



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

### โครงการวิจัยเรื่อง

เซ็นเซอร์ทางเคมีเชิงแสงสำหรับการตรวจวัดไพโรฟอสเฟตแอนไอออน

ในอาหารทะเลแช่แข็งด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์

Optical Chemosensors for Determination of Pyrophosphate Anion

Additive in Frozen Seafood by Indicator Displacement Assay Approach

จอมใจ สุกใส

และ

สรายุทธ เวชสิทธิ์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้  
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)  
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560  
มหาวิทยาลัยบูรพา

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

### โครงการวิจัยเรื่อง

เซ็นเซอร์ทางเคมีเชิงแสงสำหรับการตรวจวัดไพโรฟอสเฟตแอนไอออน  
ในอาหารทะเลแช่แข็งด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์

Optical Chemosensors for Determination of Pyrophosphate Anion  
Additive in Frozen Seafood by Indicator Displacement Assay Approach

จอมใจ สุกใส

และ

สรายุทธ เวชสิทธิ์

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 555432

สัญญาเลขที่ 24/2560

ตุลาคม พ.ศ. 2559 – กันยายน พ.ศ. 2560

## กิตติกรรมประกาศ

---

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้อุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 24/2560

## Acknowledgement

---

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 24/2560).

## บทคัดย่อ

ได้พัฒนาเซ็นเซอร์ทางเคมีเชิงแสงสำหรับการตรวจวัดไพโรฟอสเฟตแอนไอออน (PPI) ในอาหารทะเลแช่แข็งด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ โดยทำการสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์ของคอปเปอร์ (II) และสังกะสี (II) กับลิแกนด์ L1 และ L2 หลังจากนั้นนำสารประกอบที่สังเคราะห์ได้ทั้ง 4 ชนิด มาศึกษาความเป็นไปได้ในการเลือกจับกับ PPI ด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ โดยใช้อินดิเคเตอร์ไพโรแคทีคอล ไวโอเลต หรือ PV เป็นหน่วยให้สัญญาณ ในตัวทำละลาย 10 mM HEPES บัฟเฟอร์ที่ pH 7.4 จากการศึกษาพบว่า มีเพียงแอนิเมเบิลที่เตรียมจากสารประกอบ ZnL2 กับ PV เท่านั้นที่มีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัด PPI เนื่องจากมีเพียง PPI เท่านั้นที่ทำให้สีของสารละลายแอนิเมเบิลของ [ZnL2•PV] เปลี่ยนจากสีฟ้าไปเป็นสีเขียวของอินดิเคเตอร์ PV ในรูปอิสระ ในขณะที่แอนไอออนชนิดอื่น ๆ ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของสารละลายแต่อย่างใด แสดงว่าอินดิเคเตอร์ PV ในโครงสร้างของแอนิเมเบิล [ZnL2•PV] สามารถถูกแทนที่ด้วย PPI ส่งผลให้ได้อินดิเคเตอร์ PV ในรูปอิสระกลับคืนมา ดังนั้นจึงสามารถนำแอนิเมเบิล [ZnL2•PV] ไปตรวจวัด PPI ในตัวอย่างจริงได้แม้ในสถานะที่มีแอนไอออนชนิดอื่นอยู่ในระบบ เมื่อนำแอนิเมเบิลดังกล่าวมาตรวจสอบปริมาณของ PPI ที่ใช้ในอาหารทะเลแช่แข็ง พบว่ามีปริมาณ PPI ที่สัมพันธ์กับค่าที่ระบุไว้ที่ภาชนะที่บรรจุ

## Abstract

Four dinuclear complexes copper (II) and zinc(II) with ligand **L1** and **L2** (**ML1** and **ML2**, where  $M = \text{Cu}^{2+}$  or  $\text{Zn}^{2+}$ ) have synthesized and employed as optical chemical sensor for determination of pyrophosphate (**PPi**) in frozen seafood using indicator displacement assay or IDAs. The sensing process was performed in 10 mM HEPES buffer at pH 7.4. The pyrocatechol violet or **PV** have used as the sensing indicator. It was found that only **[ZnL2•PV]** showed the highly selective sensing for **PPi** over the others ensembles. Because **PPi** displaced **PV** from **[ZnL2•PV]** ensembles resulted in the color changed from blue color of **[ZnL2•PV]** to green color of **PV** in the free form whereas the others anions could not. Therefore, **[ZnL2•PV]** have used for determination of **PPi** in frozen sea food. The results showed that the quantity of **PPi** related to the value of **PPi** specified on the package.

## สารบัญเรื่อง

บทที่	เรื่อง	หน้า
	กิตติกรรมประกาศ	i
	Acknowledgement	ii
	บทคัดย่อภาษาไทย	iii
	บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
	สารบัญเรื่อง	v
	สารบัญตาราง	vii
	สารบัญรูป	viii
<b>1</b>	<b>บทนำ</b>	
1.1	ที่มาและความสำคัญ	1
1.2	ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	3
1.3	การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง	6
1.4	วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	10
1.5	ขอบเขตของโครงการวิจัย	10
1.6	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	10
<b>2</b>	<b>วิธีดำเนินการวิจัย</b>	
2.1	เครื่องมือและอุปกรณ์	11
2.2	สารเคมี	11
2.3	วิธีการทดลอง	12
<b>3</b>	<b>ผลการวิจัยและอภิปราย</b>	
3.1	การสังเคราะห์ลิแกนด์ L1, L2 และสารประกอบโคออร์ดิเนชัน ML1 และ ML2	21
3.2	การศึกษาความเป็นไปได้และหาสภาวะของการทดลองที่เหมาะสมในการนำสารประกอบโคออร์ดิเนชันมาใช้ในการตรวจวัดไฟโรฟอสเฟต (PPi) ในระบบแบคทีเรีย	22
3.3	การศึกษาการเกิดเอนไซม์ระหว่างสารประกอบโคออร์ดิเนชัน ZnL2 และ PV ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมทรี	24



	3.4	การศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกับแอนไอออนของ เอนไซม์เบิล [ZnL <sub>2</sub> •PV] ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมทรี	25
<b>บทที่</b>	<b>เรื่อง</b>		<b>หน้า</b>
	3.5	การศึกษาผลการรบกวนของไอออนชนิดต่างๆ ต่อการตรวจวัด PPI โดยใช้เอนไซม์เบิล [ZnL <sub>2</sub> •PV] ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตร เมทรี	27
	3.6	การหาขีดจำกัดในการตรวจวัด (Detection of limit) สารละลาย PPI ด้วยเอนไซม์เบิล [ZnL <sub>2</sub> •PV] โดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตร เมทรี	28
	3.7	การตรวจวัด PPI ในอาหารทะเลแช่แข็งที่วางจำหน่ายใน ห้างสรรพสินค้าจังหวัดชลบุรี	29
<b>4</b>	<b>สรุปผลการวิจัย</b>		
	4.1	สรุปผลการวิจัย	30
	4.2	ข้อเสนอแนะ	30
		บรรณานุกรม	31
		ประวัตินักวิจัยและคณะ	33

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	สภาวะการทดลองสำหรับการหาค่าคงที่ของการเกิดเอนไซม์เบิระหว่าง สารประกอบโคออร์ดิเนชัน ML1 และ ML2 (R) กับอินดิเคเตอร์ PV	16
2.2	น้ำหนักของแอนไอออนชนิดต่างๆที่ใช้ในการเตรียมเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้น 0.01 M ปริมาตร 10 มิลลิลิตร	18
3.1	ปริมาณ PPI ที่ตรวจพบในอาหารทะเลแช่แข็งบางชนิดที่วางจำหน่ายใน ห้างสรรพสินค้าจังหวัดชลบุรี	29

## สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	โครงสร้างของ (ก) สารประกอบโคออร์ดิเนชันของคอปเปอร์(II) และสังกะสี (II) กับลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของไทรพอดัลเอมีน (ข) สารประกอบโคออร์ดิเนชันของคอปเปอร์(II) และสังกะสี(II) กับลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของฟิโคลิลเอมีน และ (ค) ไพรอโฟสเฟตแอนไอออน	3
1.2	กลไกการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ด้วยโมเลกุลสารที่สนใจ	4
1.3	โครงสร้างของอินดิเคเตอร์ PV, PGR, ZC, FLR และ MB9	4
3.1	โครงสร้างของลิแกนด์ L1, L2 และสารประกอบโคออร์ดิเนชัน ML1 และ ML2 (เมื่อ M คือไอออน $Cu^{2+}$ และ $Zn^{2+}$ )	21
3.2	การเปลี่ยนสีของสารละลายแอนเซมเบลที่เตรียมจากอินดิเคเตอร์ PV กับสารประกอบโคออร์ดิเนชัน (ก) $CuL1$ , (ข) $ZnL1$ , (ค) $CuL2$ และ (ง) $ZnL2$ ในสถานะที่มีไอออนลบชนิดต่าง ๆ อยู่ในระบบ โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ HEPES ความเข้มข้น 10 mM pH 7.4 เป็นตัวทำละลาย	23
3.3	สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลาย PV เมื่อทำการไทเทรตสารละลาย $ZnL2$ ลงไปยังสารละลายดังกล่าว	24
3.4	การหาอัตราส่วนในการเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสาร $ZnL2$ ความเข้มข้น 20 $\mu M$ กับสารละลาย PV ความเข้มข้น 20 $\mu M$ โดยวิธี Job's Method ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรเมทรี	25
3.5	สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของแอนเซมเบล [ $ZnL2 \cdot PV$ ] ที่มีแอนไอออนชนิดต่าง ๆ อยู่ในระบบ	26
3.6	สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลาย [ $ZnL2 \cdot PV$ ] เมื่อเติมสารละลาย PPI ความเข้มข้น 1 mM ในตัวทำละลาย 10 mM pH 7.4 HEPES	26
3.7	การเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 659 nm ของสารละลายแอนเซมเบล [ $ZnL2 \cdot PV$ ] กับแอนไอออนชนิดต่างๆในตัวทำละลาย HEPES บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 mM pH 7.4 เมื่อกำหนดให้ (1) Pi, (2) = PPI, (3) = ACO, (4) = AMP, (5) = ADP, (6) = ATP, (7) = CN <sup>-</sup> , (8) = NaOx, (9) = Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , (10) = Na <sub>2</sub> NO <sub>3</sub> , (11) = Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , (12) = NaHCO <sub>3</sub> , (13) = AcO, (14) = BzO, (15) = KSCN,	27

(16) = NaOH , (17) = NaI , (18) = NaBr , (19) = NaCl , (20) = NaF

3.8 การหาขีดจำกัดในการตรวจวัดสารละลาย PPI โดยใช้สารเชิงซ้อน 28

[ZnL<sub>2</sub>•PV] ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปคโตรสโคปี เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย [ZnL<sub>2</sub>•PV] ที่มีสารละลาย PPI ความเข้มข้นต่างๆ

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ที่มาและความสำคัญ

ในปัจจุบันประเทศไทยอยู่ในกลุ่มประเทศที่เป็นผู้นำในการส่งออกผลิตภัณฑ์อาหารทะเลของโลกและการส่งออกดังกล่าวได้นำรายได้เข้าสู่ประเทศไทยเป็นจำนวนมาก โดยผลิตภัณฑ์ที่ส่งออกส่วนมากอยู่ในรูปอาหารทะเลแช่แข็ง แต่ในช่วงระยะเวลา 2-3 ปี ที่ผ่านมาประเทศไทยต้องเผชิญกับปัญหาการแข่งขันที่สูงมากขึ้นทั้งจากคู่แข่งที่สำคัญคือประเทศเวียดนามที่มีอัตราการเจริญเติบโตทางเศรษฐกิจอย่างรวดเร็วและการที่ประเทศไทยไม่สามารถเพิ่มปริมาณการส่งออกเพิ่มได้อันเป็นผลมาจากข้อจำกัดทางด้านปัญหาสิ่งแวดล้อมรวมถึงปัญหาของต้นทุนการผลิตที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นการเพิ่มมูลค่าของสินค้ารวมทั้งการรักษาคุณภาพของอาหารทะเลแช่แข็งจึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกของอุตสาหกรรมการส่งออกอาหารทะเลแช่แข็งของไทย<sup>(1)</sup>

ปัญหาหนึ่งที่มีมักจะพบบ่อยในอาหารทะเลแช่แข็งคือ ก่อนที่เราจะนำอาหารทะเลแช่แข็งมาปรุงอาหารเพื่อการบริโภคจะต้องผ่านขั้นตอนการละลายและการปรุง ซึ่งในขั้นตอนนี้เนื้อจะสูญเสียน้ำหนักไปเป็นปริมาณมากโดยสาเหตุมาจากขณะที่เป็นน้ำแข็ง น้ำจะถูกเปลี่ยนโครงสร้างเกิดผลึกซึ่งมีความคมและเนื้อเยื่อมีการหดตัวกลไกนี้ทำให้ผนังเซลล์ถูกทำลาย เมื่อนำมาละลายของเหลวที่อยู่ภายในเซลล์ก็จะไหลออกมาด้วยทำให้เกิดการสูญเสียน้ำหนักในปริมาณมากกว่าปกติ นอกจากนี้โครงสร้างของเนื้อเยื่อก็เปลี่ยนแปลงไปด้วยทำให้รสชาติความเหนียวนุ่มเปลี่ยนแปลงไป จากปัญหานี้ทำให้มีการนำสารกลุ่มโพลีฟอสเฟตเข้ามาใช้จุ่มเคลือบผิวของอาหารก่อนนำไปแช่แข็งเพื่อช่วยลดการสูญเสีย น้ำหนัก<sup>(6,19)</sup> เช่น โซเดียมไพโรฟอสเฟต (pyrophosphate หรือ PPI), โซเดียมไตรฟอสเฟต และ โซเดียมเฮกซะเมตาฟอสเฟต เนื่องจากสารประกอบอินทรีย์ฟอสเฟตเหล่านี้มีคุณสมบัติรักษาคุณภาพของเนื้อสัตว์ได้ เช่น ช่วยเพิ่มความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อ ช่วยให้เนื้อมีคุณภาพทางเนื้อสัมผัสและประสาทสัมผัสที่ดีขึ้น (ความนุ่ม ความฉ่ำน้ำ สี กลิ่นและรส)<sup>(7,13)</sup>

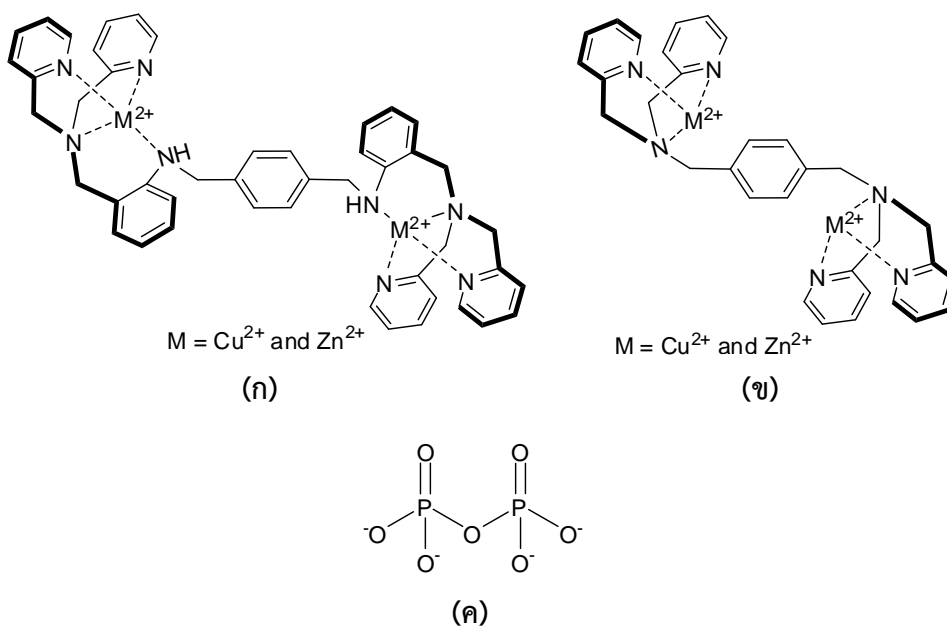
ถึงแม้ว่าจะมีการอนุญาตให้ใช้สารประกอบฟอสเฟตในอุตสาหกรรมอาหารอย่างแพร่หลายแต่ก็มีการกำหนดปริมาณที่อนุญาตให้ใช้ได้ในระดับที่ไม่มีอันตรายต่อผู้บริโภค โดยมีรายงานพบว่า หากผู้บริโภคได้รับฟอสเฟตในปริมาณมากจะส่งผลให้เกิดอาการระคายเคืองบริเวณผิวหนังและเยื่อต่างๆ ซึ่งความรุนแรงของอาการจะขึ้นอยู่กับปริมาณสารโพลีฟอสเฟตที่เรารับประทานเข้าไป และภูมิคุ้มกันของร่างกายในแต่ละบุคคล และนอกจากนี้ยังพบว่า การได้รับฟอสเฟตปริมาณมากทำให้เกิดโรคกระดูกพรุนได้ง่ายในผู้ที่มีภาวะไตทำงานไม่ปกติ<sup>(4,14)</sup> สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตในอาหารทะเลแช่

แข็งที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันได้แก่ การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตรี<sup>(10)</sup> และเทคนิค High Performance Liquid Chromatography หรือ HPLC<sup>(23)</sup> แต่อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ฟอสเฟตในอาหารทะเลแช่แข็งด้วยเทคนิคเหล่านี้ล้วนมีข้อจำกัด เช่น ไม่สามารถวิเคราะห์จำแนกชนิดของสารประกอบฟอสเฟตได้ ต้องอาศัยขั้นการเตรียมตัวอย่างวิเคราะห์ที่ยุ่งยากและจำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง ดังนั้นนักวิจัยจึงมุ่งหวังที่จะพัฒนาเทคนิคในการตรวจวัดสารประกอบฟอสเฟตแบบใหม่ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยเทคนิคหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจอย่างมากคือ เทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ (Indicator Displacement Assays หรือ IDAs)<sup>(16,22)</sup> เป็นวิธีการหนึ่งที่ยอมรับใช้ในงานทางเซ็นเซอร์เคมีในปัจจุบัน โดยอาศัยการเกิดอันตรกิริยาแบบนอน-โควาเลนต์ระหว่างตัวรับ (receptor) กับอินดิเคเตอร์ที่ทำหน้าที่เป็นหน่วยให้สัญญาณ (sensory unit) การตรวจวัดสารที่สนใจ (analyte) ด้วยวิธีการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์นั้น จะมีการแข่งขันกันระหว่างสารที่สนใจกับอินดิเคเตอร์ ซึ่งการตรวจวัดจะเกิดขึ้นเมื่อสารที่สนใจสามารถเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ที่เชื่อมต่ออยู่กับโมเลกุลของรีเซปเตอร์ได้ โดยสามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงการเกิดอันตรกิริยาระหว่างรีเซปเตอร์กับโมเลกุลของสารที่สนใจได้จากการเปลี่ยนแปลงสัญญาณในรูปแบบต่างๆ โดยใช้เครื่องมือวิเคราะห์ที่ไม่ยุ่งยาก หรืออาจสังเกตได้จากการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายด้วยตาเปล่า ซึ่งการตรวจวัดสารที่สนใจด้วยวิธีการดังกล่าวจะมีความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจวัดได้เป็นอย่างดี

ภาคตะวันออกของประเทศไทยเป็นแหล่งอาหารทะเลที่สำคัญแหล่งหนึ่งของประเทศ และเนื่องจากทางคณะผู้วิจัยได้ประสบความสำเร็จในการพัฒนาเซ็นเซอร์ทางเคมีเชิงแสงสำหรับการตรวจวัดแอนไอออนด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์<sup>(20,21)</sup> ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาการตรวจวัดไพโรฟอสเฟตแอนไอออน (pyrophosphate anion หรือ PPI) ในอาหารทะเลแช่แข็งด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ โดยใช้สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์ของคอปเปอร์ (II) และซิงค์(II) กับลีแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของฟิโคลิลเอมีนเป็นโมเลกุลรีเซปเตอร์ และใช้อินดิเคเตอร์ชนิดต่าง ๆ ที่มีความเหมาะสมในการตรวจวัดเป็นหน่วยให้สัญญาณ โครงสร้างของสารประกอบโคออร์ดิเนชันที่ใช้ในงานวิจัยนี้และโครงสร้างของไพโรฟอสเฟตแอนไอออน แสดงได้ดังรูปที่ 1.1 โดยอาหารทะเลแช่แข็งที่นำมาใช้เป็นตัวอย่างในงานวิจัยนี้เป็นอาหารทะเลแช่แข็งที่มีแหล่งผลิตในพื้นที่ภาคตะวันออก

โครงการวิจัยที่ได้เสนอนี้เป็นการวิจัยในลักษณะบูรณาการเชิงยุทธศาสตร์ที่มีการบูรณาการใน 3 มิติ ได้แก่ มิติงานตามยุทธศาสตร์พื้นที่ มิติงานตามยุทธศาสตร์กระทรวง/แรงงาน และมิติยุทธศาสตร์สำคัญของรัฐบาลที่ตอบสนองนโยบายของการขับเคลื่อน Thailand 4.0 กล่าวคือเป็นงานวิจัยที่มีการทำวิจัยและเก็บตัวอย่างอาหารทะเลแช่แข็งที่มีแหล่งการผลิตในจังหวัดแถบภาคตะวันออก และยังเป็น

งานวิจัยและพัฒนาในกลุ่มเทคโนโลยีในกลุ่มอาหาร เกษตรและเทคโนโลยีชีวภาพ และกลุ่มสาธารณสุข สุขภาพและเทคโนโลยีทางการแพทย์ นอกจากนี้แล้วข้อเสนอโครงการวิจัยดังกล่าวยังสอดคล้องกับ ยุทธศาสตร์วิจัยของมหาวิทยาลัยบูรพามุ่งสู่ความเป็นเลิศในศาสตร์ด้านศาสตร์ทางทะเล



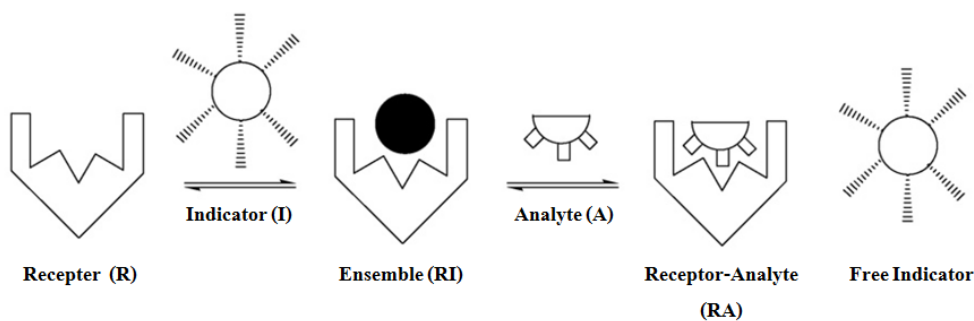
**รูปที่ 1.1** โครงสร้างของ (ก) สารประกอบโคออร์ดิเนชันของคอปเปอร์(II) และสังกะสี(II) กับลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของไทรพอดัลเอมีน L1 (ข) สารประกอบโคออร์ดิเนชันของคอปเปอร์(II) และสังกะสี(II) กับลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของพิโคลิลเอมีน L2 และ (ค) ไฟโรฟอสเฟตแอนไอออน

## 1.2 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

### 1.2.1 เทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์

เทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ (IDAs)<sup>(16,22)</sup> เป็นวิธีหนึ่งที่ยอมรับใช้ในงานทางเซ็นเซอร์เคมีในปัจจุบัน โดยอาศัยการเกิดอันตรกิริยาแบบนอน-โควาเลนต์ระหว่างตัวรับ (receptor) กับอินดิเคเตอร์ (indicator) ที่ทำหน้าที่เป็นหน่วยให้สัญญาณโดยที่อันตรกิริยาดังกล่าวสามารถเกิดการผันกลับได้ การตรวจวัดสารที่สนใจ (analyte) ด้วยวิธีการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์นั้น จะมีการแข่งขันกันระหว่างสารที่สนใจกับอินดิเคเตอร์ ซึ่งการตรวจวัดจะเกิดขึ้นเมื่อสารที่ต้องการทำการตรวจวัดสามารถเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ที่เชื่อมต่อกับโมเลกุลของรีเซปเตอร์ได้ โดยสามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงการเกิดอันตรกิริยาระหว่างรีเซปเตอร์กับโมเลกุลของสารที่สนใจได้จากการเปลี่ยนแปลงสัญญาณในรูปแบบ

ต่างๆ ขึ้นอยู่กับชนิดของอินดิเคเตอร์ หรืออาจสังเกตได้จากการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย ซึ่งสีของสารละลายที่เกิดขึ้นในขั้นแรกจะเป็นสีของสารละลายระหว่างรีเซปเตอร์กับอินดิเคเตอร์ หรือที่เรียกว่า เอนเซมเบิล (ensemble) โดยสีของสารละลายเอนเซมเบิลจะต้องมีความแตกต่างจากสีของอินดิเคเตอร์ในรูปอิสระอย่างชัดเจน เมื่อโมเลกุลสารที่สนใจเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ในสารละลายเอนเซมเบิลได้ จะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนสีของสารละลายจากสีของเอนเซมเบิลไปเป็นสีของอินดิเคเตอร์อิสระ สิ่งที่สำคัญที่จะทำให้ระบบดังกล่าวมีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดคือการที่โมเลกุลของสารที่สนใจสามารถเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ได้นั้นค่าคงที่ความเสถียรของสารประกอบระหว่างสารที่สนใจกับหน่วยเลือกจับ ( $K_{RA}$ ) จะต้องมีค่ามากกว่าค่าคงที่ความเสถียรของสารประกอบของเอนเซมเบิล ( $K_{RI}$ ) ซึ่งกลไกการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ด้วยโมเลกุลสารที่สนใจแสดงได้ดังรูปที่ 1.2

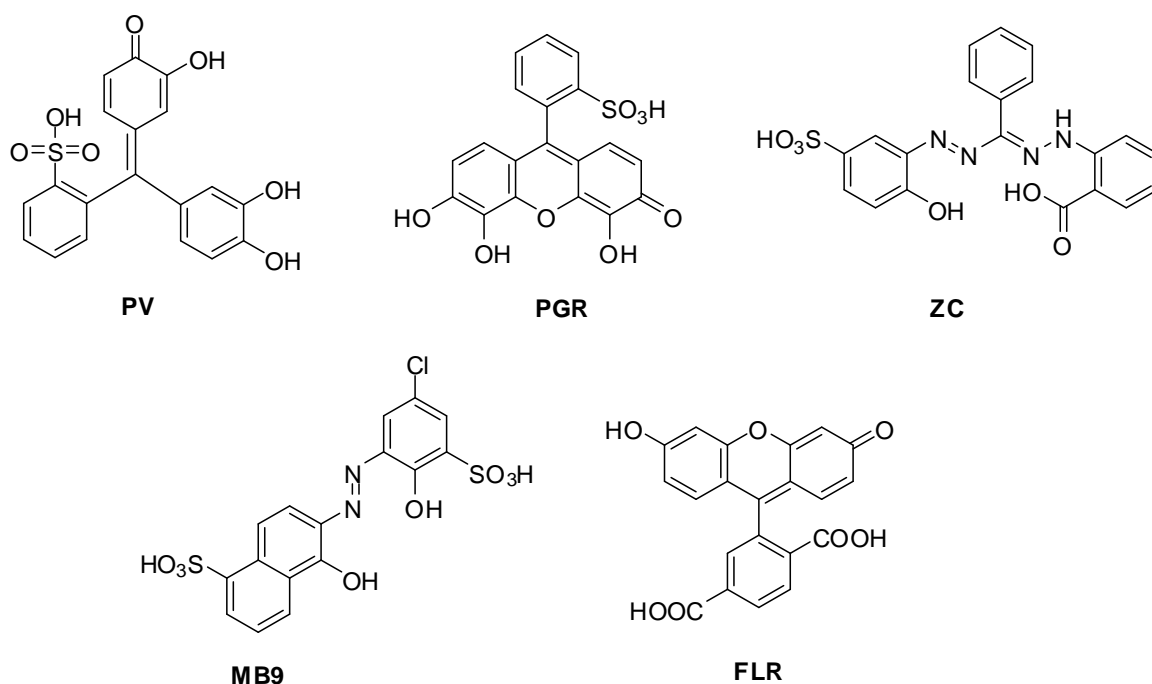


รูปที่ 1.2 กลไกการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ด้วยโมเลกุลสารที่สนใจ

### รูปที่ 1.2 กลไกการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ด้วยโมเลกุลสารที่สนใจ

ตัวอย่างของอินดิเคเตอร์ที่นำมาใช้ในเทคนิค IDA ได้แก่ Pyrocatechol Violet (PV), Pyrogallol Red (PGR), Zincon (ZC), fluorescein (FLR), Mordant Blue 9 (MB 9) เป็นต้น โครงสร้างของอินดิเคเตอร์ดังกล่าวแสดงดังรูปที่ 1.3





รูปที่ 1.3 โครงสร้างของอินดิเคเตอร์ PV, PGR, ZC, FLR และ MB9

เทคนิค IDA เป็นวิธีการที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจวัดสารที่สนใจได้ทั้งแคทไอออนและแอนไอออน ซึ่งเทคนิคดังกล่าวเป็นวิธีการตรวจวัดที่มีข้อดีกว่าการใช้โมเลกุลทางเซ็นเซอร์เคมีในการตรวจวัดโดยตรง เนื่องจาก IDA เป็นเทคนิคที่อาศัยการเกิดอันตรกิริยาแบบนอนโควาเลนต์ในการเชื่อมต่อกันระหว่างโมเลกุลของรีเซปเตอร์กับอินดิเคเตอร์ จึงทำให้ง่ายและไม่เสียเวลามากในการเตรียมเซ็นเซอร์เพื่อใช้ในการตรวจวัด รวมทั้งยังสามารถเปลี่ยนชนิดของอินดิเคเตอร์ที่นำมาใช้ในการเชื่อมต่อกับโมเลกุลของรีเซปเตอร์ ชนิดเดียวกันได้ ด้วยประโยชน์และข้อดีต่างๆที่กล่าวมาข้างต้นจึงทำให้เป็นที่นิยมใช้เทคนิค IDA ในการตรวจวัดแอนไอออนที่มีความสำคัญต่อกระบวนการทางชีวภาพต่างๆ ได้แก่ การตรวจวัดกรดอะมิโนฮิสทีดีน เป็นต้น<sup>(17)</sup>

### 1.2.2 ความสำคัญของแอนไอออนไพโรฟอสเฟต

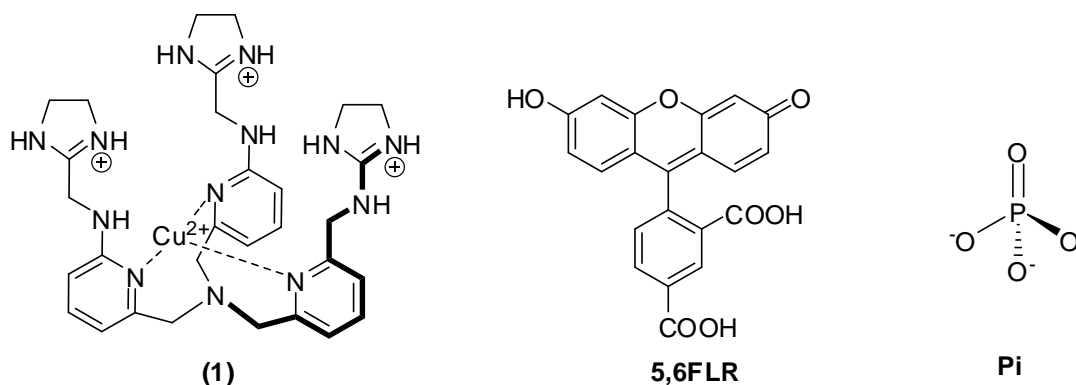
ไพโรฟอสเฟต ( $P_2O_7^{4-}$ , PPI) เป็นสารเคมีชนิดหนึ่งในกลุ่มสารประกอบอินทรีย์ฟอสเฟตที่นิยมนำมาใช้รักษาคุณภาพของอาหารทะเลแช่แข็ง เนื่องจากสารประกอบไพโรฟอสเฟตมีคุณสมบัติรักษาคุณภาพของเนื้อสัตว์ได้เช่น ช่วยเพิ่มความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อสัตว์ ช่วยให้เนื้อสัตว์มีคุณภาพทางเนื้อสัมผัสและประสาทสัมผัสที่ดีขึ้น (ความนุ่ม ความฉ่ำน้ำ สี กลิ่นและรส)<sup>(7,13)</sup> และช่วยยืดอายุการเก็บรักษา โดยลด Freezer burn ซึ่งเกิดจากการสูญเสียน้ำของอาหารแช่แข็ง ลดอัตราการเหม็นหืนอันเป็นสาเหตุมาจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในเนื้อสัตว์ แต่อย่างไรก็ตามหากมีการใช้ไพโรฟอสเฟตในปริมาณมากเกินไปจะส่งผลให้เนื้อสัตว์มีลักษณะแข็งตึง โปร่งใสคล้ายแก้ว (ลักษณะดังกล่าวจะสังเกตเห็นชัด

ในผลิตภัณฑ์กึ่งแข็งและเนือปลาแข็ง) และเนื้อที่มีลักษณะเป็นเมือก<sup>(2,8)</sup> โดยตามมาตรฐานของประเทศแคนาดา สินค้าประมงแข็งที่อนุญาตให้นำเข้าต้องมีปริมาณไพโรฟอสเฟตที่อนุญาตให้ตรวจพบได้โดยอ้างอิงตาม background level ของผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำไม่เกิน 0.5%<sup>(3)</sup>

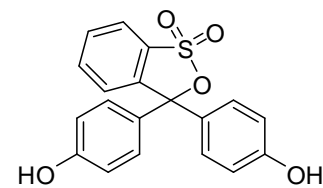
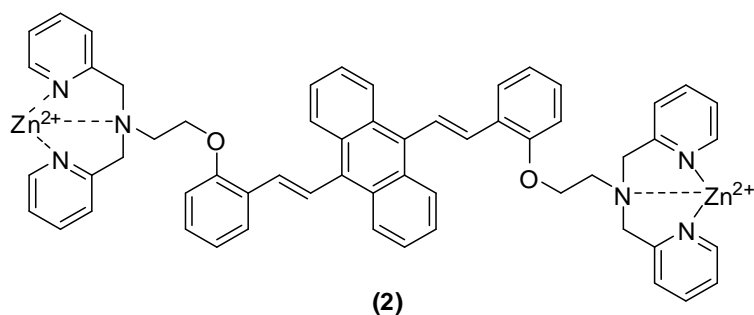
ถึงแม้ว่าจะมีการอนุญาตให้ใช้สารประกอบไพโรฟอสเฟตในอุตสาหกรรมอาหารอย่างแพร่หลาย แต่ก็มีข้อกำหนดปริมาณที่อนุญาตให้ใช้ได้ในระดับที่ไม่มีอันตรายต่อผู้บริโภค โดยมีรายงานพบว่าหากผู้บริโภคได้รับไพโรฟอสเฟตในปริมาณมากจะส่งผลให้เกิดอาการระคายเคืองบริเวณผิวหนังและเนื้อเยื่อต่างๆ และก่อให้เกิดอาการแพ้ซึ่งความรุนแรงจะขึ้นอยู่กับปริมาณสารไพโรฟอสเฟตที่ร่างกายรับเข้าไป นอกจากนี้ยังพบว่าการที่ร่างกายได้รับฟอสฟอรัสปริมาณมากทำให้เกิดโรคกระดูกพรุนได้ง่ายในผู้ที่มีภาวะไตทำงานไม่ปกติเนื่องจากโดยปกติแล้วฟอสฟอรัสจะถูกขับออกทางไต แต่เมื่อไตเสื่อมไม่สามารถขับฟอสฟอรัสส่วนเกินออกจากร่างกายได้ปกติ จะส่งผลให้เกิดการสะสมฟอสฟอรัสในร่างกาย เมื่อระดับฟอสฟอรัสในเลือดสูงร่างกายจะดึงเอาแคลเซียมในกระดูกมาจับฟอสฟอรัส ซึ่งจะเกิดในรูปผลึกแคลเซียมไพโรฟอสเฟต (Calcium pyrophosphate dihydrate) ซึ่งผลึกดังกล่าวจะเกิดการรวมตัวกันที่บริเวณข้อต่อต่างๆของร่างกายและส่งผลให้ข้อดังกล่าวเกิดการอักเสบซึ่งเรียกอาการผิดปกติดังกล่าวว่าโรคเก๊าท์เทียม (Pseudogout)<sup>(5,12)</sup>

### 1.3 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

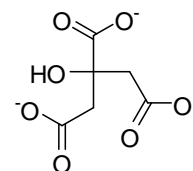
Tobey และคณะ<sup>(18)</sup> ได้นำสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดโมโนนิวเคลียร์ของคอปเปอร์(II) **(1)** และอินดิเคเตอร์ 5(6)-Carboxyfluorescein (**5,6FLR**) มาใช้เป็นเซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดแอนไอออนฟอสเฟตหรือ Pi ในตัวอย่างน้ำลายของมนุษย์ ด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ในสารละลาย TRIS บัฟเฟอร์ที่ pH 7.4 ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าระบบดังกล่าวให้ค่าการตรวจวัดที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับอุปกรณ์การตรวจวัดฟอสเฟตที่มีขายทางการค้าโดยระบบดังกล่าวสามารถตรวจวัดได้ค่าเท่ากับ 5.5 ( $\pm 0.5$ ) mM ในขณะที่อุปกรณ์การตรวจวัดฟอสเฟตที่มีขายทางการค้าสามารถตรวจวัดได้ค่าเท่ากับ 5.1 ( $\pm 0.6$ ) mM



Zece Zhu และคณะ<sup>(24)</sup> ได้นำสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์ของไอออนโลหะซิงก์(II) กับลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของไดฟิโคลิลเอมีน **(2)** มาใช้ในการตรวจวัดแอนไอออนซิเตรท (Citrate) ด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์โดยใช้อินดิเคเตอร์ Phenol Red (**PR**) ทำหน้าที่เป็นส่วนควบคุมการให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของโมเลกุล **(2)** ผลการทดลองพบว่าค่าคงที่การเกิดสารเชิงซ้อนระหว่างสารประกอบ **(2)** และแอนไอออนซิเตรทมีค่าเท่ากับ  $9.2 \times 10^5 \text{M}^{-1}$  และระบบดังกล่าวมีความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจวัดแอนไอออนซิเตรทเป็นอย่างยิ่งโดยให้ค่าขีดจำกัดการตรวจวัดเท่ากับ 0.1  $\mu\text{M}$  ในระบบสารละลาย HEPES บัฟเฟอร์

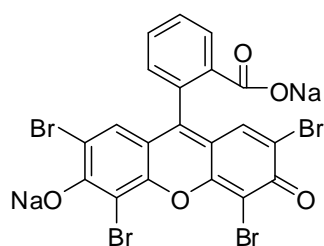


**Phenol Red**

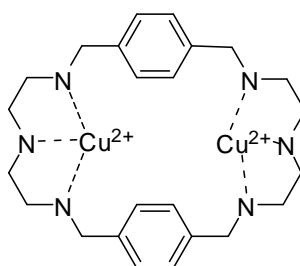


**Citrate**

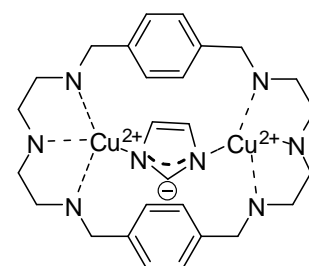
Hortala และคณะ<sup>(9)</sup> ได้นำวิธีการถูกแทนที่ของฟลูออเรสเซนต์อินดิเคเตอร์ eosine Y (EOY) มาใช้ในการตรวจวัดกรดอะมิโน และใช้สารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์ของคอปเปอร์ (II) เป็นโมเลกุลของรีเซปเตอร์ (3) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ 0.05 M HEPES ที่ pH 7 เป็นตัวทำละลาย จากการศึกษาพบว่าแอนิเมชันของ [(3).Eosin Y] มีความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกับกรดอะมิโนฮิสทีดินมากที่สุด ซึ่งคาดว่ากรดอะมิโนฮิสทีดินเกิดพันธะโคออร์ดิเนตโควาเลนต์กับอะตอมของคอปเปอร์ (II) ทั้งสองอะตอม โดยใช้ไนโตรเจนในวงอิมิดาโซลเป็นอะตอมผู้ให้อิเล็กตรอนได้เป็นสารประกอบ (4)



**EOY**



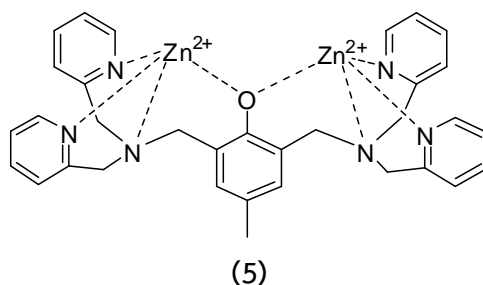
**(3)**



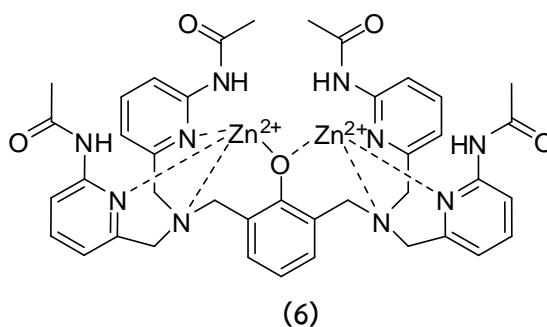
**(4)**

Morgan และคณะ<sup>(15)</sup> ได้นำสารประกอบโคออร์ดิเนชัน (5) และ อินดิเคเตอร์ pyrocatechol violet (PV) มาพัฒนาเป็นระบบที่ใช้ในการตรวจวัดสารประกอบอนินทรีย์ฟอสเฟตแอนไอออน ด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารละลายแอนิเมชันที่เกิดขึ้นมีสีเขียวซึ่งแตกต่างไปจากสารละลายของ PV ในรูปอิสระที่เป็นสีน้ำตาล และเมื่อทำการเติมสารประกอบอนินทรีย์ฟอสเฟตเข้าไปในระบบจะส่งผลให้สีของสารละลายเปลี่ยนกลับมาเป็นสีของอินดิเคเตอร์ PV ใน

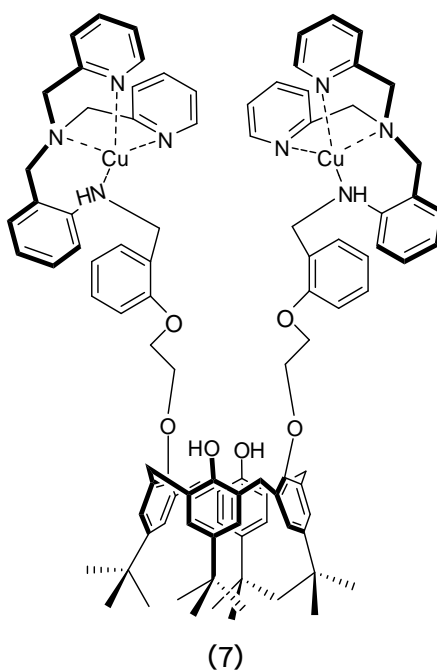
รูปอิสระดั้งเดิม อย่างไรก็ตามผลการทดลองพบว่าระบบดังกล่าวไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง Pi และ PPI ได้



Jae Han Lee และคณะ<sup>(11)</sup> ได้นำสารประกอบโคออร์ดิเนชัน (6) และ อินดิเคเตอร์ pyrocatechol violet (PV) มาพัฒนาเป็นระบบที่ใช้ในการตรวจวัดไพโรฟอสเฟตแอนไอออน หรือ PPI ด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ จากการศึกษาพบว่าสารละลาย PV เมื่ออยู่ในรูปอิสระจะมีสีเหลือง แต่เมื่อเกิดเป็นเอนแซมเบิลกับสารประกอบโคออร์ดิเนชัน (6) จะเปลี่ยนเป็นสีฟ้า และมีค่าคงที่ความเสถียรของเอนแซมเบิล [6·PV] เท่ากับ  $(1.4 \pm 0.1) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  นอกจากนี้ยังพบว่าสารละลายเอนแซมเบิลที่เกิดขึ้นสามารถใช้ในการตรวจวัด PPI ได้อย่างมีความจำเพาะเจาะจง เนื่องจาก PPI สามารถเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ PV ในเอนแซมเบิลดังกล่าวได้ และเกิดการเปลี่ยนสีของสารละลายจากสีฟ้ากลับมาเป็นสีเหลืองดั้งเดิมของ PV ในรูปอิสระ โดยจากการคำนวณค่าคงที่ความเสถียรระหว่างสารประกอบโคออร์ดิเนชัน (6) กับ PPI มีค่าเท่ากับ  $(5.39 \pm 0.03) \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  ซึ่งมีค่ามากกว่าค่าคงที่ความเสถียรของเอนแซมเบิล



Sarayut Watchasit และคณะ<sup>(20)</sup> ได้นำสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์คอปเปอร์ (II) กับ ลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของคาลิกซ์[4]แอรีน (7) มาใช้เป็นโมเลกุลของรีเซ็ปเตอร์ในการตรวจวัด PPI ด้วยเทคนิค IDA โดยใช้ PV เป็นอินดิเคเตอร์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ 80/20 (%v/v) MeCN/H<sub>2</sub>O ใน 10 mM HEPES ที่ pH 6.4 จากการทดลองพบว่าสารละลาย PV เมื่ออยู่ในรูปอิสระจะมีสีเหลือง แต่เมื่อเกิดเอนแซมเบิลกับสารประกอบโคออร์ดิเนชัน (7) จะเปลี่ยนเป็นสีเขียว และมีค่าคงที่ความเสถียรของเอนแซมเบิลเท่ากับ  $1.30 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  นอกจากนี้ยังพบว่าเอนแซมเบิลดังกล่าวสามารถนำมาใช้ในการตรวจวัด PPI ได้อย่างมีความจำเพาะเจาะจง โดยพบว่าเมื่อมี PPI อยู่ในระบบ PPI สามารถเกิดพันธะโคออร์ดิเนตโควาเลนต์กับสารประกอบ (7) โดยเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ PV ทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของสารละลายจากสีเขียวกลับไปเป็นสีเหลืองของ PV ในรูปอิสระได้ โดยมีค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดสารประกอบเท่ากับ  $5.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$



Sarayut Watchasit และคณะ<sup>(21)</sup> ได้นำสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์ของก (II) กับ ลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของไทโรโพลด์เอมีน (8) มาใช้เป็นโมเลกุลของรีเซ็ปเตอร์ในการตรวจวัด PPI ด้วยเทคนิค IDA โดยใช้ Methylthymol blue (MTB) เป็นอินดิเคเตอร์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ 80/20 (%v/v) MeCN/H<sub>2</sub>O ใน 10 mM HEPES ที่ pH 7.4 จากการทดลองพบว่าสารละลาย MTB เมื่ออยู่ในรูปอิสระจะมีสีเขียว แต่เมื่อเกิดเอนแซมเบิลกับสารประกอบโคออร์ดิเนชัน (8) จะเปลี่ยนเป็นสี

ฟ้า และมีค่าคงที่ความเสถียรของแอนเชมเบิล ( $\log \beta$ ) เท่ากับ  $6.05 \pm 0.16$  นอกจากนี้ยังพบว่าแอนเชมเบิลดังกล่าวสามารถนำมาใช้ในการตรวจวัด PPI ได้อย่างมีความจำเพาะเจาะจง โดยพบว่าเมื่อมี PPI อยู่ในระบบ PPI สามารถเกิดพันธะโคออร์ดิเนตโควาเลนต์กับสารประกอบ (8) โดยเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ MTB ทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของสารละลายจากสีฟ้ากลับไปเป็นสีเขียว PV ในรูปอิสระได้ โดยได้สารประกอบ (9) เป็นผลิตภัณฑ์

#### 1.4 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อพัฒนาการตรวจวัดแอนไอออนไฟโรฟอสเฟตในอาหารทะเลแช่แข็งด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์

#### 1.5 ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. สังเคราะห์และพิสูจน์โครงสร้างลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ฟิโคลิลเอมีน (L1)
2. สังเคราะห์และพิสูจน์โครงสร้างลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์โทรพอดัลเอมีน (L2)
3. สังเคราะห์และพิสูจน์โครงสร้างของสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์กับลิแกนด์

L1 (CuL1 และ ZnL1) และลิแกนด์ L2 (CuL2 และ ZnL2)

4. ศึกษาความเป็นไปได้และหาสภาวะของการทดลองที่เหมาะสมในการนำสารประกอบโคออร์ดิเนชันที่สังเคราะห์ได้มาใช้เป็นเซนเซอร์ทางเคมีเชิงแสงสำหรับการตรวจวัดแอนไอออนไฟโรฟอสเฟตในระบบแบตช์ (batch system)

5. นำสารประกอบโคออร์ดิเนชันที่สังเคราะห์ได้มาใช้เป็นเซนเซอร์ทางเคมีเชิงแสงสำหรับการตรวจวัดแอนไอออนไฟโรฟอสเฟตในตัวอย่างอาหารทะเลแช่แข็ง

#### 1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ด้านวิชาการ : ได้ชุดตรวจวัดแอนไอออนไฟโรฟอสเฟตในอาหารทะเลแช่แข็งด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

ด้านสังคมและชุมชน : เพิ่มความปลอดภัยให้แก่ผู้บริโภค



## บทที่ 2

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรมิเตอร์ (HP Hewlett Packard G1103A)
2. เครื่อง Nuclear magnetic Resonance, NMR (broker, Advance Ultrashield 400 MHz)
3. เครื่องระเหยตัวทำละลายแบบสูญญากาศ

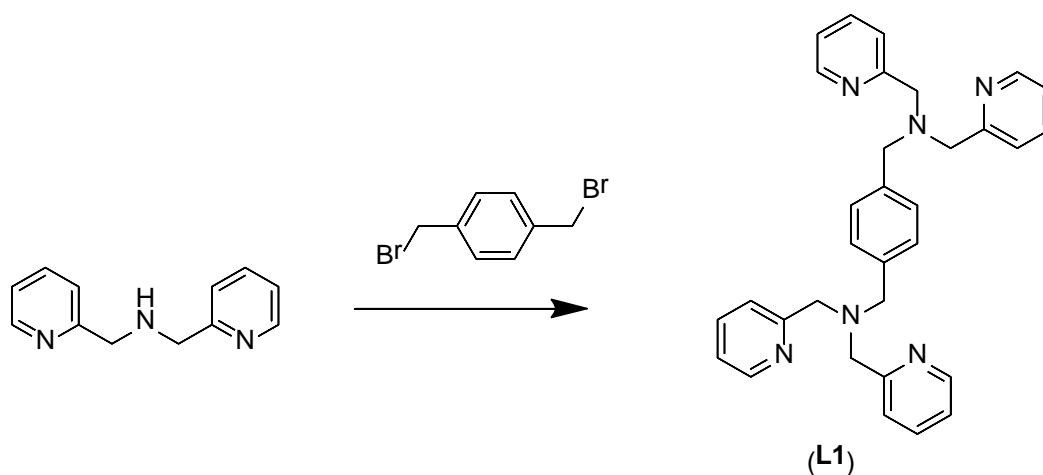
#### 2.2 สารเคมี

Acetonitrile	$C_2H_3N$	A.R.Grade (FLUKA)
Adenosine monophosphate (AMP)	$C_{10}H_{14}N_5O_7P$	A.R.Grade (ALDRICH)
Adenosine diphosphate (ADP)	$C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2$	A.R.Grade (ALDRICH)
Adenosine triphosphate (ATP)	$C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$	A.R.Grade (ALDRICH)
Hydroxyethylpiperazineethane sulfonic acid (HEPES)	$C_8H_{18}N_2O_4S$	A.R.Grade (FLUKA)
Pyrogallol red (PV)	$C_{19}H_{12}O_8S$	A.R.Grade (FLUKA)
Sodium acetate	$C_2H_3NaO_2$ หรือ NaOAc	A.R.Grade (ALDRICH)
Sodium benzoate	$C_7H_5NaO_2$ หรือ NaOBz	A.R.Grade (ALDRICH)
Sodium carbonate	$Na_2CO_3$	A.R.Grade (ALDRICH)
Sodium cyanide	NaCN	A.R.Grade (ALDRICH)
Sodium iodide	NaI	A.R.Grade (ALDRICH)
Sodium bromide	NaBr	A.R.Grade (ALDRICH)
Sodium chloride	NaCl	A.R.Grade (ALDRICH)
Sodium fluoride	NaF	A.R.Grade (ALDRICH)
Sodium hydrogen carbonate	$NaHCO_3$	A.R.Grade (ALDRICH)
Sodium hydroxide	NaOH	A.R.Grade (ALDRICH)
Sodium nitrate	$NaNO_3$	A.R.Grade (ALDRICH)

Sodium phosphate	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	A.R.Grade (ALDRICH)
Sodium sulfate	$\text{Na}_2\text{SO}_4$	A.R.Grade (ALDRICH)
Sodium thiocyanate	$\text{NaSCN}$	A.R.Grade (ALDRICH)
Sterile water	General Hospital Products Public Co., Ltd	
Tetrasodium pyrophosphate	$\text{Na}_4(\text{P}_2\text{O}_7)$	A.R.Grade (ALDRICH)

## 2.3 วิธีการทดลอง

### 2.3.1 การสังเคราะห์ลิแกนด์ L1



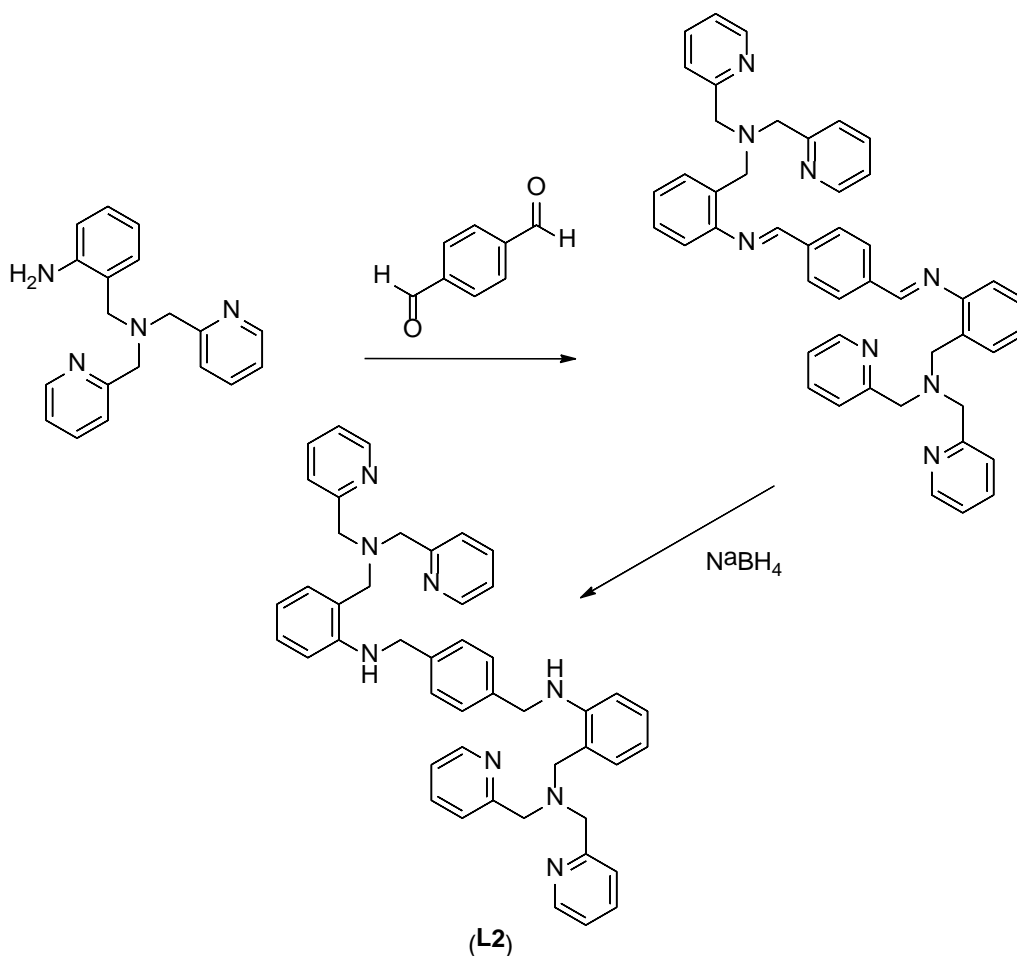
ละลายสารประกอบ dipicolylamine 5.86 กรัม (29.41 มิลลิโมล) ด้วยอะซิโตนไนไตรต์ที่ปราศจากน้ำ 150 มิลลิลิตรในขวดก้นขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 1,4-bis(bromomethyl)benzene 3.25 กรัม (12.32 มิลลิโมล)  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  9.58 กรัม (29.40 มิลลิโมล) และเติม KI 3.06 กรัม (18.43 มิลลิโมล) ลงไปในสารละลายดังกล่าว คนสารละลายเป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศแก๊สไนโตรเจน หลังจากนั้นกรองสารละลายและนำสารละลายไประเหยตัวทำละลายออกโดยการกลั่นลดความดัน และนำไปสกัดด้วย  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  และน้ำสามครั้ง เก็บชั้น  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  มากำจัดน้ำด้วย  $\text{MgSO}_4$  กรองและนำสารละลายไประเหยตัวทำละลายออก และทำการแยกสารด้วย column chromatography โดยใช้ (10/90) MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นของเหลวสีน้ำตาลขุ่น จากนั้นตกตะกอนด้วยน้ำและอะซิโตน ได้ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นของแข็งสีเหลืองซีดของ L1 ร้อยละผลิตภัณฑ์เท่ากับ 2.36 (0.23 กรัม)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ , ppm):  $\delta$  8.47-8.45 (m, 4H, ArH), 7.73-7.69 (m, 4H, ArH), 7.61 (s, 2H, ArH), 7.59 (s, 2H, ArH), 7.37 (s, 4H, ArH), 7.20-7.16 (m, 4H, ArH), 3.73 (s, 8H,  $-\text{CH}_2-$ ), 3.63 (s, 4H,  $-\text{CH}_2-$ ).

$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ , ppm):  $\delta$  159.73, 148.78, 137.99, 136.43, 128.76, 122.77, 100.02, 59.66, 57.84.

ESI-MS (positive mode); 501.2785  $[\text{L1}+\text{H}]^+$ , 523.2606  $[\text{L1}+\text{Na}]^+$ .

## 2.3.2 การสังเคราะห์ลิแกนด์ L2



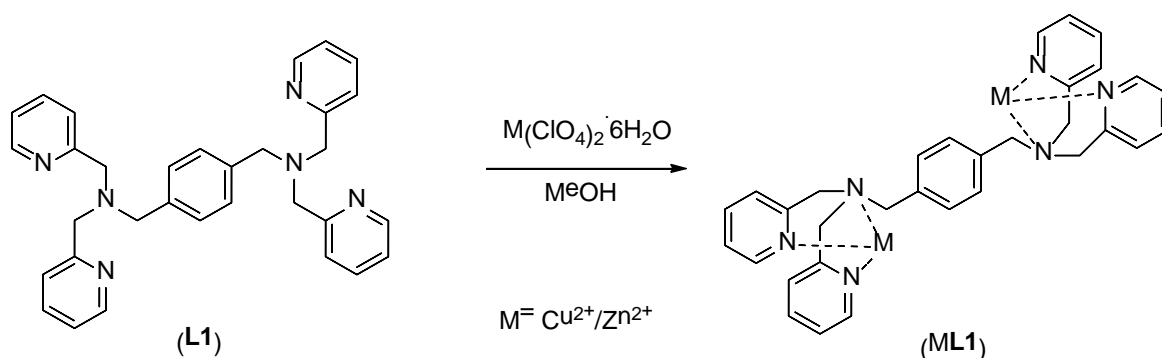
ละลายสารประกอบ tripodalamine 7.56 กรัม (24.84 มิลลิโมล) ด้วยอะซิโตรไนโตรที่ปราศจากน้ำ 150 มิลลิลิตร ในขวดก้นขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติม terephthalaldehyde 1.11 กรัม (8.28 มิลลิโมล) ลงไปในสารละลายดังกล่าว คนสารละลายเป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศแก๊สไนโตรเจน หลังจากนั้นกรองสารละลายและนำสารละลายไประเหยตัวทำละลายออกโดยการกลั่นลดความดัน ได้ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นของเหลวสีน้ำตาลดำ นำสารละลายที่ได้มาละลายด้วย MeOH 100 มิลลิลิตร ในขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นค่อยๆ เติม NaBH<sub>4</sub> 7.62 กรัม (201.44 มิลลิโมล) ลงในสารละลายดังกล่าว และทำการคนสารละลายที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสภายใต้บรรยากาศแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นกรองสารละลายและเติมน้ำ 150 มิลลิลิตร ลงไปในสารละลายที่ได้จากการกรอง และนำไประเหยตัวทำละลายออกโดยการกลั่นลดความดัน และนำไปสกัดด้วย CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 150 มิลลิลิตร สามครั้ง เก็บชั้น CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> มากำจัดน้ำด้วย MgSO<sub>4</sub> กรองและนำสารละลายไประเหยตัวทำละลายออก และทำการแยกสารด้วย column chromatography โดยใช้ (20/80) MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นของเหลวสี

น้ำตาลของสารประกอบ (9) จากนั้นตกตะกอนด้วยน้ำและอะซิโตน ได้ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นของแข็งสีเหลืองซีด ร้อยละผลิตภัณฑ์เท่ากับ 30

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ , ppm):  $\delta$  8.41 (d,  $J=4.4$  Hz, 4H, ArH) 7.50-7.45 (m, 4H, ArH) 7.35 (s, 4H, ArH) 7.25 (d,  $J=8.0$  Hz, 4H ArH) 7.09-7.02 (m, 8H, ArH) 6.53 (d,  $J=8.0$  Hz, 4H ArH) 4.43 (s, 4H,  $-\text{CH}_2-$ ) 3.70 (s, 8H,  $-\text{CH}_2-$ ) 3.63 (s, 4H,  $-\text{CH}_2-$ ).

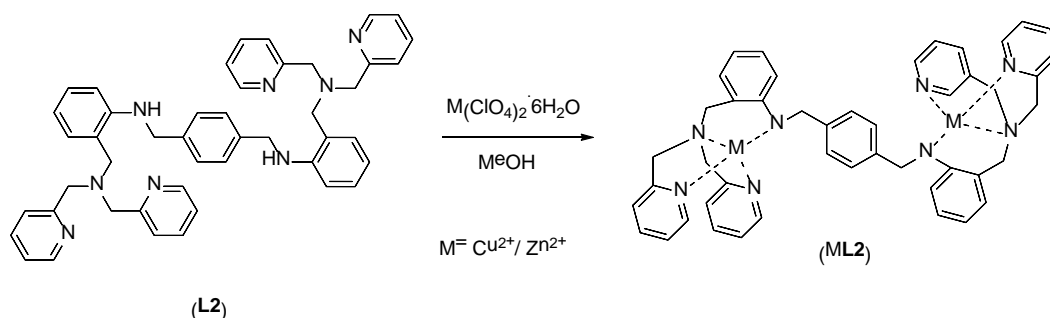
$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ , ppm):  $\delta$  159.11, 149.01, 148.02, 139.12, 136.32, 131.04, 128.52, 127.59, 123.14, 122.00, 115.43, 109.99, 59.57, 57.87, 46.33.

### 2.3.3 การสังเคราะห์สารประกอบ CuL1 และ ZnL1



ละลาย  $\text{M}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (2 mmol) ในน้ำ 10 มิลลิลิตร และละลายลิแกนด์ L1 (0.2 g, 0.40 mmol) ในอะซิโตนไนไตรต์ 10 มิลลิลิตร จากนั้นค่อยๆ เติมสารละลาย  $\text{M}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ลงในสารละลาย ลิแกนด์ L1 1 และให้ความร้อนแก่สารละลาย 10 นาที จากนั้นคนสารละลายอย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะเกิดตะกอนสีฟ้าอ่อนของ CuL1 หรือสีขาวของ ZnL1 กรองและล้างด้วยไดคลอโรมีเทน 50 มิลลิลิตร ร้อยละผลิตภัณฑ์ของ CuL1 และ ZnL1 มีค่าเท่ากับ 60 และ 50 ตามลำดับ

### 2.3.4 การสังเคราะห์สารประกอบ CuL2 และ ZnL2



ละลายลิแกนด์ L2 (0.28 มิลลิโมล) ในไดคลอโรมีเทนปริมาตร 10 มิลลิลิตร และละลาย Cu(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 0.52 กรัม (1.41 มิลลิโมลในเมทานอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายของ M(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> ลงในสารละลายลิแกนด์ L2 อย่างช้าๆ คนและให้ความร้อน 10 นาที ปล่อยให้สารละลายเย็นลงและคนสารละลายอย่างต่อเนื่อง จะได้ตะกอนสีฟ้าของ CuL2 หรือสีขาวของ ZnL2 กรองและล้างตะกอนด้วย MeOH ร้อยละผลิตภัณท์ของ CuL2 และ ZnL2 มีค่าเท่ากับ 70 และ 50 ตามลำดับ

### 2.3.5 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES pH 7.4 ความเข้มข้น 10 mM ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

ชั่ง HEPES 12.6165 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับ pH ของสารละลายจนมีค่าเท่ากับ 7.4 หลังจากนั้นนำสารละลายดังกล่าวถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดบอกปริมาตร

### 2.3.6 การหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนไซม์ระหว่างอินดิเคเตอร์ PV กับสารประกอบโคออร์ดิเนชัน ML ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโคปี

#### 2.3.6.1 การเตรียมสารละลาย CuL ความเข้มข้น 400 μM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ชั่ง CuL 26.79 มิลลิกรัม ละลายด้วยอะซิโตนไทรล์และน้ำ แล้วปรับใส่ขวดวัดปริมาตร 5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นปิเปตสารละลายที่เตรียมได้ 0.5 มิลลิลิตรใส่ขวดวัดปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 10 mM HEPES pH 7.4

#### 2.3.6.2 การเตรียมสารละลาย ZnL ความเข้มข้น 400 μM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ชั่ง Zn<sub>2</sub>B 38.45 มิลลิกรัม ละลายด้วยอะซิโตนไทรล์และน้ำ แล้วปรับใส่ขวดวัดปริมาตร 5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นปิเปตสารละลายที่เตรียมได้ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 10 mM HEPES pH 7.4

### 2.3.6.3 การเตรียมสารละลาย PV ความเข้มข้น 20 $\mu\text{M}$ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ชั่ง PV 4.00 มิลลิกรัม ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 10 mM HEPES แล้วปรับใส่ขวดวัดปริมาตร 5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นปิเปตสารละลายที่เตรียมได้ 0.50 มิลลิลิตรใส่ขวดวัดปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์

### 2.3.6.4 วิธีการทดลอง

ปิเปตสารละลาย PV ความเข้มข้น 20  $\mu\text{M}$  ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในคิวเวท จากนั้นค่อยๆไทเทรตสารละลายของสารประกอบโคออร์ดิเนชันแต่ละชนิด ความเข้มข้น 400  $\mu\text{M}$  ลงในคิวเวทดังกล่าว โดยใช้ปริมาตรที่แสดงดังตารางที่ 3.1 หลังจากนั้นคนสารละลายให้เข้ากัน นำสารละลายเอนเซมเบลที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 250-900 nm นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความยาวคลื่นที่ใช้ในการทดลอง และคำนวณหาค่าคงที่ของการเกิดเอนเซมเบลโดยใช้โปรแกรม SPECFIT (SPECFIT/32, 2004)

**ตารางที่ 2.1** สภาวะการทดลองสำหรับการหาค่าคงที่ของการเกิดเอนเซมเบลระหว่างสารประกอบโคออร์ดิเนชัน ML1 และ ML2 (R) กับอินดิเคเตอร์ PV

ครั้งที่	ปริมาตร PV (มิลลิลิตร)	ปริมาตร R (มิลลิลิตร)	โมลของ PV	โมลของ R	อัตราส่วน โมลของ R ต่อ โมลของ PV
1	2.0	0.00	$4 \times 10^{-8}$	0.0	0.0
2	2.0	0.01	$4 \times 10^{-8}$	$4.0 \times 10^{-9}$	0.1
3	2.0	0.02	$4 \times 10^{-8}$	$8.0 \times 10^{-9}$	0.2
4	2.0	0.03	$4 \times 10^{-8}$	$1.2 \times 10^{-8}$	0.3
5	2.0	0.04	$4 \times 10^{-8}$	$1.6 \times 10^{-8}$	0.4
6	2.0	0.05	$4 \times 10^{-8}$	$2.0 \times 10^{-8}$	0.5
7	2.0	0.06	$4 \times 10^{-8}$	$2.4 \times 10^{-8}$	0.6
8	2.0	0.07	$4 \times 10^{-8}$	$2.8 \times 10^{-8}$	0.7
9	2.0	0.08	$4 \times 10^{-8}$	$3.2 \times 10^{-8}$	0.8
10	2.0	0.09	$4 \times 10^{-8}$	$3.6 \times 10^{-8}$	0.9
11	2.0	0.10	$4 \times 10^{-8}$	$4.0 \times 10^{-8}$	1.0

12	2.0	0.12	$4 \times 10^{-8}$	$4.4 \times 10^{-8}$	1.1
13	2.0	0.13	$4 \times 10^{-8}$	$4.8 \times 10^{-8}$	1.2
14	2.0	0.14	$4 \times 10^{-8}$	$5.2 \times 10^{-8}$	1.3
15	2.0	0.15	$4 \times 10^{-8}$	$5.6 \times 10^{-8}$	1.4
16	2.0	0.16	$4 \times 10^{-8}$	$6.0 \times 10^{-8}$	1.5

## 2.7 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกับแอนไอออนชนิดต่างๆ ของ เอนเซมเบิล

### 2.7.1 การเตรียมสารละลาย CuL ความเข้มข้น 20 $\mu$ M ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ชั่ง CuL 13.40 มิลลิกรัม ละลายด้วยอะซิโตนไตรรล์และน้ำ แล้วปรับใส่ขวดวัดปริมาตร 5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นปิเปตสารละลายที่เตรียมได้ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 10 mM HEPES pH 7.4

### 2.7.2 การเตรียมสารละลาย ZnL ความเข้มข้น 20 $\mu$ M ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ชั่ง ZnL 19.22 มิลลิกรัม ละลายด้วยอะซิโตนไตรรล์และน้ำ แล้วปรับใส่ขวดวัดปริมาตร 5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นปิเปตสารละลายที่เตรียมได้ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 10 mM HEPES pH 7.4

### 2.7.3 การเตรียมสารละลาย PV ความเข้มข้น 400 $\mu$ M ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ชั่ง PV 16.01 มิลลิกรัม ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 10 mM HEPES แล้วปรับใส่ขวดวัดปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลาย 0.50 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์

### 2.7.4 การเตรียมสารละลายแอนไอออนชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

#### 2.7.4.1 การเตรียมสารละลายแอนไอออนชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 0.01 M ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ชั่งแอนไอออนชนิดต่างๆตามน้ำหนักที่แสดงไว้ในตารางที่ 2.2 จากนั้นนำไปละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน และปรับใส่ขวดวัดปริมาตร 10 มิลลิลิตร



ตารางที่ 2.2 น้ำหนักของแอนไอออนชนิดต่างๆที่ใช้ในการเตรียมเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้น 0.01 M ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ลำดับที่	ชนิดของแอนไอออน	ชนิดเกลือของแอนไอออน	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)
1	$\text{HPO}_4^{2-}$	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	13.40
2	$\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ หรือ $\text{PPi}$	$\text{Na}_4(\text{P}_2\text{O}_7)$	28.20
3	$\text{SO}_4^{2-}$	$\text{Na}_2\text{SO}_4$	16.76
4	$\text{NO}_3^-$	$\text{NaNO}_3$	8.51
5	$\text{CO}_3^{2-}$	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	10.60
6	$\text{HCO}_3^-$	$\text{NaHCO}_3$	9.10
7	$\text{AcO}^-$	$\text{NaOAc}$	13.34
8	$\text{BzO}^-$	$\text{NaOBz}$	14.58
9	$\text{SCN}^-$	$\text{NaSCN}$	8.11
10	$\text{CN}^-$	$\text{NaCN}$	5.59

11	OH <sup>-</sup>	NaOH	15.51
12	I <sup>-</sup>	NaI	14.94
13	Br <sup>-</sup>	NaBr	10.28
14	Cl <sup>-</sup>	NaCl	5.84
15	F <sup>-</sup>	NaF	4.20
16	AMP	AMP	36.52
17	ADP	ADP	39.10
18	ATP	ATP	41.50

#### 2.7.4.2 การเตรียมสารละลายแอนไอออนชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ปิเปตแอนไอออนชนิดต่างๆที่ความเข้มข้น 0.01 M (จากข้อ 2.5.4.1) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตร 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 10 mM HEPES pH 7.4

#### 2.7.5 การเตรียมสารละลายเอนไซม์ระหว่างสารประกอบโคออร์ดิเนชันกับสารละลาย PV

ปิเปตสารละลาย PV 400  $\mu$ M (จากข้อ 3.5.3) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในสารละลายของสารประกอบโคออร์ดิเนชันแต่ละชนิดที่มีความเข้มข้น 20  $\mu$ M ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

#### 2.7.6 วิธีการทดลอง

ปิเปตสารละลายเอนไซม์ระหว่างสารประกอบโคออร์ดิเนชันแต่ละชนิดกับสารละลาย PV ที่เตรียมไว้ในข้อ 2.3.6.3 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดแก้ว จากนั้นปิเปตสารละลายแอนไอออนแต่ละชนิด ความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้วดังกล่าว เขย่าให้เข้ากันและสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเอนไซม์ในสภาวะที่มีแอนไอออนชนิดต่างๆอยู่ในระบบ

ในการพิจารณาว่าแอนไอออนชนิดใดสามารถแทนที่ PV ได้ นั้น สามารถสังเกตได้จากการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเอนไซม์ และการพิจารณาว่าเอนไซม์ใดมีความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกับแอนไอออนชนิดใดนั้น สามารถทำได้โดยสังเกตว่าแอนไอออนชนิดใดทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมมากที่สุด โดยทำการทดลองดังนี้

ปิเปตสารละลายเอนไซม์เบิลระหว่างสารประกอบโคออร์ดิเนชันแต่ละชนิดกับสารละลาย PV ที่เตรียมไว้ในข้อ 2.5.5 ใส่ลงในคิวเวท และนำสารละลายเอนไซม์เบิลดังกล่าวไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 250-900 nm จากนั้นปิเปตสารละลายแอนไอออน 1 mM ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตรลงในคิวเวท คนสารละลายให้เข้ากันและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเอนไซม์เบิลอิสระ และสารละลายของเอนไซม์เบิลเมื่อเติมแอนไอออนแต่ละชนิดกับความยาวคลื่นที่ใช้ในการทดลอง การพิจารณาว่าแอนไอออนชนิดใดสามารถแทนที่ PV ได้นั้นสังเกตได้จากการเปลี่ยนสีของสารละลายเอนไซม์เบิลจากสีน้ำเงินไปเป็นสีชมพูของ PV อิสระ

## 2.8 การหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดสารประกอบโคออร์ดิเนชันระหว่างสารประกอบโคออร์ดิเนชัน $ZnL_2$ กับแอนไอออนไพโรฟอสเฟต ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน

### 2.8.1 การเตรียมสารละลาย $ZnL_2$ ความเข้มข้น $20 \mu M$ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

เตรียมเหมือนข้อ 2.5.1

### 2.8.2 การเตรียมสารละลาย PV ความเข้มข้น 400 $\mu\text{M}$ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายสต็อก โดยชั่ง PV 8.00 มิลลิกรัม ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 10 mM HEPES แล้วปรับใส่ขวดวัดปริมาตร 5 มิลลิลิตร และปิเปตสารละลายสต็อก 0.5 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์

### 2.8.3 การเตรียมสารละลาย PPI ความเข้มข้น 400 $\mu\text{M}$ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ปิเปต PPI ความเข้มข้น 0.01 M (จากข้อ 2.5.4.1) ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตร 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 10 mM HEPES pH 7.4

### 2.8.4 วิธีการทดลอง

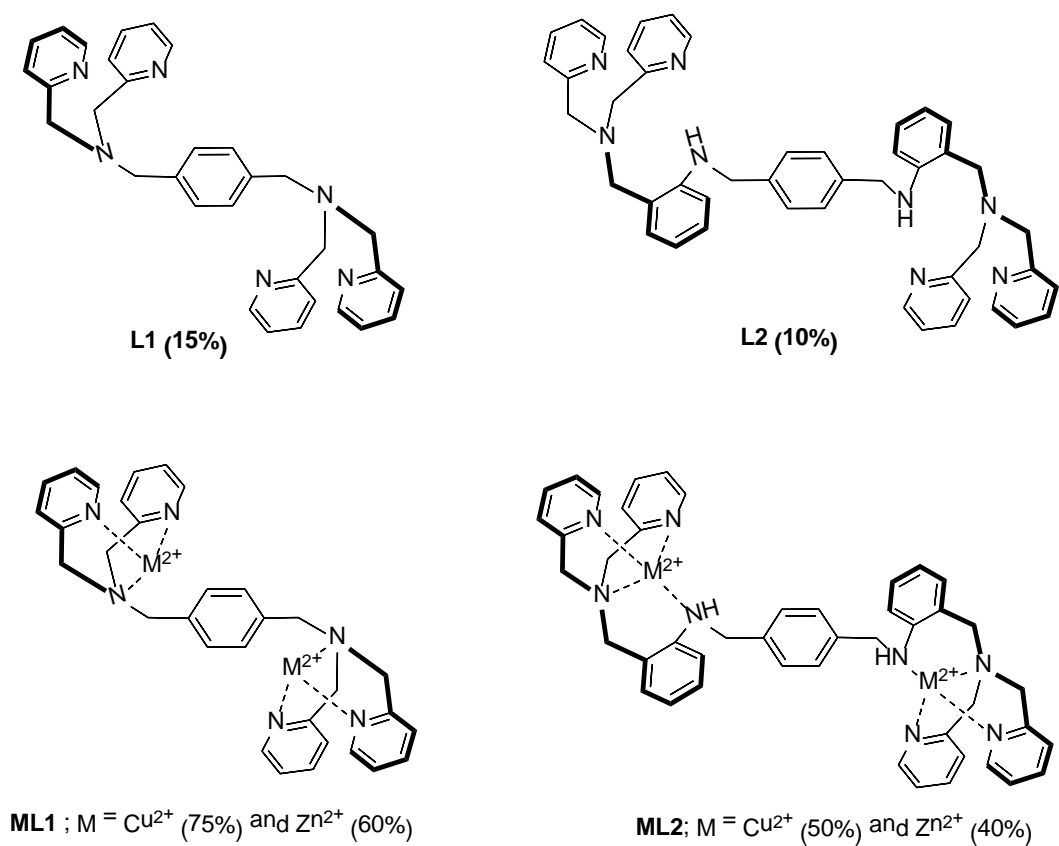
ปิเปตสารละลายของสารประกอบโคออร์ดิเนชันความเข้มข้น 20  $\mu\text{M}$  ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในควิวเวท จากนั้นปิเปตสารละลาย PV ความเข้มข้น 400  $\mu\text{M}$  ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรใส่ลงในควิวเวทดังกล่าว คนสารละลายให้เข้ากัน นำสารละลายดังกล่าวไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 250-900 nm หลังจากนั้นเติมสารละลายของ PPI ความเข้มข้น 400  $\mu\text{M}$  ครั้งละ 0.01 มิลลิลิตร ลงในควิวเวทดังกล่าว คนสารละลายให้เข้ากันและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 250-900 nm นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความยาวคลื่นที่ใช้ในการทดลอง และคำนวณหาค่าคงที่การเกิดของสารประกอบโคออร์ดิเนชันโดยใช้โปรแกรม SPECFIT (SPECFIT/32, 2004)

### บทที่ 3

#### ผลการวิจัยและอภิปรายผล

##### 3.1 การสังเคราะห์ลิแกนด์ L1, L2 และสารประกอบโคออร์ดิเนชัน ML1 และ ML2

ได้ทำการสังเคราะห์และพิสูจน์โครงสร้างลิแกนด์ L1, L2 และสารประกอบโคออร์ดิเนชัน ML1 และ ML2 (เมื่อ M คือไอออน  $\text{Cu}^{2+}$  และ  $\text{Zn}^{2+}$ ) ได้เป็นผลสำเร็จ โครงสร้างของสารประกอบทั้ง 4 ชนิด แสดงได้ในรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 โครงสร้างของลิแกนด์ L1, L2 และสารประกอบโคออร์ดิเนชัน ML1 และ ML2 (เมื่อ M คือไอออน  $\text{Cu}^{2+}$  และ  $\text{Zn}^{2+}$ )

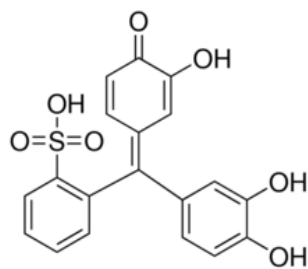


### 3.2 การศึกษาความเป็นไปได้และหาสภาวะของการทดลองที่เหมาะสมในการนำสารประกอบ

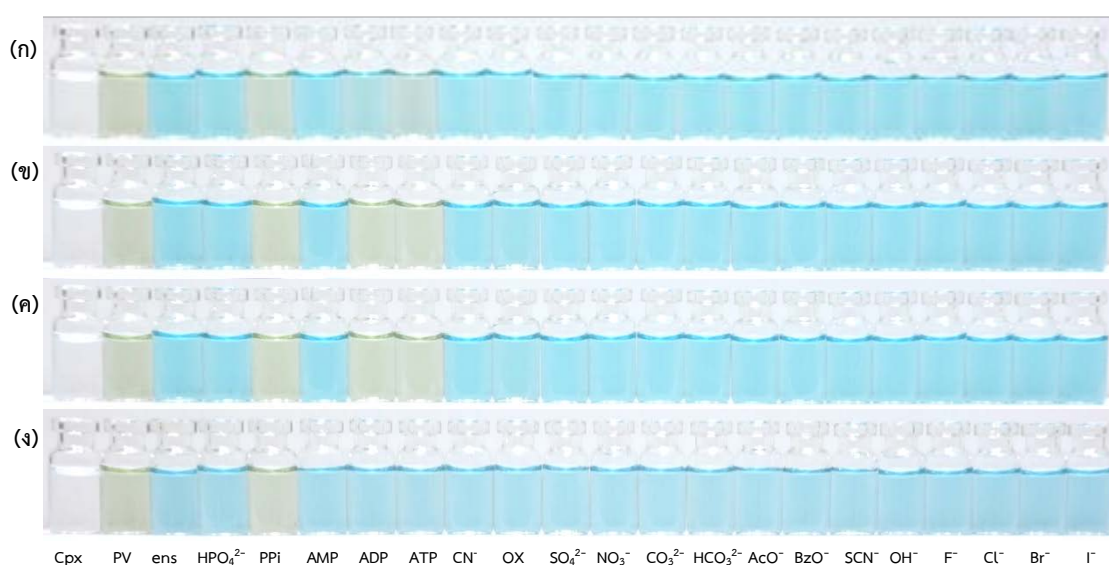
#### โคออร์ดิเนชันมาใช้ในการตรวจวัดไพโรฟอสเฟต (PPI) ในระบบแบ็คซ์

เมื่อนำสารประกอบโคออร์ดิเนชัน CuL1, ZnL1, CuL2 และ ZnL2 มาศึกษาความเป็นไปได้ในการตรวจวัด PPI ด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ และใช้สารละลายบัฟเฟอร์ HEPES ความเข้มข้น 10 mM pH 7.4 เป็นตัวทำละลายโดยนำสารประกอบทั้ง 4 มาเตรียมเป็นเอนเซมเบลกับอินดิเคเตอร์ไพโรแคทีคอลไวโอเลต (pyrocatechol violet หรือ PV) ผลการทดลองแสดงได้ดังรูปที่ 3.2 จะเห็นได้ว่าสารละลายของสารประกอบโคออร์ดิเนชันทั้ง 4 ชนิดเป็นสารละลายใสไม่มีสี (ขวดที่ 1, cpx) สารละลาย PV ในรูปอิสระสารละลายมีสีเขียว (ขวดที่ 2, PV) และสารละลายเอนเซมเบลของสารประกอบโคออร์ดิเนชันทั้ง 4 ชนิดมีสีฟ้า (ขวดที่ 3, ens)

จากรูปที่ 3.2 จะเห็นได้ว่าเอนเซมเบลของสารประกอบทั้ง 4 ชนิดให้ผลความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกับแอนไอออนได้ต่างกัน โดยมีเพียงเอนเซมเบลของสารประกอบ ZnL2 กับอินดิเคเตอร์ PV เท่านั้นที่มีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัด PPI เนื่องจากมีเพียง PPI เท่านั้นที่ทำให้สีของสารละลายเอนเซมเบลของ [ZnL2•PV] เปลี่ยนจากสีฟ้าไปเป็นสีเขียวของอินดิเคเตอร์ PV ในรูปอิสระ (รูปที่ 3.2ง) ในขณะที่แอนไอออนชนิดอื่น ๆ ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของสารละลายแต่อย่างใด แสดงว่าอินดิเคเตอร์ PV ในโครงสร้างของเอนเซมเบล [ZnL2•PV] สามารถถูกแทนที่ด้วย PPI ส่งผลให้ได้อินดิเคเตอร์ PV ในรูปอิสระกลับคืนมา ดังนั้นจึงสามารถนำเอนเซมเบล [ZnL2•PV] ไปตรวจวัด PPI ในตัวอย่างจริงได้แม้ในสภาวะที่มีแอนไอออนชนิดอื่นอยู่ในระบบ



pyrocatecholviolet หรือ PV

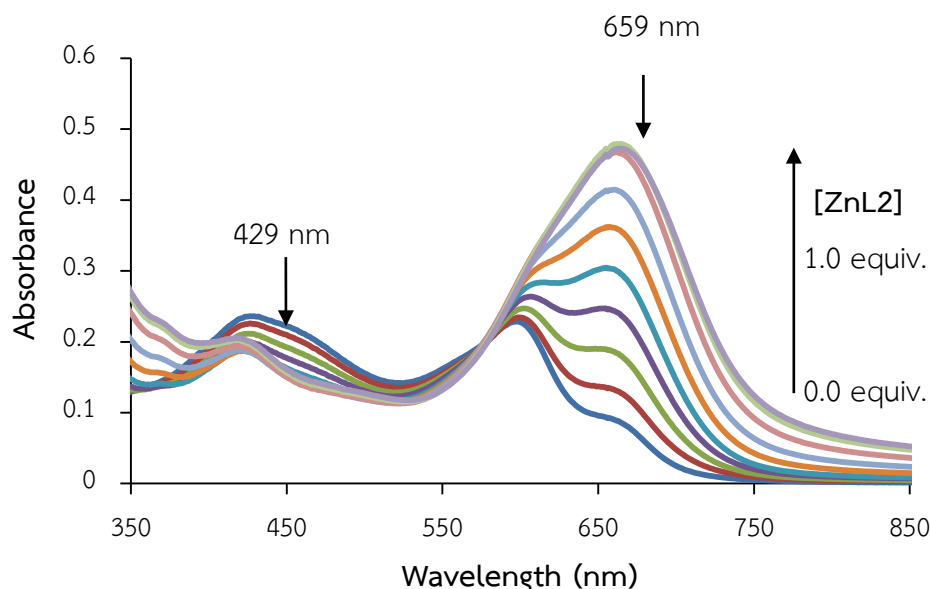


**รูปที่ 3.2** การเปลี่ยนสีของสารละลายเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากอินดิเคเตอร์ PV กับสารประกอบโคออร์ดิเนชัน (ก) CuL1, (ข) ZnL1, (ค) CuL2 และ (ง) ZnL2 ในสถานะที่มีไอออนลบชนิดต่าง ๆ อยู่ในระบบ โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ HEPES ความเข้มข้น 10 mM pH 7.4 เป็นตัวทำละลาย



### 3.3 การศึกษาการเกิดเอนเซมเบิลระหว่างสารประกอบโคออร์ดิเนชัน ZnL2 และ PV ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมทรี

เมื่อนำสารละลาย PV ที่มีความเข้มข้น 20  $\mu\text{M}$  ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทำการไทเทรตกับสารละลายประกอบเชิงซ้อน ZnL2 ความเข้มข้น 400  $\mu\text{M}$  ครั้งละ 0.01 มิลลิลิตร (0.1 equivalent) แล้วนำสารละลายดังกล่าวไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมทรี โดยทำการทดลองจนครบ 1.0 equivalent พบว่าสารละลาย PV ในรูปอิสระมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 429 nm และเมื่อค่อย ๆ ไทเทรตสารละลาย ZnL2 ลงไปยังสารละลายดังกล่าวพบว่าสีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีฟ้า โดยมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 659 nm ดังแสดงในรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลาย PV เมื่อทำการไทเทรตสารละลาย ZnL2 ลงไปยังสารละลายดังกล่าว

เมื่อทำการหาอัตราส่วนในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง ZnL2 และสารละลาย PV ด้วยวิธี Job's method โดยทำการเตรียมสารละลายผสมระหว่างสารละลาย ZnL2 กับ สารละลาย PV ที่เศษส่วนโมลต่างกัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 659 นาโนเมตร จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 659 นาโนเมตร พบว่าค่าการ

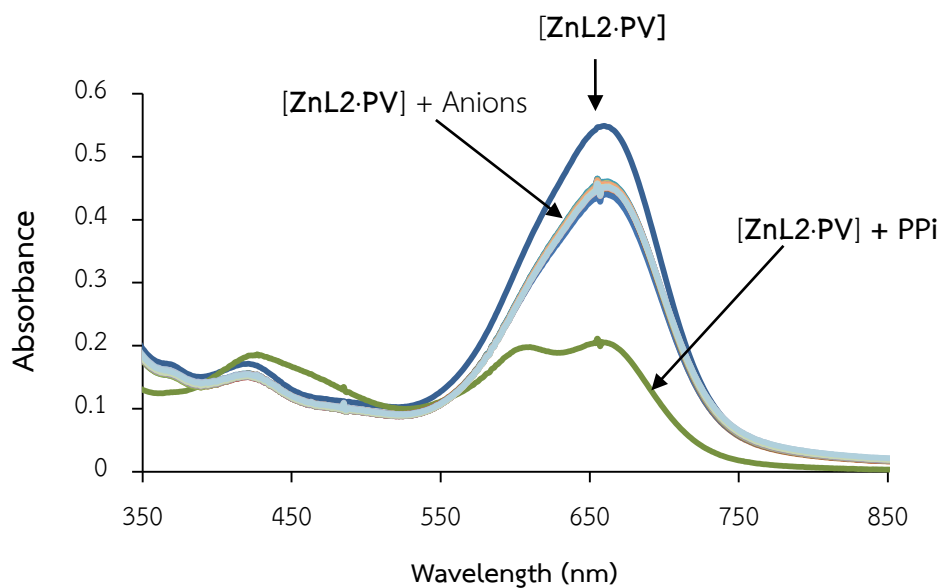
ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นดังกล่าวมีค่าสูงสุดที่เคี่ส่วยโมลของ ZnL2 : PV คือ 0.5 : 0.5 แสดงว่าอัตราส่วนในการเกิดเป็นเอนเซมเบิลของ ZnL2 : PV คือ 1:1 ดังแสดงในรูปที่ 3.4



**รูปที่ 3.4** การหาอัตราส่วนในการเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสาร ZnL2 ความเข้มข้น 20  $\mu\text{M}$  กับสารละลาย PV ความเข้มข้น 20  $\mu\text{M}$  โดยวิธี Job's Method ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปคโตรเมทรี

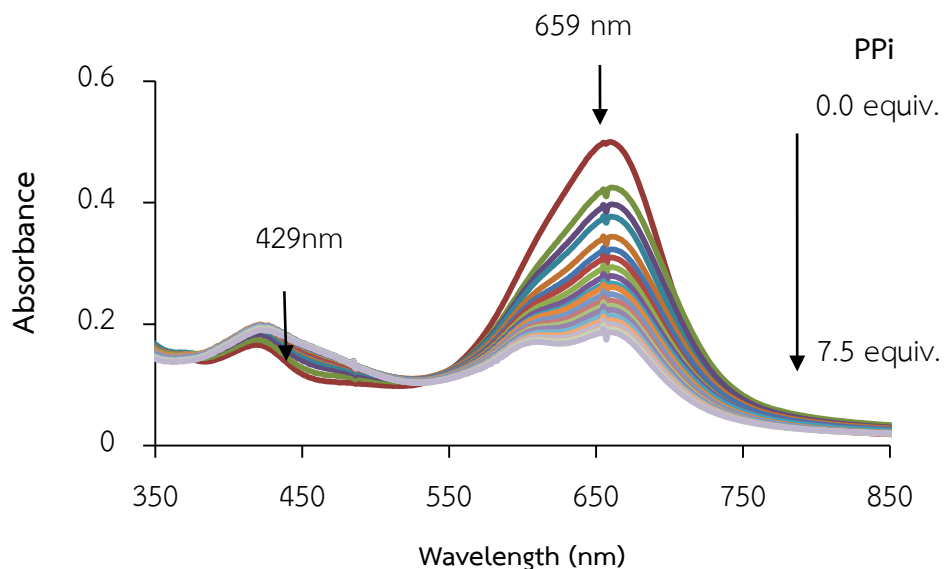
**3.4 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกับแอนไอออนของเอนเซมเบิล [ZnL2•PV] ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปคโตรเมทรี**

จากรูปที่ 3.5 เมื่อนำสารละลาย [ZnL2•PV] มาวัดค่าการดูดกลืนแสง พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดคือ 659 นาโนเมตร และเมื่อพิจารณาสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลาย [ZnL2•PV] ในสถานะที่มีแอนไอออนชนิดต่างๆ พบว่ามีเพียงแอนไอออน PPI ที่ส่งผลทำให้สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลาย [ZnL•PV] ที่ความยาวคลื่น 659 นาโนเมตร มีค่าลดลงอย่างเห็นได้ชัด โดยสังเกตได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับแอนไอออนชนิดอื่นๆ แสดงว่าเอนเซมเบิล [ZnL2•PV] มีความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกับ PPI ได้เป็นอย่างดี



รูปที่ 3.5 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของเอนไซม์เบิล  $[ZnL_2 \cdot PV]$  ที่มีแอนไอออนชนิดต่าง ๆ อยู่ในระบบ

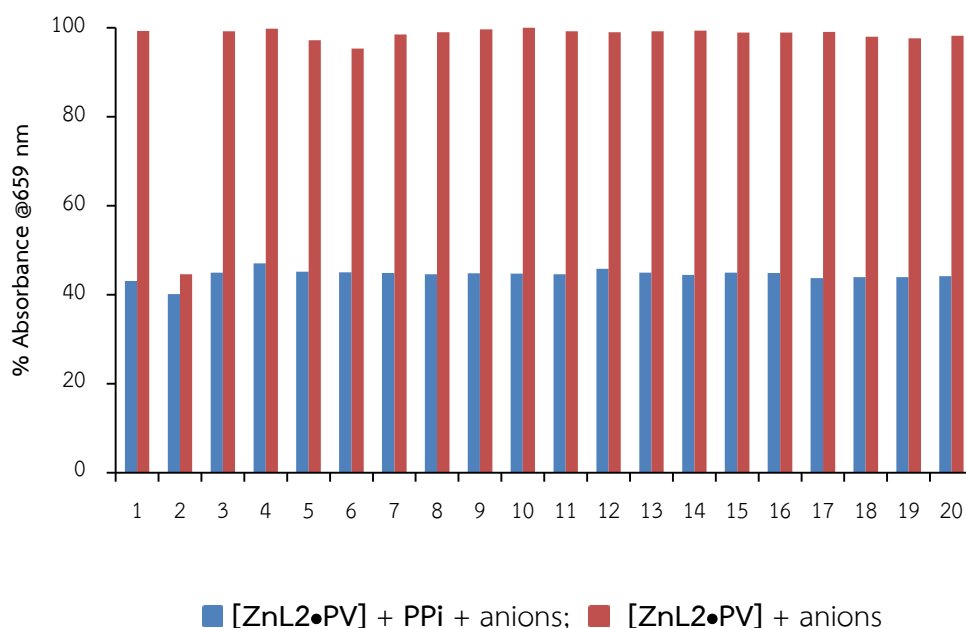
เมื่อทำการไทเทรตสารละลายเอนไซม์เบิล  $[ZnL_2 \cdot PV]$  ด้วย PPI พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 659 nm มีค่าลดลงและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 429 nm มีค่าเพิ่มขึ้น และสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีฟ้าไปเป็นสีเขียวของ PV ในรูปอิสระ แสดงว่า PPI เข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ PV ในโครงสร้างของเอนไซม์เบิลได้ ดังแสดงในรูปที่ 3.6



รูปที่ 3.6 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลาย  $[ZnL2 \cdot PV]$  เมื่อเติมสารละลาย PPI ความเข้มข้น 1 mM ในตัวทำละลาย 10 mM pH 7.4 HEPES

### 3.5 การศึกษาผลการรบกวนของแอนไอออนชนิดต่างๆ ต่อการตรวจวัด PPI โดยใช้เอนไซม์เบิล $[ZnL2 \cdot PV]$ ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรเมทรี

จากการศึกษาผลการรบกวนของแอนไอออนชนิดต่างๆ ต่อการตรวจวัด PPI โดยใช้เอนไซม์เบิล  $[ZnL2 \cdot PV]$  โดยทำการเตรียมสารละลายเชิงซ้อน  $[ZnL2 \cdot PV]$  + PPI ที่มีความเข้มข้น 20  $\mu M$  ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในคิวเวท จากนั้นทำการปิเปตสารละลายแอนไอออนชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 350  $\mu L$  ลงในคิวเวทที่มีสารละลายเชิงซ้อน  $[ZnL2 \cdot PV]$  + PPI เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 659 นาโนเมตร กับแอนไอออนชนิดต่างๆ ที่เติมลงไป ซึ่งได้ผลการทดลองดังรูปที่ 3.7



**รูปที่ 3.7** การเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 659 nm ของสารละลายเอนไซม์เบิล [ZnL2•PV] กับแอนไอออนชนิดต่างๆในตัวทำละลาย HEPES บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 mM pH 7.4 เมื่อกำหนดให้ (1) Pi , (2) = PPI , (3) = ACO , (4) = AMP , (5) = ADP , (6) = ATP , (7) = CN<sup>-</sup> , (8) = NaOx , (9) = Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> , (10) = Na<sub>2</sub>NO<sub>3</sub> , (11) = Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> , (12) = NaHCO<sub>3</sub> , (13) = AcO , (14) = BzO , (15) = KSCN , (16) = NaOH , (17) = NaI , (18) = NaBr , (19) = NaCl , (20) = NaF

จากรูปที่ 3.7 พบว่าไม่มีแอนไอออนชนิดใดที่มีผลรบกวนต่อการตรวจวัดสารละลาย PPI โดยใช้ [ZnL2•PV] เนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 659 nm ไม่ลดลงแต่อย่างใด แสดงว่าเอนไซม์เบิล [ZnL2•PV] นี้ สามารถนำมาใช้เป็นเซ็นเซอร์ทางเคมีเชิงแสงในการตรวจวัด PPI ได้ดี โดยไม่ถูกรบกวนจากแอนไอออนชนิดอื่นๆ

### 3.6 การหาขีดจำกัดในการตรวจวัด (Detection of limit) สารละลาย PPI ด้วยเอนไซม์เบิล ZnL2 โดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรเมทรี

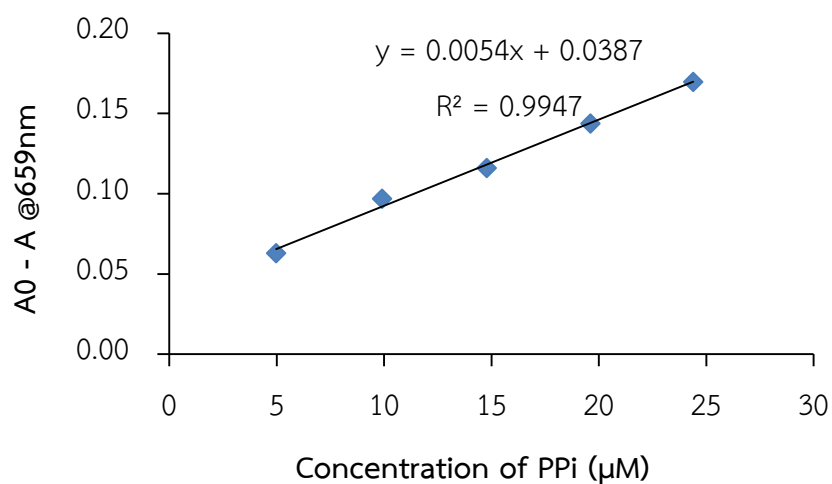
การหาขีดจำกัดในการตรวจวัด PPI ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรเมทรี สามารถหาได้จากการนำข้อมูลการทำไทเทรชันของสารละลาย [ZnL2•PV] ด้วย PPI มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 659 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของสารละลาย PPI ดังแสดงในรูปที่ 3.8 และนำไปคำนวณหาค่าขีดจำกัดการตรวจวัด ดังสมการที่ (3.1)

$$\text{Detection of limit} = 3\sigma/k \quad (3.1)$$

โดยที่  $\sigma$  คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation) ของสารละลายแบลงค์ที่วัดค่าความเข้มข้น

ของสารละลาย PPI ที่ความยาวคลื่น 659 นาโนเมตร จำนวน 10 ครั้ง

k คือ ความชันของกราฟที่ได้จากการสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 659 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของสารละลาย PPI



รูปที่ 3.8 การหาขีดจำกัดในการตรวจวัดสารละลาย PPI โดยใช้สารเชิงซ้อน [ZnL2•PV] ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโคปี เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย [ZnL2•PV] ที่มีสารละลาย PPI ความเข้มข้นต่างๆ

จากการทดลองหาค่าขีดจำกัดการตรวจวัดของสารละลาย PPI โดยใช้เอนไซม์เบิล [ZnL2•PV] ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโคปี เมื่อค่า  $\sigma$  เท่ากับ 0.4097 พบว่าสารละลายประกอบเชิงซ้อน [ZnL2•PV] สามารถใช้ในการตรวจวัดสารละลาย PPI ได้ ซึ่งมีขีดจำกัดในการตรวจวัดเท่ากับ 0.60 µM

### 3.7 การตรวจวัด PPI ในอาหารทะเลแช่แข็งที่วางจำหน่ายในห้างสรรพสินค้าจังหวัดชลบุรี

จากการนำเอนไซม์เบิล [ZnL2•PV] ที่มีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัด PPI มาตรวจวัด PPI ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารทะเลแช่แข็งที่วางจำหน่ายในห้างสรรพสินค้าจังหวัดชลบุรี พบว่า PPI ที่ใช้ในอุตสาหกรรมแช่แข็งอาหารทะเลจะอยู่ในกลุ่มสารที่มี INS 450 (INS คือ International numbering system for food additive) และการรายงานปริมาณ PPI ที่ใช้ในอาหารทะเลแช่แข็งจะรายงานรวมอยู่ในรูปของสารที่ทำให้เกิดความชุ่มชื้นกลุ่มฟอสเฟตชนิดอื่น ๆ ซึ่งจากการตรวจสอบปริมาณของ PPI ที่ใช้ในอาหารทะเลแช่แข็งแต่ละชนิดโดยใช้เอนไซม์เบิล [ZnL2•PV] พบว่ามีค่าที่สัมพันธ์กับค่าที่ระบุไว้ที่ภาชนะที่บรรจุ ดังแสดงในตารางที่ 3.1

**ตารางที่ 3.1** ปริมาณ PPI ที่ตรวจพบในอาหารทะเลแช่แข็งบางชนิดที่วางจำหน่ายในห้างสรรพสินค้าจังหวัดชลบุรี

ชนิดของอาหารทะเลแช่แข็ง	สารที่ทำให้เกิดความชุ่มชื้นที่ระบุข้างภาชนะที่บรรจุ	ปริมาณที่ระบุข้างภาชนะบรรจุ	ปริมาณ PPI ที่ตรวจพบ (เฉพาะกลุ่ม INS 450)
กุ้งดิบผ่าหลังแช่แข็ง	INS 451(i)	0.4 %	
	INS 339(ii)		0.2%
	INS 450 (iii)		
กุ้งขาวแช่แข็ง	INS 451(i)	ไม่ได้ระบุ	
	INS 330		0.1%
	INS 450 (iii)		
ปลาทะเลแช่แข็ง	INS 451(i)	0.2%	0.15%
	INS 450 (iii)		

#### หมายเหตุ

INS 339 = sodium phosphate

INS 450 = Diphosphate

INS 450 (iii) = tetrasodium diphosphate

INS 451 = triphosphate

INS 451(i) = Pentasodium Triphosphate





## บทที่ 4

### สรุปผลการวิจัย

#### 4.1 สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้สังเคราะห์ลิแกนด์ L1, L2 และสารประกอบโคออร์ดิเนชันชนิดไดนิวเคลียร์ของคอปเปอร์ (II) และสังกะสี (II) กับลิแกนด์ทั้ง 2 ชนิดได้เป็นผลสำเร็จ (ML1 และ ML2 เมื่อ M คือ  $Cu^{2+}$  และ  $Zn^{2+}$ ) หลังจากนั้นนำสารประกอบโคออร์ดิเนชันที่สังเคราะห์ได้ทั้ง 4 ชนิด มาศึกษาความจำเพาะเจาะจงกับแอนไอออนด้วยเทคนิคการถูกแทนที่ของอินดิเคเตอร์ โดยใช้อินดิเคเตอร์ไฟโรแคทีคอล ไวโอเลต หรือ PV เป็นหน่วยให้สัญญาณ ในตัวทำละลาย 10 mM HEPES บัฟเฟอร์ที่ pH 7.4 จากการศึกษาพบว่า มีเพียงเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบ ZnL2 กับ PV เท่านั้นที่มีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัด PPI เนื่องจากมีเพียง PPI เท่านั้นที่ทำให้สีของสารละลายเอนไซม์เบิลของ [ZnL2•PV] เปลี่ยนจากสีฟ้าไปเป็นสีเขียวของอินดิเคเตอร์ PV ในรูปอิสระ ในขณะที่แอนไอออนชนิดอื่นๆ ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของสารละลายแต่อย่างใด แสดงว่าอินดิเคเตอร์ PV ในโครงสร้างของเอนไซม์เบิล [ZnL2•PV] สามารถถูกแทนที่ด้วย PPI ส่งผลให้ได้อินดิเคเตอร์ PV ในรูปอิสระกลับคืนมา ดังนั้นจึงสามารถนำเอนไซม์เบิล [ZnL2•PV] ไปตรวจวัด PPI ในตัวอย่างจริงได้แม้ในสภาวะที่มีแอนไอออนชนิดอื่นอยู่ในระบบ จะเห็นได้ว่าทั้งโครงสร้างของลิแกนด์และชนิดของไอออนโลหะต่างก็เป็นปัจจัยสำคัญในการควบคุมความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัด PPI ในงานวิจัยนี้ โดยที่ค่าขีดจำกัดในการตรวจวัด PPI ด้วยเอนไซม์เบิลดังกล่าวมีค่าเท่ากับ  $0.60 \mu M$  เมื่อนำเอนไซม์เบิลดังกล่าวมาตรวจสอบปริมาณของ PPI ที่ใช้ในอาหารทะเลแช่แข็งพบว่า มีปริมาณที่สัมพันธ์กับค่าที่ระบุไว้ที่ภาชนะที่บรรจุ

#### 4.2 ข้อเสนอแนะ

สังเคราะห์ลิแกนด์ชนิดใหม่ที่ทำให้ค่าขีดจำกัดในการตรวจวัด PPI มีค่าน้อยกว่านี้ เพื่อนำไปตรวจวัด PPI ที่มีอยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต

## บรรณานุกรม

1. จุฬ สิ้นชัยพานิช. 2544, การรับรู้และการมีส่วนร่วมในการทำการประมงอย่างมีความรับผิดชอบของเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกุ้งทะเลในบริเวณพื้นที่ปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราชและสงขลา กรุงเทพฯ : 100 น.
2. สุทธิวัฒน์ เบญจกุล (มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร). 2536, การใช้ฟอสเฟตในอาหารทะเล. อาหาร, 1 หน้า 7-12
3. Additional Information - List of Permitted Additives in Fish and Fish Products. สืบค้นวันที่ 10 มกราคม 2560 เข้าถึงได้จาก <http://www.inspection.gc.ca/food/fish-and-seafood/product-inspection/additives/additional-information/eng/1414520861545/1414520931807>
4. Calvo, M. S., Moshfegh, A. J. and Tucker, K. L. (2014). Assessing the health impact of phosphorus in the food supply: issues and considerations. *Advances in Nutrition*, 5, 104-113.
5. Christoffersen, M. R., and Christoffersen, J. (2003). Effects of a bisphosphonate (EHDP) on growth, formation and dissolution of calcium pyrophosphate crystals. *Crystal Growth & Design*, 3, 79–82.
6. Faithong, J. Raksakulthai, N. and Chaiyawat M. (2006). Effect of phosphates and salt on yield and quality of cooked white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Kasetsart Journal (Natural Science)*, 4, 108-116.
7. Goncalves, A. A. and Ribeiro, J. L. D. (2008). Do phosphates improve the seafood quality? Reality and legislation. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 3(3), 237-247.
8. Henson, L. S.; Kowalewski, K. M. (1992). Use of phosphates in seafood. *Infofish International*, 5, 52-54.
9. Hortala, M. A., Fabbrizzi, L., Marcotte, N., Stomeo, F., Taglietti, A. (2002). Designing the selectivity of the fluorescent detection of amino acids: A chemosensing ensemble for histidine. *Journal of the American Chemical Society*, 125, 20-21.
10. Jastrzebska, A. (2009). Modifications of spectrophotometric methods for total phosphorus determination in meat samples. *Chemical Papers*, 63, 47-54.

11. 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.
12. Ley-Ngardigal, K., Combes, C., Teychene, S., Bonhomme, C., Coelho-Diogo, C., Gras, P., Rey, C. and Biscans, B. (2017). Influence of ionic additives on triclinic calcium pyrophosphate dihydrate precipitation. *Crystal Growth & Design*, 17, 37–50.
13. Long, N., H., B., S., R Gál, R., Buňka, F. (2011). Use of phosphates in meat products. *African Journal of Biotechnology*, 10, 19874-19882.
14. Molins, R. A., Kraft, A. A., Walker, H. W., Rust, R. E., Olson, D. G. and K. Merkenich, K. (1987). Effect of inorganic polyphosphates on ground beef characteristics: microbiological effects on frozen beef patties. *Journal of Food Science*, 52, 46–49.
15. Morgan, B. P., He, S. and Smith, R. C. (2007). Zinc enzyme model/ complexometric indicator pairs in indicator displacement assays for inorganic phosphates under physiological conditions. *Inorganic Chemistry*, 46, 9262–9266.
16. Nguyen, B. T. and Anslyn, E. V. (2006). Indicator–displacement assays. *Coordination Chemistry Reviews*, 250, 3118-3127.
17. Sun, S-K., Tua, K-X. and Yan, X-P. (2012). An indicator-displacement assay for naked-eye detection and quantification of histidine in human urine. *Analyst*, 137, 2124-2128.
18. Tobey, S. L., and Anslyn, E. V. (2003). Determination of inorganic phosphate in serum and saliva using a synthetic receptor. *Organic Letters*, 5, 2029–2031.
19. Toldrá, F. (2003). Muscle foods: water, structure and functionality. *Food Science and Technology International*, 9(3), 173-177.
20. Watchasit, S., Kaowliew, A., Suksai, C., Thawatchai, T., Ngeontae, W., & Pakawatchai, C. (2010). Selective detection of pyrophosphate by new tripodal amine calix[4]arene-based Cu(II) complexes using indicator displacement strategy. *Tetrahedron Letter*, 51, 3398-3402.
21. 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.

22. Wiskur, S. L., Ait-Haddou, H., Lavigne, J. J. and Anslyn, E. V. (2001). Teaching old indicators new tricks. *Accounts of Chemical Research*, 34(12), 963–972.
23. Yoza, N., Akazaki, I., Nakazato, T., Ueda, N., Kodama, H., and Tateda, A. (1991). High-performance liquid chromatographic determination of pyrophosphate in the presence of a 20,000-fold excess of orthophosphate. *Analytical Biochemistry*, 199, 279-85.
24. Zhu, Z., Zhou, J., Li, Z. and Yang, C. (2015). Dinuclear zinc complex for fluorescent indicator-displacement assay of citrate. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 208, 151–158.