รหัสโครงการ SUT 1-102-45-12-36

รายงานการวิจัย

การสังเคราะห์ 1-Ile-Dolastatin 11: เอไมด์อนาล็อก (Amide Analogue) ของสารต้านมะเร็งโดลาสแตติน 11

(Synthesis of 1-Ile-Dolastatin 11: The Amide Analogue of the Anticancer Depsipeptides Dolastatin 11)

ผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิชญา ตระการรุ่งโรจน์ (นาคเขียว)

สาขาวิชาเคมี

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2545

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กันยายน 2549

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่เป็นเป็นผู้ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย โดยการวิจัยครั้งนี้ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2545 พร้อมกันนี้ ข้าพเจ้าต้องขอขอบคุณ Professor Robert B. Bates แห่ง Department of Chemistry ณ The University of Arizona ประเทศสหรัฐอเมริกา เป็นอย่างยิ่ง ในการเป็นผู้ให้ความอนุเคราะห์สารประ- กอบอินเทอร์มิเดียตที่ใช้ในการศึกษาวิจัยในโครงการนี้ และเป็นผู้ที่ทำให้ข้าพเจ้าตระหนักถึงความสำคัญของเคมีอินทรีย์และการวิจัยมาจนถึงทุกวันนี้

นอกจากนั้นข้าพเจ้าขอขอบคุณผู้ที่ให้ความช่วยเหลือและให้ความสะดวกในการศึกษาวิจัยของโครงการนี้ ได้แก่ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนพร แม่นยำ เป็นผู้อนุเคราะห์สารเคมีและเครื่องมือวิทยาศาสตร์บางชนิดที่ใช้ในการศึกษาวิจัย, คุณ Yanling Hua เจ้าหน้าที่ฝ่ายวิเคราะห์ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีโดยใช้เครื่องมือนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (Nuclear Magnetic Resonance) รวมทั้งเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการอาคาร F2 ห้อง 2215 ทุกท่าน ที่ช่วยดูแลห้องปฏิบัติการและอำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์วิทยาศาสตร์

ท้ายที่สุดนี้ ข้าพเจ้าต้องขอขอบคุณ คุณปราโมทย์ ตระการรุ่งโรจน์ เพื่อนร่วมชะตาชีวิตของข้าพเจ้า ที่เป็นผู้จุดประกาย แนะแนวคิดและคอยเป็นกำลังใจให้ในยามที่ประสบกับปัญหาต่าง ๆ อย่างสม่ำเสมอตลอดมา

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการสังเคราะห์สารประกอบเอไมด์อนาล็อกของสารต้านมะเร็งโดลาสแตติน 11 ซึ่งสารประกอบโดลาสแตติน 11 นั้น เป็นสารประกอบเดปซี่เพปไทด์ที่มีโครงสร้างเป็นวง วิธีการสังเคราะห์ที่ได้เสนอในโครงการวิจัยนี้ ได้กำหนดขอบเขตไว้ โดยที่ได้ใช้แบบแผนในการสังเคราะห์ที่เหมือนกันกับของสารประกอบโดลาสแตติน 11 เท่านั้น โดยจะประกอบไปด้วยสารประกอบอินเทอร์มิเดียตที่สำคัญ 5 ชนิด แต่ได้แทนที่สารประกอบไฮดรอกซีแอซิด ชนิด (2S,3S)-2-hydroxy-3- methyl- pentanoic acid ด้วยสารประกอบ L-isoleucine ทั้งนี้เพื่อต้องการจะแทนที่พันธะเอสเทอร์ภายในวงของสารประกอบโดลาสแตติน 11 ด้วยพันธะเอไมด์ สำหรับขั้นตอนในการสังเคราะห์นั้น สารประ กอบอินเทอร์มิเดียตทั้ง 5 ชนิดจะถูกนำมาเชื่อมกัน โดยปฏิกิริยาการสร้างพันธะเพปไทด์ และได้ใช้เทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (เอ็นเอ็มอาร์) ในการวิเคราะห์โครงสร้างของสารประกอบที่สังเคราะห์ได้ในแต่ละขั้นตอน และการประเมินผลของการสังเคราะห์

ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเอ็นเอ็มอาร์ พบว่าสารประกอบเอไมด์อนาล็อกที่สังเคราะห์ได้นั้น จะมีโครงสร้างเป็นโซ่ตรงปลายเปิด ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาการสร้างพันธะเพปไทด์ระหว่างโมเลกุลได้ดีกว่า การสร้างพันธะเพปไทด์ภายในโมเลกุลแล้วให้สารประกอบที่เป็นวง ซึ่งผลการศึกษานี้สามารถชี้ให้เห็นว่า แบบแผนในการสังเคราะห์ที่ใช้ ซึ่งเหมือนกับการสังเคราะห์สารประกอบโดลาสแตติน 11 นั้น อาจจะไม่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์สารประกอบเอไมด์อนาล็อกชนิดนี้ก็ได้ ทั้งนี้ควรจะได้มีการศึกษาเพื่อออกแบบการสังเคราะห์ที่เหมาะสม เช่นเดียวกันกับการศึกษาในเชิงโครงสร้างเคมี คอนฟอร์เมชัน และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบอนาล็อกชนิดนี้ต่อไปในอนาคต

Abstract

This research was aimed to synthesize 1-Ile-Dolastatin 11, an amide analogue of the anticancer cyclic depsipeptide Dolastatin 11. The synthesis methodology in this project was limited only to that used for synthesizing Dolastain 11, which composed of five key intermediates except to replace the hydroxyl acid, (2S,3S)-2-hydroxy-3-methyl- pentanoic acid with L-isoleucine unit to form the amide bond linkage instead of the ester bond. These intermediates were coupled to one another sequentially by peptide bond forming reactions and structures of resulted synthetic peptides were determined and evaluated by NMR.

From NMR analyses, this synthetic amide analogue appeared to have an open-chain structure and it was likely to form intermolecular peptide bond with another peptide molecule rather than to form intramolecular peptide linkage to give the cyclic structure. These results suggested that the proposed synthesis strategy as that of Dolastatin 11 may not be suitable for the making of 1-Ile-Dolastatin 11 analogue. Further studies in designing of other synthesis pathways as well as detailed chemical structures, conformations, and biological activity aspects of this amide analogue will need to be pursued in the future.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	ฉ
สารบัญแผนภาพ	ช
คำอธิบายสัญลักษณ์	ซ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
1.2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย	13
1.3. ขอบเขตของการวิจัย	13
1.4. ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	14
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
2.1. กรอบแนวคิดและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	15
2.2. วิธีการทดลอง	19
2.2.1. สถานที่และสภาวะในการทดลอง	19
2.2.2. ปฏิกิริยาเคมีที่เกี่ยวข้องในการทดลอง	19
2.2.3. ขั้นตอนในการสังเคราะห์	23
2.2.4. การวิเคราะห์ผลการทดลอง	23
2.2.5. เครื่องมือวิทยาศาสตร์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	24
บทที่ 3 ผลการวิจัย	26
บทที่ 4 ข้อวิจารณ์	
4.1. วิจารณ์ผลการทดลอง	39
4.2. ปัญหาอุปสรรค และแนวทางแก้ไข	46
4.2.1. ปัญหาในแง่ของสภาวะในการทดลอง	46
4.2.2 ปัญหาในแง่ของข้อจำกัดในการใช้สารเคมีบางชนิด	47
4.2.3. ปัญหาในแง่ของสภาวะอากาศที่มีผลต่ออายุการใช้งานของรีเอเจนต์	47
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	49

บรรณานุกรม 50
ภาคผนวก 53
ประวัติผู้วิจัย 59

สารบัญแผนภาพ

		หน้า
แผนภาพที่ 1	แสดงแบบแผนในการสังเคราะห์สารประกอบโดลาสแตติน 11 (**20**)	17
แผนภาพที่ 2	แสดงแบบแผนในการสังเคราะห์สารประกอบเอไมด์อนาล็อกของสารโดลาสแตติน 11 (**24**)	18
แผนภาพที่ 3	แสดงปฏิกิริยาการสร้างพันธะเพปไทด์ด้วยวิธี Mixed anhydried	20
แผนภาพที่ 4	แสดงปฏิกิริยาการสร้างพันธะเพปไทด์ด้วยวิธี Carbodiimide	21
แผนภาพที่ 5	แสดงปฏิกิริยาในการกำจัดหมู่ปกป้อง –Boc ด้วย TFA	22
แผนภาพที่ 6	แสดงปฏิกิริยาการเติมไฮโดรเจน (Hydrogenation) เพื่อกำจัดหมู่ Benzyl-	22
แผนภาพที่ 7	แสดงปฏิกิริยาเคมีในการสังเคราะห์สารประกอบ **42**	27
แผนภาพที่ 8	แสดงปฏิกิริยาเคมีในการสังเคราะห์สารประกอบ **48**	30
แผนภาพที่ 9	แสดงปฏิกิริยาในการสังเคราะห์สารประกอบ **50**	32
แผนภาพที่ 10	แสดงปฏิกิริยาในการสังเคราะห์สารประกอบ **52**	34
แผนภาพที่ 11	แสดงปฏิกิริยาในการสังเคราะห์สารประกอบ **24**	36
แผนภาพที่ 12	แสดงปฏิกิริยาของการสร้างสารประกอบไดคีโตไพเพอร์ราซีน **55**	39

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	แสดงวัฏจักรของการแบ่งเซลล์	2
ภาพที่ 2	แสดงโครงสร้างของแอคตินมอนอเมอร์ หรือ G-actin	6
ภาพที่ 3	แสดงคอนฟอร์เมชันที่มีพลังงานต่ำที่สุดของสารประกอบเอไมด์อนาล็อกของสารโดลาสแตติน 11 (24)	12
ภาพที่ 4	แสดงคอนฟอร์เมชันที่เหมือนกันของสารประกอบโดลาสแตติน 11 (20) และสารประกอบเอไมด์อนาล็อกของสารโดลาสแตติน 11 (24)	13
ภาพที่ 5	แสดงส่วนต่าง ๆ ของสารประกอบโดลาสแตติน 11 (20)	15
ภาพที่ 6	แสดงสารประกอบอินเทอร์มิเดียตที่สำคัญ 5 ชนิด ในการสังเคราะห์สารประกอบโดลาสแตติน 11 (20)	16
ภาพที่ 7	แสดงสารประกอบอินเทอร์มิเดียตที่สำคัญ 5 ชนิด ในการสังเคราะห์สารประกอบเอไมด์อนาล็อกของสารโดลาสแตติน 11 (20)	26
ภาพที่ 8	แสดงไดเมอร์ของสารประกอบ **56**	37
ภาพที่ 9	แสดงการเกิดพันธะไฮโดรเจนของหมู่ฟังก์ชันเอไมด์ และหมู่ฟังก์ชันเอสเทอร์	44
ภาพที่ 10	แสดงการเปรียบเทียบคอนฟอร์เมชันของไดเมอร์ของสารประกอบ 56 (ซ้ายมือ) และไดเมอร์ของสารประกอบที่แทนที่หมู่เอไมด์ในสารประกอบ 56 ด้วยหมู่เอสเทอร์ (ขวามือ)	45

คำอธิบายสัญลักษณ์

Boc	t-butyloxycarbonyl
Bn	benzyl
DCM	dichloromethane
DKP	diketopiperazine
EDC	1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide
EtOAc	ethyl acetate
HOBt	1-hydroxybenzotriazole (hydrate)
IBCF	isobutylchloroformate
NMM	4-methylmorpholine
TEA	triethylamine
TFA	trifluoroacetic acid
TMS	tetramethylsilane

สัญลักษณ์ที่ใช้สำหรับ NMR สเปกตรัม

br	broad
brs	broad singlet
d	doublet
m	multiplet
s	singlet

บทที่ 1
บทนำ

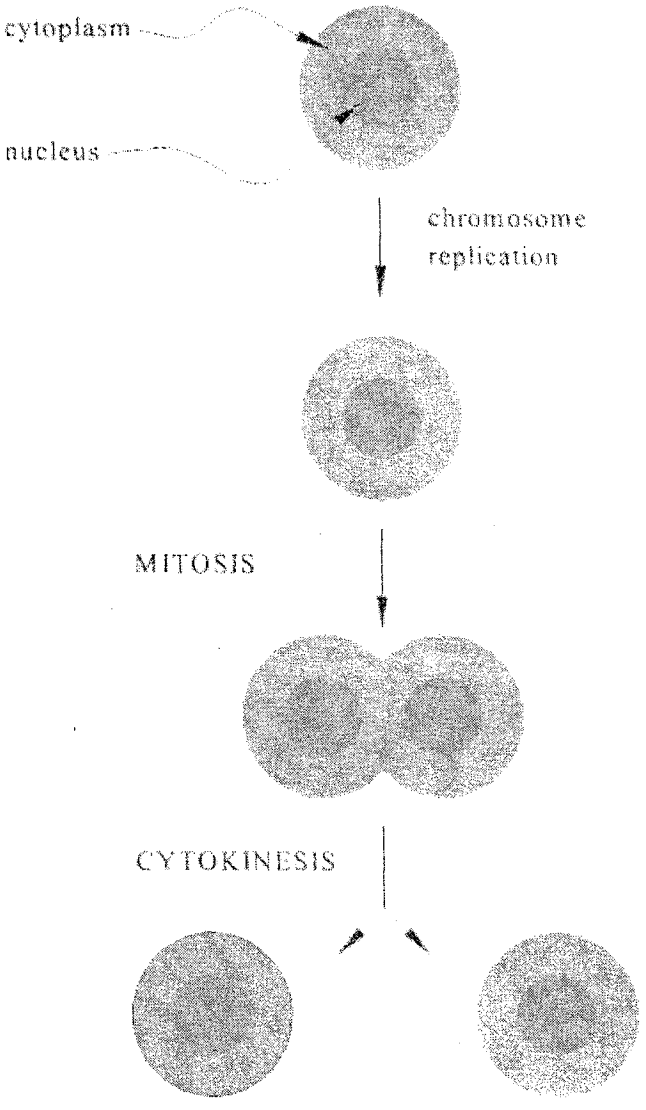
1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

มะเร็งเป็นโรคร้ายที่คร่าชีวิตผู้คนเป็นจำนวนมากในแต่ละปี สำหรับในประเทศไทย จากสถิติล่าสุดของกลุ่มข้อมูลข่าวสารสุขภาพ สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ กระทรวงสาธารณสุข ประจำปี 2548 ระบุว่า จำนวนของผู้เสียชีวิตจากมะเร็งชนิดต่าง ๆ รวมกันอยู่ในอัตรา 81.4 ต่อประชากร 100,000 คน ซึ่งเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตอันดับหนึ่งของประชากรในประเทศไทย โดยมะเร็งชนิดที่พบว่าเป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตในประเทศไทยคือ มะเร็งตับ มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม และมะเร็งปากมดลูก (กลุ่มข้อมูลข่าวสารสุขภาพ สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ กระทรวงสาธารณสุข, 2549)

มะเร็งที่พบและรู้จักในร่างกายของมนุษย์มีมากกว่า 150 ชนิด การที่เซลล์มะเร็งแต่ละชนิดนั้นมีพฤติกรรมที่แตกต่างกัน ทำให้ยากในการรักษาและเยียวยา โดยทั่วไปการรักษามะเร็งสามารถทำได้โดย การผ่าตัด การฉายรังสี และการรักษาด้วยเคมีบำบัด (chemotherapy) เป็นต้น การรักษาด้วยเคมีบำบัดเป็นการกำจัดเซลล์มะเร็งโดยใช้สารเคมี ซึ่งเป็นวิธีการรักษาที่ได้ผลดีใน กรณีที่เซลล์มะเร็งได้แพร่กระจายไปยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกายแล้ว ยาที่ใช้ในการรักษามะเร็งหลายชนิดมีแหล่งกำเนิดมาจากธรรมชาติ เช่น จากพืชสมุนไพร แบคทีเรียบางชนิด หรือจากสิ่งมีชีวิตทางทะเล (marine organisms) ถึงแม้ว่าในปัจจุบันจะมียาที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งมากมายหลายชนิด แต่ปริมาณผู้ป่วยและผู้ที่เสียชีวิตจากโรคมะเร็งก็ยังมีในปริมาณมากทุกปี ดังสถิติที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ดังนั้นการหายาต้านมะเร็งตัวใหม่โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ยาที่มีกลไกในการกำจัดเซลล์มะเร็งที่แตกต่างไปจากยาใช้อยู่ในปัจจุบัน จึงยังเป็นความจำเป็นอันเร่งด่วนที่จะต้องทำ

การกำจัดเซลล์มะเร็งที่มีประสิทธิภาพวิธีหนึ่งคือ การยับยั้งกระบวนการแบ่งเซลล์ของเซลล์มะเร็ง ในกระบวนการแบ่งเซลล์นั้นสามารถแบ่งได้เป็น 2 ขั้นตอนที่สำคัญคือ ขั้นไมโทซิส (mitosis) ซึ่งจะเป็นขั้นตอนที่มีการแบ่งตัวของนิวเคลียสออกเป็น 2 นิวเคลียสภายในเซลล์ หลังจากนั้นจะเป็นขั้นของการแบ่งไซโทรพลาซึม (cytokinesis) ซึ่งจะทำให้ได้เซลล์ใหม่ 2 เซลล์จากเซลล์เริ่มต้น ตามภาพที่ 1 ซึ่งแสดงวัฏจักรของการแบ่งเซลล์

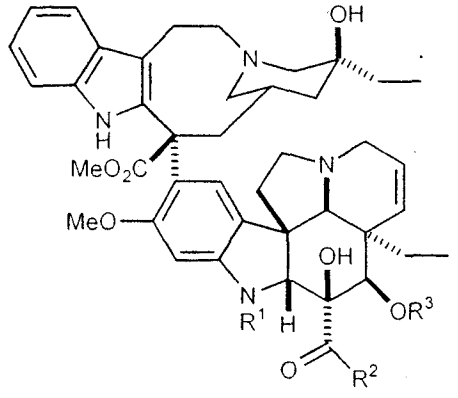
สำหรับขั้นตอนไมโทซิสหรือการแบ่งนิวเคลียสนั้น เกิดขึ้นได้โดยกระบวนการพลวัต (dynamic process) ของการสร้างและสลายตัวของไมโครทูบลู (microtubules) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของโปรตีนที่ชื่อว่า ทูบูลิน (tubulin) สารที่ยับยั้งกระบวนการสร้างและสลายไมโครทูบูลนี้ จะเรียกว่า "microtubule inhibitors" หรือ "microtubule poison" หรือ "spindle poison"



ภาพที่ 1 แสดงวัฏจักรของการแบ่งเซลล์

สารประกอบที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งโดยกลไกนี้ อาจจะเข้าไปยับยั้ง กระบวนการเกิดพอลิเมอร์ของโปรตีนทูบูลิน หรือเข้าไปเกาะกับโมเลกุลของไมโครทูบูลแล้ว ทำให้ไมโครทูบูลเสถียรจนไม่สามารถสลายตัวได้ สำหรับสารประกอบกลุ่มแรกที่เข้าไปยับยั้งยับยั้งปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันของโปรตีนทูบูลิน ได้แก่ สารประกอบในกลุ่มอัลคาลอยด์ เช่น สารประกอบวินบลาสติน (Vinblastin, **1**), สารประกอบวินคริสติน (Vincristin, **2**), สารประกอบวินดิซิน (Vindisine, **3**), สารประกอบโคชิซิน (Colchisin, **4**) และสารประกอบคริบโทฟายซิน 1 (Cryptophycin 1, **5**) เป็นต้น

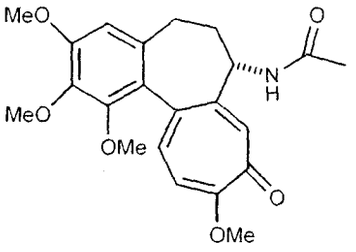
สารประกอบ วินบลาสติน (**1**), วินคริสติน (**2**) และ วินดิซิน (**3**) ได้มาจากพืชสมุนไพรชนิด *Catharanthus roseous* ซึ่งพบในเกาะมาดากาสกา (Madagascar) (Rai amd Wolff, 1996) สารประกอบที่ได้นำมาใช้ในการรักษาแบบเคมีบำบัดแล้ว ได้แก่ วินบลาสติน (**1**) และวินคริสติน (**2**) (Mujagic et al., 1993) ส่วนสารประกอบวินดิซิน (**3**) นั้น ขณะนี้ยังอยู่ในระหว่างการทดสอบในระดับคลินิกเพื่อใช้ในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งเต้านม (Patocka and Strunecka, 1999)



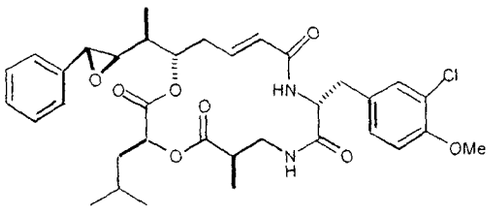
	R^1	R^2	R^3
1	Me	OMe	Ac
2	CHO	OMe	Ac
3	Me	NH_2	H

ส่วนตัวอย่างของสารประกอบชนิดอื่น ๆ ที่พบว่ามีกลไกในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ในขั้นไมโทซิสเช่นเดียวกันนี้ ได้แก่ สารประกอบโคชิซิน (Colchisin, **4**) ซึ่งเป็นอัลคาลอยด์ที่สกัดแยกได้จาก *Colchicum autumnale* ซึ่งเดิมทีนั้นสารประกอบนี้ใช้ในการรักษาโรคเก๊าท์ (Sackett และ Varma, 1993) สารประกอบคริบโทฟายซิน 1 (Cryptophycin 1, **5**) ซึ่งสกัดแยกมาจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิด *Nostoc sp.* GSV 244 (Sabbaraju et al., 1997) ก็เป็นอีกสารหนึ่งที่ยับยั้งกระบวนการเกิดพอลิเมอร์ของโปรตีนทูบูลิน จากการศึกษา พบว่าสารประกอบคริบโทฟายซิน 1 (**5**) นี้ มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งที่ดื้อยา รวมทั้งเซลล์มะเร็งอีกหลายชนิดด้วย (Smith et al., 1994)

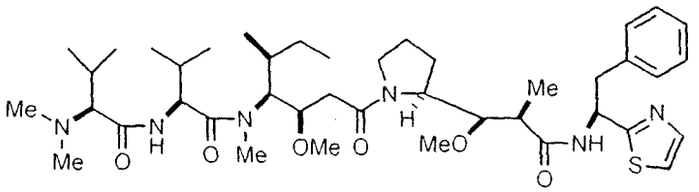
นอกจากสารประกอบประเภทอัลคาลอยด์แล้ว ก็ยังพบว่าสารประกอบโดลาสแตติน 10 (Dolastatin 10, **6**) ซึ่งเป็นสารประกอบประเภทเพนตะเพปไทด์ (pentapeptide) สกัดแยกมาได้จากสิ่งมีชีวิตทางทะเลชนิด *Dolabella auricularia* (Pettit et al., 1987) นั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งที่สูงมาก ปัจจุบันกำลังในระหว่างการทดสอบในระดับคลินิก



4



5

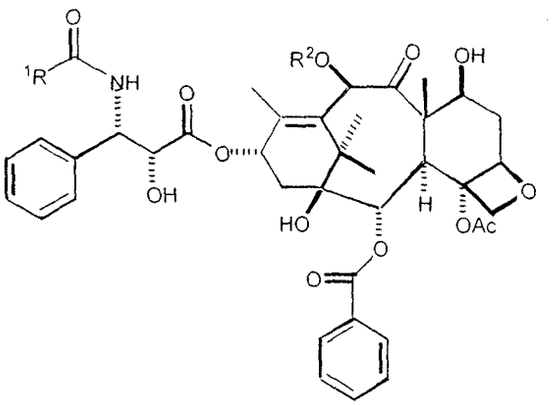


6

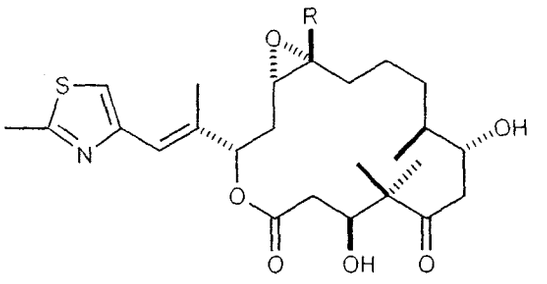
ตามที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นว่า สารประกอบที่เข้าไปยับยั้งกระบวนการแบ่งเซลล์ขั้นไมโทซิสนั้น นอกจากจะเข้าไปขัดขวาง การสร้างพอลิเมอร์ของโปรตีนทูบูลินแล้ว ยังมีสารประกอบอีกบางชนิดที่เข้าไปทำให้ไมโครทูบูลเสถียรจนไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาการสลายพอลิเมอร์ได้ สารในกลุ่มนี้ ได้แก่ สารประกอบ แทคซอล (Taxol, 7) ซึ่งเป็นสารประกอบที่พบในเปลือกไม้ของพืชในสกุล *Texus* ชนิด *Texus brevifolia* (Borman, 1991) สารประกอบแทคซอลนี้ได้ถูกนำมาใช้ในการรักษาด้วยเคมีบำบัด เพื่อรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านม และมะเร็งปากมดลูก (Schiff, Horwitz และ Fant, 1979) นอกจากนั้นสำหรับสารประกอบอนาล็อก (analogue) ของแทคซอล (7) หรือ สารสังเคราะห์ที่ได้มีโครงสร้างทางเคมีดัดแปลงมาจากสารประกอบแทคซอล (7) ที่ชื่อว่า แทคซอเทียร์ (Taxotere, **8**) นั้น พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งสูงกว่าสารประกอบแทคซอล (7) ถึง 4 เท่า (Ringel และ Horwitz, 1991) เนื่องจากมีความสามารถในการละลายน้ำได้ดีกว่า และยังมีผลข้างเคียงในการใช้น้อยกว่าอีกด้วย สารประกอบแทคซอเทียร์ (**8**) นี้ได้มีการนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งเต้านม และมะเร็งปากมดลูกแล้วเช่นกัน

สำหรับสารประกอบชนิดอื่น ๆ ที่มีกลไกในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเช่นเดียวกันกับสารประกอบแทคซอล (7) และแทคซอเทียร์ (8) ได้แก่ สารประกอบอีโพไธโลน เอ และ บี (Epothilones A, **9** และ B, **10**) ที่สกัดแยกได้จากเชื้อแบคทีเรียชนิด *Soranglium cellulosom* (Bollag et al., 1995) สารประกอบดิสโคเดอราไมด์ (Discodermolide, **11**) ซึ่งสกัดแยกได้จากสัตว์ทะเลประเภทฟองน้ำที่อาศัยอยู่บริเวณทะเลคาริเบรียน ชนิด *Discodermia dissolute* โดยที่สารประกอบนี้มีฤทธิ์ต้านเซลล์

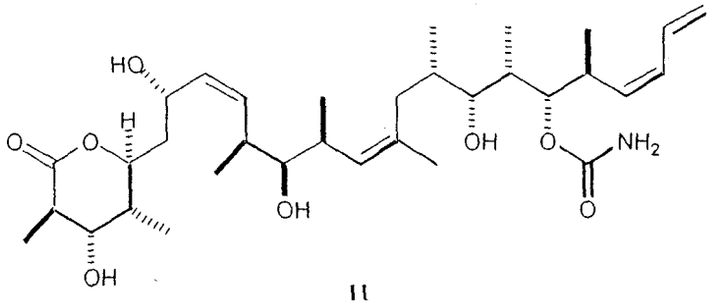
มะเร็งมากกว่าสารประกอบแทคซอล (7) ถึง 100 เท่า (terHaar et al., 1996; Hung, Chen และ Schreiber, 1996)



	R^1	R^2
7	C_6H_5	t-Bu
8	Ac	H



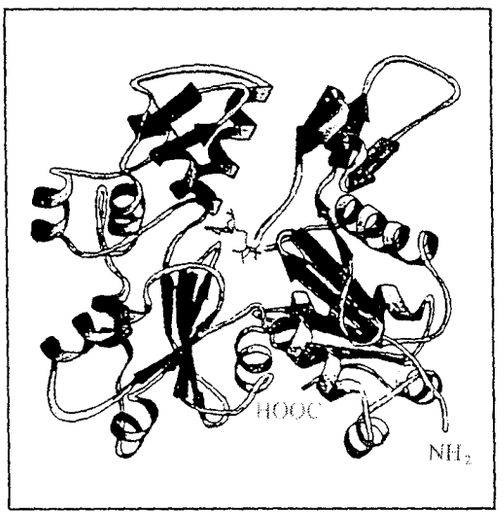
	R
9	H
10	Me



11

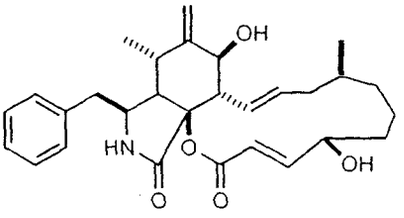
วิธีการในการกำจัดเซลล์มะเร็ง นอกจากจะไปขัดขวางขั้นตอนการแบ่งนิวเคลียส หรือไมโทซิสแล้ว การขัดขวางขั้นตอนของการแบ่งไซโทรพลาสซึม (cytokinesis) ก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่ง การแบ่งไซโทรพลาซึม (cytokinesis) ของเซลล์นั้นจะต้องใช้กระบวนการสร้างและสลายไมโครฟิลา-

เมนท์ (microfilamens) ซึ่งเป็นกระบวนการพลวัต (dynamic process) เช่นเดียวกับการสร้างและสลายไมโครทูบูล ไมโครฟิลาเมนท์นี้ เป็นพอลิเมอร์ของโปรตีนแอคติน (actin) โดยโปรตีนแอคติน ชนิดที่เป็นมอนอเมอร์ (monomer) จะเรียกว่า globular actin หรือ G-actin โครงสร้างจะมีลักษณะตามที่แสดงไว้ในภาพ 2 (Holmes et al., 1990) ซึ่งเมื่อเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชัน แล้วจะสร้างไมโครฟิลาเมนท์ของแอคติน หรือ F-actin ซึ่งจะจัดตัวในลักษณะที่เป็นฮีลิกซ์ (helix)

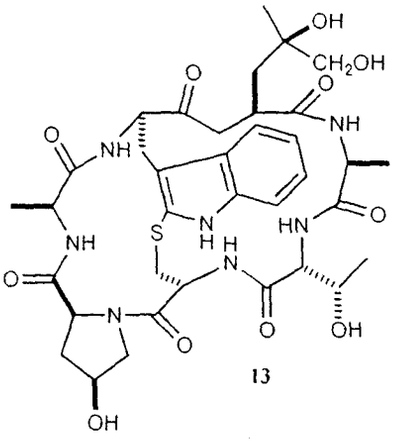


ภาพที่ 2 แสดงโครงสร้างของแอคตินมอนอเมอร์ หรือ G-actin

สารประกอบที่ขัดขวางการทำงานของไมโครฟิลาเมนต์ (microfilament inhibitors) ในขั้นตอนการแบ่งไซโทรพลาซึม นั่นคือการเข้าไปขัดขวางการทำงานของโปรตีนแอคตินนั่นเอง ทั้งนี้ยังไม่มีสารประกอบชนิดใดเลยที่มีกลไกในการยับยั้งกระบวนการแบ่งเซลล์เช่นนี้ ที่ใช้ในการรักษามะเร็งแบบเคมีบำบัด ทำให้การศึกษาและวิจัยทางเคมีของสารประกอบกลุ่มนี้อยู่ในความสนใจมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่สกัดแยกได้จากสิ่งมีชีวิตทางทะเล เนื่องจากมีกลไกในการออกฤทธิ์แตกต่างจากยารักษามะเร็งที่ใช้ในปัจจุบัน ตัวอย่างของสารประกอบในกลุ่มนี้ ได้แก่ สารประกอบประเภทไซโตชาลาซินชนิดต่าง ๆ (Cooper, 1987) เช่น สารประกอบไซโตชาลาซิน บี (Cytochalasin B, **12**) เป็นต้น นอกจากนั้นยัง ได้แก่ สารประกอบฟลาลอยดิน (Phalloidin, **13**) ซึ่งเป็นสารประกอบประเภททอกซิน (toxin) ซึ่งสกัดแยกได้จากเห็ดพิษ *Amanita* (Faulstich และ Wieland, 1978) จากการศึกษาพบว่า สารประกอบฟลาลอยดิน (**13**) นี้ ได้เข้าไปขัดขวางกลไกในการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันของโปรตีนแอคตินได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตามเนื่องจากสารประกอบฟลาลอยดิน (**13**) นี้มีความเป็นพิษมากเกินกว่าที่จะใช้เป็นยาในการรักษามะเร็งได้ ปัจจุบันจึงใช้สารประกอบนี้เพื่อศึกษาการทำงานของ F-Actin เท่านั้น



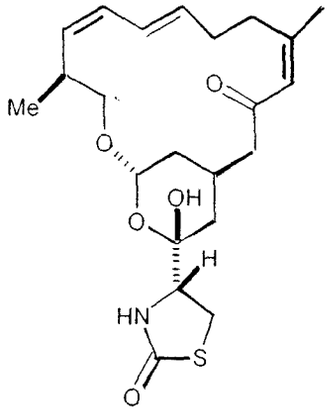
12



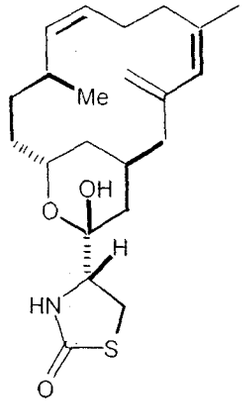
13

ตัวอย่างเพิ่มเติมของสารประกอบที่ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันของโปรตีนแอคติน ได้แก่สารประกอบดังต่อไปนี้

สารประกอบลาทรันคูลิน เอ และ บี (Latrunculins A (**14**); B (**15**)) ซึ่งสกัดแยกได้จากสิ่งมีชีวิตทางทะเลประเภทฟองน้ำที่พบบริเวณทะเลแดง ชนิด *Latrunculia magnifica* (Keller) (Kashman et al. in 1980) หรือภายหลังได้ถูกกำหนดชื่อวิทยาศาสตร์ใหม่ว่า *Negombata magnifica*



14



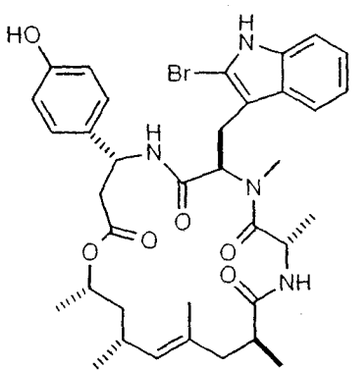
15

สารประกอบแจสปลาไคโนลิด หรือ แจสปามิด (Jasplakinolide หรือ Jaspamide (**16**) เป็นสารประกอบเพปไทด์ที่แยกได้จากสิ่งมีชีวิตทางทะเลประเภทฟองน้ำชนิด *Jaspis johnstoni* (Crews, Manes, และ Boehler, 1986) สารประกอบ แจสปลาไคโนลิด (**16**) นี้ มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม และมะเร็งต่อมลูกหมากได้เป็นอย่างดี แต่ก็มีระดับความเป็นพิษสูงเช่นกัน ดังนั้นจึงไม่สามารถนำมาใช้หรือพัฒนาเป็นยาที่ใช้ในการรักษามะเร็งได้

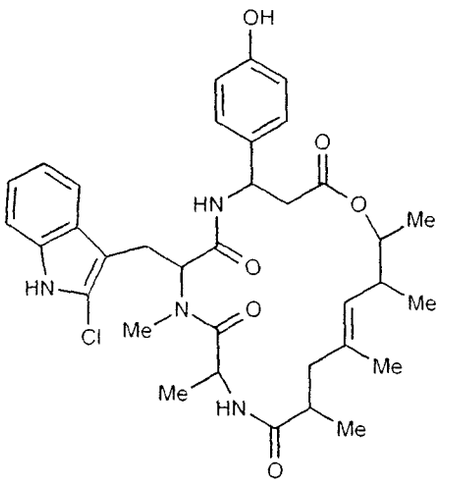
สารประกอบ สวินโฮไลด์ เอ (Swinholide A, **17**) ซึ่งเป็นสารประกอบประเภทวง 44 เหลี่ยมของแลคโทนไดเมอร์ ชนิดแมคโครไรด์ (44-membered ring dimeric lactone macrolide) สกัด

แยกได้จากสิ่งมีชีวิตทางทะเลประเภทฟองน้ำที่พบบริเวณทะเลแดงชนิด *Theonella swinhoei* (Carmely และ Kashman, 1985) ซึ่งภายหลังพบว่า สารประกอบนี้สามารถสกัดแยกได้จาก *T. swinhoei* ที่พบบริเวณเกาะโอกินาวา ประเทศญี่ปุ่น (Kobayashi , 1990) ด้วยเช่นกัน

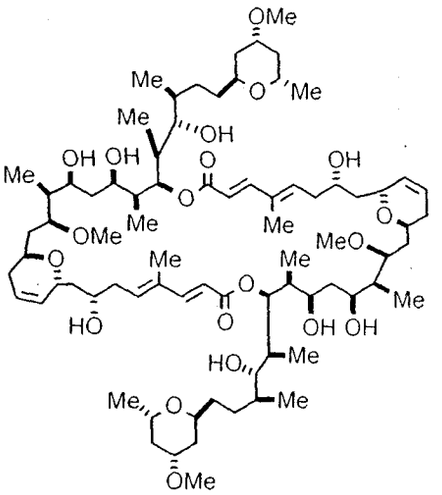
สารประกอบมิสะไคโนลิด เอ (Misakinolide A , **18**) ซึ่งเป็นสารประกอบวง 40 เหลี่ยม ประเภทแลคโทนไดเมอร์ ชนิดแมคโครไรด์ (40-membered dimeric lactone macrolide) สกัดแยกได้จากฟองน้ำทะเลชนิด *Theonella* ที่พบบริเวณเกาะโอกินาวา ประเทศญี่ปุ่น (Sakai, Higa และ Kashman, 1986)



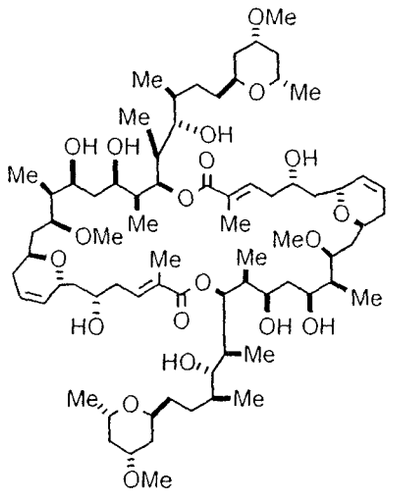
16



19



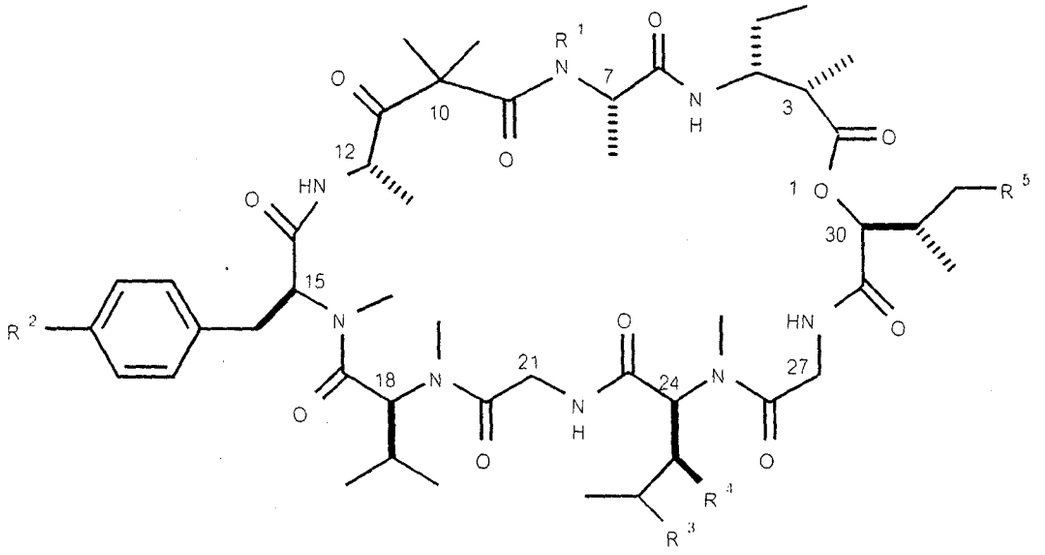
17



18

สารประกอบในกลุ่มโคลดราไมด์ (Chondramides) เช่น โคลดราไมด์ ดี (Chondramide D, **19**) ซึ่งเป็นสารประกอบเดปซิเพปไทด์ที่สกัดแยกออกมาได้จากแบคทีเรียที่คล้ายราเมือก (myxobacterium) ชนิด *Chondromyces crocatus* (Kunze, 1995) สารประกอบเหล่านี้มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายคลึงกับสารประกอบแจสปลาไคโนลิด (**16**)

สารประกอบโดลาสแตติน 11 (Dolastatin 11, **20**) เป็นสารประกอบประเภทไซคลิกเดปซี่เพปไทด์ (cyclic depsipeptides) ที่ได้มาจากสิ่งมาจากสิ่งมีชีวิตทางทะเล (marine organism) ในมหาสมุทรอินเดีย ชนิด *Dolabella auricularia* โดย G. R. Pettit และคณะผู้ร่วมวิจัยที่ Arizona State University (Pettit et al., 1989)



	R^1	R^2	R^3	R^4	R^5
20	H	OMe	Me	H	Me
21	Me	H	Me	H	Me
22	H	OMe	H	Me	Me
23	Me	OMe	Me	H	Me

ในการสกัดแยก *D. auricularia* นอกจากจะได้สารประกอบโดลาสแตติน 11 (Dolastatin 11, **20**) แล้วยังได้สารประกอบโดลาสแตติน 12 (Dolastatin 12, **21**) ซึ่งเป็นสารอนาล็อก หรือสารประกอบที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายคลึงกันตามธรรมชาติ (natural analogue) ในปริมาณเล็กน้อยด้วย ถึงแม้ว่าสารประกอบทั้งสองจะมีโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกันไม่มาก แต่ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า

สารประกอบโดลาสแตติน 11 (**20**) มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ประมาณ 30 เท่าของ สารประกอบโดลาสแตติน 12 (**21**) โดยให้ค่า ED_{50} เป็น 2.7×10^{-3} และ 7.5×10^{-2} μg/mL ตามลำดับ

สารประกอบโดลาสแตติน 11 (**20**) นี้มีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกับสารมาจัสดูลามีดด์ ซี (Majusculamide C, **22**) ที่ได้มาจากการสกัดแยกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue green alga) ชนิด *Lyngbya majuscular* จากบ่อน้ำของ Anewetak Atoll ใน Marshall Islands (Carter et.al., 1984; Mynderse, Hunt และ Moore, 1989) และสารลิไบยาสแตติน 1 (Lyngbyastatin 1, **23**) ได้จากการสกัดแยกเส้นใยของสาหร่ายชนิด *Lyngbya majuscular* ที่อยู่รวมกับชนิด *Schizothrix calcicola* ที่พบในบริเวณใกล้กับเกาะ Guam สารทั้งสองตัวหลังได้ถูกแยกออกมาโดย R. Moore และคณะผู้ร่วมวิจัยที่ University of Hawaii (Harrigan et al, 1998)

สารประกอบโดลาสแตติน 11 (**20**) นี้ จะมีลักษณะกลไกในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเช่นเดียวกับสารประกอบแจสปลาไคโนลิด (**16**) กล่าวคือจะทำให้ไมโครฟิลาเมนต์ของแอคตินเสถียรจนไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาการสลายพอลิเมอร์ได้ จากผลการทดสอบโดยสถาบันมะเร็งแห่งชาติ (National Cancer Institute) ประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่า สารประกอบโดลาสแตติน 11 นี้เป็นสารประกอบที่สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนแอคตินได้ดีที่สุด ตามข้อมูลในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงผลของสารประกอบต่าง ๆ ที่มีต่อปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันของแอคติน

สารประกอบที่ใช้ทดสอบ	EC_{50}, μM
โดลาสแตติน 11 (**20**)	9.5
มาจัสดูลามีดด์ ซี (**22**)	19
แจสปลาไคโนลิด (**16**)	42
ฟลาลอยดิน (**13**)	22

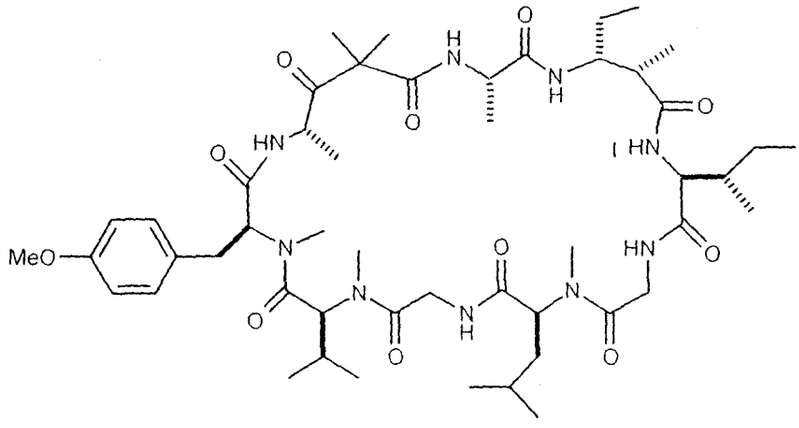
(EC_{50} คือความเข้มข้นของสารที่ทำให้ลดปริมาณของโปรตีน50% ในส่วนลอย (supernatant)

เนื่องจากปริมาณของสารประกอบโดลาสแตติน 11 (**20**) ที่ได้จากธรรมชาตินั้นน้อยมาก โดย *D. auricularia* ปริมาณ 1.6 ตัน จะสามารถสกัดแยกสารประกอบโดลาสแตติน (**20**) ได้แค่ 44 มิลลิกรัมเท่านั้น ซึ่งเป็นสาเหตุที่นำไปสู่การสังเคราะห์ (total synthesis) สารประกอบโดลาสแตติน 11 (**20**) โดยกลุ่มวิจัยของ R. B. Bates ณ University of Aizona ที่สำเร็จอย่างสมบูรณ์ในปี 1996 (Bates et al., 1997) จากผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งของสารประกอบโดลาสแตติน 11 สังเคราะห์นี้ ในการกำจัดเซลล์มะเร็งของมนุษย์ 60 ชนิด ณ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ประเทศ

สหรัฐอเมริกา พบว่าอยู่ในเกณฑ์ที่สูงมากในมะเร็งบางประเภท โดยเฉลี่ยแล้วอยู่ในความเข้มข้นระดับนาโนโมล (nanomol) กับมะเร็งทุกชนิด (Stessman, 1998)

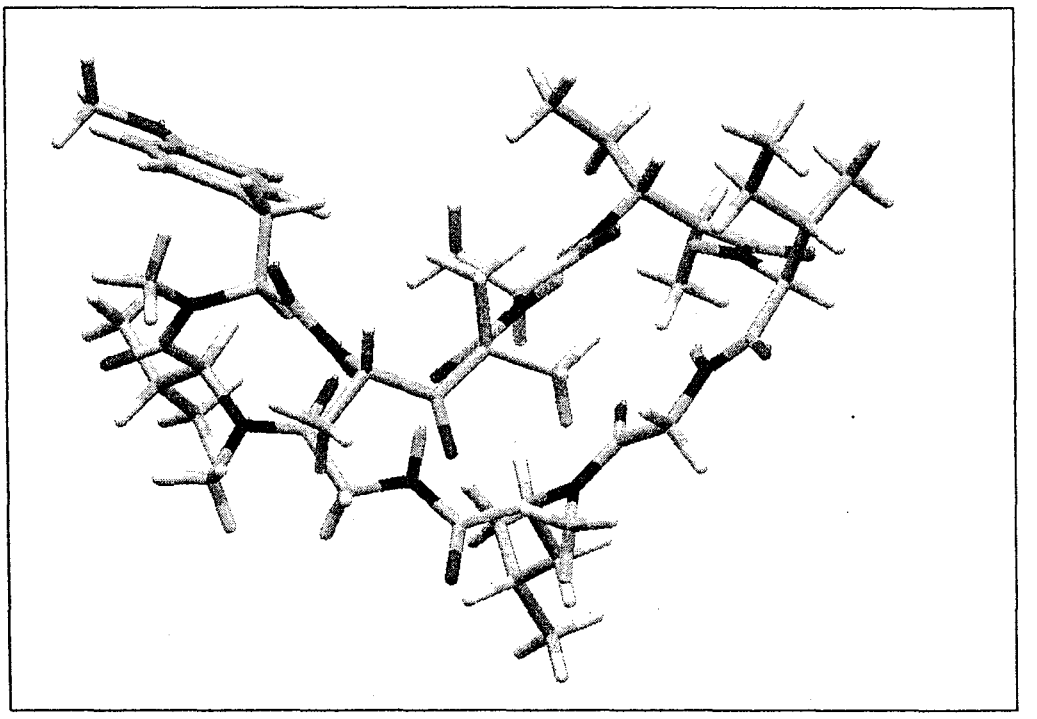
ถึงแม้ว่า สารประกอบโดลาสแตติน 11 (**20**) จะมีประสิทธิภาพในการกำจัดเซลล์มะเร็งสูง แต่สารประกอบนี้ อาจจะไม่ใช่สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สูงที่สุด หรือเหมาะที่สุดในบรรดาสารที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายคลึงกัน เพื่อนำมาพัฒนาเป็นยารักษาโรคมะเร็งในที่สุด ดังตัวอย่างของสารสังเคราะห์ที่เป็นอนาล็อกของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่กล่าวมาแล้ว เช่น สารประกอบแทคซอเทียร์ (**8**) ซึ่งเป็นสารประกอบอนาล็อกของสารแทคซอล (7) ที่พบว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงกว่าสารประกอบแทคซอล (7) ถึง 4 เท่า นอกจากนั้น ความสามารถในการละลายน้ำที่ดีกว่าของสารประกอบแทคซอเทียร์ (**8**) ทำให้สามารถนำมาใช้ได้สะดวกขึ้นอีกด้วย (Ringel และ Horwitz, 1991) ดังนั้นโดยหลักการเดียวกันนี้ สารสังเคราะห์ที่เป็นอนาล็อกของสารประกอบโดลาสแตติน 11 (**20**) ก็อาจจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงกว่า หรือมีผลข้างเคียง (side effects) ในการใช้น้อยกว่า หรือสามารถผลิตได้ในต้นทุนที่ถูกกว่าสารประกอบโดลาสแตติน 11 (**20**) ก็เป็นได้ จึงเป็นจุดเริ่มต้นของโครงการวิจัยการสังเคราะห์อนาล็อกของสารประกอบโดลาสแตติน 11 (**20**)

สารประกอบเอไมด์อนาล็อกของสารโดลาสแตติน 11 (1-Ile-dolastatin 11, **24**) เป็นสารประกอบชนิดหนึ่งที่คาดว่าน่าจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง เนื่องจากหมู่เอสเทอร์ในสารประกอบโดลาสแตติน 11 (**20**) ซึ่งสามารถถูกไฮโดรไลซ์ (hydrolyzed) ให้วงเพปไทด์(cyclic peptides) เปิดออกโดยเอนไซม์เอสเทอร์เรส (esterease) ในร่างกายนั้น จะส่งผลทำให้ความสามารถในการจับตัวกับเส้นใยแอคตินลดลง การแทนที่หมู่เอสเทอร์ด้วยหมู่เอไมด์ ก็น่าจะทำให้ความเสถียรของวงเพปไทด์เพิ่มขึ้น และคาดว่าฤทธิ์ทางชีวภาพก็น่าที่จะสูงขึ้นด้วยเช่นกัน ตัวอย่างเช่น สารสังเคราะห์เอไมด์อนาล็อกของสารประกอบคริบโทฟายซิน 1 (**5**) นั้น พบว่ามีฤทธิ์ต้านมะเร็งได้ดีมากในเซลล์ที่มีความต้านทานต่อยา (drug-resistant cell) (Smith et al., 1994) เป็นต้น

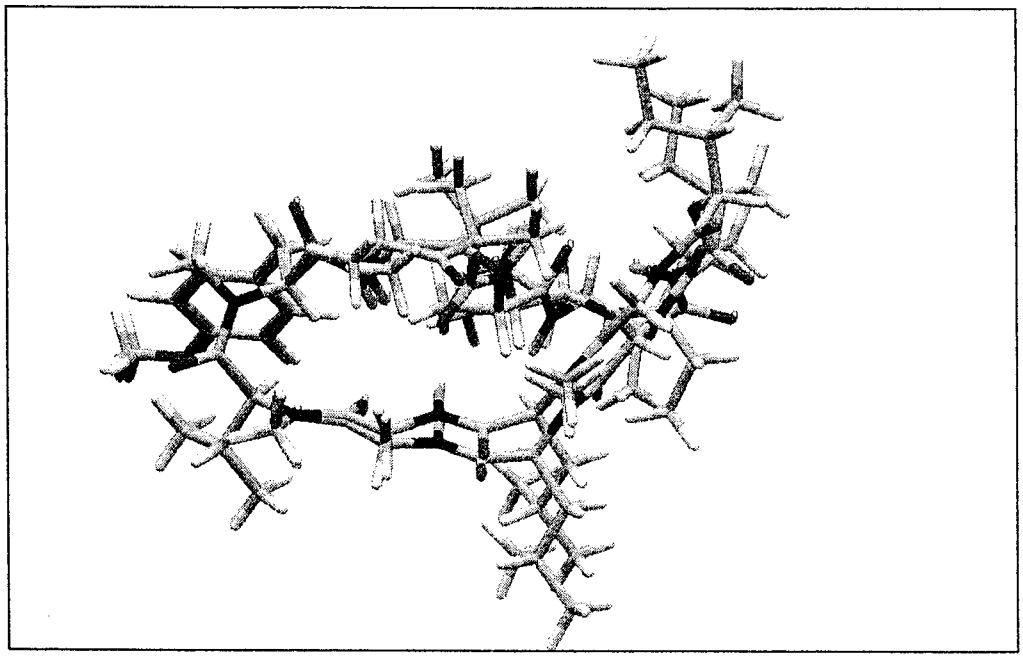


24

ทั้งนี้จากการศึกษาโครงสร้างโดยใช้เทคนิค Molecular Modeling เพื่อหาคอนฟอร์เมชั่น (conformation) ที่เสถียรที่สุด หรือ มีพลังงานต่ำสุด ของสารประกอบเอไมด์อนาล็อกของสารโดลาสแตติน 11 (**24**) ดังแสดงในภาพที่ 3 พบว่าจะมีความคล้ายคลึงกับคอนฟอร์เมชั่นที่มีความเสถียรที่สุด ซึ่งคาดว่าจะเป็นคอนฟอร์เมชันที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบโดลาสแตติน 11 (**20**) ดังแสดงในภาพที่ 4 (Nakkiew, 2000)



ภาพที่ 3 แสดงคอนฟอร์เมชันที่มีพลังงานต่ำที่สุดของสารประกอบเอไมด์อนาล็อกของสารโดลาสแตติน 11 (**24**)



ภาพที่ 4 แสดงคอนฟอร์เมชันที่เหมือนกันของสารประกอบโดลาสแตติน 11 (**20**) และสารประกอบเอไมด์อนาล็อกของสารโดลาสแตติน 11 (**24**)

ดังนั้นหากการศึกษาในด้านฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบอนาล็อกนี้แล้ว พบว่าสามารถใช้ในการต้านเซลล์มะเร็งได้ ก็สามารถจะนำไปสู่การทดสอบในสัตว์ทดลองเพื่อใช้ในการรักษาโรคมะเร็งในขั้นต่อไป

1.2. วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อสังเคราะห์สารประกอบเอไมด์อนาล็อกของสารต้านมะเร็งโดลาสแตติน 11

1.3. ขอบเขตของการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์หลักในการศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการสังเคราะห์สารประกอบเอไมด์อนาล็อกของสารต้านมะเร็งโดลาสแตติน 11 โดยใช้แบบแผนในการสังเคราะห์เช่นเดียวกันกับสารประกอบโดลาสแตติน 11 และด้วยงบประมาณที่จำกัด ดังนั้นการศึกษาและวิเคราะห์โครงสร้างของสารประกอบที่สังเคราะห์ได้ในแต่ละขั้นตอน จะใช้เทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ หรือ เอ็นเอ็มอาร์ (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) ชนิดโปรตอน เอ็นเอ็มอาร์ (^{1}H NMR) เท่านั้น (ดูรายละเอียดเพิ่มเติมในบทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย ข้อ 2.2.4.) ส่วนการศึกษาในเชิงลึก เพื่อยืนยันโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ และการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสังเคราะห์จะไม่รวมอยู่ในขอบเขตของโครงการวิจัยนี้

1.4. ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

การศึกษาวิจัยเรื่อง การสังเคราะห์สารประกอบเอไมด์อนาล็อกของสารต้านมะเร็งโดลาสแตติน 11 นี้ ทำให้เข้าใจถึงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อปฏิกิริยาในการสังเคราะห์เพปไทด์ นอกจากนั้นยังได้เพิ่มพูนความรู้และความเข้าใจเกี่ยวกับโครงสร้างทางเคมี และคอนฟอร์เมชันของสารประกอบเพปไทด์ในกลุ่มสารประกอบโดลาสแตติน 11 อีกด้วย ทั้งนี้ความรู้ที่ได้จากการศึกษาวิจัยในโครงการนี้ สามารถนำไปใช้ในการออกแบบระเบียบวิธีในการสังเคราะห์สารประกอบเพปไทด์ให้เหมาะสม และมีประสิทธิภาพมากขึ้น รวมทั้งหากได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมในแง่โครงสร้างทางเคมี ที่มีผลต่อฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง ก็จะทำให้เกิดประโยชน์ต่อการออกแบบสารต้นแบบ (lead compound) ที่สามารถนำไปพัฒนาเป็นยา เพื่อใช้ในการบำบัดรักษาโรคมะเร็งได้ในอนาคต

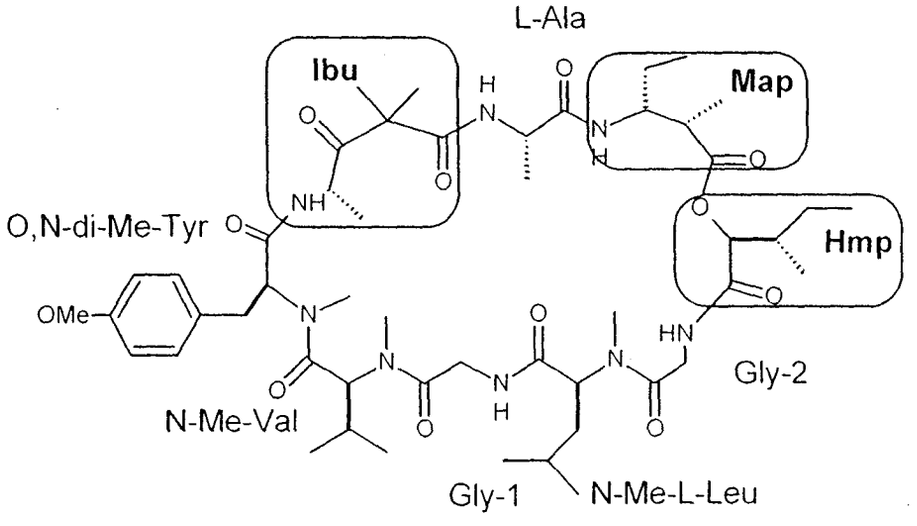
บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

ในบทที่ 2 เรื่องวิธีดำเนินการวิจัยนี้ จะประกอบไปด้วยหัวข้อกรอบแนวคิดและทฤษฎีที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์สารประกอบเอไมด์อนาล็อกของสารโดลาสแตติน 11(**24**) และวิธีทำการทดลอง ซึ่งได้ครอบคลุมเนื้อหาในรายละเอียดของสภาวะในการทดลอง, ปฏิกิริยาเคมีที่เกี่ยวข้อง, ขั้นตอนในการสังเคราะห์, วิธีการวิเคราะห์ รวมทั้งวัสดุและสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

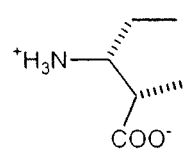
2.1. กรอบแนวคิดและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

ดังที่กล่าวมาแล้วในบทที่ 1 ว่า สารประกอบโดลาสแตติน 11 (**20**) เป็นสารประกอบที่สกัดแยกได้จากสิ่งมีชีวิตทางทะเลชนิด *Dolabella auricularia* ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งหลายชนิดได้ดี สำหรับโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบโดลาสแตติน 11 (**20**) นั้น โดยการศึกษาของ G.R Pettit และคณะ (Pettit et al., 1989) พบว่าประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 8 ชนิด และสารประกอบไฮดรอกซีแอซิด (hydroxyl acid) อีก 1 ชนิด ดังแสดงในภาพที่ 5 ได้แก่ สารประกอบ N,O-dimethyl-L-tyrosine, N-methyl-L-valine, L-alanine, N-methyl-L-leucine, สารประกอบ β-amino acid ชนิด 3-amino-2-methylpentanoic acid (Map, **25**), สารประกอบ γ-amino acid ชนิด 4-amino-2,2-dimethyl-3-oxopentanoic acid (Ibu, **26**) อย่างละ 1 หน่วย และ glycine 2 หน่วย ส่วนสารประกอบไฮดรอกซีแอซิด ได้แก่ สารประกอบ (2S,3S)-2-hydroxy-3-methyl- pentanoic acid (Hmp, **27**)

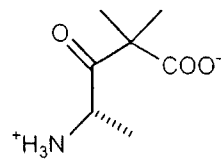


ภาพที่ 5 แสดงส่วนต่าง ๆ ของสารประกอบโดลาสแตติน 11 (**20**)

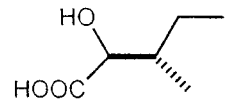
การสังเคราะห์สารประกอบ 3-amino-2-methylpentanoic acid (**25**) นั้น ประกอบไปด้วย 8 ขั้นตอน (Jefford และ McNulty, 1994) ส่วนสารประกอบ 4-amino-2,2-dimethyl-3-oxopentanoic acid (**26**) นั้นสามารถสังเคราะห์ได้จากการนำ Boc-L-alanine มาทำปฏิกิริยากับสารประกอบ benzyl acetate จะได้สารประกอบ β-ketoester **28** ซึ่งจะนำมาทำปฏิกิริยาการแทนที่ด้วยหมู่เมทิลจำนวน 2 หมู่ โดยใช้ methyl iodide และ sodium hydride เพื่อให้ได้สารประกอบ geminal dimethyl **31**



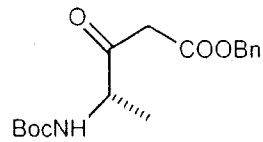
25



26

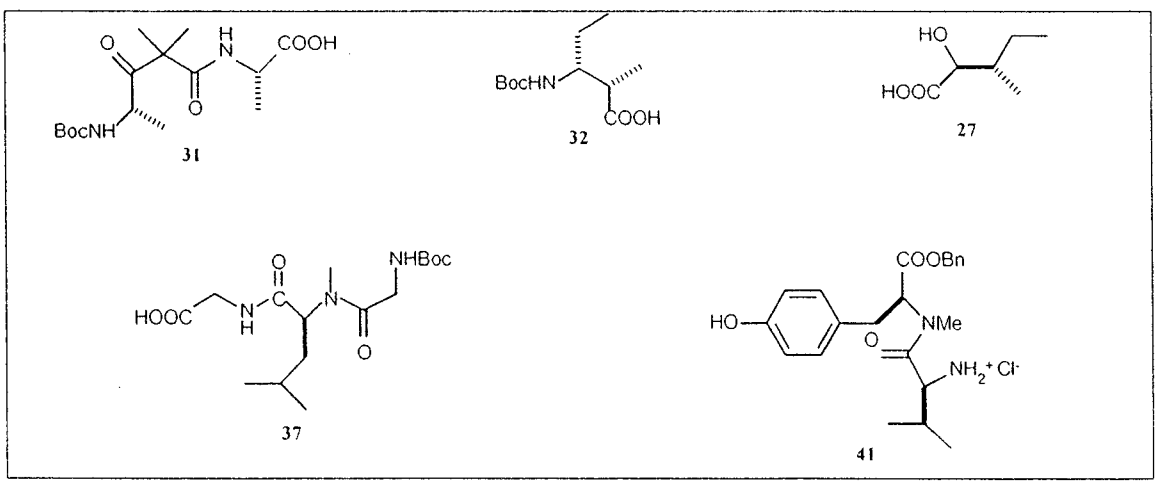


27

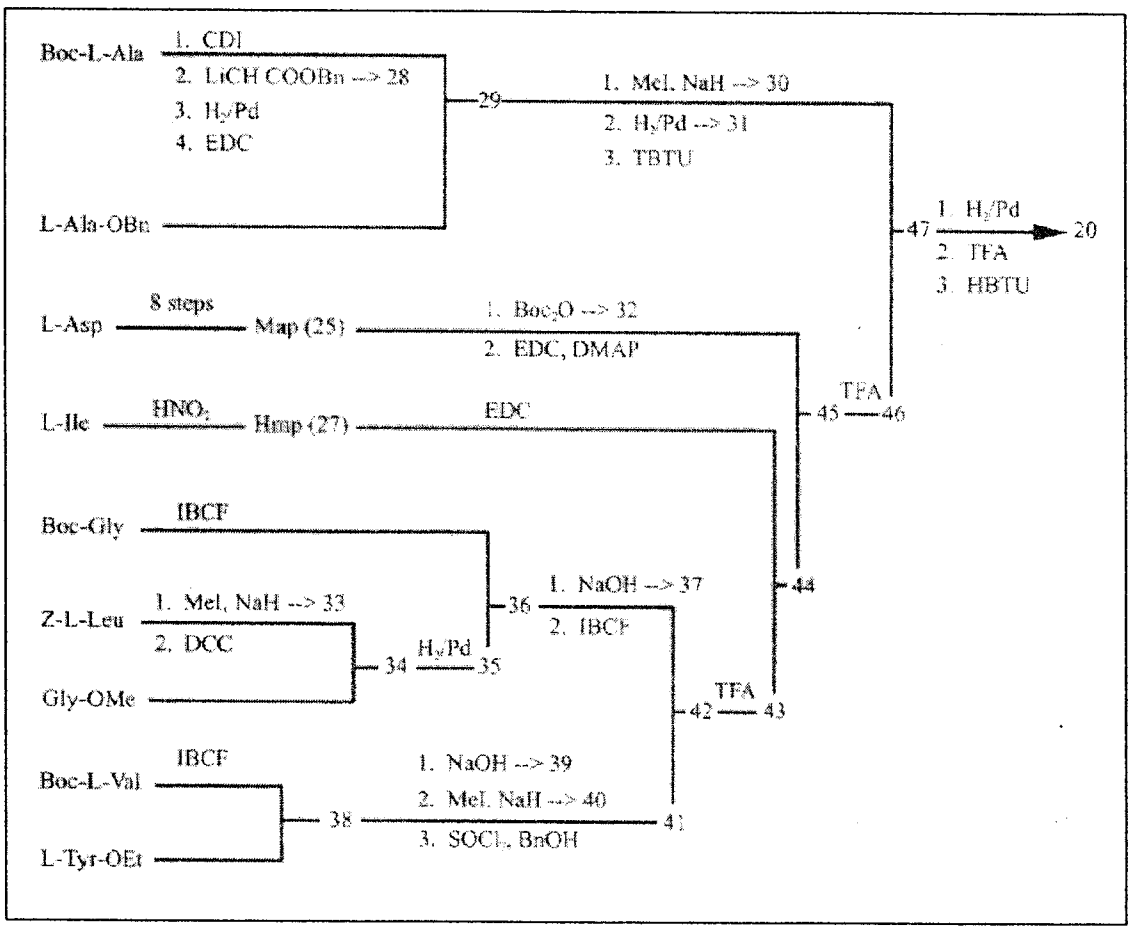


28

สำหรับวิธีในการสังเคราะห์สารประกอบโดลาสแตติน 11 (**20**) ที่เสร็จอย่างสมบูรณ์ในปี 1996 โดยกลุ่มวิจัยของ R. B. Bates ณ University of Arizona นั้น ประกอบไปด้วยสารประกอบอินเทอร์มิเดียตที่สำคัญทั้งหมด 5 ชนิด ดังแสดงในภาพที่ 6 ส่วนแบบแผนในการสังเคราะห์อย่างสมบูรณ์ซึ่งมีทั้งหมด 40 ขั้นตอนได้แสดงไว้ในแผนภาพที่ 1 (Bates et al., 1996)

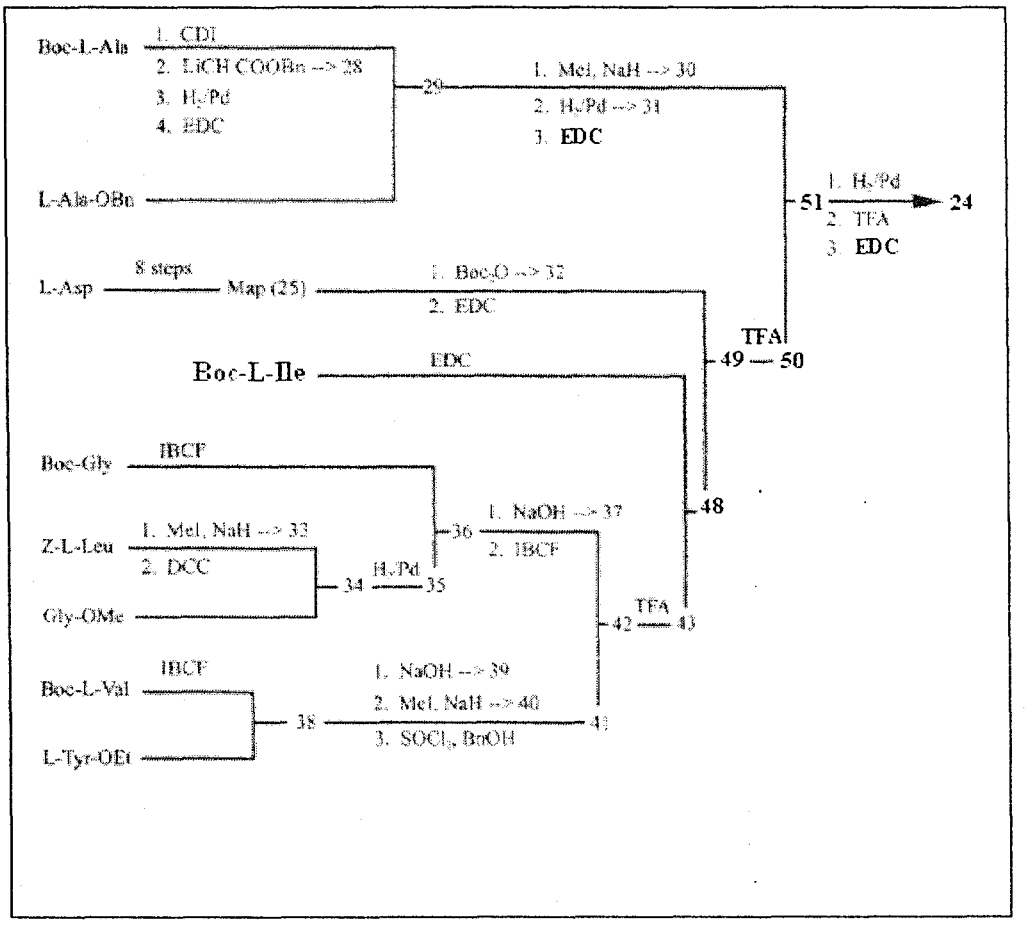


ภาพที่ 6 แสดงสารประกอบอินเทอร์มิเดียตที่สำคัญ 5 ชนิด ในการสังเคราะห์สารประกอบโดลาสแตติน 11 (**20**)



แผนภาพที่ 1 แสดงแบบแผนในการสังเคราะห์สารประกอบโดลาสแตติน 11 (**20**)

การสังเคราะห์สารประกอบเอไมด์อนาล็อกของสารโดลาสแตติน 11 (**24**) สามารถทำได้โดยการใช้สารประกอบกรดอะมิโน Boc-L-isoleucine แทนที่สารประกอบไฮดรอกซีแอซิด (2S,3S)-2-hydroxy-3-methylpentanoic acid (**27**) ดังนั้นแบบแผนในการสังเคราะห์สารประกอบเอไมด์อนาล็อกของโดลาสแตติน 11 (**24**) จะเป็นไปตามแผนภาพที่ 2



แผนภาพที่ 2 แสดงแบบแผนในการสังเคราะห์สารประกอบเอไมด์อนาล็อกของสารโดลาสแตติน 11 (**24**)

2.2. วิธีการทดลอง

2.2.1. สถานที่และสภาวะในการทดลอง

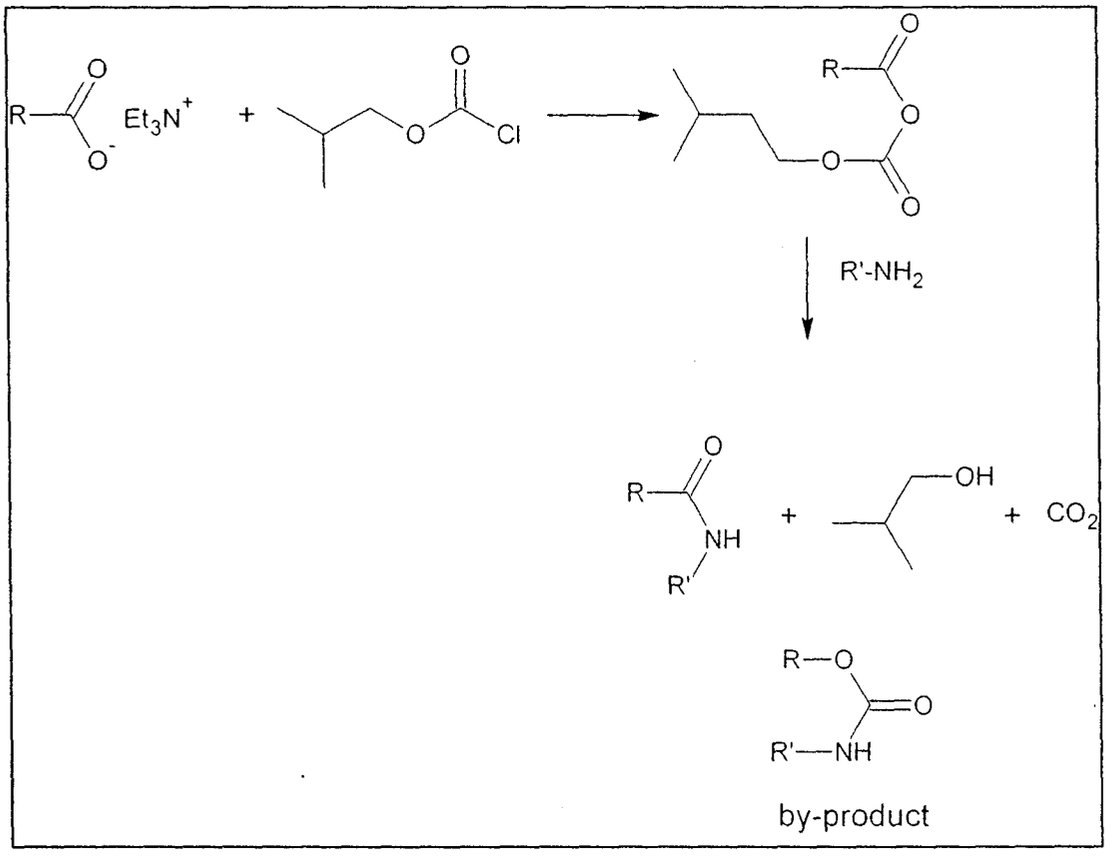
สถานที่ในการทำการทดลองของโครงการวิจัยนี้คือ ห้องปฏิบัติการของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา โดยเริ่มแรกนั้นจะอยู่ที่อาคารเครื่องมือ 2 ห้อง 2215 และภายหลังได้ย้ายสถานที่ในการทดลองไปที่อาคารเครื่องมือ 1 ห้อง 1317 ในด้านสภาวะของการทดลองนั้น สำหรับในการทดลองช่วงแรกที่อาคารเครื่องมือ 2 ห้อง 2215 จะเป็นห้องปฏิบัติการในระบบเปิด ไม่สามารถควบคุมอุณหภูมิ ความชื้น และประสิทธิภาพในระบบการระบายอากาศได้ อุณหภูมิโดยเฉลี่ยประมาณ 33 ^{o}C และมีความชื้นสัมพัทธ์โดยเฉลี่ย 73% (ข้อมูลจากกรมอุตุนิยมวิทยา กระทรวงเทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร) ส่วนห้องปฏิบัติการที่อาคารเครื่องมือ 1 ห้อง 1317 นั้น เป็นห้องที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ โดยอุณหภูมิเฉลี่ยที่ดำเนินการทดลองอยู่ในช่วง 25-28 ^{o}C ส่วนในด้านความชื้นสัมพัทธ์นั้นสามารถควบคุมได้บ้างตามประสิทธิภาพในการทำงานของเครื่องปรับอากาศภายในห้องปฏิบัติการ และเนื่องจากห้องปฏิบัติการเป็นห้องปิด ดังนั้นประสิทธิภาพในการหมุนเวียนของอากาศและการระบายอากาศจึงขึ้นกับประสิทธิภาพในการทำงานของเครื่องดูดควันที่ติดตั้งในห้องปฏิบัติการ ซึ่งพบว่าในฤดูร้อนการระบายอากาศเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ ส่วนในฤดูฝนหรือช่วงที่มีฝนตกนั้น ไอระเหยของสารมักจะควบแน่นอยู่บริเวณตู้ดูดควัน ทำให้เกิดปัญหาในการทดลอง ตามที่จะได้กล่าวต่อไปในบทที่ 4 ข้อวิจารณ์

2.2.2. ปฏิกิริยาเคมีที่เกี่ยวข้องในการทดลอง

เนื่องจากสารประกอบเอไมด์อนาล็อกของสารโดลาสแตติน 11 (**24**) นั้นเป็นสารประกอบประเภทเพปไทด์ ดังนั้นปฏิกิริยาเคมีที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์ จะเป็นปฏิกิริยาของการสร้างพันธะเพปไทด์ ซึ่งปฏิกิริยาที่ได้ใช้ในโครงการวิจัยนี้ ได้แก่

1. วิธีการสังเคราะห์พันธะเพปไทด์แบบ Mixed Anhydride

การสังเคราะห์โดยวิธีการนี้ จะประกอบไปด้วยขั้นตอนที่หมู่ฟังก์ชันกรดคาร์บอกซิลิกในโมเลกุลของกรดอะมิโน ในรูปของเกลือแอมโมเนียมคาร์บอกซิเลต จะทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์ เช่น สารประกอบ isobutylchloroformate (IBCF) เพื่อสร้างสารประกอบแอนไฮไดร์ (anhydride) จากนั้นสารประกอบแอนไฮไดร์ที่เกิดขึ้นนี้ จะทำปฏิกิริยากับหมู่อะมีนของกรดอะมิโนอีกตัวหนึ่ง เพื่อสร้างพันธะเพปไทด์ ตามสมการแสดงปฏิกิริยาในแผนภาพที่ 3

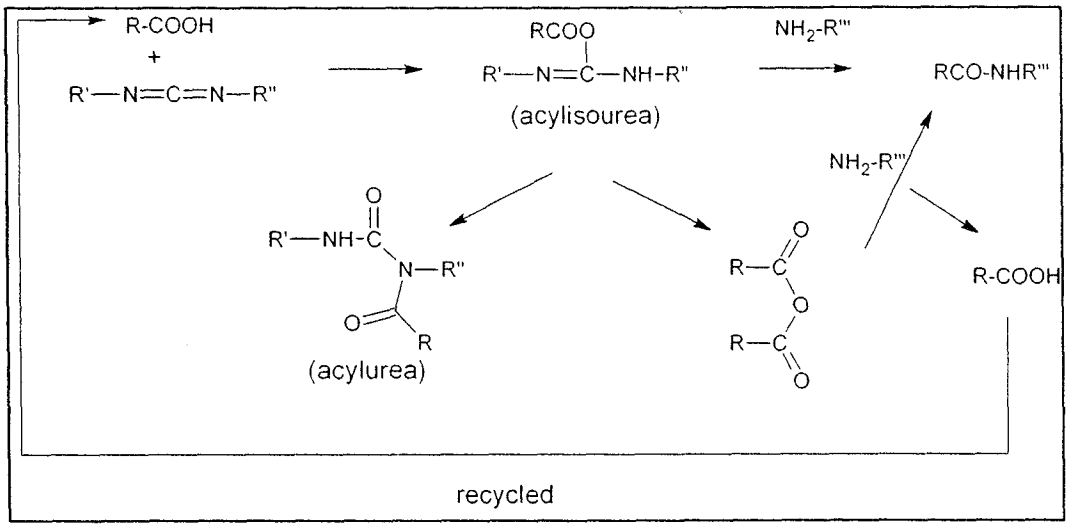


แผนภาพที่ 3 แสดงปฏิกิริยาการสร้างพันธะเพปไทด์ด้วยวิธี Mixed anhydried

2. วิธีการสังเคราะห์พันธะเพปไทด์แบบ Carbodiimide

การสังเคราะห์พันธะเพปไทด์ด้วยวิธี Carbodiimide นี้ เป็นวิธีการที่ได้รับความนิยมมาก รีเอเจนต์ที่ใช้ในปฏิกิริยา ได้แก่สารประกอบคาร์โบไดอิมมิด (carbodiimide) เช่น N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) และสารประกอบ 1-ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) เป็นต้น ในโครงการวิจัยนี้ได้เลือกใช้สารประกอบ EDC เป็นรีเอเจนต์ที่ใช้ในการทดลองเนื่องจาก สารประกอบ by-product ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยานั้น สามารถละลายน้ำได้ ทำให้ง่ายต่อการกำจัดออกโดยการสกัดล้างด้วยตัวทำละลาย ปฏิกิริยาเคมีที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยาการสร้างพันธะเพปไทด์ตามวิธีนี้ ได้แสดงไว้ในแผนภาพที่ 4

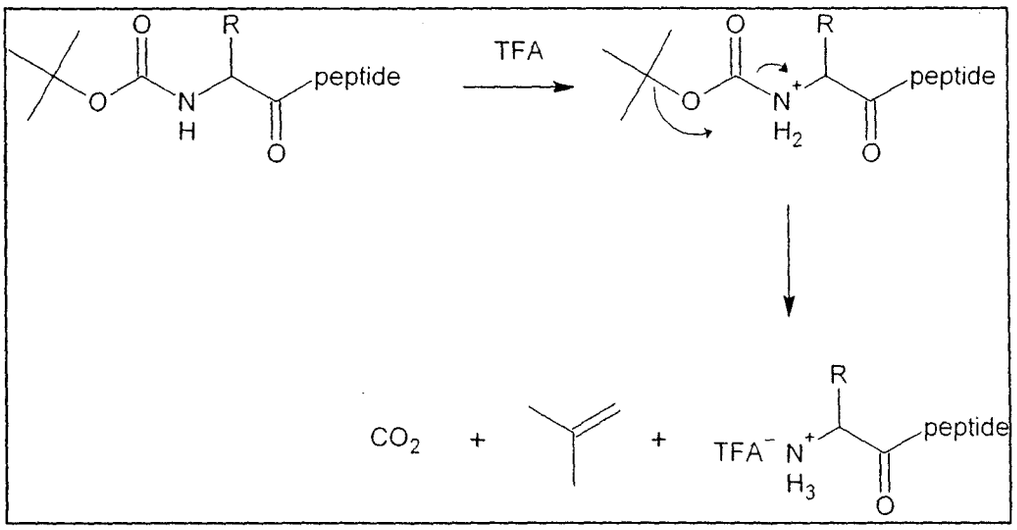
โดยที่ในขั้นแรกนั้น หมู่ฟังก์ชันกรดคาร์บอกซิลิกของกรดอะมิโนชนิดแรก จะเข้าไปทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์ เกิดเป็นสารประกอบอินเทอร์มิเดียตประเภท acylisourea ซึ่งจะทำปฏิกิริยาต่อกับหมู่อะมีนของกรดอะมิโนอีกชนิดหนึ่งได้อย่างรวดเร็ว เพื่อสร้างพันธะเพปไทด์ และให้สารประกอบประเภท acylurea เป็น by-product



แผนภาพที่ 4 แสดงปฏิกิริยาการสร้างพันธะเพปไทด์ด้วยวิธี Carbodiimide

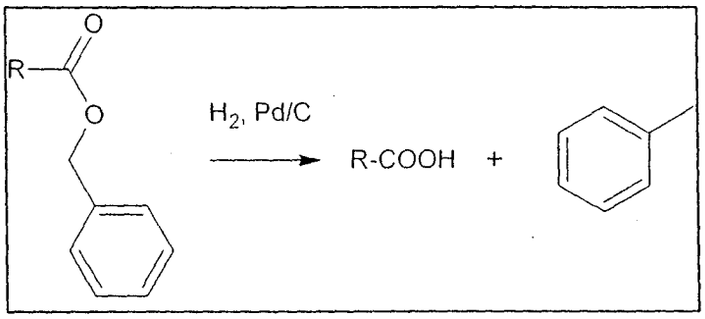
นอกจากปฏิกิริยาในการสังเคราะห์เพปไทด์แล้ว เนื่องจากกรดอะมิโนมีทั้งหมู่ฟังก์ชันกรดคาร์บอกซิลิก และอะมีน อยู่ในโมเลกุลเดียวกัน ดังนั้นเพื่อให้ปฏิกิริยาการสร้างพันธะเพปไทด์เป็นไปในทิศ ทางตามแบบแผนในการสังเคราะห์ จึงจำเป็นต้องใส่หมู่ปกป้อง (protecting groups) เข้าไปที่ปลายด้านใดด้านหนึ่งของกรดอะมิโน เพื่อไม่ให้หมู่ฟังก์ชันที่ปลายด้านนั้นเกิดปฏิกิริยาได้ สำหรับหมู่ปกป้องที่ใช้ในการทดลองสำหรับหมู่ฟังก์ชันอะมีน คือ หมู่ tert-butyloxycarbonyl- หรือ t-Boc- หรือ Boc- และสำหรับหมู่ฟังก์ชันกรดคาร์บอกซิลิก ได้แก่ หมู่ benzyl- ทั้งนี้เมื่อสามารถสังเคราะห์พันธะเพปไทด์ได้ตามที่ต้องการแล้ว จะต้องกำจัดหมู่ปกป้องออกเพื่อให้สามารถสร้างพันธะเพปไทด์ในขั้นต่อ ๆ ไปได้

ปฏิกิริยาในการกำจัดหมู่ Boc- จะใช้รีเอเจนต์ที่มีฤทธิ์เป็นกรด ซึ่งกรดที่นิยมใช้คือ สารประกอบ trifluoroacetic acid หรือ TFA โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะเป็นไปตามสมการแสดงปฏิกิริยาในแผนภาพที่ 5 จะเห็นได้ว่าสารประกอบ by-products ที่ได้จากปฏิกิริยานั้น ได้แก่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (carbon dioxide, CO_2) และ สารประกอบ isobutylene ซึ่งจะระเหยออกไปโดยง่าย ทำให้ไม่ต้องผ่านกระบวนการแยกผลิตภัณฑ์ที่ต้องการก่อนที่จะทำการสังเคราะห์ในขั้นต่อไปแต่อย่างใด



แผนภาพที่ 5 แสดงปฏิกิริยาในการกำจัดหมู่ปกป้อง –Boc ด้วย TFA

สำหรับหมู่ปกป้องของหมู่ฟังก์ชันกรดคาร์บอกซิลิกในโมเลกุลของกรดอะมิโน ซึ่งได้แก่ หมู่ benzyl นั้น จะสามารถกำจัดออกได้โดยปฏิกิริยาการเติมไฮโดรเจน (hydrogenation) ตามแผนภาพที่ 6 ซึ่งจะได้ สารประกอบ toluene เป็น by-product โดยสารประกอบนี้จะระเหยออกไปได้ง่าย ทำให้ไม่ต้องผ่านกระบวนการแยกผลิตภัณฑ์ที่ต้องการแต่ประการใด



แผนภาพที่ 6 แสดงปฏิกิริยาการเติมไฮโดรเจน (Hydrogenation) เพื่อกำจัดหมู่ Benzyl-

2.2.3. ขั้นตอนในการสังเคราะห์

การสังเคราะห์สารประกอบเอไมด์อนาล็อกของสารโดลาสแตติน 11 (**24**) นั้นประกอบไปด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ตามที่ได้แสดงไว้แล้ว ในแผนภาพที่ 2 (ดูหน้า 18 ในบทนี้) ซึ่งในการสังเคราะห์จะประกอบไปด้วยสารประกอบอินเทอร์มิเดียตทั้งหมด 5 ตัว ซึ่งจะคล้ายคลึงกับแบบแผนในการสังเคราะห์สารประกอบโดลาสแตติน11 (**20**) เพียงแต่จะเปลี่ยนจากการใช้ สารประกอบไฮดรอกซีแอซิด (2S,3S)-2-hydroxy-3-methylpentanoic acid (**27**) มาเป็น สารประกอบกรดอะมิโน Boc-L-isoleucine แทน

สารประกอบ Boc-L-Isoleucine นั้นได้จัดซื้อมาเพื่อใช้ในการทดลอง ส่วนสารประกอบอินเตอร์มิเดียตอื่น ๆ อีก 4 ชนิดนั้น ได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มวิจัยของ Professor Robert B. Bates แห่ง The University of Arizona ประเทศสหรัฐอเมริกา ทั้งนี้ได้มีการเปลี่ยนแปลงแผนการดำเนินงาน (ดูรายละเอียดในหัวข้อ 4.2 เรื่อง ปัญหาอุปสรรคในการทำวิจัย และแนวทางแก้ไข)

สารประกอบที่สังเคราะห์ได้ในแต่ละขั้นตอน จะผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยการสกัดล้าง ด้วยสารละลายกรดเจือจาง สารละลายเบสเจือจาง สารละลายเกลืออิ่มตัว และน้ำกลั่น เพื่อกำจัดสารประกอบ by-product ที่ได้จากปฏิกิริยา และได้ใช้เทคนิคทางโครมาโตรกราฟีในขั้นสุดท้าย ทั้งนี้เพื่อป้องกันปัญหาการสูญเสียสารประกอบที่สังเคราะห์ไปกับเทคนิคในการวิเคราะห์ต่าง ๆ และเพื่อให้มีปริมาณเพียงพอต่อการสังเคราะห์จนถึงขั้นสุดท้ายของปฏิกิริยา

2.2.4. การวิเคราะห์ผลการทดลอง

การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบที่สังเคราะห์ได้ในแต่ละขั้นตอนนั้น ได้ใช้เทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ หรือ เอ็นเอ็มอาร์ (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) ชนิดโปรตอน เอ็นเอ็มอาร์ (^{1}H NMR) โดยได้ส่งไปวิเคราะห์ที่ฝ่ายวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ในการวิเคราะห์แต่ละครั้งสารตัวอย่างจะนำไปละลายด้วย deuterated chloroform ($CDCl_3$) ประมาณ 0.5-0.7 mL โดยมีสารประกอบ tetramethylsilane (TMS) เป็น internal standard สเปกตรัมที่ได้นั้นสามารถนำไปเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของสารประกอบในกลุ่มโดลาสแตติน 11 (**20**) และสารประกอบอนาล็อกของโดลาสแตติน 11 ชนิดอื่น ๆ ได้ เนื่องจากลักษณะและตำแหน่งของ peak ใน ^{1}H สเปกตรัมของสารประกอบในกลุ่มนี้มีลักษณะเฉพาะตัว ซึ่งโดยปกติแล้วจะให้ความถูกต้องมากกว่า 90%

2.2.5. เครื่องมือวิทยาศาสตร์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการทดลอง
   - เครื่องมือวิเคราะห์นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Varian รุ่น INOVA ความถี่ 300 MHz สำหรับการวิเคราะห์ ^{1}H NMR
   - เครื่องมือวิเคราะห์ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Waters รุ่น 600 ซึ่งมีตัววัดการดูดกลืนแสง UV ชนิด Dual λ Absorbance รุ่น 2487
   - เครื่อง Rotary Evaporator เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Büchi รุ่น R-200
   - อ่างให้ความเย็น เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Heto รุ่น CBN 28-30
   - เครื่องกวนสาร (Hotplate Stirrer) เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Wellab
   - เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท ADAM รุ่น AFP-720 LC

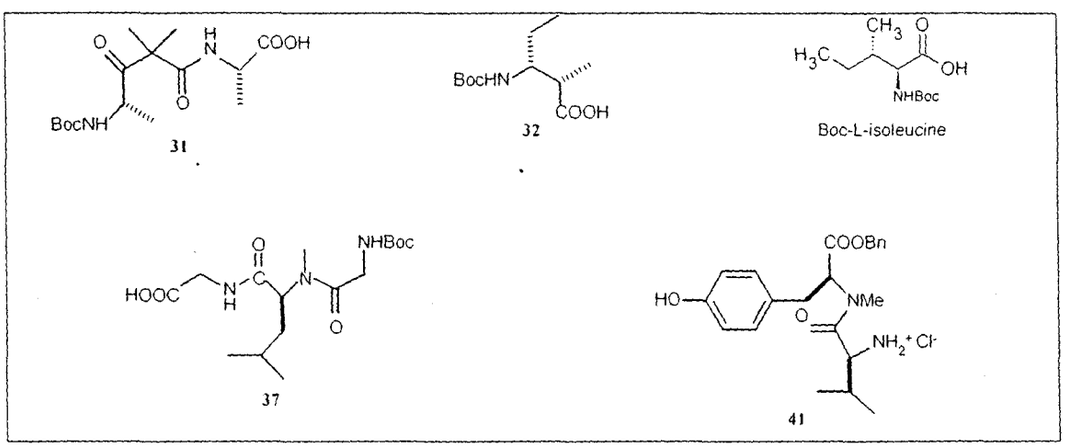
2. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง
   - Celite 545 ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Fluka
   - Dichloromethane, AR Grade ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Carlo Erba
   - 1-[(3-dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, 98+%, ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Aldrich และ 1-[(3-dimethylamino)propyl]-3-ethyl-carbodiimide hydrochloride purum ≥98.0% ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Fluka
   - Ethyl Acetate, AR Grade ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Carlo Erba
   - Ethyl Alcohol Absolute, AR Grade ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Carlo Erba
   - Hydrochloric acid fuming 37% ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Merck
   - Isobutylchloroformate for synthesis ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Merck
   - Magnesium sulfate anhydrous; purum ≥98.0% ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Fluka และ Magnesium sulfate anhydrous 97% ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Panreac
   - 4-Methylmorpholine for synthesis ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Merck
   - Molecular sieves type 4A 1/8" rod; ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Fluka
   - N-(tert-butoxycarbonyl)-L-isoleucine;99+% ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Acros
   - Palladium on activated carbon 10% Pd ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Acros และ Palladium on activated carbon; puriss: 10% Pd ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Fluka
   - Sodium hydrogen Carbonate AR Grade ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Carlo Erba

- Triethylamine ≥98% ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Fluka
- Trifluoroacetic acid; purum ≥98.0% ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Fluka และ Trifluoroacetic acid for synthesis ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Merck

บทที่ 3

ผลการวิจัย

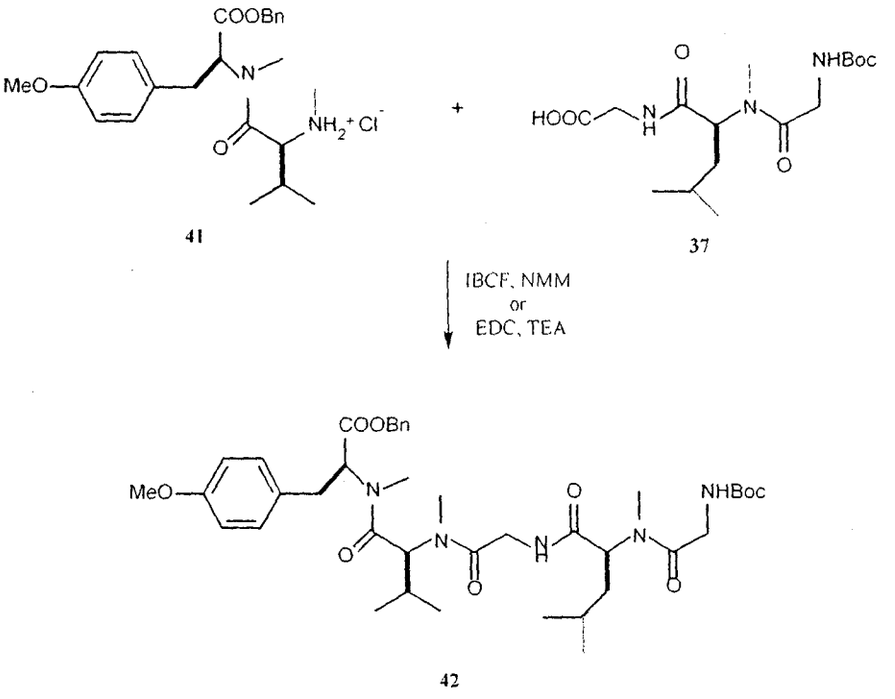
การสังเคราะห์สารประกอบเอไมด์อนาล็อกของสารโดลาสแตติน 11 (**24**) นั้น จะเป็นไปตามแผนภาพที่ 2 (ดูบทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย หน้า 18) สำหรับขั้นตอนในการสังเคราะห์สารประกอบเอไมด์อนาล็อกของสารโดลาสแตติน 11 (**24**) นั้น โดยหลักแล้วจะเป็นการสังเคราะห์พันธะเพปไทด์ เพื่อเชื่อมสารประกอบอินเทอร์มิเดียตที่สำคัญทั้ง 5 ซึ่งได้แก่สารประกอบ **31**, **32**, **37**, **41** และ Boc-L-isoleucine (ตามที่แสดงในภาพที่ 7) ซึ่งผลการสังเคราะห์ในแต่ละขั้นตอนจะเป็นดังต่อไปนี้



ภาพที่ 7 แสดงสารประกอบอินเทอร์มิเดียตที่สำคัญ 5 ชนิด ในการสังเคราะห์สารประกอบเอไมด์อนาล็อกของสารโดลาสแตติน 11 (**20**)

3.1. การสังเคราะห์สารประกอบ Boc-Gly-N-Me-L-Leu-Gly-N-Me-L-Val-O,N-di-Me-L-Tyr-O-Bn (42)

การสังเคราะห์สารประกอบ **42** นั้น ได้ดำเนินการสังเคราะห์โดยใช้วิธีการสังเคราะห์ทั้งวิธี Mixed anhydride และ วิธี Carbodiimide ซึ่งปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นนั้น แสดงไว้ในแผนภาพที่ 7

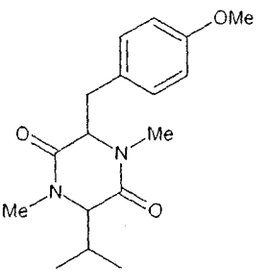


แผนภาพที่ 7 แสดงปฏิกิริยาเคมีในการสังเคราะห์สารประกอบ **42**

3.1.1. การสังเคราะห์โดยใช้ปฏิกิริยาการสร้างพันธะเพปไทด์วิธี Mixed Anhydride

เมื่อนำสารประกอบไดเพปไทด์ **41** และสารประกอบกรดคาร์บอกซิลิก **37** มาทำปฏิกิริยากับสารประกอบ IBCF ซึ่งเป็นรีเอเจนต์ และมีสารประกอบ NMM เป็นเบส ตัวทำละลายที่ใช้คือ DCM โดยอัตราส่วนจำนวนโมลของสารตั้งต้นที่ใช้ทั้งสองและรีเอเจนต์ทุกชนิดเท่ากัน ปฏิกิริยาดำเนินไปภายใต้บรรยากาศของก๊าซ Argon และคนสารละลายตลอดเวลาขณะทำปฏิกิริยาด้วย magnetic stirrer อุณหภูมิเริ่มต้นปฏิกิริยา คือ 0°C หลังจากทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง แล้วคนสารละลายที่อุณหภูมิห้องต่อไปอีกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองเอาตะกอนออกจากสารละลาย แล้วนำสารละลายนั้นไปสกัดล้างด้วยสารละลาย 2N HCl (3 x 10 mL) ตามด้วยสารละลาย 5% $NaHCO_3$ (3 x 10 mL) และด้วยสารละลายน้ำเกลืออิ่มตัว(3 x 10 mL) เพื่อกำจัดกรดและเบสที่ยังคงเหลืออยู่ในสารละลาย นำชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์มาเติม $MgSO_4$ anhydrous เพื่อขจัดน้ำ แล้วกรองเอาส่วนที่เป็นของแข็งออก เมื่อระเหยตัวทำละลายออกแล้วจะได้สารที่มีลักษณะเป็นยางเหนียวสีเหลืองอ่อน ซึ่งจากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H NMR พบว่าผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาประมาณ 90% คือ สารประกอบไดคีโตไพเพอร์ราซีน (diketopiperazine หรือ DKP, **55**) ที่เกิดจากปฏิกิริยาการสร้างวง 6 เหลี่ยมของสารประกอบไดเพปไทด์ **41** ซึ่งมีตำแหน่งของ peak ในสเปกตรัม ^{1}H NMR ที่ δ 0.95 (d, J= 6.7 Hz);

1.03 (d, J= 6.7 Hz); 1.45 (m); 2.67 (s); 3.02 (s); 3.29 (dd, J= 14, 4.9 Hz); 3.03 (dd, J= 14.7, 8.8 Hz); 3.55 (d, J= 7.3 Hz); 3.79 (s); 4.08 (dd, J= 7.8, 3.2 Hz); 6.85 (d, J= 9.0 Hz); 7.14 (d, J= 8.4 Hz)



55

3.1.2. การสังเคราะห์โดยใช้ปฏิกิริยาการสร้างพันธะเพปไทด์วิธี Carbodiimide

เมื่อนำสารประกอบไดเพปไทด์ **41** และสารประกอบกรดคาร์บอกซิลิก **37** มาทำปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศของก๊าซ N_2 โดยใช้สารประกอบ EDC เป็นรีเอเจนต์ในอัตราส่วนจำนวนโมลเป็น 2 เท่าของสารตั้งต้นทั้งสอง และสารประกอบ TEA เป็นเบสในอัตราส่วนจำนวนโมลเท่ากับสารตั้งต้นทั้ง 2 ชนิด ตัวทำละลายที่เลือกใช้คือ DCM (Sheehan, Cruickshank และ Preston, 1965) คนสารละลายตลอดเวลาโดยใช้ magnetic stirrer เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง หลังจากระเหยตัวทำละลายออกแล้วจะได้ตะกอนสีเหลืองอ่อน เมื่อละลายตะกอนที่ได้ด้วย EtOAc แล้วนำไปสกัดล้างด้วยน้ำกลั่น (3 x 20 mL) เพื่อกำจัด by-product ที่ได้จากปฏิกิริยา นำสารละลายในชั้น EtOAc มาเติม $MgSO_4$ anhydrous เพื่อขจัดน้ำ แล้วกรองส่วนที่เป็นของแข็งออก จากนั้นระเหยตัวทำละลายได้สารที่มีลักษณะเป็นยางเหนียวสีเหลืองอ่อน ซึ่งจากการวิเคราะห์ด้วย ^1H NMR พบว่าสารที่ได้คือผลิตภัณฑ์ **42** ที่ต้องการ และสารประกอบ **55** ในอัตราส่วน 1:3

ในการสังเคราะห์เพื่อเพิ่มปริมาณของสารประกอบ **42** ได้ทำปฏิกิริยาซ้ำ โดยใช้สัดส่วนจำนวนโมลของสารตั้งต้นและรีเอเจนต์เช่นเดิม แต่ได้ใส่ molecular sieve ซึ่งเป็นตัวดูดความชื้นในปริมาณประมาณ 5 mg เพิ่มเข้าไปในสารละลายด้วยขณะทำการสังเคราะห์ ซึ่งจะกรองออกจากสารละลายเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ก่อนจะทำการสกัดล้าง จาก ^1H NMR (ดูสเปกตรัมที่ I ในภาคผนวก) พบว่า อัตราส่วนของสารประกอบ **42** ต่อ สารประกอบไดคีโตไพเพอร์ราซีน **55** เพิ่มขึ้นมาในอัตราส่วน 2:3 คิดเป็น 70% yield (มวลโมเลกุลของสารประกอบ **42** ที่ใช้ในการคำนวณคือ 753)

สำหรับตำแหน่งของ peak ใน ^1H NMR ของสารประกอบเพนตะเพปไทด์ **42** ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ คือ (สารผสมของ 8 rotamers) δ 0.21, 0.56, 0.56, 0.62, 0.70, 0.80-1.0 (12H,

d, J= 6.5 Hz); 1.44 (9H, s); 2.28, 2.46, 2.82, 2.85, 2.90, 2.95 (9H, s); 3.73; 3.76 (3H, s); 4.35 (1H, m); 5.13, 5.21 (2H, d, J= 10.8); 6.78, 6.83, 7.05, 7.14 (4H, d, J= 8.6-8.7 Hz), 7.32 (5H, brs)

ทั้งนี้เพื่อเป็นการลดการสูญเสียสารประกอบในกระบวนการแยกโดยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี ดังนั้นในการสังเคราะห์ในขั้นต่อ ๆ ไปนั้น ไม่จำเป็นต้องแยกสารประกอบ **55** ออกมาก่อน เนื่องจากสารประกอบ **55** ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาต่อไปได้อีกแล้ว ทำให้ไม่รบกวนต่อปฏิกิริยาการสังเคราะห์พันธะเพปไทด์แต่อย่างใด

3.2. การสังเคราะห์สารประกอบ Gly-N-Me-L-Leu-Gly-N-Me-L-Val-O,N-di-Me-L-Tyr-O-Bn.TFA (43)

เมื่อนำสารประกอบเพนตะเพปไทด์ **42** มาทำปฏิกิริยากับ TFA เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นใช้ก๊าซ N_2 เป่า เพื่อระเหย TFA ออก แล้วเติม EtOAc ลงไป 20 mL แล้วระเหยตัวทำละลายออกอีกครั้งเพื่อกำจัด TFA ที่ยังเหลือค้างอยู่ หลังจากระเหยตัวทำละลายออกหมดแล้วจะได้สารที่มีลักษณะเป็นยางเหนียวสีน้ำตาลอ่อน ซึ่งได้นำไปไว้ในโถดูดความชื้น (desiccator) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ก่อนจะนำไปวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค ^{1}H NMR จากการวิเคราะห์พบว่าได้กำจัดหมู่ Boc- ซึ่งมี peak อยู่บริเวณ δ1.44 ppm ออกไปได้สำเร็จ คิดปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็น 100% yield (มวลโมเลกุลของสารประกอบ **43** ที่ใช้ในการคำนวณคือ 767)

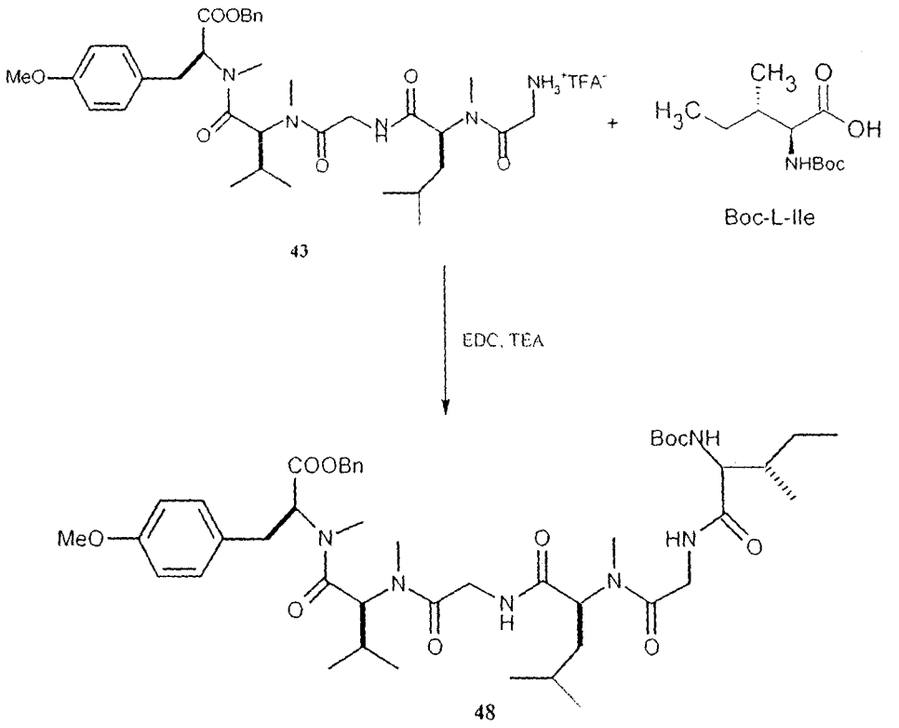
ตำแหน่งของ peak ใน ^{1}H NMR (สารผสมของ rotamers) จะอยู่ที่ δ 0.20-1.0 (12H, brd); 1.71 (2H, t, J= 7.3 Hz); 2.71, 2.76, 2.80, 2.94, 3.06 (9H, s); 3.76; 3.79 (3H, s); 5.18 (m); 6.80, 6.86, 7.10, 7.18 (4H, brd), 7.35 (5H, brs) ดังแสดงในสเปกตรัมที่ 2 (ดูภาคผนวก) นอกเหนือจาก peak ของสารประกอบ **55** ที่ยังอยู่ในสารตัวอย่าง

3.3. การสังเคราะห์สารประกอบ Boc-L-Ile-Gly-N-Me-L-Leu-Gly-N-Me-L-Val-O,N-di-Me-L-Tyr-O-Bn (48)

ปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารประกอบเพปไทด์ **48** จะเป็นไปตามแผนภาพแสดงปฏิกิริยาที่ 8 ซึ่งเป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบเกลือ TFA **43** มาทำปฏิกิริยากับสารประกอบ Boc-L-isoleucine ภายใต้บรรยากาศของก๊าซ N_2 เพื่อสร้างพันธะเพปไทด์โดยวิธี Carbodiimide ในการสังเคราะห์ได้ใช้ DCM เป็นตัวทำละลาย ส่วนปริมาณของรีเอเจนต์ต่าง ๆ นั้นได้ใช้ในอัตราส่วนจำนวนโมลเช่นเดียวกันกับการสังเคราะห์สารประกอบ **42** ปฏิกิริยาดำเนินไปที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยคนสารละลายตลอดเวลาโดยใช้ magnetic stirrer เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดและได้ระเหยตัวทำละลายแล้ว จะได้ตะกอนสีเหลืองอ่อน ละลายตะกอนที่ได้ด้วย EtOAc จากนั้นสารละลายที่ได้นำไปสกัดล้างด้วยน้ำกลั่น (3 x 10 mL) เพื่อกำจัด by-product ที่ได้จากปฏิกิริยา แล้วนำสารละลายใน

ชั้น EtOAc มาเติม $MgSO_4$ anhydrous เพื่อขจัดน้ำ กรองส่วนที่เป็นของแข็งออกแล้วระเหยตัวทำละลาย จะได้สารที่มีลักษณะเป็นยางเหนียวสีเหลืองอ่อน จากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H NMR พบว่า ได้สารประกอบ **48** ตามที่ต้องการในปริมาณ 20% yield (มวลโมเลกุลของสารประกอบ **48** ที่ใช้ในการคำนวณคือ 866)

จาก ^{1}H NMR พบว่ามีข้อสังเกตที่ลักษณะของ peak ของหมู่ปกป้อง Boc- และของหมู่ Benzyl- จะมีขนาดเล็กและกว้างมากเมื่อเทียบกับสารประกอบในกลุ่มเดียวกัน (ดูข้อวิจารณ์ในบทที่ 4 ข้อ 4.1.3) peak ใน ^{1}H NMR (สารผสมของ rotamers) จะอยู่ที่ δ 0.22, 0.58, 0.78, 0.81-1.0 (12H, brd); 1.44 (9H, brs); 1.72 (2H, m); 2.60, 2.82, 2.88, 2.94, 2.98 (9H, s); 3.75; 3.79 (3H, s); 5.15 (2H, m); 6.42 (-NH, brd); 6.78, 6.88, 7.05, 7.15 (4H, d, J= 8.6-8.7 Hz), 7.35 (5H, brs) ดังแสดงในสเปกตรัมที่ 3 (ดูภาคผนวก) นอกเหนือจาก peak ของสารประกอบ **55** ที่ยังอยู่ในสารตัวอย่าง



แผนภาพที่ 8 แสดงปฏิกิริยาเคมีในการสังเคราะห์สารประกอบ **48**

3.4. การสังเคราะห์สารประกอบ L-Ile-Gly-N-Me-L-Leu-Gly-N-Me-L-Val-O,N-di-Me-L-Tyr-O-Bn.TFA (49)

เมื่อนำสารประกอบเพปไทด์ **48** มาทำปฏิกิริยากับ TFA เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นใช้ก๊าซ N_2 เป่า เพื่อระเหย TFA ออก แล้วเติม EtOAc ลงไป 20 mL แล้วระเหยตัวทำละลายออกอีกครั้งหนึ่ง เพื่อกำจัด TFA ที่ยังเหลือค้างอยู่ จะได้สารที่มีลักษณะเป็นยางเหนียวสีน้ำตาลอมแดง ซึ่งได้นำไปไว้ในโถดูดความชื้น (desiccator) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ก่อนจะนำไปวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค ^{1}H NMR ซึ่งจากการวิเคราะห์พบว่าได้กำจัดหมู่ Boc- ซึ่งมี peak อยู่บริเวณ δ1.44 ppm ออกไปได้สำเร็จ ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็น 100% yield (มวลโมเลกุลของสารประกอบ **49** ที่ใช้ในการคำนวณคือ 880)

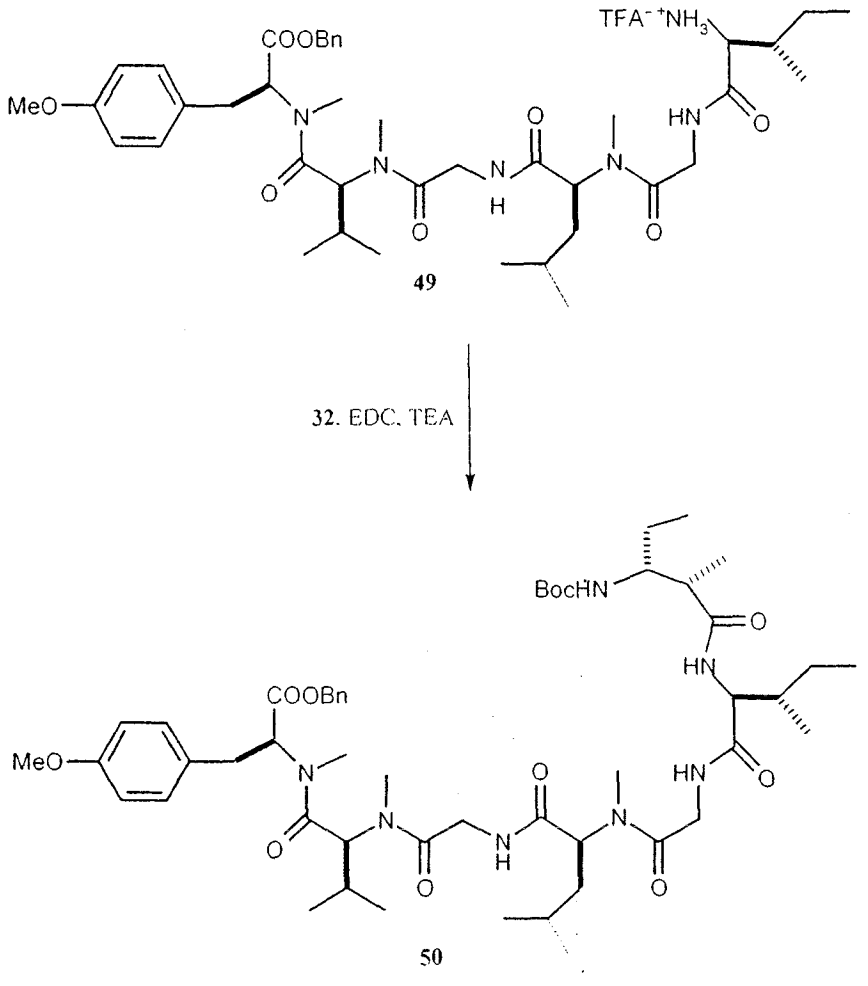
ตำแหน่งของ peak ใน ^{1}H NMR (สารผสมของ rotamers) จะอยู่ที่ δ 0.20, 0.58, 0.71, 0.84, 0.89-1.0 (12H, brd); 1.71 (m); 2.87, 2.93, 2.97, 3.05 (9H, s); 3.75; 3.79 (3H, s); 5.15 (m); 6.78, 6.86, 7.02, 7.18 (4H, brd); 7.34 (5H, brs); 8.00 (-NH+H_2O, br) นอกเหนือจาก peak ของสารประกอบ **55** ที่ยังอยู่ในสารตัวอย่าง

3.5. การสังเคราะห์สารประกอบ Boc-Map-L-Ile-Gly-N-Me-L-Leu-Gly-N-Me-L-Val-O,N-di-Me-L-Tyr-O-Bn (50)

ปฏิกิริยาในการสังเคราะห์สารประกอบ **50** เป็นไปตามแผนภาพแสดงปฏิกิริยาที่ 9 ซึ่งสารประกอบเกลือ TFA **49** ได้ทำปฏิกิริยากับสารประกอบกรดคาร์บอกซิลิก **32** ภายใต้บรรยากาศของก๊าซ N_2 ในตัวทำละลาย DCM สภาวะในการทดลองเหมือนกับปฏิกิริยาในการสังเคราะห์สารประกอบ **42** และ **48** แต่ปริมาณของสารประกอบ EDC ซึ่งเป็นรีเอเจนต์ จะใช้เป็น 3 เท่าของจำนวนโมลของสารตั้งต้น **49** และ **32** โดยที่หลังจากคนสารละลายตลอดเวลาโดยใช้ magnetic stirrer เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องแล้ว ได้ระเหยตัวทำละลายออกซึ่งจะเหลือตะกอนสีเหลืองอ่อนละลายตะกอนที่ได้ด้วย EtOAc จากนั้นสกัดล้างด้วยน้ำกลั่น(3 x 10 mL) ตามด้วยสารละลาย 5% $NaHCO_3$ (3 x 10 mL) สารละลาย 2N HCl (3 x 10 mL) และสารละลายน้ำเกลืออิ่มตัว ตามลำดับ เพื่อกำจัดสารประกอบ by-product ที่ได้จากปฏิกิริยา แล้วเติม $MgSO_4$ anhydrous ลงไปในสารละลายของ EtOAc กรองส่วนที่เป็นของแข็งออก เมื่อระเหยตัวทำละลายออกแล้วจะได้สารที่มีลักษณะเป็นยางเหนียวสีเหลืองอ่อน ซึ่งคือสารประกอบเพปไทด์ **50** ที่ต้องการในปริมาณ 55% yield (มวลโมเลกุลของสารประกอบ **50** ที่ใช้ในการคำนวณคือ 983)

จากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H NMR พบว่า ลักษณะของ peak ของหมู่ปกป้อง Boc- และ Benzyl- นั้น มีขนาดเล็ก และกว้างมาก เช่นเดียวกับการสารประกอบ **48** (ดูข้อวิจารณ์ในบทที่ 4 ข้อ 4.1.5.) โดยตำแหน่งของ peak ใน ^{1}H NMR (สารผสมของ rotamers) จะอยู่ที่ δ 0.20, 0.56, 0.68, 0.79, 0.83-1.0 (12H, brd); 1.44 (9H, s); 1.71 (m); 2.60, 2.46, 2.84, 2.95, 2.97 (9H, s); 3.75; 3.79 (3H, s); 5.20

(m); 5.95 (-NH, br); 6.78, 6.88, 7.05, 7.17 (4H, brd), 7.36 (5H, brs) ดังแสดงในสเปกตรัมที่ 4 (ดูภาคผนวก) นอกเหนือจาก peak ของสารประกอบ **55** ที่ยังอยู่ในสารตัวอย่าง



แผนภาพที่ 9 แสดงปฏิกิริยาในการสังเคราะห์สารประกอบ **50**

3.6. การสังเคราะห์สารประกอบ Map-L-Ile-Gly-N-Me-L-Leu-Gly-N-Me-L-Val-O,N-di-Me-L-Tyr-O-Bn.TFA (51)

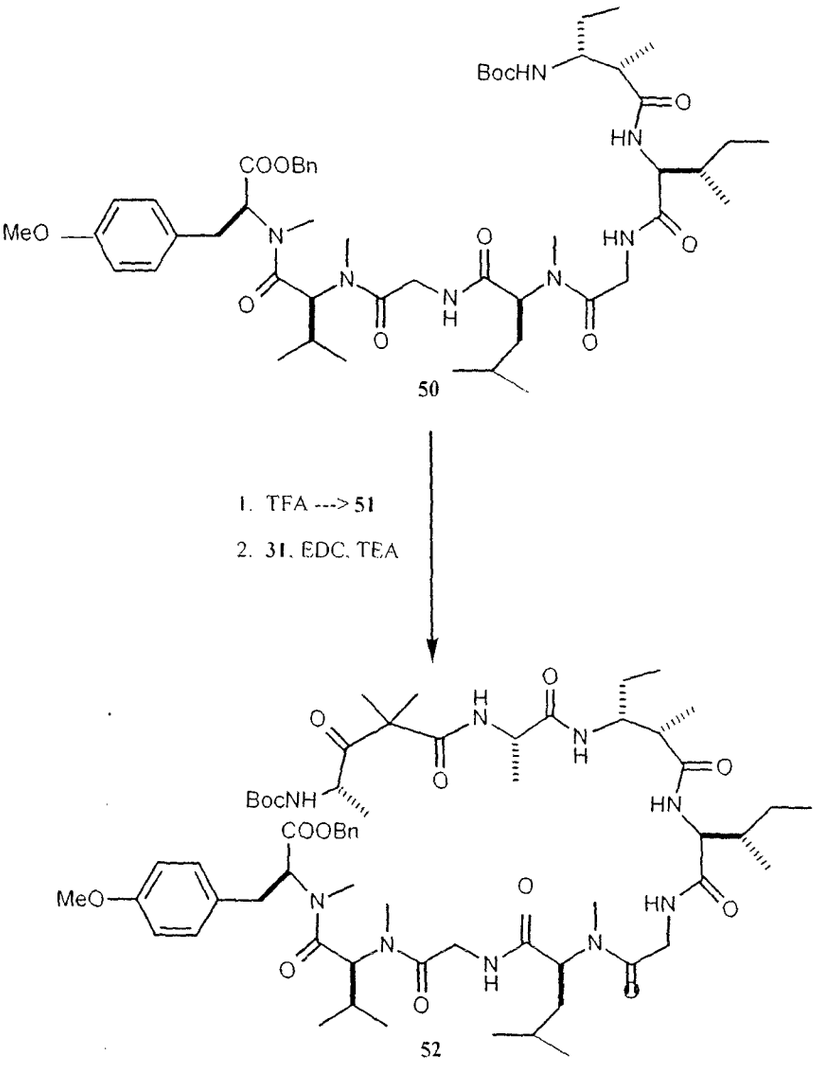
เมื่อนำสารประกอบเพปไทด์ **50** มาทำปฏิกิริยากับ TFA เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นระเหย TFA ออก โดยใช้ก๊าซ N_2 เป่า แล้วเติม EtOAc ลงไป 20 mL ระเหยตัวทำละลายออกอีกครั้งเพื่อกำจัด TFA ที่ยังเหลือค้างอยู่ จะได้สารที่มีลักษณะเป็นยางเหนียวสีเหลืองอ่อน ซึ่งได้นำไปเก็บไว้ในโถดูดความชื้น (desiccator) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ก่อนที่จะไปวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค ^{1}H NMR ซึ่งจากการวิเคราะห์พบว่าได้กำจัดหมู่ Boc- ซึ่งมี peak อยู่บริเวณ δ1.44 ppm ออกไปได้สำเร็จ คิดปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็น 100% yield (มวลโมเลกุลของสารประกอบ **51** ที่ใช้ในการคำนวณคือ 997)

ตำแหน่งของ peak ใน ^{1}H NMR จะอยู่ที่ δ 0.35, 0.52, 0.71, 0.68-1.0 (brd); 1.73 (m); 2.85, 2.98, 3.13 (9H, s); 3.79 (3H, brs); 5.20 (m); 5.88 (-NH, brs); 6.78, 6.84, 7.08, 7.18 (4H, brd), 7.35 (5H, brs) นอกเหนือจาก peak ของสารประกอบ **55** ที่ยังอยู่ในสารตัวอย่าง

3.7. การสังเคราะห์สารประกอบ Boc-Ibu-Map-L-Ile-Gly-N-Me-L-Leu-Gly-N-Me-L-Val-O,N-di-Me-L-Tyr-O-Bn (52)

การสังเคราะห์สารประกอบเพปไทด์ **52** เป็นไปตามแผนภาพแสดงปฏิกิริยาที่ 10 ซึ่งหลังจากได้กำจัดหมู่ปกป้อง Boc- ออกจากสารประกอบ **50** แล้ว สารประกอบเกลือTFA **51** ที่ได้นั้นจะทำปฏิกิริยากับสารประกอบ **32** โดยวิธี Carbodiimide ปฏิกิริยาดำเนินไปภายใต้บรรยากาศของก๊าซ N_2ในตัวทำละลาย DCM สภาวะในการทดลองนั้นเหมือนกันกับการสังเคราะห์สารประกอบ **42** , **48** และ **50** แต่ใช้ปริมาณของ รีเอเจนต์ EDC เป็น 3 เท่าของจำนวนโมลของสารตั้งต้น **32** และ **51** โดยที่หลังจากคนสารละลายตลอดเวลาโดยใช้ magnetic stirrer เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง และระเหยตัวทำละลายออกแล้ว จะให้ตะกอนสีเหลืองอ่อน ละลายตะกอนนี้ด้วย EtOAc แล้วนำไปสกัดล้างด้วยน้ำกลั่น(3 x 10 mL) ตามด้วยสารละลาย 5% $NaHCO_3$ (3 x 10 mL) สารละลาย 2N HCl (3 x 10 mL) และสารละลายน้ำเกลืออิ่มตัว ตามลำดับ เก็บสารละลายในชั้น EtOAc แล้วเติม $MgSO_4$ anhydrous เพื่อขจัดน้ำ แล้วกรองส่วนที่เป็นของแข็งออก หลังจากระเหยตัวทำละลายออกแล้วจะได้สารที่มีลักษณะเป็นยางเหนียวสีเหลืองอ่อน ในปริมาณคิดเป็น 41% yield (มวลโมเลกุลของสารประกอบ **52** ที่ใช้ในการคำนวณคือ 1195)

จากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H NMR พบว่าสามารถสังเคราะห์สารประกอบ **52** ได้ โดยตำแหน่งของ peak ใน ^{1}H NMR (สารผสมของ rotamers) จะอยู่ที่ δ 0.20, 0.58, 0.70, 0.80-1.00 (12H, brd); 1.43 (9H, s); 1.72 (m); 2.60, 2.46, 2.84, 2.94, 2.96 (9H, s); 3.75; 3.79 (3H, brs); 5.18 (m); 6.80, 6.84, 7.05, 7.17 (4H, brd, J= 8.6-8.7 Hz), 7.35 (5H, brs) (ดังแสดงในภาพสเปกตรัมที่ 5 ในภาคผนวก) นอกเหนือจาก peak ของสารประกอบ **55** ที่ยังอยู่ในสารตัวอย่าง



แผนภาพที่ 10 แสดงปฏิกิริยาในการสังเคราะห์สารประกอบ **52**

3.8. การสังเคราะห์สารประกอบ Boc-Ibu-Map-L-Ile-Gly-N-Me-L-Leu-Gly-N-Me-L-Val-O,N-di-Me-L-Tyr-OH (53)

เพื่อกำจัดหมู่ปกป้อง Benzyl- ของหมู่ฟังก์ชันกรดคาร์บอกซิลิกในกรดอะมิโน tyrosine โดยปฏิกิริยาการเติมไฮโดรเจน (hydrogenation) ได้นำสารประกอบ **52** มาละลายในตัวทำละลาย absolute ethanol จากนั้นเติม 10% Pd on activated charcoal ภายใต้บรรยากาศของก๊าซ N_2 แล้วจึงให้ปฏิกิริยาดำเนินไปภายใต้บรรยากาศของก๊าซ H_2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยคนสารละลายตลอดเวลาด้วย magnetic stirrer เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดลง ได้ผ่านก๊าซ N_2 ลงไปในสารละลายเพื่อไล่ก๊าซ H_2 เป็นเวลา 15 นาที แล้วกรองเอาผงถ่านออก สารละลายที่ได้นำไประเหยตัวทำละลายออก ซึ่งจะได้สารที่มีลักษณะเป็นยางเหนียวใสไม่มีสี ในปริมาณคิดเป็น 87% yield (มวลโมเลกุลของสารประกอบ **53** ที่ใช้ในการคำนวณคือ 1105)

จากการวิเคราะห์ด้วย ^1H NMR พบว่าสามารถสังเคราะห์สารประกอบ **53** ได้ โดยตำแหน่งของ peak ใน ^1H NMR ของหมู่ Benzyl- ที่ δ 7.35 ppm ได้หายไป ตำแหน่งอื่น ๆ ของ peak ใน ^1H NMR จะอยู่ที่ δ 0.86-1.00 (m); 2.88, 2.96 (9H, s); 3.76 (3H, s); 5.13 (-NH, br) เพิ่มเติมจาก peak ของสารประกอบ **55** ที่ยังอยู่ในสารตัวอย่าง

3.9. การสังเคราะห์สารประกอบ Ibu-Map-L-Ile-Gly-N-Me-L-Leu-Gly-N-Me-L-Val-O,N-di-Me-L-Tyr-OH.TFA (54)

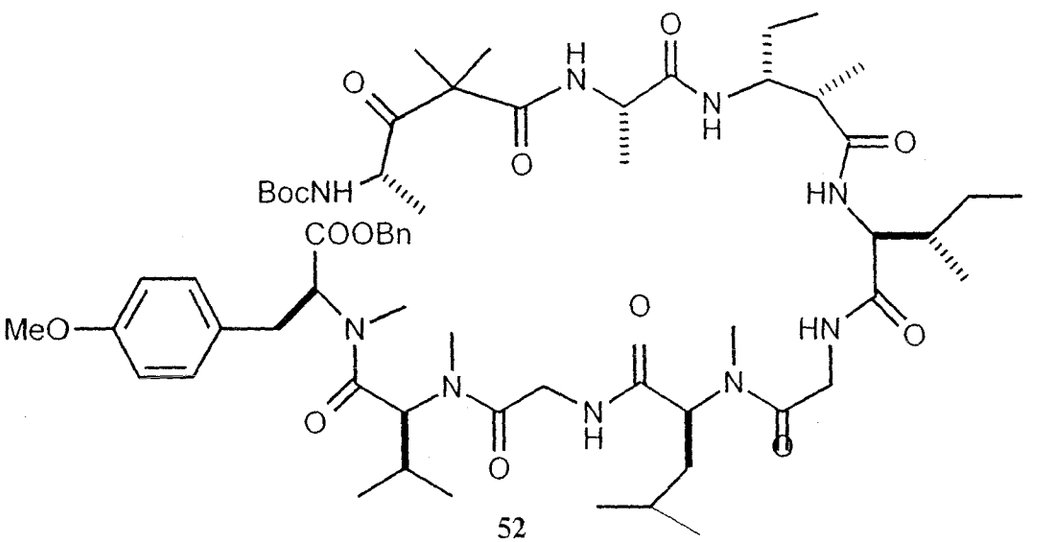
เพื่อกำจัดหมู่ปกป้องของหมู่ฟังก์ชันอะมิโน ได้นำสารประกอบเพปไทด์ **53** มาทำปฏิกิริยากับ TFA เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น ระเหย TFA ออกโดยใช้ก๊าซ N_2 เป่า แล้วเติม EtOAc ลงไป 20 mL แล้วระเหยตัวทำละลายออกอีกครั้งเพื่อกำจัด TFA ที่ยังเหลือค้างอยู่ หลังจากระเหยตัวทำละลายออกหมดแล้ว จะได้สารที่มีลักษณะเป็นยางเหนียวสีเหลืองอ่อน ซึ่งจะนำไปไว้ในโถดูดความชื้น (desiccator) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ก่อนจะนำไปวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค ^1H NMR จากการวิเคราะห์พบว่าได้กำจัดหมู่ Boc- ซึ่งมี peak อยู่บริเวณ δ1.44 ppm ออกไปได้สำเร็จ คิดปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็น 100% yield (มวลโมเลกุลของสารประกอบ **53** ที่ใช้ในการคำนวณคือ 1119)

ตำแหน่งของ peak ใน ^1H NMR จะอยู่ที่ δ 0.20, 0.68, 0.83, 0.89-1.00 (12H, brd); 1.71 (m); 2.82, 2.96, 3.13 (9H, brs); 3.79 (3H, brs); 6.12 (-NH, br)

3.10. การสังเคราะห์สารประกอบเอไมด์อนาล็อกของสารโดลาสแตติน 11 (24)

ปฏิกิริยาในการสังเคราะห์สารประกอบเอไมด์อนาล็อกของสารโดลาสแตติน 11(**24**) เป็นปฏิกิริยาการสร้างพันธะเพปไทด์ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกของปลายด้านกรดอะมิโน tyrosine กับหมู่อะมีนของปลายด้านกรดอะมิโน Ibu (**26**) ซึ่งจะเป็นไปตามแผนภาพแสดงปฏิกิริยาที่ 11 การสร้าง

พันธะเพปไทด์ภายในโมเลกุล เพื่อทำให้สารประกอบเป็นวงนั้น สามารถทำได้ภายใต้สภาวะที่เจือจางมาก (super dilution) ในการสังเคราะห์สารประกอบ **24** ได้ใช้การสังเคราะห์เพปไทด์วิธี carbodiimide โดยสภาวะในการทำปฏิกิริยานั้น จะเป็นเช่นเดียวกันกับการสังเคราะห์สารประกอบ **42**, **48**, **50** และ **52** แต่ได้เปลี่ยนแปลงสัดส่วนของรีเอเจนต์ EDC ที่ใช้ให้เป็น 5 เท่าของจำนวนโมลของสารตั้งต้น **54** และได้เพิ่มปริมาณตัวทำละลาย DCM ขึ้นจากเดิม 5 เท่าเช่นกัน ปฏิกิริยาดำเนินไปโดยคนสารละลายตลอดเวลาด้วย magnetic stirrer ภายใต้บรรยากาศของก๊าซ N_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อระเหยตัวทำละลายออกแล้ว จะได้ตะกอนสีเหลืองอ่อน ละลายตะกอนที่ได้นี้ด้วย EtOAc แล้วสกัดล้างด้วยน้ำกลั่น (3 x 20 mL) สารละลายที่อยู่ในชั้นของ EtOAc นำไปใส่ $MgSo_4$ anhydrous เพื่อดูดน้ำ จากนั้นกรองส่วนที่เป็นของแข็งออก ระเหยตัวทำละลายจะได้ตะกอนสารที่มีลักษณะเป็นยางเหนียวสีเหลืองอ่อน



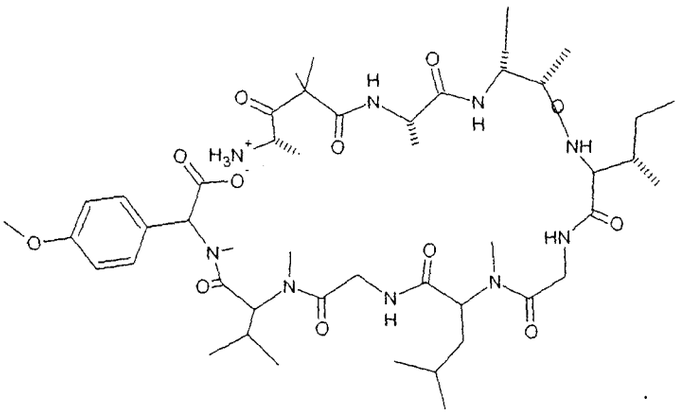
52

1. H_2, Pd, **53**
2. TFA, **54**
3. EDC

24

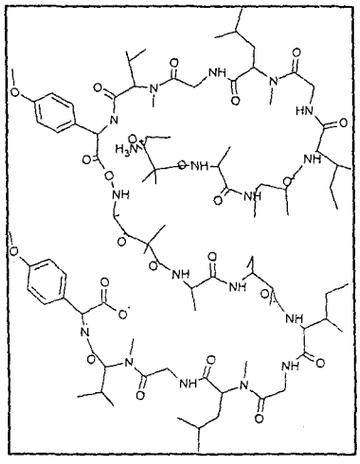
แผนภาพที่ 11 แสดงปฏิกิริยาในการสังเคราะห์สารประกอบ **24**

จากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H NMR พบว่าสารประกอบที่สังเคราะห์ได้นั้น มี peak ของหมู่ฟังก์ชัน กรดคาร์บอกซิลิกอิสระ (-COOH) ปรากฏอยู่ในช่วง δ11-12 ppm ดังแสดงในสเปกตรัมที่ 6 (ดูภาคผนวก) ซึ่งโครงสร้างของสารประกอบที่ได้นั้นน่าจะเป็นสารประกอบ **56** ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าสารประกอบ **24** ที่เป็นวงเพปไทด์นั้น ไม่สามารถสังเคราะห์ได้ตามแบบแผนการสังเคราะห์ของสารประกอบโดลาสแตติน 11 (**20**) (ดูข้อวิจารณ์เพิ่มเติมในบทที่ 4 ข้อ 4.1.10)



56

และเมื่อทำการสังเคราะห์ซ้ำอีกครั้งหนึ่ง ปรากฏว่า ^{1}H NMR สเปกตรัมที่ได้นั้น แตกต่างไปจากผลของการสังเคราะห์ในครั้งแรก แต่ยังปรากฏ peak ของหมู่กรดคาร์บอกซิลิกอิสระอยู่ แต่มีค่า chemical shift ต่างไปจากเดิม คืออยู่ในช่วง δ5-6 ซึ่งหากพิจารณาจากพื้นที่ใต้ peak แล้วนั้น ไม่น่าจะเป็นตำแหน่งของหมู่ –NH เพียงอย่างเดียว แต่คาดว่าน่าจะเป็น –COOH ที่มีเกิดพันธะไฮโดรเจนกับน้ำ ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นสารประกอบไดเมอร์ของ **56** ตามภาพที่ 8 ทั้งนี้จะต้องมีการศึกษาในเชิงลึกเพื่อยืนยันโครงสร้างทางเคมีต่อไป



ภาพที่ 8 แสดงไดเมอร์ของสารประกอบ **56**

เพื่อให้สามารถพิจารณา ^{1}H NMR สเปกตรัมของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ได้อย่างชัดเจนขึ้น ได้แยกสารผสมที่ได้จากการสังเคราะห์นี้โดยใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ที่ใช้น้ำกับอะซีโทรไนไทรล์ (acetonitrile, ACN) เป็น mobile phase ในระบบ gradient โดยจะเพิ่มปริมาณของ ACN จาก 0% เป็น 100% ภายในเวลา 60 นาที จากการทดลองพบว่าสามารถแยกสารที่คาดว่าจะเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการออกมาได้ที่ 43 นาที และ 57 นาที ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเนื่องจากปริมาณของสารที่แยกออกมาได้นั้นมีประมาณ 1 mg เท่านั้น ดังนั้นเมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ^{1}H NMR ที่มีความถี่ 300 MHz แล้ว ไม่สามารถระบุโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบได้ ทั้งนี้ควรจะได้ทำการศึกษาในแง่ของฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบที่สังเคราะห์ได้ และหากพบว่ามีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง ก็น่าที่จะได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมในแง่โครงสร้างทางเคมี และคอนฟอร์เมชันของสารประกอบในโครงการวิจัยอื่น ๆ ต่อไป

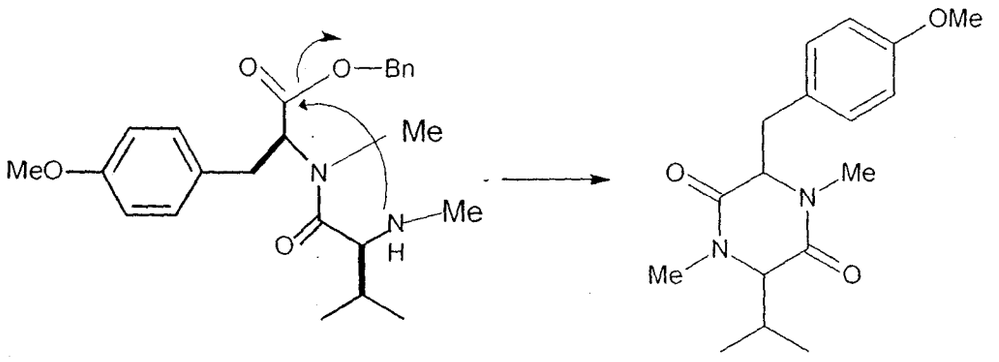
บทที่ 4
ข้อวิจารณ์

การสังเคราะห์สารประกอบเอไมด์อนาล็อกของโดลาสแตติน 11 (**24**) นั้น มีรายละเอียดในแง่ทฤษฎี และผลการทดลอง ดังที่ได้กล่าวมาแล้วในบทที่ 2 และ 3 ตามลำดับ สำหรับเนื้อหาในบทนี้จะได้กล่าวถึงข้อวิจารณ์ของผลการทดลอง รวมถึงปัญหาอุปสรรคในการทำวิจัย และแนวทางแก้ไข ซึ่งผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า จะเป็นข้อมูลที่มีประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยในด้านเคมีอินทรีย์สังเคราะห์ต่อไปในอนาคต

4.1. วิจารณ์ผลการทดลอง

4.1.1. การสังเคราะห์สารประกอบ Boc-Gly-N-Me-L-Leu-Gly-N-Me-L-Val-O,N-di-Me-L-Tyr-O-Bn (42)

การสังเคราะห์โดยใช้ปฏิกิริยาการสร้างพันธะเพปไทด์ไม่ว่าจะเป็นวิธี Mixed anhydride หรือวิธี Carbodiimide ก็ตาม พบว่าปัญหาที่สำคัญในการสังเคราะห์คือ การเกิด by-product ประเภทไดคีโตไพเพอร์ราซีน 55 ที่เกิดจากปฏิกิริยาการสร้างพันธะเพปไทด์ภายในโมเลกุลของสารประกอบไดเพปไทด์ **41** โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะเป็นไปตามแผนภาพที่ 12 ดังนี้



แผนภาพที่ 12 แสดงปฏิกิริยาของการสร้างสารประกอบไดคีโตไพเพอร์ราซีน 55

ปัจจัยที่ส่งเสริมปฏิกิริยาการสร้างสารประกอบประเภทไดคีโตไพเพอร์ราซีนนี้ คาดว่าน่าจะเกิดมาจากสภาวะที่มีน้ำในปริมาณมากเข้ามาในปฏิกิริยา ซึ่งจะสัมพันธ์กับความชื้นสัมพัทธ์ ณ สภาวะที่ทำการทดลอง เพราะเมื่อได้ใส่ตัวดูดความชื้น molecular sieve ลงไปแล้ว พบว่าอัตราส่วนของผลิตภัณฑ์ **42** ที่ต้องการ ต่อสารประกอบ 55 ที่เป็น by-product นั้น จะสูงขึ้น (ดูผลการทดลองใน

บทที่ 3 ข้อ 3.1) สำหรับบทบาทของน้ำที่ส่งผลสนับสนุนปฏิกิริยาการสร้างพันธะเพปไทด์ภายในโมเลกุลและให้สารประกอบวง 6 เหลี่ยมเป็นผลิตภัณฑ์นั้น สันนิษฐานได้ว่าน่าจะเกิดจากเหตุผล 3 ประการ ประการแรก ดังเป็นที่ทราบกันอยู่แล้วว่าสารประกอบประเภทไดคีโตไพเพอร์ราซีนนั้นมักจะเกิดได้ดีในโมเลกุลของเพปไทด์ที่หมู่ฟังก์ชันอัลคิลอะมีน (-NHR) (Ward, Lazny และ Pedras, 1997) ดังเช่นโมเลกุลของสารประกอบ **41** เพราะหมู่อัลคิลจะทำให้เกิดพันธะเพปไทด์ระหว่างโมเลกุลนั้นเกิดได้ช้า เนื่องจากผลของความเกะกะภายในโมเลกุล (steric effect) เมื่อเปรียบเทียบกับปฏิกิริยาที่ผลิตภัณฑ์ที่เป็นวง 6 เหลี่ยมซึ่งมีเสถียรภาพสูง สำหรับเหตุผลประการที่ 2 นั้น น่าจะมาจากโมเลกุลของน้ำสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารประกอบอินเทอร์มิเดียตบางส่วนที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบกรดคาร์บอกซิลิกและรีเอเจนต์ ทำให้ไม่สามารถเกิดการสร้างพันธะเพปไทด์กับอะมีนของกรดอะมิโนอีกชนิดได้ ส่วนเหตุผลประการสุดท้ายนั้น หากพิจารณา by-products ของปฏิกิริยาการสังเคราะห์พันธะเพปไทด์ที่เป็นสารประกอบในกลุ่มยูเรียที่สามารถละลายน้ำได้ ซึ่งหากมีปริมาณน้ำในสารละลายที่เกิดปฏิกิริยามากพอ จะละลายสารประกอบ by-products เหล่านี้ แล้วทำให้ pH ของสารละลายให้สูงขึ้น ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดสารประกอบไดคีโตไพเพอร์ราซีน (Goolcharran และ Borchardt, 1998)

สำหรับแนวทางในการป้องกันไม่ให้เกิดสารประกอบ **55** นี้ นอกจากจะต้องควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ในห้องปฏิบัติการให้น้อยที่สุดแล้ว ยังสามารถเติมสารประกอบ 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) ลงไปในปฏิกิริยาได้เพื่อลดปริมาณการเกิดสารประกอบประเภทไดคีโตไพเพอร์ราซีนและลดการเกิด racemization ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาได้อีกด้วย แต่สารประกอบ HOBt นี้ไม่สามารถสั่งเข้ามาใช้ในประเทศไทยได้ (ดูข้อ 4.2.2 เรื่องปัญหาในแง่ของข้อจำกัดในการใช้สารเคมีบางชนิด)

ในการสังเคราะห์ในขั้นต่อไปนั้น ไม่จำเป็นต้องแยกสารประกอบ **55** นี้ออกมา เพราะหากพิจารณาโครงสร้างของสารประกอบ **55** แล้ว จะเห็นได้ว่าสารประกอบนี้ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาต่อไปได้อีก ดังนั้นจะไม่มีผลรบกวนต่อไปปฏิกิริยาการสร้างพันธะเพปไทด์ ทั้งยังสามารถใช้ในการเปรียบเทียบปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเมื่อเทียบกับเมื่อเริ่มต้นได้อีกด้วย และประกอบกับสารประกอบ **42** ที่สังเคราะห์ได้มีปริมาณน้อยมาก ซึ่งจะสูญเสียไปมากกับกระบวนการแยกโดยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี และการวิเคราะห์ อาจทำให้มีปริมาณไม่เพียงพอต่อการสังเคราะห์ในขั้นต่อ ๆ ไปได้

4.1.2. การสังเคราะห์สารประกอบ Gly-N-Me-L-Leu-Gly-N-Me-L-Val-O,N-di-Me-L-Tyr-O-Bn.TFA (43)

เมื่อนำสารประกอบเพนตะเพปไทด์ **42** มาทำปฏิกิริยาเพื่อกำจัดหมู่ปกป้อง Boc- โดยใช้TFA พบว่าปฏิกิริยาดำเนินไปได้อย่างดีมาก โดยให้ผลิตภัณฑ์ 100% yield อย่างไรก็ตาม

เช่นเดียวกับข้างต้น เนื่องจากปัญหาความชื้นบรรยากาศซึ่งไม่สามารถควบคุมได้ ทำให้เกิดการควบแน่นของน้ำลงไปในสารละลายขณะทำปฏิกิริยาด้วย การระเหยกรดและตัวทำละลายอินทรีย์ออกจึงเป็นปัญหามาก ดังนั้นจึงต้องนำไปไว้ในโถอบความชื้นเป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว ก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์โดยเทคนิค ^{1}H NMR

4.1.3. การสังเคราะห์สารประกอบ Boc-L-Ile-Gly-N-Me-L-Leu-Gly-N-Me-L-Val-O,N-di-Me-L-Tyr-O-Bn (48)

ปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารประกอบเพปไทด์ **48** เป็นการสร้างพันธะเพปไทด์ระหว่างสารประกอบ **43** ที่เป็นเกลือ TFA กับ Boc-L-isoleucine โดยวิธี Carbodiimide ซึ่งพบว่าสามารถสังเคราะห์สารประกอบ **48** ได้ในปริมาณ 20% yield เท่านั้น ทั้งนี้คาดว่าน่าจะเกิดมาจากปัญหาเรื่องสภาวะในการทดลองเช่นเดียวกันกับการสังเคราะห์ในขั้นก่อนหน้านี้ ประกอบกับ เกลือคาร์บอกซิเลตของ Boc-L-isoleucine ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยานั้น บางส่วนทำปฏิกิริยากับน้ำ ทำให้ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาการสร้าง acylisourea ซึ่งเป็นสารประกอบอินเทอร์มิเดียตที่เกิดขึ้นเพื่อสร้างพันธะเพปไทด์กับหมู่ฟังก์ชันอะมีนของสารประกอบ **43** ได้

ทั้งนี้เมื่อพิจารณา ^{1}H NMR แล้วพบว่ามีข้อสังเกตที่น่าสนใจที่ลักษณะของ peak ของหมู่ปกป้อง Boc- และของหมู่ Benzyl- จะมีขนาดเล็กและกว้างมากเมื่อเทียบกับสารประกอบในกลุ่มเดียวกัน ในกรณีของสารประกอบ **48** นั้น น่าจะเกิดจากการที่โครงสร้างเกิด racemization ซึ่งได้แก่ การเปลี่ยนคอนฟิกุเรชันที่ไครัลคาร์บอนตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่ง ขบวนการนี้เกิดได้ดีหากสารละลายมีกรดปนอยู่ ทำให้สารประกอบที่สังเคราะห์ได้เป็นสารผสมของ rotamers หลายชนิด ซึ่งเป็นปัญหาต่อเนื่องมาจากการระเหย TFA ของการสังเคราะห์สารประกอบ **43** นอกจากนั้นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ลักษณะของ peak ใน ^{1}H NMR กว้าง น่าจะเกิดมาจากการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างน้ำที่อยู่ในสารตัวอย่างกับหมู่อะมิโนและหมู่คาร์บอนิลของสารประกอบเพปไทด์ ส่วนการที่ peak ของหมู่ปกป้อง Boc- มีขนาดเล็กมากนั้น คาดว่าอาจเนื่องมาจากสภาวะอากาศที่ชื้น ซึ่งทำให้การระบายอากาศภายในตู้ดูดควันไม่ดี ทำให้สารประกอบ TFA ที่ยังค้างอยู่ในตู้ดูดควันและในโถอบความชื้น เข้าทำปฏิกิริยากับหมู่ Boc- ทำให้หมู่ Boc- บางส่วนหลุดออกไปได้ และเกิดเป็นสารประกอบที่เป็นหมู่อะมีนอิสระ ($-NH_2$) ปนอยู่ด้วย

4.1.4. การสังเคราะห์สารประกอบ L-Ile-Gly-N-Me-L-Leu-Gly-N-Me-L-Val-O,N-di-Me-L-Tyr-O-Bn.TFA (49)

เมื่อนำสารประกอบเพปไทด์ **48** มาทำปฏิกิริยากับ TFA เพื่อกำจัดหมู่ปกป้อง Boc- นั้นปฏิกิริยาดำเนินไปโดยให้สารประกอบ **49** เป็นผลิตภัณฑ์ 100% yield แต่ปัญหาที่พบยังเป็น

ขั้นตอนในการระเหย TFA ซึ่งพบว่าระบบการระบายอากาศของตู้ดูดควันทำงานอย่างไม่มีประสิทธิภาพในสภาวะอากาศที่ชื้นดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ทำให้สารประกอบ TFA บางส่วน และน้ำควบแน่นกลับเข้าในระหว่างทำปฏิกิริยา ทั้งนี้ได้ใช้เครื่อง rotary evaporator แต่เนื่องจากสารละลายมีน้ำปนเปื้อนอยู่ในปริมาณมาก ทำให้ยากแก่การระเหยตัวทำละลายออก การคงเหลือของสารประกอบ TFA ซึ่งเป็นกรดนี้ เป็นสาเหตุอย่างหนึ่งของการเกิด racemization ตามที่ได้กล่าวมาแล้วในข้อ 4.1.3

4.1.5. การสังเคราะห์สารประกอบ Boc-Map-L-Ile-Gly-N-Me-L-Leu-Gly-N-Me-L-Val-O,N-di-Me-L-Tyr-O-Bn (50)

ปฏิกิริยาในการสังเคราะห์สารประกอบ **50** เป็นการสร้างพันธะเพปไทด์โดยวิธี Carbodiimide เช่นเดียวกันกับการสังเคราะห์สารประกอบ **42** และ **48** ผลการวิจัยพบว่าสามารถสังเคราะห์สารประกอบเพปไทด์ **50** ที่ต้องการได้ โดยคิดเป็น 55% yield ทั้งนี้จากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H NMR พบว่า ลักษณะของ peak ของหมู่ปกป้อง Boc- และ Benzyl- นั้น มีขนาดเล็ก และกว้างมาก เช่นเดียวกับในกรณีของสารประกอบ **48** ทั้งนี้อาจเกิดมาจากสาเหตุเดียวกันกับกรณีของสารประกอบ **48** โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเกิด racemization ในตำแหน่งที่ใกล้กับหมู่ Boc- นอกจากนั้นอาจมีสาเหตุมาจากหมู่ Boc- ในสาร ประกอบกรดคาร์บอกซิลิก **32** ได้หลุดออกไป เนื่องมาจากสภาวะของห้องปฏิบัติการ เช่น อุณหภูมิ ความชื้น หรือภาชนะในการเก็บสารนั้นได้สัมผัสกับไอของกรดภายในห้องปฏิบัติการ หรือปฏิกิริยาในการใส่หมู่ปกป้อง Boc- ในขั้นตอนของการสังเคราะห์สารประกอบ **32** อาจไม่สมบูรณ์

4.1.6. การสังเคราะห์สารประกอบ Map-L-Ile-Gly-N-Me-L-Leu-Gly-N-Me-L-Val-O,N-di-Me-L-Tyr-O-Bn.TFA (51)

เมื่อนำสารประกอบเพปไทด์ **50** มาทำปฏิกิริยากับ TFA เพื่อกำจัดหมู่ปกป้อง Boc- พบว่าปฏิกิริยาดำเนินไปได้ดี โดยให้ปริมาณผลิตภัณฑ์คิดเป็น 100% yield (ดูปัญหาที่พบในหัวข้อ 4.1.2 และ 4.1.4 เพิ่มเติม)

4.1.7. การสังเคราะห์สารประกอบ Boc-Ibu-Map-L-Ile-Gly-N-Me-L-Leu-Gly-N-Me-L-Val-O,N-di-Me-L-Tyr-O-Bn (52)

การสังเคราะห์สารประกอบเพปไทด์ **52** นั้นเป็นการสร้างพันธะเพปไทด์โดยวิธี Carbodiimide โดยใช้สภาวะในการทดลองนั้นเหมือนกันกับการสังเคราะห์สารประกอบ **42**, **48** และ **50** ซึ่งได้สารประกอบที่เป็นผลิตภัณฑ์ **52** ในปริมาณคิดเป็น 41% yield ในการสังเคราะห์ จากการพิจารณา ^{1}H NMR แล้วนั้นพบว่าขนาดและลักษณะของหมู่ปกป้อง Boc- มีลักษณะเหมือนกับ

สารประกอบในกลุ่มโดลาสแตติน 11 (20) และอนาล็อกชนิดอื่น ๆ ซึ่งทำให้เข้าใจได้ว่า สารประกอบ 52 นี้ มีคอนฟอร์เมชัน หรือมีรูปลักษณะทางเคมีที่คล้ายคลึงกับสารประกอบในกลุ่มเดียวกันนี้

4.1.8. การสังเคราะห์สารประกอบ Boc-Ibu-Map-L-Ile-Gly-N-Me-L-Leu-Gly-N-Me-L-Val-O,N-di-Me-L-Tyr-OH (53)

ปฏิกิริยาการเติมไฮโดรเจน (hydrogenation) เพื่อกำจัดหมู่ปกป้อง Benzyl- ของหมู่กรดคาร์บอกซิลิกในกรดอะมิโน tyrosine ให้สารประกอบผลิตภัณฑ์คิดเป็น 87% yield

4.1.9. การสังเคราะห์สารประกอบ Ibu-Map-L-Ile-Gly-N-Me-L-Leu-Gly-N-Me-L-Val-O,N-di-Me-L-Tyr-OH.TFA (54)

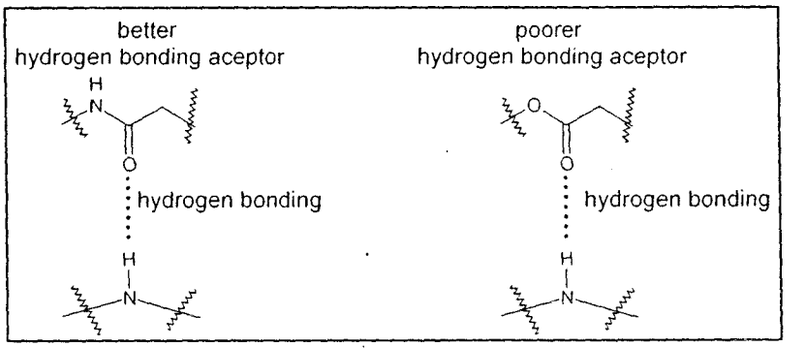
เพื่อกำจัดหมู่ปกป้อง Boc ของหมู่ฟังก์ชันอะมีนโนในกรดอะมิโน Ibu (26) โดยใช้ TFA พบว่าปฏิกิริยาดำเนินไปได้เป็นอย่างดี โดยปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่ได้คิดเป็น 100% (ดูปัญหาที่พบในหัวข้อ 4.1.2., 4.1.4. และ 4.1.6.)

4.1.10. การสังเคราะห์สารประกอบเอไมด์อนาล็อกของสารโดลาสแตติน 11 (24)

ปฏิกิริยาในการสังเคราะห์สารประกอบเอไมด์อนาล็อกของสารโดลาสแตติน 11 (24) เป็นปฏิกิริยาการสร้างพันธะเพปไทด์ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกของปลายด้านกรดอะมิโน tyrosine กับหมู่อะมีนของปลายด้านกรดอะมิโน Ibu (26) นั้น ที่ทำได้ภายใต้สภาวะที่เจือจางมาก (super dilution) เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการสร้างพันธะเพปไทด์ภายในโมเลกุลสามารถเกิดขึ้นได้ ซึ่งจากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H NMR ที่พบว่ายังมี peak ของหมู่กรดคาร์บอกซิลิกอิสระ (-COOH) ปรากฏอยู่ในช่วง δ11-12 ppm ซึ่งหมายถึง ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไม่สามารถสร้างพันธะเพปไทด์เพื่อสร้างสารประกอบที่เป็นวงได้ ทั้งนี้เป็นไปได้ว่าแบบแผนในการสังเคราะห์สารประกอบ 24 นั้นให้สำเร็จนั้น ไม่สามารถใช้ลำดับและแบบแผนการสังเคราะห์เช่นเดียวกันกับของสารประกอบโดลาสแตติน 11 (20) ได้ โดยปัญหาในการสังเคราะห์เช่นนี้ เกิดในกรณีของการสังเคราะห์สารประกอบลิไบ-ยาสแตติน (23) ซึ่งมีหมู่เมทิลเพิ่มขึ้นมาเพียงแค่หมู่เดียวเท่านั้น แต่ก็ส่งผลต่อความสามารถในการเกิด epimerization ซึ่งทำให้ลักษณะของ ^{1}H NMR เปลี่ยนไป และยังไม่สามารถสังเคราะห์ได้โดยใช้แบบแผนในการสังเคราะห์เช่นเดียวกันกับสารประกอบโดลาสแตติน 11 (20) ได้อีกด้วย (Bates et al., 2002)

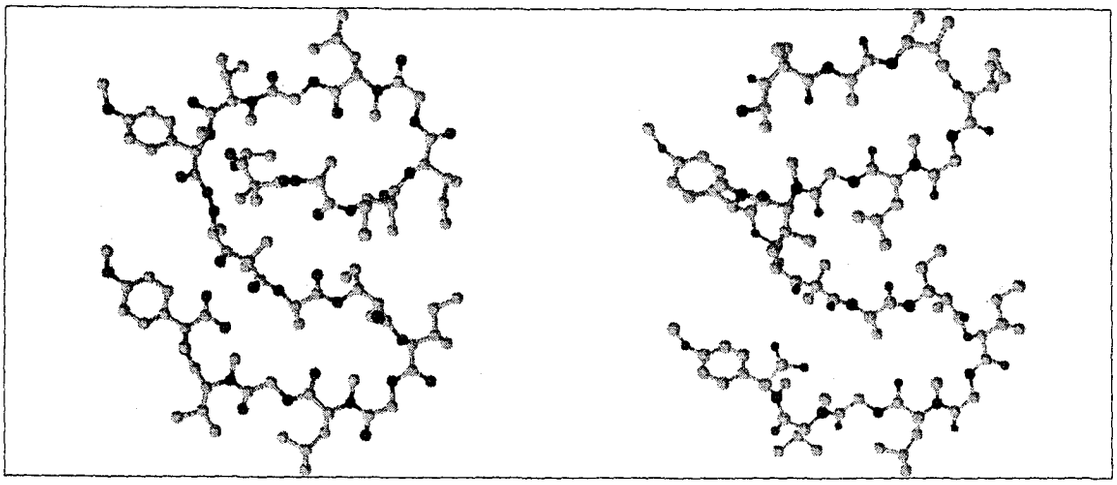
เมื่อพิจารณาโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบเอไมด์อนาล็อกของสารโดลาสแตติน 11 (24) ที่ต้องเปลี่ยนจากหมู่ฟังก์ชันจากเอสเทอร์ในสารประกอบโดลาสแตติน 11 (20) มาเป็นหมู่ฟังก์ชันเอไมด์แล้ว ถึงแม้หมู่ฟังก์ชันทั้งสองนี้จะจัดตัวอยู่ในคอนฟิกุเรชัน trans เหมือนกัน

แต่การเปลี่ยนจากออกซิเจนอะตอมในหมู่ฟังก์ชันเอสเทอร์ที่มีสภาพไฟฟ้าลบ (electronegativity) มาก มาเป็นไนโตรเจนอะตอมที่มีสภาพไฟฟ้าลบน้อยกว่าในหมู่ฟังก์ชันเอไมด์นั้น ได้ส่งผลต่อแบบแผนในการสร้างพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุลของเพปไทด์ ตามที่แสดงในภาพที่ 9 โดยที่หมู่คาร์บอนิลของเอสเทอร์นั้นจะเป็นตัวรับพันธะไฮโดรเจนที่ไม่ดี เมื่อเทียบกับหมู่คาร์บอนิลของเอไมด์ นอกจากนั้นหมู่ –NH ใน isoleucine ยังสามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับส่วนอื่น ๆ ภายในโมเลกุลของเพปไทด์ได้ ในขณะที่อะตอมของออกซิเจนในหมู่ฟังก์ชันเอสเทอร์ไม่สามารถทำได้ (Coombs et al., 1999) นอกจากนั้นแบบแผนที่แตกต่างนี้ คาดว่าน่าจะเกิดจากปริมาณของโมเลกุลของน้ำที่เข้ามาสร้างพันธะไฮโดรเจนกับโมเลกุลของเพปไทด์ด้วยเช่นเดียวกัน



ภาพที่ 9 แสดงการเกิดพันธะไฮโดรเจนของหมู่ฟังก์ชันเอไมด์ และหมู่ฟังก์ชันเอสเทอร์

ทั้งนี้เมื่อได้ทำการสังเคราะห์ซ้ำอีกครั้ง จาก ^{1}H NMR พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้ น่าจะเป็นไดเมอร์ของสารประกอบ **56** สำหรับเหตุผลที่สารประกอบ **56** สร้างพันธะเพปไทด์ระหว่างโมเลกุลและให้สารประกอบไดเมอร์ แทนที่จะสร้างพันธะเพปไทด์ภายในโมเลกุลและให้สารประกอบที่เป็นวงนั้น สันนิษฐานโดยอาศัยข้อมูลจากโปรแกรมในการหาคอนฟอร์เมชันที่เหมาะสมของโมเลกุล (optimization) ในสามมิติ คาดว่าน่าจะมาจากการที่ไดเมอร์ของสารประกอบ **56** ที่สังเคราะห์ได้นี้ มีคอนฟอร์เมชันในลักษณะเป็นฮีลิกซ์ (ภาพทางด้านซ้ายมือ) ซึ่งจะเสถียร เมื่อเปรียบเทียบการแทนที่พันธะเอไมด์ในสารประกอบ **56** ด้วยพันธะเอสเทอร์ (ภาพทางด้านขวามือ) ดังแสดงในภาพที่ 10



ไดเมอร์ของสารประกอบ **56** ไดเมอร์ของสารประกอบได้แทนที่หมู่เอไมด์ในสารประกอบ **56** ด้วยหมู่แอสเทอร์

ภาพที่ 10 แสดงการเปรียบเทียบคอนฟอร์เมชันของไดเมอร์ของสารประกอบ **56** (ซ้ายมือ) และไดเมอร์ของสารประกอบที่แทนที่หมู่เอไมด์ในสารประกอบ **56** ด้วยหมู่เอสเทอร์ (ขวามือ)

การศึกษาวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์หลัก เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในเบื้องต้นสำหรับการสังเคราะห์ในเชิงการสังเคราะห์สารประกอบเอไมด์อนาล็อกของสารโคลาสแตติน 11 (**24**) โดยใช้แบบแผนในการสังเคราะห์เช่นเดียวกันกับของสารประกอบโคลาสแตติน 11 เท่านั้น อันด้วยข้อจำกัดในด้านงบประมาณและด้วยปัจจัยอื่น ๆ (ดูรายละเอียดเพิ่มเติมในข้อ 4.2 ในหัวข้อปัญหาอุปสรรคในการทำวิจัย และแนวทางแก้ ไข) ทั้งนี้ควรจะได้มีการศึกษาในเชิงลึกเพื่อยืนยันโครงสร้างทางเคมีและคอนฟอร์เมชันที่เหมาะสมของสารประกอบ รวมถึงฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเซลล์มะเร็งในโครงการวิจัยอื่น ๆ ต่อไปในอนาคต

4.2. ปัญหาอุปสรรคในการทำวิจัย และแนวทางแก้ไข

4.2.1. ปัญหาในแง่ของสภาวะในการทดลอง

ในการสังเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารประกอบเพปไทด์นั้น มีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องควบคุมสภาวะในการทดลองในแง่ของทั้งอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ในห้องปฏิบัติการที่ทำการทดลอง ปัญหาที่พบในการทำการทดลองเพื่อสังเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการที่อาคารเครื่องมือ 2 ห้อง 2215 อันเกิดเนื่องมาจากการที่ไม่สามารถควบคุมสภาวะในการทดลองได้เลย ทั้งในแง่อุณหภูมิ และโดยเฉพาะอย่างยิ่งปริมาณน้ำที่เข้ามารบกวนปฏิกิริยา พบว่าในบางครั้งไม่สามารถสังเคราะห์สารประกอบได้เลย และได้สูญเสียสารประกอบอินเทอร์มิเดียตที่ต้องผ่านกระบวนการในสังเคราะห์หลายขั้นตอนไป จนต้องมาเริ่มต้นใหม่หลายครั้ง จนเมื่อได้ย้ายห้องปฏิบัติการมาที่ห้องที่อาคารเครื่องมือ 1 ห้อง 1317 ซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิ และความชื้นสัมพัทธ์ในห้องปฏิบัติการได้บ้างโดยใช้เครื่องปรับอากาศ ทำให้ผลการสังเคราะห์ได้ดีขึ้น แต่ก็ยังประสบปัญหาในเรื่องของการระบายอากาศ ส่งผลให้สารเคมีบางชนิดสามารถเข้าไปปนเปื้อนในระหว่างการทดลอง

การแก้ปัญหา

แนวทางการแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นในการทำวิจัยอันเนื่องมาจากสภาวะที่ใช้ในการทดลองนั้น สามารถทำได้ดีที่สุดภายใต้งบประมาณที่ได้มาคือ การใช้ตัวดูดความชื้น เช่น molecular sieve ใส่เข้าไปในระหว่างการทำปฏิกิริยา กระนั้นก็ตามปฏิกิริยาก็ยังดำเนินไปได้ไม่ดีนัก ทำให้ต้องเริ่มต้นสังเคราะห์ใหม่หลายครั้ง จากเดิมที่เสนอจะสังเคราะห์สารประกอบอินเทอร์มิเดียต **37** และ **41** ซึ่งประกอบไปด้วยขั้นตอนในการสังเคราะห์รวมกันทั้งหมด 8 ขั้นตอน ที่ห้องปฏิบัติการของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี แต่เมื่อพิจารณาสภาวะแวดล้อม และข้อจำกัดต่าง ๆ ซึ่งส่งผลต่องบประมาณของโครงการแล้ว ไม่คุ้มค่ากับการสังเคราะห์ในประเทศไทย ดังนั้นจึงต้องขอความอนุเคราะห์สารประกอบอินเทอร์มิเดียตทั้ง 2 นี้ จากกลุ่มวิจัยของ Professor Bates ที่ The University of Arizona ที่ได้ช่วยกรุณาส่งมาให้หลายครั้ง

การเลือกปฏิกิริยาที่เหมาะสมที่สุดภายใต้สภาวะและข้อจำกัดข้างต้นก็เป็นอีกทางหนึ่งซึ่งได้ใช้ในระหว่างการศึกษาวิจัย เมื่อพิจารณาและทดลองวิธีการสังเคราะห์แบบต่าง ๆ ซึ่งรีเอ-เจนต์ที่ใช้ ล้วนแต่สามารถทำปฏิกิริยากับน้ำได้ทั้งสิ้น ปฏิกิริยาการสังเคราะห์วิธี Carbodiimide น่าจะเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุด เนื่องมาจากสารประกอบ by-products ที่ได้จากปฏิกิริยาสามารถละลายน้ำได้ ดังนั้นตามหลักสมดุลเคมีแล้ว ปฏิกิริยาก็ควรจะดำเนินไปในทิศทางที่ให้ผลิตภัณฑ์มากที่สุด

4.2.2. ปัญหาในแง่ของข้อจำกัดในการใช้สารเคมีบางชนิด

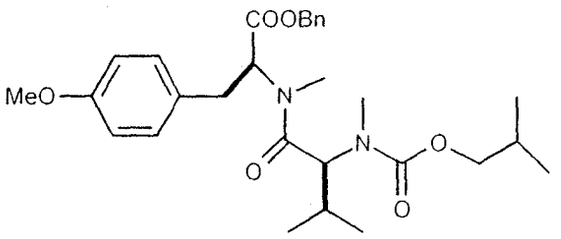
ดังที่ได้กล่าวไปบ้างแล้วเกี่ยวกับข้อจำกัดในการใช้สารเคมีในหัวข้อ 4.1.1. สารเคมีที่มีความจำเป็นและมีส่วนช่วยในการทำให้ปฏิกิริยาการสังเคราะห์เพปไทด์ให้มีประสิทธิภาพดีขึ้นและยังลดการเกิด racemization เช่น HOBt นั้น ไม่สามารถสั่งเข้ามาใช้ในประเทศไทยได้ เนื่องจากสารประกอบดังกล่าวไม่ปลอดภัยที่จะสามารถขนส่งทางเครื่องบินได้ บริษัทที่จำหน่ายสารเคมีในประเทศไทยจึงไม่สั่งเข้ามาจำหน่าย

แนวทางแก้ไข

ข้อจำกัดในแง่การใช้สารเคมีนี้ ไม่มีทางแก้ไขนอกจากจะต้องไปทำการวิจัยที่ต่างประเทศเท่านั้น ปัญหาดังกล่าวนี้เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้การศึกษาวิจัยทางด้านเคมีสังเคราะห์ไม่ก้าวหน้าไปเท่าที่ควร เพราะปัจจัยสำคัญของปฏิกิริยาการสังเคราะห์ทางเคมี คือ การใช้รีเอเจนต์ที่เหมาะสม ในสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

4.2.3. ปัญหาในแง่ของสภาวะอากาศที่มีผลต่ออายุการใช้งานของรีเอเจนต์

ด้วยสภาวะอากาศที่ร้อนและชื้น ทำให้อายุของรีเอเจนต์ที่ใช้ในการสังเคราะห์สั้น เช่น สารประกอบ EDC ซึ่งเป็นรีเอเจนต์ที่ใช้ในการสร้างพันธะเพปไทด์นั้น เมื่อเปิดขวดแล้วใช้เพียง 2-3 ครั้ง สารประกอบจะเปลี่ยนจากของแข็งสีขาวขุ่นเป็นสีเหลือง คาดว่าเกิดจากการทำปฏิกิริยากับน้ำในบรรยากาศ ซึ่งไม่สามารถนำรีเอเจนต์ขวดนี้กลับมาใช้ได้อีก ส่วนสารประกอบ IBCF สามารถทำปฏิกิริยากับน้ำได้สารประกอบ 57 ทำให้ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับสารประกอบกรดอะมิโนในการสร้างพันธะเพปไทด์ได้เช่นกัน



57

แนวทางแก้ไข

หลังจากได้พบกับปัญหาดังกล่าว ได้พยายามแก้ไขโดยพยายามให้รีเอเจนต์สัมผัสกับบรรยากาศให้น้อยที่สุด และโดยการเก็บสารไว้ในที่ที่มีอุณหภูมิต่ำ เช่น ตู้เย็น แต่ปัญหาที่พบคือการนำสารเข้าและออกจากตู้เย็น ทำให้เกิดความชื้นขึ้นในภาชนะที่บรรจุสารเคมีนั้น ดังนั้นจึงได้ทำ

ภาชนะพิเศษที่บรรจุตัวดูดความชื้นใส่ลงไปด้วยในขณะจัดเก็บสาร ซึ่งพบว่าสามารถยืดอายุสารเคมี ให้มีประสิทธิภาพในการทำงานของได้ยาวนานขึ้น

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

การสังเคราะห์สารประกอบเอไมด์อนาล็อกของสารโดลาสแตติน 11 (**24**) ในโครงการวิจัยนี้ได้ใช้แบบแผนในการสังเคราะห์ เช่นเดียวกันกับการสังเคราะห์สารประกอบโดลาสแตติน 11 (**20**) โดยประกอบไปด้วย สารประกอบอินเทอร์มิเดียตที่สำคัญ 5 ชนิด ซึ่งจะต้องนำมาเชื่อมกันโดยพันธะเพปไทด์ จากผลการวิจัยพบว่าผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้นั้นเป็นสารประกอบเพปไทด์ที่เป็นโซ่ยาวปลายเปิด (open chain) แทนที่จะเกิดเป็นสารประกอบที่เป็นวง เมื่อทำการสังเคราะห์ซ้ำพบว่า การเกิดพันธะเพปไทด์ระหว่างโมเลกุลให้ไดเมอร์ของเพปไทด์ที่เป็นโซ่ยาวปลายเปิดนั้น เกิดได้ดีกว่าการสร้างพันธะเพปไทด์ภายในโมเลกุลที่ให้สารประกอบเพปไทด์ที่เป็นวง ทั้งนี้สันนิษฐานว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับแบบแผนของพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุลของเพปไทด์ และพันธะไฮโดรเจนของเพปไทด์กับโมเลกุลของน้ำที่อยู่ล้อมรอบ ซึ่งแตกต่างจากภาวะในการสังเคราะห์สารประกอบโดลาสแตติน 11 (**20**) ทั้งนี้ควรจะได้มีการศึกษาในเชิงลึกเพื่อยืนยันโครงสร้างทางเคมี และคอนฟอร์เมชันที่เหมาะสมของสารประกอบ รวมถึงฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเซลล์มะเร็งในโครงการวิจัยอื่น ๆ ต่อไปในอนาคต

ปัญหาอุปสรรคที่สำคัญในการสังเคราะห์คือ สภาวะในการทดลองที่ไม่สามารถควบคุมปริมาณความชื้นสัมพัทธ์ให้เหมาะสมต่อการทำงานของรีเอเจนต์ได้ ทั้งสาเหตุเดียวกันนี้ยังเป็นปัจจัยส่งเสริมในปฏิกิริยาของการเกิดสารประกอบ by-product นอกจากนั้นยังส่งผลให้อายุการใช้งานของสารเคมีสั้นกว่าปกติอีกด้วย สำหรับการแก้ไขโดยการใช้ตัวดูดความชื้นใส่ลงไปในปฏิกิริยาช่วยให้ปฏิกิริยาเกิดได้ดีขึ้นบ้าง ส่วนปัญหาอื่น ๆ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ ได้แก่ ข้อจำกัดในการใช้สารเคมีบางชนิดที่จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์ ซึ่งไม่สามารถสั่งเข้ามาใช้ในประเทศไทยได้

ในปัจจุบันการศึกษาวิจัยด้านเคมีอินทรีย์สังเคราะห์นั้น มีความสำคัญมากต่อการพัฒนาองค์ความรู้ในด้านเภสัชเคมี เช่น การสังเคราะห์สารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อสามารถนำมาใช้ในการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาเป็นยารักษาโรคร้ายแรงต่อไปได้ ดังนั้นการส่งเสริมและสนับสนุนให้มีการศึกษาวิจัยในด้านนี้ จึงเป็นสิ่งที่จำเป็นต่อการพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่มุ่งเน้นการสร้างองค์ความรู้บนพื้นฐานที่สามารถพึ่งพาตนเองได้ ทั้งนี้ผู้วิจัยหวังว่าโครงการวิจัยเรื่องการสังเคราะห์สารประกอบเอไมด์อนาล็อกของสารต้านมะเร็งโดลาสแตติน 11 นี้ จะเป็นส่วนหนึ่งที่ช่วยชี้ให้เห็นถึงความสำคัญดังกล่าว รวมทั้งข้อมูลต่าง ๆ และผลการศึกษาที่ได้ ปัญหาอุปสรรค และแนวทางการแก้ปัญหา จะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาในเชิงเคมีสังเคราะห์ในโครงการวิจัยอื่น ๆ ต่อไปในอนาคต

บรรณานุกรม

กลุ่มข้อมูลข่าวสารสุขภาพ สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ กระทรวงสาธารณสุข. 2549. จำนวนและอัตราตายต่อประชากร 100,000 คน จำแนกตามสาเหตุที่สำคัญ พ.ศ. 2544-2548. Availble URL: http://203.157.19.191

กรมอุตุนิยมวิทยา กระทรวงเทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร. 2549. ภูมิอากาศบ้านเรา. Availble URL: http://www.tmd.go.th/knowledge/book_weather06.html

Bates, R. B.; Brusoe, K. G.; Burns, J. J.; Caldera, S.; Cui, W.; Gangwar, S.; Gramme, M. R.; McClure, K. J.; Rouen, G. P.; Schadow, H.; Stessman, C. C.; Taylor, S.R.; Vu, V.; Yarlick, G.; Zhang, J.; Pettit, G. R.; Bontems, R. (1997). J. Am. Chem. Soc. Volume 119. Page 2111.

Bollag, D. M.; McQueney, P. A.; Zhu, J.; Hensens, O.; Koupal, L.; Liesch, J.; Goetz, M.; Lazarides, E.; Woods, C. M. (1995). Cancer Res. Volume 55. Page 2325.

Borman, S. (1991) Chem. & Eng. News. 2nd September. Page 11.

Carmely, S.; Kashman, Y. (1985). Tetrahedron Lett. Volume 26. Page 511.

Carter, D. C.; Moore, R. E.; Mynderse, J. S.; Niemczura, W. P.; Todd, J. S. (1984). J. Org. Chem. Volume 49. Page 236.

Coombs, G.S.; Rao, M. S., Olson, A. J.; Dawson, P. E.; Madison, E. L. (1999). J. Biol. Chem. Volume 274. Page 24074.

Cooper, J. A. J. (1987). Cell. Biol. Volume 105. Page 1473.

Crews, P.; Manes, L. V.; Boehler, M. (1986). Tetrahedron Lett. Volume 27. Page 2797.

Faulstich, H.; Wieland, T. (1978). Crc Crit. Rev. Biochem. Volume 5. Page 185.

Goolcharran, C.; Borchardt, R. T. (1998). J. Pharm.Sci. Volume 87. Page 283.

Harrigan, G. G.; Yoshida, W. Y.; Moore, R. E.; Nagle, D. G.; Park, P. U.; Biggs, J.; Paul, V. J.; Mooberry, S. L.; Corbett, T. H.; Valeriote, F. A. (1998). J. Nat. Prod. Volume 61. Page 1221.

Holmes, K. C.; Kabach, W.; Manherz, H. G.; Pai, E. F.; Suck, D. (1990). Nature. Volume 347. Page 37.

Hung, D. T.; Chen, J.; Schreiber, S. L. (1996). Chem. Biol. Volume 3. Page 287.

Jefford, C. W.; McNulty, J. (1994). Helv. Chim. Acta. Volume 77. Page 2142.

Kashman, Y.; Groweiss, A.; Shmueli, U. (1980). Tetrahedron Lett. Volume 21. Page 3629.

Kobayashi, M.; Tanaka, J.-I., Katori, T.; Matsuura, M.; Yamashita, M.; Kitagawa, I. (1990). Chem. Pharm. Bull. Volume 38. Page 3409.

Kunze, B.; Jansen, R.; Sasse, F.; Hofle, G.; Reichenbach H. (1995). J. Antibiot. Volume 48. Page 1262.

Nakkiew, P. (2000). Ph.D. Dissertation. The University of Arizona, Tucson, Arizona.

Patocka, J.; Strunecka A. (1999) Acta Medica (Hradec Kealove). Volume 42. Page 3.

Pettit, G. R.; Kamano, Y.; Herald, C. L.; Tuinman, A. A.; Boettner, F. E.; Kizu, H.; Schmidt, J. M.; Baczynskyi, L.; Tomer, K. B.; Bontems, R. J. (1987). J. Am. Chem. Soc. Volume 109. Page 6883.

Pettit, G. R.; Kamano, Y.; Kizu, H.; Dufresne, C.; Herald, C. L.; Bontems, R. J.; Schmidt, J. M.; Boettner, F. E.; Niėman, R. A. (1989). Heterocycles. Volume 28. Page 553.

Rai, S. S.; Wolff J. (1996) J. Biol. Chem. Volume 271. Page 14707.

Ringel, I.; Horwitz, S. B. (1991). J. Natl. Cancer Inst. Volume 83. Page 288.

Sabbaraju, G. V.; Golakoti, T.; Patterson, G. M. L.; Moore, R. E. (1997). J. Nat. Prod. Volume 60. Page 302.

Sackett, D. L.; Varma, J. K. (1993). Biochem. Volume 32. Page13560.

Sakai, R.; Higa, T.; Kashman, Y. (1986). Chem. Lett. Volume 9. Page 1499.

Schiff, P. B.; Horwitz, S. B.; Fant, J. (1997). Nature. Volume 277. Page 665.

Sheehan, J.C.; Preston, J.; Cruickshank, P.A. (1965). J. Am. Chem. Soc. Volume 87. Page 2492.

Smith, C. D.; Zhang, X. Q.; Mooberry, S. L.; Patterson, G. M. L.; Moore, R. E. (1994). Cancer Res. Volume 54. Page 3779.

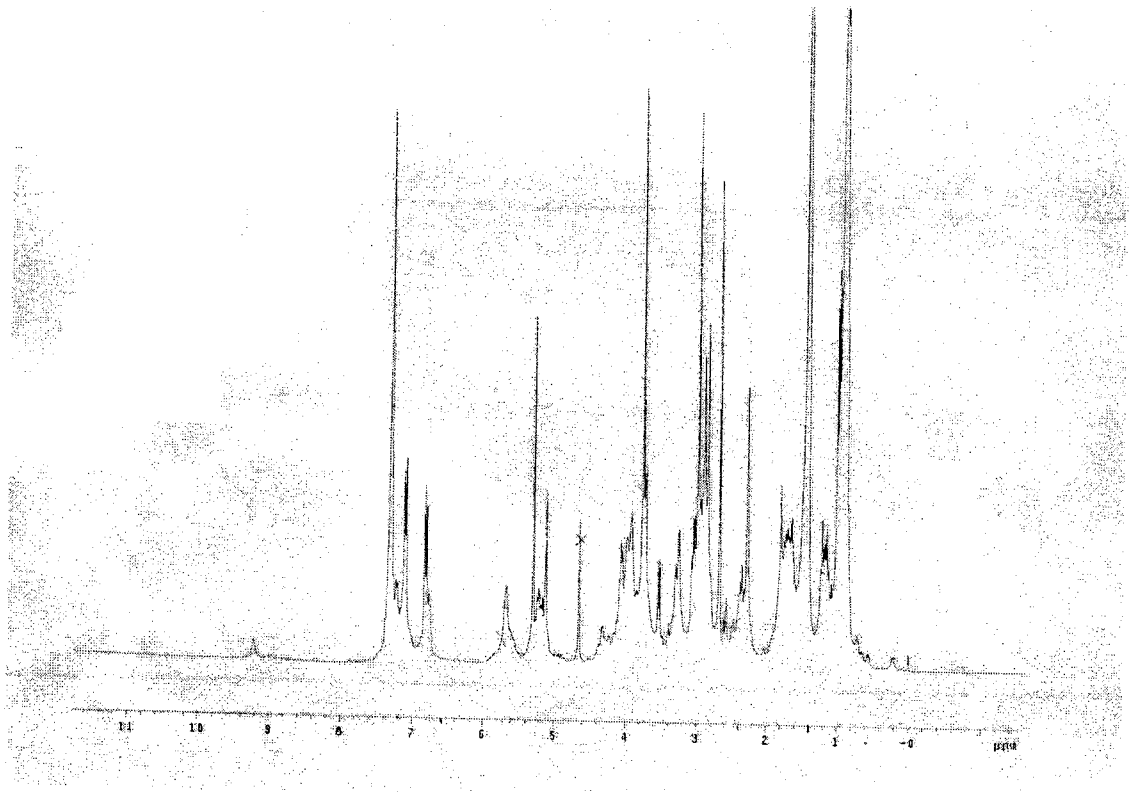
Smith, C. D.; Zhang, X. Q.; Mooberry, S. L.; Patterson, G. M. L.; Moore, R. E. (1994). Cancer Res. Volume 54. Page 3779.

Stessman, C. C. (1998). Ph. D. Dissertation. The University of Arizona, Tucson, Arizona.

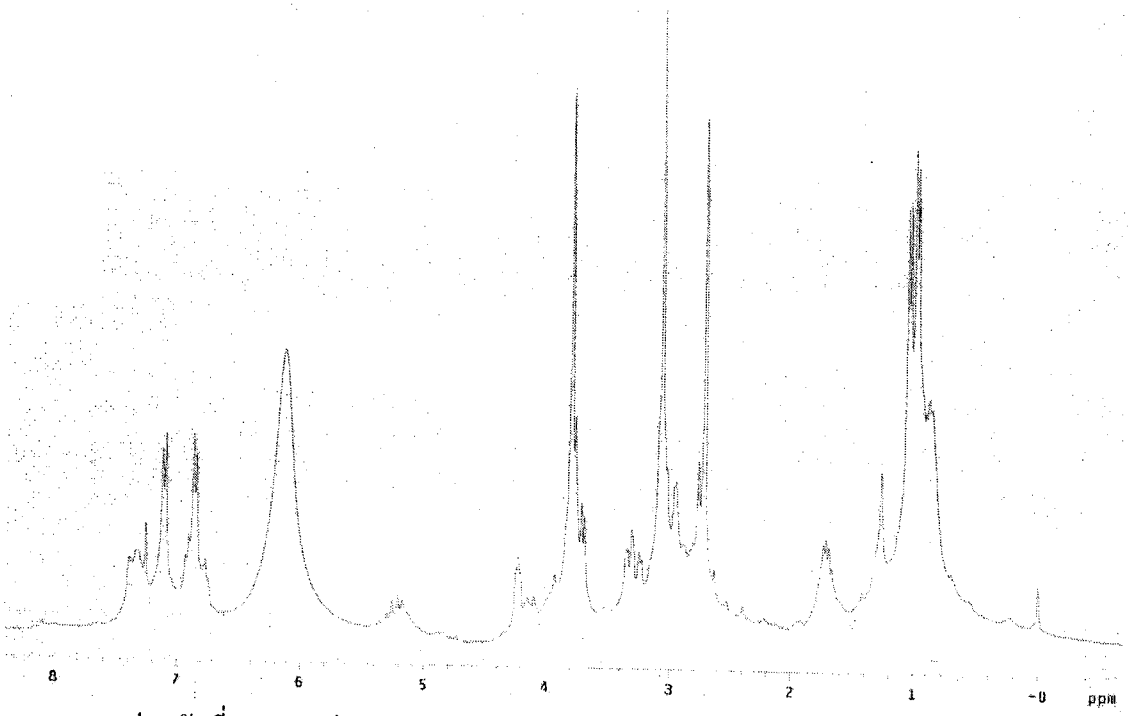
terHaar, E.; Kowalski, R. J.; Hamel, E.; Lin, C. M.; Longley, R. E.; Gunasekera, S. P.; Rosenkranz, H. S.; Day, B. W. (1996). Biochem. Volume 35. Page 243.

Ward, D. E.; Lazny, R.; Pedras, M. S. C. (1997). Tetrahedron Lett. Volume 338. Page 339.

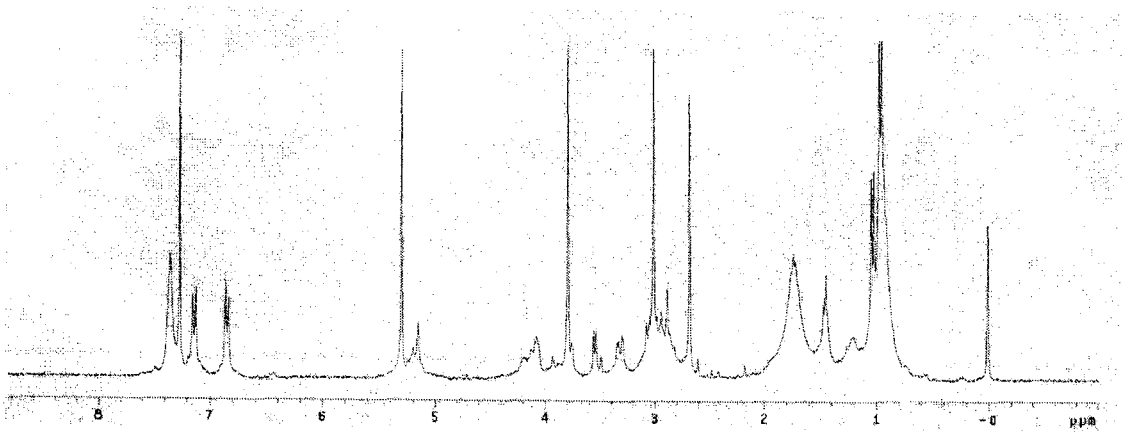
ภาคผนวก



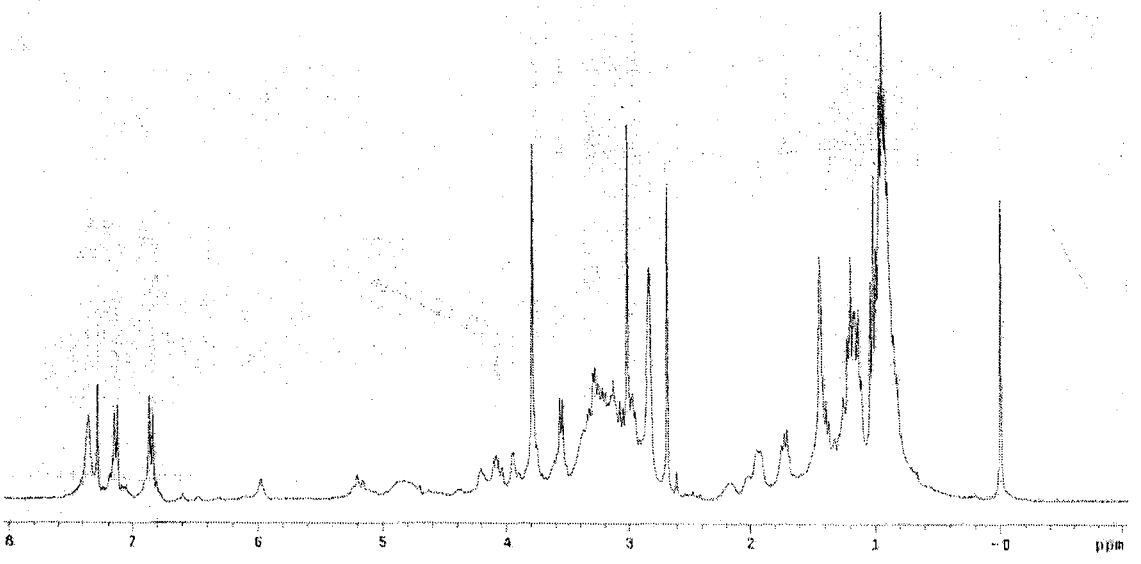
สเปกตรัมที่ 1 แสดง ^{1}H NMR 300 MHz สเปกตรัมของสารผสมระหว่างสารประกอบ **42** และ **55** ในตัวทำละลาย $CDCl_3$



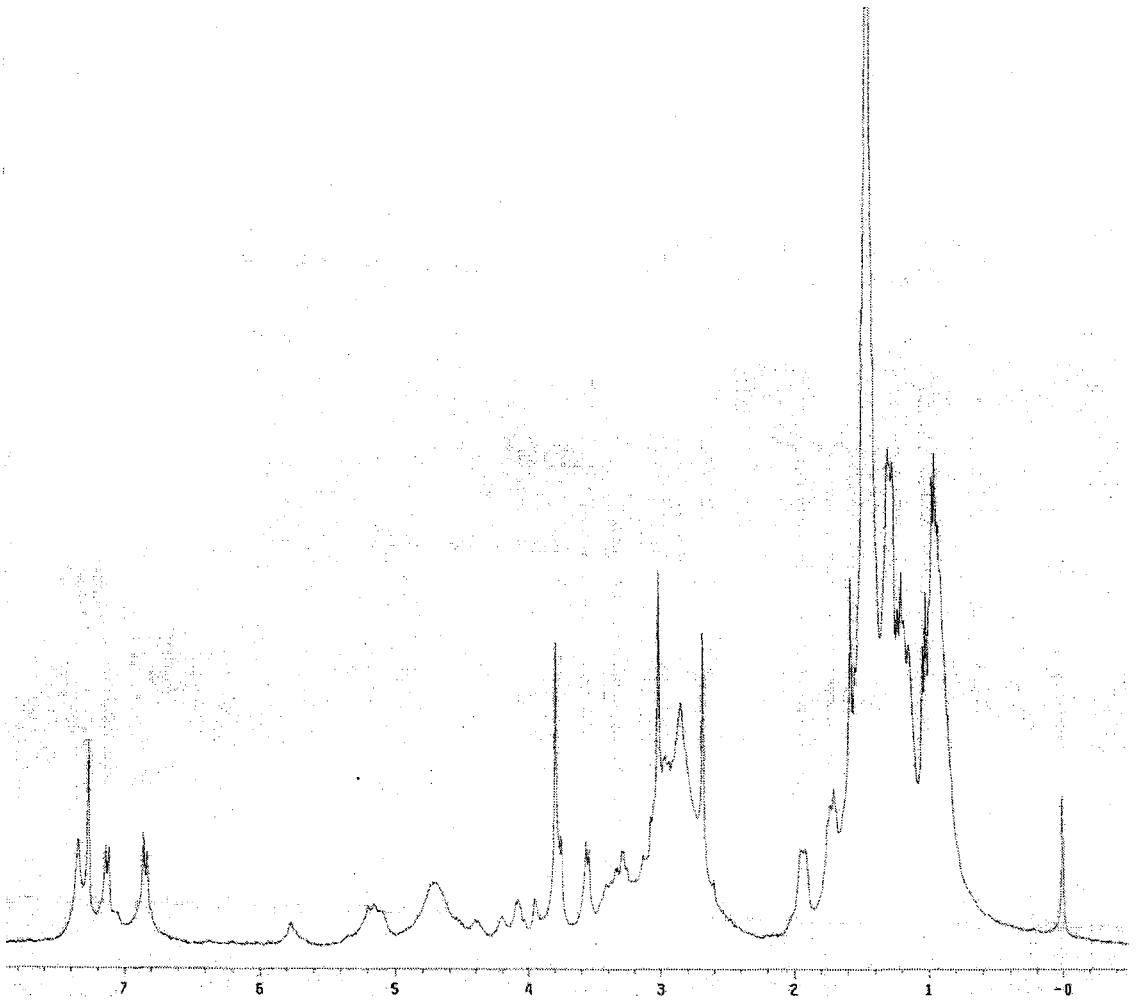
สเปกตรัมที่ 2 แสดง ^{1}H NMR 300 MHz สเปกตรัมของสารผสมระหว่างสารประกอบ **43** และ **55** ในตัวทำละลาย $CDCl_3$



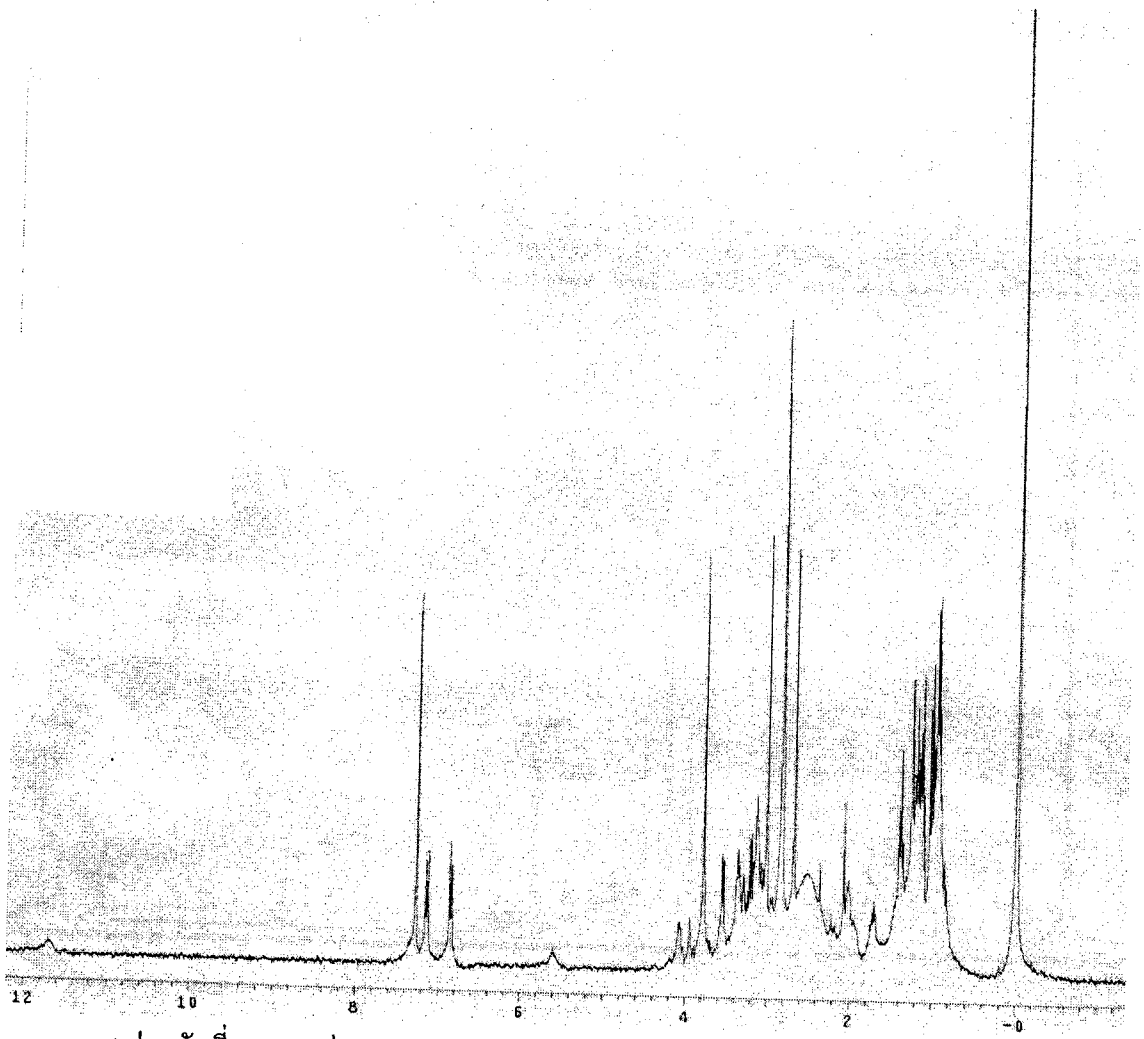
สเปกตรัมที่ 3 แสดง ^{1}H NMR 300 MHz สเปกตรัมของสารผสมระหว่างสารประกอบ **48** และ **55** ในตัวทำละลาย $CDCl_3$



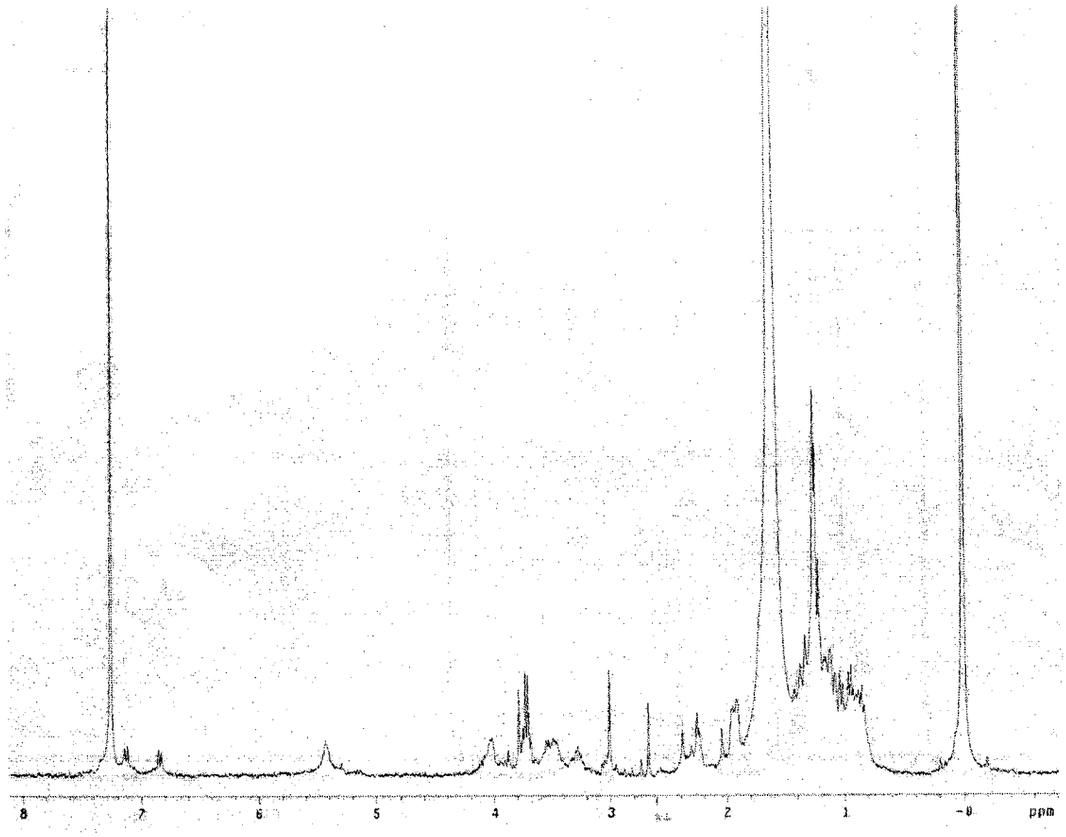
สเปกตรัมที่ 4 แสดง ^{1}H NMR 300 MHz สเปกตรัมของสารผสมระหว่างสารประกอบ **50** และ **55** ในตัวทำละลาย $CDCl_3$



สเปกตรัมที่ 5 แสดง ^{1}H NMR 300 MHz สเปกตรัมของสารผสมระหว่างสารประกอบ **52** และ **55** ในตัวทำละลาย $CDCl_3$



สเปกตรัมที่ 6 แสดง ^{1}H NMR 300 MHz สเปกตรัมของสารผสมระหว่างสารประกอบ **56** และ **55** ในตัวทำละลาย $CDCl_3$



สเปกตรัมที่ 7 แสดง ^{1}H NMR 300 MHz สเปกตรัมของสารผสมระหว่างไดเมอร์ของสารประกอบ **56** และสารประกอบ **55** ในตัวทำละลาย $CDCl_3$

ประวัตินักวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิชญา ตระการรุ่งโรจน์ สกุลเดิม นาคเขียว เป็นคนจังหวัดนนทบุรี จบการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต เกียรตินิยมอันดับหนึ่งเหรียญทอง จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2537 และสำเร็จการศึกษาระดับดุษฎีบัณฑิต สาขาเคมี ณ The University of Arizona เมือง Tucson รัฐอริโซนา ประเทศสหรัฐอเมริกา เมื่อปี พ.ศ. 2543 ปัจจุบันเป็นอาจารย์ประจำสาขาวิชาเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประสบการณ์ด้านวิจัยได้แก่ เคมีอินทรีย์สังเคราะห์ของสารประกอบในกลุ่มเพปไทด์ ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยใช้เทคนิค solution และ solid-phase peptide synthesis รวมทั้งการใช้เคมีคำนวณเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบและฤทธิ์ทางชีวภาพ นอกจากนั้นยังทำการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ทั้งในแง่ของการสกัดแยกเพื่อหาสารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ และการหาโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบอินทรีย์ โดยใช้เทคนิคนิวเคลียร์แมก-เนติกเรโซแนนซ์ (Nuclear Magnetic Resonance, NMR)

รางวัลและทุนวิจัยที่เคยได้รับมีดังต่อไปนี้

- ทุนอุดหนุนการวิจัยของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
- ทุนสนับสนุนการวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ ของสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
- ทุนผู้ช่วยวิจัย ของภาควิชาเคมี The University of Arizona ประเทศสหรัฐอเมริกา
- ทุนพัฒนาอาจารย์ของทบวงมหาวิทยาลัย ตามความต้องการของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เพื่อไปศึกษาระดับปริญญาเอก ณ ประเทศสหรัฐอเมริกา
- ประกาศเกียรติคุณสำหรับผู้มีผลการเรียนดีเด่นทางด้านวิทยาศาสตร์ สาขาเคมี จากมูลนิธิ ศาสตราจารย์ ดร. แถบ นีละนิธิ
- โล่ห์รางวัลผู้มีผลการเรียนดีเยี่ยม จากภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์แล้วมีดังต่อไปนี้

- Ali, M.A.; Bates, R.B.; Crane, Z.D.; Dicus, C.W.; Gramme, M.R.; Hamel, E.; Marcischak, J.; Martinez, D.S.; McLure, K.J.; **Nakkiew, P.**; Pettit, G.R.; Stessman, C.C.; Sufi, B.A.; Yarick, G.V. Dolastatin 11 Conformations, Analogues and Pharmacophore *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 4138.

- Punopas, K.; Eumkeb, G.; Chitsomboon, B.; **Nakkiew, P.** The Study of Antibacterial Activity of Some Medicinal Plants in Lamiaceae Family. *Suranaree J. Sci Tech* **2004**, *11*, 52-59.
- Bates, R. B.; Cai, S.; Cantor, R. S.; Carducci, M. D.; Irvine, A. K.; Jiorle, B. V.; **Nakkiew, P.**; Setzer, W. N.; Trinh, L.N. Agatholic Acid. *Acta Cryst.* **2003**, E59, o97-o98.
- Setzer, W. N.; Vogler, B.; Bates, R. B.; Schmidt, J. M.; Dicus, C. W.; **Nakkiew, P.**; Haber, W. A. HPLC-NMR/HPLC-MS Analysis of the Bark Extract of *Stauranthus perforatus*. *Phytochem. Anal.* **2003**, *14*, 54-59.
- Bates, R. B.; Hamel, E.; Moore, R. E.; **Nakkiew, P.**; Pettit, G. R.; Sufi, B.A. Lyngbyastatin 1 and Ibu-epilyngbyastatin 1: Synthesis, Stereochemistry and NMR Line-broadening *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1824-1829.
- Gosse, B.; Gnabre, J.; Bates, R. B.; Dicus, C. W.; **Nakkiew, P.**; Huang, C. Antiviral Saponins from *Tieghemella heckellii J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1942-1944.
- Setzer,W. N.; Setzer, M.C.; Peppers, R. L.; McFerrin,M. B.; Meehan, E.J.; Chen, L.; Bates, R. B.; **Nakkiew, P.**; Jackes B. R. Triterpenoid Constituents in the Bark of *Balanops australiana*. *Aust. J. Chem.* **2000**, *53*, 809-812.
- Setzer, W. N.; Setzer, M. C.; Bates, R. B.; **Nakkiew, P.**; Jackes, B. R.; Chen, L.; McFerrin, M. B.; Meehan, E. J. Antibacterial Hydroxycinnamyl Esters from *Piper canium* from Paluma, North Queensland, Australia. The Crystal and Molecular Structure of (+)-Bornyl Coumarate. *Planta Med* **1999**, *65*, 747.