โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ควอนตัมดอทที่ทำให้เสถียรด้วยพอลิเมอร์คอนจูเกตกับแมนโนสสำหรับการตรวจติดตามทางชีวภาพ

Quantum Dots Stabilized by Mannose-conjugated Polymer for Bioimaging Applications

ชื่อนิสิต นางสาวณัฐณิชา เลิศอมรมีสุข

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2558

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ควอนตัมดอทที่ทำให้เสถียรด้วยพอลิเมอร์คอนจูเกตกับแมนโนสสำหรับการตรวจติดตามทางชีวภาพ

Quantum Dots Stabilized by Mannose-conjugated Polymer for Bioimaging Applications

โดย

นางสาวณัฐณิชา เลิศอมรมีสุข

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เรื่อง ควอนตัมดอทที่ทำให้เสถียรด้วยพอลิเมอร์คอนจูเกตกับแมนโนสสำหรับการตรวจติดตามทางชีวภาพ

โดย นางสาวณัฐณิชา เลิศอมรมีสุข

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

P. Paduneyos .....ประธานกรรมการ

(อาจารย์ ดร.ภาณุวัฒน์ ผดุงรส)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร.วรวีร์ โฮเว่น)

พรรณี ลีลาดี .....กรรมการ

(อาจารย์ ดร.พรรณี ลีลาดี)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย พาราสุข)

หัวหน้าภาควิชาเคมี

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. .....

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ ☑ ดีมาก ☐ ดี ☐ พอใช้

ชื่อโครงการ ควอนตัมดอทที่ทำให้เสถียรด้วยพอลิเมอร์คอนจูเกตกับแมนโนสสำหรับการตรวจติดตามทางชีวภาพ
ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาวณัฐณิชา เลิศอมรมีสุข เลขประจำตัว 5533079023
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.วรวีร์ โฮเว่น
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2558

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีเป้าหมายที่จะเตรียมควอนตัมดอทที่ละลายน้ำและเข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิตที่สามารถตรวจติดตามเซลล์เป้าหมายที่มีความผิดปกติและมีตัวรับแมนโนสเป็นจำนวนมาก เริ่มจากการสังเคราะห์ 2'-aminoethyl-α-D-mannopyranoside จาก 1,2,3,4,6-penta-O-acetyl-D-mannopyranose ผ่านปฏิกิริยา 3 ขั้นตอน ได้แก่ ไกลโคซิเลชัน ปลดหมู่ปกป้อง และไฮโดรจิเนชัน จากนั้นนำอนุพันธ์แมนโนสที่สังเคราะห์ได้ไปคอนจูเกตกับพอลิ(เมทาคริลิกแอซิด-โค-2-เมทาคริโลอิลออกซีเอทิลฟอสโฟริลโคลีน) (PMAMPC) ที่มี degree of polymerization เป้าหมายเท่ากับ 100 และมีอัตราส่วนของโคมอนอเมอร์ (MA:MPC) เป็น 60:40 ซึ่งสังเคราะห์ผ่าน RAFT polymerization โดยใช้ ethyl(dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)/ N-hydroxysuccinimide (NHS) เป็นรีเอเจนต์คู่ควบทำให้ได้ PMAMPC-mannose พิสูจน์เอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้ในแต่ละขั้นตอนของการทำปฏิกิริยาด้วย ^{1}H NMR และ FT-IR spectroscopy เนื่องจากการมีเสถียรภาพต่ำของควอนตัมดอทเริ่มต้น ทำให้ไม่ประสบความสำเร็จในการเตรียมควอนตัมดอทที่ทำให้เสถียรด้วย PMAMPC-mannose ด้วยวิธีแลกเปลี่ยนลิแกนด์โดยใช้เอทานอลามีนเป็นลิแกนด์ติดอย่างอ่อนแบบชั่วคราว

คำสำคัญ : ควอนตัมดอท, เข้ากันได้ทางชีวภาพ, การแลกเลี่ยนลิแกนด์, ตัวรับแมนโนส

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Title Quantum Dots Stabilized by Mannose-conjugated Polymer for Bioimaging Applications

Student name Miss Natnicha Leardamonmeesuk ID 5533079023

Advisor name Associate Professer Voravee P. Hoven, Ph.D.

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University. Academic Year 2015

Abstract

This research aims to prepare water-soluble and biocompatible quantum dots (QDs) that are capable of targeting abnormal cells having enriched mannose receptors. 2'-Aminoethyl-α-D-mannopyranoside was first synthesized from 1,2,3,4,6-penta-O-acetyl-D-mannopyranose via 3-step reaction; glycosylation, deprotection, and hydrogenation. The synthesized mannose derivative was then conjugated with poly(methacrylic acid)-*co*-(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) (PMAMPC) having targeted degree of polymerization of 100 and comonomer ratio (MA:MPC) of 60:40 that was synthesized by RAFT polymerization employing ethyl(dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)/ N-hydroxysuccinimide (NHS) as coupling reagents and yielded PMAMPC-mannose. Chemical structures of all products obtained in each step of reactions were verified by ^{1}H NMR and FT-IR spectroscopy. Due to the low stability of the original QDs, we were unsuccessful in preparing QDs stabilized with PMAMPC-mannose via ligand exchange using ethanolamine as temporary soft-binding ligand.

Keywords: Quantum dots, biocompatible, ligand exchange, Mannose-receptor

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยความเมตตาอย่างยิ่งของ รองศาสตราจารย์ ดร.วรวีร์ โฮเว่น อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่เอื้อเฟื้อสถานที่ สารเคมี และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย อาจารย์ได้ให้ความรู้ คำอธิบายด้วยความเข้าใจ เสียสละเวลาในการให้ความช่วยเหลือ ตรวจทาน และแก้ไขข้อบกพร่องรวมทั้งปัญหาต่างๆ ในการทำงานวิจัยตลอดจนช่วยแก้ไขรายงานฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.ภาณุวัฒน์ ผดุงรส ที่ให้ความช่วยเหลือ ความสนใจ เอาใจใส่ในขั้นตอนการสังเคราะห์อนุพันธ์ของแมนโนส อีกทั้งสละเวลาให้เกียรติมาเป็นกรรมการสอบการวิจัยครั้งนี้ อาจารย์ ดร.นำพล อินสิน ที่ให้ความอนุเคราะห์ในส่วนของควอนตัมดอท และอาจารย์ ดร.พรรณี ลีลาดี ที่สละเวลาให้เกียรติมาเป็นกรรมการสอบการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้กรุณาถ่ายทอดความรู้ ประสบการณ์ และเทคนิคปฏิบัติการอันเป็นพื้นฐานสำคัญในการทำงานวิจัย ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนเครื่องมือและด้านทุนสนับสนุนสำหรับงานวิจัยทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลงได้

ขอขอบคุณนางสาวศศิธร รอดท่าไม้ นิสิตปริญญาเอก นางสาวพิมพ์อร ขุนสุข นิสิตปริญญาโท และพี่ๆ ในกลุ่มวิจัยของรองศาสตราจารย์ ดร.วรวีร์ โฮเว่น ที่ให้คำปรึกษาขณะทำงาน ช่วยเหลือในการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ข้อมูลด้วยเทคนิค NMR และ เครื่องมือ lyophilizer ขอขอบคุณนางสาวจมรพรรณ ยังเจริญยืนยง นิสิตปริญญาโทในกลุ่มวิจัยของอาจารย์ ดร.นำพล อินสิน ที่ช่วยสังเคราะห์ควอนตัมดอท รวมถึงอาจารย์และนิสิตท่านอื่นที่ได้เคยให้ความช่วยเหลือในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยขอระลึกถึงความกรุณาของทุกท่านที่กล่าวมาข้างต้นไว้ ณ ที่นี้

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ค
Abstract	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญรูปภาพ	ช
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
บทที่ 2 การทดลอง	10
2.1 วิธีการทดลองทั่วไป	10
2.2 วิธีการสังเคราะห์	11
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	18
3.1 การสังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุพันธ์ของแมนโนส (2'-Aminoethyl-α-D-mannopyranoside)	18
3.2 การสังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของโคพอลิเมอร์ PMAMPC ติดกับ 2'-aminoethyl-α-D-mannopyranoside	25
3.3 การเตรียมและพิสูจน์เอกลักษณ์ควอนตัมดอทที่ทำให้เสถียรด้วย PMAMPC-mannose โดยวิธีแลกเปลี่ยนลิแกนด์	30
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	31
เอกสารอ้างอิง	34
ประวัติผู้วิจัย	36

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ หน้า

1.1 โครงสร้างของ QDs-PMAMPC-2'-aminoethyl-α-D-mannopyranose 2

1.2 ระยะห่างระหว่าง energy band gap ที่มีการเปลี่ยนแปลงตามขนาดของควอนตัมดอท 3

1.3 การเรืองแสงของควอนตัมดอทมีความสัมพันธ์กับการดูดกลืนโฟตอน 3

1.4 การห่อหุ้ม poly(maleic anhydride alt-1-tetradecene) บนพื้นผิวของควอนตัมดอท 4

1.5 ขั้นตอนการสังเคราะห์ poly(para-methyl triphenylamine-b-cysteamine acrylamide) 5

1.6 ขั้นตอนการสังเคราะห์ triblock copolymer 5

1.7 การสังเคราะห์ลิแกนด์ที่มีหมู่ไทออลหลายหมู่ ของ PAA-g-MEA 6

1.8 การปรับปรุงพื้นผิวของทองด้วยโคพอลิเมอร์บรัชของ PMAMPC 7

1.9 อนุภาคนาโนของเงินที่ถูกทำให้เสถียรด้วย MPC 7

1.10 ควอนตัมดอทที่ปรับปรุงผิวด้วย PEGylated mannose/galactose (n = 45-50) 8

1.11 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของแมนโนสและห่อหุ้มผิวของอนุภาคนาโนซิลิกอน 9

2.1 สมการแสดงการสังเคราะห์ 2-azidoethanol 11

2.2 แสดงแผนภาพการสังเคราะห์อนุพันธ์ของแมนโนส (2'-Aminoethyl-α-D-mannopyranoside) 12

2.3 แผนภาพการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ PMAMPC ติดกับ 2'-aminoethyl-α-D-mannopyranose 14

2.4 แผนภาพแสดงการติด PMAMPC-2'-aminoethyl-α-D-mannopyranose กับ QDs 16

3.1 กลไกการสังเคราะห์ 2-azidoethanol 18

3.2 ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) สเปกตรัมของ 2-azidoethanol 19

3.3 IR สเปกตรัมของ 2-azidoethanol (ล่าง) และ 2-bromoethanol (บน) 19

3.4 สมการแสดงปฏิกิริยาการเตรียม 2'-azidoethyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-α-D-mannopyranoside 20

3.5 กลไกแสดงปฏิกิริยาการเตรียม 2'-azidoethyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-α-D-mannopyranoside 20

3.6 ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) สเปกตรัมของ 2'-azidoethyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-α-D-Mannopyranoside 21

3.7 IR (KBr disc) สเปกตรัมของ 2'-azidoethyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-α-D-mannopyranoside 22

3.8 ปฏิกิริยากำจัดหมู่แอซิทิล 22

3.9 กลไกแสดงปฏิกิริยากำจัดหมู่แอซิทิล โดยจากโครงสร้างที่ 1 กลไกในการกำจัดหมู่แอซิทิลที่เหลือมีลักษณะแบบเดียวกัน 23

3.10 ปฏิกิริยาแสดงการเปลี่ยนหมู่เอไซด์ให้เป็นหมู่แอมิโนโดยการทำปฏิกิริยา hydrogenation 23

3.11 ^{1}H NMR (400 MHz, D_2O) สเปกตรัมของ 2'-aminoethyl-α-D-mannopyranoside 24

3.12 IR (KBr disc) สเปกตรัมของ 2'-aminoethyl-α-D-mannopyranoside 24

3.13 ^{1}H NMR สเปกตรัมของ PMAMPC 25

รูปที่	หน้า
3.14 ปฏิกิริยาการเตรียม PMAMPC-mannose	26
3.15 กลไกการเกิดปฏิกิริยาในการเตรียม PMAMPC-mannose	27
3.16 ^{1}H NMR สเปกตรัมของ PMAMPC-mannose	28
3.17 IR สเปกตรัม ของ (a) 2'-Aminoethyl-α-D-mannopyranoside (b) PMAMPC และ (c) PMAMPC-mannose	29
3.18 ^{1}H NMR สเปกตรัมของ (a) PMAMPC (b) PMAMPC-mannose และ (c) 2'-Aminoethyl-α-D-mannopyranoside	29
3.19 (a) QDs ที่เหมาะสมในการเปลี่ยนเป็นลิแกนด์อ่อน (b) QDs ที่ไม่เหมาะสมในการเปลี่ยนเป็นลิแกนด์อ่อน ดูภายใต้ blacklight	30
3.20 (a) QDs ในสภาวะที่เหมาะสมในการเปลี่ยนลิแกนด์ (b) QDs หลังเปลี่ยนเป็นลิแกนด์อ่อน (c) ชั้นน้ำหลังเปลี่ยนเป็นลิแกนด์อ่อนดูภายใต้ blacklight	31

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

δ	chemical shift
CDCl3	deuterated chloroform
d	doublet
dd	doublet of doublet
DP	degree of polymerization
EDC	ethyl(dimethylaminopropyl) carbodiimide
IR	Infrared spectroscopy
m	multiplet
MA	methacrylic acid
mol.eq.	mol equivalent
MPC	2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine
NHS	N-hydroxysuccinimide
NMR	nuclear magnetic resonance
PBS	Phosphate buffer saline
PMAMPC	poly(methacrylic acid)-co-(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)
QDs	Quantum Dots
TLC	Thin Layer Chromatography
TOPO	trioctylphosphine oxide

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

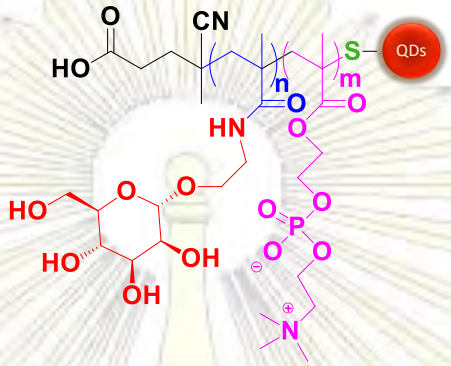
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงการ

ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์มีความพยายามอย่างยิ่งที่จะหาวิธีการตรวจติดตามเซลล์ที่มีความผิดปกติ เช่น เซลล์มะเร็งหรือเซลล์เนื้องอก เพื่อการตรวจวินิจฉัยในขั้นต้นและนำไปสู่การบำบัดรักษาที่เหมาะสม การตรวจติดตามเซลล์ด้วยเทคนิคทางฟลูออเรสเซนต์จึงมีบทบาทอย่างมาก วัสดุขนาดในระดับนาโนเมตรที่มีการนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยชนิดหนึ่งและได้รับความสนใจในปัจจุบัน คือ ควอนตัมดอท (quantum dots; QDs) ควอนตัมดอทเป็นอนุภาคอนินทรีย์ที่มีสมบัติเป็นสารกึ่งตัวนำ บางครั้งก็ถูกเรียกว่า ผลึกนาโน (nanocrystals) ประกอบขึ้นจากธาตุ หมู่ สอง-หก (II-VI) สาม-ห้า (III-V) และสี่-หก (IV-VI) ในตารางธาตุ เช่น แคดเมียมซีรีไนด์ (CdSe) แคดเมียมซัลไฟด์ (CdS) และแคดเมียมเทลลูไลด์ (CdTe) เป็นต้น มีความสามารถในการเปล่งแสงได้สว่างและยาวนาน ทำให้สามารถใช้ในการตรวจติดตามด้วยเทคนิคทางฟลูออเรสเซนต์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเนื่องจากมีขนาดเล็กมาก (2-10 นาโนเมตร หรือ 10-50 อะตอม) จึงสามารถนำเข้าสู่เซลล์ได้สะดวก อย่างไรก็ตามควอนตัมดอทมีข้อจำกัดในการใช้งาน เนื่องจากไม่ละลายน้ำและมีความเป็นพิษสูง การจะนำเอาควอนตัมดอทมาใช้กับเซลล์สิ่งมีชีวิต จึงมีความจำเป็นที่จะต้องทำให้ควอนตัมดอทละลายน้ำได้และไม่เป็นพิษ แนวทางหนึ่งที่สามารถใช้ในการดัดแปลงควอนตัมดอทให้มีสมบัติดังกล่าว คือการใช้สารทำให้เสถียร (stabilizer) ที่เป็นพอลิเมอร์ที่มีสมบัติเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatible) ซึ่งนอกจากจะช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำและลดความเป็นพิษได้แล้ว พอลิเมอร์ดังกล่าวควรจะมีหมู่ฟังก์ชันที่สามารถสร้างพันธะเคมีกับสารที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเซลล์เป้าหมายได้อีกด้วย

โครงการวิจัยนี้สนใจศึกษาการใช้โคพอลิเมอร์ของพอลิ(เมทาคริลิกแอซิด-โค-2-เมทาคริโลอิลออกซีเอทิลฟอสโฟริลโคลีน) (poly(methacrylic acid-co-2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine); PMAMPC) เป็นสารทำให้ควอนตัมดอทเสถียร เพื่อเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำและลดความเป็นพิษของควอนตัมดอท เนื่องจากโคพอลิเมอร์ดังกล่าวสามารถละลายน้ำได้ และมีสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพ ทั้งนี้ส่วนของ 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) เป็นส่วนที่แสดงสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพ ในขณะที่ส่วนของ methacrylic acid (MA) เป็นหมู่ฟังก์ชันที่สามารถรองรับการติดสารชีวโมเลกุลที่จำเพาะเจาะจงกับเซลล์เป้าหมายได้ ซึ่งในงานวิจัยนี้สนใจที่จะติดแมนโนส (mannose) ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุล

เดี่ยวที่มีความจำเพาะกับเซลล์มะเร็งบางชนิดที่มีตัวรับแมนโนส (mannose receptor) เป็นจำนวนมาก เช่น มะเร็งตับ มะเร็งที่ม้าม และมะเร็งเต้านม เป็นต้น



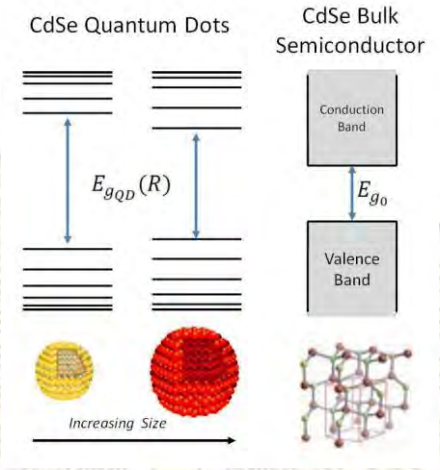
รูปที่ 1.1 โครงสร้างของ QDs-PMAMPC-2'-aminoethyl-α-D-mannopyranose

1.2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.2.1 สมบัติของควอนตัมดอท

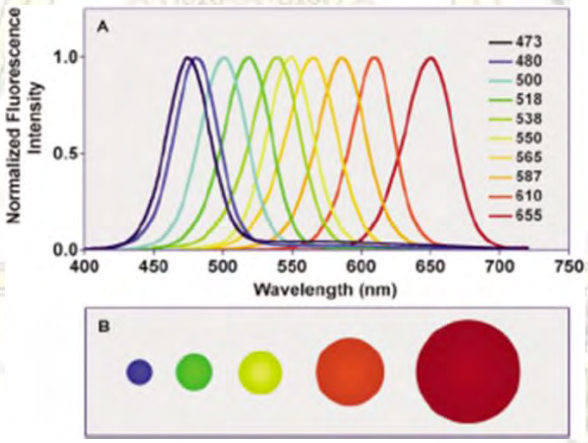
ควอนตัมดอท (quantum dots; QDs) หรือผลึกนาโน (nanocrystals) เป็นอนุภาคอนินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นสารกึ่งตัวนำ ประกอบขึ้นจากธาตุ หมู่ สอง-หก (II-VI) สาม-ห้า (III-V) และสี่-หก (IV-VI) ในตารางธาตุของเพอริออดิก (periodic table) มีลักษณะเป็นทรงกลมมีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 2-10 นาโนเมตร หรือ 10-50 อะตอม มีความสามารถในการเรืองแสงได้เนื่องจากอิเล็กตรอนที่อยู่ภายในโครงสร้างขนาดนาโนของควอนตัมดอทถูกจำกัดบริเวณการเคลื่อนที่ทั้งสามมิติไว้ (quantum confinement) ทำให้ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้อย่างอิสระ การที่อิเล็กตรอนถูกจำกัดบริเวณนี้ ทำให้เกิดการส่งผ่านพลังงานแบบไม่ต่อเนื่อง หรือเกิดเป็นพลังงานแบบควอนตัม ซึ่งค่าระดับพลังงานของอิเล็กตรอนภายในควอนตัมดอทนี้ขึ้นอยู่กับขนาดและสัมพันธ์กับการมองเห็นสีของควอนตัมดอท โดยควอนตัมดอทจะมีขนาดใกล้เคียงกับพลังงานของช่องว่างระหว่างชั้นพลังงาน (energy band gap) ควอนตัมดอทที่มีขนาดใหญ่จะมีช่องว่างระหว่างแถบพลังงานต่ำ (valence band) และแถบพลังงานสูง (conduction band) แคบ ทำให้มีพลังงานต่ำจะอยู่ในช่วงสีแดง ในทางกลับกัน ควอนตัมดอทที่มีขนาดเล็ก ช่องว่างระหว่างแถบพลังงานต่ำ (valence band) และแถบพลังงานสูง (conduction band) จะกว้างกว่า ทำให้มีพลังงานสูงจะอยู่ในช่วงแสงสีน้ำเงิน

คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1.2 ระยะห่างระหว่าง energy band gap ที่มีการเปลี่ยนแปลงตามขนาดของควอนตัมดอท [1]

ดังนั้นการเรืองแสงของควอนตัมดอทจึงขึ้นอยู่กับขนาด ควอนตัมดอทที่มีขนาดใหญ่จะเรืองแสงอยู่ในช่วงขอบเขตของสีแดง เนื่องจากอิเล็กตรอนภายในควอนตัมดอทนั้นมีช่องว่างระหว่างระดับพลังงานแคบลง ทำให้ควอนตัมดอทดูดกลืนโฟตอนที่มีความยาวคลื่นมากพลังงานต่ำ จึงมีสีที่อยู่ในช่วงด้านปลายของสเปกตรัมสีแดง (red shift) และควอนตัมดอทที่มีขนาดที่เล็กลงลดหลั่นกันลงมาจะมีการดูดกลืนโฟตอนที่มีความยาวคลื่นสั้นลงจึงเรืองแสงอยู่ในขอบเขตของสีน้ำเงิน (blue shift)

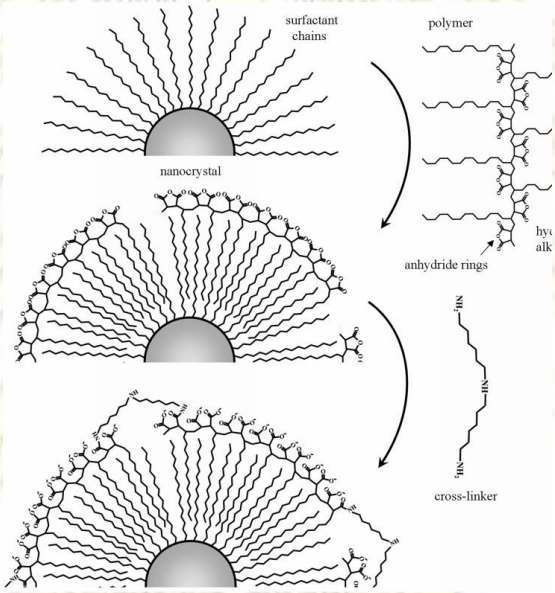


รูปที่ 1.3 การเรืองแสงของควอนตัมดอทมีความสัมพันธ์กับการดูดกลืนโฟตอน [2]

ด้วยสมบัตินี้ควอนตัมดอทจึงถูกนำมาใช้ในงานที่หลากหลาย เช่น ใช้เป็นอุปกรณ์เปล่งแสง อุปกรณ์การตรวจวัดด้วยแสง อุปกรณ์ทางด้านเซลล์แสงอาทิตย์ และทางด้านชีววิทยา โดยทางด้านชีววิทยาควอนตัมดอทถูกใช้ในการตรวจติดตามพิมพ์ถ่ายภาพภายในเซลล์ ช่วยให้การศึกษามีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ซึ่งมีความสำคัญในงานวิจัยหลายด้าน เช่น วิทยาเอ็มบริโอ มะเร็ง เนื้องอก การบำบัดด้วยสเตมเซลล์ และระบบภูมิคุ้มกัน

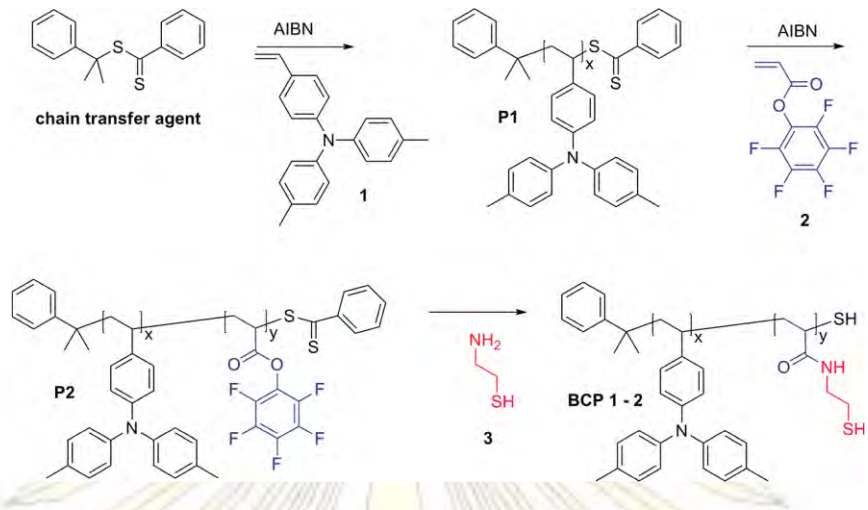
1.2.2 ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการทำควอนตัมดอทให้เสถียรด้วยพอลิเมอร์มีดังนี้

ในปี ค.ศ. 2004 Pellegrino และคณะ [3] พัฒนาวิธีการปรับปรุงพื้นผิวของควอนตัมดอท เพื่อให้สามารถละลายน้ำได้ โดยใช้พอลิเมอร์ที่มีสมบัติเป็นแอมฟิฟิลิก (amphiphilic polymer) ของ poly(maleic anhydride alt-1-tetradecene) น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์คือ 7,300 ที่มีทั้งส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) ติดเข้ากับควอนตัมดอทที่เคลือบด้วย trioctylphosphine (TOP) พอลิเมอร์จะหันด้านที่ชอบน้ำออกหาน้ำ ช่วยให้ควอนตัมดอทสามารถละลายในน้ำได้ นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำการติด bis(6-aminohexyl)amine ทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมประสาน (cross-linker) เพื่อเป็นการเพิ่มความเสถียรของชั้นพอลิเมอร์ที่ติดลงบนพื้นผิวควอนตัมดอท ซึ่งวิธีการสังเคราะห์ดังกล่าวสามารถทำได้ง่าย ทำให้พอลิเมอร์มีความเสถียรมากขึ้นในน้ำ



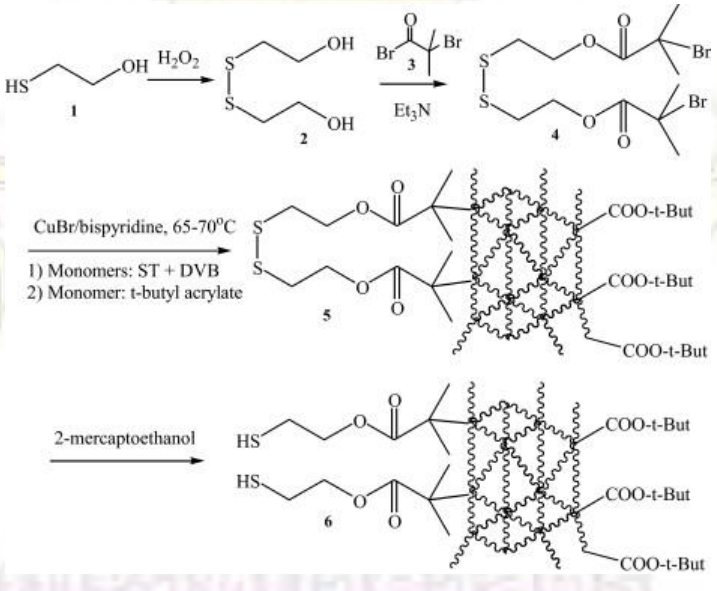
รูปที่ 1.4 การห่อหุ้ม poly(maleic anhydride alt-1-tetradecene) บนพื้นผิวของควอนตัมดอท [3]

ในปี ค.ศ. 2009 Zorn และคณะ [4] ได้ทำการปรับปรุงควอนตัมดอทด้วยพอลิเมอร์ที่มีสมบัติทางไฟฟ้าเป็นพอลิเมอร์กึ่งตัวนำ โดยเคลือบผิวของควอนตัมดอทด้วย block copolymer (BCP) ของ poly(para-methyl triphenylamine-b-cysteamine acrylamide) ซึ่งมีหมู่ –SH ทำหน้าที่เป็นตัวจับผิวควอนตัมดอทด้วยวิธีแลกเปลี่ยนลิแกนด์ ทำให้ควอนตัมดอทที่ได้มีความสามารถในการละลายและเป็นคอลลอยด์ที่เสถียร นอกจากนี้ยังช่วยคงความสามารถในการเรืองแสงของควอนตัมดอทอีกด้วย



รูปที่ 1.5 ขั้นตอนการสังเคราะห์ poly(para-methyl triphenylamine-b-cysteamine acrylamide) [4]

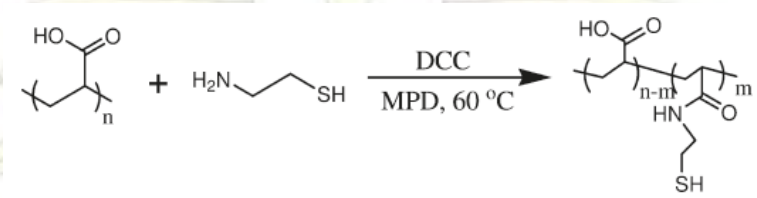
ในปี ค.ศ. 2010 Tongxin และคณะ [5] ได้พัฒนา triblock copolymer เพื่อเคลือบบนผิวของควอนตัมดอทที่ทำให้เสถียรด้วย trioctylphosphine oxide (TOPO-QDs) ด้วยวิธีแลกเปลี่ยนลิแกนด์ โดยโคพอลิเมอร์ทำหน้าที่เป็น multidentate polymer ประกอบด้วย (1) polythiol block ซึ่งจะมีหมู่ -SH ทำหน้าที่จับกับผิวของควอนตัมดอท ทำให้ควอนตัมดอทมีเสถียรภาพมากขึ้น (2) cross-linked hydrophobic block ซึ่งส่วนที่ไม่ชอบน้ำจะห่อหุ้มควอนตัมดอทไว้ ป้องกันการสลายตัวของควอนตัมดอท ด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสหรือเอนไซม์ และ (3) polycarboxylic acid block เป็นส่วนที่เพิ่มความสามารถในการละลายน้ำและเป็นหมู่ฟังก์ชันที่สามารถใช้จับกับยาเพื่อขนส่งไปในเซลล์ได้



รูปที่ 1.6 ขั้นตอนการสังเคราะห์ triblock copolymer [5]

ในปี ค.ศ. 2010 Liu และคณะ [6] ได้สังเคราะห์ลิแกนด์ที่มีปริมาณหมู่ไทออล (thiol group) จำนวนมากในโซ่พอลิเมอร์ (multidentate polymer ligand) ซึ่งจะใช้ในการเคลือบผิวควอนตัมดอท เพื่อช่วยในการ

ติดและเพื่อเพิ่มความเสถียรของควอนตัมดอทในน้ำ โดยเตรียมจากปฏิกิริยาระหว่าง poly(acrylic acid) (PAA) และ mercaptoethylamine (MEA) โดยใช้ dicyclohexylcarbodiimide (DCC) เป็นรีเอเจนต์คู่ควบ จากการทดลองพบว่าทำให้ได้ควอนตัมดอทที่มีเสถียรภาพในช่วง pH 3-14 และมีการเรืองแสงที่ยาวนาน นอกจากนี้การเคลือบด้วย PAA ทำให้ควอนตัมดอทมีขนาดเล็กลง และการมีหมู่คาร์บอกซิลของ PAA ทำให้สามารถนำไปติดกับสารชีวโมเลกุลต่อได้อีกด้วย

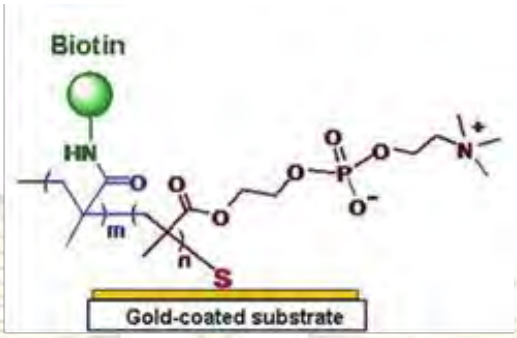


รูปที่ 1.7 การสังเคราะห์ลิแกนด์ที่มีหมู่ไทออลหลายหมู่ ของ PAA-g-MEA [6]

พอลิเมอร์ที่เตรียมจาก 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) เป็นพอลิเมอร์ละลายน้ำที่มีสมบัติในการเข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิต [7,8,9] และยังไม่พบการศึกษาในการนำมาใช้เคลือบควอนตัมดอทเพื่อเพิ่มการละลายน้ำและลดความเป็นพิษ เป็น ตัวอย่างงานวิจัยที่มีการนำพอลิเมอร์ดังกล่าวไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาวัสดุทางการแพทย์มีดังนี้

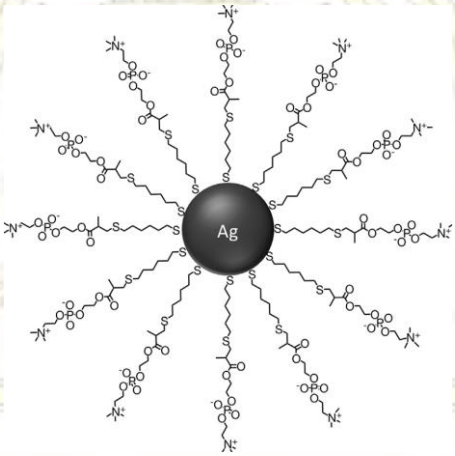
ในปี ค.ศ. 2008 Goto และคณะ [7] ได้ทำการเตรียมอนุภาค poly(L-lactic acid) (PLA) ขนาดนาโนเมตร ที่มีการปรับปรุงพื้นผิวด้วยโคพอลิเมอร์ของ 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) n-butyl methacrylate (BMA) และ *p*-nitrophenyloxycarbonyl poly(ethylene glycol) methacrylate (MEONP) เพื่อการเลือกจับอย่างจำเพาะเจาะจงกับโปรตีนตัวอย่างในของผสมของโปรตีน โดยจะตรึง anti-BSA เข้ากับโคพอลิเมอร์โดยการทำปฏิกิริยากับหมู่ active ester ในส่วนของ MEONP โดย anti-BSA ที่ตรึงจะจับกับโปรตีน BSA ในของผสม ส่วนของ MPC จะช่วยลดการยึดเกาะอย่างไม่จำเพาะเจาะจงของโปรตีนตัวอื่นในของผสม ทำให้ anti-BSA ที่ตรึงจับกับ BSA ได้อย่างจำเพาะเจาะจง และมีประสิทธิภาพมากขึ้น

ในปี ค.ศ. 2012 Akkahat และคณะ [8] ได้ทำการปรับปรุงพื้นผิวทองด้วยโคพอลิเมอร์บรัชของ 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) และ methacrylic acid (MA) (PMAMPC) เนื่องจากโคพอลิเมอร์ดังกล่าวประกอบด้วยส่วนของ MA ที่สามารถใช้ในการตรึงโพรบผ่านการสร้างพันธะโควาเลนต์ และส่วนของ MPC ที่มีความเข้ากันได้ดีทางชีวภาพและมีสมบัติลดการยึดเกาะแบบไม่จำเพาะ ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการตรึงโพรบ คือ ไบโอติน และศึกษาการจับยึดกับ avidin ใน 0.14% blood plasma



รูปที่ 1.8 การปรับปรุงพื้นผิวของทองด้วยโคพอลิเมอร์บรัชของ PMAMPC [8]

ในปี ค.ศ. 2015 Sangsuwan และคณะ [9] ได้ทำการปรับปรุงพื้นผิวอนุภาคนาโนของเงินด้วยพอลิเมอร์บรัชของ 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) ที่ดัดแปลงให้มีหมู่ไทออลที่ปลายโดยการเติม 1,6-hexanedithiol เกิดเป็น thiolated-2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC-SH) ซึ่งสามารถสร้างพันธะกับพื้นผิวของอนุภาคนาโนของเงินเกิดเป็น MPC-AgNPs เพื่อลดความเป็นพิษทำให้มีความเข้ากันได้กับเซลล์ดียิ่งขึ้น และช่วยให้สามารถกระจายตัวได้อย่างเสถียร ถูกนำไปใช้ในการฆ่าเซลล์เนื้องอก

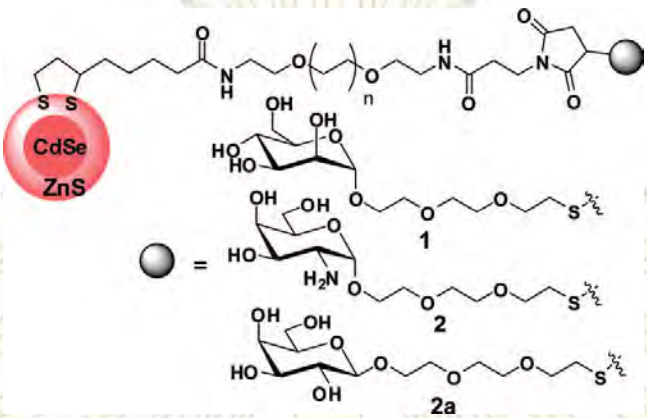


รูปที่ 1.9 อนุภาคนาโนของเงินที่ถูกทำให้เสถียรด้วย MPC [9]

ตัวอย่างงานวิจัยที่มีการใช้แมนโนสเพื่อจับอย่างจำเพาะเจาะจงกับเซลล์เป้าหมาย

ในปี ค.ศ. 2009 Kikkeri และคณะ [10] ได้ทำการปรับปรุงพื้นผิวอนุภาคของควอนตัมดอทด้วย poly(ethylene glycol) ที่ติดกับอนุพันธ์ของแมนโนส (PEGylated mannose) และอนุพันธ์ของกาแล็กโตส (PEGylated galactose) เพื่อเพิ่มความสามารถในการจับแบบจำเพาะเจาะจงกับเนื้อตายของเซลล์ตับที่มีปริมาณของ mannose receptor และ asialoglycoprotein receptor (ASGP-R) มากกว่าเซลล์ปกติ งานวิจัยนี้ได้ทำการทดลองทั้งเซลล์ที่เลี้ยงในหลอดทดลองและในหนู พบว่าควอนตัมดอทหลังปรับปรุงพื้นผิวด้วยอนุพันธ์ของแมนโนสจะจับแบบจำเพาะกับตัวรับแมนโนส (mannose receptor) ที่พบมากบนเซลล์

Kupffer และเซลล์ endothelial ในตับ ส่วนควอนตัมดอทหลังปรับปรุงด้วยอนุพันธ์ของกาแล็กโตสจะจับแบบจำเพาะกับ asialoglycoprotein receptor (ASGP-R)

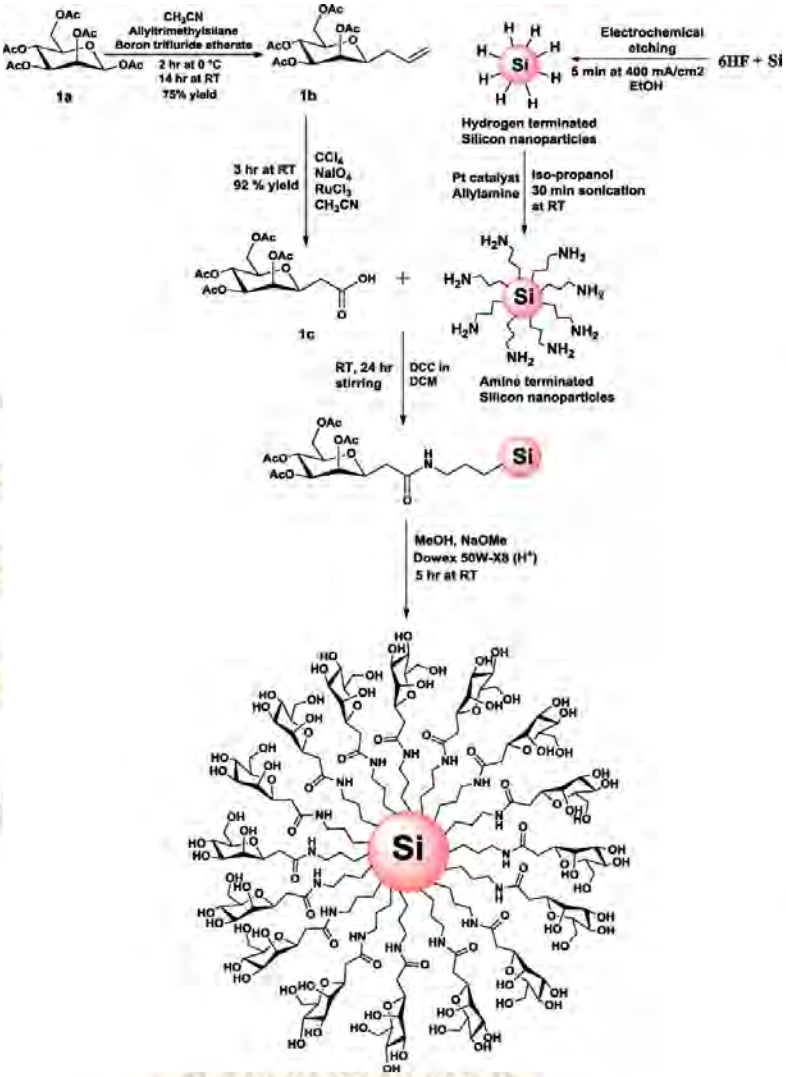


รูปที่ 1.10 ควอนตัมดอทที่ปรับปรุงผิวด้วย PEGylated mannose/galactose (n = 45-50) [10]

ในปี ค.ศ. 2013 Zhu และคณะ [11] ได้นำอนุภาคนาโนที่ห่อหุ้มพื้นผิวด้วย poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) มาปรับปรุงด้วยแมนโนสเพื่อใช้ในการตรวจติดตามและรักษาเซลล์เนื้องอก โดยการเลือกจับอย่างจำเพาะกับตัวรับแมนโนส พบว่าอนุภาคนาโนหลังจากปรับปรุงด้วยแมนโนสมีความสามารถในการจับกับ tumor-associated macrophages (TAMs) ซึ่งเป็นเซลล์ที่สามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็งหรือเนื้องอกได้

ในปี ค.ศ. 2013 Ahire และคณะ [12] ได้ปรับปรุงอนุภาคนาโนของซิลิกอนให้มีความสามารถในการจับแบบจำเพาะเจาะจงกับพื้นผิวบริเวณที่เป็นมะเร็ง เพื่อใช้ในการตรวจติดตามเซลล์มะเร็งเต้านม โดยการห่อหุ้มพื้นผิวของอนุภาคดังกล่าวด้วยอนุพันธ์ของแมนโนส คือ 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-D-mannopyranosyl acid โดยติดกับอนุภาคนาโนของซิลิกอนที่สังเคราะห์ให้พื้นผิวมีหมู่เอมีน ผ่านปฏิกิริยา amination โดยอนุพันธ์ของแมนโนสสามารถจับแบบจำเพาะกับ MCF-7 ที่พบเป็นปริมาณมากในเซลล์มะเร็งเต้านม

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1.11 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของแมนโนสและห่อหุ้มผิวของอนุภาคนาโนซิลิกอน [12]

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

การทดลอง

2.1 วิธีการทดลองทั่วไป

2.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. การชั่งน้ำหนักสารทุกชนิดใช้เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง จาก Precisa รุ่น XT 220A
2. ไมโครปิเปตขนาด 10, 100, 1,000 ไมโครลิตร จาก Acura รุ่น 825, Socorex และ Gilson
3. การระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ใช้เครื่อง rotary evaporator จาก Buchi Rotavapor รุ่น R-200 ประกอบกับอ่างน้ำร้อนจาก Buchi รุ่น B-490 ใช้ปั๊มน้ำจาก Sibata รุ่น WJ-20 และเครื่องหล่อเย็นจาก Julabo รุ่น F-33
4. การตั้งปฏิกิริยาใช้เครื่องกวนแบบให้ความร้อนจาก IKA C-MAG รุ่น HS 7
5. เครื่องดูดสุญญากาศจาก LABCONCO รุ่น 117
6. การระเหยตัวทำละลายน้ำด้วยเทคนิค lyophilization ใช้เครื่อง freeze dryer จาก Labconco รุ่น 77535-01
7. การติดตามปฏิกิริยาด้วยเทคนิค thin layer chromatography (TLC) ใช้แผ่น thin layer chromatography จาก MERCK ที่ใช้ silica gel 60 F_{254} เคลือบบนแผ่นอะลูมิเนียม
8. การทำสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography ใช้ silica gel ขนาด 60 mesh จาก Merck เป็นเฟสคงที่
9. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic resonance (^{1}H NMR) ทำโดยใช้ deuterated solvent ที่เหมาะสมละลายสารตัวอย่างและวัดโดยเครื่อง Varian Mercury-400 ที่ความถี่ 400 MHz สำหรับ ^{1}H NMR
10. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารด้วยเทคนิค Infrared spectroscopy วัดด้วยเครื่อง Infrared spectrometer จาก Thermo Scientific Nicolet 6700 FT-IR

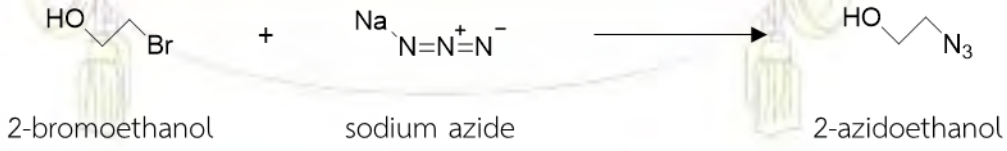
2.1.2 สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุพันธ์ของแมนโนสและโคพอลิเมอร์ของ PMAMPC เป็น reagent grade จาก Sigma-Aldrich, Merck, Fluka และ Acros ได้แก่ 1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl-D-mannopyranose, 2-bromoethanol, $BF_3.OEt_2$, sodium azide, methacrylic acid (MA), 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC), 4,4'-Azobis(4-cyanovaleric acid), 4-Cyanopentanoic acid dithiobenzoate, hydrazine monohydrate,10 x Phosphate buffered saline (10x PBS), ethyl(dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) และ n-hydroxysuccinimide (NHS)
2. ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้เป็นเกรด analytical grade จาก Carlo Erba, RCI Labscan และ Emsure ได้แก่ acetone, ethanol, ether, ethyl acetate, dichloromethane (DCM), hexane และ methanol
3. TLC stain ที่ใช้ ได้แก่ *p*-anisaldehyde และ ninhydrin

2.2 วิธีการสังเคราะห์

ขั้นที่ 1 การสังเคราะห์ 2-Azidoethanol

แสดงดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 สมการแสดงการสังเคราะห์ 2-azidoethanol

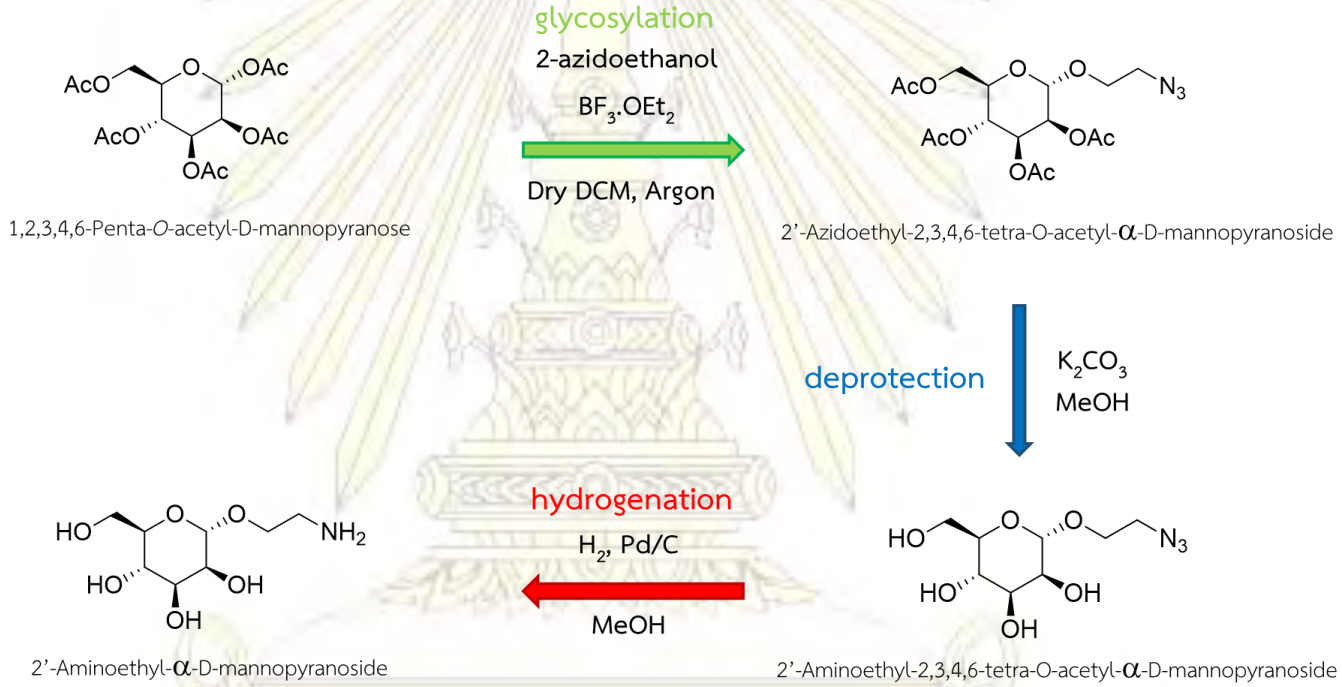
ชั่ง 2-bromoethanol ลักษณะเป็นของเหลวใสไม่มีสี ปริมาณ 31.8916 กรัม (0.2552 โมล, 1 eq.) และ sodium azide ลักษณะเป็นของแข็งละเอียดสีขาว ปริมาณ 32.6270 กรัม (0.5019 โมล, 2 eq.) ละลาย sodium azide ในน้ำ 100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดก้นกลม เติม 2-bromoethanol และใส่แท่งแม่เหล็กคน โดยให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ในระบบเปิดโดยใช้อ่างน้ำมัน จากนั้นทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปสกัดด้วย diethyl ether 3 ครั้ง ด้วยกรวยแยก และเก็บชั้นสารอินทรีย์แล้วระเหยตัวทำ

ละลายออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นของเหลวใสไม่มีสี ปริมาณ 13.9589 กรัม (ประมาณ 13 มิลลิลิตร, 0.1603 โมล) คิดเป็น 63% yield พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิค ^{1}H NMR (รูปที่ 3.2) และ IR (รูปที่ 3.3 (ล่าง))

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, รูปที่ 3.2): d (ppm) 3.4 (t, 2H, CH_2N_3), 3.7 (t, 2H, CH_2O)

IR (KBr disc, รูปที่ 3.3 (ล่าง)): 3370 cm^{-1} (broad, O-H) and 2100 cm^{-1} (N_3)

ขั้นที่ 2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของแมนโนส (2'-Aminoethyl-α-D-mannopyranoside) แสดงดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 แผนภาพการสังเคราะห์อนุพันธ์ของแมนโนส (2'-Aminoethyl-α-D-mannopyranoside)

Glycosylation

กลั่น anh. dichloromethane โดยเผาขวดก้นกลมพร้อมแท่งแม่เหล็กคน และ molecular sieve ด้วยกระบวนการ flame-dried glassware และเผาขวดก้นกลมพร้อมแท่งแม่เหล็กคน และ molecular sieve ด้วย flame-dried process ถ่ายแท่งแม่เหล็กคน และ molecular sieve ใส่ในขวด vial ไล่อากาศด้วยการเป่าก๊าซอาร์กอนปิดฝาขวดให้แน่น นำขวดก้นกลมมาเติม 1,2,3,4,6-penta-D-acetyl-D-mannopyranose ลักษณะเป็นของแข็งละเอียดสีขาว ปริมาณ 2.0137 กรัม (5.12 มิลลิโมล, 1 eq.) เพื่อนำไปทำ azeotrope ไล่ความชื้น ละลายใน anh. dichloromethane 51.2 มิลลิลิตร (0.1 M) เติมแท่งแม่เหล็กคน และ molecular sieve ด้วยความรวดเร็ว เป่าก๊าซอาร์กอนไล่อากาศ ปิดปากขวดก้นกลมด้วย

septum พันทับด้วยลวด เทปดำ พาราฟิล์ม และปักลูกโป่งที่บรรจุแก๊สอาร์กอนเพื่อให้อยู่ภายใต้บรรยากาศอาร์กอน แล้วเติม 2-azidoethanol ปริมาณ 0.6490 มิลลิลิตร (8.20 มิลลิโมล, 1.6 eq.) ลงในขวดก้นกลมโดยใช้กระบอกฉีดยา จากนั้นแช่ขวดก้นกลมในอ่างน้ำแข็ง เติม $BF_3.OEt_2$ ปริมาณประมาณ 2.6 มิลลิลิตร (27.65 มิลลิโมล, 5.4 eq.) ลงในขวดก้นกลมโดยใช้กระบอกฉีดยาแก้วในขณะที่แช่ในอ่างน้ำแข็ง คนสารละลายเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำขวดก้นกลมออกจากอ่างน้ำแข็งและคนสารละลายที่อุณหภูมิห้องต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ ethyl acetate:hexanes อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ตรวจสอบตำแหน่งของผลิตภัณฑ์ด้วย UV lamp และนำไปจุ่มใน *p*-anisaldehyde แล้วนำไปเผา ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลายอิ่มตัว $NaHCO_3$ จากนั้นทำการสกัดด้วย $NaHCO_3$ 2 ครั้ง โดยใช้กรวยแยก เก็บชั้นสารอินทรีย์ ล้างชั้นสารอินทรีย์ด้วยสารละลายอิ่มตัว NaCl และน้ำ ดึงน้ำที่เหลือออกด้วย Na_2SO_4 จากนั้นระเหยตัวทำละลายโดยใช้เครื่อง rotary evaporator จะได้ crude ลักษณะของเหลวหนืดสีเหลืองเข้ม ปริมาณ 2.3283 กรัม จากนั้นทำสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography โดยวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมในการแยก คือ ethyl acetate:hexane อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตรผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดใสสีเหลืองอ่อน ปริมาณ 1.3405 กรัม คิดเป็น 62% yield พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิค ^{1}H NMR (รูปที่ 3.6) และ IR (รูปที่ 3.7)

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, รูปที่ 3.6): d (ppm) 1.99, 2.03, 2.04, 2.10 (12H, s, Me); 3.40-3.49 (2H, m, $OCH_2\underline{CH_2}N_3$); 3.53-3.69 (1H, m, $O\underline{CH_2}CH_2N_3$); 3.83-3.89 (1H, m, $O\underline{CH_2}CH_2N_3$); 3.96-4.02 (1H, m, H5); 4.03-4.11 (1H, dd, $\underline{CH_2}OCH_3$); 4.80 (1H, d, H1); 5.21-5.28 (3H, m, H2, 3, 4)

IR (KBr disc, รูปที่ 3.7): 2100 cm^{-1} (N_3)

Deprotection

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ข้างต้นปริมาณ 1.0053 กรัม (2.385 มิลลิโมล, 1 eq.) ใส่ในขวดก้นกลม เติม MeOH ปริมาณ 47.7 มิลลิลิตร (0.05 M) และแท่งแม่เหล็ก ตั้งคนจนสารละลายหมด เติม K_2CO_3 ปริมาณ 1.65 กรัม (11.93 มิลลิโมล, 5 eq.) ปิดปากขวดก้นกลมด้วยจุกยาง คนสารละลายเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการกรอง K_2CO_3 ออกโดยการใช้กระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นสารละลายหนืดใสสีเหลืองอ่อน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

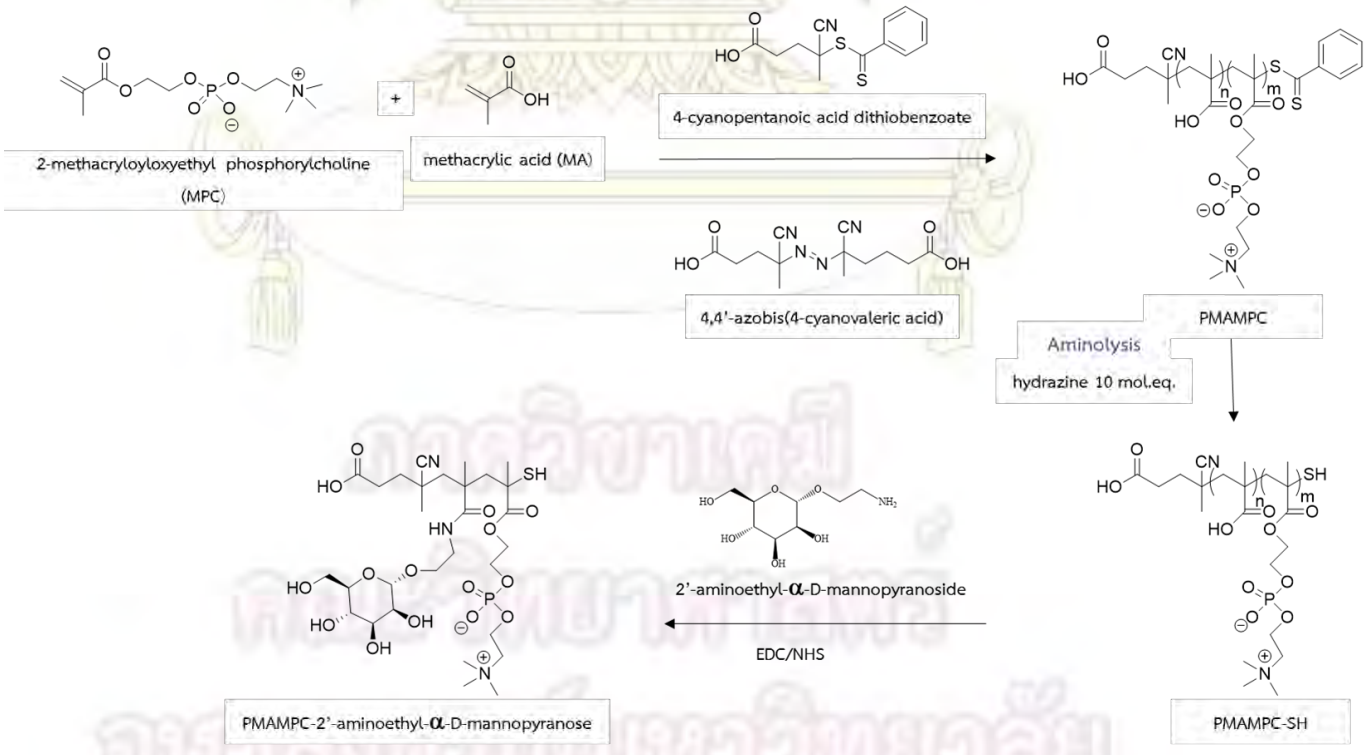
Hydrogenation

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ข้างต้นมาละลายใน MeOH ปริมาณ 24 มิลลิลิตร (0.1 M) ในขวดก้นกลม เติม 10% Pd/C 50 มิลลิกรัม และเติมแท่งแม่เหล็ก ปิดปากขวดโดยใช้จุกยางและตั้งคน จากนั้นเติมแก๊ส H_2 โดยใช้ลูกโป่ง 2 ลูก เพื่อให้มั่นใจว่าอากาศในขวดก้นกลมถูกแทนที่ด้วยแก๊ส H_2 คนสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยปักลูกโป่ง H_2 ค้างไว้ ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิค TLC โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น MeOH:DCM ในอัตราส่วน 1:10 โดยปริมาตร ตรวจสอบตำแหน่งโดยการเผาใน ninhydrin จากนั้นกรอง Pd/C โดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator ได้ผลิตภัณฑ์ลักษณะของเหลวหนืดใสสีเหลืองอ่อน ปริมาณ 0.3381 กรัม คิดเป็น 63.16 %yield พิสูจน์เอกลักษณ์โดยเทคนิค ^{1}H NMR (รูปที่ 3.11) และ IR (รูปที่ 3.12)

^{1}H NMR (400 MHz, D_2O, รูปที่ 3.11): d (ppm) 1.90 (4H, s, OH); 3.04 (2H, d, $\underline{CH_2}OH$); 3.31 (2H, s, NH_2); 3.49-3.89 (4H, m, H2, 3, 4, 5); 4.78 (1H, s, H1)

IR (KBr disc, รูปที่ 3.12): 3000-3500 cm^{-1} (broad, O-H)

ขั้นที่ 3 การสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ PMAMPC ติดกับ 2'-aminoethyl-α-D-mannopyranose แสดงดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 แผนภาพการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ PMAMPC ติดกับ 2'-aminoethyl-α-D-mannopyranose

การสังเคราะห์ PMAMPC

ต้มน้ำ milliQ ใน vial จนเดือด จับเวลา 10 นาที ปิดฝา vial ด้วย septum เป่าแก๊สไนโตรเจนลงในน้ำ milliQ จนเย็น พร้อมทั้งนำ EtOH ใส่ใน vial อีกขวดหนึ่ง ปิดด้วย septum แล้วเป่าไนโตรเจนเพื่อไล่อากาศ ชั่ง 4,4'-azobis(4-cyanovaleric acid) (Initiator) ปริมาณ 0.0052 กรัม (0.0186 มิลลิโมล) ใน vial และตามด้วย 4-cyanopentanoic acid dithiobenzoate (RAFT reagent) 0.0210 กรัม (0.0752 มิลลิโมล)ชั่ง MPC 0.8850 กรัม (2.993 มิลลิโมล) ใน vial อีกขวดหนึ่ง เติมน้ำ milliQ 1,683 ไมโครลิตร EtOH 1,870 ไมโครลิตร 10x PBS 187 ไมโครลิตร และ MA 380.6 ไมโครลิตร ใส่แท่งแม่เหล็กปิดขวดด้วย septum ตั้งคนจนสารละลายหมด จากนั้นปิเปตต์สารละลายไปใส่ใน vial ที่มี Initiator และ RAFT reagent อยู่ ใส่แท่งแม่เหล็ก ปิดด้วย septum เป่าสารละลายด้วยแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 30 นาที ตั้งปฏิกิริยาในอ่างน้ำมัน ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้ว dialysis สารละลายที่ได้ในน้ำเป็นเวลา 4 วัน เปลี่ยนน้ำ DI วันละ 2 ครั้ง เช้า เย็น โดยเก็บสารตัวอย่างก่อนทำ dialysis ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อนำไปหา %conversion นำสารที่ได้ไปกำจัดน้ำออกด้วยเทคนิค lyophilization ใช้เครื่อง freeze dryer ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นของแข็งมีลักษณะเป็นปุยสีส้มอ่อน ปริมาณ 0.8597 กรัม มี total units = 95 units, MPC units = 42 units และ MA = 53 units

Reduction of dithiobenzoate group

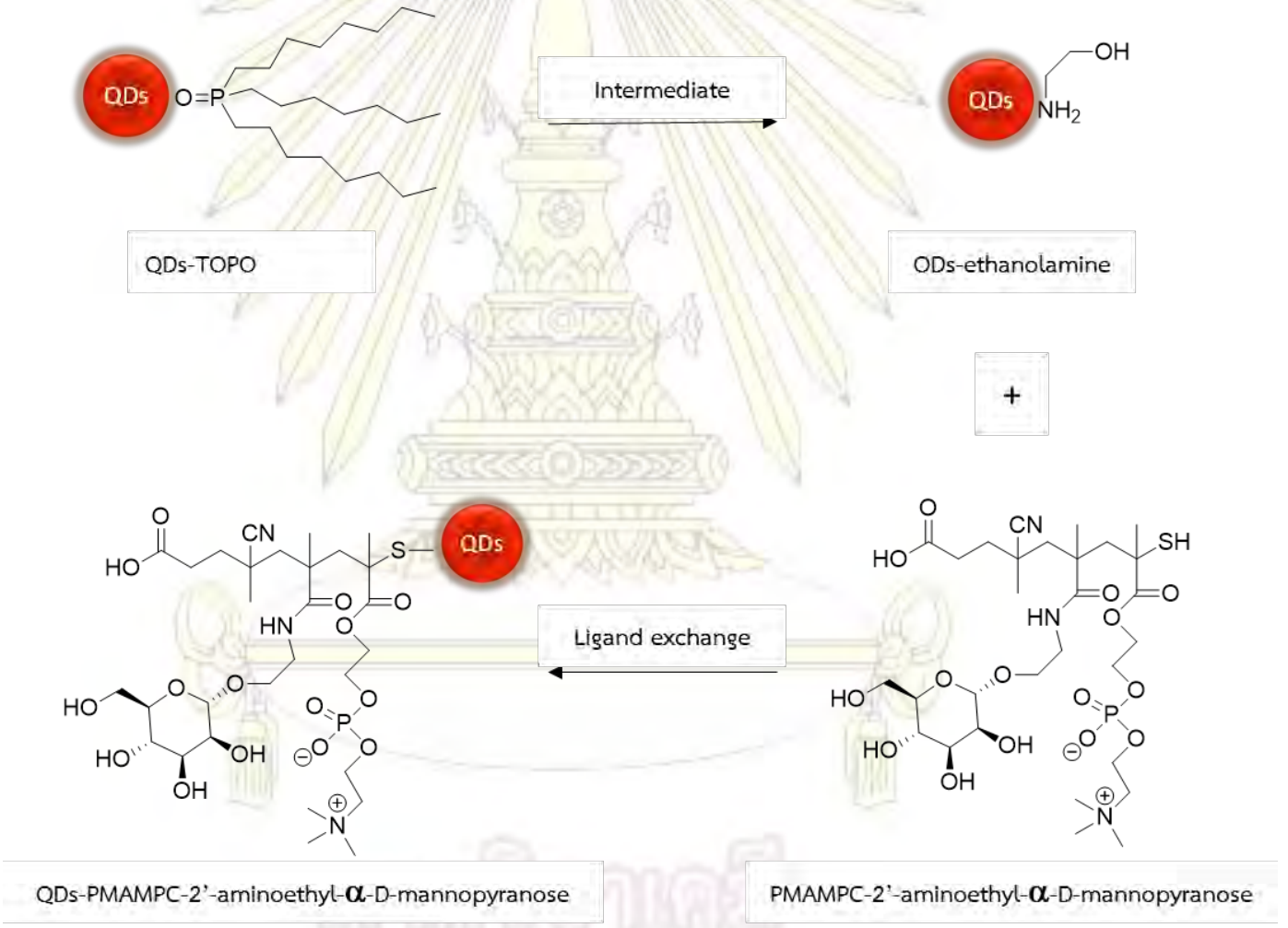
ชั่ง PMAMPC 0.4282 กรัม (2.481×10^{-5} mol) ใส่ใน vial ละลายด้วยน้ำ milliQ 4.96 มิลลิลิตร (5 mM) เติม 65% hydrazine 19.1 ไมโครลิตร (10 mol.eq.) ใส่แท่งแม่เหล็ก คนจนสีส้มหายไป พบว่าต้องเติม hydrazine อีก 2 ครั้งในปริมาณเท่ากัน จึงจะได้สารละลายใส แล้วนำไปแช่ในตู้เย็นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายพอลิเมอร์ที่ได้หยดลงใน HCl 10 มิลลิลิตร (1.2 M) dialysis ใน HCl pH 3 (เตรียมจาก HCl 1.2 M 830 ไมโครลิตร/DI 1000 มิลลิลิตร) เป็นเวลา 2 วัน และในน้ำ DI 2 วัน ทำการกำจัดน้ำออกด้วยเทคนิค lyophilization ใช้เครื่อง freeze dryer ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นของแข็งมีลักษณะเป็นปุยสีขาว ปริมาณ 0.3838 กรัม

การติด PMAMPC-SH กับ 2'-aminoethyl-α-D-mannopyranoside

ชั่ง PMAMPC-SH ปริมาณ 20 มิลลิกรัม (0.0614 มิลลิโมล ของ MA) ใส่ใน vial พร้อม แท่งแม่เหล็ก เติมน้ำ DI 4 มิลลิลิตร ตั้งคนจนสารละลายหมด เติม ethyl(dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) ปริมาณ 153.35 มิลลิกรัม (0.2 M) และ N-hydroxysuccinimide (NHS) ปริมาณ 23 มิลลิกรัม (0.05 M) ตั้ง

คนสารละลายเป็นเวลา 30 นาที เติม 2’-aminoethyl-α-D-mannopyranoside ที่สังเคราะห์ได้ในขั้นที่ 2 ปริมาณ 0.137 กรัม ปิดฝาขวด vial ด้วยฝาพลาสติกหุ้มด้วยฟอยล์ ตั้งคนทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วนำไป dialysis ในน้ำ DI เป็นเวลา 4 วัน เมื่อครบกำหนดเวลาแล้วนำสารละลายไปกำจัดน้ำออกด้วยเทคนิค lyophilization ใช้เครื่อง freeze dryer ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นปุยสีขาว

ขั้นที่ 4 การติด PMAMPC-2’-aminoethyl-α-D-mannopyranose กับ QDs แสดงดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 แผนภาพแสดงการติด PMAMPC-2’-aminoethyl-α-D-mannopyranose กับ QDs

นำควอนตัมดอทที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก อ.ดร.นำพล อินสิน มีลักษณะเป็นสารละลายแยกชั้นสีส้มอ่อน ชั้นบนเป็นสารละลายใสของ Hexane ชั้นล่างเป็นสารละลายขุ่นของ surfactant โดยเรืองแสงเล็กน้อยภายใต้ blacklight ในชั้นล่างเป็นสีส้มแดง ใส่แท่งแม่เหล็ก และให้ความร้อนกับสารละลาย

ควอนตัมดอท พร้อมตั้งคนจนสารละลายเป็นชั้นเดียว เมื่อส่อง blacklight จะเห็นว่ามีการเรืองแสงเล็กน้อยในชั้นบน ปิเปตต์ควอนตัมดอทในชั้นบน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ (centrifuge tube) เติม acetone 13 มิลลิลิตร นำไปเซนตริฟิวจ์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อวินาที (rpm) เป็นเวลา 10 นาที เพื่อล้างควอนตัมดอท จากนั้นละลายควอนตัมดอทที่ล้างแล้วด้วย hexane 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวด vial พร้อม แท่งแม่เหล็ก ตั้งคนสารละลายในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที แล้วเติม ethanolamine ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทีละหยดช้าๆ โดยใช้ไมโครปิเปตต์ ตั้งคนต่อในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที และเติมน้ำ DI ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทีละหยดช้าๆ ตั้งคนสารละลายต่อในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที สารละลายจะแยกเป็น 2 ชั้น นำแท่งแม่เหล็กออก ดูดชั้นน้ำ (ชั้นล่าง) โดยใช้ปิเปตมาใส่ใน vial อีกขวดหนึ่ง นำไปส่องภายใต้ blacklight พบว่าควอนตัมดอทมีการตกตะกอนติดขอบและใต้ขวด จึงลองทำการติดกับ PMAMPC-mannose 10 มิลลิกรัม ที่ละลายในน้ำ DI 1 มิลลิลิตร โดยปิเปตควอนตัมดอทเติมลงไปในสารละลาย PMAMPC-mannose เมื่อนำไปส่องดูภายใต้ blacklight จะเห็นการตกตะกอนที่ชัดเจนของควอนตัมดอทที่ก้น vial

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

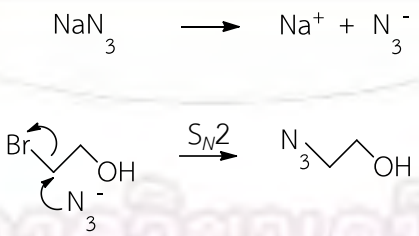
บทที่ 3

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยสนใจที่จะพัฒนาควอนตัมดอทเป็นตัวตรวจติดตามเซลล์ที่มีความผิดปกติ เช่น เซลล์มะเร็งตับ และเซลล์มะเร็งเต้านม เป็นต้น เนื่องจากเป็นเซลล์ที่มีตัวรับแมนโนส (mannose receptor) เป็นจำนวนมากกว่าเซลล์ปกติ ในที่นี้จึงมีความจำเป็นที่ต้องสังเคราะห์อนุพันธ์ของแมนโนสให้มีหมู่ฟังก์ชันที่พร้อมเกิดปฏิกิริยาเคมีกับพอลิเมอร์ PMAMPC และสามารถนำพอลิเมอร์ที่ติดกับแมนโนสแล้วไปเป็นตัวทำให้เสถียร (stabilizer) ให้กับควอนตัมดอทได้ ทำให้ควอนตัมดอทมีความสามารถในการละลายน้ำ และสามารถจับแบบจำเพาะเจาะจงกับเซลล์ที่มี mannose receptor ได้ เพื่อการตรวจวินิจฉัยในขั้นต้นและนำไปสู่การบำบัดรักษาที่เหมาะสมต่อไป

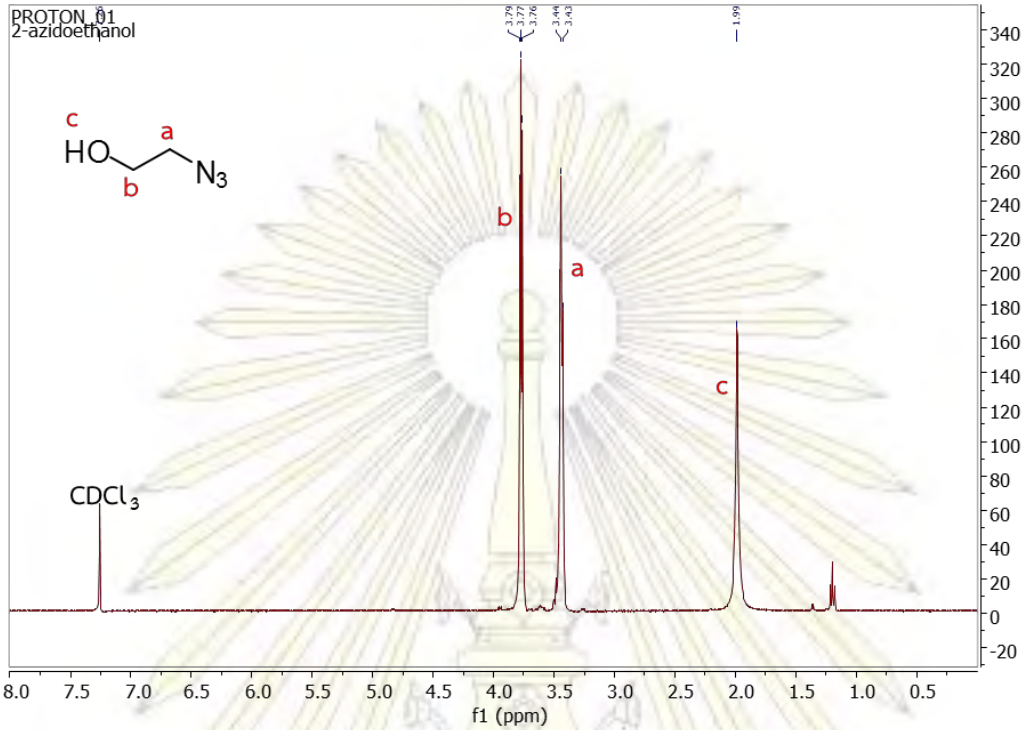
3.1 การสังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุพันธ์ของแมนโนส (2'-Aminoethyl-α-D-mannopyranoside)

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของแมสโนสให้มีหมู่อะมิโน ($-NH_2$) เพื่อให้สามารถเกิดปฏิกิริยาเอมิเนชัน (amination reation) กับหมู่คาร์บอกซิล (COOH) ของโคพอลิเมอร์ PMAMPC ได้นั้น ทำโดยเริ่มจากการสังเคราะห์ 2-azidoethanol จากสารตั้งต้น 2-bromoethanol และ sodium azide ตามแนวทางที่ได้มีรายงานไว้แล้วโดย Li Y. และคณะ [13] มีกลไกการเกิดปฏิกิริยาแสดงในรูปที่ 3.1



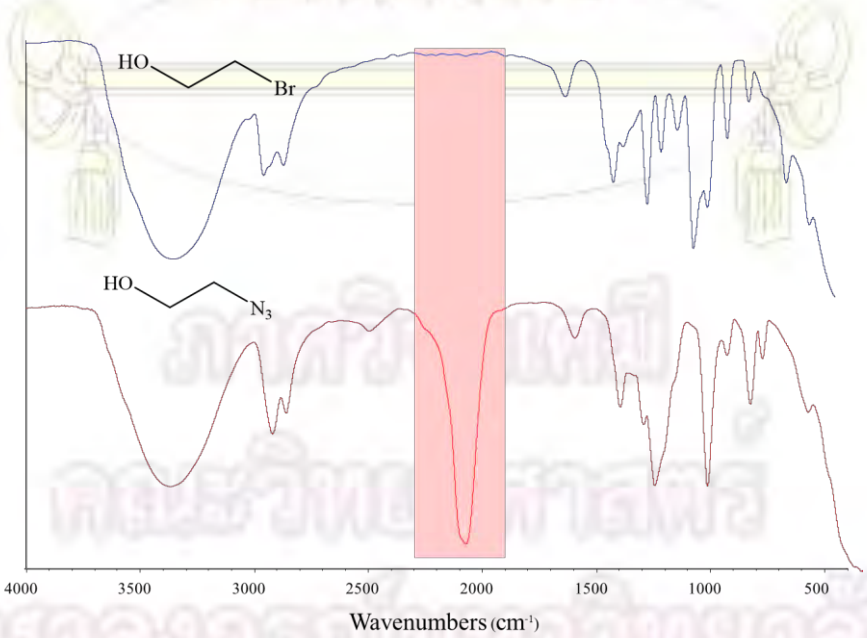
รูปที่ 3.1 กลไกการสังเคราะห์ 2-azidoethanol

พบว่าได้ผลิตภัณฑ์เป็นของเหลวใสไม่มีสี คิดเป็น 63 % yield จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค ^{1}H NMR จากรูปที่ 3.2 พบสัญญาณของโปรตอนที่ตำแหน่ง chemical shift (δ) 3.4 (t, 2H, CH_2N_3) และ 3.7 (t, 2H, CH_2O) ppm ที่ตำแหน่ง a และ b ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับโครงสร้างของ 2-azidoethanol



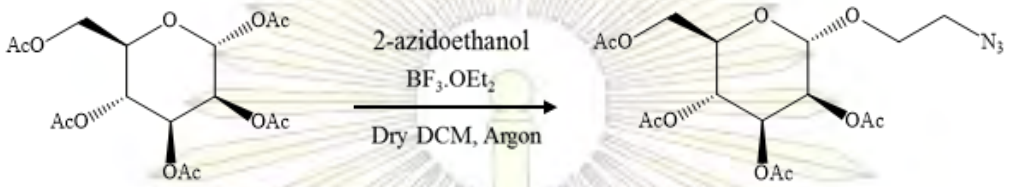
รูปที่ 3.2 ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) สเปกตรัมของ 2-azidoethanol

จาก IR สเปกตรัมแสดงในรูปที่ 3.3 ของ 2-azidoethanol จะพบพีกของ O-H stretching ที่ตำแหน่ง wavenumber 3300-3500 cm^{-1} และ N_3 stretching เพิ่มขึ้นจากสารตั้งต้นในตำแหน่ง wavenumber ที่ 2100 cm^{-1} ทำให้สามารถยืนยันการมีหมู่ azide ในผลิตภัณฑ์ได้



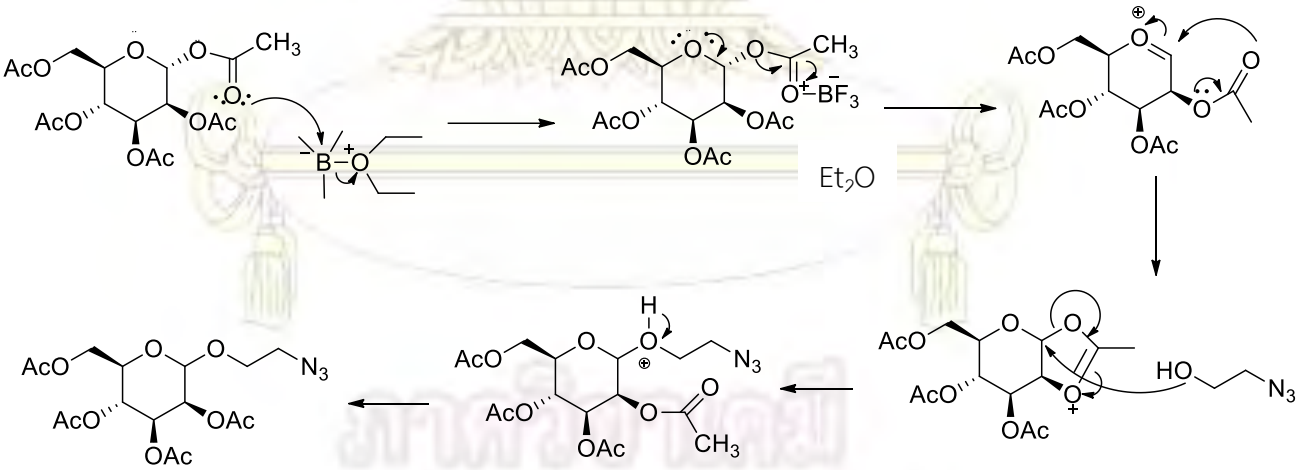
รูปที่ 3.3 IR สเปกตรัมของ 2-azidoethanol (ล่าง) และ 2-bromoethanol (บน)

เมื่อได้ 2-azidoethanol แล้ว จึงนำไปทำปฏิกิริยาต่อกับ 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetyl-D-mannopyranose เพื่อแทนที่หมู่แอซิเตท ที่ตำแหน่ง anomeric carbon ดังแสดงในรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.4 สมการแสดงปฏิกิริยาการเตรียม 2'-azidoethyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-α-D-mannopyranoside

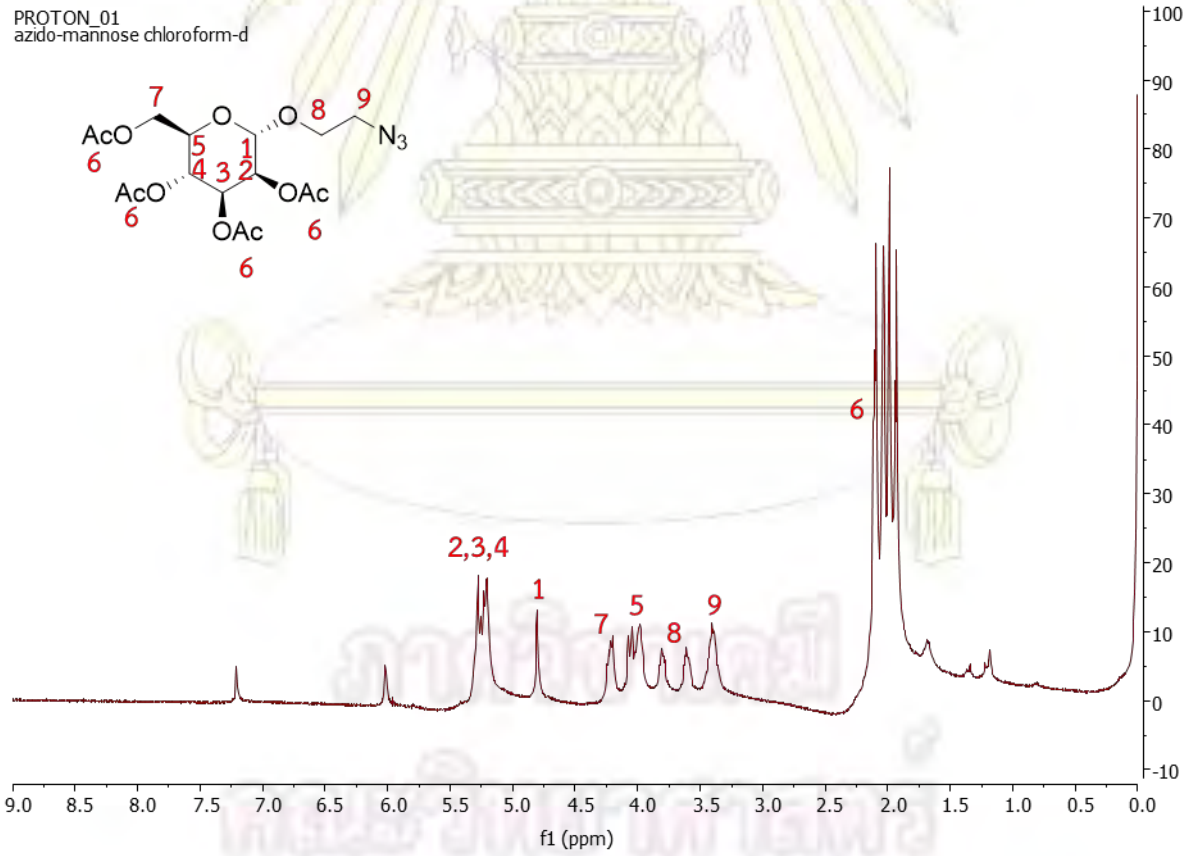
ซึ่งมีกลไกการเกิดปฏิกิริยาแสดงดังรูปที่ 3.5 โดย boron trifluoride diethyl etherate ($BF_3.OEt_2$) ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เข้าทำปฏิกิริยาที่ตำแหน่ง alpha glycosides ให้ผลิตภัณฑ์ชนิดเดียว ปฏิกิริยานี้ทำในระบบปิดและแห้งภายใต้บรรยากาศอาร์กอน เนื่องจากถ้ามีความชื้นในระบบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะไม่ใช่สารที่ต้องการเพราะน้ำเป็นนิวคลีโอไฟล์ที่ดี สามารถแย่งเกิดปฏิกิริยาได้



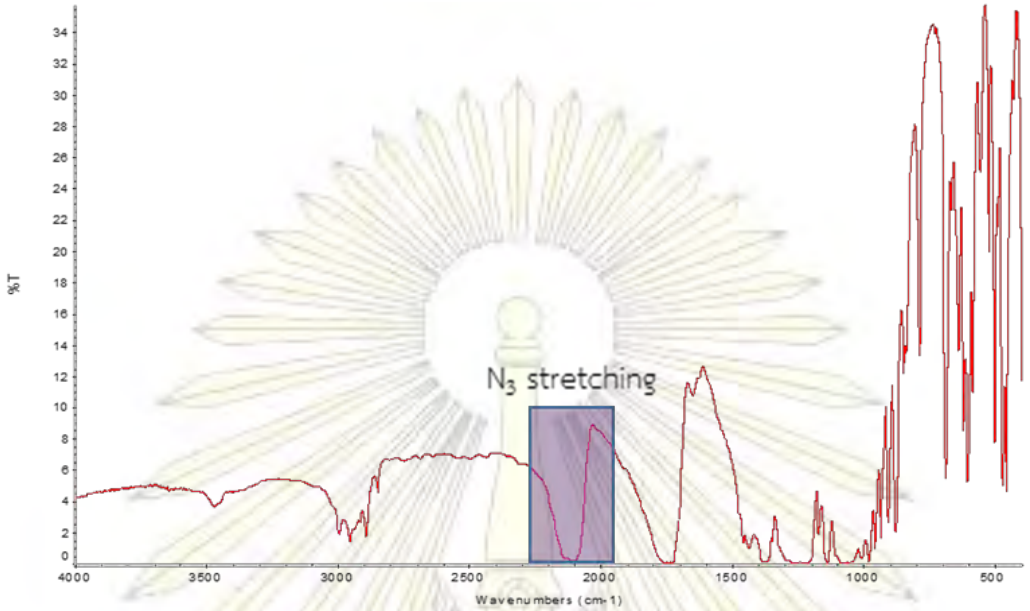
รูปที่ 3.5 กลไกแสดงปฏิกิริยาการเตรียม 2'-azidoethyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-α-D-mannopyranoside

เมื่อติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC แล้วพบว่าเกิดปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์ จึงหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย $NaHCO_3$ จากนั้นทำการสกัดด้วย $NaHCO_3$ 2 ครั้ง โดยใช้กรวยแยก เก็บชั้นสารอินทรีย์ ล้างชั้นสารอินทรีย์ด้วยสารละลายอิ่มตัว NaCl และน้ำ ดึงน้ำที่เหลือออกด้วย Na_2SO_4 จากนั้นระเหยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (DCM) โดยใช้เครื่อง rotary evaporator จะได้ crude ลักษณะของเหลวหนืดสีเหลืองเข้ม เมื่อทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำสารให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทรกราฟีจะได้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมในการแยก คือ ethyl acetate : hexane อัตราส่วน 1:1 ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดใสสีเหลืองอ่อน คิดเป็น 62 %yield ซึ่งไม่สูงมาก เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นมีขั้วใกล้เคียงกับสารตั้งต้น ทำให้เมื่อเก็บสารยังมีบางส่วนที่ไม่สามารถแยกออกจากสารตั้งต้นได้

จากนั้นพิสูจน์เอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิค ^{1}H NMR ดังแสดงสเปกตรัมในรูปที่ 3.6 โดยพบสัญญาณของโปรตอนที่ตำแหน่ง chemical shift (δ, ppm) 1.99, 2.03, 2.04, 2.10 (12H, s, Me), 3.40-3.49 (2H, m, $OCH_2\underline{CH_2}N_3$), 3.53-3.69 (1H, m, $O\underline{CH_2}CH_2N_3$), 3.83-3.89 (1H, m, $O\underline{CH_2}CH_2N_3$), 3.96-4.02 (1H, m, H5), 4.03-4.11 (1H, dd, $\underline{CH_2}OCH_3$), 4.80 (1H, d, H1), 5.21-5.28 (3H, m, H2, 3, 4) และเทคนิค IR ดังแสดงสเปกตรัมในรูปที่ 3.7 พบพีกที่สำคัญของ N_3 stretching ที่ตำแหน่ง 2100 cm^{-1} จาก 2 เทคนิคนี้สามารถยืนยันได้ว่าผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้เป็นสารที่ต้องการจริง

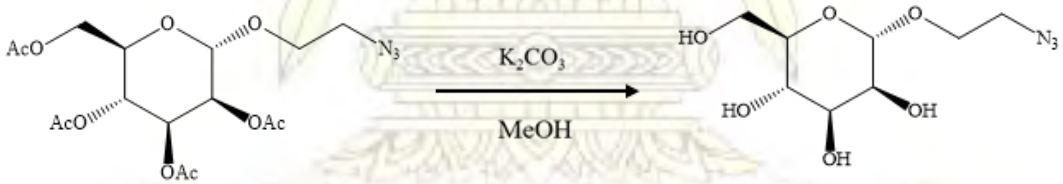


รูปที่ 3.6 ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) สเปกตรัมของ 2'-azidoethyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-α-D-mannopyranoside



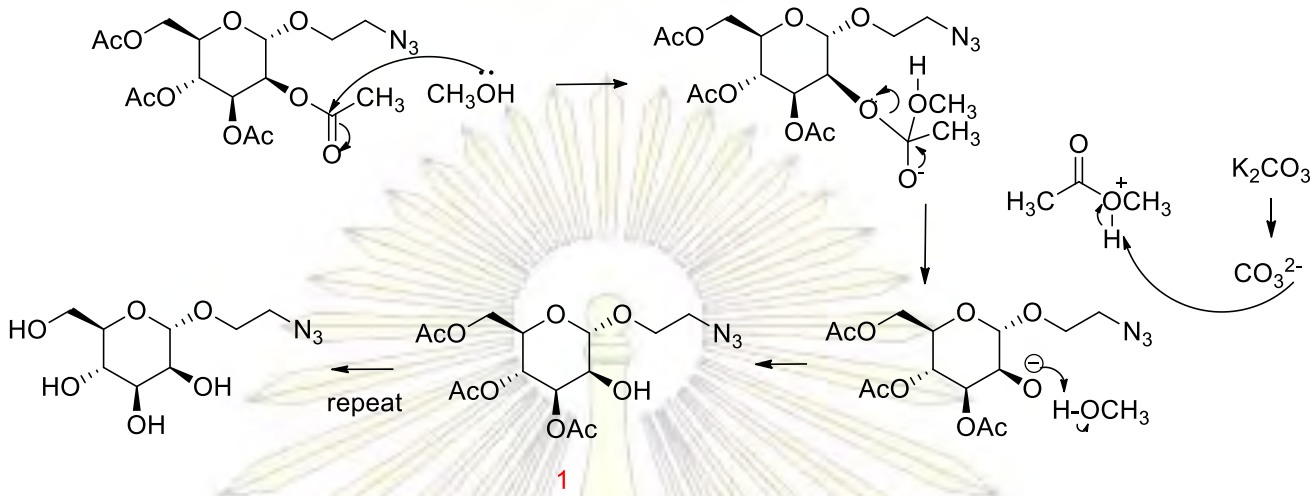
รูปที่ 3.7 IR (KBr disc) สเปกตรัมของ 2'-azidoethyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-α-D-mannopyranoside

จากนั้นจึงทำการกำจัด (deprotection) หมู่แอซิทิลโดยเปลี่ยนให้เป็นหมู่ไฮดรอกซิล แสดงปฏิกิริยาดังรูปที่ 3.8



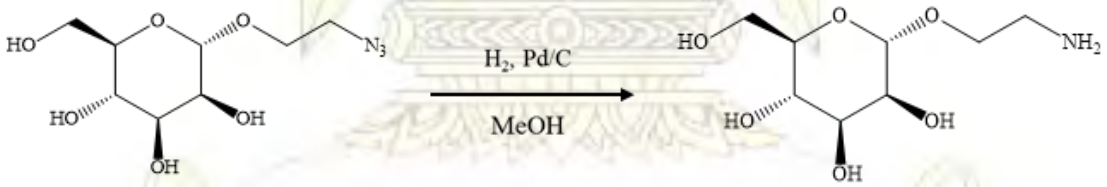
รูปที่ 3.8 ปฏิกิริยากำจัดหมู่แอซิทิล

มีกลไกการเกิดปฏิกิริยาแสดงดังรูปที่ 3.9 โดยทำปฏิกิริยาในเมทานอล มี K_2CO_3 เป็นตัวเข้าทำปฏิกิริยาในระบบปิดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการกรอง K_2CO_3 ออกด้วยกระดาษกรอง ทำการระเหยตัวทำละลายคือเมทานอลออก จะได้ของเหลวใสสีเหลืองอ่อนแต่เมื่อวางทิ้งไว้เกิดเป็นตะกอนสีขาวขุ่นซึ่งเกิดขึ้นเนื่องจากเมทานอลที่ใช้มีความชื้น K_2CO_3 จึงละลายไปบางส่วนจึงต้องทำการกรองซ้ำหลายรอบเพื่อแยก K_2CO_3 ออกจากสาร



รูปที่ 3.9 กลไกแสดงปฏิกิริยากำจัดหมู่แอซิทิล โดยจากโครงสร้างที่ 1 กลไกในการกำจัดหมู่แอซิทิลที่เหลือมีลักษณะแบบเดียวกัน

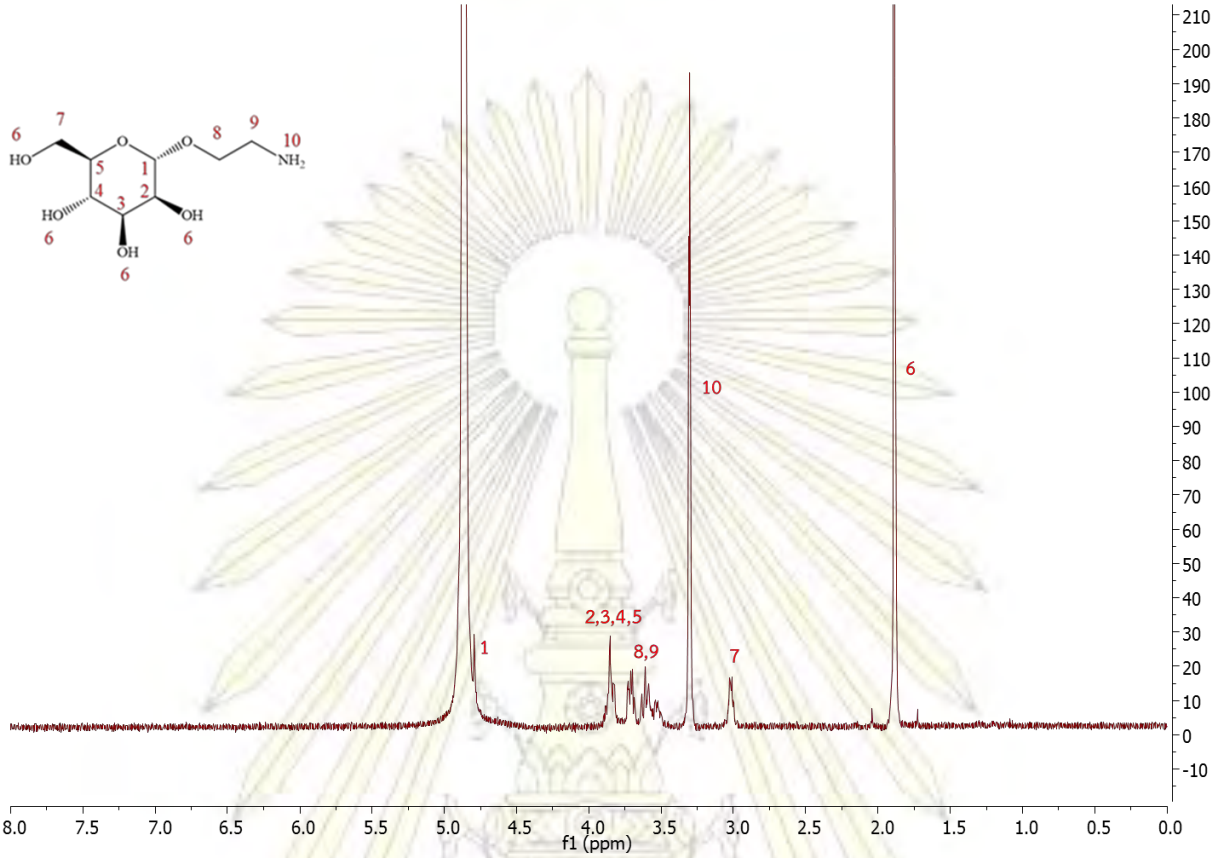
จากนั้นทำการเปลี่ยนหมู่เอไซด์ไปเป็นหมู่อะมิโนโดยการทำปฏิกิริยา hydrogenation ในระบบปิดมีตัวเร่งปฏิกิริยา คือ Pd/C ในตัวทำละลายเมทานอล แสดงปฏิกิริยาดังรูปที่ 3.10



รูปที่ 3.10 ปฏิกิริยาแสดงการเปลี่ยนหมู่เอไซด์ให้เป็นหมู่แอมิโนโดยการทำปฏิกิริยา hydrogenation

จากการติดตามผลด้วยเทคนิค TLC พบว่าปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์จึงทำการหยุดปฏิกิริยา โดยการกรอง Pd/C ออก จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายเมทานอลโดยใช้เครื่อง rotary evaporator จะได้ผลิตภัณฑ์ลักษณะของเหลวใสสีเหลืองอ่อน คิดเป็น 63 %yield

จากนั้นพิสูจน์เอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิค ^{1}H NMR ดังแสดงสเปกตรัมในรูปที่ 3.11 พบสัญญาณโปรตอนที่ตำแหน่ง chemical shift (δ, ppm) 1.90 (4H, s, OH), 3.04 (2H, d, $\underline{CH_2}$OH), 3.31 (2H, s, NH_2), 3.49-3.89 (4H, m, H2, 3, 4, 5) และ 4.78 (1H, s, H1) และจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค IR ดังแสดงสเปกตรัมในรูปที่ 3.12 พบพีก broad ของ O-H stretching ที่ซ้อนทับกับ NH_2 stretching ที่ 3000-3500 cm^{-1}

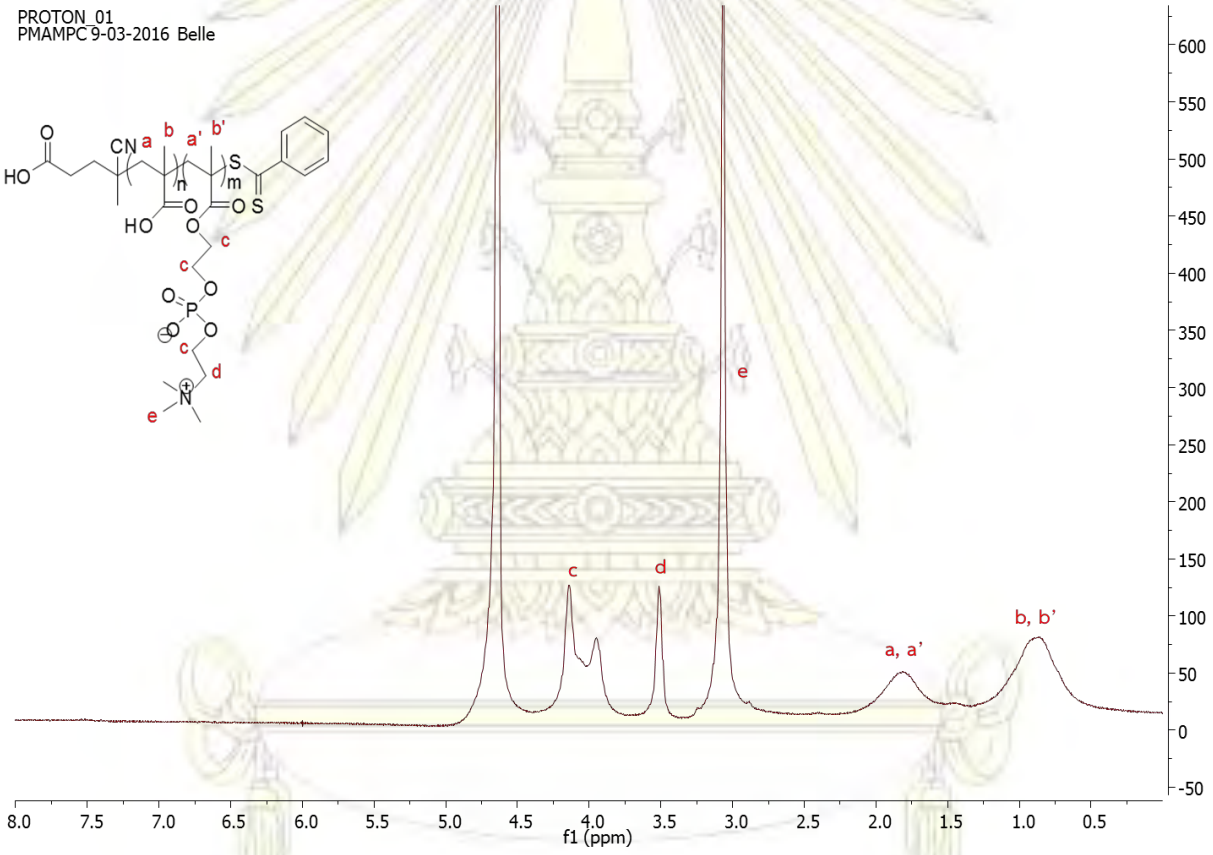


รูปที่ 3.11 ^{1}H NMR (400 MHz, D_2O) สเปกตรัมของ 2'-aminoethyl-α-D-mannopyranoside

รูปที่ 3.12 IR (KBr disc) สเปกตรัมของ 2'-aminoethyl-α-D-mannopyranoside

3.2 การสังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของโคพอลิเมอร์ PMAMPC ติดกับ 2'-aminoethyl-α-D-mannopyranoside

การสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ของ PMAMPC ผ่านปฏิกิริยา RAFT polymerization เป็นวิธีที่สามารถควบคุมน้ำหนักโมเลกุลของโคพอลิเมอร์และอัตราส่วนของมอนอเมอร์ทั้ง 2 ชนิดในโคพอลิเมอร์ได้ โดยที่ปลายโซ่ของโคพอลิเมอร์ PMAMPC จะมีหมู่ dithiobenzoate ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยา aminolysis กับ hydrazine แล้วเปลี่ยนเป็นหมู่ thiol ซึ่งเป็นส่วนที่รองรับการติดเข้ากับควอนตัมดอท การสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ PMAMPC สามารถยืนยันโครงสร้างได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ^{1}H NMR ดังแสดงสเปกตรัมในรูปที่ 3.13



รูปที่ 3.13 ^{1}H NMR (400 MHz, D_2O) สเปกตรัมของ PMAMPC

จากรูปที่ 3.13 จะพบสัญญาณโปรตอนที่ตำแหน่ง chemical shift (δ, ppm) 1.6-2.2 (H_a และ $H_{a'}$), 0.6-1.2 (H_b และ $H_{b'}$), 2.8-3.2 (H_e), 3.8-4.2 (H_c), และ 3.4-3.6 (H_d) ppm ทั้งนี้สามารถคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลและอัตราส่วนของมอนอเมอร์ใน PMAMPC ด้วยสมการดังต่อไปนี้

$$\text{Total repeating units} = \left\{\frac{(\text{Integral of the Hb and Hb}')/6}{(\text{Integral of the Hf})/5}\right\} \times 2 \qquad \text{สมการที่ 3.1}$$

Mn =[Repeating units of MA×MW of MA (86.06 g/mol)+

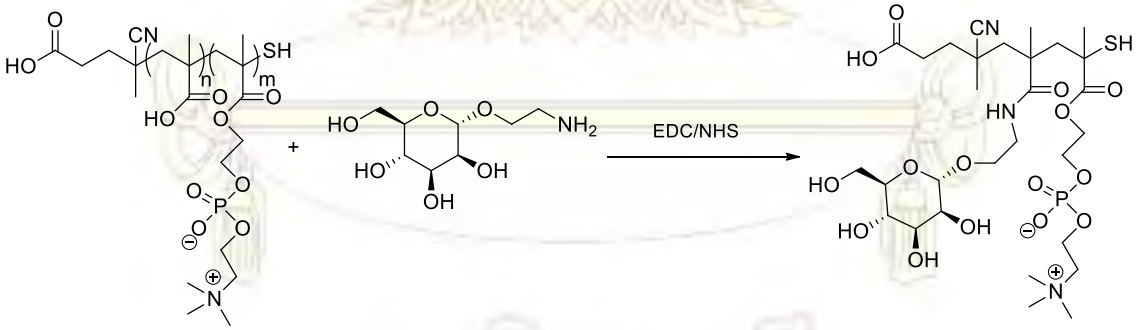
Repeating units of MPC×MW of MPC (295.68 g/mol)] สมการที่ 3.2

$$\text{Ratio of MPC in copolymer (\%)} = \left\{\frac{\text{Repeating units of MPC}}{\text{Total repeating units}}\right\} \times 100$$

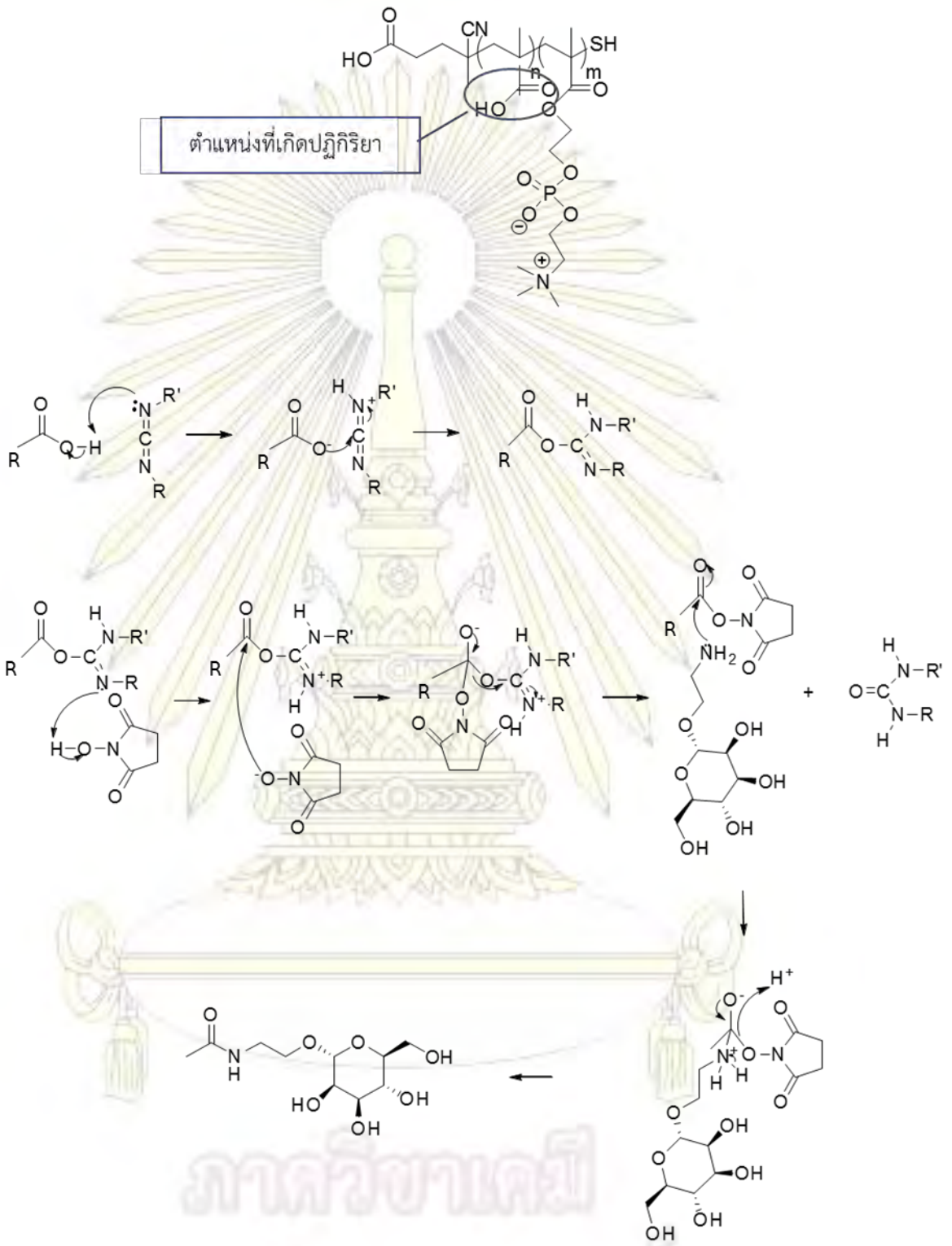
$$\text{Ratio of MA in copolymer (\%)} = \left\{\frac{\text{Repeating units of MA}}{\text{Total repeating units}}\right\} \times 100 \qquad \text{สมการที่ 3.3}$$

จากการสังเคราะห์ PMAMPC DP100 (60:40) (%MA:%MPC) ที่มีน้ำหนักโมเลกุล เป้าหมาย 19,366 กรัมต่อโมล จากการคำนวณโดยใช้สมการข้างต้นได้ PMAMPC ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 17,259 กรัมต่อโมล และอัตราส่วนของมอนอเมอร์เป็น 44.2%MPC (42 หน่วย) และ 55.8%MA (53 หน่วย) ซึ่งถือว่ามีค่าใกล้เคียงกับที่คาดการณ์ไว้ทางทฤษฎี

เมื่อนำ PMAMPC ไปต่อกับอนุพันธ์ของแมนโนสโดยใช้ EDC/NHS เป็นรีเอเจนต์คู่ควบ แสดงปฏิกิริยาดังรูปที่ 3.14 ซึ่งมีกลไกแสดงดังรูปที่ 3.15



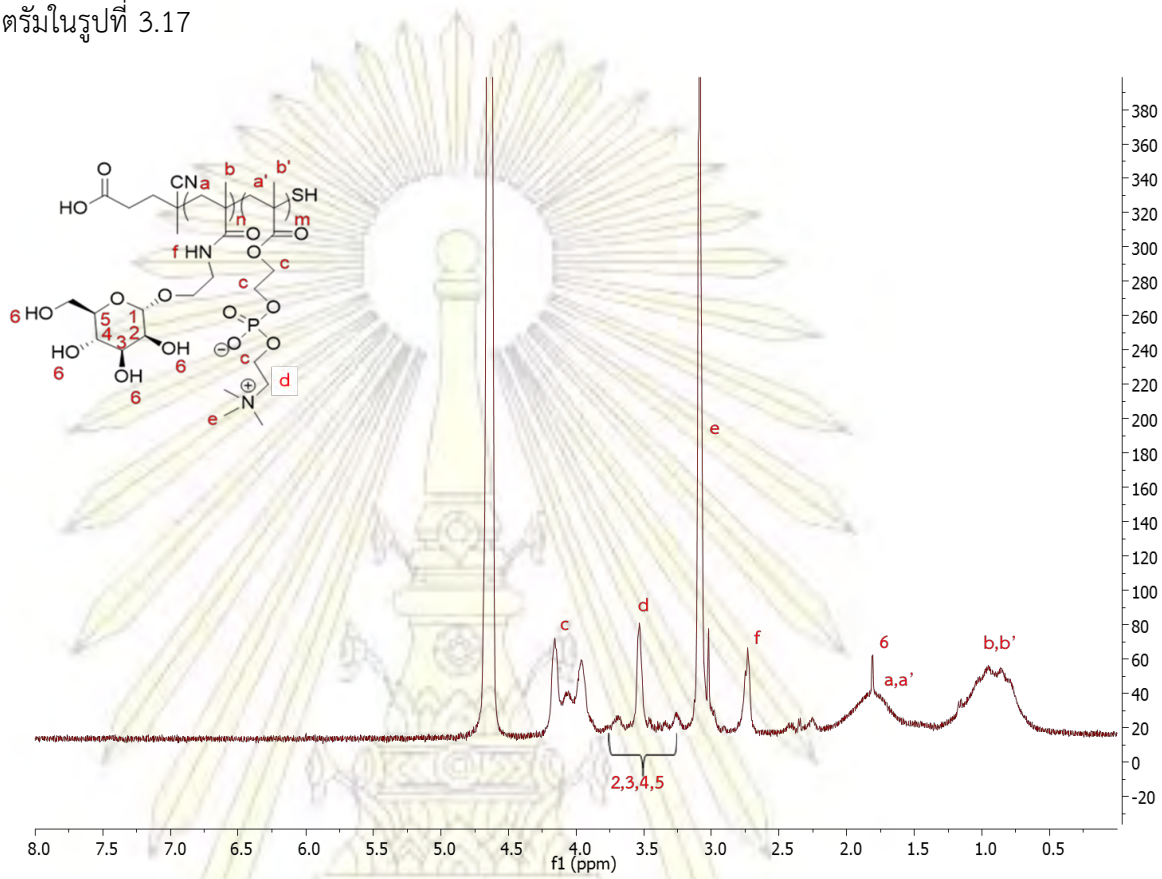
รูปที่ 3.14 ปฏิกิริยาการเตรียม PMAMPC-mannose



รูปที่ 3.15 กลไกการเกิดปฏิกิริยาในการเตรียม PMAMPC-mannose

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

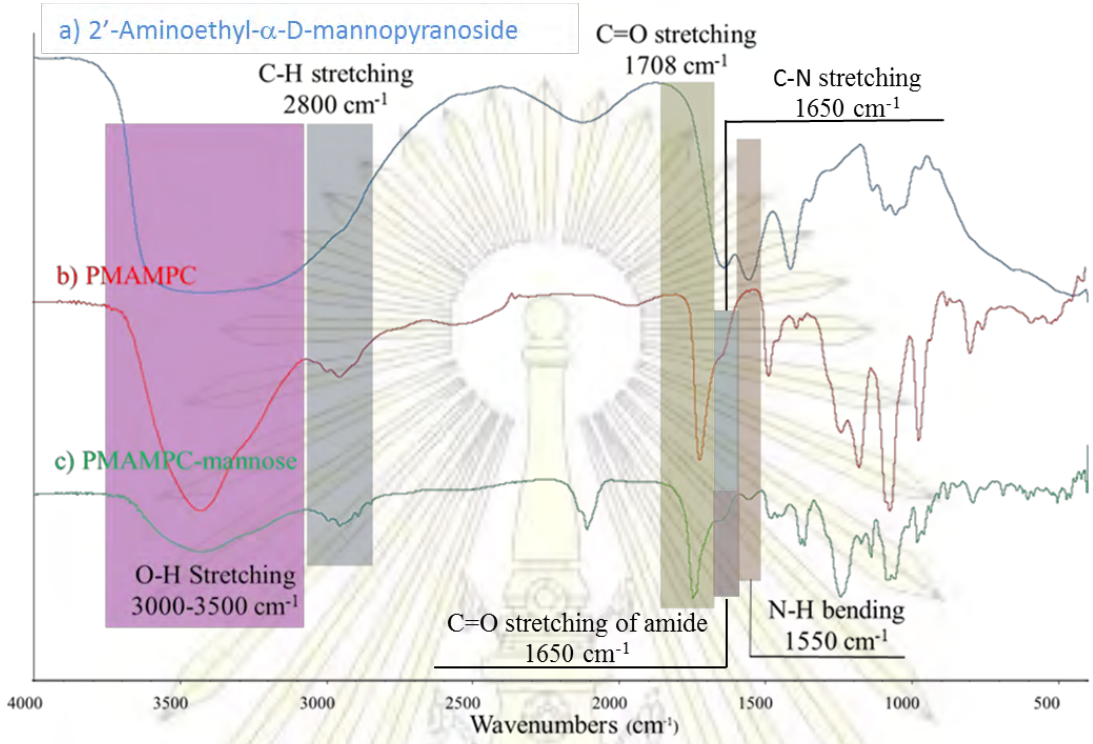
สามารถยืนยันโครงสร้างผลิตภัณฑ์ได้ด้วยเทคนิค ^{1}H NMR ดังแสดงสเปกตรัมในรูปที่ 3.16 และ IR ดังแสดงสเปกตรัมในรูปที่ 3.17



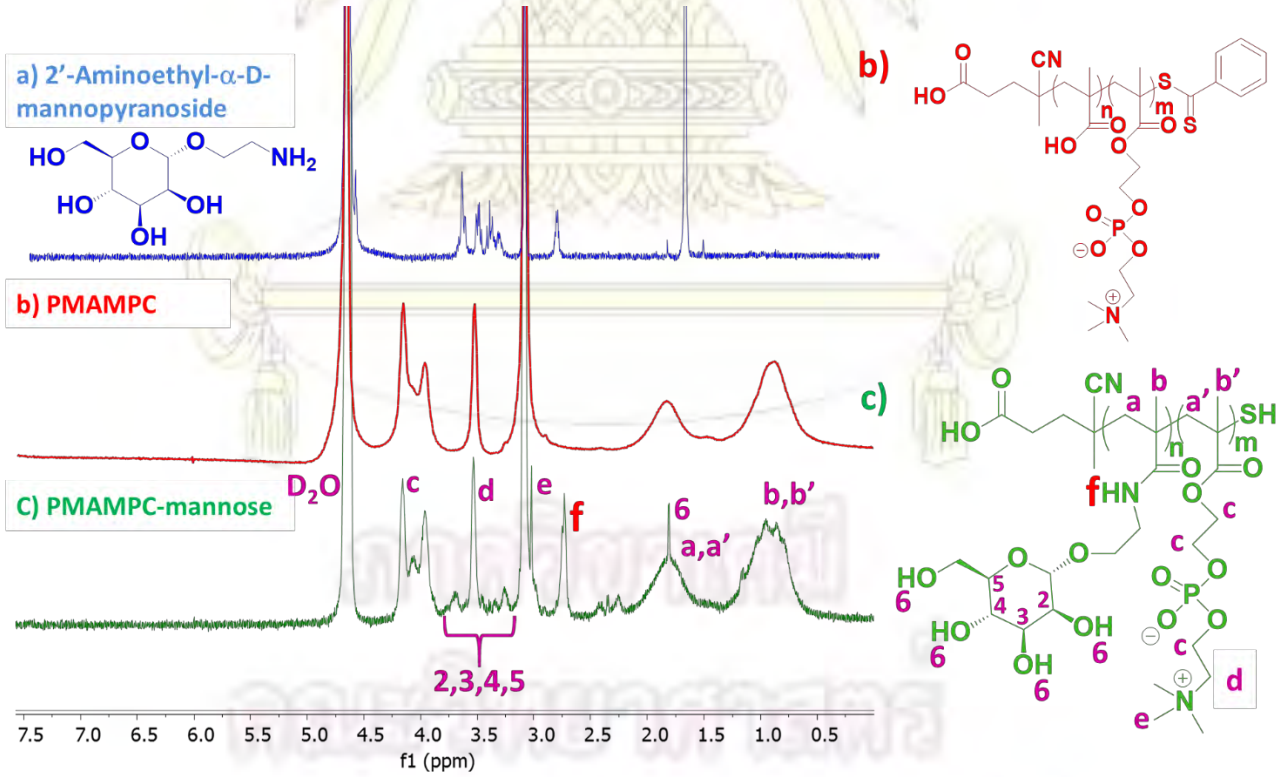
รูปที่ 3.16 ^{1}H NMR (400 MHz, D_2O) สเปกตรัมของ PMAMPC-mannose

จากรูปที่ 3.16 พบสัญญาณโปรตอนที่ตำแหน่ง chemical shift (δ, ppm) 1.6-2.2 (H_a และ $H_{a'}$), 0.6-1.2 (H_b และ $H_{b'}$), 2.9-3.2 (H_e), 3.8-4.2 (H_c), 3.4-3.6 (H_d) ซึ่งเป็นของ PMAMPC และ 2.7-2.8 (H_f) ซึ่งเป็นพีกของโปรตอนที่ต่อกับ N นอกจากนี้ยังพบสัญญาณโปรตอนของอนุพันธ์แมนโนสที่ตำแหน่ง 1.8 (H_6) และ 3.2-3.8 (H_2, H_3, H_4 และ H_5) ซึ่งเป็นการยืนยันการติดอนุพันธ์ของแมนโนสเข้ากับโคพอลิเมอร์ PMAMPC ทั้งนี้แสดงสเปกตรัมเปรียบเทียบกับ PMAMPC และ 2'-aminoethyl-α-D-mannopyranoside ไว้ในรูปที่ 3.18 ด้วย

จากรูปที่ 3.17 จะเห็นว่า PMAMPC ที่ต่อกับอนุพันธ์ของแมนโนส จะแสดงพีกที่เป็นเอกลักษณ์ทั้งของ PMAMPC คือ C=O stretching ที่ตำแหน่ง 1708 cm^{-1} ของหมู่คาร์บอกซิล อนุพันธ์ของแมนโนส คือ N-H bending ที่ตำแหน่ง 1550 cm^{-1} และ C=O stretching ที่ตำแหน่ง 1650 cm^{-1} ของหมู่เอไมด์ ซึ่งจะขึ้นที่ตำแหน่งซ้อนทับกับ C-N stretching ของ PMAMPC ซึ่งเป็นการยืนยันการติดอนุพันธ์ของแมนโนสเข้ากับ PMAMPC นอกจากนี้ยังพบ O-H stretching ที่ตำแหน่ง 3000-3500 cm^{-1} และ C-H stretching ที่ตำแหน่ง 2800 cm^{-1}



รูปที่ 3.17 IR สเปกตรัม ของ (a) 2'-Aminoethyl-α-D-mannopyranoside (b) PMAMPC และ (c) PMAMPC-mannose

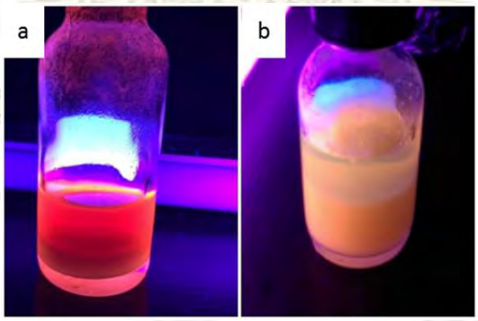


รูปที่ 3.18 ^{1}H NMR (400 MHz, D_2O) สเปกตรัมของ (a) PMAMPC (b) PMAMPC-mannose และ (c) 2'-Aminoethyl-α-D-mannopyranoside

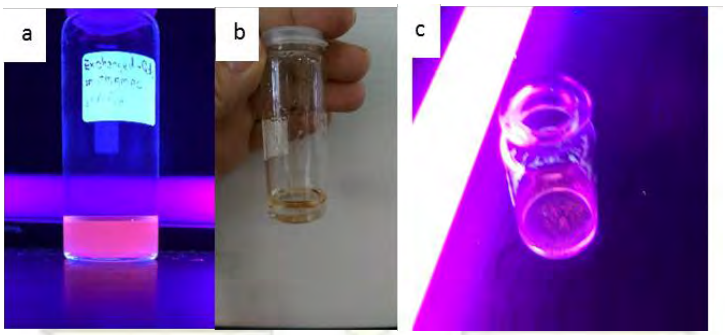
3.3 การเตรียมและพิสูจน์เอกลักษณ์ควอนตัมดอทที่ทำให้เสถียรด้วย PMAMPC-mannose โดยวิธีแลกเปลี่ยนลิแกนด์

การทดลองนี้ต้องการเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำของควอนตัมดอท จากเดิมที่มีลิแกนด์บนพื้นผิวคือ TOPO ซึ่งกระจายตัวในเฮกเซนเป็นลิแกนด์แบบอ่อนโดยทำปฏิกิริยากับ ethanolamine เนื่องจากมีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวของหมู่เอมีนทำให้สามารถจับกับพื้นผิวของควอนตัมดอทได้และเปลี่ยนเฟสในการกระจายตัวมาอยู่ในน้ำ[14] จากนั้นจึงติดกับ PMAMPC-mannose ด้วยวิธีการแลกเปลี่ยนลิแกนด์บริเวณหมู่ thiol จากรูปที่ 3.19 จะเห็นว่าควอนตัมดอทในสภาวะปกติ (a) จะมีการเรืองแสงสีส้มแดงทั้งชั้นบนและชั้นล่าง ส่วนควอนตัมดอทที่นำมาใช้ (b) นั้นเรืองแสงในชั้นล่างเล็กน้อยเท่านั้น แสดงให้เห็นว่าควอนตัมดอทที่นำมาใช้นั้นไม่เหมาะสมในการใช้งาน มีเสถียรภาพต่ำตั้งแต่ต้น

ด้วยเหตุนี้จึงไม่ประสบความสำเร็จในการเปลี่ยนเฟสการกระจายตัวของควอนตัมดอทมาอยู่ในน้ำ สังเกตได้จากการแยกตัวเป็น 2 ชั้น เมื่อเปรียบเทียบกับควอนตัมดอทที่ประสบความสำเร็จในการแลกเปลี่ยนลิแกนด์ แสดงดังรูปที่ 3.20 (a) ควอนตัมดอทยังกระจายตัวอยู่ในชั้นเฮกเซนเห็นเป็นสีส้ม (ชั้นบน) แสดงดังรูปที่ 3.20(b) เมื่อแยกชั้นน้ำชั้นล่างใส่ในขวดอีกขวดแล้วนำไปดูการเรืองแสงภายใต้ blacklight จะเห็นว่าควอนตัมดอทจับตัวกันตกตะกอนที่ก้นขวดมีการเรืองแสงเล็กน้อย แสดงดังรูปที่ 3.20 (c) คาดว่าเกิดจาก shell ด้านนอกของควอนตัมดอทมีขั้วไม่เหมาะสมในการเปลี่ยนเป็นลิแกนด์อ่อนทำให้เกิดการจับตัวกันเกิดเป็นตะกอนเล็กๆ ไม่สามารถกระจายตัวในน้ำได้ เมื่อแยกเฉพาะชั้นน้ำมาทำการทดลองต่อนั้นจึงไม่สามารถติด PMAMPC-mannose ลงบนควอนตัมดอทแล้วทำให้เกิดการกระจายตัวในน้ำได้



รูปที่ 3.19 (a) QDs ที่เหมาะสมในการเปลี่ยนเป็นลิแกนด์อ่อน (b) QDs ที่ไม่เหมาะสมในการเปลี่ยนเป็นลิแกนด์อ่อน ดูภายใต้ blacklight



รูปที่ 3.20 (a) QDs ในสภาวะที่เหมาะสมในการเปลี่ยนลิแกนด์ (b) QDs หลังเปลี่ยนเป็นลิแกนด์อ่อน (c) ชั้นน้ำหลังเปลี่ยนเป็นลิแกนด์อ่อนดูภายใต้ blacklight

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการสังเคราะห์และทำให้บริสุทธิ์ของอนุพันธ์ของแมนโนส คือ 2'-aminoethyl-α-D-mannopyranoside) โดยสังเคราะห์จากสารตั้งต้น คือ 1,2,3,4,6-penta-D-acetyl-D-mannopyranose และ 2-azidoethanol ซึ่งเตรียมได้จาก 2-bromoethanol และ sodium azide ผ่านปฏิกิริยา 3 ขั้นตอน คือ 1. glycosylation จากนั้นทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี มีวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม คือ ethyl acetate : hexanes ในอัตราส่วน 1:1 2. deprotection และ 3. hydrogenation ได้ปริมาณของผลิตภัณฑ์ 62% yield ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์โดยใช้เทคนิค ^{1}H NMR spectroscopy และ Infrared spectroscopy พบว่าผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้มีโครงสร้างสอดคล้องกับสารที่ต้องการจริง ในส่วนต่อมาคือการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ PMAMPC ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่มีความสามารถในการละลายน้ำและรองรับการติดหมู่ฟังก์ชันเพื่อเพิ่มความเข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิตและความสามารถในการจับแบบจำเพาะกับเซลล์เป้าหมาย โดยสังเคราะห์ PMAMPC ผ่านปฏิกิริยา RAFT polymerization ที่กำหนดค่าเป้าหมาย DP = 100 และ MA:MPC = 60:40 ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเป้าหมาย 19,366 กรัมต่อโมล PMAMPC ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุล 17,259 กรัมต่อโมล และอัตราส่วนของมอนอเมอร์เป็น 55.8%MA และ 44.2%MPC โดยได้ DP = 95 (56:44) ซึ่งถือว่ามีค่าใกล้เคียงกับที่คาดการณ์ไว้ทางทฤษฎี และเมื่อติดอนุพันธ์ของแมนโนสกับ PMAMPC โดยใช้ EDC/NHS เป็นรีเอเจนต์คู่ควบ ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ยืนยันด้วยเทคนิค ^{1}H NMR spectroscopy พบตำแหน่งโปรตอนที่ต่อกับ N ของหมู่เอไมด์ขึ้นสัญญาณที่ chemical shift 2.7-2.8 ppm และ Infrared spectroscopy พบสัญญาณของ C=O stretching ของเอไมด์ที่ตำแหน่ง 1650 cm^{-1} N-H bending ที่ตำแหน่ง 1550 cm^{-1} เป็นการยืนยันว่าสามารถติดอนุพันธ์ของแมนโนสกับ PMAMPC ได้ อย่างไรก็ตามในขั้นตอนสุดท้ายไม่ประสบความสำเร็จในการเตรียมควอนตัมดอททำให้เสถียรด้วย PMAMPC ที่ติดกับอนุพันธ์ของแมนโนสด้วยวิธีการแลกเปลี่ยนลิแกนด์ ทั้งนี้คาดว่าเป็นผลมาจากการที่ควอนตัมดอทเริ่มต้นมีเสถียรภาพต่ำ

แนวทางในการดำเนินงานวิจัยในอนาคต

1. การสังเคราะห์อนุพันธ์ของแมนโนสติดกับ PMAMPC ในเบื้องต้นประสบความสำเร็จ แต่ไม่สามารถนำไปติดบนพื้นผิวของควอนตัมดอทได้เนื่องจากไม่สามารถแลกเปลี่ยนลิแกนด์ได้ จึงควรทำการสังเคราะห์ให้ได้ควอนตัมดอทที่มีเสถียรภาพสูง ก่อนนำมาติดกับพอลิเมอร์ PMAMPC-mannose
2. การติด PMAMPC-mannose เข้ากับควอนตัมดอทนั้น จะทำการติดผ่านหมู่ไทออล ในโคพอลิเมอร์ PMAMPC ซึ่งมีหมู่ไทออลเพียงตำแหน่งเดียวที่ปลายโซ่ อาจทำให้จับกับผิวควอนตัมดอทได้ไม่ดีนัก ดังนั้นจึงควรเพิ่มหมู่ไทออลในโคพอลิเมอร์ PMAMPC ซึ่งอาจจะอาศัยการเกิดปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอกซิลบางส่วนในโคพอลิเมอร์กับ cystamine ก่อนนำมาติดกับอนุพันธ์ของแมนโนส

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

1. Michael Hughes Publication. http://www.michaelchughes.com (accessed March 24, 2016).

2. Torchynska T.; Vorobiev Y. Semiconductor II-VI Quantum Dots with Interface States and Their Biomedical Applications, 2011. Intech Institute for Learning Science Web. http://www.intechopen.com/books/advanced-biomedical-engineering/semiconductor-ii-vi-quantum-dots-with-interface-states-and-their-biomedical-applications (accessed March 24, 2016).

3. Pellegrino, T.; Manna, L.; Kudera, S.; Liedl, T.; Koktysh, D.; Rogach, A. L.; Keller, S.; Radler, J.; Natile, G.; Parak, W. J. Hydrophobic nanocrystals coated with an amphiphilic polymer shell: A general route to water soluble nanocrystals. *Nano Letters* **2004**, *4*, 703-707.

4. Zorn, M.; Bae, W. K.; Kwak, J.; Lee, H.; Lee, C.; Zentel, R.; Char, K. Quantum dot-block copolymer hybrids with improved properties and their application to quantum dot light-emitting devices. *ACS Nano* **2009,** *3,* 1063–1068.

5. Tongxin, W.; Rajagopalan, S.; Alexandru, K.; Andy, H. T.; Kyethann, F.; James, M.; Paul C. W. Synthesis of amphiphilic triblock copolymers as multidentate ligands for biocompatible coating of quantum dots. *Physicochemical Engineering Aspect* **2010**, *375*, 147–155.

6. Liu, L.; Guo, X.; Li, Y.; Zhong, X. Bifunctional multidentate ligand modified highly stable water-soluble quantum dots. *Inorganic Chemistry* **2010**, *49*, 3768-3775.

7. Goto, Y.; Matsuno, R.; Konno, T.; Takai, M.; Ishihara, K. Polymer nanoparticles covered with phosphorylcholine groups and immobilized with antibody for high-affinity separation of proteins. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 828–833.

8. Akkahat, P.; Kiatkamjornwong, S.; Yusa, S.; Hoven, V. P.; Iwasaki, Y. Development of a novel antifouling platform for biosensing probe immobilization from methacryloyloxyethyl phosphorylcholine-containing copolymer brushes. *Langmuir* **2012**, *28*, 5872-5881.

9. Sangsuwan, A.; Kawasaki, H.; Iwasaki, Y. Thiolated-2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine protected silver nanoparticles as novel photo-induced cell-killing agents. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* **2015**, 140, 128–134.

10. Kikkeri, R.; Lepenies, B.; Abibekian, A.; Laurino, P.; Seeberger, P. H. *In vitro* imaging and *in vivo* liver targeting with carbohydrate capped quantum dots. *Journal of American Chemical Society.* **2009**, *131,* 2110–2112.

11. Zhu, S.; Niu, M.; O'Mary, H.; Cui, Z. Targeting of tumor-associated macrophages made possible by PEG sheddable, mannose-modified nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics.* **2013**, *10*, 3525–3530.

12. Ahire, J. H.; Chambrier I.; Mueller A.; Bao Y.; Chao Y. Synthesis of D-mannose capped silicon nanoparticles and their interactions with MCF-7 human breast cancerous cells. ACS *Applied Materials and Interfaces.* **2013**, *5*, 7384–7391.

13. Li, Y.; Yang, J.; Benicewicz C. B. Well-controlled polymerization of 2-azidoethyl methacrylate at near room temperature and click functionalization. *Journal of Polymer Science*. **2007, *45*,** 4300–4308.

14. Suttipat, D.; Sathienthammanee, W. Development of fluorescent particles for bio-related application. Senior project, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, 2013

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวณัฐณิชา เลิศอมรมีสุข เกิดเมื่อวันที่ 7 เดือนเมษายน พ.ศ. 2537 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย แผนการเรียนวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์จากโรงเรียนเตรียมอุดมศึกษาพัฒนาการ จังหวัดกรุงเทพมหานคร เมื่อปีการศึกษา 2554 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2555 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้หลังจบการศึกษาระดับปริญญาตรี บ้านเลขที่ 73 ซอยพึ่งมี 22 ถนนสุขุมวิท 93 แขวงบางจาก เขตพระ-โขนง จังหวัดกรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10260 หมายเลขโทรศัพท์ 092-2626400 อีเมล Natnicha573@gmail.com

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย