สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การสังเคราะห์เปปไทด์โดยเทคนิควัฏภาคของแข็ง

4 เล่ม

T107757

นายนรเวช ธีระกำจาย

เลขหมู่..........
เลขทะเบียน 107757
วัน,เดือน,ปี 10 พ.ค. 2553

b. 12210651
i. ....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Synthesis of Peptides on Solid Phase

Mr. Norawech Terakamjay

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for

the Degree of Bachelor of Science

Department of Chemistry

Faculty of Science

King Mongkut's Instutute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2005

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การสังเคราะห์เปปไทด์โดยเทคนิควัฏภาคของแข็ง
นักศึกษา	นายนรเวช ธีระกำจาย รหัส 45050110
ภาควิชา	เคมี
สาขาวิชา	เคมีอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา	2548
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.พัชนี เจริญยิ่ง

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ.ดร. ธีรวัฒน์ มงคลอัศวรัตน์	ธีรวัฒน์ มงคลอัศวรัตน์
กรรมการ ผศ.ดร. ภัทธาวุธ มนต์วิเศษ	[illegible]
กรรมการ ผศ.ดร. พัชนี เจริญยิ่ง	พัชนี เจริญยิ่ง

(ผศ.ดร.ประยงค์ ดวงดี)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

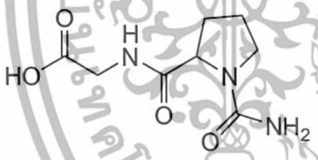
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

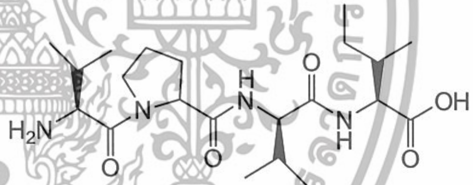
หัวข้อโครงงานพิเศษ	การสังเคราะห์เปปไทด์บนวัฏภาคของแข็ง
นักศึกษา	นายนรเวช ธีระกำจาย
รหัสประจำตัวนักศึกษา	45050110
ภาควิชา	เคมี
สาขาวิชา	เคมีอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา	2548
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.พัชนี เจริญยิ่ง

บทคัดย่อ

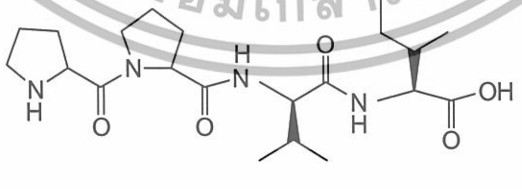
โครงงานพิเศษนี้เป็นการศึกษาการสังเคราะห์เปปไทด์บนวัฏภาคของแข็ง โดยใช้แวงก์เรซิน เป็นตัวเชื่อมโยง โครงสร้างของเปปไทด์ที่สังเคราะห์ได้ **18a** **21a** และ **21b** ถูกยืนยันด้วยเทคนิคนิวเคลียแมกเนติกเรโซแนนท์ จากการทดลองพบว่าผลิตผลรวมของเปปไทด์ที่เตรียมได้อยู่ในช่วง 40 ถึง 60 เปอร์เซ็นต์



Glycylprolylglycine 18a



Valylprolyvalylisoleucine 21a



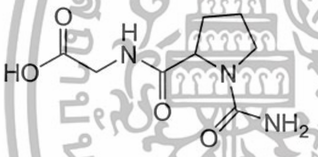
Prolylprolylvalylisoleucine 21b

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

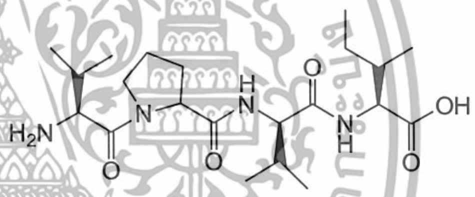
Special Project Title	Synthesis of Peptides on Solid Phase
Name	Mr. Norawech Terakamjay
Department	Chemistry, Faculty of Science
Program	Industrial Chemistry
Acadermic Year	2005
Special Project Advisor	Asst. Prof. Dr. Patchanee Charoenying

Abstract

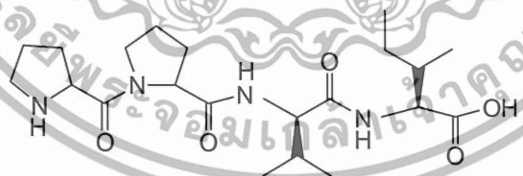
This research aimed to study a synthetic of peptides on solid phase using Wang resin as linker. The structure of peptides **18a**, **21a** and **21b** was confirmed by Nuclear Magnetic Resonance spcetroscopy. The results found that the overall yield of peptides were 40 to 60%.



Glycylprolylglycine 18a



Valylprolyvalylisoleucine 21a



Prolylprolylvalylisoleucine 21b

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับความช่วยเหลือ ความร่วมมือ ตลอดจนคำแนะนำต่างๆจากคณาจารย์ และบุคลากรหลายฝ่าย คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณ

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.พัชนี เจริญยิ่ง อาจารย์ที่ปรึกษา ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ และตรวจแก้ไขโครงงาน ทำให้โครงงานพิเศษฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ทั้งยังสอนให้อดทน และรับผิดชอบทั้งเรื่องส่วนตัวและเรื่องงาน

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.ธีรวัฒน์ มงคลอัศวรัตน์ ที่เป็นกรรมการตรวจสอบโครงงานพิเศษ และช่วยกรุณาตรวจแก้ไขโครงงานพิเศษฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น รวมทั้งให้ความรัก และดูแลช่วยเหลือในทุกด้าน

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ภัทธาวุธ มนต์วิเศษ ที่เป็นกรรมการตรวจสอบโครงงานพิเศษ และช่วยกรุณาตรวจแก้ไขโครงงานพิเศษฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณพี่ปริญญาโท ภาควิชาเคมีทุกท่านที่คอยช่วยเหลือให้การทำโครงงานพิเศษนี้ดำเนินไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่เลี้ยงดู ให้ความรัก การอบรม เป็นห่วงเป็นกำลังใจ ส่งเรียนให้การศึกษาจนมีวันนี้ ขอบคุณเพื่อนที่ช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดการทำโครงงานพิเศษ ถ้ามีสิ่งผิดพลาดประการใดผู้จัดทำขอน้อมรับ และขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

นายนรเวช ธีระกำจาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
รายการอักษรย่อ	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาของโครงงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์งานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตงานวิจัย	2
1.4 ขั้นตอนการวิจัยและดำเนินงาน	2
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	
2.1 เทคนิควัฏภาคของแข็ง	3
2.1.1 ตัวค้ำจุน (solid support)	3
2.1.2 ตัวเชื่อมโยง (linker)	6
2.1.3 การเตรียมตัวเชื่อมโยง	9
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	10
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 สารเคมี	14
3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	14
3.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์	15
3.4 วิธีการทดลองทั่วไปในปฏิกิริยา การใส่หมู่กระตุ้นคาร์บอกซิลิกของกรดอะมิโน	15
3.5 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์เปปไทด์บนวัฏภาคของแข็ง	16
3.5.1 ขั้นตอนการสังเคราะห์ glycylprolylglycine (18a)	19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.5.2 ขั้นตอนการสังเคราะห์ valylprolylvalylisoleucine (21a)	20
3.5.3 ขั้นตอนการสังเคราะห์ prolylprolylvalylisoleucine (21b)	21
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	
4.1 การสังเคราะห์การใส่หมู่กระตุ้นคาร์บอกซิลิกของกรดอะมิโน	23
4.2 การสังเคราะห์เปปไทด์โดยเทคนิควัฏภาคของแข็ง	29
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	35
เอกสารอ้างอิง	37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1 แสดงชนิดตำแหน่งของเปปไทด์ที่สังเคราะห์	19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1 แผนภาพการสังเคราะห์สารโดยเทคนิควัฏภาคของแข็ง 3
รูปที่ 2.2 ภาพโครงสร้างพอลิสไตรีนที่ไม่ผ่านการเชื่อมโยง และที่ผ่านการเชื่อมโยง 5
รูปที่ 2.3 ปฏิกิริยาการแทนที่ด้วยฮาโลเจนเพื่อให้ตัวค้ำจุน มีหมู่ฟังก์ชันที่ว่องไวในการทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อกับตัวเชื่อมโยง 6
รูปที่ 2.4 ปฏิกิริยาการตัดสารออกจากตัวเชื่อมโยง 7
รูปที่ 2.5 โครงสร้างตัวเชื่อมโยงแวง(4) 7
รูปที่ 2.6 ปฏิกิริยาการกำจัดหมู่ป้องกัน 8
รูปที่ 2.7 แสดงการติดตั้งอุปกรณ์ที่ใช้ในการสังเคราะห์สาร โดยเทคนิควัฏภาคของแข็ง 9
รูปที่ 2.8 แสดงลักษณะการเข้าทำปฏิกิริยาแบบ Pre loading 10
รูปที่ 2.9 แสดงการเข้าทำปฏิกิริยาแบบ Direct loading 10
รูปที่ 3.1 แสดงการใส่หมู่กระตุ้นคาร์บอกซิลิกของกรดอะมิโน 15
รูปที่ 3.2 แสดงการเชื่อมต่อของแวงเรซิน กับ Fmoc-Glycine 16
รูปที่ 3.3 แสดงขั้นตอนการดำเนินการสังเคราะห์ 16
รูปที่ 3.4 แสดงการเชื่อมต่อของสาร (8) กับ Fmoc amino acid activated 17
รูปที่ 3.5 แสดงการตัดหมู่ป้องกัน Fmoc ออกจากสารที่ (9) 17
รูปที่ 3.6 แสดงการเชื่อมต่อของสาร (10) กับ Fmoc amino acid activated 18
รูปที่ 3.7 แสดงการตัดหมู่ป้องกัน Fmoc ออกจากสารที่ (11) 18
รูปที่ 3.8 แสดงการตัดสารผลิตภัณฑ์ออกจากตัวเชื่อมโยงและตัวค้ำจุน 19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 4.1 แสดงการสังเคราะห์การใส่หมู่กระตุ้นคาร์บอกซิลิกของ Fmoc-Glycine 23
รูปที่ 4.2 แสดงสเปกตรัม ^{1}H-NMR ของสาร Fmoc-Gly-O(*p*-NO_2) 23
รูปที่ 4.3 แสดงสเปกตรัม ^{13}C-NMR ของสาร Fmoc-Gly-O(*p*-NO_2) 24
รูปที่ 4.4 แสดงการสังเคราะห์การใส่หมู่กระตุ้นคาร์บอกซิลิกของ Fmoc-Proline 24
รูปที่ 4.5 แสดงสเปกตรัม ^{1}H-NMR ของสาร Fmoc-Pro-O(*p*-NO_2) 25
รูปที่ 4.6 แสดงสเปกตรัม ^{13}C-NMR ของสาร Fmoc-Pro-O(*p*-NO_2) 26
รูปที่ 4.7 แสดงการสังเคราะห์การใส่หมู่กระตุ้นคาร์บอกซิลิกของ Fmoc-Alanine 26
รูปที่ 4.8 แสดงสเปกตรัม ^{1}H-NMR ของสาร Fmoc-Val-O(*p*-NO_2) 27
รูปที่ 4.9 แสดงสเปกตรัม ^{13}C-NMR ของสาร Fmoc-Val-O(*p*-NO_2) 27
รูปที่ 4.10 แสดงการสังเคราะห์การใส่หมู่กระตุ้นคาร์บอกซิลิกของ Fmoc-Isoleucine 28
รูปที่ 4.11 แสดงสเปกตรัม ^{1}H-NMR ของสาร Fmoc-Ile-O(*p*-NO_2) 28
รูปที่ 4.12 แสดงสเปกตรัม ^{13}C-NMR ของสาร Fmoc-Ile-O(*p*-NO_2) 29
รูปที่ 4.13 แสดง ^{1}H-NMR ของ glycylprolylglycine (18a) โดยใช้ $CDCl_3$ /TMS เป็นตัวทำละลาย 30
รูปที่ 4.14 แสดงเสปกตรัม ^{13}C NMR ของสาร glycylprolylglycine (18a) 30
รูปที่ 4.15 แสดง ^{1}H-NMR ของ valylprolylvalylisoleucine (21a) โดยใช้ $CDCl_3$ /TMS เป็นตัวทำละลาย 31
รูปที่ 4.16 แสดงเสปกตรัม ^{13}C-NMR ของสาร valylprolylvalylisoleucine (21a) 32
รูปที่ 4.17 แสดง ^{1}H-NMR ของ prolylprolylvalylisoleucine (21b) โดยใช้ $CDCl_3$ /TMS เป็นตัวทำละลาย 33
รูปที่ 4.18 แสดงเสปกตรัม ^{13}C NMR ของสาร prolylprolylvalylisoleucine (21b) 34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายการอักษรย่อ

AA	amino acid
d	doublet
DCC	*N,N*-icyclohexylcarbodiimide
DCM	dichlomethane
DIC	*N,N*-diisopropylcarbodiimide
DMF	*N,N*-dimethylformamide
Et	ethyl
Fmoc	9-fluorenylmethyloxycarbonyl
Gly	glycine
Ile	isoleucine
m	multiplet
Me	methyl
MeOH	methanol
NMR	nucler magnetic resonance
ppm	part per million
Pro	proline
PS	polystyrene
q	quatlet
RT	room temperature
s	singlet
t	triplet
TFA	trifluoro acetic acid
Val	valine

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ

กรดอะมิโน หรือ amino acid [1, 2] คือโมเลกุลส่วนประกอบ กรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบสำคัญของโปรตีน ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด กรดอะมิโนมีความหมายในทางชีวเคมีคือ กรดอะมิโนแบบแอลฟา (alpha amino acids) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีทั้งหมู่อะมิโนและหมู่คาร์บอกซิล อยู่บนคาร์บอนอะตอมเดียวกัน คาร์บอนอะตอมนี้ถูกเรียกว่า แอลฟาคาร์บอน เรซิดิวของกรดอะมิโน (amino acid residue) คือ กรดอะมิโนที่ถูกดึงโมเลกุลของน้ำออกไปหนึ่งโมเลกุล (ไฮโดรเจนไอออนหนึ่งไอออนจากหมู่อะมิโนและไฮดรอกไซด์ไอออนจากหมู่คาร์บอกซิล) เรซิดิวของกรดอะมิโน ซึ่งเกิดขึ้นขณะสร้างพันธะเปปไทด์ (Peptide bond) ความหมายในพจนานุกรมของพันธะเปปไทด์คือ สารประกอบน้ำหนักโมเลกุลต่ำให้อะมิโน แอซิด 2 ตัวหรือมากกว่าเมื่อเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

สารเปปไทด์มีมากกว่า 400 ชนิด สามารถพิจารณาโครงสร้างทางเคมีเป็น 2 กลุ่มหลักคือ เปปไทด์ ที่มีโครงสร้างเป็นโซ่ตรง (Linear peptide) และเปปไทด์ที่มีโครงสร้างเป็นวง (Cyclic peptide) เป็นสารธรรมชาติ พบได้ในพืช สิ่งมีชีวิตในทะเลและสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก [3] จากการวิจัยสารกลุ่มเปปไทด์มีฤทธิ์ทางชีวภาพไวต่อปฏิกิริยาในสิ่งมีชีวิต จากการแยกและหาคุณลักษณะแล้วพบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ เชื่อว่าหน้าที่หลักของเปปไทด์ทั้งสองชนิด เกี่ยวข้องกับการเข้าไปทำลายเนื้อเยื่อของแบคทีเรีย มีประโยชน์ในการใช้งานที่หลากหลาย เช่น การนำไปใช้ผลิตยา [4] เคลือบบรรจุภัณฑ์ป้องกันการติดเชื้อ แต่เนื่องจากสารเปปไทด์ที่ได้จากธรรมชาติมีปริมาณที่น้อย ไม่เพียงพอต่อความต้องการ และการได้มาในปริมาณที่มาก หมายถึงการใช้ทรัพยากรที่มากตามไปด้วยเป็นการทำลายระบบนิเวศ การสังเคราะห์เปปไทด์ขึ้นจึงเป็นวิธีหนึ่งที่ช่วยแก้ปัญหาที่กล่าวมาได้ ด้วยเหตุนี้การสังเคราะห์ทางเคมีอินทรีย์บนวัฏภาคของแข็งจึงเป็นเทคนิคหนึ่งที่พัฒนาเร็วมากในวงการวิทยาศาสตร์และเป็นเทคนิคที่สำคัญสำหรับในการผลิตตัวยาใหม่ ๆ ซึ่งแต่เดิมในขบวนการสังเคราะห์ด้วยเทคนิคสารละลายนั้นกระบวนการสังเคราะห์มักมีหลายขั้นตอนทำให้ต้องใช้เวลาในกระบวนการสังเคราะห์นาน และแต่ละขั้นตอนในการสังเคราะห์จำเป็นที่จะต้องมีการแยกสารอินเทอร์มิเดียตและสารบริสุทธิ์ทุกครั้งก่อนที่จะนำไปทำปฏิกิริยาต่อ ซึ่งเป็นการเพิ่มเวลาในการสังเคราะห์ให้มากขึ้น ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาการสังเคราะห์ด้วยเทคนิควัฏภาคของแข็งขึ้นมาเพื่อทดแทนวิธีการสังเคราะห์ด้วยเทคนิคสารละลาย ข้อดีในการสังเคราะห์ด้วยเทคนิควัฏภาคของแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นั้นพบว่าสามารถแยกสารอินเทอร์มิเดียตและสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ได้ง่ายขึ้น โดยอาศัยการล้างด้วยตัวทำละลายสลับกับการกรอง ในระหว่างที่ทำการสังเคราะห์หลาย ๆ ครั้งและสามารถทำปฏิกิริยาต่อได้ทันที ส่วนรีเอเจนต์ที่มากเกินพอเพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดได้สมบูรณ์ยิ่งขึ้นนั้นสามารถถูกกำจัดออกได้ด้วยการล้างและการกรองเช่นกัน

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาปฏิกิริยาของการสังเคราะห์เปปไทด์บนวัฏภาคของแข็ง
2. สามารถนำวิธีการสังเคราะห์เปปไทด์บนวัฏภาคของแข็งไปประยุกต์ใช้สังเคราะห์เปปไทด์ธรรมชาติได้

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1. ทำการสังเคราะห์เปปไทด์บนวัฏภาคของแข็ง
2. ศึกษาหาโครงสร้างของเปปไทด์ที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิคทางสเปกโทสโกปี

1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน

1. ศึกษาลักษณะทางเคมีของเปปไทด์และศึกษาขั้นตอนทดลองการสังเคราะห์สารที่สนใจ
2. ดำเนินการทดลองสังเคราะห์เปปไทด์โดยเทคนิควัฏภาคของแข็ง
3. ตรวจสอบและวิเคราะห์โครงสร้างของเปปไทด์ที่สังเคราะห์ได้โดยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. สังเคราะห์เปปไทด์โดยเทคนิควัฏภาคของแข็งได้ในปริมาณสูงและบริสุทธิ์
2. ลดการทำลายธรรมชาติจากการนำพืชและสิ่งมีชีวิตมาใช้ทดลอง

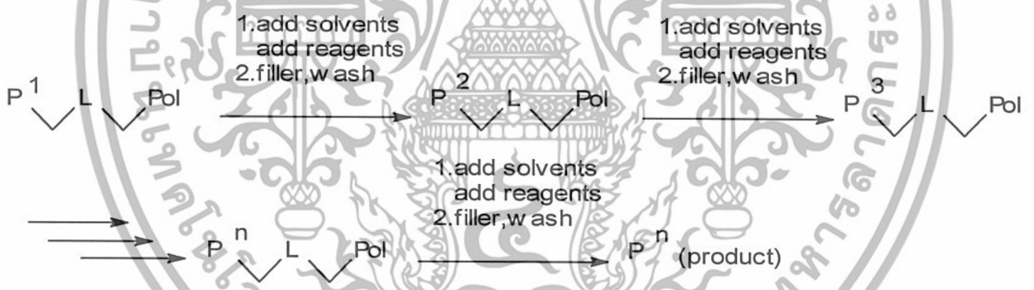
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 เทคนิควัฏภาคของแข็ง (Solid phase)[5]

การสังเคราะห์สารเคมีอินทรีย์โดยเทคนิควัฏภาคของแข็ง หมายถึง การสังเคราะห์สารโดยมีตัวกลางในการสังเคราะห์ นั่นก็คือตัวเชื่อมโยงซึ่งเป็นตัวเชื่อมต่อกับสารตั้งต้น (substrate) และตัวค้ำจุน (support) ซึ่งสามารถทำให้กลไกในการแยกออกจากตัวเชื่อมโยงของสารตั้งต้นและตัวทำละลายง่ายขึ้นหรืออาจกล่าวได้ว่า การสังเคราะห์สารเคมีอินทรีย์ โดยใช้เทคนิควัฏภาคของแข็งทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้น และได้ผลิตภัณฑ์ปริมาณมากขึ้นในเวลาที่รวดเร็ว

การสังเคราะห์สารอินทรีย์โดยเทคนิควัฏภาคของแข็ง การสังเคราะห์ประกอบด้วย สารตั้งต้น และสารมัธยันต์ที่เชื่อมโยงกับตัวค้ำจุน(insoluble material) ด้วยสิ่งนี้ทำให้สามารถเกิดกลไกการแยกของสารมัธยันต์ จากสารตั้งต้นและตัวทำละลาย



รูปที่ 2.1 แผนภาพการสังเคราะห์สารโดยเทคนิควัฏภาคของแข็ง

Pol : Support , L : linker , P : synthetic intermediate

จากแผนภาพแสดงปฏิกิริยาข้างบน จะเห็นว่าการสังเคราะห์โดยเทคนิควัฏภาคของแข็งประกอบด้วย 2 ส่วนในการเกิดปฏิกิริยาคือ

1. ตัวค้ำจุน (support)
2. ตัวเชื่อมโยง (linker)

2.1.1 ตัวค้ำจุน (solid support)

ตัวค้ำจุนที่ใช้ในการสังเคราะห์สารโดยเทคนิควัฏภาคของแข็ง ส่วนใหญ่เป็นพอลิเมอร์ เช่น พอลิสไตรีน มีความแตกต่างกันในด้านรูปร่างที่สามารถสังเกตเห็นได้จากภายนอก ซึ่งโดยส่วนใหญ่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะมีอนุภาคเป็นทรงกลม (ทรงกลมขนาดประมาณ 0.04-0.15 มิลลิเมตร) ด้วยขนาดที่เล็กของตัวค้ำจุนจะทำให้การชั่ง การกรองและการทำให้แห้งทำได้อย่างรวดเร็ว และเหมาะสำหรับการประยุกต์ใช้งานอื่นๆนอกจากตัวค้ำจุนจะมีรูปร่างเป็นทรงกลมแล้วยังมีรูปร่างอื่นที่แตกต่างกันออกไป เช่น แบบแผ่น (sheet), เข็ม (crown-shaped), แผ่นกลมขนาดเล็ก (small discs)

คุณสมบัติทั่วไปของตัวค้ำจุน

1. ความเสถียรเชิงกล (mechanical stability) พอลิเมอร์ที่ใช้เป็นตัวค้ำจุนจะต้องไม่เกิดการแตกหักง่าย เพราะจะทำให้ขนาดของอนุภาคเล็กจนเกินไป ซึ่งจะทำให้เกิดการอุดตันของตัวกรอง (filter)
2. ตัวค้ำจุนจำเป็นต้องเฉื่อยต่อปฏิกิริยาภายใต้สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา
3. ตัวค้ำจุนจำเป็นต้องมีหมู่ฟังก์ชันที่ว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาเพื่อที่ว่าในการสังเคราะห์ตัวเชื่อมโยงสามารถสร้างพันธะระหว่างตัวเชื่อมโยงกับตัวค้ำจุน ซึ่งเกิดภายในตัวค้ำจุน (ไม่อยู่บนผิวหน้า) ความสามารถในการแพร่ของสารตั้งต้นเพื่อเข้าไปในอนุภาคตัวค้ำจุนก็จำเป็นที่ต้องพิจารณาถึงพอลิเมอร์ที่ละลายได้ เช่น พอลิสไตรีนที่ไม่ได้เชื่อมโยงหรือพอลิเอทิล ไกลคอล สามารถนำมาใช้เป็นตัวค้ำจุนสำหรับการสังเคราะห์สารเคมีอินทรีย์

โดยทั่วไปแล้วพอลิเมอร์ที่ละลายได้สามารถทำให้ตกตะกอนแยกจากตัวทำละลายได้ หรือทำให้บริสุทธิ์ได้โดยการกรองผ่านเยื่อเลือกผ่าน หรือการตกผลึกใหม่ซึ่งพอลิเมอร์ที่ไม่ละลายทำไม่ได้ เพราะฉะนั้นความต้องการที่จะแยกตัวเชื่อมโยงออกจากสาร ก็สามารถทำได้ง่ายกว่าพอลิเมอร์ที่ไม่ละลาย ตัวค้ำจุนที่ละลายได้สามารถใช้กับ สารที่ไม่ละลายอย่างไรก็ตามการสังเคราะห์บนตัวค้ำจุนที่ละลายได้ก็มีข้อเสีย คือ การสังเคราะห์บนตัวค้ำจุนที่ละลายได้จะยากต่อการควบคุมหรือปฏิบัติการโดยอัตโนมัติ นอกจากนี้สารหรือตัวทำละลายสามารถเกิดการเชื่อมโยง หรือผูกมัดทางกายภาพที่แข็งแรงกับพอลิเมอร์ได้ง่ายทำให้เกิดการตกตะกอน เป็นสารเหนียวๆ จะทำให้การกรองทำได้ยากและใช้เวลานานขึ้นด้วย ทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยาการสังเคราะห์บนพอลิเมอร์ที่ละลายได้ไม่รวดเร็วไปกว่าการสังเคราะห์บนพอลิเมอร์ที่ไม่ละลายหรือพอลิเมอร์ที่เกิดการเชื่อมโยง

วัสดุที่ใช้เป็นตัวค้ำจุน (support) ในการสังเคราะห์สารเคมีอินทรีย์โดยใช้เทคนิควัฏภาคของแข็งมีมากมายแต่ไม่ใช่ทั้งหมดจะสามารถเข้าได้กับตัวทำละลาย อย่างไรก็ตาม การเลือกใช้ชนิดของตัวค้ำจุนให้เหมาะสมขึ้นกับการใช้งาน

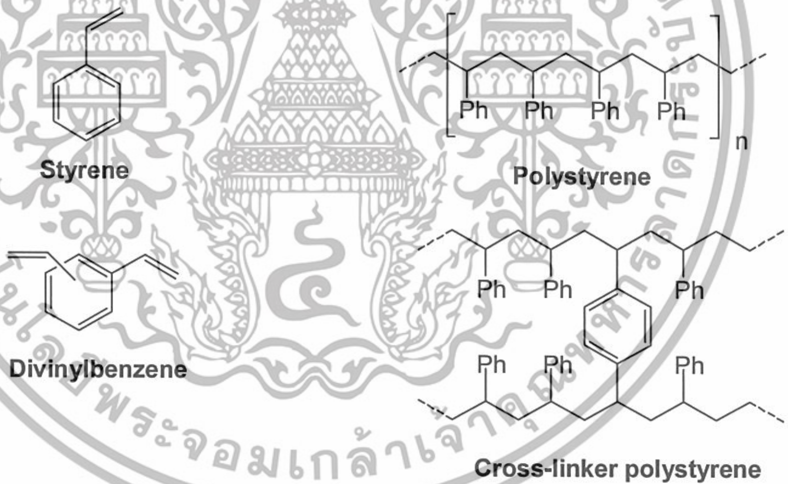
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พอลิสไตรีน (Polystyrene)

โดยทั่วไปนิยมใช้พอลิสไตรีน และพอลิเมอร์ร่วมของพอลิสไตรีน กับตัวเชื่อมโยงหลายชนิดเป็นตัวค้ำจุนในการสังเคราะห์สารเคมีอินทรีย์ โดยวัฏภาคของแข็งพอลิสไตรีนที่มีโครงสร้างเป็นเส้นตรง หรือพอลิสไตรีนที่ไม่มีการเชื่อมโยง กับตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น โทลูอีน พิริดีน เอทิล อะซิเตต THF คลอโรฟอร์ม หรือ ไดคลอโรมีเทน ที่อุณหภูมิต่ำ แต่ว่องไวต่อการตกตะกอนโดยการใช้เมทานอล หรือ น้ำ

พอลิเมอร์ร่วมของสไตรีนกับไดไวนิลเบนซีน

ตัวค้ำจุนที่นิยมใช้กันมากในการสังเคราะห์สารเคมีอินทรีย์ โดยวัฏภาคของแข็ง คือ พอลิเมอร์ร่วมของสไตรีนกับไดไวนิลเบนซีน พอลิเมอร์ ไม่สามารถละลายได้เมื่อมีการเชื่อมโยงมากกว่า 0.2 % แต่สามารถบวมตัวได้มากในตัวทำละลายอินทรีย์ โดยทั่วไปความสามารถในการบวมตัวของพอลิเมอร์พอลิสไตรีนจะลดลงเมื่อการเชื่อมโยงเพิ่มมากขึ้น

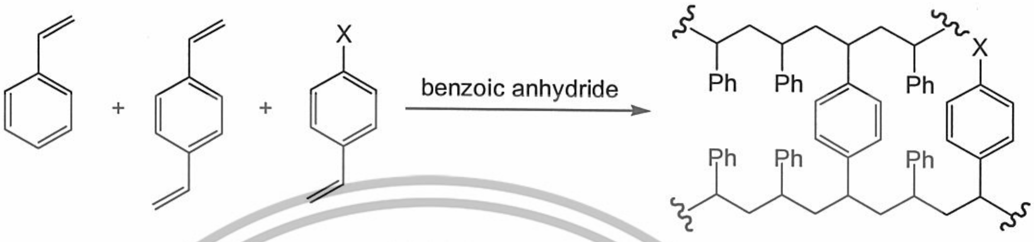


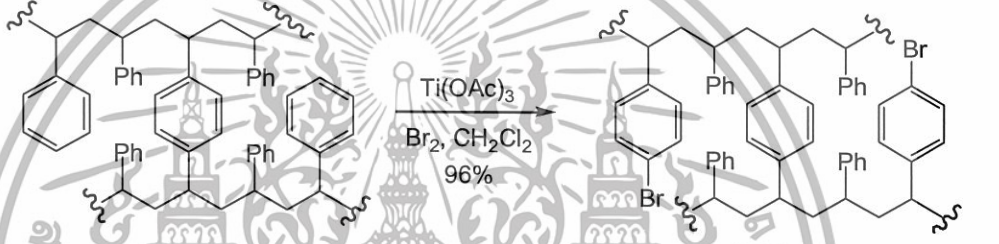
รูปที่ 2.2 ภาพโครงสร้างพอลิสไตรีนที่ไม่ผ่านการเชื่อมโยงและที่ผ่านการเชื่อมโยง

พอลิสไตรีนที่ผ่านการเชื่อมโยงถูกเตรียมขึ้นโดยการสังเคราะห์พอลิเมอร์แบบอนุมูลอิสระของสารแขวนลอยของพอลิสไตรีน และไดไวนิลเบนซีน ดังรูปที่ 2.2 การควบคุมขนาดของเม็ดพอลิเมอร์ทำได้โดย เติมสารลดแรงตึงผิว และ โดยการปรับอัตราเร็วในการปั่นกวน ซึ่งมีผลให้พอลิเมอร์มีขนาดช่องว่างที่แตกต่างกัน พอลิสไตรีนที่มีช่องว่างขนาดเล็ก และถูกเชื่อมโยงด้วยไดไวนิลเบนซีน 1-2 % เป็นพอลิเมอร์ที่นิยมใช้กัน โดยทั่วไปในการสังเคราะห์โดยวัฏภาคของแข็ง แต่พอลิเมอร์ที่มีการเชื่อมโยงน้อย (0.5% ไดไวนิลเบนซีน) ก็ยังมีใช้กันอยู่บ้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นสิ่งที่ต้องพิจารณาในการเลือกใช้ตัวค้ำจุน คือ ขนาดของเม็ดพอลิเมอร์ ซึ่งจะสัมพันธ์กับองศาการเชื่อมโยง ดังรูป 2.3 ซึ่งหมู่ฟังก์ชันไม่ได้อยู่เฉพาะบนผิวหน้าของเม็ดพอลิเมอร์เท่านั้นแต่ยังอยู่ในทุกส่วนของเม็ดพอลิเมอร์



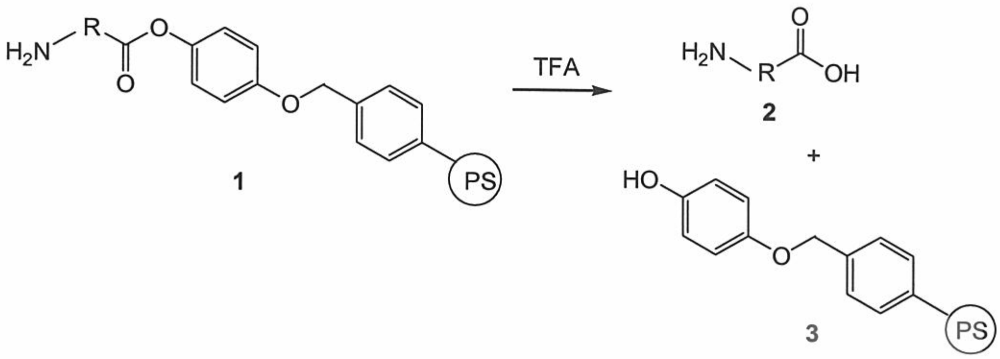


รูปที่ 2.3 ปฏิกิริยาการแทนที่ด้วยฮาโลเจนเพื่อให้ตัวค้ำจุนมีหมู่ฟังก์ชันที่ว่องไวในการทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อกับตัวเชื่อมโยง

2.1.2 ตัวเชื่อมโยง (Linker)

ตัวเชื่อมโยงเป็นโมเลกุลซึ่งเป็นตัวกลางที่ ใช้เชื่อมกับตัวค้ำจุนในการสังเคราะห์ โดยใช้เทคนิควัฏภาคของแข็ง ตัวเชื่อมโยงต้องสามารถเกิดปฏิกิริยากับสารต้นแบบและตัวค้ำจุนได้ง่ายและต้องเสถียรภายใต้สภาวะในการเกิดปฏิกิริยาและสามารถที่จะแยกได้เมื่อสิ้นสุดการสังเคราะห์โดยไม่เกิดอันตรายกับผลิตภัณฑ์ ตัวเชื่อมโยงจะต่อกับตัวค้ำจุนโดยมี spacer เป็นตัวเชื่อมดังรูปที่ 2.4 เพื่อให้มีความยืดหยุ่นและยังทำให้การแพร่ของ reagent เพื่อเข้ามาสร้างพันธะกับตัวเชื่อมโยงได้ง่ายลดความเกะกะ เพราะตัวเชื่อมโยงสามารถเชื่อมต่อกับตัวค้ำจุนได้และไม่มีการหลุดของตัวเชื่อมโยงเกิดขึ้นในระหว่างที่ทำการสังเคราะห์อย่างต่อเนื่องแต่จะมีการแตกพันธะของตัวเชื่อมโยงและผลิตภัณฑ์ตัวเชื่อมโยงมีหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl) ซึ่งไม่สามารถผันกลับได้ในการเชื่อมกันระหว่างตัวเชื่อมโยงกับหมู่อะมิโน ที่ติดกับตัวค้ำจุนได้เป็นเอไมด์ ในกรณีนี้ ตัวที่ค้ำจุนที่ใช้จะเป็นพอลิสไตรีน หรืออะมิโนเมทิลพอลิสไตรีน ดังรูปที่ 2.4

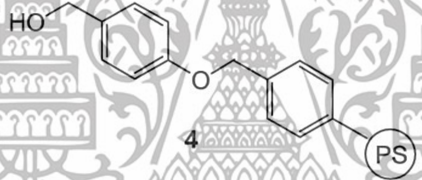
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 ปฏิกิริยาการตัดสารออกจากตัวเชื่อมโยง

ตัวเชื่อมโยงแวง (Wang Linker)[6, 7]

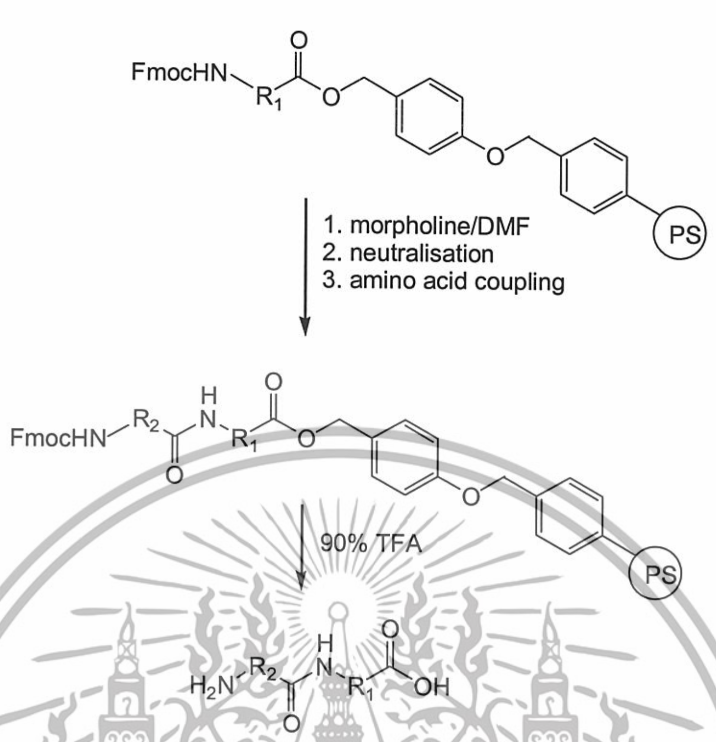
ตัวเชื่อมโยงแวงมีอีกชื่อหนึ่งว่า 4-แอลคอกซีเบนซิลแอลกอฮอล์มีสูตรโครงสร้างดังรูป 2.5



รูปที่ 2.5 โครงสร้างตัวเชื่อมโยงแวง

ตัวเชื่อมโยงแวงสามารถที่จะเตรียมได้โดยนำ 4- ไฮดรอกซีแอลกอฮอล์ทำปฏิกิริยากับเรซินเมอริฟิล ในสภาวะที่ตัวเชื่อมโยงเป็นเบสชนิดนี้เหมาะกับการสังเคราะห์สารประกอบเอมีนและสารประกอบฟีนอล ซึ่งในการตัดจะต้องทำในสภาวะที่เป็นกรด โดยใช้กรดไตรฟลูออโรอะซิติก (TFA) ถ้าใช้หมู่ 2-(*p*-biphenyl)-2-propyloxy-carbonyl (Bpoc) สามารถถอดออกโดยใช้ 0.5% TFA ในไดคลอโรมีเทนซึ่งถ้าใช้ 9-fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) เป็นหมู่ป้องกันอะมิโน สามารถกำจัดหมู่ป้องกันออกโดย 90% TFA ใน CH_2Cl_2 30นาที ซึ่งเป็นสภาวะที่ทำให้การกำจัดมีประสิทธิภาพ จึงทำให้ตัวเชื่อมโยงนี้เป็นที่นิยมดังรูปที่ 2.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 ปฏิกิริยาการกำจัดหมู่ป้องกัน

เทคนิคทั่วไปสำหรับการดำเนินการสังเคราะห์บนตัวค้ำจุนที่ไม่ละลายการสังเคราะห์สารเคมีอินทรีย์ โดยเทคนิควัฏภาคของแข็งเป็นวิธีที่ง่าย ปฏิกิริยาบนวัฏภาคของแข็งดำเนินไปโดยเขย่าตัวค้ำจุน(support) กับของผสมระหว่างตัวทำละลาย และ reagents เป็นระยะเวลาหนึ่ง กรองของผสมและล้างตัวค้ำจุน(support) ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม แยกผลิตภัณฑ์ที่ออกจากตัวค้ำจุน ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูงจากการสังเคราะห์วิธีตรงหรือเพิ่มความบริสุทธิ์โดยการตกผลึกใหม่หรือโครมาโทกราฟี

ส่วนมากตัวค้ำจุน(support) ที่ใช้สำหรับวัฏภาคของแข็งทำหน้าที่สังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ โดยตัวค้ำจุนเป็นอนุภาคทรงกลมขนาดเล็ก (0.04-0.15มิลลิเมตร) สามารถกรองได้โดยแก้วหรือ poly propylene fritts การสังเคราะห์วัฏภาคของแข็งที่อุณหภูมิห้องดังรูป 2.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

DCP (5–18 h).

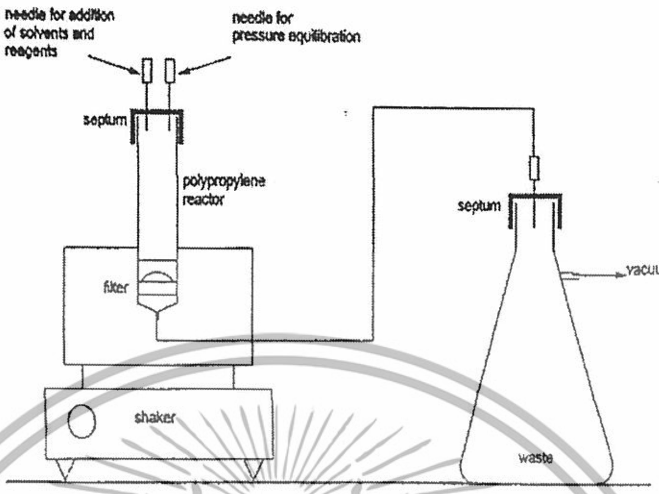


Fig. 1.1. Typical setup for manual solid-phase synthesis.

รูปที่ 2.7 แสดงการติดตั้งอุปกรณ์ที่ใช้ในการสังเคราะห์สาร โดยเทคนิควัฏภาคของแข็ง

ใช้หลอดพอลิพอพิลีนเป็นหลอดปฏิกิริยาเพราะมีน้ำหนักเบาและใสสามารถมองเห็นปฏิกิริยาของของผสมได้แต่ไม่ควรใช้ความร้อน ถ้าต้องการใช้ความร้อนควรเลือกหลอดปฏิกิริยาเป็นPTFEหรือแก้วแต่ละหลอดปฏิกิริยาปิดด้วย septum และต่อกับพอลิเอทิลีนไปยัง filtering flask ซึ่งใช้รองรับสารที่ทิ้งคือสารที่ไม่เกิดปฏิกิริยารวมทั้งสารละลายต่างๆ

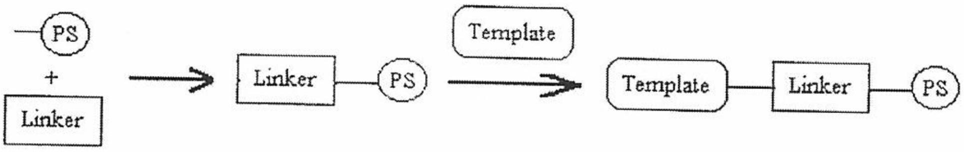
สารค้ำจุนที่ได้ไม่จำเป็นต้องทำให้แห้งและระหว่างการเปลี่ยนปฏิกิริยาเพียงแต่ทำการล้างด้วยตัวทำลายที่เหมาะสมอย่างเพียงพอ การล้างครั้งสุดท้ายควรจะล้างให้มากเป็นพิเศษ ความไม่บริสุทธิ์ ระหว่างการแยกจะเป็นสิ่งปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้าย

2.1.3 การเตรียมตัวเชื่อมโยง

1. Pre-loading of thescaffold

เป็นวิธีที่ตัวเชื่อมโยงเข้าทำปฏิกิริยากับพอลิเมอร์ที่เป็นตัวค้ำจุนแล้วค่อยเกิดปฏิกิริยาการเชื่อมโยงกับสารต้นแบบ แสดงดังรูปที่ 2.9 ซึ่งจากลักษณะการเข้าทำปฏิกิริยาแบบนี้ เมื่อตัวค้ำจุนเชื่อมต่อกับตัวเชื่อมโยงจะเข้าทำปฏิกิริยากับสารต้นแบบ อาจเกิดขึ้นได้ไม่สมบูรณ์เนื่องจากความเกะกะของตัวเชื่อมโยงเอง

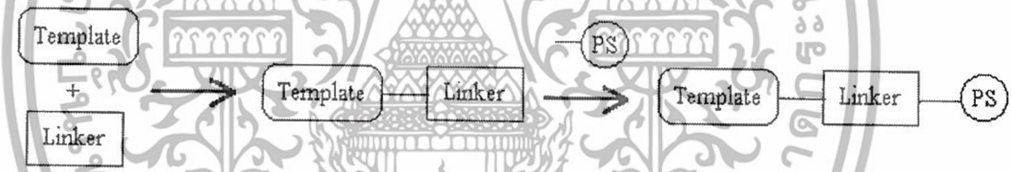
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.8 แสดงลักษณะการเข้าทำปฏิกิริยาแบบ Pre loading

2. Direct loading of the scaffold

เป็นวิธีที่สารต้นแบบทำการใส่หมู่ป้องกันที่ตำแหน่ง secondary amine แล้วเข้าทำปฏิกิริยากับตัวเชื่อมโยงก่อนที่จะเชื่อมติดกับพอลิเมอร์ที่เป็นตัวค้ำจุนแสดงดังรูป 2.9 วิธีนี้มีข้อดีคือไม่มีความเกะกะของตัวเชื่อมโยงจึงทำให้การสังเคราะห์มีประสิทธิภาพมากกว่าวิธี Pre-loading of the scaffold

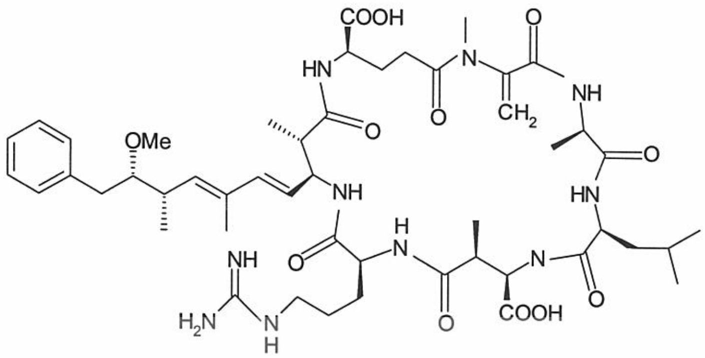


รูปที่ 2.9 แสดงการเข้าทำปฏิกิริยาแบบ Direct loading

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

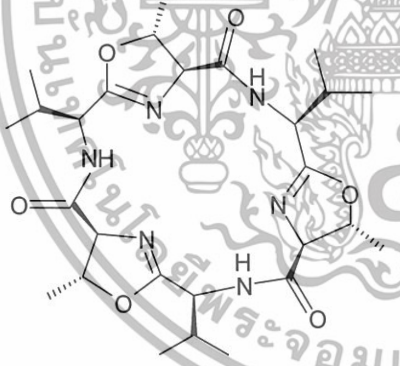
Harada และคณะ[8] ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของโครงสร้างของ Microcystin-LR **5** ซึ่งพบว่าไซคลิกเปปไทด์นี้ เป็นสาเหตุการตายของสัตว์ท้องถิ่นในประเทศบราซิล ซึ่งไซคลิคเปปไทด์ **5** ซึ่งสารนี้ถูกสร้างมาจาก แบคทีเรียสายพันธุ์ *cyanobacterial genera Microcystis* สาหร่ายน้ำจืด *(Anabaena)* และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *(Nostoc)*

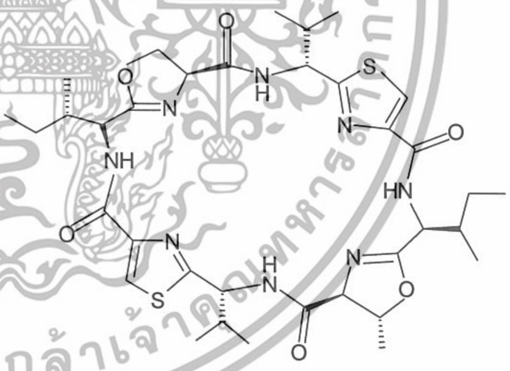
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Microcystin-LR 5

Haberhauer และ Romniger[9] สังเคราะห์สาร **6** และ **7** เป็นไซคลิกเปปไทด์ที่ได้จากการเกิดปฏิกิริยาในวงจรของพวกเห็ด รา สิ่งมีชีวิตประเภทพืชในทะเล โดยได้พบว่าสาร **6** และ **7** ให้ผลในเชิงลบต่อเซลล์ มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และยับยั้งปฏิกิริยาของไวรัสบางประเภทได้ และตัวอย่างที่ได้พบสำหรับคุณสมบัติของสาร **6** สามารถแสดงการต้านยาที่ใช้ในการปลูกถ่ายอวัยวะ

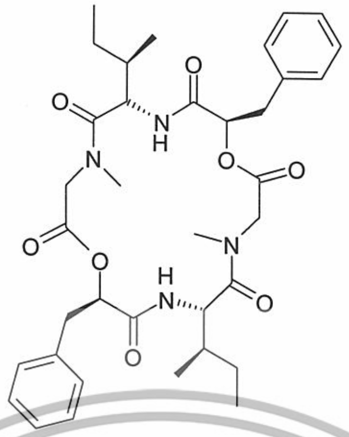




Westiellamid 6 Ascidiacy clamide 7

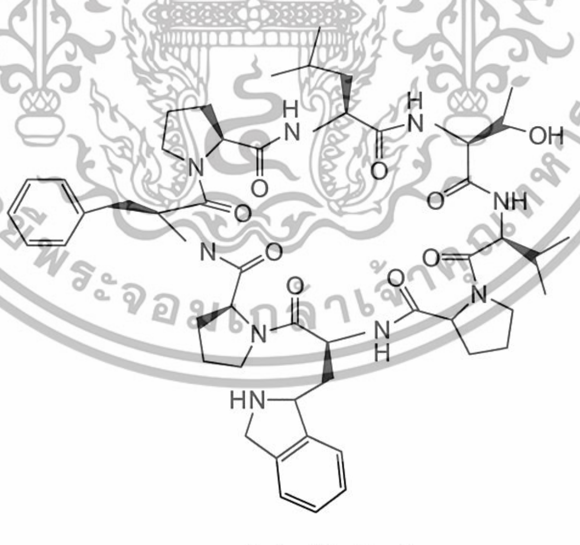
Vongvanich และคณะ[10] ได้สกัด Hirsutellide A **8** เป็น 18-membered cyclic depsipeptide จากเซลล์ของ *Hirsutella kobayasi* ซึ่งพบว่าเป็นสารที่มีคุณสมบัติ antimycobacterial activity มีค่า MIC 6-12 μg/mL

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Hirsutellide A 8

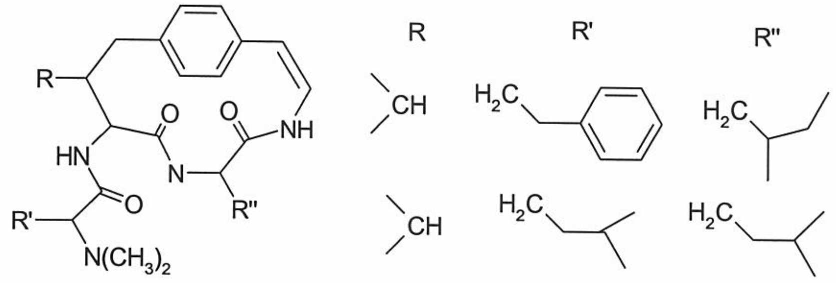
Jaspars และคณะ[11] สกัดแยกสาร **9** เป็นโครงสร้างใหม่ของไซคลิก octapeptide (cyclo[Thr-Val-Pro-Trap-Pro-Phe-Pro-Leu]) ทั้งหมดเกิดจากการสร้างพันธะกันชนิดทรานส์ (transpeptide bond geometry) ไซคลิกเปปไทด์นี้เป็นชนิด proline-rich แหล่งที่มาได้จากฟองน้ำทะเลหมู่เกาะฟีจิ



Axinellin C 9

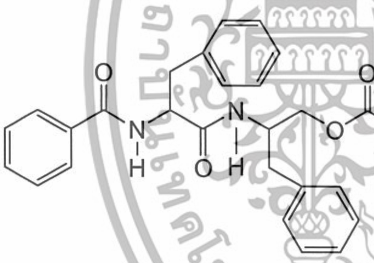
Morel และคณะ[12] สกัดแยกสาร **10** เป็นอัลคาลอยด์เปปไทด์ที่ได้จากการสกัดแยกส่วนเปลือกของต้น *Discaria Americana* สายพันธุ์ *Discaria* ตระกูล *Rhamnaceae* โดยขึ้นกระจายอยู่ทั่วไป ชาวบราซิลเลียนใช้ในการปรุงยารักษาเบาหวาน(diabetes)โรคผิวหนัง (skin disorders) โรคทางเดินอาหาร (stomach disorders)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

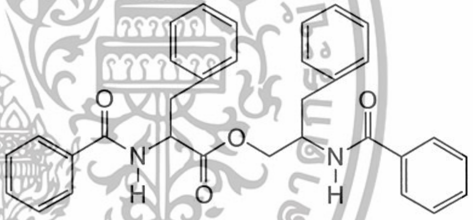


Discarine 10

Herz และคณะ[13] สกัดแยกเปปไทด์ **11** และ **12** จากสารสกัดชั้นเมทานอล ของ *Croton hieronymi* Griseb. พบว่าเมื่ออยู่ในรูปของสารสกัดหยาบมีฤทธิ์ในการต้านเซลล์ lung carcinoma A-549 และต้าน human colon carcinoma (IC_{50}=2.5 μg/ml)



Aurentiamide acetate 11



***N*-benzoylphenylalaninyl-*N*-benzoyl phenylalaninate 12**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมี

1.	*N,N*-diisopropylcarbodiimide (DIC)		บริษัทSIGMA
2.	*N,N*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC)		บริษัทFluka
3.	ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (DMF)		บริษัท Fluka
4.	morpholine		บริษัท Fluka
5.	โซเดียมไฮดรอกไซด์		บริษัท Lab Scan
6.	นินไฮดริน		
7.	ไดคลอโรมีเทน	เกรดการค้า	บริษัท Zen point
8.	เอทิลอะซิเตต	เกรดการค้า	บริษัท Zen point
9.	เมทานอล	เกรดการค้า	บริษัท Zen point
10.	เฮกเซน	เกรดการค้า	บริษัท Zen point
11.	Fmoc-Ala-OH		บริษัท Fluka
12.	Fmoc-Gly-OH		บริษัท Fluka
13.	Fmoc-Ile-OH		บริษัท Fluka
14.	Fmoc-Pro-OH		บริษัท Fluka
15.	Fmoc-Val-OH		บริษัท Fluka
16.	ซิลิกาเจล ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง(0.06-0.20 มิลลิเมตร)		บริษัท Carlo ERBA

3.2 เครื่องมือ

1. บริภัณฑ์เครื่องแก้ว
2. กระดาษกรอง
3. หลอดทดลอง
4. หลอดหยด
5. เครื่องปั่นกวนแม่เหล็ก
6. แท่งแม่เหล็ก
7. หลอดฉีดยาพลาสติก

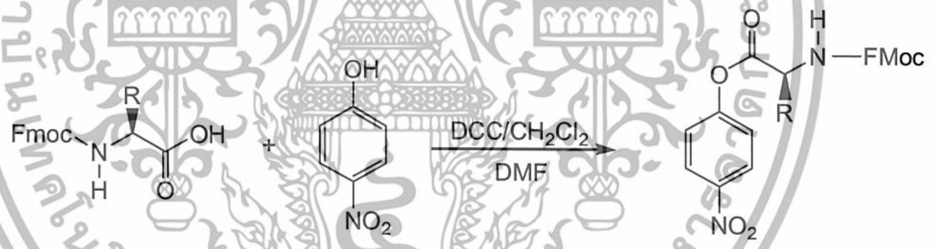
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. เครื่องเขย่า
9. เครื่องกรองลดความดัน
10. ตู้อบ
11. คอลัมน์
12. เครื่องระเหยสุญญากาศ
13. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
14. แผ่นทิลเลเยอร์โครมาโทกราฟี (TLC aluminium sheet) บริษัท MERCK

3.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

เครื่องฟูเรียทรานส์ฟอร์มนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนท์ BRUKER รุ่น Advance DPX 300 ความถี่ 300 เมกกะเฮิร์ท

3.4 วิธีการทดลองทั่วไปในปฏิกิริยาการใส่หมู่กระตุ้นคาร์บอกซิลิกของกรดอะมิโน ดังรูปที่ 3.1



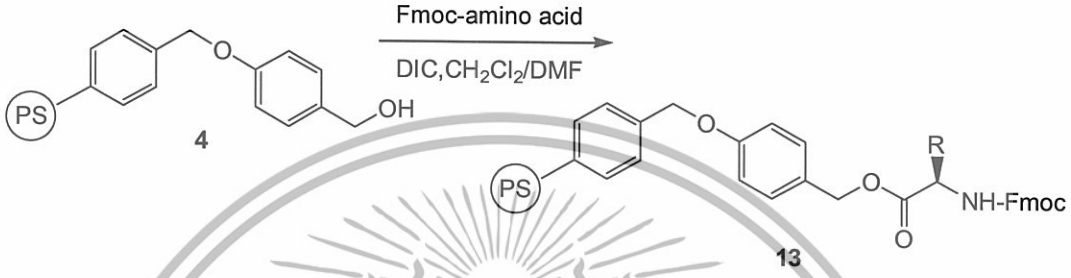
รูปที่ 3.1 แสดงการใส่หมู่กระตุ้นคาร์บอกซิลิกของกรดอะมิโน

1. ชั่ง Fmoc-amino acid (1 equiv.) ใส่ในขวดก้นกลมขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วยไดคลอโรมีเทนและไดเมทิลฟอร์มาไมด์ในปริมาณเล็กน้อย
2. หลังจากนั้นเติมสารละลาย DCC (1.2 equiv.) ในไดคลอโรมีเทนลงไป ปั่นกวนที่อุณภูมิห้องเป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง
3. หลังจากนั้นเติม 4-nitrophenol (1.2 equiv.) ลงไป ปั่นกวนที่อุณภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง
4. ทดสอบปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลาย เฮกเซน : ไดคลอโรมีเทน (1 : 2)
5. แยกสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี
6. พิสูจน์โครงสร้างด้วยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติเรโซแนนท์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

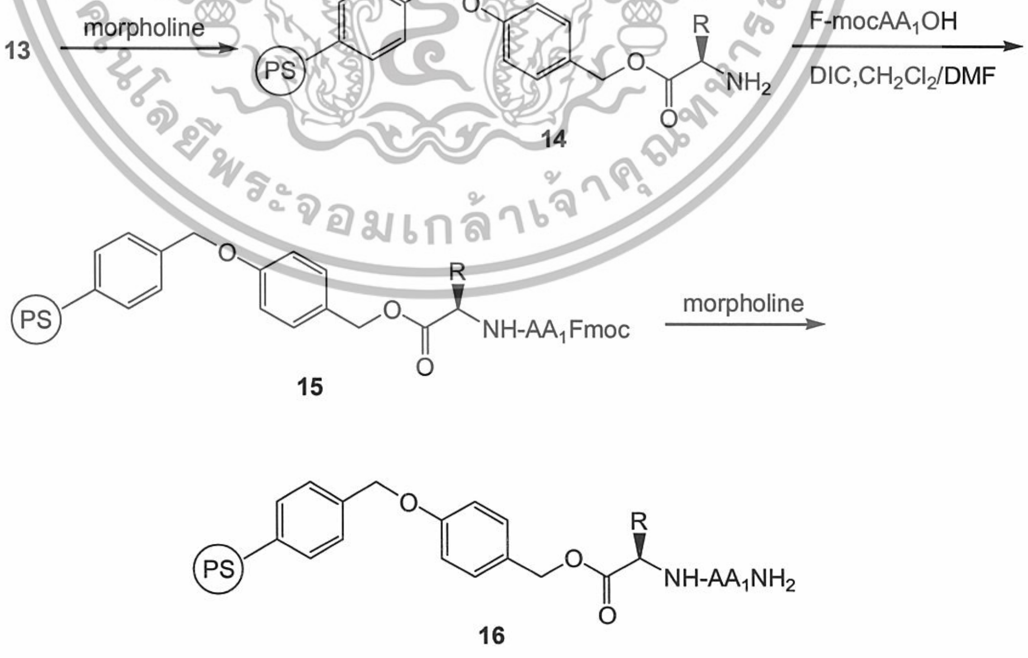
3.5 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์เปปไทด์บนวัฏภาคของแข็ง

เขย่าของผสมที่อุณหภูมิห้องประมาณ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นกรองและล้างด้วยไดคลอโรมีเทน และเมทานอล ทำการตัดหมู่ป้องกัน Fmoc ออกด้วย morpholine ในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (DMF) ใช้เวลาเขย่า 30 นาที กรองออกดังรูป 3.2



รูปที่ 3.2 แสดงการเชื่อมต่อของแวงเรซิน กับ Fmoc-Glycine

ทำการตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาโดยใช้ reagent A และreagent B เท่ากับ 3 : 1 หยด ให้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส จะเกิดสีน้ำเงินม่วงขึ้นบนผิวเรซินแสดงการเกิดของหมู่อะมิโนอิสระ

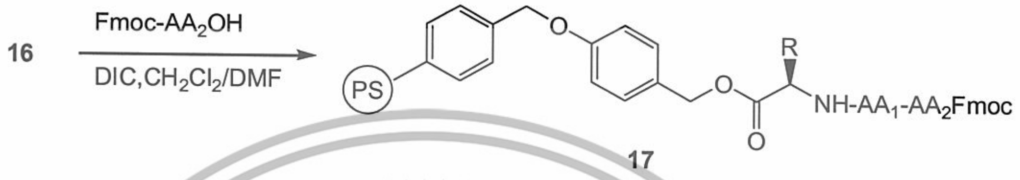


รูปที่ 3.3 แสดงขั้นตอนการดำเนินการสังเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

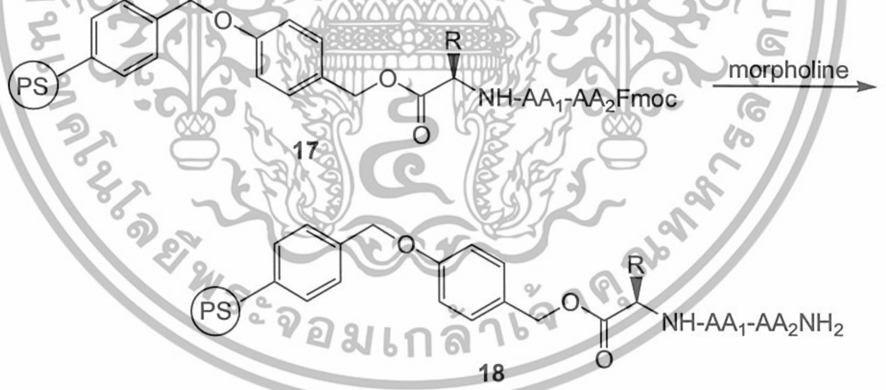
สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

เขย่าของผสมที่อุณหภูมิห้องประมาณ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นกรองและล้างด้วยไดคลอโรมีเทน และเมทานอลทำการตัดหมู่ป้องกัน Fmoc ออกด้วย morpholine ในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ให้มีปริมาณท่วมเรซินเล็กน้อยใช้เวลาเขย่า 30 นาทีทำการกรองสารละลายออกได้สาร **17**



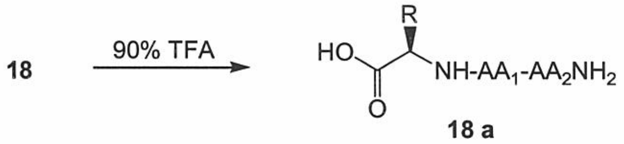
รูปที่ 3.4 แสดงการเชื่อมต่อของสาร 17 กับ Fmoc amino acid activated

ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาโดยใช้ reagent A และreagent B เท่ากับ 3 : 1 หยด ทำการให้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส จะเกิดสีน้ำเงินม่วงขึ้นบนผิวเรซินแสดงการเกิดของหมู่อะมิโนอิสระ



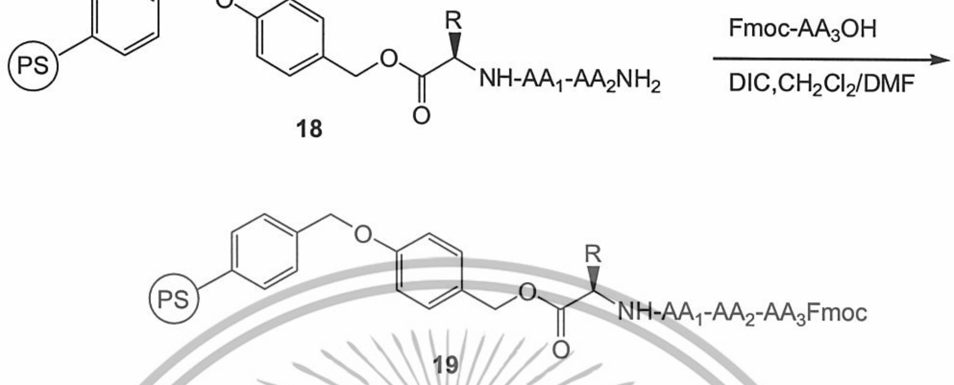
รูปที่ 3.5 แสดงการตัดหมู่ป้องกัน Fmoc ออกจากสาร 18

เมื่อนำสาร **18** มาทำการตัดออกจากตัวค้ำจุนได้ดังนี้



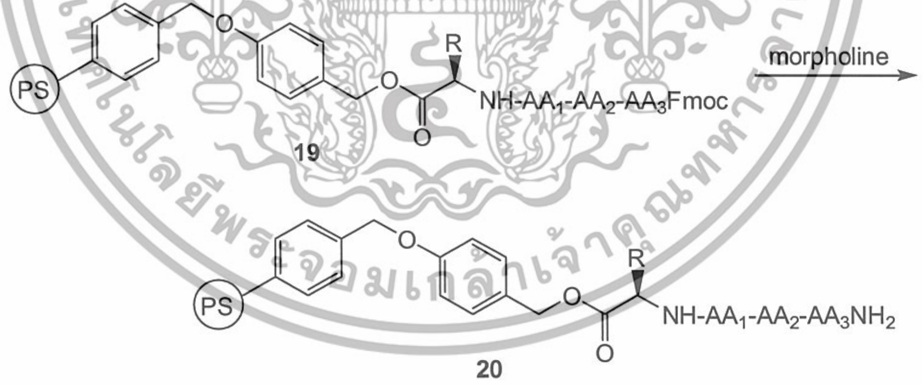
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
107757

นำสาร **18** มาทำปฏิกิริยาต่อดังรูป ที่ 3.6



รูปที่ 3.6 แสดงการเชื่อมต่อของสาร 18 กับ Fmoc amino acid activated

เขย่าของผสมที่อุณหภูมิห้องประมาณ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นกรองและล้างด้วยไดคลอโรมีเทน และเมทานอลทำการตัดหมู่ป้องกัน Fmoc ออกด้วย morpholine ในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ ใช้เวลาเขย่า 30 นาที กรองออกดังรูปที่ 3.7



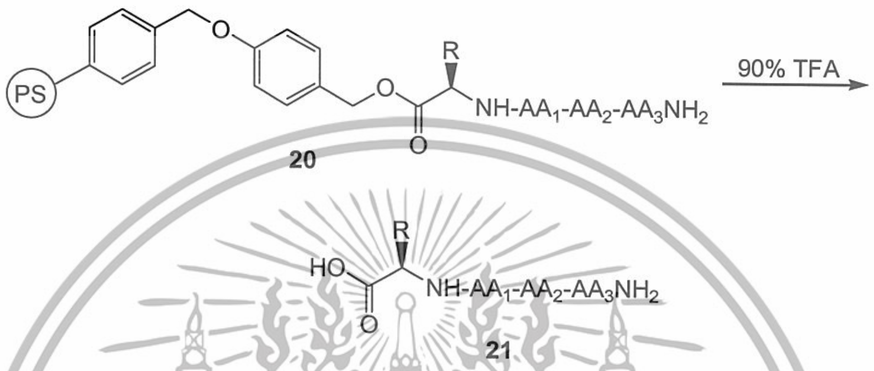
รูปที่ 3.7 แสดงการตัดหมู่ป้องกัน Fmoc ออกจากสาร 19

ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาโดยใช้ reagent A และreagent B เท่ากับ 3 : 1 หยด ทำการให้คามร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 60องศาเซลเซียส จะเกิดสีน้ำเงินม่วงขึ้นบนผิวเรซินแสดงการเกิดของหมู่อะมิโนอิสระขึ้น

นำสาร **20** ทำปฏิกิริยาต่อจนได้ชนิดของสารตามต้องการ หลังจากนั้นกรองและล้างด้วยไดคลอโรมีเทนสลับกับเมทานอล เมื่อต้องการหยุดปฏิกิริยาทำโดยการตัดสารผลิตภัณฑ์ออกจากตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื่อมโยงและตัวค้ำจุน ทำการตัดสารผลิตภัณฑ์ออกโดยนำสาร **20** ทำปฏิกิริยากับ 90% TFAในไดคลอโรมีเทน เขย่าสารที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 30 นาที ทำการกรองเก็บสารละลาย หลังจากนั้นระเหยตัวทำละลายออกจากสารผลิตภัณฑ์ นำสารไปพิสูจน์โครงสร้างด้วยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนท์ ดังรูปที่ 3.8



รูปที่ 3.8 แสดงการตัดสารผลิตภัณฑ์ออกจากตัวเชื่อมโยงและตัวค้ำจุน

ตารางที่ 3.1 แสดงชนิดตำแหน่งของเปปไทด์สังเคราะห์

สาร	Fmoc-amino acid	AA_1	AA_2	AA_3
18a	Fmoc-Gly	Pro	Gly	-
21a	Fmoc-Ile	Val	Pro	Val
21b	Fmoc-Ile	Val	Pro	Pro

3.5.1 ขั้นตอนการสังเคราะห์ glycylprolylglycine 18a

1. ชั่งเรซินใส่ใน column cap 106 มิลลิกรัม (0.106 mmol resin) แช่ในไดคลอโรมีเทนให้บวมตัว หลังจากนั้นกรองเอาตัวทำลายออก
2. ชั่งFmoc-Gly-OH 63.03 มิลลิกรัม (0.212 mmol) ละลายในตัวทำละลาย DMF เล็กน้อยเติมไดคลอโรมีเทนและเติมสารละลาย DIC 49.79 ไมโครลิตร (0.318 mmol) ในไดคลอโรมีเทนลงไป นำส่วนผสมที่ได้ใส่ในเรซินที่บวมตัวด้วยไดคลอโรมีเทนแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมากรองและล้างด้วยไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล เพื่อล้างรีเอเจนต์ที่มากเกินพอออก
4. ทำการตัดหมู่ป้องกัน Fmoc ออกด้วย morpholine ในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ ใช้เวลาเขย่านาน 30 นาที กรองและล้างออกด้วยไดคลอโรมีเทนและเมทานอล และทำซ้ำอีกครั้งหนึ่ง
5. ทดสอบปฏิกิริยาโดยนำเรซินเล็กน้อยด้วย reagent A 3 หยด และ reagent B 1หยด จะให้ผลทดสอบเป็นสีน้ำเงินม่วง แสดงว่าปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์
6. หลังจากนั้นนำเรซินที่ได้มาทำปฏิกิริยาต่อกับกรดอะมิโนที่ใส่เข้าไปเป็นตัวที่ 2 คือ Fmoc-Pro-OH 71.53 มิลลิกรัม (0.212 mmol) ละลายในไดเมทิลฟอร์มาไมด์และไดคลอโรมีเทนเล็กน้อย
7. นำไปเขย่าเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมากรองและล้างด้วยไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล เพื่อล้างรีเอเจนต์ที่มากเกินพอออก
8. ทำการทดสอบปฏิกิริยาด้วย reagent A 3 หยด และ reagent B 1 หยดจะได้สีของสารละลายทดสอบเหมือนเดิมไม่มีการเปลี่ยนแปลง แสดงว่าปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์แล้ว กรองและล้างด้วยไดคลอโรมีเทนและเมทานอล
9. ตัดหมู่ป้องกัน Fmoc ออกด้วย morpholine ในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ หลังจากตัดหมู่ป้องกันออกแล้วทำการทดสอบด้วย reagent A 3 หยด และ reagent B 1 หยด จะได้สารละลายสีน้ำเงินม่วง แสดงว่าปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์แล้ว
10. ทดลองซ้ำในขั้นตอนที่ 2-5
11. ตัดสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ออกจากเรซินด้วย 90% TFA ในไดคลอโรมีเทน ได้สารผลิตภัณฑ์ 42.23 เปอร์เซ็นต์ และพิสูจน์โครงสร้างด้วยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนท์

3.5.2 ขั้นตอนการสังเคราะห์ valylprolylvalylisoleucine 21a

1. ชั่งเรซินใส่ใน column cap 110 มิลลิกรัม (0.11 mmol resin) แช่ในไดคลอโรมีเทนให้บวมตัว หลังจากนั้นกรองเอาตัวทำลายออก
2. ชั่งFmoc-Ile-OH 77.75 มิลลิกรัม (0.22 mmol) ละลายในไดเมทิลฟอร์มาไมด์เล็กน้อยเติมไดคลอโรมีเทนและเติมสารละลาย DIC 51.67 ไมโครลิตร (0.33 mmol) ในไดคลอโรมีเทนลงไป นำส่วนผสมที่ได้ใส่ในเรซินที่บวมตัวด้วยไดคลอโรมีเทนแล้ว
3. นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมากรองและล้างด้วยไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล เพื่อล้างรีเอเจนต์ที่มากเกินพอออก
4. ทำการตัดหมู่ป้องกัน Fmoc ออกด้วย morpholine ในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ ใช้เวลาเขย่านาน 30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นาที กรองและล้างออกด้วยไดคลอโรมีเทนและเมทานอล และทำซ้ำอีกครั้งหนึ่ง

5. ทดสอบปฏิกิริยาโดยนำเรซินเล็กน้อยด้วย reagent A 3หยด และ reagent B 1หยด จะให้ผลทดสอบเป็นสีน้ำเงินม่วง แสดงว่าปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์
6. หลังจากนั้นนำเรซินที่ได้มาทำปฏิกิริยาต่อกับกรดอะมิโนโดยกรดอะมิโนที่ใส่เข้าไปเป็นตัวที่ 2 คือ Fmoc-Val-OH 74.67 มิลลิกรัม (0.22 mmol) ละลายในไดเมทิลฟอร์มาไมด์และไดคลอโรมีเทน
7. นำไปเขย่าเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมากรองและล้างด้วยไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล เพื่อล้างรีเอเจนต์ที่มากเกินพอออก
8. ทำการทดสอบปฏิกิริยาด้วย reagent A 3 หยด และ reagent B 1 หยดจะได้สีของสารละลายทดสอบเหมือนเดิมไม่มีการเปลี่ยนแปลง แสดงว่าปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์แล้ว กรองและล้างด้วยไดคลอโรมีเทนและเมทานอล
9. ตัดหมู่ป้องกัน Fmoc ออกด้วย morpholine ในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ หลังจากตัดหมู่ป้องกันออกแล้วทำการทดสอบด้วย reagent A 3 หยด และ reagent B 1 หยด จะได้สารละลายสีน้ำเงินม่วง แสดงว่าปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์แล้ว
10. หลังจากนั้นนำเรซินที่ได้มาทำปฏิกิริยาต่อกับกรดอะมิโน โดยกรดอะมิโนที่ใส่เข้าไปเป็นตัวที่3 คือ Fmoc-Pro-OH 74.22 มิลลิกรัม (0.22 mmol) ละลายในไดเมทิลฟอร์มาไมด์และไดคลอโรมีเทน
11. ทดลองซ้ำในขั้นตอนที่ 3-9
12. ตัดสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ออกจากเรซินด้วย 90% TFA ในไดคลอโรมีเทน ได้สารผลิตภัณฑ์ 60.58 เปอร์เซ็นต์ และพิสูจน์โครงสร้างด้วยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติเรโซแนนท์

3.5.3 ขั้นตอนการสังเคราะห์ **prolylprolylvalylisoleucine 21b**

1. ชั่งเรซินใส่ใน column cap 100 มิลลิกรัม (0.1 mmol resin) แช่ในไดคลอโรมีเทนให้บวมตัว หลังจากนั้นกรองเอาตัวทำลายออก
2. ชั่งFmoc-Ile-OH 70.69 มิลลิกรัม (0.2 mmol) ละลายในไดเมิลฟอร์มาไมด์เล็กน้อยเติมไดคลอโรมีเทนและเติมสารละลาย DIC 46.97ไมโครลิตร (0.3 mmol) ในไดคลอโรมีเทนลงไป นำส่วนผสมที่ได้ใส่ในเรซินที่บวมตัวด้วยไดคลอโรมีเทนแล้ว
3. นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมากรองและล้างด้วยไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล เพื่อล้างรีเอเจนต์ที่มากเกินพอออก
4. ทำการตัดหมู่ป้องกัน Fmoc ออกด้วย morpholine ในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ ใช้เวลาเขย่านาน 30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นาที กรองและล้างออกด้วยไดคลอโรมีเทนและเมทานอล และทำซ้ำอีกครั้งหนึ่ง

5. ทดสอบปฏิกิริยาโดยนำเรซินเล็กน้อยด้วย reagent A 3หยด และ reagent B 1หยด จะให้ผลทดสอบเป็นสีน้ำเงินม่วง แสดงว่าปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์
6. หลังจากนั้นนำเรซินที่ได้มาทำปฏิกิริยาต่อกับกรดอะมิโนที่ใส่เข้าไปเป็นตัวที่ 2 คือ Fmoc-Val-OH 67.89 มิลลิกรัม (0.2 mmol) ละลายในไดเมทิลฟอร์มาไมด์และไดคลอโรมีเทน
7. นำไปเขย่าเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมากรองและล้างด้วยไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล เพื่อล้างรีเอเจนต์ที่มากเกินพอออก
8. ทำการทดสอบปฏิกิริยาด้วย reagent A 3 หยด และ reagent B 1 หยดจะได้สีของสารละลายทดสอบเหมือนเดิมไม่มีการเปลี่ยนแปลง แสดงว่าปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์แล้ว กรองและล้างด้วยไดคลอโรมีเทนและเมทานอล
9. ตัดหมู่ป้องกัน Fmoc ออกด้วย morpholine ในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ หลังจากตัดหมู่ป้องกันออกแล้วทำการทดสอบด้วย reagent A 3 หยด และ reagent B 1 หยด จะได้สารละลายสีน้ำเงินม่วง แสดงว่าปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์แล้ว
10. หลังจากนั้นนำเรซินที่ได้มาทำปฏิกิริยาต่อกับกรดอะมิโนโดยกรดอะมิโนที่ใส่เข้าไปเป็นตัวที่ 3 คือ Fmoc-Pro-OH 67.48 มิลลิกรัม (0.2 mmol) ละลายในไดเมทิลฟอร์มาไมด์และไดคลอโรมีเทน
11. ทดลองซ้ำในขั้นตอนที่ 7-9
12. ตัดสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ออกจากเรซินด้วย 90% TFA ในไดคลอโรมีเทน และพิสูจน์โครงสร้างด้วยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนท์

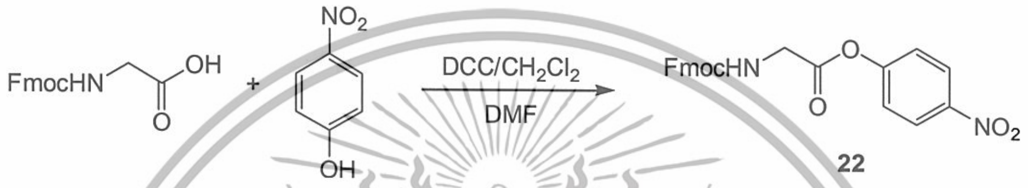
พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลอง

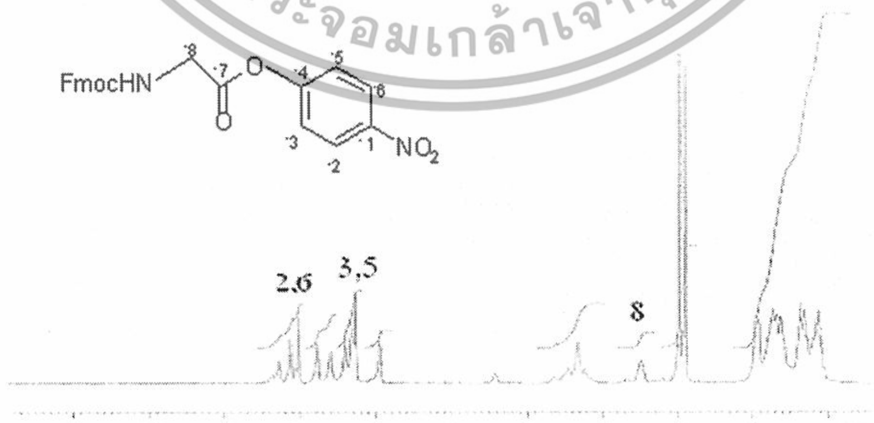
4.1 การสังเคราะห์การใส่หมู่กระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลิกของกรดอะมิโน

4.1.1 การใส่หมู่กระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลิกของ Fmoc-Glycine



รูปที่ 4.1 แสดงการสังเคราะห์การใส่หมู่กระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลิกของ Fmoc-Glycine

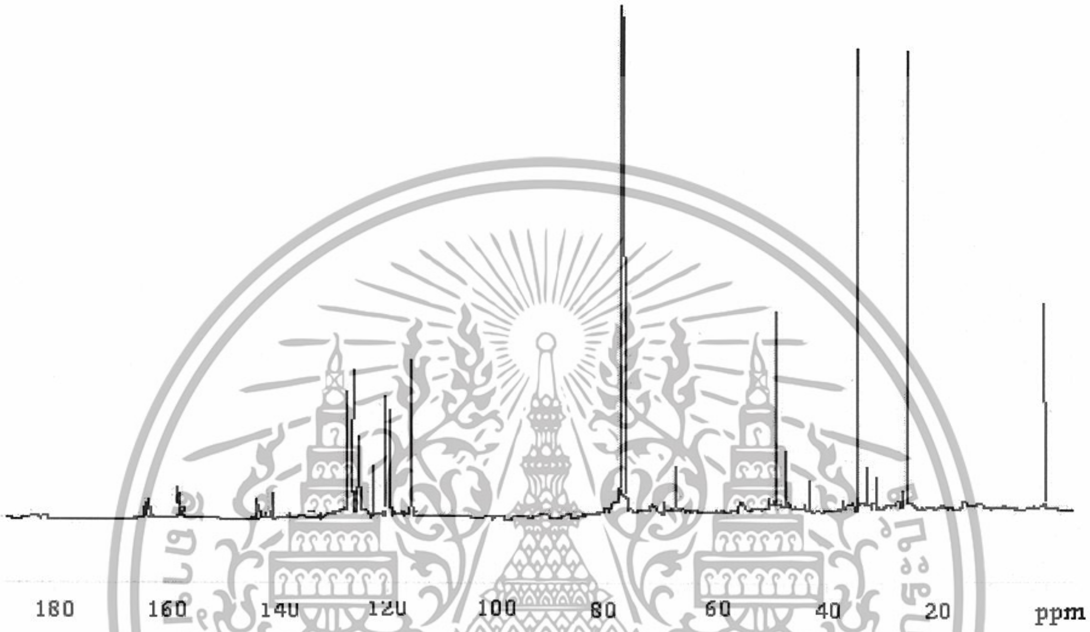
ปั่นกวนของผสมที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องทำการตรวจปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี ผลจากการตรวจสอบปฏิกิริยาโดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ เฮกเซน : เอทิล อะซิเตต ปรากฏจุดเรืองแสงยูวี 256 นาโนเมตร แสดงความมีขั้วมากกว่าสารตั้งต้น ทำการสกัดและล้างปฏิกิริยาด้วย ไดคลอโรมีเทน และนำนำสารที่คาดว่าเป็นสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีและนำสารบริสุทธิ์ไปหาสูตรโครงสร้างด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR ซึ่งแสดงข้อมูลดังรูปที่ 4.2 จากผล ^{1}H-NMR (300MHz, $CDCl_3$) พบสัญญาณที่เคมิคัลชิพ (ppm) เท่ากับ 8.25 (2H, d, H-2 และ H-6), 7.35 (2H, d, H-3 และ H-5) และ 3.58 (2H, s, H-8)



รูปที่ 4.2 แสดง ^{1}H-NMR สเปกตรัมของสาร 22 โดยใช้ $CDCl_3$ เป็นตัวทำละลาย

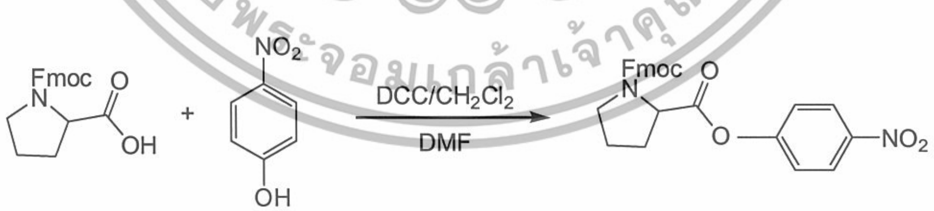
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผล ^{13}C-NMR (300MHz, $CDCl_3$) พบสัญญาณที่เคมิคัลชิพ (ppm) เท่ากับ 162.60 (C-1), 126.52 (C-2 และ C-6), 116.03 (C-3 และ C-5), 122.32 (C-4), 163.20 (C-7) และ 47.80 (C-8) ดังแสดงในรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 แสดง ^{13}C-NMR สเปกตรัมของสาร **22** โดยใช้ $CDCl_3$ เป็นตัวทำละลาย

4.1.2 การใส่หมู่กระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลิกของ Fmoc-Proline

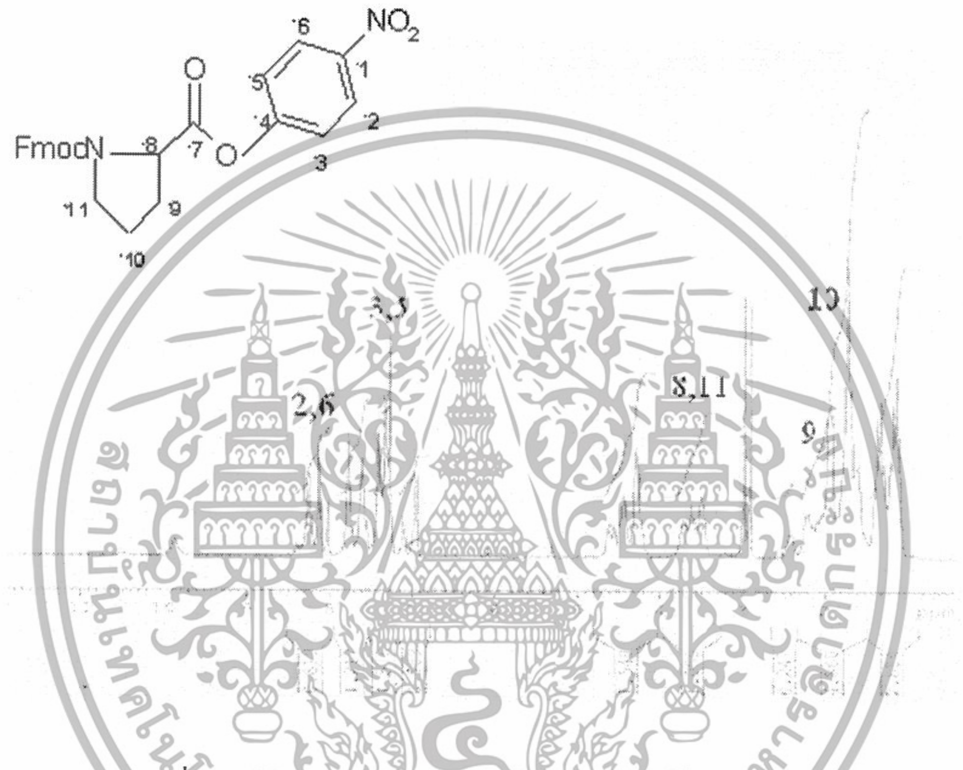


รูปที่ 4.4 แสดงการสังเคราะห์การใส่หมู่กระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลิกของ Fmoc-Proline

ปั่นกวนของผสมที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องทำการตรวจปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทรกราฟี ผลจากการตรวจสอบปฏิกิริยาโดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ เฮกเซน : เอทิล อะซิเตต ปรากฏจุดเรืองแสงยูวี 256 นาโนเมตร แสดงความมีขั้วมากกว่าสารตั้งต้น ทำการสกัดและล้างปฏิกิริยาด้วย ไดคลอโรมีเทน และน้ำนำสารที่คาดว่าเป็นสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

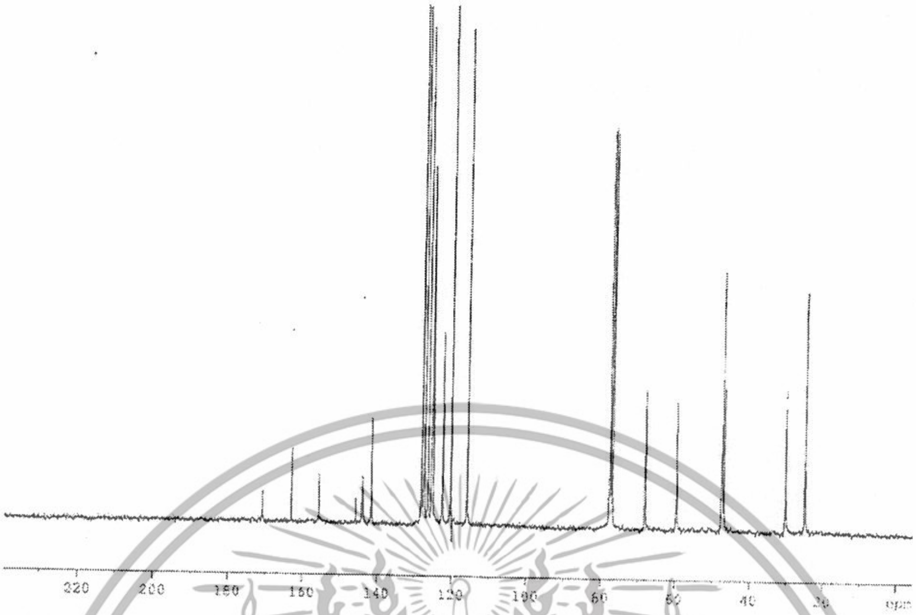
บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีและนำสารบริสุทธิ์ไปหาสูตรโครงสร้างด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR ซึ่งแสดงดังรูปที่ 4.5 จากผล ^{1}H-NMR (300MHz, $CDCl_3$) พบสัญญาณที่เคมิคัลชิพ (ppm) เท่ากับ 8.25 (2H, d, H-2 และ H-6), 7.35 (2H, d, H-3 และ H-5), 3.64 (1H, m, H-8), 3.58 (2H, t, H-11), 2.16 (2H, t, H-9) และ1.89 (2H, t, H-10)



รูปที่ 4.5 แสดง ^{1}H-NMR สเปกตรัมของสาร **23** โดยใช้ $CDCl_3$ เป็นตัวทำละลาย

จากผล ^{13}C-NMR (300MHz, $CDCl_3$) พบสัญญาณที่เคมิคัลชิพ (ppm) เท่ากับ 170.79 (C-7), 162.60 (C-1), 126.52 (C-2 และ C-6), 116.03 (C-3 และ C-5), 122.32 (C-4), 47.54 (C-8), 47.07 (C-9), 30.00 (C-9) และ 24.97 (C-10) ดังแสดงในรูปที่ 4.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



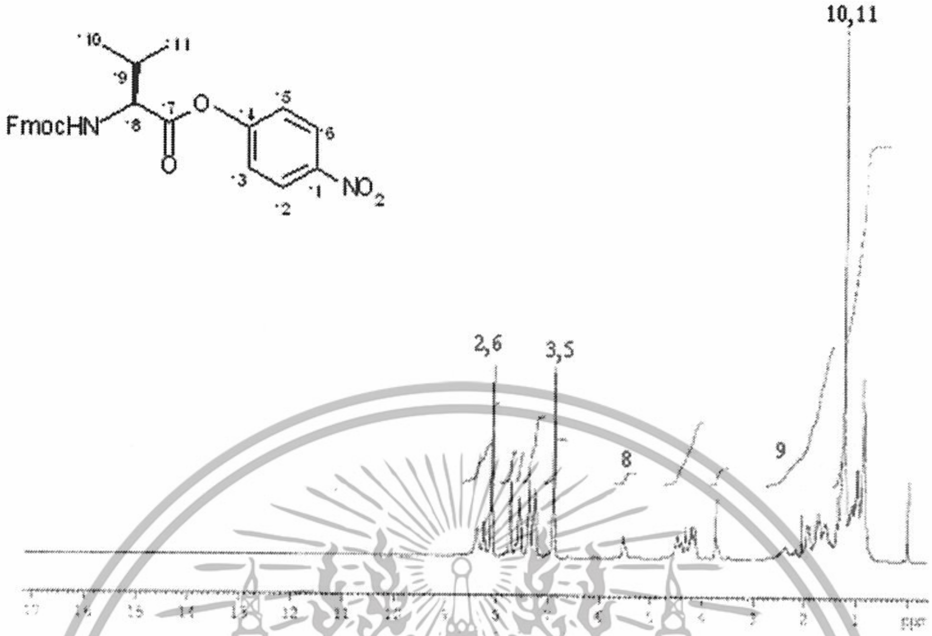
รูปที่ 4.6 แสดง [13]C-NMR สเปกตรัมของสาร **23** โดยใช้ $CDCl_3$ เป็นตัวทำละลาย

4.1.3 การใส่หมู่กระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลิกของ Fmoc-Valine

รูปที่ 4.7 แสดงการสังเคราะห์การใส่หมู่กระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลิกของ Fmoc-Valine

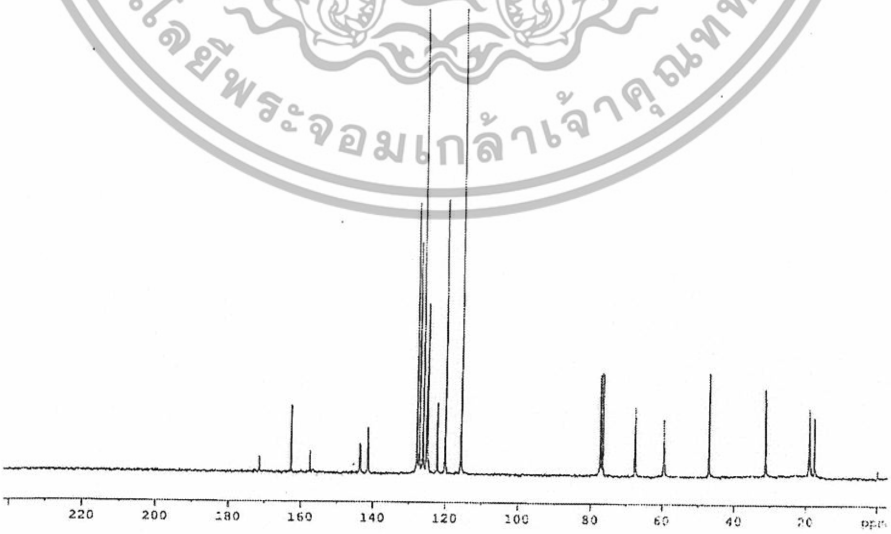
ปั่นกวนของผสมที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องทำการตรวจปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทรกราฟี ผลจากการตรวจสอบปฏิกิริยาโดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ เฮกเซน : เอทิล อะซิเตต ปรากฏจุดเรืองแสงยูวี 256 นาโนเมตร แสดงความมีขั้วมากกว่าสารตั้งต้น ทำการสกัดและล้างปฏิกิริยาด้วย ไดคลอโรมีเทน และน้ำนำสารที่คาดว่าเป็นสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีและนำสารบริสุทธิ์ไปหาสูตรโครงสร้างด้วยเทคนิค [1]H-NMR ซึ่งแสดงข้อมูลดังรูปที่ 4.8 จากผล [1]H-NMR (300MHz, $CDCl_3$) พบสัญญาณที่เคมิคัลชิพ (ppm) เท่ากับ 8.09 (2H, d, H-2 และ H-6), 6.88 (2H, d, H-3 และ H-5), 5.53 (1H, d, H-8), 2.23 (2H, m, H-9) และ 0.87 (6H, m, H-10 และ H-11)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 แสดง ^{1}H-NMR สเปกตรัมของสาร **24** โดย $CDCl_3$ ใช้เป็นตัวทำละลาย

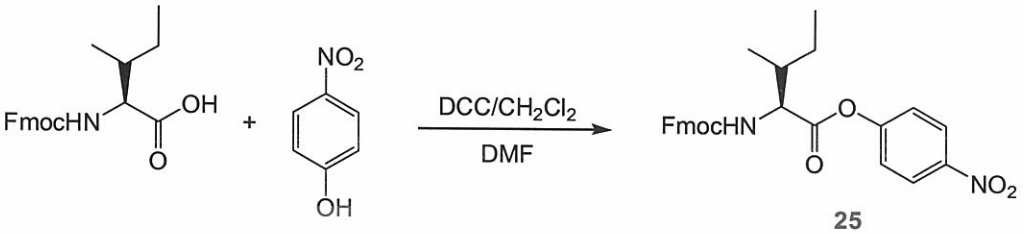
จากผล ^{13}C-NMR (300MHz, $CDCl_3$) พบสัญญาณที่เคมิคัลชิพ (ppm) เท่ากับ 171.36 (C-7), 162.64 (C-1), 126.20 (C-2 และC-6), 115.72 (C-3 และ C-5), 122.32 (C-4), 47.16 (C-8), 31.57 (C-9), 19.27 (C-11) และ 17.19 (C-10) ดังแสดงในรูปที่ 4.9



รูปที่ 4.9 แสดง ^{13}C-NMR สเปกตรัมของสาร **24** โดย $CDCl_3$ ใช้เป็นตัวทำละลาย

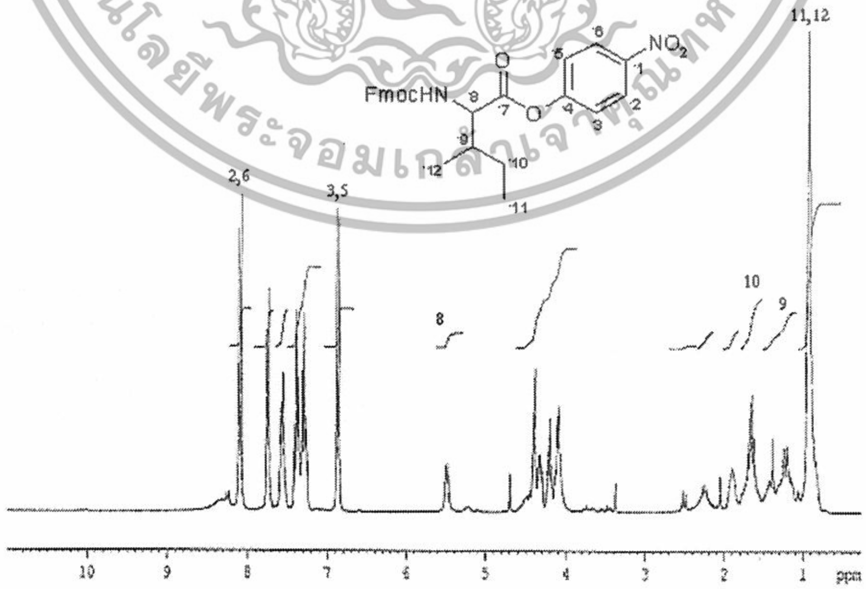
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.4 การใส่หมู่กระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลิกของ Fmoc-Isoleucine



รูปที่ 4.10 แสดงการสังเคราะห์การใส่หมู่กระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลิกของ Fmoc-Isoleucine

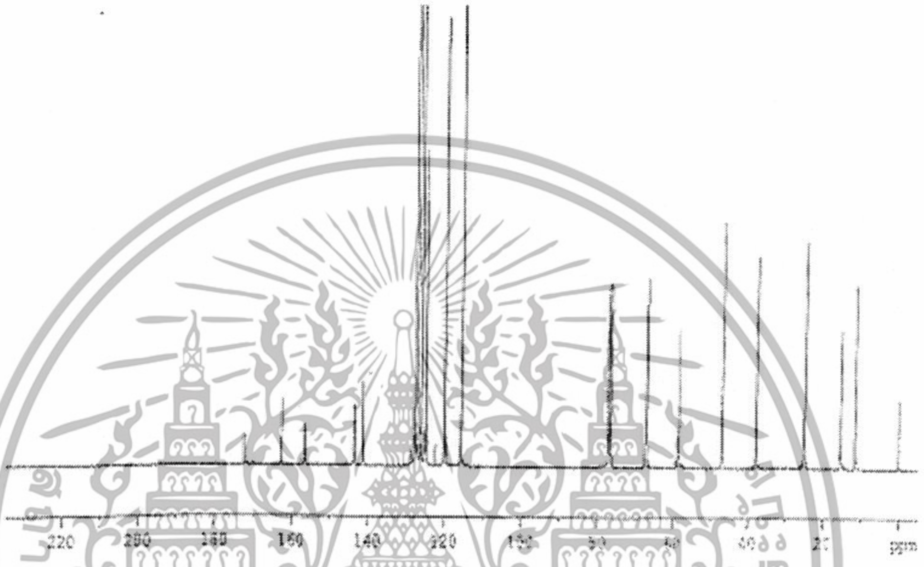
ปั่นกวนของผสมที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องทำการตรวจปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทรกราฟี ผลจากการตรวจสอบปฏิกิริยาโดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ เฮกเซน : เอทิล อะซิเตต ปรากฏจุดเรืองแสงยูวี 256 นาโนเมตร แสดงความมีขั้วมากกว่าสารตั้งต้น ทำการสกัดและล้างปฏิกิริยาด้วย ไดคลอโรมีเทน และน้ำนำสารที่คาดว่าเป็นสารผลิตภัณฑ์ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีและนำสารบริสุทธิ์ไปหาสูตรโครงสร้างด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR ซึ่งแสดงข้อมูลดังรูปที่ 4.11 จากผล ^{1}H-NMR (300MHz, $CDCl_3$) พบสัญญาณที่เคมิคัลชิพ (ppm) เท่ากับ 8.08 (2H, d, H-2 และ H-6), 6.8 (2H, d, H-3 และ H-5), 5.50 (1H, d, H-8), 1.24 (2H, m, H-9) 1.65 (2H, m, H-10) และ 0.87 (6H, m, H-11 และ H-12)



รูปที่ 4.11 แสดง ^{1}H-NMR สเปกตรัมของสาร 25 โดยใช้ $CDCl_3$ เป็นตัวทำละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผล ^{13}C-NMR (300MHz, $CDCl_3$) พบสัญญาณที่เคมิคัลชิพ (ppm) เท่ากับ 172.30 (C-7), 162.58 (C-1), 126.17 (C-2 และC-6), 115.67 (C-3 และ C-5), 122.32 (C-4), 47.15 (C-8), 38.80 (C-10), 25.09 (C-9), 15.49 (C-10) และ 11.58 (C-11) ดังแสดงในรูปที่ 4.11



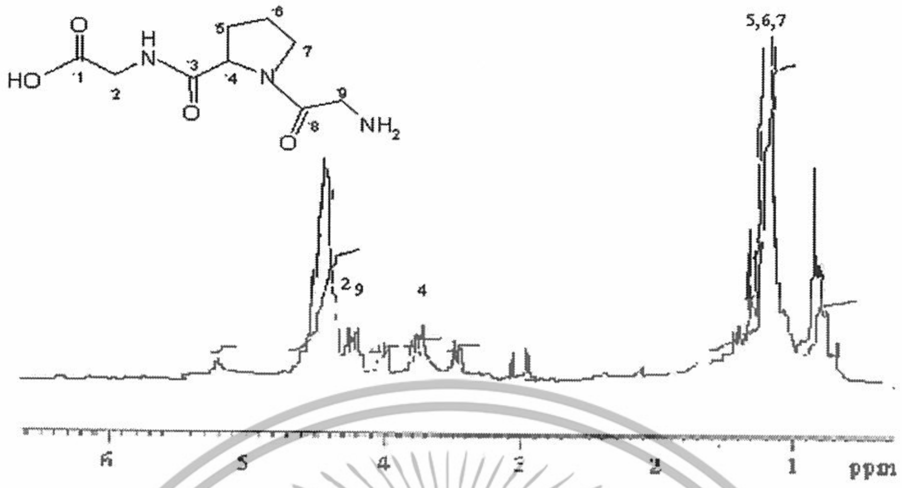
รูปที่ 4.12 แสดง ^{13}C-NMRสเปกตรัมของสาร **25** โดยใช้ $CDCl_3$ เป็นตัวทำละลาย

4.2 การสังเคราะห์เปปไทด์โดยเทคนิควัฏภาคของแข็ง

4.2.1 การสังเคราะห์ glycylprolyglycine

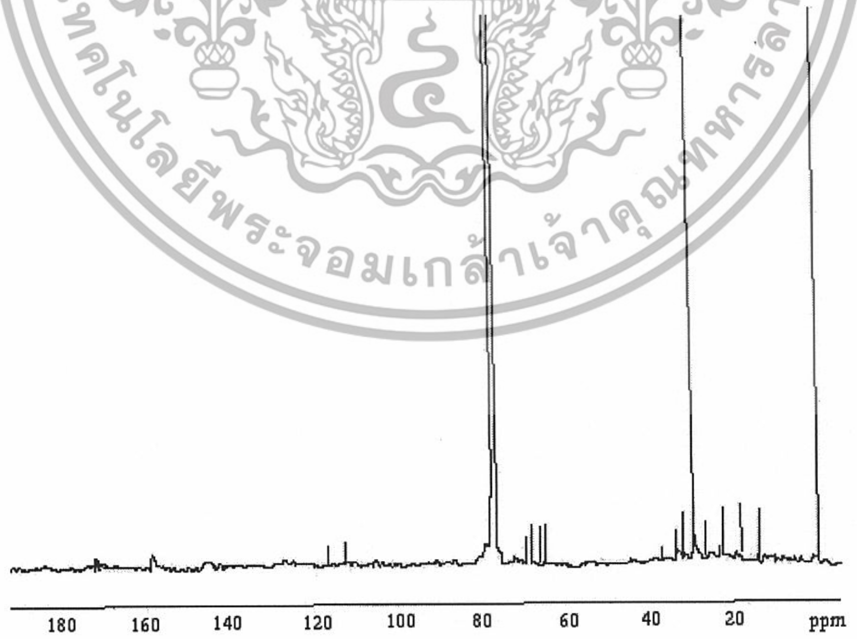
จากปฏิกิริยานี้สามารถสังเคราะห์ไตรเปปไทด์ glycylprolyglycine **18a** เท่ากับ 42.23 เปอร์เซ็นต์ และจากการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) พบสัญญาณที่เคมิคัลชิพ (ppm) เท่ากับ 4.20 (2H, s, H-2), 4.07 (2H, s, H-9), 3.80 (1H, t, H-4), 1.33 (6H, m, H-5, H-6 และ H-7) ดังแสดงในรูปที่ 4.13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.13 แสดง ^{1}H-NMR สเปกตรัมของสาร glycylprolylglycine **18a** โดยใช้ $CDCl_3$ เป็นตัวทำละลาย

จากผล ^{13}C-NMR (300MHz, $CDCl_3$) พบสัญญาณที่เคมิคัลชิพ (ppm) เท่ากับ 172.8 (C-1), 171.97 (C-3), 167.50 (C-8), 64.9 (C-9), 37.4 (C-2), 33.70 (C-4), 33.46 (C-7), 18.9 (C-5) และ 18.5 (C-6) ดังแสดงในรูปที่ 4.14

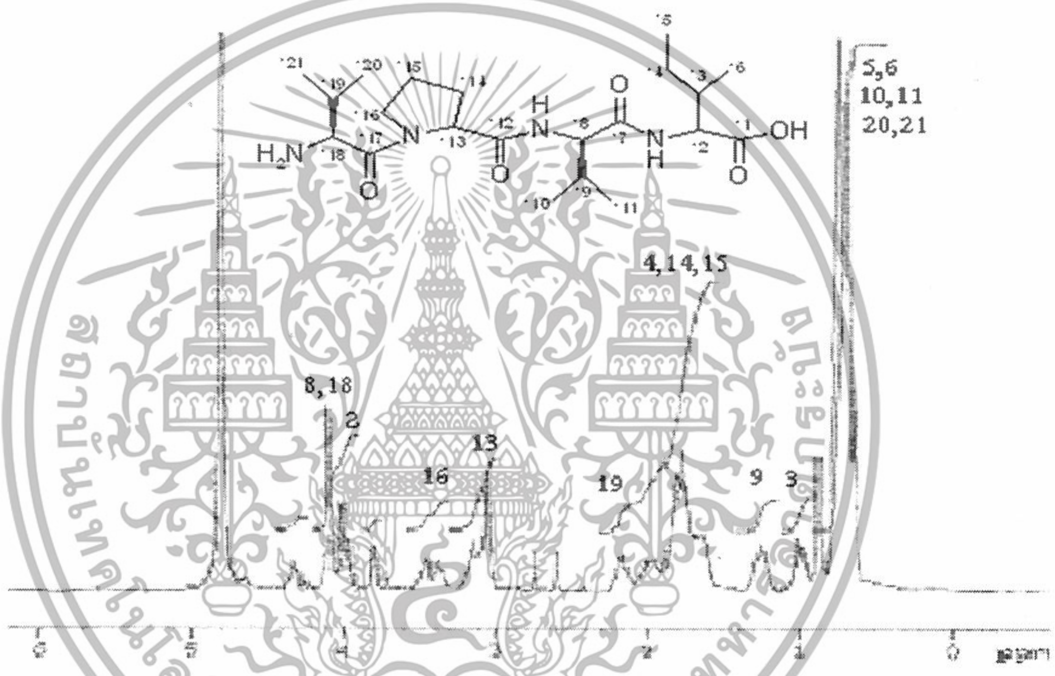


รูปที่ 4.14 แสดง ^{13}C-NMR สเปกตรัมของสาร glycylprolylglycine **18a** โดยใช้ $CDCl_3$ เป็นตัวทำละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 การสังเคราะห์ valylprolyvalylisoleucine 21a

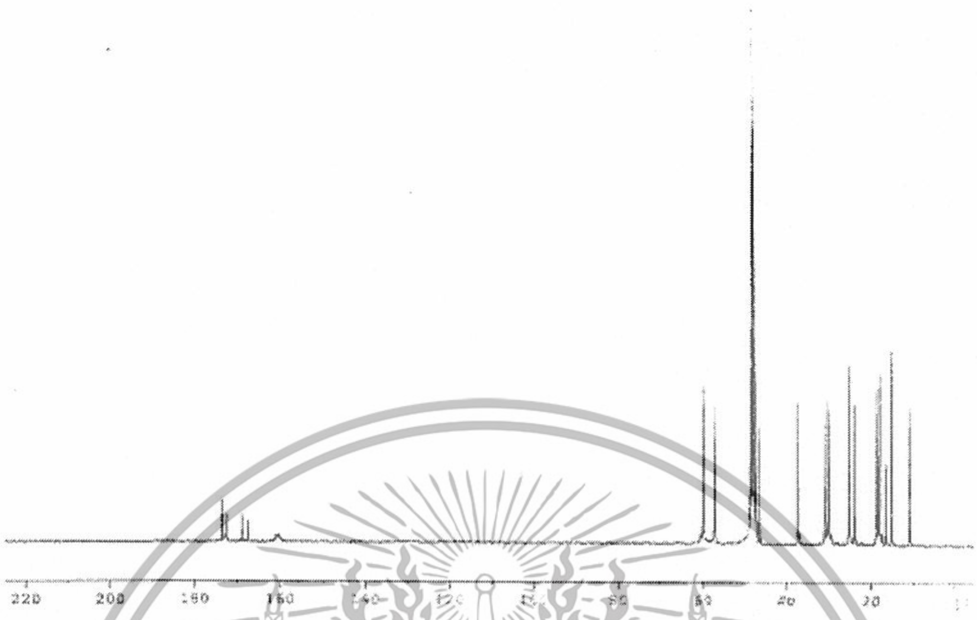
จากปฏิกิริยานี้สามารถสังเคราะห์เททระเปปไทด์ valylprolyvalylisoleucine **21a** เท่ากับ 60.58 เปอร์เซ็นต์ และจากการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) พบสัญญาณที่เคมิคัลชิฟ (ppm) เท่ากับ 4.08 (2H, d, H-8 และ H-18), 3.99 (1H, d, H-2), 3.10 (1H, t, H-16), 3.04 (2H, t, H-13), 1.80 (6H, m, H-4, H-14 และ H-15), 1.30 (1H, m, H-9), 1.02 (1H, m, H-3) และ 0.73 (18H, m, H-5, H-6, H-10, H-11, H-20 และ H-21) ดังแสดงในรูปที่ 4.15



รูปที่ 4.15 แสดง ^{1}H-NMR สเปกตรัมของ valylprolylvalylisoleucine **21a**
โดยใช้ $CDCl_3$ เป็นตัวทำละลาย

จากผล ^{13}C-NMR (300MHz, $CDCl_3$) พบสัญญาณที่เคมิคัลชิฟ (ppm) เท่ากับ 173.49 (C-1), 172.30 (C-3), 168.79 (C-12), 167.56 (C-17), 59.90 (C-8 และ C-18), 57.17 (C-2), 46.47 (C-13), 37.28 (C-16), 30.76 (C-3), 30.17 (C-19), 25.17 (C-9), 23.90 (C-4), 18.61 (C-14), 17.80 (C-15), 16.23 (C-6), 14.98 (C-10, C-11, C-20 และ C-21) และ 10.74 (C-5) ดังแสดงในรูป 4.16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

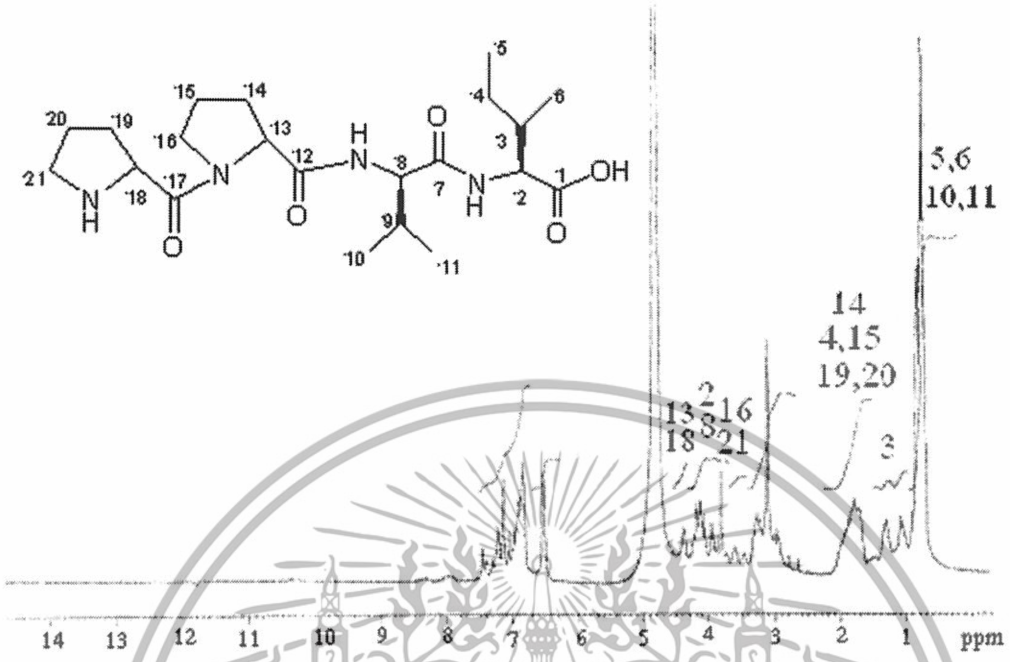


รูปที่ 4.16 แสดง ^{13}C-NMR สเปกตรัมของสาร valylprolylvalylisoleucine **21a** โดยใช้ $CDCl_3$ เป็นตัวทำละลาย

4.2.3 การสังเคราะห์ prolylprolylvalylisoleucine 21b

จากปฏิกิริยานี้สามารถสังเคราะห์เททระเปปไทด์ prolylprolylvalylisoleucine **21b** เท่ากับ 53.07 เปอร์เซ็นต์ และจากการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) พบสัญญาณที่เคมิคัลชิพ (ppm) เท่ากับ 4.54 (2-H, m, H-13 และ H-18), 4.28 (1H, d, H-8), 4.21 (1H, d, H-2), 3.67 (2H, t, H-16), 3.61 (1H, m, H-21), 2.51 (2H, m, H-14), 2.07 (8H, m, H-4, H-15, H-19 และ H-20), 1.53 (1H, m, H-9), 1.26 (1H, m, H-3), 0.98 (12H, m, H-5, H-6, H-10 และ H-11) ดังแสดงในรูปที่ 4.17

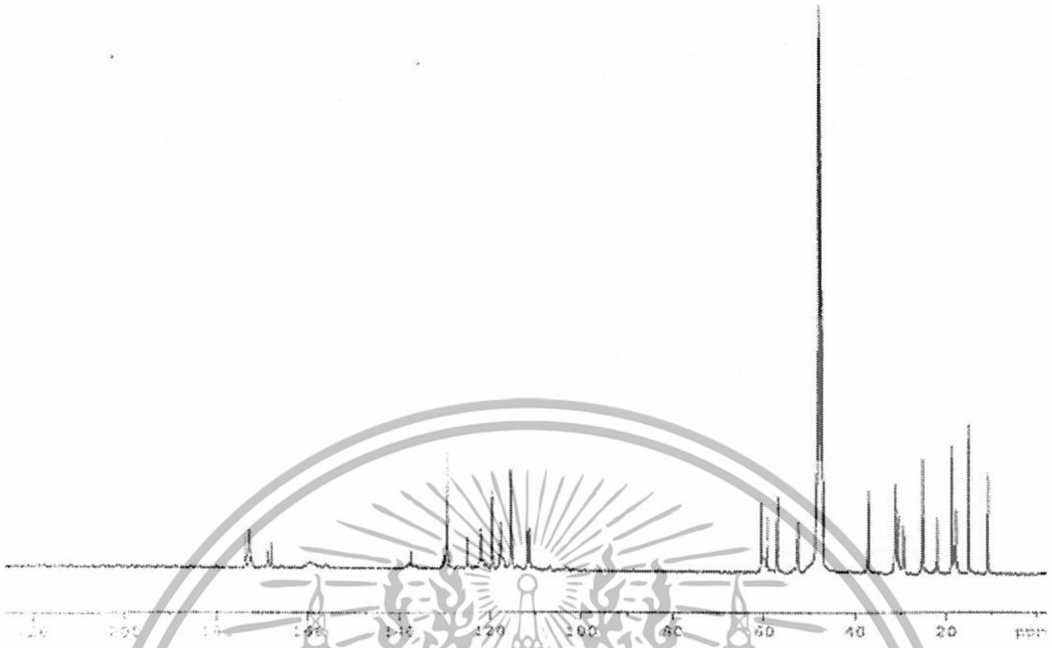
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.17 แสดง ^{1}H-NMR สเปกตรัม ของ **prolylprolylvalylisoleucine 21b** โดยใช้ $CDCl_3$ เป็นตัวทำละลาย

จากผล ^{13}C-NMR (300MHz, $CDCl_3$) พบสัญญาณที่เคมิคัลชิฟ (ppm) เท่ากับ 173.43 (C-1), 172.77 (C-12 และ C-17), 167.28 (C-7), 60.64 (C-2), 59.39 (C-8), 57.07 (C-18), 46.56 (C-13), 37.32 (C-16 และ C-21), 31.11 (C-9), 29.51 (C-3), 28.49 (C-19), 24.94 (C-4), 24.08 (C-14), 18.70 (C-15 และ C-20) 17.73 (C-10 และ C-11), 14.99 (C-6) และ 10.76 (C-5) ดังแสดงในรูปที่ 4.18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



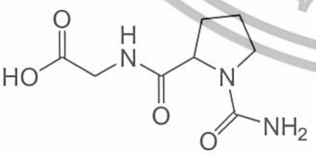
รูปที่ 4.18 แสดง ^{13}C-NMRสเปกตรัมของสาร prolylprolylvalylisoleucine **21b**
โดยใช้ $CDCl_3$ เป็นตัวทำละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

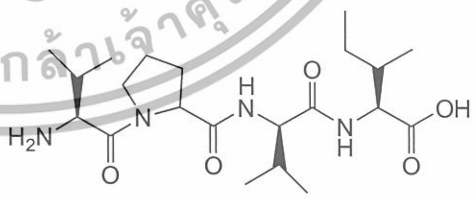
บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

ในการทดลองจะนำกรดอะมิโนที่มีการใส่หมู่ป้องกันคือหมู่ Fmoc ทำปฏิกิริยาเข้าไปทีละตัวจนได้สารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ การสังเคราะห์เริ่มโดยการนำกรดอะมิโนที่มีหมู่ป้องกัน (protecting group)คือ Fmoc(9-fluorenlymethyloxycarbonyl) เช่น เอฟมอกฟีนิลอะลานีน (Fmoc-glycine) มาทำปฏิกิริยากับเชื่อมโยงคือ Wang resin และใช้ DIC เพื่อทำการกระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนให้ไวต่อปฏิกิริยาแทนการกระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลด้วย *p*-nitrophenol ซึ่งพบว่าเมื่อนำกรดอะมิโนที่ถูกกระตุ้นนี้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีจะให้เปอร์เซ็นต์ผลิตผลที่ค่อนข้างต่ำ สารผลิตภัณฑ์ที่ได้การกระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลด้วย DIC ถูกนำมาทำปฏิกิริยาต่อกับกรดอะมิโนที่มีหมู่ป้องกัน และทำการสังเคราะห์ซ้ำต่อไปจนได้ความยาวของเปปไทด์ที่มากขึ้นพอเพียงกับความต้องการ และเมื่อได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการแล้วจะทำการตัดสารผลิตภัณฑ์ออกจากเรซินด้วย 90%TFAในไดคลอโรมีเทน และทำการยืนยันโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตสโกปี (^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR)

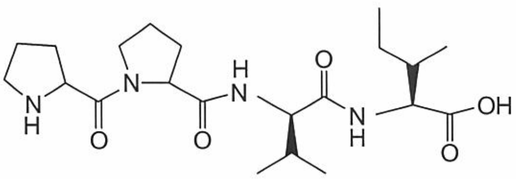
จากการทดลองพบว่าการสังเคราะห์เปปไทด์บนวัฏภาคของแข็งเทคนิควัฏภาคของแข็งสามารถแยกสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ได้ง่ายกว่าการสังเคราะห์โดยเทคนิควัฏภาคสารละลาย และสามารถสังเคราะห์เปปไทด์ได้ 3 ชนิดซึ่งได้แก่ glycylprolylglycine **18a**, valylprolylvalylisoleucine **21a** และ prolylprolylvalylisoleucine **21b** คิดเป็นเปอร์เซ็นต์สารผลิตภัณฑ์ในระดับค่อนข้างดี



Glycylprolylglycine 18a



Valylprolyvalylisoleucine 21a



Prolylprolylvalylisoleucine 21b

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการสังเคราะห์เพิ่มสายโซ่เปปไทด์ให้มีความยาวมากขึ้น
2. นำเปปไทด์ที่เตรียมได้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อเป็นการนำไปสู่แนวทางในการหาความสัมพันธ์ของโครงสร้างกับฤทธิ์ทางชีวภาพ
3. ควรทำการตรวจสอบปฏิกิริยาระหว่างขั้นตอนการสังเคราะห์ทุกขั้นตอน
4. ต้องทำการล้างรีเอเจนต์ระหว่างการทำปฏิกิริยาออกให้หมด

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

[1] R.F.Doolittle, Redundancies in Protein Sequences, In Predictions of Protien Structure and the Principle of Protien Conformation (Fasman, G.D.ed) Plenum Press, New York, (1989)599-623.

[2] L.David, M.Nelson and Michale, Lehnihger Principles of Biochemistry, Worth Publishers, 3 rd edition, (2000), ISBN 1572591536.

[3] Y. S. Yun, M. K. Takeya and H. Itokawa, **J. Nat. Prod.** Vol. 60, 216-218, 1997.

[4] G. E. Atkinson, P. M. Fischer and W. C. Chan, **J. Org. Chem.**, Vol. 65, 5048-5065, 2002.

[5] S. R. Wilson and A. W. Czarnik, **Combinatorial Chemistry**, New York, John Wiley & Sons, 1997.

[6] W. Su-Sun., **J. Am. Chem. Soc.**, Vol. 85, 1328-1330,1973.

[7] F. Guiller, D Orain and M. Bradley, **Chemical Review**, 100, 2019-2157, 2000.

[8] K. Fujuii, K. Sivonen, T. Nakano and K. Harada, **Tetrahedron**, 58, 6863-6871, 2002.

[9] G. Haberhauer and F. Rominger, **Tetrahedron Lett**., 43, 6335-6338, 2002.

[10] N. Vongvanich, P. Kittakoop, M Iasaka, S. Trakulnaleamsai, S. Viuttipong, M. Tanticharoen and Y. Thebtaranonth, **J. Nat. Prod**., 65, 1346-1348, 2002.

[11] J. N. Tabudravu, L. A. Morris, J. Jantina Kettenes-van den Bosch and M. Jaspars, **Tetrahedron**, 58, 7863-7868, 2002.

[12] S. R. Giacomelli, G. Maldaner, W. A. Gonzaga, C. M. Garcia, U. F. Da Silva, I. Dalcol and A. F. Morel, **Phytochemistry**, 65, 933-937, 2004.

[13] Cear A. N. Catalan, C. S. De Heluani, C. Kotowicz, T. E. Gedris and W. Herz, **Phytochemistry**, 64, 625-629, 2003.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้