



โครงการ การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การสังเคราะห์ end-stacking super-quenchers สำหรับ fluorescence probes ที่มาจากพีเอ็นเอ
Synthesis of end-stacking super-quenchers for PNA-based fluorescence hybridization probes

ชื่อนิสิต นางสาวพสธร เปรมชื่น

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2560

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การสังเคราะห์ end-stacking super-quenchers สำหรับ fluorescence probes ที่มาจากพีเอ็นเอ

Synthesis of end-stacking super-quenchers for PNA-based fluorescence hybridization probes

โดย

นางสาวพสธร เปรมชื่น

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

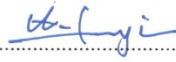
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2560

โครงการ การสังเคราะห์ end-stacking super-quenchers สำหรับ fluorescence probes ที่มาจากพีเอ็นเอ
โดย นางสาวพัชร เปรมชื่น

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


คณะกรรมการสอบโครงการ


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. อภิชาติ อิมยัม)


..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ศาสตราจารย์ ดร. ธีรยุทธ วิไลวัลย์)


..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. ธนธรณ์ ขอทวิวัฒนา)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี


..... หัวหน้าภาควิชาเคมี
(รองศาสตราจารย์ ดร. วุฒิชัย พารวุธ)

วันที่ 19... เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2561

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ ดีมาก ดี พอใช้

ชื่อโครงการ การสังเคราะห์ end-stacking super-quenchers สำหรับ fluorescence probes ที่มาจาก
พีเอ็นเอ

ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาวพศร เปรมชื่น เลขประจำตัว 5733135623

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ศาสตราจารย์ ดร. อธิรุท วิไลวัลย์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2560

บทคัดย่อ

แอนทราควิโนน (anthraquinone) เป็นสีย้อมชนิดหนึ่งที่มีการนำไปใช้งานที่หลากหลาย อีกทั้งยังมีคุณสมบัติในการเป็นฉลากที่มีความไวทางเคมีไฟฟ้าและสามารถใช้เป็นตัวระงับสัญญาณการเรืองแสงหรือควอนเซอร์ได้ ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยสนใจที่จะสังเคราะห์อนุพันธ์ของแอนทราควิโนนเพื่อนำไปใช้เป็นควอนเซอร์ในฟลูออเรสเซนส์พีเอ็นเอโพรบที่พัฒนาขึ้นมาก่อนหน้านี้โดยอาศัยหลักโดยใช้การติดฉลากสีย้อม 2 ตัวไว้ในปลายด้านเดียวกันของโพรบ โดยสีย้อมตัวหนึ่งทำหน้าที่เป็นฟลูออโรฟอร์และอีกตัวหนึ่งเป็นแอนทราควิโนนที่ทำหน้าที่เป็นควอนเซอร์ ซึ่งทั้งคู่ทำอันตรกิริยาระหว่างกันได้ดี ทำให้โพรบมีการเรืองแสงที่ต่ำในสภาวะปกติ แต่เมื่อมีดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่ด้วย แอนทราควิโนนจะแยกตัวออกมาซ้อนทับกับคู่เบสตรงปลายสายของโมเลกุลลูกผสมพีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอ อย่างไรก็ตามในงานวิจัยก่อนหน้านี้ สีย้อมแอนทราควิโนนที่ทำหน้าที่เป็นตัวควอนเซอร์นั้นยังมีประสิทธิภาพไม่ดีนัก ทำให้การเปลี่ยนแปลงสัญญาณของโพรบที่ทำหน้าที่เป็นตัวตรวจวัดการเข้าคู่กันของลำดับเบสดีเอ็นเอไม่ชัดเจนเท่าที่ควร เพื่อที่จะพัฒนาความสามารถในการใช้งานแอนทราควิโนนเป็นตัวควอนเซอร์ที่ดีขึ้น ผู้วิจัยจึงได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ของแอนทราควิโนนให้มีคอนจูเกชันเพิ่มขึ้น โดยมีจุดประสงค์เพื่อเพิ่มความสามารถในการดูดกลืนแสงของแอนทราควิโนน โดยเริ่มจาก 1,4-dihydroxyanthraquinone เป็นสารตั้งต้น แล้วเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลเป็นหมู่โทซิลเลตโดยปฏิกิริยาโทซิลเลชัน ได้เป็น 1,4-bis(tosyloxy)anthraquinone แล้วเติมหมู่อัลคิลหรือเอริลอะมิโนลงไปแทนที่หมู่โทซิลเลตข้างเดียวโดยผ่านปฏิกิริยาการแทนที่แบบนิวคลีโอฟิลิกของสารประกอบอะโรมาติกได้ผลิตภัณฑ์เป็น 1-(cyclohexylamino)-4-(tosyloxy)anthraquinone และ 1-(anilino)-4-(tosyloxy)anthraquinone ขึ้นต่อมาเป็นการทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสในภาวะเบสได้ผลิตภัณฑ์เป็น 1-(cyclohexylamino)-4-hydroxyanthraquinone โดยสามารถใช้เทคนิค $^1\text{H-NMR}$ ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ยืนยันโครงสร้างของสาร และในขั้นสุดท้ายจะนำสารประกอบอะมิโนไฮดรอกซีแอนทราควิโนนที่ได้ไปต่อกับหมู่คาร์บอกซิล เพื่อนำไปเชื่อมต่อกับพีเอ็นเอเพื่อให้สามารถนำไปใช้งานเป็นควอนเซอร์ในฟลูออเรสเซนส์พีเอ็นเอโพรบสำหรับตรวจวัดลำดับเบสของดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพสูงต่อไป

คำสำคัญ: แอนทราควิโนน, ควอนเซอร์, ฟลูออโรฟอร์, ฟลูออเรสเซนส์พีเอ็นเอโพรบ, ปฏิกิริยาโทซิลเลชัน, ปฏิกิริยาการแทนที่แบบนิวคลีโอฟิลิก, ปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส

Project Title Synthesis of end-stacking super-quenchers for PNA-based fluorescence hybridization probes
Student Name Miss Pasatorn Premchuen Student ID 5733135623
Advisor Name Professor Dr. Tirayut Vilaivan
Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2017

Abstract

Anthraquinone is an interesting dye that can be used in many applications. It has an ability to be act as an electrochemically active label and can be used as a quencher. This work focuses on the synthesis of derivatives of anthraquinone to be used as a quencher in fluorescence PNA probes previously developed in this group by attaching two dyes at the same end of a probe. One of the dyes is acting as a fluorophore and the other is anthraquinone which acts as a quencher. The strong interaction between the two dyes in single stranded probes lead to a low fluorescence emission. In the presence of DNA target, the anthraquinone separates to form a base stack with the terminal base pair of the PNA-DNA duplex, resulting in an increased fluorescence. However, in previous work, the efficiency of the simple anthraquinone quencher was low therefore the signal change of the probe for DNA detection was not yet optimal. To improve the quenching ability of anthraquinone, derivatives of anthraquinone with more conjugation has been synthesized with the aim to increase the absorption of anthraquinone. The starting material 1,4- dihydroxyanthraquinone was converted into 1,4-bis(tosyloxy)anthraquinone by tosylation. Single substitution of the tosylate by an alkylamino or arylamino group by nucleophilic aromatic substitution resulted in 1-(cyclohexylamino)-4-(tosyloxy)anthraquinone and 1-(anilino)-4-(tosyloxy)anthraquinone. Subsequent hydrolysis under basic condition gave the product 1-(cyclohexylamino)-4-hydroxyanthraquinone. The structure of which was confirmed by ^1H NMR technique. In the final step, the obtained aminohydroxyanthraquinone will be joined with a carboxyl group for attachment to PNA in order to act as a quencher in fluorescence PNA probe for DNA base sequence detection with high efficiency.

Keywords: anthraquinone, quencher, fluorescence PNA probe, tosylation reaction, nucleophilic substitution reaction, hydrolysis reaction

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยและรายงานฉบับนี้จะไม่สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี หากไม่ได้รับความกรุณาอย่างสูง ขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ศาสตราจารย์ ดร. ธีรยุทธ วิไลวัลย์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา ความรู้ ข้อคิด ถ่ายทอดประสบการณ์ต่างๆ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือและการสนับสนุนเป็นอย่างดีตลอดระยะเวลา ทำวิจัย รวมทั้งให้ความช่วยเหลือในการเขียนรายงานฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ อิ่มยิ้ม และอาจารย์ ดร. ธนธรณ์ ขอทวีวัฒนา ที่กรุณา เสียสละเวลาอันมีค่าให้เกียรติเป็นประธาน และกรรมการสอบงานวิจัยครั้งนี้ รวมถึงให้คำแนะนำ และข้อสงสัย ตลอดจนตรวจสอบแก้ไขให้รายงานฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ คุณโชติมา วิไลวัลย์ ที่คอยให้คำแนะนำถึงข้อปฏิบัติภายในห้องปฏิบัติการ ขอขอบคุณ นางสาวเพ็ญทิพ เหมือนแก้ว นายฐิติพงษ์ คำเคนทรงพานุช นายชญัญ เจริญภักดี นายณัฐพล จิระกิตติวุฒิ นางสาวกชกร ศุภบวรสถิต นางสาวตรีชฎา รัฐจักร นายเกรียงศักดิ์ ฝ่ายเครือ นางสาวดวงรัตน์ นิมนอนุสรณ์กุล และนางสาวบุญส่ง ดิษมังกล้อย ที่คอยให้คำแนะนำตลอดจนให้ความช่วยเหลือในทุกๆขั้นตอนของการทำวิจัย

ขอขอบคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัยที่ให้ทุนสนับสนุนในการดำเนินการงานวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณกำลังใจจากพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ในภาคเคมีทุกคน และขอขอบพระคุณบิดา มารดา ที่สนับสนุนในทุกๆเรื่องและให้กำลังใจผู้วิจัยเสมอมา จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ


	หน้า
ปกใน	ก
หน้าอำนวยการ	ข
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ค
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญรูปภาพ	ช
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 ทฤษฎีที่สำคัญ	2
1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
1.4 วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย	9
บทที่ 2 การทดลอง	10
2.1 รายการเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี	10
2.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารแอนทราควิโนน	10
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	14
3.1 การสังเคราะห์สารในกลุ่มแอนทราควิโนน	14
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	21
เอกสารอ้างอิง	22
ประวัติผู้วิจัย	25

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1.1	การทำงานของ terminally labelled fluorescence probe	2
รูปที่ 1.2	แผนภาพระดับชั้นพลังงานของ electronic และ vibrational state	3
รูปที่ 1.3	สเปกตรัมที่คาบเกี่ยวกันของเคเวนเซอร์และฟลูออโรฟอร์	4
รูปที่ 1.4	โครงสร้างของพีเอ็นเอและดีเอ็นเอ	5
รูปที่ 1.5	โครงสร้างของ aegPNA และ pyrrolidinyl PNA	6
รูปที่ 1.6	โครงสร้างของ aegPNA และ acpcPNA	6
รูปที่ 1.7	โครงสร้างและการระบุตำแหน่งของแอนทราควิโนน	7
รูปที่ 1.8	โครงสร้างของอนุพันธ์ของแอนทราควิโนนที่สังเคราะห์	7
รูปที่ 1.9	การสังเคราะห์ AAQ และ DAAQ	8
รูปที่ 1.10	เส้นทางการสังเคราะห์สารต้านจุลชีพ	8
รูปที่ 1.11	แผนภาพการสังเคราะห์ aminoanthraquinone	9
รูปที่ 1.12	แผนภาพการสังเคราะห์โมเลกุลเคเวนเซอร์ในกลุ่มแอนทราควิโนนที่พร้อมจะนำไปเชื่อมกับพีเอ็นเอ	9
รูปที่ 2.1	แผนภาพการสังเคราะห์สาร 1	10
รูปที่ 2.2	แผนภาพการสังเคราะห์สาร 2	11
รูปที่ 2.3	แผนภาพการสังเคราะห์สาร 3	12
รูปที่ 2.4	แผนภาพการสังเคราะห์สาร 4	13
รูปที่ 3.1	โครงสร้างของสารในกลุ่มแอนทราควิโนนที่สังเคราะห์ในงานวิจัยนี้	14
รูปที่ 3.2	แผนภาพการสังเคราะห์ 1,4-dihydroxy anthraquinone (1)	15
รูปที่ 3.3	¹ HNMR ของสาร 1	15
รูปที่ 3.4	¹ HNMR ของสาร 2	16
รูปที่ 3.5	¹ HNMR ของสาร 3	17
รูปที่ 3.6	กลไกการเกิดปฏิกิริยา nucleophilic aromatic substitution	18
รูปที่ 3.7	¹ HNMR ของสาร 4	19
รูปที่ 3.8	แผนภาพการสังเคราะห์สารในกลุ่มแอนทราควิโนนรวมถึงสภาวะและค่า % yield ในงานวิจัยนี้	20

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ



acpc	2-aminocyclopentanecarboxylic acid
aeg	N-2-aminoethylglycine
CDCl ₃	deuterated chloroform
d	doublet (NMR)
dd	doublet of doublets (NMR)
DNA	deoxyribonucleic acid
DMSO	dimethyl sulfoxide
g	gram
¹ H-NMR	proton nuclear magnetic resonance
Hz	Hertz
<i>J</i>	coupling constant (Hz)
L	Liter
m	multiplet (NMR)
mg	milligram
mL	milliliter
m/z	mass per charge number of ions (mass spectroscopy)
M	molar
MHz	Megahertz
PNA	Peptide nucleic acid
s	singlet (NMR)
t	triplet (NMR)
λ_{\max}	maximum absorbance wavelength (ultraviolet spectroscopy)

บทที่ 1

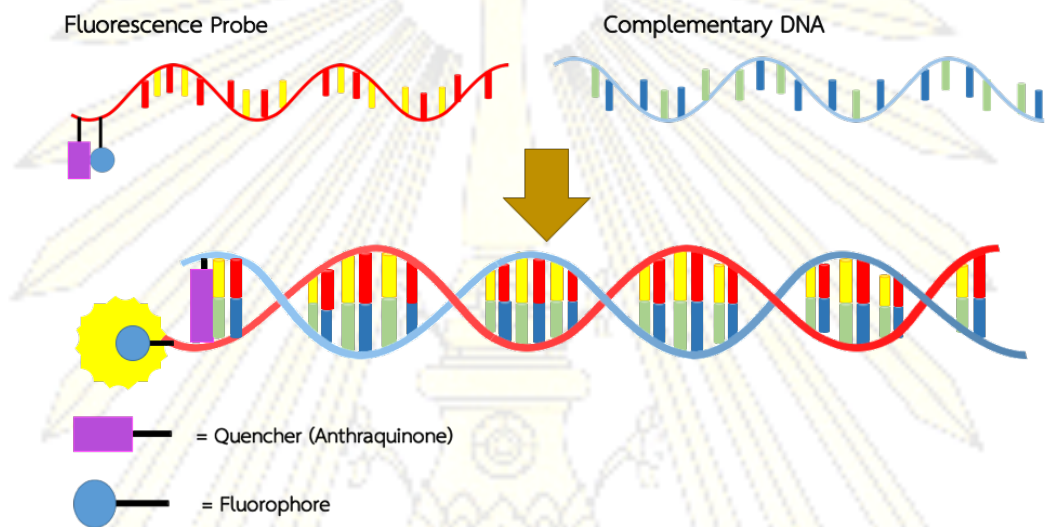
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปี ค.ศ. 1991 Nielsen และคณะ¹⁻² ได้มีการสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบดีเอ็นเอขึ้นมาเรียกว่าเพปไทด์นิวคลีอิกแอซิดหรือพีเอ็นเอ (Peptide Nucleic Acid; PNA) ที่ยังคงมีความสามารถในการเข้าคู่กันกับดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอได้ตามแบบวัตสัน-คริก (Watson-Crick) อีกทั้งยังสามารถจับกับดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอเกิดเป็นโมเลกุลลูกผสมที่มีความเสถียรมากกว่าโมเลกุลลูกผสมที่เกิดจากการจับกันระหว่างดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอด้วยกันเอง นอกจากนี้พีเอ็นเอยังมีความคงทนต่อเอนไซม์โปรตีเอสและนิวคลีเอสซึ่งเป็นข้อได้เปรียบเมื่อเทียบกับดีเอ็นเอ ในช่วงเวลาประมาณเกือบ 30 ปีที่ผ่านมา มีกลุ่มวิจัยอื่นได้พยายามพัฒนาพีเอ็นเอให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยมีระบบพีเอ็นเอที่น่าสนใจของ Lowe และ Vilaivan³⁻⁴ ที่เริ่มต้นพัฒนาขึ้นในปี ค.ศ. 1997 ซึ่งมีการดัดแปลงโครงสร้างที่ค่อนข้างยืดหยุ่นของพีเอ็นเอต้นแบบให้เป็นพิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอ (pyrrolidinyl PNA) และต่อมาในปี ค.ศ. 2006 Vilaivan และคณะ⁵⁻⁸ ได้พัฒนาพิร์โรลิดินิลพีเอ็นเอชนิดใหม่ที่เรียกว่า acpcPNA ซึ่งมีโครงสร้างหลักเป็น โพรลิล-2-อะมิโนไซโคลเพนเทนคาร์บอกซิลิก แอซิด acpcPNA มีความสามารถในด้านความจำเพาะและการยึดจับกับดีเอ็นเอที่สูงกว่าพีเอ็นเอต้นแบบและพีเอ็นเอระบบอื่นที่มีผู้พัฒนาขึ้น ทำให้มันมีศักยภาพในการนำไปพัฒนาเป็นโพรบ (probe) สำหรับการตรวจสอบลำดับเบสของสารพันธุกรรม และอาจนำไปประยุกต์ใช้กับงานหลายด้าน เช่น การตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์⁹ ด้านเทคโนโลยีทางอาหารและเกษตร¹⁰ ที่ยังมีความต้องการที่จะหาวิธีเทคนิคในการตรวจสอบที่ไม่ยุ่งยาก รวดเร็วและสังเกตการเปลี่ยนแปลงได้ง่ายขึ้น การที่ใช้พีเอ็นเอแทนที่ดีเอ็นเอในการนำมาใช้เป็นโพรบสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการตรวจวัดได้เนื่องจากความแข็งแรงและความจำเพาะเจาะจงของการจับยึดที่สูงขึ้น ประกอบกับการที่มันเสถียรภายใต้ภาวะที่ดีเอ็นเอถูกย่อยสลายได้ง่าย

Vilaivan และคณะได้นำ acpcPNA มาพัฒนาเป็นโพรบในหลายรูปแบบ โดยรูปแบบที่น่าสนใจหนึ่งคือโพรบเรืองแสงที่ตอบสนองต่อการเข้าคู่กันกับดีเอ็นเอ ตัวอย่างเช่น งานของ Vilaivan และคณะ¹¹ ได้มีการนำเทคนิคการติดฉลากที่เป็นสีย้อม (dye) 2 ตัวไว้ที่บริเวณใกล้เคียงกันตรงปลายด้านเดียวกันของโพรบซึ่งทำให้ค่าสัญญาณการเรืองแสงที่วัดได้มีค่าต่ำในสภาพที่พีเอ็นเอเป็นสายเดี่ยว เนื่องจากการที่สีย้อมที่ทำหน้าที่เป็นฟลูออโรฟออร์ (fluorophore) และสีย้อมที่ทำหน้าที่เป็นควENCHER (quencher) นั้นเกิดอันตรกิริยาระหว่างกันได้ดี โดยในงานวิจัยที่อ้างถึงนี้เลือกใช้ควENCHER เป็นสีย้อมในกลุ่มแอนทราควิโนน (anthraquinone) ด้วยเหตุผลสำคัญคือสีย้อมดังกล่าวมีความสามารถในการซ้อนทับกับคู่เบสหรือแทรกตัวเข้าไปในระหว่างคู่เบสในดีเอ็นเอสายคู่หรือโมเลกุลลูกผสมระหว่างพีเอ็นเอและดีเอ็นเอได้ ดังนั้น เมื่อพีเอ็นเอที่ติดฉลากคู่เกิดการเข้าคู่กับดีเอ็นเอจะทำให้แอนทราควิโนนแยกตัวออกมาซ้อนทับกับคู่เบสที่อยู่ตรงปลาย ทำให้สีย้อมที่เป็นฟลูออโรฟออร์เป็นอิสระและไม่ถูกควENCHER อีกต่อไป การเรืองแสงจึงเพิ่มขึ้น ทำให้สามารถใช้พีเอ็นเอที่ติดฉลากคู่ดังกล่าวในการจำแนกลำดับเบสของดีเอ็นเอได้ โดยเมื่อมีดีเอ็นเอคู่ผสมอยู่

ด้วยจะทำให้การเรืองแสงเพิ่มขึ้นดังรูปที่ 1.1 อย่างไรก็ตาม แม้จะสามารถพิสูจน์หลักการได้ว่าเป็นจริงตามทฤษฎี สีย้อมแอนทราควิโนนอย่างง่ายที่ใช้ในงานวิจัยดังกล่าวมีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วงยูวีเท่านั้นและมีค่าโมลาร์แอฟซอร์ปติวิตี (molar absorptivity) ที่ต่ำ การควENCHING จึงอาจเกิดได้ไม่ดึนั้ก ทำให้การเปลี่ยนแปลงสัญญาณยังไม่ดีเท่าที่ควร ผู้วิจัยจึงมีสมมติฐานว่าถ้าพัฒนาส่วนของแอนทราควิโนนให้มีการดูดกลืนแสงในช่วงวิสิเบิล ซึ่งสอดคล้องกับช่วงคลื่นที่เกิดการคายแสงของฟลูออโรฟอร์และทำให้มีค่าโมลาร์แอฟซอร์ปติวิตีสูงขึ้นอาจทำให้การควENCHING เกิดได้ดีขึ้นซึ่งจะส่งผลโดยตรงต่อประสิทธิภาพของโพรบที่พัฒนาขึ้น

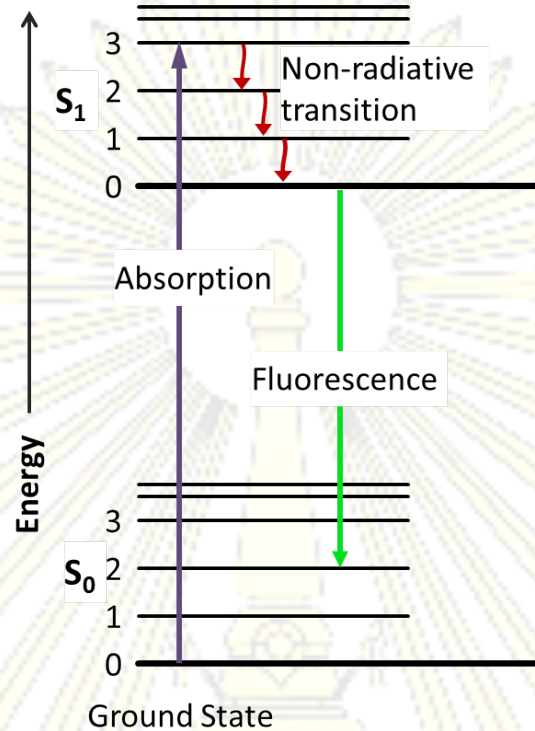


รูปที่ 1.1 การทำงานของ terminally labeled fluorescence probe

1.2 ทฤษฎีที่สำคัญ

1.2.1 ปรากฎการณ์ฟลูออเรสเซนส์

ปรากฏการณ์ฟลูออเรสเซนส์เกิดเมื่ออิเล็กตรอนในโมเลกุลได้รับพลังงานคลื่นแสงในช่วงที่เหมาะสมจากแสงยูวีและวิสิเบิล ทำให้สารเรืองแสงที่ถูกกระตุ้นทำการคายพลังงานออกมาในรูปแสงที่อยู่ระหว่าง electronic และ vibrational state ของสารเรืองแสง โดย electronic state จะมีชั้นพลังงานย่อยเรียกว่า vibration levels หากพลังงานที่ใส่เข้าไปมากกว่าระดับพลังงานของสถานะพื้น (ground state) และสถานะกระตุ้น (excited state) อิเล็กตรอนที่ถูกกระตุ้นจาก vibration state ขั้นต่ำสุดไปยัง electronic state ที่ชั้นกระตุ้นนี้โมเลกุลก็จะคายพลังงานที่ได้รับไปยังชั้นต่ำสุดของ electronic state จากนั้นก็จะคายพลังงานจากชั้นกระตุ้นของ electronic state กลับลงไปที่สถานะพื้น vibrational state พร้อมกับปล่อยแสงฟลูออเรสเซนส์ออกมามดังรูปที่ 1.2

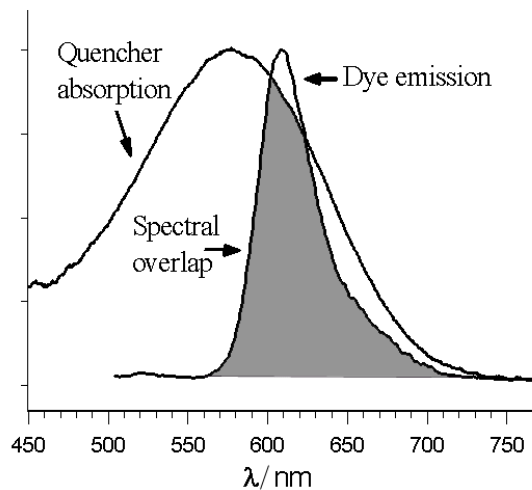


รูปที่ 1.2 แผนภาพระดับชั้นพลังงานของ electronic และ vibrational state¹²

1.2.2 เควนซิง (Quenching)

เควนซิง¹³ (quenching) คือกระบวนการที่ลดความเข้มของการคายแสงฟลูออเรสเซนส์ของสารหนึ่งๆ โดยมีกลไกของการเกิดเควนซิงได้หลายแบบ ที่สำคัญคือ การถ่ายโอนพลังงานแบบฟอร์สเตอร์ (Förster Resonance Energy Transfer; FRET) และคอลลิชันเควนซิง (collision quenching) ซึ่งอาจรวมถึง static (contact) และ dynamic quenching

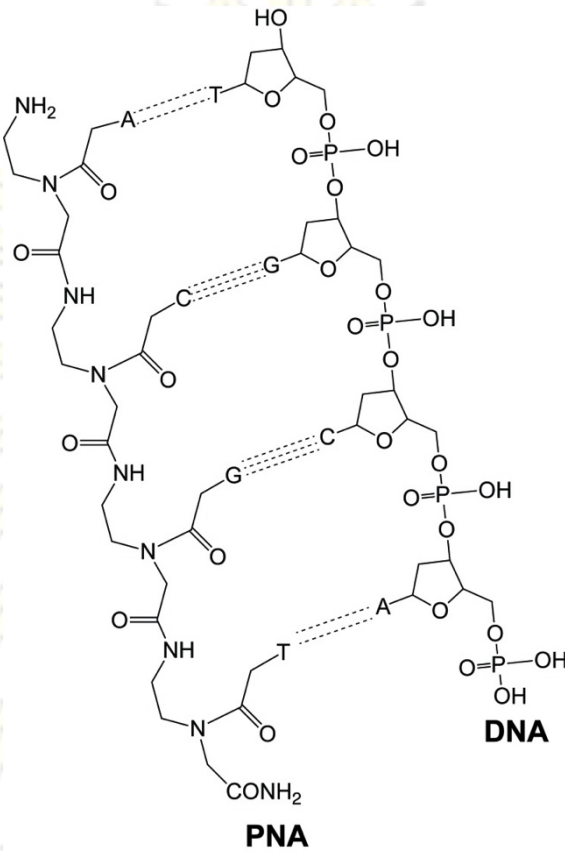
กลไกแบบ FRET นั้นเกิดขึ้นได้เมื่อฟลูออเรสเซนส์โดเนอร์ (fluorescent donor) มีค่าสเปกตรัมของการคายแสง (emission spectrum) ที่คาบเกี่ยวกับสเปกตรัมการดูดกลืน (absorption spectrum) ของตัวฟลูออเรสเซนส์แอกเซปเตอร์ (fluorescence acceptor) หรือเควนเซอร์ เรียกว่า spectrum overlap ดังรูปที่ 1.3 พลังงานที่เควนเซอร์ดูดซับไปนั้นอาจจะถูกปลดปล่อยออกมาในรูปแบบของฟลูออเรสเซนส์ (fluorescence) หรือที่ไม่ใช่ฟลูออเรสเซนส์ (nonfluorescence)



รูปที่ 1.3 สเปกตรัมที่คาบเกี่ยวกันของควอนเซอร์และฟลูออโรฟอร์¹⁴

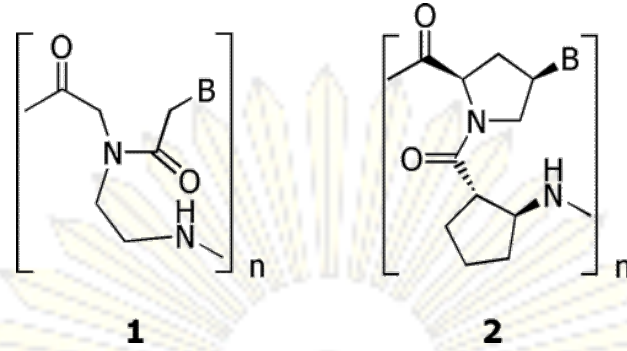
1.2.3 เพปไทด์นิวคลีอิกแอซิด (Peptide Nucleic Acid: PNA)

พีเอ็นเอ (PNA) คือโมเลกุลที่สังเคราะห์เลียนแบบดีเอ็นเอ โดย Nielsen และคณะ ในปี ค.ศ. 1991 โดยแทนที่น้ำตาลดีออกซีไรโบสและหมู่ฟอสเฟตของดีเอ็นเอด้วยสาร เอ็น-2-อะมิโนเอทิลไกลซีน (*N*-2-aminoethylglycine; AEG) ที่เป็นกรดอะมิโนชนิดหนึ่ง ซึ่งพีเอ็นเอนี้สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอได้ตามกฎการเข้าคู่กันของวัตสัน-คริก อีกทั้งยังมีความเสถียรมากกว่าการจับกันระหว่างดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอตามธรรมชาติ นอกจากนี้พีเอ็นเอยังมีความเสถียรต่อการย่อยสลายของเอนไซม์นิวคลีเอสซึ่งเป็นข้อจำกัดของดีเอ็นเอตามธรรมชาติ ในขณะที่พีเอ็นเอจะมีโครงสร้างเป็นเพปไทด์แต่ก็เป็นเพปไทด์ที่ไม่พบในธรรมชาติ ทำให้พีเอ็นเอมีความเสถียรภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิต และมีการนำพีเอ็นเอไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ มากมาย โดยเฉพาะการควบคุมการแสดงออกทางพันธุกรรม และการนำไปใช้งานเป็นโพรบ สำหรับตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอ



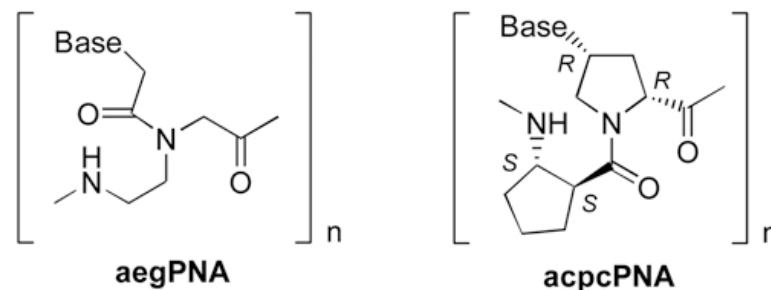
รูปที่ 1.4 โครงสร้างของพีเอ็นเอและดีเอ็นเอ¹⁵

นอกเหนือจาก PNA ที่ Nielsen และคณะได้ทำการพัฒนาขึ้น ก็ยังมีคณะวิจัยอื่นที่ได้พยายามพัฒนาคุณสมบัติของพีเอ็นเอให้มีประสิทธิภาพในการจับยึดกับดีเอ็นเอเพิ่มมากขึ้น ตัวอย่างที่น่าสนใจคือระบบพีเอ็นเอของ Vilavain และคณะ ที่พัฒนาขึ้นในปี ค.ศ. 1997 ที่ได้พัฒนาพีโรลิดินิลพีเอ็นเอขึ้นมาโดยอาศัยหลักการจำกัดคอนฟอร์เมชันของโมเลกุลของพีเอ็นเอต้นแบบ โดยการใช้นิวคลีโออะมิโนแอซิด (nucleo-amino acid) ที่เป็นอนุพันธ์ของโพรลีนเข้ามาแทนที่น้ำตาลดีออกซีไรโบสในดีเอ็นเอ และใช้ amino acid spacer ที่เป็นวงแหวนมาแทนที่พันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ (phosphodiester bond) ดังรูปที่ 1.5



รูปที่ 1.5 โครงสร้างของ aegPNA และ pyrrolidinyl PNA⁸

ต่อมาปี ค.ศ. 2006 Vilaivan และคณะได้ทำการพัฒนาพีโรลิดินิลพีเอ็นเอแบบใหม่เรียกว่า acpcPNA ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนไพโรลิดินที่มีสเตอริโอเคมีเป็น $2'R,4'R$ และมีกรดเบต้าอะมิโน 2-amino-1-cyclopentanecarboxylic acid (ACPC) ที่มีสเตอริโอเคมีเป็น $1S,2S$ โดยระบบพีเอ็นเอใหม่นี้มีความสามารถในการจับยึดกับดีเอ็นเอได้แข็งแรงกว่าอาร์เอ็นเอ ไม่เกิดการ self-pairing อีกทั้งยังแสดงความแข็งแรงและความจำเพาะเจาะจงในการจับยึดกับดีเอ็นเอมากกว่า aegPNA ของ Nielsen และสามารถจับยึดกับดีเอ็นเอได้เฉพาะในทิศทางแอนติพาราเรลเท่านั้นซึ่งแตกต่างจาก aegPNA ที่จับยึดได้ในทั้งสองทิศทาง ซึ่งความสามารถเหล่านี้ทำให้เมื่อนำ acpcPNA ไปใช้งานเป็นโพรบสำหรับการตรวจวัดดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นได้

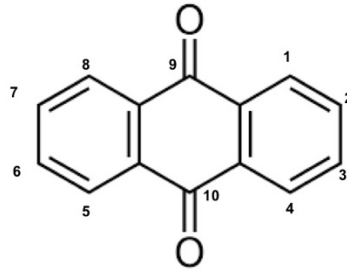


รูปที่ 1.6 โครงสร้างของ aegPNA และ acpcPNA¹⁶

1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แอนทราควิโนน¹⁷ เป็นสารอินทรีย์ที่มีวงอะโรมาติกต่อกันสามวง และมีหมู่คีโตนสองหมู่อยู่ตำแหน่งตรงข้ามกันในวงแหวนตรงกลาง มักใช้เป็นตัวเริ่มต้นในการสังเคราะห์สารอื่นๆ โดยอนุพันธ์ของแอนทราควิโนนมักสังเคราะห์โดยการเติมหมู่แทนที่ที่มีหมู่ให้อิเล็กตรอนลงไปเป็นตำแหน่งที่ว่างอยู่ 8 ตำแหน่งดังรูปที่ 1.7 โดยมักเติมที่ตำแหน่ง 1, 4, 5 และ 8 แอนทราควิโนนมีค่าการดูดกลืนยูวีสเปกตรัมสูงสุดอยู่ที่ 252, 272 และ 323

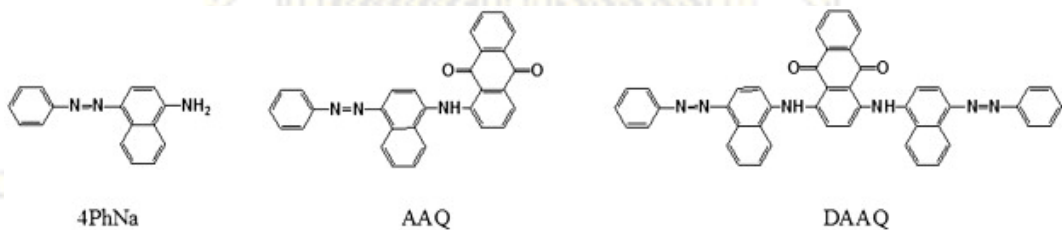
nm.¹⁸ มีค่า chemical shift ของ ¹H NMR บนวงอะโรมาติกของโครงสร้างแอนทราควิโนนอยู่ในช่วง 7.20-8.40¹⁹ ppm.



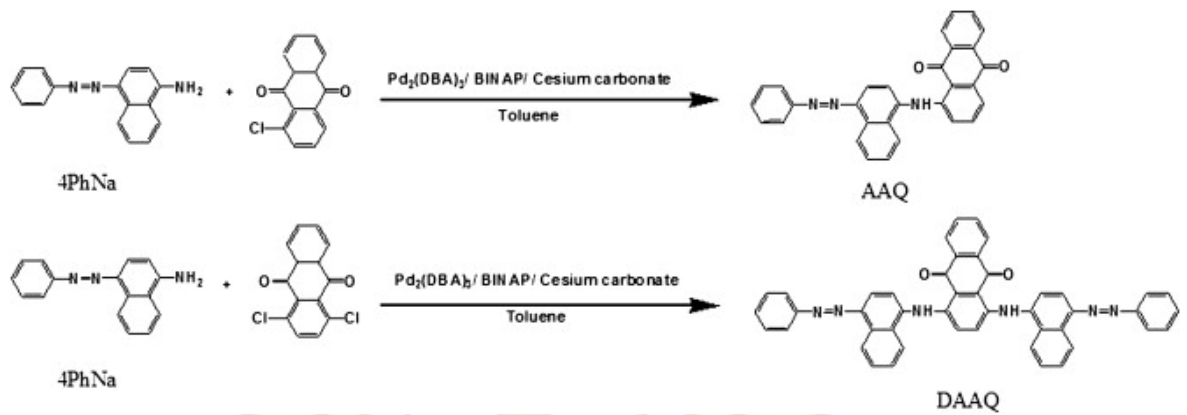
รูปที่ 1.7 โครงสร้างและการระบุตำแหน่งของแอนทราควิโนน

แอนทราควิโนนนั้นเป็นสี้อมที่มีความน่าสนใจเนื่องจากสามารถนำไปใช้งานด้านต่างๆ เช่นในด้านการแพทย์ เป็นยาต้านมะเร็ง²⁰ ต้านเชื้อแบคทีเรีย²¹ นอกจากนี้ แอนทราควิโนนยังสามารถนำไปเชื่อมกับสารทางชีวภาพได้หลายอย่าง อาทิ นิวคลีโอติกแอซิด (nucleic acid) โพลีเพปไทด์ (polypeptide) โดยมีสมบัติเป็นฉลากที่ว่องไวทางเคมีไฟฟ้า และตัวควอนเซอร์ โดยได้มีการสังเคราะห์อนุพันธ์ออกมามากมายเพื่อให้สามารถขยายขอบเขตการใช้งานให้มากขึ้น ตัวอย่างของงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเช่น

ในปี 2010 Park และคณะ²² ได้สังเคราะห์ 1-(4-phenylazo-naphthalen-1-ylamino)-anthraquinone (AAQ) และ 1,4-bis-(4-phenylazo-naphthalen-1-ylamino)-anthraquinone (DAAQ) ดังรูปที่ 1.8 จากสารตั้งต้น 4-phenylazo-1-naphthylamine (4PhNa) ผ่านปฏิกิริยา Suzuki C-N coupling โดยหมู่ Azo นั้นแสดงคุณสมบัติทางไฟฟ้าที่เสถียร ส่วนแอนทราควิโนนนั้นมีความเสถียรต่อความร้อนที่ดี ผู้วิจัยจึงได้ออกแบบและสังเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารสองส่วนนี้เพื่อนำไปใช้เป็นแบล็คเมทริกซ์ (Black Matrix) ชนิดใหม่ สำหรับใช้ในตัวเก็บประจุยิ่งยวด โดยสารทั้งสองมีการดูดกลืนยูวีสเปกตรัมสูงสุดอยู่ที่ 428 และ 481 nm ตามลำดับ

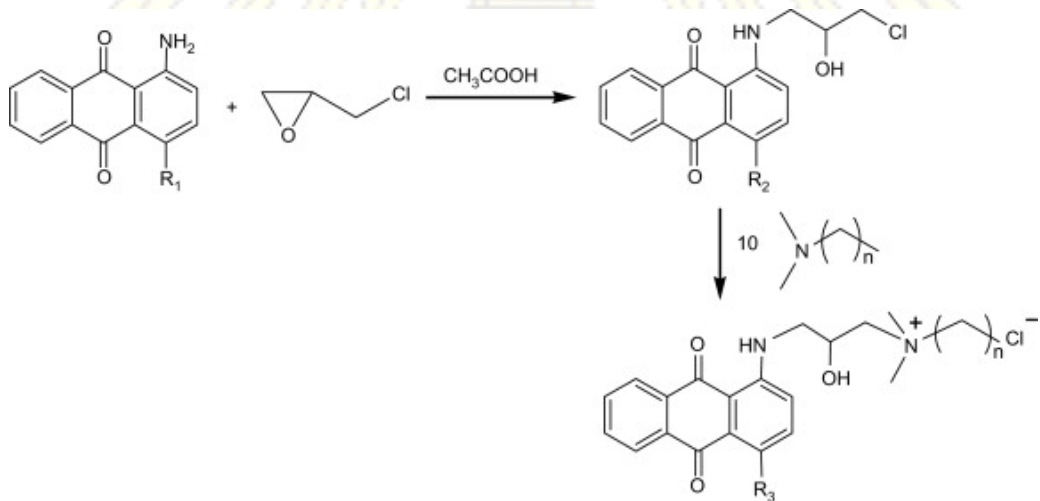


รูปที่ 1.8 โครงสร้างของอนุพันธ์แอนทราควิโนนที่สังเคราะห์



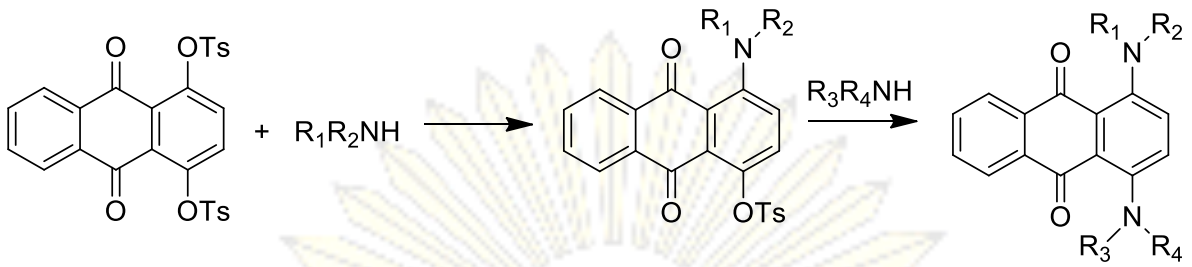
รูปที่ 1.9 การสังเคราะห์ AAQ และ DAAQ ตามลำดับ

ในปี 2016 Sun และคณะ²³ ได้นำหมู่ควอเทอร์นารีแอมโมเนียม (quarternary ammonium salt) มารวมกับแอนทราควิโนนผ่านปฏิกิริยาอัลคิลเลชันของอะมิโนแอนทราควิโนน และการแทนที่ด้วยนิวคลีโอไฟล์ (nucleophilic substitution) เพื่อสังเคราะห์กลุ่มของสารต้านจุลชีพชนิดใหม่ (antimicrobial cationic colorants) ที่มีความยาวของสายโซ่ไฮโดรคาร์บอน (n) ต่างๆกัน



รูปที่ 1.10 เส้นทางสังเคราะห์สารต้านจุลชีพ

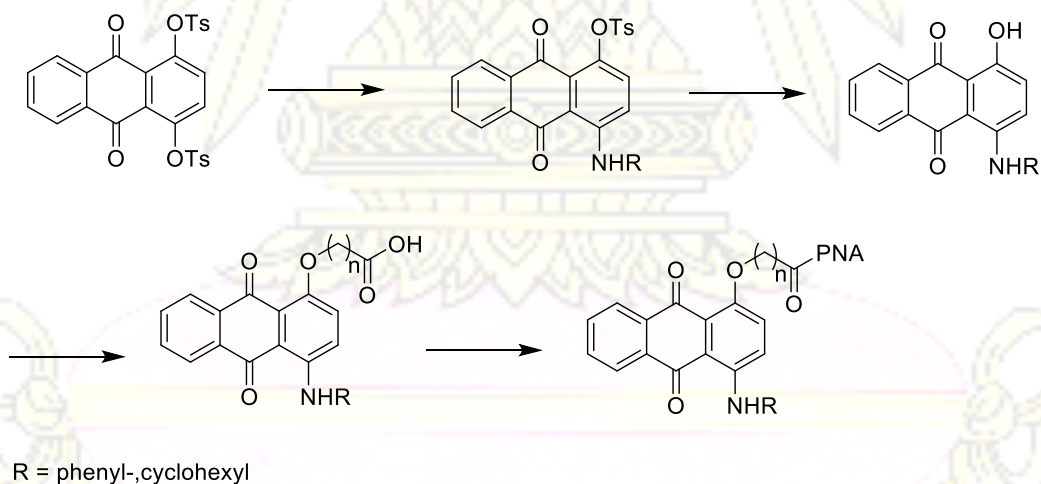
ในปี 1986 Zielske²⁴ ได้ทำการทดลองเตรียมสาร aminoanthraquinones จาก (tosyloxy)anthraquinones โดยมีเป้าหมายเพื่อทำการสังเคราะห์ unsymmetrical 1,4-bis(tosyloxy)anthraquinone ซึ่งเกิดได้โดยผ่าน amino(tosyloxy)anthraquinone ซึ่งในงานวิจัยของ Zielske นี้มีส่วนขั้นตอนในการสังเคราะห์ amino(tosyloxy)anthraquinone จาก 1,4-bis(tosyloxy)anthraquinone โดยการรีฟลักซ์กับเอมีนใน dichloromethane ที่อุณหภูมิ 40 °C จะได้สารที่มี yields ที่ดีถ้าเอมีนที่ใส่เข้าไปนั้นเป็น alkyl-substituted ซึ่งเป็นวิธีการที่ผู้ทดลองได้นำมาใช้ในงานวิจัยนี้



รูปที่ 1.11 แผนภาพการสังเคราะห์ aminoanthraquinone

1.4 วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย

ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจะสังเคราะห์อนุพันธ์ของแอนทราควิโนนชนิดใหม่โดยการเพิ่มหมู่แอลคิลอะมิโนหรือเอริลอะมิโนบนวงแหวนของแอนทราควิโนน เพื่อเพิ่มความสามารถในการดูดกลืนแสงโดยการเพิ่มคอนจูเกชัน ในขณะเดียวกันก็เพิ่มหมู่คาร์บอกซิลเพื่อนำไปเชื่อมต่อกับพีเอ็นเอไว้อีกด้านหนึ่ง โดยในงานวิจัยนี้จะใช้สาร 1,4-ไดไฮดรอกซีแอนทราควิโนนเป็นสารตั้งต้น โดยเปลี่ยนให้เป็นอนุพันธ์ไดโทซิล จากนั้นเติมหมู่แอลคิลหรือเอริลอะมิโนโดยอาศัยปฏิกิริยาแทนที่แบบนิวคลีโอฟิลิกบนวงอะโรมาติกของโทซิลออกซีแอนทราควิโนนเพียงข้างเดียว จากนั้นจะทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสด้วยเบส (basic hydrolysis) ก่อนจะนำไปต่อกับหมู่คาร์บอกซิล เพื่อนำไปติดบนพีเอ็นเอ โดยมีเป้าหมายสุดท้ายเพื่อนำไปใช้เป็นควอนเซอร์สำหรับเพิ่มประสิทธิภาพของฟลูออเรสเซนส์พีเอ็นเอโพรบ (fluorescence PNA probe) ต่อไป



รูปที่ 1.12 แผนการสังเคราะห์ใหม่เลกุลควอนเซอร์ในกลุ่มแอนทราควิโนนที่พร้อมจะนำไปเชื่อมกับพีเอ็นเอ

บทที่ 2 การทดลอง

2.1 รายการเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

2.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

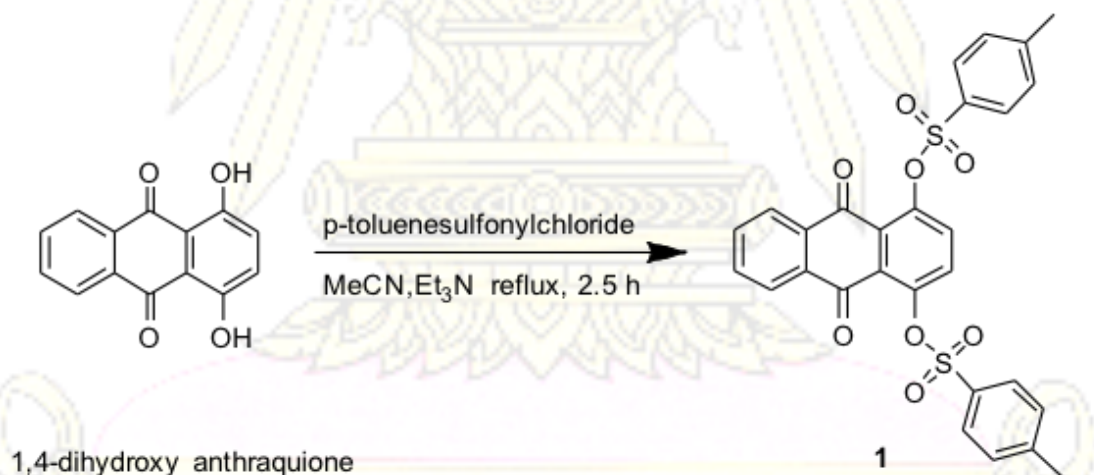
- การชั่งน้ำหนักสาร: เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง DKSH รุ่น AND GR-200
- การทำให้สารแห้ง: เครื่องปั๊มสุญญากาศ (diaphragm vacuum pump) รุ่น JK-DVP-0.5A ยี่ห้อ JKI
- การพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค ^1H NMR (proton nuclear magnetic resonance): เครื่อง Varian Mercury-400 NMR spectrometer ที่ความถี่ 400 MHz

2.1.2 สารเคมี

- การสังเคราะห์อนุพันธ์สารแอนทราควิโนน ได้แก่ 1,4-dihydroxyanthraquinone จาก Acros, *p*-toluenesulfonyl chloride, cyclohexylamine จาก Fluka, aniline จาก UNIVAR, triethylamine จาก Merck
- ตัวทำละลายอินทรีย์ใช้ชนิด analytical grade ได้แก่ ethanol, acetonitrile, dichloromethane, acetonitrile, ethyl acetate, acetone จาก RCI Labscan, Thailand และ hexane จาก Scharlau

2.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารแอนทราควิโนน

2.2.1 การสังเคราะห์ 1,4-bis(tosyloxy)anthraquinone (1)

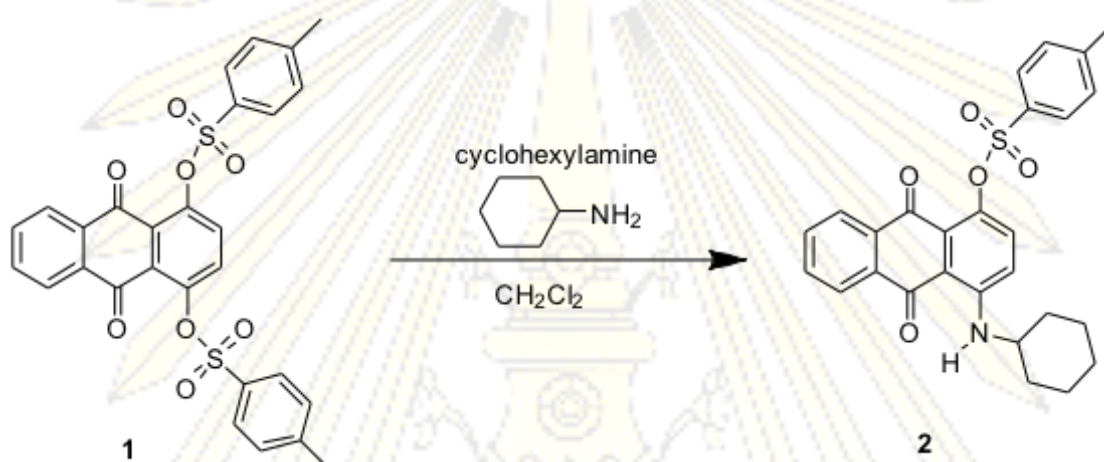


รูปที่ 2.1 แผนภาพการสังเคราะห์สาร 1

ทำตามวิธีการของ Zielske²⁴ โดยละลาย 1,4-dihydroxy anthraquinone (1.031 g, 4.2 mmol) ในตัวทำละลาย acetonitrile 30 mL เติม *p*-toluenesulfonyl chloride (192 mg, 10 mmol) และ

triethylamine 3 mL ทำการรีฟลักซ์ที่ 85 °C เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง จากนั้นทำการ evaporation เพื่อกำจัด acetonitrile จากนั้นละลายของแข็งด้วย dichloromethane และสกัดกับน้ำ 3 ครั้งโดยเก็บชั้น organic phase (ชั้นล่าง) ใช้ magnesium sulfate กำจัดน้ำที่เหลือ จากนั้นทำการตกผลึกสารโดยใช้ hexane ที่ร้อนนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งและทำการกรองสุญญากาศ จะได้ผลึกเป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน 2.0608 g (90.2 %yield) $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.02 (s, 2H), 7.84 (d, $J = 8.1$ Hz, 4H), 7.72 (s, 2H), 7.49 (s, 2H), 7.32 (d, $J = 7.5$ Hz, 4H), 2.40 (s, 6H)

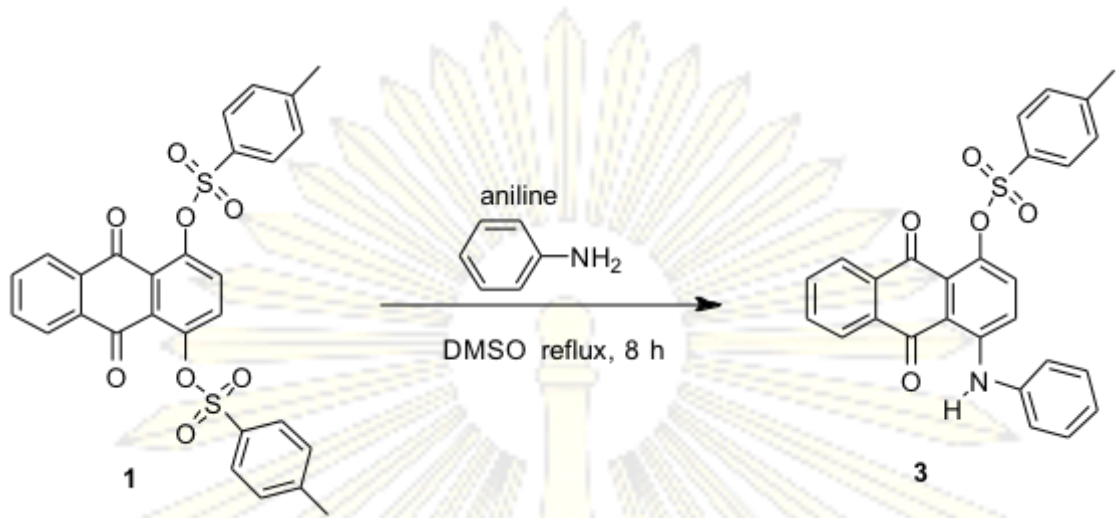
2.2.2 การสังเคราะห์ 1-(cyclohexylamino)-4-(tosyloxy)anthraquinone (2)



รูปที่ 2.2 แผนภาพการสังเคราะห์สาร 2

นำ สาร 1 (0.5054 g, 0.91 mmol) ละลายใน dichloromethane 20 mL เติม cyclohexylamine (1 ml, 8.7 mmol) ทำการรีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นระเหยตัวทำละลายออก และละลายของแข็งที่เหลือด้วย dichloromethane จากนั้นทำการตกตะกอนสารโดยเติม hexane นำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งและทำการกรองสุญญากาศ จะได้เป็นของแข็งสีแดง นำไปทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (15 % ethyl acetate in hexane) ได้ผลึกเป็นของแข็งสีแดง 0.3481 g (79.7 %yield) $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 10.75 (s, H), 8.28 (d, $J = 7.2$ Hz, H), 8.26 (d, $J = 7.2$ Hz, H), 8.19 (d, $J = 7.6$ Hz, H), 8.17 (d, $J = 7.6$ Hz, H), 7.94 (d, $J = 8.3$ Hz, H), 7.92 (d, $J = 8.3$ Hz, H), 7.88 (d, $J = 8.1$ Hz, H), 7.65 (d, $J = 8.9$ Hz, H), 7.63 (d, $J = 8.9$ Hz, H), 7.40 (d, $J = 8.1$ Hz, H), 3.58 (m, H), 2.45 (s, 3H), 2.08-2.11 (m, 2H), 1.90-1.93 (m, 2H), 1.64 (m, 2H), 1.31 (m, 2H)

2.2.3 การสังเคราะห์ 1-(anilino)-4-(tosyloxy)anthraquinone (3)



รูปที่ 2.3 แผนภาพการสังเคราะห์สาร 3

ละลาย สาร 1 (0.3012 g, 0.55 mmol) ใน dimethyl sulfoxide 20 mL แล้วเติม aniline ลงไป (6 mL, 0.07 mol) ทำการรีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 130 °C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นจึงระเหยตัวทำละลายออก และละลายของแข็งที่เหลือด้วย dichloromethane และสกัดกับน้ำ 3 ครั้งโดยเก็บชั้น organic phase (ชั้นล่าง) ใช้ magnesium sulfate กำจัดน้ำที่เหลือ นำของแข็งที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (5 % acetone in hexane) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีม่วง 0.0805 g (33.0 %yield) $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 11.54 (s, H), 8.22 (d, $J = 5.9$ Hz, H), 8.20 (d, $J = 5.9$ Hz, H), 8.04 (d, $J = 6.4$ Hz, H), 8.02 (d, $J = 6.4$ Hz, H), 7.85 (m, H), 7.84 (m, H), 7.73 (d, $J = 6.4$ Hz, H), 7.43 (d, $J = 6.2$ Hz, H), 7.41 (d, $J = 6.2$ Hz, H), 7.38 (d, $J = 6.2$ Hz, H), 7.27 (m, H), 2.36 (s, 3H)

2.2.4 การสังเคราะห์ 1-(cyclohexylamino)-4-hydroxyanthraquinone (4)



รูปที่ 2.4 แผนภาพการสังเคราะห์สาร 4

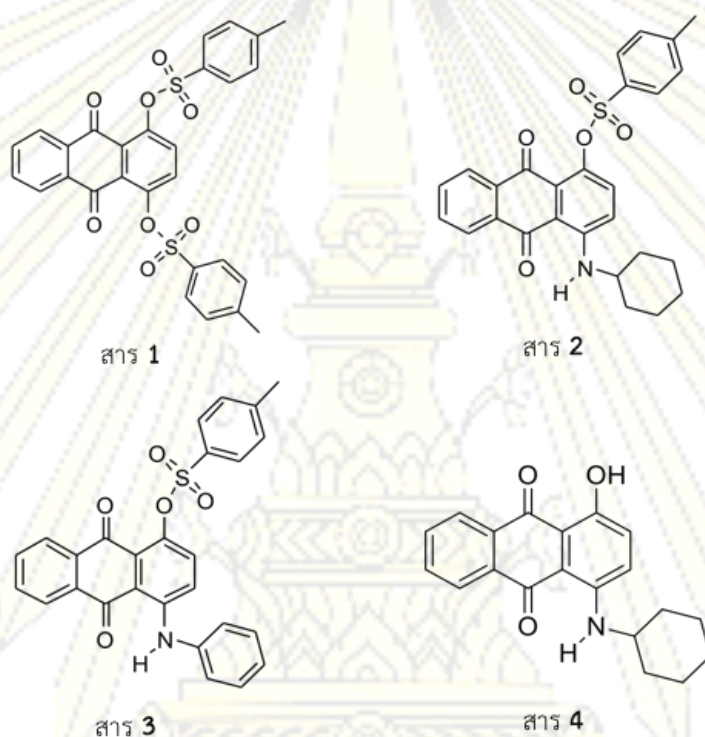
ซัง สาร 2 มา 0.0515 g (0.11 mmol) เติม potassium hydroxide (0.1230 g, 2.1 mmol) และ ethanol 2 mL และทำการรีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 120 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปรับพีเอชให้เป็นกรดด้วย 10% hydrochloric acid เมื่อเติมน้ำลงไป 2 mL มีการตกตะกอนของแข็งเกิดขึ้น จึงนำไปกรองสุญญากาศได้ผลิตภัณฑ์เป็นของแข็งสีน้ำเงิน 0.1180 g. (32.0 %yield) $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 10.53 (d, $J = 7.4$ Hz, H), 8.36 (d, $J = 7.9$ Hz, H), 8.34 (d, $J = 7.0$ Hz, H), 7.79 (d, $J = 7.1$ Hz, H), 7.77 (d, $J = 7.1$ Hz, H), 7.72 (d, $J = 7.5$ Hz, H), 7.25 (d, $J = 7.5$ Hz, H), 5.36 (s, H), 3.62 (m, H), 1.84 - 2.06 (m, H), 1.84 - 2.06 (m, H), 1.47-1.66 (m, H), 1.25 (m, 2H), 1.25 (m, 2H)

บทที่ 3

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

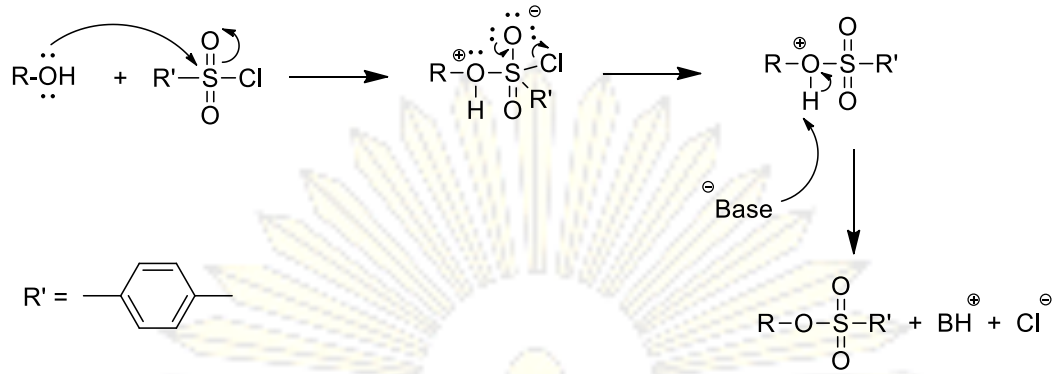
3.1 การสังเคราะห์สารในกลุ่มแอนทราควิโนน

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้มีแผนที่จะสังเคราะห์สารในกลุ่มแอนทราควิโนนทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ 1,4-bis(tosyloxy)anthraquinone (1), 1-(cyclohexylamino)-4-(tosyloxy)anthraquinone (2), 1-(anilino)-4-(tosyloxy)anthraquinone (3) และ 1-(cyclohexylamino)-4-hydroxyanthraquinone (4) แสดงดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 โครงสร้างของสารในกลุ่มแอนทราควิโนนที่สังเคราะห์ได้ในงานวิจัยนี้

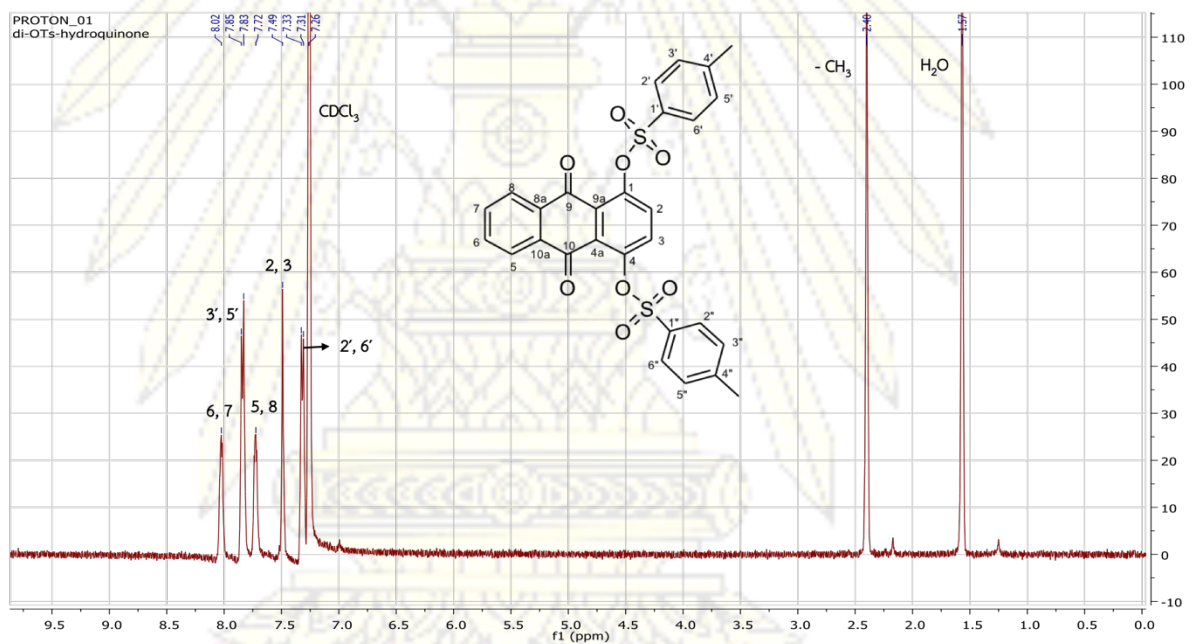
สาร 1 เป็นอินเทอร์มีเดียตสำหรับการสังเคราะห์สาร 2 และ 3 สารนี้สังเคราะห์ได้โดยอาศัยปฏิกิริยา tosylation ของ 1,4-dihydroxyanthraquinone ตามวิธีการของ Zielske ในปฏิกิริยานี้ หมู่ -OH ที่มีความหนาแน่นของอิเล็กตรอนสูงทำหน้าที่เป็นนิวคลีโอไฟล์ เข้าไปทำปฏิกิริยาแทนที่คลอรีนใน tosyl chloride จากนั้นจะถูกดีโพรเตนตในภาวะเบส เกิดเป็นโทซิลเลตเอสเทอร์ (tosylate ester) ดังรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 แผนภาพการสังเคราะห์ 1,4-dihydroxy anthraquinone (1)

จากปฏิกิริยานี้จะได้สาร 1 เป็นผงสีเหลืองอ่อนโดยมีปริมาณผลผลิตเป็น 90.2 %yield ซึ่งเทียบเคียงได้ กับงานวิจัยของ Zielske²⁴

ข้อมูล ¹H NMR สเปกตรัมของสาร 1 เป็นดังแสดงในรูปที่ 3.3 ซึ่งสอดคล้องกับเอกสารอ้างอิง²⁴ และสามารถวิเคราะห์ได้ดังนี้



รูปที่ 3.3 ¹HNMR ของสาร 1 (400 MHz, CDCl₃)

สาร 1 มีโครงสร้างเป็นแบบสมมาตร มีค่า chemical shift ดังนี้

สัญญาณ δ 8.02 (s, 2H) เป็นโปรตอนของคาร์บอนตำแหน่งที่ 6,7 บนวงอะโรมาติกของโครงสร้างหลักแอนทราควิโนน

สัญญาณ δ 7.84 (d, J = 8.1 Hz, 4H) เป็นโปรตอนของคาร์บอนบนวงอะโรมาติกตำแหน่งที่ 3', 5' ของหมู่โทซิลเลต

สัญญาณ δ 7.72 (s, 2H) เป็นโปรตอนของคาร์บอนตำแหน่งที่ 5,8 บนวงอะโรมาติกของโครงสร้างหลักแอนทราควิโนน

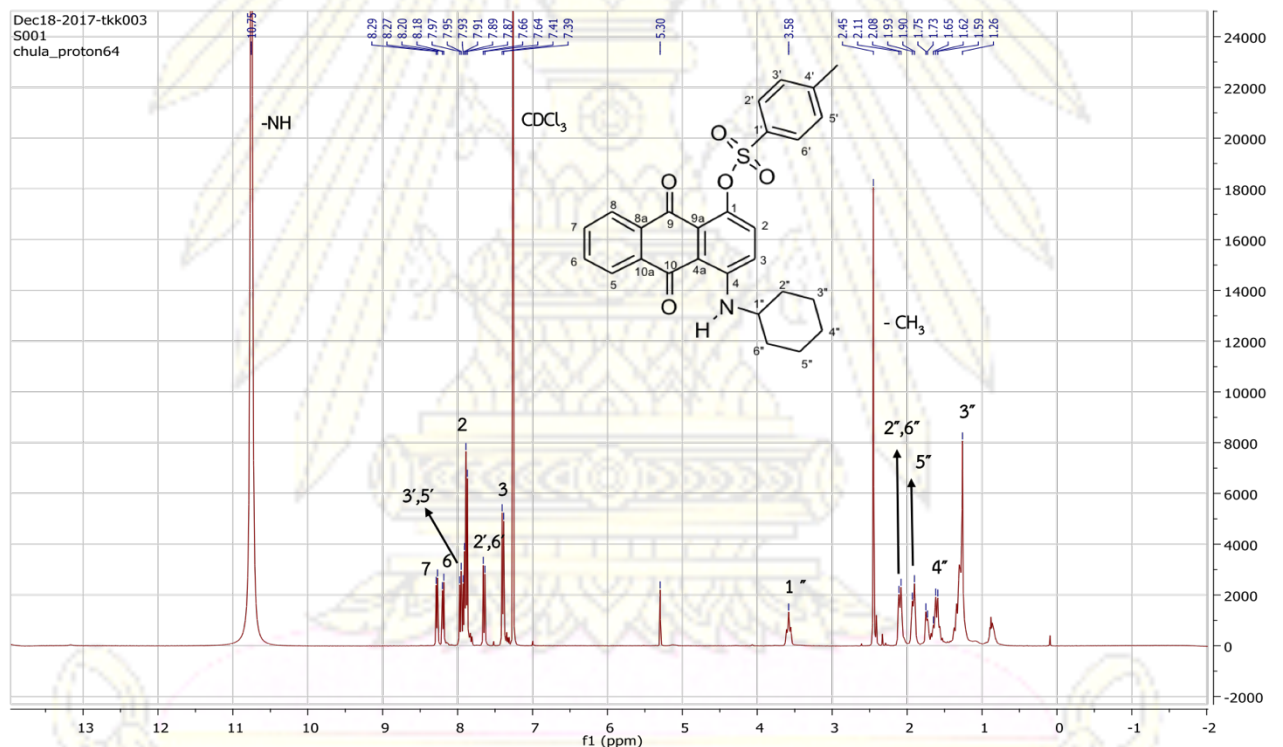
สัญญาณ δ 7.49 (s, 2H) เป็นโปรตอนของคาร์บอนตำแหน่งที่ 2, 3 บนวงอะโรมาติกของโครงสร้างหลักแอนทราควิโนน

สัญญาณ δ 7.32 (d, $J = 7.5$ Hz, 4H) เป็นโปรตอนของวงอะโรมาติกตำแหน่งที่ 2',6' ของหมู่โทซิลเลต

สัญญาณ δ 2.40 (s, 6H) เป็นโปรตอนของหมู่เมทิล (methyl) บนวงอะโรมาติกตำแหน่งที่ 4' ของหมู่โทซิลเลต

สัญญาณ δ 1.50 เป็น H_2O ที่ปนมากับตัวทำละลาย

ในขั้นตอนต่อไป เป็นการแทนที่หมู่โทซิลเลตที่เป็น leaving group ที่ดีในสาร **1** ด้วย cyclohexyl amine และ aniline ตามวิธีการสังเคราะห์ของ Zielske ได้เป็น สาร **2** และ **3** ตามลำดับ สาร **2** เป็นผงสีแดงสว่าง ได้ปริมาณผลผลิตเป็น 79.7 %yield สาร **3** เป็นผงสีม่วงและมีปริมาณผลผลิตเป็น 33 %yield ข้อมูล 1H NMR สเปกตรัมของสาร **2** และ **3** เป็นดังแสดงในรูปที่ 3.4 และ 3.5 ตามลำดับ



รูปที่ 3.4 1H NMR ของสาร **2** (400 MHz, $CDCl_3$)

สามารถวิเคราะห์ข้อมูล 1H NMR ของสาร **2** ได้ดังนี้

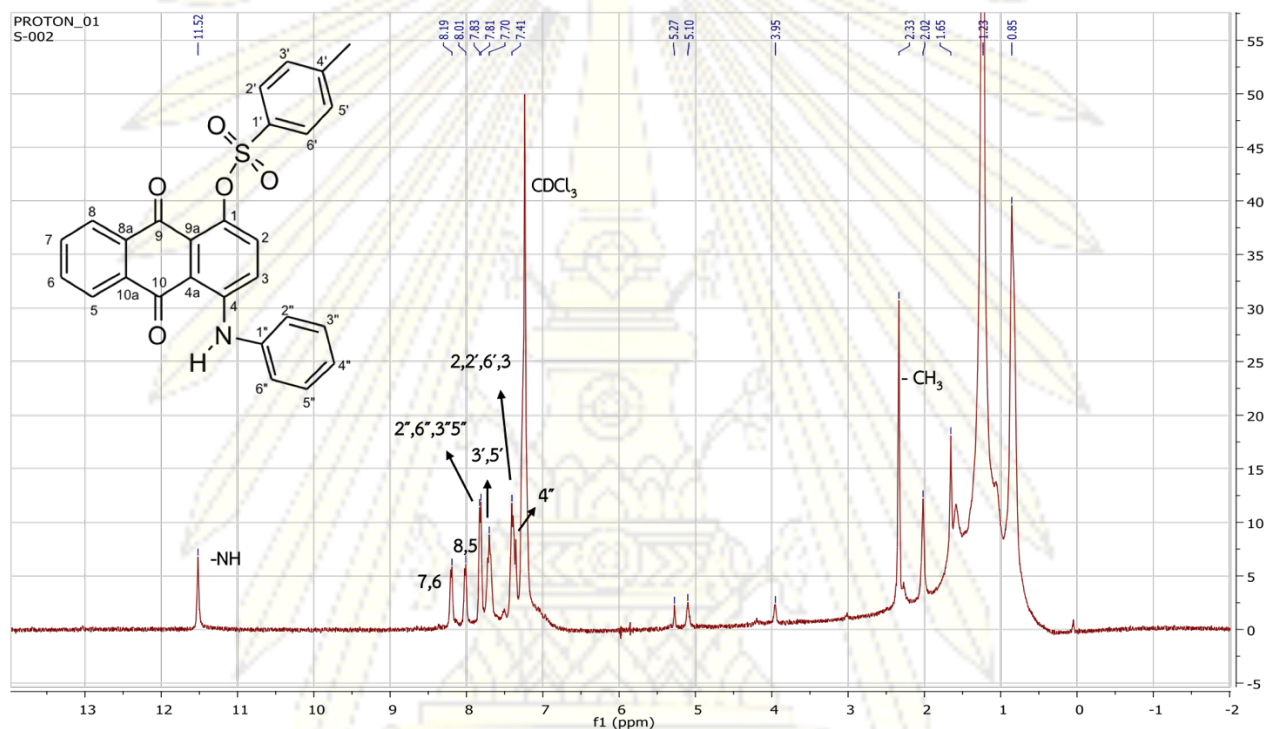
สัญญาณ δ 10.75 (d, $J = 7.4$ Hz, H) เป็นโปรตอนของหมู่เอมีน (amine)

สัญญาณ δ 8.28 (d, $J = 7.2$ Hz, H), 8.26 (d, $J = 7.2$ Hz, H), 8.19 (d, $J = 7.6$ Hz, H), 8.17 (d, $J = 7.6$ Hz, H), 7.88 (d, $J = 8.1$ Hz, H), 7.40 (d, $J = 8.1$ Hz, H) เป็นโปรตอนของคาร์บอนตำแหน่งที่ 7, 6, 8, 5, 2 และ 3 ตามลำดับ บนวงอะโรมาติกของโครงสร้างหลักแอนทราควิโนน

สัญญาณ δ 7.94 (d, $J = 8.3$ Hz, H), 7.92 (d, $J = 8.3$ Hz, H), 7.65 (d, $J = 8.9$ Hz, H), 7.63 (d, $J = 8.9$ Hz, H) เป็นโปรตอนของวงอะโรมาติกตำแหน่งที่ 3', 5', 2' และ 6' ตามลำดับ ของหมู่โทซิเลต

สัญญาณ δ 3.58 (m, H), 2.08 - 2.11 (m, 2H), 1.90 - 1.93 (m, 2H), 1.64 (m, 2H), 1.31 (m, 2H) เป็นโปรตอนของคาร์บอนบนวงไซโคลเฮกซิลเอมีน

สัญญาณ δ 2.45 (s, 3H) เป็นโปรตอนของหมู่เมทิลบนวงอะโรมาติกตำแหน่งที่ 4' ของหมู่โทซิเลต



รูปที่ 3.5 ^1H NMR ของสาร 3 (400 MHz, CDCl_3)

และสามารถวิเคราะห์ข้อมูล ^1H NMR ของสาร 3 ได้ดังนี้

สัญญาณ δ 11.54 (s, H) NH โปรตอนของหมู่เอมีน

สัญญาณ δ 8.22 (d, $J = 5.9$ Hz, H), 8.20 (d, $J = 5.9$ Hz, H), 8.04 (d, $J = 6.4$ Hz, H), 8.02 (d, $J = 6.4$ Hz, H), 7.43 (d, $J = 6.2$ Hz, H), 7.38 (d, $J = 6.2$ Hz, H) เป็นโปรตอนของคาร์บอนตำแหน่งที่ 7, 6, 8, 5, 2 และ 3 ตามลำดับ บนวงอะโรมาติกของโครงสร้างหลักแอนทราควิโนน

สัญญาณ δ 7.73 (d, $J = 6.4$ Hz, H), 7.41 (d, $J = 6.2$ Hz, H) เป็นโปรตอนของวงอะโรมาติกตำแหน่งที่ 3', 5', 2' และ 6' ตามลำดับ ของหมู่โทซิเลต

สัญญาณ δ 7.85 (m, H), 7.84 (m, H) เป็นโปรตอนของวงอะโรมาติกตำแหน่งที่ 2'', 6'', 3'' และ 5''

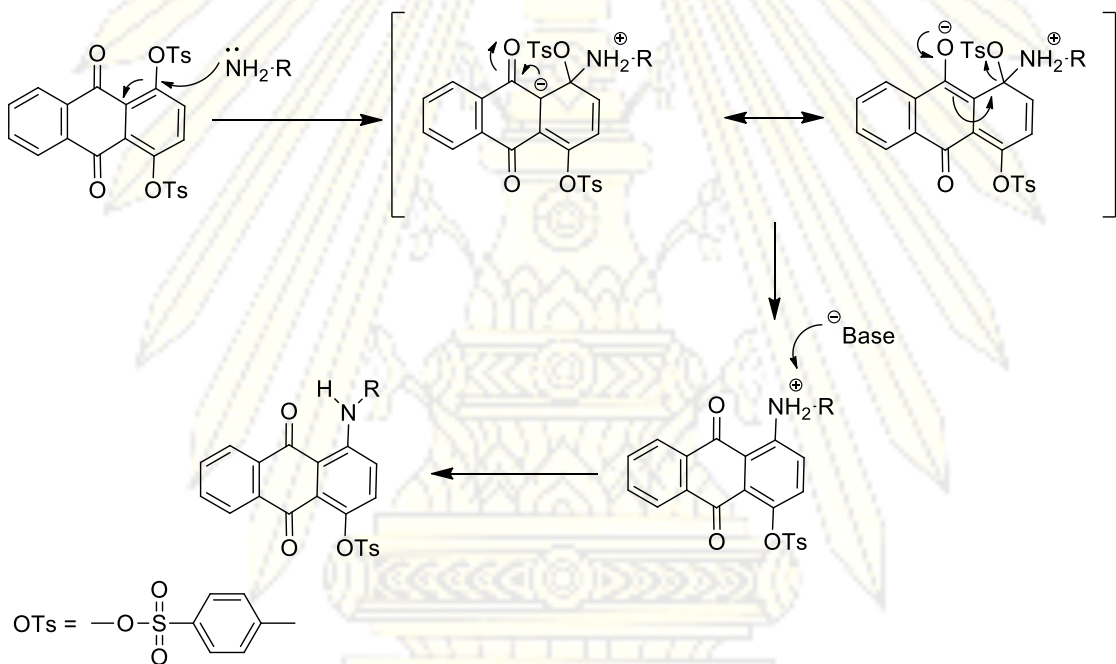
ตามลำดับ บนวงอะโรมาติกของ aniline

สัญญาณ δ 7.27 (m, H) เป็นโปรตอนของวงอะโรมาติกตำแหน่งที่ 4" บนวงอะโรมาติกของ aniline

สัญญาณ δ 2.36 (s, 3H) เป็นโปรตอนของของหมู่เมทิลบนวงอะโรมาติกตำแหน่งที่ 4' ของหมู่โทซิเลต (tosylate)

สัญญาณ δ ในช่วง 1.00-2.50 เป็นโปรตอนของไฮโดรคาร์บอนที่อาจติดมากับ hexane ที่ใช้ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี

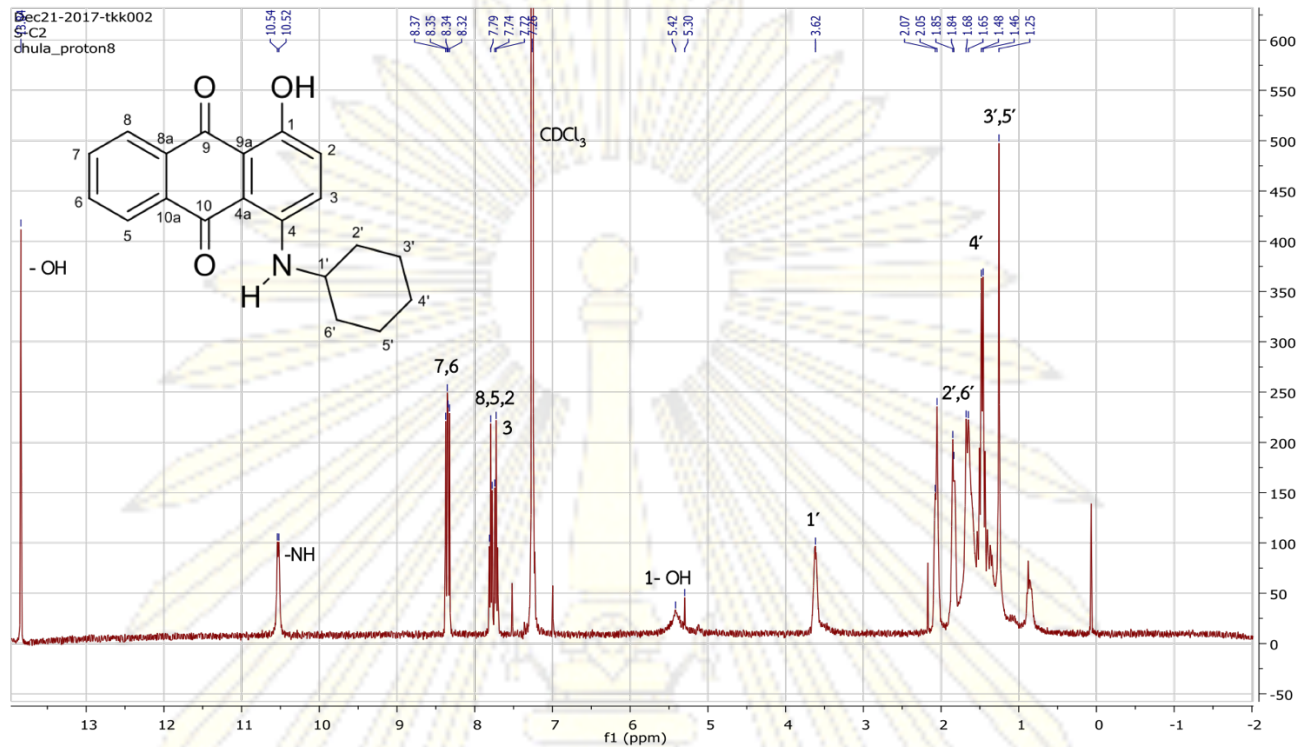
ปฏิกิริยาแทนที่ของสาร 1 ได้เป็นสาร 2 และ 3 คาดว่าเกิดผ่านกลไกแบบ nucleophilic aromatic substitution โดยหมู่คาร์บอนิลในแอนทราควิโนนทำหน้าที่ดึงอิเล็กตรอน ทำให้ความหนาแน่นของอิเล็กตรอนในวงแหวนต่ำลง โดยหมู่คาร์บอนิลทั้งสองส่งผลกระทบต่อทุกตำแหน่ง จึงเกิดปฏิกิริยาแทนที่ได้ง่าย ดังแสดงในรูปที่ 3.6



รูปที่ 3.6 กลไกการเกิดปฏิกิริยา nucleophilic aromatic substitution

ขั้นตอนต่อไปเป็นการสังเคราะห์สาร 4 ซึ่งมีหมู่ฟีนอลอิสระเพื่อนำไปต่อกับหมู่คาร์บอกซิลต่อไป สารนี้สังเคราะห์ได้โดยอาศัยการไฮโดรไลซ์ด้วยเบสเพื่อกำจัดหมู่โทซิเลต โดยทำตามวิธีเดียวกับ Xiang และคณะ²⁵ ได้สาร 4 เป็นของแข็งสีน้ำเงิน มีปริมาณผลผลิตเป็น 32 %yield ซึ่งกลไกการเกิดไฮโดรลิสซิสของซัลโฟเนตเอสเทอร์คล้ายกับคาร์บอกซิเลตเอสเทอร์ แต่ไฮดรอกไซด์ (OH^-) เข้าไปชนที่ซัลเฟอร์อะตอมแล้วเกิด pentacoordinate sulfur intermediate ที่มีประจุลบที่ออกซิเจนอะตอม จากนั้นประจุลบจะ delocalize กลับลงมา ไล่หมู่ฟีนอลิก (ArO^-) ออก ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไฮดรอกซีแอนทราควิโนนตามต้องการ

ข้อมูล $^1\text{H NMR}$ สเปกตรัมของสาร **4** เป็นดังแสดงในรูปที่ 3.7 ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ดังต่อไปนี้



รูปที่ 3.7 $^1\text{H NMR}$ ของสาร **4** (400 MHz, CDCl_3)

สัญญาณ δ 13.84 (s, H) เป็นหมู่ OH

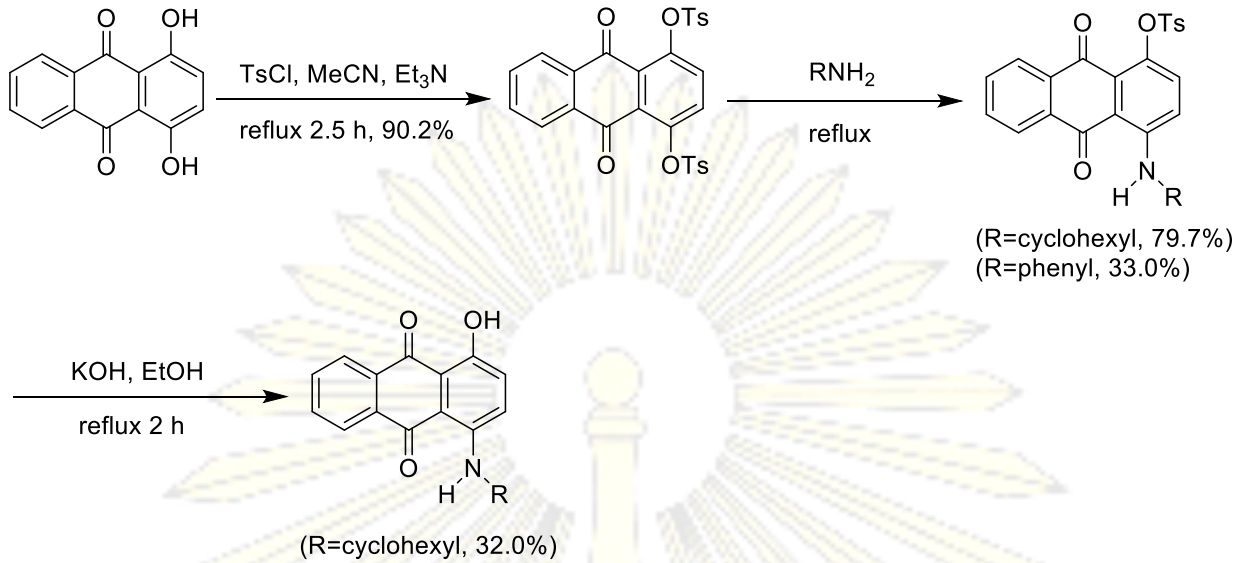
สัญญาณ δ 10.53 (d, $J = 7.4$ Hz, H), เป็นโปรตอนของหมู่เอมีน

สัญญาณ δ 8.36 (d, $J = 7.9$ Hz, H), 8.34 (d, $J = 7.0$ Hz, H), 7.79 (d, $J = 7.1$ Hz, H), 7.77 (d, $J = 7.1$ Hz, H), 7.72 (d, $J = 7.5$ Hz, H), 7.25 (d, $J = 7.5$ Hz, H) เป็นโปรตอนของคาร์บอนตำแหน่งที่ 7, 6, 8, 5, 2 และ 3 ตามลำดับ บนวงอะโรมาติกของโครงสร้างหลักแอนทราควิโนน

สัญญาณ δ 5.36 (s, H) เป็นโปรตอนของหมู่ไฮดรอกซี (hydroxy) ที่ตำแหน่ง 1 บนวงอะโรมาติกของโครงสร้างหลักแอนทราควิโนน

สัญญาณ δ 3.62 (m, H), 1.84 - 2.06 (m, H), 1.84 - 2.06 (m, H), 1.47-1.66 (m, H), 1.25 (m, 2H), 1.25 (m, 2H) เป็นโปรตอนของคาร์บอนตำแหน่ง 1', 2', 6', 4', 3' และ 5' บนวงไซโคลเฮกซิลเอมีน

จากการทดลอง สามารถสังเคราะห์สารได้ทั้งสิ้น 4 ชนิด โดยวิธีและขั้นตอนรวมถึงปฏิกิริยาเคมีที่เกี่ยวข้อง ตลอดจน % yield ตามที่ระบุในรูปที่ 3.8



รูปที่ 3.8 แผนภาพการสังเคราะห์สารในกลุ่มแอนทราควิโนนรวมถึงสภาวะและค่า % yield ในงานวิจัยนี้

ในการทดลองขั้นที่อาศัยปฏิกิริยานิวคลีโอไฟล์กับวงอะโรมาติกของโทซิลออกซีแอนทราควิโนนโดยใช้ไซโคลเฮกซิลเอมีน และอะนิลีน เพื่อให้เกิดเป็นสาร 2 และ 3 ตามลำดับนั้น พบว่า % yield ของสาร 2 ดีกว่าสาร 3 มาก ซึ่งอธิบายได้จากความเป็นนิวคลีโอไฟล์ที่ลดลงของอะนิลีนเมื่อเทียบกับไซโคลเฮกซิลเอมีน เนื่องจากการดีโลคัลไลซ์ของอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวบนไนโตรเจนอะตอมเข้าไปในวงแหวนเบนซีน จึงสามารถเกิดการแทนที่หมู่โทซิลเตตในสาร 1 ได้ยากกว่าไซโคลเฮกซิลเอมีน

จากที่คาดไว้ว่าหากเพิ่มคอนจูเกชันให้มากขึ้นในส่วนวงแหวนของ anthraquinone จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดกลืนแสงให้อยู่ในช่วงความยาวคลื่นที่มากขึ้นและทำให้การทำหน้าที่ในการควENCH ได้มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น ซึ่งจากข้อมูลของสาร 1, 2 และ 3 ที่สังเคราะห์ได้นั้นมีสีเหลือง สีแดง และสีม่วงตามลำดับ และจากหลักการเรื่องสี สีที่เห็นเป็นสีที่สะท้อนออกมาและสารจะดูดกลืนสีที่ตรงข้ามกัน ดังนั้นสาร 1, 2 และ 3 จะดูดกลืนแสงสีม่วง, เขียวน้ำเงิน และเหลือง ตามลำดับ โดยแสงสีเหลืองจะมีความยาวคลื่นมากที่สุด ส่วนสีม่วงมีความยาวคลื่นที่ต่ำสุด ซึ่งสอดคล้องกับสมมุติฐานที่ตั้งไว้ กล่าวคือสาร 2 และ 3 ซึ่งมีคอนจูเกชันจากไนโตรเจนอะตอมที่ต่อกับวง anthraquinone จะดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่นที่มากกว่าสาร 1 และสาร 3 จะดูดกลืนที่มีความยาวคลื่นที่มากกว่าสาร 2 เนื่องจากสาร 3 มีวงอะโรมาติก ซึ่งมีคอนจูเกชันเพิ่มขึ้นจากสาร 2 ที่เป็นวงไซโคลเฮกซิล อย่างไรก็ตาม ควรจะต้องมีการศึกษาช่วงคลื่นของการดูดกลืนแสงและค่า molar extinction coefficient ด้วยเทคนิค UV-Vis spectrophotometry ต่อไปเมื่อสามารถสังเคราะห์โมเลกุลเป้าหมายได้แล้ว

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการสังเคราะห์สาร 1,4-bis(tosyloxy)anthraquinone (1) ซึ่งเป็นอินเทอร์มีเดียตในการสังเคราะห์สาร 1-(cyclohexylamino)-4-(tosyloxy)anthraquinone (2) และ 1-(anilino)-4-(tosyloxy)anthraquinone (3) ซึ่งสามารถสังเคราะห์สารทั้งสองได้สำเร็จเช่นกัน โดยได้ปริมาณผลผลิตเป็น 90.2, 79.7 และ 33.0% โดยสาร 3 ได้ปริมาณผลิตน้อยกว่าสาร 2 เนื่องจากอะนินเป็นนิวคลีโอไฟล์ที่ไม่ดีเท่าไซโคลเฮกซิลเอมีน และยืนยันโครงสร้างโดยใช้เทคนิค ^1H NMR ในขั้นตอนต่อไปคือการกำจัดหมู่โทซิเลตเพื่อให้ได้เป็นหมู่ไฮดรอกซิลอิสระโดยปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสภายใต้ภาวะเบส ซึ่งทำสำเร็จกับสาร 2 เพียงสารเดียว ได้ผลิตภัณฑ์เป็น 1-(cyclohexylamino)-4-hydroxylantraquinone (4) โดยมีปริมาณผลผลิต 32.0% ในขณะที่ปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสของสาร 3 กำลังอยู่ระหว่างการปรับปรุงสภาวะ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

สาร 1, 2 และ 3 ที่สังเคราะห์ได้มีสีเหลือง สีแดง และสีม่วง ซึ่งแสดงว่ามีการดูดกลืนแสงสีม่วง, เขียว น้ำเงิน และเหลือง ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับสมมุติฐานที่คาดว่าถ้ามีคอนจูเกชันเพิ่มขึ้นจะทำให้การดูดกลืนแสงเลื่อนไปทางความยาวคลื่นที่มากขึ้นด้วย งานที่ควรจะทำต่อไปคือการนำโมเลกุลที่สังเคราะห์ได้ไปเชื่อมต่อกับหมู่คาร์บอกซิลผ่านสายโซ่แอลคิลเพื่อนำไปใช้งานเป็นคเวนเซอร์ในฟลูออเรสเซนส์พีเอ็นเอโพรบที่คาดหมายว่าจะให้ประสิทธิภาพสูงกว่าแอนทราควิโนนที่ไม่มีหมู่แทนที่

เอกสารอ้างอิง

1. Nielsen, P. E.; Egholm, M.; Berg, R. H.; Buchardt, O. Sequence-Selective Recognition of DNA by Standard Displacement with a Thymine-Substituted Polyamide. *Science* **1991**, *254*, 1497-1500
2. Nielsen, P. E., and Egholm, M. An Introduction to PNA. Peptide Nucleic Acid. *Molec. Biol.* **1999**, *1*, 89-104.
3. Lowe, G.; Vilaivan, T. Amino Acids Bearing Nucleobases for the Synthesis of Novel Peptide Nucleic Acids. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1* **1997**, 539-546.
4. Lowe, G.; Vilaivan, T. Dipeptides Bearing Nucleobases for the Synthesis of Novel Peptide Nucleic Acids. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1* **1997**, 547-554.
5. Vilaivan, T.; Suparpprom, C.; Harnyuttanakorn, P.; Lowe, G. Synthesis and Properties of Novel Pyrrolodinylyl PNA Carrying β -Amino Acid Spacers. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5533-5536.
6. Vilaivan, T.; Lowe, G. A Novel Pyrrolidinylyl PNA Showing High Sequence Specificity and Preferential Binding to DNA over RNA. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9326-9327.
7. Suparpprom, C.; Srisuwannaket, C.; Sangvanich, P.; Vilaivan, T. Synthesis and Oligodeoxynucleotide Binding Properties of Pyrrolidinylyl Peptide Nucleic Acids Bearing Prolyl-2-aminocyclopentanecarboxylic Acid (ACPC) Backbones. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 2833-2837.
8. Vilaivan, T.; Srisuwannaket, C. Hybridization of Pyrrolidinylyl Peptide Nucleic Acids and DNA: Selectivity, Base-Pairing Specificity, and Direction of Binding. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1897-1900.
9. Al-Otaibi, J.; EL Gogary, T.; Synthesis of Novel Anthraquinones: Molecular Structure, Molecular Chemical Reactivity Descriptors and Interactions with DNA as Antibiotic and Anti-Cancer Drugs. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *1130*, 799-809.
10. Passamano, M.; Pighini, M. QCM DNA-Sensor for GMOs Detection. *Sens. Actuators, B.* **2006**, *118*, 177-181.

11. Yotapan, N.; Nim-anussornkul, D.; Vilaivan, T.; Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acid Terminally Labeled with Fluorophore and End-Stacking Quencher as a Probe for Highly Specific DNA Sequence Discrimination. *Tetrahedron Lett.* **2016**, *72*, 7992-7999.
12. Jablonski Diagram of Fluorescence.
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Jablonski_Diagram_of_Fluorescence_Only.png
(accessed June 20, 2018).
13. Quenching (Fluorescence)
[https://en.wikipedia.org/wiki/Quenching_\(fluorescence\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Quenching_(fluorescence)) (accessed June 21, 2018).
14. Donor Emission and Quencher Absorption Spectral Overlap
<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fig1.gif> (accessed June 20, 2018).
15. Quijano, E.; Bahal, R.; Ricciardi, A.; Saltzman W. M.; Glazer, M. P.; Therapeutic Peptide Nucleic Acids: Principles, Limitations and Opportunities. *Yale J Biol Med.* **2017**, *90*, 583-598
16. Vilaivan, C.; Srisuwannaket, C.; Ananthanawat, C.; Suparpprom, C.; Kawakami, J.; Yamaguchi, Y.; Tanaka, Y.; Vilaivan, T.; Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acid with $\alpha\beta$ -peptide backbone A Conformationally Constrained PNA with Unusual Hybridization Properties. *Artif DNA PNA XNA* **2011**, *2*, 50-59.
17. Anthraquinone
<https://en.wikipedia.org/wiki/Anthraquinone> (accessed June 24, 2018).
18. Chumbalov T.; Chanysheva S.; Muzychkina R.; UV and IR Spectra of Anthraquinone and Chrysophanol Derivatives. *Appl. Spectrosc.* **1967**, *6*, 832-836
19. Arnone. A.; Mondelli, R.; Fronza. G.; ^{13}C NMR Analysis of Anthraquinone as Models for Anthracycline Antibiotics. *J Magn Reson.* **1977**, *28*, 69-79.
20. Al-Otaibi, J.; EL Gogary, T.; Synthesis of Novel Anthraquinones: Molecular Structure, Molecular Chemical Reactivity Descriptors and Interactions with DNA as Antibiotic and Anti-Cancer Drugs. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *1130*, 799-809

21. Gouda, M.A.; Berghot, M.A.; Shoeib, A.I.; Khalil, A.M.; Synthesis and Antimicrobial of New Anthraquinone Derivatives incorporating Pyrazole Moiety. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 1843-1848.
22. Jung, J.; Park, Y.; Park, J.; Synthesis and Electrochemical Properties of Azo and Anthraquinone Derivatives. *Curr. Appl. Phys.* **2010**, *10*, 147-151.
23. Liu, J.; Sun, G.; The Synthesis of Novel Cationic Anthraquinone Dyes with High Potent Antimicrobial Activity. *Dyes and Pigments* **2008**, *77*, 380-386.
24. Zielske, A.; (Tosyloxy)anthraquinones: Versatile Synthons for the Preparation of Various Aminoanthraquinones. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 1305-1309
25. Huang, H.; Wu, Y.; Zhang, W.; Feng, C.; Wang, B.; Cai, W.; Hu, P.; Zhao, K.; Xiang, S.; Copper-Catalyzed Regioselective C-H Sulfonyloxylation of Electron Rich Arenes with *p*-Toluenesulfonic Acid and Sulfonyloxylation of Aryl(mesityl)iodonium Sulfonates. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *82*, 3094-3101.

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวพศร เปรมชื่น เกิดเมื่อวันที่ 8 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2539 ที่จังหวัดนครนายก สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนปราจิณราษฎรอำรุง จังหวัดปราจีนบุรี เมื่อปี 2556 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 424/786 หมู่ 12 ตำบลท่างาม อำเภอเมืองปราจีนบุรี จังหวัดปราจีนบุรี รหัสไปรษณีย์ 25000 อีเมล sunny_pyc@hotmail.com

