

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

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

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

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

สาร 6-oxime *syn* C-7 67 แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่สูง ถึงแม้ว่าไม่สูงเท่าสาร 2 ส่วน 6-oxime *anti* C-7 69 ซึ่งเป็น 5 α -ecdysteroid แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพปานกลาง แสดงว่า 6-keto oxygen ไม่ใช่สิ่งจำเป็นสำหรับการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพของเอคไคสเตียรอยด์ คราบไคที่ α,β -unsaturated system ยังคงอยู่ เอคไคสเตียรอยด์ก็ยังคงแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพอยู่ อย่างน้อยก็เป็นกรณีของ nitrogen analogue ซึ่งที่น่าสนใจคือ oxime 69 นี้กลับมีฤทธิ์ทางชีวภาพ ทั้งๆที่เป็น 5 α -ecdysteroid

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

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

Heterocyclic esters ของ 20-hydroxyecdysone (2) แสดงฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกความที่น่านใจ (ดูตารางที่ 30) เริ่มจาก 20-hydroxyecdysone 2-(furan-2-carboxylate) (72) เนื่องจากเราไม่สามารถเตรียมเอสเตอร์ชนิดนี้ให้ได้เพียงชนิดเดียว แต่อยู่เป็นสัดส่วนผสม 2:1 กับ 20-hydroxyecdysone 3-(furan-2-carboxylate) (73) จึงทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในลักษณะของส่วนผสมของสองไอโซเมอร์นี้ ปรากฏว่าฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนผสมนี้ปานกลางเมื่อเทียบกับสาร 2 แต่ฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร 73 เพียงชนิดเดียวมีค่าสูงกว่ามาก แสดงว่า 73 มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงกว่า 72 ยกเว้นกรณีที่อยู่ในลักษณะที่เป็นส่วนผสมแล้วสารทั้งสองมีฤทธิ์ทางชีวภาพหักล้างกันเอง สาร 20-hydroxyecdysone 22-(furan-2-carboxylate) (74) ก็มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง ซึ่งเป็นสิ่งที่น่าสนใจ เพราะจากข้อมูลที่มีผู้รายงานการกดพิษของสาร 2 ที่อยู่ในพืชโคซฮอยทาบกม *Cepaea nemoralis* ด้วยการทำ acetylation ที่ตำแหน่ง 22 ได้ทำให้ฤทธิ์ทางชีวภาพลดลงไปมาก¹¹ นั้น การที่สาร 74 ยังแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่สูงเช่นนี้ แสดงว่าการเกิดเป็นเอสเตอร์ที่ตำแหน่ง 22 ไม่ได้ลดฤทธิ์ทางชีวภาพเสมอไป สำหรับ 20-hydroxyecdysone 25-(furan-2-carboxylate) (77) นั้น ก็แสดงผลที่น่าสนใจ คือมีฤทธิ์ทางชีวภาพค่อนข้างสูงกว่าที่ควรจะเป็น ถึงแม้ว่าได้มีการสรุปไว้โดยกลุ่มของ Horn ว่า acetate ester ที่ตำแหน่ง 25 ลดฤทธิ์ทางชีวภาพของเอคไดสเตียรอยด์ลงไปมาก¹³

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

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

วัสดุและวิธีการ

วัสดุและวิธีการทั่วไปเช่นเดียวกับที่ได้ระบุไว้แล้ว^{3,33}

งานวิจัยทางด้านพฤกษเคมี ได้ดำเนินการ 2 ส่วนคือ

1. การสกัดแยกและหาสูตรโครงสร้างของเอคไดสเตียรอยด์จากพืช

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

นำเปลือกกราก (root bark) ของต้นคันทื่น (Vitex canescens Kurz) ซึ่งได้จากอำเภอบึงนาราง จังหวัดนครสวรรค์ และได้ตากให้แห้งและทำการบดแล้ว (2.5 กิโลกรัม) มาสกัดด้วย *n*-hexane และเอทานอลตามลำดับ โดยใช้เครื่องสกัด Soxhlet นำส่วนที่สกัดด้วยเอทานอลมาระเหยงตัวทำละลายออกไปเกือบหมด แล้วเติมน้ำลงไป กรอง ตกตะกอนและละลายส่วนที่กรองได้ด้วยคลอโรฟอร์ม เอทิลอะซิเตต และนอร์มัลบิวทานอลตามลำดับ โดยใช้เครื่องสกัดของเหลว-ของเหลวแบบต่อเนื่อง (continuous liquid-liquid extraction apparatus)

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

กลุ่ม fr C1 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำหลายครั้งจนได้ 24-*epi*-makisterone A (21) (7 มิลลิกรัม) ข้อมูล ¹H NMR ดูตารางที่ 1 ส่วนข้อมูล ¹³C NMR สอดคล้องกับข้อมูลที่มีผู้รายงานไว้¹⁴

กลุ่ม fr C2 นำกลุ่มนี้มาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีใหม่ แล้วตกผลึกด้วยเมทานอล-เอทิลอะซิเตต ได้ 20-hydroxycodysone (2) (5.36 กรัม) เมื่อเปรียบเทียบกับ TLC กับสาร 2 ที่เคยพิสูจน์เอกลักษณ์มาก่อนแล้ว¹² และเปรียบเทียบ IR และ ¹H NMR สเปกตรัมกับสาร ที่มีผู้รายงานไว้¹² ปรากฏว่าตรงกัน

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

กลุ่ม fr E1 ออกมาด้วยตัวชะคลอโรฟอร์ม-เมทานอล 88:12 ถึง 86:14 เมื่อนำมาผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำ ได้ crude ecdysteroid fraction (52 มิลลิกรัม) ซึ่งเมื่อนำมาผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีอีกครั้งหนึ่ง แล้วนำ fraction ที่มีเอคไดสเตียรอยด์มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC (คอลัมน์: Sherisorb ODS2, 5 ไมโครเมตร, 250x4.6 มิลลิเมตร; mobile phase: MeOH-H₂O (1:1); flow rate: 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที; detector: 254 nm) ทำให้ได้ shidasterone (22) (5 มิลลิกรัม) ปรากฏว่าเมื่อทำการตรวจสอบ fraction หนึ่ง

ของ chloroform extract ใหม่อีกครั้งก็ได้พบว่ามีสาร 22 อยู่ปนกับส่วนผสมของเอคไดสเตียรอยด์ แต่ก็ไม่ได้ทำการแยกเพิ่มเติม

กลุ่ม fr E2 ออกมากับตัวชะลอโรฟอรัม-เมทานอล 84:16 ถึง 82:18 ประกอบด้วยสารหลายชนิด แต่จากการสังเกต colour reaction บน TLC พบว่าบางชนิดเป็นสารประเภทเอคไดสเตียรอยด์ หลังจากการทำแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำถึง 3 ครั้ง ได้เลือกเอา 2 subfraction (subfr 1 subfr 2) มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC (คอลัมน์: μ Bondapak C18, 10 ไมโครเมตร, 300x3.9 มิลลิเมตร; mobile phase: MeOH-H₂O (1:1); flow rate: 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที; detector: 254 nm)

จาก subfr 1 ได้เอคไดสเตียรอยด์ 22 เพิ่มเติมมาอีก (3 มิลลิกรัม) จาก subfr 2 ได้เอคไดสเตียรอยด์ calonysterone (16) (2 มิลลิกรัม) และพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเปรียบเทียบ TLC, IR และ ¹H NMR กับสาร ที่แยกมาได้ก่อนหน้านี้จากเปลือกของต้นไข่น้ำ¹⁵

กลุ่ม fr E3 ส่วนใหญ่เป็นเอคไดสเตียรอยด์ชนิดเดียวกับที่แยกออกมาได้ในปริมาณมากจาก chloroform extract ซึ่งกล่าวมาแล้วและมีส่วนประกอบย่อยอื่นๆในปริมาณน้อยมากอีกจำนวนหนึ่ง

กลุ่ม fr E4 ออกมากับตัวชะลอโรฟอรัม-เมทานอล 76:24 ถึง 72:28 ได้นำมาแยกด้วย HPLC (DeltaPak C18, 15 ไมโครเมตร, 300x7.8 มิลลิเมตร; mobile phase: MeOH-H₂O (7:15); flow rate: 3.0 มิลลิลิตรต่อนาที; detector: 254 nm) ปรากฏว่าได้ 3 subfractions

จาก subfr 1 พบว่ามี turkesterone (23) (4 มิลลิกรัมจาก 1/3 ของ crude subfraction) การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ 23 ได้ทำโดยเปรียบเทียบ TLC กับสาร authentic ที่ทราบแน่นอน¹² และเปรียบเทียบข้อมูล ¹H NMR กับที่ได้รายงานมาก่อนแล้ว¹²

เมื่อนำ subfr 2 มาตรวจสอบโดย TLC (คลอโรฟอรัม-เมทานอล = 5:1, 3 runs) พบว่ามีสาร 2 ชนิดผสมอยู่ เมื่อทำการแยกโดย HPLC ซ้ำ (Sherisorb ODS2, 5 ไมโครเมตร, 250x 4.6 มิลลิเมตร; mobile phase: MeOH-H₂O (1:3); flow rate: 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที; detector: 254 nm) ทำให้ได้เอคไดสเตียรอยด์ 2 ชนิด สารชนิดแรก (หนัก 3 มิลลิกรัม) เป็นเอคไดสเตียรอยด์ใหม่คือ 24-*epi*-abutasterone (24) และสารชนิดที่สอง (ประมาณ 0.5 มิลลิกรัม) เป็นเอคไดสเตียรอยด์ที่ไม่ทราบโครงสร้าง

24-*Epi*-abutasterone (24). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3408, 2962, 1651, 1444, 1383, 1303, 1057, 950, 877. ข้อมูล ¹H NMR และ ¹³C NMR ดูตารางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ. HR-FABMS m/z : 497.3132 [M+H]⁺ (คำนวณสำหรับ C₂₇H₄₆O₄: 497.3144).

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

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

All compounds were recorded in pyridine-*d*₅.

*Data taken from ref 47.

^{a,b} Assignments may be reversed for signals with the same superscript.

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

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

All compounds were recorded in pyridine- d_5 .

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

2) การสกัดแยก 20,26-Dihydroxyecdysone (28)

การสกัดแยก 20,26-dihydroxyecdysone จาก *Vitex glabrata*

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

ในการแยก 20,26-dihydroxyecdysone จากพืชสกุล *Vitex* หลังจากแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้พัฒนาระบบ HPLC เพื่อให้แยกสารออกมาจากเฮกไซเดรียออร์บอื่น รวมทั้งสารประเภทอื่นๆ ที่ยังมีปนอยู่ 3 ระบบดังนี้

System A Column : Spherisorb S100DS2, 10 μ m, 10x250 mm; mobile phase: MeOH-H₂O (35:65); flow rate: 2.0ml/min; detector: 254 nm; t_R ของ turkesterone (23) และ 20,26-dihydroxyecdysone เป็น 20.8 และ 27.5 min ตามลำดับ

System B Column : Hypersil BDS18, 5 μ m, 4.6x250 mm; mobile phase: *i*-PrOH-H₂O (5:95); flow rate: 1.4 ml/min; detector: 242 nm; t_R ของ 20,26-dihydroxyecdysone "epimer 1" และ "epimer 2" คือ 38.5 และ 44.5 min ตามลำดับ

System C Column : Hypersil Si, 5 μ m, 4.6x250 mm; mobile phase: CHCl₃-H₂O (93:7); flow rate: 1.2 ml/min; detector: 254 nm; t_R ของ 24-*epi*-abutasterone (24) และ 20,26-dihydroxyecdysone (28) คือ 10.5 และ 15.0 min ตามลำดับ

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

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

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

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

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

Entry	Plant material	"Epimer 1": "Epimer 2"
1	<i>V. Glabrata</i> ^a	1:2.5
2	<i>V. canescens</i> (sample 1) ^a	1:4.0
3	<i>V. canescens</i> (sample 2) ^a	1:3.7
4	<i>V. pinnata</i> ^a	1:2.1
5	<i>V. canescens</i> ^b	1:14.7
6	<i>S. nutans</i> ^{c,50}	15:1

^aStem bark^bRoot bark^cAerial part

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

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

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

นำเปลือกต้นไข่ม้า (*Vitex glabrata*)แห้งที่บดแล้ว (4.5 กิโลกรัม) มาสกัดตามลำดับด้วยตัวทำละลาย *n*-hexane และ EtOH โดยใช้เครื่อง Soxhlet extraction apparatus นำส่วนที่สกัดด้วยเอทานอล (EtOH extract) มาสกัดต่อด้วยวิธีการ continuous liquid-liquid extraction โดยใช้ CHCl₃ เป็นตัวทำละลาย ได้ CHCl₃ extract (41 กรัม) ซึ่งหลังจากนำไปผ่านขั้นตอนการแยกและทำสารให้บริสุทธิ์หลายขั้นตอน ได้ pterosterone (26, 21 มิลลิกรัม) ตกผลึกในเมทานอล-คลอโรฟอร์มเป็น fine needles จุดหลอมเหลว 227-228 °C (lit.¹² 229-230 °C) ข้อมูลทาง ¹H NMR (ดูตารางที่ 4) และ IR สอดคล้องกับที่ได้มีรายงานไว้¹² นอกจากนี้ยังได้ 20-hydroxyecdysone (2) ปริมาณ 860 มิลลิกรัม เป็นสารที่มีปริมาณมากใน extract นี้และมีข้อมูลทาง ¹H NMR และ TLC ตรงกับ authentic sample¹³

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

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

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

H	27	26	42	43	44	45	46
	$\text{C}_6\text{D}_6\text{H}$	$\text{C}_6\text{D}_6\text{H}$	CDCl_3	Isomer 1 ^a CDCl_3	CDCl_3	CDCl_3	CDCl_3
2	4.16 (m)	4.16 (m)	4.25 (m)	4.25 (m)	4.19 (m)	4.16 (m)	4.20 (m)
3	4.22 (br s)	4.22 (br s)	4.23 (br s)	4.23 (br s)	4.24 (br s)	4.21 ^b	4.23 (br s)
5	2.97 (dd)	3.00 (dd)	3.33 (dd)	2.34 (dd)	2.33 (dd)	2.29 (dd)	2.33 (dd)
	ca 1.3, 3.0	13.1, 3.0	12.5, 4.3	12.5, 4.3	12.5, 4.3	12.6, 4.7	12.5, 4.3
7	6.22 (d, 2.4)	6.25 (d, 2.1)	5.80 (d, 2.1)	5.80 (d, 2.1)	5.80 (d, 2.1)	5.76 (d, 2.4)	5.80 (d, 2.4)
9	3.58 (m)	3.58 (m)	2.78 (m)	2.78 (m)	2.78 (m)	2.73 (m)	2.78 (m)
17	3.02 (s, 9.1)	2.97 (s, 9.1)	2.20 (dd, 9.7, 1.6)	2.19 ^c	2.22 (dd, 9.7, 9.4)	2.12 (dd, 9.4, 8.4)	2.18 (dd, 9.4, 8.9)
22	4.10 (m)	4.12 (br d, 10)	3.78 (dd, 8.5, 3.9)	3.60 (dd, 9.1, 2.3)	3.87 (dd, 9.7, 2.7)	3.86 (dd, 10.3, 1.6)	3.96 (dd, 10.3, 1.5)
24	4.47 (br d, 9.7)	3.94 (m)	2.86 (s, 6.2)		2.81 (dd, 7.9, 3.3)	4.21 ^b	3.34 (m)
26	-	-	-	2.53 (d, 4.8)	-	4.33 (br s)	-
				2.67 (d, 4.8)		4.09 (br s)	
19-44a	1.21 (s)	1.20 (s)	0.76 (s)	0.77 (s)	0.77 (s)	0.72 (s)	0.77 (s)
19-44b	1.03 (s)	1.08 (s)	0.96 (s)	0.96 (s)	0.95 (s)	0.91 (s)	0.96 (s)
21-44a	1.02 (s)	1.38 (s)	1.11 (s)	1.13 (s)	1.12 (s)	1.07 (s)	1.12 (s)
26-44a	0.98 (d, 6.7)	1.01 (d, 6.7)	1.27 (s)	-	1.26 (s)	-	0.91 (d, 6.7)
27-44a	1.08 (d, 6.7)	1.01 (d, 6.7)	1.30 ^d (s)	1.29 ^d (s)	1.26 (s)	1.07 (s)	0.93 (d, 6.7)
C(=O)Me_2	-	-	1.31 ^e , 1.32, 1.37, 1.47 (m, s)	1.30 ^f , 1.33, 1.41, 1.49 (m, s)	1.20, 1.22, 1.38, 1.46 (m, s)	1.25, 1.26, 1.34, 1.42 (m, s)	1.30, 1.31, 1.38, 1.46 (m, s)

^a Assigned from a mixture of two isomers 25, 26 species

^b Partially superimposed signal

^c Assignment may be reversed for signals with the same multiplicity

ไปแยกด้วย reversed-phase HPLC ซึ่งมีระบบดังนี้ Column: Spherisorb S10ODS2, 10x250 mm, 10 μ m; mobile phase: MeOH-H₂O (30:70); flow rate: 2.0 ml/min; detector: 254 nm เก็บ fraction ได้ 3 fractions ดังนี้

(1) กลุ่มที่ 1, t_R = 11.0 min

(2) กลุ่มที่ 2, t_R = 11.9 min

(3) กลุ่มที่ 3, t_R = 12.8 min

ปรากฏว่าทั้ง 3 fraction สารยังปนกันอยู่ จึงนำมารวมใหม่ แล้วแยกด้วยระบบ HPLC ใหม่ดังนี้

Column: μ Bondapak C18, 3.9X300 mm, 10 μ m; mobile phase: MeOH-H₂O (18:82); flow rate: 1.0 ml/min; detector: 254 nm ในกรณีนี้ สามารถแยกสารออกได้เป็น 3 กลุ่มดังนี้

(1) กลุ่ม fr B1, t_R = 26.0 min

(2) กลุ่ม fr B2, t_R = 34.4 min

(3) กลุ่ม fr B3, t_R = 40.8 min

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

Column: Hypersil Si, 4.6X250 mm, 5 μ m; mobile phase: CHCl₃-MeOH (90:10); flow rate: 1.2 ml/min; detector: 254 nm

ผลการแยกมีดังนี้

(1) กลุ่ม fr B1 แยกได้ 2 กลุ่มย่อยดังนี้

กลุ่มย่อย B1.1, t_R = 8.0 min ไม่ใช่สารประเภทเอกโคสเตียรอยด์ มีปริมาณน้อย

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

(2) กลุ่ม fr B2 แยกได้ 2 กลุ่มย่อยดังนี้

กลุ่มย่อย B2.1, t_R = 9.0 min ไม่ใช่สารประเภทเอกโคสเตียรอยด์ มีปริมาณน้อย

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

มิลลิกรัม

(3) กลุ่ม fr B3 แยกได้ 2 กลุ่มย่อยดังนี้

กลุ่มย่อย B3.1, t_R = 9.0 min ไม่ใช่สารประเภทเอกโคสเตียรอยด์ มีปริมาณน้อย

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

มิลลิกรัม

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

29: IR: ν_{max} cm^{-1} : 3408, 2967, 1654, 1384, 1052; ^1H NMR ^{13}C NMR ดูตารางที่ 5 และ 6 ตามลำดับ. FABMS (-ve): m/z 511.2912 $[\text{M-H}]^-$. $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}_9$ requires 511.2907.

30 "epimer 1": IR: ν_{max} cm^{-1} : 3448, 2952, 1660, 1385, 1053; ^1H NMR ^{13}C NMR ดูตารางที่ 5 และ 6 ตามลำดับ. FABMS (-ve): m/z 511.2906 $[\text{M-H}]^-$. $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}_9$ requires 511.2907.

30 "epimer 2": IR: ν_{max} cm^{-1} : 3448, 2927, 1660, 1385, 1053; ^1H NMR ^{13}C NMR ดูตารางที่ 5 และ 6 ตามลำดับ. FABMS (-ve): m/z 511.2908 $[\text{M-H}]^-$. $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}_9$ requires 511.2907.

2. การสกัดแยกเอเคไดสเดียรอยด์เพื่อใช้ในการสังเคราะห์

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

ตารางที่ 5. ¹H NMR data of compounds 23, 24, 28, 29 and 30 (in pyridine-d₅)

H	23	24	28 "Epimer 1"	28 "Epimer 2"	29	30 "Epimer 1"	30 "Epimer 2"
1	3.40				3.43 (dd, 12.5, 3.8)	3.43 (dd, 12.4, 3.5)	3.44 (dd, 12.5, 3.5)
2	4.56 (m) ^a	4.18 (m)	4.19 (m)	4.18 (m)	4.57 (m) ⁱ	4.58 (m) ^m	4.58 (m) ^p
3	4.19 (br s)	4.23 (br s)	4.23 (br s)	4.23 (br s)	4.20 (br s)	4.20 (br s)	4.21 (br s)
5	3.00 ^b	2.99 (dd, 12.9, 3.5)	3.01 ^f	3.01 ^h	3.00 (dd, 12.7, 3.2)	3.00 ^g	3.00
7	6.26 (d, ca 2)	6.22 (d, 2.1)	6.25 (d, 2.4)	6.25 (d, 2.4)	6.25 (d, ca 2)	6.28 (d, ca 2)	6.28 (br s)
9	3.83 (m) ^e	3.57 (m)	3.58 (m)	3.58 (m)	3.84 (br d, 7)	3.85-3.89 ⁿ	3.85-3.89 ^k
11	4.56 (m) ^a				4.60 (m) ⁱ	4.58 (m) ^m	4.58 (m) ^p
12ax	3.00 ^b				3.04 ¹²	3.02 ⁿ	3.02
17	3.06	3.08 (t, 9.1)	3.03 ^f	3.08 ^h	3.16 (t, 9.1) ¹⁴	3.09 (t, 9.1)	3.09 (t, 8.9)
22	3.83 (m) ^e	4.51 (dd, 9.6, 2.3) ^e	3.92 (br d, 10.3)	3.90 (dd, 10.6, 1.8)	4.50 (br d, 8.6) ⁱ	3.85-3.89 ⁿ	3.85-3.89 ^k
24		4.37 (dd, 9, 2.7) ^e			4.35 (br d, 8.8) ⁱ		
26	-	-	3.87 ⁸ and 3.88 ⁸	3.86	-	3.85-3.89	3.85-3.89
18-Me	1.23 (s) ^d	1.22 (s)	1.204 (s)	1.208 (s)	1.26 (s)	1.24 (s)	1.24 (s)
19-Me	1.28 (s) ^d	1.06 (s)	1.06 (s)	1.06 (s)	1.29 (s)	1.30 (s)	1.30 (s)
21-Me	1.55 (s)	1.63 (s)	1.58 (s)	1.57 (s)	1.61 (s)	1.56 (s)	1.55 (s)
26-Me	1.33 (s)	1.46 (s)	-	-	1.45 (s)	-	-
27-Me	1.33 (s)	1.47 (s)	1.47 (s)	1.46 (s)	1.45 (s)	1.45 (s)	1.44 (s)

^{a-p} Two overlapping signals; ^{k, l, m, n, o, p} Partially overlapping signals¹²⁻¹⁴ assignments may be reversed for signals with the same superscript

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

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

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

การสังเคราะห์ปรับเปลี่ยนเอคไคสเตียรอยด์

1. การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันและสายโซ่ด้านข้าง

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

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

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

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

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

Stachysterone C (31). Amorphous, mp 225-227 °C (from MeOH-CHCl₃). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3418, 2926, 1648, 1444, 1382, 1316, 1116, 1055, 876. $^1\text{H NMR}$: ดูตารางที่ 7.

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

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

*Recorded in pyridine- d_5 .^zRecorded in CDCl_3 .^aAssigned from a mixture of compounds 35 and 36.^{**}Assignments may be reversed for signals with the same superscript.^{**}Obscured signal.

25,26-Didehydroponasterone A (32). Needles, mp 263-265 °C (from MeOH-CHCl₃). ¹H NMR: ดูตารางที่ 7

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

วิธีการทั่วไป ละลาย ligand ใน *tert*-butanol-H₂O (7:1) แล้วนำ osmium tetroxide มาละลายใน THF เป็น stock solution THF ที่ใช้ให้สารละลายเมื่อเติม OsO₄ ลงไปแล้วมีอัตราส่วนของ *t*-BuOH : THF : H₂O เป็น 7:4:1 นำสารละลายของ stachysterone C (31) 5 มิลลิกรัมใน *t*-BuOH: THF:H₂O (7:4:1) (1 มิลลิลิตร) มาเติมลงในสารละลายของสารเชิงซ้อนระหว่าง OsO₄ กับ ligand ให้อัตราส่วนระหว่าง Ligand:osmium tetroxide:olefin เป็น 1.5:1.3:1 คนส่วนผสมเป็นเวลา 5 นาทีแล้วเติมสารละลาย 1% sodium metabisulphite ลงไป สกัดด้วย *n*-BuOH (3x10 มิลลิลิตร) ระเหยตัวทำละลายออก นำมาแยก ligand ออกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี นำส่วนผสมของ 24 และ 25 ไปหาอัตราส่วนโดยใช้ ¹H NMR สเปกโทรสโกปี ในบางกรณีได้ใช้ ช่วยยืนยันด้วย (Column: Sherisorb ODS2, 5 ไมโครเมตร, 250x4.6 มิลลิเมตร; mobile phase: MeOH-H₂O (1:3); flow rate: 1 มิลลิลิตรต่อนาที; detector: 254 nm).

สำหรับการพิสูจน์เอกลักษณ์ของ 24 และ 25 ได้กระทำตอนที่เตรียมสารทั้งสองครั้งแรกโดยใช้ pyridine เป็น ligand และแยกแอสโตเคอร์ออกซึ่งสองชนิดออกจากกันโดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้คลอโรฟอร์ม-เมทานอลเป็นตัวชะ สาร 24 มีข้อมูล ¹H NMR เหมือนกันทุกประการกับ 24-*epi*-abutasterone ที่ได้มาจากเปลือกรากของต้นคำเตียน ส่วนสาร 25 มี ¹H NMR สอดคล้องกันทุกประการกับข้อมูล ¹H NMR ของ abutasterone ที่มีผู้รายงานไว้¹⁷ สำหรับอัตราส่วนของของสาร 24 และ 25 ได้แสดงไว้ในตารางที่ 8

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

วิธีที่ 1

Dihydroxylation ของ 25,26-Didehydroponasterone A (32)

เติมสารละลายของ OsO₄ (0.1 มิลลิลิตร, เตรียมได้จากการละลาย 250 มิลลิกรัมของ OsO₄ ใน THF 5 มิลลิลิตร) ลงในสารละลายของสาร 32 (8 มิลลิกรัม) ใน pyridine (0.5 มิลลิลิตร) และกวนส่วนผสมของปฏิกิริยาเป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลาย 1% NaHSO₃ (20 มิลลิลิตร) แล้วเติมสารละลายอิ่มตัวของ NaCl ลงไป สกัดส่วนผสมด้วยเฮกซ์อีเทนอลซ้ำหลายครั้งจนกระทั่งตรวจสอบชั้นน้ำไม่พบสารผลิตภัณฑ์ นำส่วนที่สกัดด้วยเฮกซ์อีเทนอลมาระเหยเอาตัวทำละลายออกไปแล้วนำส่วนที่เหลือมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้คลอโรฟอร์ม-เมทานอลเป็นตัวชะ ได้ส่วนผสม C-25

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

Entry	Ligand	Ratio of Products 24 : 25
1	Pyridine	2 : 1 ^a
2	DHQD-MQE	4 : 1 ^a
3	DHQD-PE	4 : 1 ^a
4	(DHQD) ₂ -PHAL	7 : 1 ^{ab}
5	(DHQD) ₂ -PYR	6 : 1 ^{ab}
6	DHQ-MQE	10 : 7 ^a
7	DHQ-PE	10 : 7 ^a
8	(DHQ) ₂ -PHAL	4 : 1 ^a
9	(DHQ) ₂ -PYR	4 : 1 ^a

^aDetermined by ¹H NMR spectral analysis

^bDetermined by HPLC analysis

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

20,26-Dihydroxyecdysone "epimer 1". IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3400, 2924, 1649, 1443, 1383, 1315, 1120, 1055, 880. ข้อมูล ^1H NMR ดูตารางที่ 9. FAB-MS (-ve) m/z : 495 $[\text{M-H}]^-$. HR-FABMS (-ve) m/z : 495.2962 $[\text{M-H}]^-$ (คำนวณสำหรับ $\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{O}_6$: 495.2957).

20,26-Dihydroxyecdysone "epimer 2". IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3400, 2928, 1648, 1382, 1185, 1105, 1052, 875. ข้อมูล ^1H NMR ดูตารางที่ 9. HR-FABMS (-ve) m/z : 495.2945 $[\text{M-H}]^-$ (คำนวณสำหรับ $\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{O}_6$: 495.2957).

วิธีที่ 2

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

วิธีที่ 3

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

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

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

All compounds were recorded in pyridine-*d*₅.^{*,+} Obscured signals

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

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

Epoxidation ของ ไอเลฟิน 35 และ 36

นำส่วนผสมของไอเลฟิน 35 และ 36 (อัตราส่วน 3:2, 40 มิลลิกรัม) ซึ่งเตรียมได้จาก 20-hydroxyecdysone 2,3:20,22-diacetonide (33) (ซึ่งสาร 33 นี้เตรียมมาจาก เฮกไซเตอโรยด์ 2) มาละลายในคลอโรฟอร์ม (1 มิลลิลิตร) จากนั้นจึงเติม *m*-CPBA (70%, 30 มิลลิกรัม) คนส่วนผสมเป็นเวลา 20 นาที แล้วเติม 1% NaHSO₃ ลงไป หลังจากคนส่วนผสมเป็นเวลา 30 นาทีแล้ว ทำการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม ระเหยตัวทำละลาย และแยกส่วนผสมของ epoxides ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้ CHCl₃-MeOH เป็นตัวชะ ได้ epoxide 42 (8 มิลลิกรัม, 19%), 43 (9 มิลลิกรัม, 22%) และ 44 (14 มิลลิกรัม, 34%) สำหรับ epoxide 43 นั้นเป็นส่วนผสมของสอง isomeric 25, 26-epoxides

42: Amorphous; IR: ν_{max} cm⁻¹: 3472, 2980, 1666, 1455, 1376, 1243, 1217, 1169, 1105, 1057, 1005, 904, 876, 753; ¹H NMR ดูตารางที่ 4. FABMS (+ve): *m/z* 559.3630 [M+H]⁺. C₃₃H₅₁O₇, requires 559.3634.

43: Amorphous; IR: ν_{max} cm⁻¹: 3474, 2976, 1661, 1452, 1374, 1244, 1215, 1167, 1105, 1057; ¹H NMR ดูตารางที่ 4. FABMS (+ve): *m/z* 559.3636 [M+H]⁺. C₃₃H₅₁O₇, requires 559.3634.

44: Aggregated needles from CHCl₃-hexane, จุดหลอมเหลว 206-206 °C; IR: ν_{max} cm⁻¹: 3474, 2930, 1661, 1454, 1377, 1243, 1218, 1169, 1105, 1057, 1008, 876; ¹H NMR ดูตารางที่ 4. คำนวณ สำหรับ C₃₃H₅₀O₇·1/2H₂O: C, 69.81; H, 9.05 หาได้: C, 69.51; H, 8.69.

ปฏิกิริยาระหว่าง Epoxide 44 กับอิเทียมโบรไมด์: การสังเคราะห์ hydroxy olefin 45

ส่วนผสมของ epoxide 44 (50 มิลลิกรัม) และ LiBr (200 มิลลิกรัม) ใน MeCN (4 มิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิปกติเป็นเวลา 2 สัปดาห์ เติมน้ำลงไปแล้วสกัดส่วนผสมด้วยคลอโรฟอร์ม (3x25 มิลลิลิตร) ทำให้สารผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี (CHCl_3 -MeOH, 98:2) ได้ hydroxy olefin 45 (25 มิลลิกรัม, 50%) เป็น amorphous solid : IR: ν_{max} cm^{-1} : 3442, 2916, 2848, 1659, 1454, 1370, 1242, 1215, 1166, 1093, 1056; ^1H NMR ดูตารางที่ 4. FABMS (-ve): m/z 557.3485 $[\text{M}-\text{H}]^-$. $\text{C}_{33}\text{H}_{50}\text{O}_7$ requires 557.3487.

Catalytic hydrogenation ของ hydroxy olefin 45

นำ hydroxy olefin 45 (41 มิลลิกรัม) มาทำ catalytic hydrogenation โดยใช้ 5% Pd-C (50 มิลลิกรัม) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา กรองส่วนผสมผ่าน Celite column อย่างถี่ถ้วน แล้วระเหยตัวทำละลายออกไป นำมาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี (CHCl_3 -MeOH, 98:2) ทำให้ได้ 24-*epi*-pterosterone 2,3:20,22-diacetonide (46) (39 มิลลิกรัม, 95%). IR: ν_{max} cm^{-1} : 3472, 2960, 2874, 1658, 1463, 1372, 1243, 1216, 1168, 1107, 1090, 1057, 1000, 877; ^1H NMR ดูตารางที่ 4. FABMS (-ve): m/z 559.3634 $[\text{M}-\text{H}]^-$. $\text{C}_{33}\text{H}_{48}\text{O}_7$ requires 559.3634.

การขจัดหมู่ Acetonide ของสาร 46

เติม 70% AcOH (1.5 มิลลิลิตร) ลงไปในสารละลายของสาร 46 (19 มิลลิกรัม) ในเอทานอล และคนสารละลายเป็นเวลา 4 วัน เติมน้ำลงในส่วนผสมแล้วสกัดด้วย *n*-BuOH จนตรวจไม่พบสารผลิตภัณฑ์ในชั้นน้ำ นำชั้นสารอินทรีย์มารวมกันแล้วระเหยตัวทำละลายออกโดยการกลั่นร่วมกับน้ำ ทำสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้ 24-*epi*-pterosterone (27, 12 มิลลิกรัม, 74%) เป็นผลึกรูปปริซึม จุดหลอมเหลว 164-165 °C (lit 151-152 °C); IR: ν_{max} cm^{-1} : 3382, 2964, 1656, 1469, 1383, 1334, 1052; ^1H NMR ดูตารางที่ 4. คำนวณสำหรับ $\text{C}_{33}\text{H}_{48}\text{O}_7 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$: C, 60.65; H, 9.43 ทาได้: C, 60.40; H, 9.73.

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

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

สาร 33 เตรียมได้จาก 2 โดยใช้วิธีที่ทราบกันแล้ว¹⁷ แต่มีการปรับปรุงบางประการ กล่าวคือ ทำการกวนส่วนผสมระหว่าง 2 (160 มิลลิกรัม) และ *p*-TsOH (25 มิลลิกรัม) ในอะซิโตนที่ปราศจากน้ำ (1 มิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิปกติเป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วเติมน้ำ สกัดสารละลายที่ได้ด้วย CHCl_3 (3x30

มิลลิกรัม) ตามด้วยล้างชั้นสารอินทรีย์ด้วยน้ำ แล้วทำให้ปราศจากน้ำด้วย anhydrous sodium sulphate ระเหยตัวทำละลายให้แห้ง และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ CHCl_3 -MeOH (99:1) เป็น ตัวชะ ได้สาร 33 (146 มิลลิกรัม 78%), mp. 232-234 °C from acetone-hexane (lit.¹⁷ 233-234 °C) ข้อมูล ทางสเปกโตรสโกปี (IR, ^1H NMR) ของสารนี้ตรงกับที่เคยรายงานไว้¹⁷

การเตรียม Olefin diacetonides 35 และ 36

ละลาย diacetonide 33 (1.4388 กรัม) ใน pyridine (10 มิลลิกรัม) และคนไว้ที่อุณหภูมิ 5 °C เป็น เวลา 5 นาที เติม mesyl chloride (2 มิลลิกรัม) และกวนส่วนผสมของปฏิกิริยานี้นาน 20 นาที เติม DMAP (50 มิลลิกรัม) และกวนต่อที่อุณหภูมิ 5 °C เป็นเวลา 20 นาที แล้วปล่อยให้ส่วนผสมนี้ถึงอุณหภูมิ ปกติอย่างช้าๆ พร้อมกับตรวจสอบความก้าวหน้าของปฏิกิริยาด้วย TLC จากนั้นเติมสารละลาย 1% NaHCO_3 แล้วสกัดด้วย CHCl_3 (3x 40 มิลลิกรัม) ล้างชั้น CHCl_3 ด้วยน้ำ ทำให้ปราศจากน้ำระเหยตัวทำ ละลายให้แห้ง และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ CHCl_3 -MeOH (99:1) เป็นตัวชะ ให้ ส่วนผสม 3:2 ของ 35 และ 36 (925 มิลลิกรัม 67%). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3470, 2975, 1658, 1445, 1373, 1243, 1215, 1057, 884; ข้อมูล ^1H NMR ตรงกับที่เคยรายงานไว้แล้ว³⁹ FABMS (-ve) m/z (% relative intensity) 541 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (20), 501(29), 485(10), 339(17), 325 (30), 183(100).

Hydroboration ของ olefin diacetonides 35 และ 36

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

47: IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3535, 3458, 2960, 1642, 1373, 1245, 1225, 1170, 1060, 881; ข้อมูล ^1H NMR แสดงไว้ในตารางที่ 10; HR FABMS (-ve) m/z : 559.3639 $[\text{M}-\text{H}]^-$ คำนวณสำหรับ $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_7$: 559.3634.

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

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

Recorded in CDCl_3 .

48: IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3468, 2961, 2870, 1660, 1466, 1371, 1244, 1217, 1169, 1058, 878; ^1H NMR แสดงไวโนตารางที่ 10; HR FABMS (-ve) m/z : 559.3634 [M-H] $^-$ คำนวณสำหรับ $\text{C}_{33}\text{H}_{52}\text{O}_7\text{-H}$: 559.3634.

49 "epimer 1": IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3451, 2938, 1658, 1647, 1371, 1244, 1217, 1170, 1108, 1059, 883; ข้อมูล ^1H NMR แสดงไวโนตารางที่ 10; HR FABMS (-ve) m/z : 559.3632 [M-H] $^-$. คำนวณสำหรับ $\text{C}_{33}\text{H}_{52}\text{O}_7\text{-H}$: 559.3634

49 "epimer 2": IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3436, 2937, 2875, 1658, 1451, 1371, 1244, 1217, 1170, 1108, 1058, 883; ข้อมูล ^1H NMR แสดงไวโนตารางที่ 10; HR FABMS (-ve) m/z : 559.3632 [M-H] $^-$ คำนวณสำหรับ $\text{C}_{33}\text{H}_{52}\text{O}_7\text{-H}$: 559.3634.

Acetonide deprotection ของสาร 47, 48 and 49.

เติม 70% AcOH (1 มิลลิกรัม) ลงในสารละลายของสาร 47 (18 มิลลิกรัม) ใน dioxane (0.1 มิลลิกรัม) ทำการกวนของผสมนี้เป็นเวลา 3 วัน เติมน้ำ (50 มิลลิกรัม) แล้วสกัดด้วย *n*-butanol จนกระทั่งไม่มีสารเหลือในชั้นน้ำ แล้วระเหยตัวทำละลายออกโดยการกลั่นร่วมกับน้ำ ทำสารให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟีได้ pterosterone (26) (11 มิลลิกรัม, 71%). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3368, 2958, 1641, 1444, 1384, 1306, 1072, 877; ข้อมูล ^1H NMR แสดงไวโนตารางที่ 11 และตรงกับที่ได้มีการรายงานไว้แล้ว⁶²

ทำการ deacetonide สาร 48 (19 มิลลิกรัม) โดยใช้วิธีเดียวกับสาร 47 ได้ 24-*epi*-pterosterone (27) (12 มิลลิกรัม, 74%). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3390, 2965, 2870, 1658, 1465, 1439, 1385, 1333, 1108, 1054, 1012, 875; ข้อมูล ^1H NMR (ตารางที่ 11) และสอดคล้องกับที่ได้มีการรายงานไว้แล้ว⁶²

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

14 "epimer 1": IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3386, 2937, 1640, 1383, 1049, 872; ข้อมูล ^1H NMR แสดงไวโนตารางที่ 11; HR FABMS (-ve) m/z 479.3004 [M-H] $^-$. คำนวณสำหรับ $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_7\text{-H}$: 479.3008.

14 "epimer 2": IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3387, 2943, 1641, 1384, 1052; ข้อมูล ^1H NMR แสดงไวโนตารางที่ 11; HR FABMS m/z 479.3001 [M-H] $^-$. คำนวณสำหรับ $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_7\text{-H}$: 479.3008.

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

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

Recorded in pyridine- d_5 .

*Also appeared in Table 4.

2. การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันในโครงสร้างหลักของเอกไดเตียรอยด์

1) การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่วง A

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

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

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

20-Hydroxyecdysone 20,22-acetonide 2-mesylate (55). IR $\nu_{max}^{KBr} cm^{-1}$: 3444, 2966, 1649, 1450, 1427, 1372, 1333, 1254, 1217, 1174, 1103, 1000; ข้อมูล 1H NMR แสดงไว้ในตารางที่ 12; EIMS: m/z 345 $[M-side\ chain-CH_2SO_3H]^+$ (11), 382(10), 327(23), 310(6), 283(17), 232(9), 213(7), 201(10), 183(6), 158(7), 143(25), 125(41), 122(5), 99(100); คำนวณสำหรับ $C_{31}H_{50}O_9S \cdot H_2O$: C, 60.38; H, 8.44; พบได้ C, 59.95; H, 8.03%.

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

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

3-Dehydro-2-deoxy-20-hydroxyecdysone 20,22-acetonide (56). IR $\nu_{max}^{KBr} cm^{-1}$: 3438, 2966, 1711, 1662, 1453, 1373, 1251, 1216, 1172, 1103, 1001, 754; ข้อมูล 1H NMR แสดงไว้ในตารางที่ 12; EIMS: m/z 474 $[M-CO]^+$ (1), 456(2), 438(5), 396(15), 314(24), 298(49), 271(100); HR-FABMS (-ve) m/z : 501.3219 $[M-H]^-$ คำนวณสำหรับ $C_{30}H_{48}O_8-H$: 501.3216.

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

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

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

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

^{*} Recorded in pyridine- d_5 .^{*} Recorded in CDCl_3 .

1% NaHCO₃ (100 มิลลิลิตร) แล้วสกัดด้วย EtOAc (4x30 มิลลิลิตร) ทำชั้นอินทรีย์ให้ปราศจากน้ำ และระเหยตัวทำละลายให้แห้ง แล้วนำส่วนผสม (100 มิลลิกรัม) มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟีใช้ตัวชะเป็น CHCl₃:MeOH (94:6) ให้สาร 57 (25 มิลลิกรัม, 24%) และสาร 58 (41 มิลลิกรัม, 40%)

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

3-Dehydro-2-deoxy-20-hydroxyecdysone 20,22-acetonide 3-oxime syn C2 (58). Prism, mp. 210-212 °C (from EtOAc-hexane); IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3396, 2964, 1659, 1465, 1375, 1172, 1105, 1002; ข้อมูล ¹H NMR แสดงไว้ในตารางที่ 13; FABMS (+ve): *m/z* 518 [M+H]⁺ (52), 502(100), 484(11), 442 (14), 424(41), 300(12), 282(16), 201(10), 185(26), 143(85), 59(99); HR-FABMS (+ve) *m/z*: 518.3493 [M+H]⁺ คำนวณสำหรับ C₃₀H₂₇NO₆+H: 518.3481.

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

เติม 70% AcOH (1 มิลลิลิตร) ลงในสารละลายที่กำลังกวนของสาร (56) (262 มิลลิกรัม) ในเมทานอล (1 มิลลิลิตร) กวนส่วนผสมของปฏิกิริยานี้ที่อุณหภูมิปกติเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ทำส่วนผสมนี้ให้เป็นกลางด้วย 1% NaHCO₃ แล้วสกัดด้วย EtOAc (4x30 มิลลิลิตร) ทำชั้นอินทรีย์ให้ปราศจากน้ำ และระเหยตัวทำละลายให้แห้ง แล้วทำสารให้บริสุทธิ์โดยใช้ Chromatotron ใช้ตัวชะเป็น HCl₃:MeOH (95:5 ถึง 93:7) ให้สาร 53 (150 มิลลิกรัม, 65%)

3-Dehydro-2-deoxy-20-hydroxyecdysone (53). Mp. 225-226 °C (lit. 225-226 °C)⁴⁶; IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3392, 2958, 1696, 1672, 1383, 1146, 919; ข้อมูล ¹H NMR แสดงไว้ในตารางที่ 12; คำนวณสำหรับ C₂₇H₃₀O₆ · 1/2H₂O: C, 68.78; H, 9.12 หาได้ C, 68.78; H, 8.80%.

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

เติม hydroxylamine hydrochloride (55 มิลลิกรัม) ลงในสารละลายของสาร (53) (54 มิลลิกรัม) ใน pyridine (1 มิลลิลิตร) กวนส่วนผสมของปฏิกิริยานี้ที่อุณหภูมิปกติเป็นเวลา 18 นาที แล้ว work up เหมือนเช่นเดิมทำสาร (60 มิลลิกรัม) ให้บริสุทธิ์โดยใช้ Chromatotron ใช้ตัวชะเป็น CHCl₃:MeOH (95:5 ถึง 94:6) ให้สาร 52 (52 มิลลิกรัม, 84%) ซึ่งเป็นของผสมในอัตราส่วน 2:5 ระหว่าง *syn* และ *anti* isomer โดยเป็นส่วนผสมระหว่าง 59 และ 60 (อัตราส่วนอาจกลับกัน)

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

ตารางที่ 13. ¹H NMR data of compounds 57 - 60

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

^aRecorded in CDCl₃.[†]The stereochemistry of the hydroxyl groups of the oximes was tentatively assigned.^{*}Recorded in pyridine-*d*₅.^{*}A signal which was superimposed with that of H-9 at δ3.16 was due to one of H-4 or H-2.^{*}A signal which was partially superimposed with that of H-9 at δ3.16 was due to one of H-4 or H-2.

^1H NMR แสดงไว้ในตารางที่ 13; คำนวณสำหรับ $\text{C}_{27}\text{H}_{43}\text{NO}_6 \cdot 3/2\text{H}_2\text{O}$: C, 64.26; H, 9.19; N, 2.78 หาได้ C, 64.10; H, 9.39; N, 2.54%.

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

เติม methoxylamine hydrochloride (30 มิลลิกรัม) ลงในสารละลายของสาร (53) (152 มิลลิกรัม) ใน pyridine (2 มิลลิลิตร) กวนส่วนผสมของปฏิกิริยานี้ที่อุณหภูมิปกติเป็นเวลา 50 นาที หลังจากนั้นเติม 1% NaHCO_3 (100 มิลลิลิตร) แล้วสกัดด้วย EtOAc (4x30 มิลลิลิตร) ทำชั้นอินทรีย์ให้ปราศจากน้ำ และระเหยตัวทำละลายให้แห้ง นำส่วนผสม (150 มิลลิกรัม) มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟีใช้ตัวจะเป็น $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ พบว่า fraction ที่ใช้ตัวจะเป็น $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (96:4) ให้สาร 61 (68 มิลลิกรัม, 43%) และสาร 62 (71 มิลลิกรัม, 45%)

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

3-Dehydro-2-deoxy-20-hydroxyecdysone 3-methoxime *syn* C2 (62). Rods, mp. 174-176 °C (from MeOH-EtOAc); IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3438, 2968, 1665, 1467, 1381, 1159, 1051; ข้อมูล ^1H NMR แสดงไว้ในตารางที่ 14; คำนวณสำหรับ $\text{C}_{27}\text{H}_{43}\text{NO}_7$: C, 66.27; H, 8.88; N, 2.76 หาได้ C, 66.58; H, 9.26; N, 2.77%.

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

เติม methoxylamine hydrochloride (30 มิลลิกรัม) ลงในสารละลายของสาร (56) (50 มิลลิกรัม) ใน pyridine (1 มิลลิลิตร) กวนส่วนผสมของปฏิกิริยานี้ที่อุณหภูมิปกติเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติมน้ำ (100 มิลลิลิตร) แล้วสกัดด้วย EtOAc (4x30 มิลลิลิตร) ทำชั้นอินทรีย์ให้ปราศจากน้ำ และระเหยตัวทำละลายให้แห้ง นำส่วนผสม (68 มิลลิกรัม) มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ตัวจะเป็น $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วสูง พบว่า fraction ที่ใช้ตัวจะเป็น $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (98:2) ให้สาร 63 (26 มิลลิกรัม, 37%) และสาร 64 (29 มิลลิกรัม, 41%)

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

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

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

^aOne of the H2 signals.^bOne of the H4 signals.^cRecorded in pyridine- d_5 .^dRecorded in CDCl_3 .

3-Dehydro-2-deoxy-20-hydroxyecdysone 20,22-acetonide 3-methoxime *syn* C2 (64). Fine needles, mp. 230-232°C (from EtOAc-hexane); IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3476, 2964, 1658, 1452, 1372, 1215, 1103, 1051; ข้อมูล ^1H NMR แสดงไว้ในตารางที่ 14; FABMS (+ve): m/z 532 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100), 502(66), 484(8), 438(24), 424(6), 185(34), 143(48), 59(58); HR-FABMS (+ve) m/z : 532.3636 $[\text{M}+\text{H}]^+$ คำนวณสำหรับ $\text{C}_{31}\text{H}_{40}\text{NO}_6+\text{H}$: 532.3638.

2) การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของวง B

20-Hydroxyecdysone 6-oximes และ 6-methoximes

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

เติม hydroxylamine hydrochloride (120 มิลลิกรัม) ลงในสารละลายของสาร (2) (100 มิลลิกรัม) ใน pyridine (1 มิลลิลิตร) กวนส่วนผสมของปฏิกิริยานี้ที่อุณหภูมิปกติเป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นเติม 1% NaHCO_3 (100 มิลลิลิตร) แล้วสกัดด้วย $n\text{-BuOH}$ (4x20 มิลลิลิตร) ทำชั้นอินทรีย์ให้ปราศจากน้ำ และระเหยตัวทำละลายให้แห้ง แล้วนำส่วนผสม (100 มิลลิกรัม) มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Chromatotron ใช้ตัวจะเป็น $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ พบว่า fraction ที่ใช้ตัวจะเป็น $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (85:15) ให้สาร 69 (38 มิลลิกรัม, 37%) และ fraction ที่ใช้ตัวจะเป็น $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (85:15 ถึง 82:18) ให้สาร 67 (50 มิลลิกรัม, 49%)

5 α -20-Hydroxyecdysone 6-oxime *anti* C7 (69). Aggregated prism, mp. 180-182 °C (from MeOH-EtOAc); IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3362, 2962, 1647, 1448, 1381, 1124, 1064; ข้อมูล ^1H NMR แสดงไว้ในตารางที่ 15; คำนวณสำหรับ $\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{NO}_7\cdot\text{H}_2\text{O}$: C, 63.15; H, 9.16; N, 2.72 หาได้ C, 63.28; H, 9.24; N, 2.73%.

20-Hydroxyecdysone 6-oxime *syn* C7 (67). Amorphous, mp. 168-169 °C (from MeOH-EtOAc); IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3372, 2930, 1644, 1463, 1379, 1209, 1145, 1052; ข้อมูล ^1H NMR แสดงไว้ในตารางที่ 15; คำนวณสำหรับ $\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{NO}_7\cdot\frac{3}{2}\text{H}_2\text{O}$: C, 62.04; H, 9.26; N, 2.68 หาได้ C, 61.82; H, 9.51; N, 2.61%.

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

เติม methoxylamine hydrochloride (60 มิลลิกรัม) ลงในสารละลายของ 20-hydroxyecdysone (2) (120 มิลลิกรัม) ใน pyridine (2 มิลลิลิตร) กวนส่วนผสมของปฏิกิริยานี้ที่อุณหภูมิปกติเป็นเวลา 3 วัน หลังจาก work up ตามปกติ นำส่วนผสม (160 มิลลิกรัม) มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ตัวจะเป็น $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (92:8) ให้สาร 70 (76 มิลลิกรัม, 44%) และสาร 71 (43 มิลลิกรัม, 25%)

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

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

Recorded in pyridine- d_5 .

*Superimposed signal.

20-Hydroxyecdysone 6-methoxime *anti* C7 (70). Fine, aggregated needles, mp. 228-230 °C (from MeOH-EtOAc); IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3396, 2964, 1647, 1459, 1381, 1143, 1105, 1054; ข้อมูล ^1H NMR แสดงไว้ในตารางที่ 15; คำนวณสำหรับ $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{NO}_7 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$: C, 64.84; H, 9.33; N, 2.70 หาได้ C, 65.15; H, 9.70; N, 2.68%.

20-Hydroxyecdysone 6-*O*-methoxime *syn* C7 (71). Prisms, mp. 169-171 °C (from MeOH-EtOAc); IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3438, 2960, 1623, 1444, 1380, 1124, 1066; ข้อมูล ^1H NMR แสดงไว้ในตารางที่ 15; คำนวณสำหรับ $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{NO}_7 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$: C, 59.68; H, 9.41; N, 2.49 หาได้ C, 59.26; H, 9.21; N, 2.61%.

3. การเตรียมอนุพันธ์ของหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งต่าง ๆ ในโมเลกุล

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

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

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

20-Hydroxyecdysone 2-(furan-2-carboxylate) (72) และ 20-Hydroxyecdysone 3-(furan-2-carboxylate) (73). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3442, 2960, 1717, 1640, 1579, 1471, 1382, 1292, 1231, 1172, 1127, 1078, 1055, 987, 953, 884, 760; ^1H NMR ดูตารางที่ 16; FABMS (+ve): m/z 613 $[\text{M}+\text{K}]^+$; 575 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HR-FABMS (+ve): m/z 575.3218 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (คำนวณสำหรับ $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_9$: 575.3220).

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

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

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

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

*Recorded in pyridine- d_5 ; *Recorded in CDCl_3 ; **interchangeable

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

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

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

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

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

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

20-Hydroxyecdysone 2,3:20,22-diacetonide 25-(furan-2-carboxylate) (78). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3474, 2976, 2874, 1710, 1661, 1576, 1474, 1368, 1307, 1243, 1216, 1178, 1117, 1056, 1007, 934, 884, 837, 763; ^1H NMR ดูตารางที่ 17; FABMS (+ve) : m/z 655 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 637 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$.

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

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

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

H	76 ^a	77 ^a	78 ^a
2	4.20 (m)	4.15 (m)	4.19 (m)
3	4.25 (br s)	4.22 (br s)	4.24 (br s)
5	2.32 (dd, 12.5, 4.8)	3.00 (dd, 13.4, 3.6)	2.33 (dd, 12.6, 4.7)
7	5.80 (d, 2.4)	6.24 (d, 2.4)	5.80 (d, 2.4)
9	2.80 (m)	3.57 (m)	2.77 (m)
17	2.40 (t, 9)	2.98 (t, 9)	2.19 (m)
22	5.05 (dd, 10.6, 2.1)	3.87 (br d, 9.4)	3.63 (dd, 9.4, 3)
18-Me	0.84 (s)	1.21 (s)	0.76 (s)
19-Me	0.96 (s)	1.06 (s)	0.95 (s)
21-Me	1.31 (s) ^b	1.60 (s) ^a	1.12 (s)
26-Me	1.18 (s)	1.56 (s) ^a	1.29 (s)
27-Me	1.20 (s)	1.58 (s) ^a	1.30 (s)
3'	7.19 (dd, 3.3, 0.9)	7.24 (dd, 3.3, 0.9)	7.04 (dd, 3.3, 0.6)
4'	6.50 (dd, 3.3, 1.8)	6.38 (dd, 3.3, 1.8)	6.45 (dd, 3.3, 1.8)
5'	7.58 (dd, 1.8, 0.9)	7.68 (dd, 1.8, 0.9)	7.52 (dd, 1.8, 0.6)
Acetonide Me	1.34 ^b , 1.47 (each s)	-	1.38, 1.46, 1.54, 1.57 (each s)

^aRecorded in CDCl_3 .^bRecorded in pyridine- d_5 .^{a,b}Assignments may be reversed for signals with the same superscript.

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

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

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

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

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

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

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

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

Catalytic hydrogenolysis ของสาร 81

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

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

H	80	81	82
2	3.40 (m)	3.78 (m)	4.09 (m)
3	4.17 (br s)	5.72 (br s)	5.40 (br s)
5	2.45 (dd, ca 13, ca 4)	2.48 (dd, 13.3, 3.9)	2.39 (dd, 13.4, 3.9)
7	5.83	5.88 (d, 2.3)	5.85 (d, 2.4)
9	2.96 (m)	3.00 (m)	3.05 (m)
17	2.22 (t, ca 8)	2.24 (dd, 9.2, 7.8)	2.22 (t, 8.8)
22	3.65	3.68 (d, 8.5)	3.64 (dd, 8.8, 2.1)
18-Me	0.78 (s)	0.82 (s)	0.79 (s)
19-Me	0.97 (s)	1.06 (s)	1.03 (s)
21-Me	1.17 (s)	1.19 (s)	1.15 (s)
26-Me	1.22 (s)	1.26 (s)	1.21 (s)
27-Me	1.22 (s)	1.27 (s)	1.22 (s)
3'	-	-	7.21 (dd, 3.6, 0.6)
4'	-	-	6.51 (dd, 3.6, 1.8)
5'	-	-	7.58 (dd, 1.8, 0.6)
Acetonide Me	1.33, 1.42 (each s)	1.35, 1.44 (each s)	1.31, 1.40 (each s)
PhCH ₂ O	4.57 (d, 11.7)	4.52 (d, 11.8)	
	4.63 (d, 11.7)	4.75 (d, 11.8)	
PhCH ₂ O	7.35 (m)	7.31 (m)	

Recorded in CDCl₃

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

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

Acetonide deprotection ของสาร 81 และ Catalytic hydrogenolysis ของสาร 84

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

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

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

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

ละลายสาร 2 (150 มิลลิกรัม) ใน pyridine (1 มิลลิลิตร) แล้วเติมเบนซีน (10 มิลลิลิตร) เติมน้ำ 25 มิลลิลิตร เติมน้ำตาลทรายแดง (2.5 มิลลิลิตร) และส่วนผสมของปฏิกิริยาที่อุณหภูมิปกติเป็นเวลา 25 นาที เติมน้ำลงไป แล้วสกัดส่วนผสมด้วยเอทิลอะซิเตต (3x25 มิลลิลิตร) ล้างชั้นเอทิลอะซิเตตด้วยน้ำ และคูลน้ำออกด้วย Na_2SO_4 ที่ปราศจากน้ำ ทำสารให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้สาร 85 (155 มิลลิกรัม, 84%)

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

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

H	83	84
2	5.23 (<i>m</i>)	3.78 (<i>m</i>)
3	4.22 (<i>br s</i>)	5.72 (<i>br s</i>)
5	2.55 (<i>dd</i> , 13.4, 3.9)	2.48 (<i>dd</i> , 13.3, 3.9)
7	5.85 (<i>d</i> , 2.4)	5.88 (<i>d</i> , 2.3)
9	3.11 (<i>m</i>)	3.00 (<i>m</i>)
17	2.22 (<i>t</i> , <i>ca</i> 9)	2.24 (<i>dd</i> , 9.2, 7.8)
22	3.64 (<i>dd</i> , <i>ca</i> 9, <i>ca</i> 2)	3.68 (<i>d</i> , 8.5)
18-Me	0.79 (<i>s</i>)	0.82 (<i>s</i>)
19-Me	1.00 (<i>s</i>)	1.06 (<i>s</i>)
21-Me	1.15 (<i>s</i>)	1.19 (<i>s</i>)
26-Me	1.21 (<i>s</i>)	1.26 (<i>s</i>)
27-Me	1.22 (<i>s</i>)	1.27 (<i>s</i>)
3'	7.21 (<i>dd</i> , 3.6, 0.6)	7.22 (<i>br d</i> , 3.5)
4'	6.51 (<i>dd</i> , 3.6, 1.8)	6.53 (<i>dd</i> , 3.5, 1.7)
5'	7.57 (<i>dd</i> , 1.8, 0.6)	7.60 (<i>br s</i>)
Acetonide Me	1.31, 1.40 (each <i>s</i>)	1.35, 1.44 (each <i>s</i>)
PhCH_2O	-	4.52 (<i>d</i> , 11.8) 4.75 (<i>d</i> , 11.8)
PhCH_2O	-	7.32 (<i>m</i>)

Recorded in CDCl_3

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

H	85	86	87
2	5.46 (<i>m</i>)	4.42 (<i>m</i>)	4.20 (<i>m</i>)
3	4.44 (<i>br s</i>)	5.52 (<i>br s</i>)	4.24 (<i>br s</i>)
5	3.06 (<i>dd</i> , 13.2, 3.2)	2.67 (<i>dd</i> , 13.5, 3.8)	3.00 (<i>dd</i> , 13.4, 3.6)
7	6.24 (<i>d</i> , 1.8)	6.23 (<i>d</i> , 2.4)	6.23 (<i>d</i> , 2.1)
9	3.69 (<i>m</i>)	3.60 (<i>m</i>)	3.58 (<i>m</i>)
17	2.97 (<i>t</i> , 9)	2.99 (<i>t</i> , 9.1)	3.05 (<i>t</i> , 9)
22	3.86 (<i>br d</i> , 9.1)	3.88 (<i>br d</i> , 8.2)	5.70 (<i>dd</i> , 10.8, 2)
18-Me	1.18 (<i>s</i>)	1.21 (<i>s</i>)	1.19 (<i>s</i>)
19-Me	1.08 (<i>s</i>)	1.10 (<i>s</i>)	1.06 (<i>s</i>)
21-Me	1.57 (<i>s</i>)	1.58 (<i>s</i>)	1.75 (<i>s</i>)
26-Me	1.38 (<i>s</i>)	1.36 (<i>s</i>)	1.30 (<i>s</i>)
27-Me	1.38 (<i>s</i>)	1.37 (<i>s</i>)	1.30 (<i>s</i>)
3'	7.69 (<i>m</i>)	7.66 (<i>dd</i> , 4.8, 1.2)	7.65 (<i>dd</i> , 4.8, 1.2)
4'	7.03 (<i>m</i>)	7.02 (<i>dd</i> , 4.8, 3.6)	7.03 (<i>dd</i> , 4.8, 3.6)
5'	7.91 (<i>m</i>)	7.91 (<i>dd</i> , 3.6, 1.2)	7.93 (<i>dd</i> , 3.6, 1.2)

Recorded in pyridine- d_7 .

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

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

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

Acetonide deprotection ของสาร (88)

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

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

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

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

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

Acetonide deprotection ของสาร 90

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

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

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

H	88 ^a	89 ^a	90 ^a
2	4.21 (m)	4.16 (m)	4.20 (m)
3	4.25 (m)	4.23 (m)	4.25 (br s)
5	2.33 (dd, 12.6, 4.7)	3.00 (dd, 12.8, 4.2)	2.33 (dd, 12.5, 4.6)
7	5.82 (d, 2.4)	6.24	5.82 (d, 2.2)
9	2.81 (m)	3.58 (m)	2.77 (m)
17	2.40 (dd, 9.1, 8.8)	3.00 (t, 8.8)	2.22 (dd, 9.2, 8.1)
22	5.04 (dd, 10.5, 1.9)	3.88 (br d, 10.1)	3.64 (dd, 9.3, 2.9)
18-Me	0.84 (s)	1.22 (s)	0.77 (s)
19-Me	0.96 (s)	1.06 (s)	0.97 (s)
21-Me	1.31 (s) ^b	1.62 (s) ^c	1.14 (s)
26-Me	1.19 (s)	1.57 (s) ^c	1.31 (s)
27-Me	1.21 (s)	1.58 (s) ^c	1.32 (s)
3'	7.61 (dd, 4.8, 0.9)	7.55 (dd, 5.1, 0.9)	7.48 (dd, 4.8, 0.8)
4'	7.11 (dd, 4.8, 3.6)	6.99 (dd, 5.1, 3.6)	7.06 (dd, 4.8, 3.8)
5'	7.85 (dd, 3.6, 0.9)	7.87 (dd, 3.6, 0.9)	7.71 (dd, 3.8, 0.8)
Acetonide Me	1.34 ^b , 1.47 (each s)	-	1.40, 1.48, 1.56, 1.58 (each s)

^aRecorded in CDCl_3 .^bRecorded in pyridine- d_7 .^cAssignments may be reversed for signals with the same superscript.

การสังเคราะห์สาร 91

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

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

Acetonide deprotection ของสาร 91

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

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

Catalytic hydrogenolysis ของสาร 92

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

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

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

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

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

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

H	91	92
2	3.74 (<i>m</i>)	3.72 (<i>m</i>)
3	5.67 (<i>br d</i>)	5.65 (<i>br s</i>)
5	2.46 (<i>dd</i> , 13.5, 4.1)	2.44 (<i>dd</i> , 13.4, 3.9)
7	5.85 (<i>d</i> , 2.4)	5.83 (<i>d</i> , 2.2)
9	2.96 (<i>m</i>)	2.96 (<i>m</i>)
17	2.21 (<i>dd</i> , 9.4, 7.9)	2.31 (<i>t</i> , 9)
22	3.64 (<i>dd</i> , 9.1, 2.1)	3.41 (<i>d</i> , 10.1)
18-Me	0.79 (<i>s</i>)	0.84 (<i>s</i>)
19-Me	1.03 (<i>s</i>)	1.02 (<i>s</i>)
21-Me	1.16 (<i>s</i>)	1.19 (<i>s</i>)
26-Me	1.23 (<i>s</i>)	1.22 (<i>s</i>)
27-Me	1.24 (<i>s</i>)	1.23 (<i>s</i>)
3'	7.55 (<i>dd</i> , 5.1, 1.2)	7.54 (<i>dd</i> , 4.8, 1.1)
4'	7.09 (<i>dd</i> , 5.1, 3.6)	7.07 (<i>dd</i> , 4.8, 3.7)
5'	7.81 (<i>dd</i> , 3.6, 1.2)	7.79 (<i>dd</i> , 3.7, 1.1)
Acetonide Me	1.31, 1.40 (each <i>s</i>)	-
PhCH ₂ O	4.47 (<i>d</i> , 11.8)	4.45 (<i>d</i> , 11.8)
	4.73 (<i>d</i> , 11.8)	4.71 (<i>d</i> , 11.8)
PhCH ₂ O	7.25 (<i>m</i>)	7.25 (<i>m</i>)

Recorded in CDCl₃

(2 มิลลิลิตร) แล้วกรอง N,N -dicyclohexylurea ออกไป ทำการ reflux ส่วนผสมของปฏิกิริยาเป็นเวลา 1 วัน เติมน้ำลงในส่วนผสมปฏิกิริยา แล้วสกัดด้วย n -butanol (3×20 มิลลิลิตร) ถ้างั่น butanol ด้วยน้ำ แล้วระเหยตัวทำละลายออก โดยการกลั่นร่วมออกไปกับน้ำ ทำสารให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้สารผลิตภัณฑ์ 93 (32 มิลลิกรัม, 33%)

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

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

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

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

Acetonide deprotection ของ สาร 95

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

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

งานวิจัยทางการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ

1. การเพาะเลี้ยงหนอนแมลงวันบ้าน ใช้สายพันธุ์แมลงวันบ้านจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นำดักแด้ (pupae) มาเพาะเลี้ยงในกรงบุลาข่าย โดยวางดักแด้บนสำลีขึ้น บรรจุโครสผสมนมในอัตราส่วน 2:5 ใส่ถ้วยไว้ในกรงเพื่อเลี้ยงแมลงวันที่ออกมาจากดักแด้ อีกถ้วยหนึ่งมีสำลีชุบน้ำเพื่อให้เกิดความชุ่มชื้น แมลงวันออกมาจากดักแด้ในระยะเวลา 3-5 วัน เมื่อเกิดเป็นแมลงวันแล้ว นำถ้วยที่มีปลาป่นที่ทำให้ชื้นแล้วใส่เข้าไปในกรง ในเวลาประมาณ 2 วันแมลงวันก็ออกไข่ไว้บนปลาป่น จากนั้นอีกภายในเวลา 24 ชั่วโมงไข่ก็เป็นตัวอ่อน (larvae) นำตัวอ่อนมาเลี้ยงใน medium ซึ่งประกอบด้วยจิรแลก ราข้าวฮีสต์ และน้ำในสัดส่วนตามสูตรอาหารของตัวอ่อนแมลงวัน ผสมอาหารให้เข้ากันดีในภาชนะแล้วนำเกลบเติมลงไป นำตัวอ่อนมาใส่ลงในภาชนะที่เตรียมไว้แล้วปิดทับด้วยเกลบ ในเวลา 5-7 วันตัวอ่อนหรือที่เรียกว่าหนอนแมลงวันก็เข้าดักแด้ เก็บดักแด้มาล้างน้ำแล้วเริ่มขั้นตอนแรกซ้ำอีก ทำเช่นนี้เรื่อยๆ ไปจน

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

H	93 [*]	94 [*]	95 [*]
2	5.53 (<i>m</i>)	4.18 (<i>m</i>)	4.21 (<i>m</i>)
3	4.43 (<i>m</i>)	4.23 (<i>br s</i>)	4.26 (<i>m</i>)
5	3.05 (<i>dd</i> , 13.1, 3.6)	3.00 (<i>dd</i> , 13.2, 3.5)	2.33 (<i>dd</i> , 12.5, 4.8)
7	6.25 (<i>d</i> , 1.8)	6.22 (<i>d</i> , 2.1)	5.83 (<i>d</i> , 2.7)
9	3.69 (<i>m</i>)	3.57 (<i>m</i>)	2.81 (<i>m</i>)
17	2.97 (<i>t</i> , 9.1)	3.04 (<i>t</i> , 8.8)	2.40 (<i>dd</i> , 9.1, 8.8)
22	3.86 (<i>br d</i> , 9.7)	5.72 (<i>dd</i> , 10.8, 2)	5.04 (<i>dd</i> , 10.8, 2)
18-Me	1.19 (<i>s</i>)	1.19 (<i>s</i>)	0.84 (<i>s</i>)
19-Me	1.06 (<i>s</i>)	1.06 (<i>s</i>)	0.96 (<i>s</i>)
21-Me	1.56 (<i>s</i>)	1.68 (<i>s</i>)	1.31 (<i>s</i>) [†]
26-Me	1.39 (<i>s</i>)	1.27 (<i>s</i>)	1.18 (<i>s</i>)
27-Me	1.39 (<i>s</i>)	1.27 (<i>s</i>)	1.20 (<i>s</i>)
1'	13.19 (<i>br s</i>)	13.18 (<i>br s</i>)	9.21 (<i>br s</i>)
3'	7.26 (<i>m</i>)	7.23 (<i>m</i>)	6.93 (<i>m</i>)
4'	6.36 (<i>m</i>)	6.37 (<i>m</i>)	6.27 (<i>m</i>)
5'	7.26 (<i>m</i>)	7.28 (<i>m</i>)	6.98 (<i>m</i>)
Acetonide Me	-	-	1.33 (<i>s</i>) [†] , 1.47 (<i>s</i>)

^{*}Recorded in pyridine-*d*₇.[†]Recorded in CDCl₃.[†]Assignments may be reversed for signals with the same superscript.

ถึง generation ที่ 8 จึงนำมาใช้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้ หนอนแมลงวันที่นำมาผูกเพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้จะอยู่ในช่วงเวลา 5-7 วัน หรือเป็นช่วงเวลาที่หนอนอย่างน้อยประมาณ 10 % ได้เข้าดักแด้ไปแล้ว นำหนอนแมลงวันมาล้างด้วยน้ำแล้วจับน้ำออก จากนั้นจึงผูกด้วยด้ายที่ทำจากผ้าขดตรงปล้องที่ 7 หรือปล้องที่ 8 จากทางด้านหัว เพื่อไม่ให้เอนโคไคเตเดรียที่ถูกรังจากด้านหัวถูกส่งมาเลี้ยงทางด้านท้อง ก่อนใช้ด้ายให้ล้างด้วยสารละลาย 1% sodium hypochlorite นำหนอนแมลงวันที่ถูกแล้ยมาวางบนกระดาษที่ชุบน้ำให้ชื้นแล้วเล็กน้อยเพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำจากตัวหนอน ในระยะเวลา 24 ชั่วโมงถัดมา ทางด้านหัวของหนอนที่ถูกไว้ก็เริ่มแสดงความเป็นดักแด้ (puparia) แต่ทางส่วนท้องยังคงอยู่ในสภาวะของตัวอ่อน ทำการคัดเลือกตัวหนอนที่อยู่ในสภาพพร้อมที่จะทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยแยกมากับไว้อีก ประมาณ 5 ถึง 6 ชั่วโมง

2. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพใช้วิธีการของ Kaplanis และคณะ³⁵ ใช้หนอนแมลงวันที่ถูกและเข้าดักแด้เฉพาะส่วนหัวจำนวน 10 ตัวในแต่ละความเข้มข้นของสารละลายเอนโคไคเตเดรียที่ทำการทดสอบ โดยแต่ละตัวได้รับการฉีดสารละลาย 3 ไมโครลิตร ใช้ 20-hydroxyecdysone (2) และน้ำกลั่นเป็น positive และ negative control ตามลำดับ หากสารไม่ละลายในน้ำกลั่น ให้ใช้ aq EtOH (ไม่เกิน 20%) หรือ aq. emulsion ของ Tween 80 แล้วแต่กรณี การให้ score ของผลการทดสอบใช้วิธีการของ Ohaki และคณะ³⁶ กล่าวคือ การเกิดการเข้าดักแด้ของส่วนท้องที่ฉีดสารละลายสำหรับการทดสอบเป็น complete, marked, slight หรือ ไม่เกิดการเข้าดักแด้เลย (none) ให้ score เป็น 100, 75, 50 และ 0% ตามลำดับ

นำสารที่สกัดแยกได้และที่สังเคราะห์ได้มาทดสอบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบ (ดูตารางที่ 24 ถึง 32)

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

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

* dissolved in 10% aqueous ethanol.

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

Compound	Conc $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Amount	Number pupation						%Effectiveness
			Complete	Marked	Slight	None	Dead	Surviving	
20-Hydroxyecdysone(2)	0.025	10	2	-	6	1	1	9	55.5
	0.05	10	8	1	1	-	1	9	92.5
	0.10	10	10	-	-	-	-	10	100
28 "Epimer 1" ^a	-	10	-	-	-	10	-	10	0
	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.10	10	1	2	-	7	-	10	25.0
	0.25	10	6	-	-	4	-	10	60.0
	1.00	10	7	-	-	-	3	7	100
28 "Epimer 2" ^b	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.10	10	5	2	1	1	1	9	77.8
	0.25	10	8	-	-	-	2	8	100
	1.00	10	9	-	-	-	1	9	100

^a dissolved in distilled H₂O.

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

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

* dissolved in 16% aqueous ethanol.

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

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

* dissolved in 10% aqueous ethanol.

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

Compound	Conc. µg/µl	Amount	Mosquito population						Mortality
			Complete	Morbid	Flight	Move	Dead	Surviving	
20-Hydroxyecdysone ^a	0.01	10	-	1	1	1	-	18	12.5
	0.025	10	4	1	2	3	-	16	62.5
	0.08	10	8	1	1	7	-	18	92.5
	0.100	10	10	-	-	-	-	10	100
	0.250	10	10	-	-	-	-	10	100
	0.05	10	-	-	-	10	-	10	0
59+60 mixture ^a	0.10	10	2	-	3	5	-	16	33.6
	0.175	10	3	2	1	5	1	8	35.9
	0.25	10	6	1	-	2	0	10	72.5
	0.03	10	-	-	-	10	-	10	0
	0.10	10	-	-	-	0	1	8	0
	0.175	10	-	-	-	10	-	10	0
Compound 61 ^a	0.25	10	-	1	1	8	-	10	12.5
	0.50	10	3	2	1	5	-	10	62.5
	0.75	10	6	3	1	2	-	10	72.5
	1.00	10	8	-	1	1	-	10	85.0
	0.05	10	-	-	-	10	-	10	0
	0.10	10	-	1	-	9	-	10	7.5
Compound 62 ^a	0.175	10	1	-	-	9	-	10	10.0
	0.25	10	-	2	2	6	-	10	25.0
	0.50	10	8	2	-	2	-	10	75.0
	0.05	10	-	-	-	10	-	10	0

^a dissolved in 10% aqueous ethanol.

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

Compound	Conc [μg/10μl]	Amount	Number pupation						Mortality %
			Complete	Marked	Blind	None	Dead	Surviving	
5O-20-Hydroxyecdysone 6-oxime salt C ^C (68)	0.10	10	-	-	1	8	1	9	4.5
	0.175	10	4	1	-	4	1	9	51.7
	0.25	10	9	-	1	-	-	10	95
	0.50	10	10	-	-	-	-	10	100
	1.000	10	10	-	-	-	-	10	100
20-Hydroxyecdysone 6- oxime salt C ^C (67)	0.05	10	-	-	-	8	2	8	0
	0.10	10	4	1	-	5	-	10	47.5
	0.25	10	10	-	-	-	-	10	100
	1.00	10	9	-	-	-	1	9	100
	10.00	10	-	-	-	-	-	-	-
20-Hydroxyecdysone 6-O- methoxime salt C ^C (70)	0.05	10	-	-	-	10	-	10	0
	0.10	10	-	-	-	10	-	10	0
	0.25	10	-	-	-	9	1	9	0
	1.00	10	-	-	-	9	1	9	0
	10.00	10	1	-	-	6	3	6	16.6
20-Hydroxyecdysone 6-O- methoxime salt C ^C (71)	0.05	10	-	-	-	10	-	10	0
	0.10	10	-	-	-	10	-	10	0
	0.25	10	1	1	3	5	-	10	31.5
	1.00	10	10	-	-	-	-	10	100

^C Dissolved in Tween 80.

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

Compound	Conc. μg/5μl	Amount	Number population						%Effectiveness
			Complete	Marked	Slight	None	Dead	Surviving	
Mixture of 20-hydroxyecdysone 3-(fluo-2-carboxylate (72) and 3-carboxylate (73) and (fluo-2-carboxylate) (73)	0.10	15	1	2	-	9	3	12	20.5
	0.25	15	7	-	1	3	4	11	68.2
	1.00	15	10	-	-	-	5	10	100
	10.00	15	10	-	-	-	5	10	100
20-Hydroxyecdysone 3-(fluo-2-carboxylate) (73)	0.05	10	3	1	1	4	1	9	47.0
	0.10	10	6	2	1	1	-	10	80.0
	0.25	10	8	1	1	-	-	10	92.5
	1.00	10	9	1	-	-	-	10	97.5
20-Hydroxyecdysone 22-(fluo-2-carboxylate) (74)	0.025	10	-	-	-	10	-	10	0
	0.05	10	-	-	5	3	-	10	25.0
	0.10	10	2	3	3	-	-	10	72.5
	0.175	10	6	4	-	-	-	10	90.0
20-Hydroxyecdysone 25-(fluo-2-carboxylate) (77)	0.25	10	10	-	-	-	-	10	100
	0.025	10	-	-	-	10	-	10	0
	0.05	10	2	-	3	4	-	10	30.0
	0.10	10	2	1	2	5	-	10	37.5
	0.25	10	10	-	-	-	-	10	100

* dissolved in 10% aqueous ethanol.

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

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

* dissolved in 10% aqueous ethanol.

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

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

* dissolved in 10% aqueous ethanol

เอกสารอ้างอิง

- 1) R. Lafont and I. D. Wilson, *The Ecdysone Handbook*, The Chromatographic Society, Nottingham, 1992.
- 2) R. Lafont, *Insect Biochem.*, 1991, 21, 697.
- 3) A. Butenandt and P. Karlson, *Z. Naturforsch.*, 1954, 9b, 389.
- 4) D. H. S. Horn, E. J. Middleton, J. A. Wunderlich and F. Hamshire, *Chem. Commun.*, 1966, 339.
- 5) K. Nakanishi, M. Koreeda, S. Sasaki, M. L. Chang and H. Y. Hsu, *Chem. Commun.*, 1966, 915.
- 6) T. Takemoto, S. Ogawa and N. Nishimoto, *Yakugaku Zasshi*, 1967, 87, 325.
- 7) F. Camps, Plant Ecdysteroids and Their Interaction with Insects. In *Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids*, J. B. Harborne and F. A. Tomas-Babaran, eds., Clarendon Press, Oxford, 1991, pp. 331-376.
- 8) A. Suksamrarn and C. Sommechai, *Phytochemistry*, 1993, 32, 303.
- 9) A. Suksamrarn, C. Sommechai, P. Charulpong and B. Chitkul, *Phytochemistry*, 1995, 38, 473.
- 10) J.-F. Modde, R. Lafont and J. A. Hoffmann, *Int. J. Invert. Reprod. Devel.*, 1984, 7, 161.
- 11) M. Garcia, J.-P. Girault and R. Lafont, *Int. J. Invert. Reprod. Devel.*, 1986, 9, 43.
- 12) K. Werawattanametin, V. Podimuang and A. Suksamrarn, *J. Nat. Prod.*, 1986, 49, 365.
- 13) R. Bergamasco and D. H. S. Horn, The Biological Activities of Ecdysteroids and Analogues. In *Progress in Ecdysone Research*, J. A. Hoffmann, ed., Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1980, pp. 299-324.
- 14) W. E. Robbins, J. N. Kaplanis, M. J. Thompson, T. J. Shortino and S. C. Joyner, *Steroids*, 1970, 16, 105.
- 15) A. Suksamrarn, P. Ganpinyo and C. Sommechai, *Tetrahedron Lett.*, 1994, 35, 4445.
- 16) M. N. Galbraith and D. H. S. Horn, *Aust. J. Chem.*, 1969, 22, 1045.
- 17) A. Suksamrarn and P. Pattanaprateep, *Tetrahedron*, 1995, 51, 10633.
- 18) K.-D. Spindler, J. Koolman, F. Mosora and H. Emmerlich, *J. Insect Physiol.*, 1977, 23, 441.
- 19) J. G. Lloyd-Jones H. H. Rees and T. W. Goodwin, *Phytochemistry*, 1973, 12, 569.
- 20) J. B. Siddall, D. H. S. Horn and E. J. Middleton, *Chem. Commun.*, 1967, 899.
- 21) Q. R. Petersen, R. C. Cambie and G. B. Russell, *Aust. J. Chem.*, 1993, 46, 1961.

- 22) T. G. Davies, W. J. S. Lockley, R. Boid, H. H. Rees and T. W. Goodwin, *Biochem. J.*, 1980, **190**, 537.
- 23) D. R. Greenwood, L. N. Dinan and H. H. Rees, *Biochem. J.*, 1984, **217**, 783.
- 24) J.-P. Girault, C. Blais, P. Beydon, C. Rolando and R. Lafont, *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 1989, **10**, 199.
- 25) L. Dinan and H. H. Rees, *Steroids*, 1978, **32**, 629.
- 26) M. N. Galbraith, D. H. S. Horn, E. J. Middleton and R. J. Hackney, *Aust. J. Chem.*, 1969, **22**, 1517.
- 27) U. Hedtmann, R. Klintz, K. Hobert, J. Frelek, I. Vlahov and P. Welzei, *Tetrahedron*, 1991, **23**, 3753.
- 28) P. Cherbas, D. A. Trainor, R. J. Stonard and K. Nakanishi, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1982, 1307.
- 29) S. S. Lee, K. Nakanishi and P. Cherbas, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1991, 51.
- 30) J. Tomas, F. Camps, J. Coll, E. Mele and N. Pascual, *Tetrahedron*, 1992, **48**, 9809.
- 31) M. N. Galbraith, D. H. S. Horn, E. J. Middleton, R. J. Hackney, *Aust. J. Chem.*, 1969, **22**, 1059.
- 32) T. Kametani, M. Tsubuki, K. Higurashi and T. Honda, *J. Org. Chem.*, 1986, **51**, 2932.
- 33) A. Suksamrarn and B. Yingyongnarongkul, *Tetrahedron*, 1996, **52**, 12623.
- 34) A. Suksamrarn and B. Yingyongnarongkul, *Tetrahedron*, 1997, **53**, 3145.
- 35) A. Suksamrarn, S. Charoensuk and B. Yingyongnarongkul, *Tetrahedron*, 1996, **52**, 10673.
- 36) J. B. Siddall, J. P. Marshall, A. Bowers, A. D. Cross, J. A. Edwards and J. H. Fried, *J. Am. Chem. Soc.*, 1966, **88**, 862.
- 37) H. Mori, K. Shibata, K. Tsuneda and M. Sawai, *Chem. Pharm. Bull. (Japan)*, 1968, **16**, 563.
- 38) A. Furlenmeier, A. Furst, A. Langemann, Waldvogel, P. Hocks, U. Kerb and R. Wiechert, *Helv. Chim. Acta*, 1967, **50**, 2387.
- 39) D. H. R. Barton, P. G. Feakins, J. P. Poyser and P. G. Sammes, *J. Chem. Soc. (C)*, 1970, 1584.
- 40) S. Ogawa, N. Nishimoto, N. Okamoto and T. Takemoto, *Yakugaku Zasshi*, 1971, **91**, 916.
- 41) R. W. Miller, J. Clardy, J. Kozłowski, K. L. Mikolajczak, R. D. Plattner, R. G. Powell, C. R. Smith, D. Weisleder and Z. Qi-Tai, *Planta Med.*, 1985, 40.
- 42) P. Maurer, J.-P. Girault, M. Larcheveque and R. Lafont, *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 1993, **23**, 29.

- 43) H. Hikino, T. Okuyama, S. Arihara, Y. Hikino, T. Takemoto, H. Mori and K. Shibata *Chem. Pharm. Bull.*, 1975, 23, 1458.
- 44) P. G. Roussel, N. J. Turner and L. N. Dinan, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1995, 933.
- 45) L. Canonica, B. Danieli, G. Ferrari, J. Krepsinsky and G. Rainoldi, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1973, 737.
- 46) M. Zhang, M. J. Stout and I. Kubo, *Phytochemistry*, 1992, 31, 247.
- 47) J. Coll, N. Reixach, F. Sanchez-Baeza, J. Casas and F. Camps, *Tetrahedron*, 1994, 50, 7247.
- 48) N. Nishimoto, Y. Shiobara, F. Masumi, S. Inoue, T. Takemoto, F. Oliveira, G. Akisue, M. K. Akisue, G. Hashimoto, O. Tanaka, R. Kasai and H. Matura, *Phytochemistry*, 1987, 26, 2505.
- 49) S. Ohta, J. R. Guo, Y. Hiraga and T. Suga, *Phytochemistry*, 1996, 41, 745.
- 50) J.-P. Girault, M. Bathori, E. Varga, K. Szendrei and R. Lafont, *J. Nat. Prod.*, 1990, 53, 279.
- 51) M. J. Thompson, J. N. Kaplanis, W. E. Robbins and R. T. Yamamoto, *Chem. Commun.*, 1967, 650.
- 52) M. N. Galbraith, D. H. S. Horn, E. J. Middleton, J. N. Kaplanis and M. J. Thompson, *Experientia*, 1973, 29, 782.
- 53) M. B. Pinheiro, W. W. Filho, A. I. Rocha, B. Porter and E. Wenkert, *Phytochemistry*, 1983, 22, 2320.
- 54) H. C. Kolb, M. S. VanNieuwenhze and K. B. Sharpless, *Chem. Rev.*, 1994, 94, 2483.
- 55) J. N. Kaplanis, L. T. Tabor, M. J. Thompson, W. E. Robbins and T. J. Shortino, *Steroids*, 1966, 8, 625.
- 56) T. Ohtaki, R. D. Milkman and C. M. Williams, *Proc. Nat Acad. Sci. USA*, 1967, 58, 981.
- 57) H. Rimpler, *Tetrahedron Lett.*, 1969, 329.
- 58) T. Takemoto, S. Arihara, Y. Hikino and H. Hikino, *Tetrahedron Lett.*, 1968, 375.
- 59) B. Yingyongnarongkul and A. Suksamrarn, *Tetrahedron*, 1998, 54, 2795.
- 60) A. Suksamrarn, B. Yingyongnarongkul and N. Promrangsang, *Tetrahedron*, 1998, 54, 14565.
- 61) M. B. Smith, *Organic Synthesis*, McGraw-Hill, Singapore, 1994, p. 425.
- 62) A. Suksamrarn, B. Yingyongnarongkul and S. Charoensuk, *Tetrahedron*, 1999, 55, 255.
- 63) T. Takemoto, Y. Hikino, S. Arihara, H. Hikino, S. Ogawa and N. Nishimoto, *Tetrahedron Lett.*, 1968, 2475.

- 64) H. Hikino, K. Mohri, Y. Hikino, S. Arihara, T. Takemoto, H. Mori, and K. Shibata, *Tetrahedron*, 1976, **32**, 3015.
- 65) M. J. Thompson, J. N. Kaplanis, W. E. Robbins, S. R. Dutky and H. N. Nigg, *Steroids*, 1974, **24**, 359.
- 66) A. Suksamrarn and B. Yingyongnarongkul, *Tetrahedron*, 1997, **53**, 3145.

ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์

ผลงานวิจัยจากโครงการวิจัยนี้ที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ มีดังนี้

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

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

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

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

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

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

4. การสังเคราะห์ 24-*epi*-Pterosterone อย่าง regioselective ได้ทำการสังเคราะห์ 24-*epi*-pterosterone ซึ่งเป็นเอคไคสเตียรอยด์ที่หายากอีกชนิดหนึ่ง อย่าง regioselective เป็นผลสำเร็จ ทำให้มีเอคไคสเตียรอยด์สำหรับศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพได้

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

5. การสกัดแยกและหาสูตรโครงสร้างเอคไคสเตียรอยด์ที่มีขั้วสูงมาก จากเปลือกรากของต้นผ้าเสียน ได้แยกเอคไคสเตียรอยด์ที่มีขั้วสูงมากจากเปลือกรากต้นผ้าเสียนได้ 3 ชนิดคือ 24*R*-11 α ,20,24-trihydroxyecdysone, 11 α ,20,26-trihydroxyecdysone โดยชนิดหลังนี้มีสอง C-25 epimers เป็นเอคไคสเตียรอยด์ใหม่ทั้ง 3 ชนิด และมีหมู่ไฮดรอกซิลอยู่ในโมเลกุลถึง 8 หมู่

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

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

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

ผลงานวิจัยที่กำลังเขียนหรือคาดว่าจะเขียนส่งไปตีพิมพ์

จากการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันในโครงสร้างหลักคือที่วง A และวง B ของเอคไคสเตียรอยด์ นำไปสู่การสังเคราะห์และการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร 2 กลุ่ม คือ

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

รายการ Scheme

Scheme 1
Scheme 2
Scheme 3

หน้า

29
31
33

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเช่นเดียวกันมารวมเข้าด้วยกัน เพื่อเขียน paper ที่ดีขึ้น ชื่อเรื่องของ paper ยังไม่ได้ตั้งไว้ อาจจะเป็นแนวคล้ายกับชื่อดังต่อไปนี้

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

2) การเตรียมอนุพันธ์ของหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งต่างๆ ในโมเลกุล ได้เตรียม heterocyclic esters ระหว่างเอคไคสเตียรอยด์คือ 20-hydroxyecdysone กับ furan-2-carboxylic acid, thiophene-2-carboxylic acid และ pyrrole-2-carboxylic acid โดยให้เกิดเอสเตอร์ที่ตำแหน่ง 2 และ 22 ของเอคไคสเตียรอยด์ และส่วนใหญ่เตรียมเอสเตอร์ที่ตำแหน่ง 3 และ 25 ของเอคไคสเตียรอยด์ด้วย ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของการเป็นฮอร์โมนลอกคราบน่าสนใจมาก กล่าวคืออนุพันธ์เอสเตอร์หลายชนิดยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงอยู่ ทั้งๆที่ผลการทดสอบในอดีตที่มีผู้อื่นรายงานพบว่า อนุพันธ์อะไซด์จะต่ำกว่า parent ecdysteroids แต่ที่เรพบนี้แตกต่างจากที่คาดไว้ ที่สำคัญคือ heterocyclic esters บางชนิดที่เตรียมได้ มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงกว่า parent ecdysteroid ด้วยซ้ำไป ฉะนั้นเมื่อเขียน paper แล้วน่าจะไม่มีปัญหาในการได้รับการตีพิมพ์ ขณะนี้กำลังร่าง manuscript โดยอาจนำข้อมูลบางส่วนของ unpublished results ที่เรร่วมกันมารวมด้วย paper จะมีชื่อคล้ายคลึงกับที่เขียนไว้ดังนี้

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

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยส่วนหนึ่งที่ในตัวของตัวเองยังไม่เพียงพอที่จะเขียนเป็นผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ แต่จะรอรอรวมกับงานแนวเดียวกันนี้ในโอกาสต่อไป

