



การตรวจวัดกลูตาไธโอนด้วยคัลลอร์ิเมตริกเซนเซอร์โดยใช้สารประกอบเชิงซ้อนไดนิวเคลียร์ของคอปเปอร์ (II) กับอินดิเคเตอร์ไพโรแกลลอล เรด

Colorimetric Sensing of Glutathione by Copper (II) Complex with Pyrogallol Red Indicator

จอมใจ สุกใส¹ และ สรายุทธ เวชสิทธิ์^{2*}

Chomchai Suksai¹ and Sarayut Watchasit^{2*}

¹ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

² ห้องปฏิบัติการนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรมิเตอร์ หน่วยบริการนวัตกรรมทางวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

¹ Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Burapha University

² Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic Laboratory, Science Innovation Facility, Faculty of Science, Burapha University

Received : 21 July 2021

Revised : 13 September 2021

Accepted : 20 September 2021

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้นำสารประกอบเชิงซ้อนไดนิวเคลียร์ของคอปเปอร์ (II) กับลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของเมตาไซลีน (L) มาศึกษาการเลือกจับกับแอนไอออนชนิดต่าง ๆ โดยใช้ไพโรแกลลอล เรด เป็นหน่วยให้สัญญาณในสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 พบว่าแอนไอออนที่เตรียมจากสารประกอบ Cu_2L_2 และอินดิเคเตอร์ไพโรแกลลอล เรด (pyrogallol red หรือ PGR) มีความจำเพาะในการตรวจวัดกลูตาไธโอน (GSH) เนื่องจากมีเพียงกลูตาไธโอนเท่านั้นที่สามารถเปลี่ยนสีสารละลายของแอนไอออน $[Cu_2L_2 \cdot PGR]$ จากสีน้ำเงินไปเป็นสีส้มซึ่งเป็นสีของอินดิเคเตอร์ PGR ชัดจำกัดการตรวจวัดกลูตาไธโอนด้วยแอนไอออน $[Cu_2L_2 \cdot PGR]$ มีค่าเท่ากับ $0.85 \mu M$ นอกจากนี้ยังสามารถใช้แอนไอออนดังกล่าวมาใช้ในการตรวจวัดหาปริมาณกลูตาไธโอนในยาประเภทแคปซูลได้

คำสำคัญ : ไพโรแกลลอล เรด; สารประกอบเชิงซ้อนไดนิวเคลียร์ของคอปเปอร์ (II); กลูตาไธโอน; แอนไอออน



Abstract

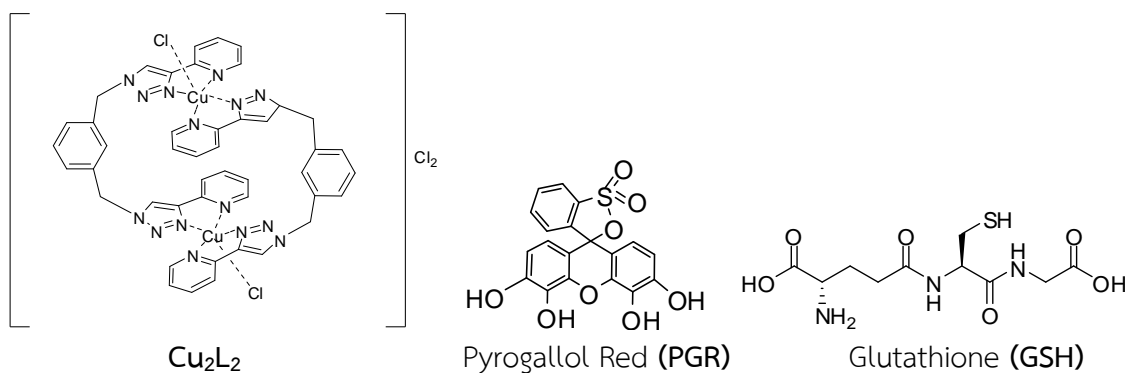
In this research, the dinuclear copper (II) complex containing m-xylene units (Cu_2L_2) was applied to study the sensing abilities towards anions using Pyrogallol Red (PGR) as sensory unit in 10 mM HEPES buffer pH 6. The results demonstrated that the $[\text{Cu}_2\text{L}_2\cdot\text{PGR}]$ ensemble can be able to sense glutathione (GSH) selectively over than other anions, the color of $[\text{Cu}_2\text{L}_2\cdot\text{PGR}]$ change from blue to orange color of PGR in the present of GSH. The detection limit of GSH was 0.85 μM . The proposed ensemble was successfully applied to determination of glutathione in drug capsule.

Keywords : pyrogallol Red ; dinuclear copper (II) complex ; glutathione; ensemble

บทนำ

ปัจจุบันกลูตาไธโอน (Glutathione หรือ GSH) ได้รับความสนใจจากศาสตร์มากมายหลายแขนง เนื่องจากมีบทบาทสำคัญในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Gaucher *et al.*, 2018) สามารถพบได้ทั่วไปในเซลล์ต่างๆ ของร่างกายโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเซลล์ตับ ในภาวะการเกิดโรคหรือภาวะความผิดปกติของร่างกายบางอย่าง เช่น โรคพาร์กินสัน โรคอัลไซเมอร์ โรคเบาหวาน (Mischley *et al.*, 2016) โรคมะเร็ง (Kennedy *et al.*, 2020) การได้รับรังสี สารพิษ สารเคมี โลหะหนักบางชนิด เป็นต้น ภาวะเหล่านี้จะทำให้ร่างกายเข้าสู่ภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) ซึ่งจะนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระ กลูตาไธโอนจึงมีความสำคัญในบทบาทของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น นอกจากนี้ยังมีแนวคิดในการนำกลูตาไธโอนมาใช้ในด้านความสวยงามและช่วยให้ผิวขาว อันเนื่องมาจากได้มีการค้นพบโดยบังเอิญว่าผู้ป่วยโรคมะเร็งระยะสุดท้ายที่ได้รับการฉีดกลูตาไธโอนเพื่อเพิ่มภูมิต้านทาน กลับพบว่าผิวขาวขึ้นและสีผมอ่อนลง ซึ่งอธิบายได้จากการที่ร่างกายมีปริมาณกลูตาไธโอนสูงกว่าภาวะปกติมีผลยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่เกี่ยวข้องกับเม็ดสีผิวทำให้เม็ดสีผิวเปลี่ยนจากสีน้ำตาลดำเป็น สีขาวชมพู ซึ่งจะมองดูผิวพรรณออกขาวชมพูมากขึ้น (Villarama and Maibach, 2005) แต่ปัจจุบันยังไม่พบงานวิจัยทางการแพทย์ที่น่าเชื่อถือใด ๆ ที่สามารถยืนยันได้ว่ากลูตาไธโอนสามารถทำให้ผิวขาวขึ้นได้จริง ซึ่งเทคนิคที่นิยมใช้ในการตรวจวัด กลูตาไธโอน ได้แก่ Resonance Elastic Light Scattering (RELS) Spectroscopy (Stobiecka *et al.*, 2010), Electrochemiluminescence (ECL) method (Gao *et al.*, 2016) และ High-performance Liquid Chromatography (HPLC) (Yu *et al.*, 2016) แต่การตรวจวัดด้วยเทคนิคดังกล่าวนี้ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง หรือในบางเทคนิคจำเป็นต้องอาศัยขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยาก

ในปัจจุบันยังมีอีกสาขาทางวิจัยที่นิยมนำเทคนิคเซนเซอร์ทางเคมีเชิงแสง มาใช้ในการตรวจวัดกลูตาไธโอนซึ่งข้อดีของการใช้เทคนิคนี้คือ ตรวจวัดได้ง่ายและรวดเร็ว สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า มีสภาพไวและความจำเพาะที่ดี ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ต่ำ สามารถประยุกต์ใช้ตรวจวัดในภาคสนามและไม่จำเป็นต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ (Jia *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2013) ในงานวิจัยนี้จึงได้นำสารประกอบชนิดโคออร์ดิเนชัน Cu_2L_2 มาใช้เป็นหน่วยรีเซปเตอร์ในการตรวจวัดกลูตาไธโอน และใช้อินดิเคเตอร์ Pyrogallol Red (PGR) ทำหน้าที่เป็นหน่วยให้สัญญาณ ซึ่งโครงสร้างของสารประกอบ Cu_2L_2 , PGR และ Glutathione (GSH) แสดงได้ในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้างของ Cu_2L_2 , PGR และ GSH



วิธีดำเนินการวิจัย

1. สารเคมี

เกลือของแอนไฮดรอน กรดอะมิโน บัฟเฟอร์ อินดิเคเตอร์และสารเคมีอื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษาจากบริษัท QREC, Sigma-Aldrich, Fluka, TCI และ BDH ตัวทำละลายอินทรีย์ EtOH, MeOH, MeCN และ CH_2Cl_2 จากบริษัท RCI Labscan น้ำกลั่น จากบริษัท General Hospital Products Public Co., Ltd,

2. อุปกรณ์และเครื่องมือ

เครื่องระเหยตัวทำละลายแบบลดความดัน (Heidolph Laborota 4000 efficient)

ยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรมิเตอร์ (Agilent 8453)

ฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Agilent Cary Eclipse)

เครื่องวัดค่า pH (Mettler toledo)

นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรมิเตอร์ (Bruker Avance III HD 400 MHz)

3. วิธีการทดลอง

3.1 การสังเคราะห์ลิแกนด์ L

ในงานวิจัยนี้ได้ดัดแปลงการสังเคราะห์ลิแกนด์ L มาจากงานวิจัยของ Pokharel และคณะ (Pokharel *et al.*, 2013) โดยขั้นแรกทำการเตรียมสารประกอบลิแกนด์ L โดยทำการละลาย α, α' -dibromo-m-xylene (792 mg, 3.0 mmol) ในตัวทำละลายผสมระหว่าง DMF/ H_2O ในอัตราส่วน 4:1 ปริมาตร 15 mL จากนั้นเติม NaN_3 (410 mg, 6.30 mmol) ตามด้วย Na_2CO_3 (312 mg, 3.0 mmol), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (300 mg, 1.2 mmol), ascorbic acid (420 mg, 2.4 mmol) และ 2-ethynylpyridine (640 mg, 6.0 mmol) ทำการคนสารละลายผสมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 ชั่วโมง จากนั้นทำการเติมสารละลาย NH_3/EDTA ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2 g ใน 28% aqueous ammonia 5 mL และปรับปริมาตรเป็น 100 mL ด้วย H_2O) ลงในสารละลายผสมดังกล่าว จากนั้นทำการสกัดสารละลายผสมด้วย chloroform (2 x 100 mL) และเก็บชั้นตัวทำละลายอินทรีย์มาทำให้น้ำด้วย Anhydrous MgSO_4 ทำการระเหยตัวทำละลายออกแล้วตกผลึกจะได้ของแข็งสีขาว จากนั้นทำการกรองผลึกและล้างผลึกด้วย diethyl ether เย็น จะได้ลิแกนด์ L (910 mg, 77%)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.55 (d, $J = 4.8$ Hz, 2H, ArH), 8.21-8.18 (m, 4H, ArH), 7.83-7.79 (m, 2H, ArH), 7.42-7.23 (m, 6H, ArH), 5.59 (s, 4H, $-\text{CH}_2-$)

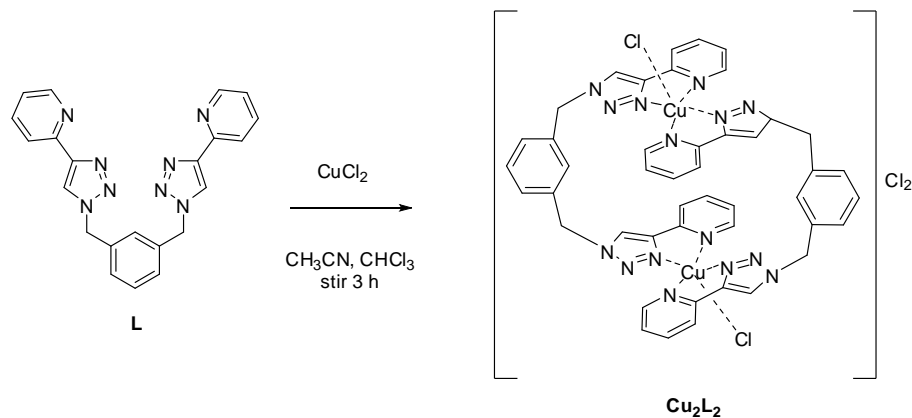
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 149.82, 148.92, 148.41, 137.37, 135.60, 130.14, 128.63, 127.92, 123.02, 122.34, 120.46, 53.96



ภาพที่ 2 แผนภาพแสดงวิธีการสังเคราะห์ลิแกนด์ L

3.2 การสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชันไดนิวเคลียร์ Cu_2L_2

สารประกอบ Cu_2L_2 ที่ใช้ในการวิจัยนี้ทำการสังเคราะห์ตามกระบวนการในงานวิจัยของ Pokharel โดยทำการละลายลิแกนด์ L (200 mg, 0.51 mmol) ใน Chloroform (25 mL) จากนั้นค่อยๆ หยดสารละลายลิแกนด์ L ดังกล่าวลงในสารละลายของ $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (86 mg, 0.51 mmol) ใน CH_3CN (25 mL) ทำการคนสารละลายผสมเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จะเกิดของแข็งสีเขียวขึ้น ทำการกรองของแข็งดังกล่าวและล้างด้วย CH_3CN และ $CHCl_3$ ตามลำดับ จะได้สารประกอบโคออร์ดิเนชันไดนิวเคลียร์ Cu_2L_2 (242 mg, 90.2%)



ภาพที่ 3 แผนภาพแสดงวิธีการสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชันไดนิวเคลียร์ Cu_2L_2

ในการพิจารณาว่าสารละลาย $[Cu_2L_2 \cdot PGR]$ จะมีความจำเพาะต่อแอนไอออนชนิดใดนั้น นอกจากการสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายแล้ว ยังสามารถทำได้โดยการสังเกตว่าแอนไอออนชนิดใดที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมมากที่สุด โดยนำสารละลาย $[Cu_2L_2 \cdot PGR]$ ในขณะที่ยังไม่เติมสารละลายแอนไอออนชนิดต่าง ๆ และในขณะที่เติมแล้ว นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 250-900 nm จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความยาวคลื่น



3.4 การหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนไซม์ของสารประกอบ Cu_2L_2 กับอินดิเคเตอร์ PGR โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน

ปิเปตสารละลายอินดิเคเตอร์ PGR ที่มีความเข้มข้น 20 μM ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ในตัวทำละลาย HEPES บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 mM ที่ pH 6 ลงในคิวเวทและทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง จากนั้นทำการไทเทรตด้วยสารละลายสารประกอบเชิงซ้อน Cu_2L_2 ความเข้มข้น 400 μM ครั้งละ 5.00 ไมโครลิตร (0.05 equivalent) ในตัวทำละลาย HEPES บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 mM ที่ pH 6 จากนั้นคนสารละลายเป็นเวลา 1 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความยาวคลื่น

3.5 การหาอัตราส่วนในการเกิดเอนไซม์ของสารประกอบ Cu_2L_2 กับ PGR โดยวิธี Job's method

บรรจุสารละลาย Cu_2L_2 ความเข้มข้น 20 μM ในตัวทำละลาย HEPES บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 mM ที่ pH 6 และสารละลาย PGR ความเข้มข้น 20 μM ในตัวทำละลาย HEPES บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 mM ที่ pH 6 ลงในบิวเรต จากนั้นทำการไขสารละลายทั้งสองชนิดลงในขวดวัดปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร โดยเตรียมในอัตราส่วนโมลระหว่าง Cu_2L_2 /PGR ในช่วง 0 – 1 equivalent เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 567nm จากนั้นนำข้อมูลมาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 567 nm กับเศษส่วนโมลของ Cu_2L_2

3.6 การศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง Cu_2L_2 กับ GSH โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน

ปิเปตสารละลายเอนไซม์ของสารประกอบ Cu_2L_2 กับ PGR [Cu_2L_2 •PGR] (1:1 equivalent) ความเข้มข้น 20 μM ปริมาตร 2.00 มิลลิลิตร ในตัวทำละลาย HEPES บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 mM ที่ pH 6 ลงในคิวเวทและทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง จากนั้นทำการไทเทรตสารละลาย GSH ความเข้มข้น 1 mM ครั้งละ 0.025 มิลลิลิตร (0.625 equivalent) ในตัวทำละลาย HEPES บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 mM ที่ pH 6 ลงในคิวเวทที่มีสารละลาย [Cu_2L_2 •PGR] คนสารละลายให้เข้ากันเป็นเวลา 3 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงทุกครั้งที่มีการเติมสารละลาย GSH ลงไป จนกระทั่งไทเทรตครบ 0.35 มิลลิลิตร (8.75 equivalent) นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความยาวคลื่น

3.7 การศึกษาการตรวจวัด GSH ด้วยเอนไซม์เบิล [Cu_2L_2 •PGR] โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมทรี ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและปราศจากออกซิเจน

การทดลองในสภาวะที่มีออกซิเจนทำโดยปิเปตสารละลายเอนไซม์เบิล [Cu_2L_2 •PGR] ความเข้มข้น 20 μM ปริมาตร 2.00 มิลลิลิตร ในตัวทำละลาย HEPES บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 mM ที่ pH 6 ลงในคิวเวทแล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง จากนั้นปิเปตสารละลาย GSH ความเข้มข้น 1 mM 0.35 มิลลิลิตร ในตัวทำละลาย HEPES บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 mM ที่ pH 6 ลงในคิวเวทที่มีสารละลาย [Cu_2L_2 •PGR] คนสารละลายให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงทุก ๆ 30 วินาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับเวลา (นาที)

ในส่วนการทดลองในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนไม่สามารถทำโดยทำการผ่านแก๊สไนโตรเจนลงในสารละลายเอนไซม์เบิล [Cu_2L_2 •PGR] และสารละลาย GSH ในตัวทำละลาย HEPES บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 mM ที่ pH 6 เป็นเวลา 15 นาที (Butler et al., 1994) และทำการทดลองต่อไปเช่นเดียวกับในกรณีสภาวะที่มีออกซิเจน



3.8 การศึกษาผลการรบกวนของไอออนชนิดต่าง ๆ ต่อการตรวจวัด GSH ด้วยเอนไซม์เบิล [Cu₂L₂•PGR] โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี

ปีเปตสารละลายเชิงซ้อน [Cu₂L₂•PGR] + GSH ความเข้มข้น 20 μM ปริมาตร 2.00 มิลลิลิตร ลงในคิวเวท จากนั้นปีเปตสารละลายแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 350.00 ไมโครลิตร ลงในคิวเวทที่มีสารละลายเชิงซ้อน [Cu₂L₂•PGR] + GSH คนสารละลายให้เข้ากันเป็นเวลา 3 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 567 nm ในสภาวะที่มีแอนไอออนชนิดต่าง ๆ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 567 nm กับแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ที่เติมลงไป

3.9 การวิเคราะห์ปริมาณกลูตาไธโอนในตัวอย่างยาแคปซูลโดยใช้ยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี

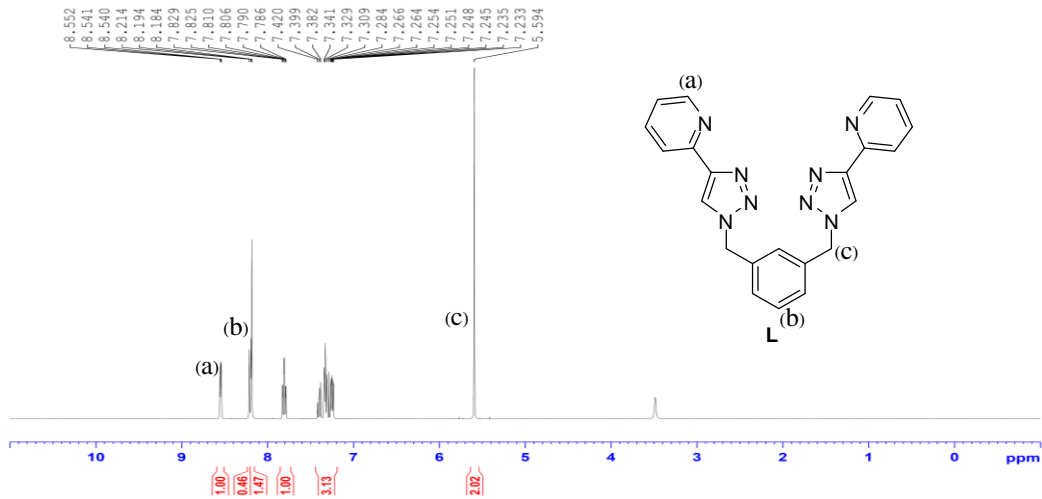
ปีเปตสารละลายเอนไซม์เบิล [Cu₂L₂•PGR] ความเข้มข้น 20 μM ปริมาตร 2.00 มิลลิลิตร ในตัวทำละลาย HEPES บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 mM ที่ pH 6 ลงในคิวเวท แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง จากนั้นปีเปตสารละลายตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ในตัวทำละลาย HEPES บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 mM ที่ pH 6 ลงในคิวเวทดังกล่าว และทำการเติมสารละลายมาตรฐาน GSH ความเข้มข้น 500 μM ปริมาตรต่างกันตามลำดับให้ได้ความเข้มข้น 1, 3, 5 และ 7 μM ปรับปริมาตรให้ปริมาตรรวมเท่ากับ 2.35 มิลลิลิตรด้วยสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 คนสารละลายให้เข้ากัน จับเวลา 3 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 420 nm กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน GSH (μM)

ผลการวิจัย

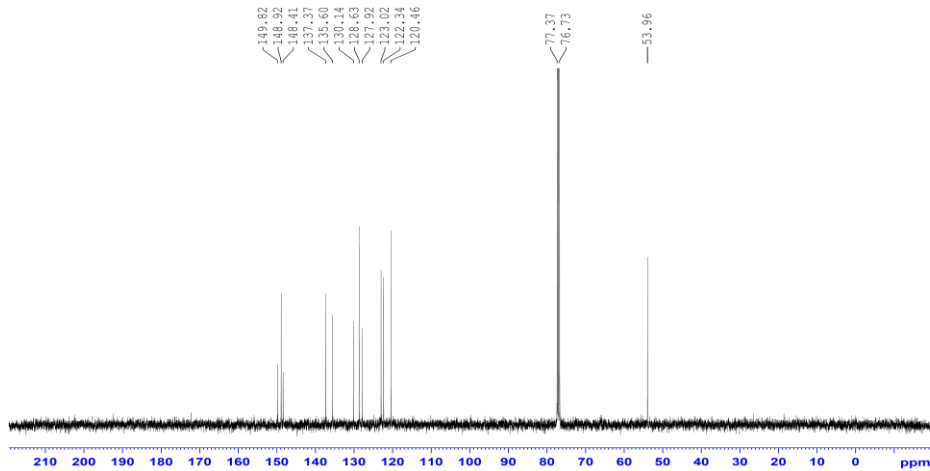
1. การสังเคราะห์ลิแกนด์ L และสารประกอบโคออร์ดิเนชันไดนิวเคลียร์ Cu₂L₂

ลิแกนด์ L ที่จะนำมาใช้ในการเตรียมสารประกอบโคออร์ดิเนชัน Cu(II) สามารถเตรียมได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่าง α,α'-dibromo-m-xylene กับ 2-ethynylpyridine ในตัวทำละลาย DMF : H₂O อัตราส่วน 4:1 และทำการคนสารละลายที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน ได้สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาวร้อยละของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 77 จากนั้นทำการการพิสูจน์โครงสร้างของลิแกนด์ L โดยใช้เทคนิค ¹H-NMR ได้ผลการวิเคราะห์ดังภาพที่ 4 และ 5

สำหรับสารประกอบ Cu₂L₂ ทำการสังเคราะห์ตามกระบวนการในงานวิจัยของ Pokharel และคณะ โดยเตรียมจากการทำปฏิกิริยาระหว่างลิแกนด์ L และ CuCl₂•2H₂O ได้สารประกอบโคออร์ดิเนชัน Cu₂L₂ ที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีเขียวร้อยละของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 90.2



ภาพที่ 4 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของลิแกนด์ L ในตัวทำละลาย CDCl_3

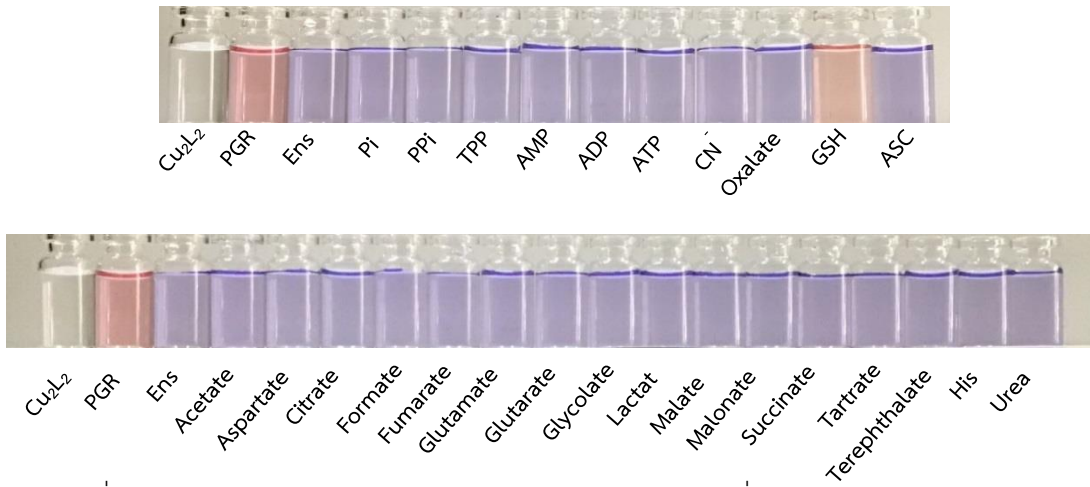


ภาพที่ 5 $^{13}\text{C-NMR}$ สเปกตรัมของลิแกนด์ L ในตัวทำละลาย CDCl_3

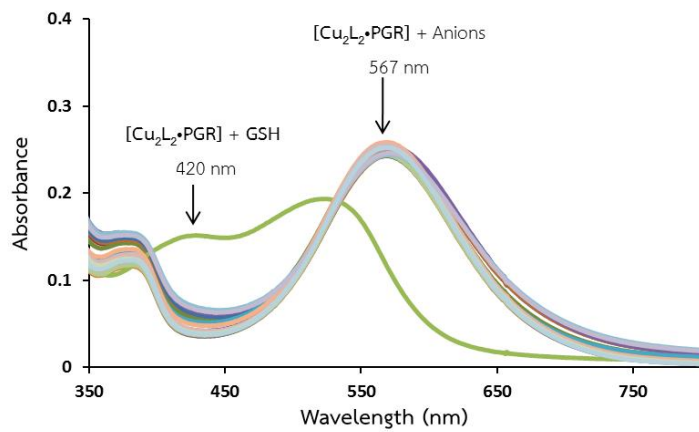
2. การศึกษาความจำเพาะในการตรวจวัดแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ของเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบ Cu_2L_2 กับอินดิเคเตอร์ PGR โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี

จากการศึกษาความจำเพาะของแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ต่อสารประกอบ Cu_2L_2 ในสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 โดยทำการเปิดสารละลาย Cu_2L_2 ความเข้มข้น 20 μM ปริมาตร 2.00 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้วและเปิดสารละลาย PGR ความเข้มข้น 400 μM ปริมาตร 0.10 มิลลิลิตร ตามลงในขวดดังกล่าว คนสารละลายให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีไม่มีสีไปเป็นสีน้ำเงิน จากนั้นทำการเปิดแอนไอออนชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 0.35 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้วที่มีสารละลายของเอนไซม์เบิล [$\text{Cu}_2\text{L}_2\cdot\text{PGR}$] คนสารละลายให้เข้ากันเป็นเวลา 3 นาที และสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย ผลการทดลองที่ได้แสดงดังภาพที่ 6 และเมื่อนำสารละลายเอนไซม์เบิล

[Cu₂L₂•PGR] ในสภาวะที่มีแอนไอออนชนิดต่าง ๆ มาวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรีจะได้สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของเอนไซม์เบิล [Cu₂L₂•PGR] ดังภาพที่ 7



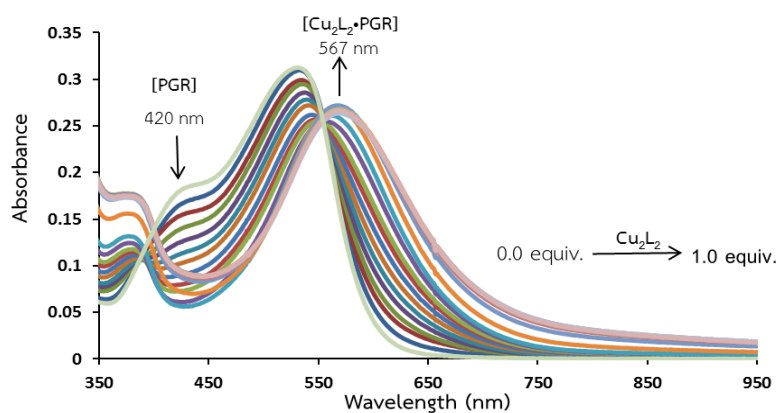
ภาพที่ 6 การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเอนไซม์เบิล [Cu₂L₂•PGR] ในสภาวะที่มีแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ในสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6



ภาพที่ 7 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายเอนไซม์เบิล [Cu₂L₂•PGR] (20 μM) ที่มีแอนไอออนชนิดต่างๆ (1 mM) ในสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6

3. การหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนไซม์ของสารประกอบ Cu_2L_2 กับอินดิเคเตอร์ PGR โดยใช้เทคนิค ยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน

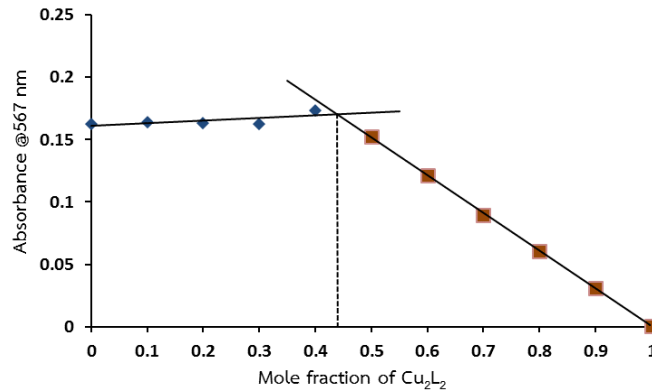
การหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนไซม์ของสารประกอบ Cu_2L_2 กับอินดิเคเตอร์ PGR โดยใช้เทคนิค ยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน ทำได้โดยนำสารละลาย PGR ความเข้มข้น 20 μM ปริมาตร 2.00 มิลลิลิตร มาไทเทรตด้วยสารละลาย Cu_2L_2 ความเข้มข้น 400 μM ครั้งละ 5.00 ไมโครลิตร (0.05 equivalent) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิค ยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี โดยทำการทดลองจนครบ 0.10 มิลลิลิตร (1 equivalent) ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 8



ภาพที่ 8 ยูวี-วิสิเบิลไทเทรชันสเปกตรัมของสารละลาย PGR (20 μM) ด้วยสารละลาย Cu_2L_2 (400 μM) ในสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6

4. การหาอัตราส่วนในการเกิดเอนไซม์ของสารประกอบ Cu_2L_2 กับ PGR โดยวิธี Job's method

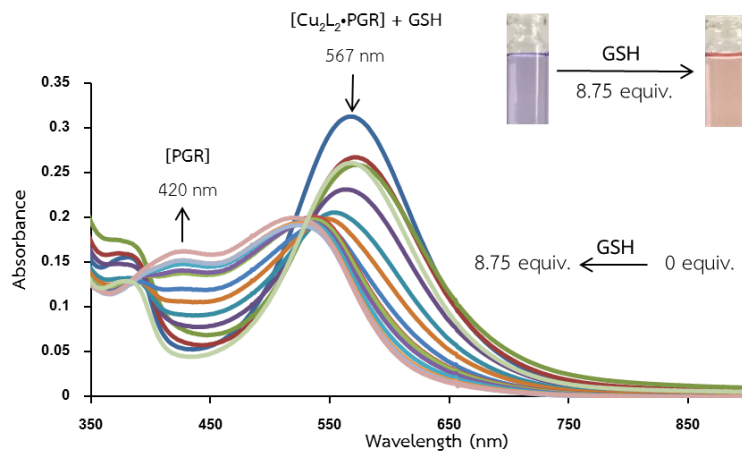
การหาอัตราส่วนในการเกิดเอนไซม์ของสารประกอบ Cu_2L_2 กับ PGR โดยวิธี Job's method โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี ทำได้โดยเตรียมสารละลายผสมระหว่างสารละลาย Cu_2L_2 และสารละลาย PGR ที่เศษส่วนโมลต่างกัน แล้วนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 567 nm จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 567 nm กับเศษส่วน โมลของ Cu_2L_2 ดังแสดงในภาพที่ 9



ภาพที่ 9 การหาอัตราส่วนในการเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสารละลาย Cu_2L_2 (20 μM) กับสารละลาย PGR (20 μM) ในสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 โดยวิธี Job's

5. การศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง Cu_2L_2 กับ GSH โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน

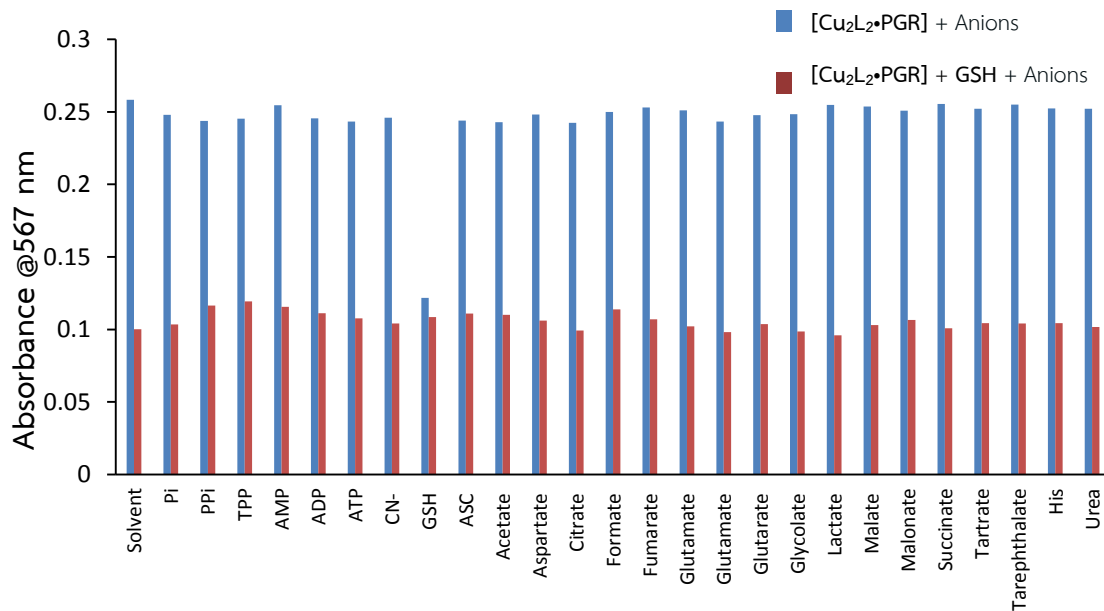
การศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง Cu_2L_2 กับ GSH โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน ทำได้โดยไทเทรตสารละลายเอนไซม์เบิล [$Cu_2L_2 \cdot PGR$] ความเข้มข้น 20 μM 2.00 มิลลิลิตร ด้วยสารละลาย GSH ความเข้มข้น 1 mM ครั้งละ 0.025 มิลลิลิตร (0.625 equivalent) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงจนครบ 0.35 มิลลิลิตร (8.75 equivalent) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความยาวคลื่น ดังภาพที่ 10



ภาพที่ 10 ยูวี-วิสิเบิลไทเทรชันสเปกตรัมของสารละลายเอนไซม์เบิล [$Cu_2L_2 \cdot PGR$] (20 μM) ด้วยสารละลาย GSH (1mM) ในสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6

6. การศึกษาการรบกวนของไอออนชนิดต่าง ๆ ต่อการตรวจวัด GSH ด้วยเอนไซม์เบิล [Cu₂L₂•PGR] โดยใช้เทคนิค ยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี

การศึกษาผลการรบกวนของแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ต่อการตรวจวัด GSH ด้วยเอนไซม์เบิล [Cu₂L₂•PGR] โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี โดยเตรียมสารละลายผสมของ [Cu₂L₂•PGR] + GSH ความเข้มข้น 20 μM จากนั้นเติมสารละลายแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ลงไป และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 567 nm ในสภาวะที่มีแอนไอออนชนิดต่าง ๆ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 567 nm กับแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ที่เติมลงไปแสดงได้ดังภาพที่ 11



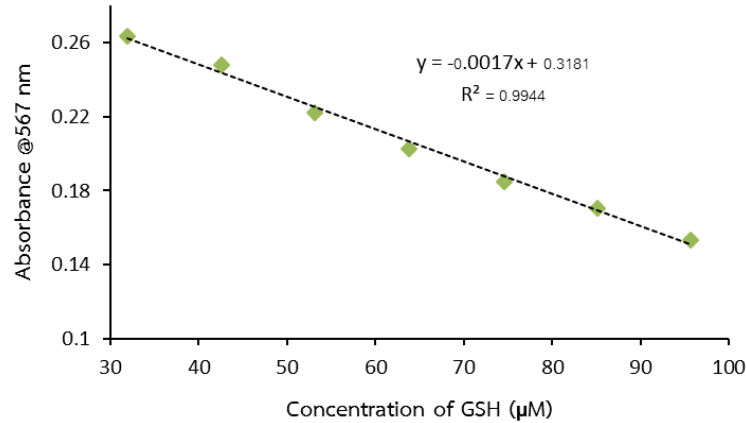
ภาพที่ 11 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย [Cu₂L₂•PGR]+GSH (20 μM) กับสารละลายแอนไอออนชนิดต่าง ๆ (1 mM) ในสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 ที่ความยาวคลื่น 567 nm

7. การหาขีดจำกัดการในการตรวจวัด GSH ด้วยเอนไซม์เบิล [Cu₂L₂•PGR] โดยใช้เทคนิค ยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี

การหาขีดจำกัดในการตรวจวัด GSH ด้วยเอนไซม์เบิล [Cu₂L₂•PGR] โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี สามารถคำนวณหาขีดจำกัดการตรวจวัด ดังสมการที่ 1 (Watchasit *et al.*, 2014)

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

โดยที่ σ คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ของค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่วัดค่าการดูดกลืนแสงจำนวน 10 ครั้ง k คือ ความชันของกราฟที่ได้จากการสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 567 nm กับความเข้มข้น GSH



ภาพที่ 12 การหาขีดจำกัดในการตรวจวัดสารละลาย GSH โดยใช้เอนไซม์เบิล [Cu₂L₂•PGR]

8. การวิเคราะห์หาปริมาณกลูตาไธโอนในตัวอย่งยาแคปซูลด้วยโดยใช้ยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมตรี

จากการทดลองวิเคราะห์หาปริมาณกลูตาไธโอนในตัวอย่งยาแคปซูลโดยการเติมสารละลายมาตรฐานลงในสารละลายตัวอย่างและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (µM) พบว่าสามารถวิเคราะห์หาปริมาณกลูตาไธโอนได้แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณกลูตาไธโอนในตัวอย่งยาแคปซูลโดยใช้ยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรีเทียบกับปริมาณที่วิเคราะห์ได้จากวิธีมาตรฐานโดยใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรโฟโตเมตรี

ตัวอย่าง	Fluorescence Spectrophotometry*		UV-Visible spectrophotometry	
	ปริมาณที่พบ (mg/เม็ด)	% Recovery	ปริมาณที่พบ (mg/เม็ด)	% Recovery
G01	332.81	101.0-135.0	326.50	101.0-111.3
G02	208.29	100.8-117.5	199.48	99.8-109.2
G03	229.73	72.52-98.75	230.05	81.6-102.8

*ใช้วิธีตามมาตรฐานของ Roman Kandar (Kandar *et al.*, 2007)

วิจารณ์ผลการวิจัย

1. การสังเคราะห์ลิแกนด์ L และสารประกอบโคออร์ดิเนชันไดนิวเคลียร์ Cu_2L_2

จากผลการสังเคราะห์ลิแกนด์ L ที่ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Pokharel และคณะ (Pokharel et al., 2013) ปรากฏว่าสามารถสังเคราะห์สารผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาวร้อยละของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 77 จากนั้นทำการการพิสูจน์โครงสร้างของลิแกนด์ L โดยใช้เทคนิค ^1H-NMR ได้ผลการวิเคราะห์ดังภาพที่ 4 พบว่าปรากฏพีคของ $-ArH$ (a) ของวง pyridine ที่มีลักษณะเป็น doublet ที่ δ เท่ากับ 8.55 ppm มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 2 โปรตอน พีค $-ArH$ (b) ที่มีลักษณะเป็น multiplet ที่ δ เท่ากับ 8.21 ppm มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 1 โปรตอน และพีค $-CH_2-$ (c) ที่มีลักษณะเป็น singlet ที่ δ เท่ากับ 5.59 ppm มีจำนวนโปรตอนเท่ากับ 4 โปรตอน ซึ่งเป็นการยืนยันได้ว่าสารประกอบที่สังเคราะห์ได้เป็นลิแกนด์ L นอกจากนั้นเมื่อทำการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค $^{13}C-NMR$ ก็ปรากฏสัญญาณของอะตอมคาร์บอนทั้ง 22 ตำแหน่ง ดังแสดงในภาพที่ 4 และ 5 สำหรับสารประกอบ Cu_2L_2 ทำการสังเคราะห์ตามกระบวนการในงานวิจัยของ Pokharel และคณะ โดยเตรียมจากการทำปฏิกิริยาระหว่างลิแกนด์ L และ $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ ได้สารประกอบโคออร์ดิเนชัน Cu_2L_2 ที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว ร้อยละของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 90.2

2. การศึกษาความจำเพาะในการตรวจวัดแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ของเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากสารประกอบ Cu_2L_2

กับอินดิเคเตอร์ PGR โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี

จากผลการศึกษาความจำเพาะของแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ต่อสารประกอบ Cu_2L_2 จะเห็นได้ว่าสารละลายเอนไซม์เบิล [$Cu_2L_2 \cdot PGR$] มีความจำเพาะกับแอนไอออน GSH เพียงชนิดเดียว เนื่องจากมีเพียง GSH เท่านั้นที่ทำให้สีของสารละลายเปลี่ยนจากสีน้ำเงินไปเป็นสารละลายสีแดงของ PGR ในขณะที่แอนไอออนชนิดอื่นๆ ไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเอนไซม์เบิลแต่อย่างใด และเมื่อนำสารละลายเอนไซม์เบิล [$Cu_2L_2 \cdot PGR$] ในสภาวะที่มีแอนไอออนชนิดต่าง ๆ มาวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี พบว่ามีเพียง GSH ที่ส่งผลทำให้สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายเอนไซม์เบิล [$Cu_2L_2 \cdot PGR$] ที่ความยาวคลื่น 567 nm มีค่าลดลงและที่ความยาวคลื่น 420 nm มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ในขณะที่แอนไอออนชนิดอื่น ๆ ส่งผลให้เกิดการลดลงของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของเอนไซม์เบิล [$Cu_2L_2 \cdot PGR$] มีค่าลดลงเพียงเล็กน้อย

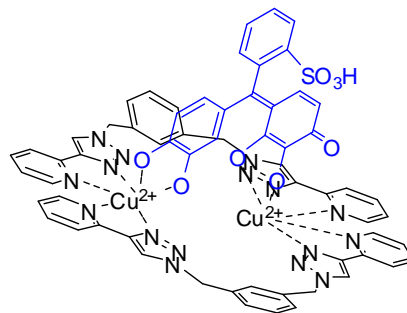
3. การหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนไซม์เบิลของสารประกอบ Cu_2L_2 กับอินดิเคเตอร์ PGR โดยใช้เทคนิค

ยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน

จากผลการทดลองการหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนไซม์เบิลของสารประกอบ Cu_2L_2 กับอินดิเคเตอร์ PGR โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน จากภาพที่ 8 เมื่อเติมสารละลาย Cu_2L_2 ลงไป 0 ถึง 1.0 equivalent จะสังเกตเห็นได้ว่าสีของสารละลายเปลี่ยนจากสารละลายสีแดงของ PGR ไปเป็นสารละลายสีน้ำเงินของเอนไซม์เบิล โดยพบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 567 nm มีค่าเพิ่มขึ้นและที่ความยาวคลื่น 420 nm มีค่าการดูดกลืนแสงลดลง เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการทำยูวี-วิสิเบิลไทเทรชันไปคำนวณหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนไซม์เบิลระหว่างสารประกอบ Cu_2L_2 กับอินดิเคเตอร์ PGR โดยใช้โปรแกรม SPECFIT พบว่ามีค่า $\log K = 4.32 \pm 0.21$ ซึ่งสอดคล้องกับการเกิดเอนไซม์เบิลสปีซีส์ [$Cu_2L_2 \cdot PGR$]

4. การหาอัตราส่วนในการเกิดเอนไซม์เบิลของสารประกอบ Cu_2L_2 กับ PGR โดยวิธี Job's method

จากผลการศึกษาการเกิดเอนไซม์เบิลระหว่าง Cu_2L_2 และ PGR ด้วยวิธี Job's method ดังภาพที่ 9 พบว่าเมื่อทำการลากเส้นสัมผัสจะเกิดจุดตัดที่เศษส่วนโมลของ Cu_2L_2 ที่ประมาณ 0.44 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า PGR เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับ Cu_2L_2 ด้วยอัตราส่วน 1:1 โครงสร้างที่เป็นไปได้ของสปีชีส์ที่เกิดขึ้นแสดงได้ดังภาพที่ 13 ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Ruangpornvisuti และคณะ (Ruangpornvisuti *et al.*, 2019) ที่แสดงให้เห็นว่าอินดิเคเตอร์ PGR จะให้คู่อิเลคตรอนของอะตอมออกซิเจนเกิดพันธะโคออร์ดิเนทโคเวเลนต์กับอะตอมของ Cu(II)



ภาพที่ 13 โครงสร้างที่เป็นไปได้ของสปีชีส์ $[Cu_2L_2 \cdot PGR]$

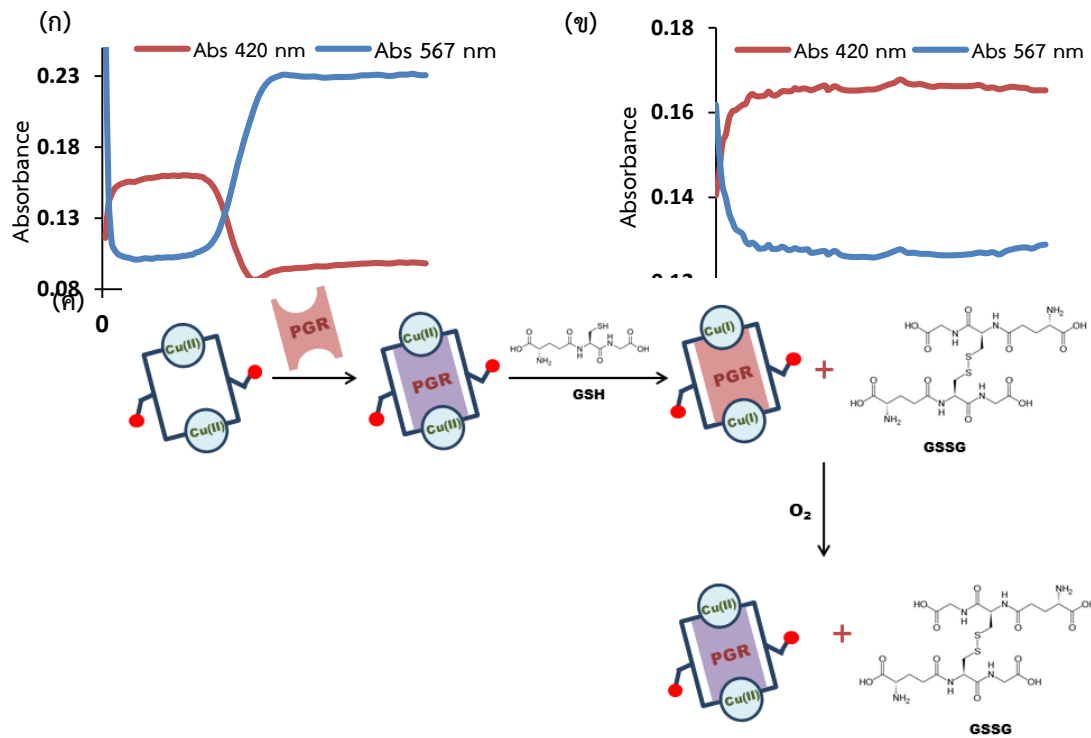
5. การศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง Cu_2L_2 กับ GSH โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทรชัน

จากผลการศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง Cu_2L_2 กับ GSH ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลไทเทรชันดังภาพที่ 10 จะเห็นได้ว่าเมื่อทำการเติมสารละลาย GSH ลงไปในสารละลายเอนไซม์เบิล $[Cu_2L_2 \cdot PGR]$ สารละลายดังกล่าวจะค่อย ๆ เปลี่ยนจากสีน้ำเงินไปเป็นสีแดง และค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเอนไซม์เบิล $[Cu_2L_2 \cdot PGR]$ ที่ความยาวคลื่น 567 nm มีค่าลดลง ในขณะที่ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 420 nm มีค่าเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 15 นาทีพบว่าสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีแดงกลับมาเป็นสีน้ำเงินคล้ายกับสีของเอนไซม์เบิลอีกครั้ง จากปรากฏการณ์ดังกล่าวผู้วิจัยจึงคาดว่าเป็นไปได้ที่เมื่อทำการเติม GSH เข้าไปในระบบ GSH จะไปรีดิวซ์ Cu(II) ไอออน ในโครงสร้างของสารประกอบ Cu_2L_2 ไปเป็น Cu(I) ไอออนและเมื่อ GSH ถูกออกซิไดซ์ด้วยแก๊สออกซิเจนในอากาศจะเปลี่ยนไปเป็น GSSG (Freedman *et al.*, 1989; Filomeni *et al.*, 2005) นอกจากนี้ออกซิเจนยังมีผลทำให้ Cu(I) ไอออน เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกลายเป็น Cu(II) ไอออน กลับมาดังเดิม (Milne *et al.*, 1993) ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาการตรวจวัด GSH ด้วยเอนไซม์เบิล $[Cu_2L_2 \cdot PGR]$ ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและปราศจากออกซิเจน โดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายทุก ๆ 30 วินาที จนครบ 1 ชั่วโมง สังเกตสีของสารละลายและนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับเวลา (นาที)

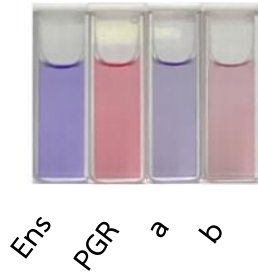
ผลการทดลองจากภาพที่ 14(ก) พบว่าในสภาวะที่มีออกซิเจน ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 และ 567 nm มีค่าคงที่ในช่วง 3-15 นาที และสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีแดง จากนั้นเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาทีค่าการดูดกลืน

แสงที่ความยาวคลื่น 420 nm จะลดลงและที่ 567 nm จะเพิ่มขึ้นก่อนจะคงที่ทั้งสองความยาวคลื่น โดยสีของสารละลายเริ่มเปลี่ยนจากสีแดงไปเป็นสีน้ำเงินของเอนไซม์เบิลจนเมื่อครบ 1 ชั่วโมง สีของสารละลายจะเปลี่ยนกลับไปเป็นสีน้ำเงินของเอนไซม์เบิล ดังภาพที่ 14(ข)เมื่อทำการทดลองภายใต้สภาวะที่ปราศจากออกซิเจน พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 3 นาที ค่าการดูดกลืนแสงทั้งสองความยาวคลื่นจะค่อนข้างคงที่ สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินไปเป็นสีส้มและเมื่อครบ 1 ชั่วโมงสีของสารละลายจะเปลี่ยนไปเพียงเล็กน้อย ดังภาพที่ 15

จากผลการทดลองดังที่ได้กล่าวมาแล้วจึงเป็นไปได้ว่าเมื่อทำการเติม GSH ลงไปยังสารละลายของเอนไซม์เบิล GSH จะไปทำปฏิกิริยารีดิวซ์ Cu^{2+} ไอออนในโครงสร้างของสารประกอบ Cu_2L_2 ไปเป็น Cu^+ ไอออนและสีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินของเอนไซม์เบิลไปเป็นสีแดงของอินดิเคเตอร์ PGR ในขณะเดียวกัน GSH จะถูกออกซิไดซ์ไปเป็นกลูตาไธโอนในรูป GSSG โดยในสภาวะที่มีออกซิเจนอยู่ในระบบ ออกซิเจนจะไปออกซิไดซ์ Cu^+ ไอออนในโครงสร้างของ Cu_2L_2 ไปเป็น Cu^{2+} ไอออนส่งผลให้สีของสารละลายกลับมาเป็นสีน้ำเงินของสารละลายเอนไซม์เบิลอีกครั้ง ตามกลไกที่แสดงดังภาพที่ 14(ค)



ภาพที่ 14 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับเวลา (นาที) ของสารละลาย $[Cu_2L_2 \cdot PGR]$ (20 μM) ที่มีสารละลาย GSH (1 mM) ในสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 (a) ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน (b) ภายใต้สภาวะที่ปราศจากออกซิเจน และ (c) กลไกการตรวจวัดกลูตาไธโอนด้วยเอนไซม์เบิล $[Cu_2L_2 \cdot PGR]$ ในสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH6 ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน



ภาพที่ 15 การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเอนเซมเบล็ด $[Cu_2L_2 \cdot PGR]$ เมื่อเติมสารละลาย GSH เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะ (a) ที่มีออกซิเจน และ (b) ที่ปราศจากออกซิเจน ในสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6

6. การศึกษาการรบกวนของไอออนชนิดต่าง ๆ ต่อการตรวจวัด GSH ด้วยเอนเซมเบล็ด $[Cu_2L_2 \cdot PGR]$ โดยใช้เทคนิค ยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี

ผลการศึกษาการรบกวนของแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ต่อการตรวจวัด GSH ด้วยเอนเซมเบล็ด $[Cu_2L_2 \cdot PGR]$ ดังภาพที่ 11 เมื่อพิจารณากราฟแท่งสีน้ำเงิน พบว่าเมื่อทำการเติมแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ลงไปในสารละลายเอนเซมเบล็ด $[Cu_2L_2 \cdot PGR]$ มีเพียงแค่ว่า GSH เท่านั้นที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 567 nm ลดลง จากนั้นเมื่อพิจารณากราฟแท่งสีแดงที่ทำการเติมแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ลงไปในระบบที่มี GSH อยู่ด้วย พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 567 nm มีแนวโน้มที่ลดลง ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าไม่มีแอนไอออนชนิดใดที่สามารถรบกวนการตรวจวัด GSH ด้วยสารละลายของเอนเซมเบล็ด $[Cu_2L_2 \cdot PGR]$ ในสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 แสดงให้เห็นว่าสารละลายเอนเซมเบล็ด $[Cu_2L_2 \cdot PGR]$ สามารถนำมาใช้เป็นเซนเซอร์ทางเคมีในการตรวจวัด GSH ได้เป็นอย่างดีโดยไม่ถูกรบกวนจากแอนไอออนชนิดอื่น ๆ

7. การหาขีดจำกัดการในการตรวจวัด GSH ด้วยเอนเซมเบล็ด $[Cu_2L_2 \cdot PGR]$ โดยใช้เทคนิค ยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี

จากการทดลองหาค่าขีดจำกัดการตรวจวัดของสารละลาย GSH โดยใช้เอนเซมเบล็ด $[Cu_2L_2 \cdot PGR]$ ด้วยเทคนิค ยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี เมื่อค่า \square เท่ากับ 0.00048 พบว่ามีค่าขีดจำกัดในการตรวจวัด GSH เท่ากับ 0.85 μ M หรือ 0.26 mg/L ซึ่งเมื่อพิจารณาข้อกำหนดตามประกาศของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาฉบับราชกิจจานุเบกษา 18 ตุลาคม 2549 ที่ได้กำหนดให้ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมควรมีส่วนประกอบของแอล-กลูตาไธโอน (L-glutathione) ไม่เกิน 250 มิลลิกรัม แล้วจึงแสดงให้เห็นว่าเทคนิคการตรวจวัด GSH ที่ผู้วิจัยพัฒนาขึ้นมีความสามารถที่จะตรวจวัด GSH ในตัวอย่างเป็นผลิตภัณฑ์ที่จำหน่ายตามท้องตลาดได้

8. การวิเคราะห์หาปริมาณกลูตาไธโอนในตัวอย่างยาแคปซูลด้วยโดยใช้ยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมทรี

ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างยาเม็ดแคปซูลจากตารางที่ 1 แสดงให้เห็นว่าปริมาณกลูตาไธโอนที่วิเคราะห์ได้จากวิธีที่พัฒนาขึ้นมามีค่าใกล้เคียงกับปริมาณที่วิเคราะห์ได้จากวิธีมาตรฐาน และเมื่อทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีโดยใช้หลักทางสถิติ t-Test: Paired Two Sample for Means ที่ความเชื่อมั่น 95 % พบว่าค่า t ที่ได้จากการทดลองเท่ากับ 1.68



ซึ่งน้อยกว่าค่า t ทางทฤษฎีที่เท่ากับ 4.30 ($t_{cal} < t_{crit}$) แสดงให้เห็นว่าข้อมูลไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นวิธีการหาปริมาณกลูตาไธโอนด้วยเทคนิคเซนเซอร์ทางเคมีเชิงแสงที่พัฒนาขึ้นมาจึงสามารถใช้ได้ในการวิเคราะห์หาปริมาณกลูตาไธโอนในยาแคปซูลได้

สรุปผลการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ได้นำสารประกอบ Cu_2L_2 และอินดิเคเตอร์ PGR มาใช้สำหรับตรวจวัด glutathione (GSH) โดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี ในสารละลาย HEPES buffer ความเข้มข้น 10 mM pH 6 จากการศึกษากการเกิดเอนไซม์ของสารประกอบ Cu_2L_2 กับอินดิเคเตอร์ PGR นั้นพบว่าเมื่อเติมสารละลายสีแดงของอินดิเคเตอร์ PGR ลงไปยังสารละลายสีไม่มีสีของสารประกอบ Cu_2L_2 สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 567 nm จากการหาค่าคงที่ความเสถียรของการเกิดเอนไซม์ระหว่าง Cu_2L_2 กับ PGR ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลโทเทอรัล โดยใช้โปรแกรม SPECFIT พบว่ามีค่าคงที่ความเสถียรเท่ากับ $\log K = 4.32 \pm 0.21$ ซึ่งสอดคล้องกับการเกิดเอนไซม์ $[Cu_2L_2 \cdot PGR]$ จากการศึกษาหาอัตราส่วนในการเกิดเอนไซม์ระหว่างสารประกอบ Cu_2L_2 และอินดิเคเตอร์ PGR โดยวิธี Job's method พบว่ามีอัตราส่วนของการเกิดเอนไซม์คือ 1:1

เมื่อนำเอนไซม์ $[Cu_2L_2 \cdot PGR]$ มาศึกษาความจำเพาะในการตรวจวัดแอนไอออนชนิดต่าง ๆ พบว่ามีเพียง GSH เท่านั้นที่ทำให้สีน้ำเงินของสารละลายเอนไซม์เปลี่ยนเป็นสีส้มของอินดิเคเตอร์ PGR แสดงว่ามีเพียงแค GSH เท่านั้นที่จำเพาะกับเอนไซม์ $[Cu_2L_2 \cdot PGR]$ โดยคาดว่าเมื่อเติม GSH เข้าไปในระบบ GSH จะทำการรีดิวซ์ Cu^{2+} ไอออนในโครงสร้างของสารประกอบ Cu_2L_2 ไปเป็น Cu^+ ไอออนและสีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินของเอนไซม์ไปเป็นสีแดงของอินดิเคเตอร์ PGR ในขณะที่เดียวกัน GSH จะถูกออกซิไดซ์ไปเป็นกลูตาไธโอนในรูป GSSG โดยในสภาวะที่มีออกซิเจนอยู่ในระบบ ออกซิเจนจะออกซิไดส์ Cu^+ ไอออนในโครงสร้างของ Cu_2L_2 ไปเป็น Cu^{2+} ไอออนส่งผลให้สีของสารละลายกลับมาเป็นสีน้ำเงินของสารละลายเอนไซม์อีกครั้ง

เมื่อทำการศึกษามลภาวะรบกวนของแอนไอออนชนิดต่าง ๆ ต่อการตรวจวัด GSH ด้วยเอนไซม์ $[Cu_2L_2 \cdot PGR]$ พบว่าไม่มีแอนไอออนชนิดใดส่งผลรบกวนต่อการตรวจวัด GSH เนื่องจากไม่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 567 nm มีค่าลดลง แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ $[Cu_2L_2 \cdot PGR]$ สามารถนำมาใช้เป็นเซนเซอร์ทางเคมีเชิงแสงในการตรวจวัด GSH ได้เป็นอย่างดีและการตรวจวัด GSH ด้วยสารละลายเอนไซม์ $[Cu_2L_2 \cdot PGR]$ ซึ่งจำกัดการตรวจวัดเท่ากับ 0.85 μM

นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ยังได้ประสบความสำเร็จในการนำเอนไซม์ $[Cu_2L_2 \cdot PGR]$ มาใช้ตรวจวิเคราะห์ปริมาณกลูตาไธโอนในตัวอย่างยาแบบแคปซูล ซึ่งปริมาณกลูตาไธโอนที่วิเคราะห์ได้จากวิธีที่พัฒนาขึ้นมา มีค่าใกล้เคียงกับปริมาณที่วิเคราะห์ได้จากวิธีมาตรฐาน และเมื่อทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีโดยใช้หลักทางสถิติ t-Test: Paired Two Sample for Means ที่ความเชื่อมั่น 95 % แสดงให้เห็นว่าข้อมูลไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นวิธีการหาปริมาณกลูตาไธโอนด้วยเทคนิคเซนเซอร์ทางเคมีเชิงแสงที่พัฒนาขึ้นมาจึงสามารถใช้ได้ในการวิเคราะห์หาปริมาณกลูตาไธโอนในยาแคปซูลได้



กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยตลอดทั้งโครงการ จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี และทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทเงินรายได้ ประจำปี งบประมาณ พ.ศ. 2563 ของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา หมายเลขสัญญา SC11/2563

เอกสารอ้างอิง

- Butler, I. B., Schoonen, M. A. A. and Rickard, D. T. (1994). Removal of Dissolved Oxygen from Water : A Comparison of Four Common Techniques. *Talanta*, 41, 211-215.
- Filomeni, G., Rotilio, G. and Ciriolo, M. R. (2005). Disulfide Relays and Phosphorylative Cascades: Partners in Redox-mediated Signaling Pathways. *Cell Death and Differentiation* 12, 1555–1563
- Gao, W., Liu, Z., Qi, L., Lai, J., Kitte, S. A. and Xu, G. (2016). Ultrasensitive Glutathione Detection Based on Lucigenin Cathodic Electrochemiluminescence in the Presence of MnO₂ Nanosheets. *Analytical Chemistry*, 88, 7654-7659.
- Gaucher, C., Boudier, A., Bonetti, J., Clarot, I., Leroy, P. and Parent, M. (2018). Glutathione: Antioxidant Properties Dedicated to Nanotechnologies. *Antioxidants*, 7, 62.
- Jia, R., Jin, K., Zhang, J., Zheng, X., Wang, S. and Zhang, J. (2020). Colorimetric and Fluorescent Detection of Glutathione Over Cysteine and Homocysteine with Red-emitting N-doped Carbon Dots. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 321, 128506.
- Freedman, J. H., Ciriolo, M. R. and Peisach, J. (1989). The Role of Glutathione in Copper Metabolism and Toxicity. *The Journal of Biological Chemistry*, 264, 5598-5605.
- Kandar, R., Zakova, P., Lotkova, H., Kucera, O., and Cervinkova, Z. (2007). Determination of Reduced and Oxidized Glutathione in Biological Samples Using Liquid Chromatography with Fluorimetric Detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43(4), 1382–1387.



- Kennedy, L., Sandhu, J. K., Harper, M.-E., and Cuperlovic-Culf, M. (2020). Role of Glutathione in Cancer: From Mechanisms to Therapies. *Biomolecules*, 10, 1429.
- Liu, X., Wang, Q., Zhang, Y., Zhang, L., Sub, Y. and Lv, Y. (2013). Colorimetric Detection of Glutathione in Human Blood Serum Based on The Reduction of Oxidized TMB. *New Journal of Chemistry*, 37, 2174-2178.
- Milne, L., Nicotera, P., Orrenius, S. and Burkitt, M. J. (1993). Effect of Glutathione and Chelating Agents on Copper-Mediated DNA Oxidation: Pro-oxidant and Antioxidant Properties of Glutathione. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 304, 102-109.
- Mischley, L. K., Standish, L. J., Weiss, N. S., Padowski, J. M., Kavanagh, T. J., White, C. C., and Rosenfeld, M. E. (2016). Glutathione as a Biomarker in Parkinson's Disease: Associations with Aging and Disease Severity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.
- Pokharel, U. R., Fronczek, F. R., and Maverick, A. W. (2014). Reduction of Carbon Dioxide to Oxalate by a Binuclear Copper Complex. *Nature Communications*, 5.
- Stobiecka, M., Coopersmith, K. and Hepel, M. (2010). Resonance Elastic Light Scattering (RELS) Spectroscopy of Fast non-Langmuirian Ligand-Exchange in Glutathione-Induced Gold Nanoparticle Assembly. *Journal of Colloid and Interface Science*, 350, 168-177.
- Teerasarunyanon, T., Watchasit, S., Suksai, C., Tuntulani, T. and Ruangpornvisuti, V. (2019). UV-vis and Theoretical Studies on an Ensemble of Dinuclear Cu(II) Complex of Anthracene-based Tripodal Tetramine with Pyrogallol Red for Cyanide Detection and Species Distribution in Aqueous Solution. *Inorganic Chemistry Communications*, 108, 107502.
- Villarama, C. D. and Maibach, H. I. (2005). Glutathione as a Depigmenting Agent: An Overview. *International Journal of Cosmetic Science*, 27, 147-153.



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.

Yu, Y., Shi, J., Zhao, X., Yuan, Z., Lu, C. and Lu, J. (2016). Electrochemiluminescence Detection of Reduced and Oxidized Glutathione Ratio by Quantum Dot-layered Double Hydroxide Film. *Analyst*, 141, 3305-3312.