

อิทธิพลของโครงสร้างลิแกนด์ในการตรวจวัดกรดอะมิโนฮิสทีดิน
ด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ โดยใช้สารประกอบไดนิวเคลียร์คอปเปอร์ (II)
กับลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของแอนทราซีน

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

สรายุทธ เวชสิทธิ์¹ ธวัชชัย ตันทุลานี^{1*} และ จอมใจ สุกใส²

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

¹ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

² ศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

¹ Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University

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

Received : 13 September 2016

Accepted : 29 September 2016

Published online : 10 October 2016

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการนำแอนเซนเบิลที่เตรียมจากสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์คอปเปอร์ (II) กับลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของแอนทราซีน Cu_2L1 และ Cu_2L2 กับฟลูออเรสเซนต์อินดิเคเตอร์ Eosin Y มาใช้ในการตรวจวัดกรดอะมิโนฮิสทีดิน (His) ด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ โดยใช้สารละลาย 0.01 M HEPES บัฟเฟอร์ pH 7.4 ใน 80/20 (%v/v) MeCN/H₂O เป็นตัวทำละลาย จากการทดลองพบว่าค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดสารเชิงซ้อนระหว่างสารประกอบ Cu_2L1 และ Cu_2L2 กับอินดิเคเตอร์ Eosin Y มีค่า log K เท่ากับ 3.82 ± 0.25 และ 4.91 ± 0.33 ตามลำดับ จากการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำแอนเซนเบิลทั้งสองมาใช้ในการเป็นฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์สำหรับการตรวจวัดกรดอะมิโนฮิสทีดิน พบว่ามีเพียงแอนเซนเบิลที่เตรียมจากสารประกอบ Cu_2L2 และอินดิเคเตอร์ Eosin Y เท่านั้นที่สามารถนำไปใช้ในการตรวจวัด His ได้อย่างจำเพาะเจาะจง ในขณะที่แอนเซนเบิลที่เตรียมจากสารประกอบ Cu_2L1 นั้นสามารถถูกรบกวนได้จากกรดอะมิโนชนิดอื่นๆ ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์คอปเปอร์ (II) Cu_2L2 สามารถใช้เป็นรีเซปเตอร์สำหรับตรวจวัด His โดยใช้ฟลูออเรสเซนต์อินดิเคเตอร์ Eosin Y เป็นหน่วยให้สัญญาณด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์

คำสำคัญ : สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์คอปเปอร์ เทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์
ลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของแอนทราซีน กรดอะมิโนฮิสทีดิน ฟลูออเรสเซนต์เซ็นเซอร์

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

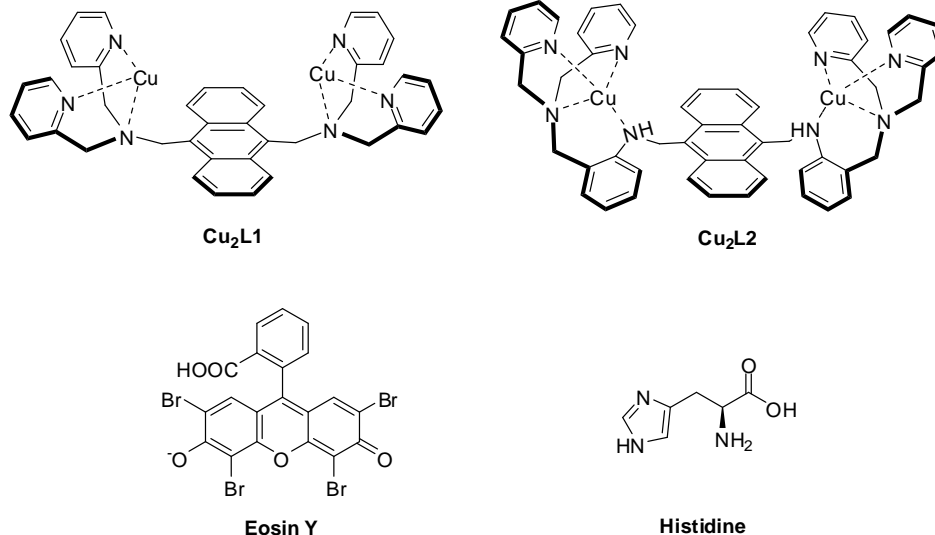
Abstract

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

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

บทนำ

ในระยะเวลาประมาณสองทศวรรษที่ผ่านมา นักวิจัยพบว่ามี การอุบัติใหม่ ของภาวะผิดปกติที่มีสาเหตุมาจากความผิดปกติของระดับสารเคมีในร่างกายของมนุษย์มากขึ้น อาทิเช่น ฮิสทรีโมเน แอนโอดอน และกรดอะมิโน ทำให้นักวิทยาศาสตร์ในปัจจุบันให้ความสนใจในการพัฒนาเทคนิคที่จะใช้สำหรับตรวจวัดปริมาณสารเคมีในเซลล์เหล่านี้มากขึ้น ในกลุ่มของกรดอะมิโนที่จำเป็น 20 ชนิด พบว่ากรดอะมิโนฮิสทรีดีน (His) มีบทบาทต่อกระบวนการต่างๆ ในร่างกายของมนุษย์ เช่น มีบทบาทในกระบวนการนำส่งกระแสประสาท (Sulliva Jr *et al.*, 1996) ในผู้ป่วยโรคพาร์คินสันพบว่า มีปริมาณฮิสทรีดีนในระดับต่ำกว่าปกติ (Nan *et al.*, 1999) ในขณะที่ผู้ป่วยภาวะบวมน้ำ (histidinemia) จะมีปริมาณ His สูงกว่าปกติ (Kovach & Meyerhoff, 1982) นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยพบว่า กรดอะมิโนฮิสทรีดีนได้ถูกนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในร่างกายของสัตว์ที่มีภาวะความดันโลหิตสูงขณะตั้งครรภ์ ซึ่งภาวะดังกล่าว นั้นจะมีปริมาณของไกลโคโปรตีนที่มีกรดอะมิโนฮิสทรีดีนเป็นองค์ประกอบหลัก (Histidine-Rich Glycoprotein หรือ HRG) (Bolin *et al.*, 2011) อยู่ในสภาวะที่ต่ำกว่าปกติ วิธีที่ใช้ในการตรวจวัดกรดอะมิโนฮิสทรีดีนที่ใช้ในปัจจุบันได้แก่ Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) (Kaspar *et al.*, 2008) และ Liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) (Tang *et al.*, 2008) แต่ปัญหาที่พบคือวิธีดังกล่าว นั้นมีข้อจำกัดที่ต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาแพงและต้องอาศัยผู้วิเคราะห์ที่มีความเชี่ยวชาญ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเสนอวิธีการตรวจวัดกรดอะมิโนฮิสทรีดีนด้วยโมเลกุลเซ็นเซอร์ทางเคมีเชิงแสงโดยอาศัยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ (Indicator displacement assay) (Wiskur *et al.*, 2001) โดยใช้สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์ของคอปเปอร์ (II) กับลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของแอนทราซีนที่มีหมู่ไดฟิโคลิลแอมีน ($\text{Cu}_2\text{L1}$) และลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของแอนทราซีนที่มีหมู่ไทโรโพลด์แอมีน ($\text{Cu}_2\text{L2}$) เป็นโมเลกุลรีเซปเตอร์ และใช้ฟลูออเรสเซนต์อินดิเคเตอร์ Eosin Y เป็นหน่วยให้สัญญาณในการตรวจวัด ซึ่งโครงสร้างของโมเลกุลที่ใช้ในงานวิจัยนี้แสดงได้ดังภาพที่ 1



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

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สารเคมี

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

2. อุปกรณ์และเครื่องมือ

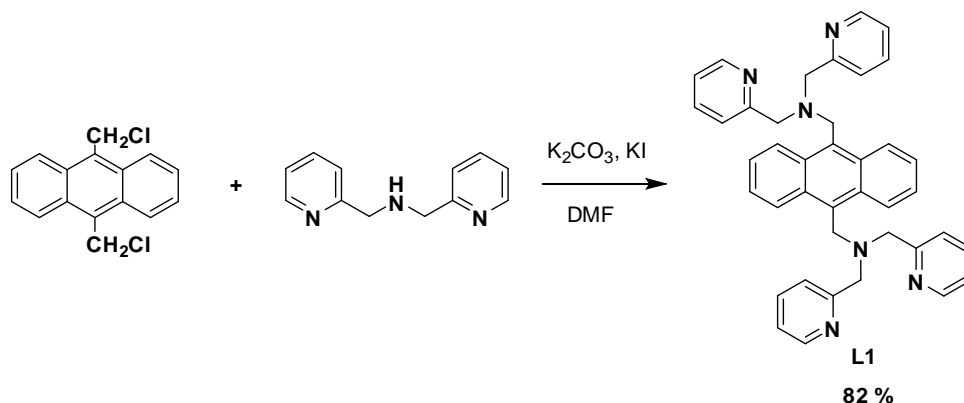
นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรมิเตอร์ ยี่ห้อ Bruker รุ่น AVANCE 400 และฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ Agilent รุ่น Cary Eclipse

3. วิธีการทดลอง

3.1 การสังเคราะห์ลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของแอนทราซีนที่มีหมู่ไดฟิโคลิลเอมีน

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

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

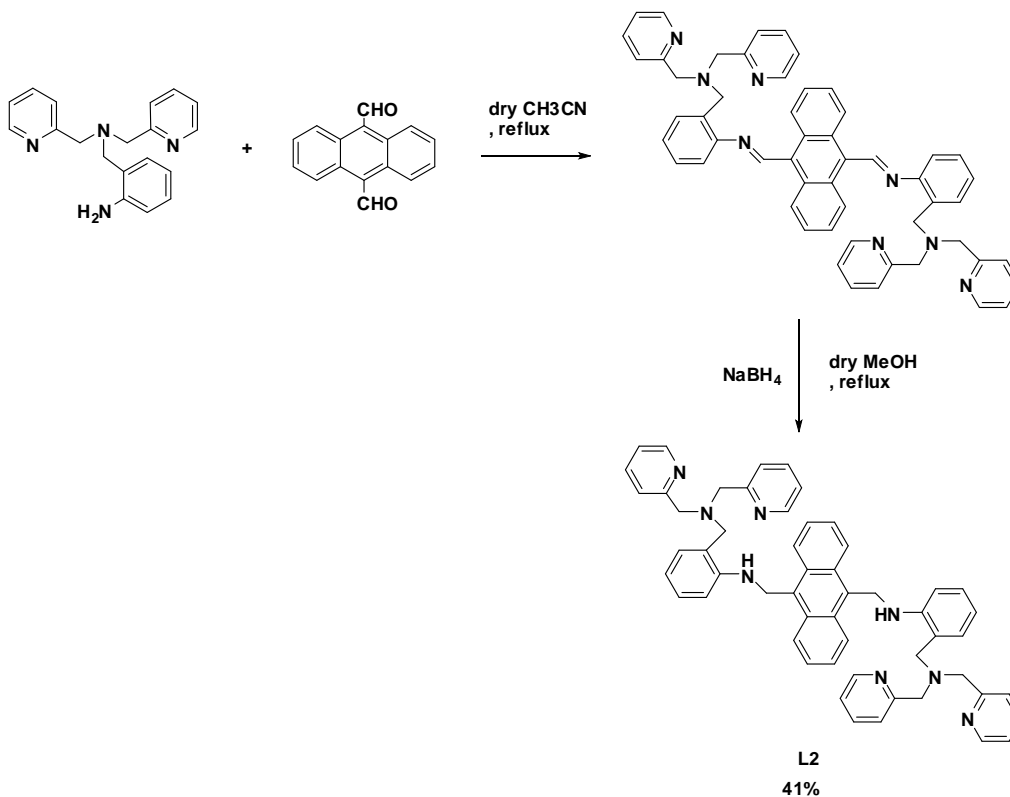


ภาพที่ 2 แผนภาพแสดงวิธีการสังเคราะห์ลิแกนด์ L1

3.2 การสังเคราะห์ลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของแอนทราซีนที่มีหมู่ไพโรพิดัลเอมีน

ละลายสารประกอบไพโรพิดัลเอมีน 1.93 กรัม ด้วย MeCN ที่ปราศจากน้ำ 50 มิลลิลิตร จากนั้นจึงเติม 9,10-diformylanthracene 0.64 กรัม ลงในสารละลายดังกล่าว ทำการรีฟลักซ์สารละลายผสมภายใต้บรรยากาศแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายโดยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบลดความดัน ได้ผลิตภัณฑ์เป็นของเหลวสีน้ำตาลแดง ทำการละลายสารผลิตภัณฑ์ดังกล่าวด้วย MeOH 100 มิลลิลิตร นำสารละลายผสมมาทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ -5 °C จากนั้นค่อยๆเติม NaBH_4 4.18 กรัม ลงในสารละลายผสม ทำการรีฟลักซ์สารละลายผสมภายใต้บรรยากาศแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำสารละลายมาทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้องและเติมน้ำ 150 มิลลิลิตร ลงในสารละลายดังกล่าว นำสารละลายผสมมาระเหย MeOH โดยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบลดความดัน จากนั้นนำส่วนที่เหลือมาสกัดด้วย CH_2Cl_2 ล้างด้วยน้ำครึ่งละ 100 มิลลิลิตร 3 ครั้ง และนำชั้น CH_2Cl_2 มากำจัดน้ำด้วย MgSO_4 ที่ปราศจากน้ำ นำสารละลายผสมที่ได้มาระเหย CH_2Cl_2 โดยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบลดความดัน และทำการตกผลึกด้วย $\text{CH}_3\text{OH} : \text{diethyl ether}$ (1:1 v/v) จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีเหลือง ร้อยละของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 41 (Watchasit *et al.*, 2014)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 8.45 (q, $J = 3.6$ Hz, 4H, ArH), 8.03 (d, $J = 4.4$ Hz, 4H, ArH), 7.58 (q, $J = 3.6$ Hz, 4H, ArH), 7.38 (t, $J = 8$ Hz, 2H, ArH), 7.18 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, ArH), 7.10 (d, $J = 8$ Hz, 2H, ArH), 6.73 (m, 10H, ArH), 6.51 (d, $J = 7.6$ Hz, 4H, ArH), 6.33 (s, 2H, -NH-), 5.28 (s, 4H, -CH₂-), 3.59 (s, 4H, -CH₂-), 3.52 (s, 8H, -CH₂-).
ESI-MS (positive mode); 811.4281 $[\text{M}+\text{H}]^+$.



ภาพที่ 3 แผนภาพแสดงวิธีการสังเคราะห์ลิแกนด์ L2

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

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

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

3.4 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์ของ Cu(II) กับลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของแอนทราซีนที่มีหมู่ไทโรโพลด์แอมีน (Cu₂L2)

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

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

3.5 การหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนเซมเบิลระหว่างอินดิเคเตอร์ Eosin Y กับสารประกอบโคออร์ดิเนชัน Cu₂L1 และ Cu₂L2 ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ไทเทรชัน

เปิดสารละลายอินดิเคเตอร์ Eosin Y ความเข้มข้น 1 μM ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในควิวเวท จากนั้นค่อยๆ ไทเทรตสารละลายของสารประกอบโคออร์ดิเนชันแต่ละชนิด ความเข้มข้น 20 μM ลงในควิวเวทดังกล่าวด้วยไมโครไซริงค์ หลังจากนั้นคนสารละลายให้เข้ากัน นำสารละลายเอนเซมเบิลที่ได้ไปวัดค่าความเข้มแสง โดยเครื่องฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ทำการไทเทรตจนกระทั่งค่าความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์คงที่ นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์กับความยาวคลื่น และคำนวณหาค่าคงที่ของการเกิดเอนเซมเบิลโดยใช้โปรแกรม SPECFIT (Binstead *et al.*, 2000)

3.6 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกับกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ของเอนเซมเบิล

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

3.7 การศึกษาอันตรกิริยาระหว่างการแทนที่ของ His กับสารประกอบของเอนเซมเบิลที่เกิดจากสารประกอบโคออร์ดิเนชัน Cu₂L2 กับอินดิเคเตอร์ Eosin Y

เปิดสารละลายอินดิเคเตอร์ Eosin Y ความเข้มข้น 1 μM ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในควิวเวท จากนั้นเปิดสารประกอบโคออร์ดิเนชัน Cu₂L2 ความเข้มข้น 20 μM ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในควิวเวทดังกล่าว คนสารละลายให้เข้ากัน นำสารละลายดังกล่าวไปวัดค่าความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ หลังจากนั้นเติมสารละลายของ His ความเข้มข้น

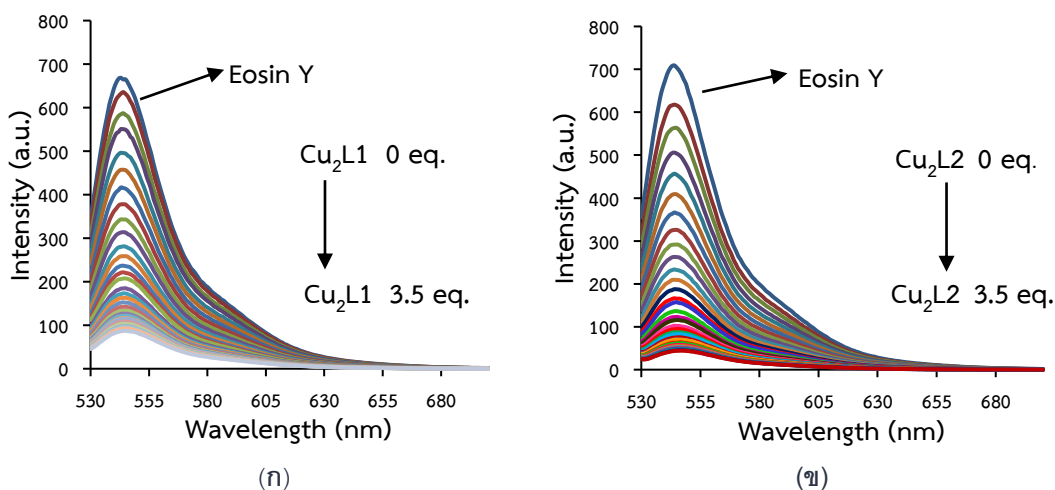
0.1 mM ครั้งละ 10 ไมโครลิตร ลงในคิวเวทดังกล่าว คนสารละลายให้เข้ากัน และนำไปวัดค่าความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ และนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์กับความยาวคลื่น และคำนวณหาค่าคงที่การเกิดของสารประกอบโคออร์ดิเนชันโดยใช้โปรแกรม SPECFIT

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

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

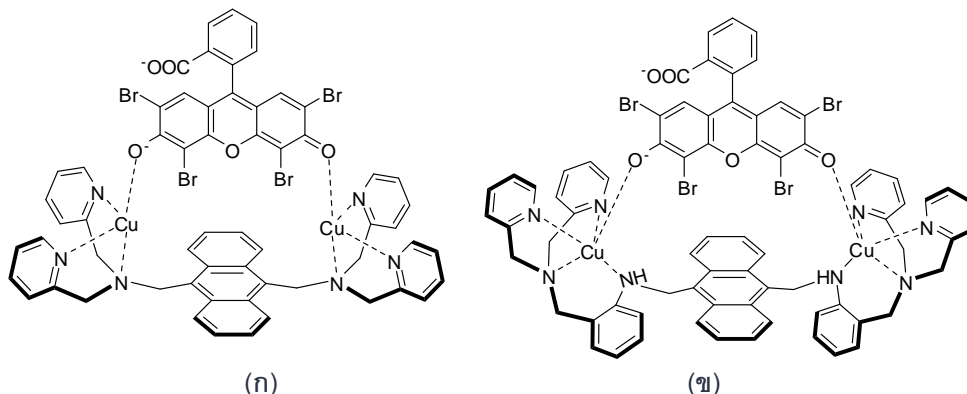
จากการทดลองพบว่าสารละลายอินดิเคเตอร์ Eosin Y มีค่าความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์สูงสุดที่ความยาวคลื่น 545 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 525$ nm) และเมื่อทำการไทเทรตสารละลายของสารประกอบโคออร์ดิเนชันของคอปเปอร์ (II) ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนลงไปยังสารละลายอินดิเคเตอร์ดังกล่าว พบว่าค่าความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของอินดิเคเตอร์ในรูปอิสระจะมีค่าลดลงเนื่องจากคอปเปอร์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

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



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

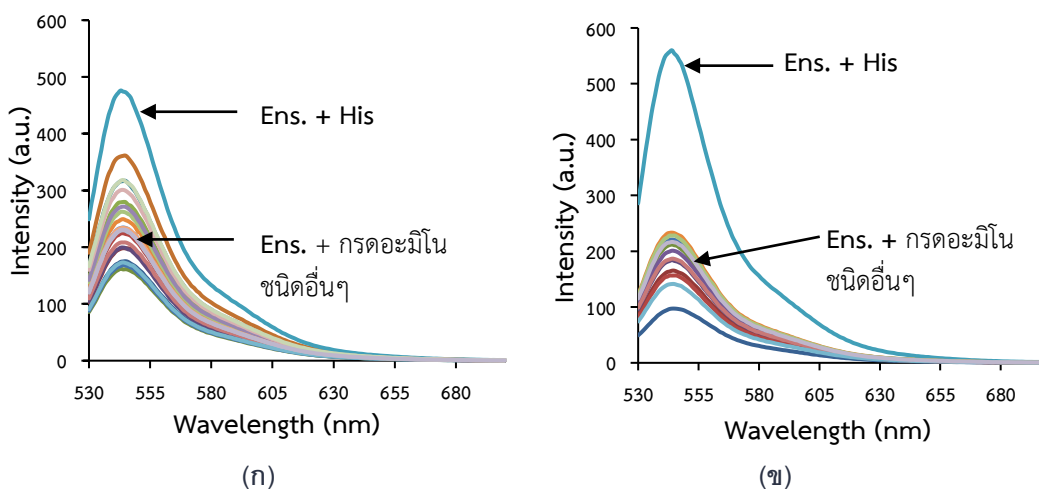
โครงสร้างที่เป็นไปได้ของเอนไซม์เบิลทั้งสองแสดงได้ในภาพที่ 5 จะเห็นได้ว่าอินดิเคเตอร์ Eosin Y ใช้ออกซิเจน 2 อะตอมของหมู่คีโตนและหมู่แอลกอฮอล์ ในการสร้างพันธะโคออร์ดิเนตโควาเลนต์กับ Cu^{2+} แต่ละอะตอมในโครงสร้างของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน (Zhang & Yoshida, 2011)



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

2. การศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกับกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ของเอนไซม์เบิล

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

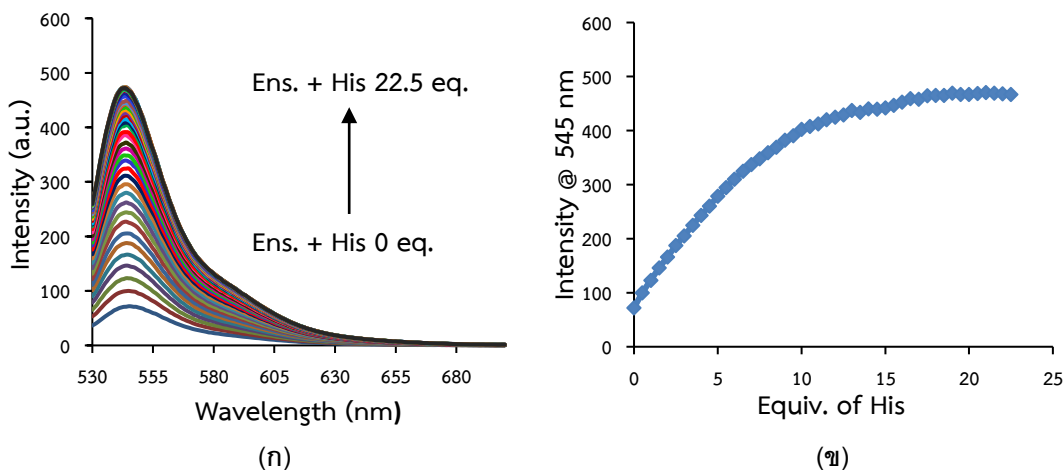


ภาพที่ 6 (ก) ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัมของสารละลายเอนไซม์เบิล [$\text{Cu}_2\text{L1}\cdot\text{Eosin Y}$] ในสภาวะที่มีกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ

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

ในสภาวะที่มีกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ 4 equivalents อยู่ในระบบ

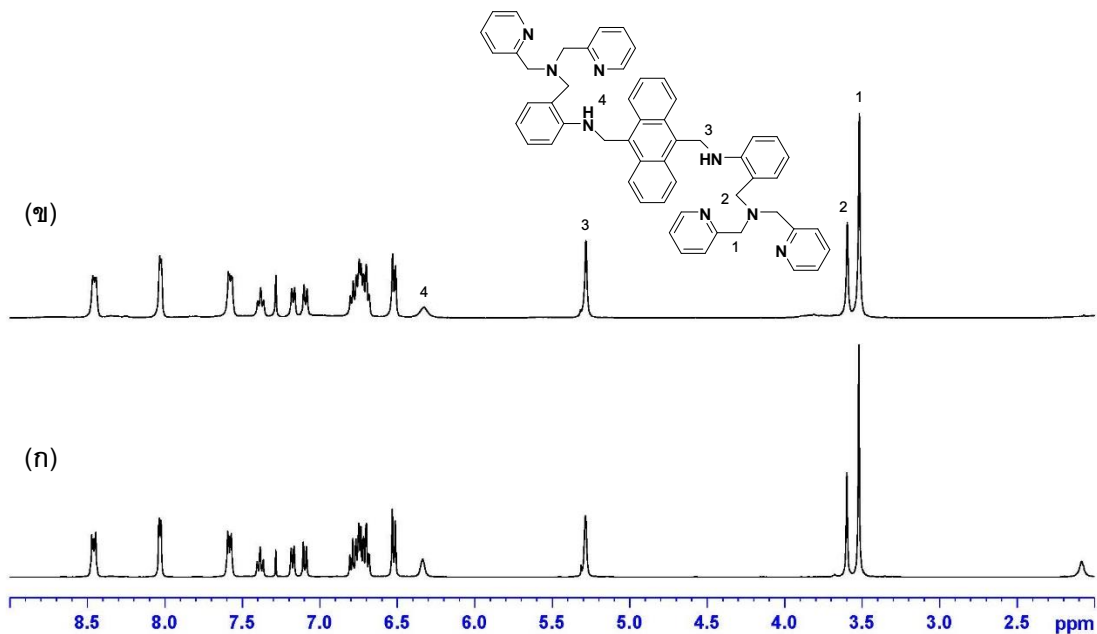
จากภาพที่ 7 จะเห็นได้ว่า เมื่อค่อย ๆ เติม His ลงไปยังสารละลายเอนไซม์ [Cu₂L2·Eosin Y] จะส่งผลให้ความเข้มข้นของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 545 nm มีเพิ่มขึ้น ทั้งนี้คาดว่า เป็นผลเนื่องมาจาก His อยู่ในระบบได้เข้าไปแทนที่ Eosin Y ในโครงสร้างเอนไซม์ [Cu₂L2·Eosin Y] และทำให้อินดิเคเตอร์ Eosin Y หลุดออกมาอยู่ในรูปอิสระ ส่งผลให้ความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของอินดิเคเตอร์ Eosin Y ในรูปอิสระที่ความยาวคลื่น 545 nm มีค่าเพิ่มขึ้น



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

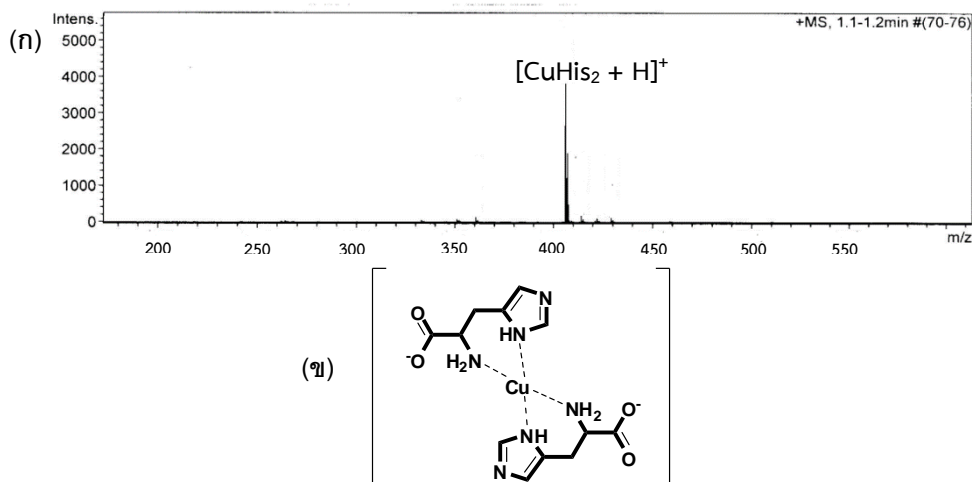
3. การศึกษาอันตรกิริยาระหว่างการแทนที่ของ His กับสารประกอบของเอนไซม์ [Cu₂L2·Eosin Y]

จากงานวิจัยของ Folmer-Andersen และคณะ (Folmer-Andersen *et al.*, 2005) ที่พบว่า His สามารถแทนที่อินดิเคเตอร์ 5(6)-carboxyfluorescein และลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของไพริดีน เกิดเป็นสารประกอบ [Cu·His₂] ในสารละลาย ซึ่งในงานวิจัยนี้พบว่าเมื่อค่อย ๆ เติมสารละลาย His ลงไปยังสารละลายของสารประกอบโคออร์ดิเนชัน Cu₂L2 เข้มข้น 1 mM พบว่ามีของแข็งสีเหลืองเกิดขึ้นในสารละลาย หลังจากนั้นกรองของแข็งที่ได้และนำไปพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิค ¹H-NMR พบว่า ¹H-NMR สเปกตรัมของของแข็งที่กรองได้มีลักษณะเหมือนกับ ¹H-NMR สเปกตรัมของลิแกนด์ L2 ในรูปอิสระ โดยที่ค่า δ ที่ 3.52 ppm เป็นโปรตอนของหมู่เมทิลลีน ที่ตำแหน่งโปรตอน 1 ค่า δ ที่ 3.59 ppm เป็นโปรตอนของหมู่เมทิลลีน ที่ตำแหน่งโปรตอน 2 ค่า δ ที่ 5.28 ppm เป็นโปรตอนของหมู่เมทิลลีน ที่ตำแหน่งโปรตอน 3 และค่า δ ที่ 6.33 ppm เป็นโปรตอนของหมู่แอมีนที่ตำแหน่งโปรตอน 4 ผลการทดลองดังกล่าวแสดงว่า His สามารถเข้าไปแทนที่ Eosin Y ลิแกนด์ L2 และได้สารประกอบ [Cu·His₂] ($\log K = 18.1$) เกิดขึ้นในสารละลายเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Anderson นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อนำสารละลายที่ได้จากการกรองเอาของแข็งสีเหลืองออกไปมาตั้งทิ้งไว้ 1 คืนจะได้ของแข็งสีฟ้า หลังจากนั้นจึงกรองของแข็งดังกล่าวและนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรีพบว่าพิกที่มีค่า m/z สูงสุดคือพิกที่ตำแหน่ง 404.1112 ซึ่งเป็นน้ำหนักโมเลกุลของสปีซีส์ [Cu·His₂ + H⁺] ดังแสดงในภาพที่ 9-ก



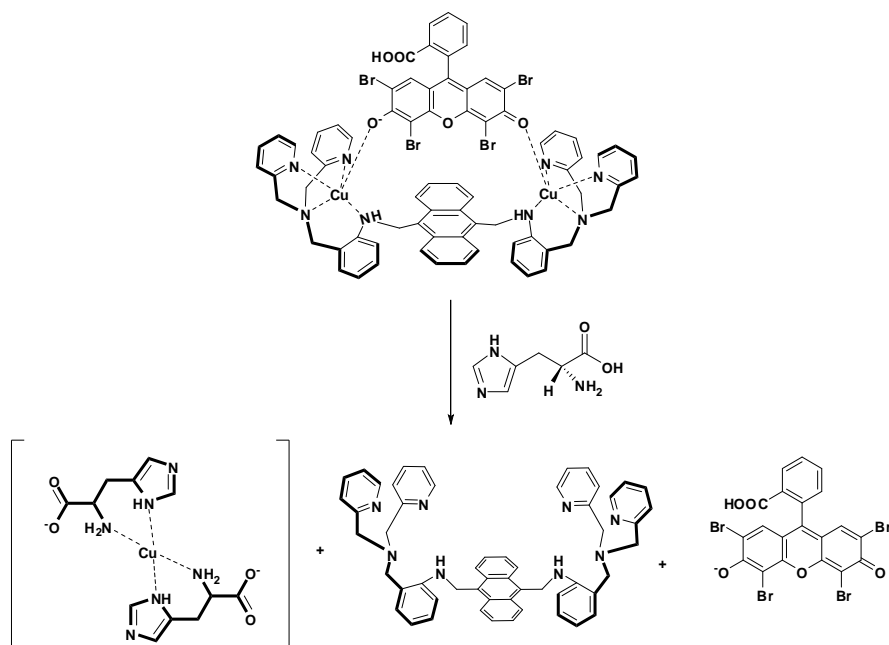
ภาพที่ 8 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของ (ก) ลิแกนด์ L2 ในรูปอิสระและ (ข) ของแข็งที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบ Cu_2L_2 และกรดอะมิโน His

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



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

จากโครงสร้างของสารประกอบ $[Cu \cdot His_2]$ จะเห็นได้ว่าเมื่อ His สร้างพันธะโคออร์ดิเนตโควาเลนต์กับไอออนคอปเปอร์ (II) แล้วจะทำให้ได้โครงสร้างที่เลตที่มีลักษณะเป็นวง 6 เหลี่ยม (six-membered rings) จึงส่งผลให้สารประกอบโคออร์ดิเนชันที่เกิดขึ้นมีความเสถียรสูง (Wada & Fernando, 1971) จากเหตุผลดังกล่าวจึงทำให้ His สามารถเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ Eosin Y และลิแกนด์ L2 ในโครงสร้างของเอนไซม์เบ็ด $[CuL_2 \cdot Eosin Y]$ ได้



ภาพที่ 10 ขั้นตอนการแทนที่ของ His กับสารประกอบของเอนไซม์เบ็ดที่เกิดจากสารประกอบโคออร์ดิเนชัน Cu_2L_2 กับอินดิเคเตอร์ Eosin Y

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาความเป็นไปได้ในการตรวจวัดกรดอะมิโนฮิสทีดีน (His) ด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์โดยใช้เอนไซม์เบ็ดที่เตรียมจากสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์ของคอปเปอร์ (II) กับลิแกนด์ที่มีหมู่ไดฟิโคลิลแอมีน Cu_2L_1 และหมู่ไทโรพิดัลแอมีน Cu_2L_2 เป็นองค์ประกอบกับอินดิเคเตอร์ Eosin Y ในสารละลายบัฟเฟอร์ 80/20 (%v/v) CH_3CN/H_2O ใน 0.01 M HEPES pH 7.4 จากการศึกษาการเกิดเอนไซม์เบ็ดของสารประกอบโคออร์ดิเนชันทั้งสองชนิดด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ไทเทรชัน พบว่าเมื่อทำการไทเทรตสารละลายสารประกอบโคออร์ดิเนชันไดนิวเคลียร์ของคอปเปอร์ (II) ลงไปยังสารละลาย Eosin Y จะทำให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 545 nm มีค่าลดลงเนื่องจากคอปเปอร์ (II) ไอออนเป็นตัว quencher ที่ดี ดังนั้นเมื่ออินดิเคเตอร์ Eosin Y เกิดพันธะโคออร์ดิเนชันกับคอปเปอร์ (II) ในสารประกอบจึงทำให้ความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของอินดิเคเตอร์ Eosin Y มีค่าลดลง โดยสารละลายเอนไซม์เบ็ดระหว่างสารประกอบโคออร์ดิเนชัน Cu_2L_1 กับ Eosin Y มีค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนไซม์เบ็ด ($\log K$) $[Cu_2L_1 \cdot Eosin Y]$ มีค่าเท่ากับ 3.82 ± 0.25 ส่วนสารละลายเอนไซม์เบ็ดระหว่างสารประกอบโคออร์ดิเนชัน Cu_2L_2 กับ Eosin Y มีค่า $\log K$ ของการเกิดเอนไซม์เบ็ด $[Cu_2L_2 \cdot Eosin Y]$ เท่ากับ 4.91 ± 0.33 จากค่า $\log K$ ของการเกิดเอนไซม์เบ็ดทั้งสองจะเห็นได้ว่าอินดิเคเตอร์

Eosin Y เกิดอันตรกิริยากับไอออนของ Cu^{2+} ในโครงสร้างของสารประกอบ Cu_2L_2 ได้แข็งแรงกว่าสารประกอบ Cu_2L_1 เนื่องจากในโครงสร้างของ Cu_2L_1 นั้นมีความยืดหยุ่นของโครงสร้างมากกว่า Cu_2L_2 ซึ่งเป็นผลมาจากการที่หมู่ไดฟิโคลิดแอมีนมีความเกะกะน้อยกว่า (steric effect) หมู่ไทรโพรตัลแอมีน จึงทำให้โครงสร้างของสารประกอบ Cu_2L_2 มีความแข็งแรงของโครงสร้างมากกว่าสารประกอบ Cu_2L_1 ส่งผลให้สามารถควบคุมระยะห่างระหว่างไอออนคอปเปอร์ (II) ได้ดีกว่าในสารประกอบ Cu_2L_1 และส่งผลให้อินดิเคเตอร์ Eosin Y สร้างพันธะโคออร์ดิเนตโควาเลนต์กับไอออนคอปเปอร์ (II) ในโครงสร้างของสารประกอบ Cu_2L_2 ได้อย่างแข็งแรง

เมื่อนำเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบโคออร์ดิเนชัน Cu_2L_1 และ Cu_2L_2 กับอินดิเคเตอร์ Eosin Y มาทำการศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกับกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ พบว่าเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบโคออร์ดิเนชัน Cu_2L_2 กับ Eosin Y มีความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกับกรดอะมิโนฮิสทีดีนได้เป็นอย่างดี ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากลไกการตรวจวัด His นั้นเกิดผ่านปฏิกิริยาการแทนที่ โดยที่ His เข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ Eosin Y และลิแกนด์ L2 ในสารประกอบ Cu_2L_2 เกิดเป็นสารประกอบโคออร์ดิเนชัน $[\text{Cu}\cdot\text{His}_2]$ และลิแกนด์ L2 กับอินดิเคเตอร์ Eosin Y ในรูปอิสระ ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า สารประกอบโคออร์ดิเนชันของคอปเปอร์ (II) (Cu_2L_2) สามารถใช้เป็นรีเซปเตอร์ในการตรวจวัดกรดอะมิโน His ด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ โดยใช้อินดิเคเตอร์ Eosin Y เป็นหน่วยให้สัญญาณ

กิตติกรรมประกาศ

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

เอกสารอ้างอิง

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

- Kovach, P. M., Meyerhoff, M. E. (1982). Development and Application of a Histidine-Selective Biomembrane Electrode. *Analytical Chemistry*, 54(2), 217-220.
- Liu, Z., Yang, Z., Li, T., Wang, B., Li, Y., Qin, D. Wang, M. Yana, M. (2011). An Effective Cu(II) Quenching Fluorescence Sensor in Aqueous Solution and 1D Chain Coordination Polymer Framework. *Dalton Transactions*, 40, 9370-9373.
- Nan, C. G., Ping, W. X., Ping, D. J., Qing, C. H. (1999). A Study on Electrochemistry of Histidine and Its Metabolites based on the Diazo Coupling Reaction. *Talanta*, 49, 319-330.
- Sullivan Jr, D. J., Gluzman, I. Y., Goldberg, D. E. (1996). Plasmodium Hemozoin Formation Mediated by Histidine-Rich Proteins. *Science*, 271, 219-222.
- Tang, F., Wu, K. K., Nie, Z., Ding, L., Liu, Q., Yuan, J., Guo, M., Yao, S. (2008). Quantification of Amino Acid Ionic Liquids Using Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1208, 175-181.
- Wada, H. & Fernando, Q. (1971). Determination of Formation Constants of Copper(II) Complexes of (Hydroxyethylidene) diphosphonic Acid with Solid State Cupric Ion- Selective Electrode. *Analytical Chemistry*, 43(6), 751–755.
- Watchasit, S., Suktanarak, P., Suksai, C., Ruangpornvisuti, V., Tuntulani, T. (2014). Discriminate Sensing of Pyrophosphate Using a New Tripodal Tetramine-Based Dinuclear Zn(II) Complex Under an Indicator Displacement Assay Approach. *Dalton Transactions*, 43, 14701-14709.
- Wiskur, S.L., Ait-Haddou, H., Lavigne, J.J., Anslyn, E.V. (2001). Teaching Old Indicators New Tricks. *Accounts of Chemical Research*, 34(12), 963-972.
- Zhang, J., Sun L., Yoshida T. (2011). Spectroelectrochemical Studies on Redox Reactions of Eosin Y and Its Polymerization with Zn²⁺ Ions. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 662, 384-395.