

การตรวจวัดแอนไอออนไพโรฟอสเฟตด้วยวิธีการแทนที่อินดิเคเตอร์

Indicator Displacement Assay Approach for Detection of Pyrophosphate Anion

สรายุทธ เวชสิทธิ์*

Sarayut Watchasit*

ห้องปฏิบัติการนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรมิเตอร์ หน่วยบริการนวัตกรรมทางวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic Laboratory, Science Innovation Facility, Faculty of Science, Burapha University

Received : 23 July 2017

Accepted : 20 October 2017

Published online : 25 October 2017

บทคัดย่อ

ไพโรฟอสเฟตแอนไอออน (pyrophosphate, $P_2O_7^{4-}$ หรือ PPI) จัดเป็นแอนไอออนชนิดหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในร่างกายของสิ่งมีชีวิต ตัวอย่างเช่น ปฏิกริยาพอลิเมอไรเซชันของกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก ปฏิกริยาไฮโดรไลซิสของอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (ATP) และนอกจากนี้ PPI ยังเป็นสารเคมีที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ สำหรับผู้ป่วยที่เป็นโรคเก๊าท์เทียม (pseudo gout) ดังนั้นการตรวจวัด PPI จึงเป็นความท้าทายสำหรับนักวิจัยเป็นอย่างยิ่ง ในบทความนี้จึงนำเสนอเทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์สำหรับการตรวจวัดแอนไอออนไพโรฟอสเฟตโดยจำแนกชนิดของอินดิเคเตอร์ที่ใช้เป็น 2 ประเภท คือ โครโมจีนิกอินดิเคเตอร์ และฟลูออเรสเซนต์อินดิเคเตอร์

คำสำคัญ : ไพโรฟอสเฟตแอนไอออน เทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์ เซ็นเซอร์ทางเคมีเชิงแสง โครโมจีนิกอินดิเคเตอร์ ฟลูออเรสเซนต์อินดิเคเตอร์

Abstract

Pyrophosphate anion ($P_2O_7^{4-}$ or PPI) plays an important role in many biological processes. In particular, PPI participates in adenosine triphosphate hydrolysis and involves in deoxy ribonucleic acid polymerase reactions. Moreover, the amount of PPI is recently acts as biomarker for patients with chondrocalcinosis which have been shown to have high synovial fluid PPI level. Therefore, discriminate sensing of PPI under physiological conditions remains a significant challenge. In this review, two types of indicator displacement assay (IDAs) approach are described, namely, chromogenic and fluorogenic indicator displacement assay.

Keywords : pyrophosphate anion, indicator displacement assay, optical chemosensor, chromogenic indicator, fluorescence indicator

*Corresponding author. E-mail : s.watchasit@yahoo.com

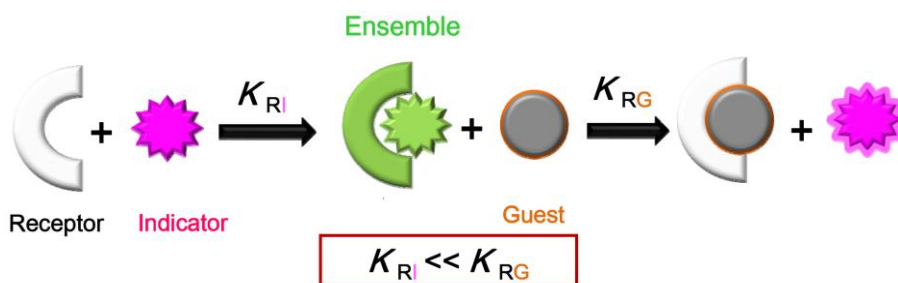
บทนำ

ไพโรฟอสเฟตแอนไอออน (pyrophosphate, $P_2O_7^{4-}$ หรือ PPI) จัดเป็นแอนไอออนชนิดหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในร่างกายของสิ่งมีชีวิต ตัวอย่างเช่น ปฏิกริยาพอลิเมอไรเซชันของกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (deoxyribonucleic acid polymerization) (Lipscomb & Sträter, 1996) ปฏิกริยาไฮโดรไลซิสของ adenosine triphosphate (ATP) ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตเพื่อให้ได้พลังงานมาใช้ในการบวนการทำงานต่างๆ ของร่างกาย ซึ่งจะมี PPI เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นร่วมด้วย (Du *et al.*, 2008; Nishizawa *et al.*, 1999) นอกจากนี้ยังพบว่า PPI เป็นสารเคมีที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) สำหรับผู้ป่วยที่เป็นโรคเก๊าท์เทียม (pseudo gout) โดยพบว่าบริเวณข้อต่ออวัยวะต่างๆ ของผู้ป่วยโรคเก๊าท์เทียมจะมีการสะสมของผลึกแคลเซียมไพโรฟอสเฟตไดไฮเดรต ($Ca_2(P_2O_7) \cdot 2H_2O$) ปริมาณมาก ส่งผลให้เกิดการอักเสบของข้อ (Christoffersen *et al.*, 2003) ซึ่งเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์ PPI ในปัจจุบันจำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาแพงเช่น เทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC) (Yoza *et al.*, 1991), เทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี (mass spectrometry) หรือในบางเทคนิคจำเป็นต้องอาศัยขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยากอีกทั้งยังมีค่าขีดจำกัดการตรวจวัดที่ไม่ดีเช่น เทคนิคการทดสอบด้วยเอนไซม์ (enzymatic assay) (Katano *et al.*, 2013) และเทคนิคทางไฟฟ้าเคมี (Berchmans *et al.*, 2012) จะเห็นได้ว่าการตรวจวัดไพโรฟอสเฟตด้วยเทคนิคดังที่กล่าวมามีข้อจำกัดมากมาย ดังนั้นนักวิจัยจึงสนใจที่จะพัฒนาเทคนิคใหม่เพื่อนำมาใช้ในการตรวจวัด PPI ได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวดเร็ว และไม่จำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาสูง ซึ่งเทคนิคที่เป็นที่นิยมอย่างมากรุ่นก็คือ เซ็นเซอร์ทางเคมีเชิงแสง (optical chemosensor) โดยโมเลกุลที่จะนำมาใช้เป็นเซ็นเซอร์นั้นจะประกอบด้วย 2 ส่วนที่สำคัญคือส่วนที่ทำหน้าที่เลือกจับกับโมเลกุลหรือไอออนที่เราสนใจกับส่วนที่ทำหน้าที่ให้สัญญาณเมื่อเกิดการจับกันของโมเลกุลที่สนใจกับส่วนเลือกจับแล้ว (Suksai & Tuntulani, 2003) เทคนิคดังกล่าวเป็นที่นิยมและมีการพัฒนามาใช้ในการตรวจวัดโมเลกุลต่างๆ มากมายทั้ง แอนไอออน แคทไอออน และโมเลกุลที่เป็นกลางอื่นๆ แต่อย่างไรก็ตาม เนื่องจากเทคนิคดังกล่าวจำเป็นต้องมีการสังเคราะห์ให้โมเลกุลที่ใช้เป็นเซ็นเซอร์นั้นมีการเชื่อมต่อกันของหน่วยเลือกจับกับหน่วยให้สัญญาณด้วยพันธะโควาเลนต์ ส่งผลให้เทคนิคดังกล่าวมีข้อจำกัดคือโมเลกุลเซ็นเซอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นนั้นจะสามารถตรวจวัดโมเลกุลที่สนใจได้เพียง 1 ชนิดเท่านั้น หากจะตรวจวัดโมเลกุลอื่นๆ ก็จะต้องสังเคราะห์เซ็นเซอร์ชนิดใหม่ขึ้นมา ทำให้ต้องสิ้นเปลืองทั้งค่าใช้จ่าย เวลาและทรัพยากรในการสังเคราะห์จำนวนมาก ดังนั้นนักวิจัยจึงสนใจที่จะพัฒนาเซ็นเซอร์ทางเคมีเชิงแสงชนิดใหม่ที่สามารถตรวจวัดโมเลกุลที่สนใจหลายชนิดโดยใช้โมเลกุลเซ็นเซอร์เพียงชนิดเดียว ซึ่งเทคนิคเซ็นเซอร์ทางเคมีเชิงแสงที่กำลังได้รับความสนใจจากนักเคมีในปัจจุบันก็คือ เทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์ (indicator displacement assays, IDAs) (Nguyen & Anslyn, 2006)

1. เทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์ (indicator displacement assays)

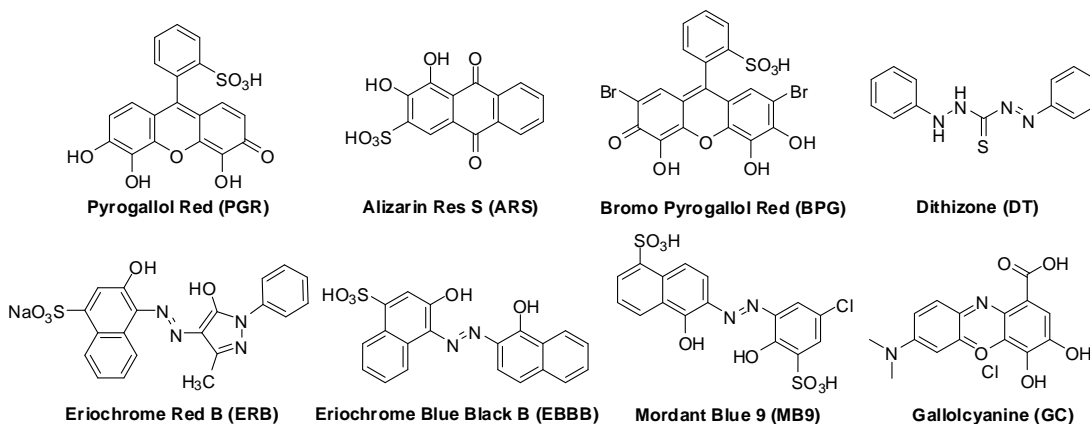
หลักการการทำงานของเทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์นั้นในระบบจะประกอบด้วยโมเลกุลที่ทำหน้าที่เป็นหน่วยเลือกจับหรือรีเซปเตอร์ (receptor) และส่วนที่ทำหน้าที่ให้สัญญาณคืออินดิเคเตอร์ (indicator) ที่สามารถใช้ได้ทั้งฟลูออเรสเซนต์ (fluorophore) และโครโมจีนิก (chromophore) อินดิเคเตอร์ โดยทั้งสองส่วนนี้จะไม่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะโควาเลนต์ แต่จะเชื่อมต่อกันด้วยอันตรกิริยาอย่างอ่อนเช่น พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonding), แรงดึงดูดทางไฟฟ้า (electrostatic interaction) และพันธะโคออร์ดิเนตโควาเลนต์ (coordinate covalent) (Steed & Atwood, 2002) เป็นต้น เมื่อรีเซปเตอร์และอินดิเคเตอร์จับกันแล้วก็จะได้โมเลกุลเซ็นเซอร์ชนิดใหม่เกิดขึ้นซึ่งเราจะเรียกว่าเอนเซมเบิล (ensemble) โดยสมบัติเชิงแสง

(optical property) ของเอนเซมเบิลจะแตกต่างไปจากรีเซปเตอร์และอินดิเคเตอร์ในรูปอิสระ จากนั้นเราจะนำเอนเซมเบิลที่ได้ไปตรวจวัดโมเลกุลที่สนใจ โดยเมื่อมีโมเลกุลที่สนใจ (guest) ในระบบ โมเลกุลดังกล่าวจะเข้าจับกับรีเซปเตอร์แทนที่อินดิเคเตอร์และทำให้อินดิเคเตอร์หลุดออกมาอยู่ในสารละลายอย่างอิสระส่งผลให้สมบัติเชิงแสงของสารละลายนั้นเปลี่ยนกลับมาเป็นของอินดิเคเตอร์ในรูปอิสระดั้งเดิม ทั้งนี้ระบบการตรวจวัดดังกล่าวจะมีความจำเพาะเจาะจงต่อโมเลกุลที่สนใจก็ต่อเมื่อค่าคงที่การเกิดสารเชิงซ้อน (formation constant, K_{RG}) ระหว่างเอนเซมเบิลเซปเตอร์กับโมเลกุลที่สนใจมีค่ามากกว่าค่าคงที่การเกิดเอนเซมเบิล (K_{RI}) และค่าคงที่การเกิดสารเชิงซ้อนระหว่างของเอนเซมเบิลกับโมเลกุลที่เป็นตัวรบกวน (interference) โดยหลักการทำงานของเทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์แสดงได้ภาพที่ 1



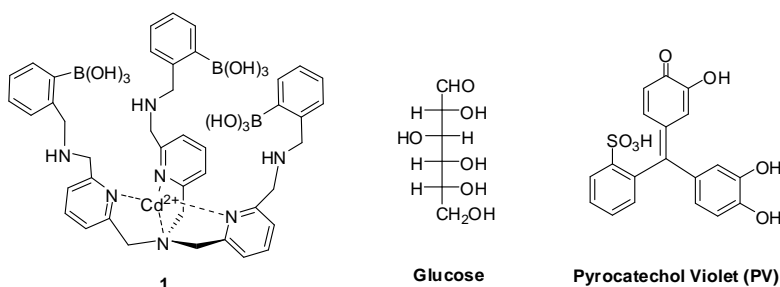
ภาพที่ 1 แผนภาพแสดงการทำงานของเทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์ โดยที่ R = รีเซปเตอร์, I = อินดิเคเตอร์ และ G = โมเลกุลที่สนใจตรวจวัด

สำหรับกลไกการเปลี่ยนแปลงสัญญาณเชิงแสงของเทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์นั้น สามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงได้ 2 แบบขึ้นอยู่กับชนิดของอินดิเคเตอร์คือฟลูออเรสเซนส์อินดิเคเตอร์และโครโมจีนิกอินดิเคเตอร์ โดยกลไกของการเปลี่ยนแปลงสัญญาณ อาทิเช่น กระบวนการ photoinduced electron transfer (PET) (Wiskur *et al.*, 2001), fluorescence resonance energy transfer (FRET) (Nguyen & Anslyn, 2006), electronic energy transfer (EET) (Silva *et al.*, 1997) หรือกลไกการเปลี่ยนแปลงสัญญาณของโครโมจีนิกอินดิเคเตอร์เช่น การถ่ายเทประจุ (charge transfer) และการเกิดสารประกอบโคออร์ดิเนชัน (Martínez & Sancenon, 2003) ซึ่งอินดิเคเตอร์ที่นิยมใช้ในเทคนิค IDAs แสดงดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 โครงสร้างของอินดิเคเตอร์ที่นิยมใช้ในเทคนิค IDAs

เทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์นั้นมีข้อดีที่กว่าเซ็นเซอร์ทางเคมีเชิงแสงแบบดั้งเดิม (conventional optical chemosensor) หลายประการอาทิเช่น นักเคมีไม่จำเป็นต้องสังเคราะห์โมเลกุลให้มีส่วนที่ให้อิทธิพล จึงส่งผลให้ลดขั้นตอนเวลา ค่าใช้จ่ายและทรัพยากรในการสังเคราะห์ได้อย่างมาก โมเลกุลรีเซปเตอร์หนึ่งโมเลกุลสามารถตรวจวัดสารที่สนใจได้มากกว่าหนึ่งชนิดโดยอาศัยการเปลี่ยนชนิดของอินดิเคเตอร์ (Hargrove *et al.*, 2011) หากใช้โครโมจีนิกอินดิเคเตอร์ก็จะทำให้สามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาได้ด้วยตาเปล่า และที่สำคัญระบบดังกล่าวสามารถตรวจวัดโมเลกุลที่สนใจได้ดีทั้งในตัวทำละลายที่เป็นน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ โดยกลุ่มนักวิจัยที่มีชื่อเสียงและมีการพัฒนาเทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์อย่างมากคือกลุ่มวิจัยของ Anslyn (Zhang and Anslyn, 2007) ที่ได้เสนอการนำเทคนิคนี้ไปใช้ในการตรวจวัดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือด โดยใช้รีเซปเตอร์ที่เป็นสารประกอบโคออร์ดิเนชันของ Cd(II) (1) กับอินดิเคเตอร์ pyrocatechol violet (PV) ดังนั้นจึงมีการประยุกต์นำเทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์ไปใช้ในการตรวจวัดทั้งแคทไอออนและแอนไอออน ตลอดจนถึงสารชีวโมเลกุลต่างๆ มากมาย (Nguyen & Anslyn, 2006) ซึ่งในบทความนี้จะเน้นไปที่การนำเทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์ไปใช้ตรวจวัดแอนไอออนไพโรฟอสเฟตด้วยฟลูออเรสเซนส์และโครโมจีนิกอินดิเคเตอร์ในระบบต่างๆ ทั้งในสิ่งแวดล้อมและในตัวอย่างชีวภาพ

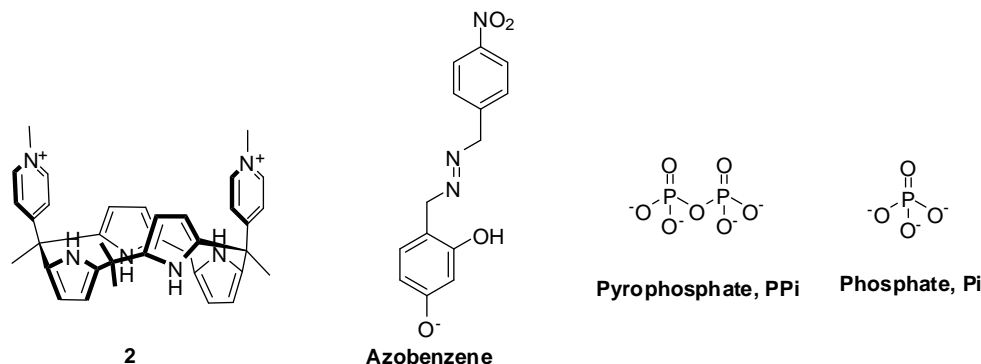


ภาพที่ 3 โครงสร้างของรีเซปเตอร์ 1, glucose และอินดิเคเตอร์ PV

2. การตรวจวัดแอนไอออนไพโรฟอสเฟตด้วยเทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์โดยใช้โครโมจีนิกอินดิเคเตอร์

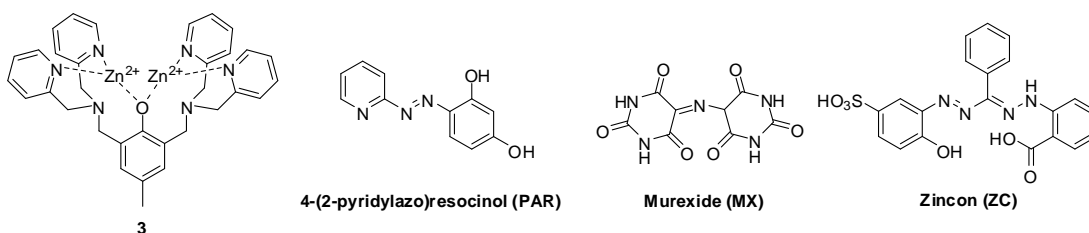
การตรวจวัดแอนไอออนด้วยเทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์โดยใช้โครโมจีนิกอินดิเคเตอร์เป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมากเนื่องจากการเลือกใช้โครโมจีนิกอินดิเคเตอร์นั้นข้อดีคือมีความง่ายในการติดตามการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาได้ด้วยตาเปล่า (naked eye) ทำให้การนำไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างจริงมีความสะดวก ไม่ต้องพึ่งพาเครื่องมือราคาแพงและง่ายต่อการเข้าใจของบุคคลทั่วไปที่ไม่มีความรู้ทางเคมี สำหรับการตรวจวัด PPI ด้วยเทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์ด้วยโครโมจีนิกอินดิเคเตอร์นั้น เริ่มแรกมีการพัฒนารีเซปเตอร์สำหรับตรวจวัด PPI ให้ง่ายโดยการอาศัยอันตรกิริยาแบบพันธะไฮโดรเจนและการเหนี่ยวนำกันโดยตรงโดยอาศัยแรงดึงดูดทางไฟฟ้าของประจุบวกและประจุลบ (electrostatic interaction) โดยการออกแบบโมเลกุลรีเซปเตอร์จะนิยมออกแบบให้มีหมู่ ยูเรีย (urea), ไทโอยูเรีย (thiourea), เอไมด์ (amide), เอมีน (amine), ไพโรล (pyrrole) และ อิมิดาโซเลียม (imidazoliums) (Lee *et al.*, 2015) เป็นต้น เพื่อให้สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับโมเลกุลของแอนไอออนได้ดีและสามารถแทนที่อินดิเคเตอร์ในโครงสร้างเฮนเชมเบลได้ โดยคณะวิจัยของ Kaur (Kaur *et al.*, 2013) ได้ทำการสังเคราะห์รีเซปเตอร์ที่เป็นอนุพันธ์ของ คาลิกซ์[4]ไพโรล (calix[4]pyrrole) (2) และใช้อินดิเคเตอร์ที่เป็น

อนุพันธ์ของเอโซเบนซีน (azobenzene) โดยรีเซปเตอร์ 2 จะจับกับเอโซเบนซีน ผ่านอันตรกิริยาแบบพันธะไฮโดรเจนเกิดเป็น เอนเซมเบิลและนำเอนเซมเบิลดังกล่าวไปทำการตรวจวัด PPI แต่อย่างไรก็ตามผู้วิจัยพบว่าระบบดังกล่าวนี้มีแอนไอออน ฟอสเฟต (PO_4^{3-} , Pi) เป็นไอออนรบกวนการตรวจวัด PPI



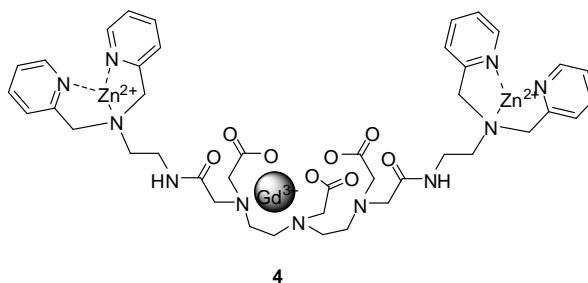
ภาพที่ 4 โครงสร้างของรีเซปเตอร์ 2 อินดิเคเตอร์ azobenzene, PPI และ Pi

จะเห็นได้ว่าการตรวจวัด PPI ด้วยเทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์โดยอาศัยเพียงแรงกระทำแบบพันธะไฮโดรเจนนั้น ประสบปัญหาการถูกรบกวนจากแอนไอออนอื่นๆ อันเป็นผลมาจากอันตรกิริยาระหว่างรีเซปเตอร์และอินดิเคเตอร์ที่มีไม่มากพอ ส่งผลให้ไอออนอื่นๆ สามารถรบกวนการตรวจวัดได้ นักวิจัยจึงแก้ปัญหาดังกล่าวด้วยการใช้รีเซปเตอร์ที่เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของไอออนโลหะกับลิแกนด์หลากหลายชนิด โดยไอออนโลหะในรีเซปเตอร์นั้นจะช่วยเพิ่มแรงดึงดูดระหว่างรีเซปเตอร์กับ PPI ให้มากขึ้นและเพิ่มความจำเพาะในการเลือกจับมากขึ้นตามนิยามของ Lewis (Lewis acid base) (Jensen, 1978) ซึ่งลิแกนด์ที่ได้รับความนิยมในยุคเริ่มต้นคือลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของไดพิโคลิลเอมีน (dipicolyl amine, DPA) ในปี 2007 กลุ่มวิจัยของ Morgan ได้ทำการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำสารประกอบโคออร์ดิเนชันของ Zn(II) กับลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของไดพิโคลิลเอมีน (3) มาใช้ในการตรวจวัด PPI ด้วยเทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์ โดยทำการศึกษาเกี่ยวกับโครโมจีนิกอินดิเคเตอร์ 11 ชนิด (Morgan *et al.*, 2007) ประกอบด้วย ARS, BPG, DT, ERB, EBBB, MB9, GC, PAR, MX, PV และ ZC (โครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 2, 3 และ 4) ในระบบตัวทำละลายน้ำที่ pH 7.4 และใช้สารประกอบ N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES) เป็นบัฟเฟอร์ ดังแสดงในภาพที่ 5 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของอินดิเคเตอร์ทั้ง 11 ชนิด ที่เหมาะสมในการเตรียมเอนเซมเบิลมีค่าอยู่ระหว่าง 2.8×10^{-4} M (alizarin red S) ถึง 2.7×10^{-6} M (bromo pyrogallol red) โดยเอนเซมเบิลที่เตรียมขึ้นทั้งหมดนั้นมีเพียงเอนเซมเบิลที่เตรียมจากอินดิเคเตอร์ bromo pyrogallol red (BPG), mordant blue 9 (MB9) และ zincon (ZC) เท่านั้นที่มีความจำเพาะต่อการตรวจวัด PPI โดยเอนเซมเบิลชนิดอื่นๆ จะถูกรบกวนการตรวจวัดด้วยแอนไอออนฟอสเฟต โดยเป็นผลมาจากค่าคงที่การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่เหมาะสมตามที่ได้กล่าวมาในขั้นต้นนั่นเอง



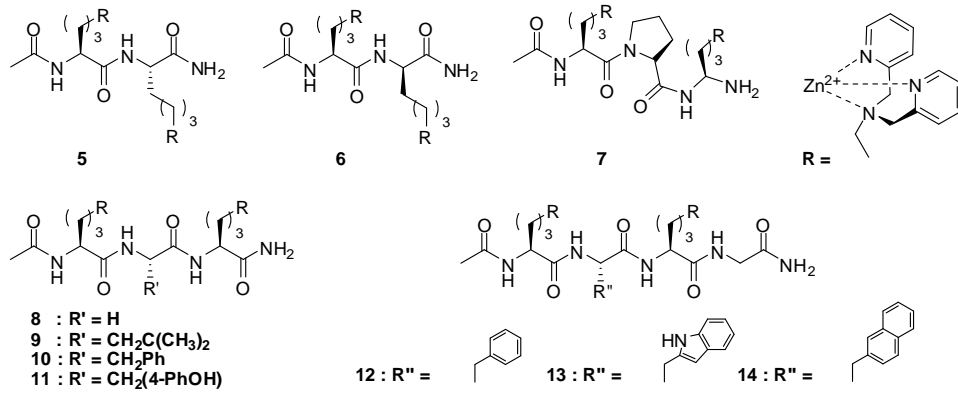
ภาพที่ 5 โครงสร้างของรีเซปเตอร์ 3 และโครโมจีนิกอินดิเคเตอร์ PAR, MX และ ZC

ต่อมาคณะวิจัยของ Surman (Surman *et al.*, 2011) ได้นำสารประกอบเชิงซ้อนของ Gd(II) และ Zn(II) กับลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของ DPA (4) (ภาพที่ 6) มาใช้เป็นรีเซปเตอร์ และใช้ pyrocatechol violet (PV) เป็นอินดิเคเตอร์ ผลการศึกษาการไทเทรชันด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์เบิลที่เกิดขึ้นมีอัตราส่วนระหว่าง 4:PV เท่ากับ 1:1 และเมื่อนำเอนไซม์เบิลที่เตรียมได้ไปตรวจวัด PPI พบว่าเมื่อทำการไทเทรต PPI ลงในสารละลายเอนไซม์เบิลสีของสารละลายจะเปลี่ยนกลับไปเป็นสีของอินดิเคเตอร์ในรูปอิสระซึ่งเป็นการยืนยันว่า PPI เข้าไปแทนที่ PV ได้ โดยพบว่าสารประกอบที่เกิดขึ้นมีอัตราส่วนระหว่าง 4:PPI เท่ากับ 1:2 ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับผลการทำไทเทรชันด้วยเทคนิค ³¹P-NMR ที่รายงานว่าอัตราส่วนของการเกิดสารเชิงซ้อน [4:PPI] คือ 1:1 ในช่วงเริ่มต้นของการไทเทรตและเปลี่ยนเป็น 1:2 ในจุดยุติการไทเทรต แต่อย่างไรก็ตามผลการทดลองพบว่าระบบดังกล่าวไม่สามารถตรวจวัด PPI ได้อย่างจำเพาะเจาะจงในระบบที่มี ATP อยู่ร่วมด้วยเนื่องจาก ATP สามารถแทนที่อินดิเคเตอร์ PV ได้เช่นเดียวกัน



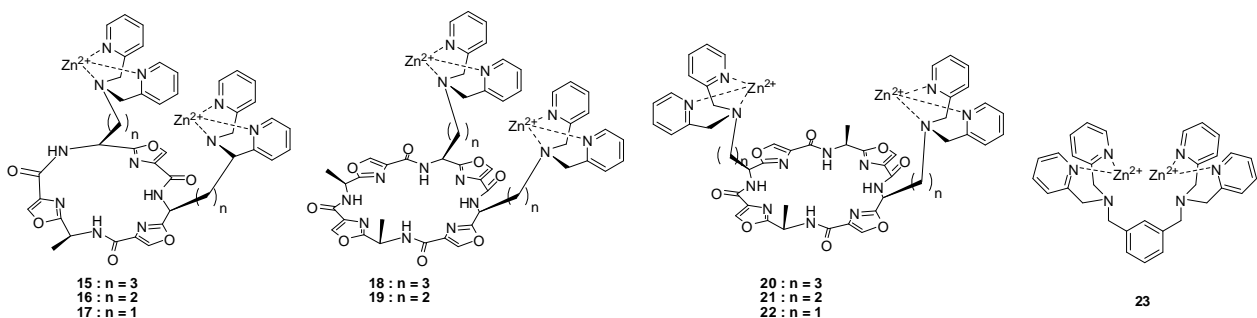
ภาพที่ 6 โครงสร้างของรีเซปเตอร์ 4

ในปี 2013 คณะวิจัยของ Jolliffe (Yuen and Jolliffe, 2013) ได้ทำการศึกษาการตรวจวัด PPI ด้วยเทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์โดยใช้รีเซปเตอร์ที่เป็นสารประกอบโคออร์ดิเนชันของ Zn(II) กับกลุ่มลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของ DPA ที่มีโครงสร้างหลักเป็นเปปไทด์สายตรง 10 ชนิด (5-14) กับอินดิเคเตอร์ PV ในระบบตัวทำละลายน้ำ ผลการทดลองพบว่าเอนไซม์เบิลที่เตรียมได้จากรีเซปเตอร์ทั้ง 10 ชนิดสามารถตรวจวัด PPI ได้แต่ไม่สามารถจำแนก PPI ในระบบที่มี ATP และ ADP (adenosine diphosphate) ได้ โดยรีเซปเตอร์ 14 นั้นมีค่าคงที่การเกิดสารเชิงซ้อนของเอนไซม์เบิลกับ PPI มากกว่าค่าคงที่การเกิดสารเชิงซ้อนของเอนไซม์เบิลกับ ATP มากที่สุด ซึ่งโครงสร้างรีเซปเตอร์ทั้ง 10 ชนิด แสดงดังภาพที่ 7



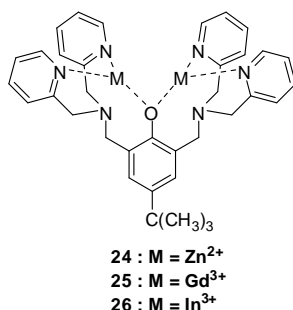
ภาพที่ 7 โครงสร้างของเปปไทด์รีเซปเตอร์ 5-14

ในปีเดียวกันนี้เองคณะวิจัยของ Jolliffe (Liu *et al.*, 2013) ได้พยายามแก้ปัญหาความจำเพาะเจาะจงดังกล่าว โดยทำการสังเคราะห์รีเซปเตอร์กลุ่มใหม่ที่เป็นอนุพันธ์ของ DPA ที่มีโครงสร้างหลักเป็นเปปไทด์แบบวง 8 ชนิด (15-22) และโครงสร้างหลักเป็นวงเบนซีน (23) มาใช้เตรียมเป็นเอนไซม์เปิดกับอินดิเคเตอร์ที่มีหมู่ catechol 3 ชนิดคือ PV, BPG และ PGR (โครงสร้างแสดงดังรูปที่ 2 และ 3) ในระบบตัวทำละลายน้ำที่ pH 7.4 และใช้สารประกอบ HEPES เป็นบัฟเฟอร์ โดยผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์เปิดที่เตรียมจากอินดิเคเตอร์ PGR กับรีเซปเตอร์ทั้ง 9 ชนิด ไม่สามารถคำนวณหาค่าคงที่การเกิดสารเชิงซ้อนและอัตราส่วนการเกิดสารเชิงซ้อนได้ซึ่งเป็นผลมาจากการเกิดสารเชิงซ้อนมากกว่าสองชนิดในระบบสารละลาย ส่วนเอนไซม์เปิดที่เตรียมจากอินดิเคเตอร์ BPR นั้นมีอัตราส่วนการเกิดสารเชิงซ้อนกับรีเซปเตอร์ในอัตราส่วน 1:2 (อินดิเคเตอร์:รีเซปเตอร์) และเอนไซม์เปิดที่เตรียมจากอินดิเคเตอร์ PV มีอัตราส่วนระหว่าง อินดิเคเตอร์:รีเซปเตอร์ เท่ากับ 1:1 เมื่อนำเอนไซม์เปิดทั้งหมดไปทดสอบการตรวจวัด PPI พบว่าเอนไซม์เปิดที่เตรียมจากอินดิเคเตอร์ PGR กับรีเซปเตอร์ 15, 17, 18 และ 22 นั้นมีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัด PPI โดยที่ได้รับผลกระทบจากการรบกวนของ ATP และ ADP น้อยมาก (การเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงน้อยกว่า 15%) ส่วนเอนไซม์เปิดที่เตรียมจากอินดิเคเตอร์ PV กับรีเซปเตอร์ 15 - 22 นั้นสามารถตรวจวัด PPI ได้ แต่อย่างไรก็ตามหากมีปริมาณ ATP, ADP และ citrate มากขึ้นก็จะส่งผลกระทบการตรวจวัดได้สำหรับเอนไซม์เปิดที่เตรียมจากอินดิเคเตอร์ BPG นั้นพบว่าไม่มีแอนไอออนใดที่สามารถเปลี่ยนสีสารละลายได้ โดยโครงสร้างของรีเซปเตอร์ 15-23 แสดงดังภาพที่ 8



ภาพที่ 8 โครงสร้างของเปปไทด์รีเซปเตอร์ 15-22

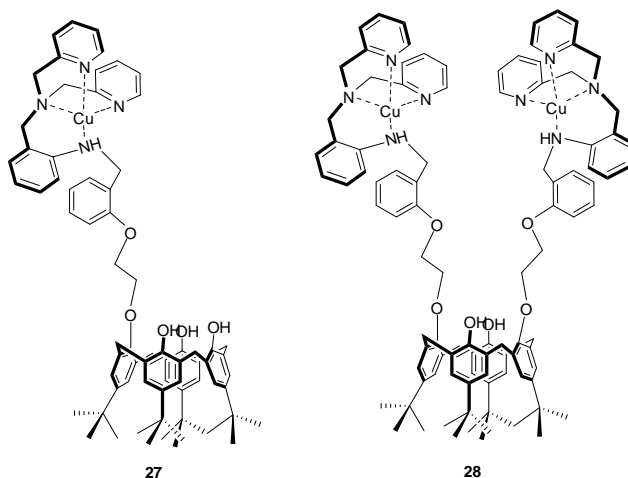
นอกจากสารประกอบของ Zn(II) ยังมีการนำสารประกอบของไอออนโลหะชนิดอื่นๆ มาใช้เป็นรีเซปเตอร์สำหรับตรวจวัด PPI ด้วยเทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์อีกด้วย โดยกลุ่มวิจัย Svane (Svane *et al.*, 2015) ได้ทำการสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิเนชันของ Zn²⁺ (24), Gd³⁺ (25), และ In³⁺ (26) กับลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของ DPA และใช้อินดิเคเตอร์ PV เป็นอินดิเคเตอร์ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเมื่อทำการเปลี่ยนชนิดของไอออนโลหะในสารประกอบรีเซปเตอร์จะส่งผลกระทบต่อความจำเพาะในการเลือกจับ PPI โดยรีเซปเตอร์ 25 นั้นจะมีความเหมาะสมในการตรวจวัด PPI มากที่สุด โดยไม่มีแอนไอออนอื่นๆ รบกวนการตรวจวัด ส่วนรีเซปเตอร์ 24 และ 26 นั้นจะมีการรบกวนจากแอนไอออน HPO₄²⁻, ATP และ HAsO₄²⁻ ทั้งนี้เป็นผลมาจากการที่ไอออนโลหะ Gd³⁺ มีประจุ +3 ช่วยเพิ่มแรงดึงดูดทางประจุกับไอออนของไพโรฟอสเฟตที่มีประจุ -4 อย่างไรก็ตามสำหรับไอออน In³⁺ นั้น ไม่มีความจำเพาะเจาะจงกับ PPI อันเป็นผลมาจากเอนไซม์เบิลที่เตรียมขึ้นจากรีเซปเตอร์ 26 นั้น เกิดเป็นเอนไซม์เบิลที่มีอัตราส่วนระหว่าง รีเซปเตอร์:อินดิเคเตอร์ไม่เป็น 1:1 ส่งผลให้ค่า K_{ri} มีค่าน้อยกว่ารีเซปเตอร์ที่เตรียมจาก Gd³⁺ โดยโครงสร้างของรีเซปเตอร์ทั้ง 3 ชนิด แสดงดังภาพที่ 9



ภาพที่ 9 โครงสร้างของรีเซปเตอร์ 24, 25 และ 26

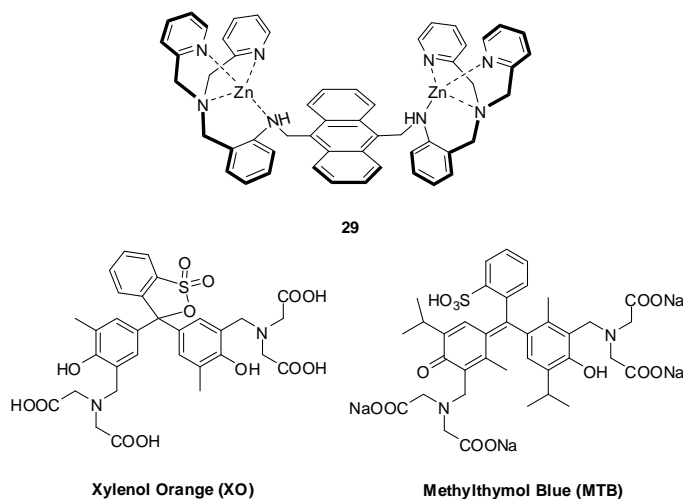
ในปี 2010 กลุ่มวิจัยของ Suksai (Watchasit *et al.*, 2010) ได้ทำการสังเคราะห์ลิแกนด์ชนิดใหม่ที่เป็นอนุพันธ์ของไตรโพนัลเอมีน (tripodal amine, TPA) ที่มีโครงสร้างหลักเป็นคาลิกซ์[4]แอรีน (*p*-tert-calix[4]arene) และทำการเตรียมสารประกอบโคออร์ดิเนชันกับไอออนโลหะ Cu(II) 2 ชนิดคือแบบโมโนนิวเคลียร์ (27) และแบบได-นิวเคลียร์ (28) เพื่อใช้เป็นรีเซปเตอร์สำหรับตรวจวัด PPI ในระบบตัวทำละลาย H₂O:acetonitrile อัตราส่วน 2:8 โดยปริมาตร โดยมี HEPES เป็นบัฟเฟอร์ที่ pH 6.4 โดยผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อทำการเตรียมเอนไซม์เบิลจากรีเซปเตอร์ทั้งสองชนิดกับอินดิเคเตอร์ PV พบว่ามีเพียงรีเซปเตอร์ 28 เท่านั้นที่สามารถนำมาเตรียมเป็นเอนไซม์เบิลสำหรับตรวจวัด PPI ได้ ส่วนเอนไซม์เบิลที่เตรียมจากรีเซปเตอร์ 27 นั้นไม่สามารถนำไปใช้ตรวจวัด PPI ได้ เนื่องจากสีของเอนไซม์เบิลที่เตรียมได้มีความแตกต่างจากสีของอินดิเคเตอร์น้อยมาก เมื่อนำเอนไซม์เบิล [28:PV] ไปทดสอบกับแอนไอออนชนิดต่างๆ พบว่าเอนไซม์เบิลดังกล่าวสามารถตรวจวัด PPI ได้อย่างจำเพาะเจาะจงและสามารถตรวจวัดได้ในระบบที่มีแอนไอออน PO₄³⁻ ร่วมอยู่ด้วย แต่กระนั้นก็พบว่าหากมี ATP และ ADP อยู่ในระบบ แอนไอออนทั้งคู่ก็สามารถเปลี่ยนสีของสารละลายเอนไซม์เบิลไปเป็นสีของอินดิเคเตอร์ในรูปอิสระได้เช่นเดียวกัน งานวิจัยนี้เป็นการยืนยันว่ารีเซปเตอร์ที่จะนำมาใช้เตรียมเอนไซม์เบิลกับอินดิเคเตอร์ PV นั้นจะต้องเป็นรีเซปเตอร์ชนิดได-นิวเคลียร์จึงจะเตรียมเอนไซม์เบิลที่มีค่า K_{ri} เหมาะสมที่จะนำมาใช้ตรวจวัด PPI ได้ ในระบบที่มี Pi อยู่ร่วมด้วยได้ นอกจากนั้นกลุ่มวิจัยยังได้ค้นพบว่าระยะห่างระหว่างไอออนโลหะคอปเปอร์ทั้งสองอะตอมในโครงสร้างของ

รีเซปเตอร์ก็มีผลกับความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัด PPI เช่นเดียวกัน โดยโครงสร้างของรีเซปเตอร์ 27 และ 28 แสดงดังภาพที่ 10



ภาพที่ 10 โครงสร้างของรีเซปเตอร์ 27 และ 28

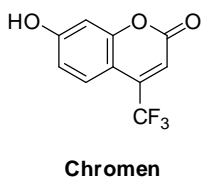
จากผลการศึกษาข้างต้นกลุ่มวิจัยของ Suksai (Watchasit *et al.*, 2014) จึงได้ทำการพัฒนาระบบการตรวจวัด PPI ให้มีความจำเพาะเจาะจงยิ่งขึ้นโดยทำการสังเคราะห์รีเซปเตอร์ชนิดไดนิวเคลียร์ชนิดใหม่ที่เป็นสารประกอบโคออร์ดิเนชันของ Zn^{2+} กับลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของ TPA ที่มีโครงสร้างหลักเป็นแอนทราซีน (29) และใช้โครโม-จินิกอินดิเคเตอร์ 4 ชนิดคือ PV, BPG, xylenol orange (XO) และ methylthymol blue (MTB) ในระบบตัวทำละลาย H_2O :acetonitrile อัตราส่วน 2:8 โดยมี HEPES เป็นบัฟเฟอร์ที่ pH 7.4 ซึ่งผลวิจัยที่ค้นพบนั้นมีความน่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง โดยพบว่าแอนเซมเบลิตที่เตรียมจากอินดิเคเตอร์ PV และ BPG นั้นเกิดเป็นแอนเซมเบลิตที่มีอัตราส่วนระหว่าง อินดิเคเตอร์:รีเซปเตอร์ 28 เท่ากับ 2:1 ส่งผลให้ค่า K_f ระหว่างรีเซปเตอร์กับอินดิเคเตอร์ทั้ง 2 มีค่าไม่มากพอที่จะแยก PPI ออกจากแอนไอออนฟอสเฟตอื่นๆ จึงส่งผลให้การตรวจวัด PPI ด้วยแอนเซมเบลิตดังกล่าวถูกรบกวนด้วยแอนไอออนที่มีฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบอื่นๆ ในขณะที่แอนเซมเบลิตที่เตรียมจากอินดิเคเตอร์ XO นั้นพบว่าไม่มีแอนไอออนใดที่สามารถเปลี่ยนสีของสารละลายแอนเซมเบลิตได้ ซึ่งเป็นผลมาจากโครงสร้างของ XO ที่มีขนาดพอดีกับระยะห่างระหว่าง Zn^{2+} ทั้งสองในโครงสร้างของรีเซปเตอร์ ส่งผลให้เกิดเป็น แอนเซมเบลิตที่มีค่า K_f สูงมากจนกระทั่งไม่มีแอนไอออนใดสามารถแทนที่ได้แม้กระทั่ง CN^- ที่เป็นลิแกนด์ที่แรงที่สุดตามอนุกรม spectrochemical series ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับเมื่อทำการเปลี่ยนอินดิเคเตอร์เป็น MTB ที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับ XO มากแตกต่างกันที่โครงสร้างของ MTB จะมีหมู่ isopropyl ทำให้โครงสร้างมีความเกะกะ (steric effect) มากกว่า XO ส่งผลให้ค่า K_f ของการเกิดแอนเซมเบลิตน้อยกว่า XO แต่มากกว่า PV และ BPG จึงทำให้แอนเซมเบลิต [29:MTB] มีความจำเพาะต่อการตรวจวัด PPI โดยมีการทดลองการทำไทเทรชันด้วยเทคนิค 1H และ ^{31}P NMR และการคำนวณด้วยเทคนิคเคมีคอมพิวเตอร์ยืนยันกระบวนการแทนที่และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น และเห็นอีกนัยหนึ่งสามารถตรวจวัด PPI ได้แม้ในระบบจะมีแอนไอออน PO_4^{3-} , ATP, ADP, AMP และ CN^- ร่วมอยู่ด้วย โดยถือเป็นงานวิจัยแรกที่สามารถจำแนก PPI ออกจากแอนไอออนกลุ่มดังกล่าวได้ และแสดงการตรวจวัด PPI ได้ในตัวอย่างจริง โดยโครงสร้างของรีเซปเตอร์ 29 และอินดิเคเตอร์ XO และ MTB แสดงดังภาพที่ 11



ภาพที่ 11 โครงสร้างของรีเซปเตอร์ 29 และอินดิเคเตอร์ XO และ MTB

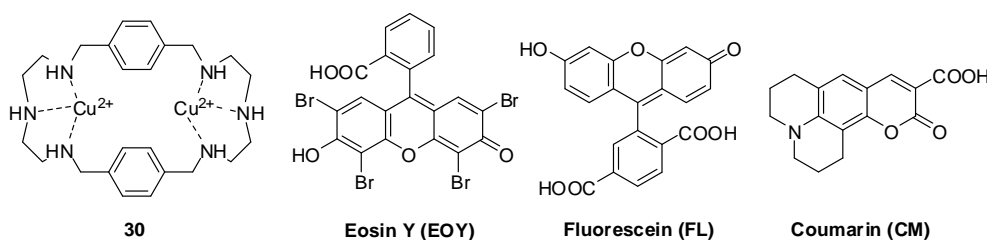
3. การตรวจวัดแอนไอออนไพโรฟอสเฟตด้วยเทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์โดยใช้ฟลูออเรสเซนต์อินดิเคเตอร์

ในหัวข้อที่ผ่านมาได้กล่าวถึงการตรวจวัดแอนไอออน PPI ด้วยเทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์โดยใช้โครโมจีนิก อินดิเคเตอร์ซึ่งมีข้อดีคือมีความง่ายในการติดตามการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาได้ด้วยตาเปล่า แต่อย่างไรก็ตามข้อด้อยของการใช้โครโมจีนิกอินดิเคเตอร์นั้นคือการตรวจวัดจะให้ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection, LOD) ได้ไม่ดีมากนักทำให้ไม่สามารถตรวจวัด PPI ได้หากมีปริมาณน้อย ดังนั้นการนำฟลูออเรสเซนต์อินดิเคเตอร์มาใช้เตรียมเอนไซม์เบิลสำหรับตรวจวัด PPI จึงได้ถูกพัฒนามาพร้อมกันเพื่อเพิ่มสภาพไว (sensitivity) ในการตรวจวัดให้ดีขึ้น โดยกลุ่มวิจัยของ Sokkalingam (Sokkalingam *et al.*, 2012) ได้ใช้รีเซปเตอร์ที่เป็นอนุพันธ์ของคาลิกซ์[4]ไพโรล 2 และฟลูออเรสเซนต์อินดิเคเตอร์ 2-oxo-4-(trifluoromethyl)-2H-chromen-7-olate (Chromen) เตรียมเป็นเอนไซม์เบิลเพื่อใช้ตรวจวัด PPI ในระบบตัวทำละลาย acetonitrile ผลการศึกษาพบว่าเมื่ออินดิเคเตอร์ Chromen เกิดเป็นเอนไซม์เบิลแล้วจะส่งผลให้สัญญาณฟลูออเรสเซนต์หายไป (quenching) และมีค่าคงที่การเกิดสารเชิงซ้อนเท่ากับ $2.25 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ แต่เมื่อทำการเติม PPI ลงไปในสารละลายเอนไซม์เบิลจะส่งผลให้สัญญาณฟลูออเรสเซนต์กลับมาดังเดิม (enhance) อันเป็นผลมาจากการที่ PPI เข้าไปจับกับรีเซปเตอร์แทนที่ Chromen ทำให้ Chromen หลุดออกมาอยู่ในรูปอิสระและส่งผลให้สัญญาณฟลูออเรสเซนต์กลับมาดังเดิม ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ ที่แสดงให้เห็นการเกิดอันตรกิริยาระหว่างรีเซปเตอร์ 2 กับอินดิเคเตอร์ และเมื่อทำการเติม PPI ลงในสารละลายก็ส่งผลให้เห็นอินดิเคเตอร์อยู่ในรูปอิสระ โดยโครงสร้างของอินดิเคเตอร์ Chromen แสดงดังภาพที่ 12



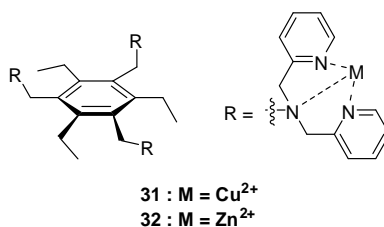
ภาพที่ 12 โครงสร้างของฟลูออเรสเซนต์อินดิเคเตอร์ Chromen

เนื่องจากปัญหาความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัด PPI ด้วยการใช้อันตรกิริยาแบบพันธะไฮโดรเจนผ่านกระบวนการการแทนที่อินดิเคเตอร์นั้นประสบปัญหาเช่นเดียวกับการตรวจวัดด้วยโครโมจีนิกอินดิเคเตอร์ที่มีกฎการบวกรวมการตรวจวัดด้วย ATP, ADP, AMP และ Pi นั้นเอง ดังนั้นนักเคมีจึงเลือกใช้รีเซปเตอร์ที่เป็นสารประกอบโคออร์ดิเนชันมาแทนที่รีเซปเตอร์ที่เป็นลิแกนด์เพียงอย่างเดียว โดยกลุ่มวิจัยของ Fabbrizzi (Fabbrizzi *et al.*, 2002) ได้นำรีเซปเตอร์ที่เป็นสารประกอบโคออร์ดิเนชันของ Cu(II) กับลิแกนด์ที่เป็น azacrown (30) มาเตรียมเป็นเอนไซม์กับฟลูออเรสเซนต์อินดิเคเตอร์ 3 ชนิดคือ coumarin (CM), eosin Y (EOY), และ fluorescein (FL) ในตัวทำละลายน้ำโดยใช้ HEPES เป็นบัฟเฟอร์ที่ pH 7.4 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอินดิเคเตอร์ EOY เกิดเป็นเอนไซม์ที่มีค่า K_s สูงที่สุดโดยมีค่าเท่ากับ $1.34 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ และสามารถตรวจวัด PPI ได้ในปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดถึง $2 \mu\text{M}$ โดยไม่ได้รับผลการรบกวนจาก PO_4^{3-} แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ไม่ได้แสดงผลการทดสอบกับ ATP, ADP และ AMP



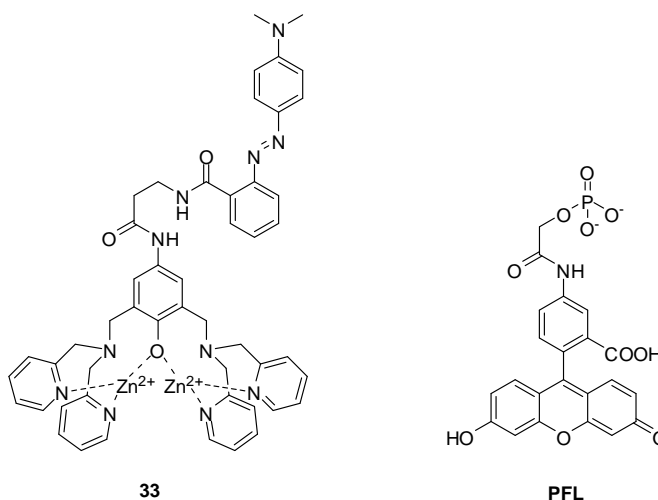
ภาพที่ 13 โครงสร้างของรีเซปเตอร์ 30 และฟลูออเรสเซนต์อินดิเคเตอร์ EOY, FL และ CM

จากผลการศึกษาข้างต้นกลุ่มวิจัยของ Ahn (Oh *et al.*, 2007,2008) จึงได้เลือกใช้อินดิเคเตอร์ EOY นำมาเตรียมเป็นเอนไซม์กับรีเซปเตอร์ที่เป็นสารประกอบโคออร์ดิเนชันของลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของ DPA กับไอออนโลหะ Cu(II) 31 และ Zn(II) 32 เพื่อใช้ในการตรวจวัด PPI โดยผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ที่เตรียมจากรีเซปเตอร์ทั้งสองนั้นมีความจำเพาะเจาะจงในการเลือกจับกับแอนไอออนที่แตกต่างกัน โดยเอนไซม์ [32:EOY] จะมีความจำเพาะต่อการเลือกจับแอนไอออน 1,4,5-tris(phosphate) (IP_3) ส่วนเอนไซม์ [31:EOY] นั้นจะมีความจำเพาะต่อการตรวจวัด PPI ซึ่งผลการศึกษาดังกล่าวเป็นการแสดงให้เห็นว่าไอออนของโลหะก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อความจำเพาะในการเลือกจับกับ PPI ในเทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์



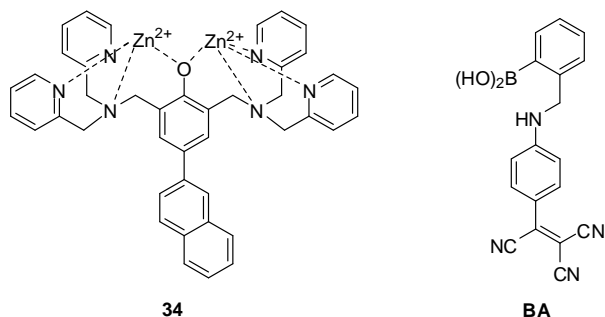
ภาพที่ 14 โครงสร้างของรีเซปเตอร์ 31 และ 32

ไม่เพียงแต่อินดิเคเตอร์ที่มีขายตามท้องตลาดเท่านั้นที่ถูกนำมาใช้สำหรับเทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์ แต่นักเคมียังทำการสังเคราะห์อินดิเคเตอร์ชนิดใหม่ๆ ขึ้นมาเพื่อใช้เป็นอินดิเคเตอร์สำหรับตรวจวัด PPI โดยในปี 2007 Lee และคณะ (Lee *et al.*, 2007) ได้ทำการสังเคราะห์สารประกอบโคออร์ดิชันของ Zn(II) กับลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของ DPA ที่มีหมู่เอโซเบนซีน เป็นองค์ประกอบ (33) และสังเคราะห์อินดิเคเตอร์ที่เป็นอนุพันธ์ของ fluorescein ที่มีหมู่ฟอสเฟต เป็นองค์ประกอบ (PFL) เพื่อนำมาเตรียมเป็นเอนไซม์เบิลสำหรับตรวจวัด PPI โดยอินดิเคเตอร์ PFL นั้นเมื่ออยู่ในรูปอิสระ จะให้สัญญาณฟลูออเรสเซนส์สูงสุดที่ความยาวคลื่นประมาณ 520 นาโนเมตร แต่เมื่อเกิดเป็นเอนไซม์เบิลกับรีเซปเตอร์ 33 แล้วจะส่งผลให้สัญญาณดังกล่าวหายไป และเมื่อเติม PPI ลงในระบบ PPI จะเข้าไปแทนที่อินดิเคเตอร์ PFL ส่งผลให้อินดิเคเตอร์ดังกล่าวกลับมาให้สัญญาณฟลูออเรสเซนส์อีกครั้ง



ภาพที่ 15 โครงสร้างของรีเซปเตอร์ 33 และอินดิเคเตอร์ PFL

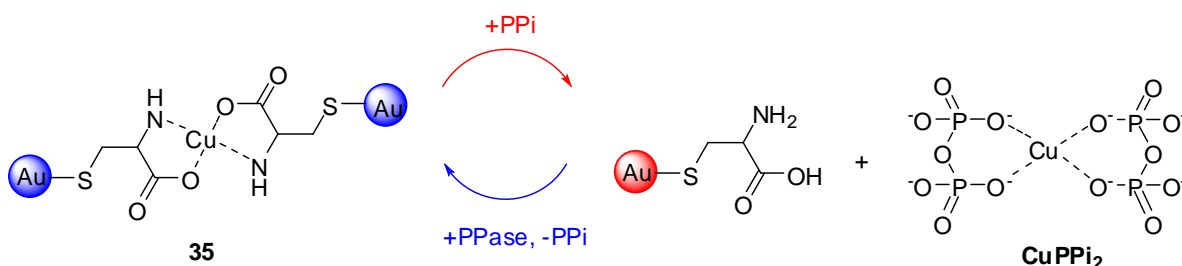
ในทางกลับกันกลุ่มวิจัยของ Lee (Lee *et al.*, 2011) ได้เสนอแนวคิดใหม่ในการตรวจวัด PPI ด้วยเทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์ โดยทำการสังเคราะห์รีเซปเตอร์ที่เป็นสารประกอบโคออร์ดิเนชันของ Zn(II) กับลิแกนด์ที่เป็นอนุพันธ์ของ DPA ที่มีหมู่แวนิลิล (34) เป็นส่วนประกอบ ซึ่งรีเซปเตอร์ดังกล่าวสามารถให้สัญญาณฟลูออเรสเซนส์ได้จึงทำหน้าที่เป็นอินดิเคเตอร์ไปด้วยในเวลาเดียวกัน และทำการสังเคราะห์สารประกอบที่เป็นอนุพันธ์ของ boronic acid (BA) ให้ทำหน้าที่เป็นตัวลดสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ (fluorescence quencher) เมื่อทำการเตรียมเอนไซม์เบิลจากสารทั้งสองชนิดจะได้เอนไซม์เบิลที่ไม่ให้สัญญาณฟลูออเรสเซนส์ แต่เมื่อเติม PPI ลงในระบบ PPI จะเข้าไปจับกับรีเซปเตอร์และทำให้ BA หลุดออกมาส่งผลให้สัญญาณฟลูออเรสเซนส์ของรีเซปเตอร์กลับมาอีกครั้ง



ภาพที่ 16 โครงสร้างของรีเซปเตอร์ 34 และ BA

4. การตรวจวัดแอนไอออนไพโรฟอสเฟตด้วยเทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์ร่วมกับอนุภาคนาโน

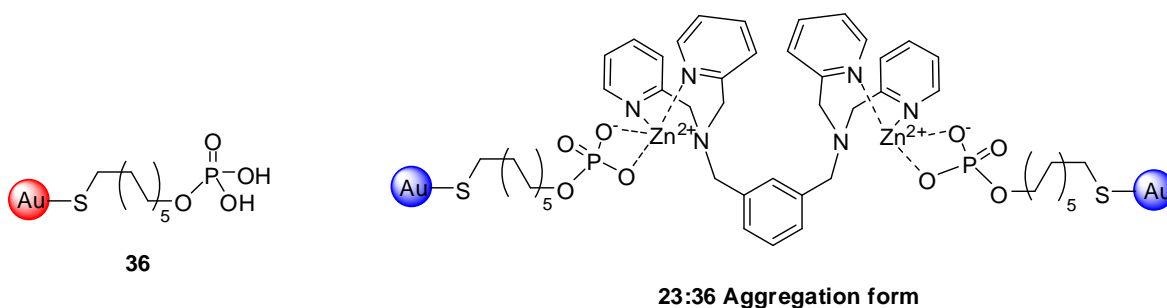
ในช่วงไม่กี่ปีมานี้ อนุภาคนาโน (Nanoparticles) ถูกนำมาใช้ในงานวิจัยทางด้านเซ็นเซอร์ทางเคมีเป็นจำนวนมาก อาทิเช่น การตรวจวัดไอออนของโลหะ แอนไอออน และสารชีวโมเลกุลต่างๆ (Saha *et al.*, 2012) แต่สำหรับการตรวจวัดแอนไอออนไพโรฟอสเฟตโดยใช้อนุภาคนาโนร่วมกับเทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์นั้น ยังเป็นเรื่องใหม่ที่มีความท้าทายนักวิจัย โดยในปี 2011 กลุ่มวิจัยของ Deng (Deng *et al.*, 2013) ได้ทำการสังเคราะห์รีเซปเตอร์อนุภาคนาโนทองคำ (Gold nanoparticles, AuNPs) ที่มีการปรับปรุงพื้นผิวให้มีหมู่กรดอะมิโนซิสทีอีน (Cysteine) 35 มาใช้ในการตรวจวัดแอนไอออน PPI โดยนำอนุภาคนาโนทองคำดังกล่าวที่อยู่ในรูปกระจายตัว (Dispersion form) สารละลายเป็นสีแดง มาเตรียมให้อยู่ในรูปการรวมตัว (Aggregation form) มีสารละลายเป็นสีม่วง (เอนเซมเบิล) โดยการเติมสารละลายไอออนโลหะ Cu^{2+} จากนั้นจึงนำอนุภาคนาโนทองคำที่เตรียมได้มาตรวจวัดแอนไอออน PPI ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อ PPI เข้าไปอยู่ในระบบ จะเข้าไปจับกับไอออนของโลหะ Cu^{2+} แทนที่รีเซปเตอร์ 35 เกิดเป็นสารประกอบ $CuPPI_2$ ส่งผลให้เกิดการกระจายตัวของอนุภาคนาโน สีของสารละลายจึงเปลี่ยนจากสีม่วงกลับไปเป็นสีแดงดั้งเดิม และมากกว่านั้นสารประกอบ $CuPPI_2$ ยังสามารถตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์ Pyrophosphatase (PPase) ที่เกิดในปฏิกิริยาย้อนกลับได้อีกด้วย



ภาพที่ 17 กลไกการตรวจวัด PPI และ PPase โดยใช้รีเซปเตอร์ที่เตรียมจากอนุภาคนาโนทองคำ 35

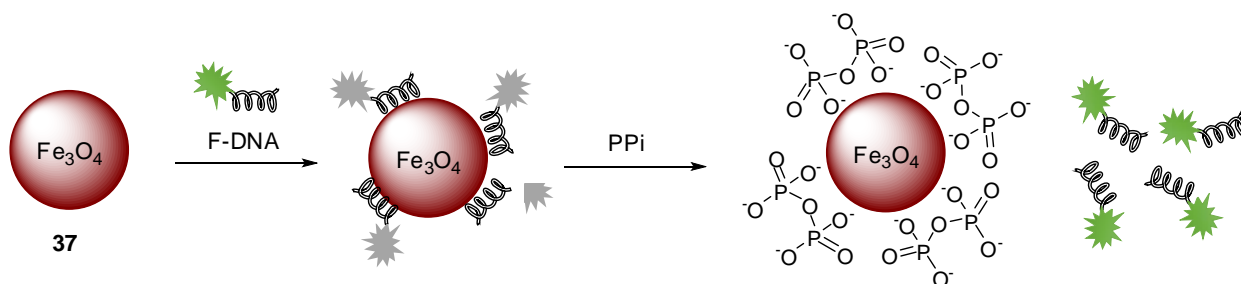
ในปีเดียวกัน กลุ่มวิจัยของ Kim (Kim *et al.*, 2013) ได้ทำการสังเคราะห์รีเซปเตอร์อนุภาคนาโนทองคำ (Gold nanoparticles, AuNPs) ที่ทำการปรับปรุงพื้นผิวให้มีอัลคิลฟอสเฟต (Alkyl phosphate) 36 เพื่อใช้สำหรับตรวจวัดแอนไอออน PPI ร่วมกับรีเซปเตอร์ 23 โดยผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอนุภาคนาโนทองคำดังกล่าวเมื่ออยู่ในรูปกระจายตัวจะมี

สารละลายเป็นสีแดง และเมื่อทำการเติมรีเซปเตอร์ 23 และแอนไอออน PPI ลงไปในสารละลายสีของสารละลายจะยังคงเป็นสีแดงอยู่ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอนุภาคนาโนทองคำ 36 ยังคงอยู่ในรูปกระจายตัว แต่หากทำการเติมรีเซปเตอร์ 23 และแอนไอออนชนิดอื่นๆ ลงไป สีของสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงเนื่องมาจากเกิดการรวมตัวกันของอนุภาคนาโนทองคำ ซึ่งสามารถอธิบายปรากฏการณ์ดังกล่าวได้คือ ในกรณีของ PPI นั้น PPI จะจับกับรีเซปเตอร์ 23 ส่งผลให้อนุภาคนาโนทองคำ 36 ที่มีหมู่ฟอสเฟตติดอยู่เกิดการผลัดกันอยู่จึงไม่เกิดการรวมตัวกันสีของสารละลายจึงยังคงเป็นสีแดงอยู่ แต่ในกรณีแอนไอออนอื่นๆ รีเซปเตอร์ 23 จะจับกับหมู่ฟอสเฟตของอนุภาคนาโนได้ดีกว่าแอนไอออนอื่นๆ ทำให้เกิดการรวมตัวกันอันเนื่องมาจากรีเซปเตอร์ 23 ดึงอนุภาคนาโน 36 เข้ามาใกล้กัน สีของสารละลายจึงเปลี่ยนเป็นสีม่วง (23:36 Aggregation form) นั้น มาเตรียมให้อยู่ในรูปการรวมตัว (Aggregation form) มีสารละลายเป็นสีม่วง นอกจากนั้นงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถตรวจวัด PPI ได้ในระดับความเข้มข้นต่ำถึง 146 nM



ภาพที่ 18 โครงสร้างของรีเซปเตอร์ 36 และการรวมตัวกันของรีเซปเตอร์ 23 และ 36

นอกจากการใช้การเปลี่ยนแปลงสีของอนุภาคนาโนทองคำในการติดตามการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาเคมีโดยตรงแล้ว ยังมีการนำอนุภาคนาโนชนิดอื่นมาใช้ในการตรวจวัด PPI ด้วยเทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์ด้วย ในปี 2015 กลุ่มวิจัยของ Tong (Tong et al., 2015) ได้ทำการสังเคราะห์อนุภาคนาโนแม่เหล็ก (Magnetic nanoparticles, Fe_3O_4) 37 เพื่อใช้ในการตรวจวัดแอนไอออน PPI โดยมีกลไกการตรวจวัดคือการนำอนุภาคนาโนแม่เหล็กไปผสมกับสารละลายของ DNA สายเดี่ยว (Single-strand DNA) ที่มีการติดหมู่ฟลูออเรสเซนต์อินดิเคเตอร์ไว้ F-DNA ซึ่งในภาวะอิสระนั้นสาย F-DNA ดังกล่าวจะให้สัญญาณฟลูออเรสเซนต์สูงสุดที่ความยาวคลื่น 518 นาโนเมตร แต่เมื่อสาย F-DNA ดังกล่าวจับกับอนุภาคนาโนแม่เหล็ก 37 จะส่งผลให้สัญญาณฟลูออเรสเซนต์ดังกล่าวลดลง จากนั้นจึงนำสารละลายผสมที่เตรียมได้ (แอนิเมบิล) ไปตรวจวัด PPI ซึ่ง PPI ในระบบ จะเข้าไปจับกับอนุภาคนาโนแม่เหล็กแทนที่ F-DNA ส่งผลให้สาย F-DNA หลุดออกมาอยู่ในสารละลายอย่างอิสระและให้สัญญาณฟลูออเรสเซนต์กลับมาดังเดิม



ภาพที่ 19 กลไกการตรวจวัด PPI โดยใช้รีเซปเตอร์ที่เป็นอนุภาคนาโนแม่เหล็ก 37

บทสรุป

จากที่ได้กล่าวมาทั้งหมดจะเห็นได้ว่า การตรวจวัดแอนไอออน PPI ด้วยเทคนิคการแทนที่อินดิเคเตอร์นั้นได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง ตั้งแต่แรกเริ่มที่ระบบมีความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจวัดน้อยเนื่องจากมีแอนไอออนฟอสเฟตอื่นๆ รบกวน จนกระทั่งสามารถพัฒนาแอนิเมียมเบิลให้มีความจำเพาะต่อการตรวจวัด PPI แม้ในสภาวะที่มีไอออนอื่นๆ รบกวนได้ และมีการพัฒนานำเอาฟลูออเรสเซนส์อินดิเคเตอร์ และอนุภาคนาโนชนิดต่างๆ มาใช้ควบคุมไปเพื่อเพิ่มสภาพไวในการตรวจวัด โดยอาศัยอันตรกิริยาแบบต่างๆ อาทิเช่นพันธะไฮโดรเจน แรงดึงดูดทางไฟฟ้า และพันธะโคออร์ดิเนทโคเวเลนต์ ซึ่งการพัฒนาดังกล่าวนี้อาศัยความรู้ความเข้าใจ การสังเกต และองค์ความรู้ต่างๆ มากมาย มิใช่เป็นแต่เพียงการลองผิดลองถูกเท่านั้น

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.ธวัชชัย ต้นทุลลानी และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จอมใจ สุกใส อาจารย์ที่ปรึกษาเมื่อครั้งผู้เขียนศึกษาในระดับปริญญาเอกและปริญญาโท ที่ให้ความเมตตาประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และให้โอกาสผู้เขียนมีวันนี้ได้ ขอขอบคุณทุน PERCH-CIC และทุนโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก ที่ให้ทุนค่าใช้จ่ายในการศึกษาระดับปริญญาโทและปริญญาเอก

เอกสารอ้างอิง

- Berchmans, S., Issa, T. B., & Singh, P. (2012). Determination of inorganic phosphate by electroanalytical methods: A review. *Analytica Chimica Acta*, 729, 7-20.
- Christoffersen, M. R., & Christoffersen, J. (2003). Effects of a bisphosphonate (EHDP) on growth, formation, and dissolution of calcium pyrophosphate crystals. *Crystal Growth & Design*, 3, 79-82.
- Deng, J., Jiang, Q., Wang, Y., Yang, L., Yu, P. & Mao, L. (2013). Real-time colorimetric assay of inorganic pyrophosphatase activity based on reversibly competitive coordination of Cu^{2+} between cysteine and pyrophosphate ion. *Analytical Chemistry*, 85, 9409-9415.
- Du, J., Wang, X., Jia, M., Li, T., Mao, J., & Guo, Z. (2008). Recognition of phosphate anions in aqueous solution by a dinuclear zinc(II) complex of a cyclen-tethered terpyridine ligand. *Inorganic Chemistry Communications*, 11, 999-1002.
- Fabbrizzi, L., Marcotte, N., Stomeo, F., & Taglietti, A. (2002). Pyrophosphate detection in water by fluorescence competition assays: Inducing selectivity through the choice of the indicator. *Angewandte Chemie International Edition*, 41, 3811-3814.
- Hargrove, A. E., Nieto, S., Zhang, T., Sessler, J. L., & Anslyn, E. V. (2011). Artificial receptors for the recognition of phosphorylated molecules. *Chemical Reviews*, 111, 6603-6782.
- Jensen, W. B. (1978). The Lewis acid-base definitions: A status report. *Chemical Reviews*, 78, 1-22.

- Katano, H., Watanabe, H., Takakuwa, M., Maruyama, C., & Hamano, Y. (2013). Colorimetric determination of pyrophosphate anion and its application to adenylation enzyme assay. *Analytical Sciences*, 29, 1095-1098.
- Kaur, S., Hwang, H., Lee, J. T., & Lee, C. H. (2013). Displacement-based, chromogenic calix[4]pyrrole indicator complex for selective sensing of pyrophosphate anion. *Tetrahedron Letters*, 54, 3744-3747.
- Kim, S., Eom, M. S., Kim, S. K., Seo, S. H. & Han, M. S. (2013). A highly sensitive gold nanoparticle-based colorimetric probe for pyrophosphate using a competition assay approach. *Chemical Communication*, 49, 152-154.
- Lee, D. H., Kim, S. Y., & Hong, J. I. (2007). Quencher-fluorophore ensemble for detection of pyrophosphate in water. *Tetrahedron Letters*, 48, 4477-4480.
- Lee, J. H., Jeong, A. R., Jung, J. H., Park, C. M., & Hong, J. I. (2011). A highly selective and sensitive fluorescence sensing system for distinction between diphosphate and nucleoside triphosphates. *Journal of Organic Chemistry*, 76, 417-423.
- Lee, S., Yuen, K. K. Y., Jolliffe, K. A., & Yoon, J. (2015). Fluorescent and colorimetric chemosensors for pyrophosphate. *Chemical Society Reviews*, 44, 1749-1762.
- Lipscomb, W. N., & Sträter, N. (1996). Recent advances in zinc enzymology. *Chemical Reviews*, 96, 2375-2434.
- Liu, X., Ngo, H. T., Ge, Z., Butler, S. J., & Jolliffe, K. A. (2013). Tuning colourimetric indicator displacement assays for naked-eye sensing of pyrophosphate in aqueous media. *Chemical Science*, 4, 1680-1686.
- Martínez, M. R., & Sancenón, F., (2003). Fluorogenic and chromogenic chemosensors and reagents for anions. *Chemical Reviews*, 103, 4419-4476.
- Morgan, B. P., He, S., & Smith, R. C. (2007). Zinc enzyme model/complexometric indicator pairs in indicator displacement assays for inorganic phosphates under physiological conditions. *Inorganic Chemistry*, 46, 9262-9266.
- Nguyen, B. T., & Anslyn, E. V. (2006). Indicator displacement assays. *Coordination Chemistry Reviews*, 250, 3118-3127.
- Nishizawa, S., Kato, Y., & Teramae, N. (1999). Fluorescence sensing of anions via intramolecular excimer formation in a pyrophosphate-induced self-assembly of a pyrene-functionalized guanidinium receptor. *Journal of the American Chemical Society*, 121(40), 9463-9464.
- Oh, D. J. & Ahn, K. H. (2008). Fluorescent sensing of IP₃ with a trifurcate Zn(II)-containing chemosensing ensemble system. *Organic Letters*, 10, 3539-3452.
- Oh, D. J., Han, M. S., & Ahn, K. H. (2007). Metal-containing trifurcate chemosensing ensemble for phytate. *Supramolecular Chemistry*, 19, 315-320.

- Saha, K., Agasti, S. S., Kim, C., Li, X. & Rotello, V. M. (2012). Gold nanoparticles in chemical and biological sensing. *Chemical Reviews*, 112, 2739-2779.
- Silva, P. D., Gunaratne, H. Q. N., Gunnlaugsson, T., Huxley, A. J. M., McCoy, C. P., Rademacher, J. T., & Rice, T. E. (1997). Signaling recognition events with fluorescent sensors and switches. *Chemical Reviews*, 97, 1515-1566.
- Sokkalingam, P., Kim, D. S., Hwang, H., Sessler, J. L., & Lee, C. H. (2012). A dicationic calix[4]pyrrole derivative and its use for the selective recognition and displacement-based sensing of pyrophosphate. *Chemical Science*, 3, 1819–1824.
- Steed, J. W. & Atwood, J. L. 2002. Supramolecular chemistry. John Wiley & Sons Ltd., England.
- Suksai, C., & Tuntulani. (2003). Chromogenic anion sensors. *Chemical Society Reviews*, 32, 192-202.
- Surman, A. J., Bonnet, C. S., Lowe, M. P., Kenny, G. D., Bell, J. D., Toth, E., & Vilar, R. (2011). A pyrophosphate-responsive gadolinium(III) MRI contrast agent. *Chemistry - A European Journal*, 17, 223-230.
- Svane, S., Kjeldsen, F. McKee, V., & McKenzie, C. J. (2015). The selectivity of water-based pyrophosphate recognition is tuned by metal substitution in dimetallic receptors. *Dalton Transactions*, 44, 11877–11886.
- Tong, L., Chen, Z., Jiang, Z. Y., Sun, M.M., Li, L., Liu, J., tang, B. (2015). Fluorescent sensing of pyrophosphate anion in synovial fluid based on DNA-attached magnetic nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*, 72, 51-55.
- Watchait, S., Kaowliw, A., Suksai, C., Tuntulani, T., Ngeontae, W., & Pakawatchai, C. (2010). Selective detection of pyrophosphate by new tripodal amine calix[4]arene-based Cu(II) complexes using indicator displacement strategy. *Tetrahedron Letters*, 51, 3398–3402.
- Watchait, S., Suktanarak, P., Suksai, C., Ruangpornvisuti, V., & Tuntulani, T. (2014). Discriminate sensing of pyrophosphate using a new tripodal tetramine-based dinuclear Zn(II) complex under an indicator displacement assay approach. *Dalton Transactions*, 43, 14701–14709.
- Wiskur, S. L., Ait-Haddou, H., Lavigne, J. J., & Anslyn, E. V. (2001). Teaching old indicators new tricks. *Accounts of Chemical Research*, 34, 963-972.
- Yoza, N., Akazaki, I., Nakazato, T., Ueda, N., Kodama, H., & Tateda, A. (1991). High-performance liquid chromatographic determination of pyrophosphate in the presence of a 20,000-fold excess of orthophosphate. *Analytical Biochemistry*, 199, 279-285.
- Yuen, K. K. Y., & Jolliffe, K. A. (2013). Bis[zinc(II)dipicolylamino]-functionalised peptides as high affinity receptors for pyrophosphate ions in water. *Chemical communications*, 49, 4824-4826.
- Zhang, T., & Anslyn, E. V., (2007). Using an indicator displacement assay to monitor glucose oxidase activity in blood serum. *Organic Letters*, 9, 1627-1629.