

การสังเคราะห์เทตระเปปไทด์ที่มี Ile-Val เป็นโครงสร้างหลัก
บนวัสดุภาคของแข็งโดยตัวเชื่อมโยงแวงก์

SYNTHESIS OF Ile-Val BASED TETRAPEPTIDES ON SOLID PHASE
USING WANG LINKER

ลักขณา จิรมิตรมงคล
LUKSANA JIRAMITMONGKON

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย

ณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2549

ISBN 974-15-2423-4

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การสังเคราะห์เททระเปปไทด์ที่มี Ile – Val เป็นโครงสร้างหลัก
บนวัฏภาคของแข็งโดยตัวเชื่อมโยงแวงก์

SYNTHESIS OF Ile – Val BASED TETRAPEPTIDES ON SOLID PHASE
USING WANG LINKER

ลักษณา จิรมิตรมงคล

LUKSANA JIRAMITMONGKON

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน..... 63418
วัน,เดือน,ปี 28 ส.ค. 2549

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2549

ISBN 974-15-2423-4

COPYRIGHT 2006

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การสังเคราะห์เทตระเปปไทด์ที่มี Ile - Val เป็นโครงสร้างหลัก
บนวิฎภาคของแข็งโดยตัวเชื่อมโยงวงก่

นักศึกษา

นางสาวลักขณา จิรมิตรมงคล

รหัสประจำตัวนักศึกษา

45064300

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา

เคมี

พ.ศ.

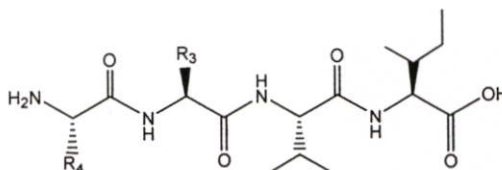
2549

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์

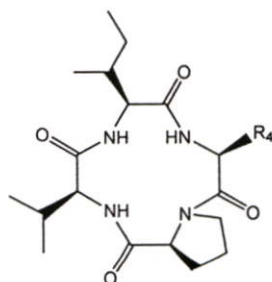
ผศ. ดร. พัทณี เจริญยิ่ง

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เสนอวิธีการสังเคราะห์เทตระเปปไทด์ด้วยเทคนิควิฎภาคของแข็ง โดยใช้ Wang resin เป็นวิฎภาคของแข็ง ได้ผลิตผลโดยรวมของเทตระเปปไทด์อยู่ในช่วง 40 - 90 เปอร์เซ็นต์ และทำการปัดวงไซคลิกเทตระเปปไทด์ด้วยเทคนิคสารละลาย ได้ผลิตผลโดยรวมอยู่ในช่วง 45 - 80 เปอร์เซ็นต์



- | | |
|---|--|
| 107a R ₃ = -CH ₂ CH ₂ CH ₂ -, R ₄ = -CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃ | 107g R ₃ = -CH ₂ CH(CH ₃) ₂ , R ₄ = -CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃ |
| 107b R ₃ = -CH ₂ CH ₂ CH ₂ -, R ₄ = -CH ₂ CH(CH ₃) ₂ | 107h R ₃ = -CH ₂ CH(CH ₃) ₂ , R ₄ = -CH(CH ₃) ₂ |
| 107c R ₃ = -CH ₂ CH ₂ CH ₂ -, R ₄ = -CH(CH ₃) ₂ | 107i R ₃ = -CH ₂ CH(CH ₃) ₂ , R ₄ = -CH ₂ CH ₂ CH ₂ - |
| 107d R ₃ = -CH ₂ CH ₂ CH ₂ -, R ₄ = -CH ₂ CH ₂ CH ₂ - | 107j R ₃ = -CH ₂ CH(CH ₃) ₂ , R ₄ = -CH ₂ CH(CH ₃) ₂ |
| 107e R ₃ = -CH ₂ CH ₂ CH ₂ -, R ₄ = -CH ₂ -indole | 107k R ₃ = -CH ₂ CH(CH ₃) ₂ , R ₄ = -CH ₂ -indole |
| 107f R ₃ = -CH ₂ CH ₂ CH ₂ -, R ₄ = -CH ₂ Ph | |



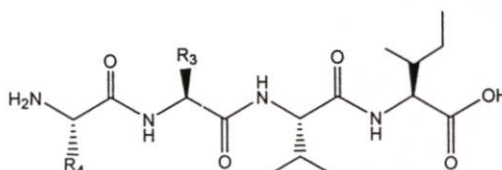
- | |
|--|
| 108a R ₄ = -CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃ |
| 108b R ₄ = -CH ₂ CH(CH ₃) ₂ |
| 108c R ₄ = -CH(CH ₃) ₂ |
| 108d R ₄ = -CH ₂ CH ₂ CH ₂ - |

นำเทตระเปปไทด์และไซคลิกเทตระเปปไทด์ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อแบคทีเรีย
แกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบพบว่าเทตระเปปไทด์ 3 ชนิดมีฤทธิ์ต้าน *C. diphtheriae* และ
ไซคลิกเปปไทด์ 2 ชนิด มีฤทธิ์ต้าน *C. diphtheriae* และ *P. aeruginosa* ATCC 27853

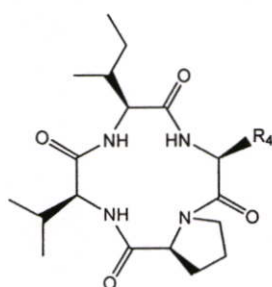
Thesis Title	Synthesis of Ile – Val Based Tetrapeptides on Solid Phase Using Wang Linker
Student	Miss.Luksana Jiramitmongkon
Student ID.	45064300
Degree	Master of Science
Programme	Chemistry
Year	2006
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Patchanee Charoenying

ABSTRACT

This research proposes a synthetic of tetrapeptides on solid phase. Wang resin was used as solid phase in yields ranging from 40 to 90%. Cyclization of cyclic tetrapeptides were performed on solution phase in yields ranging from 45 to 80%.



- | | |
|---|--|
| 107a R ₃ = -CH ₂ CH ₂ CH ₂ -, R ₄ = -CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃ | 107g R ₃ = -CH ₂ CH(CH ₃) ₂ , R ₄ = -CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃ |
| 107b R ₃ = -CH ₂ CH ₂ CH ₂ -, R ₄ = -CH ₂ CH(CH ₃) ₂ | 107h R ₃ = -CH ₂ CH(CH ₃) ₂ , R ₄ = -CH(CH ₃) ₂ |
| 107c R ₃ = -CH ₂ CH ₂ CH ₂ -, R ₄ = -CH(CH ₃) ₂ | 107i R ₃ = -CH ₂ CH(CH ₃) ₂ , R ₄ = -CH ₂ CH ₂ CH ₂ - |
| 107d R ₃ = -CH ₂ CH ₂ CH ₂ -, R ₄ = -CH ₂ CH ₂ CH ₂ - | 107j R ₃ = -CH ₂ CH(CH ₃) ₂ , R ₄ = -CH ₂ CH(CH ₃) ₂ |
| 107e R ₃ = -CH ₂ CH ₂ CH ₂ -, R ₄ = -CH ₂ -indole | 107k R ₃ = -CH ₂ CH(CH ₃) ₂ , R ₄ = -CH ₂ -indole |
| 107f R ₃ = -CH ₂ CH ₂ CH ₂ -, R ₄ = -CH ₂ Ph | |



- | |
|--|
| 108a R ₄ = -CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃ |
| 108b R ₄ = -CH ₂ CH(CH ₃) ₂ |
| 108c R ₄ = -CH(CH ₃) ₂ |
| 108d R ₄ = -CH ₂ CH ₂ CH ₂ - |

Tetrapeptides and cyclic tetrapeptides were tested with gram – positive bacterial and gram – negative bacterial . The results found that three types of tetrapeptides showed activity against *C. diphtheriae* and two types of cyclic tetrapeptides showed activity against *C. diphtheriae* and *P. aeruginosa* ATCC 27853 .

Key words : tetrapeptides, cyclic tetrapeptides, Wang resin, solid phase, solution phase

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้อย่างดี ด้วยคำแนะนำ และคำปรึกษาจาก ผศ.ดร.พัชนี เจริญยิ่ง ซึ่งเป็นอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ และดร.บดินทร์ ชิตกุล อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม ข้าพเจ้ารู้สึกทราบบ้างในความอนุเคราะห์จากท่านอาจารย์ทั้งสองท่าน และขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. ภัทรารุช มนต์วิเศษ ผศ. ดร. วันฉัตร ชื่นชม และ ผศ. ดร. บุญเอก ยิ่งขงณรงค์กุล ที่ให้เกียรติเป็นคณะกรรมการสอบหัวข้อโครงร่างวิทยานิพนธ์และวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณ รศ. ดร. นันทนา อรุณฤกษ์ ภาควิชาโหราศาสตร์ คณะทันตแพทย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่กรุณาช่วยทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่สังเคราะห์ได้

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ งบประมาณปี 2547 ที่ให้การสนับสนุนด้านเงินทุนวิจัยในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ในสาขาวิชาเคมีอินทรีย์สถาบันเทคโนโลยี พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกคนที่ให้คำแนะนำต่างๆ และคอยให้กำลังใจเสมอมา

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัวของข้าพเจ้าที่เป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนในทุกเรื่องๆ ทำให้ข้าพเจ้าสามารถทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมาจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอบแต่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

ลักษณา จิรมิตรมงคล

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	VII
สารบัญรูป.....	IX
รายการคำย่อ.....	XII
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	2
1.4 ขั้นตอนการวิจัยและดำเนินงาน.....	2
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ.....	4
2.1 การสังเคราะห์เปปไทด์และไซคลิกเปปไทด์.....	4
2.1.1 เทคนิควิทยุภาคของแข็ง.....	4
2.1.1.1 ลักษณะของตัวกำจุน.....	4
2.1.1.2 ตัวเชื่อมโยง.....	6
2.1.1.3 หลักการสังเคราะห์.....	10
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	13
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	26
3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	26
3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.....	27
3.3 การทดลองทั่วไป.....	28
3.4 การสังเคราะห์เทตระเปปไทด์ด้วยเทคนิควิทยุภาคของแข็ง.....	29
3.4.1 การเตรียม Wang resin (90).....	29

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4.2 ปฏิกริยาการใส่หมู่กระตุ้นที่หมู่คาร์บอกซิลิกของกรดอะมิโน.....	30
3.4.3 ปฏิกริยาการสังเคราะห์เทอะระเปปไทด์บนวัฏภาคของแข็ง.....	31
3.4.4 ปฏิกริยาการสังเคราะห์ไฮคลิดเทอะระเปปไทด์ด้วยเทคนิคสารละลาย.....	34
3.4.5 การทดสอบ Antimicrobial.....	35
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์.....	36
4.1 การเตรียม Wang resin (90).....	36
4.1.1 การสังเคราะห์ aldehyde resin (89).....	36
4.1.2 การสังเคราะห์ Wang resin (90).....	37
4.2 ปฏิกริยาการใส่หมู่กระตุ้นที่หมู่คาร์บอกซิลิกของกรดอะมิโน.....	38
4.2.1 ปฏิกริยาการใส่หมู่กระตุ้นของ Fmoc – Pro – OH	38
4.2.2 ปฏิกริยาการใส่หมู่กระตุ้นของ Fmoc – Ile – OH	41
4.2.3 ปฏิกริยาการใส่หมู่กระตุ้นของ Fmoc – Val – OH	43
4.2.4 ปฏิกริยาการใส่หมู่กระตุ้นของ Fmoc – Phe – OH.....	45
4.2.5 ปฏิกริยาการใส่หมู่กระตุ้นของ Fmoc – Leu – OH.....	47
4.3 ปฏิกริยาการสังเคราะห์เทอะระเปปไทด์บนวัฏภาคของแข็ง.....	49
4.3.1 การสังเคราะห์ isoleucylvalylprolylisoleucine (107a).....	51
4.3.2 การสังเคราะห์ isoleucylvalylprolylleucine (107b).....	54
4.3.3 การสังเคราะห์ isoleucylvalylprolylvaline (107c).....	57
4.3.4 การสังเคราะห์ isoleucylvalylprolylproline (107d).....	60
4.3.5 การสังเคราะห์ isoleucylvalylprolyltryptophane (107e).....	63
4.3.6 การสังเคราะห์ isoleucylvalylprolylphenylalanine (107f).....	66
4.3.7 การสังเคราะห์ isoleucylvalylleucylisoleucine (107g).....	69
4.3.8 การสังเคราะห์ isoleucylvalylleucylvaline (107h).....	72
4.3.9 การสังเคราะห์ isoleucylvalylleucylproline (107i).....	75
4.3.10 การสังเคราะห์ isoleucylvalylleucylleucine (107j).....	78
4.3.11 การสังเคราะห์ isoleucylvalylleucyltryptophane (107k).....	81
4.4 ปฏิกริยาการสังเคราะห์ไฮคลิดเทอะระเปปไทด์ด้วยเทคนิคสารละลาย.....	84

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.4.1 การสังเคราะห์ cyclo(isoleucylvalylprolylisoleucine) (108a).....	85
4.4.2 การสังเคราะห์ cyclo(isoleucylvalylprolylleucine) (108b).....	88
4.4.3 การสังเคราะห์ cyclo(isoleucylvalylprolylvaline) (108c).....	91
4.4.4 การสังเคราะห์ cyclo(isoleucylvalylprolylproline) (108d).....	94
4.5 ผลการทดสอบ Antimicrobial	97
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	100
บรรณานุกรม.....	104
ประวัติผู้เขียน.....	107

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงตัวเชื่อมโยงที่ไม่เสถียรต่อกรดและสภาวะในการตัด.....	7
2.2 แสดงตัวเชื่อมโยงที่ไม่เสถียรต่อนิวคลีโอไฟล์และรีเอเจนต์ในการตัด.....	8
2.3 แสดงตัวเชื่อมโยงที่ไม่เสถียรต่อแสง.....	8
2.4 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสำหรับ D,L ไซคลิกเปปไทด์ ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (MIC).....	16
2.5 แสดงผลการวิเคราะห์สำหรับอนุกรมของไซคลิกเปปไทด์ c(Gly-Phe-X ₃ -X ₂ -Hyp-X ₁).....	25
4.1 แสดงข้อมูล NMR ของสาร (91) และ (96).....	40
4.2 แสดงข้อมูล NMR ของสาร (92) และ (97).....	42
4.3 แสดงข้อมูล NMR ของสาร (93) และ (98).....	44
4.4 แสดงข้อมูล NMR ของสาร (94) และ (99).....	46
4.5 แสดงข้อมูล NMR ของสาร (95) และ (100).....	48
4.6 แสดงข้อมูล NMR ของ isoleucylvalylprolylisoleucine (107a).....	53
4.7 แสดงข้อมูล NMR ของ isoleucylvalylprolylleucine (107b).....	56
4.8 แสดงข้อมูล NMR ของ isoleucylvalylprolylvaline (107c).....	59
4.9 แสดงข้อมูล NMR ของ isoleucylvalylprolylproline (107d).....	62
4.10 แสดงข้อมูล NMR ของ isoleucylvalylprolyltryptophane (107e).....	65
4.11 แสดงข้อมูล NMR ของ isoleucylvalylprolylphenylalanine (107f).....	68
4.12 แสดงข้อมูล NMR ของ isoleucylvalylleucylisoleucine (107g).....	71
4.13 แสดงข้อมูล NMR ของ isoleucylvalylleucylvaline (107h).....	74
4.14 แสดงข้อมูล NMR ของ isoleucylvalylleucylproline (107i).....	77
4.15 แสดงข้อมูล NMR ของ isoleucylvalylleucylleucine (107j).....	80
4.16 แสดงข้อมูล NMR ของ isoleucylvalylleucyltryptophane (107k).....	83
4.17 แสดงข้อมูล NMR ของ cyclo(isoleucylvalylprolylisoleucine) (108a).....	87
4.18 แสดงข้อมูล NMR ของ cyclo(isoleucylvalylprolylleucine) (108b).....	90
4.19 แสดงข้อมูล NMR ของ cyclo(isoleucylvalylprolylvaline) (108c).....	93
4.20 แสดงข้อมูล NMR ของ cyclo(isoleucylvalylprolylproline) (108d).....	96
4.21 แสดงผลการทดสอบ Antimicrobial ของสาร 107a – f.....	97
4.22 แสดงผลการทดสอบ Antimicrobial ของสาร 107g – k.....	98

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.23 แสดงผลการทดสอบ Antimicrobial ของสาร 108a – d	99

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	แผนภาพแสดงตัวกำจุนที่เชื่อมอยู่กับตัวเชื่อมโยงกับ scaffold บนพื้นผิวของตัวกำจุน.....4
2.2	แผนภาพแสดงองค์ประกอบของ Merrifield resin ที่มี 1 – 2 % crosslinked polystyrene ภายใต้การขยายที่เพิ่มมากขึ้น (a) ภาพขยายต่ำ (b) ภาพขยายปานกลาง ที่แสดงคุณลักษณะที่คล้ายฟองน้ำ และ (c) ภาพขยายสูงสุดแสดงการล้อมรอบ (solvation) ของตัวสนับสนุนโดยโมเลกุลของไดคลอโรมีเทน.....5
2.3	แผนผังแสดงการสังเคราะห์เปปไทด์บนวัฏภาคของแข็ง11
2.4	แผนผังแสดงการสังเคราะห์เปปไทด์บนวัฏภาคของแข็งที่มีหมู่ป้องกัน Boc/benzyl.....12
2.5	แผนผังแสดงการสังเคราะห์เปปไทด์บนวัฏภาคของแข็งที่มีหมู่ป้องกัน Fmoc/tBu.....12
2.6	ตัวอย่างของหมู่ป้องกันสายโซ่ด้านข้างที่เลือกจำเพาะในการกำจัดสำหรับ Fmoc/tBu.....13
2.7	หมู่ป้องกันอะมิโน 6 – nitroveratryloxycarbonyl (Nvoc) ที่ไม่เสถียรต่อแสง การกำจัดเกิดขึ้นโดยใช้ความยาวคลื่น UV ($\lambda = 350$ นาโนเมตร).....13
4.1	แสดงสเปกตรัม FT – IR ของ aldehyde resin (89).....37
4.2	แสดงสเปกตรัม FT – IR ของ Wang resin (90).....38
4.3	แสดงสเปกตรัม ^1H NMR ของสาร Fmoc – Pro – O(<i>p</i> -NO ₂ Ph) (96).....39
4.4	แสดงสเปกตรัม ^{13}C NMR ของสาร Fmoc – Pro – O(<i>p</i> -NO ₂ Ph) (96).....39
4.5	แสดงสเปกตรัม ^1H NMR ของสาร Fmoc – Ile – O(<i>p</i> -NO ₂ Ph) (97).....41
4.6	แสดงสเปกตรัม ^{13}C NMR ของสาร Fmoc – Ile – O(<i>p</i> -NO ₂ Ph) (97).....42
4.7	แสดงสเปกตรัม ^1H NMR ของสาร Fmoc – Val – O(<i>p</i> -NO ₂ Ph) (98).....43
4.8	แสดงสเปกตรัม ^{13}C NMR ของสาร Fmoc – Val – O(<i>p</i> -NO ₂ Ph) (98).....43
4.9	แสดงสเปกตรัม ^1H NMR ของสาร Fmoc – Phe – O(<i>p</i> -NO ₂ Ph) (99).....45
4.10	แสดงสเปกตรัม ^{13}C NMR ของสาร Fmoc – Phe – O(<i>p</i> -NO ₂ Ph) (99).....45
4.11	แสดงสเปกตรัม ^1H NMR ของสาร Fmoc – Leu – O(<i>p</i> -NO ₂ Ph) (100).....47
4.12	แสดงสเปกตรัม ^{13}C NMR ของสาร Fmoc – Leu – O(<i>p</i> -NO ₂ Ph) (100).....47
4.13	แสดงสเปกตรัม ^1H NMR ของสาร isoleucylvalylprolylisoleucine (107a).....51
4.14	แสดงสเปกตรัม ^{13}C NMR ของสาร isoleucylvalylprolylisoleucine (107a).....51
4.15	แสดงสเปกตรัม FT – IR ของ isoleucylvalylprolylisoleucine (107a).....52
4.16	แสดงสเปกตรัม ^1H NMR ของสาร isoleucylvalylprolylleucine (107b).....54
4.17	แสดงสเปกตรัม ^{13}C NMR ของสาร isoleucylvalylprolylleucine (107b).....54

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.18 แสดงสเปกตรัม FT – IR ของ isoleucylvalylprolylleucine (107b).....	55
4.19 แสดงสเปกตรัม ¹ H NMR ของสาร isoleucylvalylprolylvaline (107c).....	57
4.20 แสดงสเปกตรัม ¹³ C NMR ของสาร isoleucylvalylprolylvaline (107c).....	57
4.21 แสดงสเปกตรัม FT – IR ของ isoleucylvalylprolylvaline (107c).....	58
4.22 แสดงสเปกตรัม ¹ H NMR ของสาร isoleucylvalylprolylproline (107d).....	60
4.23 แสดงสเปกตรัม ¹³ C NMR ของสาร isoleucylvalylprolylproline (107d).....	60
4.24 แสดงสเปกตรัม FT – IR ของ isoleucylvalylprolylproline (107d).....	61
4.25 แสดงสเปกตรัม ¹ H NMR ของสาร isoleucylvalylprolyltryptophane (107e).....	63
4.26 แสดงสเปกตรัม ¹³ C NMR ของสาร isoleucylvalylprolyltryptophane (107e).....	63
4.27 แสดงสเปกตรัม FT – IR ของ isoleucylvalylprolyltryptophane (107e).....	64
4.28 แสดงสเปกตรัม ¹ H NMR ของสาร isoleucylvalylprolylphenylalanine (107f).....	66
4.29 แสดงสเปกตรัม ¹³ C NMR ของสาร isoleucylvalylprolylphenylalanine (107f).....	66
4.30 แสดงสเปกตรัม FT – IR ของ isoleucylvalylprolylphenylalanine (107f).....	67
4.31 แสดงสเปกตรัม ¹ H NMR ของสาร isoleucylvalylleucylisoleucine (107g).....	69
4.32 แสดงสเปกตรัม ¹³ C NMR ของสาร isoleucylvalylleucylisoleucine (107g).....	69
4.33 แสดงสเปกตรัม FT – IR ของ isoleucylvalylleucylisoleucine (107g).....	70
4.34 แสดงสเปกตรัม ¹ H NMR ของสาร isoleucylvalylleucylvaline (107h).....	72
4.35 แสดงสเปกตรัม ¹³ C NMR ของสาร isoleucylvalylleucylvaline (107h).....	72
4.36 แสดงสเปกตรัม FT – IR ของ isoleucylvalylleucylvaline (107h).....	73
4.37 แสดงสเปกตรัม ¹ H NMR ของสาร isoleucylvalylleucylproline (107i).....	75
4.38 แสดงสเปกตรัม ¹³ C NMR ของสาร isoleucylvalylleucylproline (107i).....	75
4.39 แสดงสเปกตรัม FT – IR ของ isoleucylvalylleucylproline (107i).....	76
4.40 แสดงสเปกตรัม ¹ H NMR ของสาร isoleucylvalylleucylleucine (107j).....	78
4.41 แสดงสเปกตรัม ¹³ C NMR ของสาร isoleucylvalylleucylleucine (107j).....	78
4.42 แสดงสเปกตรัม FT – IR ของ isoleucylvalylleucylleucine (107j).....	79
4.43 แสดงสเปกตรัม ¹ H NMR ของสาร isoleucylvalylleucyltryptophane (107k).....	81
4.44 แสดงสเปกตรัม ¹³ C NMR ของสาร isoleucylvalylleucyltryptophane (107k).....	81
4.45 แสดงสเปกตรัม FT – IR ของ isoleucylvalylleucyltryptophane (107k).....	82

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.46 แสดงสเปกตรัม ^1H NMR ของสาร cyclo(isoleucylvalylprolylisoleucine) (108a).....	85
4.47 แสดงสเปกตรัม ^{13}C NMR ของสาร cyclo(isoleucylvalylprolylisoleucine) (108a).....	85
4.48 แสดงสเปกตรัม FT – IR ของ cyclo(isoleucylvalylprolylisoleucine) (108a).....	86
4.49 แสดงสเปกตรัม ^1H NMR ของสาร cyclo(isoleucylvalylprolylleucine) (108b).....	88
4.50 แสดงสเปกตรัม ^{13}C NMR ของสาร cyclo(isoleucylvalylprolylleucine) (108b).....	88
4.51 แสดงสเปกตรัม FT – IR ของ cyclo(isoleucylvalylprolylleucine) (108b).....	89
4.52 แสดงสเปกตรัม ^1H NMR ของสาร cyclo(isoleucylvalylprolylvaline) (108c).....	91
4.53 แสดงสเปกตรัม ^{13}C NMR ของสาร cyclo(isoleucylvalylprolylvaline) (108c).....	91
4.54 แสดงสเปกตรัม FT – IR ของ cyclo(isoleucylvalylprolylvaline) (108c).....	92
4.55 แสดงสเปกตรัม ^1H NMR ของสาร cyclo(isoleucylvalylprolylproline) (108d).....	94
4.56 แสดงสเปกตรัม ^{13}C NMR ของสาร cyclo(isoleucylvalylprolylproline) (108d).....	94
4.57 แสดงสเปกตรัม FT – IR ของ cyclo(isoleucylvalylprolylproline) (108d).....	95

รายการคำย่อ

AA	amino acid
AcOH	acetic acid
Arg	arginine
Asn	asparagines
Asp	aspartic acid
Boc	<i>tert</i> - butyloxycarbonyl
DCC	<i>N,N</i> - dicyclohexylcarbodiimide
DCM	dichloromethane
DIC	<i>N,N</i> - diisopropylcarbodiimide
DIEA	<i>N,N</i> - diisopropylethylamine
DMAP	4 - <i>N,N</i> - dimethylamino pyridine
DMF	<i>N,N</i> - dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
Et	ethyl
EtOAc	ethyl acetate
Fmoc	9 - fluorenylmethyloxycarbonyl
Gln	glutamine
Gly	glycine
Glu	glutamic acid
HBTU	2 - (1 <i>H</i> - benzotriazole - 1 - <i>y</i>) - 1, 1, 3, 3 - tetramethyl - uranium hexafluorophosphate
HMPA	hydroxymethylphenoxyacetic acid
HOAt	1 - hydroxyl - 7 - azabenzotriazole
HOBt	1 - hydroxybenzotriazole
Ile	isoleucine
Leu	leucine
MeOH	methanol
OAll	allyloxy
OBu ^t	<i>tert</i> - butyl ester
PGs	protecting group

Ph	phenyl
Phe	phenylalanine
ppm	part per million
Pro	proline
PyBroP	bromo – tris – pyrrolidino – phosphonium hexafluorophosphate
Ser	serine
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> - butyl
TFA	trifluoroacetic acid
THF	tetrahydrofuran
TLC	thin – layer chromatography
TMG	<i>N,N,N',N'</i> - tetramethylguanidine
TMS – OTf	trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate
Trp	tryptophane
Val	valine

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

การสังเคราะห์ทางเคมีอินทรีย์บนวัสดุภาคของแข็งเป็นเทคนิคที่พัฒนาเร็วมากในสาขาวิทยาศาสตร์และเป็นเทคนิคที่สำคัญสำหรับการค้นพบตัวยาชนิดใหม่ๆ[1] แต่เดิมในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยเทคนิคสารละลายนั้นกระบวนการสังเคราะห์มักมีหลาย ๆ ขั้นตอน ทำให้ต้องใช้เวลาในกระบวนการสังเคราะห์นาน และแต่ละขั้นตอนในการสังเคราะห์จำเป็นที่จะต้องมีการแยกสารอินเตอร์มีเดียตและสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ทุกครั้งก่อนที่จะนำไปทำปฏิกิริยาต่อ ซึ่งเท่ากับว่าเป็นการเพิ่มเวลาในกระบวนการสังเคราะห์ให้มากขึ้น และมักไม่เป็นที่น่าพอใจมากนักถ้ามองในด้านเศรษฐศาสตร์ ปัญหาเหล่านี้ในวันจะมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเมื่อต้องการที่จะทำการสังเคราะห์สารหลาย ๆ ตัวในเวลาพร้อม ๆ กัน ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาการสังเคราะห์ด้วยเทคนิควัสดุภาคของแข็งขึ้นมา เพื่อทดแทนวิธีการสังเคราะห์ด้วยเทคนิคสารละลาย การสังเคราะห์ด้วยเทคนิควัสดุภาคของแข็งนั้นสามารถแยกสารอินเตอร์มีเดียตและสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ได้ง่ายขึ้น โดยอาศัยการล้างด้วยตัวทำละลายและการกรอง ในระหว่างที่ทำการสังเคราะห์หลาย ๆ ครั้ง และสามารถทำปฏิกิริยาต่อได้ทันที ส่วนรีเอเจนต์ที่มากเกินไปเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาเกิดได้สมบูรณ์ยิ่งขึ้นนั้นก็สามารถถูกกำจัดออกได้ด้วยการล้างและการกรองเช่นกัน ขณะที่สารผลิตภัณฑ์ยังคงสร้างพันธะโควาเลนต์อยู่กับตัวค้ำจุน หลังจากทำการสังเคราะห์เสร็จสมบูรณ์สารประกอบเป้าหมายจะถูกปลดปล่อยให้เป็นอิสระจากตัวค้ำจุนได้โดยการใช้รีเอเจนต์ในการตัดและแยกออกมาโดยการกรอง ซึ่งจะได้สารผลิตภัณฑ์ที่บริสุทธิ์โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการแยกสารให้บริสุทธิ์อีก และปริมาณสารผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้จากเทคนิควัสดุภาคของแข็งจะได้ปริมาณสารที่มากกว่าถ้าเทียบในปริมาณสารตั้งต้นที่เท่ากัน ซึ่งกระบวนการการสังเคราะห์ด้วยเทคนิควัสดุภาคของแข็งเป็นเทคนิคที่ง่าย รวดเร็ว และสังเคราะห์สารได้ปริมาณที่มากในเวลาพร้อม ๆ กัน จึงเหมาะสำหรับที่จะใช้สังเคราะห์สารที่นำมาทดสอบฤทธิ์ทางยา[2] จากการศึกษาพบว่าการคือยาของเชื้อเพิ่มมากขึ้นและเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ดังนั้นจึงมีความจำเป็นเร่งด่วนในการเสาะหาตัวใหม่ ๆ เพื่อรับมือกับเชื้อที่คือต่อยาที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันได้ผลดี แต่ในอนาคตอาจใช้ไม่ได้ผล ความพยายามของนักวิจัยที่ต้องการแก้ปัญหาเหล่านี้จึงได้มีการนำมาทดสอบในหลาย ๆ วิธี และหนึ่งในวิธีนั้นก็คือ การพัฒนายาปฏิชีวนะขึ้นมาโดยอาศัยความรู้พื้นฐานของสารประกอบพวกเปปไทด์ เพราะว่าสัตว์มีกระดูกสันหลังจำนวนมาก อาทิเช่น มนุษย์ที่สามารถสร้างสารเปปไทด์ขึ้นมาเพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เข้าสู่ร่างกาย ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งที่รวดเร็วและมากพอที่จะทำให้เชื้อแบคทีเรียตายได้

ทำให้เปปไทด์เป็นสารเป้าหมายที่น่าสนใจต่อการนำมาบำบัดโรค และจากงานวิจัยใหม่ ๆ ยิ่งทำให้กลุ่มสารของเปปไทด์เป็นที่น่าสนใจมากยิ่งขึ้น[3] สารธรรมชาติเปปไทด์มากกว่า 400 ชนิด ที่มีการแยกและหาคุณลักษณะแล้วพบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ ทั้งที่ได้จากสิ่งมีชีวิตในทะเลและสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก[4] จากคุณสมบัติที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบของเปปไทด์สามารถพิจารณาโครงสร้างทางเคมีได้เป็น 2 กลุ่มหลัก คือ มีโครงสร้างเป็นโซ่ตรงและเป็นไซคลิก เชื่อว่าหน้าที่หลักของเปปไทด์ทั้งสองชนิด เกี่ยวข้องกับการเข้าไปทำลายเนื้อเยื่อของแบคทีเรีย แล้วแทรกซึมเข้าไปออกฤทธิ์ยังตัวเซลล์ของแบคทีเรีย จึงทำให้เชื้อแบคทีเรียตายได้ โดยทั่วไปไซคลิกเปปไทด์จะเสถียรต่อการทดสอบมากกว่าพวกที่เป็นโซ่ตรง ดังนั้นไซคลิกเปปไทด์จึงถูกคาดหวังว่าจะมีคุณสมบัติทางยามากกว่า[5]

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อเป็นแนวทางการสังเคราะห์ในการเตรียมเทระเปปไทด์โดยมี Ile – Val เป็นโครงสร้างหลักบนวิฎภาคของแข็ง
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเทระเปปไทด์ที่เตรียมได้

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1. สังเคราะห์เทระเปปไทด์โดยมี Ile – Val เป็นโครงสร้างหลักบนวิฎภาคของแข็ง
2. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเทระเปปไทด์ที่เตรียมได้

1.4 ขั้นตอนการวิจัยและดำเนินงาน

ขั้นตอนการวิจัยแบ่งออกเป็น 6 ขั้นตอน

1. การเชื่อมต่อกรดอะมิโนตัวแรกเข้ากับวิฎภาคของแข็ง โดยกรดอะมิโนตัวแรกจะถูกเชื่อมต่อเข้ากับหมู่ที่เรียกว่า ตัวเชื่อมโยง (linker) บนเรซิน
2. ขั้นตอนการกำจัดหมู่ป้องกันของปลายไนโตรเจน (N – terminal deprotection) เพื่อให้เหลือหมู่อะมิโนอิสระสำหรับทำปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอกซิลิกของกรดอะมิโนตัวถัดไป
3. ทำการกระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลิกของกรดอะมิโน และทำปฏิกิริยาควบกับกรดอะมิโนตัวถัดไป
4. กำจัดหมู่ป้องกันครั้งสุดท้าย และทำการแยกสารผลิตภัณฑ์ออกจากวิฎภาคของแข็ง
5. หาสูตรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้ โดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี
6. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเทระเปปไทด์ที่สังเคราะห์ได้

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถสังเคราะห์เทอร์เพนไฮโดรที่มี Ile – Val เป็นโครงสร้างหลักโดยเทคนิควิศวกรรมชีวภาพของแข็ง ให้ได้ปริมาณสารผลิตภัณฑ์ที่สูงและบริสุทธิ์
2. สามารถลดเวลาที่ใช้ในการสังเคราะห์ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคสารละลาย
3. สามารถนำเทอร์เพนไฮโดรที่สังเคราะห์โดยเทคนิควิศวกรรมชีวภาพของแข็งมาทำปฏิกิริยาต่อด้วยเทคนิคสารละลายได้ เพื่อเตรียมเป็นไซคลิกเทอร์เพนไฮโดร
4. เทอร์เพนไฮโดรและไซคลิกเทอร์เพนไฮโดรที่สังเคราะห์ได้นั้นอาจมีฤทธิ์ทางชีวภาพ

บทที่ 2

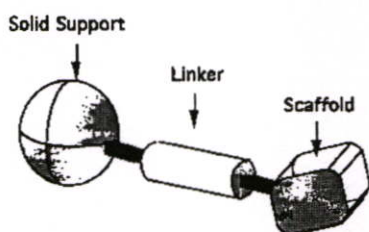
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 การสังเคราะห์เปปไทด์และไซคลิกเปปไทด์

วิธีการในการสังเคราะห์เปปไทด์และไซคลิกเปปไทด์มีอยู่ด้วยกันหลายวิธี ในงานวิจัยนี้จะศึกษาการสังเคราะห์เปปไทด์และไซคลิกเปปไทด์โดยเทคนิควิทยาของแข็ง ซึ่งมีวิธีการดังนี้

2.1.1 เทคนิควิทยาของแข็ง (Solid Phase)[6]

เทคโนโลยีของวิทยาของแข็งที่นำมาใช้สามารถแตกออกเป็น 3 ส่วนประกอบหลัก (รูปที่ 2.1) ดังนี้ ส่วนประกอบแรกเป็นตัวค้ำจุน (solid support) ซึ่งตัวค้ำจุนควรมีความเสถียรต่อตัวทำละลายและรีเอเจนต์ที่ใช้ ส่วนประกอบที่สอง คือ ตัวเชื่อมโยง (linker) ซึ่งเชื่อมอยู่ระหว่างตัวค้ำจุนกับ scaffold หรือโมเลกุลเป้าหมาย ตัวเชื่อมโยงควรมีความสามารถตัดออกได้ง่ายภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง แต่เสถียรต่อสภาวะของปฏิกิริยาที่ทำการทดลองเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ส่วนประกอบที่สาม คือ scaffold หรือโมเลกุลเป้าหมาย ซึ่งควรจะถูกสังเคราะห์ได้ในปริมาณผลิตภัณฑ์ที่สูงและบริสุทธิ์



รูปที่ 2.1 แผนภาพแสดงตัวค้ำจุนที่เชื่อมอยู่กับตัวเชื่อมโยงกับ scaffold บนพื้นผิวของตัวค้ำจุน

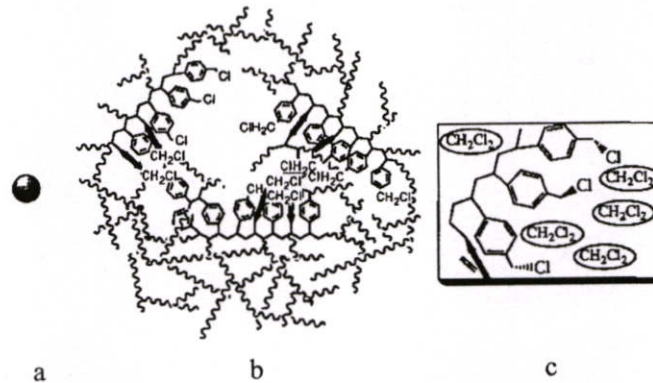
จากแผนภาพจะเห็นว่า การสังเคราะห์สารโดยเทคนิควิทยาของแข็งประกอบด้วย 2 ส่วนที่สำคัญในการเกิดปฏิกิริยา คือ

1. ตัวค้ำจุน (Support)
2. ตัวเชื่อมโยง (Linker)

2.1.1.1 ลักษณะของตัวค้ำจุน

ขอบเขตของการสังเคราะห์เปปไทด์เคยเป็นส่วนหนึ่งของการพัฒนาที่ได้มีการพัฒนาตัวค้ำจุนที่เป็นของแข็งใหม่ ๆ ขึ้นมาสำหรับใช้ในการสังเคราะห์ทางเคมีอินทรีย์ R.B. Merrifield และคณะ[7] เป็นผู้บุกเบิกขึ้นมาใช้ในการสังเคราะห์ โดยใช้ 1- 2 % พอลิสไตรีนเป็นสารมาตรฐาน

สำหรับการสังเคราะห์เคมีอินทรีย์บนผิวของแข็ง การเชื่อมโยงกันอย่างอ่อน ๆ ของพอลิสไตรีนสามารถมองได้ในรูปคล้ายฟองน้ำ โดยหมู่ที่ทำปฏิกิริยาจะอยู่ภายในโพรง (รูปที่ 2.2) ตัวทำละลาย เช่น ไคลอโรฟอร์มเป็นตัวที่ทำให้ตัวค้ำจุนขยายตัว ในขณะที่ตัวทำละลาย เช่น เมทานอลเป็นตัวที่ทำให้ตัวค้ำจุนหดตัว



รูปที่ 2.2 แผนภาพแสดงองค์ประกอบของ Merrifield resin ที่มี 1 – 2 % crosslinked polystyrene ภายใต้การขยายที่เพิ่มมากขึ้น (a) ภาพขยายต่ำ (b) ภาพขยายปานกลางที่แสดงคุณลักษณะที่คล้ายฟองน้ำ และ (c) ภาพขยายสูงสุดแสดงการล้อมรอบ (solvation) ของตัวสนับสนุนโดยโมเลกุลของไคลอโรฟอร์ม

คุณสมบัติทางกายภาพของตัวค้ำจุน [2]

1 การบวมตัว (Swelling)

การบวมตัว (swelling) คือ การขยายตัวของเม็ดเรซิน ซึ่งเกิดขึ้นโดยการทำตัวทำละลายแทรกซึมผ่านเข้าไปอยู่ภายในโพรงของเม็ดเรซิน แนวโน้มการบวมตัวของเรซินในตัวทำละลายที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับความมีขั้วของตัวทำละลายและอันดับการเชื่อมโยงของพอลิเมอร์เป็นหลัก

2 การเชื่อมโยง (Crosslinking)

ขึ้นอยู่กับอันดับการเชื่อมโยงของตัวค้ำจุน ว่ามีลักษณะเป็นรูพรุนขนาดเล็กคล้ายเจล (การเชื่อมโยงที่ต่ำ) หรือ รูพรุนขนาดใหญ่ (การเชื่อมโยงสูง, > 5%) จำนวนและการเข้าถึงของด้านที่ทำปฏิกิริยามักถูกนำมาพิจารณามากกว่าประเภทของรูปแบบ ซึ่งพอลิเมอร์ที่มีลักษณะคล้ายเจลจะถูกล้อมรอบด้วยตัวทำละลายได้ดีกว่า กล่าวคือ จะมีการเคลื่อนที่อย่างอิสระของสายโซ่พอลิเมอร์ ซึ่งถ้ามองกลับไปที่มีสถานะคล้ายกับเทคนิคสารละลายในกรณีที่เราเรซินนั้นถูกล้อมรอบไปด้วยสารตั้งต้น

3 การแพร่ (Diffusion)

ทำให้มีการแลกเปลี่ยนกันระหว่างรีเอเจนต์ที่มีมวลโมเลกุลต่ำกับอนุภาคภายในพอลิเมอร์และสารละลายรีเอเจนต์ที่ล้อมรอบตัวค้ำจุน อัตราปฏิกิริยาของวฏภาคของแข็งที่เกิดขึ้นโดยทั่วไปไม่ขึ้นกับการแพร่ จะขึ้นอยู่กับขนาดอนุภาค ความมีขั้วของรีเอเจนต์ ขนาดของตัวค้ำจุน และตัวทำละลาย

4 อิทธิพลของความมีขั้ว (Polarity Effect)

เมื่อตัวค้ำจุนถูกแช่อยู่ในตัวทำละลายที่เหมาะสมควรจะมีขั้ว ขอมให้รีเอเจนต์แทรกซึมเข้าไปได้และเกิดปฏิกิริยากับโครงสร้างพอลิเมอร์ คือถ้าคุณสมบัติทางเคมีเหล่านี้ไม่เข้ากันกับพอลิเมอร์พบว่าภายในเม็ครีเอเจนต์จะมีความเข้มข้นต่ำกว่า ดังนั้นการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมหรือการรวมกันของตัวทำละลายจึงเป็นสิ่งที่สำคัญที่สุด

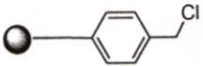
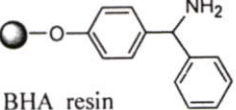
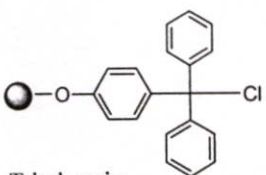
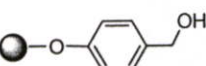
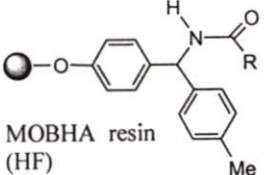
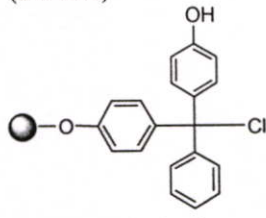
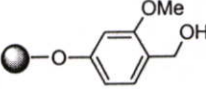
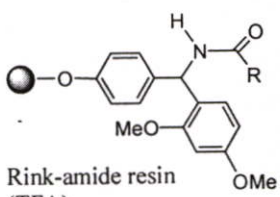
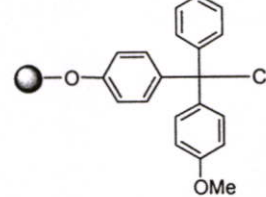
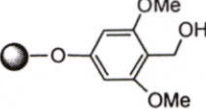
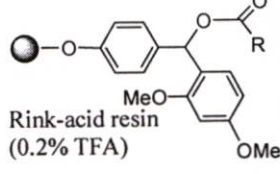
2.1.1.2 ตัวเชื่อมโยง (linker)

ในบางกรณีเรซินและตัวเชื่อมโยงก็ถูกพิจารณาให้เป็นหมู่ป้องกันหนึ่งของหมู่ฟังก์ชันของผลิตภัณฑ์ บทบาทของตัวเชื่อมโยงมักมีอิทธิพลน้อยมากต่อเรซินในกระบวนการสังเคราะห์หรือการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบที่สังเคราะห์ได้ในภายหลัง ตัวเชื่อมโยงควรมีคุณสมบัติทางเคมีที่เสถียรตลอดกระบวนการสังเคราะห์ และสามารถที่จะเลือกจำเพาะในการตัดเพื่อปลดปล่อยสารประกอบจากเรซินในช่วงเวลาต่าง ๆ ของการสังเคราะห์ ซึ่งในการตัดสารประกอบออกจากเรซินนั้นสามารถกระทำได้ในหลาย ๆ สภาวะ ดังนี้

การตัดด้วยกรด

โดยส่วนมากการพิจารณาตัวเชื่อมโยงที่ไม่เสถียรต่อกรดจะแยกตามความสามารถต่อเสถียรภาพของ benzylic carbocations ที่ถูกสร้างขึ้นระหว่างปฏิกิริยาที่มีการตัด โดยทั่วไปความเสถียรจะมีผลต่อการตัดมากกว่า และให้ผลสเปกตรัมที่กว้างของสภาวะกรดซึ่งสามารถนำมาใช้ได้ การเลือกตัวเชื่อมโยงจะขึ้นอยู่กับความเสถียรทางเคมีและความต้องการเพื่อให้ได้มาซึ่งโมเลกุลเป้าหมาย โดยตัวเชื่อมโยงที่ต้องใช้สภาวะในการตัดที่รุนแรงมักมีเสถียรภาพในการเชื่อมกันเป็นอย่างมากของผลิตภัณฑ์ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นกับพอลิเมอร์ ดังนั้นการปลดปล่อยสารผลิตภัณฑ์ออกจากตัวเชื่อมโยงที่เร็วเกินไปจึงเกิดขึ้นได้น้อยมาก และสารประกอบที่สายโซ่ด้านข้างถูกป้องกันด้วยหมู่ที่ไม่เสถียรต่อสภาวะกรดที่รุนแรงก็จะพบในลักษณะเช่นเดียวกัน ซึ่งเป็นอีกวิธีหนึ่งที่น่ามาใช้ในการสังเคราะห์ร่วมกับตัวเชื่อมโยงที่ไม่เสถียรในสภาวะที่เป็นกรดอ่อน

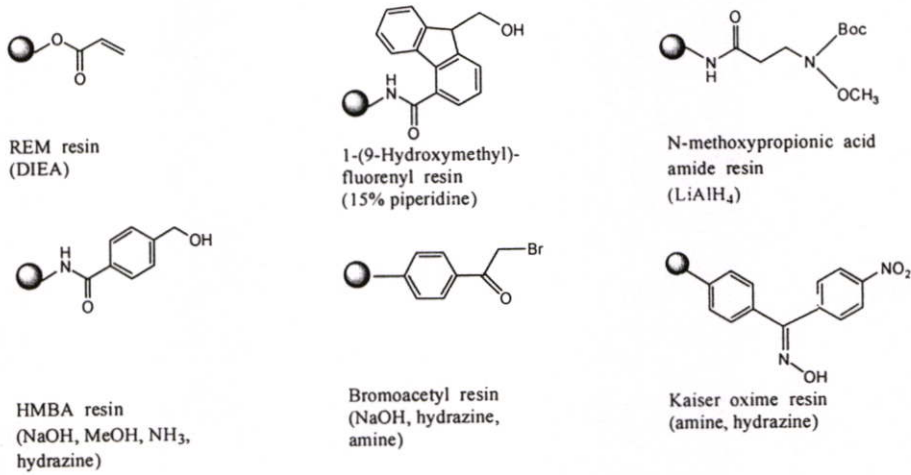
ตารางที่ 2.1 แสดงตัวเชื่อมโยงที่ไม่เสถียรต่อกรดและสภาวะในการตัด

Benzyl anchors	Benzhydryl anchors	Trityl anchors
 <p>Merrifield resin (HF)</p>	 <p>BHA resin (TFMSA)</p>	 <p>Trityl resin (2% TFA)</p>
 <p>Wang resin (95% TFA)</p>	 <p>MOBHA resin (HF)</p>	 <p>4-Hydroxytrityl resin (1% TFA)</p>
 <p>SASRIN (1% TFA)</p>	 <p>Rink-amide resin (TFA)</p>	 <p>4-Methoxytrityl resin (1% TFA)</p>
 <p>HAL resin (0.1% TFA)</p>	 <p>Rink-acid resin (0.2% TFA)</p>	

การตัดด้วยนิวคลีโอไฟล์

ตัวเชื่อมโยงที่ไม่เสถียรต่อนิวคลีโอไฟล์ถูกนำมาใช้ในการสังเคราะห์ เนื่องจากตัวเชื่อมโยงเหล่านี้สามารถปลดปล่อยโมเลกุลเป้าหมายให้หลุดออกได้เร็วขึ้นไม่ว่าจะอยู่ในสภาวะกรดหรือเบส หรือทั้งกรด-เบส โดยที่สภาวะเหล่านี้จะไปมีผลต่อตัวเชื่อมโยงที่นำมาใช้ในการสังเคราะห์ ซึ่งกระบวนการนี้เป็นกระบวนการที่นิวคลีโอไฟล์เข้าไปแทนที่เพื่อใช้ในกระบวนการปลดปล่อยสารประกอบจากเรซิน

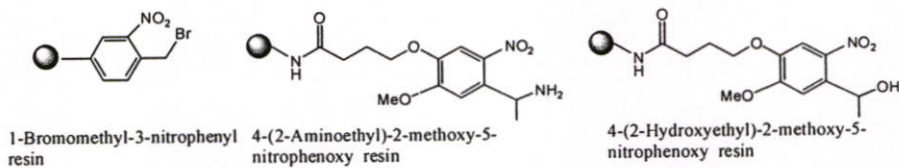
ตารางที่ 2.2 แสดงตัวเชื่อม โยงที่ไม่เสถียรต่อนิวคลีโอไฟล์และรีเอเจนต์ในการตัด



การตัดด้วยวิธีอื่น ๆ

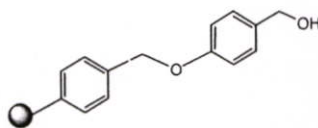
การตัดด้วยแสงเป็นการตัดตัวเชื่อม โยงที่ไม่เสถียรต่อแสง ซึ่งผลิตภัณฑ์จะถูกปลดปล่อยโดยการฉายแสงที่มีความยาวคลื่น 320 – 365 นาโนเมตร ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ดี โดยการตัดด้วยแสงนั้นสามารถกระทำได้ในสารละลาย ทำให้วิธีการตัดนี้เป็นอีกหนึ่งวิธีที่น่าสนใจที่จะนำมาใช้กับสารที่จะนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารประกอบพวกกรดคาร์บอกซิลิก คาร์บอกซาไมด์ เอมีน และไฮดรอกซี ที่เป็นหมู่ด้านปลายของสารประกอบสามารถถูกปลดปล่อยให้เป็นอิสระได้

ตารางที่ 2.3 แสดงตัวเชื่อม โยงที่ไม่เสถียรต่อแสง



ตัวเชื่อม โยงมีหลายชนิดแล้วแต่ละชนิดจะเหมาะสำหรับการสังเคราะห์สารประกอบประเภทต่าง ๆ กัน ดังนี้

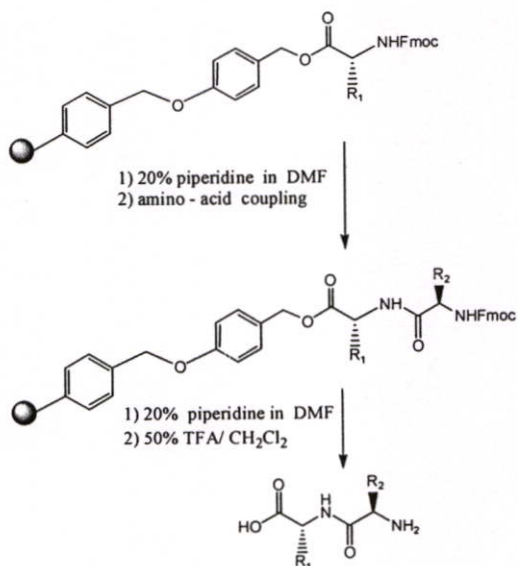
1. ตัวเชื่อมโยง *p*-Alkoxybenzyl Alcohol Resin (Wang resin)[8,9]



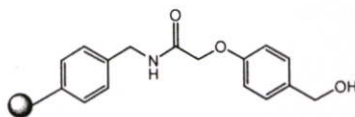
Wang resin

เป็นตัวเชื่อมโยงที่ถูกพัฒนาขึ้นมาโดย Wang และนำมาใช้ประโยชน์ในการสังเคราะห์พอลิเปปไทด์ต่าง ๆ เป็นจำนวนมาก ในการสังเคราะห์สามารถตัดเปปไทด์จากตัวค้ำจุนได้โดยใช้สถานะในการตัดเป็นกรดอ่อน Wang linker เป็นตัวค้ำจุนมาตรฐานสำหรับการสังเคราะห์เปปไทด์โดยใช้ Fmoc เป็นหมู่ป้องกัน ซึ่ง Fmoc เป็นหมู่ป้องกันที่ไม่เสถียรต่อเบส ฉะนั้นในการทำปฏิกิริยาจึงสามารถกระทำได้ง่าย เพราะขั้นตอนที่ทำการตัด Fmoc ออก สารผลิตภัณฑ์ยังคงจับอยู่กับตัวค้ำจุน เนื่องจากสถานะในการตัดตัวค้ำจุนกับสารผลิตภัณฑ์นั้นจะต้องใช้ในสถานะที่เป็นกรด ดังแสดงในแผนภาพที่ 1

แผนภาพที่ 1



2. ตัวเชื่อมโยง 4-Hydroxymethylphenoxyacetic acid (HMPA linker)[9]



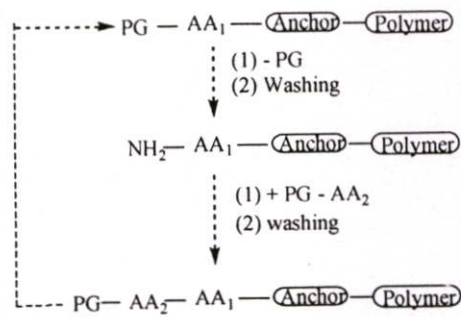
HMPA linker

HMPA linker เตรียมได้จากการทำปฏิกิริยากันของ aminomethyl resin กับ 4 - hydroxymethylphenoxyacetic acid ซึ่งเหมาะกับการสังเคราะห์เปปไทด์เช่นเดียวกับ Wang resin เพียงแต่ว่า HMPA linker จะมีการเพิ่มตัวกลาง (spacer) เข้าไปเพื่อช่วยให้สถานะในการตัดรุนแรงน้อยลงเมื่อเทียบกับ Wang resin สถานะที่ใช้ในการตัดจะใช้ 20% TFA ใน DCM เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งเป็นสถานะในการตัดที่มีประสิทธิภาพ ได้ผลผลิตกันซ์ถึง 96%

2.1.1.3 หลักการการสังเคราะห์ [10]

การสังเคราะห์เปปไทด์บนตัวค้ำจุนอาศัยพื้นฐานความสัมพันธ์ของหลักการง่าย ๆ และที่เกิดขึ้นโดยทั่วไปจากคาร์บอนด้านปลาย (C- terminal) ไปยังไนโตรเจนด้านปลาย (N - terminal) ขั้นตอนแรกในกระบวนการสังเคราะห์หมู่คาร์บอกซิลที่เป็นคาร์บอนด้านปลายของกรดอะมิโน จะถูกเชื่อมกับเรซินผ่านตัวเชื่อมโยง เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาข้างเคียง รวมทั้งหมู่ฟังก์ชันอื่นของสายโซ่ด้านข้างก็ต้องถูกป้องกันด้วย เพื่อเป็นการเพิ่มสายโซ่เปปไทด์จึงได้อธิบายวัฏจักรในการเกิดในรูปที่ 2.3 ซึ่งได้มีการต่อสายโซ่สำหรับกรดอะมิโนแต่ละตัว และเข้าไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์ สุดท้ายเปปไทด์จะถูกปลดปล่อยจากตัวค้ำจุนโดยการตัดของตัวเชื่อมโยง และหมู่ป้องกันสายโซ่ด้านข้าง (PGs)

สำหรับความสำเร็จของการสังเคราะห์เปปไทด์บนวัฏภาคของแข็งขึ้นอยู่กับปฏิกิริยาควบคุมและการกำจัดหมู่ป้องกัน ซึ่งเกี่ยวกับปริมาณและปฏิกิริยาข้างเคียงตามการคาดหมาย (สำหรับตัวอย่างอื่นเนื่องจากหมู่ป้องกันสายโซ่ด้านข้างที่ไม่เสถียร) อีกเหตุผลหนึ่ง คือ ทั้งการทำให้สารบริสุทธิ์และการหาคุณลักษณะของเรซินที่ล้อมรอบไปด้วยสารอินเตอร์มีเดียตซึ่งเป็นไปได้ด้วยวิธีการวิเคราะห์แบบดั้งเดิม เหตุผลอื่น ๆ คือ เปปไทด์ที่เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้มักมีคุณสมบัติทางเคมีที่สูงและคุณสมบัติทางกายภาพก็คล้ายกันกับผลิตภัณฑ์ที่ตัดออกมา ซึ่งการทำให้บริสุทธิ์และการหาคุณลักษณะต้องใช้ความสามารถอย่างสูง



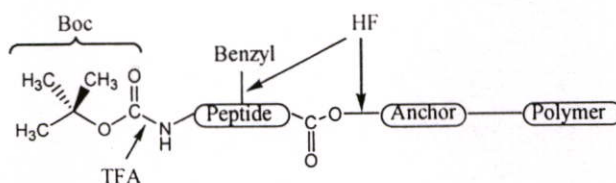
รูปที่ 2.3 แผนผังแสดงการสังเคราะห์เปปไทด์บนวิฎภาคของแข็ง

วิธีการเลือกหมู่ป้องกัน

เพื่อเป็นการรับประกันความก้าวหน้าของปฏิกิริยาคู่ควบ ทั้งหมู่อะมิโนที่ตำแหน่งแอลฟาและสายโซ่ด้านข้างที่ไวต่อปฏิกิริยาของหมู่ฟังก์ชันทั้ง 3 จึงจำเป็นที่จะต้องมีการป้องกันหมู่ฟังก์ชันเหล่านี้ให้อยู่ในรูปที่สามารถผันกลับไปเป็นหมู่ฟังก์ชันเดิม โดยมีการพิจารณาความเสถียรของหมู่ป้องกันสายโซ่ด้านข้างและหมู่ป้องกันไนโตรเจนด้านปลาย จึงจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาวิธีการกระทำในบางลักษณะเสียก่อน เนื่องจากการตัดหมู่ป้องกันไนโตรเจนด้านปลายจะเกิดขึ้นหลังจากการเกิดปฏิกิริยาคู่ควบแล้ว และในบางทีก็ไม่มีอิทธิพลต่อความเสถียรของหมู่ป้องกันสายโซ่ด้านข้าง สำหรับส่วนของหมู่ป้องกันสายโซ่ด้านข้างก็อาจจะไม่เสถียรเช่นกัน ดังนั้นการตัดจึงสามารถตัดได้ที่ขั้นตอนสุดท้ายของการสังเคราะห์โดยไม่มีการทำลายโครงสร้างของเปปไทด์

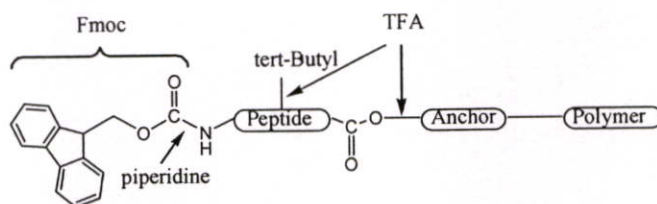
ในทางปฏิบัติ วิธีการเลือกหมู่ป้องกันทั้ง 2 ได้มีการพิสูจน์แล้วและนำมาใช้ในหมู่คนจำนวนมากของการสังเคราะห์เปปไทด์บนวิฎภาคของแข็ง ซึ่งหมายถึงวิธีการของ Boc/benzyl และ Fmoc/tBu

วิธีการของ Boc/benzyl (รูปที่ 2.4) ย้อนกลับไปยังยุคของ Merrifield และเคยเป็นตัวกีดขวางการเปลี่ยนกลับไปเป็นหมู่อะมิโนที่ตำแหน่งแอลฟาของกรดอะมิโน ซึ่งถูกนำมาใช้สำหรับการขยายโซ่ด้วยหมู่ป้องกัน *tert* - butyloxycarbonyl (Boc) ซึ่งหมู่ป้องกันนี้สามารถถูกกำจัดได้ด้วย 1 : 1 ของ dichloromethane (DCM)/trifluoroacetic acid (TFA) อีกกรณีหนึ่งสายโซ่ด้านข้างของหมู่ฟังก์ชันทั้ง 3 ของกรดอะมิโนถูกป้องกันด้วยหมู่ป้องกันประเภท benzyl ซึ่งเสถียรต่อสภาวะที่ใช้สำหรับการกำจัดหมู่ป้องกัน Boc การกำจัดหมู่ป้องกันของสายโซ่ด้านข้างต้องใช้กรดแก่ซึ่งอาจจะเป็น anhydrous hydrogen fluoride (HF) หรือ trifluoromethanesulfonic acid (TFMSA)



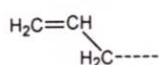
รูปที่ 2.4 แผนผังแสดงการสังเคราะห์เปปไทด์บนวัสดุภาคของแข็งที่มีหมู่ป้องกัน Boc/benzyl

วิธีการของ Fmoc/tBu มักถูกเรียกว่า “orthogonal” หรือหมู่ป้องกันที่ตั้งฉากกัน เพราะหมู่ป้องกันนี้จะไม่ขึ้นกับความไม่เสถียรต่อกรดของหมู่ฟังก์ชันเช่นเดียวกับ Boc/benzyl แต่จะขึ้นอยู่กับความไม่เสถียรต่อเบสของหมู่ป้องกันของอะมิโนที่ตำแหน่งแอลฟา หมู่ 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) และความไม่เสถียรต่อกรดของหมู่ป้องกันสายโซ่ด้านข้างและตัวเชื่อมโยง (รูปที่ 2.5) ซึ่งหมายความว่าหมู่ป้องกันสายโซ่ด้านข้างก็ยังคงอยู่บนโซ่เปปไทด์ โดยที่วิธีการของ Boc/benzyl นั้นเป็นไปได้ อันเนื่องมาจากคุณสมบัติที่ไม่ตั้งฉากกัน ทำให้วิธีการของ Fmoc/tBu เป็นวิธีการที่น่าสนใจมากกว่าและสำคัญมากกว่า เพราะในการกำจัดหมู่ป้องกันจะมีการแตกออกอย่างเป็นขั้นตอน และสามารถเลือกที่จะควมแน่นหรือปรับเปลี่ยนในสารละลายได้

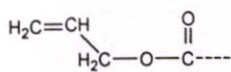


รูปที่ 2.5 แผนผังแสดงการสังเคราะห์เปปไทด์บนวัสดุภาคของแข็งที่มีหมู่ป้องกัน Fmoc/tBu

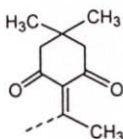
ยังมีหมู่ป้องกันและตัวเชื่อมโยงซึ่งมีคุณสมบัติที่ตั้งฉากกันในทั้ง 3 รูปแบบ อีกเป็นจำนวนมากนำมาใช้ในเคมีเปปไทด์ ในกรณีของ Fmoc/tBu ซึ่งหมายความว่าสามารถเชื่อมกับกรดหรือเบสได้ ตัวอย่างเช่น การยินยอมให้มีการเลือกปรับเปลี่ยนสายโซ่ด้านข้างของหมู่ฟังก์ชันที่ 3 ของกรดอะมิโน อาจจะเป็นหมู่ป้องกันกลุ่มอัลลิล (รูปที่ 2.6) ซึ่งมีแง่มุมที่น่าสนใจเนื่องจากหมู่ป้องกันกลุ่มนี้สามารถถูกตัดออกได้ในสภาวะที่เป็นกลางโดยใช้ Pd catalyst หมู่ป้องกัน 1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexyllidene)ethyl (Dde) เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ดีเยี่ยม เนื่องจากการจำเพาะในการตัดด้วย 2% hydrazine ใน DCM แต่จะเสถียรในสภาวะกรดโดยเฉพาะในสภาวะที่เป็นเบส (รูปที่ 2.6) acetamidomethyl (Acm) เป็นหมู่ป้องกันสายโซ่ด้านข้างของ cysteine ซึ่งสามารถถูกตัดออกได้ในสภาวะออกซิเดชัน เช่น การตัดออกด้วย I_2 (รูปที่ 2.6)



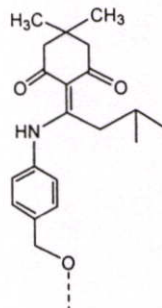
All = allyl



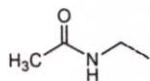
Aloc = allyloxycarbonyl



Dde = 1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexylidene)ethyl



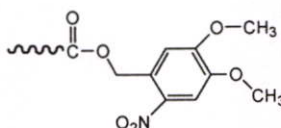
ODmab = 4-(N-[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexylidene)-3-methylbutyl]amino)benzyloxy



Acm = acetamidomethyl

รูปที่ 2.6 ตัวอย่างของหมู่ป้องกันสายโซ่ด้านข้างที่เลือกจำเพาะในการกำจัดสำหรับ Fmoc/tBu

นอกจากนี้ยังสามารถเลือกหมู่ป้องกันที่ไม่เสถียรต่อแสงได้ (รูปที่ 2.7) เนื่องจากสารในกลุ่มนี้สามารถถูกกำจัดได้โดยไม่มีอิทธิพลต่อหมู่ป้องกันอื่น ๆ

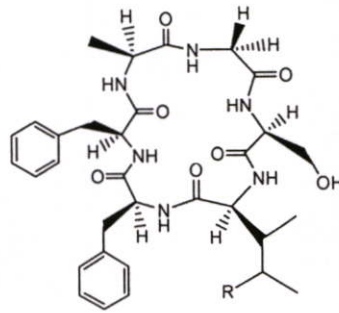


รูปที่ 2.7 หมู่ป้องกันอะมิโน 6-nitroveratryloxycarbonyl (Nvoc) ที่ไม่เสถียรต่อแสง การกำจัดเกิดขึ้นโดยใช้ความยาวคลื่น UV ($\lambda = 350$ นาโนเมตร)

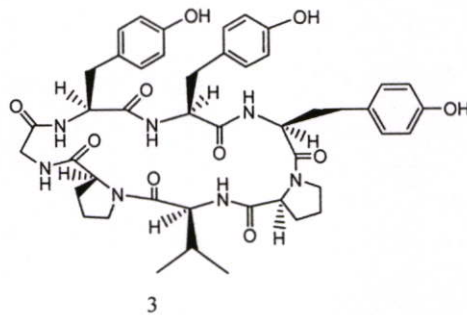
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Samonina G. และคณะ[11] พบว่าเปปไทด์ Glyproline ทั้งที่เป็นเส้นตรงประกอบด้วย PG, GP, PGP และไซคลิก PG แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่คล้าย ๆ กัน โดย glyproline จะไปมีผลต่อการยับยั้งการแข็งตัวของเลือด การเกาะตัวของเกล็ดเลือด และการต่อต้านเชื้อเมือกต่าง ๆ ภายในกระเพาะอาหาร และยังพบว่า cPG ประมาณ 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม จะไปมีผลต่อการต้านการเสียความทรงจำจากการถูกไฟฟ้าช็อตได้

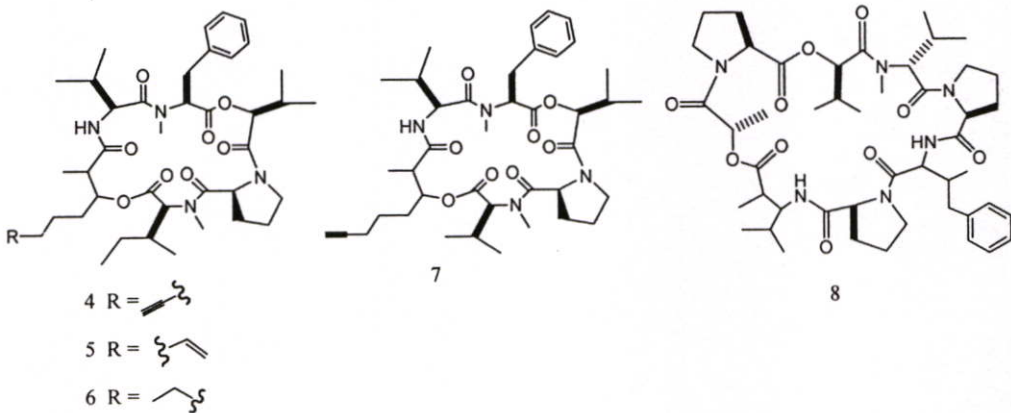
Morita G. และคณะ[12] พบไซคลิกเปปไทด์ 3 ตัวใหม่ คือ Delavayins A – C (1 – 3) แยกได้จากรากของ *Stellaria delavayi* ซึ่งเป็นพืชชั้นสูงและมีฤทธิ์ทางชีวภาพ



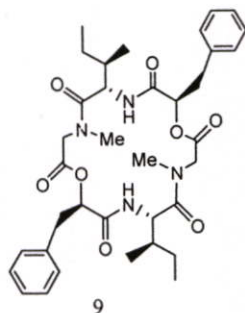
1: R = OH
2: R = H



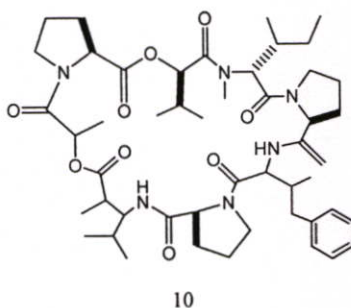
Nogle M. และคณะ[13] ทำการแยก Dolastatin 16(8) จาก *Lyngbya majuscula* และออกฤทธิ์ในการต้านการเกิดเมตาบอลิซึมของเนื้องอก นอกจากนี้ยังพบว่า Antanapeptins A – D (4 – 7) ยังเป็นอนุกรมใหม่อีกอนุกรมหนึ่ง ซึ่ง Antanapeptins ในอนุกรมนี้จะมีฤทธิ์ทางชีววิทยาต่าง ๆ มากมาย



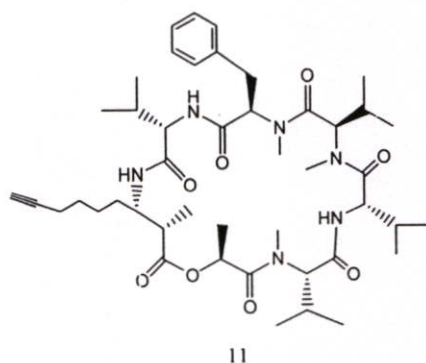
Vongvanich N. และคณะ[14] สกัด Hirsutellide A (9) จากเซลล์ของเห็ดรา *Hirsutella kobayashii* BCC 1660 ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียและต้านเชื้อไข้มาลาเรีย แต่ไม่มีผลกับ cell line ที่ 50 $\mu\text{g/ml}$



Davies-Coleman T. และคณะ[15] ทำการแยก Homodolastin 16 (10) จากแบคทีเรียสีน้ำเงิน *Lyngbya majuscula* เป็นสารที่มีศักยภาพสูงในการเป็นสารต้านมะเร็ง และ Dolastin 16 มีฤทธิ์ปานกลางในการเป็นสารต้านมะเร็งหลอดอาหารและมะเร็งปากมดลูก



Williams G. และคณะ[16] แยก Ulongapeptin (11) จากแบคทีเรียสีน้ำเงินในทะเล *Lyngbya* sp. โดยที่ Ulongapeptin จะไปยับยั้งสารที่เป็นพิษต่อ KB cell ซึ่งมีค่า IC_{50} 0.63 μM



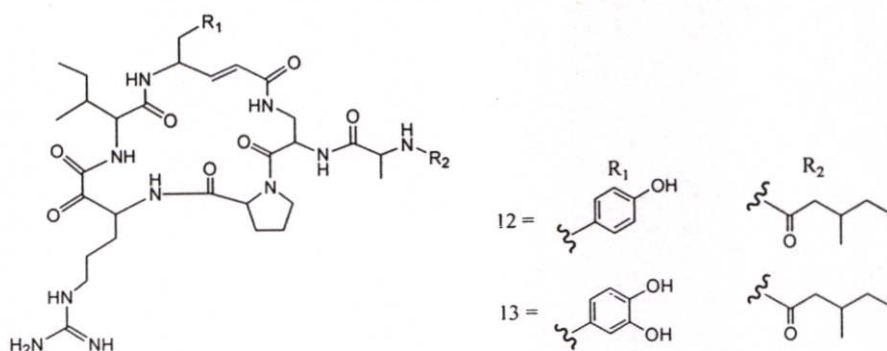
Ghadiri M. และคณะ[17] ได้นำเปปไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้นมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบและ hemolytic ดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสำหรับ D,L ไซคลิกเปปไทด์ ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (MIC)

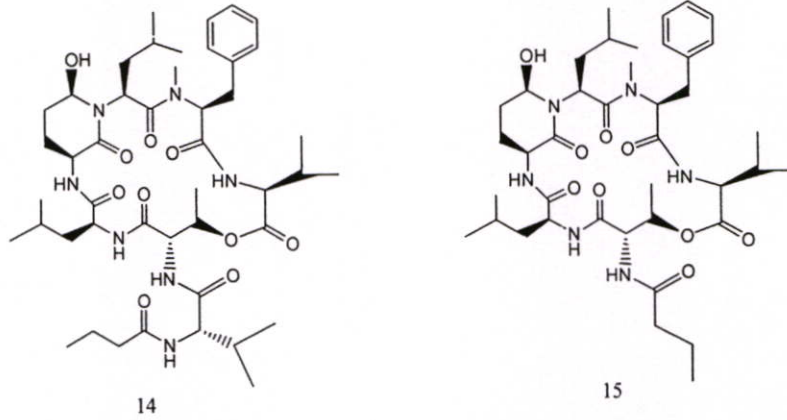
Peptide	MIC (μM)		
	<i>S. aureus</i> Gram(+)	<i>G. codi</i> Gram(-)	Hemolysis HD ₅₀
1. (KQRWLWLW)	6	80	45
2. (RRKWLWLW)	6	15	50
3. (KKLWLW)	10	17	80
4. (RRLWLW)	35	5	90

ผลที่ได้ชี้ให้เห็นว่าเปปไทด์ที่มีปลายเป็นเบสแก่ (Arg หรือ Lys) เป็นสารที่สำคัญมากในการออกฤทธิ์ ซึ่งเปปไทด์ทั้ง 4 ตัวนี้สามารถทำให้เชื้อแบคทีเรียตายได้ภายในเวลา 5 นาที และเมื่อนำมาทดสอบความเป็นพิษกับหนูทดลองโดยใช้วิธี methicillin – resistsnt *S. aureus* (MRSA) พบว่าหนูทดลองที่ถูกควบคุมตายภายใน 48 ชั่วโมง ส่วนหนูที่ได้รับเปปไทด์ตัวที่ 2 กลับมีชีวิตรอดมากกว่า 7 วันที่ทำการศึกษา

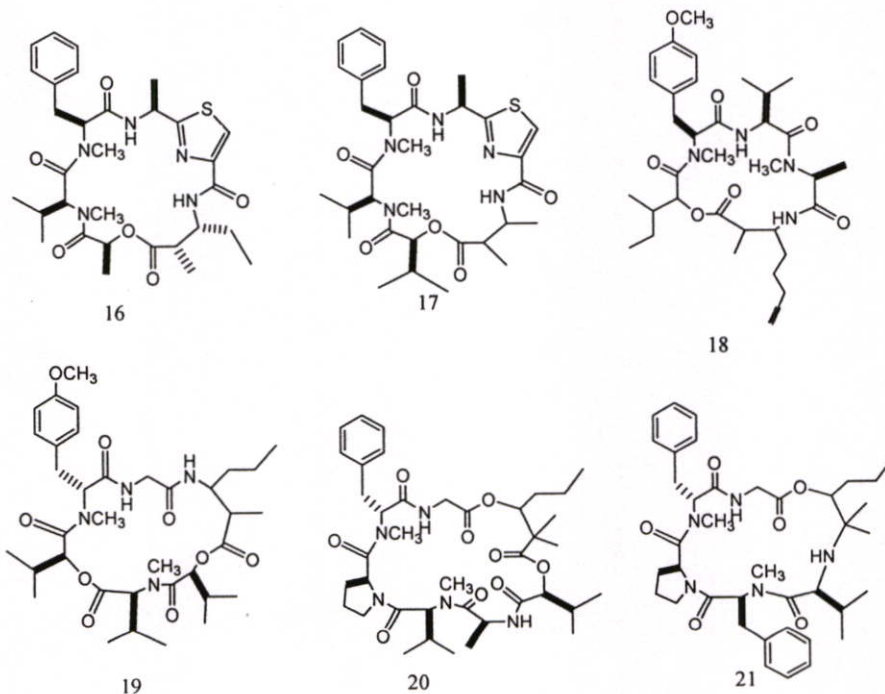
Marukami Y. และคณะ[18] ได้ทำการแยกสาร 2 ตัวขึ้นมาใหม่ ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ Trytase ได้แก่ Cyclotheonamide E4 (12) และ E5 (13) จากฟองน้ำสกุล *Ircinia* ซึ่ง Cyclotheonamide E4 แสดงศักยภาพในการเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ Trytase ในร่างกายมนุษย์ มีค่า IC₅₀ 5.1 nM



Williams G. และคณะ[19] สกัดแยกสารในกลุ่ม Depsipeptides ขึ้นมาใหม่ 2 ตัวคือ Tasipeptins A (14) และ B (15) จากแบคทีเรียสีน้ำเงิน *Symphoca* sp. ซึ่งเป็นสารที่มีผลต่อ KB cell ซึ่ง Tasipeptides A มีค่า IC_{50} 0.93 μ M และ Tasipeptides B มีค่า IC_{50} 0.82 μ M

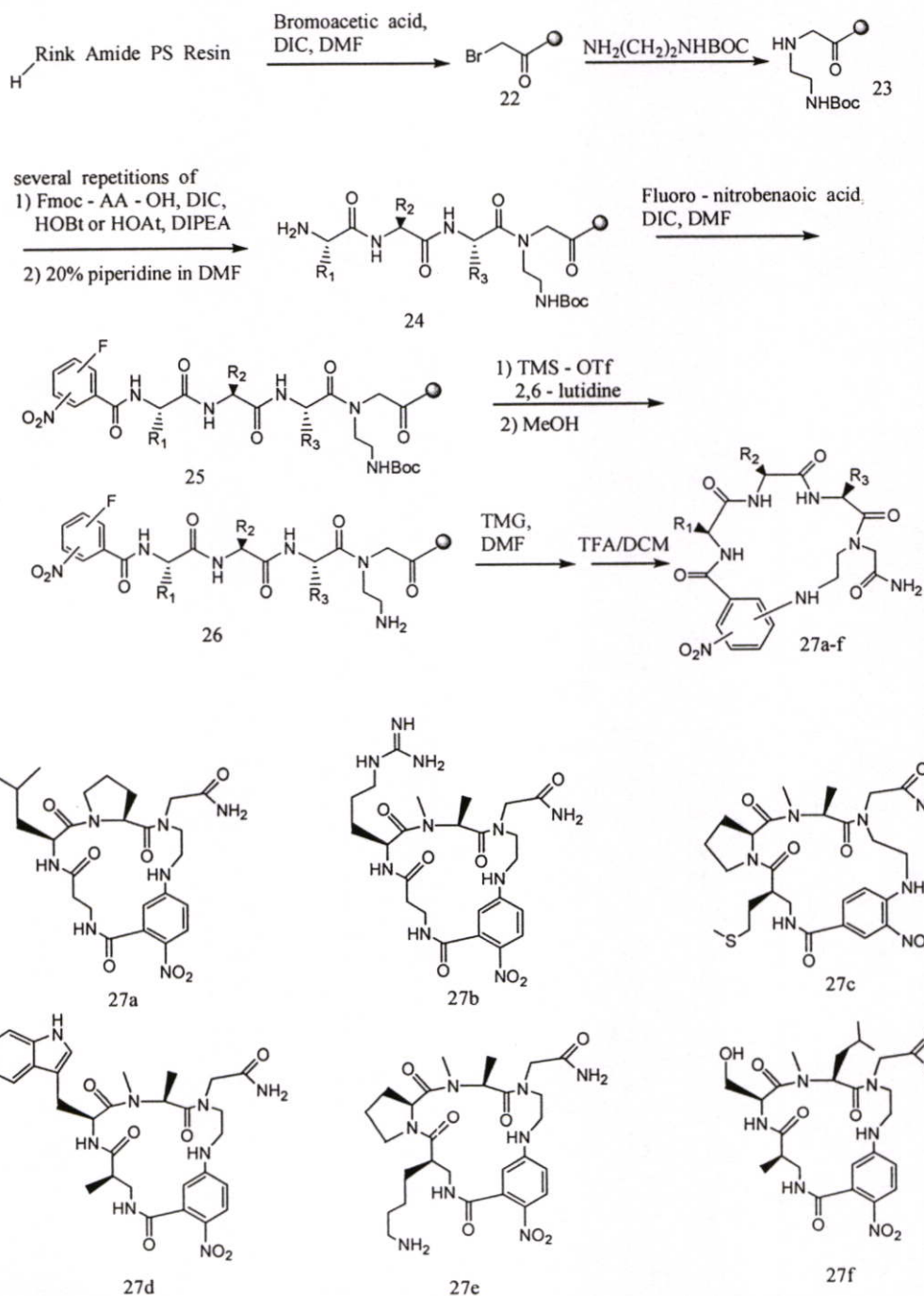


Tan Tong Lik และคณะ[20] ทำการแยก Quinenamides (16-21) จากแบคทีเรียสีน้ำเงิน *Lyngbya majuscula* ซึ่ง Quinenamides B (17) และ C (18) ได้นำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อออกซิดริยแรงของระบบประสาทในหนู มีค่า IC_{50} 15 และ 16 μ M ตามลำดับ



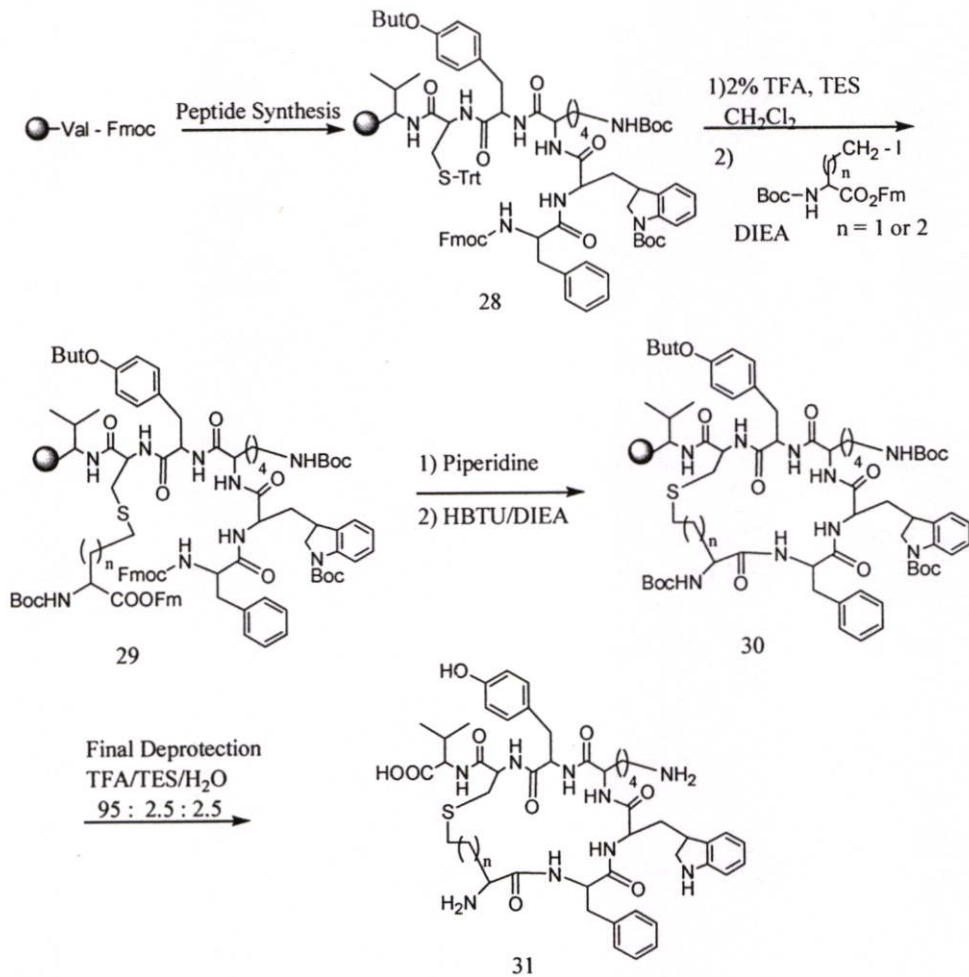
Mikael Kofod – Hansen และคณะ[21] ได้ทำการค้นหาวีธีการสังเคราะห์ใหม่ ๆ ขึ้นมา เพื่อใช้ในการปิดวงของไตรเปปไทด์บนวัฏภาคของแข็ง โดยใช้ปฏิกิริยาการแทนที่ด้วยนิวคลีโอไฟล์บนวงอะโรมาติกในขั้นที่มีการปิดวง ซึ่งวิธีนี้จะใช้ Fmoc – peptide เป็นสารพื้นฐานในการสังเคราะห์บน N – aminoethyl – substituted glycine ที่ล้อมรอบอยู่บน Rink amide PS – resin ดังแผนภาพที่ 2

แผนภาพที่ 2



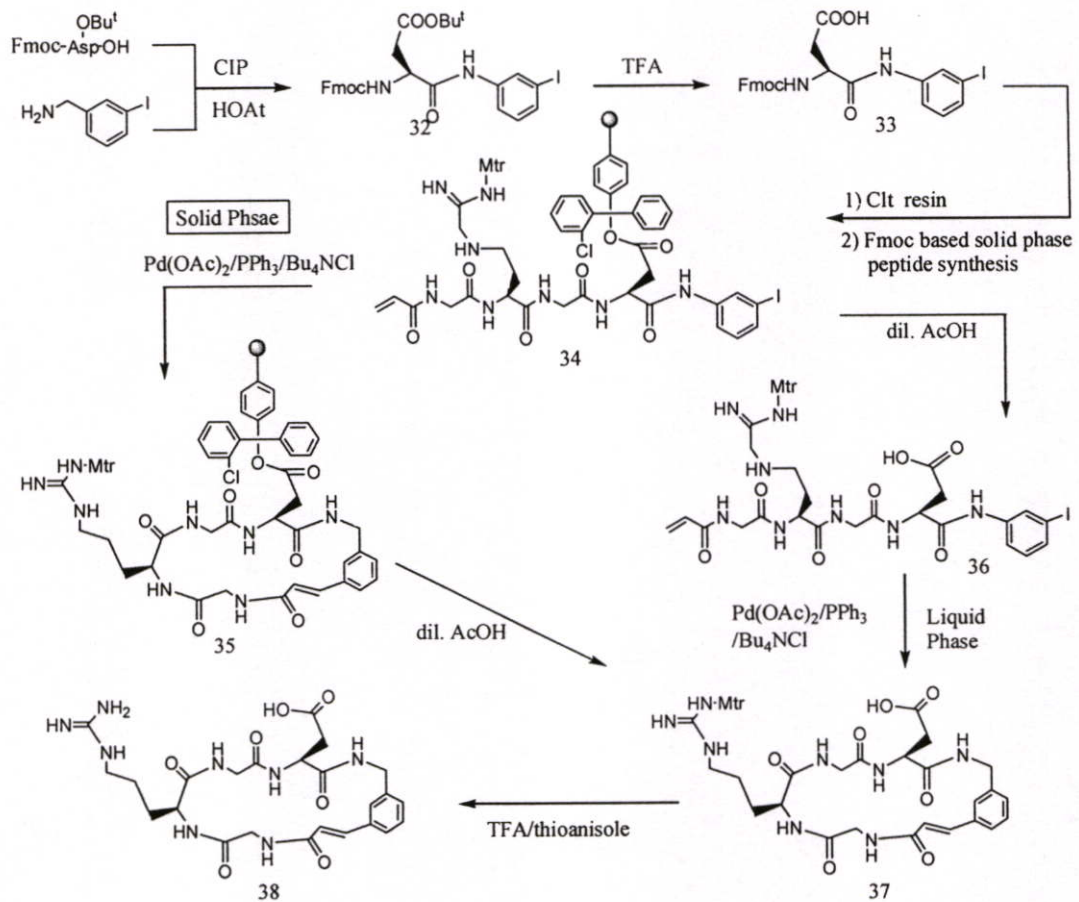
Campiglia P. และคณะ[22] ได้ทำการสังเคราะห์ไซคลิกเปปไทด์ที่ประกอบไปด้วย thioether เป็นสายโซ่ด้านข้าง บนสารพื้นฐาน (2S) - 9 - fluorenylmethyl - 2 - [(tert - butoxycarbonyl)amino] - 4 - iodobutanoate และตัวเดียวกันแต่เป็น 5 - iodopentanoate ซึ่งได้มาจาก Boc - L - Asp - OFm และ Boc - L - Glu - OFm ตามลำดับ การสังเคราะห์กระทำโดยใช้เทคนิควิทยุภาคของแข็งและไมโครเวฟเข้าด้วยกันเพื่อช่วยในการปัดวง ดังแผนภาพที่ 3

แผนภาพที่ 3



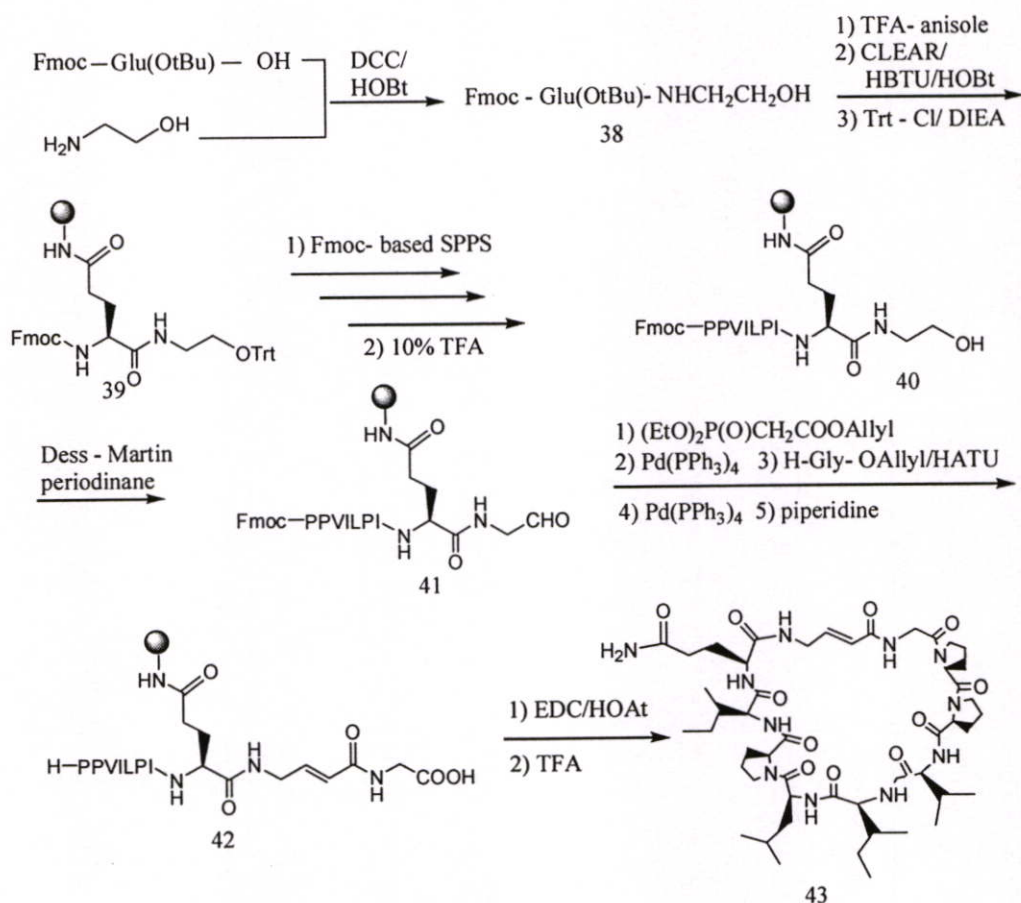
Akaji K. และคณะ[23] ทำการสังเคราะห์ไซคลิกเปปไทด์บนวัฏภาคของแข็งโดยใช้ปฏิกิริยาของเฮกต์ ซึ่งจะเป็นการปิดวงแบบหัวต่อหาง ดังแผนภาพที่ 4

แผนภาพที่ 4



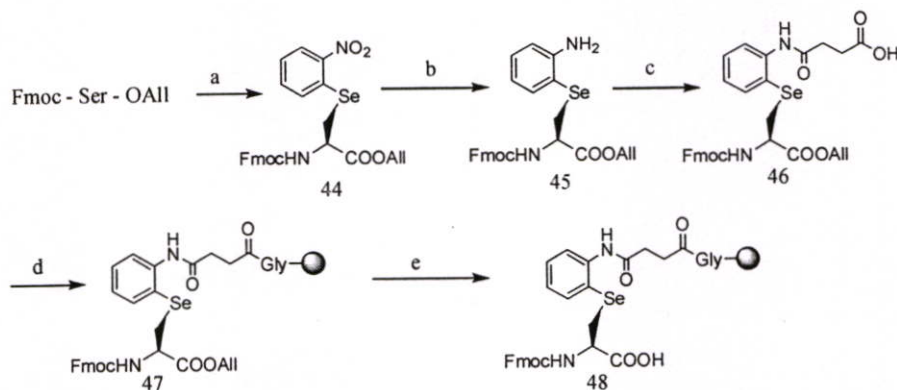
Bang Kyu Jeong และคณะ[24] ได้สังเคราะห์เปปไทด์และไซคลิกเปปไทด์โอเลฟินที่เป็นส่วนประกอบของที - เซลล์มนุษย์ในเชื้อไวรัสฮิวมนิวโรซิมิซันชนิด 1 (HTLV-1) บนวิถีกาของแข็งโดยใช้ปฏิกิริยา Horner - Emmons ซึ่งใช้เปปไทด์อัลดีไฮด์ที่เตรียมจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของเปปไทด์แอลกอฮอล์ด้วยปฏิกิริยา Dess - Martin periodinate เป็นสารตัวเริ่ม ดังแผนภาพที่ 5

แผนภาพที่ 5



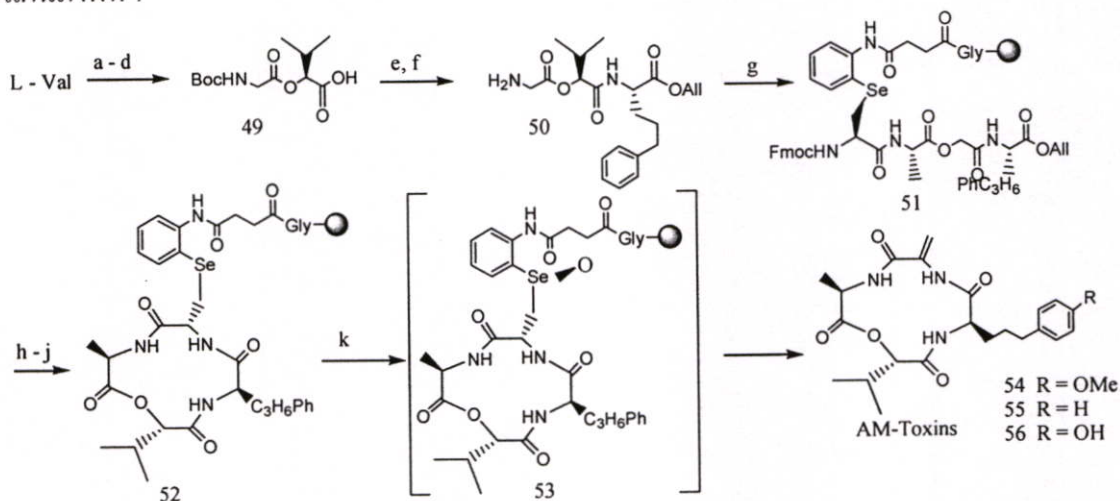
Horikawa E. และคณะ[25] ทำการสังเคราะห์ cyclic dehydropeptide, AM – toxin II ด้วยเทคนิควิทยาศาสตร์ของแข็ง ซึ่งใช้ selenyl เป็นตัวเชื่อมโยง และเมื่อทำการตัดผลิตภัณฑ์ออกจากเรซินจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีโครงสร้างเป็นพันธะคู่เกิดขึ้นภายใต้สภาวะการออกซิไดส์ที่ไม่รุนแรง ด้วย TBHP ดังแผนภาพที่ 6 และ 7

แผนภาพที่ 6



Reagents and conditions: (a) *o*-NO₂-C₆H₄-SeCN, Bu₃P/Pyridine, rt, 2 h(83%); (b) Zn, AcOH/THF, rt, 2h(82%); (c) succinic anhydride, DIEA/CH₂Cl₂,rt, 3 h(81%); (d) Gly-Wang resin(0.65 mmol/g), HATU,DIEA/DMF,voltex, rt, overnight,98% in Keiser test; (e) Pd(PPh₃)₄, dimedone/THF, voltex, rt, 3 h

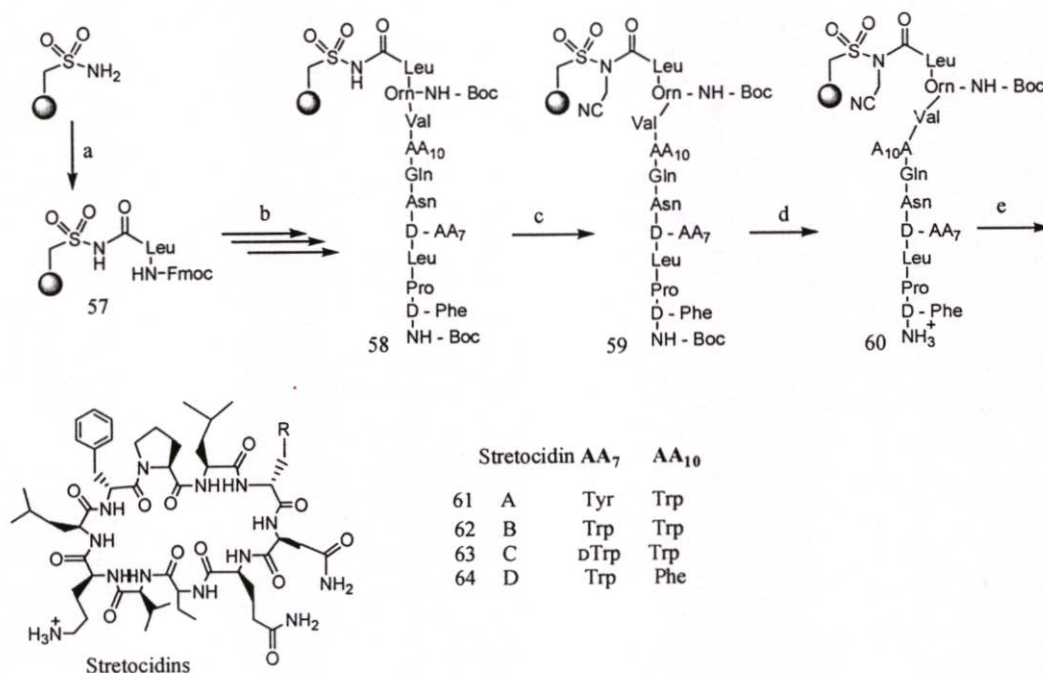
แผนภาพที่ 7



Reagents and conditions: (a)NaNO₂/AcOH aq., rt, 30 min(76%); (b) Cs₂CO₃ then allyl bromide, rt, overnight (65%); (c) Boc-Ala, DCC, DMAP/DMF, rt, overnight(73%); (d) cat. Pd(PPh₃)₄,piperidine/THF, rt, 2 h (93%); (e) L-App-OAll, HATU,DIEA/DMF, rt, 6 h(88%); (f) 50% TFA/CH₂Cl₂, rt, 1h; (g) (48), HATU, DIEA/DMF, voltex, rt, overnight; (h) cat.Pd(PPh₃)₄, dimedone/THF, voltex, rt, 2 h; (i) 40% piperidine/DMF, voltex, rt, 1 h; (j) FDPP, DIEA/DMF, voltex, rt, 2 days; (k) TBHP/CH₂Cl₂ - TFE, voltex, rt, 7 h

Qin C. และคณะ[26] สังเคราะห์ decapeptide antibiotics streptocidins A – D ที่สกัดได้จาก *Streptomyces* sp. ด้วยเทคนิควิทยาศาสตร์ของแข็งแล้วตามด้วยการปิดวง โดยปราศจากการใส่หมู่อุปกรณ์ที่สายโซ่ด้านข้าง ดังแผนภาพที่ 8

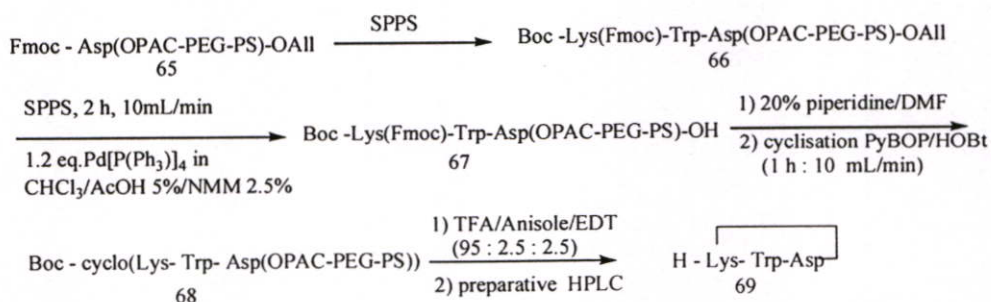
แผนภาพที่ 8



Reagents and conditions : (a) Fmoc-Leu-OH, PyBOP, DIPEA, CHCl₃, -20 °C, 8 h, repeat once; (b) 20% piperidine/DMF; then Fmoc-AA-OH (Boc-D-Phe-OH for the last residue), DIC/HOBt, 2h; (c) ICH₂CN, NMP, DIPEA, 24 h; (d) CF₃COOH/phenol/ *i*-Pr₃SiH/H₂O = 88:5:5:2, 1 h (f) 20% DIPEA/ THF

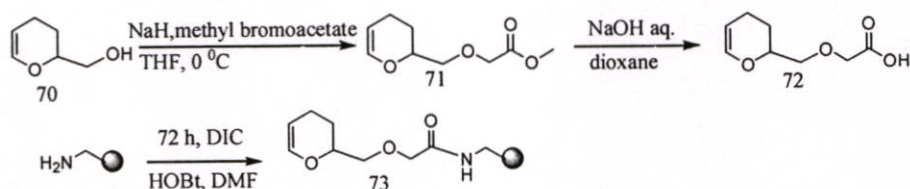
Flouzat C. และคณะ[27] ทำการสังเคราะห์ cyclic tripeptide แบบหัวต่อกับสายโซ่ด้านข้างด้วยเทคนิควิทยาศาสตร์ของแข็ง โดยใช้กระบวนการตัดยึดโน้มติของอัลลิทด้วย Pd[P(Ph₃)₄ แล้วจึงตามด้วยการปิดวง ดังแผนภาพที่ 9

แผนภาพที่ 9

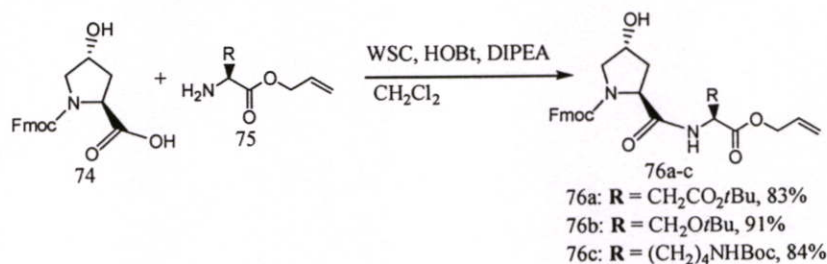


Basso A. และคณะ[28] ทำการสังเคราะห์อนุกรมของ cyclic hexapeptides ซึ่งเปปไทด์เหล่านี้จะประกอบไปด้วย hydroxyproline building block ที่เป็นส่วนที่ไปจับกับตัวกำจุน และตัวเชื่อมโยง THP ที่เตรียมขึ้นก็จะถูกนำไปรวมกับหมู่ไฮดรอกซิลของกรดอะมิโน โดยที่กรดอะมิโนที่ใช้จะเป็นทั้ง D- และ L- เพื่อศึกษาถึงอิทธิพลที่มีผลต่อการบิดงอ ดังแผนภาพที่ 10 11 และ 12

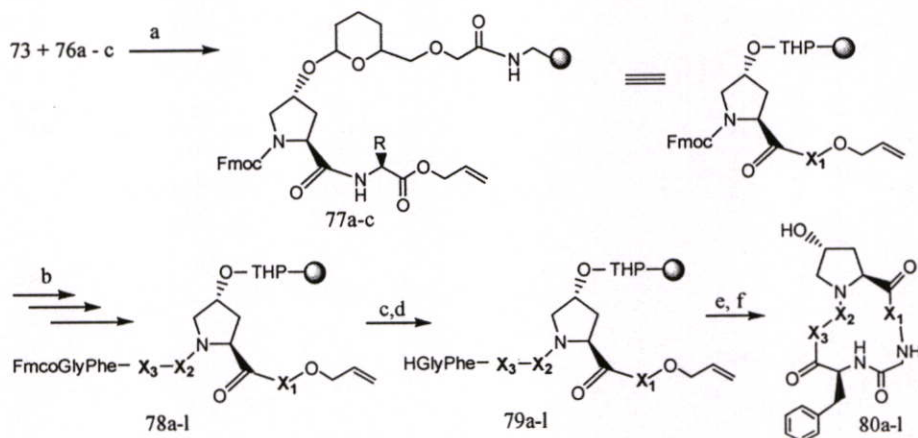
แผนภาพที่ 10



แผนภาพที่ 11



แผนภาพที่ 12



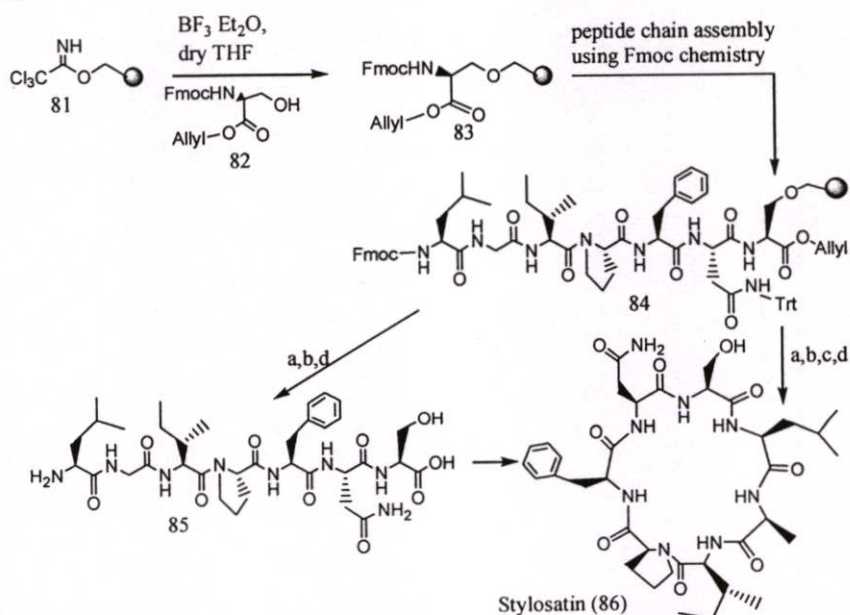
Reagents and conditions: (a) PPTS, 1,2 - dichloroethane, 80 °C; (b) amino acid, PyBOP, DIPEA, DMF, then piperidine, DMF; (c) Pd(PPh₃)₄, N- methylmorpholine, acetic acid, CH₂Cl₂; (d) piperidine, DMF; (e) PyBOP, HOAt, DIPEA, DMF; (f) TFA, H₂O

ตารางที่ 2.5 แสดงผลการวิเคราะห์สำหรับอนุกรมของไซคลิกเปปไทด์ c(Gly-Phe-X₃-X₂-Hyp-X₁)

สารประกอบ	X ₁	X ₂	X ₃	HPLC purity (%)	ES - MS
80a	L- Asp	L- Glu	L - Lys	69	690.6
80b	L -Ser	L- Glu	L - Lys	47	662.3
80c	L- Lys	L- Glu	L - Lys	71	703.4
80d	L- Asp	D- Glu	L - Lys	54	690.6
80e	L- Ser	D- Glu	L - Lys	43	662.3
80f	L- Lys	D- Glu	L - Lys	82	703.4
80g	L- Asp	L- Glu	D - Lys	62	690.6
80h	L- Ser	L- Glu	D - Lys	42	662.3
80i	L- Lys	L- Glu	D - Lys	75	703.4
80j	L- Asp	D- Glu	D - Lys	55	690.6
80k	L- Ser	D- Glu	D - Lys	42	662.3
80l	L- Lys	D- Glu	D - Lys	77	703.4

Yan Liang Y. และคณะ[29] ได้พัฒนาวิธีการสังเคราะห์ไซคลิกเปปไทด์ที่มี serine หรือ threonine เป็นส่วนประกอบขึ้นมา โดยใช้ประโยชน์จากสายโซ่ด้านข้าง β -hydroxyl ของหมู่อะมิโนที่ต่อกับ Wang resin ในการรวมกันของโซ่เปปไทด์ซึ่งอาศัยหลักการของ Fmoc / *t*Bu แล้วตามด้วยตัวเร่งพลาเดียม ในการปลดปล่อยหมู่ป้องกันอัลลิลของคาร์บอนด้านปลายและปิดวงบนเรซิน ซึ่งในการเตรียม Stylostatin 1 ได้ใช้วิธีนี้ในการสังเคราะห์ดังแผนภาพที่ 13

แผนภาพที่ 13



Reagents and conditions: (a) 20% piperidine in DMF; (b) $\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4/\text{PhSiH}_3$ in DCM 30 min twice; (c) PyBop/HOBt/DIEA in DMF; (d) TFA

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

	เกรด	บริษัท
1. acetonitrile	AR	Lab Scan
2. bromo – tris – pyrrolidino – phosphoniumhexafluorophosphate	chemical	Fluka
3. dichloromethane	commercial	Zen point
4. dimethylformamide	AR	Lab Scan
5. ethanol	AR	Carlo ERBA
6. ethyl acetate	commercial	Zen point
7. Fmoc – Ile – OH	chemical	Fluka
8. Fmoc – Leu – OH	chemical	Fluka
9. Fmoc – Phe – OH	chemical	Fluka
10. Fmoc – Pro – OH	chemical	Fluka
11. Fmoc – Trp – OH	chemical	Fluka
12. Fmoc – Val – OH	chemical	Fluka
13. hexane	commercial	Zen point
14. 4 – hydroxybenzaldehyde	chemical	Fluka
15. 1 – hydroxybenzotriazole	chemical	Fluka
16. Merrifield resin	chemical	Fluka
17. methanol	commercial	Zen point
18. ninhydrin	chemical	SIGMA
19. 4 – nitrophenol	AR	Fluka
20. <i>N,N</i> – dicyclohexylcarbodiimide	chemical	Fluka
21. <i>N,N</i> – diisopropylcarbodiimide	Lab	SIGMA
22. 4 – <i>N,N</i> – dimethylaminopyridine	chemical	Fluka
23. piperidine	Lab	
24. potassium carbonate	AR	Carlo ERBA

	เกรด	บริษัท
25. potassium iodide	AR	Riedel-deHaon
26. silica gel (dimeter mm. 0.06 – 0.20)	chromatography	Carlo ERBA
27. sodium borohydride	chemical	Fluka
28. tetrahydrofuran	AR	Lab Scan

3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. บีกเกอร์ ขนาด 50 มิลลิลิตร
2. กระจกควง ขนาด 10 มิลลิลิตร
3. ขวดกักกลม ขนาด 50 และ 100 มิลลิลิตร
4. กระจกทรง
5. เทอร์โมมิเตอร์
6. หลอดทดลอง
7. ซ้อนตักสาร
8. หลอดหยด
9. เครื่องปั่นกวนแม่เหล็ก
10. แท่งแม่เหล็ก
11. หลอดฉีดยาพลาสติก
12. เครื่องเขย่า
13. เครื่องกรองลดความดัน
14. ตู้อบ
15. คอลัมน์
16. กรวยแยก
17. เครื่องระเหยสุญญากาศ
18. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
19. แผ่นทินเลเซอร์โครมาโทกราฟี (TLC aluminium sheet, silica gel 60 F₂₅₄ MERCK)
20. เครื่องฟูเรียทรานส์ฟอร์มนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ BRUKER รุ่น Avance DPX 300 ความถี่ 300 เมกะเฮิรต์
21. เครื่องฟูเรียทรานส์ฟอร์มอินฟราเรด Perkin Elmer รุ่น Spectrum GX 60237
22. เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ Finnigan LC – Q MS detector

3.3 การทดลองทั่วไป

ตัวทำละลายที่ใช้ในการทดลองที่เป็นกรดทางการค้าถูกนำมาผ่านกระบวนการการกลั่นก่อนนำไปใช้ทุกครั้ง และ DMF ที่นำมาใช้จะแช่ไว้ใน Molecular sieve เพื่อลดน้ำและความชื้น ส่วนสารเคมีที่ได้จากการซื้อจะนำมาใช้โดยปราศจากการทำสารให้บริสุทธิ์

สเปกตรัม ^1H และ ^{13}C NMR ถูกบันทึกโดยเครื่องฟูเรียทรานส์ฟอร์มมิกนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ BRUKER รุ่น Avance DPX 300 ที่ความถี่ 300 เมกกะเฮิร์ต การละลายสารตัวอย่างจะทำการละลายโดยใช้ตัวทำละลาย CDCl_3 และ CD_3OD โดยมี TMS เป็นสารมาตรฐาน ตัวทำละลายที่เหลืออยู่จะปรากฏตำแหน่งสัญญาณของ CHCl_3 และ CH_3OH ที่ δ 7.26 และ 3.35 ppm สำหรับสเปกตรัม ^1H NMR และที่ δ 77.0 และ 46.7 ppm สำหรับสเปกตรัม ^{13}C NMR ตามลำดับ

อินฟราเรดสเปกตรัมบันทึกโดยเครื่องฟูเรียทรานส์ฟอร์มมิกอินฟราเรด Perkin Elmer รุ่น Spectrum GX 60237 โดยใช้ KBr เป็นวัสดุในการทำหน้าต่างเซลล์ และทำการบันทึกในช่วงความถี่ $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$

แมสสเปกตรัมบันทึกโดยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ Finnigan LC - Q MS detector ด้วยเทคนิค electrospray

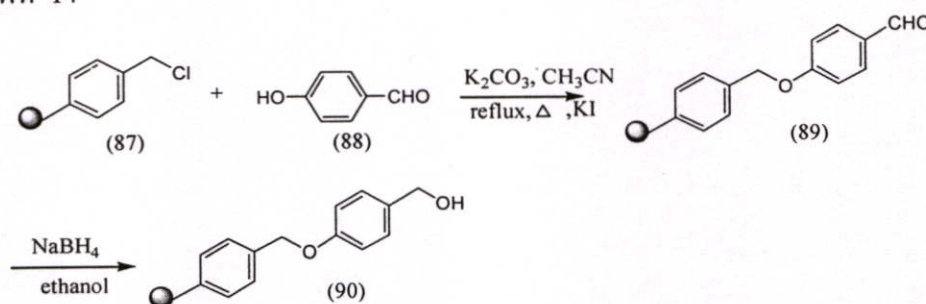
การทดสอบการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์เปปไทด์ใช้ reagent A และ reagent B ในการทดสอบ ซึ่งเตรียมได้ดังนี้ reagent A : สารละลาย 1) ชั่ง phenol 40 กรัม ละลายใน absolute ethanol 10 มิลลิลิตร สารละลาย 2) ชั่ง KCN 65 มิลลิกรัม ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร แล้วแบ่งมา 2 มิลลิลิตร เจือจางด้วย pyridine ที่กลั่นใหม่ ๆ 100 มิลลิลิตร แล้วจึงทำการผสมสารละลาย 1 และ 2 เข้าด้วยกัน reagent B : ชั่ง ninhydrin 2.5 กรัม ละลายใน absolute ethanol 50 มิลลิลิตร [30]

3.4 การสังเคราะห์เทอร์อะเปปไทด์ด้วยเทคนิควิถีภาคของแข็ง

ขั้นตอนในการสังเคราะห์เทอร์อะเปปไทด์บนวิถีภาคของแข็ง เริ่มด้วยการสังเคราะห์วิถีภาคของแข็งดังนี้

3.4.1 การเตรียม Wang resin (90)

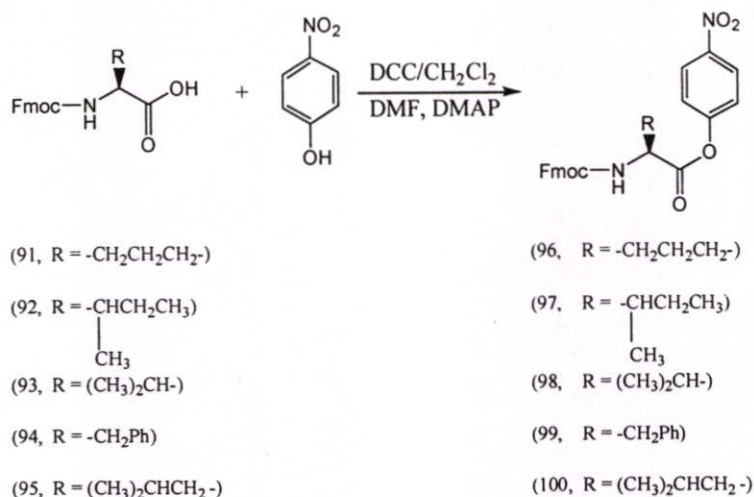
แผนภาพที่ 14



1. ชั่ง Merrifield resin (87) หนัก 2.0537 กรัม (2.26 มิลลิโมล/Cl) ใส่ในขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร เติม 4 - hydroxybenzaldehyde (88) 1.8943 กรัม (15.12 มิลลิโมล) K_2CO_3 2.090 กรัม (15.12 มิลลิโมล) KI 2.510 กรัม (15.12 มิลลิโมล) และเติม CH_3CN 100 มิลลิลิตร
2. หลังจากนั้นนำไปรีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 82 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง เมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์แล้วนำมากรองด้วยเครื่องดูดสุญญากาศ ล้างด้วยน้ำในปริมาตร 2 ลิตร เพื่อล้าง K_2CO_3 ให้หมด และสุดท้ายล้างด้วย ethanol 30 มิลลิลิตร นำไปอบให้แห้ง ได้สารผลิตภัณฑ์ (89) หนัก 2.2453 กรัม (99%)
3. พิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี
4. ทำปฏิกิริยารีดักชันสาร (89) โดยแช่เรซินที่ได้ให้บวมตัวใน THF
5. หลังจากนั้นเตรียม $NaBH_4$ 572.1 มิลลิกรัม (15.12 มิลลิโมล) ใน ethanol 50 มิลลิลิตร แล้วจึงเติมเรซินที่บวมตัวแล้วลงไป ปั่นกวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง
6. นำมากรองด้วยเครื่องดูดสุญญากาศ ล้างด้วยน้ำในปริมาตร 2 ลิตร เพื่อล้าง $NaBH_4$ ออกให้หมด และตามด้วย ethanol 30 มิลลิลิตร นำไปอบให้แห้ง ซึ่งจะได้ Wang resin (90) หนัก 2.2504 กรัม (99%)
7. พิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

3.4.2 ปฏิกิริยาการใส่หมู่กระตุ้นที่หมู่คาร์บอกซิลิกของกรดอะมิโน

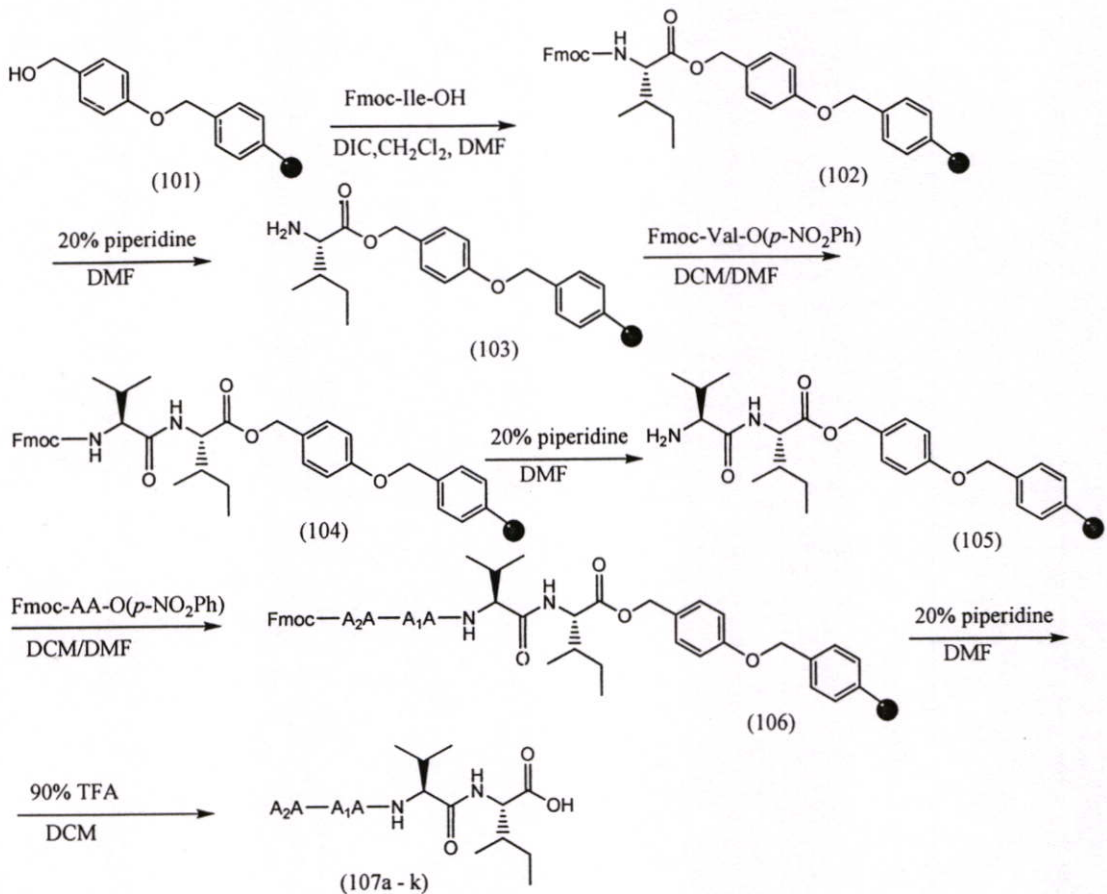
แผนภาพที่ 15



1. ชั่ง Fmoc – amino acid 500 mg (1 equiv.) ใส่ในขวดก้นกลมขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วย DCM และ DMF ในปริมาณเล็กน้อย
2. หลังจากนั้นเติมสารละลาย DCC 1.2 equiv. ใน DCM ลงไป ปั่นกวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
3. หลังจากนั้นเติม 4 - nitrophenol 1.2 equiv. ลงไป ปั่นกวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง
4. ทดสอบปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลาย hexane : DCM (1 : 2)
5. แยกสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้สารผลิตภัณฑ์
 - (96)หนัก 631.8 mg (90%) มีค่า R_f เท่ากับ 0.26
 - (97)หนัก 691.5 mg (87%) มีค่า R_f เท่ากับ 0.34
 - (98)หนัก 637.2 mg (91%) มีค่า R_f เท่ากับ 0.32
 - (99)หนัก 550.9 mg (84%) มีค่า R_f เท่ากับ 0.29 และ
 - (100)หนัก 508.4 mg (76%) มีค่า R_f เท่ากับ 0.39
6. พิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์

3.4.3 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์เทอร์เปปไทด์บนวัฏภาคของแข็ง

แผนภาพที่ 16



107a	AA ₁ = Pro, AA ₂ = Ile	107g	AA ₁ = Leu, AA ₂ = Ile
107b	AA ₁ = Pro, AA ₂ = Leu	107h	AA ₁ = Leu, AA ₂ = Val
107c	AA ₁ = Pro, AA ₂ = Val	107i	AA ₁ = Leu, AA ₂ = Pro
107d	AA ₁ = Pro, AA ₂ = Pro	107j	AA ₁ = Leu, AA ₂ = Leu
107e	AA ₁ = Pro, AA ₂ = Trp	107k	AA ₁ = Leu, AA ₂ = Trp
107f	AA ₁ = Pro, AA ₂ = Phe		

- ซั่งเรซินใส่ใน column cap 1100 มิลลิกรัม (1.21 มิลลิโมลเรซิน) แช่ใน DCM ให้บวมตัว หลังจากนั้นกรองเอาตัวทำละลายออก
- ซั่ง Fmoc - Ile - OH 855.3 มิลลิกรัม (2.42 มิลลิโมล) ละลายในตัวทำละลายผสมระหว่าง DMF : DCM (1 : 3) 5 มิลลิลิตรและเติมสารละลาย DIC 305.4 มิลลิกรัม (2.42 มิลลิโมล) ใน DCM 1 มิลลิลิตรลงไป นำส่วนผสมที่ได้ใส่ในเรซินที่บวมตัวด้วย DCM

3. นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลานาน 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำมากรองและล้างด้วย DCM และ MeOH เพื่อล้างรีเอเจนต์ที่มากเกินไปออก
4. ทำการตัดหมู่ป้องกัน Fmoc ออกด้วย 20% piperidine ใน DMF ใช้เวลาเขย่านาน 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
5. กรองและล้างหมู่ Fmoc ที่ทำการตัดออกแล้วด้วย DCM และ MeOH และทำการตัดหมู่ Fmoc ออกซ้ำอีกครั้งหนึ่งด้วย 20% piperidine เช่นเดิม เสร็จแล้วทำการกรองและล้างด้วย DCM และ MeOH
6. ทดสอบปฏิกิริยาด้วย reagent A 6 หยด และ reagent B 3 หยด สารละลายจะให้ผลทดสอบเป็นสีม่วงแสดงว่ามีปฏิกิริยาเกิดขึ้น
7. หลังจากนั้นนำเรซินที่ได้มาทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนที่ใส่หมู่กระตุ้นด้านปลายคาร์บอนซิกลิกแล้ว โดยกรดอะมิโนที่ใส่เข้าไปเป็นตัวที่ 2 คือ Fmoc-Val-O(*p*-NO₂Ph) 867.0 มิลลิกรัม (1.82 มิลลิโมล) ละลายใน DMF 1 มิลลิลิตรและ DCM 3 มิลลิลิตร นำไปเขย่าเป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง
8. ทำการทดสอบปฏิกิริยาด้วย reagent A 6 หยด และ reagent B 3 หยด จะได้สีของสารละลายทดสอบเหมือนเดิมไม่มีการเปลี่ยนแปลง แสดงว่าปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์แล้ว กรองและล้างด้วย DCM และ MeOH
9. ตัดหมู่ป้องกัน Fmoc ออกด้วย 20% piperidine ใน DMF เช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 4. และข้อ 5. หลังจากตัดหมู่ป้องกันออกแล้วทำการทดสอบด้วย reagent A 6 หยด และ reagent B 3 หยด จะได้สารละลายสีม่วงแสดงว่ามีปฏิกิริยาเกิดขึ้น
10. หลังจากนั้นแบ่งเรซินออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 600 มิลลิกรัมและส่วนที่ 2 500 มิลลิกรัม และทำปฏิกิริยาต่อดังนี้
 - 10.1. นำเรซินส่วนที่ 1 ทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนตัวที่ 3 คือ Fmoc-Pro-O(*p*-NO₂Ph) 469.6 มิลลิกรัม (0.99 มิลลิโมล) ละลายในตัวทำละลาย DMF 1 มิลลิลิตรและ DCM 3 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง ทดสอบปฏิกิริยาด้วย reagent A และ reagent B เมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์แล้วทำการตัดหมู่ป้องกันออกด้วย 20% piperidine เหมือนเดิม หลังจากนั้นแบ่งเรซินที่ได้ออกเป็น 6 ส่วนเท่า ๆ กัน และนำแต่ละส่วนมาทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนตัวที่ 4 ดังนี้
 - 10.1.1. ส่วนที่ 1 ทำปฏิกิริยากับ Fmoc-Ile-O(*p*-NO₂Ph) 80.9 มิลลิกรัม (0.165 มิลลิโมล)
 - 10.1.2. ส่วนที่ 2 ทำปฏิกิริยากับ Fmoc-Leu-O(*p*-NO₂Ph) 78.3 มิลลิกรัม (0.165 มิลลิโมล)
 - 10.1.3. ส่วนที่ 3 ทำปฏิกิริยากับ Fmoc-Val-O(*p*-NO₂Ph) 78.6 มิลลิกรัม (0.165 มิลลิโมล)
 - 10.1.4. ส่วนที่ 4 ทำปฏิกิริยากับ Fmoc-Pro-O(*p*-NO₂Ph) 78.3 มิลลิกรัม (0.165 มิลลิโมล)
 - 10.1.5. ส่วนที่ 5 ทำปฏิกิริยากับ Fmoc-Trp-OH 93.8 มิลลิกรัม (0.22 มิลลิโมล) และ DIC

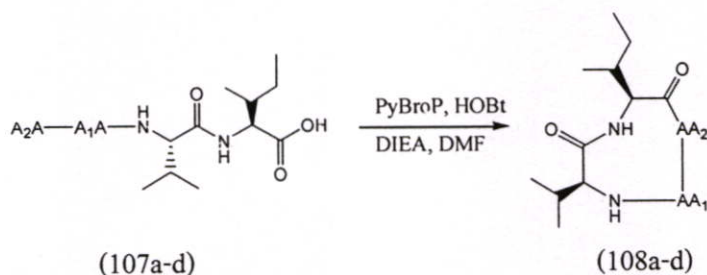
83.2 มิลลิกรัม (0.66 มิลลิโมล) ใน DCM

- 10.1.6. ส่วนที่ 6 ทำปฏิกิริยากับ Fmoc-Phe-O(*p*-NO₂Ph) 83.9 มิลลิกรัม (0.165 มิลลิโมล)
- 10.2. นำเรซินส่วนที่ 2 ทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนตัวที่ 3 คือ Fmoc-Leu-O(*p*-NO₂Ph) 469.7 มิลลิกรัม (0.99 มิลลิโมล) ละลายในตัวทำละลาย DMF 1 มิลลิลิตรและ DCM 3 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง ทดสอบปฏิกิริยากับ reagent A และ reagent B เมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์แล้วทำการตัดหมู่ป้องกันออกด้วย 20% piperidine เหมือนเดิม หลังจากนั้นแบ่งเรซินที่ได้ออกเป็น 5 ส่วนเท่า ๆ กัน และนำแต่ละส่วนมาทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนตัวที่ 4 ดังนี้
- 10.2.1. ส่วนที่ 1 ทำปฏิกิริยากับ Fmoc-Ile-O(*p*-NO₂Ph) 80.9 มิลลิกรัม (0.165 มิลลิโมล)
- 10.2.2. ส่วนที่ 2 ทำปฏิกิริยากับ Fmoc-Val-O(*p*-NO₂Ph) 78.6 มิลลิกรัม (0.165 มิลลิโมล)
- 10.2.3. ส่วนที่ 3 ทำปฏิกิริยากับ Fmoc-Pro-O(*p*-NO₂Ph) 78.3 มิลลิกรัม (0.165 มิลลิโมล)
- 10.2.4. ส่วนที่ 4 ทำปฏิกิริยากับ Fmoc-Leu-O(*p*-NO₂Ph) 78.3 มิลลิกรัม (0.165 มิลลิโมล)
- 10.2.5. ส่วนที่ 5 ทำปฏิกิริยากับ Fmoc-Trp-OH 93.8 มิลลิกรัม (0.22 มิลลิโมล) และ DIC 83.2 มิลลิกรัม (0.66 มิลลิโมล) ใน DCM

11. ตัดสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ออกจากเรซินด้วย 90% TFA ใน DCM และทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี ระบบตัวทำละลาย MeOH : EtOAc (8 : 2) ได้สารผลิตภัณฑ์
- 107a หนัก 41.3 mg (85.3%) ค่า R_f เท่ากับ 0.3
- 107b หนัก 43.2 mg (89.2%) ค่า R_f เท่ากับ 0.5
- 107c หนัก 43.8 mg (93.5%) ค่า R_f เท่ากับ 0.29
- 107d หนัก 21.7 mg (46.5%) ค่า R_f เท่ากับ 0.29
- 107e หนัก 42.8 mg (77.8%) ค่า R_f เท่ากับ 0.6
- 107f หนัก 50.3 mg (96.5%) ค่า R_f เท่ากับ 0.39
- 107g หนัก 37.1 mg (72.1%) ค่า R_f เท่ากับ 0.39
- 107h หนัก 29.2 mg (60.1%) ค่า R_f เท่ากับ 0.58
- 107i หนัก 34.1 mg (70.4%) ค่า R_f เท่ากับ 0.47
- 107j หนัก 30.3 mg (60.4%) ค่า R_f เท่ากับ 0.58
- 107k หนัก 19.1 mg (32.9%) ค่า R_f เท่ากับ 0.74
12. พิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ เทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี และเทคนิคแมสสเปกโทรสโกปี
13. เมื่อทำการพิสูจน์โครงสร้างได้แล้ว นำสารที่สังเคราะห์ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

3.4.4 ปฏิบัติการสังเคราะห์ไซคลิกเทอร์เปปไทด์ด้วยเทคนิคสารละลาย

แผนภาพที่ 17



- 108a AA₁ = Pro, AA₂ = Ile
 108b AA₁ = Pro, AA₂ = Leu
 108c AA₁ = Pro, AA₂ = Val
 108d AA₁ = Pro, AA₂ = Pro

1. ชั่งน้ำหนักของเทอร์เปปไทด์ 1 equiv. ละลายใน DMF 2 มิลลิลิตร ปั่นกวนที่อุณหภูมิห้อง
2. หลังจากนั้นเติมสารละลายของ PyBroP 3.5 equiv. HOBt 3.5 equiv. และ DIEA 3.5 equiv. ใน DMF 3 มิลลิลิตรลงไป ปั่นกวนที่อุณหภูมิห้องนานเป็นเวลา 3 วัน ทำการทดสอบปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบของตัวทำละลายเป็น DCM : MeOH (2 : 8)
3. เมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์แล้วทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้สาร 108a น้หนัก 39.7 (85.5%) ค่า R_f เท่ากับ 0.32
 108b น้หนัก 18.8 (44.5%) ค่า R_f เท่ากับ 0.53
 108c น้หนัก 39.5 (88.0%) ค่า R_f เท่ากับ 0.53
 108d น้หนัก 34.3 (76.7%) ค่า R_f เท่ากับ 0.33
4. ทำการพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ เทคนิคอินฟราเรด สเปกโทรสโกปี และเทคนิคแมสสเปกโทรสโกปี
5. เมื่อทำการพิสูจน์โครงสร้างได้แล้ว นำสารที่สังเคราะห์ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

3.4.5 การทดสอบ Antimicrobial

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย คัดแปลงมาจากวิธีของ Bauer และคณะ [31] โดยมีวิธีการทดลองดังนี้

1. นำแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่เก็บไว้บน Trypticase Soy Agar เพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Brain Heart Infusion Broth บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อราใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Sabouraud Broth บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 – 72 ชั่วโมง
2. หลังจากนั้นนำแบคทีเรียที่เพาะได้มาปรับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เพื่อให้ได้ความขุ่นของ McFarland เบอร์ 0.5 ซึ่งเทียบเท่ากับจำนวนแบคทีเรีย $10^5 - 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร
3. นำแบคทีเรียที่เตรียมได้มาเพาะลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller Hinton Agar อยู่ โดยการขีดลงบนหน้าวุ้นให้ทั่วจำนวน 3 ครั้ง ทำให้ได้จานอาหารเลี้ยงเชื้อมีแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ อยู่บนหน้าวุ้น
4. หลังจากนั้นนำแผ่นดิสก์ขนาด 0.6 มิลลิเมตร ที่มีสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ซึ่งละลายด้วย DMSO (เจือจางลงเป็น 2 เท่า ตามลำดับ) วางบนผิววุ้นที่มีแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ บ่มทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 – 24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย
5. อาหารสำหรับเชื้อราใช้เป็นชนิด Sabouraud Agar และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 – 72 ชั่วโมง ซึ่งอุณหภูมิและเวลาขึ้นอยู่กับเชื้อราแต่ละชนิด
6. การอ่านผลถ้าพบ clear zone รอบแผ่นดิสก์มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 2 มิลลิเมตร แต่น้อยกว่า 5 มิลลิเมตร แสดงว่าสารทดสอบมีผลต่อแบคทีเรียชนิดที่ทดสอบในระดับอ่อน (weak) ถ้าพบ clear zone รอบแผ่นดิสก์มากกว่าหรือเท่ากับ 5 มิลลิเมตร แต่น้อยกว่า 8 มิลลิเมตร แสดงว่าสารทดสอบมีผลต่อแบคทีเรียชนิดที่ทดสอบในระดับปานกลาง (moderate) และถ้า clear zone รอบแผ่นดิสก์มากกว่าหรือเท่ากับ 8 มิลลิเมตร แสดงว่าสารทดสอบมีผลต่อแบคทีเรียชนิดที่ทดสอบในระดับดี (good)

บทที่ 4

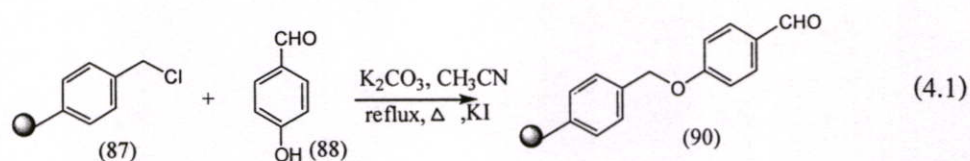
ผลการทดลองและวิจารณ์

ขั้นตอนในการสังเคราะห์เทตระเปปไทด์และไซคลิกเทตระเปปไทด์ แบ่งออกเป็นขั้นตอนได้ดังนี้

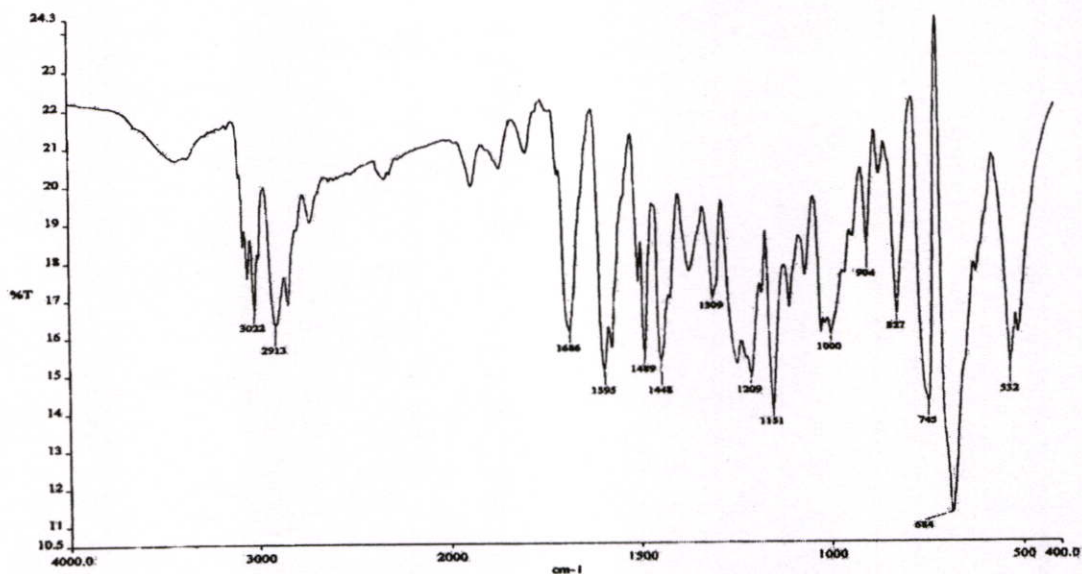
4.1 การเตรียม Wang resin (90)

4.1.1 การสังเคราะห์ aldehyde resin (89)

ตัวเชื่อมโยงที่ทำการสังเคราะห์ในการทดลองนี้คือ Wang resin (90) โดยการสังเคราะห์เริ่มจากการทำปฏิกิริยากันของ Merrifield resin (87) กับ 4-hydroxybenzaldehyde (88) ดังสมการที่ 4.1



การตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาเบื้องต้น โดยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของเรซิน Merrifield resin (87) ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยานั้นจะมีสีขาว แต่เมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นสีของเรซินจะค่อย ๆ เปลี่ยนไปจนปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์จะได้เรซินที่มีสีเหลือง โดยที่สีเหลืองที่เกิดขึ้นมานั้นเกิดจากการที่ 4 - hydroxybenzaldehyde (88) เข้าไปแทนที่หมู่คลอไรด์ที่เรซิน เมื่อ 4 - hydroxybenzaldehyde (88) เข้าไปจับกับเรซินจึงทำให้สีซึ่งเป็นคุณสมบัติทางกายภาพของเรซินเปลี่ยนไป และเมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์แล้วทำการตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี แสดงข้อมูลดังรูปที่ 4.1

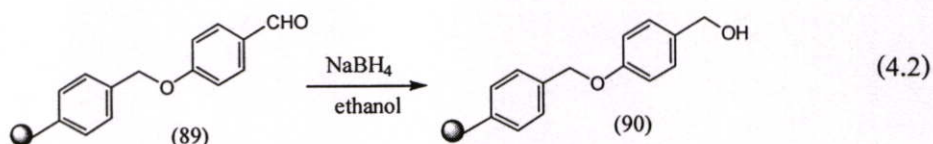


รูปที่ 4.1 แสดงสเปกตรัม FT-IR ของ aldehyde resin (89)

จากผลการทดลองได้ข้อมูลดังนี้ IR (KBr) ν_{\max} 3022 (= C - H, stre.), 2913 (- C - H, stre.), 2000 - 1700 (overtone aromatic), 1686 (C = O), 1595 (- C = C -, ring stre.), 1448 (-C = C -, ring stre.), และ 1209 (C - O, stre.) cm^{-1}

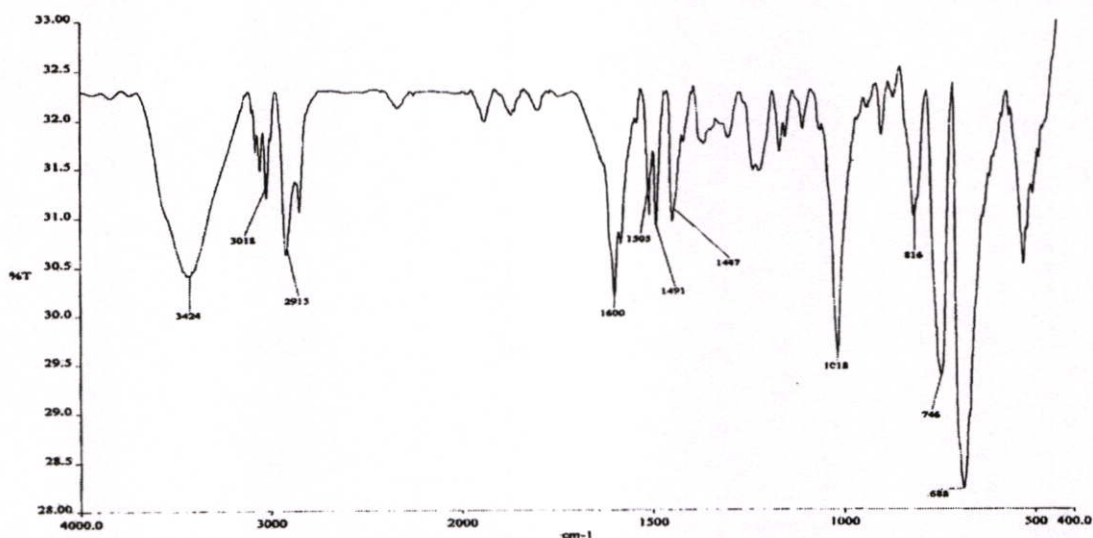
4.1.2 การสังเคราะห์ Wang resin (90)

นำ aldehyde resin (89) ที่ได้มาทำปฏิกิริยารีดักชันด้วย NaBH_4 ใน ethanol ดังสมการที่ 4.2



ในการทดลองจะนำ aldehyde resin (89) มาแช่ในตัวทำละลาย THF ก่อนทำการทดลอง เพื่อให้เรซินบวมตัวด้วยตัวทำละลาย และหลังจากนั้นจึงค่อย ๆ หยดใส่ลงใน NaBH_4 ใน ethanol เมื่อใส่เรซินลงไปหมดแล้วก็ให้ทำการปั่นกววนต่อไปในระบบเปิด ในการเกิดปฏิกิริยาจะมีแก๊ส H_2 เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดเวลา ในเบื้องต้นสามารถตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาได้โดยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงไปของสีของเรซิน ซึ่งเรซินจะเปลี่ยนสีจากสีเหลืองไปเป็นสีขาว เมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์แล้วทำการตรวจสอบปฏิกิริยาด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี แสดงข้อมูลดังรูปที่

4.2



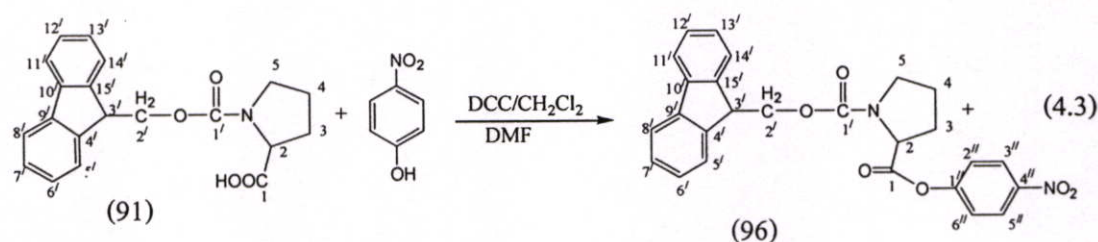
รูปที่ 4.2 แสดงสเปกตรัม FT-IR ของ Wang resin (90)

จากการทดลองได้ข้อมูลดังนี้ IR (KBr) v_{\max} 3424 (- OH), 3018 (= C - H, stre.), 2915 (- C - H, stre.), 2000 - 1700 (overtone aromatic), 1600 (- C = C -, ring stre.), 1447 (- C = C -, ring stre.) และ 1018 (C - O, stre.) cm^{-1}

4.2 ปฏิกริยาการใส่หมู่กระตุ้นที่หมู่คาร์บอกซิลิกของกรดอะมิโน

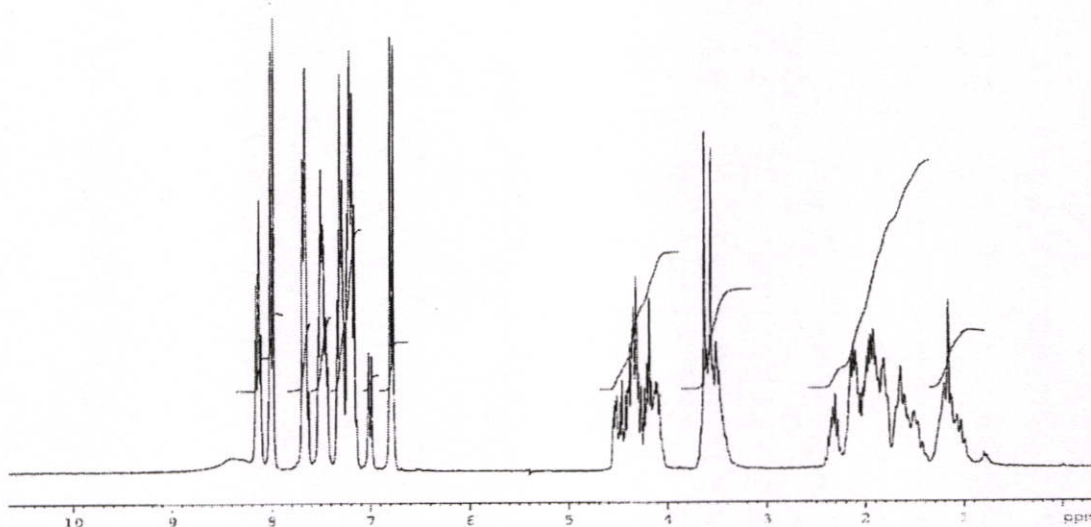
4.2.1 ปฏิกริยาการใส่หมู่กระตุ้นของ Fmoc-Pro-OH

ปฏิกริยาเกิดขึ้นโดยการทำปฏิกริยากันของ Fmoc-Pro-OH (91) กับ 4-nitrophenol โดยมี DCC เป็น coupling reagent ดังสมการที่ 4.3

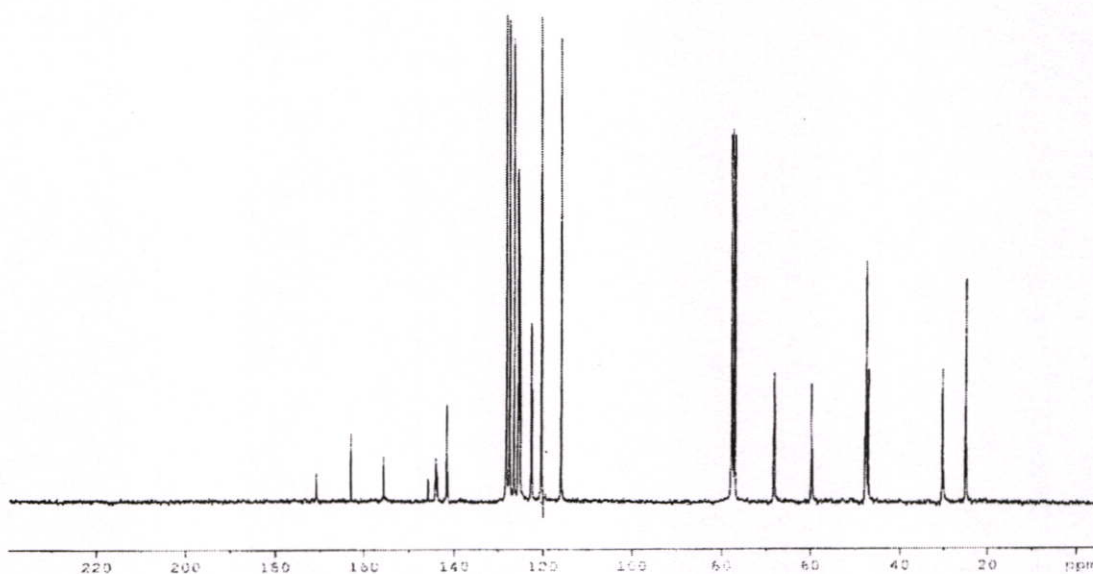


ตรวจสอบการเกิดปฏิกริยาด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี ระบบตัวทำละลายเป็น hexane : DCM (1 : 2) ปรากฏว่ามีการดูดกลืนแสงยูวีที่ 254 นาโนเมตร และเมื่อนำมาทดสอบด้วย ninhydrin จะให้จุดสีเหลือง ซึ่งอยู่สูงกว่าสารตั้งต้น แสดงว่าสารผลิตภัณฑ์ที่ได้มีขั้วที่ต่ำกว่าสารตั้งต้น ในการทดลองนี้ถ้าต้องการให้ได้ผลิตภัณฑ์ในปริมาณที่มากขึ้นควรใส่ DCC ลงไปก่อนแล้วทำการปั่นกววนเป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วจึงเติม 4-nitrophenol ลงไป ทำการปั่นกววนต่ออีกเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อปฏิกริยาสมบูรณ์แล้วทำการกรองเอาซูเรียของ DCC ออกและล้างด้วย DCM

แยกสารที่ได้ให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวชะเป็น DCM ตลอดทั้งคอลัมน์จนแยกสารเสร็จ เพราะสารผลิตภัณฑ์ที่ได้มีขี้ดำนามากและมีขี้วอกคล้ายกับ 4 - nitrophenol จากการทดลองพบว่าการสังเคราะห์สารในปริมาณมาก ๆ ในครั้งเดียวนั้นจะได้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตในปริมาณที่ต่ำกว่าการสังเคราะห์ในปริมาณน้อย ๆ ฉะนั้นถ้าต้องการใช้สารในปริมาณมาก ๆ ควรแบ่งการสังเคราะห์ 2 ครั้งและเมื่อสังเคราะห์เสร็จสมบูรณ์แล้วจึงค่อยนำทั้ง 2 ส่วนมาใช้ร่วมกัน เพื่อให้ได้ปริมาณสารที่มากขึ้น และทำการพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ แสดงข้อมูลดังรูปที่ 4.3 และ 4.4



รูปที่ 4.3 แสดงสเปกตรัม ^1H NMR ของ Fmoc-Pro-O(*p*-NO₂Ph) (96)



รูปที่ 4.4 แสดงสเปกตรัม ^{13}C NMR ของ Fmoc-Pro-O(*p*-NO₂Ph) (96)

จากการทดลองได้ข้อมูลของ ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) และ ^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3) ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงข้อมูล NMR ของสาร (91) และ (96)

Fmoc – Pro – OH (91)			Fmoc – Pro – O(<i>p</i> -NO ₂ Ph) (96)	
ตำแหน่ง	δ_{H} (ppm, mult*, <i>J</i> in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (ppm, mult, <i>J</i> in Hz)	δ_{C}
1	-	176.03	-	170.79
2	3.57(1H, t, 3.04)	47.22	3.64(1H, m)	47.54
3	2.15(1H, m)	29.41	2.16(2H, m)	30.00
4	1.94(2H, m)	24.34	1.93(2H, m)	24.97
5	3.48(2H, t, 6.83)	46.65	3.58(2H, m)	47.07
1'	-	155.74	-	155.67
2'	4.42(2H, m)	67.85	4.46(2H, m)	68.33
3'	4.12(1H, t, 6.39)	59.28	4.19(1H, m)	59.86
4', 15'	-	143.78	-	144.15
5', 14'	7.58(2H, d, 7.21)	127.08	7.51(2H, d, 7.12)	127.50
6', 13'	7.29(2H, t, 6.09)	119.98	7.22(2H, t, 6.85)	120.46
7', 12'	7.38(2H, m)	125.04	7.31(2H, m)	125.60
8', 11'	6.67(2H, d, 7.38)	127.74	7.67(2H, d, 7.13)	128.22
9', 10'	-	141.32	-	141.74
1''	-	-	-	122.73
2'', 6''	-	-	6.78(2H, d, 8.94)	116.03
3'', 5''	-	-	7.99(2H, d, 8.96)	126.52
4''	-	-	-	162.99

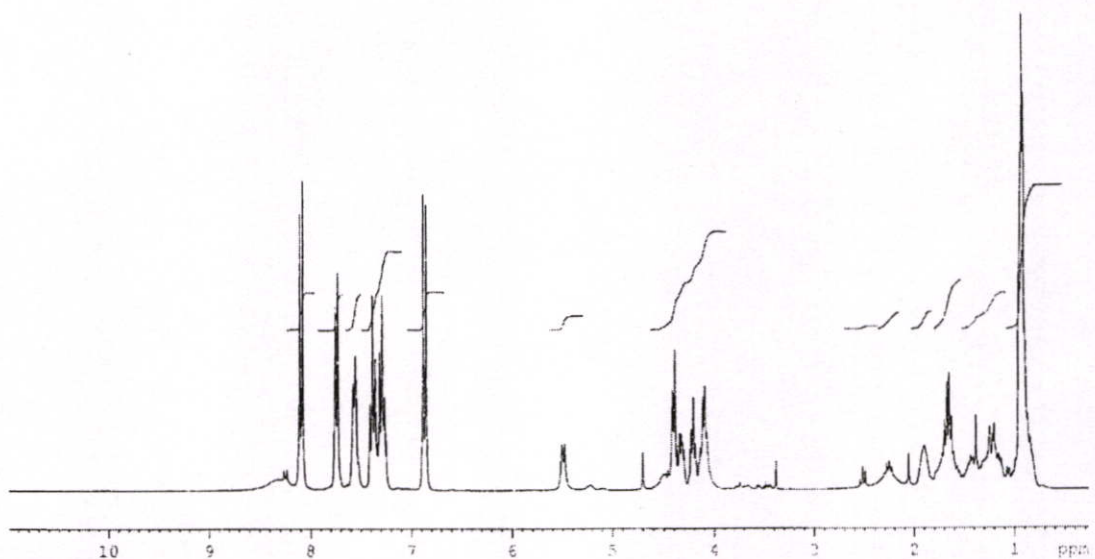
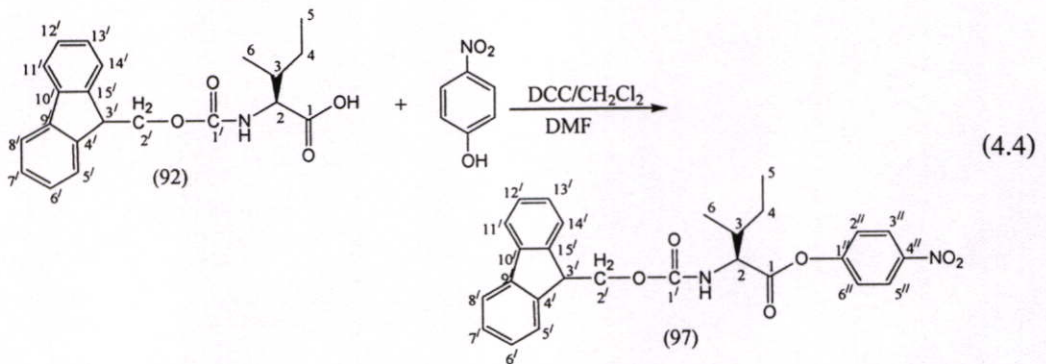
* mult = multiplicity

จากผลการทดลองที่ได้เมื่อทำการใส่หมู่ 4 – nitrophenol เข้าไปที่หมู่คาร์บอกซิลิกของกรดอะมิโน ตำแหน่งสัญญาณของ ^1H NMR ที่เพิ่มขึ้นจาก Fmoc – Pro – OH (91) คือ doublet ที่ δ 6.78 และ δ 7.99 ppm สัญญาณที่สนามแม่เหล็กต่ำกว่าคือที่ δ 7.99 ppm เกิดจากโปรตอนตำแหน่ง 3'' และ 5'' ได้รับอิทธิพลจากหมู่ NO₂ ซึ่งเป็นหมู่ที่ดึงอิเล็กตรอนได้ดีจึงทำให้ปรากฏที่สนามแม่เหล็กต่ำ ส่วนสัญญาณที่ δ 6.78 ppm เกิดจากโปรตอนตำแหน่ง 2'' และ 6'' ซึ่งอยู่ห่าง

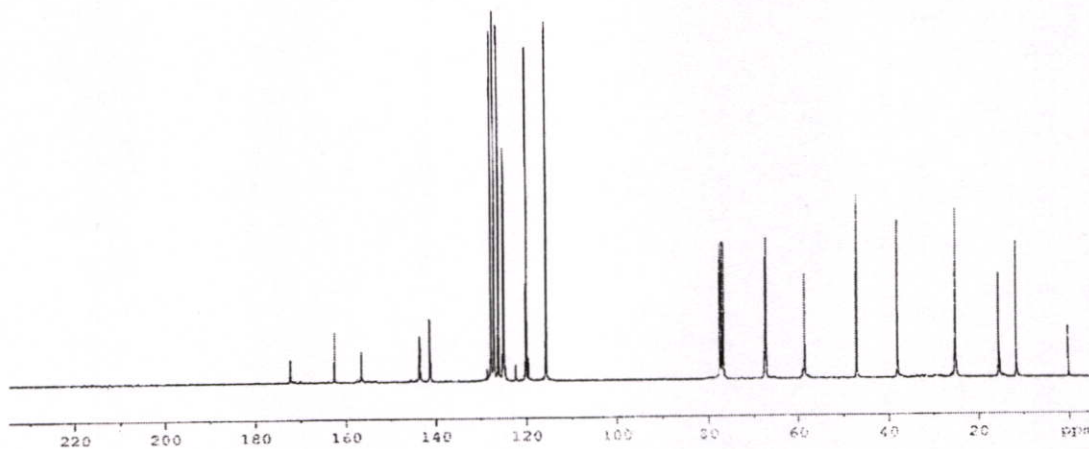
จากหมู่ NO_2 จึงได้รับอิทธิพลจากหมู่ NO_2 น้อยกว่า ทำให้ปรากฏสัญญาณที่สนามแม่เหล็กสูง และตำแหน่งสัญญาณของ ^{13}C NMR ที่เพิ่มขึ้นคือที่ δ 116.03 122.73 126.52 และ 162.99 ppm ซึ่งเกิดจากคาร์บอนที่ตำแหน่ง 1'' 2'' 3'' 4'' 5'' และ 6'' ของวงอะโรมาติก 4-nitrophenol สัญญาณที่สนามแม่เหล็กต่ำคือที่ δ 162.99 ppm เกิดจากคาร์บอนตำแหน่ง 4'' เนื่องจากเป็นตำแหน่งที่อยู่ใกล้หมู่ NO_2 มากที่สุด จึงทำให้คาร์บอนที่ตำแหน่งนี้ปรากฏที่สนามแม่เหล็กต่ำที่สุดของวงอะโรมาติก 4-nitrophenol

วิธีการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาการใส่หมู่กระตุ้นของ Fmoc-Pro-OH รวมทั้งขั้นตอนวิธีการทดลอง การแยกสารให้บริสุทธิ์ และเทคนิคต่าง ๆ นั้นนำมาใช้ในการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาการใส่หมู่กระตุ้นของ Fmoc-amino acid ตัวอื่น ๆ เช่นกัน รวมทั้งการแปลผลข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีใช้หลักการในการอ่านผลการทดลองเหมือนกัน ผลการทดสอบของ Fmoc-amino acid ตัวอื่น ๆ แสดงผลการทดลองตามหัวข้อต่าง ๆ ดังนี้

4.2.2 ปฏิกิริยาการใส่หมู่กระตุ้นของ Fmoc-Ile-OH ดังสมการที่ 4.8



รูปที่ 4.5 แสดงสเปกตรัม ^1H NMR ของ Fmoc-Ile-O(*p*- NO_2Ph) (97)



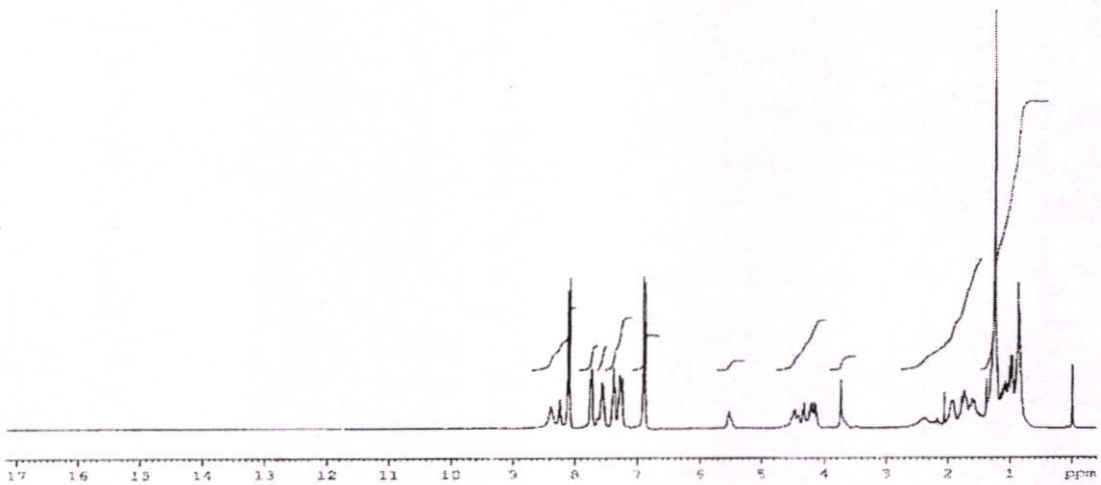
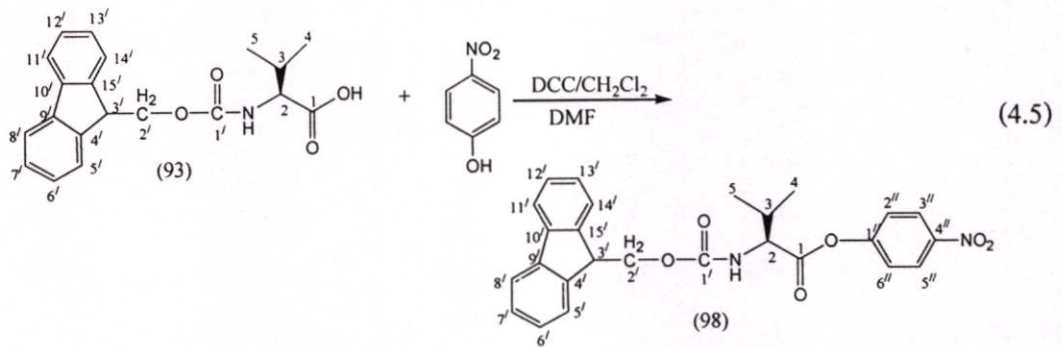
รูปที่ 4.6 แสดงสเปกตรัม ^{13}C NMR ของ Fmoc-Ile-O(*p*-NO₂Ph) (97)

จากการทดลองได้ข้อมูลของ ^1H NMR (300 MHz, CDCl₃) และ ^{13}C NMR (300 MHz, CDCl₃) ดังตารางที่ 4.2

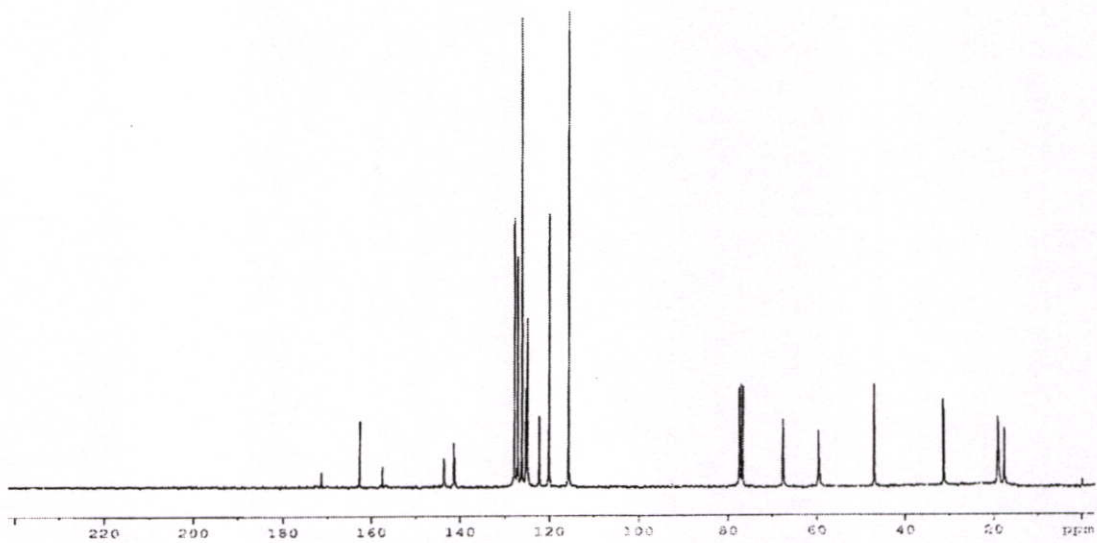
ตารางที่ 4.2 แสดงข้อมูล NMR ของสาร (92) และ (97)

Fmoc-Ile-OH (92)			Fmoc-Ile-O(<i>p</i> -NO ₂ Ph) (97)	
ตำแหน่ง	δ_{H} (ppm, mult, <i>J</i> in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (ppm, mult, <i>J</i> in Hz)	δ_{C}
1	-	177.23	-	172.30
2	5.32(1H, d, 8.60)	47.61	5.48(1H, d, 8.69)	47.15
3	1.20(1H, m)	25.31	1.24(1H, m)	25.09
4	1.49(2H, m)	38.15	1.65(2H, m)	38.80
5	0.97(6H, m)	11.99	0.94(6H, m)	11.58
6		15.88		15.49
1'	-	156.60	-	156.61
2'	4.41(2H, m)	67.53	4.41(2H, d, 6.84)	67.17
3'	4.23(1H, t, 5.80)	58.68	4.10(1H, t, 5.84)	58.57
4', 15'	-	144.11	-	143.57
5', 14'	7.57(2H, d, 6.80)	127.48	7.56(2H, d, 6.88)	127.12
6', 13'	7.30(2H, m)	120.39	7.29(2H, m)	120.05
7', 12'	7.39(2H, m)	125.45	7.33(2H, m)	125.32
8', 11'	7.75(2H, d, 7.43)	128.13	7.73(2H, d, 7.45)	127.81
9', 10'	-	141.73	-	141.33
1''	-	-	-	122.32
2'', 6''	-	-	6.86(2H, d, 9.11)	115.67
3'', 5''	-	-	8.08(2H, d, 9.11)	126.17
4''	-	-	-	162.58

4.2.3 ปฏิกิริยาใส่หมู่กระตุ้นของ Fmoc-Val-OH ดังสมการที่ 4.5



รูปที่ 4.7 แสดงสเปกตรัม ^1H NMR ของ Fmoc-Val-O(*p*-NO₂Ph) (98)



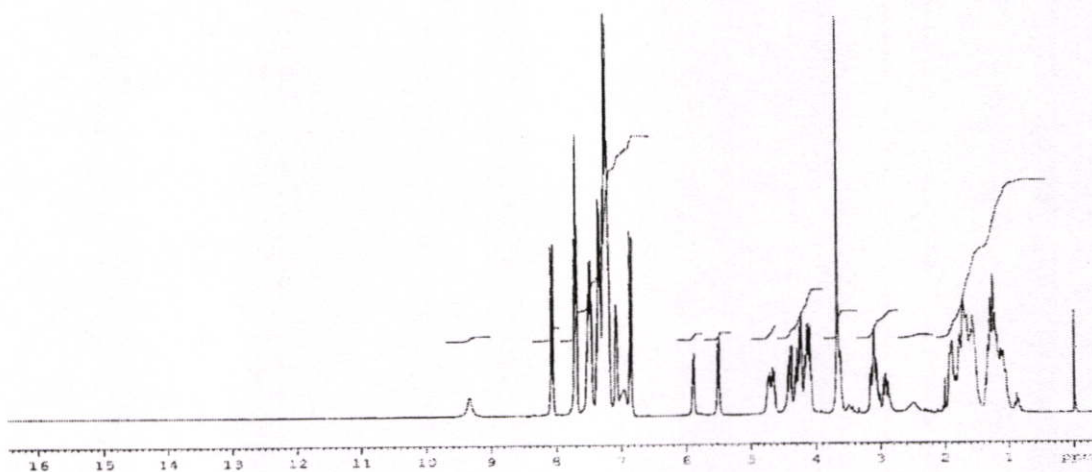
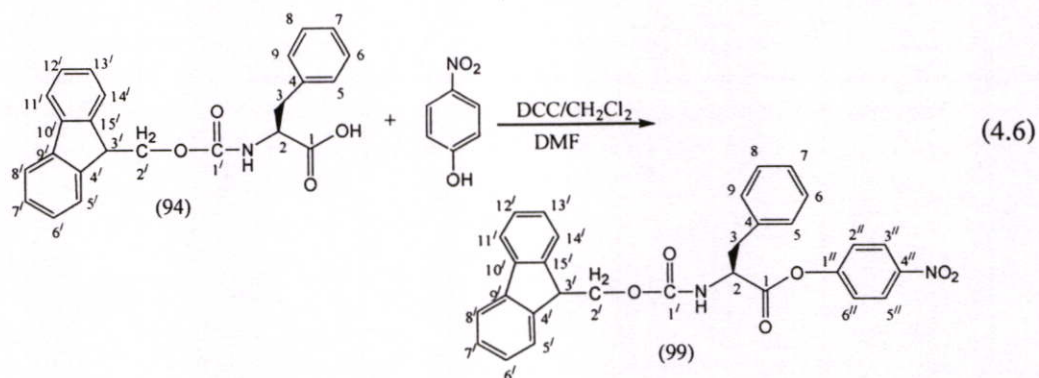
รูปที่ 4.8 แสดงสเปกตรัม ^{13}C NMR ของ Fmoc-Val-O(*p*-NO₂Ph) (98)

จากการทดลองได้ข้อมูลของ ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) และ ^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3) ดังตารางที่ 4.3

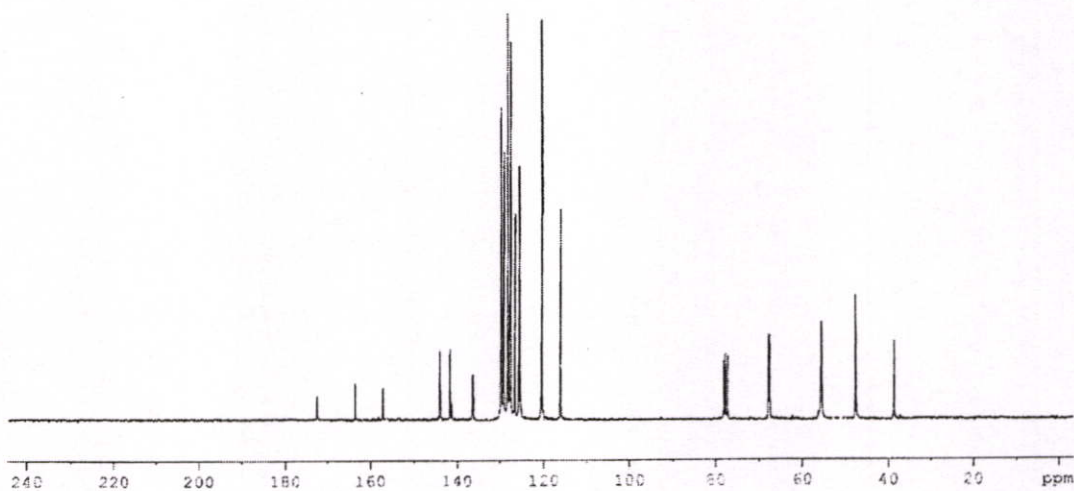
ตารางที่ 4.3 แสดงข้อมูล NMR ของสาร (93) และ (98)

Fmoc – Val – OH (93)			Fmoc – Val – O(<i>p</i> -NO ₂ Ph) (98)	
ตำแหน่ง	δ_{H} (ppm, mult, <i>J</i> in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (ppm, mult, <i>J</i> in Hz)	δ_{C}
1	-	177.13	-	171.35
2	5.29(1H, d, 8.92)	47.59	5.53(1H, d, 6.85)	47.16
3	2.23(1H, m)	31.43	2.23(1H, m)	31.57
4	0.93(6H, q)	19.39	0.87(6H, m)	19.27
5		17.85		17.79
1'	-	156.8	-	156.84
2'	4.40(2H, d, 6.87)	67.55	4.34(2H, m)	67.69
3'	4.22(1H, t, 6.75)	59.28	4.21(1H, m)	59.66
4', 15'	-	144.11	-	143.62
5', 14'	7.57(2H, d, 6.84)	127.48	7.56(2H, d, 6.24)	127.88
6', 13'	7.30.(2H, m)	120.39	7.29(2H, m)	120.10
7', 12'	7.38(2H, t, 7.25)	125.45	7.38(2H, m)	125.33
8', 11'	7.73(2H, d, 7.33)	128.13	7.73(2H, d, 7.32)	127.15
9', 10'	-	141.73	-	141.34
1''	-	-	-	122.31
2'', 6''	-	-	6.88(2H, d, 9.11)	115.72
3'', 5''	-	-	8.09(2H, d, 9.05)	126.20
4''	-	-	-	162.64

4.2.4 ปฏิกิริยาใส่หมู่กระตุ้นของ Fmoc - Phe - OH ดังสมการที่ 4.6



รูปที่ 4.9 แสดงสเปกตรัม ^1H NMR ของ Fmoc - Phe - O(*p*-NO₂Ph) (99)



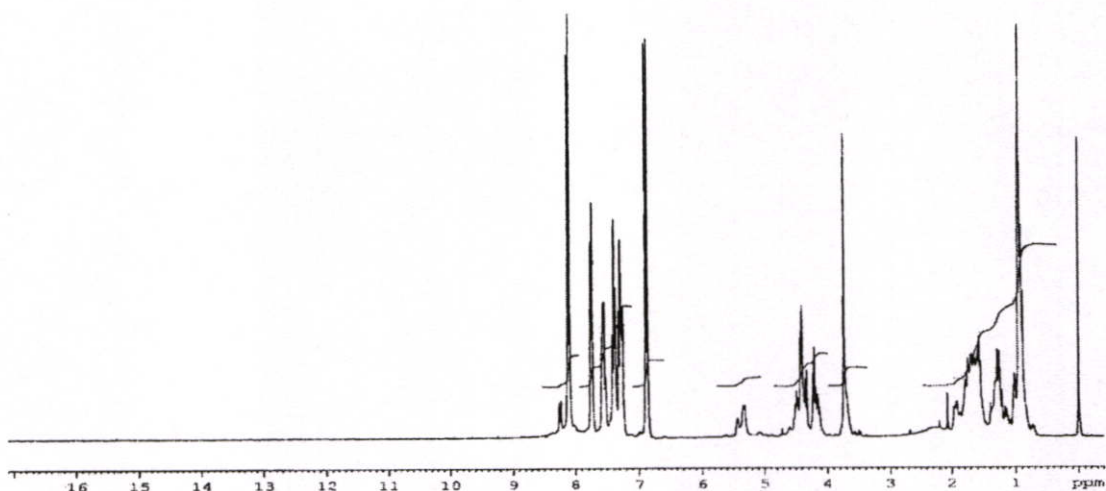
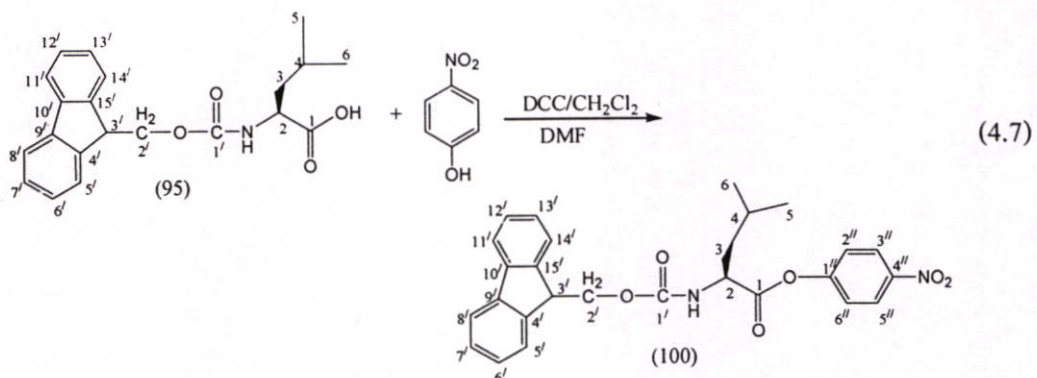
รูปที่ 4.10 แสดงสเปกตรัม ^{13}C NMR ของ Fmoc - Phe - O(*p*-NO₂Ph) (99)

จากการทดลองได้ข้อมูลของ ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) และ ^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3) ดังตารางที่ 4.4

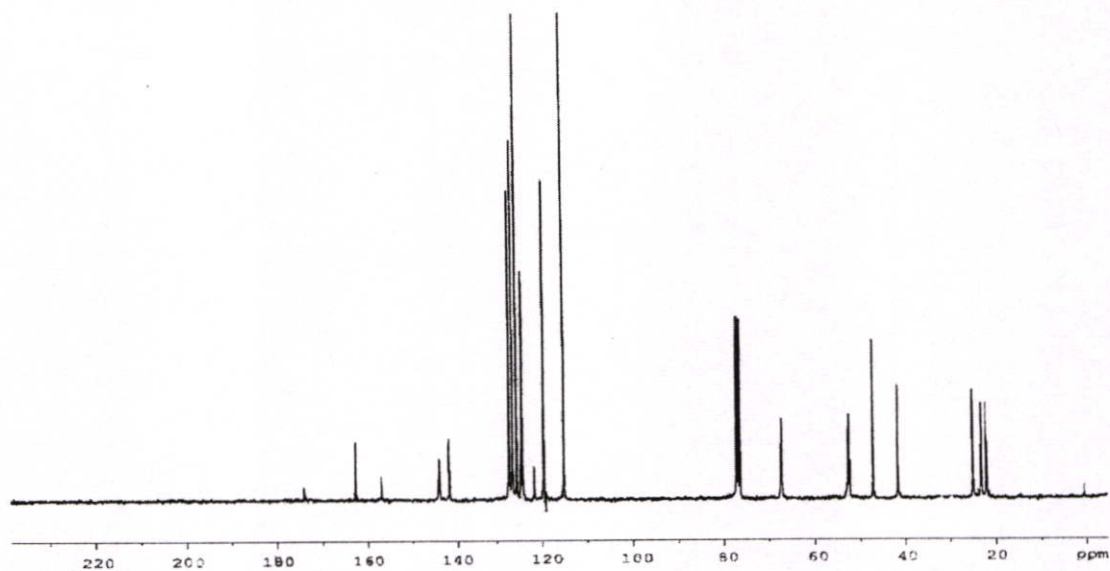
ตารางที่ 4.4 แสดงข้อมูล NMR ของสาร (94) และ (99)

Fmoc – Phe – OH (94)			Fmoc – Phe – O(<i>p</i> -NO ₂ Ph) (99)	
ตำแหน่ง	δ_{H} (ppm, mult, <i>J</i> in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (ppm, mult, <i>J</i> in Hz)	δ_{C}
1	-	174.49	-	172.50
2	4.50(1H, t, 4.11)	47.82	4.64(1H, m)	47.24
3	3.03(2H, m)	38.29	3.10(2H, m)	38.47
4	-	137.58	-	137.50
5, 9	7.22(5H, m)	127.68	7.26(5H, m)	128.12
6, 8		129.01		129.00
7		129.90		129.90
1'	-	157.47	-	153.30
2'	4.32(2H, d, 7.14)	67.55	4.38(2H, d, 9.11)	67.43
3'	4.15(1H, m)	55.95	4.12(1H, m)	55.15
4', 15'	-	144.50	-	143.82
5', 14'	7.55(2H, m)	127.40	7.52(2H, m)	127.43
6', 13'	7.28(2H, m)	120.47	7.09(2H, m)	120.36
7', 12'	7.37(2H, t, 7.39)	125.70	7.33(2H, m)	125.03
8', 11'	7.74(2H, d, 7.45)	128.30	7.71(2H, m)	128.12
9', 10'	-	141.90	-	141.61
1''	-	-	-	120.02
2'', 6''	-	-	6.84(2H, d, 9.11)	116.02
3'', 5''	-	-	8.05(2H, d, 9.03)	126.47
4''	-	-	-	163.25

4.2.5 ปฏิกิริยาใส่หมู่อะดัมของ Fmoc - Leu - OH ดังสมการที่ 4.7



รูปที่ 4.11 แสดงสเปกตรัม ^1H NMR ของ Fmoc - Leu - O(*p* - NO_2Ph) (100)



รูปที่ 4.12 แสดงสเปกตรัม ^{13}C NMR ของ Fmoc - Leu - O(*p* - NO_2Ph) (100)

จากการทดลองได้ข้อมูลของ ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) และ ^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3) ดังตารางที่ 4.5

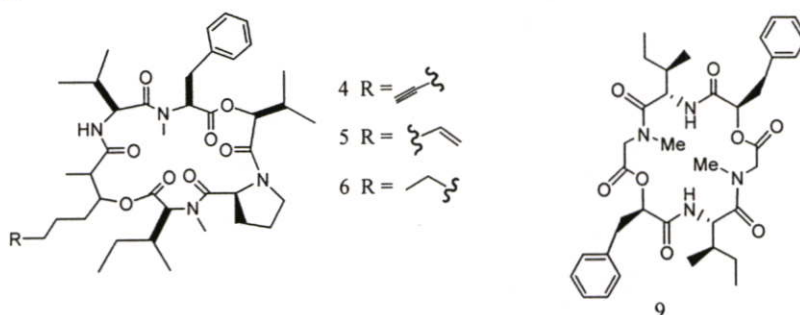
ตารางที่ 4.5 แสดงข้อมูล NMR ของสาร (95) และ (100)

Fmoc – Leu – OH (95)			Fmoc – Leu – O(<i>p</i> -NO ₂ Ph) (100)	
ตำแหน่ง	δ_{H} (ppm, mult, <i>J</i> in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (ppm, mult, <i>J</i> in Hz)	δ_{C}
1	-	178.34	-	174.19
2	5.16(1H, m)	47.60	5.48(1H, m)	47.53
3	1.69(2H, m)	41.82	1.65(2H, m)	41.91
4	1.55(1H, m)	25.18	1.25(1H, m)	25.16
5	0.94(6H, d, 5.28)	23.21	0.94(6H, m)	23.14
6		22.10		22.15
1'	-	156.58	-	156.90
2'	4.40(2H, d, 6.54)	67.49	4.39(2H, d, 6.84)	67.72
3'	4.20(1H, t, 6.73)	52.80	4.10(1H, t, 5.84)	52.88
4', 15'	-	144.09	-	143.91
5', 14'	7.56(2H, m)	127.47	7.56(2H, m)	127.50
6', 13'	7.28(2H, t, 7.23)	120.38	7.29(2H, m)	120.44
7', 12'	7.37(2H, t, 7.27)	125.44	7.39(2H, m)	125.36
8', 11'	7.72(2H, d, 7.33)	128.12	7.73(2H, d, 7.45)	128.20
9', 10'	-	141.74	-	141.73
1''	-	-	-	122.65
2'', 6''	-	-	6.86(2H, d, 9.11)	116.06
3'', 5''	-	-	8.08(2H, d, 9.11)	126.56
4''	-	-	-	162.82

4.3 ปฏิกริยาการสังเคราะห์เทอร์เปปไทด์บนวัฏภาคของแข็ง

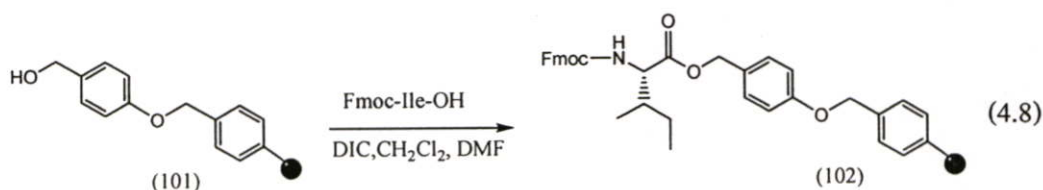
จากการทดลองเป็นการสังเคราะห์เทอร์เปปไทด์บนวัฏภาคของแข็ง โดยตัวเชื่อมโยงเวกซ์ซึ่งเทอร์เปปไทด์ที่ทำการสังเคราะห์จะมี isoleucine และ valine เป็นโครงสร้างหลัก

โดยในการทดลองจะเริ่มจากการนำเรซินมาแช่ใน DCM เพื่อให้เรซินบวมตัว เนื่องจากภายในเม็ดเรซินจะมีหมู่ฟังก์ชันที่ใช้ทำปฏิกิริยาอยู่เป็นจำนวนมาก เมื่อเรซินบวมตัวก็จะทำให้ภายในเม็ดเรซินมีโพรงมากขึ้น จึงทำให้สารที่เข้าทำปฏิกิริยาสามารถแทรกซึมเข้าไปภายในเม็ดเรซินได้ดีขึ้น เป็นผลให้ปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ขึ้น และได้สารผลิตภัณฑ์ในปริมาณมาก โดยกรดอะมิโนตัวแรกที่ใช้คือ isoleucine และตามด้วย valine สาเหตุที่เลือกกรดอะมิโน 2 ชนิดนี้มาเป็นโครงสร้างหลักเนื่องจากในการค้นคว้าเอกสารอ้างอิงต่าง ๆ เกี่ยวกับสารประกอบเปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพส่วนใหญ่จะมีกรดอะมิโน 2 ชนิดนี้เป็นองค์ประกอบอยู่ในสัดส่วนที่มาก [13, 14, 16, 32, 33, 34] ตัวอย่างเช่น Antanapeptins A – C (4 – 6) ที่สามารถออกฤทธิ์ในการต้านการเกิดเมตาบอลิซึมของเนื้องอก และ Hirsutellide A (9) เป็นสารที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียและต้านเชื้อไขมาลาเรีย



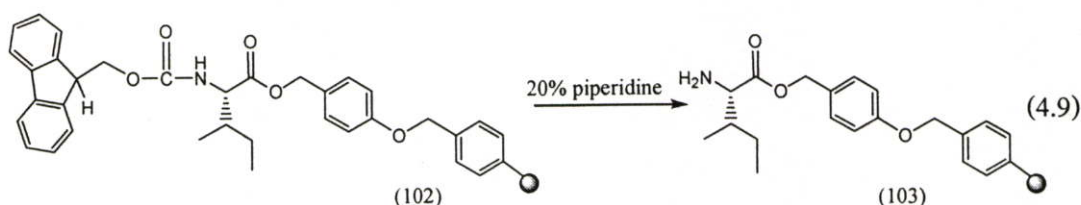
ส่วนกรดอะมิโนตัวที่ 3 และ 4 นั้นเลือกใช้กรดอะมิโนที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการมาใช้เพื่อค้นหา กลุ่มสารที่สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ขั้นตอนในการทดลองคือ เมื่อแช่เรซินให้บวมตัวด้วย DCM แล้ว ทำการดูดเอา DCM ออก และเติมกรดอะมิโนตัวแรกลงไป คือ isoleucine เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ดังสมการ 4.8

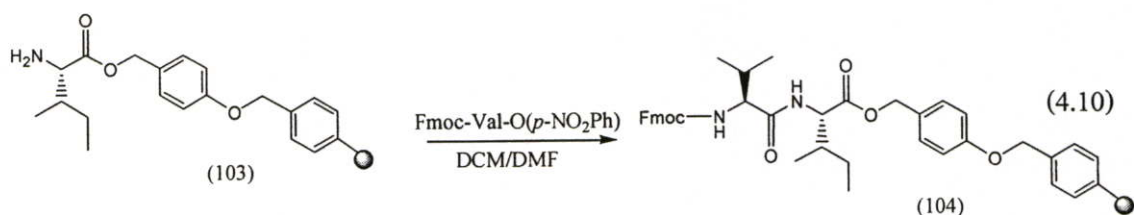


จากนั้นทำการล้างเรซินด้วย DCM และ MeOH

นำสาร (102) มาทำการถอดหมู่ป้องกันออกโดยการเติม 20% piperidine ใน DMF ลงไป เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที ล้างด้วย DCM และ MeOH ทำซ้ำอีกครั้งหนึ่งโดยการเติม 20% piperidine ลงไป และสุดท้ายล้างด้วย DCM และ MeOH ดังสมการ 4.9

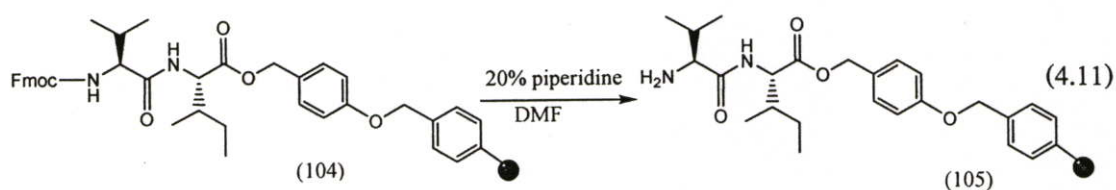


นำสารผลิตภัณฑ์ (103) มาทำปฏิกิริยาควบคู่กับกรดอะมิโนตัวที่ 2 ที่ทำการใส่หมู่กระตุ้นที่หมู่คาร์บอกซิลิกแล้ว คือ Fmoc-Val-O(*p*-NO₂Ph) ละลายใน DMF และ DCM จากนั้นนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ดังสมการ 4.10

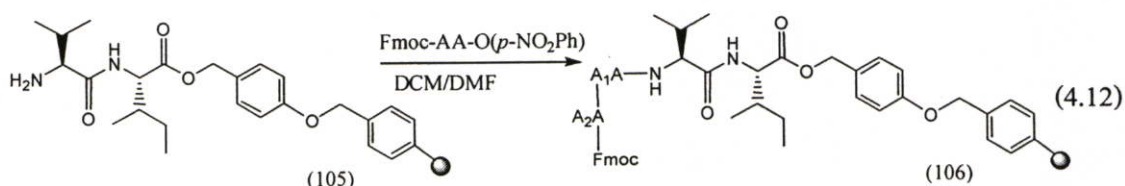


ล้างเรซินด้วย DCM และ MeOH

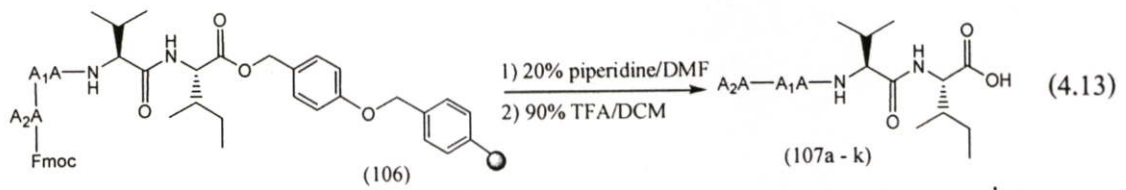
นำสารผลิตภัณฑ์ (104) มาทำการถอดหมู่ป้องกันออกเช่นเดียวกับสมการ 4.9 เพื่อถอดเอาหมู่ Fmoc ออก ดังสมการ 4.11



หลังจากนั้นนำสารผลิตภัณฑ์ (105) มาทำปฏิกิริยาควบคู่กับกรดอะมิโนตัวที่ 3 และ 4 เช่นเดียวกับสมการ 4.10 เพื่อให้ได้เทตระเปปไทด์ดังสมการ 4.12

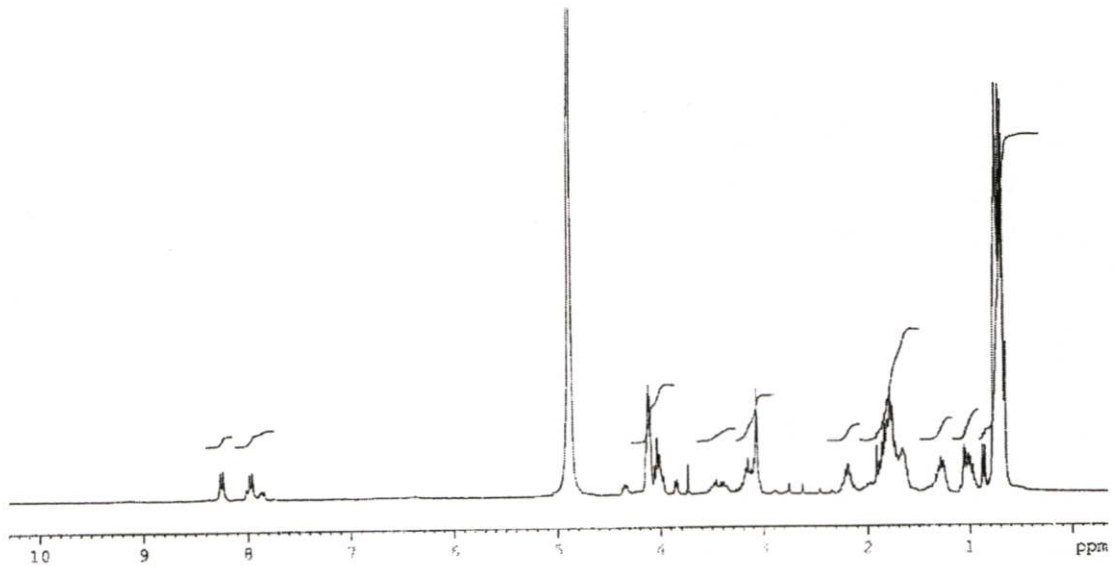


นำสารผลิตภัณฑ์ (106) มาทำการถอดหมู่ป้องกันออกเช่นเดียวกับสมการ 4.9 และตัดสารผลิตภัณฑ์ออกจากเรซินโดยใช้ 90% TFA ใน DCM ดังสมการ 4.13

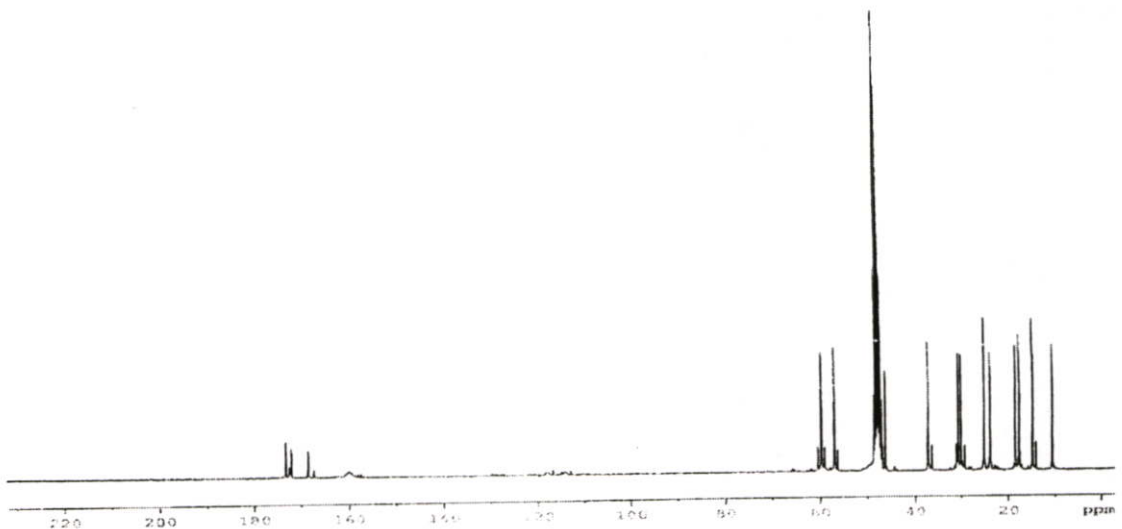


หลังจากทำการตัดสารผลิตภัณฑ์ (107a - k) ออกจากเรซินแล้ว จึงนำสารที่สังเคราะห์ได้มาพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี เทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี และเทคนิคแมสสเปกโทรสโกปีตามหัวข้อต่างๆ ดังนี้

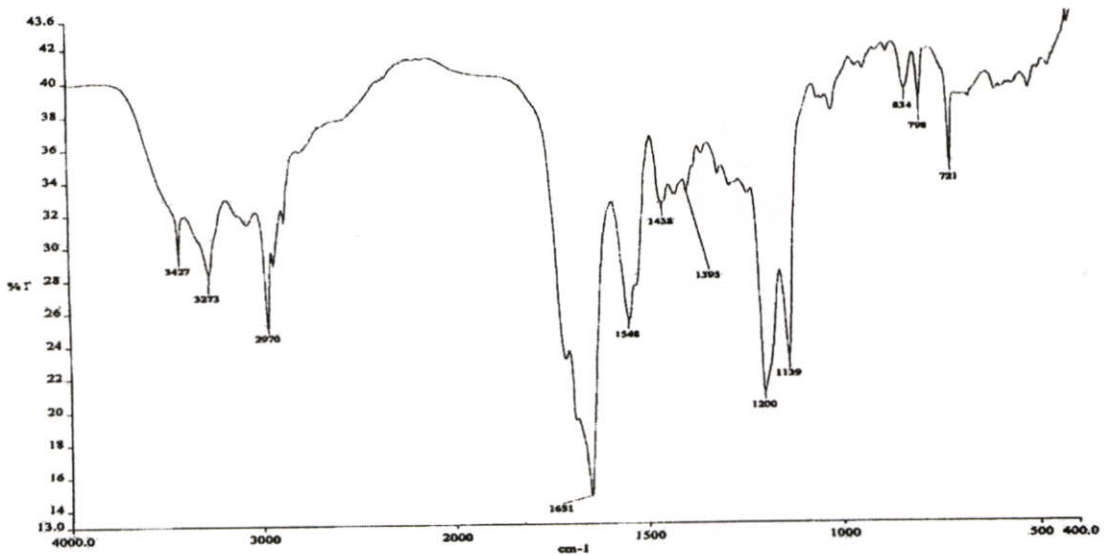
4.3.1 การสังเคราะห์ isoleucylvalylprolylisoleucine (107a)



รูปที่ 4.13 แสดงสเปกตรัม ^1H NMR ของ isoleucylvalylprolylisoleucine (107a)



รูปที่ 4.14 แสดงสเปกตรัม ^{13}C NMR ของ isoleucylvalylprolylisoleucine (107a)

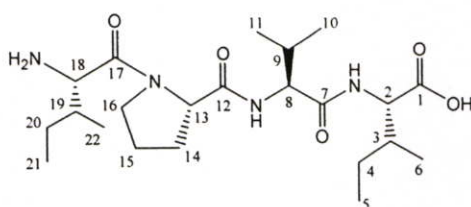


รูปที่ 4.15 แสดงสเปกตรัม FT-IR ของ isoleucylvalylprolylisoleucine (107a)

จากสเปกตรัม ^1H NMR มี 9 ตำแหน่งสัญญาณ จากอินทิกรัลสามารถบอกอัตราส่วนจำนวนโปรตอนที่ทำให้เกิดสัญญาณเป็น 18 : 1 : 1 : 8 : 1 : 1 : 2 : 1 : 2 ซึ่งตำแหน่งสัญญาณทั้งหมดเป็นตำแหน่งสัญญาณของหมู่ $-\text{CH}$, $-\text{CH}_2$ และ $-\text{CH}_3$ ดังนั้นสัญญาณที่ δ 0.71 ppm ควรจะเกิดจากหมู่ $-\text{CH}_3$ ที่อยู่ด้านปลายของสายโซ่ทั้งหมดได้ 18 โปรตอน สัญญาณที่ δ 1.0 1.28 และ 2.19 ppm เป็น multiplet แต่ละสัญญาณเกิดจาก 1 โปรตอนและคาร์บอนอะตอมข้างเคียงมีโปรตอนเกาะอยู่ 5 6 และ 5 ตัวตามลำดับ ซึ่งหมู่ที่เป็นไปได้คือหมู่ $-\text{CH}$ ที่ตำแหน่ง 3 9 และ 19 ตามลำดับ สัญญาณที่ δ 1.79 ppm เกิดจาก 8 โปรตอน หมู่ที่เป็นไปได้คือหมู่ $-\text{CH}_2$ ที่ตำแหน่ง 4 14 15 และ 20 สัญญาณที่ δ 3.08 ppm เป็น doublet เกิดจาก 1 โปรตอนและคาร์บอนอะตอมข้างเคียงมีโปรตอนเกาะอยู่ 1 ตัว จึงควรเป็นหมู่ $-\text{CH}$ ที่ตำแหน่ง 18 สัญญาณที่ δ 3.16 ppm เป็น multiplet เกิดจาก 2 โปรตอน ควรเป็นหมู่ $-\text{CH}_2$ ที่ตำแหน่ง 16 และสัญญาณที่ δ 4.10 ppm เป็น double doublet เกิดจาก 2 โปรตอน ซึ่งเป็นหมู่ $-\text{CH}_2$ หมู่ที่ขึ้นที่ตำแหน่งสัญญาณเดียวกันและคาร์บอนอะตอมข้างเคียงมีโปรตอนเกาะอยู่ 1 ตัว จึงเป็นตำแหน่ง 2 และ 8 ของสายโซ่เปปไทด์

สเปกตรัม ^{13}C NMR พบตำแหน่งสัญญาณที่สำคัญคือตำแหน่งสัญญาณที่ δ 173.32 172.13 168.60 และ 167.30 ppm เป็นตำแหน่งสัญญาณของหมู่ $\text{C}=\text{O}$ โดยตำแหน่งสัญญาณนี้จะเป็นตำแหน่งที่บ่งบอกถึงการสร้างพันธะเปปไทด์ ซึ่งในการทดลองเป็นการสังเคราะห์เทตระเปปไทด์ที่เกิดจากกรดอะมิโน 4 ตัว ดังนั้นจึงพบตำแหน่งสัญญาณของพันธะเปปไทด์ 3 ตำแหน่งที่สัญญาณ δ 172.13 168.60 และ 167.30 ppm และของกรดคาร์บอกซิลิก 1 ตำแหน่งที่สัญญาณ δ 173.32 ppm ซึ่งเป็นตำแหน่งทางด้านปลายของสายโซ่เปปไทด์ที่ไม่ได้สร้างพันธะเปปไทด์กับกรดอะมิโนตัวอื่น ๆ ผลการทดลองสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 4.6

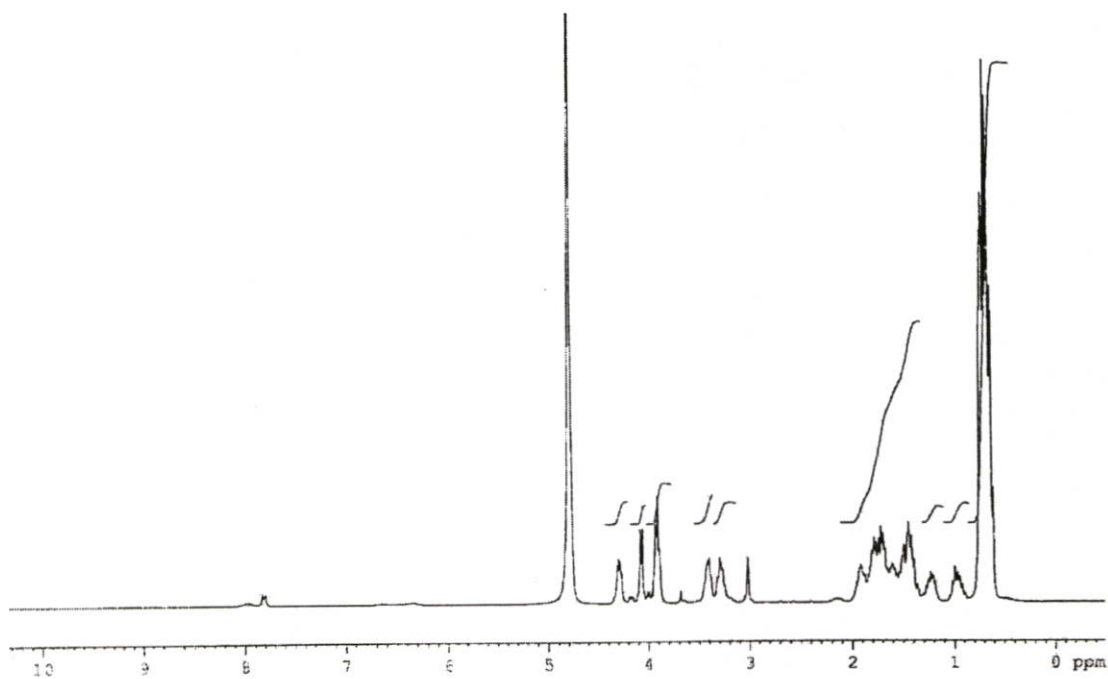
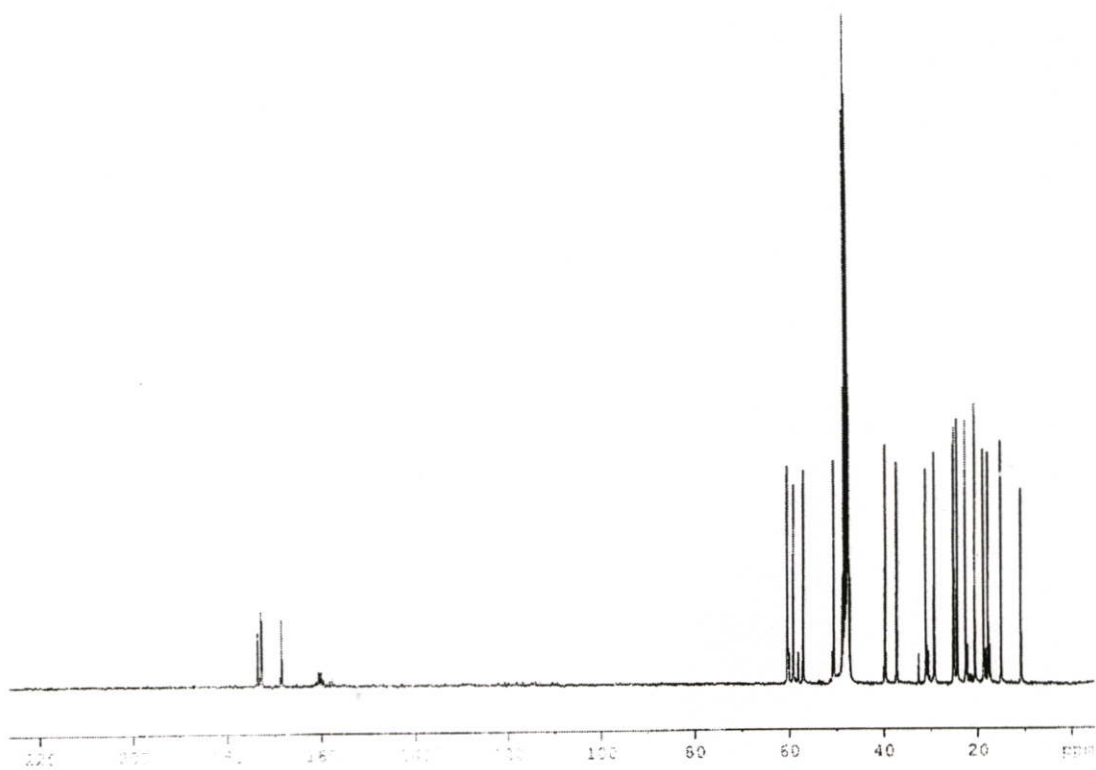
ตารางที่ 4.6 แสดงข้อมูล NMR ของ isoleucylvalylprolylisoleucine (107a)

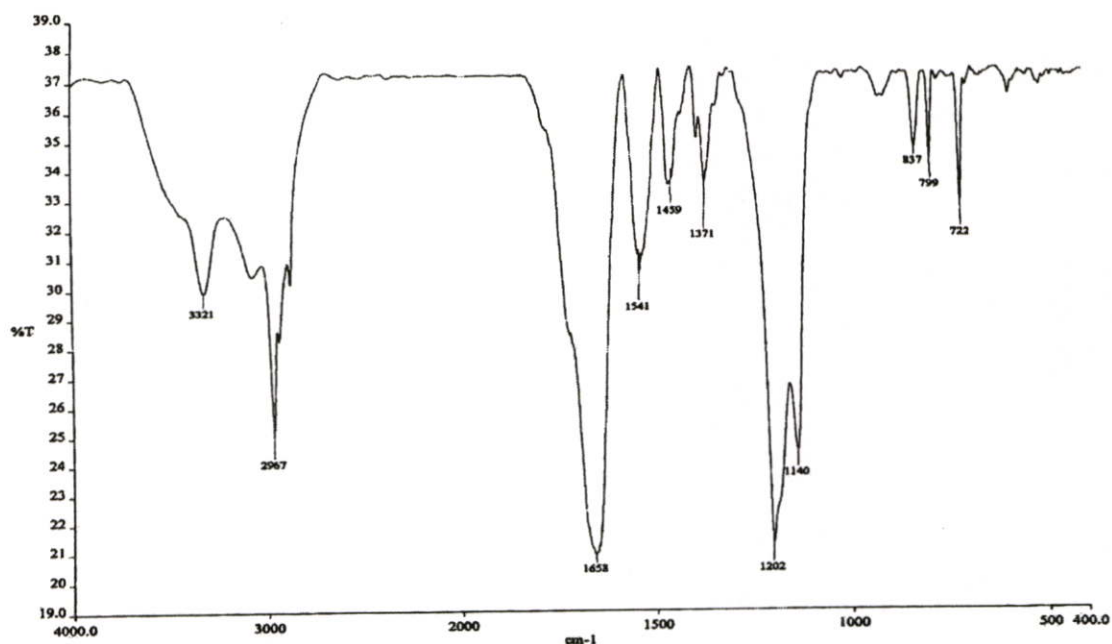


Isolucylvalylprolylisoleucine (107a)			
ตำแหน่ง	δ_{H} (ppm, mult, J in Hz)	ตำแหน่ง	δ_{C}
1	-	1	173.32
2, 8	4.10(2H, dd, 3.37, 2.94)	2, 18	59.72
3	1.0(1H, m)	3, 19	29.98
4, 14, 20	1.79(8H, m)	4, 20	24.97
15		5, 21	10.55
5, 6	0.71(18H, m)	6, 22	14.82
10, 11		7	168.60
21, 22		8	59.64
7		9	30.58
9	1.28(1H, m)	10, 11	17.62
12	-	12	167.3
13	4.03(1H, d, 4.97)	13	46.28
16	3.16(2H, m)	14	23.71
17	-	15	18.42
18	3.08(1H, d, 6.92)	16	37.08
19	2.19(1H, m)	17	172.13

IR (KBr) ν_{max} 3273 (- OH), 2970 (- C - H, stre.), 1651 (C = O), 1548 (- NH, bend.), 1458 (- CH₂, bend), 1395 (- CH₃, bend.), 1200 (C - O, stre.), 1139 (C - N, stre.), และ 834 (- NH, oop.) cm⁻¹; MS (electrospray) : C₂₂H₄₀N₄O₅ จากการคำนวณได้ 440.3 m/z ที่พบ 463.8 [M+ Na]⁺ (15.3%)

4.3.2 การสังเคราะห์ isoleucylvalylprolylleucine (107b)

รูปที่ 4.16 แสดงสเปกตรัม ^1H NMR ของ isoleucylvalylprolylleucine (107b)รูปที่ 4.17 แสดงสเปกตรัม ^{13}C NMR ของ isoleucylvalylprolylleucine (107b)

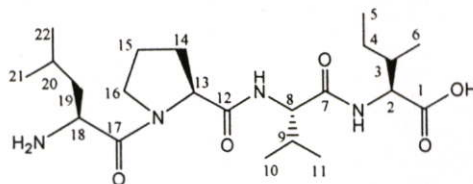


รูปที่ 4.18 แสดงสเปกตรัม FT-IR ของ isoleucylvalylpropylleucine (107b)

จากสเปกตรัม ^1H NMR ประกอบด้วย 11 ตำแหน่งสัญญาณ และมีอินทิกรัลอัตราส่วนจำนวนโปรตอนเป็น 18 : 1 : 1 : 1 : 2 : 2 : 4 : 1 : 1 : 2 : 2 : 1 ตำแหน่งสัญญาณที่ δ 0.70 ppm เกิดจากหมู่ $-\text{CH}_3$ ที่อยู่ทางด้านปลายของสายโซ่ทั้งหมดมี 18 โปรตอน สัญญาณที่ δ 0.99 1.23 1.92 และ 3.30 ppm เป็น multiplet แต่ละสัญญาณเกิดจาก 1 โปรตอนและคาร์บอนอะตอมข้างเคียงมีโปรตอนเกาะอยู่ 5 6 6 และ 2 ตัวตามลำดับ จึงเป็นหมู่ $-\text{CH}$ ที่ตำแหน่ง 3 9 20 และ 13 ตามลำดับ สัญญาณที่ δ 1.73 ppm เป็น multiplet เกิดจาก 2 โปรตอนและมีโปรตอนข้างเคียงเกาะอยู่ 4 ตัวจึงเป็นหมู่ $-\text{CH}_2$ ที่ตำแหน่ง 15 สัญญาณที่ δ 1.80 ppm เป็น multiplet เกิดจาก 4 โปรตอน ซึ่งเป็นตำแหน่งสัญญาณของหมู่ $-\text{CH}_2$ 2 หมู่ที่ขึ้นที่ตำแหน่งสัญญาณเดียวกันและมีโปรตอนข้างเคียง 4 ตัวจึงเป็นตำแหน่งที่ 4 และ 14 สัญญาณที่ δ 1.49 ppm เป็น triplet เกิดจาก 2 โปรตอนและมีโปรตอนข้างเคียง 2 ตัว หมู่ที่เป็นไปได้คือหมู่ $-\text{CH}_2$ ของตำแหน่ง 19 สัญญาณที่ δ 3.43 ppm เกิดจาก 2 โปรตอนของตำแหน่ง 16 สัญญาณที่ δ 3.90 ppm เป็น double doublet เกิดจาก 2 โปรตอนของหมู่ $-\text{CH}$ 2 หมู่ของตำแหน่ง 2 และ 8 และสัญญาณที่ δ 4.06 ppm เกิดจาก 1 โปรตอนของหมู่ $-\text{CH}$ ที่มีโปรตอนข้างเคียง 1 ตัว ซึ่งเป็นตำแหน่ง 8 ของสายโซ่เปปไทด์

สเปกตรัม ^{13}C NMR พบตำแหน่งสัญญาณของหมู่ $\text{C}=\text{O}$ ที่สร้างพันธะเปปไทด์ 3 ตำแหน่ง ที่สัญญาณ δ 168.47 172.57 และ 172.75 ppm และหมู่ $\text{C}=\text{O}$ ของกรดคาร์บอกซิลิก 1 ตำแหน่งที่สัญญาณ δ 173.46 ppm ซึ่งเป็นตำแหน่งของกรดคาร์บอกซิลิกที่อยู่ทางด้านปลายของสายโซ่เปปไทด์และไม่มีพันธะสร้างพันธะเปปไทด์กับกรดอะมิโนอื่น ผลการทดลองสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 4.7

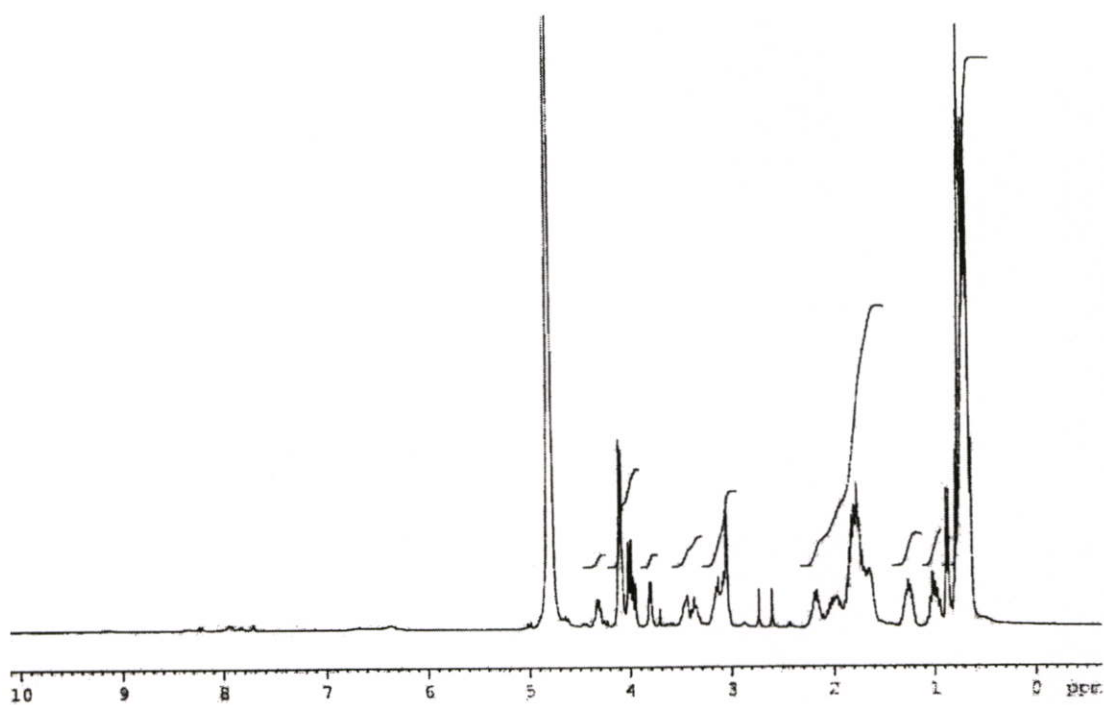
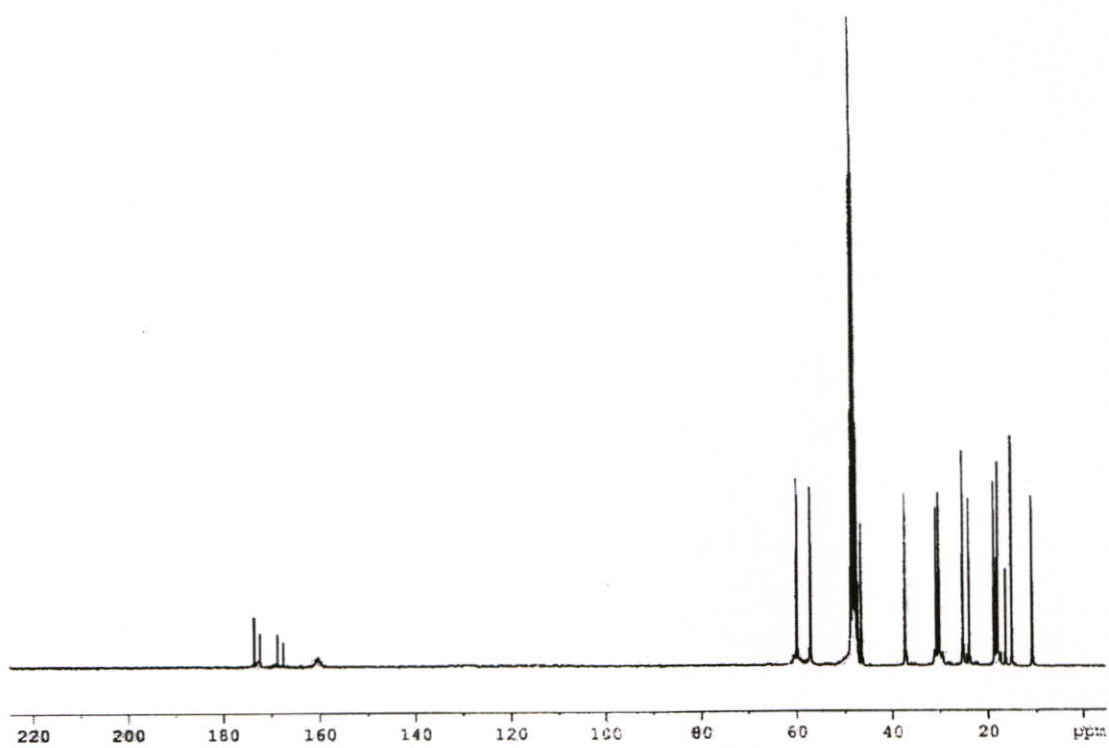
ตารางที่ 4.7 แสดงข้อมูล NMR ของ isoleucylvalylprolylleucine (107b)

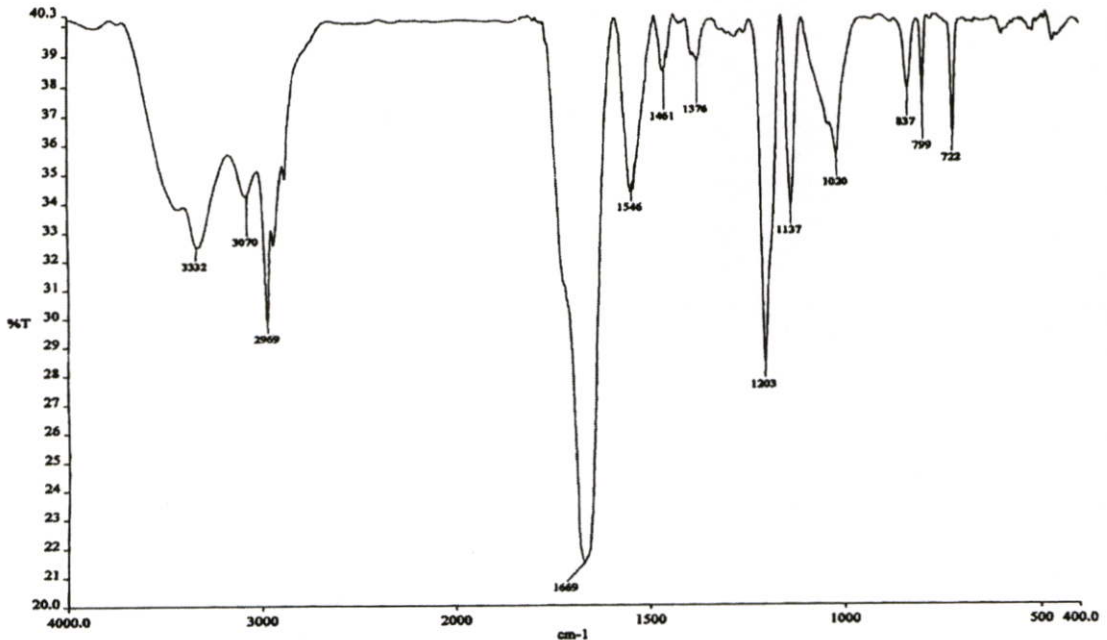


Isoleucylvalylprolylleucine (107b)			
ตำแหน่ง	δ_H (ppm, mult, J in Hz)	ตำแหน่ง	δ_C
1	-	1	173.46
2, 18	3.90(2H, dd, 4.52, 2.55)	2	59.19
3	0.99(1H, m)	3	29.30
4, 14	1.80(4H, m)	4	25.01
5	0.70(18H, m)	5	10.76
6		6	14.99
10, 11		10, 11	17.76
21, 22		21, 22	20.54
7	-	7	172.75
8	4.06(1H, d, 5.64)	8	60.47
9	1.23(1H, m)	9	31.11
12	-	12	172.57
13	3.30(1H, m)	13	57.09
15	1.73(2H, m)	14	24.34
16	3.43(2H, m)	15	18.71
17	-	16	37.34
19	1.49(2H, t, 5.07)	17	168.47
20	1.92(1H, m)	18	50.62
		19	39.74
		20	22.55

IR (KBr) ν_{\max} 3321 (- OH), 2967 (- C - H, stre.), 1658 (C = O), 1541 (- NH, bend.), 1459 (- CH₂, bend), 1371 (- CH₃, bend.), 1202 (C - O, stre.), 1140 (C - N, stre.), และ 837 (- NH, oop.) cm⁻¹; MS (electrospray) : C₂₂H₄₀N₄O₅ จากการคำนวณได้ 440.3 m/z ที่พบ 440.9 [M⁺](7.9%) 327.5 [M-Leu]⁺(5.9%)

4.3.3 การสังเคราะห์ isoleucylvalylprolylvaline (107c)

รูปที่ 4.19 แสดงสเปกตรัม ^1H NMR ของ isoleucylvalylprolylvaline (107c)รูปที่ 4.20 แสดงสเปกตรัม ^{13}C NMR ของ isoleucylvalylprolylvaline (107c)

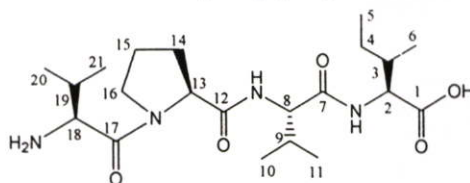


รูปที่ 4.21 แสดงสเปกตรัม FT-IR ของ isoleucylvalylpropylvaline (107c)

จากสเปกตรัม ^1H NMR ประกอบด้วย 9 ตำแหน่งสัญญาณ อินทิกรัลมีอัตราส่วนจำนวนโปรตอนเป็น 18:1:1:6:1:1:2:1:2 สัญญาณที่ δ 0.73 ppm เกิดจาก 18 โปรตอนของหมู่ $-\text{CH}_3$ ที่อยู่ทางด้านปลายของสายโซ่ทั้งหมด ส่วน multiplet ที่ δ 1.02 1.30 และ 2.17 ppm ซึ่งแต่ละตำแหน่งสัญญาณมีจำนวน 1 โปรตอนและมีโปรตอนข้างเคียง 5 6 และ 6 ตัวตามลำดับ หมู่ที่เป็นไปได้คือหมู่ $-\text{CH}$ ที่ตำแหน่ง 3 9 และ 19 ตามลำดับ multiplet ที่ δ 1.80 ppm มีจำนวน 6 โปรตอนที่เกิดจากหมู่ $-\text{CH}_2$ ที่ตำแหน่ง 4 14 และ 15 ที่ขึ้นที่ตำแหน่งสัญญาณเดียวกันและมีโปรตอนข้างเคียง 4 ตัว triplet ที่ δ 3.04 ppm มีจำนวน 1 โปรตอนเกิดจากหมู่ $-\text{CH}$ ที่มีโปรตอนข้างเคียง 2 ตัว จึงเป็นตำแหน่ง 13 สัญญาณที่ δ 3.10 ppm เป็น triplet มีจำนวน 2 โปรตอนและมีโปรตอนข้างเคียง 2 ตัว หมู่ที่เป็นไปได้คือหมู่ $-\text{CH}_2$ ที่ตำแหน่ง 16 doublet ที่ δ 3.99 ppm มีจำนวน 1 โปรตอนเกิดจากหมู่ $-\text{CH}$ ที่มีโปรตอนข้างเคียง 1 ตัว จึงเป็นตำแหน่ง 2 และสัญญาณที่ δ 4.08 ppm มีจำนวน 2 โปรตอนเกิดจากหมู่ $-\text{CH}$ 2 หมู่ที่ขึ้นที่ตำแหน่งสัญญาณเดียวกันและมีโปรตอนข้างเคียง 1 ตัว จึงเป็นตำแหน่ง 8 และ 18 ของสายโซ่เปปไทด์

สเปกตรัม ^{13}C NMR พบตำแหน่งสัญญาณของหมู่ $\text{C}=\text{O}$ ที่สร้างพันธะเปปไทด์ 3 ตำแหน่ง ที่สัญญาณ δ 167.56 168.79 และ 172.30 ppm และหมู่ $\text{C}=\text{O}$ ของกรดคาร์บอกซิลิก 1 ตำแหน่งที่สัญญาณ δ 173.49 ppm โดยตำแหน่งสัญญาณที่พบจะบ่งบอกถึงการสร้างเปปไทด์ระหว่างกรดอะมิโน ผลการทดลองสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 4.8

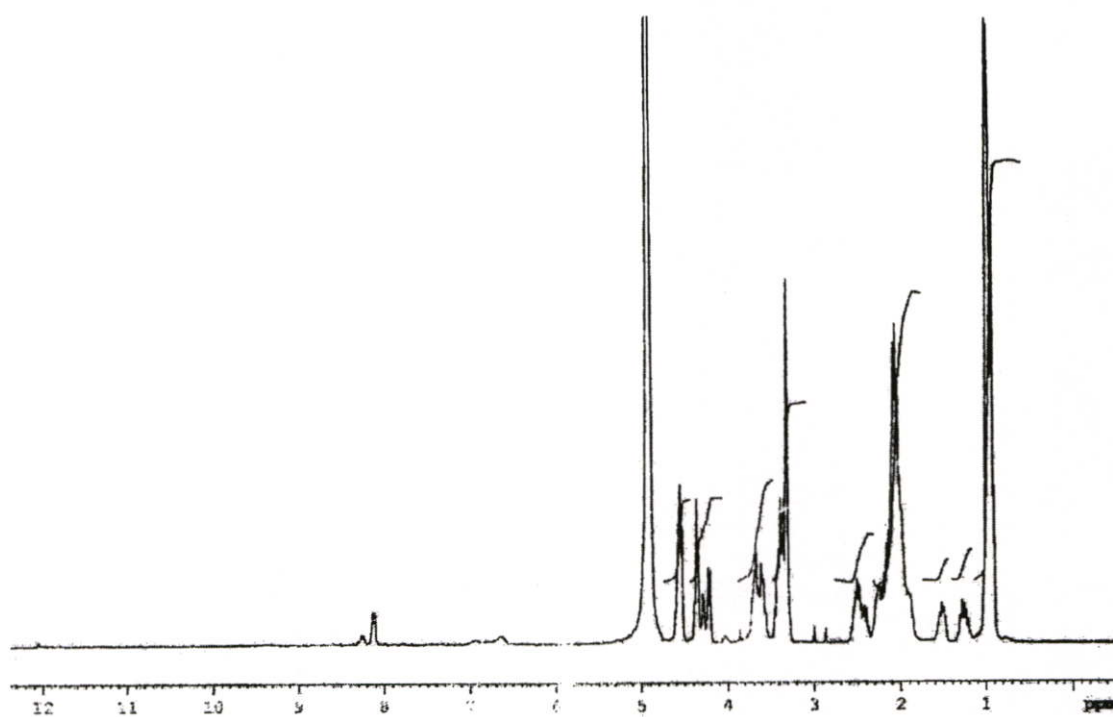
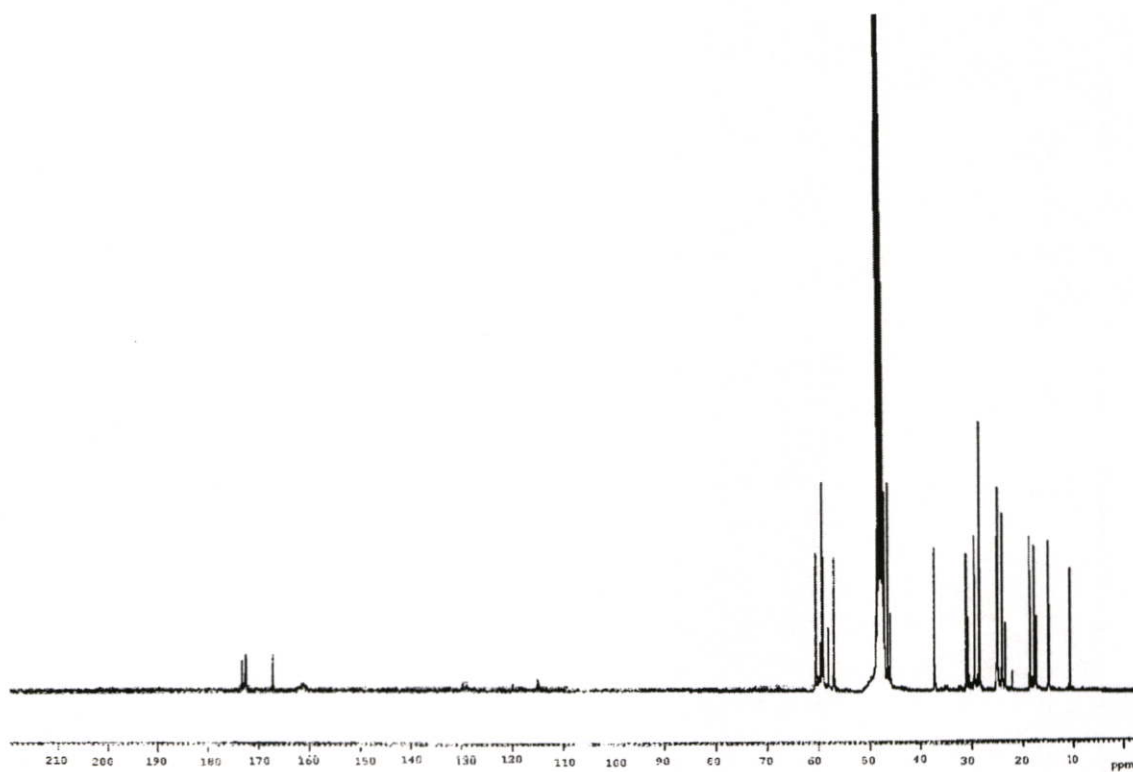
ตารางที่ 4.8 แสดงข้อมูล NMR ของ isoleucylvalylprolylvaline (107c)

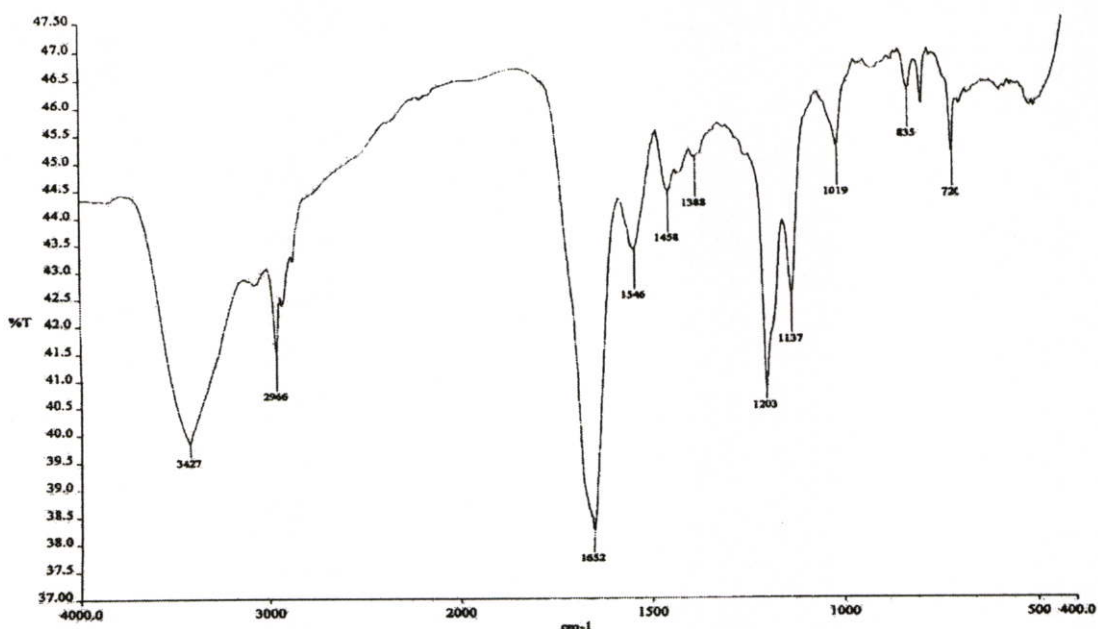


Isoleucylvalylprolylvaline (107c)			
ตำแหน่ง	δ_H (ppm, mult, J in Hz)	ตำแหน่ง	δ_C
1	-	1	173.49
2	3.99(1H, d, 7.68)	2	57.17
3	1.02(1H, m)	3	30.76
4	1.80(6H, m)	4	23.90
14, 15		5	10.74
5, 6	0.73(18H, m)	6	16.23
10, 11		7	172.30
20, 21		8, 18	59.90
7	-	9	25.17
8, 18	4.08(2H, d, 5.56)	10, 11	14.98
9	1.30(1H, m)	20, 21	
12	-	12	168.79
13	3.04(1H, t, 1.45)	13	46.47
16	3.10(2H, t, 3.42)	14	18.61
17	-	15	17.80
19	2.17(1H, m)	16	37.28
		17	167.56
		19	30.17

IR (KBr) ν_{\max} 3332 (- OH), 2969 (- C - H, stre.), 1669 (C = O), 1546 (- NH, bend.), 1461 (- CH₂, bend), 1376 (- CH₃, bend.), 1203 (C - O, stre.), 1137 (C - N, stre.), และ 837 (- NH, oop.) cm⁻¹; MS (electrospray) : C₂₁H₃₈N₄O₅ จากการคำนวณได้ 426.3 m/z ที่พบ 426.4 [M⁺](9.7%) 372.2 [M-Val]⁺(44.1%)

4.3.4 การสังเคราะห์ isoleucylvalylprolylproline (107d)

รูปที่ 4.22 แสดงสเปกตรัม ^1H NMR ของ isoleucylvalylprolylproline (107d)รูปที่ 4.23 แสดงสเปกตรัม ^{13}C NMR ของ isoleucylvalylprolylproline (107d)

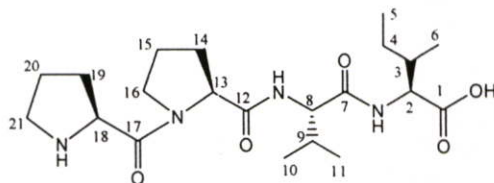


รูปที่ 4.24 แสดงสเปกตรัม FT-IR ของ isoleucylvalylprolylproline (107d)

จากสเปกตรัม ^1H NMR ประกอบด้วย 10 ตำแหน่งสัญญาณ โดยอินทิกรัลมีอัตราส่วนจำนวนโปรตอนเป็น 12:1:1:8:2:2:2:1:1:2 ตำแหน่งสัญญาณที่ δ 0.98 ppm มีทั้งหมด 12 โปรตอนซึ่งเกิดจากโปรตอนของหมู่ $-\text{CH}_3$ ที่ด้านปลายของสายโซ่ทั้งหมด multiplet ที่ δ 1.26 และ 1.53 ppm มี 1 โปรตอนและมีโปรตอนข้างเคียง 5 และ 6 ตัวตามลำดับ เกิดจากหมู่ $-\text{CH}$ ที่ตำแหน่ง 3 และ 9 ตามลำดับ multiplet ที่ δ 2.07 ppm มี 8 โปรตอนเกิดจากหมู่ $-\text{CH}_2$ ที่ตำแหน่ง 4 15 19 และ 20 ที่ขึ้นที่ตำแหน่งสัญญาณเดียวกัน multiplet ที่ δ 2.51 ppm มี 2 โปรตอนและมีโปรตอนข้างเคียง 3 ตัวจึงเป็นหมู่ $-\text{CH}_2$ ที่ตำแหน่ง 14 สัญญาณที่ δ 4.54 ppm เป็น multiplet มี 2 โปรตอนและมีโปรตอนข้างเคียง 2 ตัวซึ่งเกิดจากหมู่ $-\text{CH}$ ที่ตำแหน่ง 13 และ 18 ที่ขึ้นที่ตำแหน่งสัญญาณเดียวกัน triplet ที่ δ 3.61 และ 3.67 ppm มี 2 โปรตอนและมีโปรตอนข้างเคียง 2 ตัวซึ่งเป็นหมู่ $-\text{CH}_2$ ที่ตำแหน่ง 16 และ 17 ตามลำดับ และ doublet ที่ δ 4.21 และ 4.28 ppm เกิดจาก 1 โปรตอนที่ไม่มีโปรตอนข้างเคียง 1 ตัวจึงเป็น $-\text{CH}$ ที่ตำแหน่ง 8 และ 2 ตามลำดับของสายโซ่เปปไทด์

สเปกตรัม ^{13}C NMR พบตำแหน่งสัญญาณของหมู่ $\text{C}=\text{O}$ ที่สร้างพันธะเปปไทด์ 3 ตำแหน่ง ที่สัญญาณ δ 167.28 และ 172.77 ppm ของตำแหน่ง 12 และ 17 ซึ่งขึ้นที่ตำแหน่งสัญญาณเดียวกัน และหมู่ $\text{C}=\text{O}$ ของกรดคาร์บอกซิลิก 1 ตำแหน่งที่สัญญาณ δ 173.43 ppm โดยตำแหน่งสัญญาณที่พบจะบ่งบอกถึงการสร้างเปปไทด์ระหว่างกรดอะมิโน ผลการทดลองสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 4.9

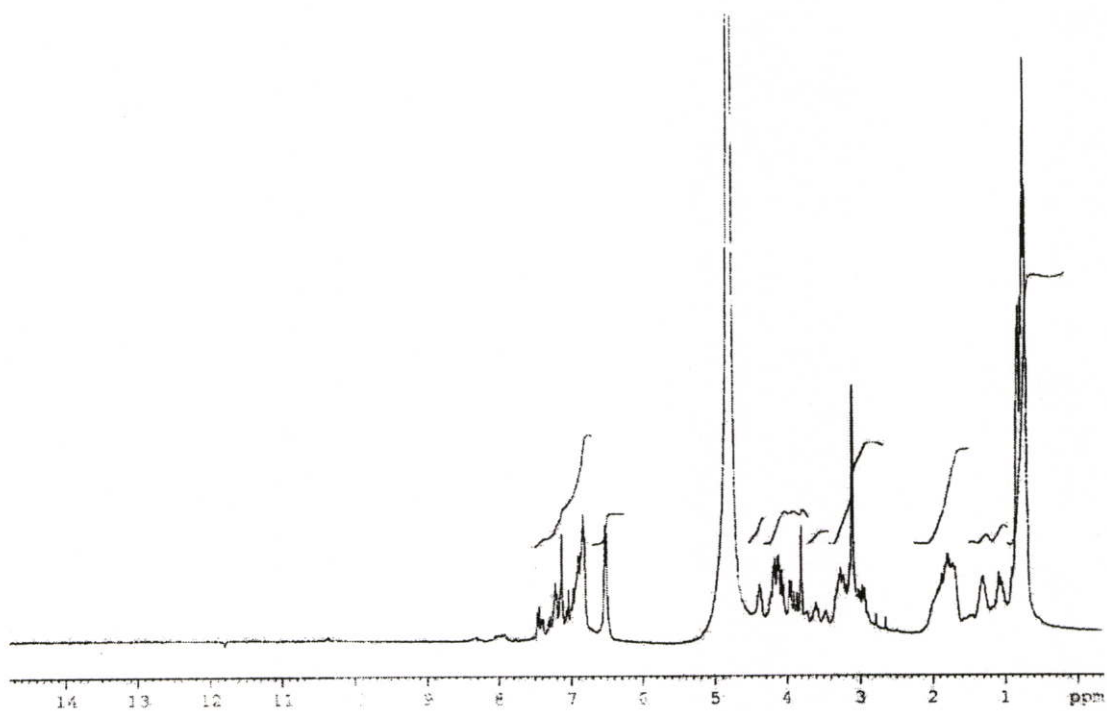
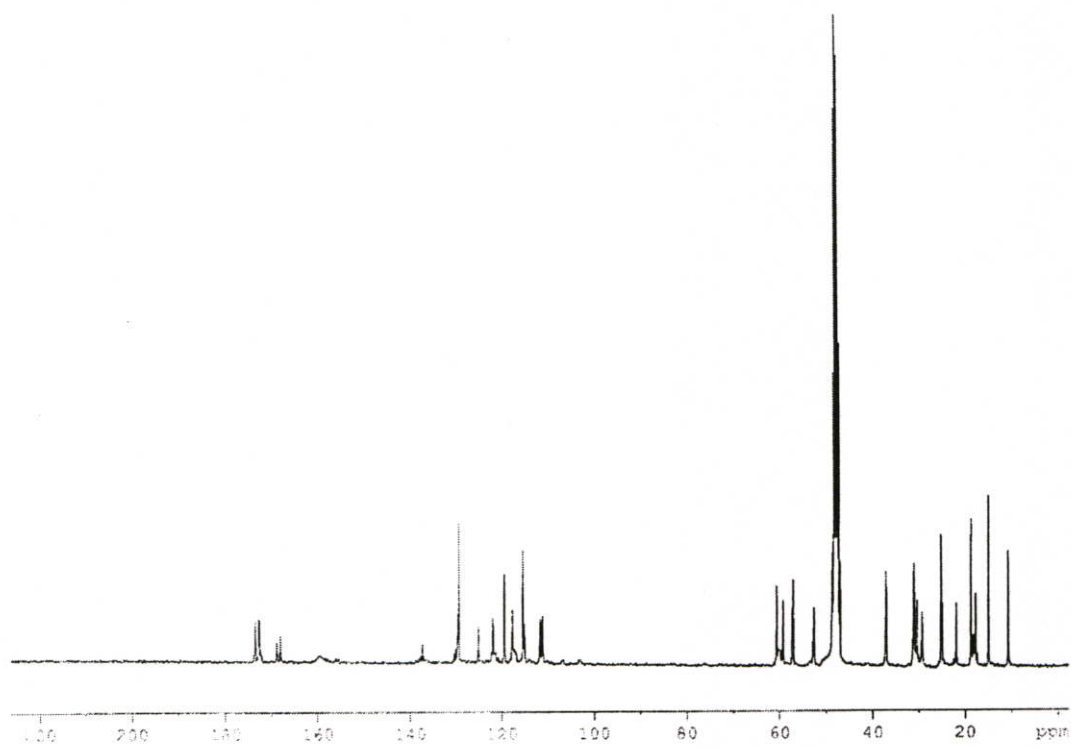
ตารางที่ 4.9 แสดงข้อมูล NMR ของ isoleucylvalylprolylproline (107d)

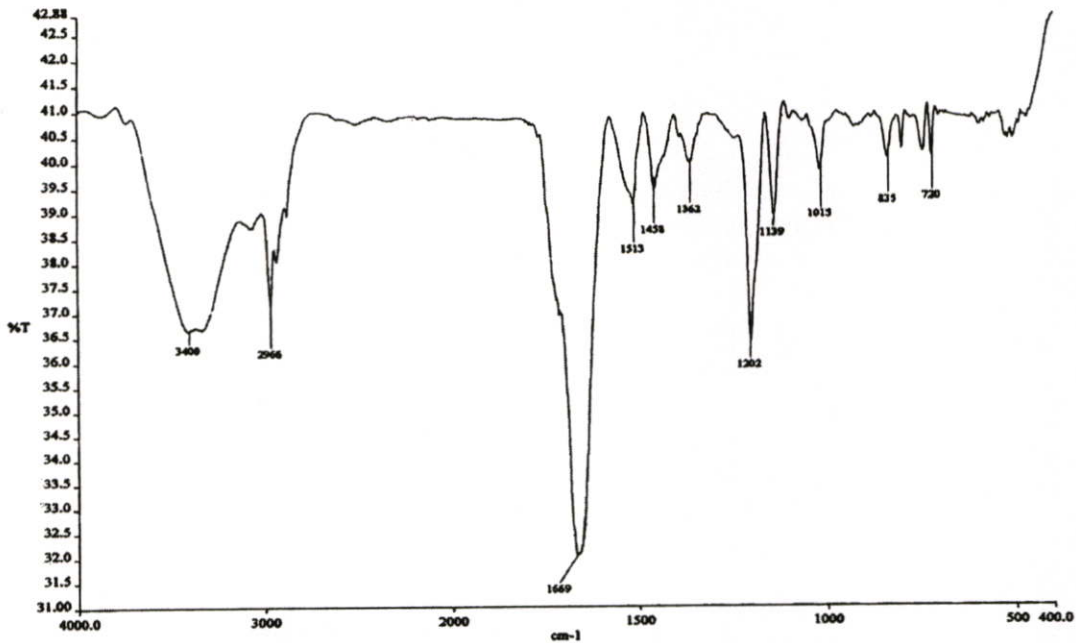


isoleucylvalylprolylproline (107d)			
ตำแหน่ง	δ_{H} (ppm, mult, J in Hz)	ตำแหน่ง	δ_{C}
1	-	1	173.43
2	4.28(1H, d, 5.21)	2	60.64
3	1.26(1H, m)	3	29.51
4, 15	2.07(8H, m)	4	24.94
19, 20		5	10.76
5, 6	0.98(12H, m)	6	14.99
10, 11		7	167.28
7	-	8	59.39
8	4.21(1H, d, 7.13)	9	31.11
9	1.53(1H, m)	10, 11	17.73
12	-	12	172.77
13, 18	4.54(2H, m)	13	46.56
14	2.51(2H, m)	14	24.08
16	3.67(2H, t, 6.04)	15, 20	18.70
17	-	16, 21	37.32
21	3.61(2H, t, 7.44)	17	172.53
		18	57.07
		19	28.49

IR (KBr) ν_{max} 3427 (- OH), 2966 (- C - H, stre.), 1652 (C = O), 1546 (- NH, bend.), 1458 (- CH₂, bend), 1388 (- CH₃, bend.), 1203 (C - O, stre.), 1137 (C - N, stre.), และ 835 (- NH, oop.) cm⁻¹; MS (electrospray) : C₂₁H₃₆N₄O₅ จากการคำนวณได้ 424.3 m/z ที่พบ 326.0 [M-Pro]⁺ (3.5%) 310.0 [M-CH₃CH₂(CH₃)CHCHCOOH]⁺ (4.7%)

4.3.5 การสังเคราะห์ isoleucylvalylprolyltryptophane (107e)

รูปที่ 4.25 แสดงเปกตรัม ^1H NMR ของ isoleucylvalylprolyltryptophane (107e)รูปที่ 4.26 แสดงสเปกตรัม ^{13}C NMR ของ isoleucylvalylprolyltryptophane (107e)

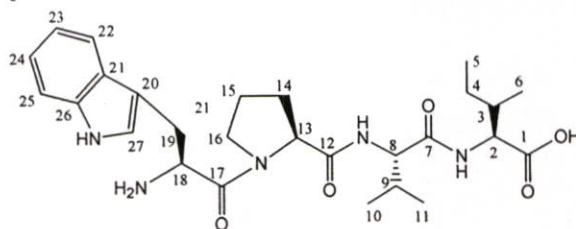


รูปที่ 4.27 แสดงสเปกตรัม FT-IR ของ isoleucylvalylprolyltryptophane (107e)

จากสเปกตรัม ^1H NMR ประกอบด้วย 12 ตำแหน่งสัญญาณ โดยอินทิกรัลมีอัตราส่วน จำนวนโปรตอนเป็น 12 : 1 : 1 : 1 : 6 : 1 : 2 : 1 : 1 : 1 : 2 : 4 : 1 สัญญาณที่ δ 0.75 ppm มี 12 โปรตอนซึ่งเกิดจากหมู่ $-\text{CH}_3$ ที่อยู่ทางด้านปลายของสายโซ่ทั้งหมด multiplet ที่ δ 1.09 1.33 3.13 และ 3.49 ppm แต่ละตำแหน่งสัญญาณมี 1 โปรตอนและมีโปรตอนข้างเคียง 5 6 2 และ 2 ตัวตามลำดับ ซึ่งเกิดจากหมู่ $-\text{CH}$ ที่ตำแหน่ง 3 9 13 และ 18 ตามลำดับ multiplet ที่ δ 1.89 ppm มี 6 โปรตอนซึ่งเกิดจากหมู่ $-\text{CH}_2$ ที่ตำแหน่ง 4 14 และ 15 ที่ขึ้นที่ตำแหน่งสัญญาณเดียวกัน multiplet ที่ δ 3.26 ppm มี 2 โปรตอนของหมู่ $-\text{CH}_2$ และมีโปรตอนข้างเคียง 2 ตัว จึงเป็นตำแหน่ง 16 doublet ที่ δ 4.13 และ 4.18 ppm ซึ่งแต่ละตำแหน่งสัญญาณมี 1 โปรตอนที่เกิดจากหมู่ $-\text{CH}$ และมีโปรตอนข้างเคียง 1 ตัวของตำแหน่ง 8 และ 2 ตามลำดับ doublet ที่ δ 6.51 ppm มี 2 โปรตอนซึ่งเกิดจากหมู่ $-\text{CH}_2$ และมีโปรตอนข้างเคียง 1 โปรตอนของตำแหน่ง 19 สัญญาณที่ δ 6.85 ppm มี 4 โปรตอนซึ่งสัญญาณในช่วงนี้จะเป็นสัญญาณของสารประกอบอะโรมาติก ดังนั้นที่สัญญาณนี้จึงเป็นโปรตอนที่ตำแหน่ง 22 23 24 และ 25 ของวงอะโรมาติก และสัญญาณที่ δ 7.14 ppm เป็น singlet มี 1 โปรตอนแสดงว่าที่คาร์บอนอะตอมข้างเคียงไม่มีโปรตอนเกาะอยู่ ซึ่งตำแหน่งที่เป็นไปได้คือตำแหน่ง 27 ของสายโซ่เปปไทด์

สเปกตรัม ^{13}C NMR พบตำแหน่งสัญญาณของหมู่ $\text{C}=\text{O}$ ที่สร้างพันธะเปปไทด์ 3 ตำแหน่ง ที่สัญญาณ δ 168.08 168.88 และ 172.61 ppm และหมู่ $\text{C}=\text{O}$ ของกรดคาร์บอกซิลิก 1 ตำแหน่งที่สัญญาณ δ 173.54 ppm โดยตำแหน่งสัญญาณที่พบจะบ่งบอกถึงการสร้างเปปไทด์ระหว่างกรดอะมิโน ผลการทดลองสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 4.10

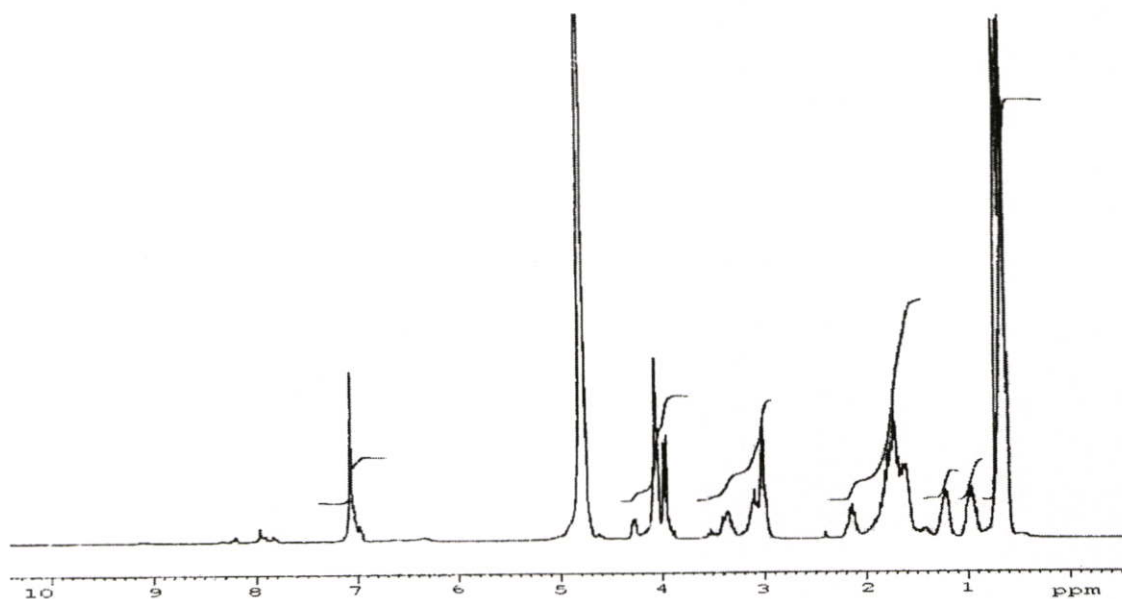
ตารางที่ 4.10 แสดงข้อมูล NMR ของ isoleucylvalylprolyltryptophane (107e)



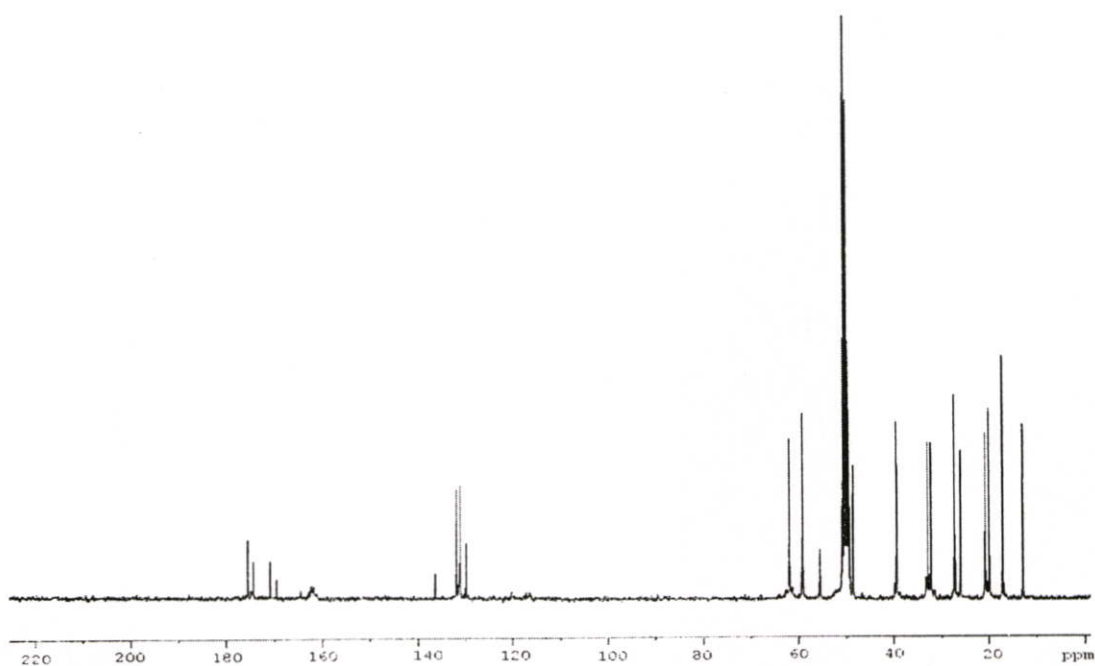
Isoleucylvalylprolylthryptophane (107e)			
ตำแหน่ง	δ_{H} (ppm, mult, J in Hz)	ตำแหน่ง	δ_{C}
1	-	1	173.54
2	4.18(1H, d, 3.65)	2	57.12
3	1.09(1H, m)	3	30.47
4, 14, 15	1.89(6H, m)	4	25.19
5	0.75(12H, m)	5	10.76
6		6	17.82
10, 11		7	172.61
7	-	8	59.24
8	4.13(1H, d, 5.62)	9	27.10
9	1.33(1H, m)	10,11	14.99
12	-	12	168.88
13	3.13(1H, m)	13	52.62
16	3.26(2H, m)	14	21.92
17	-	15	18.75
18	3.49(1H, m)	16	31.18
19	6.51(2H, d, 1.83)	17	168.08
20	-	18	37.36
21	-	19	60.71
22, 23, 24, 25	6.85(4H, s)	20	111.76
26	-	21	125.13
27	7.14(1H, s)	22	117.71
		23	119.46
		24	115.43
		25	111.26
		26	129.41
		27	121.97

IR (KBr) ν_{\max} 3400 (-OH), 2966 (-C-H, stre.), 1669 (C=O), 1513 (-NH, bend.), 1458(-CH₂, bend), 1362 (-CH₃, bend.), 1202 (C-O, stre.), 1139 (C-N, stre.), และ 835 (-NH, oop.) cm^{-1} ; MS (electrospray) : C₂₁H₃₉N₄O₅ จากการคำนวณได้ 513.3 m/z ที่พบ 468.9 [M-COOH]⁺(21.8%) 326.5 [M-Trp]⁺(23.5%)

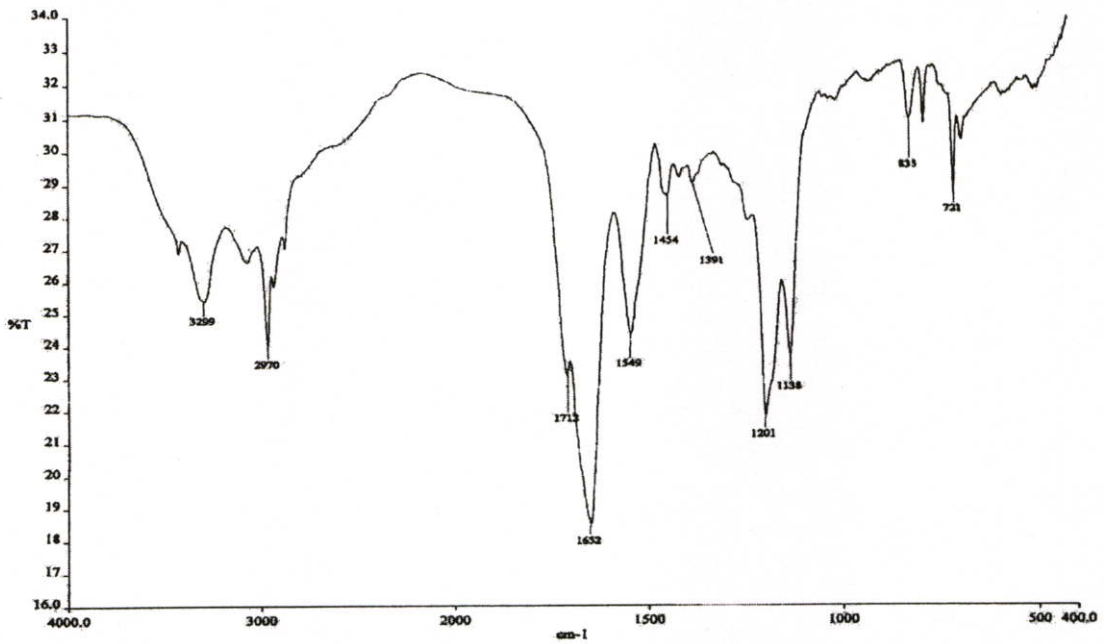
4.3.6 การสังเคราะห์ isoleucylvalylprolylphenylalanine (107f)



รูปที่ 4.28 แสดงสเปกตรัม ¹H NMR ของ isoleucylvalylprolylphenylalanine (107f)



รูปที่ 4.29 แสดงสเปกตรัม ¹³C NMR ของ isoleucylvalylprolylphenylalanine (107f)

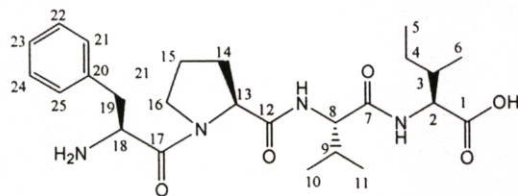


รูปที่ 4.30 แสดงสเปกตรัม FT-IR ของ isoleucylvalylprolylphenylalanine (107f)

จากสเปกตรัม ^1H NMR ประกอบด้วย 9 ตำแหน่งสัญญาณ โดยอินทิกรัลมีอัตราส่วนจำนวนโปรตอนเป็น 12:1:1:6:2:1:1:4:5 สัญญาณที่ δ 0.67 ppm มีจำนวน 12 โปรตอนซึ่งเกิดจากหมู่ $-\text{CH}_3$ ที่อยู่ทางด้านปลายของสายโซ่ทั้งหมด multiplet ที่ δ 1.01 และ 1.22 ppm ซึ่งแต่ละตำแหน่งสัญญาณมี 1 โปรตอนของหมู่ $-\text{CH}$ และมีโปรตอนข้างเคียง 5 และ 6 ตัว ตามลำดับ ของตำแหน่ง 3 และ 9 ตามลำดับ multiplet ที่ δ 1.74 ppm มี 6 โปรตอนที่เกิดจากหมู่ $-\text{CH}_2$ ของตำแหน่ง 4 14 และ 15 ที่ขึ้นที่ตำแหน่งสัญญาณเดียวกัน triplet ที่ δ 3.10 ppm มี 2 โปรตอนและมีโปรตอนข้างเคียง 2 ตัว จึงเป็นหมู่ $-\text{CH}_2$ ที่ตำแหน่ง 16 สัญญาณที่ δ 3.36 ppm เป็น triplet มี 1 โปรตอนของหมู่ $-\text{CH}$ และมีโปรตอนข้างเคียง 2 ตัวของตำแหน่ง 13 สัญญาณที่ δ 3.97 ppm เป็น doublet มี 1 โปรตอนและมีโปรตอนข้างเคียง 1 ตัวที่ตำแหน่ง 2 สัญญาณที่ δ 4.08 ppm เป็น triplet มี 4 โปรตอนที่เกิดจากหมู่ $-\text{CH}$ ที่ตำแหน่ง 8 และ 18 กับหมู่ $-\text{CH}_2$ ที่ตำแหน่ง 19 และสัญญาณที่ δ 7.07 ppm มี 5 โปรตอนของวงอะโรมาติก

สเปกตรัม ^{13}C NMR พบตำแหน่งสัญญาณของหมู่ $\text{C}=\text{O}$ ที่สร้างพันธะเปปไทด์ 3 ตำแหน่ง ที่สัญญาณ δ 169.88 170.87 และ 175.58 ppm และหมู่ $\text{C}=\text{O}$ ของกรดคาร์บอกซิลิก 1 ตำแหน่งที่สัญญาณ δ 174.72 ppm โดยตำแหน่งสัญญาณที่พบจะบ่งบอกถึงการสร้างเปปไทด์ระหว่างกรดอะมิโน ผลการทดลองสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 4.11

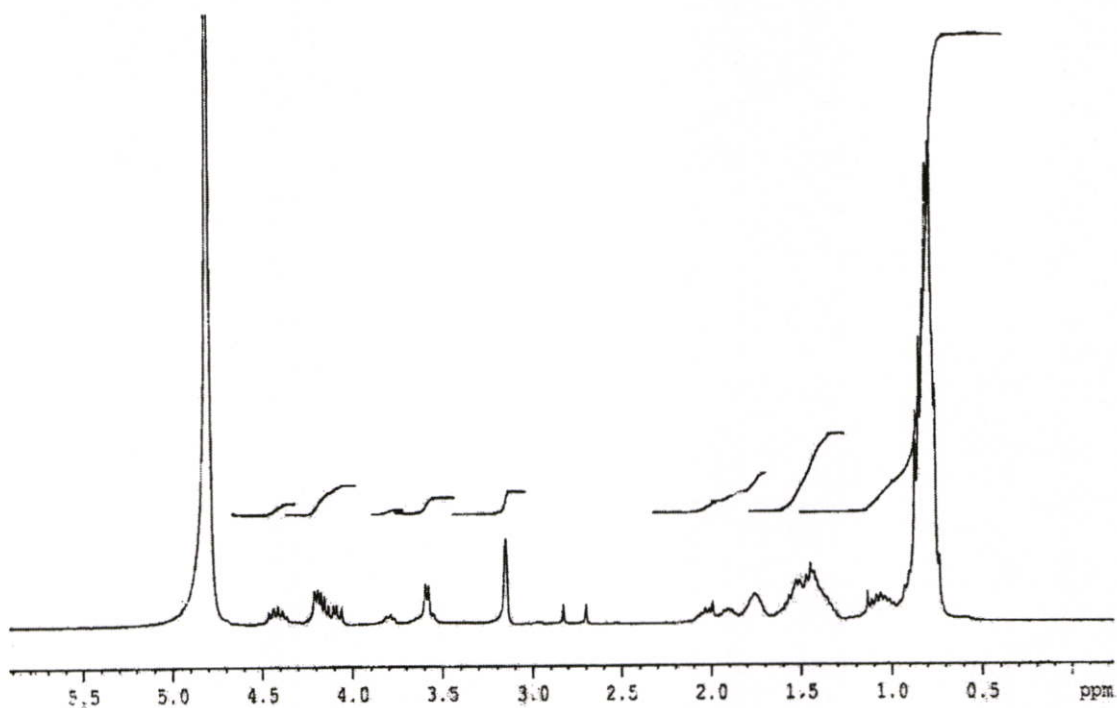
ตารางที่ 4.11 แสดงข้อมูล NMR ของ isoleucylvalylprolylphenylalanine (107f)



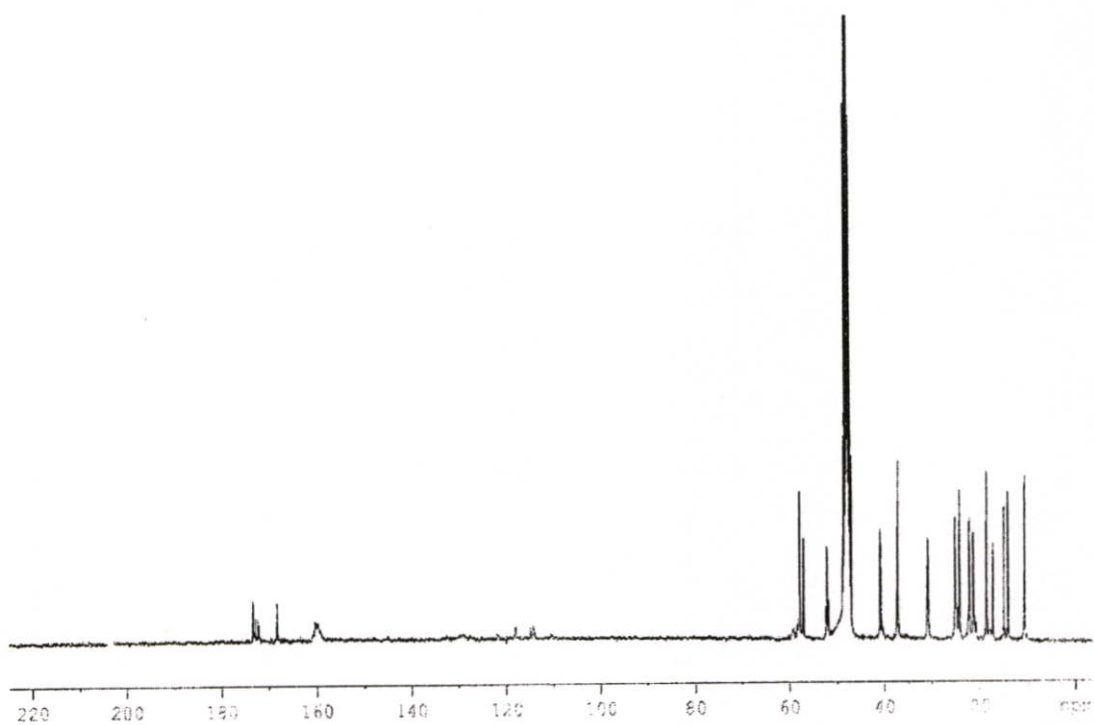
Isoleucylvalylprolylphenylalanine (107f)			
ตำแหน่ง	δ_{H} (ppm, mult, J in Hz)	ตำแหน่ง	δ_{C}
1	-	1	174.72
2	3.97(1H, d, 7.59)	2, 18	59.22
3	1.01(1H, m)	3	32.25
4, 14	1.74(6H, m)	4	27.24
15		5	12.82
5, 6	0.67(12H, m)	6	17.07
10, 11		7	170.87
7	-	8	61.98
8, 18	4.08(4H, t, 10.55)	9	32.85
19		10, 11	19.89
9	1.22(1H, m)	12	169.88
12	-	13	48.55
13	3.36(1H, t, 4.83)	14	25.98
16	3.10(2H, t, 8.48)	15	20.69
17	-	16	39.35
20	-	17	175.58
21, 22	7.07(5H, d, 3.46)	19	55.53
23, 24		20	136.44
25		21, 25	131.19
		22, 24	131.97
		23	129.92

IR (KBr) v_{max} 3299 (- OH), 2970 (- C - H, stre.), 1712 (C = O), 1652 (- C = C-, aromatic), 1454 (- C = C -, aromatic), 1549 (- NH, bend.), 1391 (- CH₃, bend.), 1201 (C - O, stre.), 1138 (C - N, stre.), และ 835 (- NH, oop.) cm^{-1} ; MS (electrospray) : C₂₅H₃₈N₄O₅ จากการคำนวณได้ 474.3 m/z ที่พบ 429.9 [M-COOH]⁺ (2.9%)

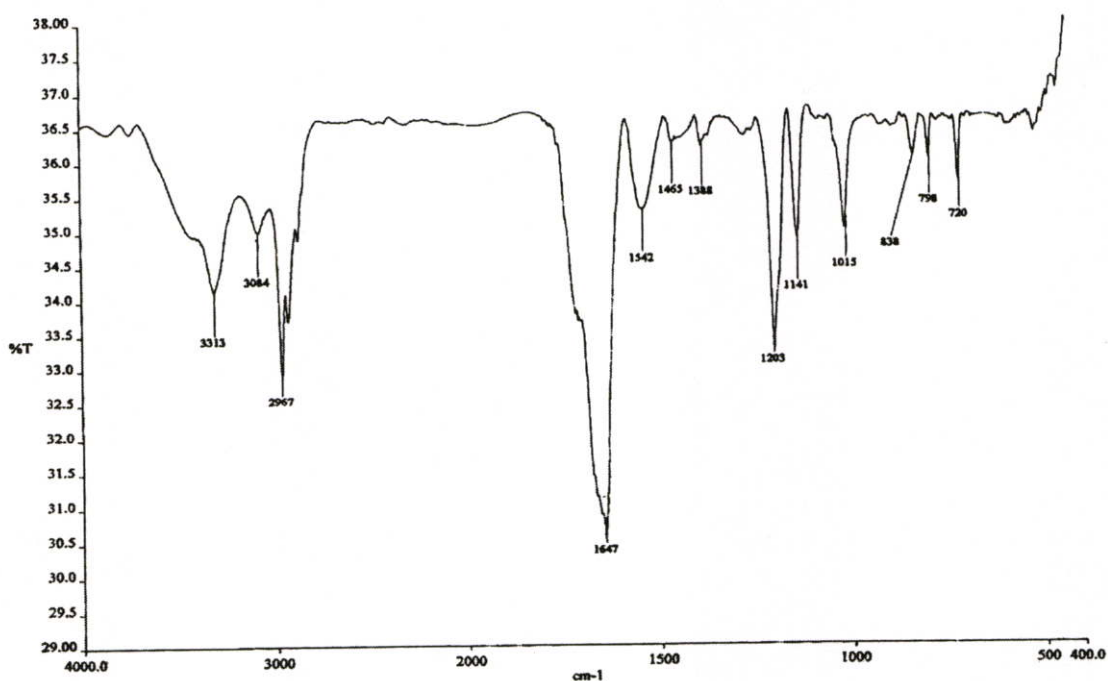
4.3.7 การสังเคราะห์ isoleucylvalylleucylisoleucine (107g)



รูปที่ 4.31 แสดงสเปกตรัม ^1H NMR ของ isoleucylvalylleucylisoleucine (107g)



รูปที่ 4.32 แสดงสเปกตรัม ^{13}C NMR ของ isoleucylvalylleucylisoleucine (107g)

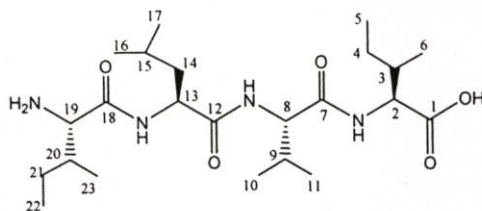


รูปที่ 4.33 แสดงสเปกตรัม FT-IR ของ isoleucylvalylleucineisoleucine (107g)

จากสเปกตรัม ^1H NMR ประกอบด้วย 9 ตำแหน่งสัญญาณ โดยอินทิกรัลมีอัตราส่วนจำนวนโปรตอนเป็น 24:2:6:1:1:1:1:1:1 สัญญาณที่ δ 0.78 ppm มี 24 โปรตอนซึ่งเกิดจากหมู่ $-\text{CH}_3$ ที่อยู่ทางด้านปลายของสายโซ่ทั้งหมด multiplet ที่ δ 1.06 ppm มี 2 โปรตอนที่เกิดจากหมู่ $-\text{CH}_2$ หมู่และมีโปรตอนข้างเคียง 5 ตัวของตำแหน่ง 3 และ 20 สัญญาณที่ δ 1.51 ppm เป็น multiplet มี 6 โปรตอนที่เกิดจากหมู่ $-\text{CH}_2$ ของตำแหน่ง 4 14 และ 20 multiplet ที่ δ 1.75 1.90 และ 4.41 ppm ซึ่งแต่ละสัญญาณมี 1 โปรตอนและมีโปรตอนข้างเคียง 6 6 และ 2 ตัวตามลำดับ ของหมู่ $-\text{CH}$ ที่ตำแหน่ง 15 9 และ 13 ตามลำดับ doublet ที่ δ 3.15 3.57 และ 4.19 ppm แต่ละสัญญาณมี 1 โปรตอนและมีโปรตอนข้างเคียง 1 ตัวของหมู่ $-\text{CH}$ ที่ตำแหน่ง 19 8 และ 2 ตามลำดับ

สเปกตรัม ^{13}C NMR พบตำแหน่งสัญญาณของหมู่ $\text{C}=\text{O}$ ที่สร้างพันธะเปปไทด์ 3 ตำแหน่ง ที่สัญญาณ δ 168.35 169.59 และ 172.85 ppm และหมู่ $\text{C}=\text{O}$ ของกรดคาร์บอกซิลิก 1 ตำแหน่งที่สัญญาณ δ 173.43 ppm โดยตำแหน่งสัญญาณที่พบจะบ่งบอกถึงการสร้างเปปไทด์ระหว่างกรดอะมิโน ผลการทดลองสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 4.12

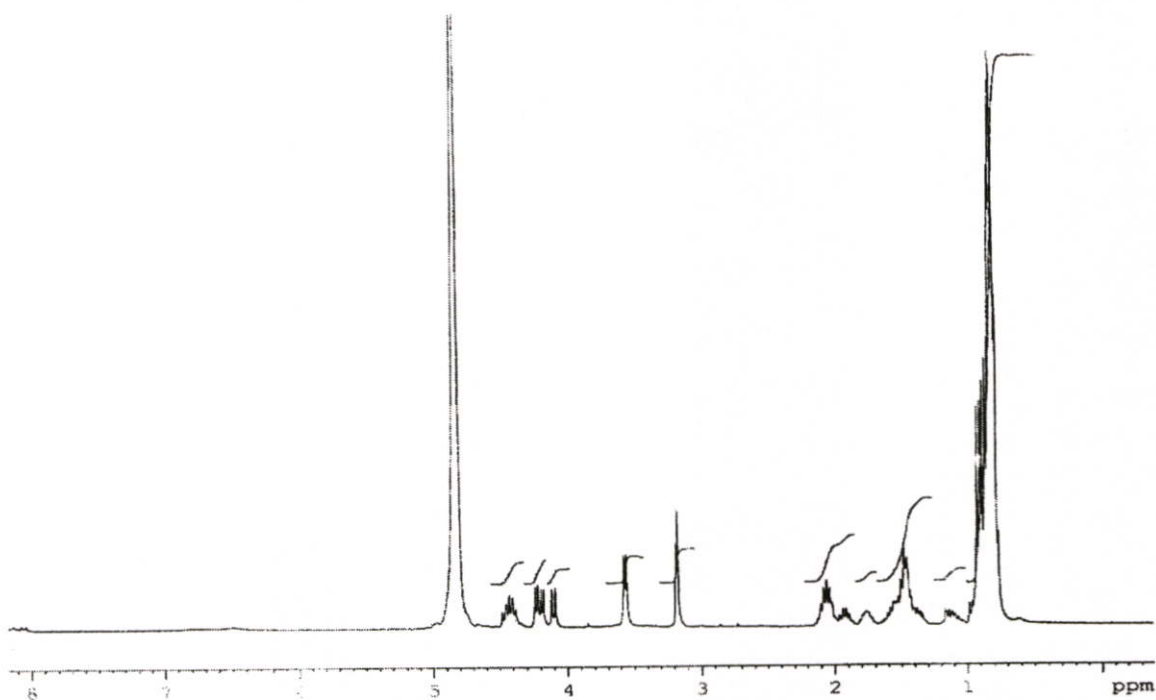
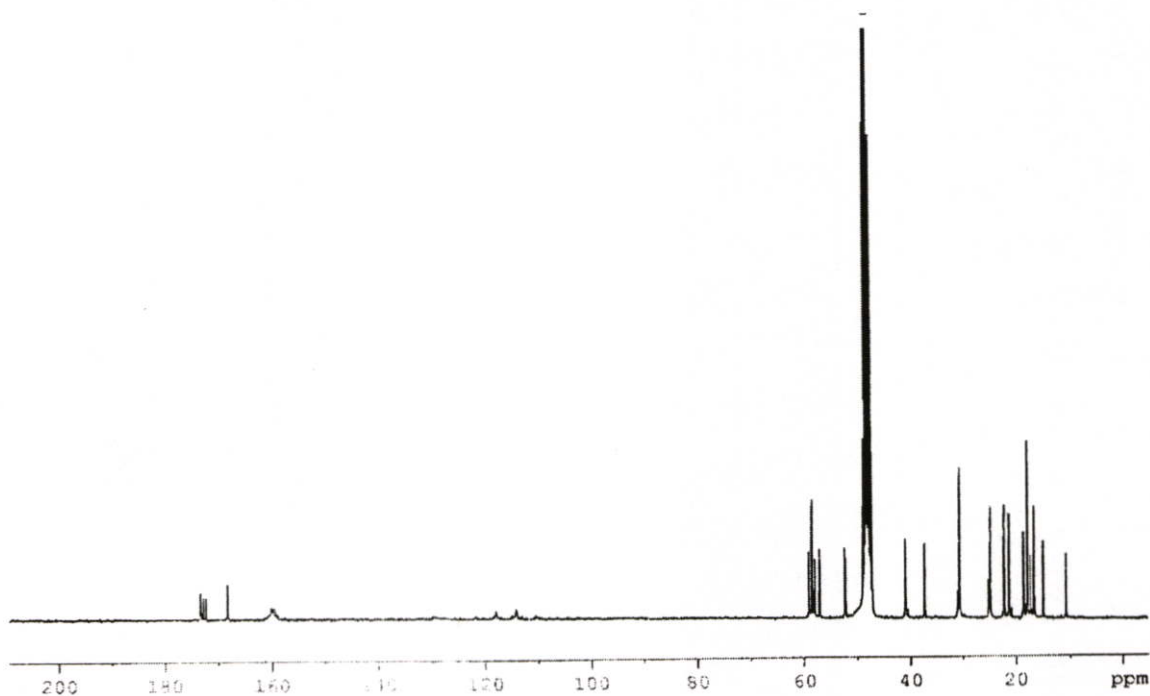
ตารางที่ 4.12 แสดงข้อมูล NMR ของ isoleucylvalylleucylisoleucine (107g)

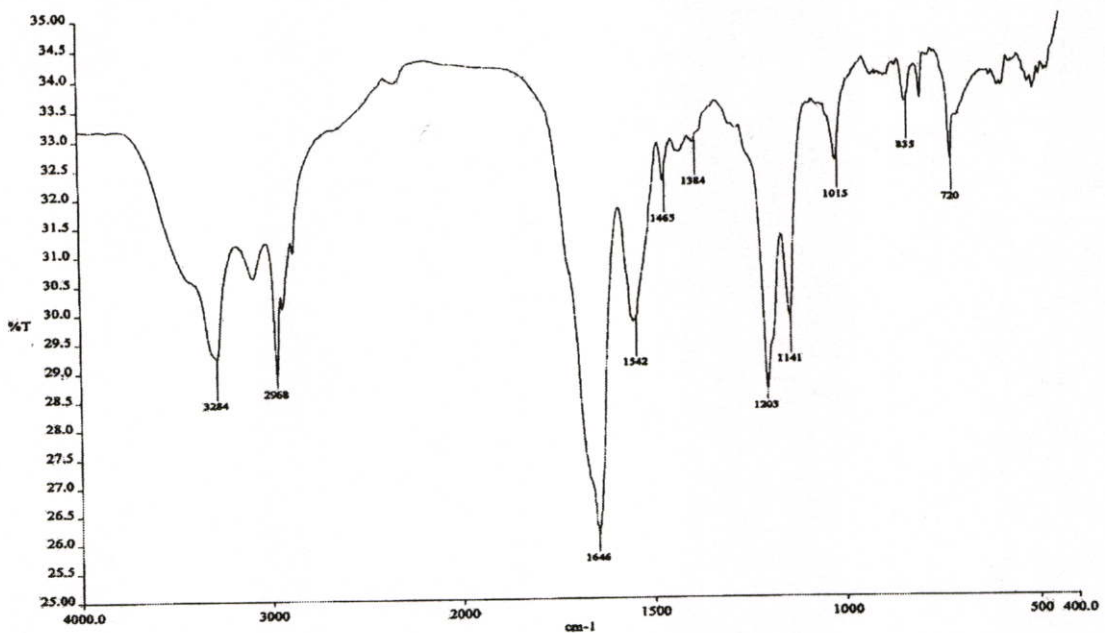


Isoleucylvalylleucylisoleucine (107g)			
ตำแหน่ง	δ_{H} (ppm, mult, J in Hz)	ตำแหน่ง	δ_{C}
1	-	1	173.43
2	4.19(1H, d, 5.40)	2, 19	57.88
3, 20	1.06(2H, m)	3, 20	37.17
4	1.51(6H, m)	4	25.15
14, 21		5, 22	10.65
5, 22	0.78(24H, m)	6, 23	14.14
6, 23		7	172.85
10, 11		8	57.07
16, 17		9	30.73
7	-	10, 11	14.99
8	3.57(1H, d, 5.21)	12	169.59
9	1.90(1H, m)	13	52.18
12	-	14	40.95
13	4.41(1H, m)	15	24.21
15	1.75(1H, m)	16, 17	18.57
18	-	18	168.35
19	3.15(1H, d, 1.30)	21	22.23

IR (KBr) ν_{max} 3313 (- OH), 2967 (- C - H, stre.), 1647 (C = O), 1542 (- NH, bend.), 1465 (- CH₂, bend), 1388 (- CH₃, bend.), 1203 (C - O, stre.), 1141 (C - N, stre.), และ 838 (- NH, oop.) cm⁻¹; MS (electrospray) : C₂₃H₄₄N₄O₅ จากการคำนวณได้ 456.3 m/z ที่พบ 343.6 [M-Ile]⁺ (16.8%) 229.9 [M-Ile-Leu]⁺(5.9%)

4.3.8 การสังเคราะห์ isoleucylvalylleucylvaline (107h)

รูปที่ 4.34 แสดงสเปกตรัม ^1H NMR ของ isoleucylvalylleucylvaline (107h)รูปที่ 4.35 แสดงสเปกตรัม ^{13}C NMR ของ isoleucylvalylleucylvaline (107h)

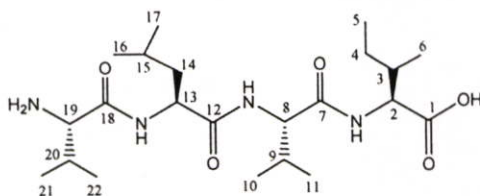


รูปที่ 4.36 แสดงสเปกตรัม FT-IR ของ isoleucylvalylleucylvaline (107h)

จากสเปกตรัม ^1H NMR ประกอบด้วย 9 ตำแหน่งสัญญาณ โดยอินทิกรัลอัตราส่วน จำนวนโปรตอนเป็น 24 : 1 : 4 : 1 : 2 : 1 : 1 : 1 : 1 สัญญาณที่ δ 0.79 ppm มี 24 โปรตอนซึ่งเกิดจากหมู่ $-\text{CH}_3$ ที่อยู่ด้านปลายของสายโซ่ทั้งหมด multiplet ที่ δ 1.11 1.76 และ 4.40 ppm แต่ละสัญญาณมี 1 โปรตอนของหมู่ $-\text{CH}$ และมีโปรตอนข้างเคียง 5 6 และ 2 ตัวตามลำดับ ของตำแหน่ง 3 15 และ 13 ตามลำดับ multiplet ที่ δ 1.46 ppm มี 4 โปรตอนของหมู่ $-\text{CH}_2$ ของตำแหน่ง 4 และ 14 ซึ่งขึ้นที่ตำแหน่งสัญญาณเดียวกัน multiplet ที่ δ 2.04 ppm มี 2 โปรตอน และมีโปรตอนข้างเคียง 6 ตัวของหมู่ $-\text{CH}$ ที่ตำแหน่ง 9 และ 20 doublet ที่ δ 3.56 และ 4.09 ppm แต่ละสัญญาณมี 1 โปรตอนและมีโปรตอนข้างเคียง 1 ตัวของหมู่ $-\text{CH}$ ที่ตำแหน่ง 19 และ 8 ตามลำดับ และสัญญาณที่ δ 4.22 ppm เป็น double doublet มี 1 โปรตอนของหมู่ $-\text{CH}$ ที่ตำแหน่ง 2 ของสายโซ่เปปไทด์

สเปกตรัม ^{13}C NMR พบตำแหน่งสัญญาณของหมู่ $\text{C}=\text{O}$ ที่สร้างพันธะเปปไทด์ 3 ตำแหน่ง ที่สัญญาณ δ 168.34 172.41 และ 172.93 ppm และหมู่ $\text{C}=\text{O}$ ของกรดคาร์บอกซิลิก 1 ตำแหน่งที่สัญญาณ δ 173.45 ppm โดยตำแหน่งสัญญาณที่พบจะบ่งบอกถึงการสร้างเปปไทด์ ระหว่างกรดอะมิโน ผลการทดลองสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 4.13

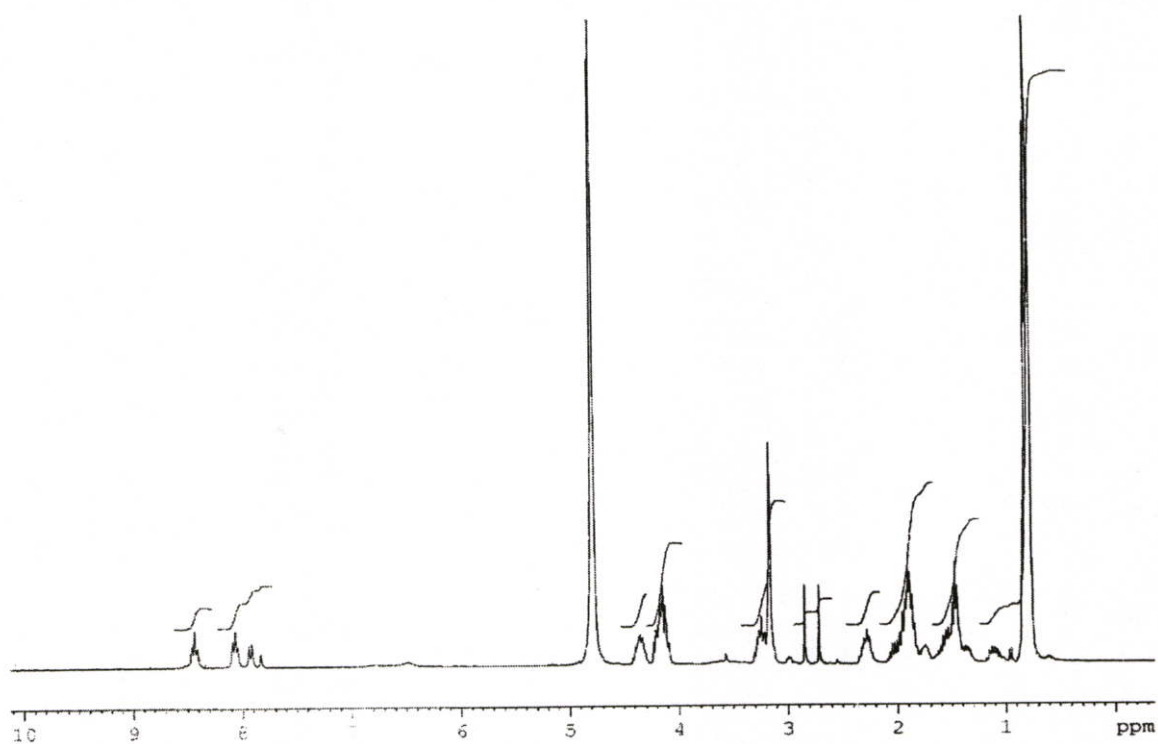
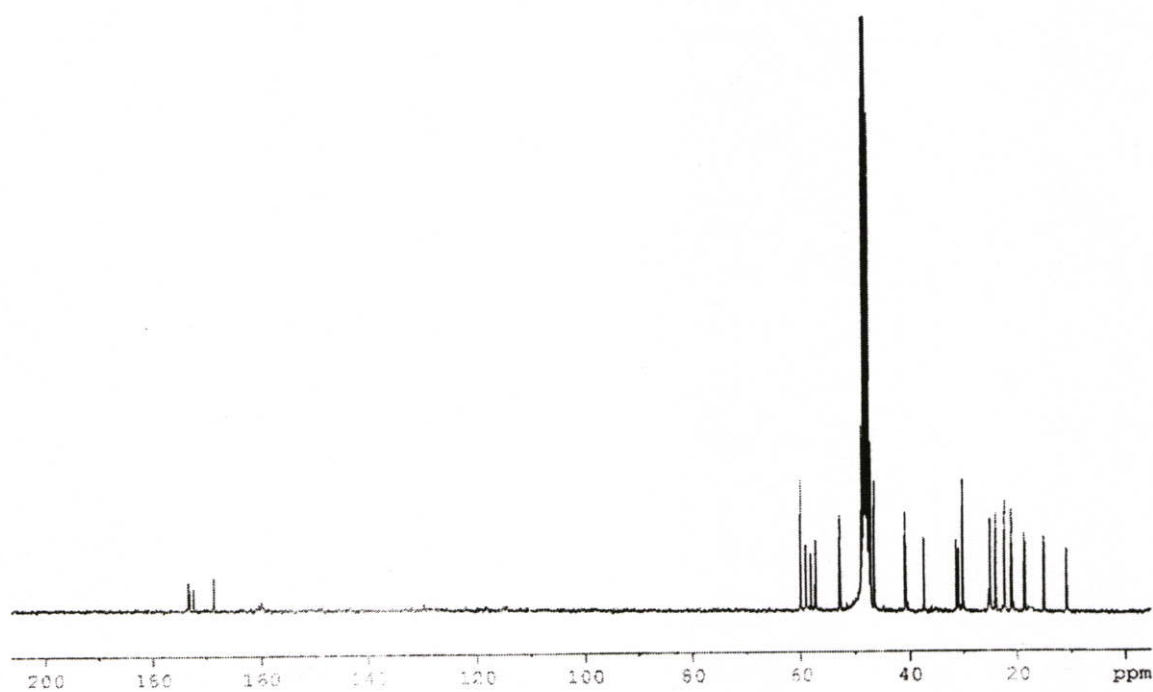
ตารางที่ 4.13 แสดงข้อมูล NMR ของ isoleucylvalylleucylvaline (107h)

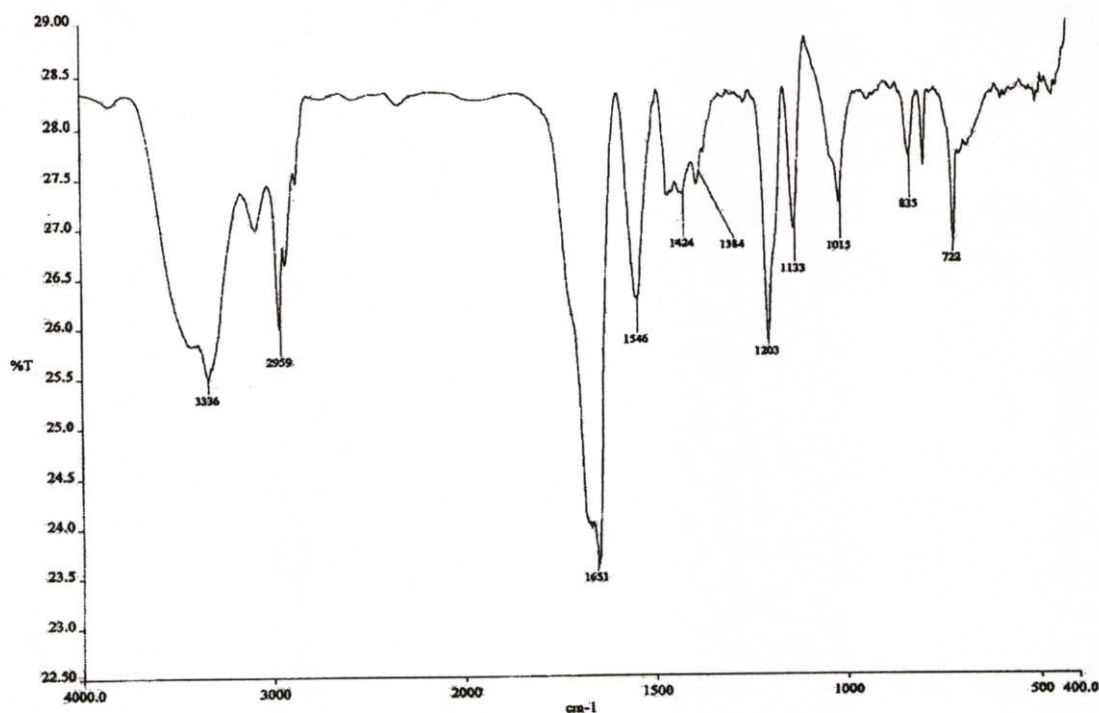


Isoleucylvalylleucylvaline (107h)			
ตำแหน่ง	δ_{H} (ppm, mult, J in Hz)	ตำแหน่ง	δ_{C}
1	-	1	173.45
2	4.22(1H, dd, 5.71, 5.61)	2	57.06
3	1.11(1H, m)	3	37.31
4, 14	1.46(4H, m)	4	24.76
5, 6	0.79(24H, m)	5	10.75
10, 11		6	14.99
16, 17		7	172.93
21, 22		8, 19	58.47
7	-	9, 20	30.64
8	4.09(1H, d, 8.04)	10, 11, 21, 22	17.89
9, 20	2.04(2H, m)	12	172.41
12	-	13	52.34
13	4.40(1H, m)	14	40.97
15	1.76(1H, m)	15	22.18
18	-	16, 17	21.35
19	3.56(1H, d, 5.37)	18	168.34

IR (KBr) ν_{max} 3284 (- OH), 2968 (- C - H, stre.), 1646 (C = O), 1542 (- NH, bend.), 1465 (- CH₂, bend), 1384 (- CH₃, bend.), 1203 (C - O, stre.), 1141 (C - N, stre.), และ 835 (- NH, oop.) cm⁻¹; MS (electrospray) : C₂₂H₄₂N₄O₅ จากการคำนวณได้ 442.3 m/z ที่พบ 327.3 [M-CH₃CH₂(CH₃)CHCHCOOH]⁺ (42.9%)

4.3.9 การสังเคราะห์ isoleucylvalylleucylproline (107i)

รูปที่ 4.37 แสดงสเปกตรัม ^1H NMR ของ isoleucylvalylleucylproline (107i)รูปที่ 4.38 แสดงสเปกตรัม ^{13}C NMR ของ isoleucylvalylleucylproline (107i)

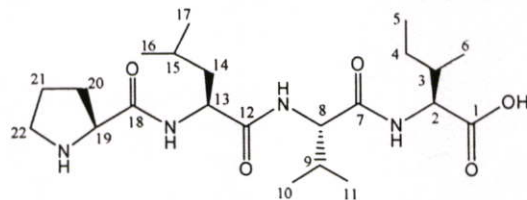


รูปที่ 4.39 แสดงสเปกตรัม FT-IR ของ isoleucylvalylleucylproline (107i)

จากสเปกตรัม ^1H NMR ประกอบด้วย 10 ตำแหน่งสัญญาณ โดยอินทิกรัลอัตราส่วน จำนวนโปรตอนเป็น 18 : 1 : 2 : 1 : 6 : 1 : 2 : 1 : 2 : 1 สัญญาณที่ δ 0.81 ppm มี 18 โปรตอนของหมู่ $-\text{CH}_3$ ที่อยู่ด้านปลายสายโซ่ทั้งหมด multiplet ที่ δ 1.13 1.75 2.28 3.24 และ 4.33 ppm ซึ่งแต่ละสัญญาณมี 1 โปรตอนของหมู่ $-\text{CH}$ และมีโปรตอนข้างเคียง 5 6 6 2 และ 2 ตัวตามลำดับ ของตำแหน่ง 3 15 9 19 และ 13 ตามลำดับ multiplet ที่ δ 1.48 และ 3.17 ppm แต่ละสัญญาณมี 2 โปรตอนของหมู่ $-\text{CH}_2$ และมีโปรตอนข้างเคียง 4 และ 2 ตัวตามลำดับที่ตำแหน่ง 21 และ 22 ตามลำดับ multiplet ที่ δ 1.91 ppm มี 6 โปรตอนของหมู่ $-\text{CH}_2$ ที่ตำแหน่ง 4 14 และ 20 และสัญญาณที่ δ 4.15 ppm มี 2 โปรตอนเกิดจากหมู่ $-\text{CH}$ ของตำแหน่ง 2 และ 8 ที่ขึ้นที่ตำแหน่งเดียวกัน

สเปกตรัม ^{13}C NMR พบตำแหน่งสัญญาณของหมู่ $\text{C}=\text{O}$ ที่สร้างพันธะเปปไทด์ 3 ตำแหน่ง ที่สัญญาณ δ 168.61 172.42 และ 172.09 ppm และหมู่ $\text{C}=\text{O}$ ของกรดคาร์บอกซิลิก 1 ตำแหน่งที่สัญญาณ δ 173.41 ppm โดยตำแหน่งสัญญาณที่พบจะบ่งบอกถึงการสร้างเปปไทด์ระหว่างกรดอะมิโน ผลการทดลองสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 4.14

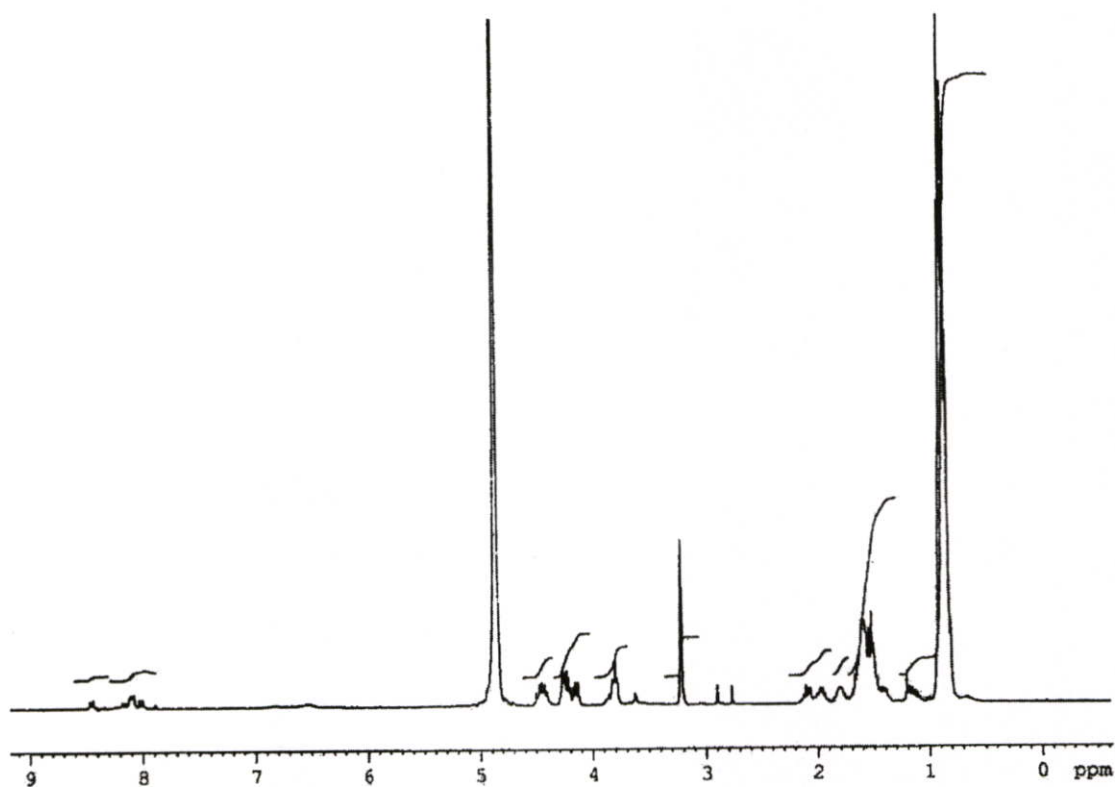
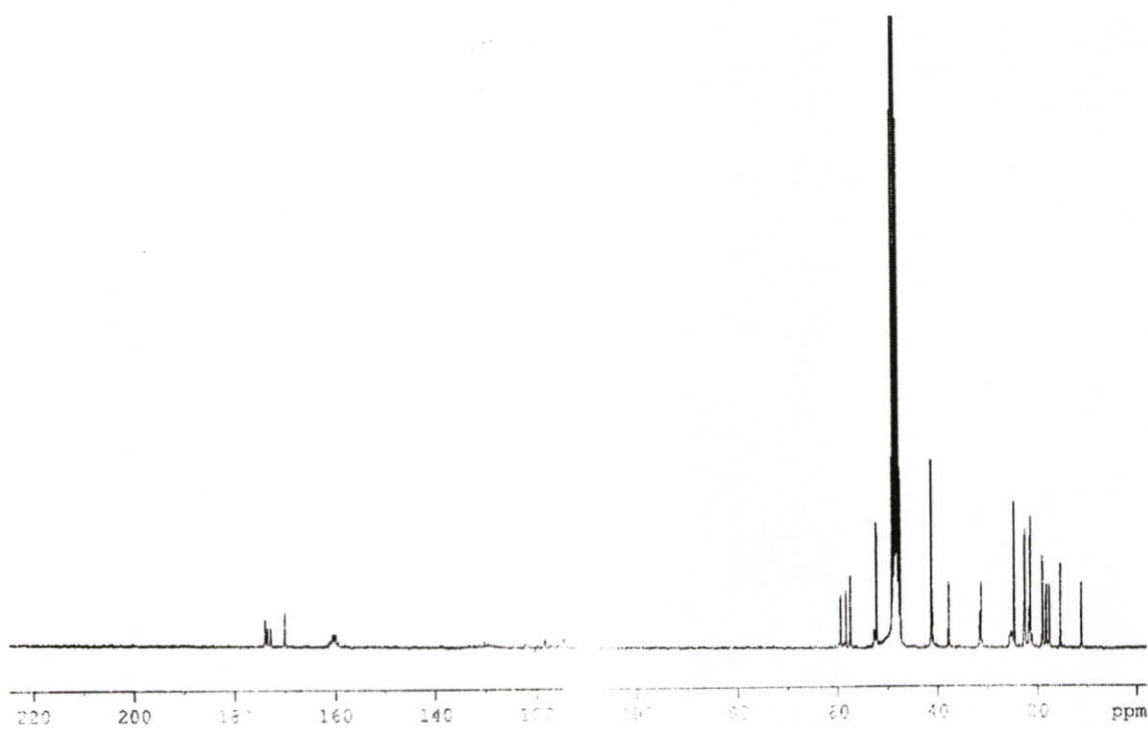
ตารางที่ 4.14 แสดงข้อมูล NMR ของ isoleucylvalylleucylproline (107i)

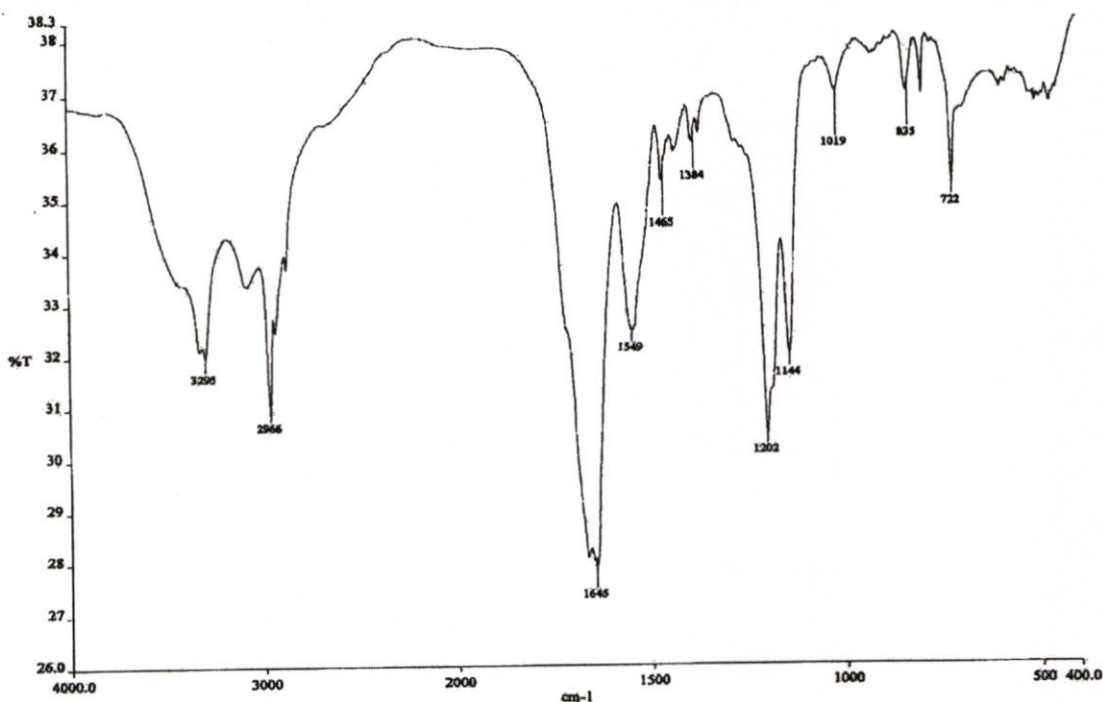


Isoleucylvalylleucylproline (107i)			
ตำแหน่ง	δ_H (ppm, mult, J in Hz)	ตำแหน่ง	δ_C
1	-	1	173.41
2,8	4.15(2H, m)	2	57.09
3	1.13(1H, m)	3	31.19
4	1.91(6H, m)	4	24.92
14, 20		5	10.75
5	0.81(18H, m)	6	15.00
6		7	173.09
10, 11		8	58.87
16, 17		9	30.79
7	-	10, 11	18.64
9	2.28(1H, m)	12	172.42
12	-	13	52.76
13	4.33(1H, m)	14	37.28
15	1.75(1H, m)	15	22.25
18	-	16, 17	21.05
19	3.24(1H, m)	18	168.61
21	1.48(2H, m)	19	59.92
22	3.17(2H, m)	20	30.03
		21	23.91
		22	40.79

IR (KBr) ν_{max} 3336 (- OH), 2959 (- C - H, stre.), 1651 (C = O), 1546 (- NH, bend.), 1424 (- CH₂, bend), 1384 (- CH₃, bend.), 1203 (C - O, stre.), 1133 (C - N, stre.), และ 835 (- NH, oop.) cm⁻¹; MS (electrospray) : C₂₂H₄₀N₄O₅ จากการคำนวณได้ 440.3 m/z ที่พบ 326.3 [M-CH₃CH₂(CH₃)CHCOOH]⁺ (11.5%) 229.5 [M-Pro-Leu]⁺ (3.2%)

4.3.10 การสังเคราะห์ isoleucylvalylleucylleucine (107j)

รูปที่ 4.40 แสดงสเปกตรัม ^1H NMR ของ isoleucylvalylleucylleucine (107j)รูปที่ 4.41 แสดงสเปกตรัม ^{13}C NMR ของ isoleucylvalylleucylleucine (107j)

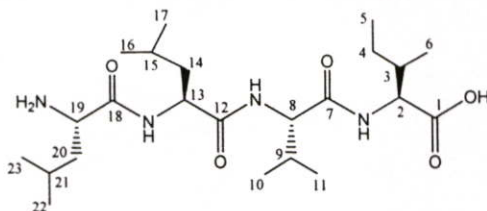


รูปที่ 4.42 แสดงสเปกตรัม FT-IR ของ isoleucylvalylleucylleucine (107j)

จากสเปกตรัม ^1H NMR ประกอบด้วย 10 ตำแหน่งสัญญาณ โดยอินทิกรัลอัตราส่วน จำนวนโปรตอนเป็น 24:1:6:1:1:1:1:1:1:1 สัญญาณที่ δ 0.83 ppm มี 24 โปรตอนซึ่งเกิดจากหมู่ $-\text{CH}_3$ ที่อยู่ด้านปลายสายโซ่ทั้งหมด multiplet ที่ δ 1.15 1.81 1.95 2.08 และ 4.22 ppm ในแต่ละสัญญาณนี้จะประกอบไปด้วยสัญญาณละ 1 โปรตอนของหมู่ $-\text{CH}$ และเป็นตำแหน่งที่มีโปรตอนข้างเคียง 5 6 6 6 และ 2 ตัวตามลำดับ จึงเป็นตำแหน่ง 3 15 9 21 และ 13 ตามลำดับ multiplet ที่ δ 1.59 ppm มี 6 โปรตอนซึ่งเกิดจากหมู่ $-\text{CH}_2$ ที่ตำแหน่ง 4 14 และ 20 ที่ขึ้นที่ตำแหน่งสัญญาณเดียวกัน triplet ที่ δ 3.80 ppm มี 1 โปรตอนที่เกิดจากหมู่ $-\text{CH}$ และมีโปรตอนข้างเคียง 2 ตัวจึงเป็นตำแหน่ง 19 สัญญาณที่ δ 4.13 ppm เป็น doublet มี 1 โปรตอนและมีโปรตอนข้างเคียง 1 ตัวจึงเป็นตำแหน่ง 8 และสัญญาณที่ δ 4.16 ppm เป็น double doublet มี 1 โปรตอนและมีโปรตอนข้างเคียง 1 ตัวของตำแหน่ง 2 ของสายโซ่เปปไทด์

สเปกตรัม ^{13}C NMR พบตำแหน่งสัญญาณของหมู่ $\text{C}=\text{O}$ ที่สร้างพันธะเปปไทด์ 3 ตำแหน่ง ที่สัญญาณ δ 170.02 172.88 และ 173.41 ppm และหมู่ $\text{C}=\text{O}$ ของกรดคาร์บอกซิลิก 1 ตำแหน่งที่สัญญาณ δ 173.91 ppm โดยตำแหน่งสัญญาณที่พบจะบ่งบอกถึงการสร้างเปปไทด์ระหว่างกรดอะมิโน ผลการทดลองสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 4.15

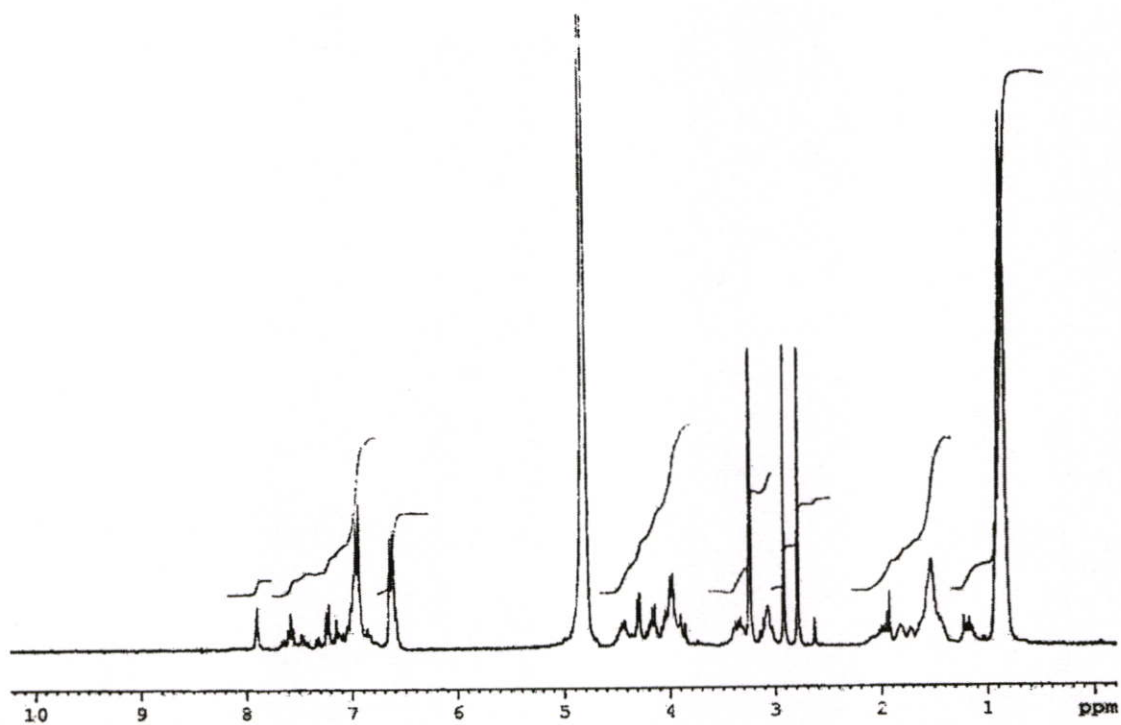
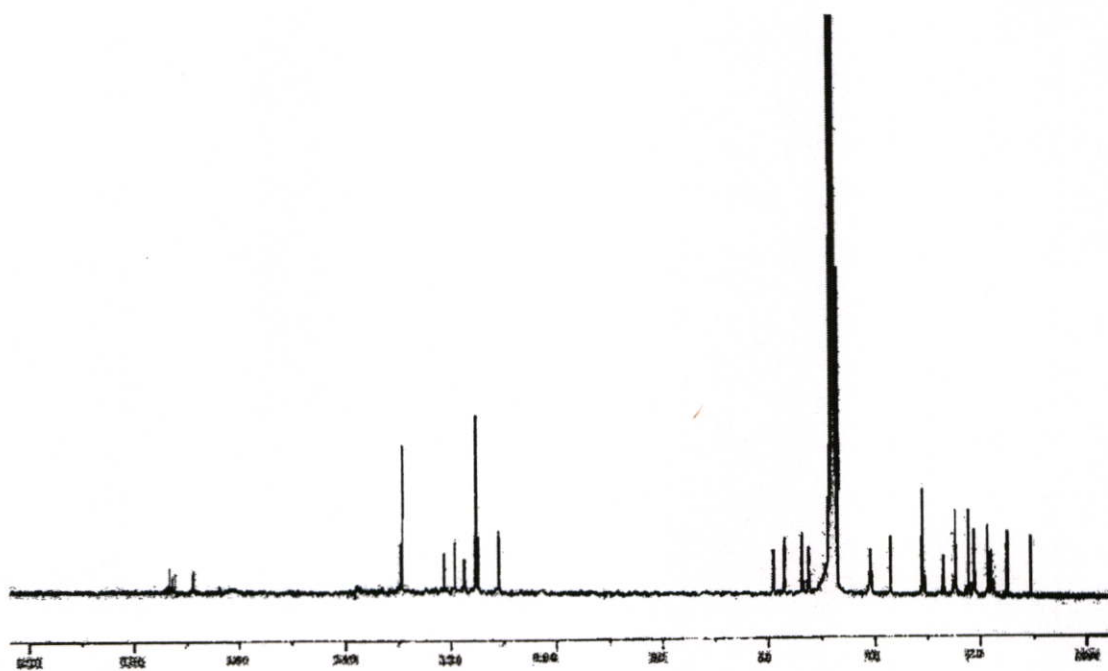
ตารางที่ 4.15 แสดงข้อมูล NMR ของ isoleucylvalylleucylleucine (107j)

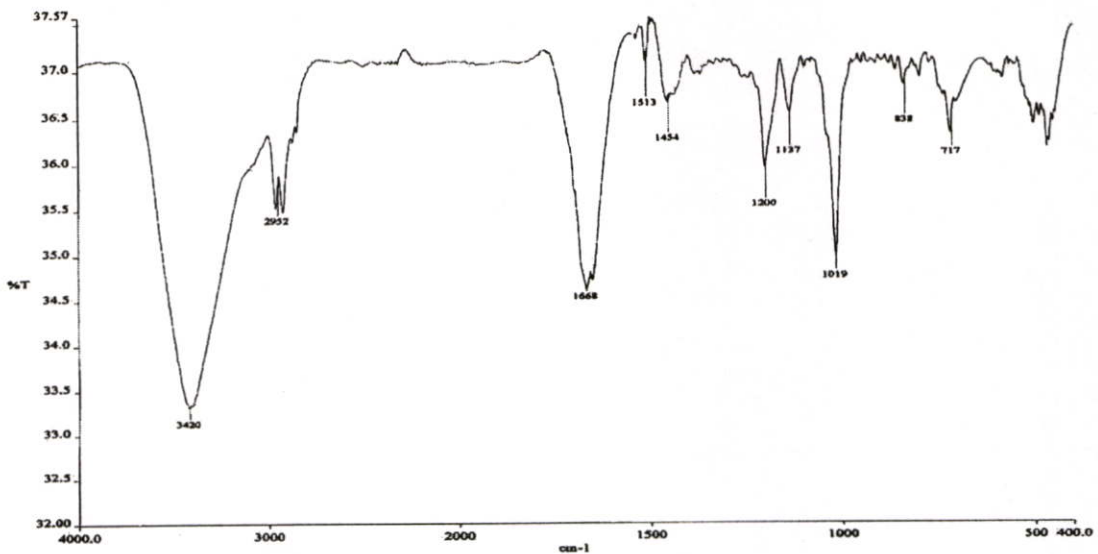


Isoleucylvalylleucylleucine (107j)			
ตำแหน่ง	δ_{H} (ppm, mult, J in Hz)	ตำแหน่ง	δ_{C}
1	-	1	173.91
2	4.16(1H, dd, 4.77, 5.20)	2	57.55
3	1.15(1H, m)	3	37.77
4, 14, 20	1.59(6H, m)	4	22.57
5	0.83(24H, m)	5	11.23
6		6	15.48
10, 11		7	173.41
16, 17		8	58.40
22, 23		9	24.78
7		-	10, 11
8	4.13(1H, d, 5.20)	12	172.88
9	1.95(1H, m)	13	52.31
12	-	14	41.29
13	4.22(1H, m)	15, 21	21.50
15	1.81(1H, m)	16, 17	18.45
18	-	18	170.02
19	3.80(1H, t, 6.66)	19	59.45
21	2.08(1H, m)	20	31.26
		22, 23	18.27

IR (KBr) ν_{max} 3295 (- OH), 2966 (- C - H, stre.), 1645 (C = O), 1549 (- NH, bend.), 1465 (- CH₂, bend), 1384 (- CH₃, stre.), 1202 (C - O, stre.), 1144 (C - N, stre.), และ 835 (- NH, oop.) cm⁻¹; MS (electrospray) : C₂₂H₄₄N₄O₅ จากการคำนวณได้ 456.2 m/z ที่พบ 343.2 [M-Leu]⁺ (31.8%) 230.4 [M-Leu-Leu]⁺ (8.2%)

4.3.11 การสังเคราะห์ isoleucylvalylleucyltryptophane (107k)

รูปที่ 4.43 แสดงสเปกตรัม ^1H NMR ของ isoleucylvalylleucyltryptophane (107k)รูปที่ 4.44 แสดงสเปกตรัม ^{13}C NMR ของ isoleucylvalylleucyltryptophane (107k)

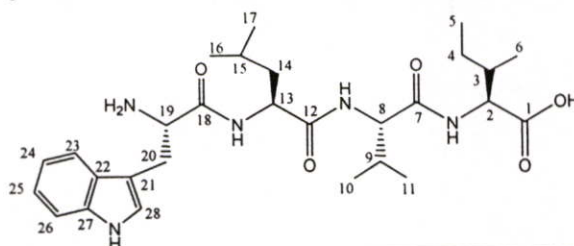


รูปที่ 4.45 แสดงสเปกตรัม FT-IR ของ isoleucylvalylleucyltryptophane (107k)

จากสเปกตรัม ^1H NMR ประกอบด้วย 12 ตำแหน่งสัญญาณ โดยอินทิกรัลอัตราส่วน จำนวนโปรตอนเป็น 18 : 1 : 4 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1 : 4 : 1 สัญญาณที่ δ 0.88 ppm มี 18 โปรตอนซึ่งเกิดจากหมู่ $-\text{CH}_3$ ที่อยู่ปลายสายโซ่ทั้งหมด multiplet ที่ δ 1.23 1.73 1.83 และ 3.11 ppm ในแต่ละสัญญาณจะประกอบไปด้วย 1 โปรตอนของหมู่ $-\text{CH}$ และเป็นตำแหน่งที่มีโปรตอนข้างเคียง 5 6 6 และ 2 ตัวตามลำดับ ซึ่งตำแหน่งที่น่าจะเป็นไปได้คือตำแหน่ง 3 15 9 และ 19 ตามลำดับ multiplet ที่ δ 1.54 ppm มี 4 โปรตอนที่เกิดจากหมู่ $-\text{CH}_2$ 2 หมู่ที่ขึ้นที่ตำแหน่งสัญญาณเดียวกันก็คือตำแหน่ง 4 และ 14 สัญญาณที่ δ 4.17 ppm เป็น triplet มี 1 โปรตอนแสดงว่าเกิดจาก 1 โปรตอนของหมู่ $-\text{CH}$ และเป็นตำแหน่งที่มีโปรตอนข้างเคียง 2 ตัวตำแหน่งที่เป็นไปได้คือตำแหน่ง 13 doublet ที่ δ 4.29 และ 4.43 ppm ในแต่ละสัญญาณประกอบไปด้วยสัญญาณละ 1 โปรตอนของหมู่ $-\text{CH}$ ที่มีโปรตอนข้างเคียง 1 ตัว และตำแหน่งที่เป็นไปได้คือตำแหน่ง 8 และ 2 ตามลำดับ doublet ที่ δ 6.64 ppm มี 2 โปรตอนซึ่งเกิดจากหมู่ $-\text{CH}_2$ ที่มีโปรตอนข้างเคียง 1 ตัว ตำแหน่งที่เป็นไปได้คือตำแหน่ง 20 สัญญาณที่ δ 6.95 ppm เป็น doublet มี 4 โปรตอน โดยที่สัญญาณในช่วงนี้จะเป็นช่วงสัญญาณของอะโรมาติก ดังนั้นที่ตำแหน่งสัญญาณนี้จึงเป็นของตำแหน่ง 23 24 25 และ 26 ของวงอะโรมาติก และสัญญาณที่ δ 7.22 ppm เป็น singlet มี 1 โปรตอน แสดงว่าเป็นตำแหน่งของหมู่ $-\text{CH}$ ที่ไม่มีโปรตอนข้างเคียงเกาะอยู่ซึ่งตำแหน่งที่เป็นไปได้มากที่สุดคือตำแหน่ง 28 ของสายโซ่เปปไทด์

สเปกตรัม ^{13}C NMR พบตำแหน่งสัญญาณของหมู่ $\text{C}=\text{O}$ ที่สร้างพันธะเปปไทด์ 3 ตำแหน่ง ที่สัญญาณ δ 168.94 172.43 และ 172.87 ppm และหมู่ $\text{C}=\text{O}$ ของกรดคาร์บอกซิลิก 1 ตำแหน่งที่สัญญาณ δ 173.41 ppm โดยตำแหน่งสัญญาณที่พบจะบ่งบอกถึงการสร้างเปปไทด์ระหว่างกรดอะมิโน ผลการทดลองสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 4.16

ตารางที่ 4.16 แสดงข้อมูล NMR ของ isoleucylvalylleucyltryptophane (107k)



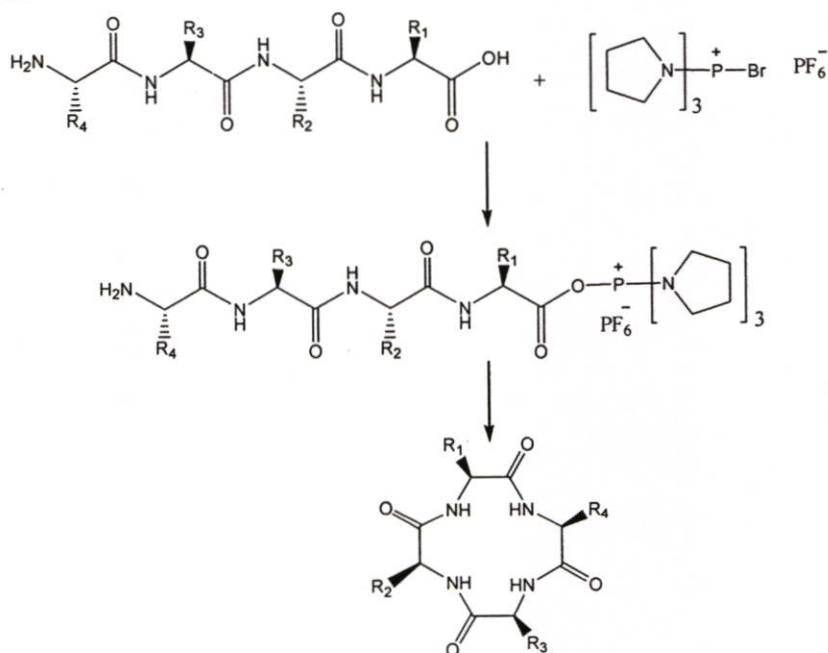
Isoleucylvalylleucyltryptophane (107k)			
ตำแหน่ง	δ_{H} (ppm, mult, J in Hz)	ตำแหน่ง	δ_{C}
1	-	1	173.41
2	4.43(1H, d, 8.07)	2	59.08
3	1.23(1H, m)	3	25.16
4, 14	1.54(4H, m)	4	24.80
5, 6	0.88(18H, m)	5	10.77
10, 11		6	15.00
16, 17		7	172.87
7	-	8	57.08
8	4.29(1H, d, 5.81)	9	31.07
9	1.83(1H, m)	10, 11	18.67
12	-	12	172.43
13	4.17(1H, t, 6.03)	13	52.62
15	1.73(1H, m)	14	37.30
18	-	15	22.29
19	3.11(1H, m)	16, 17	21.24
20	6.64(2H, d, 8.32)	18	168.94
21	-	19	53.79
22	-	20	41.04
23, 24	6.95(4H, d, 8.22)	21	115.01
25, 26		22	121.34
27	-	23	117.58
28	7.22(1H, s)	24	129.43
		25	115.42
		26	111.07
		27	129.65
		28	119.30

IR (KBr) ν_{\max} 3420 (- OH), 2952 (- C - H, stre.), 1668 (C = O), 1513 (- NH, bend.), 1454 (- CH₂, bend), 1200 (C - O, stre.), 1137 (C - N, stre.), และ 838 (- NH, oop.) cm⁻¹; MS (electrospray) : C₂₈H₄₃N₅O₅ จากการคำนวณได้ 529.3 m/z ที่พบ 529.0 [M]⁺(23.2%) 511.5 [M-H₂O]⁺(25.9%)

4.4 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไซคลิกเทอร์เปปไทด์ด้วยเทคนิคสารละลาย

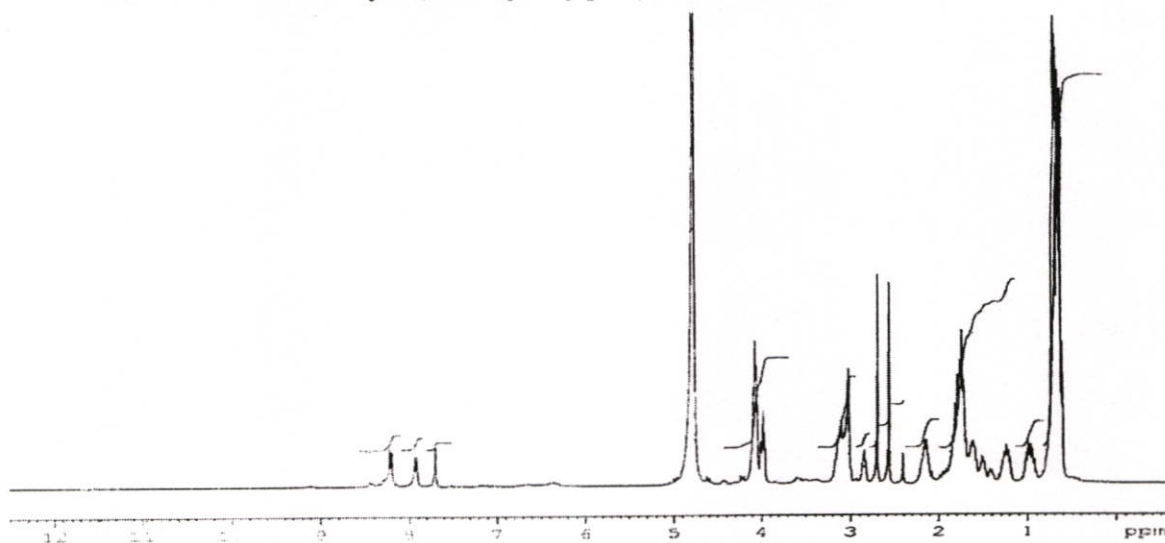
จากการทดลองเป็นการประยุกต์นำเทอร์เปปไทด์ที่เป็นโซ่ตรงมาทำปฏิกิริยาการปิดวง เพื่อให้ได้ไซคลิกเทอร์เปปไทด์ โดยวิธีนี้เป็นวิธีที่ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสังเคราะห์ไซคลิกเทอร์เปปไทด์ที่กระทำด้วยเทคนิคสารละลายทั้งการทดลอง เพราะวิธีนี้จะเป็นวิธีที่ลดเวลาในการสังเคราะห์ได้มากกว่า และขั้นตอนการทำสารให้บริสุทธิ์ในระหว่างขั้นตอนการสังเคราะห์สามารถทำได้ง่ายกว่าโดยอาศัยการล้างและการกรองด้วยสารละลาย ซึ่งจะลดปัญหาการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีในแต่ละช่วงของขั้นตอนในกระบวนการสังเคราะห์ โดยเทอร์เปปไทด์ที่นำมาสังเคราะห์เพื่อเป็นแนวทางในการสังเคราะห์คือสารประกอบ 107a-d การทดลองเริ่มจากการนำเทอร์เปปไทด์มาละลายใน DMF ก่อน เมื่อเทอร์เปปไทด์ละลายหมดแล้วจึงนำมาทำปฏิกิริยาปิดวงด้วย PyBroP, HOBt และ DIEA ใน DMF และทำการปั่นกวนที่อุณหภูมิห้อง [35] โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแสดงดังแผนภาพที่ 18

แผนภาพที่ 18

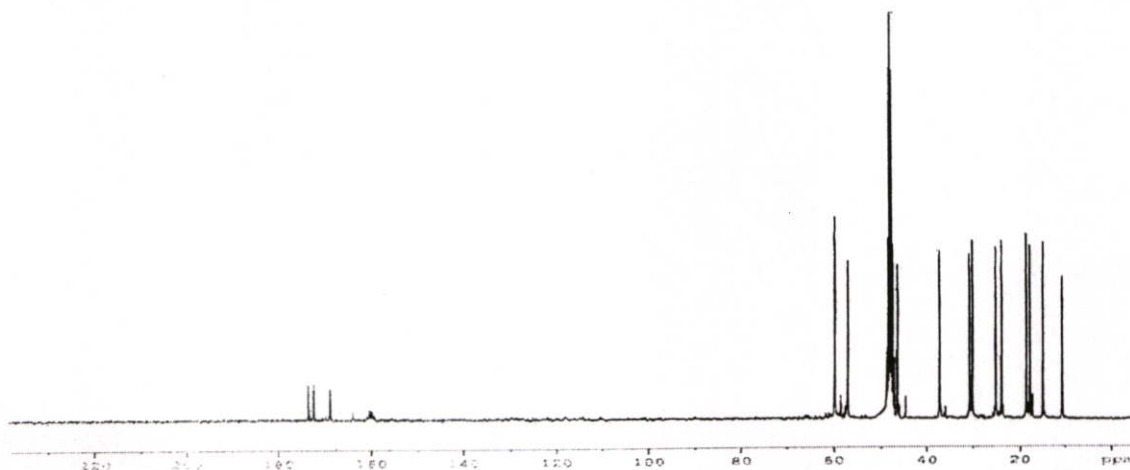


หลังจากนั้นตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลาย DCM : MeOH (2 : 8) และใช้ ninhydrin เป็นสารทดสอบจะปรากฏจุดสีเหลืองเมื่อให้ความร้อน จากการทดลองพบว่าการปั่นกวนที่ 36 ชั่วโมง เป็นเวลาที่ดีที่สุดในการทดลอง เพราะเป็นเวลาที่ให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตมากที่สุด ถึงแม้ว่าจะมีการปั่นกวนให้ปฏิกิริยาดำเนินไปมากกว่า 36 ชั่วโมง เปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่ได้ก็ไม่แตกต่างกัน เมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์แล้วจึงทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ DCM และ MeOH เป็นตัวชะ ซึ่งเริ่มแรกในการชะคอลัมน์จะใช้ DCM ชะตลอดทั้งคอลัมน์ก่อนเพื่อชะเอา DMF และรีเอเจนต์ตัวอื่น ๆ ที่สามารถละลายได้ใน DCM ออกมาก่อน เมื่อแยกสารบริสุทธิ์ได้แล้วนำไซคลิกเทระเปปไทด์ที่สังเคราะห์ได้ไปพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ประกอบด้วยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ เครื่องฟูเรียรทรานส์ฟอร์มอินฟราเรด และเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ ผลการทดลองที่ได้ดังหัวข้อต่าง ๆ ดังนี้

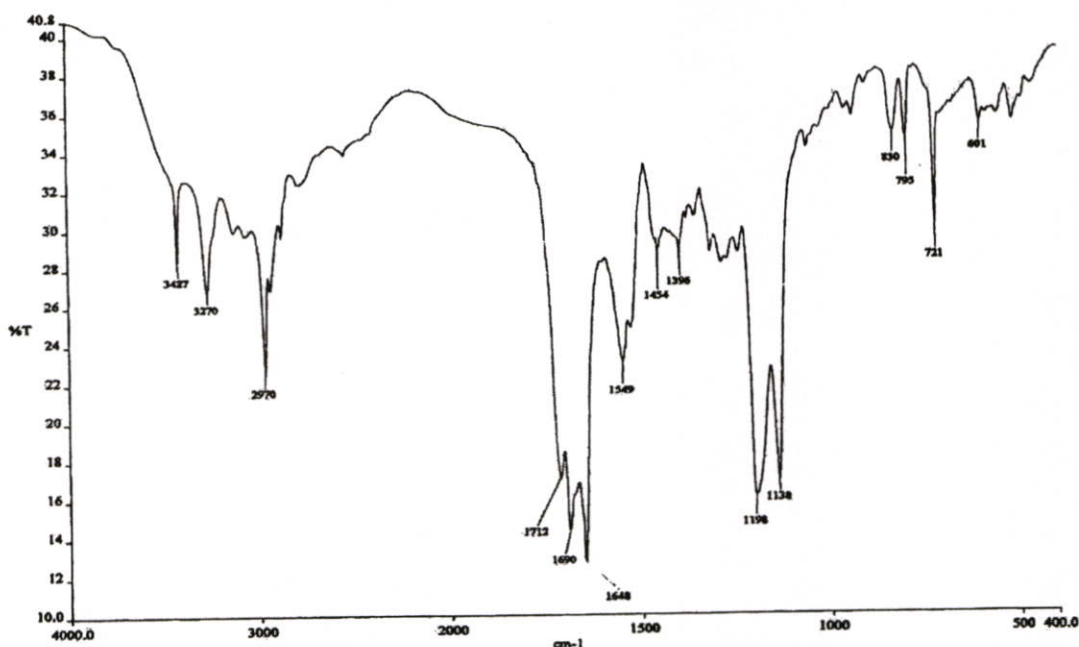
4.4.1 การสังเคราะห์ cyclo(isoleucylvalylprolylisoleucine) (108a)



รูปที่ 4.46 แสดงสเปกตรัม ^1H NMR ของ cyclo(isoleucylvalylprolylisoleucine) (108a)



รูปที่ 4.47 แสดงสเปกตรัม ^{13}C NMR ของ cyclo(isoleucylvalylprolylisoleucine) (108a)

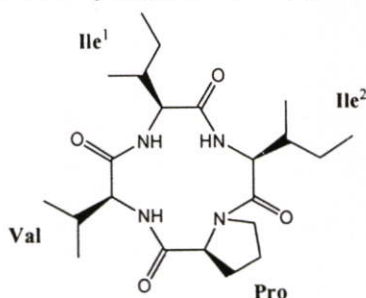


รูปที่ 4.48 แสดงสเปกตรัม FT - IR ของ cyclo(isoleucylvalylprolylisoleucine) (108a)

จากสเปกตรัม ^1H NMR พบสัญญาณที่ δ 0.72 ppm เป็น multiplet ซึ่งเป็นตำแหน่งสัญญาณของหมู่ $-\text{CH}_3$ ที่อยู่ปลายสายโซ่ ทั้งหมดมี 18 โปรตอน multiplet ที่ δ 1.00 ppm มี 1 โปรตอนของหมู่ $-\text{CH}$ และมีโปรตอนข้างเคียง 5 ตัวซึ่งเป็นตำแหน่ง β -Ile¹ multiplet ที่ δ 1.24 ppm มี 1 โปรตอนของหมู่ $-\text{CH}$ และมีโปรตอนข้างเคียง 6 ตัวของตำแหน่ง β -Val multiplet ที่ δ 1.67 ppm มี 2 โปรตอนของหมู่ $-\text{CH}_2$ ของตำแหน่ง γ -Pro สัญญาณที่ δ 1.78 ppm เป็น multiplet ซึ่งเกิดจากหมู่ $-\text{CH}_2$ ของตำแหน่ง γ -Ile¹ β -Pro และ γ -Ile² สัญญาณที่ δ 2.15 ppm เป็น multiplet มี 1 โปรตอนของหมู่ $-\text{CH}$ และมีโปรตอนข้างเคียง 5 ตัวของตำแหน่ง β -Ile² สัญญาณที่ δ 3.03 ppm เป็น triplet มี 1 โปรตอนและมีโปรตอนข้างเคียง 1 ตัวของตำแหน่ง α -Ile² สัญญาณที่ δ 3.11 ppm มี 2 โปรตอนและมีโปรตอนข้างเคียง 2 ตัวของตำแหน่ง δ -Pro สัญญาณที่ δ 3.96 ppm เป็น triplet มี 1 โปรตอนและมีโปรตอนข้างเคียง 2 ตัวของตำแหน่ง α -Pro สัญญาณที่ δ 4.05 ppm เป็น double doublet ของหมู่ $-\text{CH}$ 2 หมู่ที่ตำแหน่ง α -Ile¹ กับ α -Val

สเปกตรัม ^{13}C NMR พบตำแหน่งสัญญาณของหมู่ $\text{C}=\text{O}$ ที่ δ 168.79 172.31 และ 173.49 ppm โดยสัญญาณที่พบเป็นตำแหน่งสัญญาณที่เกิดจากการสร้างพันธะเปปไทด์ของกรดอะมิโน ซึ่งจากสเปกตรัมจะพบว่าหมู่ $\text{C}=\text{O}$ ของ Ile¹ และ Ile² จะขึ้นที่ตำแหน่งสัญญาณเดียวกันคือที่ δ 172.31 ppm เนื่องจากโครงสร้างโมเลกุลที่เหมือนกัน ผลการทดลองสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 4.17

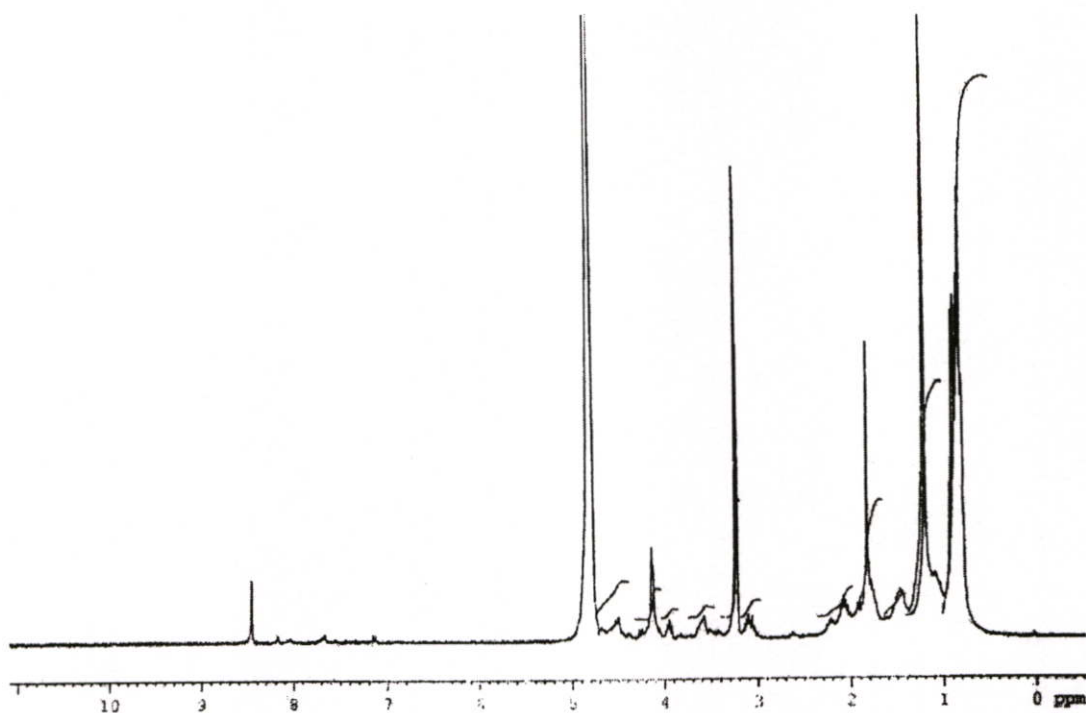
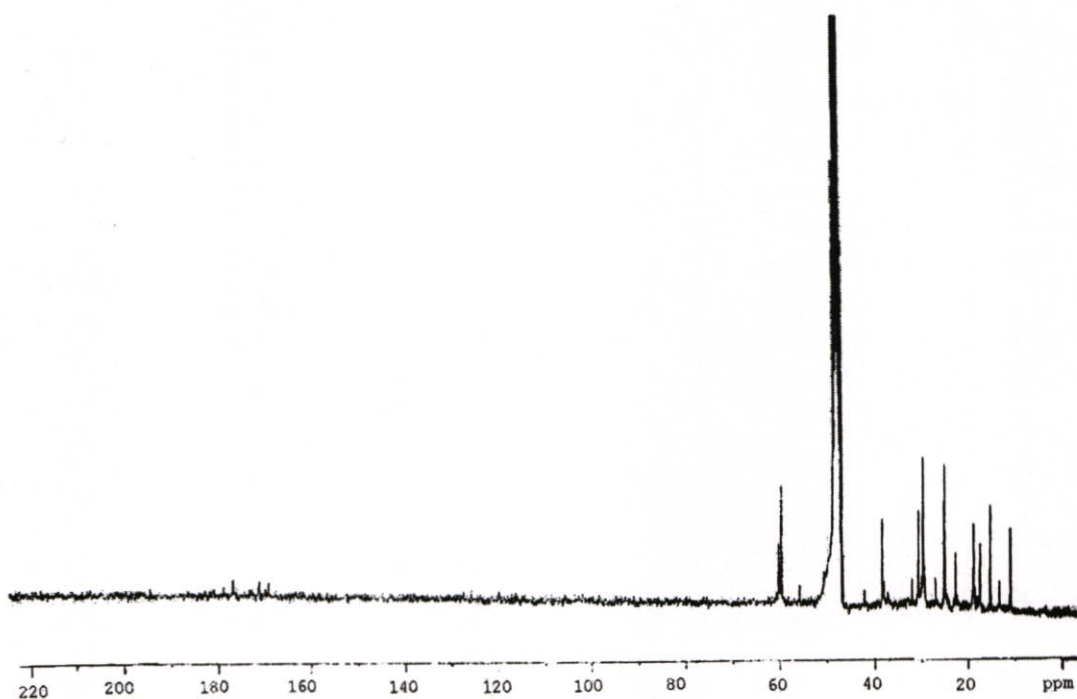
ตารางที่ 4.17 แสดงข้อมูล NMR ของ cyclo(isoleucylvalylprolylisoleucine) (108a)

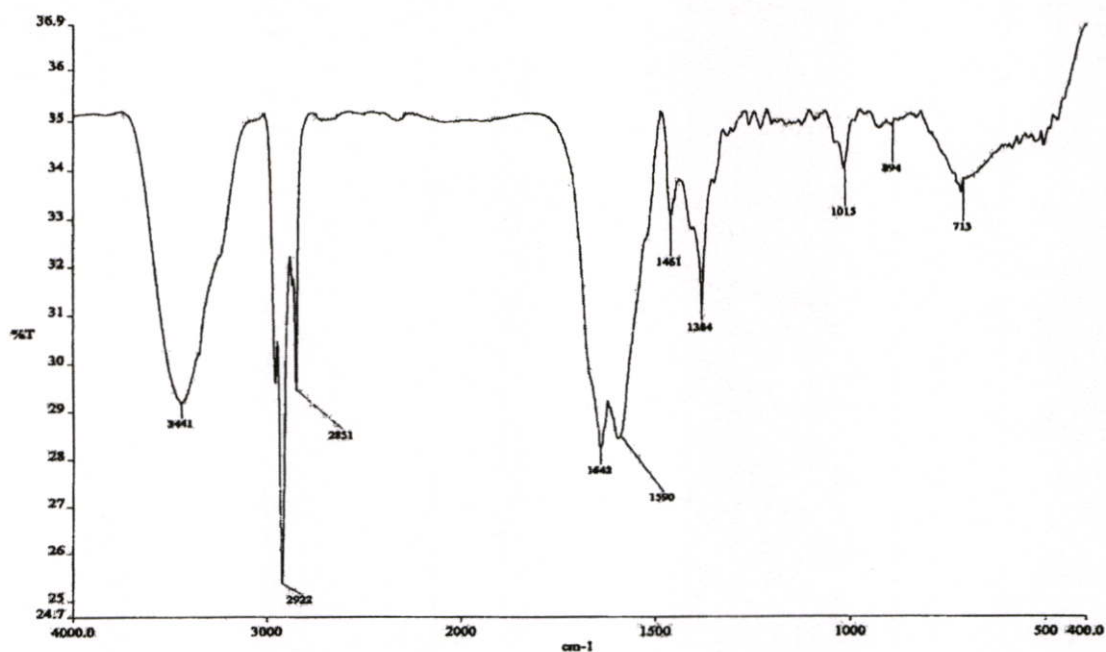


cyclo(isoleucylvalylprolylisoleucine) (113a)					
ตำแหน่ง	δ_{H} (ppm, mult, J in Hz)	δ_{C}	ตำแหน่ง	δ_{H} (ppm, mult, J in Hz)	δ_{C}
Ile¹			Pro		
C = O	-	172.31	C = O	-	173.49
α	4.05(1H, dd, 4.69, 5.62)	59.90	α	3.96(1H, t, 3.85)	46.47
β	1.00(1H, m)	30.76	β	1.78(2H, m)	23.90
CH ₃	0.72(3H, m)	14.99	γ	1.67(2H, m)	18.61
γ	1.78(2H, m)	25.17	δ	3.11(2H, m)	37.27
CH ₃	0.72(3H, m)	10.73	Ile²		
Val			C = O	-	172.31
C = O	-	168.79	α	3.03(1H, t, 3.74)	59.84
α	4.05(1H, dd, 4.69, 5.62)	57.15	β	2.15(1H, m)	30.76
β	1.24(1H, m)	30.16	CH ₃	0.72(3H, m)	14.99
CH ₃	0.72(3H, m)	17.80	γ	1.78(2H, m)	25.17
CH ₃	0.72(3H, m)	17.80	CH ₃	0.72(3H, m)	10.73

IR (KBr) ν_{max} 3427 (2° N – H, stre.), 2970 (- C – H, stre.), 1712 (C = O), 1549 (- NH, bend.), 1454 (- CH₂, bend.), 1396 (- CH₃, bend.), 1198 (C – N, stre.), และ 830 (- NH, oop.) cm⁻¹;
 MS (eletrospray) : C₂₂H₃₈N₄O₄ จากการคำนวณได้ 422.3 m/z ที่พบ 325.4 [M-Pro]⁺ (70.6%)

4.4.2 การสังเคราะห์ cyclo(isoleucylvalylprolylleucine) (108b)

รูปที่ 4.49 แสดงสเปกตรัม ^1H NMR ของ cyclo(isoleucylvalylprolylleucine) (108b)รูปที่ 4.50 แสดงสเปกตรัม ^{13}C NMR ของ cyclo(isoleucylvalylprolylleucine) (108b)

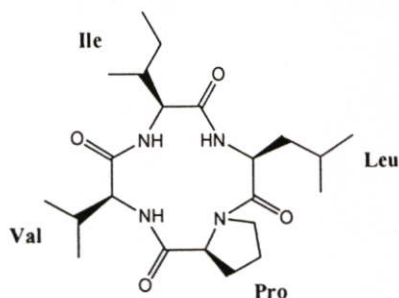


รูปที่ 4.51 แสดงสเปกตรัม FT-IR ของ cyclo(isoleucylvalylprolylleucine) (108b)

จากสเปกตรัม ^1H NMR พบสัญญาณที่ δ 0.83 ppm ซึ่งเป็นสัญญาณของหมู่ $-\text{CH}_3$ ที่อยู่ปลายสายโซ่ทั้งหมดมี 18 โปรตอน สัญญาณที่ δ 1.83 ppm เป็นสัญญาณของหมู่ $-\text{CH}_2$ ที่ตำแหน่ง γ -Ile β -Pro และ γ -Pro ซึ่งแต่ละตำแหน่งจะมีจำนวนโปรตอน 2 โปรตอนและมีโปรตอนข้างเคียง 3 ตัวจึงปรากฏพิคเป็น multiplet สัญญาณที่ δ 2.08 ppm เป็น multiplet มี 1 โปรตอนเกิดจากหมู่ $-\text{CH}$ ที่มีโปรตอนข้างเคียง 6 ตัวจึงเป็นของตำแหน่ง β -Val สัญญาณที่ δ 2.22 และ 3.10 ppm ลักษณะสัญญาณเป็น multiplet และในแต่ละตำแหน่งสัญญาณมี 1 โปรตอนของหมู่ $-\text{CH}$ และเป็นตำแหน่งที่มีโปรตอนข้างเคียง 4 และ 2 ตัวตามลำดับ จึงเป็นตำแหน่ง γ -Pro และ α -Leu ตามลำดับ สัญญาณที่ δ 3.23 ppm ลักษณะสัญญาณเป็น triplet ที่ตำแหน่งสัญญาณนี้ประกอบไปด้วยหมู่ $-\text{CH}_2$ ที่ตำแหน่ง δ -Pro และ β -Leu ซึ่งแต่ละตำแหน่งจะมี 2 โปรตอนและเป็นตำแหน่งที่มีโปรตอนข้างเคียง 2 ตัว กับหมู่ $-\text{CH}$ ซึ่งมี 1 โปรตอนและมีโปรตอนข้างเคียง 2 ตัวจึงเป็นตำแหน่ง α -Pro สัญญาณที่ δ 4.12 ppm เป็น doublet ที่ตำแหน่งสัญญาณนี้ประกอบไปด้วยหมู่ $-\text{CH}$ ที่ตำแหน่ง α -Ile กับ α -Val ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มี 1 โปรตอนและมีโปรตอนข้างเคียง 1 ตัว

สเปกตรัม ^{13}C NMR พบตำแหน่งสัญญาณของหมู่ $\text{C}=\text{O}$ ที่ δ 171.40 และ 176.99 ppm โดยสัญญาณที่พบเป็นตำแหน่งสัญญาณที่เกิดจากการสร้างพันธะเปปไทด์ของกรดอะมิโน จากสเปกตรัมพบว่าหมู่ $\text{C}=\text{O}$ ของ Pro และ Leu จะขึ้นที่ตำแหน่งสัญญาณเดียวกันคือที่ δ 176.99 ppm และของ Ile กับ Val ก็ขึ้นที่ตำแหน่งเดียวกันเช่นกันคือที่ δ 171.40 ppm ผลการทดลองสรุปได้ดังตารางที่ 4.18

ตารางที่ 4.18 แสดงข้อมูล NMR ของ cyclo(isoleucylvalylprolylleucine) (108b)

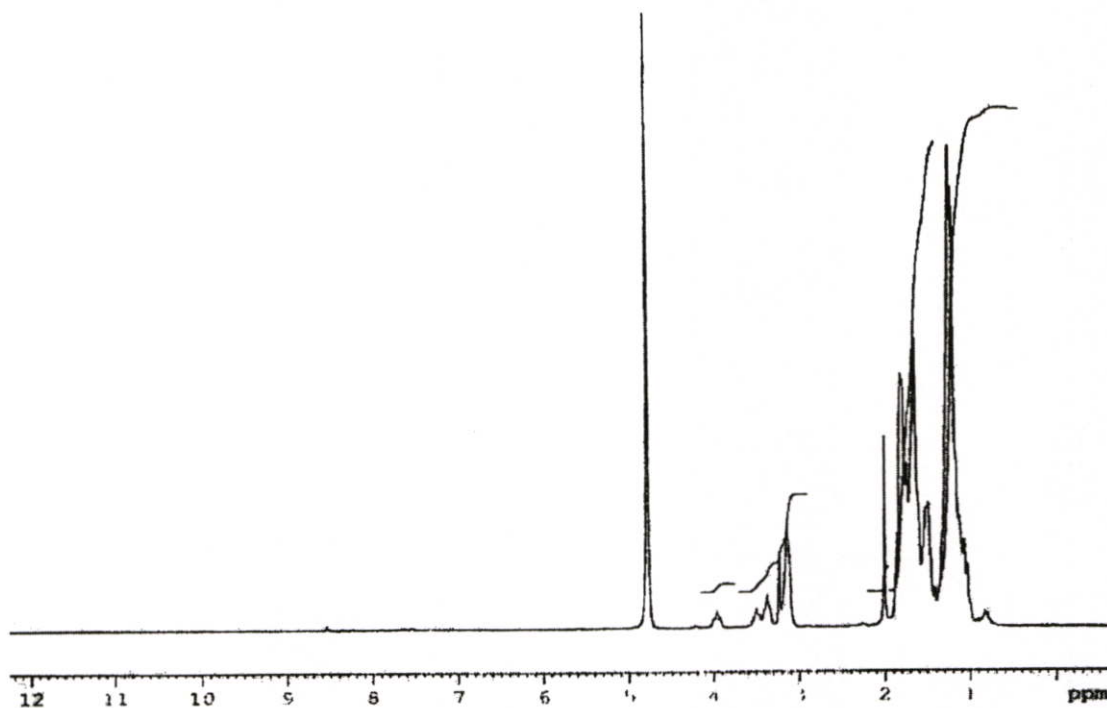
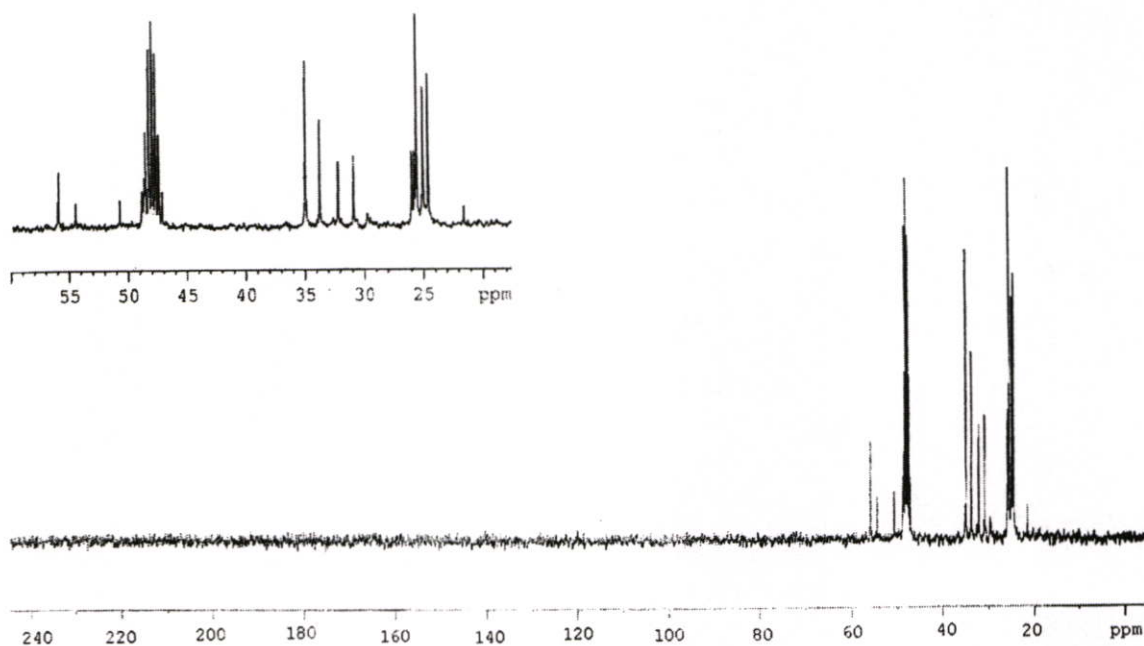


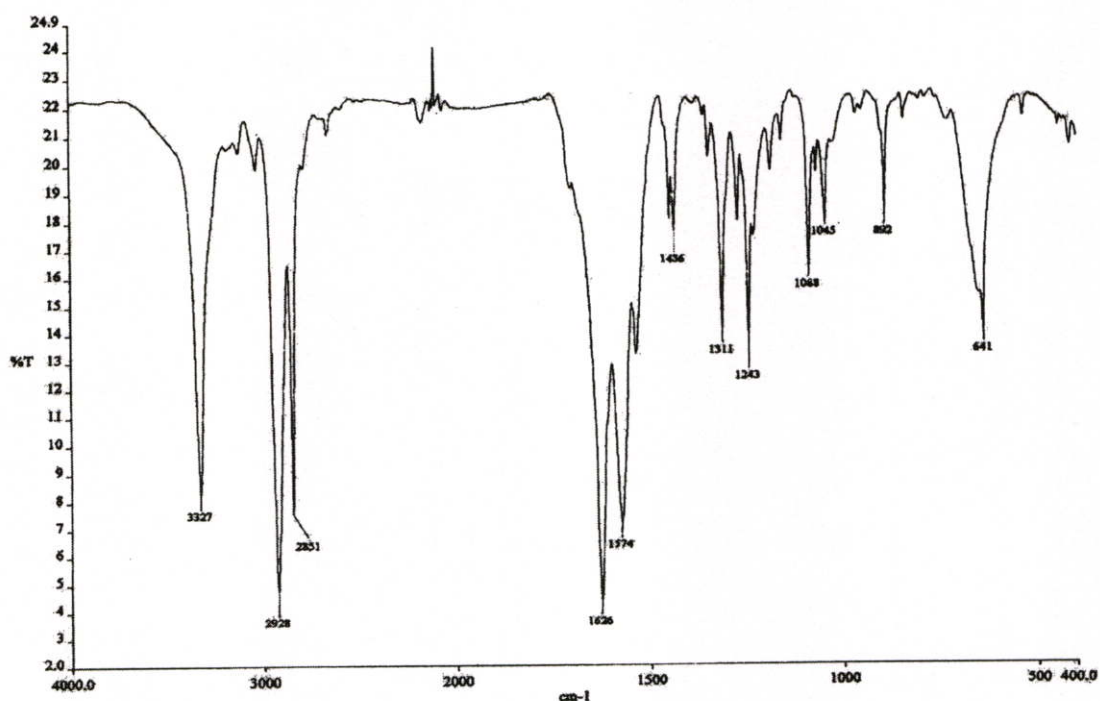
cyclo(isoleucylvalylprolylleucine) (113b)

ตำแหน่ง	δ_{H} (ppm, mult, J in Hz)	δ_{C}	ตำแหน่ง	δ_{H} (ppm, mult, J in Hz)	δ_{C}
Ile			Pro		
C = O	-	171.40	C = O	-	176.99
α	4.12(1H, d, 5.41)	59.78	α	3.23(1H, t, 1.43)	46.76
β	1.47(1H, m)	29.70	β	1.83(2H, m)	18.85
CH ₃	0.83(3H, m)	13.39	γ	1.83(2H, m)	17.53
γ	1.83(2H, m)	22.69	δ	3.23(2H, t, 1.43)	38.48
CH ₃	0.83(3H, m)	11.12	Leu		
Val			C = O	-	176.99
C = O	-	171.40	α	3.10(1H, m)	60.34
α	4.12(1H, d, 5.41)	59.78	β	3.23(2H, t, 1.43)	32.04
β	2.08(1H, m)	30.70	γ	2.22(1H, m)	55.88
CH ₃	0.83(3H, m)	15.33	CH ₃	0.83(3H, m)	25.15
CH ₃	0.83(3H, m)	15.33	CH ₃	0.83(3H, m)	25.15

IR (KBr) ν_{max} 3441 (2° N – H, stre.), 2922 (- C – H, stre.), 1642 (C = O), 1590 (- NH, bend.), 1461 (- CH₂, bend.), 1384 (- CH₃, bend.), 1015 (C – N, stre.), และ 894 (- NH, oop.) cm⁻¹;
 MS (electrospray) : C₂₂H₃₈N₄O₄ จากการคำนวณได้ 422.5 m/z ที่พบ 325.2 [M-Pro]⁺(64.4%)
 273.4 [M-(CH₃)₂CHCHNH-Pro]⁺(61.8%) 246.4 [M-Pro-Val]⁺(8.8%)

4.4.3 การสังเคราะห์ cyclo(isoleucylvalylprolylvaline) (108c)

รูปที่ 4.52 แสดงสเปกตรัม ^1H NMR ของ cyclo(isoleucylvalylprolylvaline) (108c)รูปที่ 4.53 แสดงสเปกตรัม ^{13}C NMR ของ cyclo(isoleucylvalylprolylvaline) (108c)

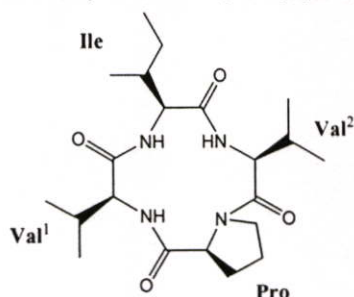


รูปที่ 4.54 แสดงสเปกตรัม FT-IR ของ cyclo(isoleucylvalylprolylvaline) (108c)

จากสเปกตรัม ^1H NMR พบสัญญาณที่ δ 1.22 ppm เป็นสัญญาณของหมู่ $-\text{CH}_3$ ที่อยู่ปลายสายโซ่ ทั้งหมดมี 18 โปรตอน สัญญาณที่ δ 1.42 ppm เป็นสัญญาณของหมู่ $-\text{CH}$ ที่ตำแหน่ง β -Ile กับ β -Val¹ ซึ่งในแต่ละตำแหน่งจะมี 1 โปรตอนและเป็นตำแหน่งที่มีโปรตอนข้างเคียง 5 และ 6 ตัวตามลำดับ จึงปรากฏสัญญาณเป็น multiplet สัญญาณที่ δ 1.67 ppm เป็นสัญญาณของหมู่ $-\text{CH}_2$ ที่ประกอบไปด้วยตำแหน่ง γ -Ile β -Pro และ γ -Pro โดยที่แต่ละตำแหน่งจะมี 2 โปรตอนและมีโปรตอนข้างเคียง 4 3 และ 4 ตัวตามลำดับ จึงปรากฏสัญญาณเป็น multiplet สัญญาณที่ δ 1.81 ppm เป็นสัญญาณที่ประกอบไปด้วยหมู่ $-\text{CH}$ ที่ตำแหน่ง α -Ile α -Val¹ α -Pro α -Val² และ β -Val² กับหมู่ $-\text{CH}_2$ ที่ตำแหน่ง δ -Pro

สเปกตรัม ^{13}C NMR พบตำแหน่งสัญญาณของหมู่ $\text{C}=\text{O}$ ที่ δ 177.8 179.1 179.9 และ 178.5 ppm โดยสัญญาณที่พบเป็นตำแหน่งสัญญาณที่เกิดจากการสร้างพันธะเปปไทด์ของกรดอะมิโน ผลการทดลองสรุปได้ดังตารางที่ 4.19

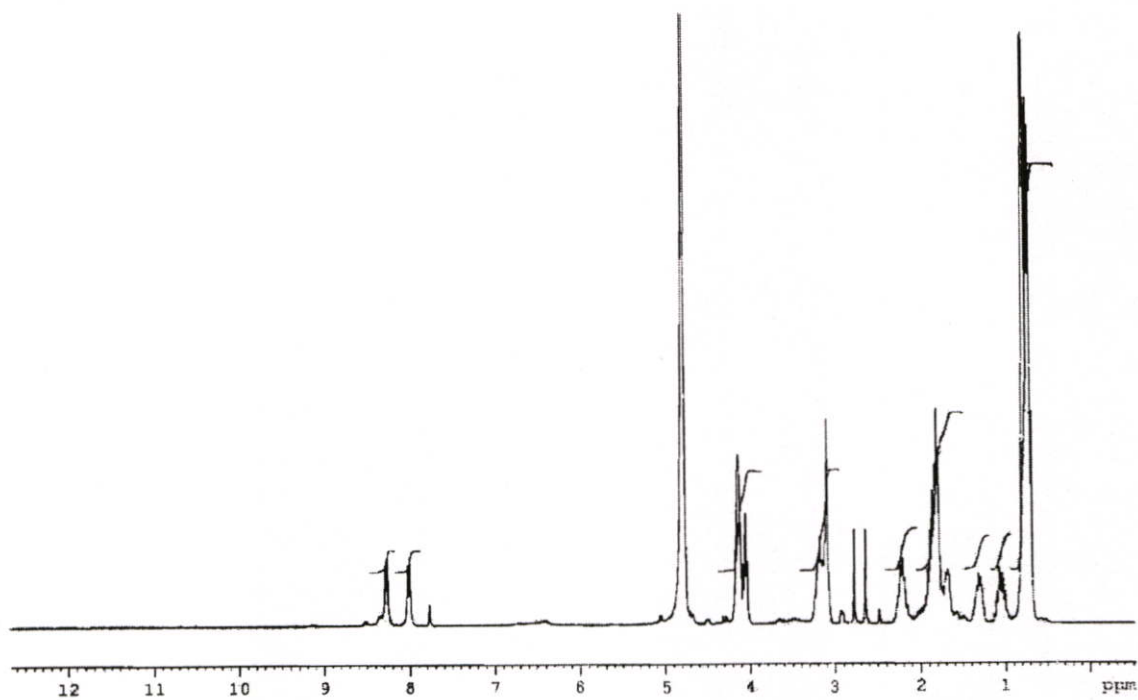
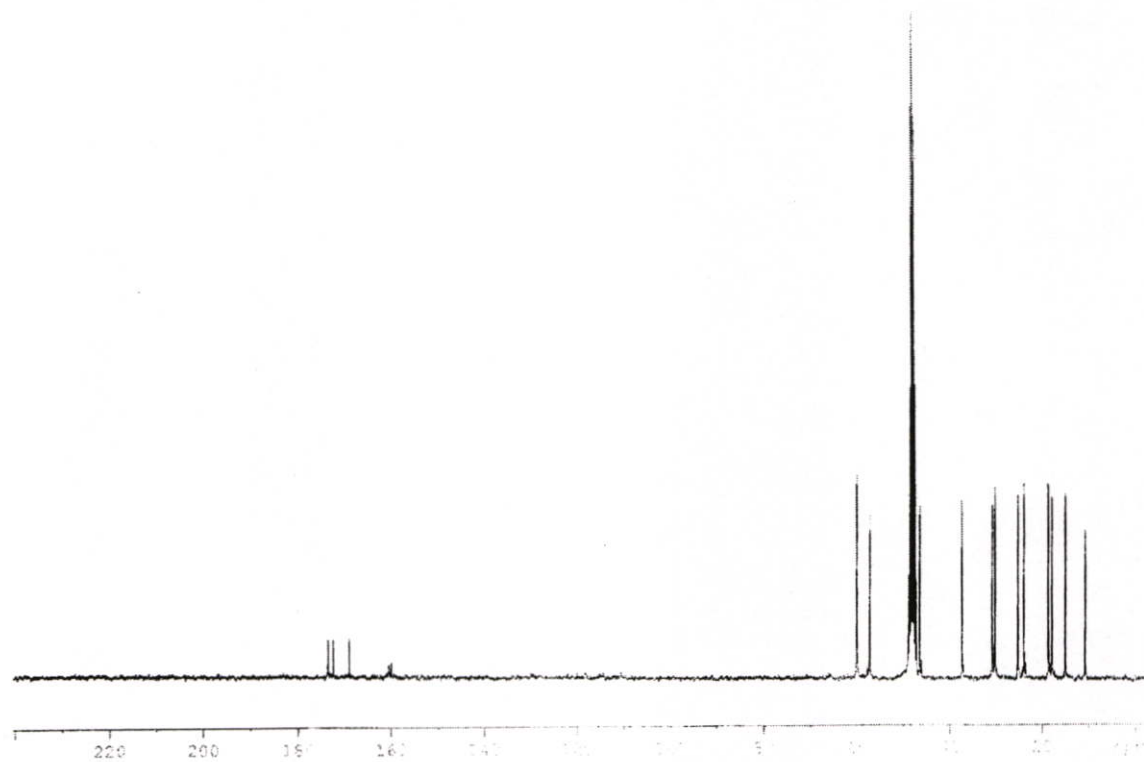
ตารางที่ 4.19 แสดงข้อมูล NMR ของ cyclo(isoleucylvalylprolylvaline) (108c)

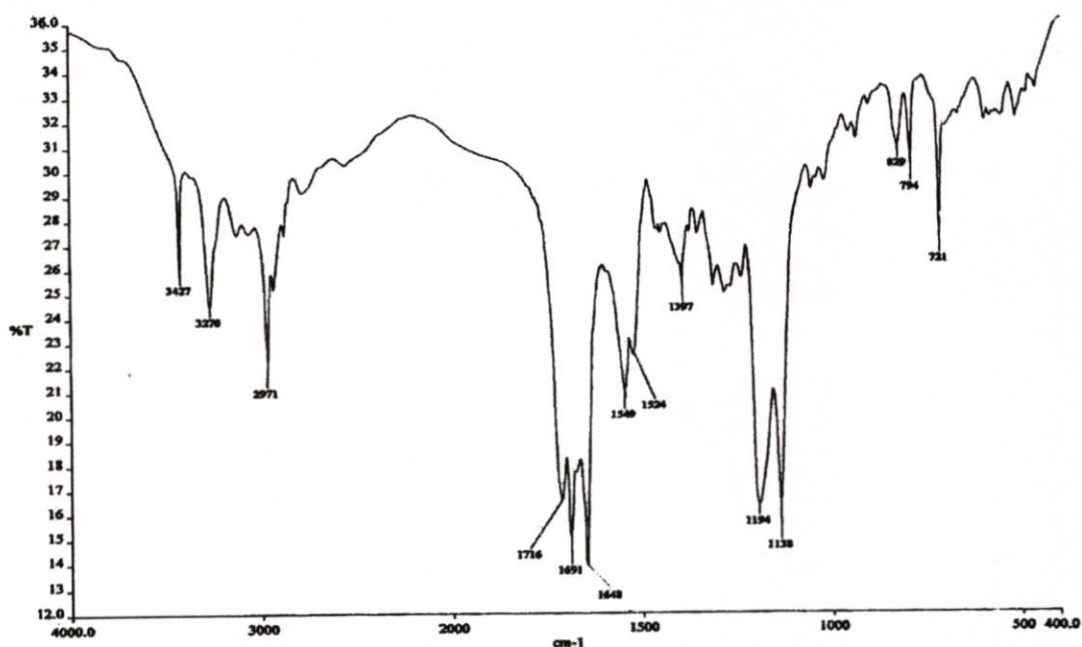


cyclo(isoleucylvalylprolylvaline) (113c)					
ตำแหน่ง	δ_H (ppm, mult, <i>J</i> in Hz)	δ_C	ตำแหน่ง	δ_H (ppm, int, <i>J</i> in Hz)	δ_C
Ile			Pro		
C = O	-	178.50	C = O	-	179.90
α	1.81(1H, m)	54.50	α	1.81(1H, m)	50.73
β	1.42(1H, m)	32.19	β	1.67(2H, m)	25.97
CH ₃	1.22(3H, m)	24.60	γ	1.67(2H, m)	25.76
γ	1.67(2H, m)	30.92	δ	1.81(2H, m)	35.00
CH ₃	1.22(3H, m)	21.57	Val²		
Val¹			Val¹		
C = O	-	179.10	C = O	-	177.80
α	1.81(1H, m)	55.97	α	1.81(1H, m)	55.97
β	1.42(1H, m)	33.76	β	1.81(1H, m)	33.76
CH ₃	1.22(3H, m)	25.04	CH ₃	1.22(3H, m)	25.56
CH ₃	1.22(3H, m)	25.04	CH	1.22(3H, m)	25.56

IR (KBr) ν_{max} 3327 (2° N – H, stre.), 2928 (- C – H, stre.), 1626 (C = O), 1574 (- NH, bend.), 1436 (- CH₂, bend.), 1311 (- CH₃, bend.), 1243 (C – N, stre.), และ 892 (- NH, oop.) cm⁻¹;
 MS (electrospray) : C₂₁H₃₆N₄O₄ จากการคำนวณได้ 408.3 m/z ที่พบ 336.6[M-(CH₃)₂CHCH₂NH]⁺(37.3%) 308.8[M-NH(C=O)CH₂CH(CH₃)₂]⁺(21.5%) 281.4[M-Ile-NH]⁺(7.1%)

4.4.4 การสังเคราะห์ cyclo(isoleucylvalylprolylproline) (108d)

รูปที่ 4.55 แสดงสเปกตรัม ^1H NMR ของ cyclo(isoleucylvalylprolylproline) (108d)รูปที่ 4.56 แสดงสเปกตรัม ^{13}C NMR ของ cyclo(isoleucylvalylprolylproline) (108d)

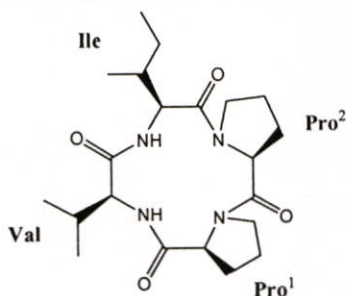


รูปที่ 4.57 แสดงสเปกตรัม FT-IR ของ cyclo(isoleucylvalylprolylproline) (108d)

จากสเปกตรัม ^1H NMR พบสัญญาณที่ δ 0.80 ppm เป็น multiplet ซึ่งเป็นตำแหน่งสัญญาณของหมู่ $-\text{CH}_3$ ที่อยู่ปลายสายโซ่ ทั้งหมดมี 12 โปรตอน multiplet ที่ δ 1.10 ppm มี 1 โปรตอนของหมู่ $-\text{CH}$ และมีโปรตอนข้างเคียง 5 ตัวซึ่งเป็นตำแหน่ง β -Ile multiplet ที่ δ 1.30 ppm มี 1 โปรตอนของหมู่ $-\text{CH}$ และมีโปรตอนข้างเคียง 6 ตัวของตำแหน่ง β -Val multiplet ที่ δ 1.70 ppm มี 2 โปรตอนของหมู่ $-\text{CH}_2$ ของตำแหน่ง γ -Pro² สัญญาณที่ δ 1.82 ppm เป็น multiplet ซึ่งเกิดจากหมู่ $-\text{CH}_2$ ของตำแหน่ง γ -Ile γ -Pro¹ และ β -Pro² สัญญาณที่ δ 2.20 ppm เป็น multiplet มี 2 โปรตอนของหมู่ $-\text{CH}_2$ และมีโปรตอนข้างเคียง 3 ตัวของตำแหน่ง β -Pro¹ สัญญาณที่ δ 3.11 ppm เป็น triplet มี 2 โปรตอนและมีโปรตอนข้างเคียง 2 ตัวของตำแหน่ง δ -Pro² สัญญาณที่ δ 3.19 ppm มี 2 โปรตอนและมีโปรตอนข้างเคียง 2 ตัวของตำแหน่ง δ -Pro¹ สัญญาณที่ δ 4.06 ppm เป็น triplet ซึ่งเกิดจากหมู่ $-\text{CH}$ ของตำแหน่ง α -Pro¹ กับ α -Pro² สัญญาณที่ δ 4.15 ppm เป็น doublet ของหมู่ $-\text{CH}$ 2 หมู่ที่ตำแหน่ง α -Ile กับ α -Val

สเปกตรัม ^{13}C NMR พบตำแหน่งสัญญาณของหมู่ $\text{C}=\text{O}$ ที่ δ 168.71 172.26 และ 173.42 ppm โดยสัญญาณที่พบเป็นตำแหน่งสัญญาณที่เกิดจากการสร้างพันธะเปปไทด์ของกรดอะมิโน ซึ่งจากสเปกตรัมจะพบว่าหมู่ $\text{C}=\text{O}$ ของ Ile และ Val จะขึ้นที่ตำแหน่งสัญญาณเดียวกัน คือที่ δ 168.71 ppm ผลการทดลองสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 4.20

ตารางที่ 4.20 แสดงข้อมูล NMR ของ cyclo(isoleucylvalylprolylproline) (108d)



cyclo(isoleucylvalylprolylproline) (113d)

ตำแหน่ง	δ_{H} (ppm, mult, <i>J</i> in Hz)	δ_{C}	ตำแหน่ง	δ_{H} (ppm, mult, <i>J</i> in Hz)	δ_{C}
Ile			Pro¹		
C = O	-	168.71	C = O	-	173.42
α	4.15(1H, d, 2.77)	59.76	α	4.06(1H, t, 6.22)	46.04
β	1.10(1H, m)	30.09	β	2.20(2H, m)	23.85
CH ₃	0.80(3H, m)	14.94	γ	1.82(2H, m)	18.56
γ	1.82(2H, m)	25.12	δ	3.19(2H, m)	37.22
CH ₃	0.80(3H, m)	10.69	Pro²		
Val			Pro²		
C = O	-	168.71	C = O	-	172.26
α	4.15(1H, d, 2.77)	59.76	α	4.06(1H, t, 6.22)	46.04
β	1.30(1H, m)	30.72	β	1.82(2H, m)	23.85
CH ₃	0.80(3H, m)	17.75	γ	1.70(2H, m)	18.56
CH ₃	0.80(3H, m)	17.75	δ	3.11(2H, t, 3.53)	37.22

IR (KBr) ν_{max} 3427 (2° N – H, stre.), 2971 (- C – H, stre.), 1761 (C = O), 1549 (- NH, bend.), 1397 (- CH₃, bend.), 1194 (C – N, stre.), และ 829 (- NH, oop.) cm⁻¹; MS (electrospray) : C₂₁H₃₄N₄O₄ จากการคำนวณได้ 406.3 m/z ที่พบ 392.3 [M-NH]⁺ (1.8%) 308.9 [M-Pro]⁺ (0.6%)

ตารางที่ 4.22 แสดงผลการทดสอบ Antimicrobial ของสาร 107g - k

mycobacterial	สารทดสอบ	107g	107h	107i	107j	107k
<u>S. milleri group</u>		<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)
<u>S. mutans ATCC 27175</u>		<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)
<u>S. pneumoniae</u>		<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)
<u>S. aureus ATCC 25923</u>		<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)
<u>S. aureus (MRSA)</u>		<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)
<u>S. coag negative</u>		<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)
<u>B. subtilis ATCC 26633</u>		<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)
<u>B. pertussis</u>		<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)
<u>C. diphtheriae</u>		50(W)	<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)
<u>P. aeruginosa ATCC 27853</u>		<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)
<u>E. coli ATCC 25922</u>		<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)
<u>V. cholerae</u>		<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)
<u>V. parahaemolyticus</u>		<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)
<u>Microsporum spp</u>		<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)
<u>C. albicans</u>		<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)
<u>C. kruselii</u>		<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)
<u>C. tropicalis</u>		<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)
<u>T. mentagophyte</u>		<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)
<u>T. rubrum</u>		<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)
<u>Acremonium spp</u>		<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)

ตารางที่ 4.23 แสดงผลการทดสอบ Antimicrobial ของสาร 113a – d

mycobacterial	สารทดสอบ	113a	113b	113c	113d
<i>S. milleri</i> group		<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)
<i>S. mutans</i> ATCC 27175		<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)
<i>S. pneumoniae</i>		<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923		<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)
<i>S. aureus</i> (MRSA)		<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)
<i>S. coag</i> negative		<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)
<i>B. subtilis</i> ATCC 26633		<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)
<i>B. pertussis</i>		<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)
<i>C. diphtheriae</i>		50(W)	<50(R)	<50(R)	50(W)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853		50(W)	<50(R)	<50(R)	<50(R)
<i>E. coli</i> ATCC 25922		<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)
<i>V. cholerae</i>		<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)
<i>V. parahaemolyticus</i>		<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)
<i>Microsporium</i> spp		<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)
<i>C. albicans</i>		<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)
<i>C. krucei</i>		<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)
<i>C. tropicalis</i>		<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)
<i>T. mentagophyte</i>		<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)
<i>T. rubrum</i>		<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)
<i>Acremonium</i> spp		<50(R)	<50(R)	<50(R)	<50(R)

หมายเหตุ Weak zone (W) 0.2 < clear zone < 0.5 cm.

Moderate zone (M) 0.5 < clear zone < 0.8 cm.

Good zone (G) clear zone \geq 0.8 cm.

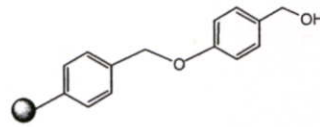
Resistant (R)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการสืบค้นงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เปปไทด์บนวัสดุภาคของแข็ง เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคสารละลาย พบว่าการสังเคราะห์เปปไทด์ด้วยเทคนิคสารละลายมักมีหลายขั้นตอน และแต่ละขั้นตอนต้องผ่านขั้นตอนการแยกสารให้บริสุทธิ์ก่อนจึงนำมาทำปฏิกิริยาต่อได้ ทำให้เทคนิคสารละลายเป็นเทคนิคที่ต้องใช้เวลาในการสังเคราะห์นานมากขึ้น ส่วนเทคนิควัสดุภาคของแข็งนั้นสามารถใช้รีเอเจนต์ในปริมาณที่มากเกินไปได้ เนื่องจากขั้นตอนการแยกสารให้บริสุทธิ์ทำได้ง่าย โดยอาศัยการล้างด้วยตัวทำละลายและการกรอง และผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้มีความบริสุทธิ์มาก[36] ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่ได้จากเทคนิควัสดุภาคของแข็งจะได้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่สูงกว่าเทคนิคสารละลาย

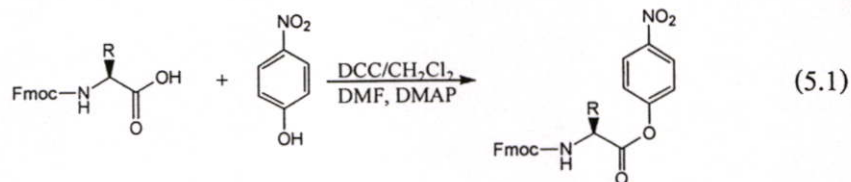
จากการศึกษาพบว่า Wang linker (90) เป็นตัวเชื่อมโยงที่นิยมนำมาใช้ในการสังเคราะห์เปปไทด์มากที่สุด เนื่องจากสภาวะที่ใช้ในการตัดสารผลิตภัณฑ์ออกจากเรซินเป็นปฏิกิริยาที่ไม่รุนแรงมากนัก ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการเตรียม Wang resin เพื่อใช้เป็นวัสดุภาคของแข็งในการสังเคราะห์เทตระเปปไทด์



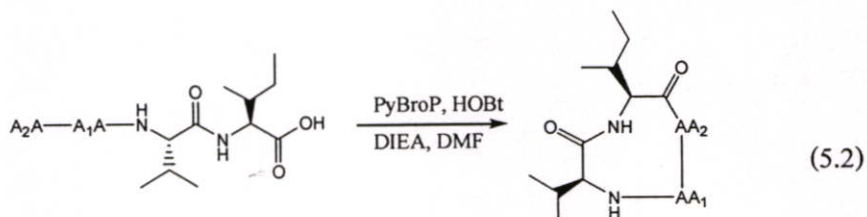
Wang resin (90)

การทดลองเริ่มจากการนำกรดอะมิโนที่มีการใส่หมู่ป้องกันและหมู่กระตุ้นแล้วเข้าไปที่ละตัวจนได้สารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมาในการสังเคราะห์เปปไทด์นั้นจะใช้กรดอะมิโนที่ใส่แต่หมู่ป้องกันอย่างเดียวเข้าทำปฏิกิริยา ส่วนการใส่หมู่กระตุ้นนั้นจะทำไปพร้อม ๆ กันกับการทำปฏิกิริยาระหว่างกรดอะมิโนกับเรซิน[8] โดยหมู่กระตุ้นที่นิยมใช้กับเทคนิควัสดุภาคของแข็งคือ DIC เนื่องจากเมื่อปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์แล้วอินเตอร์มีเดียตที่เกิดจากปฏิกิริยาสามารถถูกกำจัดออกได้ง่าย โดยอาศัยการล้างและการกรองด้วยตัวทำละลาย ส่วนเหตุผลที่ในการทดลองนี้ต้องใช้กรดอะมิโนที่ใส่หมู่กระตุ้นเข้าไปก่อนมาทำปฏิกิริยา เพราะต้องการให้กรดอะมิโนที่ใส่เข้าไปทำปฏิกิริยากับเรซินมีความว่องไวต่อการทำปฏิกิริยาอยู่ก่อน ฉะนั้นในการทำปฏิกิริยากันระหว่างกรดอะมิโนกับเรซินจึงไม่จำเป็นต้องใส่ DIC ลงไปเพื่อกระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลิกของกรดอะมิโนอีก โดยวิธีการนี้จะเป็นวิธีการที่นำไปสู่การลดปริมาณการใช้ DIC ซึ่งเป็นสารที่มีปริมาณน้อยในห้องปฏิบัติการและเป็นสารห้ามนำเข้า นอกจาก DIC แล้วยังมี DCC อีกตัวหนึ่ง

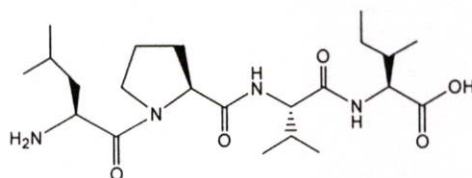
นิยมนำมาใช้เป็นตัวกระตุ้นได้เช่นกัน แต่ส่วนใหญ่แล้ว DCC จะนิยมใช้ในเทคนิคสารละลายมากกว่า เพราะอินเตอร์มีเดียที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาจะไม่ละลายในตัวทำละลายใด ๆ เลย จึงไม่สามารถถูกกำจัดออกได้ด้วยการล้างด้วยตัวทำละลาย ดังนั้นในการทดลองนี้จึงจำเป็นต้องมีการใส่หมู่กระตุ้นเข้าไปที่กรดอะมิโนก่อน โดยใช้ 4 - nitrophenol ไปกระตุ้นที่หมู่คาร์บอกซิลิกของกรดอะมิโนได้ 4 - nitrophenyl ester ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นหมู่หลุดที่ดีดังสมการที่ 5.1



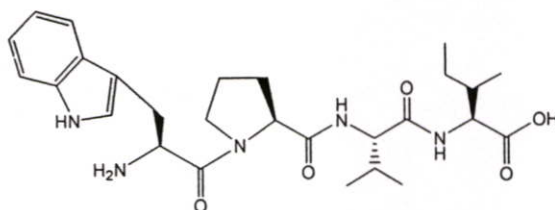
เมื่อเตรียมกรดอะมิโนได้แล้วจึงนำมาทำปฏิกิริยาบนวฏภาคของแข็งต่อ สุดท้ายเมื่อได้เทระเปปไทด์ที่ต้องการแล้วจึงทำการตัดสารผลิตภัณฑ์ออกจากเรซินด้วย 90% TFA ในไดคลอโรมีเทน และนำเทระเปปไทด์ส่วนหนึ่งที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ อีกส่วนหนึ่งนำมาทำปฏิกิริยาต่อเพื่อทำการปิดวงให้ได้ไซคลิกเทระเปปไทด์ โดยในขั้นตอนจะเป็นการทำการทดลองด้วยเทคนิคสารละลายซึ่งใช้ PyBroP และ HOBt เป็นตัวเร่งในการเกิดปฏิกิริยาดังสมการที่ 5.2 และนำไซคลิกเทระเปปไทด์ที่สังเคราะห์ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป



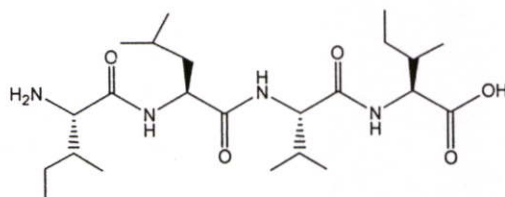
จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์ที่สังเคราะห์ได้ พบว่ามีเทระเปปไทด์และไซคลิกเทระเปปไทด์บางตัวเท่านั้นที่สามารถออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งได้แก่ isoleucylvalylprolylleucine (107b), isoleucylvalylprolyltryptophane (107e), isoleucylvalylleucylisoleucine (107g), cyclo(isoleucylvalylprolylisoleucine) (108a) และ cyclo(isoleucylvalylprolylproline) (108d) โดยเปปไทด์เหล่านี้มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Corynebacterium diphtheriae*. มีค่า MIC เท่ากับ 12.5 50 50 50 และ 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ตามลำดับ และสาร cyclo(isoleucylvalylprolylisoleucine) (108a) ยังออกฤทธิ์ยับยั้ง *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 มีค่า MIC เท่ากับ 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$



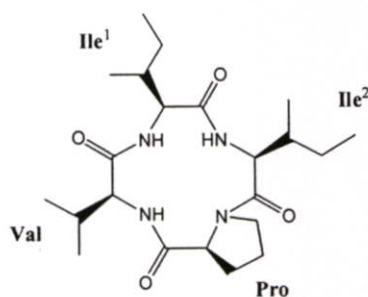
Isoleucylvalylpropylleucine (107b)



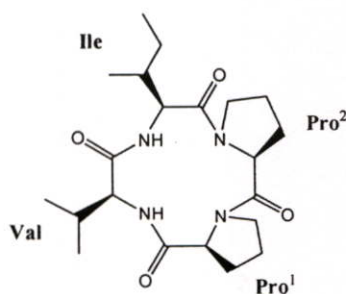
Isoleucylvalylpropyltryptophane (107e)



Isoleucylvalylleucylisoleucine (107g)



cyclo(isoleucylvalylprolylisoleucine) (108a)



cyclo(isoleucylvalylprolylproline) (108d)

สรุปทฤษฎีบทเปปไทด์ 107a – k ในงานวิจัยนี้เตรียมขึ้นโดยเทคนิควิถีภาคของแข็ง เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคสารละลายพบว่าเทคนิควิถีภาคของแข็งมีขั้นตอนการแยกสารให้บริสุทธิ์ง่ายกว่าและได้ปริมาณผลผลิตในเปอร์เซ็นต์ที่สูงกว่า ในการประยุกต์นำทฤษฎีบทเปปไทด์ที่สังเคราะห์ได้มาเตรียมเป็นไซคลิกทฤษฎีบทเปปไทด์ 108a – d ด้วยเทคนิคสารละลายพบว่าได้ปริมาณผลผลิตในเปอร์เซ็นต์ที่สูงกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับการสังเคราะห์ด้วยเทคนิคสารละลายตั้งแต่ต้น และการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียพบว่าทั้งทฤษฎีบทเปปไทด์และไซคลิกทฤษฎีบทเปปไทด์ที่เตรียมได้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ

ข้อเสนอแนะ

1. ในการทดลองอาจจะลองเปลี่ยนกรดอะมิโนเป็นกรดอะมิโนตัวอื่นบ้าง เพื่อเป็นการปรับปรุงโครงสร้างและคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย หรืออาจจะลองสลับตำแหน่งของกรดอะมิโน
2. ศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของกรดอะมิโน เช่น การเพิ่มหมู่ฟังก์ชันเข้าไปที่อะตอมไนโตรเจน หรือเปลี่ยนสายโซ่ด้านข้างเป็นหมู่ฟังก์ชันอื่น แล้วจึงนำมาเตรียมเป็นสารประกอบเปปไทด์ และศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพ

บรรณานุกรม

- [1] Gail E. A., Peter M. F. and Weng C. C. **J. Org. Chem.** Vol. 65, pp. 5048 – 5065, 2002
- [2] Hicham F. **Combinatorial Chemistry.** Great Britain, Oxford University, 2002
- [3] Rebecca L. C. “**Cyclic Antibiotic Peptide Desing : Structure and Membrane Interaction**” [online]. Available : <http://www.scs.uiuc.edu/chem/program/chem435/so2-coppins.pdf>. 2001
- [4] Young S. Y., Morita K. T. and Hideji I. **J. Nat. Prod.** Vol. 60, pp. 216 – 218, 1997
- [5] John N. L., Jeffrey P. M. and Kade D. R. **J. Chem. Soc., Perkin Trans 1.** pp. 471 – 484, 2001
- [6] Stephen R. W. and Antrony W. C. **Combinatorial Chemistry.** New York, John wiley & Sons, 1997
- [7] Merrifield R.B. **J. Am. Chem. Soc.** Vol. 85, pp. 2149, 1963
- [8] Wang S. S. **J. Am. Chem. Soc.** Vol. 95, pp. 1328 – 1330, 1973
- [9] Guiller F., Orain D. and Bradley M. **Chemical Review.** Vol. 100, pp. 2091 – 2157, 2000
- [10] Annette B. S. and Weber P. **Combinatorial Strategies in Biological and Chemistry.** England, John Wiley & Sons, 2002
- [11] Somonina G., Ashmarin I. and Lyapina L. **Pathophysiology.** Vol. 8, pp. 229 – 234, 2002
- [12] Morita H., Kayashita T., Uchida A., Takeya K. and Itokawa H. **J. Nat. Prod.** Vol. 60, pp. 212 – 215, 1997
- [13] Nogle M. L. and Gerwick H. W. **J. Nat. Prod.** Vol. 65, pp. 21 – 24, 2002
- [14] Vongvanich N., Prasat K., Massahiko I., Srisuda T., Saovaluk V., Morakot T. and Yodhathai T. **J. Nat. Prod.** Vol. 65, pp. 1346 – 1348, 2002
- [15] Davies – Coleman T. M., Dzeha M. T., Gray A. C., Hess S., Pannell K. L., Hendricks T. D. and Arendes E. C. **J. Nat. Prod.** Vol. 66, pp. 712 – 715, 2003
- [16] Williams G. P., Yoshida Y. W., Quon K. M., Moore E. R. and Paul J. V. **J. Nat. Prod.** Vol. 66, pp. 651 – 654, 2003
- [17] Ghadiri M.R. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.** Vol. 34, pp. 93 – 95, 1995
- [18] Marulami Y., Takei M., Shindo K., Kitazume C., Tanaka J., Higa T. and Fukachi H. **J. Nat. Prod.** Vol. 65, pp. 259 – 261, 2002

- [19] William G. P., Yoshida W., Moore E. R. and Paul J. V. **J. Nat. Prod.** Vol. 66, pp. 620 – 624, 2003
- [20] Tan T. L., Sitachita N. and Gerwick H. W. **J. Nat. Prod.** Vol. 66, pp. 764 – 771, 2003
- [21] Mikael K. H., Peschke B. and ThØgersen H. **J. Org. Chem.** Vol. 67, pp. 1227 – 1232, 2002
- [22] Compiglia P., Gomez – Monterry I., Longobardo L., Lama T., Novellino E. and Grieco P. **Tetrahedron Letters.** Vol. 45, pp.1453 – 1456, 2004
- [23] Akaji K., Teruya K. and Aimoto S. **Tetrahedron.** Vol. 57, pp. 2293 – 2303, 2001
- [24] Bang K. J., Hasegawa K., Kawakami T., Aimoto S. and Akaji K. **Tetrahedron Letters.** Vol. 45, pp. 99 – 102, 2004
- [25] Horikawa E., Kodaka M., Nakahara Y., Okano H. and Nakamura K. **Tetrahedron Letters.** Vol. 42, pp. 8337 – 8339, 2001
- [26] Qin C., Zhong X., Lee N. N., Bu X., Chan W. S. and Guo Z. **Tetrahedron Letters.** Vol. 45, pp. 217 – 220, 2004
- [27] Flouzat C., Margueite F., Percebois F., Monteil A. and Combourieu M. **Tetrahedron Letters.** Vol. 38, pp. 1191 – 1194, 1997
- [28] Basso A. and Ernst B. **Tetrahedron Letters.** Vol. 42, pp. 6687 – 6690, 2001
- [29] Yan L. Z., Edwards P., Flora D. and Mayer J. P. **Tetrahedron Letters.** Vol. 45, pp. 923 – 925, 2004
- [30] Varendor K., Stephen B. H. K., James P. T. and Merrifield R. B. **Analytical Biochemistry.** Vol. 117, pp. 147 – 145, 1981
- [31] Bauer AW., Kirby WMM., Sherris JC. And Turck M. **American Journal Clinical Pathology.** Vol. 45, pp. 493 – 496, 1966
- [32] Jasir A., Kasprzykowski F., Lindstrom V., Schalen C. and Grubb A. **Indian J. Med. Res.** pp. 74 – 76, 2004
- [33] Napolitano A., Bruno I., Riccio R. and Gomez – Paloma L. **Tetrahedron.** Vol. 46, pp. 1 – 8, 2005
- [34] Aneiros A. and Garateix A. **Journal of Chromatography B.** Vol. 803, pp. 41 – 53, 2004
- [35] Eric F., Jacques C., Antonine P., Marie – Noelle D. and Patrick J. **Tetrahedron.** Vol. 47, pp. 259 – 270, 1991

- [36] Dean T. **“A Practical Introduction to Solid Phase Chemistry”** [online]. Available :
<http://www.chemsoc.org/pdf/ccn/solidphase.pdf>. 1998

