

บทที่ 2

วิธีการทดลอง

1. สารเคมีและอุปกรณ์

1.1 สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในขั้นตอนการสังเคราะห์สาร

สารตั้งต้นของปฏิกิริยา Reagent ตัวเร่งปฏิกิริยา และตัวทำละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

สารตั้งต้น Reagent และตัวเร่งปฏิกิริยา

Aniline	Sigma-Aldrich, (MO, U.S.A.)
Benzoyl Chloride	Sigma-Aldrich, (MO, U.S.A.)
Benzyl Bromide	Sigma-Aldrich, (MO, U.S.A.)
Ethyl Bromoacetate	Wako Pure Chemical Industries (Japan)
<i>p</i> -Fluoroaniline	TCI (Japan)
<i>p</i> -Fluorobenzoyl Chloride	TCI (Japan)
Iodopentane	Sigma-Aldrich, (MO, U.S.A.)
Oxone [®]	Sigma-Aldrich, (MO, U.S.A.)
Methyl Iodide	Wako Pure Chemical Industries (Japan)
<i>p</i> -Methylthioaniline	TCI (Japan)
<i>p</i> -Methylthiobenzoyl Chloride	Sigma-Aldrich, (MO, U.S.A.)
Pyridine	Merck (NJ, U.S.A.)
Sodium Hydride	Sigma-Aldrich, (MO, U.S.A.)
Sodium Sulfate, Anhydrous	Fisher Scientific (PA, U.S.A.)
<i>p</i> -Toluidine	Sigma-Aldrich, (MO, U.S.A.)
<i>p</i> -Tolyl Chloride	Sigma-Aldrich, (MO, U.S.A.)

ตัวทำละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาเคมี

Chloroform	Anhydrous, Labscan Asia
<i>N,N</i> -Dimethylformamide*	Anhydrous, Labscan Asia
Dichloromethane*	Anhydrous, Labscan Asia
Ethanol	Anhydrous, Labscan Asia
Methanol	Anhydrous, Labscan Asia

*N,N-Dimethylformamide Chloroform และ Dichloromethane จะถูก Treat ด้วย Molecular Sieves 4A ก่อนถูกนำมาใช้

1.2 สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์
มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

สารเคมีและอุปกรณ์	รายละเอียด
Silica Gel 60 for Column Chromatography (40-63 µm)	Merck (NJ, U.S.A.)
Aluminum Backed Plates	Merck (NJ, U.S.A.)
Pre-coated with Silica (0.1 mm, 60F ₂₅₄)	
ส่วนตัวทำละลายที่ใช้ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ เช่น Hexane และ Ethyl Acetate เป็นตัวทำละลายชนิด Commercial Grade ซึ่งจะถูกลั่นก่อนนำมาใช้	

1.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในขั้นตอนการพิสูจน์เอกลักษณ์
มีดังต่อไปนี้

Melting Point Apparatus (Mel-TempII, Laboratory devices, USA)

Fourier Transform-infrared Spectrophotometer (FT-IR Model Spectrum One Perkin Elmer™)

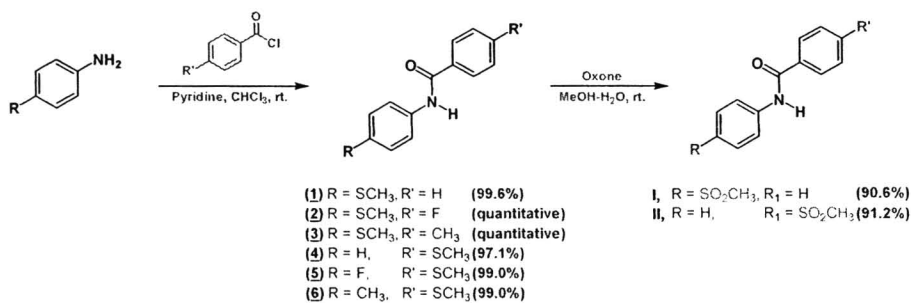
Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance Spectrophotometer (FT-NMR 500 MHz; Model UNITY INOVA)

Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance Spectrophotometer (Varin and JEOL GSX400 instrument operated at 400 MHz)

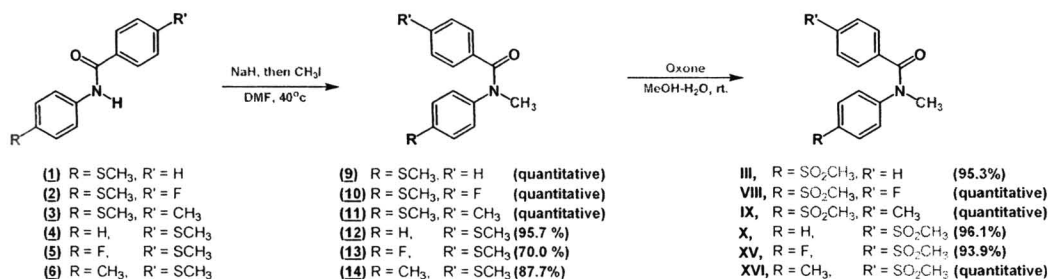
High Resolution Mass Spectrometer (Microtof, Bruker)

2. การสังเคราะห์สาร

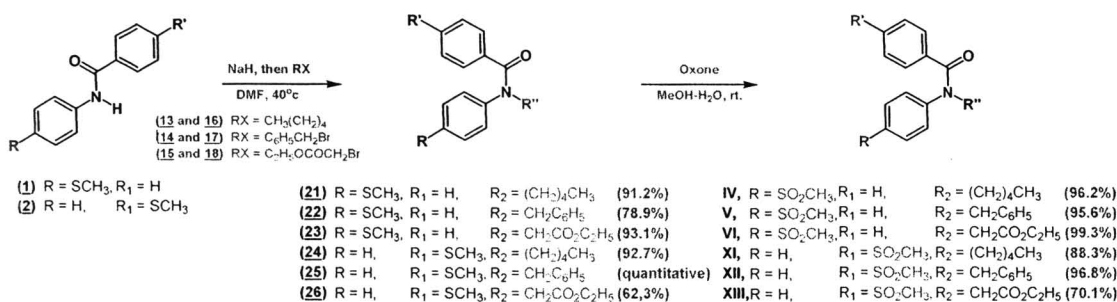
คณะวิจัยได้ทำการสังเคราะห์ *N-H-N*-(4-(methylsulfonyl)phenyl)benzamide จำนวน 1 ตัว (สาร I) *N*-Substituted-*N*-(4-(methylsulfonyl)phenyl)benzamide จำนวน 7 ตัว (สาร III-IX) *N*-4-(methylsulfonyl)-*N*-phenylbenzamide จำนวน 1 ตัว (สาร II) และ *N*-Substituted-4-(methylsulfonyl)-*N*-phenylbenzamide จำนวน 7 ตัว (สาร X-XVI) ดังลำดับขั้นตอน และ % yield ซึ่งแสดงไว้ใน Synthetic Scheme 1-4 (รูปที่ 9-12)



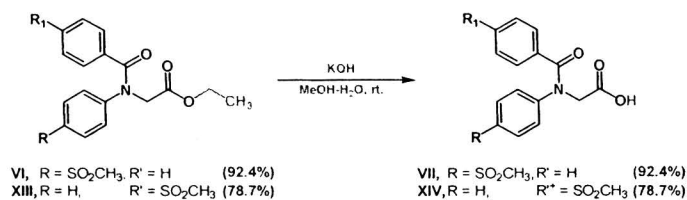
รูปที่ 9 Synthetic scheme แสดงการสังเคราะห์ *N*-H Benzamide (สาร I-II)



รูปที่ 10 Synthetic scheme แสดงการสังเคราะห์ *N*-Methylated Benzamide (สาร III, VIII-X, XV-XVI)



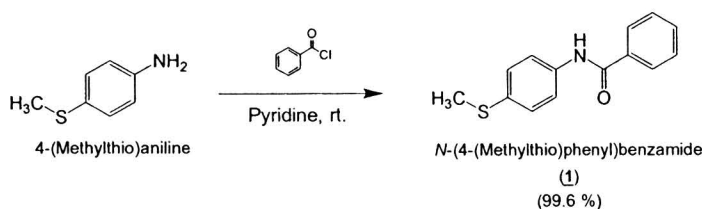
รูปที่ 11 Synthetic scheme แสดงการสังเคราะห์ *N*-Alkylated Benzamide (สาร IV-VI, XI-XIII)



รูปที่ 12 Synthetic scheme แสดงการสังเคราะห์ *N*-Carboxymethylated Benzamide (สาร VII, XIV)

ซึ่งมีรายละเอียดของวิธีการสังเคราะห์ดังต่อไปนี้

การเตรียม *N*-(4-(Methylthio)phenyl)benzamide (**1**)



ละลาย 4-(Methylthio)aniline (511 mg, 3.67 mmol) ใน Dichloromethane (10 ml) จากนั้นจึงเติม Benzoyl Chloride (577 mg, 4.11 mmol, 1.12 equiv) และ Pyridine (366 mg, 4.63 mmol, 1.26 equiv) ลงไปช้า ๆ พร้อมทั้ง Stir เพื่อให้สารผสมเข้ากัน และ Stir สารผสมที่ได้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงทำการกรองเพื่อแยกเอาตะกอนที่เกิดขึ้นออกจาก Reaction Mixture และทำการล้างตะกอนที่กรองได้ด้วย Dichloromethane เย็น จะได้ตะกอนสีขาวของ *N*-(4-(Methylthio)phenyl)benzamide (**1**) หนัก 890 mg (99.6 %) เมื่อทำการตกผลึกซ้ำในสารละลายผสมระหว่าง Dichloromethane-*n*-Hexane จะมีจุดหลอมเหลว 178-180 °C

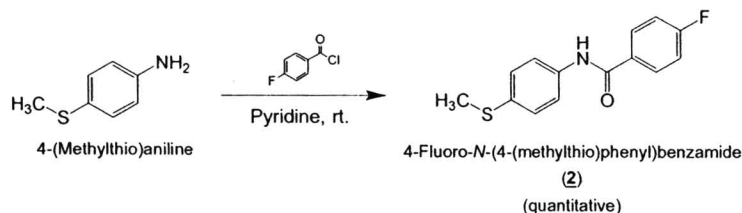
IR (KBr), ν_{max} , cm⁻¹ : 3349, ($\nu_{\text{N-H}}$, 2° amide), 3170-3001 ($\nu_{\text{C-H}}$, aromatic), 2983-2829 ($\nu_{\text{C-H}}$, aliphatic), 1650 ($\nu_{\text{C=O}}$, amide), 1587, 1497 ($\nu_{\text{C=C}}$, aromatic).

¹H-NMR (CDCl₃, ppm) : 2.49 (s, 3H), 7.29 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.50 (m, 2H), 7.56 (m, 1H), 7.59 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.77 (br, s, 1H), 7.84 (m, 2H) .

¹³C-NMR (CDCl₃, ppm) : 16.65, 120.75, 126.95, 128.03, 128.81, 128.88, 133.98, 134.86, 135.52, 165.55.

HR-MS Calcd for (M+H)⁺ 244.0796
 Found 244.0798

การเตรียม 4-Fluoro-N-(4-(methylthio)phenyl)benzamide (2)



ละลาย 4-(Methylthio)aniline (390 mg, 2.80 mmol, 1.11 equiv) ใน Chloroform (10 ml) จากนั้นจึงเติม *p*-Fluorobenzoyl Chloride (400 mg, 2.54 mmol) และ Pyridine (370 mg, 3.41 mmol, 1.34 equiv) ลงไปช้า ๆ พร้อมทั้ง Stir เพื่อให้สารผสมเข้ากัน และ Stir สารผสมที่ได้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วจึงทำการกรองเพื่อแยกเอาตะกอนที่เกิดขึ้นออกจาก Reaction Mixture และทำการล้างตะกอนที่กรองได้ด้วย Chloroform เย็น จะได้ตะกอนสีขาวของ 4-Fluoro-*N*-(4-(methylthio)phenyl)benzamide (**2**) หนัก 664 mg (quantitative)และทำการตกผลึกซ้ำในสารละลายผสมระหว่าง Ethyl Acetate-*n*-Hexane

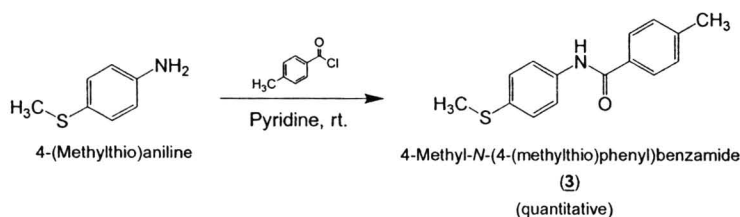
IR (KBr), ν_{max} , cm^{-1} : 3355, ($\nu_{\text{N-H}}$, 2° amide), 1650 ($\nu_{\text{C=O}}$, amide),
1603, 1586, 1505 ($\nu_{\text{C=C}}$, aromatic)

$^1\text{H-NMR}$ (Acetone- d_6 , ppm) : 2.49 (s, 3H), 7.27 (dd, $J = 8.8$ and 8.8 Hz, 2H),
7.29 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.79 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H),
8.07 (dd, $J = 5.4$ and 8.8 Hz, 2H), 7.77 (br, s, 1H)

¹³C-NMR (Acetone-*d*₆, ppm): 16.38, 116.12 (*d*, *J* = 22.0 Hz), 121.70, 128.38, 130.99 (*d*, *J* = 9.0 Hz), 132.66 (*d*, *J* = 3.1 Hz), 134.04, 137.90, 165.13, 165.58 (*d*, *J* = 249.4 Hz).

HR-MS	Calcd for (M+H) ⁺	262.0702
	Found	262.0703

การเตรียม 4-Methyl-N-(4-(methylthio)phenyl)benzamide (3)

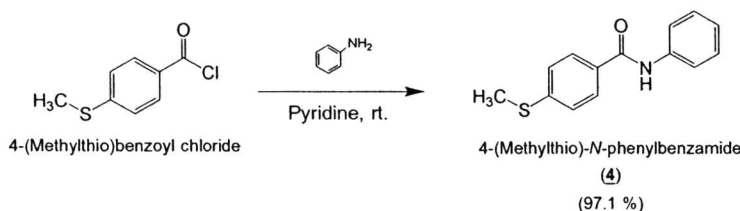


ละลาย 4-(Methylthio)aniline (390 mg, 2.80 mmol, 1.11 equiv) ใน Chloroform (10 ml) จากนั้นจึงเติม *p*-Methylbenzoyl Chloride (400 mg, 2.52 mmol) และ Pyridine (370 mg, 3.41 mmol, 1.35 equiv) ลงไปช้า ๆ พร้อมทั้ง Stir เพื่อให้สารผสมเข้ากัน และ Stir สารผสมที่ได้ที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วจึงทำการกรองเพื่อแยกเอาตะกอนที่เกิดขึ้นออกจาก Reaction Mixture และทำการล้างตะกอนที่กรองได้ด้วย Chloroform เย็น จะได้ตะกอนสีขาวของ 4-Methyl-*N*-(4-(methylthio)phenyl)benzamide (**3**) หนัก 650 mg (quantitative) และทำการตกผลึกซ้ำใน

สารละลายผสมระหว่าง Ethyl Acetate-*n*-Hexane

IR (KBr), ν_{max} , cm^{-1} : 3339, ($\nu_{\text{N-H}}$, 2° amide), 1653 ($\nu_{\text{C=O}}$, amide),
1589, 1524, 1508 ($\nu_{\text{C=C}}$, aromatic)
 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , ppm) : 2.43 (s, 3H), 2.49 (s, 3H), 7.29 (m, 4H),
7.58 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.74 (br, s, 1H),
7.76 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H)
 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , ppm): 15.87, 21.65, 120.88, 127.14, 128.25, 129.63, 132.15,
133.94, 135.85, 142.61, 165.65.
HR-MS Calcd for $(\text{M}+\text{H})^+$ 253.0953
Found 253.0953

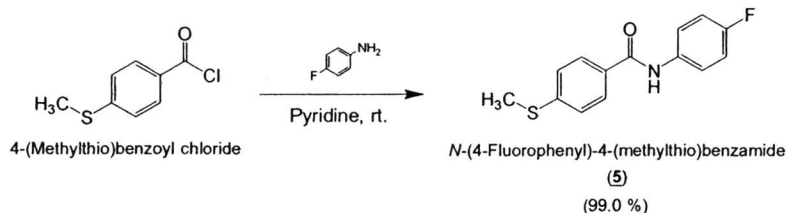
การเตรียม 4-(Methylthio)-*N*-phenylbenzamide (**4**)



ละลาย Aniline (1201 mg, 12.90 mmol, 1.20 equiv) ใน Chloroform (20 ml) จากนั้นจึงเติม 4-(Methylthio)benzoyl Chloride (2000 mg, 10.72 mmol) และ Pyridine (1212 mg, 15.33 mmol, 1.43 equiv) ลงไปช้า ๆ พร้อมทั้ง Stir เพื่อให้สารผสมเข้ากัน และ Stir สารผสมที่ได้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วจึงทำการกรองเพื่อแยกเอาตะกอนที่เกิดขึ้นออกจาก Reaction Mixture และทำการล้างตะกอนที่กรองได้ด้วย Chloroform เย็น จะได้ตะกอนสีขาวของ 4-(Methylthio)-*N*-phenylbenzamide (**4**) หนัก 2533 mg (97.1 %) และทำการตกผลึกซ้ำในสารละลายผสมระหว่าง Ethyl Acetate-*n*-Hexane

IR (KBr), ν_{max} , cm^{-1} : 3338, ($\nu_{\text{N-H}}$, 2° amide), 3047 ($\nu_{\text{C-H}}$, aromatic),
2913 ($\nu_{\text{C-H}}$, aliphatic), 1650 ($\nu_{\text{C=O}}$, amide),
1594, 1424 ($\nu_{\text{C=C}}$, aromatic).
 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , ppm) : 2.53 (s, 3H), 7.15 (m, 1H), 7.30 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.37 (m, 2H), 7.63 (m, 2H), 7.79 (m, 3H).
 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , ppm) : 15.00, 120.15, 124.50, 125.54, 127.38, 129.08, 130.97,
137.91, 144.07, 165.10.
HR-MS Calcd for $(\text{M}+\text{H})^+$ 244.0796
Found 244.0798

การเตรียม *N*-(4-Fluorophenyl)-4-(methylthio)benzamide (**5**)



ละลาย 4-Fluoroaniline (370 mg, 3.33 mmol, 1.11 equiv) ใน Chloroform (10 ml) จากนั้นจึงเติม *p*-Methylthiobenzoyl Chloride (560 mg, 3.00 mmol) และ Pyridine (290 mg, 3.67 mmol, 1.22 equiv) ลงไปช้า ๆ พร้อมทั้ง Stir เพื่อให้สารผสมเข้ากัน และ Stir สารผสมที่ได้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วจึงทำการกรองเพื่อแยกเอาตะกอนที่เกิดขึ้นออกจาก Reaction Mixture และทำการล้างตะกอนที่กรองได้ด้วย Chloroform เย็น จะได้ตะกอนสีขาวของ *N*-(4-Fluorophenyl)-4-(methylthio)benzamide (**5**) หนัก 776 mg (99.0 %) และทำการตกผลึกซ้ำในสารละลายผสมระหว่าง Ethyl Acetate-*n*-Hexane

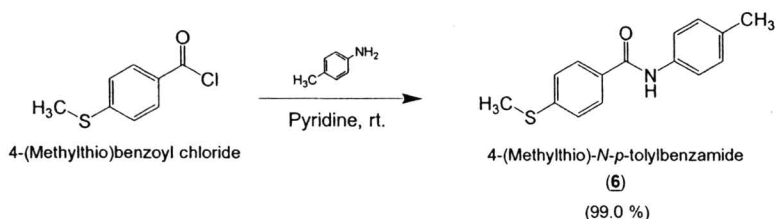
IR (KBr), ν_{max} , cm^{-1} : 3350, ($\nu_{\text{N-H}}$, 2° amide), 1645 ($\nu_{\text{C=O}}$, amide),
1591, 1527, 1510 ($\nu_{\text{C=C}}$, aromatic)

$^1\text{H-NMR}$ (Acetone- d_6 , ppm) : 2.55 (s, 3H), 7.11 (dd, $J = 8.8$ and 9.0 Hz, 2H),
7.36 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.84 (dd, $J = 5.0$ and 9.0 Hz, 2H),
7.93 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 9.51 (br, s, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (Acetone- d_6 , ppm): 13.83, 114.97 (d, $J = 22.2$ Hz), 121.89 (d, $J = 8.0$ Hz),
125.04, 127.87, 131.18, 135.75 (d, $J = 2.7$ Hz), 143.73,
158.89 (d, $J = 240.9$ Hz), 164.71.

HR-MS Calcd for $(\text{M}+\text{H})^+$ 262.0702
Found 262.0697

การเตรียม 4-(Methylthio)-*N*-*p*-tolylbenzamide (**6**)



ละลาย *p*-Toluidine (350 mg, 3.26 mmol, 1.09 equiv) ใน Chloroform (10 ml) จากนั้นจึงเติม *p*-Methylbenzoyl Chloride (560 mg, 3.00 mmol) และ Pyridine (290 mg, 3.67 mmol, 1.22 equiv) ลงไปช้า ๆ พร้อมทั้ง Stir เพื่อให้สารผสมเข้ากัน และ Stir สารผสมที่ได้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วจึงทำการกรองเพื่อแยกเอาตะกอนที่เกิดขึ้นออกจาก Reaction Mixture และทำการล้างตะกอนที่กรองได้ด้วย Chloroform เย็น จะได้ตะกอนสีขาวของ 4-(Methylthio)-*N*-*p*-tolylbenzamide (**6**) หนัก 764 mg (99.0 %) และทำการตกผลึกซ้ำในสารละลายผสมระหว่าง Ethyl

Acetate-*n*-Hexane

IR (KBr), ν_{max} , cm^{-1} : 3339, ($\nu_{\text{N-H}}$, 2° amide), 3042 ($\nu_{\text{C-H}}$, aromatic),
2913, 2863 ($\nu_{\text{C-H}}$, aliphatic), 1648 ($\nu_{\text{C=O}}$, amide),
1597, 1527 ($\nu_{\text{C=C}}$, aromatic)

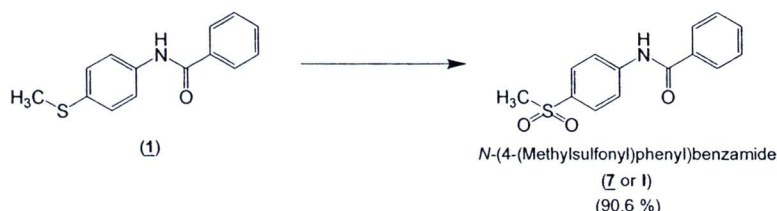
$^1\text{H-NMR}$ (Acetone- d_6 , ppm) : 2.04 (s, 3H), 2.54 (s, 3H), 7.14 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H),
7.35 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.70 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H),
7.92 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 9.38 (br, s, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (Acetone- d_6 , ppm): 13.86, 19.91, 120.10, 125.04, 127.84, 128.97, 131.53,
132.84, 136.97, 143.45, 164.56.

HR-MS Calcd for $(\text{M}+\text{H})^+$ 253.0953
Found 253.0949



การเตรียม *N*-(4-(Methylsulfonyl)phenyl)benzamide (**7** or **1**)



ผสมสารละลาย *N*-(4-(Methylthio)phenyl)benzamide (**1**) (240 mg, 0.99 mmol ใน methanol 10 ml) กับสารละลาย Oxone® (1850 mg, 3.01 mmol ในน้ำ 20 ml) พร้อมทั้ง stir เพื่อให้สารผสมเข้ากัน เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วจึงเท reaction mixture ลงในน้ำและนำสารผสมที่ได้มาทำการสกัดด้วย ethyl acetate ล้างชั้นสารละลาย ethyl acetate ที่ได้ด้วยน้ำและน้ำเกลืออิ่มตัวตามลำดับ ทำการดูดน้ำที่อาจจะหลงเหลืออยู่ในชั้นสารละลาย ethyl acetate ด้วย anhydrous sodium sulfate แล้วทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกแบบลดความดัน จะได้ตะกอนสีขาวของ *N*-methyl-*N*-(4-(methylsulfonyl)phenyl)benzamide (**7** or **1**) หนัก 249 mg (90.6 %) และทำการตกผลึกซ้ำในสารละลายผสมระหว่าง Ethyl Acetate-*n*-Hexane

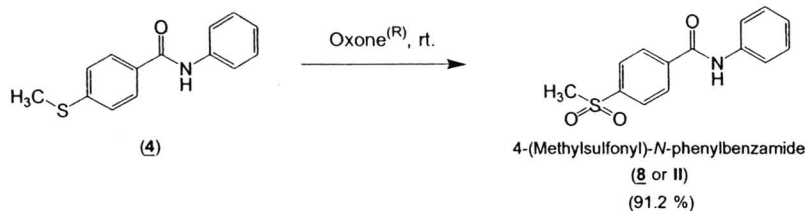
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , ppm) : 3.18 (s, 3H), 7.56 (m, 2H), 7.63 (m, 2H), 7.91 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.98 (m, 2H), 8.05 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 10.46 (br, s, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , ppm): 44.05, 120.65, 128.60, 128.79, 129.25, 132.82, 135.15,
135.81, 144.62, 167.12.

HR-MS Calcd for $(\text{M}+\text{H})^+$ 276.0694
Found 276.0689



การเตรียม 4-(Methylsulfonyl)-*N*-phenylbenzamide (**8** or **II**)



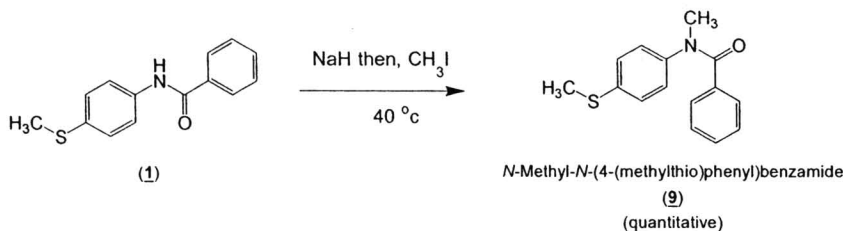
ผสมสารละลาย 4-(Methylthio)-*N*-phenylbenzamide (**4**) (240 mg, 0.99 mmol ใน methanol 10 ml) กับสารละลาย Oxone® (1856 mg, 3.02 mmol ในน้ำ 20 ml) พร้อมทั้ง stir เพื่อให้สารผสมเข้ากัน เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วจึงเท reaction mixture ลงในน้ำและนำสารผสมที่ได้มาทำการสกัดด้วย ethyl acetate ล้างชั้นสารละลาย ethyl acetate ที่ได้ด้วยน้ำและน้ำเกลืออิ่มตัวตามลำดับ ทำการดูดน้ำที่อาจจะหลงเหลืออยู่ในชั้นสารละลาย ethyl acetate ด้วย anhydrous sodium sulfate แล้วทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกแบบลดความดัน จะได้ตะกอนสีขาวของ 4-(Methylsulfonyl)-*N*-phenylbenzamide (**8** or **II**) หนัก 251 mg (91.2 %) และทำการตกผลึกซ้ำในสารละลายผสมระหว่าง Ethyl Acetate-*n*-Hexane

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, ppm) : 3.29 (s, 3H), 7.13 (m, 1H), 7.37 (m, 2H), 7.78 (m, 2H), 8.08 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 8.21 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 10.47 (br, s, 1H).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, ppm): 43.49, 121.01, 124.72, 127.72, 129.33, 129.36, 139.51, 140.25, 143.92, 165.20.

HR-MS Calcd for (M+H)⁺ 276.0694
Found 276.0692

การเตรียม *N*-Methyl-*N*-(4-(methylthio)phenyl)benzamide (**9**)



ละลาย *N*-(4-(Methylthio)phenyl)benzamide (**4**) (105 mg, 0.43 mmol) ใน Dried *N,N*-Dimethylformamide (2 ml) เติม Sodium Hydride (60%, 22 mg, 0.55 mmol) ลงไปในสารละลาย พร้อมทั้ง Stir เพื่อให้สารผสมเข้ากัน จนกระทั่งไม่สามารถสังเกตเห็นฟองของแก๊ส Hydrogen เกิดขึ้นในสารผสม (เป็นเวลาประมาณ 30 นาที) จากนั้นจึงเติม Methyl Iodide (102 mg, 0.72 mmol) ลงไป และ Stir สารผสมที่ได้ที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง รอให้สารผสมเย็นลง แล้วจึงเท Reaction Mixture ลงในน้ำ 30 ml และนำสารผสมที่ได้มาทำการสกัดด้วย Ethyl Acetate ล้างชั้นสารละลาย Ethyl Acetate ที่ได้ด้วยน้ำและน้ำเกลืออิ่มตัวตามลำดับ ทำการดูดน้ำที่อาจจะหลงเหลืออยู่ในชั้นสารละลาย Ethyl Acetate ด้วย Anhydrous Sodium Sulfate แล้วทำการระเหยเอาตัวทำละลาย

ออกแบบลดความดัน จากนั้นนำสารผสมที่เหลื้อมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค Column Chromatography ผ่าน Silica Gel ที่มีตัวทำละลายผสมระหว่าง Ethyl Acetate และ *n*-Hexane ในสัดส่วน 1:5 เป็น Mobile Phase จะได้ *N*-Methyl-*N*-(4-(methylthio)phenyl)benzamide (**9**) ที่มีลักษณะเป็นของเหลวใส สีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 114 mg (quantitative)

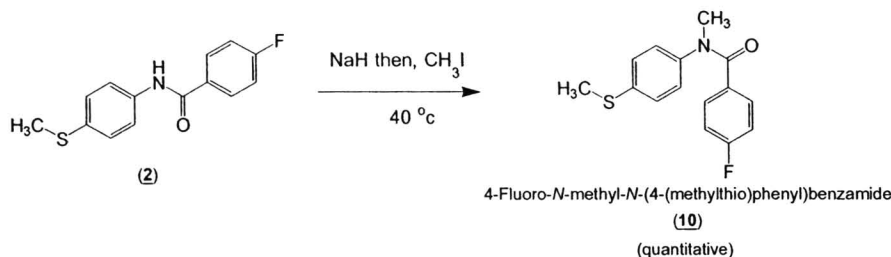
IR (neat), ν_{max} , cm^{-1} : 2954, 2924, 2854 ($\nu_{\text{C-H}}$, aliphatic), 1644 ($\nu_{\text{C=O}}$, amide), 1494, 1461 ($\nu_{\text{C=C}}$, aromatic).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , ppm) : 2.42 (s, 3H), 3.46 (s, 3H), 6.95 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.08 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.18 (m, 2H), 7.25 (m, 1H), 7.30 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , ppm): 15.89, 38.56, 127.11, 127.36, 127.96, 128.83, 129.78, 135.99, 136.98, 142.15, 170.75.

HR-MS Calcd for $(\text{M}+\text{H})^+$ 258.0953
Found 258.0945

การเตรียม 4-Fluoro-*N*-methyl-*N*-(4-(methylthio)phenyl)benzamide (**10**)



ละลาย 4-Fluoro-*N*-(4-(methylthio)phenyl)benzamide (**2**) (400 mg, 1.53 mmol) ใน Dried *N,N*-Dimethylformamide (5 ml) เติม Sodium Hydride (60%, 92 mg, 2.30 mmol) ลงไปในสารละลาย พร้อมทั้ง Stir เพื่อให้สารผสมเข้ากัน จนกระทั่งไม่สามารถสังเกตเห็นฟองของแก๊ส Hydrogen เกิดขึ้นในสารผสม (เป็นเวลาประมาณ 30 นาที) จากนั้นจึงเติม Methyl Iodide (325 mg, 0.72 mmol) ลงไปและ Stir สารผสมที่ได้ที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง รอให้สารผสมเย็นลง แล้วจึงเท Reaction Mixture ลงในน้ำ 30 ml และนำสารผสมที่ได้มาทำการสกัดด้วย Ethyl Acetate ล้างชั้นสารละลาย Ethyl Acetate ที่ได้ด้วยน้ำและน้ำเกลืออ้อมตัวตามลำดับ ทำการดูดน้ำที่อาจจะหลงเหลืออยู่ในชั้นสารละลาย Ethyl Acetate ด้วย Anhydrous Sodium Sulfate แล้วทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกแบบลดความดัน จากนั้นนำสารผสมที่เหลื้อมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค Column Chromatography ผ่าน Silica Gel ที่มีตัวทำละลายผสมระหว่าง Ethyl Acetate และ *n*-Hexane ในสัดส่วน 1:3 เป็น Mobile Phase จะได้ 4-Fluoro-*N*-methyl-*N*-(4-(methylthio)phenyl)benzamide (**10**) ที่มีลักษณะเป็นของเหลวใส สีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 421 mg (quantitative)

IR (neat), ν_{max} , cm^{-1} : 3059 ($\nu_{\text{C-H}}$, aromatic), 2919, 2853 ($\nu_{\text{C-H}}$, aliphatic), 1645 ($\nu_{\text{C=O}}$, amide), 1600, 1493, 1462 ($\nu_{\text{C=C}}$, aromatic)

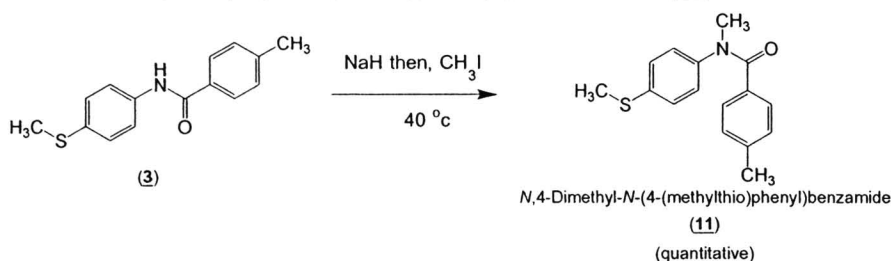
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , ppm) : 2.44 (s, 3H), 3.46 (s, 3H), 6.86 (dd, $J = 8.7$ and 8.7 Hz,

2H), 6.94 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.10 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H),
7.31 (dd, $J = 5.4$ and 8.7 Hz, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , ppm): 15.85, 38.67, 115.06 (d, $J = 22.3$ Hz), 127.17, 127.35,
131.21 (d, $J = 8.5$ Hz), 131.98 (d, $J = 3.5$ Hz), 137.32,
142.05, 163.39 (d, $J = 250.3$ Hz), 169.65.

HR-MS Calcd for $(\text{M}+\text{H})^+$ 276.0858
Found 276.0850

การเตรียม *N*,4-Dimethyl-*N*-(4-(methylthio)phenyl)benzamide (**11**)



ละลาย 4-Methyl-*N*-(4-(methylthio)phenyl)benzamide (**3**) (400 mg, 1.56 mmol) ใน Dried *N,N*-Dimethylformamide (5 ml) เติม Sodium Hydride (60%, 95 mg, 2.38 mmol) ลงไปในสารละลาย พร้อมทั้ง Stir เพื่อให้สารผสมเข้ากัน จนกระทั่งไม่สามารถสังเกตเห็นฟองของแก๊ส Hydrogen เกิดขึ้นในสารผสม (เป็นเวลาประมาณ 30 นาที) จากนั้นจึงเติม Methyl Iodide (330 mg, 2.32 mmol) ลงไปและ Stir สารผสมที่ได้ที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง รอให้สารผสมเย็นลง แล้วจึงเท Reaction Mixture ลงในน้ำ 30 ml และนำสารผสมที่ได้มาทำการสกัดด้วย Ethyl Acetate ล้างชั้นสารละลาย Ethyl Acetate ที่ได้ด้วยน้ำและน้ำเกลืออิ่มตัวตามลำดับ ทำการดูน้ำที่อาจจะหลงเหลืออยู่ในชั้นสารละลาย Ethyl Acetate ด้วย Anhydrous Sodium Sulfate แล้วทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกแบบลดความดัน จากนั้นนำสารผสมที่เหลือมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค Column Chromatography ผ่าน Silica Gel ที่มีตัวทำละลายผสมระหว่าง Ethyl Acetate และ *n*-Hexane ในสัดส่วน 1:3 เป็น Mobile Phase จะได้ *N*,4-Dimethyl-*N*-(4-(methylthio)phenyl)benzamide (**11**) ที่มีลักษณะเป็นของเหลวใส สีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 422 mg (quantitative)

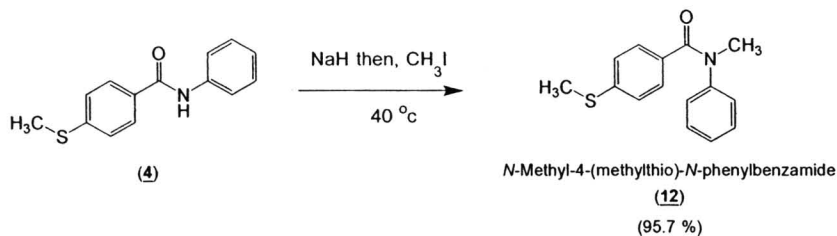
IR (neat), ν_{max} , cm^{-1} : 3025 ($\nu_{\text{C-H}}$, aromatic), 2919, 2852 ($\nu_{\text{C-H}}$, aliphatic),
1639 ($\nu_{\text{C=O}}$, amide), 1493 ($\nu_{\text{C=C}}$, aromatic).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , ppm) : 2.27 (s, 3H), 2.43 (s, 3H), 3.45 (s, 3H), 6.95 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 6.98 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.09 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.20 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , ppm): 15.94, 21.49, 38.65, 127.14, 127.34, 128.62, 129.01, 132.99,
136.76, 140.01, 142.47, 170.79.

HR-MS Calcd for $(\text{M}+\text{H})^+$ 272.1109
Found 272.1111

การเตรียม *N*-Methyl-4-(methylthio)-*N*-phenylbenzamide (**12**)



ละลาย 4-(Methylthio)-*N*-phenylbenzamide (**4**) (400 mg, 1.64 mmol) ใน Dried *N,N*-Dimethylformamide (5 ml) เติม Sodium Hydride (60%, 80 mg, 2.00 mmol) ลงไปในสารละลาย พร้อมทั้ง Stir เพื่อให้สารผสมเข้ากัน จนกระทั่งไม่สามารถสังเกตเห็นฟองของแก๊ส Hydrogen เกิดขึ้นในสารผสม (เป็นเวลาประมาณ 30 นาที) จากนั้นจึงเติม Methyl Iodide (300 mg, 2.11 mmol) ลงไปและ Stir สารผสมที่ได้ที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง รอให้สารผสมเย็นลง แล้วจึงเท Reaction Mixture ลงในน้ำ 30 ml และนำสารผสมที่ได้มาทำการสกัดด้วย Ethyl Acetate ล้างชั้นสารละลาย Ethyl Acetate ที่ได้ด้วยน้ำและน้ำเกลืออิมิตัวตามลำดับ ทำการดูดน้ำที่อาจจะหลงเหลืออยู่ในชั้นสารละลาย Ethyl Acetate ด้วย Anhydrous Sodium Sulfate แล้วทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกแบบลดความดัน จากนั้นนำสารผสมที่เหลือมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค Column Chromatography ผ่าน Silica Gel ที่มีตัวทำละลายผสมระหว่าง Ethyl Acetate และ *n*-Hexane ในสัดส่วน 1:3 เป็น Mobile Phase จะได้ *N*-Methyl-4-(methylthio)-*N*-phenylbenzamide (**12**) ที่มีลักษณะเป็นของเหลวใส สีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 405 mg (95.7 %)

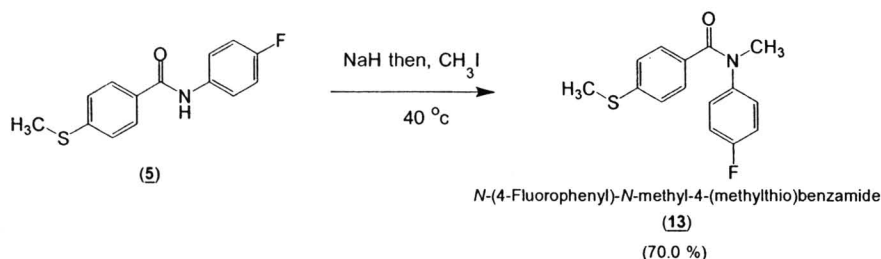
IR (neat), ν_{max} , cm^{-1} : 3059, 3030 ($\nu_{\text{C-H}}$, aromatic), 2918 ($\nu_{\text{C-H}}$, aliphatic), 1639 ($\nu_{\text{C=O}}$, amide), 1592, 1493 ($\nu_{\text{C=C}}$, aromatic).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , ppm) : 2.41 (s, 3H), 3.38 (s, 3H), 7.00 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.04 (m, 2H), 7.15 (m, 1H), 7.22 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.24 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , ppm): 14.99, 38.51, 124.78, 126.44, 126.82, 129.22, 129.39, 132.03, 141.08, 145.08, 170.04.

HR-MS Calcd for $(\text{M}+\text{H})^+$ 258.0953
Found 258.0956

การเตรียม *N*-(4-Fluorophenyl)-*N*-methyl-4-(methylthio)benzamide (**13**)



ละลาย *N*-(4-Fluorophenyl)-4-(methylthio)benzamide (**5**) (430 mg, 1.64 mmol) ใน Dried

N,N-Dimethylformamide (5 ml) เติม Sodium Hydride (60%, 97 mg, 2.42 mmol) ลงไปในสารละลาย พร้อมทั้ง Stir เพื่อให้สารผสมเข้ากัน จนกระทั่งไม่สามารถสังเกตเห็นฟองของแก๊ส Hydrogen เกิดขึ้นในสารผสม (เป็นเวลาประมาณ 30 นาที) จากนั้นจึงเติม Methyl Iodide (300 mg, 2.11 mmol) ลงไปและ Stir สารผสมที่ได้ที่อุณหภูมิ 40 °c เป็นเวลา 2 ชั่วโมง รอให้สารผสมเย็นลง แล้วจึงเท Reaction Mixture ลงในน้ำ 30 ml และนำสารผสมที่ได้มาทำการสกัดด้วย Ethyl Acetate ล้างชั้นสารละลาย Ethyl Acetate ที่ได้ด้วยน้ำและน้ำเกลืออ้อมตัวตามลำดับ ทำการดูดน้ำที่อาจจะหลงเหลืออยู่ในชั้นสารละลาย Ethyl Acetate ด้วย Anhydrous Sodium Sulfate แล้วทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกแบบลดความดัน จากนั้นนำสารผสมที่เหลือมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค Column Chromatography ผ่าน Silica Gel ที่มีตัวทำละลายผสมระหว่าง Ethyl Acetate และ *n*-Hexane ในสัดส่วน 1:5 เป็น Mobile Phase จะได้ *N*-(4-Fluorophenyl)-*N*-methyl-4-(methylthio)benzamide (13) ที่มีลักษณะเป็นของเหลวใส สีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 316 mg (70.0 %)

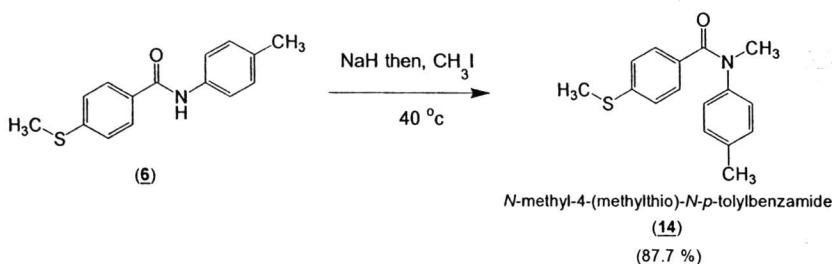
IR (neat), ν_{max} , cm^{-1} : 3064 ($\nu_{\text{C-H}}$, aromatic), 2919 ($\nu_{\text{C-H}}$, aliphatic), 1639 ($\nu_{\text{C=O}}$, amide), 1594, 1508 ($\nu_{\text{C=C}}$, aromatic)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , ppm) : 2.42 (s, 3H), 3.45 (s, 3H), 6.85 (dd, $J = 8.5$ and 8.5 Hz, 2H), 7.00 – 7.02 (m, 4H), 7.20 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H),

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , ppm): 14.96, 38.65, 116.15 (d, $J = 22.6$ Hz), 124.84, 128.44 (d, $J = 8.4$ Hz), 129.29, 131.75, 141.10, 141.21, 160.77 (d, $J = 247.0$ Hz), 170.06.

HR-MS Calcd for $(\text{M}+\text{H})^+$ 276.0858
Found 276.0856

การเตรียม *N*-methyl-4-(methylthio)-*N*-*p*-tolylbenzamide (14)

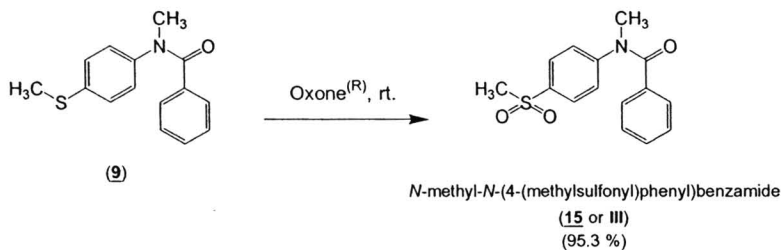


ละลาย 4-(Methylthio)-*N*-*p*-tolylbenzamide (6) (420 mg, 1.62 mmol) ใน Dried *N,N*-Dimethylformamide (5 ml) เติม Sodium Hydride (60%, 80 mg, 2.00 mmol) ลงไปในสารละลาย พร้อมทั้ง Stir เพื่อให้สารผสมเข้ากัน จนกระทั่งไม่สามารถสังเกตเห็นฟองของแก๊ส Hydrogen เกิดขึ้นในสารผสม (เป็นเวลาประมาณ 30 นาที) จากนั้นจึงเติม Methyl Iodide (300 mg, 2.11 mmol) ลงไปและ Stir สารผสมที่ได้ที่อุณหภูมิ 40 °c เป็นเวลา 2 ชั่วโมง รอให้สารผสมเย็นลง แล้วจึงเท Reaction Mixture ลงในน้ำ 30 ml และนำสารผสมที่ได้มาทำการสกัดด้วย Ethyl Acetate ล้างชั้นสารละลาย Ethyl Acetate ที่ได้ด้วยน้ำและน้ำเกลืออ้อมตัวตามลำดับ ทำการดูดน้ำที่อาจจะหลงเหลืออยู่ในชั้นสารละลาย Ethyl Acetate ด้วย Anhydrous Sodium Sulfate แล้วทำการระเหยเอาตัวทำละลาย

ออกแบบลดความดัน จากนั้นนำสารผสมที่เหลื้อมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค Column Chromatography ผ่าน Silica Gel ที่มีตัวทำละลายผสมระหว่าง Chloroform และ *n*-Hexane ใน สัดส่วน 1:2 เป็น Mobile Phase จะได้ *N*-methyl-4-(methylthio)-*N*-*p*-tolylbenzamide (**14**) ที่มี ลักษณะเป็นของเหลวใส สีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 389 mg (87.7 %)

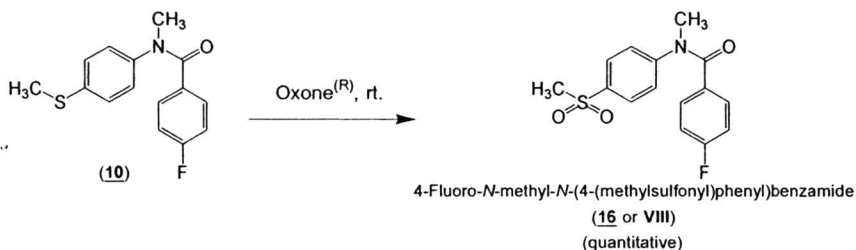
IR (neat), ν_{max} , cm^{-1} : 3025 ($\nu_{\text{C-H}}$, aromatic), 2919 ($\nu_{\text{C-H}}$, aliphatic), 1639 ($\nu_{\text{C=O}}$, amide), 1594, 1510 ($\nu_{\text{C=C}}$, aromatic).
 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , ppm) : 2.28 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 3.45 (s, 3H), 6.91 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 6.99 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.03 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.22 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H).
 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , ppm): 15.00, 20.92, 38.59, 124.77, 125.59, 129.36, 129.84, 132.21, 136.28, 140.86, 142.48, 170.03.
 HR-MS Calcd for $(\text{M}+\text{H})^+$ 272.1109
 Found 272.1107

การเตรียม *N*-methyl-*N*-(4-(methylsulfonyl)phenyl)benzamide (**15** or **III**)



ผสมสารละลาย *N*-Methyl-*N*-(4-(methylthio)phenyl)benzamide (**9**) (88 mg, 0.34 mmol) ใน methanol 5 ml) กับสารละลาย Oxone® (699 mg, 1.14 mmol ในน้ำ 5 ml) พร้อมทั้ง stir เพื่อให้ สารผสมเข้ากัน เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วจึงเท reaction mixture ลงในน้ำและนำสารผสมที่ได้มาทำ การสกัดด้วย ethyl acetate ล้างชั้นสารละลาย ethyl acetate ที่ได้ด้วยน้ำและน้ำเกลืออิ่มตัว ตามลำดับ ทำการดูดน้ำที่อาจจะหลงเหลืออยู่ในชั้นสารละลาย ethyl acetate ด้วย anhydrous sodium sulfate แล้วทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกแบบลดความดัน จะได้ *N*-methyl-*N*-(4-(methylsulfonyl)phenyl)benzamide (**15** or **III**) ที่มีลักษณะเป็นของเหลวใส ไม่มีสี น้ำหนัก 94 mg (95.3 %)

IR (neat), ν_{max} , cm^{-1} : 2923, 2854 ($\nu_{\text{C-H}}$, aliphatic), 1643 ($\nu_{\text{C=O}}$, amide), 1591, 1493 ($\nu_{\text{C=C}}$, aromatic), 1306, 1151 (δ_{SO_2} , sulfone).
 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, ppm) : 3.17 (s, 3H), 3.41 (s, 3H), 7.25-7.35 (m, 5H), 7.43 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.80 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H).
 $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, ppm): 37.90, 43.58, 127.48, 128.09, 128.28, 128.53, 130.21, 135.90, 138.10, 169.86.
 HR-MS Calcd for $(\text{M}+\text{H})^+$ 290.0851

การเตรียม 4-Fluoro-*N*-methyl-*N*-(4-(methylsulfonyl)phenyl)benzamide (**16**) or **VIII**)

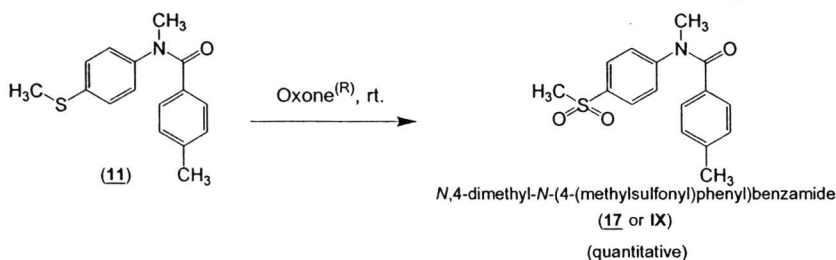
ผสมสารละลาย 4-Fluoro-*N*-methyl-*N*-(4-(methylthio)phenyl)benzamide (**10**) (209 mg, 0.76 mmol ใน methanol 10 ml) กับสารละลาย Oxone® (1405 mg, 2.29 mmol ในน้ำ 20 ml) พร้อมทั้ง stir เพื่อให้สารผสมเข้ากัน เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วจึงเท reaction mixture ลงในน้ำและนำสารผสมที่ได้มาทำการสกัดด้วย ethyl acetate ล้างชั้นสารละลาย ethyl acetate ที่ได้ด้วยน้ำและน้ำเกลืออิ่มตัวตามลำดับ ทำการดูดน้ำที่อาจจะหลงเหลืออยู่ในชั้นสารละลาย ethyl acetate ด้วย anhydrous sodium sulfate แล้วทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกแบบลดความดัน จะได้ตะกอนสีขาวของ 4-Fluoro-*N*-methyl-*N*-(4-(methylsulfonyl)phenyl)benzamide (**16**) or **VIII**) หนัก 234 mg (quantitative) และทำการตกผลึกซ้ำในสารละลายผสมระหว่าง Ethyl Acetate-*n*-Hexane

IR (KBr), ν_{max} , cm^{-1} : 3092, 3036 ($\nu_{\text{C-H}}$, aromatic), 2930 ($\nu_{\text{C-H}}$, aliphatic), 1662 ($\nu_{\text{C=O}}$, amide), 1594, 1502 ($\nu_{\text{C=C}}$, aromatic), 1295, 1149 (δ_{SO_2} , sulfone).

$^1\text{H-NMR}$ (Acetone- d_6 , ppm) : 3.09 (s, 3H), 3.50 (s, 3H), 7.03 (dd, $J = 8.9$ and 8.9 Hz, 2H), 7.41 (dd, $J = 5.4$ and 8.9 Hz, 2H), 7.44 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.47 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (Acetone- d_6 , ppm): 38.24, 44.29, 115.75 (d, $J = 22.0$ Hz), 128.15, 129.20, 132.15 (d, $J = 8.9$ Hz), 133.36 (d, $J = 2.7$ Hz), 139.52, 150.59, 164.22 (d, $J = 248.8$ Hz), 169.63.

HR-MS Calcd for $(\text{M}+\text{H})^+$ 308.0757
Found 308.0768

การเตรียม *N*,4-Dimethyl-*N*-(4-(methylsulfonyl)phenyl)benzamide (**17** or **IX**)

ผสมสารละลาย *N*,4-Dimethyl-*N*-(4-(methylthio)phenyl)benzamide (**11**) (203 mg,

0.75 mmol ใน methanol 10 ml) กับสารละลาย Oxone® (1380 mg, 2.24 mmol ในน้ำ 20 ml) พร้อมทั้ง stir เพื่อให้สารผสมเข้ากัน เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วจึงเท reaction mixture ลงในน้ำและนำสารผสมที่ได้มาทำการสกัดด้วย ethyl acetate ล้างชั้นสารละลาย ethyl acetate ที่ได้ด้วยน้ำและน้ำเกลืออิ่มตัวตามลำดับ ทำการดูดน้ำที่อาจจะหลงเหลืออยู่ในชั้นสารละลาย ethyl acetate ด้วย anhydrous sodium sulfate แล้วทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกแบบลดความดัน จะได้ตะกอนสีขาวของ *N*,4-Dimethyl-*N*-(4-(methylsulfonyl)phenyl)benzamide (**17** or **IX**) หนัก 227 mg (quantitative) และทำการตกผลึกซ้ำในสารละลายผสมระหว่าง Ethyl Acetate-*n*-Hexane

IR (KBr), ν_{max} , cm^{-1} : 3092, 3025 ($\nu_{\text{C-H}}$, aromatic), 2924 ($\nu_{\text{C-H}}$, aliphatic), 1656 ($\nu_{\text{C=O}}$, amide), 1592, 1493 ($\nu_{\text{C=C}}$, aromatic), 1295, 1150 (δ_{SO_2} , sulfone).

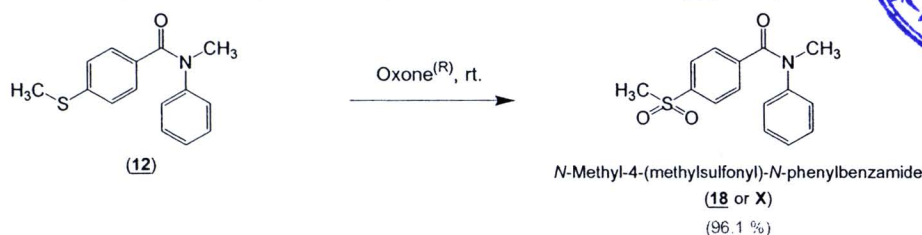
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , ppm) : 2.30 (s, 3H), 3.03 (s, 3H), 3.53 (s, 3H), 7.02 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.20 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.21 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.80 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 - d_6 , ppm): 15.94, 21.49, 38.65, 127.14, 127.34, 128.62, 129.01, 132.99, 136.76, 140.01, 142.47, 170.79.

HR-MS Calcd for $(\text{M}+\text{H})^+$ 304.1007
Found 304.1006



การเตรียม *N*-Methyl-4-(methylsulfonyl)-*N*-phenylbenzamide (**18** or **X**)

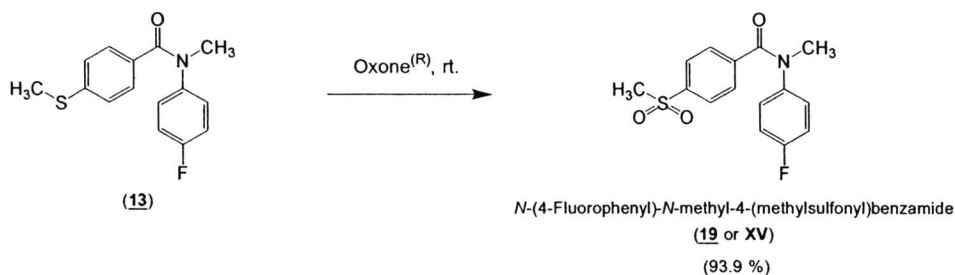


ผสมสารละลาย *N*-Methyl-4-(methylthio)-*N*-phenylbenzamide (**12**) (322 mg, 1.25 mmol ใน methanol 15 ml) กับสารละลาย Oxone® (2311 mg, 3.76 mmol ในน้ำ 15 ml) พร้อมทั้ง stir เพื่อให้สารผสมเข้ากัน เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วจึงเท reaction mixture ลงในน้ำและนำสารผสมที่ได้มาทำการสกัดด้วย ethyl acetate ล้างชั้นสารละลาย ethyl acetate ที่ได้ด้วยน้ำและน้ำเกลืออิ่มตัวตามลำดับ ทำการดูดน้ำที่อาจจะหลงเหลืออยู่ในชั้นสารละลาย ethyl acetate ด้วย anhydrous sodium sulfate แล้วทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกแบบลดความดัน จะได้ *N*-Methyl-4-(methylsulfonyl)-*N*-phenylbenzamide (**18** or **X**) ที่มีลักษณะเป็นของเหลวใส ไม่มีสี หนัก 348 mg (96.1 %)

IR (neat), ν_{max} , cm^{-1} : 3059, 3008 ($\nu_{\text{C-H}}$, aromatic), 2919 ($\nu_{\text{C-H}}$, aliphatic), 1645 ($\nu_{\text{C=O}}$, amide), 1591, 1493 ($\nu_{\text{C=C}}$, aromatic), 1312, 1152 (δ_{SO_2} , sulfone).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, ppm) : 3.16 (s, 3H), 3.38 (s, 3H), 7.16-7.29 (m, 5H),
7.50 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.77 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H).
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, ppm): 38.00, 43.33, 127.11, 127.88, 129.52, 129.90, 141.84,
142.09, 144.51, 168.98.
HR-MS Calcd for (M+H)⁺ 290.0851
Found 290.0847

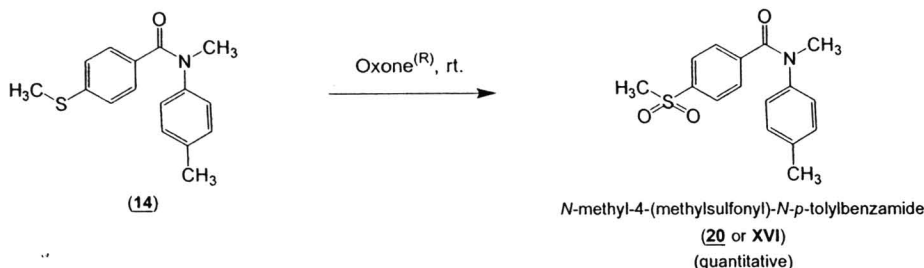
การเตรียม *N*-(4-Fluorophenyl)-*N*-methyl-4-(methylsulfonyl)benzamide (**19** or **XV**)



ผสมสารละลาย *N*-(4-Fluorophenyl)-*N*-methyl-4-(methylthio)benzamide (**13**) (275 mg, 1.00 mmol) ใน methanol 10 ml) กับสารละลาย Oxone® (1925 mg, 3.13 mmol ในน้ำ 20 ml) พร้อมทั้ง stir เพื่อให้สารผสมเข้ากัน เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วจึงเท reaction mixture ลงในน้ำและนำสารผสมที่ได้มาทำการสกัดด้วย ethyl acetate ล้างชั้นสารละลาย ethyl acetate ที่ได้ด้วยน้ำและน้ำเกลืออิมิตัวตามลำดับ ทำการดูดน้ำที่อาจจะหลงเหลืออยู่ในชั้นสารละลาย ethyl acetate ด้วย anhydrous sodium sulfate แล้วทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกแบบลดความดัน จะได้ตะกอนสีขาวของ *N*-(4-Fluorophenyl)-*N*-methyl-4-(methylsulfonyl)benzamide (**19** or **XV**) หนัก 288 mg (93.9 %) และทำการตกผลึกซ้ำในสารละลายผสมระหว่าง Ethyl Acetate-*n*-Hexane

IR (KBr), ν_{max} , cm⁻¹ : 3070, 3008 ($\nu_{\text{C-H}}$, aromatic), 2913 ($\nu_{\text{C-H}}$, aliphatic),
1636 ($\nu_{\text{C=O}}$, amide), 1594, 1510 ($\nu_{\text{C=C}}$, aromatic), , 1309,
1147 (δ_{SO_2} , sulfone).
¹H-NMR (Acetone-*d*₆, ppm) : 3.07 (s, 3H), 3.42 (s, 3H), 7.04 (dd, *J* = 8.7 and 8.7 Hz, 2H),
7.28 (dd, *J* = 5.0 and 8.7 Hz, 2H), 7.55 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H),
7.80 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H).
¹³C-NMR (Acetone-*d*₆, ppm): 37.38, 43.16, 115.90 (d, *J* = 22.9 Hz), 126.76, 129.03,
129.35 (d, *J* = 8.5 Hz), 140.67, 141.77, 141.75,
160.82 (d, *J* = 245.2 Hz), 168.18.
HR-MS Calcd for (M+H)⁺ 308.0757
Found 308.0764

การเตรียม *N*-methyl-4-(methylsulfonyl)-*N*-*p*-tolylbenzamide (**20** or **XVI**)



ผสมสารละลาย *N*-methyl-4-(methylthio)-*N*-*p*-tolylbenzamide (**14**) (270 mg, 0.99 mmol ใน methanol 10 ml) กับสารละลาย Oxone® (1925 mg, 3.13 mmol ในน้ำ 20 ml) พร้อมทั้ง stir เพื่อให้สารผสมเข้ากัน เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วจึงเท reaction mixture ลงในน้ำและนำสารผสมที่ได้มาทำการสกัดด้วย ethyl acetate ล้างชั้นสารละลาย ethyl acetate ที่ได้ด้วยน้ำและน้ำเกลืออิ่มตัวตามลำดับ ทำการดูดน้ำที่อาจจะหลงเหลืออยู่ในชั้นสารละลาย ethyl acetate ด้วย anhydrous sodium sulfate แล้วทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกแบบลดความดัน จะได้ตะกอนสีขาวของ *N*-methyl-4-(methylsulfonyl)-*N*-*p*-tolylbenzamide (**20** or **XVI**) หนัก 302 mg (quantitative) และทำการตกผลึกซ้ำในสารละลายผสมระหว่าง Ethyl Acetate-*n*-Hexane

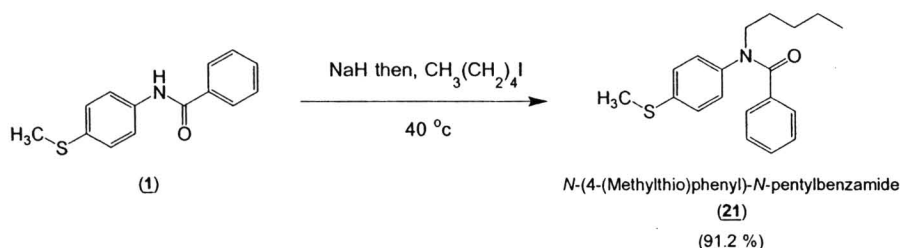
IR (KBr), ν_{max} , cm^{-1} : 3019 ($\nu_{\text{C-H}}$, aromatic), 2924 ($\nu_{\text{C-H}}$, aliphatic), 1645 ($\nu_{\text{C=O}}$, amide), 1605, 1513 ($\nu_{\text{C=C}}$, aromatic), , 13011, 1149 (δ_{SO_2} , sulfone).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , ppm) : 2.23 (s, 3H), 3.06 (s, 3H), 3.40 (s, 3H), 7.07 (s, 4H), 7.52 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.77 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 - d_6 , ppm): 19.94, 37.34, 43.16, 126.65, 127.05, 129.07, 129.77, 136.61, 141.60, 141.86, 142.00, 168.14.

HR-MS Calcd for $(\text{M}+\text{H})^+$ 304.1007
Found 304.1008

การเตรียม *N*-(4-(Methylthio)phenyl)-*N*-pentylbenzamide (**21**)



ละลาย *N*-(4-(Methylthio)phenyl)benzamide (**1**) (102 mg, 0.42 mmol) ใน Dried *N,N*-Dimethylformamide (2 ml) เติม Sodium Hydride (60%, 23 mg, 0.58 mmol) ลงไปในสารละลาย พร้อมทั้ง Stir เพื่อให้สารผสมเข้ากัน จนกระทั่งไม่สามารถสังเกตเห็นฟองของแก๊ส Hydrogen เกิดขึ้นในสารผสม (เป็นเวลาประมาณ 30 นาที) จากนั้นจึงเติม Iodopentane (130 mg, 0.66 mmol) ลงไป และ Stir สารผสมที่ได้ที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง รอให้สารผสมเย็นลง แล้วจึงเท Reaction

Mixture ลงในน้ำ 30 ml และนำสารผสมที่ได้มาทำการสกัดด้วย Ethyl Acetate ล้างชั้นสารละลาย Ethyl Acetate ที่ได้ด้วยน้ำและน้ำเกลืออิ่มตัวตามลำดับ ทำการดูดน้ำที่อาจจะหลงเหลืออยู่ในชั้นสารละลาย Ethyl Acetate ด้วย Anhydrous Sodium Sulfate แล้วทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกแบบลดความดัน จากนั้นนำสารผสมที่เหลือมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค Column Chromatography ผ่าน Silica Gel ที่มีตัวทำละลายผสมระหว่าง Ethyl acetate และ *n*-Hexane ในสัดส่วน 1:10 เป็น Mobile Phase จะได้ *N*-(4-(Methylthio)phenyl)-*N*-pentylbenzamide (**21**) ที่มีลักษณะเป็นของเหลวใส สีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 121 mg (91.2 %)

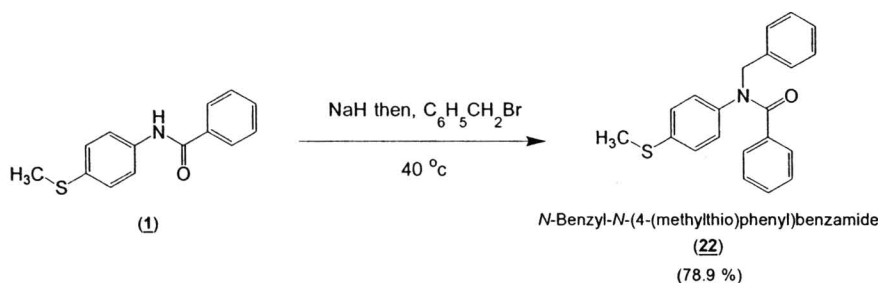
IR (neat), ν_{max} , cm^{-1} : 2927, 2854 ($\nu_{\text{C-H}}$, aliphatic), 1649 ($\nu_{\text{C=O}}$, amide), 1494, 1461 ($\nu_{\text{C=C}}$, aromatic).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , ppm) : 0.87 (*t*, $J = 6.9$ Hz, 2H), 1.27-1.34 (*m*, 4H), 1.58-1.65 (*m*, 2H), 2.42 (*s*, 3H), 3.87 (*t*, $J = 7.8$ Hz, 2H), 6.93 (*d*, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.08 (*d*, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.16 (*m*, 2H), 7.22 (*m*, 1H), 7.28 (*m*, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , ppm): 14.16, 15.84, 22.58, 27.51, 29.23, 50.61, 126.97, 127.91, 128.28, 128.75, 129.56, 136.51, 137.01, 140.71, 170.40.

HR-MS Calcd for $(\text{M}+\text{H})^+$ 314.1579
Found 314.1576

การเตรียม *N*-Benzyl-*N*-(4-(methylthio)phenyl)benzamide (**22**)



ละลาย *N*-(4-(Methylthio)phenyl)benzamide (**1**) (111 mg, 0.46 mmol) ใน Dried Dimethylformamide (2 ml) เติม Sodium Hydride (60%, 28 mg, 0.69 mmol) ลงไปในสารละลายพร้อมทั้ง Stir เพื่อให้สารผสมเข้ากัน จนกระทั่งไม่สามารถสังเกตเห็นฟองของแก๊ส Hydrogen เกิดขึ้นในสารผสม (เป็นเวลาประมาณ 30 นาที) จากนั้นจึงเติม Benzyl Bromide (157 mg, 0.92 mmol) ลงไปและ Stir สารผสมที่ได้ที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง รอให้สารผสมเย็นลง แล้วจึงเท Reaction Mixture ลงในน้ำ 30 ml และนำสารผสมที่ได้มาทำการสกัดด้วย Ethyl Acetate ล้างชั้นสารละลาย Ethyl Acetate ที่ได้ด้วยน้ำและน้ำเกลืออิ่มตัวตามลำดับ ทำการดูดน้ำที่อาจจะหลงเหลืออยู่ในชั้นสารละลาย Ethyl Acetate ด้วย Anhydrous Sodium Sulfate แล้วทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกแบบลดความดัน จากนั้นนำสารผสมที่เหลือมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค Column Chromatography ผ่าน Silica Gel ที่มีตัวทำละลายผสมระหว่าง Ethyl Acetate และ *n*-Hexane ใน

สัดส่วน 1:4 เป็น Mobile Phase จะได้ *N*-Benzyl-*N*-(4-(methylthio)phenyl)benzamide (**22**) ที่มีลักษณะเป็นของเหลวใส สีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 120 mg (78.9 %)

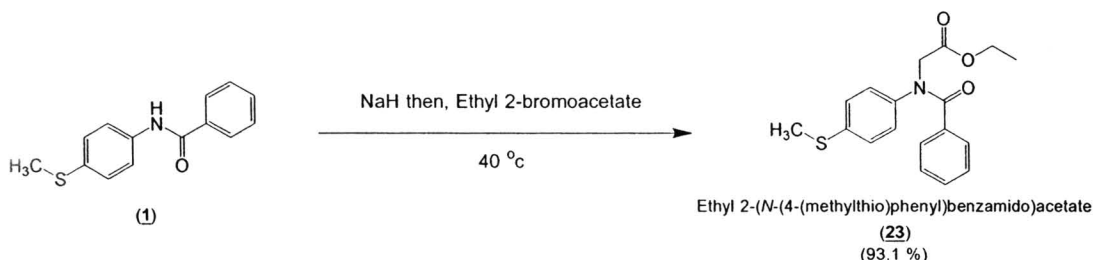
IR (neat), ν_{max} , cm^{-1} : 2953, 2924, 2854 ($\nu_{\text{C-H}}$, aliphatic), 1644 ($\nu_{\text{C=O}}$, amide), 1494, 1455 ($\nu_{\text{C=C}}$, aromatic).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , ppm) : 2.39 (s, 3H), 5.10 (s, 2H), 6.81 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 6.99 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.16-7.38 (m, 10H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , ppm): 15.54, 53.82, 126.60, 127.37, 127.78, 128.01, 128.41, 128.47, 128.70, 129.64, 135.89, 137.01, 137.46, 140.47, 170.46.

HR-MS Calcd for $(\text{M}+\text{H})^+$ 334.1266
Found 334.1266

การเตรียม Ethyl 2-(*N*-(4-(methylthio)phenyl)benzamido)acetate (**23**)



ละลาย *N*-(4-(Methylthio)phenyl)benzamide (**1**) (257 mg, 1.06 mmol) ใน Dried *N,N*-Dimethylformamide (2 ml) เติม Sodium Hydride (60%, 64 mg, 1.60 mmol) ลงไปในสารละลาย พร้อมทั้ง Stir เพื่อให้สารผสมเข้ากัน จนกระทั่งไม่สามารถสังเกตเห็นฟองของแก๊ส Hydrogen เกิดขึ้นในสารผสม (เป็นเวลาประมาณ 30 นาที) จากนั้นจึงเติม Ethyl 2-Bromoacetate (271 mg, 1.62 mmol) ลงไปและ Stir สารผสมที่ได้ที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง รอให้สารผสมเย็นลง แล้วจึงเท Reaction Mixture ลงในน้ำ 30 ml และนำสารผสมที่ได้มาทำการสกัดด้วย Ethyl Acetate ล้างชั้นสารละลาย Ethyl Acetate ที่ได้ด้วยน้ำและน้ำเกลืออิมิตัวตามลำดับ ทำการดูดน้ำที่อาจจะหลงเหลืออยู่ในชั้นสารละลาย Ethyl Acetate ด้วย Anhydrous Sodium Sulfate แล้วทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกแบบลดความดัน จากนั้นนำสารผสมที่เหลือมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค Column Chromatography ผ่าน Silica Gel ที่มีตัวทำละลายผสมระหว่าง Dichloromethane และ *n*-Hexane ในสัดส่วน 1:2 เป็น Mobile Phase จะได้ Ethyl 2-(*N*-(4-(methylthio)phenyl)benzamido)acetate (**23**) ที่มีลักษณะเป็นของเหลวใส สีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 240 mg (91.3 %)

IR (neat), ν_{max} , cm^{-1} : 2954, 2924, 2854 ($\nu_{\text{C-H}}$, aliphatic), 1746 ($\nu_{\text{C=O}}$, ester), 1651 ($\nu_{\text{C=O}}$, amide), 1495 ($\nu_{\text{C=C}}$, aromatic).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , ppm) : 1.29 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 2.42 (s, 3H), 4.23 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 4.56 (s, 2H), 7.05 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.08 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H),

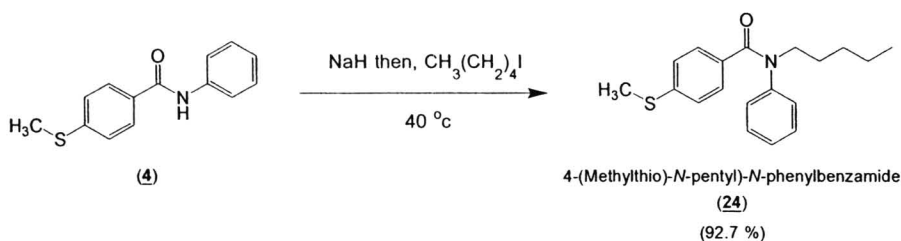
7.19 (m, 2H), 7.27 (m, 1H), 7.35 (m, 2H).

¹³C-NMR (CDCl₃, ppm): 14.14, 15.61, 52.28, 61.33, 126.79, 127.80, 128.79, 129.94, 130.62, 134.98, 137.45, 140.75, 161.01, 172.62.

HR-MS Calcd for (M+H)⁺ 330.1164

Found 330.1165

การเตรียม 4-(Methylthio)-N-pentyl)-N-phenylbenzamide (24)



ละลาย 4-(Methylthio)-N-phenylbenzamide (4) (400 mg, 1.64 mmol) ใน Dried N,N-Dimethylformamide (5 ml) เติม Sodium Hydride (60%, 80 mg, 2.00 mmol) ลงไปในสารละลาย พร้อมทั้ง Stir เพื่อให้สารผสมเข้ากัน จนกระทั่งไม่สามารถสังเกตเห็นฟองของแก๊ส Hydrogen เกิดขึ้นในสารผสม (เป็นเวลาประมาณ 30 นาที) จากนั้นจึงเติม Iodopentane (400 mg, 2.02 mmol) ลงไป และ Stir สารผสมที่ได้ที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง รอให้สารผสมเย็นลง แล้วจึงเท Reaction Mixture ลงในน้ำ 30 ml และนำสารผสมที่ได้มาทำการสกัดด้วย Ethyl Acetate ล้างชั้นสารละลาย Ethyl Acetate ที่ได้ด้วยน้ำและน้ำเกลืออิ่มตัวตามลำดับ ทำการดูดน้ำที่อาจจะหลงเหลืออยู่ในชั้นสารละลาย Ethyl Acetate ด้วย Anhydrous Sodium Sulfate แล้วทำการระเหยเอาตัวทำละลาย ออกแบบลดความดัน จากนั้นนำสารผสมที่เหลือมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค Column Chromatography ผ่าน Silica Gel ที่มีตัวทำละลายผสมระหว่าง Ethyl acetate และ n-Hexane ใน สัดส่วน 1:8 เป็น Mobile Phase จะได้ 4-(Methylthio)-N-pentyl)-N-phenylbenzamide (24) ที่มี ลักษณะเป็นของเหลวใส สีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 478 mg (92.7 %)

IR (neat), ν_{max} , cm⁻¹ : 3059, 3036 ($\nu_{\text{C-H}}$, aromatic), 2952, 2918, 2857 ($\nu_{\text{C-H}}$, aliphatic), 1639 ($\nu_{\text{C=O}}$, amide), 1594, 1491 ($\nu_{\text{C=C}}$, aromatic).

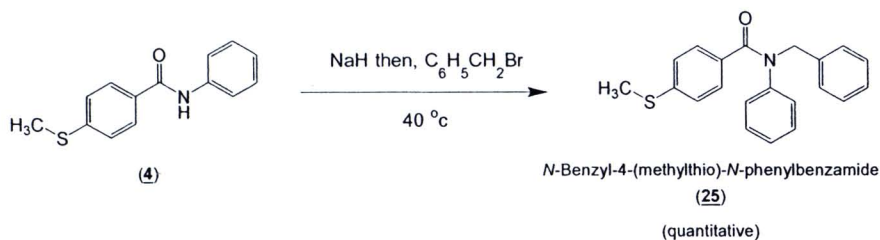
¹H-NMR (CDCl₃, ppm) : 0.87 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 1.31 (m, 4H), 1.62 (m, 2H), 2.40 (s, 3H), 3.89 (m, 2H), 6.98 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.02 (m, 2H), 7.15 (m, 1H), 7.20 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.23 (m, 2H).

¹³C-NMR (CDCl₃, ppm): 13.97, 15.30, 22.40, 27.33, 29.09, 50.62, 124.79, 126.49, 127.69, 129.13, 129.32, 132.60, 140.75, 143.71, 169.63.

HR-MS Calcd for (M+H)⁺ 314.1579

Found 314.1576

การเตรียม *N*-Benzyl-4-(methylthio)-*N*-phenylbenzamide (**25**)



ละลาย 4-(Methylthio)-*N*-phenylbenzamide (**4**) (200 mg, 0.82 mmol) ใน Dried Dimethylformamide (2 ml) เติม Sodium Hydride (60%, 40 mg, 1.00 mmol) ลงไปในสารละลาย พร้อมทั้ง Stir เพื่อให้สารผสมเข้ากัน จนกระทั่งไม่สามารถสังเกตเห็นฟองของแก๊ส Hydrogen เกิดขึ้นในสารผสม (เป็นเวลาประมาณ 30 นาที) จากนั้นจึงเติม Benzyl Bromide (200 mg, 1.17 mmol) ลงไปและ Stir สารผสมที่ได้ที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง รอให้สารผสมเย็นลง แล้วจึงเท Reaction Mixture ลงในน้ำ 30 ml และนำสารผสมที่ได้มาทำการสกัดด้วย Ethyl Acetate ล้างชั้นสารละลาย Ethyl Acetate ที่ได้ด้วยน้ำและน้ำเกลืออิมิตัวตามลำดับ ทำการดูดน้ำที่อาจจะหลงเหลืออยู่ในชั้นสารละลาย Ethyl Acetate ด้วย Anhydrous Sodium Sulfate แล้วทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกแบบลดความดัน จากนั้นนำสารผสมที่เหลือมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค Column Chromatography ผ่าน Silica Gel ที่มีตัวทำละลายผสมระหว่าง Ethyl Acetate และ *n*-Hexane ในสัดส่วน 1:3 เป็น Mobile Phase จะได้ *N*-Benzyl-4-(methylthio)-*N*-phenylbenzamide (**25**) ที่มีลักษณะเป็นของเหลวใส สีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 245 (quantitative)

IR (neat), ν_{max} , cm^{-1} : 3059, 3025 ($\nu_{\text{C-H}}$, aromatic), 2919, ($\nu_{\text{C-H}}$, aliphatic), 1639 ($\nu_{\text{C=O}}$, amide), 1592, 1493 ($\nu_{\text{C=C}}$, aromatic).

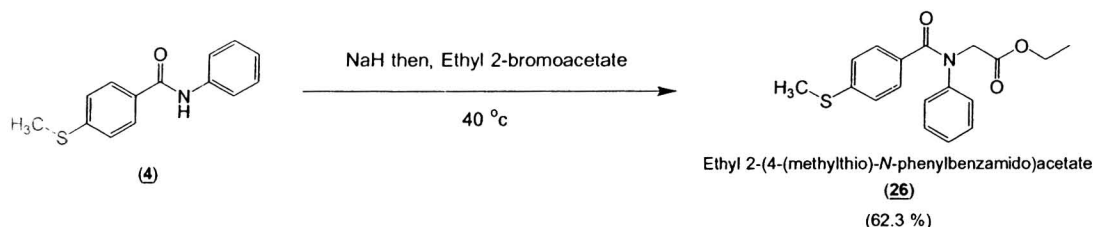
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , ppm) : 2.41 (s, 3H), 5.12 (s, 2H), 6.90-6.92 (m, 2H), 6.99 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.09-7.12 (m, 1H), 7.14-7.18 (m, 2H), 7.22-7.26 (m, 3H), 7.26 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.27-7.31 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , ppm): 14.98, 53.99, 124.76, 126.60, 127.30, 127.59, 128.37, 128.42, 129.07, 129.46, 132.08, 137.57, 141.18, 143.71, 169.89.

HR-MS Calcd for $(\text{M}+\text{H})^+$ 334.1266
Found 334.1263



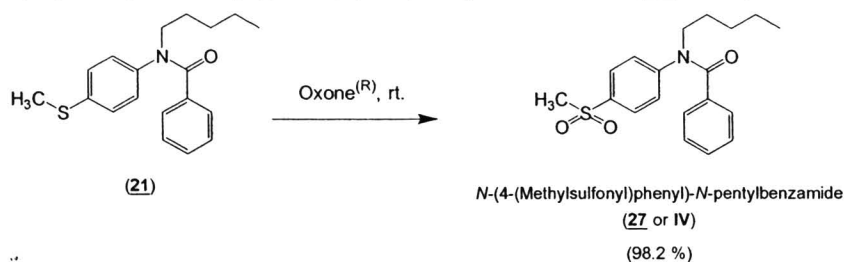
การเตรียม Ethyl 2-(4-(methylthio)-N-phenylbenzamido)acetate (**26**)



ละลาย 4-(Methylthio)-N-phenylbenzamide (**4**) (400 mg, 1.64 mmol) ใน Dried *N,N*-Dimethylformamide (5 ml) เติม Sodium Hydride (60%, 80 mg, 2.00 mmol) ลงไปในสารละลายพร้อมทั้ง Stir เพื่อให้สารผสมเข้ากัน จนกระทั่งไม่สามารถสังเกตเห็นฟองของแก๊ส Hydrogen เกิดขึ้นในสารผสม (เป็นเวลาประมาณ 30 นาที) จากนั้นจึงเติม Ethyl 2-Bromoacetate (340 mg, 2.04 mmol) ลงไปและ Stir สารผสมที่ได้ที่อุณหภูมิ 40 °c เป็นเวลา 2 ชั่วโมง รอให้สารผสมเย็นลง แล้วจึงเท Reaction Mixture ลงในน้ำ 30 ml และนำสารผสมที่ได้มาทำการสกัดด้วย Ethyl Acetate ล้างชั้นสารละลาย Ethyl Acetate ที่ได้ด้วยน้ำและน้ำเกลืออิ่มตัวตามลำดับ ทำการดูดน้ำที่อาจจะหลงเหลืออยู่ในชั้นสารละลาย Ethyl Acetate ด้วย Anhydrous Sodium Sulfate แล้วทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกแบบลดความดัน จากนั้นนำสารผสมที่เหลือมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค Column Chromatography ผ่าน Silica Gel ที่มีตัวทำละลายผสมระหว่าง Dichloromethane และ *n*-Hexane ในสัดส่วน 1:6 เป็น Mobile Phase จะได้ Ethyl 2-(4-(methylthio)-N-phenylbenzamido)acetate (**26**) ที่มีลักษณะเป็นของเหลวใส สีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 338 mg (62.3 %)

IR (neat), ν_{max} , cm^{-1} :	3059 ($\nu_{\text{C-H}}$, aromatic), 2990, 2924, ($\nu_{\text{C-H}}$, aliphatic),
	1745 ($\nu_{\text{C=O}}$, ester), 1644 ($\nu_{\text{C=O}}$, amide),
	1594, 1373 ($\nu_{\text{C=C}}$, aromatic).
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , ppm) :	1.29 (t, $J = 7.1\text{ Hz}$, 3H), 2.41 (s, 3H),
	4.23 (q, $J = 7.1\text{ Hz}$, 2H), 4.58 (s, 2H),
	7.00 (d, $J = 8.5\text{ Hz}$, 2H), 7.14 (m, 1H), 7.18 (m, 2H),
	7.24 (m, 2H), 7.26 (d, $J = 8.5\text{ Hz}$, 2H),
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , ppm):	14.13, 14.92, 52.54, 61.29, 124.71, 126.88, 127.36, 129.24,
	129.51, 131.11, 141.61, 143.97, 169.07, 170.04.
HR-MS	Calcd for $(\text{M}+\text{H})^+$ 330.1164
	Found 330.1169

การเตรียม *N*-(4-(Methylsulfonyl)phenyl)-*N*-pentylbenzamide (**27** or **IV**)



ผสมสารละลาย *N*-(4-(Methylthio)phenyl)-*N*-pentylbenzamide (**21**) (72 mg, 0.23 mmol) ใน Methanol 5 ml) กับสารละลาย Oxone® (708 mg, 1.15 mmol ในน้ำ 5 ml) พร้อมทั้ง Stir เพื่อให้สารผสมเข้ากัน เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วจึงเท Reaction Mixture ลงในน้ำและนำสารผสมที่ได้มาทำการสกัดด้วย Ethyl Acetate ล้างชั้นสารละลาย Ethyl Acetate ที่ได้ด้วยน้ำและน้ำเกลืออิ่มตัวตามลำดับ ทำการดูดน้ำที่อาจจะหลงเหลืออยู่ในชั้นสารละลาย Ethyl Acetate ด้วย Anhydrous Sodium Sulfate แล้วทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกแบบลดความดัน จะได้ *N*-(4-(Methylsulfonyl)phenyl)-*N*-pentylbenzamide (**27** or **IV**) ที่มีลักษณะเป็นของเหลวใส ไม่มีสี น้ำหนัก 78 mg (98.2 %)

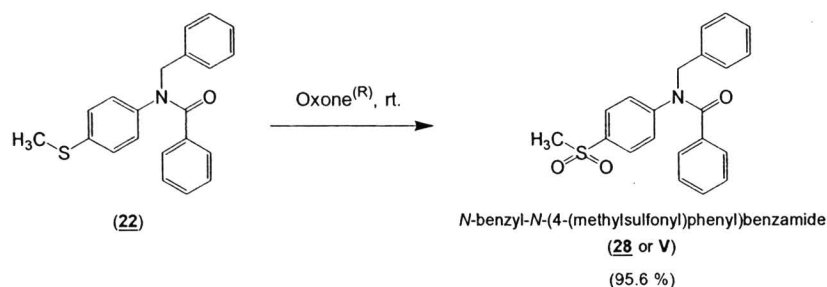
IR (neat), ν_{max} , cm^{-1} : 2954, 2924, 2854 ($\nu_{\text{C-H}}$, aliphatic), 1649 ($\nu_{\text{C=O}}$, amide), 1591, 1492 ($\nu_{\text{C=C}}$, aromatic), 1460, 1377 ($\delta_{\text{C-H}}$), 1311, 1152 (δ_{SO_2} , sulfone).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , ppm) : 0.82 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H), 1.23 (m, 4H), 1.49 (m, 2H), 3.18 (s, 3H), 3.87 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.23-7.32 (m, 5H), 7.40 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.93 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , ppm) : 14.08, 22.01, 24.12, 28.50, 43.52, 49.60, 128.12, 128.22, 128.39, 128.50, 130.08, 136.15, 138.36, 147.81, 169.61.

HR-MS Calcd for $(\text{M}+\text{H})^+$ 346.1477
Found 346.1487

การเตรียม *N*-Benzyl-*N*-(4-(methylsulfonyl)phenyl)benzamide (**27** or **V**)

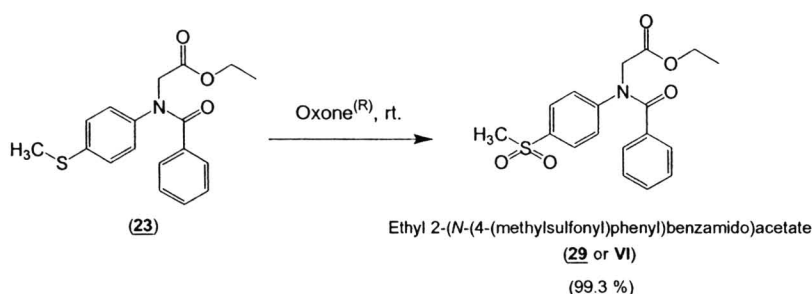


ผสมสารละลาย *N*-Benzyl-*N*-(4-(methylthio)phenyl)benzamide (**22**) (115 mg, 0.47 mmol) ใน Methanol 15 ml) กับสารละลาย Oxone® (1400 mg, 2.36 mmol ในน้ำ 15 ml) พร้อมทั้ง Stir เพื่อให้สารผสมเข้ากัน เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วจึงเท reaction mixture ลงในน้ำและนำสารผสมที่

ได้มาทำการสกัดด้วย Ethyl Acetate ล้างชั้นสารละลาย Ethyl Acetate ที่ได้ด้วยน้ำและน้ำเกลืออิ่มตัวตามลำดับ ทำการดูดน้ำที่อาจจะหลงเหลืออยู่ในชั้นสารละลาย Ethyl Acetate ด้วย Anhydrous Sodium Sulfate แล้วทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกแบบลดความดัน จะได้ตะกอนสีขาวของ *N*-Benzyl-*N*-(4-(methylsulfonyl)phenyl)benzamide (**27** or **V**) หนัก 78 mg (98.2 %) เมื่อทำการตกผลึกซ้ำในสารละลายผสมระหว่าง ethyl acetate-*n*-Hexane จะมีจุดหลอมเหลว 152-155 °C

IR (neat), ν_{max} , cm^{-1} : 3055 ($\nu_{\text{C-H}}$, aromatic), 2926 ($\nu_{\text{C-H}}$, aliphatic),
1648 ($\nu_{\text{C=O}}$, amide), 1587, 1496 ($\nu_{\text{C=C}}$, aromatic),
1300, 1149 (δ_{SO_2} , sulfone).
 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , ppm) : 3.13 (s, 3H), 5.18 (s, 2H), 7.21-7.37 (m, 10H),
7.35 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.72 (d, J = 8.7 Hz, 2H)
 $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , ppm) : 43.44, 52.70, 127.46, 127.71, 127.99, 128.03, 128.32,
128.75, 130.42, 135.67, 137.30, 138.23, 147.65, 170.12.
HR-MS Calcd for (M+H) $^+$ 366.1164
Found 366.1168

การเตรียม Ethyl 2-(*N*-(4-(methylsulfonyl)phenyl)benzamido)acetate (**29** or **VI**)



ผสมสารละลาย 2-(*N*-(4-(Methylthio)phenyl)benzamido)acetate (**23**) (210 mg, 0.64 mmol ใน Methanol 15 ml) กับสารละลาย Oxone® (2400 mg, 2.36 mmol ในน้ำ 15 ml) พร้อมทั้ง Stir เพื่อให้สารผสมเข้ากัน เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วจึงเท Reaction Mixture ลงในน้ำและนำสารผสมที่ได้มาทำการสกัดด้วย Ethyl Acetate ล้างชั้นสารละลาย Ethyl Acetate ที่ได้ด้วยน้ำและน้ำเกลืออิ่มตัวตามลำดับ ทำการดูดน้ำที่อาจจะหลงเหลืออยู่ในชั้นสารละลาย Ethyl Acetate ด้วย Anhydrous Sodium Sulfate แล้วทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกแบบลดความดัน จะได้ Ethyl 2-(*N*-(4-(methylsulfonyl)phenyl)benzamido)acetate (**29** or **VI**) ที่มีลักษณะเป็นของเหลวใส ไม่มีสี หนัก 229 mg (99.3 %)

IR (neat), ν_{max} , cm^{-1} : 2954, 2925, 2854, ($\nu_{\text{C-H}}$, aliphatic), 1744 ($\nu_{\text{C=O}}$, ester),
1656 ($\nu_{\text{C=O}}$, amide), 1592, 1493 ($\nu_{\text{C=C}}$, aromatic),
1311, 1151 (δ_{SO_2} , sulfone).
 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , ppm) : 1.19 (t, J = 7.3 Hz), 3.17 (s, 3H), 4.14 (q, J = 7.3 Hz, 2H),
4.65 (s, 2H), 7.28-7.30 (m, 4H), 7.33-7.36 (m, 1H),

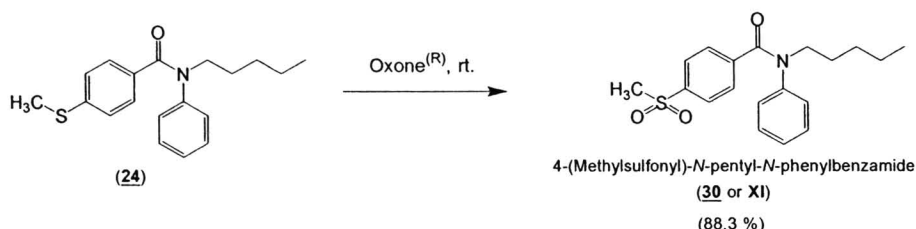
7.38 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.80 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , ppm) : 14.25, 43.53, 51.81, 61.14, 127.94, 128.09, 128.41, 128.70, 136.70, 134.89, 138.45, 148.05, 169.08, 170.01.

HR-MS Calcd for (M+H) $^+$ 362.1062

Found 362.1047

การเตรียม 4-(Methylsulfonyl)-*N*-pentyl-*N*-phenylbenzamide (**30** or **XI**)



ผสมสารละลาย 4-(Methylthio)-*N*-pentyl-*N*-phenylbenzamide (**24**) (418 mg, 1.33 mmol) ใน Methanol 15 ml) กับสารละลาย Oxone[®] (2460 mg, 4.00 mmol ในน้ำ 15 ml) พร้อมทั้ง Stir เพื่อให้สารผสมเข้ากัน เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วจึงเท Reaction Mixture ลงในน้ำและนำสารผสมที่ได้มาทำการสกัดด้วย Ethyl Acetate ล้างชั้นสารละลาย Ethyl Acetate ที่ได้ด้วยน้ำและน้ำเกลืออิ่มตัวตามลำดับ ทำการดูดน้ำที่อาจจะหลงเหลืออยู่ในชั้นสารละลาย Ethyl Acetate ด้วย Anhydrous Sodium Sulfate แล้วทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกแบบลดความดัน จะได้ 4-(Methylsulfonyl)-*N*-pentyl-*N*-phenylbenzamide (**30** or **XI**) ที่มีลักษณะเป็นของเหลวใส ไม่มีสี น้ำหนัก 407 mg (88.3 %)

IR (neat), ν_{max} , cm^{-1} : 3059, 3008 ($\nu_{\text{C-H}}$, aromatic), 2952, 2930, 2863 ($\nu_{\text{C-H}}$, aliphatic), 1645 ($\nu_{\text{C=O}}$, amide), 1594, 1494 ($\nu_{\text{C=C}}$, aromatic), 1315, 1150 (δ_{SO_2} , sulfone).

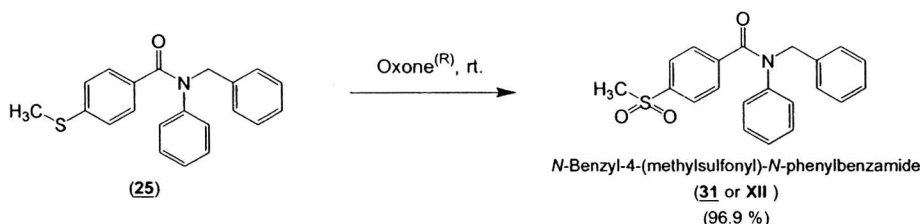
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , ppm) : 0.83 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.26 (m, 4H), 1.50 (m, 2H), 3.15 (s, 3H), 3.83 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.18-7.19 (m, 3H), 7.26-7.29 (m, 2H), 7.48 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.75 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , ppm) : 13.79, 21.82, 26.73, 28.44, 43.33, 49.43, 127.09, 127.77, 128.80, 129.43, 129.90, 141.70, 142.40, 142.85, 168.82.

HR-MS Calcd for (M+H) $^+$ 346.1477

Found 346.1476

การเตรียม ***N*-Benzyl-4-(methylsulfonyl)-*N*-phenylbenzamide (31 or XII)**



ผสมสารละลาย *N*-Benzyl-4-(methylthio)-*N*-phenylbenzamide (**25**) (240 mg, 0.72 mmol ใน Methanol 15 ml) กับสารละลาย Oxone® (1386 mg, 2.25 mmol ในน้ำ 15 ml) พร้อมทั้ง Stir เพื่อให้สารผสมเข้ากัน เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วจึงเท reaction mixture ลงในน้ำและนำสารผสมที่ได้มาทำการสกัดด้วย Ethyl Acetate ล้างชั้นสารละลาย Ethyl Acetate ที่ได้ด้วยน้ำและน้ำเกลืออิ่มตัวตามลำดับ ทำการดูดน้ำที่อาจจะหลงเหลืออยู่ในชั้นสารละลาย Ethyl Acetate ด้วย Anhydrous Sodium Sulfate แล้วทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกแบบลดความดัน จะได้ *N*-Benzyl-4-(methylsulfonyl)-*N*-phenylbenzamide (**31** or **XII**) ที่มีลักษณะเป็นของเหลวใส ไม่มีสี น้ำหนัก 255 mg (96.9 %)

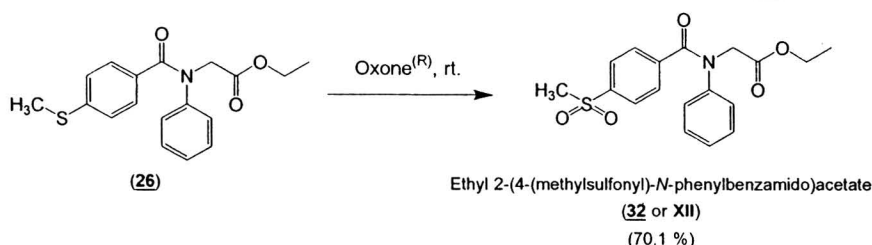
IR (neat), ν_{max} , cm^{-1} : 3059, 3031 ($\nu_{\text{C-H}}$, aromatic), 2919 ($\nu_{\text{C-H}}$, aliphatic), 1645 ($\nu_{\text{C=O}}$, amide), 1594, 1494 ($\nu_{\text{C=C}}$, aromatic), 1315, 1144 (δ_{SO_2} , sulfone).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , ppm) : 3.16 (s, 3H), 5.11 (s, 2H), 7.08-7.32 (m, 10H), 7.57 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.77 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , ppm) : 43.32, 52.94, 127.15, 127.71, 127.89, 128.57, 128.59, 129.09, 129.64, 129.76, 137.77, 141.93, 141.94, 142.75, 169.29.

HR-MS Calcd for $(\text{M}+\text{H})^+$ 366.1164
Found 366.1172

การเตรียม ***Ethyl* 2-(4-(methylsulfonyl)-*N*-phenylbenzamido)acetate (32 or XII)**



ผสมสารละลาย *Ethyl* 2-(4-(methylthio)-*N*-phenylbenzamido)acetate (**26**) (268 mg, 0.81 mmol ใน Methanol 15 ml) กับสารละลาย Oxone® (1508 mg, 2.45 mmol ในน้ำ 15 ml) พร้อมทั้ง Stir เพื่อให้สารผสมเข้ากัน เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วจึงเท Reaction Mixture ลงในน้ำและนำสารผสมที่ได้มาทำการสกัดด้วย Ethyl Acetate ล้างชั้นสารละลาย Ethyl Acetate ที่ได้ด้วยน้ำและน้ำเกลืออิ่มตัว

ตามลำดับ ทำการดูดน้ำที่อาจจะหลงเหลืออยู่ในชั้นสารละลาย Ethyl Acetate ด้วย Anhydrous Sodium Sulfate แล้วทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกแบบลดความดัน จะได้ตะกอนสีขาวของ Ethyl 2-(4-(methylsulfonyl)-*N*-phenylbenzamido)acetate (**32** or **XII**) หนัก 206 mg (70.1 %) และเมื่อทำการการตกผลึกซ้ำในสารละลายผสมระหว่าง ethyl acetate-*n*-Hexane จะมีจุดหลอมเหลว 138-140 °C

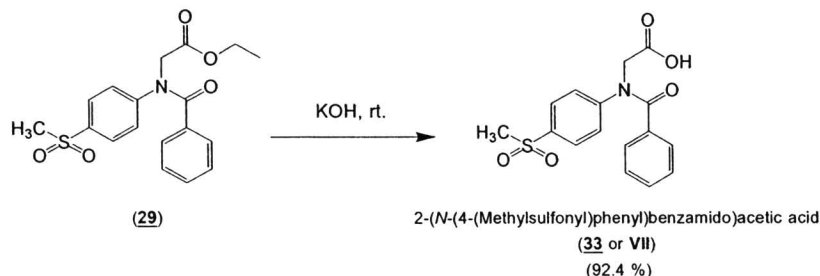
IR (neat), ν_{max} , cm^{-1} : 3048, 3003 ($\nu_{\text{C-H}}$, aromatic), 2980, 2918 ($\nu_{\text{C-H}}$, aliphatic), 1751 ($\nu_{\text{C=O}}$, ester), 1642 ($\nu_{\text{C=O}}$, amide), 1594, 1494 ($\nu_{\text{C=C}}$, aromatic), 1309, 1150 (δ_{SO_2} , sulfone).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , ppm) : 1.21 (t, $J = 7.0$ Hz), 3.16 (s, 3H), 4.15 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H), 4.60 (s, 2H), 7.18-7.29 (m, 5H), 7.50 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.79 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , ppm) : 14.25, 43.30, 51.99, 61.13, 127.27, 127.91, 128.19, 129.63, 129.87, 140.07, 142.27, 143.39, 169.27, 169.61.

HR-MS Calcd for $(\text{M}+\text{H})^+$ 362.1062
Found 362.1071

การเตรียม 2-(*N*-(4-(Methylsulfonyl)phenyl)benzamido)acetic acid (**33** or **VII**)



ผสมสารละลาย ethyl 2-(*N*-(4-(Methylsulfonyl)phenyl)benzamido)acetate (**29**) (135 mg, 0.38 mmol) ใน Ethanol 5 ml) กับสารละลาย 40 % KOH (2 หยด) พร้อมทั้ง Stir เพื่อให้สารผสมเข้ากัน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงเท Reaction Mixture ลงในน้ำและนำสารผสมที่ได้มาทำการสกัดด้วย Ethyl Acetate ล้างชั้นสารละลาย Ethyl Acetate ที่ได้ด้วยน้ำและน้ำเกลืออิมิตัวตามลำดับ ทำการดูดน้ำที่อาจจะหลงเหลืออยู่ในชั้นสารละลาย Ethyl Acetate ด้วย Anhydrous Sodium Sulfate แล้วทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกแบบลดความดัน จะได้ตะกอนสีขาวของ 2-(*N*-(4-(Methylsulfonyl)phenyl)benzamido)acetic acid (**33** or **VII**) หนัก 115 mg (92.4 %) เมื่อทำการตกผลึกซ้ำในสารละลายผสมระหว่าง methanol-น้ำ จะมีจุดหลอมเหลว 214-216 °C

IR (neat), ν_{max} , cm^{-1} : 3440 ($\nu_{\text{O-H}}$), 3109, 3020 ($\nu_{\text{C-H}}$, aromatic), 2922 ($\nu_{\text{C-H}}$, aliphatic), 1740 ($\nu_{\text{C=O}}$, acid), 1624 ($\nu_{\text{C=O}}$, amide), 1591, 1495 ($\nu_{\text{C=C}}$, aromatic), 1302, 1158 (δ_{SO_2} , sulfone).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , ppm) : 3.17 (s, 3H), 4.57 (s, 2H), 7.26-7.30 (m, 4H),

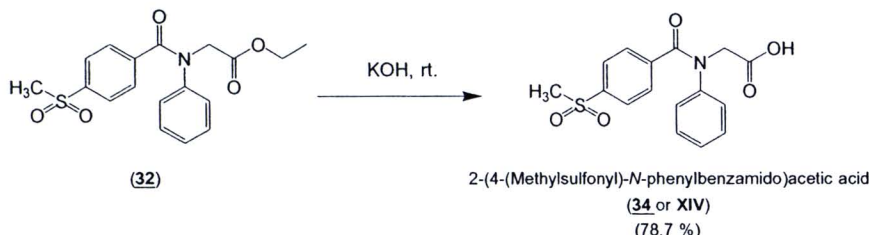
7.33-7.35 (*m*, 1*H*), 7.37 (*d*, *J* = 8.7 Hz, 2*H*),

7.91 (*d*, *J* = 8.7 Hz, 2*H*), 12.98 (*s*, 1*H*).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, ppm) : 43.55, 51.76, 127.82, 128.03, 128.37, 128.69, 130.59,
135.10, 138.28, 148.21, 169.93, 170.51.

HR-MS Calcd for (M+H)⁺ 333.0749
Found 333.0751

การเตรียม 2-(4-(Methylsulfonyl)-*N*-phenylbenzamido)acetic acid (34** or **XIV**)**



ผสมสารละลาย Ethyl 2-(4-(methylsulfonyl)-*N*-phenylbenzamido)acetate (**32**) (124 mg, 0.34 mmol) ใน Ethanol 5 ml) กับสารละลาย 40 % KOH (2 หยด) พร้อมทั้ง Stir เพื่อให้สารผสมเข้ากัน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงเท Reaction Mixture ลงในน้ำและนำสารผสมที่ได้มาทำการสกัดด้วย Ethyl Acetate ล้างชั้นสารละลาย Ethyl Acetate ที่ได้ด้วยน้ำและน้ำเกลืออ้อมตัวตามลำดับ ทำการดูดน้ำที่อาจจะหลงเหลืออยู่ในชั้นสารละลาย Ethyl Acetate ด้วย Anhydrous Sodium Sulfate แล้วทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกแบบลดความดัน จะได้ตะกอนสีขาวของ 2-(4-(Methylsulfonyl)-*N*-phenylbenzamido)acetic acid (**34** or **XIV**) หนัก 90 mg (78.7 %) เมื่อทำการตกผลึกซ้ำในสารละลายผสมระหว่าง Dichloromethane-*n*-Hexane) จะมีจุดหลอมเหลว 204-206 °C

IR (neat), ν_{max} , cm⁻¹ : 3445 ($\nu_{\text{O-H}}$), 3109, 3020 ($\nu_{\text{C-H}}$, aromatic),
2919 ($\nu_{\text{C-H}}$, aliphatic), 1754 ($\nu_{\text{C=O}}$, acid), 1616 ($\nu_{\text{C=O}}$, amide),
1589, 1497 ($\nu_{\text{C=C}}$, aromatic), 1303, 1155 (δ_{SO_2} , sulfone).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, ppm) : 3.17 (*s*, 3*H*), 4.57 (*s*, 2*H*), 7.26-7.30 (*m*, 4*H*),
7.33-7.35 (*m*, 1*H*), 7.37 (*d*, *J* = 8.7 Hz, 2*H*),
7.91 (*d*, *J* = 8.7 Hz, 2*H*), 12.98 (*s*, 1*H*).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, ppm) : 43.55, 51.76, 127.82, 128.03, 128.37, 128.69, 130.59,
135.10, 138.28, 148.21, 169.93, 170.51.

HR-MS Calcd for (M+H)⁺ 333.0749
Found 333.0751



3. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ COX

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ COX โดยอนุพันธ์ benzanilide สังเคราะห์ขึ้น ได้ขอใช้บริการวิเคราะห์ ซึ่งให้บริการโดยห้องปฏิบัติการตรวจหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) 113 อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย ถนนพหลโยธิน ต.คลองหนึ่ง จ. ปทุมธานี โดยจะใช้วิธีการที่ถูกรายงานโดย Kirtikara (Kirtikara *et. al*, 1998; Kirtikara *et. al*, 2001) ซึ่งอาศัยหลักการของ *in vitro* Whole Cell Assay System เพื่อตรวจวัดความสามารถของสารในการยับยั้งการทำงานของ COX-1 (ใน COX-2 Knockout, Mouse Lung Fibroblast Cell Line) และ COX-2 (ใน COX-1 Knockout, Mouse Lung Fibroblast Cell Line) เปรียบเทียบกับ Aspirin (Positive Control) และ 0.1 % DMSO (negative control) ดังวิธีการคร่าว ๆ ต่อไปนี้

1. นำ COX-2 Knockout, Mouse Lung Fibroblast Cell Line หรือ COX-1 Knockout, Mouse Lung Fibroblast Cell Line มาเลี้ยงใน Dubelcco' s Modified Eagle Meduim (DMEM) ที่มี Hygromycin B (200 mcg/ml), Non-essential Amino Acid (0.1 mM), L-Glutamine (50 mg/l), Ascorbic Acid (0.05 mg/ml) และ 10% Fetal Calf Serum (FCS) เพื่อให้มีความเข้มข้นของ Cell ประมาณ 1×10^5 cells/ml
2. ถ่าย Cell ในข้อ 1 ปริมาตร 100 μ l/well ลงใน 96-Well Flat Bottom Tissue Culture Plates แล้วนำไป Incubated ที่ 37°C ใน Humidified Incubator ซึ่งมี 5% CO_2 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง
3. ล้าง Cell แต่ละ Well ด้วย FCS-free DMEM Medium จากนั้นจึงนำ Cell ไปทำการ Preincubate ใน FCS-free DMEM Medium ซึ่งมีสารที่จะทดสอบ หรือตัวทำละลาย (ที่ใช้ละลายสารที่จะทดสอบ)
4. ทำการแยก Medium ออกไปและแทนที่ด้วย FCS-free DMEM Medium ซึ่งมีสารที่จะทดสอบ (หรือตัวทำละลายที่ใช้ละลายสารที่จะทดสอบ) และ Arachidonic Acid (AA) ในขนาดความเข้มข้น 20 μM
5. แยก Supernatants มาทำการตรวจหาปริมาณ PGE_2 โดยวิธี Radioimmunoassay (RIA) ซึ่งอาศัยหลักการที่ PGE_2 ใน cell culture ที่มีสารตัวอย่าง ไปแย่ง ^3H Labeled PGE_2 ในการเข้าจับกับ anti- PGE_2 Antibody

การตรวจวัดปริมาณ PGE_2

1. เจือจาง Culture Supernatant ที่แยกออกมาจากแต่ละ Well ในอัตราส่วน 1:10 ด้วย DMEM จากนั้นจึงแบ่งสารละลายที่เตรียมขึ้นปริมาตร 50 μ l ใส่ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 ml (สำหรับการเตรียม Blank ให้ใช้ DMEM ปริมาตร 50 μ L)
2. เติม anti- PGE_2 Antibody (RIA Buffer ซึ่งคือ 0.1 mM Phosphate Buffer, pH 7.4 ที่มี 0.9% Sodium Chloride, 0.1% Sodium Azide และ 0.1% Gelatin) ปริมาตร 50

- mcl ลงใน หลอด Microcentrifuge ในข้อ 1
3. เติม $^3\text{H-PGE}_2$ (1.12 mcci/ml) ปริมาตร 50 mcl ลงไปในสารผสมข้างต้น vortex ให้เข้ากัน แล้ว Incubated ที่ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงเติม 2% Charcoal-Dextran Suspension ใน RIA Buffer ปริมาตร 100 mcl และ แล้ว Incubated ที่ 4°C ต่อเป็นเวลา 15 นาที
 4. นำสารผสมที่ได้มา Centrifuge ที่ 4°C ความเร็ว 3800 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงแยก Supernatant ออกมาผสมกับ Liquid Scintillation Cocktail ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ Vortex สารผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่า Radioactivity (CPM) โดยใช้เครื่อง Scintillation Counter แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่า % Binding of $^3\text{H-PGE}_2$ และ ความเข้มข้นของ PGE_2 ที่ถูกสร้างขึ้นในแต่ละ Well ต่อไป