

รายงานการวิจัย

ทุนวิจัยองค์ความรู้ใหม่ที่เป็นพื้นฐานต่อการพัฒนา

เรื่อง

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ทางชีวภาพของ
ฮอร์โมนลอกคราบแมลง

STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP STUDY OF
INSECT MOULTING HORMONES

หัวหน้าโครงการ

นายอภิชาติ สุขสำราญ

ผู้ร่วมวิจัย

พญ.อุบลเอก บึงทองมงคลกุล และนายประเสริฐ พัฒนประทีป

1 มกราคม 2540 - 31 ธันวาคม 2542

สัญญาเลขที่ BRG/06/2540

รายงานการวิจัย

ทุนวิจัยองค์ความรู้ใหม่ที่เป็นพื้นฐานต่อการพัฒนา

เรื่อง

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ทางชีวภาพของ
ฮอร์โมนลอกกราบแมลง

STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP STUDY OF
INSECT MOULTING HORMONES

หัวหน้าโครงการ

นายอภิชาติ สุขสำราญ

ผู้ร่วมวิจัย

นายบุญเอก ยิ่งยงณรงค์กุล และนายประเสริฐ พัฒนาประทีป

1 มกราคม 2540 - 31 ธันวาคม 2542

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณอาจารย์ถิรวิธ เจริญสุข คุณนารถ พรหมรังสรรค์ คุณณนิต ษณะฉัตรชัยรัตน์ คุณสุรีย์พร หอมวิเศษวงศา คุณวราวุธ คุรุธรรมจารุ และคุณเสาวณีย์ คำพันธ์ ที่ได้ช่วยร่วมมือในการทำวิจัยด้วยความซื่อสัตย์และตั้งใจ จนงานวิจัยสำเร็จลงได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ ดร.บงกช ธารชมพู และคุณอำนวย จินตศิริกุล ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ คุณวรรณมา ศรีวินทร์นุช และคุณวรรณวิมล ทับดี ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ช่วยบันทึกข้อมูลทางนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี ขอขอบคุณคุณณิธิรัตน์ ฉิมน้อย สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ที่ได้ช่วยบันทึกข้อมูลทางแมสสเปกโตรเมตรี หากปราศจากบุคคลที่กล่าวนามมาข้างต้นนี้ งานวิจัยจะไม่สามารถสำเร็จตามจุดมุ่งหมายได้

ขอขอบคุณ คุณปรางณี ปรีชา ที่ช่วยเก็บตัวอย่างพืชสำหรับงานวิจัย และขอขอบคุณอาจารย์และเจ้าหน้าที่ของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหงที่ช่วยเหลือในด้านต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

บทคัดย่อ

ได้มีการแยกเอคโคสเตียรอยด์ชนิดใหม่จากเปลือกรากของ *Vitex canescens* คือ 24-*epi*-abutasterone, (24R)-11 α ,20,24-trihydroxyecdysone และ 11 α ,20,26-trihydroxyecdysone โดยสองชนิดหลังเป็นเอคโคสเตียรอยด์ที่มีขั้วสูงมาก คือมีหมู่ไฮดรอกซิลถึง 8 หมู่อยู่ในโมเลกุล และเอคโคสเตียรอยด์ชนิดหลังสุดมีอยู่เป็นสอง C-25 epimers นอกจากนี้ยังได้แยกเอคโคสเตียรอยด์ที่ทราบโครงสร้างมาก่อนแล้ว 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*

ได้มีการสังเคราะห์เอคโคสเตียรอยด์ชนิดใหม่หรือหาซากเพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยใช้ 20-ECD เป็นสารตั้งต้น จาก 20-ECD ได้มีการเตรียม stachysterone C ซึ่งเป็นเอคโคสเตียรอยด์ที่หาซาก 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 เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบของเอคโคสเตียรอยด์ 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 แสดงว่าสเตอริโอเคมีของตำแหน่ง 24 ของเอคโคสเตียรอยด์มีบทบาทสำคัญต่อการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้พบว่าฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบของ 3- และ 6-oximes และ methoximes

น่าสนใจมาก ซึ่งจะทำให้ทราบข้อมูลเกี่ยวกับการยึดเกาะของเอคโคสเตียรอยด์ กับ receptor ของแมลง
ได้ดียิ่งขึ้น ส่วน heterocyclic esters ของเอคโคสเตียรอยด์ก็แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ สารส่วน
ใหญ่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่สูงกว่าอะซิเตตหรือ acyl esters อื่นๆ ผลที่ได้มีคุณค่าต่อการศึกษาความ
สัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ทางชีวภาพมาก

ABSTRACT

A number of novel ecdysteroids, 24-*epi*-abutasterone, (24R)-11 α ,20,24-trihydroxyecdysone and 11 α ,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 ecdysteroid 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
การสกัดแยกและหาสูตร โครงสร้างของเอคไดสเตียรอยด์จากพืช	10
24- <i>epi</i> -Abutasterone และเอคไดสเตียรอยด์อื่นๆ	10
การสกัดแยก 20,26-Dihydroxyecdysone และการศึกษา C-25 epimer	10
การสกัดแยก Pterosterone (26) จากเปลือกต้น <i>Vitex glabrata</i>	13
การสกัดแยกเอคไดสเตียรอยด์ที่มีขั้วสูงจากเปลือกรากของ <i>Vitex canesens</i>	15
การสกัดเอคไดสเตียรอยด์เพื่อใช้ในการสังเคราะห์	15
การสังเคราะห์เพื่อปรับเปลี่ยนเอคไดสเตียรอยด์	18
การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่สายโซ่ด้านข้างของเอคไดสเตียรอยด์	18
การสังเคราะห์ 24- <i>epi</i> -Abutasterone (24) และ Abutasterone (25)	19
การสังเคราะห์ 20,26-Dihydroxyecdysone (28) ทั้งสอง C-25 epimers	22
การสังเคราะห์ 24- <i>epi</i> -Pterosterone (27) อย่าง regioselective	28
การสังเคราะห์ Inokosterone (14) และการแยก C-25 epimers ออกจากกัน	30
การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันในโครงสร้างหลักของเอคไดสเตียรอยด์	32
การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่วง A	32

	หน้า
การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่วง B	36
การปรับเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งต่างๆ ในโมเลกุล	38
การเชื่อมอนุพันธ์ Furan-2-carboxylates กับ 20-hydroxyecdysone (2)	39
การเชื่อมอนุพันธ์ Thiophene-2-carboxylates กับ 20-hydroxyecdysone (2)	42
การเชื่อมอนุพันธ์ Pyrole-2-carboxylates กับ 20-hydroxyecdysone (2)	44
วัตถุประสงค์และวิธีการ	50
งานวิจัยทางพฤกษเคมี	50
การสกัดแยกและหาสูตร โครงสร้างของเอคไดสเตอรอยด์จากพืช	50
การสกัดแยก 24- <i>epi</i> -Abutasterone และเอคไดสเตอรอยด์อื่นๆ จาก Chloroform และ Ethyl acetate extracts ของเปลือกกรากของ <i>Vitex canescens</i>	50
การสกัดแยก 20,26-Dihydroxyecdysone (28)	54
การสกัดแยก Pterosterone (26) จากเปลือกต้น <i>Vitex glabrata</i>	56
การสกัดแยก Highly oxygenated ecdysteroids จาก butanol extract ของเปลือกกราก ของ <i>Vitex canescens</i>	56
การสกัดแยกเอคไดสเตอรอยด์เพื่อใช้ในการสังเคราะห์	59
การสังเคราะห์ปรับเปลี่ยนเอคไดสเตอรอยด์	62
การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันและสายโซ่ด้านข้าง	62
การสังเคราะห์ 24- <i>epi</i> -Abutasterone (24) และ Abutasterone (25)	62
การสังเคราะห์ C-25 Epimers ทั้งสองของ 20,26-Dihydroxyecdysone	64
การสังเคราะห์ 24- <i>epi</i> -Pterosterone (27)	68
การสังเคราะห์ Inokosterone (14) และการแยก C-25 epimers ออกจากกัน	69
การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันในโครงร่างหลักของเอคไดสเตอรอยด์	74
การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่วง A	74
การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่วง B	80
การเชื่อมอนุพันธ์ของหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งต่างๆ ในโมเลกุล	82
การเชื่อมอนุพันธ์ Furan-2-carboxylates กับ 20-hydroxyecdysone (2)	82
การเชื่อมอนุพันธ์ Thiophene-2-carboxylates กับ 20-hydroxyecdysone (2)	88
การเชื่อมอนุพันธ์ Pyrole-2-carboxylates กับ 20-hydroxyecdysone (2)	93

งานวิจัยทางการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ	95
การเพาะเลี้ยงหนอนแมลงวันบ้าน	95
การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ	97
เอกสารอ้างอิง	107
ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์	111

รายการตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1. ^1H 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 <i>Vitex</i> and <i>Silene</i> species	55
ตารางที่ 4. ^1H NMR data of compounds 26, 27, 42-46.	57
ตารางที่ 5. ^1H 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. ^1H 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. ^1H NMR data of two C-25 epimers of 20,26-dihydroxyecdysone (28)	67
ตารางที่ 10. ^1H NMR data of compounds 47, 48, 49 "epimer 1" and 49 "epimer 2".	71
ตารางที่ 11. ^1H NMR data of compounds 26, 27, 14 "epimer 1" and 14 "epimer 2".	73
ตารางที่ 12. ^1H NMR data of compounds 53, 55 and 56	75
ตารางที่ 13. ^1H NMR data of compounds 57 - 60	77
ตารางที่ 14. ^1H NMR data of compounds 61-64	79
ตารางที่ 15. ^1H NMR data of compounds 67 and 69-71	81
ตารางที่ 16. ^1H NMR data of compounds 72-74	83
ตารางที่ 17. ^1H NMR data of compounds 76-78	85
ตารางที่ 18. ^1H NMR data of compounds 80 - 82	87
ตารางที่ 19. ^1H NMR data of compounds 83 and 84	89
ตารางที่ 20. ^1H NMR data of compounds 85-87	90
ตารางที่ 21. ^1H NMR data of compounds 88-90	92
ตารางที่ 22. ^1H NMR data of compounds 91 and 92	94
ตารางที่ 23. ^1H NMR data of compounds 93 - 95	96

ตารางที่ 24. <i>Musca</i> bioassay of compounds 24 and 25	98
ตารางที่ 25. <i>Musca</i> bioassay of two epimeric 20,26-dihydroxyecdysone (28)	99
ตารางที่ 26. <i>Musca</i> bioassay of compounds 26 and 27	100
ตารางที่ 27. <i>Musca</i> bioassay of inokosterone (14) "epimer 1" and 14 "epimer 2"	101
ตารางที่ 28. <i>Musca</i> bioassay of compounds 59 and 60 mixture, compounds 61 and 62	102
ตารางที่ 29. <i>Musca</i> bioassay of compounds 67, 69, 70 and 71	103
ตารางที่ 30. <i>Musca</i> bioassay of compounds 72 and 73	104
ตารางที่ 31. <i>Musca</i> bioassay of compounds 85, 87, and 89	105
ตารางที่ 32. <i>Musca</i> bioassay of compounds 93 and 94	106

รายการภาพ

ภาพที่ 1
ภาพที่ 2
ภาพที่ 3

หน้า

25

26

27

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง โครงสร้างกับฤทธิ์ทางชีวภาพของฮอร์โมนลอกคราบแมลง

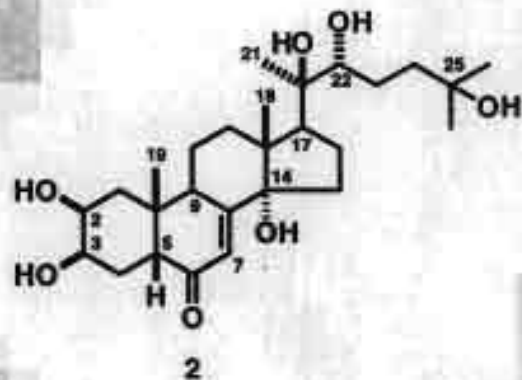
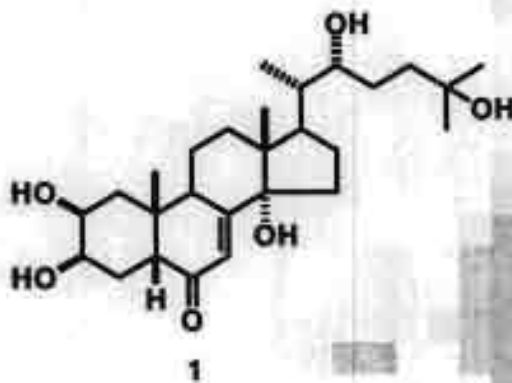
STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP STUDY OF INSECT MOULTING HORMONES

บทนำ

1. คำนำ

เป็นที่ทราบกันดีว่าการกำจัดแมลงศัตรูพืชโดยใช้สารเคมีนั้นก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสภาวะแวดล้อมและด้านสุขภาพความปลอดภัยของมนุษย์ ส่วนการกำจัดแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีนั้น ยังอยู่ในขอบเขตที่ค่อนข้างจำกัด จึงได้มีผู้สนใจที่จะป้องกันและกำจัดแมลงโดยวิธีการอื่น วิธีการหนึ่งที่น่าสนใจคือ ได้มีผู้หาทางนำฮอร์โมนประเภทหนึ่งที่แมลงผลิตขึ้นมาใช้เพื่อการเจริญเติบโตของแมลงเองคือ เอคไคสเตอรอยด์ (ecdysteroids) มาใช้ในการป้องกันและกำจัดแมลง สารประเภทนี้พบในแมลง และยังพบในกุ้ง ปู และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังอีกบาง Class ในไฟลัม Arthropoda และ ไฟลัมอื่นๆ เช่น Mollusca¹ สารประเภทนี้ในตอนเริ่มแรกที่มีการค้นพบเรียกว่า ฮอร์โมนลอกคราบ (moulting hormone) เนื่องจากสามารถทำให้แมลงเปลี่ยนแปลงจากขั้นตอนของการเป็นตัวอ่อน (larvae) ไปสู่ตัวดักแด้ (pupae) จากตัวดักแด้จะเกิดการลอกคราบกลายเป็นแมลงต่อไป เมื่อมีการศึกษาค้นคว้ากันมากขึ้น ได้พบว่า สารประเภทนี้มีหน้าที่ควบคุมกระบวนการต่างๆ ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังดังกล่าวคือ การลอกคราบ การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง และควบคุมกระบวนการสืบพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบว่าสารประเภทนี้ยังควบคุมกระบวนการทางสรีระอื่นๆ ด้วย เช่น เมแทบอลิซึมและการขับถ่าย² ฮอร์โมนนี้ แมลงต้องการใช้ในปริมาณที่น้อยมาก ฉะนั้นเราจึงพบว่าสารประเภทนี้มีอยู่ในปริมาณที่น้อยมากในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น Butenandt และ Karlson³ ได้นำดักแด้ของตัวไหม (silk-worm pupae) ปริมาณ 0.5 ดัน มาผ่านขั้นตอนการสกัดแยกหลายขั้นตอน จนได้ ecdysone (1) ซึ่งเป็นเอคไคสเตอรอยด์ชนิดหนึ่งเพียง 25 มิลลิกรัมเท่านั้น Horn และคณะ⁴ ได้นำ crayfish คือ *Janus lalandei* มา 1 ดัน สามารถแยก 20-hydroxyecdysone (2) ซึ่งเป็นเอคไคสเตอรอยด์อีกชนิดหนึ่งในปริมาณเพียง 2.3 มิลลิกรัมเท่านั้น ต่อมา Nakanishi และคณะ⁵ ได้นำพืช *Podocarpus nakaii* มาสกัดหาสารต้านมะเร็ง แต่กลับได้เอคไคสเตอรอยด์ออกมา 3 ชนิดในปริมาณที่มากกว่าที่พบในสัตว์มาก กล่าวคือ จากการใช้ใบของพืชชนิดนี้เพียง 900 กรัม สามารถแยกเอคไคสเตอรอยด์มีน้ำหนักรวมกันถึง 6.6 กรัม สารดังกล่าวมีฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบแมลง และในเวลาใกล้เคียงกันนี้ Takemoto และ

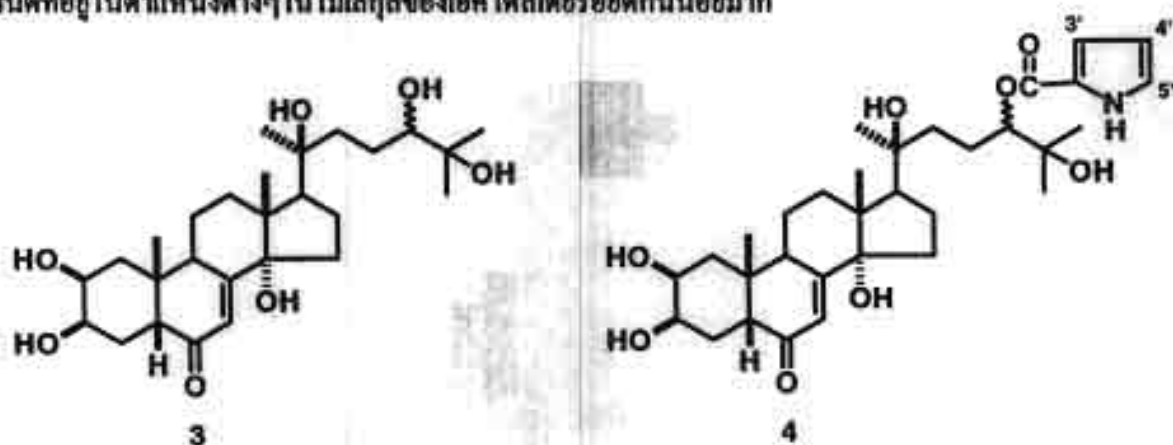
คณะ^๑ ได้ตรวจสอบหาส่วนประกอบสำคัญที่มีอยู่ในรากของพืช *Achyranthes fauriei* ซึ่งมีสรรพคุณในการขับปัสสาวะ ปรากฏว่าได้มีการพบ 20-hydroxyecdysone (2) ด้วย และมีปริมาณค่อนข้างสูง จากการที่ได้มีการค้นพบเอคไคสเตียรอยด์ในพืช และพบในปริมาณที่มากกว่าที่พบในพืช ทำให้เกิดการตื่นตัวในการวิจัยหาแหล่งของสารประเภทนี้กันมากในพืช



2. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

จากการค้นพบเอคไคสเตียรอยด์ในพืช ทำให้เชื่อกันว่า เป็นวิธีการหนึ่งที่พืชชนิดนั้นสร้างสารเคมีขึ้นมาต่อสู้กับแมลง^๑ เพราะหากแมลงไปกินพืชที่มีเอคไคสเตียรอยด์อยู่ก็จะเป็นอันตรายต่อแมลงเอง ได้มีการศึกษาพบว่าเอคไคสเตียรอยด์แต่ละชนิดมีฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบแตกต่างกัน เอคไคสเตียรอยด์บางชนิดมีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง บางชนิดมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่ำ และบางชนิดก็ไม่มีฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าว อย่างไรก็ตาม ได้เป็นที่สงสัยกันว่า เหตุใดพืชจึงสร้างเอคไคสเตียรอยด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่ำ เพราะน่าจะเป็นผลเสียต่อพืชเองในการป้องกันตนเองจากศัตรู คณะผู้วิจัยมีความเชื่อว่า พืชจะต้องมีเหตุผลอยู่เบื้องหลังอย่างแน่นอน เมื่อไม่นานมานี้ คณะผู้วิจัยได้พบเอคไคสเตียรอยด์ชนิดหนึ่งคือ pinnasterone (3) จากต้นสมอติ่นน (Vitex pinnata)^๑ เอคไคสเตียรอยด์นี้มีฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบต่ำ ต่อมาก็ได้พบเอคไคสเตียรอยด์อีกชนิดหนึ่งจากพืชสกุล Vitex ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับ V. pinnata คือ ต้นผ้าเยียน (V. canescens) เอคไคสเตียรอยด์ใหม่นี้ให้ชื่อว่า canescensterone (4)^๑ จากโครงสร้างจะเห็นได้ว่า เอคไคสเตียรอยด์นี้ต่างจาก pinnasterone (3) เพียง เป็น pyrrole-2-carboxylate ester ของ (3) แต่สิ่งที่คณะผู้วิจัยแปลกใจก็คือ เป็นครั้งแรกที่มีการค้นพบเอคไคสเตียรอยด์จากพืชที่เป็นอนุพันธ์เฮสเทอร์ของสารประกอบ nitrogen heterocycle เพราะโดยปรกติแล้ว เอคไคสเตียรอยด์ที่พบในรูปของอนุพันธ์นั้นเป็นอนุพันธ์ซึ่งเป็นที่รู้จักกันดีที่นั่นคือ อะซิเตต, benzoate, p-coumarate, acetonide และ glycoside เมื่อนำเอคไคสเตียรอยด์ (4) มาทดสอบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบ ปรากฏว่ามีฤทธิ์ตรงข้ามกับที่คาดไว้ กล่าวคือ แทนที่จะมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่ำเช่นเดียวกับเอคไคสเตียรอยด์ (3) แต่กลับแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพสูง ถึงแม้ว่ากรณีนี้จะป็นตัวอย่างแรกของการค้นพบว่าพืชสร้างเอคไคสเตียรอยด์ที่

มีฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบตรงข้ามกับที่คาดไว้ แต่การที่ฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าวเป็นไปในทางที่เป็นประโยชน์ต่อพืชเองในการป้องกันตนเองจากแมลง คณะผู้วิจัยค่อนข้างจะเชื่อว่า การที่พืชเติมหมู่ pyrrole-2-carboxylate เข้าไปที่ตำแหน่ง 24 ของ สาร (3) นั้น ไม่น่าจะเป็นเรื่องที่เกิดขึ้นโดยบังเอิญ แต่อาจเป็นการที่พืชได้มีวิวัฒนาการในการสร้างสารเคมีขึ้นมาต่อสู้กับศัตรูของพืช ฉะนั้นเป็นไปได้ที่การที่พืชสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพคล้าย pimatasterone (3) แต่ความจริงแล้วสารนี้เป็นเพียงสารมัธยันตร์ (intermediate) สำหรับการสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงอย่าง canescensterone (4) ก็ได้ และการที่พืชสร้างเอคโคสเตียรอยด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงโดยการเติมหมู่อนุพันธ์ แทนที่จะสร้างเอคโคสเตียรอยด์ชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงโดยตรงเลยเช่นนี้ จะเป็นไปได้หรือไม่ที่เป็นวิธีการหนึ่งที่พืชได้พยายามหาวิธีการป้องกันไม่ให้แมลงลดพิษของการเป็นฮอร์โมนลอกคราบของเอคโคสเตียรอยด์ชนิดนั้นได้ เพราะได้มีผู้พบว่าแมลงหรือสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังบางชนิดสามารถลดพิษของเอคโคสเตียรอยด์ที่มีอยู่ในพืชที่สัตว์เหล่านั้นกินเข้าไปได้ เช่น Modde และคณะ¹⁰ พบว่าด้งักแค้น *Locusta migratoria* สามารถลดพิษของ 20-hydroxyecdysone (2) ได้โดยการเปลี่ยน (2) ให้เป็น 20-hydroxyecdysone 3-acetate และ Garcia และคณะ¹¹ ก็ได้พบว่าหอยทาก *Cepaea nemoralis* สามารถลดพิษของ (2) ได้โดยการเปลี่ยนให้เป็น 20-hydroxyecdysone 22-acetate อย่างไรก็ตาม คำถามข้างต้นคงจะยังไม่สามารถตอบได้ถ้าเรายังมีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของเอคโคสเตียรอยด์กับฤทธิ์ทางชีวภาพที่แสดงออก (structure-activity relationships, SAR) น้อย และเรายังมีการศึกษาผลของหมู่แทนที่หลายๆ ชนิดที่อยู่ในตำแหน่งต่างๆ ในโมเลกุลของเอคโคสเตียรอยด์กันน้อยมาก



ถ้าเราพิจารณาการใช้ยาปราบศัตรูพืชที่ใช้กับพืชทางเกษตรกรรมโดยทั่วไป เราอาจมองไม่เห็นความสำคัญด้านความปลอดภัยต่อมนุษย์ เพราะอันตรายจากสารเคมีเหล่านี้ดูเหมือนจะอยู่ไกลตัวคนส่วนใหญ่ กล่าวคือ เราอาจจะนึกถึงเพียงว่า เกษตรกรเท่านั้นที่จะได้รับผลโดยตรงต่อยาปราบศัตรูพืชเหล่านี้ แต่ด้านราคายังถึงอันตรายที่เกษตรกรจะได้รับแล้ว ปัญหาที่จะไม่ใช่เรื่องธรรมดา ถึงแม้บางคนอาจจะไม่ได้คำนึงถึงเรื่องนี้ แต่สารเคมีกำจัดศัตรูพืชก็อาจก่อให้เกิดผลร้ายตามมาได้ ยิ่งถ้าเรามองตัวอย่างที่ใกล้ตัวกว่านี้คือ กรณีของพืชผักสวนครัว ถ้ามีสารกำจัดศัตรูพืชตกค้างอยู่แล้ว เราจะมองเห็นภาพของอันตราย

ที่อาจจะเกิดขึ้นได้ชัดเจนขึ้น เราคงไม่หวังให้ชาวสวนทุกคนมีความรับผิดชอบสูงในการใช้ยาปราบศัตรูพืชอย่างถูกต้อง และไม่เก็บพืชผักมาขายก่อนถึงเวลาที่เหมาะสม และควรบอิดที่เรายังมีโอกาสได้รับทราบ ว่า ชาวสวนจำนวนไม่น้อยยังไม่กล้ารับประทานผักที่เก็บมาจากสวนของตนเอง เราก็ยังคงหวังว่าจะปลอดกัภัยจากสารปนเปื้อนเหล่านั้นได้ยาก จากมุมมองที่ว่า เราอาจจะเลียนแบบพืชในการต่อสู้กับแมลงด้วยการใช้เอคโคสเตียรอยด์หรือเอคโคสเตียรอยด์ที่ปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันและ/หรือ โครงสร้างบางส่วนแล้วมาเป็นสารเคมีป้องกันและกำจัดศัตรูพืช และจากข้อมูลวิจัยที่พบว่า เอคโคสเตียรอยด์ไม่เป็นอันตรายต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม¹ หรือหากจะมีก็มึ้น้อยมาก ประกอบกับข้อมูลที่ว่า พืชหลายชนิดที่มีเอคโคสเตียรอยด์อยู่ในปริมาณมากนั้น ได้มีการใช้เป็นยาแผนโบราณมาเป็นเวลานานแล้ว จึงน่าจะมีความปลอดภัยต่อมนุษย์มากกว่ายาฆ่าแมลงอย่างแน่นอน ก็ยิ่งทำให้แนวทางในการป้องกันและกำจัดแมลงโคยวิธีนี้น่าจะได้รับความสนใจมากขึ้น แต่ปัญหาก็คือ เรายังขาดข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของเอคโคสเตียรอยด์กับฤทธิ์ทางชีวภาพที่แสดงออก กล่าวคือ เรายังทราบไม่มากนักว่า เอคโคสเตียรอยด์ที่มีโครงสร้างและหมู่ฟังก์ชันแตกต่างกันในโมเลกุลจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพแตกต่างกันอย่างไรบ้าง ปัญหาสำคัญที่การศึกษาด้านนี้ยังไม่ก้าวหน้ามากเท่าที่ควรคือ ผู้ที่ทำการศึกษาด้านนี้ขาดแหล่ง (supply) ของเอคโคสเตียรอยด์ ถึงแม้ว่าขณะนี้ได้มีการค้นพบเอคโคสเตียรอยด์กันมาแล้วมากกว่า 100 ชนิดทั้งจากพืชและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง แต่เอคโคสเตียรอยด์ส่วนใหญ่ที่ค้นพบเป็นเอคโคสเตียรอยด์ที่มีอยู่ในปริมาณน้อย โดยเฉพาะเอคโคสเตียรอยด์ที่สกัดมาได้จากสัตว์นั้น ไม่ค่อยคำนึงถึงการที่จะคิดนำมาใช้ศึกษาเพิ่มเติมในด้านอื่นๆ เพราะเพียงการสกัดแยกมาเพื่อหาสูตรโครงสร้างก็ทำได้ด้วยความลำบากยิ่งแล้ว ในบรรดาเอคโคสเตียรอยด์ที่ได้มีการค้นพบมาแล้วนั้น มีเพียงจำนวนไม่มากนักที่ได้มีการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพแล้ว ทำให้ยังขาดข้อมูลเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ทางชีวภาพอยู่มาก เมื่อขาดแหล่งของเอคโคสเตียรอยด์ นักเคมีได้พยายามแก้ปัญหาโดยการสังเคราะห์จากสเตียรอยด์ที่สกัดแยกได้จากธรรมชาติ แต่อาจกล่าวได้ว่าทุกการสังเคราะห์ประสบความสำเร็จเฉพาะในแง่วิชาการ แต่ในแง่ของการมีแหล่งของเอคโคสเตียรอยด์ที่มีโครงสร้างหรือหมู่ฟังก์ชันที่ได้รับการปรับเปลี่ยนแล้วยังอยู่ในขีดจำกัดมาก ไม่ว่าจะเป็นปัญหาด้านปริมาณสารที่สังเคราะห์ได้ หรือความยากลำบาก ทั้งนี้ยังไม่นับค่าใช้จ่ายที่ต้องใช้ไปในแต่ละวิธีการสังเคราะห์นั้นๆ แต่บังเอิญโชคที่ขณะนี้คณะผู้วิจัยได้ค้นพบแหล่งของเอคโคสเตียรอยด์ในปริมาณสูงจากพืชสกุล *Vicia* บางชนิด^{2,3} และในบรรดาเอคโคสเตียรอยด์ที่แยกออกมาได้นั้น มี 20-hydroxyecdysone (2) ในปริมาณมากที่สุด เอคโคสเตียรอยด์นี้เป็นสารหลักในการเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของฮอร์โมนลอกคราบแมลง และเอคโคสเตียรอยด์ชนิดนี้มีหมู่ไฮดรอกซิลอยู่ในตำแหน่งต่างๆกระจายทั่วทั้งโมเลกุล ทำให้มีโอกาสใช้วิธีการทางเคมีมาปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันและโครงสร้างบางส่วนของเอคโคสเตียรอยด์นี้ เพื่อนำมาศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ทางชีวภาพ อันจะเป็นแนวทางที่จะได้เอคโคสเตียรอยด์หรือสารอื่นที่มีโครงสร้างบางส่วนที่จำเป็นต่อการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่สูงและเหมาะสมต่อการใช้เป็นสารป้องกันและกำจัดแมลงต่อไป

จะเห็นได้ว่า การสกัดแยกและหาสูตรโครงสร้างของเอคโคสเตียรอยด์ก็มีความสำคัญในแง่ของการที่จะได้เอคโคสเตียรอยด์ใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจมากขึ้น ซึ่งอาจทำให้ได้ข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ทางชีวภาพ หรืออาจได้ข้อมูลที่อาจนำมาสนับสนุนหรือเพิ่มเติมกับข้อมูลที่ได้จากการสังเคราะห์และปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันและโครงสร้างของเอคโคสเตียรอยด์ อาจทำให้ได้ข้อมูลที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตสารเคมีป้องกันและกำจัดแมลงได้ในอนาคต

3. วัตถุประสงค์ของโครงการ

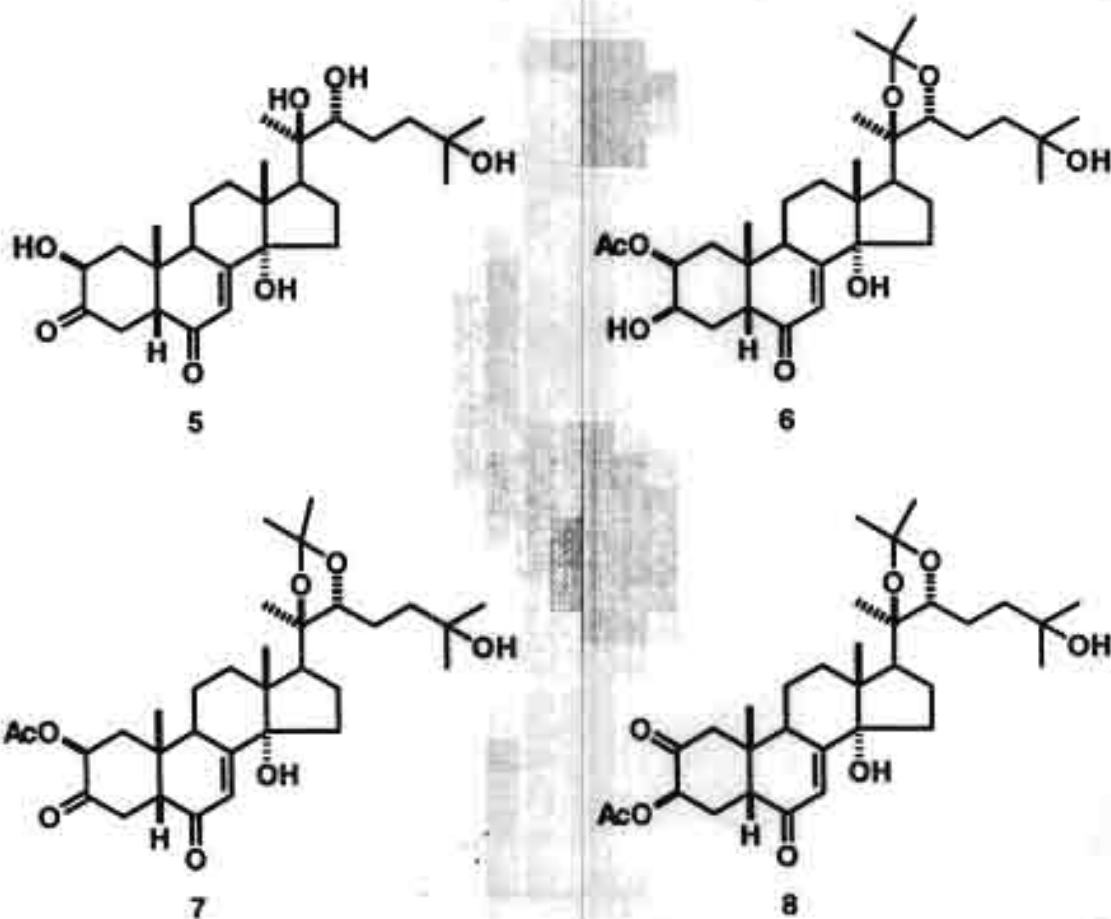
- 3.1 เพื่อสกัดแยกและหาสูตรโครงสร้างของเอคโคสเตียรอยด์จากพืชสกุล *Vitex* บางชนิด
- 3.2 เพื่อสังเคราะห์บางตัวและปรับเปลี่ยนเอคโคสเตียรอยด์ที่มีอยู่แล้ว ให้เป็นเอคโคสเตียรอยด์ที่มีหมู่ฟังก์ชันหรือโครงสร้างบางส่วนที่แตกต่างไป
- 3.3 เพื่อทดสอบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบของเอคโคสเตียรอยด์ที่แยกและสังเคราะห์ได้
- 3.4 เพื่อทำการศึกษาค้นหาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของเอคโคสเตียรอยด์กับฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อเป็นแนวทางพัฒนาสารควบคุมป้องกันและกำจัดแมลงต่อไป

4. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

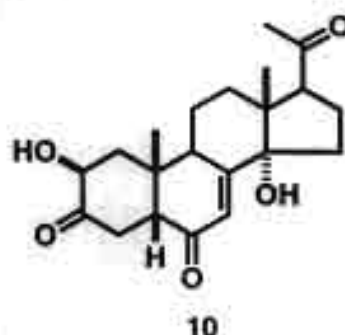
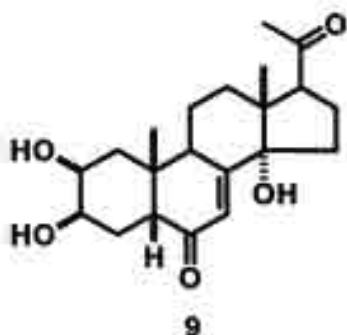
งานวิจัยทางด้านความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของเอคโคสเตียรอยด์กับฤทธิ์ทางชีวภาพในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบนั้น ยังมีค่อนข้างน้อยมาก เท่าที่มีอยู่ส่วนใหญ่เป็นงานของกลุ่มของ Horn และกลุ่มของ Robbins กล่าวคือ Bergamasco และ Horn¹³ ได้พบว่าลักษณะของโครงสร้างของเอคโคสเตียรอยด์หรือสารในกลุ่มเอคโคสเตียรอยด์ที่จะต้องมีการแสดงฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบคือ (1) การมีการเชื่อมต่อนะหว่างวง A และ B เป็นแบบซิส (*cis*-A/B ring fusion) (2) การมีหมู่คีโตนที่ตำแหน่ง 6 และต่อดังด้วยพันธะคู่ที่ตำแหน่ง 7 (6-keto-7-ene system) (3) การมีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระที่ตำแหน่ง 14 α (free 14 α -hydroxyl group) และ (4) การมีสายโซ่ด้านข้างที่มีคาร์บอนครบ (full sterol side chain) Robbins และคณะ¹⁴ ก็พบเช่นเดียวกับกลุ่มของ Horn ว่าหมู่ไฮดรอกซิลอิสระที่ตำแหน่ง 14 α ก็มีความจำเป็นต่อการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพของเอคโคสเตียรอยด์ Saksamran และคณะ¹⁵ ได้ค้นพบเพิ่มเติมอีกว่าตำแหน่ง 9 จะต้องไม่มีหมู่แทนที่ ถ้าตำแหน่งดังกล่าวมีหมู่แทนที่ จะทำให้ฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบหมดไปทันที นอกจากนี้ กลุ่มของ Horn¹³ ยังพบว่า หมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 3 β และ 22R จำเป็นต่อการแสดงฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบที่สูง และยังพบอีกว่า หมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 2 และ 25 ไม่มีความจำเป็นต่อการแสดงฤทธิ์ดังกล่าว

จากการที่แหล่งของเอคโคสเตียรอยด์ที่มีปริมาณมากมีอยู่จำกัดมาก ฉะนั้นจึงมีรายงานเกี่ยวกับการนำสารนี้ไปศึกษาปฏิกิริยาต่างๆค่อนข้างน้อยตามไปด้วย ปฏิกิริยาส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาอนุพันธ์โดยทั่วไป เช่น อะซิเลต, acetonides, trimethylsilyl ethers, sulphates และ 22-long-chain fatty

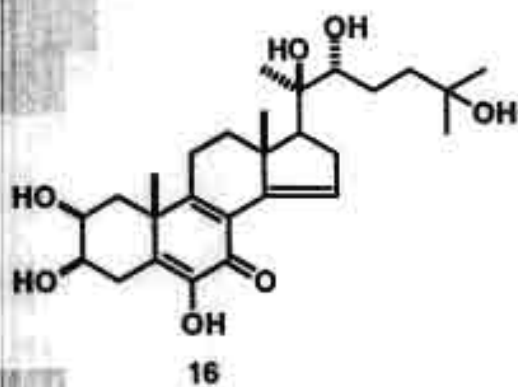
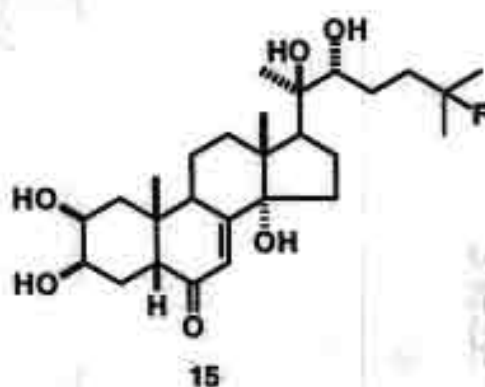
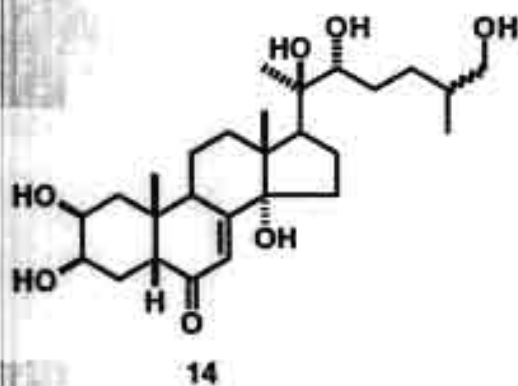
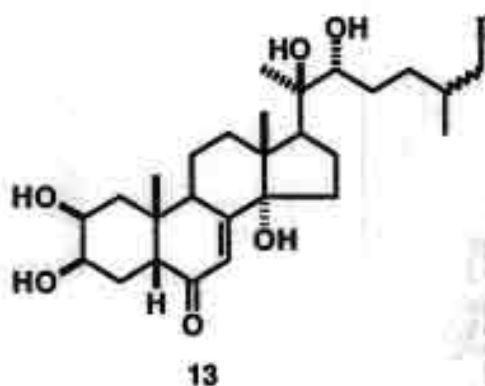
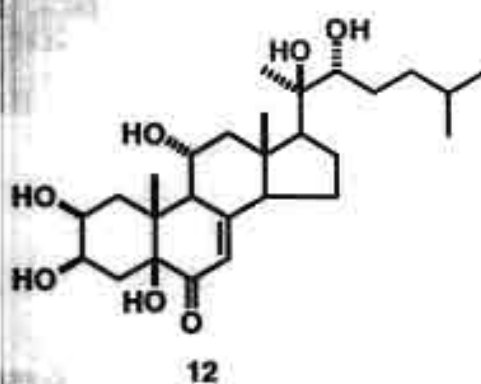
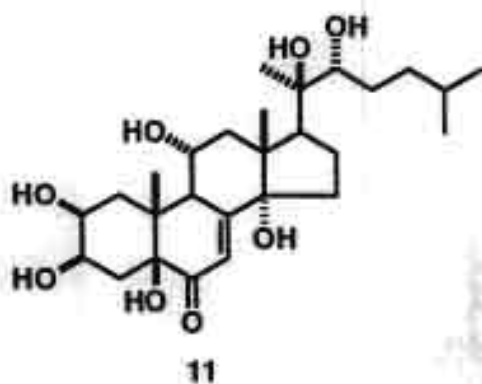
esters อย่างไรก็ตาม ได้มีการศึกษาปฏิกิริยาอื่นๆของเอคไดสเตียรอยด์กันบ้างคือ Galbraith และคณะ¹⁶ ได้เตรียมอนุพันธ์อะซิเตดของเอคไดสเตียรอยด์ 2 โดยการทำให้ partial acetylation ของสาร 2 และทำ partial deacetylation ของสารอนุพันธ์อะซิเตด ได้สารอนุพันธ์อะซิเตดบางชนิด ต่อมา Suksamrarn และ Pattanaprateep¹⁷ ได้หาวิธีใหม่ในการเตรียมอนุพันธ์ monoacetates, diacetates และ triacetates ของสาร 2 โดยการทำให้ selective acetylation ของสาร 2 Spindler และ Koolman¹⁸ ได้นำสาร 2 มาออกซิไดส์โดยใช้ แพตทินัมเป็นตะกั่วลิธัม พบว่าได้ 3-dehydro-20-hydroecdysonone (5) และสารอื่นที่ไม่ทราบโครงสร้างอีก 4-5 ชนิด Lloyd-Jones และคณะ¹⁹ ได้ใช้ Jones reagent ในการออกซิไดส์สาร 6 ปรากฏว่าได้สารผลิตภัณฑ์ 2 ชนิด คือ 7 และ 8 ในอัตราส่วน 3:1 แต่ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ Siddall และคณะ²⁰ ได้



ออกซิไดส์สาร 2 ด้วย sodium metaperiodate พบว่าได้ poststerone (9) เมื่อมีผู้ใช้รีเอเจนต์เป็น Collins reagent และ Jones reagent ก็ได้ผลเช่นเดียวกัน Petersen และคณะ²¹ ใช้รีเอเจนต์ชนิดหนึ่งในการออกซิไดส์สาร 2 โดยเปลี่ยนสภาวะของปฏิกิริยาบางประการ ปรากฏว่าได้สาร 10 เพิ่มมาอีกนอกจากสาร 9 โดยการใช้หลักการเดียวกันนี้ Davies และคณะ²² และ Greenwood และคณะ²³ รวมทั้ง Girault และคณะ²⁴ สามารถเตรียม 3-dehydroecdysteroids ทำนองเดียวกับสาร 5 Diman และคณะ²⁵ ได้นำสารพวก 3-dehydroecdysteroids มาทำการรีดิวซ์ด้วย sodium borohydride ได้ epimeric alcohols ที่ตำแหน่ง 3



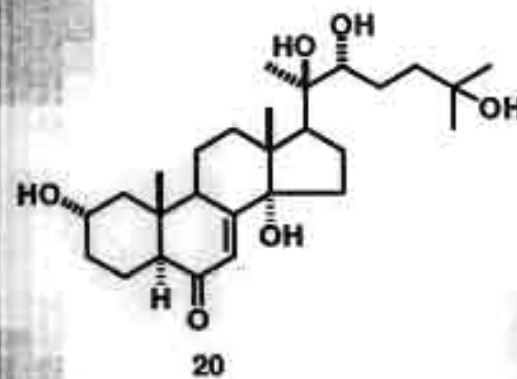
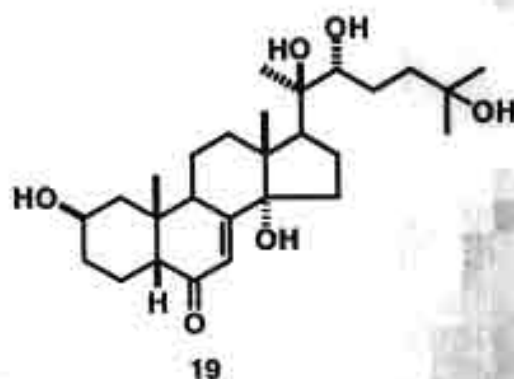
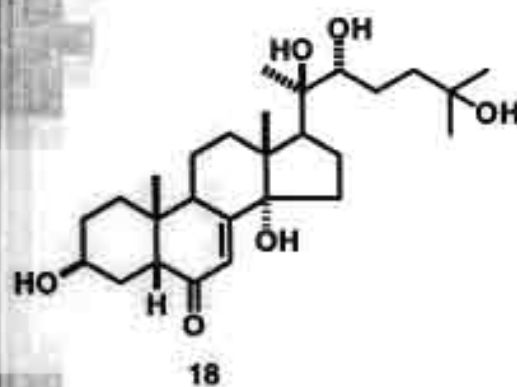
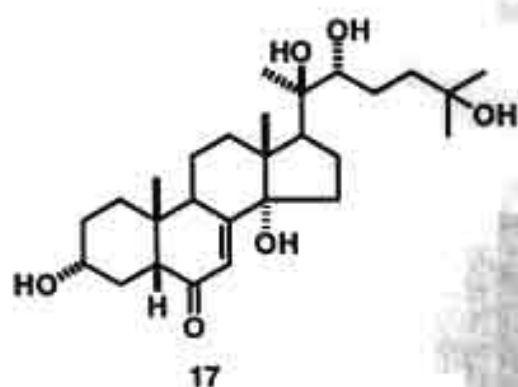
Galbraith และคณะ²⁶ และ Hedtmann และคณะ²⁷ ได้ใช้ poststerone (9) เป็นสารมัธยันตร์ (intermediate) ในการสังเคราะห์เอคโดสเตียรอยด์ชนิดอื่น สำหรับการปรับเปลี่ยนส่วนอื่นๆของเอคโดสเตียรอยด์ก็ได้มีรายงานไว้บ้าง คือ Cherbas และคณะ²⁸ ได้พบว่าเมื่อนำ muristerone A (11) มาทำปฏิกิริยากับ trimethylsilyl chloride-sodium iodide กลับได้ 14-deoxymuristerone A (12) ซึ่งมีฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบสูง Lee และคณะ²⁹ ได้สังเคราะห์ 26-iodoponasterone A (13) จาก inokosterone (14) โดยผ่านปฏิกิริยาเคมี 4 ขั้นตอน ปรากฏว่า สาร 13 นี้มีฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบสูง นอกจากนี้ Tomas และคณะ³⁰ ได้สังเคราะห์ 25-fluoroponasterone A (15) จากสาร 2 แต่สารนี้ไม่มีรายงานว่ามียุทธวิธีทางชีวภาพดีกว่าสาร 2 แต่อย่างใด เมื่อเร็วๆนี้ Suksamrarn และคณะ¹⁵ ได้หาวิธีการสังเคราะห์ calonysterone (16) ซึ่งเป็นเอคโดสเตียรอยด์ที่หาจาก เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบ ปรากฏว่าสามารถสังเคราะห์สารนี้ได้ด้วยปฏิกิริยาขั้นตอนเดียว โดยนำสาร 2 มาออกซิไดส์ด้วยออกซิเจน และมีเบสเป็นคะตะลิสต์ เมื่อนำสาร 16 ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ปรากฏว่าสารนี้ไม่มีฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบ ซึ่งสอดคล้องกับผลที่กลุ่มของ Horn ได้เสนอไว้ เพราะสาร 16 นี้ขาดลักษณะทางโครงสร้างพื้นฐานของการมีฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบหลายประการ Galbraith และคณะ³¹ ได้หาทางปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของเอคโดสเตียรอยด์ 2 โดยการขจัดหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 2 เริ่มต้นด้วยการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 2 ให้เป็นอนุพันธ์ tosylate แล้วขจัดหมู่ tosyloxy ด้วย lithium aluminum hydride แล้วออกซิไดส์หมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 6 ซึ่งเกิดจากการที่หมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 6 เกิดจากการที่หมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 2 แต่สารผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ 17 แทนที่จะเป็น 18 เนื่องจากขั้นตอนการรีดิวซ์เกิดผ่านกลไกของปฏิกิริยาที่ต่างไปจากที่คาดไว้ อย่างไรก็ตาม Kametani และคณะ³² ได้สังเคราะห์สาร 18 ได้จาก pregnenolone แต่ต้องผ่านปฏิกิริยามากมายหลายขั้นตอน ตั้งต้นจากเอคโดสเตียรอยด์ 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 เอคโดสเตียรอยด์ไม่จำเป็นต่อการแสดง



ฤทธิ์ทางชีวภาพของเอคไดสเตียรอยด์¹³ Suksamran และคณะ¹⁴ จึงได้สังเคราะห์ 3-deoxy-20-hydroxyecdysone (19) และ analogue 20 จากอนุพันธ์ 20,22-acetonide ของ 20-hydroxyecdysone (2) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ในการเป็นสอร์โบนอก絡กราม ปรากฏว่าสาร 19 มีฤทธิ์ทางชีวภาพค่อนข้างสูง ถึงแม้จะไม่สูงเท่าเอคไดสเตียรอยด์ 2 แสดงว่าหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 2 ก็ยังมีความสำคัญ

ต่อการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ ฉะนั้น จึงเห็นได้ว่า ความรู้ทางด้าน SAR ในส่วนของวง A ของเอคไดสเตียรอยด์ยังมีน้อยมาก น่าจะ ได้มีการศึกษาเพิ่มเติม

สำหรับการสังเคราะห์เอคไดสเตียรอยด์จากสารตั้งต้นที่เป็นสเตอรอยด์ที่หามาได้ง่ายก็ยังมีงานของ Siddall และคณะ³⁶, Mori และคณะ³⁷, Furlenmeier และคณะ³⁸ และ Barton และคณะ³⁹ แต่ทุกการสังเคราะห์นั้นผ่านขั้นตอนต่างๆหลายขั้นตอน เมื่อดูโครงสร้างโดยส่วนรวมของเอคไดสเตียรอยด์ จะเห็นว่าสารประเภทนี้น่าจะมีความเสถียรต่อการทำปฏิกิริยาโดยทั่วไป แต่สำหรับผู้ที่ยังไม่คุ้นเคยกับการทำปฏิกิริยาของเอคไดสเตียรอยด์กับรีเอเจนต์ชนิดต่างๆแล้วจะพบว่า บางปฏิกิริยาที่ต้องการให้เกิดกลับไม่มีอะไรเกิดขึ้นเลย บางปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้อย่างไม่คาดคิดว่าจะเกิด แต่สำหรับผู้ที่คุ้นเคยกับการทำปฏิกิริยาเคมีกับเอคไดสเตียรอยด์ก็จะพบจุดอ่อนจุดแข็งของสารประเภทนี้ต่อการทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์ชนิดต่างๆ เช่นในสภาวะที่เป็นเบส (เช่นในสารละลาย NaOH หรือ NH_4OH) ออกซิเจนในอากาศจะทำให้เกิด autoxidation ของเอคไดสเตียรอยด์ (เช่น สาร (2)) ได้¹⁵ เบสที่ไม่แรงนัก เช่น K_2CO_3 และ KHCO_3 สามารถก่อให้เกิด epimerization ที่ตำแหน่ง 5 ได้^{23,40} ในสภาวะที่เป็นกรด โดยเฉพาะกรดแอโรนินทรีย์ เช่น HCl แม้จะเป็นชนิดเจือจางก็ยังสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยา dehydration ที่ตำแหน่ง 14 ได้¹⁶ คณะผู้วิจัยยังได้พบว่า แม้แต่กรดฟอสฟอริกเข้มข้นยังทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ จากการตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วย TLC พบว่า มีสารใหม่เกิดขึ้นถึงประมาณ 12 ชนิด แสดงว่าเอคไดสเตียรอยด์ไม่ค่อยเสถียรในสภาวะที่เป็นกรด



ผลการทดลองและอภิปรายผล

การสกัดแยกและหาสูตรโครงสร้างของเอคไดสเตียรอยด์จากพืช

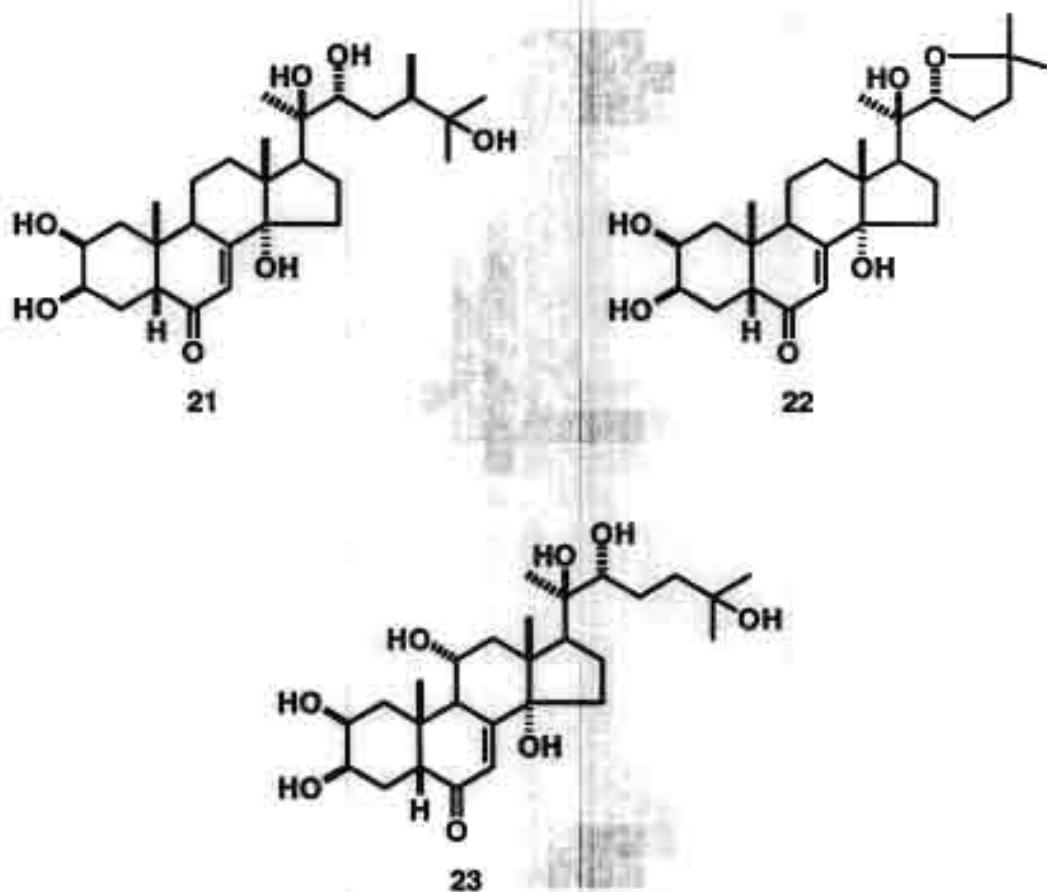
1) 24-*epi*-Abutasterone และเอคไดสเตียรอยด์อื่นๆ

จากการที่ได้เสนอโครงการวิจัยไว้ว่า โครงการวิจัยนี้จะทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ทางชีวภาพ (structure-activity relationships, SAR) ของเอคไดสเตียรอยด์ ดังนั้นในการศึกษาดังกล่าวนี้ จะต้องมีการหาเอคไดสเตียรอยด์ที่มีหมู่ฟังก์ชันหรือโครงสร้างแตกต่างกันไป เพื่อจะได้นำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการเป็นฮอร์โมนลอกการบแมลง เพื่อที่จะได้มีความเข้าใจเกี่ยวกับ SAR ต่อไป ที่มาของเอคไดสเตียรอยด์ที่จะใช้ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้เสนอไว้ในโครงการวิจัยว่าจะมาจาก 2 แหล่งคือ สกัดแยกจากพืชที่มีเอคไดสเตียรอยด์ และจากการสังเคราะห์เอคไดสเตียรอยด์และปรับเปลี่ยนเอคไดสเตียรอยด์โดยวิธีทางเคมี ส่วนที่เราจะจำเป็นต้องหาเอคไดสเตียรอยด์จากพืชเพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เพราะเราเชื่อว่า พืชสร้างเอคไดสเตียรอยด์ขึ้นมากเพื่อป้องกันตัวเองจากการรุกรานของแมลงและศัตรูชนิดอื่นๆ ดังนั้นเอคไดสเตียรอยด์ที่มีสูตรโครงสร้างหรือหมู่ฟังก์ชันแตกต่างออกไป น่าจะให้ข้อมูลทางฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกันออกไป และอาจจะทำให้ได้แนวทางที่จะนำมาสังเคราะห์เอคไดสเตียรอยด์หรือปรับเปลี่ยนเอคไดสเตียรอยด์ต่อไป ซึ่งน่าจะเป็นผลดีต่อการศึกษา SAR ของเอคไดสเตียรอยด์

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

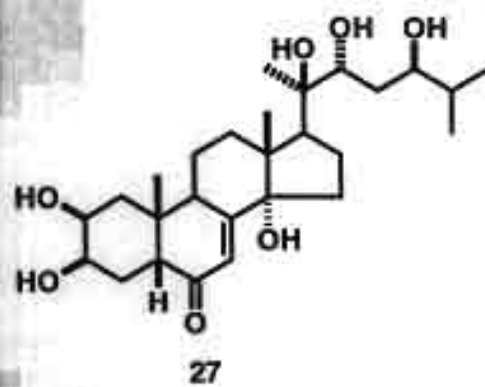
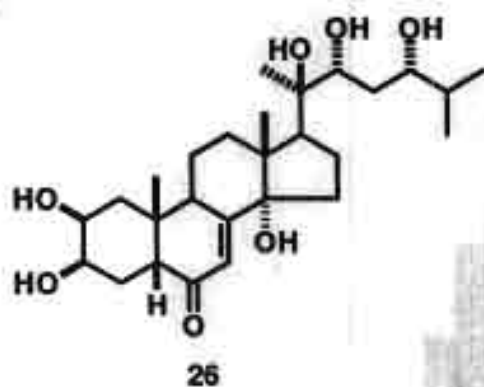
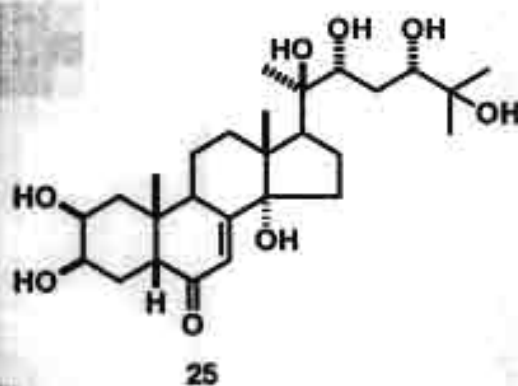
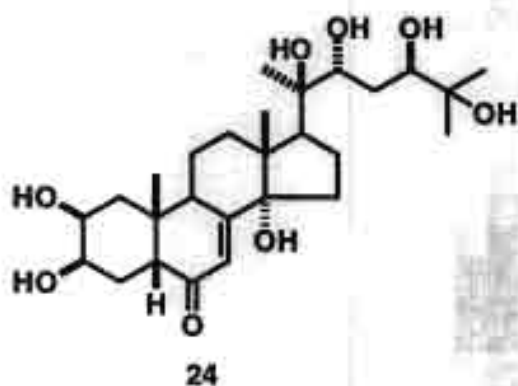
สำหรับ chloroform extract เราสามารถแยกได้ 24-*epi*-makisterone A (21)^{41,42} ส่วน ethyl acetate extract สามารถแยกได้ shidasterone (22),^{43,44} calonysterone (16)^{15,45} และ turkesterone (23)¹² เอคไดสเตียรอยด์ 22 ก็มีอยู่ใน chloroform extract ด้วย สำหรับข้อมูล ¹H NMR ของสาร 21 (ดูตารางที่ 1) สอดคล้องกับโครงสร้างของ 21 และค่า chemical shifts ของ methyl resonances ที่ได้มีผู้รายงานไว้^{41,42} ข้อมูล ¹³C NMR ของสาร 21 (ไม่ได้แสดงไว้) ก็สอดคล้องกับค่าที่มีผู้รายงานไว้⁴¹

เอกลักษณ์ของเอคไดสเตอรอยด์ 2, 16, 22 และ 23 ได้ทำโดยเปรียบเทียบข้อมูลทาง สเปกโทรสโกปีที่ได้มีรายงานไว้ และในบางกรณีก็ยืนยันโดยเปรียบเทียบ TLC กับ authentic samples (สุวัสดุและวิธีการ) เมื่อเร็ว ๆ นี้ได้มีผู้หา configuration ที่ C-22 ของสาร 22 และพบว่า เป็น 22R ⁴⁴



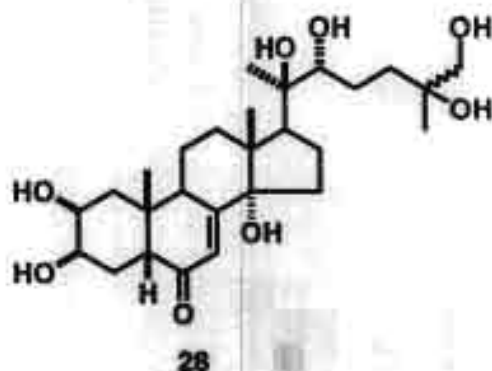
ในการแยกเอคไดสเตอรอยด์จากเปลือกกรากของต้นส้มเสี้ยวครั้งนี้ ได้แยกเอคไดสเตอรอยด์ชนิดใหม่ได้ 1 ชนิด คือ 24-*epi*-abutasterone (24) โดยแยกออกมาได้เพียง 3 มิลลิกรัมจาก ethyl acetate extract หลังจากผ่านขั้นตอนการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีและ HPLC หลายครั้ง จาก high resolution FAB-แมสสเปกตรัม ทำให้ทราบว่าสารนี้มีสูตรโมเลกุล $C_{27}H_{44}O_6$ 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 แสดงให้เห็นว่าเอคไดสเตอรอยด์ทั้ง 2 ชนิดมีเอคไดสเตอรอยด์นิวเคลียสเหมือนกัน สัญญาณ dd ทั้งสองที่ δ 4.51 ($J = 9.6$ และ 2.3 Hz) และที่ δ 4.37 ($J = 9$ และ 2.7 Hz) แสดงให้เห็นว่าหมู่ไฮดรอกซิลที่สายโซ่ด้านข้างทั้งสองหมู่ควรวอยู่ที่ C-22 และ C-24 หมู่ไฮดรอกซิลอีก 1 หมู่ควรวอยู่ที่ C-25 เพราะ 26-Me และ 27-Me เกิดเป็น 2 singlets ที่ δ 1.46 และ 1.47 ฉะนั้นจะเห็นได้ว่า oxygenation pattern ของเอคไดสเตอรอยด์ใหม่นี้กับ abutasterone (25) นั้นเหมือนกัน ต่างกันตรงที่การจัดเรียงตัวของไฮดรอกซิลของหมู่ไฮดรอกซิลเท่านั้น ค่า chemical shift

ของเอคโคเตียรอยด์นี้กับสาร 25 มีขนาด (magnitude) พอกัน แสดงว่าการจัดเรียงตัวของหมู่ไฮดรอกซิลที่ C-20 และ C-22 ของสารทั้ง 2 นี้เหมือนกัน ซึ่งโครงสร้างนี้ยังได้รับการยืนยันจากการเปรียบเทียบ ^{13}C NMR สเปกตรัมกับสาร 25" (ตารางที่ 2) จากตารางจะเห็นได้ว่า ข้อแตกต่างอย่างเด่นชัดในสเปกตรัมของสารทั้งสองชนิดนี้คือ สัญญาณที่ C-22, C-23 และ C-24 (ดูตารางที่ 2) ข้อแตกต่างดังกล่าวนี้เป็นไปทำนองเดียวกับกรณีของ pterosterone 26 และ 24-*epi*-pterosterone (27)^{14,15} 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) อยู่ที่ δ 73.4, 37.5 และ 73.5 ตามลำดับ ฉะนั้นจึงสรุปได้ว่าเอคโคเตียรอยด์ใหม่นี้ ต่างจาก abutasterone (25) ตรง configuration ของหมู่ไฮดรอกซิลที่ C-24 ฉะนั้นโครงสร้างของเอคโคเตียรอยด์นี้จึงเป็น 24 คือเป็น 24-*epi*-abutasterone



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

จากที่ได้กล่าวมาแล้วในหัวข้อที่ 1 (24-*epi*-Abutasterone และเอคไคสเตียรอยด์อื่นๆ) คือ ได้มีการแยกเอคไคสเตียรอยด์ที่มีปริมาณน้อย (ประมาณ 0.5 มิลลิกรัม) ออกมาจากเปลือกกรากของต้นคันทียน (*Vitex canescens*) ด้วย เนื่องจากปริมาณสารน้อยเกินไปจึงยังไม่ทราบว่าเป็นเอคไคสเตียรอยด์ที่ทราบโครงสร้างกันแล้วหรือเป็นชนิดใหม่ แต่จากการเปรียบเทียบ polarity ของเอคไคสเตียรอยด์นี้ คาดว่าเป็นเอคไคสเตียรอยด์ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลมากกว่า 20-hydroxyecdysone (2) อยู่ 1 หมู่ จึงได้นำเอคไคสเตียรอยด์ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอยู่ 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 เอคไคสเตียรอยด์ที่มาจาก *V. canescens* มี minor component อยู่ประมาณ 6% และเอคไคสเตียรอยด์ที่มาจาก *S. nutans* ก็มี minor component ประมาณ 6% โดย minor component ของแหล่งหนึ่งจะตรงกับ major component ของอีกแหล่งหนึ่ง จึงน่าจะเป็นไปได้มากที่สุดที่ major ecdysteroid จาก 2 แหล่งนี้ต่างก็เป็น 20,26-dihydroxyecdysone (28) แต่ต่างกันที่ stereochemistry เพียงบางจุดหรือเพียงจุดเดียว ซึ่งเป็นไปได้มากที่สุดที่จะเป็น epimer กันที่ C-25 แต่จากการศึกษาประวัติของ 20,26-dihydroxyecdysone (28) ตั้งแต่การค้นพบครั้งแรกจากหนอนไหมชาบูบ (*Manduca sexta*)³¹ และจากพืช *Podocarpus elatus*³² จนกระทั่งถึงปัจจุบัน ยังไม่ได้มีการกล่าวถึงการมี C-25 epimers ของ 28 ฉะนั้น ถ้าสารจาก 2 แหล่งนี้เป็น C-25 epimers กันจริง ก็จะเป็นสิ่งที่น่าสนใจมาก โดยเฉพาะในแง่ของฤทธิ์ทางชีวภาพ



เนื่องจากปริมาณของเอคไคสเตียรอยด์ที่ได้จากเปลือกกรากของ *V. canescens* มีน้อยมาก เพื่อที่จะให้มีสารนี้เพียงพอในการศึกษาข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี เราจึงมองหาแหล่งอื่นของเอคไคสเตียรอยด์นี้ เพราะการหาเปลือกกรากของ *V. canescens* มาใหม่จะทำให้ยากกว่า แหล่งของเอคไคสเตียรอยด์นี้ได้มองไปที่เปลือกลำต้นของต้นไผ่น้ำ (*V. glabrata*) เพราะหาได้ง่ายกว่าเปลือกต้นหรือเปลือกกรากของต้น *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 ที่ได้จาก *S. nutans* ก็ยังนับว่าเป็นประโยชน์อยู่ เพราะ authentic sample ที่ได้มานี้น้อยมาก

สำหรับเปลือกของต้น *V. glabrata* ได้มีการศึกษาส่วนประกอบทางเคมีมาก่อนหน้านี้แล้ว คือได้พบ 20-hydroxyecdysone (2)¹² ในปริมาณมาก และยังพบ turkesterone (23)¹² และ calonysterone (16)¹⁵ ในปริมาณน้อย และเราได้ใช้แหล่งของพืชนี้เป็นแหล่งสำคัญของ 20-hydroxyecdysone (2) ในงานสังเคราะห์ เมื่อนำเปลือกของต้นไปผ่านมาผ่านขั้นตอนการสกัดแยกตามวิธีการปกติของการสกัดแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ พอถึงขั้นตอนการสกัดด้วย *n*-butanol นำ butanol extract มาแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้สารหลาย fraction สำหรับ fraction ที่มี turkesterone (23) อยู่เป็นส่วนใหญ่ และมีเอคโคสเตียรอยด์ที่มีอยู่ในปริมาณน้อยอยู่จำนวนหนึ่ง ซึ่ง TLC ตรงกับ 20,26-dihydroxyecdysone (28) นำกลุ่มนี้มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี เพื่อแยกสารนี้จาก turkesterone (23) กับเอคโคสเตียรอยด์อื่น 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* จากจังหวัดนครศรีธรรมราช⁹ และจากจังหวัดแพร่ และ *V. pinnata*⁹ ในการนี้เราได้พัฒนาวิธีการหาสาร 28 ให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์อัตราส่วนของ epimers ทั้งสองของ 28 โดยใช้ 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* ทั้งจากภาคเหนือและภาคใต้มีค่าพอๆ กัน และมีค่าไม่ต่างไปมากนักจากเปลือกต้นของ *V. glabrata* และ *V. pinnata* แต่ความแตกต่างที่เด่นชัดอยู่ที่อัตราส่วนของ epimers จากเปลือกต้นของพืชในสกุล *Vitex* นี้ กับเปลือกรากของ *V. canescens*

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

ที่ 2) เพื่อที่จะให้ได้สาร 28 และ epimer เพื่อทดสอบการศึกษาทางสเปกโทรสโกปี และการนำไปทดสอบฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบต่อไป

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

24-*epi*-Pterosterone (27) เป็นเอคโคสเตียรอยด์ที่หายากชนิดหนึ่ง ได้ถูกสกัดแยกออกมาเมื่อเร็ว ๆ นี้ จากรากของ *Athyrium yokoscense*¹⁶ เอคโคสเตียรอยด์ที่เป็น C-24 epimer ของสารนี้คือ pterosterone (26) ได้มีผู้แยกสกัดได้จากพืชหลายชนิด¹⁷ รวมทั้ง *Vitex megapotaamica*¹⁸ สาร 26 นี้มีฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบสูงใน *Sarcophaga bioassay*¹⁹ จากการที่เราได้สังเคราะห์และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของ 24-*epi*-abutasterone (24) และ abutasterone (25) มาแล้ว และพบว่าสารทั้ง 2 ชนิดนี้มีฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับ 20-hydroxyecdysone (2) ใน *Musca bioassay*²⁰ จากการค้นพบดังกล่าวนี้ทำให้ทราบว่าสารที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอยู่ที่ตำแหน่ง 24 ทั้ง 24R และ 24S มีผลให้ฤทธิ์ทางชีวภาพลดลง อย่างไรก็ตามจากการที่มีผู้รายงานว่าสาร 26 ซึ่งเป็น C-25 deoxy analogue ของสาร 25 มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง²¹ ทำให้เราต้องการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร 26 และ 27 โดยใช้ *Musca bioassay*

การที่จะศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเอคโคสเตียรอยด์ 26 และ 27 ใช้นั้น จะต้องมีการตั้งกล่าว สำหรับสาร 26 นั้นได้มีรายงานว่าพบในพืชสกุล *Vitex* ดังกล่าวมาแล้วข้างต้น เราจึงได้ตรวจสอบพืชสกุล *Vitex* และพบว่าสาร 26 เป็นส่วนประกอบที่มีอยู่น้อยในเปลือกต้นไผ่น้ำ (*V. glabrata*) จึงได้ทำการสกัดแยกออกมา ข้อมูลทาง ¹H NMR (ตารางที่ 4) ตรงกับที่ได้มีผู้รายงานไว้²²

4) การสกัดแยกเอคโคสเตียรอยด์ที่มีขั้วสูงจากเปลือกรากของ *Vitex canescens*

เมื่อนำส่วนที่สกัดด้วยนอร์มัลบิวทานอล (butanol extract) จากเปลือกของต้นไผ่น้ำ (*Vitex canescens*) มาตรวจสอบด้วย TLC พบว่ามีเอคโคสเตียรอยด์ที่มีขั้วสูงอยู่ คอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจลไม่สามารถแยกเอคโคสเตียรอยด์ที่มีขั้วออกจากกันได้ ยกเว้นสามารถแยกเอคโคสเตียรอยด์ที่มีขั้วน้อยลงมาและ turkesterone (23) ส่วนใหญ่ออกจากเอคโคสเตียรอยด์ที่มีขั้วมาก

เมื่อทำการแยกด้วย HPLC โดยใช้ reversed-phase คอลัมน์ Spherisorb ทำให้สามารถกำจัด turkesterone (23) ที่ยังเหลืออยู่ให้หมดไป แต่ก็ไม่สามารถแยกเอคโคสเตียรอยด์ที่มีขั้วสูงออกจากกันได้ อย่างเด็ดขาด จึงนำส่วนย่อย (fractions) ต่างๆ ที่แยกสารได้เพียงบางส่วนมารวมกันใหม่ ซึ่งเมื่อตรวจสอบด้วย TLC ธรรมดา (normal-phase) พบว่าได้เพียงจุด (spot) เดียวเท่านั้น นำส่วนผสมมาแยกด้วยคอลัมน์ μ Bondapak C18 ชนิดวิเคราะห์ ทำให้ได้สาร 3 กลุ่มด้วยกัน เมื่อตรวจสอบด้วย TLC ธรรมดา พบว่าแต่ละกลุ่มมีสารที่มีขั้วน้อยกว่าเล็กน้อยอยู่ประมาณ 3-5 % ซึ่งสามารถแยกออกไปโดยใช้ HPLC คอลัมน์ชนิด normal-phase คือ Hypersil Si ทำให้ได้เอคโคสเตียรอยด์บริสุทธิ์ 3 ชนิด ซึ่งมีข้อมูล ¹H NMR และ

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

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

สาร 29 เป็นเอกโคสเตียรอยด์ชนิดแรกที่ย่อยออกมาจาก HPLC คอลัมน์ ชนิด reversed-phase ข้อมูลจาก HR-FAB แมสสเปกตรัมแสดงสูตรโมเลกุลเป็น $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_3$ ข้อมูล ^1H NMR สเปกตรัมของสารนี้ (ตารางที่ 5) มีความคล้ายคลึงกับของ turkesterone (23) จากลักษณะของสเปกตรัมและค่าตำแหน่งของ chemical shifts ของ H-1 ถึง H-17 รวมทั้ง 18-Me และ 19-Me ในตารางที่ 5 แสดงให้เห็นว่าเอกโคสเตียรอยด์ทั้ง 2 ชนิดมี steroid nucleus เดียวกัน จากการที่ไม่มีสัญญาณโปรตอน 1 ตัวที่ประมาณ $\delta 3.8$ 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 $\delta 4.50$ และ $\delta 4.35$ ซึ่งสอดคล้องกันอย่างพอดีกับ H-22 และ H-24 (หรือกลับกัน) โดยอาศัยพื้นฐานที่ว่าเอกโคสเตียรอยด์ที่ได้จากพืชทุกชนิดมีสเตอริโอเคมีที่ C-20 และ C-22 เหมือนกัน สเตอริโอเคมีที่คาร์บอนดังกล่าวของสารนี้กับสาร 23 ควรเหมือนกัน ฉะนั้น configuration ของหมู่ไฮดรอกซิลที่ C-24 อาจเป็น 24R (คือ 29) หรือ 24S เมื่อเปรียบเทียบกับค่า chemical shifts และลักษณะของสเปกตรัมของ H-22 และ H-24 ของสาร 29 กับ 24-*epi*-abutasterone (24, ดูตารางที่ 1) จะเห็นว่าเกือบจะเหมือนกัน ค่า chemical shifts ของโปรตอนเหล่านี้ แตกต่างไปจาก abutasterone (25) ซึ่งอยู่ที่ $\delta 4.08$ และ $\delta 4.24$ (หรือกลับกัน) สิ่งซึ่งควรกล่าวไว้ในที่นี้คือ chemical shift ของ 21-Me ของ 29 และ 24 มีค่าใกล้เคียงกันมาก แสดงว่าการจัดเรียงทางสเตอริโอเคมีที่ C-20 และ C-22 (รวมทั้งที่ C-24) ของ 29 เหมือนกับ 24

โครงสร้างของสาร 29 ยังได้รับการยืนยันต่อไปด้วยการเปรียบเทียบ ^{13}C NMR สเปกตรัมกับสาร 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)-11 α ,20,24-trihydroxyecdysone

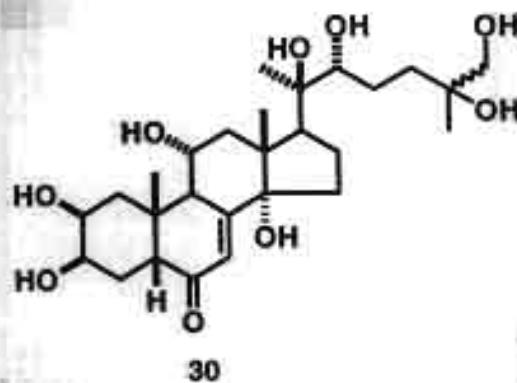
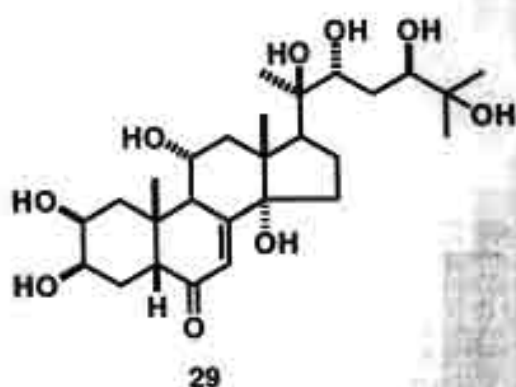
11 α ,20,26-Trihydroxyecdysone (30 "epimer 1")

เอกโคสเตียรอยด์ชนิดที่สองมีสูตรโมเลกุลเหมือนกับชนิดแรก ข้อมูล ^1H NMR ของ H-1 ถึง H-17 รวมทั้ง 18-Me และ 19-Me ของเอกโคสเตียรอยด์นี้กับ turkesterone (23) เกือบเหมือนกันทุกประการ (ดูตารางที่ 5, สาร 30 "epimer 1") แสดงว่า steroid nucleus ของเอกโคสเตียรอยด์ทั้งสองนี้เหมือนกัน

อย่างไรก็ตาม ค่า chemical shifts ของ H-22 ถึง 27-Me ของ 30 มีความแตกต่างไปจาก 23 รวมทั้งเอคไดสไดรียอดชนิดแรก แตกต่างไปคล้ายคลึงกับ 20,26-dihydroxyecdysone (28) (ตารางที่ 5) โดยเฉพาะ H-22, H-26 และ 27-Me ฉะนั้นโครงสร้างของเอคไดสไดรียอดนี้น่าจะเป็น 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 ของเอคไดสไดรียอดทั้ง 2 ชนิดนี้เหมือนกัน ส่วนค่า chemical shifts ของ C-23 ถึง C-27 สอดคล้องกันอย่างดีกับสายโซ่ด้านข้างของ 20,26-dihydroxyecdysone (28) (ดูตารางที่ 6) ฉะนั้นโครงสร้างของเอคไดสไดรียอดนี้จึงเป็น 30 "epimer 1" คือ 11 α ,20,26-trihydroxyecdysone (ในตารางที่ 5 และ 6 เรียกว่า 30 "epimer 1")

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

เอคไดสไดรียอดชนิดที่สามมีสูตรโมเลกุลเหมือนกับเอคไดสไดรียอดชนิดที่สอง ^1H NMR สเปกตรัมของสารนี้ (ดูตารางที่ 5, สาร 30 "epimer 2") เกือบเหมือนกันทุกประการจนแทบไม่มีส่วนที่แตกต่างกับสารชนิดที่สอง ^{13}C NMR สเปกตรัม ของสารทั้งสองชนิดนี้เกือบเหมือนกันทุกประการ โดยมีที่ต่างกันพอควรที่ค่า chemical shifts ของ C-26 และ C-27 เท่านั้น ข้อมูลทั้งหมดเหล่านี้แสดงว่าสาร 2 ชนิดนี้เป็น epimer กันที่ C-25 ก่อนหน้านี้เมื่อเรารู้ว่าได้มีการแยก 20,26-dihydroxyecdysone (28) ทั้งสอง C-25 epimers จากพืชสกุล *Vitex* จำนวนหนึ่ง และได้มีการสังเคราะห์เอคไดสไดรียอด 28 ทั้งสอง epimers และได้ศึกษา ^1H NMR และ ^{13}C NMR สเปกตรัมของแต่ละ epimer⁶⁰ อย่างไรก็ตามข้อมูลทางสเปกโตรสโกปีที่มีอยู่นี้ไม่สามารถบอกได้ว่าสาร 30 แต่ละ epimer มี absolute configuration ที่ C-25 เป็นอย่างไร



การสกัดแยกเอคโคสเตียรอยด์เพื่อใช้ในการสังเคราะห์

การสกัดแยก 20-hydroxyecdysone (2) ซึ่งเป็นเอคโคสเตียรอยด์ที่มีอยู่ในปริมาณมาก ได้กระทำโดยใช้เปลือกต้นไผ่น้ำ (*Vitex glabrata*) โดยสกัดด้วยเมทานอล แล้วจึงนำมาสกัดตามขั้นตอนตั้งแต่ตัวทำละลายไม่มีขั้ว คือเฮกซะน และใช้ตัวทำละลายมีขั้วปานกลางคือคลอโรฟอร์ม จนถึงตัวทำละลายมีขั้วมากคือเมทานอล แล้วจึงนำมาแยกเอคโคสเตียรอยด์ 2 ออกมา ในบางครั้งได้สกัดโดยข้ามขั้นตอนการใช้คลอโรฟอร์มไปก็ได้เช่นกัน แต่มีสารประเภทอื่น รวมทั้งเอคโคสเตียรอยด์อื่นที่มีอยู่ในปริมาณน้อยออกมากับ butanol extract มาก ทำให้ขั้นตอนการแยกเอคโคสเตียรอยด์ 2 ออกมายากขึ้น แต่การสกัดด้วยคลอโรฟอร์มก่อนก็มีข้อเสียบางประการคือมีเอคโคสเตียรอยด์ 2 บางส่วนออกมาด้วย อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการสกัดแยกสาร 2 ออกมาบ่อยๆ ก็ทำให้มีประสบการณ์ที่สามารถทำการแยกสาร 2 ออกมาได้โดยไม่ยากนัก สำหรับปริมาณสารที่แยกออกมาได้ขึ้นกับ pH ของพืชที่ใช้

การสังเคราะห์ปรับเปลี่ยนเอคโคสเตียรอยด์

การสังเคราะห์เอคโคสเตียรอยด์และปรับเปลี่ยนเอคโคสเตียรอยด์หรือโครงสร้างที่แตกต่างไปเพื่อนำไปใช้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไปนั้น ในช่วงระยะเวลา 3 ปีของโครงการ เราได้ตั้งเป้าหมายไว้ว่าจะสามารถทำงานได้ 3 ส่วนคือ การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่สายโซ่ด้านข้าง (side chain) ของเอคโคสเตียรอยด์ การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันในโครงร่างหลักของเอคโคสเตียรอยด์ และการเตรียมอนุพันธ์ของหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งต่างๆในโมเลกุล

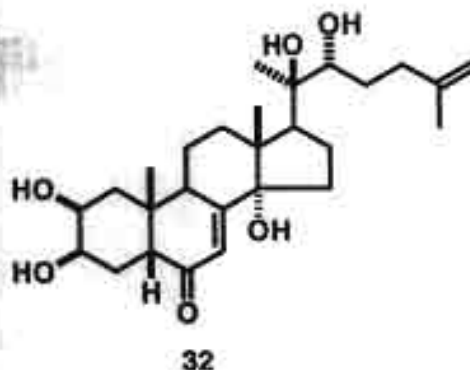
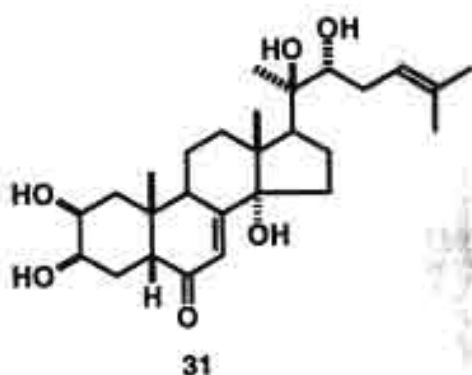
1. การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่สายโซ่ด้านข้างของเอคโคสเตียรอยด์

สำหรับการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่สายโซ่ด้านข้างของเอคโคสเตียรอยด์นั้น เป็นงานด้านสังเคราะห์ส่วนแรกที่เราได้เริ่มดำเนินการ เป้าหมายก็คือหาทางสังเคราะห์เอคโคสเตียรอยด์และ/หรือ analogues ของเอคโคสเตียรอยด์ที่มีความแตกต่างกันของหมู่ฟังก์ชันที่สายโซ่ด้านข้าง ไม่ว่าจะเป็นจำนวน ตำแหน่ง และสเตอริโอเคมีของหมู่ไฮดรอกซิลที่อยู่สายโซ่ด้านข้าง และเป็นงานส่วนที่น่าสนใจมากที่สุด เพราะจากผลของการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพทางด้านการเป็นฮอร์โมนลอกคราบที่ผ่านมาเท่าที่มีรายงานไว้ ถึงแม้จะมีไม่มากนักก็ตาม แต่ก็ทำให้ทราบว่า การเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยที่สายโซ่ด้านข้างของเอคโคสเตียรอยด์จะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านฤทธิ์ทางชีวภาพของเอคโคสเตียรอยด์ได้มาก กล่าวคือทางกลุ่มของ Horn¹³ ได้พบว่าหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 22 มีความจำเป็นต่อการแสดงฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบของแมลงวันสกุล *Calliphora* และ configuration จะต้องเป็นแบบ R ด้วย และยังพบอีกว่าหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 25 ไม่จำเป็นต่อการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าว และถ้าตำแหน่งที่ 25 ถูก acetylation ฤทธิ์ทางชีวภาพของเอคโคสเตียรอยด์นั้นจะลดลงไปด้วย จากการค้นพบ

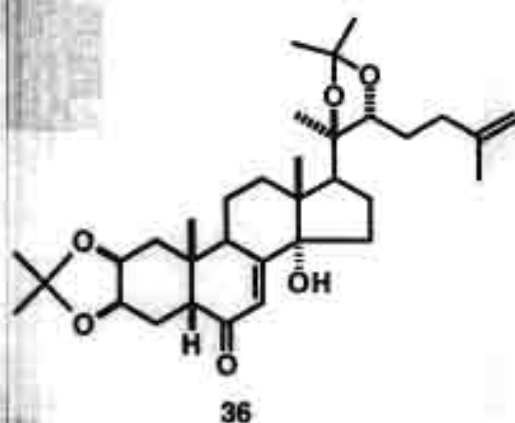
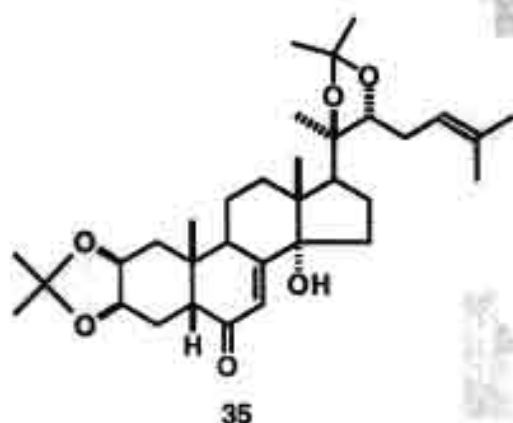
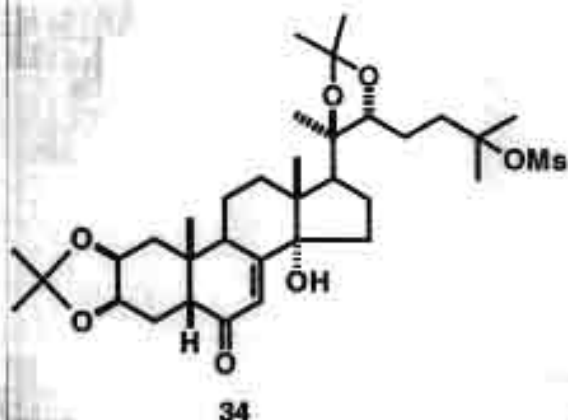
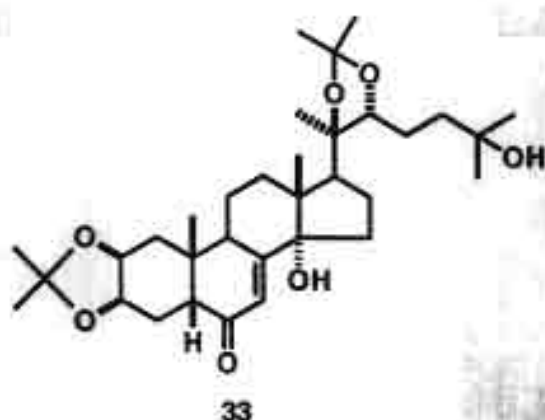
pinnasterone (3) ซึ่งเป็นเอคไดสเตียรอยด์จากต้นสมอติ่นก⁶ และมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่ำ ก็เป็นการยืนยันว่าเอคไดสเตียรอยด์ที่ไม่มีหมู่ฟังก์ชันแบบ 22R จะมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่ำ แต่เมื่อมีการพบ canescensterone (4) จากเปลือกต้นผ้าเสี้ยน⁷ ก็ทำให้เราเกิดความประหลาดใจมากที่ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารนี้กลับสูง ทั้งๆ ที่เอคไดสเตียรอยด์นี้เป็นอนุพันธ์ pyrrrole-2-carboxylate ของ 3 เท่านั้น ด้วยเหตุนี้เราจึงต้องการสังเคราะห์เอคไดสเตียรอยด์ที่มีจำนวน ตำแหน่ง และสเตอริโอเคมีของหมู่ไฮดรอกซิลต่างๆ กันในสายโซ่ด้านข้าง

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

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



ฉะนั้นจาก 20-hydroxyecdysone (2) เราป้องกันหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่งที่ 2, 3, 20 และ 22 ไม่ให้เกิดปฏิกิริยาที่ไม่ต้องการ โดยการเตรียมเป็น acetonide derivative คือ 20-hydroxyecdysone 2,3:20,22-diacetonide (33) ตามวิธีที่ได้เคยใช้มาแล้ว¹⁷ ปฏิกิริยาระหว่าง diacetonide (33) กับ mesyl chloride ใน pyridine โดยมี DMAP (4-dimethylaminopyridine) อยู่ด้วย ปฏิกิริยาเกิดผ่าน mesylate 34 ซึ่งจะ ไม่มีการแยกออกมา แต่ปฏิกิริยาจะเกิดการขจัด MeOH ค่อยไป ทำให้ได้ส่วนผสมระหว่าง olefin 35 และ 36 เป็นส่วนผสมซึ่งไม่สามารถแยกจากกันได้บน TLC นำส่วนผสม 35 และ 36 มาขจัดหมู่ acetonide ออกไปด้วย 70% กรดอะซิติก ได้ส่วนผสมของ olefin 31 และ 32 ในการวิจัยด้านผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เมื่อเราสามารถแยกเอคไดสเตียรอยด์ชนิดใหม่คือ 24-*epi*-abutasterone (24) ออกมาได้จากเปลือกกรากของต้นผ้าเสี้ยนดัง



ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นนั้น เนื่องจากเราสามารถแยก 24-*epi*-abutasterone (24) ออกมาได้เพียง 3 มิลลิกรัม เท่านั้น ฉะนั้นหากเราสามารถสังเคราะห์เอคไดสเตอรอยด์ที่หายาก (rare ecdysteroid) ชนิดนี้ได้ เราก็จะมีแหล่งของเอคไดสเตอรอยด์ที่จะนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้ และจะสามารถทราบได้ว่า เอคไดสเตอรอยด์ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 24 เพิ่มเข้ามาจากเดิมที่มีโครงสร้างหลักเป็นสาร 2 จะมีฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มขึ้นหรือลดลง หรือเท่ากับเอคไดสเตอรอยด์ 2 ซึ่งถือว่ามีความสำคัญทางชีวภาพสูง และถือเป็นสารมาตรฐานในการทดสอบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบแมลง ฉะนั้นเราจึงวางแผนในการสังเคราะห์เอคไดสเตอรอยด์ 24 โดยการนำปฏิกิริยา dihydroxylation พันธะคู่ที่ C-24 และ C-25 ของ olefin 31 โดยใช้ osmium tetroxide ก็น่าจะได้ส่วนผสมระหว่าง 24 กับ C-24 epimer ของสารนี้คือ abutasterone (25) เริ่มต้นโดยให้เกิดเป็นสารเชิงซ้อนระหว่าง OsO₄ กับ ligand ซึ่งในครั้งแรกนี้ใช้ pyridine ทำในสารละลาย *tert*-butanol-THF-H₂O (7:4:1) ก่อนแล้วจึงเติมสารละลายของ olefin 29 ลงไป การใช้ OsO₄ ใช้แบบ stoichiometric ไม่ได้ใช้แบบ catalytic คืออัตราส่วนของ OsO₄:olefin เป็น 1.3:1 ปรากฏว่าปฏิกิริยา dihydroxylation เกิดได้ดี หลังจาก work up และแยกสารผลิตภัณฑ์ 24 และ 25 ออกจากกันโดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟีอย่างระมัดระวังแล้ว ได้พิสูจน์เอกลักษณ์กับ 24 ที่แยกมาได้จากเปลือกรากของต้นคำเกี๊ยน โดยเปรียบเทียบ TLC และ ¹H NMR กัน พบว่าตรงกันทุกประการ และเมื่อเปรียบเทียบข้อมูล

¹H NMR ของ abutasterone ที่สังเคราะห์ได้กับข้อมูลที่มีผู้รายงานไว้” ปรากฏว่าสอดคล้องกันอย่างดี จึงสรุปได้ว่า เราได้พบวิธีที่สะดวกในการสังเคราะห์ 24 และ 25 เอคโคสเตียรอยด์ชนิดหนึ่ง ถึงแม้ว่าได้มีการพบในพืชมาก่อนหน้าที่มีการพบชนิดแรก⁴⁶ แต่ก็ยังเป็นเอคโคสเตียรอยด์ที่พบในปริมาณน้อย ยกเว้นในการพบครั้งแรกจากพืช *Abuta velutina*⁵³ และโอกาสที่เราจะได้มาเพื่อทำการทดสอบทางชีวภาพก็คงจะยาก ฉะนั้น การที่เราสามารถสังเคราะห์ได้จึงเป็นผลดีในแง่การศึกษา SAR เพราะจะได้เปรียบเทียบกับ 24-*epi*-abutasterone (24) ว่า สเตอริโอเคมีที่ต่างกันที่ C-24 จะทำให้มีฤทธิ์ทางชีวภาพแตกต่างกันหรือไม่

ในแง่ของการได้เอคโคสเตียรอยด์ 24 และ 25 มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพนั้น ถือว่าบรรลุจุดมุ่งหมายแล้ว แต่ในแง่ของการสังเคราะห์อาจยังไม่เพียงพอ คือเคมีที่เกี่ยวข้องอาจยังกำกวมกันระหว่างโอกาสที่จะได้รับการพิจารณาหรือไม่ได้รับการพิจารณาคีพิมพ์ในวารสารชั้นนำ ถึงแม้ว่าการสังเคราะห์สารทั้ง 2 ชนิดเป็นการพิสูจน์โครงสร้างของ 24-*epi*-abutasterone (24) ว่ามีโครงสร้างดังที่ได้เสนอไว้จริงก็ตาม เราจึงพิจารณาทำ Sharpless asymmetric dihydroxylation⁵⁴ โดยการใช้ chiral ligand โดยดูว่าโอกาสที่จะสังเคราะห์ได้ 24-*epi*-abutasterone (24) อย่าง stereoselective มากกว่าการใช้ ligand pyridine จะมีได้นาน้อยเพียงใด เราได้เลือกใช้ chiral ligand 2 ชนิด คือ dihydroquinidine 4-methyl-2-quinolyl ether (DHQD-MQE) และ dihydroquinidine 9-phenanthryl ether (DHQD-PE) ใช้อัตราส่วนของ ligand:OsO₄:olefin 1.5:1.3:1 เพื่อเป็นการเปรียบเทียบกับ ligand ที่ไม่ chiral เราจึงทำปฏิกิริยา dihydroxylation เหมือนกับกรณีที่ใช้ pyridine ทุกประการ และได้ทำปฏิกิริยาที่ใช้ pyridine ซ้ำอีกครั้งหนึ่ง เพื่อหาอัตราส่วนที่แน่นอนของเอคโคสเตียรอยด์ 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 เพิ่มขึ้นเป็น 4:1 ทั้งกรณีของ 4-methyl-2-quinolyl ether (MQE) และ 9-phenanthryl ether (PE) ดูตารางที่ 8 นอกจากนี้เรายังสนใจที่จะใช้ “second generation” chiral ligand⁵⁵ 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 ทั้งสองกรณีเหล่านี้ได้ใช้ HPLC เพื่อยืนยันผลจากการใช้ ¹H NMR ด้วย

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

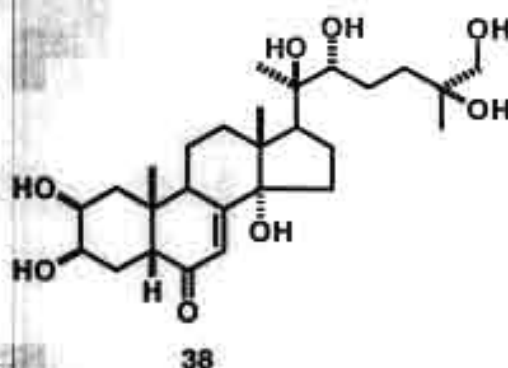
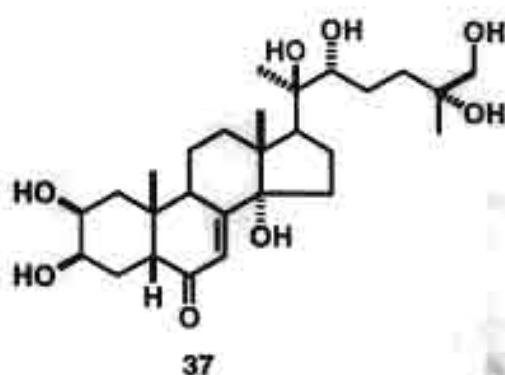
(DHQ) ซึ่งคาดว่าจะเกิด asymmetric dihydroxylation ของ olefin 31 โดยมี 25 เกิดมากขึ้นกว่าเดิม ในขณะที่ 24 เกิดขึ้นน้อยกว่าเดิม กล่าวคือเราได้ใช้ DHQ-MQE, DHQ-PE, (DHQ)₂-PHAL และ (DHQ)₂-PYR ผลปรากฏว่าเมื่อใช้ DHQ-MQE และ DHQ-PE ได้อัตราส่วนของ 24:25 เป็น 10:7 ทั้ง 2 กรณี เมื่อใช้ (DHQ)₂-PHAL และ (DHQ)₂-PYR 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* ที่ขอมมาได้นั้นมีปริมาณน้อย (1-2 มิลลิกรัม) จนไม่สะดวกต่อการนำไปศึกษาด้านต่างๆได้ เพราะเกรงว่าจะใช้สารที่เป็น authentic sample นี้หมดไปเสียก่อน จึงได้ตัดสินใจหาทางสังเคราะห์ 20,26-dihydroxyecdysone ทั้งสอง epimers และจะได้มีโอกาสดำเนินการศึกษาลักษณะเฉพาะทาง ¹H NMR ของสารทั้งสอง และจะใช้สารที่สังเคราะห์ได้ไปทดสอบฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบต่อไป

ในการสังเคราะห์ 20,26-dihydroxyecdysone ทั้งสอง C-25 epimers ถ้าคิดย้อนกลับไปถึง key intermediate ก็พบว่า 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 จึงถือเป็นการดีที่ 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 OsO₄ ใน pyridine ได้สารผลิตภัณฑ์ 20,26-dihydroxyecdysone ซึ่ง TLC แสดง spot เดียว แต่ ¹H 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 configuration ที่ตำแหน่ง 25 ฉะนั้นจึงยังไม่สามารถทราบได้ว่า epimerใดตรงกับโครงสร้างใดใน 2 โครงสร้าง (คือ 37 และ 38)



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

จากการสังเคราะห์เอคไดสเตอรอยด์ 28 ทั้งสอง epimers ตามวิธีที่ 1 จะเห็นได้ว่า ขั้นตอนแรกคือการเตรียม 25,26-didehydroponasterone A (32) นั้น ต้องแยก 32 ออกจาก stachysterone C (31) ซึ่งแยกจากกันได้อย่างมาก ทำให้ได้ปริมาณผลผลิต (% yield) ขั้นสุดท้ายค่อนข้างต่ำ ถึงแม้ในขั้นตอนหลัง ซึ่งเป็นการทำ dihydroxylation โดยใช้ OsO₄ จะให้ปริมาณผลผลิตสูงก็ตาม ฉะนั้นเราจึงหาวิธีสังเคราะห์ใหม่ที่จะดีกว่าอีก

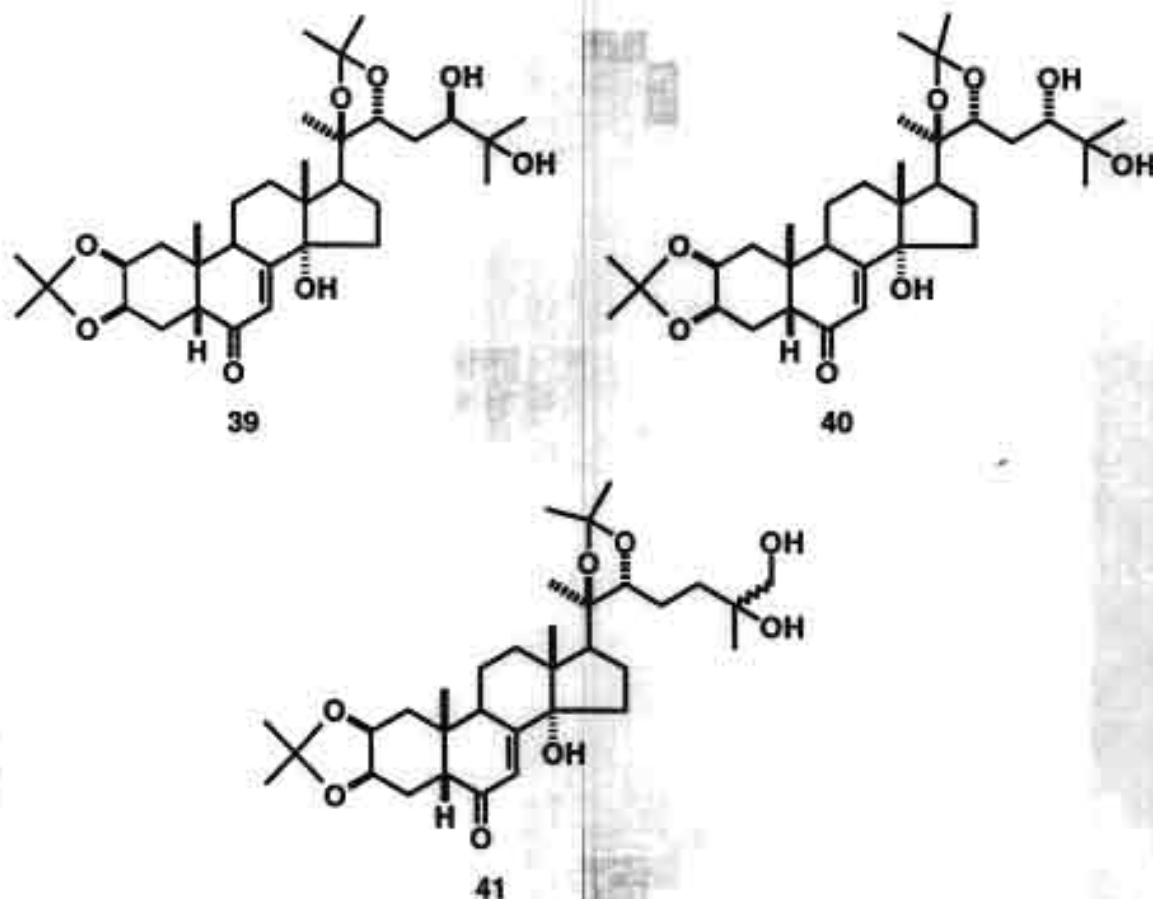
การสังเคราะห์ที่เป็นทางเลือกที่ 2 เป็นการนำส่วนผสมของ 31 และ 32 มาทำ dihydroxylation ด้วย OsO₄ โดยไม่แยก 31 และ 32 ออกจากกันก่อน ปรากฏว่าได้ส่วนผสมของ 24-*epi*-abutasterone (24), abutasterone (25) และ 20,26-dihydroxyecdysone (28) ทั้งสอง epimers เอคไดสเตอรอยด์ 24 และ 25 สามารถแยกออกจาก 28 ได้ง่ายโดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี 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 ลอก

ไป ได้ 24, 25, 20,26-dihydroxyecdysone "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 ทั้งสอง epimers สามารถแยกผ่าน diacetonide derivative ได้โดยไม่ต้องใช้ HPLC แต่มีข้อเสียคือ มีขั้นตอนของการแยกที่ค่อนข้างสลับซับซ้อน

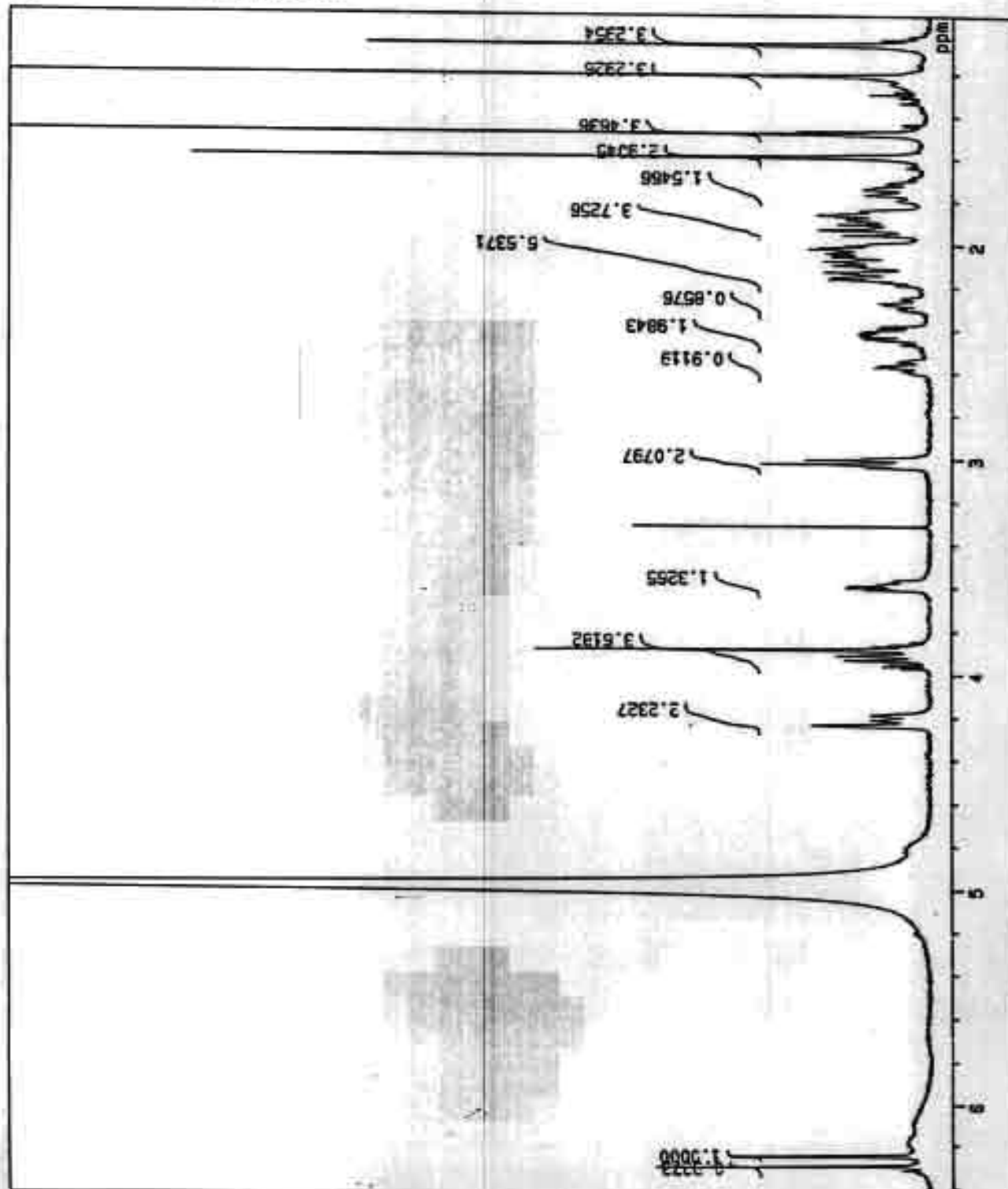
หากเปรียบเทียบการสังเคราะห์ทั้ง 3 วิธี จะเห็นได้ว่าวิธีที่ 2 มีความสะดวกที่สุด เพราะสามารถแยกสารอื่นออกจากสารที่ต้องการได้ง่ายกว่าวิธีอื่น และปริมาณผลผลิตก็อยู่ในขั้นดีกว่า



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

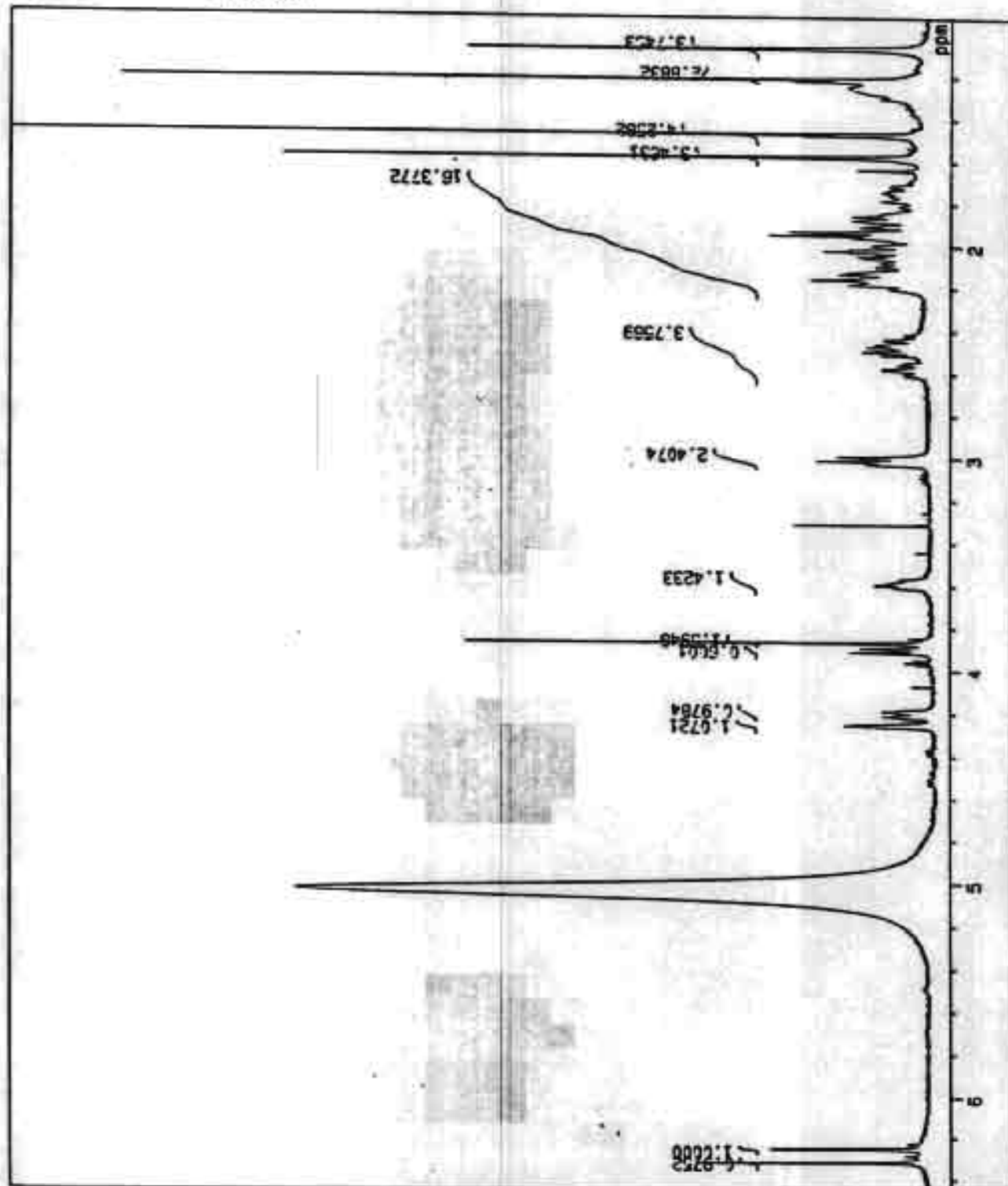
เมื่อเปรียบเทียบ ^1H NMR สเปกตรัมของ 20,26-dihydroxyecdysone "epimer 1" (ตรงกับ 20,26-dihydroxyecdysone จาก *S. mutans*, รูปภาพที่ 1) กับ 20,26-dihydroxyecdysone "epimer 2" (ตรงกับ 20,26-dihydroxyecdysone จาก *V. canescens*, รูปภาพที่ 2) พบว่าเกือบจะเหมือนกันทุกประการ ลักษณะที่แตกต่างกันของสเปกตรัมทั้งสองคือ การมีสัญญาณ multiplet ที่ $\delta 2.27$ ในสเปกตรัมของ "epimer 1" แต่ไม่มีสัญญาณที่ค่า chemical shift ดังกล่าวในสเปกตรัมของ "epimer 2" นอกจากนี้ระยะห่างระหว่าง H-2 กับ

nmr 1. ¹H NMR Spectrum of 20,26-Dihydroxyecdysone "Epimer 1"



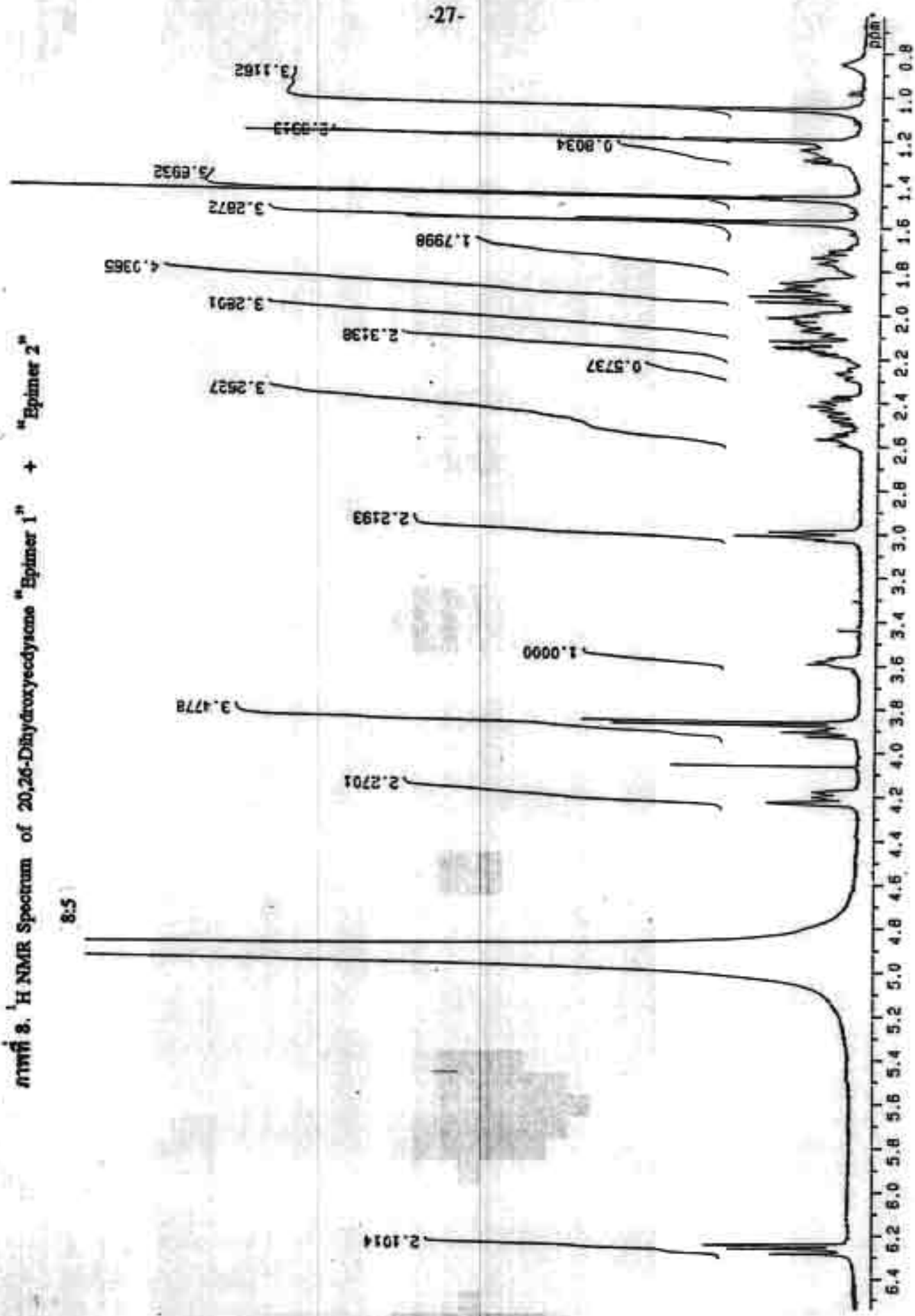
NO	INT	Hz	FTN	Hz	IG
1	0.9273	3170.73	3137.46	0.05	
2	1.0000	3136.55	3109.39	0.05	
3	2.2327	2137.71	2086.80	0.05	
4	3.6182	1993.97	1905.47	0.05	
5	1.3255	1821.55	1761.73	0.05	
6	2.0797	1530.41	1477.31	0.05	
7	0.9119	1319.23	1252.39	0.05	
8	1.9843	1249.34	1175.49	0.05	
9	0.8576	1171.22	1109.88	0.05	
10	5.5371	1107.13	994.45	0.05	
11	3.7256	985.98	907.55	0.05	
12	1.5466	910.69	830.64	0.05	
13	2.9845	816.60	769.61	0.05	
14	3.4636	761.06	711.01	0.05	
15	3.2326	632.89	578.57	0.05	
16	3.2354	580.26	497.39	0.05	

Figure 2. ^1H NMR Spectrum of 20,26-Dihydroxyecdysone "Epimer 2"



NO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
TOTAL	0.9752	1.0000	1.0721	0.9784	0.6031	1.5948	1.4233	2.4074	3.7559	16.3772	3.4631	4.2582	2.8032	3.7453
INT	3175.92	3137.46	2141.60	2114.52	1958.95	1941.79	1818.80	1524.31	1324.11	1124.53	889.28	758.62	618.85	500.87
FTN	3146.31	3118.24	2113.60	2076.98	1939.65	1913.71	1765.70	1476.39	1190.14	828.50	766.25	712.54	578.57	505.93
TS	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05

Figure 3. ^1H NMR Spectrum of 20,26-Dihydroxyecdysone "Epimer 1" + "Epimer 2"



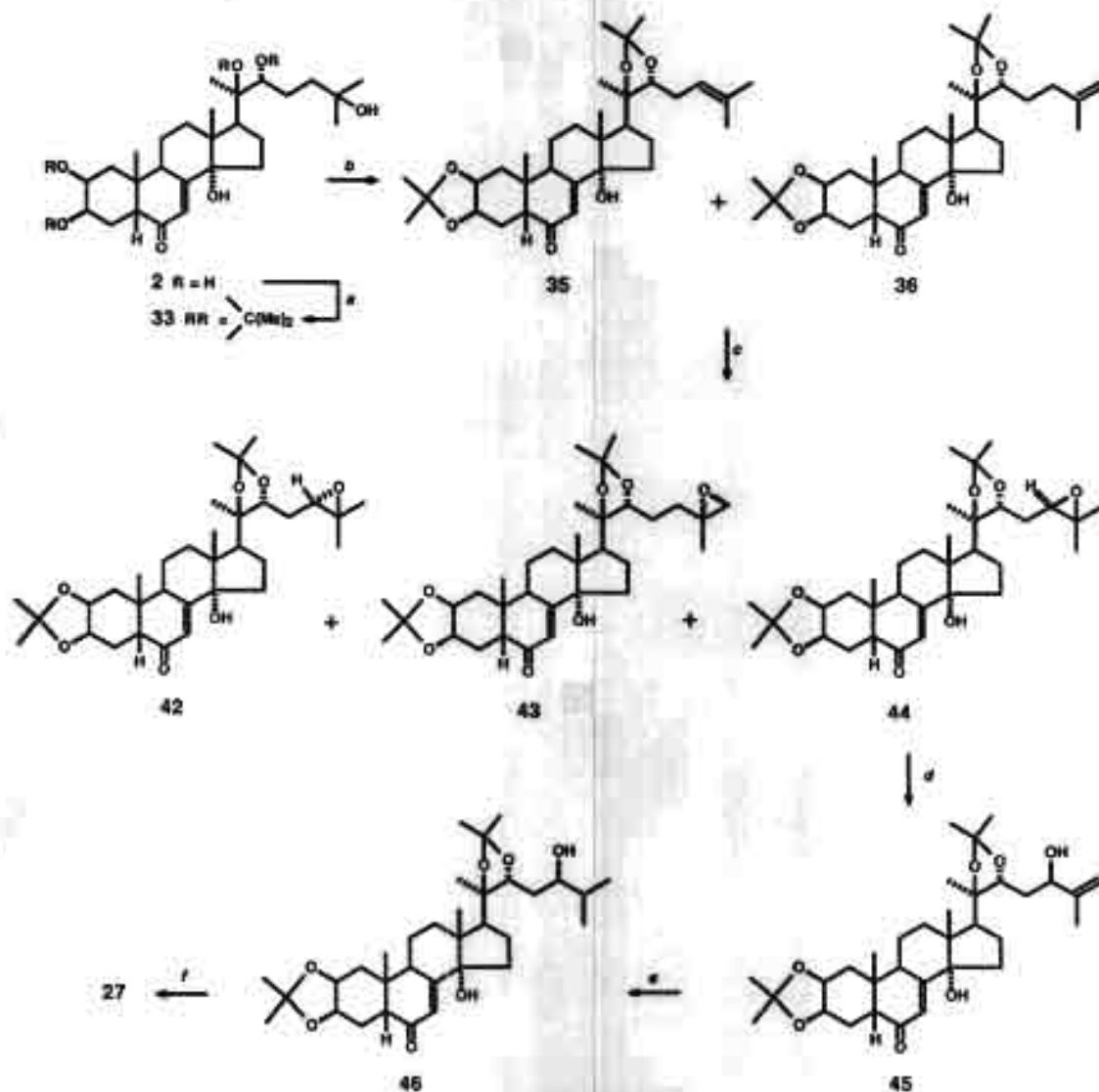
H-3 ในช่วง δ 4.19-4.25 และระหว่าง H-7 กับ OH ในช่วง δ 6.25-6.31 เมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างสอง epimer พบว่าใน "epimer 2" สัญญาณของโปรตอนคู่ดังกล่าวจะอยู่ห่างกันมากกว่า "epimer 1" อย่างไรก็ดี ตามเมื่อดู ^1H NMR สเปกตรัมของส่วนผสม (ประมาณ 1:1) ระหว่าง "epimer 1" กับ "epimer 2" ที่ได้มาจากการสังเคราะห์ พบความแตกต่างเพิ่มเติมอีกคือ 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 แล้วดู ^1H NMR สเปกตรัมดังแสดงในภาพที่ 3 จะเห็นได้ว่าเราสามารถกำหนดค่า 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 diacetone ของสารตั้งต้น 2 ได้ 20-hydroxyecdysone 2,3:20,22-diacetonide (33) ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับ MsCl ใน pyridine และมี DMAP อยู่ด้วย ได้ส่วนผสมที่ไม่แยกกันของไอโซเมอร์ 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 สองไอโซเมอร์ซึ่งไม่ทราบสเตอริโอเคมีของวง epoxide จากประสบการณ์ของเราเคยได้สเตอริโอเคมีที่มี oxygen function ที่ตำแหน่ง 24 ซึ่งเป็น R configuration จะมีจำนวนมากกว่าพวกที่มี configuration เป็น 24S³⁹ ฉะนั้นจึงคาดว่าไอโซเมอร์ 44 ซึ่งมีจำนวนมากกว่า 42 จะเป็น epoxide มีอันตรสำหรับการสังเคราะห์สาร 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 ^1H NMR (ดูตารางที่ 4) การมี olefinic function ที่ตำแหน่ง 25 ทราบได้จากสัญญาณ broad doublet 2 ชุด ของ H-26 ทั้งสองที่ δ 4.83 และ 4.99 การมีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 24 ทราบได้จากการมีสัญญาณของ H-24 ที่ δ 4.21 ในขั้นตอนของการเปิดวง epoxide นั้น ความจริงแล้วเราได้ลองใช้รีเอเจนต์อื่นแทน LiBr เช่น Li 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%) ¹H NMR ของสาร 27 ที่สังเคราะห์ได้สอดคล้องกับที่แยกได้จากพืชซึ่งมีผู้รายงานไว้¹⁰ ปริมาณผลผลิตรวมทั้งหมดของ 27 จาก epoxide 44 คือ 35%



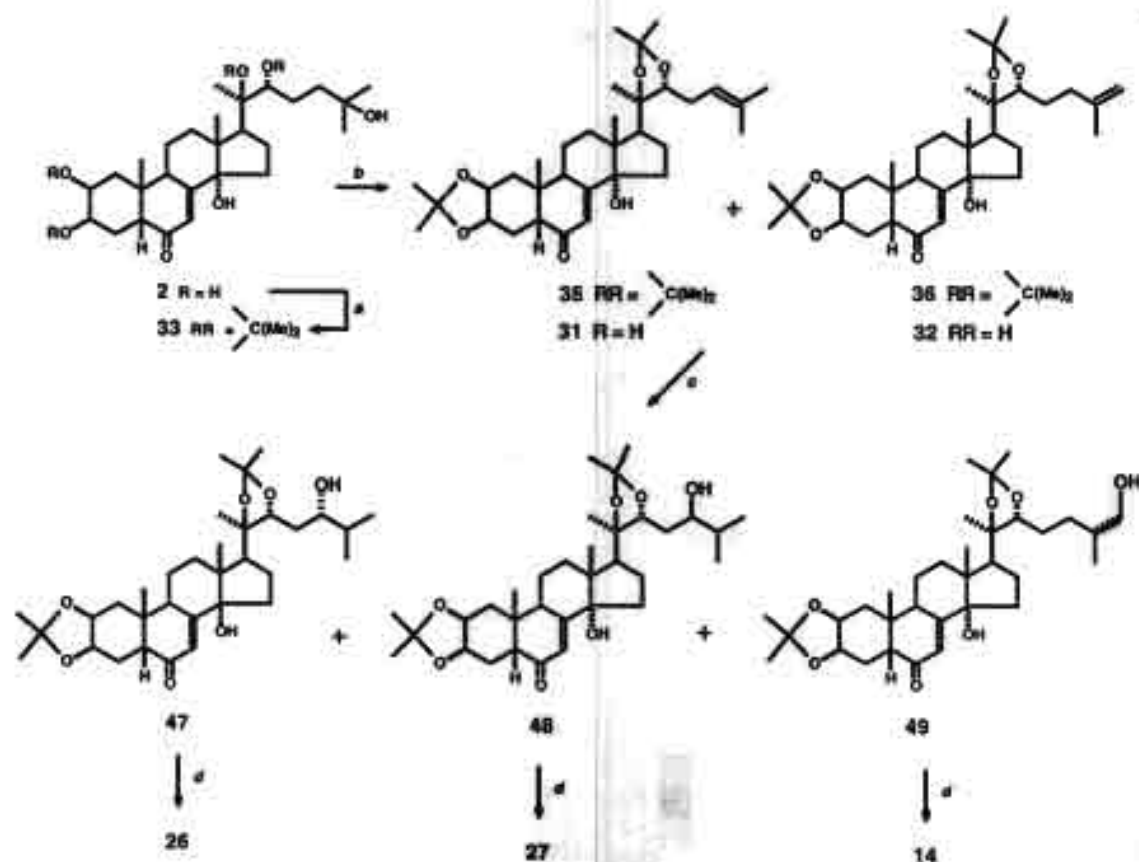
Scheme 1. Reagents and conditions: a, CH₃COCH₃, *p*-TsOH (85%); b, Reaction from 33: MsCl, pyridine, DMAP, 5 °C to ambient temp. (87%); c, *m*-CPBA, CHCl₃ (75%); d, LiBr, MeCN (50%); e, H₂/Pd-C, EtOH (95%); f, 70% AcOH (74%)

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

จากการที่เราได้ศึกษาพบว่า abutasterone (25) และ C-25 epimer ของสารนี้คือ 24-*epi*-abutasterone (24) มีฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลดความดันต่ำกว่า 20-hydroxyecdysone (2) และสาร 24 และ 25 มีฤทธิ์ทางชีวภาพพอๆกัน⁵⁹ แต่ปรากฏว่า pterosterone (26) ซึ่งเป็น C-25 deoxy analogue ของ 25 กลับมีฤทธิ์สูงกว่า 25 และ 24-*epi*-pterosterone (27) มีฤทธิ์ต่ำกว่า C-25 epimer (คือ 26) มาก⁶² และจากการที่เราได้สังเคราะห์และแยกของ C-25 epimers ของ 20,26-dihydroxyecdysone (28) ออกจากกันได้โดย ไอโซเมอร์หนึ่งมีฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลดความดันเป็นสองเท่าของอีกไอโซเมอร์หนึ่ง⁶⁰ ฉะนั้นจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของ C-25 deoxy analogue ของสาร (28) คือ inokosterone (14) สาร 14 นี้ได้มีผู้ค้นพบว่าเป็น minor ecdysteroid จากพืช *Achyranthes fauriei*⁶³ และพบว่าออกโคสเตียรอยด์นี้อยู่เป็นสัดส่วน 1:2 ของ C-25 epimers แต่ก็ไม่สามารถแยกออกจากกันได้⁶⁴ ด้วยเหตุดังกล่าวข้างต้นนี้เราจึงต้องศึกษาการสังเคราะห์ inokosterone (14) และแยกสาร C-25 epimers ออกจากกัน (ถ้าทำได้) และนำแต่ละไอโซเมอร์ไปทดสอบฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลดความดันต่อไป

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 diacetonide ก่อน แล้วจึงแยก olefins 31 และ 32 ออกจากกัน แต่ก็แยกได้บางส่วนเท่านั้น⁵⁹ เราจึงวางแผนที่จะใช้ส่วนผสมของ olefins 35 กับ 36 ในการสังเคราะห์ครั้งนี้ ปฏิกิริยา hydroboration ของส่วนผสม 35 กับ 36 กับ diborane-THF complex ใน THF ตามด้วย $\text{H}_2\text{O}_2/\text{aq. NaOH}$ 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 $^1\text{H NMR}$ (ตารางที่ 10) สอดคล้องกับโครงสร้างของสารทั้ง 4 นำสารแต่ละชนิดมา diacetonide โดยใช้ 70% AcOH ได้ pterosterone (26), 24-*epi*-pterosterone (27) และแต่ละ C-25 epimer ของ inokosterone (14) ข้อมูล $^1\text{H NMR}$ (ตารางที่ 11) ของ 26 และ 27 สอดคล้องกับค่าที่มีรายงานไว้⁶² ครั้งนี้เป็นรายงานครั้งแรกที่สามารถแยก inokosterone (14) ออกเป็นสอง C-25 epimers ได้ ทั้งสอง epimers (14 "epimer 1" และ 14 "epimer 2") มี $^1\text{H NMR}$ data เกือบเหมือนกันทุกประการ (ตารางที่ 11) ส่วน diacetonide ของแต่ละ epimer (คือ 49 "epimer 1" และ 49 "epimer 2") ก็มีค่า $^1\text{H NMR}$ คล้ายคลึงกันมากเช่นกัน (ดูตารางที่ 10) ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี (IR, $^1\text{H NMR}$ และแมสสเปกตรัม) ของแต่ละ epimer ของ 14 สอดคล้องเป็นอย่างดีกับโครงสร้าง ัญญาณ $^1\text{H NMR}$ (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



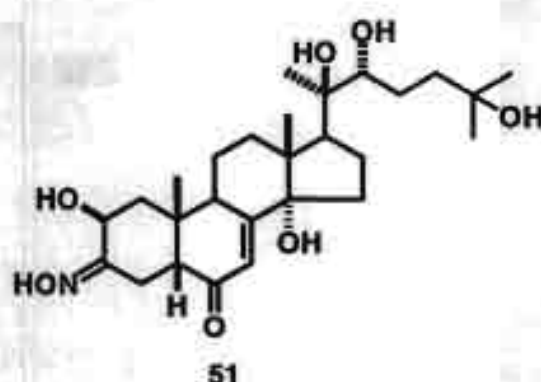
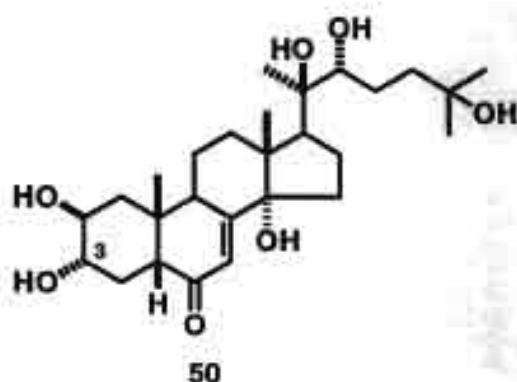
Scheme 2. Reagents and conditions: *a*, CH_3COCH_3 , $p\text{-TsOH}$; *b*, Reaction from 33: MsCl , pyridine, DMAP, 5°C to ambient temp; *c*, (i) $\text{BH}_3\text{-THF}$, (ii) $\text{H}_2\text{O}_2/\text{NaOH}$; *d*, 70% AcOH .

2. การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันในโครงสร้างหลักของเอคไดเตอรอยด์

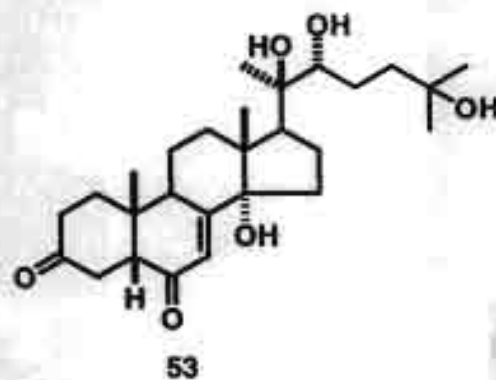
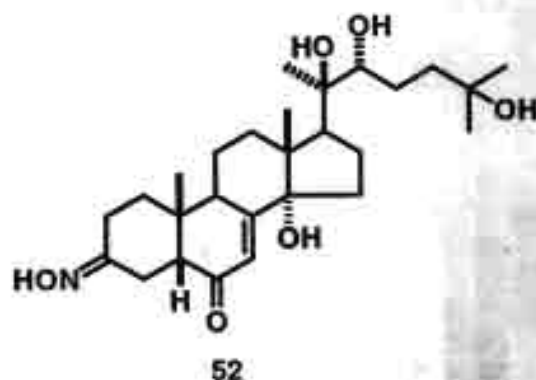
1) การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่วง A

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

จากผลงานของกลุ่มของ Horn¹³ ที่ว่า ลักษณะที่สำคัญประการหนึ่งทางโครงสร้างที่เอคไดเตอรอยด์จะแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่สูงคือ การมีหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่งที่ 3 และต้องอยู่แบบ 3 β สำหรับ stereochemistry ของหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 3 ได้มีผู้ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของ epimer ที่ตำแหน่งที่ 3 ของ 20-hydroxyecdysone (2) คือ 3-*epi*-20-hydroxyecdysone (50) พบว่ามีฤทธิ์ในการเป็นสอร์บอนลอกคราบเพียง 7-10% ของสาร 2 เท่านั้นใน *Musca bioassay*¹⁴ กลุ่มของเราต้องการศึกษาว่า ถ้าเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันอื่นนอกเหนือไปจากหมู่ไฮดรอกซิลแล้ว เอคไดเตอรอยด์จะยังคงมีฤทธิ์ทางชีวภาพอยู่หรือไม่

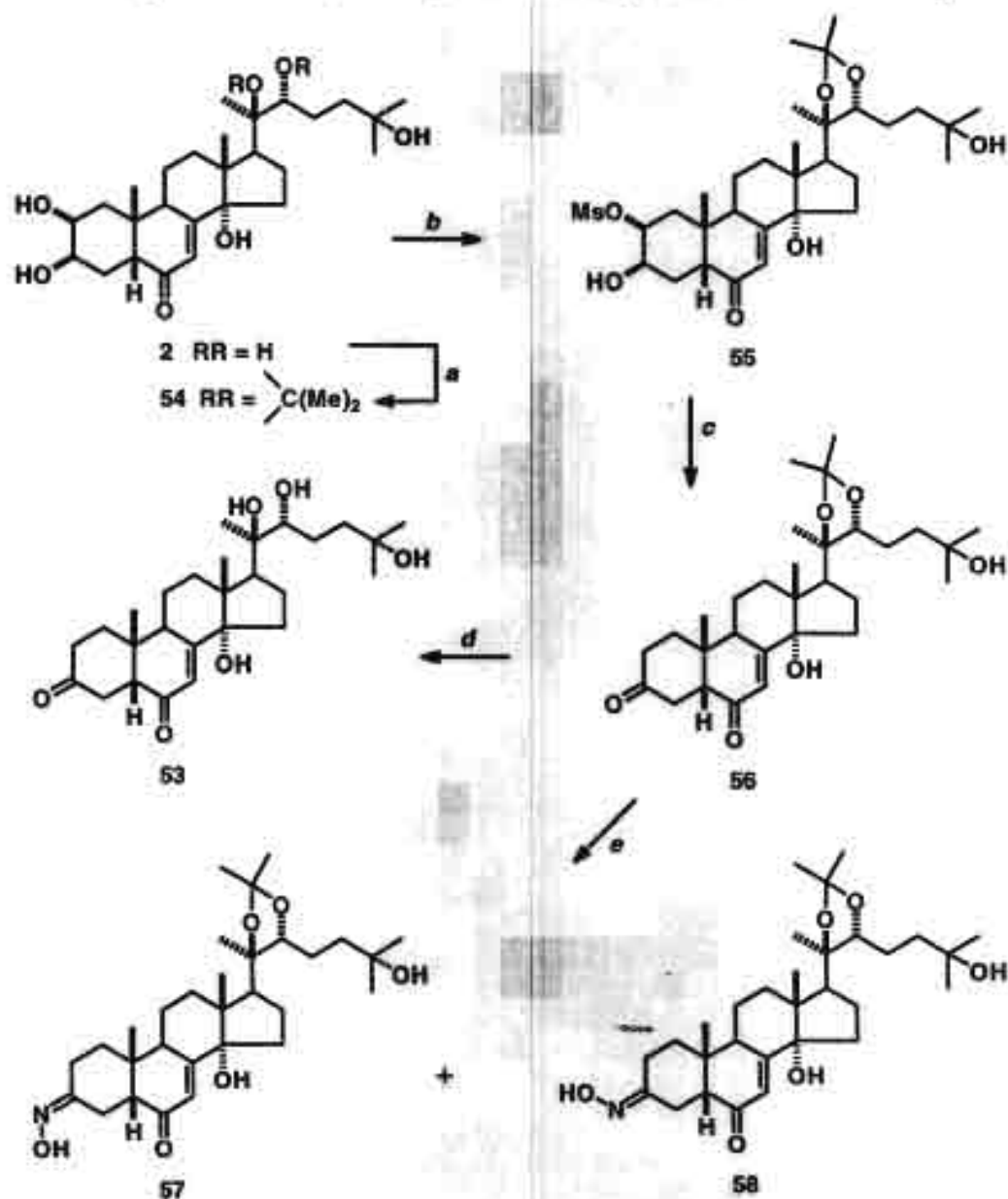


หมู่ฟังก์ชันตำแหน่งที่ 3 ที่เราต้องการศึกษาแทนหมู่ไฮดรอกซิลคือหมู่ oxime โดยอยากทราบว่า หากหมู่ไฮดรอกซิลไม่ใช่เป็นของคาร์บอนตำแหน่ง 3 โดยตรงจะยังมีบทบาทต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของเอคไดเตอรอยด์หรือไม่ เริ่มแรก เราคิดที่จะสังเคราะห์ 3-oxime 51 ซึ่งโดยหลักการจะได้มาจาก 3-dehydro-20-hydroxyecdysone (5) แต่จากรายงานการสังเคราะห์สาร 5 มาในอดีต พบว่าได้ปริมาณผลผลิตต่ำ และมีสารข้างเคียงอีกหลายชนิด¹⁵ และการที่สาร 5 เป็น α -hydroxyketone ทำให้มีปัญหาเกี่ยวกับการทำสารให้บริสุทธิ์ด้วย เราจึงวางแผนว่าจะสังเคราะห์ oxime 52 ซึ่งน่าจะได้อาจมาจาก ketone 53 ซึ่งได้มี



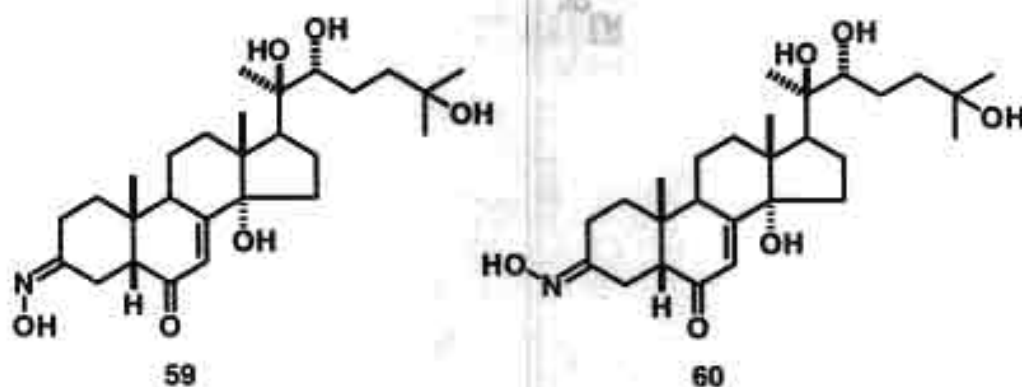
การสังเคราะห์มาก่อนแล้วเมื่อเร็ว ๆ นี้⁶⁶ ถึงแม้ว่าใน series นี้จะไม่มีหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 2 แต่จากการที่กลุ่มของ Horn¹⁷ ได้ศึกษาพบว่าหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่งที่ 2 ไม่จำเป็นต่อการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพของเอคโดสเตียรอยด์ การไม่มีหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่งที่ 2 ใน oxime 52 จึงน่าจะไม่มีปัญหาต่อการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของ oxime และอาจเป็นผลดีที่จะศึกษาผลที่เกิดจากหมู่ oxime เพียงอย่างเดียว

การเตรียม oxime 52 ได้แสดงไว้ใน Scheme 3 โดยการเตรียมสาร 54 ใช้วิธีที่ทราบกันดีแล้ว¹⁷ สำหรับการเตรียมสาร 55, 56 และ 53 ใช้วิธีการของ Suksamran และ Yingyongnarongkul⁶⁶ จาก ketone acetone 56 ทำปฏิกิริยากับ hydroxylamine hydrochloride ใน pyridine ได้ oximes ซึ่งมีสอง geometric



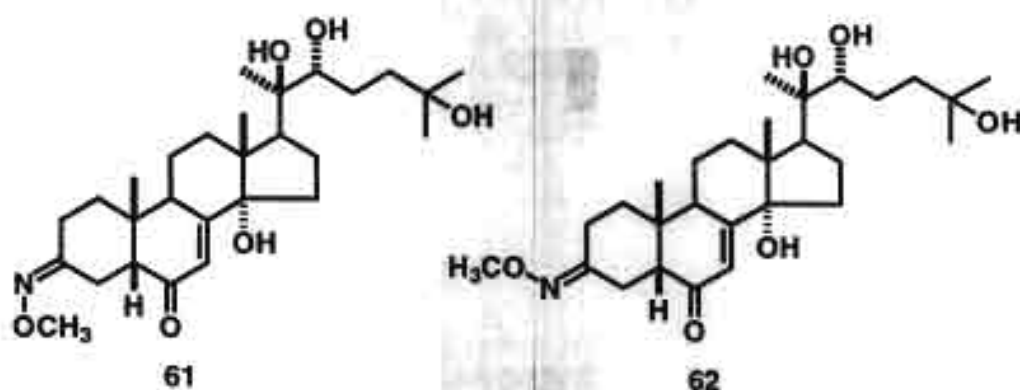
Scheme 3. Reagents and conditions: a, CH₃COCH₃, *p*-TsOH; b, Reaction from 54: MsCl, pyridine; c, 35% guanidine acetate/MeOH; d, 70% AcOH, MeOH; e, NH₂OH·HCl/pyridine [a-d, see ref. 66].

isomers ซึ่งสามารถแยกออกจากกันได้ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีได้ตามลำดับ คือ 3-dehydro-2-deoxy-20-hydroxyecdysone 20,22-acetonide 3-oxime *and* 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, ^1H NMR และแมสสเปกตรัม) สอดคล้องกับโครงสร้าง แต่ข้อมูล ^1H 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 ดังกล่าวนี้นี้ พบว่าไม่เกิดขึ้นในกรณีของ 3-methoxime analogues ซึ่งจะได้กล่าวต่อไป อย่างไรก็ตาม เมื่อนำ oxime 57 มากำจัดหมู่ acetonide ออกไป เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ กลับปรากฏว่าเกิดสารผลิตภัณฑ์ถึง 4 spots บน TLC แสดงว่าขั้นตอนการ deacetonide จะต้องมีการเตรียม oxime จึงได้ทำการ deacetonide สาร 56 ก่อน (ดู Scheme 3) แล้วจึงนำคีโตน 53 ที่ได้มาเตรียม oxime ตามวิธีเดียวกันกับการเตรียมสาร 57 และ 58 ได้ oxime 59 และ 60 ในอัตราส่วน 2:5 จากข้อมูล IR, ^1H NMR และปริมาณธาตุวิเคราะห์ที่มีอยู่ ทำให้ยืนยันได้ว่าสารทั้งสองเป็น oximes แต่ก็ไม่สามารถบอกได้ว่าแต่ละไอโซเมอร์มีการจัดเรียงตัวของหมู่ไฮดรอกซิลอย่างไร การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของ 3-oximes ทั้งสองไอโซเมอร์จึงต้องทำในลักษณะที่เป็นส่วนผสม

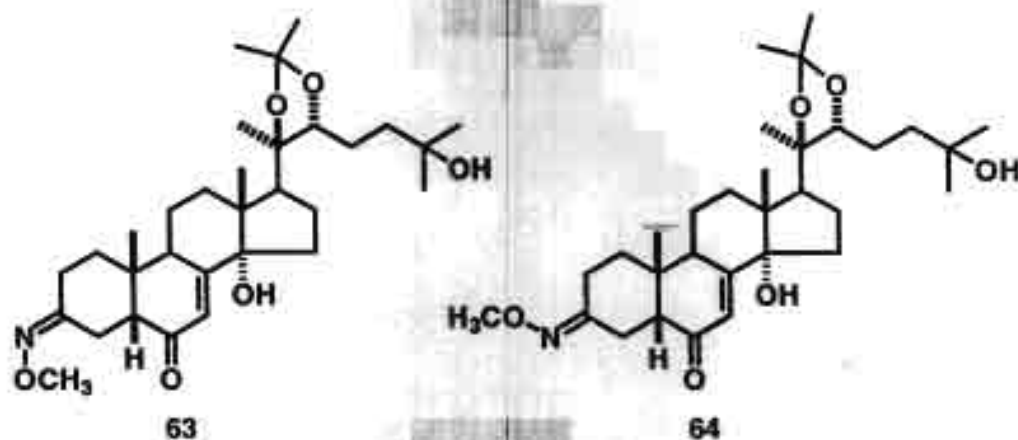


จากผลการทดสอบฤทธิ์การเป็นสอร์โบนอกโคราของส่วนผสม 3-oximes 59 และ 60 พบว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพปานกลาง (รายละเอียดอยู่ในหัวข้อการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ) อาจเป็นไปได้ที่หมู่ไฮดรอกซิลของ oxime เกิด H-bonding กับ receptor ของแมลง ทำให้การ bind เกิดขึ้นได้ดี ทำให้ยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพอยู่ จึงต้องการที่จะทราบว่า ถ้าไม่ให้เกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลของ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

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



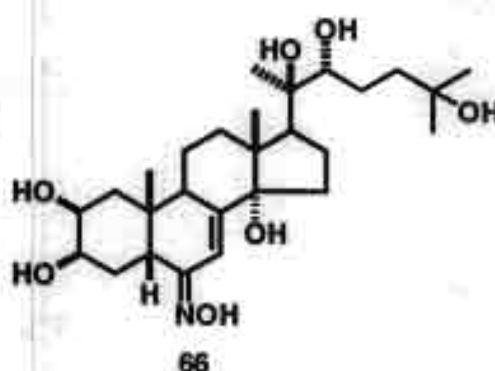
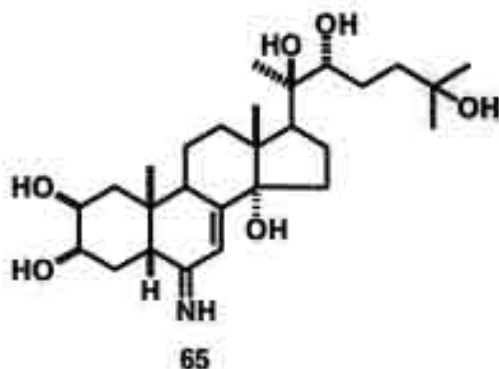
assign stereochemistry ของ methoximes โดยสารทั้งสองชนิดในชุดหลังนี้สามารถบันทึกข้อมูล ^1H NMR ใน CDCl_3 ได้ ข้อมูล ^1H NMR ของสาร 63 และ 64 (ตารางที่ 14) มีความคล้ายคลึงกันมาก แต่สิ่งที่แตกต่างกันคือสัญญาณที่ $\delta 3.06$ แสดง multiplicity ของการ splitting เป็น ddd, $J = 14.1$ และ $\text{ca } 3 \text{ Hz}$ แสดงว่าเป็น H-2 หนึ่งโปรตอน เพราะถ้าเป็น H-4 หนึ่งโปรตอน จะต้องแสดง splitting ได้ไม่เกิน dd เหตุที่ทราบว่สาร 63 มีหมู่ OCH_3 ใกล้เคียง C-2 มากกว่า 64 ก็เพราะสัญญาณของ H-2 (อย่างน้อย 1 โปรตอน) เกิด downfield shift อันเนื่องมาจากการอยู่ใกล้ H-2 ของ OCH_3 มากกว่า H-4 ส่วนที่สัญญาณ $\delta 3.08$ 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 ^1H NMR สเตปครัมของสาร 61 และ 62 ก็พบว่า เป็นไปในทำนองเดียวกันกับสาร 63 และ 64 ได้นำสาร 61 และ 62 ไปทดสอบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกควา (ดูการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ)



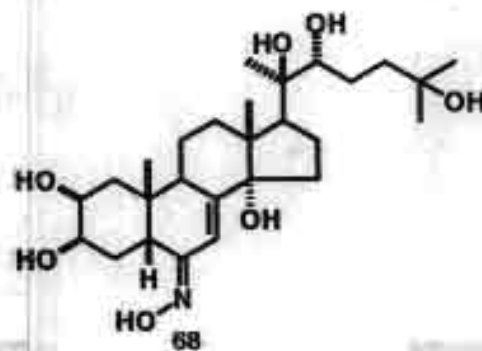
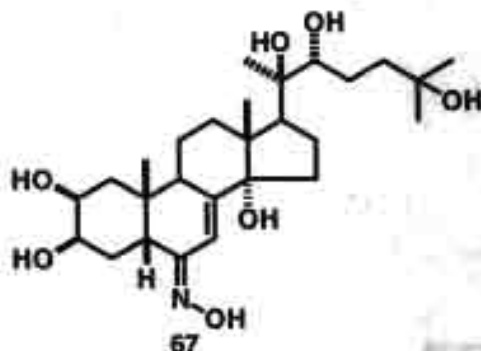
2) การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่วง B

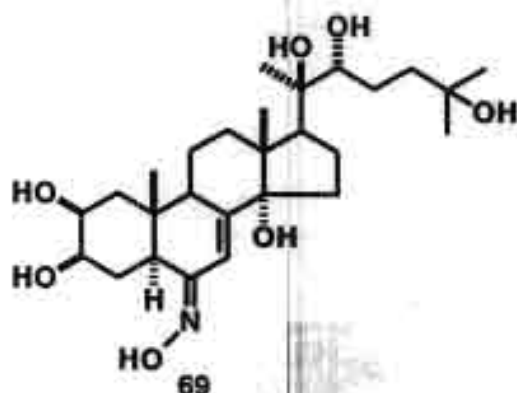
20-Hydroxyecdysone 6-oximes และ 6-methoximes

ดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ลักษณะสำคัญทางโครงสร้างประการหนึ่งที่เอคไคสเตอรอยด์จะแสดงฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบได้จะต้องมี α,β -unsaturated keto system อยู่ที่วง B และต้องเป็นชนิด 7-en-6-one system¹³ และยังพบอีกว่าหากขาดพันธะคู่ไปก็จะทำให้ฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบหมดไป นอกจากนี้หากริคิวัชหมู่คีโตนให้เปลี่ยนเป็นหมู่ไฮดรอกซิล ก็จะทำให้ฤทธิ์ทางชีวภาพหมดไปหรือต่ำมาก¹³ กลุ่มของเราต้องการทราบว่า ถ้ายังคงให้มีระบบ α,β -unsaturated system อยู่ แต่เปลี่ยน heteroatom จากออกซิเจนให้เป็นไนโตรเจน จะทำให้ฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบหมดไปหรือไม่ จากแนวคิดนี้ การเปลี่ยนออกซิเจนที่ตำแหน่ง 6 ใน 20-hydroxyecdysone (2) เป็น nitrogen analogue ก็จะได้โครงสร้าง 65 แต่ก็เห็นได้ทันทีว่าสาร 65 จะไม่เสถียร จึงได้พิจารณา oxime analogue 66 ซึ่งน่าจะเสถียร เราจึงคิด



สนใจจะศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของ oxime 66 อันดับแรกคือ ทำการเตรียม oxime 66 ก่อน โดยใช้วิธีเดียวกับการเตรียม oxime ที่ผ่านมามีข้างต้น ดังนี้ ตั้งคั่นจากเอคไคสเตอรอยด์ 2 ในสารละลาย pyridine ให้ทำปฏิกิริยากับ hydroxylamine hydrochloride แต่ใช้เวลานานกว่าที่ใช้กับการเตรียม 3-oximes หรือ 3-methoximes ที่กล่าวมาแล้ว สารผลิตภัณฑ์ 6-oximes ที่ได้มี 2 ชนิด ชนิดแรกมีขั้วสูงกว่า ปรากฏว่าเมื่อศึกษา ¹H-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

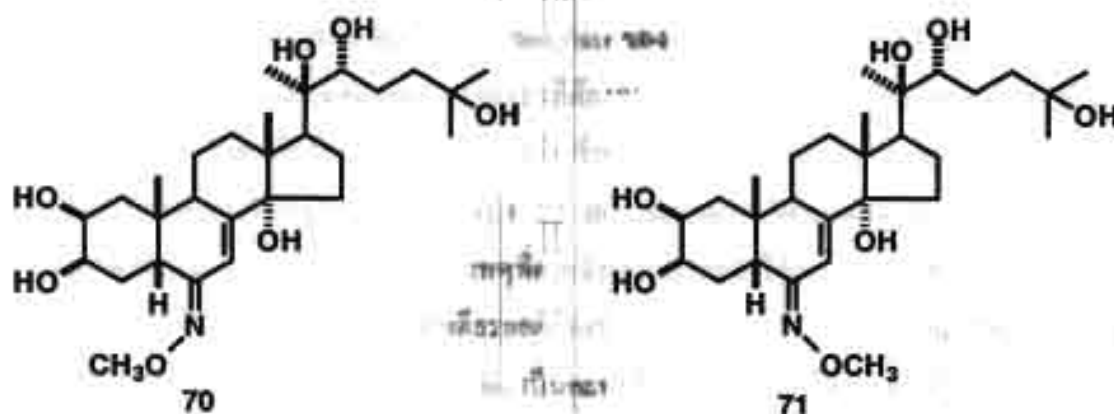




oxime ชนิดที่สองที่มีจำนวนน้อยกว่าชนิดแรก ครั้งแรกได้คาดเดาว่าคงมีโครงสร้างเป็น 68 คือเป็น geometric isomer ของ 67 แต่ที่น่าสงสัยคือ สารนี้กลับมีความเป็นจำนวนน้อยกว่าสารตั้งต้น 2 แต่จากการศึกษาข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ (ตารางที่ 15) พบว่าโครงสร้างกลับเป็น 69 ดังนี้ สัญญาณที่ δ 12.87 เป็นสัญญาณโปรตอนของหมู่ OH ของ oxime สัญญาณของ H-7 อยู่ที่ δ 6.72 ซึ่งเป็นค่าปกติสำหรับ H-7 โดยทั่วไปใน pyridine- d_5 แต่สัญญาณของ H-5 อยู่ downfield มากกว่าปกติอย่างมาก คืออยู่ที่ δ 4.23 โดยที่ H-5 ของสาร 68 อยู่ที่ δ 3.19 แสดงว่าหมู่ OH ของ oxime อยู่ใกล้ H-5 แต่ $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของสารนี้ไม่พบสัญญาณของ H-9 ในช่วง δ 3 - 4 แสดงว่า H-9 เกิด upfield shift จนอยู่นอกช่วงค่า chemical shift ดังกล่าว ซึ่งการที่จะเป็นเช่นนี้ได้จะต้องเกิด C-5 epimerization ได้ 5 α -analogue คือ 69 โดยที่ได้มีการศึกษาโดยกลุ่มของเรพบว่ามี 5 α -ecdysteroids ให้ค่า chemical shift ของ H-9 ที่ upfield กว่า โดยอยู่ในช่วงประมาณ δ 3 $^{\text{H}}$ 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 แตกต่างกันอย่างมากระหว่างสาร 70 กล่าวคือสัญญาณ H-5 ที่ δ 3.06 เป็นค่า chemical shift ที่อยู่ในช่วงปกติของเฮคโดสเตอรอยด์ใน pyridine- d_5 แต่สัญญาณของ H-7 กลับอยู่ downfield ต่อกว่ามาก (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

เขาไว้ว่า น่าจะเกิดขึ้นได้ดีกว่า oxime 68 ด้วยซ้ำไป เพราะถ้า epimerization เกิดจากความกะกะของหมู่ไฮดรอกซิลของ oxime แล้ว หมู่ methoxyl ใน 70 น่าจะยังมีความกะกะมากกว่า จึงน่าจะเกิด epimerization ได้ดีกว่า สาร oximes และ methoximes ทั้งหมดได้นำไปทดสอบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบต่อไป



3. การเตรียมอนุพันธ์ของหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งต่าง ๆ ในโมเลกุล

จากการค้นพบเอคโคสเตียรอยด์ใหม่ 2 ชนิด คือ pinnasterone (3)⁹ และ canescensterone (4)⁹ โดยที่สารทั้งสองนี้มีฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบแมลงต่างกันตรงกันข้าม คือ 3 มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่ำมาก ซึ่งตรงกับที่ได้มีการคาดไว้ล่วงหน้าว่า เอคโคสเตียรอยด์ที่ไม่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 22R จะมีฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบต่ำ ซึ่งตรงข้ามกับที่คาดไว้คือ 4 ซึ่งน่าจะมีความฤทธิ์ทางชีวภาพต่ำมากเช่นเดียวกับ 3 แต่กลับมีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง ทั้ง ๆ ที่ไม่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 22R แสดงว่า หมู่ pyrrole-2-carboxylate ที่ตำแหน่ง 24 เป็นตัวการสำคัญที่ทำให้ฤทธิ์ทางชีวภาพของ 4 สูง เราจึงเกิดความสนใจว่า ถ้าหมู่ดังกล่าวไปอยู่ที่ตำแหน่งต่าง ๆ ในโมเลกุลของเอคโคสเตียรอยด์ชนิดอื่น ๆ จะทำให้ฤทธิ์ทางชีวภาพของเอคโคสเตียรอยด์นั้น ๆ แตกต่างกันหรือไม่อย่างไร ในที่นี้ เอคโคสเตียรอยด์ที่จะนำมาเตรียมอนุพันธ์ pyrrole-2-carboxylate ที่ตำแหน่งต่าง ๆ ในโมเลกุลคือ 20-hydroxyecdysone (2) ซึ่งเป็นเอคโคสเตียรอยด์ที่เราสามารถสกัดแยกมาได้ในปริมาณค่อนข้างมากจากพืชสกุล *Vitex* ดังได้กล่าวมาแล้ว นอกจาก pyrrole-2-carboxylate แล้ว เรายังมีความประสงค์ที่จะเตรียมอนุพันธ์ของสารประกอบ heteroaromatic อื่น เช่น furan-2-carboxylate และ thiophene-2-carboxylate เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารอนุพันธ์เหล่านี้ ในขั้นตอนนี้ 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

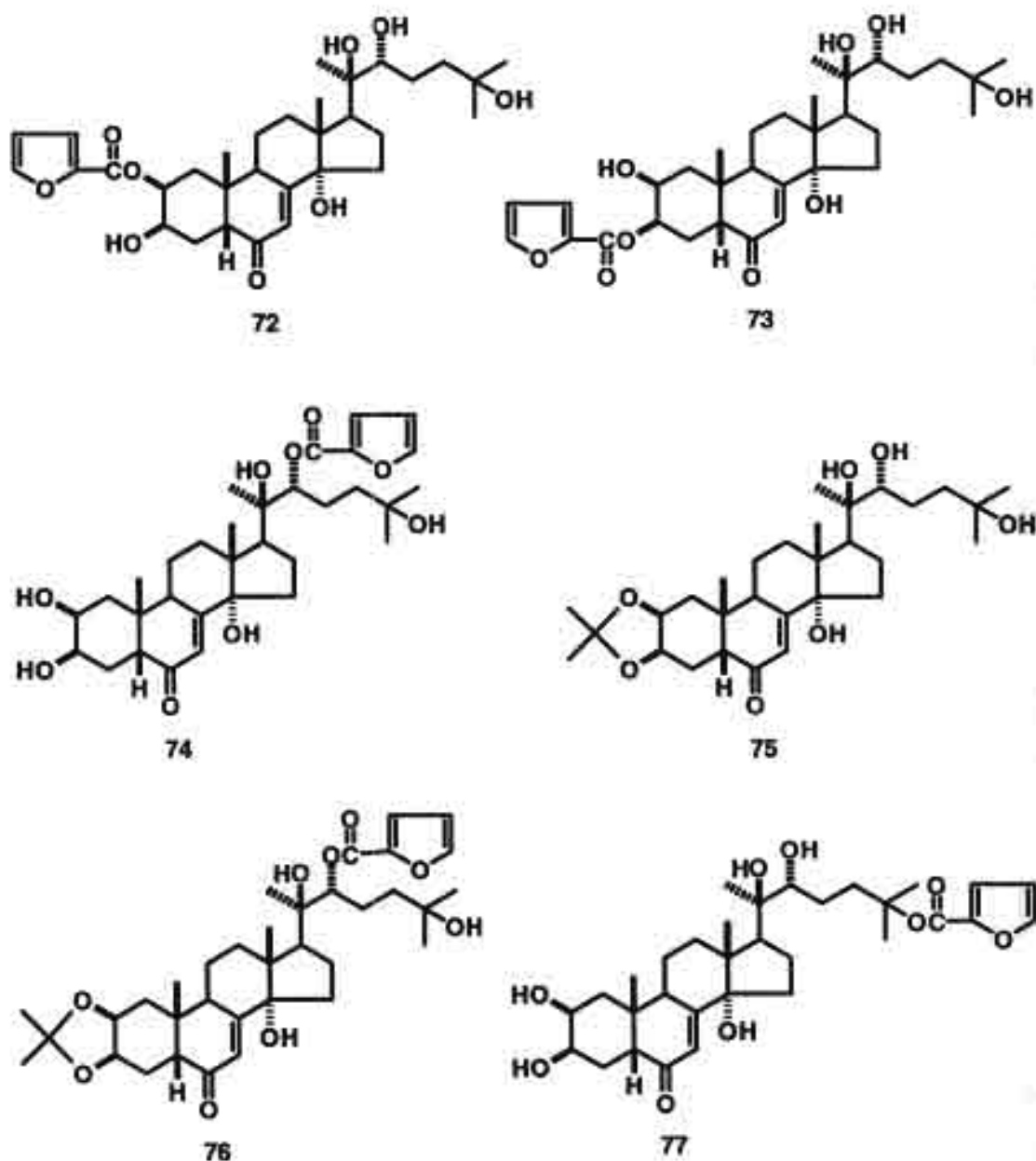
สังเคราะห์อนุพันธ์ pyrrole-2-carboxylate นั้น ไม่มี pyrrole-2-carboxylic acid chloride อยู่ในรายการสารเคมีที่มีจำหน่ายกัน แต่มี pyrrole-2-carboxylic acid ส่วนกรณีอนุพันธ์ thiophene-2-carboxylate นั้น หากสามารถสังเคราะห์ได้ด้วยก็จะเป็นผลดีมากในการศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์ของกลุ่มสาร heteroaromatic 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 เกษ จะสามารถได้สารผลิตภัณฑ์ 72 โดยไม่เกิด acylation ที่ตำแหน่ง 22 ด้วยหรือไม่ เหตุที่คาดว่าจะสามารถทำได้เพราะลำดับความว่องไวของหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งต่าง ๆ ของเอคไดสเตียรอยด์มีดังนี้ $2 > 22 > 3 > 25$ เมื่อทำปฏิกิริยาระหว่างสาร 2 กับ 2-furoyl chloride ในเบนซีน โดยมี pyridine เป็นคะตะลิสต์ ปรากฏว่าได้สารอนุพันธ์ซึ่ง TLC แสดงว่ามีสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น 1 ชนิด ซึ่งคาดว่าเป็น 20-hydroxyecdysone 2-(furan-2-carboxylate) (72) ตามต้องการ ปรากฏว่า $^1\text{H NMR}$ (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 $^1\text{H NMR}$ (pyridine- d_5) คือ ตำแหน่งค่า chemical shift ของโปรตอนตำแหน่งที่ 2 (H-2) ของสารตั้งต้น 2 เกิด downfield shift จาก 84.15 มาอยู่ที่ 85.50 ในสาร 72 และที่ย่าน aromatic proton มีโปรตอนของวง 2-substituted furan อยู่ที่ 87.27 (dd, $J = 3.3, 0.9$ Hz, H-3'), 86.46 (dd, $J = 3.3, 1.8$ Hz, H-4') และ 87.75 (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 นี้เป็นที่ทราบกันดีในกรณีของเอคไดสเตียรอยด์¹⁷

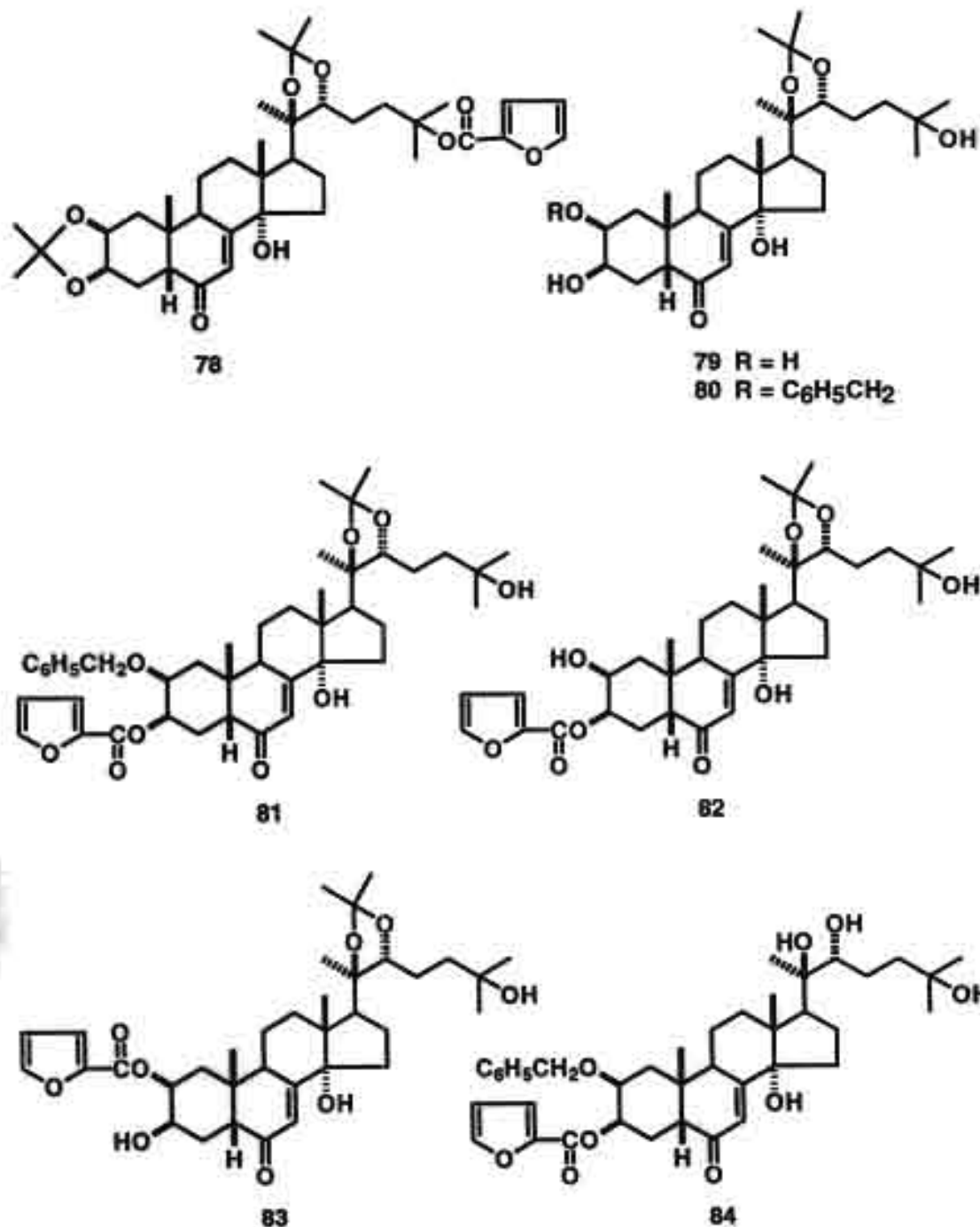
สารอนุพันธ์ furan-2-carboxylate ชนิดต่อไปที่ต้องการเตรียมคือ 20-hydroxyecdysone 22-(furan-2-carboxylate) (74) เริ่มต้นจากสาร 2 อย่างน้อยจะต้องมีหมู่ป้องกันหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 2 เพราะมีความว่องไวต่อปฏิกิริยามากกว่าตำแหน่งที่ 22 หมู่ป้องกันที่ใช้คือ acetonide โดยเตรียม 20-hydroxyecdysone 2,3-acetonide (75) จากสาร 2 โดยให้อะซิโตนทำปฏิกิริยากับ 2 มีคะตะลิสต์ คือ pyridinium *p*-toluenesulphonate ตามวิธีที่เราได้คิดค้นมาก่อนหน้านี้แล้ว¹⁷ นำ 75 ในสารละลาย pyridine มาทำปฏิกิริยากับ 2-furoyl chloride ได้สาร 76 สาร 76 นี้มีหมู่ furan-2-carboxylate อยู่ที่ตำแหน่ง 22 เพราะ H-22 เกิด downfield shift ทำนองเดียวกันกรณีของสารอนุพันธ์ 2-(furan 2 carboxylate) 72 โดย

โปรตอนดังกล่าวอยู่ที่ $\delta 5.05$ (ใน CDCl_3) นำสาร 76 มาทำจัดหมู่ป้องกัน acetonide ออกไป โดยใช้ 70% AcOH ทำให้ได้สารอนุพันธ์ 22-(furan-2-carboxylate) 74 ตามต้องการ



สารอนุพันธ์ furan-2-carboxylate ชนิดต่อไปที่ต้องการเตรียมคือ 20-hydroxyecdysone 25-(furan-2-carboxylate) (77) ในการเริ่มต้นจากสาร 2 จะต้องมีหมู่ป้องกันหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 2, 3 และ 22 เพราะมีความไวต่อปฏิกิริยามากกว่าตำแหน่งที่ 25 หมู่ป้องกันที่ใช้คือ acetonide โดยเตรียม 20-hydroxyecdysone 2,3:20,22-diacetonide (33) จากสาร 2 โดยวิธีที่ได้ทำมาแล้ว¹⁷ จากนั้นนำสาร 33 มาทำปฏิกิริยากับ 2-furoyl chloride ในสารละลาย pyridine กับเบนซีน ในกรณีนี้ใช้ DMAP ช่วยให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นที่ตำแหน่ง 25 ซึ่งมีหมู่กีดขวางอยู่ให้เกิดขึ้นได้ เราทราบได้ว่าสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นคือ

20-hydroxyecdysone 2,3:20,22-diacetonide 25-(furan-2-carboxylate) (78) โดยศึกษาจากข้อมูลทางสเปกโตรสโกปี โดยเฉพาะ ^1H NMR ซึ่งแสดงว่าสามารถนำหมู่ furan-2-carboxylate เข้าไปในโมเลกุลของสารตั้งต้น 33 ได้จากการปรากฏโปรตอนของวง furan ใน ^1H 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



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 ทำปฏิกิริยากับ โซเดียม ตามด้วย benzyl bromide ได้ benzyl ether derivative 80 นำสาร 80 มาทำปฏิกิริยากับ 2-furoyl chloride ในสารละลาย pyridine-เบนซีน ได้เอสเตอร์ 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 เมื่อเทียบกับ สาร 79 (δ 4.03¹⁷) ส่วนสาร 83 นั้น H-2 (δ 5.23) เกิด downfield shift ไป 1.43 ppm เมื่อเทียบกับสาร 79 (δ 3.80¹⁷) 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 และเนื่องจาก กรือเอเจนต์ 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 อยู่ที่ ตำแหน่ง 2 จากการเกิด downfield shift 1.31 ppm ของ H-2 ของสาร 85 (δ 5.46) เมื่อเทียบกับสารตั้งต้น 2 (δ 4.15¹⁷)

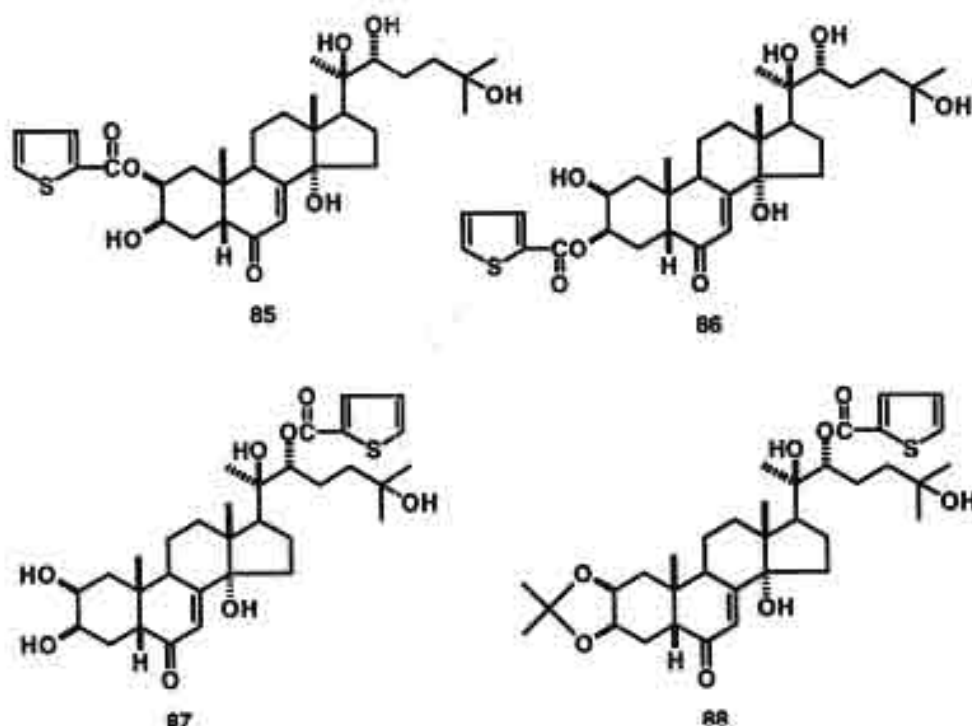
สิ่งที่น่าเป็นข้อแตกต่างที่เด่นชัดของการทำปฏิกิริยาระหว่างสาร 2 กับ thiophene-2-carboxylic acid chloride และกับ 2-furoyl chloride คือกรณีแรกได้สารอนุพันธ์ thiophene-2-carboxylate ที่ตำแหน่งที่ 2 คือสาร 85 เพียงชนิดเดียว (ไม่พบสาร 86) แต่กรณีหลังได้สารอนุพันธ์ furan-2-carboxylate ที่ตำแหน่ง 2 และ 3 (คือสาร 72 และ 73) ทั้ง 2 ชนิด โดยสาร 73 เกิดจากสาร 72 โดย C-2 $\rightarrow$ C-3 acyl migration ซึ่งได้เคยพบแล้วในกรณีการเกิด C-2 $\rightarrow$ C-3 acetyl migration¹⁷

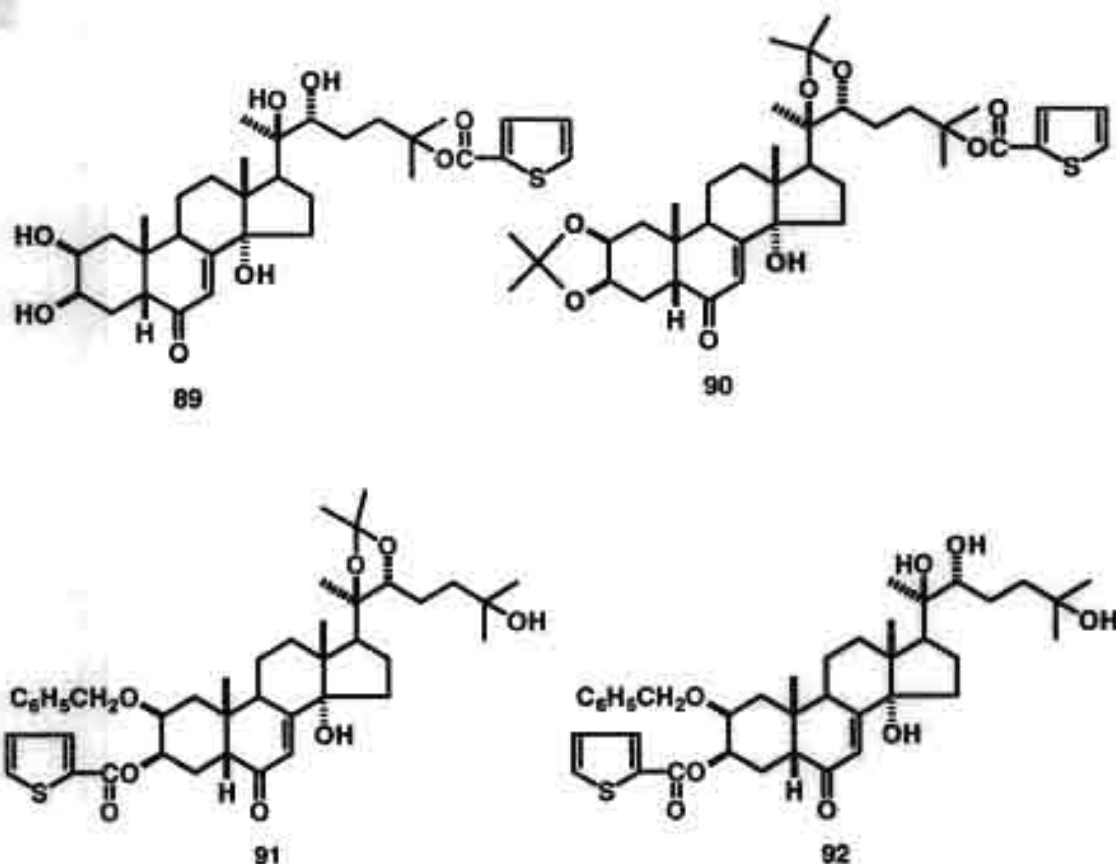
สารอนุพันธ์ thiophene-2-carboxylate ชนิดที่สองที่ได้เตรียมคือ 20-hydroxyecdysone 22-(thiophene-2-carboxylate) (87) ตั้งต้นจาก 20-hydroxyecdysone 2,3-acetonide (75) ทำปฏิกิริยากับ

thiophene-2-carboxylic acid chloride ได้สาร 88 นำ 88 มาทำจัดหมู่ป้องกัน 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) ซึ่งเมื่อนำมาทำจัดหมู่ป้องกัน 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 33¹⁷

สารอนุพันธ์ในกลุ่ม thiophene-2-carboxylate ที่จะสังเคราะห์ต่อไปคือ 20-hydroxyecdysone 3-(thiophene-2-carboxylate) (86) ใช้วิธีการเตรียมแบบเดียวกับเตรียมสารในอนุกรมของ 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 มีความไม่ชอบน้ำมากกว่ากรณีที่น่าสาร 82 มาทำ deacetonation แล้วได้สาร 73 เมื่อได้สาร 92 แล้วจึงทำปฏิกิริยา catalytic hydrogenolysis ปรากฏว่าได้สารผลิตภัณฑ์ 86 เพียง 17% เท่านั้น สาเหตุที่ปริมาณของผลผลิตต่ำนี้ เข้าใจว่าเนื่องจากสารประกอบ sulphur เป็น poison ค่ะคะตะลิสต์ในปฏิกิริยา catalytic hydrogenation อย่างไรก็ตามจุดประสงค์สำคัญของการสังเคราะห์ 86 ก็เพื่อเตรียมไว้สำหรับการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ในขั้นนี้จึงยังไม่ได้ปรับปรุงวิธีการเตรียมที่ได้ปริมาณผลผลิตมากกว่านี้





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

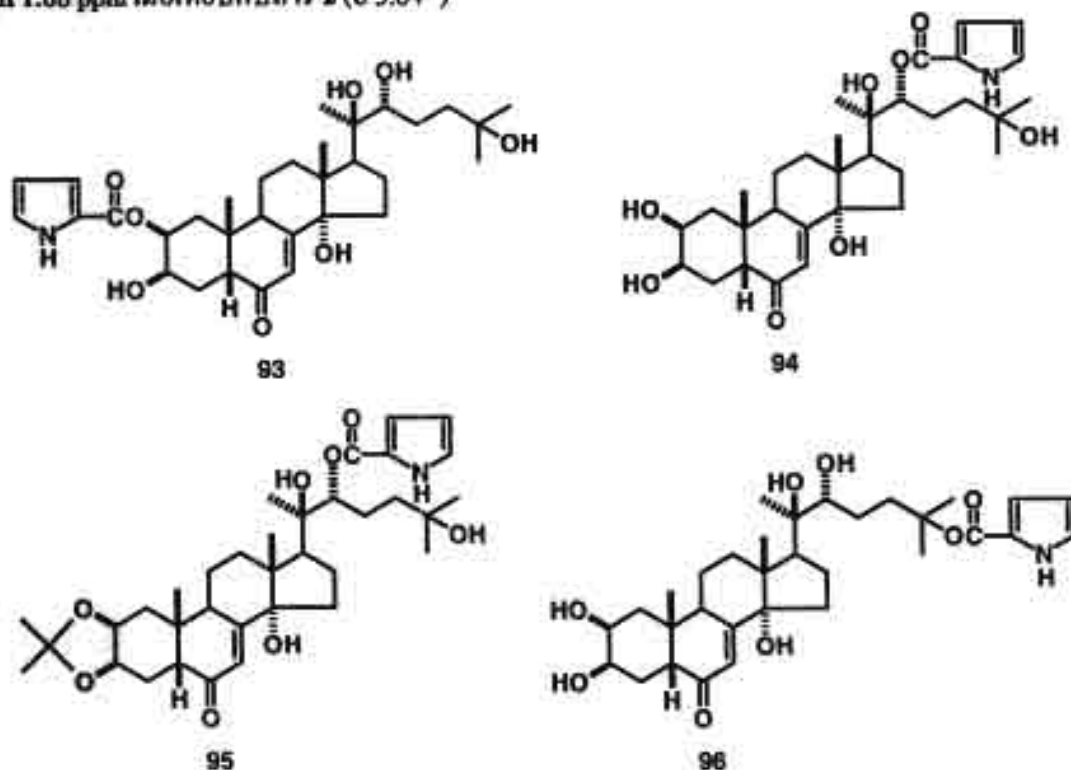
งานขั้นต่อไปเป็นการเตรียม อนุพันธ์ pyrrole-2-carboxylate ของ 20-hydroxyecdysone (2) สารชนิดแรกที่ต้องการเตรียมคือ อนุพันธ์ 20-hydroxyecdysone 2-(pyrrole-2-carboxylate) (93) ความจริงในตอนแรกของการวางแผนเตรียมอนุพันธ์สเตอรอยด์กติกเอสเทอร์ของสาร 2 นั้น ได้ตั้งใจที่จะเตรียมอนุพันธ์ของ pyrrole-2-carboxylate ก่อนอนุพันธ์ furan-2-carboxylate และ thiophene-2-carboxylate โดยจะให้ pyrrole-2-carboxylic acid chloride แต่ปรากฏว่าสารนี้ไม่มีจำหน่าย จึงเตรียมจาก pyrrole-2-carboxylic acid โดยทำปฏิกิริยากับ thionyl chloride ตามวิธีที่ได้เคยทำกันมา แล้วให้สารที่คาดว่าเป็น acid chloride ทำปฏิกิริยากับสาร 2 ปรากฏว่าไม่ได้สาร 93 ทั้งๆที่ได้พยายามปรับเปลี่ยนวิธีเตรียม acid chloride และการทำปฏิกิริยากับสาร 2 แล้วก็ตาม ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ pyrrole-2-carboxylic acid มีลักษณะเป็น vinylogous amide ทำให้มีเสถียรภาพสูงและเตรียมเป็น acid chloride ได้ยาก อีกประการหนึ่งอาจเป็นไปได้ที่ตัว acid chloride เองไม่ไวต่อปฏิกิริยาที่ควร ทำให้เกิดปฏิกิริยากับสาร 2 ยาก เมื่อได้ทำปฏิกิริยาในสถานะที่รุนแรงขึ้นก็ทำให้สารตั้งต้น 2 เปลี่ยนไปเป็นสารอื่น เพราะกรด HCl ที่ยังอาจมีเหลืออยู่อาจทำให้เอคไดสเตอรอยด์เกิดปฏิกิริยาที่ไม่ต้องการได้ง่าย 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

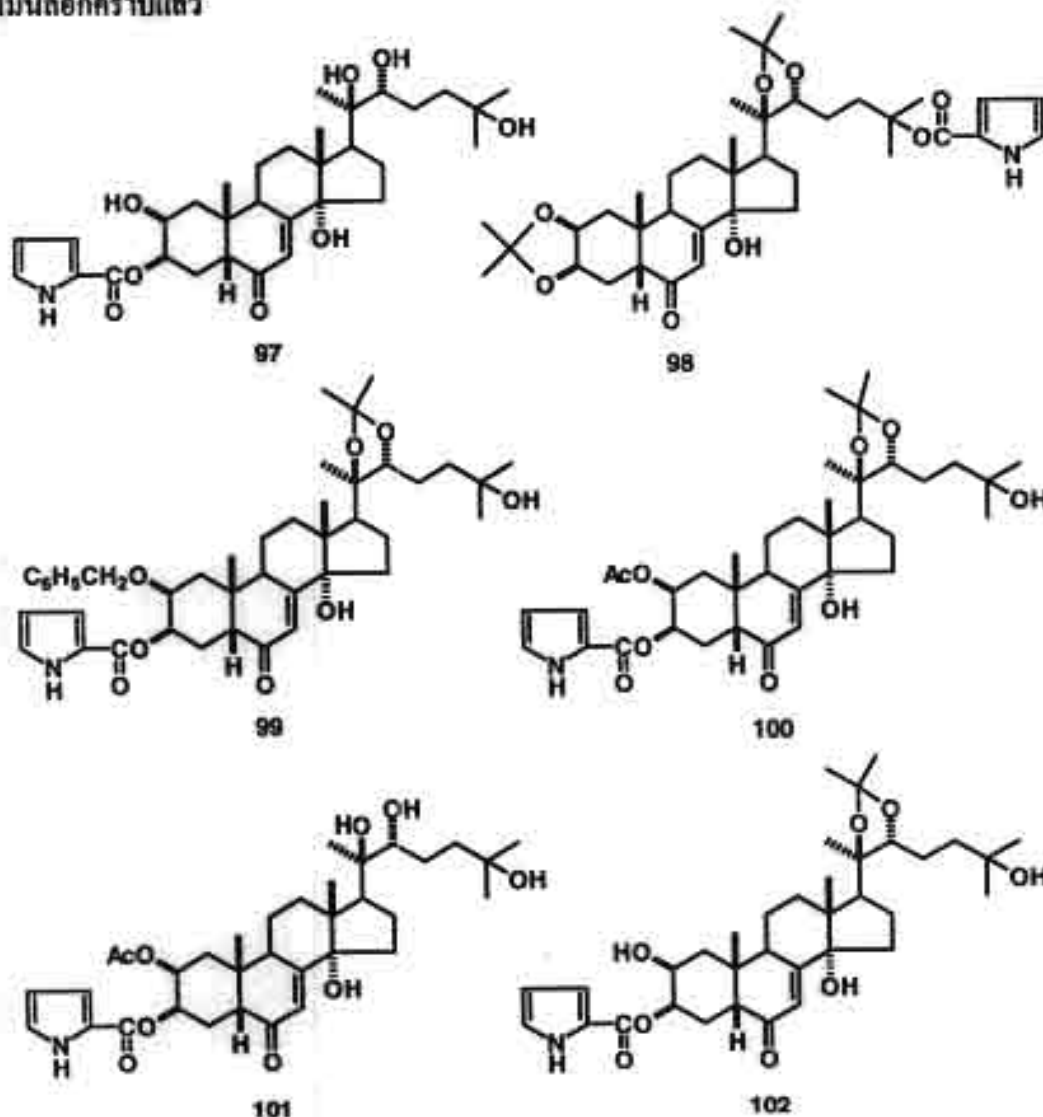
นำ pyrrole-2-carboxylic acid anhydride มาทำปฏิกิริยากับ 20-hydroxyecdysone (2) โดยใช้สภาวะและอะคะติสต์แตกต่างกันไป เท่าที่ได้ทดลองมาถึงปัจจุบันนี้ พบว่าเมื่อทำปฏิกิริยาใน dioxane โดยมี triethylamine และ DMAP อยู่ด้วยที่อุณหภูมิ reflux ได้สารผลิตภัณฑ์ 20-hydroxyecdysone 2-(pyrrole-2-carboxylate) (93) 33% พบว่าหมู่เอสเตอร์อยู่ที่ตำแหน่งที่ 2 โดย ^1H NMR สเปกตรัมของ H-2 (δ 5.53) เกิด downfield shift จากเดิม (δ 4.15¹⁷ ในสาร 2) ไป 1.38 ppm

สารอนุพันธ์ต่อไปที่ต้องการเตรียมคือ 20-hydroxyecdysone 22-(pyrrole-2-carboxylate) (94) เริ่มต้นด้วยนำสาร 75 ทำปฏิกิริยากับ pyrrole-2-carboxylic acid anhydride โดยใช้อะคะติสต์และตัวทำละลายเช่นเดียวกับกรณีการเตรียมสาร 93 กรณีนี้ได้สาร 95 ในปริมาณ 55% เมื่อนำสาร 95 มาทำจัดหมู่ป้องกัน acetonide ได้สาร 94 ในกรณีนี้สัญญาณ H-22 (δ 5.72) ใน ^1H NMR สเปกตรัมของ 94 เกิด downfield shift 1.88 ppm เมื่อเทียบกับสาร 2 (δ 3.84¹⁷)



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) นั้นได้ชี้แนะแนวทางในการเตรียมอนุพันธ์ 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 เป็นหมู่อะซิทิล 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



การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

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

เมื่อนำ abutasterone (25) และ 24-*epi*-abutasterone (24) มาทดสอบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบ พบว่าเอคไคสเตียรอยด์ทั้งสองมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่ำกว่า 20-hydroxyecdysone (2) ซึ่งเป็นสารหลักในการเปรียบเทียบและถือว่าเป็นเอคไคสเตียรอยด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง 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 ก่อนข้างมาก เอคไคสเตียรอยด์ 28 "epimer 2" (ซึ่งเป็นไอโซเมอร์ที่ elute ออกมาถึง 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 ของเอคไคสเตียรอยด์กับ 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 ของเอคไคสเตียรอยด์ต่อ receptor ของแมลง หากเราสามารถทราบ absolute configuration ที่ตำแหน่ง 25 ของแต่ละ epimer ของสารนี้ได้ก็จะทำให้เข้าใจการ bind ของเอคไคสเตียรอยด์ กับ receptor ได้มากยิ่งขึ้น