

การพัฒนาการสังเคราะห์ไดฟีนิลเมทิลเอสเทอร์ของไฮดรอกซีโพรลีน ด้วยโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต

Synthesis of diphenylmethyl ester of hydroxyproline with potassium permanganate

เพ็ญทิพ เมืองแก้ว, จตุรงค์ สุภาพพร้อม*

Penthip Muangkaew, Chaturong Suparpprom*

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้สนใจศึกษาการสังเคราะห์หน่วยมอนอเมอร์ของพีเอ็นเอระบบพิโรลิดินิล คือ *N-tert*-Butoxycarbonyl-*cis*-4-hydroxy-L-proline diphenylmethyl ester ซึ่งปฏิกิริยาที่สำคัญคือการปกป้องหมู่คาร์บอกซิลให้เป็นหมูไดฟีนิลเมทิลเอสเทอร์ โดยได้พัฒนาวิธีการสังเคราะห์ไดฟีนิลไดเอโซมีเทนซึ่งเป็นรีเอเจนต์ในปฏิกิริยาดังกล่าวจากเดิมที่ใช้เมอร์คิวริกออกไซด์เปลี่ยนเป็นโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต พบว่าสามารถสังเคราะห์สารเป้าหมายได้ผลผลิตที่สูง โดยเป็นวิธีที่ง่ายและสามารถหลีกเลี่ยงความเป็นพิษของการใช้ปรอทลงได้

คำสำคัญ : ไดฟีนิลไดเอโซมีเทน ออกซิเดชัน

Abstract

In this study, *N-tert*-butoxy carbonyl-*cis*-4-hydroxy-L-proline diphenylmethyl ester which is pyrrolidinyl monomer was synthesized by converting carboxylic acid to diphenylmethyl ester. Synthesis of Diphenyl diazomethane reagent was developed by using potassium permanganate instead of mercuric oxide. It was found that, the target molecule could be synthesized by this developed method with high yield, decrease toxicity and environment friendly

Keywords : Diphenyl diazomethane/ Oxidation

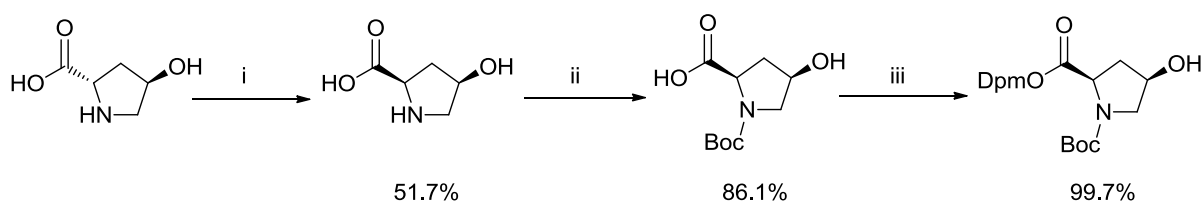
*Corresponding author. E-mail : chaturongs@nu.ac.th

1. บทนำ

พีเอ็นเอ คือ โมเลกุลที่สังเคราะห์ขึ้นมาเลียนแบบดีเอ็นเอในธรรมชาติโดยในปี ค.ศ. 1991 Nielsen และคณะ [Nielsen *et al.*, 1991] ได้สังเคราะห์พีเอ็นเอระบบแรกคือ aminoethylglycyl PNA (aegPNA) ซึ่งพีเอ็นเอระบบนี้โครงสร้างหลักเป็น 2-aminoethylglycine และนิวคลีโอเบสอยู่บนโครงสร้างหลักที่เป็นโพลิเอทเธอร์ และพบว่าสามารถเกิดสารเชิงซ้อนกับดีเอ็นเอคู่สมได้อย่างจำเพาะเจาะจงและมีเสถียรภาพสูงเนื่องจากในโครงสร้างหลักของพีเอ็นเอมีความเป็นกลางและไม่มีประจุลบของหมู่ฟอสเฟตเหมือนที่พบในดีเอ็นเอจึงไม่เกิดแรงผลักระหว่างประจุไฟฟ้าอีกทั้งยังมีความทนทานต่อเอนไซม์ในร่างกายนอกจากจะมีคุณสมบัติที่น่าสนใจแล้วพีเอ็นเอยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างหลากหลายเช่น ในด้านการตรวจวัดดีเอ็นเอ เครื่องมือวินิจฉัยโรค และเซนเซอร์ทางชีวเคมี เป็นต้น ในงานวิจัยนี้สนใจศึกษาการสังเคราะห์พิโรลิดีนมोनอเมอร์ โดยการสังเคราะห์พิโรลิดีนมोनอเมอร์ตามวิธีของ Vilaivan และคณะ [Lowe *et al.*, 1997] พบว่าในการเตรียม diphenyldiazomethane นั้นทำโดยปฏิกิริยาออกซิเดชันของ benzophenone hydrazone ด้วย mercuric oxide (HgO) ซึ่งเป็นสารที่มีความเป็นพิษสูง ผู้วิจัยจึงได้สนใจพัฒนาวิธีในการเตรียม diphenyl diazomethane ซึ่งสามารถเตรียมได้หลายวิธี เช่น ParedesR. และคณะ [Paredes *et al.*, 1965] ได้ใช้ benzhydrol เป็นตัวออกซิไดซ์และใช้ *p*-toluenesulfonic acid เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาพบว่าสามารถสังเคราะห์โมเลกุลเป้าหมายได้ผลผลิตร้อยละที่สูงอยู่ในช่วงร้อยละ 78-83 ต่อมา Lapatsanis L. และคณะ [Lapatsanis *et al.*, 1985] ได้เสนอวิธีการเตรียม diphenylmethyl ester ของอนุพันธ์ของกรดคาร์บอกซิลิกชนิดต่างอย่างง่าย โดยการใช้ phenyliodine (III) diacetate เป็นตัวออกซิไดซ์ ผลการทดลองพบว่าได้ผลผลิตร้อยละอยู่ในช่วง 73-93 ต่อมา Curini M. และคณะ [Curini *et al.*, 1997] ได้ค้นพบวิธีในการเตรียม diphenylmethyl ester โดยการใช้ Oxone ที่ตรึงลงบนอะลูมินา (wet Alumina) เป็นตัวออกซิไดซ์ benzophenone hydrazine และมี Iodine เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาพบว่าได้ร้อยละของผลิตภัณฑ์อยู่ในช่วง 70-95 และวิธีนี้ยังง่ายต่อการทำสเกลใหญ่เนื่องจากระบบของตัวออกซิไดซ์สามารถกรองออกได้ด้วยการกรองธรรมดาจึงง่ายต่อการทำปฏิกิริยาและ Oxone/Al₂O₃ นั้นมีราคาถูก และ Kang-Hyeok Lee และคณะ [Kang-Hyeok Lee *et al.*, 2006] ได้เตรียม diphenylmethyl ester จาก benzophenone hydrazone โดยได้ทำการเปลี่ยนสภาวะต่างๆเช่น วัสดุรองรับ (support) เช่น alumina และ silica gel ตัวออกซิไดซ์ เช่น KMnO₄ และ MnO₂ ผลการทดลองพบว่า การใช้อะลูมินาเป็นวัสดุรองรับให้ผลการทดลองที่ดีกว่าซิลิกาที่สภาวะเดียวกันและจากรายงานวิจัยการเตรียมพิโรลิดีนมोनอเมอร์ที่ใช้ตัวออกซิไดซ์ที่มีความเป็นพิษสูงและมีราคาแพง ในงานวิจัยนี้จึงศึกษาวิธีการเตรียม diphenylmethyl ester ของพิโรลิดีนมोनอเมอร์ให้เป็นวิธีที่หลีกเลี่ยงความเป็นพิษของปรอทโดยการใช้รีเอเจนต์ชนิดอื่น ที่หาได้ง่าย ราคาถูก มีความเป็นพิษน้อยและยังคงให้ผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณและความบริสุทธิ์สูง

2. วิธีการ

2.1 การสังเคราะห์พิโรลิดีนมोनอเมอร์



Reagents and conditions : i = 1) PrOCO₂COPr 150°C , 1 h 2) 2N HCl, reflux, ii = Boc₂O/ tBuOH, NaOH/H₂O, iii = Ph₂CN₂, EtOAc

2.1.1 การสังเคราะห์ *cis*-4-Hydroxy-D-proline

นำ *trans*-4-Hydroxy-L-proline (10.492 g, 80 mmol) ละลายใน propionic anhydride (50 mL) รีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 150°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาระเหย propionic anhydride ออกจากนั้นนำไปรีฟลักซ์กับ 2N HCl (50 mL) ที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้ไปต้มกับผงถ่านเพื่อกำจัดสี กรอง และล้างด้วยน้ำร้อน นำไประเหยน้ำออกจะได้ของแข็งสีขาว (hydrochloride

salt) หนัก 15.105 g นำไปตกผลึกโดยนำไปละลายในน้ำ 45.3 mL คนจนสารละลายใส จากนั้นเติม Et₃N 15.1 mL ค่อยๆ เติม EtOH 407.8 mL ทิ้งไว้ 15 นาทีให้ตกผลึก กรองแล้วล้างของแข็งด้วย EtOH 40 mL จะได้ของแข็งสีขาวหนัก 5.153 g (51.7% yield)

¹H NMR (400 MHz, D₂O) : δ_H 2.071 [d, J = 14.05 Hz, 1H, CH₂(3')] 2.320 [t, J = 10.46 Hz, 1H, CH₂(3)] 3.224 [dd, J = 12.26, 39.71 Hz, 2H, CH₂(5')] 4.029 [d, J = 7.76 Hz, 1H, CH(2')] 4.397 [br, 1H, CH(4')]

2.1.2 การสังเคราะห์ *cis-N-(tert-butyloxycarbonyl)-4-hydroxy-D-proline*

ละลาย *cis-4-hydroxy-D-proline* (4.780 g, 36 mmol) ใน สารละลาย NaOH 25 mL (2.162 g) และละลาย Boc₂O (9.603 g) ใน ¹BuOH 25 mL แล้วค่อยๆ หยดลงในสารละลายข้างต้น คนสารละลายประมาณ 12 ชั่วโมง แล้วระเหยตัวทำละลายออก จากนั้นเติมน้ำเล็กน้อยแล้วปรับ pH 2-3 ด้วย NaHSO₄ สกัดด้วย EtOAc 3 ครั้ง จากนั้นระเหยตัวทำละลายออก แล้วตกผลึกด้วย EtOAc 40 mL นำไปแช่ในตู้เย็นประมาณ 12 ชั่วโมง แล้วนำไปกรองและล้างตะกอนด้วย EtOAc ที่เย็นจะได้ของแข็งสีขาว 7.160 g (86.05% yield)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ_H 1.37 [s, 9H, CH₃ Boc rotamer] 1.81 [m, 1H, CH₂(3')] 2.33 [m, 1H, CH₂(3')] 3.10 [m, 1H, CH₂(5')] 3.48 [m, 1H, CH₂(5')] 4.09 [m, 1H, CH(2')] 4.19 [m, 1H, CH(4')]

2.1.3 การเตรียม Diphenyl diazomethane ด้วยโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต

นำ Benzophenonehydrazone 5 g (25 mmol) ละลายใน CH₂Cl₂ 125 mL ในภาชนะที่มีฟอยล์หุ้มอยู่จากนั้นเตรียม KMnO₄ 7.902 g (2 eq) ผสมลงใน Al₂O₃ 25 g แล้วค่อยๆ เทลงในสารละลายข้างต้น ปฏิกิริยาจะเกิดสมบูรณ์ใน 2 ชั่วโมง เมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ เติสารละลายสีม่วงออก (ภาชนะที่รองรับต้องหุ้มด้วยฟอยล์) แล้วเติม Hexane เล็กน้อยเพื่อสกัดสาร แล้วนำสารละลายที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกจะได้สารละลายสีม่วง นำไปแช่เย็น -20 °C ประมาณ 12 ชั่วโมง จะได้ของแข็งสีม่วงแล้วนำไปใช้ในการทำปฏิกิริยาต่อไปโดยไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์และการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร

2.2.4 การสังเคราะห์ *N-tert-Butoxycarbonyl-cis-4-hydroxy-L-proline diphenylmethyl ester*

ละลาย *cis-N-(tert-butyloxycarbonyl)-4-hydroxy-D-proline* (7.1597 g, 30 mmol) ใน EtOAc 50 ml แช่ในอ่างน้ำแข็ง แล้วค่อยๆ หยด Diphenylmethyl ester ที่เตรียมขึ้นได้ จนสีม่วงไม่จางหายไป คนสารละลายประมาณ 12 ชั่วโมง ระเหยตัวทำละลายออกแล้วตกตะกอนด้วย hexane 50 mL คนจนเกิดของแข็งสีขาว ใช้แท่งแก้วคนสารกระจายผลึกของแข็งที่ได้ให้ไม่จับเป็นก้อน นำไปแช่ในตู้เย็นประมาณ 12 ชั่วโมง กรองแล้วล้างด้วย hexane จะได้ของแข็งสีขาวหนัก 11.8775 g (99.68%)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ_H 1.24, 1.46 [2×s, 9H, CH₃ Boc rotamers] 2.02-2.10 [m, 2H, CH₂(3')] 2.26-2.40 [m, 2H, CH₂(5')] 3.51-3.68 [m, 1H, CH(2')] 4.41, 4.44 [dd, J = 9.82, 46.63 Hz, 1H, CH(4')] 6.88, 6.96 [2×s, 1H, CH Ph₂ rotamers] 7.33-7.26 [m, 10H, phenyl CH]

3. ผลและอภิปราย

งานวิจัยนี้ได้สังเคราะห์พิโรลิดีนมอนอเมอร์โดยเริ่มจากการทำให้เกิดปฏิกิริยาอิพิเมอร์ไรซ์เซชันของ *trans-4-hydroxy-L-proline* ให้ได้เป็น *cis-4-hydroxy-D-proline* โดยใช้ propionic anhydride แทนการใช้ acetic anhydride ตามวิธีของ Vilaivan [Lowe *et al.*, 1997] พบว่าได้ผลผลิตร้อยละอยู่ในช่วง 42-51 ซึ่งให้ผลที่ไม่แตกต่าง จากนั้นทำการปกป้องหมู่เอมีนด้วย *di-tert-butyl bicarbonate* ได้ผลผลิตร้อยละอยู่ในช่วง 74-86 จากนั้นทำการเปลี่ยนหมู่กรดคาร์บอกซิลิกของอนุพันธ์ของโพรลีนให้เป็นหมู่ไนด์ฟีนิลเมทิลเอสเทอร์ โดยได้ทำการเตรียม diphenyl diazomethane ขึ้นมาก่อนโดย ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีในการเตรียม diphenyl diazomethane ซึ่งจากการสำรวจวิธีที่ได้มีการรายงานมาก่อนหน้านี้พบว่า มี 2 วิธีที่สามารถทำได้ง่าย ใช้สารที่มีราคาถูกและไม่มีพิษ โดยวิธีแรกนั้นเป็นวิธีแบบ one-pot reaction ของ Curini M. และคณะ [Curini *et al.*, 1997] ใช้ oxone ที่ตรึงลงบนอะลูมินาเป็นตัวออกซิไดซ์ benzophenone hydrazone และมี iodine เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาผลการทดลองพบว่าสารตั้งต้นที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาไม่สามารถทำปฏิกิริยาได้ทั้งหมดและสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นไม่มี

ความบริสุทธิ์และได้ร้อยละของผลิตภัณฑ์ที่ต่ำ จึงได้ทำการทดลองวิธีที่สอง คือ การเตรียม diphenyl diazomethane ขึ้นมาก่อนตามวิธีของ Kang-Hyeok Lee และคณะ [Kang-Hyeok Lee *et al.*, 2006] โดยใช้ KMnO_4 ตรึงลงบนอะลูมินาเป็นตัวออกซิไดซ์ benzophenone hydrazone ผลการทดลองพบว่าสามารถเตรียม diphenyl diazomethane ขึ้นได้และเมื่อนำไปใช้เป็นรีเอเจนต์ในปฏิกิริยาการเปลี่ยนหมู่กรดคาร์บอกซิลิกให้ได้เป็นหมู่ไดฟีนิลเมทิลเอสเทอร์แล้วพบว่าได้ผลผลิตร้อยละที่สูงคืออยู่ในช่วง 79-98 ดังนั้นจึงสรุปผลการทดลองได้ว่าวิธีการเตรียม diphenyl diazomethane จาก KMnO_4 ให้ผลการทดลองที่ดีที่สุด อีกทั้งเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย ใช้สารราคาถูกและใช้สารที่ไม่เป็นพิษ (green chemistry)

จากผลการทดลองพบว่าการสังเคราะห์ *N-tert*-Butoxycarbonyl-*cis*-4-hydroxy-L-prolinediphenylmethyl ester โดยการใช้โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตนั้น ได้ผลการทดลองที่ไม่แตกต่างกับการสังเคราะห์โดยวิธีต่างๆ ที่ได้มีการรายงานมาก่อนหน้านี้ ตามตารางการเปรียบเทียบผลผลิตร้อยละของการสังเคราะห์ *N-tert*-Butoxycarbonyl-*cis*-4-hydroxy-L-prolinediphenyl methyl ester ด้วยวิธีที่ได้รายงานมาก่อนหน้านี้ดังตาราง 1

ตาราง 1 เปรียบเทียบผลผลิตร้อยละของ *N-tert*-Butoxycarbonyl-*cis*-4-hydroxy-L-proline diphenyl methyl ester ด้วยสภาวะต่างๆ

| ลำดับ | เอกสารอ้างอิง | สภาวะ | % Yield |
|-------|---------------------------|--|---------|
| 1 | ParedesR. และคณะ [3] | Benzene, benzhydrol reflux, <i>p</i> -toluenesulfonic acid | 78-83 |
| 2 | Lapatsanis L. และคณะ [4] | Tri-diphenylmethyl phosphate, CH_2Cl_2 , trifluoroacetic acid cat. | 71-87 |
| 3 | Lapatsanis L. และคณะ [7] | Benzophenonehydrazone, Al_2O_3 , Phenyliodine (III) diacetate cat. | 73-93 |
| 4 | Curini M. และคณะ [5] | Benzophenonehydrazone, Oxone, $\text{I}_2/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, wet alumina | 70-95 |
| 5 | Kang-Hyeok Lee และคณะ [6] | Benzophenonehydrazone, CH_2Cl_2 , 0.1 mmol $\text{KMnO}_4/\text{Al}_2\text{O}_3$, O_2 , rt | 77-94 |
| 6 | Vilavain และคณะ [8] | Benzophenonehydrazone, Na_2SO_4 , Et_2O , 10%KOH/EtOH | 78-86 |
| 7 | งานวิจัยนี้ | Benzophenonehydrazone, CH_2Cl_2 , 2 mmol $\text{KMnO}_4/\text{Al}_2\text{O}_3$, rt | 79-98 |

4. บทสรุป

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการเตรียม diphenyl diazomethane โดยใช้ KMnO_4 เป็นตัวออกซิไดซ์ เพื่อนำไปใช้ในการสังเคราะห์ *N-tert*-Butoxycarbonyl-*cis*-4-hydroxy-L-proline diphenylmethyl ester จากผลการทดลองพบว่าการสังเคราะห์ *N-tert*-Butoxycarbonyl-*cis*-4-hydroxy-L-proline diphenylmethyl ester โดยวิธีที่เตรียมขึ้นใหม่นี้ให้ผลการทดลองที่ไม่แตกต่างจากวิธีที่เคยรายงานมาก่อนหน้านี้คือได้ผลผลิตร้อยละอยู่ในช่วง 79-98 อีกทั้งวิธีนี้ยังช่วยลดความเป็นพิษของปฏิกิริยาลงได้เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีที่ใช้ mercuric oxide (HgO)

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์ ที่ได้ให้คำปรึกษาและเอื้อเฟื้อสถานที่และสารเคมีในการทำวิจัยในครั้งนี้ด้วยความเอาใจใส่ ตลอดระยะเวลาที่ทำวิจัยที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จนงานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี

6. เอกสารอ้างอิง

- Croce D.P. and Rosa L.C. (2002). Stereoselective synthesis of (1*R*,4*R*)-*N*-acyl-2-oxa-5-aza-bicyclo[2.2.1]heptanes-3-ones via mesoionic compounds. An improved synthesis of *cis*-4-hydroxy-D-proline. *Tetrahedron Asymmetry*, 197-201.
- Curini M., Rosati O. and Pisani E. (1997). Preparation of Diphenylmethyl Esters by Oxone Oxidation of Benzophenone Hydrazone. *Tetrahedron Letters*, 1239-1240.
- Kang-Hyeok Lee. and Kwang-Youn Ko (2006). Catalytic Oxidation of Benzophenone Hydrazone with Alumina-supported KMnO_4 under Oxygen Atmosphere. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 185.

- Lapatsanis L (1978). A new method for the preparation of diphenylmethylesters by using tri-diphenylmethyl phosphate as alkylating agent. *Tetrahedron Letters*, 4697-4698.
- Lapatsanis L., Miliias G. and Paraskewas S. (1985). A Simple Method for the Preparation of Diphenylmethyl Esters of N-Protected Amino Acids. *Tetrahedron Letters*, 513-515.
- Lowe G. and Vilaivan T. (1997). Amino acids bearing nucleobases for the synthesis of novel peptide nucleic acids. *J. Chem. Soc., Perkin Trans*, 539-546.
- Nielsen P.E., Egholm M., Berg R.H. and Buchardt O. (1991). Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement Thymine-substituted polyamide. *Science*, 254, 1497.
- Paredes R., Agudelo F. and Taborda G. (1965). Facile New Methods for Introduction and Removal of the Diphenylmethyl Group as a Protective Group of Carboxylic Acids. *Tetrahedron Letters*, 1965-1966.