BRG/06/2540-รศ.ดร. อภิชาต สุขสำราญ

รายงานการวิจัย

ทุนวิจัยองค์ความรู้ใหม่ที่เป็นพื้นฐานต่อการพัฒนา

เรื่อง

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ทางชีวภาพของฮอร์โมนลอกคราบแมลง

STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP STUDY OF INSECT MOULTING HORMONES

หัวหน้าโครงการ

นายอภิชาต สุขสำราญ

ผู้ร่วมวิจัย

ผศ.ดร.พนูญเอก ยิ่งยงณรงค์กุล และนายประเสริฐ พัฒนะประทีป

1 มกราคม 2540 - 31 ธันวาคม 2542

สัญญาเลขที่ BRG/06/2540

รายงานการวิจัย

ทุนวิจัยองค์ความรู้ใหม่ที่เป็นพื้นฐานต่อการพัฒนา

เรื่อง

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ทางชีวภาพของฮอร์โมนลอกคราบแมลง

STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP STUDY OF INSECT MOULTING HORMONES

หัวหน้าโครงการ

นายอภิชาต สุขสำราญ

ผู้ร่วมวิจัย

นายบุญเอก ยิ่งยงณรงค์กุล และนายประเสริฐ พัฒนาประทีป

1 มกราคม 2540 - 31 ธันวาคม 2542

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณอาจารย์สิริธร เจริญสุข คุณนารถ พรหมรังสรรค์ คุณฉนัด ธนะฉัตรชัยรัตนะ คุณสุรีย์พร หอมวิเศษวงศา คุณวราฆุท์ คุรุธรรมจารุ และคุณเสาวณีย์ คำพันธ์ ที่ได้ช่วยร่วมมือในการทำวิจัยด้วยความอุตสาหะและตั้งใจ จนงานวิจัยสำเร็จลงได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ ดร.บงกช ธารชมพู และคุณอำนวย จินดศิริกุล ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ คุณวรรณา ศรีรินทร์นุช และคุณวรรณวิมล ทับดี ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ช่วยบันทึกข้อมูลทางนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี ขอขอบคุณคุณนิติรัตน์ ฉิมน้อย สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ที่ได้ช่วยบันทึกข้อมูลทางแมสสเปกโตรเมตรี หากปราศจากบุคคลที่กล่าวนามมาข้างต้นนี้ งานวิจัยจะไม่สามารถสำเร็จตามจุดมุ่งหมายได้

ขอขอบคุณ คุณปราณี ปรีชา ที่ช่วยเก็บตัวอย่างพืชสำหรับงานวิจัย และขอขอบคุณอาจารย์และเจ้าหน้าที่ของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหงที่ช่วยเหลือด้านต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

บทคัดย่อ

ได้มีการแยกเอคไดสเตียรอยด์ชนิดใหม่จากเปลือกรากของ *Vitex canescens* คือ 24-*epi*-abutasterone, (24R)-11α,20,24-trihydroxyecdysone และ 11α,20,26-trihydroxyecdysone โดยสองชนิดหลังเป็นเอคไดสเตียรอยด์ที่มีขั้วสูงมาก คือมีหมู่ไฮดรอกซิลถึง 8 หมู่อยู่ในโมเลกุล และเอคไดสเตียรอยด์ชนิดหลังสุดมีอยู่เป็นสอง C-25 epimers นอกจากนี้ยังได้แยกเอคไดสเตียรอยด์ที่ทราบโครงสร้างมาก่อนแล้ว คือ 20-hydroxyecdysone (20-ECD), 24-*epi*-makisterone A, shidasterone, calonysterone, turkesterone และ 20,26-dihydroxyecdysone จากพืชชนิดนี้ ได้แยก pterosterone ซึ่งเป็นส่วนประกอบย่อยออกมาจากเปลือกต้นของ *V. glabrata* นอกจากนี้ยังได้มีการแสดงให้เห็นว่า 20,26-dihydroxyecdysone อยู่ในลักษณะของสอง C-25 epimers โดยอัตราส่วนของ epimer แตกต่างกันตามชนิดของพืชในสกุล *Vitex*

ได้มีการสังเคราะห์เอคไดสเตียรอยด์ชนิดใหม่หรือหายากเพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยใช้ 20-ECD เป็นสารตั้งต้น จาก 20-ECD ได้มีการเตรียม stachysterone C ซึ่งเป็นเอคไดสเตียรอยด์ที่หายาก และนำสารนี้ไปทำ asymmetric dihydroxylation ได้ 24-*epi*-abutasterone และ abutasterone ที่สังเคราะห์โดยวิธีเดียวกันนี้ โดยการใช้วิธีการเดียวกัน ได้สังเคราะห์ 20,26-dihydroxyecdysone และสามารถแยก C-25 epimers ทั้งสองออกจากกันได้ และได้ศึกษาหาข้อมูลทางสเปกโตรสโกปีอย่างละเอียด ได้มีการสังเคราะห์ 24-*epi*-pterosterone อย่าง regioselective นอกจากนี้ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบของเอคไดสเตียรอยด์ ได้มีการปรับเปลี่ยน oxygen function ที่ตำแหน่ง 3 และ 6 ของ 20-ECD ให้เป็น 3-oximes และ 3-methoxime และ 6-oximes และ 6-methoximes แต่ละชนิดอยู่ในรูปของสอง geometric isomers และได้มีการเตรียม heterocyclic esters ของ 20-ECD คือ furan-2-carboxylate, thiophene-2-carboxylate และ pyrrole-2-carboxylate esters

ได้นำสารที่แยกและสังเคราะห์ได้ไปทดสอบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบโดยใช้ *Musca* bioassay ปรากฏว่า abutasterone และ 24-*epi*-abutasterone มีฤทธิ์ทางชีวภาพใกล้เคียงกัน แต่มีฤทธิ์ต่ำกว่า 20-ECD แสดงว่าหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่งที่ 24 ลดฤทธิ์ทางชีวภาพ 20,26-dihydroxyecdysone ทั้งสอง C-25 epimers แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต่ำกว่า 20-ECD แสดงว่าเมื่อเพิ่มหมู่ไฮดรอกซิลเข้าไปที่ตำแหน่ง 26 ของ 20-ECD ทำให้ฤทธิ์ทางชีวภาพลดลง ส่วน inokosterone ทั้งสอง epimers แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกัน ปรากฏว่า pterosterone ซึ่งเป็น C-25 deoxy analogue ของ 20-ECD แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพใกล้เคียงกับ 20-ECD อย่างไรก็ตาม C-24 epimers ของสารนี้คือ 24-*epi*-pterosterone มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่ำมาก แสดงว่าสเตียริโอเคมีของตำแหน่ง 24 ของเอคไดสเตียรอยด์มีบทบาทสำคัญต่อการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้พบว่าฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบของ 3- และ 6-oximes และ methoximes

น่าสนใจมาก ซึ่งจะทำให้ทราบข้อมูลเกี่ยวกับการยึดเกาะของเอสไดสเตียรอยด์ กับ receptor ของแมลงได้ดียิ่งขึ้น ส่วน heterocyclic esters ของเอสไดสเตียรอยด์ก็แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ สารส่วนใหญ่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่สูงกว่าอะซีเตตหรือ acyl esters อื่นๆ ผลที่ได้มีคุณค่าต่อการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ทางชีวภาพมาก

ABSTRACT

A number of novel ecdysteroids, 24-*epi*-abutasterone, (24R)-11α,20,24-trihydroxyecdysone and 11α,20,26-trihydroxyecdysone have been isolated and characterized from *Vitex canescens* root bark. The latter two compounds are polar ecdysteroids with eight hydroxyl groups in the molecule and the last ecdysteroids exists as two C-25 epimers. The known ecdysteroids, i.e., 20-hydroxyecdysone (20-ECD), 24-*epi*-makisterone A, shidasterone, calonysterone, turkesterone and 20,26-dihydroxyecdysone have also been isolated and identified from this plant species. Pterosterone, another known ecdysteroid, has been isolated as a minor constituent from *V. glabrata* stem bark. It has been demonstrated that 20,26-dihydroxyecdysone exists as two C-25 epimers and the epimer ratio varied among the *Vitex* species.

In order to study structure-activity relationships, a number of new or rare ecdysteroids have been synthesized, with 20-ECD as the starting material. Asymmetric dihydroxylation of the synthesized key intermediate stachysterone C, a rare ecdysteroid, afforded 24-*epi*-abutasterone. Abutasterone, the C-24 epimeric ecdysteroid, has also been synthesized. 20,26-Dihydroxyecdysone has similarly been synthesized and separation of the two C-25 epimers of this ecdysteroid and detailed spectroscopic studies have been accomplished. Regioselective synthesis of the rare ecdysteroid 24-*epi*-pterosterone has been achieved. Two C-25 epimers of inokosterone have also been synthesized in this study. Also, in order to study relationships between structure of ecdysteroid analogues and moulting hormone activity, the oxygen functions at the 3- and 6- positions of 20-ECD have been replaced by the oxime groups and the compounds 3-dehydro-2-deoxy-20-hydroxyecdysone 3-oximes and 3-methoximes, and 20-hydroxyecdysone 6-oximes and 6-methoximes have been prepared. Each of these ecdysteroid analogues exists as two geometric isomers and each of them has been subjected to biological activity evaluation. Heterocyclic esters of 20-ECD, i.e., the furan-2-carboxylate, thiophene-2-carboxylate and pyrrole-2-carboxylate esters, have also been prepared.

Musca bioassay has been used to determine moulting hormone activity of the isolated and synthesized ecdysteroids and analogues. Abutasterone and 24-*epi*-abutasterone exhibited similar activity but they were significantly less active than 20-ECD. The finding indicated that the presence of a 24-hydroxyl group in 20-ECD resulted in decrease in activity. The two C-25 epimeric 20,26-dihydroxyecdysone showed different activity and they were less active than 20-hydroxyecdysone, suggesting that an additional hydroxyl group at the 26-position of 20-ECD lowered activity. The two

epimers of the C-25 deoxy analogue, inokosterone, also showed different activity. On the other hand, pterosterone, the C-25 deoxy analogue of abutasterone, exhibited activity comparable to 20-ECD. However, its C-24 epimer, 24-*epi*-pterosterone, exhibited much lower activity. The finding implied that stereochemistry at the 24-position played an important role in moulting hormone activity. The moulting hormone activity of the 3- and 6- oxime and methoxime analogues showed interesting activity which provided a better insight into binding of ecdysteroids to insect receptor. The heterocyclic esters of ecdysteroids showed even more interesting results. Most of them exhibited higher activity than the corresponding acetate or other acyl ester derivatives. Some ester derivatives exhibited even more active than the parent ecdysteroid, 20-ECD. The results provided valuable informations concerning structure-activity relationships.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	ii
รายการตาราง	ix
รายการภาพ	xi
รายการ Scheme	xii
บทนำ	1
คำนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของโครงการ	2
ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
ผลการทดลองและอภิปรายผล	5
การสกัดแยกและหาสูตรโครงสร้างของเอคไดสเตียรอยด์จากพืช	10
24-*epi*-Abutasterone และเอคไดสเตียรอยด์อื่น ๆ	10
การสกัดแยก 20,26-Dihydroxyecdysone และการศึกษา C-25 epimer	10
การสกัดแยก Pterosterone (26) จากเปลือกต้น *Vitex glabrata*	13
การสกัดแยกเอคไดสเตียรอยด์ที่มีขั้วสูงจากเปลือกรากของ *Vitex canesens*	15
การสกัดเอคไดสเตียรอยด์เพื่อใช้ในการสังเคราะห์	15
การสังเคราะห์เพื่อปรับเปลี่ยนเอคไดสเตียรอยด์	18
การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่สายไซด์ด้านข้างของเอคไดสเตียรอยด์	18
การสังเคราะห์ 24-*epi*-Abutasterone (24) และ Abutasterone (25)	19
การสังเคราะห์ 20,26-Dihydroxyecdysone (28) ทั้งสอง C-25 epimers	22
การสังเคราะห์ 24-*epi*-Pterosterone (27) อย่าง regioselective	28
การสังเคราะห์ Inokosterone (14) และการแยก C-25 epimers ออกจากกัน	30
การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันในโครงร่างหลักของเอคไดสเตียรอยด์	32
การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่วง A	32

หน้า

การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่วง B 36
การปรับเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งต่างๆ ในโมเลกุล 38
การเตรียมอนุพันธ์ Furan-2-carboxylates ของ 20-hydroxyecdysone (2) 39
การเตรียมอนุพันธ์ Thiophene-2-carboxylates ของ 20-hydroxyecdysone (2) 42
การเตรียมอนุพันธ์ Pyrrole-2-carboxylates ของ 20-hydroxyecdysone (2) 44
วัสดุและวิธีการ 50
งานวิจัยทางพฤกษเคมี 50
การสกัดแยกและหาสูตรโครงสร้างของเอคไดสเตียรอยด์จากพืช 50
การสกัดแยก 24-*epi*-Abutasterone และเอคไดสเตียรอยด์อื่นๆ จาก Chloroform และ Ethyl acetate extracts ของเปลือกรากของ *Vitex canesens* 50
การสกัดแยก 20,26-Dihydroxyecdysone (28) 54
การสกัดแยก Pterosterone (26) จากเปลือกต้น *Vitex glabrata* 56
การสกัดแยก Highly oxygenated ecdysteroids จาก butanol extract ของเปลือกราก ของ *Vitex canescens* 56
การสกัดแยกเอคไดสเตียรอยด์เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ 59
การสังเคราะห์ปรับเปลี่ยนเอคไดสเตียรอยด์ 62
การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันและสายโซ่ด้านข้าง 62
การสังเคราะห์ 24-*epi*-Abutasterone (24) และ Abutasterone (25) 62
การสังเคราะห์ C-25 Epimers ทั้งสองของ 20,26-Dihydroxyecdysone 64
การสังเคราะห์ 24-*epi*-Pterosterone (27) 68
การสังเคราะห์ Inokosterone (14) และการแยก C-25 epimers ออกจากกัน 69
การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ในโครงร่างหลักของเอคไดสเตียรอยด์ 74
การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่วง A 74
การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่วง B 80
การเตรียมอนุพันธ์ของหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งต่างๆ ในโมเลกุล 82
การเตรียมอนุพันธ์ Furan-2-carboxylates ของ 20-hydroxyecdysone (2) 82
การเตรียมอนุพันธ์ Thiophene-2-carboxylates ของ 20-hydroxyecdysone (2) 88
การเตรียมอนุพันธ์ Pyrrole-2-carboxylates ของ 20-hydroxyecdysone (2) 93

งานวิจัยทางด้านการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ 95
การเพาะเลี้ยงหนอนแมลงวันบ้าน 95
การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ 97
เอกสารอ้างอิง 107
ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ 111

รายการตาราง

หน้า

ตารางที่ 1. ^{1}H NMR data of compounds **21, 24 and 25** 52

ตารางที่ 2. ^{13}C NMR data of compounds **24 and 25** 53

ตารางที่ 3. C-25 Epimer ratios of 20,26-dihydroxyecdysone from *Vitex* and *Silene* species 55

ตารางที่ 4 ^{1}H NMR data of compounds **26, 27, 42-46.** 57

ตารางที่ 5. ^{1}H NMR data of compounds **23, 24, 28, 29 and 30** (in pyridine-d_5) 60

ตารางที่ 6. ^{13}C NMR data of compounds **23, 24, 28, 29 and 30** (in pyridine-d_5) 61

ตารางที่ 7. ^{1}H NMR data of compounds **31, 32, 35 and 36** 63

ตารางที่ 8. Dihydroxylation product ratios of **24** and **25** resulting from using different ligands 65

ตารางที่ 9. ^{1}H NMR data of two C-25 epimers of 20,26-dihydroxyecdysone (28) 67

ตารางที่ 10. ^{1}H NMR data of compounds **47, 48, 49** "epimer 1" and **49** "epimer 2". 71

ตารางที่ 11. ^{1}H NMR data of compounds **26, 27, 14** "epimer 1" and **14** "epimer 2". 73

ตารางที่ 12. ^{1}H NMR data of compounds **53, 55 and 56** 75

ตารางที่ 13. ^{1}H NMR data of compounds **57 - 60** 77

ตารางที่ 14. ^{1}H NMR data of compounds **61-64** 79

ตารางที่ 15. ^{1}H NMR data of compounds **67 and 69-71** 81

ตารางที่ 16. ^{1}H NMR data of compounds **72-74** 83

ตารางที่ 17. ^{1}H NMR data of compounds **76-78** 85

ตารางที่ 18. ^{1}H NMR data of compounds **80 - 82** 87

ตารางที่ 19. ^{1}H NMR data of compounds **83 and 84** 89

ตารางที่ 20. ^{1}H NMR data of compounds **85-87** 90

ตารางที่ 21. ^{1}H NMR data of compounds **88-90** 92

ตารางที่ 22. ^{1}H NMR data of compounds **91 and 92** 94

ตารางที่ 23. ^{1}H NMR data of compounds **93 - 95** 96

หน้า

ตารางที่ 24. *Musca* bioassay of compounds **24** and **25** 98

ตารางที่ 25. *Musca* bioassay of two epimeric 20,26-dihydroxyecdysone (**28**) 99

ตารางที่ 26. *Musca* bioassay of compounds **26** and **27** 100

ตารางที่ 27. *Musca* bioassay of inokosterone (**14**) "epimer 1" and **14** "epimer 2" 101

ตารางที่ 28. *Musca* bioassay of compounds **59** and **60** mixture, compounds **61** and **62** 102

ตารางที่ 29. *Musca* bioassay of compounds **67, 69, 70** and **71** 103

ตารางที่ 30. *Musca* bioassay of compounds **72** and **73** 104

ตารางที่ 31. *Musca* bioassay of compounds **85, 87,** and **89** 105

ตารางที่ 32. *Musca* bioassay of compounds **93** and **94** 106

รายการภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1	25
ภาพที่ 2	26
ภาพที่ 3	27

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง โครงสร้างกับฤทธิ์ทางชีวภาพของฮอร์โมนลอกคราบแมลง

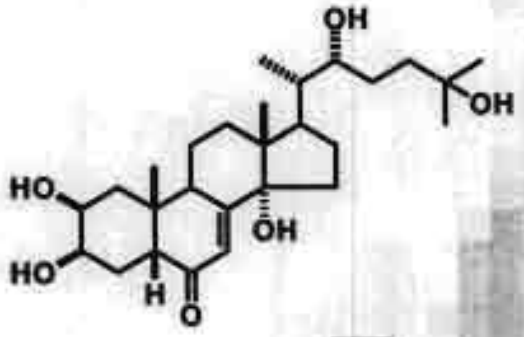
STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP STUDY OF INSECT MOULTING HORMONES

บทนำ

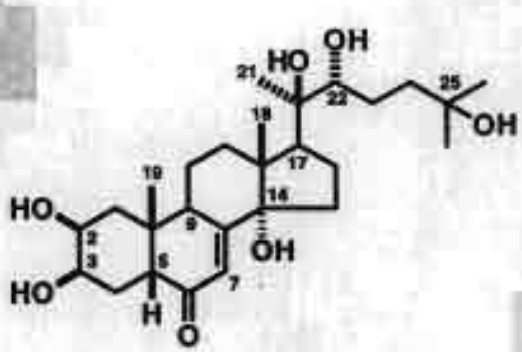
1. คำนำ

เป็นที่ทราบกันดีว่าการกำจัดแมลงศัตรูพืชโดยใช้สารเคมีนั้นก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสภาวะแวดล้อมและด้านสุขภาพความปลอดภัยของมนุษย์ ส่วนการกำจัดแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีนั้น ยังอยู่ในขอบเขตที่ค่อนข้างจำกัด จึงได้มีผู้สนใจที่จะป้องกันและกำจัดแมลงโดยวิธีการอื่น วิธีการหนึ่งซึ่งน่าสนใจคือ ได้มีผู้หาทางนำฮอร์โมนประเภทหนึ่งที่แมลงผลิตขึ้นมาใช้เพื่อการเจริญเติบโตของแมลงเองคือ เอคไดสเตียรอยด์ (ecdysteroids) มาใช้ในการป้องกันและกำจัดแมลง สารประเภทนี้พบในแมลง และยังพบในกุ้ง ปู และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังอีกบาง Class ในไฟลัม Arthropoda และ ไฟลัมอื่นๆ เช่น Mollusca[1] สารประเภทนี้ในตอนเริ่มแรกที่มีการค้นพบเรียกว่า ฮอร์โมนลอกคราบ (moulting hormone) เนื่องจากสามารถทำให้แมลงเปลี่ยนแปลงจากขั้นตอนของการเป็นตัวอ่อน (larvae) ไปสู่ดักแด้ (pupae) จากดักแด้จะเกิดการลอกคราบกลายเป็นแมลงต่อไป เมื่อมีการศึกษาค้นคว้ากันมากขึ้นได้พบว่า สารประเภทนี้มีหน้าที่ควบคุมกระบวนการต่างๆในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังดังกล่าวคือ การลอกคราบ การเปลี่ยนแปลงรูปร่างและควบคุมกระบวนการสืบพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบว่าสารประเภทนี้ยังควบคุมกระบวนการทางสรีระอื่นๆด้วย เช่น เมแทบอลิซึมและการขับถ่าย[2] ฮอร์โมนนี้ แมลงต้องการใช้ในปริมาณที่น้อยมาก ฉะนั้นเราจึงพบว่าสารประเภทนี้มีอยู่ในปริมาณที่น้อยมากในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น Butenandt และ Karlson[3] ได้นำดักแด้ของตัวไหม (silk-worm pupae) ปริมาณ 0.5 ตัน มาผ่านขั้นตอนการสกัดแยกหลายขั้นตอน จนได้ ecdysone (1) ซึ่งเป็นเอคไดสเตียรอยด์ชนิดหนึ่งเพียง 25 มิลลิกรัมเท่านั้น Horn และคณะ[4] ได้นำ crayfish คือ *Jasus lalandei* มา 1 ตัน สามารถแยก 20-hydroxyecdysone (2) ซึ่งเป็นเอคไดสเตียรอยด์อีกชนิดหนึ่งในปริมาณเพียง 2.3 มิลลิกรัมเท่านั้น ต่อมา Nakanishi และคณะ[5] ได้นำพืช *Podocarpus nakaii* มาสกัดหาสารด้านมะเร็ง แต่กลับได้เอคไดสเตียรอยด์ออกมา 3 ชนิดในปริมาณที่มากกว่าที่พบในสัตว์มากกล่าวคือ จากการใช้ใบของพืชชนิดนี้เพียง 900 กรัม สามารถแยกเอคไดสเตียรอยด์มีน้ำหนักรวมกันถึง 6.6 กรัม สารดังกล่าวมีฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบแมลง และในเวลาใกล้เคียงกันนี้ Takemoto และ

คณะ[6] ได้ตรวจสอบหาส่วนประกอบสำคัญที่มีอยู่ในรากของพืช *Achyranthes fauriei* ซึ่งมีสรรพคุณในการขับปัสสาวะ ปรากฏว่าได้มีการพบ 20-hydroxyecdysone (2) ด้วย และมีปริมาณค่อนข้างสูง จากการที่ได้มีการค้นพบเอคไดสเตียรอยด์ในพืช และพบในปริมาณที่มากกว่าที่พบในพืช ทำให้เกิดการตื่นตัวในการวิจัยหาแหล่งของสารประเภทนี้กันมากในพืช



1

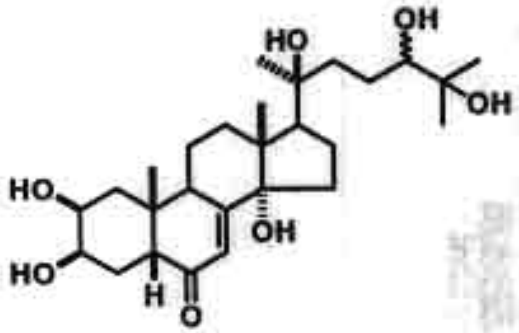


2

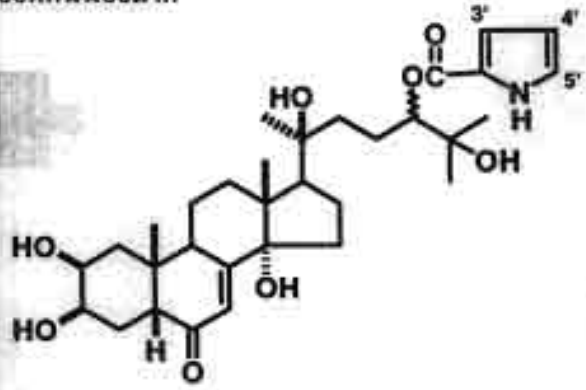
2. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

จากการค้นพบเอคไดสเตียรอยด์ในพืช ทำให้เชื่อกันว่า เป็นวิธีการหนึ่งที่พืชชนิดนั้นสร้างสารเคมีขึ้นมาต่อสู้กับแมลง[7] เพราะหากแมลงไปกินพืชที่มีเอคไดสเตียรอยด์อยู่ก็จะเป็นอันตรายต่อแมลงเอง ได้มีการศึกษาพบว่าเอคไดสเตียรอยด์แต่ละชนิดมีฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบแตกต่างกัน เอคไดสเตียรอยด์บางชนิดมีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง บางชนิดมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่ำ และบางชนิดก็ไม่มีฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าว อย่างไรก็ตาม ได้เป็นที่สงสัยกันว่า เหตุใดพืชจึงสร้างเอคไดสเตียรอยด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่ำ เพราะน่าจะเป็นผลเสียต่อพืชเองในการป้องกันตนเองจากศัตรู คณะผู้วิจัยมีความเชื่อว่า พืชจะต้องมีเหตุผลอยู่เบื้องหลังอย่างแน่นอน เมื่อไม่นานมานี้ คณะผู้วิจัยได้พบเอคไดสเตียรอยด์ชนิดหนึ่งคือ pinnatasterone (3) จากต้นสมอดีนนก (*Vitex pinnata*)[8] เอคไดสเตียรอยด์นี้มีฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบต่ำ ต่อมาก็ได้พบเอคไดสเตียรอยด์อีกชนิดหนึ่งจากพืชสกุล *Vitex* ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับ *V. pinnata* คือ ต้นผ่าแดี้ยน (*V. canescens*) เอคไดสเตียรอยด์ใหม่นี้ให้ชื่อว่า canescensterone (4)[9] จากโครงสร้างจะเห็นได้ว่า เอคไดสเตียรอยด์นี้ต่างจาก pinnatasterone (3) เพียง เป็น pyrrole-2-carboxylate ester ของ (3) แต่สิ่งที่คณะผู้วิจัยแปลกใจก็คือ เป็นครั้งแรกที่มีการค้นพบเอคไดสเตียรอยด์จากพืชที่เป็นอนุพันธ์เอสเทอร์ของสารประกอบ nitrogen heterocycle เพราะโดยปรกติแล้ว เอคไดสเตียรอยด์ที่พบในรูปของอนุพันธ์นั้นเป็นอนุพันธ์ซึ่งเป็นที่รู้จักกันดีเท่านั้นคือ อะซิเตต, benzoate, *p*-coumarate, acetonide และ glycoside เมื่อนำเอคไดสเตียรอยด์ (4) มาทดสอบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบ ปรากฏว่ามีฤทธิ์ตรงข้ามกับที่คาดไว้ กล่าวคือ แทนที่จะมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่ำเช่นเดียวกับเอคไดสเตียรอยด์ (3) แต่กลับแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพสูง ถึงแม้ว่ากรณีนี้จะเป็นตัวอย่างแรกของการค้นพบว่าพืชสร้างเอคไดสเตียรอยด์ที่

มีฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบตรงข้ามกับที่คาดไว้ แต่การที่ฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าวเป็นไปในทางที่เป็นประโยชน์ต่อพืชเองในการป้องกันตนเองจากแมลง คณะผู้วิจัยต่อนข้างจะเชื่อว่า การที่พืชเติมหมู่ pyrrole-2-carboxylate เข้าไปที่ตำแหน่ง 24 ของ สาร (3) นั้น ไม่น่าจะเป็นเรื่องที่เกิดขึ้นโดยบังเอิญ แต่อาจเป็นการที่พืชได้มีวิวัฒนาการในการสร้างสารเคมีขึ้นมาต่อสู้กับศัตรูของพืช ฉะนั้นเป็นไปได้ที่การที่พืชสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่ำอย่าง pimatasterone (3) แต่ความจริงแล้วสารนี้เป็นเพียงสารมัธยันตร์ (intermediate) สำหรับการสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงอย่าง canescensterone (4) ก็ได้ และการที่พืชสร้างเอคไดสเตียรอยด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงโดยการเพิ่มหมู่อนุพันธ์ แทนที่จะสร้างเอคไดสเตียรอยด์ชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงโดยตรงเลยเช่นนี้ จะเป็นไปได้หรือไม่ที่เป็นวิธีการหนึ่งที่พืชได้พยายามหาวิธีการป้องกันไม่ให้แมลงถอดพิษของการเป็นฮอร์โมนลอกคราบของเอคไดสเตียรอยด์ชนิดนั้นได้ เพราะได้มีผู้พบว่าแมลงหรือสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังบางชนิดสามารถถอดพิษของเอคไดสเตียรอยด์ที่มีอยู่ในพืชที่สัตว์เหล่านั้นกินเข้าไปได้ เช่น Modde และคณะ[10] พบว่าตั๊กแตน *Locusta migratoria* สามารถถอดพิษของ 20-hydroxyecdysone (2) ได้โดยการเปลี่ยน (2)ให้เป็น 20-hydroxyecdysone 3-acetate และ Garcia และคณะ[11] ก็ได้พบว่าหอยทาก *Cepaea nemoralis* สามารถถอดพิษของ (2) ได้โดยการเปลี่ยนให้เป็น 20-hydroxyecdysone 22-acetate อย่างไรก็ตาม คำถามข้างต้นคงจะยังไม่สามารถตอบได้ถ้าเรายังมีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของเอคไดสเตียรอยด์กับฤทธิ์ทางชีวภาพที่แสดงออก (structure-activity relationships, SAR) น้อย และเรายังมีการศึกษาผลของหมู่แทนที่หลายๆ ชนิดที่อยู่ในตำแหน่งต่างๆในโมเลกุลของเอคไดสเตียรอยด์กันน้อยมาก



3



4

ถ้าเราพิจารณาการใช้ยาปราบศัตรูพืชที่ใช้กับพืชทางเกษตรกรรมโดยทั่วๆไป เราอาจมองไม่เห็นความสำคัญด้านความปลอดภัยต่อมนุษย์ เพราะอันตรายจากสารเคมีเหล่านี้ดูเหมือนจะอยู่ไกลตัวคนส่วนใหญ่ กล่าวคือ เราอาจจะนึกถึงเพียงว่า เกษตรกรเท่านั้นที่จะได้รับผลโดยตรงต่อยาปราบศัตรูพืชเหล่านี้ แต่ถ้าเราคำนึงถึงอันตรายที่เกษตรกรจะได้รับแล้ว ปัญหาก็จะไม่ใช่เรื่องธรรมดา ถึงแม้บางคนอาจจะไม่ได้คำนึงถึงเรื่องนี้ แต่สารตกค้างที่อยู่บนพืชผลก็อาจก่อให้เกิดผลร้ายตามมาได้ ยิ่งถ้าเรามองตัวอย่างที่ใกล้ตัวกว่านี้คือ กรณีของพืชผักสวนครัว ถ้ามีสารกำจัดศัตรูพืชตกค้างอยู่แล้ว เราจะมองเห็นภาพของอันตราย

ที่อาจจะเกิดขึ้นได้ชัดเจนขึ้น เราคงไม่หวังให้ชาวสวนทุกคนมีความรับผิดชอบสูงในการใช้ยาปราบศัตรูพืชอย่างถูกต้อง และไม่เก็บพืชผักมาขายก่อนถึงเวลาที่เหมาะสม และตราบใดที่เรายังมีโอกาสได้รับทราบว่า ชาวสวนจำนวนไม่น้อยยังไม่กล้ารับประทานผักที่เก็บมาจากสวนของตนเอง เราก็ยังคงหวังว่าจะปลอดภัยจากสารปนเปื้อนเหล่านั้นได้ยาก จากมุมมองที่ว่า เราอาจจะเลียนแบบพืชในการต่อสู้กับแมลงด้วยการใช้เอคไดสเตียรอยด์หรือเอคไดสเตียรอยด์ที่ปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันและ/หรือโครงสร้างบางส่วนแล้วมาเป็นสารเคมีป้องกันและกำจัดศัตรูพืช และจากข้อมูลวิจัยที่พบว่า เอคไดสเตียรอยด์ไม่เป็นอันตรายต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม[3] หรือหากจะมีก็มีน้อยมาก ประกอบกับข้อมูลที่ว่า พืชหลายชนิดที่มีเอคไดสเตียรอยด์อยู่ในปริมาณมากนั้น ได้มีการใช้เป็นยาแผนโบราณมาเป็นเวลานานแล้ว จึงน่าจะมีความปลอดภัยต่อมนุษย์มากกว่ายาฆ่าแมลงอย่างแน่นอน ก็ยิ่งทำให้แนวทางในการป้องกันและกำจัดแมลงโดยวิธีนี้น่าจะได้รับความสนใจมากขึ้น แต่ปัญหาก็คือ เรายังขาดข้อมูลที่เกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของเอคไดสเตียรอยด์กับฤทธิ์ทางชีวภาพที่แสดงออก กล่าวคือ เรายังทราบไม่มากนักว่า เอคไดสเตียรอยด์ที่มีโครงสร้างและหมู่ฟังก์ชันแตกต่างกันในโมเลกุลจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพแตกต่างกันอย่างไรบ้าง ปัญหาสำคัญที่การศึกษาด้านนี้ยังไม่ก้าวหน้ามากเท่าที่ควรคือ ผู้ที่ทำการศึกษาด้านนี้ขาดแหล่ง (supply) ของเอคไดสเตียรอยด์ ถึงแม้ว่าขณะนี้ได้มีการค้นพบเอคไดสเตียรอยด์กันมาแล้วมากกว่า 100 ชนิดทั้งจากพืชและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง แต่เอคไดสเตียรอยด์ส่วนใหญ่ที่ค้นพบเป็นเอคไดสเตียรอยด์ที่มีอยู่ในปริมาณน้อย โดยเฉพาะเอคไดสเตียรอยด์ที่สกัดมาได้จากสัตว์นั้น ไม่ต้องคำนึงถึงการที่จะคิดนำมาใช้ศึกษาเพิ่มเติมในด้านอื่นๆ เพราะเพียงการสกัดแยกมาเพื่อหาสูตรโครงสร้างก็ทำได้ด้วยความลำบากยิ่งแล้ว ในบรรดาเอคไดสเตียรอยด์ที่ได้มีการค้นพบมาแล้วนั้น มีเพียงจำนวนไม่มากนักที่ได้มีการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพแล้ว ทำให้ยังขาดข้อมูลเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ทางชีวภาพอยู่มาก เมื่อขาดแหล่งของเอคไดสเตียรอยด์ นักเคมีได้พยายามแก้ปัญหาโดยการสังเคราะห์จากสเตียรอยด์ที่สกัดแยกได้จากธรรมชาติ แต่อาจกล่าวได้ว่าทุกการสังเคราะห์ประสบความสำเร็จเฉพาะในแง่วิชาการ แต่ในแง่ของการมีแหล่งของเอคไดสเตียรอยด์ที่มีโครงสร้างหรือหมู่ฟังก์ชันที่ได้รับการปรับเปลี่ยนแล้วยังอยู่ในขีดจำกัดมาก ไม่ว่าจะเป็นปัญหาด้านปริมาณสารที่สังเคราะห์ได้ หรือความยากลำบาก ทั้งนี้ยังไม่นับค่าใช้จ่ายที่ต้องใช้ไปในแต่ละวิธีการสังเคราะห์นั้นๆ แต่บังเอิญโชคดีมากที่คณะผู้วิจัยได้ค้นพบแหล่งของเอคไดสเตียรอยด์ในปริมาณสูงจากพืชสกุล *Vitex* บางชนิด[4,9,12] และในบรรดาเอคไดสเตียรอยด์ที่แยกออกมาได้นั้น มี 20-hydroxyecdysone (2) ในปริมาณมากที่สุด เอคไดสเตียรอยด์นี้เป็นสารหลักในการเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของฮอร์โมนลอกคราบแมลง และเอคไดสเตียรอยด์ชนิดนี้มีหมู่ไฮดรอกซิลอยู่ในตำแหน่งต่างๆกระจายทั่วทั้งโมเลกุล ทำให้มีโอกาสใช้วิธีการทางเคมีมาปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันและโครงสร้างบางส่วนของเอคไดสเตียรอยด์นี้ เพื่อนำมาศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ทางชีวภาพอันจะเป็นแนวทางที่จะได้เอคไดสเตียรอยด์หรือสารอื่นที่มีโครงสร้างบางส่วนที่จำเป็นต่อการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่สูงและเหมาะสมต่อการใช้เป็นสารป้องกันและกำจัดแมลงต่อไป

จะเห็นได้ว่า การสกัดแยกและหาสูตรโครงสร้างของเอคไดสเตียรอยด์ก็มีความสำคัญในแง่ของการที่จะได้เอคไดสเตียรอยด์ใหม่ที่อาจมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจมากขึ้น ซึ่งอาจทำให้ได้ข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ทางชีวภาพ หรืออาจได้ข้อมูลที่อาจนำมาสนับสนุนหรือเพิ่มเติมกับข้อมูลที่ได้จากการสังเคราะห์และปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันและโครงสร้างของเอคไดสเตียรอยด์อาจทำให้ได้ข้อมูลที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตสารเคมีป้องกันและกำจัดแมลงได้ในอนาคต

3. วัตถุประสงค์ของโครงการ

3.1 เพื่อสกัดแยกและหาสูตรโครงสร้างของเอคไดสเตียรอยด์จากพืชสกุล *Vitex* บางชนิด

3.2 เพื่อสังเคราะห์บางส่วนและปรับเปลี่ยนเอคไดสเตียรอยด์ที่มีอยู่แล้ว ให้เป็นเอคไดสเตียรอยด์ที่มีหมู่ฟังก์ชันหรือโครงสร้างบางส่วนที่แตกต่างไป

3.3 เพื่อทดสอบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบของเอคไดสเตียรอยด์ที่แยกและสังเคราะห์ได้

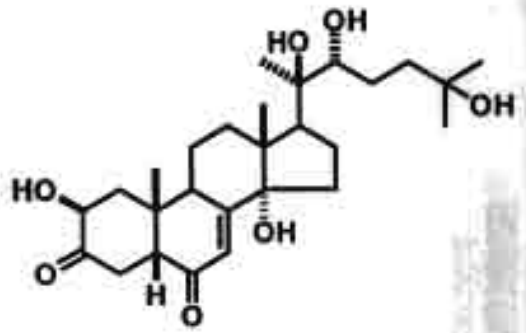
3.4 เพื่อทำการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของเอคไดสเตียรอยด์กับฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อเป็นแนวทางพัฒนาสารควบคุมป้องกันและกำจัดแมลงต่อไป

4. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

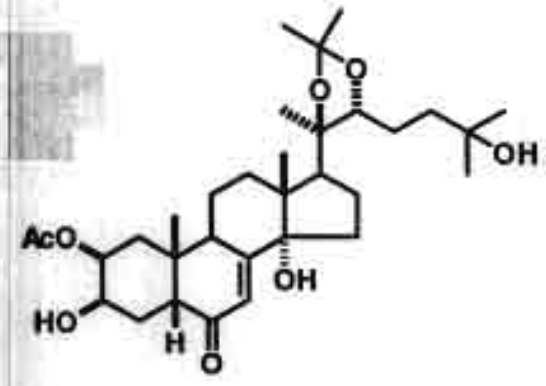
งานวิจัยทางด้านความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของเอคไดสเตียรอยด์กับฤทธิ์ทางชีวภาพในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบนั้น ยังมีค่อนข้างน้อยมาก เท่าที่มีอยู่ส่วนใหญ่เป็นงานของกลุ่มของ Horn และกลุ่มของ Robbins กล่าวคือ Bergamasco และ Horn[13] ได้พบว่าลักษณะของโครงสร้างของเอคไดสเตียรอยด์หรือสารในกลุ่มเอคไดสเตียรอยด์ที่จะต้องมีจึงจะแสดงฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบคือ (1) การมีการเชื่อมต่อระหว่างวง A และ B เป็นแบบซิส (*cis*-A/B ring fusion) (2) การมีหมู่คีโตที่ตำแหน่ง 6 และต่อด้วยพันธะคู่ที่ตำแหน่ง 7 (6-keto-7-ene system) (3) การมีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระที่ตำแหน่ง 14α (free 14α-hydroxyl group) และ (4) การมีสายโซ่ด้านข้างที่มีคาร์บอนครบ (full sterol side chain) Robbins และคณะ[14] ก็พบเช่นเดียวกับกลุ่มของ Horn ว่าหมู่ไฮดรอกซิลอิสระที่ตำแหน่ง 14α ก็มีความจำเป็นต่อการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพของเอคไดสเตียรอยด์ Suksamrarn และคณะ[15] ได้ค้นพบเพิ่มเติมอีกว่าตำแหน่ง 9 จะต้องไม่มีหมู่แทนที่ ถ้าตำแหน่งดังกล่าวมีหมู่แทนที่ จะทำให้ฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบหมดไปทันที นอกจากนี้ กลุ่มของ Horn[13] ยังพบว่า หมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 3β และ 22R จำเป็นต่อการแสดงฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบที่สูง และยังพบอีกว่า หมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 2 และ 25 ไม่มีความจำเป็นต่อการแสดงฤทธิ์ดังกล่าว

จากการที่แหล่งของเอคไดสเตียรอยด์ที่มีปริมาณมากมีอยู่จำกัดมาก ฉะนั้นจึงมีรายงานเกี่ยวกับการนำสารนี้ไปศึกษาปฏิกิริยาต่างๆค่อนข้างน้อยตามไปด้วย ปฏิกิริยาส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับการเตรียมอนุพันธ์โดยทั่วๆไป เช่น อะซีเลต, acetonides, trimethylsilyl ethers, sulphates และ 22-long-chain fatty

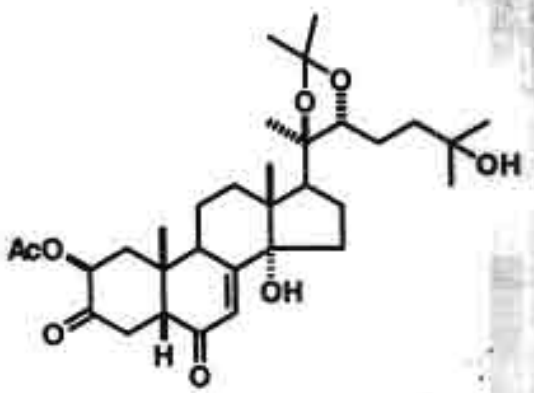
esters อย่างไรก็ตาม ได้มีการศึกษาปฏิกิริยาอื่นๆของเอคไดสเตียรอยด์กันบ้างคือ Galbraith และคณะ[16] ได้เตรียมอนุพันธ์อะซีเตตของเอคไดสเตียรอยด์ 2 โดยการทำ partial acetylation ของสาร 2 และทำ partial deacetylation ของสารอนุพันธ์อะซีเตต ได้สารอนุพันธ์อะซีเตตบางชนิด ต่อมา Suksamrarn และ Pattanaprateep[17] ได้หาวิธีใหม่ในการเตรียมอนุพันธ์ monoacetates, diacetates และ triacetates ของสาร 2 โดยการทำ selective acetylation ของสาร 2 Spindler และ Koolman[18] ได้นำสาร 2 มาออกซิไดส์โดยใช้แพลทินัมเป็นตะตะลิสต์ พบว่าได้ 3-dehydro-20-hydroyecdysone (5) และสารอื่นที่ไม่ทราบโครงสร้างอีก 4-5 ชนิด Lloyd-Jones และคณะ[19] ได้ใช้ Jones reagent ในการออก ซิไดส์สาร 6 ปรากฏว่าได้สารผลิตภัณฑ์ 2 ชนิด คือ 7 และ 8 ในอัตราส่วน 3:1 แต่ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ Siddall และคณะ[20] ได้



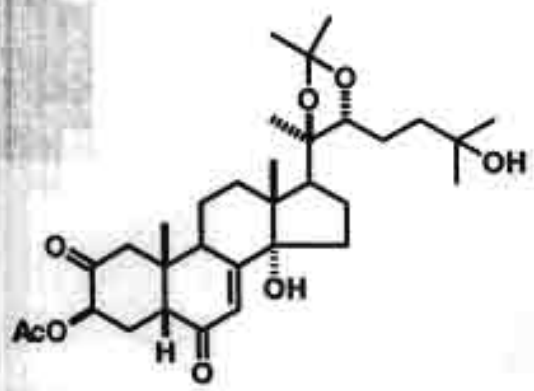
5



6

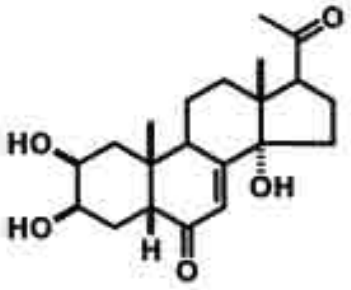


7

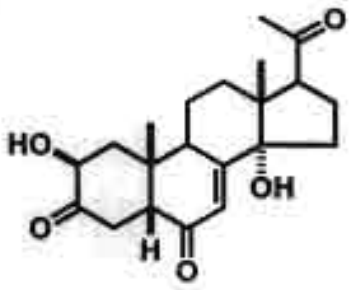


8

ออกซิไดส์สาร 2 ด้วย sodium metaperiodate พบว่าได้ poststerone (9) เมื่อมีผู้ใช้รีเอเจนต์เป็น Collin reagent และ Jones reagent ก็ได้ผลเช่นเดียวกัน Petersen และคณะ[21] ใช้รีเอเจนต์ชนิดหลังนี้ในการออกซิไดส์สาร 2 โดยเปลี่ยนสภาวะของปฏิกิริยาบางประการ ปรากฏว่าได้สาร 10 เพิ่มมาอีกนอกจากสาร 9 โดยการใช้หลักการเดียวกันนี้ Davies และคณะ[22] และ Greenwood และคณะ[23] รวมทั้ง Girault และคณะ[24] สามารถเตรียม 3-dehydroecdysteroids ทำนองเดียวกับสาร 5 Dinan และคณะ[25] ได้นำสารพวก 3-dehydroecdysteroids มาทำการรีดิวส์ด้วย sodium borohydride ได้ epimeric alcohols ที่ตำแหน่ง 3

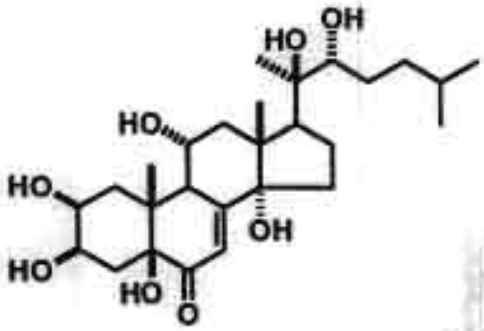


9

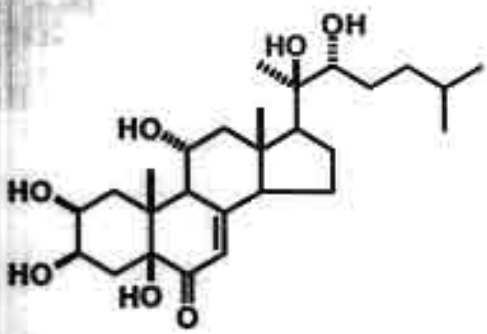


10

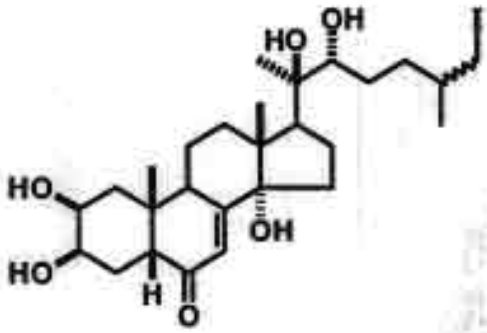
Galbraith และคณะ[26] และ Hedtmann และคณะ[27] ได้ใช้ poststerone (9) เป็นสารมัธยันตร์ (intermediate) ในการสังเคราะห์เอคไดสเตียรอยด์ชนิดอื่น สำหรับการปรับเปลี่ยนส่วนอื่นๆของเอคไดสเตียรอยด์ก็ได้มีรายงานไว้บ้าง คือ Cherbas และคณะ[28] ได้พบว่าเมื่อนำ muristerone A (11) มาทำปฏิกิริยากับ trimethylsilyl chloride-sodium iodide กลับได้ 14-deoxymuristerone A (12) ซึ่งมีฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบสูง Lee และคณะ[29] ได้สังเคราะห์ 26-iodoponasterone A (13) จาก inokosterone (14) โดยผ่านปฏิกิริยาเคมี 4 ขั้นตอน ปรากฏว่า สาร 13 นี้มีฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบสูง นอกจากนี้ Tomas และคณะ[30] ได้สังเคราะห์ 25-fluoroponasterone A (15) จากสาร 2 แต่สารนี้ไม่มีรายงานว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพดีกว่าสาร 2 แต่อย่างใด เมื่อเร็วๆนี้ Suksamrarn และคณะ[15] ได้หาวิธีการสังเคราะห์ calonysterone (16) ซึ่งเป็นเอคไดสเตียรอยด์ที่หาจาก เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบ ปรากฏว่าสามารถสังเคราะห์สารนี้ได้ด้วยปฏิกิริยาขั้นตอนเดียว โดยนำสาร 2 มาออกซิไดส์ด้วยออกซิเจนและมีเบสเป็นตะตะลิสต์ เมื่อนำสาร 16 ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ปรากฏว่าสารนี้ไม่มีฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบ ซึ่งสอดคล้องกับผลที่กลุ่มของ Horn ได้เสนอไว้ เพราะสาร 16 นี้ขาดลักษณะทางโครงสร้างพื้นฐานของการมีฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบหลายประการ Galbraith และคณะ[31] ได้หาทางปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของเอคไดสเตียรอยด์ 2 โดยการขจัดหมู่ไฮดรอกซิลที่อยู่ตำแหน่ง 2 เริ่มต้นด้วยการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 2 ให้เป็นอนุพันธ์ tosylate แล้วขจัดหมู่ tosyloxyl ด้วย lithium aluminum hydride แล้วออกซิไดส์หมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 6 ซึ่งเกิดจากการที่หมู่คีโตถูกรีดิวส์ให้กลับเป็นหมู่คีโตตามเดิม แต่สารผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ 17 แทนที่จะเป็น 18 เนื่องจากขั้นตอนการรีดิวส์เกิดผ่านกลไกของปฏิกิริยาที่ต่างไปจากที่คาดไว้ อย่างไรก็ตาม Kametani และคณะ[32] ได้สังเคราะห์สาร 18 ได้จาก pregnenolone แต่ต้องผ่านปฏิกิริยามากมายหลายขั้นตอน ตั้งต้นจากเอคไดสเตียรอยด์ 2 Suksamrarn และ Yingyongnarongkul[33,34] ได้สังเคราะห์สาร 17 และ 18 และ epimer ที่ตำแหน่ง 5 ของ 17 และ 18 รวมทั้งอนุพันธ์ acetate ที่ตำแหน่ง 3 และ 22 ของ 18 และอนุพันธ์ benzoate ที่ตำแหน่ง 22 ของ 18 เนื่องจากกลุ่มของ Horn ได้สรุปว่า หมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 2 ของ เอคไดสเตียรอยด์ไม่จำเป็นต่อการแสดง



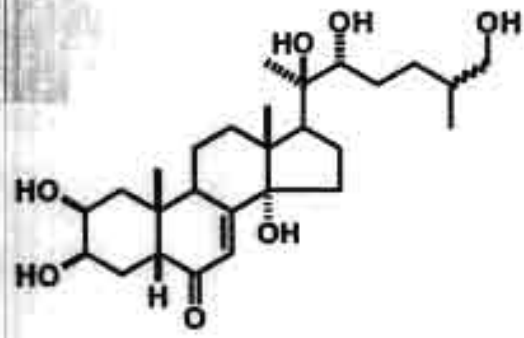
11



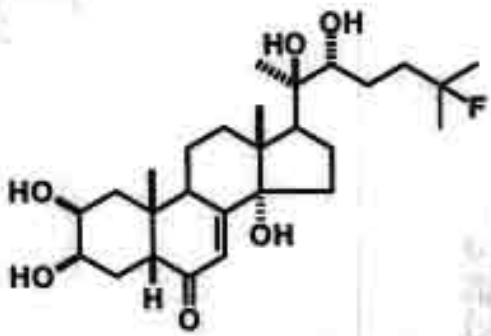
12



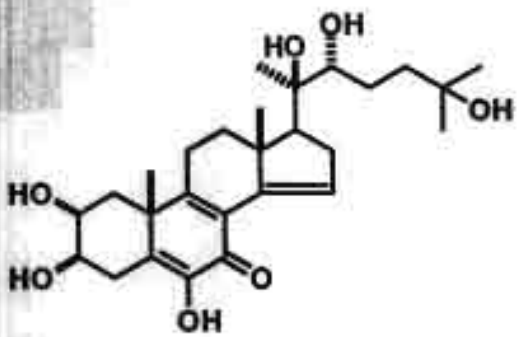
13



14



15

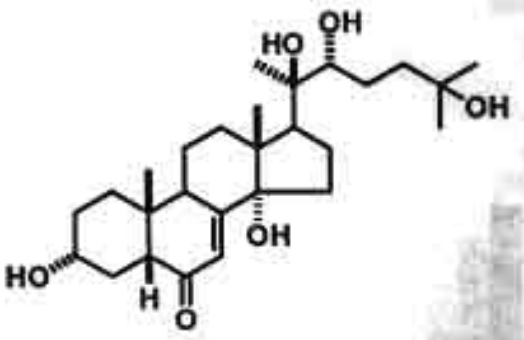


16

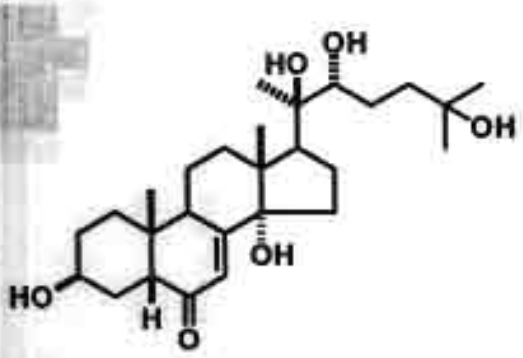
ฤทธิ์ทางชีวภาพของแอคไดสเตียรอยด์[33] Suksamrarn และคณะ[35] จึงได้สังเคราะห์ 3-deoxy-20-hydroxyecdysone (19) และ analogue 20 จากอนุพันธ์ 20,22-acetonide ของ 20-hydroxyecdysone (2) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบ ปรากฏว่าสาร 19 มีฤทธิ์ทางชีวภาพค่อนข้างสูง ถึงแม้จะไม่สูงเท่าแอคไดสเตียรอยด์ 2 แสดงว่าหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 2 ก็ยังมีความสำคัญ

ต่อการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ ฉะนั้น จึงเห็นได้ว่า ความรู้ทางด้าน SAR ในส่วนของวง A ของเอคไดสเตียรอยด์ยังมีน้อยมาก น่าจะได้มีการศึกษาเพิ่มเติม

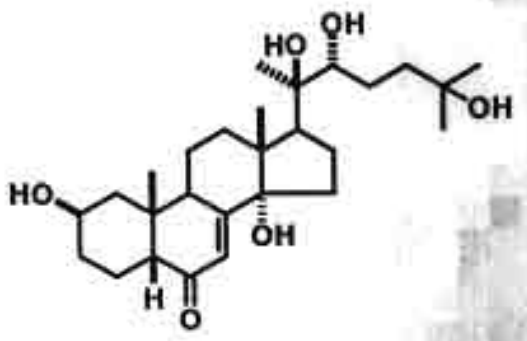
สำหรับการสังเคราะห์เอคไดสเตียรอยด์จากสารตั้งต้นที่เป็นสเตอรอยด์ที่หามาได้ง่ายก็ยังมีงานของ Siddall และคณะ[36], Mori และคณะ[37], Furlenmeier และคณะ[38] และ Barton และคณะ[39] แต่ทุกการสังเคราะห์นั้นผ่านขั้นตอนต่างๆหลายขั้นตอน เมื่อดูโครงสร้างโดยส่วนรวมของเอคไดสเตียรอยด์ จะเห็นว่าสารประเภทนี้น่าจะมีความเสถียรต่อการทำปฏิกิริยาโดยทั่วไป แต่สำหรับผู้ที่ยังไม่คุ้นเคยกับการทำปฏิกิริยาของเอคไดสเตียรอยด์กับรีเอเจนต์ชนิดต่างๆแล้วจะพบว่า บางปฏิกิริยาที่ต้องการให้เกิดกลับไม่มีอะไรเกิดขึ้นเลย บางปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้อย่างไม่คาดคิดว่าจะเกิด แต่สำหรับผู้ที่คุ้นเคยกับการทำปฏิกิริยาเคมีกับเอคไดสเตียรอยด์ก็จะพบจุดอ่อนจุดแข็งของสารประเภทนี้ต่อการทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์ชนิดต่างๆ เช่นในสภาวะที่เป็นเบส (เช่นในสารละลาย NaOH หรือ NH_4OH) ออกซิเจนในอากาศจะทำให้เกิด autoxidation ของเอคไดสเตียรอยด์ (เช่น สาร (2)) ได้[35] เบสที่ไม่แรงนัก เช่น K_2CO_3 และ $KHCO_3$ สามารถก่อให้เกิด epimerization ที่ตำแหน่ง 5 ได้[23,40] ในสภาวะที่เป็นกรด โดยเฉพาะกรดแร่อนินทรีย์ เช่น HCl แม้จะเป็นชนิดเจือจางก็ยังสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยา dehydration ที่ตำแหน่ง 14 ได้[36] คณะผู้วิจัยยังได้พบว่า แม้แต่กรดฟอร์มิกเข้มข้นยังทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ จากการตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วย TLC พบว่า มีสารใหม่เกิดขึ้นถึงประมาณ 12 ชนิด แสดงว่าเอคไดสเตียรอยด์ไม่ค่อยเสถียรในสภาวะที่เป็นกรด



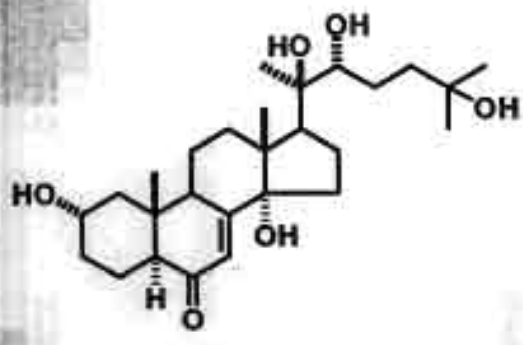
17



18



19



20

ผลการทดลองและอภิปรายผล

การสกัดแยกและหาสูตรโครงสร้างของเอคไดสเตียรอยด์จากพืช

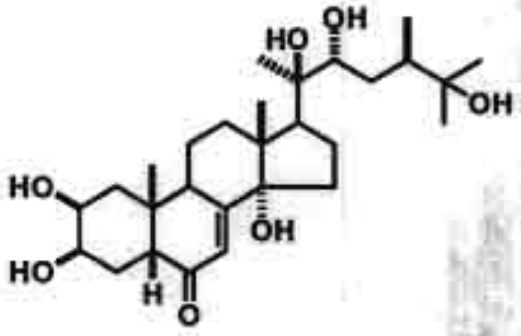
1) 24-*epi*-Abutasterone และเอคไดสเตียรอยด์อื่นๆ

จากการที่ได้เสนอโครงการวิจัยไว้ว่า โครงการวิจัยนี้จะทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ทางชีวภาพ (structure-activity relationships, SAR) ของเอคไดสเตียรอยด์ ฉะนั้นในการศึกษาดังกล่าวนี้ จะต้องมีเอคไดสเตียรอยด์ที่มีหมู่ฟังก์ชันหรือโครงสร้างแตกต่างกันไป เพื่อจะได้นำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบแมลง เพื่อที่จะได้มีความเข้าใจเกี่ยวกับ SAR ต่อไป ที่มาของเอคไดสเตียรอยด์ที่จะใช้ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้เสนอไว้ในโครงงานวิจัยว่าจะมาจาก 2 แหล่งคือ สกัดแยกจากพืชที่มีเอคไดสเตียรอยด์ และจากการสังเคราะห์เอคไดสเตียรอยด์และปรับเปลี่ยนเอคไดสเตียรอยด์โดยวิธีทางเคมี สาเหตุที่เรายังจำเป็นต้องหาเอคไดสเตียรอยด์จากพืชเพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เพราะเราเชื่อว่า พืชสร้างเอคไดสเตียรอยด์ขึ้นมาก็เพื่อป้องกันตัวเองจากการรุกรานของแมลงและศัตรูชนิดอื่นๆ ฉะนั้นเอคไดสเตียรอยด์ที่มีสูตรโครงสร้างหรือหมู่ฟังก์ชันแตกต่างออกไป น่าจะให้ข้อมูลทางฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกันออกไป และอาจจะทำให้ได้แนวทางที่จะนำมาสังเคราะห์เอคไดสเตียรอยด์หรือปรับเปลี่ยนเอคไดสเตียรอยด์ต่อไป ซึ่งน่าจะเป็นผลดีต่อการศึกษา SAR ของเอคไดสเตียรอยด์

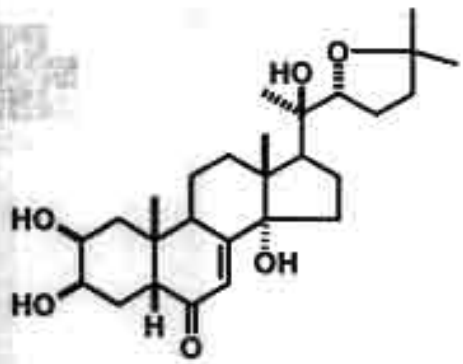
จากการนำเปลือกราก (root bark) ของต้นผ่าเสี้ยน (*Vitex canescens*) มาสกัดด้วยเฮกเซน แล้วตามด้วยเอทานอล พบว่า crude ethanol extract มีส่วนประกอบทางเคมีที่ค่อนข้างสลับซับซ้อน เมื่อเทียบกับส่วนประกอบทางเคมีของเปลือกต้น (stem bark) ของพืชชนิดนี้ ซึ่งเคยได้ทำการสกัดแยกมาแล้ว[*] เมื่อนำส่วนที่สกัดด้วยเอทานอลนี้มาสกัดแยกต่อไปตามลำดับด้วยคลอโรฟอร์มและเอทิลอะซิเตด พบว่าได้ 20-hydroxyecdysone (2) เป็นเอคไดสเตียรอยด์ที่มีอยู่ปริมาณมาก (major ecdysteroid) ทั้งใน chloroform และ ethyl acetate extracts และพบในปริมาณที่สูงมาก เอคไดสเตียรอยด์อื่นๆเป็นเอคไดสเตียรอยด์ที่มีอยู่ในปริมาณน้อย (minor ecdysteroids) จะอยู่รวมกันเป็น complex mixture ซึ่งรวมทั้งสารประเภทอื่นๆอยู่ด้วย ในการแยกจึงต้องอาศัยเทคนิคทาง HPLC เข้ามาช่วย

สำหรับ chloroform extract เราสามารถแยกได้ 24-*epi*-makisterone A (21)[41,42] ส่วน ethyl acetate extract สามารถแยกได้ shidasterone (22),[43,44] calonysterone (16)[15,45] และ turkesterone (23)[12] เอคไดสเตียรอยด์ 22 ก็มีอยู่ใน chloroform extract ด้วย สำหรับข้อมูล ^{1}H NMR ของสาร 21 (ดูตารางที่ 1) สอดคล้องกับโครงสร้างของ 21 และค่า chemical shifts ของ methyl resonances ที่ได้มีผู้รายงานไว้[41,42] ข้อมูล ^{13}C NMR ของสาร 21 (ไม่ได้แสดงไว้) ก็สอดคล้องกับค่าที่มีผู้รายงานไว้[41]

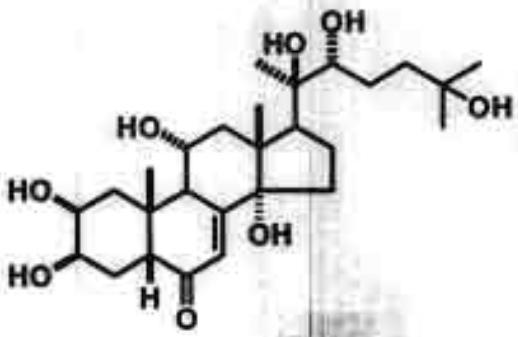
เอกลักษณ์ของเอคไดสเตียรอยด์ 2, 16, 22 และ 23 ได้ทำโดยเปรียบเทียบข้อมูลทาง สเปกโทรสโกปีที่ได้มีรายงานไว้ และในบางกรณีก็ยืนยันโดยเปรียบเทียบ TLC กับ authentic samples (ดูวัสดุและวิธีการ) เมื่อเร็วๆนี้ได้มีผู้หา configuration ที่ C-22 ของสาร 22 และพบว่าเป็น 22R [44]



21



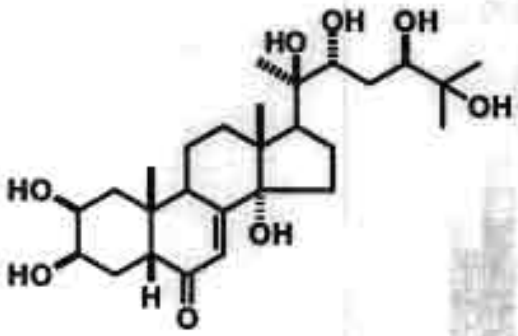
22



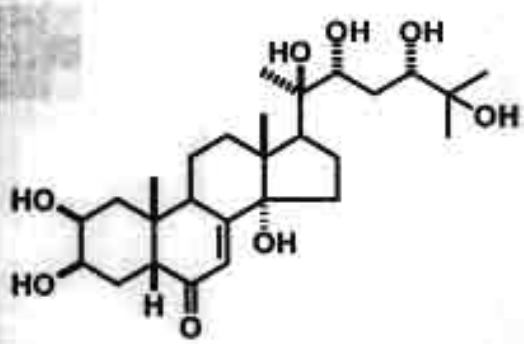
23

ในการแยกเอคไดสเตียรอยด์จากเปลือกรากของต้นผ่าเสี้ยนครั้งนี้ ได้แยกเอคไดสเตียรอยด์ชนิดใหม่ได้ 1 ชนิด คือ 24-*epi*-abutasterone (24) โดยแยกออกมาได้เพียง 3 มิลลิกรัมจาก ethyl acetate extract หลังจากผ่านขั้นตอนการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีและ HPLC หลายครั้ง จาก high resolution FAB-แมสสเปกตรัม ทำให้ทราบว่าสารนี้มีสูตรโมเลกุล $C_{27}H_{44}O_8$ สเปกตรัมของสารนี้ (ดูตารางที่ 1) มีความคล้ายคลึงกับ abutasterone (25)[46,47] ลักษณะของสเปกตรัมและตำแหน่งสัมพัทธ์ของ H-2, H-3, H-5, H-7, H-9 และ H-17 รวมทั้ง 18-Me และ 19-Me แสดงให้เห็นว่าเอคไดสเตียรอยด์ทั้ง 2 ชนิดมีเอคไดสเตียรอยด์นิวเคลียสเหมือนกัน สัญญาน dd ทั้งสองที่ δ 4.51 (J = 9.6 และ 2.3 Hz) และที่ δ 4.37 (J = 9 และ 2.7 Hz) แสดงให้เห็นว่าหมู่ไฮดรอกซิลที่สายโซ่ด้านข้างทั้งสองหมู่ควรอยู่ที่ C-22 และ C-24 หมู่ไฮดรอกซิลอีก 1 หมู่ควรอยู่ที่ C-25 เพราะ 26-Me และ 27-Me เกิดเป็น 2 singlets ที่ δ 1.46 และ 1.47 ฉะนั้นจะเห็นได้ว่า oxygenation pattern ของเอคไดสเตียรอยด์ใหม่นี้กับ abutasterone (25) นั้นเหมือนกัน ต่างกันตรงที่การจัดเรียงตัวทางสเตียริโอเคมีของหมู่ไฮดรอกซิลเท่านั้น ค่า chemical shift

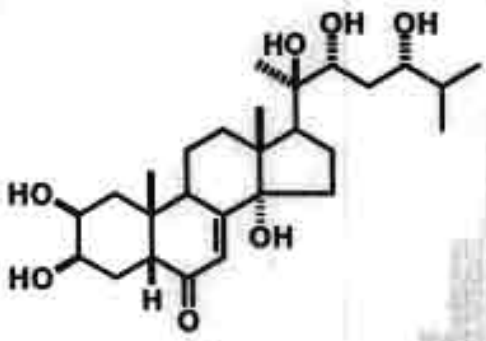
ของเอคไดสเตียรอยด์นี้กับสาร 25 มีขนาด (magnitude) พอๆกัน แสดงว่าการจัดเรียงตัวของหมู่ไฮดรอกซิลที่ C-20 และ C-22 ของสารทั้ง 2 นี้เหมือนกัน ซึ่งโครงสร้างนี้ยังได้รับการยืนยันจากการเปรียบเทียบ ^{13}C NMR สเปกตรัมกับสาร 25[47] (ตารางที่ 2) จากตารางจะเห็นได้ว่า ข้อแตกต่างอย่างเด่นชัดในสเปกตรัมของสารทั้งสองชนิดนี้คือ สัญญาณที่ C-22, C-23 และ C-24 (ดูตารางที่ 2) ข้อแตกต่างดังกล่าวนี้เป็นไปทำนองเดียวกับกรณีของ pterosterone 26 และ 24-*epi*-pterosterone (27)[48,49] ซึ่งค่า chemical shift ของ C-22, C-23 และ C-24 ของ pterosterone (26) อยู่ที่ δ 77.4, 35.7 และ 76.7 ตามลำดับ ส่วนกรณีของ 24-*epi*-pterosterone (27) อยู่ ที่ δ 73.4, 37.5 และ 73.5 ตามลำดับ ฉะนั้นจึงสรุปได้ว่าเอคไดสเตียรอยด์ใหม่นี้ ต่างจาก abutasterone (25) ตรง configuration ของหมู่ไฮดรอกซิลที่ C-24 ฉะนั้นโครงสร้างของเอคไดสเตียรอยด์นี้จึงเป็น 24 คือเป็น 24-*epi*-abutasterone



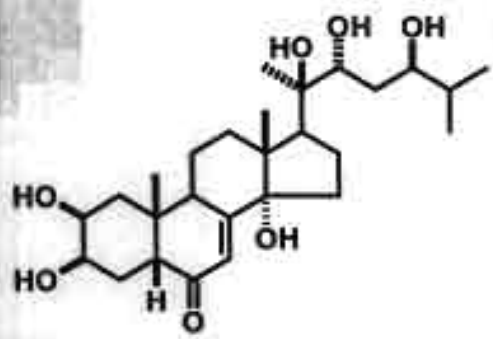
24



25



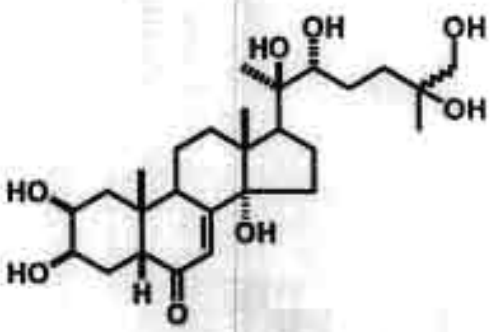
26



27

2) การสกัดแยก 20,26-Dihydroxyecdysone และการศึกษา C-25 Epimers

จากที่ได้กล่าวมาแล้วในหัวข้อที่ 1 (24-*epi*-Abutasterone และเอคไดสเตียรอยด์อื่นๆ) คือ ได้มีการแยกเอคไดสเตียรอยด์ที่มีปริมาณน้อย (ประมาณ 0.5 มิลลิกรัม) ออกมาจากเปลือกรากของต้นผ่าเสี้ยน (*Vitex canescens*) ด้วย เนื่องจากปริมาณสารน้อยเกินไปจึงยังไม่ทราบว่าเป็นเอคไดสเตียรอยด์ที่ทราบโครงสร้างกันแล้วหรือเป็นชนิดใหม่ แต่จากการเปรียบเทียบ polarity ของเอคไดสเตียรอยด์นี้ คาดว่าเป็นเอคไดสเตียรอยด์ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลมากกว่า 20-hydroxyecdysone (2) อยู่ 1 หมู่ จึงได้นำเอคไดสเตียรอยด์ที่มีอยู่ไฮดรอกซิลอยู่ 7 หมู่มาเปรียบเทียบกับสารนี้ ปรากฏว่า TLC ตรงกับ 20,26-dihydroxyecdysone (28) ที่แยกมาจากพืช *Silene nutans*[30] ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์สารตัวอย่างจาก Professor Rene Lafont แต่เมื่อเปรียบเทียบสารจากทั้ง 2 แหล่งนี้ด้วย ปรากฏว่าไม่ใช่สารชนิดเดียวกัน เมื่อตรวจสอบ HPLC chromatogram อย่างละเอียดพบว่า เอคไดสเตียรอยด์ที่มาจาก *V. canescens* มี minor component อยู่ประมาณ 6% และเอคไดสเตียรอยด์ที่มาจาก *S. nutans* ก็มี minor component ประมาณ 6% โดย minor component ของแหล่งหนึ่งจะตรงกับ major component ของอีกแหล่งหนึ่ง จึงน่าจะเป็นไปได้มากที่ major ecdysteroid จาก 2 แหล่งนี้ต่างก็เป็น 20,26-dihydroxyecdysone (28) แต่ต่างกันที่ stereochemistry เพียงบางจุดหรือเพียงจุดเดียว ซึ่งเป็นไปได้มากที่จะเป็น epimer กันที่ C-25 แต่จากการศึกษาประวัติของ 20,26-dihydroxyecdysone (28) ตั้งแต่การค้นพบครั้งแรกจากหนอนใบยาสูบ (*Manduca sexta*)[31] และจากพืช *Podocarpus elatus*[32] จนกระทั่งถึงปัจจุบัน[1] ยังไม่ได้มีการ กล่าวถึงการมี C-25 epimers ของ 28 ฉะนั้น ถ้าสารจาก 2 แหล่งนี้เป็น C-25 epimers กันจริง ก็จะเป็นสิ่งที่น่าสนใจมาก โดยเฉพาะในแง่ของฤทธิ์ทางชีวภาพ



28

เนื่องจากปริมาณของเอคไดสเตียรอยด์ที่ได้จากเปลือกรากของ *V. canescens* มีน้อยมาก เพื่อที่จะให้มีสารนี้เพียงพอในการศึกษาข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี เราจึงมองหาแหล่งอื่นของเอคไดสเตียรอยด์นี้ เพราะการหาเปลือกรากของ *V. canescens* มาใหม่จะทำได้ยากกว่า แหล่งของเอคไดสเตียรอยด์นี้ได้มองไปที่เปลือกลำต้นของต้นไข่เน่า (*V. glabrata*) เพราะหาได้ง่ายกว่าเปลือกต้นหรือเปลือกรากของต้น *V. canescens* จากสมมุติฐานที่ว่าพืชที่อยู่ในสกุล (genus) เดียวกันแต่ต่างชนิด (species) กัน มีโอกาสที่จะ

สร้างสารชนิดเดียวกันนั้น เราได้นำมาใช้ในกรณีของพืชสกุล *Vitex* ทั้งสองนี้ โดยคาดว่า ถ้า *V. glabrata* มี 20,26-dihydroxyecdysone (28) แล้วน่าจะได้ชนิดที่มี stereochemistry เหมือนกับใน *V. canescens* ปัญหาอยู่ที่ว่า เปลือกต้นของ *V. glabrata* จะมี 20,26-dihydroxyecdysone หรือไม่ และถ้ากลับปรากฏว่า 20,26-dihydroxyecdysone ที่แยกได้มี stereochemistry ไปเหมือนกับ 20,26-dihydroxyecdysone ที่ได้มาจาก *S. nutans* ก็ยังนับว่าเป็นประโยชน์อยู่ เพราะ authentic sample ที่ได้มานี้มีอยู่น้อยมาก

สำหรับเปลือกของต้น *V. glabrata* ได้มีการศึกษาส่วนประกอบทางเคมีมาก่อนหน้านี้แล้ว คือได้พบ 20-hydroxyecdysone (2)[12] ในปริมาณมาก และยังพบ turkesterone (23)[12] และ calonysterone (16)[15] ในปริมาณน้อย และเราได้ใช้แหล่งของพืชนี้เป็นแหล่งสำคัญของ 20-hydroxyecdysone (2) ในงานสังเคราะห์ เมื่อนำเปลือกของต้นไข่เน่ามาผ่านขั้นตอนการสกัดแยกตามวิธีการปกติของการสกัดแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ พอถึงขั้นตอนการสกัดด้วย *n*-butanol นำ butanol extract มาแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้สารหลาย fraction สำหรับ fraction ที่มี turkesterone (23) อยู่เป็นส่วนใหญ่ และมีเอคไดสเตียรอยด์ที่มีอยู่ในปริมาณน้อยอยู่จำนวนหนึ่ง ซึ่ง TLC ตรงกับ 20,26-dihydroxyecdysone (28) นำกลุ่มนี้มาแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี เพื่อแยกสารนี้จาก turkesterone (23) กับเอคไดสเตียรอยด์อื่น ตามด้วยการใช้ reversed phase HPLC จนได้ 20,26-dihydroxyecdysone ในปริมาณ 1 มิลลิกรัม จากเปลือกของ *V. glabrata* ปริมาณ 1 กิโลกรัม เมื่อหาอัตราส่วนของ 2 epimers พบว่าเป็น 1:2.5 ซึ่งต่างกันอย่างมากกับกรณีของสาร 28 ที่มาจากเปลือกรากของ *V. canescens* ซึ่งอัตราส่วนเป็น 1:14.7

ฉะนั้นเราจึงสนใจที่จะตรวจสอบอัตราส่วนของสอง epimers จากพืชสกุล *Vitex* อื่นๆ เราจึงตรวจสอบหาสาร 28 จาก *V. canescens* จากจังหวัดนครศรีธรรมราช[9] และจากจังหวัดแพร่ และ *V. pinnata*[9] ในการนี้เราได้พัฒนาวิธีการทำสาร 28 ให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์อัตราส่วนของ epimers ทั้งสองของ 28 โดย reversed-phase HPLC system สองระบบ (system A และ system B) อย่างไรก็ตาม สำหรับกรณีของเปลือกต้นและเปลือกรากของ *V. canescens* จากนครศรีธรรมราชทั้ง 2 ตัวอย่าง และเปลือกต้นของ *V. pinnata* นั้น ต้องเพิ่มขั้นตอนของการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วย normal-phase HPLC system (system C) เพื่อกำจัด 24-*epi*-abutasterone (24) จากสาร 28 มิเช่นนั้นจะไม่สามารถหาอัตราส่วนของ 2 epimers ของ 28 ได้ ผลการวิเคราะห์หาปริมาณของ epimers ของ 20,26-dihydroxyecdysone (28) ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3 จะเห็นได้ว่า อัตราส่วนของ ของ 28 จากเปลือกต้นของ *V. canescens* ทั้งจากภาคเหนือและภาคใต้มีค่าพอ ๆ กัน และมีค่าไม่ต่างไปมากนักจากเปลือกต้นของ *V. glabrata* และ *V. pinnata* แต่ความแตกต่างที่เด่นชัดอยู่ที่อัตราส่วนของ epimers จากเปลือกต้นของพืชในสกุล *Vitex* นี้ กับเปลือกรากของ *V. canescens*

จากปริมาณของสาร 28 ที่ได้จากการสกัดแยกจากพืชสกุล *Vitex* จะเห็นได้ว่ามีน้อยมาก เราจึงตัดสินใจทำการสังเคราะห์สาร 28 ทั้งสอง epimers (ดูการสังเคราะห์ปรับเปลี่ยนเอคไดสเตียรอยด์ หัวข้อ

ที่ 2) เพื่อที่จะให้ได้สาร 28 แต่ละ epimer เพียงพอต่อการศึกษาทางสเปคโทรสโกปี และการนำไปทดสอบฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบต่อไป

3) การสกัดแยก Pterosterone (26) จากเปลือกต้น *Vitex glabrata*

24-*epi*-Pterosterone (27) เป็นเอคไดสเตียรอยด์ที่หายากชนิดหนึ่ง ได้ถูกสกัดแยกออกเมื่อเร็วๆนี้จากรากของ *Athyrium yokoscense*[49] เอคไดสเตียรอยด์ที่เป็น C-24 epimer ของสารนี้คือ pterosterone (26) ได้มีผู้แยกออกได้จากพืชหลายชนิด[1,7] รวมทั้ง *Vitex megapotamica*[37] สาร 26 นี้มีฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบสูงใน *Sarcophaga* bioassay[38] จากการที่เราได้สังเคราะห์และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของ 24-*epi*-abutasterone (24) และ abutasterone (25) มาแล้ว และพบว่าสารทั้ง 2 ชนิดนี้มีฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับ 20-hydroxyecdysone (2) ใน *Musca* bioassay[39] จากการค้นพบดังกล่าวนี้ทำให้ทราบว่าการที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอยู่ที่ตำแหน่ง 24 ทั้ง 24R และ 24S มีผลให้ฤทธิ์ทางชีวภาพตกลง อย่างไรก็ตามจากการที่มีผู้รายงานว่าสาร 26 ซึ่งเป็น C-25 deoxy analogue ของสาร 25 มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง[38] ทำให้เราต้องการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร 26 และ 27 โดยใช้ *Musca* bioassay

การที่จะศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเอคไดสเตียรอยด์ 26 และ 27 ได้นั้น จะต้องมีสารดังกล่าว สำหรับสาร 26 นั้นได้มีรายงานว่าพบในพืชสกุล *Vitex* ดังกล่าวมาแล้วข้างต้น เราจึงได้ตรวจสอบพืชสกุล *Vitex* และพบว่าสาร 26 เป็นส่วนประกอบที่มีอยู่น้อยในเปลือกต้นไข่เน่า (*V. glabrata*) จึงได้ทำการสกัดแยกออกมา ข้อมูลทาง ^{1}H NMR (ตารางที่ 4) ตรงกับที่ได้มีผู้รายงานไว้[49]

4) การสกัดแยกเอคไดสเตียรอยด์ที่มีขั้วสูงจากเปลือกรากของ *Vitex canescens*

เมื่อนำส่วนที่สกัดด้วยบิวทานอล (butanol extract) จากเปลือกของต้นผ่าเสี้ยน (*Vitex canescens*) มาตรวจสอบด้วย TLC พบว่ามีเอคไดสเตียรอยด์ที่มีขั้วสูงอยู่ คอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจลไม่สามารถแยกเอคไดสเตียรอยด์ที่มีขั้วออกจากกันได้ ยกเว้นสามารถแยกเอคไดสเตียรอยด์ที่มีขั้วน้อยลงมาและ turkesterone (23) ส่วนใหญ่ออกจากเอคไดสเตียรอยด์ที่มีขั้วมาก

เมื่อทำการแยกด้วย HPLC โดยใช้ reversed-phase คอลัมน์ Spherisorb ทำให้สามารถกำจัด turkesterone (23) ที่ยังเหลืออยู่ให้หมดไป แต่ก็ไม่สามารถแยกเอคไดสเตียรอยด์ที่มีขั้วสูงออกจากกันได้อย่างเด็ดขาด จึงนำส่วนย่อย (fractions) ต่างๆที่แยกสารได้เพียงบางส่วนมารวมกันใหม่ ซึ่งเมื่อตรวจสอบด้วย TLC ธรรมดา (normal-phase) พบว่าได้เพียงจุด (spot) เดียวเท่านั้น นำส่วนผสมมาแยกด้วยคอลัมน์ μBondapak C18 ชนิดวิเคราะห์ ทำให้ได้สาร 3 กลุ่มด้วยกัน เมื่อตรวจสอบด้วย TLC ธรรมดา พบว่าแต่ละกลุ่มมีสารที่มีขั้วน้อยกว่าเล็กน้อยอยู่ประมาณ 3-5 % ซึ่งสามารถแยกออกไปโดยใช้ HPLC คอลัมน์ชนิด normal-phase คือ Hypersil Si ทำให้ได้เอคไดสเตียรอยด์บริสุทธิ์ 3 ชนิด ซึ่งมีข้อมูล ^{1}H NMR และ

^{13}C NMR ดังแสดงในตารางที่ 5 และ 6 ในการ assign ค่า chemical shifts ของ ^{1}H NMR และ ^{13}C NMR ได้เปรียบเทียบกับข้อมูลของเอคไดสเตียรอยด์ ที่ได้มีการบันทึกไว้แล้ว

(24R)-11α,20,24-Trihydroxyecdysone (29)

สาร 29 เป็นเอคไดสเตียรอยด์ชนิดแรกที่ออกมาจาก HPLC คอลัมน์ ชนิด reversed-phase ข้อมูลจาก HR-FAB แมสสเปคตรัมแสดงสูตรโมเลกุลเป็น $C_{27}H_{44}O_9$ ข้อมูล ^{1}H NMR สเปคตรัมของสารนี้ (ตารางที่ 5) มีความคล้ายคลึงกับของ turkesterone (23) จากลักษณะของสเปคตรัมและค่าตำแหน่งของ chemical shifts ของ H-1 ถึง H-17 รวมทั้ง 18-Me และ 19-Me ในตารางที่ 5 แสดงให้เห็นว่าเอคไดสเตียรอยด์ทั้ง 2 ชนิดมี steroid nucleus เดียวกัน จากการที่ไม่มีสัญญาณโปรตอน 1 ตัวที่ประมาณ δ3.8 เป็นการชี้แนะว่า H-22 ได้เคลื่อนไปทาง downfield เมื่อเทียบกับสาร 23 จากสูตรโมเลกุลของสารนี้ แสดงว่ามีหมู่ไฮดรอกซิลมากกว่าสาร 23 อยู่ 1 หมู่ และไฮดรอกซิลหมู่สุดท้ายนี้ควรอยู่ที่สายโซ่ด้านข้าง และหมู่ไฮดรอกซิลนี้ควรอยู่ที่ตำแหน่ง 24 เพราะจาก splitting pattern (สัญญาณ broad doublet 2 แห่ง) ที่ δ4.50 และ δ4.35 ซึ่งสอดคล้องกันอย่างพอดีกับ H-22 และ H-24 (หรือกลับกัน) โดยอาศัยพื้นฐานที่ว่าเอคไดสเตียรอยด์ที่ได้จากพืชทุกชนิดมีสเตียริโอเคมีที่ C-20 และ C-22 เหมือนกัน สเตียริโอเคมีที่คาร์บอนดังกล่าวของสารนี้กับสาร 23 ควรเหมือนกัน ฉะนั้น configuration ของหมู่ไฮดรอกซิลที่ C-24 อาจเป็น 24R (คือ 29) หรือ 24S เมื่อเปรียบเทียบค่า chemical shifts และลักษณะของสเปคตรัมของ H-22 และ H-24 ของสาร 29 กับ 24-*epi*-abutasterone (24, ดูตารางที่ 1) จะเห็นว่าเกือบจะเหมือนกัน ค่า chemical shifts ของโปรตอนเหล่านี้ แตกต่างไปจาก abutasterone (25) ซึ่งอยู่ที่ δ4.08 และ δ4.24 (หรือกลับกัน) สิ่งซึ่งควรกล่าวไว้ในที่นี้คือ chemical shift ของ 21-Me ของ 29 และ 24 มีค่าใกล้เคียงกันมาก แสดงว่าการจัดเรียงทางสเตียริโอเคมีที่ C-20 และ C-22 (รวมทั้งที่ C-24) ของ 29 เหมือนกับ 24

โครงสร้างของสาร 29 ยังได้รับการยืนยันต่อไปด้วยการเปรียบเทียบ ^{13}C NMR สเปคตรัมกับสาร 23 และ 24 (ตารางที่ 5) จะเห็นได้ว่าค่า chemical shifts ของ C-1 ถึง C-21 ของ 29 และ 23 เหมือนหรือใกล้เคียงกันมาก อย่างไรก็ตาม ค่า chemical shifts ของ C-22 ถึง C-27 ของ ทั้งสองสารนี้ มีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด (ดูตารางที่ 5) แต่เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่าง 29 กับ 24 ปรากฏว่า มีค่าเหมือนหรือใกล้เคียงกันมาก ฉะนั้นจึงสรุปได้ว่า โครงสร้างของสาร 29 คือ (24R)- 11α,20,24-trihydroxyecdysone

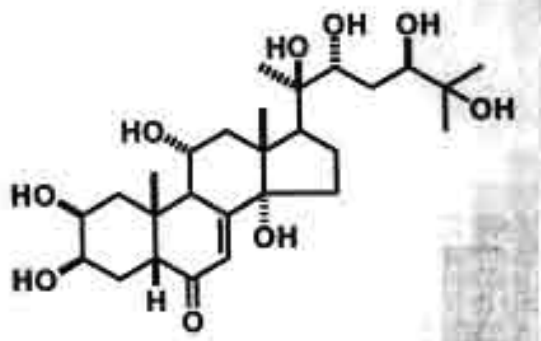
11α,20,26-Trihydroxyecdysone (30 "epimer 1")

เอคไดสเตียรอยด์ชนิดที่สองมีสูตรโมเลกุลเหมือนกับชนิดแรก ข้อมูล ^{1}H NMR ของ H-1 ถึง H-17 รวมทั้ง 18-Me และ 19-Me ของเอคไดสเตียรอยด์นี้กับ turkesterone (23) เกือบเหมือนกันทุกประการ (ดูตารางที่ 5, สาร 30 "epimer 1") แสดงว่า steroid nucleus ของเอคไดสเตียรอยด์ทั้งสองนี้เหมือนกัน

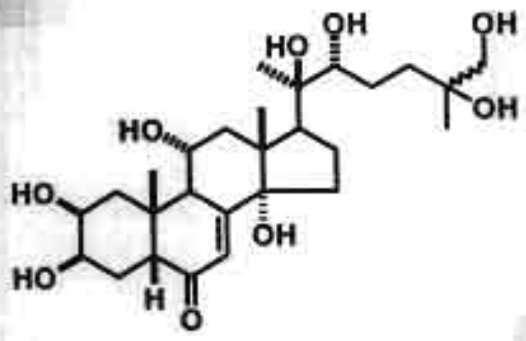
อย่างไรก็ตาม ค่า chemical shifts ของ H-22 ถึง 27-Me ของ **30** มีความแตกต่างไปจาก **23** รวมทั้งเอคไดสเตียรอยด์ชนิดแรก แต่กลับไปคล้ายคลึงกับ 20,26-dihydroxyecdysone (**28**) (ตารางที่ 5) โดยเฉพาะ H-22, H-26 และ 27-Me ฉะนั้นโครงสร้างของเอคไดสเตียรอยด์นี้น่าจะเป็น **30** ซึ่งสามารถยืนยันได้โดยจากข้อมูลจาก ^{13}C NMR ค่า chemical shifts ของ C-1 ถึง C-19 ของ **30** เกือบเหมือนกันทุกประการกับของ **23** นอกจากนี้ค่า chemical shifts ของ C-20 และ C-22 แสดงว่าการจัดตัวของหมู่ไฮดรอกซิลที่ C-20 และ C-22 ของเอคไดสเตียรอยด์ทั้ง 2 ชนิดนี้เหมือนกัน ส่วนค่า chemical shifts ของ C-23 ถึง C-27 สอดคล้องกันอย่างดีกับสายโซ่ด้านข้างของ 20,26-dihydroxyecdysone (**28**) (ดูตารางที่ 6) ฉะนั้นโครงสร้างของเอคไดสเตียรอยด์นี้จึงเป็น **30** "epimer 1" คือ 11α,20,26-trihydroxyecdysone (ในตารางที่ 5 และ 6 เรียกว่า **30** "epimer 1")

11α,20,26-Trihydroxyecdysone (30 "epimer 2")

เอคไดสเตียรอยด์ชนิดที่สามมีสูตรโมเลกุลเหมือนกับเอคไดสเตียรอยด์ชนิดที่สอง ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารนี้ (ดูตารางที่ 5, สาร **30** "epimer 2") เกือบเหมือนกันทุกประการจนแทบไม่มีส่วนที่แตกต่างกันกับสารชนิดที่สอง ^{13}C NMR สเปกตรัม ของสารทั้งสองชนิดนี้เกือบเหมือนกันทุกประการ โดยมีที่ต่างกันพอควรที่ค่า chemical shifts ของ C-26 และ C-27 เท่านั้น ข้อมูลทั้งหมดเหล่านี้แสดงว่าสาร 2 ชนิดนี้เป็น epimer กันที่ C-25 ก่อนหน้านี้เมื่อเร็วๆนี้ได้มีการแยก 20,26-dihydroxyecdysone (**28**) ทั้งสอง C-25 epimers จากพืชสกุล *Vitex* จำนวนหนึ่ง และได้มีการสังเคราะห์เอคไดสเตียรอยด์ **28** ทั้งสอง epimers และได้ศึกษา ^{1}H NMR และ ^{13}C NMR สเปกตรัมของแต่ละ epimer[60] อย่างไรก็ตามข้อมูลทางสเปกโตรสโกปีที่มีอยู่นี้ไม่สามารถบอกได้ว่าสาร **30** แต่ละ epimer มี absolute configuration ที่ C-25 เป็นอย่างไร



29



30

การสกัดแยกเอคไดสเตียรอยด์เพื่อใช้ในการสังเคราะห์

การสกัดแยก 20-hydroxyecdysone (2) ซึ่งเป็นเอคไดสเตียรอยด์ที่มีอยู่ในปริมาณมาก ได้กระทำโดยใช้เปลือกต้นไข่เน่า (*Vitex glabrata*) โดยสกัดด้วยเมทานอล แล้วจึงนำมาสกัดตามขั้นตอนตั้งแต่ตัวทำละลายไม่มีขั้ว คือนอร์มัลเฮกเซน แล้วใช้ตัวทำละลายมีขั้วปานกลางคือคลอโรฟอร์ม จนถึงตัวทำละลายมีขั้วมากคือนอร์มัลบิวทานอล แล้วจึงนำมาแยกเอคไดสเตียรอยด์ 2 ออกมา ในบางครั้งได้สกัดโดยข้ามขั้นตอนการใช้คลอโรฟอร์มไปก็ได้เช่นกัน แต่มีสารประเภทอื่น รวมทั้งเอคไดสเตียรอยด์อื่นที่มีอยู่ในปริมาณน้อยออกมากับ butanol extract มาก ทำให้ขั้นตอนการแยกเอคไดสเตียรอยด์ 2 ออกมายากขึ้น แต่การสกัดด้วยคลอโรฟอร์มก่อนก็มีข้อเสียบางประการคือมีเอคไดสเตียรอยด์ 2 บางส่วนออกมาด้วย อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการสกัดแยกสาร 2 ออกมาบ่อยๆ ก็ทำให้มีประสบการณ์ที่สามารถทำการแยกสาร 2 ออกมาได้โดยไม่ยากนัก สำหรับปริมาณสารที่แยกออกมาได้ขึ้นกับ lot ของพืชที่ใช้

การสังเคราะห์ปรับเปลี่ยนเอคไดสเตียรอยด์

การสังเคราะห์เอคไดสเตียรอยด์และปรับเปลี่ยนเอคไดสเตียรอยด์หรือโครงสร้างที่แตกต่างไปเพื่อนำไปใช้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไปนั้น ในช่วงระยะเวลา 3 ปีของโครงการ เราได้ตั้งเป้าหมายไว้ว่าจะสามารถทำงานได้ 3 ส่วนคือ การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่สายโซ่ด้านข้าง (side chain) ของเอคไดสเตียรอยด์ การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันในโครงร่างหลักของเอคไดสเตียรอยด์ และการเตรียมอนุพันธ์ของหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งต่างๆในโมเลกุล

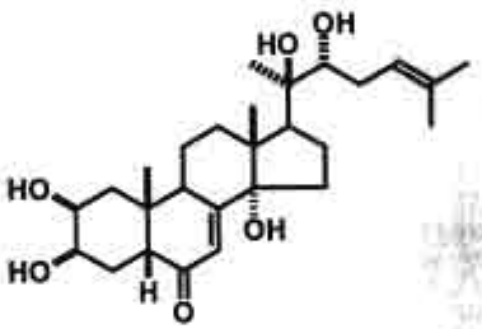
1. การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่สายโซ่ด้านข้างของเอคไดสเตียรอยด์

สำหรับการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่สายโซ่ด้านข้างของเอคไดสเตียรอยด์นั้น เป็นงานด้านสังเคราะห์ส่วนแรกที่เราได้เริ่มดำเนินการ เป้าหมายก็คือหาทางสังเคราะห์เอคไดสเตียรอยด์และ/หรือ analogues ของเอคไดสเตียรอยด์ที่มีความแตกต่างกันของหมู่ฟังก์ชันที่สายโซ่ด้านข้าง ไม่ว่าจะเป็นจำนวน ตำแหน่ง และสเตียริโอเคมีของหมู่ไฮดรอกซิลที่อยู่สายโซ่ด้านข้าง และเป็นงานส่วนที่น่าสนใจมากที่สุด เพราะจากผลของการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพทางด้านการเป็นฮอร์โมนลอกคราบที่ผ่านมาเท่าที่มีรายงานไว้ ถึงแม้จะมีไม่มากนักก็ตาม แต่ก็ทำให้ทราบว่า การเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยที่สายโซ่ด้านข้างของเอคไดสเตียรอยด์จะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านฤทธิ์ทางชีวภาพของเอคไดสเตียรอยด์ได้มาก กล่าวคือทางกลุ่มของ Horn[13] ได้พบว่าหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 22 มีความจำเป็นต่อการแสดงฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบของแมลงวันสกุล *Calliphora* และ configuration จะต้องเป็นแบบ R ด้วย และยังพบอีกว่าหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 25 ไม่จำเป็นต่อการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าว และถ้าตำแหน่งที่ 25 ถูก acetylation ฤทธิ์ทางชีวภาพของเอคไดสเตียรอยด์นั้นจะลดลงไปด้วย จากการค้นพบ

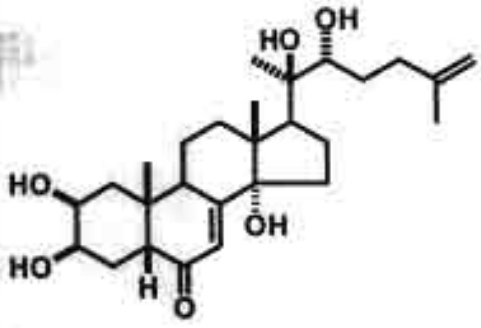
pinnatasterone (3) ซึ่งเป็นเอคไดสเตียรอยด์จากต้นสมอดีนนก[8] และมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่ำ ก็เป็นการยืนยันว่าเอคไดสเตียรอยด์ที่ไม่มีหมู่ฟังก์ชันแบบ 22R จะมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่ำ แต่เมื่อมีการพบ canescensterone (4) จากเปลือกต้นผ่าเสี้ยน[9] ก็ทำให้เราเกิดความประหลาดใจมากที่ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารนี้กลับสูง ทั้งๆ ที่เอคไดสเตียรอยด์นี้เป็นอนุพันธ์ pyrrole-2-carboxylate ของ 3 เท่านั้น ด้วยเหตุนี้เราจึงต้องการสังเคราะห์เอคไดสเตียรอยด์ที่มีจำนวน ตำแหน่ง และสเตียริโอเคมีของหมู่ไฮดรอกซิลต่างๆกันในสายโซ่ด้านข้าง

1) การสังเคราะห์ 24-*epi*-Abutasterone (24) และ Abutasterone (25)

จากสารตั้งต้น 20-hydroxyecdysone (2) เราต้องการเตรียม key intermediate ที่สามารถเปลี่ยนไปเป็นเอคไดสเตียรอยด์ หรือ analogues ของเอคไดสเตียรอยด์ที่มีจำนวน ตำแหน่ง และสเตียริโอเคมีของหมู่ไฮดรอกซิลแตกต่างกัน และเนื่องจากมีเอคไดสเตียรอยด์หลายชนิดที่มีความแตกต่างดังกล่าวที่ตำแหน่ง 24, 25 และ 26 ฉะนั้นสารมัธยันตร์หรืออินเทอร์มีเดียดังกล่าวนี้ ควรเป็นสารที่มีพันธะคู่ที่ตำแหน่ง 24, 25 (คือสาร 31) และที่ตำแหน่ง 25, 26 (คือสาร 32) จากสาร 31 และ 32 และสามารถเปลี่ยนให้เป็นเอคไดสเตียรอยด์และ analogues ด้วยปฏิกิริยาหลายประเภทด้วยกัน

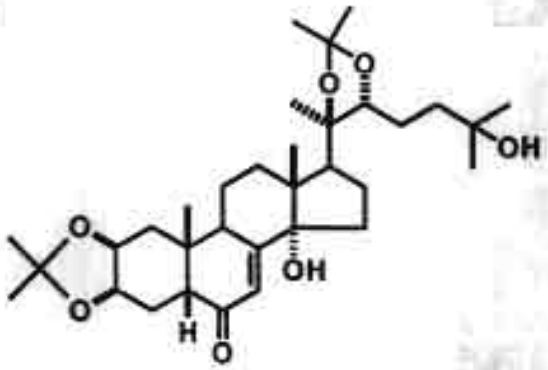


31

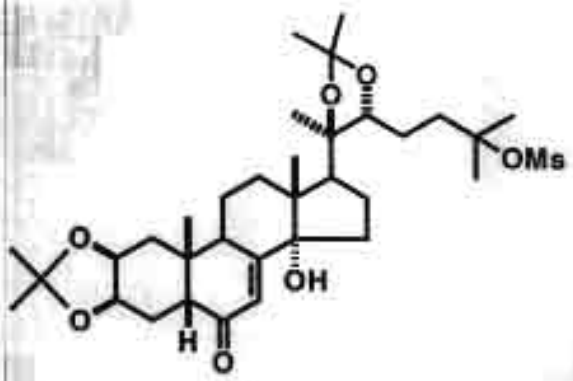


32

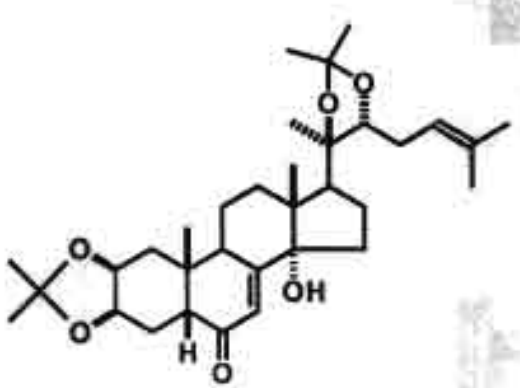
ฉะนั้นจาก 20-hydroxyecdysone (2) เราป้องกันหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่งที่ 2, 3, 20 และ 22 ไม่ให้เกิดปฏิกิริยาที่ไม่ต้องการ โดยการเตรียมเป็น acetonide derivative คือ 20-hydroxyecdysone 2,3:20,22-diacetonide (33) ตามวิธีที่ได้เคยใช้มาแล้ว[17] ปฏิกิริยาระหว่าง diacetonide (33) กับ mesyl chloride ใน pyridine โดยมี DMAP (4-dimethylaminopyridine) อยู่ด้วย ปฏิกิริยาเกิดผ่าน mesylate 34 ซึ่งจะไม่มีการแยกออกมา แต่ปฏิกิริยาจะเกิดการขจัด MsOH ต่อไป ทำให้ได้ส่วนผสมระหว่าง olefin 35 และ 36 เป็นส่วนผสมซึ่งไม่สามารถแยกจากกันได้บน TLC นำส่วนผสม 35 และ 36 มาขจัดหมู่ acetonide ออกไปด้วย 70% กรดอะซีติก ได้ส่วนผสมของ olefin 31 และ 32 ในการวิจัยด้านผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เมื่อเราสามารถแยกเอคไดสเตียรอยด์ชนิดใหม่คือ 24-*epi*-abutasterone (24) ออกมาได้จากเปลือกรากของต้นผ่าเสี้ยนดัง



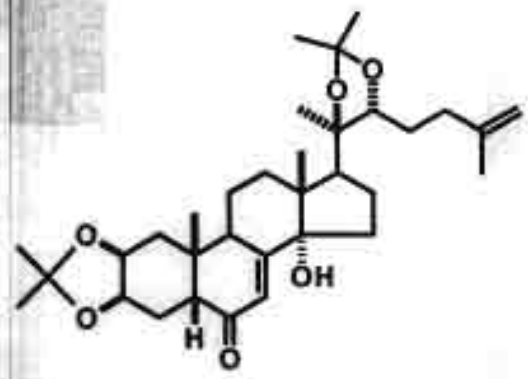
33



34



35



36

ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นนั้น เนื่องจากเราสามารถแยก 24-*epi*-abutasterone (24) ออกมาได้เพียง 3 มิลลิกรัมเท่านั้น ฉะนั้นหากเราสามารถสังเคราะห์เอคไดสเตียรอยด์ที่หายาก (rare ecdysteroid) ชนิดนี้ได้ เราก็จะมีแหล่งของเอคไดสเตียรอยด์ที่จะนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้ และจะสามารถทราบได้ว่า เอคไดสเตียรอยด์ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 24 เพิ่มเข้ามาจากเดิมที่มีโครงสร้างหลักเป็นสาร 2 จะมีฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มขึ้นหรือลดลง หรือเท่ากับเอคไดสเตียรอยด์ 2 ซึ่งถือว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง และถือเป็นสารมาตรฐานในการทดสอบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบแมลง ฉะนั้นเราจึงวางแผนในการสังเคราะห์เอคไดสเตียรอยด์ 24 โดยการทำปฏิกิริยา dihydroxylation พันธะคู่ที่ C-24 และ C-25 ของ olefin 31 โดยใช้ osmium tetroxide ก็น่าจะได้ส่วนผสมระหว่าง 24 กับ C-24 epimer ของสารนี้คือ abutasterone (25) เริ่มต้นโดยให้เกิดเป็นสารเชิงซ้อนระหว่าง OsO_4 กับ ligand ซึ่งในครั้งแรกนี้ใช้ pyridine ทำในสารละลาย *tert*-butanol-THF-H_2O (7:4:1) ก่อนแล้วจึงเติมสารละลายของ olefin 29 ลงไป การใช้ OsO_4 ใช้แบบ stoichiometric ไม่ได้ใช้แบบ catalytic คืออัตราส่วนของ OsO_4:olefin เป็น 1.3:1 ปรากฏว่าปฏิกิริยา dihydroxylation เกิดได้ดี หลังจาก work up และแยกสารผลิตภัณฑ์ 24 และ 25 ออกจากกันโดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟีอย่างระมัดระวังแล้ว ได้พิสูจน์เอกลักษณ์กับ 24 ที่แยกมาได้จากเปลือกรากของต้นผ่าเสี้ยน โดยเปรียบเทียบ TLC และ ^1H NMR กัน พบว่าตรงกันทุกประการ และเมื่อเปรียบเทียบข้อมูล

^{1}H NMR ของ abutasterone ที่สังเคราะห์ได้กับข้อมูลที่มีผู้รายงานไว้ [47] ปรากฏว่าสอดคล้องกันอย่างดี จึงสรุปได้ว่า เราได้พบวิธีที่สะดวกในการสังเคราะห์ 24 และ 25 เอคไดสเตียรอยด์ชนิดหลังนี้ ถึงแม้ว่าได้มีการพบในพืชมาก่อนหน้าที่มีการพบชนิดแรก[46,47] แต่ก็เป็นเอคไดสเตียรอยด์ที่พบในปริมาณน้อย ยกเว้นในการพบครั้งแรกจากพืช *Abuta velutina*[53] และโอกาสที่เราจะได้มาเพื่อทำการทดสอบทางชีวภาพก็คงจะยาก ฉะนั้น การที่เราสามารถสังเคราะห์ได้จึงเป็นผลดีในแง่การศึกษา SAR เพราะจะได้เปรียบเทียบกับ 24-*epi*-abutasterone (24) ว่า สเตียริโอเคมีที่ต่างกันที่ C-24 จะทำให้มีฤทธิ์ทางชีวภาพแตกต่างกันหรือไม่

ในแง่ของการได้เอคไดสเตียรอยด์ 24 และ 25 มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพนั้น ถือว่าบรรลุจุดมุ่งหมายแล้ว แต่ในแง่ของการสังเคราะห์อาจยังไม่เพียงพอ คือเคมีที่เกี่ยวข้องอาจยังก้ำกึ่งกันระหว่างโอกาสที่จะได้รับการพิจารณาหรือไม่ได้รับการพิจารณาตีพิมพ์ในวารสารชั้นนำ ถึงแม้ว่าการสังเคราะห์สารทั้ง 2 ชนิดเป็นการพิสูจน์โครงสร้างของ 24-*epi*-abutasterone (24) ว่ามีโครงสร้างดังที่ได้เสนอไว้จริงก็ตาม เราจึงพิจารณาทำ Sharpless asymmetric dihydroxylation[54] โดยการใช้ chiral ligand โดยดูว่าโอกาสที่จะสังเคราะห์ได้ 24-*epi*-abutasterone (24) อย่าง stereoselective มากกว่าการใช้ ligand pyridine จะมีได้มากน้อยเพียงใด เราได้เลือกใช้ chiral ligand 2 ชนิด คือ dihydroquinidine 4-methyl-2-quinolyl ether (DHQD-MQE) และ dihydroquinidine 9-phenanthryl ether (DHQD-PE) ใช้อัตราส่วนของ ligand:OsO_4:olefin 1.5:1.3:1 เพื่อเป็นการเปรียบกับ ligand ที่ไม่ chiral เราจึงทำปฏิกิริยา dihydroxylation เหมือนกับกรณีที่ใช้ pyridine ทุกประการ และได้ทำปฏิกิริยาที่ใช้ pyridine ซ้ำอีกครั้งหนึ่ง เพื่อหาอัตราส่วนที่แน่นอนของเอคไดสเตียรอยด์ 24 และ 25 ที่เกิดขึ้น โดยนำส่วนผสมของสาร 24 และ 25 ที่แยกออกมาแล้วด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีไปหาอัตราส่วนของสารผลิตภัณฑ์ทั้งสองชนิดด้วย โดยเปรียบเทียบค่า integral ของ H-22 และ H-24 จากผลที่ได้ (ตารางที่ 8) จะเห็นได้ว่า จากความไม่ symmetry ของโมเลกุล intrinsic factor ส่งผลให้ selectivity ของการเกิด 24:25 เป็น 2:1 ถึงแม้ว่าได้ใช้ achiral ligand เมื่อมีการใช้ chiral ligand ในกลุ่มของ dihydroquinidine (DHQD) พบว่า stereoselectivity เพิ่มเป็น 4:1 ทั้งกรณีของ 4-methyl-2-quinolyl ether (MQE) และ 9-phenanthryl ether (PE) ดูตารางที่ 8 นอกจากนี้เรายังสนใจที่จะใช้ "second generation" chiral ligand[55] คือ ในกลุ่ม phthalazine (PHAL) ligand ได้แก่ dihydroquinidine 1,4-phthalazinediyl diether [$(DHQD)_2$-PHAL] และ diphenylpyrimidine (PYR) ligand ได้แก่ dihydroquinidine 2,5-diphenyl-4,6-pyrimidinediyl diether [$(DHQD)_2$-PYR] เพราะมีรายงานว่า stereoselectivity สูงกว่ากลุ่ม "first generation" chiral ligand ที่เราได้ใช้ไปแล้วข้างต้น ปรากฏว่าเมื่อใช้ $(DHQD)_2$-PHAL ได้อัตราส่วนของสารผลิตภัณฑ์ 24:25 เป็น 7:1 ส่วนการใช้ $(DHQD)_2$-PYR อัตราส่วนของสารผลิตภัณฑ์ 24:25 เป็น 6:1 สำหรับการหาอัตราส่วนของ 24 และ 25 ทั้งสองกรณีหลังนี้ได้ใช้ HPLC เพื่อยืนยันผลจากการใช้ ^{1}H NMR ด้วย

เพื่อที่จะได้ข้อมูลเพิ่มเติมในการทำปฏิกิริยา osmylation ของ olefin 31 ไปเป็น 24-*epi*-abutasterone (24) และ abutasterone (25) เราได้เลือกใช้ chiral ligand ใน series ของ dihydroquinine

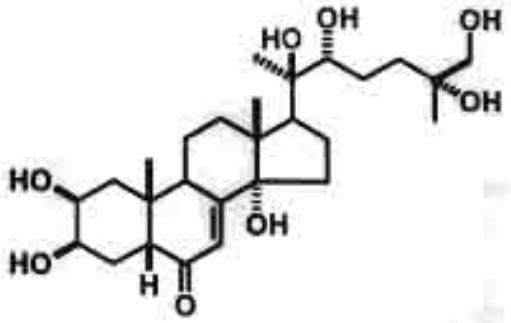
(DHQ) ซึ่งคาดว่าจะเกิด asymmetric dihydroxylation ของ olefin 31 โดยมี 25 เกิดมากขึ้นกว่าเดิม ในขณะที่ 24 เกิดขึ้นน้อยกว่าเดิม กล่าวคือเราได้ใช้ DHQ-MQE, DHQ-PE, $(DHQ)_2$-PHAL และ $(DHQ)_2$-PYR ผลปรากฏว่าเมื่อใช้ DHQ-MQE และ DHQ-PE ได้อัตราส่วนของ 24:25 เป็น 10:7 ทั้ง 2 กรณี เมื่อใช้ $(DHQ)_2$-PHAL และ $(DHQ)_2$-PYR diastereomer ratio เปลี่ยนเป็น 4:1 ทั้ง 2 กรณี แสดงว่า intrinsic factor ของการเกิดปฏิกิริยา dihydroxylation ของ 31 เห็นผลชัดเจนมากขึ้นในกรณีหลังนี้

2) การสังเคราะห์ 20,26-Dihydroxyecdysone (28) ทั้งสอง C-25 epimers

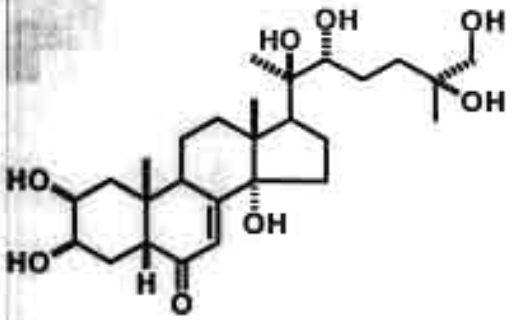
(2.1) การสังเคราะห์ 20,26-Dihydroxyecdysone ทั้งสอง C-25 epimers วิธีที่ 1

เนื่องจาก 20,26-dihydroxyecdysone (28) จาก พืชสกุล *Vitex* นั้นมีปริมาณน้อย โดยเฉพาะ *S. nutans* ที่ขอมาได้นั้นมีปริมาณน้อย (1-2 มิลลิกรัม) จนไม่สะดวกต่อการนำไปศึกษาด้านต่างๆได้ เพราะเกรงว่าจะใช้สารที่เป็น authentic sample นี้หมดไปเสียก่อน จึงได้ตัดสินใจหาทางสังเคราะห์ 20,26-dihydroxyecdysone ทั้งสอง epimers และจะได้มีโอกาสทำการศึกษาลักษณะเฉพาะทาง ^{1}H NMR ของสารทั้งสอง และจะใช้สารที่สังเคราะห์ได้ไปทดสอบฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบต่อไป

ในการสังเคราะห์ 20,26-dihydroxyecdysone ทั้งสอง C-25 epimers ถ้าคิดย้อนกลับไปถึง key intermediate ก็จะพบว่า olefin 32 คือ intermediate ที่ต้องการ ซึ่งก็คือเป็นสารผลิตภัณฑ์หนึ่งในสองชนิดที่ได้จากการทำ mesylation ของ 20-hydroxyecdysone 2,3:20,22-diacetonide (33) ซึ่งจะเกิด elimination MsOH ได้ olefin diacetonides 35 และ 36 ดังกล่าวมาแล้ว เมื่อนำส่วนผสม olefin diacetonides 35 และ 36 มาทำ deacetonation แล้วจึงแยก olefins ทั้ง 2 ชนิดออกจากกัน ชนิดแรกคือ stachysterone C (31) ซึ่งได้นำไปใช้สังเคราะห์ 24-*epi*-abutasterone (24) และ abutasterone (25) ดังได้กล่าวมาแล้ว ส่วน olefin 32 ก็จะนำมาใช้สังเคราะห์ 20,26-dihydroxyecdysone ต่อไป ฉะนั้น จึงยิ่งเป็นการดีที่ olefin ที่สังเคราะห์ได้ทั้ง 2 ชนิดสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ นอกจากนี้ยังได้ปรับปรุงวิธีการเตรียม olefins ทั้ง 2 ชนิด โดยที่เมื่อให้ส่วนผสมสาร 35 และ 36 แล้วยังไม่ทำการแยกให้บริสุทธิ์ แต่นำมาทำการขจัดหมู่ป้องกัน acetonide ออกไปแล้วจึงแยก olefins ทั้ง 2 ชนิดออกจากกัน นำ olefin 32 มาทำปฏิกิริยา osmylation โดยใช้ OsO_4 ใน pyridine ได้สารผลิตภัณฑ์ 20,26-dihydroxyecdysone ซึ่ง TLC แสดง spot เดียว แต่ ^{1}H NMR แสดงว่าเป็นส่วนผสมของสอง epimers ในอัตราส่วนประมาณ 1:1 นำส่วนผสมของ 2 epimers มาแยกด้วย HPLC (ใช้ system B) epimer แรกที่ออกมาปรากฏว่าตรงกับ 20,26-dihydroxyecdysone ที่มาจาก *S. nutans* และให้ชื่อว่า 20,26-dihydroxyecdysone "epimer 1" ส่วนชนิดที่สองที่ออกตามมาตรงกับ 20,26-dihydroxyecdysone ที่ได้มาจาก *V. canescens* และให้ชื่อว่า 20,26-dihydroxyecdysone "epimer 2" เนื่องจากยังไม่ทราบ absolute configaration ที่ตำแหน่ง 25 ฉะนั้นจึงยังไม่สามารถทราบได้ว่า epimer ใดตรงกับโครงสร้างใดใน 2 โครงสร้าง (คือ 37 และ 38)



37



38

(2.2) การสังเคราะห์ 20,26-Dihydroxyecdysone ทั้งสอง C-25 epimers วิธีที่ 2

จากการสังเคราะห์เอคไดสเตียรอยด์ 28 ทั้งสอง epimers ตามวิธีที่ 1 จะเห็นได้ว่า ขั้นตอนแรกคือการเตรียม 25,26-didehydroponasterone A (32) นั้น ต้องแยก 32 ออกจาก stachysterone C (31) ซึ่งแยกจากกันได้ยากมาก ทำให้ได้ปริมาณผลผลิต (% yield) ขั้นสุดท้ายค่อนข้างต่ำ ถึงแม้ในขั้นตอนหลัง ซึ่งเป็นการทำ dihydroxylation โดยใช้ OsO_4 จะให้ปริมาณผลผลิตสูงก็ตาม ฉะนั้นเราจึงหาวิธีสังเคราะห์ใหม่ที่สะดวกกว่าอีก

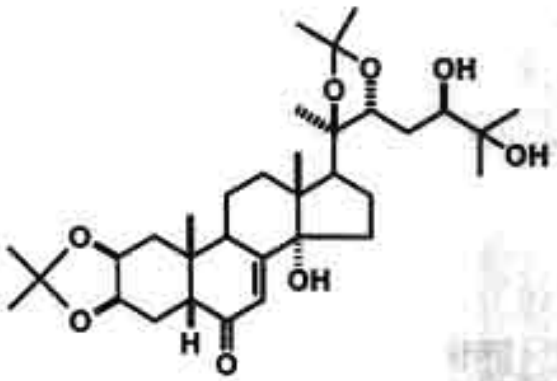
การสังเคราะห์ที่เป็นทางเลือกที่ 2 เป็นการนำส่วนผสมของ 31 และ 32 มาทำ dihydroxylation ด้วย OsO_4 โดยไม่แยก 31 และ 32 ออกจากกันก่อน ปรากฏว่าได้ส่วนผสมของ 24-*epi*-abutasterone (24), abutasterone (25) และ 20,26-dihydroxyecdysone (28) ทั้งสอง epimers เอคไดสเตียรอยด์ 24 และ 25 สามารถแยกออกจาก 28 ได้ง่ายโดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ในกรณีนี้ได้ 28 ทั้งสอง epimers เป็น 25% ซึ่ง 28 นี้ก็สามารถนำไปแยกแต่ละ epimer ออกจากกันได้

(2.3) การสังเคราะห์ 20,26-Dihydroxyecdysone ทั้งสอง C-25 epimers วิธีที่ 3

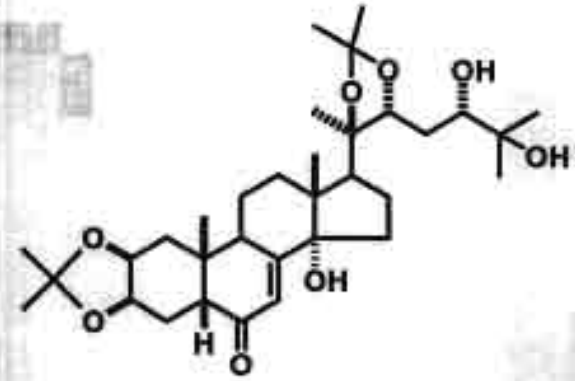
วิธีที่ 3 เป็นการทดลองนำ olefin 2,3:20,22-diacetonide 35 และ 36 มาทำปฏิกิริยา dihydroxylation ได้ส่วนผสมของ 24-*epi*-abutasterone 2,3:20,22-diacetonide (39), abutasterone 2,3:20,22-diacetonide (40) และ epimers ทั้งสองของ 20,26-dihydroxyecdysone 2,3:20,22-diacetonide (41) คอลัมน์โครมาโตกราฟีของส่วนผสม ทำให้ได้สาร 40 ที่บริสุทธิ์, บางส่วนของสาร 39 ที่บริสุทธิ์, บางส่วนของสาร 20,26-dihydroxyecdysone 2,3:20,22-diacetonide "epimer 1" ที่บริสุทธิ์, ส่วนผสมของ 39 และ 20,26-dihydroxyecdysone 2,3:20,22-diacetonide "epimer 2" และส่วนผสมของ 20,26-dihydroxyecdysone 2,3:20,22-diacetonide "epimer 1" และ 20,26-dihydroxyecdysone 2,3:20,22-diacetonide "epimer 2" ส่วนผสมหลังสุดนี้เมื่อนำมาผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีสามารถแยก 2 epimers ได้บางส่วน เมื่อนำ 39, 40, 20,26-dihydroxyecdysone 2,3:20,22-diacetonide "epimer 1" และ 20,26-dihydroxyecdysone 2,3:20,22-diacetonide "epimer 2" มาทำปฏิกิริยากำจัดหมู่ป้องกัน acetonide ออก

ไป ได้ 24, 25, 20,26-dyhydroxyecdysone "epimer 1" และ 20,26-dihydroxyecdysone "epimer 2" เมื่อทำปฏิกิริยากำจัดหมู่ acetonide ออกไปจากส่วนผสม ของ 39 กับ 20,26-dihydroxyecdysone 2,3:20,22-diacetonide "epimer 2" ตามด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้ 24 และ 20,26-dihydroxyecdysone "epimer 2" ข้อดีของการสังเคราะห์โดยวิธีนี้คือ 28 ทั้งสอง epimers สามารถแยกผ่าน diacetonide derivative ได้โดยไม่ต้องใช้ HPLC แต่มีข้อเสียคือ มีขั้นตอนของการแยกที่ค่อนข้างสลับซับซ้อน

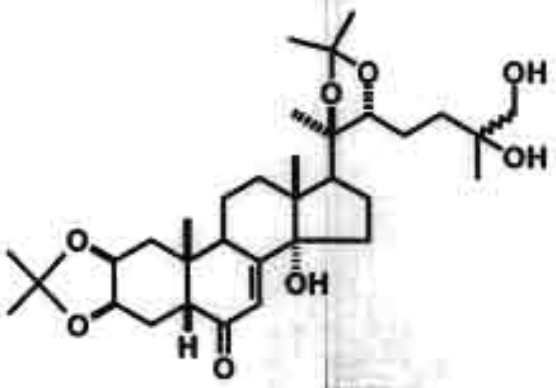
หากเปรียบเทียบการสังเคราะห์ทั้ง 3 วิธี จะเห็นได้ว่าวิธีที่ 2 มีความสะดวกที่สุด เพราะสามารถแยกสารอื่นออกจากสารที่ต้องการได้ง่ายกว่าวิธีอื่น และปริมาณผลผลิตก็อยู่ในขั้นดีกว่า



39



40

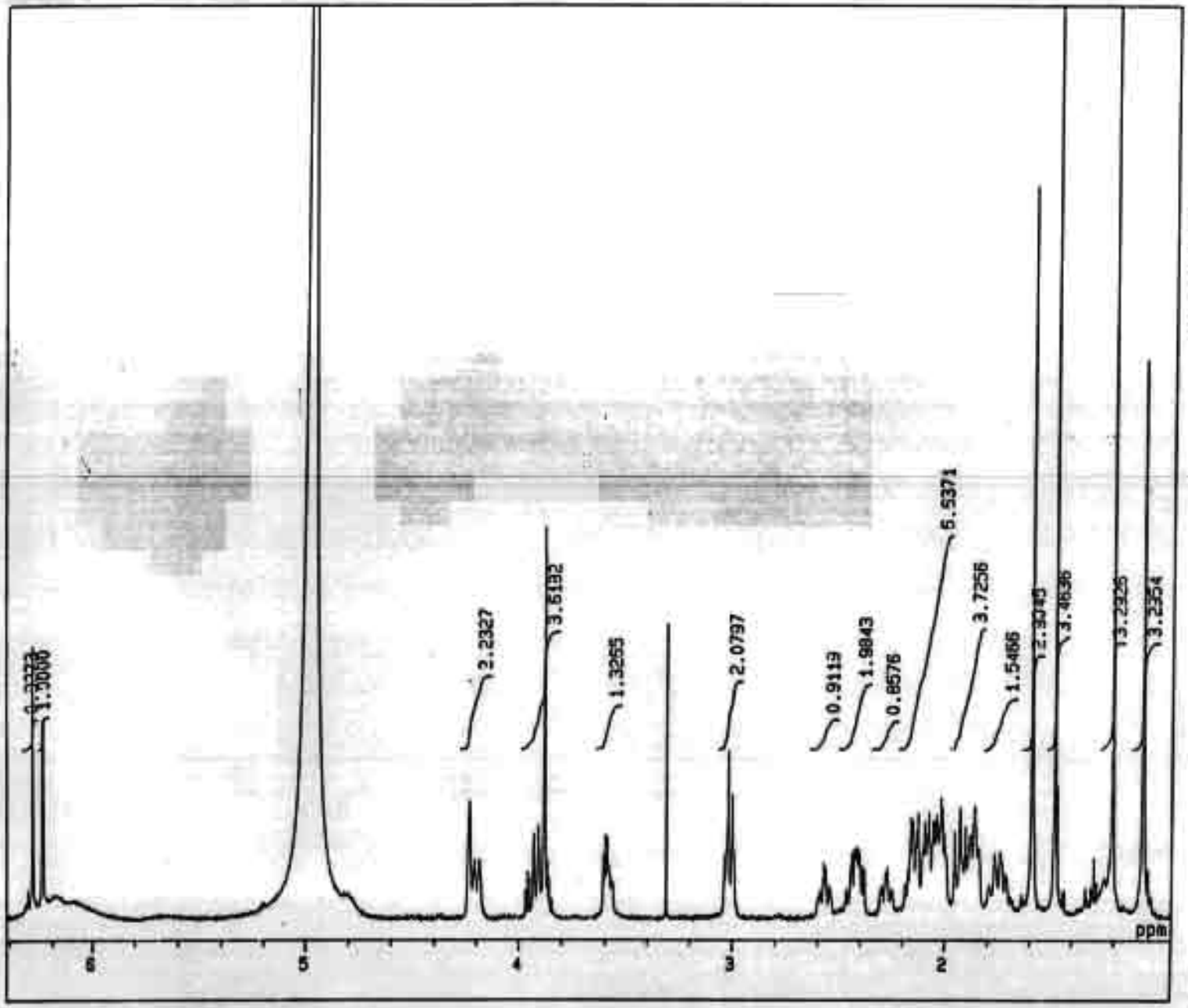


41

ลักษณะเฉพาะของ ^{1}H NMR สเปกตรัม ของ 20,26-Dihydroxyecdysone ทั้งสอง Epimers

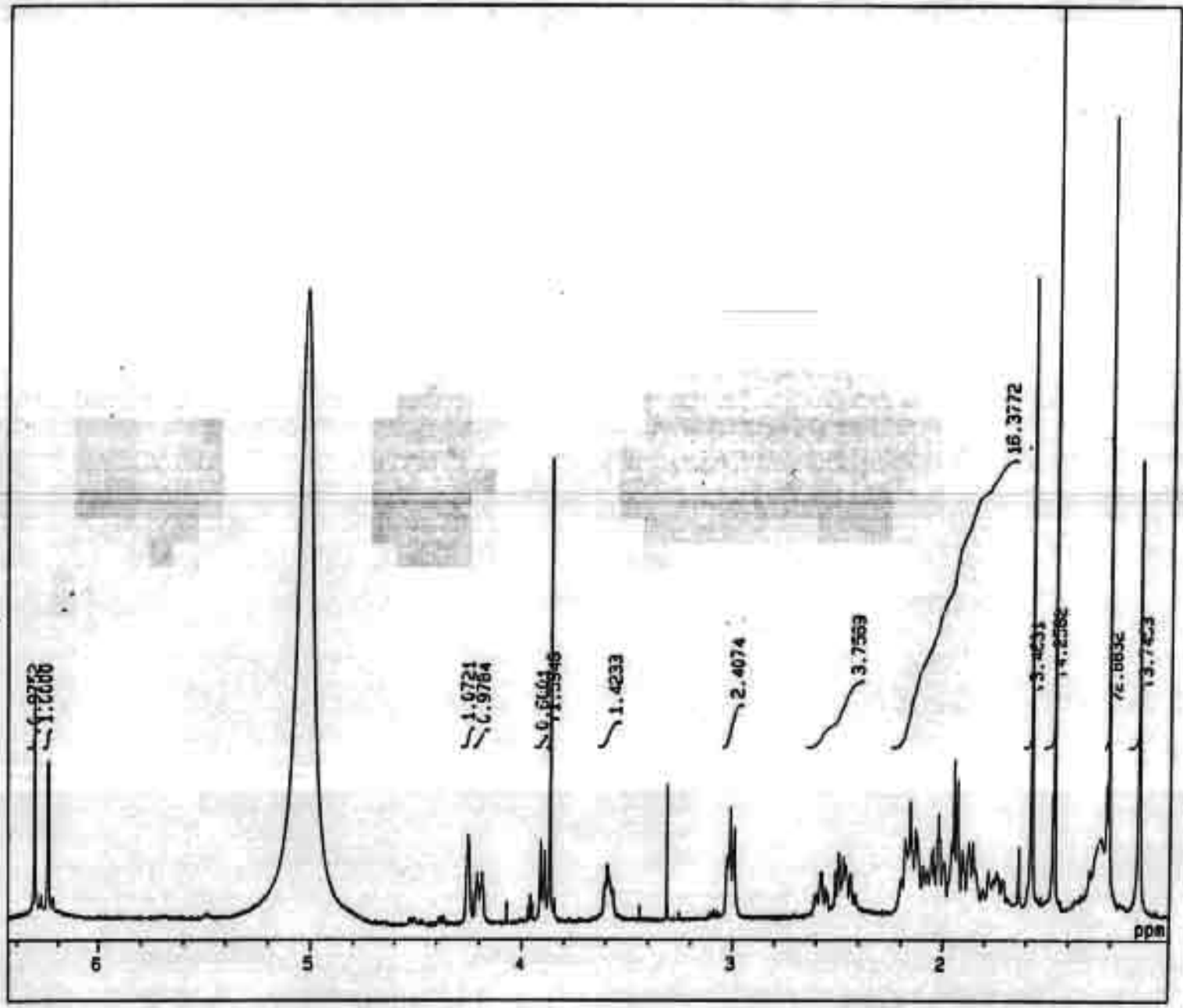
เมื่อเปรียบเทียบ ^{1}H NMR สเปกตรัมของ 20,26-dihydroxyecdysone "epimer 1" (ตรงกับ 20,26-dihydroxyecdysone จาก *S. nutans*, ดูภาพที่ 1) กับ 20,26-dihydroxyecdysone "epimer 2" (ตรงกับ 20,26-dihydroxyecdysone จาก *V. canescens*, ดูภาพที่ 2) พบว่าเกือบจะเหมือนกันทุกประการ ลักษณะที่แตกต่างกันของสเปกตรัมทั้งสองคือ การมีสัญญาณ multiplet ที่ δ2.27 ในสเปกตรัมของ "epimer 1" แต่ไม่มีสัญญาณที่ค่า chemical shift ดังกล่าวในสเปกตรัมของ "epimer 2" นอกจากนี้ระยะห่างระหว่าง H-2 กับ

ภาพที่ 1. ^{1}H NMR Spectrum of 20,26-Dihydroxyecdysone "Epimer 1"



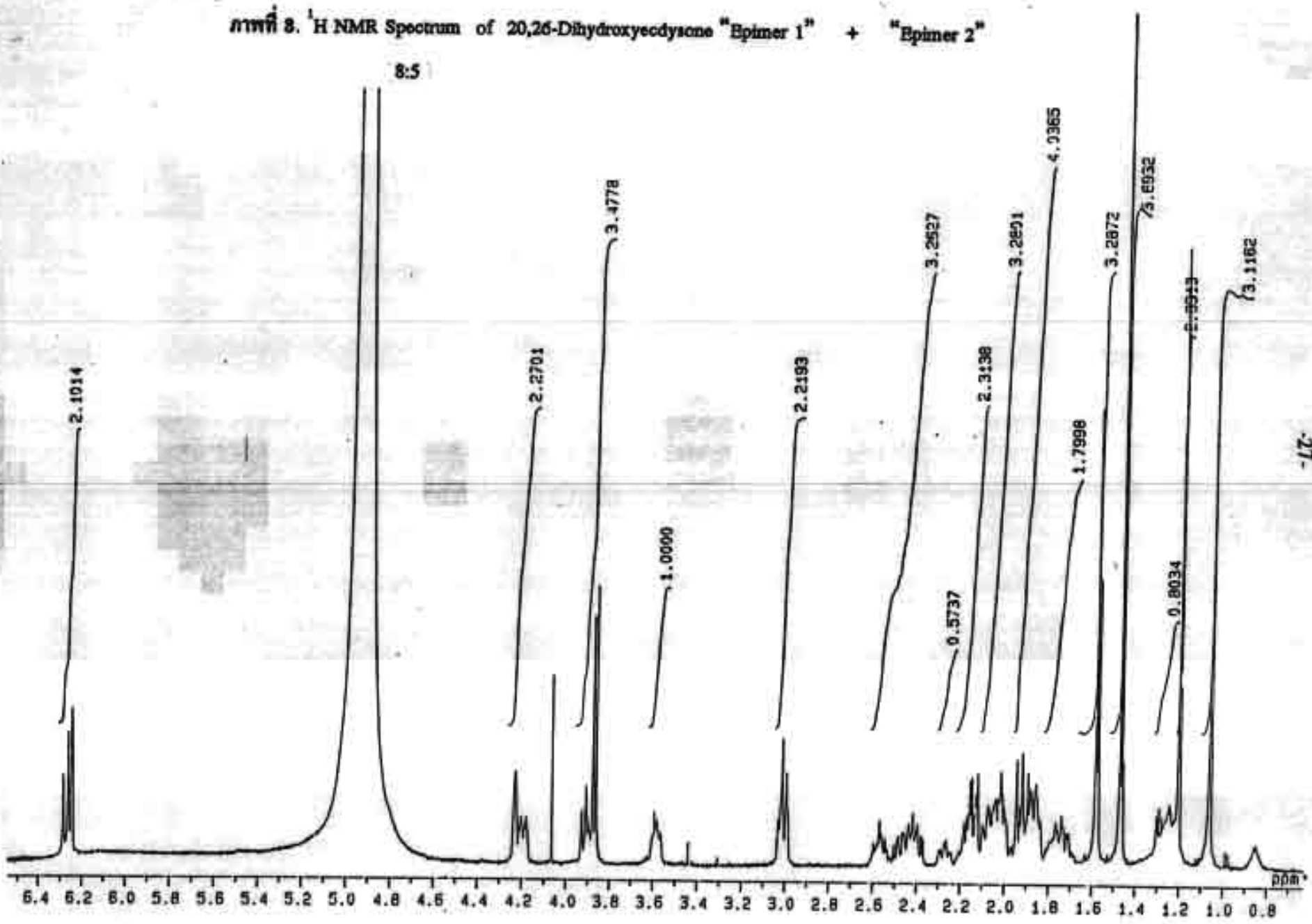
NO	EQVAL	INT H2	FIN H2	IG
1	0.9273	3170.73	3137.46	0.05
2	1.0000	3136.55	3109.39	0.05
3	2.2327	2137.71	2066.60	0.05
4	3.6182	1993.97	1905.47	0.05
5	1.3265	1821.55	1761.73	0.05
6	2.0797	1530.41	1477.31	0.05
7	0.9119	1319.23	1252.39	0.05
8	1.9843	1249.34	1175.49	0.05
9	0.8576	1171.22	1109.88	0.05
10	5.6371	1107.13	984.45	0.05
11	3.7256	985.98	907.55	0.05
12	1.5466	910.60	830.64	0.05
13	2.9045	816.60	769.61	0.05
14	3.4636	761.06	711.01	0.05
15	3.2926	632.89	578.57	0.05
16	3.2954	560.26	497.39	0.05

ภาพที่ 2. ^{1}H NMR Spectrum of 20,26-Dihydroxyecdysone "Epimer 2"



NO	DGVAL	INT HZ	FTN HZ	IG
1	0.9752	3175.92	3146.31	0.05
2	1.0000	3137.46	3118.24	0.05
3	1.0721	2141.68	2113.60	0.05
4	0.9784	2114.52	2076.98	0.05
5	0.6001	1968.95	1939.65	0.05
6	1.5948	1941.79	1913.71	0.05
7	1.4233	1818.80	1765.70	0.05
8	2.4074	1524.31	1476.39	0.05
9	3.7569	1324.11	1190.14	0.05
10	16.3772	1124.53	828.50	0.05
11	3.4631	809.28	766.25	0.05
12	4.2582	758.62	712.54	0.05
13	2.8832	618.85	578.57	0.05
14	3.7453	560.87	505.93	0.05

ภาพที่ 8. ^{1}H NMR Spectrum of 20,26-Dihydroxyecdysone "Epimer 1" + "Epimer 2"



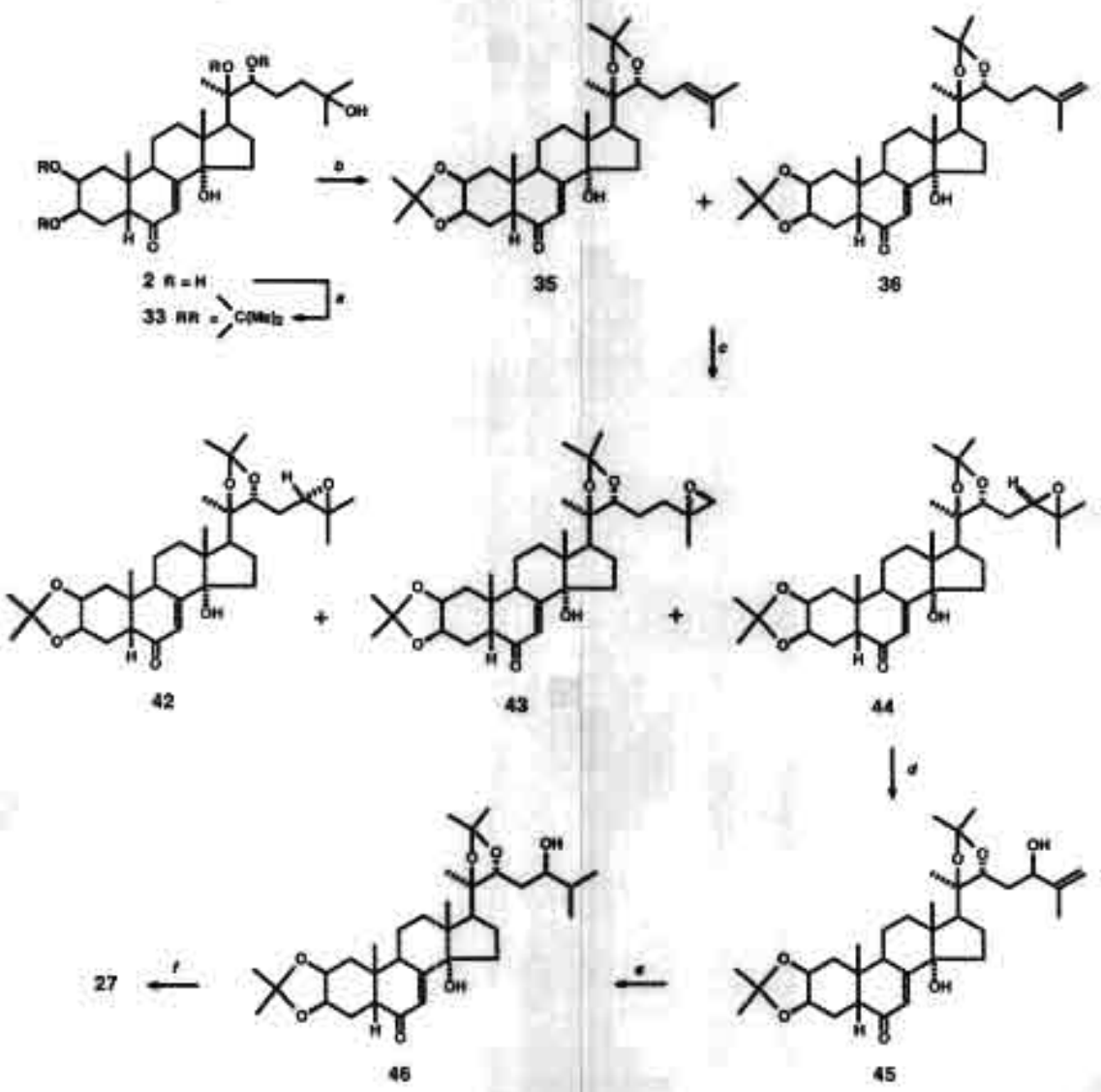
H-3 ในช่วง δ4.19-4.25 และระหว่าง H-7 กับ OH ในช่วง δ6.25-6.31 เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสอง epimer พบว่าใน "epimer 2" สัญญาณของโปรตอนคู่ดังกล่าวจะอยู่ห่างกันมากกว่า "epimer 1" อย่างไรก็ตาม เมื่อดู ^{1}H NMR สเปกตรัมของส่วนผสม (ประมาณ 1:1) ระหว่าง "epimer 1" กับ "epimer 2" ที่ได้มาจากการสังเคราะห์ พบความแตกต่างเพิ่มเติมอีกคือ ค่า chemical shifts ของ 18-Me, 27-Me และ 21-Me ของสอง epimers นี้อยู่ห่างกัน 0.004, 0.01 และ 0.01 ppm ตามลำดับ แต่ก็ไม่สามารถบอกได้ว่าสัญญาณใดเป็นของ epimer ใด เนื่องจากทั้งสอง epimers มีอยู่ในปริมาณเท่าๆกัน ฉะนั้นจึงนำแต่ละ epimer ที่แยกจากกันบริสุทธิ์แล้วมาผสมกันใหม่ในอัตราส่วนของ "epimer 1" ต่อ "epimer 2" เป็น 8:5 แล้วได้ ^{1}H NMR สเปกตรัมดังแสดงในภาพที่ 3 จะเห็นได้ว่า เราสามารถกำหนดค่า chemical shifts ของโปรตอนของทั้งสอง epimers ได้ และค่า chemical shifts แต่ละ epimer ได้อ่านจากสเปกตรัมของส่วนผสมดังกล่าว เพราะถ้าอ่านค่า chemical shifts จากคนละสเปกตรัม อาจได้ค่าที่ผิดไปจากนี้ได้ โดยเฉพาะสัญญาณโปรตอนบางสัญญาณต่างกันเพียง 0.004 ppm เท่านั้น เป็นต้น

3) การสังเคราะห์ 24-*epi*-Pterosterone (27) อย่าง regioselective

จากการตรวจสอบพบว่าในส่วนสกัดจาก *V. glabrata* ไม่มี 24-*epi*-pterosterone (27) อยู่ เราจึงตัดสินใจสังเคราะห์สารนี้ (ดู scheme 1) เริ่มต้นโดยการเตรียม diacetonide ของสารตั้งต้น 2 ได้ 20-hydroxyecdysone 2,3:20,22-diacetonide (33) ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับ MsCl ใน pyridine และมี DMAP อยู่ด้วย ได้ส่วนผสมที่ไม่แยกกันของโอเลฟิน 35 และ 36 ในอัตราส่วน 3:2 นำส่วนผสมของ 35 และ 36 มาทำปฏิกิริยากับ *m*-CPBA ในคลอโรฟอร์มได้ส่วนผสม epoxide 42, 43 และ 44 ซึ่งแยกออกจากกันโดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี อัตราส่วนของ 42 ต่อ 44 คือ *ca* 1:2 และสาร 43 อยู่เป็นส่วนผสม *ca* 1:1 ของ 25,26-epoxide สองไอโซเมอร์ซึ่งไม่ทราบสเตียริโอเคมีของวง epoxide จากประสบการณ์ของเราเอคไดสเตียรอยด์ที่มี oxygen function ที่ตำแหน่ง 24 ซึ่งเป็น R configuration จะมีขั้วมากกว่าพวกที่มี configuration เป็น 24S[39] ฉะนั้นจึงคาดว่าไอโซเมอร์ 44 ซึ่งมีขั้วมากกว่า 42 จะเป็น epoxide มัธยันตร์สำหรับการสังเคราะห์สาร 27

เมื่อนำ epoxide 44 มาเปิดวงอย่าง regioselective โดยทำปฏิกิริยากับ LiBr ใน MeCN ได้ hydroxy olefin 45 ได้ปริมาณผลผลิต 50% จะเห็นได้ว่า key step นี้เกิดจากการดึงโปรตอนจากหมู่เมทิลที่ตำแหน่ง 26 ตามด้วยการเปิดวง epoxide โดยการช่วยเหลือของลิเทียมไอออนที่ chelate ที่ออกซิเจนของ epoxide โครงสร้างของสาร 45 สามารถยืนยันได้จากข้อมูลทาง ^{1}H NMR (ดูตารางที่ 4) การมี olefinic function ที่ตำแหน่ง 25 ทราบได้จากสัญญาณ broad doublet 2 ชุด ของ H-26 ทั้งสองที่ δ4.83 และ 4.99 การมีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 24 ทราบได้จากการมีสัญญาณของ H-24 ที่ δ4.21 ในขั้นตอนของการเปิดวง epoxide นั้น ความจริงแล้วเราได้ลองใช้รีเอเจนต์อื่นแทน LiBr เช่น LiI และ LiOH แต่ให้ผลไม่ดีเท่า LiBr

ขั้นตอนต่อไปนำสาร 45 มาทำ hydrogenation โดยใช้ Pd-C เป็นคะตะลิสต์ ได้ dihydro compound 46 (95%) นำ 46 มาทำ deacetonation ด้วย 70% AcOH ได้ 24-*epi*-pterosterone (27) (74%) ^{1}H NMR ของสาร 27 ที่สังเคราะห์ได้สอดคล้องกับที่แยกได้จากพืชซึ่งมีผู้รายงานไว้[49] ปริมาณผลผลิตรวมทั้งหมดของ 27 จาก epoxide 44 คือ 35%



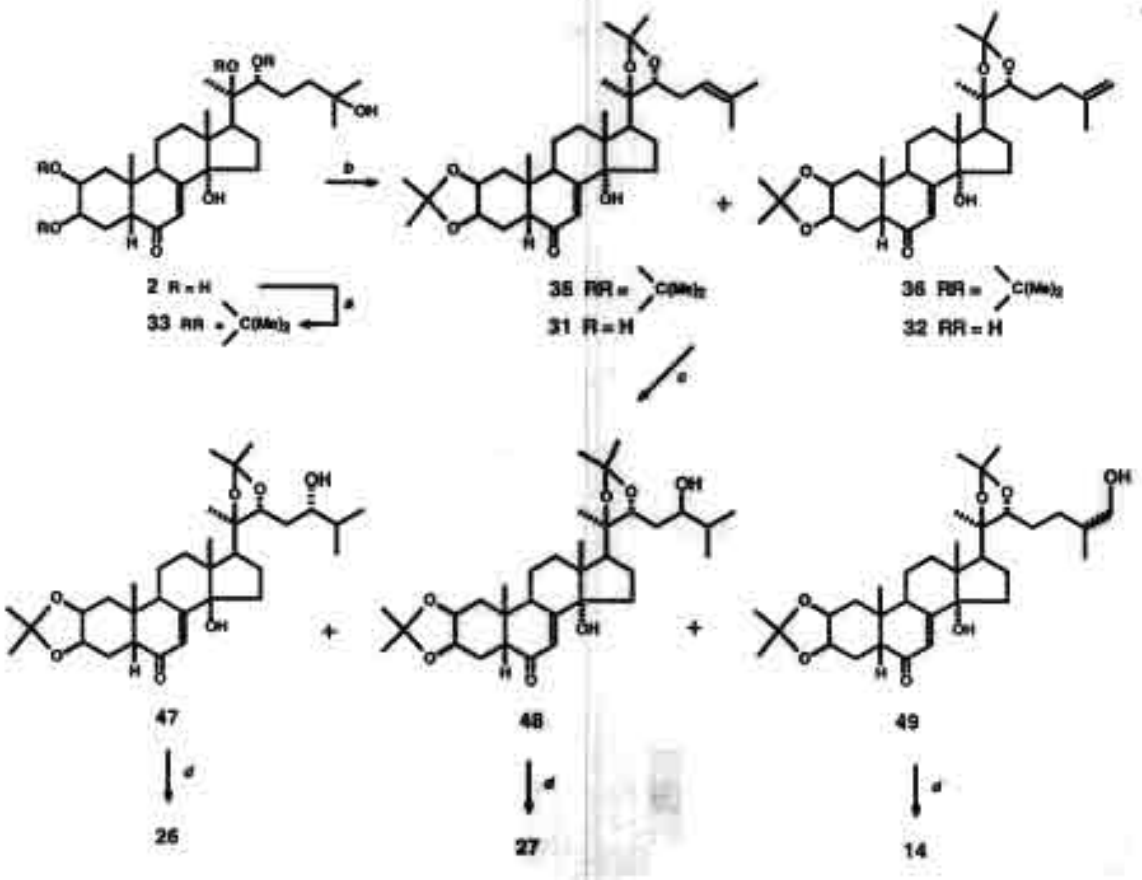
Scheme 1. *Reagents and conditions*: *a*, CH_3COCH_3, *p*-TsOH (85%); *b*, Reaction from **33**: MsCl, pyridine, DMAP, 5 °C to ambient temp. (87%); *c*, *m*-CPBA, $CHCl_3$ (75%); *d*, LiBr, MeCN (50%); *e*, H_2/Pd-C, EtOH (95%); *f*, 70% AcOH (74%)

4) การสังเคราะห์ Inokosterone (14) และการแยก C-25 epimers ออกจากกัน

จากการที่เราได้ศึกษาพบว่า abutasterone (25) และ C-25 epimer ของสารนี้คือ 24-*epi*-abutasterone (24) มีฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบต่ำกว่า 20-hydroxyecdysone (2) และสาร 24 และ 25 มีฤทธิ์ทางชีวภาพพอๆกัน[59] แต่ปรากกว่า pterosterone (26) ซึ่งเป็น C-25 deoxy analogue ของ 25 กลับมีฤทธิ์สูงกว่า 25 และ 24-*epi*-pterosterone (27) มีฤทธิ์ต่ำกว่า C-25 epimer (คือ 26) มาก[62] และจากการที่เราได้สังเคราะห์และแยกสอง C-25 epimers ของ 20,26-dihydroxyecdysone (28) ออกจากกันได้โดย ไอโซเมอร์หนึ่งมีฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบเป็นสองเท่าของอีกไอโซเมอร์หนึ่ง[60] ฉะนั้นจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของ C-25 deoxy analogue ของสาร (28) คือ inokosterone (14) สาร 14 นี้ได้มีผู้ค้นพบว่าเป็น minor ecdysteroid จากพืช *Achyranthes fauriei*[63] และพบว่าแอคไดสเตียรอยด์นี้อยู่เป็นส่วนผสม 1:2 ของ C-25 epimers แต่ก็ไม่สามารถแยกออกจากกันได้[64] ด้วยเหตุดังกล่าวข้างต้นนี้เราจึงต้องศึกษาการสังเคราะห์ inokosterone (14) และแยกสาร C-25 epimers ออกจากกัน (ถ้าทำได้) และนำแต่ละไอโซเมอร์ไปทดสอบฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบต่อไป

ในการสังเคราะห์ inokosterone (14) (Scheme 2) ใช้ key intermediate เป็น olefin 36 สำหรับ olefin 36 นี้ ได้มีการเตรียมมาแล้วจากปฏิกิริยาระหว่าง diacetonide 33 กับ MsCl ใน pyridine โดยมี DMAP อยู่ด้วย แต่จะได้ส่วนผสม 3:2 ระหว่าง olefins 35 กับ 36 ซึ่งไม่สามารถแยกออกจากกันได้ ยกเว้นทำ deacetonide ก่อน แล้วจึงแยก olefins 31 และ 32 ออกจากกัน แต่ก็แยกได้บางส่วนเท่านั้น[59] เราจึงวางแผนที่จะใช้ส่วนผสมของ olefins 35 กับ 36 ในการสังเคราะห์ครั้งนี้ ปฏิกิริยา hydroboration ของส่วนผสม 35 กับ 36 กับ diborane-THF complex ใน THF ตามด้วย H_2O_2/aq. NaOH ได้ pterosterone 2,3:20,22-diacetonide (47), 24-*epi*-pterosterone 2,3:20,22-diacetonide (48) และ inokosterone 2,3:20,22-diacetonide "epimer 1"(49) และ inokosterone 2,3:20,22-diacetonide "epimer 2" (49) โดยสาร 49 ทั้งสอง C-25 epimers นี้สามารถแยกออกจากกันได้โดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ปริมาณผลผลิตของสารทั้ง 4 ชนิดคือ 21, 22, 20 และ 20% ตามลำดับ ข้อมูล ^{1}H NMR (ตารางที่10) สอดคล้องกับโครงสร้างของสารทั้ง 4 นำสารแต่ละชนิดมา deacetonide โดยใช้ 70%AcOH ได้ pterosterone (26), 24-*epi*-pterosterone (27) และแต่ละ C-25 epimer ของ inokosterone (14) ข้อมูล ^{1}H NMR (ตารางที่ 11) ของ 26 และ 27 สอดคล้องกับค่าที่มีรายงานไว้[62] ครั้งนี้เป็นรายงานครั้งแรกที่สามารถแยก inokosterone (14) ออกเป็นสอง C-25 epimers ได้ ทั้งสอง epimers (14 "epimer 1" และ 14 "epimer 2") มี ^{1}H NMR data เกือบเหมือนกันทุกประการ (ตารางที่ 11) ส่วน diacetonide ของแต่ละ epimer (คือ 49 "epimer 1" และ 49 "epimer 2") ก็มีค่า ^{1}H NMR คล้ายคลึงกันมากเช่นกัน (ดูตารางที่ 10) ข้อมูลทางสเปกโตรสโกปี (IR, ^{1}H NMR และแมสสเปกตรัม) ของแต่ละ epimer ของ 14 สอดคล้องเป็นอย่างดีกับโครงสร้าง สัญญาณ ^{1}H NMR (ตารางที่ 11) ที่ δ 3.65 (dd, J = 10.3 และ 6.4 Hz) และ 3.77 (dd, J = 10.3 และ 5.5 Hz) ของ

"epimer 1" และที่ δ 3.64 (dd, J = 10.3 และ 6.1 Hz) และ 3.72 (dd, J = 10.3 และ 5.8 Hz) ของ "epimer 2" เป็นสัญญาณที่เป็นลักษณะเฉพาะของหมู่ CH_2 ที่ตำแหน่ง 26 ของ 25-deoxy-26-hydroxyecdysteroid อย่างไรก็ตาม ข้อมูลที่มีอยู่ไม่สามารถบอก absolute configuration ที่ C-25 ของแต่ละ epimer ของสาร 14



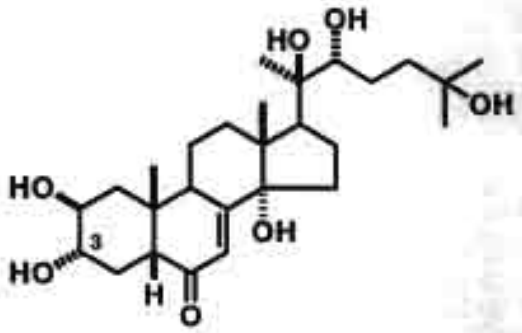
Scheme 2. *Reagents and conditions*: *a*, CH_3COCH_3, *p*-TsOH; *b*, Reaction from 33: MsCl, pyridine, DMAP, 5 °C to ambient temp; *c*, (i) BH_3-THF, (ii) H_2O_2/NaOH; *d*, 70% AcOH.

2. การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันในโครงร่างหลักของเอคไดสเตียรอยด์

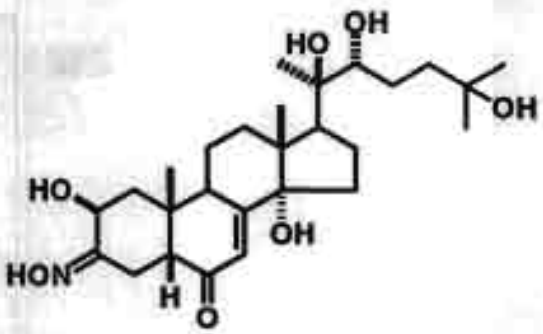
1) การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่วง A

3-Dehydro-2-deoxy-20-hydroxyecdysone 3-oximes และ 3-methoximes

จากผลงานของกลุ่มของ Horn[13] ที่ว่า ลักษณะที่สำคัญประการหนึ่งทางโครงสร้างที่เอคไดสเตียรอยด์จะแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่สูงคือ การมีหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่งที่ 3 และต้องอยู่แบบ 3β สำหรับ stereochemistry ของหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 3 ได้มีผู้ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของ epimer ที่ตำแหน่งที่ 3 ของ 20-hydroxyecdysone (2) คือ 3-*epi*-20-hydroxyecdysone (50) พบว่ามีฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบเพียง 7-10% ของสาร 2 เท่านั้นใน *Musca* bioassay[65] กลุ่มของเราต้องการศึกษาว่า ถ้าเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันอื่นนอกเหนือไปจากหมู่ไฮดรอกซิลแล้ว เอคไดสเตียรอยด์จะยังคงมีฤทธิ์ทางชีวภาพอยู่หรือไม่

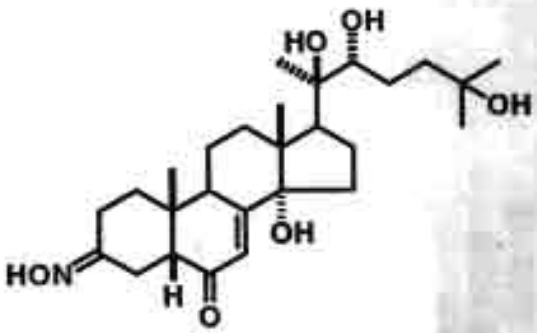


50

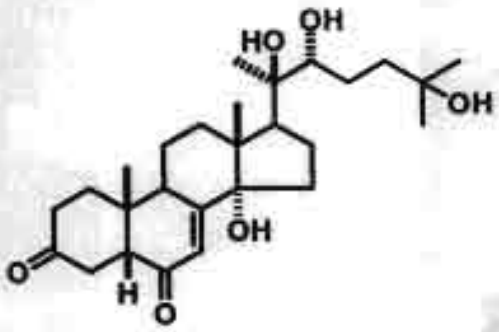


51

หมู่ฟังก์ชันตำแหน่งที่ 3 ที่เราต้องการศึกษาแทนหมู่ไฮดรอกซิลคือหมู่ oxime โดยอยากทราบว่าหากหมู่ไฮดรอกซิลไม่ใช่เป็นของคาร์บอนตำแหน่ง 3 โดยตรงจะยังมีบทบาทต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของเอคไดสเตียรอยด์หรือไม่ เริ่มแรก เราคิดที่จะสังเคราะห์ 3-oxime 51 ซึ่งโดยหลักการจะได้มาจาก 3-dehydro-20-hydroxyecdysone (5) แต่จากรายงานการสังเคราะห์สาร 5 มาในอดีต พบว่าได้ปริมาณผลผลิตต่ำ และมีสารข้างเคียงอีกหลายชนิด[18] และการที่สาร 5 เป็น α-hydroxyketone ทำให้มีปัญหาเกี่ยวกับการทำสารให้บริสุทธิ์ด้วย เราจึงวางแผนว่าจะสังเคราะห์ oxime 52 ซึ่งน่าจะได้มาจาก ketone 53 ซึ่งได้มี



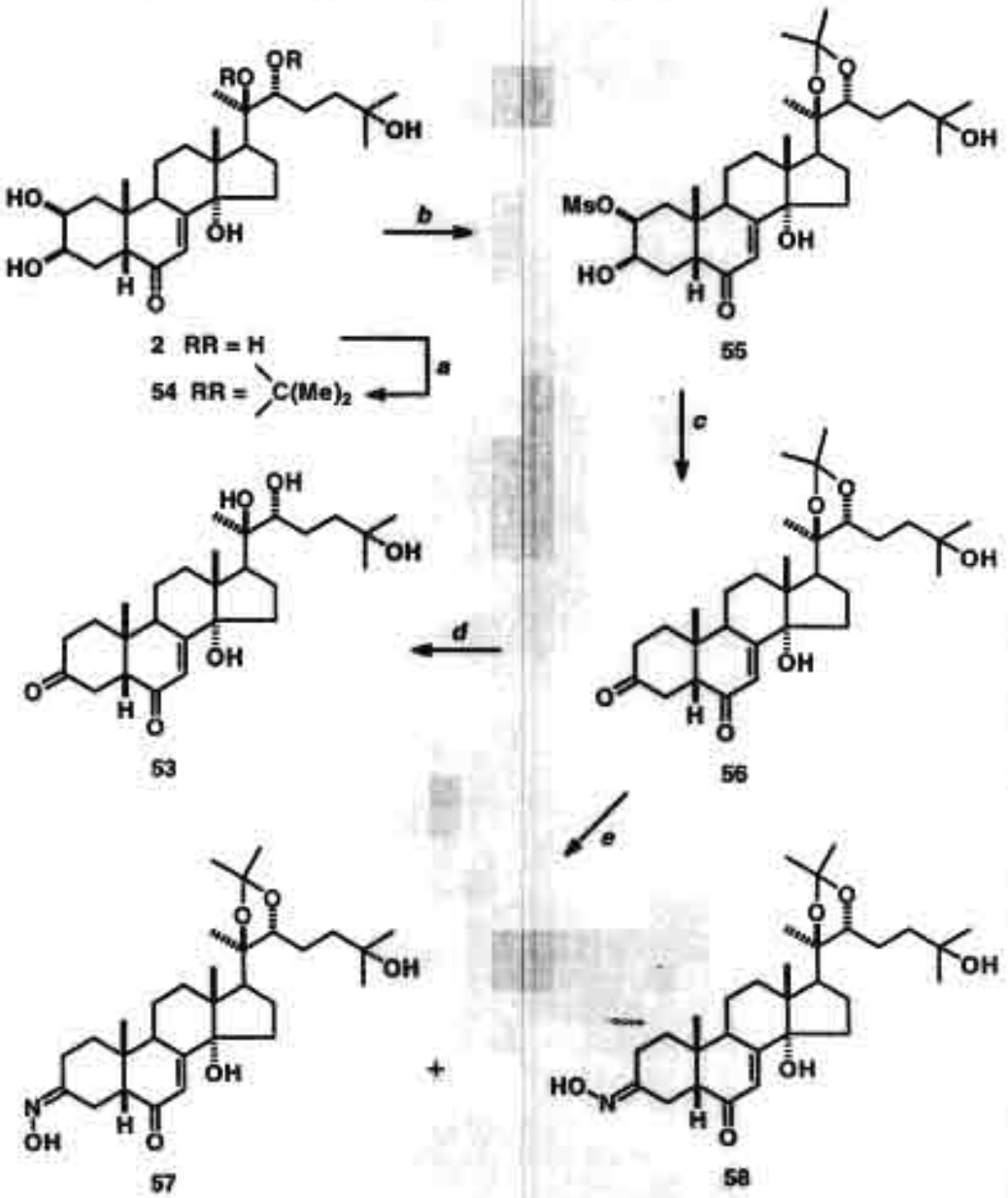
52



53

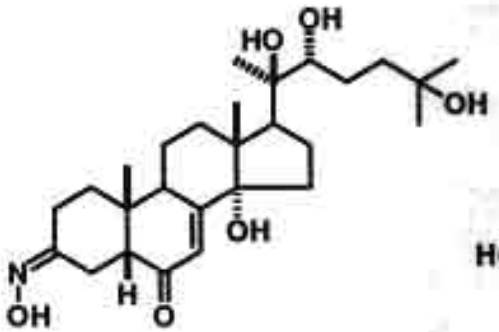
การสังเคราะห์มาก่อนแล้วเมื่อเร็วๆนี้[66] ถึงแม้ว่าใน series นี้จะไม่มีหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 2 แต่จากการที่กลุ่มของ Horn[13] ได้ศึกษาพบว่าหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่งที่ 2 ไม่จำเป็นต่อการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพของเอคไดสเตียรอยด์ การไม่มีหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่งที่ 2 ใน oxime 52 จึงน่าจะไม่มีปัญหาต่อการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของ oxime และอาจเป็นผลดีที่จะศึกษาผลที่เกิดจากหมู่ oxime เพียงอย่างเดียว

การเตรียม oxime 52 ได้แสดงไว้ใน Scheme 3 โดยการเตรียมสาร 54 ใช้วิธีที่ทราบกันดีแล้ว[17] สำหรับการเตรียมสาร 55, 56 และ 53 ใช้วิธีการของ Suksamrarn และ Yingyongnarongkul[66] จาก ketone acetonide 56 ทำปฏิกิริยากับ hydroxylamine hydrochloride ใน pyridine ได้ oximes ซึ่งมีสอง geometric

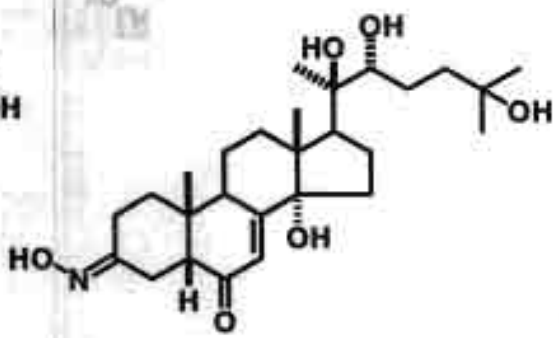


Scheme 3. *Reagents and conditions*: *a*, CH_3COCH_3, *p*-TsOH; *b*, Reaction from 54: MsCl, pyridine; *c*, 35% guanidine acetate/MeOH; *d*, 70% AcOH, MeOH; *e*, NH_2OH·HCl/pyridine [*a*-*d*, see ref. 66].

isomers ซึ่งสามารถแยกออกจากกันได้ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีได้ตามลำดับ คือ 3-dehydro-2-deoxy-20-hydroxyecdysone 20,22-acetonide 3-oxime *anti* C2 (57) และ *syn* C2 (58) ในปริมาณ 24 และ 40% ตามลำดับ สำหรับ conformation ของหมู่ hydroxyl ของ oximes ทั้งสองนั้นได้ assigned ไว้อย่าง tentative กล่าวคือ ถึงแม้ว่าทั้งสองสารคือ (57) และ (58) มีข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี (IR, ^{1}H NMR และแมสสเปกตรัม) สอดคล้องกับโครงสร้าง แต่ข้อมูล ^{1}H NMR (ตารางที่ 13) ของสาร 57 และ 58 ไม่สามารถบอก stereochemistry ของหมู่ไฮดรอกซิลของ oximes กล่าวคือ H-2 (อย่างน้อย 1 ตัว) ของ 57 และ H-4 (อย่างน้อย 1 ตัว) ของ 58 ควรเกิด downfield shift อันเนื่องมาจากการอยู่ใกล้กับ หมู่ไฮดรอกซิลใน space แต่บังเอิญสัญญาณของ H-2 หรือ H-4 เกิด overlap กับ H-9 ที่ประมาณ δ 3.16 จึงทำให้ไม่สามารถทราบ splitting pattern ของโปรตอน (ซึ่งหากเป็น H-2 น่าจะเกิดเป็น ddd ส่วน H-4 น่าจะเกิดเป็น dd) สำหรับปัญหา stereochemistry ดังกล่าวนี้ พบว่าไม่เกิดขึ้นในกรณีของ 3-methoxime analogues ซึ่งจะได้กล่าวต่อไป อย่างไรก็ตาม เมื่อนำ oxime 57 มากำจัดหมู่ acetonide ออกไป เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ กลับปรากฏว่าเกิดสารผลิตภัณฑ์ถึง 4 spots บน TLC แสดงว่าขั้นตอนการ deacetonide จะต้องมีก่อนการเตรียม oxime จึงได้ทำการ deacetonide สาร 56 ก่อน (ดู Scheme 3) แล้วจึงนำคีโตน 53 ที่ได้มาเตรียม oxime ตามวิธีเดียวกับการเตรียมสาร 57 และ 58 ได้ oxime 59 และ 60 ในอัตราส่วน 2:5 จากข้อมูล IR, ^{1}H NMR และปริมาณธาตุวิเคราะห์ที่มีอยู่ ทำให้ยืนยันได้ว่าสารทั้งสองเป็น oximes แต่ก็ไม่สามารถบอกได้ว่าแต่ละไอโซเมอร์มีการจัดเรียงตัวของหมู่ไฮดรอกซิลอย่างไร การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของ 3-oximes ทั้งสองไอโซเมอร์จึงต้องทำในลักษณะที่เป็นส่วนผสม



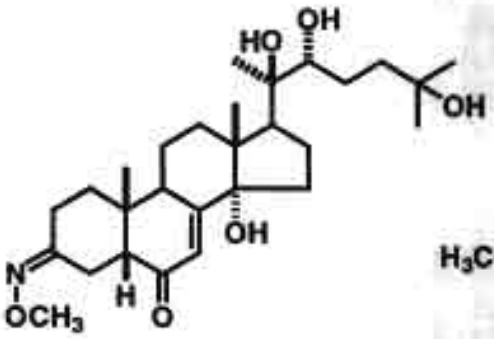
59



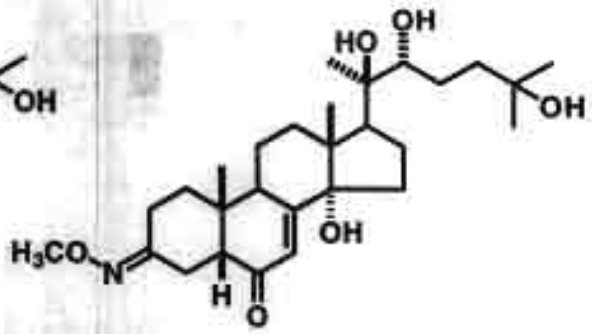
60

จากผลการทดสอบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบของส่วนผสม 3-oximes 59 และ 60 พบว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพปานกลาง (รายละเอียดอยู่ในหัวข้อการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ) อาจเป็นไปได้ที่หมู่ไฮดรอกซิลของ oxime เกิด H-bonding กับ receptor ของแมลง ทำให้การ bind เกิดขึ้นได้ดี ทำให้ยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพอยู่ จึงต้องการที่จะทราบว่า ถ้าไม่ให้เกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลของ oxime กับ receptor จะมีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างไรบ้าง จึงได้ทำการเตรียม 3-methoxime 61 กับ 62 โดยการทำปฏิกิริยาระหว่างคีโตน 53 กับ methoxylamine hydrochloride ใน pyridine ส่วน 3-

methoximes ทั้งสองไอโซเมอร์สามารถแยกออกจากกันได้โดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี เพื่อที่จะศึกษา ^{1}H NMR สเปกตรัม ได้เตรียมสาร 3-methoxime 20,22-acetonides 63 และ 64 ออกมาด้วยเพื่อช่วยในการ

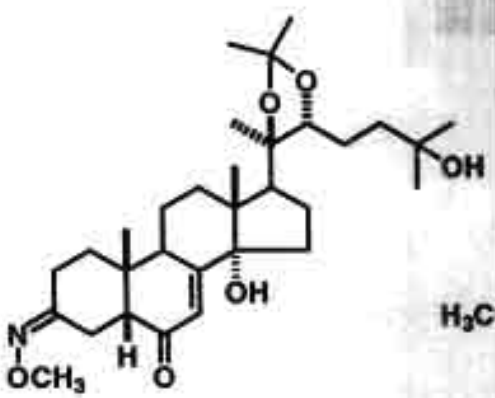


61

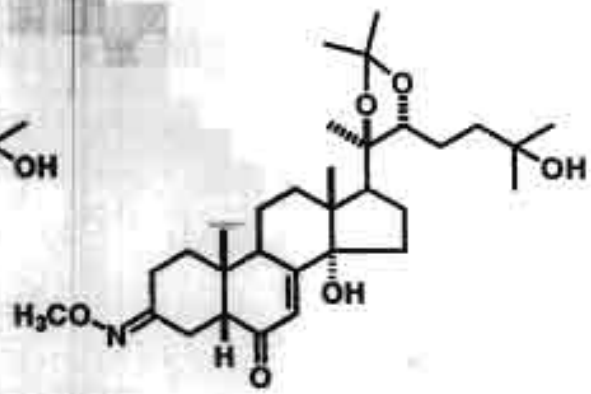


62

assign stereochemistry ของ methoximes โดยสารทั้งสองชนิดในชุดหลังนี้สามารถบันทึกข้อมูล ^{1}H NMR ใน $CDCl_3$ ได้ ข้อมูล ^{1}H NMR ของสาร 63 และ 64 (ตารางที่ 14) มีความคล้ายคลึงกันมาก แต่สิ่งที่แตกต่างกันคือสัญญาณที่ δ3.06 แสดง multiplicity ของการ splitting เป็น ddd, J = 14.1 และ *ca* 3 Hz แสดงว่าเป็น H-2 หนึ่งโปรตอน เพราะถ้าเป็น H-4 หนึ่งโปรตอน จะต้องแสดง splitting ได้ไม่เกิน dd เหตุที่ทราบว่าสาร 63 มีหมู่ OCH$_3$ ใกล้ทาง C-2 มากกว่า 64 ก็เพราะสัญญาณของ H-2 (อย่างน้อย 1 โปรตอน) เกิด downfield shift อันเนื่องมาจากการอยู่ใกล้ H-2 ของ OCH$_3$ มากกว่า H-4 ส่วนที่สัญญาณ δ3.08 ของสาร 63 แสดง multiplicity เป็น dd, J = 14.9 และ 4.5 Hz สอดคล้องกับค่า chemical shift ของ H-4 หนึ่งโปรตอนของ 63 ซึ่งแสดง multiplicity สูงสุดได้เพียง dd เท่านั้น ฉะนั้นการจัดเรียงตัวของหมู่ OCH$_3$ ในสารทั้งสองจึงเป็นไปตามที่แสดง เมื่อศึกษา ^{1}H NMR สเปกตรัมของสาร 61 และ 62 ก็พบว่าเป็นไปในทำนองเดียวกันกับสาร 63 และ 64 ได้นำสาร 61 และ 62 ไปทดสอบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบ (ดูการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ)



63

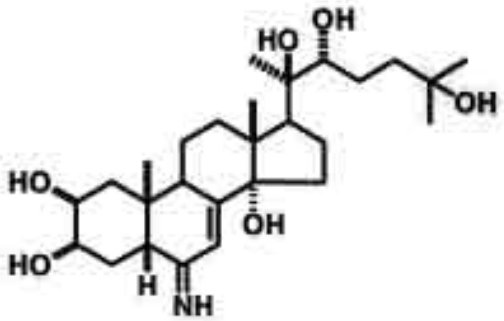


64

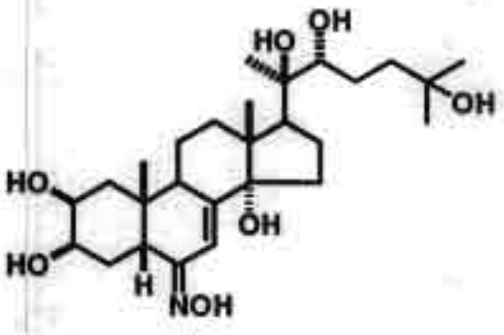
2) การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่วง B

20-Hydroxyecdysone 6-oximes และ 6-methoximes

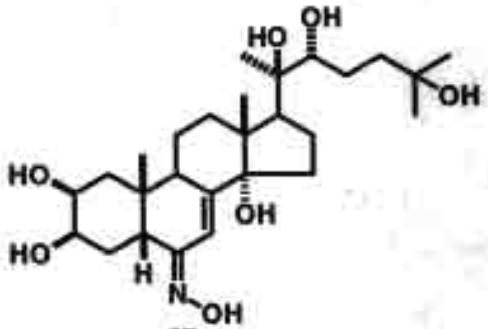
ดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ลักษณะสำคัญทางโครงสร้างประการหนึ่งที่เอคไดสเตียรอยด์จะแสดงฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบได้จะต้องมี α,β-unsaturated keto system อยู่ที่วง B และต้องเป็นชนิด 7-en-6-one system[13] และยังพบอีกว่าหากขาดพันธะคู่ไปก็จะทำให้ฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบหมดไป นอกจากนี้หากรีดิวซ์หมู่คีโตให้เป็นหมู่ไฮดรอกซิล ก็จะทำให้ฤทธิ์ทางชีวภาพหมดไปหรือต่ำมาก[13] กลุ่มของเราต้องการทราบว่า ถ้ายังคงให้มีระบบ α,β-unsaturated system อยู่ แต่เปลี่ยน heteroatom จากออกซิเจนให้เป็นไนโตรเจน จะทำให้ฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบหมดไปหรือไม่ จากแนวคิดนี้ การเปลี่ยนออกซิเจนที่ตำแหน่ง 6 ใน 20-hydroxyecdysone (2) เป็น nitrogen analogue ก็จะได้โครงสร้าง 65 แต่ก็จะเห็นได้ทันทีว่าสาร 65 จะไม่เสถียร จึงได้พิจารณา oxime analogue 66 ซึ่งน่าจะเสถียร เราจึงตัดสินใจจะศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของ oxime 66 อันดับแรกคือ ทำการเตรียม oxime 66 ก่อน โดยใช้วิธีเดียวกับการเตรียม oxime ที่ผ่านมาข้างต้น ดังนี้ ตั้งต้นจากเอคไดสเตียรอยด์ 2 ในสารละลาย pyridine ให้ทำปฏิกิริยากับ hydroxylamine hydrochloride แต่ใช้เวลานานกว่าที่ใช้กับการเตรียม 3-oximes หรือ 3-methoximes ที่กล่าวมาแล้ว สารผลิตภัณฑ์ 6-oximes ที่ได้มี 2 ชนิด ชนิดแรกมีขั้วสูงกว่า ปรากฏว่าเมื่อศึกษา ^{1}H-NMR สเปกตรัมของ oxime นี้ (ดูตารางที่ 15) แสดงสัญญาณของหมู่ไฮดรอกซิลที่ δ 12.58 การเกิด downfield shift มากอย่างผิดปกติของ H-7 (อยู่ที่ δ 7.36 แทนที่จะอยู่ที่ค่า chemical shift น้อยกว่า 7 ppm) แสดงว่าหมู่ OH อยู่ใกล้กับ H-7 ค่า chemical shift ของ H-9 ที่ δ 3.48 ก็แสดงว่า A/B ring เป็นแบบ *cis* ตามเดิม ฉะนั้น oxime ที่มีขั้วสูงนี้มีโครงสร้างเป็น 67



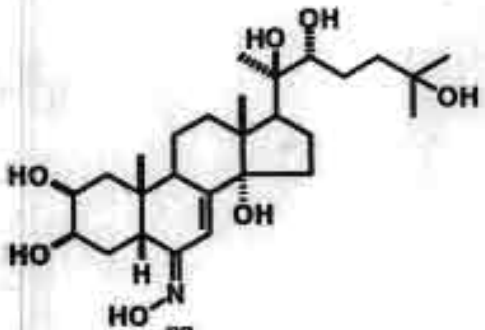
65



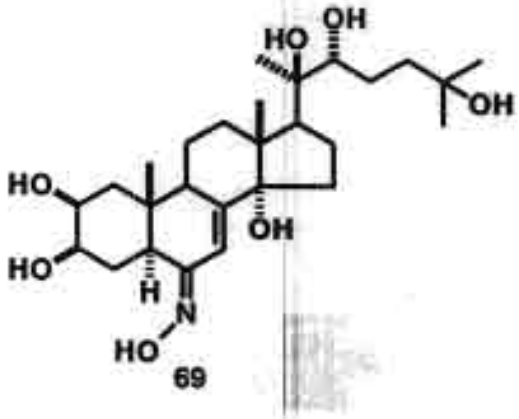
66



67



68

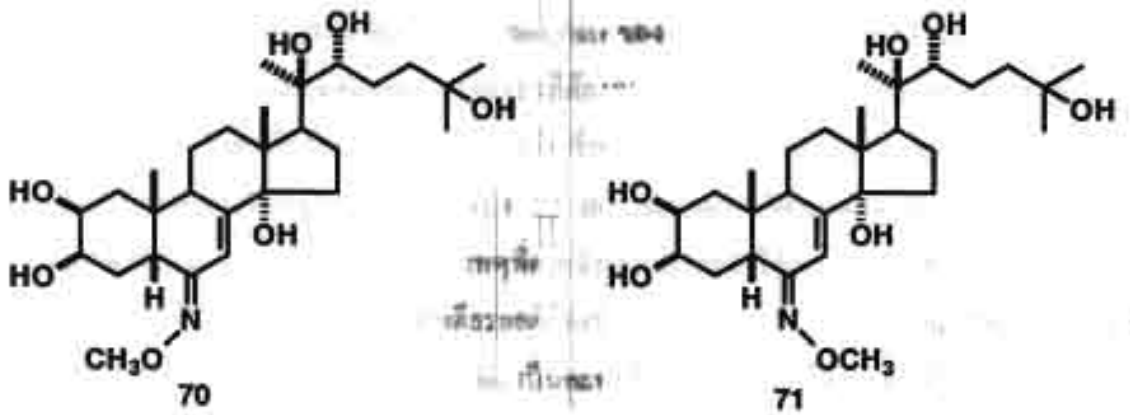


69

oxime ชนิดที่สองที่มีขั้วน้อยกว่าชนิดแรก ครั้งแรกได้คาดเดาว่าคงมีโครงสร้างเป็น **68** คือเป็น geometric isomer ของ **67** แต่ที่น่าสงสัยคือ สารนี้กลับมีความเป็นขั้วน้อยกว่าสารตั้งต้น **2** แต่จากการศึกษาข้อมูล ^{1}H-NMR (ตารางที่ 15) พบว่าโครงสร้างกลับเป็น **69** ดังนี้ สัญญาณที่ δ 12.87 เป็นสัญญาณโปรตอนของหมู่ OH ของ oxime สัญญาณของ H-7 อยู่ที่ δ 6.72 ซึ่งเป็นค่าปกติสำหรับ H-7 โดยทั่วๆไปใน pyridine-d_5 แต่สัญญาณของ H-5 อยู่ downfield มากกว่าปกติอย่างมาก คือยู่ที่ δ 4.23 โดยที่ H-5 ของสาร **68** อยู่ที่ δ 3.19 แสดงว่าหมู่ OH ของ oxime อยู่ใกล้ H-5 แต่ ^{1}H-NMR สเปกตรัมของสารนี้ไม่พบสัญญาณของ H-9 ในช่วง δ 3 - 4 แสดงว่า H-9 เกิด upfield shift จนอยู่นอกช่วงค่า chemical shift ดังกล่าว ซึ่งการที่จะเป็นเช่นนี้ได้จะต้องเกิด C-5 epimerization ได้ 5α-analogue คือ **69** โดยที่ได้มีการศึกษาโดยกลุ่มของเราพบว่า 5α-ecdysteroids ให้ค่า chemical shift ของ H-9 ที่ upfield กว่า โดยอยู่ในช่วงประมาณ δ 3[34] ฉะนั้นสาร oxime จึงมีโครงสร้างเป็น **69** แสดงว่าเมื่อเกิดเป็น **68** แล้ว มีการเกิด C-5 epimerization ได้เป็น **69** และมีความเป็นขั้วต่ำกว่าสาร **67**

จากนั้นได้เตรียม 6-methoxime ของ 20-hydroxyecdysone (**2**) เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพกับ 6-oximes **67** และ **69** เช่นเดียวกับกรณีของ 3-oximes และ 3-methoximes ข้างต้น จากปฏิกิริยาระหว่าง **2** กับ methoxylamine hydrochloride ใน pyridine ได้สารผลิตภัณฑ์ methoximes **70** และ **71** ซึ่งสามารถแยกออกจากกันได้โดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี สาร **70** มีความเป็นขั้วน้อยกว่าสาร **71** แสดงสัญญาณของ H-9 ที่ δ 3.42 (ตารางที่ 15) แสดงว่า A/B ring เป็นแบบ *cis* H-5 ของสารนี้เกิดที่ downfield อย่างมาก คืออยู่ที่ δ 3.89 แสดงว่าหมู่ OMe อยู่ด้านเดียวกับ H-5 ส่วนสาร **71** ซึ่งมีขั้วสูงกว่ามีสัญญาณของ H-9 ที่ δ 3.44 (ตารางที่ 15) แสดงว่า A/B ring เป็นแบบ *cis* เช่นกัน แต่ค่า chemical shift ของ H-5 และ H-7 แตกต่างกันอย่างมากกับของสาร **70** กล่าวคือสัญญาณ H-5 ที่ δ 3.06 เป็นค่า chemical shift ที่อยู่ในช่วงปกติของเอคไดสเตียรอยด์ใน pyridine-d_5 แต่สัญญาณของ H-7 กลับอยู่ downfield ค่อนข้างมาก (δ 6.99) เมื่อเทียบกับ H-7 ของสาร **70** (δ 6.34) ฉะนั้น methoxime **71** จึงมี conformation ของหมู่ OMe ดังแสดง สิ่งที่น่าแปลกใจคือ ในกรณีของ 6-methoxime **70** ไม่เกิด C-5 epimerization ซึ่งตรงข้ามกับการคาด

เดาไว้ว่า น่าจะเกิดขึ้นได้ดีกว่า oxime 68 ด้วยซ้ำไป เพราะถ้า epimerization เกิดจากความแกะกะของหมู่ไฮดรอกซิลของ oxime แล้ว หมู่ methoxyl ใน 70 น่าจะยิ่งมีความแกะกะมากกว่า จึงน่าจะเกิด epimerization ได้ดีกว่า สาร oximes และ methoximes ทั้งหมดได้นำไปทดสอบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบต่อไป



3. การเตรียมอนุพันธ์ของหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งต่าง ๆ ในโมเลกุล

จากการค้นพบเอคไดสเตียรอยด์ใหม่ 2 ชนิด คือ pinnatasterone (3)[9] และ cannescensterone (4)[9] โดยที่สารทั้งสองนี้มีฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบแบลงต่างกันอย่างตรงกันข้าม คือ 3 มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่ำมาก ซึ่งตรงกับที่ได้มีการคาดไว้ล่วงหน้าว่า เอคไดสเตียรอยด์ที่ไม่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 22R จะมีฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบต่ำ สิ่งที่ตรงข้ามกับที่คาดไว้คือ 4 ซึ่งน่าจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่ำมากเช่นเดียวกับ 3 แต่กลับมีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง ทั้ง ๆ ที่ไม่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 22R แสดงว่าหมู่ pyrrole-2-carboxylate ที่ตำแหน่ง 24 เป็นตัวการสำคัญที่ทำให้ฤทธิ์ทางชีวภาพของ 4 สูง เราจึงเกิดความสนใจว่า ถ้าหมู่ดังกล่าวไปอยู่ที่ตำแหน่งต่าง ๆ ในโมเลกุลของเอคไดสเตียรอยด์ชนิดอื่น ๆ จะทำให้ฤทธิ์ทางชีวภาพของเอคไดสเตียรอยด์นั้น ๆ แตกต่างกันหรือไม่อย่างไร ในที่นี้ เอคไดสเตียรอยด์ที่จะนำมาเตรียมอนุพันธ์ pyrrole-2-carboxylate ที่ตำแหน่งต่าง ๆ ในโมเลกุลคือ 20-hydroxyecdysone (2) ซึ่งเป็นเอคไดสเตียรอยด์ที่เราสามารถสกัดแยกมาได้ในปริมาณค่อนข้างมากจากพืชสกุล *Vitex* ดังได้กล่าวมาแล้ว นอกจาก pyrrole-2-carboxylate แล้ว เรายังมีความประสงค์ที่จะเตรียมอนุพันธ์ของสารประกอบ heteroaromatic อื่น เช่น furan-2-carboxylate และ thiphene-2-carboxylate เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารอนุพันธ์เหล่านี้ ในขั้นต้นนี้ ตำแหน่งที่คาดว่าจะนำหมู่ดังกล่าวเข้าไปคือตำแหน่งที่ 2 และตำแหน่งที่ 22 ถ้าหากสามารถนำเข้าไปที่ตำแหน่ง 3 และ 25 ได้ด้วยก็จะเป็นการดี

สารอนุพันธ์ที่มีหมู่ heteroaromatic แรกที่เราวางแผนสังเคราะห์คือ สารอนุพันธ์ furan-2-carboxylate เนื่องจากมีรีเอเจนต์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์อนุพันธ์นี้ขายอยู่แล้วคือ 2-furoyl chloride (furan-2-carboxylic acid chloride) น่าจะไม่มีปัญหาในการเตรียม หรือมีปัญหาไม่มากนัก สำหรับการ

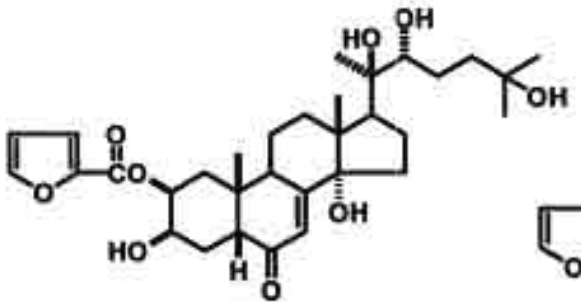
สังเคราะห์อนุพันธ์ pyrrole-2-carboxylate นั้น ไม่มี pyrrole-2-carboxylic acid chloride อยู่ในรายการสารเคมีที่มีจำหน่ายกัน แต่มี pyrrole-2-carboxylic acid ส่วนกรณีอนุพันธ์ thiophene-2-carboxylate นั้น หากสามารถสังเคราะห์ได้ด้วยก็จะเป็นผลดีมากในการศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์ของกลุ่มสาร heteroaromatic เหล่านี้

1) การเตรียมสารอนุพันธ์ Furan-2-carboxylate ของ 20-hydroxyecdysone (2)

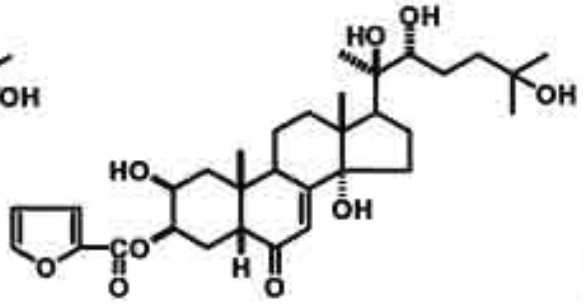
สารอนุพันธ์ furan-2-carboxylate ชนิดแรกที่ต้องการเตรียมคือ 20-hydroxyecdysone 2-(furan-2-carboxylate) (72) ในขั้นต้นนี้เราต้องการทดลองว่า ถ้าทำปฏิกิริยา acylation สาร 20-hydroxyecdysone (2) โดยตรงโดยไม่ต้องใช้หมู่ป้องกันที่ตำแหน่ง 22 เลย จะสามารถได้สารผลิตภัณฑ์ 72 โดยไม่เกิด acylation ที่ตำแหน่ง 22 ด้วยหรือไม่ เหตุที่คาดว่าจะสามารถทำได้เพราะลำดับความว่องไวของหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งต่าง ๆ ของเอคไดสเตียรอยด์มีดังนี้ 2>22>3>>25 เมื่อทำปฏิกิริยาระหว่างสาร 2 กับ 2-furoyl chloride ในแบนซีน โดยมี pyridine เป็นคะตะลิสต์ ปรากฏว่าได้สารอนุพันธ์ซึ่ง TLC แสดงว่ามีสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น 1 ชนิด ซึ่งคาดว่าเป็น 20-hydroxyecdysone 2-(furan-2-carboxylate) (72) ตามต้องการ ปรากฏว่า ^{1}H NMR (pyridine-d_5) แสดงให้ทราบว่า ความจริงแล้วสารผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นส่วนผสมระหว่าง 20-hydroxyecdysone 2-(furan-2-carboxylate) (72) กับ 20-hydroxyecdysone 3-(furan-2-carboxylate) (73) การที่ทราบว่าหมู่ furan-2-carboxylate อยู่ที่ตำแหน่ง 2 ในสาร 72 นั้น ทราบได้จากข้อมูลทาง ^{1}H NMR (pyridine-d_5) คือ ตำแหน่งค่า chemical shift ของโปรตอนตำแหน่งที่ 2 (H-2) ของสารตั้งต้น 2 เกิด downfield shift จาก δ4.15 มาอยู่ที่ δ5.50 ในสาร 72 และที่ย่าน aromatic proton มีโปรตอนของวง 2-substituted furan อยู่ที่ δ7.27 (dd, J = 3.3, 0.9 Hz, H-3'), δ6.46 (dd, J = 3.3, 1.8 Hz, H-4') และ δ7.75 (dd, J = 1.8, 0.9 Hz, H-5') และ IR สเปกตรัมก็แสดงว่ามีหมู่ furan carboxylate อยู่ (ดูวัสดุและวิธีการ) ทำนองเดียวกัน สาร 73 เราทราบว่าหมู่ furan-2-carboxylate อยู่ที่ตำแหน่ง 3 เพราะเกิด downfield shift ของ H-3 สาเหตุที่ได้สาร 73 อย่างไม่ได้คาดมาก่อนก็เพราะเกิด acyl migration ของหมู่ furan-2-carboxylate ที่ตำแหน่ง 2 ของสาร 72 มาอยู่ตำแหน่งที่ 3 ใน 73 ไม่ใช่เพราะเกิด acylation เข้าที่ตำแหน่ง 3 โดยตรง ซึ่งการเกิด acyl migration นี้เป็นที่ทราบกันดีในกรณีของเอคไดสเตียรอยด์[17]

สารอนุพันธ์ furan-2-carboxylate ชนิดต่อไปที่ต้องการเตรียมคือ 20-hydroxyecdysone 22-(furan-2-carboxylate) (74) เริ่มต้นจากสาร 2 อย่างน้อยจะต้องมีหมู่ป้องกันหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 2 เพราะมีความว่องไวต่อปฏิกิริยามากกว่าตำแหน่งที่ 22 หมู่ป้องกันที่ใช้คือ acetonide โดยเตรียม 20-hydroxyecdysone 2,3-acetonide (75) จากสาร 2 โดยให้อะซีโทนทำปฏิกิริยากับ 2 มีคะตะลิสต์ คือ pyridinium *p*-toluenesulphonate ตามวิธีที่เราได้คิดค้นมาก่อนหน้านี้แล้ว[17] นำ 75 ในสารละลาย pyridine มาทำปฏิกิริยากับ 2-furoyl chloride ได้สาร 76 สาร 76 นี้มีหมู่ furan-2-carboxylate อยู่ที่ตำแหน่ง 22 เพราะ H-22 เกิด downfield shift ทำนองเดียวกับกรณีของสารอนุพันธ์ 2-(furan 2 carboxylate) 72 โดย

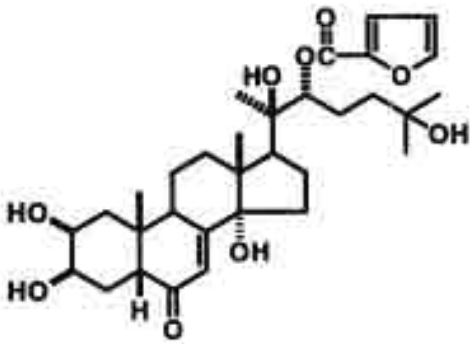
โปรตอนดังกล่าวอยู่ที่ δ5.05 (ใน $CDCl_3$) นำสาร 76 มากำจัดหมู่ป้องกัน acetonide ออกไป โดยใช้ 70% AcOH ทำให้ได้สารอนุพันธ์ 22-(furan-2-carboxylate) 74 ตามต้องการ



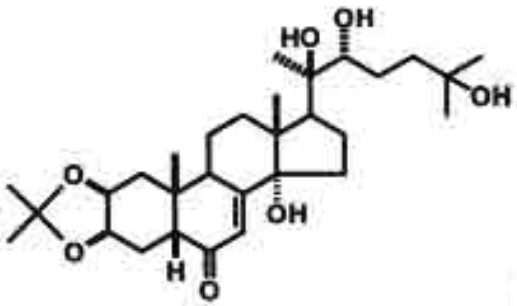
72



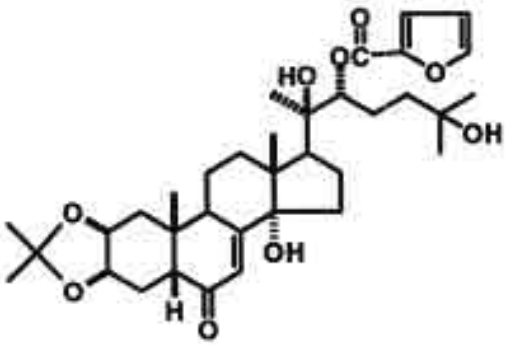
73



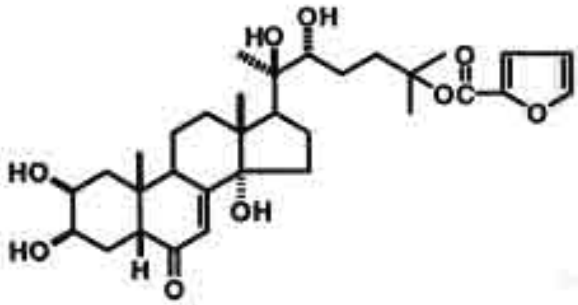
74



75



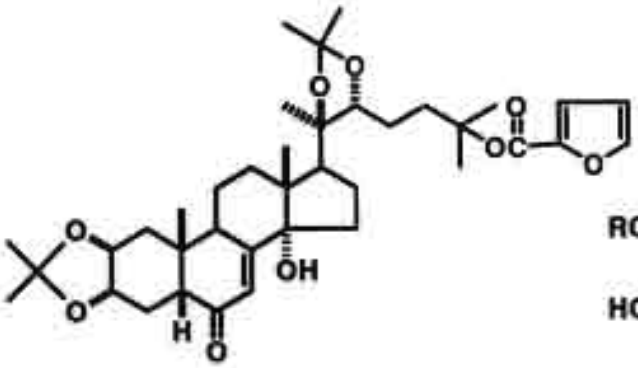
76



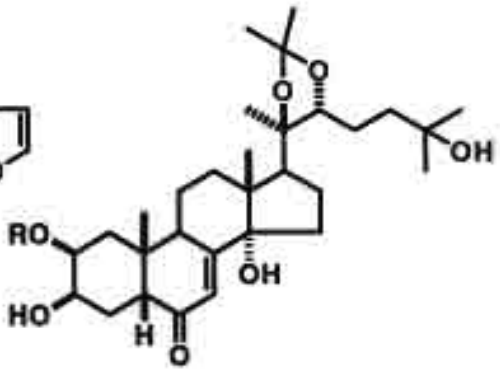
77

สารอนุพันธ์ furan-2-carboxylate ชนิดต่อไปที่ต้องการเตรียมคือ 20-hydroxyecdysone 25-(furan-2-carboxylate) (77) ในการเริ่มต้นจากสาร 2 จะต้องมีหมู่ป้องกันหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 2, 3 และ 22 เพราะมีความว่องไวต่อปฏิกิริยามากกว่าตำแหน่งที่ 25 หมู่ป้องกันที่ใช้คือ acetonide โดยเตรียม 20-hydroxyecdysone 2,3:20,22-diacetonide (33) จากสาร 2 โดยวิธีที่ได้ทำมาแล้ว[17] จากนั้นนำสาร 33 มาทำปฏิกิริยากับ 2-furoyl chloride ในสารละลาย pyridine กับเบนซีน ในกรณีนี้ใช้ DMAP ช่วยให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นที่ตำแหน่ง 25 ซึ่งมีหมู่ก็ดขวางอยู่ให้เกิดขึ้นได้ เราทราบได้ว่าสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นคือ

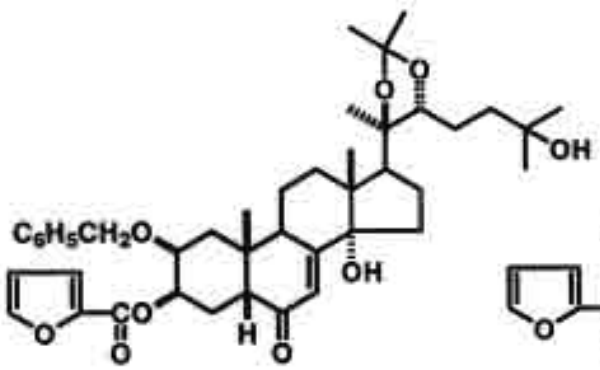
20-hydroxyecdysone 2,3:20,22-diacetonide 25-(furan-2-carboxylate) (78) โดยศึกษาจากข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี โดยเฉพาะ ^{1}H NMR ซึ่งแสดงว่าสามารถนำหมู่ furan-2-carboxylate เข้าไปในโมเลกุลของสารตั้งต้น 33 ได้จากการปรากฏโปรตอนของวง furan ใน ^{1}H NMR สเปกตรัม (ใช้ $CDCl_3$) และหมู่ดังกล่าวนี้อยู่ที่ตำแหน่ง 25 เพราะเกิด downfield shift ของ 26-Me และ 27-Me ใน 78 เมื่อนำ 78 มากำจัดหมู่ป้องกัน acetonide ออกไปได้สารอนุพันธ์ 20-hydroxyecdysone 25-(furan-2-carboxylate) (77) ตามต้องการ



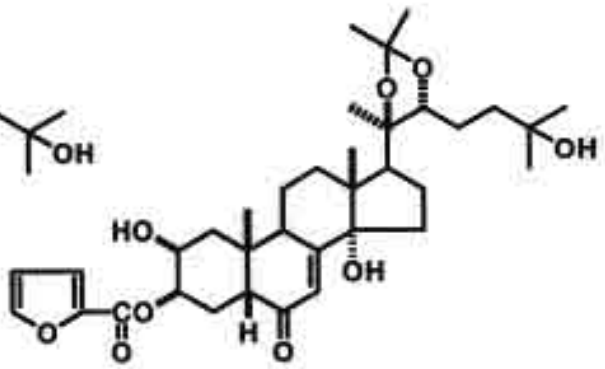
78



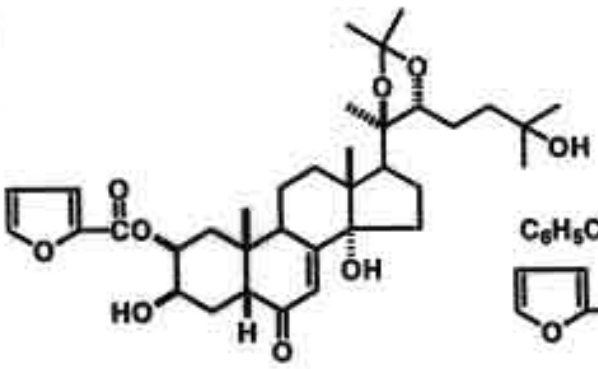
79 R = H
80 R = $C_6H_5CH_2$



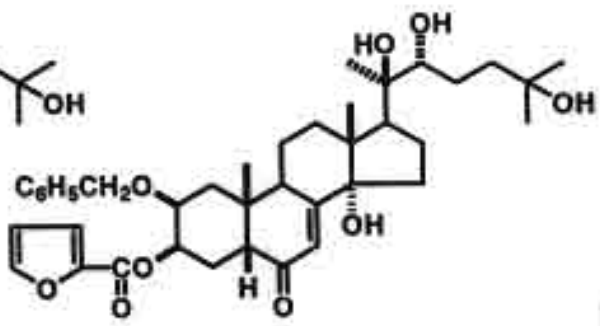
81



82



83



84

ต่อไปได้คิดหาวิธีเตรียม 20-hydroxyecdysone-3-(furan-2-carboxylate) (73) ให้ได้เพียงชนิดเดียว โดยเริ่มต้นจากสารตั้งต้นที่ป้องกันหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 20 และ 22 ไว้แล้วคือ 20-hydroxyecdysone 20,22-acetonide (79) ทำการป้องกันหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 2 ด้วยหมู่ benzyl โดยใช้ 79 ทำปฏิกิริยากับโซเดียม ตามด้วย benzyl bromide ได้ benzyl ether derivative 80 นำสาร 80 มาทำปฏิกิริยากับ 2-furoyl chloride ในสารละลาย pyridine-เบนซีน ได้เอสเทอร์ 81 นำ 81 มาทำปฏิกิริยา catalytic hydrogenolysis ในเมทานอลโดยใช้ Pd-C เป็นคะตะลิสต์ ได้สาร 82 ปรากฏว่าในปฏิกิริยานี้มี 20-hydroxyecdysone-2-(furan-2-carboxylate) (83) เกิดขึ้นมาด้วยปริมาณไม่เกิน 10% ทั้งสาร 82 และ 83 ให้ spot เดียวบน TLC การที่ทราบว่า major product เป็น 82 เพราะ H-3 (δ 5.40) เกิด downfield shift ไป 1.37 ppm เมื่อเทียบกับสาร 79 (δ 4.03[17]) ส่วนสาร 83 นั้น H-2 (δ 5.23) เกิด downfield shift ไป 1.43 ppm เมื่อเทียบกับสาร 79 (δ 3.80[17]) ได้ลองสลับขั้นตอนการกำจัดหมู่ป้องกันออก โดยกำจัดหมู่ acetonide ใน 81 ออกก่อนได้สาร 84 ซึ่งนำมาทำ catalytic hydrogenolysis ปรากฏว่าได้สาร 73 เพียงชนิดเดียวตามต้องการ

2) การเตรียมสารอนุพันธ์ Thiophene-2-carboxylates ของ 20-hydroxyecdysone (2)

เมื่อเตรียมอนุพันธ์ furan-2-carboxylates ต่างๆเสร็จแล้ว จึงคิดเตรียมสารอนุพันธ์ thiophene-2-carboxylate เพื่อนำไปทดสอบและเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพกับกลุ่ม furan-2-carboxylate และเนื่องจากรีเอเจนต์ thiophene-2-carboxylic acid chloride มีจำหน่ายอยู่แล้ว จึงดำเนินการเตรียมอนุพันธ์ thiophene-2-carboxylate ของ 20-hydroxyecdysone (2)

สารอนุพันธ์ thiophene-2-carboxylate ชนิดแรกที่เตรียมคือ 20-hydroxyecdysone 2-(thiophene-2-carboxylate) (85) จากปฏิกิริยาระหว่างสารตั้งต้น 2 กับ thiophene-2-carboxylic acid chloride ใน pyridine และเบนซีน ได้สารผลิตภัณฑ์ 85 ในปริมาณสูง (84%) การยืนยันว่าหมู่ thiophene-2-carboxylate อยู่ที่ตำแหน่ง 2 ดูจากการเกิด downfield shift 1.31 ppm ของ H-2 ของสาร 85 (δ 5.46) เมื่อเทียบกับสารตั้งต้น 2 (δ 4.15[17])

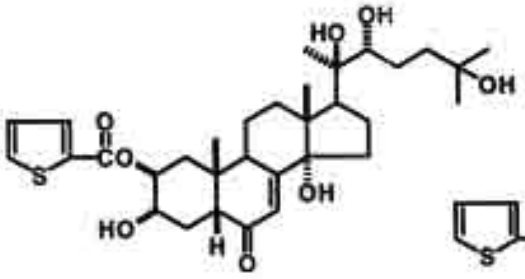
สิ่งที่เป็นข้อแตกต่างที่เด่นชัดของการทำปฏิกิริยาระหว่างสาร 2 กับ thiophene-2-carboxylic acid chloride และกับ 2-furoyl chloride คือกรณีแรกได้สารอนุพันธ์ thiophene-2-carboxylate ที่ตำแหน่งที่ 2 คือสาร 85 เพียงชนิดเดียว (ไม่พบสาร 86) แต่กรณีหลังได้สารอนุพันธ์ furan-2-carboxylate ที่ตำแหน่ง 2 และ 3 (คือสาร 72 และ 73) ทั้ง 2 ชนิด โดยสาร 73 เกิดจากสาร 72 โดย C-2 ⟶ C-3 acyl migration ซึ่งได้เคยพบแล้วในกรณีการเกิด C-2 ⟶ C-3 acetyl migration [17]

สารอนุพันธ์ thiophene-2-carboxylate ชนิดที่สองที่ได้เตรียมคือ 20-hydroxyecdysone 22-(thiophene-2-carboxylate) (87) ตั้งต้นจาก 20-hydroxyecdysone 2,3-acetonide (75) ทำปฏิกิริยากับ

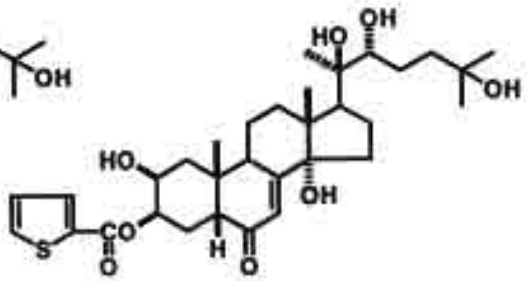
thiophene-2-carboxylic acid chloride ได้สาร 88 นำ 88 มากำจัดหมู่ป้องกัน acetonide ออกไปได้สาร 87 overall yield ของ 87 จากสารตั้งต้น 75 คือ 67%

ต่อไปเป็นการเตรียม 20-hydroxyecdysone 25-(thiophene-2-carboxylate) (89) เริ่มต้นด้วย diacetonide 33 ทำปฏิกิริยากับ thiophene-2-carboxylic acid chloride ในสารละลาย pyridine และเบนซีน โดยมี DMAP เป็นคะตะลิสต์ ได้สาร 90 (66% yield) ซึ่งเมื่อนำมากำจัดหมู่ป้องกัน acetonide ออกไปได้สาร 89 ตามต้องการ ในกรณีนี้ เมื่อมีหมู่ thiophene-2-carboxylate เข้าไปที่ตำแหน่ง 25 มีผลทำให้หมู่ 26-Me และ 27-Me ของ 90 เกิด downfield shift ไป 0.07 ppm เมื่อเทียบกับสาร 33[17]

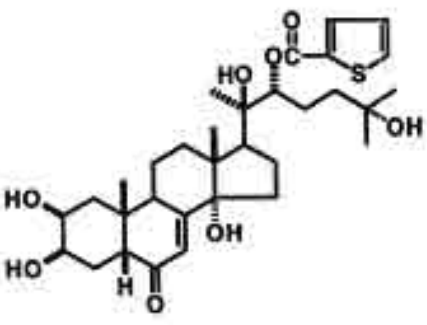
สารอนุพันธ์ในกลุ่ม thiophene-2-carboxylate ที่จะสังเคราะห์ต่อไปคือ 20-hydroxyecdysone 3-(thiophene-2-carboxylate) (86) ใช้วิธีการเตรียมแบบเดียวกับการเตรียมสารในอนุกรมของ furan-2-carboxylate คือสาร 73 โดยเริ่มจากการเตรียมสาร 91 จากสาร 91 ได้มีการเปลี่ยนแปลงขั้นตอนการทำปฏิกิริยาเพื่อให้ได้สารเป้าหมาย 86 ตามต้องการคือทำปฏิกิริยา deacetonation ก่อนปฏิกิริยา catalytic hydrogenolysis คือจากสาร 91 ทำปฏิกิริยากับ 70% AcOH ได้สาร 92 ซึ่งกรณีนี้ปฏิกิริยาใช้เวลาค่อนข้างมาก สาเหตุอาจเป็นเพราะสาร 91 มีความไม่ชอบน้ำมากกว่ากรณีที่นำสาร 82 มาทำ deacetonation แล้วได้สาร 73 เมื่อได้สาร 92 แล้วจึงทำปฏิกิริยา catalytic hydrogenolysis ปรากฏว่าได้สารผลิตภัณฑ์ 86 เพียง 17% เท่านั้น สาเหตุที่ปริมาณของผลผลิตต่ำนี้ เข้าใจว่าเนื่องมาจากสารประกอบ sulphur เป็น poison ต่อคะตะลิสต์ในปฏิกิริยา catalytic hydrogenation อย่างไรก็ตามจุดประสงค์สำคัญของการสังเคราะห์ 86 ก็เพื่อเตรียมไว้สำหรับทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ในขั้นนี้จึงยังไม่ได้ปรับปรุงวิธีการเตรียมที่ได้ปริมาณผลผลิตมากกว่านี้



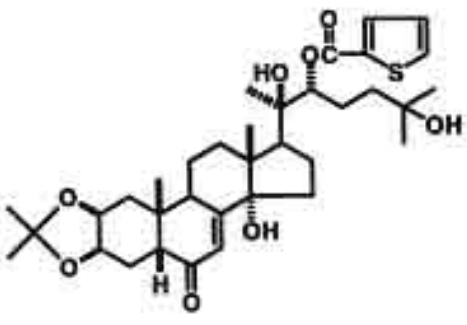
85



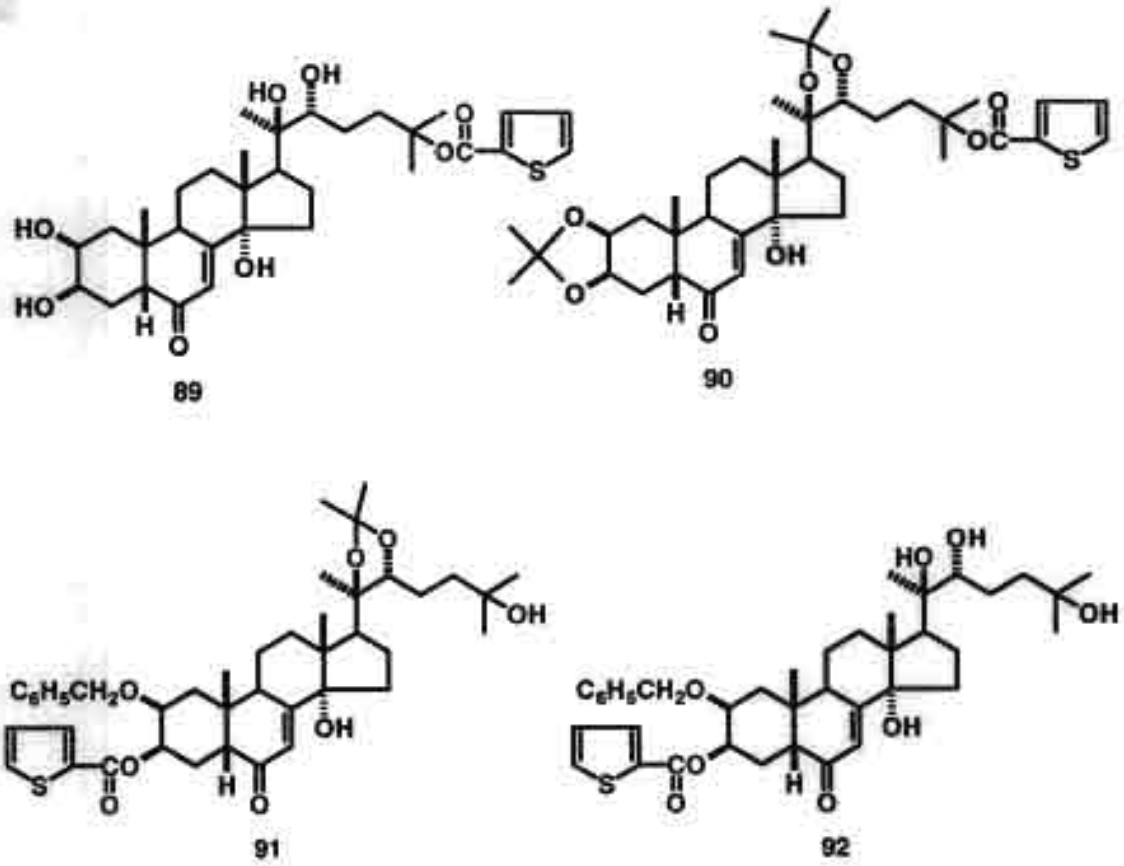
86



87



88



89 90

91 92

3) การเตรียมสารอนุพันธ์ Pyrrole-2-carboxylate ของ 20-hydroxyecdysone (2)

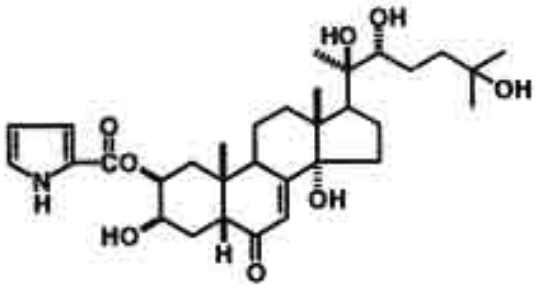
งานขั้นต่อไปเป็นการเตรียม อนุพันธ์ pyrrole-2-carboxylate ของ 20-hydroxyecdysone (2) สารชนิดแรกที่ต้องการเตรียมคือ อนุพันธ์ 20-hydroxyecdysone 2-(pyrrole-2-carboxylate) (93) ความจริงในตอนแรกของการวางแผนเตรียมอนุพันธ์เฮตเทอโรไซคลิกเอสเทอร์ของสาร 2 นั้น ได้ตั้งใจที่จะเตรียมอนุพันธ์ของ pyrrole-2-carboxylate ก่อนอนุพันธ์ furan-2-carboxylate และ thiophene-2-carboxylate โดยจะใช้ pyrrole-2-carboxylic acid chloride แต่ปรากฏว่าสารนี้ไม่มีจำหน่าย จึงเตรียมจาก pyrrole-2-carboxylic acid โดยทำปฏิกิริยากับ thionyl chloride ตามวิธีที่ได้เคยทำกันมา แล้วให้สารที่คาดว่าเป็น acid chloride ทำปฏิกิริยากับสาร 2 ปรากฏว่าไม่ได้สาร 93 ทั้งๆที่ได้พยายามปรับเปลี่ยนที่วิธีเตรียม acid chloride และการทำปฏิกิริยากับสาร 2 แล้วก็ตาม ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ pyrrole-2-carboxylic acid มีลักษณะเป็น vinylogous amide ทำให้มีเสถียรภาพสูงและเตรียมเป็น acid chloride ได้ยาก อีกประการหนึ่งอาจเป็นไปได้ที่ตัว acid chloride เองไม่ว่องไวต่อปฏิกิริยาเท่าที่ควร ทำให้เกิดปฏิกิริยากับสาร 2 ยาก เมื่อได้ทำปฏิกิริยาในสภาวะที่รุนแรงขึ้นก็ทำให้สารตั้งต้น 2 เปลี่ยนไปเป็นสารอื่น เพราะกรด HCl ที่ยังอาจมีเหลืออยู่อาจทำให้เอคไดสเตียรอยด์เกิดปฏิกิริยาที่ไม่ต้องการได้ง่าย เช่น dehydration

แนวทางการแก้ปัญหาได้เปลี่ยนเป็นการหาวิธีเตรียม pyrrole-2-carboxylic acid anhydride แทน ซึ่งเราสามารถเตรียมได้โดยนำ pyrrole-2-carboxylic acid มาทำปฏิกิริยากับ dicyclohexylcarbodiimide

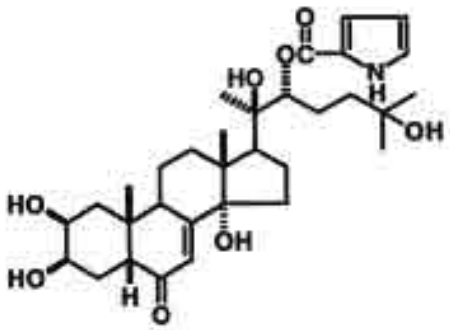
(DCC) ใน dioxane และ acid anhydride ที่ได้นี้สามารถ purify ได้โดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี เมื่อนำมาทดลองทำปฏิกิริยากับ absolute ethanol ก็สามารถทำปฏิกิริยาได้ ethyl pyrrole-2-carboxylate ซึ่งการทดลองเหล่านี้ไม่ได้แสดงไว้ในวัสดุและวิธีการ

นำ pyrrole-2-carboxylic acid anhydride มาทำปฏิกิริยากับ 20-hydroxyecdysone (2) โดยใช้สภาวะและตะตะลิสต์แตกต่างกันไป เท่าที่ได้ทดลองมาถึงปัจจุบันนี้ พบว่าเมื่อทำปฏิกิริยาใน dioxane โดยมี triethylamine และ DMAP อยู่ด้วยที่อุณหภูมิ reflux ได้สารผลิตภัณฑ์ 20-hydroxyecdysone 2-(pyrrole-2-carboxylate) (93) 33% พบว่าหมู่เอสเทอร์อยู่ที่ตำแหน่งที่ 2 โดย ^{1}H NMR สเปกตรัมของ H-2 (δ 5.53) เกิด downfield shift จากเดิม (δ 4.15[17] ในสาร 2) ไป 1.38 ppm

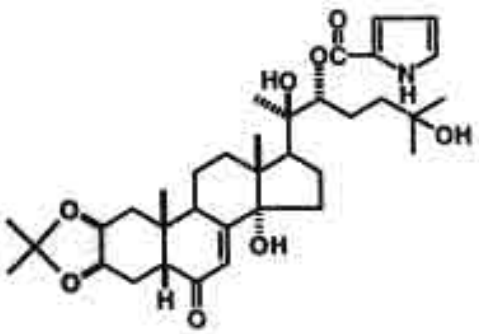
สารอนุพันธ์ต่อไปที่ต้องการเตรียมคือ 20-hydroxyecdysone 22-(pyrrole-2-carboxylate) (94) เริ่มต้นด้วยนำสาร 75 ทำปฏิกิริยากับ pyrrole-2-carboxylic acid anhydride โดยใช้ตะตะลิสต์และตัวทำละลายเช่นเดียวกับกรณีการเตรียมสาร 93 กรณีนี้ได้สาร 95 ในปริมาณ 55% เมื่อนำสาร 95 มากำจัดหมู่ป้องกัน acetonide ได้สาร 94 ในกรณีนี้สัญญาณ H-22 (δ 5.72) ใน ^{1}H NMR สเปกตรัมของ 94 เกิด downfield shift 1.88 ppm เมื่อเทียบกับสาร 2 (δ 3.84[17])



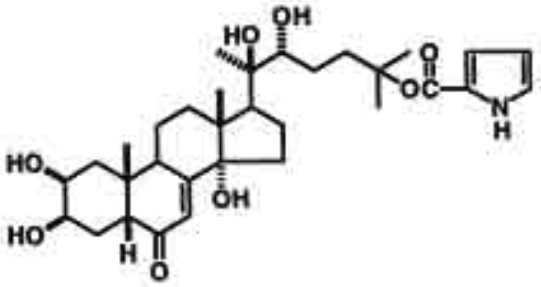
93



94



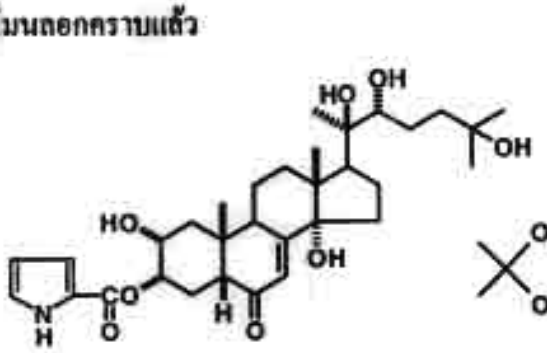
95



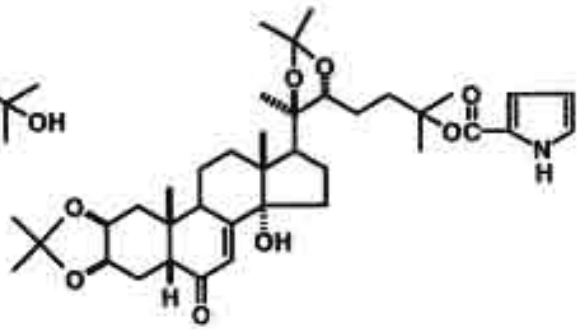
96

สำหรับสารอนุพันธ์ 20-hydroxyecdysone 25-(pyrrole-2-carboxylate) (96) ขณะนี้ยังไม่สามารถเตรียมได้ เนื่องจากหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งที่ 25 มีความว่องไวต่อปฏิกิริยาน้อยกว่าตำแหน่งที่ 2 และ 22 และความไม่ว่องไวต่อปฏิกิริยาของ ของ pyrrole-2-carboxylic acid anhydride และการเป็น tertiary hydroxyl group ที่ตำแหน่งที่ 25 ถึงแม้จะใช้สภาวะที่ค่อนข้างรุนแรง เมื่อเกิดสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา

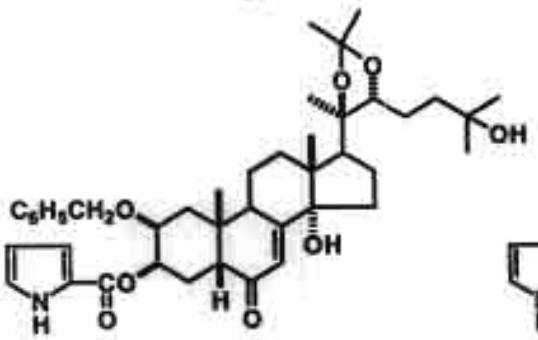
ก็พบว่าไม่มีชนิดใดที่ตรงกับสารที่ต้องการ ส่วนสารอนุพันธ์ 20-hydroxyecdysone 3-(pyrrole-2-carboxylate) (97) นั้นได้ใช้แนวทางในการเตรียมอนุพันธ์ 3-(furan-2-carboxylate) และ 3-(thiophene-2-carboxylate) คือใช้สาร 80 ทำปฏิกิริยากับ pyrrole-2-carboxylic acid anhydride ก็พบว่าปฏิกิริยาไม่เกิดขึ้น คือไม่ได้สาร 99 ซึ่งอาจมาจากการใช้หมู่ benzyl มีขนาดใหญ่ และหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 3 ไม่ค่อยว่องไวต่อปฏิกิริยา จึงได้เปลี่ยนไปใช้หมู่ป้องกันที่ตำแหน่ง 2 เป็นหมู่อะซีทิล โดยนำสาร 20-hydroxyecdysone 2-acetate 20,22-acetonide (6) มาทำปฏิกิริยากับ pyrrole-2-carboxylic acid anhydride พบว่าสามารถนำหมู่ pyrrole-2-carboxylate เข้าไปที่ตำแหน่ง 3 ได้ คือได้สาร 100 ปรากฏว่าเมื่อทำการกำจัดหมู่ป้องกัน acetonide แทนที่จะได้สารผลิตภัณฑ์ 101 กลับได้สารอื่นที่ไม่ทราบว่ามีโครงสร้างเป็นอย่างไร จึงเปลี่ยนไปทำ deacetylation เพื่อให้ได้สาร 102 ก่อนก็พบว่าเกิดปฏิกิริยาอื่นที่ไม่ต้องการ ถึงจุดนี้จึงอาจต้องตัดสินใจว่าจะไม่รวมสาร 97 ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ หรือจะพยายามหาวิธีอื่นในการเตรียม สำหรับสาร heterocyclic esters อื่นๆที่สังเคราะห์ได้ข้างต้นได้นำไปทดสอบฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบแล้ว



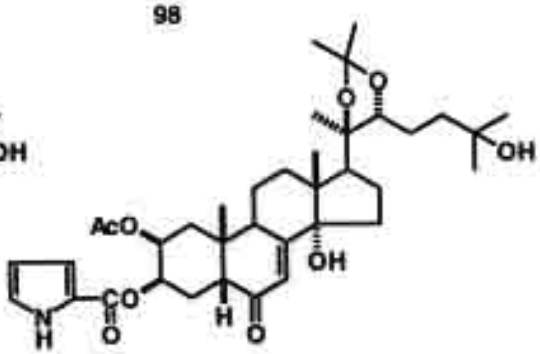
97



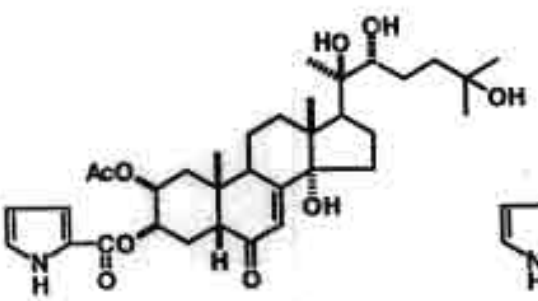
98



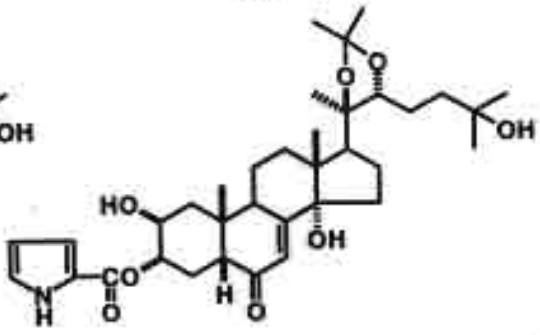
99



100



101



102

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

1) Abutasterone (25) และ 24-epi-abutasterone (24) (ตารางที่ 24)

เมื่อนำ abutasterone (25) และ 24-*epi*-abutasterone (24) มาทดสอบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบ พบว่าเอคไดสเตียรอยด์ทั้งสองมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่ำกว่า 20-hydroxyecdysone (2) ซึ่งเป็นสารหลักในการเปรียบเทียบและถือว่าเป็นเอคไดสเตียรอยด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง แสดงว่าการเพิ่มหมู่ไฮดรอกซิล 1 หมู่ที่ตำแหน่ง 24 ไม่ว่าจะเป็น S หรือ R configuration มีผลทำให้ฤทธิ์ทางชีวภาพลดลง

2) 20,26-Dihydroxyecdysone (28) ทั้งสอง C-25 epimers (ตารางที่ 25)

สาร (28) ทั้งสอง C-25 epimers มีฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบต่ำกว่าสาร 2 ค่อนข้างมาก เอคไดสเตียรอยด์ 28 "epimer 2" (ซึ่งเป็นไอโซเมอร์ที่ elute ออกมาหลัง 28 "epimer 1" ใน reversed-phase HPLC column) แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพเป็น 2 เท่าของ 28 "epimer 1" แสดงว่า binding ของ 28 "epimer 2" ต่อ receptor ของแมลงเกิดขึ้นได้ดีกว่า 28 "epimer 1" ฉะนั้นหากสามารถทราบ absolute stereochemistry ที่ตำแหน่ง 25 ของสารทั้งสองได้ จะทำให้ความเข้าใจเกี่ยวกับการ bind ของเอคไดสเตียรอยด์กับ receptor ได้ดีขึ้น การที่สาร 28 ทั้งสองไอโซเมอร์มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่ำกว่าสาร 2 แสดงว่าการเพิ่มหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 26 ในสาร 2 ทำให้ฤทธิ์ทางชีวภาพลดลง

3) Pterosterone (26) และ 24-epi-pterosterone (27) (ตารางที่ 26)

24-*epi*-Pterosterone (27) มีฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบสูงกว่า pterosterone (26) ประมาณ 7 เท่า และสาร 27 มีฤทธิ์ทางชีวภาพใกล้เคียงกับสาร 2 แสดงว่าสำหรับ 25-deoxyecdysteroid การจัดเรียงตัวของหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 24 มีความสำคัญต่อการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพมาก

4) Inokosterone (14) ทั้งสอง C-25 epimers (ตารางที่ 27)

Inokosterone (14) "epimer 1" มีฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบประมาณ 2 เท่าของ inokosterone (14) "epimer 2" แสดงว่าการจัดเรียงตัวของหมู่ต่างๆที่ตำแหน่ง 25 ของสาร 14 มีผลต่อการ bind ของเอคไดสเตียรอยด์ต่อ receptor ของแมลง หากเราสามารถทราบ absolute configuration ที่ตำแหน่ง 25 ของแต่ละ epimer ของสารนี้ได้ก็จะทำให้เข้าใจการ bind ของเอคไดสเตียรอยด์ กับ receptor ได้มากยิ่งขึ้น

5) 3-Oximes 59 และ 60, และ 3-methoximes 61 และ 62 (ตารางที่ 28)

ส่วนผสมของ 3-oximes **59** และ **60** (อัตราส่วน 2:5 หรือ 5:2 เนื่องจากยังไม่ทราบว่าไอโซเมอร์ใดเป็น major isomer) แสดงฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบปานกลาง ถึงแม้ว่าจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่ำกว่าสาร 2 ก็ตาม การที่ oximes นี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพ แสดงว่าถึงแม้ว่าไม่มีหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่งที่ 3 แต่หมู่ไฮดรอกซิลของ oxime ก็ยังมีบทบาทในการทำให้เอคไดสเตียรอยด์นี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพอยู่ อาจเป็นไปได้ที่หมู่ไฮดรอกซิลของ oxime เกิด H-bonding กับ receptor ของแมลง ทำให้การ bind เกิดขึ้นได้ดี ถึงแม้จะไม่ดีเท่ากับกรณีของสาร 2

เพื่อทดสอบว่า H-bonding ของ oximes **59** และ **60** กับ receptor หรือไม่ เราได้เตรียม 3-methoximes **61** และ **62** ปรากฏว่าสารทั้งสองมีฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบต่ำกว่าส่วนผสม 3-oximes **59** และ **60** การลดลงของฤทธิ์ทางชีวภาพเช่นนี้อาจเป็นเพราะการเกิด H-bonding (คือ electronic factor) ดังกล่าวข้างต้นเกิดขึ้นไม่ได้ อย่างไรก็ตาม การลดลงของฤทธิ์ทางชีวภาพก็อาจเกิดจากความเกะกะของหมู่ OMe ทำให้การ bind ของเอคไดสเตียรอยด์กับ receptor เกิดขึ้นได้ไม่ดีก็ได้ (เป็น steric factor) สิ่งที่ควรสังเกตก็คือ methoxime **62** มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงกว่า methoxime **61** แสดงว่าหมู่ OMe ที่อยู่ใกล้กับ C-2 มีฤทธิ์สูงกว่าหมู่ OMe ที่อยู่ใกล้กับ C-4 น่าเสียดายที่ไม่สามารถแยก 3-oximes **59** และ **60** ออกจากกันได้ มิเช่นนั้นจะได้ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของแต่ละไอโซเมอร์ ซึ่งจะทำให้เข้าใจถึงการ binding ของเอคไดสเตียรอยด์กับ receptor ได้ดีกว่านี้

6) 6-Oximes 67 และ 69, และ 6-methoximes 70 และ 71 (ตารางที่ 29)

สาร 6-oxime *syn* C-7 **67** แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่สูง ถึงแม้ว่าไม่สูงเท่าสาร **2** ส่วน 6-oxime *anti* C-7 **69** ซึ่งเป็น 5α-ecdysteroid แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพปานกลาง แสดงว่า 6-keto oxygen ไม่ใช่สิ่งจำเป็นสำหรับการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพของเอคไดสเตียรอยด์ ตราบใดที่ α,β-unsaturated system ยังคงอยู่เอคไดสเตียรอยด์ก็ยังคงแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพอยู่ อย่างน้อยก็เป็นกรณีของ nitrogen analogue ซึ่งที่น่าแปลกใจคือ oxime **69** นี้กลับมีฤทธิ์ทางชีวภาพ ทั้งๆที่เป็น 5α-ecdysteroid

เพื่อที่จะทราบว่าหมู่ไฮดรอกซิลของ oxime จำเป็นต้องอยู่อย่างอิสระหรือไม่ จึงจะแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้ จึงเตรียมอนุพันธ์ 6-methyl ether คือ 6-methoximes **70** และ **71** ปรากฏว่าจากการเปลี่ยน 6-oxime *syn* C-7 **67** มาเป็น methyl ether **71** เปลี่ยนฤทธิ์ทางชีวภาพจากสูงมาเป็นปานกลาง และ 6-methoxime *anti* C-7 **70** แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต่ำมาก แสดงว่าการขาด H-bonding เป็นการลดฤทธิ์ทางชีวภาพ อย่างไรก็ตามปัจจัยทาง steric factor ก็อาจมีส่วนเกี่ยวข้องด้วย

7) Heterocyclic esters (furan-2-carboxylate esters, thiophene-2-carboxylate esters และ pyrrole-2-carboxylate esters) ของ 20-hydroxyecdysone (2)

Heterocyclic esters ของ 20-hydroxyecdysone (2) แสดงฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบที่น่าสนใจ (ดูตารางที่ 30) เริ่มจาก 20-hydroxyecdysone 2-(furan-2-carboxylate) (72) เนื่องจากเราไม่สามารถเตรียมเอสเทอร์ชนิดนี้ให้ได้เพียงชนิดเดียว แต่อยู่เป็นส่วนผสม 2:1 กับ 20-hydroxyecdysone 3-(furan-2-carboxylate) (73) จึงทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในลักษณะของส่วนผสมของสองไอโซเมอร์นี้ ปรากฏว่าฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนผสมนี้ปานกลางเมื่อเทียบกับสาร 2 แต่ฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร 73 เพียงชนิดเดียวมีค่าสูงกว่ามาก แสดงว่า 73 มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงกว่า 72 ยกเว้นกรณีที่อยู่ในลักษณะที่เป็นส่วนผสมแล้วสารทั้งสองมีฤทธิ์ทางชีวภาพหักล้างกันเอง สาร 20-hydroxyecdysone 22-(furan-2-carboxylate) (74) ก็มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง ซึ่งเป็นสิ่งที่น่าสนใจ เพราะจากข้อมูลที่มีผู้รายงานการลดพิษของสาร 2 ที่อยู่ในพืชโดยหอยทากบก *Cepaea nemoralis* ด้วยการทำ acetylation ที่ตำแหน่ง 22 ได้ทำให้ฤทธิ์ทางชีวภาพลดลงไปมาก[11] นั้น การที่สาร 74 ยังแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่สูงเช่นนี้ แสดงว่าการเกิดเป็นเอสเทอร์ที่ตำแหน่ง 22 ไม่ได้ลดฤทธิ์ทางชีวภาพเสมอไป สำหรับ 20-hydroxyecdysone 25-(furan-2-carboxylate) (77) นั้น ก็แสดงผลที่น่าสนใจ คือมีฤทธิ์ทางชีวภาพค่อนข้างสูงกว่าที่ควรจะเป็น ถึงแม้ว่าได้มีการสรุปไว้โดยกลุ่มของ Horn ว่า acetate ester ที่ตำแหน่ง 25 ลดฤทธิ์ทางชีวภาพของเอคไดสเตียรอยด์ลงไปมาก[13]

สำหรับฤทธิ์ทางชีวภาพใน series ของ thiophene-2-carboxylate (ตารางที่ 31) สาร 20-hydroxyecdysone 2-(thiophene-2-carboxylate) (85) ซึ่งสามารถเตรียมได้โดยไม่มีสาร 20-hydroxyecdysone 3-(thiophene-2-carboxylate) (86) ปนมา มีฤทธิ์ใกล้เคียงกับส่วนผสมของสาร 72 กับ 73 สำหรับ 20-hydroxyecdysone 22-(thiophene-2-carboxylate) (87) กลับมีฤทธิ์ทางชีวภาพไม่สูงเท่าสารใน series ของ furan-2-carboxylate (คือสาร 74) แต่สาร 20-hydroxyecdysone 25-(thiophene-2-carboxylate) (89) กลับมีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงกว่าสาร 87 แสดงว่าการ binding ที่ receptor ของแมลง ที่ตำแหน่งต่างๆในโมเลกุลของเอคไดสเตียรอยด์นั้น sensitive ต่อการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยที่ตำแหน่งดังกล่าวในโมเลกุลของเอคไดสเตียรอยด์

ส่วนฤทธิ์ทางชีวภาพใน series ของ pyrrole-2-carboxylate (ตารางที่ 32) ทั้งสาร 20-hydroxyecdysone 2-(pyrrole-2-carboxylate) (93) และ 20-hydroxyecdysone 22-(pyrrole-2-carboxylate) (94) ต่างก็แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่สูงกว่าทั้งใน series ของ furan-2-carboxylate และ thiophene-2-carboxylate และค่อนข้างสูงกว่าสาร 2 โดยเฉพาะสาร 94 มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงกว่าสาร 2 ซึ่งผลที่ได้นี้น่าสนใจมาก

วัสดุและวิธีการ

วัสดุและวิธีการทั่วไปเช่นเดียวกับที่ได้ระบุไว้แล้ว[33]

งานวิจัยทางด้านพฤกษเคมี ได้ดำเนินการ 2 ส่วนคือ

1. การสกัดแยกและหาสูตรโครงสร้างของเอคไดสเตียรอยด์จากพืช

1) การสกัดแยก 24-*epi*-Abutasterone และเอคไดสเตียรอยด์อื่นๆจาก Chloroform และ Ethyl acetate extracts ของเปลือกรากของ *Vitex canescens*

นำเปลือกราก (root bark) ของต้นผ่าเสี้ยน (*Vitex canescens* Kurz) ซึ่งได้จากอำเภอพิปูน จังหวัดนครศรีธรรมราช และได้ตากให้แห้งและทำการบดแล้ว (2.5 กิโลกรัม) มาสกัดด้วย *n*-hexane และเอทานอลตามลำดับ โดยใช้เครื่องสกัด Soxhlet นำส่วนที่สกัดด้วยเอทานอลมาระเหยตัวทำละลายออกไปเกือบหมด แล้วเติมน้ำลงไป กรอง สกัดสารละลายส่วนที่กรองได้ด้วยคลอโรฟอร์ม เอทิลอะซีเตด และนอร์มัลบิวทานอลตามลำดับ โดยใช้เครื่องสกัดของเหลว-ของเหลวแบบต่อเนื่อง (continuous liquid-liquid extraction apparatus)

(1) Chloroform extract นำส่วนที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม (chloroform extract) (100 กรัม) มาแยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟี (Merck silica gel 60, 70-230 mesh หากไม่ระบุ จะถือว่าใช้ขนาด > 230 mesh) ใช้ตัวชะ (eluent) เป็นคลอโรฟอร์ม-เมทานอล โดยเพิ่มปริมาณของเมทานอลขึ้นเรื่อยๆ ตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC แล้วเลือกกลุ่ม fraction มาแยกต่อไป 2 กลุ่ม คือกลุ่ม fr C1 และ fr C2

<u>กลุ่ม fr C1</u> นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำหลายครั้งจนได้ 24-*epi*-makisterone A (21) (7 มิลลิกรัม) ข้อมูล ^{1}H NMR ดูตารางที่ 1 ส่วนข้อมูล ^{13}C NMR สอดคล้องกับข้อมูลที่มีผู้รายงานไว้[41]

<u>กลุ่ม fr C2</u> นำกลุ่มนี้มาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีใหม่ แล้วตกผลึกด้วยเมทานอล-เอทิลอะซีเตด ได้ 20-hydroxyecdysone (2) (5.36 กรัม) เมื่อเปรียบเทียบทำ TLC กับสาร 2 ที่เคยพิสูจน์เอกลักษณ์มาก่อนแล้ว[12] และเปรียบเทียบ IR และ ^{1}H NMR สเปกตรัมกับสาร ที่มีผู้รายงานไว้[12] ปรากฏว่าตรงกัน

(2) Ethyl acetate extract นำส่วนที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตด (4.69 กรัม) มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี (Merck silica gel 60, 70-230 mesh) ใช้ระบบตัวชะคล้ายคลึงกับกรณีของ chloroform extract แล้วเลือกกลุ่ม fraction มาแยกต่อไปรวม 4 กลุ่ม คือกลุ่ม fr E1 ถึงกลุ่ม fr E4

<u>กลุ่ม fr E1</u> ออกมากับตัวชะคลอโรฟอร์ม-เมทานอล 88:12 ถึง 86:14 เมื่อนำมาผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำ ได้ crude ecdysteroid fraction (52 มิลลิกรัม) ซึ่งเมื่อนำมาผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีอีกครั้งหนึ่ง แล้วนำ fraction ที่มีเอคไดสเตียรอยด์มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC (คอลัมน์: Sherisorb ODS2, 5 ไมโครเมตร , 250x4.6 มิลลิเมตร; mobile phase: MeOH-H_2O (1:1); flow rate: 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที; detector: 254 nm) ทำให้ได้ shidasterone (22) (5 มิลลิกรัม) ปรากฏว่าเมื่อทำการตรวจสอบ fraction หนึ่ง

ของ chloroform extract ใหม่อีกครั้งก็ได้พบว่ามีสาร 22 อยู่ปนกับส่วนผสมของเอคไดสเตียรอยด์ แต่ก็ไม่ได้ทำการแยกเพิ่มเติม

<u>กลุ่ม fr E2</u> ออกมากับตัวชะคลอโรฟอร์ม-เมทานอล 84:16 ถึง 82:18 ประกอบด้วยสารหลายชนิด แต่จากการสังเกต colour reaction บน TLC พบว่าบางชนิดเป็นสารประเภทเอคไดสเตียรอยด์ หลังจากการทำแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำถึง 3 ครั้ง ได้เลือกเอา 2 subfraction (subfr 1 subfr 2) มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC (คอลัมน์: μBondapak C18, 10 ไมโครเมตร, 300x3.9 มิลลิเมตร; mobile phase: MeOH-H_2O (1:1); flow rate: 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที; detector: 254 nm)

จาก subfr 1 ได้เอคไดสเตียรอยด์ 22 เพิ่มเติมมาอีก (3 มิลลิกรัม) จาก subfr 2 ได้เอคไดสเตียรอยด์ calonysterone (16) (2 มิลลิกรัม) และพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเปรียบเทียบ TLC , IR และ ^1H NMR กับสาร ที่แยกมาได้ก่อนหน้านี้จากเปลือกของต้นไข่เน่า[15]

<u>กลุ่ม fr E3</u> ส่วนใหญ่เป็นเอคไดสเตียรอยด์ชนิดเดียวกับที่แยกออกมาได้ในปริมาณมากจาก chloroform extract ซึ่งกล่าวมาแล้วและมีส่วนประกอบย่อยอื่นๆในปริมาณน้อยมากอีกจำนวนหนึ่ง

<u>กลุ่ม fr E4</u> ออกมากับตัวชะคลอโรฟอร์ม-เมทานอล 76:24 ถึง 72:28 ได้นำมาแยกต่อด้วย HPLC (DeltaPak C18, 15 ไมโครเมตร, 300x7.8 มิลลิเมตร; mobile phase: MeOH-H_2O (7:15); flow rate: 3.0 มิลลิลิตรต่อนาที; detector: 254 nm) ปรากฏว่าได้ 3 subfractions

จาก subfr 1 พบว่ามี turkesterone (23) (4 มิลลิกรัมจาก 1/3 ของ crude subfraction) การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ 23 ได้ทำโดยเปรียบเทียบ TLC กับสาร authentic ที่ทราบแน่นอน[12] และเปรียบเทียบข้อมูล ^1H NMR กับที่ได้รายงานมาก่อนแล้ว[12]

เมื่อนำ subfr 2 มาตรวจสอบโดย TLC (คลอโรฟอร์ม-เมทานอล = 5:1, 3 runs) พบว่ามีสาร 2 ชนิดผสมอยู่ เมื่อทำการแยกโดย HPLC ซ้ำ (Sherisorb ODS2, 5 ไมโครเมตร, 250x 4.6 มิลลิเมตร; mobile phase: MeOH-H_2O (1:3); flow rate: 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที; detector: 254 nm) ทำให้ได้เอคไดสเตียรอยด์ 2 ชนิด สารชนิดแรก (หนัก 3 มิลลิกรัม) เป็นเอคไดสเตียรอยด์ใหม่คือ 24-*epi*-abutasterone (24) และสารชนิดที่สอง (ประมาณ 0.5 มิลลิกรัม) เป็นเอคไดสเตียรอยด์ที่ไม่ทราบโครงสร้าง

24-*Epi*-abutasterone (24). IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1}: 3408, 2962, 1651, 1444, 1383, 1303, 1057, 950, 877. ข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR ดูตารางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ. HR-FABMS m/z: 497.3132 $[M+H]^+$ (คำนวณสำหรับ $C_{27}H_{45}O_6$: 497.3144).

ตารางที่ 1. ^{1}H NMR data of compounds **21**, **24** and **25**

H	24	21	25*
2	4.18 (*m*)	4.18 (*m*)	4.20
3	4.23 (*br s*)	4.23 (*br s*)	4.22
5	2.99 (*dd*, 12.9, 3.5)	3.01 (*dd*, 13.1, 3.6)	3.01 (*dd*, 15, 3.8)
7	6.22 (*d*, 2.1)	6.26 (*d*, 2.7)	6.24 (*d*, 2.2)
9	3.57 (*m*)	3.59 (*m*)	3.59 (*m*)
17	3.08 (*t*, 9.1)	3.00 (*t*, 9.1)	2.98 (*t*, 8.4)
22	4.51 (*dd*, 9.6, 2.3)[a]	4.07 (*br d*, 9.4)	4.25
24	4.37 (*dd*, 9, 2.7)[a]		4.08 (*d*, 9.1)
18-Me	1.22 (*s*)	1.21 (*s*)	1.20 (*s*)
19-Me	1.06 (*s*)	1.06 (*s*)	1.07 (*s*)
21-Me	1.63 (*s*)	1.58 (*s*)	1.61 (*s*)
26-Me	1.46 (*s*)	1.33 (*s*)	1.47 (*s*)[b]
27-Me	1.47 (*s*)	1.38 (*s*)	1.52 (*s*)[b]

All compounds were recorded in pyridine-d_5.

*Data taken from ref 47.

[a,b]Assignments may be reversed for signals with the same superscript.

ตารางที่ 2. ^{13}C NMR data of compounds 24 and 25

C	24	25*
1	37.9	37.9
2	68.1[a]	68.0[c]
3	68.0[a]	67.9[c]
4	32.3	32.4
5	51.3	51.3
6	203.4	203.4
7	121.6	121.6
8	166.1	166.0
9	34.4	34.4
10	38.6	38.6
11	21.1	21.0
12	31.7	31.6
13	48.1	48.0
14	84.2	84.0
15	31.9	31.9
16	21.3	21.4
17	50.0	49.9
18	17.9	17.8
19	24.4	24.4
20	76.8	76.6
21	21.7	21.7
22	73.7[b]	78.1
23	35.2	32.8
24	75.9[b]	80.2
25	72.6	72.1
26	26.1	26.8[d]
27	26.0	25.1[d]

All compounds were recorded in pyridine-d_5.

*Data taken from ref 47. [a-d]Assignments may be reversed for signals with the same superscript.

2) การสกัดแยก 20,26-Dihydroxyecdysone (28)

การสกัดแยก 20,26-dihydroxyecdysone จาก *Vitex glabrata*

พืชในสกุล *Vitex* ที่นำมาสกัดแยก 20,26-dihydroxyecdysteroid เปลือกต้นของ *V. canescens* (sample 1)[9] และเปลือกรากของ *V. canescens* จากจังหวัดนครศรีธรรมราช *V. glabrata*[12], *V. pinnata*[8] จากแหล่งเดิมที่เคยเก็บมาวิจัยแล้ว และเปลือกต้นของ *V. canescens* (sample 2) จากจังหวัดแพร่

ในการแยก 20,26-dihydroxyecdysone จากพืชสกุล *Vitex* หลังจากแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้พัฒนาระบบ HPLC เพื่อให้แยกสารออกมาจากเอคไดสเตียรอยด์อื่น รวมทั้งสารประเภทอื่นๆที่อาจมีปนอยู่ 3 ระบบดังนี้

System A Column : Spherisorb S100DS2, 10 μm, 10x250 mm; mobile phase: MeOH-H_2O (35:65); flow rate: 2.0ml/min; detector: 254 nm; t_R ของ turkesterone (23) และ 20,26-dihydroxyecdysone เป็น 20.8 และ 27.5 min ตามลำดับ

System B Column : Hypersil BDSC18, 5 μm, 4.6x250 mm; mobile phase: *i*-PrOH-H_2O (5:95); flow rate: 1.4 ml/min; detector: 242 nm; t_R ของ 20,26-dihydroxyecdysone "epimer 1" และ "epimer 2" คือ 38.5 และ 44.5 min ตามลำดับ

System C Column : Hypersil Si, 5 μm, 4.6x250 mm; mobile phase: $CHCl_3$-H_2O (93:7); flow rate: 1.2 ml/min; detector: 254 nm; t_R ของ 24-*epi*-abutasterone (24) และ 20,26-dihydroxyecdysone (28) คือ10.5 และ 15.0 min ตามลำดับ

นำเปลือกต้นไข่เน่า (*Vitex glabrata*) ซึ่งแห้งและบดเป็นผงแล้วมา 1 กิโลกรัม สกัดตามลำดับด้วยนอร์มัลเฮกเซนและเมทานอล โดยใช้ Soxhlet extraction apparatus นำส่วนที่สกัดด้วยเมทานอลซึ่งระเหยตัวทำละลายออกเกือบหมดแล้วมาเติมน้ำแล้วสกัดตามลำดับด้วยคลอโรฟอร์ม เอทิลอะซีเตต และนอร์มัลบิวทานอล นำส่วนที่สกัดด้วยบิวทานอลมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้คลอโรฟอร์ม-เมทานอลเป็นตัวชะ ตรวจสอบส่วนย่อย (fractions) ที่ออกมาด้วย TLC สำหรับส่วนย่อย ที่มี R_f value ตรงกับ 20,26-dihydroxyecdysone นั้น อยู่ในกลุ่มที่มี turkesterone (23) เป็น major component นำส่วนย่อยกลุ่มนี้มาแยกซ้ำด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ตามด้วย reversed-phase HPLC (system A) สามารถแยก 28 ได้ 1 มิลลิกรัม เมื่อทำการวิเคราะห์ต่อไปด้วย HPLC เพื่อหาปริมาณของ epimers (system B)

ทำนองเดียวกันได้ทำการแยก 20,26-dihydroxyecdysone ปริมาณ 1 มิลลิกรัม จากเปลือกต้นของ *V. canescens* (sample 2) ทำการหาอัตราส่วนของ epimers ทั้งสองที่ได้ และหาอัตราส่วนของ epimers ทั้งสอง จาก 20,26-dihydroxyecdysone จาก *Silene nutans* ด้วย system B เช่นกัน (ดูตารางที่ 3)

การสกัดแยก 20,26-dihydroxyecdysone จากเปลือกต้นของ *V.canescens* (sample 1)

นำเปลือกต้นของ *V. canescens* จากนครศรีธรรมราชมา 1 กิโลกรัม ทำการสกัดแยกเช่นเดียวกับกรณีของ *V. glabrata* ข้างต้น หลังจากนำ butanol extract มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี เพื่อแยก

ตารางที่ 3. C-25 Epimer ratios of 20,26-dihydroxyecdysone from *Vitex* and *Silene* species

Entry	Plant material	"Epimer 1":"Epimer 2"
1	*V. Glabrata*[a]	1:2.5
2	*V. canescens* (sample 1)[a]	1:4.0
3	*V. canescens* (sample 2)[a]	1:3.7
4	*V. pinnata*[a]	1:2.1
5	*V. canescens*[b]	1:14.7
6	*S. nutans*[c,50]	15:1

[a] Stem bark

[b] Root bark

[c] Aerial part

turkesterone (23) ส่วนใหญ่ และสารอื่นๆออกไปแล้ว นำมาแยกด้วย HPLC (system A) เพื่อแยกสาร 23 ที่เหลือให้ออกไปจาก 20,26-dihydroxyecdysone กับ 24-*epi*-abutasterone (24) แล้วตามด้วยการใช้ HPLC (system C) เพื่อแยก 24 ให้ออกจาก 20,26-dihydroxyecdysone กรณีนี้สามารถแยก 20,26-dihydroxyecdysone ได้ประมาณ 0.5 มิลลิกรัม จากนั้นจึงหาอัตราส่วนของ epimers ทั้งสองของสารนี้ด้วย HPLC (system B)

ทำนองเดียวกัน ได้แยก 20,26-dihydroxyecdysone จากเปลือกต้นของ *V. pinnata* และเปลือกต้นรากของ *V. canescens* โดยวิธีการเดียวกันกับการแยกจากเปลือกต้นของ *V. canescens* (sample 1) อัตราส่วนของ epimers ทั้งสองได้แสดงไว้ในตารางที่ 3

3) การสกัดแยก Pterosterone (26) จากเปลือกต้น *Vitex glabrata*

นำเปลือกต้นไข่เน่า (*Vitex glabrata*) แห้งที่บดแล้ว (4.5 กิโลกรัม) มาสกัดตามลำดับด้วยตัวทำละลาย *n*-hexane และ EtOH โดยใช้เครื่อง Soxhlet extraction apparatus นำส่วนที่สกัดด้วยเอทานอล (EtOH extract) มาสกัดต่อด้วยวิธีการ continuous liquid-liquid extraction โดยใช้ $CHCl_3$ เป็นตัวทำละลาย ได้ $CHCl_3$ extract (41 กรัม) ซึ่งหลังจากนำไปผ่านขั้นตอนการแยกและทำสารให้บริสุทธิ์หลายขั้นตอน ได้ pterosterone (26, 21 มิลลิกรัม) ตกผลึกในเมทานอล-คลอโรฟอร์มเป็น fine needles จุดหลอมเหลว 227-228 °C (lit.[37] 229-230 °C) ข้อมูลทาง ^{1}H NMR (ดูตารางที่ 4) และ IR สอดคล้องกับที่ได้มีรายงานไว้[37] นอกจากนี้ยังได้ 20-hydroxyecdysone (2) ปริมาณ 860 มิลลิกรัม เป็นสารที่มีปริมาณมากใน extract นี้ และมีข้อมูลทาง ^{1}H NMR และ TLC ตรงกับ authentic sample[12]

4) การสกัดแยก Highly oxygenated ecdysteroids จาก butanol extract ของเปลือกรากของ *Vitex canescens*

นำ butanol extract (22.10 กรัม) ซึ่งได้มาจากการสกัดเปลือกรากของ *V. canescens* จากนครศรีธรรมราชด้วยเมทานอล แล้วสกัด methanol extract ตามลำดับด้วยคลอโรฟอร์ม เอทิลอะซีเตด และนอร์มัลบิวทานอลนั้น มาแยกสารออกจากกันด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลชนิดหยาบ เริ่มใช้ตัวชะเป็น ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล 93:7 แล้วค่อย ๆ เพิ่มปริมาณของไดคลอโรมีเทน แยกสารออกได้ 6 กลุ่ม สำหรับกลุ่มที่ 5 นั้น มีน้ำหนัก 3.77 กรัม และมีจุดของสารที่ให้ UV และให้สีกับ anisaldehyde reagent ที่แสดงว่าน่าจะเป็นแอคไดสเตียรอยด์อยู่ 5 จุด ในจำนวนนี้มีอยู่ 2 จุดที่มีความเข้มสูงและตรงกับ turkesterone (23) 1 จุด อีก 1 จุดมีความเข้มสูงกว่า turkesterone นำกลุ่มที่ 5 นี้มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำ โดยใช้ซิลิกาเจลแบบเดิม ใช้ตัวชะเริ่มแรกเป็นไดคลอโรมีเทน-เมทานอล 90:10 ในครั้งนี้เก็บ fractions ได้ 9 กลุ่ม กลุ่มที่ 7 (น้ำหนัก 653 มิลลิกรัม) ซึ่ง TLC แสดงว่ามี turkesterone (23) อยู่กับสารที่มีขั้วสูงกว่า ซึ่งให้สีชมพูไปเป็นเขียวกับรีเอเจนต์ นำส่วนหนึ่งของกลุ่มนี้

ตารางที่ 4 ^{1}H NMR data of compounds **26, 27, 42-46.**

H	27	26	42	43		44	45	46
				Isomer 1*	Isomer 2*			
	C_5D_5N	C_5D_5N	$CDCl_3$	$CDCl_3$	$CDCl_3$	$CDCl_3$	$CDCl_3$	$CDCl_3$
2	4.16 (m)	4.16 (m)	4.20 (m)	4.25 (m)	4.25 (m)	4.19 (m)	4.16 (m)	4.20 (m)
3	4.22 (br s)	4.22 (br s)	4.25 (br s)	.25 (br s)	.25 (br s)	4.24 (br s)	4.21[a]	4.25 (br s)
5	2.97 (dd,	3.00 (dd,	2.33 (dd,	2.34 (dd,	2.34 (dd,	2.33 (dd,	2.29 (dd,	2.33 (dd,
	ca 13, 3.6)	13.1, 3.6)	12.6, 4.7)	12.5, 4.5)	12.5, 4.5)	12.5, 4.5)	12.6, 4.7)	12.5, 4.8)
7	6.22 (d, 2.4)	6.25 (d, 2.1)	5. 80 (d, 2.1)	5. 80 (d, 2.1)	5. 80 (d, 2.1)	5.80 (d, 2.1)	5. 76 (d, 2.4)	5. 80 (d, 2.4)
9	3.58 (m)	3.58 (m)	2.78 (m)	2.78 (m)	2.78 (m)	2.78 (m)	2.73 (m)	2.78 (m)
17	3.02 (t, 9.1)	2.92 (t, 9.1)	2.20(dd, 9.7, 7.6)	2.19[a]	2.19[a]	2.22 (dd, 9.7, 9.4)	2.12 (dd, 9.4, 6.4)	2.18 (dd, 9.4, 7.9)
22	4.10 (m)	4.12 (br d, 10)	3.78 (dd, 9.5, 3.9)	3.60 (dd, 9.1, 2.3)	3.59 (dd, *ca* 9, 2.1)	3. 87 (dd, 9.7, 2.7)	3.86 (dd, 10.3, 1.6)	3.96 (dd, 10.3, 1.5)
24	4.47 (br d, 9.7)	3.94 (m)	2.86 (t, 6.2)			2.91 (dd, 7.9, 3.3)	4.21[a]	3.34 (m)
26	-	-	-	2.55 (d, 4.8);	2.58 (d, 4.7);	-	4.83 (br s);	-
				2.67 (d, 4.8)	2.62 (d, 4.7)		4.99 (br s)	
18-Me	1.21 (s)	1.20 (s)	0.70 (s)	0.76 (s)	0.77 (s)	0.77 (s)	0.72 (s)	0.77 (s)
19-Me	1.05 (s)	1.06 (s)	0.96 (s)	0.96 (s)	0.96 (s)	0.95 (s)	0.91 (s)	0.96 (s)
21-Me	1.82 (s)	1.38 (s)	1.11 (s)	1.13 (s)	1.13 (s)	1.12 (s)	1.07 (s)	1.12 (s)
28-Me	0.98 (d, 6.7)	1.01 (d, 6.7)	1.27 (s)	-	-	1.26 (s)	-	0.91 (d, 6.7)
27-Me	1.08 (d, 6.7)	1.01 (d, 6.7)	1.30[b] (s)	1.27[b] (s)	1.29[b] (s)	1.30 (s)	1.67 (s)	0.93 (d, 6.7)
$C(Me)_2$	-	-	1.31[a], 1.32, 1.37, 1.47	1.31[b], 1.32, 1.37, 1.47	1.32[a], 1.33, 1.41, 1.47	1.30, 1.32, 1.39, 1.46	1.25, 1.26, 1.34, 1.42	1.30, 1.31, 1.38, 1.46
			(each s)	(each s)	(each s)	(each s)	(each s)	(each s)

* Assigned from a mixture of two isomers 25,26-epoxides

[a,b] Partially superimposed signal

[a,b] Assignment may be reversed for signals with the same superscript

ไปแยกด้วย reversed-phase HPLC ซึ่งมีระบบดังนี้ Column: Spherisorb S10ODS2, 10x250 mm, 10 µm; mobile phase: MeOH-H_2O (30:70); flow rate: 2.0 ml/min; detector: 254 nm เก็บ fraction ได้ 3 fractions ดังนี้

(1) กลุ่มที่ 1, t_R = 11.0 min

(2) กลุ่มที่ 2, t_R = 11.9 min

(3) กลุ่มที่ 3, t_R = 12.8 min

ปรากฏว่าทั้ง 3 fraction สารยังปนกันอยู่ จึงนำมารวมใหม่ แล้วแยกด้วยระบบ HPLC ใหม่ดังนี้

Column: µBondapak C18, 3.9X300 mm, 10 µm; mobile phase: MeOH-H_2O (18:82); flow rate: 1.0 ml/min; detector: 254 nm ในกรณีนี้ สามารถแยกสารออกได้เป็น 3 กลุ่มดังนี้

(1) กลุ่ม fr B1, t_R = 26.0 min

(2) กลุ่ม fr B2, t_R = 34.4 min

(3) กลุ่ม fr B3, t_R = 40.8 min

จากการตรวจสอบด้วย TLC พบว่าแต่ละกลุ่มมีสารปริมาณน้อย (minor component) ปนอยู่ โดยให้จุดของสารเหนือเอคไคสเตียรอยด์ที่ต้องการ และมีอยู่ไม่เกิน 5 % ของสารที่ต้องการ (ซึ่งมีขั้วสูงกว่า) ฉะนั้นจึงนำแต่ละกลุ่มมาแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วย normal-phase HPLC ดังนี้

Column: Hypersil Si, 4.6X250 mm, 5µm; mobile phase: $CHCl_3$-MeOH (90:10); flow rate: 1.2 ml/min; detector: 254 nm

ผลการแยกมีดังนี้

(1) กลุ่ม fr B1 แยกได้ 2 กลุ่มย่อยดังนี้

กลุ่มย่อย B1.1, t_R = 8.0 min ไม่ใช่สารประเภทเอคไคสเตียรอยด์ มีปริมาณน้อย

กลุ่มย่อย B1.2, t_R = 13.0 min เป็นเอคไคสเตียรอยด์ 29 มีปริมาณ 5 มิลลิกรัม

(2) กลุ่ม fr B2 แยกได้ 2 กลุ่มย่อยดังนี้

กลุ่มย่อย B2.1, t_R = 9.0 min ไม่ใช่สารประเภทเอคไคสเตียรอยด์ มีปริมาณน้อย

กลุ่มย่อย B2.2, t_R = 16.4 min เป็นเอคไคสเตียรอยด์ 30 "epimer 1" มีปริมาณ 2 มิลลิกรัม

(3) กลุ่ม fr B3 แยกได้ 2 กลุ่มย่อยดังนี้

กลุ่มย่อย B3.1, t_R = 9.0 min ไม่ใช่สารประเภทเอคไคสเตียรอยด์ มีปริมาณน้อย

กลุ่มย่อย B3.2, t_R = 16.4 min เป็นเอคไคสเตียรอยด์ 30 "epimer 2" มีปริมาณ 3.5 มิลลิกรัม

ข้อสังเกตข้างต้นคือสารทั้งสองชนิดในกลุ่มที่ 2 มี retention time ตรงกับสารทั้งสองชนิดในกลุ่มที่ 3 ใน normal-phase HPLC system แต่ใน reversed-phase HPLC system มีค่า retention time ต่างกัน

29: IR: ν_{max} cm^{-1}: 3408, 2967, 1654, 1384, 1052; ^1H NMR ^{13}C NMR ดูตารางที่ 5 และ 6 ตามลำดับ. FABMS (-ve): m/z 511.2912 $[M-H]^-$. $C_{27}H_{43}O_9$ requires 511.2907.

30 "epimer 1": IR: ν_{max} cm^{-1}: 3448, 2952, 1660, 1385, 1053; ^1H NMR ^{13}C NMR ดูตารางที่ 5 และ 6 ตามลำดับ. FABMS (-ve): m/z 511.2906 $[M-H]^-$. $C_{27}H_{43}O_9$ requires 511.2907.

30 "epimer 2": IR: ν_{max} cm^{-1}: 3448, 2927, 1660, 1385, 1053; ^1H NMR ^{13}C NMR ดูตารางที่ 5 และ 6 ตามลำดับ. FABMS (-ve): m/z 511.2908 $[M-H]^-$. $C_{27}H_{43}O_9$ requires 511.2907.

2. การสกัดแยกเอคไดสเตียรอยด์เพื่อใช้ในการสังเคราะห์

นำเปลือกต้นไข่เน่าแห้งที่บดแล้ว (5 กิโลกรัม) มาแช่ด้วยเมทานอล (15 ลิตร) รวม 3 รอบ จนเหลือ 20-hydroxyecdysone (2) อยู่ในกากพืชน้อยมาก หลังจากกรองส่วนสกัดได้แล้ว ระเหยเมทานอลออกไปด้วย rotary evaporator จนเหลือเมทานอลปริมาณเล็กน้อยใน crude extract เก็บเมทานอลไปแช่พืชใน lot ต่อไป นำส่วนสกัดที่ทำให้เข้มข้นแล้วมาเติมน้ำ (2 ลิตร) สกัดสารละลายที่กรองแล้วด้วยเฮกเซน 2 ครั้ง แล้วจึงสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม ตามด้วย *n*-butanol อีก 3 ครั้ง นำส่วนที่สกัดด้วยบิวทานอลมารวมกันแล้วล้างด้วยน้ำ ระเหยบิวทานอลออกโดยการเติมน้ำลงไป และให้ส่วนผสมของบิวทานอลและน้ำ ถูกกลั่นออกมาอย่าง azeotropic นำ butanol extract มาแยก เอา 20-hydroxyecdysone (2) โดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี (Merck silica gel 60, 70-230 mesh) เริ่มตั้งแต่ตัวชะเป็นคลอโรฟอร์ม ตามด้วยคลอโรฟอร์ม-เมทานอล นำfraction ที่มีสาร 2 มาตกผลึกด้วยเมทานอล-เอทิลอะซีเตต และทำซ้ำอีก 1-2 ครั้ง ตรวจสอบเอกลักษณ์กับ authentic 2 ด้วยการทำ TLC (คลอโรฟอร์ม-เมทานอล 7:1) และเปรียบเทียบ IR สเปกตรัม ใน lot หลังๆจะใช้วิธีเปรียบเทียบเฉพาะ TLC เท่านั้น 20-hydroxyecdysone (2) ที่แยกได้มีน้ำหนัก 4.5 กรัม และยังสามารถได้สาร 2 เพิ่มเติมอีก mother liqour หลังการกรอง

ตารางที่ 5. ^{1}H NMR data of compounds **23**, **24**, **28**, **29** and **30** (in pyridine-d_5)

H	23	24	28 "Epimer 1"	28 "Epimer 2"	29	30 "Epimer 1"	30 "Epimer 2"
1	3.40				3.43 (dd, 12.5, 3.8)	3.43 (dd, 12.4, 3.5)	3.44 (dd, 12.5, 3.5)
2	4.56 (m)[a]	4.18 (m)	4.19 (m)	4.18 (m)	4.57 (m)[i]	4.58 (m)[m]	4.58 (m)[p]
3	4.19 (br s)	4.23 (br s)	4.23 (br s)	4.23 (br s)	4.20 (br s)	4.20 (br s)	4.21 (br s)
5	3.00[b]	2.99 (dd, (12.9, 3.5)	3.01[f]	3.01[h]	3.00 (dd, 12.7, 3.2)	3.00[o]	3.00
7	6.26 (d, ca 2)	6.22 (d, 2.1)	6.25 (d, 2.4)	6.25 (d, 2.4)	6.25 (d, ca 2)	6.28 (d, ca 2)	6.28 (br s)
9	3.83 (m)[c]	3.57 (m)	3.58 (m)	3.58 (m)	3.84 (br d, 7)	3.85-3.89[o]	3.85-3.89[q]
11	4.56 (m)[a]				4.60 (m)[i]	4.58 (m)[m]	4.58 (m)[p]
12ax	3.00[b]				3.04[j,k]	3.02[n]	3.02
17	3.06	3.08 (t, 9.1)	3.03[f]	3.08[h]	3.16 (t, 9.1)[k]	3.09 (t, 9.1)	3.09 (t, 8.9)
22	3.83 (m)[c]	4.51 (dd, 9.6, 2.3)[e]	3.92 (br d, 10.3)	3.90 (dd, 10.6, 1.8)	4.50 (br d, 8.6)[j]	3.85-3.89[o]	3.85-3.89[q]
24		4.37(dd, 9, 2.7)[e]			4.35 (br d, 8.8)[j]		
26	-	-	3.87[g] and 3.88[g]	3.86	-	3.85-3.89	3.85-3.89
18-Me	1.23 (s)[d]	1.22 (s)	1.204 (s)	1.208 (s)	1.26 (s)	1.24 (s)	1.24 (s)
19-Me	1.28 (s)[d]	1.06 (s)	1.06 (s)	1.06 (s)	1.29 (s)	1.30 (s)	1.30 (s)
21-Me	1.55 (s)	1.63 (s)	1.58 (s)	1.57 (s)	1.61 (s)	1.56 (s)	1.55 (s)
26-Me	1.33 (s)	1.46 (s)	-	-	1.45 (s)	-	-
27-Me	1.33 (s)	1.47 (s)	1.47 (s)	1.46 (s)	1.45 (s)	1.45 (s)	1.44 (s)

[a-p] Two overlapping signals; [b,c,j,m,o,q] Partially overlapping signals

[d,e,k,l] assignments may be reversed for signals with the same superscript

ตารางที่ 6. ^{13}C NMR data of compounds **23**, **24**, **28**, **29** and **30** (in pyridine-d_5)

C	23	24	28 "Epimer 1"	28 "Epimer 2"	29	30 "Epimer 1"	30 "Epimer 2"
1	39.6	37.9	37.95[g]	37.95[g]	39.6	39.6	39.6
2	68.1[a]	68.1[b]	68.05[f]	68.05[f]	68.1	68.2	68.2
3	68.0[a]	68.0[b]	68.12[e]	68.14	67.9	67.9	67.9
4	32.6	32.3	31.68[d]	31.70[d]	32.6[d]	32.6[n]	32.6[n]
5	52.2	51.3	51.37	51.39	52.2	52.2	52.2
6	204.0	203.4	203.48	203.50	203.7	203.7	203.7
7	122.1	121.6	121.62	121.62	122.0	122.0	122.0
8	164.2	166.1	166.10	166.12	164.1	164.0	164.0
9	42.4	34.4	34.40	34.45	42.5	42.5	42.5
10	39.3	38.6	38.62	38.64	39.3	39.3	39.3
11	68.7[a]	21.1	21.40	21.45	68.6	68.6	68.6
12	43.9	31.7	32.41[f]	32.44[f]	43.9	43.9	43.9
13	48.0	48.1	48.08	48.08	48.0	47.9	47.9
14	84.1	84.2	84.18	84.18	84.0	84.0	84.0
15	31.7	31.9	31.96[d]	31.98[d]	31.6[d]	31.6[n]	31.6[n]
16	21.4	21.3	21.40	21.70	21.1	21.4	21.4
17	49.8	50.0	50.07	50.09	49.7	49.7	49.7
18	18.7	17.9	17.35	17.86	18.7	18.6	18.6
19	24.6	24.4	24.52[g]	24.76[g]	24.6	24.6	24.6
20	76.7	76.8	76.87	76.87	76.6	76.6	76.6
21	21.4	21.7	21.09	21.09	21.4	21.2	21.3
22	77.4	73.7[c]	77.65	77.68	73.5[m]	77.39	77.43
23	27.2	35.2	26.76	26.70	35.0	26.5	26.5
24	42.5	75.9[c]	37.55[g]	37.52[g]	75.7[m]	37.3	37.3
25	69.5	72.6	72.66	72.60	72.4	72.4	72.3
26	29.8	26.1	70.79	70.62	25.8	70.6	70.4
27	29.8	26.0	24.41[g]	24.43[g]	25.9	24.3	24.5

** Assignments may be reversed for signals with the same superscript

การสังเคราะห์ปรับเปลี่ยนเอคไดสเตียรอยด์

1. การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันและสายโซ่ด้านข้าง

1) การสังเคราะห์ 24-*epi*-abutasterone (24) และ abutasterone (25)

การสังเคราะห์ Stachysterone C 2,3:20,22-diacetonide (35) และ 25,26-Didehydroponasterone A 2,3:20,22-diacetonide (36)

นำ 20-hydroxyecdysone 2,3:20,22-diacetonide (33) (1.5565 กรัม) มาละลายใน pyridine (5 มิลลิลิตร) แล้วคนส่วนผสมที่อุณหภูมิ 0-5 °C เป็นเวลา 10 นาที เติม mesyl chloride (1 มิลลิลิตร) และ DMAP (50 มิลลิกรัม) แล้วคนส่วนผสมต่อไปที่อุณหภูมิ 5 °C เป็นเวลา 20 นาทีแล้วค่อยๆปล่อยให้ถึงอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำลงไปแล้วสกัดสารด้วยคลอโรฟอร์ม (3x35 มิลลิลิตร) นำชั้นคลอโรฟอร์มมาล้างด้วยน้ำและทำให้ปราศจากน้ำด้วย anhydrous sodium sulphate แล้วระเหยตัวทำละลายออกไป นำส่วนผสมมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ตัวชะเป็นคลอโรฟอร์ม และคลอโรฟอร์ม-เมทานอล โดยค่อยๆเพิ่มปริมาณของเมทานอล ทำให้ได้ส่วนผสมในอัตราส่วน 3:2 ของสาร 35 และ 36 (1.3160 กรัม, 87%). IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1}: 3474, 2976, 1658, 1445, 1373, 1243, 1215, 1057, 884, 756. ^{1}H NMR ดูตารางที่ 7. FABMS (+ve) : m/z 543 $[M+H]^+$; EIMS : m/z (% rel. intensity) 542 $[M^+]$ (2), 527 (9), 509 (12), 484 (8), 467 (7), 466 (11), 403 (34), 385 (13), 327 (7), 183 (16), 140 (9), 125 (100), 107 (35).

Acetonide deprotection ของส่วนผสมของ Stachysterone C 2,3:20,22-diacetonide (35) และ 25,26-Didehydroponasterone A 2,3:20,22-acetonide (36)

นำสารละลายของสาร 35 และ 36 (147 มิลลิกรัม) ในเมทานอล (1 มิลลิลิตร) มาเติม 70% กรดอะซีติก (5 มิลลิลิตร) แล้วคนส่วนผสมเป็นเวลา 4 วัน จากนี้จึงเติมน้ำลงไป แล้วสกัดด้วยบิวทานอล (3x30 มิลลิลิตร) ล้างชั้นบิวทานอลด้วยน้ำ และระเหยตัวทำละลายออกไป นำส่วนที่เหลือซึ่ง ^{1}H NMR แสดงว่ามีสาร 35 และ 36 ผสมอยู่ในอัตราส่วน 3:2 มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี พบว่าสามารถแยกสาร 31 บริสุทธิ์, ส่วนผสมของ 31 กับ 32 และ 32 ที่บริสุทธิ์ นำส่วนผสม 31 และ 32 มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีใหม่ซ้ำอีก 2 รอบ ทำให้ได้ stachysterone C (31) 68 มิลลิกรัม (54%) และ 25,26-didehydroponasterone A (32) 28 มิลลิกรัม, ส่วนผสมซึ่งส่วนใหญ่เป็นสาร 31 และส่วนน้อยเป็น 32 (7 มิลลิกรัม)

Stachysterone C (31). Amorphous, mp 225-227 °C (from MeOH-$CHCl_3$). IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1}: 3418, 2926, 1648, 1444, 1382, 1316, 1116, 1055, 876. ^{1}H NMR: ดูตารางที่ 7.

ตารางที่ 7. ^{1}H NMR data of compounds **31**, **32**, **35** and **36**

H	31*	32*	35[#]	36[*,^]
2	4.17 (*m*)	4.17 (*m*)	4.23 (*m*)	4.23 (*m*)
3	4.24 (*br s*)	4.23 (*br s*)	4.27 (*br s*)	4.27 (*br s*)
5	3.02 (*dd*, 13.2, 3.5)	3.02 (*dd*, 13.1, 3.6)	2.36 (*dd*, 12.6, 4.7)	2.36 (*dd*, 12.6, 4.7)
7	6.25 (*d*, 2.1)	6.26 (*d*, 2.1)	5.83 (*d*, *ca* 2)	5.83 (*d*, *ca* 2)
9	3.60 (*m*)	3.59 (*m*)	2.81 (*m*)	2.81 (*m*)
17	2.95 (*t*, 9.3)	2.93 (*t*, 9.1)	*ca* 2.27**	*ca* 2.27**
22	3.89 (*dd*, 9.7, 1.5)10.9)	3.84 (*br d*, 8.2, 4.8)	3.70 (*dd*, 9.7, 2.7)	3.66 (*dd*,
24	5.55 (*br t*, 7)		5.18 (*m*)	
26	-	4.75, 4.79 (each *br s*)	-	4.72, 4.75 (each *br s*)
18-Me	1.21 (*s*)	1.22 (*s*)	0.79 (*s*)	0.79 (*s*)
19-Me	1.07 (*s*)	1.07 (*s*)	0.98 (*s*)	0.98 (*s*)
21-Me	1.59 (*s*)[a]	1.57 (*s*)[b]	1.17 (*s*)[c]	1.15 (*s*)[c]
26-Me	1.59 (*s*)	-	1.64 (*s*)	-
27-Me	1.63 (*s*)[a]	1.67 (*s*)[b]	1.71 (*s*)[d]	1.74 (*s*)
>C(Me)$_2$	-	-	1.33[e], 1.33, 1.41, 1.49 (each *s*)	1.32[e], 1.33, 1.41, 1.49 (each *s*)

*Recorded in pyridine-d_5.

#Recorded in $CDCl_3$.

^Assigned from a mixture of compounds **35** and **36**.

**Assigments may be reversed for signals with the same superscript.

**Obscured signal.

25,26-Didehydroponasterone A (32). Needles, mp 263-265 °C (from MeOH-$CHCl_3$). ^1H NMR: ดูตารางที่ 7

Dihydroxylation ของ Stachysterone C (31): การสังเคราะห์ 24-*Epi*-abutasterone (24) และ Abutasterone (25)

วิธีการทั่วไป ละลาย ligand ใน *tert*-butanol-H_2O (7:1) แล้วนำ osmium tetroxide มาละลายใน THF เป็น stock solution THF ที่ใช้ให้สารละลายเมื่อเติม OsO_4 ลงไปแล้วมีอัตราส่วนของ *t*-BuOH : THF : H_2O เป็น 7:4:1 นำสารละลายของ stachysterone C (31) 5 มิลลิกรัมใน *t*-BuOH: THF:H_2O (7:4:1) (1 มิลลิลิตร) มาเติมลงในสารละลายของสารเชิงซ้อนระหว่าง OsO_4 กับ ligand ให้อัตราส่วนระหว่าง Ligand:osmium tetroxide:olefin เป็น 1.5:1.3:1 คนส่วนผสมเป็นเวลา 5 นาทีแล้วเติมสารละลาย 1% sodium metabisulphite ลงไป สกัดด้วย *n*-BuOH (3x10 มิลลิลิตร) ระเหยตัวทำละลายออก นำมาแยก ligand ออกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี นำส่วนผสมของ 24 และ 25 ไปหาอัตราส่วนโดยใช้ ^1H NMR สเปกโทรสโกปี ในบางกรณีได้ใช้ ช่วยยืนยันด้วย (Column: Sherisorb ODS2, 5 ไมโครเมตร, 250x4.6 มิลลิเมตร; mobile phase: MeOH-H_2O (1:3); flow rate: 1 มิลลิลิตรต่อนาที; detector: 254 nm).

สำหรับการพิสูจน์เอกลักษณ์ของ 24 และ 25 ได้กระทำดอนที่เตรียมสารทั้งสองครั้งแรกโดยใช้ pyridine เป็น ligand และแยกเอดไดสเตียรอยด์ทั้งสองชนิดออกจากกันโดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้คลอโรฟอร์ม-เมทานอลเป็นตัวชะ สาร 24 มีข้อมูล ^1H NMR เหมือนกันทุกประการกับ 24-*epi*-abutasterone ที่ได้มาจากเปลือกรากของต้นผ่าเสี้ยน ส่วนสาร 25 มี ^1H NMR สอดคล้องกันทุกประการกับข้อมูล ^1H NMR ของ abutasterone ที่มีผู้รายงานไว้[47] สำหรับอัตราส่วนของของสาร 24 และ 25 ได้แสดงไว้ในตารางที่ 8

2) การสังเคราะห์ C-25 Epimers ทั้งสองของ 20,26-Dihydroxyecdysone (28)

วิธีที่ 1

Dihydroxylation ของ 25,26-Didehydroponasterone A (32)

เติมสารละลายของ OsO_4 (0.1 มิลลิลิตร, เตรียมได้จากการละลาย 250 มิลลิกรัมของ OsO_4 ใน THF 5 มิลลิลิตร) ลงในสารละลายของสาร 32 (8 มิลลิกรัม) ใน pyridine (0.5 มิลลิลิตร) และกวนส่วนผสมของปฏิกิริยาเป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลาย 1% $NaHSO_3$ (20 มิลลิลิตร) แล้วเติมสารละลายอิ่มตัวของ NaCl ลงไป สกัดส่วนผสมด้วยบิวทานอลซ้ำหลายๆครั้งจนกระทั่งตรวจสอบชั้นน้ำไม่พบสารผลิตภัณฑ์ นำส่วนที่สกัดด้วยบิวทานอลมาระเหยเอาตัวทำละลายออกไปแล้วนำส่วนที่เหลือมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้คลอโรฟอร์ม-เมทานอลเป็นตัวชะ ได้ส่วนผสม C-25

ตารางที่ 8. Dihydroxylation product ratios of **24** and **25** resulting from using different ligands

Entry	Ligand	Ratio of Products **24** : **25**
1	Pyridine	2 : 1[a]
2	DHQD-MQE	4 : 1[a]
3	DHQD-PE	4 : 1[a]
4	$(DHQD)_2$-PHAL	7 : 1[a,b]
5	$(DHQD)_2$-PYR	6 : 1[a,b]
6	DHQ-MQE	10 : 7[a]
7	DHQ-PE	10 : 7[a]
8	$(DHQ)_2$-PHAL	4 : 1[a]
9	$(DHQ)_2$-PYR	4 : 1[a]

[a]Determined by ^{1}H NMR spectral analysis

[b]Determined by HPLC analysis

epimers ของ 20,26-dihydroxyecdysone (28) ซึ่งแสดง spot เดียวบน TLC เมื่อตรวจสอบด้วย ^{1}H NMR สเปกโทรสโกปี พบว่าเป็นส่วนผสมของ C-25 epimers ของ 20,26-dihydroxyecdysone ในอัตราส่วนประมาณ 1:1 ทำการแยก 2 epimers ด้วย HPLC ได้ 20,26-dihydroxyecdysone "epimer 1" และ 20,26-dihydroxyecdysone "epimer 2" ข้อมูล ^{1}H NMR (ดูตารางที่ 9) ได้มาจากการเปรียบเทียบกับ ^{1}H NMR ของส่วนผสมในอัตราส่วน 8:5 ของ "epimer 1" กับ "epimer 2"

20,26-Dihydroxyecdysone "epimer 1". IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1}: 3400, 2924, 1649, 1443, 1383, 1315, 1120, 1055, 880. ข้อมูล ^{1}H NMR ดูตารางที่ 9. FAB-MS (-ve) m/z: 495 $[M-H]^-$. HR-FABMS (-ve) m/z: 495.2962 $[M-H]^-$ (คำนวณสำหรับ $C_{27}H_{43}O_8$: 495.2957).

20,26-Dihydroxyecdysone "epimer 2". IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1}: 3400, 2928, 1648, 1382, 1185, 1105, 1052, 875. ข้อมูล ^{1}H NMR ดูตารางที่ 9. HR-FABMS (-ve) m/z: 495.2945 $[M-H]^-$ (คำนวณสำหรับ $C_{27}H_{43}O_8$: 495.2957).

วิธีที่ 2

นำส่วนผสมของ olefin 31 และ 32 (ซึ่งมีสารทั้งสองชนิดอยู่ในอัตราส่วน 3:2 และเตรียมมาจากวิธีที่ 1) 53 มิลลิกรัม มาทำปฏิกิริยา dihydroxylation ได้ส่วนผสมของ 24-*epi*-abutasterone (24), abutasterone (25) และ epimers ทั้งสองของ 20,26-dihydroxyecdysone (28) คอลัมน์โครมาโตกราฟี ของส่วนผสมทำให้ได้สาร 24 (14 มิลลิกรัม) สาร 25 (8 มิลลิกรัม) และส่วนผสมของสอง epimers ของ 20,26-dihydroxyecdysone (14 มิลลิกรัม) ปริมาณผลผลิตของเอคไดสเตียรอยด์ 24, 25 และ 28 จากส่วนผสม olefin 31 และ 32 คือ 14, 25 และ 25% ตามลำดับ เอคไดสเตียรอยด์ 24 และ 25 เหมือนกันทุกประการ (จากการเปรียบเทียบ ^{1}H NMR และ TLC กับที่เตรียมได้จากวิธีที่ 1)

วิธีที่ 3

นำส่วนผสมของ olefin diacetonides 35 และ 36 (180 มิลลิกรัม) มาทำปฏิกิริยา dihydroxylation ตามที่ได้ทำมาในวิธีที่ 1 ทำให้ได้ 24-*epi*-abutasterone 2,3:20,22-diacetonide (39), abutasterone 2,3:20,22-diacetonide (40) และส่วนผสมของสอง epimers ของ 20,26-dihydroxyecdysone 2,3:20,22-diacetonide (41) คอลัมน์โครมาโตกราฟีสามารถแยก 40 ที่บริสุทธิ์ (20 มิลลิกรัม), ส่วนหนึ่งของสาร (39) ที่บริสุทธิ์ (9 มิลลิกรัม), ส่วนหนึ่งของ 20,26-dihydroxyecdysone 2,3:20,22-diacetonide "epimer 1"ที่บริสุทธิ์ (2 มิลลิกรัม), ส่วนผสมระหว่าง 39 กับ 20,26-dihydroxyecdysone"epimer 2"(70 มิลลิกรัม) และส่วนผสมระหว่างส่วนผสมของ "epimer 1" กับ "epimer 2" (36 มิลลิกรัม) ส่วนผสมหลังสุดนี้ เมื่อทำการแยกโดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้ 20,26-dihydroxyecdysone 2,3:20,22-diacetonide "epimer 1" (10 มิลลิกรัม), 20,26-dihydroxyecdysone 2,3:20,22-diacetonide "epimer 2" (5 มิลลิกรัม) และส่วนผสมของทั้งสอง epimers (18 มิลลิกรัม) โดยทั่วไป diacetonide ทั้งหมดที่กล่าวนี้ diacetonide

ตารางที่ 9. ^{1}H NMR data of two C-25 epimers of 20,26-dihydroxyecdysone (28)

H	"Epimer 1"	"Epimer 2"
2	4.19 (*m*)	4.18 (*m*)
3	4.23 (*br s*)	4.23 (*br s*)
5	3.01*	3.01+
7	6.25 (*d*, 2.4)	6.25 (*d*, 2.1)
9	3.58 (*m*)	3.58 (*m*)
17	3.03≠	3.08≠
22	3.92 (br *d*, 10.3)	3.90 (*d d*, 10.6, 1.8)
26	3.87 and 3.88 (ABq)	3.86 (ABq)
OH	6.29 (*s*)	6.31 (*s*)
18-Me	1.204 (*s*)	1.208 (*s*)
19-Me	1.06 (*s*)	1.06 (*s*)
21-Me	1.58 (*s*)	1.57 (*s*)
27-Me	1.47 (*s*)	1.46 (*s*)

All compounds were recorded in pyridine-d_5

*,+ Obscured signals

ของ "epimer 1" มีขั้วมากที่สุด เมื่อนำ 39, 40 และแต่ละ pure epimer ของ 41 มากำจัดหมู่ป้องกัน diacetonide ออกไปด้วย 70%AcOH ปรากฏว่าได้ 24 (11 มิลลิกรัม), 25 (5 มิลลิกรัม), 20,26-dihydroxyecdysone "epimer 1" (5 มิลลิกรัม) และ20,26-dihydroxyecdysone "epimer 2" (3 มิลลิกรัม) เมื่อนำส่วนผสมระหว่าง 39 กับ 20,26-dihydroxyecdysone 2,3:20,22-diacetonide "epimer 2" (23 มิลลิกรัม) มากำจัดหมู่ diacetonide ออกไปแล้วแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้สาร 24 (7 มิลลิกรัม) และ 20,26-dihydroxyecdysone "epimer 2" (4 มิลลิกรัม) จากการวิเคราะห์ HPLC พบว่า 20,26-dihydroxyecdysone ซึ่งได้มาจากการ deacetonide สาร 2,3:20,22-diacetonide ของมัน ที่แยกได้บริสุทธิ์บางส่วนในช่วงแรกของการแยกสารผลิตภัณฑ์ (คือที่เรียกว่า 20,26-dihydroxyecdysone 2,3:20,22-diacetonide "epimer 1") นั้น ตรงกับ 20,26-dihydroxyecdysone "epimer 1" ส่วน 20,26-dihydroxyecdysone ที่แยกได้บริสุทธิ์ได้ในช่วงหลังของการแยก (และเรียกว่า 20,26-dihydroxyecdysone 2,3:20,22-diacetonide "epimer 2") นั้น ตรงกับ 20,26-dihydroxyecdysone "epimer 2"

3) การสังเคราะห์ 24-*epi*-Pterosterone (27)

Epoxidation ของ โอเลฟิน 35 และ 36

นำส่วนผสมของโอเลฟิน 35 และ 36 (อัตราส่วน 3:2, 40 มิลลิกรัม) ซึ่งเตรียมได้จาก 20-hydroxyecdysone 2,3:20,22-diacetonide (33) (ซึ่งสาร 33 นี้เตรียมมาจาก เอคไดสเตียรอยด์ 2) มาละลายในคลอโรฟอร์ม (1 มิลลิลิตร) จากนั้นจึงเติม *m*-CPBA (70%, 30 มิลลิกรัม) คนส่วนผสมเป็นเวลา 20 นาที แล้วเติม 1% $NaHSO_3$ ลงไป หลังจากคนส่วนผสมเป็นเวลา 30 นาทีแล้ว ทำการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม ระเหยตัวทำละลาย และแยกส่วนผสมของ epoxides ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้ $CHCl_3$-MeOH เป็นตัวชะ ได้ epoxide 42 (8 มิลลิกรัม, 19%), 43 (9 มิลลิกรัม, 22%) และ 44 (14 มิลลิกรัม, 34%) สำหรับ epoxide 43 นั้นเป็นส่วนผสมของสอง isomeric 25, 26-epoxides

42: Amorphous; IR: ν_{max} cm^{-1}: 3472, 2980, 1666, 1455, 1376, 1243, 1217, 1169, 1105, 1057, 1005, 904, 876, 753; ^1H NMR ดูตารางที่ 4. FABMS (+ve): m/z 559.3630 $[M+H]^+$. $C_{33}H_{51}O_7$ requires 559.3634.

43: Amorphous; IR: ν_{max} cm^{-1}: 3474, 2976, 1661, 1452, 1374, 1244, 1215, 1167, 1105, 1057; ^1H NMR ดูตารางที่ 4. FABMS (+ve): m/z 559.3636 $[M+H]^+$. $C_{33}H_{51}O_7$ requires 559.3634.

44: Aggregated needles from $CHCl_3$-hexane, จุดหลอมเหลว 206-206 °C; IR: ν_{max} cm^{-1}: 3474, 2930, 1661, 1454, 1377, 1243, 1218, 1169, 1105, 1057, 1008, 876; ^1H NMR ดูตารางที่ 4. คำนวณสำหรับ $C_{33}H_{50}O_7.1/2H_2O$: C, 69.81; H, 9.05 หาได้: C, 69.51; H, 8.69.

ปฏิกิริยาระหว่าง Epoxide 44 กับลิเทียมโบรไมด์: การสังเคราะห์ hydroxy olefin 45

คนส่วนผสมของ epoxide 44 (50 มิลลิกรัม) และ LiBr (200 มิลลิกรัม) ใน MeCN (4 มิลลิลิตร)ที่อุณหภูมิปกติเป็นเวลา 2 สัปดาห์ เติมน้ำลงไปแล้วสกัดส่วนผสมด้วยคลอโรฟอร์ม (3x25 มิลลิลิตร) ทำให้สารผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ($CHCl_3$-MeOH, 98:2) ได้ hydroxy olefin 45 (25 มิลลิกรัม, 50%) เป็น amorphous solid : IR: ν_{max} cm^{-1}: 3442, 2916, 2848, 1659, 1454, 1370, 1242, 1215, 1166, 1093, 1056; ^1H NMR ดูตารางที่ 4. FABMS (-ve): m/z 557.3485 $[M-H]^-$. $C_{33}H_{49}O_7$ requires 557.3487.

Catalytic hydrogenation ของ hydroxy olefin 45

นำ hydroxy olefin 45 (41 มิลลิกรัม) มาทำ catalytic hydrogenation โดยใช้ 5% Pd-C (50 มิลลิกรัม) เป็นคะตะลิสต์ กรองส่วนผสมผ่าน Celite column อย่างถี่ถ้วน แล้วระเหยตัวทำละลายออกไป นำมาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ($CHCl_3$-MeOH, 98:2) ทำให้ได้ 24-*epi*-pterosterone 2,3:20,22-diacetonide (**46**) (39 มิลลิกรัม, 95%). IR: ν_{max} cm^{-1}: 3472, 2960, 2874, 1658, 1463, 1372, 1243, 1216, 1168, 1107, 1090, 1057, 1000, 877; ^1H NMR ดูตารางที่ 4. FABMS (-ve): m/z 559.3634 $[M-H]^-$. $C_{33}H_{51}O_7$ requires 559.3634.

การขจัดหมู่ Acetonide ของสาร 46

เติม 70% AcOH (1.5 มิลลิลิตร) ลงไปในสารละลายของสาร 46 (19 มิลลิกรัม) ในเอทานอล และคนสารละลายเป็นเวลา 4 วัน เติมน้ำลงในส่วนผสมแล้วสกัดด้วย *n*-BuOH จนตรวจไม่พบสารผลิตภัณฑ์ในชั้นน้ำ นำชั้นสารอินทรีย์มารวมกันแล้วระเหยตัวทำละลายออกโดยการกลั่นร่วมกับน้ำ ทำสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้ 24-*epi*-pterosterone (27, 12 มิลลิกรัม, 74%) เป็นผลึกรูปปริซึม จุดหลอมเหลว 164-165 °C (lit. 151-152 °C); IR: ν_{max} cm^{-1}: 3382, 2964, 1656, 1469, 1383, 1334, 1052; ^1H NMR ดูตารางที่ 4. คำนวณสำหรับ $C_{27}H_{44}O_7 .3H_2O$: C, 60.65; H, 9.43 หาได้: C, 60.40; H, 9.73.

4) การสังเคราะห์ Inokosterone (14) และการแยก C-25 epimers ออกจากกัน

20-Hydroxyecdysone 2,3:20,22-diacetonide (33)

สาร 33 เตรียมได้จาก 2 โดยใช้วิธีที่ทราบกันแล้ว[17] แต่มีการปรับปรุงบางประการ กล่าวคือ ทำการกวนส่วนผสมระหว่าง 2 (160 มิลลิกรัม) และ *p*-TsOH (25 มิลลิกรัม) ในอะซีโตนที่ปราศจากน้ำ (1 มิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิปกติเป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วเติมน้ำ สกัดสารละลายที่ได้ด้วย $CHCl_3$ (3x30

มิลลิลิตร) ตามด้วยล้างชั้นสารอินทรีย์ด้วยน้ำ แล้วทำให้ปราศจากน้ำด้วย anhydrous sodium sulphate ระเหยตัวทำละลายให้แห้ง และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ $CHCl_3$-MeOH (99:1) เป็นตัวชะ ได้สาร 33 (146 มิลลิกรัม 78%), mp. 232-234 °C from acetone-hexane (lit.[17] 233-234 °C) ข้อมูลทางสเปกโตรสโกปี (IR, ^{1}H NMR) ของสารนี้ตรงกับที่เคยรายงานไว้[17]

การเตรียม Olefin diacetonides 35 และ 36

ละลาย diacetonide 33 (1.4388 กรัม) ใน pyridine (10 มิลลิลิตร) และคนไว้ที่อุณหภูมิ 5 °C เป็นเวลา 5 นาที เติม mesyl chloride (2 มิลลิลิตร) และกวนส่วนผสมของปฏิกิริยานี้นาน 20 นาที เติม DMAP (50มิลลิกรัม) และกวนต่อที่อุณหภูมิ 5 °C เป็นเวลา 20 นาที แล้วปล่อยในส่วนผสมนี้ถึงอุณหภูมิปกติอย่างช้าๆ พร้อมกับตรวจสอบความก้าวหน้าของปฏิกิริยาด้วย TLC จากนั้นเติมสารละลาย 1% $NaHCO_3$ แล้วสกัดด้วย $CHCl_3$ (3x 40 มิลลิลิตร) ล้างชั้น $CHCl_3$ ด้วยน้ำ ทำให้ปราศจากน้ำระเหยตัวทำละลายให้แห้ง และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ $CHCl_3$-MeOH (99:1) เป็นตัวชะ ให้ส่วนผสม 3:2 ของ 35 และ 36 (925 มิลลิกรัม 67%). IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3470, 2975, 1658, 1445, 1373, 1243, 1215, 1057, 884; ข้อมูล ^{1}H NMR ตรงกับที่เคยรายงานไว้แล้ว[59] FABMS (-ve) *m/z* (% relative intensity) 541 $[M-H]^-$ (20), 501(29), 485(10), 339(17), 325 (30), 183(100).

Hydroboration ของ olefin diacetonides 35 และ 36

ละลายส่วนผสมของสาร 35 และ 36 (74 มิลลิกรัม) ใน THF (2 มิลลิลิตร) เติม BH_3.THF complex (ca 1 M in THF, 0.15 มิลลิลิตร) ทีละส่วนในช่วงเวลา 2 ชั่วโมง พร้อมกับกวนส่วนผสมของปฏิกิริยา แล้วเติมสารละลาย hydrogen peroxide (35%, 0.1 มิลลิลิตร) และ 1N NaOH (0.15 มิลลิลิตร) และทำการกวนส่วนผสมนี้ต่อไปอีก 5 นาที หลังจากนั้นเติมน้ำ (100 มิลลิลิตร) และสกัดด้วย EtOAc (3x30 มิลลิลิตร) ระเหยตัวทำละลายออกไป แล้วทำให้บริสุทธิ์อย่างระมัดระวังด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ $CHCl_3$-MeOH เป็นตัวชะได้สาร 47 (16 มิลลิกรัม, 21%), สาร 48, สาร 49 "epimer 1" และสาร 49 "epimer 2" ตามลำดับ โดยที่สาร 48, 49 "epimer 1" และ 49 "epimer 2" ยังเจือส่วนผสมของกันและกัน จึงทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำ ได้สารบริสุทธิ์ 48 (17 มิลลิกรัม, 22%), 49 "epimer 1" (15 มิลลิกรัม, 20%) และ 49 "epimer 2" (15 มิลลิกรัม, 20%)

47: IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3535, 3458, 2960, 1642, 1373, 1245, 1225, 1170, 1060, 881; ข้อมูล ^{1}H NMR แสดงไว้ในตารางที่10; HR FABMS (-ve) *m/z* : 559.3639 $[M-H]^-$ คำนวณสำหรับ $C_{33}H_{52}O_7$-H : 559.3634.

ตารางที่ 10. ^{1}H NMR data of compounds 47, 48, 49 "epimer 1" and 49 "epimer 2".

H	47	48	49 "epimer 1"	49 "epimer 2"
2	4.20 (*m*)	4.20 (*m*)	4.20 (*m*)	4.20 (*m*)
3	4.25 (*br s*)	4.25 (*br s*)	4.25 (*br s*)	4.25 (*br s*)
5	2.34 (*dd*, 12.6, 4.7)	2.33 (*dd*, 12.5, 4.8)	2.33 (*dd*, 12.5, 4.5)	2.33 (*dd*, 12.6, 4.7)
7	5.81 (*d*, 2.1)	5.80 (*d*, 2.4)	5.80 (*d*, 2.1)	5.80 (*d*, 2.1)
9	2.78 (*m*)	2.78 (*m*)	2.78 (*m*)	2.78 (*m*)
17	2.17 (*dd*, 8.5, 7.9)	2.18 (*dd*, 9.4, 7.9)	2.19 (*dd*, 9.7, 9.4)	2.18 (*dd*, 9.4, 8.5)
22	3.80 (*dd*, 9.7, 2.7)	3.96 (*dd*, 10.3, 1.5)	3.61 (*dd*, 6.7, 5.8)	3.62 (*br d*, 9.1)
24	3.53 (*m*)	3.54 (*m*)		
26	-	-	3.45 (*dd*, 10.6, 5.8); 3.48 (*dd*, 10.6, 5.7)	3.44 (*dd*, 10.3, 6.1); 3.48 (*dd*, 10.3, 6.4)
18-Me	0.77 (*s*)	0.77 (*s*)	0.769 (*s*)	0.767 (*s*)
19-Me	0.96 (*s*)	0.96 (*s*)	0.960 (*s*)	0.959 (*s*)
21-Me	1.14 (*s*)	1.12 (*s*)	1.119 (*s*)	1.115 (*s*)
26-Me	0.93 (*d*, 6.7)	0.91 (*d*, 6.7)	-	-
27-Me	0.93 (*d*, 6.7)	0.93 (*d*, 6.7)	0.924 (*d*, 6.7)	0.912 (*d*, 6.7)
$\rangle C(Me)_2$	1.31, 1.32, 1.39, 1.47 (each *s*)	1.30, 1.31, 1.38, 1.46) (each *s*)	1.295, 1.307, 1.381, 1.468) (each *s*)	1.297, 1.307, 1.384, 1.468) (each *s*)

Recorded in $CDCl_3$.

48: IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3468, 2961, 2870, 1660, 1466, 1371, 1244, 1217, 1169, 1058, 878; ^1H NMR แสดงไว้ในตารางที่10; HR FABMS (-ve) *m/z* : 559.3634 $[M-H]^-$ คำนวณสำหรับ $C_{33}H_{52}O_7$-H : 559.3634.

49 "epimer 1": IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3451, 2938, 1658, 1647, 1371, 1244, 1217, 1170, 1108, 1059, 883; ข้อมูล^1H NMR แสดงไว้ในตารางที่10; HR FABMS (-ve) *m/z* : 559.3632 $[M-H]^-$. คำนวณสำหรับ $C_{33}H_{52}O_7$-H : 559.3634

49 "epimer 2": IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3436, 2937, 2875, 1658, 1451, 1371, 1244, 1217, 1170, 1108, 1058, 883; ข้อมูล ^1H NMR แสดงไว้ในตารางที่ 10; HR FABMS (-ve) *m/z* : 559.3632 $[M-H]^-$ คำนวณสำหรับ$C_{33}H_{52}O_7$-H : 559.3634.

Acetonide deprotection ของสาร 47, 48 and 49.

เติม 70% AcOH (1 มิลลิลิตร) ลงในสารละลายของสาร 47 (18 มิลลิกรัม) ใน dioxane (0.1 มิลลิลิตร) ทำการกวนของผสมนี้เป็นเวลา 3 วัน เติมน้ำ (50 มิลลิลิตร) แล้วสกัดด้วย *n*-butanol จนกระทั่งไม่มีสารเหลือในชั้นน้ำ แล้วระเหยตัวทำละลายออกโดยการกลั่นร่วมกับน้ำ ทำสารให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟีได้ pterosterone (**26**) (11 มิลลิกรัม, 71%). IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3368, 2958, 1641, 1444, 1384, 1306, 1072, 877; ข้อมูล ^1H NMR แสดงไว้ในตารางที่ 11 และตรงกับที่ได้มีการรายงานไว้แล้ว[62]

ทำการ deacetonide สาร 48 (19 มิลลิกรัม) โดยใช้วิธีเดียวกับสาร 47 ได้ 24-*epi*-pterosterone (**27**) (12 มิลลิกรัม, 74%). IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3390, 2965, 2870, 1658, 1465, 1439, 1385, 1333, 1108, 1054, 1012, 875; ข้อมูล ^1H NMR (ตารางที่ 11) และสอดคล้องกับที่ได้มีการรายงานไว้แล้ว[62]

ในทำนองเดียวกันสาร 14 "epimer 1" and 14 "epimer 2" ได้จากการ deacetonide ของสาร 49 "epimer 1" และ 49 "epimer 2" ในปริมาณ 75 และ 77% ตามลำดับ

14 "epimer 1": IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3386, 2937, 1640, 1383, 1049, 872; ข้อมูล ^1H NMR แสดงไว้ในตารางที่ 11; HR FABMS (-ve) *m/z* 479.3004 $[M-H]^-$. คำนวณสำหรับ $C_{27}H_{44}O_7$-H : 479.3008.

14 "epimer 2": IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3387, 2943, 1641, 1384, 1052; ข้อมูล ^1H NMR แสดงไว้ในตารางที่ 11; HR FABMS *m/z* 479.3001 $[M-H]^-$. คำนวณสำหรับ $C_{27}H_{44}O_7$-H : 479.3008.

ตารางที่ 11. ^{1}H NMR data of compounds **26**, **27**, **14** "epimer 1" and **14** "epimer 2".

H	26*	27*	14 "epimer 1"	14 "epimer 2"
2	4.16 (*m*)	4.16 (*m*)	4.17 (*m*)	4.17 (*m*)
3	4.22 (*br s*)	4.22 (*br s*)	4.23 (*m*)	4.23 (*m*)
5	3.00 (*dd*, 13.1, 3.6)	2.97 (*dd*, *ca* 13, 3.6)	3.01 (*dd*, 13.2, 3.8)	3.01 (*dd*, 13.2, 3.8)
7	6.25 (*d*, 2.1)	6.22 (*d*, 2.4)	6.25 (*d*, 2.4)	6.25 (*d*, 2.4)
9	3.58 (*m*)	3.58 (*m*)	3.59 (*m*)	3.59 (*m*)
17	2.92 (*t*, 9.1)	3.02 (*t*, 9.1)	2.95 (*t*, 9.1)	2.94 (*t*, 9.1)
22	4.12 (*br d*, 10)	4.10 (*m*)	3.85 (*br d*, *ca* 9)	3.86 (*br d*, 9.7)
24	3.94 (*m*)	4.47 (*br d*, 9.7)		
26	-	-	3.65 (*dd*, 10.3, 6.4); 3.77 (*dd*, 10.3, 5.5)	3.64 (*dd*, 10.3, 6.1); 3.72 (*dd*, 10.3, 5.8)
18-Me	1.20 (*s*)	1.21 (*s*)	1.215 (*s*)	1.217 (*s*)
19-Me	1.06 (*s*)	1.05 (*s*)	1.064 (*s*)	1.067 (*s*)
21-Me	1.58 (*s*)	1.62 (*s*)	1.563 (*s*)	1.577 (*s*)
26-Me	1.01 (*d*, 6.7)	0.98 (*d*, 6.7)	-	-
27-Me	1.01 (*d*, 6.7)	1.08 (*d*, 6.7)	1.036 (*d*, 6.7)	1.040 (*d*, 6.1)

Recorded in pyridine-d_5.

*Also appeared in Table 4.

2. การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันในโครงร่างหลักของเอคไดสเตียรอยด์

1) การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่วง A

3-Dehydro-2-deoxy-20-hydroxyecdysone 3-oximes และ 3-methoximes

การสังเคราะห์ 20-Hydroxyecdysone 20,22-acetonide 2-mesylate (55)

เติม mesyl chloride (0.5 มิลลิลิตร) ลงในสารละลายของ 20-hydroxyecdysone 20,22-acetonide (54) (700 มิลลิกรัม) ใน pyridine (5 มิลลิลิตร) กวนส่วนผสมของปฏิกิริยานี้ที่อุณหภูมิ 0-5 °C เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นเติมน้ำ (100 มิลลิลิตร) แล้วสกัดด้วย EtOAc (4x30 มิลลิลิตร) ทำชั้นอินทรีย์ให้ปราศจากน้ำด้วย anhydrous $MgSO_4$ ระเหยตัวทำละลายให้แห้ง แล้วทำสารให้บริสุทธิ์โดยใช้ Chromatotron ใช้ตัวชะเป็น $CHCl_3$:MeOH (92:8) ให้สาร 55 (610 มิลลิกรัม, 75%)

20-Hydroxyecdysone 20,22-acetonide 2-mesylate (55). IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3444, 2966, 1649, 1450, 1427, 1372, 1333, 1254, 1217, 1174, 1103, 1000; ข้อมูล ^1H NMR แสดงไว้ในตารางที่ 12; EIMS : *m/z* 345 $[M\text{-side chain-}CH_3SO_3H]^+$(11), 382(10), 327(23), 310(6), 283(17), 232(9), 213(7), 201(10), 183(6), 158(7), 143(25), 125(41), 122(5), 99(100); คำนวณสำหรับ $C_{31}H_{50}O_9S.\ H_2O$: C, 60.38; H, 8.44 หาได้ C, 59.95; H, 8.03%.

การสังเคราะห์ 3-Dehydro-2-deoxy-20-hydroxyecdysone 20,22-acetonide (56)

เติม 35% guanidine acetate (1 มิลลิลิตร) ลงในสารละลายของ 20-hydroxyecdysone 20,22-acetonide 2-mesylate (55) (310 มิลลิกรัม) ในเมทานอล (1 มิลลิลิตร) กวนส่วนผสมของปฏิกิริยานี้ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 5 วัน หลังจากนั้นเติมน้ำ (100 มิลลิลิตร) แล้วสกัดด้วย EtOAc (4x30 มิลลิลิตร) ทำชั้นอินทรีย์ให้ปราศจากน้ำด้วย anhydrous $MgSO_4$ ระเหยตัวทำละลายให้แห้ง แล้วทำสารให้บริสุทธิ์โดยใช้ Chromatotron ใช้ตัวชะเป็น $CHCl_3$: MeOH โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วสูง พบว่า fraction ที่ใช้ตัวชะเป็น $CHCl_3$:MeOH (95:5) ให้สาร 56 (200 มิลลิกรัม, 86%)

3-Dehydro-2-deoxy-20-hydroxyecdysone 20,22-acetonide (56). IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3438, 2966, 1711, 1662, 1453, 1373, 1251, 1216, 1172, 1103, 1001, 754; ข้อมูล ^1H NMR แสดงไว้ในตารางที่ 12; EIMS : *m/z* 474 $[M\text{-}CO]^+$(1), 456(2), 438(5), 396(15), 314(24), 298(49), 271(100); HR-FABMS (-ve) *m/z*: 501.3219 $[M\text{-}H]^-$ คำนวณสำหรับ $C_{30}H_{46}O_6$-H: 501.3216.

การสังเคราะห์ 3-Dehydro-2-deoxy-20-hydroxyecdysone 20,22-acetonide 3-oximes (57) และ (58)

เติม hydroxylamine hydrochloride (50 มิลลิกรัม) ลงในสารละลายของสาร (56) (100 มิลลิกรัม) ใน pyridine (2 มิลลิลิตร) กวนส่วนผสมของปฏิกิริยานี้ที่อุณหภูมิปกติเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติม

ตารางที่ 12. ^{1}H NMR data of compounds **53**, **55** and **56**

H	53[a]	55[b]	56[b]
2		4.91 (*m*)	
3	-	4.30 (*br s*)	-
5		2.52 (*dd*, 13.4, 3.9)	
7	6.20 (*d*, 2.1)	5.87 (*d*, 2.4)	5.88 (*d*, 2.1)
9	3.62 (*m*)	3.01 (*m*)	3.28 (*m*)	
17	3.04 (*t*, 9.4)	2.23 (*m*)	
22	3.88 (*br d*, 10.1)	3.65 (*dd*, 9.4, 2.4)	3.68 (*dd*, 9.2, 2.5)
18-Me	1.23 (*s*)	0.80 (*s*)	0.83 (*s*)
19-Me	1.05 (*s*)	1.02 (*s*)	1.09 (*s*)
21-Me	1.60 (*s*)	1.16 (*s*)	1.18 (*s*)
26-Me	1.37 (*s*)	1.24 (*s*)	1.24 (*s*)
27-Me	1.37 (*s*)	1.25 (*s*)	1.25 (*s*)
$\rangle$C(Me)$_2$		1.33, 1.41 (each *s*)	1.34, 1.42 (each *s*)
MsO	-	3.09 (*s*)	-

[a]Recorded in pyridine-d_5.

[b]Recorded in $CDCl_3$.

1% $NaHCO_3$ (100 มิลลิลิตร) แล้วสกัดด้วย EtOAc (4x30 มิลลิลิตร) ทำขั้นอินทรีย์ให้ปราศจากน้ำ และระเหยตัวทำละลายให้แห้ง แล้วนำส่วนผสม (100 มิลลิกรัม) มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟีใช้ตัวชะเป็น $CHCl_3$:MeOH (94:6) ให้สาร **57** (25 มิลลิกรัม, 24%) และสาร **58** (41 มิลลิกรัม, 40%)

3-Dehydro-2-deoxy-20-hydroxyecdysone 20,22-acetonide 3-oxime *anti* C2 (57). Amorphous, mp. 233-235 °C (from EtOAc-hexane); IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3370, 2970, 1660, 1447, 1372, 1172, 1103, 1051; ข้อมูล ^1H NMR แสดงไว้ในตารางที่ 13; FABMS (+ve): *m/z* 518 $[M+H]^+$(81), 502 (73), 484(7), 442(11), 424(25), 300(19), 282(12), 201(9), 143(60), 59(100).

3-Dehydro-2-deoxy-20-hydroxyecdysone 20,22-acetonide 3-oxime *syn* C2 (58). Prism, mp. 210-212°C (from EtOAc-hexane); IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3396, 2964, 1659, 1465, 1375, 1172, 1105, 1002; ข้อมูล ^1H NMR แสดงไว้ในตารางที่ 13; FABMS (+ve): *m/z* 518 $[M+H]^+$(52), 502(100), 484(11), 442 (14), 424(41), 300(12), 282(16), 201(10), 185(26), 143(85), 59(99); HR-FABMS (+ve) *m/z*: 518.3493 $[M+H]^+$ คำนวณสำหรับ $C_{30}H_{47}NO_6$+H: 518.3481.

Acetonide deprotection ของ 3-Dehydro-2-deoxy-20-hydroxyecdysone 20,22-acetonide (56)

เติม 70% AcOH (1 มิลลิลิตร) ลงในสารละลายที่กำลังกวนของสาร (56) (262 มิลลิกรัม) ใน เมทานอล (1 มิลลิลิตร) กวนส่วนผสมของปฏิกิริยานี้ที่อุณหภูมิปกติเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ทำส่วนผสมนี้ให้เป็นกลางด้วย 1% $NaHCO_3$ แล้วสกัดด้วย EtOAc (4x30 มิลลิลิตร) ทำขั้นอินทรีย์ให้ปราศจากน้ำ และระเหยตัวทำละลายให้แห้ง แล้วทำสารให้บริสุทธิ์โดยใช้ Chromatotron ใช้ตัวชะเป็น HCl_3:MeOH (95:5 ถึง 93:7) ให้สาร **53** (150 มิลลิกรัม, 65%)

3-Dehydro-2-deoxy-20-hydroxyecdysone (53). Mp. 225-226 °C (lit. 225-226 °C)[46]; IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3392, 2958, 1696, 1672, 1383, 1146, 919; ข้อมูล ^1H NMR แสดงไว้ในตารางที่ 12; คำนวณสำหรับ $C_{27}H_{42}O_6$. 1/2H_2O: C, 68.78; H, 9.12 หาได้ C, 68.78; H, 8.80%.

การสังเคราะห์ 3-Dehydro-2-deoxy-20-hydroxyecdysone 3-oximes (52)

เติม hydroxylamine hydrochloride (55 มิลลิกรัม) ลงในสารละลายของสาร (53) (54 มิลลิกรัม) ใน pyridine (1 มิลลิลิตร) กวนส่วนผสมของปฏิกิริยานี้ที่อุณหภูมิปกติเป็นเวลา 18 นาที แล้ว work up เหมือนเช่นเดิมทำสาร (60 มิลลิกรัม) ให้บริสุทธิ์โดยใช้ Chromatotron ใช้ตัวชะเป็น $CHCl_3$:MeOH (95:5 ถึง 94:6) ให้สาร **52** (52 มิลลิกรัม, 84%) ซึ่งเป็นของผสมในอัตราส่วน2:5 ระหว่าง *syn* และ *anti* isomer โดยเป็นส่วนผสมระหว่าง **59** และ **60** (อัตราส่วนอาจกลับกัน)

3-Dehydro-2-deoxy-20-hydroxyecdysone 3-oxime (52) (สาร 59 + 60). Amorphous, mp. 161-163 °C (from EtOAc-hexane); IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3388, 2964, 1651, 1448, 1382, 1153, 1070, 549; ข้อมูล

ตารางที่ 13. ^{1}H NMR data of compounds **57 - 60**

H	57[*,+]	58[*,+]	59 + 60[•]
2	a	b	
3	-	-	-
4	a	b	
5			2.45 (*dd*, 14, 4)
			2.34 (*dd*, 13, 5)
7	5.84 (*d*, 2.1)	5.85 (*d*, *ca* 2)	6.22 (*d*, 2.1)
			6.21 (*d*, 2.1)
9	3.16 (*m*)	3.16 (*m*)	3.65 (*m*)
17			3.00 (*t*, 9.2)
22	3.63 (*br d*, 8.8)	3.59 (*dd*, 8.5, 1.5)	3.87 (*dd*, 9.2, 4)
18-Me	0.78 (*s*)	0.78 (*s*)	1.20 (*s*), 1.19 (*s*)
19-Me	0.96 (*s*)	0.93 (*s*)	0.97 (*s*), 0.96 (*s*)
21-Me	1.13 (*s*)	1.12 (*s*)	1.59 (*s*), 1.58 (*s*)
26-Me	1.20 (*s*)	1.20 (*s*)	1.36 (*s*)
27-Me	1.21 (*s*)	1.23 (*s*)	1.37 (*s*)
>C(Me)$_2$	1.31, 1.39	1.30, 1.38	-
	(each *s*)	(each *s*)	

*Recorded in $CDCl_3$.

+The stereochemistry of the hydroxyl groups of the oximes was tentatively assigned.

•Recorded in pyridine-d_5.

[a]A signal which was superimposed with that of H-9 at δ3.16 was due to one of H-4 or H-2.

[b]A signal which was partially superimposed with that of H-9 at δ3.16 was due to one of H-4 or H-2.

^{1}H NMR แสดงไว้ในตารางที่ 13; คำนวณสำหรับ $C_{27}H_{43}NO_6$. 3/2H_2O: C, 64.26; H, 9.19; N, 2.78 หาได้ C, 64.10; H, 9.39; N, 2.54%.

การสังเคราะห์ 3-Dehydro-2-deoxy-20-hydroxyecdysone 3-methoximes (61) และ (62)

เติม methoxylamine hydrochloride (30 มิลลิกรัม) ลงในสารละลายของสาร (53) (152 มิลลิกรัม) ใน pyridine (2 มิลลิลิตร) กวนส่วนผสมของปฏิกิริยานี้ที่อุณหภูมิปกติเป็นเวลา 50 นาที หลังจากนั้นเติม 1% $NaHCO_3$ (100 มิลลิลิตร) แล้วสกัดด้วย EtOAc (4x30 มิลลิลิตร) ทำชั้นอินทรีย์ให้ปราศจากน้ำ และระเหยตัวทำละลายให้แห้ง นำส่วนผสม (150 มิลลิกรัม) มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟีใช้ตัวชะเป็น $CHCl_3$:MeOH พบว่า fraction ที่ใช้ตัวชะเป็น $CHCl_3$:MeOH (96:4) ให้สาร **61** (68 มิลลิกรัม, 43%) และสาร **62** (71 มิลลิกรัม, 45%)

3-Dehydro-2-deoxy-20-hydroxyecdysone 3-methoxime *anti* C2 (61). Stout, aggregated needles, mp. 198-199 °C (from $CHCl_3$-hexane); IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3408, 2960, 1650, 1467, 1383, 1224, 1155, 1056; ข้อมูล ^{1}H NMR แสดงไว้ในตารางที่ 14.

3-Dehydro-2-deoxy-20-hydroxyecdysone 3-methoxime *syn* C2 (62). Rods, mp. 174-176 °C (from MeOH-EtOAc); IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3438, 2968, 1665, 1467, 1381, 1159, 1051; ข้อมูล ^{1}H NMR แสดงไว้ในตารางที่ 14; คำนวณสำหรับ $C_{28}H_{45}NO_7$: C, 66.27; H, 8.88; N, 2.76 หาได้ C, 66.58; H, 9.26; N, 2.77%.

การสังเคราะห์ 3-Dehydro-2-deoxy-20-hydroxyecdysone 20,22-acetonide 3-methoximes (63) และ (64)

เติม methoxylamine hydrochloride (30 มิลลิกรัม) ลงในสารละลายของสาร (56) (50 มิลลิกรัม) ใน pyridine (1 มิลลิลิตร) กวนส่วนผสมของปฏิกิริยานี้ที่อุณหภูมิปกติเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติมน้ำ (100 มิลลิลิตร) แล้วสกัดด้วย EtOAc (4x30 มิลลิลิตร) ทำชั้นอินทรีย์ให้ปราศจากน้ำ และระเหยตัวทำละลายให้แห้ง นำส่วนผสม (68 มิลลิกรัม) มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ตัวชะเป็น $CHCl_3$:MeOH โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วสูง พบว่า fraction ที่ใช้ตัวชะเป็น $CHCl_3$:MeOH (98:2) ให้สาร **63** (26 มิลลิกรัม, 37%) และสาร **64** (29 มิลลิกรัม, 41%)

3-Dehydro-2-deoxy-20-hydroxyecdysone 20,22-acetonide 3-methoxime *anti* C2 (63). Plates, mp. 198-200 °C (from EtOAc-hexane); IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3416, 2966, 1665, 1462, 1375, 1170, 1106, 1051; ข้อมูล ^{1}H NMR แสดงไว้ในตารางที่ 14; FABMS (+ve): *m/z* 532 $[M+H]^+$(82), 502(100), 484(19), 466(3), 438(31), 424(8), 300(7), 282(11), 185(32), 143(65), 59(92).

ตารางที่ 14. ^{1}H NMR data of compounds 61-64

H	61[#]	62[#]	63[*]	64[*]
2		3.07[a](*ddd*, 15.2, 4.2, 3.9)		3.06[a](*ddd*, 15.2, 3.6, 3)
4	3.15[b] (*dd*, 14.1, *ca* 3)		3.08 (*dd*, 14.9, 4.5)	
7	6.19 (*d*, 2.1)	6.19 (*d*, 2.1)	5.83 (*d*, 2.4)	5.83 (*d*, 2.7)
9	3.54 (*m*)	3.56 (*m*)	3.16 (*m*)	3.16 (*m*)
17	3.00 (*t*, 9.1)	3.00 (t, 9.1)		
22	3.87 (*br d*, 9.7)	3.87 (*br d*, 9.4)	3.63 (*br d*, 9.1)	3.63 (*dd*, 9.4)
18-Me	1.19 (*s*)	1.20 (*s*)	0.77 (*s*)	0.79 (*s*)
19-Me	0.96 (*s*)	0.96 (*s*)	0.95 (*s*)	0.95 (*s*)
21-Me	1.58 (*s*)	1.58 (*s*)	1.13 (*s*)	1.14 (*s*)
26-Me	1.36 (*s*)	1.36 (*s*)	1.20 (*s*)	1.21 (*s*)
27-Me	1.36 (*s*)	1.36 (*s*)	1.21 (*s*)	1.22 (*s*)
$\diagdown$C(Me)$_2$	-	-	1.30, 1.38 (each *s*)	1.31, 1.39 (each *s*)
MeO	3.81 (*s*)	3.84 (*s*)	3.77 (*s*)	3.79 (*s*)

[a]One of the H2 signals.

[b]One of the H4 signals.

[#]Recorded in pyridine-d_5.

[*]Recorded in $CDCl_3$.

3-Dehydro-2-deoxy-20-hydroxyecdysone 20,22-acetonide 3-methoxime *syn* C2 (64). Fine needles, mp. 230-232°C (from EtOAc-hexane); IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3476, 2964, 1658, 1452, 1372, 1215, 1103, 1051; ข้อมูล ^{1}H NMR แสดงไว้ในตารางที่ 14; FABMS (+ve): *m/z* 532 $[M+H]^+$(100), 502(66), 484(8), 438(24), 424(6), 185(34), 143(48), 59(58); HR-FABMS (+ve) *m/z*: 532.3636 $[M+H]^+$ คำนวณสำหรับ $C_{31}H_{49}NO_6$+H : 532.3638.

2) การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของวง B

20-Hydroxyecdysone 6-oximes และ 6-methoximes

การสังเคราะห์ 20-hydroxyecdysone 6-oximes (69) และ (67)

เติม hydroxylamine hydrochloride (120 มิลลิกรัม) ลงในสารละลายของสาร (2) (100 มิลลิกรัม) ใน pyridine (1 มิลลิลิตร) กวนส่วนผสมของปฏิกิริยานี้ที่อุณหภูมิปกติเป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นเติม 1% $NaHCO_3$ (100 มิลลิลิตร) แล้วสกัดด้วย n-BuOH (4x20 มิลลิลิตร) ทำขั้นอินทรีย์ให้ปราศจากน้ำ และระเหยตัวทำละลายให้แห้ง แล้วนำส่วนผสม (100 มิลลิกรัม) มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Chromatotron ใช้ตัวชะเป็น $CHCl_3$:MeOH พบว่าfraction ที่ใช้ตัวชะ $CHCl_3$:MeOH (85:15) ให้สาร **69** (38 มิลลิกรัม, 37%) และ fraction ที่ใช้ตัวชะ $CHCl_3$:MeOH (85:15 ถึง 82:18) ให้สาร **67** (50 มิลลิกรัม, 49%)

5α-20-Hydroxyecdysone 6-oxime *anti* C7 (69). Aggregated prism, mp. 180-182 °C (from MeOH-EtOAc); IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3362, 2962, 1647, 1448, 1381, 1124, 1064; ข้อมูล ^{1}H NMR แสดงไว้ในตารางที่ 15; คำนวณสำหรับ $C_{27}H_{45}NO_7.H_2O$: C, 63.15; H, 9.16; N, 2.72 หาได้ C, 63.28; H, 9.24; N, 2.73%.

20-Hydroxyecdysone 6-oxime *syn* C7 (67). Amorphous, mp. 168-169 °C (from MeOH-EtOAc); IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3372, 2930, 1644, 1463, 1379, 1209, 1145, 1052; ข้อมูล ^{1}H NMR แสดงไว้ในตารางที่ 15 ; คำนวณสำหรับ $C_{27}H_{45}NO_7.3/2H_2O$: C, 62.04; H, 9.26; N, 2.68 หาได้ C, 61.82; H, 9.51; N, 2.61%.

การสังเคราะห์ 20-Hydroxyecdysone 6-methoximes (70) และ (71)

เติม methoxylamine hydrochloride (60 มิลลิกรัม) ลงในสารละลายของ 20-hydroxyecdysone (2) (120 มิลลิกรัม) ใน pyridine (2 มิลลิลิตร) กวนส่วนผสมของปฏิกิริยานี้ที่อุณหภูมิปกติเป็นเวลา 3 วัน หลังจาก work up ตามปกติ นำส่วนผสม (160 มิลลิกรัม) มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ตัวชะเป็น $CHCl_3$:MeOH (92:8) ให้สาร **70** (76 มิลลิกรัม, 44%) และสาร **71** (43 มิลลิกรัม, 25%)

ตารางที่ 15. ^{1}H NMR data of compounds **67** and **69-71**

H	67	69	70	71
2	4.23 (*m*)	4.31 (*m*)	4.15 (*m*)	4.19 (*m*)
3	4.22 (*br s*)	4.52 (*br s*)	4.21 (*m*)	4.21 (*br s*)
5	3.19 (*dd*, 13.1, 3.9)	4.23 (*dd*, 12.8, 3.6)	3.89*	3.06 (*dd*, 13.2, 3.8)
7	7.36 (*d*, 2.4)	6.72 (*d*, 2.4)	6.34 (*d*, 2.1)	6.99 (*dd*, 2.4)
9	3.48 (*m*)		3.42 (*m*)	3.44 (*m*)
17	3.02 (*t*, 9)		3.00 (*t*, 9.1)	2.99 (*t*, 9.1)
22	3.87 (*br d*, 9.4)	3.84 (*br d*, 8.5)	3.89*	3.86 (*brd*, 9.1)
18-Me	1.27 (*s*)	1.39 (*s*)	1.25 (*s*)	1.22 (*s*)
19-Me	1.09 (*s*)	1.06 (*s*)	1.03 (*s*)	1.03 (*s*)
21-Me	1.58 (*s*)	1.54 (*s*)	1.58 (*s*)	1.57 (*s*)
26-Me	1.36 (*s*)	1.43 (*s*)	1.36 (*s*)	1.36 (*s*)
27-Me	1.36 (*s*)	1.44 (*s*)	1.36 (*s*)	1.36 (*s*)
MeO	-	-	3.92 (*s*)	3.96 (*s*)

Recorded in pyridine-d_5.

*Superimposed signal.

20-Hydroxyecdysone 6-methoxime *anti* C7 (70). Fine, aggregated needles, mp. 228-230 °C (from MeOH-EtOAc); IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3396, 2964, 1647, 1459, 1381, 1143, 1105, 1054; ข้อมูล ^1H NMR แสดงไว้ในตารางที่ 15; คำนวณสำหรับ $C_{28}H_{47}NO_7.1/2H_2O$: C, 64.84; H, 9.33; N, 2.70 หาได้ C, 65.15; H, 9.70; N, 2.68%.

20-Hydroxyecdysone 6-*O*-methoxime *syn* C7 (71). Prisms, mp. 169-171 °C (from MeOH-EtOAc); IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3438, 2960, 1623, 1444, 1380, 1124, 1066; ข้อมูล ^1H NMR แสดงไว้ในตารางที่ 15; คำนวณสำหรับ $C_{28}H_{47}NO_7.3H_2O$: C, 59.68; H, 9.41; N, 2.49 หาได้ C, 59.26; H, 9.21; N, 2.61%.

3. การเตรียมอนุพันธ์ของหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งต่าง ๆ ในโมเลกุล

1) การเตรียมอนุพันธ์ Furan-2-carboxylates ของ 20-hydroxyecdysone (2)

20-Hydroxyecdysone 2-(furan-2-carboxylate) (72) และ 20-Hydroxyecdysone 3-(furan-2-carboxylate) (73)

ละลาย 20-Hydroxyecdysone (2) (100 มิลลิกรัม) ใน pyridine ที่ปราศจากน้ำ (1 มิลลิลิตร) แล้วเติมสารละลาย 2-furoyl chloride (ใช้ furoyl chloride ต่อเบนซีนที่ปราศจากน้ำ 1:5) จำนวน 0.5 มิลลิลิตร คนสารละลายที่อุณหภูมิ 0-5 °C เป็นเวลา 3.5 ชั่วโมง เติมน้ำลงไปแล้วสกัดสารละลายด้วย *n*-BuOH (4x20 มิลลิลิตร) นำชั้นบิวทานอลมาล้างด้วยน้ำ และระเหยตัวทำละลายออกโดยทำการกลั่นร่วมกับน้ำ นำส่วนที่เหลือมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ตัวชะคลอโรฟอร์ม-เมทานอล (95: 5) ได้สารผลิตภัณฑ์ 84 มิลลิกรัม (70%) ^1H NMR แสดงว่าเป็นส่วนผสมของ 72 และ 73 (ดูตารางที่ 16)

20-Hydroxyecdysone 2-(furan-2-carboxylate) (72) และ 20-Hydroxyecdysone 3-(furan-2-carboxylate) (73). IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1}: 3442, 2960, 1717, 1640, 1579, 1471, 1382, 1292, 1231, 1172, 1127, 1078, 1055, 987, 953, 884, 760; ^1H NMR ดูตารางที่ 16;. FABMS (+ve) : m/z 613 $[M+K]^+$; 575 $[M+H]^+$; HR-FABMS (+ve): m/z 575.3218 $[M+H]^+$ (คำนวณสำหรับ $C_{32}H_{47}O_9$: 575.3220).

20-Hydroxyecdysone 2,3-acetonide 22-(furan-2-carboxylate) (76)

ละลาย 20-Hydroxyecdysone (2) (40 มิลลิกรัม) ใน pyridine ที่ปราศจากน้ำ (0.5 มิลลิลิตร) เติม 2-furoyl chloride (0.5 มิลลิลิตร) แล้วคนสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำลงในส่วนผสมของปฏิกิริยาแล้วสกัดสารด้วยคลอโรฟอร์ม (4x10 มิลลิลิตร) นำชั้นคลอโรฟอร์มมาล้างด้วยน้ำ แล้วทำให้ปราศจากน้ำด้วย Na_2SO_4 ที่ปราศจากน้ำ ระเหยตัวทำละลายภายใต้ความดันต่ำ นำส่วนที่เหลือทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ตัวชะเป็นคลอโรฟอร์ม-เมทานอล (99.5:0.5) ได้สาร 37 มิลลิกรัม (78%)

ตารางที่ 16. ^{1}H NMR data of compounds 72-74

H	72*	73*	74#
2	5.50 (*m*)	4.40 (*m*)	4.18 (*m*)
3	4.45 (*br s*)	5.74 (*br s*)	4.24 (*br s*)
5	3.08 (*dd*, 13.5, 3.2)	2.78 (*dd*, 13.4, 3.9)	2.99 (*dd*, 13.4, 3.6)
7	6.24 (*d*, 2.4)	6.23 (*d*, 2.4)	6.22 (*d*, *ca* 2.1)
9	3.70 (*m*)	3.60 (*m*)	3.59 (*m*)
17	3.00 (*t*, 9)	3.00 (*t*, 9)	3.03 (*t*, 8.8)
22	3.87 (*dd*, 10, *ca* 1.8)	3.87 (*dd*, 10, *ca* 1.8)	5.72 (*dd*, 10.9, 1.8)
18-Me	1.21 (*s*)	1.22 (*s*)	1.18 (*s*)
19-Me	1.10 (*s*)	1.11 (*s*)	1.06 (*s*)
21-Me	1.57 (*s*)	1.58 (*s*)	1.74 (*s*)#
26-Me	1.38 (*s*)	1.36 (*s*)	1.29 (*s*)
27-Me	1.38 (*s*)	1.36 (*s*)	1.29 (*s*)
3'	7.27 (*dd*, 3.3, 0.9)	7.28 (*dd*, 3.3, 0.9)	7.30 (*dd*, 3.3, 0.9)
4'	6.46 (*dd*, 3.3, 1.8)	6.44 (*dd*, 3.3, 1.8)	6.44 (*dd*, 3.3, 1.5)
5'	7.75 (*dd*, 1.8, 0.9)	7.71 (*dd*, 1.8, 0.9)	7.71 (*dd*, 1.5, 0.9)
>C(Me)$_2$	-	1.34#, 1.47 (each *s*)	-

*Recorded in pyridine-d_5; #Recorded in $CDCl_3$; a,b Interchangeable

20-Hydroxyecdysone 2,3-acetonide 22-(furan-2-carboxylate) (76). IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1}: 3522, 3386, 2964, 2872, 1715, 1648, 1572, 1473, 1394, 1370, 1301, 1224, 1186, 1123, 1057, 1043, 1009, 949, 935, 885, 858, 769, 752; ^{1}H NMR ดูตารางที่ 17.

Acetonide deprotection ของ 20-hydroxyecdysone 2,3-acetonide 22-(furan-2-carboxylate) (76)

นำสาร 76 (30 มิลลิกรัม) มาละลายในเมทานอล (0.5 มิลลิลิตร) เติม 70% AcOH ลงไป แล้วคนสารละลายเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เติมน้ำลงไปในส่วนผสมของปฏิกิริยา แล้วสกัดส่วนผสมด้วยนอร์มัลบิวทานอล (3x20 มิลลิลิตร) ล้างชั้นบิวทานอลด้วยน้ำแล้วระเหยตัวทำละลายออก ทำสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ตัวชะเป็นไดคลอโรมีเทน-เมทานอล (8:1) ได้ 20-hydroxyecdysone 22-(furan-2-carboxylate (74) 24 มิลลิกรัม (86%)

20-Hydroxyecdysone 22-(furan-2-carboxylate) (74). IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1}: 3414, 2960, 2926, 1702, 1651, 1576, 1472, 1394, 1301, 1227, 1183, 1122, 1055, 1016, 944, 880, 764; ^{1}H NMR ดูตารางที่ 16.

20-Hydroxyecdysone 2,3:20,22-diacetonide 25-(furan-2-carboxylate) (78)

นำ 20-Hydroxyecdysone 2,3:20,22-diacetonide (33) 175 มิลลิกรัม มาละลายใน pyridine ที่ปราศจากน้ำ (1.5 มิลลิลิตร) และเติมเบนซีนที่ปราศจากน้ำลงไป 5 มิลลิลิตร เติม 2-furoyl chloride (1 มิลลิลิตร) และ DMAP (20 มิลลิกรัม) คนส่วนผสมของปฏิกิริยาเป็นเวลา 3วัน จากนั้นเติมน้ำลงไป สกัดด้วยเอทิลอะซีเตต (4x20 มิลลิลิตร) นำชั้นเอทิลอะซีเตตมาล้างด้วยน้ำและดูดน้ำออกไป หลังจากระเหยตัวทำละลายแล้ว ทำสารให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยออกมากับระบบตัวชะไดคลอโรมีเทน-เมทานอล (30:1) ได้สาร 78 ปริมาณ 143 มิลลิกรัม (70%)

20-Hydroxyecdysone 2,3:20,22-diacetonide 25-(furan-2-carboxylate) (78). IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1}: 3474, 2976, 2874, 1710, 1661, 1576, 1474, 1368, 1307, 1243, 1216, 1178, 1117, 1056, 1007, 934, 884, 837, 763; ^{1}H NMR ดูตารางที่ 17; FABMS (+ve) : m/z 655 $[M+H]^+$; 637 $[M+H-H_2O]^+$.

Acetonide deprotection ของ 20-Hydroxyecdysone 2,3:20,22-diacetonide 25-(furan-2-carboxylate) (78)

นำสาร 78 (40 มิลลิกรัม) มาละลายใน dioxane (0.3 มิลลิลิตร) แล้วเติม 70% AcOH ลงไป 1 มิลลิลิตร แล้วคนส่วนผสมของปฏิกิริยาเป็นเวลา 8 วัน หลังจากเติมน้ำลงไปแล้วทำการสกัดด้วยนอร์มัลบิวทานอล (3x20 มิลลิลิตร) นำชั้นบิวทานอลมาระเหยตัวทำละลายออก นำส่วนที่เหลือมาทำให้บริสุทธิ์

ตารางที่ 17. ^{1}H NMR data of compounds 76-78

H	76[a]	77*	78[a]
2	4.20 (*m*)	4.15 (*m*)	4.19 (*m*)
3	4.25 (*br s*)	4.22 (*br s*)	4.24 (*br s*)
5	2.32 (*dd*, 12.5, 4.8)	3.00 (*dd*, 13.4, 3.6)	2.33 (*dd*, 12.6, 4.7)
7	5.80 (*d*, 2.4)	6.24 (*d*, 2.4)	5.80 (*d*, 2.4)
9	2.80 (*m*)	3.57 (*m*)	2.77 (*m*)
17	2.40 (*t*, 9)	2.98 (*t*, 9)	2.19 (*m*)
22	5.05 (*dd*, 10.6, 2.1)	3.87 (*br d*, 9.4)	3.63 (*dd*, 9.4, 3)
18-Me	0.84 (*s*)	1.21 (*s*)	0.76 (*s*)
19-Me	0.96 (*s*)	1.06 (*s*)	0.95 (*s*)
21-Me	1.31 (*s*)[a]	1.60 (*s*)*	1.12 (*s*)
26-Me	1.18 (*s*)	1.56 (*s*)*	1.29 (*s*)
27-Me	1.20 (*s*)	1.58 (*s*)*	1.30 (*s*)
3′	7.19 (*dd*, 3.3, 0.9)	7.24 (*dd*, 3.3, 0.9)	7.04 (*dd*, 3.3, 0.6)
4′	6.50 (*dd*, 3.3, 1.8)	6.38 (*dd*, 3.3, 1.8)	6.45 (*dd*, 3.3, 1.8)
5′	7.58 (*dd*, 1.8, 0.9)	7.68 (*dd*, 1.8, 0.9)	7.52 (*dd*, 1.8, 0.6)
Acetonide Me	1.34[a], 1.47 (each *s*)	-	1.38, 1.46, 1.54, 1.57 (each *s*)

[a]Recorded in $CDCl_3$.

*Recorded in pyridine-d_5.

[a,*]Assigments may be reversed for signals with the same superscript.

คอลัมน์โครมาโตกราฟี สารที่ออกมากับตัวชะไดคลอโรมีเทน-เมทานอล (8:1) เป็น 20-hydroxyecdysone 25-(furan-2-carboxylate) (77) (29 มิลลิกรัม, 83%)

20-Hydroxyecdysone 25-(furan-2-carboxylate) (77). IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1}: 3402, 2936, 1700, 1649, 1576, 1473, 1388, 1316, 1183, 1119, 1055, 1011, 932, 878, 766; ^1H NMR ดูตารางที่ 17.

การสังเคราะห์ 20-Hydroxyecdysone 20,22-acetonide 2-benzyl ether (80)

ละลาย 20-Hydroxyecdysone 20,22-acetonide (79) (305 มิลลิกรัม) ใน DMF (2 มิลลิลิตร) เติม benzyl bromide (0.5 มิลลิลิตร) ลงไป แล้วคนสารละลายที่ 0-5 °C แล้วเติม NaH (100 มิลลิกรัม) คนส่วนผสมปฏิกิริยาต่อไป 45 นาที แล้วเติมน้ำแข็งลงไป สกัดส่วนผสมด้วยเอทิลอะซีเตต (3x50 มิลลิลิตร) ล้างชั้นเอทิลอะซีเตตด้วยน้ำ ดูดน้ำออกด้วย Na_2SO_4 ที่ปราศจากน้ำ ระเหยตัวทำละลายออกไป แยกสารผลิตภัณฑ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้สารผลิตภัณฑ์ 20-Hydroxyecdysone 20,22-acetonide 2-benzyl ether (80) (248 มิลลิกรัม, 69%)

20-Hydroxyecdysone 20,22-acetonide 2-benzyl ether (80). Mp. 278-280 °C (from $CHCl_3$-hexane); IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3476, 2971, 2835, 1638, 1454, 1372, 1318, 1257, 1200, 1153, 1081, 999, 909, 873, 751, 697; ^1H NMR ดูตารางที่ 18

การสังเคราะห์ 20-Hydroxyecdysone 20,22-acetonide 2-benzyl ether 3-(furan-2-carboxylate) (81)

คนสารละลายของสาร **80** (241 มิลลิกรัม) ใน pyridine (2 มิลลิลิตร) และเบนซีนที่ปราศจากน้ำ (10 มิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ 0-5 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม 2-furoyl chloride (1 มิลลิลิตร) แล้วคนส่วนผสมของปฏิกิริยาต่อไปที่ 0-5 °C แล้วปล่อยให้อุณหภูมิค่อยๆสูงขึ้นจนถึงอุณหภูมิปกติในช่วงเวลา 4 ชั่วโมง เติมน้ำลงไป แล้วสกัดส่วนผสมด้วยคลอโรฟอร์ม (3x20 มิลลิลิตร) ล้างชั้นสารอินทรีย์ด้วยน้ำ ทำให้แห้งด้วย Na_2SO_4 ที่ปราศจากน้ำ แล้วระเหยตัวทำละลายออกไปจนแห้ง ทำสารให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ซึ่ง fraction ที่ใช้ ตัวชะเป็น $CHCl_3$-MeOH (99:1) ได้สารผลิตภัณฑ์ **81** (205 มิลลิกรัม, 73%)

20-Hydroxyecdysone 20,22-acetonide 2-benzyl ether 3-(furan-2-carboxylate) (81). IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3468, 2969, 1725, 1657, 1474, 1372, 1296, 1181, 1121, 1002, 884, 762; ^1H NMR ดูตารางที่ 18; FABMS (-ve): m/z 703 $[M-H]^-$, 687, 593, 339, 111.

Catalytic hydrogenolysis ของสาร 81

ละลายสาร **81** (25 มิลลิกรัม) ในเอทานอล (2 มิลลิลิตร) แล้วทำการ hydrogenate โดยใช้ 10% Pd-C เป็นคะตะลิสต์ กรองส่วนผสมผ่านคอลัมน์บรรจุ cellulose (microcrystalline) และล้าง residue ด้วย

ตารางที่ 18. ^{1}H NMR data of compounds **80** - **82**

H	80	81	82
2	3.40 (*m*)	3.78 (*m*)	4.09 (*m*)
3	4.17 (*br s*)	5.72 (*br s*)	5.40 (*br s*)
5	2.45 (*dd*, *ca* 13, *ca* 4)	2.48 (*dd*, 13.3, 3.9)	2.39 (*dd*, 13.4, 3.9)
7	5.83	5.88 (*d*, 2.3)	5.85 (*d*, 2.4)
9	2.96 (*m*)	3.00 (*m*)	3.05 (*m*)
17	2.22 (*t*, *ca* 8)	2.24 (*dd*, 9.2, 7.8)	2.22 (*t*, 8.8)
22	3.65	3.68 (*d*, 8.5)	3.64 (*dd*, 8.8, 2.1)
18-Me	0.78 (*s*)	0.82 (*s*)	0.79 (*s*)
19-Me	0.97 (*s*)	1.06 (*s*)	1.03 (*s*)
21-Me	1.17 (*s*)	1.19 (*s*)	1.15 (*s*)
26-Me	1.22 (*s*)	1.26 (*s*)	1.21 (*s*)
27-Me	1.22 (*s*)	1.27 (*s*)	1.22 (*s*)
3′	-	-	7.21 (*dd*, 3.6, 0.6)
4′	-	-	6.51 (*dd*, 3.6, 1.8)
5′	-	-	7.58 (*dd*, 1.8, 0.6)
Acetonide Me	1.33, 1.42 (each *s*)	1.35, 1.44 (each *s*)	1.31, 1.40 (each *s*)
$PhCH_2O$	4.57 (*d*, 11.7)	4.52 (*d*, 11.8)	
	4.63 (*d*, 11.7)	4.75 (*d*, 11.8)	
$PhCH_2O$	7.35 (*m*)	7.31 (*m*)	

Recorded in $CDCl_3$

เอทานอล ระเหยส่วนที่กรองได้ให้แห้ง แล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ $CHCl_3$-MeOH (96:4) เป็นตัวชะ ได้สารผลิตภัณฑ์ 20-Hydroxyecdysone 20,22-acetonide 3-(furan-2-carboxylate) (82) ผสมกับ 20-Hydroxyecdysone 2-(furan-2-carboxylate) (83) ในอัตราส่วนประมาณ 10:1 (จาก ^{1}H NMR) (17 มิลลิกรัม, 77%)

20-Hydroxyecdysone 20,22-acetonide 3-(furan-2-carboxylate) (82) และ 20-hydroxyecdysone 20,22-acetonide 2-(furan-2-carboxylate) (83) ผสมกันอยู่ในอัตราส่วนประมาณ 10:1. IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3458, 2970, 1721, 1659, 1580, 1474, 1373, 1299, 1182, 1121, 1078, 1015, 1001, 935, 884, 763; ^{1}H NMR ดูตารางที่ 18 และ 19; FABMS (-ve): m/z 613[M-H]$^-$, 597, 501, 111.

Acetonide deprotection ของสาร 81 และ Catalytic hydrogenolysis ของสาร 84

นำสาร 81 (49 มิลลิกรัม) มาละลายในเมทานอล (0.1 มิลลิลิตร) เติม 70% AcOH (2 มิลลิลิตร) คนไว้เป็นเวลา 7 วัน ระเหยตัวทำละลายและกรดอะซิติกออกไปด้วย absolute EtOH ได้สารผลิตภัณฑ์ 84 แล้วนำไปทำ catalytic hydrogenolysis โดยตรง โดยละลายใน EtOAc (4 มิลลิลิตร) ใช้ 10% Pd-C (30 มิลลิกรัม) ทำการ hydrogenate เป็นเวลา 30 นาที กรองผ่านคอลัมน์บรรจุ cellulose (microcrystalline) ทำสารให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ $CHCl_3$-MeOH (8:1) เป็นตัวชะ ได้สารผลิตภัณฑ์ (73) ปริมาณ 13 มิลลิกรัม (50% จากสารตั้งต้น 81)

20-Hydroxyecdysone 3-(furan-2-carboxylate) (73). IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3432, 2966, 1721, 1656, 1580, 1474, 1448, 1384, 1301, 1232, 1184, 1122, 1076, 1016, 993, 953, 935, 884, 763; ^{1}H NMR ดูตารางที่ 16

2) การเตรียมอนุพันธ์ Thiophene-2-carboxylates ของ 20-hydroxyecdysone (2)

การสังเคราะห์ 20-Hydroxyecdysone 2-(thiophene-2-carboxylate) (85)

ละลายสาร 2 (150 มิลลิกรัม) ใน pyridine (1 มิลลิลิตร) แล้วเติมเบนซีน (10 มิลลิลิตร) เติม thiophene-2-carboxylic acid chloride (2.5 มิลลิลิตร) และคนส่วนผสมของปฏิกิริยาที่อุณหภูมิปกติเป็นเวลา 25 นาที เติมน้ำลงไป แล้วสกัดส่วนผสมด้วยเอทิลอะซีเตด (3x25 มิลลิลิตร) ล้างชั้นเอทิลอะซีเตดด้วยน้ำ และดูดน้ำออกด้วย Na_2SO_4ที่ปราศจากน้ำ ทำสารให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้สาร 85 (155 มิลลิกรัม, 84%)

20-Hydroxyecdysone 2-(thiophene-2-carboxylate) (85). Amorphous, mp 267-269 °C (from MeOH-EtOAc); IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3412, 2960, 1710, 1636, 1521, 1461, 1440, 1415, 1399, 1381, 1361, 1321, 1258, 1227, 1150, 1101, 1055, 953, 894, 748, 712; ^{1}H NMR ดูตารางที่ 20

ตารางที่ 19. ^{1}H NMR data of compounds **83** and **84**

H	83	84
2	5.23 (*m*)	3.78 (*m*)
3	4.22 (*br s*)	5.72 (*br s*)
5	2.55 (*dd*, 13.4, 3.9)	2.48 (*dd*, 13.3, 3.9)
7	5.85 (*d*, 2.4)	5.88 (*d*, 2.3)
9	3.11 (*m*)	3.00 (*m*)
17	2.22 (*t, ca* 9)	2.24 (*dd*, 9.2, 7.8)
22	3.64 (*dd, ca* 9, *ca* 2)	3.68 (*d*, 8.5)
18-Me	0.79 (*s*)	0.82 (*s*)
19-Me	1.00 (*s*)	1.06 (*s*)
21-Me	1.15 (s)	1.19 (*s*)
26-Me	1.21 (*s*)	1.26 (*s*)
27-Me	1.22 (*s*)	1.27 (*s*)
3′	7.21 (*dd*, 3.6, 0.6)	7.22 (*br d*, 3.5)
4′	6.51 (*dd*, 3.6, 1.8)	6.53 (*dd*, 3.5, 1.7)
5′	7.57 (*dd*, 1.8, 0.6)	7.60 (*br s*)
Acetonide Me	1.31, 1.40 (each *s*)	1.35, 1.44 (each *s*)
$PhCH_2O$	-	4.52 (*d*, 11.8)
		4.75 (*d*, 11.8)
$PhCH_2O$	-	7.32 (*m*)

Recorded in $CDCl_3$

ตารางที่ 20. ^{1}H NMR data of compounds 85-87

H	85	86	87
2	5.46 (*m*)	4.42 (*m*)	4.20 (*m*)
3	4.44 (*br s*)	5.52 (*br s*)	4.24 (*br s*)
5	3.06 (*dd*, 13.2, 3.2)	2.67 (*dd*, 13.5, 3.8)	3.00 (*dd*, 13.4, 3.6)
7	6.24 (*d*, 1.8)	6.23 (*d*, 2.4)	6.23 (*d*, 2.1)
9	3.69 (*m*)	3.60 (*m*)	3.58 (*m*)
17	2.97 (*t*, 9)	2.99 (*t*, 9.1)	3.05 (*t*, 9)
22	3.86 (*br d*, 9.1)	3.88 (*br d*, 8.2)	5.70 (*dd*, 10.8, 2)
18-Me	1.18 (*s*)	1.21 (*s*)	1.19 (*s*)
19-Me	1.08 (*s*)	1.10 (*s*)	1.06 (*s*)
21-Me	1.57 (*s*)	1.58 (*s*)	1.75 (*s*)
26-Me	1.38 (*s*)	1.36 (*s*)	1.30 (*s*)
27-Me	1.38 (*s*)	1.37 (*s*)	1.30 (*s*)
3′	7.69 (*m*)	7.66 (*dd*, 4.8, 1.2)	7.65 (*dd*, 4.8, 1.2)
4′	7.03 (*m*)	7.02 (*dd*, 4.8, 3.6)	7.03 (*dd*, 4.8, 3.6)
5′	7.91 (*m*)	7.91 (*dd*, 3.6, 1.2)	7.93 (*dd*, 3.6, 1.2)

Recorded in pyridine-d_5.

การสังเคราะห์ 20-Hydroxyecdysone 2,3-acetonide 22-(thiophene-2-carboxylate) (88)

เติม thiophene-2-carboxylic acid chloride (0.2 มิลลิลิตร) ลงในสารละลายของสาร **75** (23 มิลลิกรัม) ใน pyridine (0.1 มิลลิลิตร) และเบนซีน (1 มิลลิลิตร) และคนส่วนผสมเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วสกัดส่วนผสมด้วยเอทิลอะซีเตต (3x25 มิลลิลิตร) ล้างชั้นสารอินทรีย์ด้วยน้ำ และดูดน้ำด้วย Na_2SO_4 ที่ปราศจากน้ำ ทำสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้สารผลิตภัณฑ์ **88** (20 มิลลิกรัม, 72%)

20-Hydroxyecdysone 2,3-acetonide 22-(thiophene-2-carboxylate) (88). Amorphous, mp. 180-182°C (from $CHCl_3$-hexane); IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3412, 2960, 1710, 1636, 1521, 1461, 1440, 1415, 1399, 1381, 1361, 1321, 1258, 1227, 1150, 1101, 1055, 953, 894, 748, 712; ^{1}H NMR ดูตารางที่ 21

Acetonide deprotection ของสาร (88)

นำสาร **88** (39 มิลลิกรัม) มากำจัดหมู่ป้องกัน acetonide ตามวิธีที่ใช้เตรียมสาร **78** จาก **79** หลังจากทำสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี พบว่าได้สาร **87** (34 มิลลิกรัม, 93%)

20-Hydroxyecdysone 22-(thiophene-2-carboxylate) (87). IR: ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3424, 2930, 1648, 1522, 1415, 1383, 1275, 1225, 1159, 1101, 1050, 946, 873, 749; ^{1}H NMR ดูตารางที่ 20

การสังเคราะห์ 20-Hydroxyecdysone 2,3:20,22-diacetonide 25-(thiophene-2-carboxylate) (90)

เติม DMAP (20 มิลลิกรัม) และ thiophene-2-carboxylic acid chloride (1 มิลลิลิตร) ลงในสารละลายของสาร **75** (165 มิลลิกรัม) ใน pyridine (1 มิลลิลิตร) และเบนซีน (5 มิลลิลิตร) คนส่วนผสมเป็นเวลา 2 วัน แล้วจึง work up ตามปกติ ทำสารให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ตัวชะอัตราส่วนเดียวตลอดเป็น CH_2Cl_2-MeOH (20:1) ได้สารผลิตภัณฑ์ **90** (130 มิลลิกรัม, 66%)

20-Hydroxyecdysone 2,3:20,22-diacetonide 25-(thiophene-2-carboxylate) (90). IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3438, 2972, 2930, 1657, 1445, 1416, 1370, 1243, 1215, 1165, 1097, 1057, 1000, 881, 754; ^{1}H NMR ดูตารางที่ 21

Acetonide deprotection ของสาร 90

นำสาร **90** (20 มิลลิกรัม) มาทำการ deacetonide ด้วยวิธีเดียวกันกับการ deacetonideสาร **78** ให้เป็นสาร **77** ทำสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้สาร **89** (16 มิลลิกรัม, 91%)

20-Hydroxyecdysone 25-(thiophene-2-carboxylate) (89). Amorphous, mp. 245-247 °C (from MeOH-EtOAc); IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3454, 2962, 1703, 1653, 1453, 1417, 1375, 1251, 1214, 1137, 1100, 1052, 1002, 909, 878, 753; ^{1}H NMR ดูตารางที่ 21

ตารางที่ 21. ^{1}H NMR data of compounds **88-90**

H	88[a]	89*	90[a]
2	4.21 (*m*)	4.16 (*m*)	4.20 (*m*)
3	4.25 (*m*)	4.23 (*m*)	4.25 (*br s*)
5	2.33 (*dd*, 12.6, 4.7)	3.00 (*dd*, 12.8, 4.2)	2.33 (*dd*, 12.5, 4.6)
7	5.82 (*d*, 2.4)	6.24	5.82 (*d*, 2.2)
9	2.81 (*m*)	3.58 (*m*)	2.77 (*m*)
17	2.40 (*dd*, 9.1, 8.8)	3.00 (*t*, 8.8)	2.22 (*dd*, 9.2, 8.1)
22	5.04 (*dd*, 10.5, 1.9)	3.88 (*br d*, 10.1)	3.64 (*dd*, 9.3, 2.9)
18-Me	0.84 (*s*)	1.22 (*s*)	0.77 (*s*)
19-Me	0.96 (*s*)	1.06 (*s*)	0.97 (*s*)
21-Me	1.31 (*s*)[b]	1.62 (*s*)[c]	1.14 (*s*)
26-Me	1.19 (*s*)	1.57 (*s*)[c]	1.31 (*s*)
27-Me	1.21 (*s*)	1.58 (*s*)[c]	1.32 (*s*)
3′	7.61 (*dd*, 4.8, 0.9)	7.55 (*dd*, 5.1, 0.9)	7.48 (*dd*, 4.8, 0.8)
4′	7.11 (*dd*, 4.8, 3.6)	6.99 (*dd*, 5.1, 3.6)	7.06 (*dd*, 4.8, 3.8)
5′	7.85 (*dd*, 3.6, 0.9)	7.87 (*dd*, 3.6, 0.9)	7.71 (*dd*, 3.8, 0.8)
Acetonide Me	1.34[b], 1.47 (each *s*)	-	1.40, 1.48, 1.56, 1.58 (each *s*)

[a] Recorded in $CDCl_3$.

*Recorded in pyridine-d_5.

[c] Assigments may be reversed for signals with the same superscript.

การสังเคราะห์สาร 91

คนสารละลายของสาร 80 (50 มิลลิกรัม) ใน pyridine (2 มิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ 0-5 °C เป็นเวลา 5 นาที แล้วเติมสารละลายของ thiophene-2-carboxylic acid chloride ในเบนซีน (1:3 น้ำหนัก/ปริมาตร, 1 มิลลิลิตร) จากนั้นคนสารละลายที่อุณหภูมิประมาณ 5 °C แล้วค่อยๆปล่อยให้ถึงอุณหภูมิปกติในช่วงเวลา 6 ชั่วโมง เติมน้ำลงในส่วนผสมของปฏิกิริยา และสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม (3x15 มิลลิลิตร) นำชั้นสารอินทรีย์มาล้างด้วยน้ำ ดูดน้ำออก และระเหยให้แห้ง ทำสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้สารผลิตภัณฑ์ 91 (48 มิลลิกรัม, 81%) โดยออกมากับตัวชะ $CHCl_3$-MeOH (99:1)

20-Hydroxyecdysone 20,22-acetonide 2-benzyl ether 3-(thiophene-2-carboxylate) (91). IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3448, 2964, 2874, 1710, 1655, 1526, 1498, 1453, 1418, 1368, 1262, 1226, 1099, 1026, 951, 747; ^{1}H NMR ดูตารางที่ 22

Acetonide deprotection ของสาร 91

นำสาร 91 (25 มิลลิกรัม) มาทำการ deacetonide โดยวิธีเดียวกับที่ใช้กับการ deacetonide สาร 78 ให้เป็นสาร 77 หลังจากทำสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้สาร 92 (22 มิลลิกรัม, 93%)

20-Hydroxyecdysone 2-benzyl ether 3-(thiophene-2-carboxylate) (92). IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1}: 3468, 2968, 1713, 1662, 1527, 1454, 1418, 1372, 1259, 1219, 1171, 1101, 1027, 1002, 883, 746; ^{1}H NMR ดูตารางที่ 22; FABMS (-ve): m/z 719$[M-H]^-$ (4), 325(29), 255(38), 183(100), 127(37), 91(48).

Catalytic hydrogenolysis ของสาร 92

นำสาร 92 (14 มิลลิกรัม) มาขจัดหมู่เบนซิลโดยทำปฏิกิริยา catalytic hydrogenolysis ตามวิธีที่ใช้เตรียมสาร 73 จากสาร 84 และทำสารให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์โครมาโทรกราฟี ได้สารผลิตภัณฑ์ 86 (2 มิลลิกรัม, 17%)

20-Hydroxyecdysone 3-(thiophene 2-carboxylate) (86). ^{1}H NMR ดูตารางที่ 20

3) การเตรียมอนุพันธ์ Pyrrole-2-carboxylates ของ 20-hydroxyecdysone (2)

การสังเคราะห์ 20-Hydroxyecdysone 2-(pyrrole-2-carboxylate) (93)

ละลาย 20-Hydroxyecdysone (2) (82 มิลลิกรัม), DMAP (20 มิลลิกรัม) และ triethylamine (5 มิลลิลิตร) ใน dioxane (3 มิลลิลิตร) เติมสารละลายของ pyrrole-2-carboxylic acid anhydride ซึ่งเตรียมได้จากปฏิกิริยาระหว่าง pyrrole-2-carboxylic acid (250 มิลลิกรัม) กับ DCC (100 มิลลิกรัม) ใน dioxane

ตารางที่ 22. ^{1}H NMR data of compounds **91** and **92**

H	91	92
2	3.74 (*m*)	3.72 (*m*)
3	5.67 (*br d*)	5.65 (*br s*)
5	2.46 (*dd*, 13.5, 4.1)	2.44 (*dd*, 13.4, 3.9)
7	5.85 (*d*, 2.4)	5.83 (*d*, 2.2)
9	2.96 (*m*)	2.96 (*m*)
17	2.21 (*dd*, 9.4, 7.9)	2.31 (*t*, 9)
22	3.64 (*dd*, 9.1, 2.1)	3.41 (*d*, 10.1)
18-Me	0.79 (*s*)	0.84 (*s*)
19-Me	1.03 (*s*)	1.02 (*s*)
21-Me	1.16 (s)	1.19 (*s*)
26-Me	1.23 (*s*)	1.22 (*s*)
27-Me	1.24 (*s*)	1.23 (*s*)
3′	7.55 (*dd*, 5.1, 1.2)	7.54 (*dd*, 4.8, 1.1)
4′	7.09 (*dd*, 5.1, 3.6)	7.07 (*dd*, 4.8, 3.7)
5′	7.81 (*dd*, 3.6, 1.2)	7.79 (*dd*, 3.7, 1.1)
Acetonide Me	1.31, 1.40 (each *s*)	-
PhC$\underline{H}_2$O	4.47 (*d*, 11.8)	4.45 (*d*, 11.8)
	4.73 (*d*, 11.8)	4.71 (*d*, 11.8)
P$\underline{h}$CH$_2$O	7.25 (*m*)	7.25 (*m*)

Recorded in $CDCl_3$

(2 มิลลิลิตร) แล้วกรอง N,N-dicyclohexylurea ออกไป ทำการ reflux ส่วนผสมของปฏิกิริยาเป็นเวลา 1 วัน เติมน้ำลงในส่วนผสมปฏิกิริยา แล้วสกัดด้วย *n*-butanol (3x20 มิลลิลิตร) ล้างชั้น butanol ด้วยน้ำ แล้วระเหยตัวทำละลายออก โดยการกลั่นร่วมออกไปกับน้ำ ทำสารให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้สารผลิตภัณฑ์ 93 (32 มิลลิกรัม, 33%)

20-Hydroxyecdysone 2-(pyrrole-2-carboxylate) (93). IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3414, 2962, 1651, 1553, 1451, 1410, 1312, 1146, 1078, 1036, 993, 952, 882, 747; ^{1}H NMR ดูตารางที่ 23

การสังเคราะห์ 20-Hydroxyecdysone 2,3-acetonide 22-(pyrrole-2-carboxylate) (95)

นำสาร 75 (40 มิลลิกรัม) มาทำปฏิกิริยา esterification โดยใช้ pyrrole-2-carboxylic acid anhydride เช่นเดียวกับการเตรียมสาร 93 จาก 20-hydroxyecdysone (2) ได้สาร 95 (27 มิลลิกรัม, 55%)

20-Hydroxyecdysone 2,3-acetonide 22-(pyrrole-2-carboxylate) (95). IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3412, 2920, 1661, 1554, 1453, 1410, 1379, 1214, 1169, 1055, 953, 885, 755; ^{1}H NMR ดูตารางที่ 23

Acetonide deprotection ของ สาร 95

ละลาย acetonide 95 (18 มิลลิกรัม) ใน methanol (0.2 มิลลิลิตร) เติม 70% AcOH (0.5 มิลลิลิตร) แล้วคนสารละลายเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ $CHCl_3$-MeOH (93:7) เป็นตัวชะ ได้สารผลิตภัณฑ์ 94 (14 มิลลิกรัม, 83%)

20-Hydroxyecdysone 22-(pyrrole-2-carboxylate) (94). Amorphous, mp. 217-219 °C (from MeOH-EtOAc); IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3409, 2978, 1657, 1450, 1412, 1384, 1318, 1171, 1504, 953, 880, 844, 750; ^{1}H NMR ดูตารางที่ 23

งานวิจัยทางด้านการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ

1. การเพาะเลี้ยงหนอนแมลงวันบ้าน ใช้สายพันธุ์แมลงวันบ้านจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นำดักแด้ (pupae) มาเพาะเลี้ยงในกรงบุลาข่าย โดยวางดักแด้บนสำลีชื้น บรรจุชูโครสผสมนมในอัตราส่วน 2:5 ใส่ถ้วยไว้ในกรงเพื่อเลี้ยงแมลงวันที่ออกมาจากดักแด้ อีกถ้วยหนึ่งมีสำลีชุบน้ำเพื่อให้เกิดความชุ่มชื้น แมลงวันออกมาจากดักแด้ในระยะเวลา 3-5 วัน เมื่อเกิดเป็นแมลงวันแล้ว นำถ้วยที่มีปลาป่นที่ทำให้ชื้นแล้วใส่เข้าไปในกรง ในเวลาประมาณ 2 วันแมลงวันก็ออกไข่ไว้บนปลาป่น จากนั้นอีกภายในเวลา 24 ชั่วโมงไข่ฟักเป็นตัวอ่อน (larvae) นำตัวอ่อนมาเลี้ยงใน medium ซึ่งประกอบด้วยซีเรแลค รำข้าว อีสต์ และน้ำในสัดส่วนตามสูตรอาหารของตัวอ่อนแมลงวัน ผสมอาหารให้เข้ากันดีในถาดแล้วนำแกลบเติมลงไป นำตัวอ่อนมาใส่ลงในถาดที่เตรียมไว้นี้แล้วปิดทับด้วยแกลบ ในเวลา 5-7 วันตัวอ่อนหรือที่เรียกว่าหนอนแมลงวันก็เข้าดักแด้ เก็บดักแด้มาล้างน้ำแล้วเริ่มขั้นตอนแรกซ้ำอีก ทำเช่นนี้เรื่อยๆไปจน

ตารางที่ 23. ^{1}H NMR data of compounds 93 - 95

H	93*	94*	95#
2	5.53 (*m*)	4.18 (*m*)	4.21 (*m*)
3	4.43 (*m*)	4.23 (*br s*)	4.26 (*m*)
5	3.05 (*dd*, 13.1, 3.6)	3.00 (*dd*, 13.2, 3.5)	2.33 (*dd*, 12.5, 4.8)
7	6.25 (*d*, 1.8)	6.22 (*d*, 2.1)	5.83 (*d*, 2.7)
9	3.69 (*m*)	3.57 (*m*)	2.81 (*m*)
17	2.97 (*t*, 9.1)	3.04 (*t*, 8.8)	2.40 (*dd*, 9.1, 8.8)
22	3.86 (*br d*, 9.7)	5.72 (*dd*, 10.8, 2)	5.04 (*dd*, 10.8, 2)
18-Me	1.19 (*s*)	1.19 (*s*)	0.84 (*s*)
19-Me	1.06 (*s*)	1.06 (*s*)	0.96 (*s*)
21-Me	1.56 (*s*)	1.68 (*s*)	1.31 (*s*)*
26-Me	1.39 (*s*)	1.27 (*s*)	1.18 (*s*)
27-Me	1.39 (*s*)	1.27 (*s*)	1.20 (*s*)
1′	13.19 (*br s*)	13.18 (*br s*)	9.21 (*br s*)
3′	7.26 (*m*)	7.23 (*m*)	6.93 (*m*)
4′	6.36 (*m*)	6.37 (*m*)	6.27 (*m*)
5′	7.26 (*m*)	7.28 (*m*)	6.98 (*m*)
Acetonide Me	-	-	1.33 (*s*)*, 1.47 (*s*)

*Recorded in pyridine-d_5.

#Recorded in $CDCl_3$.

*Assigments may be reversed for signals with the same superscript.

ถึง generation ที่ 8 จึงนำมาใช้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้ หนอนแมลงวันที่นำมาผูกเพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้จะอยู่ในช่วงเวลา 5-7 วัน หรือเป็นช่วงเวลาที่หนอนอย่างน้อยประมาณ 10 % ได้เข้าดักแด้ไปแล้ว นำหนอนแมลงวันมาล้างด้วยน้ำแล้วซับน้ำออก จากนั้นจึงผูกด้วยด้ายที่ทำจากฝ้ายตรงปล้องที่ 7 หรือปล้องที่ 8 จากทางด้านหัว เพื่อไม่ให้เอคไดสเตียรอยด์ที่ถูกสร้างจากด้านหัวถูกส่งมาเลี้ยงทางด้านท้อง ก่อนใช้ด้ายให้ล้างด้วยสารละลาย 1% sodium hypochlorite นำหนอนแมลงวันที่ผูกแล้วมาวางบนกระดาษทิชชูที่ทำให้ชื้นแล้วเล็กน้อยเพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำจากตัวหนอน ในระยะเวลา 24 ชั่วโมงถัดมา ทางด้านหัวของหนอนที่ผูกไว้ก็เริ่มแสดงความเป็นดักแด้ (puparia) แต่ทางส่วนท้องยังคงอยู่ในสภาวะของตัวอ่อน ทำการคัดเฉพาะตัวหนอนที่อยู่ในสภาพพร้อมที่จะทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยแยกมาเก็บไว้อีก ประมาณ 5 ถึง 6 ชั่วโมง

2. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพใช้วิธีการของ Kaplanis และคณะ[35] ใช้หนอนแมลงวันที่ผูกและเข้าดักแด้เฉพาะส่วนหัวจำนวน 10 ตัวในแต่ละความเข้มข้นของสารละลายเอคไดสเตียรอยด์ที่ทำการทดสอบ โดยแต่ละตัวได้รับการฉีดสารละลาย 3 ไมโครลิตร ใช้ 20-hydroxyecdysone (2) และน้ำกลั่นเป็น positive และ negative control ตามลำดับ หากสารไม่ละลายในน้ำกลั่น ให้ใช้ aq EtOH (ไม่เกิน 20%) หรือ aq. emulsion ของ Tween 80 แล้วแต่กรณี การให้ score ของผลการทดสอบใช้วิธีการของ Ohtaki และคณะ[36] กล่าวคือ การเกิดการเข้าดักแด้ของส่วนท้องที่ฉีดสารละลายสำหรับการทดสอบเป็น complete, marked, slight หรือไม่เกิดการเข้าดักแด้เลย (none) ให้ score เป็น 100, 75, 50 และ 0% ตามลำดับ

นำสารที่สกัดแยกได้และที่สังเคราะห์ได้มาทดสอบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบ (ดูตารางที่ 24 ถึง 32)

ตารางที่ 24. *Musca* bioassay of compounds 24 and 25

Compound	Conc µg/3µl	Amount	Number pupariation						%Effectiveness
			Complete	Marked	Slight	None	Dead	Surviving	
20-Hydroxyecdysone (2)*	0.025	10	2	-	6	1	1	9	55.5
	0.05	10	8	1	1	-	1	10	92.5
	0.10	10	10	-	-	-	-	10	100
Distilled water	-	10	-	-	-	10	-	10	0
24-*epi*-Abutasterone (24)*	0.05	10	-	-	-	6	4	6	0
	0.10	10	-	-	-	9	1	9	0
	0.25	10	5	-	-	4	1	9	55.5
	1.00	10	8	2	-	-	-	10	95
Abutasterone (25)*	0.05	10	-	-	-	8	2	8	0
	0.10	10	-	-	-	10	-	10	0
	0.25	10	4	2	1	3	-	10	60.0
	1.00	10	8	-	-	-	2	8	100

* dissolved in 16% aqueous ethanol.

ตารางที่ 25. *Musca* bioassay of two epimeric 20,26-dihydroxyecdysone (28)

Compound	Conc µg/3µl	Amount	Number pupariation						%Effectiveness
			Complete	Marked	Slight	None	Dead	Surviving	
20-Hydroxyecdysone(2)	0.025	10	2	-	6	1	1	9	55.5
	0.05	10	8	1	1	-	1	9	92.5
Distilled water	0.10	10	10	-	-	-	-	10	100
	-	10	-	-	-	10	-	10	0
28 "Epimer 1"[b]									
	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.10	10	1	2	-	7	-	10	25.0
	0.25	10	6	-	-	4	-	10	60.0
	1.00	10	7	-	-	-	3	7	100
28 "Epimer 2"[b]	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.10	10	5	2	1	1	1	9	77.8
	0.25	10	8	-	-	-	2	8	100
	1.00	10	9	-	-	-	1	9	100

[b] dissolved in distilled H_2O.

ตารางที่ 26. *Musca* bioassay of compounds 26 and 27

Compound	Conc µg/3µl	Amount	Number pupariation						%Effectiveness
			Complete	Marked	Slight	None	Dead	Surviving	
Pterosterone (26)*	0.05	10	-	-	-	9	1	9	0
	0.10	10	2	1	1	5	1	9	36.1
	0.175	10	5	2	-	2	1	9	72.2
	0.25	10	7	2	1	-	-	10	90.0
	0.50	10	10	-	-	-	-	10	100
24-*epi*-Pterosterone (27)*	0.05	10	-	-	-	9	1	9	0
	0.10	10	-	-	-	9	1	9	0
	0.175	10	-	-	-	9	1	9	0
	0.25	10	-	-	-	10	-	10	0
	0.50	10	1	-	3	6	-	10	25.0
	1.00	10	2	-	3	-	5	5	70.0

* dissolved in 16% aqueous ethanol.

ตารางที่ 27. *Musca* bioassay of inokosterone (14) "epimer 1" and 14 "epimer 2"

Compound	Conc µg/3µl	Amount	Number pupariation						%Effectiveness
			Complete	Marked	Slight	None	Dead	Surviving	
Inokosterone (14)* "epimer 1"	0.025	10	-	-	2	7	1	9	11.1
	0.05	10	6	-	2	2	-	10	70.0
	0.10	10	10	-	-	-	-	10	100
	0.175	10	9	-	-	-	1	9	100
	0.25	10	8	-	-	-	2	8	100
	0.50	10	10	-	-	-	-	10	100
Inokosterone (14)* "epimer 2"	0.05	10	1	-	-	9	-	10	10.0
	0.10	10	3	2	-	4	1	9	50.0
	0.175	10	4	1	1	3	1	9	58.3
	0.25	10	6	-	1	2	1	9	72.2
	0.50	10	9	-	-	-	1	9	100

* dissolved in 16% aqueous ethanol.

ตารางที่ 28. *Musca* bioassay of compounds 59 and 60 mixture, compounds 61 and 62

Compound	Conc µg/0.1µl	Amount	Number population						%Effectiveness
			Complete	Marked	Slight	None	Dead	Surviving	
20-Hydroxyecdysone[a]	0.01	10	-	1	1	8	-	10	12.5
	0.025	10	4	1	2	3	-	10	62.5
	0.05	10	8	1	1	-	-	10	92.5
	0.100	10	10	-	-	-	-	10	100
	0.250	10	10	-	-	-	-	10	100
59+60 mixture[a]	0.05	10	-	-	-	10	-	10	0
	0.10	10	2	-	3	5	-	10	33.0
	0.175	10	3	2	1	3	1	9	55.5
	0.25	10	6	1	-	2	0	10	72.5
Compound 61[a]	0.05	10	-	-	-	10	-	10	0
	0.10	10	-	-	-	9	1	9	0
	0.175	10	-	-	-	10	-	10	0
	0.25	10	-	1	1	8	-	10	12.5
	0.50	10	3	1	1	5	-	10	42.5
	0.75	10	6	1	1	2	-	10	72.5
	1.00	10	8	-	1	1	-	10	85.0
Compound 62[a]	0.05	10	-	-	-	10	-	10	0
	0.10	10	-	1	-	9	-	10	7.5
	0.175	10	1	-	-	9	-	10	10.0
	0.25	10	-	2	2	6	-	10	25.0
	0.50	10	8	2	-	2	-	10	75.0

[a] dissolved in 16% aqueous ethanol.

ตารางที่ 29. *Musca* bioassay of compounds 67, 69, 70 and 71

Compound	Conc µg/µl	Amount	Number population						%Effectiveness
			Complete	Marked	Slight	None	Dead	Surviving	
5α-20-Hydroxyecdysone 6-oxime anti C7 (69)[C]	0.10	10	-	-	1	8	1	9	4.5
	0.175	10	4	1	-	4	1	9	52.7
	0.25	10	9	-	1	-	-	10	95
	0.50	10	10	-	-	-	-	10	100
	1.000	10	10	-	-	-	-	10	100
20-Hydroxyecdysone 6-oxime syn C7 (67)[C]	0.05	10	-	-	-	8	2	8	0
	0.10	10	4	1	-	5	-	10	47.5
	0.25	10	10	-	-	-	-	10	100
	1.00	10	9	-	-	-	1	9	100
20-Hydroxyecdysone 6-O-methoxime anti C7 (70)[C]	0.05	10	-	-	-	10	-	10	0
	0.10	10	-	-	-	10	-	10	0
	0.25	10	-	-	-	9	1	9	0
	1.00	10	-	-	-	9	1	9	0
	10.00	10	1	-	-	6	3	6	16.6
20-Hydroxyecdysone 6-O-methoxime syn C7 (71)[C]	0.05	10	-	-	-	10	-	10	0
	0.10	10	-	-	-	10	-	10	0
	0.25	10	1	1	3	5	-	10	32.5
	1.00	10	10	-	-	-	-	10	100

[C] Dissolved in Tween 80.

ตารางที่ 30. *Musca* bioassay of compounds 72 -74 and 77

Compound	Conc µg/3µl	Amount	Number population						%Effectiveness
			Complete	Marked	Slight	None	Dead	Surviving	
Mixture of 20-hydroxy ecdysone 2-(furan-2-carboxylate (72) and 3-(furan-2- carboxylate) (73)[a]	0.10	15	1	2	-	9	3	12	20.8
	0.25	15	7	-	1	3	4	11	68.2
	1.00	15	10	-	-	-	5	10	100
	10.00	15	10	-	-	-	5	10	100
20-Hydroxyecdysone 3-(furan-2-carboxylate (73)[a]	0.05	10	3	1	1	4	1	9	47.0
	0.10	10	6	2	1	1	-	10	80.0
	0.25	10	8	1	1	-	-	10	92.5
	1.00	10	9	1	-	-	-	10	97.5
20-Hydroxyecdysone 22-(furan-2-carboxylate) (74)[a]	0.025	10	-	-	-	10	-	10	0
	0.05	10	-	-	5	5	-	10	25.0
	0.10	10	2	5	3	-	-	10	72.5
	0.175	10	6	4	-	-	-	10	90.0
	0.25	10	10	-	-	-	-	10	100
20-Hydroxyecdysone 25-(furan-2-carboxylate) (77)[a]	0.025	10	-	-	-	10	-	10	0
	0.05	10	2	-	2	6	-	10	30.0
	0.10	10	2	1	2	5	-	10	37.5
	0.25	10	10	-	-	-	-	10	100

[a] dissolved in 10% aqueous ethanol.

ตารางที่ 31. *Musca* bioassay of compounds 85, 87, and 89

Compound	Conc µg/3µl	Amount	Number pupariation						%Effectiveness
			Complete	Marked	Slight	None	Dead	Surviving	
20-hydroxyecdysone	0.10	10	1	1	2	6	0	10	27.5
2-(thiophene-2-	0.25	10	3	3	0	2	2	8	65.6
carboxylate (85)*	1.00	10	4	3	0	1	2	8	78.1
20-Hydroxyecdysone	0.05	10	-	-	-	10	0	10	0
22-(thiophene-2-	0.10	10	-	-	-	7	3	7	0
carboxylate (87)*	0.25	10	4	1	-	3	2	8	59.4
	1.00	10	7	-	-	-	3	7	100
20-Hydroxyecdysone	0.05	10	3	-	-	6	1	9	33.0
25-(thiophene-2-	0.10	10	4	1	1	3	1	9	58.3
carboxylate (89)*	0.25	10	8	-	1	1	1	9	88.9

* dissolved in 16% aqueous ethanol.

ตารางที่ 32. *Musca* bioassay of compounds 93 and 94

Compound	Conc µg/3µl	Amount	Number puparistion						%Effectiveness
			Complete	Marked	Slight	None	Dead	Surviving	
20-Hydroxyecdysone 2-(pyrrole-2-carboxylate (93)[a]	0.01	10	-	-	-	9	1	9	0
	0.025	10	5	2	2	1	-	10	75.0
	0.050	10	9	1	1	-	-	10	97.5
	0.100	10	10	-	-	-	-	10	100
	0.250	10	10	-	-	-	-	10	100
	1.000	10	10	-	-	-	-	10	100
20-Hydroxyecdysone 22-(pyrrole-2-carboxylate (94)[a]	0.01	10	1	1	1	5	2	8	28.0
	0.025	10	5	2	2	1	1	10	75.0
	0.050	10	8	1	1	-	-	10	92.5
	0.100	10	9	-	1	-	-	10	95.0
	0.250	10	9	-	-	-	1	9	100
	1.000	10	10	-	-	-	-	10	100

[a] dissolved in 16% aqueous ethanol

เอกสารอ้างอิง

1) R. Lafont and I. D. Wilson, *The Ecdysone Handbook*, The Chromatographic Society, Nottingham, 1992.

2) R. Lafont, *Insect Biochem.*, 1991, **21**, 697.

3) A. Butenandt and P. Karlson, *Z. Naturforsch.*, 1954, **9b**, 389.

4) D. H. S. Horn, E. J. Middleton, J. A. Wunderlich and F. Hamshire, *Chem. Commun.*, 1966, 339.

5) K. Nakanishi, M. Koreeda, S. Sasaki, M. L. Chang and H. Y. Hsu, *Chem. Commun.*, 1966, 915.

6) T. Takemoto, S. Ogawa and N. Nishimoto, *Yakugaku Zasshi*, 1967, **87**, 325.

7) F. Camps, Plant Ecdysteroids and Their Interaction with Insects.In *Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids*, J. B. Harborne and F. A. Tomas-Baberan, eds., Claredon Press, Oxford, 1991, pp. 331-376.

8) A. Suksamrarn and C. Sommechai, *Phytochemistry*, 1993, **32**, 303.

9) A. Suksamrarn, C. Sommechai, P. Charulpong and B. Chitkul, *Phytochemistry*, 1995, **38**, 473.

10) J.-F. Modde, R. Lafont and J. A. Hoffmann, *Int. J. Invert. Reprod. Devel.*, 1984, **7**, 161.

11) M. Garcia, J.-P. Girault and R. Lafont, *Int. J. Invert. Reprod. Devel.*, 1986, **9**, 43.

12) K. Werawattanametin, V. Podimuang and A. Suksamrarn, *J. Nat. Prod.*, 1986, **49**, 365.

13) R. Bergamasco anf D. H. S. Horn, The Biological Activities of Ecdysteroids and Analogues. In *Progress in Ecdysone Research*, J. A. Hoffmann, ed., Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1980, pp. 299-324.

14) W. E. Robbins, J. N. Kaplanis, M. J. Thompsom, T. J. Shortino and S. C. Joyner, *Steroids*, 1970, **16**, 105.

15) A. Suksamrarn, P. Ganpinyo and C. Sommechai, *Tetrahedron Lett.*, 1994, **35**, 4445.

16) M. N. Galbraith and D. H. S. Horn, *Aust. J. Chem.*, 1969, **22**, 1045.

17) A. Suksamrarn and P. Pattanaprateep, *Tetrahedron*, 1995, **51**, 10633.

18) K.-D. Spindler, J. Koolman, F. Mosora and H. Emmerlich, *J. Insect Physiol.*, 1977, **23**, 441.

19) J. G. Lloyd-Jones H. H. Rees and T. W. Goodwin, *Phytochemistry*, 1973, **12**, 569.

20) J. B. Siddall, D. H. S. Horn and E. J. Middleton, *Chem. Commun.*, 1967, 899.

21) Q. R. Petersen, R. C. Cambie and G. B. Russell, *Aust. J. Chem.*, 1993, **46**, 1961.

22) T. G. Davies, W. J. S. Lockley, R. Boid, H. H. Rees and T. W. Goodwin, *Biochem. J.*, 1980, **190**, 537.

23) D. R. Greenwood, L. N. Dinan and H. H. Rees, *Biochem. J.*, 1984, **217**, 783.

24) J.-P. Girault, C. Blais, P. Beydon, C. Rolando and R. Lafont, *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 1989, **10**, 199.

25) L. Dinan and H. H. Rees, *Steroids*, 1978, **32**, 629.

26) M. N. Galbraith, D. H. S. Horn, E. J. Middleton and R. J. Hackney, *Aust. J. Chem.*, 1969, **22**, 1517.

27) U. Hedtmann, R. Klintz, K. Hobert, J. Frelek, I. Vlahov and P. Welzei, *Tetrahedron*, 1991, **23**, 3753.

28) P. Cherbas, D. A. Trainor, R. J. Stonard and K. Nakanishi, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1982, 1307.

29) S. S. Lee, K. Nakanishi and P. Cherbas, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1991, 51.

30) J. Tomas, F. Camps, J. Coll, E. Mele and N. Pascual, *Tetrahedron*, 1992, **48**, 9809.

31) M. N. Galbraith, D. H. S. Horn, E. J. Middleton, R. J. Hackney, *Aust. J. Chem.*, 1969, **22**, 1059.

32) T. Kametani, M. Tsubuki, K. Higurashi and T. Honda, *J. Org. Chem.*, 1986, **51**, 2932.

33) A. Suksamrarn and B. Yingyongnarongkul, *Tetrahedron*, 1996, **52**, 12623.

34) A. Suksamrarn and B. Yingyongnarongkul, *Tetrahedron*, 1997, **53**, 3145.

35) A. Suksamrarn, S. Charoensuk and B. Yingyongnarongkul, *Tetrahedron*, 1996, **52**, 10673.

36) J. B. Siddall, J. P. Marshall, A. Bowers, A. D. Cross, J. A. Edwards and J. H. Fried, *J. Am. Chem. Soc.*, 1966, **88**, 862.

37) H. Mori, K. Shibata, K. Tsuneda and M. Sawai, *Chem. Pharm. Bull. (Japan)*, 1968, **16**, 563.

38) A. Furlenmeier, A. Furst, A. Langemann, Waldvogel, P. Hocks, U. Kerb and R. Wiechert, *Helv. Chim. Acta*, 1967, **50**, 2387.

39) D. H. R. Barton, P. G. Feakins, J. P. Poyser and P. G. Sammes, *J. Chem. Soc. (C)*, 1970, 1584.

40) S. Ogawa, N. Nishimoto, N. Okamoto and T. Takemoto, *Yakugaku Zasshi*, 1971, **91**, 916.

41) R. W. Miller, J. Clardy, J. Kozlowski, K. L. Mikolajczak, R. D. Plattner, R. G. Powell, C. R. Smith, D. Weisleder and Z. Qi-Tai, *Planta Med.*, 1985, 40.

42) P. Maurer, J.-P. Girault, M. Larcheveque and R. Lafont, *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 1993, **23**, 29.

43) H. Hikino, T. Okuyama, S. Arihara, Y. Hikino, T. Takemoto, H. Mori and K. Shibata *Chem. Pharm. Bull.*, 1975, **23**, 1458.

44) P. G. Roussel, N. J. Turner and L. N. Dinan, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1995, 933.

45) L. Canonica, B. Danieli, G. Ferrari, J. Krepinsky and G. Rainoldi, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1973, 737.

46) M. Zhang, M. J. Stout and I. Kubo, *Phytochemistry*, 1992, **31**, 247.

47) J. Coll, N. Reixach, F. Sanchez-Baeza, J. Casas and F. Camps, *Tetrahedron*, 1994, **50**, 7247.

48) N. Nishimoto, Y. Shiobara, F. Masumi, S. Inoue, T. Takemoto, F. Oliveira, G. Akisue, M. K. Akisue, G. Hashimoto, O. Tanaka, R. Kasai and H. Matsura, *Phytochemistry*, 1987, **26**, 2505.

49) S. Ohta, J. R. Guo, Y. Hiraga and T. Suga, *Phytochemistry*, 1996, **41**, 745.

50) J.-P. Girault, M. Bathori, E. Varga, K. Szendrei and R. Lafont, *J. Nat. Prod.*, 1990, **53**, 279.

51) M. J. Thompson, J. N. Kaplanis, W. E. Robbins and R. T. Yamamoto, *Chem. Commun.*, 1967, 650.

52) M. N. Galbraith, D. H. S. Horn, E. J. Middleton, J. N. Kaplanis and M. J. Thompson, *Experientia*, 1973, **29**, 782.

53) M. B. Pinheiro, W. W. Filho, A. I. Rocha, B. Porter and E. Wenkert, *Phytochemistry*, 1983, **22**, 2320.

54) H. C. Kolb, M. S. VanNieuwenhze and K. B. Sharpless, *Chem. Rev.*, 1994, **94**, 2483.

55) J. N. Kaplanis, L. T. Tabor, M. J. Thompson, W. E. Robbins and T. J. Shortino, *Steroids*, 1966, **8**, 625.

56) T. Ohtaki, R. D. Milkman and C. M. Williams, *Proc. Nat Acad. Sci. USA*, 1967, **58**, 981.

57) H. Rimpler, *Tetrahedron Lett.*, 1969, 329.

58) T. Takemoto, S. Arihara, Y. Hikino and H. Hikino, *Tetrahedron Lett.*, 1968, 375.

59) B. Yingyongnarongkul and A. Suksamrarn, *Tetrahedron*, 1998, **54**, 2795.

60) A. Suksamrarn, B. Yingyongnarongkul and N. Promrangsan, *Tetrahedron*, 1998, **54**, 14565.

61) M. B. Smith, *Organic Synthesis*, McGraw-Hill, Singapore, 1994, p. 425.

62) A. Suksamrarn, B. Yingyongnarongkul and S. Charoensuk, *Tetrahedron*, 1999, **55**, 255.

63) T. Takemoto, Y. Hikino, S. Arihara, H. Hikino, S. Ogava and N. Nishimoto, *Tetrahedron Lett.*, 1968, 2475.

64) H. Hikino, K. Mohri, Y. Hikino, S. Arihara, T. Takemoto, H. Mori, and K. Shibata, *Tetrahedron*, 1976, **32**, 3015.

65) M. J. Thompson, J. N. Kaplanis, W. E. Robbins, S. R. Dutky and H. N. Nigg, *Steroids*, 1974, **24**, 359.

66) A. Suksamrarn and B. Yingyongnarongkul, *Tetrahedron*, 1997, **53**, 3145.

ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์

ผลงานวิจัยจากโครงการวิจัยนี้ที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ มีดังนี้

1. การสกัดแยกและหาสูตรโครงสร้างเอคไดสเตียรอยด์ จากเปลือกรากของต้นผ่าเสี้ยน เป็นงานชิ้นแรกของโครงการ เริ่มงานเมื่อส่งแบบเสนอโครงการให้สกว. พิจารณาไปแล้วประมาณ 2 เดือน สามารถแยกเอคไดสเตียรอยด์ได้ 6 ชนิด คือ 20-hydroxyecdysone, 24-*epi*-makisterone A, shidasterone, calonysterone, turkesterone และ 24-*epi*-abutasterone โดยเอคไดสเตียรอยด์ชนิดสุดท้ายเป็นชนิดใหม่

A. Suksamrarn, N. Promrangsan, B. Chitkul, S. Homvisasevongsa and A. Sirikate, "Ecdysteroids of the root bark of *Vitex canescens*", *Phytochemistry*, 1997, 45, 1149.

2. การสังเคราะห์ปรับเปลี่ยนเอคไดสเตียรอยด์: การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่สายโซ่ด้านข้างของเอคไดสเตียรอยด์ ได้สังเคราะห์ 24-*epi*-abutasterone ซึ่งเป็นเอคไดสเตียรอยด์ที่หายากและเพิ่งพบเป็นครั้งแรกจากเปลือกรากของต้นผ่าเสี้ยนโดยกลุ่มนักวิจัยของเรา นอกจากนี้ยังสามารถสังเคราะห์ abutasterone และ stachysterone C ซึ่งเป็นเอคไดสเตียรอยด์อีกสองชนิด ทำให้สามารถมีเอคไดสเตียรอยด์ไปทดสอบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบของแมลง ในการสังเคราะห์ ยังได้หาวิธีสังเคราะห์ 24-*epi*-abutasterone อย่าง stereoselective ด้วย

B. Yingyongnarongkul and A. Suksamrarn, "Asymmetric dihydroxylation of stachysterone C: Stereoselective synthesis of 24-*epi*-abutasterone", *Tetrahedron*, 1998, 54, 2795.

3. การแยก 20,26-Dihydroxyecdysone จากพืชสกุล *Vitex* การแยก สอง C-25 epimers ออกจากกัน และการสังเคราะห์ 20,26-Dihydroxyecdysone ทั้งสอง epimers ได้แยก 20,26-dihydroxyecdysone ซึ่งเป็นเอคไดสเตียรอยด์ที่หายากจากพืชสกุล *Vitex* และเป็นครั้งแรกที่สามารถแยกสอง C-25 epimers ออกจากกัน และได้สังเคราะห์ 20,26-Dihydroxyecdysone ทั้งสอง epimers ทำให้สามารถศึกษาข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีและทดสอบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบของแต่ละ epimer ได้

A. Suksamrarn, B. Yingyongnarongkul and N. Promrangsan, "Naturally occurring 20,26-dihydroxyecdysone exists as two C-25 epimers and exhibit different degrees of moulting hormone activity", *Tetrahedron*, 1998, 54, 14565.

4. การสังเคราะห์ 24-*epi*-Pterosterone อย่าง regioselective ได้ทำการสังเคราะห์ 24-*epi*-pterosterone ซึ่งเป็นเอคไดสเตียรอยด์ที่หายากอีกชนิดหนึ่ง อย่าง regioselective เป็นผลสำเร็จ ทำให้มีเอคไดสเตียรอยด์สำหรับศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพได้

A. Suksamram, B. Yingyongnarongkul and S. Charoensuk, "Regioselective synthesis of 24-*epi*-pterosterone", *Tetrahedron*, 1999, 55, 255.

5. การสกัดแยกและหาสูตรโครงสร้างเอคไดสเตียรอยด์ที่มีขั้วสูงมาก จากเปลือกรากของต้นผ่าเสี้ยน ได้แยกเอคไดสเตียรอยด์ที่มีขั้วสูงมากจากเปลือกรากต้นผ่าเสี้ยนได้ 3 ชนิดคือ 24*R*-11α,20,24-trihydroxyecdysone, 11α,20,26-trihydroxyecdysone โดยชนิดหลังนี้มีสอง C-25 epimers เป็นเอคไดสเตียรอยด์ใหม่ทั้ง 3 ชนิด และมีหมู่ไฮดรอกซิลอยู่ในโมเลกุลถึง 8 หมู่

A. Suksamram, N. Promrangsan and A. Jintasirikul, "Highly oxygenated ecdysteroids from *Vitex canescens* root bark", *Phytochemistry*, 1999, in press.

6. การสังเคราะห์ แยก C-25 epimers และทดสอบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบของ Inokosterone ซึ่งเป็นเอคไดสเตียรอยด์ที่หายากชนิดหนึ่ง การสังเคราะห์ครั้งนี้ ทำให้ได้ inokosterone ทั้งสอง epimers ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ และเป็นครั้งแรกที่สามารถแยก inokosterone ออกเป็นสอง C-25 epimers

B. Yingyongnarongkul and A. Suksamram, "Biological activity of 25-deoxyecdysteroids: synthesis and moulting hormone activity of two C-25 epimers of inokosterone", *ScienceAsia*, submitted.

ผลงานวิจัยที่กำลังเขียนหรือคาดว่าจะเขียนส่งไปตีพิมพ์

จากการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันในโครงสร้างหลักคือที่วง A และวง B ของเอคไดสเตียรอยด์ นำไปสู่การสังเคราะห์และการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร 2 กลุ่ม คือ

1) การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่วง A และ B นำไปสู่การเปลี่ยน oxygen function ที่ตำแหน่ง 3 ของวง A และตำแหน่ง 6 ของวง B ไปเป็น oximes และ methoximes พบว่าให้ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ ขณะนี้ (ปลายธันวาคม 2542) กำลังพิจารณาว่า จะเขียน manuscript ที่เน้นการเป็นฮอร์โมนลอกคราบที่เปลี่ยนแปลงไป เมื่อปรับเปลี่ยนโครงสร้างที่วง A และวง B หรือนำงานอื่นที่มีผล

รายการ Scheme

	หน้า
Scheme 1	29
Scheme 2	31
Scheme 3	33

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเช่นเดียวกันมารวมเข้าด้วยกัน เพื่อเขียน paper ที่ดีขึ้น ชื่อเรื่องของ paper ยังไม่ได้ตั้งไว้ อาจจะเป็นแนวคล้ายกับชื่อดังต่อไปนี้

A. Suksamrarn, W. Kuruthamajaru and P. Pattanaprateep "Moulting hormone activity of modified A and B rings of ecdysteroids", *Arch. Insect Biochem. Physiol.* (หรือวารสารอื่นที่เน้น biological activity)

2) การเตรียมอนุพันธ์ของหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งต่างๆ ในโมเลกุล ได้เตรียม heterocyclic esters ระหว่างเอคไดสเตียรอยด์คือ 20-hydroxyecdysone กับ furan-2-carboxylic acid, thiophene-2-carboxylic acid และ pyrrole-2-carboxylic acid โดยให้เกิดเอสเทอร์ที่ตำแหน่ง 2 และ 22 ของเอคไดสเตียรอยด์ และส่วนใหญ่เตรียมเอสเทอร์ที่ตำแหน่ง 3 และ 25 ของเอคไดสเตียรอยด์ด้วย ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของการเป็นฮอร์โมนลอกคราบน่าสนใจมาก กล่าวคืออนุพันธ์เอสเทอร์หลายชนิดยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงอยู่ ทั้งๆที่ผลการทดสอบในอดีตที่มีผู้อื่นรายงานพบว่า อนุพันธ์อะซีเตดจะต่ำลงกว่า parent ecdysteroids แต่ที่เราพบนี้แตกต่างจากที่คาดไว้ ที่สำคัญคือ heterocyclic esters บางชนิดที่เตรียมได้ มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงกว่า parent ecdysteroid ด้วยซ้ำไป ฉะนั้นเมื่อเขียน paper แล้วน่าจะไม่มีปัญหาในการได้รับการตีพิมพ์ ขณะนี้กำลังร่าง manuscript โดยอาจนำข้อมูลบางส่วนที่เป็น unpublished results ที่เสริมกันมาร่วมด้วย paper จะมีชื่อคล้ายคลึงกับที่เขียนไว้ดังนี้

A. Suksamrarn, T. Tanachatchairatana, P. Pattanaprateep and B. Yingyongnarongkul, "Synthesis and Biological activity of ester derivatives of ecdysteroids: unexpected degrees of moulting hormone activity of some heterocyclic esters", *Steroids* หรือ *Arch. Insect Biochem. Physiol.* หรือ วารสารอื่นในแนวเดียวกัน

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยส่วนหนึ่งที่ในตัวของเนื้องานเองยังไม่เพียงพอที่จะเขียนเป็นผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ แต่จะรอรวมกับงานแนวเดียวกันนี้ในโอกาสต่อไป