

## การสังเคราะห์ไพโรลิดินิลพีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยสารเชิงซ้อนอิริเดียม

## Synthesis of PyrrolidinyI PNA Containing Ir-Complex

ฐิตินันท์ มิตรชอบ และ จตุรงค์ สุภาพพร้อม\*

Thitinan Mitchorp and Chaturong Suparpprom\*

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

Chemistry Department, Faculty of Science, Naresuan University

Received : 25 July 2018

Accepted : 21 October 2018

Published online : 29 October 2018

## บทคัดย่อ

สารประกอบเชิงซ้อนของโลหะอิริเดียม  $[Ir(ppy)_2(4'-methyl-2,2'-bipyridine-4-carboxylic acid)](PF_6)$  (Ir-COOH) เป็นสารประกอบที่มีสมบัติเชิงแสงที่น่าสนใจ สามารถนำไปใช้เป็นตัวให้สัญญาณลูมิเนสเซนส์ในระบบทางชีวภาพได้ เนื่องจากมี Stroke shifts ที่กว้าง มีระยะเวลาการให้สัญญาณนาน และมีค่า quantum yield สูงในช่วงแสงที่มองเห็น (visible) งานวิจัยนี้สนใจนำสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะอิริเดียมมาประยุกต์โดยติดที่ปลายสายของไพโรลิดินิลพีเอ็นเอ (acpcPNA) ผ่านพันธะเพปไทด์ โดยพีเอ็นเอเป็นโมเลกุลเลียนแบบดีเอ็นเอที่มีสมบัติในการจับยึดกับดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอเป้าหมายได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้เป็นโพรบในการตรวจวัดดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) จากการทดลองหาสภาวะในการติดฉลากสารประกอบเชิงซ้อน หรือลิแกนด์กับสะพานเชื่อม (linker) พบว่าสภาวะที่ใช้ HATU/DIEA และ DCC/NHS ได้ผลผลิตร้อยละของสารผลิตภัณฑ์ 52 และ 48 ตามลำดับ และในการสังเคราะห์พีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยสารประกอบเชิงซ้อนโลหะของอิริเดียมและตรวจสอบด้วย MALDI-TOF MS พบว่าสภาวะที่ใช้ HATU/DIEA สามารถติดฉลาก Ir-COOH ลงไปบนปลายสายของไพโรลิดินิลพีเอ็นเอได้ในปริมาณเล็กน้อย ในขณะที่การใช้ DCC/NHS นั้นไม่เกิดสารผลิตภัณฑ์ แต่พบลักษณะการสลายตัวของพีเอ็นเอ ทั้งนี้สันนิษฐานว่าสารประกอบเชิงซ้อนของอิริเดียมสามารถทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำ ซึ่งจะต้องหาสภาวะที่เหมาะสมในการติดฉลาก Ir-COOH ต่อไป จากข้อมูลดังกล่าวอาจนำไปสู่การศึกษาการประยุกต์ใช้สารประกอบของโลหะอิริเดียมในการเร่งการสลายตัวของพีเอ็นเอเมื่อเข้าสู่เซลล์เป้าหมายได้

คำสำคัญ : ไพโรลิดินิลพีเอ็นเอ, อิริเดียม, สารเรืองแสง, ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ

\*Corresponding author. E-mail : chaturongs@nu.ac.th

## Abstract

Iridium complex is a promising organometallic compound for bio-photophysical studies which have a large Stokes shift, long emissive lifetimes, and high quantum yields in visible range. Synthesis of pyrrolidinyl peptide nucleic acid (acpcPNA) containing [Ir(ppy)<sub>2</sub>(4'-methyl-2,2'-bipyridine-4-carboxylic acid)](PF<sub>6</sub>) or Ir-acpcPNA was studied in this research as a candidate probe for DNA detection in Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) technique. The coupling condition for labeling Ir-COOH with linker was HATU/DIEA and DCC/NHS and gave 52 and 48 %yield, respectively. However, the coupling reaction between acpcPNA and Ir-COOH with HATU/DIEA condition gave low yield. For condition of DCC/NHS, Ir-acpcPNA product cannot be observed but the mass signal of decomposition of PNA was found. For this phenomenon, we assumed that iridium complexes can act as a catalyst for water oxidation, cause the decomposition of PNA. So, iridium complexes may be applied to use for PNA degradation within target cells.

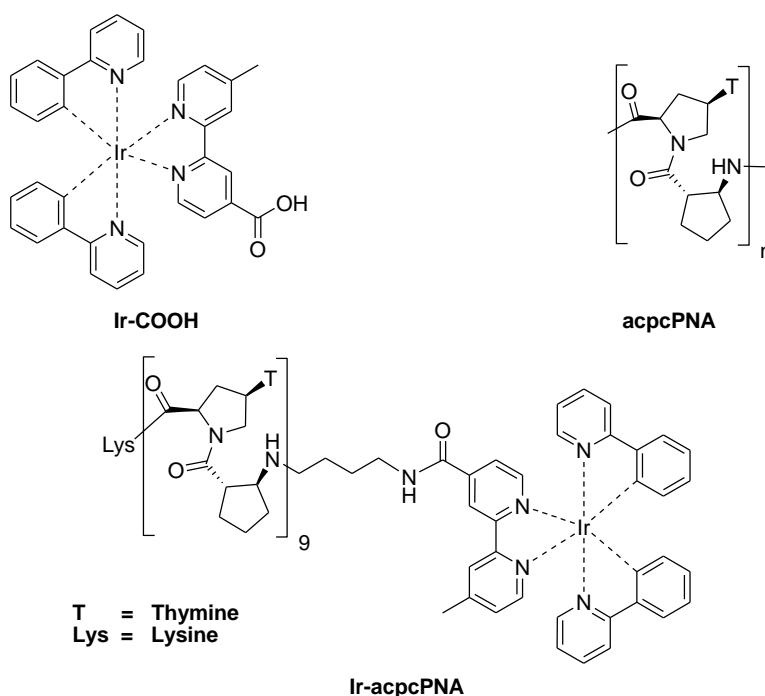
**Keywords :** pyrrolidinyl PNA, iridium, fluorescent, biomarker

## บทนำ

เพปไทด์นิวคลีโอติกแอซิด หรือพีเอ็นเอ จะประกอบไปด้วยหน่วยซ้ำของ *N*-2-aminoethylglycine ถูกเรียงต่อกันด้วยพันธะเอไมด์ (aegPNA) ในแกนหลักของแต่ละหน่วยมอนอเมอร์จะมีส่วนของนิวคลีโอเบสซึ่งสามารถเข้าคู่กับนิวคลีโอเบสบนกรดนิวคลีอิกได้ตามกฎการเข้าคู่เบสของวัตสัน-คริก (Watson-Crick base pairing rule) เกิดเป็นโมเลกุลลูกผสมพันเกลียวบันไดวนคู่เช่นเดียวกับการเข้าคู่กันของกรดนิวคลีอิกในธรรมชาติ เนื่องจากโครงสร้างไม่มีประจุจึงทำให้โมเลกุลเกลียวคู่ระหว่างพีเอ็นเอกับกรดนิวคลีอิกมีความแข็งแรงมากกว่าโมเลกุลเกลียวคู่ระหว่างกรดนิวคลีอิกกับกรดนิวคลีอิกด้วยกัน และเนื่องจากโครงสร้างหลักของ aegPNA เป็นเพปไทด์จึงทำให้สามารถทนทานต่อเอนไซมนิวคลีเอส และโปรตีเอสในร่างกาย (Nielsen, 1999) ในส่วนของการประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรค พีเอ็นเอสามารถนำมาใช้แทนกรดนิวคลีอิกในเทคนิคต่างๆ ตัวอย่างเช่น เทคนิคไมโครแอเรย์ (Microarrays) เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (Polymerase Chain Reactions; PCR) ในรูปแบบโมเลกุลลูกผสมพีเอ็นเอและดีเอ็นเอ เทคนิคซิงเกิลนิวคลีโอไทด์พอลิมอร์ฟิซึม (Single Nucleotide Polymorphism; SNP) และเทคนิควิธีการตรวจด้วยสารเรืองแสง (Fluorescent In Situ Hybridization; FISH) เป็นต้น (Koh, 2015) หลักการในการตรวจวินิจฉัยโรคจะอาศัยการเข้าคู่กันของเบสคู่สมระหว่างลำดับเบสในยีนของโรค โพรบที่ใช้ในการตรวจวัดจะอาศัยส่วนให้สัญญาณในรูปแบบของสัญญาณทางแสง ทางไฟฟ้า หรือการเปลี่ยนแปลงมวลเป็นตัวให้สัญญาณ (Sabale, Georgea, & Srivatsan, 2014; Reisberg *et al.*, 2008; Schatz, Distler, Berlin, & Schuster, 2006) หนึ่งในตัวให้สัญญาณที่น่าสนใจคือสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะทรานซิชัน เนื่องจากมี Stokes shifts ที่กว้าง มีระยะเวลาการให้สัญญาณนาน และมีค่า quantum yield สูงในช่วงของการมองเห็น (visible range) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดีในการให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ งานวิจัยของ Verheijen ได้ติดสารประกอบเชิงซ้อน Tris-(bipyridine)-ruthenium (II) ลงบนปลายฝั่งไนโตรเจนของ aegPNA พบว่าค่า melting temperature ( $T_m$ ) ของพีเอ็นเอที่มีปลายสายเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของรูทีเนียมกับดีเอ็นเอมีค่าใกล้เคียงกันกับของพีเอ็นเอปกติกับดีเอ็นเอซึ่งแสดงถึงความเสถียรของพีเอ็นเอชนิดนี้ที่ไม่เปลี่ยนแปลงไป แต่งานวิจัยนี้ไม่ได้

ศึกษาการวัดสัญญาณการเรืองแสงของพีเอ็นเอชนิดนี้ (Verheijen, van de Marel, van der Boom, & Metzler-Nolte, 2000) นอกจากนี้ในกลุ่มงานวิจัยเดียวกันได้ทำการติดฉลาก Ruthenocene ลงไปที่ปลายสายของ aegPNA เพื่อนำไปศึกษาการเข้าสู่เซลล์โดยประยุกต์ใช้กับเทคนิค Atomic absorption spectroscopy ได้สำเร็จ (Gross, Hüsken, Schur, Raszeja, Ott, & Metzler-Nolte, 2012) และในงานวิจัยของ Gasser ได้ทำการติดสารประกอบเชิงซ้อน  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{L}-\text{N}_3)]\text{Br}$  ลงไปบนปลายสายของ aegPNA พบว่าพีเอ็นเอที่มีการติดสารประกอบบริเนียมนี้มีค่า  $T_m$  สูงกว่าพีเอ็นเอที่ไม่ได้ติดสารประกอบเชิงซ้อนลงไปเล็กน้อย นอกจากนี้การติดสารประกอบบริเนียมยังสามารถพาพีเอ็นเอเข้าไปในเซลล์ HeLa โดยใช้ความเข้มข้นเพียง  $1 \mu\text{M}$  (Gasser *et al.*, 2012) จากงานวิจัยที่ได้กล่าวไปในข้างต้นแสดงให้เห็นสมบัติที่น่าสนใจบางประการของสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของพีเอ็นเอได้

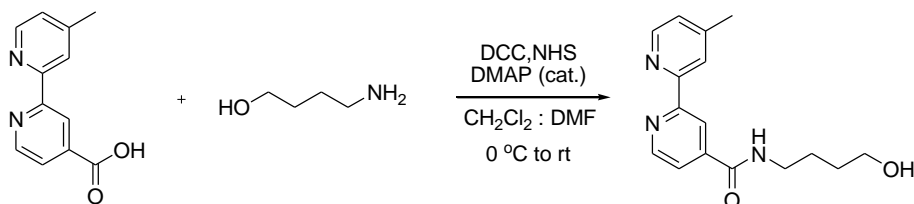
งานวิจัยนี้สนใจนำสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะอิริเดียม  $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(4'\text{-methyl-2,2'\text{-bipyridine-4-carboxylic acid})](\text{PF}_6)$  ( $\text{Ir-COOH}$ ) ซึ่งมีคุณสมบัติการแสดงการให้สัญญาณการเรืองแสงสีส้มเหลืองแบบฟอสฟอเรสเซนซ์จากการกระตุ้นแบบทริปเปต (triplet excited state) จาก  $[5d(\text{Ir}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy})]^3$  MLCT และ  $[\pi(\text{bpy}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy})]^3$  LLCT ทำให้เกิดคุณสมบัติการเรืองแสง (Zhoa, Wu, Wang, Shi, & Chen, 2011) มาติดลงไปที่ปลายสายของพิโรลิดีนพีเอ็นเอที่มีสะพานเชื่อมเป็น *D*-prolyl-2-aminocyclopentanecarboxylic acid (acpcPNA) (ภาพ 1) เนื่องจาก acpcPNA มีสมบัติในการจับยึดกับดีเอ็นเอมากกว่าใน aegPNA (Suparpprom, Srisuwannaket, Sangvanich, & Vilaivan, 2005) โดยมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาสมบัติการเรืองแสงของพิโรลิดีนพีเอ็นเอที่มีปลายสายเป็นสารประกอบของอิริเดียม และศึกษาสมบัติการจับยึดกับดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยคาดหวังว่าพิโรลิดีนพีเอ็นเอที่มีปลายสายเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของอิริเดียมจะให้สัญญาณการเรืองแสงที่ดีกว่าการใช้สารเรืองแสงประเภทสารอินทรีย์ ซึ่งอาจจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นตัวให้สัญญาณในการตรวจโรคด้วยเทคนิค FISH (FISH probe) ได้



ภาพที่ 1 โครงสร้างของสารเรืองแสง Ir-COOH โมเลกุล acpcPNA และโมเลกุลเป้าหมาย Ir-acpcPNA

## วิธีดำเนินการวิจัย

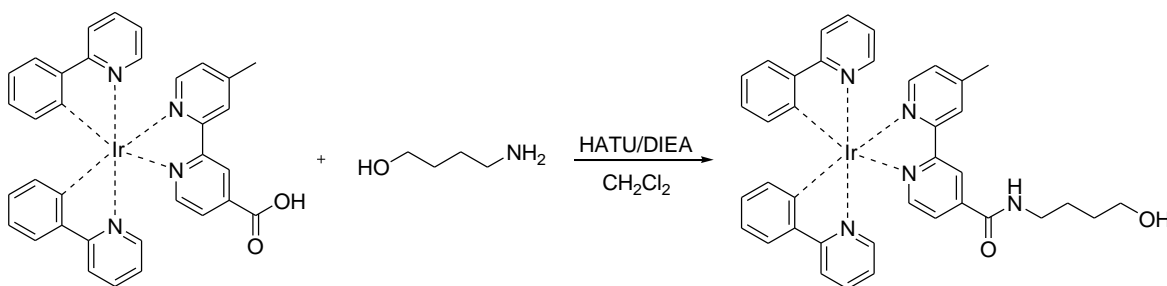
การสังเคราะห์ 4'-methyl-2,2'-bipyridine-4-carboxyl-aminobutanol



นำ 4'-methyl-2,2'-bipyridine-4-carboxylic acid (0.093 mmol) *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (0.186 mmol) 4-Dimethylaminopyridine (DMAP) (cat. amount) ละลายใน DCM 5 mL ต่ออัตราส่วน DMF 0.1 mL ที่อุณหภูมิ 0 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิต่ออีก 1 ชั่วโมง และค่อยๆ หยด 1-amino-4-butanol (0.466 mmol) ที่อุณหภูมิ 0 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และตั้งปฏิกิริยาทิ้งไว้ที่อุณหภูมิต่อ 12 ชั่วโมง กรองแล้วนำส่วนที่กรองได้มาสกัดด้วยน้ำ และสารละลาย  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  นำไประเหยตัวทำละลาย เติม EtOAc กรองส่วนของแข็งออก นำไประเหยตัวทำละลาย จากนั้นนำมาผ่าน silica gel โดยใช้ตัวทำละลายในอัตราส่วน 1 : 1 ของ EtOAc : DCM จากนั้นตกผลึกด้วย DCM และ hexane

$^1\text{H}$  NMR; (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$  (ppm) 9.25 [1H, s, C6-bipyridine], 8.85 [1H d,  $J = 4.9$  Hz, C3-bipyridine], 8.66 [1H, d,  $J = 5.7$  Hz, C3'-bipyridine], 8.57 [1H, s, C6'-bipyridine], 8.02 [1H, d,  $J = 4.9$  Hz, C4-bipyridine], 7.58 [1H, d,  $J = 5.1$  Hz, C4'-bipyridine], 3.70-3.75 [2H, m,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ], 3.51-3.58 [2H, m,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ], 2.69 [3H, s,  $\text{CH}_3$  bipyridine], 1.72-1.85 [4H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ]

การสังเคราะห์  $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(4'-\text{methyl-2,2'-bipyridine-4-carboxyl-aminobutanol})]$

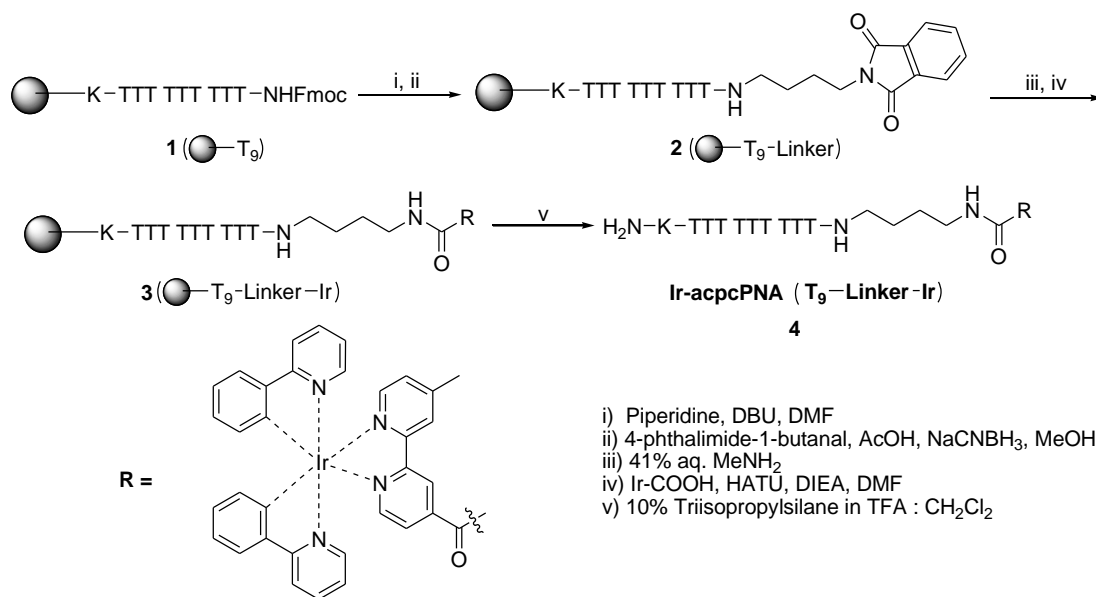


นำ Ir-COOH (70  $\mu\text{mol}$ ) และ hexafluorophosphate azabenzotriazole tetramethyl uronium (HATU) (139  $\mu\text{mol}$ ) ละลายใน DCM จากนั้นค่อยๆ เติม DIEA (210  $\mu\text{mol}$ ) และ 1-amino-4-butanol (105  $\mu\text{mol}$ ) ที่อุณหภูมิต่อตามลำดับ เมื่อสารตั้งต้นหมด เติมน้ำและสกัดด้วย DCM กำจัดน้ำด้วยการเติม  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  กรองและนำไประเหยตัวทำละลายออก จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ตัวทำละลายเป็น 1% MeOH ใน  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$

$^1\text{H}$  NMR; (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$  (ppm) 9.36 [1H, s,  $\text{CH}(\text{CO})$  bipyridine], 9.77 [1H, s,  $\text{CH}(\text{CH}_3)$  bipyridine], 7.31-8.01 [13H, m, CH phenylpyridine], 6.89-7.22 [6H, m, CH phenylpyridine], 6.25-6.33 [1H, m, CH phenylpyridine], 4.32-4.43 [2H, m,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ], 3.53-3.64, 4.32-4.43 [2H, m,  $\text{NHCH}_2$ ], 2.67 [3H, s,  $\text{CH}_3$  bipyridine], 1.87 [4H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ]

การสังเคราะห์  $[Ir(ppy)_2(4\text{'-methyl-2,2\text{'-bipyridine-4-carbonyl-aminobutyl})]-acpcPNA$  conjugate ( $Ir-acpcPNA$ ) บนวัฏภาคของแข็ง

การสังเคราะห์โพลิเมอร์ 1 จะสังเคราะห์โดยมีลำดับเบสเป็นไทมีน 9 มอนอเมอร์ตามภาพ 2 โดยใช้ TentaGel S RAM Fmoc resin เป็นวัฏภาคของแข็งด้วยวิธี solid phase peptide synthesis (Suparpprom, Srisuwannaket, Sangvanich, & Vilaivan, 2005) จากนั้นจะทำการปลดหมู่ Fmoc ด้วย piperidine และ DBU ใน DMF แล้วทำปฏิกิริยา reductive alkylation กับ 4-phthalimide-1-butanol จากนั้นปลดหมู่ phthalimide ด้วย methylamine (41% aq.) แล้วนำไปทำการ coupling กับ Ir-COOH โดยใช้สภาวะ HATU, DIEA, DMF (สภาวะ 5) และ DCC, NHS (สภาวะ 6) แล้วทำการปลดพีเอ็นเอออกจากเรซินด้วย 10% Triisopropylsilane ใน TFA : DCM และพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry



ภาพที่ 2 แผนการสังเคราะห์โพลิเมอร์เป้าหมาย (4) บนวัฏภาคของแข็งด้วยวิธี SPPS

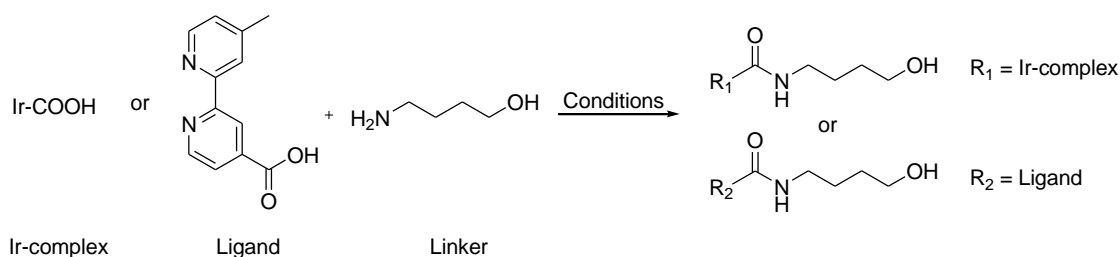
### ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

การสังเคราะห์ 4'-methyl-2,2'-bipyridine-4-carbonyl-aminobutanol และ  $[Ir(ppy)_2(4\text{'-methyl-2,2\text{'-bipyridine-4-carbonyl-aminobutanol})]$

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์การติดฉลาด Ir-complex กับสะพานเชื่อม (linker) จะใช้สภาวะทั้งหมด 3 สภาวะโดยเริ่มจากการติด 1-amino-4-butanol (linker) กับทั้ง 4'-methyl-2,2'-bipyridine-4-carboxylic acid (ligand) และ Ir-complex (ตาราง 1) พบว่าการใช้ DCC และ NHS เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุด (สภาวะ 3) เนื่องจากใช้เวลาทำปฏิกิริยา 2 วัน และได้ผลผลิตร้อยละของสารผลิตภัณฑ์เท่ากับ 48 ในขณะที่การใช้ HATU/HOBt/ DIEA และ HATU/DIEA นั้นจะเกิดปฏิกิริยาน้อยมากและไม่สามารถแยกสารให้บริสุทธิ์ได้ แสดงให้เห็นว่าการติดฉลาด ligand และ linker นั้น จะต้องใช้ coupling reagent ที่เหมาะสมจึงจะเกิดปฏิกิริยา ส่วนการทดลองติดฉลาด Ir-COOH กับ linker นั้นจะใช้สภาวะ HATU/DIEA

(สภาวะ 4) พบว่าได้ผลผลิตร้อยละของสารผลิตภัณฑ์เท่ากับ 52 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการติดฉลากของ Ir-complex หรือ ligand กับ linker

**ตารางที่ 1** สภาวะที่ใช้ในการสังเคราะห์การติดฉลาก Ir-complex กับสะพานเชื่อม (linker)

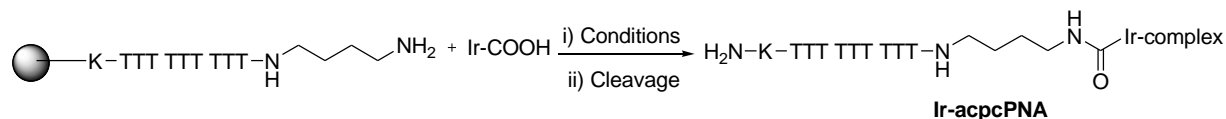


ลำดับที่	สารตั้งต้น	สภาวะที่ใช้	เวลา	ผลผลิตร้อยละของสาร (4)
1	Ligand	HATU, DIEA, DMF	4 วัน	ไม่สามารถแยกสารให้บริสุทธิ์*
2	Ligand	HATU, HOBT, DIEA, DMF	> 2 สัปดาห์	-
3	Ligand	DCC, NHS, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : DMF	2 วัน	48
4	Ir-COOH	HATU, DIEA, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	> 1 สัปดาห์	52

\*พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค <sup>1</sup>H NMR

การสังเคราะห์ [Ir(ppy)<sub>2</sub>(4'-methyl-2,2'-bipyridine-4-carbonyl-aminobutyl)]-acpcPNA (Ir-acpcPNA) บนวัสดุภาคของแข็ง จากผลเบื้องต้นในการติดฉลาก Ir-COOH ลงบน linker ในขั้นต่อมาจึงได้ทดลองติดฉลาก Ir-COOH ลงบน acpcPNA (●-T<sub>9</sub>-linker) และตรวจสอบด้วยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry พบว่าเมื่อทำการทดลองโดยใช้สภาวะ 5 จะปรากฏสัญญาณของสารผลิตภัณฑ์ Ir-acpcPNA ที่ m/z = 3901 เพียงเล็กน้อย และยังคงปรากฏสัญญาณของสารตั้งต้น acpcPNA-linker ที่ m/z = 3206 อยู่ (ภาพ 4ข) และแม้จะใช้ระยะเวลาเวลานานมากถึง 2 สัปดาห์ก็กลับยังคงปรากฏสัญญาณของสารตั้งต้นอยู่ในปริมาณมาก และความเข้มของสัญญาณสารผลิตภัณฑ์ไม่เพิ่มขึ้นจากเดิม (ภาพ 4ค) ในขณะที่เดียวกันก็มีฟีดสารปนเปื้อนเกิดขึ้น สันนิษฐานเบื้องต้นอาจเนื่องมาจากขนาดที่ใหญ่และมีลักษณะเป็นทรงกลม (sphere) และความเกาะกะของ Ir-COOH ซึ่งแตกต่างจากโมเลกุลสารเรืองแสงประเภทอินทรีย์ เช่น fluorescein, thiazole orange, pyrene หรือ aminocarbazole ที่มีลักษณะรูปร่างระนาบ (planar) จึงอาจจะทำให้การเข้าทำปฏิกิริยากับปลายเอมีนของพีเอ็นเอที่ติดอยู่บนวัสดุภาคของแข็งเกิดขึ้นได้ยากทำให้เกิดสารผลิตภัณฑ์ได้น้อยมาก ซึ่งสามารถยืนยันได้จากผลการ coupling ของ Ir-COOH เมื่อนำมาทำปฏิกิริยากับ 1-amino-4-butanol (linker) ที่สามารถเกิดสารผลิตภัณฑ์ได้ผลผลิตร้อยละ 52 นั้นเป็นเพราะโมเลกุลของ linker มีขนาดเล็กจึงสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับ Ir-COOH ที่มีขนาดใหญ่ได้

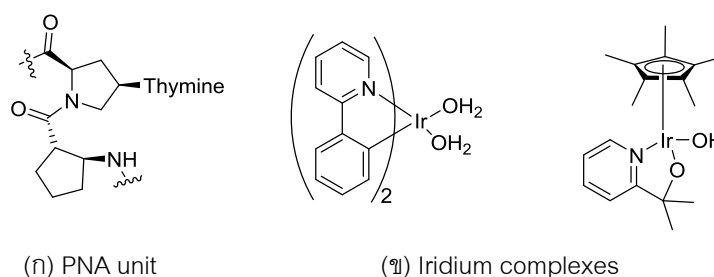
ตารางที่ 2 แสดงสภาวะที่ใช้ในการสังเคราะห์โพลิเมอร์เป้าหมาย Ir-acpcPNA



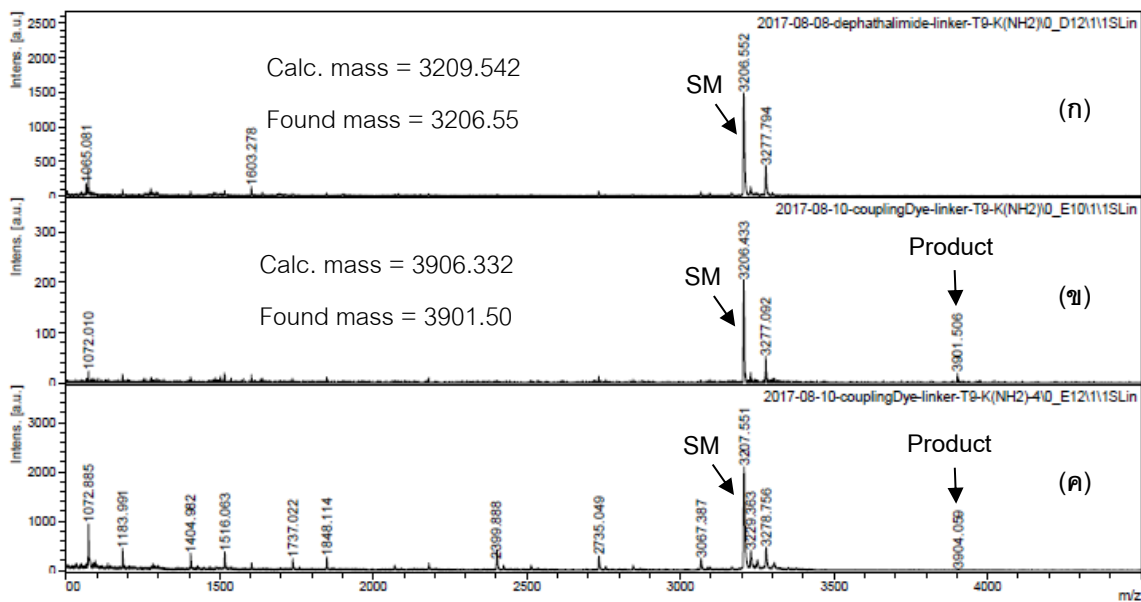
ลำดับที่	สภาวะที่ใช้	เวลา	ผลผลิตร้อยละ
5	HATU, DIEA, DMF	> 2 สัปดาห์	เล็กน้อย*
6	DCC, NHS, DMF	2 วัน	ไม่เกิดปฏิกิริยา

\*ตรวจสอบโดยใช้ MALDI-TOF Mass spectrometer

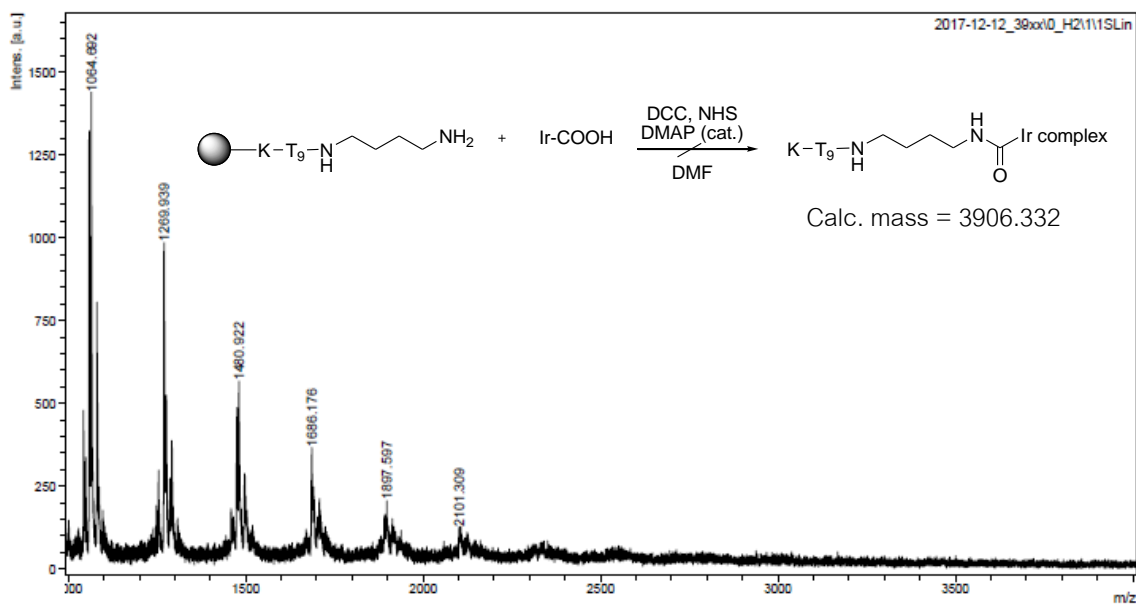
ในขณะที่สภาวะ 6 ซึ่งอ้างอิงจากงานวิจัยของ Wang (Wang *et al.*, 2012) ที่เป็นสภาวะของการ coupling หมู่อะมีนกับสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะพบว่าไม่ปรากฏสัญญาณของสารผลิตภัณฑ์ Ir-acpcPNA และสารตั้งต้น แต่พบสัญญาณของพีคขึ้นท่างกันประมาณ  $m/z = 210$  ซึ่งตรงกับมวลของมอนอเมอร์ยูนิตของพีเอ็นเอ (MW = 211; ภาพ 3ก) สันนิษฐานว่าอาจเกิดการสลายตัวของพันธะเพปไทด์และนิวคลีโอเบสบนสายพีเอ็นเอ ซึ่งมีข้อมูลจากงานวิจัยของ Thomsen พบว่าสารประกอบเชิงซ้อนของอิริเดียม เช่น Ir(2-phenylpyridine) และ Ir(2-(2'-pyridyl)-2-propanoate)OH (ภาพ 3ข) สามารถใช้เป็นตัวเร่งให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำดังสมการทางเคมี  $2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2 + 4\text{e}^- + 4\text{H}^+$  (Thomsen, Huang, Crabtree, & Brudvig, 2015) ซึ่งสารดังกล่าวเป็นสารในกลุ่มเดียวกับ Ir-COOH และสารประกอบเชิงซ้อนของอิริเดียมจะยิ่งมีความว่องไวเมื่อใช้ตัวออกซิไดส์ ซึ่ง DCC มีสมบัติเป็นตัวออกซิไดส์ได้จึงอาจทำให้โลหะอิริเดียมทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการตัดพันธะเอไมด์ของพีเอ็นเอได้



ภาพที่ 3 (ก) มอนอเมอร์ยูนิตของพีเอ็นเอ และ (ข) สารประกอบเชิงซ้อนของอิริเดียมมีสมบัติเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำ



ภาพที่ 4 MALDI-TOF mass spectra ของสภาวะ 5 (CCA matrix) ของ (ก) สารตั้งต้น (ข) เมื่อผ่านไป 3 วัน และ (ค) เมื่อผ่านไป 2 สัปดาห์



ภาพที่ 5 MALDI-TOF mass spectra ของสภาวะ 6 (CCA matrix) ไม่ปรากฏสัญญาณของสารตั้งต้น และผลิตภัณฑ์ Ir-acpcPNA



## สรุปผลการวิจัย

จากการหาสภาวะเบื้องต้นเพื่อใช้ในการติดฉลาก Ir-COOH ที่ปลายของ linker ของ acpc-T9 ได้ใช้สภาวะ HATU/DIEA (สภาวะ 5) และ DCC/NHS (สภาวะ 6) จากผลการทดลองพบว่ามีเพียงสภาวะ HATU/DIEA ที่ปรากฏสัญญาณพีคของสารผลิตภัณฑ์ที่  $m/z = 3901$  แต่เกิดขึ้นน้อยมากแม้จะใช้ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยานาน ซึ่งอาจเนื่องมาจากความเกะกะของ Ir-COOH ที่มีขนาดใหญ่จึงเข้าทำปฏิกิริยากับพีเอ็นเอบนวฏภาคของแข็งได้ยาก ในขณะที่สภาวะ DCC/NHS นั้นพบว่าพีเอ็นเอน่าจะเกิดการสลายตัว สันนิษฐานว่าเนื่องมาจากสารประกอบเชิงซ้อนของอิริเดียมสามารถทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้เกิดการสลายตัวของพีเอ็นเอได้ โดยทางผู้วิจัยจะดำเนินการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อไป อย่างไรก็ตามข้อมูลที่ได้อาจนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในการศึกษาเรื่องการเร่งการสลายตัวของพีเอ็นเอเมื่อนำเข้าสู่เซลล์เป้าหมายได้

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี (PERCH-CIC), Assistant Professor Filip Kielar ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในการอนุเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อน  $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(4\text{'-methyl-2,2'\text{-bipyridine-4-carboxylic acid)}](\text{PF}_6)$  และศาสตราจารย์ ธีรยุทธ วิไลวัลย์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในความอนุเคราะห์ให้คำปรึกษาและเครื่องมือในการวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้

## เอกสารอ้างอิง

- Gasser, G., Pinto, A., Neumann, S., Sosniak, A. M., Seitz, M., Merz, K., *et al.* (2012). Synthesis, characterisation and bioimaging of a fluorescent rhenium-containing PNA bioconjugate. *Dalton Trans.*, 41, 2304-2313.
- Gross, A., Husken, N., Schur, J., Raszeja, L., Ott, I. and Metzler-Nolte, N. (2012). A Ruthenocene-PNA Bioconjugate-Synthesis, Characterization, Cytotoxicity, and AAS-Detected Cellular Uptake. *Bioconjugate Chem.*, 23, 1764-1774.
- Koh, W. (2015). Peptide Nucleic Acid (PNA) and Its Applications. Retrieved February 10, 2018, from [http://121.254.169.23/bbs/ndata/pn\\_ref/pn\\_ref\\_1227242202.pdf](http://121.254.169.23/bbs/ndata/pn_ref/pn_ref_1227242202.pdf).
- Nielsen, P. E. (1999). Peptide nucleic acid. A molecule with two identities. *Acc. Chem. Res.*, 32, 624-630.
- Reisberg, S., Dang, LA., Nguyen, QA., Piro, B., Noel, V., Nielsen, PE. (2008). Label-free DNA electrochemical sensor based on a PNA-functionalized conductive polymer. *Talanta*, 76(1), 206-210.
- Sabale, P. M., Georgea, J. T. and Srivatsan, S. G. (2014). A base-modified PNA-graphene oxide platform as a turn-on fluorescence sensor for the detection of human telomeric repeats. *Nanoscale*, 6, 10460-10469.
- Schatz, P., Distler, J., Berlin, K. and Schuster, M. (2006). Novel method for high throughput DNA methylation marker evaluation using PNA-probe library hybridization and MALDI-TOF detection. *Nucleic Acids Res.*, 34(8), 59.

- Suparpprom, C., Srisuwannaket, C., Sangvanich, P., Vilaivan, T. (2005). Synthesis and oligodeoxynucleotide binding properties of pyrrolidinyl peptide nucleic acids bearing propyl-2-aminocyclo-pentanecarboxylic acid (ACPC) backbones. *Tetrahedron Lett.*, 46, 2833-2837.
- Thomsen, J. M., Huang, D. L., Crabtree, R. H. and Brudvig, G. W. (2015) Iridium-based complexes for water oxidation. *Dalton Trans.*, 44, 12452–12472.
- Verheijen, J. C., van de Marel, G. A., van der Boom, J. H. and Metzler-Nolte N. (2000). Transition Metal Derivatives of Peptide Nucleic Acid (PNA) Oligomer-Synthesis, Characterization and DNA binding. *Bioconjugate Chem.*, 11(6), 741-743.
- Wang, L., Puodziukynaite, E., Vary, R. P., Grumstrup, E. M., Walczak, R. W., Zolotarskaya, O. Y. (2012). Competition between Ultrafast Energy Flow and Electron Transfer in a Ru(II)-Loaded Polyfluorene Light-Harvesting Polymer. *J. Phys. Chem. Lett.*, 3 (17), 2453–2457.
- Zhoa, N., Wu, Y., Wang, R., Shi, L. and Chen, Z. (2011). An Iridium(III) Complex of Oximated 2,2'-bipyridine as a Sensitive Phosphorescent. *Analyst*, 136, 2277-2282.