



โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ฟลูออเรสเซนต์เซนเซอร์จากอนุพันธ์คูมารินสำหรับตรวจวัดฟอร์มัลดีไฮด์

Coumarin Derivatives as Fluorescent Sensors for Formaldehyde

ชื่อนิสิต	นางสาวณภัทร คำเจริญ	เลขประจำตัว	5933029023
ภาควิชา	เคมี		
ปีการศึกษา	2562		

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ฟลูออเรสเซนต์เซนเซอร์จากอนุพันธ์คูมารินสำหรับตรวจวัดฟอร์มัลดีไฮด์

Coumarin Derivatives as Fluorescent Sensors for Formaldehyde

โดย

นางสาวณภัทร คำเจริญ

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2562

โครงการ ฟลูออเรสเซนซ์เซนเซอร์จากอนุพันธ์คูมารินสำหรับตรวจวัดฟอร์มาลดีไฮด์

โดย นางสาวณภัทร คำเจริญ

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

- | | |
|--|------------------|
| 1. ศาสตราจารย์ ดร.พรเทพ สมพรพิสุทธิ์ | ประธานกรรมการ |
| 2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนวัช อาชวาคม | กรรมการ |
| 3. รองศาสตราจารย์ ดร.ไพฑูรย์ รัชตะสาคร | อาจารย์ที่ปรึกษา |

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี



.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพฑูรย์ รัชตะสาคร)
อาจารย์ที่ปรึกษา



.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย พาราสุข)
หัวหน้าภาควิชาเคมี

วันที่ 25 เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2563

ชื่อโครงการ ฟลูออเรสเซนซ์เซนเซอร์จากอนุพันธ์คูมารินสำหรับตรวจวัดฟอร์มาลดีไฮด์
ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาวณภัทร คำเจริญ เลขประจำตัว 5933029023
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.ไพฑูริย์ รัชตะสาคร
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2562

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เกี่ยวข้องกับการออกแบบและสังเคราะห์ฟลูออเรสเซนซ์เซนเซอร์สำหรับฟอร์มาลดีไฮด์ที่มีอนุพันธ์คูมารินเป็นฟลูออโรฟอร์และมีหมู่ไฮดราไซด์เป็นส่วนรับรู้ การออกแบบเซนเซอร์นี้มีสมมติฐานว่าหมู่ไฮดราไซด์จะสามารถยับยั้งสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของคูมารินได้ด้วยกระบวนการถ่ายเทอิเล็กตรอนที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยแสง และเมื่อหมู่ไฮดราไซด์เกิดปฏิกิริยาควบแน่นกับฟอร์มาลดีไฮด์แล้ว สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของเซนเซอร์จะเพิ่มสูงขึ้นเพราะกระบวนการถ่ายเทอิเล็กตรอนถูกระงับไป โดยการสังเคราะห์เริ่มด้วย ปฏิกิริยาควบแน่นระหว่างซาลิไซลัลดีไฮด์กับไดเอธิลมาโลเนต ได้ผลิตภัณฑ์เป็นคูมารินที่มีหมู่ฟังก์ชันเอธิลเอสเทอร์ จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยากับไฮดราซีนจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาวที่มีหมู่คาร์โบไฮดราไซด์ และเพื่อเป็นการเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำของเซนเซอร์ ผลิตภัณฑ์ที่มีหมู่ไฮดราไซด์ได้ถูกเปลี่ยนไปอยู่ในรูปเกลือไฮโดรคลอไรด์ด้วยการตกตะกอนกับแก๊สไฮโดรเจนคลอไรด์ในตัวทำละลายอินทรีย์ สารที่สังเคราะห์ได้ทุกชนิดได้ถูกพิสูจน์เอกลักษณ์และยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ อย่างไรก็ตาม สถานการณ์การแพร่ระบาดของไวรัสโคโรนาที่เริ่มขึ้นในเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ.2563 ทำให้รัฐบาลไทยและจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยประกาศปิดสถานศึกษาเพื่อลดการแพร่ระบาดของไวรัส จึงทำให้โครงการนี้ยังไม่ได้มีการศึกษาสมบัติเชิงแสงและประสิทธิภาพในการตรวจวัดฟอร์มาลดีไฮด์ของเซนเซอร์ที่สังเคราะห์ได้

คำสำคัญ: ฟลูออเรสเซนซ์เซนเซอร์, ฟอร์มาลดีไฮด์, อนุพันธ์คูมาริน, หมู่ไฮดราไซด์, กระบวนการถ่ายเทอิเล็กตรอนที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยแสง

Project Title Coumarin Derivatives as Fluorescent Sensors for Formaldehyde

Student Name Miss Napat Khamcharoen Student ID 5933029023

Advisor Name Associate Professor Dr. Paitoon Rashatasakhon

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2019

Abstract

This research involves the design and synthesis of fluorescent sensor for formaldehyde which contains a coumarin as a fluorophore, and a hydrazide group as a recognition unit. The sensor is designed with a hypothesis that the hydrazide group can quench the fluorescence signal of coumarin by photo-induced electron transfer process. When the hydrazide condenses with formaldehyde, the fluorescence signal can be enhanced as the electron transfer process is diminished. The synthesis begins with a condensation between salicylaldehyde and diethylmalonate which produces a coumarin with an ethyl ester functional group. The reaction of this ester with hydrazine gives rise to a white solid product with carbohydrazide group. To enhance the water solubility of this sensor, the hydrazide is converted into its hydrochloride salt by precipitation with hydrochloric acid in organic solvent. All the synthetic compounds are characterized by nuclear magnetic resonance spectroscopy. Unfortunately, the corona virus pandemic which began since February 2020 has led to the university shutdown. The on-going parts of this project include the photophysical and sensing property investigation on the successfully synthesized compound.

Keywords: fluorescent sensor, formaldehyde, coumarin derivatives, hydrazide group, photo-induced electron transfer process.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ไพฑูรย์ รัชตะสาคร อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัยนี้เป็นอย่างสูงที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำต่าง ๆ รวมทั้งความช่วยเหลือในการแก้ปัญหาและความช่วยเหลือด้านต่าง ๆ ตลอดจนการเขียนรายงานฉบับนี้

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.พรเทพ สมพรพิสุทธิ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนวัช อาชวาคม ที่ให้เกียรติเป็นประธานกรรมการและกรรมการสอบโครงการนี้ รวมทั้งคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการปรับปรุงแก้ไขให้รายงานฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณพี่ ๆ ในห้องปฏิบัติการ ชั้น 14 ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับการให้ความรู้และคำแนะนำในการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือต่าง ๆ ในห้องปฏิบัติการ รวมถึงเพื่อน ๆ และผู้มีส่วนเกี่ยวข้องสำหรับการช่วยเหลือในทุกเรื่อง ผู้วิจัยขอระลึกในความกรุณาของทุกท่านที่ได้กล่าวมาข้างต้น ตลอดจนบุคคลที่มีได้เอ่ยนามไว้ ณ ที่นี้

ณภัทร คำเจริญ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญรูป	ฎ
สัญลักษณ์และคำย่อ	ณ
บทที่ 1	1
บทนำและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	1
1.1 บทนำ	1
1.2 ทฤษฎีและความรู้พื้นฐานที่เกี่ยวข้อง	3
1.2.1 เซนเซอร์ทางเคมี (chemical sensor)	3
1.2.2 การเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence)	3
1.2.3 การลดลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence quenching)	6
1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	8
1.3.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับฟลูออเรสเซนซ์เซนเซอร์สำหรับตรวจวัดฟอร์มัลดีไฮด์	8
1.3.1.1 หมู่ตรวจวัดฟอร์มัลดีไฮด์	8
1.3.1.2 ปฏิกิริยา condensation ระหว่างหมู่อะมิโนกับฟอร์มัลดีไฮด์	9
1.3.1.3 ปฏิกิริยา condensation ระหว่างหมู่ไฮดราซีนกับฟอร์มัลดีไฮด์	10
1.3.1.4 ปฏิกิริยา 2-aza-Cope rearrangement	11
1.3.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับฟลูออเรสเซนซ์เซนเซอร์จากอนุพันธ์คูมาริน	12
1.3.2.1 อนุพันธ์คูมาริน	12
1.3.2.2 coumarin-hydrazone based fluorogenic probe (PFM)	12

1.3.2.3	7-hydroxycoumarin-3-carboxylic acid ethyl ester probe (CA)	13
1.4	วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	13
บทที่ 2		14
การทดลอง		14
2.1	เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	14
2.1.1	เครื่องมือและอุปกรณ์	14
2.1.2	สารตั้งต้นและสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา	14
2.1.3	ตัวทำละลาย	15
2.1.4	สารอื่นๆ	16
2.2	การสังเคราะห์	17
2.2.1	การสังเคราะห์ methyl 2-oxo-2 <i>H</i> -chromene-3-carboxylate (A1)	17
2.2.1.1	การทำให้บริสุทธิ์	17
a)	โดยเทคนิคการตกผลึก	17
b)	โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี	18
c)	โดยเทคนิคการตกผลึกร่วมกับเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี	18
2.2.1.2	การพิสูจน์เอกลักษณ์	20
2.2.2	การสังเคราะห์ 2-oxo-2 <i>H</i> -chromene-3-carbohydrazide (A2)	21
2.2.2.1	การทำให้บริสุทธิ์	21
a)	โดยการสกัด ด้วย Ethyl acetate และน้ำ	21
b)	โดยการสกัด ด้วย Dichloromethane และน้ำ	21
2.2.2.2	การพิสูจน์เอกลักษณ์	23
2.2.3	การสังเคราะห์ 2-oxo-2 <i>H</i> -chromene-3-carbohydrazide (A2)	24
2.2.4	การสังเคราะห์ 2-oxo-2 <i>H</i> -chromene-3-carbohydrazide (A2) ให้อยู่ในรูปเกลือ (A2 salt)	25
2.2.5	การสังเคราะห์ <i>N,N'</i> -(ethane-1,2-diyl)bis(2-oxo-2 <i>H</i> -chromene-3-carboxamide) (A3)	27

2.2.5.1 การทำให้บริสุทธิ์	27
2.2.5.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์	28
2.2.6 การสังเคราะห์ <i>N</i> -(2-aminoethyl)-2-oxo-2 <i>H</i> -chromene-3-carboxamine (A4)	29
2.2.6.1 การทำให้บริสุทธิ์	29
2.2.6.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์	30
2.2.7 การสังเคราะห์ <i>N</i> -(4-aminophenyl)-2-oxo-2 <i>H</i> -chromene-3-carboxamide (A5)	31
2.2.7.1 การทำให้บริสุทธิ์	31
2.2.8 การสังเคราะห์ 2-oxo-2 <i>H</i> -chromene-3-carboxylic acid (A6)	32
2.2.8.1 การทำให้บริสุทธิ์	32
2.2.8.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์	33
2.2.9 การสังเคราะห์ <i>N</i> -(2-aminoethyl)-2-oxo-2 <i>H</i> -chromene-3-carboxamine (A4)	34
2.2.9.1 การทำให้บริสุทธิ์	34
1. โดยการสกัด	34
2. โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี	34
2.2.10 การสังเคราะห์ 2-oxo- <i>N</i> -(pyridine-2-ylmethyl)-2 <i>H</i> -chromene-3-carboxamide (A7)	36
2.2.10.1 การทำให้บริสุทธิ์	36
1. โดยการสกัด	36
2. โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี	36
3. โดยการสกัด	37
2.2.10.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์	38
บทที่ 3	39
ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง	39
3.1 การออกแบบการสังเคราะห์โมเลกุลเป้าหมาย	39
3.2 การสังเคราะห์	41

3.2.1	การสังเคราะห์ methyl 2-oxo-2 <i>H</i> -chromene-3-carboxylate (A1)	41
3.2.2	การสังเคราะห์ 2-oxo-2 <i>H</i> -chromene-3-carbohydrazide (A2)	45
3.2.3	การสังเคราะห์ 2-oxo-2 <i>H</i> -chromene-3-carbohydrazide (A2) ให้อยู่ในรูปเกลือ (A2 salt)	49
3.2.4	การสังเคราะห์ <i>N,N'</i> -(ethane-1,2-diy)bis(2-oxo-2 <i>H</i> -chromene-3-carboxamide) (A3)	50
3.2.5	การสังเคราะห์ <i>N</i> -(2-aminoethyl)-2-oxo-2 <i>H</i> -chromene-3-carboxamine (A4)	53
3.2.6	การสังเคราะห์ <i>N</i> -(4-aminophenyl)-2-oxo-2 <i>H</i> -chromene-3-carboxamide (A5)	57
3.2.7	การสังเคราะห์ 2-oxo-2 <i>H</i> -chromene-3-carboxylic acid (A6)	58
3.2.8	การสังเคราะห์ <i>N</i> -(2-aminoethyl)-2-oxo-2 <i>H</i> -chromene-3-carboxamine (A4)	61
3.2.9	การสังเคราะห์ 2-oxo- <i>N</i> -(pyridine-2-ylmethyl)-2 <i>H</i> -chromene-3-carboxamide (A7)	63
บทที่ 4		68
	สรุปผลการทดลอง	68
4.1	สรุปผลการทดลอง	68
4.2	ข้อเสนอสำหรับงานวิจัยที่ควรจะทำต่อในอนาคต	68
	เอกสารอ้างอิง	70
	ภาคผนวก	72
	ประวัติผู้วิจัย	78

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1.1 แสดงหลักการทำงานของตัวให้สัญญาณของเซนเซอร์ทางเคมี	3
รูปที่ 1.2 แสดงแผนภาพของ Jablonski ที่ใช้อธิบายการเกิด fluorescence และ phosphorescence	4
รูปที่ 1.3 แสดงการจัดเรียงอิเล็กตรอนในสถานะพื้นและสถานะกระตุ้นของอิเล็กตรอนแบบ singlet และ triplet	4
รูปที่ 1.4 แสดงปรากฏการณ์การเกิด Stoke shift	5
รูปที่ 1.5 แสดงการอธิบายการถ่ายโอนอิเล็กตรอนจากตัวตรวจจับไปยัง หมู่ให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ด้วยทฤษฎี Frontier Orbital	6
รูปที่ 1.6 แสดงการอธิบายการเปลี่ยนแปลงของระดับพลังงานของหมู่ให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อโมเลกุลเป้าหมายจับกับหมู่ให้หรือหมู่รับอิเล็กตรอนด้วยทฤษฎี Frontier Orbital	7
รูปที่ 1.7 กลไกการเกิดปฏิกิริยาในการตรวจวัดฟอร์มัลดีไฮด์	8
รูปที่ 1.8 ปฏิกิริยา condensation ของ benzoimidazolylpyridine-based probe กับฟอร์มัลดีไฮด์ อยู่ในรูป formimine	9
รูปที่ 1.9 ปฏิกิริยา condensation ของ hydroxyquinoline-based probe กับฟอร์มัลดีไฮด์ อยู่ในรูป methylenehydrazine	10
รูปที่ 1.10 ปฏิกิริยา 2-aza-Cope rearrangement ของ silicon rhodamine-based probe กับฟอร์มัลดีไฮด์	11
รูปที่ 1.11 โครงสร้างทางเคมีของคูมาริน	12
รูปที่ 1.12 ปฏิกิริยาของ coumarin-hydrazone based fluorogenic probe (PFM) กับฟอร์มัลดีไฮด์	12

รูปที่ 1.13 ปฏิกริยาของ 7-hydroxycoumarin-3-carboxylic acid ethyl ester probe (CA) กับฟอร์มัลดีไฮด์	13
รูปที่ 1.14 แสดงโครงสร้างของโมเลกุลเป้าหมาย A2	13
รูปที่ 2.1 การสังเคราะห์ methyl 2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (A1)	17
รูปที่ 2.2 สารที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา 2.2.1	19
รูปที่ 2.3 ผลึกรูปเข็มสีขาว	19
รูปที่ 2.4 การเช็คความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค TLC	19
รูปที่ 2.5 เทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี	19
รูปที่ 2.6 การสังเคราะห์ 2-oxo-2H-chromene-3-carbohydrazide (A2)	21
รูปที่ 2.7 การเช็คความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค TLC	22
รูปที่ 2.8 การเช็คความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค TLC	22
รูปที่ 2.9 การสังเคราะห์ 2-oxo-2H-chromene-3-carbohydrazide (A2)	24
รูปที่ 2.10 การสังเคราะห์ 2-oxo-2H-chromene-3-carbohydrazide (A2) ให้อยู่ในรูปเกลือ (A2 salt)	25
รูปที่ 2.11 การเตรียมก๊าซ HCl จากการทำปฏิกิริยาระหว่าง H ₂ SO ₄ (conc.) กับ NaCl	26
รูปที่ 2.12 ตะกอนสีขาว (A2 salt)	26
รูปที่ 2.13 การสังเคราะห์ N,N'-(ethane-1,2-diy)bis(2-oxo-2H-chromene-3-carboxamide) (A3)	27
รูปที่ 2.14 การสังเคราะห์ N-(2-aminoethyl)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxamine (A4)	29
รูปที่ 2.15 การสังเคราะห์ N-(4-aminophenyl)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxamide (A5)	31
รูปที่ 2.16 การสังเคราะห์ 2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid (A6)	32
รูปที่ 2.17 การสังเคราะห์ N-(2-aminoethyl)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxamine (A4)	34
รูปที่ 2.18 การสังเคราะห์ 2-oxo-N-(pyridine-2-ylmethyl)-2H-chromene-3-carboxamide (A7)	36

รูปที่ 3.1 แสดงโครงสร้างของโมเลกุลเป้าหมาย A2	39
รูปที่ 3.2 แสดงแผนภาพ Retrosynthesis ในการสังเคราะห์ A2	39
แผนภาพที่ 3.3 แสดงขั้นตอนการสังเคราะห์โมเลกุล A2	40
แผนภาพที่ 3.4 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาร A1	42
รูปที่ 3.5 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสาร A1	43
รูปที่ 3.6 $^1\text{H-NMR}$ ที่ตำแหน่ง H_c ของสาร A1	43
รูปที่ 3.7 $^1\text{H-NMR}$ ที่ตำแหน่ง $\text{H}_e, \text{H}_f, \text{H}_g, \text{H}_h$ ของสาร A1	44
รูปที่ 3.8 $^1\text{H-NMR}$ ที่ตำแหน่ง H_k ของสาร A1	44
แผนภาพที่ 3.9 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาร A2	46
รูปที่ 3.10 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสาร A2	46
รูปที่ 3.11 $^1\text{H-NMR}$ ที่ตำแหน่ง H_k ของสาร A2	47
รูปที่ 3.12 แสดงการเรโซแนนซ์	47
รูปที่ 3.13 $^1\text{H-NMR}$ ที่ตำแหน่ง H_c ของสาร A2	47
รูปที่ 3.14 $^1\text{H-NMR}$ ที่ตำแหน่ง $\text{H}_e, \text{H}_f, \text{H}_g, \text{H}_h$ ของสาร A2	48
รูปที่ 3.15 $^1\text{H-NMR}$ ที่ตำแหน่ง H_l ของสาร A2	48
รูปที่ 3.16 การสังเคราะห์ 2-oxo-2 <i>H</i> -chromene-3-carbohydrazide (A2) ให้อยู่ในรูปเกลือ (A2 salt)	49
แผนภาพที่ 3.17 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาร A2 salt	49
แผนภาพที่ 3.18 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาร A3	50
รูปที่ 3.19 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสาร A3	51
รูปที่ 3.20 $^1\text{H-NMR}$ ที่ตำแหน่ง H_c ของสาร A3	51
รูปที่ 3.21 $^1\text{H-NMR}$ ที่ตำแหน่ง $\text{H}_e, \text{H}_f, \text{H}_g, \text{H}_h$ ของสาร A3	52
รูปที่ 3.22 $^1\text{H-NMR}$ ที่ตำแหน่ง H_l ของสาร A3	52

แผนภาพที่ 3.23 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาร A4	53
รูปที่ 3.24 ¹ H-NMR spectrum ของสาร A4	54
รูปที่ 3.25 ¹ H-NMR ที่ตำแหน่ง H _c ของสาร A4	54
รูปที่ 3.26 ¹ H-NMR ที่ตำแหน่ง H _e , H _f , H _g , H _h ของสาร A4	55
รูปที่ 3.27 ¹ H-NMR ที่ตำแหน่ง H _i ของสาร A4	55
รูปที่ 3.28 ¹ H-NMR ที่ตำแหน่ง H _m ของสาร A4	56
รูปที่ 3.29 ¹ H-NMR ที่ตำแหน่ง H _c กับ H _i ของสาร A3	56
รูปที่ 3.30 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาร A5	57
รูปที่ 3.31 การสังเคราะห์ 2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid (A6)	58
รูปที่ 3.32 ¹ H-NMR spectrum ของสาร A6	59
รูปที่ 3.33 ¹ H-NMR ที่ตำแหน่ง H _k ของสาร A6	59
รูปที่ 3.34 ¹ H-NMR ที่ตำแหน่ง H _c ของสาร A6	60
รูปที่ 3.35 ¹ H-NMR ที่ตำแหน่ง H _e , H _f , H _g , H _h ของสาร A6	60
แผนภาพที่ 3.36 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาร A4	62
รูปที่ 3.37 แสดงการจับโปรตอนของวง pyridine	63
แผนภาพที่ 3.38 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาร A7	64
รูปที่ 3.39 ¹ H-NMR spectrum ของสาร A7	65
รูปที่ 3.40 ¹ H-NMR ที่ตำแหน่ง H _k ของสาร A7	65
รูปที่ 3.41 แสดงการเรโซแนนซ์	66
รูปที่ 3.42 ¹ H-NMR ที่ตำแหน่ง H _c ของสาร A7	66
รูปที่ 3.43 ¹ H-NMR ที่ตำแหน่ง H _q ของสาร A7	66
รูปที่ 3.44 ¹ H-NMR ที่ตำแหน่ง H _e , H _f , H _g , H _h , H _n , H _o , H _p ของสาร A7	67

รูปที่ 3.45 $^1\text{H-NMR}$ ที่ตำแหน่ง H_f ของสาร A7

67

แผนภาพที่ 4.1 สรุปขั้นตอนการสังเคราะห์โมเลกุล A2

69

สัญลักษณ์และคำย่อ

^{13}C NMR	carbon-13 nuclear magnetic resonance
CDCl_3	deuterated chloroform
CH_2Cl_2	dichloromethane
CH_3CN	acetonitrile
$\text{DMSO-}d_6$	deuterated dimethyl sulfoxide
d	doublet (NMR)
EtOAc	ethyl acetate
equiv	equivalent (s)
g	gram (s)
HOMO	highest occupied molecular orbital
^1H NMR	proton nuclear magnetic resonance
Hz	Hertz
h	hour (s)
J	coupling constant
LUMO	lowest unoccupied molecular orbital
m	multiplet (NMR)
MeOH	methanol
mg	milligram (s)
mL	milliliter (s)

mmol	millimole (s)
M	molar
nm	nanometer
rt	room temperature
s	singlet (NMR)
THF	tetrahydrofuran
TLC	thin layer chromatography
v/v	volume by volume
δ	chemical shift
°C	degree Celsius
μL	microliter (s)
μM	micromolar (s)
% yield	percentage yield

บทที่ 1

บทนำและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

1.1 บทนำ

นักวิทยาศาสตร์ได้ให้ความสำคัญกับการตรวจวัดฟอर्मาลดีไฮด์ เนื่องจากเป็นสารอันตรายที่ถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง ทั้งในทางอุตสาหกรรม^[3] เกษตรกรรม^[4] และทางการแพทย์^[5] ซึ่งทำให้เกิดการรั่วไหลลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติและปนเปื้อนในอาหาร หากสัมผัสสารนี้จากการหายใจ การกิน และการดูดซึมเข้าผิวหนัง จะทำให้มีการสะสมในร่างกายโดยจะเปลี่ยนเป็นกรดฟอรั่มิก ซึ่งทำลายเซลล์หรือเนื้อเยื่อของร่างกายทำให้เกิดพยาธิสภาพกับอวัยวะต่าง ๆ โดยเฉพาะในระบบทางเดินหายใจ ตา ผิวหนัง ระบบสืบพันธุ์ ระบบภูมิคุ้มกัน ระบบขับถ่ายปัสสาวะ และการเกิดมะเร็ง เป็นต้น^[1] จาก พ.ร.บ. วัตถุอันตราย พ.ศ.2535 ฟอรั่มาลดีไฮด์ถูกจัดเป็นวัตถุอันตรายประเภทที่ 2 ซึ่งหมายถึงวัตถุอันตรายที่หากจะมีการผลิต นำเข้า ส่งออก หรือมีไว้ครอบครอง จะต้องแจ้งให้พนักงานเจ้าหน้าที่ทราบก่อนและต้องปฏิบัติตามหลักเกณฑ์และวิธีการที่กำหนด โดยกรมอุตสาหกรรมและกรมประมง^[2] ดังนั้นการตรวจวัดปริมาณของฟอรั่มาลดีไฮด์จึงมีความสำคัญอย่างมากต่อสังคมและชุมชน

การตรวจวัดฟอรั่มาลดีไฮด์สามารถทำได้หลายวิธีโดยใช้เทคนิค high-performance liquid chromatography (HPLC)^[6], gas chromatography (GC)^[7] หรือ mass spectrophotometry (MS)^[8] แต่เครื่องมือเหล่านั้นมีราคาแพง ใช้งานยากและไม่สะดวกสำหรับบุคคลทั่วไป และในงานวิจัยนี้สนใจที่จะพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดฟอรั่มาลดีไฮด์ที่ปนอยู่ในอาหาร น้ำแช่ปลาหมึกที่ตลาด หรือน้ำตามแหล่งน้ำต่าง ๆ จึงเลือกใช้เทคนิค fluorescence เนื่องจากเครื่องมือมีราคาถูก มีรูปแบบที่สามารถพกพาได้ ใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้นสามารถตรวจวัดและรู้ผลได้ทันที โดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ผ่านตัวเรืองแสง (fluorophore)

ในงานวิจัยนี้จะใช้อนุพันธ์คูมารินเป็นส่วนให้สัญญาณ^[9,10] เนื่องจากเป็นสารที่ให้สัญญาณการเรืองแสงดีในช่วง visible light และถูกกระตุ้นได้ด้วย visible light ทั้งยังเป็นสารที่มีเสถียรภาพทางความร้อนสูง มีเสถียรภาพทางเคมีดี ไม่ค่อยเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงเมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีสารอื่นปน อีกทั้งเป็นสารที่สังเคราะห์ได้ง่ายและหลากหลาย เตรียมได้จากสารตั้งต้นที่มีขายทั่วไป ทำให้สามารถดัดแปลงโครงสร้างได้ง่าย เกิดความคล่องตัวในการทำงาน และฟลูออเรสเซนซ์เซนเซอร์สำหรับฟอรั่มาลดีไฮด์นี้ต้องมีหมู่ไฮดรอกซิลเป็นส่วนตรวจวัด^[11] เพื่อใช้ในการเกิดปฏิกิริยาเฉพาะกับฟอรั่มาลดีไฮด์ ซึ่งเป็นคาร์บอนิลที่มีความไวปฏิกิริยากับเอมีนเร็วสุดและมีโอกาสพบในน้ำมากกว่าแอลดีไฮด์ชนิดอื่น

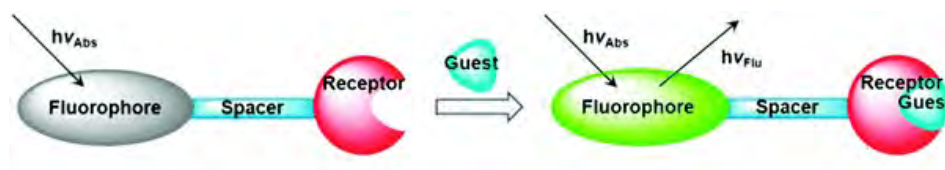
หลังการสังเคราะห์อนุพันธ์คูมาริน จะมีการนำสารที่ได้มาพิสูจน์เอกลักษณ์ทางโครงสร้างด้วยเทคนิค IR-Raman spectroscopy, NMR spectroscopy, mass spectrometry และตรวจสอบคุณสมบัติเชิงแสงด้วยเทคนิค ultraviolet-visible spectrophotometry และ fluorescence spectrophotometry จากนั้นนำไปทดสอบความสามารถในการใช้เป็นเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดฟอร์มัลดีไฮด์ โดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ ซึ่งมีกลไกเกี่ยวข้องกับปรากฏการณ์ photo-Induce electron transfer (PET) การที่ฟลูออเรสเซนซ์เซนเซอร์มีหมู่ไฮดรอกซิลเกาะอยู่จะทำให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ดับ เนื่องจากเกิดการถ่ายโอนอิเล็กตรอน ดังนั้นเมื่อมีฟอร์มัลดีไฮด์เข้ามาจับจะทำให้โอกาสในการถ่ายโอนอิเล็กตรอนน้อยลง ทำให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์สูงขึ้น

แต่อย่างไรก็ตาม การพัฒนาการออกแบบฟลูออเรสเซนซ์เซนเซอร์โดยมีคูมารินเป็นหน่วยให้สัญญาณเรืองแสงมักพบอุปสรรคในการทำให้เซนเซอร์ละลายน้ำ เนื่องจากคูมารินมี water solubility ต่ำ อีกปัญหาที่พบคือการทำให้เซนเซอร์มีค่า quantum yield สูงขึ้น และ detection limit ต่ำเพื่อให้สารมี reactivity เร็วขึ้น ในการแก้ไขปัญหาดังกล่าวสามารถทำได้โดยการทำให้ตัวเซนเซอร์อยู่ในรูปเกลือ เพื่อเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำ จึงมีโอกาสนำมาพัฒนาต่อยอดเพื่อใช้ในเซลล์ที่ยังมีชีวิตได้ และในงานวิจัยนี้จะเติมหมู่ไฮดรอกซิลซึ่งมี reactivity สูง เพื่อใช้ในการตรวจวัดฟอร์มัลดีไฮด์

1.2 ทฤษฎีและความรู้พื้นฐานที่เกี่ยวข้อง

1.2.1 เซนเซอร์ทางเคมี (chemical sensor)

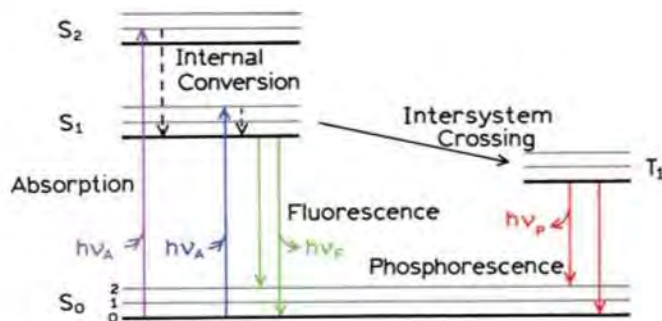
เซนเซอร์ทางเคมีคือ ตัวตรวจจับที่สังเคราะห์ขึ้นเพื่อใช้ในการตรวจวัดโมเลกุลหรือไอออนที่ต้องการ โมเลกุลที่นำมาใช้เป็นเซนเซอร์ทางเคมีจะประกอบด้วยสองส่วนที่สำคัญคือ ส่วนที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับ (receptor unit) จะเป็นส่วนที่ทำหน้าที่ในการเลือกจับโมเลกุลหรือเกสต์ที่เราสนใจซึ่งมีความจำเพาะสูง และส่วนที่ทำหน้าที่เป็นตัวให้สัญญาณ (sensory unit) จะเป็นส่วนที่แสดงการเปลี่ยนแปลงสัญญาณด้วยสมบัติทางเคมีที่เปลี่ยนแปลงไป อาจสามารถด้วยวัดได้ด้วยเทคนิคทางเคมีวิเคราะห์ เช่น โครโมฟอร์ (chromophore) จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีซึ่งสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าหรือตรวจวัดได้ด้วยเทคนิค spectrophotometry ฟลูออโรฟอร์ (fluorophore) เกิดการเปลี่ยนแปลงของการให้ฟลูออเรสเซนซ์ตรวจได้ด้วยเทคนิค fluorescence spectroscopy หรือโมเลกุลที่สามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางเคมีไฟฟ้า ดังรูปที่ 1.1



รูปที่ 1.1 แสดงหลักการทำงานของตัวให้สัญญาณของเซนเซอร์ทางเคมี

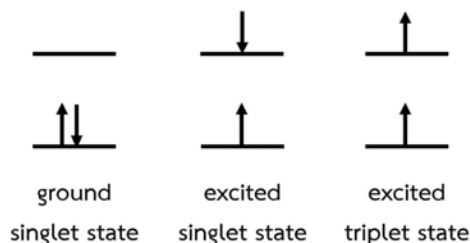
1.2.2 การเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence)

photoluminescence เป็นปรากฏการณ์การปล่อยแสงในรูปของโฟตอนออกมาของอะตอมหรือโมเลกุลที่เกิดจากการถูกกระตุ้นด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าให้อยู่ในสถานะกระตุ้น (excited state) แล้วตกกลับมายังสถานะพื้น (ground state) แบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ fluorescence และ phosphorescence ตามลักษณะการเกิดซึ่งสามารถอธิบายได้ด้วยแผนภาพของ Jablonski ดังรูปที่ 1.2



รูปที่ 1.2 แสดงแผนภาพของ Jablonski ที่ใช้อธิบายการเกิด fluorescence และ phosphorescence

จากรูป กำหนดให้ S_0 , S_1 และ S_2 คือสถานะการจัดอิเล็กตรอน (electronic state) แบบ singlet ที่สถานะพื้น สถานะกระตุ้นที่ 1 และ 2 ตามลำดับ T_1 คือสถานะการจัดอิเล็กตรอน (electronic state) แบบ triplet ในสถานะกระตุ้นที่ 1 ภายในโมเลกุล ดังรูปที่ 1.2 และในแต่ละสถานะการจัดอิเล็กตรอนจะประกอบด้วยระดับพลังงานการสั่น (vibrational energy levels) ที่ 0, 1, 2, ...

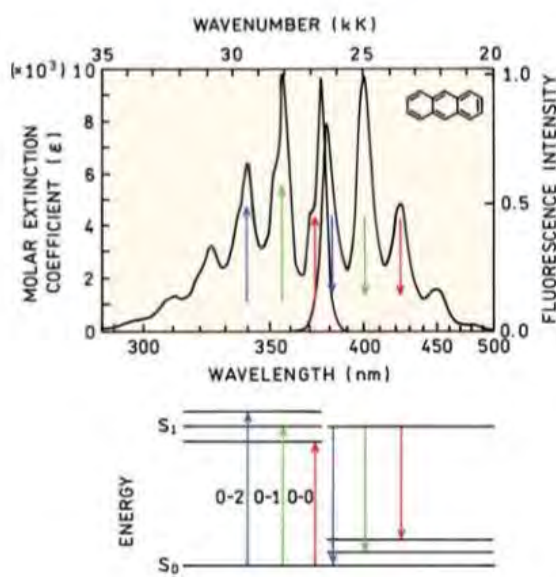


รูปที่ 1.3 แสดงการจัดเรียงอิเล็กตรอนในสถานะพื้นและสถานะกระตุ้นของอิเล็กตรอนแบบ singlet และ triplet

เมื่ออิเล็กตรอนที่อยู่ในสถานะพื้น S_0 ถูกกระตุ้นด้วยแสง อิเล็กตรอนจะเคลื่อนที่ไปอยู่ในสถานะกระตุ้น S_1 หรือ S_2 จากนั้นอิเล็กตรอนซึ่งมีพลังงานสูงจะปลดปล่อยพลังงานออกมาตกมาอยู่ในสถานะกระตุ้น S_1 ที่มีพลังงานต่ำที่สุด (ที่ระดับพลังงานการสั่นที่ 0) กระบวนการดังกล่าวเรียกว่า internal conversion ซึ่งเกิดขึ้นใน 10^{-12} s หรือน้อยกว่า จากนั้นถ้าอิเล็กตรอนตกกลับมายังสถานะพื้น S_0 พลังงานที่ปลดปล่อยออกมาจะอยู่ในรูป fluorescence เนื่องจากการถูกกระตุ้นของอิเล็กตรอนไม่มีผลต่อรูปร่างโมเลกุล (geometry) ทำให้ผลต่างพลังงานของระดับพลังงานการสั่นในสถานะกระตุ้นและในสถานะพื้นมีค่าเท่ากัน ส่งผลให้สเปกตรัมการเปล่งแสง (emission spectrum) และสเปกตรัมการดูดกลืนแสง (absorption spectrum) จากการเปลี่ยนระดับพลังงานของอิเล็กตรอนจาก $S_0 \rightarrow S_1$ มีลักษณะเหมือนกัน นอกจากนี้โมเลกุลที่อยู่ในสถานะกระตุ้น S_1 ยังสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงทิศทางของ

อิเล็กตรอน (spin conversion) ได้ทำให้อยู่ในสถานะกระตุ้น T_1 เรียกกระบวนการนี้ว่า intersystem crossing จากนั้นอิเล็กตรอนในสถานะกระตุ้น T_1 จะเคลื่อนที่ตกกลับมายังสถานะพื้น S_0 พร้อมปลดปล่อยพลังงานออกมาในรูป phosphorescence เนื่องจากสถานะกระตุ้น T_1 มีพลังงานต่ำกว่าสถานะกระตุ้น S_1 ทำให้ความยาวคลื่นของ phosphorescence มีค่ามากกว่า fluorescence และใช้เวลาในการเกิดมากกว่าเนื่องจากการตกกลับมายังสถานะพื้น S_0 เป็นการเปลี่ยนระดับพลังงานของอิเล็กตรอนแบบ forbidden

นอกจากนี้ จากแผนภาพของ Jablonski แสดงให้เห็นว่าพลังงานที่ปลดปล่อยออกมาในรูปของ fluorescence จะมีค่าน้อยกว่าพลังงานที่ดูดกลืนแสงเข้าไปเนื่องจากการสูญเสียพลังงานไปจากกระบวนการ internal conversion และการตกกลับที่สถานะพื้นแต่อยู่ในระดับพลังงานการสั่นที่ไม่ใช่ศูนย์ เรียกปรากฏการณ์ที่ความยาวคลื่นเปลี่ยนไปนี้ว่า Stokes shift ผลต่างของพลังงานระหว่าง vibrational states ทั้งใน ground และ excited states มีค่าใกล้เคียงกัน absorption spectrum หรือ excitation spectrum และ fluorescence spectrum ของสารประกอบจึงอาจมีลักษณะเป็น mirror images ของกันและกัน ดังรูปที่ 1.4



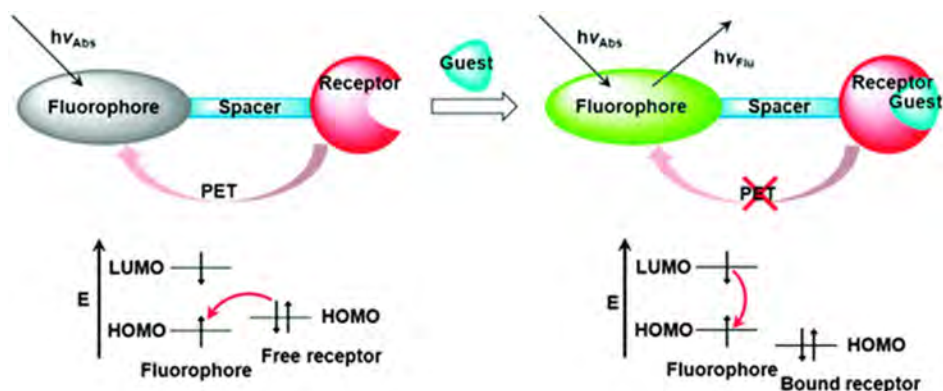
รูปที่ 1.4 แสดงปรากฏการณ์การเกิด Stoke shift

1.2.3 การลดลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence quenching)

การลดลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์สามารถเกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุ ในที่นี้จะกล่าวเพียงสองสาเหตุที่นิยมใช้ในการอธิบายปรากฏการณ์ดังกล่าวคือ

1. Photoinduced Electron Transfer (PET)

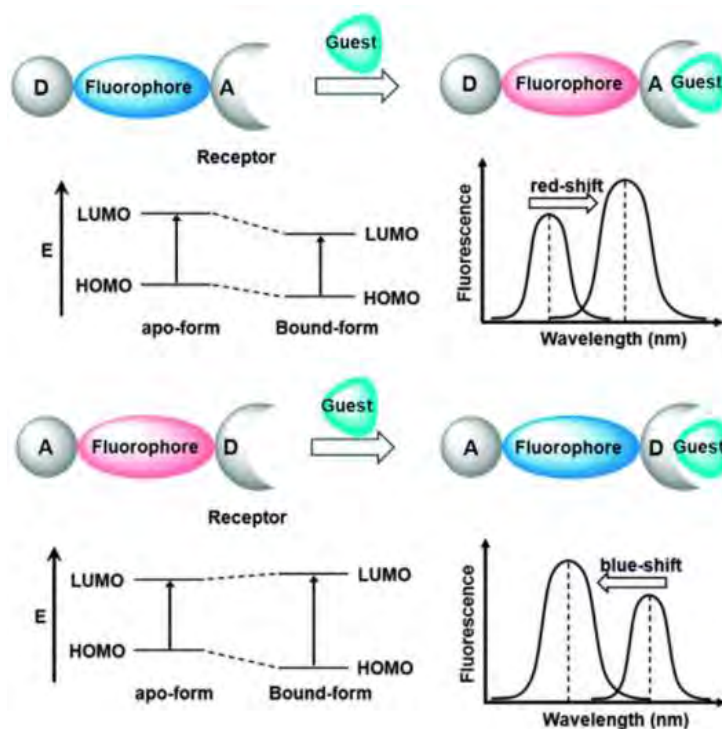
โครงสร้างของเซนเซอร์ที่มีการเปลี่ยนสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์แบบ PET จะประกอบด้วยสามส่วนคือ ตัวตรวจจับ (receptor) เป็นตัวที่ทำหน้าที่เป็นหมู่ให้อิเล็กตรอนหรือทำให้เกิดการลดลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ ฟลูออโรฟอร์ (fluorophore) ทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน และตัวเชื่อม (spacer) ทำหน้าที่เชื่อมระหว่าง receptor และ fluorophore การลดลงของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จะเกิดจากการเกิดการถ่ายโอนอิเล็กตรอน (electron transfer) ภายในโมเลกุลจากตัวตรวจจับไปยังฟลูออโรฟอร์ ซึ่งสามารถอธิบายได้ด้วยทฤษฎีออร์บิทัลส่วนหน้า (frontier orbital theory) ดังรูปที่ 1.5 เมื่อฟลูออโรฟอร์ถูกกระตุ้นด้วยความยาวคลื่นที่เหมาะสม อิเล็กตรอนในออร์บิทัลเชิงโมเลกุลที่ถูกครอบครองที่มีพลังงานสูงสุด (highest occupied molecular orbital: HOMO) จะถูกกระตุ้นให้ขึ้นไปอยู่ในออร์บิทัลเชิงโมเลกุลที่ไม่ถูกครอบครองที่มีพลังงานต่ำสุด (lowest unoccupied molecular orbital: LUMO) เนื่องจากตัวตรวจจับอยู่ใกล้กับฟลูออโรฟอร์และระดับพลังงานของ HOMO ของตัวตรวจจับอยู่ระหว่างระดับพลังงานของ HOMO และ LUMO ของฟลูออโรฟอร์ ทำให้เกิดการถ่ายโอนอิเล็กตรอนจาก HOMO ของตัวตรวจจับไปยัง HOMO ของหมู่ที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์ ส่งผลให้อิเล็กตรอนใน LUMO ของฟลูออโรฟอร์ไม่สามารถกลับมายัง HOMO ได้ สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จึงลดลง เมื่อตัวตรวจจับจับกับโมเลกุลเป้าหมายจะทำให้ระดับพลังงานของ HOMO ของตัวตรวจจับต่ำกว่าระดับพลังงานของ HOMO ของหมู่ที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์ ทำให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์กลับมาเพิ่มขึ้นได้



รูปที่ 1.5 แสดงการอธิบายการถ่ายโอนอิเล็กตรอนจากตัวตรวจจับไปยังหมู่ให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ด้วยทฤษฎี Frontier Orbital

2. Photoinduced Charge Transfer (PCT)

โครงสร้างของเซนเซอร์ที่มีการเปลี่ยนสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์แบบ PCT จะประกอบด้วยสามส่วนคือ ฟลูออโรฟอร์ (fluorophore) ส่วนที่เป็นหมู่ให้อิเล็กตรอน (donor) และส่วนที่เป็นหมู่รับอิเล็กตรอน (acceptor) หากส่วนที่เป็น donor เป็นตัวตรวจจับไอออนหรือโมเลกุล จะส่งผลให้ระดับพลังงานของ HOMO และ LUMO ของฟลูออโรฟอร์ห่างกันมากขึ้น ทำให้ความยาวคลื่นของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์มีค่าน้อยลง เรียกรวมการเกิดปรากฏการณ์ดังกล่าวว่า hypsochromic shift (blue-shift) ในทางตรงกันข้าม หากส่วนที่เป็น acceptor เป็นตัวตรวจจับไอออนหรือโมเลกุล จะส่งผลให้ระดับพลังงานของ HOMO และ LUMO ของฟลูออโรฟอร์ห่างกันน้อยลง ทำให้ความยาวคลื่นของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์มีค่ามากขึ้น และเรียกรวมการเกิดปรากฏการณ์นี้ว่า bathochromic shift (red-shift) แสดงดังรูปที่ 1.6



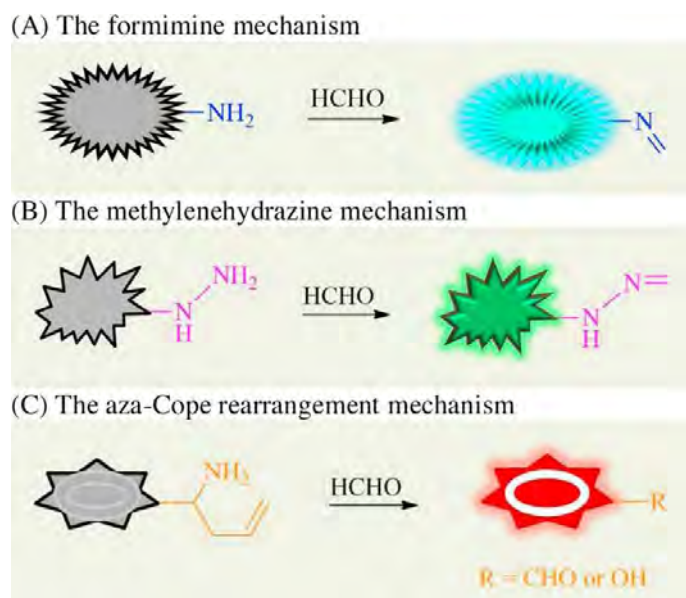
รูปที่ 1.6 แสดงการอธิบายการเปลี่ยนแปลงของระดับพลังงานของหมู่ให้อิเล็กตรอนฟลูออเรสเซนซ์เมื่อโมเลกุลเป้าหมายจับกับหมู่ให้หรือหมู่รับอิเล็กตรอนด้วยทฤษฎี Frontier Orbital

1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.3.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับฟลูออเรสเซนซ์เซนเซอร์สำหรับตรวจวัดฟอร์มัลดีไฮด์

1.3.1.1 หมู่ตรวจวัดฟอร์มัลดีไฮด์

การตรวจวัดฟอร์มัลดีไฮด์โดยใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ อาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างหมู่คาร์บอนิลของฟอร์มัลดีไฮด์กับหมู่เอมีโน สามารถเกิดได้โดยผ่านกลไกการเกิดปฏิกิริยา condensation ให้อยู่ในรูป formimine และ methylenehydrazine หรือ ผ่านกลไกการปฏิกิริยา 2-aza-Cope rearrangement^[12]

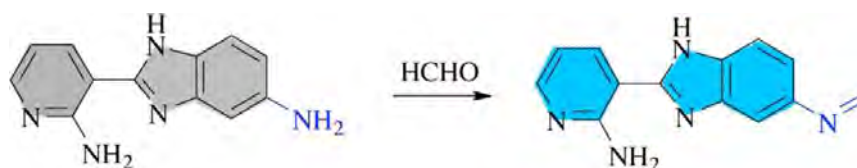


รูปที่ 1.7 กลไกการเกิดปฏิกิริยาในการตรวจวัดฟอร์มัลดีไฮด์

1.3.1.2 ปฏิกิริยา condensation ระหว่างหมู่อะมิโนกับฟอร์มัลดีไฮด์

การเกิดปฏิกิริยา condensation ระหว่างหมู่อะมิโน ($-NH_2$) กับหมู่คาร์บอนิลของฟอร์มัลดีไฮด์ ให้อยู่ในรูป formimine ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ โดยการที่ฟลูออเรสเซนซ์เซนเซอร์มีหมู่อะมิโนเกาะอยู่จะทำให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ดับ (off) เนื่องจากเกิดการถ่ายโอนอิเล็กตรอนจากหมู่อะมิโนไปยังส่วนให้สัญญาณ ดังนั้นเมื่อมีฟอร์มัลดีไฮด์เข้ามาจับจะยับยั้งการถ่ายโอนอิเล็กตรอน ทำให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์สูงขึ้น (on)

ในปี 2015 Zhou W. และคณะ^[13] ได้พัฒนา benzoimidazolylpyridine-based fluorescent probe โดยใช้หมู่อะมิโนเป็นส่วนตรวจวัดฟอร์มัลดีไฮด์ ซึ่งมีกลไกเกี่ยวข้องกับปรากฏการณ์ photo-induce electron transfer (PET) จากหมู่อะมิโนไปยัง benzoimidazolylpyridine-based probe ทำให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ดับ (off) แต่เมื่อทำปฏิกิริยากับฟอร์มัลดีไฮด์ อยู่ในรูป formimine ทำให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์สูงขึ้น (on) ที่ 415 nm and 505 nm ในสารละลายผสมน้ำ/เอทานอล (99:1, v/v) โดยมี excitation wavelength ที่ 365 nm and 400 nm ตามลำดับ และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในเชิงปริมาณวิเคราะห์ ในช่วงความเข้มข้น $0-2.7 \times 10^{-2}$ mol/L ซึ่งมี detection limit เท่ากับ 6 μ mol/L ยิ่งไปกว่านั้นสามารถนำมาใช้หาฟอร์มัลดีไฮด์ในอาหารได้

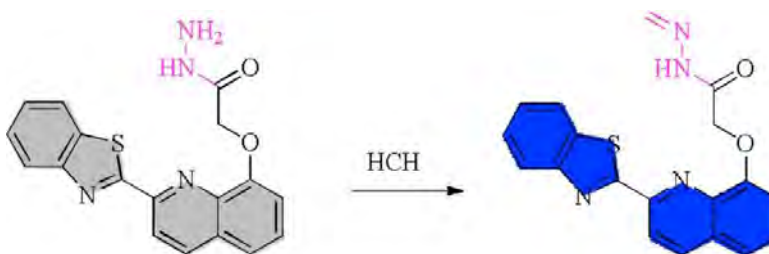


รูปที่ 1.8 ปฏิกิริยา condensation ของ benzoimidazolylpyridine-based probe กับฟอร์มัลดีไฮด์ อยู่ในรูป formimine

1.3.1.3 ปฏิกิริยา condensation ระหว่างหมู่ไฮดรากลีนกับฟอร์มัลดีไฮด์

การเกิดปฏิกิริยา condensation ระหว่างหมู่ไฮดรากลีน (-NH-NH₂) กับหมู่คาร์บอนิลของฟอร์มัลดีไฮด์ ให้อยู่ในรูป methylenehydrazine ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ โดยการที่ฟลูออเรสเซนซ์เซนเซอร์มีหมู่ไฮดรากลีนเกาะอยู่จะทำให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ดับ (off) เนื่องจากเกิดการถ่ายโอนอิเล็กตรอนจากหมู่ไฮดรากลีนไปยังส่วนให้สัญญาณ ดังนั้นเมื่อมีฟอร์มัลดีไฮด์เข้ามาจับจะยับยั้งการถ่ายโอนอิเล็กตรอน ทำให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์สูงขึ้น (on)

ในปี 2015 Liu C. และคณะ^[14] ได้พัฒนา hydroxyquinoline fluorescent probe โดยใช้หมู่ไฮดรากลีนเป็นส่วนตรวจวัดฟอร์มัลดีไฮด์ ซึ่งมีกลไกเกี่ยวข้องกับปรากฏการณ์ photo-induce electron transfer (PET) จากหมู่ไฮดรากลีนไปยัง hydroxyquinoline-based probe ทำให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ดับ (off) แต่เมื่อทำปฏิกิริยากับฟอร์มัลดีไฮด์ อยู่ในรูป methylenehydrazine ทำให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์สูงขึ้น (on) ที่ 467 nm โดยมี excitation wavelength ที่ 365 nm และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในเชิงปริมาณวิเคราะห์ ในช่วงความเข้มข้น 0-1.3×10⁻⁴ mol/L ซึ่งมี detection limit เท่ากับ 0.9 μmol/L

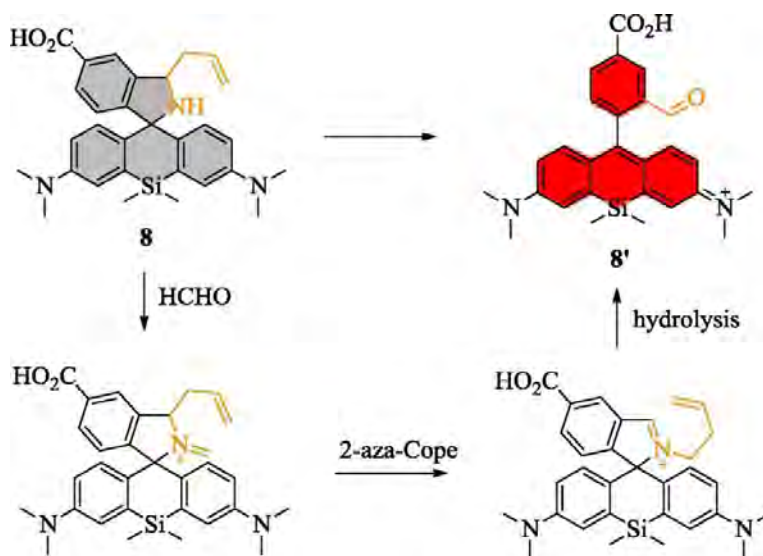


รูปที่ 1.9 ปฏิกิริยา condensation ของ hydroxyquinoline-based probe กับฟอร์มัลดีไฮด์ อยู่ในรูป methylenehydrazine

1.3.1.4 ปฏิกริยา 2-aza-Cope rearrangement

เป็นการเกิดปฏิกิริยา imine formation ระหว่างหมู่ homoallylamino กับหมู่คาร์บอนิลของฟอร์มัลดีไฮด์ จากนั้นผ่านกระบวนการ [3,3]-sigmatropic rearrangement ก่อนที่จะเกิดปฏิกิริยา hydrolysis ได้เป็นหมู่ -CHO โดยปฏิกิริยานี้มีความจำเพาะต่อฟอร์มัลดีไฮด์สูงกว่า reactive carbonyl species (RCS) อื่น

ในปี 2015 Brewer T.F. และคณะ^[15] ได้พัฒนา silicon rhodamine-based fluorescent probe โดยใช้ หมู่ homoallylamino เป็นส่วนตรวจวัดฟอร์มัลดีไฮด์ เมื่อทำปฏิกิริยากับฟอร์มัลดีไฮด์จะอยู่ในรูป imine ให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ต่ำ จากนั้นผ่านกระบวนการ 2-aza-Cope rearrangement และ hydrolysis จะให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์สูงขึ้นที่ 662 nm โดยมี excitation wavelength ที่ 645 nm

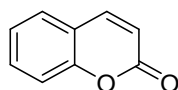


รูปที่ 1.10 ปฏิกริยา 2-aza-Cope rearrangement ของ silicon rhodamine-based probe กับ ฟอร์มัลดีไฮด์

1.3.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับฟลูออเรสเซนต์เซนเซอร์จากอนุพันธ์คูมาริน

1.3.2.1 อนุพันธ์คูมาริน

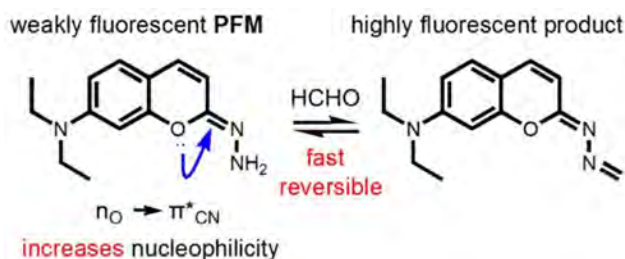
อนุพันธ์คูมาริน พบได้ในธรรมชาติหรือสังเคราะห์ขึ้น ประกอบด้วยวงอะโรมาติก จึงมีคุณสมบัติเชิงแสงที่ดี ถูกนำมาใช้เป็นฟลูออเรสเซนต์เซนเซอร์อย่างกว้างขวาง เนื่องจากสามารถดัดแปลงโครงสร้างได้ง่ายและหลากหลาย มีค่า quantum yield สูง stokes shift ช่วงกว้าง สามารถดูดและคายพลังงานในช่วง visible light ให้สัญญาณฟลูออเรสเซนต์สีน้ำเงิน (emission range ~410 - 470 nm) จึงเห็นความต่างของสัญญาณสีเขียว เหลือง แดง ที่เกิดขึ้น^[16]



รูปที่ 1.11 โครงสร้างทางเคมีของคูมาริน

1.3.2.2 coumarin-hydrazone based fluorogenic probe (PFM)

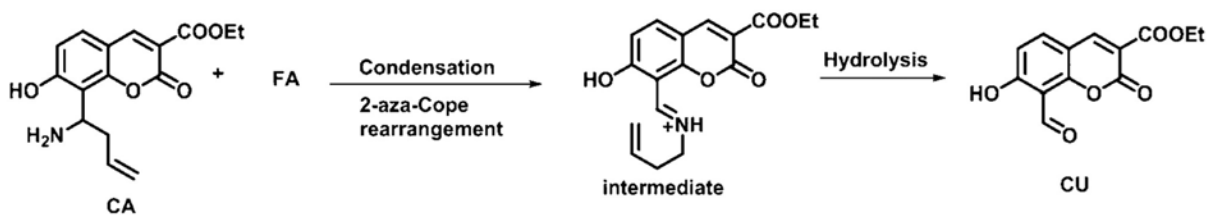
ในปี 2017 Liang X. และคณะ^[17] ศึกษาการสังเคราะห์ coumarin-hydrazone based fluorogenic probe (PFM) โดยใช้ไฮดราซีนเป็นหมู่ตรวจวัดฟอร์มัลดีไฮด์ในเซลล์และเนื้อเยื่อหลอดเลือดสมอง (HBMEC, HBVP) ซึ่งมีกลไกเกี่ยวข้องกับปรากฏการณ์ Internal charge transfer (ICT) ให้สัญญาณฟลูออเรสเซนต์สูงขึ้นไป 500 nm โดยมี excitation wavelength ที่ 364 nm มี detection limit เท่ากับ 0.4 $\mu\text{mol/L}$ และมีความจำเพาะในการตรวจวัดฟอร์มัลดีไฮด์



รูปที่ 1.12 ปฏิกิริยาของ coumarin-hydrazone based fluorogenic probe (PFM) กับฟอร์มัลดีไฮด์

1.3.2.3 7-hydroxycoumarin-3-carboxylic acid ethyl ester probe (CA)

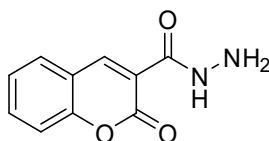
ในปี 2019 Li M. และคณะ^[18] ศึกษาการสังเคราะห์ 7-hydroxycoumarin-3-carboxylic acid ethyl ester probe (CA) โดยใช้ homoallylamino เป็นหมู่ตรวจวัดฟอรัมาลดีไฮด์ในเซลล์ที่มีชีวิต ปลายน้ำลายและเนื้อเยื่อ ซึ่งมีกลไกเกี่ยวข้องกับปรากฏการณ์ Internal charge transfer (ICT) เมื่อทำปฏิกิริยากับฟอรัมาลดีไฮด์จะอยู่ในรูป imine จากนั้นผ่านกระบวนการ 2-aza-Cope rearrangement และ hydrolysis ให้สัญญาณฟลูออเรสเซนส์ลดลงที่ 451 nm โดยมี excitation wavelength ที่ 405 nm สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในเชิงปริมาณวิเคราะห์ ในช่วงความเข้มข้น $0-20 \times 10^{-6}$ mol/L มี detection limit เท่ากับ 4.16×10^{-5} mol/L



รูปที่ 1.13 ปฏิกิริยาของ 7-hydroxycoumarin-3-carboxylic acid ethyl ester probe (CA) กับฟอรัมาลดีไฮด์

1.4 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะสังเคราะห์โมเลกุล A2 ผ่านปฏิกิริยา Knoevenagel condensation เป็นปฏิกิริยาหลักในการสังเคราะห์ โดยมีอนุพันธ์คูมาริน (coumarin derivatives) เป็นโมเลกุลสารเรืองแสงให้สัญญาณฟลูออเรสเซนส์ (fluorophore) และมีหมู่ไฮดราซีน (hydrazine group) เป็นตัวตรวจจับ (receptor) ดังรูปที่ 1.14 เพื่อใช้ในการตรวจวัดฟอรัมาลดีไฮด์ในน้ำ โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาของหมู่ไฮดราซีนและฟอรัมาลดีไฮด์ผ่านปฏิกิริยา condensation โดยแสดงผลจากการเปลี่ยนแปลงสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ของสาร (turn-on) ซึ่งมีกลไกเกี่ยวข้องกับปรากฏการณ์ photo-induce electron transfer (PET)



รูปที่ 1.14 แสดงโครงสร้างของโมเลกุลเป้าหมาย A2

บทที่ 2

การทดลอง

2.1 เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรมิเตอร์ (Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer), Varian Mercury 400 MHz
2. เครื่องอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี (Infrared Spectroscopy)
3. เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ (Mass Spectrometer)
4. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) รุ่น N-1000, Tokyo Rikakikai CO., LTD
5. เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Vacuum Dry)
6. เครื่องกวนแม่เหล็กแบบให้ความร้อน (Hotplate and Stirrer), JENWAY 1000
7. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น AB 204-S, Mettler Toledo
8. แผ่น Thin Layer Chromatography (TLC) Silica gel aluminum sheet, MERCK CO., LTD
9. คอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column Chromatography)
10. เครื่องดูดสุญญากาศ (Vacuum pump)
11. กระดาษกรอง
12. กรวยบุชเนอร์
13. กรวยแยก
14. หลอดทดลอง
15. ขวดก้นกลม

2.1.2 สารตั้งต้นและสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา

1. Salicylaldehyde

2. Dimethyl malonate
3. Piperidine
4. Acetic acid
5. Hydrazine hydrate
6. Sulfuric acid (H_2SO_4)
7. Sodium Chloride (NaCl)
8. Ethylenediamine
9. *p*-Phenylenediamine (PPD)
10. Sodium Hydroxide (NaOH)
11. 4-Dimethylaminopyridine (DMAP)
12. Triethanolamine (TEA)
13. Dicyclohexylcarbodiimide (DCC)
14. 2-Picolylamine
15. Sodium Hydrogencarbonate (NaHCO_3)

2.1.3 ตัวทำละลาย

1. อะซิโตน (Acetone)
2. เฮกเซน (Hexane)
3. ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane)
4. เอทิลอะซิเตต (Ethyl acetate)
5. เมทานอล (Methanol)
6. โทลูอีน (Toluene)
7. ไดมethylซัลฟอกไซด์ (DMSO)
8. คลอโรฟอร์มดี (CDCl_3)

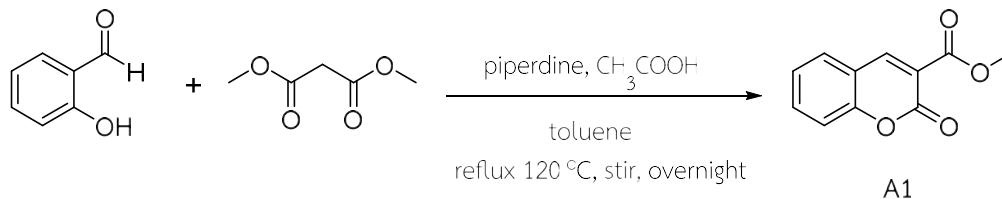
9. เตตระไฮโดรฟูแรน (THF)

2.1.4 สารอื่นๆ

1. ซิลิกาเจล 60 (0.063-0.200 มิลลิเมตร)
2. อะลูมินา
3. โซเดียมซัลเฟต (Sodium Sulfate)
4. น้ำปราศจากไอออน (DI water)
5. ยูนิเวอร์แซลอินดิเคเตอร์ (universal indicator)

2.2 การสังเคราะห์

2.2.1 การสังเคราะห์ methyl 2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (A1)



รูปที่ 2.1 การสังเคราะห์ methyl 2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (A1)

นำ Salicylaldehyde (1.05 mL, 10.06 mmol), Dimethyl malonate (2.24 mL, 19.50 mmol), Piperidine (0.13 mL, 1.316 mmol) และ Acetic acid (2 หยด) ใส่ลงในขวดก้นกลมที่มี Toluene 5 mL จากนั้นนำไปให้ความร้อนด้วยวิธีรีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง โดยติดตามปฏิกิริยาและตรวจสอบสารที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) ในระบบตัวทำละลาย 60% Dichloromethane ต่อ 40% Hexane (ซ้ำ 2 ครั้ง) หลังจากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.2.1.1 การทำให้บริสุทธิ์

a) โดยเทคนิคการตกผลึก

นำสารที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยามาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง รอจนกว่าจะตกผลึกรูปเข็มสีขาว จากนั้นดูดสารละลายสีเหลืองออก พร้อมทั้งล้างผลึกด้วย Hexane และละลายผลึกด้วย Dichloromethane เพื่อนำมาเช็คความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค TLC ใช้แผ่นอะลูมิเนียมที่เคลือบด้วยซิลิกาเจล ในระบบตัวทำละลาย 60% Dichloromethane ต่อ 40% Hexane หากยังไม่บริสุทธิ์ให้ทำการตกผลึกซ้ำจนกว่าจะบริสุทธิ์ หลังจากนั้นนำมากำจัดตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) และทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Vacuum Dry) จะได้ผลิตภัณฑ์ (A1) เป็นของแข็งสีขาว (1.32 g, 64% yield) จากนั้นนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$

b) โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี

นำสารที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยามากำจัดตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่และใช้ Dichloromethane, Hexane เป็นเฟสเคลื่อนที่ โดยเริ่มต้นที่คอลัมน์ด้วย 100% Hexane จากนั้นค่อยๆเพิ่มซ้ำด้วย Dichloromethane ที่ละ 10% ปริมาตร 100 mL จนได้ระบบตัวทำละลาย 40% Dichloromethane ต่อ 60% Hexane เก็บสารใส่ในหลอดทดลองขนาดใหญ่ ตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC ในระบบตัวทำละลาย 60% Dichloromethane ต่อ 40% Hexane แล้วนำไปกำจัดตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนและทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ จะได้ผลิตภัณฑ์ (A1) เป็นของแข็งสีขาว (2.14 g, 73% yield) จากนั้นนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$

c) โดยเทคนิคการตกผลึกร่วมกับเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี

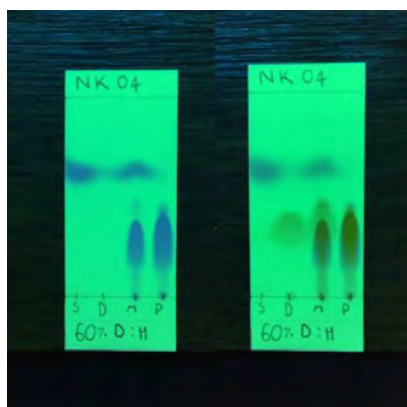
นำสารที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยามาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง รอจนกว่าจะตกผลึกรูปเข็มสีขาว จากนั้นดูดสารละลายสีเหลืองออกมาแยกเก็บไว้ พร้อมทั้งล้างผลึกด้วย Hexane แล้วดูดสารละลายนี้เก็บไว้ร่วมกับสารละลายสีเหลืองในตอนแรก เพื่อนำมาแยกสารผลิตภัณฑ์ (A1) ที่ยังเหลืออยู่ในสารละลายผสมออกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่และใช้ Dichloromethane, Hexane เป็นเฟสเคลื่อนที่ โดยเริ่มต้นที่คอลัมน์ด้วย 100% Hexane จากนั้นค่อยๆเพิ่มซ้ำด้วย Dichloromethane ที่ละ 10% ปริมาตร 100 mL จนได้ระบบตัวทำละลาย 40% Dichloromethane ต่อ 60% Hexane เก็บสารและตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC แล้วนำไปกำจัดตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนและทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ จะได้ผลิตภัณฑ์ (A1) เป็นของแข็งสีขาว 0.679 g จากนั้นนำไปรวมกับผลึกผลิตภัณฑ์ (A1) รูปเข็มสีขาว 1.168 g จะได้ผลิตภัณฑ์รวมทั้งหมด (1.847 g, 94% yield) จากนั้นนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$



รูปที่ 2.2 สารที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา 2.2.1



รูปที่ 2.3 ผลึกรูปเข็มสีขาว

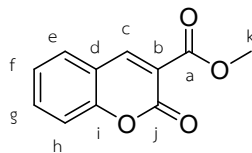


รูปที่ 2.4 การเช็คความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค TLC
(แผ่นซายไม่จุ่มไอโอดีน, แผ่นขาวจุ่มไอโอดีน)



รูปที่ 2.5 เทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี

2.2.1.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์



A1

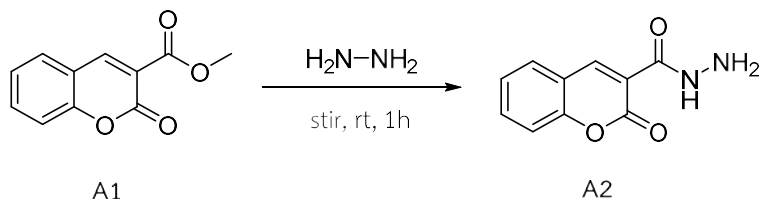
¹H-NMR ของผลิตภัณฑ์ A1

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) : δ_{H} (ppm) 8.53 (s, H_c, 1H), 7.64 – 7.61 (m, H_g, 1H), 7.60 (d, J = 1.8 Hz, H_e, 1H), 7.32 (d, J = 0.6 Hz, H_h, 1H), 7.31 – 7.29 (m, H_f, 1H), 3.91 (s, H_k, 3H).

¹³C-NMR ของผลิตภัณฑ์ A1

¹³C-NMR (CDCl₃, 126 MHz): δ_{C} (ppm) 163.79 (C_a), 156.84 (C_j), 155.29 (C_i), 149.30 (C_g), 134.61 (C_e), 129.69 (C_f), 125.02 (C_d), 117.96 (C_c), 117.93 (C_h), 116.88 (C_b), 53.02 (C_k).

2.2.2 การสังเคราะห์ 2-oxo-2*H*-chromene-3-carbohydrazide (A2)



รูปที่ 2.6 การสังเคราะห์ 2-oxo-2*H*-chromene-3-carbohydrazide (A2)

นำ A1 (0.28 g, 1.38 mmol) มาผสมกับ Hydrazine hydrate ปริมาณมากเกินพอในขวดก้นกลมขนาด 100 mL ได้สารละลายสีเหลือง คนสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จนกว่าสารตั้งต้นจะหมดโดยติดตามปฏิกิริยาและตรวจสอบสารที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค TLC ในระบบตัวทำละลาย 50% Ethyl acetate ต่อ 50% Hexane

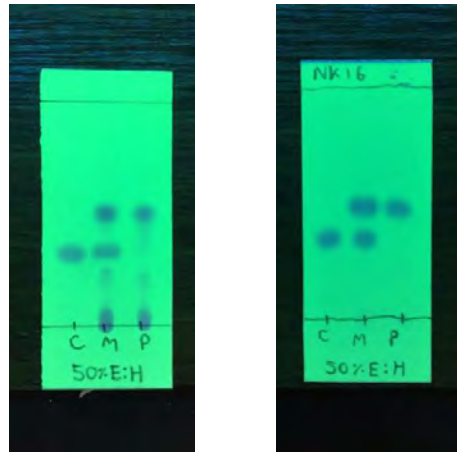
2.2.2.1 การทำให้บริสุทธิ์

a) โดยการสกัด ด้วย Ethyl acetate และน้ำ

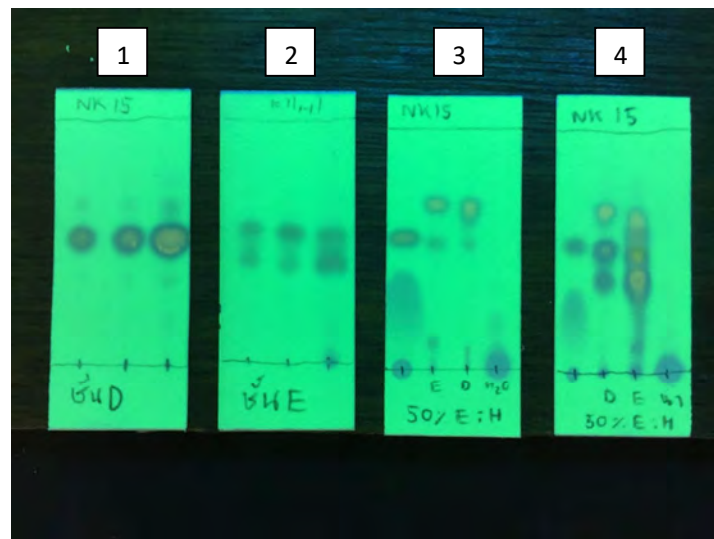
นำสารที่สังเคราะห์ได้มาสกัดด้วย Ethyl acetate และน้ำ นำชั้นน้ำมาสกัดด้วย Ethyl acetate ซ้ำอีก 2 ครั้ง กำจัดน้ำในชั้น Ethyl acetate ด้วย Na_2SO_4 anhydrous กรองด้วยกระดาษกรองและกำจัดตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน จะได้ผลิตภัณฑ์ (A2) เป็นของแข็งสีขาว จากนั้นนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$

b) โดยการสกัด ด้วย Dichloromethane และน้ำ

ทำเช่นเดียวกับ a) เพียงแค่เปลี่ยนสารที่ใช้ในการสกัด

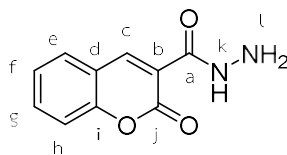


รูปที่ 2.7 การเช็คความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค TLC
(แผ่นซ้าย คือ ก่อนการสกัด, แผ่นขวา คือ หลังการสกัด)



รูปที่ 2.8 การเช็คความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค TLC
แผ่นที่ 1 คือ ชั้นสารที่สกัดด้วย Dichloromethane โดยสเปคตสารด้วยความเข้มข้นต่างกัน
แผ่นที่ 2 คือ ชั้นสารที่สกัดด้วย Ethyl acetate โดยสเปคตสารด้วยความเข้มข้นต่างกัน
แผ่นที่ 3 คือ สารที่นำมาสเปคตทันที
แผ่นที่ 4 คือ สารที่นำมาสเปคตเมื่อเวลาผ่านไป

2.2.2.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์



A2

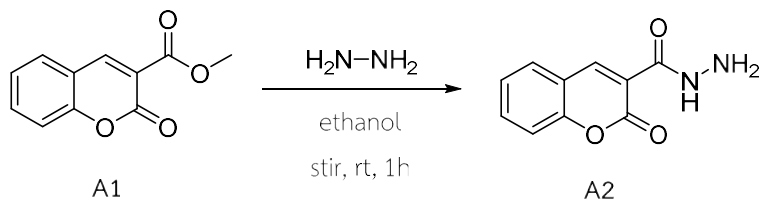
$^1\text{H-NMR}$ ของผลิตภัณฑ์ A2

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) : δ_{H} (ppm) 11.16 (s, H_k , 1H), 7.86 (s, H_c , 1H), 7.26 – 7.21 (m, H_g , 1H), 7.11 (dd, $J = 7.7, 1.7$ Hz, H_e , 1H), 6.97 (dd, $J = 4.4, 3.9$ Hz, H_h , 1H), 6.91 – 6.86 (m, H_f , 1H), 5.40 (d, $J = 78.7$ Hz, H_l , 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ ของผลิตภัณฑ์ A2

ไม่สามารถทำการทดลองได้เนื่องจากสารนี้สลายตัวได้ง่ายเมื่ออยู่ในสภาพสารละลาย อีกทั้งผู้วิจัยไม่สามารถทำวิจัยเพิ่มเติมได้เนื่องจากสถานการณ์ไม่ปกติ (Covid-19)

2.2.3 การสังเคราะห์ 2-oxo-2H-chromene-3-carbohydrazide (A2)

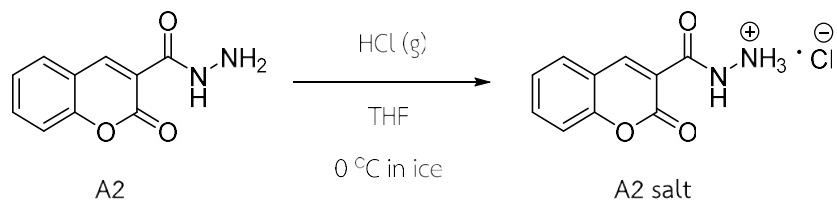


รูปที่ 2.9 การสังเคราะห์ 2-oxo-2H-chromene-3-carbohydrazide (A2)

อีกวิธีที่ใช้ในการสังเคราะห์ A2 นำ A1 (0.25 g, 1.23 mmol) มาละลายด้วยตัวทำละลาย Ethanol ปริมาตร 5 mL ในขวดกั่นกลม แล้วเติม Hydrazine hydrate ปริมาณมากเกินพอ ได้สารละลายสีเหลือง คนสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จนกว่าสารตั้งต้นจะหมด โดยติดตามปฏิกิริยาและตรวจสอบสารที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาด้วยเทคนิค TLC ในระบบตัวทำละลาย 50% Ethyl acetate ต่อ 50% Hexane ตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็นเป็นเวลา 14 วัน จะเกิดผลึกสีขาว จากนั้นดูดสารละลายสีเหลืองออกและทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ จะได้ผลิตภัณฑ์ (A2) เป็นของแข็งสีขาว จากนั้นนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค ¹H-NMR และ ¹³C-NMR

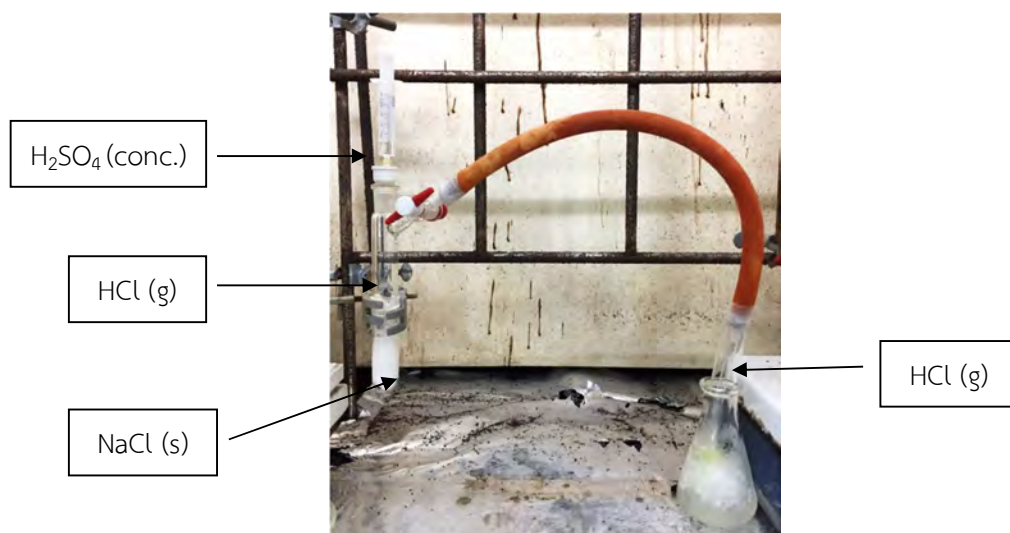
หมายเหตุ - ระหว่างรอในขั้นตอนการทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ สารผลิตภัณฑ์ (A2) ที่เป็นของแข็งสีขาวเปลี่ยนกลายเป็นสีเหลือง แสดงถึงการสลายตัวทำให้ไม่ได้ผลิตภัณฑ์ (A2) ที่ต้องการ

2.2.4 การสังเคราะห์ 2-oxo-2*H*-chromene-3-carbohydrazide (A2) ให้อยู่ในรูปเกลือ (A2 salt)



รูปที่ 2.10 การสังเคราะห์ 2-oxo-2*H*-chromene-3-carbohydrazide (A2) ให้อยู่ในรูปเกลือ (A2 salt)

นำ A2 มาละลายในตัวทำละลาย Tetrahydrofuran (THF) ปริมาตร 5 mL ในหลอดทดลองขนาดใหญ่ จากนั้นนำมาแช่ในน้ำแข็ง พร้อมกับเติมแก๊ส HCl ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่าง H_2SO_4 (conc.) กับ NaCl ลงในสารละลาย THF จะสังเกตเห็นฟองแก๊สเกิดขึ้น หลังจากนั้นสารละลายจะค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีเหลืองพร้อมทั้งเกิดตะกอนสีขาว (A2 salt) และรอจนกว่าตะกอนจะตกหมด

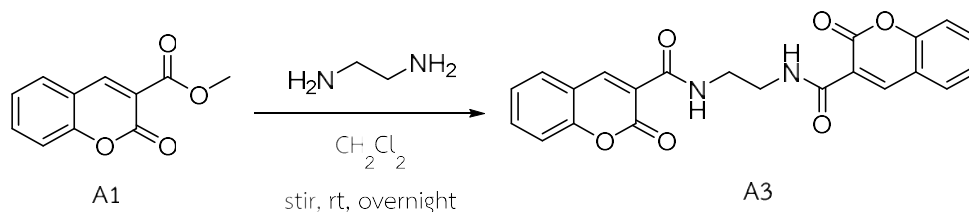


รูปที่ 2.11 การเตรียมแก๊ส HCl จากการทำปฏิกิริยาระหว่าง $\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ (conc.)}$ กับ NaCl



รูปที่ 2.12 ตะกอนสีขาว (A2 salt)

2.2.5 การสังเคราะห์ *N,N'*-(ethane-1,2-diyl)bis(2-oxo-2*H*-chromene-3-carboxamide) (A3)



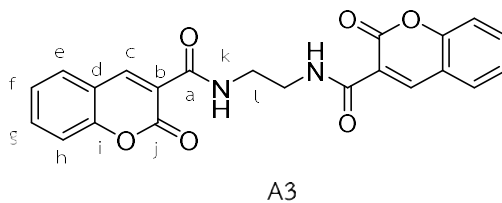
รูปที่ 2.13 การสังเคราะห์ *N,N'*-(ethane-1,2-diyl)bis(2-oxo-2*H*-chromene-3-carboxamide) (A3)

นำ A1 (0.10 g, 0.50 mmol) มาละลายด้วยตัวทำละลาย CH_2Cl_2 ปริมาตร 10 mL ในขวดกั่นกลม แล้วเติม Ethylenediamine (0.10 mL, 1.50 mmol) ได้สารละลายสีเหลือง คนสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จนกว่าสารตั้งต้นจะหมด โดยติดตามปฏิกิริยาและตรวจสอบสารที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาด้วยเทคนิค TLC ในระบบตัวทำละลาย 60% Ethyl acetate ต่อ 40% Hexane

2.2.5.1 การทำให้บริสุทธิ์

นำสารที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยามาสกัดด้วย CH_2Cl_2 และน้ำ นำชั้นน้ำมาสกัดด้วย CH_2Cl_2 ซ้ำอีก 2-3 ครั้ง จากนั้นกำจัดน้ำในชั้น CH_2Cl_2 ด้วย Na_2SO_4 anhydrous กรองด้วยกระดาษกรองและกำจัดตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน จะได้ผลิตภัณฑ์ (A3) เป็นของแข็งสีเหลือง (0.12 g, 57% yield) จากนั้นนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$

2.2.5.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์



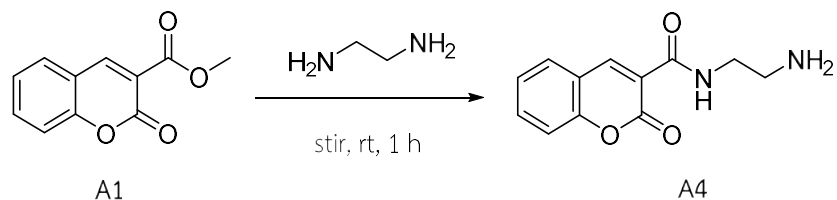
$^1\text{H-NMR}$ ของผลิตภัณฑ์ A3

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) : δ_{H} (ppm) 8.34 (s, H_c , 1H), 7.30 – 7.25 (m, H_g , 1H), 7.21 (dd, $J = 7.7, 1.6$ Hz, H_e , 1H), 6.92 (d, $J = 8.3$ Hz, H_h , 1H), 6.85 – 6.81 (m, H_f , 1H), 3.92 (s, H_l , 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ ของผลิตภัณฑ์ A3

ผู้วิจัยไม่สามารถทำวิจัยเพิ่มเติมได้ เนื่องจากสถานการณ์ไม่ปกติ (Covid-19)

2.2.6 การสังเคราะห์ *N*-(2-aminoethyl)-2-oxo-2*H*-chromene-3-carboxamine (A4)



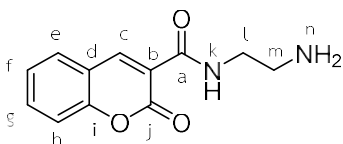
รูปที่ 2.14 การสังเคราะห์ *N*-(2-aminoethyl)-2-oxo-2*H*-chromene-3-carboxamine (A4)

นำ A1 (0.10 g, 0.50 mmol) มาละลายโดยเติม Ethylenediamine ปริมาณมากเกินไปได้สารละลายสีเหลือง คนสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จนกว่าสารตั้งต้นจะหมด โดยติดตามปฏิกิริยาและตรวจสอบสารที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาด้วยเทคนิค TLC ในระบบตัวทำละลาย 60% Ethyl acetate ต่อ 40% Hexane

2.2.6.1 การทำให้บริสุทธิ์

นำสารที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยามาสกัดด้วย CH_2Cl_2 และน้ำ นำชั้นน้ำมาสกัดด้วย CH_2Cl_2 ซ้ำ 2-3 ครั้ง จากนั้นกำจัดน้ำในชั้น CH_2Cl_2 ด้วย Na_2SO_4 anhydrous กรองด้วยกระดาษกรองและกำจัดตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน จะได้ผลิตภัณฑ์ (A4) เป็นของแข็งสีเหลือง (0.083 g, 73% yield) จากนั้นนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$

2.2.6.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์



A4

$^1\text{H-NMR}$ ของผลิตภัณฑ์ A4

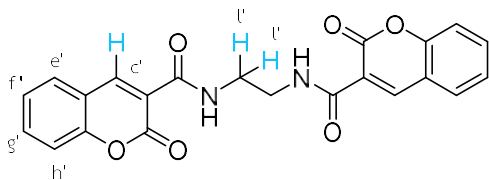
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) : δ_{H} (ppm) 8.36 (s, H_{c} , 1H), 8.32 (s, H_{c} , 1H), 7.33 – 7.24 (m, H_{g} , 1H), 7.19 (d, $J = 7.6$ Hz, H_{e} , 1H), 6.93 (dd, $J = 13.6, 8.3$ Hz, H_{h} , 1H), 6.88 – 6.80 (m, H_{f} , 1H), 3.89 (s, H_{l} , 2H), 3.63 (t, $J = 5.7$ Hz, H_{i} , 2H), 3.00 (t, $J = 5.7$ Hz, H_{m} , 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ ของผลิตภัณฑ์ A4

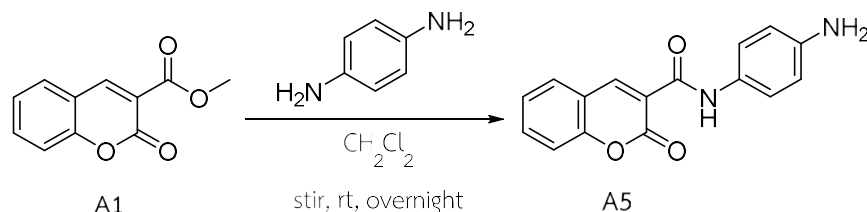
ไม่มีผล เนื่องจากสารยังไม่บริสุทธิ์

หมายเหตุ – ผลที่ได้จาก $^1\text{H-NMR}$ เป็นสารผสมระหว่าง A3 กับ A4 ต้องนำไปแยกทำให้บริสุทธิ์มากขึ้น แต่ผู้วิจัยไม่มีโอกาสได้ดำเนินงานต่อ เนื่องจากสถานการณ์ไม่ปกติ เกิดการระบาดของ Covid-19

– สัญญาณ $^1\text{H-NMR}$ ที่ตำแหน่ง c' และ l' เป็นของโครงสร้างสาร A3



2.2.7 การสังเคราะห์ *N*-(4-aminophenyl)-2-oxo-2*H*-chromene-3-carboxamide (A5)



รูปที่ 2.15 การสังเคราะห์ *N*-(4-aminophenyl)-2-oxo-2*H*-chromene-3-carboxamide (A5)

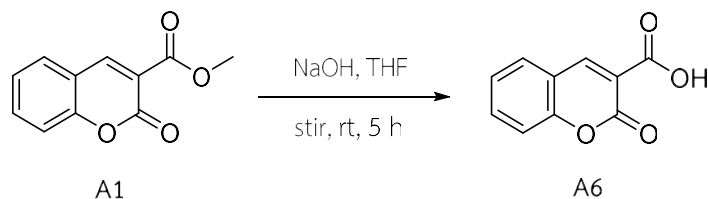
นำ A1 (0.21 g, 1.04 mmol) กับ *p*-Phenylenediamine (PPD) (1.78 g, 1.50 mmol) มาละลายด้วยตัวทำละลาย CH₂Cl₂ ปริมาตร 20 mL ในขวดกั่นกลม ได้สารละลายสีน้ำตาลแดง คนสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จนกว่าสารตั้งต้นจะหมด โดยติดตามปฏิกิริยาและตรวจสอบสารที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาด้วยเทคนิค TLC ในระบบตัวทำละลาย 20% Ethyl acetate ต่อ 80% Dichloromethane

2.2.7.1 การทำให้บริสุทธิ์

นำสารที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยามากำจัดตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่และใช้ Dichloromethane, Hexane เป็นเฟสเคลื่อนที่ โดยเริ่มต้นแฟคคอลัมน์ด้วย 50% Dichloromethane ต่อ 50% Hexane จากนั้นค่อยๆเพิ่มด้วย Dichloromethane ทีละ 10% ปริมาตร 100 mL จนได้ระบบตัวทำละลาย 100% Dichloromethane จากนั้นค่อยๆเพิ่มด้วย Ethyl acetate ทีละ 2.5% เพื่อไล่สารออกจากคอลัมน์ โดยไม่เกิน 10% Ethyl acetate ต่อ 90% Dichloromethane เก็บสารใส่ในหลอดทดลองขนาดใหญ่ ตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC ในระบบตัวทำละลาย 20% Ethyl acetate ต่อ 80% Dichloromethane แล้วนำไปกำจัดตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนและทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ จะได้ผลิตภัณฑ์ (A5) เป็นของแข็งสีเหลืองส้ม จากนั้นนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค ¹H-NMR และ ¹³C-NMR

หมายเหตุ – สารแยกได้ไม่ดี ติดคอลัมน์ เมื่อนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค ¹H-NMR และ ¹³C-NMR พบว่าสารละลายตัว ไม่ใช่สารผลิตภัณฑ์ (A5) ที่ต้องการ

2.2.8 การสังเคราะห์ 2-oxo-2*H*-chromene-3-carboxylic acid (A6)



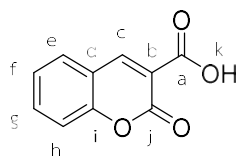
รูปที่ 2.16 การสังเคราะห์ 2-oxo-2*H*-chromene-3-carboxylic acid (A6)

นำ A1 (0.93 g, 4.58 mmol) ผสมกับ NaOH (1.00 g, 25.09 mmol) ที่ละลายอยู่ในตัวทำละลาย THF ปริมาตร 10 mL ในขวดกั่นกลม คนสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง จนกว่าสารตั้งต้นจะหมด โดยติดตามปฏิกิริยาและตรวจสอบสารที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาด้วยเทคนิค TLC ในระบบตัวทำละลาย 50% Ethyl acetate ต่อ 50% Hexane

2.2.8.1 การทำให้บริสุทธิ์

นำสารที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยามาสกัดด้วย CH_2Cl_2 และน้ำ เก็บชั้นน้ำมาหยด HCl จะสังเกตเห็นตะกอนขาว หยดจนกว่าตะกอนจะไม่ตกลงมาอีก จากนั้นนำตะกอนที่ได้มากรองโดยใช้เครื่องดูดสุญญากาศ และล้างตะกอนด้วยน้ำ หลังจากนั้นทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ จะได้ตะกอนผลิตภัณฑ์ (A6) เป็นของแข็งสีขาว (0.84 g, 96% yield) นำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$

2.2.8.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์



A6

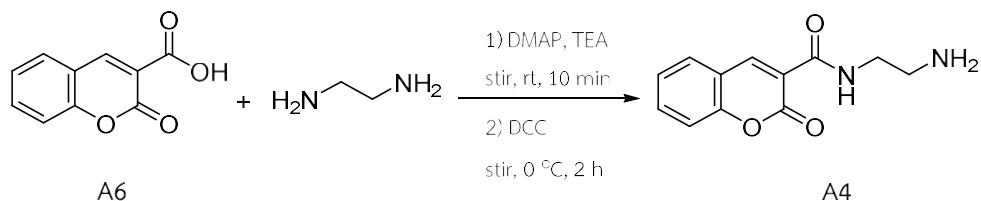
¹H-NMR ของผลิตภัณฑ์ A6

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ_{H} (ppm) 12.25 (s, H_k, 1H), 8.95 (s, H_c, 1H), 7.81 – 7.78 (m, H_g, 1H), 7.77 (dd, J = 6.0, 1.4 Hz, H_e, 1H), 7.50 (d, J = 1.8 Hz, H_h, 1H), 7.49 – 7.47 (m, H_f, 1H).

¹³C-NMR ของผลิตภัณฑ์ A6

¹³C-NMR (CDCl₃, 126 MHz): δ_{C} (ppm) 164.22 (C_a), 162.57 (C_j), 154.72 (C_i), 151.66 (C_c), 135.92 (C_g), 130.64 (C_e), 126.40 (C_f), 118.60 (C_d), 117.36 (C_b), 115.02 (C_h).

2.2.9 การสังเคราะห์ *N*-(2-aminoethyl)-2-oxo-2*H*-chromene-3-carboxamine (A4)



รูปที่ 2.17 การสังเคราะห์ *N*-(2-aminoethyl)-2-oxo-2*H*-chromene-3-carboxamine (A4)

นำ **A6** (0.20 g, 1.04 mmol) กับ DMAP (12.67 mg, 0.10 mmol) มาละลายตัวทำละลาย CH_2Cl_2 ปริมาตร 10 mL ในขวดกั่นกลม แล้วเติม TEA (0.72 mL, 5.19 mmol) คนสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม DCC (0.64 g, 3.11 mmol) คนสารละลายในน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 0°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม Ethylenediamine (0.14 mL, 2.07 mmol) แล้วคนสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จนกว่าสารตั้งต้นจะหมด โดยติดตามปฏิกิริยาและตรวจสอบสารที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาด้วยเทคนิค TLC ในระบบตัวทำละลาย 20% Methanol ต่อ 80% Dichloromethane

2.2.9.1 การทำให้บริสุทธิ์

1. โดยการสกัด

นำสารที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยามาสกัดด้วย CH_2Cl_2 และน้ำ นำชั้นน้ำมาสกัดต่อด้วย CH_2Cl_2 ซ้ำ 2-3 ครั้ง จากนั้นกำจัดน้ำในชั้น CH_2Cl_2 ด้วย Na_2SO_4 anhydrous กรองด้วยกระดาษกรอง ตรวจสอบสารที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค TLC ในระบบตัวทำละลาย 50% Ethyl acetate ต่อ 50% Hexane พบว่า สารยังไม่บริสุทธิ์ จึงต้องนำมาแยกสารให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี

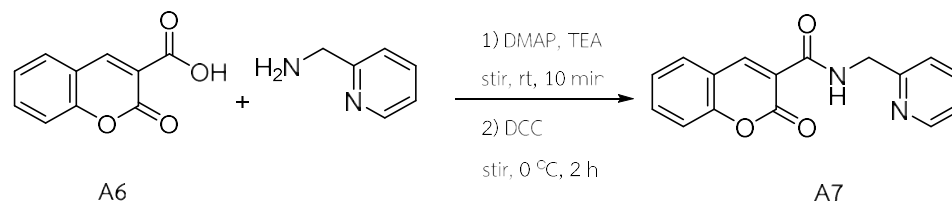
2. โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี

นำสารที่ได้จากการสกัดมากำจัดตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่และใช้ Ethyl acetate, Hexane เป็นเฟสเคลื่อนที่ใน

ช่วงแรก ส่วนในช่วงหลังใช้ Methanol, Ethyl acetate เป็นเฟสเคลื่อนที่ โดยเริ่มต้นที่คอลัมน์ด้วย 100% Hexane จากนั้นค่อยๆเพิ่มซ้ำด้วย Ethyl acetate ทีละ 5% ปริมาตร 100 mL จนได้ระบบตัวทำละลาย 25% Ethyl acetate ต่อ 75% Hexane รองนสารตัวแรกออกหมดค่อยเปลี่ยนระบบตัวทำละลายเป็น 30% Ethyl acetate ต่อ 70% Hexane รองนสารตัวที่สองออกหมด จากนั้นค่อยๆเพิ่มซ้ำด้วย Ethyl acetate ทีละ 10% ปริมาตร 50 mL จนกลายเป็นระบบตัวทำละลาย 100% Ethyl acetate ในช่วงหลังค่อยๆเพิ่มซ้ำด้วย Methanol ทีละ 2.5% เพื่อไล่สารที่เหลือออกจากคอลัมน์ โดยไม่เกิน 20% Methanol ต่อ 80% Ethyl acetate เก็บสารใส่ในหลอดทดลองขนาดใหญ่ ตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC ในระบบตัวทำละลาย 25% Ethyl acetate ต่อ 75% Hexane ในช่วงแรก ส่วนในช่วงหลังใช้ระบบตัวทำละลาย 30% Methanol ต่อ 70% Ethyl acetate แล้วนำไปกำจัดตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนและทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ

หมายเหตุ – การลงคอลัมน์ใช้เวลาในการแยกสารนานและสารที่แยกออกมาจากคอลัมน์มีปริมาณน้อยมาก เมื่อนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ พบว่าสารสลายตัว ไม่ใช่สารผลิตภัณฑ์ (A4) ที่ต้องการ

2.2.10 การสังเคราะห์ 2-oxo-N-(pyridine-2-ylmethyl)-2H-chromene-3-carboxamide (A7)



รูปที่ 2.18 การสังเคราะห์ 2-oxo-N-(pyridine-2-ylmethyl)-2H-chromene-3-carboxamide (A7)

นำ **A6** (0.20 g, 1.03 mmol) กับ DMAP (12.60 mg, 0.10 mmol) มาละลายตัวทำละลาย CH_2Cl_2 ปริมาตร 10 mL ในขวดกั่นกลม แล้วเติม TEA (1.00 mL, 5.16 mmol) คนสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม DCC (0.64 g, 3.09 mmol) คนสารละลายในน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 0°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม 2-Picolylamine (0.21 mL, 2.06 mmol) แล้วคนสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จนกว่าสารตั้งต้นจะหมด โดยติดตามปฏิกิริยาและตรวจสอบสารที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาด้วยเทคนิค TLC ในระบบตัวทำละลาย 10% Methanol ต่อ 90% Ethyl acetate

2.2.10.1 การทำให้บริสุทธิ์

1. โดยการสกัด

นำสารที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยามาสกัดด้วย CH_2Cl_2 และน้ำ นำชั้นน้ำมาสกัดต่อด้วย CH_2Cl_2 ซ้ำ 2-3 ครั้ง จากนั้นกำจัดน้ำในชั้น CH_2Cl_2 ด้วย Na_2SO_4 anhydrous กรองด้วยกระดาษกรอง ตรวจสอบสารที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค TLC ในระบบตัวทำละลาย 100% Ethyl acetate พบว่า สารยังไม่บริสุทธิ์ จึงต้องนำมาแยกสารให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี

2. โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี

นำสารที่ได้จากการสกัดมากำจัดตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ซิลิกาเป็นเฟสคงที่และใช้ Ethyl acetate, Hexane เป็นเฟสเคลื่อนที่ โดยเริ่มต้นแพ้คอลัมน์ด้วย 100% Hexane จากนั้นค่อยๆเพิ่มขั้วด้วย Ethyl acetate ทีละ 10% ปริมาตร 100 mL จนได้ระบบตัวทำละลาย 40% Ethyl acetate ต่อ 60% Hexane รวจนสารตัวแรกออกมา จากนั้นค่อยๆเพิ่มขั้วด้วย

Ethyl acetate ทีละ 10% ปริมาตร 50 mL จนกลายเป็นระบบตัวทำละลาย 100% Ethyl acetate ในช่วงหลังค่อยๆเพิ่มซ้ำด้วย Methanol ทีละ 2.5% เพื่อไล่สารที่เหลือออกจากคอลัมน์ โดยไม่เกิน 20% Methanol ต่อ 80% Ethyl acetate เก็บสารใส่ในหลอดทดลองขนาดใหญ่ ตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC ในระบบตัวทำละลาย 50% Ethyl acetate ต่อ 50% Hexane แล้วนำไปกำจัดตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนและทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ เมื่อนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ พบว่าสารผลิตภัณฑ์ (A7) ยังไม่บริสุทธิ์ จึงต้องนำมาแยกสารให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น โดยการทำให้สารอยู่ในรูปเกลือแล้วสกัดอีกครั้ง

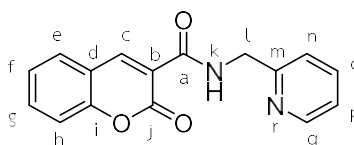
หมายเหตุ – การลงคอลัมน์ใช้เวลาในการแยกสารนานและสารที่แยกออกมาจากคอลัมน์มีปริมาณน้อยมาก

3. โดยการสกัด

นำสารผลิตภัณฑ์ (A7) ที่ได้จากเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีมาละลายด้วย HCl (1M) ทดสอบความเป็นกรดโดยใช้ยูนิเวอร์แซลอินดิเคเตอร์ จากนั้นนำมาสกัดด้วย CH_2Cl_2 และน้ำ เก็บชั้นน้ำมาเติม NaHCO_3 จนมีความเป็นเบส (ระวังเกิดฟองก๊าซ) ทดสอบความเป็นเบสโดยใช้ยูนิเวอร์แซลอินดิเคเตอร์ หลังจากนั้นนำมาสกัดด้วย CH_2Cl_2 และนำชั้นน้ำมาสกัดต่อด้วย CH_2Cl_2 ซ้ำ 2-3 ครั้ง จากนั้นกำจัดน้ำในชั้น CH_2Cl_2 ด้วย Na_2SO_4 anhydrous กรองด้วยกระดาษกรอง แล้วนำไปกำจัดตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนและทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ จะได้ผลิตภัณฑ์ (A7) เป็นของแข็งสีขาว (16.40 mg, 6% yield) จากนั้นนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$

หมายเหตุ – จากกระบวนการทำสารให้บริสุทธิ์หลายครั้ง ทำให้เกิดการสูญเสียสารผลิตภัณฑ์ A7

2.2.10.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์



A7

 $^1\text{H-NMR}$ ของผลิตภัณฑ์ A7

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) : δ_{H} (ppm) 9.60 (s, H_k , 1H), 8.92 (s, H_c , 1H), 8.59 (d, $J = 4.4$ Hz, H_q , 1H), 7.70 – 7.63 (m, H_n , H_o , H_p , 3H), 7.41 – 7.31 (m, H_e , H_f , H_g , 3H), 7.19 (dd, $J = 7.1, 5.1$ Hz, H_h , 1H), 4.79 (d, $J = 5.5$ Hz, H_l , 2H).

 $^{13}\text{C-NMR}$ ของผลิตภัณฑ์ A7

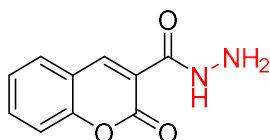
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 126 MHz) : δ_{C} (ppm) 162.09 (s), 161.62 (s), 157.04 (s), 154.85 (s), 149.73 (s), 148.83 (s), 137.18 (s), 134.45 (s), 130.17 (s), 125.62 (s), 122.72 (s), 122.11 (s), 118.95 (s), 118.79 (s), 117.02 (s), 45.69 (s).

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

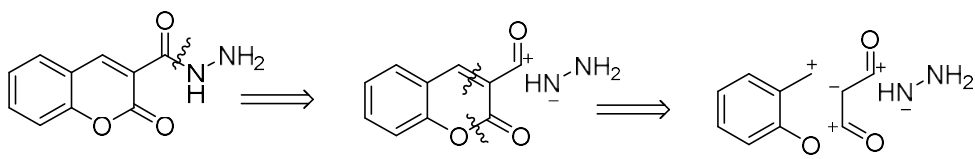
3.1 การออกแบบการสังเคราะห์โมเลกุลเป้าหมาย

ในงานวิจัยนี้ต้องการสังเคราะห์และศึกษาสมบัติของสารประกอบไฮดราไซด์ (hydrazide) **A2** แสดงดังรูปที่ 3.1 เพื่อใช้ในการใช้ตรวจวัดฟอร์มาลดีไฮด์



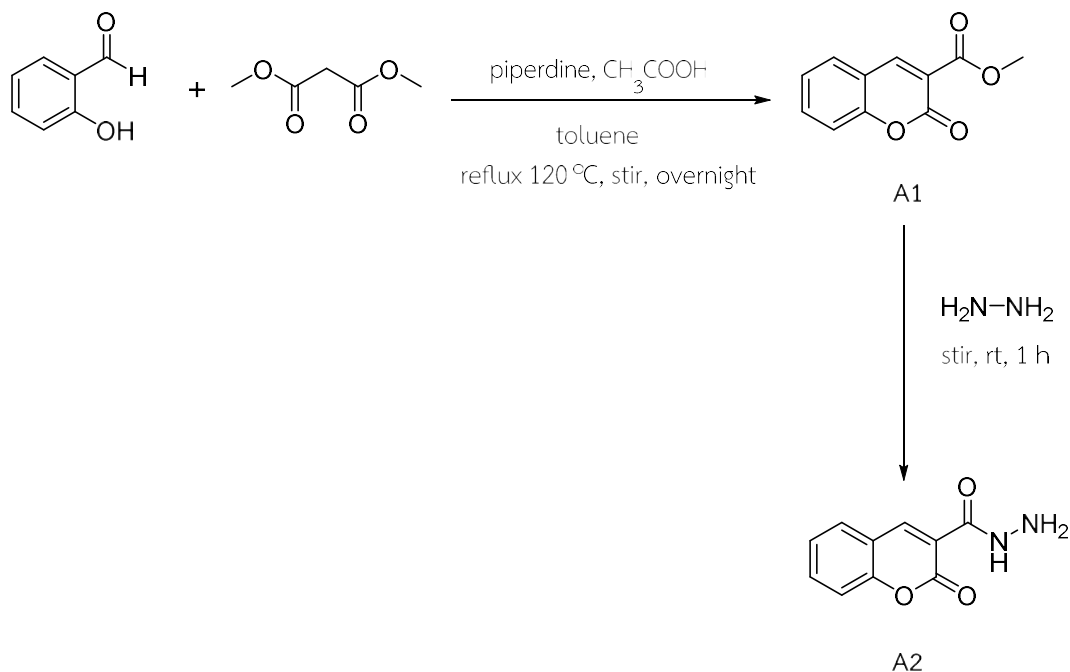
รูปที่ 3.1 แสดงโครงสร้างของโมเลกุลเป้าหมาย **A2**

โดยการสังเคราะห์สารประกอบ **A2** สามารถวางแผนการสังเคราะห์ที่ได้ตั้งแผนภาพ Retrosynthesis ซึ่งแสดงการแตกพันธะระหว่าง C-N ของอะตอมคาร์บอนของหมู่คาร์บอนิลและอะตอมไนโตรเจนของไฮดราไซด์ จากนั้นเป็นการแตกพันธะระหว่าง C-C พันธะคู่ และ O-C ของหมู่คาร์บอนิล ดังรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 แสดงแผนภาพ Retrosynthesis ในการสังเคราะห์ **A2**

จากแผนภาพ Retrosynthesis ข้างต้น งานวิจัยนี้จึงวางแผนการสังเคราะห์สารประกอบ **A2** ด้วยปฏิกิริยา 2 ขั้นตอนคือ ขั้นที่ 1 ปฏิกิริยา Knoevenagel condensation ระหว่าง Salicylaldehyde กับ Diethylmalonate ขั้นที่ 2 ปฏิกิริยา methyl 2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (**A1**) และ hydrazine hydrate ดังแผนภาพที่ 3.3



แผนภาพที่ 3.3 แสดงขั้นตอนการสังเคราะห์โมเลกุล A2

จากแผนภาพข้างต้นจะเห็นได้ว่า โมเลกุลเป้าหมาย A1 สามารถสังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา Knoevenagel condensation ระหว่าง Salicylaldehyde กับ Diethylmalonate ในตัวทำละลาย Toluene โดยใช้ Piperidine เป็นเบส และ Acetic acid เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยให้ความร้อนด้วยวิธีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง และโมเลกุลเป้าหมาย A2 สามารถสังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา Nucleophilic substitution ระหว่าง methyl 2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (A1) ด้วย hydrazine hydrate

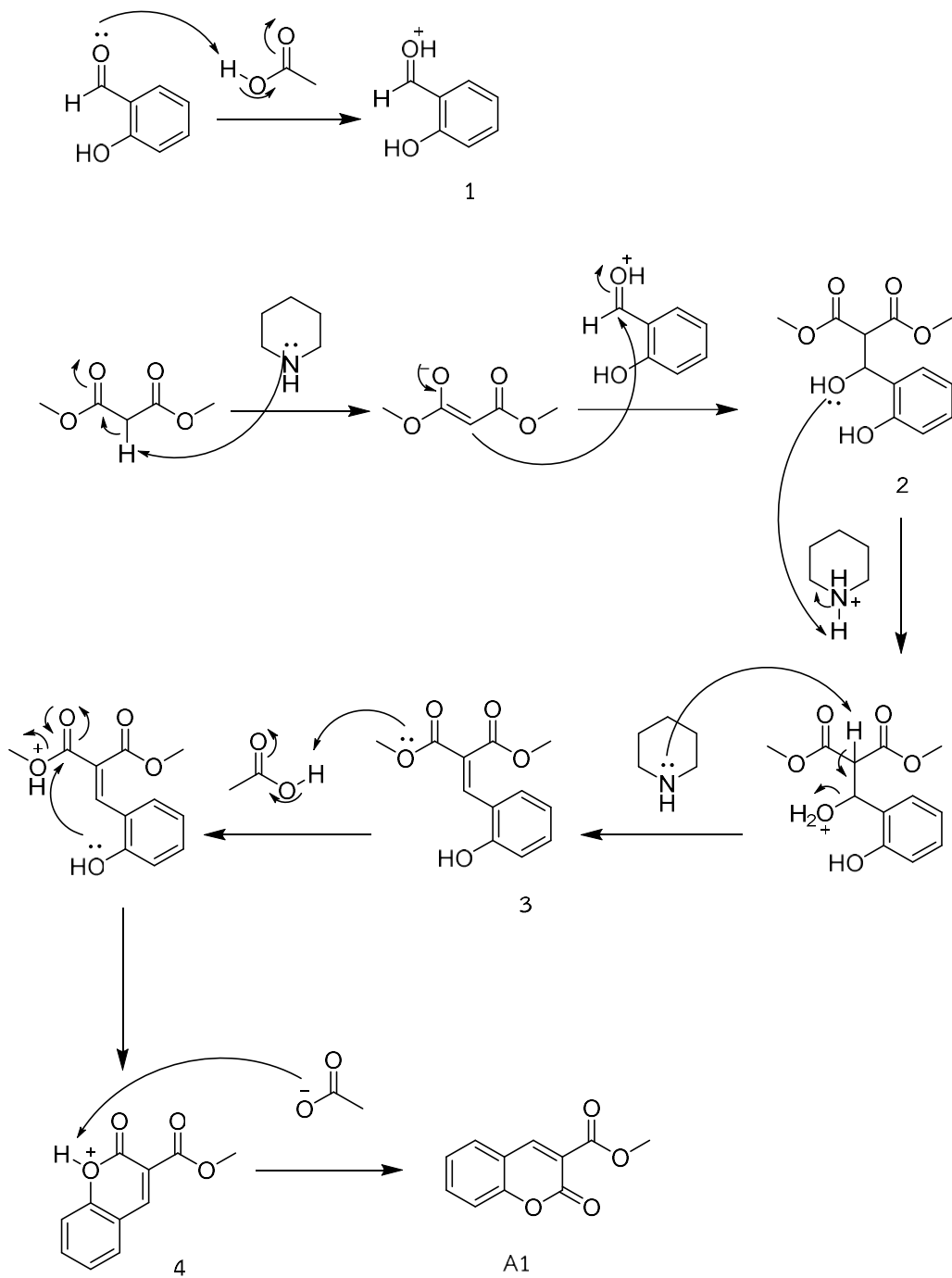
จากที่กล่าวมาข้างต้น จึงสามารถกล่าวได้ว่า การสังเคราะห์โมเลกุลเป้าหมาย A2 จะสามารถทำได้ผ่านปฏิกิริยา 2 ขั้นตอน เขียนได้ดังแสดงรูปที่ 3.3

3.2 การสังเคราะห์

3.2.1 การสังเคราะห์ methyl 2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (A1)

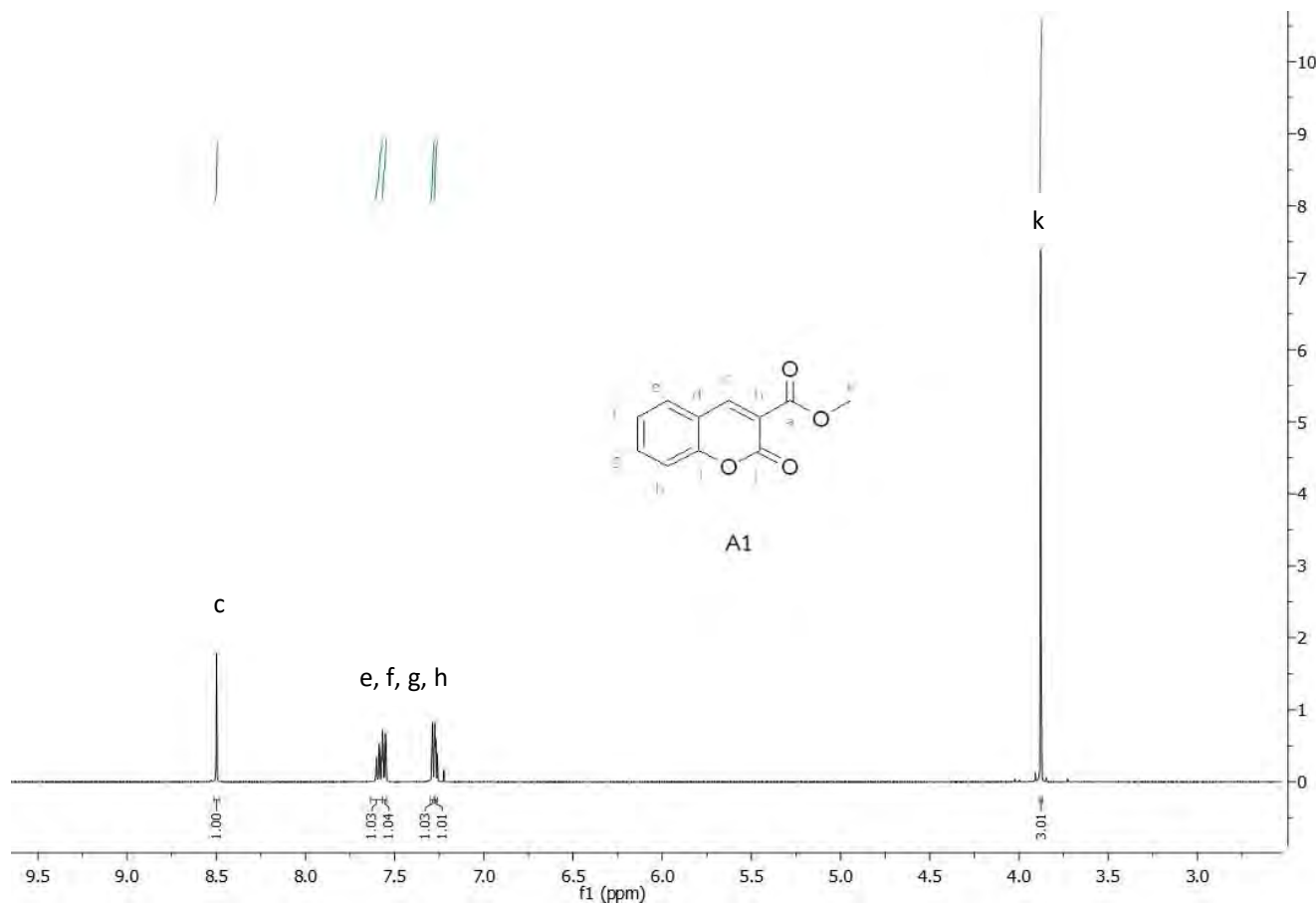
ขั้นตอนแรกเป็นการสังเคราะห์ methyl 2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (A1) จากปฏิกิริยา Knoevenagel condensation ระหว่าง Salicylaldehyde กับ Diethylmalonate โดยใช้ Piperidine เป็นเบส และ Acetic acid เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในตัวทำละลาย Toluene และรีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียสข้ามคืน จากนั้นทำสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วยการตกผลึกและการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้สารผลิตภัณฑ์ A1 เป็นของแข็งสีขาว คิดเป็น % yield เท่ากับ 94 ทั้งนี้สาเหตุในการสูญเสีย yield ของสารดังกล่าวเกิดขึ้นจากกระบวนการทำสารให้บริสุทธิ์ผ่านเทคนิคการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี เนื่องจากสารบางส่วนสามารถเกิดอันตรกิริยากับซิลิกาซึ่งเป็นเฟสคงที่ทำให้สารติดอยู่ภายในคอลัมน์ สังเกตได้จากสีของซิลิกาภายในคอลัมน์ ทำให้มีการสูญเสียสารผลิตภัณฑ์ A1 ไปบางส่วน

กลไกการเกิดปฏิกิริยาของการสังเคราะห์โมเลกุล A1 สามารถแสดงได้ดังแผนภาพที่ 3.4 โดยเริ่มจาก acetic acid ทำหน้าเป็นกรดไป protonate ที่หมู่คาร์บอนิลของ salicylaldehyde เพื่อให้สารมีความเป็นอิเล็กโตรไฟล์ (electrophile) ที่ดีขึ้น ได้เป็นสารหมายเลข 1 จากนั้น dimethylmalonate จะเกิดเป็น enolate anion โดยโปรตอนที่อยู่บนอะตอมคาร์บอนชนิด sp^3 กึ่งกลางระหว่างหมู่คาร์บอนิลซึ่งมีความเป็นกรดมากที่สุดจะถูก deprotonate โดยอะตอมไนโตรเจนของ piperidine จากนั้นจึงทำหน้าที่เป็นนิวคลีโอไฟล์ (nucleophile) เข้าทำปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอนิลของสารหมายเลข 1 ได้เป็นสารหมายเลข 2 จากนั้นเกิดการกำจัดโมเลกุลน้ำ (dehydration) จึงเกิดพันธะระหว่าง C-C พันธะคู่ ได้เป็นสารหมายเลข 3 จากนั้นเกิดปฏิกิริยา intramolecular cyclisation ของ hydroxyl group กับหมู่คาร์บอนิลของเอสเทอร์ในสภาวะกรด ปิดเป็นวงหกเหลี่ยมเกิดเป็นสารหมายเลข 4 หลังจากนั้นจะถูก neutralization ด้วย acetate anion ในปฏิกิริยาได้เป็นสารผลิตภัณฑ์ A1 ดังแผนภาพที่ 3.4



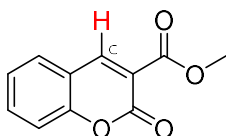
แผนภาพที่ 3.4 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาร A1

จากนั้นพิสูจน์เอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ A1 ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ พบว่า มีสัญญาณของโปรตอนทั้งหมด 4 สัญญาณ แสดงได้ดังรูปที่ 3.5 ดังนี้



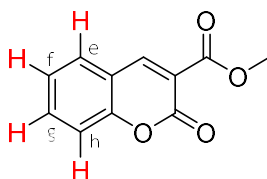
รูปที่ 3.5 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสาร A1

จะเห็นได้ว่า สัญญาณของโปรตอนที่ 8.53 ppm (H_c) เป็นสัญญาณโปรตอนที่อยู่บนอะตอมคาร์บอนชนิด sp^2 บนวง pyranone มีลักษณะเป็น singlet เนื่องจากไม่มีโปรตอนข้างเคียง โดยสัญญาณของโปรตอนชนิดนี้ downfield มากที่สุด (มีค่า chemical shift สูงที่สุด) เนื่องจากได้รับผล anisotropy จากวง aromatic และ inductive effect จากหมู่คาร์บอนิลของเอสเทอร์



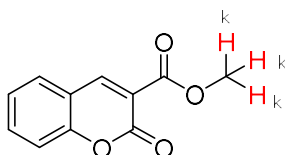
รูปที่ 3.6 $^1\text{H-NMR}$ ที่ตำแหน่ง H_c ของสาร A1

สัญญาณของโปรตอนที่ 7.64–7.61, 7.60, 7.32, 7.31–7.29 ppm เป็นสัญญาณโปรตอนที่อยู่บนอะตอมคาร์บอนชนิด sp^2 ของวง aromatic โดยสัญญาณที่ 7.64 – 7.61 ppm (H_g) และ 7.31 – 7.29 ppm (H_f) มีลักษณะเป็น triplet เนื่องจากเป็นโปรตอนอยู่ติดกับโปรตอนข้างเคียงสองตัวบนวง aromatic สัญญาณที่ 7.60 ppm (H_e) และ 7.32 ppm (H_h) มีลักษณะเป็น doublet เนื่องจากเป็นโปรตอนที่มิโปรตอนข้างเคียงหนึ่งตัวบนวง aromatic



รูปที่ 3.7 $^1\text{H-NMR}$ ที่ตำแหน่ง H_e , H_f , H_g , H_h ของสาร A1

ส่วนสัญญาณที่ของโปรตอนที่ 3.91 ppm (H_k) เป็นสัญญาณโปรตอนที่อยู่บนอะตอมคาร์บอนชนิด sp^3 บนหมู่เมทิล มีลักษณะเป็น singlet เนื่องจากไม่มีโปรตอนข้างเคียง สัญญาณของโปรตอนชนิดนี้มีค่า chemical shift ต่ำที่สุด เนื่องจากเป็นโปรตอนเพียงชนิดเดียวที่ไม่อยู่ติดกับวง aromatic และอยู่บนอะตอมของคาร์บอนที่มีไฮบริดเซชันชนิด sp^3



รูปที่ 3.8 $^1\text{H-NMR}$ ที่ตำแหน่ง H_k ของสาร A1

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาถึง integration ของสัญญาณทั้ง 4 พบว่า integration ตรงกับจำนวนของโปรตอนแต่ละชนิด จำนวนโปรตอนบนวง aromatic เท่ากับ 5 ในขณะที่ aliphatic proton เท่ากับ 3 เป็นการยืนยันว่าเป็นสาร A1 จริง

การศึกษาปฏิกิริยาระหว่าง A1 กับ Hydrazine

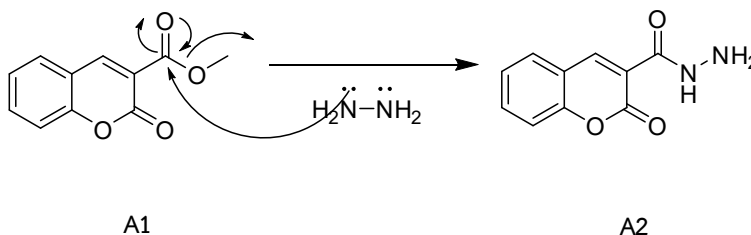
3.2.2 การสังเคราะห์ 2-oxo-2H-chromene-3-carbohydrazide (A2)

ขั้นตอนที่สอง เป็นการสังเคราะห์ 2-oxo-2H-chromene-3-carbohydrazide (A2) จากปฏิกิริยา Nucleophilic substitution ระหว่าง methyl 2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (A1) ด้วย hydrazine hydrate โดยใช้ตัวทำละลายเป็น hydrazine hydrate ปริมาณมากเกินไป คนสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วยการสกัด จะได้ผลิตภัณฑ์ A2 เป็นของแข็งสีขาว แต่ไม่สามารถนำมาคิดเป็น % yield เนื่องจากสารจะสลายตัวได้เรื่อย ๆ จนไม่ใช่สารผลิตภัณฑ์ A2 ที่ต้องการ ทั้งนี้คาดว่าปฏิกิริยาเกิดมาจาก อุณหภูมิอากาศ และตัวทำละลาย อุณหภูมิที่สูงเกินไป (อุณหภูมิห้องประมาณ 35-40 องศาเซลเซียส) อาจทำให้สารที่ไม่เสถียรสลายตัวได้ อากาศมีก๊าซออกซิเจน คาร์บอนไดออกไซด์ อาจทำให้เกิดการออกซิเดชัน และตัวทำละลายที่ใช้คือ $CDCl_3$ ซึ่งประกอบด้วย HCl มีความเป็นกรด จึงเกิดการ protonate ทำให้สารสลายตัว ก่อให้เกิดการแตกวงคูมาริน หรือหมู่เอมีนถูกออกซิไดส์ได้

โดยมีวิธีการแก้ไข คือการเก็บรักษาสารไว้ในตู้เย็น ในภาชนะปิดปราศจากอากาศ และก่อนใช้ตัวทำละลาย $CDCl_3$ ให้นำไปผสมกับ K_2CO_3 เพื่อกำจัดความเป็นกรด

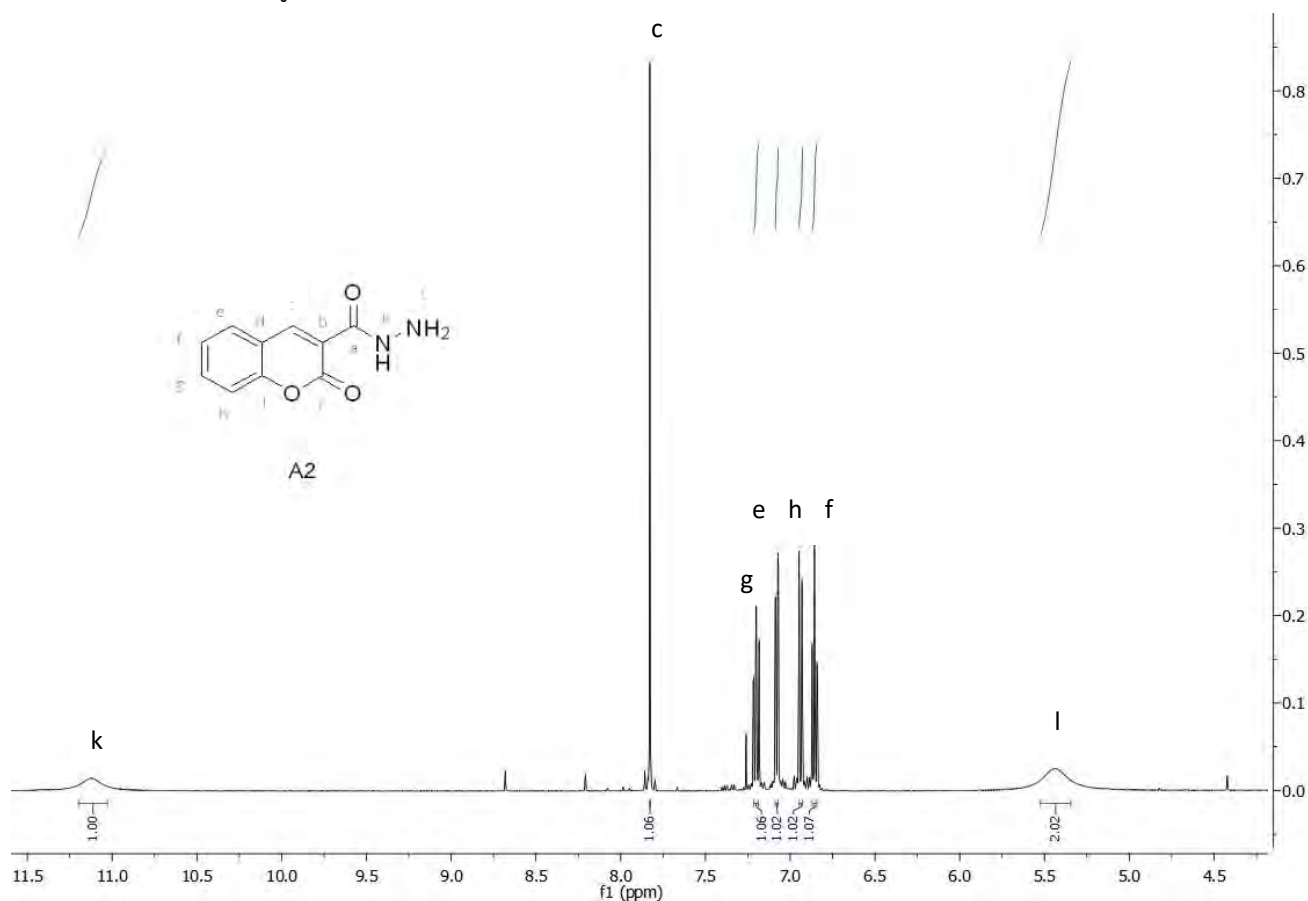
หมายเหตุ – เมื่อสังเคราะห์สารได้แล้ว ไม่ควรนำสารมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ที่ใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ เนื่องจากผู้วิจัยได้ทดลองทำแล้วพบว่าสารสลายตัวในคอลัมน์ ทั้งนี้คาดว่าซิลิกาเจลมีความเป็นกรด สารผลิตภัณฑ์ A2 จึงเกิด interaction กับซิลิกา ทำให้สารมีสลายตัวติดคอลัมน์

กลไกการเกิดปฏิกิริยาของการสังเคราะห์โมเลกุล **A2** สามารถแสดงได้ดังแผนภาพที่ 3.9 โดยเกิดปฏิกิริยา nucleophilic substitution ที่อะตอมคาร์บอนบนหมู่คาร์บอนิลของเอสเทอร์สาร **A1** โดยมีอะตอมไนโตรเจนของ hydrazine ทำหน้าที่เป็นนิวคลีโอไฟล์ จึงเกิดพันธะระหว่าง N-C ของหมู่คาร์บอนิล ได้เป็นสารผลิตภัณฑ์ **A2**



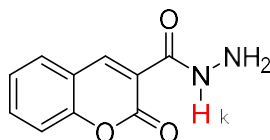
แผนภาพที่ 3.9 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาร **A2**

จากนั้นพิสูจน์เอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ **A2** ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ พบว่า มีสัญญาณของโปรตอนทั้งหมด 5 สัญญาณ แสดงได้ดังรูปที่ 3.10 ดังนี้



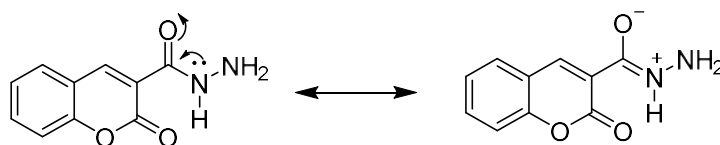
รูปที่ 3.10 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสาร **A2**

จะเห็นได้ว่าสัญญาณของโปรตอนที่ 11.16 ppm (H_k) เป็นสัญญาณโปรตอนที่อยู่บนอะตอมไนโตรเจนของไฮดราไซด์ มีลักษณะสัญญาณ broad โดยสัญญาณของโปรตอนชนิดนี้มีค่า downfield มากที่สุด (มีค่า chemical shift สูงที่สุด)



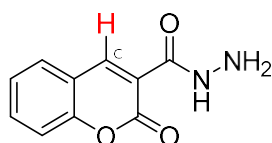
รูปที่ 3.11 $^1\text{H-NMR}$ ที่ตำแหน่ง H_k ของสาร A2

เนื่องจากเกิดการเรโซแนนซ์ไปยังหมู่คาร์บอนิลของอะตอมไนโตรเจน และผล inductive effect ของหมู่เอมีนซึ่งเป็นหมู่แทนที่ที่มีความสามารถในการดึงอิเล็กตรอน



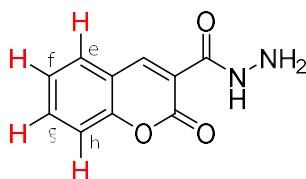
รูปที่ 3.12 แสดงการเรโซแนนซ์

สัญญาณของโปรตอนที่ 7.86 ppm (H_c) เป็นสัญญาณโปรตอนที่อยู่บนอะตอมคาร์บอนชนิด sp^2 บนวง pyranone มีลักษณะเป็น singlet เนื่องจากไม่มีโปรตอนข้างเคียง โดยเป็นโปรตอนที่ได้รับผล anisotropy จากวง aromatic และ inductive effect จากหมู่คาร์บอนิล



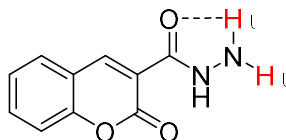
รูปที่ 3.13 $^1\text{H-NMR}$ ที่ตำแหน่ง H_c ของสาร A2

สัญญาณของโปรตอนที่ 7.26 – 7.21, 7.11, 6.97, 6.91 – 6.86 ppm เป็นสัญญาณโปรตอนที่อยู่บนอะตอมคาร์บอนชนิด sp^2 ของวง aromatic โดยสัญญาณที่ 7.26 – 7.21 ppm (H_g) และ 6.91 – 6.86 ppm (H_f) มีลักษณะเป็น triplet เนื่องจากเป็นโปรตอนอยู่ติดกับโปรตอนข้างเคียงสองตัวบนวง aromatic สัญญาณที่ 7.11 ppm (H_e) และ 6.97 ppm (H_h) มีลักษณะเป็น doublet เนื่องจากเป็นโปรตอนที่อยู่ติดกับโปรตอนข้างเคียงหนึ่งตัวบนวง aromatic



รูปที่ 3.14 $^1\text{H-NMR}$ ที่ตำแหน่ง H_e , H_f , H_g , H_h ของสาร A2

ส่วนสัญญาณที่ของโปรตอนที่ 5.40 ppm (H_l) เป็นสัญญาณโปรตอนที่อยู่บนอะตอมไนโตรเจนของไฮโดรไรด์ มีลักษณะสัญญาณ broad โดยสัญญาณของโปรตอนชนิดนี้มีค่า chemical shift ต่ำที่สุด เนื่องจากผลของการเกิดพันธะไฮโดรเจน

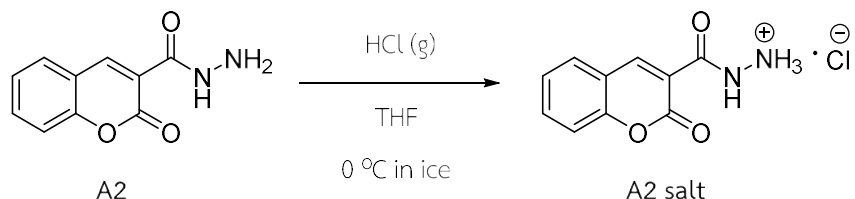


รูปที่ 3.15 $^1\text{H-NMR}$ ที่ตำแหน่ง H_l ของสาร A2

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาถึง integration ของสัญญาณทั้ง 5 พบว่า integration ตรงกับจำนวนของโปรตอนแต่ละชนิด จำนวนโปรตอนบนวง aromatic เท่ากับ 5 ในขณะที่ hydrazide proton เท่ากับ 3 เป็นการยืนยันว่าเป็นสาร A2 จริง

3.2.3 การสังเคราะห์ 2-oxo-2*H*-chromene-3-carbohydrazide (A2) ให้อยู่ในรูปเกลือ (A2 salt)

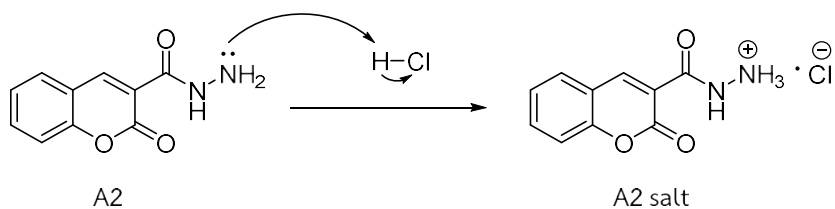
เนื่องจากสารผลิตภัณฑ์ A2 สลายตัวได้ง่าย จึงวางแผนสังเคราะห์สารผลิตภัณฑ์ A2 ให้อยู่ในรูปเกลือ เพื่อเพิ่มความเสถียร และความสามารถในการละลายน้ำ ดังรูปที่ 3.16



รูปที่ 3.16 การสังเคราะห์ 2-oxo-2*H*-chromene-3-carbohydrazide (A2) ให้อยู่ในรูปเกลือ (A2 salt)

การเกิดปฏิกิริยา Protonation ระหว่าง 2-oxo-2*H*-chromene-3-carbohydrazide (A2) กับแก๊ส HCl ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่าง H₂SO₄ (conc.) กับ NaCl ซึ่งเกิดปฏิกิริยารุนแรง แก๊ส HCl ที่ได้มาจะทำหน้าที่ป้องกันหมู่ไฮดราไซด์ ทำให้สารผลิตภัณฑ์เกิดความเสถียรและเกิดเป็นรูปตะกอน ซึ่งสามารถแยกสารออกได้ง่ายกว่าการใช้เป็นสารละลาย HCl เนื่องจากทำให้สารผลิตภัณฑ์ละลายอยู่ในน้ำแยกออกได้ยาก โดยเริ่มจากนำสาร A2 มาละลายในตัวทำละลาย THF ในน้ำแข็ง แล้วเติมแก๊ส HCl จะสังเกตเห็นฟองแก๊ส HCl เกิดขึ้น หลังจากนั้นสารละลายจะค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีเหลืองพร้อมทั้งเกิดตะกอนสีขาว (A2 salt)

กลไกการเกิดปฏิกิริยาของการสังเคราะห์โมเลกุล A2 salt สามารถแสดงได้ดังแผนภาพที่ 3.17 โดย HCl ทำหน้าเป็นกรดไป protonate ที่อะตอมไนโตรเจนของไฮดราไซด์ จึงเกิดพันธะระหว่าง N-H กลายเป็นอิเล็กโตรไฟล์ จับกับแอนไอออน ได้เป็นสารผลิตภัณฑ์ A2 salt



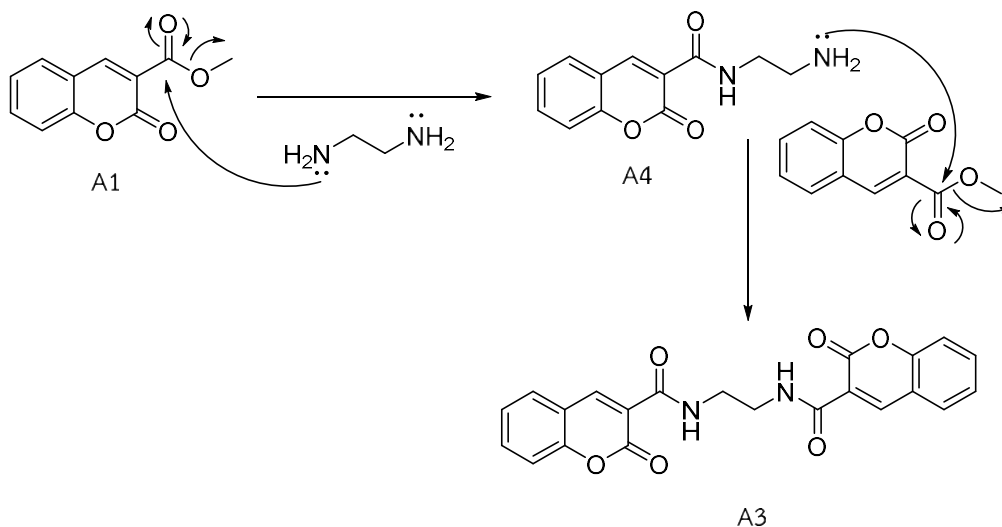
แผนภาพที่ 3.17 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาร A2 salt

การศึกษาปฏิกิริยาระหว่าง A1 กับ Aliphatic amine

3.2.4 การสังเคราะห์ *N,N'*-(ethane-1,2-diyl)bis(2-oxo-2*H*-chromene-3-carboxamide) (A3)

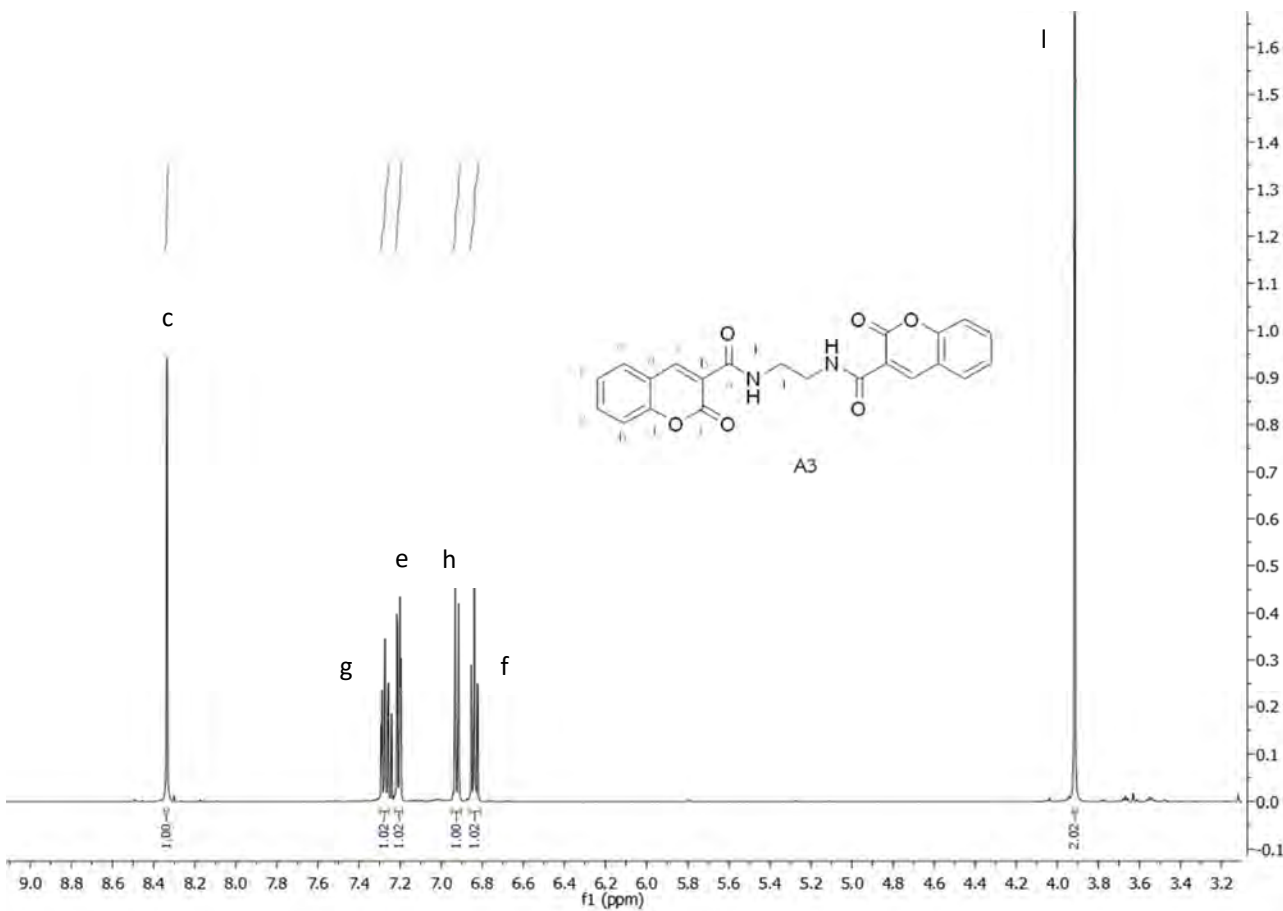
การสังเคราะห์ *N,N'*-(ethane-1,2-diyl)bis(2-oxo-2*H*-chromene-3-carboxamide) (A3) จากปฏิกิริยา Nucleophilic substitution ของ methyl 2-oxo-2*H*-chromene-3-carboxylate (A1) ด้วย ethylenediamine ในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 คนสารละลายที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน จากนั้นทำสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วยการสกัด จะได้ผลิตภัณฑ์ A3 เป็นของแข็งสีเหลือง คิดเป็น % yield เท่ากับ 57 ทั้งนี้สาเหตุในการสูญเสีย yield ของสารดังกล่าว เกิดขึ้นจากกระบวนการทำสารให้บริสุทธิ์ผ่านเทคนิคการสกัด อาจมีสารผลิตภัณฑ์บางส่วนหลงเหลืออยู่ในชั้นน้ำ หรือ เกิดเป็นสารที่ตัวอื่นที่ไม่ต้องการ

กลไกการเกิดปฏิกิริยาของการสังเคราะห์โมเลกุล A3 สามารถแสดงได้ดังแผนภาพที่ 3.18 โดยเกิดปฏิกิริยา nucleophilic substitution ที่อะตอมคาร์บอนบนหมู่คาร์บอนิลของเอสเทอร์สาร A1 โดยมีอะตอมไนโตรเจนของ ethylenediamine ทำหน้าที่เป็นนิวคลีโอไฟล์ จึงเกิดพันธะระหว่าง N-C ของหมู่คาร์บอนิล เกิดเป็นสารหมายเลข A4 จากนั้นอะตอมไนโตรเจนของสาร A4 ทำหน้าที่เป็นนิวคลีโอไฟล์ เกิดปฏิกิริยา nucleophilic substitution ที่อะตอมคาร์บอนบนหมู่คาร์บอนิลของเอสเทอร์สาร A1 ได้เป็นสารผลิตภัณฑ์ A3



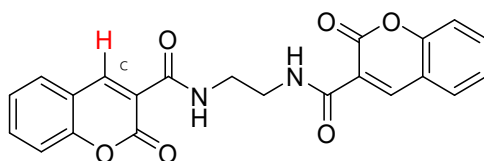
แผนภาพที่ 3.18 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาร A3

จากนั้นพิสูจน์เอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ **A3** ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ พบว่า มีสัญญาณของโปรตอนทั้งหมด 4 สัญญาณ แสดงได้ดังรูปที่ 3.19 ดังนี้



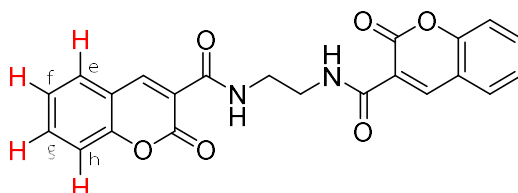
รูปที่ 3.19 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสาร **A3**

จะเห็นว่า สัญญาณของโปรตอนที่ 8.34 ppm (H_c) เป็นสัญญาณโปรตอนที่อยู่บนอะตอมคาร์บอนชนิด sp^2 บนวง pyranone มีลักษณะเป็น singlet เนื่องจากไม่มีโปรตอนข้างเคียง โดยสัญญาณของโปรตอนชนิดนี้ downfield มากที่สุด (มีค่า chemical shift สูงที่สุด) เนื่องจากได้รับผล anisotropy จากวง aromatic และ inductive effect จากหมู่คาร์บอนิลของเอสเทอร์



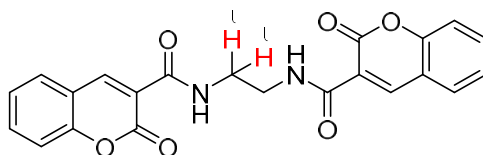
รูปที่ 3.20 $^1\text{H-NMR}$ ที่ตำแหน่ง H_c ของสาร **A3**

สัญญาณของโปรตอนที่ 7.30 – 7.25, 7.21, 6.92, 6.85 – 6.81 ppm เป็นสัญญาณโปรตอนที่อยู่บนอะตอมคาร์บอนชนิด sp^2 ของวง aromatic โดยสัญญาณที่ 7.30 – 7.25 ppm (H_g) และ 6.85 – 6.81 ppm (H_f) มีลักษณะเป็น triplet เนื่องจากเป็นโปรตอนอยู่ติดกับโปรตอนข้างเคียงสองตัวบนวง aromatic สัญญาณที่ 7.21 ppm (H_e) และ 6.92 ppm (H_h) มีลักษณะเป็น doublet เนื่องจากเป็นโปรตอนที่อยู่ติดกับโปรตอนข้างเคียงหนึ่งตัวบนวง aromatic



รูปที่ 3.21 $^1\text{H-NMR}$ ที่ตำแหน่ง H_e , H_f , H_g , H_h ของสาร A3

ส่วนสัญญาณที่ของโปรตอนที่ 3.92 ppm (H_l) เป็นสัญญาณโปรตอนที่อยู่บนอะตอมคาร์บอนชนิด sp^3 บนหมู่เมทิลีน มีลักษณะเป็น singlet เนื่องจากไม่มีโปรตอนข้างเคียง สัญญาณของโปรตอนชนิดนี้มีค่า chemical shift ต่ำที่สุด เนื่องจากเป็นโปรตอนเพียงชนิดเดียวที่ไม่อยู่ติดกับวง aromatic และอยู่บนอะตอมของคาร์บอนที่มีไฮบริดเซชันชนิด sp^3



รูปที่ 3.22 $^1\text{H-NMR}$ ที่ตำแหน่ง H_l ของสาร A3

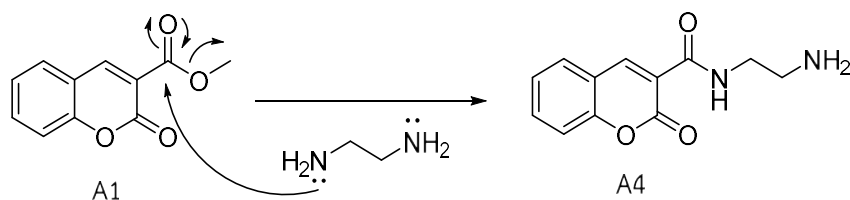
นอกจากนี้เมื่อพิจารณาถึง integration ของสัญญาณทั้ง 4 พบว่า integration ตรงกับจำนวนของโปรตอนแต่ละชนิด จำนวนโปรตอนบนวง aromatic เท่ากับ 5 ในขณะที่ aliphatic proton เท่ากับ 3 เป็นการยืนยันว่าเป็นสาร A3 จริง

การศึกษาปฏิกิริยาระหว่าง A1 กับ Aliphatic amine

3.2.5 การสังเคราะห์ *N*-(2-aminoethyl)-2-oxo-2*H*-chromene-3-carboxamide (A4)

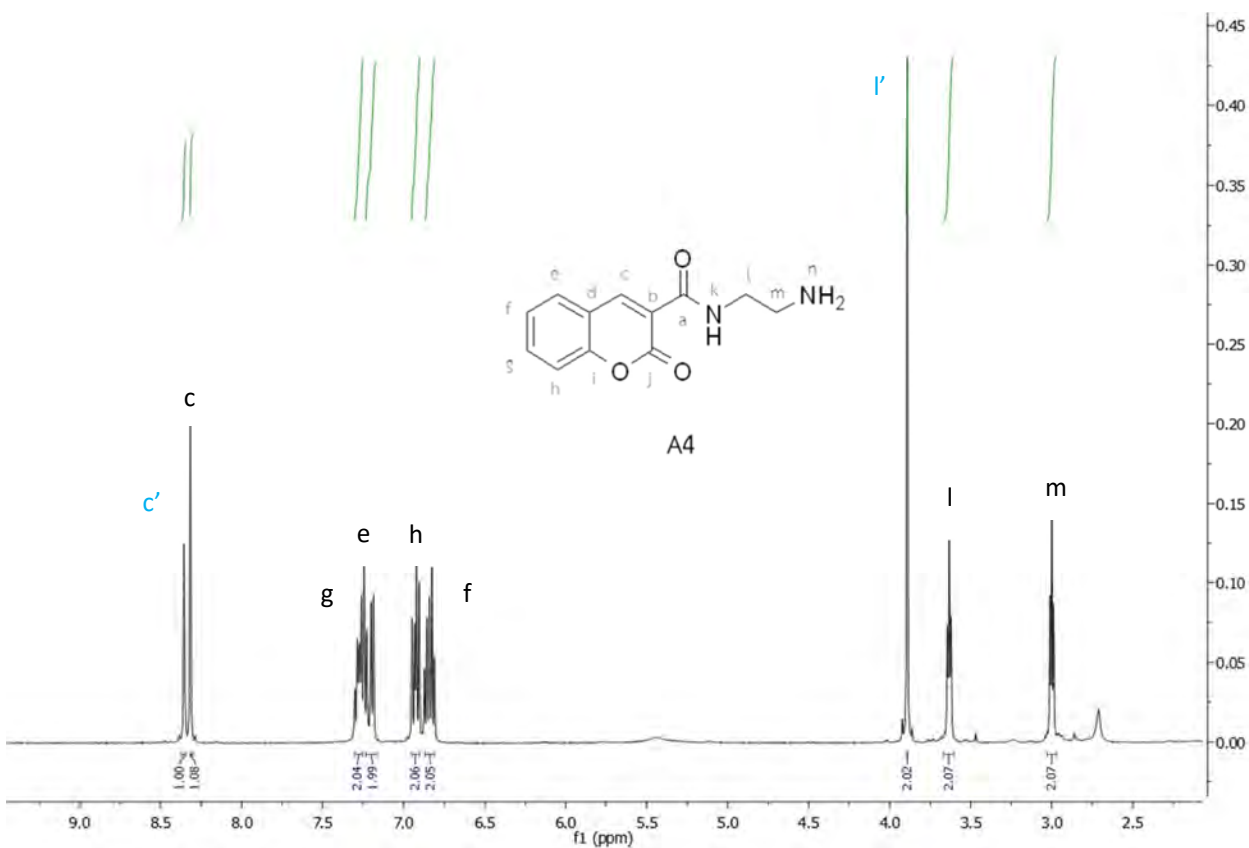
การสังเคราะห์ *N*-(2-aminoethyl)-2-oxo-2*H*-chromene-3-carboxamide (A4) จากปฏิกิริยา Nucleophilic substitution ของ methyl 2-oxo-2*H*-chromene-3-carboxylate (A1) ด้วย ethylenediamine โดยใช้ตัวทำละลายเป็น ethylenediamine ปริมาณมากเกินพอ คนสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วยการสกัด จะได้ผลิตภัณฑ์ A4 เป็นของแข็งสีเหลือง คิดเป็น % yield เท่ากับ 73 ทั้งนี้สาเหตุในการสูญเสีย yield ของสารดังกล่าวเกิดขึ้นจากกระบวนการทำสารให้บริสุทธิ์ผ่านเทคนิคการสกัด อาจมีสารผลิตภัณฑ์บางส่วนหลงเหลืออยู่ในชั้นน้ำ หรือเกิดเป็นสารที่ตัวอื่นที่ไม่ต้องการ

กลไกการเกิดปฏิกิริยาของการสังเคราะห์โมเลกุล A4 สามารถแสดงได้ดังแผนภาพที่ 3.23 โดยเกิดปฏิกิริยา nucleophilic substitution ที่อะตอมคาร์บอนบนหมู่คาร์บอนิลของเอสเทอร์สาร A1 โดยมีอะตอมไนโตรเจนของ ethylenediamine ทำหน้าที่เป็นนิวคลีโอไฟล์ จึงเกิดพันธะระหว่าง N-C ของหมู่คาร์บอนิล ได้เป็นสารผลิตภัณฑ์ A4



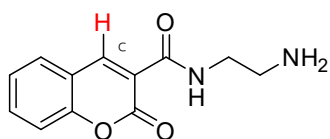
แผนภาพที่ 3.23 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาร A4

จากนั้นพิสูจน์เอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ A4 ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ พบว่า มีสัญญาณของโปรตอนทั้งหมด 5 สัญญาณ แสดงได้ดังรูปที่ 3.24 ดังนี้



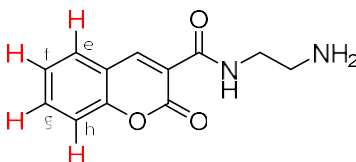
รูปที่ 3.24 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสาร A4

จะเห็นได้ว่า สัญญาณของโปรตอนที่ 8.32 ppm (H_c) เป็นสัญญาณโปรตอนที่อยู่บนอะตอมคาร์บอนชนิด sp^2 บนวง pyranone มีลักษณะเป็น singlet เนื่องจากไม่มีโปรตอนข้างเคียง โดยสัญญาณของโปรตอนชนิดนี้ downfield มากที่สุด (มีค่า chemical shift สูงที่สุด) เนื่องจากได้รับผล anisotropy จากวง aromatic และ inductive effect จากหมู่คาร์บอนิลของเอสเทอร์



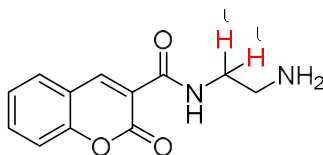
รูปที่ 3.25 $^1\text{H-NMR}$ ที่ตำแหน่ง H_c ของสาร A4

สัญญาณของโปรตอนที่ 7.33 – 7.24, 7.19, 6.93, 6.88 – 6.80 ppm เป็นสัญญาณโปรตอนที่อยู่บนอะตอมคาร์บอนชนิด sp^2 ของวง aromatic โดยสัญญาณที่ 7.33 – 7.24 ppm (H_g) และ 6.88 – 6.80 ppm (H_f) มีลักษณะเป็น triplet เนื่องจากเป็นโปรตอนอยู่ติดกับโปรตอนข้างเคียงสองตัวบนวง aromatic สัญญาณที่ 7.19 ppm (H_e) และ 6.93 ppm (H_h) มีลักษณะเป็น doublet เนื่องจากเป็นโปรตอนที่อยู่ติดกับโปรตอนข้างเคียงหนึ่งตัวบนวง aromatic



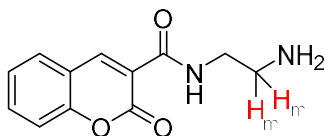
รูปที่ 3.26 $^1\text{H-NMR}$ ที่ตำแหน่ง H_e , H_f , H_g , H_h ของสาร A4

สัญญาณของโปรตอนที่ 3.63 ppm (H_l) เป็นสัญญาณโปรตอนที่อยู่บนอะตอมคาร์บอนชนิด sp^3 บนหมู่เมทิลีน มีลักษณะเป็น triplet เนื่องจากเป็นโปรตอนอยู่ติดกับโปรตอนข้างเคียงสองตัว มีค่า chemical shift ต่ำ เนื่องจากเป็นโปรตอนที่อยู่ห่างกับวง aromatic และอยู่บนอะตอมของคาร์บอนที่มีไฮบริดเซชันชนิด sp^3 แต่ยังได้รับผล inductive effect ของหมู่เอไมด์ซึ่งเป็นหมู่แทนที่ที่มีความสามารถในการดึงอิเล็กตรอน จึงมีค่า chemical shift สูงกว่าสัญญาณของโปรตอนที่ตำแหน่ง m (H_m)



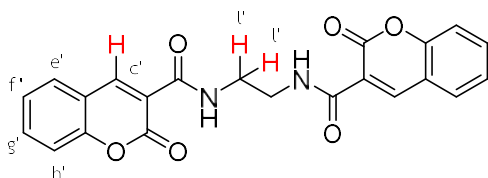
รูปที่ 3.27 $^1\text{H-NMR}$ ที่ตำแหน่ง H_l ของสาร A4

ส่วนสัญญาณของโปรตอนที่ 3.00 ppm (H_m) เป็นสัญญาณโปรตอนที่อยู่บนอะตอมคาร์บอนชนิด sp^3 บนหมู่เมทิลีน มีลักษณะเป็น triplet เนื่องจากเป็นโปรตอนอยู่ติดกับโปรตอนข้างเคียงสองตัว สัญญาณของโปรตอนชนิดนี้มีค่า chemical shift ต่ำที่สุด เนื่องจากเป็นโปรตอนที่อยู่ห่างกับวง aromatic และอยู่บนอะตอมของคาร์บอนที่มีไฮบริดเซชันชนิด sp^3



รูปที่ 3.28 $^1\text{H-NMR}$ ที่ตำแหน่ง H_m ของสาร A4

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาถึง integration ของสัญญาณทั้ง 5 พบว่า integration ไม่ตรงกับจำนวนของโปรตอนแต่ละชนิด จากรูปที่ 3.24 จะเห็นสัญญาณของโปรตอนที่ 8.36 และ 3.89 ppm ทำให้ทราบว่าสาร A4 ยังไม่บริสุทธิ์ คาดว่าเป็นสารผสมระหว่าง A3 กับ A4 เนื่องจากผลของ integration โปรตอนที่อยู่บนอะตอมคาร์บอนชนิด sp^2 ของวง aromatic (H_e, H_f, H_g, H_h) แต่ละตำแหน่งมีจำนวน 2 โปรตอน แสดงให้เห็นการซ้อนทับกันของสัญญาณโปรตอน ณ ตำแหน่งเหล่านี้ และสัญญาณของโปรตอนที่ 8.36 ppm (H_c) เป็นสัญญาณโปรตอนที่อยู่บนอะตอมคาร์บอนชนิด sp^2 บนวง pyranone มีลักษณะเป็น singlet เนื่องจากไม่มีโปรตอนข้างเคียง โดยสัญญาณของโปรตอนชนิดนี้ downfield มากที่สุด เนื่องจากได้รับผล anisotropy จากวง aromatic และ inductive effect จากหมู่คาร์บอนิลของเอสเทอร์ ส่วนสัญญาณของโปรตอนที่ 3.89 ppm (H_i) เป็นสัญญาณโปรตอนที่อยู่บนอะตอมคาร์บอนชนิด sp^3 บนหมู่เมทิลีน มีลักษณะเป็น singlet เนื่องจากไม่มีโปรตอนข้างเคียง สัญญาณของโปรตอนชนิดนี้มีค่า chemical shift ต่ำ เนื่องจากเป็นโปรตอนที่ไม่มีอยู่ติดกับวง aromatic และอยู่บนอะตอมของคาร์บอนที่มีไฮบริดเซชันชนิด sp^3



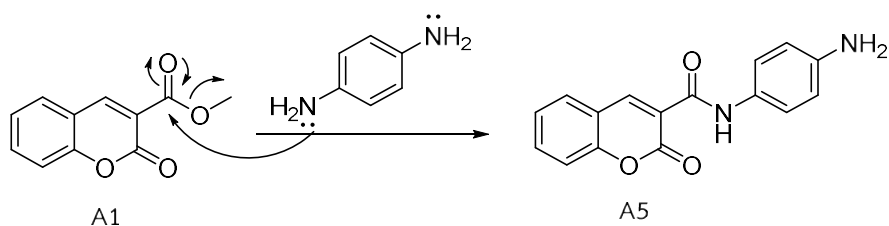
รูปที่ 3.29 $^1\text{H-NMR}$ ที่ตำแหน่ง $H_{c'}$ กับ $H_{i'}$ ของสาร A3

การศึกษาปฏิกิริยาระหว่าง A1 กับ Aromatic amine

3.2.6 การสังเคราะห์ *N*-(4-aminophenyl)-2-oxo-2*H*-chromene-3-carboxamide (A5)

การสังเคราะห์ *N*-(4-aminophenyl)-2-oxo-2*H*-chromene-3-carboxamide (A5) จากปฏิกิริยา Nucleophilic substitution ของ methyl 2-oxo-2*H*-chromene-3-carboxylate (A1) ด้วย PPD ในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 คนสารละลายที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน จากนั้นทำสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์โดยการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี พบว่าสารออกแบบ tailing ทำให้หลอดหนึ่งมีปริมาณสารน้อย เมื่อนำไปทดสอบกับแผ่น TLC ทำให้ไม่เห็น spot สาร จึงต้องนำไปกำจัดตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนก่อนเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของสาร ส่งผลให้เกิดการทิ้งสารไปในบางส่วน และสารแยกได้ไม่ดี เกิดอันตรกิริยากับซิลิกาซึ่งเป็นเฟสคงที่ทำให้สารติดอยู่ภายในคอลัมน์เป็นจำนวนมาก ไม่สามารถนำมาคิดเป็น % yield ได้ ส่วนสารที่สารสามารถแยกออกมาได้มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองส้ม หลังจากนั้นนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ แต่พบว่าสารเปลี่ยนสีจากสีเหลืองส้มเป็นสีน้ำตาล ระหว่างรอเตรียมสารเพื่อนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ จนไม่ใช่สารผลิตภัณฑ์ A5 ที่ต้องการ ทั้งนี้คาดว่าเกิดผลมาจากสารสัมผัสอากาศ ทำให้หมู่เอมีนถูกออกซิไดส์ได้

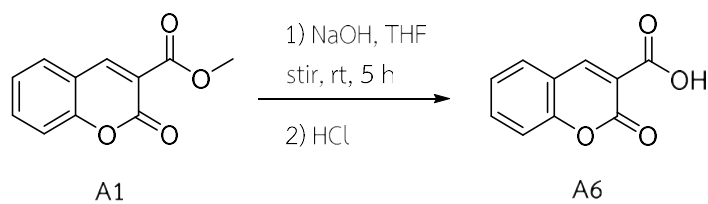
กลไกการเกิดปฏิกิริยาของการสังเคราะห์โมเลกุล A5 สามารถแสดงได้ดังแผนภาพที่ 3.30 โดยเกิดปฏิกิริยา nucleophilic substitution ที่อะตอมคาร์บอนบนหมู่คาร์บอนิลของเอสเทอร์สาร A1 โดยมีอะตอมไนโตรเจนของ PPD ทำหน้าที่เป็นนิวคลีโอไฟล์ จึงเกิดพันธะระหว่าง N-C ของหมู่คาร์บอนิล ได้เป็นสารผลิตภัณฑ์ A5



รูปที่ 3.30 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาร A5

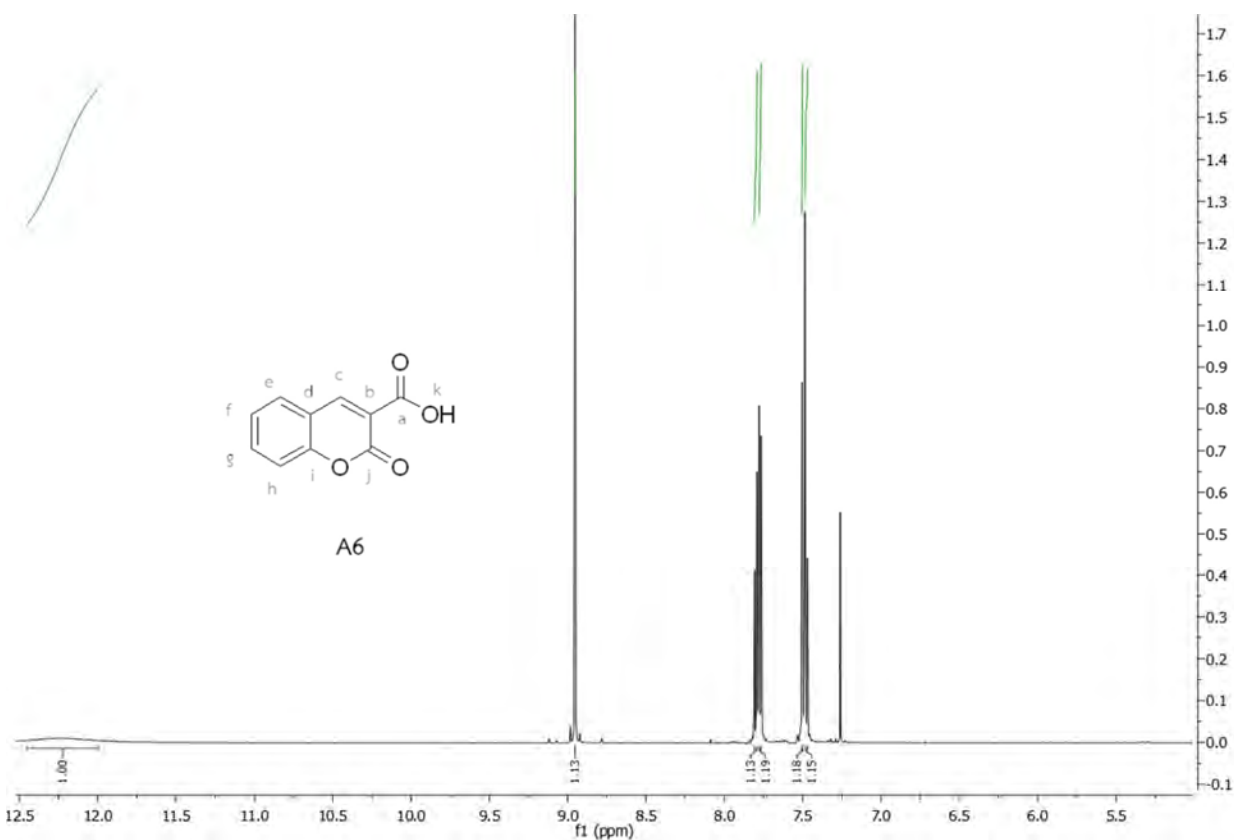
3.2.7 การสังเคราะห์ 2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid (A6)

การสังเคราะห์ 2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid (A6) จากปฏิกิริยา Hydrolysis ของ methyl 2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (A1) ในตัวทำละลาย THF คนสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นทำสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์โดยการสกัดด้วย CH_2Cl_2 และน้ำ เก็บชั้นน้ำมาหยด HCl จะได้ผลิตภัณฑ์ A6 เป็นของแข็งสีขาว คิดเป็น % yield เท่ากับ 96



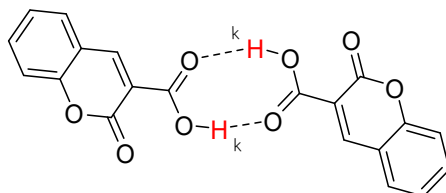
รูปที่ 3.31 การสังเคราะห์ 2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid (A6)

จากนั้นพิสูจน์เอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ A6 ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ พบว่า มีสัญญาณของโปรตอนทั้งหมด 4 สัญญาณ แสดงได้ดังรูปที่ 3.32 ดังนี้



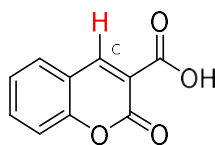
รูปที่ 3.32 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสาร A6

จะเห็นได้ว่า สัญญาณของโปรตอนที่ 12.25 ppm (H_k) เป็นสัญญาณโปรตอนที่อยู่บนอะตอมออกซิเจนของคาร์บอกซิลิก มีลักษณะสัญญาณ broad โดยสัญญาณของโปรตอนชนิดนี้ downfield มากที่สุด (มีค่า chemical shift สูงที่สุด) เนื่องจาก ผลของ inductive effect และพันธะไฮโดรเจนจากการอยู่ในรูปไดเมอร์



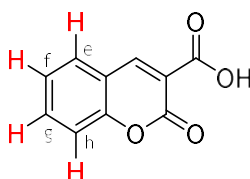
รูปที่ 3.33 $^1\text{H-NMR}$ ที่ตำแหน่ง H_k ของสาร A6

สัญญาณของโปรตอนที่ 8.95 ppm (H_c) เป็นสัญญาณโปรตอนที่อยู่บนอะตอมคาร์บอนชนิด sp^2 บนวง pyranone มีลักษณะเป็น singlet เนื่องจากไม่มีโปรตอนข้างเคียง โดยเป็นโปรตอนที่ได้รับผล anisotropy จากวง aromatic และ inductive effect จากหมู่คาร์บอนิล



รูปที่ 3.34 $^1\text{H-NMR}$ ที่ตำแหน่ง H_c ของสาร A6

สัญญาณของโปรตอนที่ 7.81 – 7.78, 7.77, 7.50, 7.49 – 7.47 ppm เป็นสัญญาณโปรตอนที่อยู่บนอะตอมคาร์บอนชนิด sp^2 ของวง aromatic โดยสัญญาณที่ 7.81 – 7.78 ppm (H_g) และ 7.49 – 7.47 ppm (H_f) มีลักษณะเป็น triplet เนื่องจากเป็นโปรตอนอยู่ติดกับโปรตอนข้างเคียงสองตัวบนวง aromatic สัญญาณที่ 7.77 ppm (H_e) และ 7.50 ppm (H_h) มีลักษณะเป็น doublet เนื่องจากเป็นโปรตอนที่อยู่ติดกับโปรตอนข้างเคียงหนึ่งตัวบนวง aromatic



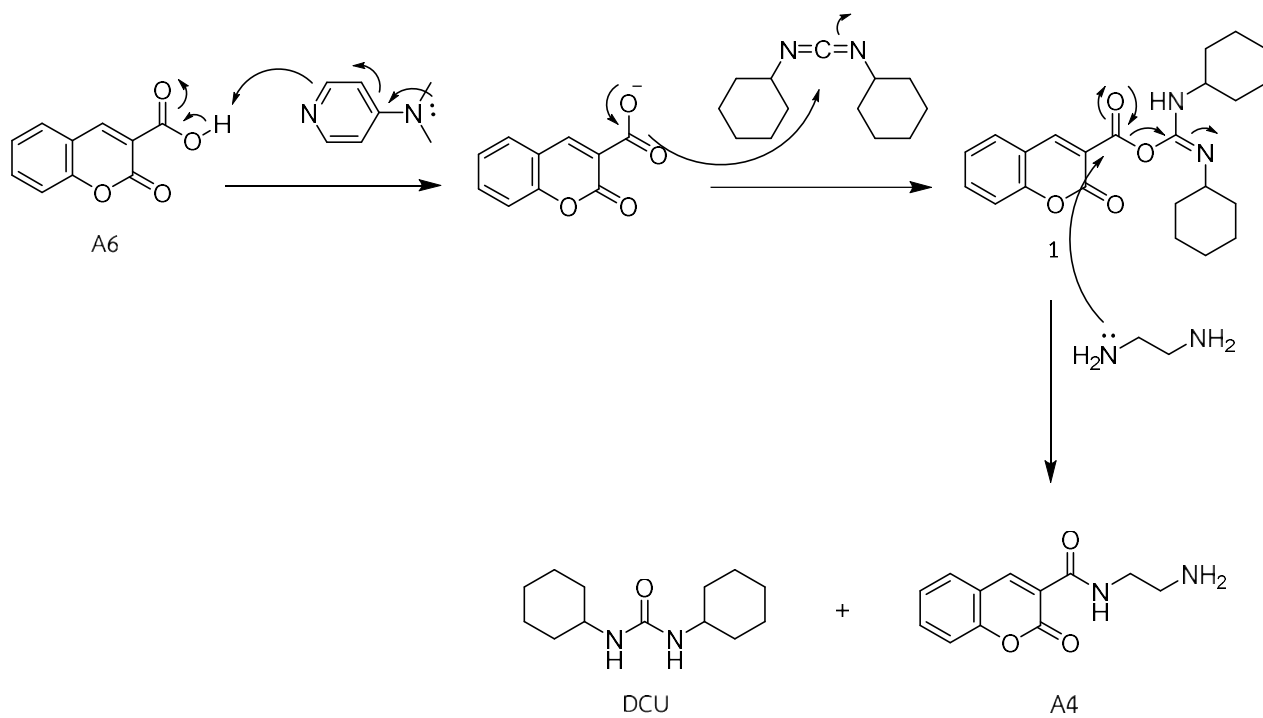
รูปที่ 3.35 $^1\text{H-NMR}$ ที่ตำแหน่ง H_e, H_f, H_g, H_h ของสาร A6

การศึกษาปฏิกิริยาของ A6 กับ Aliphatic amine

3.2.8 การสังเคราะห์ *N*-(2-aminoethyl)-2-oxo-2*H*-chromene-3-carboxamine (A4)

การสังเคราะห์ *N*-(2-aminoethyl)-2-oxo-2*H*-chromene-3-carboxamine (A4) จากปฏิกิริยา Nucleophilic substitution ระหว่าง 2-oxo-2*H*-chromene-3-carboxylic acid (A6) กับ ethylenediamine ในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 โดยใช้ 4-*N'*-dimethylaminopyridine (DMAP) ทำหน้าที่เป็นเบสที่ดี นิวคลีโอไฟล์ที่แย่ และ *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) ทำหน้าที่ช่วยให้ leaving group (-OH) หลุดออกง่าย โดยคนสารละลายในน้ำแข็งเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วเติม ethylenediamine คนสารละลายที่อุณหภูมิห้องทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นทำสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วยการสกัดและการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี พบว่าสารแยกได้ไม่ตี เกิดอันตรกิริยากับซิลิกาซึ่งเป็นเฟสคงที่ทำให้สารติดอยู่ภายในคอลัมน์เป็นจำนวนมาก ไม่สามารถนำมาคิดเป็น % yield ได้ ส่วนสารที่สารสามารถแยกออกมาได้มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง หลังจากนั้นนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ พบว่าสารละลายตัว จนไม่ใช่สารผลิตภัณฑ์ A4 ที่ต้องการ ทั้งนี้คาดว่าเป็นผลมาจากสารสัมผัสอากาศ ทำให้หมู่เอมีนถูกออกซิไดส์ได้

กลไกการเกิดปฏิกิริยาของการสังเคราะห์โมเลกุล A4 สามารถแสดงได้ดังแผนภาพที่ 3.36 โดยเริ่มจาก DMAP ทำหน้าที่เป็นเบสไป deprotonate ที่หมู่คาร์บอกซิลิกของ A6 ได้เป็น carboxylate จากนั้นเกิดปฏิกิริยา nucleophilic addition ของ carboxylate กับ DCC ได้เป็นสารหมายเลข 1 หลังจากนั้นปฏิกิริยา nucleophilic substitution ของสารหมายเลข 1 โดยอะตอมไนโตรเจนของ ethylenediamine ทำหน้าที่เป็นนิวคลีโอไฟล์ เข้าทำปฏิกิริยาที่อะตอมคาร์บอนบนหมู่คาร์บอนิลของเอสเทอร์ จึงเกิดพันธะระหว่าง N-C ของหมู่คาร์บอนิล ได้เป็นสารผลิตภัณฑ์ A4 และเกิด dicyclohexylurea (DCU) เป็น by-product

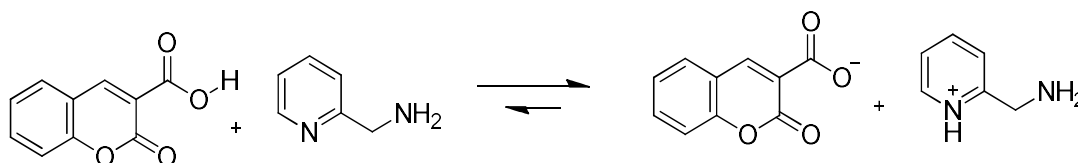


แผนภาพที่ 3.36 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาร A4

การศึกษาปฏิกิริยาของ A6 กับ Heterocyclic aliphatic amine

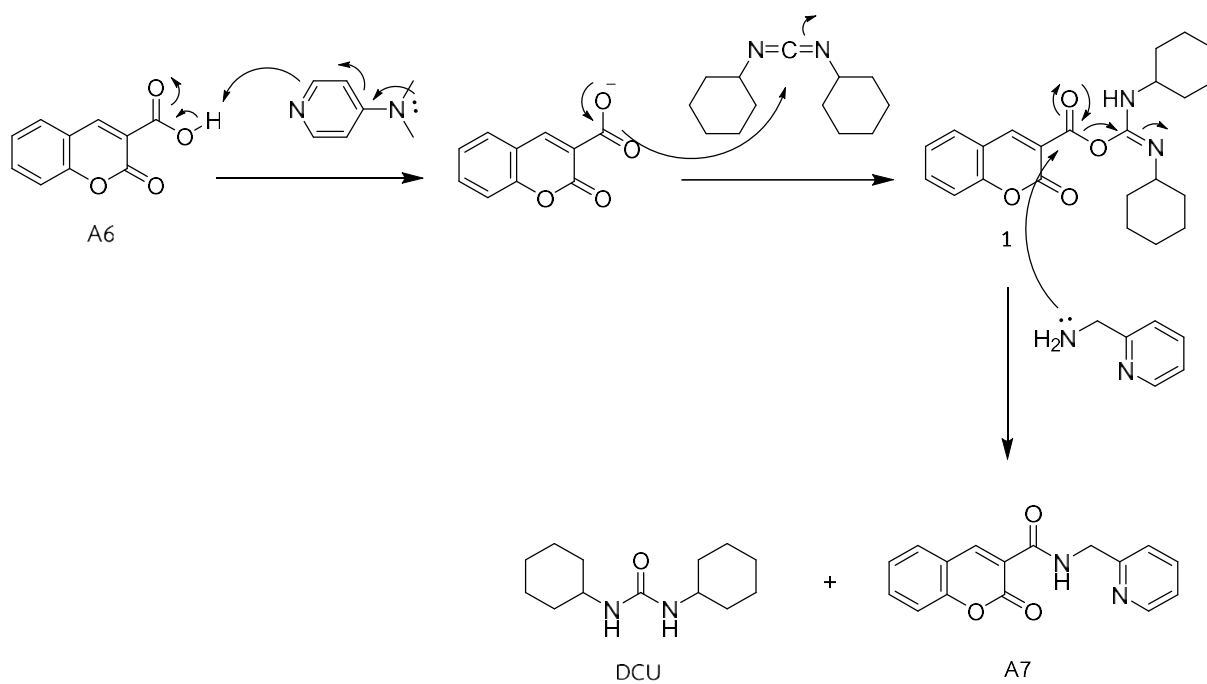
3.2.9 การสังเคราะห์ 2-oxo-N-(pyridine-2-ylmethyl)-2H-chromene-3-carboxamide (A7)

การสังเคราะห์ 2-oxo-N-(pyridine-2-ylmethyl)-2H-chromene-3-carboxamide (A7) จากปฏิกิริยา Nucleophilic substitution ระหว่าง 2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid (A6) กับ 2-Picolylamine ในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 โดยใช้ 4-N'-dimethylaminopyridine (DMAP) ทำหน้าที่เป็นเบส และ N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) ทำหน้าที่ช่วยให้ leaving group (-OH) หลุดออกง่าย โดยคนสารละลายในน้ำแข็งเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วเติม 2-Picolylamine คนสารละลายที่อุณหภูมิห้องทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นทำสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วยการสกัดและการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้อะลูมินาเป็นเฟสคงที่ เนื่องจากสารละลายตัวได้ในซิลิกาซึ่งมีความเป็นกรด ได้สารผลิตภัณฑ์ A7 เป็นของแข็งสีขาว คิดเป็น % yield เท่ากับ 6 ทั้งนี้สาเหตุในการสูญเสีย yield ของสารดังกล่าวเกิดขึ้นจากวง pyridine มีความเป็นเบส อาจถูก protonated โดยโปรตอนของสาร A6 ได้ ดังรูปที่ 3.37 ทำให้ 2-Picolylamine อยู่ในรูปเกลือที่มีประจุบวก ส่งผลให้ความเป็นนิวคลีโอไฟล์ของเอมีนลดลง มีโอกาสเกิดเป็นสาร A7 ได้น้อยลง อีกทั้งผลจากกระบวนการทำสารให้บริสุทธิ์หลายครั้ง ทำให้เกิดการสูญเสียสารผลิตภัณฑ์ A7



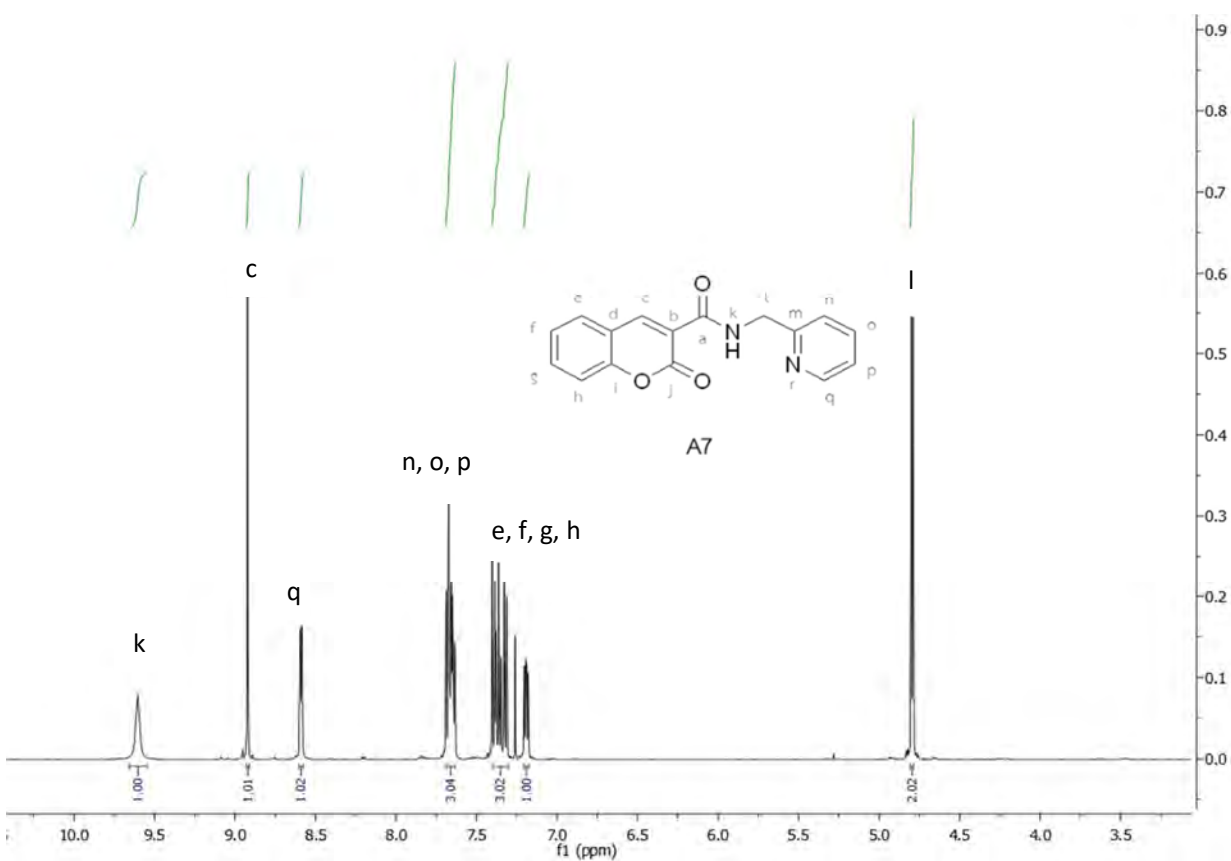
รูปที่ 3.37 แสดงการจับโปรตอนของวง pyridine

กลไกการเกิดปฏิกิริยาของการสังเคราะห์โมเลกุล A7 สามารถแสดงได้ดังแผนภาพที่ 3.38 โดยเริ่มจาก DMAP ทำหน้าที่เป็นเบสไป deprotonate ที่หมู่คาร์บอกซิลิกของ A6 ได้เป็น carboxylate จากนั้นเกิดปฏิกิริยา nucleophilic addition ของ carboxylate กับ DCC ได้เป็นสารหมายเลข 1 หลังจากนั้นปฏิกิริยา nucleophilic substitution ของสารหมายเลข 1 โดยอะตอมไนโตรเจนของ 2-Picolylamine ทำหน้าที่เป็นนิวคลีโอไฟล์ เข้าทำปฏิกิริยาที่อะตอมคาร์บอนบนหมู่คาร์บอนิลของเอสเทอร์ จึงเกิดพันธะระหว่าง N-C ของหมู่คาร์บอนิล ได้เป็นสารผลิตภัณฑ์ A7 และเกิด dicyclohexylurea (DCU) เป็น by-product



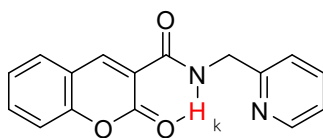
แผนภาพที่ 3.38 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาร A7

จากนั้นพิสูจน์เอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ A7 ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ พบว่า มีสัญญาณของโปรตอนทั้งหมด 5 สัญญาณ แสดงได้ดังรูปที่ 3.39 ดังนี้



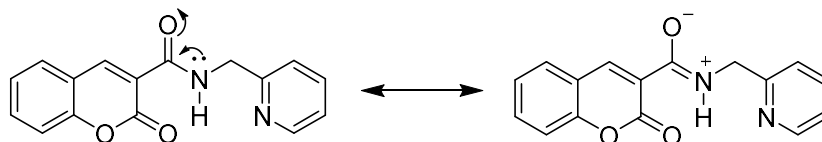
รูปที่ 3.39 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสาร A7

จะเห็นได้ว่า สัญญาณของโปรตอนที่ 9.60 ppm (H_k) เป็นสัญญาณโปรตอนที่อยู่บนอะตอมไนโตรเจนของหมู่เอมีน มีลักษณะสัญญาณ broad โดยสัญญาณของโปรตอนชนิดนี้มีค่า downfield มากที่สุด (มีค่า chemical shift สูงที่สุด) เนื่องจากผลของ hydrogen bond กับหมู่คาร์บอนิล



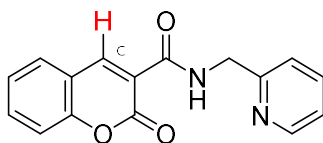
รูปที่ 3.40 $^1\text{H-NMR}$ ที่ตำแหน่ง H_k ของสาร A7

และผลจากการเรโซแนนซ์ไปยังหมู่คาร์บอนิลของอะตอมไนโตรเจน และผล inductive effect ของหมู่เอมีน ซึ่งเป็นหมู่แทนที่ที่มีความสามารถในการดึงอิเล็กตรอน



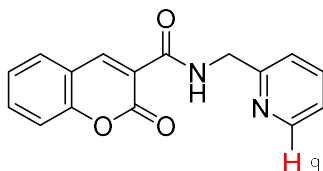
รูปที่ 3.41 แสดงการเรโซแนนซ์

สัญญาณของโปรตอนที่ 8.92 ppm (H_c) เป็นสัญญาณโปรตอนที่อยู่บนอะตอมคาร์บอนชนิด sp^2 บนวง pyranone มีลักษณะเป็น singlet เนื่องจากไม่มีโปรตอนข้างเคียง โดยเป็นโปรตอนที่ได้รับผล anisotropy จากวง aromatic และ inductive effect จากหมู่คาร์บอนิล



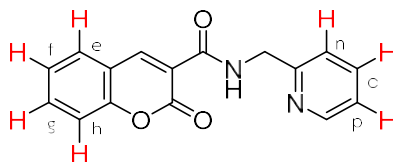
รูปที่ 3.42 $^1\text{H-NMR}$ ที่ตำแหน่ง H_c ของสาร A7

สัญญาณของโปรตอนที่ 8.59 ppm เป็นสัญญาณโปรตอนที่อยู่บนอะตอมคาร์บอนชนิด sp^2 ของวง pyridine มีลักษณะเป็น doublet เนื่องจากเป็นโปรตอนอยู่ติดกับโปรตอนข้างเคียงหนึ่งตัวบนวง pyridine โดยเป็นโปรตอนที่ได้รับผลจากอะตอมไนโตรเจนที่มีความสามารถในการดึงอิเล็กตรอน



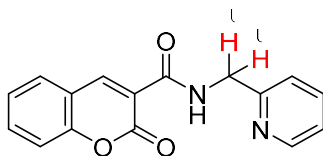
รูปที่ 3.43 $^1\text{H-NMR}$ ที่ตำแหน่ง H_q ของสาร A7

สัญญาณของโปรตอนที่ 7.70 – 7.63 เป็นสัญญาณของโปรตอนอีก 3 อะตอมที่อยู่บนอะตอมคาร์บอนชนิด sp^2 ของวง pyridine ซึ่งมีค่า chemical shift มากกว่าโปรตอนที่อยู่บนอะตอมคาร์บอนชนิด sp^2 บนวง benzene โดยมีสัญญาณของโปรตอนที่ 7.41 – 7.31, 7.19 ppm เนื่องจากวง pyridine ได้รับผลการดึงอิเล็กตรอนของอะตอมไนโตรเจน โดยสัญญาณที่ H_f, H_g, H_o ลักษณะเป็น triplet เนื่องจากเป็นโปรตอนที่อยู่ติดกับโปรตอนข้างเคียงสองตัว สัญญาณที่ H_e, H_n, H_m, H_p มีลักษณะเป็น doublet เนื่องจากเป็นโปรตอนที่อยู่ติดกับโปรตอนข้างเคียงหนึ่งตัว



รูปที่ 3.44 $^1\text{H-NMR}$ ที่ตำแหน่ง $H_e, H_f, H_g, H_h, H_m, H_o, H_p$ ของสาร A7

ส่วนสัญญาณที่ของโปรตอนที่ 4.79 ppm (H_l) เป็นสัญญาณโปรตอนที่อยู่บนอะตอมคาร์บอนชนิด sp^3 บนหมู่เมทิลีน มีลักษณะเป็น doublet เนื่องจากเป็นโปรตอนที่อยู่ติดกับโปรตอนข้างเคียงหนึ่งตัว โดยสัญญาณของโปรตอนชนิดนี้มีค่า chemical shift ต่ำที่สุด



รูปที่ 3.45 $^1\text{H-NMR}$ ที่ตำแหน่ง H_l ของสาร A7

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาถึง integration ของสัญญาณทั้ง 5 พบว่า integration ตรงกับจำนวนของโปรตอนแต่ละชนิด จำนวนโปรตอนบนหมู่เอมีน เท่ากับ 1, บนวง aromatic เท่ากับ 5, บนวง pyridine เท่ากับ 4 และ aliphatic proton เท่ากับ 2 เป็นการยืนยันว่าเป็นสาร A7 จริง

บทที่ 4

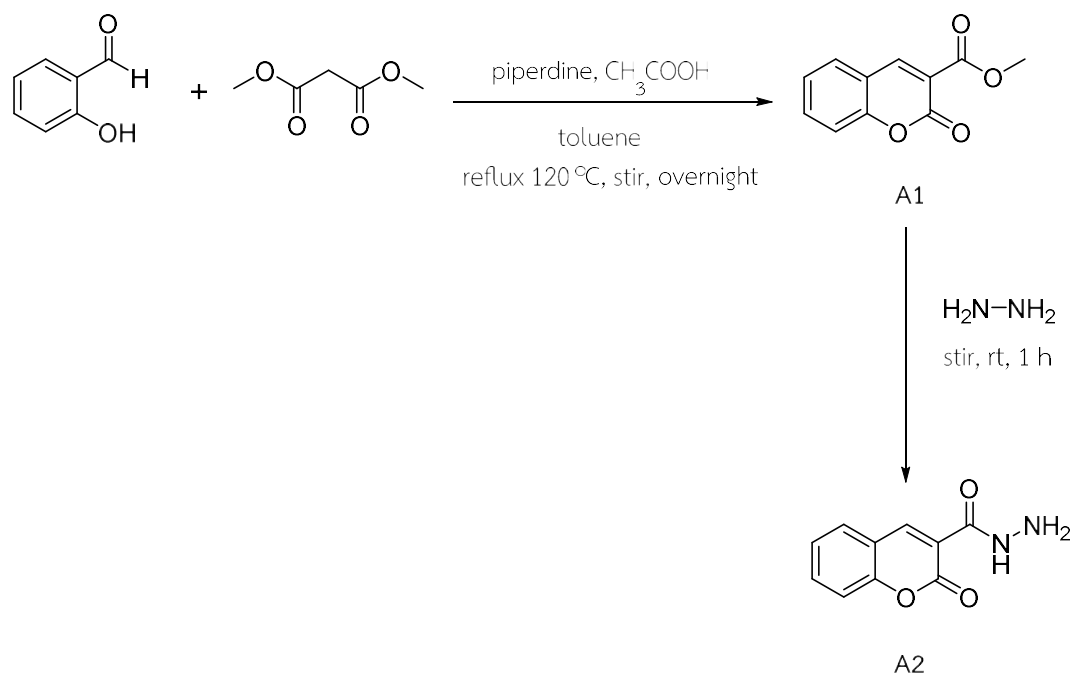
สรุปผลการทดลอง

4.1 สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยสามารถสังเคราะห์โมเลกุล **A2** เพื่อนำมาใช้เป็นตัวตรวจวัดฟอร์มาลดีไฮด์ โดยมีอนุพันธ์คูมารินเป็นหมู่ให้สัญญาณฟลูออเรสเซนต์ (fluorophore) และมีหมู่ไฮดรากลิกเป็นตัวตรวจจับ (receptor) สามารถสังเคราะห์ได้ผ่านปฏิกิริยา 2 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนที่หนึ่ง การสังเคราะห์ methyl 2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (**A1**) จากปฏิกิริยา Knoevenagel condensation ระหว่าง Salicylaldehyde กับ Diethylmalonate โดยใช้ Piperidine เป็นเบส และ Acetic acid เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในตัวทำละลาย Toluene และรีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียสข้ามคืน ได้ผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีขาว มีร้อยละผลได้ของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 94 เปอร์เซ็นต์ และสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็น methyl 2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (**A1**) จริง ขั้นตอนที่สอง เป็นการสังเคราะห์ 2-oxo-2H-chromene-3-carbohydrazide (**A2**) จากปฏิกิริยา Nucleophilic substitution ระหว่าง methyl 2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate (**A1**) ด้วย hydrazine hydrate โดยใช้ตัวทำละลายเป็น hydrazine hydrate ปริมาณมากเกินไป กวนสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ได้ผลิตภัณฑ์ **A2** เป็นของแข็งสีขาว แต่ไม่สามารถคิดร้อยละผลได้ของผลิตภัณฑ์ได้ และสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็น 2-oxo-2H-chromene-3-carbohydrazide (**A2**) จริง ดังแผนภาพที่ 4.1

4.2 ข้อเสนอสำหรับงานวิจัยที่ควรจะทำต่อในอนาคต

นำโมเลกุล **A2** ไปศึกษาสมบัติเชิงแสงด้วยวิธี ultraviolet-visible spectrophotometry และ fluorescence spectrophotometry รวมทั้งทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจวัดฟอร์มาลดีไฮด์ โดยการเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงสัญญาณเรืองแสงของเซนเซอร์ก่อนและหลังเติมฟอร์มาลดีไฮด์ความเข้มข้นต่าง ๆ และการเปรียบเทียบสัญญาณเรืองแสงของเซนเซอร์กับหมู่คาร์บอนิลอื่น ๆ ได้แก่ terephthalaldehyde, naphthalaldehyde, 3-methoxybenzaldehyde, 2-nitrobenzaldehyde, propionaldehyde, acetaldehyde, valeraldehyde, nonanal, sodium hydroxide และ glucose



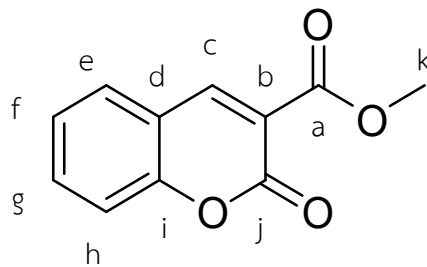
แผนภาพที่ 4.1 สรุปขั้นตอนการสังเคราะห์โมเลกุล A2

เอกสารอ้างอิง

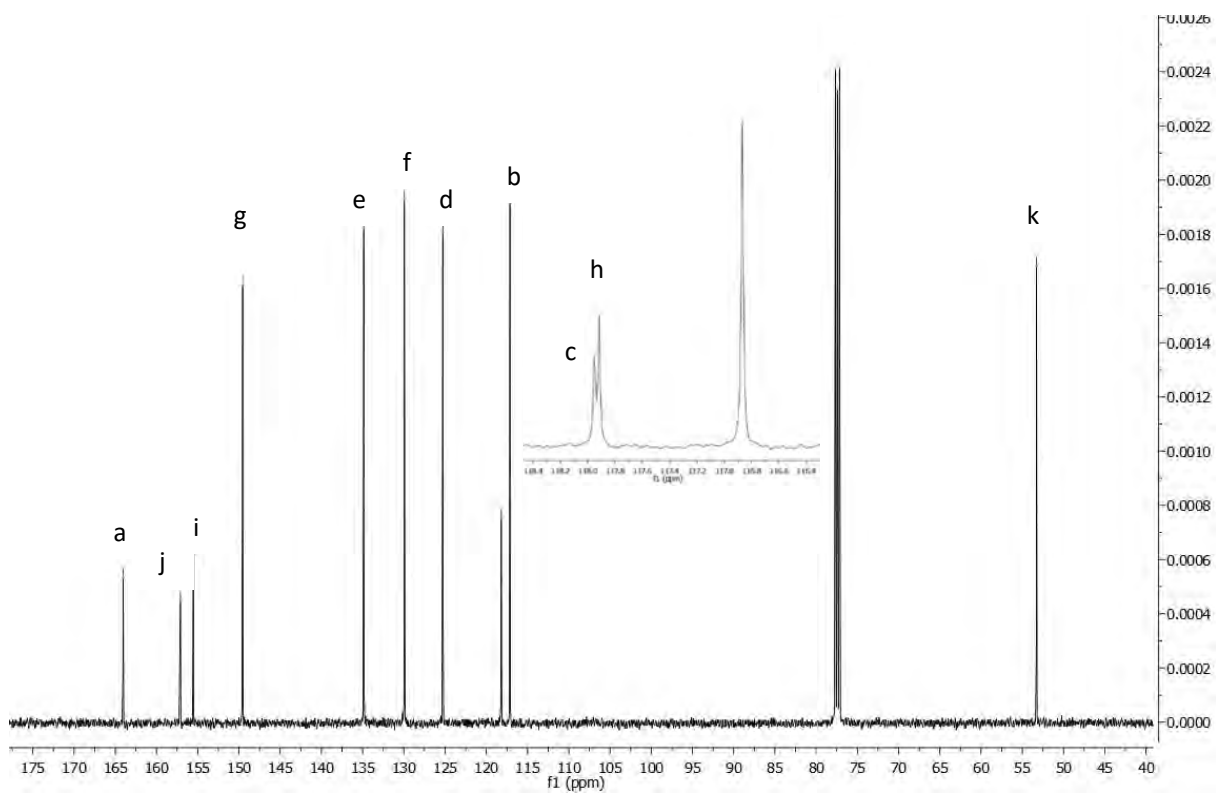
1	บ้งอร ฉางทรัพย์. พอร์มาลดีไฮด์/พอร์มาลีน ภัยร้ายใกล้ตัว. <i>วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี หัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ</i> 2558 , <i>1</i> , 97-109.
2	ฝ่ายสารอันตรายจากสาธารณสุข กองจัดการสารอันตรายและกากของเสีย กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม. พอร์มาลดีไฮด์ (Formaldehyde). สืบค้นจาก http://www.pcd.go.th/count/hazdl.cfm?FileName=36-Formaldehyde.pdf&BookName=Formaldehyde (เข้าถึงเมื่อ 14 กุมภาพันธ์ 2563)
3	Acheson, E.D.; Gardner, M.J.; Pannett, B.; Barnes, H.R.; Osmond, C.; Taylor, C.P. Formaldehyde in the British Chemical Industry: an Occupational Cohort Study. <i>Lancet</i> 1984 , <i>323</i> , 611-616.
4	Ambroise, D.; Moulin, J.J.; Squinazi, F.; Protois, J.C.; Fontana, J.M.; Wild, P. Cancer Mortality among Municipal Pest-Control Workers. <i>International Archives of Occupational and Environmental Health</i> 2005 , <i>78</i> , 387-393.
5	Elshaer, N.; Mahmoud, M. Toxic Effects of Formalin-Treated Cadaver on Medical Students, Staff Members, and Workers in the Alexandria Faculty of Medicine. <i>Alexandria Journal of Medicine</i> 2017 , <i>53</i> , 337-343.
6	Wahed, P.; Razzaq, M.A.; Dharmapuri, S.; Corrales, M. Determination of Formaldehyde in Food and Feed by an In-House Validated HPLC Method. <i>Food Chemistry</i> 2016 , <i>202</i> , 476-483.
7	Shin, H.S.; Lim, H.H. Simple Determination of Formaldehyde in Fermented Foods by HS-SPME-GC/MS. <i>International Journal of Food Science and Technology</i> 2012 , <i>47</i> , 350-356.
8	Kato, S.; Burke, P.J.; Fenick, D.J.; Taatjes, D.J.; Bierbaum, V.M.; Koch, T.H. Mass Spectrometric Measurement of Formaldehyde Generated in Breast Cancer Cells upon Treatment with Anthracycline Antitumor Drugs. <i>Chemical Research in Toxicology</i> 2000 , <i>13</i> , 509-516.
9	Thermo Fisher Scientific Inc., Coumarin and Coumarin Derivatives. Retrieved from https://www.thermofisher.com/th/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/coumarin.html (accessed 10 April 2020).
10	Li, H.; Cai, L.; Li, J.; Hu, Y.; Zhou, P.; Zhang, J. Novel Coumarin Fluorescent Dyes: Synthesis, Structural Characterization and Recognition Behavior Towards Cu(II) and Ni(II). <i>Dyes and Pigments</i> 2011 , <i>91</i> , 309-316.

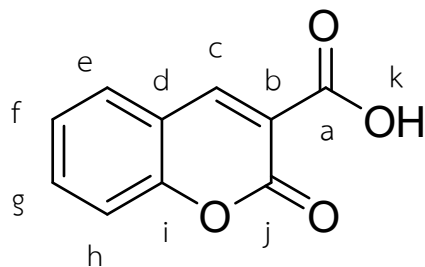
11	Bruemmer, K.J.; Brewer, T.F.; Chang, C.J. Fluorescent Probes for Imaging Formaldehyde in Biological Systems. <i>Current Opinion in Chemical Biology</i> 2017 , <i>39</i> , 17-23.
12	Xu, Z.; Chen, J.; Hu, L.L.; Tan, Y.; Liu, S.H.; Yin, J. Recent Advances in Formaldehyde-Responsive Fluorescent Probes. <i>Chinese Chemical Letters</i> 2017 , <i>28</i> , 1935-1942.
13	Zhou, W.; Dong, H.; Yan, H.; Shi, C.; Yu, M.; Wei, L.; Li, Z. HCHO-Reactive Molecule with Dual-Emission-Enhancement Property for Quantitatively Detecting HCHO in Near 100% Water Solution. <i>Sensors and Actuators, B: Chemical</i> 2015 , <i>209</i> , 664-669.
14	Liu, C.; Shi, C.; Li, H.; Du, W.; Li, Z.; Wei, L.; Yu, M. Nanomolar Fluorescent Quantitative Detection of Formaldehyde with a 8-Hydroxyquinoline Derivative in Aqueous Solution and Electrospun Nanofibers. <i>Sensors and Actuators, B: Chemical</i> 2015 , <i>219</i> , 185-191.
15	Brewer, T.F.; Chang, C.J. An aza-cope Reactivity-Based Fluorescent Probe for Imaging Formaldehyde in Living Cells. <i>Journal of the American Chemical Society</i> 2015 , <i>137</i> , 10886-10889.
16	Pereira, A.; Martins, S.; Caldeira, A.T. Coumarins as Fluorescent Labels of Biomolecules. <i>Phytochemicals in Human Health</i> . Retrieved from https://www.intechopen.com/books/phytochemicals-in-human-health/coumarins-as-fluorescent-labels-of-biomolecules (accessed 12 April 2020).
17	Liang, X.; Chen, B.; Shao, L.; Cheng, J.; Huang, M.; Chen, Y.; Hu, Y.; Han, Y.; Han, F.; Li, X. A Fluorogenic Probe for Ultrafast and Reversible Detection of Formaldehyde in Neurovascular Tissues. <i>Theranostics</i> 2017 , <i>7</i> , 2305-2313.
18	Li, M.; Kong, X.; Dong, B.; Zhang, N.; Song, W.; Lu, Y.; Lin, W. A Novel Two-Photon Fluorescent Probe for Detecting FA based on a Coumarin Derivative and Its Applications in living Cells, Zebrafish and Tissues. <i>New Journal of Chemistry</i> 2019 , <i>43</i> , 11844-11850.

ภาคผนวก

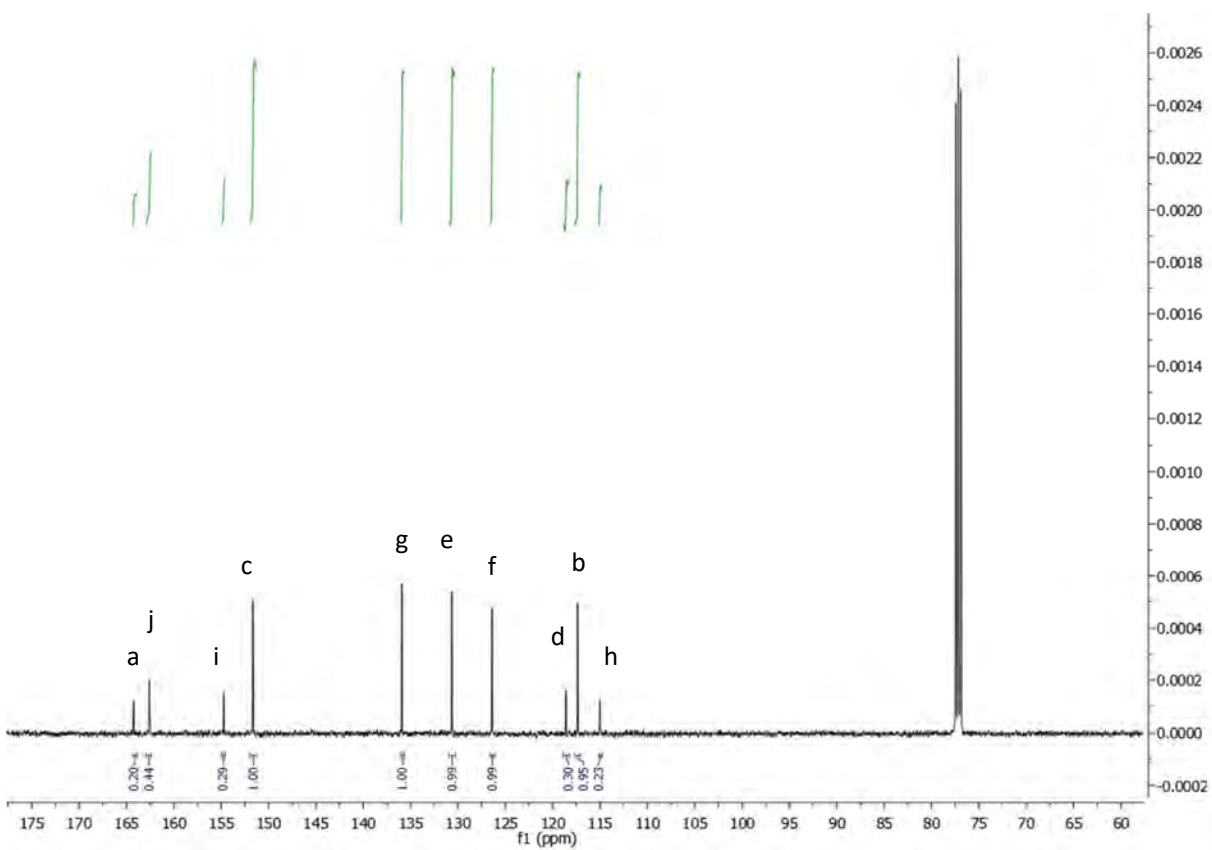


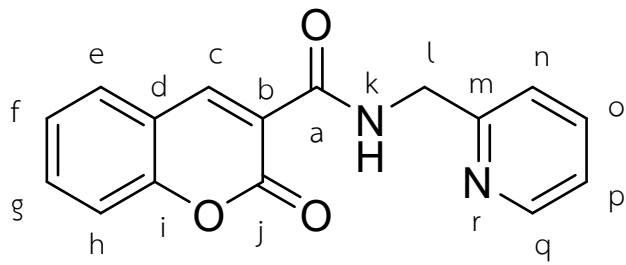
A1

รูปที่ 1 ^{13}C -NMR spectrum ของสาร A1

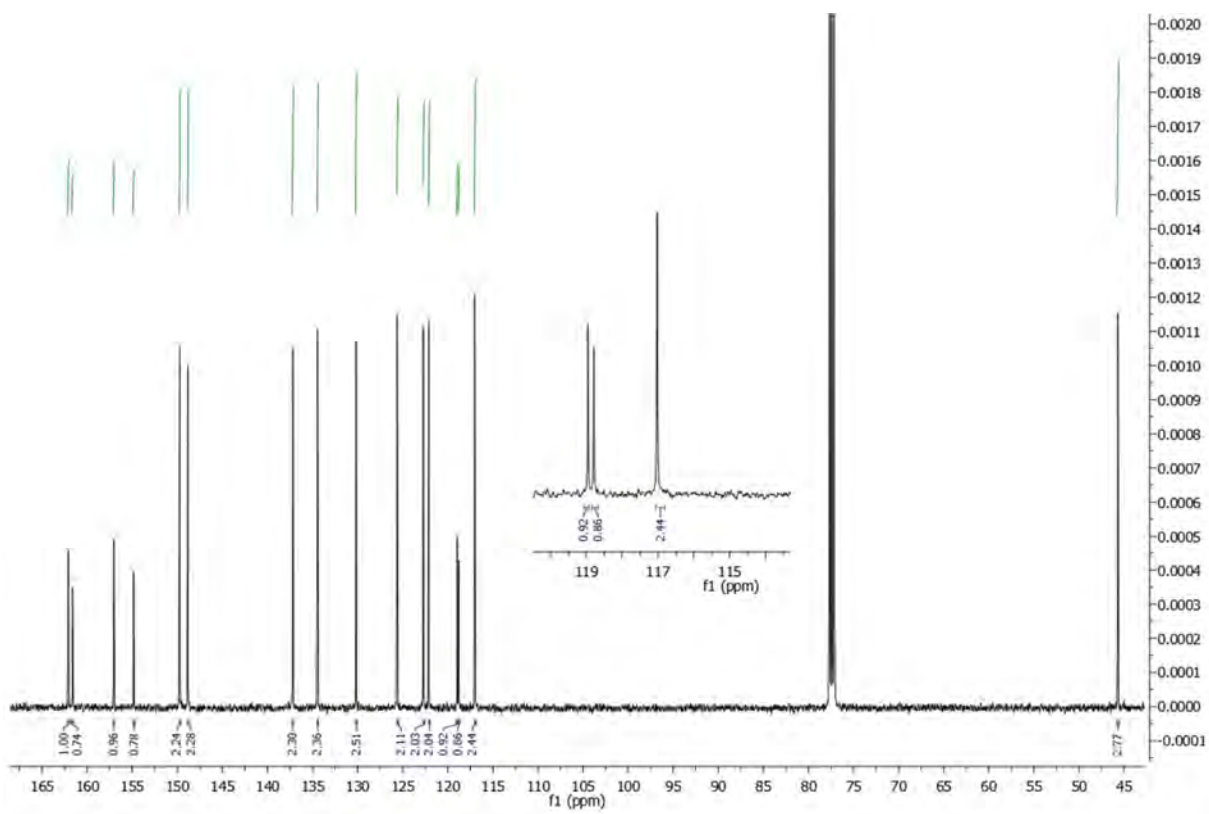


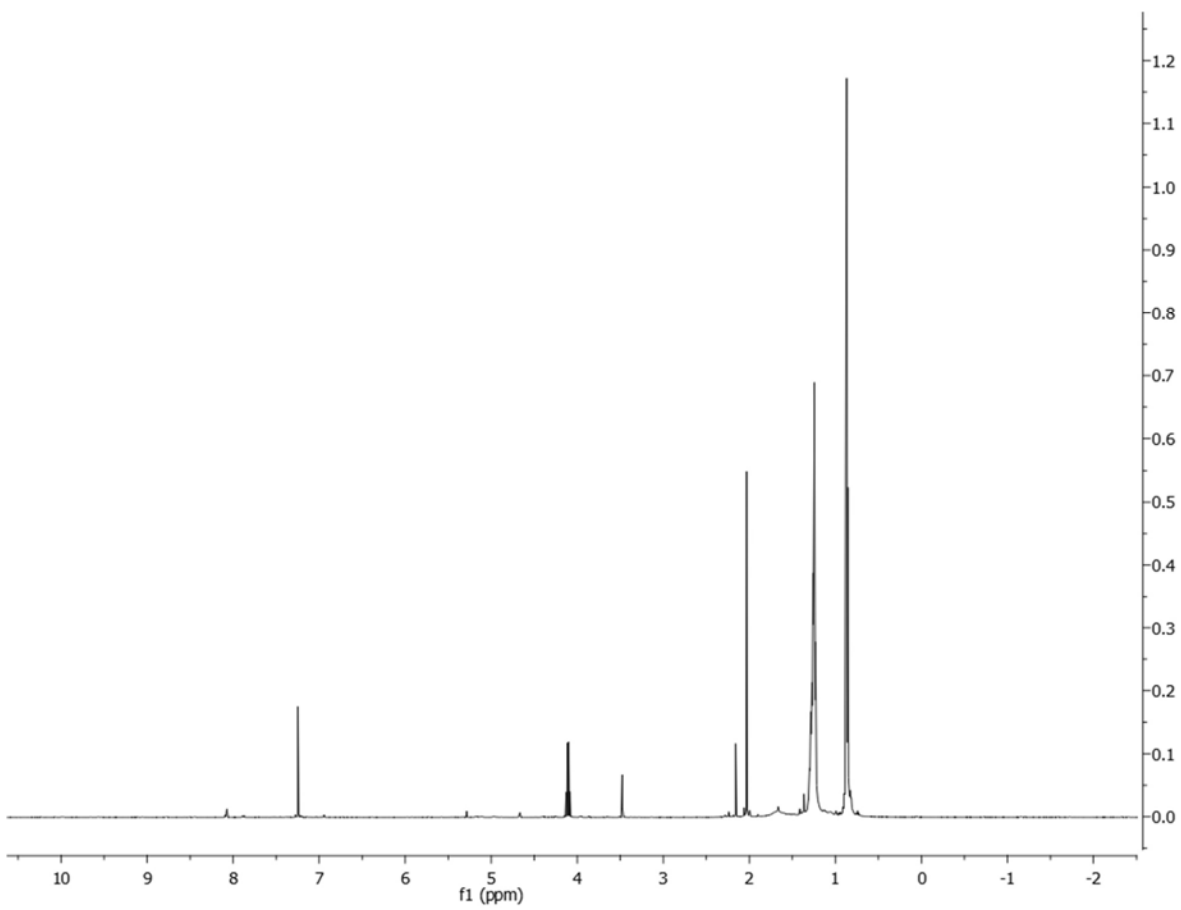
A6

รูปที่ 2 ^{13}C -NMR spectrum ของสาร A6

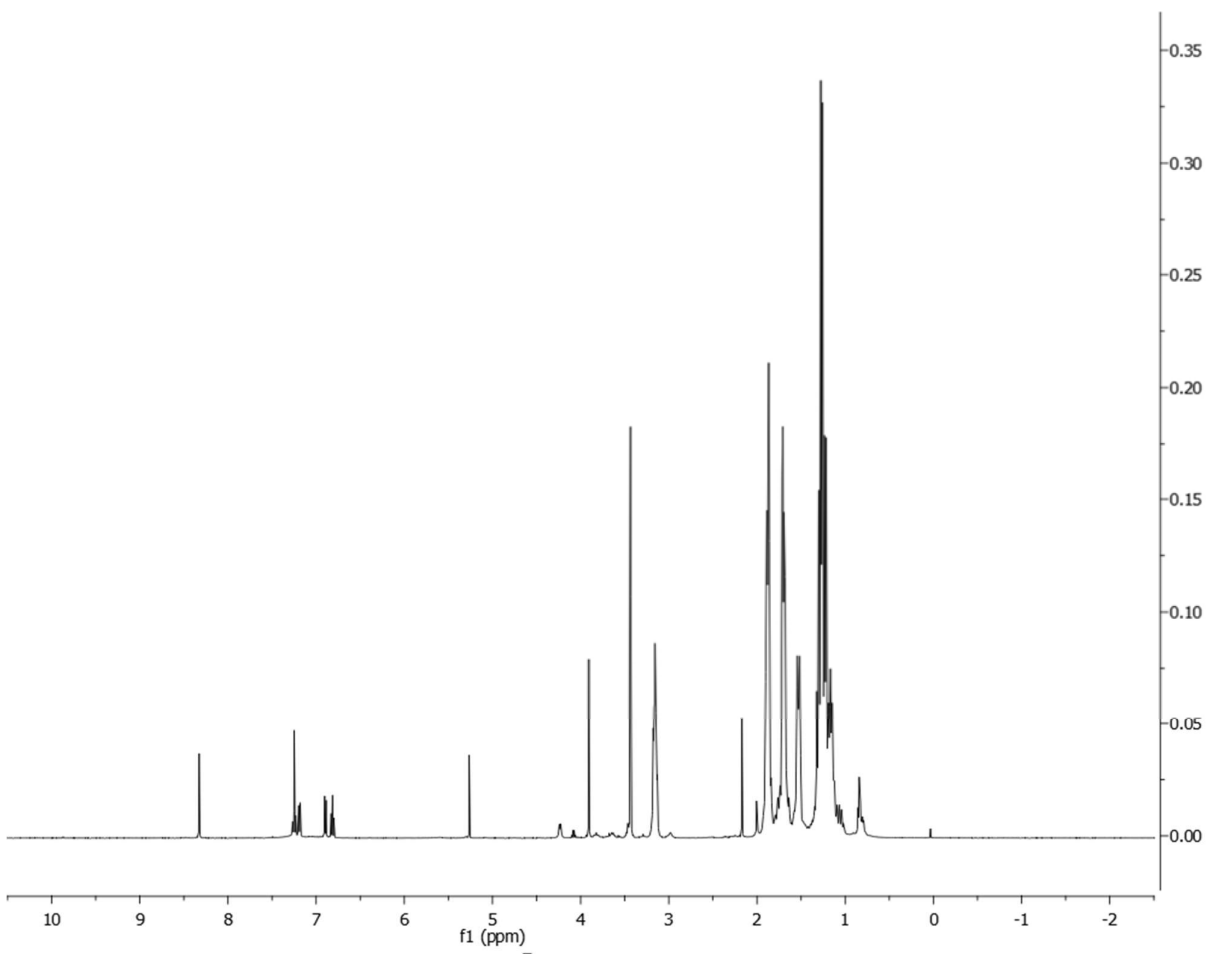


A7

รูปที่ 3 ^{13}C -NMR spectrum ของสาร A7



รูปที่ 4 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสาร A5 ที่สลายตัว



รูปที่ 5 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสาร A4 ที่สลายตัว

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวณภัทร คำเจริญ เกิดเมื่อวันที่ 24 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2540 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนราชินี จังหวัดกรุงเทพมหานคร เมื่อปีการศึกษา 2558 เคยได้รับรางวัลนักเรียนไฝ่เรียนรู้ และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2559 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 2/42 หมู่ 8 ตำบลกระทุ่มล้ม อำเภอสามปราชญ์ จังหวัดนครปฐมรหัสไปรษณีย์ 73220 อีเมล napat_aommy@hotmail.com

