

บทที่ 4

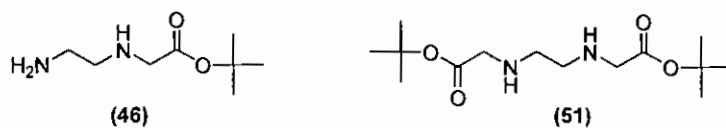
ผลการทดลองและการอภิปรายผล

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

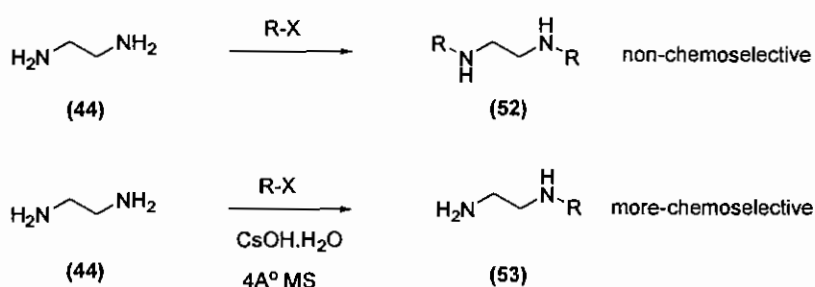
การสังเคราะห์ PNA backbone (12) เป็นการสังเคราะห์ผ่าน 2 ขั้นตอน โดยขั้นตอนแรกเป็นการทำปฏิกิริยาระหว่าง Ethylenediamine กับ *tert*-butyl bromoacetate สารผลิตภัณฑ์ที่ได้ในขั้นตอนนี้ควรเป็น Monoalkylation (46) แต่เนื่องจาก Ethylenediamine มีกลุ่มของหมู่อะมิโน 2 ตำแหน่งในโครงสร้าง ดังนั้นสถานะของปฏิกิริยาที่ใช้ต้องมีความเป็น regioselective ที่สูงได้โดยใช้สถานะที่มีความแตกต่างของจำนวนโมลของสารตั้งต้นและตัวกำหนดปริมาณ ในอัตราส่วนจำนวนโมลที่เหมาะสมคือ ใช้ Ethylenediamine 8.00 eq. และ *tert*-butyl bromoacetate 1.00 eq. และควบคุมอัตราการเติมสารต้องเติมแบบต่อเนื่อง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาแบบเฉพาะเจาะจงมากขึ้น โดยสารผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นน้ำมันสีเหลืองอ่อน จำนวน 8.48 กรัม คิดเป็นร้อยละ 53 จากการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ แสดงในภาพ 47 พบพีคที่ 1.45 ppm (s, 9H) ซึ่งเป็นของกลุ่ม *tert*-butyl และ 3.29 ppm (s, 2H) ซึ่งเป็นของ CH_2 ที่อยู่ระหว่างกลุ่มของ amino และ carbamate

นอกจากนี้ข้อมูลของ NMR ยังยืนยันว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็น monoalkylation ทั้งนี้สามารถดูได้จากอัตราส่วนของจำนวนโปรตอนตำแหน่ง 2.68 ppm (t, $J=5.7$ Hz, 2H) หรือ 2.80 ppm (t, $J=5.6$ Hz, 2H) ซึ่งเป็น CH_2 ที่มาจาก Ethylenediamine unit กับ จำนวนโปรตอนตำแหน่ง 3.29 ppm (s, 2H) ที่มาจาก *tert*-butyl bromoacetate unit โดยพบว่าอัตราส่วนของจำนวนโปรตอนดังกล่าวมีค่าเท่ากับ 1:1

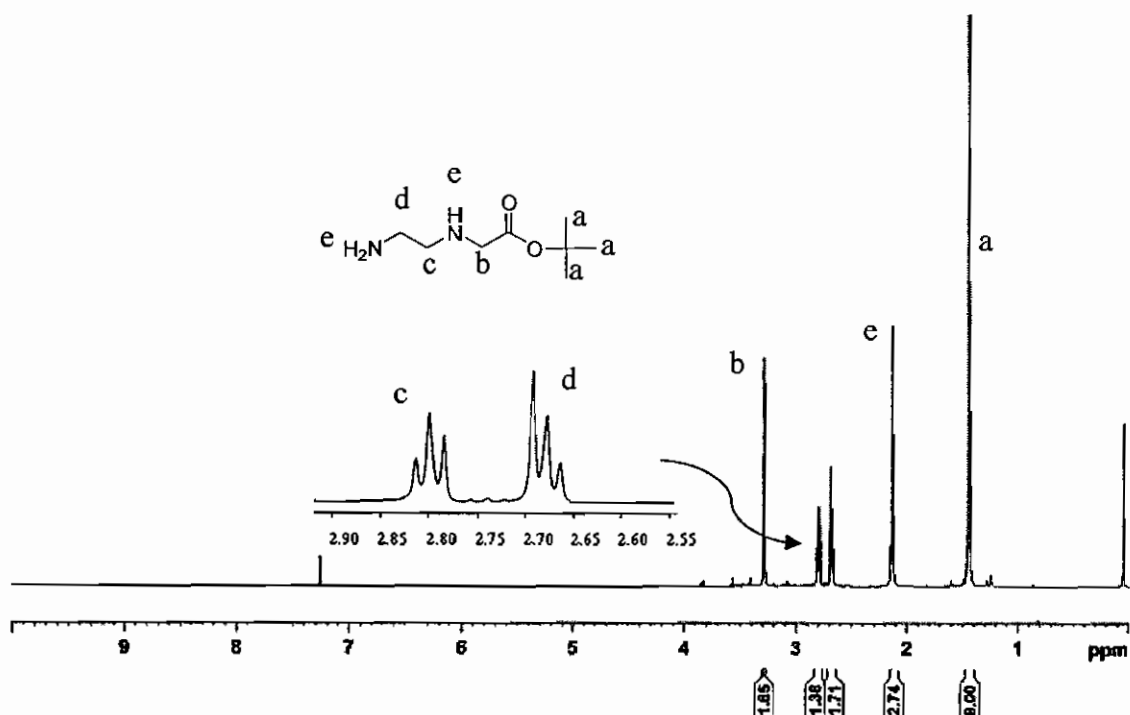
จากการศึกษาพบว่าเปอร์เซ็นต์ร้อยละของสารผลิตภัณฑ์ยังต่ำถึงแม้ว่าจะมีการควบคุมอัตราส่วนของสารตั้งต้นและสารกำหนดปริมาณในอัตราส่วนโดยโมล 1:8 ก็ตาม ที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจาก การใช้ dropping funnel ทำการควบคุมอัตราการเติมสารอย่างต่อเนื่องค่อนข้างยาก จึงทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็น Dialkylation (51) เกิดขึ้น โดยปัญหานี้สามารถแก้ไขได้โดยทำการเติม $\text{CsOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ ร่วมกับ 4 Å molecular sieve และจะทำให้เกิด Monoalkylation มากขึ้น [61]



ภาพ 45 โครงสร้างทางเคมีของสารผลิตภัณฑ์ Monoalkylation (46) และ Dialkylation (51)



ภาพ 46 N-alkylation ของ Diamine [61]



ภาพ 47 ¹H-NMR สเปกตรัมของ *tert*-Butyl *N*-(2-aminoethyl) glycinate (46) ใน CDCl₃

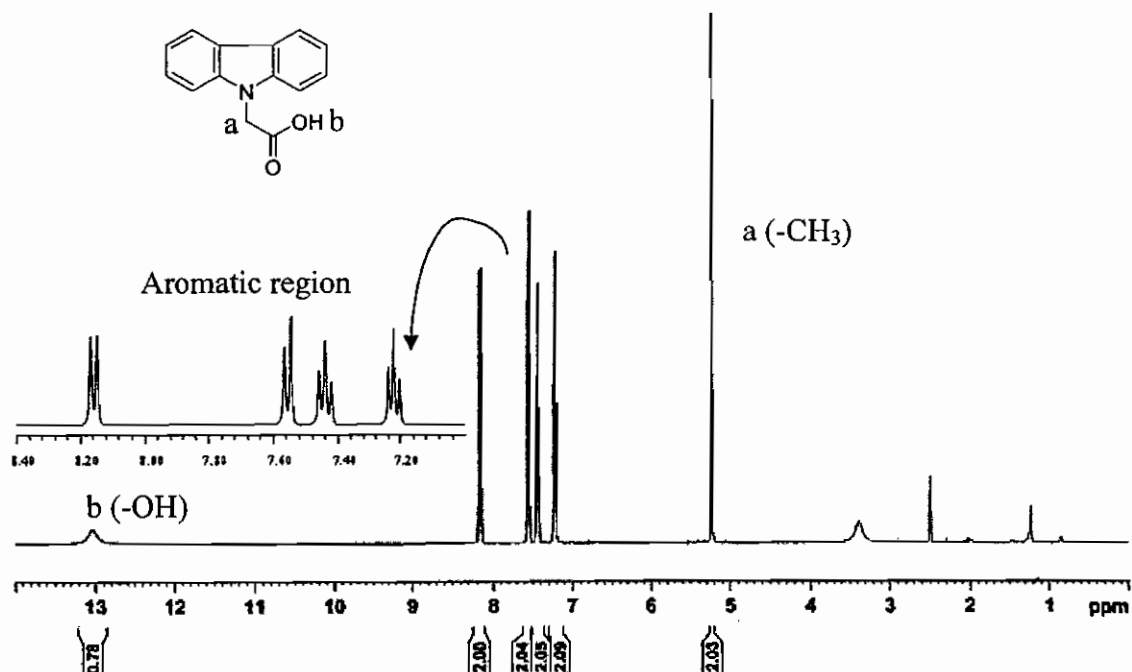
ภาพ 48 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของ *tert*-Butyl *N*-[2-(*N'*-9-fluorenylmethoxycarbonyl)aminoethyl] glycinate hydrochloride (12) ใน $\text{DMSO-}d_6$

2. การเตรียม universal base candidate ให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ของ acetic acid

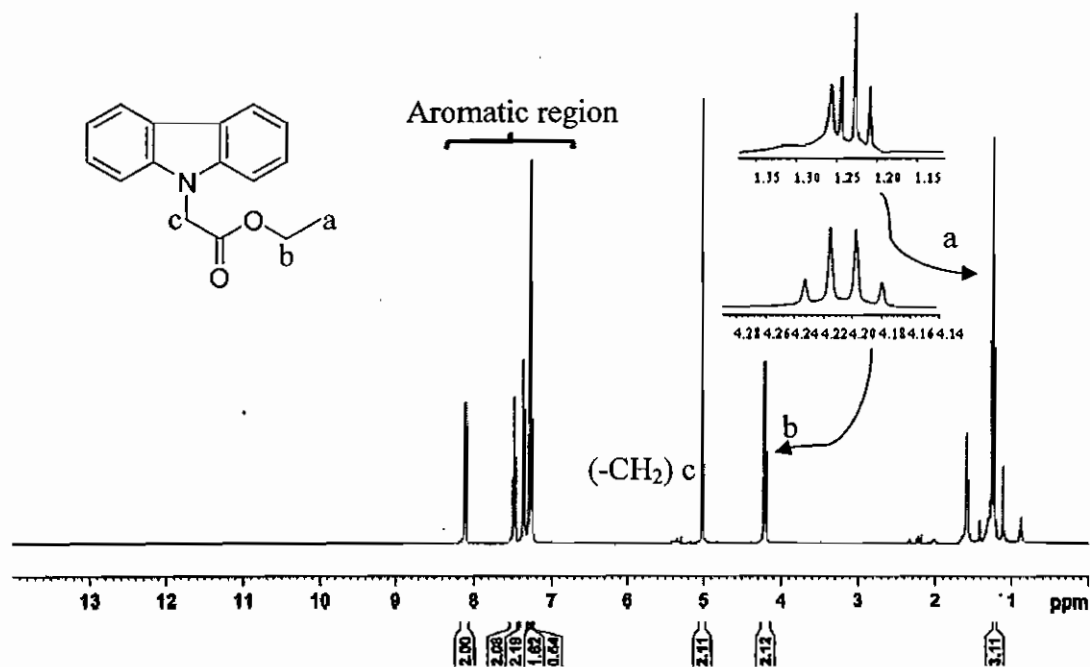
2.1 การสังเคราะห์ Carbazole-9-yl-acetic acid (7) และ Carbazole-9-yl-acetic acid ethyl ester (6)

Carbazole-9-yl-acetic acid สามารถสังเคราะห์ได้โดยทำปฏิกิริยาอัลคิลเลชันของ Carbazole (4) ด้วยสารละลาย Ethyl bromoacetate และทำปฏิกิริยาเบสไฮโดรลิซิสได้ผลิตภัณฑ์ของ Carbazole-9-yl-acetic acid (7) เป็นผลึกสีขาว 3.56 กรัม คิดเป็นร้อยละของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 88 มีค่า $R_f = 0.58$ (20% MeOH/CH₂Cl₂) ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิค ¹H-NMR แสดงในภาพ 49 และ ¹³C NMR สเปกตรัมของสารผลิตภัณฑ์ แสดงในภาคผนวก ข (ภาพ 67) ยืนยันโครงสร้างที่เกิดขึ้นของ Carbazole-9-yl-acetic acid ได้ดังนี้ คือ aromatic region ของกลุ่ม Carbazole อยู่ที่ 7.27-8.10 ppm จำนวน 8 โปรตอนและพบกลุ่ม CH₂ จากที่เชื่อมต่อระหว่างอะตอมไนโตรเจนของ Carbazole กับ COOH อยู่ที่ 5.24 ppm (s, 2H) และพบพีคของ COOH ที่ 13.0 ppm (s, 1H)

เนื่องจากในขั้นตอนการสังเคราะห์ Dinitrocarbazole ต้องใช้ Carbazole-9-yl-acetic acid ethyl ester เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ แต่เนื่องจาก Carbazole-9-yl-acetic acid ethyl ester ดังกล่าวสังเคราะห์จากปฏิกิริยาอัลคิลเลชันซึ่งมีผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาข้างเคียงจำนวนมากและยากในการแยกให้บริสุทธิ์ ดังนั้นจึงทำปฏิกิริยา esterification ของ Carbazole-9-yl-acetic acid ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์ของ Carbazole-9-yl-acetic acid ethyl ester (6) ที่มีความบริสุทธิ์สูง เป็นผลึกสีขาว 0.89 กรัม คิดเป็นร้อยละ 92 มีค่า $R_f = 0.77$ (100% CH₂Cl₂) ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารผลิตภัณฑ์ (6) ด้วยเทคนิค ¹H-NMR แสดงในภาพ 50 ยืนยันการเกิดหมู่เอสเตอร์คือพบพีคที่ 1.23 ppm (t, $J=7.1$ Hz, 3H, CH₃) และ 4.21 ppm (q, $J=7.1$ Hz, 2H, CH₂) ซึ่งเป็นโปรตอนจากหมู่ -CH₂CH₃ และพบพีคที่แสดงเอกลักษณ์ของ Carbazole อยู่ที่ 7.27-8.10 ppm จำนวน 8 โปรตอน



ภาพ 49 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของ Carbazole-9-yl-acetic acid (7) ใน DMSO- d_6

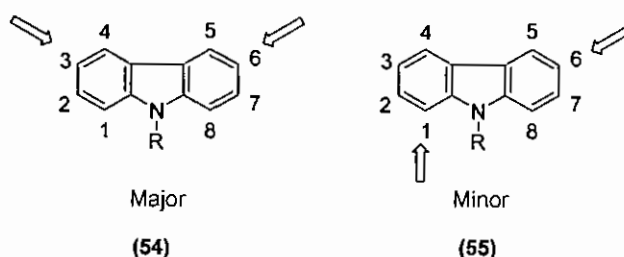


ภาพ 50 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของ Carbazole-9-yl-acetic acid ethyl ester (6) ใน CDCl_3

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

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

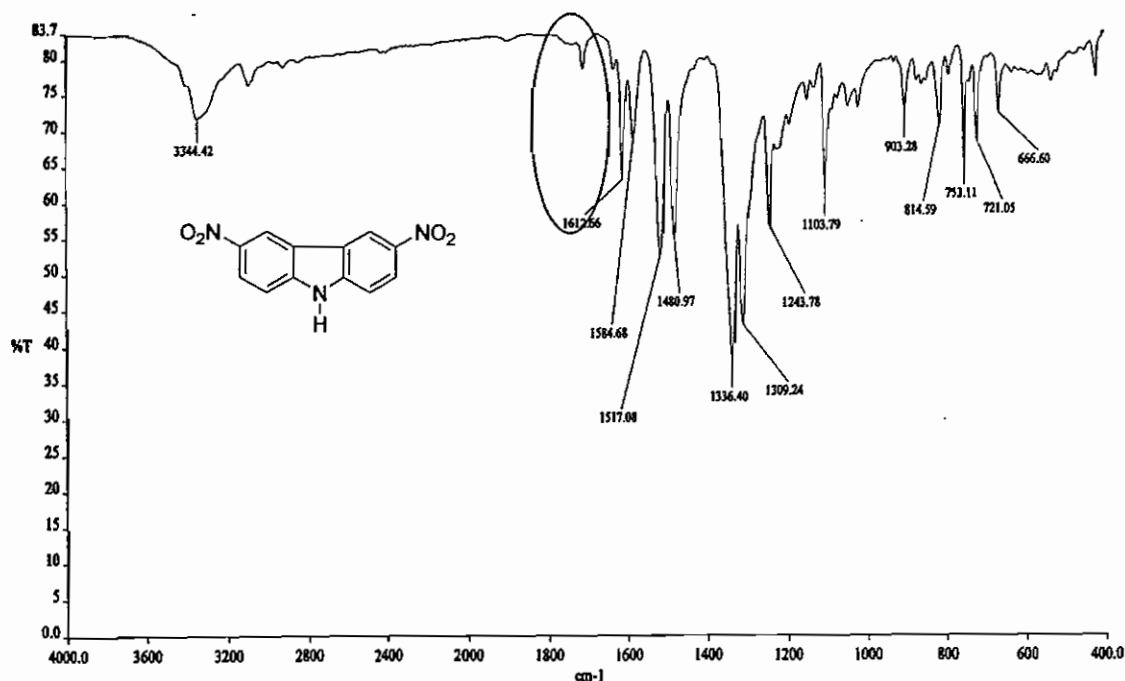
ทำการสังเคราะห์โดยทำปฏิกิริยาไนเตรชัน Carbazole ด้วย $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ร่วมกับ Acetic acid และ Acetic anhydride ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จากการศึกษาพบว่า เกิดของผสมผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยอนุพันธ์ของ 3,6- และ 1,6-Nitro-9H-carbazole การเกิดผลิตภัณฑ์ผสมระหว่าง 3,6- และ 1,6-Nitro-9H-carbazole เนื่องจากโครงสร้างที่สามารถเกิดเรโซแนนซ์ได้ของ คาร์บาโซลซึ่งเกิดจากอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวของอะตอมไนโตรเจน ทำให้สามารถเกิดการแทนที่ของอะโรมาติกได้ที่ตำแหน่ง ออร์โธ (o-) และพารา (p-) ของโครงสร้างได้ แสดงในภาพ 51 แต่ตำแหน่งที่เป็นตำแหน่งพาราจะมีความเสถียรมากกว่า [50] ทำให้ตำแหน่งที่ 3 และ 6 ซึ่งเป็นตำแหน่งพาราเกิดการแทนที่ที่มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยามากกว่า และปริมาณของผลิตภัณฑ์ทั้งสองชนิดจะขึ้นอยู่กับขนาดของหมู่แทนที่ที่ตำแหน่งไนโตรเจนของสารและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา สารผสมทั้งสองชนิดยากต่อการทำให้บริสุทธิ์เพราะฉะนั้นแนวทางที่ 1 จึงไม่ประสบผลสำเร็จ ดังนั้นเพื่อลดปัญหาการเกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็น 1,6-Dinitrocarbazole จึงเพิ่มหมู่แทนที่ด้วยหมู่ CH_2COOH ที่ตำแหน่งของอะตอมไนโตรเจนเพื่อเพิ่มความเกะกะในตำแหน่งที่ 1 และ 8 ของ Carbazole ดังนั้นการเกิด 1,6-Dinitrocarbazole น่าจะลดลงและเปอร์เซ็นต์ของ 3,6-Dinitrocarbazole ควรเพิ่มขึ้น ซึ่งจะสามารถแยกผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้มากขึ้น นอกจากนี้การใส่กลุ่มแทนที่ด้วยหมู่ CH_2COOH จะทำให้การการสังเคราะห์ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid ได้ภายในขั้นตอนเดียว ดังนั้นแนวทางการสังเคราะห์ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid ในแนวทางที่ 2 จึงเลือกใช้ Carbazole-9-yl-acetic acid เป็นสารตั้งต้น



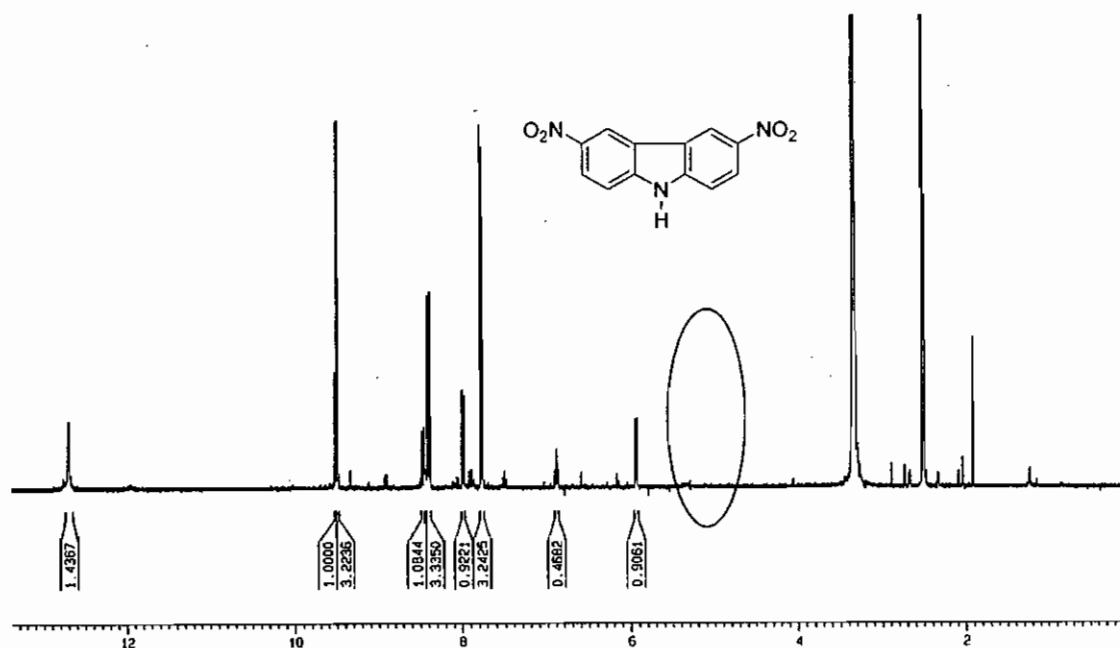
ภาพ 51 ผลิตภัณฑ์หลักและผลิตภัณฑ์รองของปฏิกิริยาไนเตรชัน

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

วิธีที่ 1 ทำการสังเคราะห์โดยทำปฏิกิริยาไนเตรชัน Carbazole-9-yl-acetic acid ด้วย $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ ร่วมกับ 65% Nitric acid และ Acetic acid ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากการศึกษพบว่า เกิดผลิตภัณฑ์ผสมของอนุพันธ์ของ Nitrocarbazole นอกจากนี้ยังเกิดการสูญเสียของหมู่อะซิติกแอซิด ($-\text{CH}_2\text{COOH}$) ทั้งนี้สังเกตได้จากการหายไปของหมู่คาร์บอนิล ($\text{C}=\text{O}$) ที่ค่า $\nu = 1719 \text{ cm}^{-1}$ ดังแสดงในภาพ 52 ซึ่งสอดคล้องกับ NMR spectroscopy ของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น ดังแสดงในภาพ 53 โดยพบว่าพีคสัญญาณของหมู่ CH_2 ที่ 5.44 ppm ซึ่งเป็นของ Methylene group ที่อยู่ระหว่าง COOH และ Carbazole หายไปจากข้อมูล IR และ NMR จึงเป็นการยืนยันชัดเจนว่าการสังเคราะห์โดยใช้ $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ ร่วมกับ 65% Nitric acid ที่ 90 องศาเซลเซียส ทำให้เกิดการเสียหมู่ CH_2COOH เนื่องจากอุณหภูมิที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาค่อนข้างสูง ดังนั้นแนวทางการแก้ไขน่าจะสามารถทำได้โดยการลดอุณหภูมิของปฏิกิริยาลง และใช้ 90% HNO_3 เป็นรีเอเจนต์ควรที่จะส่งผลให้เกิด 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid ได้มากขึ้น เพราะ 90% HNO_3 เป็นรีเอเจนต์ที่ค่อนข้างแรงในการเติมหมู่ไนโตรไปยังวงอะโรมาติก

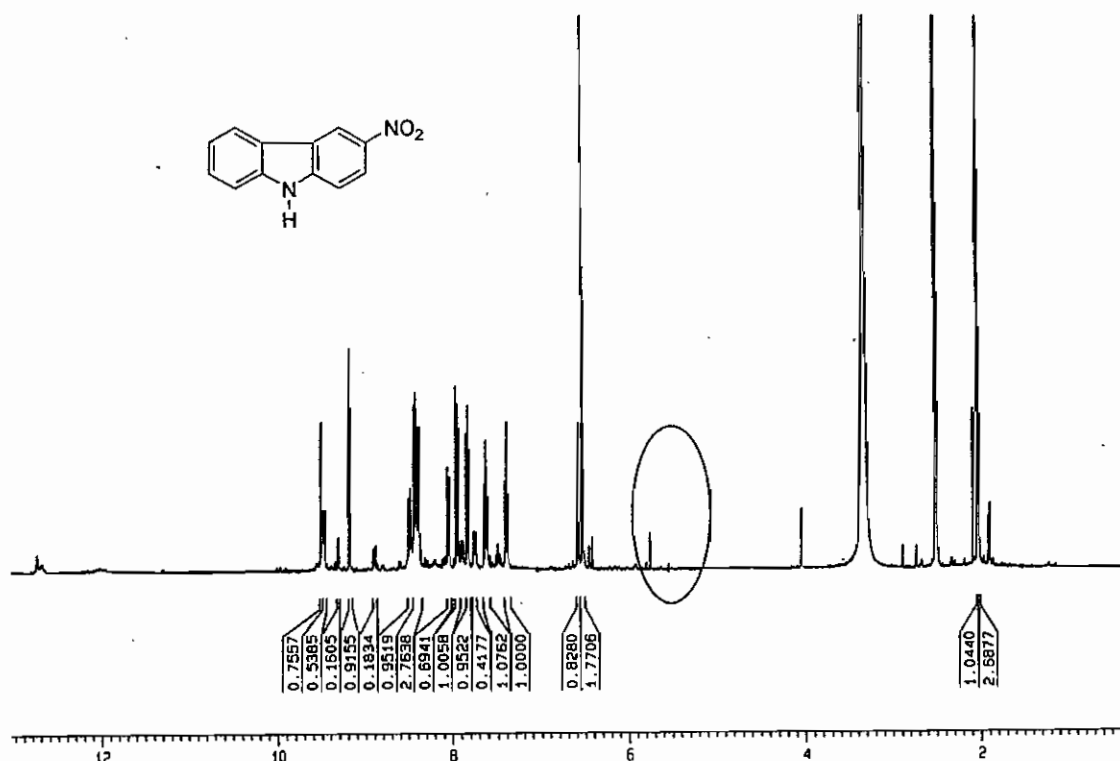


ภาพ 52 FT-IR สเปกตรัมของการสังเคราะห์ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid (8) แนวทางที่ 2 วิธีที่ 1 (KBr disc)



ภาพ 53 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของการสังเคราะห์ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid (8) แนวทางที่ 2 วิธีที่ 1 ใน $\text{DMSO-}d_6$

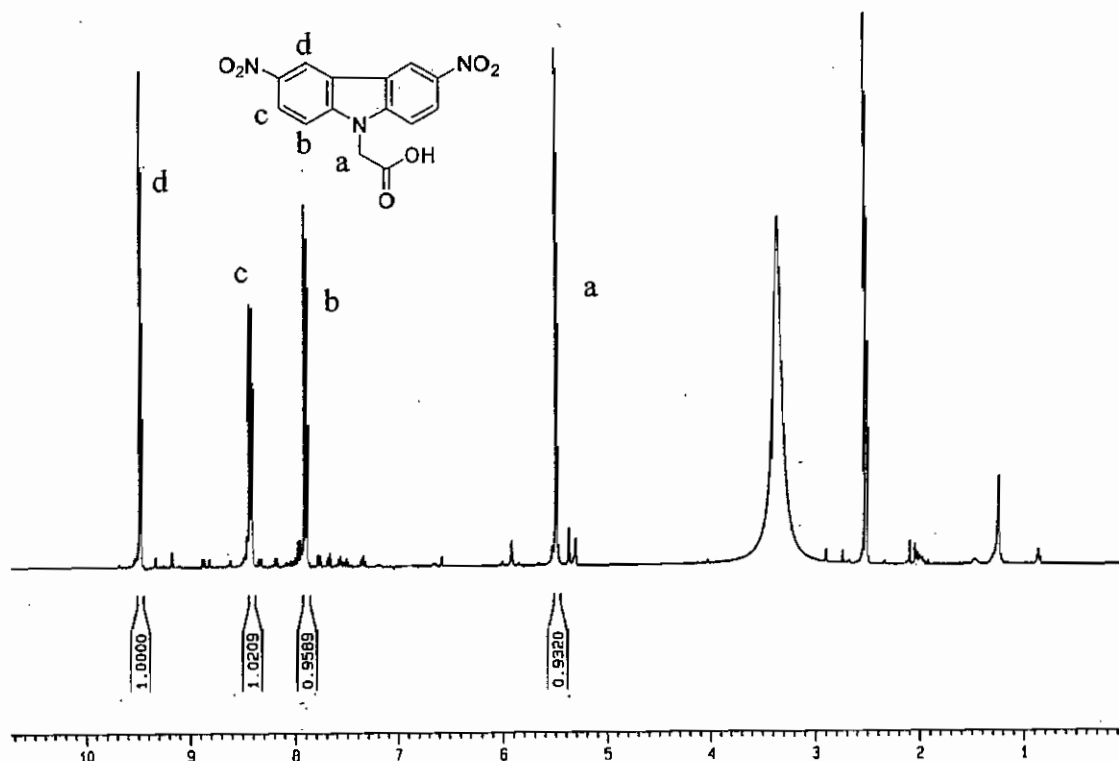
วิธีที่ 2 เป็นการการสังเคราะห์ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid โดยทำปฏิกิริยาไนเตรชัน Carbazole-9-yl-acetic acid ด้วย 90% HNO_3 ร่วมกับ Acetic acid โดยการลดอุณหภูมิจาก 90 องศาเซลเซียสเป็น 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากการศึกษพบว่ายังเกิดการสูญเสียหมู่อะซิติกแอซิด ($-\text{CH}_2\text{COOH}$) เช่นเดียวกับการการสังเคราะห์ด้วยวิธีที่ 1 ทั้งนี้ยืนยันได้จากผลของ $^1\text{H-NMR}$ แสดงในภาพ 54 พบว่าพีคที่ตำแหน่ง 5.44 ppm ซึ่งเป็นพีคของ $-\text{CH}_2$ สูญเสียไปซึ่งเป็นไปได้ว่าการลดอุณหภูมิในการสังเคราะห์ลงมาที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส น่าจะไม่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา ดังนั้นการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่ำลงน่าที่จะทำให้การหลุดออกของหมู่ CH_2COOH เกิดขึ้นได้ยากและได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้มากขึ้น ดังนั้นแนวทางในการสังเคราะห์วิธีที่ 3 และ 4 จึงเป็นการเน้นในการปรับอุณหภูมิของปฏิกิริยาลดลงที่อุณหภูมิห้องและ 10 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นจุดที่สารละลายผสมระหว่าง 90% HNO_3 ร่วมกับ Acetic acid เริ่มจะเป็นของแข็ง



ภาพ 54 ¹H-NMR สเปกตรัมของการสังเคราะห์ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid (8) แนวทางที่ 2 วิธีที่ 2 ใน DMSO-d₆

วิธีที่ 3 และ 4 ทำการสังเคราะห์โดยทำปฏิกิริยาไนเตรชัน Carbazole-9-yl-acetic acid ด้วย 90% HNO₃ ร่วมกับ Acetic acid ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากการศึกษพบว่าทั้ง 2 วิธีสามารถสังเคราะห์ได้ผลิตภัณฑ์ของ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid โดยมีค่า R_f = 0.26 (5% MeOH/CH₂Cl₂) ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิค ¹H-NMR แสดงในภาพ 55 ยืนยันการเกิด 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid คือพบโปรตอนในกลุ่ม Aromatic region ของ Carbazole อยู่ที่ 7.86 ppm (d, J=9.1 Hz, 2H), 8.39 ppm (d, J=9.1 Hz, 2H), 9.42 ppm (s, 2 H) แสดงการถูกแทนที่ของหมู่ NO₂ ในโครงสร้าง และยังพบ CH₂ อยู่ที่ 5.44 ppm (s, 1H) ของส่วน Acetic acid โดยพบว่าการเกิด ปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสจะให้ผลิตภัณฑ์ที่ค่อนข้างสะอาดและง่ายต่อการทำให้บริสุทธิ์อย่างไรก็ตามวิธีนี้ยังมีข้อเสียคือ เมื่อลดอุณหภูมิต้องมีการควบคุมอุณหภูมิตลอดเวลาทั้งนี้เพื่อไม่ให้อุณหภูมิของปฏิกิริยาไม่ต่ำจนเกินไป เพราะจะทำให้ Carbazole-9-yl-

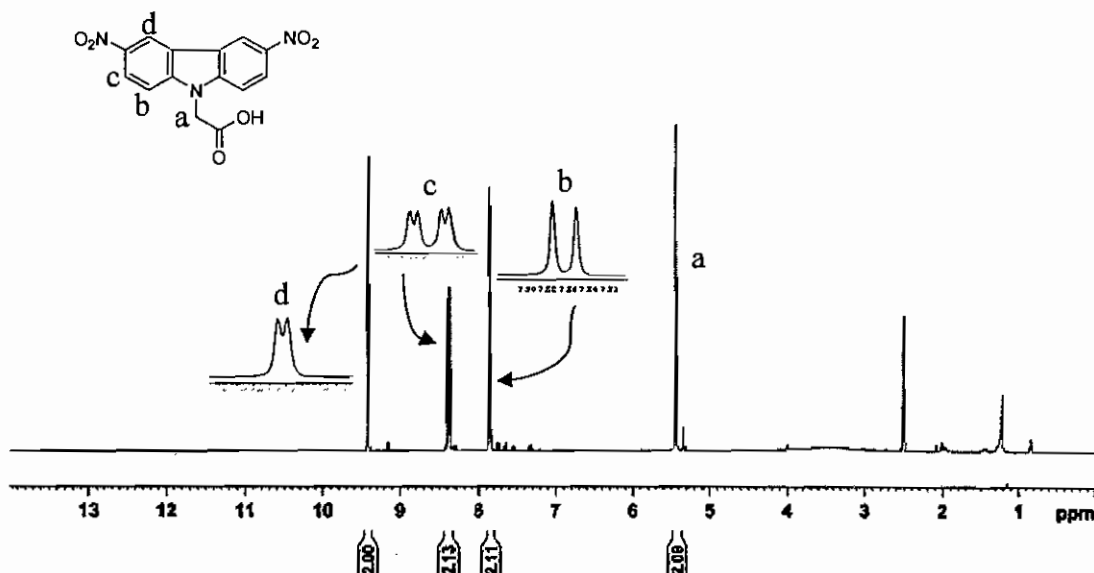
acetic acid เกิดการตกตะกอนขึ้นส่งผลให้เปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นลดลง เนื่องจากปฏิกิริยาเคมีเสียความเป็นเนื้อเดียวกันของสารตั้งต้นและรีเอเจนต์ที่ใช้



ภาพ 55 ^1H -NMR สเปกตรัมของการสังเคราะห์ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid (8) แนวทางที่ 2 วิธีที่ 3 และ 4 ใน $\text{DMSO}-d_6$

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

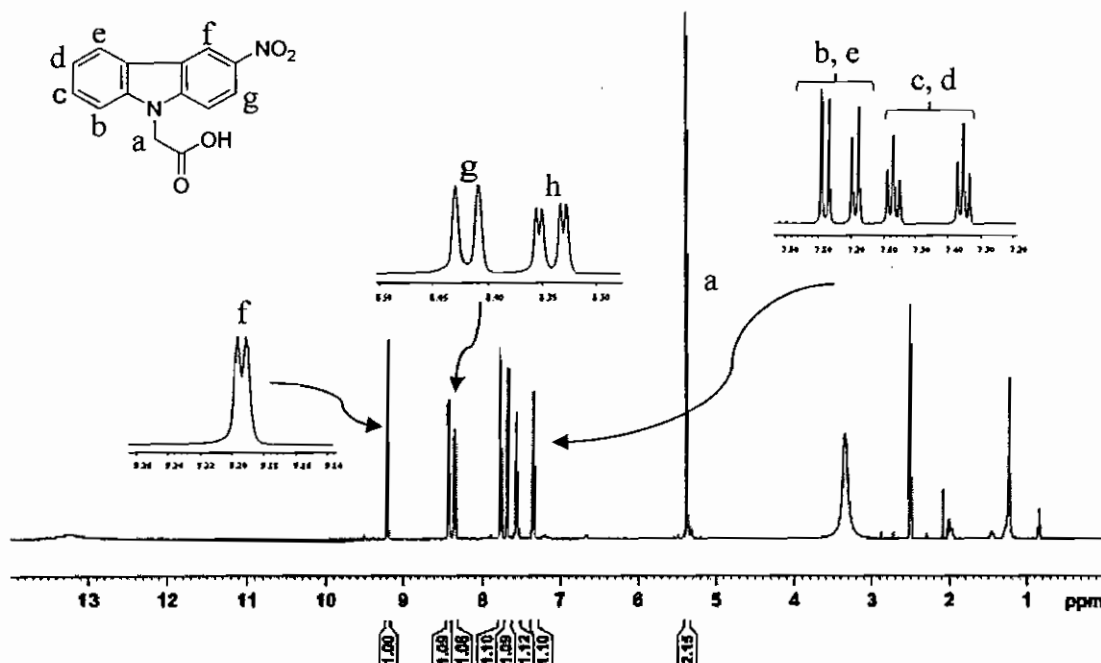
สังเคราะห์โดยเริ่มจาก 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid สามารถทำการสังเคราะห์ได้โดยการทำปฏิกิริยาไนเตรชันของ Carbazole-9-yl-acetic acid ethyl ester (6) ด้วยกรด 90 % HNO_3 ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และทำการไฮโดรลิซิส ได้ผลิตภัณฑ์ของ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid (8) จำนวน 0.94 กรัม คิดเป็นร้อยละ 75 มีค่า $R_f = 0.21$ (10% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิค ^1H -NMR แสดงในภาพ 56 และ ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารผลิตภัณฑ์ แสดงในภาคผนวก ข (ภาพ 69) ยืนยันการเกิด 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid คือพบสัญญาณที่ 5.44 ppm (s, 2H, CH_2) ซึ่งเป็นส่วนของ CH_2COOH และพบพีค doublet ที่ 7.86 ppm, double doublet ที่ 8.39 ppm และ doublet ที่ 9.42 ppm ของ Carbazole



ภาพ 56 ^1H -NMR สเปกตรัมของ 3,6-Dinitrocarbazole-9-yl-acetic acid (8) ใน $\text{DMSO}-d_6$

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

3-Nitrocarbazole-9-yl-acetic acid (11) สามารถสังเคราะห์ได้จากการทำปฏิกิริยาไนเตรชันของ Carbazole (4) ด้วย Urea nitrate ซึ่งเป็นรีเอเจนต์ที่ไม่รุนแรงทำให้ไอเล็คโตรไฟล์ที่ถูกสร้างขึ้นจาก urea nitrate มีความแรงน้อยลงส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาเพียงหนึ่งตำแหน่งบนคาร์บาโซล ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นแบบ mono-substitution ของ 3-Nitro-9H-carbazole และ 1-Nitro-9H-carbazole โดยมี 3-Nitro-9H-carbazole เป็นผลิตภัณฑ์หลักและทำให้บริสุทธิ์ได้ง่ายด้วยการตกผลึกด้วยโทลูอีน และจากนั้นทำปฏิกิริยาอัลคิลเลชันด้วย Methyl bromoacetate (10) และทำการไฮโดรลิซิส ได้ผลิตภัณฑ์ของ 3-Nitrocarbazole-9-yl-acetic acid (11) จำนวน 0.87 กรัม คิดเป็นร้อยละ 68 มีค่า $R_f = 0.3$ (10% MeOH/ CH_2Cl_2) ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิค ^1H -NMR แสดงในภาพ 57 และ ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารผลิตภัณฑ์ แสดงในภาคผนวก ข (ภาพ 68) ยืนยันการเกิด 3-Nitrocarbazole-9-yl-acetic acid คือพบพีค doublet ที่ 9.19 ppm (s, 1H, CH) แสดงการแทนที่ของ NO_2 บนโครงสร้างของ Carbazole และยังพบพีค CH_2 อยู่ที่ 5.37 ppm (s, 2H, CH_2) ซึ่งเป็นโปรตอนของหมู่ acetic acid ที่เชื่อมต่ออยู่กับโครงสร้างของ Carbazole



ภาพ 57 ^1H -NMR สเปกตรัมของ 3-Nitrocarbazole-9-yl-acetic acid (11) ใน $\text{DMSO}-d_6$

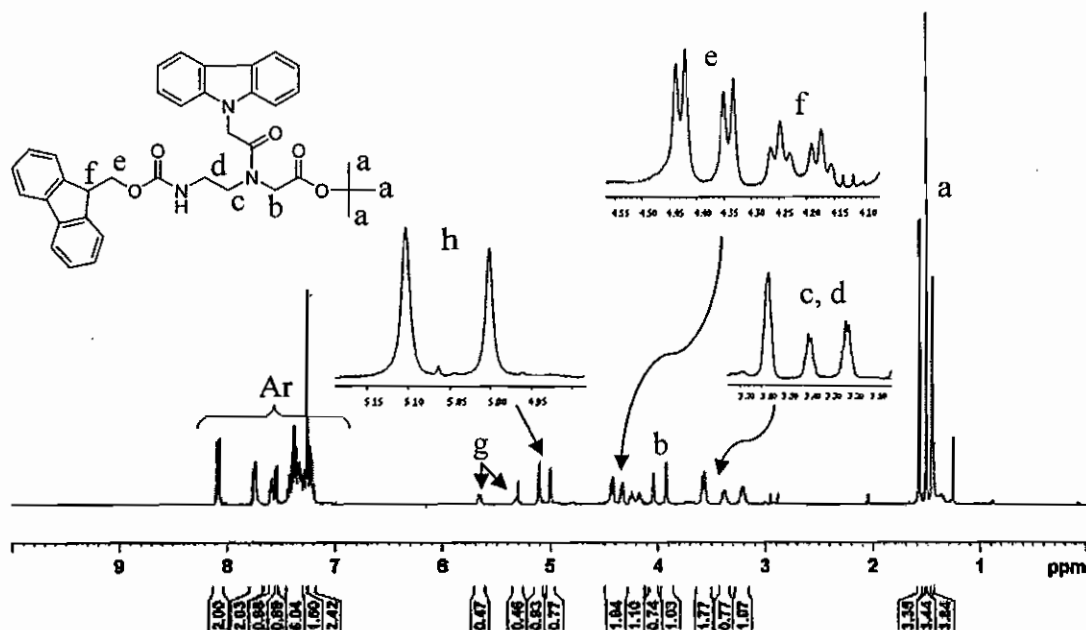
3. การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ PNA ไมโนเมอร์

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ PNA ไมโนเมอร์ โดยใช้ปฏิกิริยา coupling reaction ระหว่าง PNA backbone กับสารอนุพันธ์ของ aromatic acetic acid โดยใช้ Peptide coupling agent เช่น HATU, TBTU, HOBt และ 2,6-Lutidine

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

สามารถทำการสังเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน โดยการสังเคราะห์ได้ผลผลิตภัณฑ์ (48) จำนวน 0.074 กรัม คิดเป็นร้อยละ 51 มีค่า $R_f = 0.36$ ใน 2% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ จากผลการวิเคราะห์โครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิค ^1H -NMR แสดงในภาพ 58 และ ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารผลิตภัณฑ์ แสดงในภาคผนวก ข (ภาพ 70) ยืนยันการเกิดปฏิกิริยาของ ผลิตภัณฑ์ (48) โดยปรากฏพีคแบบ rotamer ที่ 1.45/1.58 ppm (s, 9H, CH_3) ของกลุ่ม *tert*-butyl และ 5.00/5.10 ppm (s, 2H, CH_2) ซึ่งเป็นโปรตอนที่แสดงการเชื่อมต่อกันระหว่าง Carbazole กับ PNA backbone และยังพบส่วนของ aromatic region ของกลุ่ม fluorenyl รวมอยู่กับหมู่ของ Carbazole ที่ 7.21-8.08 ppm จำนวน 16 โปรตอน ส่วนที่เป็น *N*-(2-aminoethyl) glycinate backbone ที่ 3.20-3.22 ppm (m, 1H), 3.37-3.39 ppm (m, 1H), 3.53-3.60 ppm (m, 2H),

3.93/4.05 ppm (s, 2H, CH₂), 4.19/4.25 ppm (t, $J=7.2/6.8$ Hz, 1 H), 4.34/4.43 ppm (d, $J=8.0/8.0$ Hz, 2H), และ 5.29/5.79 ppm (br, 1H, NH) นอกจากนี้ผลการพิสูจน์ด้วยเทคนิค High Resolution MALDI-TOF Mass spectroscopy พบ m/z ที่ 626.2637 (M+Na) ซึ่งสอดคล้องกับการคำนวณ m/z 603.27 แสดงในภาคผนวก ข (ภาพ 71)

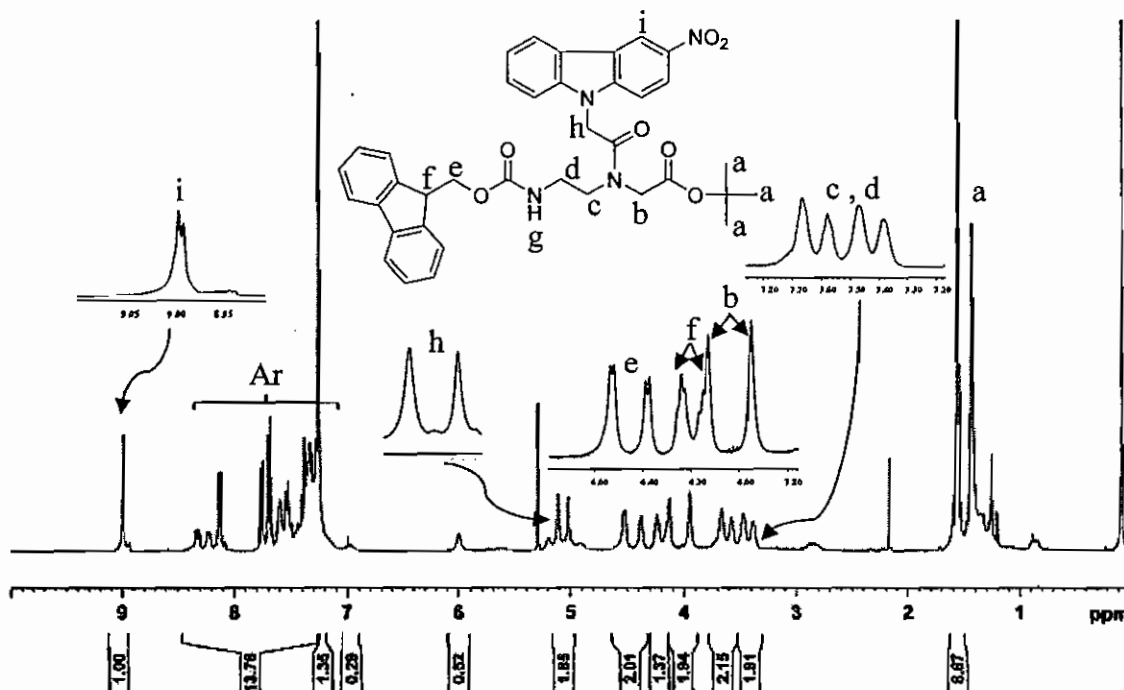


ภาพ 58 ¹H-NMR สเปกตรัมของ *tert*-Butyl N-[2-(*N*-9-fluorenylmethoxycarbonyl)aminoethyl]-N-[(carbazole)acetyl]glycinate (48) ใน CDCl₃

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

สามารถทำการสังเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน โดยการสังเคราะห์ได้ผลิตภัณฑ์ (49) จำนวน 0.35 กรัม คิดเป็นร้อยละ 78 มีค่า $R_f = 0.19$ ใน 1% MeOH/CH₂Cl₂ จากผลการวิเคราะห์โครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิค ¹H-NMR แสดงในภาพ 59 และ ¹³C NMR สเปกตรัมของสารผลิตภัณฑ์ แสดงในภาคผนวก ข (ภาพ 72) ยืนยันการเกิดปฏิกิริยาของผลิตภัณฑ์ (49) โดยปรากฏพีคแบบ rotamer ที่ 1.57 ppm (s, 9H, CH₃) ของกลุ่ม *tert*-butyl และ 5.11/5.30 ppm (s, 2H, CH₂) ซึ่งเป็นโปรตอนที่แสดงการเชื่อมต่อกันระหว่าง 3-Nitrocarbazole กับ PNA backbone และยังพบส่วนของ aromatic region ของกลุ่ม fluorenyl รวมอยู่กับหมู่ของ 3-Nitrocarbazole ที่ 7.25-8.14 ppm (m, 14H) และพบพีค doublet ที่ 8.99 ppm (s, 1H, CH) จากโครงสร้างของ 3-Nitrocarbazole และส่วนที่เป็น *N*-(2-aminoethyl) glycinate backbone ที่ 3.3/3.45 ppm

(s, 2H), 3.57/3.66 ppm (s, 2H, CH₂), 3.95/4.13 ppm (s, 2H, CH₂), 4.25 ppm (s, 1H), 4.38/4.53 ppm (d, $J=6$ Hz, 2H, CH₂), 5.9 ppm (s, 1H, NH) ผลการพิสูจน์ด้วยเทคนิค High Resolution MALDI-TOF Mass spectroscopy พบ m/z ที่ 671.25 (M+Na) ซึ่งสอดคล้องกับการคำนวณ m/z 648.26 แสดงในภาคผนวก ข (ภาพ 73)

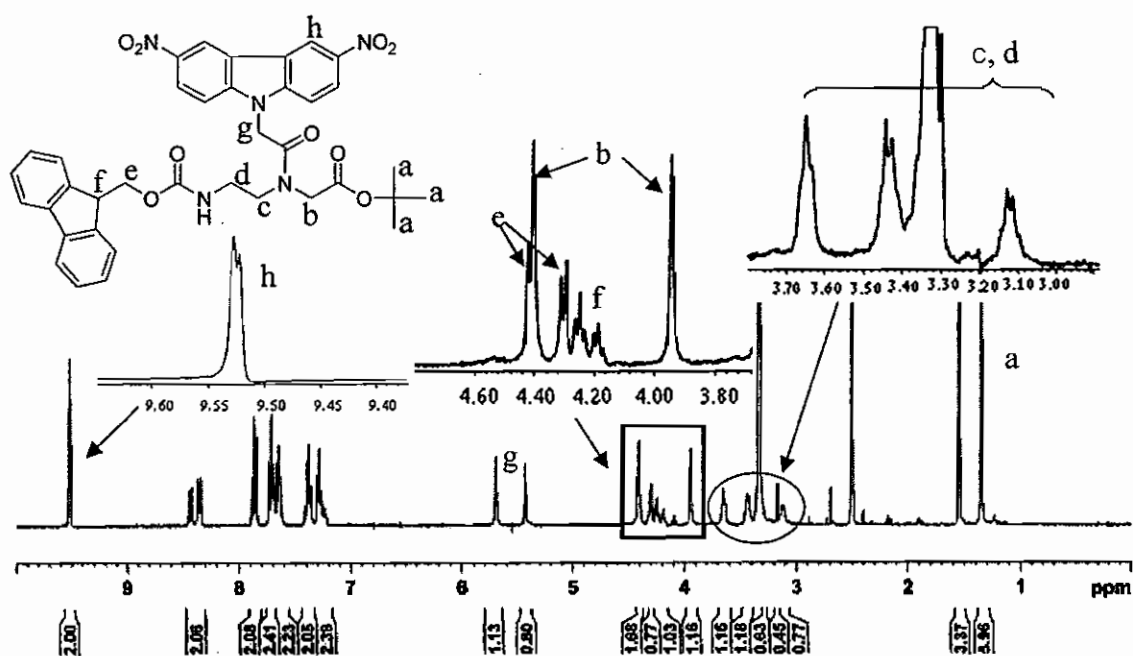


ภาพ 59 ¹H-NMR สเปกตรัมของ *tert*-Butyl *N*-[2-(*N*'-9-fluorenylmethoxycarbonyl)aminoethyl]-*N*-[(3-nitrocarbazole)acetyl] glycinate (49) ใน CDCl₃

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

สามารถทำการสังเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน โดยการสังเคราะห์ได้ผลิตภัณฑ์ (50) จำนวน 0.27 กรัม คิดเป็นร้อยละ 56 มีค่า $R_f = 0.24$ ใน 2% MeOH/CH₂Cl₂ จากผลการวิเคราะห์โครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิค ¹H-NMR แสดงในภาพ 60 และ ¹³C NMR สเปกตรัมของสารผลิตภัณฑ์ แสดงในภาคผนวก ข (ภาพ 74) ยืนยันการเกิดปฏิกิริยาของผลิตภัณฑ์ (50) โดยปรากฏพีคแบบ rotamer ที่ 1.35/1.55 ppm (s, 9H, CH₃) ของกลุ่ม *tert*-butyl และ 5.43/5.70 ppm (s, 2H, CH₂) ซึ่งเป็นโปรตอนที่แสดงการเชื่อมต่อกันระหว่าง 3,6-Dinitrocarbazole กับ PNA backbone และยังพบส่วนของ aromatic region ของกลุ่ม fluorenyl รวมอยู่กับหมู่ของ 3,6-

Dinitrocarbazole ที่ 7.29-8.44 ppm จำนวน 12 โปรตอน และพบพีก doublet ที่ 9.52 ppm (s, 2H, CH) จากโครงสร้างของ 3,6-Dinitrocarbazole และพบส่วนที่เป็น *N*-(2-aminoethyl) glycinate backbone ที่ 3.11-3.13 ppm (m, 1H), 3.30-3.32 ppm (m, 1H), 3.43-3.44 ppm (m, 1H), 3.64-3.65 ppm (m, 1H), 3.94-4.40 ppm (s, 2H), 4.23-4.25 ppm (m, 1H), 4.29-4.42 ppm (m, 2H) ผลการพิสูจน์ด้วยเทคนิค High Resolution MALDI-TOF Mass spectroscopy พบ m/z ที่ 716.23 ($M+Na$) ซึ่งสอดคล้องกับการคำนวณ m/z 693.24 แสดงในภาคผนวก ข (ภาพ 75)



ภาพ 60 ^1H -NMR สเปกตรัมของ *tert*-Butyl *N*-[2-(*N'*-9-fluorenylmethoxycarbonyl)aminoethyl]-*N*-[(3,6-dinitrocarbazole)acetyl] glycinate (50) ใน $\text{DMSO}-d_6$

4. ผลการศึกษาคุณสมบัติการเป็นยูนิเวอร์ซอลเบสของ PNA โอลิโกเมอร์ที่ประกอบด้วยอนุพันธ์ของคาร์บาไซล

ยูนิเวอร์ซอลเบส เป็นสารที่สังเคราะห์ขึ้นเลียนแบบโครงสร้างโมเลกุลของเบสในดีเอ็นเอที่แสดงคุณสมบัติที่แสดงความไม่เฉพาะเจาะจงในการเข้าคู่กับเบสในธรรมชาติทั้ง 4 ชนิด โดยมี 2 ปัจจัยที่บอกถึงคุณสมบัติการเป็นยูนิเวอร์ซอลเบส

1. ΔT_m เป็นค่าความแตกต่างของ melting temperature ที่บ่งชี้ถึงความไม่จำเพาะเจาะจงของยูนิเวอร์ซอลเบสต่อการเข้าคู่กับเบสในธรรมชาติทั้ง 4 ชนิด โดยที่ค่า ΔT_m คำนวณได้จาก

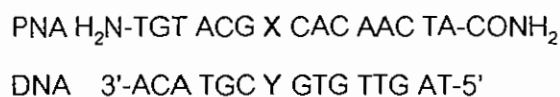
$$\Delta T_m = T_m \text{ max} - T_m \text{ min}$$

เมื่อ $T_m \text{ max}$ เป็นค่า T_m สูงสุด ที่หาได้จากการเข้าคู่กันของยูนิเวอร์ซอลเบสกับเบสในธรรมชาติตัวใดตัวหนึ่ง และ $T_m \text{ min}$ เป็นค่า T_m ต่ำสุด ที่หาได้จากการเข้าคู่กันของยูนิเวอร์ซอลเบสกับเบสในธรรมชาติตัวใดตัวหนึ่ง ซึ่งวิธีการหาค่า T_m ได้อธิบายในภาคผนวก ก โดยค่า ΔT_m ที่ได้นั้นมีค่าน้อยก็จะบ่งชี้ถึงความเป็นยูนิเวอร์ซอลที่ดี กล่าวคือ ยูนิเวอร์ซอลเบส สามารถเข้าคู่กับเบสในธรรมชาติได้อย่างไม่แตกต่างกัน

2. ΔG เป็นค่าความแตกต่างของ Gibb's free energy ที่บ่งชี้ถึงความเสถียรภายในโครงสร้างแบบดupleกซ์ ซึ่งสามารถหาค่านี้ได้จากความสัมพันธ์ระหว่างค่า T_m , ΔH และ ΔS ซึ่งสามารถคำนวณหาค่านี้ได้โดยใช้โปรแกรม MeltWin ดังอธิบายในภาคผนวก ก

ผลการศึกษาคุณสมบัติการเป็นยูนิเวอร์ซอลเบสของอนุพันธ์คาร์บาไซลใน PNA โอลิโกเมอร์ แสดงในตาราง 6

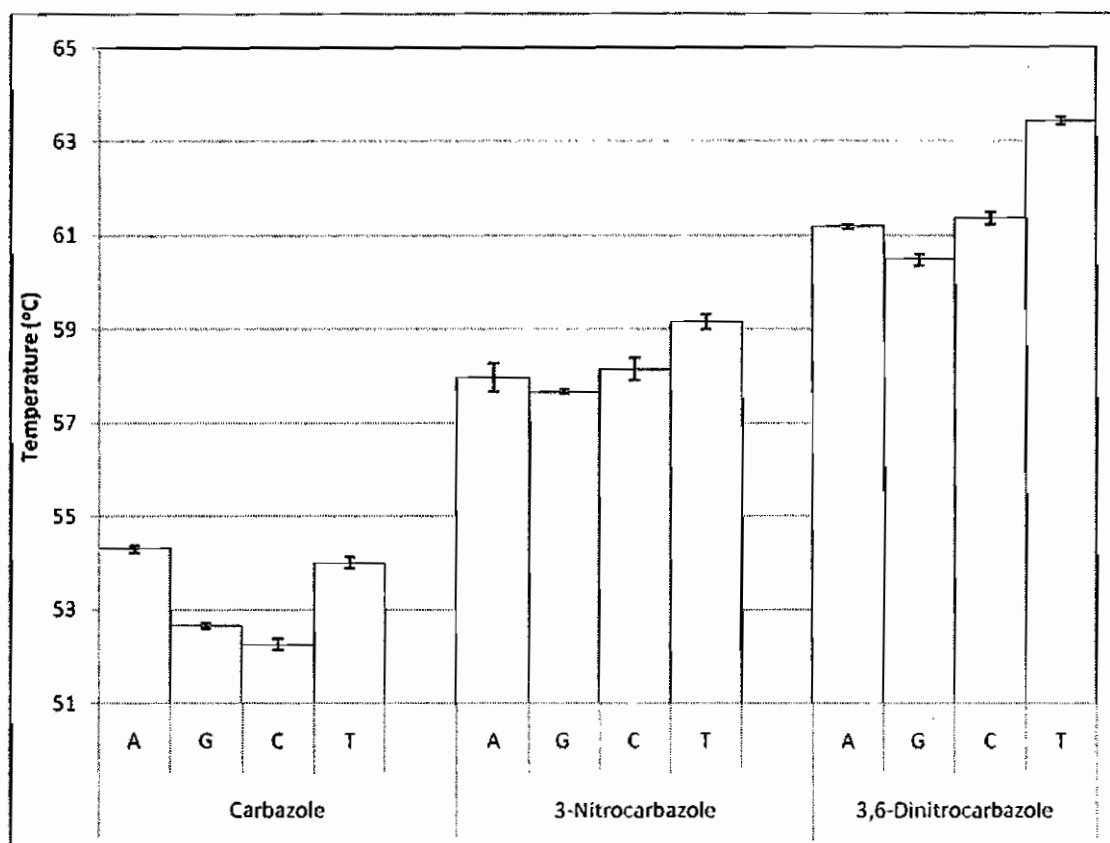
ตาราง 6 ค่า thermodynamic parameters ของ PNA:DNA complexes ที่ประกอบด้วยอนุพันธ์ของคาร์บาไซล



PNA	DNA	T_m (°C)	ΔG (kcal/mol)	Avg ΔG (kcal/mol)	Avg ΔT_m	ΔT_m (°C)
Carbazole	A	54.29	-15.77	-15.6	53.29	2.1
	C	52.65	-15.24			
	G	52.24	-15.09			
	T	53.99	-16.17			
3-Nitrocarbazole	A	57.96	-15.91	-16.6	58.22	1.5
	C	57.65	-16.61			
	G	58.14	-16.86			
	T	59.16	-16.83			
3,6-Dinitrocarbazole	A	61.18	-18.01	-18.4	61.61	2.9
	C	60.48	-18.01			
	G	61.36	-18.77			
	T	63.42	-18.75			

จากการศึกษาคุณสมบัติความเป็นยูนิเวอร์ซอลเบสของอนุพันธ์คาร์บาไซล โดยการเพิ่มหมู่ดึงอิเล็กตรอน (Electron-withdrawing group) ของหมู่นิโตรในโครงสร้างของคาร์บาไซลเพื่อเพิ่มคุณสมบัติการเกิด stacking ที่ดี โดยยืนยันผลได้จากค่าเฉลี่ย T_m ของอนุพันธ์ที่ประกอบด้วย Carbazole, 3-Nitrocarbazole และ 3,6-Dinitrocarbazole มีค่าเท่ากับ 53.3, 58.2 และ 61.6 °C ตามลำดับ โดยค่าการเลือกเข้าคู่กับเบสในธรรมชาติ (ΔT_m) มีค่าเท่ากับ 2.1, 1.5 และ 2.9 °C ตามลำดับ แผนภูมิเปรียบเทียบค่า ΔT_m แสดงในภาพ 61 จากค่า ΔT_m แสดงให้เห็นว่าอนุพันธ์ของคาร์บาไซลมีความเป็นยูนิเวอร์ซอลเบสที่ดี และการศึกษาคุณสมบัติการเกิด hybridization ของโครงสร้างแบบคูเพล็กซ์ของ PNA:DNA ที่ประกอบด้วยอนุพันธ์ของคาร์บาไซลผลจากการศึกษาพบว่ามีความเสถียรที่ใกล้เคียงกัน โดยที่ PNA ที่ประกอบด้วย 3-Nitrocarbazole (ค่าเฉลี่ย

$\Delta G = -16.6$ kcal/mol) และ 3,6-Dinitrocarbazole (ค่าเฉลี่ย $\Delta G = -18.4$ kcal/mol) แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างแบบดูเพล็กซ์ที่เกิดขึ้นเสถียรกว่าโครงสร้างแบบดูเพล็กซ์ของ PNA carbazole ความเสถียรของทั้งสองอนุพันธ์อาจเป็นผลมาจากการที่มีหมู่แทนที่เป็น $-\text{NO}_2$ ซึ่งส่งผลให้มีค่าไดโพลโมเมนต์สูง ทำให้เกิดการ stacking interaction ระหว่างคู่ duplex ได้ โดยที่ PNA ที่ประกอบด้วย 3,6-Dinitrocarbazole ซึ่งมีค่าไดโพลโมเมนต์สูงจะเสถียรกว่า PNA ที่ประกอบด้วย 3-Nitrocarbazole และ carbazole ที่เป็นตัวอ้างอิง



ภาพ 61 ความสัมพันธ์ระหว่าง T_m และ โครงสร้างแบบดูเพล็กซ์ของ PNA:DNA ที่ประกอบด้วย อนุพันธ์ของ 3- Nitrocarbazole และ 3,6-Dinitrocarbazole เปรียบเทียบกับอนุพันธ์ ของ Carbazole ที่เป็นตัวอ้างอิงในการศึกษา โดยค่า ΔT_m เท่ากับ 2.1, 1.5 และ 2.9 °C สำหรับ อนุพันธ์ที่ประกอบด้วย Carbazole, 3-Nitrocarbazole และ 3,6- Dinitrocarbazole ตามลำดับ