



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การสังเคราะห์และการประเมินศักยภาพในการประยุกต์ใช้เป็นระบบนำส่งยา
ทางหลอดเลือดดำของ cyclic hexaglycine dendrimer

โดย ดร.ลือลักษณ์ ล้อมลิ้ม

เดือน ปี ที่เสร็จโครงการ : สิงหาคม 2555

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การสังเคราะห์และการประเมินศักยภาพในการประยุกต์ใช้เป็นระบบนำส่งยา
ทางหลอดเลือดดำของ cyclic hexaglycine dendrimer

ผู้วิจัย

สังกัด

ดร.ลือลักษณ์ ล้อมลิ้ม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5180035

ชื่อโครงการ : การสังเคราะห์และการประเมินศักยภาพในการประยุกต์ใช้เป็นระบบนำส่งยา
ทางหลอดเลือดดำของ cyclic hexaglycine dendrimer

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน : ดร.ลือลักษณ์ ล้อมลิ้ม

E-mail Address : luelak.l@psu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 15 พฤษภาคม 2551-14 พฤษภาคม 2553

บทคัดย่อ:

เดนทริเมอร์ เป็นแมโครโมเลกุลที่มีลักษณะเป็น monodisperse ซึ่งมีโครงสร้างสามมิติเป็นโซ่แขนงมากมายและเป็นระเบียบ ประกอบด้วยส่วนแกนกลาง, หน่วยของโซ่แขนง และ หมู่ที่ปลายโซ่แขนง เพพไทด์เดนทริเมอร์ สามารถให้คำนิยามได้อย่างกว้างๆว่า เป็นเดนทริเมอร์ที่ประกอบด้วยพันธะเพพไทด์ สามารถสร้างมาจากทั้งกรดอะมิโนที่มีตามธรรมชาติและไม่มีตามธรรมชาติ Poly(amidoamine) หรือ PAMAM dendrimers ซึ่งเป็นเพพไทด์เดนทริเมอร์ที่ถูกดัดแปลงมาจากบีต้า-อะลานีน ได้ถูกนำมาพัฒนาอย่างกว้างขวางสำหรับใช้คอนจูเกตกับยา และใช้ในการเอนแคปซูเลตโมเลกุลยา ในงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัย ได้ทำการออกแบบ cyclic hexaglycine dendrimer generation (G) 1.5 ซึ่งมีหมู่คาร์บอกซิเลตเป็นหมู่ที่ปลายโซ่แขนงสำหรับการนำไปใช้เป็นระบบนำส่งยาทางหลอดเลือดดำ เพพไทด์เดนทริเมอร์ที่ออกแบบในงานวิจัยนี้ มีหมู่คาร์บอกซิเลตบนพื้นผิวจำนวน 35 หมู่ คาดว่าจะสามารถละลายน้ำได้โดยการทำให้อยู่ในรูปเกลือ และ หมู่คาร์บอกซิเลตสามารถใช้ในการคอนจูเกตกับยา การสังเคราะห์เพพไทด์เดนทริเมอร์นี้ ประยุกต์ใช้ Double-stage convergent approach โดยเริ่มจากการสังเคราะห์ในส่วนแกนกลาง จากนั้นทำการสังเคราะห์หมู่ที่ปลายโซ่แขนง แล้วนำทั้งสองส่วนมาเชื่อมต่อกันได้เป็น cyclic hexaglycine dendrimer G 1.5 ในขั้นตอนสุดท้าย จะทำการศึกษาค่าการละลายน้ำ ความคงตัวต่อเอนไซม์โปรตีเอส และความเข้ากันได้ทางชีวภาพของเดนทริเมอร์ที่สังเคราะห์ได้ เพื่อนำไปประเมินความเป็นไปได้ในการนำมาใช้เป็นระบบนำส่งยาทางหลอดเลือดดำ

คำหลัก : การสังเคราะห์, เดนทริเมอร์, ระบบนำส่งยา

Abstract

Project Code : MRG5180035

Project Title : Design and Synthesis of cyclic hexaglycine dendrimer as intravenous drug delivery system

Investigator : Dr. Luelak Lomlim

E-mail Address : luelak.l@psu.ac.th

Project Period : 15 May 2008 – 14 May 2010

Abstract:

Dendrimers are monodisperse macromolecules with a regular and highly branched three-dimensional architecture consisting of central core, branching units and terminal end groups. Peptide dendrimers can be broadly defined as any dendrimer that contains peptide bonds. They can be constructed from natural or unnatural amino acids. Poly (amidoamine) (PAMAM) dendrimers, peptide dendrimers derived from beta-alanine, have been extensively developed as drug conjugates and encapsulation of drugs molecules. In this research, we design cyclic hexaglycine dendrimer generation (G) 1.5 with carboxylate end groups as intravenous drug delivery system. The designed peptide dendrimer, endowed with 35 carboxylate surface groups, is expected to be water-soluble via salt formation and could provide sites for dendrimer-drug conjugation. Double- stage convergent approach will be applied in the synthesis of the designed peptide dendrimer. Starting from the synthesis of central core, then terminal end groups will be synthesized and subsequently connected with the former to obtain cyclic hexaglycine dendrimer G 1.5. Finally, water solubility, proteolytic stability and biocompatibility of the synthesized dendrimer will be studied and used for the evaluation of the peptide dendrimer as intravenous drug delivery system.

Keywords : synthesis, dendrimer, drug delivery system

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่

ชื่อโครงการวิจัย การสังเคราะห์และการประเมินศักยภาพในการประยุกต์ใช้เป็นระบบนำส่งยาทางหลอดเลือดดำของ cyclic hexaglycine dendrimer

หัวหน้าโครงการ

อ.ดร.ลือลักษณ์ ล้อมลิ้ม
ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
15 ถ.กาญจนวนิช ต.คอหงส์ อ.หาดใหญ่
จังหวัด สงขลา รหัสไปรษณีย์ 90112
โทรศัพท์ 074-288929 โทรสาร 074-428239
e-mail: luelak.l@psu.ac.th

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

Dendrimers คือ แมโครโมเลกุลที่มีโครงสร้าง 3 มิติประกอบด้วยแขนงจำนวนมาก วางตัวในลักษณะสมมาตรออกจากแกนกลาง มีขนาดอนุภาคในระดับนาโนเมตร โมเลกุลที่ได้เป็น monodisperse สามารถออกแบบควบคุมขนาด รูปร่าง น้ำหนักโมเลกุล รวมทั้งชนิดของแกนกลาง โซ่แขนง และ กลุ่มที่ปลายโซ่แขนงได้ตามความต้องการในการประยุกต์ใช้งาน

ในปัจจุบัน มีการวิจัยเพื่อนำ dendrimers มาประยุกต์ใช้ในทาง biomedical sciences เช่น ใช้เป็นยารักษาโรค ระบบนำส่งยา peptide และ oligonucleotide เป็นต้น ในปัจจุบันยังไม่มี การผลิต dendrimers ในประเทศไทย ต้องนำเข้าจากต่างประเทศซึ่งมีราคาแพง คณะผู้วิจัยจึงมีความคิดที่จะสังเคราะห์ characterize และศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ proteolytic stability และ biocompatibility ของ cyclic hexaglycine dendrimer ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างแบบใหม่ เพื่อนำมาประเมินความเป็นไปได้ที่จะนำมาพัฒนาเป็นระบบนำส่งยาแบบ polymer-drug conjugate ที่บริหารทางหลอดเลือดดำต่อไป

2. วัตถุประสงค์

- 2.1 เพื่อสังเคราะห์ และ characterize cyclic hexaglycine dendrimer ชนิดใหม่
- 2.2 เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ proteolytic stability และ *in vitro* biocompatibility ของ dendrimer ที่สังเคราะห์ได้
- 2.3 เพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการนำ dendrimer ที่สังเคราะห์ได้ไปประยุกต์ใช้เป็นระบบนำส่งยาทางหลอดเลือดดำ

3. ระเบียบวิธีวิจัย

งานวิจัยนี้ประกอบด้วยสองส่วน คือ การสังเคราะห์ ทำให้บริสุทธิ์ และ characterize peptide dendron และ dendrimer ชนิดใหม่ จากนั้นในส่วนที่สองเป็นการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ proteolytic stability และ biocompatibility เพื่อใช้ประเมินความเป็นไปได้ในการนำไปประยุกต์ใช้เป็นระบบนำส่งยาทางหลอดเลือดดำ

4. แผนการดำเนินงานวิจัย

ในเดือนที่ 1-6 ทำการสังเคราะห์ dendrimer (หมู่ที่ปลายโซ่แขนง และแกนกลาง) ทำให้บริสุทธิ์ แล้วทำการพิสูจน์เอกลักษณ์และโครงสร้างของสารที่สังเคราะห์ได้

ในเดือนที่ 7-12 ทำการสังเคราะห์ dendrimer โดยเชื่อมต่อโครงสร้างระหว่างหมู่ที่ปลายโซ่แขนงเข้ากับแกนกลาง ได้เป็น dendron และ dendrimer G1.5 ทำให้บริสุทธิ์ แล้วทำการพิสูจน์เอกลักษณ์และโครงสร้างของสารที่สังเคราะห์ได้

ในเดือนที่ 13-18 พิสูจน์เอกลักษณ์และโครงสร้างของสารที่สังเคราะห์ให้สมบูรณ์ (ภายในเดือนที่ 15) ทำการศึกษาคูณสมบัติทางกายภาพและความคงตัวต่อเอนไซม์ของ dendrimer ที่สังเคราะห์ได้

ในเดือนที่ 19-24 ทำการศึกษา biocompatibility ของ dendrimer ที่สังเคราะห์ได้ ทำการรวบรวมข้อมูลต่างๆเพื่อใช้ในการประเมินศักยภาพในการประยุกต์ใช้ cyclic hexaglycine dendrimer เป็นระบบนำส่งยาทางหลอดเลือดดำ

กิจกรรม	เดือนที่			
	1-6	7-12	13-18	19-24
1. สังเคราะห์หมู่ที่ปลายโซ่แขนง และแกนกลาง ทำให้บริสุทธิ์	✓			
2. พิสูจน์เอกลักษณ์ และโครงสร้าง	✓	✓	✓	
3. สังเคราะห์เชื่อมต่อหมู่ที่ปลายโซ่แขนงเข้ากับแกนกลาง ทำให้บริสุทธิ์		✓		
4. ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ			✓	
5. ศึกษา stability			✓	
6. ศึกษา biocompatibility				✓
7. รวบรวมข้อมูลและสรุปผลการวิจัย				✓

5. ผลงาน/หัวข้อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

ปีที่ 1: ชื่อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์: Synthesis of cyclic hexaglycine dendrimer
ชื่อวารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์ : Proceedings ในงานประชุมวิชาการระดับชาติ/นานาชาติ

ปีที่ 2: ชื่อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์: Evaluation of cyclic hexaglycine dendrimer as
Intravenous drug delivery system
ชื่อวารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์ : Pharmaceutical Research

6. งบประมาณโครงการ

	ปีที่ 1	ปีที่ 2	รวม
1. หมวดค่าตอบแทน			
- ค่าตอบแทนหัวหน้าโครงการ	120,000	120,000	240,000
2. หมวดค่าวัสดุ			
- สารเคมี (สารตั้งต้นในการสังเคราะห์, reagents, solvents สำหรับปฏิกิริยา, organic solvents สำหรับการสกัด column chromatography, spraying reagents, ตัวทำละลาย บัฟเฟอร์ อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ พอลิเมอร์ อ่างอิง เอนไซม์ เป็นต้น)	70,000	70,000	186,000
- วัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ (TLC plates, silica gels, silicone oil, วัสดุ สำหรับ HPLC เป็นต้น)	25,000	15,000	
- ค่าวัสดุสำนักงาน	3,000	3,000	
3. หมวดค่าใช้สอย			
- ค่าจัดทำรายงาน ค่าถ่ายเอกสาร	2,000	2,000	54,000
- ค่าจ้างวิเคราะห์หรือทดสอบตัวอย่าง ค่าใช้ เครื่องมือเช่น ¹ H-NMR, ¹³ C-NMR, elemental analysis, MALDI-TOF MS, plate reader เป็นต้น	15,000	25,000	
- ค่าเดินทางไปนำเสนอผลงาน	5,000	5,000	
รวมงบประมาณโครงการ	240,000	240,000	480,000

(ถัวเฉลี่ยจ่ายทุกรายการ)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อสังเคราะห์ และ characterize cyclic hexaglycine dendrimer ชนิดใหม่
2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ proteolytic stability และ *in vitro* biocompatibility ของ dendrimer ที่สังเคราะห์ได้
3. เพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการนำ dendrimer ที่สังเคราะห์ได้ไปประยุกต์ใช้เป็นระบบนำส่งยาทางหลอดเลือดดำ

วิธีทดลอง

ตามข้อเสนอโครงการ งานวิจัยนี้ประกอบด้วยงาน 2 ส่วน คือ การสังเคราะห์สารที่ต้องการด้วยวิธีการทางเคมีสังเคราะห์ และ การศึกษาความคงตัวทั้งต่อ pH และเอนไซม์ ตลอดจนการประเมินด้าน biocompatibility และ ความเป็นพิษของ dendrimer ที่สังเคราะห์ได้

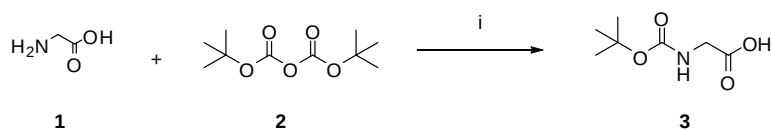
การสังเคราะห์สารที่ต้องการด้วยวิธีการทางเคมีสังเคราะห์

ผู้วิจัยได้ศึกษาสภาวะการทดลองเบื้องต้นสำหรับการสังเคราะห์ dendron และ dendrimer โดยใช้ glycine เป็นสารตั้งต้น ดังปฏิกิริยาในข้อที่ (1)- (5) เนื่องจาก glycine มีราคาไม่แพง และมีโครงสร้างไม่ซับซ้อน เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมก่อนนำมาประยุกต์ใช้กับสารตั้งต้นที่วางแผนไว้ซึ่งมีราคาสูงต่อไป นอกจากนี้ ยังเป็นการฝึกทักษะและเทคนิคต่างๆในการทำปฏิบัติการให้กับนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาที่เป็นผู้ช่วยวิจัยในโครงการ เพื่อเตรียมความพร้อมสำหรับการทำงานวิจัยที่มีความซับซ้อนมากขึ้นต่อไป

นอกจากนี้ ยังได้ทำการศึกษาสภาวะการทำปฏิกิริยาเบื้องต้นบน peptide สายสั้นๆ เช่น tetraglycine เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมก่อนนำมาประยุกต์ใช้กับ hexaglycine ซึ่งมีราคาสูงต่อไป

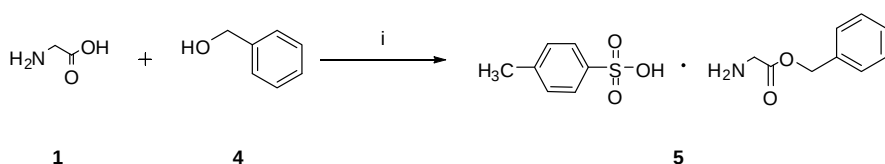
ปฏิกิริยาที่ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในเบื้องต้น ประกอบด้วยปฏิกิริยาดังต่อไปนี้ สำหรับรายละเอียดเกี่ยวกับสภาวะการทำปฏิกิริยาสังเคราะห์สาร แสดงในภาคผนวก

1. การ **protect N-terminus** ของ **amino acid** ด้วย **Benzyloxycarbonyl (Boc) protecting group** โดยใช้ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ Boc-glycine (**3**) เป็นต้นแบบ



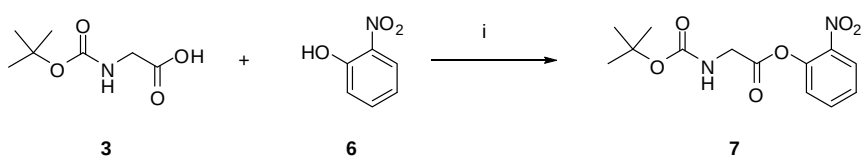
i) 1N NaOH/H₂O/DMF/rt/2h

2. การ **protect C-terminus** ของ **amino acid** โดยการเปลี่ยนเป็น **benzyl ester (Bn)** โดยใช้ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ glycine benzyl ester (**5**) เป็นต้นแบบ



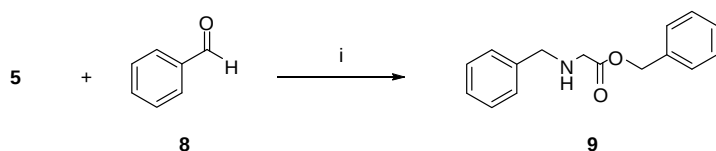
i) p-toluene sulfonic acid/100°C/14h

3. การ **activate C-terminus** ของ **amino acid** โดยเปลี่ยนให้อยู่ในรูป **active ester** โดยใช้ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ Boc-glycine 2-nitrophenyl ester (**7**) เป็นต้นแบบ



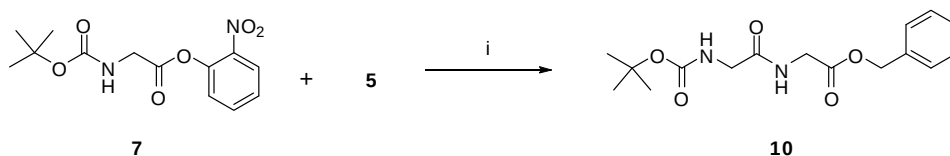
i) EDCI/rt/14h

4. การทำปฏิกิริยา **reductive amination** บนหมู่ **amino** ของ **amino acid** โดยใช้ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ benzyl 2-(benzylamino)acetate (**9**) เป็นต้นแบบ



i) Na(OAc)₃BH/MeOH/rt/24h

5. การ **coupling amino acid** เป็น **dipeptide** ด้วย **active ester** โดยใช้ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ Boc-diglycine benzyl ester (**10**) เป็นต้นแบบ



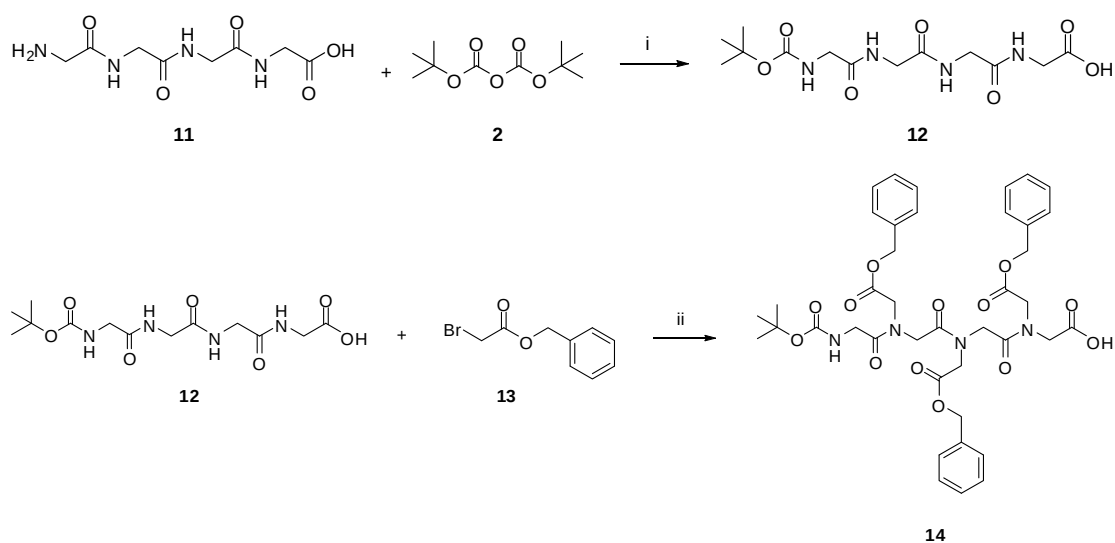
i) triethylamine/ CH_2Cl_2 /rt/12h

6. การศึกษาหาวิธีที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ส่วนแกนกลางของ dendrimer

6.1 การสังเคราะห์ส่วนแกนกลางจาก tetraglycine

เนื่องจากมีรายงานว่า การมีหมู่แทนที่บน backbone จะทำให้ปฏิกิริยาของสาย peptide ทำได้ง่ายขึ้น¹ จึงได้สนใจที่จะเติมหมู่แทนที่ลงบน backbone ของสาย peptide ก่อนแล้วจึงทำการปิดวงเพื่อให้ได้ส่วนของแกนกลาง

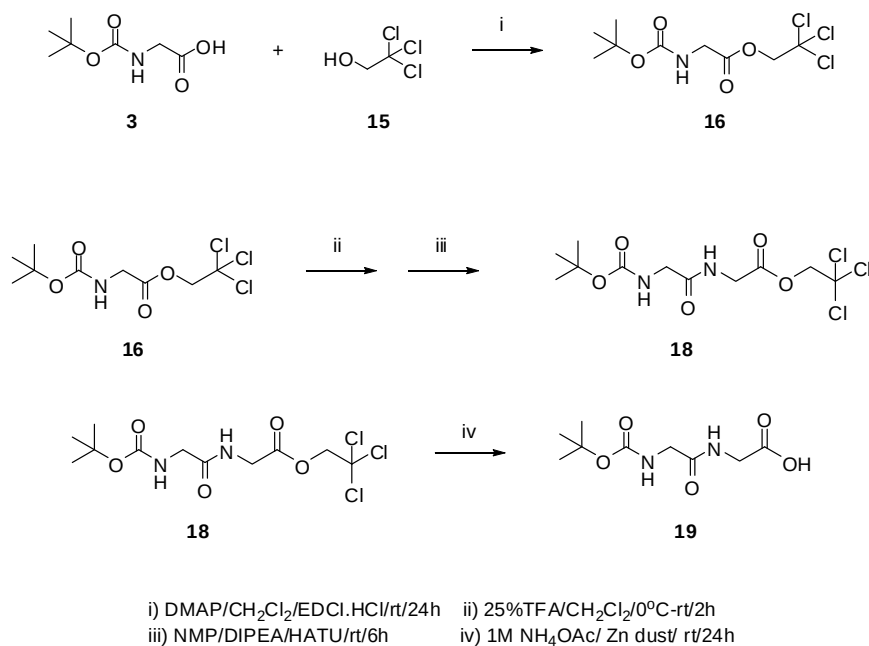
กระบวนการสังเคราะห์ เริ่มจากการ protect *N*-terminus ของ tetraglycine ด้วย Boc protecting group ได้ทำตามวิธีการสังเคราะห์ Boc-triglycine ที่เคยมีรายงานมาแล้ว⁽¹⁾ ได้สาร Boc tetraglycine (**12**) จากนั้นทำปฏิกิริยา alkylation บน amide N ของ peptide **12** ด้วย benzylbromoacetate โดยใช้ NaH เป็นเบส ได้ peptoid **14** ซึ่งหลังจากการกำจัด Boc protecting group ออกแล้ว จะได้นำไปทำปฏิกิริยา cyclization ได้เป็นแกนกลางต่อไป



i) sat NaHCO_3 :DMF (4:3)/rt/2h ii) NaH/ dry DMF/rt/6h

6.2 การสังเคราะห์ส่วนแกนกลางจาก glycine

อีกแนวทางหนึ่งที่ทดลองใช้ในการสังเคราะห์แกนกลาง ได้แก่ การสังเคราะห์โดยใช้ glycine เป็นสารตั้งต้น โดยใช้ Boc / trichloroethylester เป็น protecting group ดังแสดงในแผนภาพ

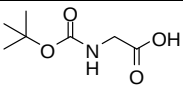
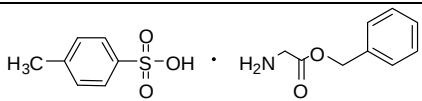
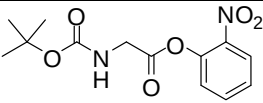
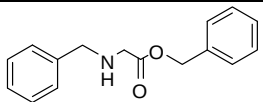
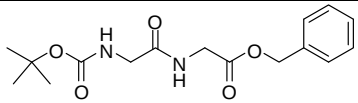


ซึ่งหลังจากที่ทำการสังเคราะห์ Boc diglycine (19) แล้ว มีแผนการสังเคราะห์โดยนำมา coupling กับ diglycine trichloroethylester ได้เป็น Boc tetraglycine trichloroethylester (21) ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ peptoid 14 ต่อไป

ผลการทดลอง

ผลการสังเคราะห์สารตามปฏิกิริยาในข้อ 1 – 5 แสดงดังตาราง ส่วนสภาวะในการทดลอง และ ข้อมูลการพิสูจน์โครงสร้างสารแสดงดังรายละเอียดในภาคผนวก

ตารางแสดงผลการสังเคราะห์สารในงานวิจัยนี้

compound	% yield	ลักษณะ	จุดหลอมเหลว (°C)
 3	53	ของแข็ง สีเหลืองอ่อน	125-127
 5	92	ของแข็ง สีขาวขุ่น	89-91
 7	87	ของเหลวหนืด สีเหลืองอ่อน	-
 9	54	ของเหลวหนืด สีเหลืองอ่อน	-
 10	80	ของแข็ง สีเหลืองอ่อน	101-103
12	98	ของแข็งสีขาว	125 - 129
14	31	ของเหลวใสไม่มีสี	-
16	85	ของเหลวสีเหลืองอ่อน	-
18	62	ของเหลวสีเหลืองอ่อน	-

จากตารางข้างต้นแสดงให้เห็นว่า สภาวะการทดลองต่างๆที่นำมาใช้ในการสังเคราะห์ สารในข้อ 1 - 5 สามารถสังเคราะห์ได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการในปริมาณสูง สภาวะดังกล่าวจึงมีความเหมาะสม และ มีความเป็นไปได้ที่จะนำไปประยุกต์ใช้กับการสังเคราะห์ dendron และ dendrimer โดยใช้สารตั้งต้นที่มีความซับซ้อนกว่าต่อไป

ผลการสังเคราะห์ส่วนแกนกลางจาก tetraglycine จากสภาวะในการทำปฏิกิริยา ดังกล่าว สามารถสังเคราะห์ Boc tetraglycine (12) ได้ แต่เมื่อนำ Boc tetraglycine ที่สังเคราะห์ได้มาทำปฏิกิริยาสังเคราะห์ peptoid 14 พบว่าได้ yield ค่อนข้างต่ำ คาดว่าน่าจะมีสาเหตุมาจากการเกิด alkylation บน amide N เกิดไม่สมบูรณ์ และ Boc tetraglycine ที่ได้อาจมีเกลือ NaCl ซึ่งเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการทำสารละลายให้เป็นกลางปะปนมา และ ไม่สามารถแยกออกจากผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้โดย GPC ทำให้ Boc tetraglycine ที่นำมาใช้มีความบริสุทธิ์ต่ำ จึงคำนวณ % yield ของการสังเคราะห์ Boc-tetraglycine (สารหมายเลข 12) ได้สูงกว่าความเป็นจริง และ % yield ของการสังเคราะห์ peptoid 14 ได้ต่ำกว่าความเป็นจริง

ดังนั้น จึงมีความจำเป็นต้องหาวิธีการทำ Boc tetraglycine ให้มีความบริสุทธิ์มากเพียงพอในการใช้เป็นสารตั้งต้นในปฏิกิริยา เช่น อาจใช้ reverse-phase chromatography (preparative HPLC หรือ MPLC) ในการทำสารให้บริสุทธิ์ เป็นต้น นอกจากนี้ยังต้องปรับปรุงสภาวะการทดลองในการสังเคราะห์ peptoid 14 ให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ต่อไป

นอกจากนี้ ผู้วิจัยได้พยายามทำ Boc-tetraglycine (สารหมายเลข 12) ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ reversed phase chromatography แต่ยังไม่สามารถหาสภาวะทางโครมาโทกราฟีที่เหมาะสมได้

การสังเคราะห์ส่วนแกนกลางจาก glycine เหตุผลที่ผู้วิจัยเลือกใช้แนวทางนี้ เนื่องจากต้องการหลีกเลี่ยงสภาวะที่ทำให้เกิดเกลือซึ่งกำจัดได้ยากดังที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น Boc-tetraglycine เป็นสารที่มีความเป็นขั้วสูง การสังเคราะห์โดยวิธีนี้ จะได้สาร intermediate ที่มีขั้วค่อนข้างต่ำ จึงอาจทำให้สามารถทำให้บริสุทธิ์โดย normal phase chromatography ได้ง่าย

กว่า สำหรับผลการสังเคราะห์ส่วนแกนกลางจาก glycine สามารถสังเคราะห์ Boc glycine trichloroethylester (สารหมายเลข16) และ Boc diglycine trichloroethylester (สารหมายเลข 18) โดยได้ % yield ของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการเป็นที่น่าพอใจ

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง และข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

งานวิจัยนี้ เป็นการสังเคราะห์และศึกษาสมบัติทางกายภาพของ cyclic hexaglycine dendrimer ชนิดใหม่ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาต่อยอดในการนำโมเลกุลดังกล่าว ไปใช้เป็นระบบนำส่งยาทางหลอดเลือดดำต่อไป

โดยสรุปแล้ว ผู้วิจัยได้ทำการในการศึกษาสภาวะการทดลองและเทคนิคที่ใช้ในการสังเคราะห์ dendron และ dendrimer ด้วยปฏิกิริยาเคมีต่างๆ ได้ศึกษาสภาวะปฏิกิริยาเคมีที่เหมาะสมในการการสังเคราะห์ส่วนแกนกลางของ dendrimer ด้วยแนวทางการสังเคราะห์ต่างๆ อย่างไรก็ตาม จะต้องทำการพัฒนาวิธีการทำ peptide ที่สังเคราะห์ได้ให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นเพื่อนำไปใช้ในการสังเคราะห์ส่วนแกนกลางต่อไป ตลอดจนยังต้องทำการสังเคราะห์ส่วนโซ่แขนง และ เชื่อมต่อเป็น dendron และ dendrimer ต่อไป

เนื่องจาก สารตั้งต้น สาร intermediate ผลิตภัณฑ์ ตลอดจน by products ต่างๆ ในงานวิจัยนี้มีความเป็นขี้สูง ทำให้มีปัญหาด้านการทำสารให้บริสุทธิ์ การทำสารให้บริสุทธิ์ต้องใช้ reversed-phase preparative HPLC ซึ่งเครื่องมือในขณะนี้ยังไม่สามารถรองรับการทำงานได้อย่างเต็มที่ นอกจากนี้ อีกแนวทางหนึ่ง อาจต้องเปลี่ยนไปใช้เทคนิคการสังเคราะห์สารแบบ solid phase synthesis

ปัญหาและอุปสรรคในการดำเนินการวิจัย

1. ปัญหาด้านบุคลากร

งานวิจัยนี้มีนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาเป็นผู้ช่วยวิจัย โดยเข้าศึกษาในภาคเรียนที่ 1 ปีการศึกษา 2551 เนื่องจากนักศึกษามีพื้นฐานความรู้และประสบการณ์ในการทำปฏิบัติการด้านอินทรีย์สังเคราะห์ไม่เพียงพอ ในช่วงแรกจึงต้องมีการฝึกเทคนิคในการสังเคราะห์ตลอดจนการพิสูจน์โครงสร้างจากสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กก่อน เพื่อให้นักศึกษาได้เรียนรู้เทคนิคต่างๆและเสริมความรู้พื้นฐานที่ใช้ในงานวิจัย

ต่อมาในปลายปี พ.ศ. 2552 นักศึกษาได้ขอเปลี่ยนหัวข้อวิทยานิพนธ์ และ อาจารย์ที่ปรึกษา โดยให้เหตุผลว่าไม่มีความถนัดและไม่ชอบทำงานปฏิบัติการด้านอินทรีย์สังเคราะห์ ทำให้โครงการวิจัยนี้ขาดผู้ช่วยวิจัยทั้งๆที่ได้ดำเนินงานมาเป็นระยะเวลาหนึ่งแล้ว หลังจากนั้น ก็ไม่สามารถหาผู้ช่วยวิจัยระดับบัณฑิตศึกษามาทำงานในโครงการได้ ส่วนผู้ช่วยวิจัยระดับปริญญาตรีก็มีความรู้พื้นฐานและเทคนิคที่ไม่เพียงพอ จึงทำให้โครงการไม่มีความก้าวหน้าเท่าที่ควร

2. ปัญหาด้านเครื่องมือ

หลังจากที่ผู้ช่วยวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาได้ลาออกไป หัวหน้าโครงการได้ลงมาทำงานในห้องปฏิบัติการตามที่เวลาจะอำนวย แต่ก็ประสบปัญหาด้านเครื่องมือวิทยาศาสตร์ เช่น ตู้ควัน (fume hood) เสียเป็นเวลาหลายเดือน เครื่องปั๊มสุญญากาศ และ freeze dryer ของคณะ มักจะเสียบ่อย และ บางครั้งเจ้าหน้าที่ที่รับตัวอย่างก็ไม่สามารถให้บริการได้ตามกำหนดเวลานอกจากนี้ ในช่วงเวลาดังกล่าว เครื่อง NMR ของศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ก็เสียต่อเนื่องกันเป็นเวลาหลายเดือน ทำให้ไม่สามารถดำเนินการวิจัยได้ตามเวลาที่กำหนด

3. ปัญหาด้านเทคนิคการสังเคราะห์

เนื่องจาก สารตั้งต้น สาร intermediate ผลิตภัณฑ์ ตลอดจน by products ต่างๆ ในงานวิจัยนี้มีความเป็นขั้วสูง ทำให้มีปัญหาด้านการทำสารให้บริสุทธิ์ การทำสารให้บริสุทธิ์ต้องใช้ reversed-phase preparative HPLC ซึ่งเครื่องมือในคณะยังไม่สามารถรองรับการทำงานได้

อย่างเต็มที่ นอกจากนี้ อีกแนวทางหนึ่ง อาจต้องเปลี่ยนไปใช้เทคนิคการสังเคราะห์สารแบบ solid phase synthesis ซึ่งมีราคาแพงและขณะนี้ยังไม่มีความพร้อมในการดำเนินการ

เอกสารอ้างอิง

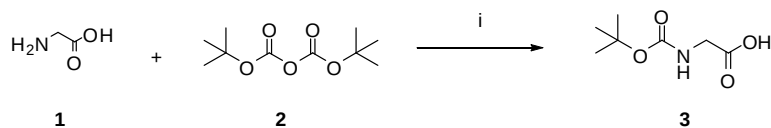
1. Shin SBY, Yoo B, Todaro LJ, and Kirschenbaum K, Cyclic peptoids, J.Am.Chem.Soc., 129, 3218-3225 (2007).

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. การเสนอผลงานในงานประชุม “นักวิจัยรุ่นใหม่...พบ...เมธีวิจัยอาวุโส สกว.” ครั้งที่ 9 วันที่ 15-17 ตุลาคม 2552 ณ โรงแรมฮอลิเดย์ อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี
2. การเสนอผลงานในงานประชุม “นักวิจัยรุ่นใหม่...พบ...เมธีวิจัยอาวุโส สกว.” ครั้งที่ 10 วันที่ 14-16 ตุลาคม 2552 ณ โรงแรมฮอลิเดย์ อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี

ภาคผนวก

การสังเคราะห์ 2-(tert-Butoxycarbonylamino)acetic acid (Boc-Gly, 3)



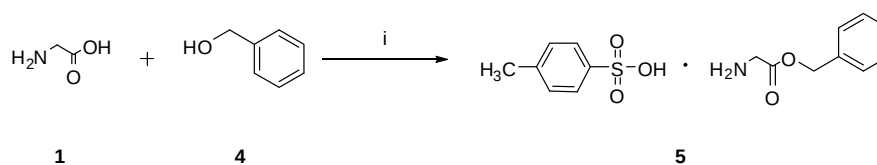
i) 1N NaOH/H₂O/DMF/rt/2h

วิธีทำ

ละลาย glycine (**1**) (750.80 mg, 10 mmol) ใน DMF 20 ml น้ำกลั่น 10 ml และ 1N NaOH 10 ml แล้วทำให้เย็นโดยนำไปแช่ใน water bath และกวนตลอดเวลา เติม Boc₂O (**2**) (2.4 g, 11 mmol) แล้วทำปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อปฏิกิริยาเกิดโดยสมบูรณ์แล้วระเหยตัวทำละลายออกให้เหลือสารละลายประมาณ 10 – 15 ml หลังจากนั้นนำไปทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม EtOAc 30 ml ปรับ pH ของชั้นน้ำให้ได้ประมาณ 2 – 3 ด้วย 10% citric acid จากนั้นนำไปสกัดแยกด้วย EtOAc ปริมาตร 15 ml จำนวน 3 ครั้ง ล้างชั้น EtOAc ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 30 ml จำนวน 2 ครั้ง และ sat. NaCl 30 ml เติม anhydrous Na₂SO₄ เพื่อกำจัดน้ำในชั้น organic solvent และ ระเหยตัวทำละลายออก นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการตกผลึกใน EtOAc – Hexane

Physical state	ของแข็งสีเหลืองอ่อน
mp (°C)	125-127
Yield (%)	1,230 mg, 53.14%
R _f	0.60 (CH ₂ Cl ₂ :MeOH=9:1, formic acid = 2)
Spectral data	IR (cm ⁻¹): 3401.09, 3340.65 [OH str., NH str.(rotamer)], 2979.95 – 2934.06 (CH ₃ , CH ₂ str.), 1742.12 (C=O str., COOH), 1690.00(C=O str., ester), 1533.77 (NH bend, amide),1398.00, 1251.06, 1165.16 (CH bending of tert-butyl group) ¹ H NMR (DMSO-d ₆), (ppm): 7.00 – 6.99 (t, 1H, NHCO), 6.62 (s, 1H, OH), 3.55 (d, 2H, CH ₂ CO), 1.34 – 1.28 (s, 9H, rotamer, t-Bu)

การสังเคราะห์ Benzyl 2-aminoacetate 4-methylbenzenesulfonate (5)



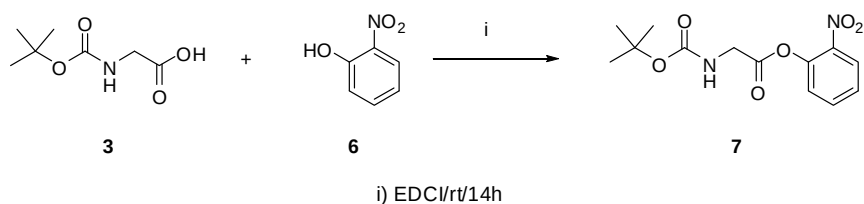
i) p-toluene sulfonic acid/100°C/14h

วิธีทำ

ผสม glycine (**1**) (1.88 g, 250 mmol) *p* – toluenesulfonic acid (4.85 g, 255 mmol) และ benzyl alcohol (**4**) 10 ml โดยใช้ benzene 5 ml เป็นตัวทำละลาย ใน round-bottom flask ปริมาตร 50 ml ให้ความร้อนโดยการ reflux เป็นเวลา 14 ชั่วโมง โดยมีการกำจัดน้ำที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาโดยใช้ Dean stark apparatus ต่อจากนั้นทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง และเติม ether ลงไปใน reaction mixture แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการตกผลึกอย่างสมบูรณ์ จากนั้นกรองเก็บผลึกของ glycine benzylester ล้างผลึกด้วย ether และ ทำให้แห้ง นำผลิตภัณฑ์มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการตกผลึกซ้ำใน MeOH – ether

Physical state	ของแข็งสีขาวขุ่น
mp ($^{\circ}\text{C}$)	89-91
Yield (%)	3,800 mg, 91.58%
R_f	0.41 (CH_2Cl_2 :MeOH=8:2)
Spectral data	IR (cm^{-1}): 2645.77, 2550.77(CH_3 str.), 1900.00 – 2100.00 (overtone band of benzene), 1754.74 ($\text{C}=\text{O}$ str., ester), 1598.71, 1505.28, 1427.74 ($\text{C}=\text{C}$ str., aromatic), 1243.68 ($\text{C}-\text{O}$ str., ester), 686.69 – 564.99 [CH bend., out-of-plane (oop), ring] ^1H NMR (CD_3Cl), (ppm): 8.08 (s, 1H, OH), 7.66 – 7.64 (d, 2H, CH in aromatic, J= 8.5 Hz), 7.24 – 7.21 (dt, 3H, CH in aromatic, J = 1.5 Hz), 7.17 - 7.16 (H_C (dd, 2H, CH in aromatic, J = 1.5 Hz), 6.98 – 6.96 (d, 2H, CH in aromatic, J = 8.5 Hz), 4.96 (s, 2H, OCOCH_2), 3.67 (t, 2H, CH_2COO), 2.22 (t, 3H, CH_3)

การสังเคราะห์ 2-Nitrophenyl 2-(tert-butoxycarbonylamino)acetate (7)

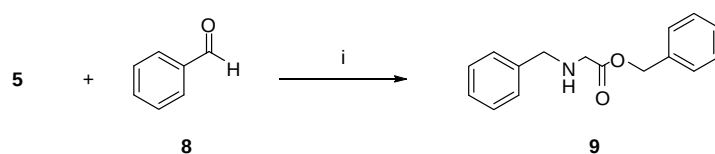


วิธีทำ

ผสม 2-(tert-butoxycarbonylamino)acetic acid (**3**) (100 mg, 0.57 mmol) และ 2-nitrophenol (**6**) (145 mg, 1.04 mmol) ใน DMF ปริมาตร 15 ml ทำให้เย็นและกวนตลอดเวลา แล้วเติม EDCI · HCl (99.69 mg, 0.52 mmol) ที่ละลายใน DMF ปริมาตร 5 ml ลงไป นำมาทำให้เย็นในอ่างน้ำแข็งต่ออีก 1.5 ชั่วโมง ต่อจากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 ชั่วโมง เมื่อเกิดปฏิกิริยาโดยสมบูรณ์ นำไปประเหยเอาตัวทำละลายออก นำของแข็งที่ได้มาละลายใน CHCl_3 20 ml สกัดด้วย 5% citric acid 10 ml จำนวน 2 ครั้ง แล้วล้างด้วย 0.1N NaOH ปริมาตร 10 ml ต่อจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 10 ml จำนวน 2 ครั้ง และ sat. NaCl 10 ml แล้วกำจัดน้ำออกโดยเติม anhydrous Na_2SO_4 และนำไปประเหยตัวทำละลายออกอีกครั้ง นำไปแยกด้วย column chromatography ด้วย hexane : EtOAc (8 : 2)

Physical state	ของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน
Yield (%)	147 mg, 87.04%
R_f	0.21 (hexane : EtOAc = 8:2)
Spectral data	IR (cm^{-1}): 3361.17 (NH str.), 2979.91, 2934.54 (CH_3, CH_2 str.), 1704.47 (C=O str., ester, amide), 1532.14 (C – NO_2 str. asymmetry in aromatic), 1368.68, 1350.48 (C – NO_2 str. symmetry in aromatic 2 band), 1255.05 (C-O str., ester), 785.39, 667.68 [CH bend., out-of-plane (oop), ring] ^1H NMR (CD_3Cl), $^{\text{TM}}$ (ppm): 8.11 - 8.09 H_D (<i>dd</i>, 1H, CH), 7.68 - 7.43 (<i>dt</i>, 1H, CH), 7.42 - 7.37 H_B (<i>t</i>, 1H, NHCO), 7.35 - 7.27 H_G (<i>ddd</i>, 1H, CH), 6.99 - 6.95 (<i>dt</i>, 1H, CH), 4.25 - 4.24 H_C (<i>d</i>, 2H, CH_2CO), 1.44 - 1.42 H_A (<i>s</i>, 9H, <i>t</i>-Bu)

การสังเคราะห์ Benzyl 2-(benzylamino)acetate (9)



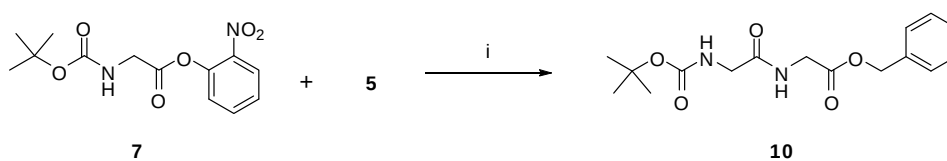
i) $\text{Na}(\text{OAc})_3\text{BH}/\text{MeOH}/\text{rt}/24\text{h}$

วิธีทำ

ละลาย benzyl 2-aminoacetate 4-methylbenzenesulfonate (**5**) (330 mg, 2.0 mmol) และ benzaldehyde (**8**) (0.223 ml, 2.20 mmol) ใน MeOH 18 ml แล้วทำการกวนที่อุณหภูมิ 0°C เป็นเวลา 15 นาที เมื่อสารละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกัน เติม NaBH_3CN (132.1 mg, 2.10 mmol) แล้วกวนที่อุณหภูมิห้อง จนกระทั่งปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ หลังจากนั้นระเหยเอาตัวทำละลายออก แล้วเติม sat. NaHCO_3 20 ml สกัดด้วย EtOAc 60 ml จำนวน 3 ครั้ง ล้างชั้น EtOAc ด้วยน้ำกลั่น 30 ml จำนวน 2 ครั้ง ตามด้วย sat. NaCl เติม anhydrous Na_2SO_4 เพื่อกำจัดน้ำที่เหลือออก และระเหยเอาตัวทำละลายออก นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปแยกด้วย column chromatography ด้วย hexane : EtOAc (95 : 5)

Physical state	ของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน
Yield (%)	276,61 mg, 54.17%
R_f	0.53 (hexane: EtOAc =9:1)
Spectral data	IR (cm^{-1}): 3370.74 (NH str.), 3064.79 – 3031.68 (CH_3 , CH_2 str.), 2926.94 (CH str. in aromatic), 1953.36 – 1813.45 (overtone band of benzene), 1746.36 ($\text{C}=\text{O}$ str., ester), 1660.11, 1502.09, 1496.49 ($\text{C}=\text{C}$ str., aromatic), 1454.71 (NH bend, amide), 1208.47 ($\text{C}-\text{O}$ bend, ester), 736.15, 698.00 [CH bend., out-of-plane (oop), ring]

การสังเคราะห์ Benzyl 2-(2-(tert-butoxycarbonylamino)acetamido)acetate (10)



i) triethylamine/ CH_2Cl_2 /rt/12h

วิธีทำ

ละลาย 2-nitrophenyl 2-(tert-butoxycarbonylamino)acetate (**7**) (66 mg, 0.4mmol) ใน dry CHCl_3 กวนที่อุณหภูมิห้อง เติม triethylamine (0.112 ml, 80.95 mg, 0.8 mmol) และ benzyl 2-aminoacetate 4-methylbenzenesulfonate (**5**) (97.78mg, 0.33 mmol) ลงในสารละลาย แล้วกวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 ชั่วโมง ระเหยตัวทำละลายออก แล้วเติม EtOAc 5 ml ต่อจากนั้นนำไปกรอง และล้างด้วย EtOAc 5 ml และนำไปสกัดด้วย 5% Na_2CO_3 10 ml, น้ำกลั่น 10 ml, HCl 10 ml และ sat. NaCl 10 ml แล้วนำผลึกที่ได้ไปละลายใน 95% ethanol ร้อน และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปแยกด้วย column chromatography ด้วย CH_2Cl_2 : MeOH (9 : 1)

Physical state	ของแข็งสีเหลืองอ่อน
mp ($^{\circ}\text{C}$)	101-103
Yield (%)	187.5 mg, 79.68%
R_f	0.30 (CH_2Cl_2 :MeOH=9:1)
Spectral data	IR (cm^{-1}): 3447.66 (NH str.), 2999.24 (CH_3 , CH_2 str.), 2718.04 (CH str. in aromatic), 1685.07 (C=O str., ester, amide), 1476.01, 1436.73, 1399.20 (C=C str., aromatic), 1478.00 – 1401.08 (CH_2 bend), 1436.71 (NH bend, amide), 1207.30 (C-O bend, ester), 802.26, 724.26 [CH bend., out-of-plane (oop), ring]

การสังเคราะห์ **2,2-dimethyl-4,7,10,13-tetraoxo-3-oxa-5,8,11,14-tetraazahexadecan-16-oic acid**

(12)

วิธีทำ

ละลาย tetraglycine (**11**) (50 mg, 0.2 mmol) ใน sat. NaHCO_3 : DMF = 4 : 3 ปริมาตร 3 ml แล้วทำให้เย็น ต่อกจากนั้นเติม Boc_2O (**2**) (54.56 mg, 0.25 mmol) ลงไปในสารละลาย แล้วทำปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อปฏิกิริยาเกิดโดยสมบูรณ์แล้ว นำไประเหยเพื่อเอาตัวทำละลายออกให้เหลือสารละลายประมาณ 10 – 15 ml หลังจากนั้นนำไปทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม EtOAc 30 ml ลงไป ปรับ pH ให้ได้ประมาณ 7 ด้วย 5% citric acid และนำไปสกัดแยกด้วย EtOAc ปริมาตร 15 ml จำนวน 3 ครั้ง ตามด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 30 ml จำนวน 2 ครั้ง และ sat. NaCl 30 ml นำไปกำจัดน้ำโดยเติม anhydrous Na_2SO_4 และระเหยตัวทำละลายออก นำผลิตภัณฑ์มาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน Sephadex LH 20 โดยใช้ น้ำกลั่น เป็น eluent

Physical state	ของแข็งสีขาว
mp ($^{\circ}\text{C}$)	125 - 129
Yield (%)	98.17%
R_f	0.37 (EtOAc : MeOH = 9 : 1 formic acid 10 %)
Spectral data	IR (cm^{-1}): 3392.77 (OH str., NH str.), 2972.52, 2934.06 (CH str., CH_2), 1668.05 (C=O str., amide), 1604.95 (NH bend., amide), 1395.96, 1363.53 (CH bend., tert-butyl) ^1H NMR (ppm, D_2O): 3.92 (s, 2H, CH_2COOH), 3.90 (s, 2H, CH_2CO), 3.71 (s, 2H, CH_2CO), 3.68 (s, 2H, CH_2CO) 1.34 (s, 9H, tert-butyl)

การสังเคราะห์ **11,14-bis(2-(benzyloxy)-2-oxoethyl)-5-(tert-butoxycarbonyl)-3,7,10,13-tetraoxo-1-phenyl-2-oxa-5,8,11,14-tetraazahexadecan-16-oic acid (14)**

วิธีทำ

ผสม NaH (47.02 mg, 1.96 mmol) ใน dry DMF ปริมาตร 2 ml ทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 0°C เติม 2,2-dimethyl-4,7,10,13-tetraoxo-3-oxa-5,8,11,14-tetraazahexadecan-16-oic acid (**12**) (50 mg, 0.14 mmol) แล้วทำปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงเติม benzylbromoacetate (**13**) (0.143 ml, 0.9 mmol) ทำปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วปรับ pH ประมาณ 7 ด้วย 5% citric acid ต่อจากนั้นจึงนำไปสกัดด้วย EtOAc 3 ครั้ง แล้วนำชั้น EtOAc มาสกัดต่อด้วยน้ำกลั่นและน้ำเกลือตามลำดับ แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี column chromatography ด้วย hexane : EtOAc = 8 : 2

Physical state	ของเหลวใสไม่มีสี
Yield (%)	28.7 mg, 31.2%
R _f	0.27 (Hexane : EtOAc = 9 : 1)
Spectral data	IR (cm ⁻¹): 3445.05(OH str., NH str.), 3067.96, 3035.26, 2956.03 (CH str., CH ₂), 1750.35 (C=O str. Ester) 1733.85 (C=O str., amide), 1616.74 (NH bend., amide), 1391.69, 1365.71 (CH bend., tert-butyl) ¹ H NMR (ppm, CDCl ₃); 8.1 (s, 1H, OOCNH), 7.2 – 7.4 (m, 15H, CH in aromatic), 5.1 – 4.8 (m, 12H, CH ₂ CO, CH ₂ OOC), 3.8 – 4.2 (m, 5H, CH ₂ COOH, CH ₂ NH), 2.6 – 2.81(m, 3H, CH ₂ CO), 2 – 1.6 (s, 9H, tert-butyl)

การสังเคราะห์ 2,2,2-trichloroethyl 2-(tert-butoxycarbonylamino)acetate (16)

วิธีทำ

นำ 2-(tert-butoxycarbonylamino)acetic acid (**3**) (50 mg, 0.29 mmol) ละลายใน CH_2Cl_2 ปริมาตร 3 ml แล้วเติม DMAP (3.54 mg, 0.039) และ trichloroethanol (**15**) (0.039 ml, 0.4 mmol) เมื่อสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว เติม EDCI·HCl (76.68 mg, 0.4 mmol) แล้วทำปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายไประเหยตัวทำละลายออก แล้วจึงเติม EtOAc และปรับ pH ให้ได้ประมาณ 7 ด้วย 5% citric acid แล้วนำไปสกัดด้วย EtOAc 3 ครั้ง แล้วนำชั้น EtOAc มาสกัดด้วยน้ำกลั่นและน้ำเกลือ หลังจากนั้นนำไปทำให้ปราศจากน้ำด้วย anhydrous Na_2SO_4 นำไปแยกด้วย column chromatography (silica gel) ด้วย hexane : EtOAc = 9 : 1

Physical state	ของเหลวสีเหลืองอ่อน
Yield (%)	75.2 mg, 84.92%
R_f	0.21 (hexane : EtOAc = 95:5)
Spectral data	IR (cm^{-1}): 3375.35 (NH str.), 2979.83 – 2934.06 (CH_3 , CH_2 str.), 1755.95 – 1715.97 (C=O str., ester, amide), 1439.55 (NH bend, amide), 814.79 – 725.11 (bend, $-\text{CCl}_3$) ^1H NMR (ppm, CDCl_3): 4.79 (s, 2H, CH_2CCl_3), 4.06 (d, 2H, CH_2CO), 1.46 (s, 9H, tert-butyl)

การสังเคราะห์ 2,2,2-trichloroethyl 2-(2-(tert-butoxycarbonylamino)acetamido)acetate (18)

วิธีทำ

นำ 2,2,2-trichloroethyl 2-(tert-butoxycarbonylamino)acetate (16) (100 mg, 0.33 mmol) มาละลายใน 25% TFA ใน DCM ปริมาตร 5 ml ทำให้เย็นที่ 0°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ต่อจากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออก ได้สาร 17 แล้วนำไปทำปฏิกิริยาต่อ โดยนำ 2-(tert-butoxycarbonylamino)acetic acid (2) (57.81mg, 0.33 mmol) ละลายใน NMP ปริมาตร 5 ml แล้วเติม HATU (136.89 mg, 0.36 mmol) ใน NMP 3 ml ลงไปในปฏิกิริยา หลังจากนั้นเติมสาร 17 ใน DIPEA (0.230 ml, 1.32 mmol) และ NMP 2 ml แล้วทำปฏิกิริยาต่อไปที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ระเหยตัวทำละลายออก เติม EtOAc นำไปสกัดด้วยน้ำกลั่น, 5% citric acid, น้ำกลั่น. Sat. NaHCO₃, น้ำกลั่น และน้ำเกลือตามลำดับ นำไปทำให้ปราศจากน้ำ แล้วจึงไปแยกด้วย column chromatography ด้วย hexane : EtOAc = 6 : 4

Physical state	ของเหลวสีเหลืองอ่อน
Yield (%)	74.2 mg, 61.83%
R _f	0.28 (hexane : EtOAc = 6 : 4)
Spectral data	IR (cm ⁻¹): 3331.92 (NH str.), 2979.47 – 2934.06 (CH ₃ , CH ₂ str.), 1748.89 – 1682.79 (C=O str., ester, amide), 1439.43 (NH bend, amide), 862.41 – 681.37 (bend, -CCl ₃) ¹ H NMR (ppm, CDCl ₃): 7.24 (s, 1H, NH), 4.05 (d, 2H, CH ₂ CCl ₃), 3.84 – 3.74 (d, 4H, CH ₂ CO), 1.44 (s, 9H, tert-butyl)