

๐๐
๒๖
พ.
๕๔๖
๒๕๕๐



สำนักงานหอสมุด

ร. ๒๖๘๒๔๘๗ C.๑
๒๑ พ.ย. ๒๕๕๐

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องมือ

เครื่องกวนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) Fisher Scientific, United State America; เครื่องชั่ง (Balance) 2 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง, Sartorius, Germany; เครื่องระเหยตัวทำละลายภายใต้สภาวะสุญญากาศ (Rotary Evaporator), Buchi B-171, Switzerland; เครื่องปั๊มสุญญากาศสมรรถนะสูง (High vacuum pump), Edward ; เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (Nuclear Magnetic Resonance), (Bruker 400 MHz) ; เครื่อง FT-IR, (Perkin-Elmer Spectrum รุ่น GX0 Series X); เครื่อง Ultraviolet Visible Spectrometer (UV-visible), (Perkin-Elmer รุ่น Lamda 20)

2. สารเคมี

1,2-ไดคลอโรอีเทน (99.8 % 1,2-dichloroethane, $C_2H_4Cl_2$) Lab Scan, Thailand; ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (99 % Dimethylsulfoxide (DMSO) $C_2H_6O_S$) Merck, Germany; ไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (99.8 % *N,N*-Dimethylformamide (DMF) C_3H_7NO) Fluka, United State America; คาร์บาซอล (96.0 % Carbazole, C_6H_9N) Fluka, Germany; ไดไอโซโพรพิลเอทิลลามีน (98 % Diisopropylethylamine (DIEA) $C_8H_{19}N$) Acros, United State America; เทอเทียรีบิวทิลโบรโมอะซิเตต (97 % *t*-Butyl bromoacetate, $C_6H_{11}BrO_2$) Fluka, France; เอทิลีนไดเอมีน (99.5 % Ethylenediamine, $C_2H_8N_2$) Fluka, Germany ; เอทิลไพโรลิดิโดล (98 % N-Methylpyrrolidone (NMP) C_5H_9NO) Fluka, Germany; ไพเพอริดีน (99.5 % Piperidine, $C_5H_{11}N$) Sigma-Aldrich, Germany; เอทิลโบรโมอะซิเตต (98% Ethylbromoacetate, $C_4H_7BrO_2$) Acros, United State America; เมทิลโบรโมอะซิเตต (98% Methylbromoacetate, $C_3H_5BrO_2$) Acros, United State America; โซเดียมไฮไดรด์ (93% Sodium hydride, NaH) Acros, Belgium; ไตรฟลูออโรอะซิติกแอซิด (99.5% Trifluoroacetic acid (TFA) $C_2HO_2F_3$) Fluka, United State America; 2,6-ลูทิดีน (99% 2,6-Lutidine, C_7H_9N) Sigma-Aldrich, Germany; ไตรฟลูออโรมีเทนซัลโฟนิคแอซิด (Trifluoromethanesulfonic acid (TFMSA) CHF_3O_3S) Sigma, United State America; 96 % 2-(1-H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium Tetrafluoroborate (TBTU) $C_{11}H_{16}BF_4N_5O$, Fluka, Switzerland; 97 % O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium Hexafluorophosphate (HATU) Aldrich, United State America; 98 % 1-

hydroxybenzotriazole (HOBt), $C_6H_5N_3O$ Acros, United State America; ตัวทำละลาย
ดีวเทอเรตสำหรับ NMR (chloroform- d , 99.8 atom % D, $CDCl_3$, Aldrich, United State
America; DMSO- d_6 และ acetic- d_3 acid- d , 99.5 atom % D, CD_3COOD ,), Arcos, United
State America; 98 % *N*-(9-fluorenylmethoxycarbonyloxy) succinimide (Fmoc), $C_{19}H_{15}NO_5$,
Fluka, China. ไดคลอโรมีเทน (99.5% Dichloromethane, CH_2Cl_2), Merck, Germany.

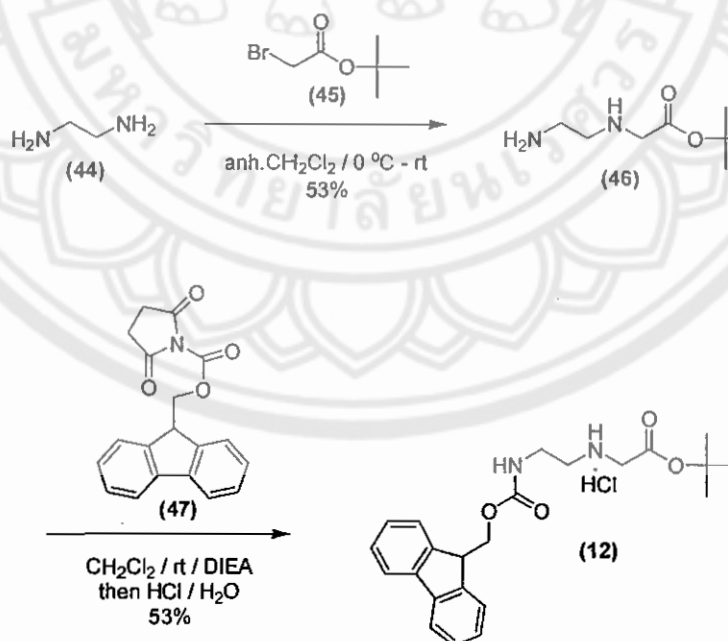
3. วิธีการเตรียมตัวทำละลายให้ปราศจากน้ำ (Anhydrous solvent)

ไดคลอโรมีเทน และไดเมทิลฟอร์มาไมด์ ทำให้ปราศจากน้ำโดยคนสารละลายบน
แคลเซียมไฮไดรด์ (CaH) ภายใต้สภาวะบรรยากาศของก๊าซไนโตรเจน 5 ชั่วโมง และทำการกลั่น
ก่อนใช้เสมอ

วิธีการทดลอง

ขั้นตอนของการศึกษาและสังเคราะห์เปปไทด์นิวคลีอิกแอซิดที่ประกอบด้วยอนุพันธ์ของ
คาร์บาไซล เพื่อใช้เป็นยูนิเวอร์ซอลเบส ประกอบไปด้วย

1. การสังเคราะห์ *tert*-Butyl *N*-[2-(*N*-9-fluorenylmethoxycarbonyl)aminoethyl]
glycinate hydrochloride, PNA backbone (12)



ภาพ 26 การสังเคราะห์ *tert*-Butyl *N*-[2-(*N*-9-fluorenylmethoxycarbonyl)amino
ethyl] glycinate hydrochloride (12) [59]

การสังเคราะห์ PNA backbone สามารถทำการสังเคราะห์ตามวิธีของ Thomson และคณะ [59] โดยทำการเตรียมขวดก้นกลมที่แห้งและสะอาดขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีแท่งกวนแม่เหล็ก (ทำ Flame dried แล้วทิ้งไว้ให้เย็นภายใต้บรรยากาศของก๊าซไนโตรเจน) เติมสารละลายที่มากเกินพอของ Ethylenediamine (44) 48.9 มิลลิลิตร (7.31×10^{-1} โมล) ลงใน $\text{anh. CH}_2\text{Cl}_2$ 300 มิลลิลิตร ลดอุณหภูมิลงมาที่ 0 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมสารละลายของ *tert*-butylbromoacetate (45) 13.5 มิลลิลิตร (9.14×10^{-2} โมล) ที่ละลายใน $\text{anh. CH}_2\text{Cl}_2$ 150 มิลลิลิตร โดยเติมแบบต่อเนื่องเป็นเวลามากกว่า 5 ชั่วโมง เมื่อทำการเติมสาร *tert*-butyl bromoacetate หหมด ปล่อยให้อุณหภูมิของสารละลายผสมเพิ่มอย่างช้าๆ จนถึงอุณหภูมิห้อง เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง และทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องภายใต้สภาวะบรรยากาศของก๊าซไนโตรเจนเป็นเวลา 12 ชั่วโมง

หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร และทำการสกัดแยกสารละลาย Ethylenediamine ที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกด้วยการสกัดด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้งๆ ละ 120 มิลลิลิตร แยกชั้นของสารละลาย CH_2Cl_2 และทำให้ปราศจากน้ำโดยการเติม $\text{anh. Na}_2\text{SO}_4$ ทำการกรอง และระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบลดความดัน และนำไปต่อเข้ากับเครื่องปั๊มสุญญากาศ สมรรถนะสูงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จะได้ *tert*-Butyl *N*-(2-aminoethyl) glycine (46) เป็นของเหลวสีเหลืองอ่อน 8.48 กรัม (53 % yields) ใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ขั้นตอนต่อไปโดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์

พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารผลิตภัณฑ์ (46) ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy ได้ผลดังนี้

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.45 (s, 9H), 2.13 (s, 3H), 2.68 (t, $J=5.7$ Hz, 2H), 2.80 (t, $J=5.6$ Hz, 2H) และ 3.29 (s, 2H) ppm

นำผลิตภัณฑ์ (46) ที่เตรียมได้ 8.48 กรัม (4.82×10^{-2} โมล) ละลายใน $\text{anh. CH}_2\text{Cl}_2$ 340 มิลลิลิตร และเติม Diisopropylethylamine (DIEA) 7.6 มิลลิลิตร (4.6×10^{-2} โมล) คนสารละลายเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายของ Fmoc-Osu (47) 15.5 กรัม (4.59×10^{-2} โมล) ที่ละลายใน $\text{anh. CH}_2\text{Cl}_2$ 100 มิลลิลิตร โดยเติมแบบต่อเนื่องเป็นเวลามากกว่า 5 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง และทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องภายใต้บรรยากาศของก๊าซไนโตรเจน 22 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 N HCl 25 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง สกัดสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยตัวทำละลาย 1N HCl 5 ครั้งๆ ละ 100 มิลลิลิตร และ Brine 250 มิลลิลิตร รวมชั้นของสารละลาย 1N HCl และ brine สกัดซ้ำด้วย CH_2Cl_2 รวมชั้นตัวทำละลายและทำให้ปราศจากน้ำด้วย Na_2SO_4 กรอง และระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นแบบลดความดัน (จนเหลือปริมาตรประมาณ 100 มิลลิลิตร) นำไป

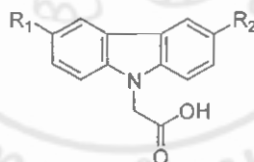
ตกผลึกที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำการกรองผลึกที่เกิดขึ้นล้างผลึกด้วยสารละลาย CH_2Cl_2 ที่เย็นและทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกผลึกซ้ำในสารละลาย 40% Acetone ต่อ CH_2Cl_2 กรอง และทำให้แห้งโดยนำไปต่อเข้ากับเครื่องปั๊มสุญญากาศสมรรถนะสูง ได้สารผลิตภัณฑ์ (12) มีลักษณะเป็นของแข็ง สีขาว 11.16 กรัม (53 % yield) มีค่า $R_f = 0.26$ (5% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) และ คิดเป็น 29 % yield เมื่อรวมทั้งสองขั้นตอน

พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารผลิตภัณฑ์ (12) ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy ได้ผลดังนี้

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 1.46 (s, 9H), 2.99 (t, $J=6.0$ Hz, 2H), 3.29 (t, $J=6.0$ Hz, 2H), 3.87 (s, 2H), 4.23 (t, $J=6.6$ Hz, 1H), 4.35 (d, $J=6.7$ Hz, 2H), 7.34 (t, $J=7.0$ Hz, 2H), 7.42 (t, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.51 (t, $J=5.6$ Hz, 1H), 7.69 (d, $J=7.3$ Hz, 2H), 7.90 (d, $J=7.5$ Hz, 2H) และ 9.13 (br s, 2H) ppm

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 27.6, 36.6, 46.4, 46.6, 47.2, 65.6, 83.0, 120.1, 125.1, 127.0, 127.6, 140.7, 143.7, 156.3 และ 165.7 ppm

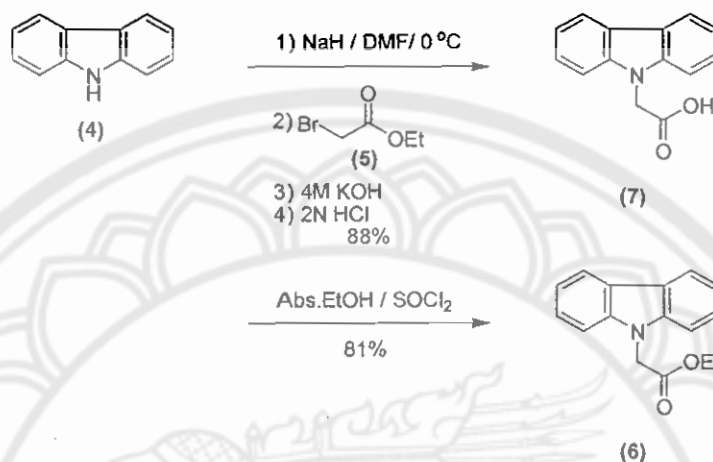
2. การเตรียม universal base candidate ให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ของ acetic acid



Carbazole-9-yl-acetic acid (7)	$R_1 = \text{H},$	$R_2 = \text{H}$
3-Nitrocarbazole-9-yl-acetic acid (8)	$R_1 = \text{H},$	$R_2 = \text{NO}_2$
3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid (11)	$R_1 = \text{NO}_2,$	$R_2 = \text{NO}_2$

ภาพ 27 universal base candidates

2.1 การสังเคราะห์ Carbazole-9-yl-acetic acid (7) และ Carbazole-9-yl-acetic acid ethyl ester (6)



ภาพ 28 การสังเคราะห์ Carbazole-9-yl-acetic acid (7) และ Carbazole-9-yl-acetic acid ethyl ester (6)

การสังเคราะห์ Carbazole-9-yl-acetic acid (7) โดยทำปฏิกิริยาอัลคิลเลชัน (Alkylation) ของ Carbazole โดยสังเคราะห์เริ่มจากการเตรียมสารละลายของ Carbazole (4) 3.01 กรัม (1.79×10^{-2} โมล) ในสารละลาย anh.DMF 40 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Sodium hydride (NaH) 1.29 กรัม (5.38×10^{-2} โมล) และคนสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะบรรยากาศของก๊าซไนโตรเจน และลดอุณหภูมิของสารละลายลงมาที่ 0 องศาเซลเซียส เติมสารละลาย Ethyl bromoacetate (5) 2.40 มิลลิลิตร (2.2×10^{-2} โมล) โดยเติมแบบต่อเนื่องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมินี้เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และทำการไฮโดรลิซิสด้วยการเติมสารละลาย 4 M KOH คนสารละลาย 30 นาที และเติมสารละลาย 2 N HCl จนมีค่า pH = 2 กรองตะกอนที่เกิดขึ้น ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นต่อเอทานอล (9:1 v/v) และทำให้บริสุทธิ์โดยตกผลึกในสารละลายโทลูอีนได้ผลิตภัณฑ์ (9) เป็นผลึกสีขาว 3.56 กรัม (88 % yield) มีค่า $R_f = 0.58$ (20% MeOH/CH₂Cl₂)

พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารผลิตภัณฑ์ (7) ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy ได้ผลดังนี้

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 5.24 (s, 2H), 7.22 (t, *J*=7.2 Hz, 2H), 7.44 (t, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.56 (d, *J*=8.2 Hz, 2H) และ 8.16 (d, *J*=7.7 Hz, 2H) ppm

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 44, 109.3, 119.1, 120.2, 122.3, 125.8, 140.5 และ 170.3 ppm

จาก Carbazole-9-yl-acetic acid (7) นำมาทำปฏิกิริยา esterification โดยใช้ Carbazole-9-yl-acetic acid (7) 0.86 กรัม (3.8×10^{-3} โมล) ละลายในเอทานอล จำนวน 20 มิลลิลิตร และทำการเติมสารละลาย Thionyl chloride (SOCl_2) 0.34 มิลลิลิตร (4.5×10^{-3} โมล) คนสารละลายผสมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์ หยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่นจะเกิดตะกอนสีขาวขึ้น ทำการกรองด้วยชุดกรองแบบสุญญากาศ และล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น นำไปทำให้แห้งโดยนำไปต่อเข้ากับเครื่องปั่นสุญญากาศสมรรถนะสูง ได้ผลิตภัณฑ์ของ Carbazole-9-yl-acetic acid ethyl ester (6) เป็นตะกอนสีขาวจำนวน 0.89 กรัม (81 % yield) มีค่า $R_f = 0.77$ (100% CH_2Cl_2)

พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารผลิตภัณฑ์ (6) ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy ได้ผลดังนี้

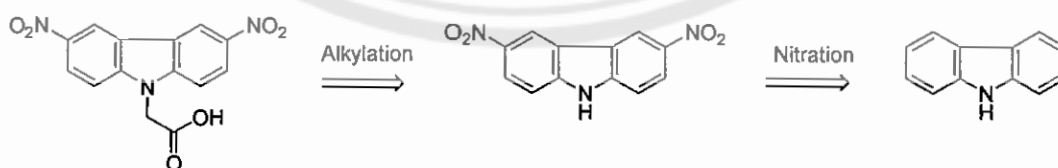
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.23 (t, $J=7.1$ Hz, 3H), 4.21 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 5.01 (s, 2H), 7.27 (t, $J=7.6$ Hz, 2 H), 7.34 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.47 (t, $J=8.0$ Hz, 2 H) และ 8.10 (d, $J=8.0$ Hz, 2 H) ppm

2.2 การสังเคราะห์ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid (8)

ทำการสังเคราะห์ 3 แนวทาง ดังนี้

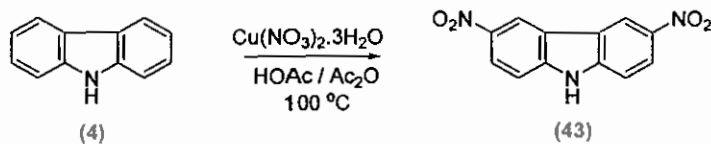
แนวทางที่ 1 สังเคราะห์ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid (8) โดยใช้ Carbazole (4) เป็นสารตั้งต้น

Retrosynthesis



ภาพ 29 แนวทางที่ 1 Retrosynthesis ของ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid (8)

วิธีการสังเคราะห์



ภาพ 30 การสังเคราะห์ 3,6-Dinitro-9H-carbazole (43)

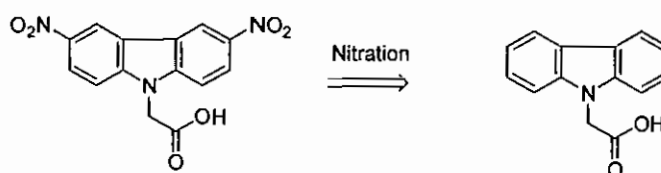
ทำการเตรียมสารละลายของ $\text{Cu(NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.43 กรัม (1.8×10^{-3} โมล) ในสารละลาย Acetic anhydride 3 มิลลิลิตร ต่อกกรดอะซิติก 2 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง ลดอุณหภูมิของสารละลายลงมาที่ 15-20 องศาเซลเซียส เติม Carbazole (4) 0.25 กรัม (1.5×10^{-3} โมล) โดยเติมเป็นส่วนๆ ประมาณ 10 นาที และทำปฏิกิริยาที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์ ทำการเติมน้ำกลั่น จะเกิดตะกอนสีเหลือง ทำการกรองและทำให้บริสุทธิ์ด้วยการเติม 8% KOH:EtOH:H₂O คนสารละลาย 30 นาที ทำการกรองและสารละลายที่ได้จากการกรองเติมกรดไฮโดรคลอริก คนสารละลายประมาณ 30 นาที กรองและล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นที่เย็น และตกผลึกในไนโตรเบนซีน ทำให้แห้งด้วยโดยนำไปต่อเข้ากับเครื่องปั๊มสุญญากาศ สมรรถนะสูง

พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิค NMR Spectroscopy ได้ผลดังนี้

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.76 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 8.39 (dd, *J*₁ = 2.3 Hz, *J*₂ = 6.7 Hz, 2H), 9.49 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H) และ 12.71 (br, 1H, NH)

แนวทางที่ 2 สังเคราะห์ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid (8) โดยใช้ Carbazole-9-yl-acetic acid (7) เป็นสารตั้งต้น

Retrosynthesis



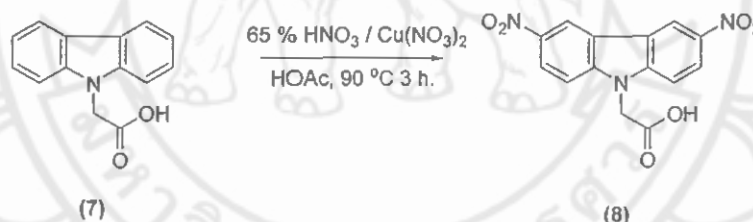
ภาพ 31 แนวทางที่ 2 Retrosynthesis ของ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid (8)

ในการทำปฏิกิริยาไนเตรชันของ Carbazole-9-yl-acetic acid ในแบบแนวทางที่ 2 นี้ ได้มีการศึกษาสภาวะที่ใช้ในการสังเคราะห์ ด้วยวิธีที่ 1-4 ดังสรุปในตาราง 5

ตาราง 5 สภาวะที่ใช้ในการศึกษาการสังเคราะห์ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid (8)

วิธี	รีเอเจนต์	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (ชั่วโมง)
1	65%HNO ₃ /Cu(NO ₃) ₂	90	3
2	90%HNO ₃	65	2
3	90%HNO ₃	30	2
4	90%HNO ₃	10	2

วิธีการสังเคราะห์วิธีที่ 1



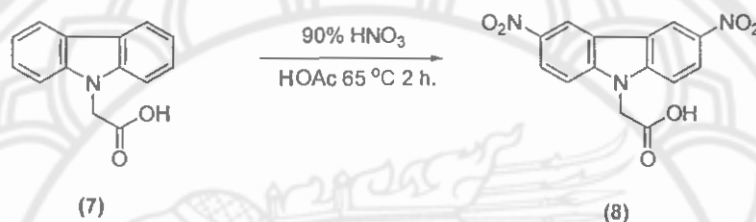
ภาพ 32 วิธีที่ 1 การสังเคราะห์ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid (8)

เตรียมขวดก้นกลมที่แห้งสะอาดขนาด 100 มิลลิลิตร พร้อมทั้งใส่แท่งกวนแม่เหล็ก (ทำ flame dried แล้วทิ้งไว้ให้เย็นภายใต้บรรยากาศของก๊าซไนโตรเจน) จากนั้นเตรียมสารละลายของ Cu(NO₃)₂·3H₂O 0.26 กรัม (5.3×10⁻³ โมล) ในกรดอะซิติก 10 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นกลมขนาด 100 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้ ที่อุณหภูมิห้อง คนสารละลายจน Cu(NO₃)₂·3H₂O ละลายในกรด อะซิติกหมด แล้วเติม 65 % HNO₃ 0.17 มิลลิลิตร (2.7×10⁻³ โมล) ที่อุณหภูมิเดียวกัน จากนั้นจึงเติม Carbazole-9-yl-acetic acid (7) 0.20 กรัม (8.9×10⁻⁴ โมล) แล้วทำปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส คนสารละลายต่อจนปฏิกิริยาลิ้นสุดลงเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นตะกอนสีเหลือง ทำการกรองและนำสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ต่อเข้ากับเครื่องปั๊มสุญญากาศสมรรถนะสูง

พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิค NMR Spectroscopy ได้ผล
ดังนี้

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.48 (s, 2H), 8.42 (d, J = 5.7 Hz, 2H)
และ 7.77 (d, J = 9.0 Hz, 2H) ppm

วิธีการสังเคราะห์วิธีที่ 2



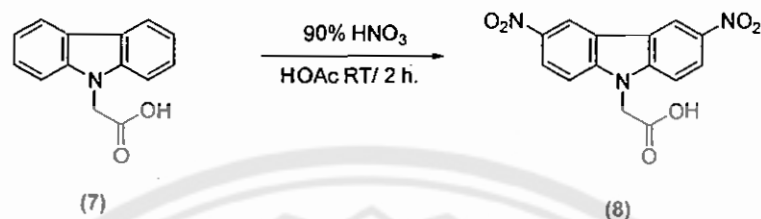
ภาพ 33 วิธีที่ 2 การสังเคราะห์ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid (8)

เตรียมขวดก้นกลมที่แห้งสะอาดขนาด 100 มิลลิลิตร พร้อมทั้งใส่แท่งกวน
แม่เหล็ก (ทำ flame dried แล้วทิ้งไว้ให้เย็นภายใต้บรรยากาศของก๊าซไนโตรเจน) จากนั้นเตรียม
สารละลายของ Carbazole-9-yl-acetic acid (7) 0.20 กรัม (8.9×10^{-4} โมล) ในกรดอะซิติก 5
มิลลิลิตร ลงในขวดก้นกลมขนาด 100 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้ ที่อุณหภูมิห้อง คนสารละลายจน
Carbazole-9-yl-acetic acid ละลายในกรดอะซิติกหมด แล้วเติม 90% HNO_3 4.0 มิลลิลิตร
(7.2×10^{-2} โมล) ที่อุณหภูมิเดียวกัน แล้วทำปฏิกิริยาต่อโดยเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 65 องศาเซลเซียส คน
สารละลายต่อจนปฏิกิริยาลิ้นสุดลงเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นตะกอนสีเหลือง
จากนั้นทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิค NMR Spectroscopy

พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิค NMR Spectroscopy ได้ผล
ดังนี้

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.17 (s, 1H), 8.39 (d, J = 9.0 Hz, 1H),
8.37 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.93 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.41 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.37 (t, J = 7.4
Hz, 1H) และ 8.02 (d, J = 7.5 Hz, 1H) ppm

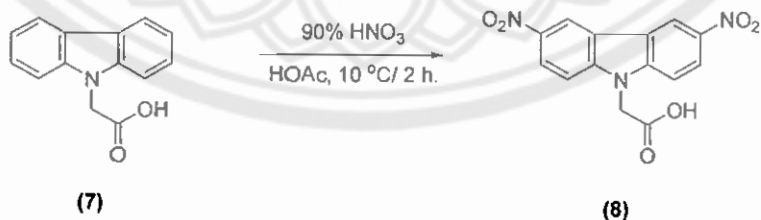
วิธีการสังเคราะห์วิธีที่ 3



ภาพ 34 วิธีที่ 3 การสังเคราะห์ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid (8)

เตรียมขวดก้นกลมที่แห้งสะอาดขนาด 100 มิลลิลิตร พร้อมทั้งใส่แท่งกวนแม่เหล็ก (ทำ flame dried แล้วทิ้งไว้ให้เย็นภายใต้บรรยากาศของก๊าซไนโตรเจน) จากนั้นเตรียมสารละลายของ Carbazole-9-yl-acetic acid (7) 0.11 กรัม (4.4×10^{-4} โมล) ใน acetic acid 5 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นกลมขนาด 100 มิลลิลิตร คนสารละลายจน Carbazole-9-yl-acetic acid ละลายใน acetic acid หมด แล้วเติม 90% HNO_3 2.0 มิลลิลิตร (3.6×10^{-2} โมล) ที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิเดียวกัน และคนสารละลายเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นตะกอนสีเหลืองนำสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ต่อเข้ากับเครื่องปั๊มสุญญากาศสมรรถนะสูง และพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิค FT-IR Spectroscopy พบค่า $\nu = 1719 \text{ cm}^{-1}$ (C=O)

วิธีการสังเคราะห์วิธีที่ 4



ภาพ 35 วิธีที่ 4 การสังเคราะห์ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid (8)

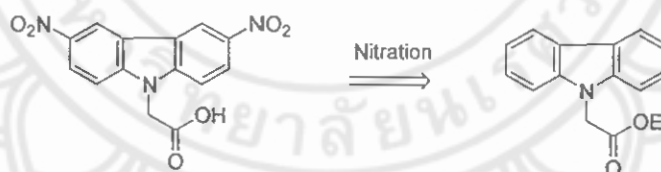
เตรียมขวดก้นกลมที่แห้งสะอาดขนาด 100 มิลลิลิตร พร้อมทั้งใส่แท่งกวนแม่เหล็ก (ทำ flame dried แล้วทิ้งไว้ให้เย็นภายใต้บรรยากาศของก๊าซไนโตรเจน) จากนั้นเตรียมสารละลายของ Carbazole-9-yl-acetic acid (7) 0.13 กรัม (5.8×10^{-4} โมล) ในกรด 5 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นกลมขนาด 100 มิลลิลิตร คนสารละลายจน Carbazole-9-yl-acetic acid ละลายใน acetic acid หมด แล้วเติม 90% HNO_3 2.0 มิลลิลิตร (4.6×10^{-2} โมล) ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แล้วทำปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิเดียวกันและคนสารละลายเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นตะกอนสีเหลือง มีค่า $R_f = 0.26$ (5% MeOH / CH_2Cl_2)

พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิค NMR Spectroscopy ได้ผลดังนี้

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.46 (s, 1H), 8.39 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 7.93 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H) และ 5.47 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H) ppm

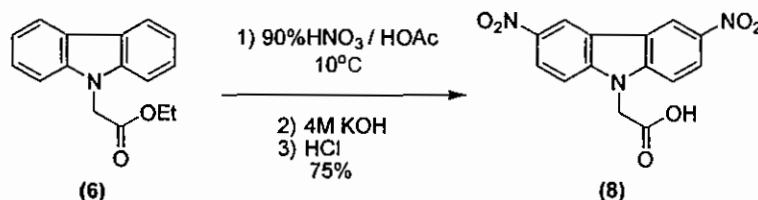
แนวทางที่ 3 สังเคราะห์ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid (8) โดยใช้ Carbazole-9-yl-acetic acid ethyl ester (6) เป็นสารตั้งต้น

Retrosynthesis



ภาพ 36 แนวทางที่ 3 Retrosynthesis ของ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid (8)

วิธีการสังเคราะห์



ภาพ 37 การสังเคราะห์ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid (8)

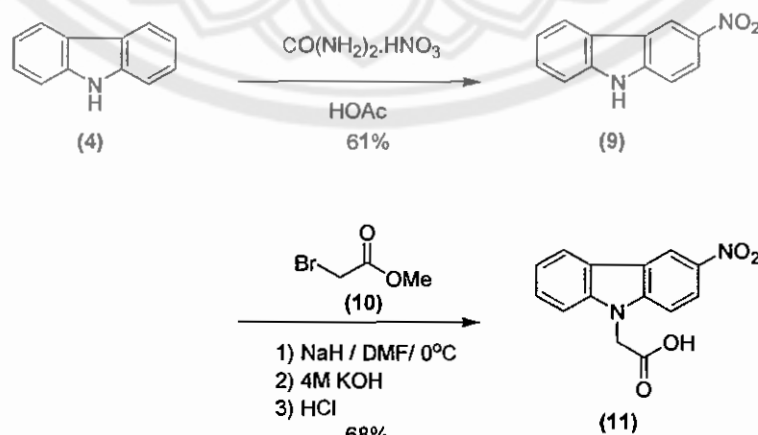
การสังเคราะห์ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid สามารถสังเคราะห์ได้ โดยเตรียมสารละลายของ Carbazole-9-yl-acetic acid ethyl ester (6) 1 กรัม (4×10^{-3} โมล) ใน acetic acid คนสารละลายจนละลายอย่างสมบูรณ์และลดอุณหภูมิของสารละลายลงมาที่ 10 องศาเซลเซียส และทำการเติม 90% HNO_3 (5.93×10^{-2} โมล) โดยแบบต่อเนื่องเป็นเวลา ประมาณ 15 นาที คนสารละลายที่อุณหภูมิเดียวกันนี้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง กรองตะกอนที่เกิดขึ้น แล้ว ทำการไฮโดรลิซิส โดยการเติมสารละลาย 4M KOH จนสารละลายหมดและทำการ reflux 12 ชั่วโมง ลดอุณหภูมิของสารละลายลงเหลือประมาณ 5-10 องศาเซลเซียส เติมน้ำกลั่น กรด ไฮโดรคลอริกเข้มข้น จนมีค่าประมาณ $\text{pH} = 2$ จะเกิดตะกอนของ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid (8) กรองและล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น และทำให้บริสุทธิ์โดยการละลายใน สารละลาย CH_2Cl_2 คนสารละลายและกรองด้วยกระดาษกรอง ล้างตะกอนด้วยสารละลาย CH_2Cl_2 และทำให้แห้งด้วยเครื่องปั๊มสุญญากาศสมรรถนะสูง ได้ผลิตภัณฑ์ 0.94 กรัม (75% yield) มีค่า $R_f = 0.21$ (10% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$)

พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารผลิตภัณฑ์ (8) ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy ได้ผล ดังนี้

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ 5.44 (s, 2H), 7.86 (d, $J=9.1$ Hz, 2H), 8.39 (d, $J=9.1$ Hz, 2H) และ 9.42 (s, 2H) ppm

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 45.0, 110.9, 118.5, 122.1, 122.6, 141.5, 145.1 และ 169.2 ppm

2.3 การสังเคราะห์ 3-Nitrocarbazole-9-yl-acetic acid (11)



ภาพ 38 การสังเคราะห์ 3-Nitrocarbazole-9-yl-acetic acid (11)

การสังเคราะห์ 3-Nitrocarbazole-9-yl-acetic acid (11) สามารถสังเคราะห์ได้โดยเตรียมสารละลายของ Carbazole (4) 3 กรัม (2×10^{-2} โมล) ในสารละลายกรดอะซิติกจำนวน 150 มิลลิลิตร ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส จนสารละลายจนสารเกิดการละลายอย่างสมบูรณ์ ทำการเติมสาร Urea nitrate 2.65 กรัม (2.00×10^{-2} โมล) และทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิเดียวกันนี้ 30 นาที สารละลายผสมจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เมื่อปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร กรองตะกอนที่เกิดขึ้นพร้อมกับล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น ตะกอนที่ได้นำมาตกผลึกในโทลูอีนได้ 3-Nitro-9H-carbazole (9) 2.34 กรัม (61 % yield) มีค่า $R_f = 0.4$ (20% EtOAc/Hexane)

พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารผลิตภัณฑ์ (9) ด้วยเทคนิค NMR ได้ผลดังนี้

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.29 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.49-7.64 (m, 3H), 8.28 (dd, $J_1 = 2.2$ Hz, $J_2 = 6.8$ Hz, 1H), 8.36 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 9.15 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H) และ 12.06 (s, 1H, NH) ppm

จาก 3-Nitro-9H-carbazole (9) ที่เตรียมได้นำมาทำปฏิกิริยาอัลคิลเลชัน โดยทำการเตรียมสารละลายของ 3-Nitro-9H-carbazole 1 กรัม (5×10^{-3} โมล) ใน anhydrous DMF 40 มิลลิลิตร จากนั้นเติม NaH 0.34 กรัม (1.4×10^{-2} โมล) จนสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะบรรยากาศของก๊าซไนโตรเจนและลดอุณหภูมิของสารละลายลงไปที่ 0 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมสารละลาย Methyl bromoacetate (10) 0.52 มิลลิลิตร โดยทำการเติมแบบต่อเนื่องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องอีก 1 ชั่วโมง เมื่อปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์ทำการไฮโดรลิซิส โดยการเติมสารละลาย 4 M KOH และเติมสารละลาย 2 N HCl จนมีค่า pH = 2 กรองตะกอนที่เกิดขึ้น และล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น ทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกในโทลูอีน ได้ 3-Nitrocarbazole-9-yl-acetic acid (11) 0.87 กรัม (68 % yield) มีค่า $R_f = 0.3$ (10% MeOH/ CH_2Cl_2)

พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารผลิตภัณฑ์ (11) ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy ได้ผลดังนี้

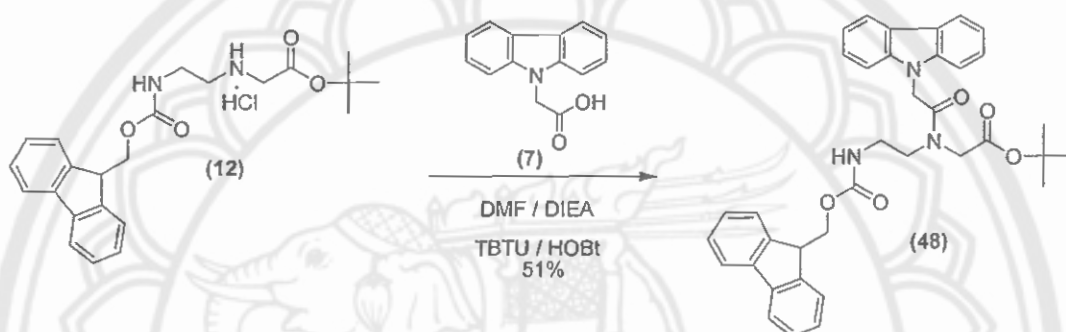
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 5.37 (s, 2H), 7.35 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.57 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.68 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.78 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 8.34 (dd, $J = 2.3$ Hz, 1H), 8.42 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H) และ 9.19 (s, 1H) ppm

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 44.4, 109.8, 110.4, 117.2, 120.9, 121.3, 121.4, 122.1, 122.2, 127.5, 140.4, 141.8, 143.9 และ 169.6 ppm

3. การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ PNA โมโนเมอร์

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ PNA โมโนเมอร์ โดยใช้ปฏิกิริยา coupling reaction ระหว่าง PNA backbone กับ aromatic acetic acid derivatives โดยใช้ peptide coupling agent เช่น HATU, TBTU, HOBt และ 2,6-Lutidine แสดงในภาคผนวก ง

3.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ *tert*-Butyl N-[2-(*N*'-9-fluorenylmethoxycarbonyl) aminoethyl]-*N*-[(carbazole)acetyl] glycinate (48)



ภาพ 39 การสังเคราะห์ *tert*-Butyl N-[2-(*N*'-9-fluorenylmethoxycarbonyl) aminoethyl]-*N*-[(carbazole)acetyl] glycinate (48)

สารผลิตภัณฑ์ (48) สามารถสังเคราะห์ได้โดยเตรียมสารละลายของ PNA backbone (12) 0.10 กรัม (2.3×10^{-4} โมล) ใน anhydrous DMF 5 มิลลิลิตร และเติมสารละลายของเบส DIEA 0.10 มิลลิลิตร (5.8×10^{-4} โมล) จากนั้นคนสารละลายผสมด้วยเครื่องคนระบบแม่เหล็กเป็นเวลาประมาณ 20 นาที ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน เติม Carbazole-9-yl-acetic acid (7) 0.062 กรัม (2.8×10^{-4} โมล), TBTU 0.089 กรัม (2.8×10^{-4} โมล) และ HOBt 0.037 กรัม (2.8×10^{-4} โมล) ตามลำดับ คนสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ภายใต้บรรยากาศของก๊าซไนโตรเจน เมื่อปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์ ระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยแบบลดความดัน แล้วเติมสารละลาย CH_2Cl_2 ทำการสกัดด้วยสารละลายอิ่มตัว NaHCO_3 กับ brine (3 x 25 มิลลิลิตร) รวมชั้นของสารละลาย CH_2Cl_2 เติม anhydrous Na_2SO_4 ทำการกรองสารละลายและนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นแบบลดความดัน และนำไปตกผลึกที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส กรองแล้วทำการล้างตะกอนด้วยสารละลาย CH_2Cl_2 ที่เย็น และทำให้แห้งโดยต่อเข้ากับเครื่องปั๊มสุญญากาศสมรรถนะสูง ได้สารผลิตภัณฑ์ (48) เป็นของแข็งสีขาวจำนวน 0.074 กรัม (51% yield) มีค่า $R_f = 0.36$ (2% MeOH/ CH_2Cl_2)

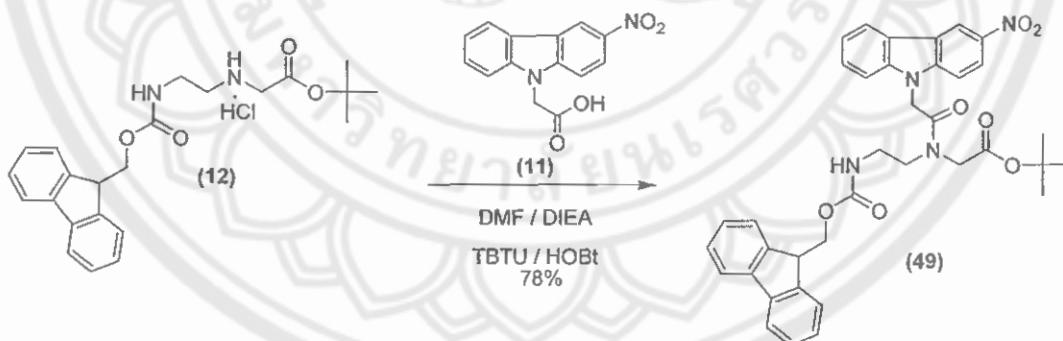
พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารผลิตภัณฑ์ (48) ด้วยเทคนิค NMR และ Mass spectroscopy ได้ผลดังนี้

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) (two rotamer) δ 1.45/1.58 (s, 9H), 3.20-3.22 (rotamer m, 1H), 3.37-3.39 (rotamer m, 1H), 3.53-3.60 (m, 2H), 3.93/4.05 (rotamer s, 2H), 4.19/4.25 (rotamer t, $J=7.2/6.8$ Hz, 1 H), 4.34/4.43 (rotamer d, $J=8.0/8.0$ Hz, 2H), 5.00/5.10 (rotamer s, 2H), 5.29/5.79 (rotamer br, 1H NH), 7.21-7.56 (m, 12H), 7.76 (d, $J=4.0$ Hz, 2H) และ 8.08 (d, $J=8.0$ Hz, 2H) ppm

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 28.0, 28.0, 29.7, 30.9, 47.23, 48.9, 49.9, 51.0, 67.1, 76.7, 77.0, 77.3, 83.6, 108.5, 108.6, 119.5, 119.6, 119.9, 120.0, 120.4, 120.5, 123.2, 123.3, 125.1, 126.0, 126.04, 127.1, 127.7, 127.8, 140.7, 140.8, 141.3, 143.8, 143.9 และ 168.6 ppm

HRMS : Calcd. For $\text{C}_{37}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_5$ m/z 603.27, found 626.26 (M+Na)

3.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ *tert*-Butyl *N*-[2-(*N*'-9-fluorenylmethoxycarbonyl) aminoethyl]-*N*-[(3-nitrocarbazole)acetyl] glycinate (49)



ภาพ 40 *tert*-Butyl *N*-[2-(*N*'-9-fluorenylmethoxycarbonyl) aminoethyl]-*N*-[(3-nitrocarbazole)acetyl]glycinate (49)

สารผลิตภัณฑ์ (49) สามารถสังเคราะห์ได้โดยเตรียมสารละลายของ PNA backbone (12) 0.30 กรัม (6.9×10^{-4} โมล) ในสารละลาย anh. DMF 5 มิลลิลิตร และเติมสารละลายของเบส DIEA 0.30 มิลลิลิตร (1.7×10^{-3} โมล) จากนั้นคนสารละลายผสมด้วยเครื่องคนระบบแม่เหล็กเป็นเวลาประมาณ 20 นาที ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน จากนั้นเติม

3-Nitrocarbazole-9-yl-acetic acid (11) 0.23 กรัม (8.3×10^{-4} โมล), TBTU 0.27 กรัม (8.3×10^{-4} โมล) และ HOBt 0.11 กรัม (8.3×10^{-4} โมล) ตามลำดับ และคนสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมงภายใต้บรรยากาศของก๊าซไนโตรเจน เมื่อปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์ระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยแบบลดความดัน แล้วเติมสารละลาย CH_2Cl_2 ทำการสกัดด้วยสารละลายอิ่มตัว NaHCO_3 กับ brine (3×25 มิลลิลิตร) ชั้นของสารละลาย CH_2Cl_2 เติม $\text{anh. Na}_2\text{SO}_4$ ทำการกรองสารละลายและนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นแบบลดความดัน และทำสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบสารละลาย 1% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ได้สารผลิตภัณฑ์ (49) เป็นของแข็งสีเหลือง 0.35 กรัม (78 % yield) มีค่า $R_f = 0.19$ (1% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$)

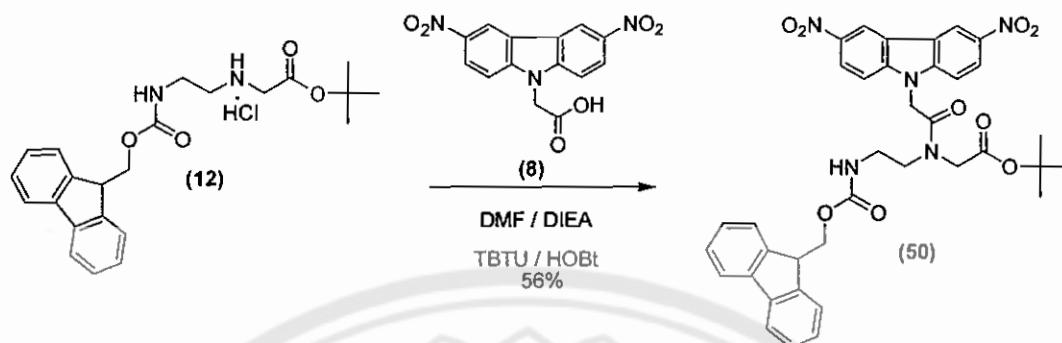
พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารผลิตภัณฑ์ (49) ด้วยเทคนิค NMR และ Mass spectroscopy ได้ผลดังนี้

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) (two rotamer) δ 1.57 (rotamer s, 9H), 3.3/3.45 (rotamer s, 2H), 3.57/3.66 (rotamer s, 2H), 3.95/4.13 (rotamer s, 2H), 4.25 (s, 1H), 4.38/4.53 (rotamer d, $J=6.0$ Hz, 2H), 5.11/5.30 (rotamer s, 2H), 5.9 (s, 1H), 7.25-8.14 (m, 14H) และ 8.99 (s, 1H) ppm

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 28.1, 28.2, 39.5, 44.9, 47.4, 49.0, 49.8, 51.0, 66.8, 76.8, 77.2, 77.5, 82.8, 84.1, 108.4, 109.4, 117.2, 120.1, 121.0, 121.1, 121.2, 121.3, 121.8, 123.0, 125.1, 127.2, 127.7, 127.9, 141.4, 141.5, 143.9, 144.1, 156.8, 166.8, 167.6, 168.7 และ 169.0 ppm

HRMS : Calcd. For $\text{C}_{37}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_7$; m/z 648.26 , found 671.25 (M+Na)

3.3 การสังเคราะห์ *tert*-Butyl *N*-[2-(*N*'-9-fluorenylmethoxycarbonyl)aminoethyl]-*N*-[(3,6-dinitrocarbazole)acetyl] glycinate (50)



ภาพ 41 *tert*-Butyl *N*-[2-(*N'*-9-fluorenylmethoxycarbonyl) aminoethyl]-*N*-[(3,6-dinitrocarbazole)acetyl]glycinate (50)

สารผลิตภัณฑ์ (50) สามารถทำการสังเคราะห์ได้โดยเตรียมสารละลายของ PNA backbone (12) 0.30 กรัม (6.9×10^{-4} โมล) ใน anhyd. DMF 5 มิลลิลิตร และทำการเติมสารละลายเบส DIEA 0.30 มิลลิลิตร (1.7×10^{-3} โมล) คนสารละลายผสมด้วยเครื่องคนระบบแม่เหล็กเป็นเวลาประมาณ 20 นาที จากนั้นเติม 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid (8) 0.26 กรัม (8.3×10^{-4} โมล), TBTU 0.27 กรัม (8.3×10^{-4} โมล) และ HOBt 0.11 กรัม (8.3×10^{-4} โมล) ตามลำดับ และคนสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ภายใต้บรรยากาศของก๊าซไนโตรเจน เมื่อปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์จะเหี่ยวตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยแบบลดความดัน แล้วเติมสารละลาย CH_2Cl_2 และทำการสกัดด้วยสารละลายอิ่มตัวของ NaHCO_3 กับ brine (3 x 25 มิลลิลิตร) ชั้นของตัวทำละลาย CH_2Cl_2 เติม Na_2SO_4 ทำการกรองสารละลายและนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นแบบลดความดัน จากนั้นนำไปตกผลึกที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส กรองผลึกและทำให้แห้งโดยต่อเข้ากับเครื่องปั๊มสุญญากาศสมรรถนะสูง ได้สารผลิตภัณฑ์ (50) เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อนจำนวน 0.27 กรัม (56 % yield) มีค่า $R_f = 0.24$ (2% MeOH/ CH_2Cl_2)

พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารผลิตภัณฑ์ (50) ด้วยเทคนิค NMR และ Mass spectroscopy ได้ผลดังนี้

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) (two rotamer) δ 1.35/1.55 (rotamer s, 9H), 3.11-3.13 (rotamer m, 1H), 3.30-3.32 (rotamer m, 1H), 3.43-3.44 (rotamer m, 1H), 3.64-3.65 (rotamer m, 1H), 3.94-4.40 (rotamer s, 2H), 4.23-4.25 (rotamer m, 1H), 4.29-4.42 (rotamer m, 2H), 5.43/5.70 (rotamer s, 2H), 7.29 (t, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.38 (t, $J=8.0$ Hz, 2H),

7.64–7.74 (m, 4H), 7.87 (t, $J=8.0$ Hz, 2H), 8.35/8.44 (rotamer d, $J=8.0/4.0$ Hz, 2H) และ 9.52 (s, 2H) ppm

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 27.7, 27.8, 44.6, 45.1, 46.8, 47.5, 48.8, 65.5, 80.8, 80.9, 109.7, 110.6, 110.8, 111.0, 118.6, 120.0, 120.1, 121.3, 122.1, 122.2, 122.5, 122.7, 125.0, 127.0, 127.3, 127.6, 128.9, 139.4, 140.7, 141.5, 143.8, 145.5, 166.2, 166.6, 166.7, 167.9 และ 169.1 ppm

HRMS : Calcd. For: $\text{C}_{37}\text{H}_{35}\text{N}_5\text{O}_9$ m/z 693.24, found 716.23 (M+Na)

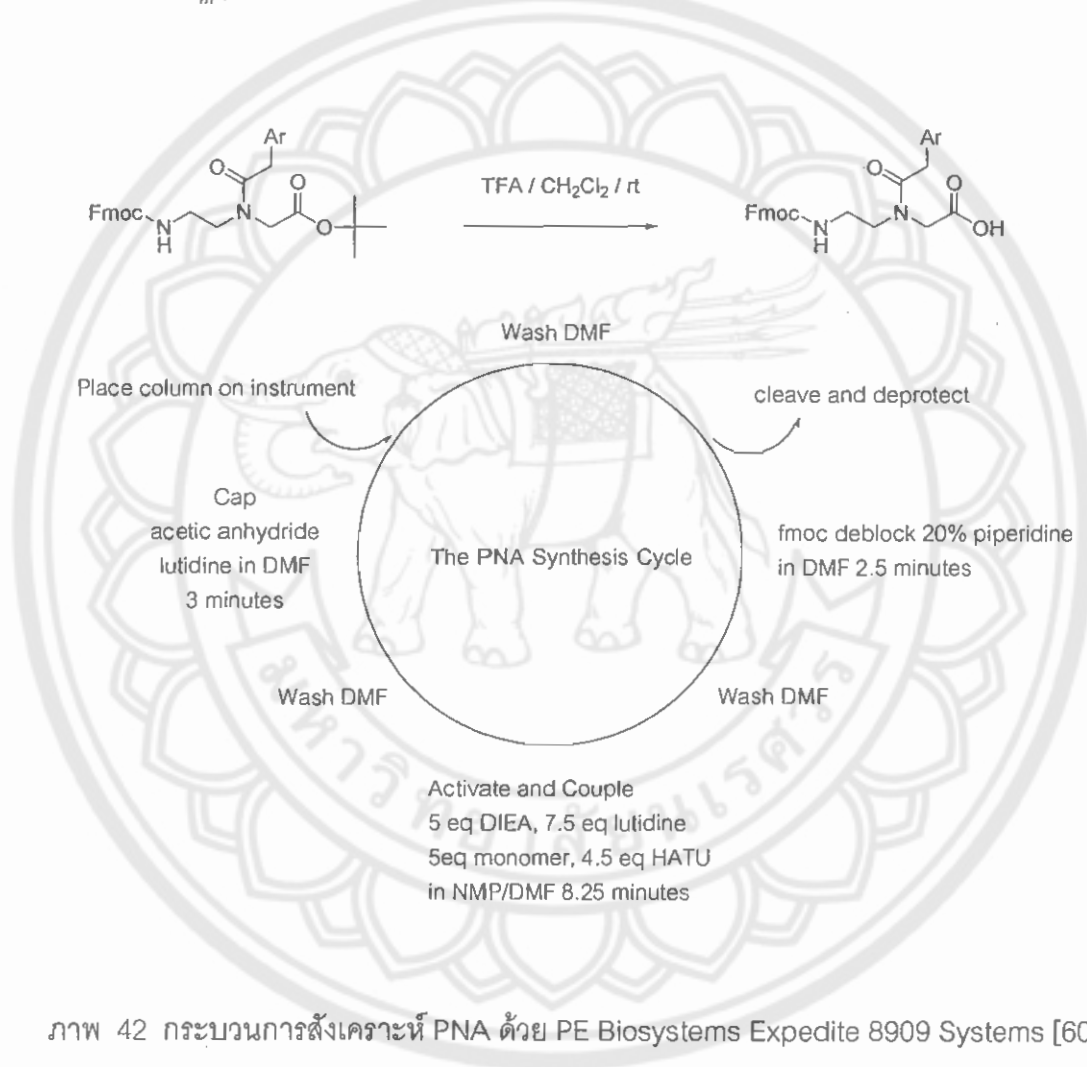
การศึกษาคุณสมบัติการเป็นยูนิเวอร์ซอลเบสของ PNA โอลิโกเมอร์ที่ประกอบด้วยอนุพันธ์ของคาร์บาไซล

PNA โอลิโกเมอร์ที่ประกอบด้วยอนุพันธ์ของคาร์บาไซล สังเคราะห์โดยใช้วิธีมาตรฐานของการสังเคราะห์แบบ solid-phase แบบอัตโนมัติด้วยเครื่อง PE Biosystems Expedite 8909 DNA/PNA synthesizer แสดงในภาพ 42 โดยเตรียม 15 เมอร์ ที่มีลำดับของเบสเป็น H-TGT-ACG-X-CAC-AAC-TA-NH₂ โดยที่ตำแหน่ง X แทนตำแหน่งของอนุพันธ์ของคาร์บาไซล แสดงในภาพ 43 กระบวนการสังเคราะห์ประกอบด้วยขั้นตอน 3 ขั้นตอน ขั้นแรก สังเคราะห์ลำดับของเบสส่วนแรกของสาย PNA oligomer (-CAC-AAC-TA-NH₂) ด้วยเครื่องอัตโนมัติ DNA/PNA synthesizer ขั้นสอง สังเคราะห์ด้วยวิธี manual coupling ระหว่างส่วนแรกของสาย กับ PNA โมโนเมอร์ของอนุพันธ์ของคาร์บาไซล (X) และขั้นตอนที่สาม สังเคราะห์ส่วนที่สองของสาย PNA โอลิโกเมอร์ (H-TGT-ACG-) ด้วยเครื่องอัตโนมัติ DNA/PNA synthesizer กลไกการเกิดปฏิกิริยาแสดงในภาคผนวก ง

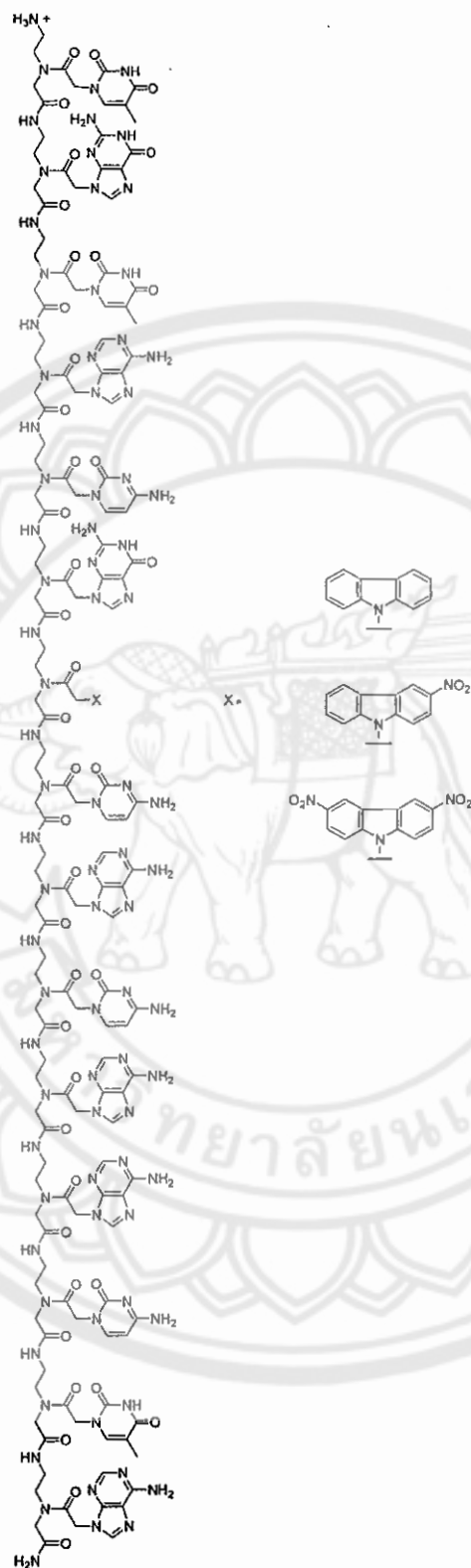
ทำการ deprotect resin ที่เชื่อมติดอยู่กับ PNA โอลิโกเมอร์ด้วยสารละลายผสมระหว่าง TFA/*m*-cresol ตกตะกอนสารละลายด้วยการเติมสารละลายอีเทอร์ และทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค reverse phase HPLC ที่อุณหภูมิคอลัมน์ที่ 55 องศาเซลเซียส ส่วนของสารที่แยกได้นำไปทำการ lyophilize จะได้ผลิตภัณฑ์ของ PNA โอลิโกเมอร์ และยืนยันผลการสังเคราะห์ด้วย MALDI-TOF mass spectrometry

การวิเคราะห์หาค่า T_m จะทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ที่เชื่อมต่อกับ peltier-heated cell และคอมพิวเตอร์สำหรับควบคุมอุณหภูมิ ทำให้ PNA โอลิโกเมอร์เกิดการเข้าคู่กับ DNA ที่เป็นเบสคู่สม โดยใช้ความเข้มข้นของสาร 4 μM ในสารละลายบัฟเฟอร์ ฟอสเฟตที่ประกอบด้วย 10 mM Sodium phosphate, 100 mM NaCl และ 0.1 mM EDTA แล้ว

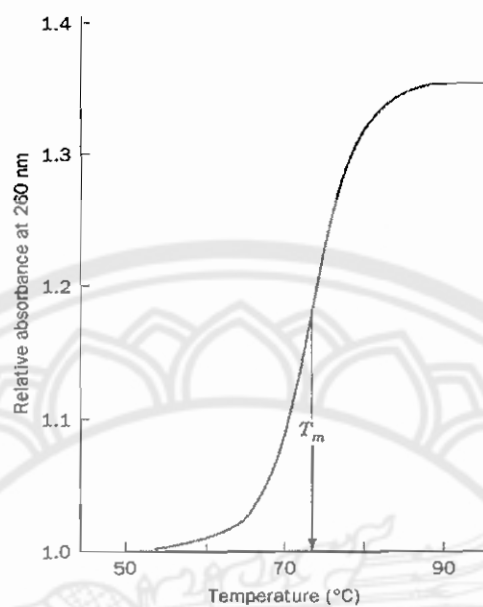
ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างที่มีความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร โดยเริ่มเพิ่มอุณหภูมิจาก 20 ถึง 80 ในอัตรา 0.5 องศาเซลเซียสต่อนาที และอัตราการลดอุณหภูมิ 0.8 องศาเซลเซียสต่อนาที ทำซ้ำทั้งหมด 4 ครั้ง จะได้ค่าการดูดกลืนแสงแต่ละช่วงอุณหภูมิ เมื่อนำมาสร้างกราฟระหว่างอุณหภูมิกับค่าการดูดกลืนแสง จะได้กราฟแบบ sigmoid แสดงในภาพ 44 ทำการคำนวณหาค่า T_m , ΔS และ ΔG ด้วยโปรแกรม Meltwin แสดงในภาคผนวก ก



ภาพ 42 กระบวนการสังเคราะห์ PNA ด้วย PE Biosystems Expedite 8909 Systems [60]



ภาพ 43 ลำดับของ PNA โอลิโกเมอร์ และอนุพันธ์ของ Carbazole ที่ใช้ในการศึกษาคุณสมบัติของยูนิเวอร์ซอลเบส



ภาพ 44 กราฟ melting temperature (T_m) ของโครงสร้างแบบคู่เบสของ DNA