

สำนักงานสมคกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



การศึกษาและพัฒนาสารเคมีตัวใหม่ที่ใช้ในการตรวจสอบกรดอะมิโน



๑/พ.  
๑๖๖๑๓  
๒๕๓๕

นาย พิสิทธิ์ ศาวีร์ชนัน

นางสาว สุสาดา ผลิกศล

เลขหมู่.....  
เลขทะเบียน.....  
วัน,เดือน,ปี.....

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา ๒๕๓๕

๖/๒๕๓๑๒๓๕

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Study and Development of New Reagents for  
Detection of Amino Acids**



**Mr. Pichai Yaviratana  
Miss. Suchada Pholkosol**

**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 Institute of Technology Ladkrabang**

**1993**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ การศึกษาและพัฒนาสารเคมีตัวใหม่ที่ใช้ในการตรวจสอบ  
กรดละมีน

โดย นาย พิเชฐ ศาวีรัตน์  
นางสาว สุธาดา ผลกิจศล

ภาควิชา เคมี

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กัรวัดณ์ มงคลกัศวรัตน์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
อนุมัติให้พิมพ์โครงการพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ชื่อวัน ลาดกระบัง

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กัรวัดณ์ มงคลกัศวรัตน์)

หัวหน้าภาควิชาเคมี

คณะกรรมการโครงการพิเศษ

ชื่อวัน ลาดกระบัง

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนิตย์ สุทธำราญ)

ประธานกรรมการ

ชื่อวัน ลาดกระบัง

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กัรวัดณ์ มงคลกัศวรัตน์)

กรรมการ

ชื่อวัน ลาดกระบัง

(อาจารย์ สุจินต์ ตันตพิสิฐกุล)

กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ส่งสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาไทย	ก
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทฤษฎี	3
บทที่ 3 การทดลอง	16
บทที่ 4 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	24
ภาคผนวก	29
บรรณานุกรม	37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การศึกษาและพัฒนาสารเคมีตัวใหม่ที่ใช้ในการตรวจสอบ กรดอะมิโน
นักศึกษา	นางพัทธกานต์ กาววิรัช นางสาวสัชชาดา ผลโกศล
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กิรวัฒน์ มงคลภักดิ์
ภาควิชา	เคมี
ปีการศึกษา	2535

บทคัดย่อ

กรดอะมิโนเป็นหน่วยพื้นฐานของโปรตีน ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าในการหาสารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบกรดอะมิโน จึงเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่ง โดยเฉพาะการนำไปใช้ประยุกต์ทางด้านนิติเวชศาสตร์ สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบกรดอะมิโนนั้นมีมากมายหลายชนิด แต่ที่นิยมใช้กันมาก คือ นิโรไซด์รีน ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนแล้วให้สารสีม่วง (Ruhemann's purple) แต่การใช้นิโรไซด์รีนก็มีปัญหาอยู่บางประการ เช่น ความไวต่ออากาศกรดอะมิโน ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาสารที่ใช้ตรวจสอบกรดอะมิโนกันมาเรื่อย ๆ จนกระทั่งในปัจจุบัน ได้มีการค้นพบสารเคมีที่มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบกรดอะมิโน คือ ดีเอฟโอ (DFO)

โครงการพิเศษนี้จึงเป็นการศึกษาหาสารคีโตนที่เหมาะสม ที่เป็นอนุพันธ์ของดีเอฟโอในการตรวจหากรดอะมิโน ซึ่งเตรียมได้จากปฏิกิริยาระหว่างลิควิดิกแลคทีด เพนตะไฮเดรต และ 2,3-ไดอะมิโนไพริดีน ปฏิกิริยาระหว่างคีโตนดังกล่าวกับกรดอะมิโนเกิดขึ้นโดยเกิดผ่านสารมัธยันตร์ที่เป็น 1,3-ไดอะล ซึ่งสามารถพิสูจน์ได้โดยการเกิดปฏิกิริยา 1,3-ไซโคลแอคดิชัน ผลิตภัณฑ์ที่ได้นี้จะเป็นไซโคลแอคติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title Study and Development of New Reagents  
for Detection of Amino Acids  
Name Mr. Pichai Yaviratana  
Miss. suchada Poonkosol  
Special Project Advisor Dr. Theeravat Mongkolaussavaratana  
Department Chemistry  
Academic Year 1992

#### Abstract

The study on the quantitative detection of  $\alpha$ -amino acids is important in forensic science. The most successful and widely used chemical for the detection of  $\alpha$ -amino acids is ninhydrin. Recently, 1,8-diaza-9-fluorenone (DFO) has been shown to give better visualisation than ninhydrin.

This special project involves a study of the preparation of DFO analogue which is synthesis from leuconic acid pentahydrate and 2,3-diamino pyridene.

The reaction of DFO analogue with  $\alpha$ -amino acid give 1,3-dipole yield which can be trapped by N-methyl-maleimide yield cycloadduct.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำโครงการพิเศษฉบับนี้ ผู้เสนอขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชีรวัดน์ มงคลศรีวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ตลอดจนคำแนะนำในระหว่างการดำเนินงานวิจัยนี้มาโดยตลอด

ขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนิตย์ สุขสำราญ และ อาจารย์ สุนันต์ ตันติพิสิฐกุล ซึ่งเป็นคณะกรรมการตรวจสอบโครงการ ที่ได้กรุณาตรวจทานและแก้ไขให้โครงการพิเศษนี้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ทำขึ้นขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ และเพื่อน ๆ ภาคเคมีทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือจนโครงการพิเศษสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

นายพิทักษ์ ศาวีรัตน์

นางสาวสุชาดา ผลโกศล

มีนาคม 2536

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

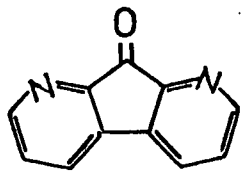
## บทที่ 1

### บทนำ

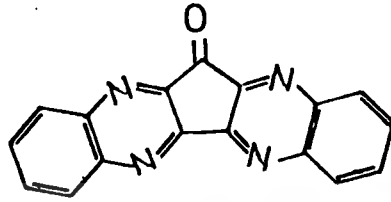
เป็นที่ทราบกันดีแล้วว่า กรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบของโปรตีน จึงได้มีการศึกษาค้นคว้าในการหาสารที่ทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโน แล้วเกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้น เช่น การเกิดสี , การราวแสง เป็นต้น ในปี 1910 Ruhemann ได้ค้นพบสารที่ว่องไวในการทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโน คือ นิไฮไดริน (ninhydrin) ซึ่งในปัจจุบันก็ทั้งเป็นสารที่ใช้กันมาก และมีประสิทธิภาพตัวหนึ่งในการหากรดอะมิโน ต่อมาในปี ค.ศ. 1956 Oden ได้นำนิไฮไดรินมาประยุกต์ในการตรวจสอบลายนิ้วมือที่แฝงบนกระดาษ แต่ในการใช้นิไฮไดรินตรวจสอบลายนิ้วมือที่แฝงบนกระดาษนั้น จะมีปัญหาสีครากจะแตกต่างกันของรอยนิ้วมือไม่ค่อยชัดเจนนัก และความว่องไวของนิไฮไดรินที่มีต่อรอยนิ้วมือนั้นยังไม่ค่อยดี ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาสารที่ใช้กันมาเรื่อยๆ จนกระทั่งได้ค้นพบสารตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพต่อการตรวจสอบกรดอะมิโนดีกว่านิไฮไดริน คือ ดีเอฟโอ (DFO) หรือ 1,8-Diaza-fluren-9-one (I)

นอกจากนั้นยังได้มีการศึกษาค้นคว้าหาสารที่ว่องไวกว่าดีเอฟโอ คือ คีโตน (II) ซึ่งมีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกับดีเอฟโอ แต่ผลที่ได้คือ ผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่สามารถเกิดการราวแสง เมื่อทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโน นอกจากนี้คีโตน (II) ยังไม่สามารถละลายในแอลกอฮอล์ได้ดีเท่ากับดีเอฟโอ ดังนั้นจึงได้มีการจัดทำโครงการงานพิเศษขึ้นเพื่อศึกษาหาสารที่เหมาะสมในการตรวจหากกรดอะมิโนในรอยนิ้วมือ โดยใช้คีโตน (III) ที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกับดีเอฟโอและคีโตน (II) ซึ่งมีคุณสมบัติและมีไนโตรเจนอะตอมมากกว่า จึงคิดว่าน่าจะให้ผลที่ดีกว่าคีโตน (II)

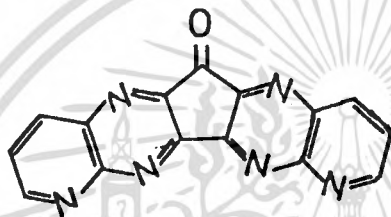
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(I)



(II)



(III)

วัตถุประสงค์ในการทำโครงการพิเศษ

เพื่อศึกษาและพัฒนาสารเคมีที่ทำการตรวจสอบกรดอะมิโนแล้วจะนำไปประยุกต์ในการตรวจสอบลายนิ้วมือในการพิสูจน์หลักฐาน

ขั้นตอนดำเนินการโดยย่อ

1. ศึกษาทฤษฎีและหาบทความที่เกี่ยวข้อง
2. สืบค้นและเตรียมสารเคมีตัวใหม่
3. ทดสอบกับกรดอะมิโน และหาข้อมูลสนับสนุนความถี่ไปได้
4. สิ่งทดสอบลายนิ้วมือที่แฝงบนกระดาษ
5. สรุปทำรายงานการวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**วิธีที่ใช้ในการตรวจสอบกรดอะมิโน**

UV absorption spec เป็นวิธีที่สะดวกที่สุดในการหาหมู่ฟังก์ชันในกรดอะมิโน ซึ่งดูดกลืนแสงในช่วง 210-300 นาโนเมตร ส่วนกรดอะมิโนจำพวกโปรตีน, อะโรมาติก, เฮเทอโรไซคลิก หรือกรดอะมิโนอื่น ๆ ที่ไม่ใช่โปรตีนนั้น ก็ไม่มีผลกระทบต่อการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ โดยวิธีที่นิยมใช้กันมี 2 วิธี คือ

- การตรวจสอบโดยการเกิดสี (Colorimetric Detection)
- การตรวจสอบโดยการวาวแสง (Fluorimetric Detection)

**การตรวจสอบโดยการเกิดสี**

วิธีการเกิดสีได้นำมาใช้ในการตรวจหากรดอะมิโนกันอย่างกว้างขวาง ซึ่งได้ใช้นินไฮดริน หรือ triketohydrindone hydrate เป็นสารที่ทำให้เกิดสี ซึ่งนินไฮดรินจะทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโน เกิดเป็น คาร์บอนไดออกไซด์ ( $CO_2$ ), แอมโมเนีย ( $NH_3$ ) และ อัลดีไฮด์ (aldehyde) ขึ้น จนในที่สุดได้สารที่ทำให้เกิดสี (Chromophore) คือ Ruhemann's purple มีสีม่วงอมฟ้า สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ 570 นาโนเมตร ปฏิกิริยาระหว่างนินไฮดรินกับกรดอะมิโนให้สีไม่แน่นอน ขึ้นอยู่กับชนิดของกรดอะมิโนด้วย นอกจากนี้ นินไฮดรินยังสามารถทำปฏิกิริยากับกรดอิมิโน (Imino acid) ได้ด้วย แต่จะให้สีเหลืองแทน สามารถดูดกลืนแสงที่ประมาณ 440 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## การตรวจสอบโดยการวาวแสง

การตรวจหากรดอะมิโนโดยวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง คือ การใช้ร่วมกับเทคนิคโครมาโทกราฟีประเภทที่บาง (Thin Layer Chromatography) และการแลกเปลี่ยนไอออน (Ion Exchange) ซึ่งเหมือนกับ การตรวจสอบแบบเกิดสี แต่เทคนิคการเกิดสีมีข้อเสียคือ ความไวค่อนข้างต่ำจำกัด คือ สามารถตรวจสอบกรดอะมิโนได้ 5-10 นาโนกรัม ยกเว้นกรณีวิเคราะห์โดยวิธีที่ไม่เฉพาะเจาะจง เช่น แกสโครมาโทกราฟี การวัดกรดอะมิโนที่เกี่ยวกับปฏิกิริยาของหมู่แอลฟาอะมิโนกับสารเคมีที่ใช้ เพื่อให้ได้สารตามต้องการ และคุณสมบัติที่สำคัญ คือ ไวต่อแสง การตรวจจึงทำได้

การวาวแสง (Fluorescence) คือ การปลดปล่อยแสงครั้งที่ 2 โดยปกติแล้วจะให้เวลาประมาณ  $10^{-9}$  วินาที หรืออาจมากถึง  $10^{-4}$  วินาที การวาวแสงนี้เกิดจากการที่สารนั้นถูกกระตุ้นโดยการดูดกลืนแสง ๗. ความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการดูดกลืนแสงของฟลูออโรโครมในย่านที่ตามองเห็น (visible) และแสงอุลตราไวโอเล็ต (ultraviolet) ได้ทำให้ไอเลคตรอนถูกกระตุ้นจากสภาวะพื้นไปถึงสภาวะเร้า และปล่อยพลังงานออกมาในรูปของพลังงานรังสี

## สารเคมีที่นิยมใช้ในการตรวจหากรดอะมิโน

### 1. นินไฮดริน (Ninhydrin)

เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า triketohydrindene hydrate หรือ 2,2-dihydroxy-1,3-indandione หรือ 1,2,3-indantrione monohydrate ได้นำมาใช้กันอย่างกว้างขวางในการพัฒนาเทคนิคทางด้าน การตรวจสอบผลึกน้ำมึก

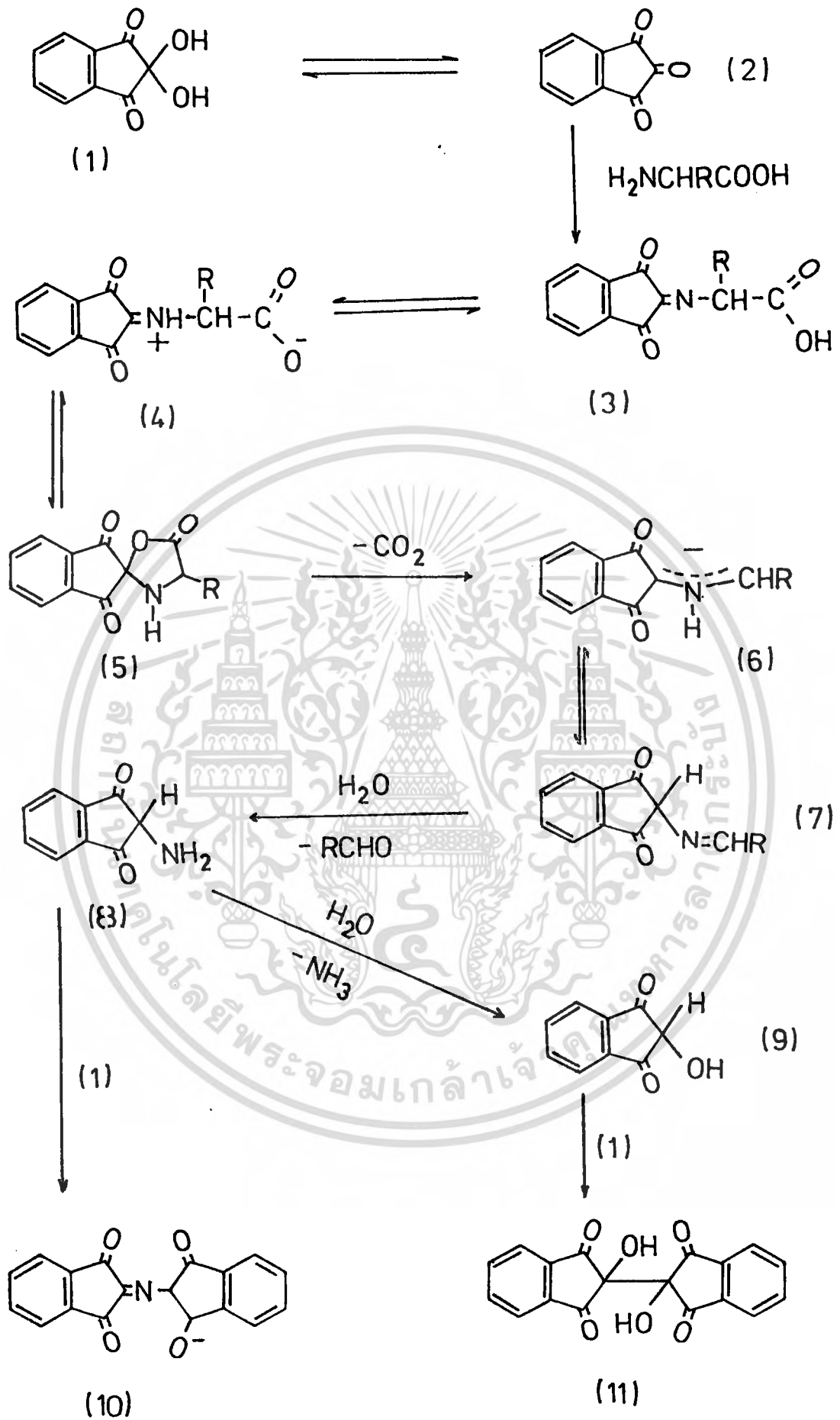
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กลไกการเกิดปฏิกิริยาของนินไฮดริน

นินไฮดริน (1) ซึ่งอยู่ในสภาวะสมดุลกับ 1,2,3-indantrione (2) โดยทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนเกิดเป็น ชิฟ เบส (Schiff base, 3) แล้วเกิดปฏิกิริยาการสูญเสียแกสคาร์บอนไดออกไซด์ (decarboxylation) โดยเกิดผ่านสวิตเทอร์ไอออน (zwitterion, 4) และสารมีกัตันต์ ออกซาโซลิดีน-5-โอน (oxazolidine-5-one, 5) ในการเกิดปฏิกิริยาการสูญเสียแกสคาร์บอนไดออกไซด์ของออกซาโซลิดีน-5-โอนนั้นเป็น 1,3-ไดโพลาร์ไซโคลรีเวอร์ชัน สเตอริโอสเปซิฟิก (stereospecific 1,3-dipolar cycloreversion) ให้เอ็น-โปรโตเนต 1,3-ไดโพล (N-protonated 1,3-dipole, 6) ซึ่งรับไฮโดรเจนไอออนจากน้ำ ให้ลิมมีน (7) ไฮโดรไลซิสของลิมมีน (7) ให้คัลลิสไซด์ และ 2-amino-1,3-indandione (8) จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยาคอนเดนเซชัน (condensation) กับ นินไฮดรินอีก 1 โมเลกุล เกิดเป็น Ruhemann's purple (10) และยังสามารถเกิดการไฮโดรไลซิสได้ ทำให้เกิดการสูญเสียแอมโมเนียได้เป็น 2-hydroxy-1,3-indandione (9) และเมื่อทำปฏิกิริยากับนินไฮดรินจะเกิดเป็น 2,2'-dihydroxy-[2,2'-biindan]-1,1',3,3'-tetraone (hydrindantin, 11)

ในปี 1966 ได้มีการศึกษาพบว่า จลนศาสตร์ของปฏิกิริยานินไฮดรินและกรดอะมิโนเป็นปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง ดังนั้นปฏิกิริยารวมจึงเป็นปฏิกิริยาอันดับสอง และขึ้นกำหนดอัตราเกิดขึ้นเมื่อนิวคลีโอไฟล์เข้าไปแทนที่หมู่ไฮดรอกซี (hydroxy) ของนินไฮดริน และเมื่อเพิ่ม pH ความเข้มข้นของประจุลบของกรดอะมิโนจะเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นการเพิ่มอัตราการเกิดปฏิกิริยา แสดงว่า Ruhemann's purple มีความเสถียรที่ pH สูง ๆ ซึ่งพบว่า เกิดขึ้นที่ pH สูงสุดระหว่าง 4.5-5.2 และถ้าหมู่เอมีนถูกโปรโตเนต ความเป็นนิวคลีโอไฟล์จะลดลง แต่ถ้าหมู่คาร์บอนิลถูกโปรโตเนต ความเป็นนิวคลีโอไฟล์จะมากขึ้น ดังนั้นถ้าต้องการเพิ่มอัตราการเกิดปฏิกิริยา ต้องทำให้หมู่คาร์บอนิลถูกโปรโตเนต แต่หมู่เอมีนไม่ถูกโปรโตเนต และถ้าสารประกอบคาร์บอนิลนี้มีคอนจูเกต (conjugate) ก็จะทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นด้วย

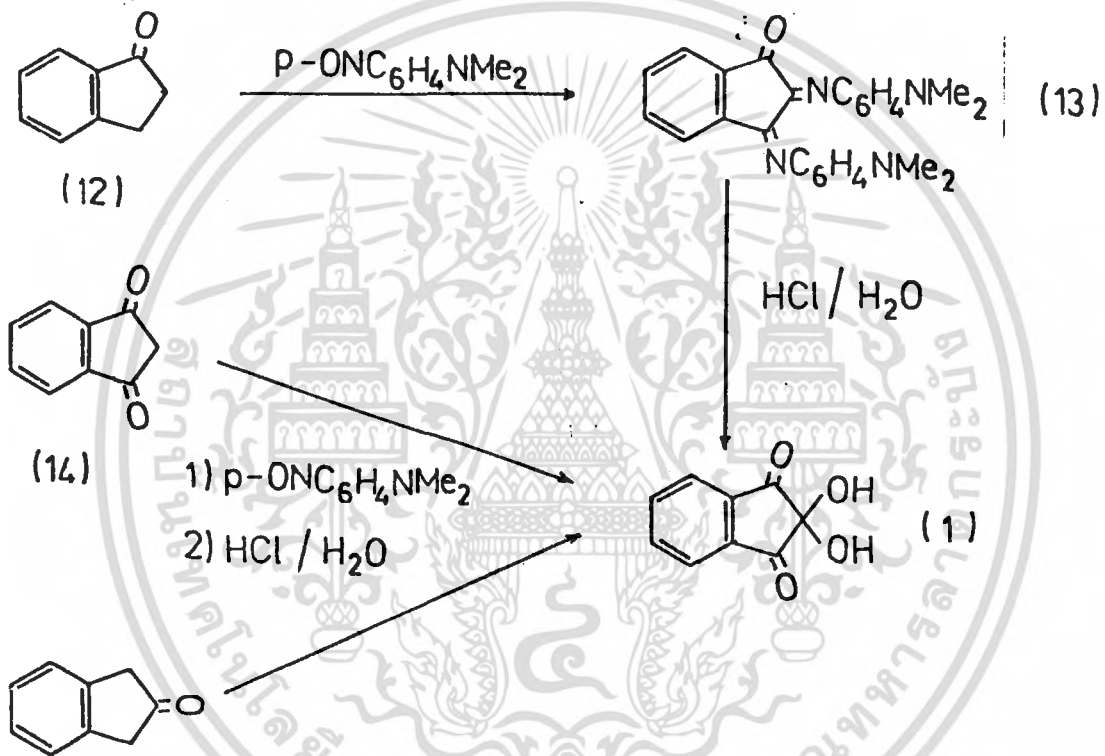
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารรูปแบบแสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาของอินโดลีนที่นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

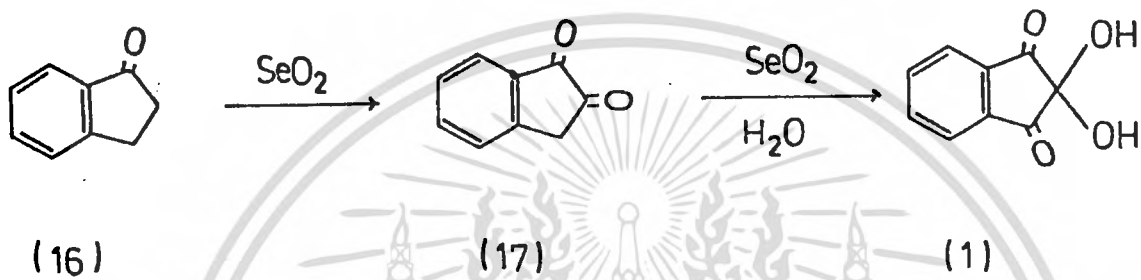
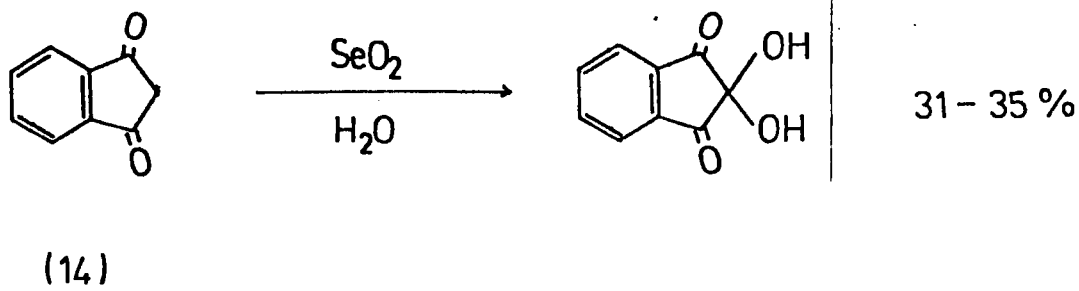
การสังเคราะห์อินโดทริน

ในปี ค.ศ. 1910 Ruhemann<sup>1</sup> ได้เตรียมอินโดทรินขึ้นเป็นครั้งแรก โดยการออกซิไดซ์ 1-indanone (12) ไปเป็น 1,2-indandione โดยวิธีของ Sachs และ Barschall<sup>2</sup> โดยเปลี่ยนหมู่เมทิลีนไปเป็นหมู่คาร์บอนิล จากการศึกษาของ KOH หรือ  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  และ p-N,N-dimethylnitrosoaniline ซนหมู่เมทิลีนของ (12) ผลิตภัณฑ์ที่ได้ (17) จะสลายตัวได้แก่ทางรวดเร็วโดยการไฮโดรไลซิสด้วยกรดได้ hydrate of indantrione (1) พบว่าเมื่อทำปฏิกิริยากับกรดอะซิติกจะได้สารสีม่วง

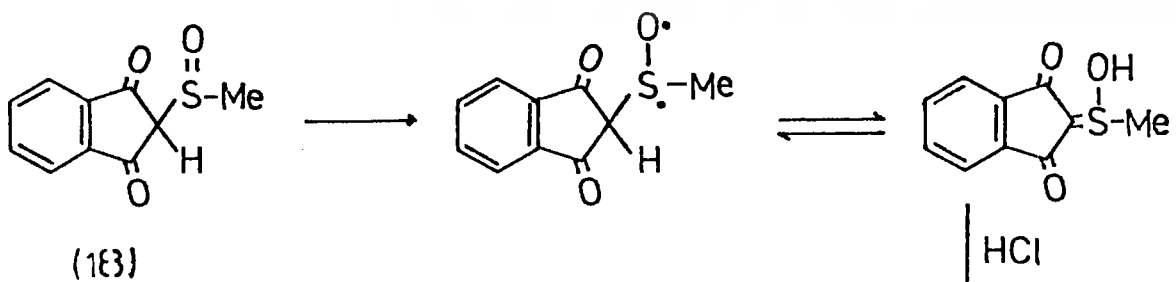
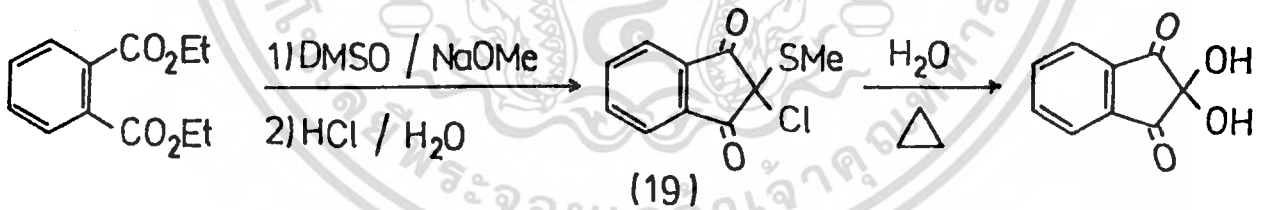


(15) Tectors และ Shriner พบว่า 1,3-indandione สามารถเตรียมได้จาก diethylphthalate และ ethyl acetate และสามารถออกซิไดซ์ไปเป็นอินโดทริน โดยวิธี selenious acid หรือ selenium dioxide ให้ผลิตภัณฑ์ประมาณร้อยละ 31-35  $\text{SeO}_2$  เป็นสารที่ใช้ในการออกซิไดซ์พวกโมโนคีโตนไปเป็นไดคีโตน นอกจากนั้นยังสามารถสังเคราะห์ไดคีโตนได้จากโมโนหรือไดคีโตนก็ได้ แต่เปอร์เซ็นต์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้มีค่าน้อยมาก แต่ Neuzil<sup>2</sup> ได้ออกซิไดซ์ 1-indanone (16) ด้วย  $\text{SeO}_2$  ให้อินโดทรินร้อยละ 79 โดยผ่านสารมัธยันตร์ คือ 1,2-indandione (17)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

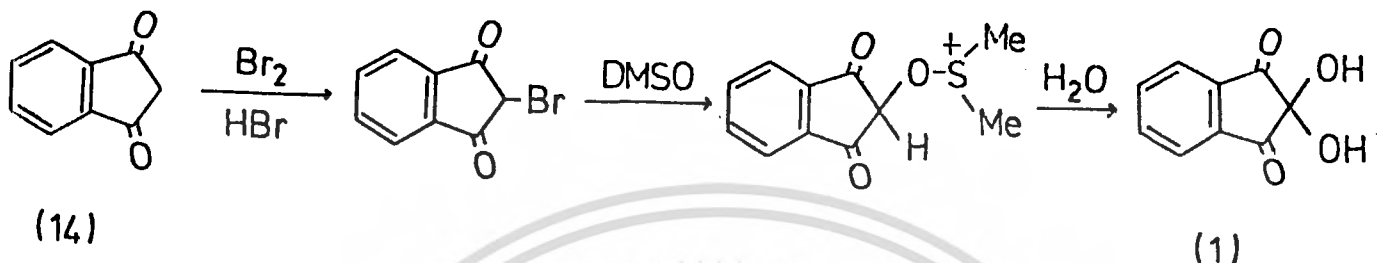


Becker และ Russell พบว่า นิโนสเตรินสามารถสังเคราะห์จากการควบแน่นของไดเอทิลพทาเลต กับ DMSO โดยใช้ NaOMe และ HCl/H<sub>2</sub>O ได้เป็น α-chloro thioether (19) และถูกไฮโดรไลซิสด้วยกรดไฮโดรคลอริก ได้นิโนสเตรินร้อยละ 79

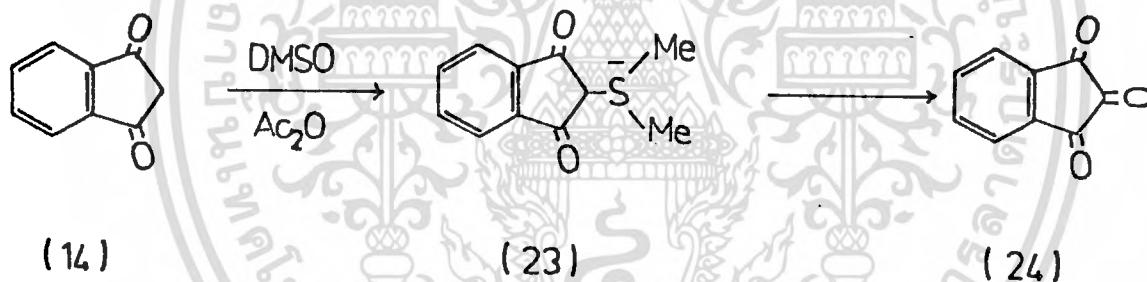


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำไปใช้ประโยชน์ในการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารต้นฉบับที่ใช้

Schipper พบว่า 1,3-indandione (14) สามารถถูกคลอกลที่ใดก็ได้ไป เป็นนินไฮดรินได้ง่ายด้วยโบรมีน หรือไฮดรเจนโบรมได์ใน DMSO ลำดับของปฏิกิริยา เป็นไปดังรูป และได้ผลิตภัณฑ์ร้อยละ 80



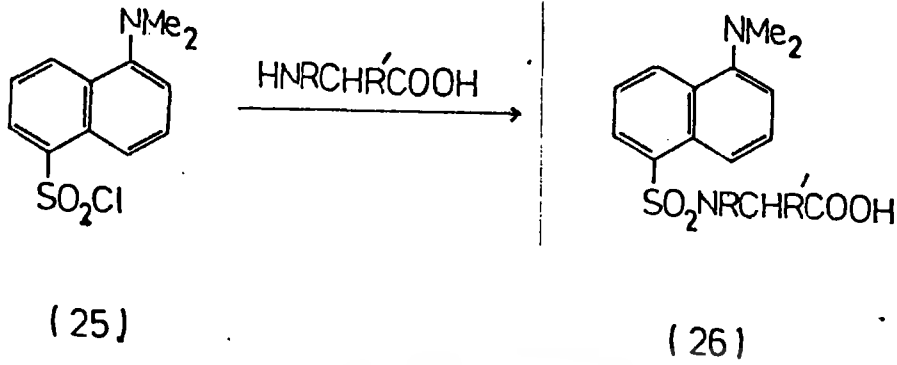
นอกจากนั้น นินไฮดรินยังสามารถสังเคราะห์ได้จาก sulphur ylide (23) ซึ่งเตรียมได้จาก 1,3-indandione (14) เมื่อโคโซโนไลซิส (23) จะได้ นินไฮดรินร้อยละ 51



## 2. แตนซิลคลอไรด์ (Dansyl Chloride)

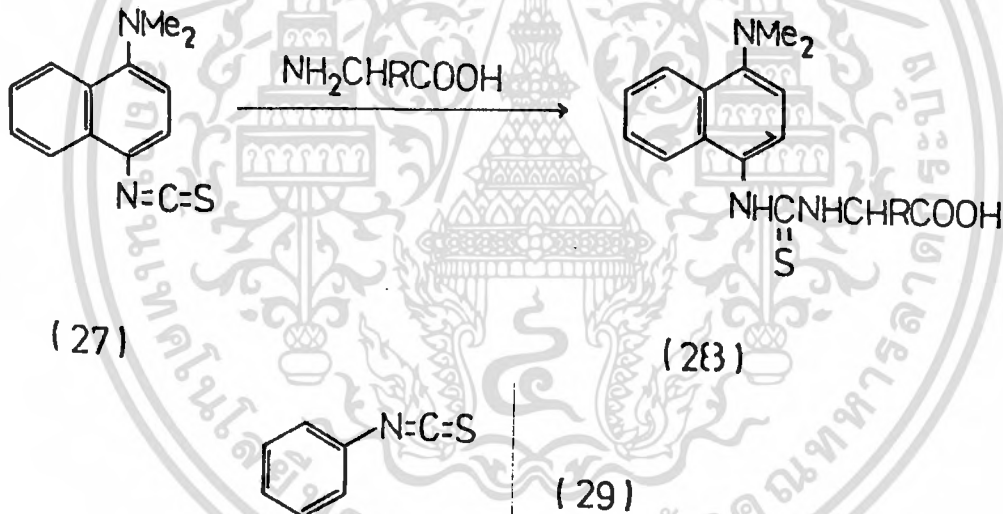
แดนซิลคลอไรด์ หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า [1-(N,N'-dimethylamino)-naphthalene-5-sulphonyl chloride] (25) เป็นสารสีตัวหนึ่งที่สามารถใช้ในการหากรดอะมิโนปริมาณน้อย ๆ ได้ ( $10^{-8}$  -  $10^{-10}$  โมล) แตนซิลคลอไรด์ทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนได้เป็นอนุพันธ์ของแดนซิลอะมิโนแอซิด (26) มีคุณสมบัติคือ สามารถวาวแสงได้ในย่านที่ตามองเห็น และมีความไวต่อกรดอะมิโนค่อนข้างสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



### 3. DNTC

ดีเอ็นทีซี หรือ [4-(N,N'-dimethylamino)-1-naphthylisothiocyanate] (27) สามารถให้อนุพันธ์ของกรดอะมิโนกับดีเอ็นทีซี (28) ซึ่งสามารถวาวแสงได้ที่ 450 นาโนเมตร วิธีนี้มีความไวมากกว่าฟีนิลไอโซไทโอไซยาเนต (phenylisothiocyanate) (29) ถึง 100 เท่า



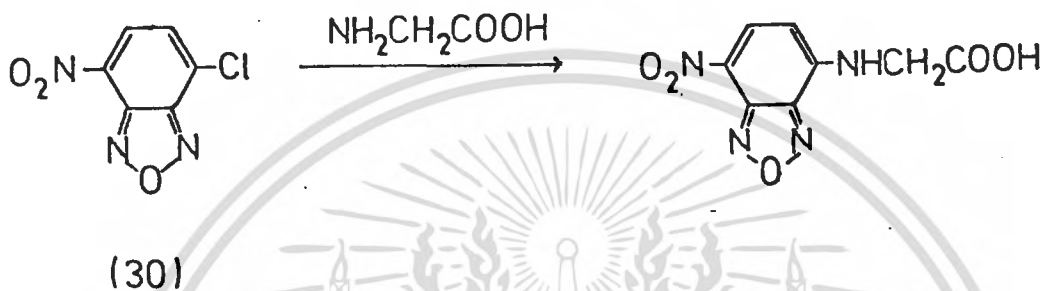
### 4. 2-p-chlorosulphophenyl-3-phenylindenone

กรดอะมิโนจะทำปฏิกิริยากับ 2-p-chlorosulphophenyl-3-phenylindenone เกิดเป็นอนุพันธ์ของไดซัล (disyl derivatives) ถ้านำอนุพันธ์ของไดซัลมาทำปฏิกิริยากับไซเคียมเอทกไฮด์ บนโครมาโตกราฟีแบบทีลิกาเจล ได้จุดของสารวาวแสงที่มีสีเขียวแกมเหลือง (ใช้แสงอุลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร) สามารถวัดระดับของกรดอะมิโนเป็นพีโคโมลได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 5. เอ็นบีดี คลอไรด์ (NBD-chloride)

หรือ (7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole หรือ 7-chloro-4-nitrobenzofurazan) (30) เป็นสารประกอบที่เสถียรและไม่สามารถวาวแสงได้ แต่เมื่อทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนให้ผลิตภัณฑ์ที่มีความสามารถในการวาวแสงได้



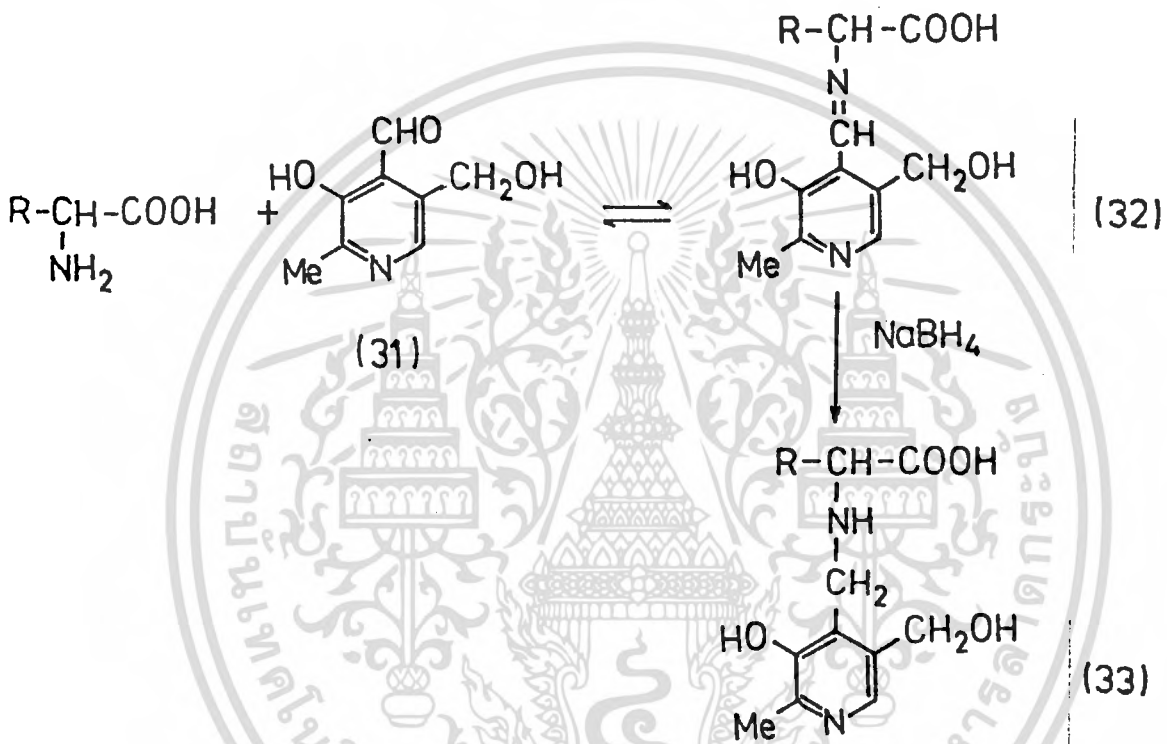
อนุพันธ์ของเอ็นบีดีที่วาวแสงมีลักษณะพิเศษ คือ ละลายได้มากในสารละลายที่มีขั้วต่ำ และมีค่าสูงสุดของความยาวคลื่นประมาณ 464 นาโนเมตร เพราะวาวแสงที่สั้นกว่าของกรดอะมิโนไม่สามารถดูดกลืนแสงในย่านที่ตามองเห็น ขณะที่อนุพันธ์ของแดนซิลคลอไรด์สามารถดูดกลืนแสงในช่วงของอุลตราไวโอเล็ต ( 245 หรือ 365 นาโนเมตร ) เพื่อให้เกิดการเรืองแสงขึ้น อนุพันธ์ของเอ็นบีดีสามารถละลายในสารละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบได้ดีกว่าแดนซิล นอกจากนี้เอ็นบีดีคลอไรด์ ยังเสถียรใน ความชื้นมากกว่าแดนซิลคลอไรด์ วิธีที่ใช้เอ็นบีดีคลอไรด์นี้มีความไวในการตรวจหากรดอะมิโนได้สูงมาก และยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับ HPLC ได้อีกด้วย

เอ็นบีดีคลอไรด์ (30) เคยประสบความสำเร็จในการใช้ตรวจหาผลึกน้ำมือแฝง โดยการใช้เลเซอร์กระตุ้นให้เกิดการวาวแสงได้ เอ็นบีดีคลอไรด์ เป็นสารที่มีความไวมากสำหรับการตรวจหาผลึกน้ำมือแฝง และเห็นสารอีกตัวหนึ่งที่ทำให้ผลึกน้ำมือแฝงได้

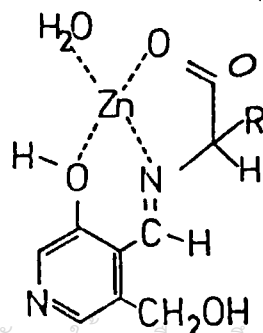
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**6. อนุพันธ์ของไพริดอกซอล (pyridoxal derivatives)**

กรดอะมิโนสามารถทำปฏิกิริยากับไพริดอกซอล (31) ภายใต้สภาวะที่  
เป็นเบส เกิดเป็น Schiff base (schiff's base) ซึ่งถูกรีดิวซ์ด้วยโซเดียมโบโรไฮไดรด์  
(NaBH<sub>4</sub>) ได้เป็นอนุพันธ์ไพริดอกซอลอะมิโนแอลดีด (33) สามารถดูดแสงได้ที่  $\lambda_{max}$   
= 322 nm ,  $\lambda_{max} = 440$  nm



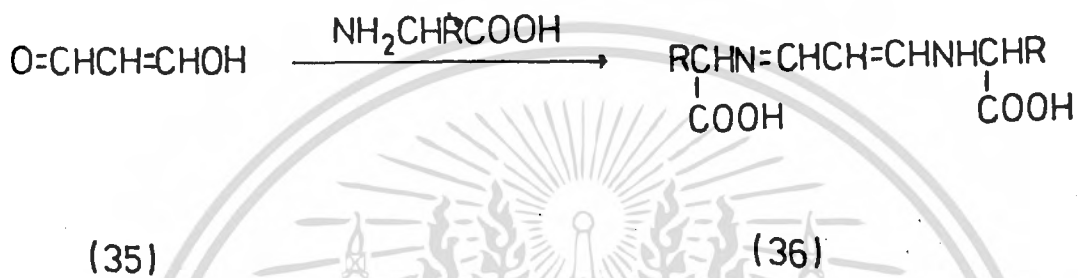
ต่อมาได้มีการพัฒนากระบวนการที่ใช้ไพริดอกซอลฟอสเฟต (pyridoxal phosphate) และซิงค์อะซิเตต ละลายในพีริดีนเมทานอล แล้วนำมาทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโน โดยที่ Zn(II) เกิดเป็นคีเลต (Chelate) กับ Schiff base (32) ให้สารดูดแสงสีฟ้า (34)



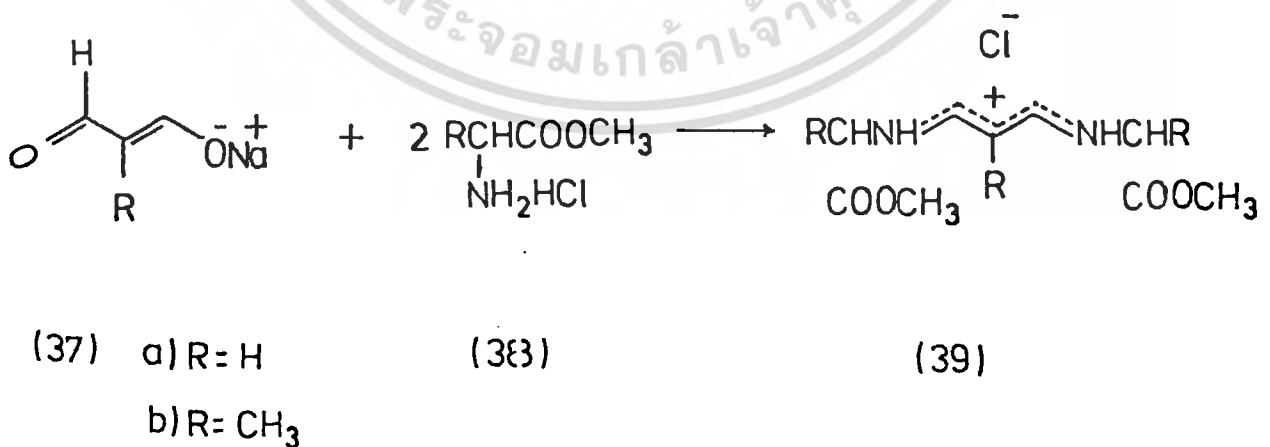
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**7. มาลอนไดอัลดีไฮด์ (malondialdehyde) [MA]**

สามารถทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนเกิดเป็น  $N,N'$ -disubstituted-1-amino-3-iminopropenes (36) เป็นสารที่เรืองแสงได้ กลไกของปฏิกิริยาระหว่างมาลอนไดอัลดีไฮด์กับไกลซีน (glycine) ค้นพบโดย Crawford

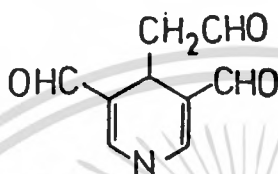


รูปแบบของปฏิกิริยาการเติมของโมเลกุลของโปรตีนโดยเกลือโซเดียมของ MA (37a) ถูกค้นคว้าโดยการศึกษาปฏิกิริยาของอะมิโนเอซิดเอสเทอร์ไฮโดรคลอไรด์ (amino acid ester hydrochloride) (38) กับเกลือของโซเดียมของไดอัลดีไฮด์ในเมทานอลแห้ง เกิดผลิตภัณฑ์ (39)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

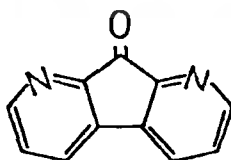
อย่างไรก็ตาม เมื่อไม่นานมานี้ได้พบว่า MA (35) ทำปฏิกิริยากับเมทาลามีน เกิดเป็นไดไฮดรไพริดีน (dihydropyridine, 40) เป็นสารเรืองแสง ถึงแม้ว่านั้น MA ยังสามารถทำปฏิกิริยากับกรดแอลฟาอะมิโนและเอสเทอร์ต่าง ๆ ได้เป็น ไดไฮดรไพริดีน ดังรูป



(40)

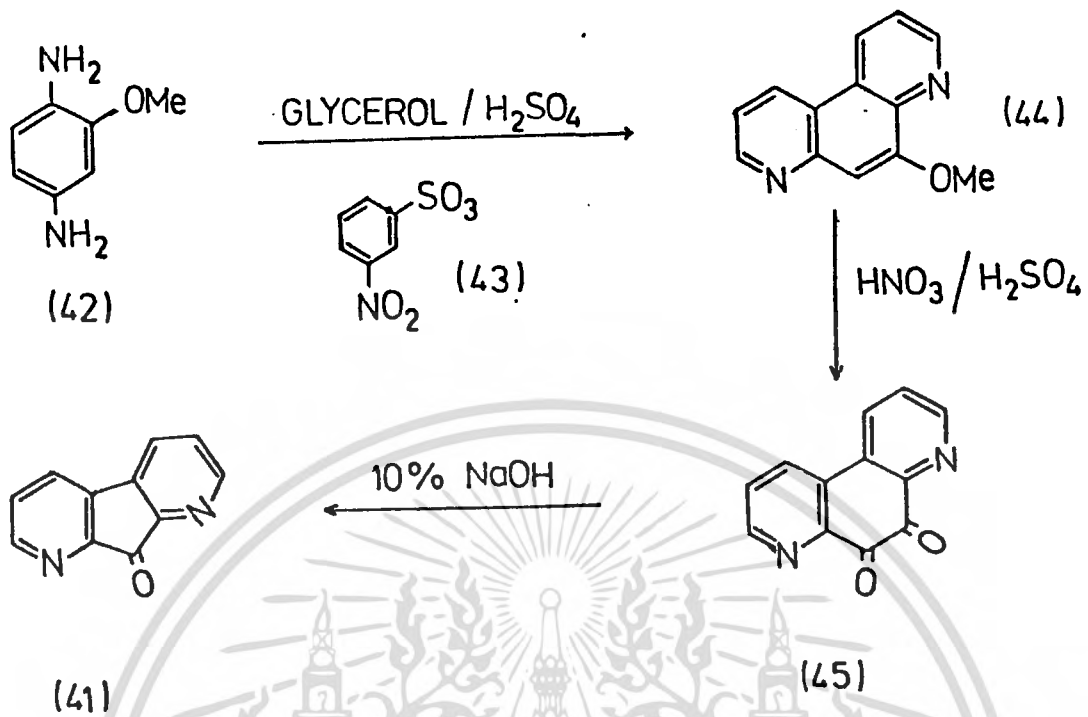
### 8. ดีเอโฟโอ (DFO)

ดีเอโฟโอ หรือ 1,8-Diazafloren-9-one<sup>4</sup> (41) สามารถใช้ในการตรวจหากรดอะมิโนได้อย่างมีประสิทธิภาพที่สุดชนิดหนึ่งในปัจจุบัน ซึ่งสามารถเตรียมได้จาก 2-methoxy-1,4-phenylenediamine (42) ทำปฏิกิริยากับกลีเซอรอลในสารละลาย 60 % กรดซัลฟูริกและใช้ m-nitrobenzenesulphonic acid (43) เป็นตัวออกซิไดซ์ เกิดเป็น 5-methoxy-4,7-phenanthroline (44) จะถูกออกซิไดซ์ด้วยกรดไนตริก และกรดซัลฟูริกได้เป็น 4,7-phenanthroline-5,6-dione (45) เกิดการจัดเรียงตัวใหม่ในสภาวะเบสได้เป็นดีเอโฟโอ

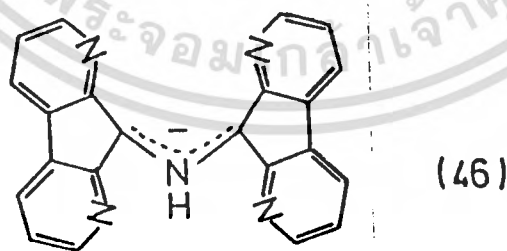


(41)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ดีเอฟไอสามารถละลายในเอทานอลให้สารละลายสีเหลือง เมื่อทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนหรือเอสเทอร์ของกรดอะมิโนได้สารละลายสีแดง [  $\lambda_{max} = 578, 475 \text{ nm}$ ] สามารถวาวแสงได้ [  $\lambda_{max} = 488$  และ  $\lambda_{max} = 560 \text{ nm}$ ] และมีความเสถียรที่อุณหภูมิห้อง จากการศึกษพบว่าสารที่สามารถวาวแสงได้คือ 1,3-ไดไซพล (46) ซึ่งมีโครงสร้างดังนี้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**บทที่ 3**  
**การทดลอง**

**สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง**

สารเคมี	เกรด	บริษัท
ไนโอธินโอทิกอล	-	-
แมงกานีสคาร์บอเนต	วิเคราะห์	J. T. baker
1,2-ไดอะมิโนไพรีดีน	วิเคราะห์	Fluka
อะลานีน	วิเคราะห์	Fluka
เอ็น-เมทิลมาลีไมด์	วิเคราะห์	Aldrich
ผงถ่าน	วิเคราะห์	Merck
กรดไนตริก		
กรดไฮโดรคลอริก		
กรดซัลฟูริก		
กรดแอสติก		
สารละลายโพแทสเซียมแมกนีเซียม	เข้มข้น 0.5 โมล/ลิตร	
สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์	เข้มข้น 1.0 โมล/ลิตร	
สารละลายแบเรียมคลอไรด์	เข้มข้น 0.2 โมล/ลิตร	
เอทานอล	เกรดวิเคราะห์	
เมทานอล	เกรดวิเคราะห์	
บิวทานอล	เกรดวิเคราะห์	
เมทิลีนคลอไรด์		
เอ็น, เอ็น-ไดเมทิลฟอร์มาไมด์		
ซิลิกาเจล 60 จีเอฟ <sub>254</sub>		Merck
ซิลิกาเจลชนิดที่ใช้กับคอลัมน์โครมาโตกราฟี คือ 60 จี		Merck

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

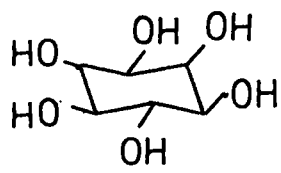
เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. Melting Point : Buchi 510 Melting Apparatus
2. Infrared Spectra : Jasco IR-810 Infrared Spectrophotometer
3.  $^1\text{H}$  Nuclear Magnetic Resonance Spectra : Varian 60 MHz NMR Spectrometer

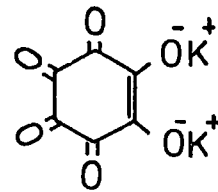
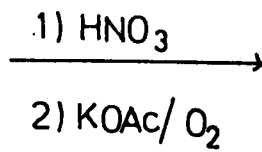


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมสารประกอบไดโพแทสเซียมไรโดไซด์ (Dipotassium Rhodizate)



(49)



(50)

เติมกรดไนตริกเข้มข้นจำนวน 125 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีไมโอ-กินโธทอลอยู่ 50 กรัม (0.278 โมล) รีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายที่ได้ไปเจือจางด้วยน้ำกลั่น 312.5 มิลลิลิตร ผ่านอากาศลงในสารละลาย โดยใช้เครื่องเป่าอากาศพร้อมกับกวนไปด้วย เติมสารละลายโพแทสเซียมอะซิเตดเข้มข้นร้อยละ 50 จำนวน 87.5 มิลลิลิตร อย่างช้า ๆ จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองส้ม แล้วเติมอีก 125 มิลลิลิตรอย่างรวดเร็ว ผ่านอากาศลงในสารละลาย และกวนต่ออีก 90 ชั่วโมง กรองสารละลายผ่านเครื่องกรองสุญญากาศ จะได้ทองเหลืองส้มค่า ล้างตะกอนด้วยสารละลายโพแทสเซียมอะซิเตดเข้มข้นร้อยละ 50 จำนวน 62.5 มิลลิลิตร และเอทานอลจำนวน 37.5 มิลลิลิตร จะได้ผลิตภัณฑ์ 31.75 กรัม (ผลิตภัณฑ์ร้อยละ 46)

IR ( $\lambda_{\text{max}}$ , KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) : 1450 - 1550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

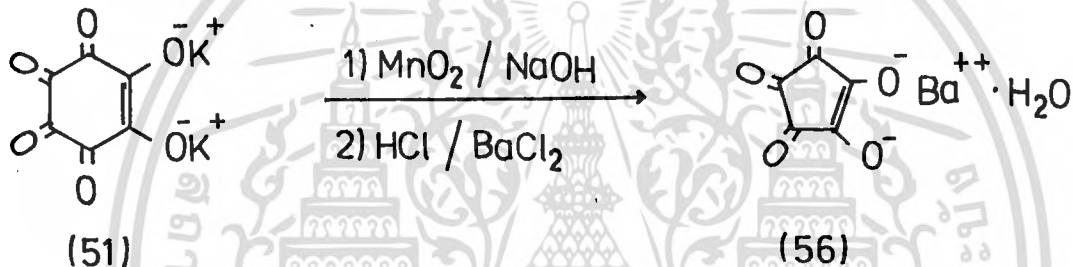
การเตรียมสารประกอบโครโคนิคแอซิดไตรไฮเดรต (Croconic acid trihydrate)

แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. การเตรียมแมงกานีสไดออกไซด์ที่ว่องไว (active manganese dioxide)

เผาแมงกานีสคาร์บอเนต (manganese(II) carbonate) ปริมาณ 63 กรัม ที่อุณหภูมิ 300 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทั้งให้เย็น แล้วเติมกรดไนตริก (2 โมลลาร์) 225 มิลลิลิตร และกวนเป็นเวลา 30 นาที เพื่อไล่คาร์บอเนตที่เหลือออกไป จากนั้นนำมากรอง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น อบตะกอนที่ได้ที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

2. การเตรียมแบเรียมโครโคเนตโมโนไฮเดรต (Barium Croconate Monohydrate)

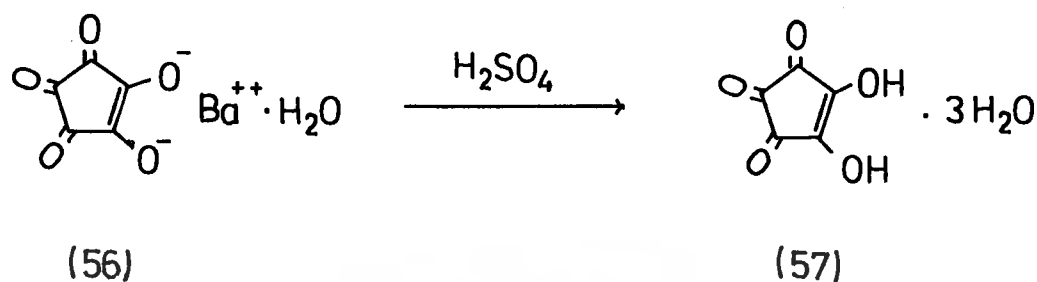


เติมสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต (1 โมลลาร์) จำนวน 1 ลิตร ลงในขวดก้นกลม จากนั้นเติมแมงกานีสไดออกไซด์ที่เตรียมไว้ 18.7 กรัม (0.22 โมล) และโซเดียมโครโคเนต 8.25 กรัม (0.034 โมล) กวนสารละลายผสมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที รีฟิลที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองสารละลายที่ร้อน จะได้สารละลายสีเหลืองเข้มและตะกอนดำ ล้างตะกอนด้วยน้ำร้อน 267 มิลลิลิตร และสารละลายแบเรียมคลอไรด์ (1.33 โมลลาร์) จำนวน 50 มิลลิลิตรที่ร้อน กวน และให้ความร้อนจนถึงอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ทั้งไว้ให้เย็นลงอย่างช้า ๆ จนถึงอุณหภูมิห้อง กรองสารละลายผ่านเครื่องกรองสุญญากาศ ได้ตะกอนสีเหลืองใส ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น เก็บไว้ในเคซิเคเตอร์ จะได้ผลิตภัณฑ์ 8 กรัม (ผลิตภัณฑ์ร้อยละ 80)

IR ( $\lambda_{max}$ , KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) : 3400, 1500-1600

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การเตรียมโครโคนิกแอซิดไตรไฮเดรต (Croconic acid trihydrate)

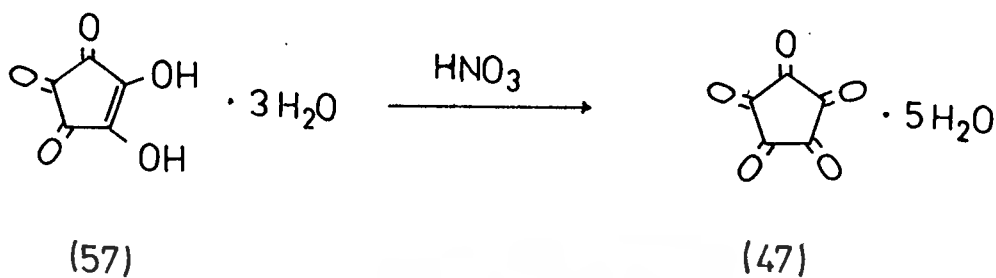


เติมสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 6 จำนวน 21 มิลลิลิตร ลงในขวด  
 ก้นกลมขนาด 100 มิลลิลิตร ซึ่งมีแบเรียมโครโคนิกเนตไบไฮเดรต 6.3 กรัม  
 (0.021 โมล) กวนและให้ความร้อนจนถึงอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และกวนสาร  
 ละลายต่ออีก 1 ชั่วโมง กรองตะกอนแบเรียมซัลเฟต (BaSO<sub>4</sub>) ทดระเห็ด ระเหย  
 สารละลายให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน จากนั้นเติมเมทานอล 19 มิลลิลิตร  
 และผงถ่าน 0.084 กรัม และกวน จากนั้นกรองสารละลายผสมด้วยกระดาษกรอง  
 นำส่วนที่เป็นสารละลายมาระเหยด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดันจนแห้ง จะได้โครโคนิก  
 แอซิดไตรไฮเดรตเป็นของแข็งสีเหลืองเข้ม 1.3 กรัม (ผลิตภัณฑ์ร้อยละ 32)

IR ( $\lambda$ )<sub>max</sub>, KBr, cm<sup>-1</sup> : 3420-1620

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

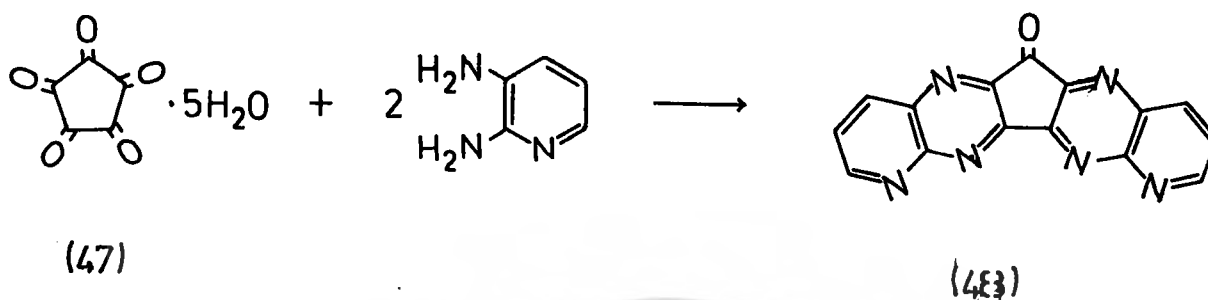
การเตรียมสารประกอบลิควินิคแอซิดเพนตะไฮเดรต (Leuconic acid Pentahydrate)



เติมกรดไนตริกเข้มข้น ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส จำนวน 46 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นกลมขนาด 100 มิลลิลิตร และเติมโครโคินิกแอซิดไตรไฮเดรต 6 กรัม (0.03 โมล) ลงช้า ๆ ในอ่างน้ำเย็น กวน และผ่านอากาศโดยใช้เครื่องโม่ผง อากาศ จนกระทั่งสีเหลืองหายไป เติมน้ำถึงผสมเอทานอล 46 มิลลิลิตร และ กวนอีก 10 นาที กรองสารละลายผ่านเครื่องกรองสุญญากาศ จะได้ทองแดงสีทาว ล้างตะกอนด้วยเมทานอลที่เย็น 30 มิลลิลิตร เก็บตะกอนในแคชเชเตอร์จนแห้ง จะได้ผลิตภัณฑ์ 5.79 กรัม (ผลิตภัณฑ์ร้อยละ 84)

IR ( $\lambda_{\text{max}}$ , KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) : 3400

การเตรียมสารประกอบคีโตน



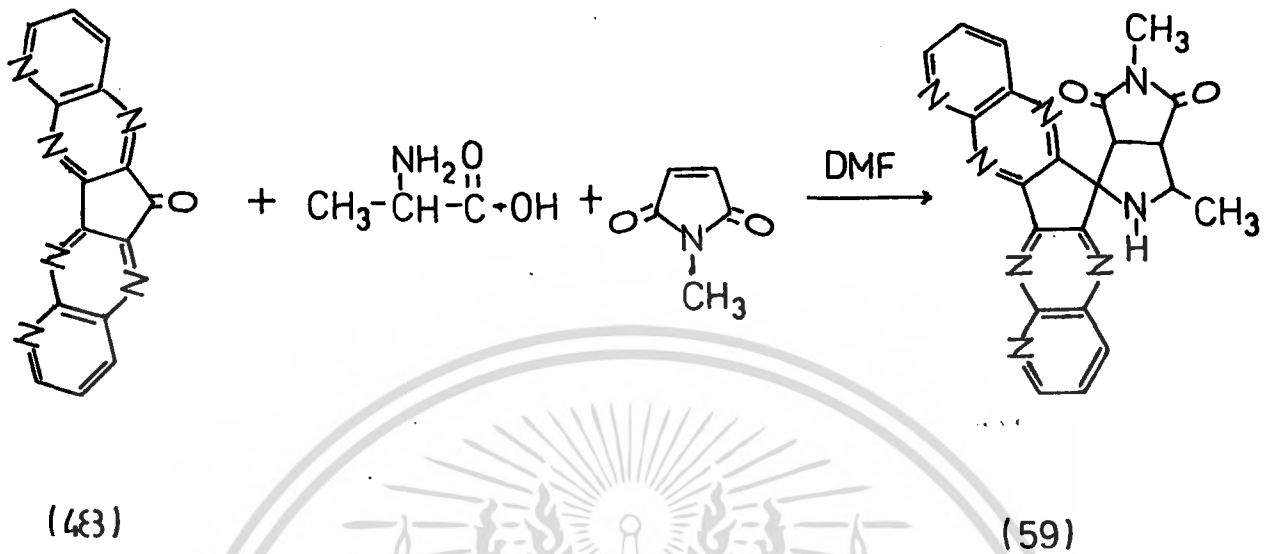
ละลายลิควิดินแอมิดเพนเตไฮดรเอต 2.5 กรัม (0.011 โมล) และ 2,3-ไดอะมิโนไพริดีน 2.4 กรัม (0.022 โมล) ในสารละลาย 50 % กรดอะซิติก จำนวน 25 มิลลิลิตร รีฟลักซ์เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ปลอกสารละลายไว้ให้เย็น กรองสารละลายผ่านเครื่องกรองสุญญากาศ ล้างตะกอนด้วยสารละลาย 50% กรดอะซิติก จะได้สารสีเขียวย้ำ 2.61 กรัม (ผลิตภัณฑ์ร้อยละ 83)

Melting point > 300 °C

IR (  $\lambda_{\text{max}}$ , KBr,  $\text{cm}^{-1}$  ) : 3050, 1750, 1500, 1080

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาการเกิดปฏิกิริยาไซโคลแอตติก



เติมสารละลายอะลานีน 0.0267 กรัม ( $3 \times 10^{-4}$  โมล) ในน้ำ 2.5 มิลลิลิตร ลงในสารละลายผสมระหว่างสารประกอบคีโตน 0.710 กรัม ( $2.5 \times 10^{-3}$  โมล) และเอ็น-เมทิลมาลอิไมด์ 0.05 กรัม ( $4.5 \times 10^{-4}$  โมล) ในเอ็น,เอ็น-ไดเมทิลฟอร์มามิด (N,N'-dimethylformamide) 12.5 มิลลิลิตร รีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ทั้งสารละลายไว้ให้เย็น ระเหยให้แห้งโดยใช้เครื่องระเหยแบบลดความดัน จากนั้นเติมเมทิลีนคลอไรด์ 25 มิลลิลิตร นำสารละลายมาสกัดด้วยน้ำกลั่น จำนวน 2 ครั้ง และสกัดอีกครั้งด้วยสารละลายไซเคียมคลอไรด์ นำสารละลายที่สกัดได้ไประเหยตัวทำละลายออก จะได้สารสีน้ำตาลเข้ม

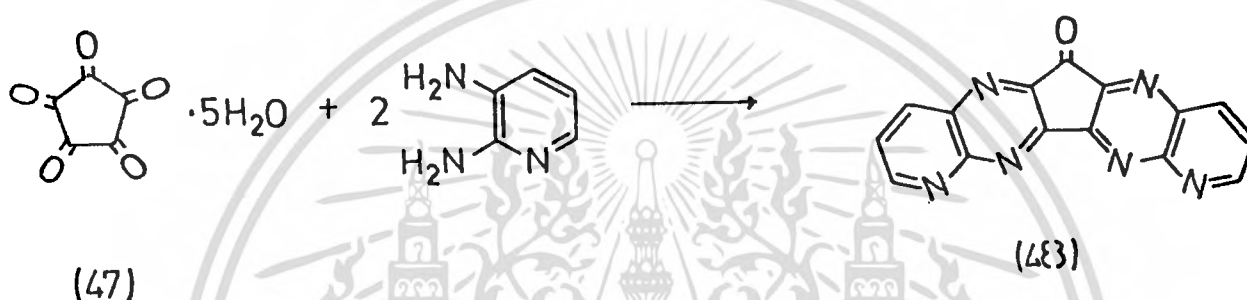
IR (  $\lambda_{\text{max}}$  , KBr ,  $\text{cm}^{-1}$  ) : 2950, 1700

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

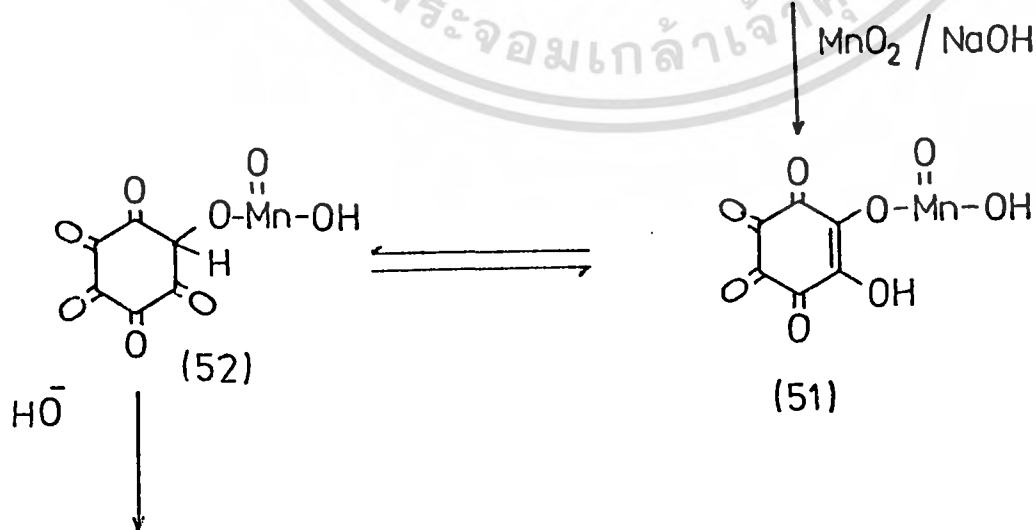
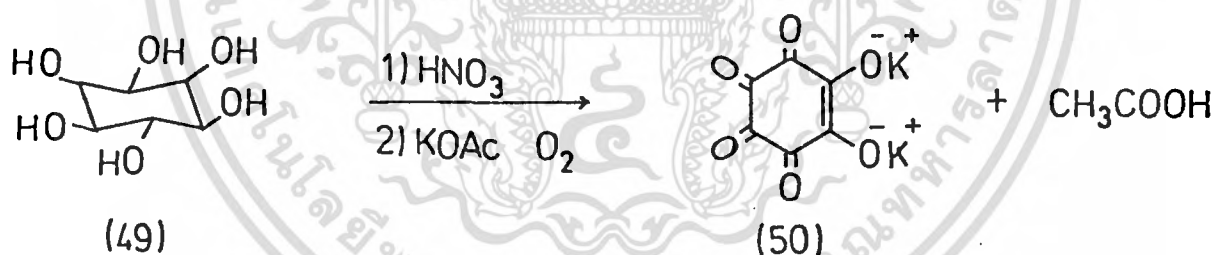
บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

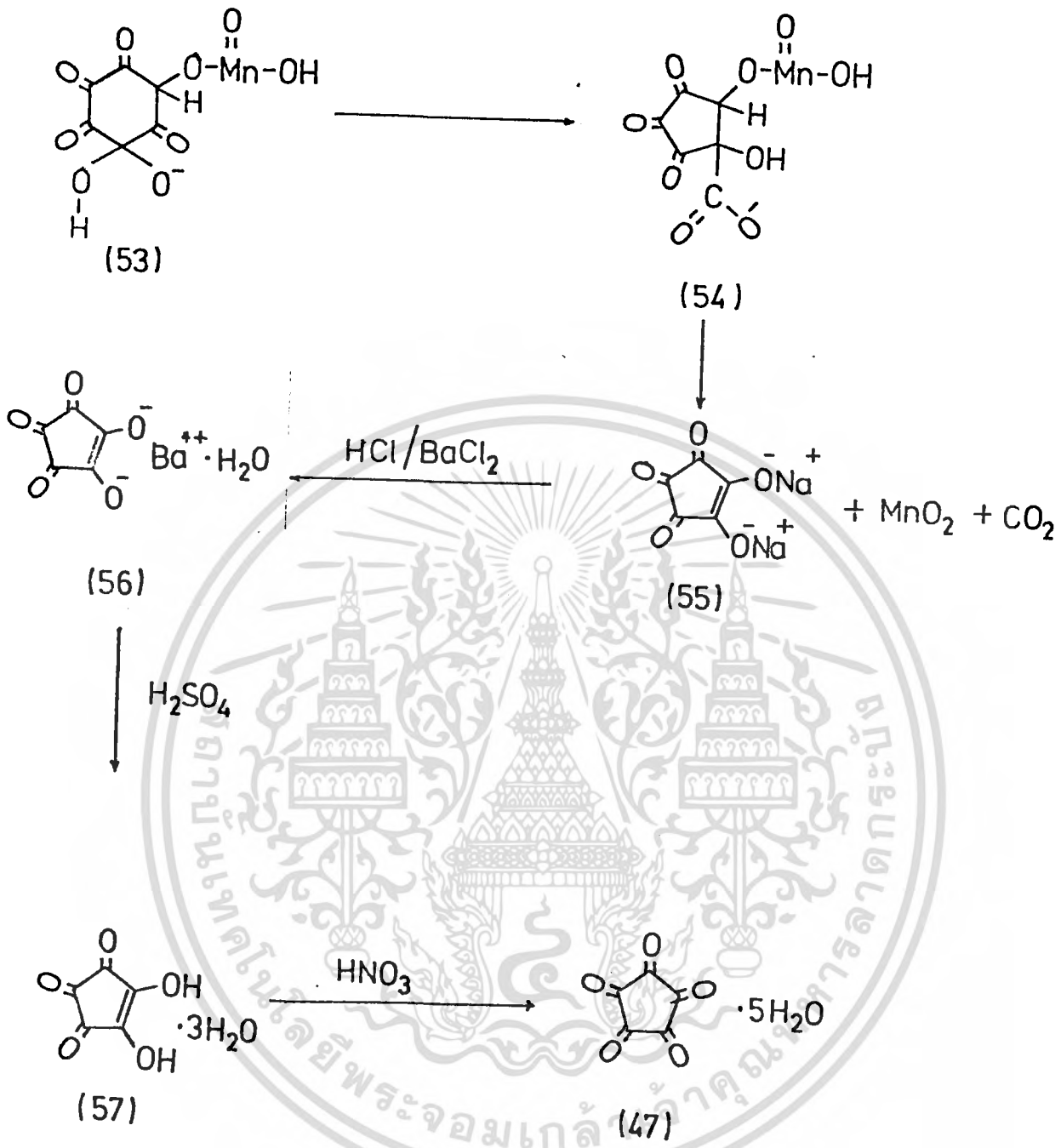
จากการศึกษาและพัฒนาสารเคมีตัวใหม่ที่ใช้ในการตรวจสอบกรดอะมิโน ในโครงการพิเศษนี้ เป็นการสังเคราะห์สารคีโตน (48) ซึ่งสามารถเตรียมได้จากปฏิกิริยาระหว่าง ลิวโคณิคแลซิดเพนตะไฮโดรคัทกับ 2,3-ไดอะมีโนไพริดีน โดยที่อัตราส่วน 1:2 ในตัวทำละลาย 50 % กรดอะซิติก จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีเขียวเข้ม



ส่วนการเตรียมสารตั้งต้นที่ใช้ในปฏิกิริยาการเตรียมคีโตน ซึ่งคือ ลิวโคณิคแลซิดเพนตะไฮโดรคัท สามารถเตรียมได้ดังปฏิกิริยาดังต่อไปนี้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ไมโอ-ฮินโบริทอล (49) ถูกสกัดได้ด้วยกรดไนตริกและโพแทสเซียมอะซิเตต  
 ในบรรยากาศของคลอโรฟอรั่ม โดยใช้เวลา 90 ชั่วโมง ให้เกลือโพแทสเซียมโรไดโซ  
 เนต (50) และกรดอะซิติก จากนั้นจะสกัดด้วยแมงกานีสไดออกไซด์ในสภาวะเบส  
 (NaOH) เกิดเป็นสารมัธยันต์แมงกานีสเอสเทอร์ (manganese ester inter-  
 mediate , 51) จากนั้นจะเกิดการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลของ (51) ไปเป็นหมู่

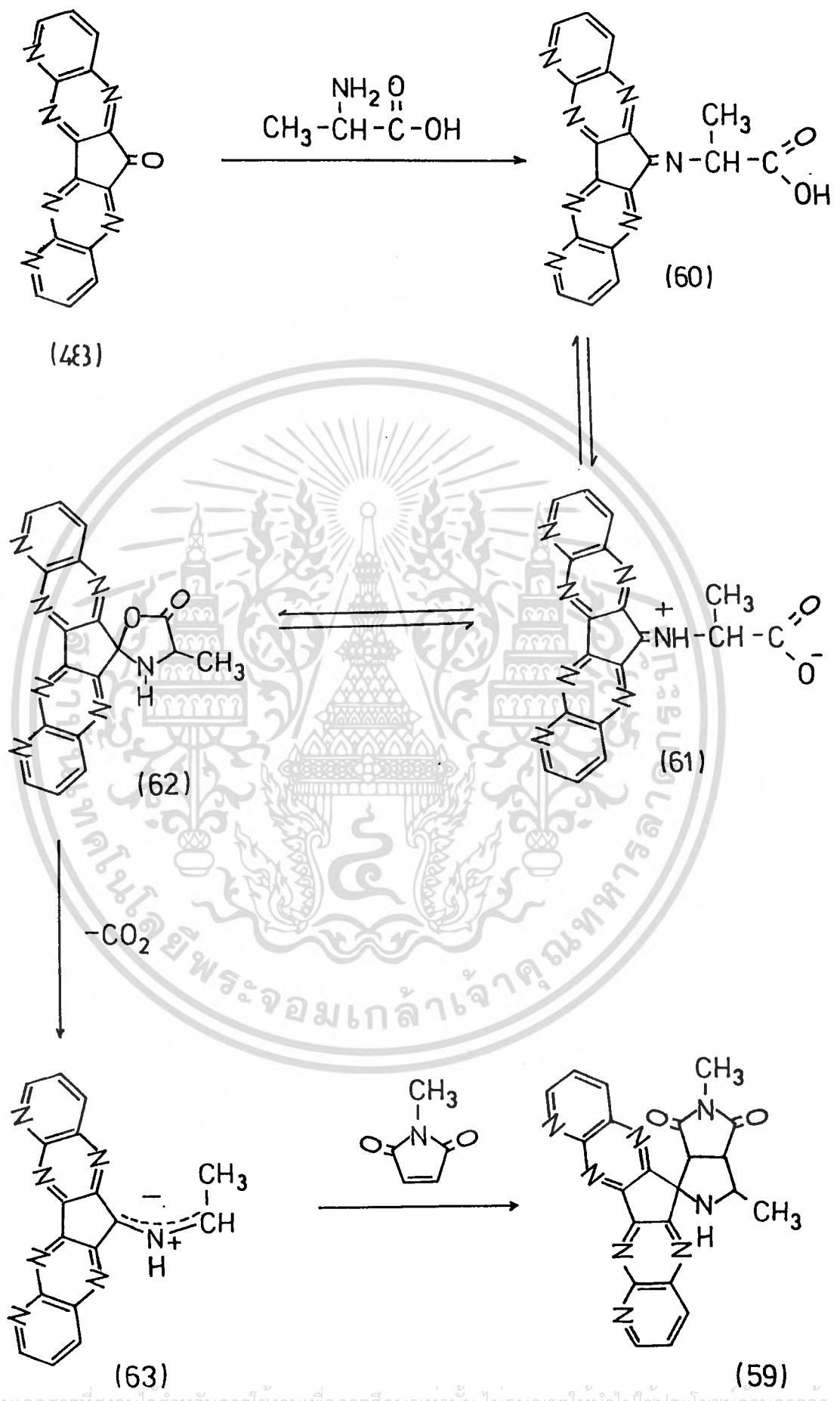
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คาร์บอนิลให้สาร (52) ซึ่งมีความเสถียรกว่า และจะเกิดการจัดเรียงตัวใหม่โดยผ่านสาร  
มัซซันท์ (53) และ (54) ได้เป็นไฮโดรคีเลมโครโคเนต (55) คาร์บอนไดออกไซด์ และ  
แมงกานีสออกไซด์ออกมา ทำให้ไฮโดรคีเลมโครโคเนตเป็นกลางโดยให้สารละลายแบเรียม  
คลอไรด์ ซึ่งจะทำให้เกิดเป็นกรดไฮโดรคลอริก ทำให้ความเป็นเบสลดลง ให้แบเรียม  
โครโคเนตโมโนไฮเดรต (56) มีลักษณะเป็นตะกอนสีเหลือง และทำให้เป็นกรดโดยเติม  
กรดซัลฟูริกได้เป็นโครโคเนตแอสิดไฮเดรต (57) มีสีเหลืองเข้ม จากนั้นลอกซีโลส  
(57) ด้วยกรดไนตริก ให้ลิวคินแอสิดเพนตะไฮเดรต (47) ซึ่งเป็นสารสีทาว  
ผลิตภัณฑ์ร้อยละ 84

สารคีโตนที่ได้จากการสังเคราะห์นี้ ไม่ค่อยบริสุทธิ์เท่าที่ควร สามารถสังเกต  
ได้จากข้อมูลทางอินฟราเรดสเปกตรัม นอกจากนี้เมื่อนำสารไปทดสอบโดยวิธี TLC  
(Thin-layer Chromatography) ผลปรากฏว่า ไม่สามารถแยกสารออกเป็นจุดได้  
เนื่องจากสารละลายที่ใช้ไม่เหมาะสม และยังไม่สามารถแสดงข้อมูลทาง NMR ได้  
เนื่องจาก คีโตนสามารถละลายได้ดีในกรดไฮโดรคลอริก แต่ไม่สามารถใช้กรดไฮโดร  
คลอริกเป็นตัวทำละลายใน NMR ได้ เพราะว่ามีไฮโดรเจนและคลอรีนอยู่ ส่วน D-Cl มี  
ราคาแพงมากจึงไม่เหมาะเป็นตัวทำละลาย นอกจากนี้คีโตนยังสามารถละลายใน DMF  
ได้ดีพอควร แต่การใช้ DMF เป็นตัวทำละลาย จะทำให้เกิดฟิสิกส์ที่ประมาณ 7-8 ซึ่ง  
เป็นช่วงเดียวกับพีคของไฮโดรเจนที่ตำแหน่งอะโรมาติกของคีโตน จึงทำให้ไม่สามารถหา  
ข้อมูลทาง NMR ได้

เมื่อสามารถสังเคราะห์คีโตน (48) ได้แล้ว จึงนำมาทดสอบกับกรดแอสทริก  
อะมิโน และเอ็น-เมทิลมาลิมิด (N-methylmaleimide, 58) ในเอ็น,เอ็น-  
ไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (N,N'-dimethylformamide) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส  
เป็นเวลา 16 ชั่วโมง สารที่ได้คาดว่าจะเป็นไซโคลแอสติก (59) ซึ่งถ้าเกิดเป็นไซโคล  
แอสติกจะมีกลไกในการเกิดปฏิกิริยาดังนี้คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากคีโตนที่สังเคราะห์ได้นี้ เป็นอนุพันธ์ของคีโตนและนิโคติน ดังนั้น กลไกการเกิดปฏิกิริยาจึงคล้ายกัน คือ คีโตนจะทำปฏิกิริยากับอะลานินโดยเกิดเป็น Schiff base (60) แล้วเกิดการสูญเสียคาร์บอนไดออกไซด์ (decarboxylation) โดยเกิดผ่านสวิตเทอร์ไอออน (zwitterion, 61) ได้เป็นสารมัธยันตร์ ออกซาโซลิดีน-5-ไอออน (62) ในการเกิดปฏิกิริยา 1,3-ไดโพลาร์ไซโคลรีเวอร์ชัน ชนิดสเตอริโอ-สเปคิฟิค (stereospecific 1,3-dipolar cycloreversion) ได้เป็นเอ็น-โปรติเนต 1,3-ไดโพล (N-Protonated 1,3-dipole, 63) ซึ่งทดสอบได้โดยการเกิดปฏิกิริยากับเอ็น-เมทิลมาลิอิมิด (58) แต่ผลิตภัณฑ์ที่ได้ยังไม่แน่ใจว่าเป็นไซโคลแอตติก (59) หรือไม่ เพราะเมื่อดูจากผลทางนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ ปรากฏว่า สเปกตรัมที่ได้ไม่ตรงกับที่ต้องการ ซึ่งอาจจะไม่เกิดเป็นไซโคลแอตติก หรืออาจจะเกิดเป็นไซโคลแอตติกแต่เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่บริสุทธิ์เท่าที่ควร จึงทำให้ได้สเปกตรัมไม่ตรงตามที่ต้องการ

เมื่อทดสอบการวาวแสงของคีโตนที่ได้ ปรากฏว่า สารละลายสีเหลืองของ 1,3-ไดโพลไม่สามารถเกิดการวาวแสงได้

### วิจารณ์ผลการทดลอง

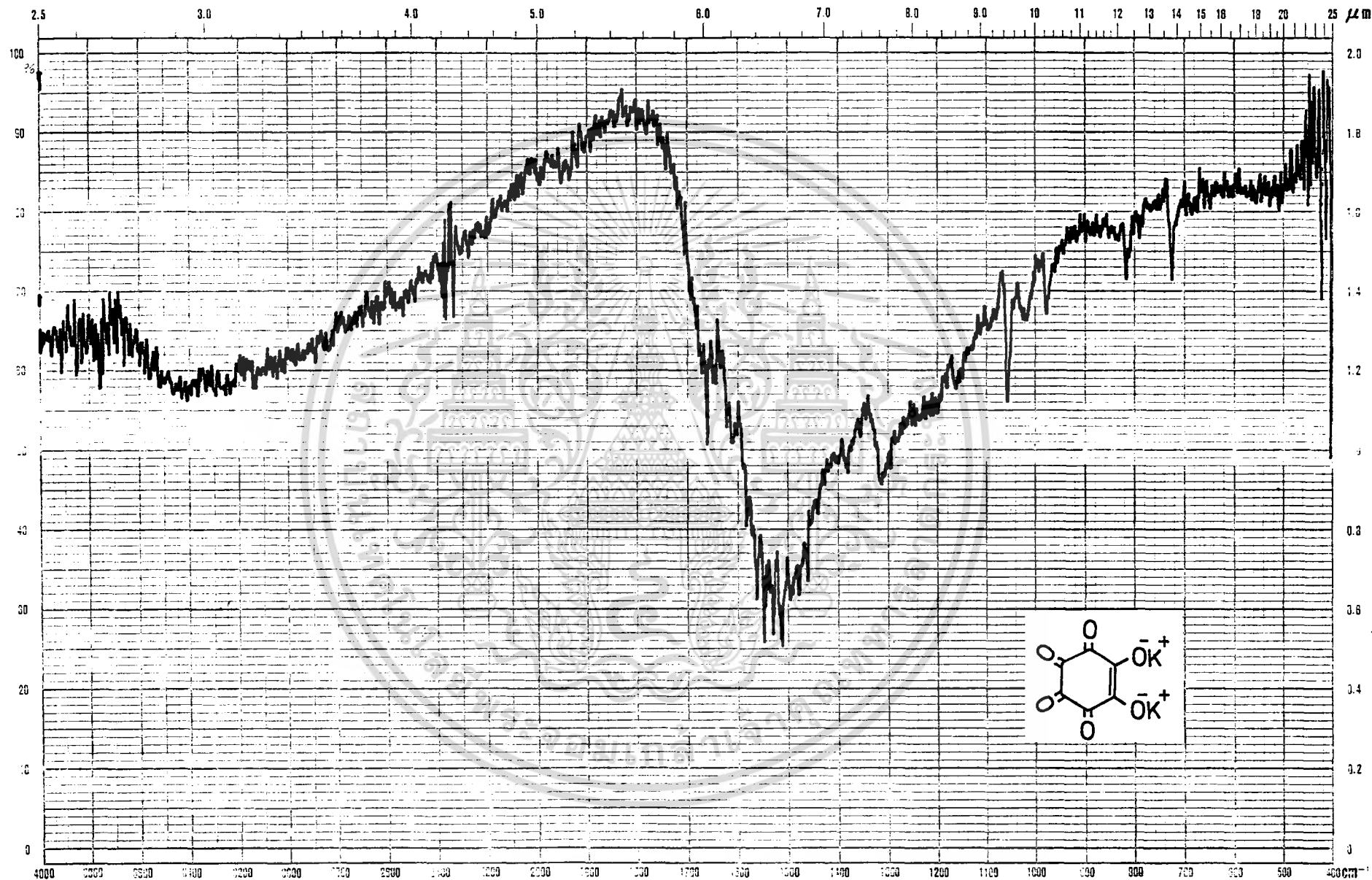
สารคีโตน (48) เมื่อทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโน ซึ่งจากการทดลองนี้ใช้ แอล-อะลานินแล้วไม่สามารถเกิดการวาวแสงได้ และคีโตน (48) ที่ได้นี้ ไม่สามารถละลายในแอลกอฮอล์ได้ นอกจากนี้ การที่ใช้สารเคมีที่มีน้ำหนักโมเลกุล และสูตรโครงสร้างที่ซับซ้อน ก็อาจมีผลกับความสามารถในการละลาย และการวาวแสงของคีโตนได้

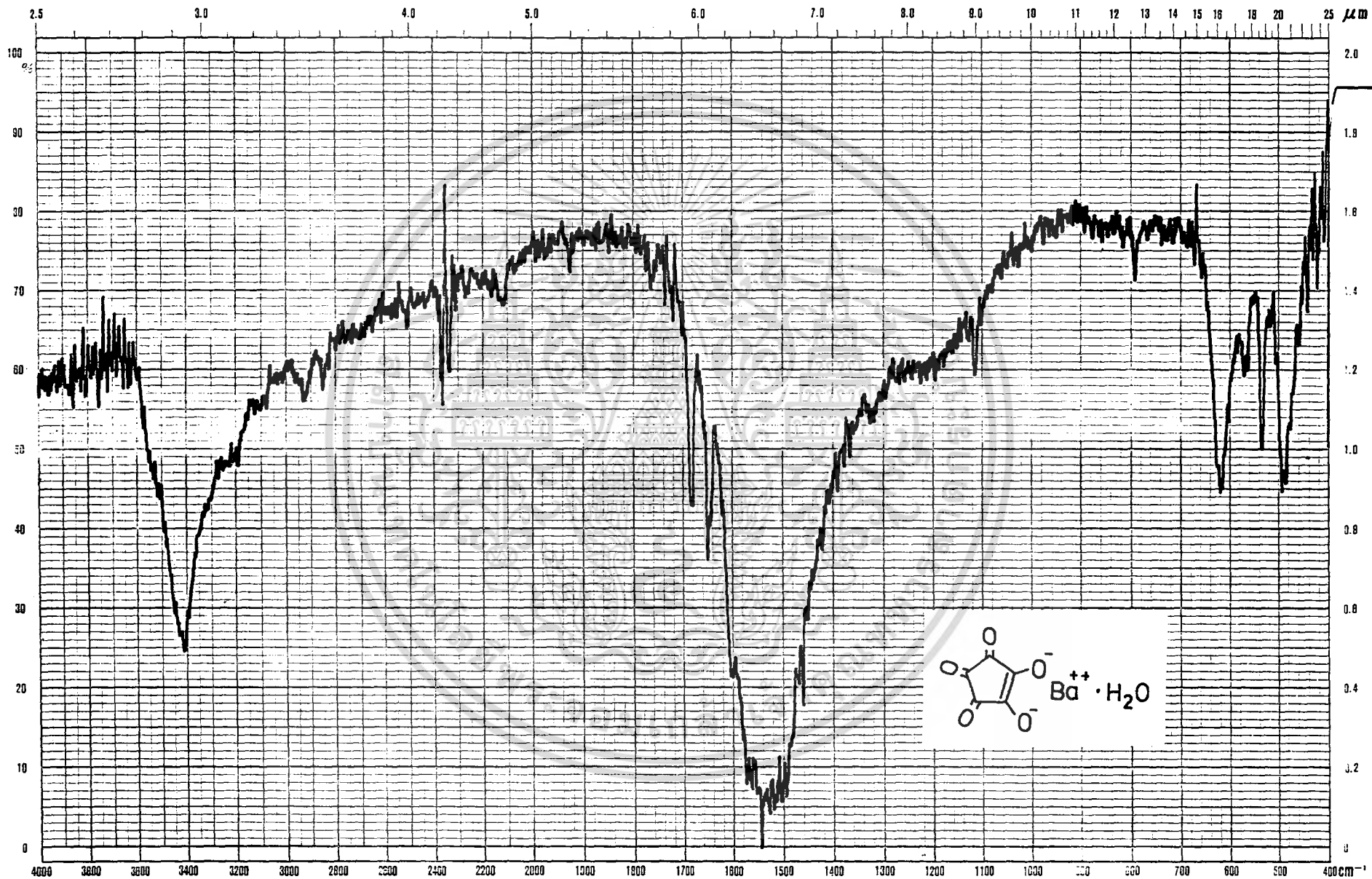
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



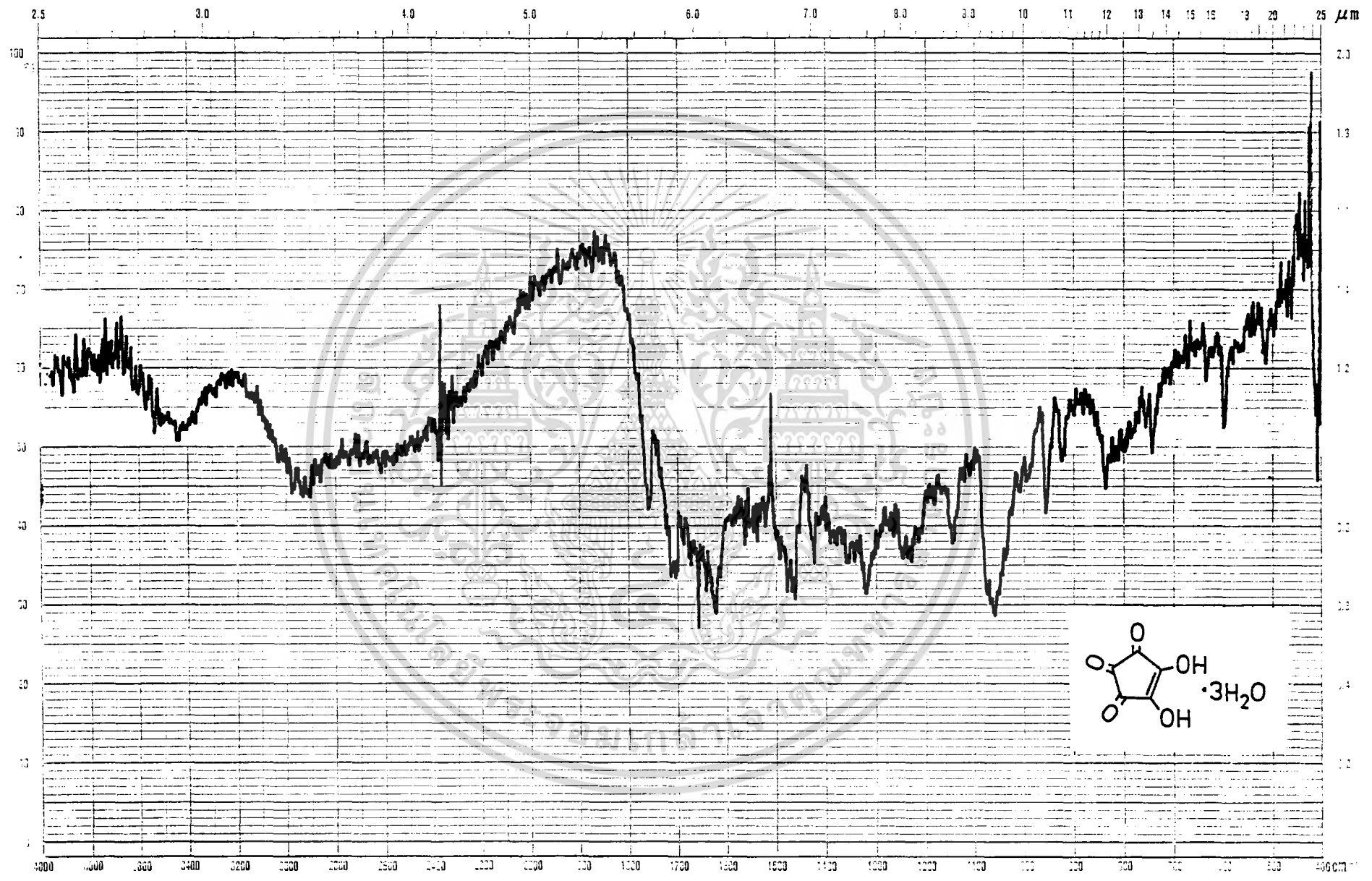
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

30



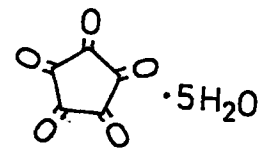
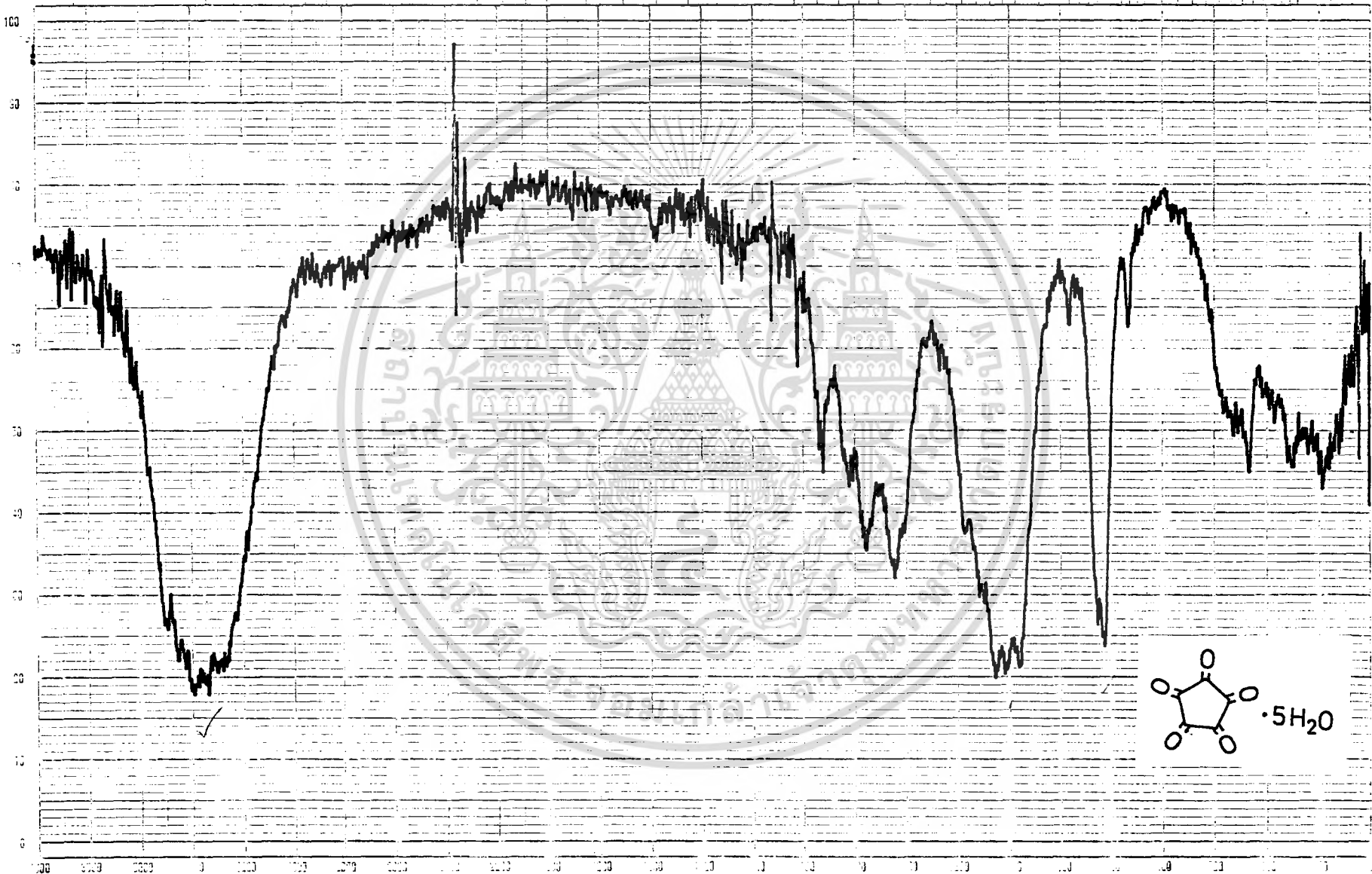


32



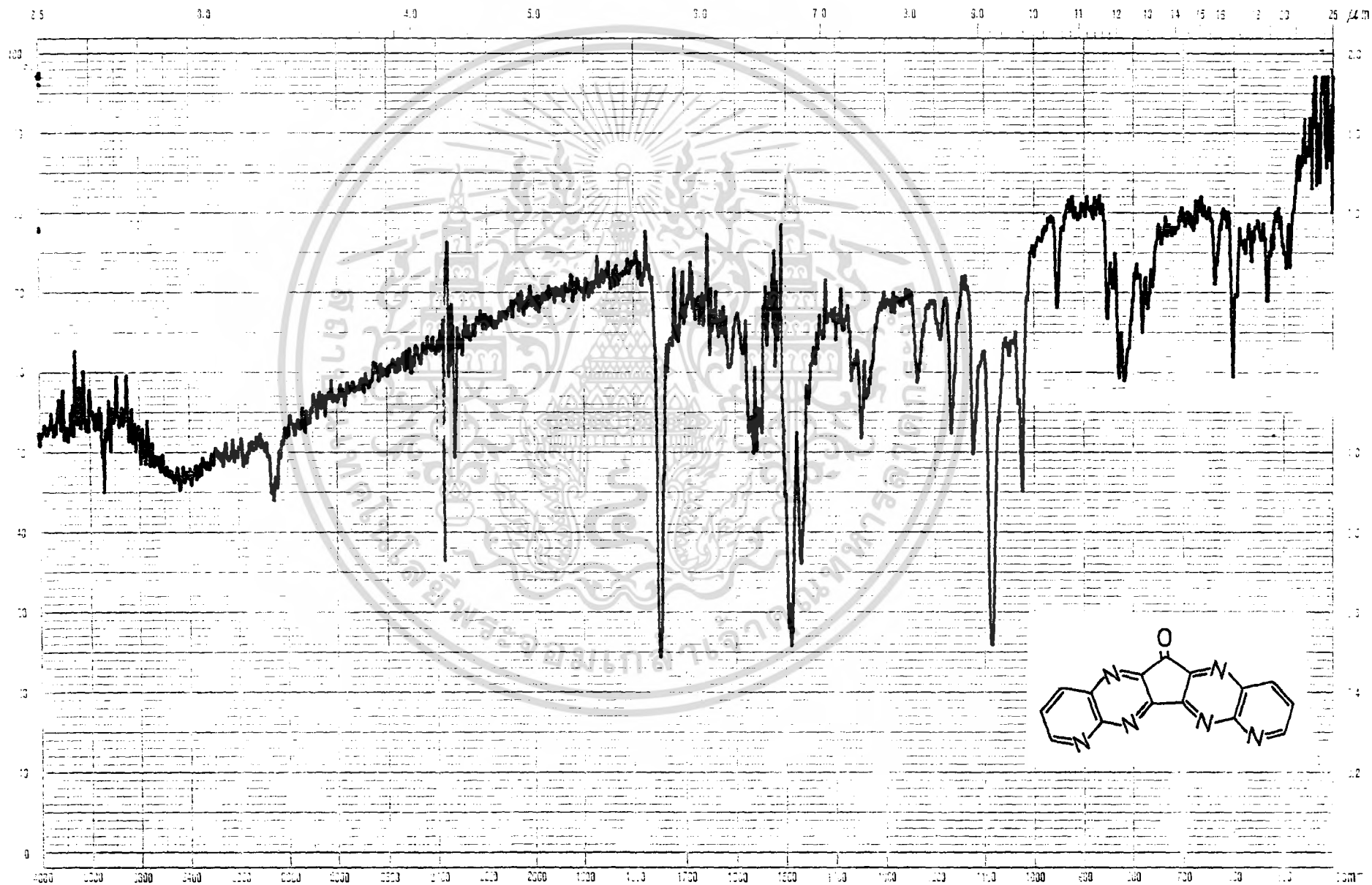


2.5 3.0 4.0 5.0 6.0 7.0 8.0 9.0 10 11 12 13 14 15 16 17 18 20 25  $\mu m$

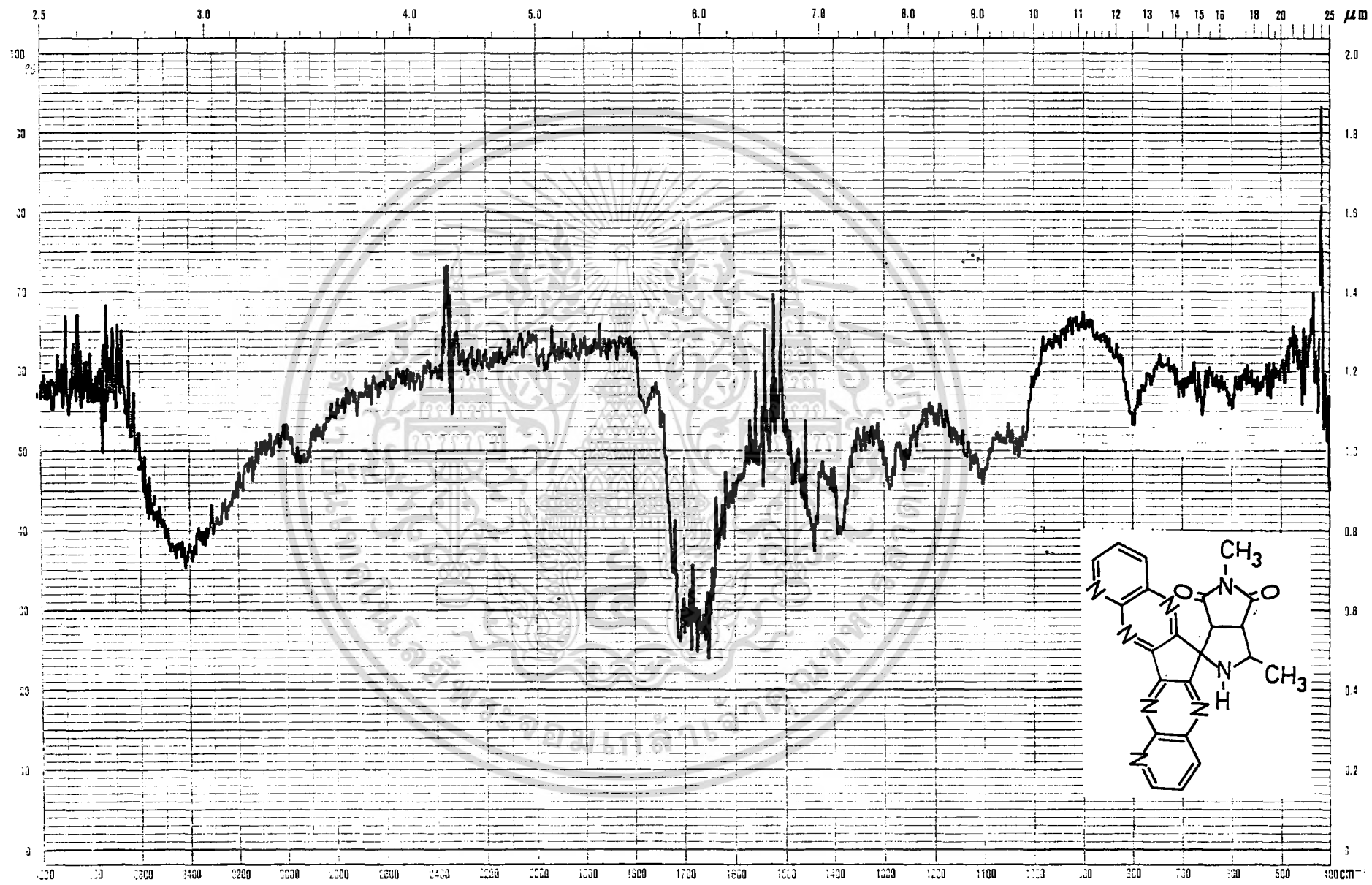


33

34



35

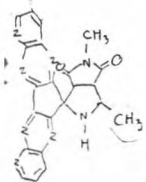


START OF SWEEP



END OF SWEEP

20ppm	1200Hz	1000	800	600	400	200	0
10ppm	600	500	400	300	200	100	0
5ppm	300	250	200	150	100	50	0
2ppm	120	100	80	60	40	20	0
1ppm	60	50	40	30	20	10	0
0.5ppm	30	25	20	15	10	5	0



ppm ( $\delta$ ) 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1 0

LOCK POS. \_\_\_\_\_ ppm SPECTRUM AMPL. \_\_\_\_\_ SWEEP TIME \_\_\_\_\_ min NUCLEUS \_\_\_\_\_ SAMPLE: no ofat. 100C/16 OPERATOR W. J. M.

LOCK POWER \_\_\_\_\_ mG FILTER \_\_\_\_\_ sec SWEEP WIDTH \_\_\_\_\_ ppm ZERO REF. \_\_\_\_\_ DATE 16/3/36

DECOUPLE POS. \_\_\_\_\_ ppm DECOUPLING POWER \_\_\_\_\_ mG RF POWER \_\_\_\_\_ mG END OF SWEEP \_\_\_\_\_ ppm SAMPLE TEMP. \_\_\_\_\_ °C SOLVENT: CDCl3 SPECTRUM NO. \_\_\_\_\_

บรรณานุกรม

1. Rosenthal , G.A. "Colorimetric and Fluorimetric Detection of Amino Acids "Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids pp. 573-575 , J.W. Arrowsmith , Great Britain , 1985
2. Chnstopher James Lennard. " New Amino Acids Specific Fingerprint Reagents " Ph.D. Thesis , Department of chemistry , Australia National University , 1986
3. Almog. J. "Reagent for Chemistry Development of Latent Fingerprint ; Vicinal Triketones-their Reaction with Amino Acids with Latent-Fingerprint on Paper "J. Forensic. Sci. Vol. 32 , No. 6 , Nov. 1987 , pp. 1565-1573
4. Mongkolaussavaratana , T , "New Reagent for the Detection of Amino Acids " Ph.D. Thesis , Queen's University of belfast , 1989

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้