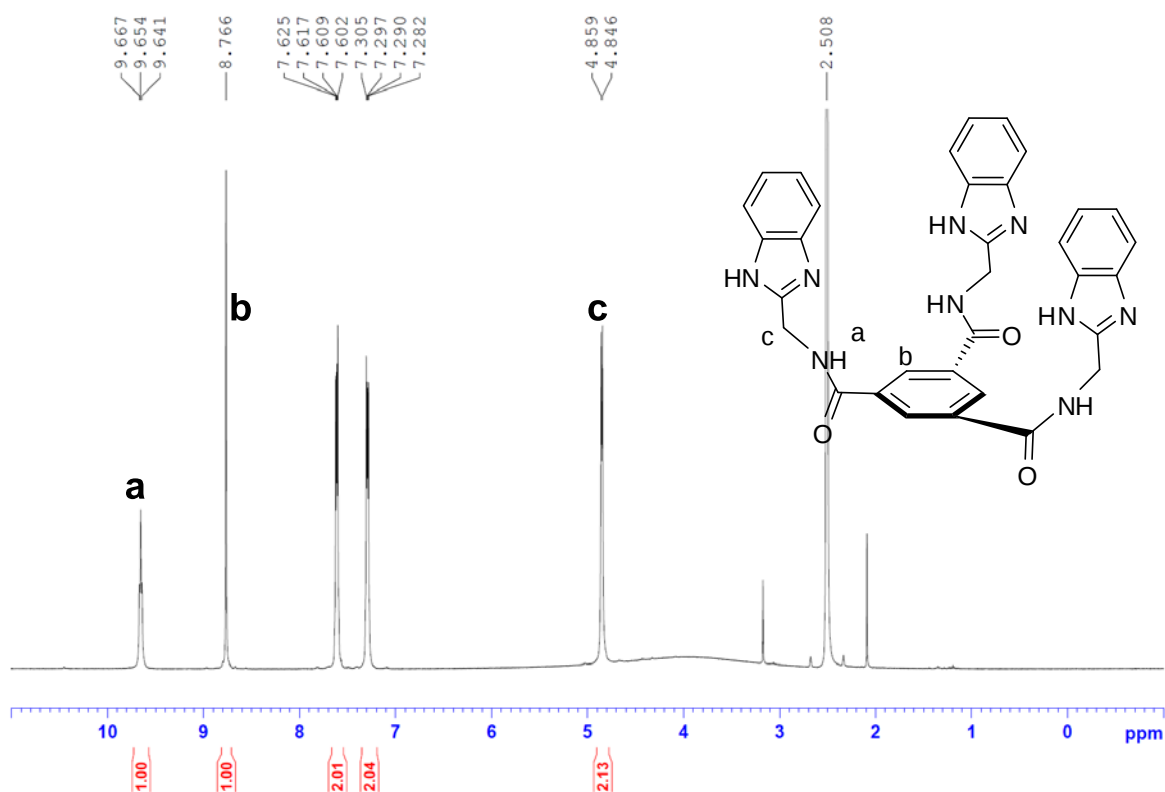
จากการสังเคราะห์ลิแกนด์ **L5N** ด้วยปฏิกิริยาระหว่าง acid chloride กับ amine ได้ผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาวและร้อยละของผลิตภัณฑ์ที่ได้เท่ากับ 53.38 จากการพิสูจน์โครงสร้างของลิแกนด์ **L5N** โดยใช้เทคนิค $^1\text{H-NMR}$ โดยให้ผลดังแสดงในภาพที่ 4.3 พบว่าปรากฏสัญญาณของ $-\text{NH}$ (a) ที่มีลักษณะเป็น triplet ที่ค่า chemical shift (δ) เท่ากับ 9.37 ppm มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 3 โปรตอน และสัญญาณของ ArH (b) ที่มีลักษณะเป็น singlet ที่ δ เท่ากับ 8.54 ppm มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 3 โปรตอน สัญญาณของ ArH (d) ที่มีลักษณะเป็น doublet ที่ δ เท่ากับ 8.52 ppm มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 3 โปรตอน สัญญาณของ $-\text{CH}_2-$ (c) ที่มีลักษณะเป็น doublet ที่ δ เท่ากับ 4.63 ppm มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 6 โปรตอน ซึ่งเป็นการยืนยันได้ว่าเป็นลิแกนด์ **L5N** จริง



รูปที่ 4.3 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของลิแกนด์ **L5N** ในตัวทำละลาย DMSO-D_6

4.1.4 การสังเคราะห์ลิแกนด์ L6N

จากการสังเคราะห์ลิแกนด์ **L6N** ด้วยปฏิกิริยาระหว่าง acid chloride กับ amine ได้ผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาวและร้อยละของผลิตภัณฑ์ที่ได้เท่ากับ 46.61 จากการพิสูจน์โครงสร้างของลิแกนด์ **L6N** โดยใช้เทคนิค $^1\text{H-NMR}$ โดยให้ผลดังแสดงในภาพที่ 4.4 พบว่าปรากฏสัญญาณของ $-\text{NH}$ (a) ที่มีลักษณะเป็น triplet ที่ค่า chemical shift (δ) เท่ากับ 9.65 ppm มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 3 โปรตอน และสัญญาณของ ArH (b) ที่มีลักษณะเป็น singlet ที่ δ เท่ากับ 8.77 ppm มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 3 โปรตอน สัญญาณของ $-\text{CH}_2-$ (c) ที่มีลักษณะเป็น doublet ที่ δ เท่ากับ 4.86 ppm มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 6 โปรตอน ซึ่งเป็นการยืนยันได้ว่าเป็นลิแกนด์ **L6N** จริง

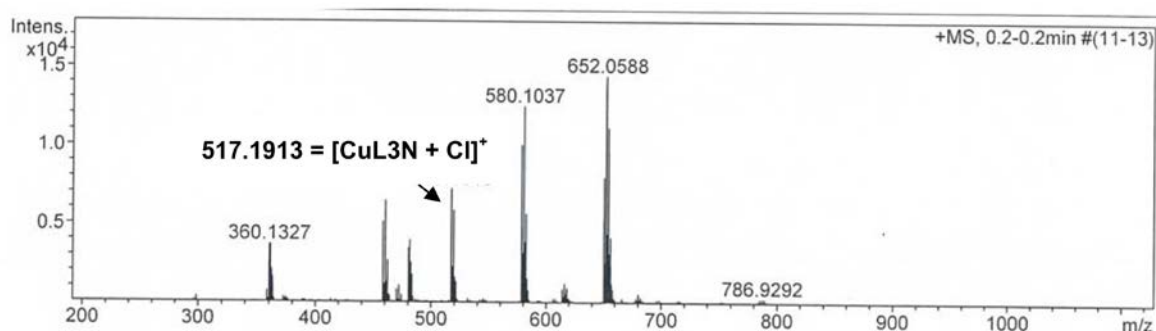


รูปที่ 4.4 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของลิแกนด์ **L6N** ในตัวทำละลาย $\text{DMSO-}D_6$

4.2 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโนนิวเคลียร์ที่ใช้ในการทดลอง

4.2.1 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน CuL3N

จากการสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโนนิวเคลียร์ **CuL3N** ในตัวทำละลาย methanol ภายใต้การรีฟลักซ์สารละลายผสมภายใต้สภาวะแก๊สไนโตรเจน ซึ่งได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาวอมฟ้าของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **CuL3N** ร้อยละของผลิตภัณฑ์ที่ได้เท่ากับ 38.35 โดยผลจากการพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิคแมสสเปคโตรเมทรีพบว่าปรากฏพีคที่ค่า m/z เท่ากับ 517.1913 ซึ่งสอดคล้องกับโมเลกุลาร์ไอออน $[\text{CuL3N} + \text{Cl}]^+$ จึงเป็นการยืนยันว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็น **CuL3N** จริง



รูปที่ 4.5 แมสสเปคตรัมของสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโนนิวเคลียร์ **CuL3N**

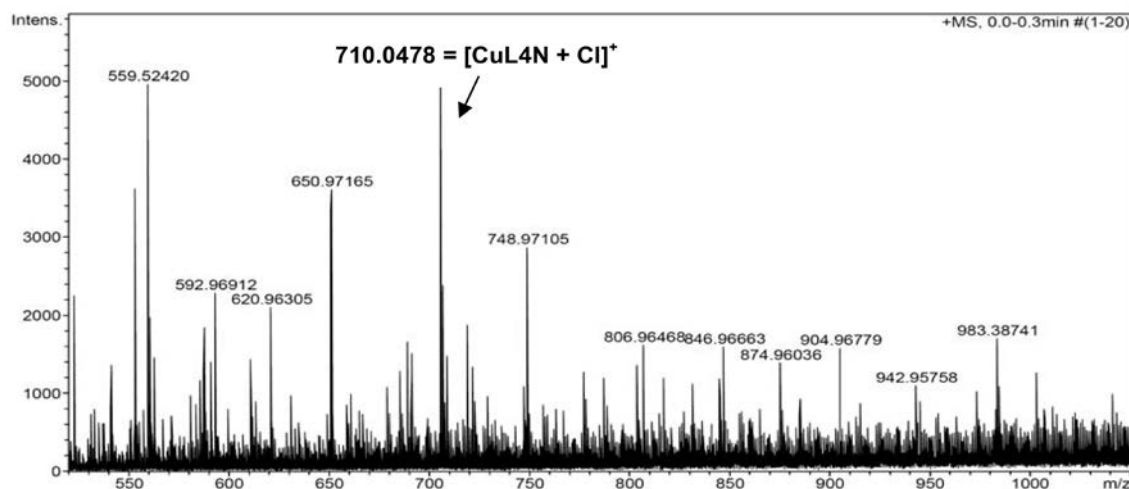
4.2.2 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน ZnL3N

จากการสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโนนิวเคลียร์ **ZnL3N** ในตัวทำละลาย methanol ภายใต้การรีฟลักซ์สารละลายผสมภายใต้สภาวะแก๊สไนโตรเจน โดยได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาวของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **ZnL3N** ร้อยละของผลิตภัณฑ์ที่ได้เท่ากับ 30.13 อย่างไรก็ตามจากการทดลองพบว่าสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **ZnL3N** นั้นมีความเสถียรต่ำเมื่อเก็บสารประกอบดังกล่าวไว้จะเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสีเหลืองเนื่องจากเกิดการสลายตัว ในงานวิจัยนี้จึงจะไม่นำสารประกอบ **ZnL3N** ไปทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

4.2.3 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน CuL4N

จากการสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโนนิวเคลียร์ **CuL4N** ในตัวทำละลาย methanol ภายใต้การรีฟลักซ์สารละลายผสมภายใต้สภาวะแก๊สไนโตรเจน ซึ่งได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาวของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **CuL4N** ร้อยละของผลิตภัณฑ์ที่ได้เท่ากับ 43.90 โดยผลจากการพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิคแมสสเปคโตรเมทรีพบว่าปรากฏพีคที่ค่า m/z เท่ากับ

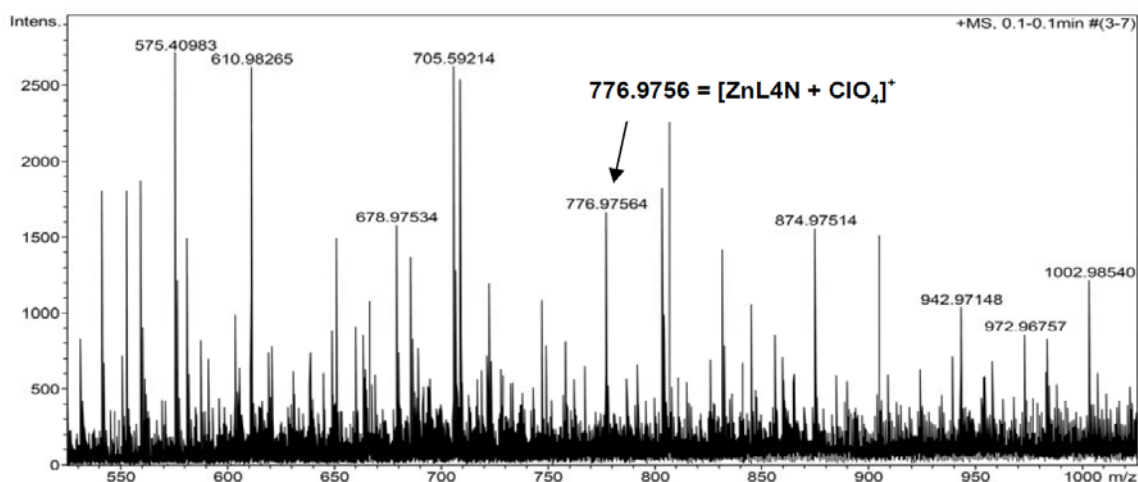
710.0478 ซึ่งสอดคล้องกับโมเลกุลไอออน $[\text{CuL4N} + \text{Cl}]^+$ จึงเป็นการยืนยันว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็น **CuL4N** จริง



รูปที่ 4.7 แมสสเปกตรัมของสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโนนิวเคลียร์ **CuL4N**

4.2.4 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน ZnL4N

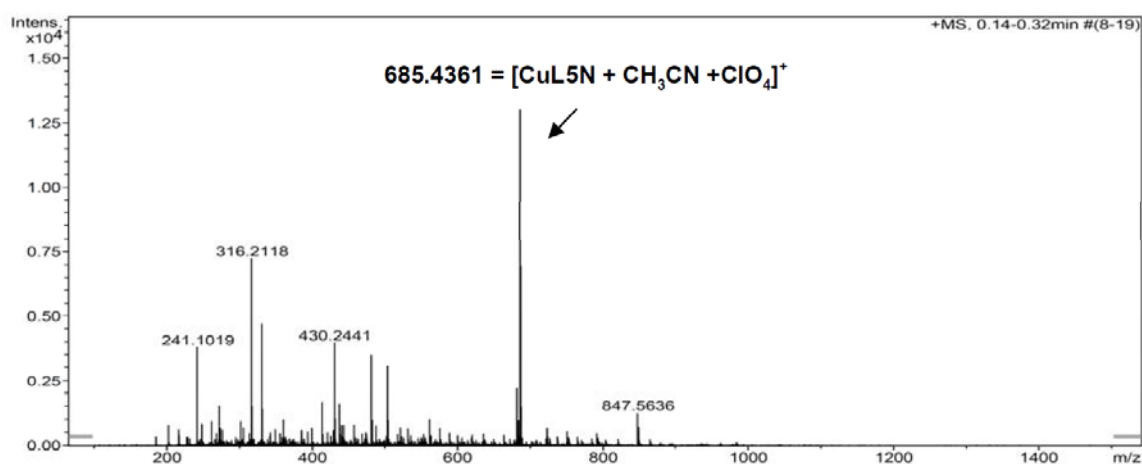
จากการสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโนนิวเคลียร์ **ZnL4N** ในตัวทำละลาย methanol ภายใต้การรีฟลักซ์สารละลายผสมภายใต้สภาวะแก๊สไนโตรเจน ซึ่งได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาวของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **ZnL4N** ร้อยละของผลิตภัณฑ์ที่ได้เท่ากับ 82.28 โดยผลจากการพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรีพบว่าปรากฏพีคที่ค่า m/z เท่ากับ 776.9756 ซึ่งสอดคล้องกับโมเลกุลไอออน $[\text{ZnL4N} + \text{ClO}_4]^+$ จึงเป็นการยืนยันว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็น **ZnL4N** จริง



รูปที่ 4.8 แมสสเปกตรัมของสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโนนิวเคลียร์ **ZnL4N**

4.2.5 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน CuL5N

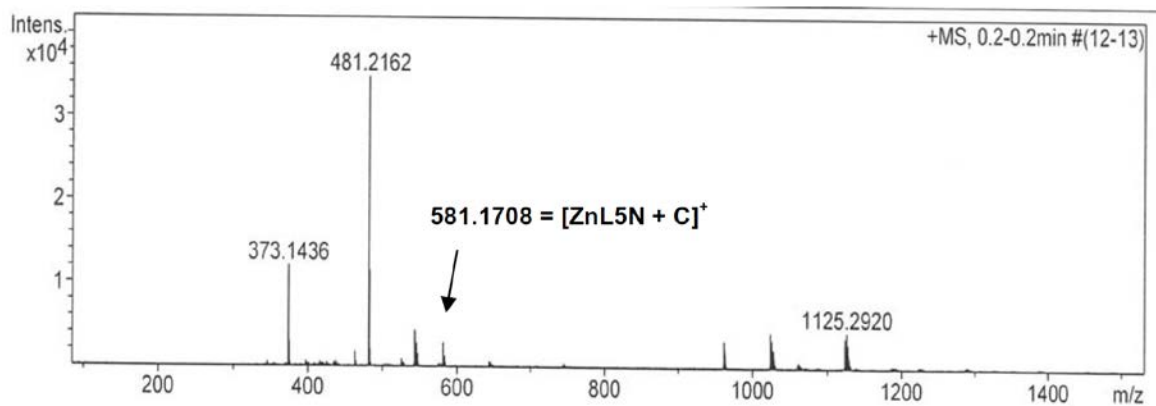
จากการสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโนนิวเคลียร์ **CuL5N** ในตัวทำละลาย methanol ภายใต้การรีฟลักซ์สารละลายผสมภายใต้สภาวะแก๊สไนโตรเจน ซึ่งได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาวของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **CuL5N** ร้อยละของผลิตภัณฑ์ที่ได้เท่ากับ 58.22 โดยผลจากการพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิคแมสสเปคโตรเมทรีพบว่าปรากฏพีคที่ค่า m/z เท่ากับ 685.4361 ซึ่งสอดคล้องกับโมเลกุลาร์ไอออน $[\text{CuL5N} + \text{CH}_3\text{CN} + \text{ClO}_4]^+$ จึงเป็นการยืนยันว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็น **CuL5N** จริง



รูปที่ 4.9 แมสสเปคตรัมของสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโนนิวเคลียร์ **CuL5N**

4.2.6 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน ZnL5N

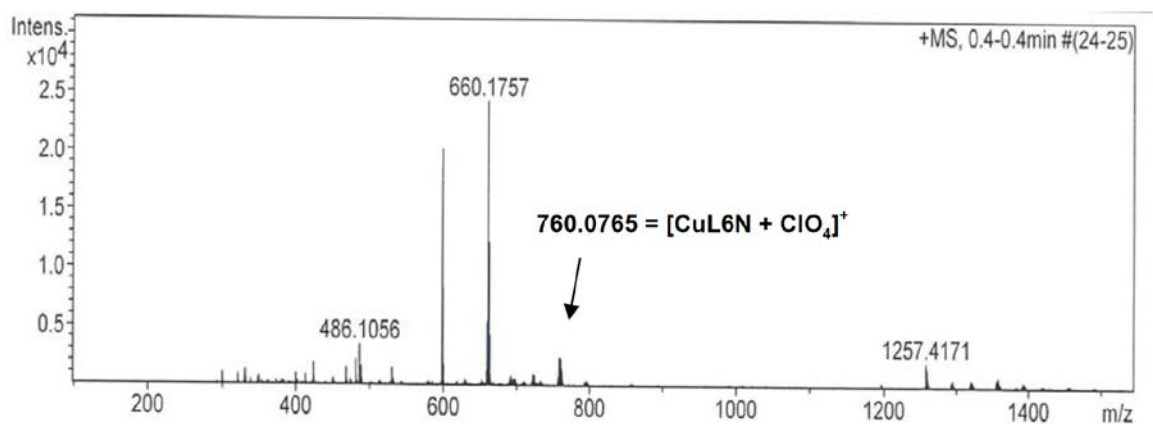
จากการสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโนนิวเคลียร์ **ZnL5N** ในตัวทำละลาย methanol ภายใต้การรีฟลักซ์สารละลายผสมภายใต้สภาวะแก๊สไนโตรเจน ซึ่งได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาวของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **ZnL5N** ร้อยละของผลิตภัณฑ์ที่ได้เท่ากับ 37.67 โดยผลจากการพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิคแมสสเปคโตรเมทรีพบว่าปรากฏพีคที่ค่า m/z เท่ากับ 581.1708 ซึ่งสอดคล้องกับโมเลกุลาร์ไอออน $[\text{ZnL5N} + \text{Cl}]^+$ จึงเป็นการยืนยันว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็น **ZnL5N** จริง



รูปที่ 4.10 แมสสเปกตรัมของสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโนนิวเคลียร์ **ZnL5N**

4.2.7 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน **CuL6N**

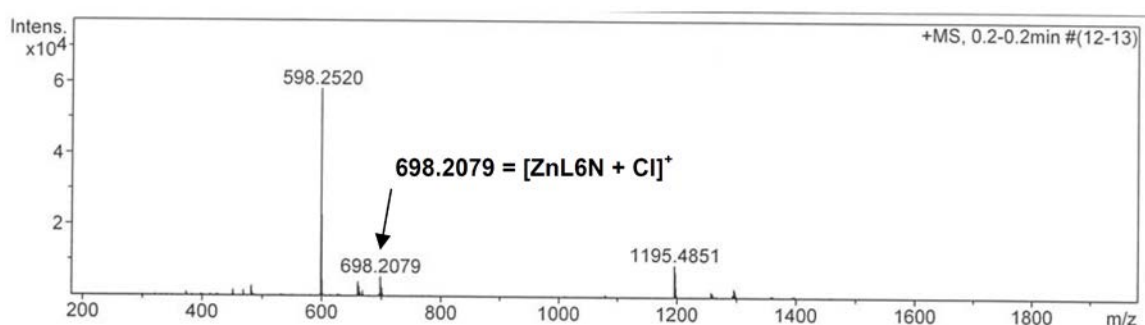
จากการสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโนนิวเคลียร์ **CuL6N** ในตัวทำละลาย methanol ภายใต้การรีฟลักซ์สารละลายผสมภายใต้สภาวะแก๊สไนโตรเจน ซึ่งได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาวของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **CuL6N** ร้อยละของผลิตภัณฑ์ที่ได้เท่ากับ 59.59 โดยผลจากการพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรีพบว่าปรากฏพีคที่ค่า m/z เท่ากับ 760.0765 ซึ่งสอดคล้องกับโมเลคิวลาร์ไอออน $[CuL6N + ClO_4]^+$ จึงเป็นการยืนยันว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็น **CuL6N** จริง



รูปที่ 4.11 แมสสเปกตรัมของสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโนนิวเคลียร์ **CuL6N**

4.2.8 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชัน ZnL6N

จากการสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโนนิวเคลียร์ **ZnL6N** ในตัวทำละลาย methanol ภายใต้การรีฟลักซ์สารละลายผสมภายใต้สภาวะแก๊สไนโตรเจน ซึ่งได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาวของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **ZnL6N** ร้อยละของผลิตภัณฑ์ที่ได้เท่ากับ 42.46 โดยผลจากการพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิคแมสสเปคโตรเมทรีพบว่าปรากฏพีคที่ค่า m/z เท่ากับ 698.2079 ซึ่งสอดคล้องกับโมเลคิวลาร์ไอออน $[\text{ZnL6N} + \text{Cl}]^+$ จึงเป็นการยืนยันว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็น **ZnL6N** จริง

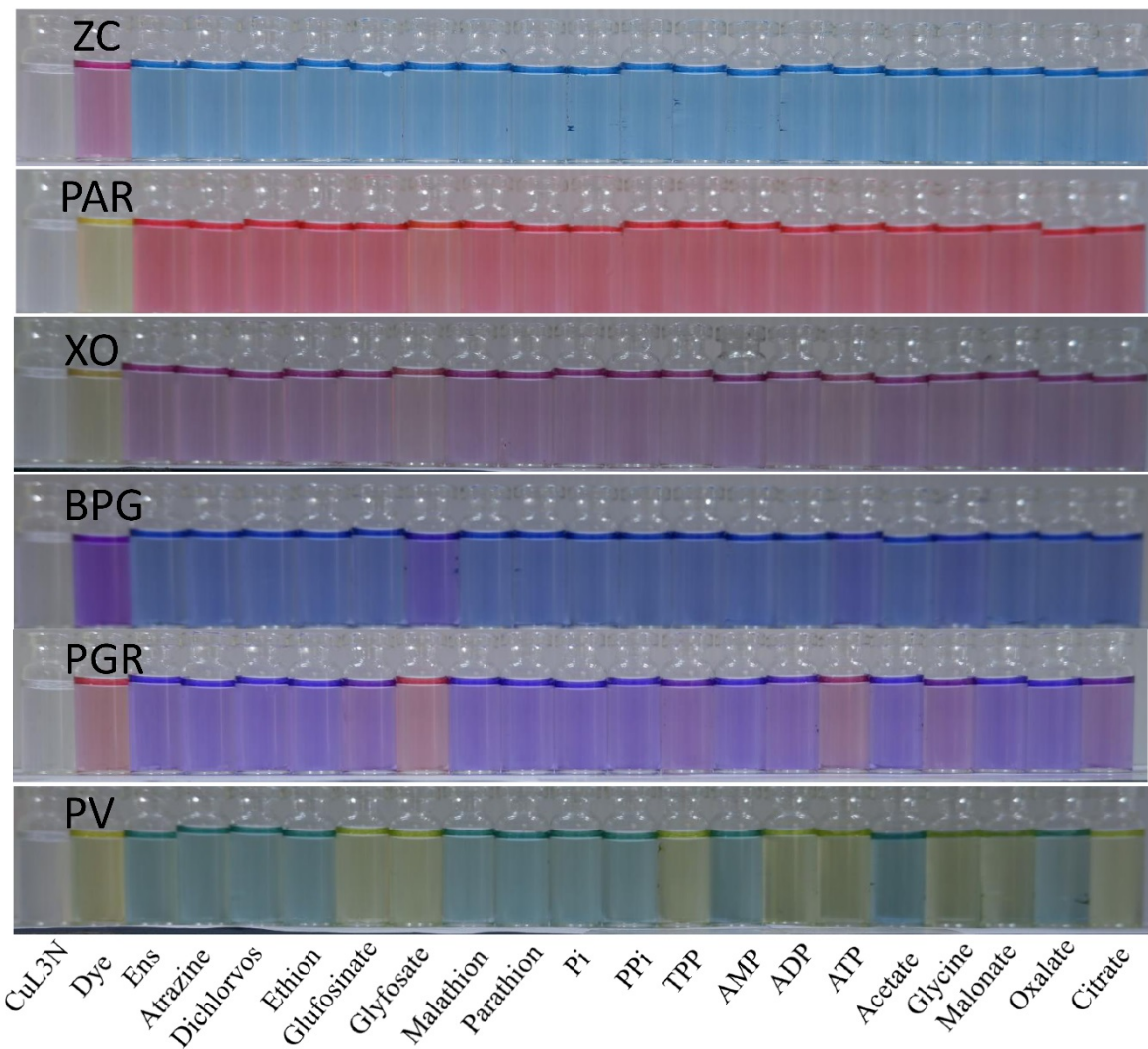


รูปที่ 4.12 แมสสเปคตรัมของสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโนนิวเคลียร์ **ZnL6N**

4.3 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ของเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโนนิวเคลียร์กับอินดิเคเตอร์ต่าง ๆ

4.3.1 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ของเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **CuL3N** กับอินดิเคเตอร์ต่าง ๆ

จากการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ต่อเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบ **CuL3N** ในสารละลายผสม 80:20% (v/v) DMSO:H₂O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM โดยทำการปิเปตสารละลาย **CuL3N** ความเข้มข้น 20 μM ปริมาตร 2 mL ลงในขวดแก้ว และปิเปตสารละลายอินดิเคเตอร์ **ZC, PAR, XO, BPG, PGR** และ **PV** ความเข้มข้น 400 μM ปริมาตร 0.1 mL ลงในขวดแก้วดังกล่าว คนสารละลายให้เข้ากัน พบว่าสีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีไม่มีสีของสารประกอบ **CuL3N** ไปเป็นสีชมพูของเอนไซม์เบิลที่แตกต่างไปจากสีของ **CuL3N** และสีของอินดิเคเตอร์อิสระ จากนั้นปิเปตสารละลายแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 0.35 mL ลงไปในขวดแก้วที่มีสารละลายของเอนไซม์เบิล คนสารละลายให้เข้ากันและสังเกตการเปลี่ยนสีของสารละลาย ซึ่งผลการทดลองที่ได้แสดงได้ดัง รูปที่ 4.12



รูปที่ 4.12 การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเอนเซมเบิลที่เตรียมจากสารประกอบโคออร์ดิเนชัน

CuL3N กับอินดิเคเตอร์ชนิดต่าง ในสภาวะที่มีแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ในสารละลายผสม

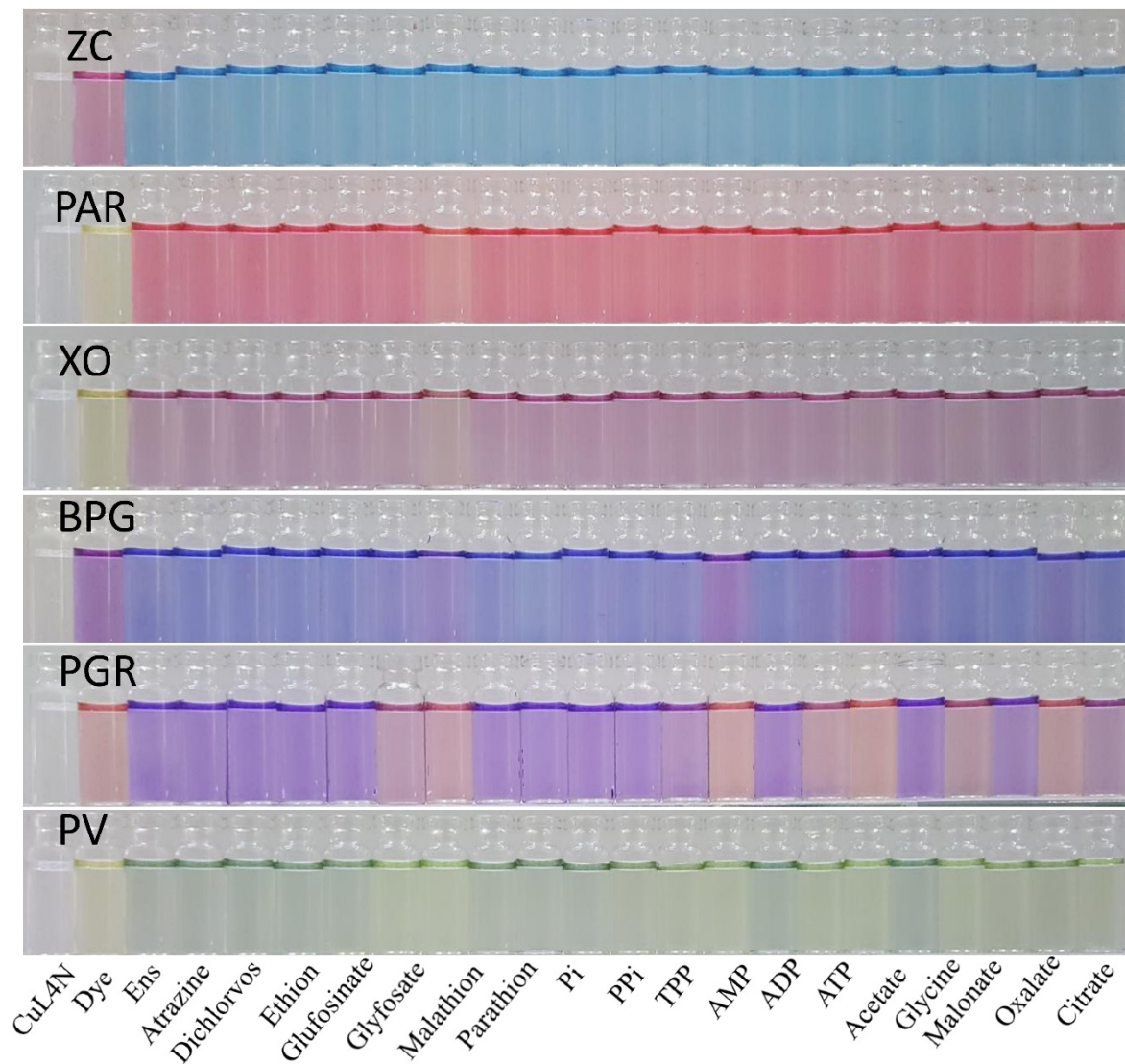
80:20% (v/v) DMSO:H₂O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM

จากรูปที่ 4.12 จะเห็นได้เมื่อทำการเติมแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ลงไปในสารละลายเอนเซมเบิล จะเกิดการเปลี่ยนแปลงคือเอนเซมเบิลที่เตรียมจากอินดิเคเตอร์ **ZC**, **PAR** และ **XO** นั้นไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเอนเซมเบิลซึ่งหมายความว่าไม่มีแอนไอออนใดที่สามารถเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ในโครงสร้างของเอนเซมเบิลได้ ในขณะที่เอนเซมเบิลที่เตรียมจากอินดิเคเตอร์ **BPG**, **PGR** และ **PV** นั้นมีแอนไอออนมากกว่าหนึ่งชนิดที่สามารถเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ในโครงสร้างของเอนเซมเบิลได้และทำให้อินดิเคเตอร์หลุดออกมาอยู่ในรูปอิสระดั้งเดิม ส่งผลให้สีของสารละลายเปลี่ยนกลับมาเป็นสีของอินดิเคเตอร์ในรูปอิสระ ซึ่งแสดงว่าเอนเซมเบิลที่เตรียมขึ้นจากสารประกอบโคออร์ดิ

เนชั่น **CuL3N** นั้นไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสได้

4.3.2 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ของเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **CuL4N** กับอินดิเคเตอร์ต่าง ๆ

จากการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ต่อเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบ **CuL4N** ในสารละลายผสม 80:20% (v/v) DMSO:H₂O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM โดยทำการปิเปตสารละลาย **CuL4N** ความเข้มข้น 20 µM ปริมาตร 2 mL ลงในขวดแก้ว และปิเปตสารละลายอินดิเคเตอร์ **ZC, PAR, XO, BPG, PGR** และ **PV** ความเข้มข้น 400 µM ปริมาตร 0.1 mL ลงในขวดแก้วดังกล่าว คนสารละลายให้เข้ากัน พบว่าสีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีไม่มีสีของสารประกอบ **CuL4N** ไปเป็นสีชมพูของเอนไซม์เบิลที่แตกต่างไปจากสีของ **CuL4N** และสีของอินดิเคเตอร์อิสระ จากนั้นปิเปตสารละลายแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 0.35 mL ลงไปในขวดแก้วที่มีสารละลายของเอนไซม์เบิล คนสารละลายให้เข้ากันและสังเกตการเปลี่ยนสีของสารละลาย ซึ่งผลการทดลองที่ได้แสดงได้ดัง รูปที่ 4.13



รูปที่ 4.13 การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมจากสารประกอบโคออร์ดิเนชัน

CuL4N กับอินดิเคเตอร์ชนิดต่าง ในสถานะที่มีแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ในสารละลายผสม

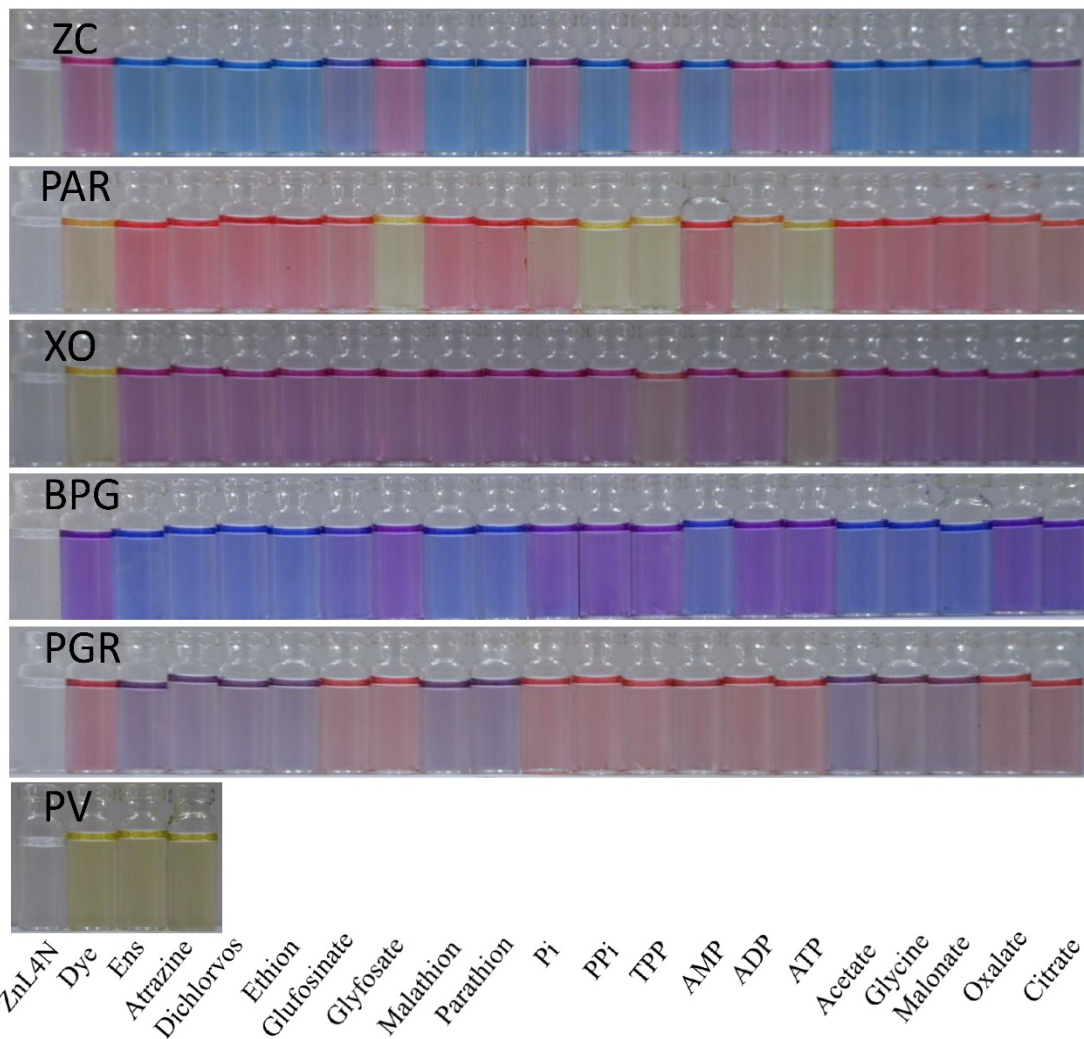
80:20% (v/v) DMSO:H₂O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM

ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.13 เห็นได้ว่าการเติมแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ลงไปในสารละลายเอนไซม์จะเกิดการเปลี่ยนแปลงคือเอนไซม์ที่เตรียมจากอินดิเคเตอร์ **ZC** นั้นไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเอนไซม์ซึ่งหมายความว่าไม่มีแอนไอออนใดที่สามารถเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ในโครงสร้างของเอนไซม์ได้ ในขณะที่เอนไซม์ที่เตรียมจากอินดิเคเตอร์ **PAR, XO, BPG, PGR** และ **PV** นั้นมีแอนไอออนมากกว่าหนึ่งชนิดที่สามารถเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ในโครงสร้างของเอนไซม์ได้และทำให้อินดิเคเตอร์หลุดออกมาอยู่ในรูปอิสระดั้งเดิม ส่งผลให้สีของสารละลายเปลี่ยนกลับมาเป็นสีของอินดิเคเตอร์ในรูปอิสระ ซึ่งแสดงว่าเอนไซม์ที่เตรียมขึ้น

จากสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **CuL4N** นั้นไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืช กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสได้

4.3.3 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ของเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **ZnL4N** กับอินดิเคเตอร์ต่าง ๆ

จากการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ต่อเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบ **ZnL4N** ในสารละลายผสม 80:20% (v/v) DMSO:H₂O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM โดยทำการปิเปตสารละลาย **ZnL4N** ความเข้มข้น 20 µM ปริมาตร 2 mL ลงในขวดแก้ว และปิเปตสารละลายอินดิเคเตอร์ **ZC, PAR, XO, BPG, PGR** และ **PV** ความเข้มข้น 400 µM ปริมาตร 0.1 mL ลงในขวดแก้วดังกล่าว คนสารละลายให้เข้ากัน พบว่าสีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีไม่มีสีของสารประกอบ **ZnL4N** ไปเป็นสีชมพูของเอนไซม์เบิลที่แตกต่างไปจากสีของ **ZnL4N** และสีของอินดิเคเตอร์อิสระ จากนั้นปิเปตสารละลายแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 0.35 mL ลงไปในขวดแก้วที่มีสารละลายของเอนไซม์เบิล คนสารละลายให้เข้ากันและสังเกตการเปลี่ยนสีของสารละลาย ซึ่งผลการทดลองที่ได้แสดงได้ดัง รูปที่ 4.14

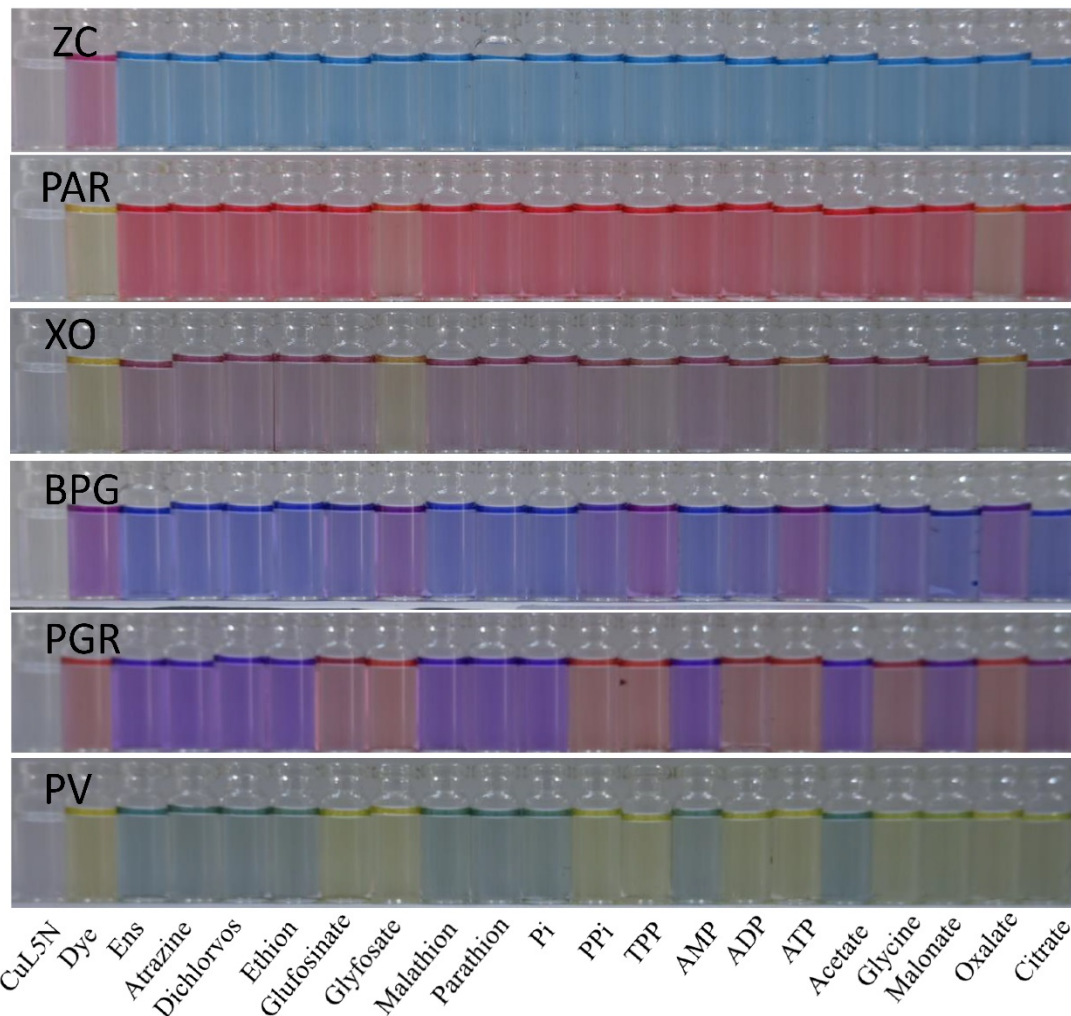


รูปที่ 4.14 การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบ **ZnL4N** กับอินดิเคเตอร์ชนิดต่าง ในสถานะที่มีแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ในสารละลายผสม 80:20% (v/v) DMSO:H₂O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM

ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.14 เห็นได้ว่าการเติมแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ลงไปในสารละลายเอนไซม์เบิลจะเกิดการเปลี่ยนแปลงคือเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากอินดิเคเตอร์ **PAR, XO, BPG** และ **PGR** นั้นมีแอนไอออนมากกว่าหนึ่งชนิดที่สามารถเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ในโครงสร้างของเอนไซม์เบิลได้และทำให้อินดิเคเตอร์หลุดออกมาอยู่ในรูปอิสระดั้งเดิม ส่งผลให้สีของสารละลายเปลี่ยนกลับมาเป็นสีของอินดิเคเตอร์ในรูปอิสระ ในขณะที่อินดิเคเตอร์ **PV** นั้นไม่เกิดเป็นเอนไซม์เบิลกับสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **ZnL4N** ซึ่งแสดงว่าเอนไซม์เบิลที่เตรียมขึ้นจากสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **ZnL4N** นั้นไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสได้

4.3.4 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ของเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **CuL5N** กับอินดิเคเตอร์ต่าง ๆ

จากการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ต่อเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบ **CuL5N** ในสารละลายผสม 80:20% (v/v) DMSO:H₂O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM โดยทำการปิเปตสารละลาย **CuL5N** ความเข้มข้น 20 µM ปริมาตร 2 mL ลงในขวดแก้ว และปิเปตสารละลายอินดิเคเตอร์ **ZC, PAR, XO, BPG, PGR** และ **PV** ความเข้มข้น 400 µM ปริมาตร 0.1 mL ลงในขวดแก้วดังกล่าว คนสารละลายให้เข้ากัน พบว่าสีของสารละลายจะเปลี่ยนจากใสไม่มีสีของสารประกอบ **CuL5N** ไปเป็นสีชมพูของเอนไซม์เบิลที่แตกต่างไปจากสีของ **CuL5N** และสีของอินดิเคเตอร์อิสระ จากนั้นปิเปตสารละลายแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 0.35 mL ลงไปในขวดแก้วที่มีสารละลายของเอนไซม์เบิล คนสารละลายให้เข้ากันและสังเกตการเปลี่ยนสีของสารละลาย ซึ่งผลการทดลองที่ได้แสดงได้ดัง รูปที่ 4.15

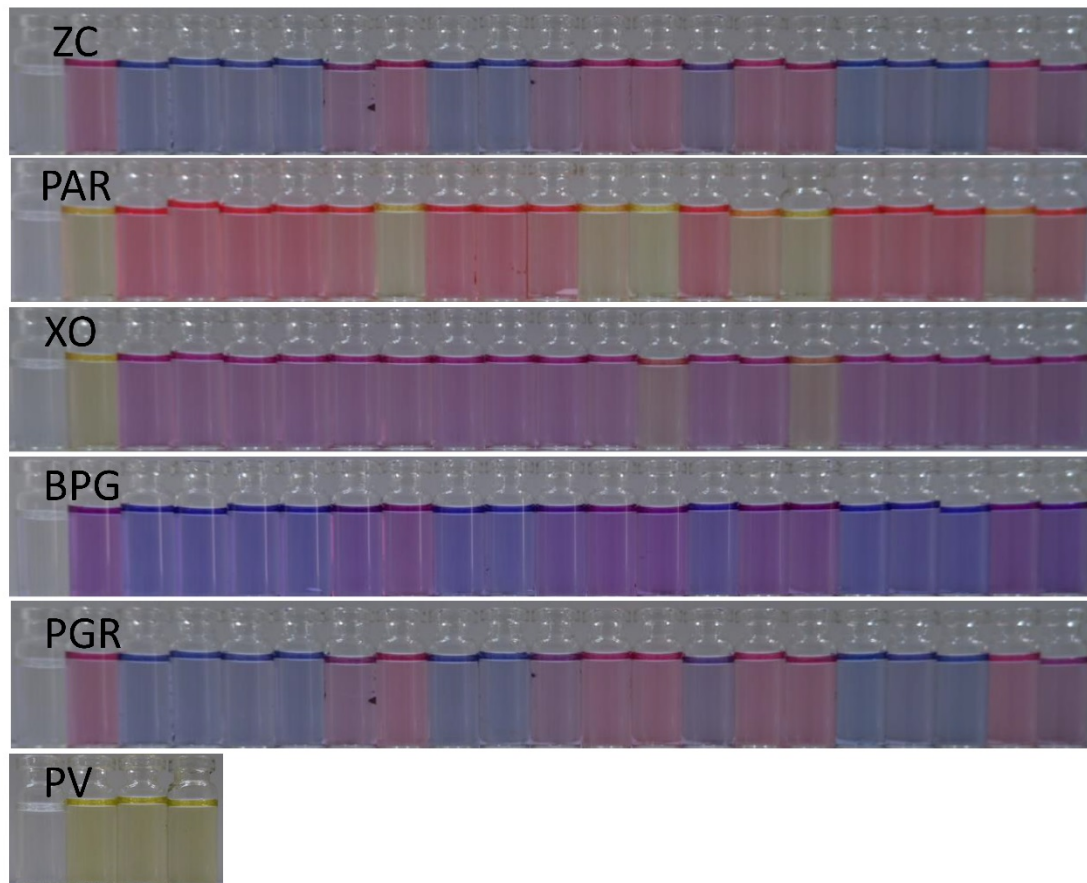


รูปที่ 4.15 การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมจากสารประกอบ **CuL5N** กับอินดิเคเตอร์ชนิดต่าง ในสภาวะที่มีแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ในสารละลายผสม 80:20% (v/v) DMSO:H₂O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM

ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.15 เห็นได้ว่าเมื่อทำการเติมแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ลงไปในสารละลายเอนไซม์จะเกิดการเปลี่ยนแปลงคือเอนไซม์ที่เตรียมจากอินดิเคเตอร์ **ZC** นั้นไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเอนไซม์ซึ่งหมายความว่าไม่มีแอนไอออนใดที่สามารถเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ในโครงสร้างของเอนไซม์ได้ ในขณะที่เอนไซม์ที่เตรียมจากอินดิเคเตอร์ **PAR, XO, BPG, PGR** และ **PV** นั้นมีแอนไอออนมากกว่าหนึ่งชนิดที่สามารถเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ในโครงสร้างของเอนไซม์ได้และทำให้อินดิเคเตอร์หลุดออกมาอยู่ในรูปอิสระดั้งเดิม ส่งผลให้สีของสารละลายเปลี่ยนกลับมาเป็นสีของอินดิเคเตอร์ในรูปอิสระ ซึ่งแสดงว่าเอนไซม์ที่เตรียมขึ้นจากสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **CuL5N** นั้นไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตได้

4.3.5 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ของเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **ZnL5N** กับอินดิเคเตอร์ต่าง ๆ

จากการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ต่อเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบ **ZnL5N** ในสารละลายผสม 80:20% (v/v) DMSO:H₂O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM โดยทำการปิเปตสารละลาย **ZnL5N** ความเข้มข้น 20 µM ปริมาตร 2 mL ลงในขวดแก้ว และปิเปตสารละลายอินดิเคเตอร์ **ZC, PAR, XO, BPG, PGR** และ **PV** ความเข้มข้น 400 µM ปริมาตร 0.1 mL ลงในขวดแก้วดังกล่าว คนสารละลายให้เข้ากัน พบว่าสีของสารละลายจะเปลี่ยนจากใสไม่มีสีของสารประกอบ **ZnL5N** ไปเป็นสีชมพูของเอนไซม์เบิลที่แตกต่างไปจากสีของ **ZnL5N** และสีของอินดิเคเตอร์อิสระ จากนั้นปิเปตสารละลายแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 0.35 mL ลงไปในขวดแก้วที่มีสารละลายของเอนไซม์เบิล คนสารละลายให้เข้ากันและสังเกตการเปลี่ยนสีของสารละลาย ซึ่งผลการทดลองที่ได้แสดงได้ดัง รูปที่ 4.16

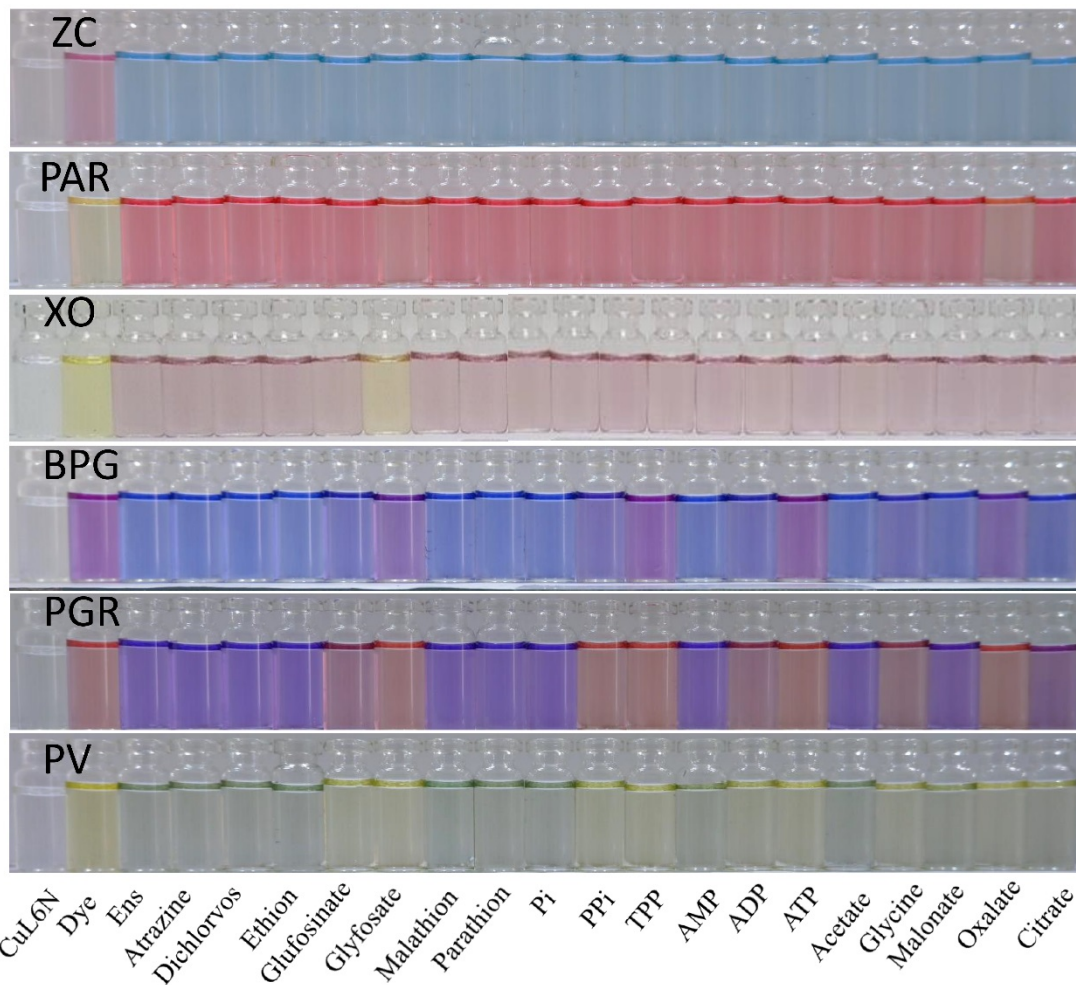


รูปที่ 4.16 การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบ **ZnL5N** กับอินดิเคเตอร์ชนิดต่าง ในสถานะที่มีแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ในสารละลายผสม 80:20% (v/v) DMSO:H₂O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM

ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.16 เห็นได้ว่าการเติมแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ลงไปในสารละลายเอนไซม์เบิลจะเกิดการเปลี่ยนแปลงคือเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากอินดิเคเตอร์ **PAR**, **XO**, **BPG** และ **PGR** นั้นมีแอนไอออนมากกว่าหนึ่งชนิดที่สามารถเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ในโครงสร้างของเอนไซม์เบิลได้และทำให้อินดิเคเตอร์หลุดออกมาอยู่ในรูปอิสระดั้งเดิม ส่งผลให้สีของสารละลายเปลี่ยนกลับมาเป็นสีของอินดิเคเตอร์ในรูปอิสระ ในขณะที่อินดิเคเตอร์ **PV** นั้นไม่เกิดเป็นเอนไซม์เบิลกับสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **ZnL5N** ซึ่งแสดงว่าเอนไซม์เบิลที่เตรียมขึ้นจากสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **ZnL5N** นั้นไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสได้

4.3.6 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ของเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **CuL6N** กับอินดิเคเตอร์ต่าง ๆ

จากการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ต่อเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบ **CuL6N** ในสารละลายผสม 80:20% (v/v) DMSO:H₂O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM โดยทำการปิเปตสารละลาย **CuL6N** ความเข้มข้น 20 µM ปริมาตร 2 mL ลงในขวดแก้ว และปิเปตสารละลายอินดิเคเตอร์ **ZC, PAR, XO, BPG, PGR** และ **PV** ความเข้มข้น 400 µM ปริมาตร 0.1 mL ลงในขวดแก้วดังกล่าว คนสารละลายให้เข้ากัน พบว่าสีของสารละลายจะเปลี่ยนจากใสไม่มีสีของสารประกอบ **CuL6N** ไปเป็นสีชมพูของเอนไซม์เบิลที่แตกต่างไปจากสีของ **CuL6N** และสีของอินดิเคเตอร์อิสระ จากนั้นปิเปตสารละลายแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 0.35 mL ลงไปในขวดแก้วที่มีสารละลายของเอนไซม์เบิล คนสารละลายให้เข้ากันและสังเกตการเปลี่ยนสีของสารละลาย ซึ่งผลการทดลองที่ได้แสดงได้ดัง รูปที่ 4.17

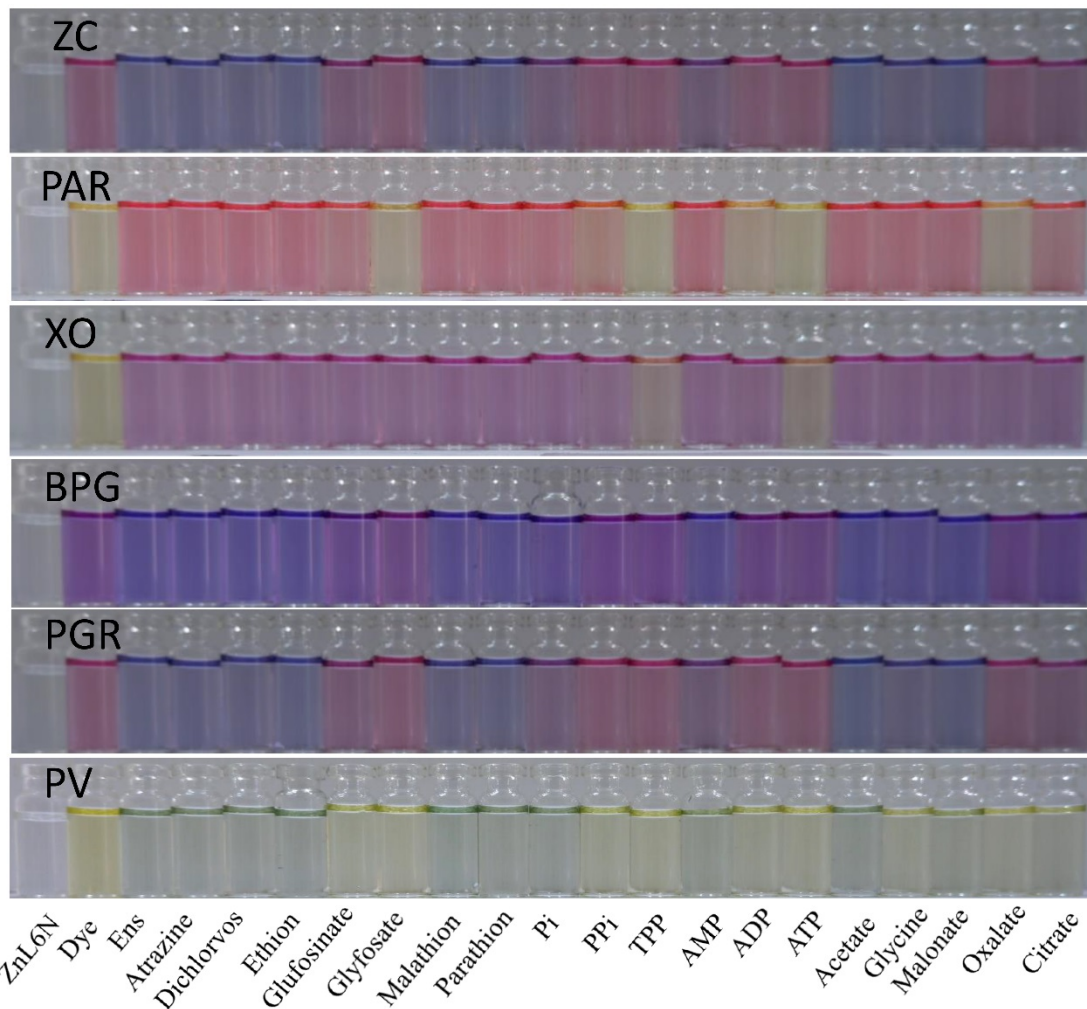


รูปที่ 4.17 การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบ **CuL6N** กับอินดิเคเตอร์ชนิดต่าง ในสถานะที่มีแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ในสารละลายผสม 80:20% (v/v) DMSO:H₂O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM

จากรูปที่ 4.17 จะเห็นได้เมื่อทำการเติมแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ลงไปในสารละลายเอนไซม์เบิลจะเกิดการเปลี่ยนแปลงคือเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากอินดิเคเตอร์ **PV**, **PAR**, **PGR** และ **BPG** นั้นมีแอนไอออนมากกว่าหนึ่งชนิดที่สามารถเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ในโครงสร้างของเอนไซม์เบิลได้และทำให้อินดิเคเตอร์หลุดออกมาอยู่ในรูปอิสระดั้งเดิม ในขณะที่เอนไซม์เบิลที่เตรียมจากอินดิเคเตอร์ **ZC** ไม่มีแอนไอออนใดที่สามารถเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ในโครงสร้างของเอนไซม์เบิลได้ แต่ที่น่าสนใจคือเอนไซม์เบิลที่เตรียมขึ้นจากอินดิเคเตอร์ **XO** นั้นมีเพียง **Glyphosate** เท่านั้นที่เปลี่ยนสีของสารละลายเอนไซม์เบิลกลับมาเป็นสีของอินดิเคเตอร์ **XO** ในรูปอิสระดั้งเดิม ซึ่งแสดงว่าเอนไซม์เบิล **[CuL6N·XO]** ที่เตรียมขึ้นนั้นมีความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจวัด **Glyphosate** ได้เป็นอย่างดี

4.3.7 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ของเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **ZnL6N** กับอินดิเคเตอร์ต่าง ๆ

จากการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ต่อเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบ **ZnL6N** ในสารละลายผสม 80:20% (v/v) DMSO:H₂O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM โดยทำการปิเปตสารละลาย **ZnL6N** ความเข้มข้น 20 μ M ปริมาตร 2 mL ลงในขวดแก้ว และปิเปตสารละลายอินดิเคเตอร์ **ZC, PAR, XO, BPG, PGR** และ **PV** ความเข้มข้น 400 μ M ปริมาตร 0.1 mL ลงในขวดแก้วดังกล่าว คนสารละลายให้เข้ากัน พบว่าสีของสารละลายจะเปลี่ยนจากใสไม่มีสีของสารประกอบ **ZnL6N** ไปเป็นสีชมพูของเอนไซม์เบิลที่แตกต่างไปจากสีของ **ZnL6N** และสีของอินดิเคเตอร์อิสระ จากนั้นปิเปตสารละลายแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 0.35 mL ลงไปในขวดแก้วที่มีสารละลายของเอนไซม์เบิล คนสารละลายให้เข้ากันและสังเกตการเปลี่ยนสีของสารละลาย ซึ่งผลการทดลองที่ได้แสดงได้ดัง รูปที่ 4.18



รูปที่ 4.18 การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเอนไซม์เอนไซม์ที่เตรียมจากสารประกอบ **ZnL6N** กับอินดิเคเตอร์ชนิดต่าง ๆ ในสถานะที่มีแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ในสารละลายผสม 80:20% (v/v) DMSO:H₂O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM

ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.18 เห็นได้ชัดว่าเมื่อทำการเติมแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ลงไปในสารละลายเอนไซม์จะเกิดการเปลี่ยนแปลงคือเอนไซม์ที่เตรียมจากอินดิเคเตอร์ **PV, PAR, XO, BPG** และ **PGR** นั้นมีแอนไอออนมากกว่าหนึ่งชนิดที่สามารถเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ในโครงสร้างของเอนไซม์ได้และทำให้อินดิเคเตอร์หลุดออกมาอยู่ในรูปอิสระดั้งเดิม ส่งผลให้สีของสารละลายเปลี่ยนกลับมาเป็นสีของอินดิเคเตอร์ในรูป ซึ่งแสดงว่าเอนไซม์ที่เตรียมขึ้นจากสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **ZnL6N** นั้นไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสได้

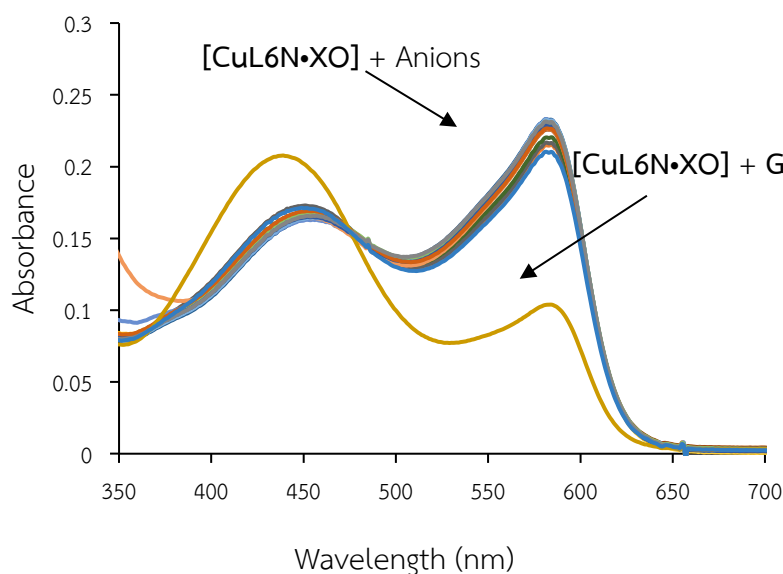
จากการศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดแอนไอออนชนิดต่าง ๆ รวมถึงสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสของเอนไซม์ที่เตรียมจากสารประกอบโคออร์ดิเนชัน ที่ทำการสังเคราะห์ทั้งหมดในงานวิจัยนี้สรุปได้ว่าเอนไซม์ที่เตรียมขึ้นจากสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **CuL6N**

กับอินดิเคเตอร์ **XO** นั้นมีความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจวัด **Glyphosate** เป็นอย่างยิ่งดังนั้นในขั้นตอนการศึกษาต่อจากนี้จึงเลือกทำการศึกษากการตรวจวัด

Glyphosate ด้วยเอนไซม์เบิล **[CuL6N•XO]**

4.4 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดแอน **Glyphosate** ไอออนชนิดต่าง ๆ ของเอนไซม์เบิล ที่เตรียมจากสารประกอบ **CuL6** กับอินดิเคเตอร์ **XO** โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี

จากผลการศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกับแอนไอออนของเอนไซม์เบิล **[CuL6N•XO]** ดังรูปที่ 4.17 เมื่อนำสารละลายเอนไซม์เบิล **[CuL6N•XO]** ในสภาวะที่มีแอนไอออนชนิดต่าง ๆ มาวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี พบว่ามีเพียง **Glyphosate** ที่ส่งผลทำให้สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายเอนไซม์เบิล **[CuL6N•XO]** ที่ความยาวคลื่น 583 nm มีค่าลดลงอย่างเห็นได้ชัด ในขณะที่แอนไอออนชนิดอื่น ๆ ไม่ทำให้สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของเอนไซม์เบิล **[CuL6N•XO]** มีการเปลี่ยนแปลงแต่อย่างใด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์เบิลดังกล่าวมีความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจวัด **Glyphosate** เป็นอย่างดี



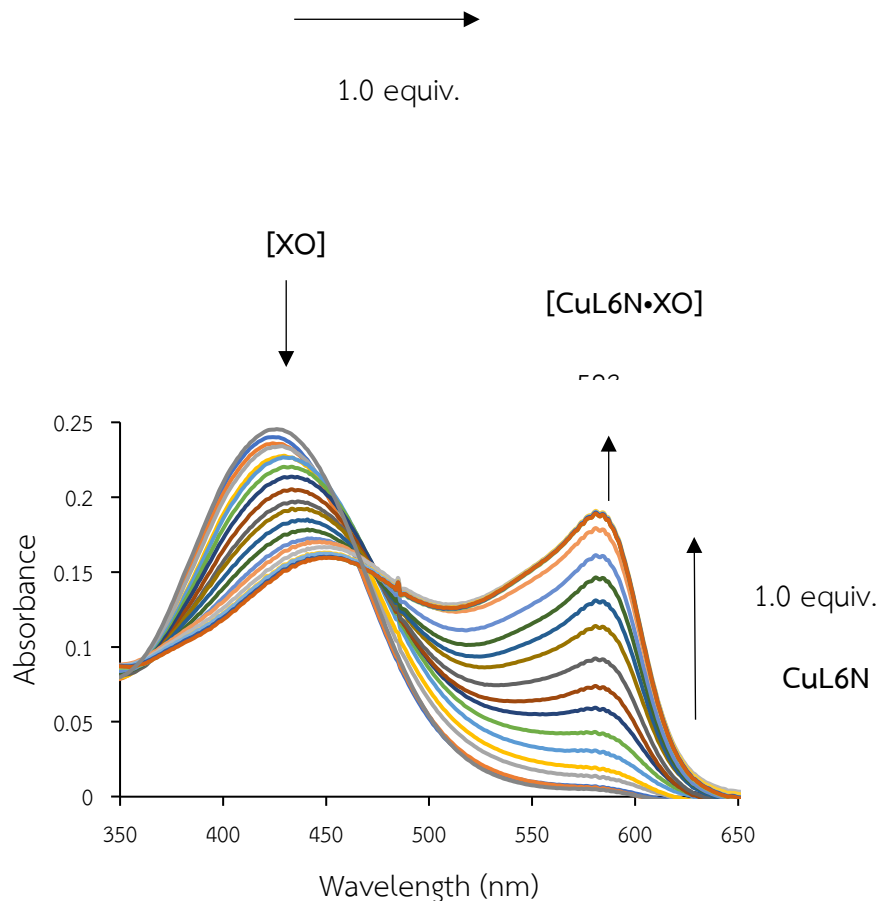
รูปที่ 4.19 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายเอนไซม์เบิล **[CuL6N•XO]** ความเข้มข้น 20 μM ที่มีแอนไอออนชนิดต่าง ๆ (1 mM) ในสารละลายผสม 80:20% (v/v) DMSO:H₂O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM

4.5 การหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนไซม์ของสารประกอบ **CuL6N** กับอินดิเคเตอร์ **XO** โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน

การหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนไซม์ของสารประกอบ **CuL6N** กับอินดิเคเตอร์ **XO** โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทรชันทำได้โดยนำสารละลาย **XO** ความเข้มข้น 20 μM ปริมาตร 2 mL มาไทเทรตด้วยสารละลาย **CuL6N** ความเข้มข้น 400 μM ครั้งละ 0.005 mL (0.05 equivalent) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี โดยทำการทดลองจนครบ 0.1 mL (1.0 equivalent) ผลการทดลองแสดงได้ดังรูปที่ 4.20 จากการศึกษพบว่าสารละลายสีเหลืองของอินดิเคเตอร์ **XO** ในรูปอิสระมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 426 nm และเมื่อเติมสารละลาย **CuL6N** ลงไป 0 ถึง 1.0 equivalent จะสังเกตเห็นได้ว่าสีของสารละลายเปลี่ยนจากสารละลายเหลืองไปเป็นสารละลายสีชมพูพร้อมกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 583 nm มีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการทำยูวี-วิสิเบิลไทเทรชันไปคำนวณหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนไซม์ระหว่างสารประกอบ **CuL6N** กับอินดิเคเตอร์ **XO** โดยใช้โปรแกรม SPECFIT พบว่าค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนไซม์ $\log K = 4.62 \pm 0.32$ ซึ่งสอดคล้องกับการเกิดสปีชีส์ **[CuL6N•XO]**



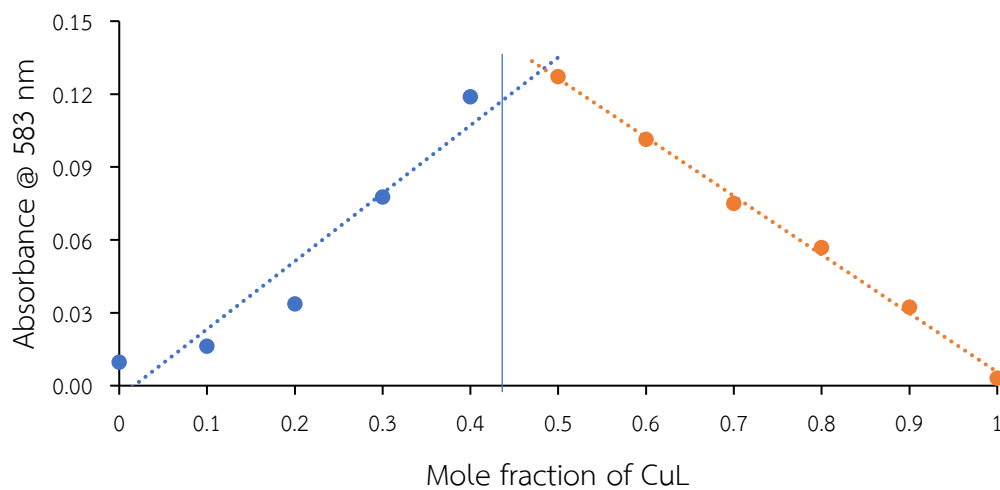
CuL



รูปที่ 4.20 ยูวี-วิสิเบิลไทเทรชันสเปกตรัมของสารละลาย **XO** (20 μM) ด้วยสารละลาย **CuL6N** (400 μM) ในสารละลายผสม 80:20% (v/v) DMSO:H₂O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM

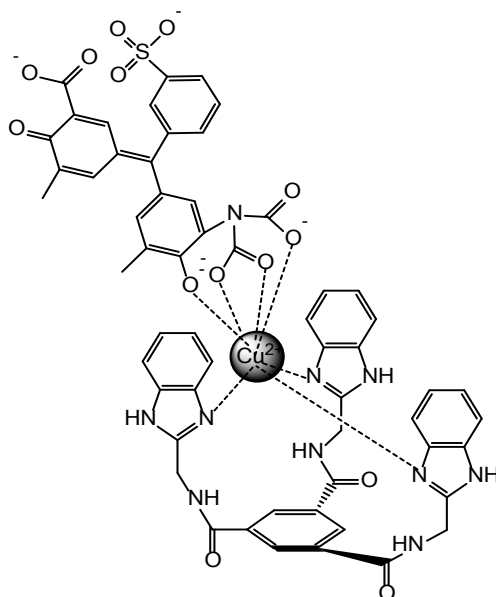
4.6 การหาอัตราส่วนในการเกิดเอนเซมเบิลของสารประกอบ **CuL6N** กับ **XO** โดยวิธี Job's method

การหาอัตราส่วนในการเกิดเอนเซมเบิลของสารประกอบ **CuL6N** กับ **XO** โดยวิธี Job's method โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี ทำได้โดยเตรียมสารละลายผสมระหว่างสารละลาย **CuL6N** และสารละลาย **XO** ที่เศษส่วนโมลต่างกัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 583 nm จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 583 nm กับเศษส่วนโมล ของ **CuL6N** จากรูปที่ 4.21 พบว่าเมื่อลากเส้นสัมผัสจะเกิดจุดตัดที่เศษส่วนโมลของ **CuL6N** ที่ประมาณ 0.5 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า **XO** เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับ **CuL6N** ด้วยอัตราส่วน 1:1



รูปที่ 4.21 การหาอัตราส่วนในการเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสารละลาย **CuL6N** (20 μ M) กับ สารละลาย **XO** (20 μ M) ในสารละลายผสม 80:20% (v/v) DMSO:H₂O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM โดยวิธี Job's Method

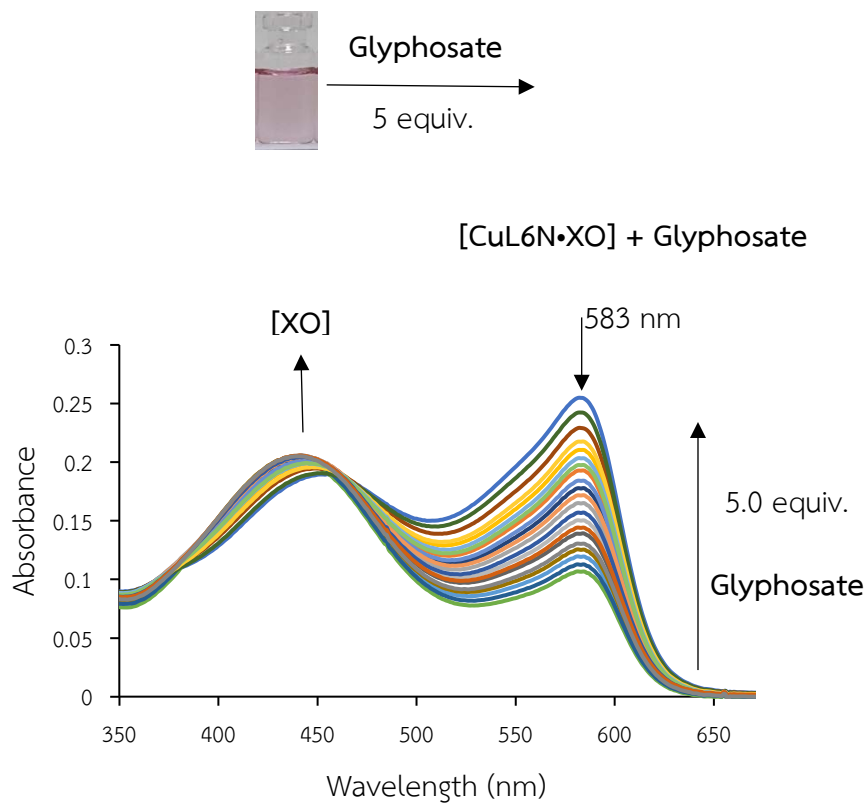
จากผลการหาอัตราส่วนในการเกิดเอนเซมเบิลของสารประกอบ **CuL6N** กับ **XO** โดยวิธี Job's method นั้นจึงคาดว่าโครงสร้างที่เป็นไปได้ของเอนเซมเบิล **[CuL6N•XO]** แสดงได้ดังรูปที่ 4.22 ซึ่งคาดว่าอินดิเคเตอร์ **XO** ประพฤติตัวเป็นเตตระเดนเตตลิแกนด์ และเกิดพันธะโคออร์ดิเนตวาเลนซ์กับไอออน Cu²⁺ ทั้งสองอะตอมโดยใช้ออกซิเจนทั้ง 4 อะตอมเป็นอะตอมผู้ให้อิเล็กตรอน



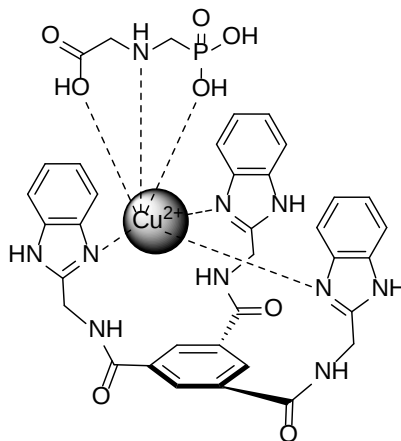
รูปที่ 4.22 โครงสร้างที่เป็นไปได้ของสารประกอบ [CuL6N•XO]

4.7 การหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง CuL6N กับ Glyphosate ด้วยวิธีการแทนที่อินดิเคเตอร์ โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน

การหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง CuL6N กับ Glyphosate ด้วยวิธีการแทนที่ของอินดิเคเตอร์ โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน ทำได้โดยไทเทรตสารละลาย เอนเซมเบิล [CuL6N•XO] ความเข้มข้น 20 μM 2 mL ด้วยสารละลาย Glyphosate ความเข้มข้น 1 mM 0.005 mL (0.05 equivalent) จนถึง 0.20 มิลลิลิตร (5 equivalent) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาสร้าง กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความยาวคลื่น ดังรูปที่ 4.23 จากรูปจะเห็นว่าเมื่อ เติมสารละลาย Glyphosate ลงไป สารละลายจะค่อย ๆ เปลี่ยนจากสีชมพูไปเป็นสีเหลือง เนื่องจาก Glyphosate เข้าไปแทนที่ XO ในโครงสร้างของเอนเซมเบิลและทำให้ได้ XO ในรูปอิสระอยู่ใน สารละลาย จึงทำให้ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเอนเซมเบิล [CuL6N•XO] ที่ความยาวคลื่น 583 nm มีค่าการดูดกลืนแสงลดลง ในขณะที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 426 nm ของ XO ในรูป อิสระมีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการทำยูวี-วิสิเบิลไทเทรชันมาคำนวณหาค่าคงที่ ความเสถียรของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน CuL6N กับ Glyphosate โดยใช้โปรแกรม SPECFIT พบว่ามีค่า $\log K = 4.95 \pm 0.29$ ซึ่งสอดคล้องกับการเกิดสปีชีส์ของสารประกอบ [CuL6N:Glyphosate] โครงสร้างที่เป็นไปได้ของสารประกอบดังกล่าวแสดงได้ดังรูปที่ 4.24 (Kaur S. *et al.*, 2017)



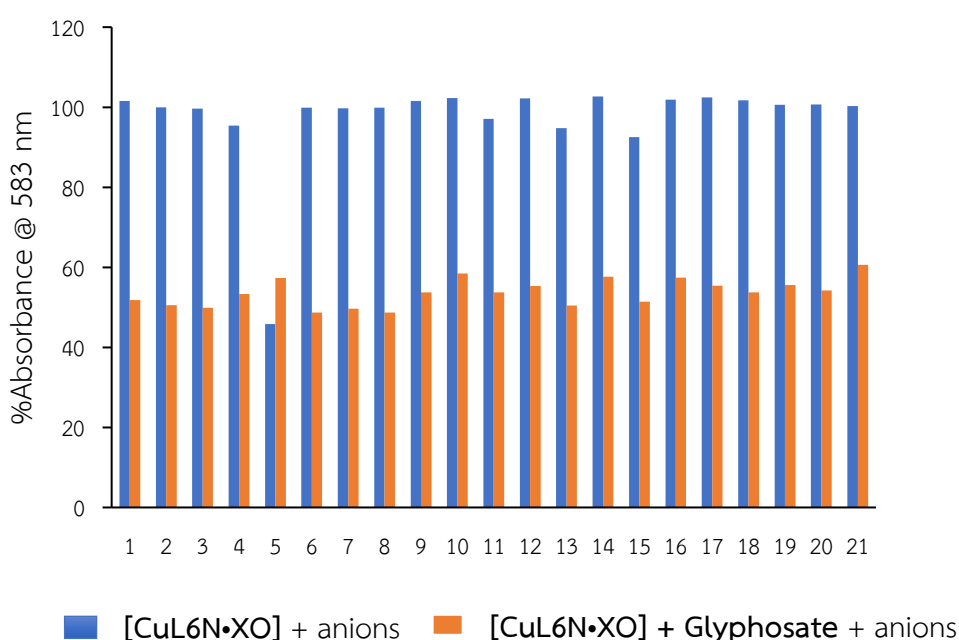
รูปที่ 4.23 ยูวี-วิสิเบิลไทเทรชันสเปกตรัมของสารละลายเอนไซม์เบิล **[CuL6N•XO]** (20 μ M) ด้วยสารละลาย **Glyphosate** (1 mM) ในสารละลายผสม 80:20% (v/v) DMSO:H₂O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM



รูปที่ 4.24 โครงสร้างที่เป็นไปได้ของสารประกอบ **[CuL6N:Glyphosate]**

4.8 การศึกษาผลการรบกวนของไอออนชนิดต่าง ๆ ต่อการตรวจวัด **Glyphosate** ด้วยเอนไซม์เบิล **[CuL6N•XO]** โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี

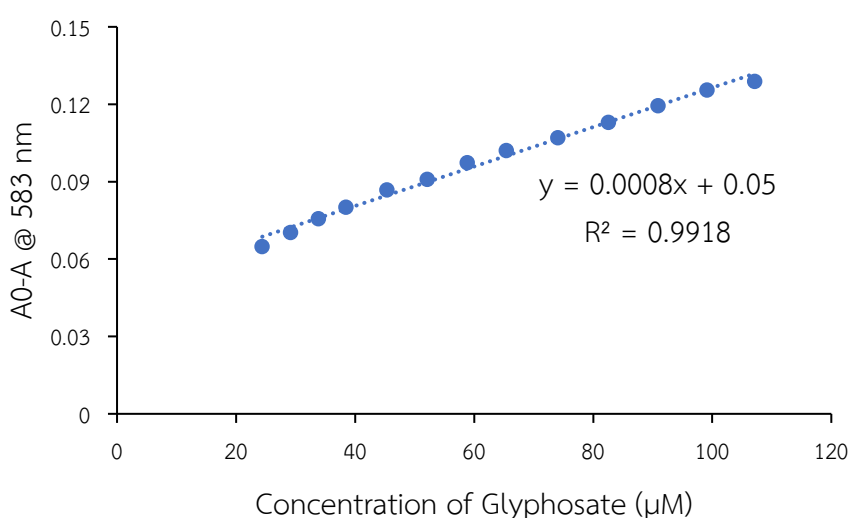
การศึกษาผลการรบกวนของแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ต่อการตรวจวัด **Glyphosate** ด้วยเอนไซม์เบิล **[CuL6N•XO]** โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรีแสดงได้ดังรูปที่ 4.25 พบว่าไม่มีแอนไอออนชนิดใดที่สามารถรบกวนการตรวจวัด **Glyphosate** ด้วยสารละลายของเอนไซม์เบิล **[CuL6N•XO]** ในสารละลาย 80:20% (v/v) DMSO:H₂O HEPES buffer pH 6.4 ความเข้มข้น 10 mM แสดงให้เห็นว่าสารละลายเอนไซม์เบิล **[CuL6N•XO]** สามารถนำมาใช้เป็นเซ็นเซอร์ทางเคมีในการตรวจวัด **Glyphosate** ได้เป็นอย่างดี โดยไม่ถูกรบกวนจากแอนไอออนชนิดอื่น ๆ



รูปที่ 4.25 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย **[CuL6N•XO] + Glyphosate** (20 μ M) กับสารละลายแอนไอออนชนิดต่าง ๆ (1 mM) ในสารละลายผสม 80:20% (v/v) DMSO:H₂O ความเข้มข้น 10 mM pH 6.4 โดยที่ (1) = Atrazine , (2) = Dichlorvos , (3) = Ethion , (4) = Glufosinate , (5) = Glyphosate , (6) = Marathion , (7) = Parathion , (8) = Paraquat , (9) = Chlorpyrifos , (10) = Pi , (11) = PPi , (12) = AMP , (13) = ADP , (14) = Acetate , (15) = Glycine , (16) = Malonate , (17) = NaF , (18) = NaCl , (19) = NaBr , (20) = NaI , (21) = Citrate

4.6 การหาขีดจำกัดในการตรวจวัด **Glyphosate** ด้วยเอนไซม์เบิล [CuL6•XO] โดยใช้เทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์

การหาขีดจำกัดในการตรวจวัด **Glyphosate** ด้วยเอนไซม์เบิล [CuL6•XO] โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี สามารถคำนวณหาขีดจำกัดการตรวจวัด ดังสมการที่ 1 โดยที่ σ คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation) ของค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย [CuL6•XO] จำนวน 10 ครั้ง k คือ ความชันของกราฟที่ได้จากการสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 583 nm กับความเข้มข้นของสารละลาย **Glyphosate**



รูปที่ 4.26 การหาขีดจำกัดในการตรวจวัดสารละลาย **Glyphosate** โดยใช้เอนไซม์เบิล [CuL6N•XO]

จากการทดลองหาขีดจำกัดการตรวจวัดของสารละลาย **Glyphosate** โดยใช้เอนไซม์เบิล [CuL•XO] ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรสโคปี เมื่อค่า σ เท่ากับ 0.0011 พบว่ามีขีดจำกัดในการตรวจวัด **Glyphosate** เท่ากับ 0.66 μM หรือ 0.11 ppm

สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการสังเคราะห์ลิแกนด์ที่เป็นอนพันธ์ของไทรพอดัลเอมีน 4 ชนิดคือ **L3N**, **L4N**, **L5N** และ **L6N** และทำการสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโนนิวเคลียร์ของไอออนโลหะคอปเปอร์ (II) และซิงก์ (II) กับลิแกนด์ทั้ง 4 ได้สารประกอบโคออร์ดิเนชัน **CuL3N**, **CuL4N**, **CuL5N**, **CuL6N**, **ZnL3N**, **ZnL4N**, **ZnL5N** และ **ZnL6N** จากนั้นนำมาศึกษาสมบัติการนำมาใช้เป็นเซ็นเซอร์ทางเคมีเชิงแสงในการตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสด้วยวิธีการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์โดยใช้โครโมจีนิกอินดิเคเตอร์ Xylenol Orange (**XO**) Pyrocatechol Violet (**PV**) Zincon (**ZC**) Pyrogallol Red (**PGR**) Bromo Pyrogallol Red (**BPG**) และ 4-(2-Pyridylazo resorcinol) (**PAR**) เป็นอินดิเคเตอร์ที่ให้สัญญาณในการตรวจวัด ในสารละลาย 80:20% (v/v) DMSO:H₂O HEPES buffer pH 6.4 ที่ความเข้มข้น 10 mM จากการศึกษาค่าคงที่การเกิดสารประกอบโคออร์ดิเนชัน **CuL6N** กับอินดิเคเตอร์ **XO** นั้นมีความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจวัดสารกำจัดศัตรูพืช **Glyphosate** เป็นอย่างดี โดยเมื่อเติมสารละลายสีเหลืองของอินดิเคเตอร์ **XO** ลงไปในสารละลายสีไม่มีสีของสารประกอบ **CuL6N** จะได้สารละลายสีชมพูของเอนไซม์เบิล **[CuL6N•XO]** มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 583 nm จากการศึกษาค่าคงที่ความเสถียรของสารละลายเอนไซม์เบิล **[CuL6N•XO]** ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน โดยใช้โปรแกรม SPECFIT พบว่ามีค่าคงที่ความเสถียรเท่ากับ $\log K = 4.62 \pm 0.32$ ซึ่งสอดคล้องกับการเกิดสารละลายเอนไซม์เบิล **[CuL6N•XO]** จากการศึกษาค่าอัตราส่วนในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนเอนไซม์เบิล ระหว่างสารประกอบ **CuL6N** กับ อินดิเคเตอร์ **XO** โดยใช้วิธี Job's method พบว่าอัตราส่วนในการเกิดเอนไซม์เบิล **[CuL6N•XO]** เป็น 1:1

เมื่อนำสารละลายเอนไซม์เบิล **[CuL6N•XO]** ตรวจวัด **Glyphosate** จะเกิดการเปลี่ยนสีชมพูของสารละลายเอนไซม์เบิล **[CuL6N•XO]** ไปเป็นสารละลายสีเหลืองของอินดิเคเตอร์ **XO** ในรูปอิสระ จากการศึกษาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง **CuL6N** กับ **Glyphosate** ด้วยวิธีการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ โดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน โดยใช้โปรแกรม SPECFIT พบว่ามีค่าคงที่ความเสถียรเท่ากับ $\log K = 4.95 \pm 0.29$ ซึ่งสอดคล้องกับการเกิดสปีชีส์ของสารประกอบ **[CuL6N:Glyphosate]** เมื่อทำการศึกษาผลการรบกวนของแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ต่อการตรวจวัด **Glyphosate** พบว่าไม่มีแอนไอออนชนิดใดที่รบกวนการตรวจวัด **Glyphosate** เนื่องจากไม่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 583 nm มีค่าลดลง แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์เบิล **[CuL6N•XO]** สามารถนำมาใช้เป็นเซ็นเซอร์ทางเคมีเชิงแสงในการตรวจวัด **Glyphosate** ได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้พบว่าการตรวจวัด

Glyphosate ด้วยสารละลายเอนไซม์เบิล **[CuL6N•XO]** มีค่าขีดจำกัดการตรวจวัดเท่ากับ 0.66 μM หรือ 0.11 ppm

ข้อเสนอแนะ : ในอนาคตจะพัฒนาไปเป็นชุดตรวจ **Glyphosate** วัดได้จริง

เอกสารอ้างอิง

- De Almeida, L. K. S., Chigome, S., Torto, N., Frost, C. L., and Pletschke, B. I. (2015). A novel colorimetric sensor strip for the detection of glyphosate in water. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 206, 357-363.
- Eddleston, M. and Phillips, M. R., (2004). Self-Poisoning with Pesticides. *British Medical Journal*, 328, 42-44.
- Eddleston, M., Street, J. M., Self, I., Thompson, A., Kinge, T., Williams, N.; Naredog, G., Dissanayake, K., Yuf, L.-M., Worek, F., Johnh, H.; Smithd, S., Thiermann, H., Harris, J. B. and Clutton, R. E. (2012). A role for solvents in the toxicity of agricultural organophosphorus pesticides. *Toxicology*, 294, 94-103.
- Fabbrizzi, L., Leone, A. and Taglietti, A. (2001). A Chemosensing Ensemble for Selective Carbonate Detection in Water Based on Metal-Ligand Interactions. *Angewandte Chemie International Edition*, 40, 3066-3069.
- Fabbrizzi, L., Marcotte, N., Stomeo, F. and 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.
- Flomenbaum, F., Goldfrank, L., Hoffman, R., Howland, M. A., Lewin, N. and Nelson, L. Goldfrank's Toxicologic Emergencies, Eighth Edition (Toxicologic Emergencies (Goldfrank's)) 8th Edition. New York: McGraw-Hill. 2006:1536-55.
- Gillezeau, C., Gerwen, M. V., Shaffer, R. M., Rana, I., Zhang, L., Sheppard, L. and Taioli, E. (2019). The evidence of human exposure to glyphosate: a review. *Environmental Health*, 18, 2-16.
- Gomes, M. P., Manac'h, S. G., Hénault-Ethier, L., Labrecque, M., Lucotte, M. and Juneau, P. (2017). Glyphosate-Dependent Inhibition of Photosynthesis in Willow. *Frontier in Plant Science*, 8, 207-220.
- Han, M. S. and 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. *Angewandte Chemie International Edition*, 41, 3809-3811.

- Hanke, I., Singer, H. and Hollender, J. (2008). Ultratrace-level determination of glyphosate, aminomethylphosphonic acid and glufosinate in natural waters by solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: performance tuning of derivatization, enrichment and detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391, 2265-2276.
- Hargrove, A. E., Nieto, S., Zhang, T., Sessler, J. L., & Anslyn, E. V. (2011). Artificial receptors for the recognition of phosphorylated molecules. *Chemical Reviews*, 111(11), 6603-6782.
- Hortala, M A., Fabbrizzi, L., Marcotte, N., Stomeo, F. and 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.
- Hu, M. and Feng, G. (2012). Highly selective and sensitive fluorescent sensing of oxalate in water. *Chemical Communications*, 48, 6951-6953.
- Jeyaratnam, J. (1990). Acute Pesticide Poisoning: A Major Global Health Problem. *World Health Statistics Quarterly*, 43, 139-144.
- Kaur, S., Kumar, V., Chawla, M., Cavallo, L., and Poater, A. (2017). Pesticides curbing soil fertility: effect of complexation of free metal. *Frontiers in Chemistry*, 5, 1-10.
- Lee, J. H., Park, J., Lah, M. S., Chin, J. and Hong, J. I. (2007). High-Affinity Pyrophosphate Receptor by a Synergistic Effect between Metal Coordination and Hydrogen Bonding in Water. *Organic Letters*, 9, 3729–3731.
- Minami, T., Liu, Y., Akdeniz, A., Koutnik, P., Esipenko, N. A., Nishiyabu, R., Kubo, Y. and Anzenbacher, P. (2014). Intramolecular Indicator Displacement Assay for Anions: Supramolecular Sensor for Glyphosate. *Journal of the American Chemical Society*, 136, 11396-11401.
- Metzger, A., Lynch, V.M. and Anslyn, E.V. (1997). A Synthetic Receptor Selective for Citrate. *Angewandte Chemie International Edition*, 36, 862-865.
- Motojyuku, M., Saito, T., Akieda, K., Otsuka, H., Yamamoto, I. and Inokuchi, S. J. (2008). Determination of glyphosate, glyphosate metabolites, and glufosinate in human serum by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 875, 509-514.

- Nguyen, B. T., and Anslyn, E. V. (2006). Indicator displacement assays. *Coordination Chemistry Reviews*, 250, 3118–3127.
- Raj, P., Singh, A., Kaur, K. Aree, T., Singh, A. and Singh, A. (2016). Fluorescent Chemosensors for Selective and Sensitive Detection of Phosmet/Chlorpyrifos with Octahedral Ni²⁺ Complexes. *Inorganic Chemistry*, 55, 4874-4883.
- Saito, T., Aoki, H., Namera, A., Oikawa, H., Miyazaki, S., Nakamoto, A. and Inokuchi, S. (2011). Mix-mode TiO-C18 Monolith Spin Column Extraction and GC-MS for the Simultaneous Assay of Organophosphorus Compounds and Glufosinate, and Glyphosate in Human Serum and Urine. *Analytical Sciences*, 27, 999-1005.
- Silva, P. D., Gunaratne, H. Q. N., Gunnlaugsson, T., Huxley, A. J. M., McCoy, C. P., Rademacher, J. T., and Rice, T. E. (1997). Signaling recognition events with fluorescent sensors and switches. *Chemical Reviews*, 97, 1515-1566.
- Songa, E. A., Arotiba, O. A., Owino, J. H. O., Jahed, N., Baker, P. G. L. and Iwuoha, E. I. (2009). Electrochemical detection of glyphosate herbicide using horseradish peroxidase immobilized on sulfonated polymer matrix. *Bioelectrochemistry*, 75, 117-123.
- Soga, T. and Imaizumi, M. (2001). Capillary electrophoresis method for the analysis of inorganic anions, organic acids, amino acids, nucleotides, carbohydrates and other anionic compounds. *Electrophoresis*, s22, 3418-3425.
- Steed, J. W. & Atwood, J. L. 2002. Supramolecular chemistry. John Wiley & Sons Ltd., England.
- Suksai, C. and Tuntulani, T. (2003). Chromogenic anion sensors. *Chemical Society Reviews*, 32, 192-202
- Wang, M., Ye, H., You, L. and Chen, X. (2016). A Supramolecular Sensor Array Using Lanthanide-Doped Nanoparticles for Sensitive Detection of Glyphosate and Proteins. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8, 574-581.
- Watchasit, S., Kaowliw, A., Suksai, C., Tuntulani, T., Ngeontae, W. and 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.

Watchasit, S., Suktanarak, P., Suksai C., Ruangpornvisuti, V. and 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., and Anslyn, E. V. (2001). Teaching old indicators new tricks. *Accounts of Chemical Research*, 34, 963-972.

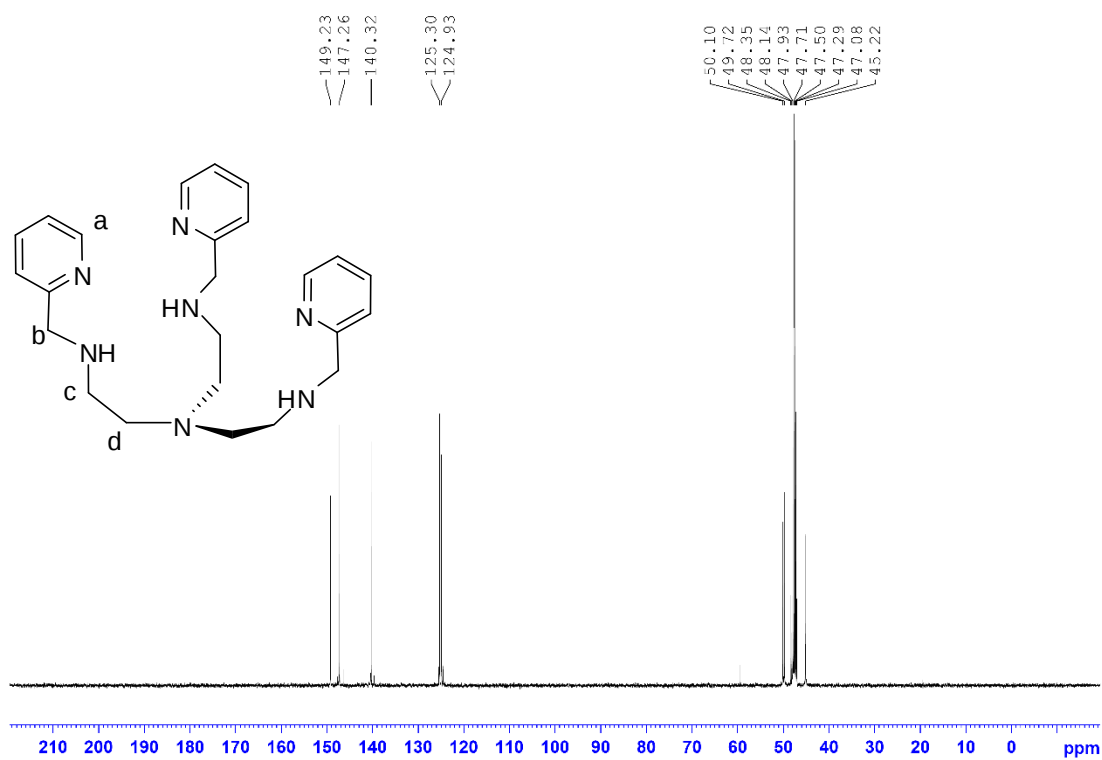
World Health Organization, 1990. Public Health Impact of Pesticides Used in Agriculture, 0 edn. WHO, Geneva.

เครือข่ายเตือนภัยสารเคมีกำจัดศัตรูพืช สมาเกษตรกรแห่งชาติ. (2560). สืบค้นวันที่ 11 มีนาคม

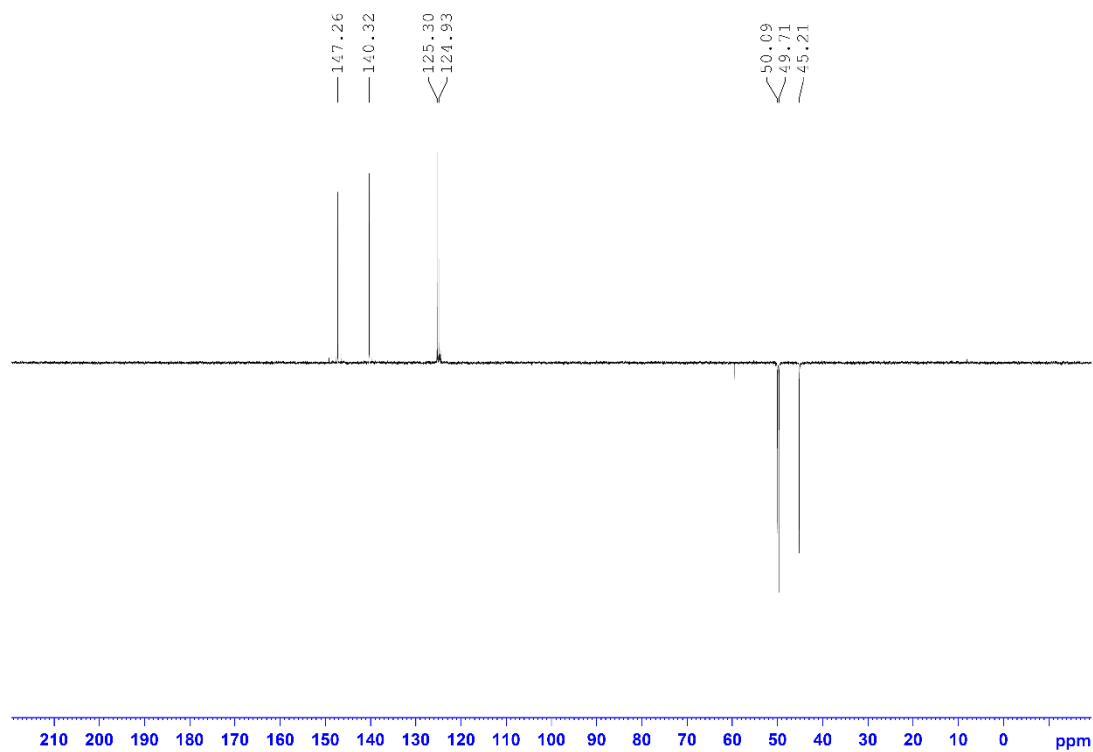
2563, จาก <https://thaipublica.org/2017/09/thai-pan-11-9-2560/>.

สรายุทธ เวชสิทธิ์. 2560. การตรวจวัดแอนไอออนไฟโรฟอสเฟตด้วยวิธีการแทนที่อินดิเคเตอร์. วารสาร วิทยาศาสตร์บูรพา, 22(3), 464 – 480.

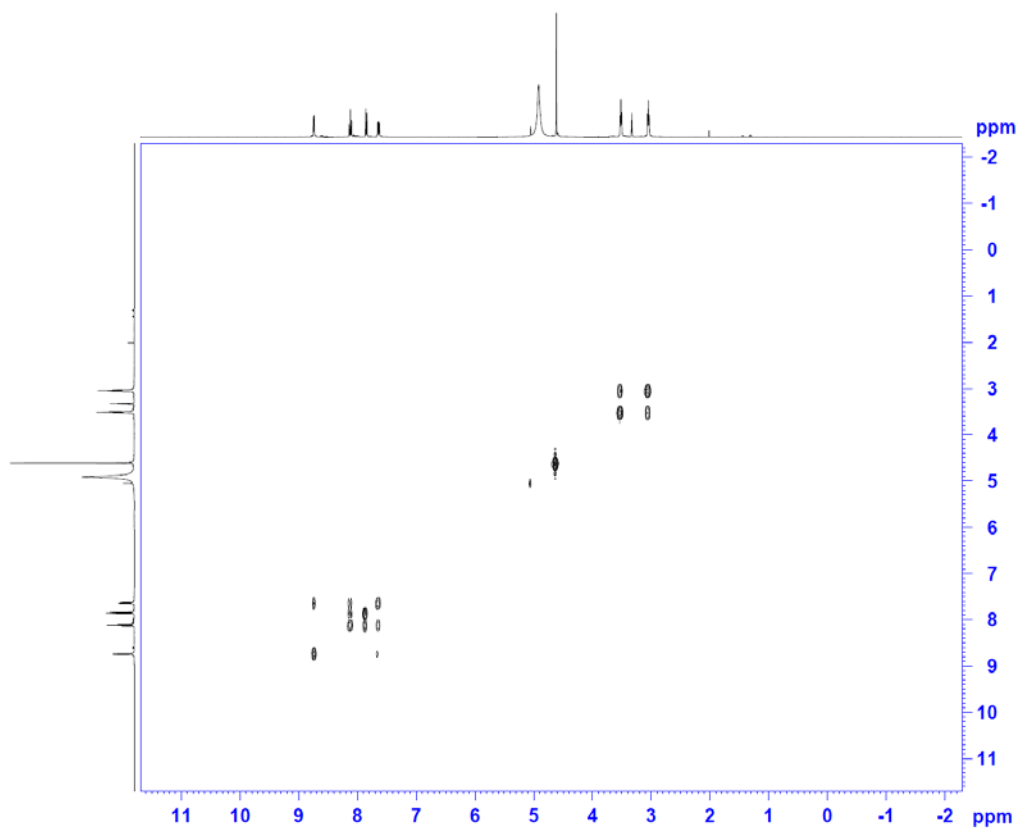
ภาคผนวก



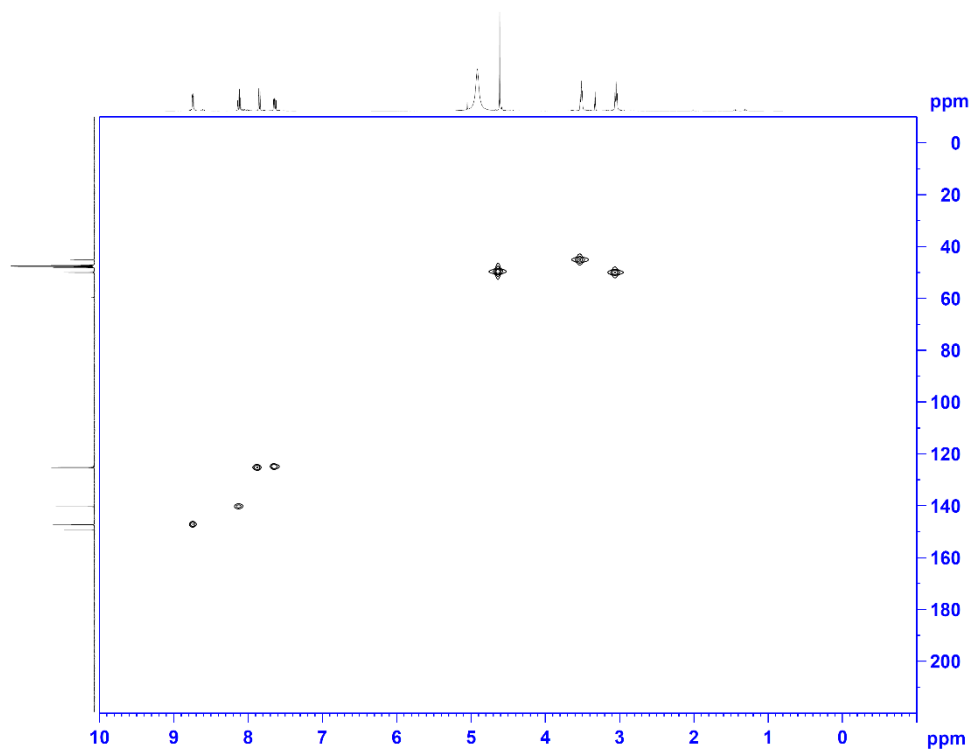
รูปที่ S.1 ^{13}C -NMR สเปกตรัมของลิแกนด์ **L3N** ในตัวทำละลาย CD_3OD



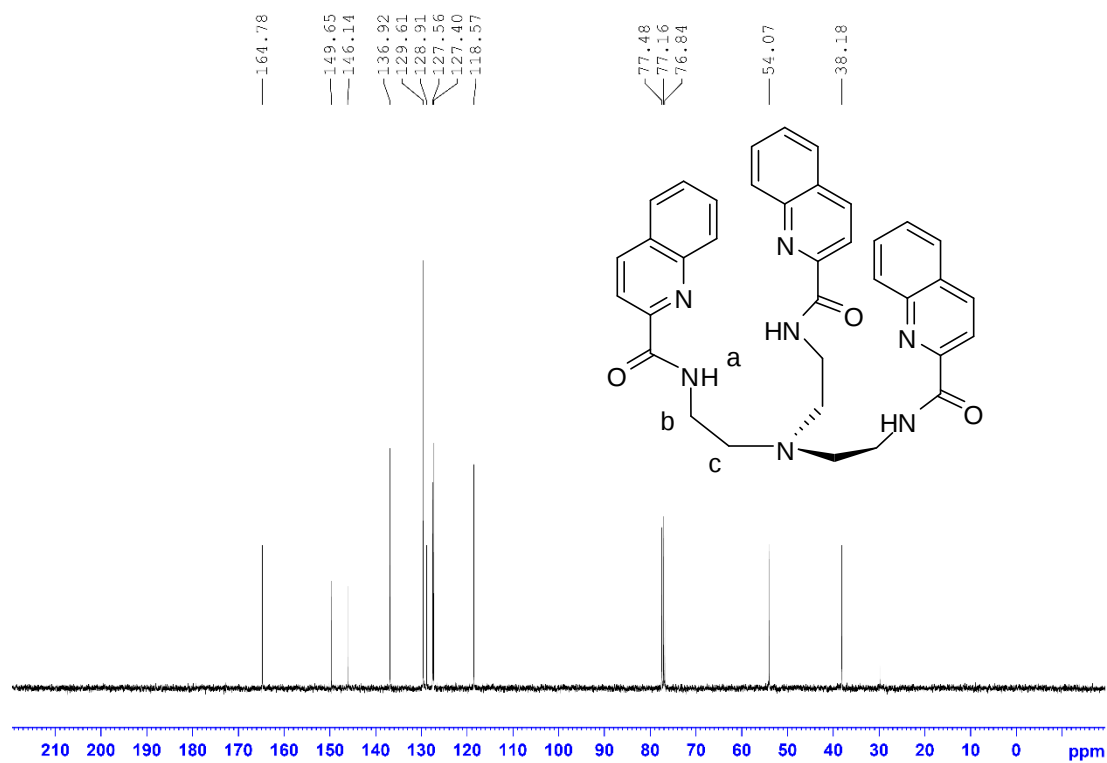
รูปที่ S.2 DEPT135-NMR สเปกตรัมของลิแกนด์ **L3N** ในตัวทำละลาย CD_3OD



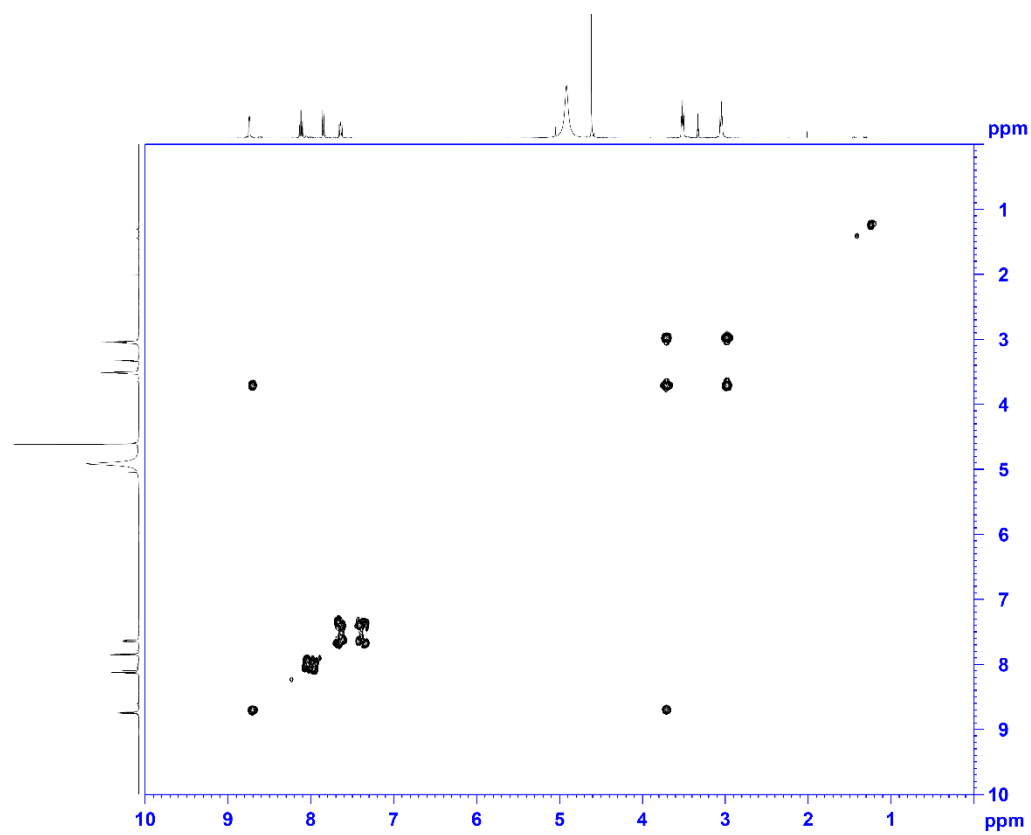
รูปที่ S.3 COSY-NMR สเปกตรัมของลิแกนด์ **L3N** ในตัวทำละลาย CD_3OD



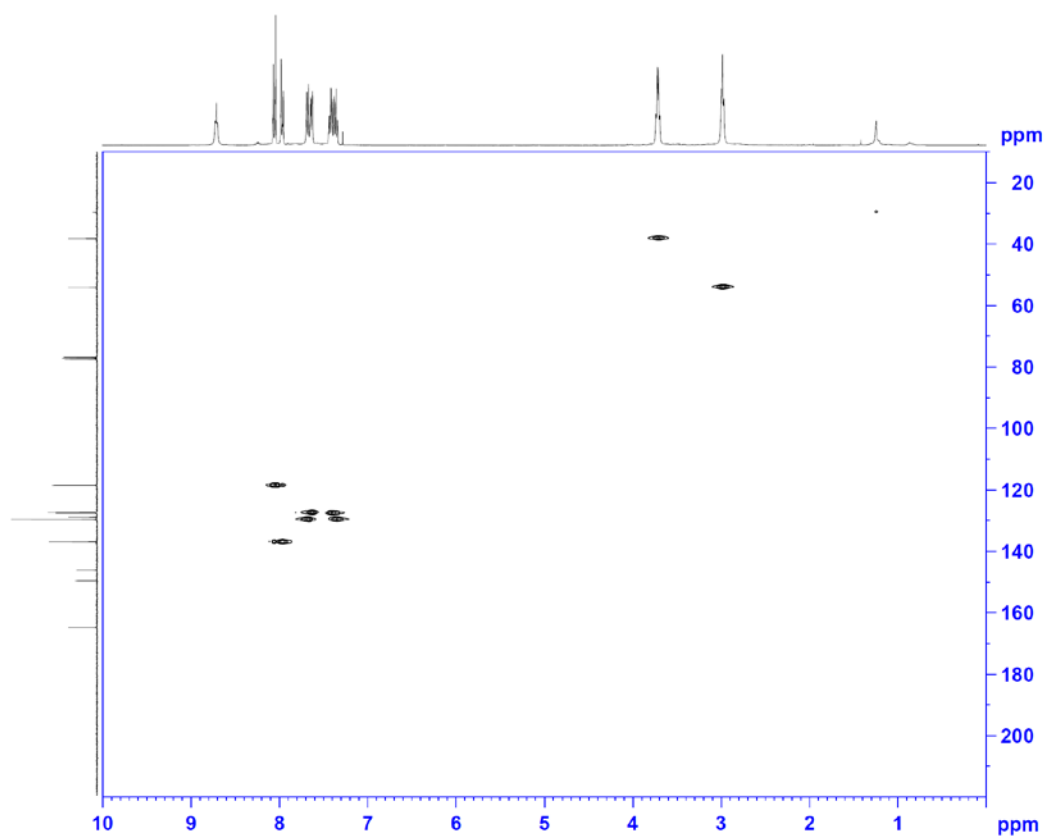
รูปที่ S.4 HSQC-NMR สเปกตรัมของลิแกนด์ **L3N** ในตัวทำละลาย CD_3OD



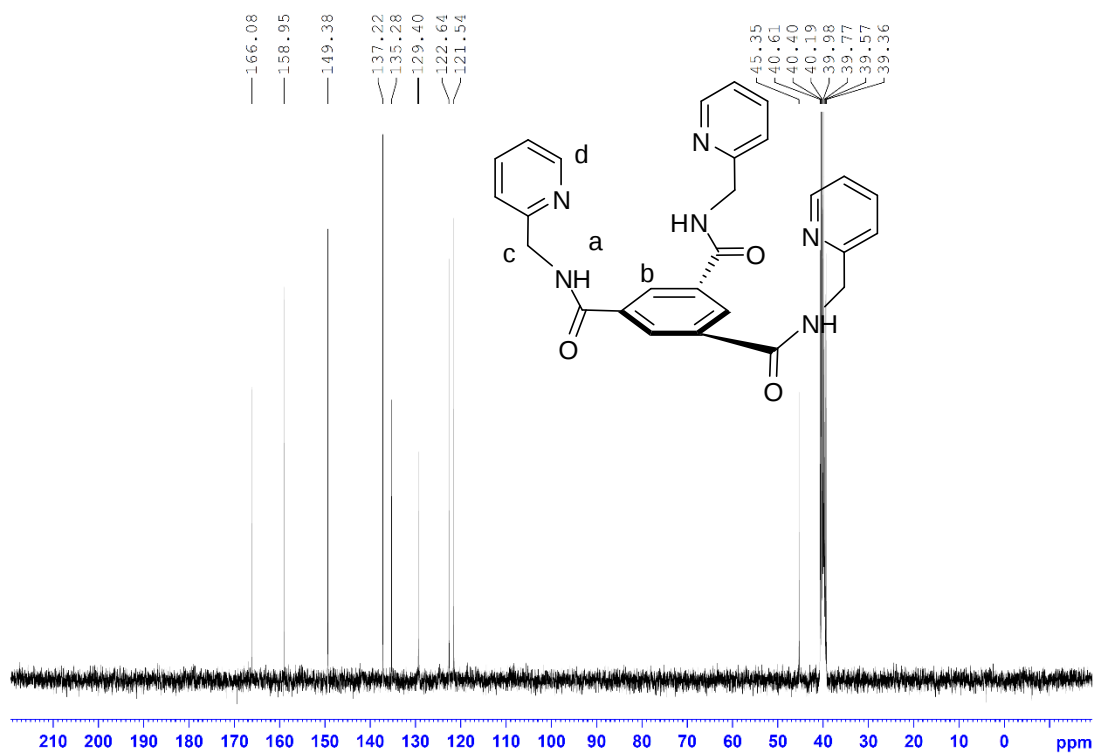
รูปที่ S.5 ^{13}C -NMR สเปกตรัมของลิแกนด์ **L4N** ในตัวทำละลาย CDCl_3



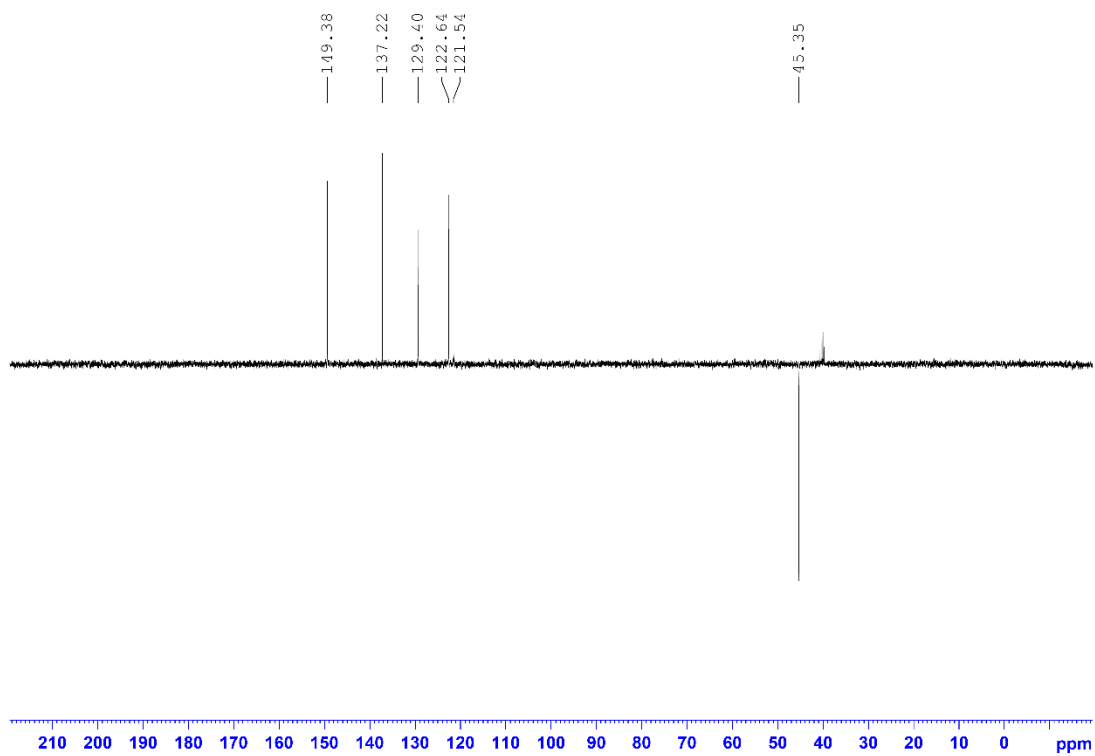
รูปที่ S.6 COSY-NMR สเปกตรัมของลิแกนด์ **L4N** ในตัวทำละลาย CDCl_3



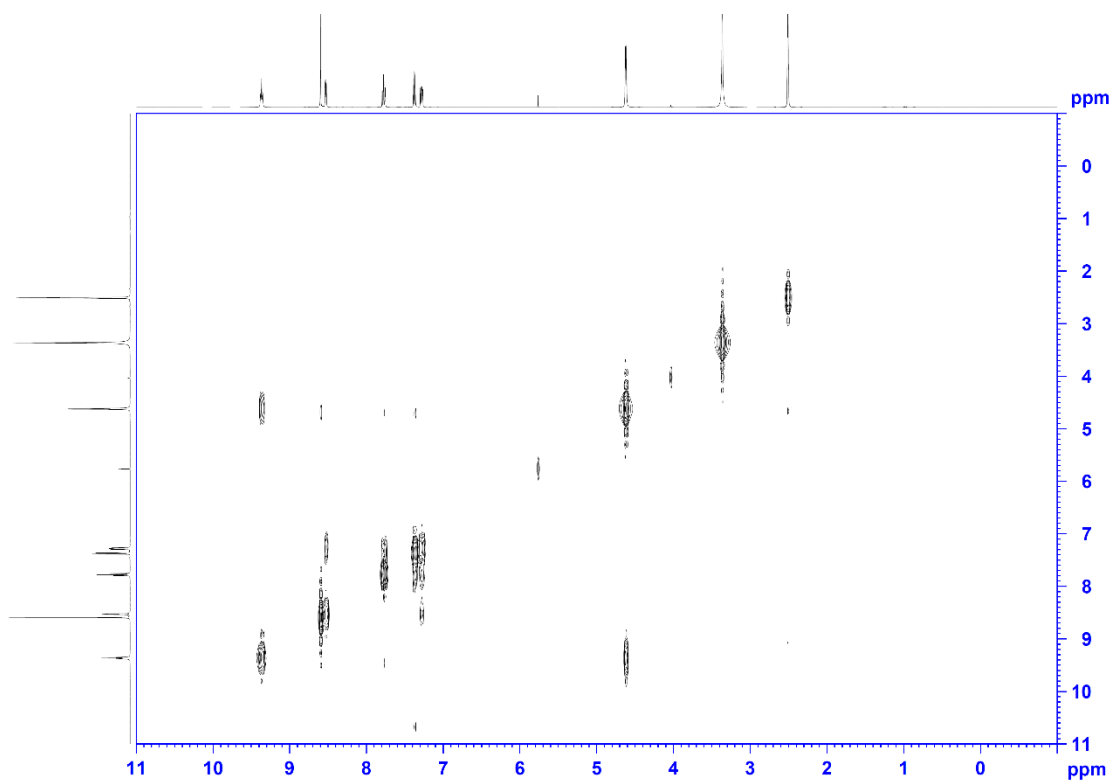
รูปที่ S.7 HSQC-NMR สเปกตรัมของลิแกนด์ **L4N** ในตัวทำละลาย CDCl_3



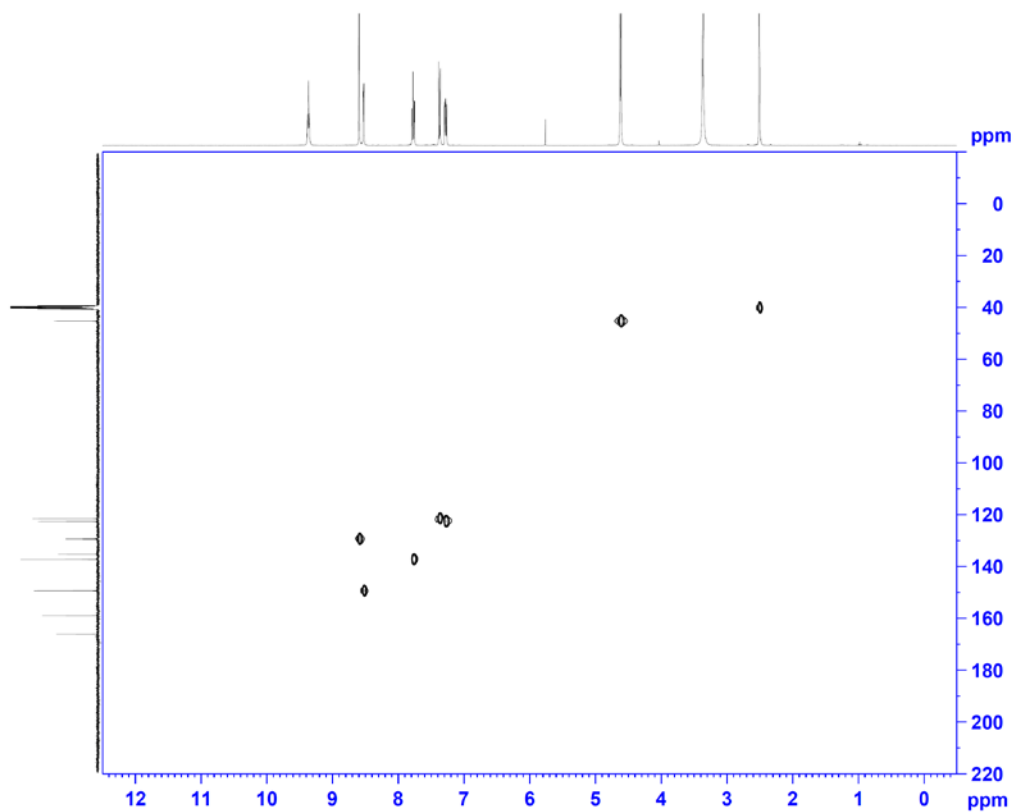
รูปที่ S.8 ^{13}C -NMR สเปกตรัมของลิแกนด์ **L5N** ในตัวทำละลาย DMSO-D_6



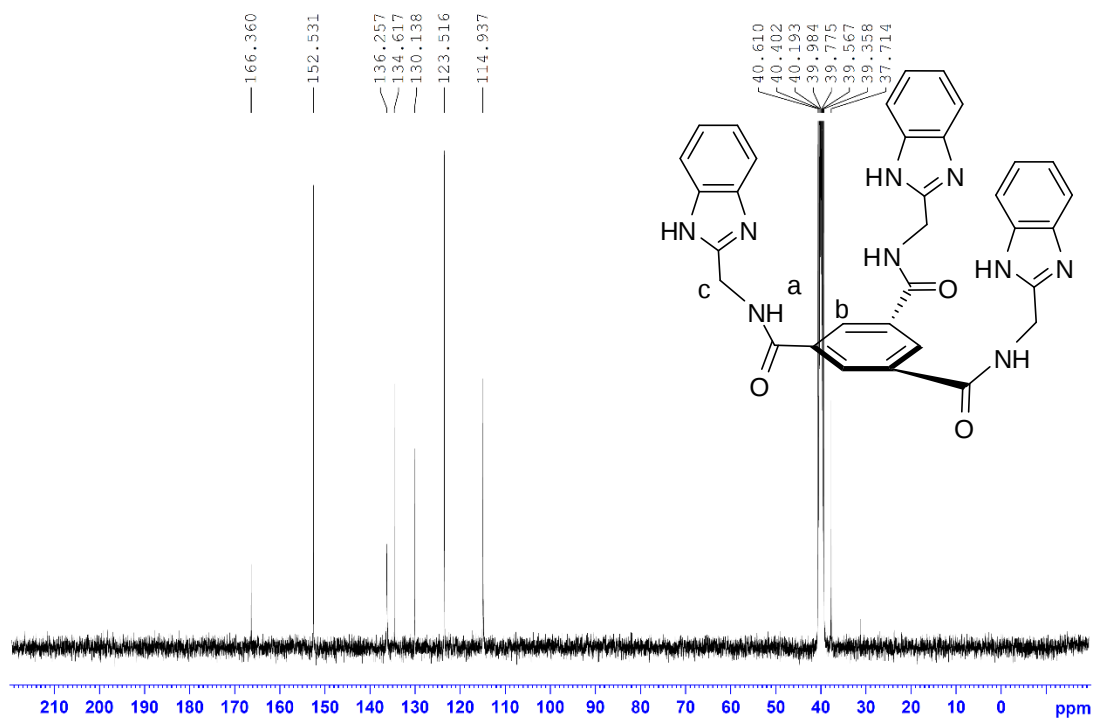
รูปที่ S.9 DEPT-NMR สเปกตรัมของลิแกนด์ **L5N** ในตัวทำละลาย DMSO-D6



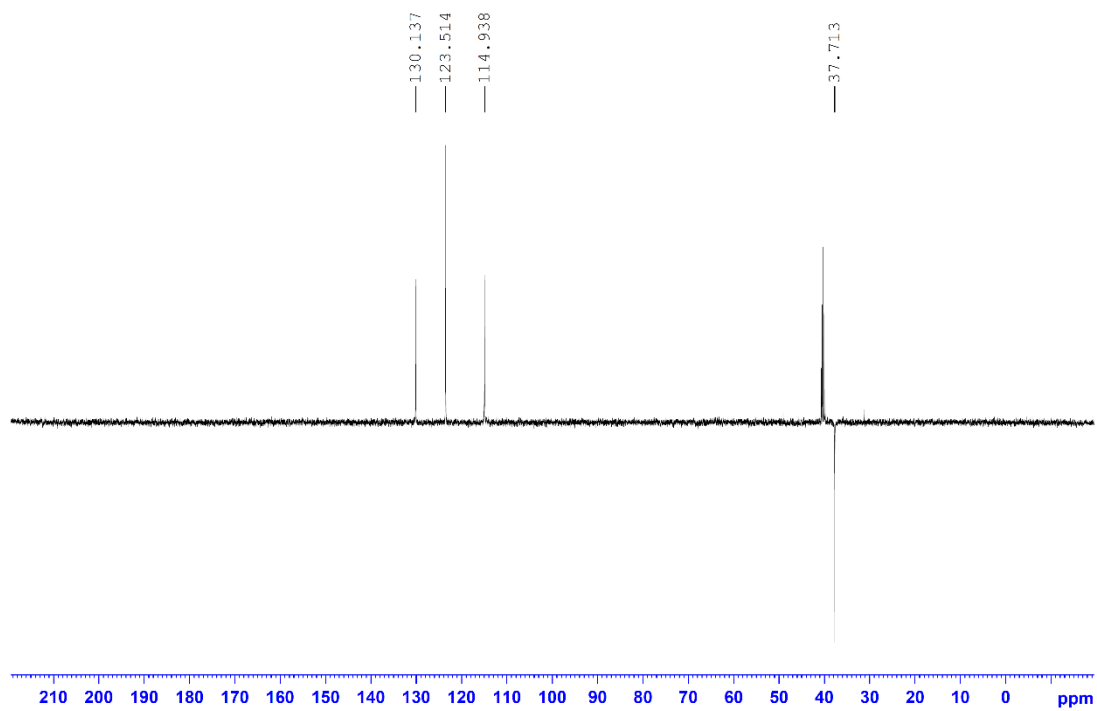
รูปที่ S.10 COSY-NMR สเปกตรัมของลิแกนด์ **L5N** ในตัวทำละลาย DMSO-D6



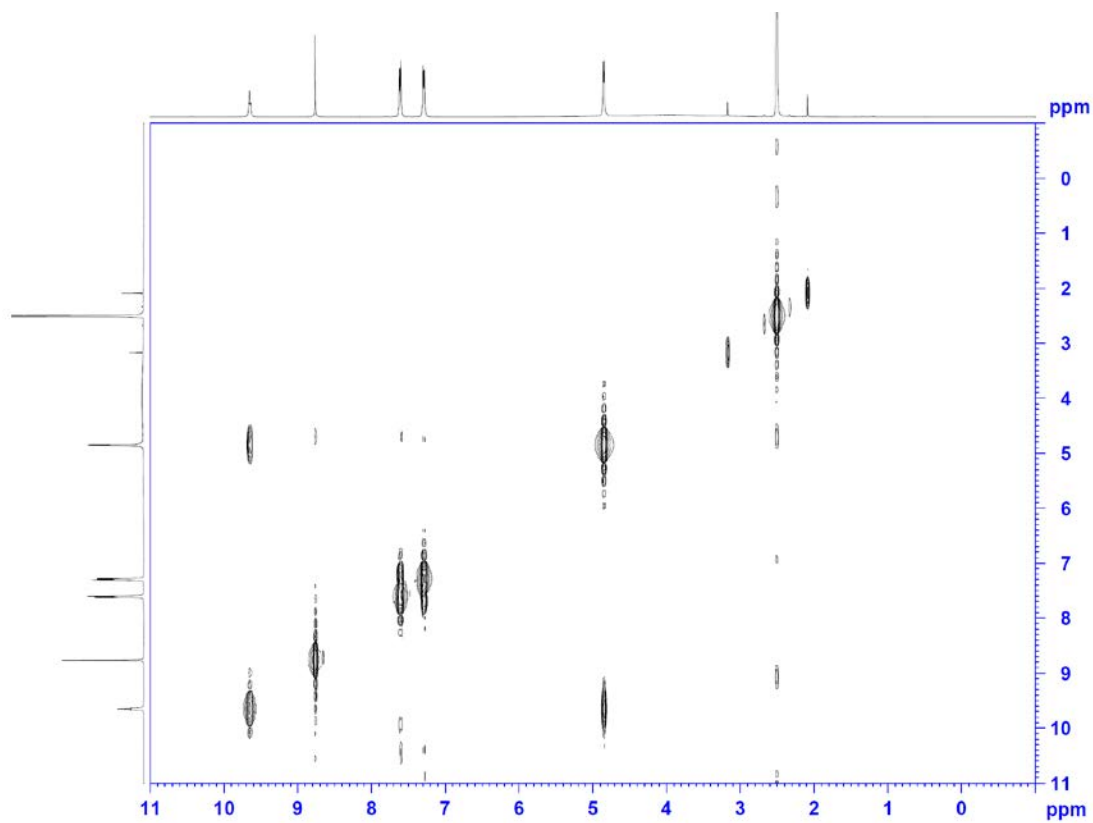
รูปที่ S.10 HSQC-NMR สเปกตรัมของลิแกนด์ **L5N** ในตัวทำละลาย DMSO-D6



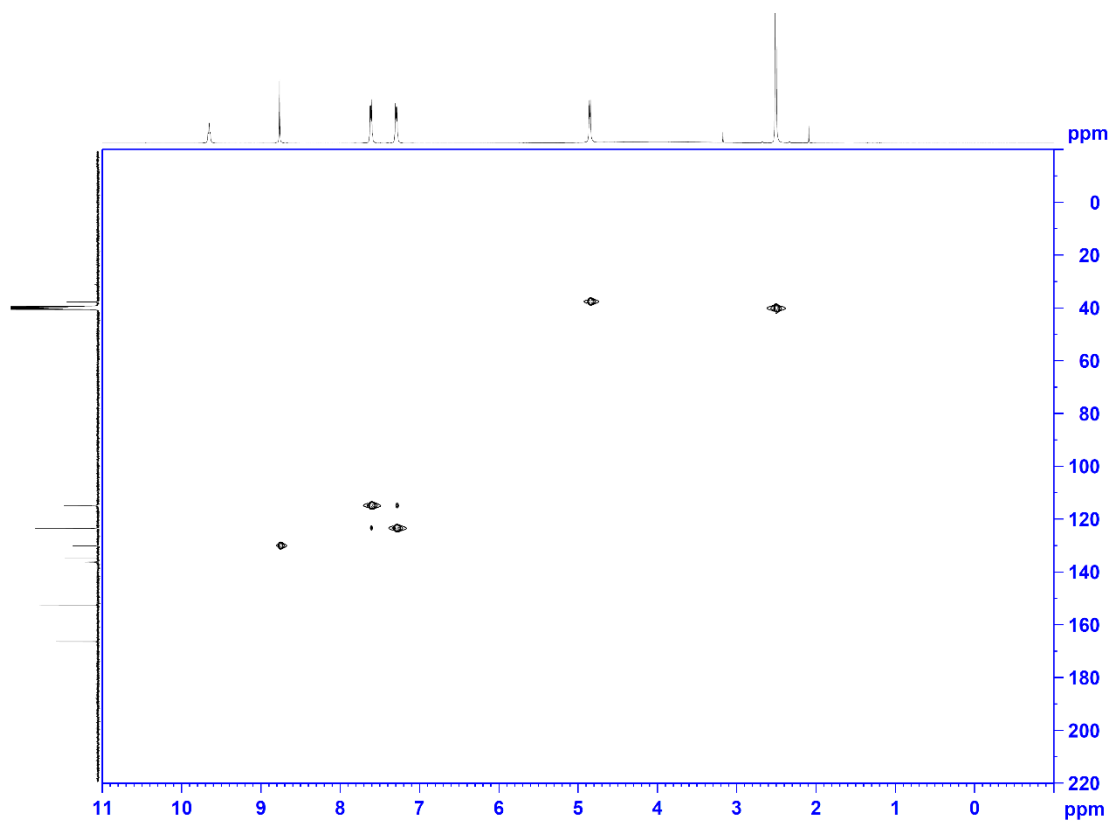
รูปที่ S.11 ^{13}C -NMR สเปกตรัมของลิแกนด์ **L6N** ในตัวทำละลาย DMSO-D6



รูปที่ S.12 DEPT135-NMR สเปกตรัมของลิแกนด์ **L6N** ในตัวทำละลาย DMSO-D6



รูปที่ S.13 COSY-NMR สเปกตรัมของลิแกนด์ **L6N** ในตัวทำละลาย DMSO-D6



รูปที่ S.14 HSQC-NMR สเปกตรัมของลิแกนด์ **L6N** ในตัวทำละลาย DMSO-D₆

ประวัตินักวิจัย

ชื่อ - สกุล	ดร.สรายุทธ เวชสิทธิ์
วันเกิด	3 มิถุนายน 2528
ภูมิลำเนา	155 หมู่ 10 ต.ห้วยแร้ง อ.เมือง จ.ตราด
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	ฝ่ายวิจัยและยุทธศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย บูรพา ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี
การศึกษา	
2547 – 2550	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
2551 – 2552	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
2553 – 2558	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนที่เคยได้รับ	
2551 – 2552	PERCH-CIC
2553 - 2558	The Royal Golden Jubilee Ph.D. Program