ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

คุณสมบัติทางเทอร์โมไดนามิกส์ของ Peptide Nucleic Acid

ภาคผนวก ก

คุณสมบัติทางเทอร์โมไดนามิกส์ของ Peptide Nucleic Acid [64]

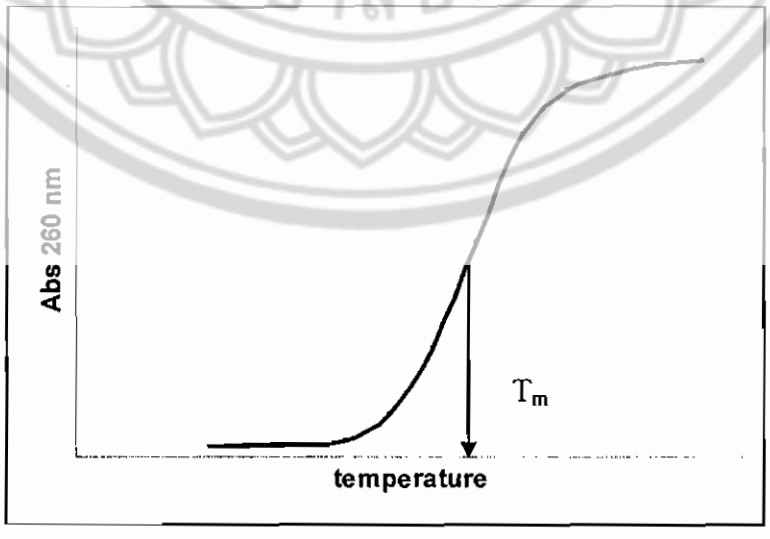
กระบวนการทางชีววิทยาส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับการจดจำที่เฉพาะเจาะจง และความซับซ้อนของโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น โปรตีน กรดนิวคลิอิก หรือ คาร์โบไฮเดรต และสารโมเลกุลขนาดใหญ่อื่น ๆ หรือสารชีวโมเลกุลขนาดเล็ก ๆ ส่วนใหญ่การจดจำเหตุการณ์จะเป็นสารกลุ่มของกรดนิวคลิอิก ซึ่งประกอบด้วยการสร้างความเสถียรของ DNA double helix การถ่ายทอดแบบและกระบวนการกลับมาเข้าคู่ของดีเอ็นเอ การถ่ายทอดข้อมูลรหัสในดีเอ็นเอสู่อาร์เอ็นเอ และการแปลรหัสของอาร์เอ็นเอไปสู่กระบวนการการสังเคราะห์โปรตีน เป็นต้น

กระบวนการจดจำเหตุการณ์ต่าง ๆ นี้เป็นความเข้าใจในเชิงการบรรยายทางความรู้สึก แต่ไม่สามารถอธิบายให้เข้าใจได้ในระดับของการเกิดปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุล และแรงที่มีความสัมพันธ์ของความเสถียรระหว่างโมเลกุล ดั้งนั้นความรู้ทางด้านเทอร์โมไดนามิกส์ จึงถูกนำมาใช้ในการสันนิฐานโครงสร้าง โดยนำมาอธิบายสารโมเลกุลขนาดใหญ่ทางชีววิทยาถึงความเข้าใจของพื้นฐานของการจดจำเหตุการณ์ของสารชีวโมเลกุล โดยเฉพาะอย่างยิ่งยังช่วยในการพัฒนาการสังเคราะห์ทางเคมีของกรดนิวคลิอิก spectroscopic และ colorimetric การบ่งบอกค่าทางเทอร์โมไดนามิกส์ของการจดจำเหตุการณ์จึงเป็นแนวทางที่ดี โดยที่เป้าหมายของการศึกษาค่าทางเทอร์โมไดนามิกส์ของกรดนิวคลิอิกเป็นการพัฒนาความสามารถในการคาดเดาในการสร้างกรดนิวคลิอิก และความเสถียรของสารกลุ่มนี้ มีประโยชน์มากในการปรับปรุงและออกแบบการสังเคราะห์ตัวตรวจวัดด้วยโอลิโกนิวคลิโอไทด์ สำหรับการประยุกต์ใช้ในทางเทคโนโลยีทางชีววิทยาการตรวจสอบ และการรักษาต่าง ๆ

สำหรับการศึกษาคุณสมบัติทางเทอร์โมไดนามิกส์ของ PNA หรือ DNA จะเป็นการอธิบายพื้นฐานของการเกิดปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุล ในการศึกษาค่าเทอร์โมไดนามิกส์ของ PNA จะรายงานผลในรูปของความเสถียรของอุณหภูมิ (Thermal stability) ของสารประกอบอย่างไรก็ตามก็มีบางรายงานที่รายวานในรูปของค่า thermodynamic parameter เช่น ค่า ΔH และ ΔS แต่ส่วนใหญ่จะรายงานผลในรูปแบบของ melting temperature, T_m สำหรับ PNA หรือ DNA duplex โดยที่ melting temperature, T_m เป็นคำจำกัดความที่หมายถึงอุณหภูมิที่จุดสมดุลที่มีปริมาณของ base pair duplex และ unpair single strand ปริมาณที่เท่า ๆ กัน และยังพบว่าค่า T_m มีความสัมพันธ์กับค่าคงที่สมดุลทางเทอร์โมไดนามิกส์ (K) ด้วยการวัดค่าทางเทอร์โมไดนามิกส์ของ

โครงสร้างแบบดูเพล็กซของ DNA จะเป็นการตรวจสอบกระบวนการแตกสายของ DNA แยกออกเป็นสายเดี่ยว ซึ่งสามารถตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงนี้ได้โดยใช้เทคนิค ยูวี-สเปคโตรโฟโตเมตรี เนื่องจากโครงสร้างแบบดูเพล็กซจะเกิดการซ้อนทับกันของเบสอยู่ภายในโครงสร้าง เมื่อทำให้สายแตกออกหมู่ของโครงสร้างของเบสซึ่งมีคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงสามารถดูดกลืนแสงได้มากขึ้น ความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงระหว่าง double strand และ single strand เรียกว่า hypochromicity effect เมื่อดีเอ็นเออยู่ในรูปโครงสร้างแบบดูเพล็กซ อันตรกิริยาระหว่างเบสจะลดค่าการดูดกลืนแสง เมื่อสายแตกออกเป็นสายเดี่ยว ๆ อันตรกริยาระหว่างเบสจะอ่อนลง ทำให้ลดความใกล้กันของเบสค่าการดูดกลืนแสงจึงสูงขึ้นกว่าโครงสร้างแบบดูเพล็กซ ข้อมูลจากการดูดกลืนแสงต่ออุณหภูมิเรียกว่า melting curve แสดงในภาพ 65 โดยที่ตำแหน่งตรงกลางของการเปลี่ยนแปลงกำหนดให้เป็นค่า melting temperature, T_m จากค่าที่ได้สามารถนำมาวิเคราะห์หาค่าข้อมูลทางเทอร์โมไดนามิกส์ที่ประกอบด้วย ΔH, ΔS และ ΔG สำหรับการเปลี่ยนแปลงจาก double strand ไปเป็น single strand

การวิเคราะห์ค่าทางเทอร์โมไดนามิกส์เป็นค่าที่ใช้ในงานวิจัยทางด้านชีวเคมี โดยเฉพาะการตรวจวัดความสัมพันธ์ของโครงสร้างของกรดนิวคลีอิก ข้อมูลทางเทอร์โมไดนามิกส์ของดีเอ็นเอมีความสำคัญต่อการประยุกต์ทางด้านชีวเคมีต่าง ๆ เช่น ข้อมูลของค่า T_m ใช้ในการตรวจวัดหาความยาวที่สั้นที่สุดของ oligonucleotide probe เพื่อต้องการความเสถียรของโครงสร้างแบบดูเพล็กซ กับยีนเป้าหมาย และสามารถแสดงค่าความเสถียรของการเกิดโครงสร้างแบบดูเพล็กซของดีเอ็นเอได้



ภาพ 65 Melting curve ของโครงสร้างแบบดูเพล็กซ DNA

การวิเคราะห์ค่าทางเทอร์โมไดนามิกส์ด้วยโปรแกรม MeltWin [65]

โปรแกรม MeltWin เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการคำนวณพารามิเตอร์ทางเทอร์โมไดนามิกส์จากค่า hermal melting ของ oligonucleotides ในการคำนวณอาจจะแบ่งออกได้ถึง 4 ระดับขึ้นอยู่กับสมดุลของ self-complementary, bi-molecular; non-self complementary, bi-molecular ; uni-molecular hairpins และ single strands สำหรับสมดุลแบบ bi-molecular และ hairpin โปรแกรมที่เหมาะสมในการใช้คำนวณข้อมูลคือ Marquardt-Levenbergalgorithum ดังสมการ

$$\varepsilon(T) = (M_{ss}T + B_{ss}) \cdot \alpha + (M_{ds}T + B_{ds}) \cdot (1 - \alpha)$$

เมื่อ $\varepsilon(T)$ = extinction coefficient

$(M_{ss}T + B_{ss})$ = mole-fraction weight ของ single strand

$(M_{ds}T + B_{ds})$ = mole-fraction weight ของ double strand

α = mole fraction

T = temperature

จากสมการด้านซ้ายของฝั่งขวาเทอมของ T จะแทนด้วยค่าของน้ำหนักเศษส่วนโมลซึ่งหาได้จาก สมการเส้นตรงของ melt curve ที่เกิดจาก single-stranded molecules และในสมการด้านขวาของฝั่งขวาเทอมของ T จะแทนด้วยค่าน้ำหนักของเศษส่วนโมลซึ่งหาค่าได้จากสมการเส้นตรงของ Melt curve ที่เกิดจาก double stranded complexes

เศษส่วนโมล (α) คือ ฟังก์ชั่นของอุณหภูมิซึ่งคำนวณได้จากค่าคงที่สมดุลและความเข้มข้นของ strand ทั้งหมดในสมการของ bi-molecular ส่วนอุณหภูมิ (T) และค่าคงที่สมดุล (K) ของ uni-molecular จะต้องพิจารณาจากการคำนวณพารามิเตอร์ทางไดนามิกส์

$$K = \exp\left(\frac{\Delta S}{R} - \frac{\Delta H}{RT}\right)$$

สำหรับปฏิกิริยาแบบ bi-molecular โปรแกรม Meltwin จะช่วยในการวิเคราะห์ข้อมูลในแบบ Van-Hoff จากที่กล่าวมาข้างต้นพบว่า ค่า T_m จะเปลี่ยนแปลงไปตามค่าความเข้มข้นซึ่งแสดงดังสมการ เมื่อ C_t หมายถึง ความเข้มข้นของ oligomer ทั้งหมด

$$\frac{1}{T_m} = \left(\frac{R}{\Delta H}\right).\ln(C_t) + \left(\frac{\Delta S}{\Delta H}\right)$$ ใช้สำหรับ self complementary

$$\frac{1}{T_m} = \left(\frac{R}{\Delta H}\right).\ln\left(\frac{C_t}{4}\right) + \left(\frac{\Delta S}{\Delta H}\right)$$ ใช้สำหรับ non – self complementary

ดังนั้นเมื่อพลอตกราฟระหว่าง $\frac{1}{T_m}$ เทียบกับ $\ln(C_t)$ หรือ $\ln\left(\frac{C_t}{4}\right)$ ก็จะได้ค่าในส่วนของพารามิเตอร์ทางเทอร์โมไดนามิกส์ ในการเปรียบเทียบพารามิเตอร์ทางเทอร์โมไดนามิกต่าง ๆ เช่น particularly enthalpy, obtained by these two methods, melt curve fitting และ T_m dependent analysis พารามิเตอร์เหล่านี้จะช่วยบอกได้ว่าปฏิกิริยาการแตกตัวที่เกิดขึ้นเป็นแบบ 2-state

ภาคผนวก ข

^{1}H, ^{13}C-NMR และ Mass spectrum ของสารผลิตภัณฑ์

ภาคผนวก ข

^{1}H, ^{13}C-NMR และ Mass spectrum ของสารผลิตภัณฑ์

ภาพ 66 ^{13}C-NMR สเปกตรัมของ *tert*-Butyl *N*-[2-(*N*'-9-fluorenylmethoxycarbonyl)amino ethyl] glycinate hydrochloride (12) ใน DMSO-d_6

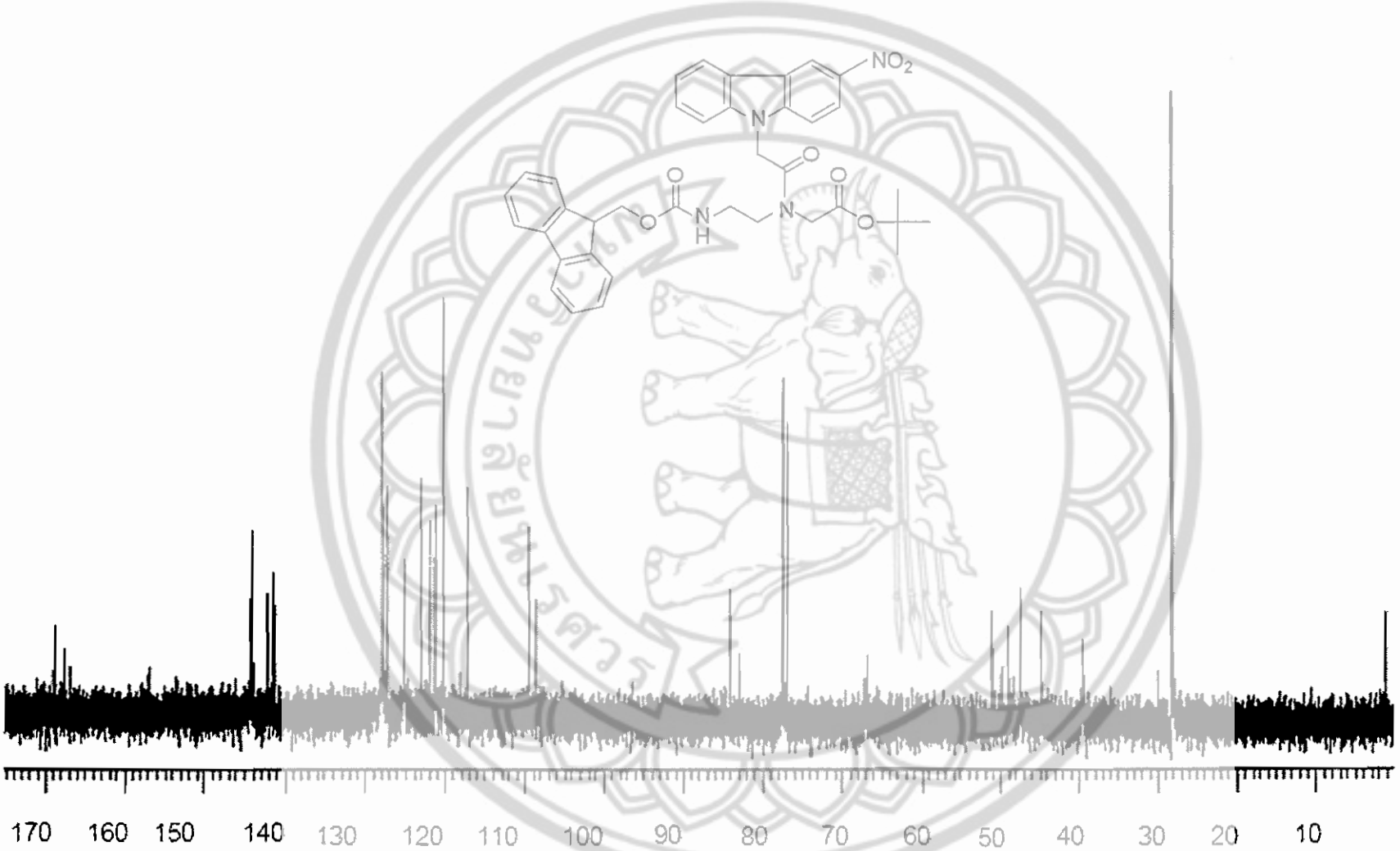
ภาพ 67 ^{13}C-NMR สเปกตรัมของ Carbazole-9-yl-acetic acid (7) ใน DMSO-d_6

ภาพ 68 ^{13}C-NMR สเปกตรัมของ 3-Nitrocarbazole-9-yl-acetic acid (11) ใน DMSO-d_6

ภาพ 69 ^{13}C-NMR สเปกตรัมของ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid (8) ใน DMSO-d_6

ภาพ 70 ^{13}C-NMR spectrum ของ *tert*-Butyl *N*-[2-(*N*'-9-fluorenylmethyoxycarbonyl) aminoethyl]-*N*-[(carbazole)acetyl]glycinate (48) ใน $CDCl_3$

ภาพ 71 HRMS ของ *tert*-Butyl *N*-[2-(*N*'-9-fluorenylmethyoxycarbonyl) aminoethyl]-*N*-[(carbazole)acetyl]glycinate (48)



ภาพ 72 ^{13}C-NMR สเปกตรัม *tert*-Butyl *N*-[2-(*N'*-9-fluorenylmethyoxycarbonyl) aminoethyl]-*N*-[(3-nitrocarbazole)acetyl] glycinate **(49)** ใน $CDCl_3$

ภาพ 73 HRMS ของ *tert*-Butyl *N*-[2-(*N*'-9-fluorenylmethyoxycarbonyl) aminoethyl]-*N*-[(3-nitrocarbazole)acetyl] glycinate (49)

ภาพ 74 ^{13}C-NMR สเปกตรัมของ *tert*-Butyl *N*-[2-(*N*'-9-fluorenylmethyoxycarbonyl) aminoethyl]-*N*-[(3,6-dinitrocarbazole)acetyl] glycinate (50) ใน DMSO-d_6

ภาพ 75 HRMS ของ *tert*-Butyl *N*-[2-(*N*'-9-fluorenylmethoyxycarbonyl) aminoethyl]-*N*-[(3,6-dinitrocarbazole)acetyl] glycinate (50) ใน DMSO-d_6

ภาคผนวก ค

การคำนวณหาค่า extinction coefficient ของอนุพันธ์ของคาร์บาโซล

ภาคผนวก ค

การคำนวณหาค่า extinction coefficient ของอนุพันธ์ของคาร์บาโซล

เตรียมสารละลาย stock solution 10 mM ของอนุพันธ์คาร์บาโซลในสารละลาย 100 mM $NaHCO_3$ จากนั้นทำการเจือจางสารละลายจาก stock solution ให้มีความเข้มเท่ากับ 0.01, 0.02 และ 0.03 mM ด้วย 100 mM $NaHCO_3$ และนำสารละลายที่เตรียมไว้ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ด้วย water bath เป็นเวลา 1 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร จากค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้แต่ละความเข้มข้นนำมาคำนวณหาค่า extinction coefficient ด้วยสมการตามกฎของ Beer's law

$$A = \varepsilon bc$$

A = Absorbance

ε = Extinction coefficient ($l\ mol^{-1}\ cm^{-1}$)

b = path length of the cell (cm)

c = concentration of the solution

Compound	Extinction coefficient ($l\ mol^{-1}\ cm^{-1}$)
Carbazole acetic acid	18183
3-Nitrocarbazole acetic acid	7178
3,6-Dinitrocarbazole acetic acid	18467

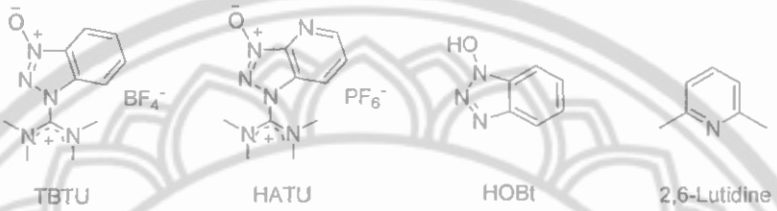
ภาคผนวก ง

กลไกการสังเคราะห์แบบ solid phase synthesis

ภาคผนวก ง

กลไกการสังเคราะห์แบบ solid phase synthesis [66]

1. สาร coupling reagent



HOBt : 1-hydroxybenzotriazole

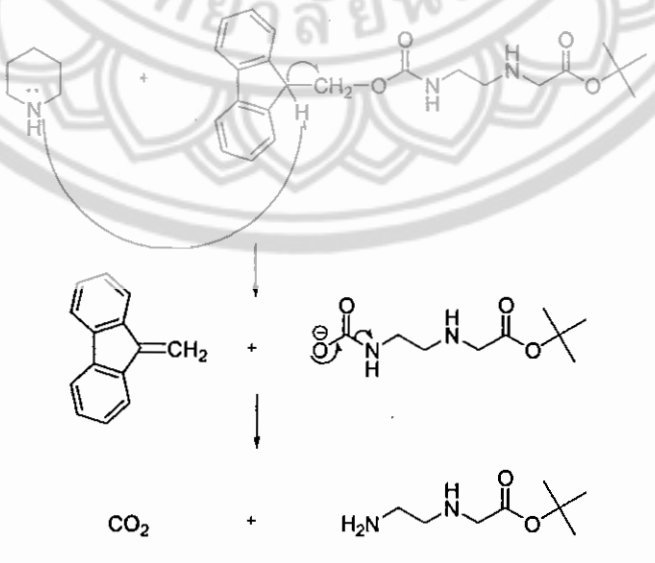
TBTU: 2-(1-H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-teramethyluronium tetrafluoroborate

DIEA : diisopropylethylamine

HATU: ((O-(7-azabenzotriazol-l-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate

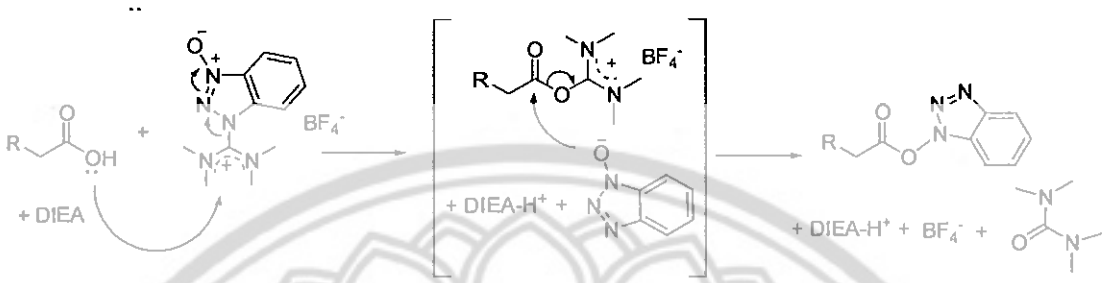
ภาพ 76 สาร coupling reagent

2. การ deprotection กลุ่มของ Fmoc ด้วย Piperidine



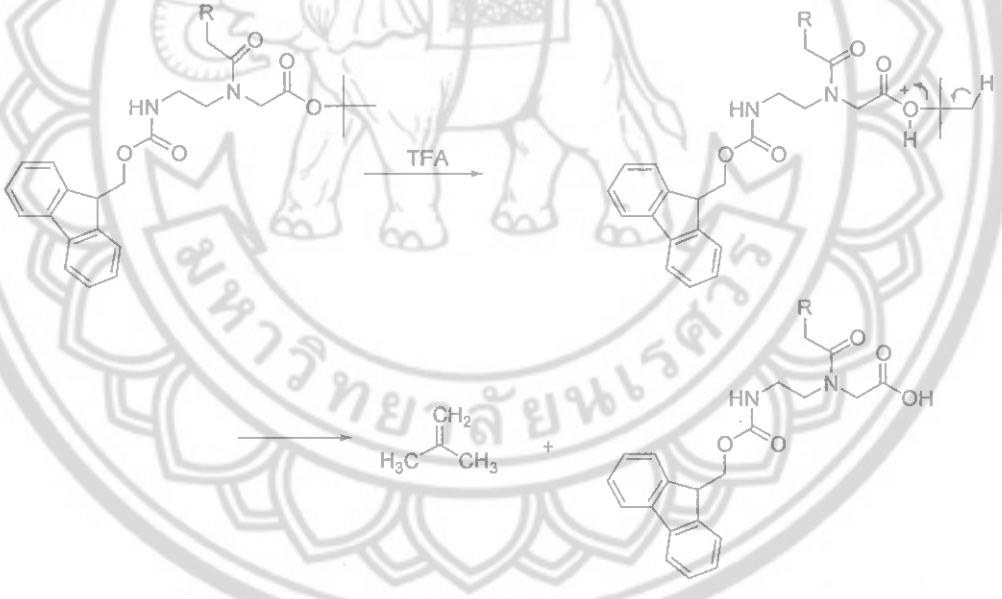
ภาพ 77 การ deprotection กลุ่มของ Fmoc ด้วย Piperidine

3. ปฏิกิริยา coupling reaction



ภาพ 78 ปฏิกิริยา coupling reaction

4. การ cleavage ของกลุ่ม tertiary butyl



ภาพ 79 การ cleavage ของกลุ่ม tertiary butyl