



โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ	การพัฒนา nanoคอมโพสิตฟลูออโรฟอร์-พลาสมอนิกเพื่อตรวจจับไอออน-โมเลกุล
	Development of ion-molecule recognizing fluorophore-plasmonic nanostructure composite
ชื่อนิสิต	นางสาวฐิติรัตน์ กมลทิพย์วงศ์ เลขประจำตัว 5833016723
ภาควิชา	เคมี
ปีการศึกษา	2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทความย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the senior project authors' files submitted through the faculty.

การพัฒนา นาโนคอมโพสิตฟลูออโรฟอร์-พลาสมอนิกเพื่อตรวจจับไอออน-โมเลกุล

Development of ion-molecule recognizing fluorophore-plasmonic nanostructure
composite

โดย

นางสาว จูติรัตน์ กมลทิพย์วงศ์

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


ปีการศึกษา 2561

โครงการ การพัฒนานาโนคอมโพสิตฟลูออโรพอร์-พลาสมอนิกเพื่อตรวจจับไอออน-โมเลกุล

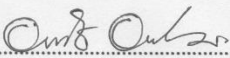
โดย นางสาวฐิติรัตน์ กมลทิพย์วงศ์

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ


.....ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. สอนง เอกสิทธิ์)



.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนวัช อาชวาคม)


.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพฑูรย์ รัชตะสาคร)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี


.....หัวหน้าภาควิชาเคมี

(รองศาสตราจารย์ ดร. วุฒิชัย พาราสุข)

วันที่...๒๕...เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2562

ชื่อโครงการ การพัฒนานาโนคอมโพสิตฟลูออโรฟอร์-พลาสมอนิกเพื่อตรวจจับไอออน
โมเลกุล

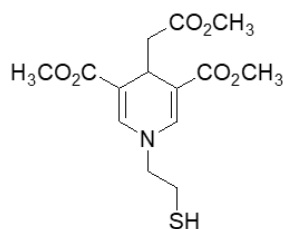
ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาวฐิติรัตน์ กมลทิพย์วงศ์ เลขประจำตัว 5833016723

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนวัช อาชวาคม

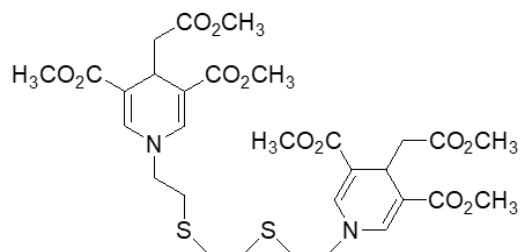
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2561

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันสิ่งแวดล้อมมีโลหะปนเปื้อนเป็นจำนวนมาก เช่น ปรอท อาร์เซนิก ทองคำ เป็นต้น ผู้วิจัยจึงพัฒนาวิธีในการตรวจวัดโลหะเหล่านี้ โดยสังเคราะห์สารอนุพันธ์ 1,4-dihydropyridine (DHP) ที่มีหมู่แทนที่บนไนโตรเจนอะตอมที่แตกต่างกัน ได้แก่ DHP-SH และ Bis-DHP-SS ซึ่ง DHP-SH สังเคราะห์จาก 2-aminoethanethiol และ Bis-DHP-SS สังเคราะห์จาก DHP-OTs จากการทดลองผู้วิจัยสามารถพิสูจน์ทราบโครงสร้างได้โดย ^1H NMR และ MS อนุพันธ์ DHP ที่สังเคราะห์ได้มีคุณสมบัติการดูดกลืนและเปล่งแสงแบบฟลูออเรสเซนส์ที่มีความยาวคลื่น 360 nm และ 450 nm ตามลำดับ นอกจากนี้อนุพันธ์ DHP ทั้งสองชนิดดับสัญญาณฟลูออเรสเซนส์กับ Au^{3+} ในสารละลายน้ำ โดย DHP-SH และ Bis-DHP-SS กับ Au^{3+} จะเกิดการดับสัญญาณการเรืองแสงอย่างสมบูรณ์เมื่อเวลาผ่านไป 20 และ 60 นาที ตามลำดับ และได้นำ Bis-DHP-SS มาทดสอบการเป็นเซนเซอร์ตรวจวัดปริมาณ Au^{3+} ในสารละลาย พบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนส์กับความเข้มข้นของ Au^{3+} ในช่วง 10-50 μM ซึ่งให้ค่า LOD เท่ากับ 7.71 μM การพัฒนาการสังเคราะห์นาโนคอมโพสิตและนำไปทดสอบการตรวจวัดโลหะไอออนของระบบนาโนพาร์ติเคิลกับ DHP-SH กำลังอยู่ระหว่างการดำเนินการ



DHP-SH



Bis-DHP-SS

คำสำคัญ: ฟลูออเรสเซนส์, เซนเซอร์, 1,4-ไดไฮโดรไพริดีน, ไอออนโลหะ, ทองคำ

Project title Development of ion-molecule recognizing fluorophore-plasmonic nanostructure composite

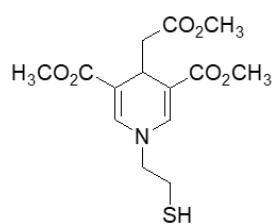
Student Name Miss Thitirut Kamonthipwong Student ID 5833016723

Advisor Name Assistant Professor Dr. Anawat Ajavakom

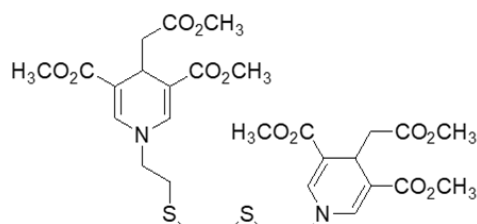
Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2018

Abstract

Nowadays, the environment has been contaminated by many heavy metal ions such as mercury, arsenic, gold. Therefore, we have developed the method to detect such metal ions by synthesizing 1,4-dihydropyridine derivatives (DHP) i.e., DHP-SH and Bis-DHP-SS, containing different substituent on the nitrogen atom. DHP-SH and Bis-DHP-SS were synthesized from 2-aminoethanethiol and 1,4-dihydropyridine tosylates (DHP-OTs), respectively. Synthesized compounds were characterized by ^1H NMR and MS. These derivatives have maximum absorption and fluorescence emission properties at 360 nm and 450 nm, respectively. And, fluorescent signals of both DHPs were quenched by Au^{3+} in MilliQ water. In details, once DHP-SH and Bis-DHP-SS were formed to Au^{3+} , their fluorescent signals completely disappeared after 20 mins and 60 mins, respectively. Bis-DHP-SS was tested as a sensor for the determination of Au^{3+} in MilliQ water and it gave a linear relationship between the fluorescence intensity and Au^{3+} concentration in the range of 10-50 μM demonstrating LOD value to be 7.71 μM . Development of synthesizing nanocomposite between nanoparticles and DHP-SH and sense for the determination of metal ions are on progress.



DHP-SH



Bis-DHP-SS

Keywords: fluorescence, sensor, 1,4-dihydropyridine, metal ions, gold

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนวัช อาชวาคม ซึ่งเป็นที่ปรึกษาของโครงการนี้ ที่ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างดีตลอดการทำวิจัยจนทำให้การทำรายงานเสร็จสิ้นสมบูรณ์ อีกทั้งขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.สนอง เอกสิทธิ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร.ไพฑูรย์ รัชตะสาคร ที่กรุณาสละเวลาเป็นกรรมการสอบ รวมทั้งให้คำแนะนำและตรวจสอบแก้ไขรายงานฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ดร.วโรธร ไพรสุวรรณ ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ รวมถึงเทคนิคในการทำวิจัย และสมาชิกในหน่วย MAPS group ทุกคนที่ให้ความรู้ ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการวิจัย ให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการเคมีและอุปกรณ์ในการทำการทดลอง และเป็นธุระให้ในส่วนของเครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือมาโดยตลอดระยะเวลาในการทำวิจัยจนสามารถทำวิจัยได้ลุล่วงไปด้วยดี

นางสาวฐิติรัตน์ กมลทิพย์วงศ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญรูปประกอบ	ช
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ญ
บทที่ 1	
1.1 มูลเหตุจูงใจ	1
1.2 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	2
1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
1.4 วัตถุประสงค์และขอบเขตงาน	12
บทที่ 2 การทดลอง	
2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์	13
2.2 สารเคมี	13
2.3 วิธีการสังเคราะห์	14
2.4 การศึกษาการดูดกลืนและคายแสงของอนุพันธ์ DHP ในตัวทำละลายต่าง ๆ	18
2.5 การเตรียม stock solution ของนาโนคอมโพสิต	18
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	
3.1 การสังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์โครงสร้าง	20

	หน้า
3.2 การศึกษาสมบัติเชิงแสง	26
3.3 Au ³⁺ ion sensor	26
3.4 การสังเคราะห์นาโนคอมโพสิต	32
3.5 การศึกษาการเลือกจับจำเพาะของนาโนคอมโพสิต	33
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	
สรุปผลการทดลอง	34
การพัฒนางานวิจัยในอนาคต	35
เอกสารอ้างอิง	36
ภาคผนวก	40
ประวัติผู้วิจัย	45

สารบัญรูปประกอบ

	หน้า
รูปที่ 1.1 โครงสร้างของอนุพันธ์ DHP-OH	1
รูปที่ 1.2 โครงสร้างของสารเป้าหมาย DHP-SH, Mono-DHP-SS, Bis-DHP-SS	2
รูปที่ 1.3 แผนภาพ Jablonski ของปรากฏการณ์การเกิด Fluorescence	3
รูปที่ 1.4 การถ่ายเทพลังงานแบบ FRET	4
รูปที่ 1.5 กระบวนการเกิด Photoinduced Electron Transfer (PET)	4
รูปที่ 1.6 กระบวนการเกิด Internal Charge Transfer (ICT)	5
รูปที่ 1.7 โครงสร้างของอนุพันธ์ของ naphthalimide และสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์	6
รูปที่ 1.8 โครงสร้างของอนุพันธ์ของ thiocoumarin, สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์และ desulfurization	7
รูปที่ 1.9 โครงสร้างของอนุพันธ์ของ DHP และสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์	8
รูปที่ 1.10 โครงสร้างของอนุพันธ์ของ fluorescein และสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์	8
รูปที่ 1.11 โครงสร้างของ DPP-PyR และการจับกันระหว่างสารกับ Fe^{3+} และ Au^{3+}	9
รูปที่ 1.12 โครงสร้างของอนุพันธ์ของ naphthalimide และสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์	10
รูปที่ 1.13 โครงสร้างของอนุพันธ์ของ coumarin-thiol และสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์	11
รูปที่ 1.14 โครงสร้างของ EDPMA และสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์	11
รูปที่ 3.1 แผนภาพการสังเคราะห์ DHP-SH	20
รูปที่ 3.2a ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ DHP-SH	21
รูปที่ 3.2b กลไกการเกิด tricarboxylic acid	21
รูปที่ 3.3 การสังเคราะห์ DHP-SH	21

	หน้า
รูปที่ 3.4 ^1H NMR ของ DHP-SH	22
รูปที่ 3.5 การสังเคราะห์ Bis-DHP-SS	23
รูปที่ 3.6 ^1H NMR ของ Bis-DHP-SS	24
รูปที่ 3.7 ^1H NMR ของอนุพันธ์ DHP	25
รูปที่ 3.8 HRMS ของอนุพันธ์ DHP	26
รูปที่ 3.9 Fluorescence spectra of DHP-SH in various solvents	28
รูปที่ 3.10 Fluorescence spectra of Bis-DHP-SS in various solvents	28
รูปที่ 3.11 Fluorescence spectra of DHP-SH in MilliQ water	29
รูปที่ 3.12 Fluorescence spectra of Bis-DHP-SS in MilliQ water	29
รูปที่ 3.13 Time dependence of Bis-DHP-SS in MilliQ water	30
รูปที่ 3.14 Time dependence of DHP-SH in MilliQ water	30
รูปที่ 3.15 Competitive experiment of Bis-DHP-SS	31
รูปที่ 3.16 Fluorescence titration of Bis-DHP-SS	32
รูปที่ 3.17 การสังเคราะห์นาโนคอมโพสิต	33
รูปที่ 3.18 แผนภาพการสังเคราะห์นาโนคอมโพสิต	33
รูปที่ A-1 ^1H NMR ของ DHP-OH	40
รูปที่ A-2 ^{13}C NMR ของ DHP-OH	41
รูปที่ A-3 ^{13}C NMR ของ DHP-OTs	42
รูปที่ A-4 Normalized absorption of Bis-DHP-SS	42

	หน้า
รูปที่ A-5 Normalized emission of Bis-DHP-SS	43
รูปที่ A-6 Normalized absorption of DHP-SH	43
รูปที่ A-7 Normalized emission of DHP-SH	44

คำอธิบายคำย่อและสัญลักษณ์

R_f	retardation factor
mL	milliliter
equiv	equivalent
mg	milligram
mmol	millimole
μL	microliter
μM	micromolar
nm	nanometer
^1H NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance
^{13}C NMR	Carbon Nuclear Magnetic Resonance
HRMS	High Resolution Mass Spectroscopy
MHz	megahertz
δ	chemical shift
J	coupling constant
s	singlet
d	doublet
t	triplet
m	multiplet
λ	wavelength
ϵ	molar extinction
M	mol/dm^3
mM	milli mol/dm^3
DHP	dihydropyridine
TEA	triethylamine
TsCl	tosyl chloride

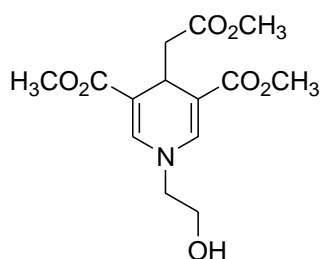
AuNP	gold nanoparticle
AgNP	silver nanoparticle

บทที่ 1

บทนำ

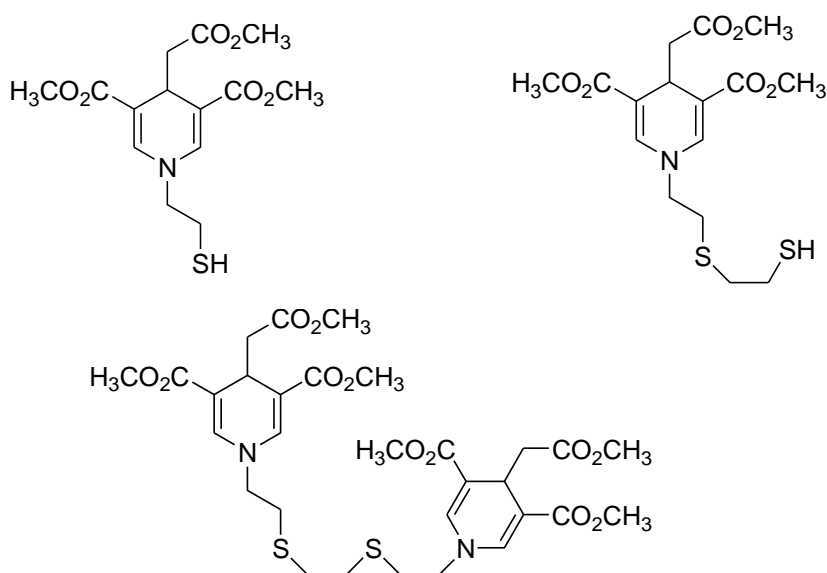
1.1 มุลเหตุจูงใจ

ทองคำ เป็นโลหะที่มีมูลค่าสูง ในอดีตได้มีการนำทองคำไปทำเป็นส่วนผสมในเงินตรา เครื่องประดับ นอกจากนี้ทองคำยังสามารถนำไปทำเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมีอุตสาหกรรม คือ ใช้เป็นวัสดุในตัวตรวจวัด เช่น AuNP (gold nanoparticles) [1] เป็นต้น ยาที่ใช้ทองคำสามารถนำมารักษาโรคได้มากมาย เช่น โรคไขข้ออักเสบ โรคหอบหืด วัณโรค มาลาเรีย มะเร็ง โรคเอดส์ เป็นต้น [2-10] การตรวจวัดทองคำสามารถทำได้หลายวิธีโดยใช้เทคนิคต่าง ๆ เช่น เทคนิคอะตอมมิกแอบซอร์บชันสเปกโตรสโคปี (Atomic Absorption Spectroscopy, AAS), เทคนิคอินดักทีฟลีคอปเปิลพลาสมาแมสสเปกโตรสโคปี (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectroscopy, ICP-MS) เป็นต้น เนื่องจากเทคนิคเหล่านี้ใช้เครื่องมือค่อนข้างแพงและยังต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการดูแลเครื่องมือ ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดความยุ่งยากในการตรวจวัดไอออนของโลหะทองคำ ด้วยเหตุนี้ได้มีการค้นคว้าหาวิธีในการตรวจวัดที่สะดวก ง่าย รวดเร็วและมีราคาในการวิเคราะห์ที่ต่ำ นั่นคือ Fluorometry ซึ่งเป็นวิธีที่วัดตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยมาก โดยวัดความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์โดยวิธีนี้มีความจำเพาะสูง มีความไวในการตรวจวัดสูง และสามารถประยุกต์ใช้งานได้หลายด้าน เช่น ด้านการแพทย์ ด้านสิ่งแวดล้อม จากงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่า สารที่นิยมนำมาทำเป็นตัวตรวจวัดทองคำเป็นสารจำพวก rhodamine [11-17], fluorescein [18,19], BODIPY [20-22], naphthalimide [23,24], coumarin [25,26] และ rhodamine-BODIPY coupling [27,28] ในงานวิจัยของ Sirijindalert และคณะ [29] ได้มีการคิดค้นและพัฒนาารูปแบบการสังเคราะห์สาร DHP-OH ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ 1,4-dihydropyridine (DHP) (รูปที่ 1.1) โดยการนำปฏิกิริยาของ Hantzsch ที่มาดัดแปลงและประยุกต์มาใช้



รูปที่ 1.1 โครงสร้างของอนุพันธ์ DHP-OH

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะพัฒนาการสังเคราะห์สารที่เป็นอนุพันธ์ของ DHP ชนิดใหม่ เพื่อนำไปจับกับนาโนพาร์ติเคิลของโลหะ (Metal Nanoparticle, MNP) โดยออกแบบให้มีหมู่ไทออลตรงปลายหมู่แอลคิลที่ติดกับอะตอมไนโตรเจน (DHP-SH) (รูปที่ 1.2) เพื่อให้สามารถจับกับอนุภาคนาโนพาร์ติเคิลทองคำได้ดีและมีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยจุดประสงค์หลักในการนำอนุพันธ์ DHP ไปจับกับ metal nanoparticles นั้นเพื่อเพิ่มความไวต่อการตรวจวัดไอออนโลหะให้ดีขึ้น นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ศึกษาความแตกต่างของการจับกับกลุ่มไอออนโลหะและการให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของอนุพันธ์ DHP ที่มีการแทนที่ของหมู่ DHP จำนวน 1 หรือ 2 หมู่ ที่ปลายของสารเอทิลีนไทออล ซึ่งประกอบด้วย Mono-DHP-SS และ Bis-DHP-SS (รูปที่ 1.2)



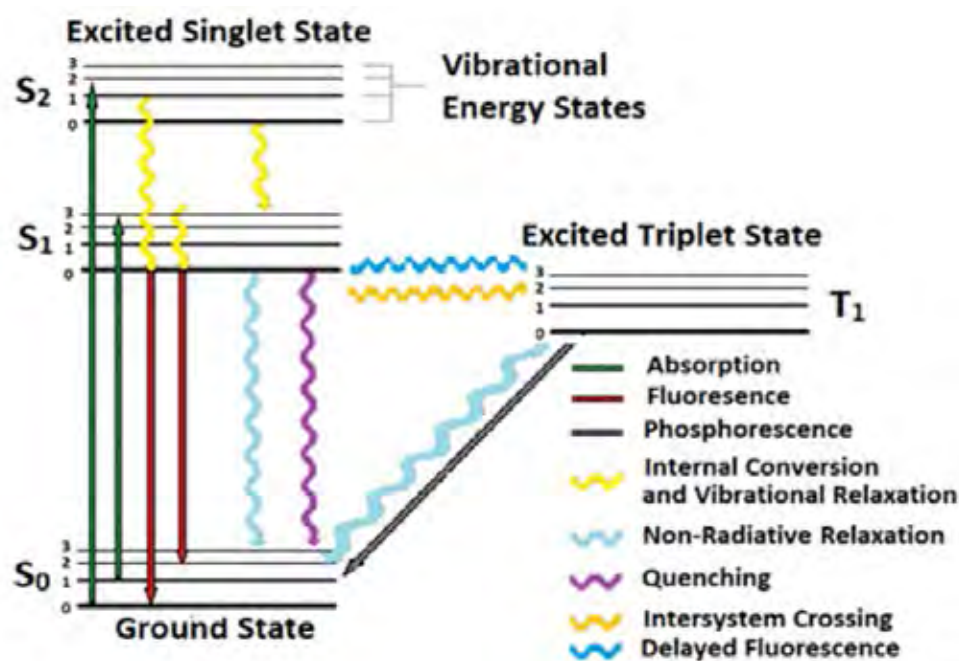
รูปที่ 1.2 โครงสร้างของสารเป้าหมาย DHP-SH, Mono-DHP-SS และ Bis-DHP-SS

1.2 ทฤษฎีที่สำคัญ

1.2.1 ปฏิกิริยาฟลูออเรสเซนซ์

ฟลูออเรสเซนซ์ อธิบายปรากฏการณ์การเรืองแสงที่แสงถูกปล่อยออกมาโดยอะตอมหรือโมเลกุลที่ดูดกลืนหรือรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าจากแหล่งอื่น ในการเรืองแสงของสารจำเป็นต้องมีโครงสร้างที่มีระบบคอนจูเกตและมีความแข็งเกร็ง (rigidity) ของโครงสร้างในระดับที่เพียงพอ ผู้วิจัยเรียกสารที่เรืองแสงนี้ว่า

ฟลูออโรฟอร์ (Fluorophore) ในการดูดกลืน แสงพลังงานสูงจะกระตุ้นระบบเพื่อให้อิเล็กตรอนภายในโมเลกุลเปลี่ยนจากสถานะพื้น (ground state) ไปอยู่ที่สถานะกระตุ้น (excited state) จากนั้นอิเล็กตรอนจะกลับสู่สถานะพลังงานต่ำที่สุดอย่างรวดเร็วในรูปแบบของการเรืองแสง หลังจากที่อิเล็กตรอนปลดปล่อยพลังงานแล้ว แสงฟลูออเรสเซนซ์จะหายไปทำให้อิเล็กตรอนกลับสู่สถานะพื้นและปล่อยพลังงานสะสมไว้คืนให้โฟตอน แสงที่ปล่อยจะมีพลังงานต่ำกว่ารังสีที่ดูดกลืน กระบวนการเรืองแสงทั้งหมดเป็นวัฏจักร ถ้าฟลูออโรฟอร์ยังอยู่สภาพเดิมหลังผ่านการกระตุ้นด้วยแสงพลังงานสูง ฟลูออโรฟอร์เดียวกันก็สามารถนำไปใช้ในการตรวจวัดและกระตุ้นซ้ำ ๆ ได้ ดังนั้นฟลูออโรฟอร์เดียวสามารถสร้างหลายพันโฟตอนอันเนื่องมาจากเทคนิคการตรวจจับที่มีความไวสูง

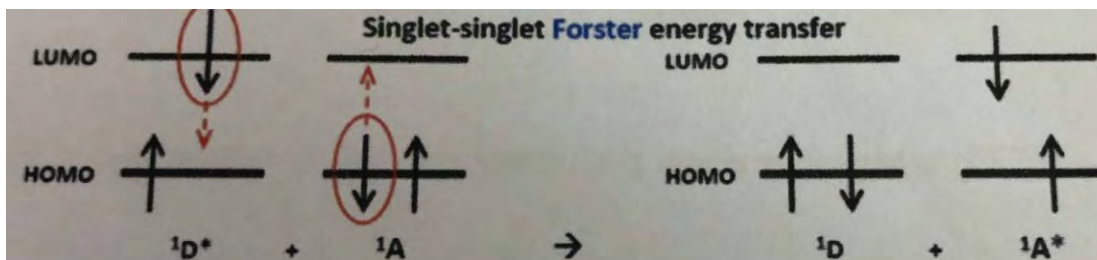


รูปที่ 1.3 แผนภาพ Jablonski ของปรากฏการณ์การเกิด Fluorescence

จากแผนภาพ Jablonski (รูปที่ 1.3) เมื่อสารดูดกลืนคลื่นแสงจะเกิดการเปลี่ยนระดับพลังงานสถานะพื้น (S_0) ไปยังสถานะกระตุ้นแบบ singlet state มีระดับพลังงานสูงขึ้น (S_1) หรือ (S_2) (ที่ระดับ S_2 จะมีระดับพลังงานสูงกว่า S_1) หลังจากการเกิดผ่อนคลายแบบสั่น (Vibrational relaxation) พร้อมลดระดับพลังงานไปยัง S_1 จากนั้นก็จะคายพลังงานในรูปแบบฟลูออเรสเซนซ์ กลับสู่พลังงานในสถานะพื้น (S_0) ในกรณีที่มีระดับพลังงาน S_1 หลังจากเกิดการผ่อนคลายของการสั่นก่อนจะคายพลังงานโฟตอนกลับสู่ระดับพลังงาน S_0 ซึ่งเป็นปรากฏการณ์เรืองแสง (Phosphorescence) ซึ่งโดยปกติใช้เวลานานกว่าการเกิด

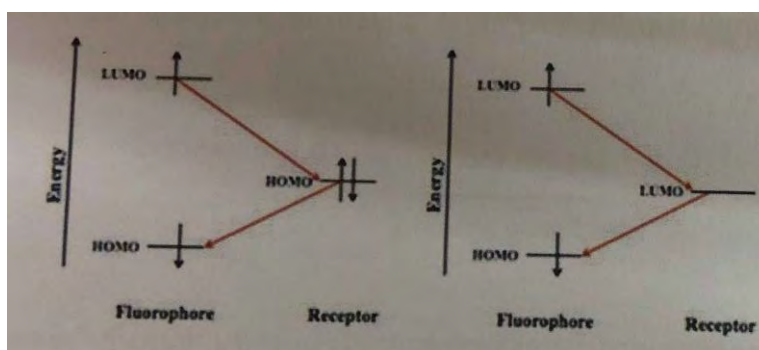
ฟลูออเรสเซนส์ค่อนข้างมาก หนึ่งในการณ์ที่โมเลกุลในสภาวะกระตุ้นทั้ง S_1 เกิดการลดระดับพลังงานลง เนื่องมาจากการแทรกแซงของโมเลกุลแวดล้อม หรือภายในโมเลกุลเองมีผลทำให้สัญญาณฟลูออเรสเซนส์ลดลง (Fluorescence quenching) ซึ่งกลไกการแทรกแซงกระบวนการเรืองแสงที่สำคัญ ได้แก่

1. การถ่ายเทพลังงานภายในโมเลกุลแบบ Forster Resonance Energy Transfer (FRET) ที่ทำให้มีการลดระดับพลังงานในรูปที่ไม่ให้แสงโดยการเหนี่ยวนำไดโพลโมเมนต์ของหน่วยเรืองแสงในภาวะกระตุ้นที่ทำหน้าที่เป็นตัวให้พลังงาน (energy donor) กับโมเลกุลข้างเคียงกับที่ทำหน้าที่รับพลังงาน (energy acceptor) โดยตัวรับพลังงานต้องมีช่องพลังงาน HOMO-LUMO อยู่ระหว่างช่องพลังงานของหน่วยเรืองแสงและประสิทธิภาพการถ่ายเทพลังงานแปรผกผันกับระยะห่างระหว่างหน่วยเรืองแสงกับตัวรับพลังงาน(ยกกำลังหก) กระบวนการ FRET จะเกิดได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อหน่วยเรืองแสงกับตัวรับพลังงานอยู่ห่างกันไม่เกิน 10 นาโนเมตร



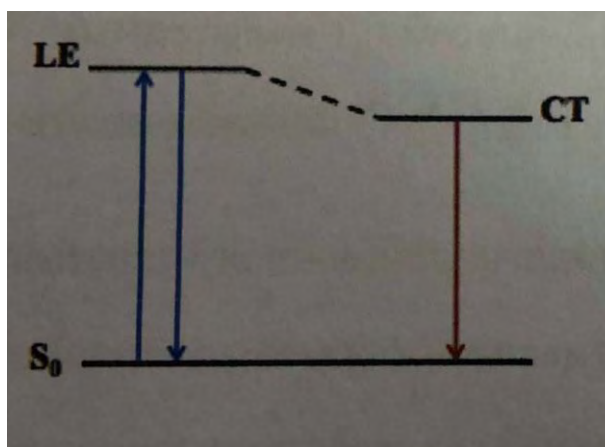
รูปที่ 1.4 การถ่ายเทพลังงานแบบ FRET

2. การถ่ายเทอิเล็กตรอนภายในโมเลกุลแบบ Photoinduced Electron Transfer (PET) จากตัวให้อิเล็กตรอน (electron donor) ไปยังตัวรับอิเล็กตรอน (electron acceptor) ที่มีระดับพลังงานต่ำกว่า เช่น LUMO ของตัวรับอิเล็กตรอนอยู่ต่ำกว่า LUMO ของหน่วยเรืองแสงในภาวะกระตุ้นที่ทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน หรือ HOMO ของหน่วยเรืองแสงในภาวะกระตุ้นที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนอยู่ต่ำกว่า HOMO ของตัวให้อิเล็กตรอน ซึ่งการถ่ายเทอิเล็กตรอนนี้ทำให้สัญญาณฟลูออเรสเซนส์ลดลง



รูปที่ 1.5 กระบวนการเกิด Photoinduced Electron Transfer (PET)

3. การถ่ายเทคู่อิเล็กตรอนภายในโมเลกุลที่เรียกว่า Internal Charge Transfer (ICT) ซึ่งเกิดผ่านระบบพายคอนจูเกตภายในโมเลกุล มีผลทำให้โมเลกุลสารเรืองแสงภาวะกระตุ้นมีระดับพลังงานลดลง และในขณะเดียวกันสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เลื่อนไปทางแสงสีแดง (red shift) ซึ่งกระบวนการดังกล่าวมักทำให้ประสิทธิภาพการเรืองแสงลดลงด้วยเนื่องจากโมเลกุลในภาวะกระตุ้นมีช่วงชีวิตที่ยาวขึ้น



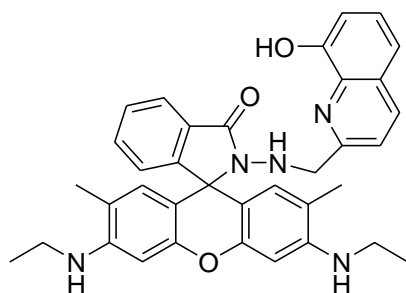
รูปที่ 1.6 กระบวนการเกิด Internal Charge Transfer (ICT)

4. การสูญเสียคุณสมบัติการเรืองแสงเนื่องจากมีอันตรกิริยาหรือปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับพลังงานหรือโครงสร้าง

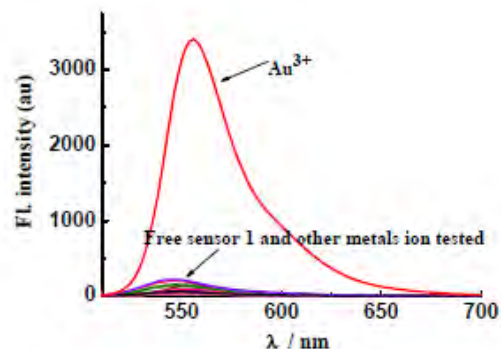
1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปี ค.ศ.2011 J. Wang และคณะ [30] ได้สังเคราะห์สารที่เป็นอนุพันธ์ของ naphthalimide (รูปที่ 1.7a) โดยพวกเขาได้พัฒนาการสังเคราะห์เพื่อให้ตรวจวัด Au^{3+} พบว่า สารนี้ให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ (รูปที่ 1.7b) เมื่อทดลองในสารละลายของ EtOH/H₂O (3:7 v/v) ที่ความยาวคลื่น (λ_{ex}) 500 นาโนเมตร โดยสารจะเลือกจับจำเพาะกับ Au^{3+} ที่มีอัตราส่วนในการจับเป็นแบบ 1:1 โดยมีค่าคงที่การจับ (K) เท่ากับ 3.63×10^5 การที่ให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์แบบ turn-on สามารถพิสูจน์ได้ด้วยการสังเกตได้ด้วย

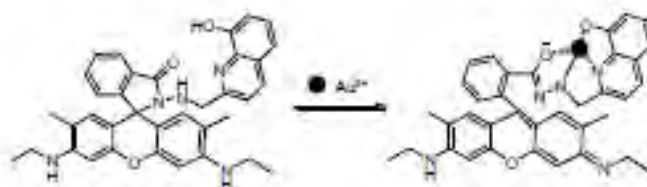
ตาเปล่าโดยเกิดการเปลี่ยนสีจากไม่มีสี (sensor) เป็นสีเขียวเหลือง (sensor+Au³⁺) และกลไกการจับระหว่าง sensor กับ Au³⁺ มีกลไกการจับ คือ Au³⁺ ไปกระตุ้นให้เกิดการเปิดวงของ spiro ดังรูปที่ 1.7c



(a)



(b)



(c)

รูปที่ 1.7

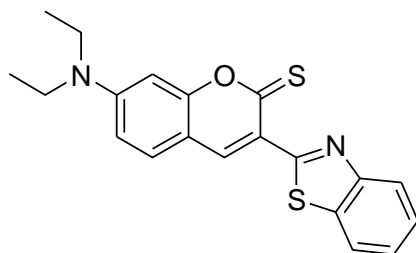
(a) โครงสร้างของสาร

(b) สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เมื่อเติมไอออนชนิดต่าง ๆ ใน EtOH/H₂O (3:7 v/v)

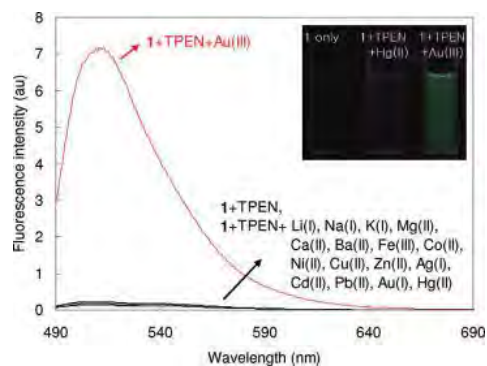
(c) กลไกการจับระหว่าง sensor กับ Au³⁺

ในปี ค.ศ.2012 J.E. Park และคณะ [31] ได้สังเคราะห์อนุพันธ์ของ thiocoumarin (รูปที่ 1.8a) ซึ่ง Au³⁺ ชักนำให้เกิด desulfurization ของ thiocarbonyl กล่าวคือ เปลี่ยนจาก thiocoumarin เป็น coumarin (รูปที่ 1.8c) เพื่อให้เกิดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ (รูปที่ 1.8b) ในสารละลายผสมระหว่าง CH₃CN/acetate buffer (1:1 v/v) มีการเปลี่ยนสีจากชมพูเป็นสีเขียวเหลืองโดยสามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า ในการทดสอบการเลือกจับจำเพาะกับไอออนชนิดต่าง ๆ พบว่า สารนี้สามารถเลือกจับจำเพาะทั้ง Au³⁺ และ Hg²⁺ ได้ แต่พวกเขาต้องการให้มันเลือกจับจำเพาะเฉพาะ Au³⁺ จึงได้มีการเติม TPEN ซึ่งเป็น

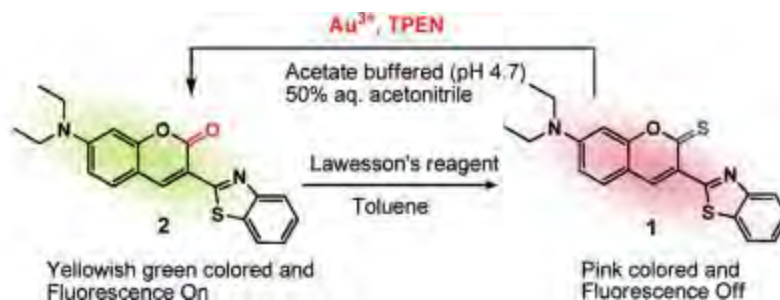
chelating agent ลงไปเพื่อไปยังยังไม่ให้สารนี้จับกับ Hg^{2+} ดังนั้น ในการตรวจวัด Au^{3+} ต้องใช้ TPEN ไล่ลงไปด้วยเพื่อให้เกิดการเลือกจับจำเพาะกับ Au^{3+} เท่านั้น



(a)



(b)



(c)

รูปที่ 1.8

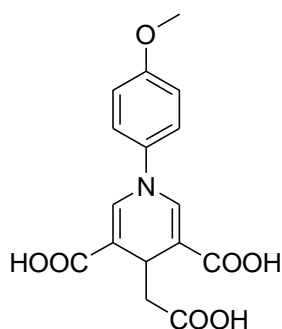
(a) โครงสร้างของอนุพันธ์ของ thiocoumarin

(b) สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เมื่อเติมไอออนชนิดต่าง ๆ ใน CH_3CN /acetate buffer (1:1 v/v)

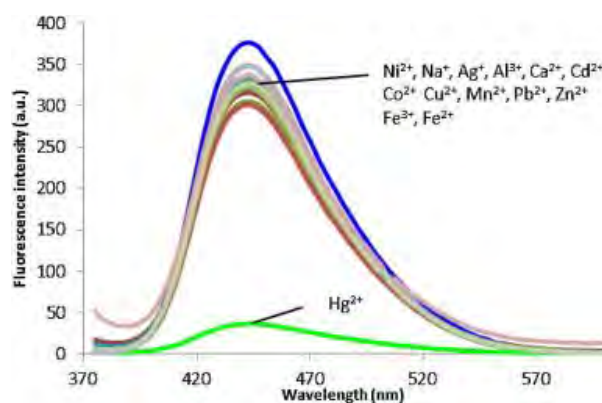
(c) desulfurization ของ thiocoumarin

ในปี ค.ศ.2013 D. Homrarueng และคณะ [32] ได้สังเคราะห์สารอนุพันธ์ของ DHP ที่ประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิลิก 3 ตัว (รูปที่ 1.9a) พบว่าสารดังกล่าวสามารถเลือกจับจำเพาะกับ Hg^{2+} ในสารละลายน้ำ ที่มีอัตราส่วนในการจับแบบ 1:1 และให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ 443 นาโนเมตร (รูปที่ 1.9b) ซึ่งสามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า การลดลงของสัญญาณการเรืองแสงเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้น

ของ Hg^{2+} ที่มีค่า $K_{sv}=78,300$ ซึ่งให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่เครื่องมือสามารถวัดได้เท่ากับ 0.2 mM กระบวนการลดลงของสัญญาณเกี่ยวข้องกับการออกซิเดชันของ DHP กลายเป็นวงพริดิเนียมที่ถูกเหนี่ยวนำโดย Hg^{2+} โดยเฉพาะซึ่งทำให้เกิดการเลือกจำเพาะเหนือโลหะอื่น ๆ



(a)

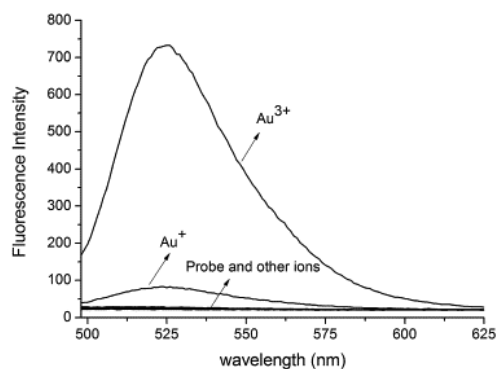
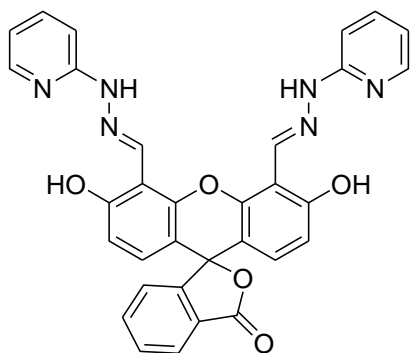


(b)

รูปที่ 1.9 (a) โครงสร้างของสาร

(b) สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารเมื่อจับกับไอออนโลหะชนิดต่าง ๆ ในสารละลายน้ำ

ในปี ค.ศ.2015 S. Kambam และคณะ [33] ได้สังเคราะห์สารที่เป็นอนุพันธ์ของ fluorescein (รูปที่ 1.10a) พบว่า สารดังกล่าวให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ (รูปที่ 1.10b) ดีเมื่อจับกับ Au^{3+} ในสารละลายน้ำ ($\lambda_{ex}=493\text{ nm}$) เมื่อสังเกตได้ด้วยตาเปล่าจะเห็นการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายเมื่อเติม Au^{3+} ใน probe การเพิ่มการเรืองแสงนั้นเกิดจากการไฮโดรไลซิสของพันธะ C=N ที่ผันกลับไม่ได้ซึ่งเกิดจาก Au^{3+} อีกทั้งสารนี้ยังสามารถตรวจวัด Au^{3+} ภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตได้



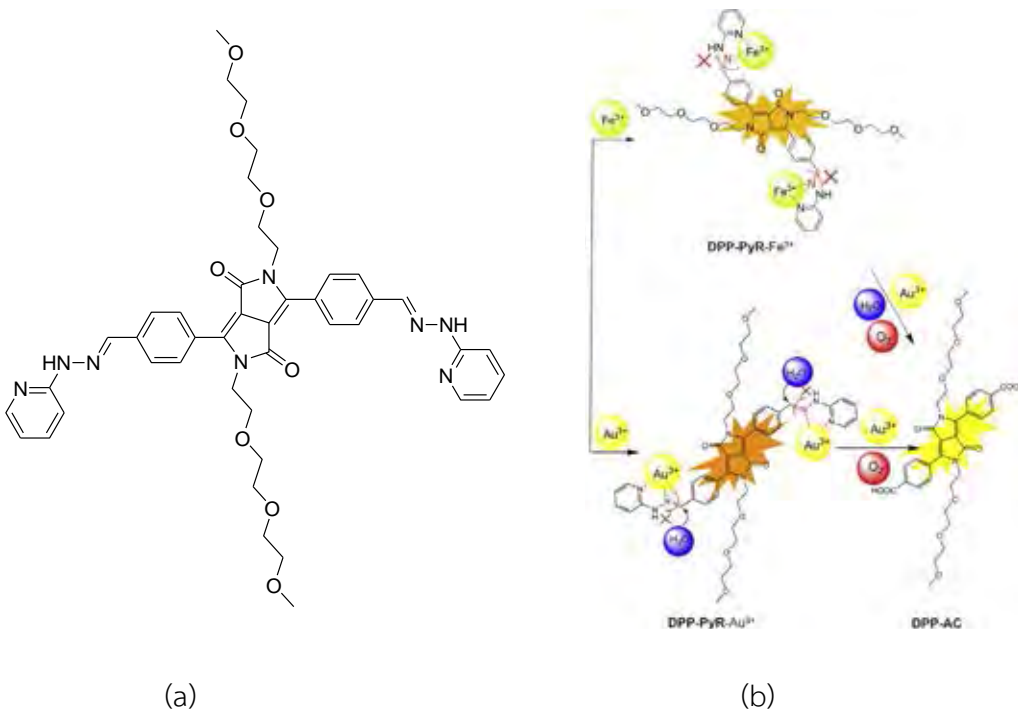
(a)

(b)

รูปที่ 1.10 (a) โครงสร้างของสาร

(b) สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เมื่อเติมไอออนชนิดต่าง ๆ ในสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES

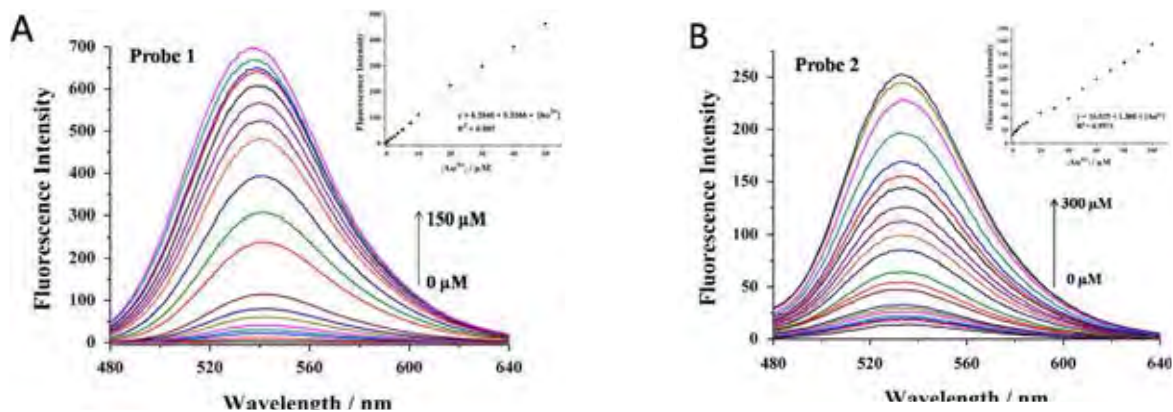
ในปี ค.ศ.2016 X. Yang และคณะ [34] ได้สังเคราะห์สารที่มีวง diketopyrrolopyrrole (รูปที่ 1.11a) พบว่า สารนี้มีคุณสมบัติในการตรวจวัดไอออนโลหะได้ 2 ชนิดพร้อมกัน คือ Fe^{3+} และ Au^{3+} ซึ่งทั้งสองไอออนนี้ต่างให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์แบบ turn-on ที่ความยาวคลื่น (λ_{ex}) เท่ากับ 465 นาโนเมตรในสารละลายของ EtOH/PBS buffer (1:1 v/v) สาเหตุที่สารตัวนี้สามารถตรวจวัดได้ทั้งสองไอออนนี้ เนื่องจากเมื่อ probe จับกับ Fe^{3+} จะถูกยับยั้งการเกิด isomerization ของ C=N เนื่องจาก probe เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับ Fe^{3+} จากนั้นเมื่อเข้าสู่เซลล์สิ่งมีชีวิต สารเชิงซ้อนนี้จะถูกไฮโดรไลซ์ด้วยน้ำและออกซิเดชันด้วย O_2 ซึ่งทำให้ probe นี้สามารถตรวจวัด Au^{3+} ได้ (รูปที่ 1.11b)



รูปที่ 1.11 (a) โครงสร้างของสาร

(b) แผนภาพแสดงการจับกันระหว่างสารกับ Fe^{3+} และ Au^{3+}

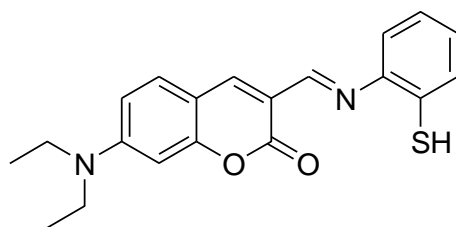
ในปี ค.ศ.2016 Y.Li และคณะ [35] ได้สังเคราะห์สารที่เป็นอนุพันธ์ของ naphthalimide (รูปที่ 1.12a) พบว่า probe 1 และ probe 2 ให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ในสารละลายที่ต่างกัน กล่าวคือ probe 1 จะเกิดสัญญาณในสารละลาย EtOH/H₂O (0.5%EtOH) ส่วน probe 2 เกิดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ในสารละลาย EtOH/H₂O (40%EtOH) ซึ่งการมีสัดส่วนของ EtOH ที่น้อยกว่าจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจาก hydroxy เป็น alkoxy ซึ่งจะเกิดการยับยั้งการเกิดกระบวนการ PET โดย probe 1 จะเกิดสัญญาณเมื่อเติม Au³⁺ กับ Au⁺ ลงไป แต่ Au³⁺ นั้นจะให้สัญญาณที่เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนมากกว่า Au⁺ เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ของ Au⁺



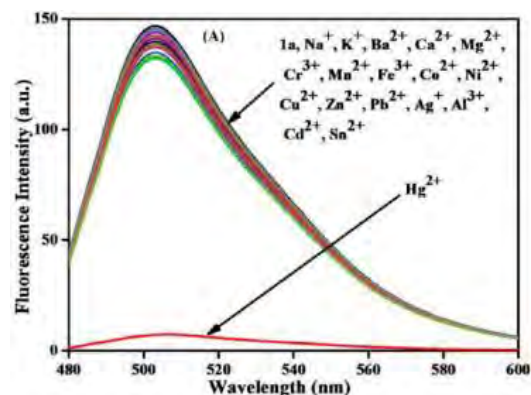
รูปที่ 1.12 (A) โครงสร้างของ probe 1 และสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เมื่อเติมไอออนชนิดต่าง ๆ ในสารละลาย EtOH/H₂O (0.5%EtOH)

(B) โครงสร้างของ probe 1 และสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เมื่อเติมไอออนชนิดต่าง ๆ ในสารละลาย EtOH/H₂O (0.4%EtOH)

ในปี ค.ศ.2017 Shaily และคณะ [36] ได้สังเคราะห์อนุพันธ์ของ coumarin-thiol (รูปที่ 1.13a) พบว่าสารดังกล่าวสามารถให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ลดลง (รูปที่ 1.13b) ที่ความยาวคลื่น 466 นาโนเมตรเมื่อจับกับ Hg^{2+} ด้วยอัตราส่วน 1:1 โดยมีค่าการจับเท่ากับ $5.549 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ สารนี้สามารถสร้างใหม่และนำกลับมาใช้ใหม่ได้โดยการกำจัดโลหะออกด้วย CN^- สารเชิงซ้อนของ $\text{sensor} + \text{Hg}^{2+}$ สามารถนำไปตรวจวัด CN^- ได้ และให้สเปกตรัมการดูดกลืนแสงและคายแสงใหม่ การเปลี่ยนสีที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่าเปลี่ยนจากสีเหลืองเขียวเป็นสีส้มทำให้ sensor นี้มีความพิเศษที่สามารถตรวจวัดได้ทั้ง Hg^{2+} และ CN^-



(a)

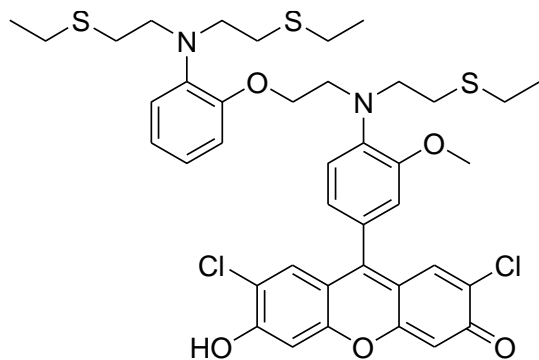


(b)

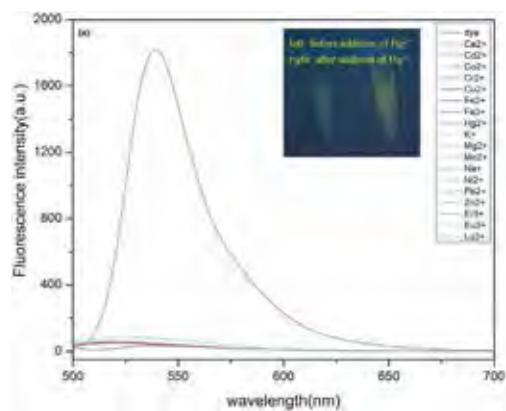
รูปที่ 1.13 (a) โครงสร้างของสาร

(b) สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เมื่อจับกับไอออนต่าง ๆ

ในปี ค.ศ. 2018 D.Liu และคณะ [37] ได้สังเคราะห์อนุพันธ์ของ coumarin (EDPMA) (รูปที่ 1.14a) พบว่าสามารถจับกับ Hg^{2+} ได้อย่างจำเพาะด้วยอัตราส่วน 1:1 และให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 539 นาโนเมตร (รูปที่ 1.14b) ในสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES อีกทั้งยังศึกษาการตรวจวัด Hg^{2+} ในเซลล์สิ่งมีชีวิต ซึ่งสารตัวนี้มีคุณสมบัติคือ สามารถผ่านเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์ของสิ่งมีชีวิตได้ดีจึงทำให้สามารถตรวจวัด Hg^{2+} ในเซลล์ได้



(a)



(b)

รูปที่ 1.14

(a) โครงสร้างของสาร

(b) สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เมื่อจับกับไอออนชนิดต่าง ๆ ในสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES

1.4 วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย

1. พัฒนาการสังเคราะห์ 1,4-ไดไฮโดรพิริดีนที่มีหมู่ไทออลโดยใช้ปฏิกิริยา modified Hantzsch เพื่อตรวจวัดไอออนโลหะ
2. พัฒนานาโนคอมโพสิตระหว่างอนุพันธ์ 1,4-ไดไฮโดรพิริดีนและนาโนพาร์ติเคิลของทองคำ
3. นำสารที่ได้หรือนาโนคอมโพสิตใหม่ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดไอออนโลหะ

บทที่ 2

การทดลอง

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น AB204-S (Mettler Toledo, Thailand)
2. เครื่อง Ultraviolet-visible spectrophotometer Varian Cary 100 Bio (Varian, USA)
3. เครื่อง Fluorescence Spectrophotometer รุ่น LS 45 Luminescence spectrophotometer (Perkin Elmer, UK)
4. เครื่อง Rotary evaporator รุ่น R-200 (Buchi Rotavapor, Germany)
5. แผ่น TLC Silica gel 60 F₂₆₄ aluminum sheet (MERCK, Germany)

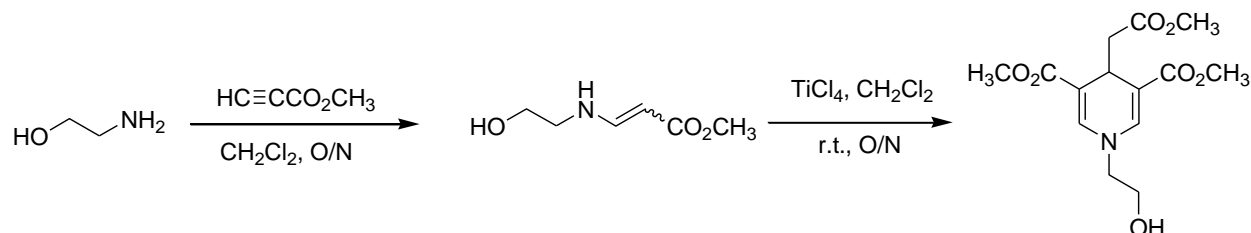
2.2 สารเคมี

1. Tosyl chloride
2. Triethylamine
3. Dichloromethane
4. Ethyl acetate
5. Hexane
6. Chloroform
7. Titanium tetrachloride
8. Di-*tert*-butyl decarbonate
9. 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene

10. 1,2-dithiolethane
11. Sodium sulfate
12. Methyl propiolate
13. 2-aminoethanethiol
14. 6-amino-1-hexanol

2.3 วิธีการสังเคราะห์

2.3.1 การสังเคราะห์ 1,4-dihydropyridine alcohol (DHP-OH)

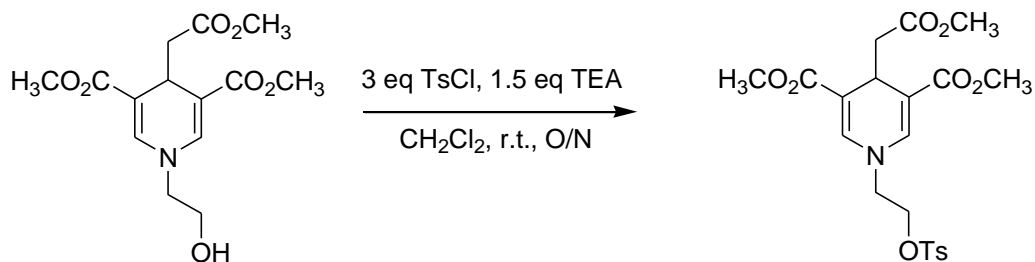


ในสารละลาย ethanolamine (1,010 mg, 16.6 mmol) ในไดคลอโรมีเทน (0.1 M) เติม methyl propiolate (1,670 mg, 1.2 equiv) อย่างช้า ๆ ตั้งปฏิกิริยาไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิห้องภายใต้แก๊สไนโตรเจน นำสารละลายไปทำให้แห้งภายใต้ความดันต่ำเพื่อให้ได้ *N*-aliphatic β -amino acrylates

หลังจากนั้นนำ crude *N*-aliphatic β -amino acrylates มาละลายในสารละลายไดคลอโรมีเทนที่แห้ง (0.1 M) เติม TiCl_4 (0.2 equiv) อย่างช้า ๆ และตั้งปฏิกิริยาไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิห้องภายใต้แก๊สไนโตรเจน จากนั้นเติมน้ำ DI ที่เย็น (25 mL) แล้วสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน (25 mL) เก็บชั้นอินทรีย์มาทำให้เป็นกลางด้วยการเติมสารละลาย 0.1M NaHCO_3 แล้วล้างชั้นอินทรีย์ด้วยน้ำ DI ที่เย็น (3x25 mL) กำจัดน้ำออกด้วยแมกนีเซียมซัลเฟต และระเหยตัวทำละลายให้แห้งภายใต้ความดันต่ำ นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography ($\text{EtOAc/Hexane} = 1:50$ ถึง $1:3$) ได้ 1,4-dihydropyridine alcohol (DHP-OH) เป็นของแข็งสีเหลือง (1.37 g, 4 mmol, 24%); $R_f(\text{EtOAc})$ 0.43; δ_{H} (400 MHz, CDCl_3): 7.18 (2H, s, $\text{CH}=\text{C}$), 4.07 (1H, t, J 4 Hz, CHCH_2CO_2), 3.75 (2H, t, J 4 Hz,

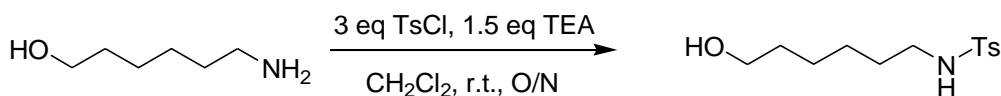
CH_2OH), 3.72 (6H, s, CCO_2CH_3), 3.58 (3H, s, $CH_2CO_2CH_3$), 3.42 (2H, t, J 4 Hz, CH_2N), 2.66 (2H, d, J 4 Hz, $CH_2CO_2CH_3$); δ_C (100 MHz, $CDCl_3$): 174.1, 167.0, 140.5, 105.3, 61.7, 57.6, 51.4, 38.8, 28.7 HRMS (ESI): $[M+Na]^+$, found 336.1034 $C_{14}H_{19}NNaO_7^+$ requires 336.1054

2.3.2 การสังเคราะห์ 1,4-dihydropyridine tosylate (DHP-OTs)



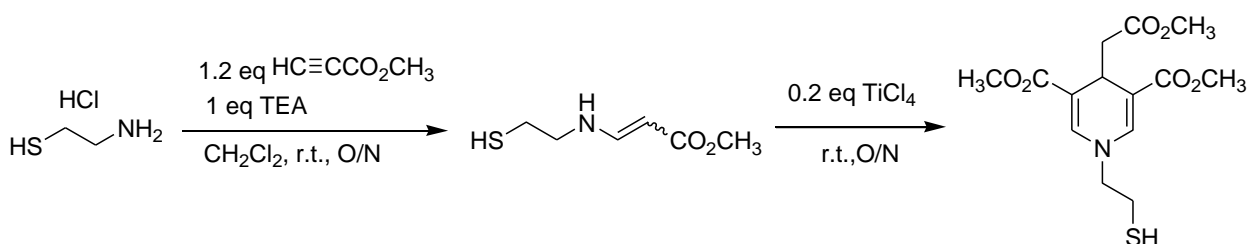
ผสมสาร DHP-OH (500 mg, 1.6 mmol) และ TEA (332 μ L, 1.5 equiv) ในไดคลอโรมีเทน (0.1 M) จากนั้นใส่ TsCl (914 mg, 4.8 mmol, 3.0 equiv) คนสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน เมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์ นำสารละลายไปสกัดด้วยน้ำ (3x25 mL) กำจัดน้ำออกด้วยโซเดียมซัลเฟต และระเหยตัวทำละลาย นำผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography (EtOAc/Hexane = 3:1) เพื่อให้ได้ DHP-OTs ซึ่งมีลักษณะของแข็งสีเหลือง (100 mg, 0.21 mmol, 13%); R_f (75%EtOAc/Hexane) 0.86; δ_H (400 MHz, $CDCl_3$): 7.64 (2H, d, J 8 Hz, $CHCSO_2$) 7.22 (2H, d, J 8 Hz, $CHCCH_3$) 7.01 (2H, s, $CH=C$), 4.15 (1H, t, J 4 Hz, $CHCH_2CO_2CH_3$), 3.98 (2H, t, J 5 Hz, CH_2N), 3.91 (2H, t, J 5 Hz, CH_2OSO_2), 3.60 (6H, s, CO_2CH_3), 3.44 (3H, s, $CH_2CO_2CH_3$), 2.32 (3H, s, CCH_3), 2.23 (2H, d, J 4 Hz, $CH_2CO_2CH_3$); HRMS (ESI); $[M+Na]^+$, found 490.1142 $C_{24}H_{31}NNaO_9S^+$ requires 490.1140

2.3.3 การสังเคราะห์ 6-NHTs-1-hexanol



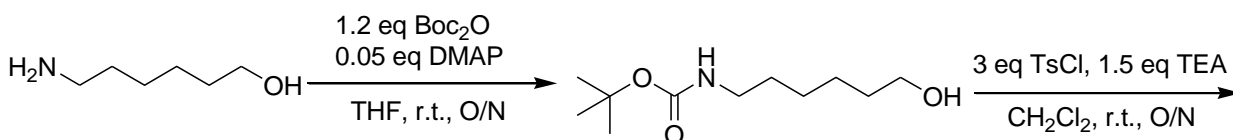
ผสม 6-amino-1-hexanol (500 mg, 4.27 mmol) และ TEA (889 μ L, 1.5 equiv) ในไดคลอโรมีเทน (0.1 M) จากนั้นใส่ TsCl (2,440 mg, 12.8 mmol, 3.0 equiv) คนสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน เมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์ นำสารละลายไปสกัดด้วยน้ำ (3x25 mL) กำจัดน้ำออกด้วยโซเดียมซัลเฟต และระเหยตัวทำละลาย จะได้ crude oil ซึ่งนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography (EtOAc/Hexane = 3:1) เพื่อให้ได้ 6-NHTs-1-hexanol เป็นของแข็งสีเหลือง (820 mg, 3.00 mmol, 64%); R_f (75% EtOAc/Hexane) 0.25; δ_H (400 MHz, $CDCl_3$): 7.77 (2H, d, J 8 Hz, CH_2SO_2), 7.33 (2H, d, J 8 Hz, CH_2CH_3), 3.63 (2H, t, J 7 Hz, CH_2OH), 2.96 (2H, t, J 7 Hz, CH_2NH), 2.45 (3H, s, CCH_3), 1.57-1.45 (4H, m, $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2OH$), 1.39-1.28 (4H, m, $CH_2CH_2CH_2CH_2OH$)

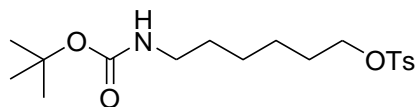
2.3.4 การสังเคราะห์ DHP-SH



ละลายสาร 2-aminoethanethiol (400 mg, 3.52 mmol) ในไดคลอโรมีเทน (0.1 M) เติม methyl propylate (376 μ L, 1.2 equiv) และ TEA (491 μ L, 1.0 equiv) โดยทำปฏิกิริยาภายใต้แก๊สไนโตรเจน แล้วตั้งปฏิกิริยาเป็นเวลา 1 วัน นำสารละลายมาสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน (3x25 mL) กำจัดน้ำออกด้วยโซเดียมซัลเฟตและ ระเหยตัวทำละลาย จากนั้นนำสารไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography (EtOAc/Hexane = 1:1) เพื่อให้ได้ DHP-SH ซึ่งมีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง (100 mg, 0.31 mmol, 6%); R_f (50%EtOAc/Hexane) 0.44; δ_H (400 MHz, $CDCl_3$): 7.08 (2H, s, $CHNCH_2$), 4.09 (1H, t, J 5 Hz, $CHCH_2CO_2CH_3$), 3.66 (6H, s, CCO_2CH_3), 3.53 (3H, s, $CH_2CO_2CH_3$), 3.49 (2H, d, J 7 Hz, CH_2CH_2SH), 2.98 (2H, t, J 7 Hz, CH_2CH_2SH), 2.42 (2H, d, J 5 Hz, $CHCH_2CO_2CH_3$)

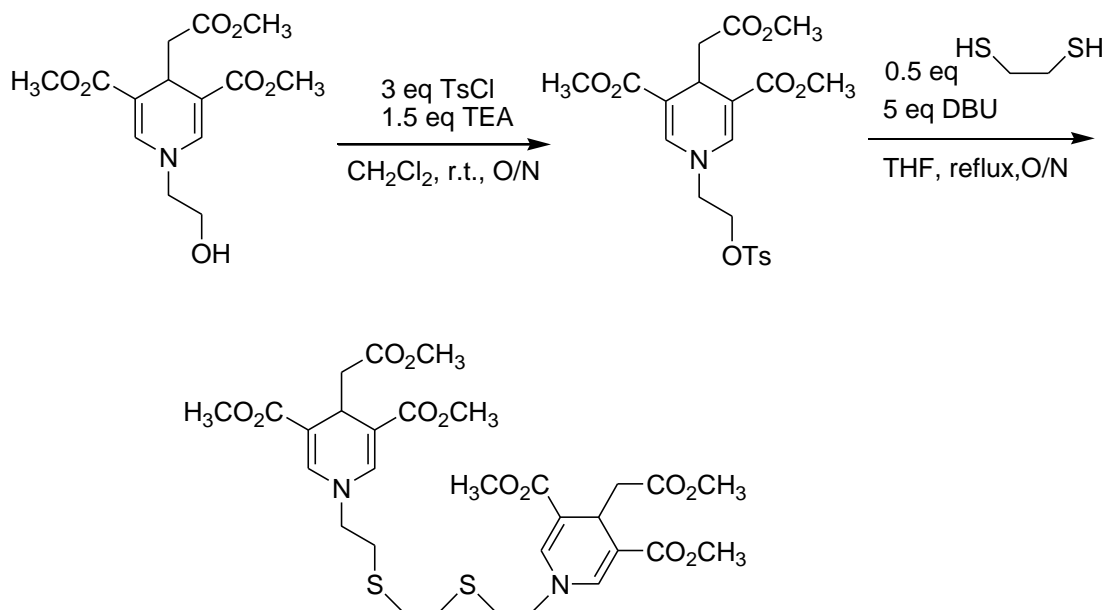
2.3.5 การสังเคราะห์ 6-TsO-1-NHBoc





ผสมสาร 6-amino-1-hexanol (500 mg, 4.27 mmol) กับ Boc_2O (1,180 μL , 1.2 equiv) มาละลายใน THF (5 mL) จากนั้นเติม DMAP (26.1 mg, 0.21 mmol, 0.05 equiv) แล้วตั้งปฏิกิริยาไว้ 1 วัน จากนั้นจึงเติม TsCl (2,442 mg, 12.8 mmol, 3.0 equiv) และ TEA (880 μL , 1.5 equiv) ในไดคลอโรมีเทน (5 mL) ตั้งปฏิกิริยาทิ้งไว้ 1 วัน หลังจากนั้นทำให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography (EtOAc/Hexane = 1:4) เพื่อให้ได้ 6-TsO-1-NHBoc ซึ่งมีลักษณะเป็นสารละลายใส ไม่มีสี (100 mg, 0.27 mmol, 6%); R_f (25%EtOAc/Hexane) 0.39; δ_H (400 MHz, CDCl_3): 7.71 (2H, d, J 8 Hz, CHCOSO_2), 7.27 (2H, d, J 8 Hz, CHCCH_3), 3.94 (2H, t, J 6 Hz, CH_2NH), 2.98 (2H, t, J 6 Hz, CH_2OSO_2), 2.37 (3H, s, OCH_3), 1.64-1.48 (4H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OSO}_2$), 1.36 (9H, s, $(\text{CH}_3)_3\text{O}$), 1.28-1.11 (4H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OSO}_2$)

2.3.6 การสังเคราะห์ Bis-DHP-SS



นำสาร DHP-OTs (500 mg, 1.07 mmol) ละลายใน THF (10 mL) แล้วนำไปตั้งรีฟลักซ์ จากนั้นเติม 1,2-dithioethane (45 μL , 0.5 equiv) และ DBU (798 μL , 5 equiv) จากนั้นตั้งปฏิกิริยาไว้ 1 วัน แล้วนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography (EtOAc/DCM = 1:1) พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ 2 ตัว คือ Mono-DHP-SS และ Bis-DHP-SS ได้สารเป็นของแข็งสีเหลือง (80 mg, 117 μmol , 11%); R_f (50% EtOAc/DCM) 0.40; δ_{H} (400 MHz, CDCl_3): 7.11 (2H, s, CHN), 4.05 (2H, q, J 7 Hz, CHCH_2CO_2), 3.67 (12H, s, CCO_2CH_3) 3.52 (6H, d, J 6 Hz, $\text{CHCH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$), 3.47 (4H, t, J 7 Hz, CH_2N), 2.81 (2H, s, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 2.72 (4H, t, J 7 Hz, CH_2S), 2.41 (4H, d, J 5 Hz, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$) HRMS (ESI); $[\text{M}]^+$, found 684.1965 $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{NNaO}_9\text{S}^+$ requires 684.2023

2.4 การศึกษาการดูดกลืนและคายแสงของอนุพันธ์ DHP (DHP-SH และ Bis-DHP-SS) ในตัวทำละลายต่าง ๆ

เตรียม stock solution ของ fluorophore โดยละลายสาร 0.1 mmol ของ DHP-SH และ Bis-DHP-SS ใน DMSO (10 mL) เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 10 mM ของ DHP-SH และ Bis-DHP-SS

2.4.1 UV-Vis Spectrophotometer

กราฟการดูดกลืน UV-Vis ของ stock solution ของ fluorophore ถูกบันทึกจากความยาวคลื่นตั้งแต่ 300 nm ถึง 600 nm ที่อุณหภูมิคงที่

2.4.2 Fluorescence Spectrophotometer

ความเข้มข้นของ stock solution ของ fluorophore คือ 10 mM กราฟการคายแสงของสารถูกบันทึกตั้งแต่ความยาวคลื่นตั้งแต่ 360 nm ถึง 650 nm ที่อุณหภูมิคงที่ ซึ่งใช้ความยาวคลื่นกระตุ้นที่ 370 nm (DHP-SH), 360 nm (Bis-DHP-SS) ที่ได้จากความยาวคลื่นดูดกลืนของเครื่อง UV-Vis

2.5 การเตรียม stock solution ของนาโนคอมโพสิต

2.5.1 เตรียมสารละลาย AuNP

ชั่งสาร $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 998 mg ในน้ำ 50 mL ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 4.8×10^{-2} M แล้วนำไปเจือจางให้ได้ความเข้มข้นเป็น 2.5×10^{-4} M จากนั้นนำสารละลายไปเติมสารละลายซิเตรตเข้มข้น 1%wt ปริมาตร 10.2 และ 1.4 mL นำไปรีฟลักซ์เป็นเวลา 1 ชั่วโมงและตั้งทิ้งไว้ข้ามคืนให้สารละลายเย็น

2.5.2 เตรียมสารละลาย AgNP

ชั่ง AgNO_3 36 mg ในน้ำ 200 mL จากนั้นเติมสารละลายซิเตรตเข้มข้น 1%wt ปริมาตร 4 mL 2 หลอด ตั้งรีฟลักซ์เป็นเวลา 1 ชั่วโมงและตั้งทิ้งไว้ข้ามคืนให้สารละลายเย็น

2.5.3 เตรียม stock solution ของ DHP-SH

ชั่ง DHP-SH 1.800 mg ละลายด้วยน้ำ MilliQ 25 mL

2.5.4 เตรียมนาโนพาร์ติเคิลที่จับกับ DHP-SH

ปิเปตนาโนพาร์ติเคิล (AuNP และ AgNP) มา 2 mL ผสมกับ DHP-SH 2 mL จากนั้นตั้งปฏิกิริยาไว้ข้ามคืน เมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์จะสังเกตเห็นตะกอนและการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย นำมา centrifuge และล้างตะกอนด้วย EtOAc จนกระทั่ง DHP-SH

2.5.5 การศึกษาการเลือกจับจำเพาะของนาโนพาร์ติเคิล (AuNP, AgNP) และ DHP-SH และไอออนโลหะชนิดต่าง ๆ

เตรียมความเข้มข้นของ stock solution ของ AuNP กับ DHP-SH และ AgNP กับ DHP-SH ความเข้มข้น 1%w/v

บทที่ 3

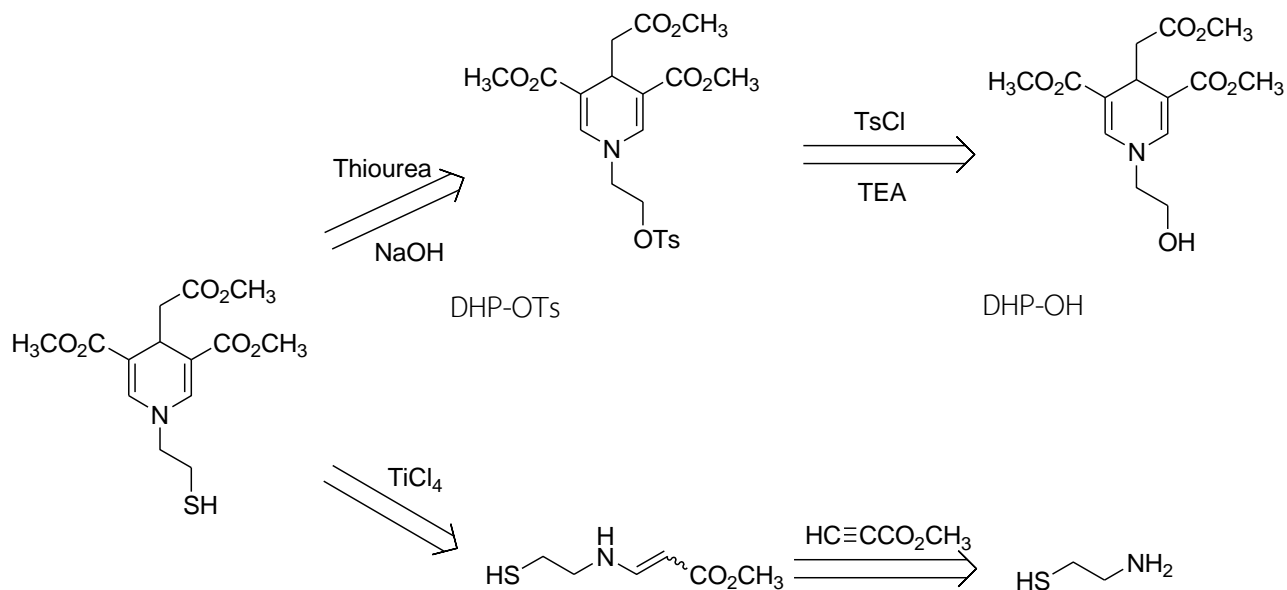
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

3.1 การสังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์โครงสร้าง

ในการสังเคราะห์ DHP-SH มีวิธีในการสังเคราะห์ 2 วิธี คือ

1. สังเคราะห์จาก DHP-OH ด้วยการนำไปทำปฏิกิริยากับ tosyl chloride และ triethylamine จะได้ผลิตภัณฑ์เป็น DHP-OTs จากนั้นนำไปทำต่อกับ thiourea และ NaOH ซึ่งจะได้ DHP-SH (รูปที่ 3.1)

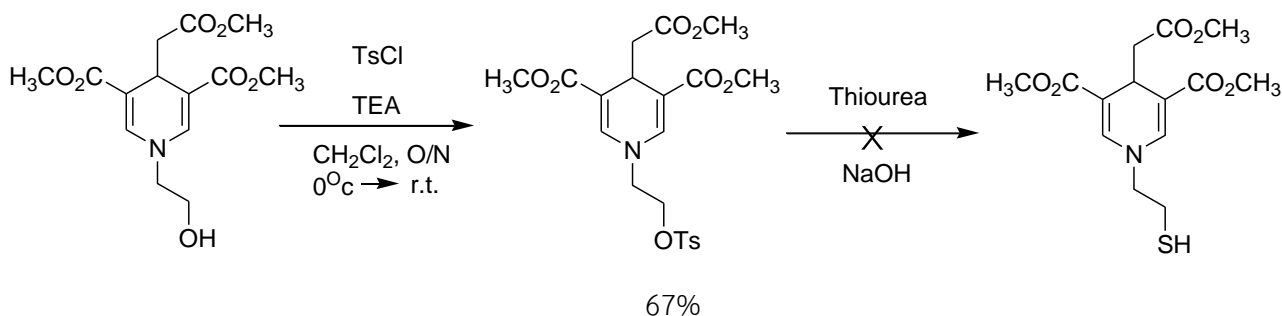
2. สังเคราะห์จาก 1,2-ethanethiol ด้วยการนำไปทำปฏิกิริยากับ methyl propiolate จะได้ *N*-aliphatic amino acrylates จากนั้นนำไปทำกับ $TiCl_4$ โดยปฏิกิริยา cyclization (รูปที่ 3.1)



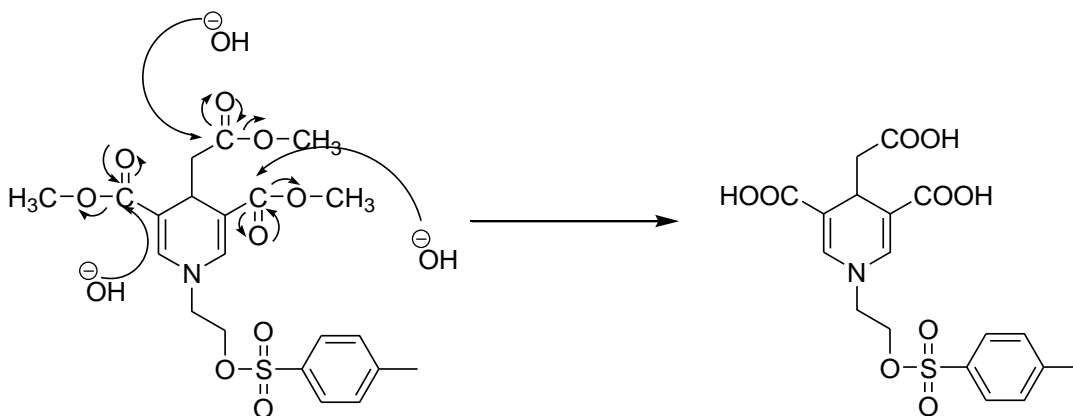
รูปที่ 3.1 การสังเคราะห์ DHP-SH

ในวิธีแรกได้ทำการสังเคราะห์ DHP-OTs จาก DHP-OH ด้วยการทำปฏิกิริยากับ TsCl โดยมี TEA เป็นเบสสามารถให้ผลิตภัณฑ์เป็น DHP-OTs ด้วยร้อยละผลิตภัณฑ์ที่ 67% จากนั้นนำ DHP-OTs ไปทำการสังเคราะห์ DHP-SH ด้วย thiourea และ NaOH แต่ผู้วิจัยไม่สามารถสังเคราะห์ DHP-SH ได้ (รูปที่

3.2a) เนื่องจากผู้วิจัยใช้ NaOH ที่ทำหน้าที่เป็นเบสค่อนข้างแรง ($pK_b = -1.8$) จึงสามารถเกิดไฮโดรไลซิสของ รงหมู่เอสเทอร์กลายเป็น tricarboxylic acid ได้ (รูปที่ 3.2b)

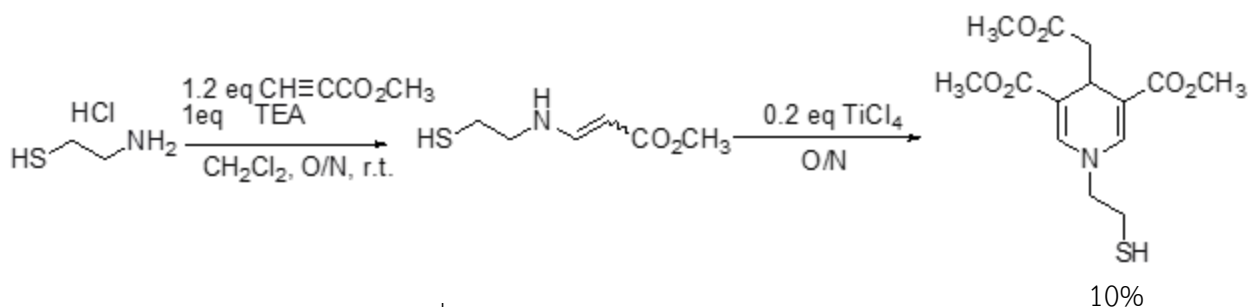


รูปที่ 3.2a ปฏิกริยาการสังเคราะห์ DHP-SH



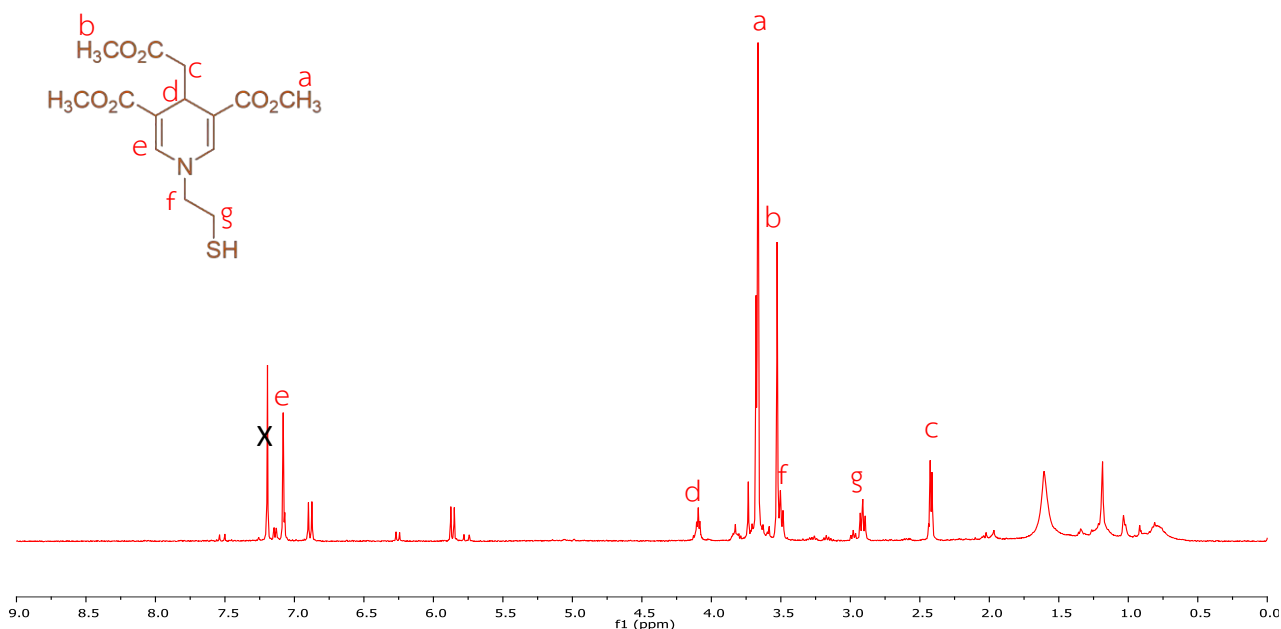
รูปที่ 3.2b กลไกการเกิด tricarboxylic acid

จากสาเหตุข้างต้น ผู้วิจัยจึงเปลี่ยนวิธีในการสังเคราะห์มาเป็นวิธีที่ 2 โดยอาศัยปฏิกิริยา Hantzsch และ Michael addition ด้วย $TiCl_4$ โดยเริ่มจาก 2-aminoethanethiol ทำปฏิกิริยากับ methyl propiolate โดยมี triethylamine เป็นเบสเพื่อให้เกลือ HCl ของสารตั้งต้นละลายเพิ่มขึ้นเพื่อให้ปฏิกิริยาดำเนินไปข้างหน้าได้อย่างเหมาะสม ได้ผลิตภัณฑ์เป็น β -aminoacrylates ซึ่งทำการระเหยตัวทำละลายภายใต้ความดันต่ำก่อนนำไปทำปฏิกิริยากับ $TiCl_4$ จะได้ DHP-SH (รูปที่ 3.3) เป็นของแข็งสีเหลือง ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ที่น้อย (10%) เนื่องจากอาจเหลือสารตั้งต้นเยอะ



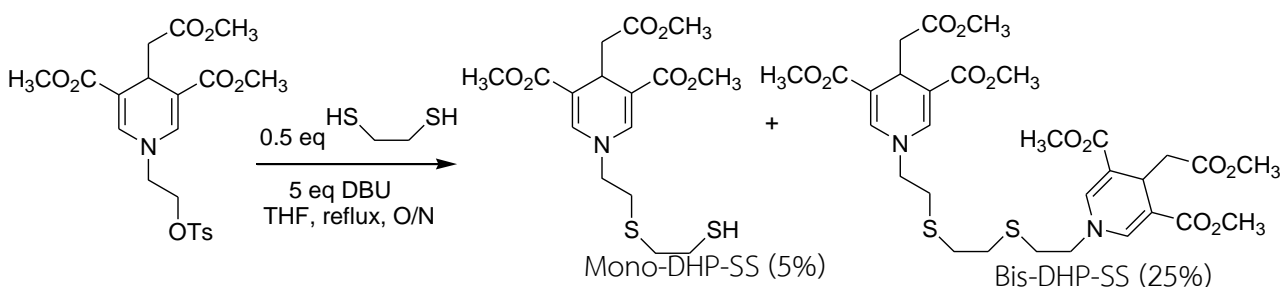
ต่อมาทำการยืนยันโครงสร้างของ DHP-SH ด้วย ^1H NMR พบว่า มีจำนวนข้อมูลทั้งหมด 7 ชุด โดยสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ) 7.08 และ 4.09 ppm (e และ d ตามลำดับ) เป็นโปรตอนบนวงอะโรมาติก เนื่องจากโปรตอน e อยู่ใกล้กับอะตอมไนโตรเจนจึงทำให้สัญญาณไปทาง downfield มากกว่าโปรตอน d สัญญาณที่ 3.66-3.51 ppm (a และ b) เป็นโปรตอนของเมทิลตรงหมู่เอสเทอร์ โดยโปรตอน a อยู่ใกล้กับพันธะคู่และอะตอมไนโตรเจนเป็นผลให้สัญญาณขึ้นที่ downfield มากกว่า b สัญญาณที่ 3.50 ppm และ 2.98-2.91 ppm (f และ g ตามลำดับ) เป็นโปรตอนบนสายไทออล โดยโปรตอน f อยู่ใกล้กับอะตอมไนโตรเจนมากกว่าโปรตอน g ซึ่งเป็นตัวดึงอิเล็กตรอนจึงทำให้โปรตอน f เกิด downfield มากกว่า g สัญญาณที่ 2.42 ppm (c) เป็นโปรตอนของเมทิลีน (รูปที่ 3.4) และเมื่อสังเกต ^1H NMR พบว่าเกิด peak ที่ไม่ต้องการเกิดขึ้น ซึ่งทางผู้วิจัยได้ทำการแยกคอลัมน์ซ้ำหลายรอบแต่ปรากฏว่า peak นั้นก็ไม่หายไป จากนั้นจึงนำไปตกผลึกด้วยเฮกเซนซึ่งพบว่า peak นั้นยังปรากฏอยู่ ผู้วิจัยจึง

สันนิษฐานว่า peak ดังกล่าวอาจเกิดเป็น by product ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาซึ่งผู้วิจัยยังไม่ทราบดีว่าเป็นสารใดหรือ SH นั้นไม่เสถียรเนื่องจากสามารถเกิดออกซิไดซ์กับออกซิเจนในอากาศได้



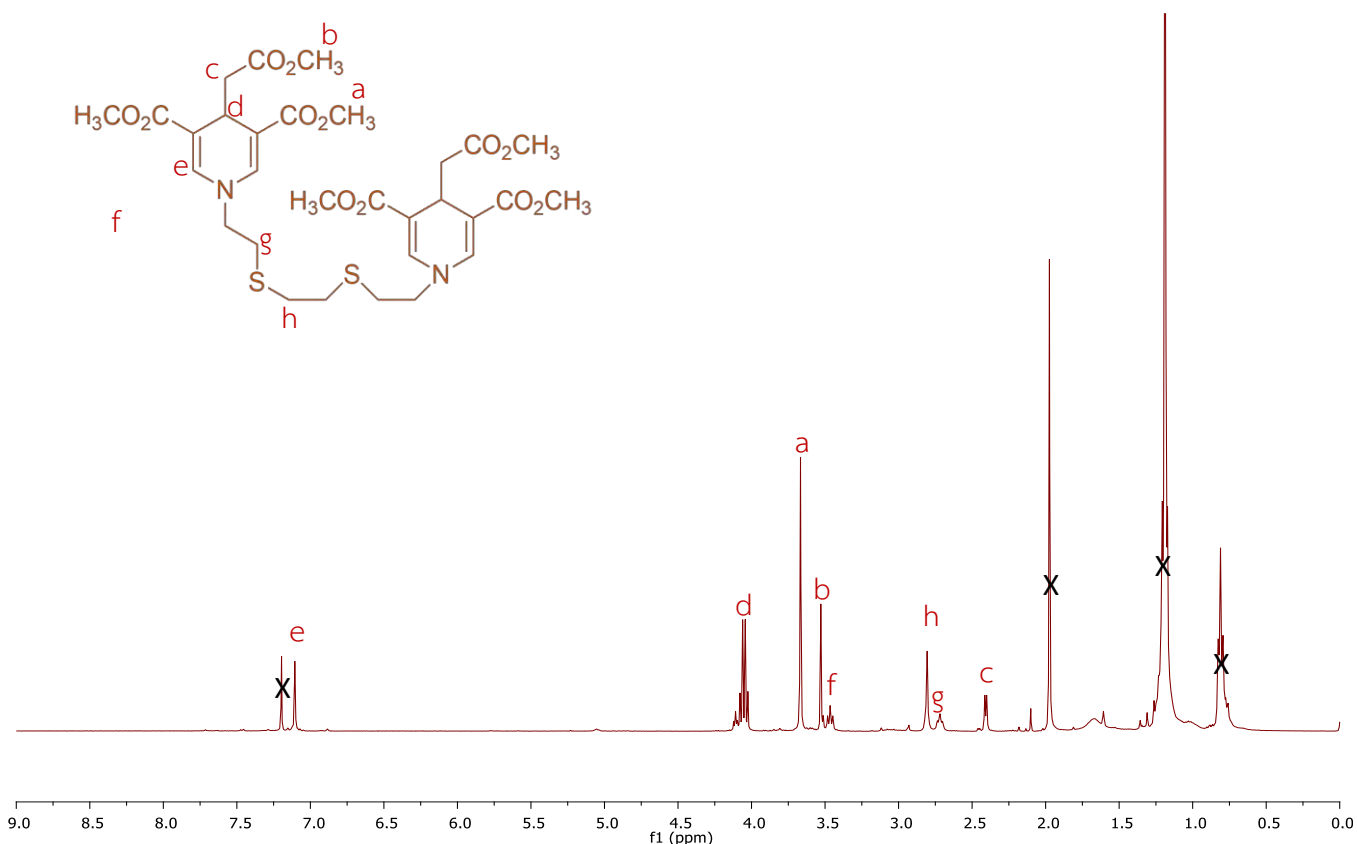
รูปที่ 3.4 ^1H NMR ของ DHP-SH

ต่อมาได้สังเคราะห์ Bis-DHP-SS จากการนำ DHP-OTs ทำปฏิกิริยากับ 1,2-dithioethane โดยอาศัยปฏิกิริยา $\text{S}_{\text{N}}2$ (รูปที่ 3.5) และ 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) ทำหน้าที่เป็นเบสซึ่งจะไป deprotonate โปรตอนของ SH กับ 1,2-dithioethane โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้มี 2 ชนิด คือ Mono-DHP-SS และ Bis-DHP-SS (รูปที่ 1.2) ซึ่ง Mono-DHP-SS เป็น by product ที่เกิดขึ้น โดยที่ Mono-DHP-SS มีชั้วมากกว่า Bis-DHP-SS เมื่อแยกออกมาด้วยวิธี column chromatography ซึ่งใช้ silica gel พบว่า Bis-DHP-SS ออกมาก่อน ผู้วิจัยจึงทำการเก็บสารละลายและนำไปทดสอบสมบัติการดูดกลืนแสง และเนื่องจากผู้วิจัยต้องการ Bis-DHP-SS ไปใช้ในการทดสอบต่อไป ผู้วิจัยจึงได้ทำการปรับ eq ของ DHP-OTs และเพิ่มเวลาในการตั้งปฏิกิริยาเพื่อให้ได้ Bis-DHP-SS (25%)



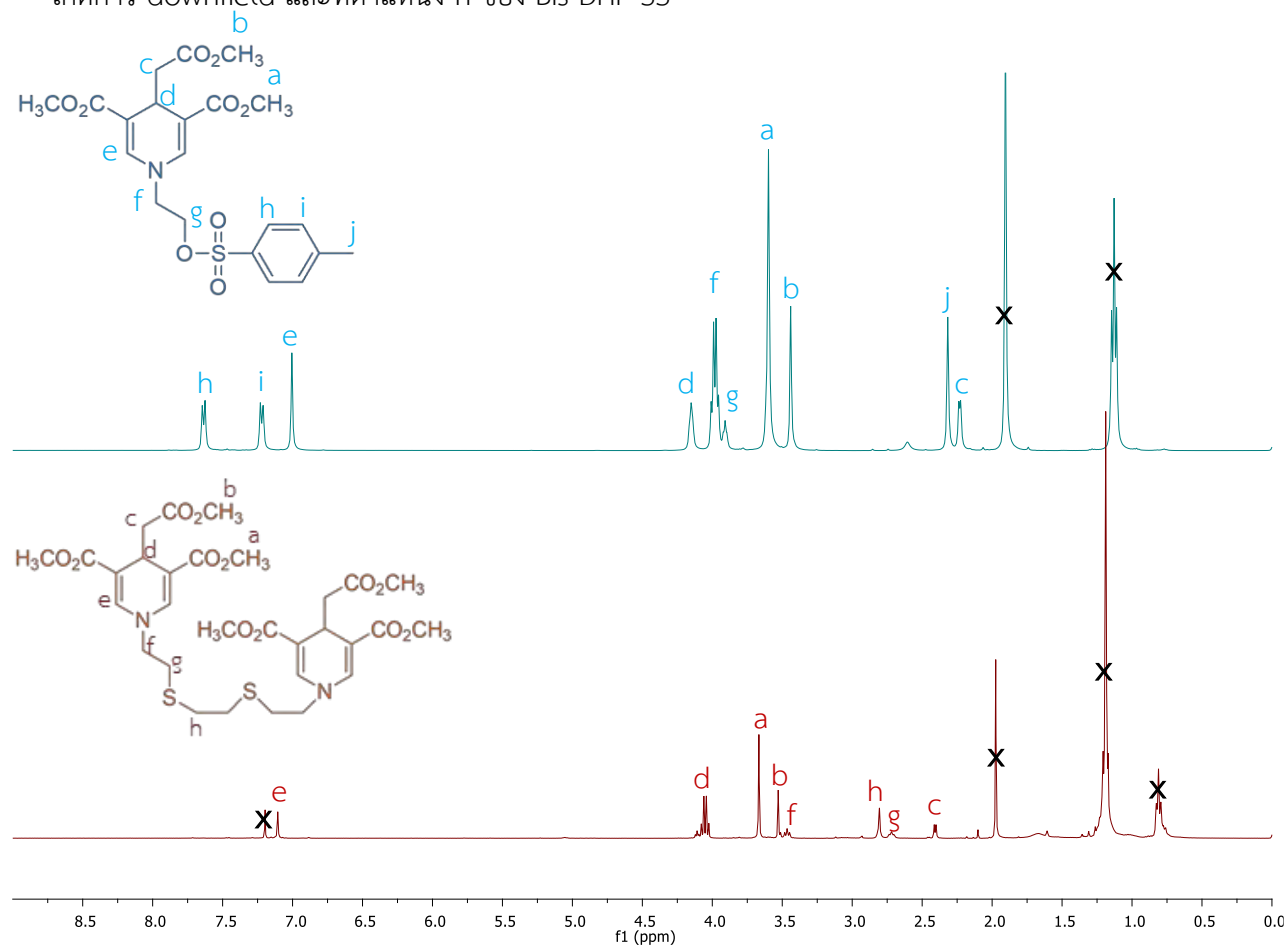
รูปที่ 3.5 การสังเคราะห์ Bis-DHP-SS

เมื่อทำการพิสูจน์โครงสร้างของสาร Bis-DHP-SS ด้วย ^1H NMR พบว่า มีจำนวนข้อมูลทั้งหมด 8 ชุด โดยสัญญาณที่ 7.11 และ 4.07 ppm (e และ d ตามลำดับ) เป็นโปรตอนบนวงอะโรมาติก ซึ่งโปรตอน e อยู่ใกล้กับอะตอมไนโตรเจนที่เป็นหมู่ดึงอิเล็กตรอนทำให้สัญญาณไปทาง downfield มากกว่าโปรตอน d สัญญาณที่ 3.67 และ 3.52 ppm เป็นโปรตอนของเมทิลตรงหมู่เอสเทอร์ สัญญาณที่ 3.66-3.51 ppm (a และ b) เป็นโปรตอนของเมทิลตรงหมู่เอสเทอร์ โดยโปรตอน a อยู่ใกล้กับพันธะคู่และอะตอมไนโตรเจน เป็นผลให้สัญญาณขึ้นที่ downfield มากกว่า b สัญญาณที่ 3.47 และ 2.72 ppm (f และ g ตามลำดับ) เป็นของโปรตอนบนสายไทออล สัญญาณที่ 2.81 ppm (h) เป็นโปรตอนที่ต่ออยู่กับซัลเฟอร์ สัญญาณที่ 2.41 ppm (c) เป็นโปรตอนของเอทิลีน

รูปที่ 3.6 ^1H NMR ของ Bis-DHP-SS

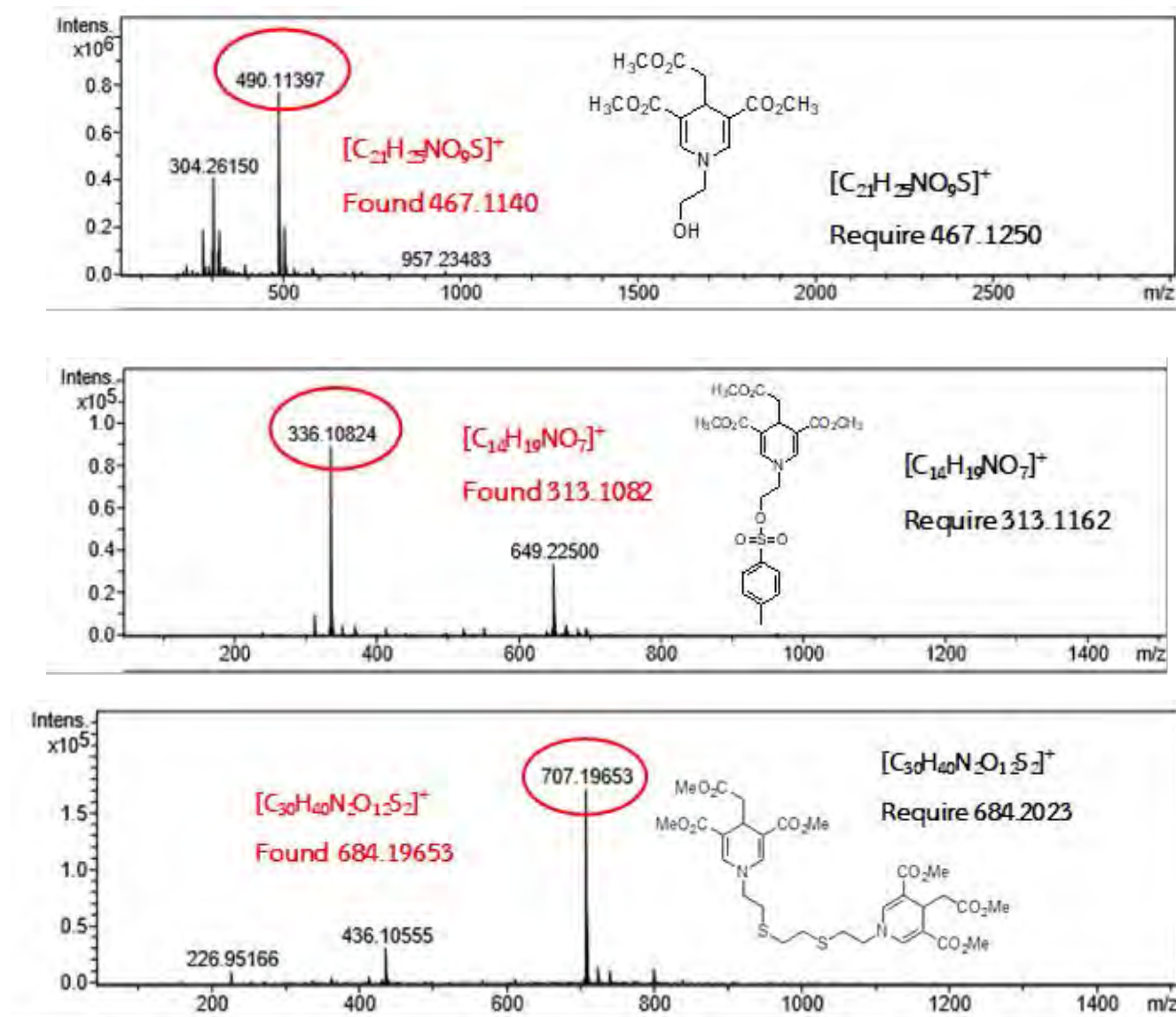
เมื่อนำ ^1H NMR มาเปรียบเทียบกันระหว่างสารตั้งต้น (DHP-OTs) และผลิตภัณฑ์ (Bis-DHP-SS) ดังรูปที่ 3.7 พบว่า DHP-OTs ให้สัญญาณ ^1H NMR จำนวน 10 ชุด ในขณะที่ Bis-DHP-SS ให้สัญญาณ

^1H NMR จำนวน 8 ชุด ที่ตำแหน่งของโปรตอน f และ g เกิดการ upfield เนื่องจากออกซิเจนมีค่า EN มากกว่าซัลเฟอร์ จึงทำให้ความหนาแน่นอิเล็กตรอนของโปรตอนน้อยกว่า เป็นผลให้ค่า chemical shift มากกว่า เนื่องจากการเปลี่ยนหมู่ OTs เป็น SH ทำให้สัญญาณโปรตอนที่ตำแหน่ง a, b, c, d และ e นั้น เกิดการ downfield และที่ตำแหน่ง h ของ Bis-DHP-SS



รูปที่ 3.7 ^1H NMR ของอนุพันธ์ DHP

การพิสูจน์โครงสร้างของอนุพันธ์ DHP ยืนยันโดย HRMS ซึ่งแสดงสัญญาณของ molecular ion ของสารหรือน้ำหนักของโมเลกุลดังแสดงในรูปที่ 3.8 กราฟ HRMS ของ DHP-OH, DHP-OTs และ Bis-DHP-SS สอดคล้องกับน้ำหนักที่ต้องการโดยมีค่าเท่ากับ 467.1140, 313.1082 และ 684.1965 ตามลำดับ



รูปที่ 3.8 HRMS ของอนุพันธ์ DHP

3.2 การศึกษาสมบัติเชิงแสงของสาร

ผลของการศึกษาการดูดกลืนแสงและคายแสงของ 10 μM ของ DHP-SH และ Bis-DHP-SS ในหลายตัวทำละลาย เช่น THF, ACN, DMSO, EtOH และ MilliQ water โดยความยาวคลื่นของการดูดกลืนและคายแสงสูงสุดของสารทั้งสองตัวได้นำมาสรุปในตารางที่ 1 ซึ่ง Bis-DHP-SS มีค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงเท่ากับ $0.0064 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ จากการทดลองจะสังเกตเห็นว่าในตัวทำละลายน้ำ MilliQ มีความยาวคลื่นดูดกลืนแสงและคายแสงมากกว่าในตัวทำละลายอื่น ๆ เนื่องจาก สารทั้งสองตัวมีขั้วและน้ำ MilliQ เป็นตัวทำละลายที่มีขั้วมากสุดในตัวทำละลายอีก 4 ชนิด ทำให้สารจะ stabilize excited state จึงทำให้ระดับพลังงานกระตุ้นลดลงเป็นผลให้ band gap แคบลง ความยาวคลื่นจึงมากกว่า และความยาวคลื่นมีค่าที่ใกล้เคียงกันเนื่องจากสารทั้งสองตัวมีวง dihydropyridine เป็นองค์ประกอบเหมือนกัน

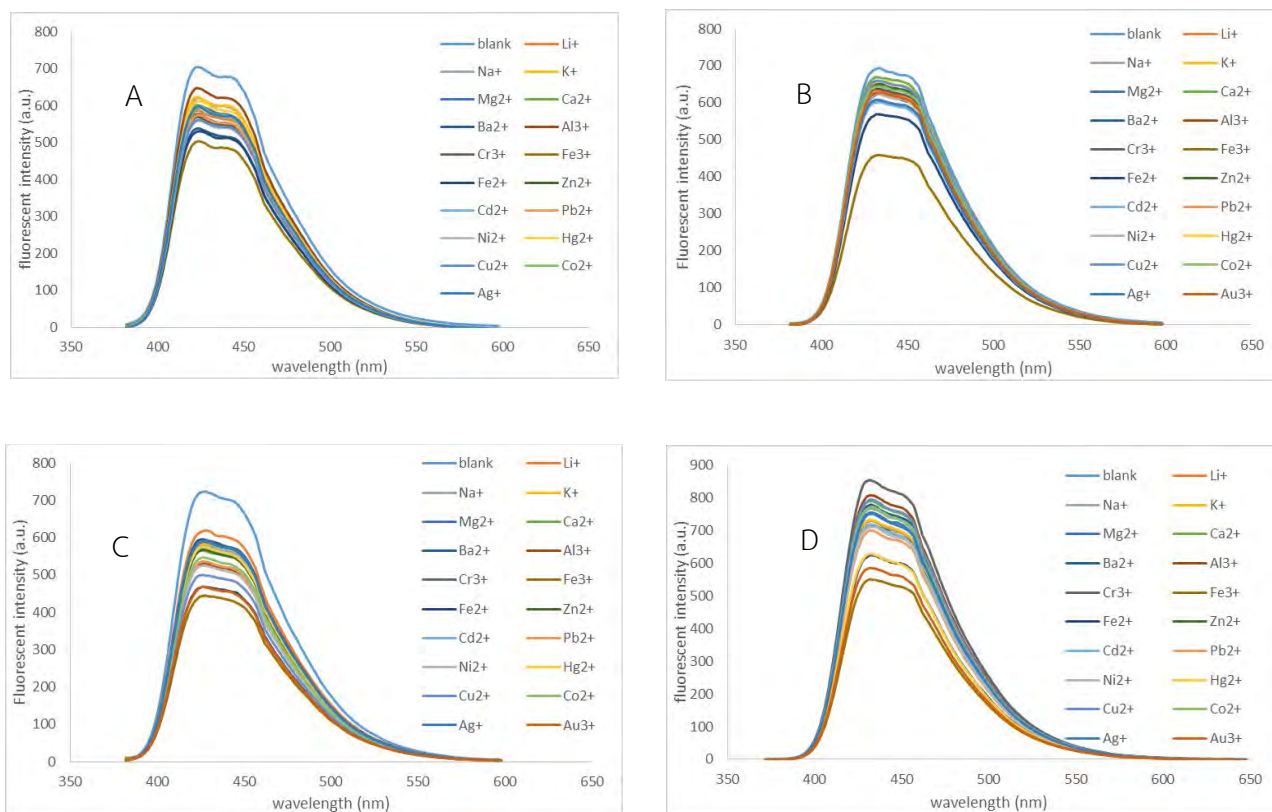
ตารางที่ 1 Photophysical property of DHP series in various solvents

ตัวทำละลาย	DHP-SH		Bis-DHP-SS	
	λ_{ab}	λ_{em}	λ_{ab}	λ_{em}
THF	361	423	366	441
ACN	357	426	358	428
DMSO	362	431	365	433
EtOH	361	433	361	435
MilliQ	365	445	367 ($\epsilon=0.0064$)	446

3.3 Au³⁺ ion sensor

3.3.1 Fluorescent emission of DHP series responding to metal ions

ผู้วิจัยได้ทำการทดลองการตรวจวัดการเลือกจับจำเพาะกับโลหะของอนุพันธ์โดยใช้ Fluorescence spectroscopy เพื่อศึกษาคุณสมบัติในการตรวจวัดไอออนโลหะชนิดต่าง ๆ โดยศึกษาการเลือกจับจำเพาะของ DHP-SH และ Bis-DHP-SS (10 μM) กับไอออนโลหะ 19 ชนิด (100 μM) เช่น Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Al^{3+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ag^+ และ Au^{3+} ในตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด คือ THF, ACN, DMSO และ EtOH พบว่า ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ (รูปที่ 3.9 กับ 3.10 ตามลำดับ) อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยจึงได้ทำการทดลอง DHP-SH ในตัวทำละลาย MilliQ และ Bis-DHP-SS ในสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES พบว่า อนุพันธ์ทั้งสองชนิดให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เลือกจับจำเพาะกับ Au^{3+} (รูปที่ 3.11 กับ 3.12 ตามลำดับ)



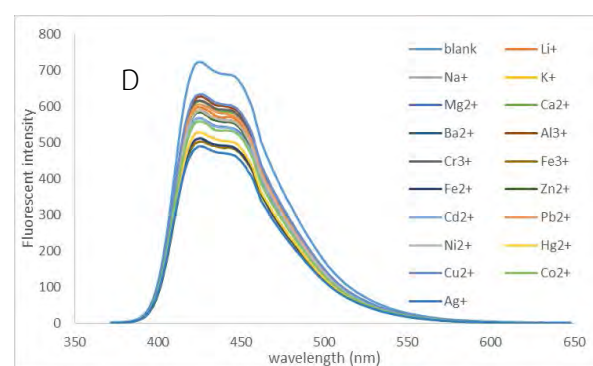
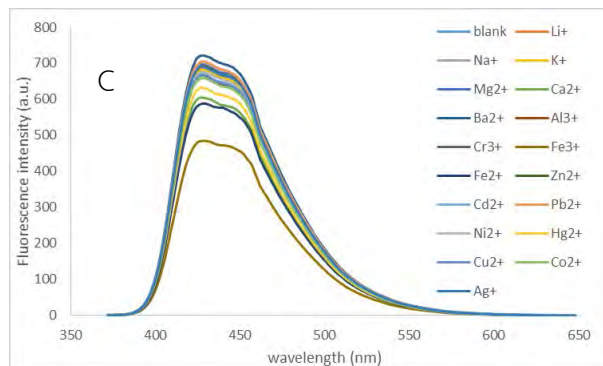
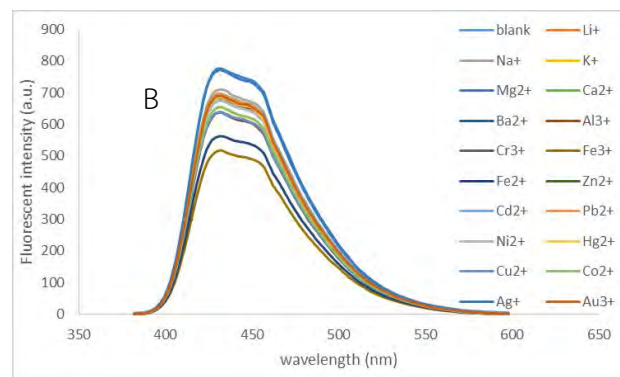
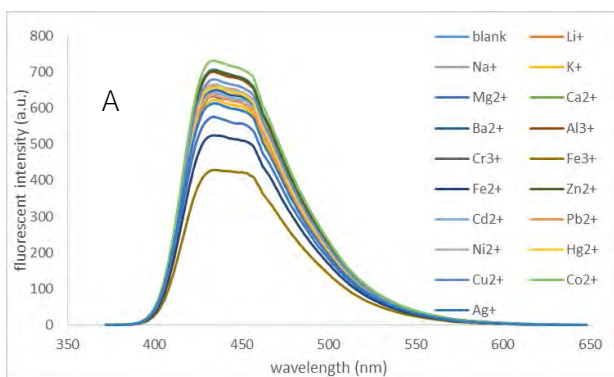
รูปที่ 3.9 Fluorescence spectra of DHP-SH in

A) ACN

B) DMSO

C) THF

D) EtOH



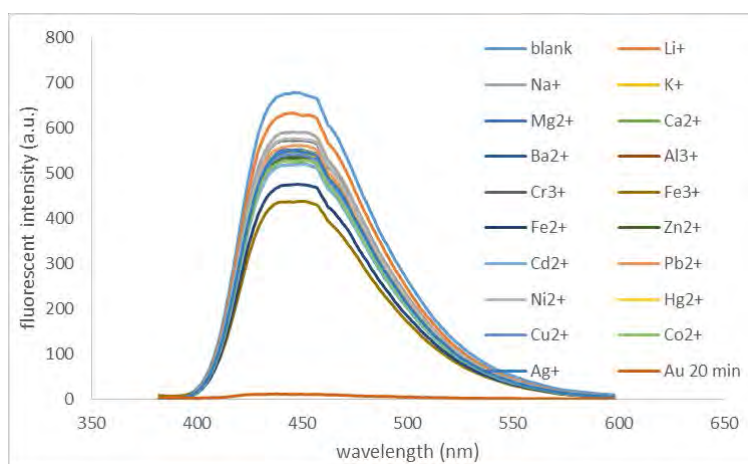
รูปที่ 3.10 Fluorescence spectra of Bis-DHP-SS in

A) ACN

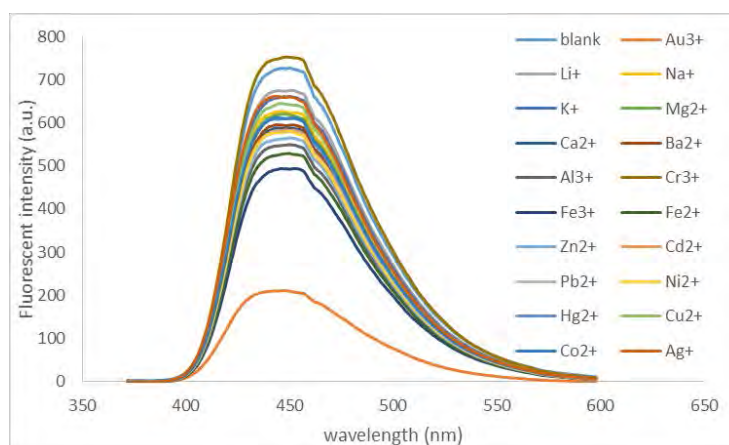
B) EtOH

C) THF

D) DMSO



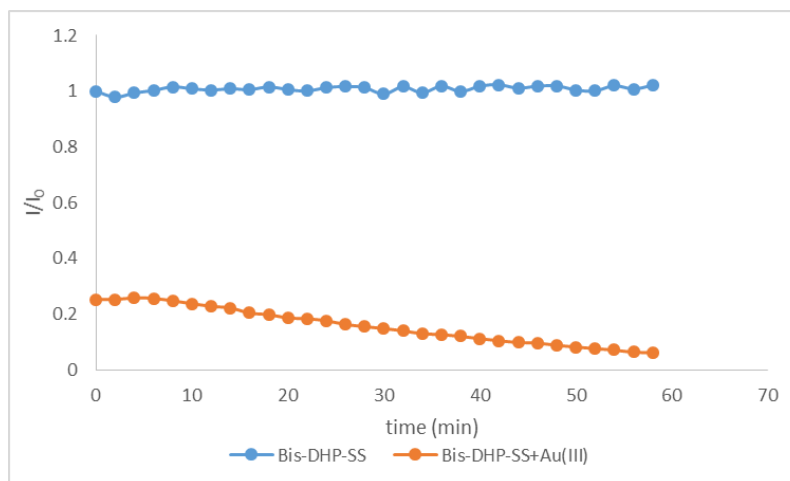
รูปที่ 3.11 Fluorescence spectra of DHP-SH in MilliQ water after 20 mins



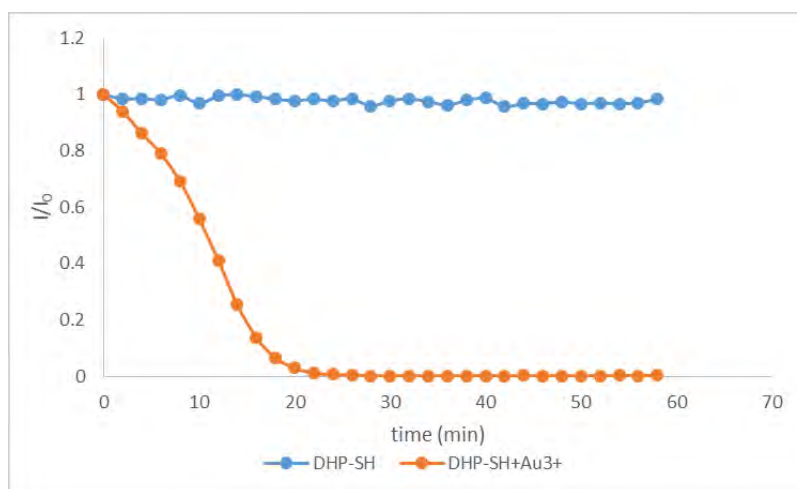
รูปที่ 3.12 Fluorescence spectra of Bis-DHP-SS in HEPES

3.3.2 Reaction time of Au^{3+} with DHP-SH and Bis-DHP-SS

เนื่องจาก DHP-SH และ Bis-DHP-SS เกิดการเลือกจับจำเพาะกับ Au^{3+} ในตัวทำละลายน้ำ จึงนำมาศึกษาเวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง DHP-SH และ Bis-DHP-SS กับ Au^{3+} พบว่า DHP-SH และ Bis-DHP-SS ให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ลดลงอย่างสมบูรณ์หลังจากเวลาผ่านไป 20 และ 60 นาที ตามลำดับ (รูปที่ 3.13 และ 3.14 ตามลำดับ) โดยผลการทดลองทางจลนพลศาสตร์พบว่า ความเข้มข้นของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ลดลงและต่ำสุดหลังจากเวลาผ่านไป 20 และ 60 นาที เนื่องจากกระบวนการลดลงค่อนข้างช้าอาจเป็นผลมาจากปฏิกิริยาทางเคมีซึ่งการเกิดได้ช้าเนื่องจากขนาดของ fluorophore ที่ใหญ่ขึ้น และความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองนั้นค่อนข้างต่ำ ($10\mu\text{M}$)



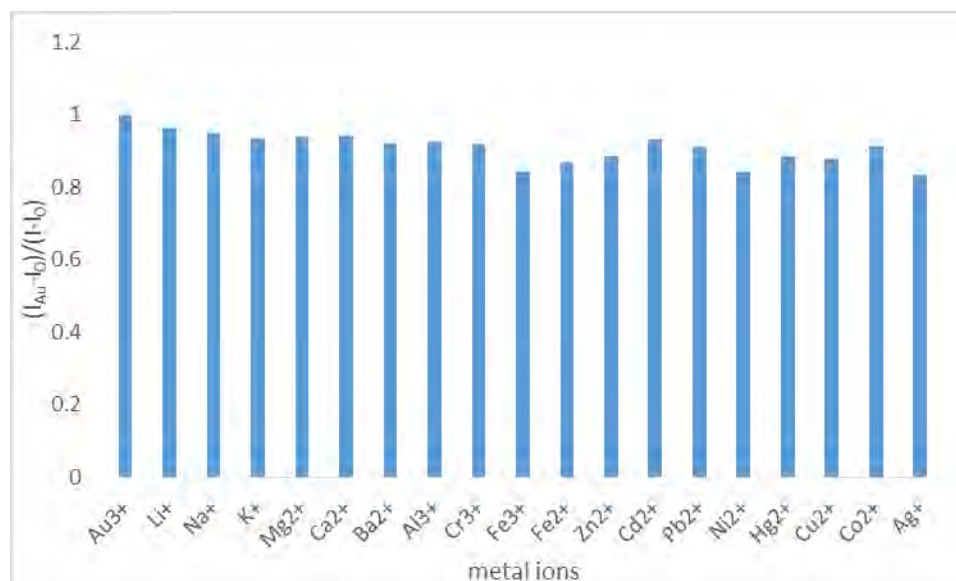
รูปที่ 3.13 Time dependence of Bis-DHP-SS in MilliQ water



รูปที่ 3.14 Time dependence of DHP-SH in MilliQ water

3.3.3 Competitive experiment of Bis-DHP-SS over interfering metal ions

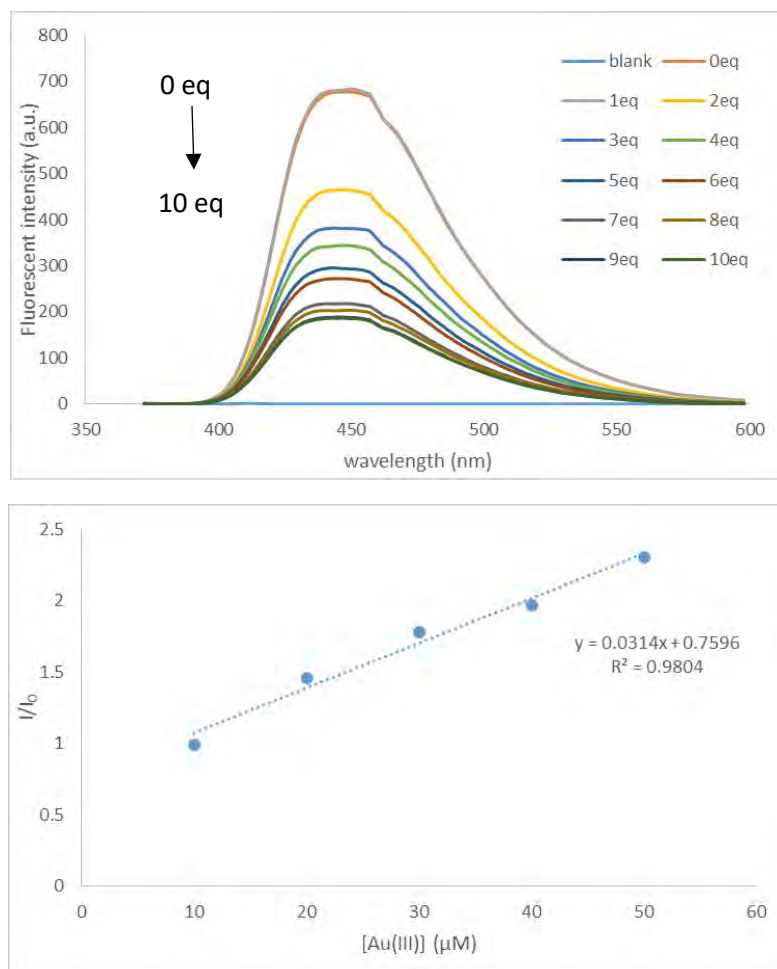
ในการศึกษาการรบกวนจากไอออนโลหะชนิดอื่นๆดังแสดงในรูปที่ 3.15 ซึ่งสารละลายประกอบด้วย 1 eq Bis-DHP-SS : 10 eq Au^{3+} : 10 eq each metal ions ในสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES ที่ความยาวคลื่น 360 nm พบว่า สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่มีไอออนชนิดอื่นอยู่ในสารละลายของ Bis-DHP-SS ที่มี Au^{3+} ไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณ ดังนั้น Bis-DHP-SS สามารถใช้จับจำเพาะกับ Au^{3+} แม้จะมีไอออนชนิดอื่นรบกวนอยู่



รูปที่ 3.15 Competitive experiment of 10 μM of Bis-DHP-SS of Au^{3+} after addition 100 μM other metal ions in HEPES buffer

3.3.4 Fluorescence titration of Bis-DHP-SS with Au^{3+}

ในการทดลองเพื่อหาปริมาณวิเคราะห์ด้วยวิธี fluorescence titration ของ Bis-DHP-SS (10 μM) กับ Au^{3+} (0-100 μM) พบว่า ในรูปที่ 3.16 ช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงความเข้มข้นของ Au^{3+} เท่ากับ 10 ถึง 50 μM ซึ่งมีค่า $R^2 = 0.9804$ จากกราฟเส้นตรงสามารถหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่เครื่องมือสามารถวัดได้ (LOD) ซึ่งหาได้จาก 3 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานหารด้วยความชันของกราฟ ซึ่งค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) หาจากการวัดสารละลายเปล่าจำนวน 10 ครั้ง ผู้วิจัยหาค่า LOD ได้เท่ากับ 7.71 μM จากการทดลองพบว่า เมื่อความเข้มข้นของ Au^{3+} เพิ่มขึ้น สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จะลดลง ซึ่งความเข้มข้นของ Au^{3+} มีผลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาของการเกิดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ลดลงที่เกิดขึ้นโดย Au^{3+} และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจาก DHP เป็นอนุพันธ์พริดีเนียม อีกทั้งผลการทดลองยังยืนยันได้อีกว่าการลดลงของสัญญาณไม่ได้เกิดจากการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง Bis-DHP-SS กับ Au^{3+}



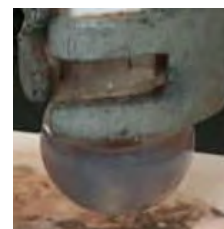
รูปที่ 3.16 Fluorescent titration of Bis-DHP-SS in HEPES buffer

3.4 การสังเคราะห์นาโนคอมโพสิตระหว่าง AuNP และ AgNP กับ DHP-SH

จากการทดลองได้ทำการสังเคราะห์นาโนคอมโพสิตโดยปิเปตสารละลาย AuNP และ AgNP ปริมาตร 2 mL กับ DHP-SH 2 mL และคนสารละลายเป็นเวลา 1 วัน พบว่าสารละลายระหว่าง AuNP กับ DHP-SH เปลี่ยนจากสีไวน์เป็นสีชมพู และสารละลายระหว่าง AgNP กับ DHP-SH เปลี่ยนจากสีน้ำตาลเป็นสีดำ โดยที่ทั้งสองนาโนคอมโพสิตมีตะกอนเกิดขึ้นด้วย จากนั้นผู้วิจัยนำสารละลายทั้งสองมาเซนตริฟิวส์แล้วล้างตะกอนด้วย EtOAc เพื่อกำจัด DHP-SH ที่เหลือ จากนั้นนำตะกอนไป freeze dry เพื่อไล่น้ำออกซึ่งได้ผลิตภัณฑ์เป็น AuNP-S-DHP และ AgNP-S-DHP (รูปที่ 3.17a และ 3.17b ตามลำดับ)



(a)



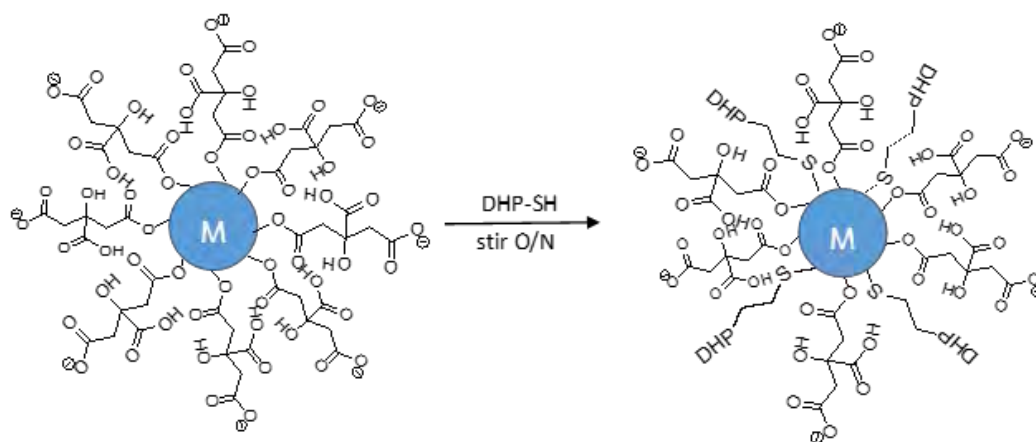
(b)

รูปที่ 3.17 การสังเคราะห์นาโนคอมโพสิต

(a) AuNP+DHP-SH (b) AgNP+DHP-SH

3.5 การศึกษาการเลือกจับจำเพาะของนาโนคอมโพสิต

เมื่อผู้วิจัยเตรียม stock solution ของนาโนคอมโพสิตทั้งสอง ผู้วิจัยนำไปวัดการเลือกจับจำเพาะด้วย fluorescence spectroscopy พบว่า สารละลายนาโนคอมโพสิตทั้งสองไม่เกิดการเลือกจับจำเพาะกับไอออนโลหะเนื่องจากในขั้นตอนการสังเคราะห์นาโนคอมโพสิตผู้วิจัยไม่สามารถนำมาละลายในน้ำเพื่อใช้ในการวัดการจับกับโลหะไอออนได้



M = AuNP, AgNP

รูปที่ 3.18 แผนภาพการสังเคราะห์นาโนคอมโพสิต

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองสามารถสังเคราะห์ DHP-SH จากปฏิกิริยาระหว่าง 2-aminoethanethiol กับ tosyl chloride และ triethylamine ได้ผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีเหลือง โดยมีเปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์เป็น 6% และสามารถสังเคราะห์ Bis-DHP-SS จากปฏิกิริยาระหว่าง 1,4-dihydropyridine tosylates กับ 1,2-dithioethane และ 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene ได้ผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีเหลือง โดยมีเปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์เป็น 11% ซึ่งสารที่ได้จากการสังเคราะห์ได้พิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิค ^1H NMR และ HRMS เมื่อวัดการดูดกลืนแสงของสาร DHP-SH และ Bis-DHP-SS ที่เติม Au^{3+} ในตัวทำละลายน้ำ MilliQ พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 365 nm และ 367 nm ตามลำดับ และมีค่าการคายแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 445 nm และ 446 nm ตามลำดับ โดยการเรืองแสงของ Bis-DHP-SS ($10\ \mu\text{M}$) จะลดลงอย่างเลือกจับจำเพาะเจาะจงต่อ Au^{3+} ($100\ \mu\text{M}$) และเมื่อนำสาร Bis-DHP-SS ($10\ \mu\text{M}$) ไปวัดสัญญาณการเรืองแสงที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ($1-100\ \mu\text{M}$) พบว่าให้กราฟเส้นตรงที่ช่วงความเข้มข้นของ Au^{3+} $10-50\ \mu\text{M}$ ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ Au^{3+} เชิงปริมาณได้และยังสามารถหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้เท่ากับ $7.71\ \mu\text{M}$ ในการพัฒนานาโนคอมโพสิตเพื่อใช้ตรวจวัดโลหะไอออนนั้น พบว่า ไม่สามารถนำมาใช้ในการตรวจวัดได้เนื่องจากนาโนคอมโพสิตที่ได้ไม่สามารถละลายในน้ำได้

การพัฒนางานวิจัยในอนาคต

เนื่องจากในงานวิจัยนี้ยังไม่สามารถสังเคราะห์นาโนคอมโพสิตระหว่าง AuNP และ AgNP กับ DHP-SH ได้ ในอนาคตผู้วิจัยมีความหวังว่าจะสามารถสังเคราะห์นาโนคอมโพสิตเพื่อใช้ในการตรวจวัดไอออนโลหะได้ และในอนาคตต้องการเปรียบเทียบการเลือกจับจำเพาะระหว่างนาโนพาร์ติเคิลที่มีสารที่เป็นสายสั้นกับสายยาว จะส่งผลกับการเกิดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์หรือไม่ อย่างไร

เอกสารอ้างอิง

- [1] W.J. Stark; P.R. Stoessel; W. Wohlleben; A. Hafner. Industrial applications of nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, *44*, 5793-5805.
- [2] A. Mishulow; C.A. Krumwiede. A colorimetric reaction between gold chloride and toxins apparently indicative of toxic strength: a preliminary report. *J. Immunol.*, **1927**, *14*, 77-80.
- [3] A. Locke; E.R. Main. Investigation of proposed colorimetric method for titration of diphtheria toxins. *J.A.M.A.*, **1928**, *90*, 259-260.
- [4] American Rheumatism Association. The Cooperating Clinics Committee. *Arthritis Rheum.*, **1973**, *16*, 353-358.
- [5] C.F. Shaw. Gold-Based therapeutic agents. *Chem. Rev.*, **1999**, *99*, 2589-2600.
- [6] L. Messori; G. Marconin; A. Sigel; H. Sigel (Eds.). Metal Ions and their complexes in medication. *CRC Press, New York*, **2004**, 279-284.
- [7] I. Ott. On the medicinal chemistry of gold complexes as anticancer drugs. *Coord. Chem. Rev.*, **2009**, *253*, 1670-1681.
- [8] M. Navarro. Gold complexes as potential anti-paraitic agents. *Coord. Chem. Rev.*, **2009**, *253*, 1619-1626.
- [9] A. Finkelstein; D. Walz; V. Batista; M. Mizraji; F. Roisman; A. Misher. Auranofin new oral gold compound for treatment of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, **1976**, *35*, 251-257.
- [10] R. Tomioka; T.E. King. Gold-induced pulmonary disease: clinical features, outcome, and differentiation from rheumatoid lung disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **1997**, *155*, 1011-1020.

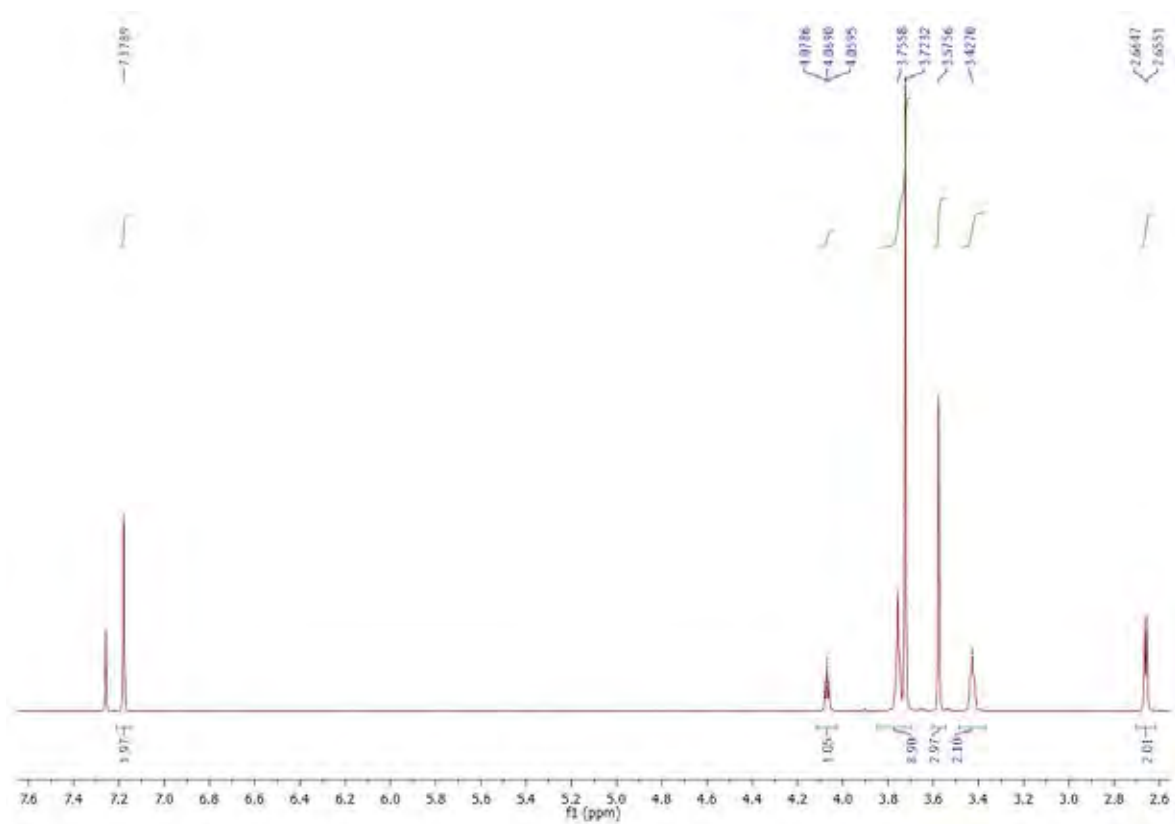
- [11] M.J. Jou; X. Chen; K.M.K. Swamy; H.N. Kim; H.J. Kim; S. Lee; J. Yoon. Highly selective fluorescent probe for Au³⁺ based on cyclization of propargylamide. *Chem. Commun.*, **2009**, 7218-7220.
- [12] E. Mustafa; K. Erman; U. Muhammed. A rhodamine based turn-on chemodosimeter for monitoring gold ions in synthetic samples and living cells. *Analyst*, **2013**, *138*, 3638-3641.
- [13] Y.K. Yang; S. Lee; J. Tae. A gold(III) ion-selective fluorescent probe and its application to bio imagings. *Org Lett.*, **2009**, *11*, 5610-5613.
- [14] O.A. Egorova; H. Seo; C. Amrita; K.H. Ann. Reaction-based fluorescent sensing of Au(I)/Au(III) species: mechanistic implications on vinyl gold intermediates. *Org. Lett.*, **2010**, *12*, 401-403.
- [15] H. Seo; M.E. Jun; K. Ranganathan; K.H. Lee; K.T. Kim; W. Lim; Y.M. Rhee; K.H. Ahn. Ground-state elevation approach to suppress side reactions in gold-sensing systems based on alkyne activation. *Org Lett.*, **2014**, *16*, 1374-1377.
- [16] F. Song; H. Ning; H. She; J. Wang; X. Peng. A turn-on fluorescent probe for Au³⁺ based on rhodamine derivative and its bioimaging application. *Sci. China. Chem.*, **2014**, *57*, 1043-1047.
- [17] L. Yuan; W.Lin; Y. Yang; J. Song. A fast-responsive fluorescent probe for detection of gold ions in water and synthetic products. *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 4703-4705.
- [18] H. Seo; M.E. Jun; O.A. Egorova; K.H. Lee; K.T. Kim; K.H. Ahn. A reaction-based sensing scheme for gold species: introduction of a (2-ethynyl)benzoate reactive moiety. *Org. Lett.*, **2012**, *14*, 5062-5065.

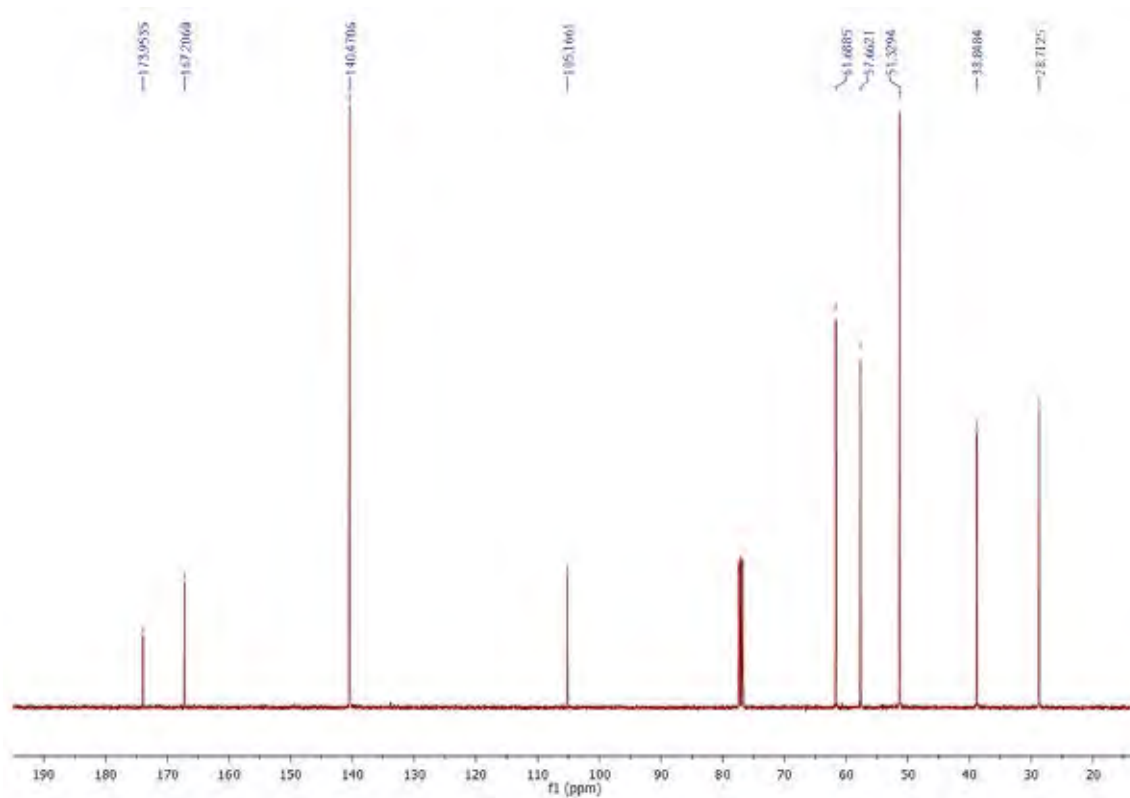
- [19] T.P. Nitin; S.S. Valmik; S.T. Milind; P. Hemant Kumar; R.B. Prakriti; B. Ayan Kumar; P. Chitta Ranjan. Exploiting the higher alkynophilicity of Au-species: development of a highly selective fluorescent probe for gold ions. *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, 11229-11231.
- [20] J. Park; S. Choi; T.I. Kim; Y. Kim. Highly selective fluorescence turn-on sensing of gold ions by a nanoparticle generation/C-I bond cleavage sequence. *Analyst*, **2012**, *137*, 4411-4414.
- [21] U. Muhammed; E. Mustafa. A BODIPY-based reactive probe for the detection of Au(III) species and its application to cell imaging. *Chem. Commun.*, **2014**, *50*, 5884-5886.
- [22] J.B. Wang; Q.Q. Wu; Y.Z. Min; Y.Z. Liu; Q.H. Song. A novel fluorescent probe for Au(III)/Au(I) ions based on an intramolecular hydroamination of a bodipy derivative and its application to bioimaging. *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, 744-746.
- [23] J.Y. Choi; G.H. Kim; Z. Guo; H.Y. Lee; K.M.K. Swamy; J. Pai; S. Shin; I. Shin; J. Yoon. Highly selective ratiometric fluorescent probe for Au³⁺ and its application to bioimaging. *Biosens. Bioelectron.*, **2013**, *49*, 438-441.
- [24] M. Dong; Y.W. Wang; Y. Peng. Explaining the disparate stereoselectivities of N-oxide catalyzed allylations and propargylations of aldehydes. *Org. Lett.*, **2010**, *12*, 5310-5313.
- [25] J. Ho Do; H.N. Kim; J. Yoon; J.S. Kim; H.J. Kim. A rationally designed fluorescence turn-on probe for the gold(III) ion. *Org. Lett.*, **2010**, *12*, 932-934.
- [26] B. Wang; T. Fu; Y. Sheng; J. Li; Y. Chen. An intramolecular charge transfer (ICT) -based dual emission fluorescent probe for the ratiometric detection of gold ions. *Anal. Method*, **2013**, *5*, 3639-3641.

- [27] X. Cao; W. Lin; Y. Ding; Ratio-Au: a FRET-based fluorescent probe for ratio-metric determination of gold ions and nanoparticles. *Chem. Eur. J.*, **2011**, *17*, 9066-9069.
- [28] K. Erman; U. Muhammed; E. Mustafa. A rhodamine/BODIPY-based fluorescent probe for the differential detection of Hg(II) and Au(III). *Chem. Commun.*, **2014**, *50*, 1119-1121.
- [29] T. Sirijindalert; K. Hansuthirakul; P. Rashatasakhon; M. Sukwattanasinitt; A. Ajavakorn. Novel synthetic route to 1,4-dihydropyridines from β -amino acrylates by using titanium(IV) chloride under facile conditions. *Tetrahedron*, **2010**, *66*, 5161-5167.
- [30] J. Wang; W. Lin; L. Yuan; J. Song; W. Gao. Development of a reversible fluorescent gold sensor with high selective. *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 12506-12508.
- [31] J.E. Park; M.G. Choi; S.K. Chang. Colorimetric and fluorescent signaling of Au³⁺ by desulfurization of thiocoumarin. *Inorg. Chem.*, **2012**, *51*, 2880-2884.
- [32] D. Homrarueng; T. Sirijindalert; L. Dubas; M. Sukwattanasinitt; A. Ajavakorn. Selective fluorescent sensor for mercury ions in aqueous media using 1,4-dihydropyridine derivative. *Tetrahedron*, **2013**, *69*, 1617-1621.
- [33] S. Kambam; B. Wang; F. Wang; Y. Wang; H. Chen; J. Yin; X. Chen. A highly sensitive and selective fluorescence probe for Au³⁺ and its application in living cell imaging. *Sensors and Actuators B*, **2015**, *209*, 1005-1010.
- [34] X. Yang; X. Liu; Y. Li; F. Wu; J. Mao; Y. Yuan; Y. Cui; G. Sun; G. Zhang. A differentially selective probe based on diketopyrrolopyrrole with fluorescence turn-on response to Fe³⁺, and dual-mode turn-on and ratiometric response to Au³⁺, and its application in living cell image. *Biosens and Bioelectron.*, **2016**, *80*, 288-293.

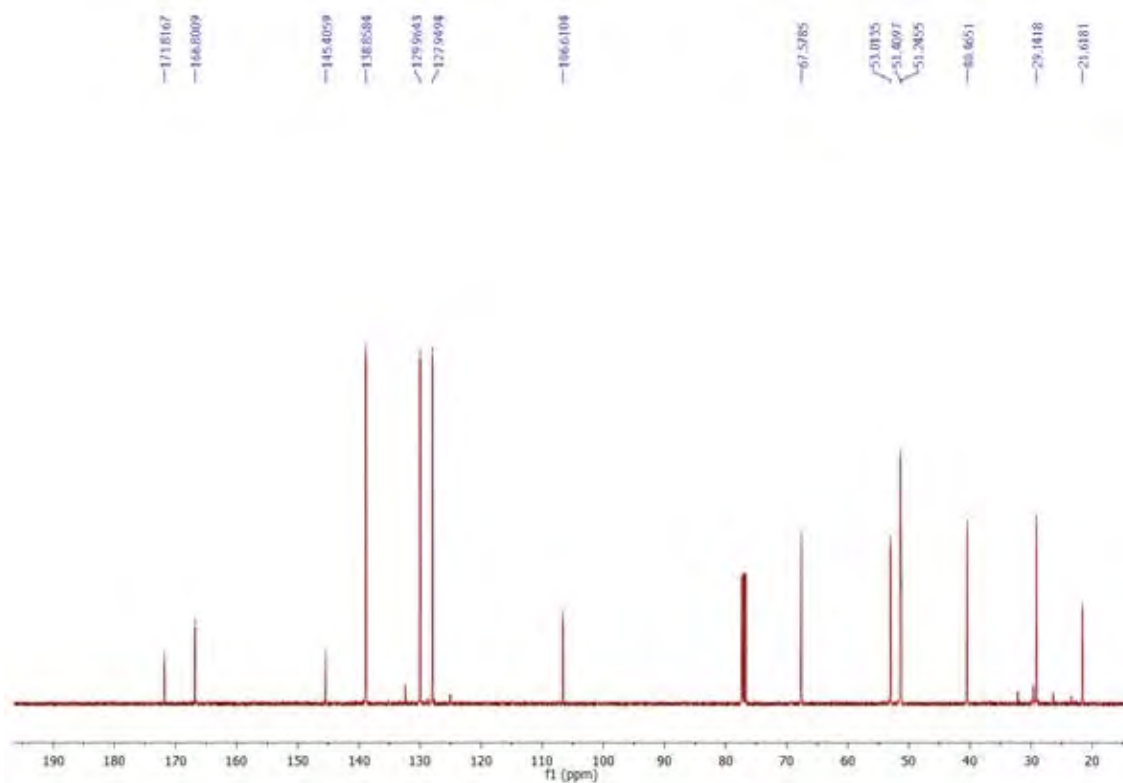
- [35] Y. Li; Y. Qiu; J. Zhang; X. Zhu; B. Zhu; X. Liu; X. Zhang; H. Zhang. Naphthalimide derived fluorescent probes with turn-on response for Au³⁺ and its application for biological visualization. *Biosens and Bioelectron.*, **2016**, *83*, 334-338.

ภาคผนวก

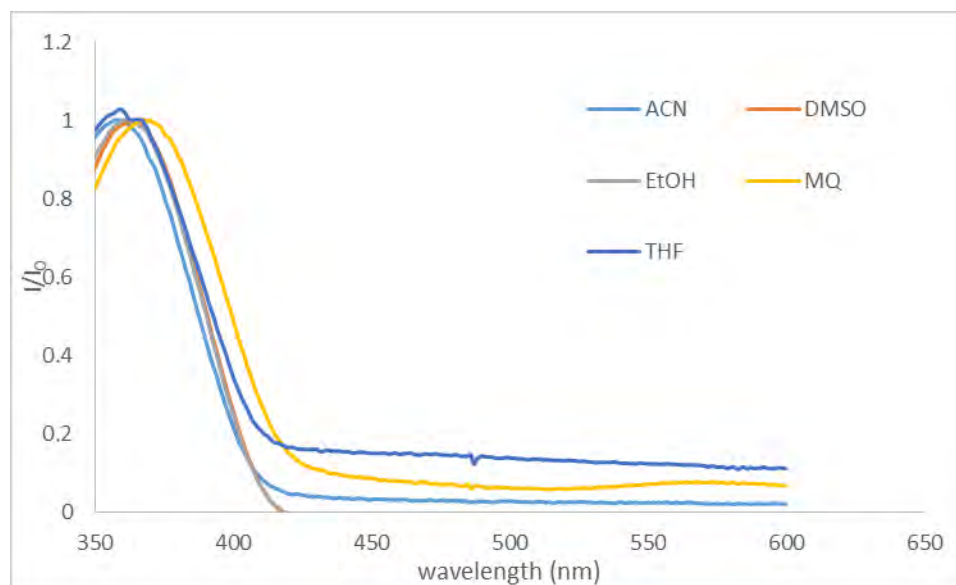
รูปที่ A-1 ^1H NMR ของ DHP-OH



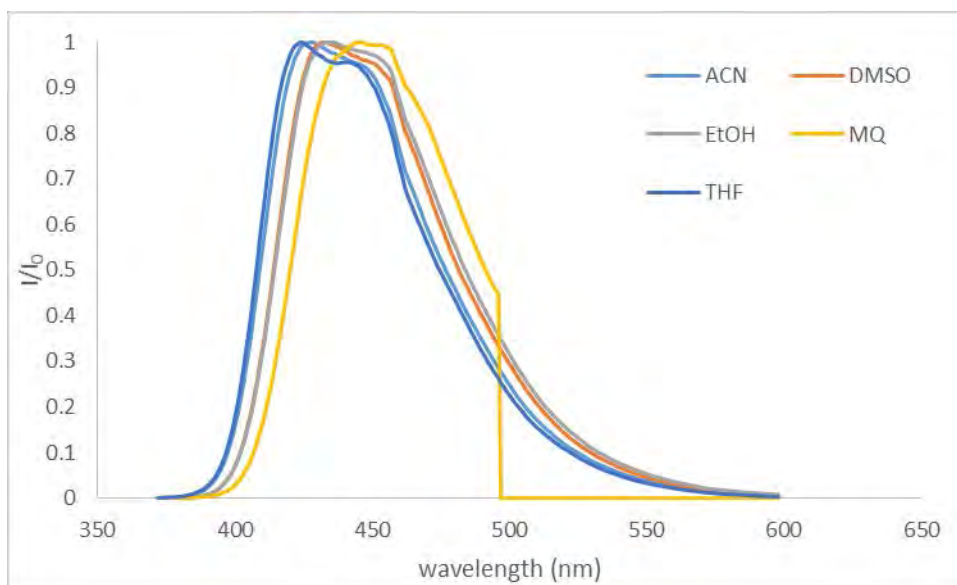
รูปที่ A-2 ^{13}C NMR ของ DHP-OH



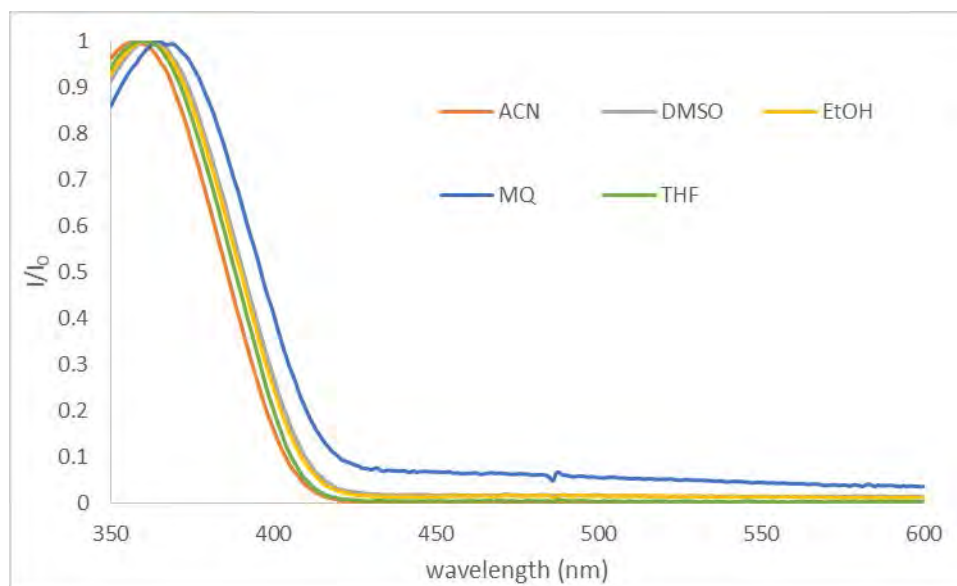
รูปที่ A-3 ^{13}C NMR ของ DHP-OTs



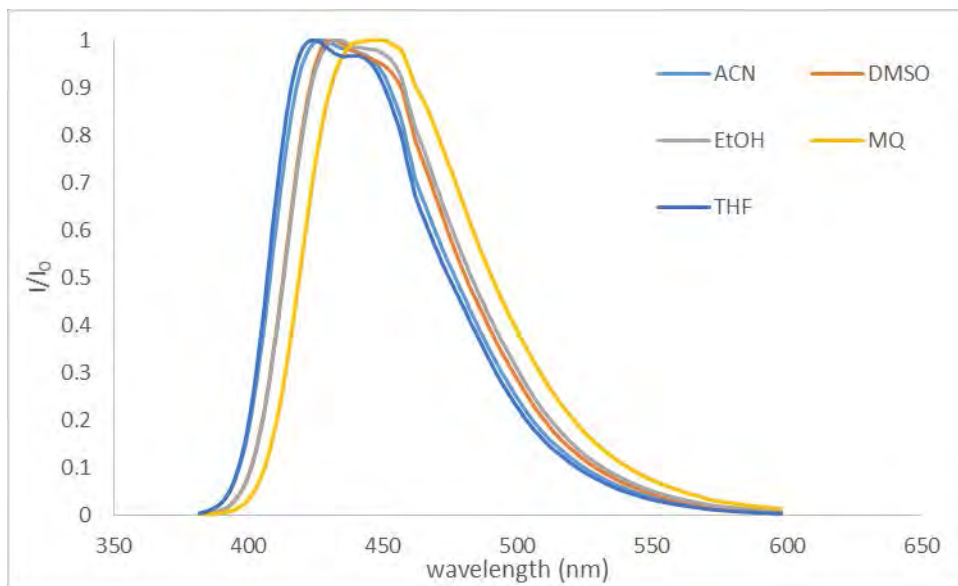
รูปที่ A-4 Normalized absorption of Bis-DHP-SS



รูปที่ A-5 Normalized emission of Bis-DHP-SS



รูปที่ A-6 Normalized absorption of DHP-SH



รูปที่ A-7 Normalized emission of DHP-SH

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวฐิติรัตน์ กมลทิพย์วงศ์ เกิดเมื่อวันที่ 2 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2540 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย สายสามัญ แผนการเรียนวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์ จากโรงเรียนสตรีวัดมหาพฤฒาราม ในพระบรมราชินูปถัมภ์ เมื่อปีการศึกษา 2557 และเข้า การศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2558 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้หลังจบการศึกษาปริญญาตรี บ้านเลขที่ 73 ซอยจันทน์ 16 แยก 10 ถนนจันทน์ 16 แขวงทุ่งวัดดอน เขตสาทร จังหวัดกรุงเทพมหานคร 10120 อีเมล a_cha_nida@hotmail.com