



โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ สีย้อมสไตริลสำหรับเป็นตัวรับรู้น้ำตาล
Styryl dyes for sensing of sugars

ชื่อนิสิต นางสาวณัฐสิริ ไพศาล

เลขประจำตัว 5933038623

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สีย้อมสไตริลสำหรับเป็นตัวรับรู้น้ำตาล

Styryl dyes for sensing of sugars

โดย

นางสาวณัฐสิริ ไพศาล

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2562

โครงการ สีย้อมสไตริลสำหรับเป็นตัวรับรู้น้ำตาล

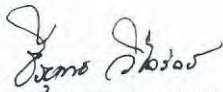
โดย นางสาวณัฐสิริ ไพศาล

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

- | | |
|--|------------------|
| 1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรุณศิริ ชิตางกูร | ประธานกรรมการ |
| 2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาณุวัฒน์ ผดุงรส | กรรมการ |
| 3. ศาสตราจารย์ ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์ | อาจารย์ที่ปรึกษา |

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี



(ศาสตราจารย์ ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์)
อาจารย์ที่ปรึกษา



(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย พาราสุข)
หัวหน้าภาควิชาเคมี

วันที่ 25 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2563

ชื่อโครงการ สีย้อมสไตริลสำหรับเป็นตัวรับรู้น้ำตาล

ชื่อนิติในโครงการ นางสาวณัฐสิริ ไพศาล เลขประจำตัว 5933038623

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ศาสตราจารย์ ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2562

บทคัดย่อ

โรคเบาหวานมีลักษณะเฉพาะคือระดับน้ำตาลในเลือดที่สูงผิดปกติ การควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดเป็นสิ่งสำคัญในการควบคุมโรค ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยสนใจที่จะพัฒนาสีย้อมสไตริลที่มีหมู่บอร์อนิกแบบใหม่เพื่อใช้เป็นตัวตรวจวัดระดับน้ำตาลโดยอาศัยหลักการของปฏิกิริยาระหว่างหมู่บอร์อนิกและหมู่ไดออลที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีย้อมซึ่งส่งผลต่อคุณสมบัติการเรืองแสงในฟลูออเรสเซนส์และการดูดกลืนแสงยูวี-วิสิเบิล นอกจากนี้หมู่บอร์อนิกยังสามารถเกิดปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ดังนั้นสีย้อมสไตริลที่มีหมู่บอร์อนิกยังสามารถใช้ตรวจวัด H_2O_2 ได้ และสามารถประยุกต์ใช้สำหรับตรวจวัดระดับน้ำตาลกลูโคสทางอ้อมโดยตรวจวัดจาก H_2O_2 จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสโดยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ผู้วิจัยได้สังเคราะห์สีย้อมสไตริลที่มีหมู่บอร์อนิกมีร้อยละของผลได้อยู่ที่ 28 ยืนยันโครงสร้างโดยใช้เทคนิค 1H NMR และ MALDI-TOF MS การทดสอบเบื้องต้นกับน้ำตาลพบการเปลี่ยนสีและการเรืองแสงภายใต้แสงธรรมชาติและแสงยูวี และจากเทคนิค MALDI-TOF MS บ่งชี้ให้เห็นว่าเกิดปฏิกิริยาระหว่างสีย้อมสไตริลที่มีหมู่บอร์อนิกและน้ำตาลจริง อย่างไรก็ตามเมื่อตรวจวัดที่ความเข้มข้นต่ำ การเปลี่ยนแปลงของการดูดกลืนแสงและการเรืองแสงไม่ชัดเจนเพียงพอต่อการตรวจวัดน้ำตาลเนื่องจากเกิดการเสถียรภาพของสีย้อมเมื่ออยู่ในภาวะที่มีบัฟเฟอร์ ต่อมาได้พัฒนาวิธีการตรวจวัดน้ำตาลกลูโคสทางอ้อมผ่าน H_2O_2 โดยเริ่มจากการตรวจวัด H_2O_2 กับสีย้อมสไตริลที่มีหมู่บอร์อนิก จากกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของ H_2O_2 และสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่ 560 nm ที่วัดโดยใช้เครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์พบว่ามีช่วงความเป็นเส้นตรง ($r^2 = 0.9912$) ในช่วงความเข้มข้นของ H_2O_2 ระหว่าง 0-25 μM และขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOD) เท่ากับ 0.03177 μM หรือ 31.8 nM นอกจากนี้กราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของ H_2O_2 และค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (A_{500}/A_{390}) มีช่วงความเป็นเส้นตรง ($r^2 = 0.9921$) ในช่วงความเข้มข้นของ H_2O_2 ระหว่าง 0-50 μM และขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOD) เท่ากับ 0.10093 μM หรือ 101 nM นำสภาวะที่ได้ไปใช้ในการตรวจวัดน้ำตาลกลูโคสทางอ้อมหลังจากที่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสที่เร่งด้วยกลูโคสออกซิเดสและได้ผลิตภัณฑ์ H_2O_2 จากผลการทดลองด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์และยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมตริ์แสดงให้เห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้นสัญญาณที่ได้ก็สูงขึ้นด้วย และสามารถประมาณค่า LOD ได้ไม่เกิน 1 μM ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ต่ำกว่าระดับกลูโคสในเลือดและปัสสาวะ ด้วยเหตุนี้จึงเชื่อว่าน่าจะสามารถนำสีย้อมสไตริลที่มีหมู่บอร์อนิกเพื่อไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดน้ำตาลกลูโคสในตัวอย่างจริงได้

คำสำคัญ: น้ำตาล, สีย้อมสไตริล, หมู่บอร์อนิก, ฟลูออเรสเซนส์, ยูวี-วิสิเบิล, ตัวรับรู้

Project Title Styryl dyes for sensing of sugars

Student Name Miss Nattasiri Phaisarn Student ID 5933038623

Advisor Name Professor Tirayut Vilaivan, D.Phil.

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2019

Abstract

Diabetes is characterized by a higher glucose level in blood than normal. Monitoring blood sugar levels is important to control the disease. In this research, we aim to develop a new styryl dye carrying a boronic acid functional group as a sensor for measuring the sugar level. The design principle relies on the boronic-diols interaction that should result in the structural change of the dye, which should affect its optical properties such as fluorescence and UV-Vis absorption. In addition, the boronic group can also react with hydrogen peroxide (H_2O_2) and therefore the styryl-boronic dye may also be useful for sensing H_2O_2 . This can be further developed as an indirect method for measuring glucose level by the detection of H_2O_2 from glucose oxidation by the enzyme glucose oxidase (GOx). The styryl-boronic dye was synthesized in 28% yield, and their structures were confirmed by ^1H NMR and MALDI-TOF MS. The preliminary direct detection of sugar seemed to show some color and fluorescence change when performed under natural light and UV light, and MALDI-TOF MS indicated that the reaction between the styryl-boronic dye and the sugar had indeed occurred. However, when the detection was performed at low concentrations, the absorption and fluorescence change was not sufficient to detect the sugar probably due to the decomposition of the dye in the presence of buffer. Next, the indirect detection of glucose via H_2O_2 was examined starting by measurement of free H_2O_2 with the styryl-boronic dye. The calibration curve between H_2O_2 concentration and fluorescence signal at 560 nm from fluorescence spectrophotometer showed a linear correlation ($r^2 = 0.9912$) over the range of 0-25 μM H_2O_2 and the limit of detection (LOD) was 0.03177 μM or 31.8 nM. Furthermore, the calibration curve between H_2O_2 concentration and absorption signal from UV-Vis spectrophotometer (A_{500}/A_{390}) showed a linear correlation ($r^2 = 0.9921$) over the range of 0-50 μM H_2O_2 and the limit of detection (LOD) was 0.10093 μM or 101 nM. The condition was next applied for the indirect detection of glucose after being oxidized with glucose oxidase to obtain H_2O_2 . The results from both fluorescence and UV-Visible spectrophotometry showed that higher glucose concentrations result in higher signal in a linear fashion, with an estimated LOD lower than 1 μM . This concentration is much lower than blood and urine glucose levels and hence the developed styryl-boronic dye should be applicable for the detection of glucose in real samples.

Keywords: sugar, styryl dye, boronic group, fluorescent, UV-visible, sensor

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ เรื่อง สีย้อมสไตริลสำหรับเป็นตัวรับรู้น้ำตาล สำเร็จ ลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือจากศาสตราจารย์ ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ความช่วยเหลือให้คำปรึกษาและการสนับสนุนเป็นอย่างดีตลอดระยะเวลาที่ทำการวิจัย ตั้งแต่ถ่ายทอดประสบการณ์ต่าง ๆ ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ห้องปฏิบัติการ พร้อมทั้งเครื่องมือและสารเคมี ในการทำวิจัยเป็นอย่างดี รวมทั้งให้ความช่วยเหลือในการเขียนรายงานฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรุณศิริ ชิตางกูร และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาณุวัฒน์ ผดุงรส ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าให้เกียรติเป็นกรรมการสอบโครงการวิจัยครั้งนี้ ตลอดจนกรุณาให้คำแนะนำและตรวจสอบแก้ไขรายงานฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น รวมทั้งคณาจารย์ทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชา ให้ความรู้ และประสบการณ์ต่าง ๆ ตลอดจนภาควิชาเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่สนับสนุนการใช้ห้องปฏิบัติการและเครื่องมือวิจัยต่าง ๆ

ขอขอบคุณ นางสาวกชกร ศุภวรรสสถิตย์ นางโชติมา วิไลวัลย์ นายเกรียงศักดิ์ ฝ่ายเครือ นายชัญญ์ เจริญภักดี นางสาวเพ็ญทิพ เมืองแก้ว นางสาวโสมลวัฒน์ ทิพย์ขุนทอง นายณัฐกร อุปถัมภ์ และ นางสาวดวงกมล เตียรธภัทรติก ที่คอยให้คำแนะนำตลอดจนให้ความช่วยเหลือในทุกขั้นตอนของการทำวิจัย และขอขอบคุณทุกท่านที่กำลังใจและความช่วยเหลือจากพ่อ แม่ และเพื่อน ๆ

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนในการดำเนินงานวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยขอโน้มรำลึกในความกรุณาของทุกท่านที่ได้กล่าวมาข้างต้น และบุคคลที่ไม่ได้เอ่ยนามไว้ ณ ที่นี้

สารบัญ

| | หน้า |
|---|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย | ค |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | ง |
| กิตติกรรมประกาศ | จ |
| สารบัญ | ฉ |
| สารบัญรูป..... | ช |
| สัญลักษณ์และคำย่อ..... | ฐ |
| บทที่ 1 บทนำ..... | 1 |
| 1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ | 1 |
| 1.2 ทฤษฎีที่สำคัญและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... | 2 |
| 1.2.1 โรคเบาหวาน | 2 |
| 1.2.2 หมู่บอโรนิกและการประยุกต์ใช้ในการเป็นตัวตรวจวัดน้ำตาล | 3 |
| 1.2.3 หมู่บอโรนิกและการประยุกต์ใช้ในการเป็นตัวรับรู้ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์..... | 7 |
| 1.2.4 สีย้อมสไตริล | 8 |
| 1.3 วัตถุประสงค์และขอบเขตของงานวิจัย..... | 9 |
| บทที่ 2 การทดลอง..... | 12 |
| 2.1 รายการเครื่องมือ อุปกรณ์ สารเคมี | 12 |
| 2.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ | 12 |
| 2.1.2 รายการสารเคมี..... | 12 |
| 2.2 วิธีการสังเคราะห์สีย้อมสไตริล | 13 |
| 2.2.1 การสังเคราะห์สีย้อมสไตริลที่มีประจุบวก (positively-charged styryl dye) และหมู่บอโรนิก (BT+_B(OH) ₂)..... | 13 |
| 2.2.2 สีย้อมสไตริลอื่น ๆ ที่นำมาทดสอบ | 14 |
| 2.3 วิธีการตรวจวัดน้ำตาลโดยตรง | 14 |
| 2.3.1 การทดลองเบื้องต้นเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมของสีย้อมสไตริลกับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและโมเลกุลคู่ด้วยวิธีสังเกตด้วยตาเปล่า | 14 |
| 2.3.2 การทดลองฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรสโคปี (fluorescence spectroscopy) | 17 |
| 2.3.3 การทดลองยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรี (UV-visible spectrophotometry)..... | 18 |

| | |
|--|----|
| 2.3.4 การทดลองหาชนิดและความเข้มข้นของบัพเฟอร์ที่เหมาะสมโดยใช้ยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมตรี (UV-visible spectrophotometry) | 18 |
| 2.3.5 การทดสอบระหว่างสีย้อมสไตริล 3 กับน้ำตาลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในระดับ mM โดยใช้ยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมตรี (UV-visible spectrophotometry)..... | 18 |
| 2.4 วิธีการตรวจวัดน้ำตาลกลูโคสทางอ้อม | 19 |
| 2.4.1 การทดสอบระหว่างสีย้อมสไตริล 3 กับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ | 19 |
| 2.4.2 การทดลองฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรสโคปี (fluorescence spectroscopy) | 21 |
| 2.4.3 การทดลองยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรี (UV-visible spectrophotometry)..... | 21 |
| 2.4.4 การตรวจวัดน้ำตาลทางอ้อมโดยตรวจวัดปริมาณไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของน้ำตาลกลูโคสกับกลูโคสออกซิเดส ^๑ | 21 |
| บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง..... | 24 |
| 3.1 การสังเคราะห์ พิสูจน์เอกลักษณ์ของสีย้อมสไตริลและสมบัติการเรืองแสงที่ตอบสนองต่อน้ำตาล | 24 |
| 3.2 วิธีการตรวจวัดน้ำตาลโดยตรง | 27 |
| 3.2.1 การพิสูจน์หลักการเบื้องต้นเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมของสีย้อมสไตริลกับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและโมเลกุลคู่ด้วยวิธีสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีด้วยตาเปล่า | 27 |
| 3.2.2 การทดลองฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรสโคปี (fluorescence spectroscopy) | 35 |
| 3.2.3 การทดลองยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรี (UV-visible spectrophotometry)..... | 37 |
| 3.2.4 การพิสูจน์หาชนิดและความเข้มข้นของบัพเฟอร์ที่เหมาะสมโดยใช้ยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมตรี (UV-visible spectrophotometry) | 39 |
| 3.2.5 การติดตามการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสีย้อมสไตริล 3 กับน้ำตาลความเข้มข้นต่าง ๆ ในระดับ mM โดยใช้ยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมตรี (UV-visible spectrophotometry)..... | 41 |
| 3.3 วิธีการตรวจวัดน้ำตาลกลูโคสทางอ้อม | 41 |
| 3.3.1 หลักการ | 41 |
| 3.3.2 การพิสูจน์เบื้องต้นสำหรับการตรวจวัดระหว่างสีย้อมสไตริล 3 กับ H ₂ O ₂ | 42 |
| 3.3.3 การพิสูจน์เบื้องต้นสำหรับการตรวจวัดน้ำตาลทางอ้อมโดยตรวจวัดปริมาณ H ₂ O ₂ ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของน้ำตาลกลูโคสทำกับกลูโคสออกซิเดส | 48 |
| 3.4 วิจารณ์ผลการทดลองและแนวทางพัฒนาต่อไปในอนาคต | 51 |
| บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง..... | 57 |
| เอกสารอ้างอิง..... | 59 |
| ประวัติผู้วิจัย | 62 |

สารบัญรูป

รูปที่ 1.1 แผนภาพอธิบายปฏิกิริยาระหว่างสีย้อมสไตริลที่มีหมู่บอโรนิกกับสารประกอบไดออล 2

รูปที่ 1.2 แผนภาพการเกิดปฏิกิริยาของหมู่บอโรนิกกับ *cis*-1,2-diols โดยที่ค่า K_a และ K_a' คือ ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาของหมู่บอโรนิกและบอโรเนตเอสเทอร์ ตามลำดับ และ K_{trig} และ K_{tet} คือ ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาของโบรอนอะตอมที่มีโครงสร้างสามเหลี่ยมแบนราบและโบรอนอะตอมที่มีโครงสร้างเตตระฮีดรัลตามลำดับ 3

รูปที่ 1.3 แผนภาพสมดุลของหมู่บอโรนิกและบอโรเนต¹⁵ 4

รูปที่ 1.4 แผนภาพการเกิดปฏิกิริยาของ anthrylboronic acid กับ diol²¹ 5

รูปที่ 1.5 แผนภาพแสดงโครงสร้างของน้ำตาลฟรุกโตส, กลูโคส และกาแลคโตส และตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิล (สีแดง) ที่เกิดสามารถปฏิกิริยากับหมู่บอโรนิก⁴ 5

รูปที่ 1.6 ตัวอย่างการสังเคราะห์โมเลกุล boronic acid azo dyes²² 6

รูปที่ 1.7 แผนภาพ (ก) กลไกการจับน้ำตาลของตัวรับ BBV และสีย้อมฟลูออเรสเซนต์ที่มีประจุ HPTS (ข) ตัวตรวจวัดน้ำตาลที่มีประจุบวกและสีย้อมฟลูออเรสเซนต์ที่มีประจุลบ HPTS²³ 7

รูปที่ 1.8 โครงสร้างของอนุพันธ์ stilbene ที่มีหมู่บอโรนิก⁵ 7

รูปที่ 1.9 แผนภาพการเกิดปฏิกิริยาของสีย้อมสไตริลที่มีหมู่บอโรเนตเอสเทอร์กับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์⁸ .. 8

รูปที่ 1.10 โครงสร้างทั่วไปของสีย้อมสไตริล 8

รูปที่ 1.11 สีย้อมสไตริลที่มีหมู่บอโรนิกที่เป็นเป้าหมายของการสังเคราะห์ในงานวิจัยนี้ 9

รูปที่ 2.1 แผนภาพการสังเคราะห์ 2-(4-boronostyryl)-3-methylbenzothiazolium hexafluorophosphate (3) 13

รูปที่ 2.2 แผนภาพการสังเคราะห์ 2,3-dimethylbenzothiazol-3-ium iodide (1) 13

รูปที่ 2.3 แผนภาพการสังเคราะห์ 2-(4-boronostyryl)-3-methylbenzothiazolium hexafluorophosphate (3) 14

รูปที่ 2.4 สีย้อมสไตริลที่มีหมู่บอโรนิกอยู่ตำแหน่ง *ortho* (4) และ *meta* (5) 14

รูปที่ 2.5 การทดลองหาความเข้มข้นบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม สำหรับการตรวจวัดน้ำตาลด้วยวิธีการดูสีด้วยตาเปล่าและสังเกตการเรืองแสงภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 nm และ 365 nm เมื่อใช้สีย้อมสไตริล 3 ความเข้มข้น 5 mM และน้ำตาลฟรุกโตส ความเข้มข้น 50 mM ในบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต หมายเลข 1, 3, 5, 7 = 5 mM dye และหมายเลข 2, 4, 6, 8 = 5 mM dye + 50 mM fructose 15

รูปที่ 2.6 การทดลองหาชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม สำหรับการตรวจวัดน้ำตาลด้วยวิธีการดูสีด้วยตาเปล่าและสังเกตการเรืองแสงภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 nm และ 365 nm เมื่อใช้สีย้อมสไตริล 3 ความเข้มข้น 5 mM น้ำตาลฟรุกโตสความเข้มข้น 50 mM และบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 mM หมายเลข 1, 2 = ใน 10 mM NaOAc buffer (pH 5.0), หมายเลข 3, 4 = ใน 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), หมายเลข 5, 6 = ใน 10 mM Na₂CO₃ buffer (pH 9.0), หมายเลข 1, 3, 5 สภาวะที่ไม่มีน้ำตาล และหมายเลข 2, 4, 6 สภาวะที่มีน้ำตาลฟรุกโตสความเข้มข้น 50 mM..... 16

รูปที่ 2.7 การทดสอบสีย้อมสไตริล 3 ทำปฏิกิริยากับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและโมเลกุลคู่ ด้วยวิธีการดูสีด้วยตาเปล่าและสังเกตการเรืองแสงภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 nm เมื่อใช้สีย้อมสไตริล 3 ความเข้มข้น 5

mM และน้ำตาลในบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 10 mM หมายเลข 1 = 5 mM dye, 2 = 5 mM dye + glucose, 3 = 5 mM dye + fructose, 4 = 5 mM dye + sucrose, 5 = 5 mM dye + galactose, 6 = 5 mM dye + lactose และ 7 = 5 mM dye + maltose 16

รูปที่ 2.8 การทดสอบของสีย้อมสไตริล 3 ความเข้มข้น 5 mM และน้ำตาลฟรุคโตสที่ความเข้มข้น ตั้งแต่ 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 และ 50 mM ในบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 10 mM ภายใต้แสงธรรมชาติ และแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 nm และ 365 nm 17

รูปที่ 2.9 การทดลองหาชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม เมื่อใช้สีย้อมสไตริล 3 ความเข้มข้น 100 µM ในบัฟเฟอร์ 10 mM หมายเลข 1, 3, 5 ไม่มี H₂O₂ หมายเลข 2, 4, 6 มี H₂O₂ ความเข้มข้น 200 µM ภายใต้แสงธรรมชาติและแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 nm 19

รูปที่ 2.10 การทดลองหาความเข้มข้นของบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต (pH 9.0) เมื่อใช้สีย้อมสไตริล 3 ความเข้มข้น 100 µM หมายเลข 1, 3, 5 ไม่มี H₂O₂ หมายเลข 2, 4, 6 มี H₂O₂ ความเข้มข้น 200 µM ภายใต้แสงธรรมชาติและแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 nm 20

รูปที่ 2.11 การเปรียบเทียบสีของสีย้อม 3 ความเข้มข้น 100 µM ในบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต (pH 9.0) ความเข้มข้น 10 mM ที่ทำปฏิกิริยากับ H₂O₂ ที่ความเข้มข้น 0, 1, 5, 10, 50, 100 และ 200 µM ภายใต้แสงธรรมชาติและแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 nm 20

รูปที่ 3.1 สีย้อมสไตริล 2-(4-boronostyryl)-3-methylbenzothiazolium hexafluorophosphate (BT+₂B(OH)₂) (3) 24

รูปที่ 3.2 แผนภาพการสังเคราะห์ 2,3-dimethylbenzothiazol-3-ium iodide (1) 24

รูปที่ 3.3 ¹H NMR ของ 2,3-dimethylbenzothiazol-3-ium iodide (1) (500 MHz, DMSO-*d*₆) 25

รูปที่ 3.4 แผนภาพการสังเคราะห์ 2-(4-boronostyryl)-3-methylbenzothiazolium hexafluorophosphate (BT+₂B(OH)₂) (3) 26

รูปที่ 3.5 ¹H NMR ของ 2-(4-boronostyryl)-3-methylbenzothiazolium hexafluorophosphate (3) (500 MHz, DMSO-*d*₆) 26

รูปที่ 3.6 ภาพแสดงการหาความเข้มข้นบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม สำหรับการตรวจวัดน้ำตาลด้วยวิธีการดูสีด้วยตาเปล่าและสังเกตการเรืองแสงภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 nm และ 365 nm เมื่อใช้สีย้อมสไตริล 3 ความเข้มข้น 5 mM และน้ำตาลฟรุคโตส ความเข้มข้น 50 mM ในบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต หมายเลข 1, 3, 5, 7 = 5 mM dye (controls) และหมายเลข 2, 4, 6, 8 = 5 mM dye + 50 mM fructose 28

รูปที่ 3.7 ภาพการหาชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม สำหรับการตรวจวัดน้ำตาลด้วยวิธีการดูสีด้วยตาเปล่าและสังเกตการเรืองแสงภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 nm และ 365 nm เมื่อใช้สีย้อมสไตริล 3 ความเข้มข้น 5 mM น้ำตาลฟรุคโตส ความเข้มข้น 50 mM และบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 mM หมายเลข 1, 2 = ใน 10 mM NaOAc buffer (pH 5.0), หมายเลข 3, 4 = ใน 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), หมายเลข 5, 6 = ใน 10 mM Na₂CO₃ buffer (pH 9.0), หมายเลข 1, 3, 5 สภาวะที่ไม่มีน้ำตาล และหมายเลข 2, 4, 6 สภาวะที่มีน้ำตาลฟรุคโตสความเข้มข้น 50 mM 29

รูปที่ 3.8 ภาพการทดสอบสีย้อมสไตริล 3 ทำปฏิกิริยากับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและโมเลกุลคู่ ด้วยวิธีการดูสีด้วยตาเปล่าและสังเกตการเรืองแสงภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 nm เมื่อใช้สีย้อมสไตริล 3 ความเข้มข้น 5

mM และน้ำตาลปริมาณมากเกินไป ในบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 10 mM หมายเลข 1 = 5 mM dye, 2 = 5 mM dye + glucose, 3 = 5 mM dye + fructose, 4 = 5 mM dye + sucrose, 5 = 5 mM dye + galactose, 6 = 5 mM dye + lactose และ 7 = 5 mM dye + maltose..... 30

รูปที่ 3.9 ภาพภายใต้แสงธรรมชาติและแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 nm และ 365 nm ของสีย้อมสไตริล 3 ความเข้มข้น 5 mM และน้ำตาลฟรุกโตสที่ความเข้มข้น ตั้งแต่ 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 และ 50 mM (หมายเลข 1-7 ตามลำดับ) ในบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 10 mM 31

รูปที่ 3.10 MALDI-TOF MS สเปกตรัมของ (A) = สีย้อมสไตริล 3 (5 mM), (B) = สีย้อมสไตริล 3 (5 mM) + บัฟเฟอร์ Na₂CO₃ 10 mM และ (C) = สีย้อมสไตริล 3 (5 mM) + บัฟเฟอร์ Na₂CO₃ 10 mM + น้ำตาลฟรุกโตส 50 mM เมื่อทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 32

รูปที่ 3.11 ¹H NMR ของสีย้อมสไตริล (3) กับน้ำตาลฟรุกโตส (500 MHz, DMSO-d₆)..... 32

รูปที่ 3.12 ภาพภายใต้แสงธรรมชาติและแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 nm และ 365 nm ของสีย้อมสไตริลที่มีหมู่บอโรนิกตำแหน่ง *ortho* (4) ความเข้มข้น 5 mM และน้ำตาลฟรุกโตสความเข้มข้น 50 mM ในบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต 10 mM หมายเลข 1 = 5 mM dye, 2 = 5 mM dye + 10 mM Na₂CO₃ และ 3 = 5 mM dye + 10 mM Na₂CO₃ + 50 mM fructose 33

รูปที่ 3.13 MALDI-TOF MS สเปกตรัมของ (A) = สีย้อม *ortho* (4) (5 mM), (B) = สีย้อม *ortho* (4) (5 mM) + บัฟเฟอร์ Na₂CO₃ 10 mM และ (C) = สีย้อม *ortho* (4) (5 mM) + บัฟเฟอร์ Na₂CO₃ 10 mM + น้ำตาลฟรุกโตส 50 mM เมื่อทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 34

รูปที่ 3.14 ภาพภายใต้แสงธรรมชาติและแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 nm และ 365 nm ของสีย้อมสไตริลที่มีหมู่บอโรนิกตำแหน่ง *meta* (5) ความเข้มข้น 5 mM กับน้ำตาลฟรุกโตสความเข้มข้น 50 mM ในบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 10 mM หมายเลข 1 = 5 mM dye, 2 = 5 mM dye + 10 mM Na₂CO₃ และ 3 = 5 mM dye + 10 mM Na₂CO₃ 50 mM fructose 35

รูปที่ 3.15 MALDI-TOF MS สเปกตรัมของ (A) = สีย้อม *meta* (4) (5 mM), (B) = สีย้อม *meta* (4) (5 mM) + บัฟเฟอร์ Na₂CO₃ 10 mM และ (C) = สีย้อม *meta* (4) (5 mM) + บัฟเฟอร์ Na₂CO₃ 10 mM + น้ำตาลฟรุกโตส 50 mM เมื่อทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 35

รูปที่ 3.16 กราฟการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนส์ของสีย้อมสไตริล 3 ในบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต (pH 9.0) ความเข้มข้น 10 mM วัดการเรืองแสงด้วยเครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรมิเตอร์ โดยใช้ความยาวคลื่นกระตุ้นที่ 390 nm (ก) สเปกตรัมของฟลูออเรสเซนส์ในสถานะที่ไม่มีน้ำตาล (ข) สเปกตรัมของฟลูออเรสเซนส์ในสถานะที่มีน้ำตาลฟรุกโตสความเข้มข้น 50 mM (ค) กราฟระหว่างสัญญาณการเรืองแสง (F/F_0 ที่ความยาวคลื่น 490 nm) กับเวลา 37

รูปที่ 3.17 กราฟการดูดกลืนแสงยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรีของสีย้อมสไตริล 3 ความเข้มข้น 10 μM ในบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต (Na₂CO₃) (pH 9.0) ความเข้มข้น 10 mM (ก) สเปกตรัมของการดูดกลืนแสงยูวี-วิสิเบิล ในสถานะที่ไม่มีน้ำตาล (ข) สเปกตรัมของการดูดกลืนแสงยูวี-วิสิเบิล ในสถานะที่มีน้ำตาลฟรุกโตสความเข้มข้น 50 mM (ค) กราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (A_{390}/A_{280}) กับเวลาของการเกิดปฏิกิริยา 39

รูปที่ 3.18 กราฟการดูดกลืนแสงยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมตรีของสีย้อมสไตริล 3 ความเข้มข้น 10 μM (ก) บัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต (pH 9.0) (ข) บัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต (pH 7.0) 40

รูปที่ 3.19 กราฟการดูดกลืนแสงยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมตรี เมื่อใช้สีย้อมสไตริล 3 ความเข้มข้น 10 μM กับน้ำตาล ฟรุกโตสที่ความเข้มข้นต่างๆในระดับ mM ในบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 500 μM 41

รูปที่ 3.20 แผนภาพกลไกการเกิดปฏิกิริยา deboronation ด้วย H_2O_2 ภายใต้ภาวะเบส³⁶ 42

รูปที่ 3.21 แผนภาพการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสกับกลูโคสออกซิเดสและการเกิดปฏิกิริยาของสีย้อมสไตริล 3 กับ H_2O_2 42

รูปที่ 3.22 ภาพภายใต้แสงธรรมชาติและแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 nm ของการหาชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม เมื่อใช้สีย้อมสไตริล 3 ความเข้มข้น 100 μM ในบัฟเฟอร์ 10 mM หมายเลข 1, 3, 5 ไม่มี H_2O_2 หมายเลข 2, 4, 6 มี H_2O_2 ความเข้มข้น 200 μM 43

รูปที่ 3.23 ภาพภายใต้แสงธรรมชาติและแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 nm ของการหาความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม เมื่อใช้สีย้อมสไตริล 3 ความเข้มข้น 100 μM หมายเลข 1, 3, 5 ไม่มี H_2O_2 หมายเลข 2, 4, 6 มี H_2O_2 ความเข้มข้น 200 μM 43

รูปที่ 3.24 ภาพภายใต้แสงธรรมชาติและแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 nm เปรียบเทียบสีของสีย้อม 3 ความเข้มข้น 100 μM ในบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต (pH 9.0) ความเข้มข้น 10 mM ที่ทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 0, 1, 5, 10, 50, 100 และ 200 μM (หมายเลข 1-7 ตามลำดับ) 44

รูปที่ 3.25 แผนภาพการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสีย้อม 3 กับ H_2O_2 44

รูปที่ 3.26 MALDI-TOF MS สเปกตรัมของ (A) = สีย้อม 3 (100 μM) + บัฟเฟอร์ Na_2CO_3 1 mM และ (B) = สีย้อม 3 (100 μM) + บัฟเฟอร์ Na_2CO_3 1 mM + H_2O_2 200 μM เมื่อทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พิกที่แสดงสัญลักษณ์ด้วย * คือพิกของแมทริกซ์ (CCA) ซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา 45

รูปที่ 3.27 กราฟแสดงการเรืองแสงของสีย้อม 3 (10 μM) หลังทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 0, 1, 5, 15, 20, 25, 30, 40 และ 50 μM ในบัฟเฟอร์ Na_2CO_3 (pH 9.0) 500 μM เป็นเวลา 60 นาที โดยวัดที่ความยาวคลื่นกระตุ้นที่ 500 nm (ก) ฟลูออเรสเซนส์สเปกตรัมของ H_2O_2 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (0-50 μM) (ข) กราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของ H_2O_2 (0-25 μM) และสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่ 560 nm แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยจากการวัด 3 ครั้ง และ error bar แสดงถึงค่า SD 46

รูปที่ 3.28 กราฟการดูดกลืนแสงยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรีของสีย้อม 3 (10 μM) หลังทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20, 30 และ 50 μM ในบัฟเฟอร์ Na_2CO_3 (pH 9.0) ความเข้มข้น 500 μM วัดการเรืองแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (ก) สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ H_2O_2 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (0-50 μM) (ข) กราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้น H_2O_2 ช่วงความเข้มข้น (0-50 μM) และค่าการดูดกลืนแสง แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยจากการวัด 3 ครั้ง และ error bar แสดงถึงค่า SD 47

รูปที่ 3.29 กราฟแสดงการเรืองแสงของสีย้อม 3 (10 μM) หลังทำปฏิกิริยากับน้ำตาลกลูโคสที่ผ่านการออกซิไดซ์ด้วยกลูโคสออกซิเดส ที่ความเข้มข้น 0, 1, 5, 10, 20 และ 50 μM ในบัฟเฟอร์ Na_2CO_3 (pH 9.0) 500 μM เป็นเวลา 60 นาที โดยวัดที่ความยาวคลื่นกระตุ้นที่ 500 nm (ก) ฟลูออเรสเซนส์สเปกตรัมของกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (0-50 μM) (ข) กราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของกลูโคส (0-50 μM) และสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่ 560 nm 49

รูปที่ 3.30 กราฟการดูดกลืนแสงยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรีของสีย้อม 3 (10 μM) หลังทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของน้ำตาลกลูโคสกับกลูโคสออกซิเดส ที่ความเข้มข้น 0, 1, 5, 10, 20 และ 50

μM ในบัฟเฟอร์ Na_2CO_3 (pH 9.0) ความเข้มข้น 500 μM วัดการเรืองแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (ก) สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (1-50 μM) (ข) กราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นกลูโคสช่วงความเข้มข้น (0-50 μM) และค่าการดูดกลืนแสง 50

สัญลักษณ์และคำย่อ

| | |
|--------------------|--|
| δ | chemical shift |
| μL | microliter |
| μM | micromolar |
| d | doublet |
| dL | deciliter |
| $^{\circ}\text{C}$ | degree Celcius |
| DMSO- d_6 | deuterated dimethyl sulfoxide |
| EtOH | ethanol |
| Hz | hertz |
| LOD | limit of detection |
| M | molar |
| m | multiplet |
| MALDI-TOF MS | matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry |
| Me | methyl |
| mg | milligram |
| MHz | megahertz |
| mL | milliliter |
| mM | millimolar |
| mmol | millimole |
| nM | nanomolar |
| NMR | nuclear magnetic resonance |
| PB | phosphate buffer |
| PMT | photomultiplier tube |
| s | singlet |
| SD | standard deviation |
| t | triplet |
| TLC | thin layer chromatography |
| T_m | melting temperature |
| Tris | tris-(hydroxymethyl)aminomethane |
| UV | ultraviolet |

บทที่ 1

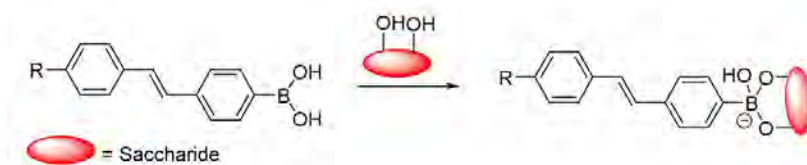
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ

ในปัจจุบัน พฤติกรรมการดำเนินชีวิตของมนุษย์และค่านิยมการบริโภคมีการเปลี่ยนแปลงไปจากในอดีต อันเป็นผลมาจากบทบาทในสังคมที่เปลี่ยนไปและการขยายตัวของสังคมเมือง ส่งผลให้เกิดการสะสมความเสี่ยงต่อโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง เช่น โรคความดันโลหิตสูง โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคมะเร็ง หรือโรคเบาหวาน ซึ่งจะมีการดำเนินโรคอย่างช้า ๆ ค่อย ๆ สะสมอาการอย่างต่อเนื่อง โดยโรคเบาหวานถือเป็นหนึ่งในปัญหาใหญ่ที่กำลังทวีความรุนแรงมากขึ้น ซึ่งโรคเบาหวาน หมายถึง ภาวะที่ร่างกายมีระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูงกว่าปกติซึ่งวิธีตรวจเบื้องต้นคือการเจาะน้ำตาลในเลือดหลังอดอาหาร คนปกติจะมีระดับน้ำตาลในเลือดต่ำกว่า 100 mg/dL (<5.6 mM) ถ้ามีน้ำตาลในระดับ 100-125 mg/dL (5.6-6.9 mM) จะถือเป็นกลุ่มเสี่ยงต่อการเป็นโรคเบาหวาน แต่ถ้าหากมีน้ำตาลสูงถึง 126 mg/dL (7 mM) ขึ้นไปจะถือเป็นโรคเบาหวาน¹ เบาหวานเป็นโรคที่สามารถพบได้ในคนทุกช่วงอายุ อีกทั้งยังอาจส่งผลข้างเคียงทำให้เกิดโรคอื่น เช่น โรคหัวใจ ไตวาย มะเร็ง เป็นต้น ในทางการแพทย์โรคเบาหวานยังเป็นอีกหนึ่งโรคร้ายที่ยังไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ ทำได้เพียงแต่การควบคุมระดับน้ำตาลให้เหมาะสมเท่านั้น² ซึ่งในปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดอย่างแพร่หลายเพื่อให้ได้วิธีการตรวจวัดที่ให้ผลถูกต้อง รวดเร็ว และสะดวกต่อการใช้งาน เช่น ชุดตรวจวัดระดับน้ำตาลชนิดพกพาที่ใช้การตรวจวัดเชิงแสง (photometric method)³ โดยตรวจระดับน้ำตาลจากค่าความเข้มของสีของสารประกอบที่อยู่ในแถบตรวจ อย่างไรก็ตามชุดตรวจวัดดังกล่าวยังมีข้อจำกัดคือค่าของน้ำตาลที่ตรวจวัดได้สามารถถูกรบกวนด้วยความขุ่นของเลือด และสารที่มีสีต่าง ๆ ในเลือด

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยสนใจใช้โมเลกุลที่มีหมู่บอร์อนิกเป็นตัวรับรู้ทางเคมี ซึ่งหมู่บอร์อนิกเป็นหมู่ฟังก์ชันที่สามารถทำปฏิกิริยากับน้ำตาล^{4,5} และสารอื่นที่จำเพาะบางชนิด เช่น ฟลูออไรด์⁶ และ ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์⁷ โดยเมื่อหมู่บอร์อนิกทำปฏิกิริยากับโมเลกุลเป้าหมายจะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโมเลกุลทำให้สมบัติบางประการของมันเปลี่ยนไป ซึ่งอาจตรวจวัดได้โดยเทคนิคต่าง ๆ เช่น การสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีด้วยตาเปล่า (colorimetric assay) และฟลูออเรสเซนส์ (fluorescence)⁵ โดยในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยสนใจที่จะพัฒนาตัวรับรู้น้ำตาลโดยการสังเคราะห์โมเลกุลสี้อมที่มีหมู่บอร์อนิกในโมเลกุล เพื่อใช้ในการตรวจวัดระดับน้ำตาลกลูโคส

สำหรับโมเลกุลสี้อมที่ผู้วิจัยเลือกใช้ คือสี้อมในกลุ่มสไตริล โดยภายในโมเลกุลของสี้อมสไตริลมีระบบพายอิเล็กตรอน (π -electron) ของวงอะโรมาติกที่มีอิเล็กตรอนมาก กับเฮเทอโรอะโรมาติกที่มีสมบัติขาดแคลนอิเล็กตรอน เชื่อมกันด้วยพันธะคู่ที่มีระบบคอนจูเกต (π -conjugation) ซึ่งสามารถสังเคราะห์ได้ง่าย และสามารถปรับเปลี่ยนโครงสร้างโมเลกุลได้อย่างหลากหลายเพื่อให้ได้สมบัติเชิงแสงที่ต้องการ ผู้วิจัยจึงสนใจพัฒนาตัวรับรู้โดยการสังเคราะห์สี้อมสไตริลที่มีหมู่บอร์อนิกในโมเลกุล เพื่อตรวจวัดระดับน้ำตาล โดยมีหลักการคือหมู่บอร์อนิกสามารถทำปฏิกิริยากับหมู่ไดออล (diols) เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนไซคลิกบอร์อนิกเอสเทอร์ได้ (รูปที่ 1.1)



รูปที่ 1.1 แผนภาพอธิบายปฏิกิริยาระหว่างสีย้อมสไตริลที่มีหมู่บอโรนิกกับสารประกอบไดออล

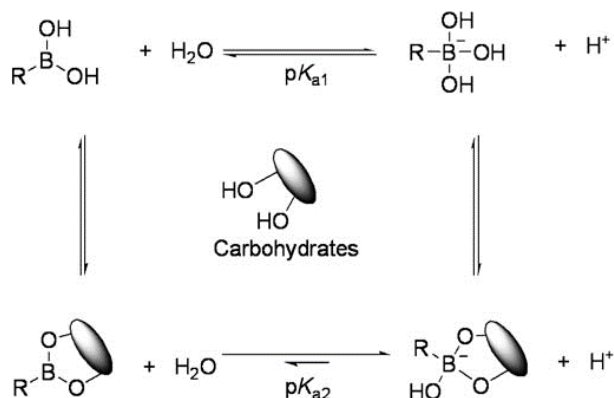
ในงานวิจัยมีสมมติฐานว่าสีย้อมในกลุ่มสไตริลที่มีหมู่บอโรนิกอาจจะแสดงสมบัติเชิงแสงแตกต่างกันก่อนและหลังจับกับน้ำตาล ซึ่งเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเมื่อเกิดปฏิกิริยากับน้ำตาล และน่าจะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดชนิดและ/หรือปริมาณน้ำตาลได้ โดยคาดว่า การเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงแสงนี้สามารถติดตามได้โดยใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรสโคปี และ/หรือยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรี โดยคาดว่าจะสามารถติดตามความเปลี่ยนแปลงจากการเรืองแสงที่เพิ่มขึ้นและการบ่งบอกความแตกต่างระหว่างสีของสีย้อมสไตริลระหว่างก่อนและหลังจับกับโมเลกุลน้ำตาลได้โดยตรง นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ยังสนใจพัฒนาวิธีการตรวจวัดระดับน้ำตาลทางอ้อม โดยอาศัยการตรวจวัดปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลกลูโคสกับเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสโดยอาศัยคุณสมบัติของหมู่บอโรนิกที่สามารถทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ และอาจใช้วิธีนี้ในการบ่งบอกปริมาณน้ำตาลกลูโคสได้ ซึ่งจะมีข้อดีคือมีความจำเพาะต่อน้ำตาลกลูโคสเท่านั้น ดังที่ได้มีหลายงานวิจัยที่ได้ศึกษามาก่อนหน้านี้^{7, 8}

1.2 ทฤษฎีที่สำคัญและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.2.1 โรคเบาหวาน

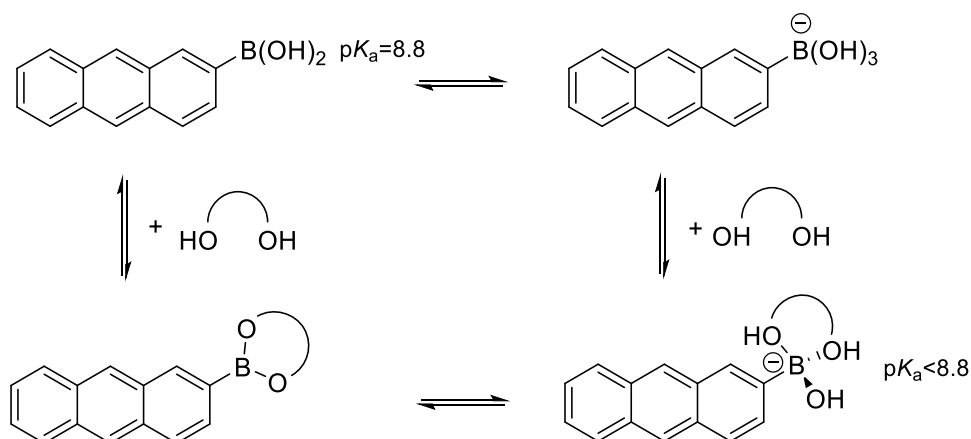
โรคเบาหวาน (diabetes) คือ ภาวะที่ร่างกายมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงกว่าปกติ โดยเกิดจากความผิดปกติของฮอร์โมนอินซูลิน โดยโรคเบาหวานจะเป็นเป็น 2 ประเภท ได้แก่ ประเภทที่ 1 เป็นภาวะเรื้อรังที่ตับอ่อนผลิตอินซูลินเพียงเล็กน้อยหรือไม่มีเลย ส่วนประเภทที่ 2 เป็นประเภทที่พบได้บ่อยที่สุด คือ ร่างกายผลิตฮอร์โมนอินซูลินไม่เพียงพอต่อร่างกาย ถ้าหากร่างกายมีการสะสมน้ำตาลในเลือดปริมาณมากซึ่งอาจจะก่อให้เกิดโรคและอาการแทรกซ้อน เช่น โรคหัวใจ โรคไต หรือภาวะของหลอดเลือดที่ผิดปกติ⁹ และน้ำตาลในเลือดของร่างกาย หมายถึง น้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ใช้ในร่างกายเพื่อสร้างพลังงานให้เซลล์ต่าง ๆ โดยจะต้องอยู่ในระดับที่เหมาะสมต่อร่างกายไม่สูงหรือต่ำจนเกินไป ในปัจจุบันโรคเบาหวานยังคงเป็นโรคเรื้อรัง เนื่องจากไม่มีวิธีการรักษาให้หายขาด แต่วิธีที่ดีที่สุดในการรักษาคือการตรวจวัดและควบคุมระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดให้เหมาะสมอยู่เสมอ เช่น การควบคุมอาหาร การออกกำลังกาย และการใช้ยาควบคุมระดับน้ำตาล เป็นต้น ดังนั้นการตรวจวัดระดับน้ำตาลจึงมีความสำคัญ โดยในปัจจุบันมีเครื่องตรวจน้ำตาลในเลือดแบบพกพา ซึ่งอาศัยหลักการที่ว่าน้ำตาลกลูโคสในเลือดทำปฏิกิริยากับเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็น H_2O_2 ซึ่งจะไปทำปฏิกิริยากับสีย้อมบนแถบสี โดยระดับความเข้มข้นของน้ำตาลในเลือดจะสัมพันธ์กับความเข้มของสีและการดูดกลืนแสง¹⁰ และจะแปลผลออกมาเป็นตัวเลข ซึ่ง ISO และองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาได้กำหนดเกณฑ์ไว้ว่าค่าตัวเลขที่ได้จะต้องมีค่า ± 20 mg/dL (1.11 mM) สำหรับระดับ <100 mg/dL (5.6 mM) หรือ $\pm 20\%$ สำหรับระดับน้ำตาล >100 mg/dL (5.6 mM) อยู่น้อย 95% ของผลลัพธ์^{11, 12}

ที่ผ่านมาได้มีผู้นำหมู่บอโรนิกมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดน้ำตาลโดยใช้ร่วมกับ pH indicators ดังตัวอย่างในงานวิจัยของ Ghosh และคณะ¹⁴ ได้อาศัยสมบัติความเป็นกรดของหมู่บอโรนิกที่เปลี่ยนไปหลังจากทำปฏิกิริยากับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและโมเลกุลคู่ (รูปที่ 1.3) ทำให้สามารถใช้ pH indicators ในการตรวจวัดเชิงสีที่เปลี่ยนไปจากการเปลี่ยนแปลง pH ของสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้น โดยหมู่บอโรนิกจะถูกเปลี่ยนไปเป็นบอโรเนตเอสเทอร์ซึ่งมีโครงสร้างเป็นเททระฮีดรัลและแสดงความเป็นกรดมากกว่ากรดบอโรนิก ซึ่งวิธีการนี้สามารถทำได้ง่าย และสามารถใช้ในการตรวจวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสในน้ำเกลือในทางการแพทย์ได้ แต่ยังมีข้อจำกัดเนื่องจากตอบสนองได้ดีต่อน้ำตาลบางตัวเท่านั้นซึ่งอาจจะปรับปรุงได้โดยการเปลี่ยนไปใช้อนุพันธ์หมู่บอโรนิกอื่น ๆ



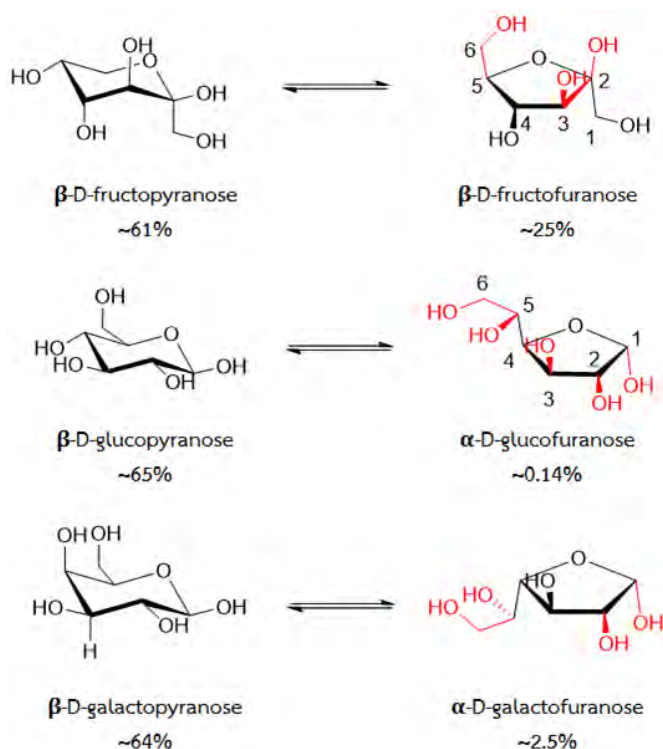
รูปที่ 1.3 แผนภาพสมดุลของหมู่บอโรนิกและบอโรเนต¹⁵

สารในกลุ่มฟีนิลบอโรนิกแอซิด [$\text{PhB}(\text{OH})_2$] ได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางในการพัฒนาเป็นตัวรับรู้น้ำตาลและไดออล เนื่องจากโครงสร้างที่เปลี่ยนไปของหมู่บอโรนิกส่งผลต่อความหนาแน่นของอิเล็กตรอนบนวงแหวนเบนซีนโดยตรง และสามารถส่งผลในระยะไกลผ่านคอนจูเกชัน¹⁶⁻¹⁹ ตัวอย่างเช่น ในปี 1959 Lorand และ Edwards ได้ศึกษาโครงสร้างที่เป็นกลางและมีประจุลบ [$\text{PhB}(\text{OH})_3^-$] ของ phenyl boronic acid²⁰ โดยพบว่าโครงสร้างของหมู่บอโรนิกที่สามารถเปลี่ยนรูปแบบโครงสร้างจาก sp^2 ไปเป็น sp^3 hybridization จะมีผลโดยตรงต่อการเกิดฟลูออเรสเซนส์ และสามารถใช้ในการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้พัฒนาเพื่อเป็นตัวตรวจวัดน้ำตาลได้⁵ อีกตัวอย่างหนึ่งคืองานวิจัยของ Yoon และ Czarnik ในปี 1992 ซึ่งได้พัฒนาตัวตรวจวัดที่มีหมู่บอโรนิกที่มีโบรอนเชื่อมต่อโดยตรงกับโมเลกุลที่เป็นฟลูออโรฟอร์ (รูปที่ 1.4) ทำให้สามารถตอบสนองต่อน้ำตาล และติดตามผลได้จากระดับสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ (fluorescence quenching)²¹



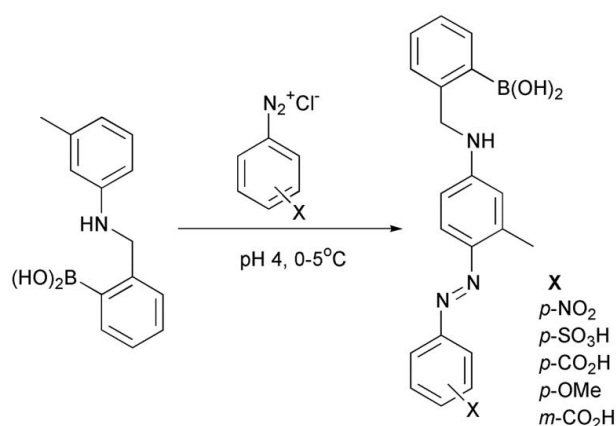
รูปที่ 1.4 แผนภาพการเกิดปฏิกิริยาของ anthrylboronic acid กับ diol²¹

ในปี 2013 Xin และคณะ ได้ตรวจหาความจำเพาะของหมู่บอโรนิกที่ตำแหน่งต่าง ๆ กับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว โดยพบว่าหมู่บอโรนิกสามารถเกิดโครงข่ายกับน้ำตาลได้หลายแบบ เนื่องจากน้ำตาลมีโครงสร้างที่ไม่แน่นอน (รูปที่ 1.5) ซึ่งอันตรกิริยาระหว่างหมู่บอโรนิกกับ *cis*-1,2- or 1,3-diols จะเกิดผลิตภัณฑ์เป็นแบบ five- หรือ six-membered cyclic esters ตามลำดับ ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถเกิดกับน้ำตาลที่มีความเข้มข้นในระดับ mM ซึ่งเป็นระดับที่พบในเลือด โดยความแข็งแรงของหมู่บอโรนิกที่จะจับกับหมู่ไดออล (diols) ก็จะขึ้นกับทิศทางการจัดเรียงตัวของหมู่ไฮดรอกซิลในน้ำตาล⁴ และพบว่าความสามารถในการจับของหมู่บอโรนิกกับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เรียงตามลำดับได้ดังนี้ ฟรุคโตส > กาแลคโตส > แมนโนส > กลูโคส²⁰



รูปที่ 1.5 แผนภาพแสดงโครงสร้างของน้ำตาลฟรุคโตส, กลูโคส และกาแลคโตส และตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิล (สีแดง) ที่เกิดสามารถปฏิกิริยากับหมู่บอโรนิก⁴

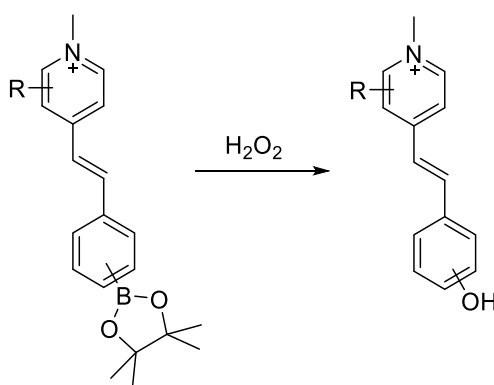
ในปี 2002 งานวิจัยของ Ward และคณะ²² ต้องการพัฒนาตัวตรวจวัด boronic acid azo dyes ที่เป็นโมเลกุล internal charge transfer (ICT) (รูปที่ 1.6) ซึ่งคาดหวังว่าจะมีการเปลี่ยนสีเมื่อเกิดปฏิกิริยากับน้ำตาล และได้มีการเปลี่ยนหมู่แทนที่บนวงอะโรมาติกของ azo dyes เช่น methoxy หรือ nitro group ซึ่งก่อนหน้านี้ไม่ได้มีการศึกษามาก่อนว่าการเปลี่ยนหมู่แทนที่ที่จะส่งผลต่อสีที่เปลี่ยนไปของ boronic acid azo dyes หรือไม่ ถ้าหากมีการเปลี่ยนแปลงมากพอจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดน้ำตาลกลูโคสเพื่อการวินิจฉัยโรคเบาหวานได้ จากการศึกษาปฏิกิริยาระหว่าง boronic acid azo dyes กับน้ำตาลโดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมตรี และใช้น้ำตาลฟรุกโตสในการทดลองเนื่องจากมีงานวิจัยก่อนหน้านี้ระบุไว้ว่า น้ำตาลฟรุกโตสให้ค่า pK_a ที่ลดลงมากเมื่อจับกับหมู่บอโรนิกมากกว่าน้ำตาลตัวอื่น ๆ ซึ่งผู้วิจัยพบว่า boronic acid azo dyes สามารถเกิดปฏิกิริยากับน้ำตาลได้จริงและทำให้การดูดกลืนแสงเปลี่ยนแปลงจริงแต่มีการ shift ไปทางความยาวคลื่นสั้นลง (blue shift) เพียง 55 nm เท่านั้น โดยผลวิจัยพบว่าโครงสร้างหมู่แทนที่บน azo dyes มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยากับน้ำตาลและการให้สีที่เปลี่ยนไป



รูปที่ 1.6 ตัวอย่างการสังเคราะห์โมเลกุล boronic acid azo dyes²²

นอกจากนี้ในปี 2007 Schiller และคณะ²³ ได้ศึกษาและพัฒนาตัวรับรู้น้ำตาลจากเกลือ bipyridinium ที่มีหมู่บอโรนิก โดยใช้หลักการดังแสดงในรูปที่ 1.7 ก. กล่าวคือ ในการตรวจวัดจะใช้สีย้อมฟลูออเรสเซนส์ที่มีประจุลบ 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt (HPTS) ร่วมกับกับเกลือ bipyridinium ที่มีหมู่บอโรนิกซึ่งมีประจุบวกในโมเลกุล ดังแสดงในรูปที่ 1.7 ข. ในสถานะที่ไม่มีน้ำตาล สีย้อมประจุลบกับเกลือ bipyridinium ประจุบวกจะเกิดสารเชิงซ้อนที่ให้สัญญาณฟลูออเรสเซนส์น้อย เนื่องจากสามารถเกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอนจากสีย้อมไปยังเกลือ bipyridinium ได้ ทำให้เกิดการดับแสงฟลูออเรสเซนส์ของสีย้อม แต่ในสถานะที่มีน้ำตาล เมื่อน้ำตาลเกิดปฏิกิริยากับหมู่บอโรนิก เกิดเป็นหมู่บอโรเนตเอสเทอร์ที่มีประจุลบ ทำให้ประจุรวมของโมเลกุลเกลือ bipyridinium เป็น 0 ส่งผลให้ประสิทธิภาพการดับแสงฟลูออเรสเซนส์น้อยลง และสีย้อม HPTS ก็สามารถตอบสนองสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ได้มากขึ้น โดยผลการวิจัยพบว่าเกลือ bipyridinium *ortho*-BBV ให้ผลการตรวจวัดน้ำตาลกับสีย้อม HPTS ได้ดีกว่า *meta*-BBV เนื่องจากให้ความแตกต่างในสถานะที่มีและไม่มีน้ำตาลได้มากกว่า

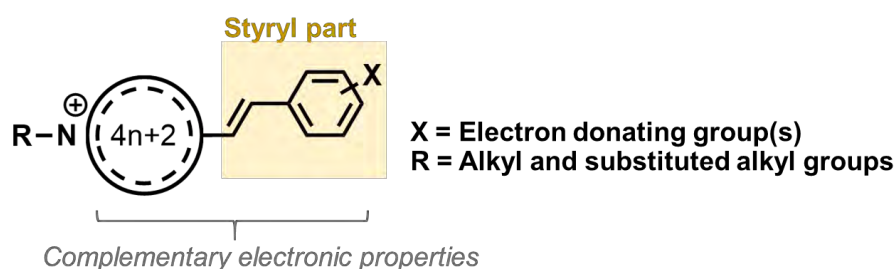
ตั้งต้นที่โดยปกติไม่เรืองแสง แต่เมื่อเกิดปฏิกิริยาที่เร่งเอนไซม์แล้วจะให้ผลิตภัณฑ์ที่เรืองแสงได้²⁸ นอกจากนี้ยังได้มีงานวิจัยที่พัฒนาเซนเซอร์สำหรับตรวจวัด H_2O_2 โดยตรง เช่น งานวิจัยของ Lippert และคณะ ได้พัฒนา boronate-based fluorescent probes เพื่อใช้ในการตรวจวัด H_2O_2 ²⁹ และ Lee และคณะ⁸ ได้พัฒนาตัวตรวจวัดในกลุ่มสีย้อมสไตริลที่สังเคราะห์ได้จาก *N*-methylpicolinium และ *N*-methylquinolinium salts กับ 3-formylphenyl boronate esters ซึ่งจะได้สีย้อมสไตริลที่มีสมบัติในการเปลี่ยนแปลงสีและการเรืองแสงเมื่อให้ทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 เนื่องจากสีย้อมสไตริลที่มีหมู่บอโรนิกสามารถเกิดปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์และให้ผลิตภัณฑ์เป็นอนุพันธ์ของฟินอล (รูปที่ 1.9) อีกทั้งยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดน้ำตาลกลูโคส โดยอาศัยการตรวจวัด H_2O_2 ที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลกลูโคสกับเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส⁸ ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเป็นอีกหนึ่งวิธีที่จะสามารถตรวจวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสทางอ้อมได้ จึงสามารถที่จะนำหลักการนี้ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดน้ำตาลกลูโคสและติดตามปฏิกิริยาได้การเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงของสีย้อมสไตริลได้



รูปที่ 1.9 แผนภาพการเกิดปฏิกิริยาของสีย้อมสไตริลที่มีหมู่บอโรนเตเอสเทอร์กับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์⁸

นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Lampard และคณะ⁷ ยังได้ใช้อนุพันธ์ stilbene ที่มีหมู่บอโรนิกในการตรวจวัด H_2O_2 ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์ได้สำเร็จ โดยพบว่าอนุพันธ์ stilbene ตอบสนองสัญญาณฟลูออเรสเซนส์หลังจากทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 อย่างไรก็ตามในการตรวจวัดภายในเซลล์พบว่าไม่พบสัญญาณการเปลี่ยนแปลงแต่พบสัญญาณที่อาจเกิดจากการรบกวนของไนโตรเจน หรือ reactive oxygen species (ROS) และมีค่าขีดจำกัดของการตรวจวัด H_2O_2 ต่ำสุด (LOD) ที่มากกว่า 3 mM

1.2.4 สีย้อมสไตริล

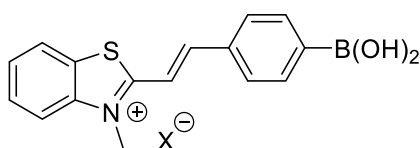


รูปที่ 1.10 โครงสร้างทั่วไปของสีย้อมสไตริล

สีย้อมสไตริลเป็นสีย้อมที่ประกอบด้วยวงอะโรมาติกสองวงที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะคู่ โดยทั่วไปวงหนึ่งมักจะเป็นวงเฮเทอโรอะโรมาติกที่ขาดแคลนอิเล็กตรอน และอีกวงหนึ่งเป็นวงอะโรมาติกที่มีอิเล็กตรอนมาก (รูปที่ 1.10) สีย้อมในกลุ่มนี้สามารถสังเคราะห์ได้ง่าย³⁰ สามารถปรับช่วงคลื่นของการเรืองแสงได้อย่างหลากหลายโดยการปรับสมบัติการให้และรับอิเล็กตรอนของวงอะโรมาติกทั้งสอง³¹ และสามารถปรับเปลี่ยนโครงสร้างให้มีหมู่ฟังก์ชันที่สามารถจับและเกิดการตอบสนองกับโมเลกุลที่หลากหลาย

1.3 วัตถุประสงค์และขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาตัวรับรู้น้ำตาลโดยการสังเคราะห์สีย้อมในกลุ่มสไตริลที่มีหมู่บอร์อนิก โดยในงานวิจัยนี้สนใจที่จะใช้หมู่เอ็น-เมทิลเบนโซไทอะโซเลียม (*N*-methylbenzothiazolium) เชื่อมต่อกับวงอะโรมาติกที่มีหมู่บอร์อนิกผ่านพันธะคู่ (รูปที่ 1.11) เนื่องจากเป็นโมเลกุลที่ใหม่ที่ยังไม่เคยมีผู้มีการศึกษามาก่อน และหมู่เมทิลเบนโซไทอะโซเลียมยังเป็นกลุ่มเฮเทอโรอะโรมาติกที่มีสมบัติขาดแคลนอิเล็กตรอน ซึ่งเอื้อต่อการสังเคราะห์สีย้อม ประกอบกับมีผลการศึกษามาก่อนหน้านี้ว่าสีย้อมดังกล่าวมีสมบัติเชิงแสงที่ดี³² โดยจะพิสูจน์โครงสร้างของสีย้อมสไตริลที่มีหมู่บอร์อนิกที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (NMR) และ MALDI-TOF MS และจะนำสีย้อมที่ได้ไปทำปฏิกิริยากับน้ำตาล โดยทดสอบกับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) และน้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharide) เพื่อประเมินประสิทธิภาพการเรืองแสงและความสามารถในการเกิดปฏิกิริยากับสีย้อมสไตริลที่มีหมู่บอร์อนิกและเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงเชิงแสงด้วยการวิเคราะห์โดยการวัดการดูดกลืนแสง (UV-Vis spectrophotometry) และเทคนิคฟลูออเรสเซนส์ (fluorescence) นอกจากนี้ ผู้วิจัยยังสนใจพัฒนาวิธีการตรวจวัดน้ำตาลทางอ้อมโดยใช้สีย้อมสไตริลที่สังเคราะห์ได้เพื่อใช้ในการตรวจวัดไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ เนื่องจากหมู่บอร์อนิกที่ต่อกับวงเบนซีนสามารถทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เกิดผลิตภัณฑ์เป็นอนุพันธ์ฟีนอลที่มีสีเข้มหรือมีการเรืองแสงที่เปลี่ยนไป และหากประสบความสำเร็จจะนำวิธีการดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคส โดยนำน้ำตาลกลูโคสทำปฏิกิริยากับกลูโคสออกซิเดส และวัดปริมาณไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้น ซึ่งแม้จะมีขั้นตอนมากกว่าแต่อาจมีข้อดีคือให้ความไวสูง และมีความจำเพาะกับน้ำตาลกลูโคสมากกว่าวิธีการตรวจวัดโดยตรง



รูปที่ 1.11 สีย้อมสไตริลที่มีหมู่บอร์อนิกที่เป็นเป้าหมายของการสังเคราะห์ในงานวิจัยนี้

บทที่ 2

การทดลอง

2.1 รายการเครื่องมือ อุปกรณ์ สารเคมี

2.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

การวัดการเรืองแสงของสาร กระทำโดยใช้เครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (fluorescence spectrophotometer) รุ่น Cary Eclipse (Varian/Agilent Technologies) และเครื่องวัดการดูดกลืนแสงชนิดนาโนดรอป (Nanodrop Spectrophotometer) รุ่น 3300 (Thermo Scientific)

การตรวจวัดสัญญาณการดูดกลืนแสง ใช้เครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis spectrophotometer) รุ่น Cary100 (Varian/Agilent Technologies)

การถ่ายภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต กระทำโดยใช้เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต UV Transilluminator รุ่น VILBER LOURMAT TCP-20.LM โดยใช้แหล่งกำเนิดแสงที่ 312 nm และ 365 nm และถ่ายภาพโดยกล้อง Canon EOS M เลนส์ EF-M 18-55 IS STM และ EF-M 22 STM ในโหมดแมนนวลผ่านฟิลเตอร์สีเหลือง ยี่ห้อ Citiwide Digital เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 52 mm เพื่อตัดแสง UV โดยตั้งค่าของกล้องดังต่อไปนี้: ISO: 800; รูรับแสง: 5.6; ความไวชัตเตอร์: 1/6 วินาที

การพิสูจน์เอกลักษณ์ ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ใช้เครื่อง JEOL JNM-ECZ500R/S1 NMR spectrometer ทำงานที่ความถี่ 500 MHz สำหรับ ^1H และการวัดมวลโมเลกุลใช้เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ชนิด Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI-TOF Mass Spectrometer) รุ่น Microflex (Bruker Daltonics) โดยใช้ α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CCA, 99%, Sigma Aldrich) เป็น matrix

การชั่งน้ำหนักสาร ใช้เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่งของ DKSH รุ่น AND GR-200

การปิเปตสาร การปิเปตสารปริมาณน้อยใช้ไมโครปิเปต ยี่ห้อ Optipette ขนาด 0.1-2 μL , ยี่ห้อ RAININ Pipet-Lite XLS ขนาด 0.5-10 μL , 2-20 μL , 20-200 μL และ ยี่ห้อ BOECO Germany ขนาด 100-1000 μL สำหรับสารปริมาณมาก (> 1 mL) ใช้ graduate pipette ชนิดแก้ว ยี่ห้อ HBG ประเทศเยอรมนี

การทำให้สารแห้ง ใช้เครื่องปั๊มสุญญากาศ (diaphragm vacuum pump) รุ่น JK-DVP-0.5A (JKI)

การควบคุมอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา ใช้เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (heating block) รุ่น TDB - 400 (Biosan)

2.1.2 รายการสารเคมี

2.1.2.1 การสังเคราะห์สีย้อมสไตริลที่มีหมู่บอร์อนิก ใช้ 2-methylbenzothiazole (99%) จาก Sigma Aldrich, 4-formylphenylboronic acid จาก Tokyo Chemical Industry (TCI), methyl iodide จาก BDH และ ammonium hexafluorophosphate จาก Acros Organics

2.1.2.2 ตัวทำละลายที่ใช้ methanol จาก Carlo Erba, ethanol (AR grade) จาก RCI Lab Scan

2.1.2.3 บัฟเฟอร์ที่ใช้ ได้แก่ บัฟเฟอร์ Tris-HCl (pH 7.4), บัฟเฟอร์ Sodium carbonate (pH 9.0) และบัฟเฟอร์ Phosphate (pH 7.0) โดยเจือจางจากสารละลายสต็อกความเข้มข้น 1 M ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการโดยใช้น้ำปราศจากไอออน (ความต้านทาน 18.2 M \cdot cm) ที่ได้จากเครื่องทำน้ำบริสุทธิ์ Milli-Q (Merck Millipore)

2.1.2.4 น้ำตาลที่ใช้ ได้แก่ glucose จาก คีกษาภัณฑ์, fructose จาก Merck, galactose 99% จาก Acros Organics, sucrose จาก Merck, maltose จาก Carbosyn Limited และ lactose จาก BDH

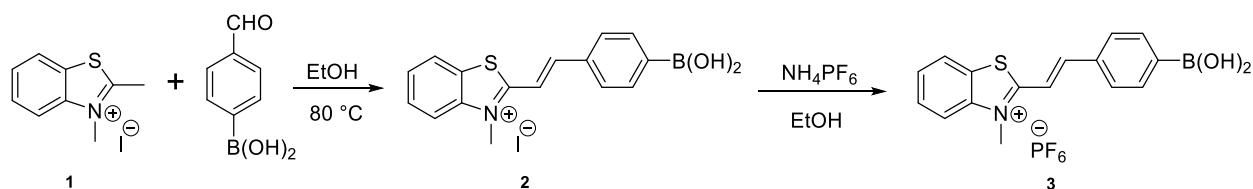
2.1.2.5 สารเคมีสำหรับการตรวจวัดน้ำตาลกลูโคสทางอ้อม ได้แก่ hydrogen peroxide-urea จาก Merck และ glucose oxidase (76.8 unit/mg) จาก TCI

2.1.2.6 การติดตามปฏิกิริยาเคมี ใช้เทคนิค TLC (Thin Layer Chromatography) ซึ่งเป็นแผ่นอะลูมิเนียมที่เคลือบด้วยซิลิกาเจล 60 F₂₅₄ ความหนา 0.2 mm จาก Merck D.C.

2.2 วิธีการสังเคราะห์สีย้อมสไตริล

2.2.1 การสังเคราะห์สีย้อมสไตริลที่มีประจุบวก (positively-charged styryl dye) และหมู่บอโรนิก (BT+₂B(OH)₂)

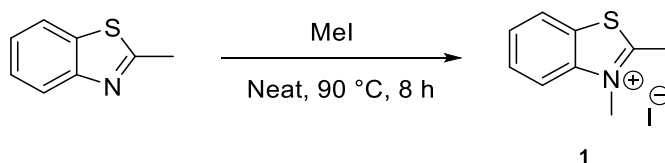
การสังเคราะห์สีย้อมสไตริลที่มีประจุบวก (positively-charged styryl dye) และหมู่บอโรนิก (BT+₂B(OH)₂, **3**) มีวิธีการสังเคราะห์แสดงดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 แผนภาพการสังเคราะห์ 2-(4-boronostyryl)-3-methylbenzothiazolium hexafluorophosphate (**3**)

a) 2,3-Dimethylbenzothiazol-3-ium iodide (**1**)³³

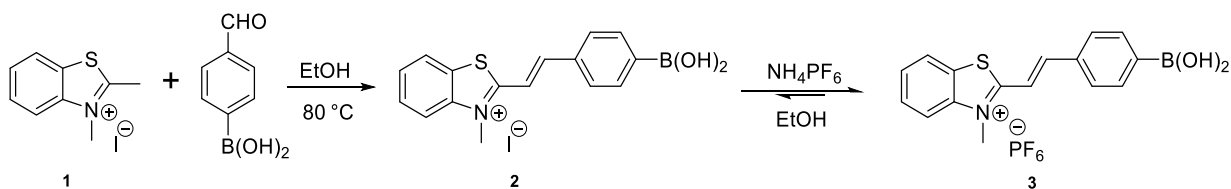
สังเคราะห์สาร **1** โดยให้ 2-methylbenzothiazole (0.64 mL, 0.746 g, 5 mmol) ทำปฏิกิริยากับ methyl iodide (0.62 mL, 5 mmol) โดยให้ความร้อนในหลอดทดลองที่มีฝาเกลียวปิดสนิทที่ 90 °C เป็นเวลา 1 คืน ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (heating block) ดังรูปที่ 2.2 หลังจากปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์แล้ว สังเกตได้จากไม่พบฟีกของสารตั้งต้นเมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ล้างตะกอนด้วย diethyl ether 5 mL แล้วนำไปกรองตัวทำละลายออกด้วยเครื่องปั๊มสุญญากาศ ทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศ ได้สาร **1** เป็นของแข็งสีขาวขุ่น 1.3636 g คิดเป็นผลผลิต 94%; นำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค ¹H NMR ในตัวทำละลาย DMSO-*d*₆ และ MALDI-TOF MS; ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8.44 (dd, *J* = 8.1, 0.5 Hz, 1H), 8.28 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.90 – 7.83 (m, 1H), 7.81 – 7.75 (m, 1H), 4.19 (s, 3H), 3.17 (s, 3H); *m/z* (MALDI-TOF) 163.60, calcd. for C₉H₁₀NS⁺ (M⁺) 164.05



รูปที่ 2.2 แผนภาพการสังเคราะห์ 2,3-dimethylbenzothiazol-3-ium iodide (**1**)

b) 2-(4-Boronostyryl)-3-methylbenzothiazolium hexafluorophosphate (3)

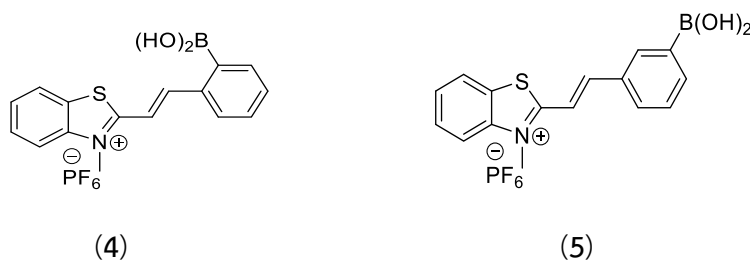
รีฟลักซ์สารละลายผสมระหว่างสาร **1** (0.1381 g, 0.498 mmol) และ 4-formyl phenylboronic acid (0.0772 g, 0.515 mmol) ใน ethanol ที่ 80 °C เป็นเวลา 13 ชั่วโมง จะได้สาร **2** แต่เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ต้องการยังมีสารตั้งต้นปนอยู่จึงต้องแลกเปลี่ยนแอนไอออนจาก iodide ion (I⁻) เป็น hexafluorophosphate ion (PF₆⁻) โดยการเติม ammonium hexafluorophosphate (0.0897 g, 0.547 mmol) ดังรูปที่ **2.3** เพื่อให้สารผลิตภัณฑ์ตกตะกอนง่ายขึ้น ซึ่งจะเกิดตะกอนของผลิตภัณฑ์ขึ้น (สาร **3**) เป็นของแข็งสีเหลือง 0.0586 g คิดเป็นผลผลิต 28%; นำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค ¹H NMR ในตัวทำละลาย DMSO-*d*₆ และ MALDI-TOF MS; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.43-8.40 (m), 8.24 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.18 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 8.06 (d, *J* = 15.9, 1H), 7.99 (d, *J* = 8.2, 2H), 7.91 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.88-7.84 (m, H), 7.80-7.76 (m, H), 4.35 (s, 3H); *m/z* (MALDI-TOF) 296.05, calcd. for C₁₆H₁₅BNO₂S⁺ (M⁺), 296.09



รูปที่ 2.3 แผนภาพการสังเคราะห์ 2-(4-boronostyryl)-3-methylbenzothiazolium hexafluorophosphate (3)

2.2.2 สีย้อมสไตริลอื่น ๆ ที่นำมาทดสอบ

สีย้อมสไตริลที่มีประจุบวกที่มีหมู่บอโรนิก (BT+_{B(OH)₂}) ที่ตำแหน่ง *ortho* (4) และ *meta* (5) (รูปที่ 2.4) สังเคราะห์โดย น.ส.ดวงกมล เตียรธภัทรติก นิสิตปริญญาโท ภาควิชาปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภายใต้ความดูแลของ ศ.ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์



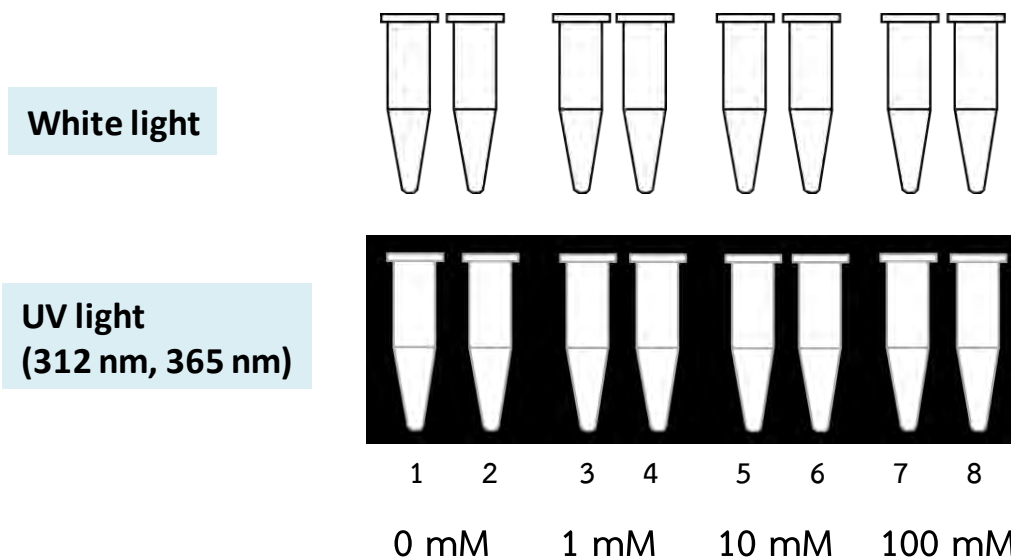
รูปที่ 2.4 สีย้อมสไตริลที่มีหมู่บอโรนิกอยู่ตำแหน่ง *ortho* (4) และ *meta* (5)

2.3 วิธีการตรวจวัดน้ำตาลโดยตรง

2.3.1 การทดลองเบื้องต้นเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมของสีย้อมสไตริลกับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและโมเลกุลคู่ด้วยวิธีสังเกตด้วยตาเปล่า

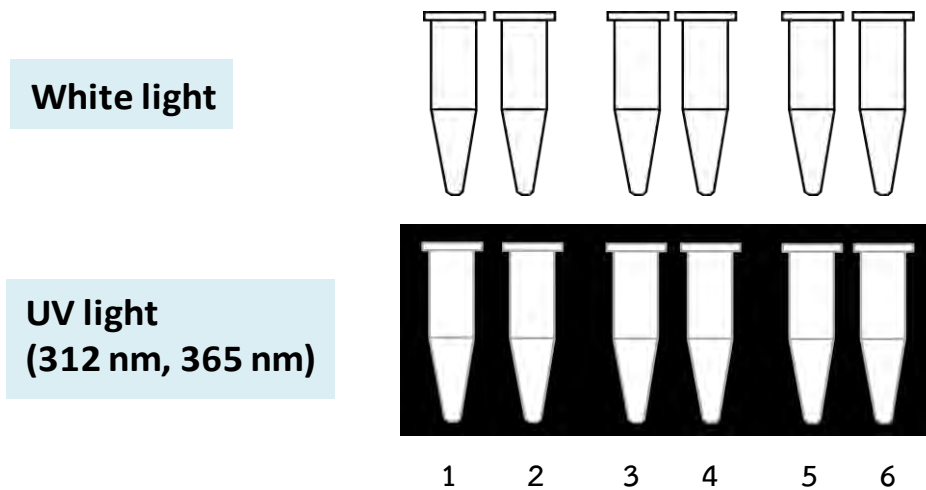
2.3.1.1 การหาความเข้มข้นและชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม

เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต (PB) (pH 7.0) ความเข้มข้น 0, 1, 10 และ 100 mM ผสมกับสีย้อมสไตริล 3 ความเข้มข้น 5 mM (เตรียมจากสารละลายสต็อกสีย้อม 3 ที่ความเข้มข้น 10 mM โดยการละลายสีย้อม 4.4 mg ในสารผสมระหว่าง DMSO 500 μ L กับน้ำ 500 μ L) ทั้งในสถานะที่มีน้ำตาลฟรุกโตสความเข้มข้น 50 mM และไม่มีน้ำตาล ในหลอด PCR ขนาด 0.2 mL ใช้เวลาบ่ม (incubation time) 3 ชั่วโมง ปริมาตรรวม 50 μ L บันทึกภาพภายใต้แสงธรรมชาติและแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 nm และ 365 nm ซึ่งเป็นความยาวคลื่นมาตรฐานของหลอดยูวีที่ใช้ในเครื่อง UV transilluminator



รูปที่ 2.5 การทดลองหาความเข้มข้นบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม สำหรับการตรวจวัดน้ำตาลด้วยวิธีการดูสีด้วยตาเปล่าและสังเกตการเรืองแสงภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 nm และ 365 nm เมื่อใช้สีย้อมสไตริล 3 ความเข้มข้น 5 mM และน้ำตาลฟรุกโตส ความเข้มข้น 50 mM ในบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต หมายเลข 1, 3, 5, 7 = 5 mM dye และหมายเลข 2, 4, 6, 8 = 5 mM dye + 50 mM fructose

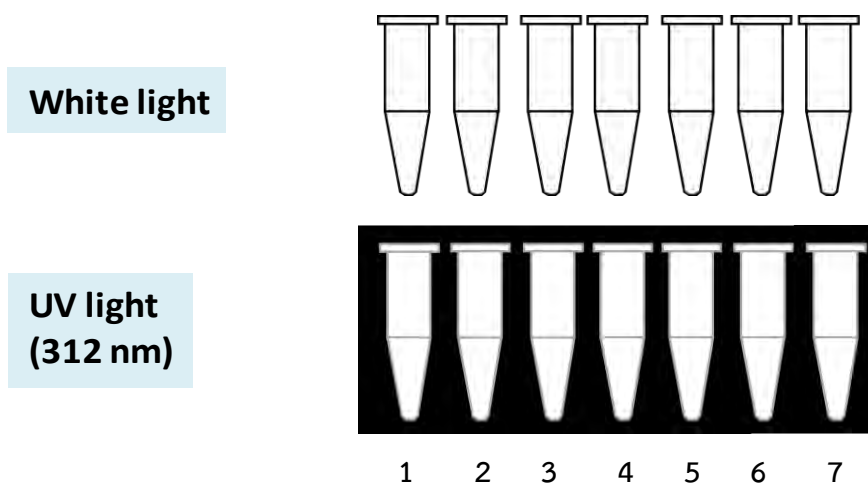
ขั้นตอนการหาชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม เลือกใช้บัฟเฟอร์ทั้งหมด 3 ชนิด ความเข้มข้น 10 mM ได้แก่ บัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตต (NaOAc) (pH 5.0), บัฟเฟอร์ Tris-hydrochloride (Tris-HCl) (pH 7.4) และ บัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต (Na₂CO₃) (pH 9.0) ผสมกับสีย้อมสไตริล 3 ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 5 mM ทั้งในสถานะที่มีน้ำตาลฟรุกโตสความเข้มข้น 50 mM และไม่มีน้ำตาล ใช้เวลาบ่ม (incubation time) 30 นาที บันทึกภาพภายใต้แสงธรรมชาติและแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 nm และ 365 nm



รูปที่ 2.6 การทดลองหาชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม สำหรับการตรวจวัดน้ำตาลด้วยวิธีการดูสีด้วยตาเปล่า และสังเกตการเรืองแสงภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 nm และ 365 nm เมื่อใช้สีย้อมสไตริล 3 ความเข้มข้น 5 mM น้ำตาลฟรุกโตสความเข้มข้น 50 mM และบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 mM หมายเลข 1, 2 = ใน 10 mM NaOAc buffer (pH 5.0), หมายเลข 3, 4 = ใน 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), หมายเลข 5, 6 = ใน 10 mM Na₂CO₃ buffer (pH 9.0), หมายเลข 1, 3, 5 สภาวะที่ไม่มีน้ำตาล และหมายเลข 2, 4, 6 สภาวะที่มีน้ำตาลฟรุกโตสความเข้มข้น 50 mM

2.3.1.2 การทดสอบทำปฏิกิริยากับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและโมเลกุลคู่

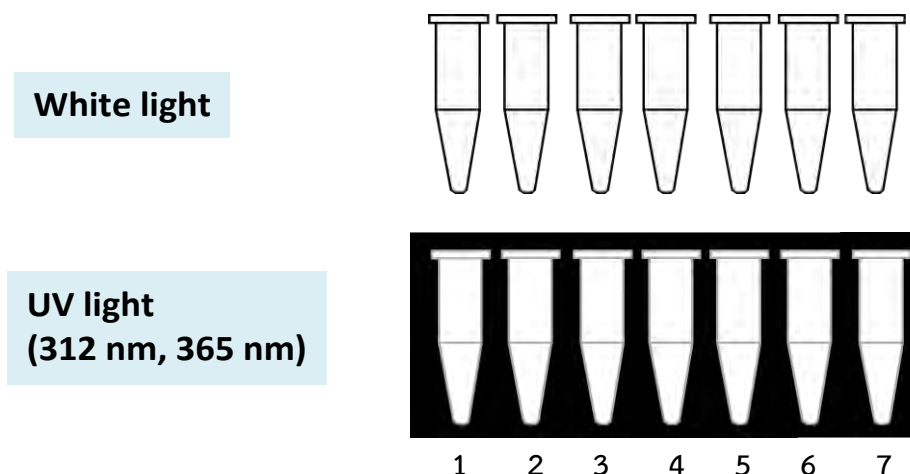
เตรียมสารละลายสีย้อมสไตริล 3 ความเข้มข้น 5 mM ละลายในบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต (pH 9.0) ความเข้มข้น 10 mM ทำปฏิกิริยากับน้ำตาล ได้แก่ กลูโคส, ฟรุกโตส, ซูโครส, กาแลคโตส, แลคโตส และมอลโทส ที่มากเกินพอในหลอด PCR และเทียบกับสภาวะที่ไม่มีน้ำตาล โดยทุกหลอดมีปริมาตรรวมเป็น 50 μ L ใช้เวลาบ่ม 120 นาที บันทึกภาพภายใต้แสงธรรมชาติและแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 nm



รูปที่ 2.7 การทดสอบสีย้อมสไตริล 3 ทำปฏิกิริยากับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและโมเลกุลคู่ ด้วยวิธีการดูสีด้วยตาเปล่าและสังเกตการเรืองแสงภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 nm เมื่อใช้สีย้อมสไตริล 3 ความเข้มข้น 5 mM และน้ำตาลในบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 10 mM หมายเลข 1 = 5 mM dye, 2 = 5 mM dye + glucose, 3 = 5 mM dye + fructose, 4 = 5 mM dye + sucrose, 5 = 5 mM dye + galactose, 6 = 5 mM dye + lactose และ 7 = 5 mM dye + maltose

2.3.1.3 การทดสอบระหว่างสีย้อมสไตริล 3 กับน้ำตาลฟรุกโตสที่ความเข้มข้นต่างๆ

เตรียมสารละลายสีย้อมสไตริล 3 ความเข้มข้น 5 mM ละลายในบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต (pH 9.0) ความเข้มข้น 10 mM ทำปฏิกิริยากับน้ำตาลฟรุกโตส ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 2.5, 5, 10 และ 50 mM ในหลอด PCR 6 หลอด ตามลำดับ และเทียบกับหลอด PCR ในสถานะที่ไม่มีน้ำตาล ซึ่งมีปริมาตรรวมเป็น 50 μ L โดยใช้เวลาป่ม 30 นาที และบันทึกภาพภายใต้แสงธรรมชาติและแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 nm และ 365 nm และพิสูจน์ผลิตรากันท์ที่ได้โดยด้วย MALDI-TOF MS



รูปที่ 2.8 การทดสอบของสีย้อมสไตริล 3 ความเข้มข้น 5 mM และน้ำตาลฟรุกโตสที่ความเข้มข้น ตั้งแต่ 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 และ 50 mM ในบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 10 mM ภายใต้แสงธรรมชาติและแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 nm และ 365 nm

2.3.1.4 การทดสอบระหว่างสีย้อมสไตริลที่มีหมู่บอโรนิกอยู่ที่ตำแหน่ง *ortho* (4), *meta* (5) กับน้ำตาลฟรุกโตส

เตรียมสารละลายสีย้อมสไตริล BT+ ที่มีหมู่บอโรนิกที่ตำแหน่ง *ortho* (4), *meta* (5) (รูปที่ 2.4) ความเข้มข้น 5 mM (เตรียมสต็อกสีย้อมความเข้มข้น 10 mM โดยการละลายสาร 4.4 mg ในสารผสมระหว่าง DMSO 500 μ L กับน้ำ 500 μ L) ในบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต (pH 9.0) ความเข้มข้น 10 mM ทำปฏิกิริยากับน้ำตาล ฟรุกโตสความเข้มข้น 50 mM โดยจะแบ่งเป็น 2 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1 ใช้สีย้อม BT+ ตำแหน่ง *ortho* (4) ส่วนการทดลองที่ 2 ใช้สีย้อมสไตริล BT+ ตำแหน่ง *meta* (5) โดยทั้ง 2 การทดลองทำในหลอด PCR ทั้งหมด 6 หลอด แบ่งเป็นการทดลองละ 3 หลอด บันทึกภาพภายใต้แสงธรรมชาติและแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 nm และ 365 nm และพิสูจน์ผลิตรากันท์ที่ได้โดยด้วย MALDI-TOF MS

2.3.2 การทดลองฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรสโคปี (fluorescence spectroscopy)

การวัดการเรืองแสงด้วยเครื่องฟลูออเรสเซนส์ ใช้ความยาวคลื่นกระตุ้น (λ_{ex}) ที่ 390 nm โดยตั้งค่า PMT (photomultiplier tube) voltage เท่ากับ 940 วัดในโหมด kinetics เป็นเวลา 1 ชั่วโมง บันทึกสัญญาณในช่วงคลื่น 400-800 nm วัด 15 ครั้ง ทุก ๆ 5 นาที โดยจะแบ่งเป็น 2 การทดลอง

การทดลองที่ 1 เป็นสถานะที่ไม่มีน้ำตาล เตรียมสารละลายสีย้อมสไตริล 3 ความเข้มข้น 10 μM (จากสต็อก 1 mM) ละลายในบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต (pH 9.0) ความเข้มข้น 10 mM โดยให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 μL

การทดลองที่ 2 เป็นสถานะที่มีน้ำตาล เตรียมสารละลายสีย้อมสไตริล 3 ความเข้มข้น 10 μM (จากสต็อก 1 mM) ละลายในบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต (pH 9.0) ความเข้มข้น 10 mM ทำปฏิกิริยากับน้ำตาลฟรุกโตส 50 mM โดยให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 μL

วัดการเรืองแสงของสารตัวอย่างทั้ง 2 การทดลอง รอบละ 3 ครั้ง และวัด blank (บัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต 10 mM) จากนั้นจึงนำสเปกตรัมที่วัดได้ไปหักลบด้วย blank ในโปรแกรม Microsoft Excel และสร้างกราฟระหว่างสัญญาณการเรืองแสง (F/F_0 ที่ ความยาวคลื่น 490 nm) กับเวลา

2.3.3 การทดลองยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรี (UV-visible spectrophotometry)

การวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ วัดในโหมด kinetics เป็นเวลา 1 ชั่วโมง บันทึกสัญญาณในช่วงคลื่น 200-800 nm วัด 15 ครั้ง โดยวัดทุก ๆ 5 นาที โดยจะแบ่งเป็น 2 การทดลอง และเตรียมสารละลายตัวอย่างเช่นเดียวกับข้อ 2.3.2 และสร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (A_{390}/A_{280}) กับเวลา

2.3.4 การทดลองหาชนิดและความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมโดยใช้ยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมตรี (UV-visible spectrophotometry)

เตรียมสารละลายสีย้อมสไตริล 3 ความเข้มข้น 10 μM ผสมกับบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0, 200, 500, 1000, 5000 และ 10000 μM โดยจะแบ่งเป็น 2 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1 ใช้บัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต (pH 9.0) ส่วนการทดลองที่ 2 ใช้บัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต (pH 7.0) จากนั้นวัดวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ บันทึกสัญญาณในช่วงคลื่น 200-800 nm

2.3.5 การทดสอบระหว่างสีย้อมสไตริล 3 กับน้ำตาลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในระดับ mM โดยใช้ยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมตรี (UV-visible spectrophotometry)

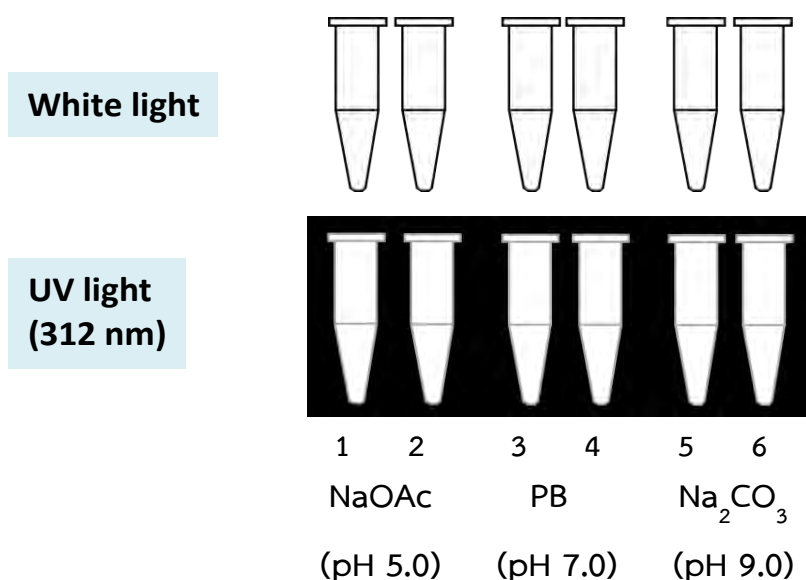
เตรียมสารละลายสีย้อมสไตริล 3 ความเข้มข้น 10 μM ผสมกับน้ำตาลฟรุกโตสที่ความเข้มข้น 1, 2, 5 และ 10 mM ในหลอด Eppendorf 4 หลอด ที่ไว้ข้ามคืน จากนั้นใส่บัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต (pH 9.0) ความเข้มข้น 500 μM โดยให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 μL ด้วยน้ำ milli-Q ใช้เวลาบ่มอีก 1 ชม. แล้ววัดการดูดกลืนแสงยูวี และวัด blank (บัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต 500 μM)

2.4 วิธีการตรวจวัดน้ำตาลกลูโคสทางอ้อม

2.4.1 การทดสอบระหว่างสีย้อมสไตริล 3 กับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

2.4.1.1 การหาความเข้มข้นและชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม

การหาชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม เลือกใช้บัฟเฟอร์ทั้งหมด 3 ชนิด ความเข้มข้น 10 mM ได้แก่ บัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตต (pH 5.0), บัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต (pH 7.0) และบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต (pH 9.0) ผสมกับสีย้อมสไตริล 3 ความเข้มข้น 100 μM และทำในสภาวะที่มี H_2O_2 ความเข้มข้น 200 μM (เตรียมจากสารละลายสต็อก Urea- H_2O_2 ความเข้มข้น 10 mM โดยการละลายสาร 1.9 mg ในน้ำ milli-Q 2 mL) และไม่มี H_2O_2 โดยทำในหลอด PCR 6 หลอด ใช้เวลาบ่ม 30 นาที บันทึกภาพภายใต้แสงธรรมชาติและแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 nm



รูปที่ 2.9 การทดลองหาชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม เมื่อใช้สีย้อมสไตริล 3 ความเข้มข้น 100 μM ในบัฟเฟอร์ 10 mM หมายเลข 1, 3, 5 ไม่มี H_2O_2 หมายเลข 2, 4, 6 มี H_2O_2 ความเข้มข้น 200 μM ภายใต้แสงธรรมชาติและแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 nm

เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต (pH 9.0) ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 mM ผสมกับสีย้อมสไตริล 3 ความเข้มข้น 100 μM และทำในสภาวะที่มีและไม่มี H_2O_2 โดยทำในหลอด PCR 6 หลอด ใช้เวลาบ่ม 30 นาที บันทึกภาพภายใต้แสงธรรมชาติและแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 nm

2.4.2 การทดลองฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรสโกปี (fluorescence spectroscopy)

การวัดการเรืองแสงด้วยเครื่องฟลูออเรสเซนส์ ใช้ความยาวคลื่นกระตุ้น (λ_{ex}) ที่ 500 nm บันทึกสัญญาณในช่วงคลื่น 510-800 nm โดยตั้งค่า PMT (photomultiplier tube) voltage เท่ากับ 940

2.4.2.1 การหาค่าความไวในการตรวจวัด (sensitivity)

เตรียมสารละลายสีย้อมสไตริล 3 ความเข้มข้น 10 μM (จากสต็อก 1 mM) ผสมกับ H_2O_2 ความเข้มข้น 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 และ 50 μM ละลายในบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต (pH 9.0) ความเข้มข้น 500 μM โดยปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 μL ด้วยน้ำ milli-Q ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง วัดการเรืองแสงของสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นละ 3 ชุด วัดชุดละ 3 ครั้ง และวัด blank (บัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 500 μM) จากนั้นจึงนำสเปกตรัมที่วัดได้ไปหักลบด้วย blank ในโปรแกรม Microsoft Excel และสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นกับสัญญาณการเรืองแสง เลือกส่วนที่เป็นเส้นตรงมาทำ curve fitting โดยใช้ least square method และหาค่า limit of detection โดยใช้สมการ $\text{LOD} = 3 \text{SD}(\text{blank})/\text{slope}$

2.4.3 การทดลองยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรี (UV-visible spectrophotometry)

การวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ บันทึกสัญญาณในช่วงคลื่น 200-800 nm และเตรียมสารละลายตัวอย่างเช่นเดียวกับข้อ 2.4.2.1 วัด blank (บัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต 500 μM) และสร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (A_{500}/A_{390}) กับความเข้มข้นของ H_2O_2 (μM) เลือกส่วนที่เป็นเส้นตรงมาทำ curve fitting โดยใช้ least square method และหาค่า limit of detection โดยใช้สมการ $\text{LOD} = 3 \text{SD}(\text{blank})/\text{slope}$

2.4.4 การตรวจวัดน้ำตาลทางอ้อมโดยตรวจวัดปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของน้ำตาลกลูโคสกับกลูโคสออกซิเดส⁸

2.4.4.1 การทดลองฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรสโกปี (fluorescence spectroscopy)

การวัดการเรืองแสงด้วยเครื่องฟลูออเรสเซนส์ ใช้ความยาวคลื่นกระตุ้น (λ_{ex}) ที่ 500 nm บันทึกสัญญาณในช่วงคลื่น 510-800 nm โดยตั้งค่า PMT (photomultiplier tube) voltage เท่ากับ 940

เตรียมสารละลายกลูโคสออกซิเดส 10 nm (จากสต็อก 0.25 μM ในน้ำ) และน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 100, 500, 1000, 2000 และ 5000 μM (จากสต็อก 10 mM) ผสมกันในบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต (pH 7.0) 10 mM เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจะทำการเจือจางสารละลายใน cuvette ลง 100 เท่า โดยจะได้ความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่เกิดขึ้นจากกลูโคสตามทฤษฎี คือ 1, 5, 10, 20 และ 50 μM โดยจะปิเปตสารละลายผสมของกลูโคสออกซิเดส และน้ำตาลกลูโคสในบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต (pH 7.0) ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 10 μL ในแต่ละความเข้มข้นผสมกับสารละลายสีย้อมสไตริล 3 ความเข้มข้น 10 μM (จากสต็อก 1 mM) และบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต (pH 9.0) โดยปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1000 μL ด้วยน้ำ milli-Q ทิ้งไว้ 1 ชม. วัดการเรืองแสงของสารตัวอย่างความเข้มข้นละ 1 ครั้ง และวัด blank (บัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต 500 μM) จากนั้นจึงนำสเปกตรัมที่วัดได้ไปหักลบด้วย blank ในโปรแกรม Microsoft Excel และสร้างกราฟระหว่างสัญญาณการเรืองแสงกับความเข้มข้นของกลูโคส (μM)

2.4.4.2 การทดลองยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรี (UV-visible spectrophotometry)

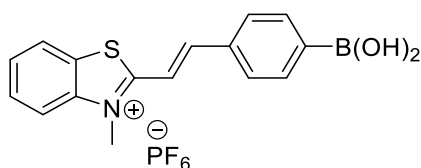
การวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ บันทึกสัญญาณในช่วงคลื่น 200-800 nm โดยเตรียมสารละลายตัวอย่างเช่นเดียวกับข้อ 2.4.4.1 วัด blank (บัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต 500 μM) และสร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (A_{500}/A_{390}) กับความเข้มข้นกลูโคส (μM)

บทที่ 3

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

3.1 การสังเคราะห์ พิสูจน์เอกลักษณ์ของสีย้อมสไตริลและสมบัติการเรืองแสงที่ตอบสนองต่อน้ำตาล

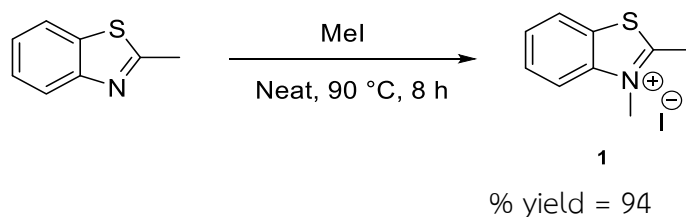
ในงานวิจัยนี้ได้สังเคราะห์สีย้อมสไตริลที่มีหมู่เมทิลเบนโซไทอะโซเลียมเชื่อมต่อกับวงอะโรมาติกที่มีหมู่บอโรนิกผ่านพันธะคู่ โดยได้สังเคราะห์สีย้อม $BT+_B(OH)_2$ (3) ดังรูปที่ 3.1 ซึ่งเป็นสีย้อมที่ออกแบบมาเพื่อให้สามารถเกิดปฏิกิริยากับน้ำตาลผ่านการสร้างพันธะระหว่างหมู่บอโรนิกกับหมู่ไดออลได้ และคาดว่าอาการเกิดพันธะจะทำให้สมบัติเชิงแสงของสีย้อมเปลี่ยนแปลงไป



(3)

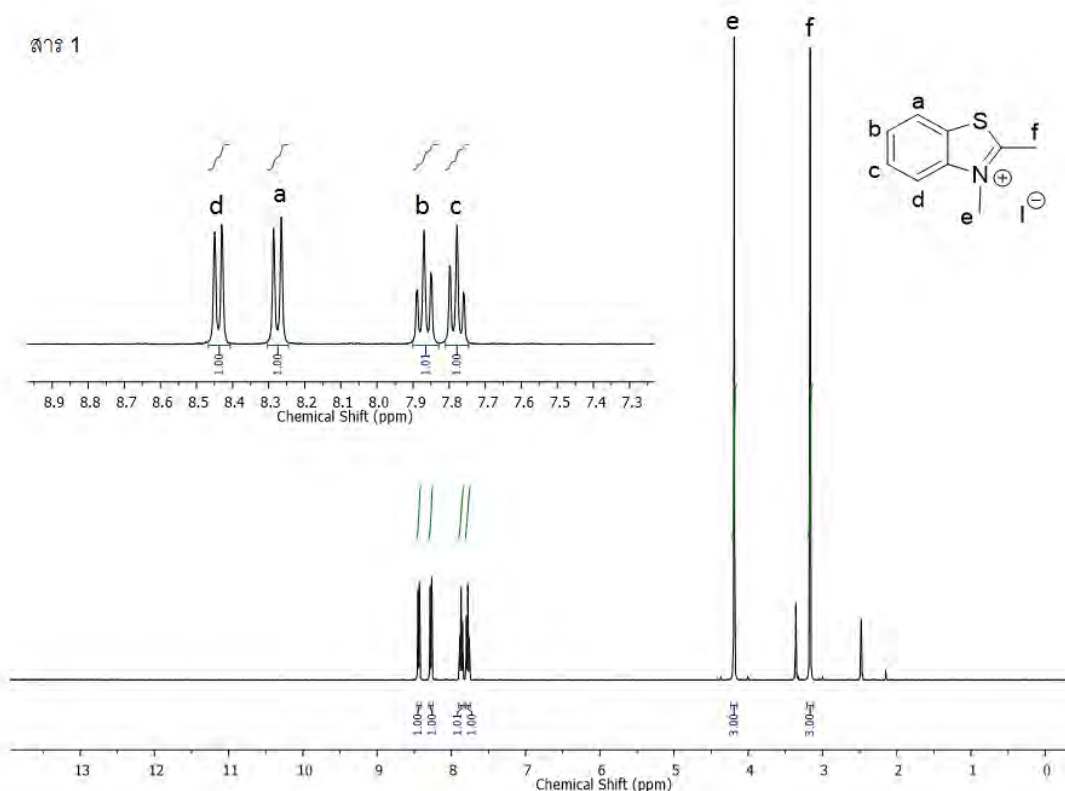
รูปที่ 3.1 สีย้อมสไตริล 2-(4-boronostyryl)-3-methylbenzothiazolium hexafluorophosphate ($BT+_B(OH)_2$) (3)

โดยสีย้อม 3 สังเคราะห์ได้จาก 2,3-dimethylbenzothiazol-3-ium iodide (1) ซึ่งสามารถสังเคราะห์สารนี้ได้โดยใช้ 2-methylbenzothiazole และ methyl iodide เป็นสารตั้งต้น ให้ความร้อนที่ 90 °C โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นปฏิกิริยา methylation ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้เองโดยไม่ต้องมีตัวทำละลายหรือตัวเร่งปฏิกิริยาอื่นอยู่ด้วย จะได้ผลิตภัณฑ์เป็น 2,3-dimethylbenzothiazol-3-ium iodide (1)³³ ที่ 94% yield ดังรูปที่ 3.2 โดยผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวขุ่น



รูปที่ 3.2 แผนภาพการสังเคราะห์ 2,3-dimethylbenzothiazol-3-ium iodide (1)

จากนั้นได้พิสูจน์เอกลักษณ์ยืนยันผลิตภัณฑ์ที่ได้พบว่ามีมวลโมเลกุลที่ได้จากเทคนิค MALDI-TOF MS ได้ค่า $m/z = 163$ ซึ่งสอดคล้องกับมวลโมเลกุลที่คำนวณได้จากสูตรโครงสร้างของ 1 และจากการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ได้ข้อมูล 1H NMR สเปกตรัมของสาร 1 ดังแสดงในรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 ^1H NMR ของ 2,3-dimethylbenzothiazol-3-ium iodide (1) (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

สามารถวิเคราะห์ ^1H NMR ของสาร 1 ได้ดังนี้

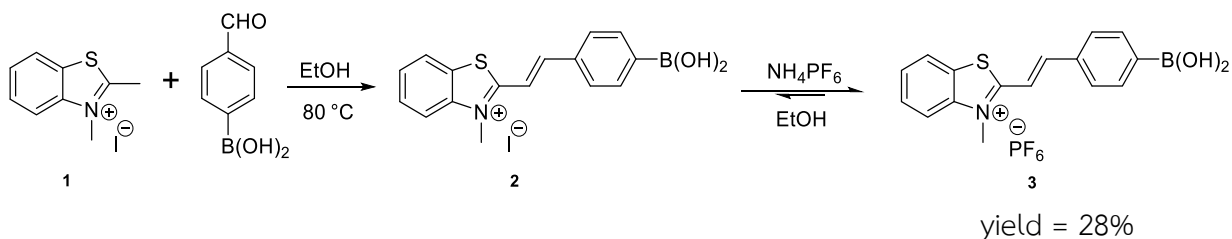
สัญญาณที่ δ 8.44 ppm (dd, $J = 8.1, 0.5$ Hz, 1H) เป็นโปรตอนตำแหน่ง d บนวง benzothiazole มีลักษณะเป็น doublet เนื่องจากมีโปรตอนข้างเคียงเพียง 1 ตัว ตัว และเกิดการ deshield มากที่สุด เนื่องจากอยู่ติดกับไนโตรเจนที่มีประจุบวก ทำให้อิเล็กตรอนถูกดึงไปอยู่ใกล้ไนโตรเจนมากกว่าโปรตอนในตำแหน่งที่ a ของวง benzothiazole ที่ δ 8.28 ppm ที่อยู่ติดกับซัลเฟอร์ ซึ่งมี EN ต่ำกว่าไนโตรเจน ทำให้ deshield น้อยกว่า และมีลักษณะเป็น doublet

สัญญาณที่ δ 7.90 – 7.83 ppm (m, 1H) เป็นโปรตอนตำแหน่ง b ของวง benzothiazole สัญญาณนี้จะปรากฏเป็น triplet เนื่องจาก coupling กับโปรตอนในตำแหน่ง a และ c ซึ่งโปรตอนตำแหน่ง b จะอยู่ตำแหน่งพาราของหมู่ไนโตรเจนที่มีประจุบวก ซึ่งดึงอิเล็กตรอนแบบเรโซแนนซ์ จึงเกิดการ deshield มากกว่าโปรตอนของคาร์บอนตำแหน่ง c ที่ δ 7.81-7.75 ppm (m, 1H) ที่อยู่ตำแหน่งพาราของหมู่ซัลเฟอร์ ซึ่งให้อิเล็กตรอน สัญญาณนี้ปรากฏเป็น triplet เนื่องจากการคู่ควบกับโปรตอน b และ d ที่อยู่ข้างเคียง

สัญญาณที่ δ 4.49 ppm เป็นของโปรตอนที่มีไฮบริดเซชันแบบ sp^3 ได้แก่หมู่เมทิลตำแหน่ง e มีพื้นที่ใต้พีคเป็น 3H ซึ่งสอดคล้องกับจำนวนโปรตอนมีลักษณะเป็น singlet และเนื่องจากเป็นหมู่เมทิลที่ต่ออยู่กับไนโตรเจนที่มีประจุบวก (+NMe) ทำให้ deshield มากกว่าโปรตอนตำแหน่ง f ที่ δ 3.17 ppm (s, 3H) เป็นของหมู่เมทิลที่มีลักษณะเป็น singlet เช่นกัน

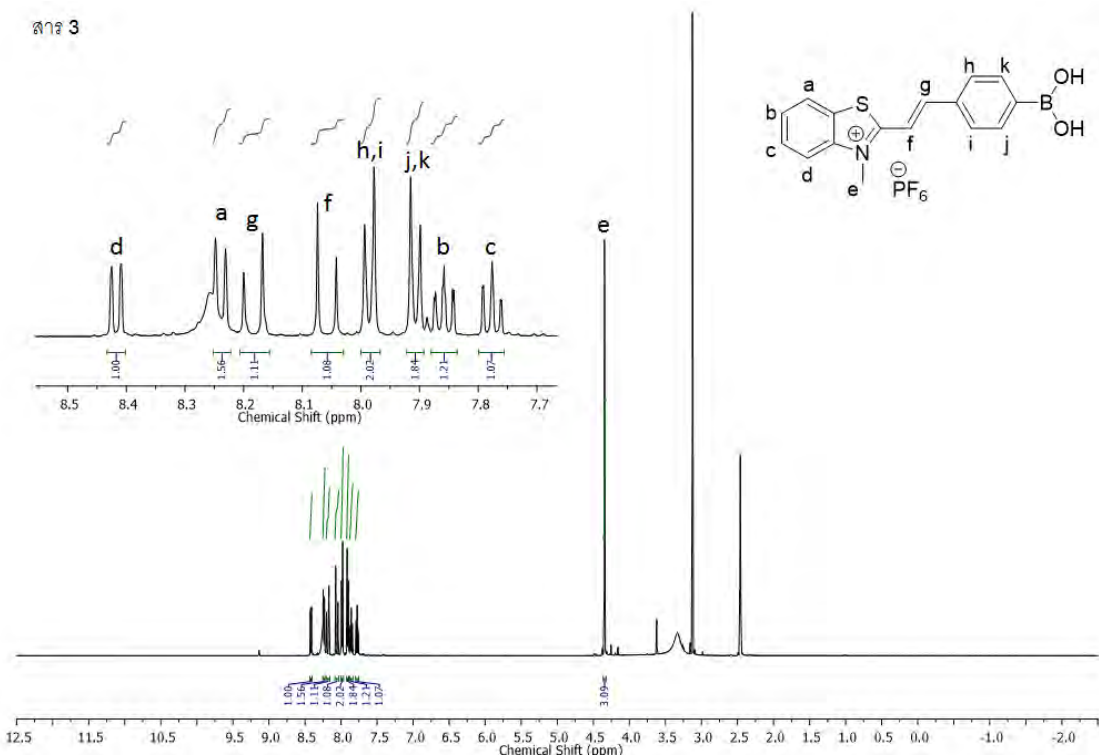
ต่อมาได้สังเคราะห์สีย้อมสไตริล 3 โดยใช้ 2,3-dimethylbenzothiazol-3-ium iodide (1) ที่สังเคราะห์ได้ไปทำปฏิกิริยากับ 4-formylphenyl boronic acid เป็นสารตั้งต้น ตั้งรีฟลักซ์สารทั้งสองในเอทานอล โดยจะเกิดผ่านปฏิกิริยา aldol condensation โดยมีหมู่ methyl ที่ถูก deprotonate ทำหน้าที่เป็น

นิวคลีโอไฟล์ เข้าทำปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอนิลของแอลดีไฮด์ ตามด้วยการกำจัดน้ำออก ปฏิกิริยานี้เกิดได้เอง โดยไม่ต้องมีตัวเร่งปฏิกิริยาอื่นอยู่ด้วย หลังจากการสังเคราะห์พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์ จึงเปลี่ยน counter ion จาก iodide ion (I⁻) เป็น hexafluorophosphate ion (PF₆⁻) ซึ่งเป็น counterion ที่เฉื่อย มีสมมาตรสูง และมีมวลโมเลกุลสูง เพื่อให้ตกผลึกง่ายขึ้น และนำไปตกผลึกเพื่อกำจัดสารตั้งต้น ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์เป็น 2-(4-boronostyryl)-3-methylbenzothiazolium hexafluoro-phosphate (**3**) ดังรูปที่ 3.4 โดยผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองและจากการสืบค้นข้อมูลจาก SciFinder เมื่อวันที่ 24 เมษายน 2563 พบว่าเป็นสารใหม่ยังไม่มีใครเคยมีผู้ศึกษามาก่อน



รูปที่ 3.4 แผนภาพการสังเคราะห์ 2-(4-boronostyryl)-3-methylbenzothiazolium hexafluorophosphate (BT+_B(OH)₂) (**3**)

จากนั้นได้ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ยืนยันผลิตภัณฑ์ที่ได้พบว่ามวลโมเลกุลที่ได้จากเทคนิค MALDI-TOF MS สอดคล้องกับมวลโมเลกุลที่คำนวณได้จากสูตรโมเลกุลของ **3** โดยไม่รวมหมู่ PF₆⁻ เนื่องจากในแมสสเปกตรัมจะตรวจวัดได้เฉพาะส่วนที่เป็นสีย้อมซึ่งมีประจุบวก และจากการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ได้ข้อมูล ¹H NMR สเปกตรัมของสาร **3** แสดงดังรูปที่ 3.5



รูปที่ 3.5 ¹H NMR ของ 2-(4-boronostyryl)-3-methylbenzothiazolium hexafluorophosphate (**3**) (500 MHz, DMSO-*d*₆)

สามารถวิเคราะห์ ^1H NMR ของสาร 3 ได้โดยอาศัยตำแหน่งของเคมีคัลชิฟต์และรูปแบบของการ coupling ซึ่งได้รับการยืนยันโดยการเปรียบเทียบกับสารอื่นที่เคยมีผู้สังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการและได้รับการยืนยันโครงสร้างโดยเทคนิค ^1H - ^1H COSY แล้ว ดังนี้

สัญญาณที่ δ 8.43-8.40 ppm (m) เป็นโปรตอนในตำแหน่งที่ d บนวง benzothiazole ซึ่งมีลักษณะเป็น doublet เนื่องจากมีโปรตอนข้างเคียงเพียง 1 ตัว และเกิดการ deshield มากที่สุด เนื่องจากอยู่ติดกับไนโตรเจนที่มีประจุบวก ทำให้อิเล็กตรอนถูกดึงไปอยู่ใกล้ไนโตรเจนมากกว่าโปรตอนในตำแหน่งที่ a ของวง benzothiazole ที่ δ 8.24 ppm ที่อยู่ติดกับซัลเฟอร์ ซึ่งมี EN ต่ำกว่าไนโตรเจน ทำให้ deshield น้อยกว่า และมีลักษณะเป็น doublet แต่สังเกตได้ไม่ชัดเนื่องจากการซ้อนทับกับสัญญาณโปรตอนของ hydroxyl group (-OH) ของหมู่บอร์อนิก

สัญญาณที่ δ 8.18 ppm (d, 1H) เป็นโปรตอนตำแหน่ง g ที่เป็นส่วนของพันธะคู่ ซึ่งเป็นตำแหน่งที่เมื่ออิเล็กตรอนดีโลคัลไลซ์ (delocalized) เข้าไปในวง benzothiazole แล้วจะเกิดการ deshield มากกว่าโปรตอนตำแหน่ง f ที่อยู่คู่กัน ซึ่งจะเห็นสัญญาณที่ δ 8.06 ppm (d, 1H) โดยโปรตอนทั้งสองจะเกิดการคู่ควบ (coupling) ซึ่งกันและกัน ให้สัญญาณเป็น doublet ทั้งคู่

สัญญาณที่ δ 7.99 ppm (d, 2H) เป็นโปรตอนตำแหน่ง h และ i บนวงอะโรมาติกที่มีหมู่บอร์อนิก สัญญาณนี้ปรากฏเป็น doublet เนื่องจาก coupling กับโปรตอนในตำแหน่ง k และ j ที่อยู่ติดกัน ซึ่งจะเห็นสัญญาณที่ δ 7.91 (d, 2H) สัญญาณนี้ปรากฏเป็น doublet เนื่องจากโครงสร้างทั้งสองฝั่งของวงอะโรมาติกที่มีหมู่บอร์อนิกสมมาตรกัน จึงทำให้สัญญาณของ h และ i ขึ้นที่ตำแหน่งเดียวกัน รวมไปถึง j และ k ก็ปรากฏสัญญาณขึ้นที่ตำแหน่งเดียวกันด้วย

สัญญาณที่ δ 7.88-7.84 ppm (m, H) เป็นโปรตอนตำแหน่ง b ของวง benzothiazole สัญญาณนี้จะปรากฏเป็น triplet เนื่องจาก coupling กับโปรตอนในตำแหน่ง a และ c ซึ่งโปรตอนตำแหน่ง b จะอยู่ตำแหน่งพาราของหมู่ไนโตรเจนที่มีประจุบวก ซึ่งดึงอิเล็กตรอนแบบเรโซแนนซ์ จึงเกิดการ deshield มากกว่าโปรตอนของคาร์บอนตำแหน่ง c ที่ δ 7.80-7.76 ppm (m, 1H) ที่อยู่ตำแหน่งพาราของหมู่ซัลเฟอร์ ซึ่งให้อิเล็กตรอน สัญญาณนี้ปรากฏเป็น triplet เนื่องจากการคู่ควบกับโปรตอน b และ d ที่อยู่ข้างเคียง

สัญญาณที่ δ 4.35 ppm เป็นของโปรตอนที่มีไฮบริดเซชันแบบ sp^3 ได้แก่หมู่เมทิลตำแหน่ง e (+NMe) มีพื้นที่ได้ฟีกเป็น 3H ซึ่งสอดคล้องกับจำนวนโปรตอน และมีลักษณะเป็น singlet เนื่องจากไม่มีโปรตอนอื่นที่อยู่ข้างเคียง ส่วนสัญญาณที่ ประมาณ 3 และ 2 ppm เป็นสัญญาณของน้ำและ DMSO- d_5 ตามลำดับ

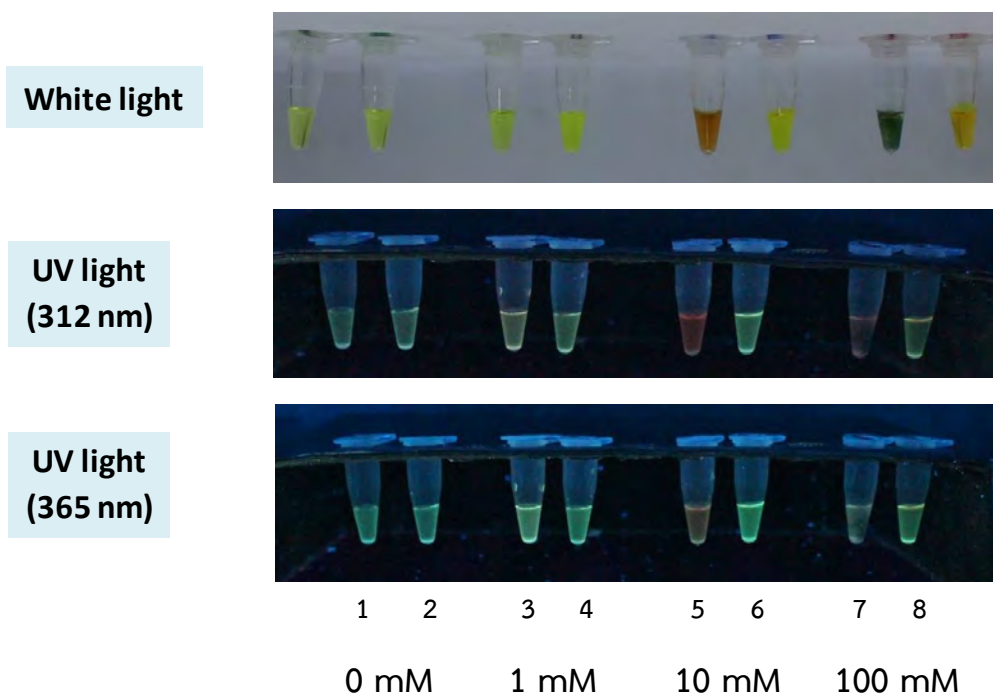
3.2 วิธีการตรวจวัดน้ำตาลโดยตรง

3.2.1 การพิสูจน์หลักการเบื้องต้นเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมของสีย้อมสไตริลกับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และโมเลกุลคู่ด้วยวิธีสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีด้วยตาเปล่า

3.2.1.1 การหาความเข้มข้นและชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม

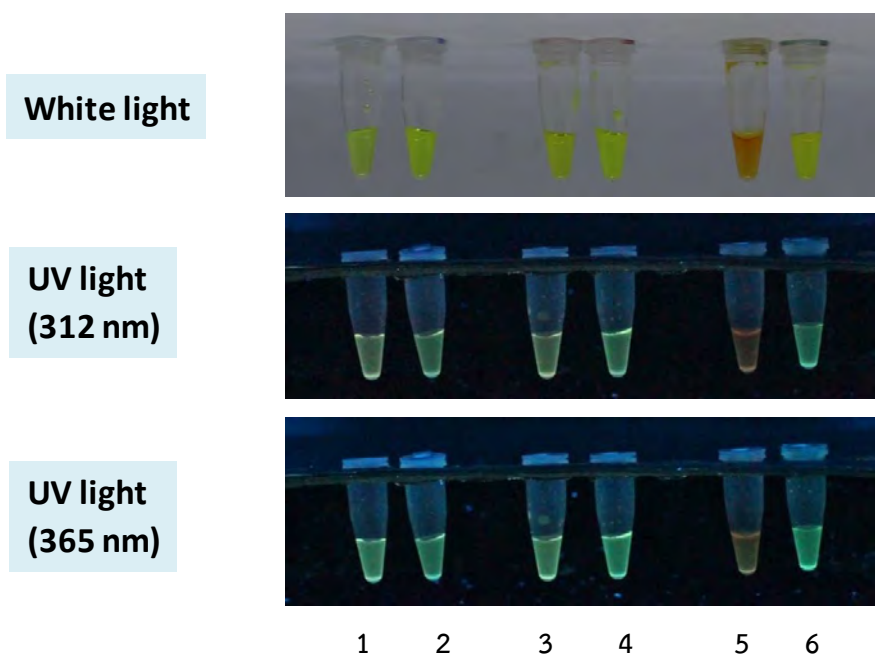
ในการทดลองได้นำสีย้อม 3 ที่สังเคราะห์ขึ้นได้นี้ไปทดสอบสมบัติการเปลี่ยนแปลงการเรืองแสงที่ตอบสนองกับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและโมเลกุลคู่โดยการสังเกตการเรืองแสงด้วยตาเปล่าภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 nm และ 365 nm โดยขั้นแรกจะทำการหาความเข้มข้นและชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม

สำหรับการตรวจวัดน้ำตาลก่อน โดยใช้บัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต (pH 7.0) ความเข้มข้น ตั้งแต่ 0, 1, 10 และ 100 mM ทั้งในสถานะที่มีและไม่มีน้ำตาลฟรุกโตส ดังแสดงในรูปที่ 3.6 พบว่าบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 10 mM (pH 7.0) สามารถสังเกตเห็นความแตกต่างของสีและการเรืองแสงแล้ว จึงเลือกใช้ความเข้มข้นบัฟเฟอร์ที่ 10 mM สำหรับการทดลองต่อไป และสีของสารละลายที่เกิดขึ้นในสถานะที่มีน้ำตาลจะอยู่ในโทนสีเหลืองเข้มเนื่องจากน้ำตาลสามารถจับกับสีย้อมและป้องกันไม่ให้สีย้อมเสียสภาพ ซึ่งจะอธิบายรายละเอียดเพิ่มเติมในลำดับถัดไป



รูปที่ 3.6 ภาพแสดงการหาความเข้มข้นบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม สำหรับการตรวจวัดน้ำตาลด้วยวิธีการดูสีด้วยตาเปล่าและสังเกตการเรืองแสงภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 nm และ 365 nm เมื่อใช้สีย้อมสไตริล 3 ความเข้มข้น 5 mM และน้ำตาลฟรุกโตส ความเข้มข้น 50 mM ในบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต หมายเลข 1, 3, 5, 7 = 5 mM dye (controls) และหมายเลข 2, 4, 6, 8 = 5 mM dye + 50 mM fructose

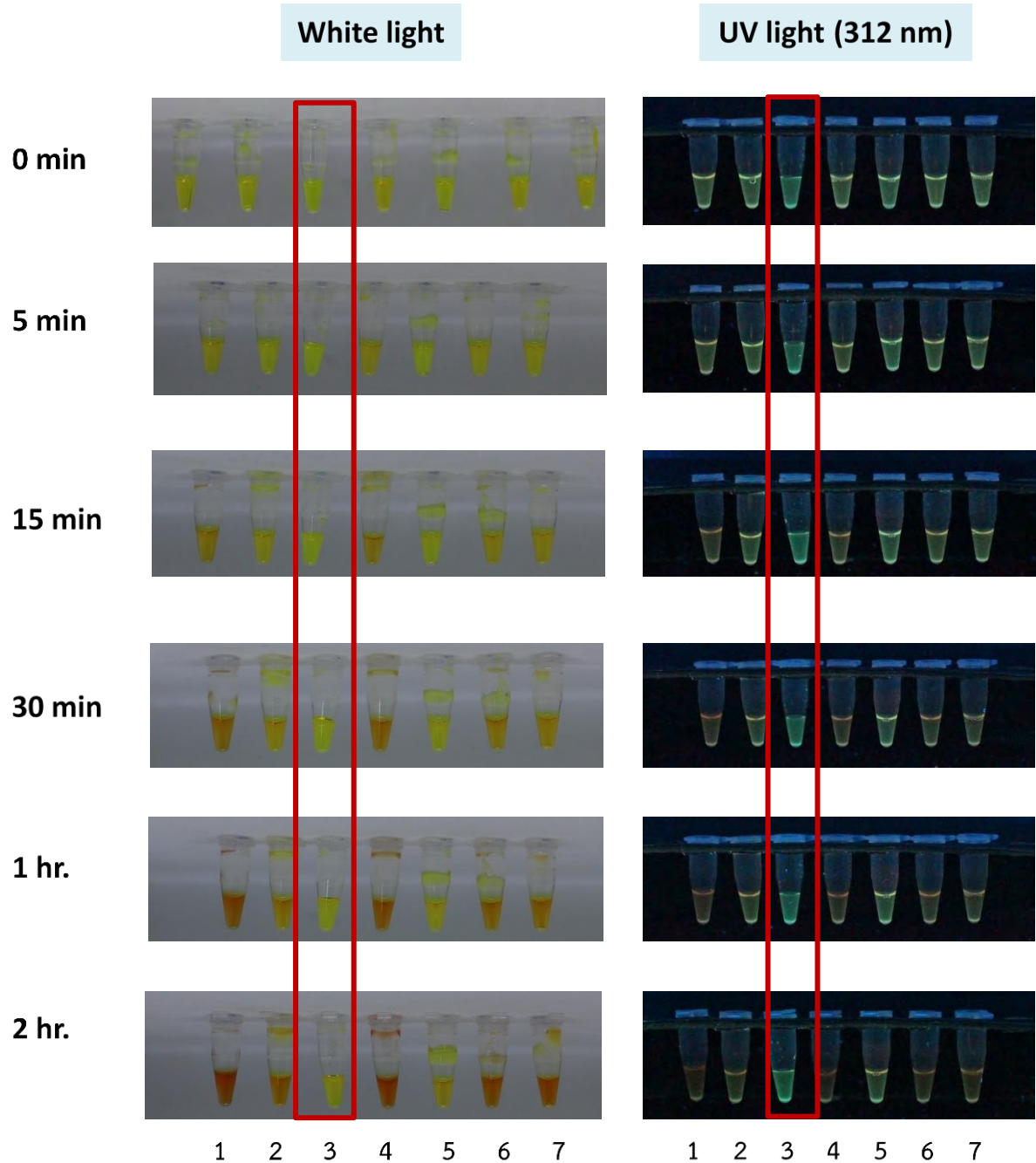
ต่อมาได้หาชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม โดยใช้ความเข้มข้นบัฟเฟอร์ที่ 10 mM ที่ได้จากผลการทดลองก่อนหน้านี้ และได้ศึกษาเพิ่มเติมกับบัฟเฟอร์อีก 3 ชนิด ได้แก่ บัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตต (pH 5.0), บัฟเฟอร์ Tris-hydrochloride (pH 7.4) และบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต (pH 9.0) ดังแสดงในรูปที่ 3.7 พบว่าหลอดหมายเลข 5 และ 6 ที่มีบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต (pH 9.0) เกิดการเปลี่ยนแปลงเร็วที่สุด และเร็วกว่าบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟตที่ใช้ในตอนแรก โดยหลอดหมายเลข 5 ในสถานะที่ไม่มีน้ำตาลให้สารละลายสีส้มในแสงธรรมชาติและไม่เกิดการเรืองแสงเมื่ออยู่ภายใต้แสงยูวี แต่หลอดหมายเลข 6 ในสถานะที่มีน้ำตาลให้สารละลายสีเหลืองภายใต้แสงธรรมชาติและเรืองแสงสีเขียวภายใต้แสงยูวี จึงเลือกใช้บัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต (pH 9.0) สำหรับการทดลองต่อไป



รูปที่ 3.7 ภาพการหาชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม สำหรับการตรวจวัดน้ำตาลด้วยวิธีการดูสีด้วยตาเปล่าและสังเกตการเรืองแสงภายใต้แสงยูวีที่มีความยาวคลื่น 312 nm และ 365 nm เมื่อใช้สีย้อมสไตริล 3 ความเข้มข้น 5 mM น้ำตาลฟรุกโตส ความเข้มข้น 50 mM และบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 mM หมายเลข 1, 2 = ใน 10 mM NaOAc buffer (pH 5.0), หมายเลข 3, 4 = ใน 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), หมายเลข 5, 6 = ใน 10 mM Na₂CO₃ buffer (pH 9.0), หมายเลข 1, 3, 5 สภาวะที่ไม่มีน้ำตาล และหมายเลข 2, 4, 6 สภาวะที่มีน้ำตาลฟรุกโตสความเข้มข้น 50 mM

3.2.1.2 การพิสูจน์หลักการการทำปฏิกิริยาของสีย้อมสไตริลร่วมกับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและโมเลกุลคู่

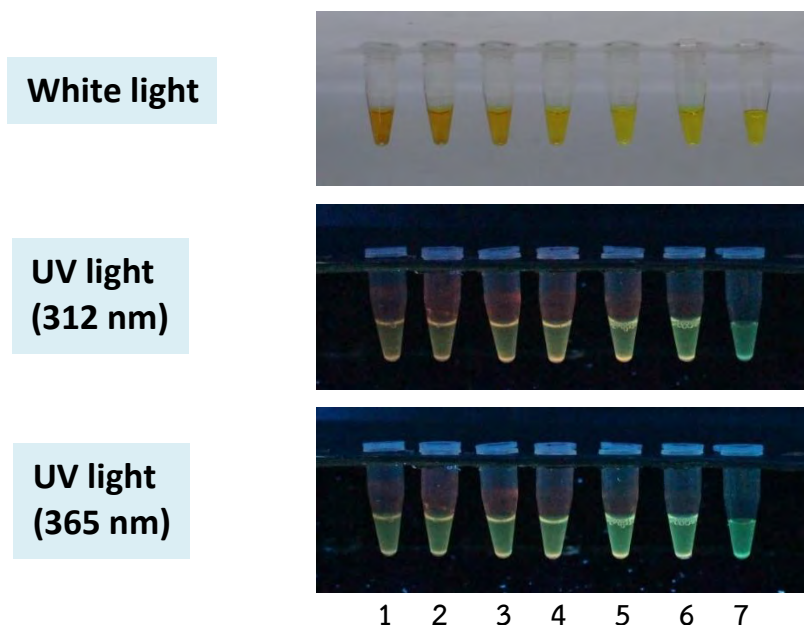
ในการทดลองใช้สีย้อม 3 ละลายในบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต (pH 9.0) ความเข้มข้น 10 mM ทำปฏิกิริยากับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ได้แก่ กลูโคส, ฟรุกโตส และกาแลคโตส และน้ำตาลโมเลกุลคู่ ได้แก่ ซูโครส, มอลโทส และแลคโตส ดังแสดงในรูปที่ 3.8 ตามลำดับ โดยใช้ปริมาณน้ำตาลมากเกินไป และติดตามการเกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้มั่นใจว่าปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์และสังเกตเห็นสีว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงสำหรับน้ำตาลทุกตัว โดยพบว่าน้ำตาลทั้ง 6 ตัวมีการให้สีที่แตกต่างกัน แต่หลอดหมายเลข 3 คือ น้ำตาลฟรุกโตสมีการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายที่ชัดเจนที่สุด อาจเนื่องมาจากโครงสร้างของน้ำตาลฟรุกโตสมีโครงสร้างของหมู่ hydroxyl group (-OH) จัดเรียงตัวแบบ *cis*-diol เป็นโครงสร้าง β -D-fructofuranose มีค่า abundance เท่ากับ 25%³⁴ ซึ่งมากกว่าน้ำตาลกลูโคสที่มีโครงสร้าง α -D-glucopyranose ซึ่งมีค่า abundance เพียง 0.14%³⁵ ดังแสดงในรูปที่ 1.5 (บทที่ 1) ทำให้จับกับโครงสร้างหมู่บอร์อนิกของสีย้อมสไตริลได้ดี²⁰ จึงเลือกใช้น้ำตาลฟรุกโตสสำหรับการทดลองต่อไป



รูปที่ 3.8 ภาพการทดสอบสีย้อมสไตริล 3 ทำปฏิกิริยากับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและโมเลกุลคู่ ด้วยวิธีการดูสีด้วยตาเปล่าและสังเกตการเรืองแสงภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 nm เมื่อใช้สีย้อมสไตริล 3 ความเข้มข้น 5 mM และน้ำตาลปริมาณมากเกินพอ ในบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 10 mM หมายเลข 1 = 5 mM dye, 2 = 5 mM dye + glucose, 3 = 5 mM dye + fructose, 4 = 5 mM dye + sucrose, 5 = 5 mM dye + galactose, 6 = 5 mM dye + lactose และ 7 = 5 mM dye + maltose

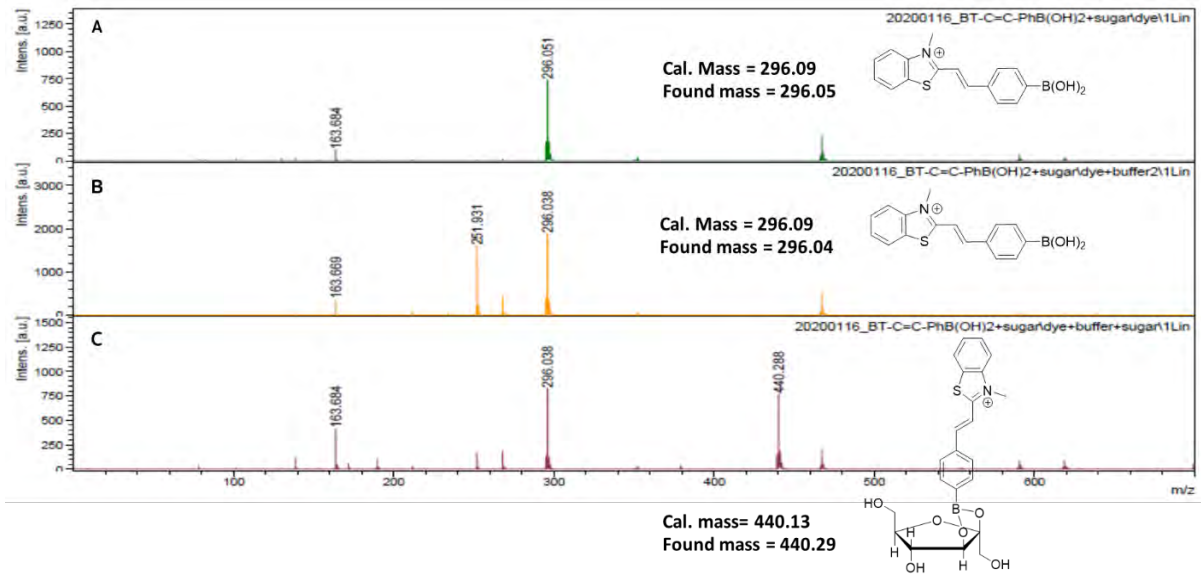
3.2.1.3 การทดลองเบื้องต้นระหว่างสีย้อม 3 กับน้ำตาลฟรุคโตสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

จากการทดลองก่อนหน้านี้พบว่าน้ำตาลฟรุคโตสเกิดปฏิกิริยากับสีย้อมได้ดีที่สุด จึงเลือกใช้น้ำตาลฟรุคโตสเป็นตัวแทนในการตรวจวัดน้ำตาล ต่อมาจึงได้เปรียบเทียบความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุคโตส ตั้งแต่ความเข้มข้น 0.5, 1, 2.5, 5, 10 และ 50 mM ดังแสดงในรูปที่ 3.9 พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุคโตส ภายใต้แสงธรรมชาติสีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีส้มเป็นสีเหลืองมากขึ้นตามลำดับ และภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 nm และ 365 nm สารละลายจะเรืองแสงสีเขียวมากขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นเช่นกัน

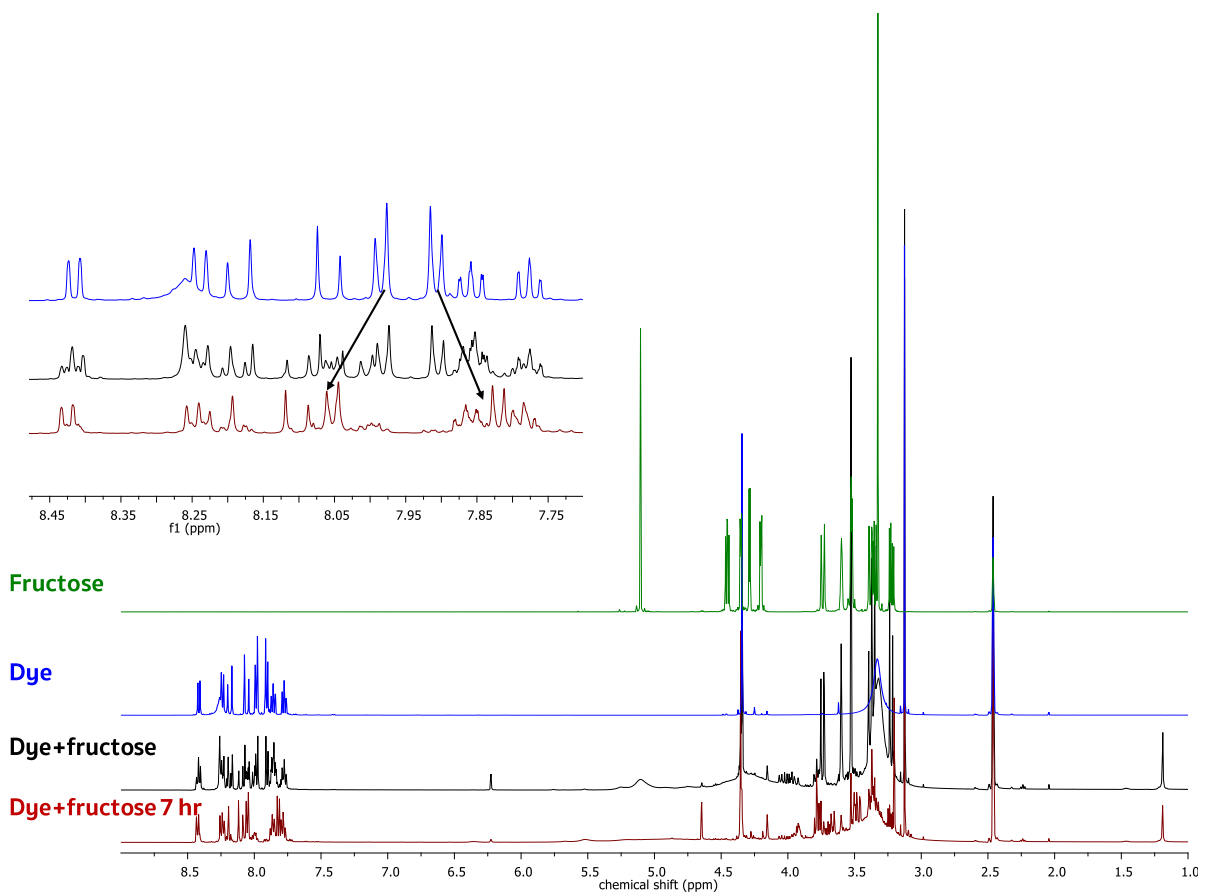


รูปที่ 3.9 ภาพภายใต้แสงธรรมชาติและแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 nm และ 365 nm ของสีย้อมสไตริล 3 ความเข้มข้น 5 mM และน้ำตาลฟรุคโตสที่ความเข้มข้น ตั้งแต่ 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 และ 50 mM (หมายเลข 1-7 ตามลำดับ) ในบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 10 mM

นอกจากนี้ยังได้ติดตามการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS เพื่อพิสูจน์และวิเคราะห์โครงสร้างสารที่เปลี่ยนแปลง ดังแสดงในรูปที่ 3.10 พบว่ามวลโมเลกุลที่ได้จากเทคนิค MALDI-TOF MS ที่ $m/z = 440$ สอดคล้องกับมวลโมเลกุลที่คำนวณได้จากสูตรโครงสร้างของผลิตภัณฑ์ (C) ที่คาดว่าจะเกิดขึ้นจริง แต่ก็ได้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ต้องการนี้ขึ้นทั้งหมด โดยพบมวลโมเลกุลที่ $m/z = 163$ ซึ่งตรงกับสาร 1 ที่เป็นสารตั้งต้น ซึ่งแสดงถึงการแตกของบริเวณพันธะคู่ที่เชื่อมระหว่างส่วนของ methylbenzothiazolium และ phenylboronic ทำให้สีย้อมเสียสภาพในการเกิดปฏิกิริยากับน้ำตาล และจากรูป (B) จะพบพีกของสารตั้งต้นและพีกที่มี $m/z = 252$ ซึ่งคำนวณได้ตรงกับสีย้อมที่หมู่บอโรนิกหลุดออกไป ซึ่งเป็นการยืนยันได้ว่าสีย้อมจะสูญเสียสภาพบางส่วนเมื่ออยู่ในบัฟเฟอร์ และได้พิสูจน์การเกิดปฏิกิริยาเพิ่มเติมโดยใช้เทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ได้ข้อมูล $^1\text{H NMR}$ สเปกตรัม ดังรูปที่ 3.11 ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสีย้อมสไตริล 3 กับน้ำตาลฟรุคโตสจริง โดยจะเห็นการเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมทั้งในส่วนของน้ำตาลและส่วนของสีย้อมอย่างชัดเจน



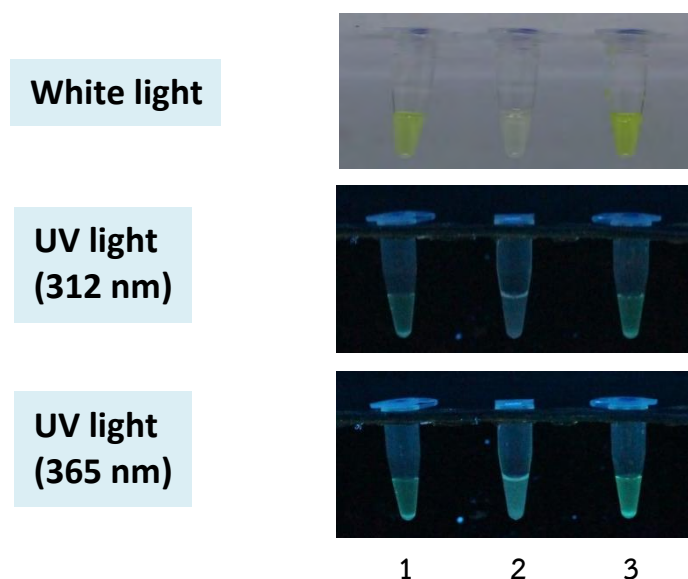
รูปที่ 3.10 MALDI-TOF MS สเปกตรัมของ (A) = สีย้อมสไตริล 3 (5 mM), (B) = สีย้อมสไตริล 3 (5 mM) + บัฟเฟอร์ Na_2CO_3 10 mM และ (C) = สีย้อมสไตริล 3 (5 mM) + บัฟเฟอร์ Na_2CO_3 10 mM + น้ำตาลฟรุกโตส 50 mM เมื่อทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



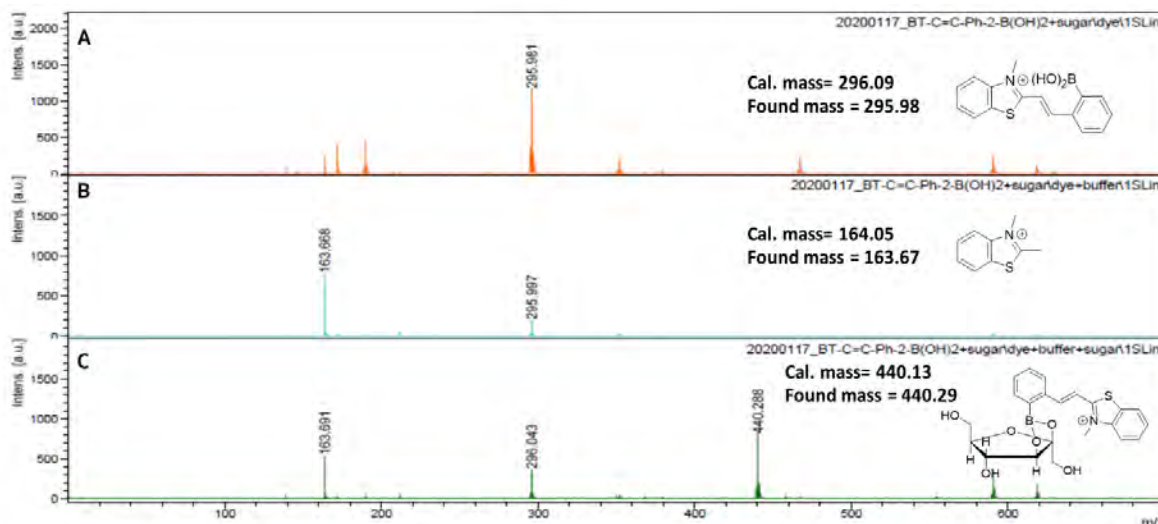
รูปที่ 3.11 ^1H NMR ของสีย้อมสไตริล (3) กับน้ำตาลฟรุกโตส (500 MHz, DMSO-d_6)

3.2.1.4 การทดสอบระหว่างสีย้อมสไตริลที่มีหมู่บอร์นิกอยู่ที่ตำแหน่ง *ortho* (4) และ *meta* (5) กับน้ำตาลฟรุกโตส

ต่อมาได้ทำการทดลองเพิ่มเติมกับสีย้อมสไตริลที่มีหมู่บอร์นิกอยู่ที่ตำแหน่ง *ortho* (4) และ *meta* (5) ดังแสดงในรูปที่ 2.4 (บทที่ 2) ที่ความเข้มข้น 5 mM ละลายในบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต (pH 9.0) ความเข้มข้น 10 mM (สารละลายนี้จะมี DMSO 25% เนื่องจากเตรียม stock ของ 3 ใน DMSO) ทำปฏิกิริยากับน้ำตาลฟรุกโตส ความเข้มข้น 50 mM โดยการทดลองแรกเป็นของสีย้อมสไตริลที่มีหมู่บอร์นิกที่ตำแหน่ง *ortho* (4) ดังแสดงในรูปที่ 3.12 พบว่าเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าสีย้อมสไตริลในบัฟเฟอร์ให้การเปลี่ยนแปลงเป็นสีขุ่นเหมือนกับสีย้อมเสียสภาพไป และเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีน้ำตาลเกิดการเปลี่ยนแปลงสีและเกิดการเรืองแสงภายใต้แสงยูวีเล็กน้อย จึงศึกษาด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS เพื่อพิสูจน์และวิเคราะห์โครงสร้างสารที่เปลี่ยนแปลง ดังแสดงในรูปที่ 3.13 พบว่าเมื่อสีย้อมสไตริลที่มีหมู่บอร์นิกที่ตำแหน่ง *ortho* (4) อยู่ในสภาวะที่มีบัฟเฟอร์จะเกิดการแตกออกของพันธะคู่ ทำให้พบมวลโมเลกุลของสารตั้งต้นที่ $m/z = 163$ โดยเกิดได้เกือบสมบูรณ์ เมื่อเทียบกับสีย้อมที่มีหมู่บอร์นิกที่ตำแหน่ง *para* ซึ่งเกิดปฏิกิริยานี้ไม่มากนัก คาดว่าอาจเกิดจาก steric effect ที่ตำแหน่ง *ortho* ทำให้โมเลกุลของสีย้อมนี้ไม่เสถียร สำหรับในสภาวะที่มีน้ำตาลฟรุกโตสพบว่าเกิดมวลโมเลกุลของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการที่ $m/z = 440$ แต่ก็พบมวลโมเลกุลของสารตั้งต้นที่ $m/z = 163$ เช่นกัน แสดงว่าสีย้อมที่มีโครงสร้างแบบ *ortho* (4) ไม่เสถียรภายใต้ภาวะบัฟเฟอร์

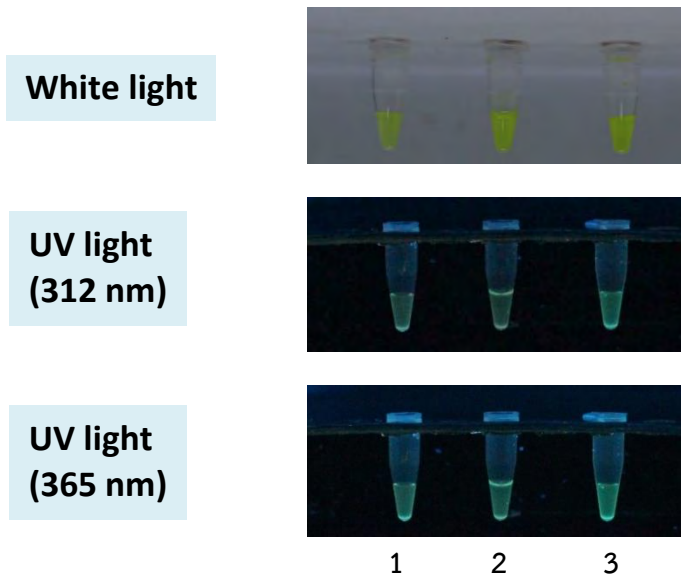


รูปที่ 3.12 ภาพภายใต้แสงธรรมชาติและแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 nm และ 365 nm ของสีย้อมสไตริลที่มีหมู่บอร์นิกตำแหน่ง *ortho* (4) ความเข้มข้น 5 mM และน้ำตาลฟรุกโตสความเข้มข้น 50 mM ในบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต 10 mM หมายเลข 1 = 5 mM dye, 2 = 5 mM dye + 10 mM Na₂CO₃ และ 3 = 5 mM dye + 10 mM Na₂CO₃ + 50 mM fructose

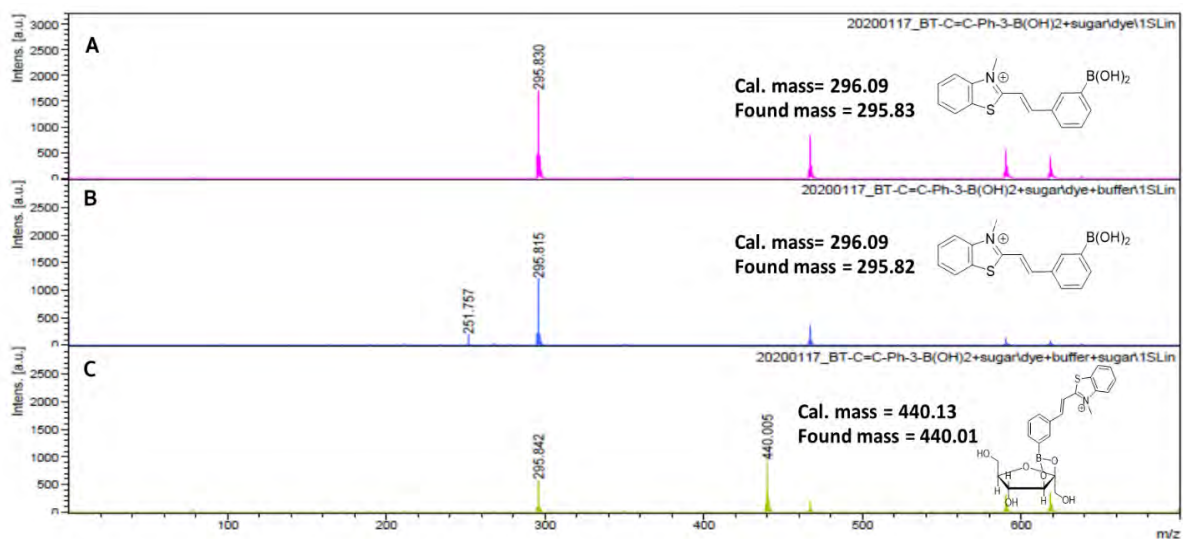


รูปที่ 3.13 MALDI-TOF MS สเปกตรัมของ (A) = สีย้อม *ortho* (4) (5 mM), (B) = สีย้อม *ortho* (4) (5 mM) + บัฟเฟอร์ Na_2CO_3 10 mM และ (C) = สีย้อม *ortho* (4) (5 mM) + บัฟเฟอร์ Na_2CO_3 10 mM + น้ำตาล ฟรุคโตส 50 mM เมื่อทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ส่วนการทดลองที่สองใช้สีย้อมสไตริลที่มีหมู่บอริกที่มีตำแหน่ง *meta* (5) ความเข้มข้น 5 mM ละลายในบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต (pH 9.0) ความเข้มข้น 10 mM (มี DMSO 25%) ทำปฏิกิริยากับน้ำตาล ฟรุคโตสความเข้มข้น 50 mM ดังแสดงในรูปที่ 3.14 พบว่าเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าพบว่าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งในสภาวะที่มีน้ำตาล (หลอดที่ 2) และไม่มีน้ำตาล (หลอดที่ 3) และผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ดังแสดงในรูปที่ 3.15 พบว่าเมื่อสีย้อมสไตริลอยู่ในสภาวะที่ไม่มีน้ำตาลแต่มีบัฟเฟอร์ (B) จะพบมวลโมเลกุลที่ $m/z = 252$ ซึ่งเป็นมวลโมเลกุลที่คำนวณได้จากโครงสร้างสีย้อมที่มีหมู่บอริกหลุดออกใน ปริมาณเล็กน้อย แต่จะไม่พบการแตกออกของพันธะคู่เลย และเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีน้ำตาล (C) จะพบมวล โมเลกุลที่สอดคล้องกับโครงสร้างของผลิตภัณฑ์ กับสารตั้งต้นที่เหลืออยู่เท่านั้น แสดงว่าสีย้อมที่มีโครงสร้าง แบบ *meta* ค่อนข้างเสถียรในสารละลายบัฟเฟอร์มากกว่าสีย้อมตัวอื่น อย่างไรก็ตาม การเปลี่ยนสีภายใต้แสง ธรรมชาติ และการเรืองแสงภายใต้แสงยูวีกลับเห็นได้ไม่ชัดเจนเหมือนของสีย้อมแบบ *para*



รูปที่ 3.14 ภาพภายใต้แสงธรรมชาติและแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 nm และ 365 nm ของสีย้อมสไตริลที่มีหมู่บอโรนิกตำแหน่ง *meta* (5) ความเข้มข้น 5 mM กับน้ำตาลฟรุกโตสความเข้มข้น 50 mM ในบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 10 mM หมายเลข 1 = 5 mM dye, 2 = 5 mM dye + 10 mM Na₂CO₃ และ 3 = 5 mM dye + 10 mM Na₂CO₃ 50 mM fructose

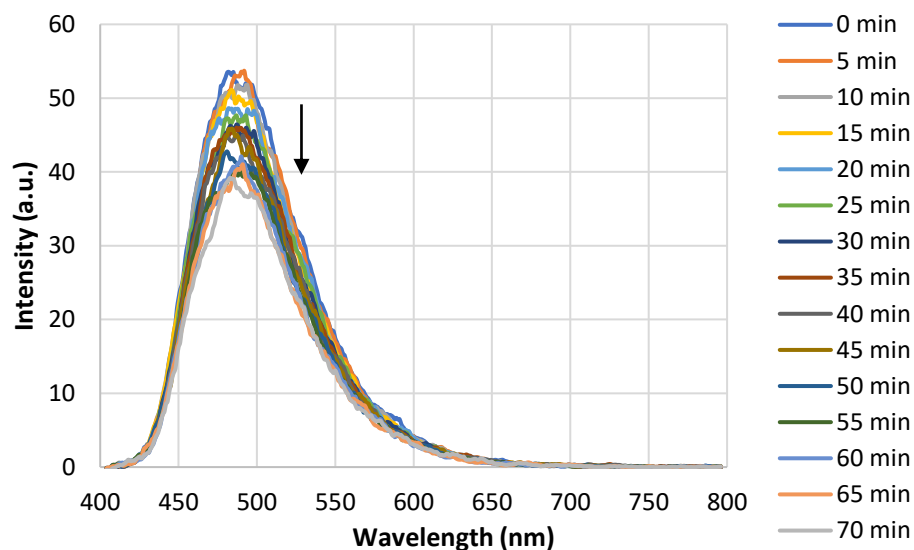


รูปที่ 3.15 MALDI-TOF MS สเปกตรัมของ (A) = สีย้อม *meta* (4) (5 mM), (B) = สีย้อม *meta* (4) (5 mM) + บัฟเฟอร์ Na₂CO₃ 10 mM และ (C) = สีย้อม *meta* (4) (5 mM) + บัฟเฟอร์ Na₂CO₃ 10 mM + น้ำตาลฟรุกโตส 50 mM เมื่อทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

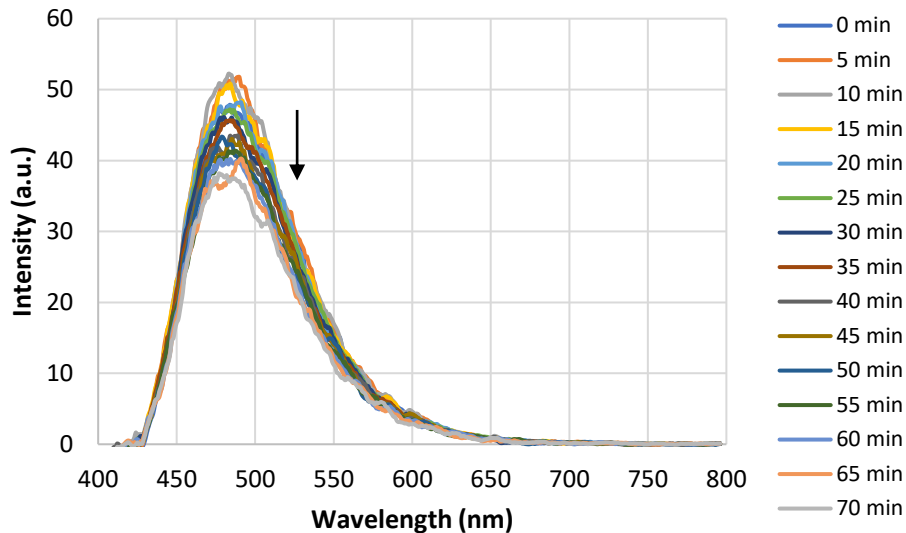
3.2.2 การทดลองฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรสโคปี (fluorescence spectroscopy)

จากผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นค่อนข้างซับซ้อนกว่าที่คาดไว้แต่แรกเนื่องจากความไม่เสถียรของสีย้อมที่มีหมู่บอโรนิกที่เกิดได้ทั้งปฏิกิริยาการหลุดออกของหมู่บอโรนิกและการแตกออกของพันธะคู่กลับไปเป็นสารตั้งต้น ซึ่งปฏิกิริยาเหล่านี้อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีและการเรืองแสงของ 3 ในบัฟเฟอร์ที่สังเกตเห็น ในขณะที่ 3 ที่ทำปฏิกิริยากับน้ำตาลแล้วจะเสถียรมากขึ้นจึงไม่

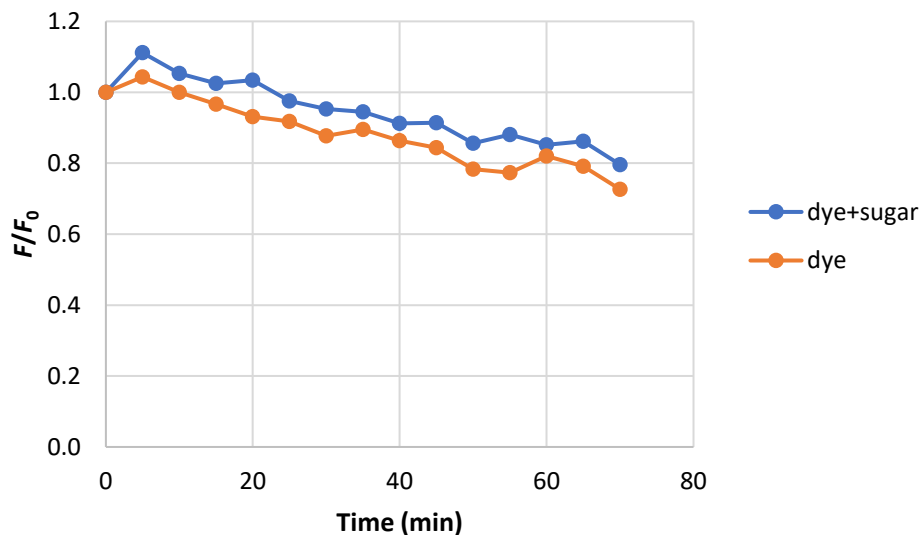
เกิดการเปลี่ยนแปลงที่พบในสีย้อมสีระ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการทดสอบเบื้องต้นกับสีย้อม 3 ที่มีหมู่บอโรนิกที่ตำแหน่ง *para* แสดงการเปลี่ยนแปลงที่ค่อนข้างชัดเจนจากการสังเกตด้วยตาเปล่า จึงได้นำภาวะดังกล่าวมาทดลองใช้ในการตรวจวัดน้ำตาลโดยใช้เครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ในการทดลองที่ 1 เป็นสภาวะที่ไม่มีน้ำตาล โดยใช้สีย้อมสไตริล 3 ความเข้มข้น 10 μM ในบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต (pH 9.0) ความเข้มข้น 10 mM พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปความเข้มแสงของฟลูออเรสเซนส์ที่ได้มีค่าลดลง ดังรูปที่ 3.16 ก. โดยอาจเป็นผลมาจากสีย้อมเมื่ออยู่ในสารละลายที่มีบัฟเฟอร์บัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต (pH 9.0) เกิดการเสียสภาพ ตามที่ได้พิสูจน์โดยเทคนิค MALDI-TOF MS ก่อนหน้านี้ (หัวข้อ 3.1.2.3) ส่วนการทดลองที่ 2 เป็นสภาวะที่มีน้ำตาล โดยใช้สีย้อมสไตริล 3 ความเข้มข้น 10 μM ในบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต (pH 9.0) ความเข้มข้น 10 mM กับน้ำตาลฟรุกโตส 50 mM พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปความเข้มแสงของฟลูออเรสเซนส์ที่ได้ก็มีค่าลดลงเช่นเดียวกับในสภาวะที่ไม่มีน้ำตาล ดังรูปที่ 3.16 ข. ซึ่งผลการทดลองตรงกันข้ามกับที่คาดหมายไว้ว่าสีย้อมสไตริลที่จับกับน้ำตาลจะทำให้เกิดการเรืองแสงที่สว่างมากขึ้นและเมื่อเวลาผ่านไปความเข้มแสงของฟลูออเรสเซนส์ก็ควรจะเพิ่มขึ้นด้วย คาดว่าเกิดจากการที่สีย้อมเสียสภาพเมื่ออยู่ในบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต (pH 9.0) และทำให้ไม่เหลือสีย้อมที่จะไปทำปฏิกิริยากับน้ำตาล โดยในกรณีของการวัดด้วยเครื่องจะใช้ความเข้มข้นของสีย้อมที่ต่ำ จึงอาจจะเกิดการเสียสภาพไปได้มากกว่าการทดสอบในหลอดทดลองที่ใช้สีย้อมเข้มข้นสูงกว่ามาก เมื่อนำสเปกตรัมที่วัดได้ไปห้กับด้วย blank ในโปรแกรม Microsoft Excel และสร้างกราฟระหว่างสัญญาณการเรืองแสง (F/F_0 ที่ ความยาวคลื่น 490 nm) กับเวลา ดังรูปที่ 3.16 ค. พบว่าสัญญาณการเรืองแสงมีค่าลดลงเมื่อเวลาผ่านไป และไม่พบความแตกต่างของการเกิดปฏิกิริยาทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีน้ำตาล



(ก)



(ข)



(ค)

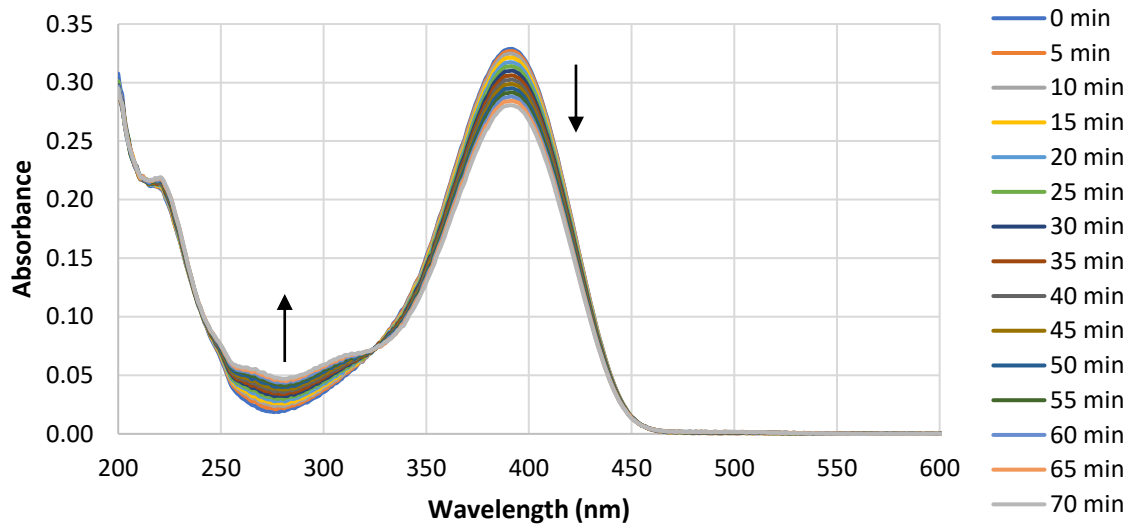
รูปที่ 3.16 กราฟการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนส์ของสีย้อมสไตริล 3 ในบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต (pH 9.0) ความเข้มข้น 10 mM วัดการเรืองแสงด้วยเครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรมิเตอร์ โดยใช้ความยาวคลื่นกระตุ้นที่ 390 nm (ก) สเปกตรัมของฟลูออเรสเซนส์ในสถานะที่ไม่มีน้ำตาล (ข) สเปกตรัมของฟลูออเรสเซนส์ในสถานะที่มีน้ำตาลฟรุกโตสความเข้มข้น 50 mM (ค) กราฟระหว่างสัญญาณการเรืองแสง (F/F_0 ที่ความยาวคลื่น 490 nm) กับเวลา

3.2.3 การทดลองยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรี (UV-visible spectrophotometry)

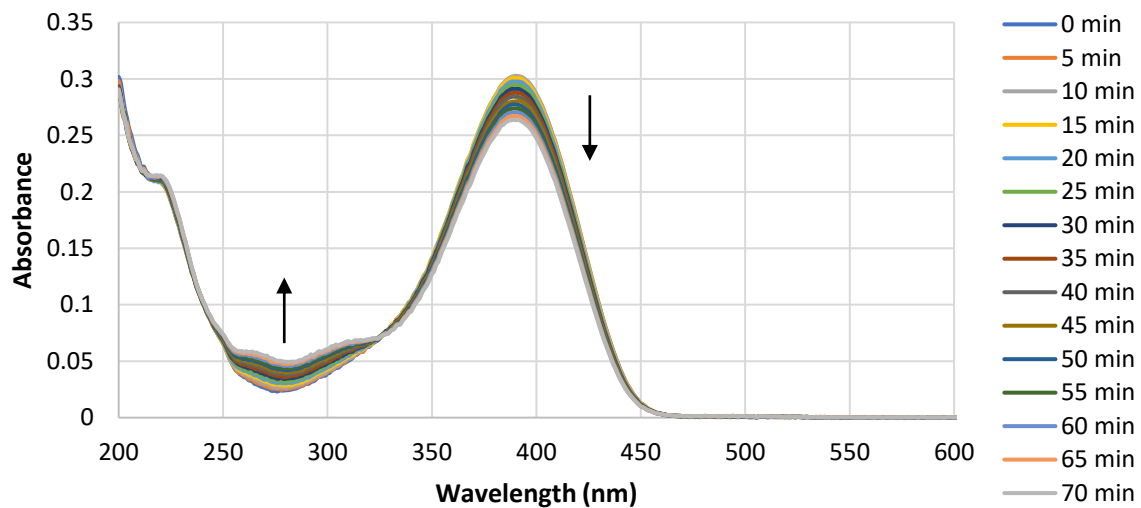
เนื่องจากการทดสอบด้วยตาเปล่าเห็นการเปลี่ยนแปลงสีที่ชัดเจนกว่าการเปลี่ยนการเรืองแสง จึงได้ศึกษาค่าการดูดกลืนแสงควบคู่ไปด้วยโดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรี โดยในการทดลองแรกเป็นสถานะที่ไม่มีน้ำตาล โดยใช้สีย้อมสไตริล 3 ความเข้มข้น 10 μM ในบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต (pH 9.0) ความเข้มข้น 10 mM พบว่าค่าการดูดกลืนแสงมีค่าลดลงเมื่อเวลาผ่านไป ดังรูปที่ 3.17 ก. แสดงให้เห็นว่าสี

ย้อมมีการเสียดสีภาพเมื่ออยู่ในสารละลายที่มีบัฟเฟอร์เป็นเวลานาน ทำให้เกิดการสีอ่อนลง ส่วนอีกการทดลองหนึ่งเป็นสถานะที่มีน้ำตาล ดังรูปที่ 3.17 ข. พบว่าค่าการดูดกลืนแสงก็ลดลงเมื่อเวลาผ่านไปเช่นเดียวกับในสถานะที่ไม่มีน้ำตาล ดังนั้นจึงไม่เห็นความแตกต่างของทั้งสองสถานะ เมื่อสร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (A_{390}/A_{280}) กับเวลา ดังรูปที่ 3.17 ค. พบว่าค่าการดูดกลืนแสงมีค่าลดลงเมื่อเวลาผ่านไป และมีแนวโน้มในทิศทางเดียวกันทั้งเมื่อมีและไม่มีน้ำตาล

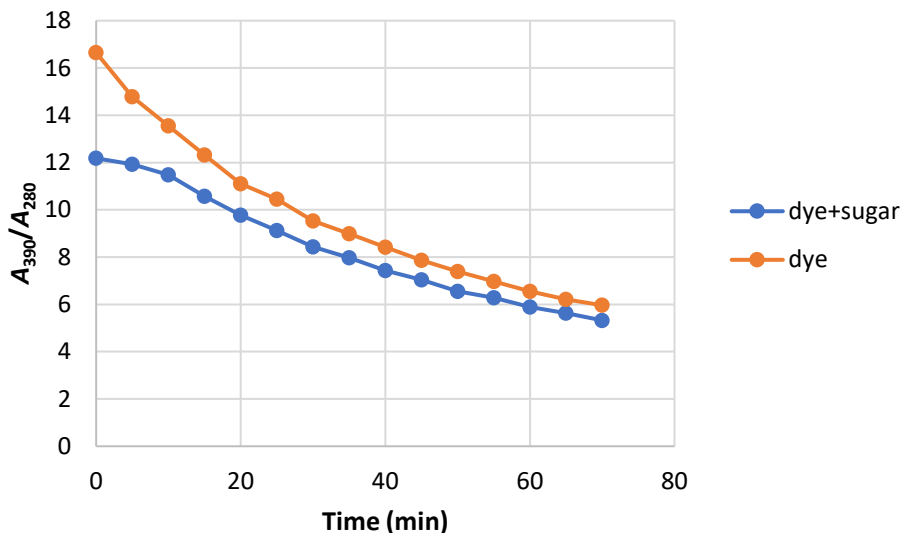
จากผลการทดลองที่ได้จากข้อ 3.2.2 และ 3.2.3 ผู้วิจัยมีสมมติฐานว่าสีย้อมสไตริลเสียดสีภาพเมื่ออยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต (pH 9.0) เข้มข้น 10 mM ซึ่งอาจจะเป็นความเข้มข้นที่สูงเกินไปเมื่อเทียบกับสีย้อม ดังนั้นในการทดลองถัดไปจึงทดลองหาความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสีย้อมสไตริลกับน้ำตาล



(ก)



(ข)

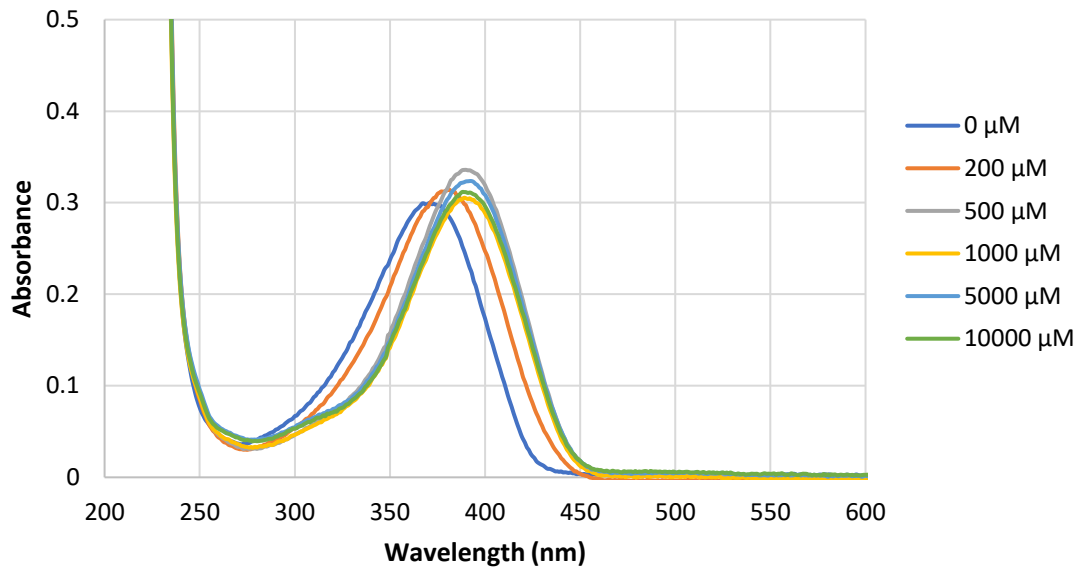


(ค)

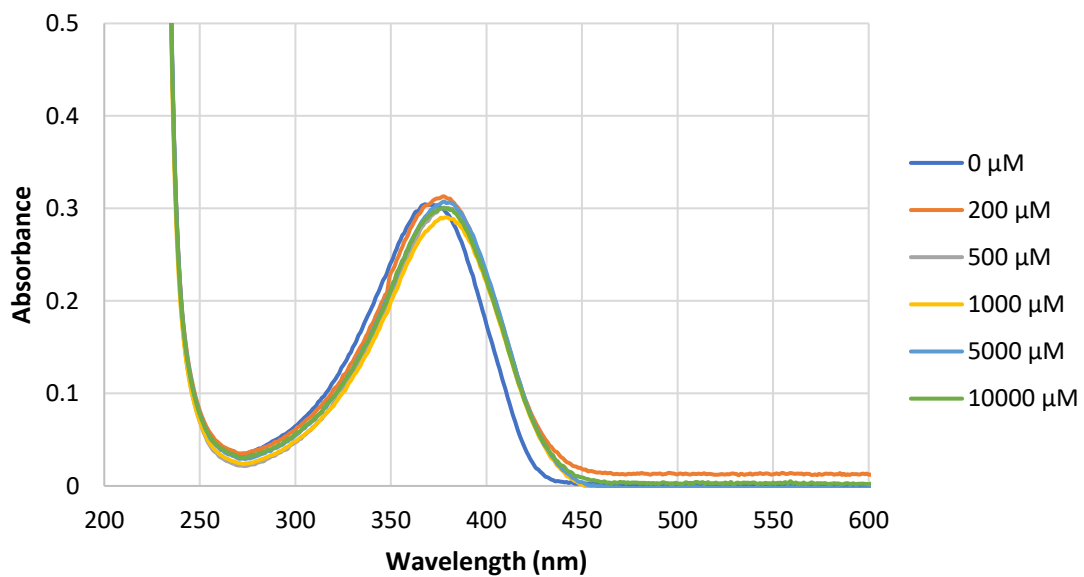
รูปที่ 3.17 กราฟการดูดกลืนแสงยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรีของสีย้อมสไตริล 3 ความเข้มข้น 10 μM ในบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) (pH 9.0) ความเข้มข้น 10 mM (ก) สเปกตรัมของการดูดกลืนแสงยูวี-วิสิเบิล ในสถานะที่ไม่มีน้ำตาล (ข) สเปกตรัมของการดูดกลืนแสงยูวี-วิสิเบิล ในสถานะที่มีน้ำตาลฟรุกโตสความเข้มข้น 50 mM (ค) กราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (A_{390}/A_{280}) กับเวลาของการเกิดปฏิกิริยา

3.2.4 การพิสูจน์หาชนิดและความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมโดยใช้ยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมตรี (UV-visible spectrophotometry)

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาชนิดและความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการใช้ในปฏิกิริยา เนื่องจากหากใช้ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่สูงเกินไปจะทำให้สีย้อมสไตริล 3 เสียสภาพทำให้ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยากับน้ำตาลได้ และจากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าถ้าไม่มีบัฟเฟอร์จะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีและการเรืองแสง ดังนั้นจึงต้องหาความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาและเห็นการเปลี่ยนแปลงสีหรือการเรืองแสงได้ โดยใช้บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0, 200, 500, 1000, 5000 และ 10000 μM โดยจะแบ่งเป็น 2 การทดลอง โดยการทดลองแรกใช้บัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต (pH 9.0) ดังรูปที่ 3.18 ก. พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของสีย้อมที่บัฟเฟอร์แต่ละความเข้มข้นมีค่าใกล้เคียงกัน แต่ความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นทำให้ค่า λ_{max} เลื่อนไปที่ความยาวคลื่นที่มากขึ้นเล็กน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเมื่อความเข้มข้นของบัฟเฟอร์เพิ่มขึ้นส่งผลให้สีย้อมที่ตำแหน่งหมู่บอร์อนิกเปลี่ยนโครงสร้างจาก sp^2 hybridization เปลี่ยนไปเป็น sp^3 hybridization ได้เร็วมากยิ่งขึ้นส่งผลให้เกิดการจับกับน้ำตาลได้เร็วและทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีหรือมีการเรืองแสงมากขึ้น ส่วนอีกการทดลองหนึ่งใช้บัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต (pH 7.0) พบว่าไม่ให้ผลที่แตกต่างกันมากนักทั้งค่าการดูดกลืนแสงและความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสงแม้จะมีความเข้มข้นที่แตกต่างกันดังรูปที่ 3.18 ข. เมื่อสร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (A_{390}/A_{370}) กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของบัฟเฟอร์ พบว่าเมื่อเทียบความเข้มข้นที่เท่ากันบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต (pH 9.0) มีค่าการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่มากกว่าบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต (pH 7.0) อีกทั้งยังทำให้สีย้อมสไตริลเปลี่ยนไปเป็นโครงสร้างแบบเทอร์ฮีดรัลได้เร็วกว่า ซึ่งเป็นโครงสร้างที่พร้อมเกิดปฏิกิริยากับน้ำตาล ดังนั้นจึงเลือกใช้บัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต (pH 9.0) ที่ความเข้มข้น 500 μM ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่เห็นการเปลี่ยนแปลงและเป็นการป้องกันการเสียสภาพของสีย้อมที่เกิดจากการมีบัฟเฟอร์ความเข้มข้นที่สูงด้วย



(ก)

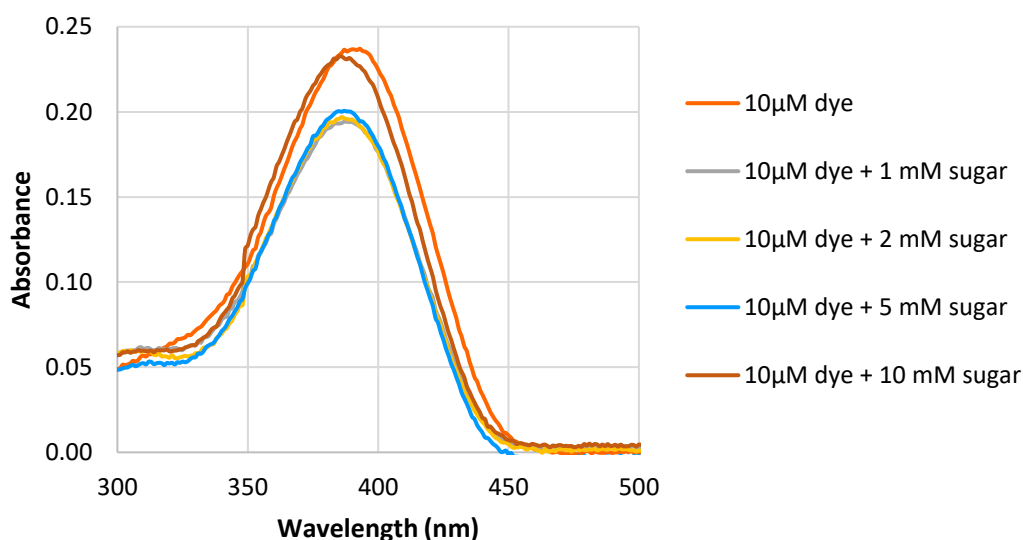


(ข)

รูปที่ 3.18 กราฟการดูดกลืนแสงยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมตรีของสี้อมสไตริล 3 ความเข้มข้น 10 μM
 (ก) บัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต (pH 9.0) (ข) บัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต (pH 7.0)

3.2.5 การติดตามการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสีย้อมสไตริล 3 กับน้ำตาลความเข้มข้นต่าง ๆ ในระดับ mM โดยใช้ยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมตรี (UV-visible spectrophotometry)

ในการทดลองนี้เป็นการเพิ่มระดับความเข้มข้นของน้ำตาลจากระดับ μM เป็นระดับ mM เนื่องจากคิดว่าหากเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลแล้วจะทำให้สีย้อมสไตริลเกิดปฏิกิริยากับน้ำตาลและเห็นการเปลี่ยนแปลงเกิดการเรืองแสงได้ชัดเจนมากขึ้น โดยใช้น้ำตาลฟรุกโตสที่ความเข้มข้น 1, 2, 5 และ 10 mM ดังรูปที่ 3.19 พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลแล้วค่าการดูดกลืนแสงและความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสงที่ได้ยังมีค่าที่ไม่แตกต่างกันมากนัก ซึ่งตรงกันข้ามกับกับสมมติฐานที่ตั้งไว้ว่าหากเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลแล้วจะทำให้สีย้อมจับกับน้ำตาลและเกิดการเรืองแสงที่มากขึ้น ดังนั้นจึงไม่ได้ทดลองในส่วนนี้ต่อ และได้เปลี่ยนแนวทางเป็นการพัฒนาวิธีการตรวจวัดน้ำตาลทางอ้อมแทน

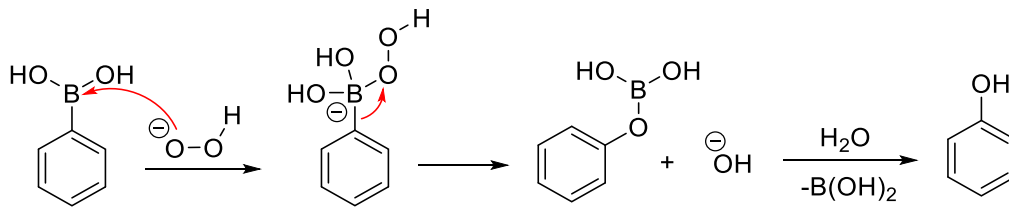


รูปที่ 3.19 กราฟการดูดกลืนแสงยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมตรี เมื่อใช้สีย้อมสไตริล 3 ความเข้มข้น 10 μM กับน้ำตาล ฟรุกโตสที่ความเข้มข้นต่างๆในระดับ mM ในบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 500 μM

3.3 วิธีการตรวจวัดน้ำตาลกลูโคสทางอ้อม

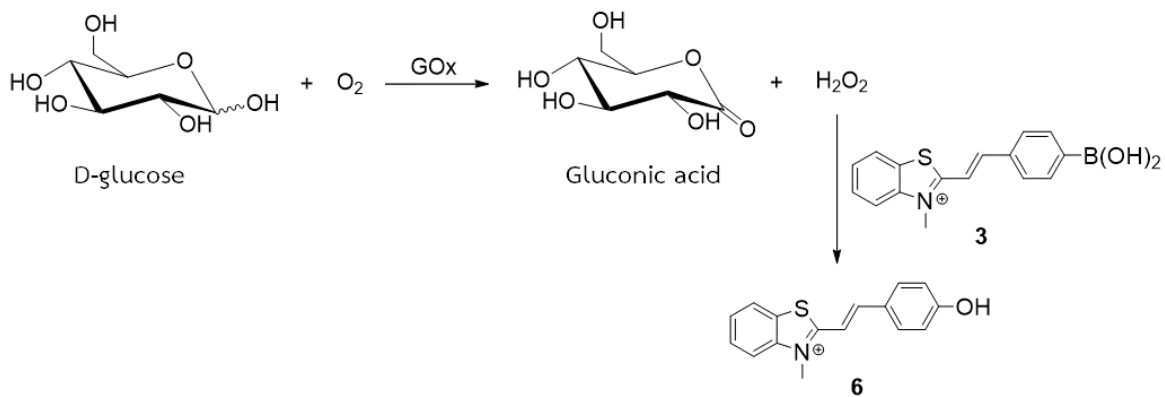
3.3.1 หลักการ

เนื่องจากการตรวจวัดน้ำตาลโดยให้เกิดปฏิกิริยากับหมู่บอโรนิกของสีย้อมโดยตรงไม่ได้เป็นไปตามที่คาดไว้ โดยแม้จะพิสูจน์ได้จากเทคนิค MALDI-TOF MS และ ^1H NMR ว่ามีการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสีย้อมกับน้ำตาลจริง แต่การเปลี่ยนสีและการเรืองแสงเกิดขึ้นค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับสีย้อมอิสระ ส่วนการเปลี่ยนแปลงสีและการเรืองแสงที่สังเกตเห็นในกรณีของสีย้อม 3 ที่อยู่ในบัฟเฟอร์น่าจะเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างสีย้อม 3 กับบัฟเฟอร์ จึงมีอีกแนวคิดหนึ่งในการพัฒนาตัวตรวจวัดน้ำตาลโดยอ้อม โดยอาศัยสมบัติของหมู่ฟีนอลบอโรนิก ที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ได้เป็นฟีนอล⁸ ดังรูปที่ 3.20



รูปที่ 3.20 แผนภาพกลไกการเกิดปฏิกิริยา deboronation ด้วย H_2O_2 ภายใต้ภาวะเบส³⁶

โดยหมู่แทนที่ $-\text{B}(\text{OH})_2$ (หมู่ดึงอิเล็กตรอน) และ $-\text{OH}$ (หมู่ให้อิเล็กตรอน) ส่งผลต่อวงเบนซีนต่างกัน สีและการเรืองแสงจึงน่าจะต่างกันด้วย ประกอบกับความรู้ที่ว่ากลูโคสสามารถทำปฏิกิริยากับเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (GOx) เกิดเป็น gluconic acid และได้ H_2O_2 เป็นผลิตภัณฑ์ข้างเคียง ดังรูปที่ 3.21 ซึ่งการตรวจวัดน้ำตาลกลูโคสในอุปกรณ์ตรวจวัดกลูโคสหลายชนิดอาศัยหลักการตรวจหา H_2O_2 ที่เกิดขึ้นเป็นผลิตภัณฑ์ข้างเคียงนี้⁸



รูปที่ 3.21 แผนภาพการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสกับกลูโคสออกซิเดสและการเกิดปฏิกิริยาของสีย้อมสไตริล 3 กับ H_2O_2

จากการศึกษาเอกสารอ้างอิงพบว่าเคยมีผู้พัฒนาวิธีการตรวจวัดน้ำตาลกลูโคสโดยวิธีนี้มาก่อนหน้านี้กับสีย้อมชนิดอื่น⁸ ผู้วิจัยจึงศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้สีย้อมสไตริล 3 ในการตรวจวัด H_2O_2 เพื่อนำไปใช้ในการตรวจวัดน้ำตาลกลูโคสโดยทางอ้อม

3.3.2 การพิสูจน์เบื้องต้นสำหรับการตรวจวัดระหว่างสีย้อมสไตริล 3 กับ H_2O_2

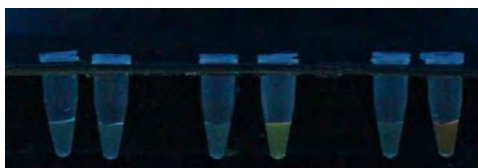
3.3.2.1 การหาความเข้มข้นและชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม

ในการทดลองได้ทดสอบกับบัฟเฟอร์ทั้งหมด 3 ชนิด ความเข้มข้น 10 mM ได้แก่ บัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตต (pH 5.0), บัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต (pH 7.0) และบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต (pH 9.0) พบว่าการใช้บัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต (pH 7.0) ในสภาวะที่มี (หลอดที่ 4) และไม่มี H_2O_2 (หลอดที่ 3) พบว่าให้การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายที่แตกต่างกัน แสดงถึงการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสีย้อมสไตริลกับ H_2O_2 แต่การใช้บัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต (pH 9.0) ให้การเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนกว่าที่เวลาบ่มเท่ากัน และสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงได้รวดเร็วที่สุดดังรูปที่ 3.22

White light



UV light
(312 nm)



1 2 3 4 5 6
NaOAc PB Na₂CO₃
(pH 5.0) (pH 7.0) (pH 9.0)

รูปที่ 3.22 ภาพภายใต้แสงธรรมชาติและแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 nm ของการหาชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม เมื่อใช้สีย้อมสไตริล 3 ความเข้มข้น 100 μM ในบัฟเฟอร์ 10 mM หมายเลข 1, 3, 5 ไม่มี H₂O₂ หมายเลข 2, 4, 6 มี H₂O₂ ความเข้มข้น 200 μM

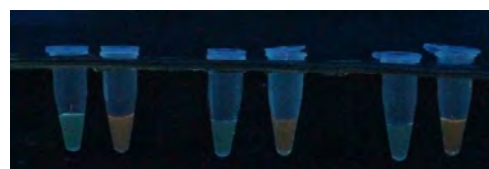
เนื่องจากปฏิกิริยากำจัดหมู่บอโรนิกเกิดได้ดีภายใต้ภาวะเบส เนื่องจากเบสจะทำให้ H₂O₂ เปลี่ยนไปเป็น HO₂⁻ ที่เป็นนิวคลีโอไฟล์ที่ดี และภาวะเบสยังช่วยให้บอโรนเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นเกิดไฮโดรลิซิสไปเป็นฟีนอลได้เร็วขึ้นดังกลไกในรูปที่ 3.20 ดังนั้นจึงเลือกใช้บัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต (pH 9.0) ในการทดลองต่อไป

จากนั้นจึงหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต (Na₂CO₃) (pH 9.0) โดยเปรียบเทียบที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 mM พบว่าทั้ง 3 ความเข้มข้นให้การเปลี่ยนแปลงที่ไม่แตกต่างกันมากนัก ดังรูปที่ 3.23 และที่ความเข้มข้นบัฟเฟอร์ 1 mM เป็นความเข้มข้นที่น้อยที่สุดและเห็นการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจน (หลอดที่ 1 และ 2) จึงเลือกใช้ความเข้มข้นบัฟเฟอร์ 1 mM ในการทดลองต่อไป

White light



UV light
(312 nm)

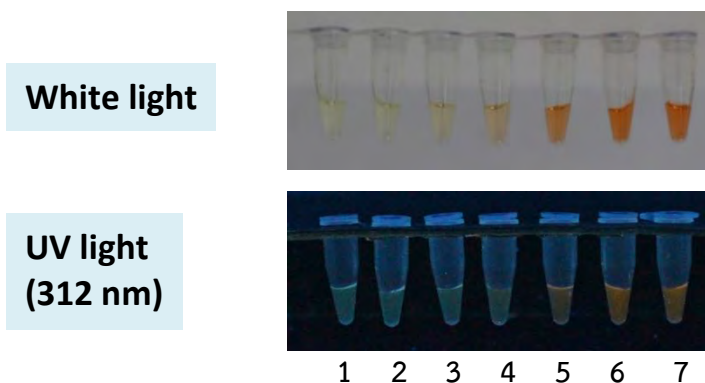


1 2 3 4 5 6
1 mM 10 mM 100 mM

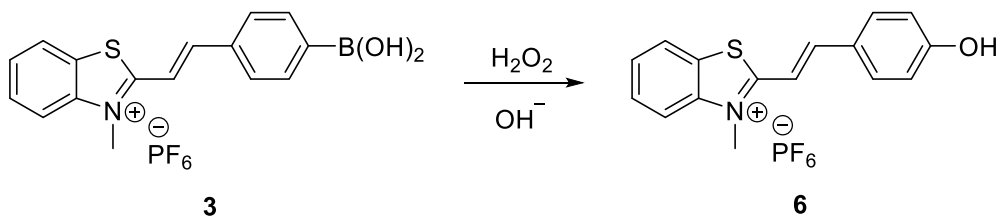
รูปที่ 3.23 ภาพภายใต้แสงธรรมชาติและแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 nm ของการหาความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม เมื่อใช้สีย้อมสไตริล 3 ความเข้มข้น 100 μM หมายเลข 1, 3, 5 ไม่มี H₂O₂ หมายเลข 2, 4, 6 มี H₂O₂ ความเข้มข้น 200 μM

3.3.2.2 การทดสอบระหว่างสีย้อมสไตริล 3 กับ H_2O_2 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

จากการทดลองก่อนหน้าได้เลือกใช้บัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) (pH 9.0) ความเข้มข้น 1 mM และใช้ H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 0, 1, 5, 10, 50, 100 และ 200 μM โดยให้ความเข้มข้นของสีย้อม 3 คงที่ที่ 100 μM พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ H_2O_2 สีของสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีส้มและเข้มมากขึ้นตามลำดับ ในขณะที่เดียวกันการเรืองแสงก็เปลี่ยนจากสีออกเขียวไปเป็นสีส้มมากขึ้น ดังรูปที่ 3.24 เนื่องจากสีย้อม 3 ที่มีหมู่บอโรนิกถูกเปลี่ยนไปเป็นสีย้อม 6 ที่มีหมู่ OH ได้มากขึ้น ดังรูปที่ 3.25

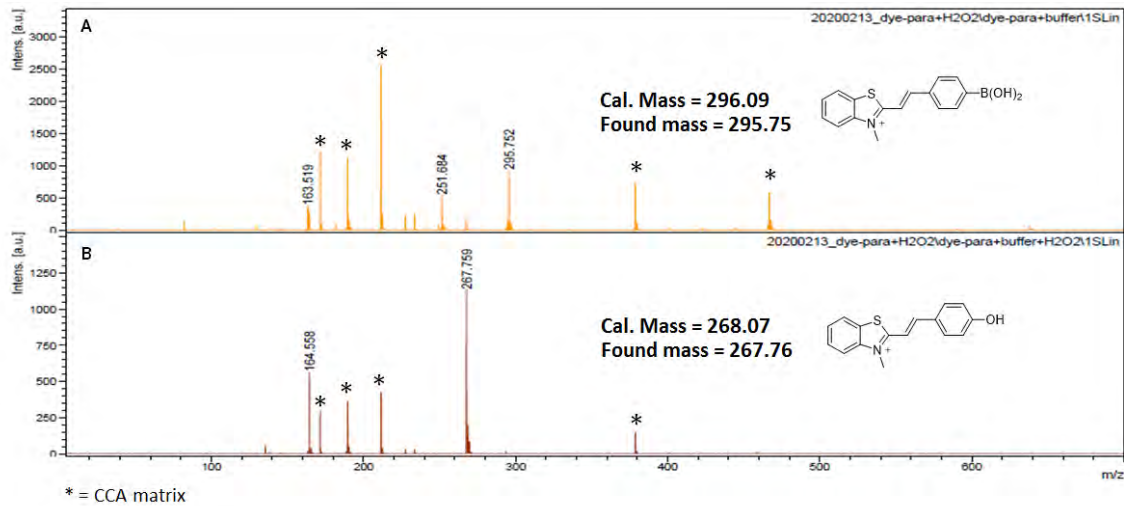


รูปที่ 3.24 ภาพภายใต้แสงธรรมชาติและแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 nm เปรียบเทียบสีของสีย้อม 3 ความเข้มข้น 100 μM ในบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนต (pH 9.0) ความเข้มข้น 10 mM ที่ทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 0, 1, 5, 10, 50, 100 และ 200 μM (หมายเลข 1-7 ตามลำดับ)



รูปที่ 3.25 แผนภาพการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสีย้อม 3 กับ H_2O_2

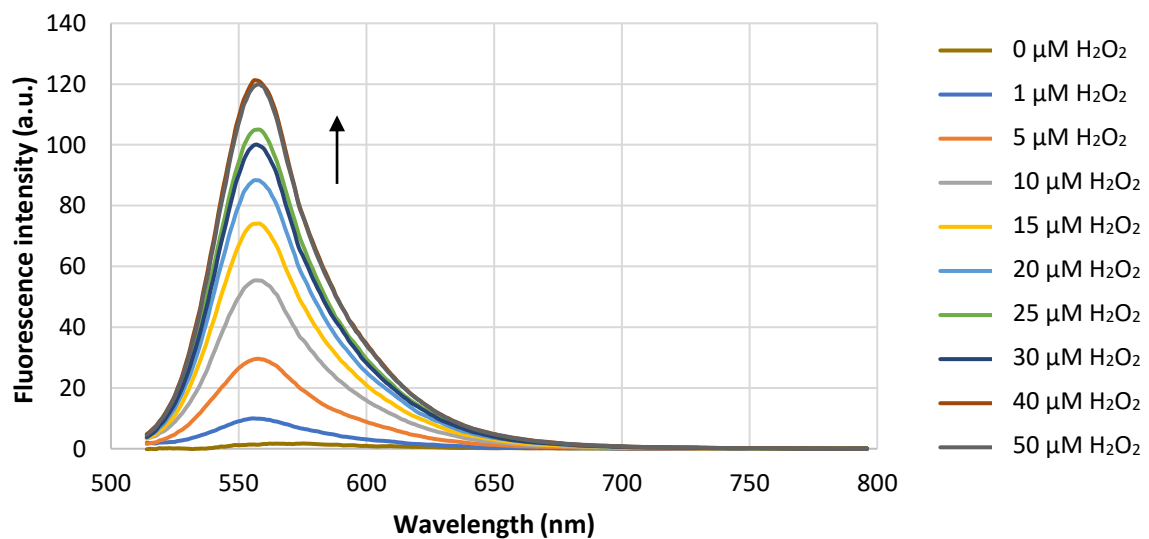
จากนั้นจึงใช้เทคนิค MALDI-TOF MS เพื่อพิสูจน์และวิเคราะห์โครงสร้างสารที่เปลี่ยนแปลง พบว่าหลังเกิดปฏิกิริยากับ H_2O_2 ในรูป (B) เกิดพีกใหม่ที่ $m/z = 267$ ซึ่งสอดคล้องกับโครงสร้างของผลิตภัณฑ์ที่คาดว่าจะเกิดขึ้น และยังพบว่ามีสีย้อมบางส่วนที่โครงสร้างแตกบริเวณพันธะคู่ สังเกตได้จากพีกที่ $m/z = 163$ ของสารตั้งต้นที่มีความเข้มเพิ่มขึ้นจากที่เห็นในสีย้อมปกติในสถานะที่ไม่มี H_2O_2 (A) นอกจากนี้ยังพบผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการหลุดออกของหมู่บอโรนิกที่ $m/z = 252$ ดังที่เคยอธิบายไปแล้วในหัวข้อ 3.2.1.3 ดังรูปที่ 3.26



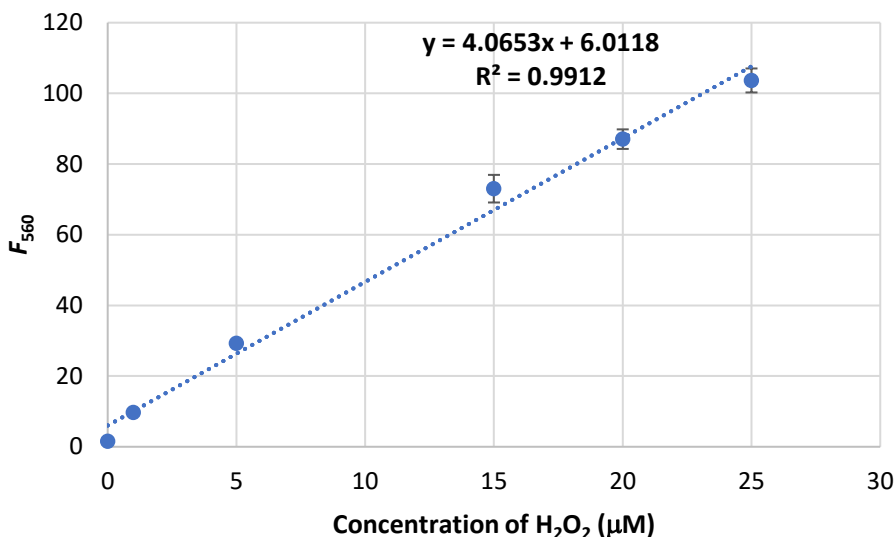
รูปที่ 3.26 MALDI-TOF MS สเปกตรัมของ (A) = สีย้อม 3 (100 μM) + บัฟเฟอร์ Na₂CO₃ 1 mM และ (B) = สีย้อม 3 (100 μM) + บัฟเฟอร์ Na₂CO₃ 1 mM + H₂O₂ 200 μM เมื่อทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พิกที่แสดงสัญลักษณ์ด้วย * คือพิกของแมทริกซ์ (CCA) ซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา

3.3.2.3 การหาค่าความไวในการตรวจวัด (sensitivity) โดยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์

เมื่อได้ภาวะที่เหมาะสมจากการทดสอบเบื้องต้นโดยใช้การสังเกตการเปลี่ยนสีและการเรืองแสงด้วยตาเปล่าแล้วจึงได้นำภาวะดังกล่าวมาใช้ในการตรวจวัด H₂O₂ โดยใช้เครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้สีย้อม 3 (10 μM) ร่วมกับบัฟเฟอร์ Na₂CO₃ (pH 9.0) ความเข้มข้น 500 μM พบว่าเมื่อระดับความเข้มข้นของ H₂O₂ เพิ่มสูงขึ้นสัญญาณการเรืองแสงจะเพิ่มสูงขึ้นด้วย ซึ่งพบว่า ที่ความเข้มข้นสูงสุดของ H₂O₂ ที่ทดสอบคือ 50 μM ให้สัญญาณเรืองแสงชัดเจนที่มี λ_{em} อยู่ที่ 560 nm ดังรูปที่ 3.27 ก. และเมื่อนำความเข้มข้นของสัญญาณการเรืองแสงที่ 560 nm ไปพล็อตเทียบกับความเข้มข้นของ H₂O₂ จะพบว่าได้กราฟที่เป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0-25 μM H₂O₂ ดังรูปที่ 3.27 ข. ซึ่งจากสมการ linear regression ($r^2 = 0.9912$) ได้ค่า slope = 4.0653 และ คำนวณ LOD จาก 3SD(blank)/slope ได้เท่ากับ 0.03177 μM หรือ 31.8 nM โดยผลการทดลองที่ได้ยืนยันว่าสามารถใช้สีย้อมสไตริล 3 ในการตรวจวัด H₂O₂ ได้จริง



(ก)

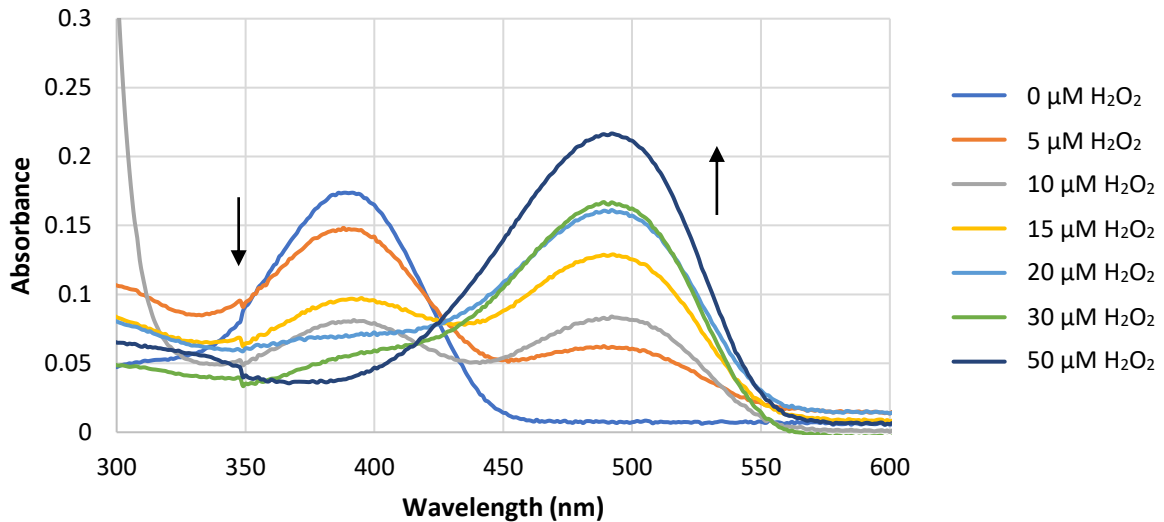


(ข)

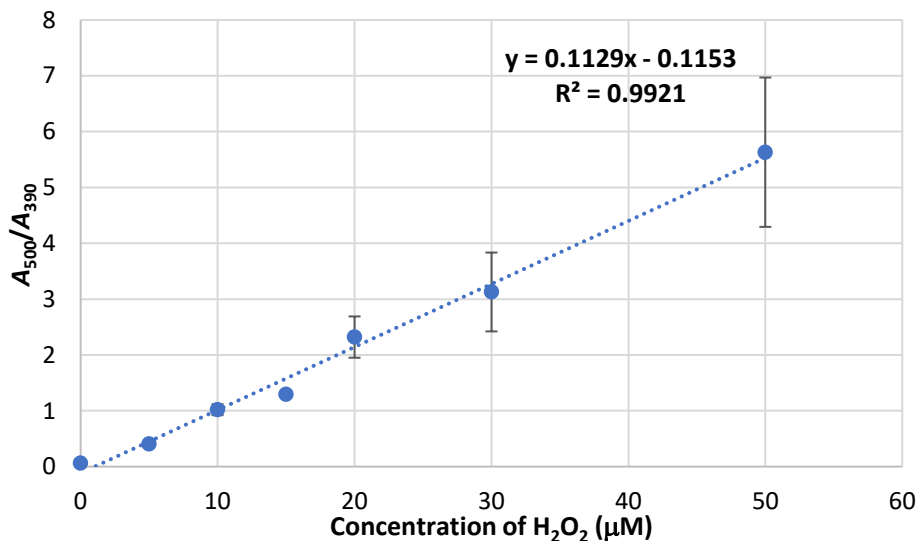
รูปที่ 3.27 กราฟแสดงการเรืองแสงของสีย้อม 3 (10 µM) หลังทำปฏิกิริยากับ H₂O₂ ที่ความเข้มข้น 0, 1, 5, 15, 20, 25, 30, 40 และ 50 µM ในบัฟเฟอร์ Na₂CO₃ (pH 9.0) 500 µM เป็นเวลา 60 นาที โดยวัดที่ความยาวคลื่นกระตุ้นที่ 500 nm (ก) ฟลูออเรสเซนส์สเปกตรัมของ H₂O₂ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (0-50 µM) (ข) กราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของ H₂O₂ (0-25 µM) และสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่ 560 nm แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยจากการวัด 3 ครั้ง และ error bar แสดงถึงค่า SD

3.3.2.4 การหาค่าความไวในการตรวจวัด (sensitivity) โดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมตรี (UV-visible spectrophotometry)

นอกจากนี้ยังได้ทดลองตรวจวัด H₂O₂ จากการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้สีย้อม 3 (10 µM) ร่วมกับ ใน Na₂CO₃ (pH 9.0) ความเข้มข้น 500 µM พบว่าจากสเปกตรัมการดูดกลืนแสงจะเห็นได้ว่าการดูดกลืนแสงที่บริเวณสองความยาวคลื่นด้วยกัน ได้แก่ การดูดกลืนแสงของสีย้อมสไตริล 3 ที่มีหมู่บอโรนิก ที่มี λ_{abs} เท่ากับ 390 nm และการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ 6 ที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างสีย้อมสไตริลกับ H₂O₂ ซึ่งมีหมู่แทนที่เปลี่ยนจากหมู่บอโรนิกเป็นหมู่ OH ทำให้เกิดการเลื่อนของ λ_{abs} ไปเป็น 500 nm การเลื่อนของ λ_{abs} ไปในทิศทางสีแดง (red shift) สอดคล้องกับคอนจูเกชันที่เพิ่มขึ้นจากการเปลี่ยนหมู่บอโรนิกไปเป็นหมู่ OH ซึ่งเป็นหมู่ให้อิเล็กตรอน โดยพบว่าเมื่อความเข้มข้นของ H₂O₂ เพิ่มขึ้นจะให้ค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ 6 ที่สูงขึ้นบริเวณ λ_{abs} ที่ 500 nm และค่าการดูดกลืนแสงของสีย้อมสไตริล 3 ที่ λ_{abs} 390 nm จะลดลง ดังรูปที่ 3.28 ก. และเมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 390 nm และ 500 nm (A_{500}/A_{390}) ไปพล็อตเทียบกับความเข้มข้นของ H₂O₂ ที่ทดสอบ (0-50 µM) และความเข้มข้นที่ให้กราฟเส้นตรงจะอยู่ที่ช่วง 0-50 µM H₂O₂ ดังรูปที่ 3.28 ข. ซึ่งจากสมการ linear regression ($r^2 = 0.9921$) ได้ค่า slope = 0.1129 และ คำนวณ LOD จาก $3SD(\text{blank})/\text{slope}$ ได้เท่ากับ 0.10093 µM หรือ 101 nM ซึ่งสูงกว่าที่ได้จากการวัดโดยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์เล็กน้อย แต่มีช่วงความเป็นเส้นตรงที่กว้างกว่า อย่างไรก็ตาม ได้ค่า SD ที่ค่อนข้างสูงในช่วงความเข้มข้นสูง ทั้งนี้เนื่องจากตัวเลขที่นำมาพล็อตเป็นอัตราส่วนของการดูดกลืนแสงที่สองความยาวคลื่น จึงมีความผิดพลาดในการหารได้มากกว่า โดยผลการทดลองที่ได้จากทั้งสองวิธียืนยันว่าสามารถใช้สีย้อมสไตริล 3 ในการตรวจวัด H₂O₂ ได้จริง



(ก)



(ข)

รูปที่ 3.28 กราฟการดูดกลืนแสงยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรีของสีย้อม 3 ($10 \mu\text{M}$) หลังทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20, 30 และ $50 \mu\text{M}$ ในบัฟเฟอร์ Na_2CO_3 (pH 9.0) ความเข้มข้น 500 μM วัดการเรืองแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (ก) สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ H_2O_2 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (0-50 μM) (ข) กราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้น H_2O_2 ช่วงความเข้มข้น (0-50 μM) และค่าการดูดกลืนแสง แต่ละจุดเป็นค่าเฉลี่ยจากการวัด 3 ครั้ง และ error bar แสดงถึงค่า SD

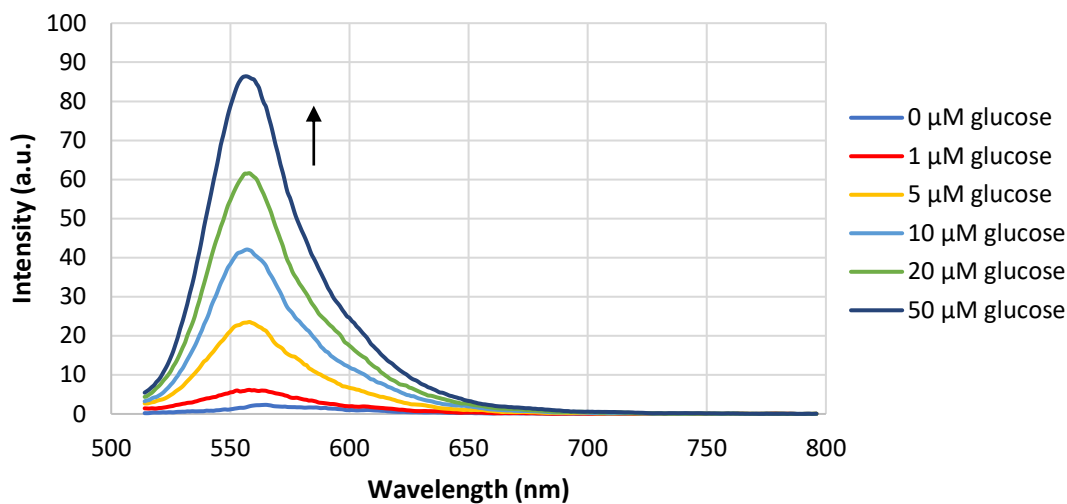
จากการเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้กับงานวิจัยของ Lee และคณะ^๑ ซึ่งศึกษาสีย้อมสไตริลที่มีหมู่บอโรนิกคล้ายกัน แต่มีหมู่พริดีเนียมหรือควิโนลิเนียมแทนหมู่เบนโซโซลีน และอีกสิ่งหนึ่งที่แตกต่างคืองานวิจัยของ Lee และคณะใช้บอโรเนตเอสเทอร์แทนที่จะเป็นบอโรนิกแอซิด พบว่าในงานวิจัยนี้สามารถตรวจวัด H_2O_2 โดยได้สัดส่วนความเข้มข้น H_2O_2 :ความเข้มข้นสีย้อมที่ต่ำกว่าในเวลาเท่ากัน แสดงให้เห็นว่าโมเลกุลสีย้อม 3 ในงานวิจัยนี้สามารถแยกความแตกต่างของ H_2O_2 ที่ความเข้มข้นต่ำได้ดี และเห็นการ

เปลี่ยนแปลงในโหมดฟลูออเรสเซนส์ชัดเจนกว่าสีย้อมในงานวิจัยของ Lee และคณะ เนื่องจากโมเลกุลของสีย้อม 3 แสดงการเรืองแสงที่ต่ำมากเมื่อถูกกระตุ้นที่ 500 nm ทำให้อัตราส่วนระหว่างสัญญาณเมื่อมี H_2O_2 เทียบกับสีย้อมอิสระมีค่าสูงมากถึง 75 เท่า ในขณะที่สีย้อมจากงานวิจัยของ Lee ให้ตัวเลขอัตราส่วนดังกล่าวเพียง 5-18 เท่าเท่านั้น นอกจากนี้ การเปลี่ยนแปลงของยูวี-วิสิเบิลสเปกตรัมของสีย้อม 3 ก็ชัดเจนกว่ามาก โดยพบการดูดกลืนแสงสองความยาวคลื่นที่ 510 nm เป็นของผลิตภัณฑ์ 6 ที่เกิดจากสีย้อมกับ H_2O_2 ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นและที่ 390 nm เป็นของสีย้อม 3 ที่มีค่าการดูดกลืนแสงลดลงเนื่องจากเกิดเป็นผลิตภัณฑ์มากขึ้น แต่ไม่สามารถเทียบ LOD ได้เนื่องจากในงานของ Lee ไม่ได้คำนวณค่านี้ไว้แน่ชัด แต่ความเข้มข้นต่ำสุดของ H_2O_2 ที่รายงานว่าวัดได้อยู่ที่สูงกว่า 10 μM ซึ่งสูงกว่าในงานวิจัยนี้ที่วัดได้ถึงระดับ 0.1 μM

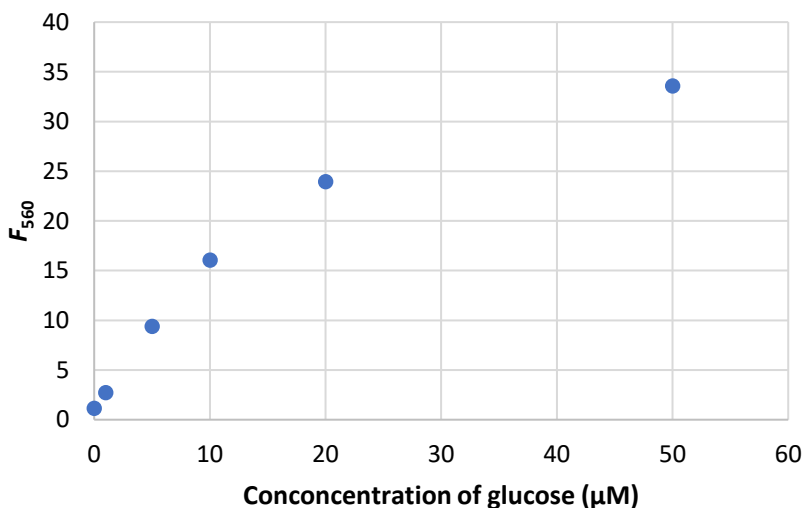
3.3.3 การพิสูจน์เบื้องต้นสำหรับการตรวจวัดน้ำตาลทางอ้อมโดยตรวจวัดปริมาณ H_2O_2 ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของน้ำตาลกลูโคสทำกับกลูโคสออกซิเดส

3.3.3.1 การทดลองฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรสโคปี (fluorescence spectroscopy)

ในการทดลองได้เลือกใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองก่อนหน้านี้ โดยใช้สีย้อม 3 (10 μM) ร่วมกับบัฟเฟอร์ Na_2CO_3 (pH 9.0) ความเข้มข้น 500 μM ทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาระหว่างกลูโคสออกซิเดสกับกลูโคสเพื่อใช้ในการตรวจวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสทางอ้อม โดยใช้เครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ พบว่าเมื่อมีกลูโคสจะได้ให้สัญญาณเรืองแสงชัดเจนที่ λ_{em} 560 nm และเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสเพิ่มขึ้นความเข้มของสัญญาณการเรืองแสงก็เพิ่มขึ้นด้วย ดังรูปที่ 3.29 ก. ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลที่ได้จากการตรวจวัดปริมาณ H_2O_2 โดยตรงในข้อที่ 3.3.1.3 จากนั้นเมื่อนำค่าความเข้มของสัญญาณการเรืองแสงที่ 560 nm ไปพล็อตกับความเข้มข้นของกลูโคส จะพบว่าสัญญาณไม่เป็นเส้นตรงตลอดช่วงความเข้มข้นของกลูโคสที่ทดสอบ (0-50 μM) แต่ความเข้มข้นที่ให้กราฟเส้นตรงจะอยู่ที่ช่วง 0-10 μM กลูโคส ดังรูปที่ 3.29 ข. ในการทดลองนี้ได้วัดสัญญาณที่แต่ละความเข้มข้นเพียงครั้งเดียว จึงไม่สามารถคำนวณค่า LOD จากสูตร $3SD(\text{blank})/\text{slope}$ ได้ แต่เนื่องจากกลูโคสที่ความเข้มข้น 1 μM ให้สัญญาณที่แตกต่างจาก blank ชัดเจน ดังนั้นค่า LOD ของการตรวจวัดกลูโคสโดยวิธีฟลูออเรสเซนส์ที่พัฒนาขึ้นน่าจะใกล้เคียงกับ 1 μM หรือต่ำกว่าเล็กน้อย จากผลที่ได้เมื่อเทียบกับงานวิจัยของ Lee และคณะ⁸ ซึ่งได้ใช้สีย้อมที่คล้ายกันนำมาตรวจวัดกลูโคสร่วมกับ GOx พบว่าค่าต่ำสุดที่ตรวจวัดได้คืออยู่ในช่วง 20-100 μM เมื่อเทียบกับผลการทดลองที่ได้พบว่าสีย้อม 3 สามารถตรวจวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสได้ที่มีความเข้มข้นต่ำกว่าในระดับ 1 μM (หรือ 100 μM ในสารละลายก่อนเจือจาง) ซึ่งน่าจะว่องไวพอที่จะใช้ในตัวอย่างจริงได้ เช่น น้ำตาลกลูโคสในเลือดซึ่งมีความเข้มข้น 4-7 mM ⁴ แต่อาจต้องเพิ่มความเข้มข้นของสีย้อมที่ใช้หรือเจือจางตัวอย่างลงเพื่อป้องกันสัญญาณอิ่มตัว



(ก)



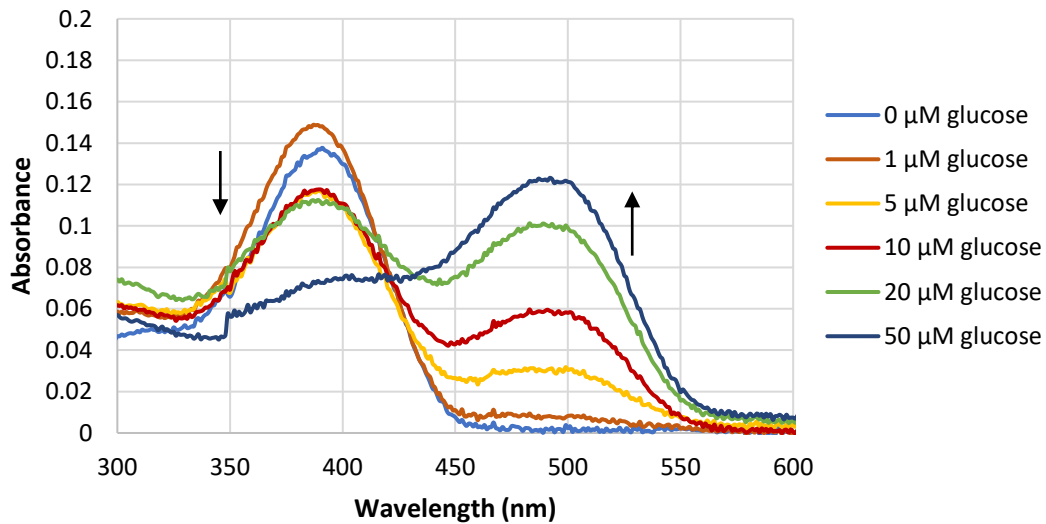
(ข)

รูปที่ 3.29 กราฟแสดงการเรืองแสงของสีย้อม 3 (10 μM) หลังทำปฏิกิริยากับน้ำตาลกลูโคสที่ผ่านการออกซิไดซ์ด้วยกลูโคสออกซิเดส ที่ความเข้มข้น 0, 1, 5, 10, 20 และ 50 μM ในบัฟเฟอร์ Na_2CO_3 (pH 9.0) 500 μM เป็นเวลา 60 นาที โดยวัดที่ความยาวคลื่นกระตุ้นที่ 500 nm (ก) ฟลูออเรสเซนส์สเปกตรัมของกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (0-50 μM) (ข) กราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของกลูโคส (0-50 μM) และสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่ 560 nm

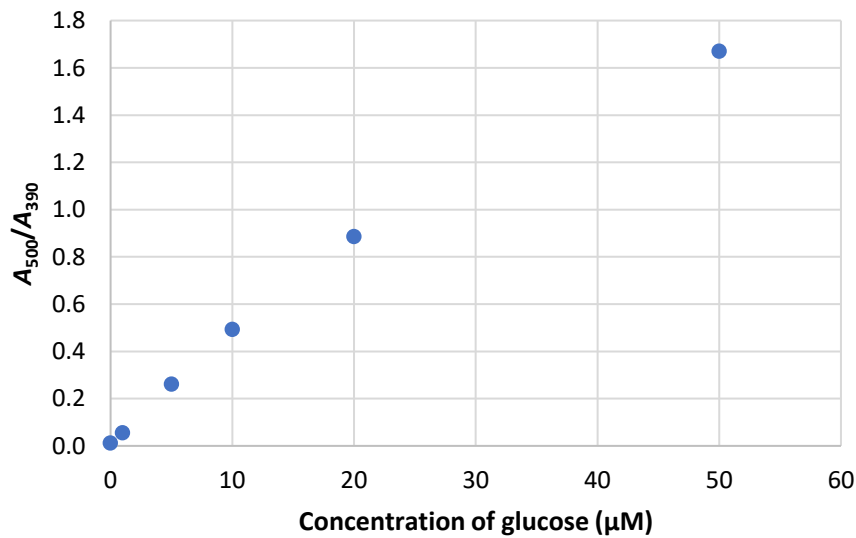
3.3.3.2 การทดลองยูวี-วิสิเบิลยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมตรี (UV-visible spectrophotometry)

ในทำนองเดียวกัน ได้ตรวจวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสทางอ้อม โดยผ่านการตรวจวัดปริมาณ H_2O_2 ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาระหว่างกลูโคสออกซิเดสกับกลูโคสด้วยการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์โดยใช้สีย้อม 3 (10 μM) ในบัฟเฟอร์ Na_2CO_3 (pH 9.0) ความเข้มข้น 500 μM จากสเปกตรัมจะเห็นการดูดกลืนแสงที่บริเวณสองความยาวคลื่นด้วยกัน ได้แก่ การดูดกลืนแสงที่ λ_{abs} 390 nm ของสีย้อมสไตริล 3 และการดูดกลืนแสงที่ λ_{abs} 500 nm ของผลิตภัณฑ์ 6 ที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างสีย้อมสไตริลกับ H_2O_2 ที่ได้จากปฏิกิริยาของกลูโคสออกซิเดสร่วมกับกลูโคส โดยเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสเพิ่มขึ้นจะให้ค่า

การดูดกลืนแสงที่ 500 nm สูงขึ้น และค่าการดูดกลืนแสงที่ 390 nm ลดลงเช่นเดียวกับที่ทดสอบกับ H_2O_2 อิสระ **ดั่งรูปที่ 3.30 ก.** และเมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 390 nm และ 500 nm (A_{500}/A_{390}) ไปพล็อตเทียบกับความเข้มข้นของกลูโคสที่ทดสอบ (0-50 μM) และความเข้มข้นที่ให้กราฟเส้นตรงจะอยู่ที่ช่วง 0-10 μM H_2O_2 **ดั่งรูปที่ 3.30 ข.** ในการทดลองนี้ได้วัดสัญญาณที่แต่ละความเข้มข้นเพียงครั้งเดียว จึงไม่สามารถคำนวณค่า LOD จากสูตร $3SD(\text{blank})/\text{slope}$ ได้ แต่เนื่องจากกลูโคสที่ความเข้มข้น 1 μM ให้สัญญาณที่แตกต่างจาก blank ชัดเจน จึงประมาณการได้ว่าค่า LOD ของการตรวจวัดกลูโคสโดยวิธียูวี-วิสิเบิลน่าจะใกล้เคียงกับ 1 μM หรือต่ำกว่าเล็กน้อย ซึ่งใกล้เคียงกับวิธีฟลูออเรสเซนส์



(ก)



(ข)

รูปที่ 3.30 กราฟการดูดกลืนแสงยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรีของสีย้อม 3 (10 μM) หลังทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของน้ำตาลกลูโคสกับกลูโคสออกซิเดส ที่ความเข้มข้น 0, 1, 5, 10, 20 และ 50 μM ในบัฟเฟอร์ Na_2CO_3 (pH 9.0) ความเข้มข้น 500 μM วัดการเรืองแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (ก) สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (1-50 μM) (ข) กราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นกลูโคสช่วงความเข้มข้น (0-50 μM) และค่าการดูดกลืนแสง

3.4 วิจารณ์ผลการทดลองและแนวทางพัฒนาต่อไปในอนาคต

จากผลการทดลองทั้งหมดในการตรวจวัดน้ำตาลโดยแบ่งเป็น 2 วิธี ได้แก่ การตรวจวัดน้ำตาลโดยตรง และการตรวจวัดน้ำตาลทางอ้อม ซึ่งวิธีแรกตรวจวัดน้ำตาลโดยตรงร่วมกับสีย้อมสไตริล 3 4 และ 5 ยังไม่สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมที่จะทำให้เห็นความแตกต่างในการตรวจวัดน้ำตาลแต่ละชนิดได้ ซึ่งถ้าหากไม่ใช้บัฟเฟอร์ก็จะทำให้ไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงสี แต่เมื่อใช้บัฟเฟอร์แล้วก็จะทำให้สีย้อมเสียสภาพไป รวมถึงการใช้เวลาตรวจวัดค่อนข้างนานจึงจะเห็นการเปลี่ยนแปลง อีกทั้งยังมีข้อจำกัดกับชนิดของน้ำตาลที่จะตรวจวัดได้ ส่วนวิธีที่สองเป็นการตรวจวัดน้ำตาลกลูโคสทางอ้อมโดยใช้สีย้อมสไตริล 3 ในการวัดปริมาณ H_2O_2 ที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างกลูโคสกับเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ซึ่งพบว่าสามารถตรวจวัดได้จริง โดยเกิดการเพิ่มขึ้นของการเรืองแสงและการเปลี่ยนสีที่เป็นสัดส่วนกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เพิ่มขึ้น และจากกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและค่าฟลูออเรสเซนส์ หรือจากค่าการดูดกลืนแสงก็ให้ค่าความเข้มข้นในช่วงที่เป็นเส้นตรง 0-10 μM โดยมีค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในเชิงปริมาณ (LOD) อยู่ที่ระดับ 1 μM หรือต่ำกว่า ซึ่งเพียงพอต่อการใช้งานจริง

แนวทางพัฒนาคืออาจปรับเปลี่ยนโครงสร้างสีย้อมเป็นสีย้อมที่สามารถคงสภาพอยู่ได้ในภาวะที่เป็นเบสสูง เนื่องจากอาจทำให้สีย้อมไม่เสถียรและสามารถเกิดปฏิกิริยากับน้ำตาลได้โดยตรง และจากการตรวจวัดน้ำตาลทางอ้อมในเบื้องต้น พบว่าหากสามารถนำสภาวะความเข้มข้นที่ได้จากการทดสอบในข้อ 3.3.2 มาต่อยอดเพื่อหากราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นก็อาจจะทำให้สามารถตรวจวัดน้ำตาลกลูโคสในปริมาณความเข้มข้นน้อยได้ และคาดว่าวิธีนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ตรวจวัดกับน้ำตาลกลูโคสในเลือดได้ เนื่องจากปริมาณกลูโคสในเลือดจะอยู่ที่ประมาณ 4-7 mM โดยสิ่งที่ต้องศึกษาต่อคือความจำเพาะของการทดสอบกับน้ำตาลกลูโคสเทียบกับน้ำตาลอื่น และการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในตัวอย่างเป็นจริงเช่นเลือดหรือปัสสาวะ ที่ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ และการรบกวนจากสารอื่น ๆ ที่อยู่ตัวอย่างจริง

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้พัฒนาสีย้อมสไตริลที่มีหมู่บอโรนิกชนิดใหม่ ได้แก่ 2-(4-boronostyryl)-3-methylbenzothiazolium hexafluorophosphate (BT+_{B(OH)₂}) (3) เพื่อใช้เป็นตัวตรวจวัดน้ำตาล โดยอาศัยอันตรกิริยาระหว่างหมู่บอโรนิกกับหมู่ไดออลของน้ำตาล ที่ทำให้โครงสร้างของหมู่บอโรนิกเปลี่ยนแปลงไป และส่งผลต่อสมบัติเชิงแสงของสีย้อม สามารถสังเคราะห์สีย้อมดังกล่าวจากปฏิกิริยาระหว่าง methylation และ aldol condensation จากนั้นได้ยืนยันโครงสร้างของสีย้อมที่สังเคราะห์ได้โดยเทคนิค ¹H NMR และ MALDI-TOF MS

เมื่อได้สีย้อม 3 แล้วจึงได้นำมาทดสอบความสามารถในการตรวจวัดน้ำตาลโดยตรง โดยได้พิสูจน์หลักการเบื้องต้นเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมของสีย้อมสไตริลกับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและโมเลกุลคู่ชนิดต่าง ๆ ด้วยวิธีสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีด้วยตาเปล่าภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 312 nm และ 365 nm ชั้นแรกหาบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมโดยใช้น้ำตาลฟรุคโตสเป็นต้นแบบ และทดสอบกับบัฟเฟอร์ NaOAc (pH 5.0), Tris-HCl (pH 7.4) และ Na₂CO₃ (pH 9.0) ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 mM ผู้วิจัยเลือกบัฟเฟอร์ Na₂CO₃ (pH 9.0) ความเข้มข้น 10 mM เพราะให้การเปลี่ยนแปลงเร็วที่สุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป จากนั้นใช้สีย้อม (3) ร่วมกับบัฟเฟอร์โซเดียมคาร์บอเนตทำปฏิกิริยากับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและโมเลกุลคู่ชนิดต่าง ๆ พบว่าน้ำตาลฟรุคโตสแสดงการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนที่สุด จึงเลือกมาเป็นตัวแทนของน้ำตาลในการทดลองต่อมา ซึ่งจะเทียบการเปลี่ยนแปลงสีระหว่างสีย้อม 3 ที่มีหมู่บอโรนิกที่ตำแหน่ง *para* กับสีย้อมที่มีหมู่บอโรนิกตำแหน่ง *ortho* (4) และ *meta* (5) จากการวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF MS พบว่า *ortho* (4) ไม่เสถียรภายใต้ภาวะบัฟเฟอร์โดยเกิดการแตกออกของพันธะคู่ได้ง่าย ส่วนสีย้อม *meta* (5) ไม่พบการแตกของพันธะและมีความเสถียรที่สุดแต่สังเกตเห็นภายใต้แสงธรรมชาติและแสงยูวีได้ไม่ชัดเจน ส่วนสีย้อม *para* (3) พบการแตกออกของพันธะคู่และการกำจัดหมู่บอโรนิกในบัฟเฟอร์บางส่วน แต่ก็สามารถเกิดปฏิกิริยากับน้ำตาลฟรุคโตสได้จริง และให้ความแตกต่างของสีย้อมในบัฟเฟอร์เมื่อมีและไม่มีน้ำตาลภายใต้แสงธรรมชาติและแสงยูวีได้ชัดเจนกว่าสีย้อมตัวอื่น จึงได้นำภาวะดังกล่าวมาทดลองใช้ในการตรวจวัดน้ำตาลโดยใช้เครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ในสภาวะที่มีและไม่มีน้ำตาลฟรุคโตส พบว่าไม่สามารถตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงได้ กล่าวคือเมื่อเวลาผ่านไปความเข้มแสงของฟลูออเรสเซนส์ที่ได้ก็มีค่าลดลงทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีน้ำตาลเช่นเดียวกันกับเมื่อศึกษาเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรี ที่แสดงค่าการดูดกลืนแสงลดลงเมื่อเวลาผ่านไป ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากการใช้สีย้อมที่มีความเข้มข้นต่ำทำให้เสถียรภาพในบัฟเฟอร์ไปมากก่อนที่จะจับกับน้ำตาล ต่อมาจึงได้เพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลจากระดับ μM เป็นระดับ mM พบว่าค่าการดูดกลืนแสงและความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสงที่ได้ก็ยังมีค่าที่ไม่แตกต่างกันมากนักซึ่งไม่เป็นไปตามสมมติฐานที่ตั้งไว้

เนื่องจากการตรวจวัดน้ำตาลโดยตรงไม่ประสบความสำเร็จ อีกทั้งยังสีย้อม 3 มีการตอบสนองกับน้ำตาลฟรุคโตสได้ดีกว่าน้ำตาลกลูโคส ซึ่งผิดไปจากวัตถุประสงค์ของงานวิจัย จึงได้พัฒนาวิธีการใช้สีย้อม 3 ในการตรวจวัดน้ำตาลกลูโคสโดยอ้อม ผ่านการตรวจวัด H₂O₂ ที่เกิดจากปฏิกิริยาของกลูโคสกับเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสโดยได้ทดสอบเบื้องต้นด้วยวิธีสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีด้วยตาเปล่าภายใต้แสงยูวี ในชั้นแรกเป็นการหาบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมโดยทดสอบกับบัฟเฟอร์ NaOAc (pH 5.0), phosphate (pH 7.0) และ Na₂CO₃ (pH 9.0) โดยเลือกบัฟเฟอร์ Na₂CO₃ (pH 9.0) เพราะมีการเปลี่ยนแปลงเร็วที่สุด โดยเมื่อมี H₂O₂ อยู่ด้วย จะเห็นการเปลี่ยนสีจากไม่มีสีเป็นสีส้ม และการเรืองแสงจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีส้ม จากนั้นหาความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ Na₂CO₃ ที่เหมาะสม พบว่าที่ ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 mM ผลไม่ได้แตกต่างกันมาก

นัก ผู้วิจัยจึงเลือกใช้บัฟเฟอร์ Na_2CO_3 (pH 9.0) ความเข้มข้น 1 mM ในการทดลองต่อไป จากนั้นได้ทดสอบกับ H_2O_2 ความเข้มข้น 0, 1, 5, 10, 50, 100 และ 200 μM โดยใช้สีย้อม **3** (100 μM) บัฟเฟอร์ Na_2CO_3 (pH 9.0) ความเข้มข้น 1 mM พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้น H_2O_2 สีภายใต้แสงธรรมชาติเป็นสีส้มเข้มมากขึ้นและแสงยูวีสีออกเขียวไปเป็นสีส้มมากขึ้น

จากนั้นหาความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างสัญญาณฟลูออเรสเซนส์กับความเข้มข้นของ H_2O_2 โดยใช้เครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ซึ่งนำภาวะที่ได้จากการทดสอบข้างต้นมาใช้ในการตรวจวัด H_2O_2 โดยใช้สีย้อมสไตริล **3** ความเข้มข้น 10 μM บัฟเฟอร์ Na_2CO_3 (pH 9.0) ความเข้มข้น 500 μM และ H_2O_2 ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-50 μM พบว่าสัญญาณที่ได้ไม่เป็นเส้นตรงตลอดช่วงของความเข้มข้น H_2O_2 ที่นำมาทดสอบ แต่ได้กราฟเส้นตรงในช่วง 0-25 μM โดยมี $r^2 = 0.9912$ และคำนวณค่า LOD ได้เท่ากับ 0.03177 μM หรือ 31.8 nM และได้หาความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของ H_2O_2 ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้ภาวะเดียวกับการทดลองในฟลูออเรสเซนส์ และเมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 390 nm ซึ่งเป็นของสีย้อม **3** และ 500 nm ซึ่งเป็นของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาระหว่างสีย้อม **3** กับ H_2O_2 (A_{500}/A_{390}) ไปพล็อตเทียบกับความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่ทดสอบ (0-50 μM) ซึ่งความเข้มข้นที่ให้กราฟเส้นตรงจะอยู่ที่ช่วง 0-50 μM โดยมี $r^2 = 0.9921$ และคำนวณค่า LOD ได้เท่ากับ 0.10093 μM หรือ 101 nM โดยผลการทดลองที่ได้จากทั้งสองวิธียืนยันว่าสามารถใช้สีย้อมสไตริล **3** ในการตรวจวัด H_2O_2 ได้จริง

ต่อมาจึงได้นำสีย้อม **3** ไปใช้ในการตรวจวัดน้ำตาลทางอ้อมโดยตรวจวัดปริมาณ H_2O_2 ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำตาลกลูโคสที่เร่งด้วยกลูโคสออกซิเดส โดยเครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ พบว่าเมื่อมีน้ำตาลกลูโคสอยู่ด้วยจะได้ให้สัญญาณเรืองแสงชัดเจนที่ λ_{em} 560 nm และเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสเพิ่มขึ้นความเข้มของสัญญาณการเรืองแสงก็เพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากการตรวจวัดปริมาณ H_2O_2 โดยตรง และเมื่อนำค่าความเข้มของสัญญาณการเรืองแสงที่ 560 nm ไปพล็อตกับความเข้มข้นของกลูโคสที่ทดสอบ (0-50 μM) จะให้ความเข้มข้นที่ให้กราฟเส้นตรงจะอยู่ที่ช่วง 0-10 μM และยังสามารถตรวจวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสทางอ้อมด้วยการวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์พบว่าเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสเพิ่มขึ้นจะให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 nm สูงขึ้น และค่าการดูดกลืนแสงที่ 390 nm ลดลงเช่นเดียวกับที่ทดสอบกับ H_2O_2 อิสระ และเมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 390 nm และ 500 nm (A_{500}/A_{390}) ไปพล็อตเทียบกับความเข้มข้นของกลูโคสที่ทดสอบ (0-50 μM) ความเข้มข้นที่ให้กราฟเส้นตรงจะอยู่ที่ช่วง 0-10 μM H_2O_2 โดยทั้งวิธีได้วัดสัญญาณที่แต่ละความเข้มข้นเพียงครั้งเดียว จึงไม่สามารถคำนวณค่า LOD ได้แต่สามารถประมาณค่า LOD จากผลการทดลองได้น่าจะต่ำกว่า 1 μM เล็กน้อย ซึ่งเป็นค่าที่ดีกว่าสีย้อมที่เคยมีผู้รายงานมาก่อนหน้านี้

จากผลการทดลองในการตรวจวัดน้ำตาลทั้งหมด 2 วิธี พบว่าวิธีการตรวจวัดน้ำตาลโดยตรงยังไม่สามารถหาภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวัดความแตกต่างของน้ำตาลแต่ละชนิดได้และยังใช้เวลานานในการตรวจวัด ส่วนวิธีการตรวจวัดน้ำตาลกลูโคสทางอ้อมสามารถใช้สีย้อม **3** ในการตรวจวัด H_2O_2 ที่เกิดขึ้นได้จริง เนื่องจากมีการเรืองแสงและเปลี่ยนสีตามปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เพิ่มขึ้น และจากผลการตรวจวัดทางอ้อมคาดว่าสามารถนำไปต่อยอดในการตรวจวัดน้ำตาลกลูโคสในเลือดได้ โดยจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Clinic, M. Diabetes. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/diabetes/diagnosis-treatment/drc-20371451> (accessed April 26, 2020).
2. Ndebele, N.; Mack, J.; Nyokong, T. A 3,5-DistyrylBODIPY dye functionalized with boronic acid groups for direct electrochemical glucose sensing. *Electroanalysis* **2019**, *31*, 137-145.
3. Rajan, S. A. P.; Towe, B. C. In *Non-invasive method to detect the changes of glucose concentration in whole blood using photometric technique*, 2014 36th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 2014; pp 4034-4037.
4. Wu, X.; Li, Z.; Chen, X.-X.; Fossey, J. S.; James, T. D.; Jiang, Y.-B. Selective sensing of saccharides using simple boronic acids and their aggregates. *Chemical Society Reviews* **2013**, *42*, 8032-8048.
5. DiCesare, N.; Lakowicz, J. R. Spectral properties of fluorophores combining the boronic acid group with electron donor or withdrawing groups. Implication in the development of fluorescence probes for saccharides. *The Journal of Physical Chemistry A* **2001**, *105*, 6834-6840.
6. DiCesare, N.; Lakowicz, J. R. New sensitive and selective fluorescent probes for fluoride using boronic acids. *Analytical Biochemistry* **2002**, *301*, 111-116.
7. Lampard, E. V.; Sedgwick, A. C.; Sun, X.; Filer, K. L.; Hewins, S. C.; Kim, G.; Yoon, J.; Bull, S. D.; James, T. D. Boronate-based fluorescence probes for the detection of hydrogen peroxide. *ChemistryOpen* **2018**, *7*, 262-265.
8. Lee, S. W.; Rhee, H.-W.; Chang, Y.-T.; Hong, J.-I. Ratiometric fluorescent probes for hydrogen peroxide from a focused library. *Chemistry – A European Journal* **2013**, *19*, 14791-14794.
9. WHO. Diabetes. https://www.who.int/health-topics/diabetes#tab=tab_1 (accessed April 21, 2020).
10. แผนงานสนับสนุนระบบบริการโรคเรื้อรังและโรคเฉพาะสำนักงานประกันสุขภาพแห่งชาติ, คู่มือการใช้เครื่องตรวจน้ำตาลในเลือดชนิดพกพา, 2556.
11. International Organization for Standardization. Determination of performance criteria for in vitro blood glucose monitoring systems for management of human diabetes mellitus. **2002**.
12. U.S. Food and Drug Administration. Extended release oral dosage forms: development, evaluation and application of in vitro/in vivo correlations. Rockville: Food and Drug Administration. **1997**.
13. Liu, Z.; He, H. Synthesis and applications of boronate affinity materials: from class selectivity to biomimetic specificity. *Accounts of Chemical Research* **2017**, *50*, 2185-2193.

14. Ghosh, K. K.; Yap, E.; Kim, H.; Lee, J.-S.; Chang, Y.-T. A colorimetric pH indicators and boronic acids ensemble array for quantitative sugar analysis. *Chemical Communications* **2011**, *47*, 4001-4003.
15. Lee, J. W.; Lee, J.-S.; Chang, Y.-T. Colorimetric identification of carbohydrates by a ph indicator/ph change inducer ensemble. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 6485-6487.
16. Sienkiewicz, P. A.; Roberts, D. C. Chemical affinity systems—I: pH dependence of boronic acid-diol affinity in aqueous solution. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry* **1980**, *42*, 1559-1575.
17. James, T. D.; Sandanayake, K. S.; Shinkai, S. Chiral discrimination of monosaccharides using a fluorescent molecular sensor. *Nature* **1995**, *374*, 345-347.
18. James, T. D.; Sandanayake, K. S.; Iguchi, R.; Shinkai, S. Novel saccharide-photoinduced electron transfer sensors based on the interaction of boronic acid and amine. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 8982-8987.
19. Hartley, J. H.; James, T. D.; Ward, C. J. Synthetic receptors. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **2000**, 3155-3184.
20. Lorand, J. P.; Edwards, J. O. Polyol complexes and structure of the benzenboronate ion. *The Journal of Organic Chemistry* **1959**, *24*, 769-774.
21. Yoon, J.; Czarnik, A. W. Fluorescent chemosensors of carbohydrates. A means of chemically communicating the binding of polyols in water based on chelation-enhanced quenching. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114*, 5874-5875.
22. Ward, C. J.; Patel, P.; James, T. D. Boronic acid appended azo dyes—colour sensors for saccharides. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **2002**, 462-470.
23. Schiller, A.; Wessling, R. A.; Singaram, B. A fluorescent sensor array for saccharides based on boronic acid appended bipyridinium salts. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46*, 6457-6459.
24. Chen, S.-x.; Schopfer, P. Hydroxyl-radical production in physiological reactions. *European Journal of Biochemistry* **1999**, *260*, 726-735.
25. Bankar, S. B.; Bule, M. V.; Singhal, R. S.; Ananthanarayan, L. Glucose oxidase—an overview. *Biotechnology Advances* **2009**, *27*, 489-501.
26. Cadenas, E.; Davies, K. J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology and Medicine* **2000**, *29*, 222-230.
27. Dickinson, B. C.; Chang, C. J. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nature Chemical Biology* **2011**, *7*, 504.
28. Zhou, M.; Diwu, Z.; Panchuk-Voloshina, N.; Haugland, R. P. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Analytical Biochemistry* **1997**, *253*, 162-168.

29. Lippert, A. R.; Van de Bittner, G. C.; Chang, C. J. Boronate oxidation as a bioorthogonal reaction approach for studying the chemistry of hydrogen peroxide in living systems. *Accounts of Chemical Research* **2011**, *44*, 793-804.
30. Deligeorgiev, T.; Vasilev, A.; Kaloyanova, S.; Vaquero, J. J. Styryl dyes - synthesis and applications during the last 15 years. *Coloration Technology* **2010**, *126*, 55-80.
31. Krieg, R.; Eitner, A.; Halbhuber, K. J. Tailoring and histochemical application of fluorescent homo-dimeric styryl dyes using frozen sections: from peroxidase substrates to new cytochemical probes for mast cells, keratin, cartilage and nucleic acids. *Acta Histochemica* **2011**, *113*, 682-702.
32. Tiarpattaradilok, D. The detection of small molecular target by styryl dye and aptamer. Senior Project. Department of Chemistry: Chulalongkorn University: Bangkok, Thailand. **2019**.
33. Shi, Q.-Q.; Sun, R.; Ge, J.-F.; Xu, Q.-F.; Li, N.-J.; Lu, J.-M. A comparative study of symmetrical and unsymmetrical trimethine cyanine dyes bearing benzoxazolyl and benzothiazolyl groups. *Dyes and Pigments* **2012**, *93*, 1506-1511.
34. Angyal, S. J., The composition of reducing sugars in solution. In *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Elsevier, 1984; Vol. 42; pp 15-68.
35. Angyal, S. J., The composition of reducing sugars in solution: Current aspects. In *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Academic Press, 1991; Vol. 49; pp 19-35.
36. Wikipedia. Hydroboration–oxidation reaction. https://en.wikipedia.org/wiki/Hydroboration%E2%80%93oxidation_reaction (accessed April 24, 2020).

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวณัฐสิริ ไพศาล เกิดเมื่อวันที่ 30 เดือน เมษายน พ.ศ. 2540 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนบดินทรเดชา (สิงห์ สิงหเสนี) ๒ จังหวัดกรุงเทพมหานคร เมื่อปีการศึกษา 2558 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2559 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 797/29 ซอย ประชาสงเคราะห์ 2 ถนนประชาสงเคราะห์ แขวงดินแดง เขตดินแดง จังหวัด กรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10400 อีเมล nattasiri.ph@gmail.com