ฟลูออเรสเซนต์ที่มีฐานเป็นอิมิดาโซเลียมและกรดโบโรนิกสำหรับตรวจวัดสารประกอบเอมีนทางชีวภาพ

Fluorescence sensors based on imidazolium and boronic acid for a biogenic amine sensing

โดย

นางสาววีราภัทร วิจิตร์แสงศรี

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2556

เรื่อง ฟลูออเรสเซนต์ที่มีฐานเป็นอิมิดาโซเลียมและกรดโบโรนิกสำหรับตรวจวัดสารประกอบเอมีนทาง ชีวภาพ

โดย นางสาววีราภัทร วิจิตร์แสงศรี เลขประจำตัว 5333121423

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

.... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สัมฤทธิ์ วัชรสินธุ์)

.... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุษยรัตน์ ธรรมพัฒนกิจ)

.... กรรมการ

(ดร.พรรณี ลีลาดี)

รายงานนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดย หัวหน้าภาควิชาเคมี

....

(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย พาราสุข)

หัวหน้าภาควิชาเคมี

วันที่......เดือน........................พ.ศ...........

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ ฟลูออเรสเซนต์ที่มีฐานเป็นอิมิดาโซเลียมและกรดโบโรนิกสำหรับตรวจวัดสารประกอบเอมีนทางชีวภาพ

ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาววีราภัทร วิจิตร์แสงศรี เลขประจำตัว 5333121423

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. บุษยรัตน์ ธรรมพัฒนกิจ

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2556

บทคัดย่อ

ผู้วิจัยสังเคราะห์โมเลกุลเซ็นเซอร์ histamine blue ผ่านปฏิกิริยาเมโซไอออนิกจากไอโซควิโนลีน, ไตรฟลูออโรแอซิดแอนไฮไดรด์ และเมทิลไอโซไซยาโนอะซีเตต มีร้อยละผลิตภัณฑ์เป็น 23 เพื่อใช้ในการวิเคราะห์สารประกอบเอมีนทางชีวภาพสองชนิดคือ ฮิสทามีนและฮิสทิดีนด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรโฟโตเมตรี พบว่า histamine blue ให้สัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่ 400 นาโนเมตร เมื่อในระบบมีฮิสทามีนหรือฮิสทิดีน สัญญาณฟลูออเรสเซนต์จะเคลื่อนไปยังตำแหน่ง 410 นาโนเมตร โดยผลจากสเปกตรัมของสารประกอบทั้งสองชนิดเหมือนกัน histamine blue จึงไม่สามารถใช้ในการวิเคราะห์หาเอมีนทางชีวภาพชนิดใดชนิดหนึ่งได้อย่างจำเพาะเจาะจง ดังนั้น ผู้วิจัยได้ออกแบบโมเลกุล NapIm2 และ NapIm3 โดยฮิสทิดีนซึ่งมีหมู่คาร์บอกซิเลตจะสามารถจับกับ NapIm3 เมื่อให้พลังงานกระตุ้นที่ 340 นาโนเมตร จะพบสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของ NapIm3 ที่ 525 นาโนเมตร ในขณะที่ฮิสทามีนซึ่งไม่มีหมู่คาร์บอกซิเลตจะไม่พบการเปลี่ยนแปลง ดังนั้น histamine blue สามารถใช้ในการจำแนกฮิสทามีนและฮิสทิดีนจากเอมีนทางชีวภาพชนิดอื่น จากนั้นใช้ NapIm3 แยกจับกับฮิสทิดีน ดังนั้นการใช้เซ็นเซอร์ทั้งสองชนิดจะช่วยทำให้สามารถแยกการตรวจวัดฮิสทิดีนและฮิสทามีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: ฮิสทามีน, ฮิสทิดีน, histamine blue

Title Fluorescence sensors based on imidazolium and boronic acid for a biogenic amine sensing

Student name Miss Weerapat Vichitsangsri ID 5333121423

Advisor Assist. Professor Dr. Boosayarat Tomapatanaget

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic year 2013

Abstract

Histamine blue was synthesized via mesoionic reaction from isoquinoline, TFAA, and methyl isocyanoacetate with 23% yield. The binding affinities with biogenic amines including histamine and histidine, were investigated by fluorescence spectrophotometry. **Histamine blue** shows the fluorescence signal at 400 nm. Upon the interaction with histamine and histidine, **Histamine blue** adduct performed the bathochromic shift with the emission band at 410 nm. A similar fluorescence change cannot differentiate Hist and His regarding to non-specificity of histamine blue for sensing purpose. Therefore, **NapIm2** and **NapIm3** were designed as sensors to discriminate Histamine and Histidine. The carboxylic acid in histidine is expected to preferentially bind with **NapIm3** resulting in fluorescence-on aspect at 525 nm with excitation wavelength at 340 nm while histamine cannot perform this phenomena. Notably, **histamine blue** can discriminate histamine and histidine from other biogenic amines and **NapIm3** shows fluorescence-on with only histidine. Therefore, the multi-sensors offer a promising discrimination between histamine and histidine.

Keywords: histamine, histidine, histamine blue

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ **ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุษยรัตน์ ธรรมพัฒนกิจ** อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่กรุณาให้ความสนับสนุน ความรู้ ความเมตตา คำแนะนำ และแนวทางในการดำเนินงานวิจัย อีกทั้งสละเวลาเพื่อให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆเป็นอย่างดียิ่งมาโดยตลอด ทำให้การวิจัยและรายงานเล่มนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ **ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สัมฤทธิ์ วัชรสินธุ์** และ **ดร.พรรณี ลีลาดี** ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าในการตรวจทานแก้ไขรายงาน ตลอดจนให้คำชี้แนะ และให้เกียรติเป็นคณะกรรมการในการสอบวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณพี่ๆหน่วยวิจัยซุปราโมเลกุล ที่ได้ให้ความรู้เกี่ยวกับเทคนิคต่างๆ อาทิ การดูแลเครื่องมือ เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมีที่จำเป็น รวมทั้งให้ความช่วยเหลือในการวิเคราะห์ทางเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรโฟโตเมตรีและเครื่องมือวิเคราะห์อื่นๆ และให้คำแนะนำ คำปรึกษาที่ดีมากมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณ โครงการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้เอื้อเฟื้อเครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีที่จำเป็นในการทำวิจัยให้สำเร็จด้วยดี และที่ขาดไม่ได้คือ กำลังใจและความช่วยเหลือจากครอบครัวและเพื่อนๆทุกคนในภาควิชาเคมี ผู้วิจัยขอระลึกในความกรุณาของทุกท่านที่ได้กล่าวมาข้างต้น

ผู้วิจัย

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ง

กิตติกรรมประกาศ จ

สารบัญ ฉ

สารบัญรูป ญ

สารบัญแผนภาพ ฎ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความสำคัญและมูลเหตุจูงใจในการนำเสนอโครงการ 1

1.2 การออกแบบโมเลกุลเซ็นเซอร์และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 2

1.3 ขอบเขตงานวิจัยการสังเคราะห์โมเลกุลเซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดสารประกอบเอมีนทางชีวภาพ 6

บทที่ 2 ทฤษฎี 8

2.1 เคมีซุปราโมเลกุลาร์ (supramolecular chemistry) 8

2.2 เซ็นเซอร์ทางเคมี (Chemical sensor) 8

2.3 ฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรโฟโตเมตรี (Fluorescence Spectrophotometer) 9

2.3.1 กระบวนการถ่ายโอนพลังงานฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence resonance energy transfer - FRET) 10

2.4 การออกแบบโครงสร้างโมเลกุลเซ็นเซอร์ 11

2.4.1 การออกแบบโครงสร้าง AnIm1 และ NapIm1 12

2.4.2 การออกแบบโครงสร้าง NapIm2 และ NapIm3 15

บทที่ 3 วิธีการทดลองและผลการทดลอง 17

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี 17

3.2 การสังเคราะห์โมเลกุลเซ็นเซอร์ histamine blue 20

3.3 การสังเคราะห์โมเลกุลเซ็นเซอร์ที่มีฐานเป็นเกลืออิมิดาโซเลียมและกรดโบโรนิกสำหรับการตรวจวัดสารประกอบเอมีนทางชีวภาพ 21

3.3.1 การสังเคราะห์โมเลกุลเซ็นเซอร์ AnIm1 22

หน้า

3.3.1.1 การสังเคราะห์ 3-(5,5-dimethyl-1,3,2-dioxaborinan-2-yl)benzaldehyde (**A1**) 23

3.3.1.2 การสังเคราะห์ (3-(5,5-dimethyl-1,3,2-dioxaborinan-2-yl)phenyl)methanol (**A2**) 24

3.3.1.3 การสังเคราะห์ 2-(3-(bromomethyl)phenyl)-5,5-dimethyl-1,3,2-dioxaborinane (**A3**) 25

3.3.1.4 การสังเคราะห์ 2-chloro-*N*-phenylacetamide (**B1**) 26

3.3.1.5 การสังเคราะห์ 2-chloro-N-(4-formylphenyl)acetamide (**B2**) 27

3.3.2 การสังเคราะห์โมเลกุล **NapIm1** 28

3.3.2.1 การสังเคราะห์ 2-(2-aminoethyl)-6-bromo-1*H*-benzo[de]isoquinoline-1,3(2*H*)-dione (**C1**) 30

3.3.2.2 การสังเคราะห์ 3-(1*H*-imidazol-1-yl)propanoic acid (**D1**) 31

3.3.2.3 การสังเคราะห์ 3-(1*H*-imidazol-1-yl)propanoate (**F1**) 32

3.3.2.4 การสังเคราะห์ 3-(1*H*-imidazol-1-yl)propanoic acid (**D1**) 33

3.3.2.5 การสังเคราะห์ 3-bromo-*N*-(2-(6-bromo-1,3-dioxo-1H-benzo[de]isoquinolin-2(3H)-yl)ethyl)propanamide (**C2**) 34

3.3.3 การสังเคราะห์โมเลกุล **NapIm2** และ **NapIm3** 34

3.3.3.1 การสังเคราะห์ *N*-(2-aminoethyl)-3-(1*H*-imidazol-1-yl)propanamide (**F2**) 36

3.3.3.2 การสังเคราะห์ *N*-(2-(1,3-dioxo-1*H*-benzo[de]isoquinolin-2(3*H*)-yl)ethyl)-3-(1*H*-imidazol-1-yl)propanamide (**F3**) 37

3.3.3.3 การสังเคราะห์โมเลกุล **F4** 38

3.3.3.4 การสังเคราะห์โมเลกุล **NapIm3** 39

3.4 การศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของ **histamine blue** และ **NapIm3** กับฮิสทามีนและฮิสทิดีนในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน pH 7.4 (phosphate buffer saline) 40

3.4.1 เตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน pH 7.4 40

หน้า

3.4.2 เตรียม stock solution ของ **histamine blue** ความเข้มข้น 1×10^{-3} โมลาร์ 40

3.4.3 เตรียม stock solution ของ **NapIm3** ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ 40

3.4.4 เตรียม stock solution ของฮิสทิดีนความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ 40

3.4.5 เตรียม stock solution ของฮิสทามีนความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ 41

3.4.6 ศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของ **histamine blue** กับฮิสทามีนและฮิสทิดีน 41

3.4.7 ศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของ **NapIm3** กับฮิสทามีนและฮิสทิดีน 41

บทที่ 4 วิจารณ์ผลและสรุปผลการทดลอง 42

4.1 การสังเคราะห์โมเลกุลเซ็นเซอร์ **histamine blue** 42

4.2 การสังเคราะห์โมเลกุลเซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดสารประกอบเอมีนทางชีวภาพ 44

4.2.1 การสังเคราะห์โมเลกุล **AnIm1** 44

4.2.1.1 การสังเคราะห์ 3-(5,5-dimethyl-1,3,2-dioxaborinan-2-yl)benzaldehyde (**A1**) 46

4.2.1.2 การสังเคราะห์ (3-(5,5-dimethyl-1,3,2-dioxaborinan-2-yl)phenyl) methanol (**A2**) 48

4.2.1.3 การสังเคราะห์ 2-(3-(bromomethyl)phenyl)-5,5-dimethyl-1,3,2-dioxaborinane (**A3**) 49

4.2.1.4 การสังเคราะห์ 2-chloro-*N*-phenylacetamide (**B1**) 51

4.2.1.5 การสังเคราะห์ 2-chloro-N-(4-formylphenyl)acetamide (**B2**) 52

4.2.2 การสังเคราะห์โมเลกุล NapIm1 52

4.2.2.1 การสังเคราะห์ 2-(2-aminoethyl)-6-bromo-1*H*-benzo[de]isoquinoline-1,3(2*H*)-dione (**C1**) 54

4.2.2.2 การสังเคราะห์ 3-(1*H*-imidazol-1-yl)propanoic acid (**D1**) 55

4.2.2.3 การสังเคราะห์ 3-(1*H*-imidazol-1-yl)propanoate (**F1**) 55

4.2.2.4 การสังเคราะห์ 3-(1*H*-imidazol-1-yl)propanoic acid (**D1**) 57

หน้า

4.2.2.5 การสังเคราะห์ 3-bromo-*N*-(2-(6-bromo-1,3-dioxo-1H-benzo[de] iso- quinolin-2(3H)-yl)ethyl)propanamide (**C2**) 58
4.2.3 การสังเคราะห์โมเลกุล **NapIm2** และ **NapIm3** 59
4.2.3.1 การสังเคราะห์ *N*-(2-aminoethyl)-3-(1*H*-imidazol-1-yl)propanamide (**F2**) 61
4.2.3.2 การสังเคราะห์ *N*-(2-(1,3-dioxo-1*H*-benzo[de]isoquinolin-2(3*H*)-yl)ethyl)-3-(1*H*-imidazol-1-yl)propanamide (**F3**) 62
4.2.3.4 การสังเคราะห์ **F4** 63
4.2.3.5 การสังเคราะห์ **NapIm3** 64
4.3 การศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของ **histamine blue** กับฮิสทามีนและฮิสทิดีน 66
4.4 การศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของ **NapIm3** กับฮิสทามีนและฮิสทิดีน 67
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 69
5.1 สรุปผลการทดลอง 69
5.2 งานวิจัยที่คาดว่าจะทำต่อไปในอนาคต 70
เอกสารอ้างอิง 71
ประวัติผู้วิจัย 74

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

หน้า

1.1 การเกิดปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลทของฮิสทิดีน 1

1.2 โครงสร้างโมเลกุล *o*-phthalaldehyde 2

1.3 โครงสร้างโมเลกุล EPF ก่อนและหลังเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับฮิสทิดีน 3

1.4 ปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบระหว่างโมเลกุล PSE และอนุพันธุ์ของเอมีน 4

1.5 ปฏิกิริยาระหว่าง histamine blue และฮิสทามีน 4

1.6 สัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของโมเลกุล histamine blue ก่อนและหลังเติมฮิสทามีน (พลังงานกระตุ้น 340 นาโนเมตร) 5

1.7 กลไกการเกิดสารประกอบระหว่าง histamine blue และฮิสทามีน 5

1.8 โครงสร้างสารประกอบระหว่าง NapIm1 และฮิสทิดีน 6

1.9 โครงสร้างสารประกอบระหว่าง NapIm2 และฮิสทิดีน 7

2.1 กระบวนการเกิดฟลูออเรสเซนต์ 10

2.2 แผนภาพแสดงการเกิดกระบวนการถ่ายโอนพลังงานฟลูออเรสเซนต์ 11

2.3 ภาพแสดงโมเลกุลเซ็นเซอร์ AnIm1, NapIm1, NapIm2 และ NapIm3 11

2.4 ภาพแสดงโมเลกุลเซ็นเซอร์ AnIm1และ NapIm1 12

2.5 ภาพแสดงโครงสร้างวงอิมิดาโซเลียม 12

2.6 โครงสร้างสารประกอบระหว่าง histamine blue, AnIm1 และ NapIm1, กับฮิสทามีนและฮิสทิดีน 14

2.7 ภาพแสดงโมเลกุลเซ็นเซอร์ NapIm2 และNapIm3 15

2.8 ภาพแสดงสารประกอบระหว่างฮิสทิดีนและ NapIm2 กับNapIm3 16

3.1 ภาพแสดงโมเลกุลเซ็นเซอร์ AnIm1, NapIm1, NapIm2 และ NapIm3 21

4.1 โมเลกุล histamine blue 42

4.2 กลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง histamine blue และฮิสทามีน 42

4.3 การสังเคราะห์โมเลกุล histamine blue 43

4.4 ^{1}H-NMR spectrum ของสาร **histamine blue** ใน $CDCl_3$ 43

หน้า

4.5 ^{1}H-NMR spectrum ของสาร **A1** ใน $CDCl_3$ 47

4.6 ^{1}H-NMR spectrum ของสาร **A2** ใน $CDCl_3$ 48

4.7 ^{1}H-NMR spectrum ของสาร **A3** ใน $CDCl_3$ 50

4.8 ^{1}H-NMR spectrum ของสาร **B1** ใน $CDCl_3$ 51

4.9 ^{1}H-NMR spectrum ของสาร **C1** ใน DMSO 54

4.10 ^{1}H-NMR spectrum ของสาร **F1** ใน $CDCl_3$ 56

4.11 กลไกการปิดวงของโมเลกุล **D1** 57

4.12 ^{1}H-NMR spectrum ของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาระหว่าง **C1** และ **G1** ใน DMSO 59

4.13 ^{1}H-NMR spectrum ของสาร **F2** ใน $CDCl_3$ 61

4.14 ^{1}H-NMR spectrum ของสาร **F3** ใน MeOD 63

4.15 ^{1}H-NMR spectrum ของสาร **NapIm3** ใน CD_3CN 65

4.16 แสดงฟลูออเรสเซนต์สเปกตรัมของ **histamine blue** ก่อนและหลังเติมฮิสทามีนกับฮิสทิดีน 66

4.17 กลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง **histamine blue** และฮิสทามีน 67

4.18 แสดงฟลูออเรสเซนต์สเปกตรัมของ **histamine blue** ก่อนและหลังเติมฮิสทามีนกับฮิสทิดีน 68

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญแผนภาพ

หน้า

3.1 แสดงการสังเคราะห์โมเลกุลเซ็นเซอร์ AnIm1 22

3.2 แผนภาพแสดงการสังเคราะห์โมเลกุลเซ็นเซอร์ NapIm1 29

3.3 แผนภาพแสดงการสังเคราะห์โมเลกุล D1 31

3.4 แสดงการสังเคราะห์โมเลกุล E1 33

3.5 แผนภาพแสดงการสังเคราะห์โมเลกุลเซ็นเซอร์ NapIm2 และ NapIm3 35

4.1 แผนภาพแสดงการสังเคราะห์โมเลกุลเซ็นเซอร์ AnIm1 45

4.2 แสดงการสังเคราะห์โมเลกุลเซ็นเซอร์ NapIm1 53

4.3 แสดงการสังเคราะห์โมเลกุล D1 55

4.4 แผนภาพแสดงการสังเคราะห์โมเลกุล E1 57

4.5 แสดงการสังเคราะห์โมเลกุลเซ็นเซอร์ NapIm2 และ NapIm3 60

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

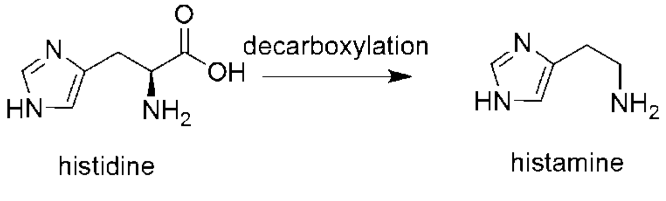
บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและมูลเหตุจูงใจในการนำเสนอโครงการ

ฮิสทามีน (histamine) เป็นสารประกอบเอมีนทางชีวภาพชนิดหนึ่งที่มีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกัน ถูกผลิตจากเบโซฟิลล์ (basophil) และเซลล์มาสต์ (mast cell) ที่บริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน โครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยวงอิมิดาโซลและสายโซ่เอมีน สามารถส่งผลให้เกิดอาการแพ้อย่างรุนแรงในผู้ป่วยบางกลุ่ม

ฮิสทิดีน (histidine)เป็นเอมีนทางชีวภาพอีกชนิดซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกาย ไม่มีอันตรายต่อร่างกายของผู้บริโภค โครงสร้างโมเลกุลมีความคล้ายคลึงกับฮิสทามีนอย่างมาก โดยถ้าฮิสทิดีนเกิดปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลทจะให้ผลิตภัณฑ์เป็นฮิสทามีน ดังรูปที่ 1.1 ดังนั้นปริมาณของฮิสทามีนที่สูงในอาหาร เช่น เนื้อปลา ซึ่งเกิดจากฮิสทิดีนที่เป็นกรดอะมิโนจำเป็นเกิดการสลายตัวไป จึงสามารถบ่งบอกถึงความเน่าเสียของอาหารได้ ด้วยเหตุนี้การพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ปริมาณฮิสทามีนจึงจำเป็นต้องได้รับการพัฒนา แต่ด้วยโครงสร้างของฮิสทามีนและฮิสทิดีนที่คล้ายคลึงกัน การตรวจวัดเอมีนเพียงชนิดใดชนิดหนึ่งจึงเป็นเรื่องที่ยุ่งยาก เทคนิคการติดตามสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนต์เป็นหนึ่งในวิธีที่ได้รับความสนใจนำมาแก้ปัญหาดังกล่าว



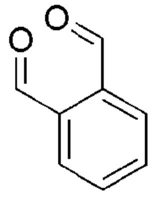
รูปที่ 1.1 การเกิดปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลทของฮิสทิดีน

เทคนิคฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence) เป็นเทคนิคในการตรวจวัดการคายพลังงานแสงของโมเลกุลเซ็นเซอร์หลังให้พลังงานกระตุ้น มีข้อดีคือมีความจำเพาะเจาะจง วิเคราะห์ได้

ง่าย รวดเร็ว มีค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ต่ำสามารถตรวจวัดสารในปริมาณน้อยได้ดีกว่าการวัดการดูดกลืนพลังงานแสง 1000 – 500000 เท่า นอกจากนี้สารที่ให้ผลกับเทคนิคฟลูออเรสเซนต์ยังสามารถนำไปประยุกต์ให้เกิดกระบวนการถ่ายโอนพลังงานฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescence Resonance Energy Transfer - FRET) ซึ่งก่อให้เกิดความไวในการวิเคราะห์สารปริมาณต่ำได้มากขึ้น ดังนั้นงานวิจัยนี้ได้ออกแบบและพัฒนาตัวตรวจวัดที่มีความจำเพาะเจาะจงตอการตรวจจับสารประกอบเอมีนทางชีวภาพทั้งสองชนิดแตกต่างกัน โดยอาศัยกระบวนการถ่ายโอนพลังงานฟลูออเรสเซนต์

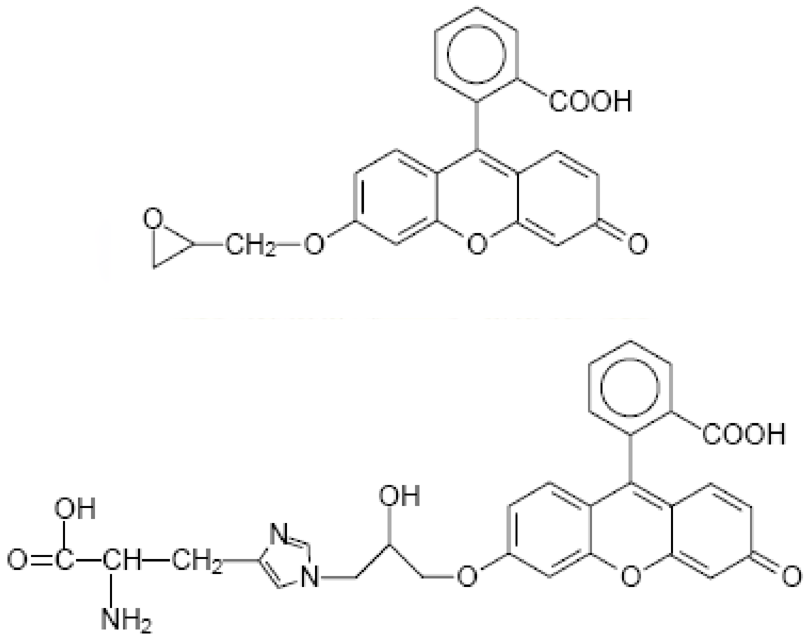
1.2 การออกแบบโมเลกุลเซ็นเซอร์และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ที่ผ่านมา ได้มีงานวิจัยหลากหลายงานที่ค้นคว้าเทคนิคสำหรับวัดปริมาณฮิสทีดีนและฮิสทามีนอย่างจำเพาะเจาะจงทั้งด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์และเทคนิคอื่นๆ ในปี 1998 Frattini และคณะ[1] เปรียบเทียบวิธีการหาปริมาณฮิสทามีนและฮิสทิดีนในปลาทูน่าด้วยสองเทคนิค เทคนิคแรกคือสกัดด้วยเปอร์คลอริก แล้วตรวจหาปริมาณฮีสทามีนด้วยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี(high performance liquid chromatography) เปรียบเทียบประสิทธิภาพกับเทคนิคการสกัดด้วยกรดไทรคลอโรแอซีติก สังเคราะห์ให้เป็นอนุพันธ์ของ *o*-phthalaldehyde (OPA) โครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 1.2 และตรวจวัดสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนต์ ซึ่งพบว่า เทคนิคแรกมีขั้นตอนการวิเคราะห์ที่ง่ายและใช้เวลาน้อยกว่า แต่มีข้อเสียคือมีขีดจำกัดการตรวจวัดสูง เทคนิคที่สอง มีขั้นตอนซับซ้อน แต่ได้ประสิทธิภาพที่ดี มีการแยกสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของอนุพันธ์ OPA กับฮิสทามีนและฮิสทิดีนชัดเจน แต่อนุพันธ์ของสารดังกล่าวมีความเสถียรต่ำ



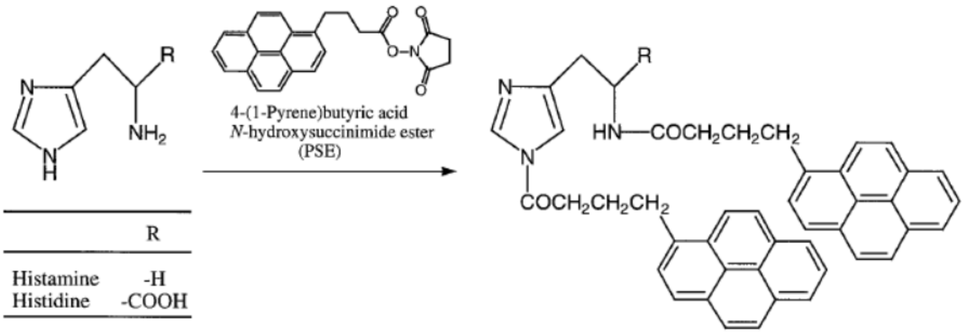
รูปที่ 1.2 โครงสร้างโมเลกุล *o*-phthalaldehyde

ต่อมา Li และคณะ[2] สังเคราะห์โมเลกุลเซ็นเซอร์ 3-epoxypropoxy fluorescein (**EPF**) มีโครงสร้างที่สามารถจับอย่างจำเพาะเจาะจงกับฮิสทิดีนดังแสดงในรูปที่ 1.3 โดยจับได้ดีกว่ากรดอะมิโนชนิดอื่นๆ ส่งผลให้ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์ของ **EPF** เพิ่มสูงขึ้น และมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของฮิสทิดีนที่ใช้ แต่อย่างไรก็ตาม การตรวจวัดด้วยเซ็นเซอร์ชนิดนี้ยังไม่สามารถกำจัดปัญหาการรบกวนของฮิสทามีนและอนุพันธุ์ของฮิสทามีนได้



รูปที่ 1.3 โครงสร้างโมเลกุล **EPF** ก่อนและหลังเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับฮิสทิดีน

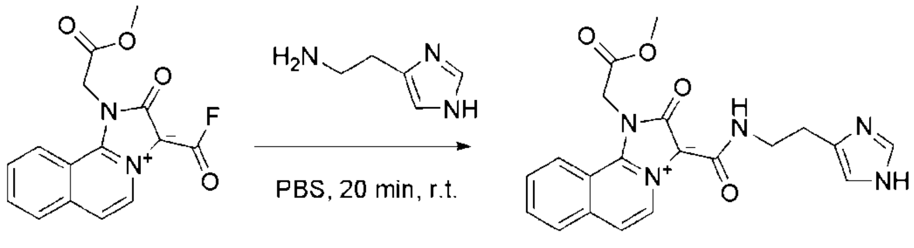
ในปี 2003 Yoshida และคณะ[3] ศึกษาการจับกันของอนุพันธ์ของเอมีนทั้งสองชนิดกับ 4-(1-Pyrene)butyric acid *N*-hydroxysuccinimide ester (**PSE**) ดังแสดงในรูปที่ 1.4 โดยใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนต์ พบว่าอนุพันธ์ของเอมีนทั้งสองชนิดทำให้มีการเปลี่ยนแปลงความยาวคลื่นที่ค่าสัญญาณสูงสุดต่างกันที่ตำแหน่ง 513 นาโนเมตร จึงสามารถหาความสัมพันธ์ของค่าสัญญาณกับความเข้มข้นของเอมีนแต่ละชนิดได้ แต่ต้องอาศัยการแยกสารอนุพันธุ์ทั้งสองชนิดจากเทคนิคไฮเพอร์ฟอ์มานซ์ลิควิดโครมาโตรกราฟีเข้าช่วยก่อน จึงถือว่ายังมีความซับซ้อนและยุ่งยากในขั้นตอนอยู่



รูปที่ 1.4 ปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบระหว่างโมเลกุล PSE และอนุพันธุ์ของเอมีน

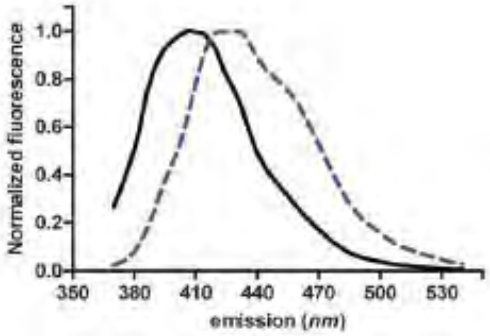
ในปี 2012 Kielland และคณะ[4] สังเคราะห์โมเลกุลเซ็นเซอร์ histamine blue ซึ่งสามารถจับกับหมู่เอมีนของฮิสทามีนดังรูปที่ 1.5 โดยเมื่อกระตุ้นด้วยความยาวคลื่นแสงที่ 340 นาโนเมตร พบว่าสัญญาณฟลูออเรสเซนต์เกิด bathochromic shift จากสัญญาณของ histamine blue ปกติที่ 410 นาโนเมตรเปลี่ยนเป็นตำแหน่ง 450 นาโนเมตร ดังแสดงในรูปที่ 1.6 และเมื่อทดสอบกับสารสื่อประสาทอื่น พบว่า histamine blue มีความจำเพาะเจาะจงกับฮิสทามีนมากกว่าอย่างเห็นได้ชัด

ถึงแม้ว่างานวิจัยของ Kielland จะระบุว่าโมเลกุล histamine blue มีความจำเพาะเจาะจงต่อฮิสทามีนเท่านั้น แต่ทว่าไม่พบข้อมูลทางเทคนิคฟลูออเรสเซนต์ของโมเลกุล histamine blue กับฮิสทิดีน ซึ่งมีความเป็นไปได้สูงว่าน่าจะเกิดการเปลี่ยนแปลงสัญญาณสัญญาณฟลูออเรสเซนต์คล้ายกับฮิสทามีน เนื่องจากกลไกของปฏิกิริยาเริ่มจากการแทนที่ด้วยนิวคลีโอไฟล์ ณ หมู่แอซิดฟลูออไรด์ โดยมีอะตอมไนโตรเจนของอิมิดาโซลทำหน้าที่เป็นนิวคลีโอไฟล์ ดังแสดงในรูปที่ 1.7 ซึ่งอิมิดาโซลนั้นเป็นส่วนหนึ่งในโครงสร้างของเอมีนทั้งสองชนิด จึงไม่สามารถสรุปว่าโมเลกุล histamine blue นั้นมีความจำเพาะเจาะจงต่อฮิสทามีนเพียงอย่างเดียว

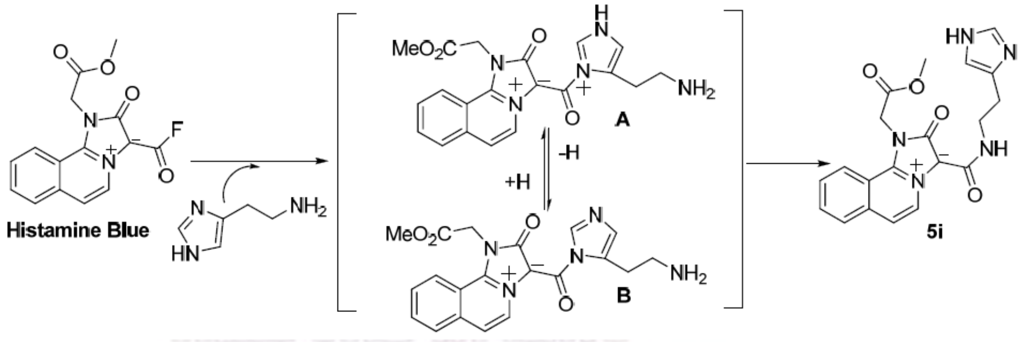


histamine blue

รูปที่ 1.5 ปฏิกิริยาระหว่าง histamine blue และฮิสทามีน



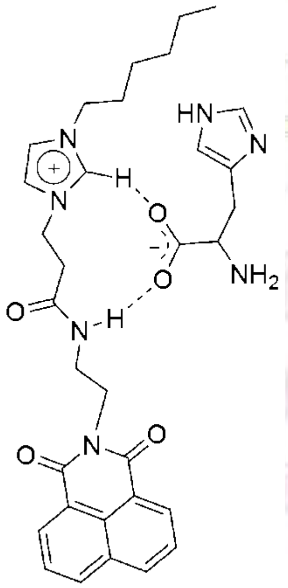
รูปที่ 1.6 สัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของโมเลกุล histamine blue ก่อน (สีดำ) และหลัง (สีน้ำเงิน) เติมฮิสทามีน (พลังงานกระตุ้น 340 นาโนเมตร)



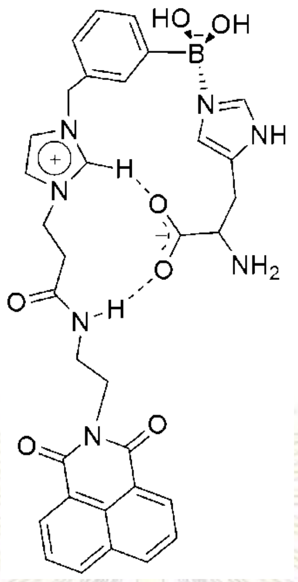
รูปที่ 1.7 กลไกการเกิดสารประกอบระหว่าง histamine blue และฮิสทามีน

1.3 ขอบเขตงานวิจัยการสังเคราะห์โมเลกุลเซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดสารประกอบเอมีนทางชีวภาพ

จากงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้น ยังไม่มีงานวิจัยใดที่สามารถออกแบบและสังเคราะห์โมเลกุลที่สามารถแยกจำแนกการตรวจวัดปริมาณฮิสทามีนและฮิสทิดีนได้ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์เพียงอย่างเดียว ผู้วิจัยจึงออกแบบโมเลกุลเซ็นเซอร์ที่ฐานเป็นเกลืออิมิดาโซเลียมและมีหมู่ฟลูออโรฟอร์คือแนพทาลิไมด์ของ NapIm2 และ NapIm3 โดยตำแหน่งสำคัญที่ทำให้เกิดความจำเพาะเจาะจงคือบริเวณหมู่อิมิดาโซเลียมซึ่งติดประจุบวกและอะตอมไฮโดรเจนของหมู่เอไมด์ที่มีความเป็นกรดสูง จะสามารถจับกับหมู่คาร์บอกซิเลตของฮิสทิดีนได้ ในขณะที่ฮิสทามีนไม่สามารถเกิดอันตรกิริยาดังกล่าวได้ ดังนั้น เมื่อสารละลายที่มีโมเลกุลเซ็นเซอร์ NapIm3 และฮิสทิดีนอยู่ด้วย จะเกิดการเข้าจับกันด้วยแรงดึงดูดทางไฟฟ้า (electrostatic force) ดังแสดงในรูปที่ 1.8 และสำหรับโมเลกุลเซ็นเซอร์ NapIm2 ได้ออกแบบให้มีกรดโบโรนิกอยู่ในโครงสร้างเพื่อใช้จับกับวงอิมิดาโซลของฮิสทิดีน จะทำให้อันตรกิริยาระหว่าง NapIm2 และฮิสทิดีนแข็งแรงยิ่งขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 1.9



รูปที่ 1.8 โครงสร้างสารประกอบระหว่าง NapIm3 และฮิสทิดีน



รูปที่ 1.9 โครงสร้างสารประกอบระหว่าง NapIm2 และฮิสทิดีน

จากอันตรกิริยานี้ส่งผลให้โครงสร้างของโมเลกุลเซ็นเซอร์ในระบบที่มีฮิสทามีนและฮิสทิดีนมีความแตกต่างกัน ผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่าในระบบของโมเลกุลเซ็นเซอร์ NapIm และฮิสทิดีน โครงสร้างสารประกอบเชิงซ้อนใหม่จะให้สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนต์ที่แตกต่างกับโมเลกุลเซ็นเซอร์ในสารละลายฮิสทามีนที่ไม่เกิดอันตรกิริยาและการเปลี่ยนแปลงของโมเลกุล NapIm ทั้งสองชนิด นำไปสู่การตรวจวัดที่จำเพาะเจาะจงกับฮิสทิดีน ซึ่งเมื่อใช้งานร่วมกับ histamine blue จะสามารถแยกตรวจวัดฮิสทิดีนได้อย่างจำเพาะเจาะจง

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

ทฤษฎี

2.1 เคมีซุปราโมเลกุลาร์ (supramolecular chemistry)

เคมีซุปราโมเลกุลาร์ (supramolecular chemistry) เป็นวิทยาศาสตร์แขนงหนึ่งซึ่งกำลังเป็นที่สนใจและมีการศึกษากันอย่างแพร่หลายในหลายๆสาขา เช่น สาขาเคมี สาขาชีวเคมี[5] สาขาฟิสิกส์[6] สาขาการแพทย์[7] สาขาวิศวกรรมศาสตร์[8,9] โดยมีพื้นฐานพัฒนามาจากโมเลกุลพื้นฐานอย่างง่ายที่เลียนแบบธรรมชาติจนเป็นโมเลกุลที่มีความซับซ้อนมากขึ้น และสามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางเคมีได้หลากหลาย เช่น การศึกษากระบวนการทางชีววิทยา การพัฒนายารักษาโรคและการพัฒนาตัวเร่งปฏิกิริยา[10] โดยเฉพาะเครื่องมือทางด้านเคมีเซ็นเซอร์[11]

หลักการพื้นฐานของเคมีซุปราโมเลกุลาร์เป็นการศึกษาแรงระหว่างโมเลกุลแบบนอน-โควาเลนต์ (non-covalent) เช่น พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) แรงผลักทางไฟฟ้า (electrostatic interaction) อันตรกิริยาแคตไอออน-ไพ (cation-π)และอันตรกิริยาไพ-ไพ (π - π interaction) ซึ่งถึงแม้จะเป็นอันตรกิริยาอย่างอ่อน แต่มีความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับ ดังนั้น ความรู้ทางเคมีซุปราโมเลกุลาร์จึงสามารถนำมาพัฒนาเป็นโมเลกุลที่ใช้เลือกจับทางเคมี และตัวให้สัญญาณทางเคมีได้

2.2 เซ็นเซอร์ทางเคมี (Chemical sensor)

เซ็นเซอร์ทางเคมีเป็นเครื่องมือที่ใช้ตรวจวัดไอออนหรือสารประกอบอินทรีย์ โดยสัญญาณที่แสดงผลสามารถอ่านค่าได้โดยเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ การตรวจวัดอาจจะเป็นไปได้ทั้งเชิงปริมาณ (quantitative) และเชิงคุณภาพวิเคราะห์ (qualitative) โดยส่วนประกอบพื้นฐานของเซ็นเซอร์ทางเคมีประกอบด้วย 2 ส่วนคือ

1. ตัวจับโมเลกุล (receptor) หรือโมเลกุลโฮสต์ มีความจำเพาะเจาะจงต่อสารที่ตรวจวัด

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. ตัวให้สัญญาณ (sensory unit) แปลงสัญญาณทางเคมีเมื่อเกิดการจับกันของโมเลกุลโฮสต์กับสารที่ต้องการตรวจวัด (analyze) ให้เป็นสัญญาณที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์
3. ส่วนเชื่อมต่อ (spacer) เป็นโครงสร้างส่วนที่เชื่อมระหว่างตัวจับโมเลกุล (receptor) และตัวให้สัญญาณ (sensory unit) อาจมีหรือไม่มีก็ได้

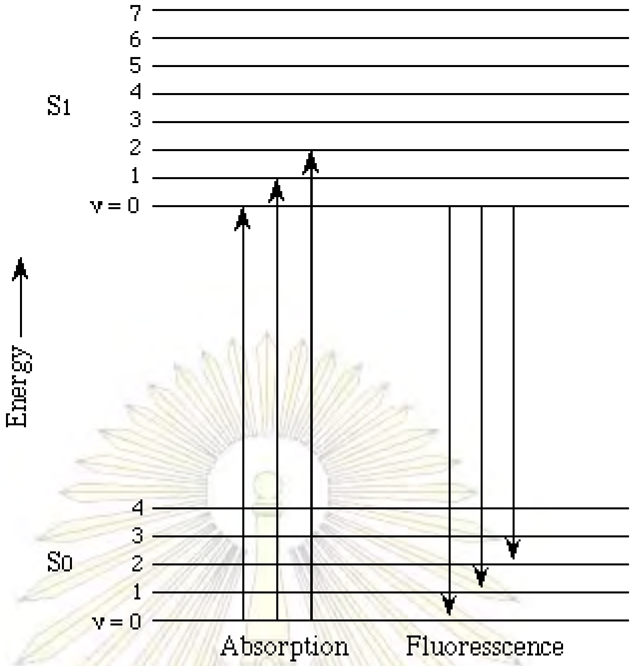
โดยคุณสมบัติของเซ็นเซอร์ทางเคมีที่ดีประกอบด้วย

1. ความเสถียร
2. ประสิทธิภาพในการแปลงสัญญาณทางเคมีเป็นสัญญาณที่ตรวจวัดได้
3. ความจำเพาะเจาะจง
4. ความว่องไวในการตรวจวัด

2.3 ฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรโฟโตเมตรี (Fluorescence Spectrophotometer)

ฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรโฟโตเมตรี (Fluorescence Spectrophotometry) เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์คุณสมบัติของสารโดยอาศัยการดูดกลืนแสงส่งผลให้โมเลกุลถูกกระตุ้นจากระดับชั้นพลังงานสถานะพื้น (ground state) ไปสู่ระดับชั้นพลังงานกระตุ้น (excited state) โมเลกุลที่ถูกกระตุ้นไปอยู่ในระดับพลังงานที่สูงจะไม่มีความเสถียรจึงต้องมีการคายพลังงานออกมา ถ้าพลังงานที่คายออกมานั้นอยู่ในรูปของพลังงานแสงจะเรียกว่าฟลูออเรสเซนต์ ดังรูปที่ 2.1

สถาบันวิทยบริการ
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

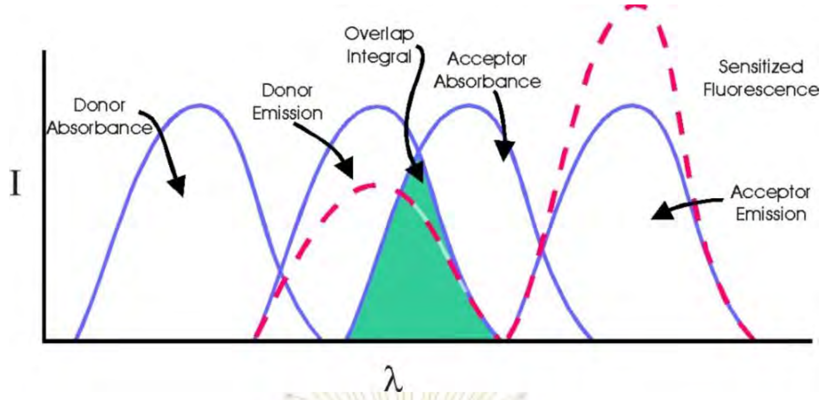


รูปที่ 2.1 กระบวนการเกิดฟลูออเรสเซนต์

2.3.1 **กระบวนการถ่ายโอนพลังงานฟลูออเรสเซนต์** (fluorescence resonance energy transfer - FRET)

กระบวนการถ่ายโอนพลังงานฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence resonance energy transfer - FRET) เป็นการถ่ายโอนพลังงานระหว่างหมู่ฟลูออโรฟอร์สองหมู่ ซึ่งประกอบด้วยหมู่ให้พลังงาน (donor group) และหมู่รับพลังงาน (acceptor group) เมื่อหมู่ให้พลังงานถูกกระตุ้นและคายพลังงานออกมา พลังงานดังกล่าวจะถูกดูดกลืนด้วยหมู่รับพลังงานและเกิดการคายแสงฟลูออเรสเซนต์ที่ความยาวคลื่นอีกค่าหนึ่ง ดังแสดงในรูปที่ 2.2 โดยการถ่ายโอนพลังงานนั้นมีปัจจัยสำคัญคือ

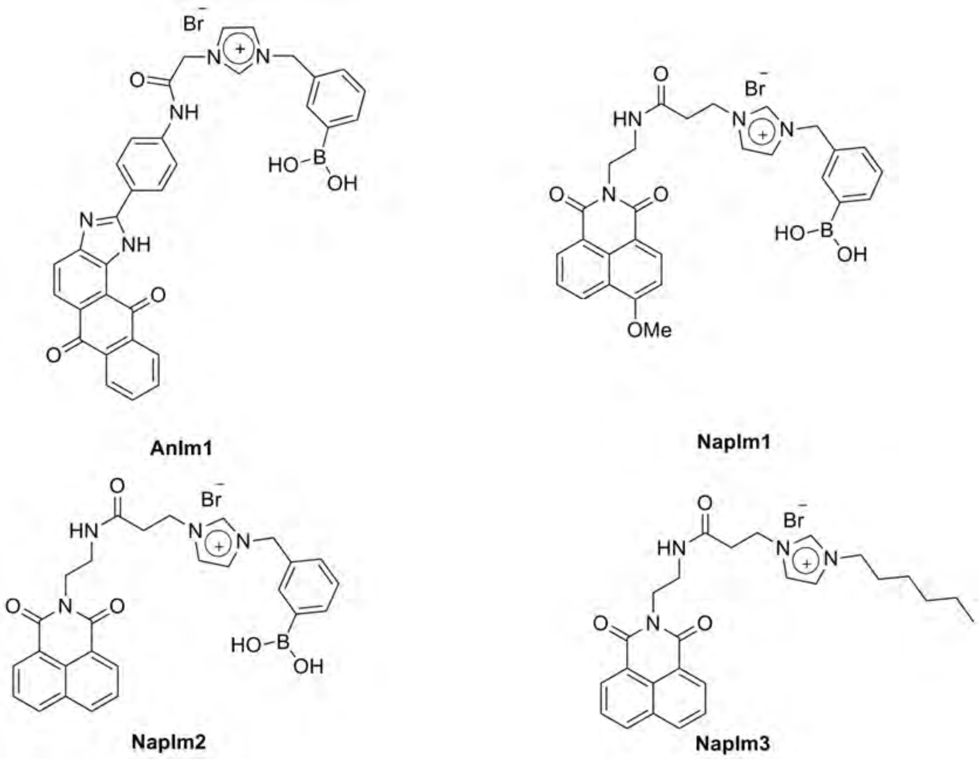
1. ความยาวคลื่นของพลังงานที่หมู่ให้พลังงานคายออกมาต้องอยู่ในช่วงเดียวกับความยาวคลื่นที่หมู่รับพลังงานดูดกลืนได้
2. ระยะห่างระหว่างหมู่ฟลูออโรฟอร์ทั้งสองหมู่ต้องอยู่ในช่วง 10-50 อังสตรอม



รูปที่ 2.2 แผนภาพแสดงการเกิดกระบวนการถ่ายโอนพลังงานฟลูออเรสเซนต์

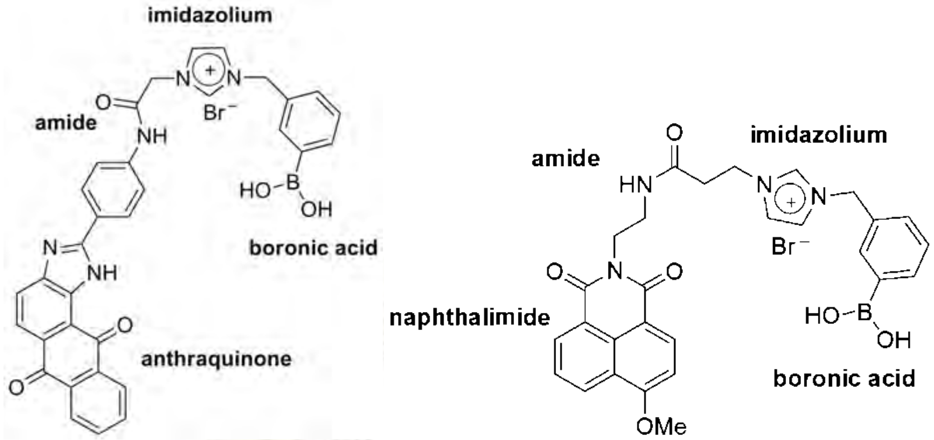
2.4 การออกแบบโครงสร้างโมเลกุลเซ็นเซอร์

ในงานวิจัยนี้ ได้มีการออกแบบโมเลกุลเซ็นเซอร์สำหรับการตรวจวัดสารประกอบเอมีนทางชีวภาพทั้งหมด 4 โครงสร้าง ได้แก่ AnIm1, NapIm1, NapIm2 และ NapIm3 ดังแสดงในรูปภาพที่ 2.3 โดยแต่ละโครงสร้างนั้นถูกออกแบบขึ้นมาภายใต้สมมุติฐานที่ตั้งไว้ต่างกัน ดังนี้



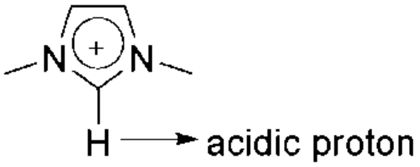
รูปที่ 2.3 ภาพแสดงโมเลกุลเซ็นเซอร์ AnIm1, NapIm1, NapIm2 และ NapIm3

2.4.1 **การออกแบบโครงสร้าง** AnIm1 **และ** NapIm1



รูปที่ 2.4 ภาพแสดงโมเลกุลเซ็นเซอร์ (ซ้าย) AnIm1 (ขวา) NapIm1

1) หมู่อิมิดาโซเลียม (imidazolium) โครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 2.5 ทำหน้าที่เป็นตัวจับเกสต์โมเลกุล (guest molecule) มีประจุเป็นบวกซึ่งสามารถเกิดแรงดึงดูดทางไฟฟ้า (electrostatic interaction) กับโมเลกุลที่มีประจุเป็นลบ และนอกจากนี้ไฮโดรเจนในตำแหน่ง *2H* เป็นไฮโดรเจนที่มีความเป็นกรดสูง สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) ได้ดี [12,13] จึงสามารถจับกับหมู่คาร์บอกซิเลตของฮิสทิดีนได้ด้วยอันตรกิริยา 2 ชนิดคือแรงดึงดูดทางไฟฟ้า (electrostatic interaction) และพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond)



รูปที่ 2.5 ภาพแสดงโครงสร้างวงอิมิดาโซเลียม

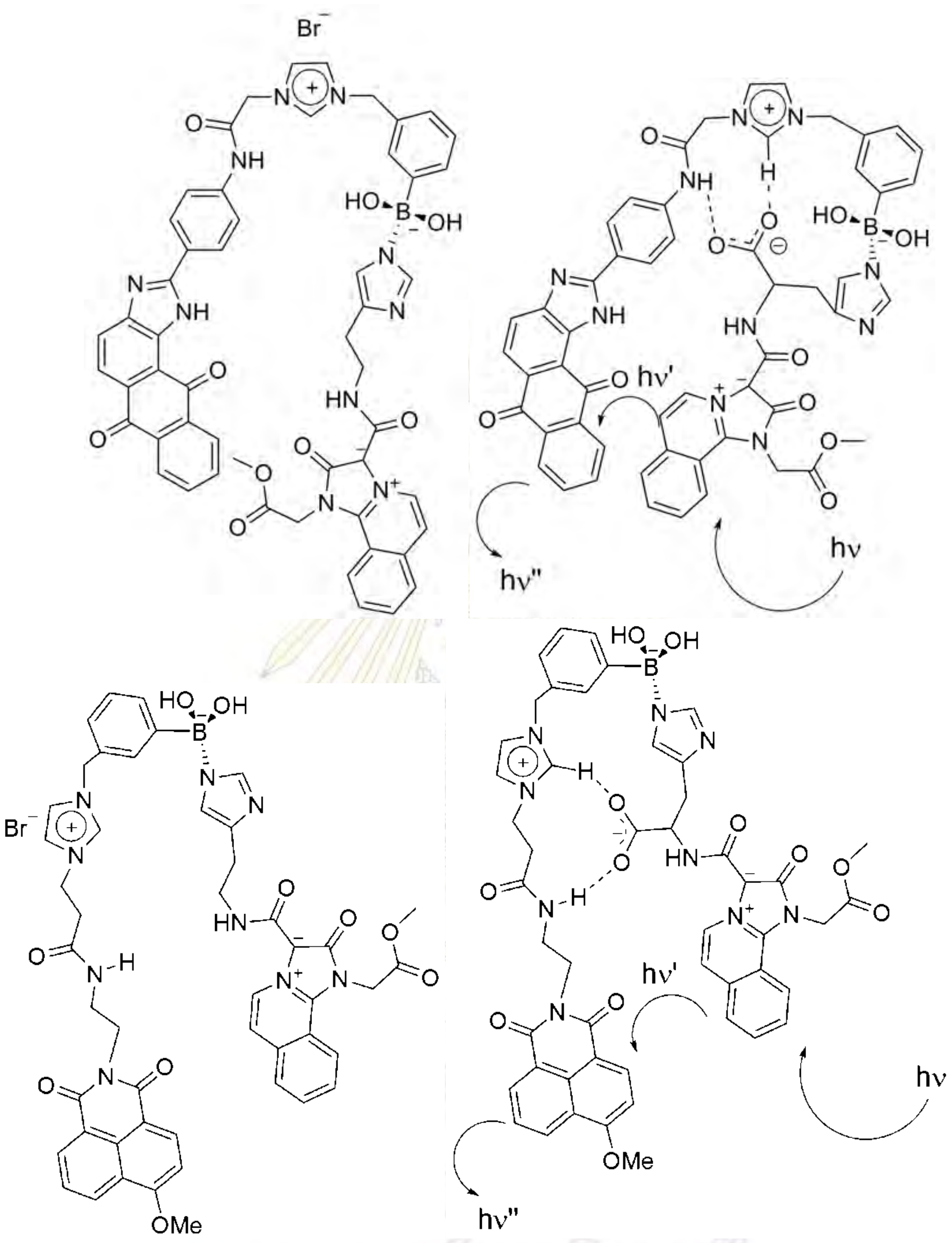
2) หมู่เอไมด์ (amide) ทำหน้าที่เป็นตัวจับเกสต์โมเลกุล (guest molucule) เนื่องจากสารประกอบเอไมด์ สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) กับหมู่คาร์บอกซิเลตได้เช่นกัน

3) กรดโบโรนิก (boronic acid)[14] ทำหน้าที่เป็นตัวจับกับอะตอมไนโตรเจนบนวงอิมิดาโซลของสารประกอบเอมีนได้

4) หมู่แอนทราควิโนน (anthraquinone) สามารถให้สัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่ 555 นาโนเมตร โดยถูกกระตุ้นที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร[15] ซึ่งใกล้เคียงกับค่าความยาวคลื่นที่สารประกอบของ histamine blue กับฮิสทามีนหรือฮิสทิดีนคายออกมา ดังนั้นกระบวนการถ่ายโอนพลังงานฟลูออเรสเซนต์ (FRET)

ด้วยการทำงานของตัวจับโมเลกุลทั้งสาม ทำให้โครงสร้างของสารประกอบระหว่างโมเลกุลเซ็นเซอร์ , **histamine blue** และสารประกอบเอมีนทั้งสองมีความแตกต่างกันในด้านความแข็งแรง ดังแสดงในรูปที่ 2.6 โดยสารประกอบเชิงซ้อนของฮิสทิดีนถูกจับด้วยอันตรกิริยาที่มากกว่า ทำให้หมู่ฟลูออโรฟอร์ของ **histamine blue** เข้าใกล้กับหมู่ฟลูออโรฟอร์ของ **AnIm1** และ **NapIm1** คือหมู่แอนทราควิโนน (anthraquinone) และหมู่แนพทาลิไมด์ (naphthalimide) ตามลำดับ ดังนั้น จึงทำให้เกิดการถ่ายโอนพลังงานฟลูออเรสเซนต์ (FRET) ขึ้นได้ ซึ่งจากปรากฏการณ์คาดว่าน่าจะใช้ในการแยกจำแนกการตรวจวัดฮิสทิดีนออกจากฮิสทามีนได้

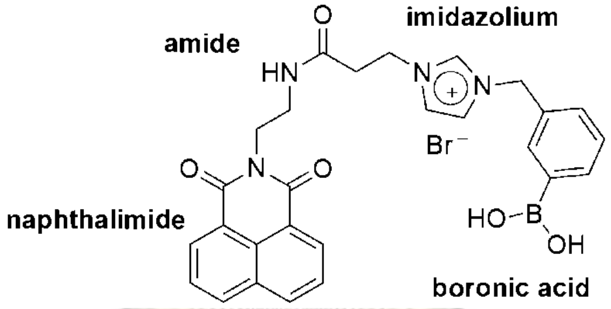
ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



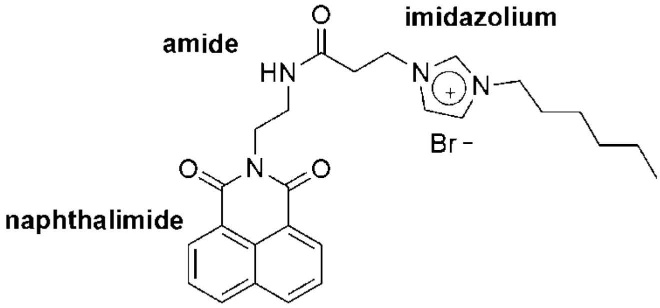
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2.6 โครงสร้างสารประกอบระหว่าง histamine blue, (บน)AnIm1 (ล่าง) NapIm1 และ(ซ้าย) ฮิสทามีน (ขวา) ฮิสทิดีน

2.4.2 **การออกแบบโครงสร้าง** NapIm2 **และ** NapIm3



a)



b)

รูปที่ 2.7 ภาพแสดงโมเลกุลเซ็นเซอร์ a) NapIm2 b) NapIm3

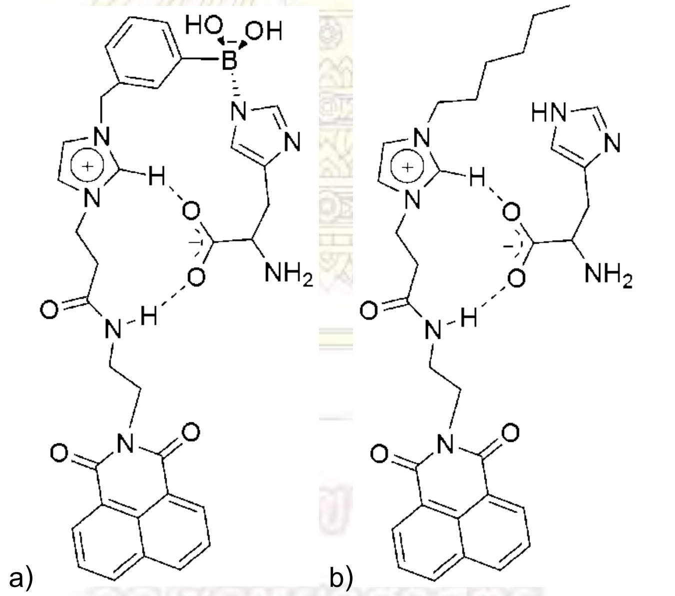
การออกแบบโมเลกุลในกลุ่ม NapIm2 และ NapIm3 มีจุดประสงค์เพื่อใช้ในการตรวจวัดในลักษณะที่แตกต่างไปจากโมเลกุลเซ็นเซอร์กลุ่มแรก โดยออกแบบให้เกิดอันตรกิริยากับฮิสทิดีนอิสระ ไม่ใช่ในรูปสารประกอบของ histamine blue ดังแสดงในรูปที่ 2.8 ผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่าการเข้าจับของฮิสทิดีนจะทำให้สัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของ NapIm2 และ NapIm3 เปลี่ยนแปลง ซึ่งจะมีความจำเพาะเจาะจงต่อฮิสทิดีนเท่านั้น เมื่อนำผลการตรวจวัดมาใช้ร่วมกับผลที่ได้จากการตรวจวัดด้วย histamine blue โดยใช้ histamine blue ในการจำแนกฮิสทามีนและฮิสทิดีนออกจากสารประกอบเอมีนทางชีวภาพชนิดอื่นๆ ก่อนใช้โมเลกุล NapIm2 หรือ NapIm3 จำแนกเฉพาะปริมาณฮิสทิดีน โดยโครงสร้างของโมเลกุลประกอบด้วย

1) หมู่อิมิดาโซเลียม (imidazolium) ทำหน้าที่เป็นตัวจับเกสต์โมเลกุล (guest molecule) กับหมู่คาร์บอกซิเลตของฮิสทิดีนได้ด้วยสองอันตรกิริยาคือแรงดึงดูดทางไฟฟ้า (electrostatic interaction) และพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond)

2) หมู่เอไมด์ (amide) ทำหน้าที่เป็นตัวจับเกสต์โมเลกุล (guest molecule) เกิดพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) กับหมู่คาร์บอกซิเลต

3) กรดโบโรนิก (boronic acid) ทำหน้าที่เป็นตัวจับอะตอมไนโตรเจนบนวงอิมิดาโซลของสารประกอบเอมีนได้

4) หมู่แนพทาลิไมด์ (naphthalimide) สามารถให้สัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่ประมาณ 380 นาโนเมตร โดยถูกกระตุ้นที่ความยาวคลื่นประมาณ 320 นาโนเมตร[16]



รูปที่ 2.8 ภาพแสดงสารประกอบระหว่างฮิสทิดีนและ a) NapIm2 b) NapIm3

บทที่ 3

วิธีการทดลองและผลการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

1. Magnetic bar
2. Hot plate
3. Rotary vacuum evaporator
4. Column chromatography
5. pH meter
6. Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)
7. Infrared spectroscopy (IR)
8. Fluorescence spectrometer

สารเคมี

1. 3-formylphenylboronic acid
2. 2,2-dimethylpropadiol
3. Toluene
4. Sodium borohydride
5. Methanol
6. Sodium hydrogen carbonate
7. Phosphorus tribromide
8. Dichloromethane
9. Sodium sulfate

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

10. Imidazole
11. Ethyl acetate
12. Aniline
13. 2-chloroacetyl chloride
14. Triethylamine
15. Phosphoryl chloride
16. Dimethylformamide
17. 4-bromo-1,8-naphthalic anhydride
18. Ethylenediamine
19. 3-bromopropanoic acid
20. Potassium hydroxide
21. Potassium carbonate
22. Tetrabutylammonium bromide
23. Tetrabutylammonium iodide
24. Hydrochloric acid
25. 3-bromopropanoic acid
26. Thionyl chloride
27. Ethyl 3-bromopropionate
28. 1,8-naphthalic anhydride
29. Acetonitrile
30. Isoquinoline
31. Methylisocyanoacetate
32. Trifluoroacetic anhydride
33. Celite
34. Sodium carbonate
35. Sodium hydrogenphosephate

36. Sodium dihydrogenphosphate

37. Sodium chloride

38. Dimethylsulfoxide

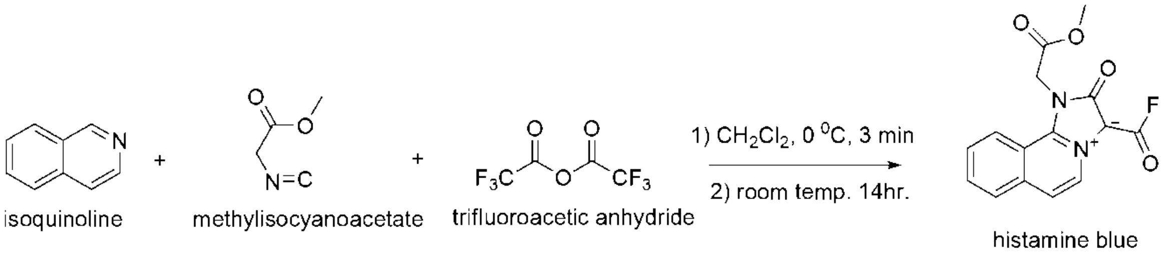
39. Histidine

40. Histamine

41. 1-bromohexane

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 **การสังเคราะห์โมเลกุลเซ็นเซอร์** histamine blue[17]



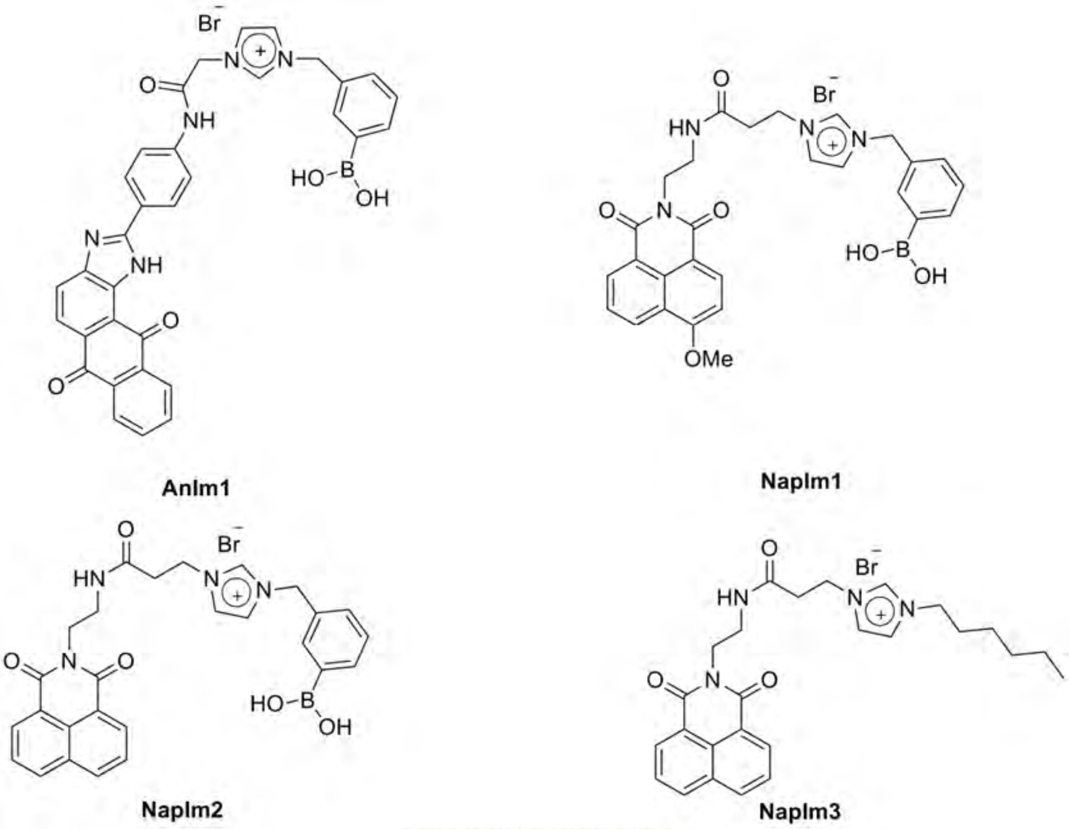
บรรจุสารไอโซควิโนลีน (isoquinoline) 1.08 กรัม (8.34 มิลลิโมล) ในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน 15 มิลลิลิตรลงในขวดก้นกลมสองคอขนาด 25 มิลลิลิตร คนสารละลายภายใต้บรรยากาศไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เติมไตรฟลูออโรอะซิติกแอนไฮไดรด์ (trifluoroacetic anhydride) 1.416 มิลลิลิตร (10.00 มิลลิโมล) และเมทิลไอโซไซยาโนอะซิเตต (methylisocyanoacetate) 0.759 มิลลิลิตร (8.34 มิลลิโมล) ลงในสารละลายตามลำดับ คนสารละลายผสมที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินต่อไป ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 ชั่วโมง เติมสารละลายอิ่มตัวของโซเดียมคาร์บอเนต 30 มิลลิลิตร คนสารละลายต่อประมาณ 10 นาที แล้วนำสารทั้งหมดมาสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนและน้ำ 3 ครั้ง เก็บชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ในขวดก้นกลม เติมซิลิกาเจลและโซเดียมซัลเฟตลงไป คนสารทั้งหมดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงกรองผ่านซีไลต์ นำของเหลวมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นลดความดันแบบหมุน (rotary evaporator) เติมไดเอทิลอีเทอร์ลงไปจนเกิดการตกตะกอน กรองเพื่อเก็บตะกอน พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ **histamine blue** เป็นของแข็งสีม่วงอมเทาหนัก 0.580 กรัม คิดเป็นร้อยละผลิตภัณฑ์ 23

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร histamine blue

^{1}H-NMR spectrum (**รูปที่** 4.4) ($CDCl_3$, 400 MHz) : $\boldsymbol{\delta}$ (ppm)

$\boldsymbol{\delta}$ = 9.32 (d, -Ar*H*, 1H), 8.05 (d, -Ar*H*, 1H), 7.95 (d, -Ar*H*-, 1H), 7.83 (t, -Ar*H*, 1H), 7.76 (t, -Ar*H*, 1H), 7.56 (d, -Ar*H*, 1H), 5.35 (s, -CH_2-, 2H), 3.80 (s, -CH_3, 3H)

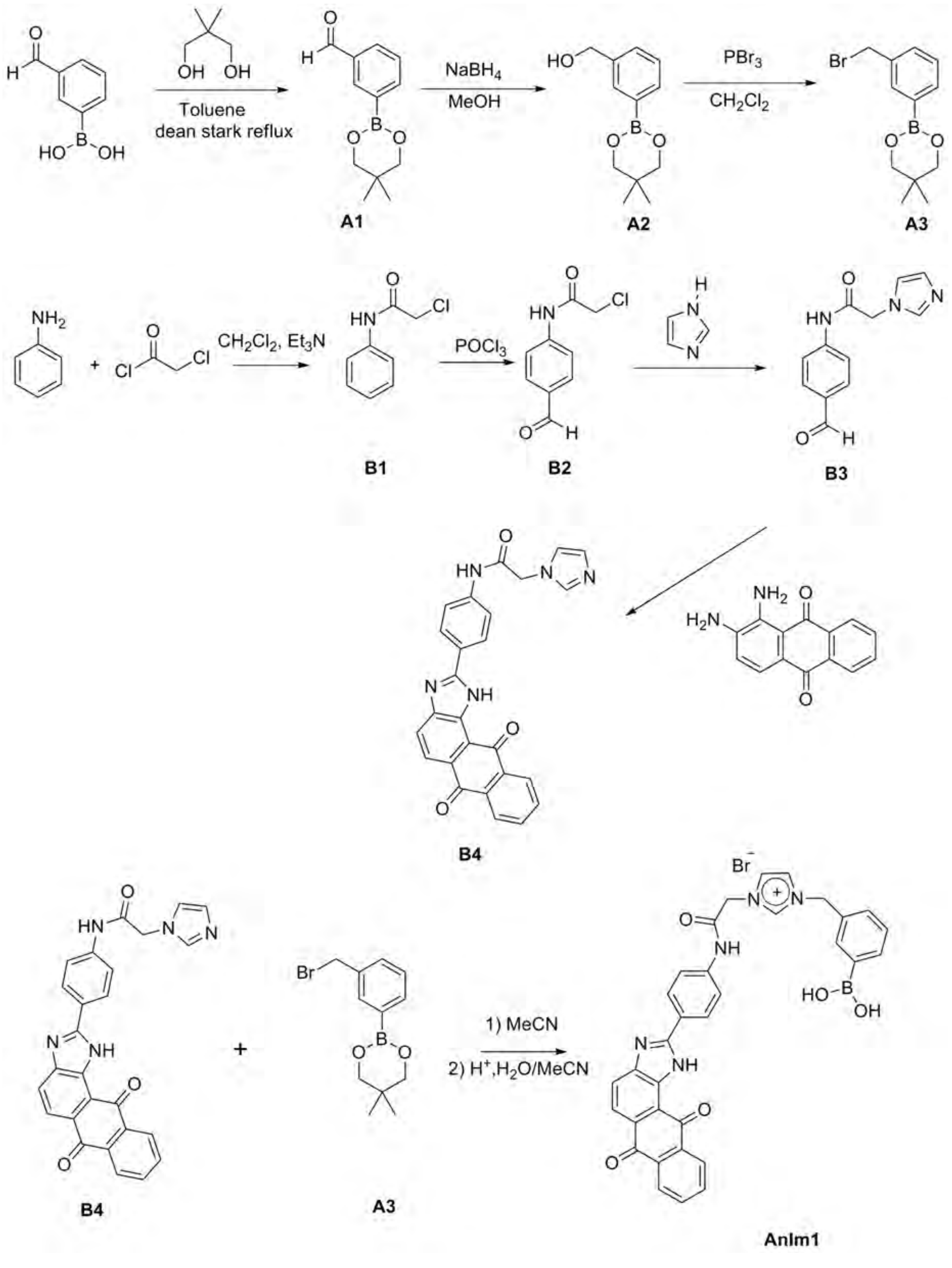
3.3 การสังเคราะห์โมเลกุลเซ็นเซอร์ที่มีฐานเป็นเกลืออิมิดาโซเลียมและกรดโบโรนิกสำหรับการตรวจวัดสารประกอบเอมีนทางชีวภาพ



รูปที่ 3.1 ภาพแสดงโมเลกุลเซ็นเซอร์ AnIm1, NapIm1, NapIm2 และ NapIm3

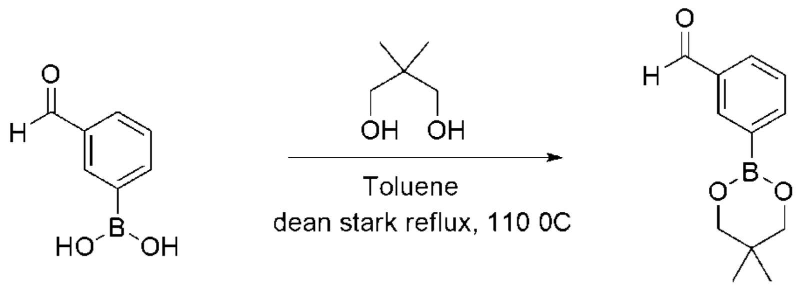
ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.1 การสังเคราะห์โมเลกุลเซ็นเซอร์ AnIm1



แผนภาพที่ 3.1 แสดงการสังเคราะห์โมเลกุลเซ็นเซอร์ AnIm1

3.3.1.1 **การสังเคราะห์** 3-(5,5-dimethyl-1,3,2-dioxaborinan-2-yl)benzaldehyde (A1)



A1

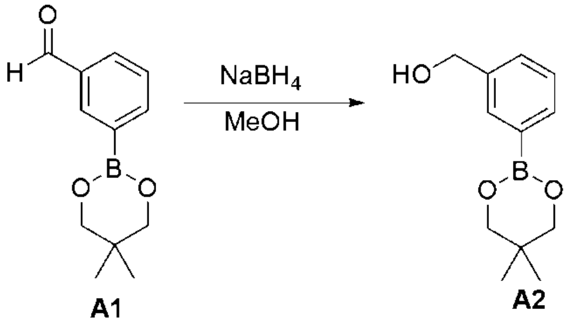
เติมสาร 3-ฟอร์มิลฟีนิลโบโรนิก แอซิด (3-formylphenylboronic acid) 0.600 กรัม (4.00 มิลลิโมล) ลงในขวดก้นกลมสองคอขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีโมเลกุลาร์ซีฟบรรจุอยู่ เติมตัวทำละลายโทลูอีนปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสาร 2,2-ไดเมทิลโพรพาไดออล (2,2-dimethylpropadiol) 0.416 กรัม (4.00 มิลลิโมล) ลงไปในสารละลายผสม รีฟลักซ์ปฏิกิริยาแบบดีน สตาร์กที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 ชั่วโมง กรองสารละลายผสมด้วยกระดาษกรองเพื่อแยกโมเลกุลาร์ซีฟออก นำของเหลวที่ได้มาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นลดความดันแบบหมุน (rotary evaporation) พบสาร 3-(5,5-dimethyl-1,3,2-dioxaborinan-2-yl)benzaldehyde **(A1)** เป็นของเหลวหนืดสีเหลืองหนัก 0.690 กรัม คิดเป็นร้อยละผลิตภัณฑ์ 79

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร A1

^{1}H-NMR spectrum (**รูปที่** 4.5) ($CDCl_3$, 400 MHz) : δ (ppm)

δ = 10.04 (s, -CO*H*, 1H), 8.30 (s, -Ar*H*, 1H), 8.05 (d, -Ar*H*, 1H), 7.95 (d, -Ar*H*, 1H), 7.52 (t, -Ar*H*, 1H), 3.79 (s, -CH_2-, 4H), 1.00 (s, -CH_3, 6H)

3.3.1.2 **การสังเคราะห์** (3-(5,5-dimethyl-1,3,2-dioxaborinan-2-yl)phenyl)methanol (A2)



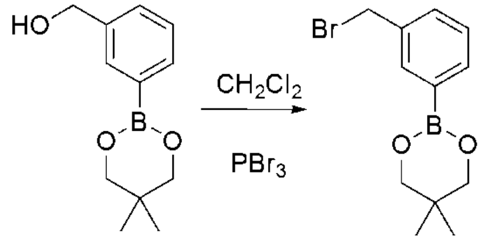
บรรจุสาร 3-(5,5-dimethyl-1,3,2-dioxaborinan-2-yl)benzaldehyde **(A1)** 0.690 กรัม (3.16 มิลลิโมล) ลงในขวดก้นกลมสองคอขนาด 250 มิลลิลิตร คนให้ละลายด้วยเมทานอลปริมาตร 25 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เติมโซเดียมโบโรไฮไดรด์ (sodium borohydride) 2.391 กรัม (63.2 มิลลิโมล) ลงไปในขวดก้นกลม หลังจากปฏิกิริยาดำเนินไปเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ค่อยๆเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) 3 โมลาร์เพื่อปรับสารละลายผสมให้ pH เท่ากับ 7 จากนั้นนำมาระเหยเมทานอลด้วยเครื่องกลั่นลดความดันแบบหมุน (rotary evaporator) จากนั้นสกัดของเหลวที่เหลือด้วยน้ำและไดคลอโรมีเทน 3 ครั้ง เก็บชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมดรวมกัน เติมโซเดียมซัลเฟต (sodium sulfate) เพื่อกำจัดน้ำ จากนั้นกรองโซเดียมซัลเฟตทิ้ง แล้วนำของเหลวที่เหลือมาระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องกลั่นความดันแบบหมุน พบผลิตภัณฑ์สาร A2 เป็นของแข็งสีชมพูหนัก 0.466 กรัม คิดเป็นร้อยละผลิตภัณฑ์ 67

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร A2

^{1}H-NMR spectrum (**รูปที่** 4.6) ($CDCl_3$, 400 MHz) : δ (ppm)

δ = 7.79 (s, -Ar*H*, 1H), 7.73 (d, -Ar*H*, 1H), 7.45 (d, -Ar*H*, 1H), 7.37 (t, -Ar*H*, 1H), 4.70 (s, -CH_2-, 2H), 3.77 (s, -CH_2-, 4H), 1.02 (s, -CH_3, 6H)

3.3.1.3 **การสังเคราะห์** 2-(3-(bromomethyl)phenyl)-5,5-dimethyl-1,3,2-dioxaborinane (A3)



A2 **A3**

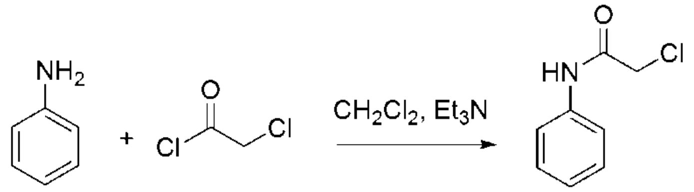
บรรจุสาร (3-(5,5-dimethyl-1,3,2-dioxaborinan-2-yl)phenyl)methanol **(A2)** 0.466 กรัม (2.12 มิลลิโมล) ในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน 20 มิลลิลิตรลงในขวดก้นกลมสองคอ ขนาด 250 มิลลิลิตร คนสารละลายภายใต้สภาวะไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ละลายฟอสฟอรัสไตรโบรไมด์ (phosphorus tribromide) 0.1 มิลลิลิตร (1.06 มิลลิโมล) ในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน 20 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายผสม แล้วคนสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เติมสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (sodium hydrogencarbonate) ทีละหยดเพื่อปรับสารละลายผสมให้มี pH เท่ากับ 7 นำมาสกัดด้วยน้ำและไดคลอโรมีเทน 3 ครั้ง นำชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ได้มาเติมโซเดียมซัลเฟต (sodium sulfate) เพื่อกำจัดน้ำ แล้วกรองออก ระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องกลั่นลดความดันแบบหมุน (rotary evaporation) พบผลิตภัณฑ์สาร **A3** เป็นของแข็งสีชมพูเข้มหนัก 0.413 กรัม คิดเป็นร้อยละผลิตภัณฑ์ 69

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร A3

^{1}H-NMR spectrum (**รูปที่** 4.7) ($CDCl_3$, 400 MHz) : $\boldsymbol{\delta}$ (ppm)

δ = 7.79 (s, -Ar*H*, 1H), 7.73 (d, -Ar*H*, 1H), 7.45 (d, -Ar*H*, 1H), 7.37 (t, -Ar*H*, 1H), 4.51 (s, -CH_2-, 2H), 3.78 (s, -CH_2-, 4H), 1.02 (s, -CH_3, 6H)

3.3.1.4 **การสังเคราะห์** 2-chloro-*N*-phenylacetamide (B1)



B1

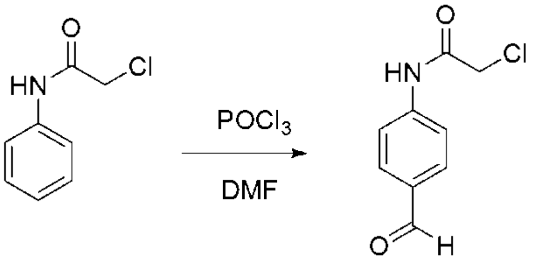
บรรจุแอนนิลีน (aniline) 0.466 กรัม (5.00 มิลลิโมล) และไตรเอทิลเอมีน 0.705 มิลลิลิตร (5.00 มิลลิโมล) ในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในขวดก้นกลมสองคอขนาด 250 มิลลิลิตร คนสารละลายผสมที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ค่อยๆเติมสารละลาย 2-คลอโรอะซีติลคลอไรด์ (2-chloroacethyl chloride) 0.565 กรัม (5 มิลลิโมล) ในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน 20 มิลลิลิตร ลงในสารละลายผสม คนสารละลายผสมที่อุณหภูมิห้องภายใต้บรรยากาศไนโตรเจนเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องกลั่นลดความดันแบบหมุน ทำให้ผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น 20% เฮกเซนในเอทิลอะซีเตต พบสาร **B1** เป็นของเหลวสีน้ำตาลหนัก 0.433 กรัม คิดเป็นร้อยละผลผลิต 51

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร B1

^{1}H-NMR spectrum (**รูปที่** 4.8) ($CDCl_3$, 400 MHz) : $\boldsymbol{\delta}$ (ppm)

δ = 8.24 (s, -N*H*-, 1H), 7.56 (d, -Ar*H*-, 2H), 7.36 (t, -Ar*H*-, 2H), 7.19 (, -Ar*H*-, 1H), 4.19 (s, -CH_2-, 2H)

3.3.1.5 **การสังเคราะห์** 2-chloro-N-(4-formylphenyl)acetamide (B2)



B1 **B2**

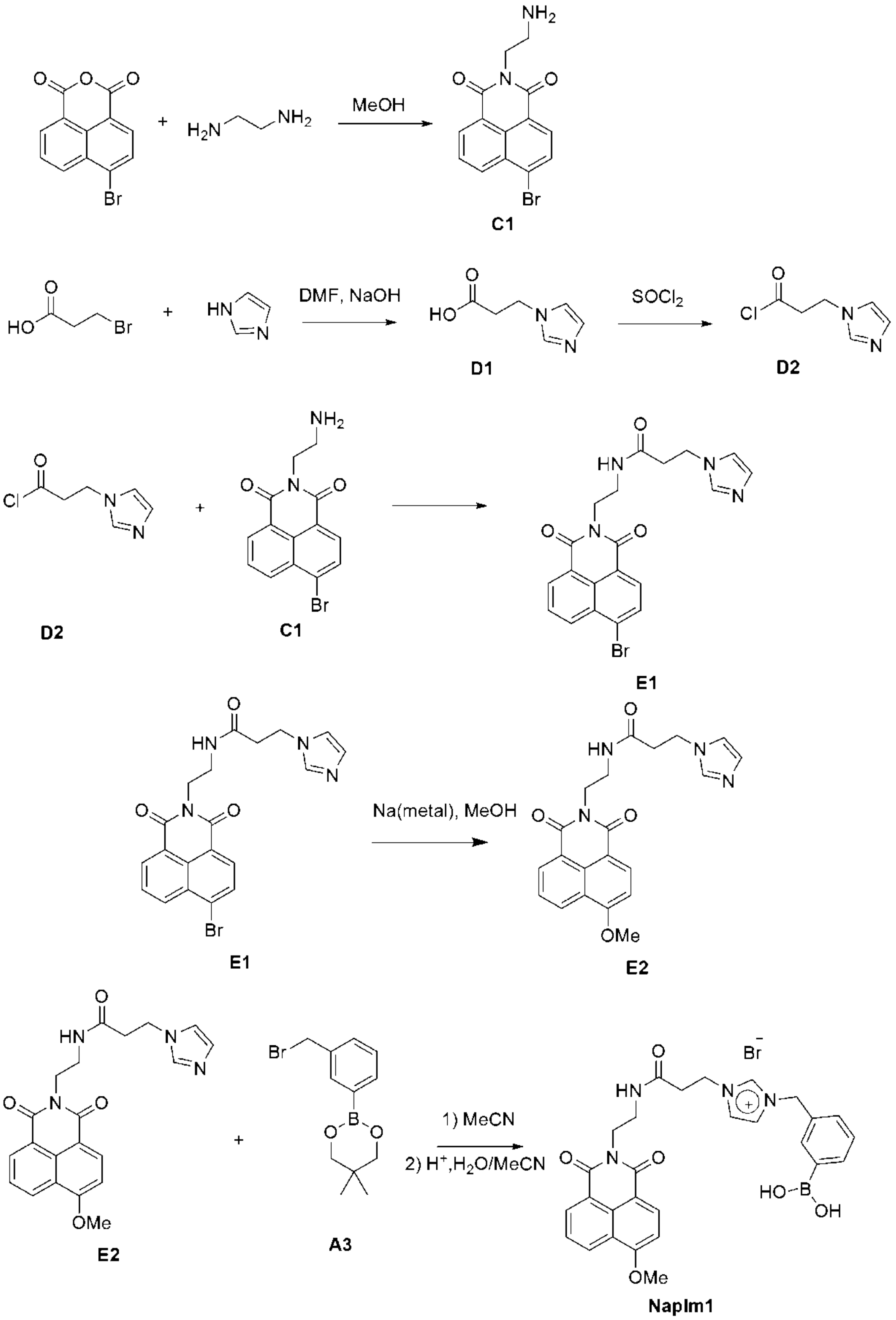
ละลายสาร **B1** ปริมาณ 0.178 กรัม (1.049 มิลลิโมล) ด้วยไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (dimethylformamide, DMF) 0.3 มิลลิลิตร คนสารละลายภายใต้บรรยากาศไนโตรเจนที่อุณหภูมิห้อง ค่อยๆเติมสารฟอสฟอริลคลอไรด์ (phosphoryl chloride) 0.209 กรัม (1.36 มิลลิโมล) ตั้งปฏิกิริยารีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง สกัดสารละลายผสมด้วยน้ำและเอทิลอะซีเตต เติมโซเดียมซัลเฟต (sodium sulfate) ลงในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์เพื่อกำจัดน้ำ ระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยเครื่องกลั่นลดความดันแบบหมุน (rotary evaporator) พบว่าปฏิกิริยานี้ไม่สามารถแยก **B2** ให้บริสุทธิ์ได้

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.2 การสังเคราะห์โมเลกุล NapIm1

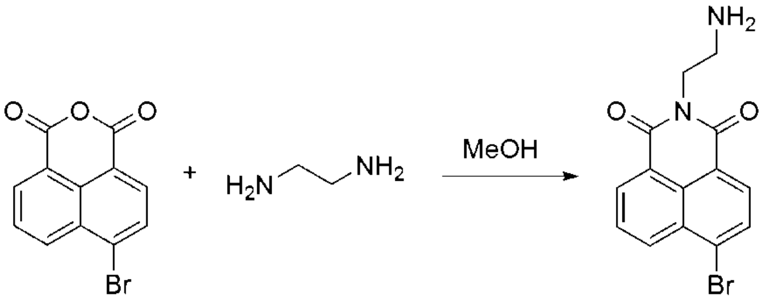
เนื่องจากการสังเคราะห์โมเลกุล **AnIm1** ไม่ประสบผลสำเร็จ จึงออกแบบโครงสร้างโมเลกุลเซ็นเซอร์ตัวใหม่คือ **NapIm1** ซึ่งมีแผนการสังเคราะห์ดังแสดงในแผนภาพที่ 3.2

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



แผนภาพที่ 3.2 แสดงการสังเคราะห์โมเลกุลเซ็นเซอร์ NapIm1

3.3.2.1 **การสังเคราะห์** 2-(2-aminoethyl)-6-bromo-1*H*-benzo[de]isoquinoline-1,3(2*H*)-dione (C1)



C1

บรรจุสาร 4-โบรโม-1,8-แนพทาลิก แอนไฮไดรด์ (4-bromo-1,8-naphthalic anhydride) 0.554 กรัม (2 มิลลิโมล) ในตัวทำละลายเมทานอล 20 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นกลมสองคอขนาด 250 มิลลิลิตร เติมเอทิลีนไดเอมีน (ethylenediamine) 0.601 กรัม (10 มิลลิโมล) คนสารละลายผสมที่อุณหภูมิห้องภายใต้บรรยากาศไนโตรเจนเป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบตะกอนสีเหลืองในปฏิกิริยา กรองสารละลายผสมได้ตะกอนหลักของผลิตภัณฑ์ **C1** และนำ filtrate ที่ได้มาสกัดด้วยน้ำและไดคลอโรมีเทน 2 ครั้ง นำชั้นตัวทำละลายอินทรีย์มาเติมโซเดียมซัลเฟต (sodium sulfate) เพื่อกำจัดน้ำแล้วกรองออก ระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องกลั่นลดความดันแบบหมุน (rotary evaporation) ได้ผลิตภัณฑ์ **C1** อีกส่วนหนึ่ง เมื่อนำมารวมกันพบว่าผลิตภัณฑ์ **C1** เป็นของแข็งสีเหลืองหนัก 0.544 กรัม คิดเป็นร้อยละผลิตภัณฑ์ 85

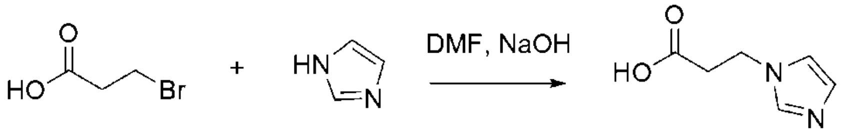
ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร C1

^{1}H-NMR spectrum (**รูปที่** 4.9) (DMSO, 400 MHz) : δ (ppm)

δ = 8.54 (d, -Ar*H*, 1H), 8.30 (d, -Ar*H*, 1H), 8.19 (d, -Ar*H*, 2H), 7.98 (t, -Ar*H*, 1H), 4.03 (t, -CH_2-, 2H), 2.77 (t, -CH_2-, 2H)

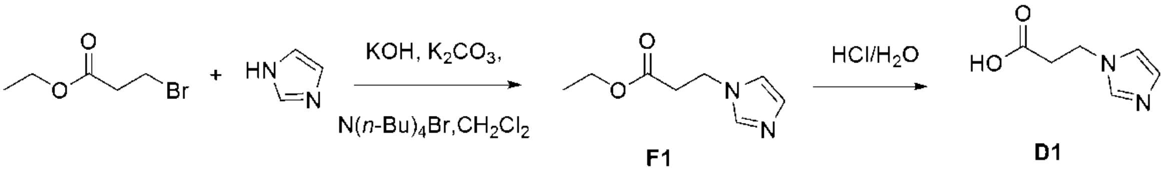
3.3.2.2 **การสังเคราะห์** 3-(1*H*-imidazol-1-yl)propanoic acid (D1)



D1

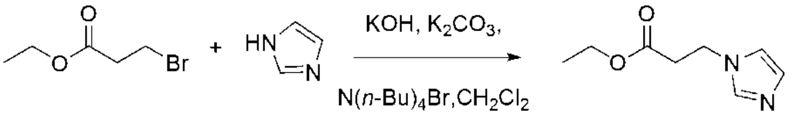
ละลายอิมิดาโซล (imidazole) 0.143 กรัม (2.1 มิลลิโมล) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) 0.084 กรัม (2.1 มิลลิโมล) ในตัวทำละลายเป็นไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (dimethylformamide, DMF) 3 มิลลิลิตร ในขวดก้นกลมสองคอขนาด 250 มิลลิลิตร คนสารละลายเป็นเวลา 30 นาที ค่อยๆเติมสารละลาย 3-โบรโมโพรพาโนอิก แอซิด (3-bromopropanoic acid) 0.176 กรัม (1.15 มิลลิโมล) ลงในปฏิกิริยา ตั้งรีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สกัดสารละลายผสมทั้งหมดด้วยน้ำและเอทิลอะซีเตต แต่พบว่าผลิตภัณฑ์ไม่สามารถถูกแยกมาอยู่ในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ได้ จึงไม่สามารถสังเคราะห์ D1 ด้วยวิธีนี้

ดังนั้น จึงได้วางแผนการสังเคราะห์ D1 ขึ้นมาใหม่ซึ่งเป็นไปดังแผนภาพที่ 3.3



แผนภาพที่ 3.3 แสดงการสังเคราะห์โมเลกุล D1

3.3.2.3 **การสังเคราะห์** 3-(1*H*-imidazol-1-yl)propanoate (F1)



F1

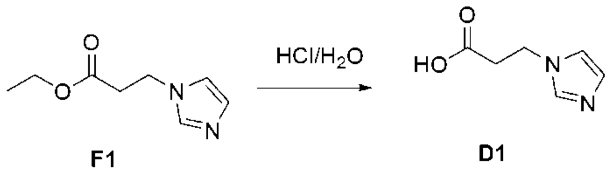
บรรจุอิมิดาโซล (imidazole) 0.340 กรัม (5 มิลลิโมล) โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (potassium hydroxide) 0.421 กรัม (7.5 มิลลิโมล) โพแทสเซียมคาร์บอเนต 0.577 กรัม (4.175 มิลลิโมล) และ *n*-เตตระบิวทิลแอมโมเนียม โบรไมด์ (*n*-tetrabutylammonium bromide) 0.032 กรัม (0.1 มิลลิโมล) ในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน 20 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นกลมสองคอขนาด 250 มิลลิลิตร คนสารละลายเป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลายเอทิล 3-โบรโมโพรพาโนเอต (ethyl 3-bromopropanoate) 0.905 กรัม (5 มิลลิโมล) ในไดคลอโรมีเทนอย่างช้าๆ ตั้งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองแยกเกลืออนินทรีย์ที่เหลือออก นำของเหลวที่ได้มาสกัดด้วยน้ำและไดคลอโรมีเทน 3 ครั้ง เติมโซเดียมซัลเฟต (sodium sulfate) เพื่อกำจัดน้ำออกจากตัวทำละลายอินทรีย์ นำชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ไประเหยแห้งด้วยเครื่องกลั่นลดความดันแบบหมุน (rotary evaporator) พบผลิตภัณฑ์ **F1** เป็นของเหลวหนืดสีเหลืองหนัก 0.649 กรัม คิดเป็นร้อยละผลิตภัณฑ์ 77

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร F1

^{1}H-NMR spectrum (**รูปที่** 4.10) ($CDCl_3$, 400 MHz) : δ (ppm)

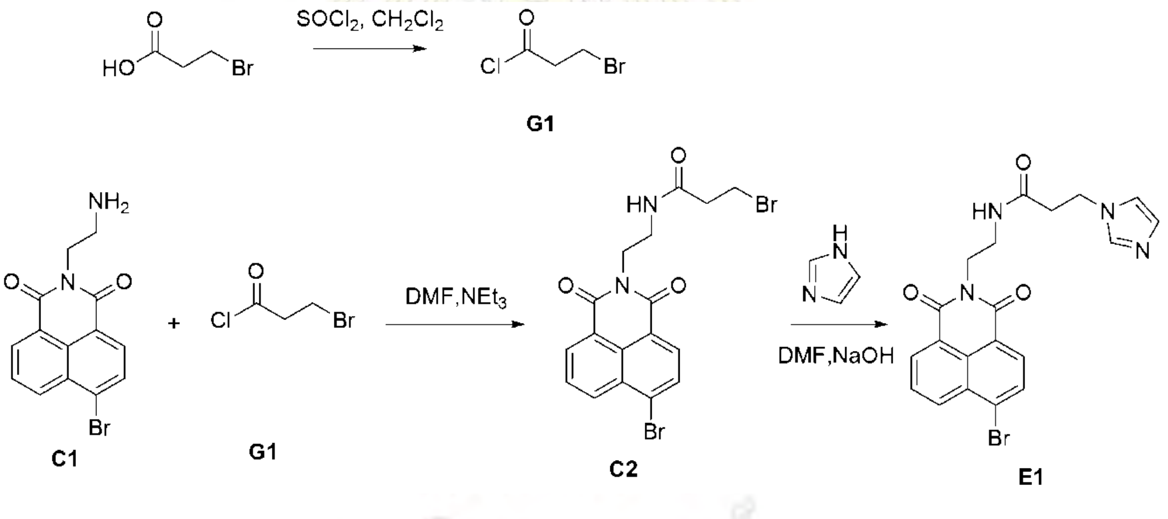
δ = 7.60 (s, -Ar*H*, 1H), 7.03 (d, -Ar*H*, 1H), 6.94 (d, -Ar*H*, 1H), 4.26 (q, -CH_2-, 2H), 4.12 (t, -CH_2-, 2H), 2.76 (t, -CH_2-, 2H), 1.22 (t, -CH_3, 3H)

3.3.2.4 **การสังเคราะห์** 3-(1*H*-imidazol-1-yl)propanoic acid (D1)



ละลายสาร **F1** 0.649 กรัม (3.859 มิลลิโมล) ในน้ำ 15 มิลลิลิตรซึ่งมีกรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) 46.3 มิลลิโมล คนให้เข้ากัน ตั้งรีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจนเป็นเวลา 8 ชั่วโมง ตกผลึกด้วยไอโซโพรพานอล (isopropanol) พบว่าปฏิกิริยาไม่เกิดสาร **D1**

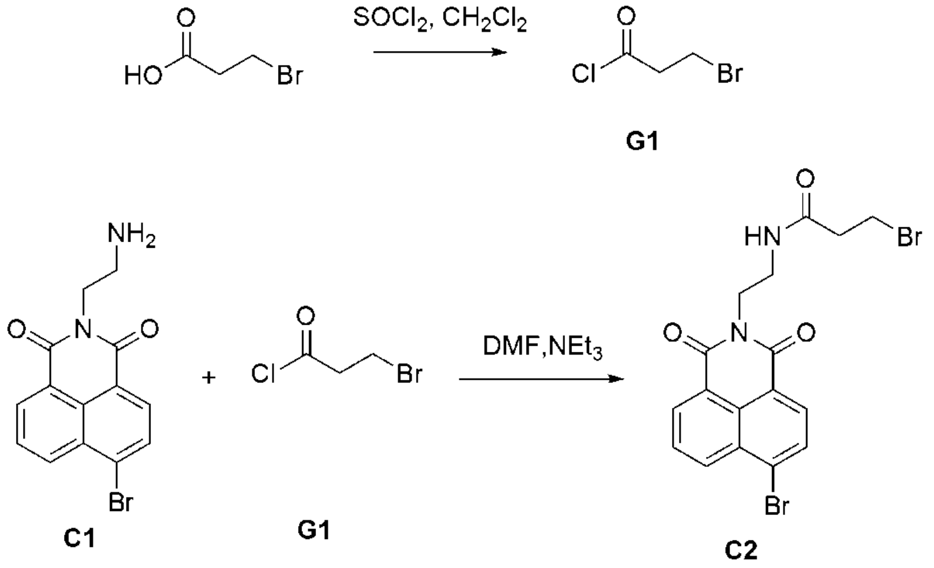
ด้วยเหตุนี้ จึงปรับแผนการสังเคราะห์อีกครั้ง โดยเปลี่ยนวิธีการสังเคราะห์ **E1** ดังแสดงในแผนภาพที่ 3.4



แผนภาพที่ 3.4 แสดงการสังเคราะห์โมเลกุล E1

คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

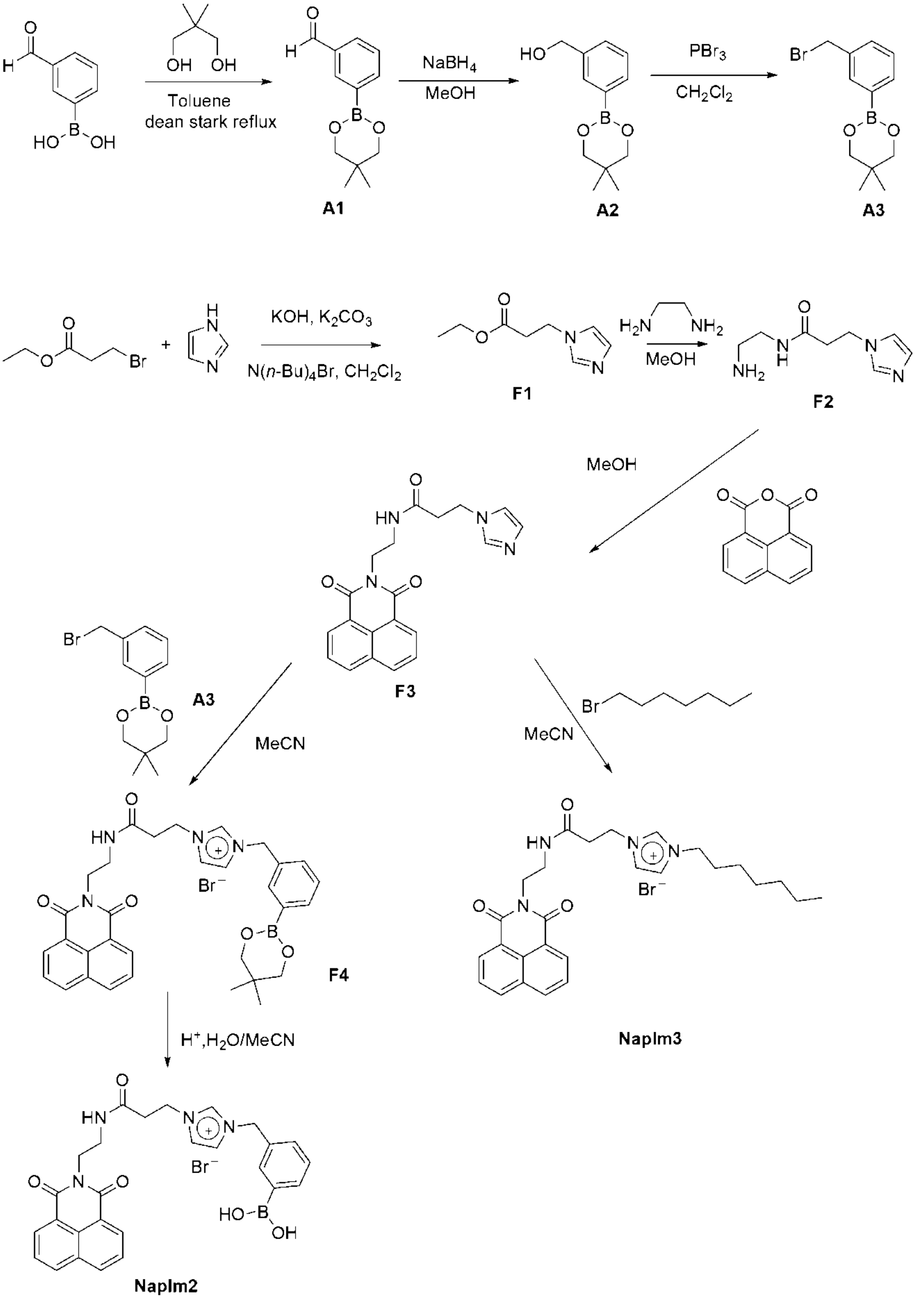
3.3.2.5 **การสังเคราะห์** 3-bromo-*N*-(2-(6-bromo-1,3-dioxo-1H-benzo[de]isoquinolin-2(3H)-yl)ethyl)propanamide (C2)



บรรจุ 3-โบรโมโพรพาโนอิก แอซิด (3-bromopropanoic acid) 0.153 กรัมลงในขวดก้นกลมสองคอขนาด 250 มิลลิลิตรต่อเข้ากับชุดอุปกรณ์ schlenk line เติมไดคลอโรมีเทน 5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมไทโอนิลคลอไรด์ (thionylchloride) 2.03 มิลลิลิตร (28 มิลลิโมล) ตามลงไป คนสารจนสารละลายใสเป็นเนื้อเดียวกัน แสดงว่าเกิดสาร **G1** สมบูรณ์แล้ว ล้างไทโอนิลคลอไรด์ด้วยไดคลอโรมีเทนภายใต้ปั๊มดูดอากาศ 3 ครั้ง แล้วเติมสารละลาย **C1** 0.319 กรัม (1 มิลลิโมล) ในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (dimethylformamide, DMF) 6 มิลลิลิตร ผ่านแคนนูลาร์ (cannular) คนสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นกลั่นตัวทำละลายออกจนแห้ง เมื่อนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ พบว่าไม่เกิดสาร **C2**

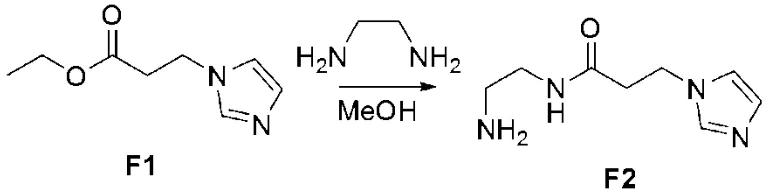
3.3.3 การสังเคราะห์โมเลกุล NapIm2 และ NapIm3

เนื่องจากการสังเคราะห์โมเลกุล **AnIm1** ไม่ประสบผลสำเร็จ จึงออกแบบโครงสร้างโมเลกุลเซ็นเซอร์ตัวใหม่คือ **NapIm2** และ **NapIm3** ซึ่งมีแผนการสังเคราะห์ดังแสดงในแผนภาพที่ 3.5



แผนภาพที่ 3.5 แสดงการสังเคราะห์โมเลกุลเซ็นเซอร์ NapIm2 และ NapIm3

3.3.3.1 **การสังเคราะห์** *N*-(2-aminoethyl)-3-(1*H*-imidazol-1-yl)propanamide (F2)



ละลายเอทิลีนไดเอมีน (ethylenediamine) 0.681 กรัม (11.33 มิลลิโมล) ด้วยเมทานอล 20 มิลลิลิตรในขวดก้นกลมสองคอขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน ค่อยๆเติมสารละลาย **F1** 0.635 กรัม (3.78 มิลลิโมล) ในเมทานอล 25 มิลลิลิตร ลงในปฏิกิริยา คนสารละลายให้เข้ากันเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นลดความดันแบบหมุน (rotary evaporator) พบผลิตภัณฑ์ **F2** เป็นของเหลวหนืดสีเหลือง หนัก 0.678 กรัม คิดเป็นร้อยละผลิตภัณฑ์ 98

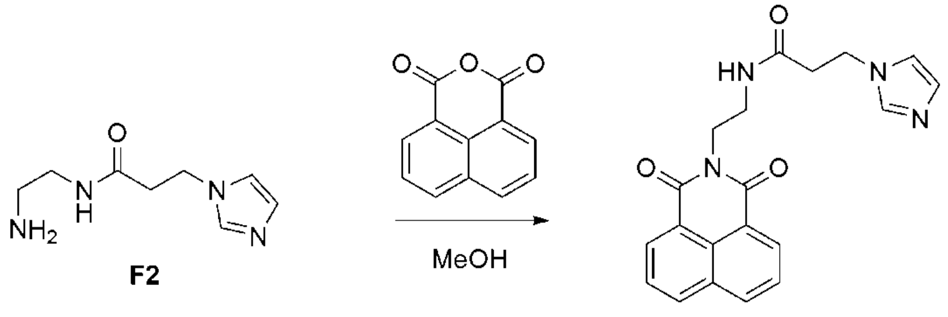
การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร F2

^{1}H-NMR spectrum (**รูปที่** 4.13) ($CDCl_3$, 400 MHz) : δ (ppm)

δ = 7.47 (s, -Ar*H*, 1H), 6.99 (d, -Ar*H*, 1H), 6.93 (d, -Ar*H*, 1H), 6.59 (s, -N*H*-, 1H), 4.30 (t, -CH_2-, 2H), 3.25 (t, -CH_2-, 2H), 2.75 (t, -CH_2-, 2H), 2.61 (t, -CH_2-, 2H)

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.3.2 **การสังเคราะห์** *N*-(2-(1,3-dioxo-1*H*-benzo[de]isoquinolin-2(3*H*)-yl)ethyl)-3-(1*H*-imidazol-1-yl)propanamide (F3)



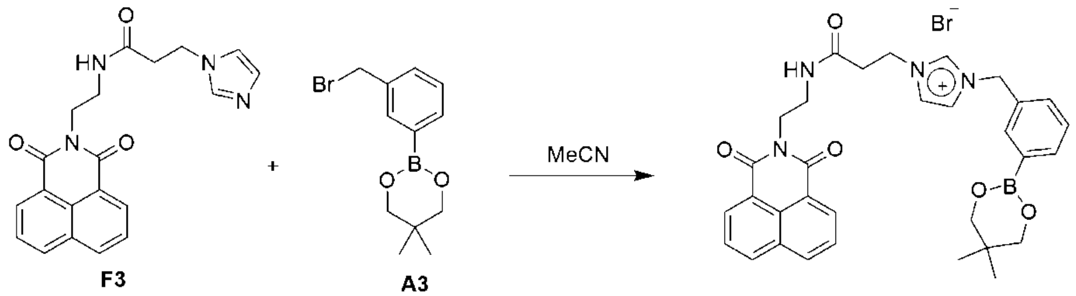
บรรจุสาร 1,8-แนพทาลิก แอนไฮไดรด์ (1,8-napthalic anhydride) 0.369 กรัม (1.86 มิลลิโมล) และตัวทำละลายเมทานอล 15 มิลลิลิตร ในขวดก้นกลมสองคอขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลาย F2 0.339 กรัม (1.86 มิลลิโมล) ลงไป ตั้งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจนเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นแยกสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น 10% เมทานอลในเอทิลอะซีเตต พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ F3 เป็นของเหลวสีเหลืองหนัก 0.146 กรัม คิดเป็นร้อยละผลิตภัณฑ์ 22

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร F3

^{1}H-NMR spectrum (**รูปที่** 4.14) (MeOD, 400 MHz) : δ (ppm)

δ = 8.27 (t, -Ar*H*, 2H), 8.09 (t, -Ar*H*, 2H), 7.58 (m, -Ar*H*, 3H), 6.94 (d, -Ar*H*, 1H), 6.76 (d, -Ar*H*, 1H), 4.10 (t, -CH_2-, 2H), 4.08 (t, -CH_2-, 2H), 3.38 (t, -CH_2-, 2H), 2.46 (t, -CH_2-, 2H)

3.3.3.3 การสังเคราะห์โมเลกุล F4

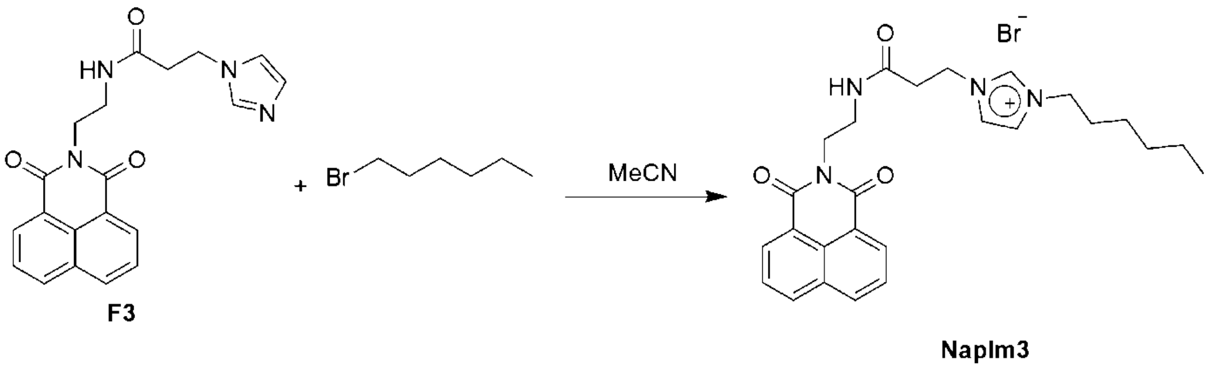


F3 A3 F4

บรรจุสาร **F3** 0.146 กรัม (0.403 มิลลิโมล) และสาร **A3** 0.114 กรัม (0.403 มิลลิโมล) และตัวทำละลายอะซีโตไนไตรล์ 5 มิลลิลิตร ในขวดก้นกลมสองคอขนาด 50 มิลลิลิตร ตั้งปฏิกิริยารีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองสารละลายได้ตะกอนผลิตภัณฑ์ **F4** ซึ่งมีร้อยละผลิตภัณฑ์ต่ำมาก ไม่สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ได้

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.3.4 **การสังเคราะห์โมเลกุล** NapIm3



บรรจุสาร **F3** 0.612 กรัม (1.69 มิลลิโมล) และ 1- โบรโมเฮกเซน 0.279 กรัม (1.69 มิลลิโมล) และตัวทำละลายอะซีโตไนไตรล์ 5 มิลลิลิตร ในขวดก้นกลมสองคอขนาด 50 มิลลิลิตร ตั้งปฏิกิริยารีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องกลั่นลดความดันแบบหมุน (rotary evaporator) เติมเมทานอลลงไปจนเกิดตะกอน กรองแยกตะกอน นำของเหลวที่กรองได้ระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องกลั่นลดความดันแบบหมุน (rotary evaporator) พบผลิตภัณฑ์ **NapIm3** เป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลหนัก 0.590 กรัม คิดเป็นร้อยละผลิตภัณฑ์ 78

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร NapIm3

^{1}H-NMR spectrum (**รูปที่** 4.15) (CD_3CN, 400 MHz) : δ (ppm)

δ = 8.58 (s, -Ar*H*, 1H), 8.43 (d, -Ar*H*, 2H), 8.28 (d, -Ar*H*, 2H), 7.75 (t, -Ar*H*, 2H), 7.30 (d, -Ar*H*, 1H), 7.23 (d, -Ar*H*, 1H), 6.87 (s, -N*H*, 1H), 4.25 (t, -CH_2-, 2H), 4.12 (t, -CH_2-, 2H), 4.00 (t, -CH_2-, 2H), 3.40 (t, -CH_2-, 2H), 2.54 (t, -CH_2-, 2H), 1.19 (m, -CH_2-, 8H), 0.77 (t, -CH_3-, 3H)

3.4 การศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของ histamine blue และ NapIm3 กับฮิสทามีนและฮิสทิดีนในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน pH 7.4 (Phosphate buffer saline)

3.4.1 เตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน pH 7.4

ชั่งโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 1.150 กรัม และโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.5844 กรัม ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำ Milli Q เติมสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4) 0.26 กรัม ในน้ำ Milli Q 25 มิลลิลิตร ลงไปในสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตและโซเดียมคลอไรด์ คนสารละลายจากนั้นปรับ pH ด้วยสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตให้มี pH เป็น 7.4 ปรับปริมาตรสารละลายในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ Milli Q จะได้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน pH 7.4

3.4.2 เตรียม stock solution ของ histamine blue ความเข้มข้น 1.0×10^{-3} โมลาร์

ชั่งสาร **histamine blue** 0.240 มิลลิกรัม (7.94×10^{-4} มิลลิโมล) ในไวแอล (vial) ละลายด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)ปริมาตร 0.794 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย **histamine blue** ความเข้มข้น 1.0×10^{-3} โมลาร์

3.4.3 เตรียม stock solution ของ NapIm3 ความเข้มข้น 0.1000 โมลาร์

ชั่งสาร **NapIm3** 48.99 มิลลิกรัม (0.1095 มิลลิโมล) ในไวแอล (vial) ละลายด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ปริมาตร 1.095 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย **NapIm3** ความเข้มข้น 0.1000 โมลาร์

3.4.4 เตรียม stock solution ของฮิสทิดีน (histidine) ความเข้มข้น 0.1000 โมลาร์

ชั่งฮิสทิดีน 7.72 มิลลิกรัม (0.0498 มิลลิโมล) ในไวแอล (vial) ละลายด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (phosephate buffer saline) pH 7.4 ปริมาตร 0.498 มิลลิลิตร จะได้สารละลายฮิสทิดีนความเข้มข้น 0.1000 โมลาร์

3.4.5 เตรียม stock solution ของฮิสทามีน (histamine) ความเข้มข้น 0.1000 โมลาร์

ชั่งฮิสทามีน 6.25 มิลลิกรัม (0.0562 มิลลิโมล) ในไวแอล (vial) ละลายด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (phosephate buffer saline) pH 7.4 ปริมาตร 0.562 มิลลิลิตร จะได้สารละลายฮิสทิดีนความเข้มข้น 0.1000 โมลาร์

3.4.6 ศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของ histamine blue กับฮิสทามีนและฮิสทิดีน

ปิเปต stock solution ของ **histamine blue** 0.020 มิลลิลิตร ลงในคิวเวต ปรับปริมาตรเป็น 2.000 มิลลิลิตรโดยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (phosephate buffer saline) pH 7.4 โดยมีอัตราส่วนรวมเป็น 10% ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน คนสารละลายเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการคายแสงด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรโฟโตเมทรี (fluorescence spectrophotometry) โดยให้พลังงานกระตุ้นที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร แล้วทำซ้ำอีก 2 ตัวอย่าง โดยก่อนปรับปริมาตร เติม stock solution ของฮิสทามีน 0.002 มิลลิลิตร และ stock solution ของฮิสทิดีน 0.002 มิลลิลิตร ตามลำดับ

3.4.7 ศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของ NapIm3 กับฮิสทามีนและฮิสทิดีน

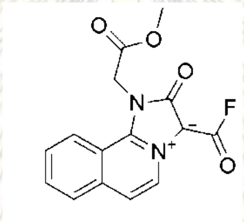
ปิเปต stock solution ของ **NapIm3** 0.002 มิลลิลิตร ลงในคิวเวต ปรับปริมาตรเป็น 2 มิลลิลิตรโดยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (phosephate buffer saline) pH 7.4 โดยมีอัตราส่วนรวมเป็น 10% ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน คนสารละลายเป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าการคายแสงด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรโฟโตเมทรี (fluorescence spectrophotometry) โดยให้พลังงานกระตุ้นที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร แล้วทำซ้ำอีก 2 ตัวอย่าง โดยก่อนปรับปริมาตร เติม stock solution ของฮิสทามีน 0.002 มิลลิลิตร และ stock solution ของฮิสทิดีน 0.002 มิลลิลิตร ตามลำดับ

บทที่ 4

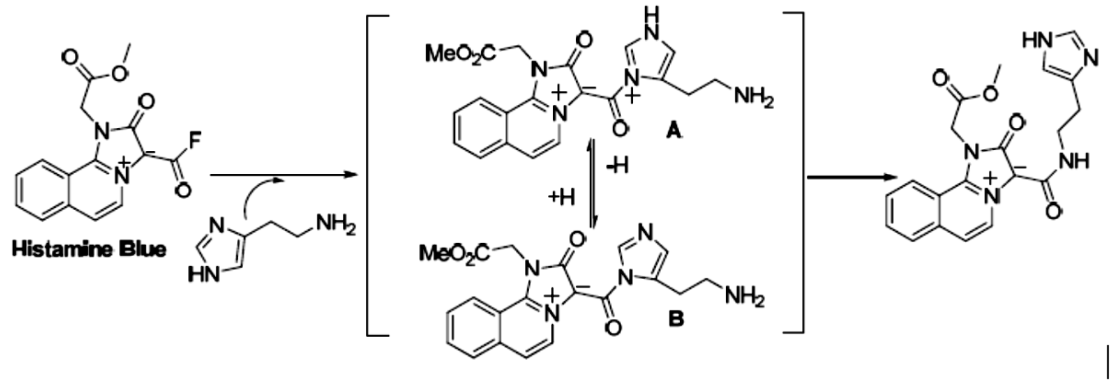
วิจารณ์ผลและสรุปผลการทดลอง

4.1 การสังเคราะห์โมเลกุลเซ็นเซอร์ histamine blue

Histamine blue เป็นเซ็นเซอร์ที่ถูกออกแบบสำหรับตรวจวัดปริมาณฮิสทามีน มีโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 4.1 ประกอบด้วยหมู่แอซิดฟลูออไรด์ (acid fluoride) ที่ทำหน้าที่จับกับฮิสทามีน ณ ตำแหน่งวงอิมิดาโซล (imidazole) ดังแสดงในรูปที่ 4.2

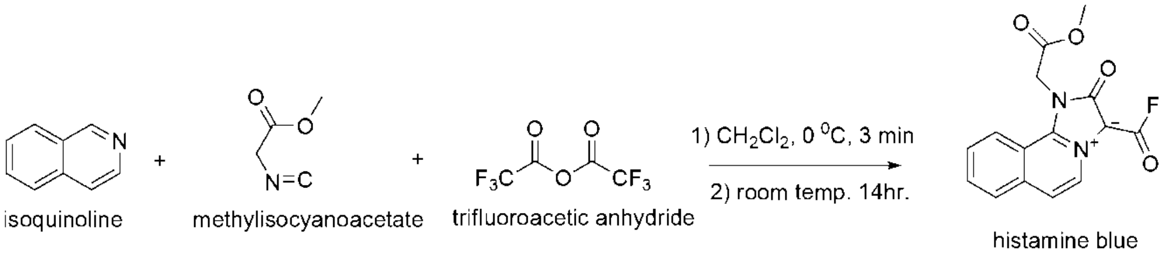


รูปที่ 4.1 โมเลกุล histamine blue

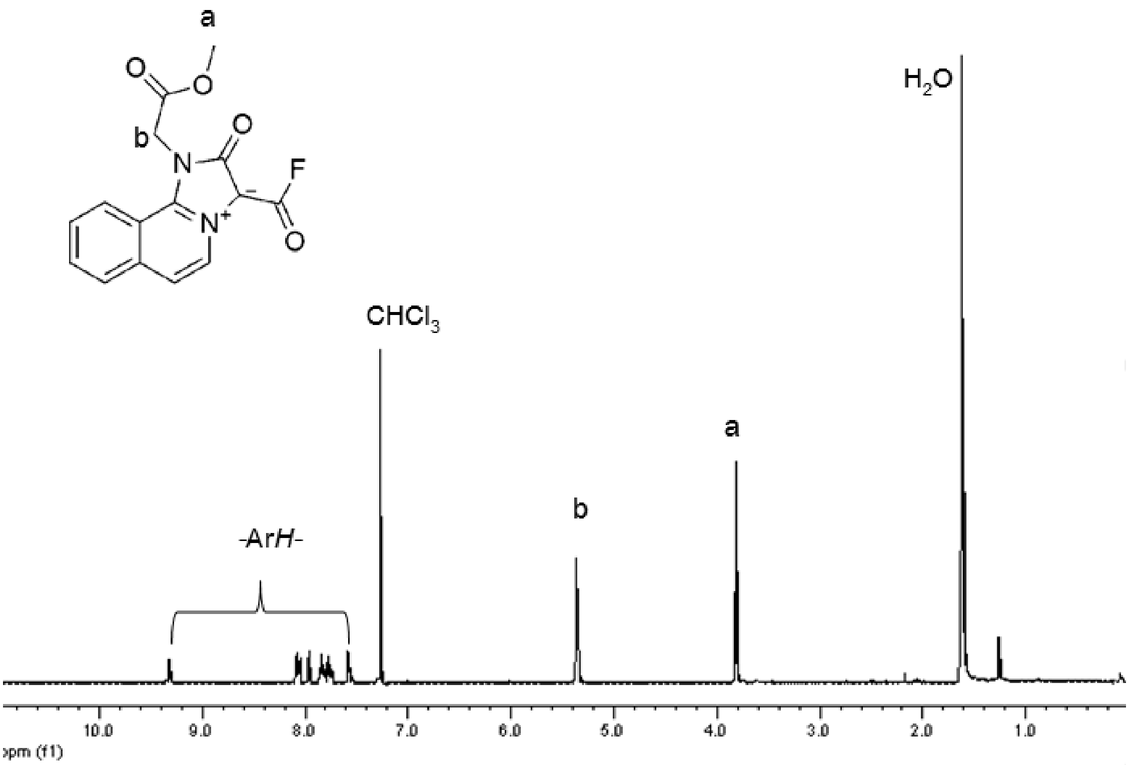


รูปที่ 4.2 กลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง histamine blue และฮิสทามีน

โดยขั้นตอนการสังเคราะห์ผ่านปฏิกิริยาเมโซไอออนิกจากไอโซควิโนลีน เมทิลไอโซไซยาโนอะซีเตต เป็นไปดังแสดงในรูปที่ 4.3 ผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของแข็งสีม่วงอมเทา คิดเป็นร้อยละผลิตภัณฑ์ 23 นำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคโปรตอนเอ็มเอ็นอาร์สเปกโตรสโกปี (^{1}H-NMR spectroscopy) ผลสเปกตรัมแสดงในรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.3 การสังเคราะห์โมเลกุล histamine blue



รูปที่ 4.4 ^{1}H-NMR spectrum ของสาร **histamine blue** ใน $CDCl_3$

จาก ^{1}H-NMR สเปกตรัม (รูปที่ 4.4) พบสัญญาณของหมู่อะโรมาติกที่ตำแหน่ง 7.55-9.30 ppm จำนวน 6 โปรตอน สำหรับสัญญาณของอะลิฟาติกโปรตอน H_a และ H_b พบที่ตำแหน่ง 3.80 ppm และ 5.35 ppm จำนวน 2 และ 3 โปรตอนตามลำดับ สามารถสรุปได้ว่าสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นจริงเพราะสัญญาณ ^{1}H-NMR สอดคล้องกับโครงสร้างของสาร **histamine blue**

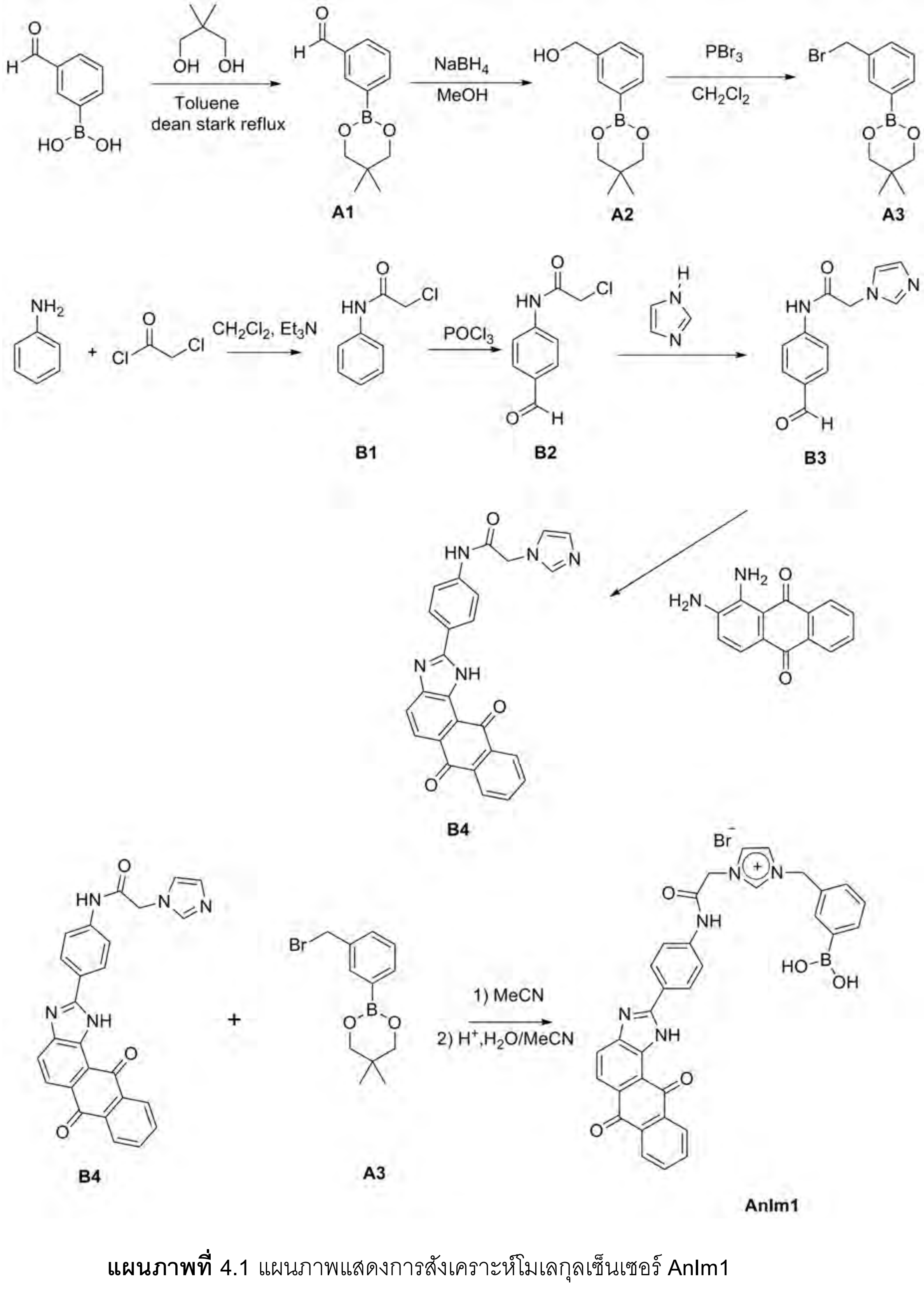
4.2 การสังเคราะห์โมเลกุลเซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดสารประกอบเอมีนทางชีวภาพ

โมเลกุลเซ็นเซอร์ที่ออกแบบและสังเคราะห์ ได้แก่ AnIm1, NapIm1, NapIm2 และ NapIm3 โดยทั้งนี้มีส่วนประกอบเป็นเกลืออิมิดาโซเลียมซึ่งเป็นประจุบวกและมีอะตอมไฮโดรเจนที่มีความเป็นกรดสูง จึงสามารถเข้าจับกับหมู่คาร์บอกซิลของฮิสทิดีนได้ดี และมีหมู่แนพทาลิไมด์เป็นฟลูออโรฟอร์ในการให้สัญญาณฟลูออเรสเซนต์ โดยหลักการออกแบบนี้คาดว่าจะเกิดอันตรกิริยากับฮิสทิดีนที่หมู่คาร์บอกซิเลต ทำให้สามารถแยกจำแนกการตรวจวัดฮิสทิดีนได้อย่างจำเพาะเจาะจง

4.2.1 การสังเคราะห์โมเลกุล AnIm1

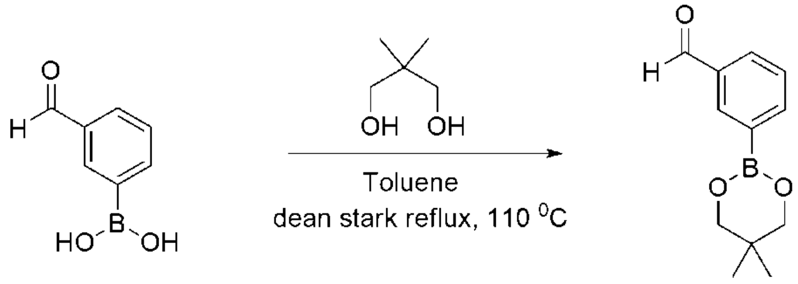
โมเลกุล AnIm1 มีส่วนประกอบพื้นฐานเป็นอิมิดาโซเลียม เอไมด์ และกรดโบโรนิกซึ่งทำหน้าที่จับกับฮิสทิดีน และหมู่แอนทราควิโนนที่ทำหน้าที่หน่วยตรวจวัด ขั้นตอนการสังเคราะห์ AnIm1 เป็นไปตามแผนภาพที่ 4.1

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



แผนภาพที่ 4.1 แผนภาพแสดงการสังเคราะห์โมเลกุลเซ็นเซอร์ AnIm1

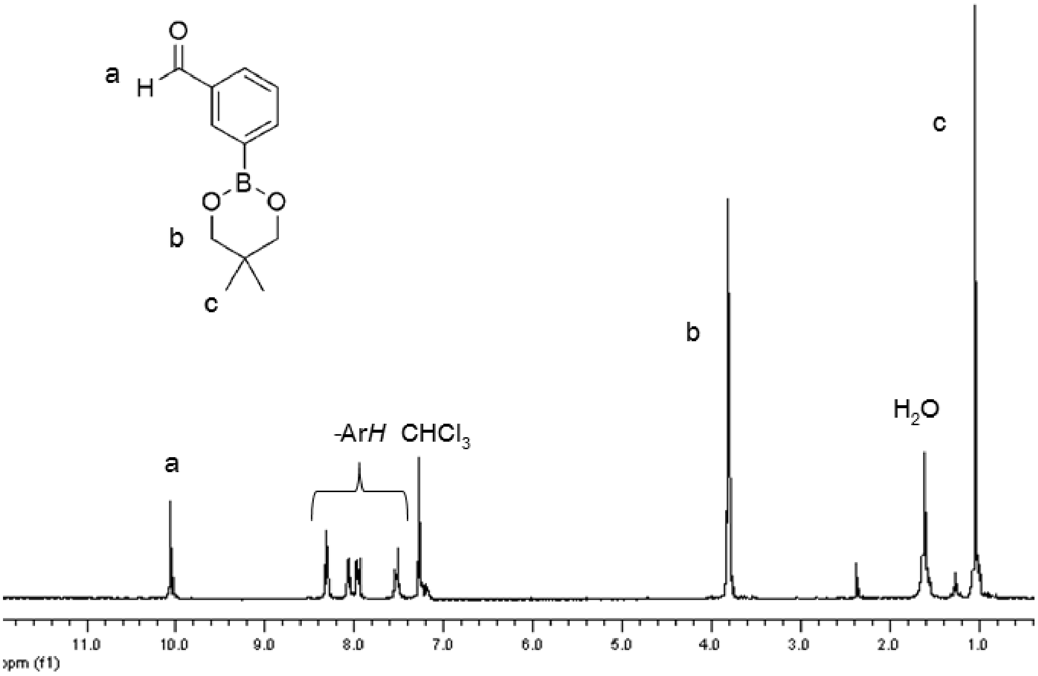
4.2.1.1 **การสังเคราะห์** 3-(5,5-dimethyl-1,3,2-dioxaborinan-2-yl)benzaldehyde (A1)



A1

สาร **A1** สังเคราะห์จากปฏิกิริยาการควบแน่น (condensation) ระหว่าง 3-ฟอร์มิลฟีนิลโบโรนิก แอซิด (3-formylphenylboronic acid) และ 2,2-ไดเมทิล-1,3-โพรพาไดออล (2,2-dimethyl-1,3-propadiol) ในตัวทำละลายโทลูอีน โดยในระบบจะมีโมเลคิวลาร์ซีฟ (molecular sieve) และใช้การรีฟลักซ์แบบดีน สตาร์ก (dean stark reflux) เพื่อกำจัดน้ำที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลือง คิดเป็นร้อยละผลิตภัณฑ์ 79 พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกโตรสโกปี (^{1}H-NMR spectroscopy) ผลสเปกตรัมแสดงในรูปที่ 4.5

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

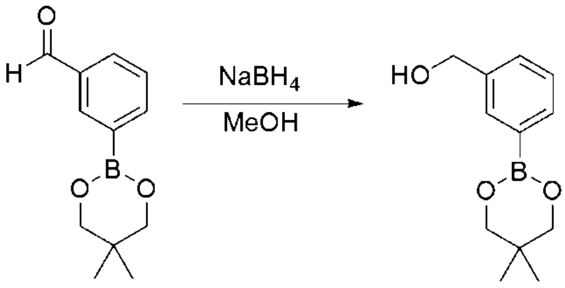


รูปที่ 4.5 ^{1}H-NMR spectrum ของสาร **A1** ใน $CDCl_3$

จาก ^{1}H-NMR สเปกตรัม (รูปที่ 4.5) พบสัญญาณโปรตอนของหมู่อะโรมาติก –Ar*H* ที่ตำแหน่ง 7.59, 7.95, 8.05 และ 8.30 ppm จำนวน 4 โปรตอน และสัญญาณโปรตอนของ –C*H*O- (H_c) ของหมู่อัลดีไฮด์ที่ตำแหน่ง 10.04 ppm นอกจากนี้ยังพบสัญญาณโปรตอนของอะลิฟาติกโปรตอน $–OCH_2$- (H_b) และ $–CH_3$ (H_c) ที่ตำแหน่ง 3.79 ppm และ 1.00 ppm ตามลำดับ สามารถสรุปได้ว่าสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นจริงเพราะสัญญาณ ^{1}H-NMR สอดคล้องกับโครงสร้างของสาร **A1**

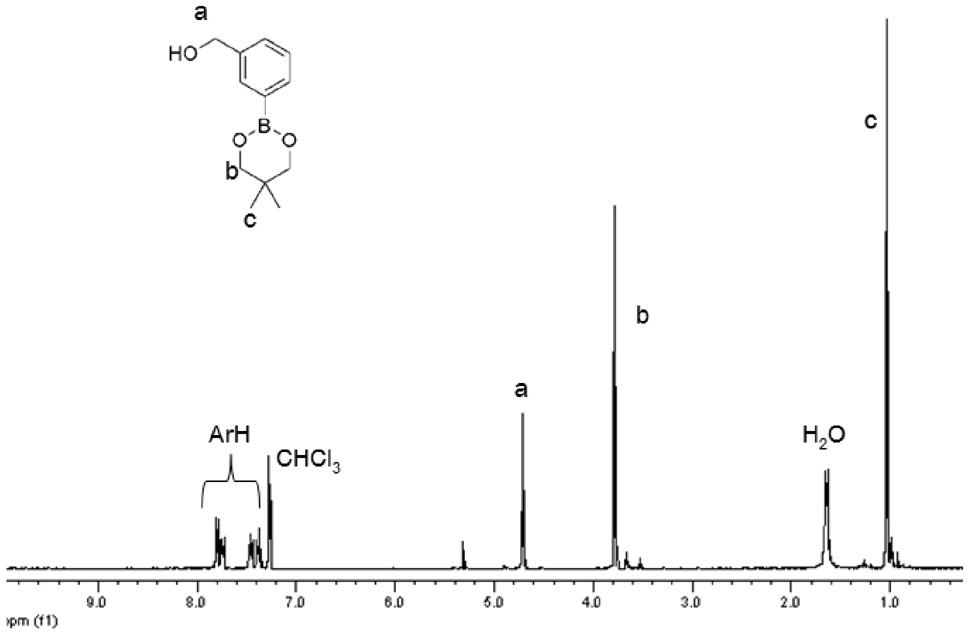
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2.1.2 **การสังเคราะห์** (3-(5,5-dimethyl-1,3,2-dioxaborinan-2-yl)phenyl) methanol (A2)



A1 **A2**

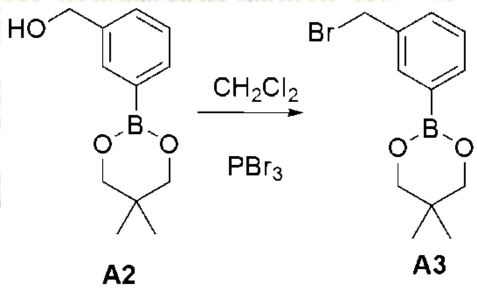
สาร A2 สังเคราะห์จากปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) ของสาร A1 ด้วยโซเดียมโบโรไฮไดรด์ (sodium borohydirde) ในตัวทำละลายเมทานอล ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นของแข็งสีชมพู คิดเป็นร้อยละผลิตภัณฑ์ 67 พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกโตรสโกปี (^{1}H-NMR spectroscopy) ผลสเปกตรัมแสดงในรูปที่ 4.6



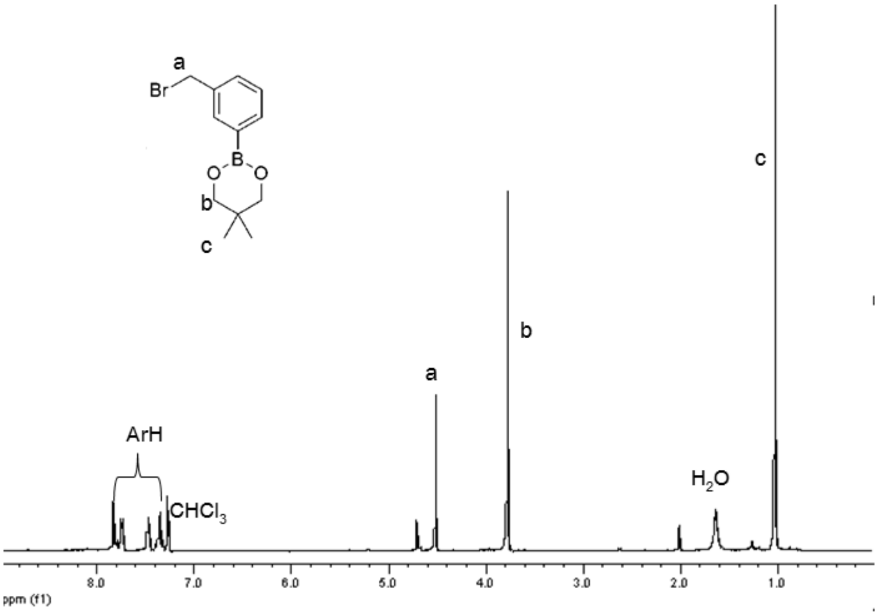
รูปที่ 4.6 ^{1}H-NMR spectrum ของสาร **A2** ใน $CDCl_3$

จาก [1]H-NMR สเปกตรัม (รูปที่ 4.6) พบสัญญาณโปรตอนของหมู่อะโรมาติก –Ar*H* ที่ตำแหน่ง 7.35-7.79 ppm จำนวน 4 โปรตอน และพบสัญญาณโปรตอนของอะลิฟาติกโปรตอน –OCH_2- (H_a) –OCH_2- (H_b) และ –CH_3 (H_c) ที่ตำแหน่ง 4.70 ppm, 3.77 ppm และ 1.02 ppm ตามลำดับ นอกจากนี้ไม่พบสัญญาณ –C*H*O- ของหมู่อัลดีไฮด์ที่ตำแหน่ง 10.04 ppm ในสเปกตรัม จึงสามารถสรุปได้ว่าสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นจริงเพราะสัญญาณ [1]H-NMR สอดคล้องกับโครงสร้างของสาร A2

4.2.1.3 **การสังเคราะห์** 2-(3-(bromomethyl)phenyl)-5,5-dimethyl-1,3,2-dioxaborinane (A3)



สาร A3 สังเคราะห์จากปฏิกิริยาแทนที่ด้วยนิวคลิโอไฟล์ (nucleophilic substitution) ระหว่างสาร A2 และฟอสฟอรัสไตรโบรไมด์ (phosphorus tribromide) ในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นของแข็งสีชมพูเข้ม คิดเป็นร้อยละผลิตภัณฑ์ 69 พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกโตรสโกปี ([1]H-NMR spectroscopy) ผลสเปกตรัมแสดงในรูปที่ 4.7

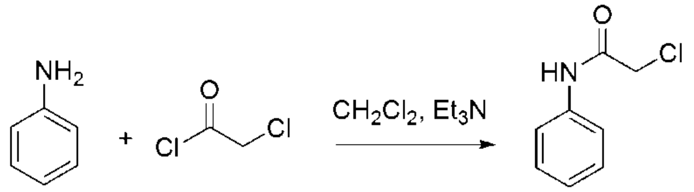


รูปที่ 4.7 ^{1}H-NMR spectrum ของสาร **A3** ใน $CDCl_3$

จาก ^{1}H-NMR สเปกตรัม (รูปที่ 4.7) พบสัญญาณโปรตอนของหมู่อะโรมาติก –Ar*H* ที่ตำแหน่ง 7.34-7.82 ppm จำนวน 4 โปรตอน และพบสัญญาณของอะลิฟาติกโปรตอน –OCH_2- (H_a) –OCH_2- (H_b) และ –CH_3 (H_c) ที่ตำแหน่ง 4.51 ppm, 3.77 ppm และ 1.02 ppm ตามลำดับ โดย H_a นั้น มีการเคลื่อนของค่า chemical shift ไปทาง upfield จาก 4.70 ppm ไปยัง 4.51 ppm แสดงว่ามีหมู่แทนที่ที่เปลี่ยนไป นั่นคือหมู่ไฮดรอกซิลถูกแทนที่ด้วยหมู่โบรโม จึงสามารถสรุปได้ว่าสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นจริงเพราะสัญญาณ ^{1}H-NMR สอดคล้องกับโครงสร้างของสาร **A3**

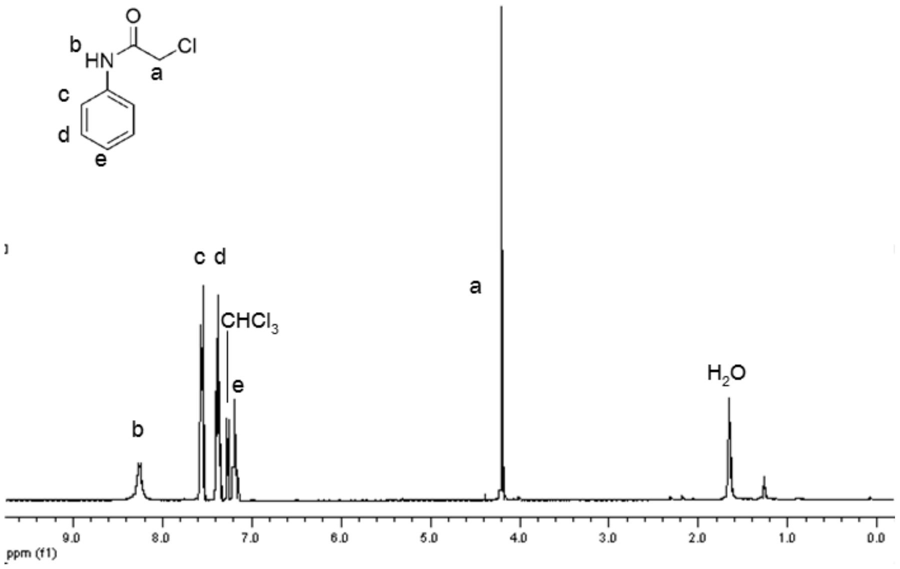
ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2.1.4 **การสังเคราะห์** 2-chloro-*N*-phenylacetamide (B1)



B1

สาร **B1** สังเคราะห์จากปฏิกิริยาแทนที่ด้วยนิวคลิโอไฟล์ (nucleophilic substitution) ระหว่างสารแอนนิลีน (aniline) และ 2-คลอโรอะซีติลคลอไรด์ (2-chloroacethyl chloride) ในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาล คิดเป็นร้อยละผลิตภัณฑ์ 51 พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกโตรสโกปี (^{1}H-NMR spectroscopy) ผลสเปกตรัมแสดงในรูปที่ 4.8

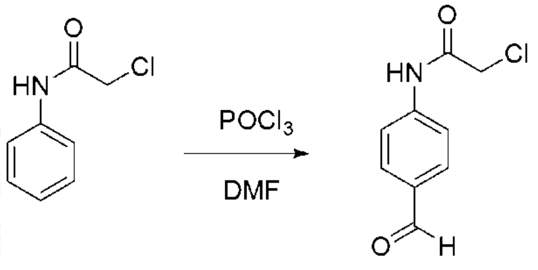


รูปที่ 4.8 ^{1}H-NMR spectrum ของสาร **B1** ใน $CDCl_3$

จาก ^{1}H-NMR สเปกตรัม (รูปที่ 4.8) พบสัญญาณโปรตอนของหมู่อะโรมาติก –Ar*H* ที่ตำแหน่ง 7.19, 7.36 และ 7.56 ppm ซึ่งเป็นสัญญาณของ H_e, H_d และ H_c ตามลำดับ และ

สัญญาณของหมู่เมทิล –COCH_2- (H_a) ที่ตำแหน่ง 4.19 ppm และสุดท้าย พบสัญญาณของหมู่เอไมด์ –CON*H*- (H_b) ที่ตำแหน่ง 8.24 ppm จึงสามารถสรุปได้ว่าสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นจริงเพราะสัญญาณ ^{1}H-NMR สอดคล้องกับโครงสร้างของสาร **B1**

4.2.1.5 **การสังเคราะห์** 2-chloro-N-(4-formylphenyl)acetamide (B2)



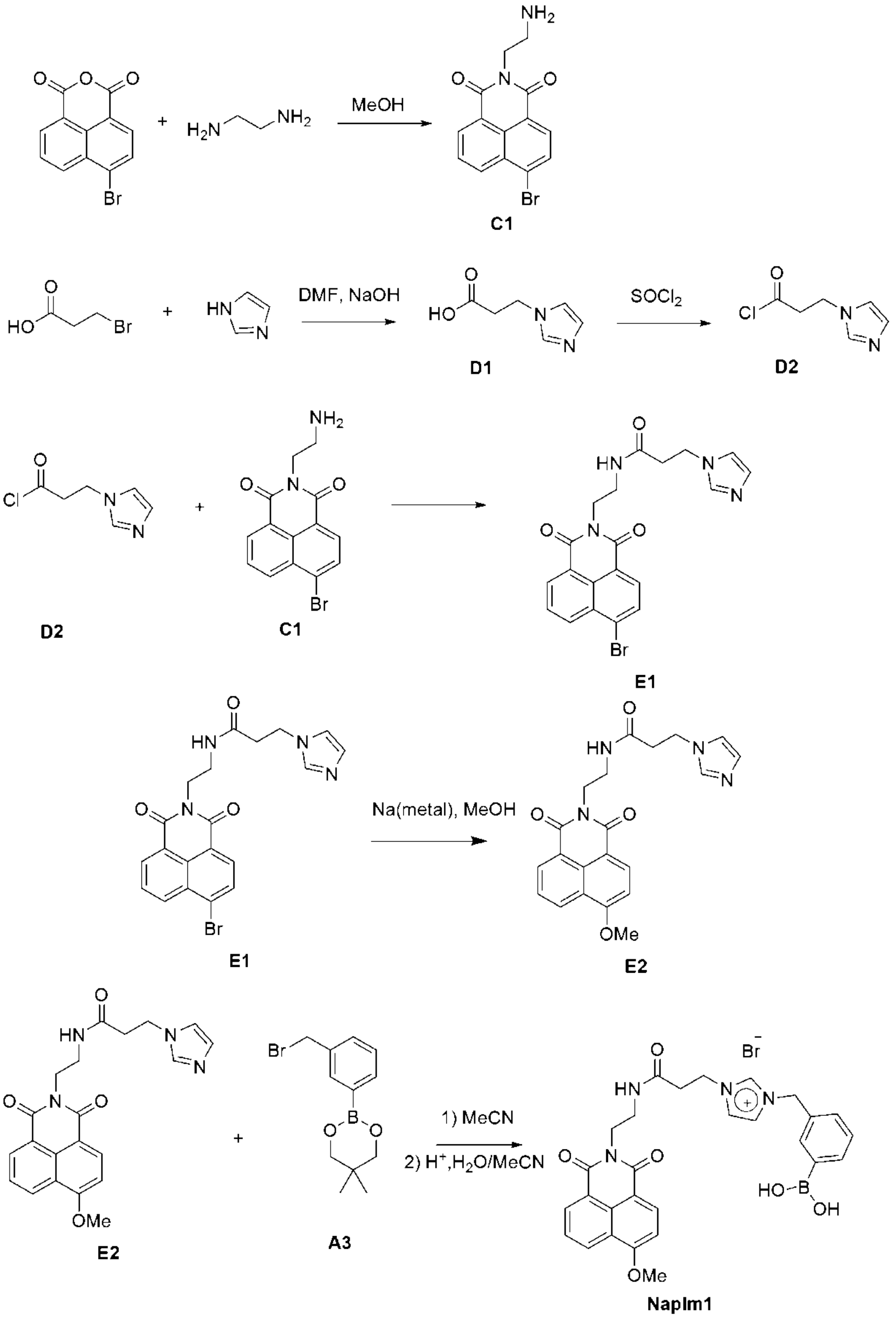
B1 **B2**

สาร **B2** สังเคราะห์จากปฏิกิริยา Vilsmeier-Haack ระหว่าง **B1** และฟอสฟอริลคลอไรด์ (phosphorylchloride) ในตัวทำละลายไดเมทิลฟอร์มาไมด์ ในการกำจัด DMF นั้นต้องใช้อุณหภูมิสูงซึ่งทำให้เกิดการสลายตัวของ **B2** ได้ ขั้นตอนนี้จึงไม่สามารถแยกผลิตภัณฑ์ออกมาได้

เนื่องจากสารประกอบแอนทราควิโนนละลายได้ยากมากทั้งในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วและไม่มีขั้ว และให้สัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสงต่ำมาก จึงได้มีการออกแบบโมเลกุลใหม่ที่ใช้แนพทาลิไมด์เป็นฟลูออโรฟอร์

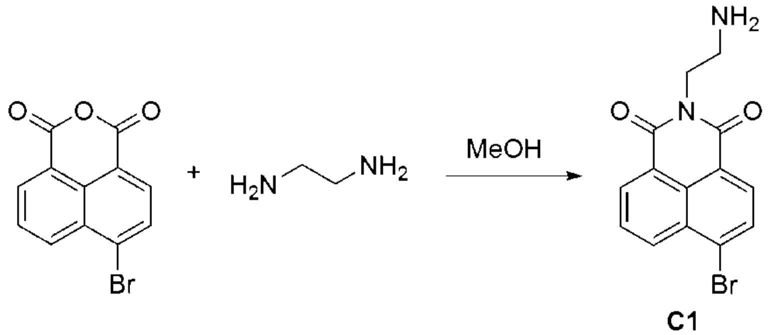
4.2.2 **การสังเคราะห์โมเลกุล** NapIm1

โมเลกุล **NapIm1** มีส่วนประกอบพื้นฐานเป็นอิมิดาโซเลียม เอไมด์และกรดโบโรนิกซึ่งทำหน้าที่จับกับฮิสทิดีน และหมู่แนพทาลิไมด์ที่ทำหน้าที่เป็นหน่วยตรวจวัด ขั้นตอนการสังเคราะห์ **NapIm1** เป็นไปตามแผนภาพที่ 4.2



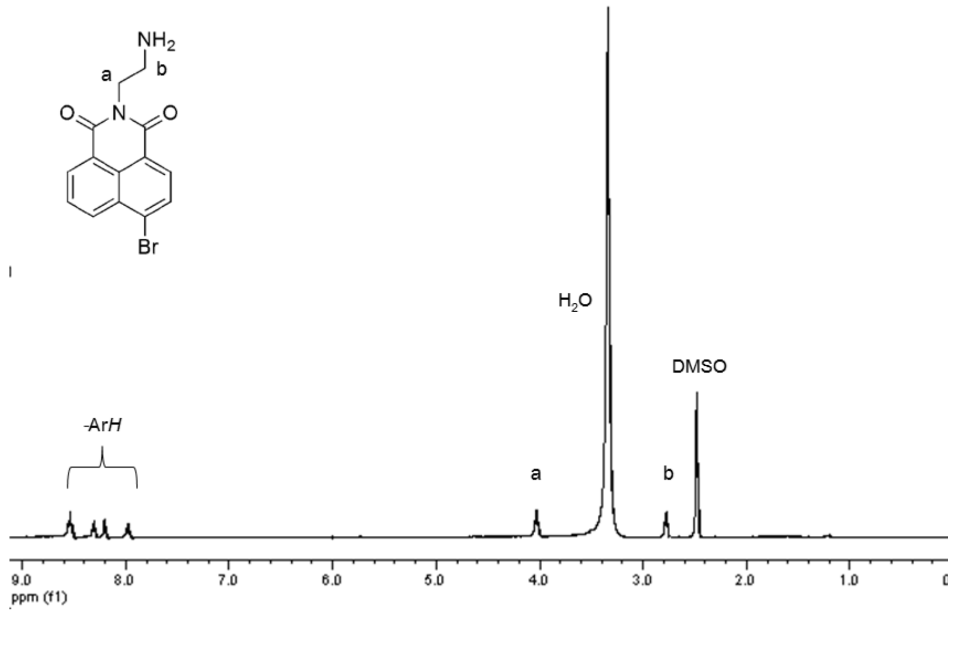
แผนภาพที่ 4.2 แสดงการสังเคราะห์โมเลกุลเซ็นเซอร์ NapIm1

4.2.2.1 **การสังเคราะห์** 2-(2-aminoethyl)-6-bromo-1*H*-benzo[de]isoquinoline-1,3(2*H*)-dione (C1)



C1

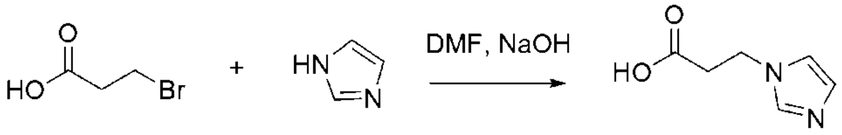
สาร **C1** สังเคราะห์จากปฏิกิริยาแทนที่ด้วยนิวคลิโอไฟล์ (nucleophilic substitution) ระหว่าง4-โบรโม-1,8-แนพทาลิก แอนไฮไดรด์ (4-bromo-1,8-naphthalic anhydride) และเอทิลีนไดเอมีน (ethylenediamine) ในตัวทำละลายเมทานอล ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง คิดเป็นร้อยละผลิตภัณฑ์ 85 พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกโตรสโกปี (^{1}H-NMR spectroscopy) ผลสเปกตรัมแสดงในรูปที่ 4.9



รูปที่ 4.9 ^{1}H-NMR spectrum ของสาร **C1** ใน DMSO

จาก ^{1}H-NMR สเปกตรัม (รูปที่ 4.9) พบสัญญาณโปรตอนของหมู่อะโรมาติก –ArH ที่ตำแหน่ง 7.98-8.54 ppm และสัญญาณโปรตอนของหมู่อะลิฟาติก –CONCH_2- (H_a) และ -H_2NCH_2- (H_b) ที่ตำแหน่ง 4.03 ppm และ 2.77 ppm ตามลำดับ จึงสามารถสรุปได้ว่าสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นจริงเพราะสัญญาณ ^{1}H-NMR สอดคล้องกับโครงสร้างของสาร **C1**

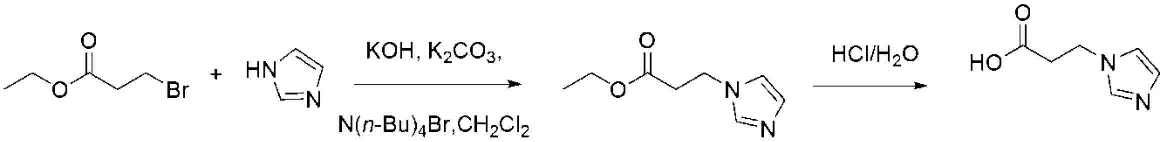
4.2.2.2 **การสังเคราะห์** 3-(1*H*-imidazol-1-yl)propanoic acid (D1)



D1

สาร **D1** สังเคราะห์จากปฏิกิริยาแทนที่ด้วยนิวคลิโอไฟล์ (nucleophilic substitution) ระหว่างอิมิดาโซล (imidazole) และ 3-โบรโมโพรพาโนอิก แอซิด (3-bromopropanoic acid) ในตัวทำละลายไดเมทิลฟอร์มาไมด์ พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่สามารถถูกแยกออกจากตัวทำละลายได้ เนื่องจากสภาพความเป็นประจุของโมเลกุลที่ทำให้ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ ดังนั้น ขั้นตอนนี้ไม่สามารถสังเคราะห์ **D1** ได้

ดังนั้น จึงได้วางแผนการสังเคราะห์ **D1** ขึ้นมาใหม่ซึ่งเป็นไปดังแผนภาพที่ 4.3



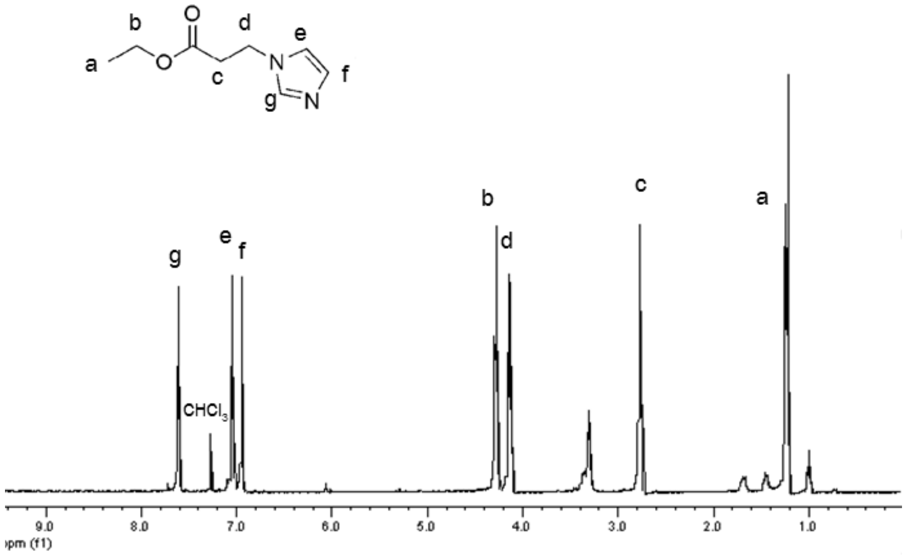
F1 **D1**

แผนภาพที่ 4.3 แสดงการสังเคราะห์โมเลกุล D1

4.2.2.3 **การสังเคราะห์** 3-(1*H*-imidazol-1-yl)propanoate (F1)

สาร **F1** สังเคราะห์จากปฏิกิริยาแทนที่ด้วยนิวคลิโอไฟล์ (nucleophilic substitution) ระหว่างอิมิดาโซล (imidazole) และเอทิล 3-โบรโมโพรพาโนเอต (ethyl 3-bromopropanoate)

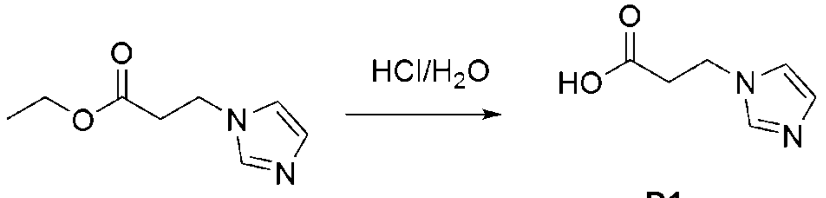
ในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลือง คิดเป็นร้อยละผลิตภัณฑ์ 77 พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกโตรสโกปี (^{1}H-NMR spectroscopy) ได้สเปกตรัมแสดงในรูปที่ 4.10



รูปที่ 4.10 ^{1}H-NMR spectrum ของสาร **F1** ใน $CDCl_3$

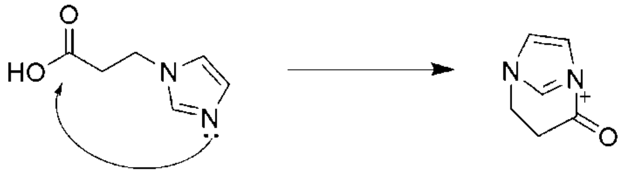
จาก ^{1}H-NMR สเปกตรัม (รูปที่ 4.10) พบสัญญาณโปรตอนของหมู่อะโรมาติก –Ar*H* ที่ตำแหน่ง 6.94, 7.03 และ 7.60 ppm คือ H_f ,H_e และH_g ตามลำดับ ซึ่งมีจำนวน 3 โปรตอน แสดงให้เห็นว่าโปรตอนของอิมิดาโซลถูกแทนที่ไปหนึ่งตำแหน่ง และสัญญาณของหมู่อะลิฟาติก –CH_3 (H_a), -OCH_2- (H_b), -COCH_2- (H_c) และ –NCH_2- (H_d) ที่ตำแหน่ง 1.22, 4.26, 2.76 และ 4.12 ppm ตามลำดับ จึงสามารถสรุปได้ว่าสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นจริงเพราะสัญญาณ ^{1}H-NMR สอดคล้องกับโครงสร้างของสาร **F1**

4.2.2.4 **การสังเคราะห์** 3-(1*H*-imidazol-1-yl)propanoic acid (D1)



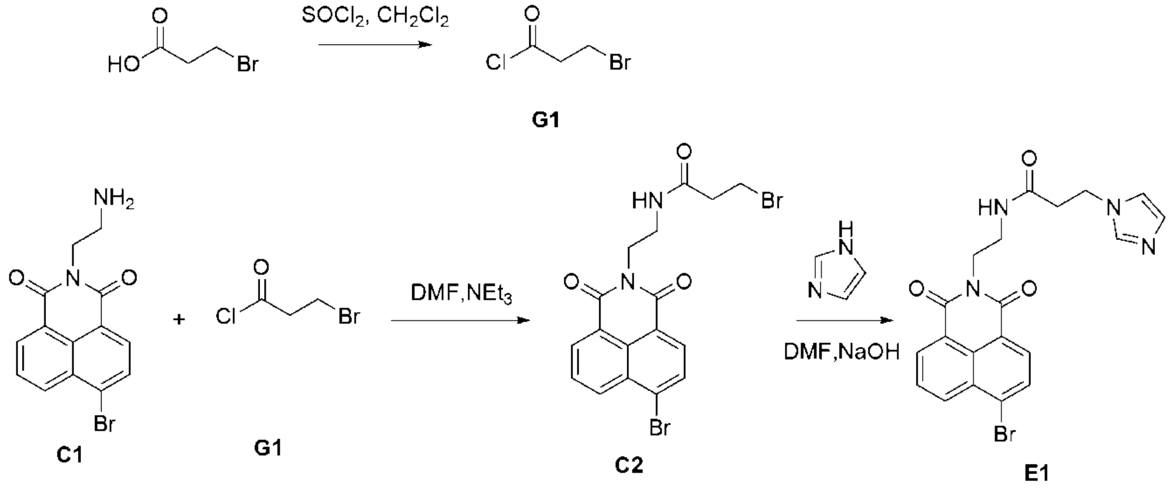
F1 **D1**

สาร D1 สังเคราะห์จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ของสาร F1 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกในน้ำ พบว่าไม่สามารถสังเคราะห์ D1 ได้ เพราะไม่พบสัญญาณคาร์บอกซิลิกโปรตอน เนื่องจากสาร D1 สามารถเกิดปฏิกิริยาการปิดวงภายในโมเลกุลระหว่างหมู่คาร์บอกซิลและวงอิมิดาโซล[18] ดังแสดงในรูปที่ 4.11



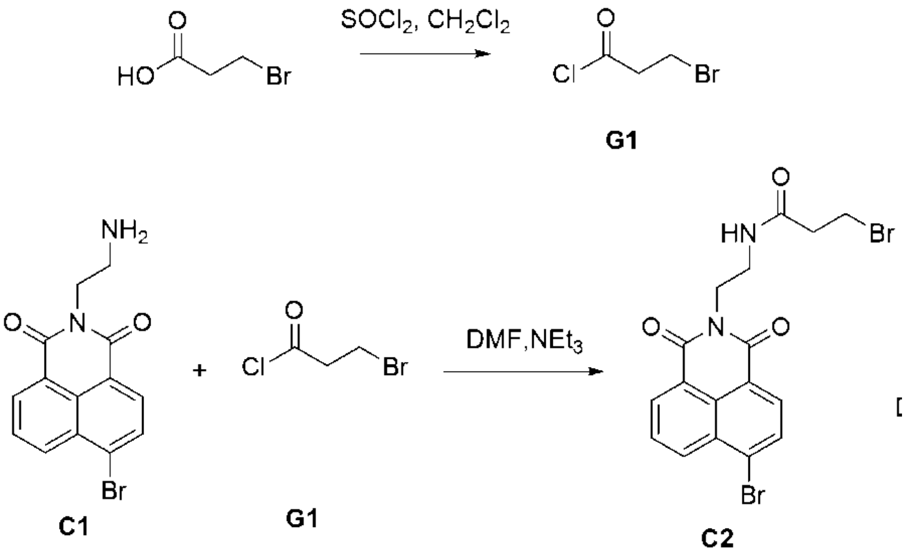
รูปที่ 4.11 กลไกการปิดวงของโมเลกุล D1

ด้วยเหตุนี้ จึงปรับแผนการสังเคราะห์อีกครั้ง โดยเปลี่ยนวิธีการสังเคราะห์ E1 เป็นดังแผนภาพที่ 4.4

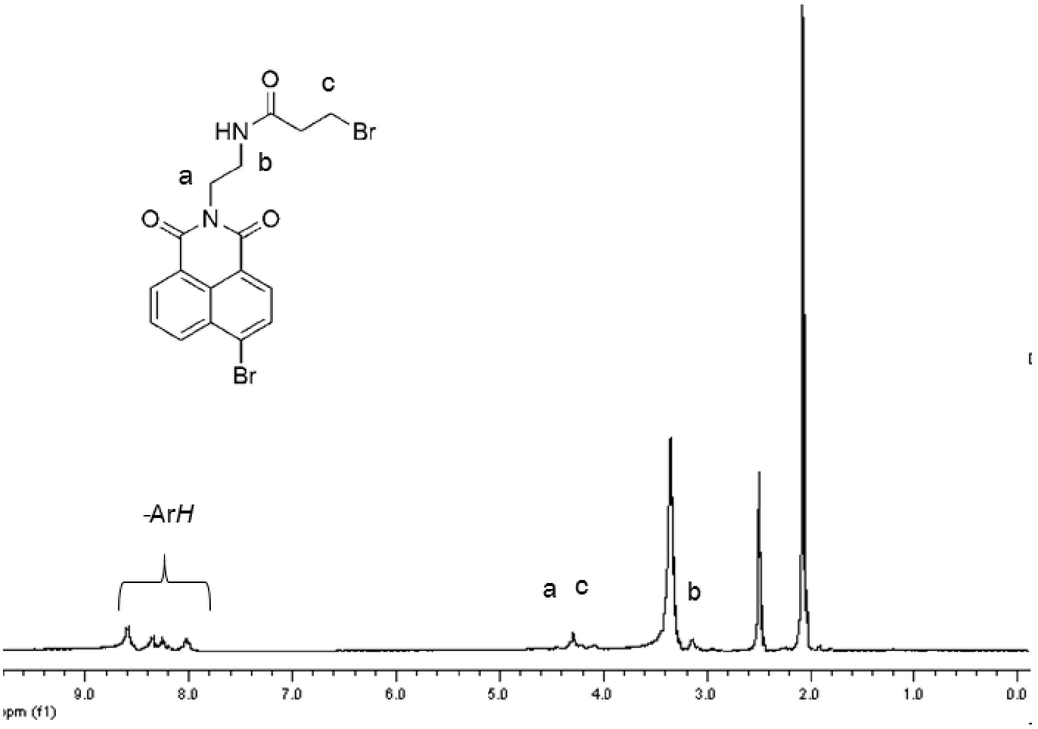


แผนภาพที่ 4.4 แสดงการสังเคราะห์โมเลกุล E1

4.2.2.5 **การสังเคราะห์** 3-bromo-*N*-(2-(6-bromo-1,3-dioxo-1H-benzo[de] iso-quinolin-2(3H)-yl)ethyl)propanamide (C2)



การสังเคราะห์สาร **C2** เริ่มต้นจากการสังเคราะห์สาร **G1** จากปฏิกิริยาแทนที่ด้วยนิวคลีโอไฟล์ (nucleophilic substitution) ของ3-โบรโมโพรพาโนอิก แอซิด (3-bromopropanoic acid) ด้วยไทโอนิลคลอไรด์ (thionylchloride) จากนั้นทำปฏิกิริยาแทนที่ด้วยนิวคลีโอไฟล์ (nucleophilic substitution) ต่อทันทีกับสาร **C1** ในตัวทำละลายไดเมทิลฟอร์มาไมด์ พบว่าไม่สามารถสังเคราะห์ **C2** ได้ เนื่องจากไม่พบอะตอมไฮโดรเจนของหมู่เอไมด์ของสาร **C2** ในสเปกตรัมโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ ซึ่งอาจจะมีน้ำในปฏิกิริยาจากตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนเข้าไปรบกวนการเปลี่ยนจากหมู่ไฮดรอกซีเป็นหมู่คลอโร จึงไม่เกิดการคัปปลิงกับเอมีน

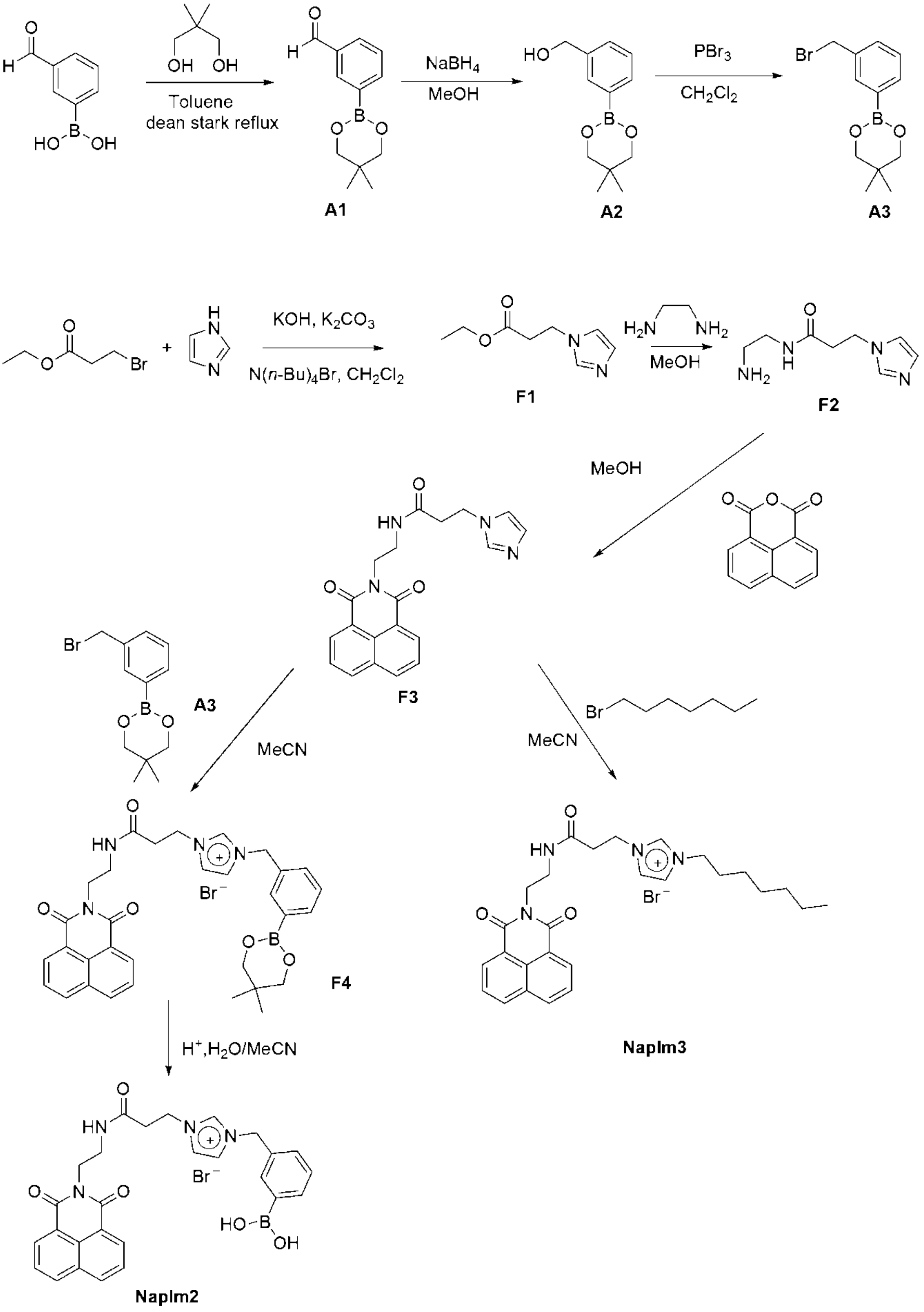


รูปที่ 4.12 [1]H-NMR spectrum ของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาระหว่าง **C1** และ **G1** ใน DMSO

4.2.3 **การสังเคราะห์โมเลกุล NapIm2 และ NapIm3**

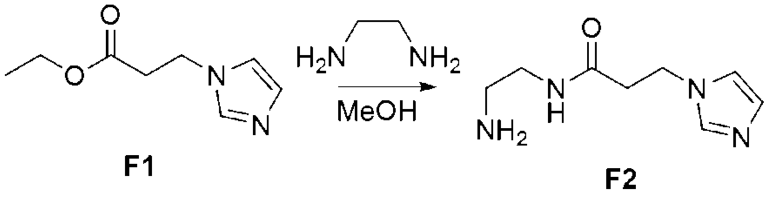
โมเลกุล **NapIm2** มีส่วนประกอบพื้นฐานเป็นเกลืออิมิดาโซเลียมที่ทำหน้าที่จับกับฮิสทิดีน และหมู่แนพทาลิไมด์ที่ทำหน้าที่เป็นฟลูออโรฟอร์ โดยโมเลกุล **NapIm3** ได้เพิ่มส่วนของกรดโบโรนิกเพื่อเพิ่มความแข็งแรงของอันตรกิริยาการจับฮิสทิดีน ขั้นตอนการสังเคราะห์ **NapIm2** และ **NapIm3** เป็นไปตามแผนภาพที่ 4.5

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

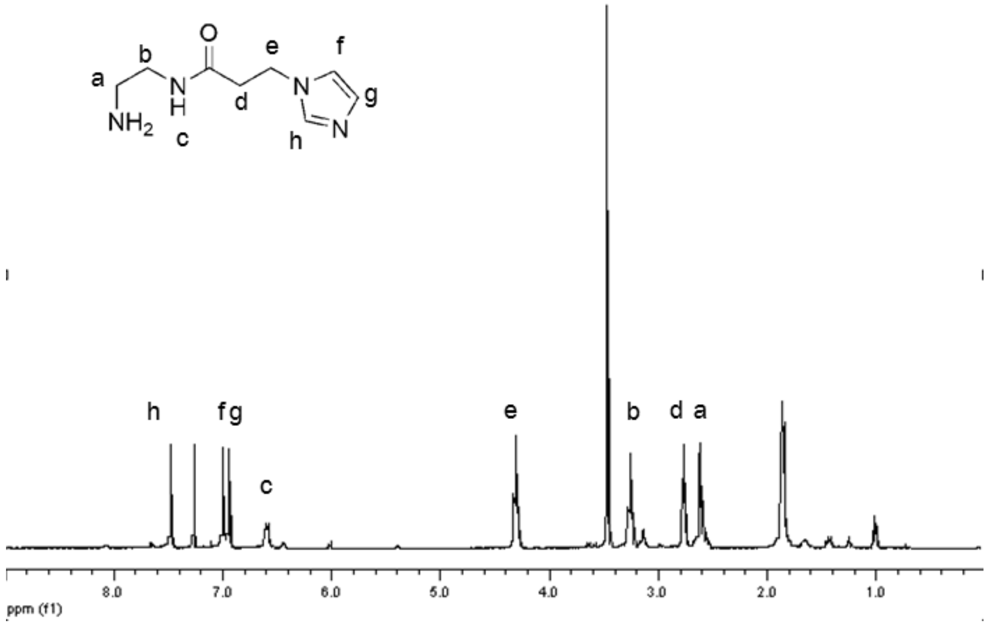


แผนภาพที่ 4.5 แสดงการสังเคราะห์โมเลกุลเซ็นเซอร์ NapIm2 และ NapIm3

4.2.3.1 **การสังเคราะห์** *N*-(2-aminoethyl)-3-(1*H*-imidazol-1-yl)propanamide (F2)



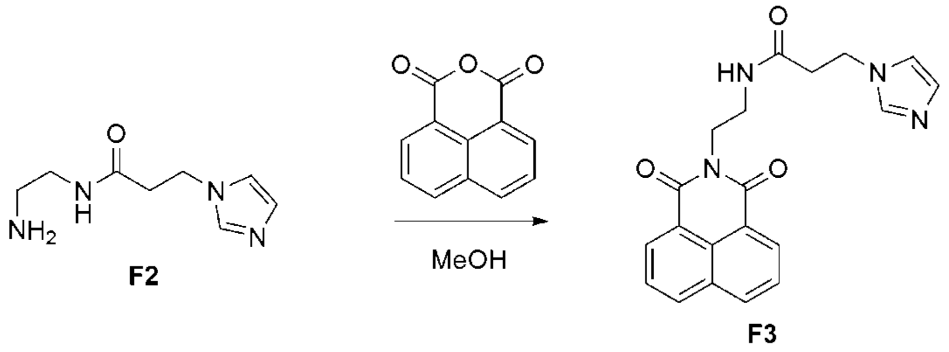
สาร **F2** สังเคราะห์จากปฏิกิริยาแทนที่ด้วยนิวคลิโอไฟล์ (nucleophilic substitution) ระหว่างสาร **F1** และเอทิลีนไดเอมีน (ethylenediamine) ในตัวทำละลายเมทานอล ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลือง คิดเป็นร้อยละผลิตภัณฑ์ 98 พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกโตรสโกปี (^{1}H-NMR spectroscopy) ผลสเปกตรัมแสดงในรูปที่ 4.13



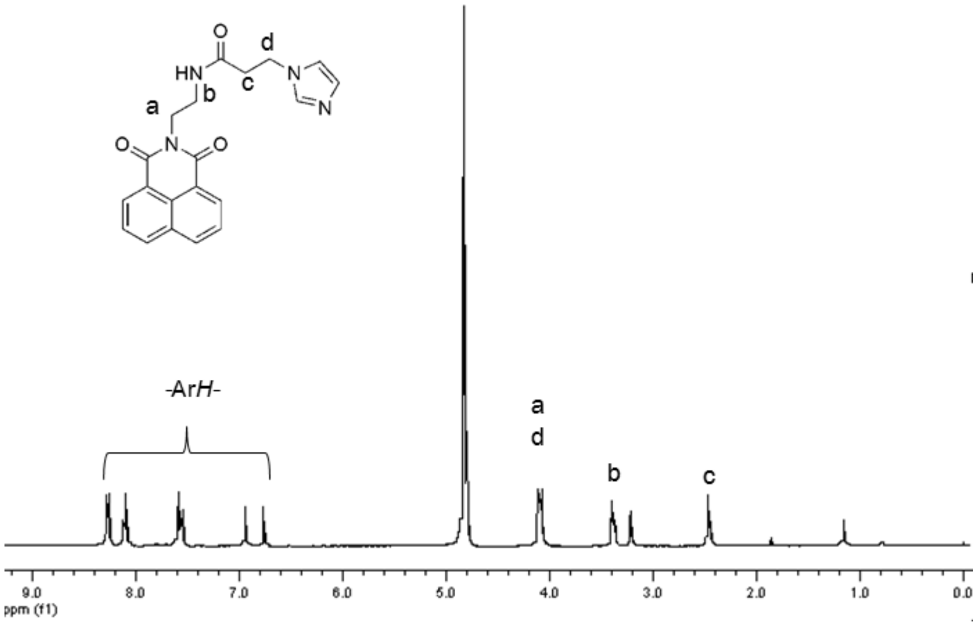
รูปที่ 4.13 ^{1}H-NMR spectrum ของสาร **F2** ใน $CDCl_3$

จาก ^{1}H-NMR สเปกตรัม (รูปที่ 4.13) พบสัญญาณของหมู่อะโรมาติก –Ar*H* ที่ตำแหน่ง 6.93, 6.99 และ 7.47 ppm คือ H_g ,H_f และH_h ตามลำดับ และสัญญาณของหมู่อะลิฟาติก –NCH_2- (H_a), -NCH_2- (H_b),–COCH_2- (H_d) และ –NCH_2- (H_e) ที่ตำแหน่ง 2.61, 3.25, 2.75 และ 4.30 ppm ตามลำดับ นอกจากนั้นยังพบสัญญาณของหมู่เอไมด์ -CON*H*- (H_c) ที่ตำแหน่ง 6.59 ppm จึงสามารถสรุปได้ว่าสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นจริงเพราะสัญญาณ ^{1}H-NMR สอดคล้องกับโครงสร้างของสาร **F2**

4.2.3.2 **การสังเคราะห์** *N*-(2-(1,3-dioxo-1*H*-benzo[de]isoquinolin-2(3*H*)-yl)ethyl) -3-(1*H*-imidazol-1-yl)propanamide (F3)



สาร **F3** สังเคราะห์จากปฏิกิริยาแทนที่ด้วยนิวคลิโอไฟล์ (nucleophilic substitution) ระหว่างสาร **F2** และ1,8-แนพทาลิก แอนไฮไดรด์ (1,8-napthalic anhydride) ในตัวทำละลายเมทานอล ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลือง คิดเป็นร้อยละผลิตภัณฑ์ 98 พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกโตรสโกปี (^{1}H-NMR spectroscopy) ได้สเปกตรัมแสดงในรูปที่ 4.14

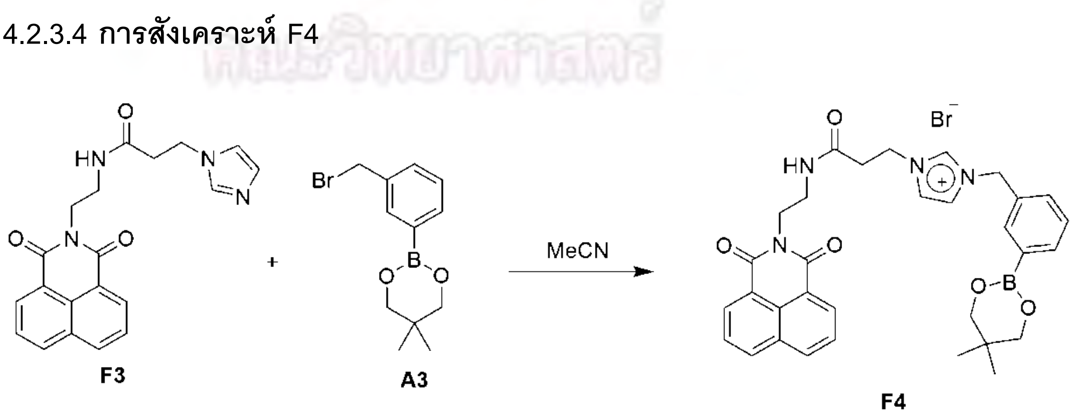


รูปที่ 4.14 ^{1}H-NMR spectrum ของสาร **F3** ใน MeOD

จาก ^{1}H-NMR สเปกตรัม (รูปที่ 4.14) พบสัญญาณของหมู่อะโรมาติก –Ar*H* ที่ตำแหน่ง 6.76-8.27 ppm ซึ่งเป็นสัญญาณจากทั้งวงอิมิดาโซลและหมู่แนพทาลิไมด์ และพบสัญญาณของหมู่อะลิฟาติก –NCH_2- (H_a), -NCH_2- (H_b),–COCH_2- (H_c) และ –NCH_2- (H_d) ที่ตำแหน่ง 4.10, 3.38, 2.46 และ 4.08 ppm ตามลำดับ จึงสามารถสรุปได้ว่าสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นจริง เพราะสัญญาณ ^{1}H-NMR สอดคล้องกับโครงสร้างของสาร **F3**

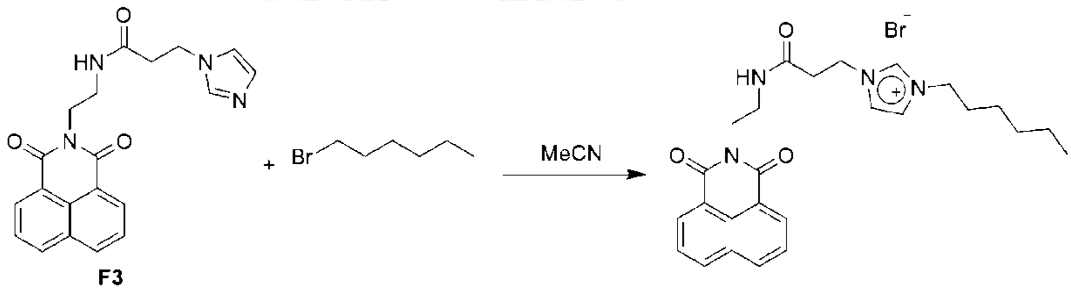
ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์

4.2.3.4 การสังเคราะห์ F4



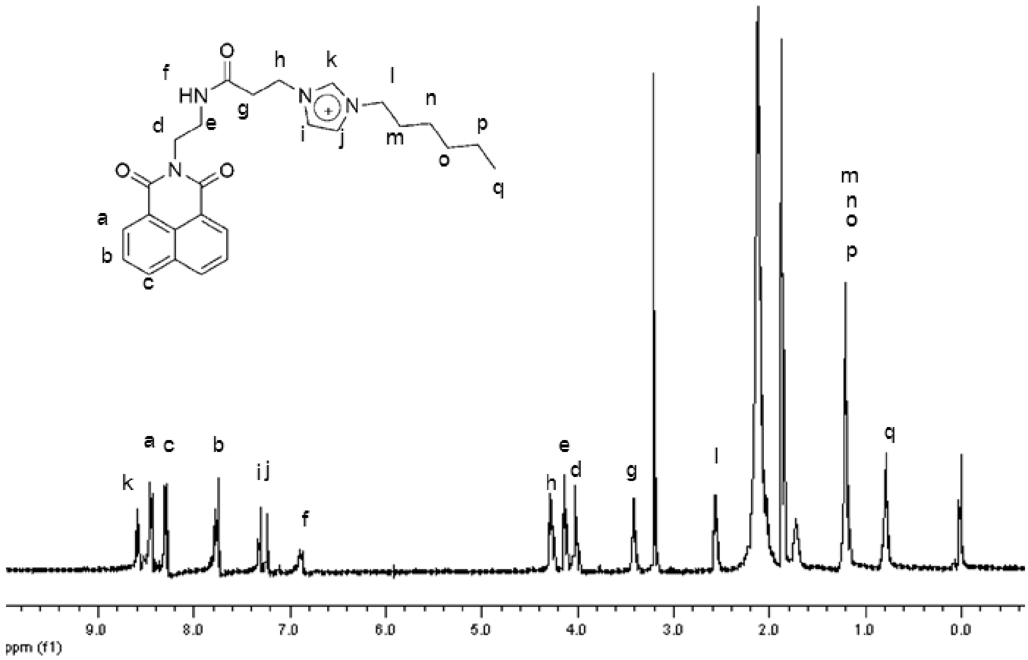
สาร **F4** สังเคราะห์จากปฏิกิริยาแทนที่ด้วยนิวคลิโอไฟล์ (nucleophilic substitution) ระหว่างสาร **F3** และ **A3** ในตัวทำละลายอะซีโตไนไตรล์ ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นของแข็งสีน้ำตาล คิดเป็นร้อยละผลิตภัณฑ์ 5 ไม่สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกโตรสโกปี (^{1}H-NMR spectroscopy) ได้ เนื่องจากมีปริมาณน้อยเกินไป

4.2.3.3 **การสังเคราะห์ NapIm3**



สาร **NapIm3** สังเคราะห์จากปฏิกิริยาแทนที่ด้วยนิวคลิโอไฟล์ (nucleophilic substitution) ระหว่างสาร **F3** และ1-โบรโมเฮกเซน (1-bromohexane) ในตัวทำละลายอะซีโตไนไตรล์ ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาล คิดเป็นร้อยละผลิตภัณฑ์ 78 พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกโตรสโกปี (^{1}H-NMR spectroscopy) ได้สเปกตรัมแสดงในรูปที่ 4.15

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

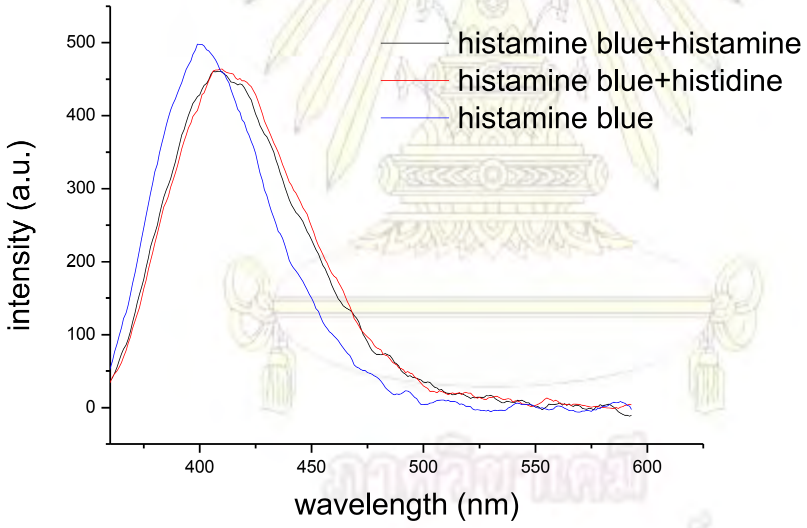


รูปที่ 4.15 ^{1}H-NMR spectrum ของสาร **NapIm3** ใน CD_3CN

จาก ^{1}H-NMR สเปกตรัม (รูปที่ 4.15) พบสัญญาณโปรตอนของหมู่แนพทาลิไมด์ –Ar*H* (H_a, H_b, H_c) ที่ตำแหน่ง 8.43, 7.75 และ 8.28 ppm ตามลำดับ พบสัญญาณโปรตอนของหมู่อิมิดาโซลเลียม (H_i, H_j) ที่ตำแหน่ง 7.30 และ 7.23 ppm ตามลำดับ และเกิดการ upfield ของโปรตอนตำแหน่ง *2H* (H_k) ไปที่ 8.58 ppm และพบสัญญาณของหมู่อะลิฟาติก –NCH_2- (H_d), -NCH_2- (H_e), -CON*H*- (H_f), –COCH_2- (H_g), –NCH_2- (H_h), -NCH_2- (H_l), -CH_2- (H_m, H_n, H_o, H_p) และ –CH_3 (H_q) ที่ตำแหน่ง 4.00, 4.12, 6.87, 3.40, 4.25, 2.54, 1.19 และ 0.77 ppm ตามลำดับ จึงสามารถสรุปได้ว่าสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นจริงเพราะสัญญาณ ^{1}H-NMR สอดคล้องกับโครงสร้างของสาร **NapIm3**

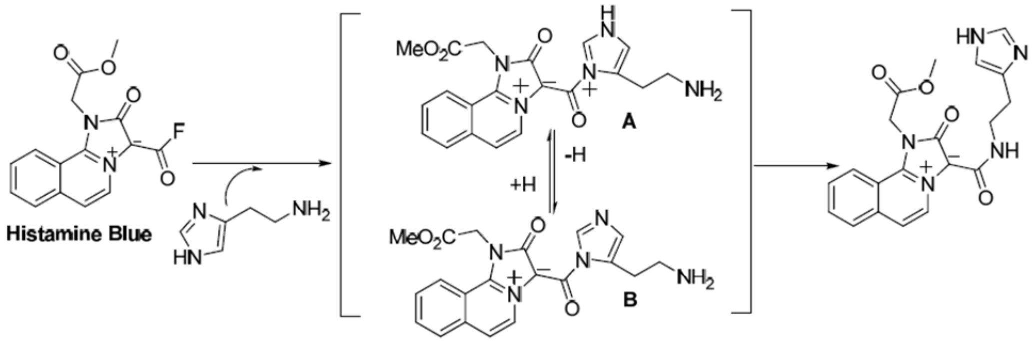
4.3 การศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของ histamine blue กับฮิสทามีนและฮิสทิดีน

จากผลการทดลองที่แสดงในรูปที่ 4.16 พบว่าเมื่อโมเลกุล histamine blue ถูกกระตุ้นด้วยพลังงานแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร จะคายสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนต์ที่มีความยาวคลื่นสูงสุด 400 นาโนเมตร และเมื่อในระบบมีฮิสทามีนจะเกิดการเลื่อน (shift) ของสัญญาณไปที่ 410 นาโนเมตร ซึ่งไม่แตกต่างจากผลการทดลองกับฮิสทิดีน แสดงว่า histamine blue ไม่มีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดฮิสทามีน เนื่องจาก histamine blue สามารถเกิดสารประกอบกับฮิสทิดีนได้



รูปที่ 4.16 แสดงฟลูออเรสเซนต์สเปกตรัมของ histamine blue ก่อน (น้ำเงิน) และหลังเติมฮิสทามีน (ดำ) กับฮิสทิดีน (แดง)

สาเหตุที่ histamine blue ไม่มีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดปริมาณฮิสทามีน สามารถวิเคราะห์ว่าเนื่องจากการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของ histamine blue และฮิสทามีน เกิดผ่านการเข้าชนหมู่แอซิดฟลูออไรด์โดยไนโตรเจนที่มีความเป็นนิวคลีโอไฟล์สูงบนวงอิมิดาโซล ฮิสทิดีนซึ่งมีหมู่อิมิดาโซลจึงสามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนดังกล่าวได้เช่นกัน กลไกปฏิกิริยาดังกล่าว แสดงในรูปที่ 4.17

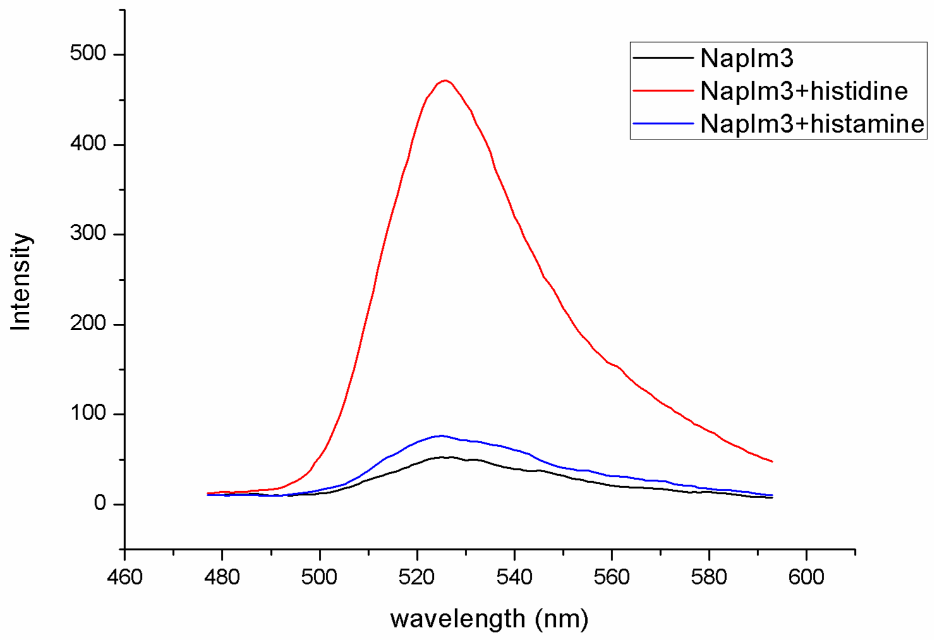


รูปที่ 4.17 กลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง histamine blue และฮิสทามีน

4.4 การศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของ NapIm3 กับฮิสทามีนและฮิสทิดีน

จากผลการทดลองที่แสดงในรูปที่ 4.18 พบว่าเมื่อให้พลังงานกระตุ้นที่ 340 นาโนเมตร โมเลกุล NapIm3 จะให้สัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มต่ำมากที่ประมาณ 525 นาโนเมตร เนื่องจากมีการรวมตัวกัน (aggregation) ระหว่างโมเลกุลเซ็นเซอร์ ด้วยอันตรกิริยา π-π stacking ที่หมู่แนพทาลิไมด์ ทำให้เกิดการยับยั้งสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ และเมื่อเติมฮิสทามีนเข้าไปในระบบ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ ในขณะที่การเติมฮิสทิดีนทำให้เกิดการเพิ่มสูงขึ้นของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์อย่างเห็นได้ชัด แสดงให้เห็นว่ามีการจับกันของหมู่คาร์บอกซิเลตของฮิสทิดีนกับหมู่อิมิดาโซเลียมของ NapIm3 ซึ่งฮิสทิดีนที่เข้าไปทำอันตรกิริยาได้ทำลายอันตรกิริยา π-π stacking ของหมู่แนพทาลิไมด์ จึงไม่เกิดการรวมตัวกัน (aggregation) ของโมเลกุลเซ็นเซอร์ เป็นผลให้สัญญาณฟลูออเรสเซนต์สูงขึ้น จากการ

เปลี่ยนแปลงนี้จึงสามารถสรุปได้ว่า โมเลกุล NapIm3 นั้นมีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดฮิสทิดีน



รูปที่ 4.18 แสดงฟลูออเรสเซนต์สเปกตรัมของ NapIm3 ก่อน (ดำ) และหลังเติมฮิสทามีน (น้ำเงิน) กับฮิสทิดีน (แดง)

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

5.1 สรุปผลการทดลอง

การสังเคราะห์โมเลกุลเซ็นเซอร์สำหรับตรวจวัดสารประกอบเอมีนทางชีวภาพ ผู้วิจัยได้ออกแบบและสังเคราะห์โมเลกุลเซ็นเซอร์ **histamine blue**, **F4** และ **NapIm3** โดยโมเลกุล **histamine blue** สังเคราะห์จากปฏิกิริยาเมโซไอออนิกระหว่างไอโซควิโนลีน, เมทิลไอโซไซยาโนอะซีเตต และไตรฟลูออโรอะซีติกแอนไฮไดรด์ ได้เป็นของแข็งสีม่วงอมเทา คิดเป็นผลิตภัณฑ์ร้อยละ 23 สำหรับการสังเคราะห์โมเลกุล **F4** จากปฏิกิริยาแทนที่ด้วยนิวคลิโอไฟล์ของสาร **F3** และ **A3** ได้เป็นของแข็งสีขาว คิดเป็นผลิตภัณฑ์ร้อยละ 5 มีความไวต่อความชื้นในอากาศ ส่งผลให้มีเพียงบางส่วนของ **A3** ที่เข้าไปทำปฏิกิริยา ดังนั้น ผลิตภัณฑ์จึงมีปริมาณน้อย ไม่สามารถนำไปสังเคราะห์ในขั้นตอนต่อไปได้ และการสังเคราะห์ **NapIm3** จากปฏิกิริยาแทนที่ด้วยนิวคลิโอไฟล์ (nucleophilic substitution) ของ 1-โบรโมเฮกเซน (1-bromohexane) และสาร **F3** ได้เป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาล คิดเป็นผลิตภัณฑ์ร้อยละ 78

จากการทดลองศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับเอมีนทางชีวภาพของ **histamine blue** และ **NapIm3** ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (phosphate buffer saline) pH 7.4 ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรโฟโตเมทรี (fluorescence spectrophotometry) พบว่า **histamine blue** สามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนได้กับทั้งฮิสทามีนและฮิสทิดีน โดยจะเกิดการเลื่อน (shift) ของสัญญาณจาก 400 นาโนเมตร เป็น 410 นาโนเมตร เนื่องจากสารประกอบเอมีนทางชีวภาพทั้งสองชนิดนี้มีวงอิมิดาโซลอยู่ในโครงสร้างเหมือนกัน จึงไม่สามารถตรวจวัดปริมาณ ฮิสทามีนได้อย่างจำเพาะเจาะจง และสารประกอบ **NapIm3** ให้สัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่ 525 นาโนเมตร เมื่อเติมฮิสทิดีนในระบบ พบว่าสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่ 525 นาโนเมตร มีความเข้มสูงขึ้น แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงต่อหมู่คาร์บอกซิเลตของฮิสทิดีน

5.2 งานวิจัยที่คาดว่าจะทำต่อไปในอนาคต

5.2.1 สังเคราะห์โมเลกุลเซ็นเซอร์ NapIm2 ในสภาวะที่เหมาะสม

5.2.2 ศึกษาการตรวจวัดปริมาณเอมีนทางชีวภาพชนิดอื่นๆด้วย NapIm2 และ NapIm3 ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรโฟโตเมตรี

5.2.3 พัฒนาโมเลกุลเซ็นเซอร์ที่มีฐานเป็นอิมิดาโซเลียมเพื่อตรวจวัดฮิสทิดีนอย่างจำเพาะเจาะจง โดยประยุกต์ใช้กับกระบวนการถ่ายโอนพลังงานฟลูออเรสเซนต์ (FRET)

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บรรณานุกรม

1. V. Frattni, and C. Lionetti, Histamine and histidine determination in tuna fish samples using high-performance liquid chromatography Derivatization with *o*-phthalaldehyde and fluorescence detection or UV detection of "free" species, *J. Chromatogr. A.*, **1998**, *809*, 241-245.
2. X. Li, H. Ma, S. Dong, X. Duan, and S. Liang, Selective labeling of histidine by a designed fluorescein-based probe, *Talanta.*, **2004**, *62*, 367-371.
3. H. Yoshida, F. Ichinose, T. Yoshitake, Y. Nakano, K. Todoroki, H. Nohta, and M. Yamaguchi, Selective labeling of histidine by a designed fluorescein-based probe, *Anal. Sci.*, **2004**, *20*, 557-559.
4. N. Kielland, M. Vendrell, R. Lavilla, and Y. Chang, Imaging histamine in live basophils and macrophages with a fluorescent mesoionic acid fluoride, *Chem. Commun.,* **2012**, *48*, 7401-7403.
5. P. Luo, Y. Luo, J. Huang, W. Lu, D. Luo, J. Yu, S. Liu, Incorporation of camptothecin into reduction-degradable supramolecular micelles for enhancings its stability, *Colloid Surf., B*, **2013**, *109*,167-175.
6. M. Kumar, K.V. Rao, S.J. George, Supramolecular charge transfer nanostructures, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2014**, *16*, 1300-1313.
7. D.K. Smith, A supramolecular approach to medical chemistry: medicine beyond the molecule, *J. Chem. Educ.*, **2005**, *82*, 393-400.
8. M.J. Bojdys, M.E. Briggs, J.T.A. Jones, D.J. Adams, S.Y. Chong, M. Schmidtmann, A.I. Cooper, Supramolecular engineering of intrinsic and extrinsic porosity in covalent organic cages, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 16566-16571.

9. A. Ciesielski, D.J. Szabelski, W. Rzysku, A. Cadeddu, T.R. Cook, P.J. Stang, D. Sanori, Concentration-dependent supramolecular engineering of hydrogen –bonded nanostructures at surfaces: predicting self-assembly in 2D, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 6942-6950.
10. M. Raynal, P. Ballester, A. Vidal-Ferran, P.W.N.M. van Leevwen, Supramolecular catalysis. Part 1: non-covalent interactions as a tool for building and modifying homogeneous catalysts, *Chem. Soc. Rev.*, **2014**, *43*, 1660-1733.
11. L. Fabbrizzi, A. Poggi, Sensors and switches from supramolecular chemistry, *Chem. Soc. Rev.*, **1995**, *24*, 197-202.
12. L. Leclercq, A.R. Schmitzer, Supramolecular effects involving the incorporation of guest substrates in imidazolium liquid networks: Recent advances and future developments, *Supramol. Chem.*, **2009**, *21*, 245-263.
13. J. Thar, M. Brehm, A.P. Seitsonen, B. Kirchner, Unexpected hydrogen bond dynamics in imidazolium-based ionic liquids, *J. Phys. Chem. B*, **2009**, *113*, 15129-15132.
14. Y. Zhang, Z. He, G. Li, A novel fluorescent vesicular sensor for saccharides based on boronic acid diol interaction, *Talanta*, **2010**, *81*, 591-596.
15. H.M. Chawla, R. Shukla, S. Pandey, Preferential recognition of zinc ions through a new anthraquinonoidal calix[4]arene, *Tetrahedron Lett.*, **2012**, *53*, 2996-2999.
16. B. Ramachandram, G. Saroja, N.B. Sankaran, A. Samanta, Unusually high fluorescence enhancement of some 1,8-naphthalimide derivatives by transition metal salts. *J. Phys. Chem. B.*, **2000**, *104*, 11824-11832
17. M.J. Arevalo, N. Kielland, C. Masdeu, M. Miguel, N. Isambert, R. Lavilla, Multicomponent access to functionalized mesoionic structures based on

TFAA activation of isocyanides: novel domino reaction, *Eur. J. Org. Chem.*, **2009**, 2009, 617-625.

18. S.S. Pawar, S.B. Dahikar, S.A. Bhutada, R.S. Shendge, P.L. Gorde, R.B. Kakde, S.R. Arote, Synthesis and antibacterial activity of various Schiff base derivatives of N-substituted, *Org. Chem. Indian J.*, **2009**, 5, 316-320.

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้วิจัย

นางสาววีราภัทร วิจิตร์แสงศรี เกิดเมื่อวันที่ 17 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2535 ที่จังหวัดอ่างทอง สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย สายสามัญ แผนการเรียนวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์จากโรงเรียนมหิดลวิทยานุสรณ์ จังหวัดนครปฐม เมื่อปีการศึกษา 2552 และเข้ารับการศึกษาระดับปริญญาตรีหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2553 ที่อยู่ปัจจุบัน บ้านเลขที่ 111 หมู่ 6 ตำบลหัวตะพาน อำเภอวิเศษชัยชาญ จังหวัดอ่างทอง 14110 เบอร์โทรศัพท์ 084-0804462

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย