

การพัฒนาการสังเคราะห์ไดฟีนิลเมทิลเอสเทอร์ของไฮดรอกซีโพรลีน
ด้วยโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต

Synthesis of diphenylmethyl ester of hydroxyproline with potassium permanganate

เพ็ญทิพย์ เมืองแก้ว, จตุรงค์ สุภาพพร้อม*

Penthip Muangkaew, Chaturong Suparpprom*

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้สนใจศึกษาการสังเคราะห์หน่วยมอนอเมอร์ของพีเคเอ็นเอระบบพิโรลิดินิด คือ *N-tert*-Butoxycarbonyl-*cis*-4-hydroxy-L-proline diphenylmethyl ester ซึ่งปฏิกิริยาที่สำคัญคือการปกป้องหมู่คาร์บอกซิลให้เป็นหมู่ไดฟีนิลเมทิลเอสเทอร์ โดยได้พัฒนาวิธีการสังเคราะห์ไดฟีนิลไดเอโซมีเทนซึ่งเป็นรีเอเจนต์ในปฏิกิริยาดังกล่าว จากเดิมที่ใช้เมอร์คิวริกออกไซด์เปลี่ยนเป็นโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต พบว่าสามารถสังเคราะห์สารเป้าหมายได้ผลผลิตที่สูง โดยเป็นวิธีที่ง่ายและสามารถหลีกเลี่ยงความเป็นพิษของการใช้ปรอทลงได้

คำสำคัญ : ไดฟีนิลไดเอโซมีเทน / ออกซิเดชัน

Abstract

In this study, *N-tert*-butoxy carbonyl-*cis*-4-hydroxy-L-proline diphenylmethyl ester which is pyrrolidiny 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

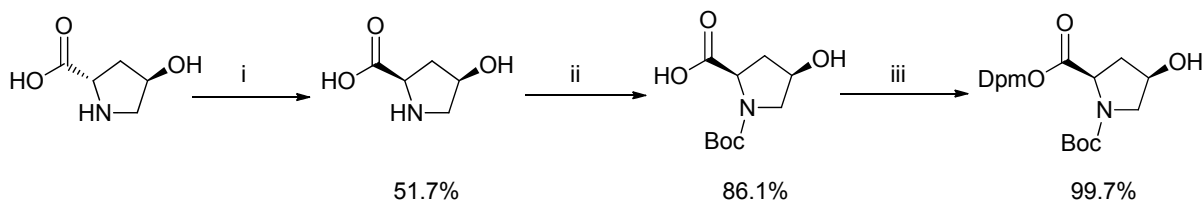
*Corresponding author. E-mail: chaturongs@nu.ac.th

1. บทนำ

พีเอ็นเอ คือ โมเลกุลที่สังเคราะห์ขึ้นมาเลียนแบบดีเอ็นเอในธรรมชาติโดยในปี ค.ศ. 1991Nielsen และคณะ [Nielsen *et al.*, 1991] ได้สังเคราะห์พีเอ็นเอระบบแรกคือ aminoethylglycyl PNA (aegPNA) ซึ่งพีเอ็นเอระบบนี้โครงสร้างหลักเป็น 2-aminoethylglycine และนิวคลีโอเบสอยู่บนโครงสร้างหลักที่เป็นโพลิเอทิลีนไกลคอล และพบว่าสามารถเกิดสารเชิงซ้อนกับดีเอ็นเอ คู่สมได้อย่างจำเพาะเจาะจงและมีเสถียรภาพสูง เนื่องจากในโครงสร้างหลักของพีเอ็นเอนั้นมีความเป็นกลาง และไม่มีการจับของหมู่ฟอสเฟตเหมือนกับดีเอ็นเอ จึงไม่เกิดแรงผลักระหว่างประจุไฟฟ้าอีกทั้งยังมีความทนทานต่อเอนไซม์ในร่างกายนอกจากจะมีคุณสมบัติที่น่าสนใจแล้วพีเอ็นเอยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างหลากหลายเช่น ในด้านการการตรวจวัดดีเอ็นเอ เครื่องมือวินิจฉัยโรค และเซนเซอร์ทางชีวเคมี เป็นต้นในงานวิจัยนี้สนใจศึกษาการสังเคราะห์พิโรลิดีนมอนอเมอร์ โดยการสังเคราะห์พิโรลิดีนมอนอเมอร์ตามวิธีของ Vilaivan และคณะ [Lowe *et al.*, 1997] พบว่าในการเตรียม diphenyldiazomethane นั้นทำโดยปฏิกิริยาออกซิเดชันของ benzophenonehydrazone ด้วย mercuric oxide (HgO) ซึ่งเป็นสารที่มีความเป็นพิษสูง ผู้วิจัยจึงได้สนใจพัฒนาวิธีในการเตรียม diphenyl diazomethane ซึ่งสามารถเตรียมได้หลายวิธี เช่น Paredes R. 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 และวิธีนี้ยังง่ายต่อการทำสเกลใหญ่เนื่องจากระบบของตัวออกซิไดซ์สามารถกรองออกได้ด้วยการกรองธรรมดา จึงง่ายต่อการทำปฏิกิริยาและ Oxone/Al₂O₃ นั้นมีราคาถูก และ Kang-Hyeok Lee และคณะ [Kang-Hyeok Lee *et al.*, 2006] ได้เตรียม diphenylmethyl ester จาก benzophenonehydrazone โดยได้ทำการเปลี่ยนสถานะต่างๆ เช่น วัสดุรองรับ (support) เช่น alumina และ silica gel ตัวออกซิไดซ์ เช่น KMnO₄ และ MnO₂ ผลการทดลองพบว่า การใช้อะลูมินาเป็น วัสดุรองรับให้ผลการทดลองที่ดีกว่าซิลิกาที่สถานะเดียวกัน และจากรายงานวิจัยการเตรียมพิโรลิดีนมอนอเมอร์ที่ใช้ตัวออกซิไดซ์ที่มีความเป็นพิษสูงและมีราคาแพง ในงานวิจัยนี้จึงศึกษาวิธีการเตรียม diphenylmethyl ester ของพิโรลิดีนมอนอเมอร์ให้เป็นวิธีที่หลีกเลี่ยงความเป็นพิษของปรอทโดยใช้รีเอเจนต์ชนิดอื่นที่หาได้ง่าย ราคาถูก มีความเป็นพิษน้อยและยังคงให้ผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณและความบริสุทธิ์สูง

2. วิธีการ

2.1 การสังเคราะห์พิโรลิดีนมอนอเมอร์



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*-butoxycarbonyl)-4-hydroxy-D-proline

ละลาย *cis*-4-hydroxy-D-proline (4.780 g, 36 mmol) ใน สารละลาย NaOH 25mL (2.162 g) และละลาย Boc₂O (9.603 g) ใน ^tBuOH 25 mL แล้วค่อยๆ หยดลงในสารละลายข้างต้น คนสารละลายประมาณ 12 ชั่วโมง แล้วระเหยตัวทำละลายออก จากนั้นเติมน้ำเล็กน้อยแล้วปรับ pH 2-3 ด้วย NaHSO₄ สกัดด้วย EtOAc 3 ครั้ง จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกแล้วตกผลึกด้วย 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 ในภาชนะที่มีฟอยล์หุ้มอยู่ จากนั้นเตรียม KMnO₄ 7.902 g (2 eq) ผสมลงใน Al₂O₃ 25 g แล้วค่อยๆ เทลงในสารละลายข้างต้น ปฏิกิริยาจะเกิดสมบูรณใน 2 ชั่วโมง เมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณเทสารละลายสีม่วงออก (ภาชนะที่รองรับต้องหุ้มด้วยฟอยล์) แล้วเติม Hexane เล็กน้อยเพื่อกลั้วสาร 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*-butoxycarbonyl)-4-hydroxy-D-proline (7.1597 g, 30 mmol) ใน EtOAc 50 ml แช่ในอ่างน้ำแข็งแล้วค่อยๆ 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

งานวิจัยนี้ได้สังเคราะห์พิโรลิดีนมมอนอเมอร์โดยเริ่มจากการทำให้เกิดปฏิกิริยาอิพิเมอไรเซชันของ *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 จากนั้นทำการเปลี่ยนหมู่กรดคาร์บอกซิลิกของอนุพันธ์ของพิโรลิดีนให้เป็นหมู่ไดฟีนิลเมทิลเอสเทอร์ โดยได้ทำการเตรียม diphenyl diazomethane ขึ้นมาก่อนโดย ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีในการเตรียม diphenyl diazomethane ซึ่งจากการสำรวจวิธีที่ได้มีการรายงานมาก่อนหน้านี้พบว่ามี 2 วิธีที่สามารถทำได้ง่าย ใช้สารที่มีราคาถูก และไม่มีความเป็นพิษ โดยวิธีแรกนั้นเป็นวิธีแบบ one-pot reaction ของ Curini M. และคณะ [Curini et al., 1997] ใช้ oxone ที่ตรึงลงบนอะลูมินาเป็นตัวออกซิไดซ์ benzophenone hydrazone และมี iodine เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาผลการทดลองพบว่า สารตั้งต้นที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาไม่สามารถทำปฏิกิริยาได้ทั้งหมด และสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นไม่มีความบริสุทธิ์ และได้ร้อยละของผลิตภัณฑ์ที่ต่ำ 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-proline diphenyl methyl ester โดยการใช้นิพแทสซีเอ็มเปออร์แมงกานีสไดออกไซด์ ได้ผลการทดลองที่ไม่แตกต่างกับการสังเคราะห์โดยวิธีต่างๆ ที่ได้มีการรายงานมาก่อนหน้านี้ ตามตารางการเปรียบเทียบผลผลิตร้อยละของการสังเคราะห์ *N-tert*-Butoxycarbonyl-*cis*-4-hydroxy-L-proline diphenyl methyl ester ด้วยวิธีที่ได้รายงานมาก่อนหน้านี้ดังตาราง 1

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

ลำดับ	เอกสารอ้างอิง	สภาวะ	% Yield
1	Paredes R. 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 , Phenyl iodine (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	Vilaivan 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 diphenyl methyl ester จากผลการทดลองพบว่าการสังเคราะห์ *N-tert*-Butoxycarbonyl-*cis*-4-hydroxy-L-proline diphenyl methyl ester โดยวิธีที่เตรียมขึ้นใหม่นี้ให้ผลการทดลองที่ไม่แตกต่างจากวิธีที่เคยรายงานมาก่อนหน้านี้คือได้ผลผลิตร้อยละอยู่ในช่วง 79-98 อีกทั้งวิธีนี้ยังช่วยลดความเป็นพิษของปฏิกิริยาได้เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีที่ใช้ mercuric oxide (HgO)

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.ธีรยุทธ วิไลวัลย์ ที่ได้ให้คำปรึกษาและเชื้อเพื่อสถานที่และสารเคมีในการทำวิจัยในครั้งนี้ ด้วยความเอาใจใส่ 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 KMnO₄ 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., Milias 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 stand displacement Thymine-substituted polyamide. *Science*, 254, 1497.
- ParedesR., 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.