



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การประยุกต์ใช้ปฏิกิริยาของ vicinal dianions ของ succinic ester derivatives ในการเตรียมสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจำพวก γ -butyrolactones และ lignans และการ ค้นหา lignans ที่มี cytotoxic activity จากพืชสมุนไพรในสกุล *Phyllanthus*

โดย ศาสตราจารย์ ดร.มนัส พรหมโคตร และคณะ

15 มิถุนายน 2547

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การประยุกต์ใช้ปฏิกิริยาของ vicinal dianions ของ succinic ester derivatives ในการเตรียมสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจำพวก γ -butyrolactones และ lignans และการค้นหา lignans ที่มี cytotoxic activity จากพืชสมุนไพรในสกุล *Phyllanthus*

คณะผู้วิจัย

- ศาสตราจารย์ ดร.มนัส พรหมโคตร
- รองศาสตราจารย์ ดร.ปทุมรัตน์ ตูจินดา

สังกัด

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่กรุณาอนุเคราะห์ให้ทุนวิจัยองค์ความรู้ใหม่ที่เป็นพื้นฐานต่อการพัฒนา สนับสนุนการวิจัยตั้งแต่ 15 มิถุนายน 2544-15 มิถุนายน 2547

ขอขอบคุณบุคคลที่ให้ความอนุเคราะห์ในด้านต่าง ๆ ดังมีรายนามต่อไปนี้

ศ.ดร. วิชัย รวีตระกูล	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
ศ.ดร. ธวัชชัย สันติสุข	หอพรรณไม้ กรมป่าไม้ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
รศ.ดร. สมัยศึก โสภาสรรค์	ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
รศ. ดร. พลังพล คงเสรี	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
นายณรงค์ นันทะแสน	หอพรรณไม้ กรมป่าไม้ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
นางสาววัชรีย์ หาญยิ่ง	นักศึกษาปริญญาโท สาขาเคมีอินทรีย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
นางสาวดารณี สุริกรรัมย์	นักศึกษาปริญญาโท สาขาเคมีอินทรีย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
นางสาว ลัดดาวัลย์ ลำเภากเงิน	นักศึกษาปริญญาโท สาขาเคมีอินทรีย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
นางสาว อริสสรา อีสสระรี่	นักศึกษาปริญญาโท สาขาเคมีอินทรีย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
นายอนรรฆ คำขาว	นักศึกษาปริญญาโทสาขาเคมีอินทรีย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และผู้ช่วยวิจัย
นางสาวจิตรา กรสกุลกาญจน์	นักศึกษาปริญญาโทสาขาเคมีอินทรีย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
นางสาวเสาวรีย์ ทูทุมมา	นักศึกษาปริญญาโทสาขาเคมีอินทรีย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และผู้ช่วยวิจัย
นางสาววันเพ็ญ ธัญญเจริญ	ผู้ช่วยวิจัย

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ที่ให้การอนุเคราะห์ในการเก็บและบันทึกข้อมูลทาง IR UV NMR MS และ elemental analysis

นางพัชรินทร์ ภูชัยพัฒนานนท์	นักวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
นางสาวอัมพร ศรีสุทธิพฤทธิ	นักวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
นางสุทธิพร พิกุลทอง	นักวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
นางสาวกิ่งแก้ว เสรีกุล	นักวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
นางสาวอรฉัตร วัฒนพงษ์	นักวิทยาศาสตร์ โครงการพัฒนานักศึกษาด้านการศึกษาและการวิจัยทาง เคมี

ขอขอบคุณ คุณ พัชรี ดั่งเงิน ที่ให้การอนุเคราะห์ในการดูแลด้านการเงินและบัญชี

ขอขอบคุณโครงการพัฒนาบัณฑิตศึกษาและการวิจัยทางเคมีสำหรับทุนการศึกษาแก่นักศึกษาที่ร่วมโครงการ ตลอดจนให้การสนับสนุนในด้านวัสดุ และอุปกรณ์เครื่องมือต่าง ๆ

สุดท้ายนี้คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับการให้ใช้สถานที่และอุปกรณ์เครื่องมือต่าง ๆ ในการวิจัย

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
สารบัญ	iii
บทคัดย่อ/Abstract	1
Executive Summary	7
เนื้อหาทางานวิจัย	
งานวิจัยด้านการสังเคราะห์	12
1. การเตรียมสารเริ่มต้น dimethyl α -(methyldiphenylsilyl)succinate (1) และ diethyl α -(dimethoxyphosphono)succinate (2)	12
2. การศึกษาวิธีการเตรียม และ ปฏิกิริยาของ vicinal dianion 3	13
3. การศึกษาปฏิกิริยาของ vicinal dianion 4	16
4. การศึกษาการเตรียม vicinal dianion 18 จาก triethyl ethanetricarboxylate และการศึกษาปฏิกิริยากับ carbonyl compounds	17
4.1 ปฏิกิริยาของ dianion 18 กับ aldehydes	17
4.2 การศึกษาการ isomerization ของ γ -lactone 21	20
4.3 ปฏิกิริยาของ dianion 18 กับ ketones	22
5. การศึกษาวิธีการเตรียม ($\pm$)-Methylenolactocin (25) และ ($\pm$)-Protolichesterinic acid (26)	23
6. การเตรียม paraconic acid 34a	25
7. การศึกษาวิธีการเตรียม Methylenolactocin (25)	26
8. การเตรียมสาร ($\pm$)-Lichesterinic acid (27), ($\pm$)-Phaseolinic acid (28), ($\pm$)-Nephromop-sinic acid (29), ($\pm$)-Rocellaric acid (30), และ ($\pm$)-Dihydroprotolichesterinic acid (31)	27
8.1 การเตรียม ($\pm$)-Lichesterinic acid (27)	27
8.2 การเตรียมสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ 28, 29, 30 และ 31	29
9. การศึกษาวิธีการเตรียมและปฏิกิริยาของ vicinal dianion 42	32
9.1 การเตรียม α -aroylsuccinic ester 41	33
10. การเตรียม vicinal dianions 42a-c และ การศึกษาปฏิกิริยากับ carbonyl compounds	33
11. การเตรียม α -arylidene- γ -butyrolactones 45 จาก α -aroyl- γ -butyrolactone 43	35
12. การเตรียมสารประกอบ dihydrofuran 49	37
13. การเตรียม tetrasubstituted furan 50	39
14. การเตรียมสารประกอบ 2,5-diaryl-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octanes 54	39
15. การเตรียม thuriferic acid ethyl ester and analogues (56) และ การเตรียม picropodophyllone (57)	40
16. การเตรียมสารประกอบ furofurans 68 จากสารประกอบ TC- α -aroyl- γ -lactones 43	42
17. การศึกษาปฏิกิริยาของ vicinal dianions ของ chiral succinic acid derivatives	46
17.1 การเตรียมสารประกอบ (+)- β -arylmethyl- γ -butyrolactones 75	48

	หน้า
งานวิจัยด้านผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ	50
1. การสำรวจและเก็บพืชสกุล <i>Phyllanthus</i>	50
2. การสกัดด้วยการแช่ในเมทานอลเพื่อ screen หา cytotoxic activity ในขั้นต้น	51
3. การทดสอบ cytotoxic activity ของส่วนสกัดต่าง ๆ ที่ได้จากการแช่ในเมทานอลอย่างเดียว	52
4. การ partition เพื่อให้ได้ส่วนสกัดที่มีขั้วแตกต่างกัน และการทดสอบ cytotoxic activity	54
5. การสกัดตามลำดับความมีขั้วของตัวทำละลาย (sequential extraction)	58
6. การแยกสารองค์ประกอบ และการศึกษาหาโครงสร้างของสารองค์ประกอบของพืชในสกุล <i>Phyllanthus</i>	63
7. การแยกสารองค์ประกอบจากส่วนสกัดของ <i>Phyllanthus taxodiifolius</i>	64
7.1 การแยกสารจากส่วนเหนือดิน (aerial part, PX) ของตัวอย่างที่ 1 ของ <i>Phyllanthus taxodiifolius</i>	64
- การแยกสารองค์ประกอบจากส่วนสกัด hexane ของ <i>Phyllanthus taxodiifolius</i> (ตัวอย่างที่ 1)	64
- การแยกสารองค์ประกอบจากส่วนสกัด ethyl acetate ของ <i>Phyllanthus taxodiifolius</i> (ตัวอย่างที่ 1)	66
- การแยกสารองค์ประกอบจากส่วนสกัด <i>n</i> -butanol ของ <i>Phyllanthus taxodiifolius</i> (ตัวอย่างที่ 1)	68
7.2 การแยกสารจากส่วนเหนือดิน (aerial part, PX) ของตัวอย่างที่ 2 ของ <i>Phyllanthus taxodiifolius</i>	69
- การแยกสารองค์ประกอบจากส่วนสกัด hexane ของ <i>Phyllanthus taxodiifolius</i> (ตัวอย่างที่ 2)	69
- การแยกสารองค์ประกอบจากส่วนสกัด EtOAc ของ <i>Phyllanthus taxodiifolius</i> (ตัวอย่างที่ 2)	71
- การแยกสารองค์ประกอบจากส่วนสกัด <i>n</i> -butanol ของ <i>Phyllanthus taxodiifolius</i> (ตัวอย่างที่ 2)	72
8. การพิสูจน์โครงสร้างของสารองค์ประกอบที่บริสุทธิ์จาก <i>Phyllanthus taxodiifolius</i>	73
8.1 Physical data ของสารที่บริสุทธิ์จาก <i>Phyllanthus taxodiifolius</i>	73
- Compound 1 (Glochidone)	73
- Compound 2 (Glochidonol)	74
- Compound 3 (Cleistanthin A methyl ether)	76
- Compound 4 (Cleistanthin A)	77
- Compound 5 (Cleistanthoside A)	79
- Compound 5a (Cleistanthoside A tetraacetate)	80
- Compound 9 (Taxodiifoloside, New compound)	81
- Compound 7 (<i>N</i> -Benzoylphenylalaninyl- <i>N</i> -benzoylphenylalaninate)	84
- Compound 8 (<i>N</i> -Benzoylphenylalaninoylphenylalaninol acetate)	85
- Compound 10 (4-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid)	86

	หน้า
9. การทดสอบฤทธิ์ cytotoxic activity ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จาก <i>Phyllanthus taxodiifolius</i>	86
10. การแยกสารองค์ประกอบจาก <i>Phyllanthus acutissima</i> และการทดสอบ cytotoxic activity ของส่วนแยกย่อยต่างๆ	86
11. การพิสูจน์โครงสร้างของสาร 11-15	88
11.1 Physical properties และ spectroscopic data ของสาร 11-15	88
- Compound 11 (Canthin-6-one)	88
- Compound 12 (9-Methoxycanthin-6-one)	89
- Compound 13 (1-Hydroxycanthin-6-one)	89
- Compound 14 (9,10-Dimethoxycanthin-6-one)	90
- Compound 15 (Scopoletin)	91
สรุปผลงานวิจัยในรอบ 3 ปี	92
- ด้านการสังเคราะห์	92
- ด้านผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ	93
เอกสารอ้างอิง	97
- ด้านการสังเคราะห์	97
- ด้านผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ	98
Output ที่ได้จากโครงการ	100
- ผลงานวิจัยที่ได้ตีพิมพ์แล้ว	100
- ผลงานวิจัยที่กำลังจะตีพิมพ์	100
- Abstract ในการประชุมวิชาการนอกประเทศ	100
- Abstract ในการประชุมวิชาการในประเทศของนักศึกษา	100
- แบบปากเปล่า	100
- แบบโปสเตอร์	101
ภาคผนวก	

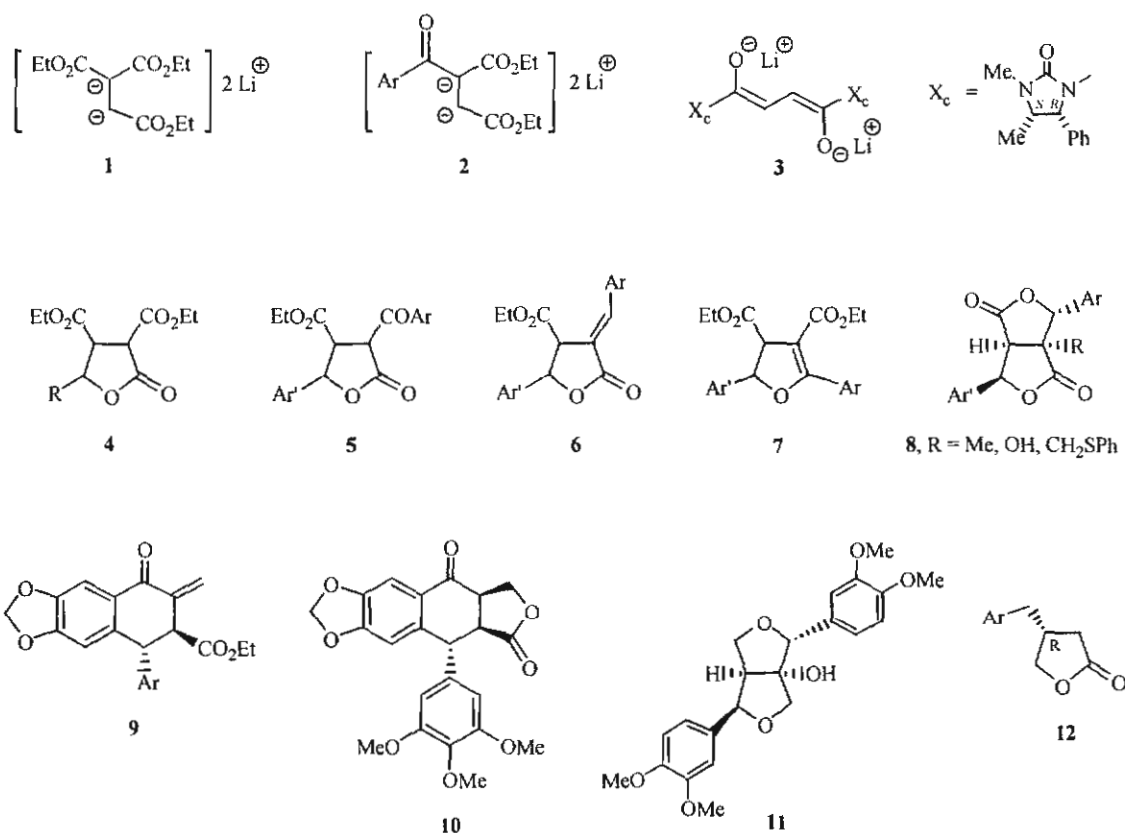
บทคัดย่อ/ABSTRACT

การสร้างพันธะ carbon-carbon โดยใช้ปฏิกิริยาของ vicinal dianion มีความสำคัญและเป็นที่น่าสนใจมาก เนื่องจากปฏิกิริยากับ electrophiles จะเป็นแบบ regioselective และ stereoselective

Vicinal dianion ของอนุพันธ์ของ succinic acid ก็เป็น vicinal dianion ที่มีผู้ศึกษาปฏิกิริยากันมาก และใช้ประโยชน์ในการเตรียมสารประเภทต่าง ๆ ที่สำคัญ คณะวิจัยของเราที่สนใจที่จะพัฒนาวิธีการสังเคราะห์โดยใช้อนุพันธ์ของ succinic acid เป็น "4-carbon building block" ในการสังเคราะห์สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มี γ -butyrolactone เป็น nucleus ตลอดจนสารจำพวก lignans จึงทำให้ศึกษาปฏิกิริยาของ vicinal dianion 1, 2 และ 3 ซึ่งสามารถเตรียมขึ้นมาได้ง่ายโดยให้ triethyl ethanetricarboxylate, diethyl α -aroylsuccinates และ (4*S*, 5*R*)-3,4-(dimethyl-2-oxo-5-phenylimidazolidin-1-yl)butane-1,4-dione ทำปฏิกิริยากับ lithium diisopropylamide (2 equiv) ใน THF ที่ -78°C เป็นเวลา 1 ชม.

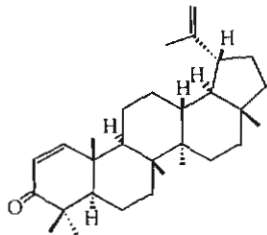
Vicinal dianions ของ 1 และ 2 ทำปฏิกิริยากับ carbonyl compounds แบบ regioselective ที่ β -carbon จะได้ γ -butyrolactones 4 และ 5 ตามลำดับ ภายใต้ conditions ที่เหมาะสม vicinal dianion 2 จะทำปฏิกิริยากับ aromatic aldehydes จะได้ dihydrofurans 7 สารประเภท 4 สามารถใช้เป็นสารเริ่มต้นในการเตรียม ($\pm$)-lichesterinic acid, ($\pm$)-phaseolinic acid, ($\pm$)-nephromopsinic acid และ ($\pm$)-dihydroprotolichesterinic acid ส่วนสารประเภท 5 สามารถใช้เป็นสารเริ่มต้นในการเตรียมสารประกอบ α -arylidene- γ -butyrolactones 6, 2,6-diaryl-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octane-4,8-diones 7, thuriferic ethyl ester และ อนุพันธ์ 8 และ picropodophyllone 9 สาร bislactone ประเภท 7 สามารถใช้เป็นสารเริ่มต้นสำหรับการเตรียม gmelinol (10) ซึ่งมี anti-malarial activity

ส่วน vicinal dianion 3 ก็ทำปฏิกิริยากับ arylmethyl bromides แบบ high diastereoselective ได้ product ที่สามารถใช้เตรียม (*R*)- β -arylmethyl- γ -butyrolactones 11 ได้ ซึ่งสารชนิดนี้ใช้เป็นสารเริ่มต้นที่สำคัญในการเตรียม lignan natural products ต่าง ๆ

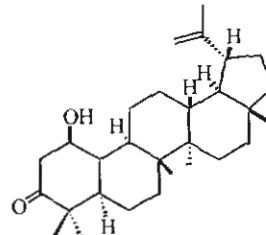


กลุ่มวิจัยของเราได้ทำการค้นหาสารประเภท cytotoxic lignans และ ประเภทอื่น ๆ จากพืชด้วย ด้วยจุดมุ่งหมายที่จะได้สารต้นแบบที่จะนำมาพัฒนาเป็นยารักษามะเร็ง ได้ทำการเก็บตัวอย่างพืชในสกุล *Phyllanthus* จากส่วนต่าง ๆ ของประเทศไทยมาได้ทั้งหมด 18 สปีชีส์ แต่ได้ตัดสินใจทำการศึกษาแบบลึกในพืชเพียง 2 สปีชีส์เท่านั้น ทั้งนี้เพราะว่า ส่วนสกัดเมทานอลของพืชทั้งสอง และส่วนสกัดจากการ partition นั้นแสดง cytotoxic activity ในเกณฑ์ดีมาก

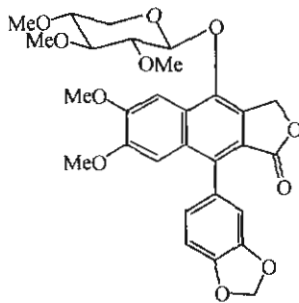
ได้ทำการแยกสารองค์ประกอบของ *Phyllanthus taxodiifolius* และวิเคราะห์หาโครงสร้างของสารที่แยกได้ ปรากฏว่าได้สาร triterpenes 1 และ 2, lignans glycosides 3-5 และ 9, และ amides 7 และ 8 และพบว่า 9 เป็น lignan glycoside ใหม่ ซึ่งยังไม่มีผู้รายงานมาก่อน ได้ทดสอบ cytotoxic activity ของสาร 1-6 แล้ว แต่ของสาร 7-9 ยังไม่ได้ผลการทดสอบ สาร 3 and 4 แสดง cytotoxic activity ใน cancer cell lines ของมนุษย์ และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม



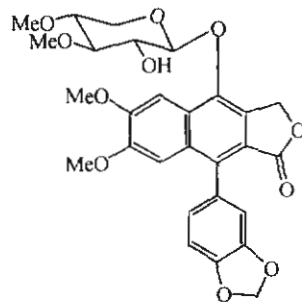
1



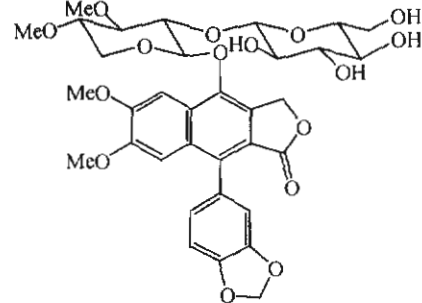
2



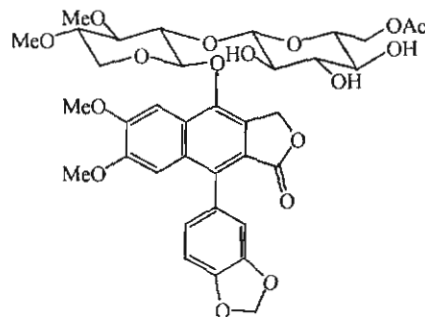
3



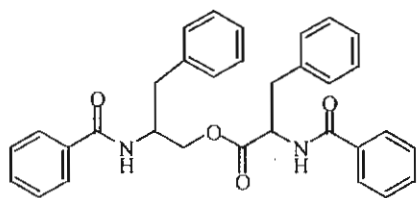
4



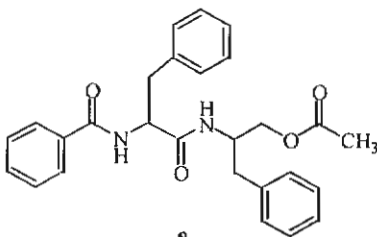
5



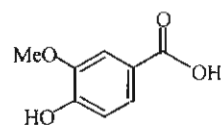
9 (New)



7

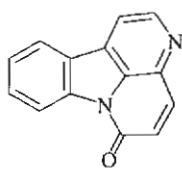


8

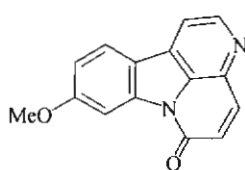


10

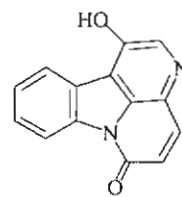
จากการศึกษาทางเคมีของ *Phyllanthus acutissima* ทำให้สามารถแยกสารได้ทั้งหมด 7 ตัว ได้วิเคราะห์หาโครงสร้างของ known canthin-6 one alkaloids **11-14** และ coumarin **15** ได้แล้ว แต่โครงสร้างของ triterpenes **16 and 17** ซึ่งคาดว่าเป็นสารใหม่ยังอยู่ในระหว่างดำเนินการ สำหรับการทดสอบ cytotoxicity ของสารที่แยกได้จาก *Phyllanthus acutissima* ยังอยู่ระหว่างการรอผล



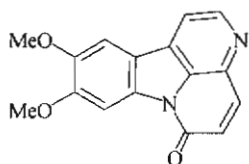
11



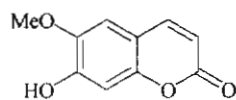
12



13

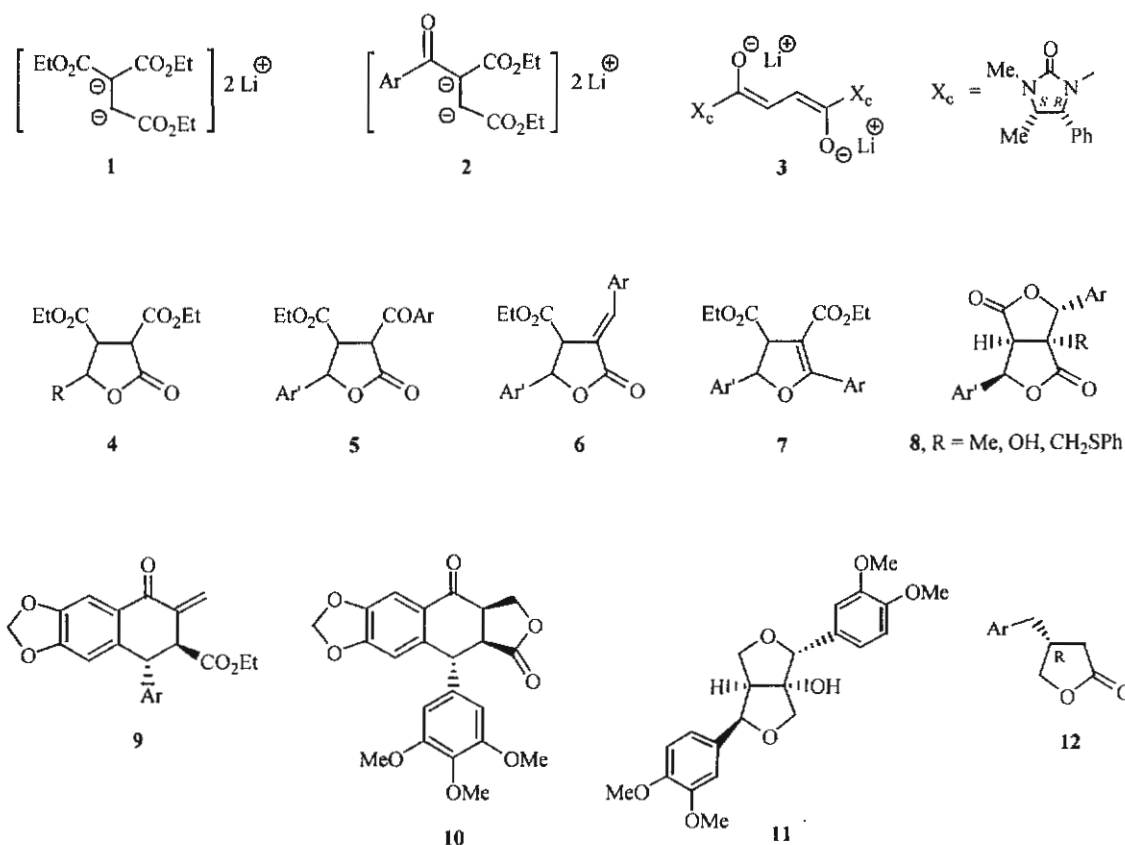


14



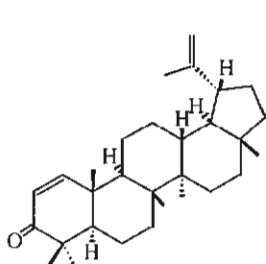
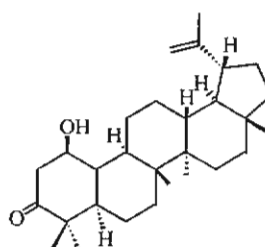
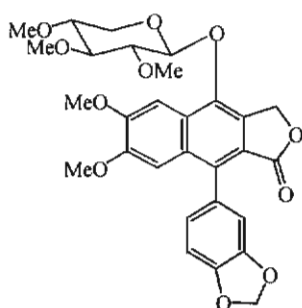
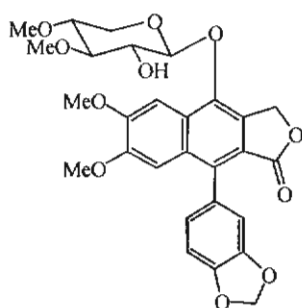
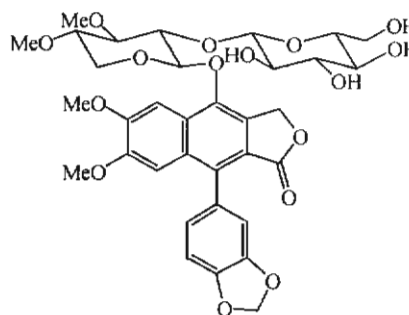
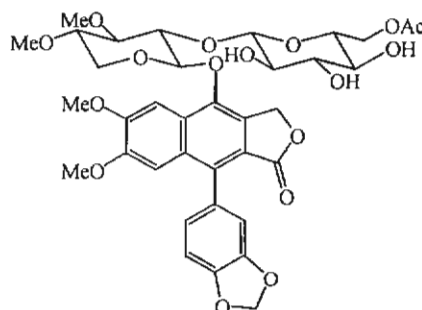
15

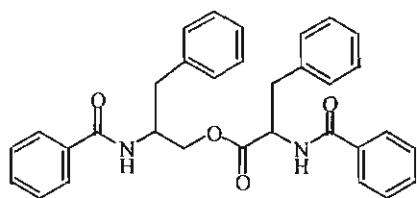
Carbon-carbon bond formations based on the reactions of dianions are of interest, because high regio- and stereoselectivities towards electrophiles have been achieved. Among these dianions, the vicinal dianions of succinic acid derivatives have been extensively demonstrated to be useful reagents for the preparation of various classes of compounds. In the course of our study on using succinic acid derivatives as versatile 4-carbon building blocks for synthesis of some natural products containing the γ -butyrolactone nucleus, including lignans; we investigated the reactions of the vicinal dianions **1**, **2** and **3**, which could be obtained by treatment of triethyl ethanetricarboxylate, diethyl α -aroylsuccinates and (4*S*,5*R*)-3,4-(dimethyl-2-oxo-5-phenyl-imidazolidin-1-yl)butane-1,4-dione with 2 equivalents of lithium diisopropylamide in tetrahydrofuran at -78°C for 1h. The vicinal dianions **1** and **2** reacted with carbonyl compounds regioselectively at β -carbon to furnish the corresponding β -hydroxy adducts which underwent lactonisation to provide γ -butyrolactones **4** and **5**, respectively, upon acidic work-up. These γ -butyrolactones were found to be versatile inter-mediate for preparation of various types of compounds. Thus, γ -butyrolactones of type **4** were converted into ($\pm$)-lichesterinic acid, ($\pm$)-phaseolinic acid, ($\pm$)-nephromopsinic acid and ($\pm$)-dihydrotolichesterinic acid. Furthermore, α -aroyl- γ -butyrolactones **5** were used as starting materials for syntheses of α -arylidene- γ -butyrolactones **6**, 2,6-diaryl-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octane-4,8-diones **7**, thuriferic acid ethyl ester and analogues **8**, and picrodophyllone (**9**). The bis-lactone of type **7** was used as an important precursor for the preparation of gmelinol (**10**), which exhibited anti-malarial activity. Highly diastereoselective alkylation of chiral vicinal dianion **3** was also investigated. The method provided a new general strategy to (*R*)- β -arylmethyl- γ -butyrolactones **11**, which are important precursors for syntheses of some lignan natural products.



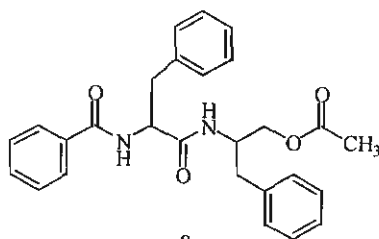
Our research group has also searched for cytotoxic lignans or other types from plants with the aim of obtaining lead compounds for the development to anti-cancer drugs. Eighteen species of *Phyllanthus* were collected from all parts of Thailand. Only two species, *Phyllanthus taxodiifolius* and *Phyllanthus acutissima* were chosen for detailed investigation as the potent cytotoxic activities were found in their crude MeOH extracts and the fractions from the partitions.

Ten compounds have been so far isolated from *Phyllanthus taxodiifolius*. The structures of triterpenes **1** and **2**, lignans glycosides **3**–**5** and **9**, and amides **7** and **8** have been characterized. Compound **9** is a new lignan glycoside. Cytotoxic activity evaluation of compound **1**–**6** have been carried out, but the evaluation of compounds **7**–**9** is in progress. Compounds **3** and **4** showed potent cytotoxic activity in several human and mammalian cancer cell lines.

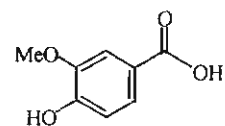
**1****2****3****4****5****9 (New)**



7

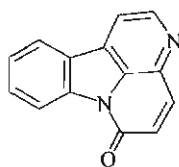


8

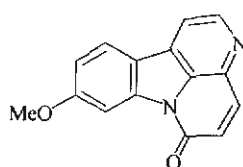


10

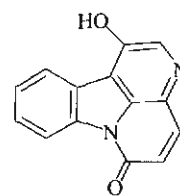
The investigation of *Phyllanthus acutissima* has resulted in the isolation of seven compounds. The structures of four known canthin-6 one alkaloids **11**–**14** and known coumarin **15** have been identified. The structure elucidation of two isolated new triterpenes **16** and **17** have not been fully characterized. Cytotoxicity evaluation of all isolated compounds against a panel of human and mammalian cancer cell lines is in progress.



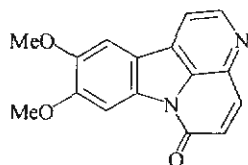
11



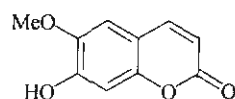
12



13



14



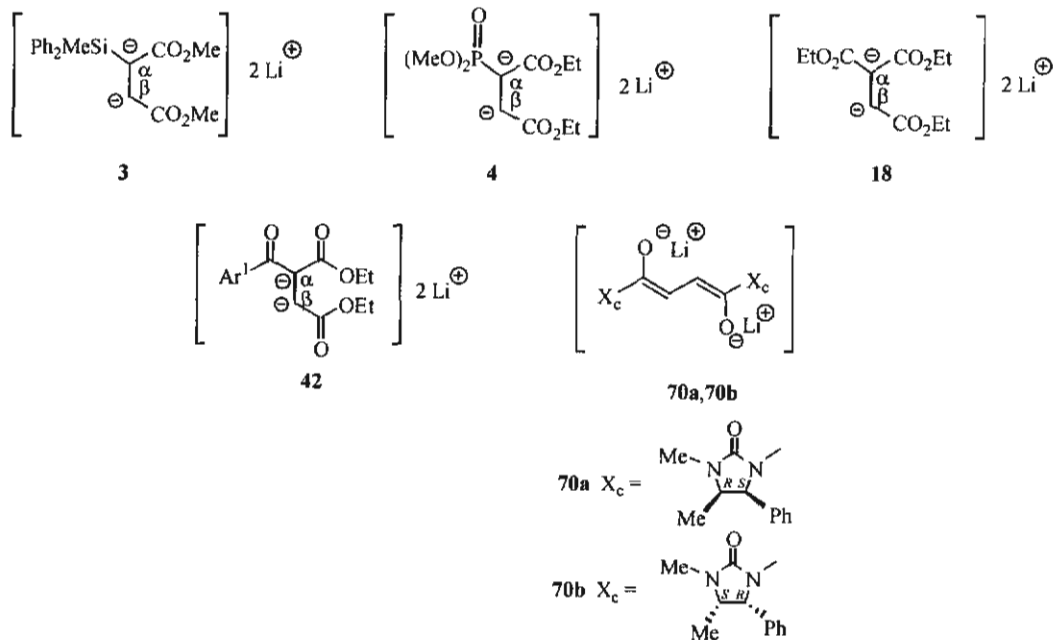
15

EXECUTIVE SUMMARY

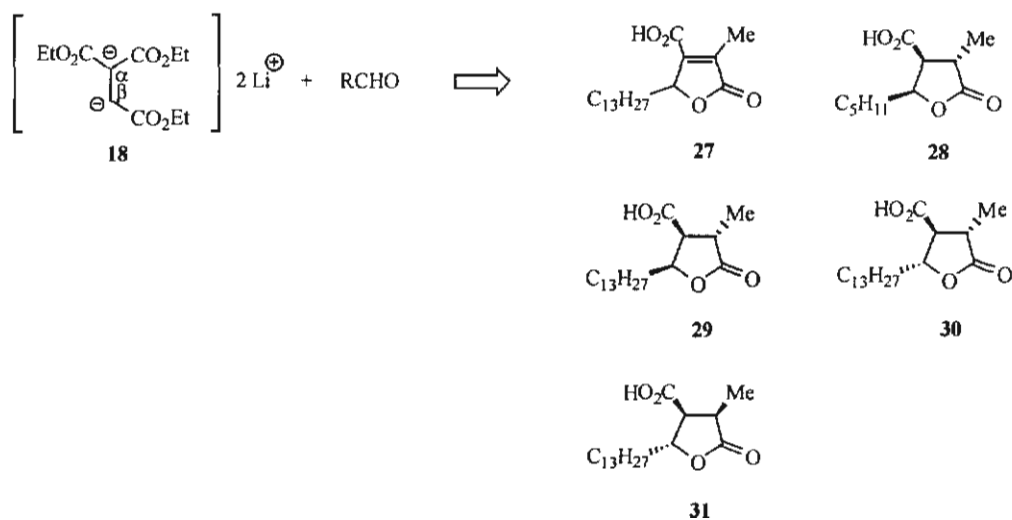
งานวิจัยในโครงการนี้ แบ่งเป็น 2 ส่วน คือ การวิจัยด้านการสังเคราะห์ และการวิจัยด้านผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ

ด้านการสังเคราะห์

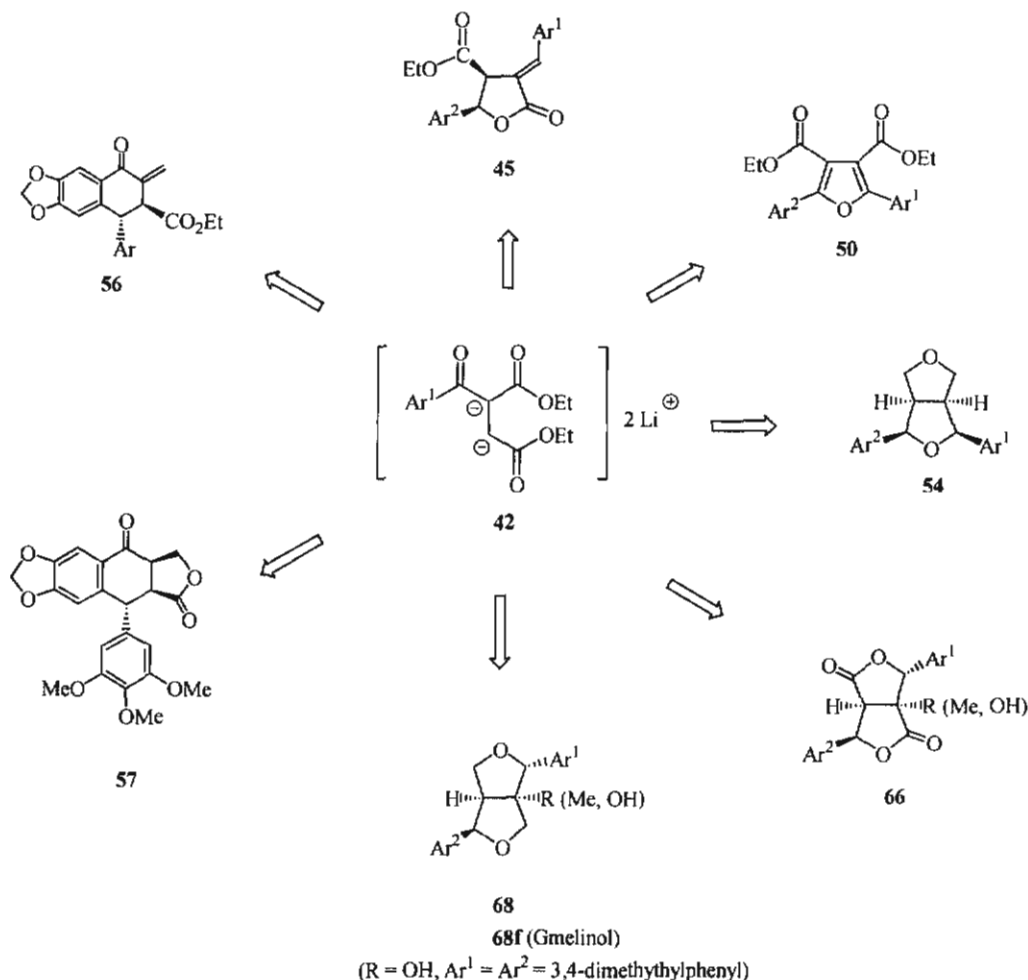
ได้ศึกษาปฏิกิริยาของ vicinal dianions **3**, **4**, **18**, **42** และ **70** โดยพบว่า vicinal dianion ทุกตัวทำปฏิกิริยากับ electrophiles เช่น carbonyl compounds เป็นแบบ regioselective ที่ β -carbon



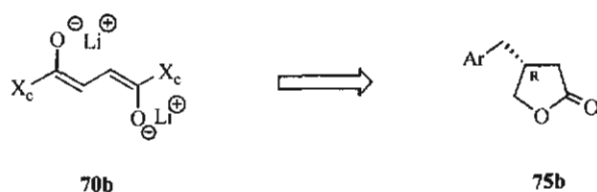
ได้แสดงให้เห็นประโยชน์ของ vicinal dianion **18** ว่าเป็น reagent ที่สามารถใช้เตรียม α, β, γ -trisubstituted γ -butyrolactone natural products ได้เช่น ($\pm$)-lichesterinic acid (**27**), ($\pm$)-phaseolinic acid (**28**), ($\pm$)-nephromopsinic acid (**29**), ($\pm$)-rocellaric acid (**30**) และ ($\pm$)-dihydroprotolichesterinic acid (**31**) ได้



นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถใช้ vicinal dianion **42** สำหรับเตรียมสารประกอบ α -arylidene paraconic ester **45**, tetrasubstituted furans **50**, furofurans **54**, thuriferic acid ethyl esters **57**, picropodophyllone (**57**), bislactones **66**, และ furofurans **68** รวมทั้ง gmelinol (**68f**) ซึ่งมี anti-malarial activity



ส่วน vicinal dianion **70b** ใช้เป็น reagent สำหรับการเตรียม (*R*)-arylmethyl- γ -butyrolactones **75b** ได้ ซึ่งเป็นสารเริ่มต้นที่สำคัญสำหรับการเตรียม lignan natural products ต่าง ๆ ได้ตามที่ผู้รายงานไว้ใน literature

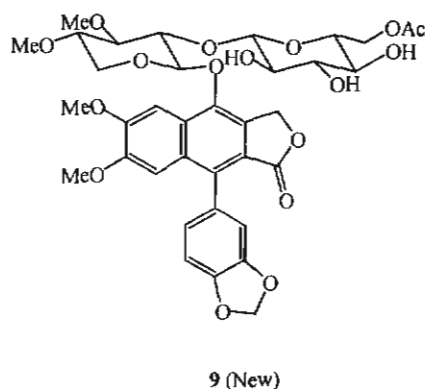
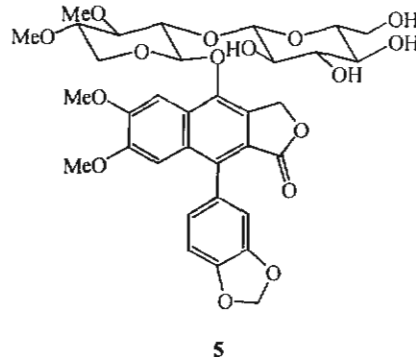
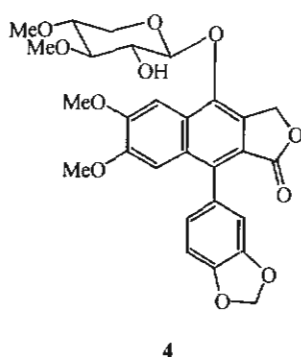
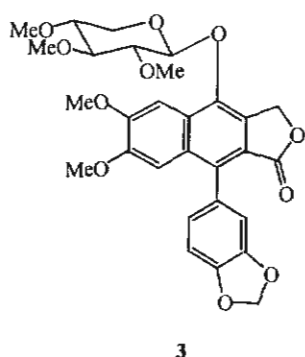
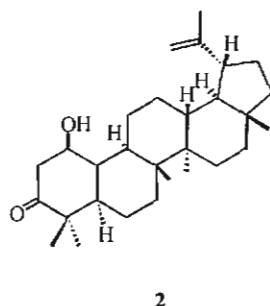
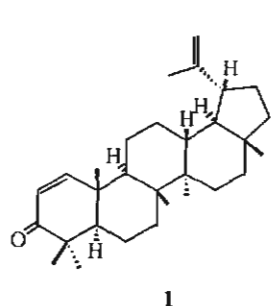


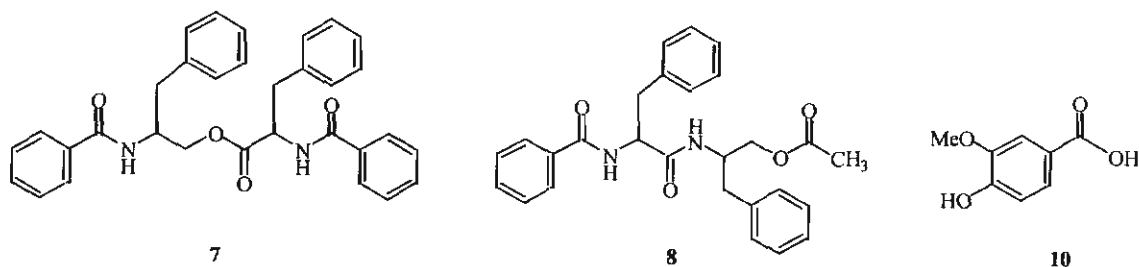
ด้านการผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

กลุ่มวิจัยของเราได้เล็งเห็นความสำคัญของสารจำพวก lignans จากธรรมชาติ อีกทั้งได้เห็นตัวอย่าง การพัฒนารักษามะเร็งจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ Podophyllotoxin และอนุพันธ์ จึงสนใจที่จะวิจัยด้านผลิตภัณฑ์ ธรรมชาติควบคู่ไปกับการงานด้านการสังเคราะห์ด้วย โดยที่มุ่งเป้าหมายว่า จะค้นหาพืชสมุนไพรไทยที่มีสารองค์

ประกอบจำพวก lignans ใหม่ ๆ ที่อาจมี cytotoxic activity และมีแนวโน้มว่าจะพัฒนาเป็นยารักษามะเร็งได้ ได้เก็บและทำการทดสอบ cytotoxic activity ของพืชในสกุล *Phyllanthus* (วงศ์ Euphorbiaceae) รวมทั้งหมด 18 สปีชีส์ ในจำนวนนี้พบว่า *Phyllanthus taxodiifolius* และ *Phyllanthus acutissima* นั้นแสดง potent cytotoxic activity และได้ทำการศึกษาทางเคมีของพืชทั้ง 2 สปีชีส์นี้อย่างละเอียด

จาก *Phyllanthus taxodiifolius* พบสาร triterpenes 2 ตัว ได้แก่ glochidone (1) และ glochidonol (2) พบสารจำพวก lignan glycosides 4 ตัว ได้แก่ cleistanthin A methyl ether (3), cleistanthin A (4), cleistanthoside A (5) และสาร lignan glycoside ใหม่ คือ taxodiifolioside (9) ซึ่งมีโครงสร้างเป็น monoacetate ของ cleistanthoside A พบสารจำพวก amides 2 ตัว ได้แก่ *N*-benzoylphenylalaninyl-*N*-benzoylphenylalaninate (7) และ *N*-benzoylphenylalaninoylphenylalaninol acetate (8) นอกจากนี้ยังพบสารอนุพันธ์ของกรดเบนโซอิก คือ 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid (10)



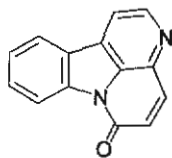


ได้ทำการวิเคราะห์หาโครงสร้างโดยวิธีทาง spectroscopy และการเปรียบเทียบกับใน literature แต่เนื่องจากเป็นข้อมูลที่ได้จาก literature ไม่ค่อยสมบูรณ์นัก ซึ่งข้อมูลสำหรับสารบางตัวได้มีรายงานแต่เฉพาะ ^1H NMR และบางตัวก็มี ^{13}C NMR ด้วย แต่ไม่มีการทำ 2D-NMR experiments เพื่อการ assign ตำแหน่ง chemical shifts ต่าง ๆ ดังนั้นกลุ่มวิจัยของเราจึงน่าจะมีการ assign chemical shifts ได้ถูกต้องมากกว่า เนื่องจากได้ทำ 2D-NMR experiments ของสาร lignans ที่แยกได้ สำหรับสาร 5 นั้นการละลายไม่ดีขึ้นจึงได้เตรียมเป็นอนุพันธ์ tetraacetate คือ cleistanthoside A tetraacetate (5a) โดยปฏิกิริยากับ acetic anhydride และ *N,N*-dimethylaminopyridine (DMAP) ที่อุณหภูมิห้อง แล้วได้ทำการวิเคราะห์โครงสร้างของ cleistanthoside A tetraacetate (5a) แทน cleistanthoside A (5) แม้ว่าได้ทำ 2D-NMR experiment ของ 5 แล้วก็ตาม แต่การวิเคราะห์ทำได้ไม่ดีเนื่องจากสัญญาณขึ้นซ้อนกันและ broad มาก

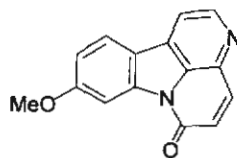
ได้ทำ methylation ของ cleistanthin A (4) โดยปฏิกิริยากับ methyl iodide/NaH/DMSO ปรากฏว่าได้ product ที่มี ^1H NMR เหมือน cleistanthin A methyl ether (3) ทุกประการ จึงสรุปได้ว่า สาร 3 เป็น analogue ของสาร 4 ขณะนี้ได้พยายามทำ monoacetylation ของสาร 5 ด้วย เพื่อพิสูจน์ว่า สาร 9 เป็น analogue ของสาร 5 แต่ยังไม่ได้นำสาร 9 ไปทำ fully acetylation ทั้งนี้เพราะมีอยู่ปริมาณน้อย ต้องทำการวัด physical properties ต่าง ๆ ก่อน และยังต้องทดสอบ cytotoxic activity อีกด้วย ส่วนสาร 6 มีปริมาณน้อยมากไม่สามารถหาโครงสร้างได้ และยังไม่พบในตัวอย่างพืชที่เก็บครั้งที่ 2 ด้วย

ในแต่ละขั้นตอนของงานวิจัยด้านนี้ได้ทำการทดสอบ cytotoxic activity โดยตลอด ทั้งในส่วนสกัด ใน fractions และในสารบริสุทธิ์ ได้ผลการทดสอบ cytotoxic activity ของสารที่แยกได้ ซึ่งพบว่าสาร 3 และ 4 มีผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์ดีมาก (สาร 3: ED_{50} ใน P-388 cell line 0.112 $\mu\text{g/mL}$ ใน KB cell line 0.016 $\mu\text{g/mL}$ ใน Col-2 cell line 0.076 $\mu\text{g/mL}$ ใน BCA-1 cell line 0.028 $\mu\text{g/mL}$ ใน Lu-1 cell line 0.021 $\mu\text{g/mL}$ และใน ASK cell line 0.275 $\mu\text{g/mL}$; สาร 4 ED_{50} ใน P-388 cell line 0.053 $\mu\text{g/mL}$ ใน KB cell line 0.003 $\mu\text{g/mL}$ ใน Col-2 cell line 0.029 $\mu\text{g/mL}$ ใน BCA-1 0.014 $\mu\text{g/mL}$ ใน Lu-1 cell line 0.008 $\mu\text{g/mL}$ และใน ASK cell line 0.128 $\mu\text{g/mL}$) สำหรับ สาร 5 และ สาร 6 นั้นไม่ active ขณะนี้ยังรอผลการทดสอบสาร 7-9 อยู่

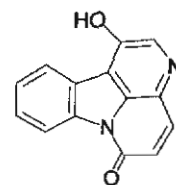
การศึกษาสารองค์ประกอบจาก *Phyllanthus acutissima* ตัวอย่างที่ 1 นั้น พบสารจำพวก alkaloids 4 ตัว และ coumarin อีก 1 ตัว alkaloids ทั้ง 4 ตัวเป็นชนิด canthin-6-one alkaloid ได้แก่ canthin-6-one (11), 9-methoxycanthin-6-one (12), 1-hydroxycanthin-6-one (13), 9,10-dimethoxycanthin-6-one (14) ส่วน coumarin ที่แยกได้คือ scopoletin (15)



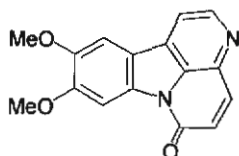
11



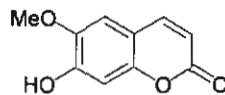
12



13



14



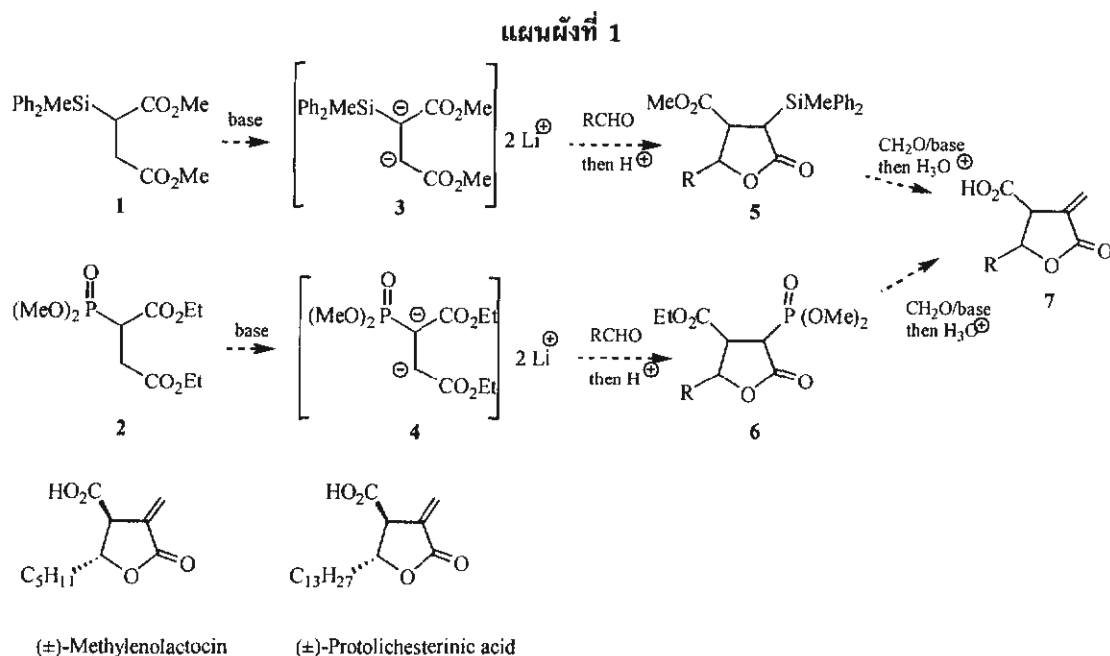
15

ได้ทำการแยกสารจาก *Phyllanthus acutissima* ตัวอย่างที่ 2 ซึ่งมีปริมาณมากกว่า ปรากฏว่าแยกสาร triterpenes ได้อีก 2 ตัว คือสาร 16 และ 17 สารทั้งสองต่างมี cyclopropane ring อยู่ที่ตำแหน่ง 13, 14 มี olefinic protons 2 protons และ aromatic protons อยู่ในโครงสร้างด้วย คาดว่าเป็นสารใหม่ทั้ง 2 ตัว แต่เนื่องจาก เพิ่งแยกสาร 2 ตัวนี้ได้ และสารทั้งสองเป็นสารที่โมเลกุลใหญ่มาก ($M^+ = 614$ และ $= 658$) จึงยังคงต้องศึกษา โครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีเพิ่มเติมต่อไปอีก ส่วน cytotoxic activity ของสารที่แยกได้นั้นยังรอผล อยู่

เนื้อหางานวิจัย

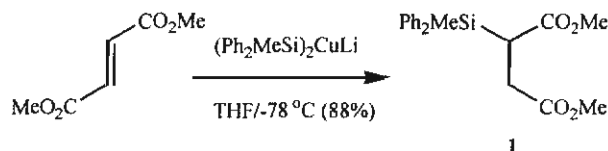
งานวิจัยด้านการสังเคราะห์

ในระยะแรกของงานวิจัย ได้พยายามมุ่งเน้นไปยังการเตรียมสาร 5 และ 6 ซึ่งจะใช้เป็นตัวกลางในการเตรียมสารประกอบ α -methylene- γ -lactones 7 เช่น ($\pm$)-methylenolactocin¹ และ ($\pm$)-protolichesterinic acid² โดยหาวิธีเตรียม vicinal dianions 3 และ 4 จากสารประกอบ succinic esters 1 และ 2 โดยให้ทำปฏิกิริยากับ base ที่เหมาะสม และศึกษาปฏิกิริยาของมันเป็นกับ carbonyl compounds โดยหวังว่าจะได้สารประกอบ 5 และ 6 ตามต้องการ (แผนผังที่ 1)

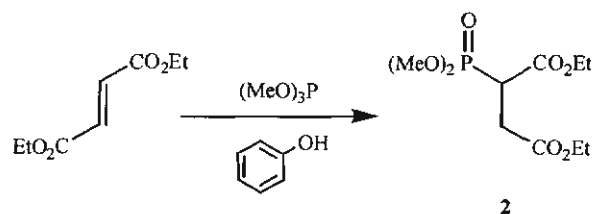


1. การเตรียมสารเริ่มต้น dimethyl α -(methyldiphenylsilyl)succinate (1) และ diethyl α -(dimethoxyphosphono)succinate (2)

สามารถเตรียมสาร 1 ได้ 88% yield โดยทำปฏิกิริยา conjugate addition ระหว่าง $(\text{Ph}_2\text{MeSi})_2\text{CuLi}$ (1 equiv) กับ dimethyl fumarate (1 equiv)³ ใน tetrahydrofuran (THF) ที่ -78°C เป็นเวลา 2 ชม. การเตรียม $(\text{Ph}_2\text{MeSi})_2\text{CuLi}$ สามารถเตรียมได้โดยง่ายจากปฏิกิริยาระหว่าง lithium กับ Ph_2MeSiCl (methyldiphenylchlorosilane) ใน THF ที่ 0°C ประมาณ 3 ชม. หลังจากนั้นค่อยเติมลงไปยัง copper(I) cyanide (0.5 equiv) ที่ suspend ใน THF ที่ 0°C จะได้สารละลายสีดำของ $(\text{Ph}_2\text{MeSi})_2\text{CuLi/LiCN}$



ส่วนสาร 2 ก็ได้มาจากปฏิกิริยาระหว่าง trimethyl phosphite กับ dimethyl fumarate โดยมี phenol รวมอยู่ด้วยที่อุณหภูมิ $150-160^\circ\text{C}$ ประมาณ 5 ชม.⁴ หลังจากกลั่นภายใต้ความดัน จะได้สาร 2 66% yield

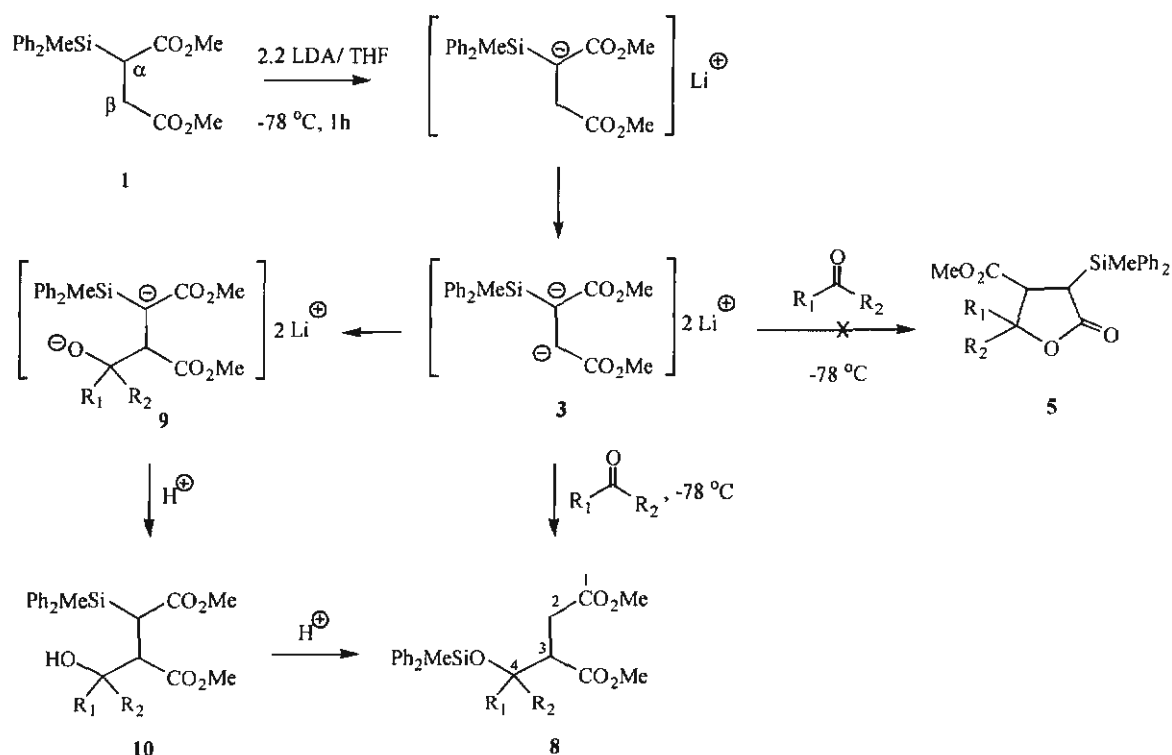


2. การศึกษาวิธีการเตรียม และ ปฏิกิริยาของ vicinal dianion 3

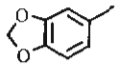
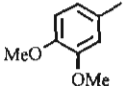
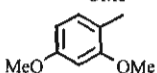
ในการศึกษาขั้นต้น ได้ทดลองเตรียม vicinal dianion 3 โดยให้สารประกอบ 1 (1 equiv) ทำปฏิกิริยากับ lithium diisopropylamide (LDA, 2.2 equiv) ใน THF ที่ -78°C 1 ชม. แล้วเติม acetone (1.2 equiv) ลงไปยัง reaction mixture ปลอยไว้ที่ -78°C 2 ชม. เสร็จแล้ว workup ด้วย dil. HCl พบว่า สามารถแยกสาร 8a ได้ถึง 57% yield ไม่พบว่าการเกิดสารที่ต้องการ 5a ($R_1 = R_2 = \text{Me}$) เลย ในทำนองเดียวกันเมื่อให้ dianion 3 ทำปฏิกิริยากับ carbonyl compounds ตัวอื่น ๆ (ดังสรุปไว้ในตารางที่ 1) ก็ได้สารประกอบ 8b-8e เช่นเดียวกัน โดยไม่พบว่าการเกิดสารประกอบประเภท 5 ที่ต้องการ

สามารถอธิบายการเกิดสารประกอบประเภท 8 ได้คือ ปฏิกิริยา regioselective addition ของ dianion 3 กับ carbonyl compounds เกิดขึ้นที่ β -carbon ของ dianion 3 จะได้ alkoxide intermediate 9 ซึ่งจะถูกรีดด้วย dil. HCl จะได้สาร 10 สาร 10 เกิด acid-catalyzed 1,4-silyl group migration จาก carbon ไปยัง oxygen atom ซึ่งคาดว่าจะเกิดได้ไวกว่า lactonisation ดังแสดงไว้ในแผนผังที่ 2

แผนผังที่ 2



ตารางที่ 1 การเตรียมสารประกอบ 8a-e

สาร 8	R ^S	R ^L	% Yield ^a	Syn : Anti ^b
8a	CH ₃	CH ₃	57	-
8b		-(CH ₂) ₅ -	42	-
8c	H		61	24 : 76
8d	H		45	17 : 83
8e	H		55	30 : 70

^a Isolated yield; ^b วัดโดย¹H-NMR ของ H-4

สารประกอบ 8a-e ที่เตรียมได้นี้ ได้ characterized โดยใช้ spectroscopic methods รวมทั้ง elemental analysis ด้วย IR spectra ของสาร 8 แสดง carbonyl absorption peak ของ carbomethoxy group ที่ 1739-1740 cm⁻¹ การหาสัดส่วนของ syn- และ anti-diastereomers หาได้โดยวัด coupling constant ของ proton ของ OCHAr ดังนี้คือ

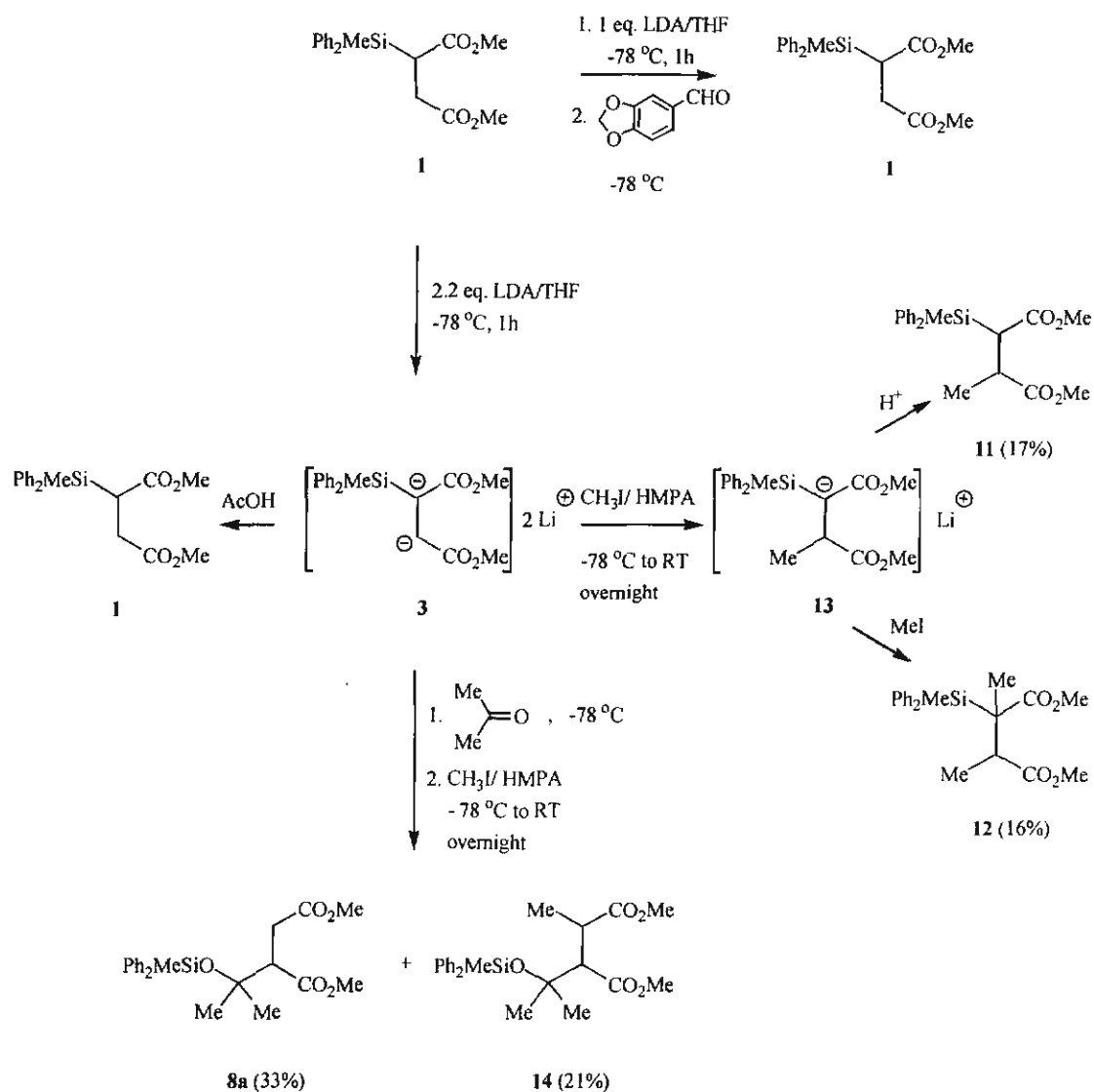
syn-isomer δ 5.06-5.52 ppm (d, *J* = 3.3-4.7 Hz)

anti-isomer δ 4.75-5.17 ppm (d, *J* = 8.0-8.5 Hz)

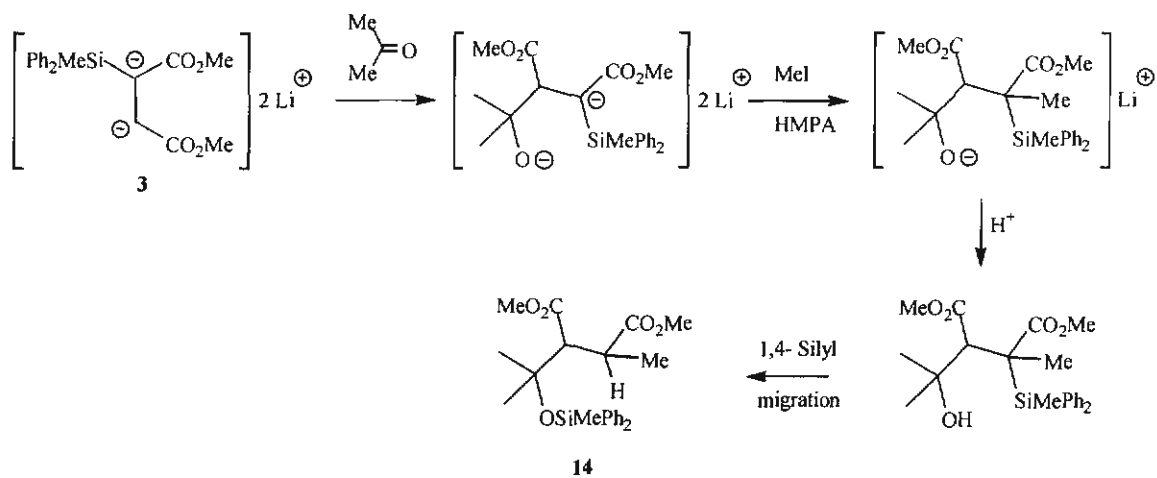
การที่สามารถสังเคราะห์สาร 8 ได้ ทำให้มั่นใจได้ว่า dianion 3 ได้เกิดขึ้นจริง ๆ เมื่อให้สารเริ่มต้น 1 ทำปฏิกิริยากับ LDA (2 equiv) ใน THF ที่ -78 °C ได้พยายามพิสูจน์การเกิด dianion 3 โดยการ trap ด้วย D₂O หรือ CH₃CO₂D โดย quench สารละลาย THF ของ “dianion” พบว่า ไม่มี “deuterium incorporation” เข้าไปที่ α- และ β-carbon ของสารเริ่มต้น 1 จะได้เพียงสาร 1 กลับคืนมา เมื่อลอง trap ด้วย acetic acid ก็ได้สาร 1 กลับคืนเช่นกัน แสดงว่า “dianion 3” มีความเสถียร แต่เมื่อให้สารละลาย “dianion 3” ทำปฏิกิริยากับ methyl iodide (3-4 equiv) โดยมี hexamethylphosphoramide (HMPA) อยู่ด้วย ที่อุณหภูมิ -78 °C ถึงอุณหภูมิห้อง ทำให้สามารถแยกสาร β-methylated product 11 ได้ 17% yield และสาร α,β-dimethylated product 12 ได้ 16% yield จากผลการทดลองนี้ ทำให้เชื่อได้ว่าเกิด dianion 3 จริง ๆ ซึ่งทำปฏิกิริยากับ methyl iodide แบบ regioselective ที่ β-carbon จะได้สาร 11 และ enolate 13 ซึ่งจะทำปฏิกิริยาไม่สมบูรณ์หลังจาก workup จะได้สาร 11

ได้ลองใช้ electrophile สองตัวที่ต่างกันทำปฏิกิริยากับ dianion 3 คือ acetone เป็นตัวแรก และ methyl iodide เป็น electrophile ตัวที่สอง เพื่อจะแสดงให้เห็น regioselectivity ของ dianion 3 เวลาทำปฏิกิริยากับ electrophile ดังนั้นเมื่อให้ dianion 3 ทำปฏิกิริยากับ acetone (1 equiv) ที่ -78 °C 2 ชม. เสร็จแล้ว เติมน methyl iodide (1.5 equiv) และ HMPA ลงไป และทิ้งไว้ โดยค่อย ๆ ปล่อยให้ถึงอุณหภูมิห้องค้างคืน ทำให้สามารถแยกสาร 8a ได้ 33% yield และสาร 14 21 % yield (ดูแผนผังที่ 3) การเกิดสาร 14 อธิบายได้ตามแผนผังที่ 4

แผนผังที่ 3



แผนผังที่ 4



ได้ทดลองทำปฏิกิริยาโดยให้สารเริ่มต้น 1 (1 equiv) ทำปฏิกิริยากับ LDA (1 equiv)/THF ที่ -78°C แล้วเติม piperonal (1 equiv) ลงไปที่ -78°C แล้วปล่อยให้ทำปฏิกิริยา 2 ชม. หลังจาก workup ด้วย dil. HCl พบว่าจะไม่สามารถแยกสารประกอบประเภท 8 หรือ 9 ได้เลย แต่จะได้สารเริ่มต้น 1 กลับคืนเกือบทั้งหมด จากผลการทดลองเหล่านี้ทำให้เชื่อว่า dianion 3 เกิดขึ้นแน่นอนจากการให้สาร 1 ทำปฏิกิริยากับ LDA (2 equiv) ใน THF ที่ -78°C 1 ชม.

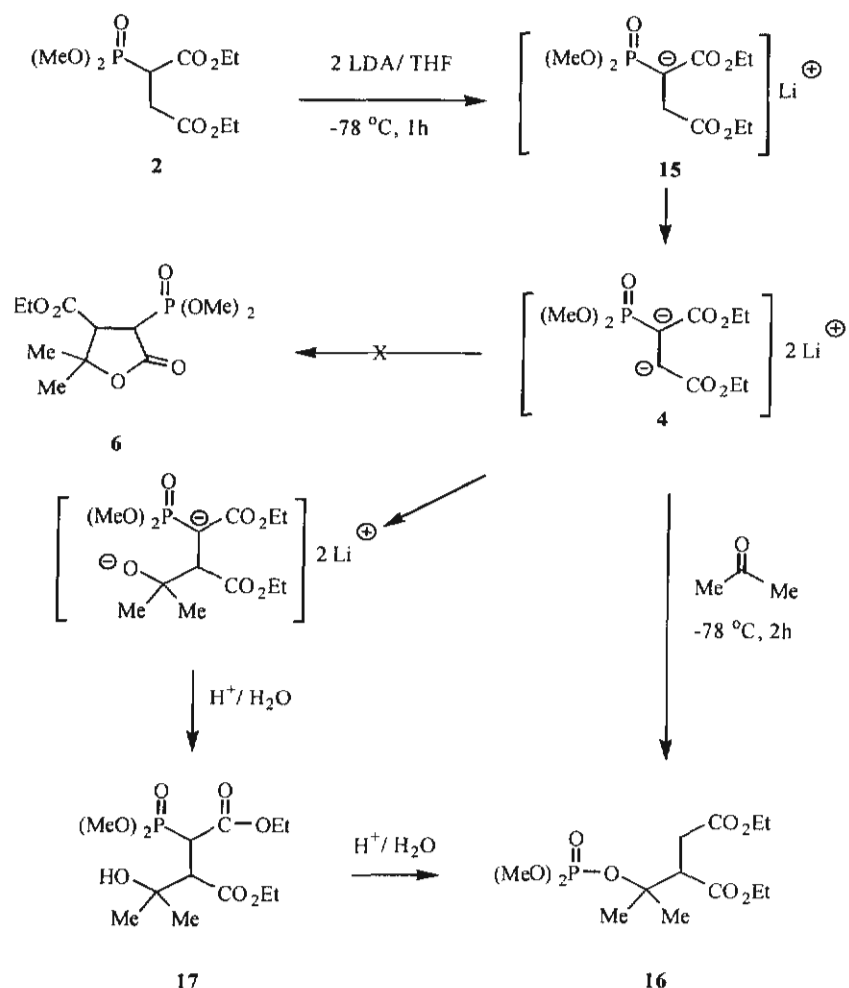
จากการศึกษาข้างต้นถึงแม้ว่าปฏิกิริยาของ dianion 3 กับ carbonyl compounds จะไม่นำไปสู่สารประเภท 5 ที่ต้องการได้ แต่ regioselectivity ของ dianion 3 เวลาทำปฏิกิริยากับ electrophile จะเป็นไปตามที่คาดไว้ คือจะใช้ anion ที่ β -carbon ทำปฏิกิริยากับ electrophile ก่อน เนื่องจากจะเป็นจุดที่ reactive กว่าที่ α -carbon นอกจากนี้ acid-catalyzed 1,4-carbon to oxygen silyl migration ที่เกิดขึ้นก็เป็น reaction ที่น่าสนใจ ซึ่งอาจนำไปประยุกต์ในการศึกษาเกี่ยวกับสารประเภทอื่น ๆ ได้

การที่ไม่สามารถเตรียมสารประเภท 5 ซึ่งเป็นสาร key intermediate สำหรับการเตรียมสารประกอบ α -methylene- γ -lactone ประเภท 7 ได้ จึงพยายามศึกษาปฏิกิริยาของ dianion 4 แทน ดังปรากฏรายละเอียดในหัวข้อที่ 3

3. การศึกษาปฏิกิริยาของ vicinal dianion 4

เมื่อให้สาร 2 ทำปฏิกิริยากับ LDA (2 equiv) ใน THF ที่ -78°C นาน 1 ชม. คาดว่าเกิด dianion 4 โดยขั้นแรกจะเกิด anion 15 ก่อน ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ equivalent ที่สองของ LDA นำไปสู่ dianion 4 เมื่อให้ทำปฏิกิริยากับ acetone (1 equiv) ที่ -78°C นาน 2 ชม. แล้ว workup โดยเติม dil. HCl ลงไป สามารถแยกสารประกอบ 16 ได้ถึง 37% yield โดยที่ไม่สามารถแยกสารประกอบประเภท 6 ที่ต้องการได้ เมื่อทำปฏิกิริยาเดียวกันนี้แต่มี HMPA อยู่ด้วยก็ได้ผลเช่นเดียวกัน แยกสาร 16 ได้ 31% yield ทดลองทำปฏิกิริยากับ cyclohexanone ก็พบว่าจะได้ complex mixture ของ products ซึ่งแยกออกจากกันยากมาก

เป็นที่น่าแปลกใจมากก็คือ การที่สามารถแยกสาร 16 ได้ ซึ่งการเกิดสาร 16 ก็อธิบายได้คล้าย ๆ กับกรณีของปฏิกิริยาของ dianion 3 กับ carbonyl compound (ตามที่ได้รายงานไว้แล้วในหัวข้อที่ 2) คือปฏิกิริยาของ dianion 4 กับ acetone หลังจาก acidify ด้วย dil. HCl แล้วจะได้สาร 17 ซึ่งเกิด 1,4-carbon to oxygen phosphoryl migration ซึ่งปฏิกิริยาแบบนี้จะพบน้อยมากใน Literature⁵ เนื่องจากปฏิกิริยาของ dianion 4 กับ carbonyl compound ค่อนข้าง complex จึงคิดว่าจะชะลอการวิจัยส่วนนี้ไว้ก่อน



4. การศึกษาการเตรียม vicinal dianion **18** จาก triethyl ethanetricarboxylate และการศึกษาปฏิกิริยากับ carbonyl compounds

จากการศึกษาปฏิกิริยาของ dianions **3** และ **4** ที่เตรียมมาจากสารเริ่มต้น dimethyl α -(methyldi-phenylsilyl)succinate (**1**) และ diethyl α -(dimethoxyphosphono)succinate (**2**) โดยให้ทำปฏิกิริยากับ lithium diisopropylamide (LDA, 2 equiv) ใน THF ที่อุณหภูมิ -78°C พบว่า regioselectivity ของ dianion **3** เมื่อทำปฏิกิริยากับ carbonyl compound สูง คือจะทำปฏิกิริยาที่ β -carbon ก่อน จะได้สาร **8** หลัง work-up เป็นที่น่าเสียดายว่า จะไม่ได้ expected product **5** ซึ่งคาดว่าจะใช้สารนี้เป็นตัวที่สำคัญในการเตรียม α -methylene- γ -lactone ประเภท **7** ทั้งนี้ก็เนื่องจากเกิด 1,4-silyl migration ระหว่าง workup ตามที่ได้กล่าวไว้แล้ว ดังนั้นจึงได้ศึกษาปฏิกิริยาของ dianion **18** กับ carbonyl compound ต่าง ๆ ดังผลการทดลองดังนี้

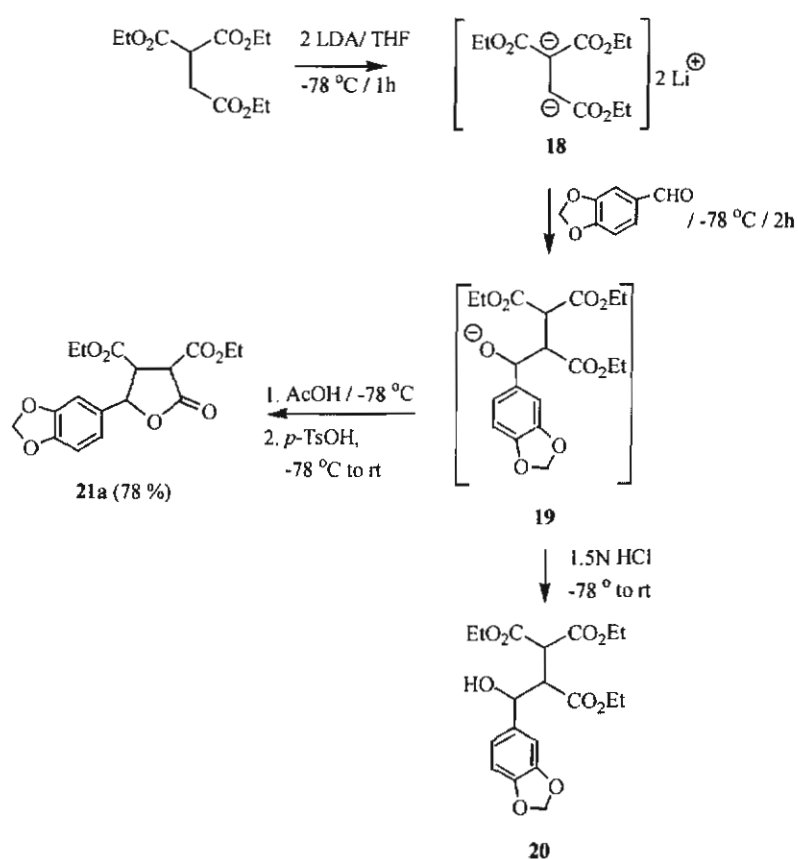
4.1 ปฏิกิริยาของ dianion **18** กับ aldehydes

Vicinal dianion **18** สามารถเตรียมขึ้นมาได้โดยง่าย โดยให้ triethyl ethanetricarboxylate ที่สามารถซื้อได้ ทำปฏิกิริยากับ LDA (2 equiv) ใน THF ที่ -78°C 1 ชม. เมื่อเติมสาร piperonal (1.2 equiv) แล้วปล่อยให้ทำปฏิกิริยานาน 2 ชม. หลังจากนั้น quenched ด้วย 1.5 N HCl แล้วค่อย ๆ ปล่อยให้อุณหภูมิของปฏิกิริยาลงถึงอุณหภูมิห้อง เสร็จแล้ว work-up พบว่า จะได้สารประกอบ **20** เป็นส่วนมาก จะให้สาร γ -lactone **21a** จำนวนเล็กน้อยเท่านั้น ตามที่ได้วิเคราะห์จาก $^1\text{H-NMR}$ ของ crude product แต่เนื่องจากงานวิจัยของเราต้องการให้ได้สารประกอบ γ -lactone ประเภท **21a** จึงได้พยายามหาวิธีการ quench ปฏิกิริยาดังกล่าวด้วยวิธีการอื่น และได้พบว่าเมื่อ

quench ปฏิกริยาด้วย glacial acetic acid ที่ -78°C แล้ว warm มาที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม *p*-toluenesulfonic acid (*p*-TsOH) จำนวนเล็กน้อยลงไป แล้ว stir ทั้งค้างคืน หลังจากนั้น work-up ตามปกติโดยสกัดด้วย ethyl acetate พบว่าจะได้สาร γ -lactone **21a** ถึง 78% yield หลังจาก chromatography เป็นส่วนผสมของ diastereomer 4 ตัว เป็นสัดส่วน 71:11:16:2 เมื่อนำ crude product **20** มาทำปฏิกิริยากับ *p*-TsOH ใน CH_2Cl_2 ที่อุณหภูมิห้องค้างคืน ก็จะได้สาร γ -lactone **21a** เช่นเดียวกัน (แผนผังที่ 5)

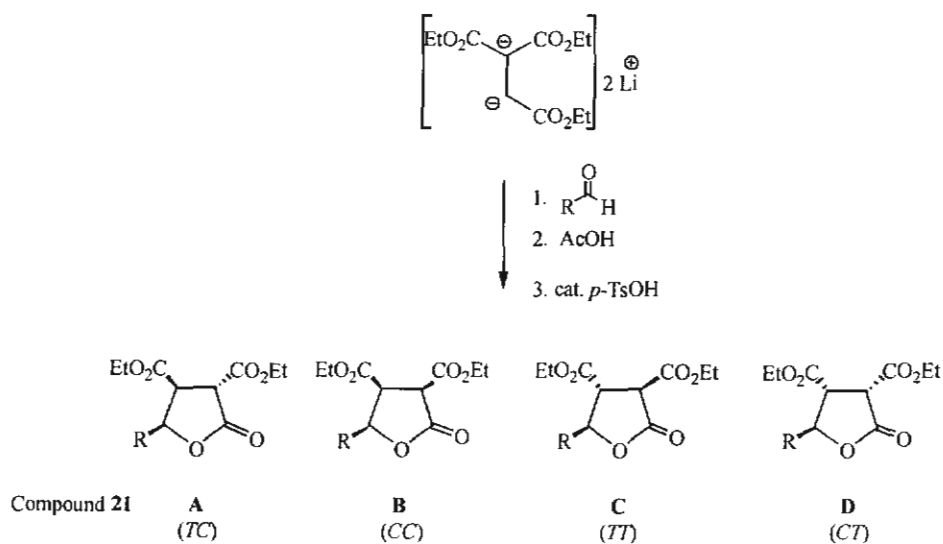
การที่สามารถเตรียมสาร γ -lactone **21a** ได้แสดงว่า dianion **18** ทำปฏิกิริยากับ piperonal เป็นแบบ regioselective ที่ β -carbon ของ dianion **18** นำไปสู่ intermediate **19** ก่อนที่จะได้ **21a** หลังจาก quench ด้วย AcOH/*p*-TsOH

แผนผังที่ 5



หลังจากที่ได้พบความสำเร็จในการเตรียมสาร γ -lactone **21a** แล้ว เราได้ศึกษาปฏิกิริยาของ dianion **18** กับ aldehyde ตัวอื่น พบว่าจะได้ γ -lactones **21b-21c** ผลการทดลองได้รวบรวมไว้ในตารางที่ 2 จะเห็นว่า % yield ที่ได้ค่อนข้างดี และได้เป็นส่วนผสมของ diastereomers (แผนผังที่ 6) major diastereomer ที่ได้คือ TC-isomer (ตารางที่ 2)

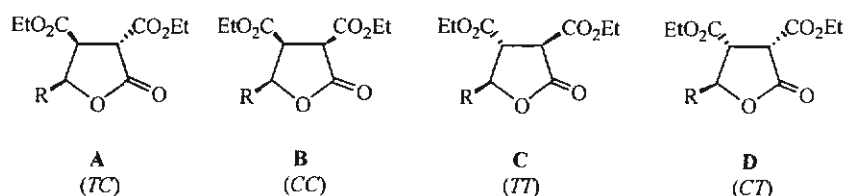
แผนผังที่ 6

ตารางที่ 2 การเตรียมสาร γ -lactones 21a-f

Entry	γ -Lactone	R	% Yield ^a	TC/CC/TT/CT (or A/B/C/D)
1	21a		78	71:11:16:2 ^b
2	21b		81	79:4:14:3 ^b
3	21c	Ph-	78	71:6:19:4 ^c
4	21d	<i>t</i> -Bu	53	(80:20) ^d
5	21e	<i>n</i> -C ₅ H ₁₁ -	55	79:6:15:trace ^c
6	21f	<i>n</i> -C ₁₃ H ₂₇ -	62	86:3:11:trace ^c

^aIsolated yield.^bDetermined by ¹H-NMR at H-5 of the isolated product.^cDetermined by ¹H-NMR at H-5 of the crude product.^dThe relative stereochemistry could not be assigned and the ratio was determined by ¹H-NMR at H-3 of the crude product.^eDetermined by ¹H-NMR at H-3 and H-5 of the crude product.

ตารางที่ 3 $^1\text{H-NMR}$ data ของ lactones 21a-c, e, f.



21	Assignment	H-3 (d)		H-4 (dd)		H-5 (d)	
		δ (ppm)	$J_{3,4}$ (Hz)	δ (ppm)	$J_{3,4}$ and $J_{4,5}$ (Hz)	δ (ppm)	$J_{4,5}$ (Hz)
21a	A = TC	4.11	7.3	4.07	7.5 (app.t)	5.73	7.5
	B = CC	-	-	-	-	5.47	5.7
	C = TT	3.98	10.7	3.76	10.7, 8.9	5.37	8.9
	D = CT	3.92	9.4	3.45	9.4 (app.t)	5.79	9.3
21b	A = TC	4.20	7.6	4.15	7.7 (app.t)	5.84	8.0
	B = CC	-	-	-	-	5.58	5.7
	C = TT	4.06	10.8	-	-	5.47	9.1
	D = CT	3.99	9.3	3.53	9.3 (app.t)	5.90	9.3
21c	A = TC	-	-	-	-	5.91	7.0
	B = CC	3.95	7.2	-	-	5.65	5.7
	C = TT	4.09	10.6	-	-	5.56	8.9
	D = CT	4.02	9.3	3.57	9.1 (app.t)	5.97	8.9
21e	A = TC	3.88	8.0	3.81	8.0 (app.t)	-	-
	B = CC	3.67	7.3	-	-	-	-
	C = TT	3.89	10.3	-	10.2, 8.6	-	-
	D = CT	-	9.4	-	9.2 (app.t)	-	-
21f	A = TC	3.99	8.0	3.92	7.9 (app.t)	-	-
	B = CC	3.76	7.3	-	-	4.46	5.2
	C = TT	3.98	10.2	3.54	10.2, 8.7	-	-
	D = CT	3.84	9.5	3.22	9.4 (app.t)	-	-

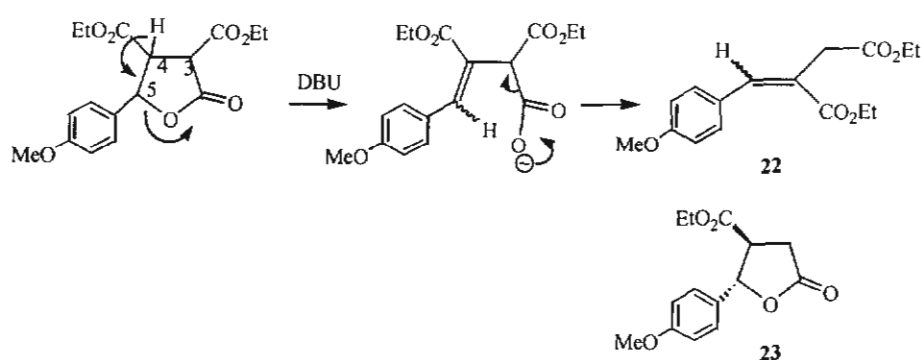
cis และ *trans*-stereochemistry ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 4 และ 5 ของ γ -lactone 21 สามารถหาได้โดยวัดค่า coupling constant ($^1\text{H-NMR}$) ของ proton ที่คาร์บอน 5 ซึ่งปรากฏที่ δ 5.37-5.97 ppm เป็น doublet ซึ่งค่า J_{cis} จะประมาณ 5.7-8.0 Hz ส่วนค่า J_{trans} จะประมาณ 8.9-9.3 Hz ส่วน stereochemistry ที่คาร์บอน 3 และ คาร์บอน 4 หาได้โดยค่า coupling constant ของ proton ที่คาร์บอน 3 ซึ่งปรากฏที่ δ 3.67 ถึง 4.11 ppm เป็น doublet (ดูตารางที่ 3)

4.2 การศึกษาการ isomerization ของ γ -lactone 21

จากการที่ได้ γ -lactone 21 เป็นส่วนผสมของ diastereomer โดยมี TC-isomer เป็น major isomer นั้น จึงคิดว่าเราควรจะสามารถที่จะ isomerise ส่วนผสมของ γ -lactone เพื่อให้ได้ TT-isomer เป็น major diastereomer ได้ เนื่องจากว่าเป็น isomer ที่ควรจะ stable มากที่สุด ดังนั้นจึงได้ศึกษาการ isomerization โดยใช้ DBU

(diazabicycloundecane) เป็น catalyst และทำปฏิกิริยาภายใต้ conditions ต่าง ๆ กัน (ตามที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4)

จากผลการทดลองพบว่า ไม่ว่าเริ่มต้นจาก γ -lactone **21b** ที่เป็นส่วนผสมของ isomers (entry 1 ตารางที่ 4) หรือเริ่มจาก pure isomer TC-**21b** (ตารางที่ 4, entries 2-5) จะได้ TT-isomer เป็น major isomer และ CC-isomer เป็น minor isomer เนื่องจาก stable น้อยที่สุด conditions ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับ isomerise γ -lactone **21b** ควรจะเป็นการใช้ DBU (0.25 equiv)/THF/อุณหภูมิห้อง/2วัน ซึ่งจะได้ product กลับคืนมา 91% yield และมีสัดส่วนของ TT-**21b** ถึง 79 ส่วน (ตารางที่ 4, entry 4) เป็นที่น่าสังเกตว่าให้ทำการ isomerisation ที่อุณหภูมิ 40 °C หรือตั้งปฏิกิริยาไว้นาน 7 วัน จะทำให้สาร α,β -unsaturated ester **22** ประมาณ 12-22% yield การเกิดสาร **22** อธิบายได้โดย mechanism ที่แสดงไว้ในสมการ ส่วน paraconic ester **23** อาจเกิดมาจาก DBU catalyzed deethoxycarboxylation ของสาร **21b** ที่ถูก isomerized ถึง equilibrium แล้ว ดังแสดงจะเห็นว่า สาร **23** เป็น pure *trans*-isomer



ตารางที่ 4 Isomerisation ของสาร **21b**

Entry	Starting lactone (TC/CC/TT/CT)	Conditions	Results:
			Lactone 21 (% yield ^a , TC/CC/TT/CT ^b) and other products
1	21b (86:trace:14:trace)	DBU (1 equiv) in CH ₂ Cl ₂ at 40 °C for 4.5 h	21b (58%, 12:0:76:12) and 22 (22%, E/Z = 36:64)
2	TC- 21b	DBU (0.5 equiv) in THF at 40 °C for 6 h	21b (72%, 12:0:78:10) and 22 (15%) ^d
3	TC- 21b	DBU (0.5 equiv) in THF at RT, overnight	21b (77%, 10:0:80:10) and 22 (3%) ^d
4	TC- 21b	DBU (0.25 equiv) in THF at RT, 2 days	21b (91%, 8:0:78:14) and 22 (3%) ^d
5	TC- 21b	DBU (0.25 equiv) in THF at RT, 7 days	21b (32%, 9:0:79:12) and 22 (12%) ^d and 23 (35%)

^aIsolated yield.

^bDetermined by ¹H-NMR at H-5.

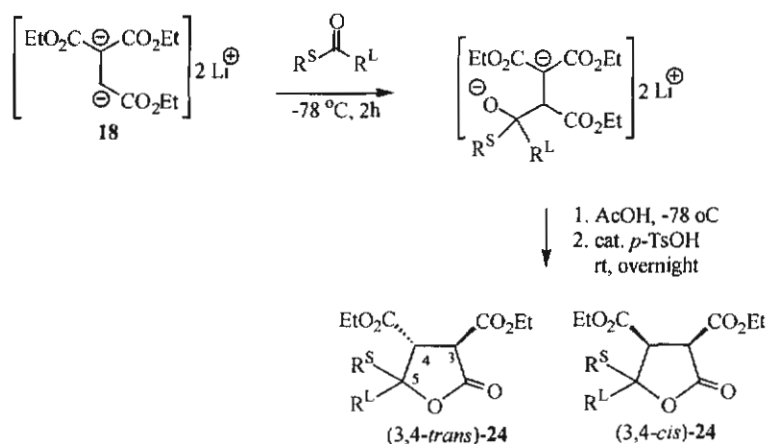
^cNot isolated.

^dRatio of E/Z isomer was not determined.

4.3 ปฏิกิริยาของ dianion 18 กับ ketones

หลังจากได้พบว่า dianion 18 ทำปฏิกิริยากับ aldehyde ได้ γ -lactone แล้ว ได้ศึกษาปฏิกิริยาของ dianion 18 กับ ketone ว่าจะได้ γ -lactone 24 ใน % yield ที่ดีหรือไม่ พบว่า dianion 18 ทำปฏิกิริยากับ ketones ได้ดี ภายใต้ standard conditions ที่ใช้กับ aldehydes ทำให้ได้สาร γ -lactone 24 ที่ต้องการ ดังรวบรวมไว้ในตารางที่ 5 พบว่า *trans*-isomers ของสาร 24a, 24b และ 24c เป็น major isomers (แผนผังที่ 7)

แผนผังที่ 7



ตารางที่ 5 การเตรียมสาร 24a-e

สาร	R ^S	R ^L	% Yield ^a	3,4-position <i>cis/trans</i> ^b
24a	CH ₃	CH ₃	45	0:100
24b	-(CH ₂) ₅ -		58	0:100
24c	Ph	Ph	41	14:86
24d	CH ₃	Ph	39	- ^c
24e	CH ₃	Et	37	- ^c

^a Isolated yield.

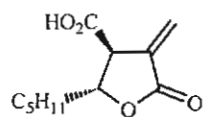
^b Determined by ¹H-NMR at H-3.

^c Not determined.

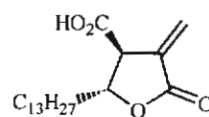
โครงสร้างของสาร γ -lactone 24 พิสูจน์ได้โดยใช้ IR, NMR และ MS IR spectra ของสารเหล่านี้จะแสดง carbonyl absorption ที่ 1737-1747 cm⁻¹ และ 1784-1800 cm⁻¹ ส่วน *cis*- และ *trans*-stereochemistry ที่ carbon-3 และ carbon-4 หาได้โดยวัดค่า coupling constant ระหว่าง protons ที่เกาะที่ carbon-3 และ carbon-4 คือ $J_{cis} \sim 6.6$ Hz และ $J_{trans} = 9-11$ Hz

5. การศึกษาวิธีการเตรียม (±)-Methylenolactocin (25) และ (±)-Protolichesterinic acid (26)

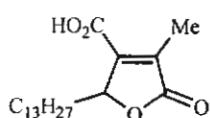
หลังจากประสบความสำเร็จในการเตรียมสาร γ -lactone ประเภท 21 ซึ่งควรจะใช้เป็นสารเริ่มต้นได้ในการเตรียมสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เช่น สาร 25-31 ตามที่เสนอไว้ในข้อเสนอโครงการ



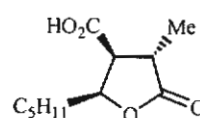
25

Methylenolactocin¹

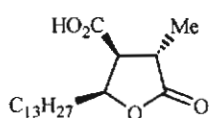
26

Protolichesterinic acid²

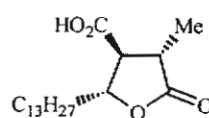
27

Lichesterinic acid⁶

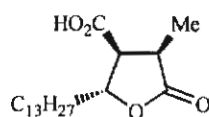
28

Phaseolinic acid⁷

29

Nephromopsinic acid⁸

30

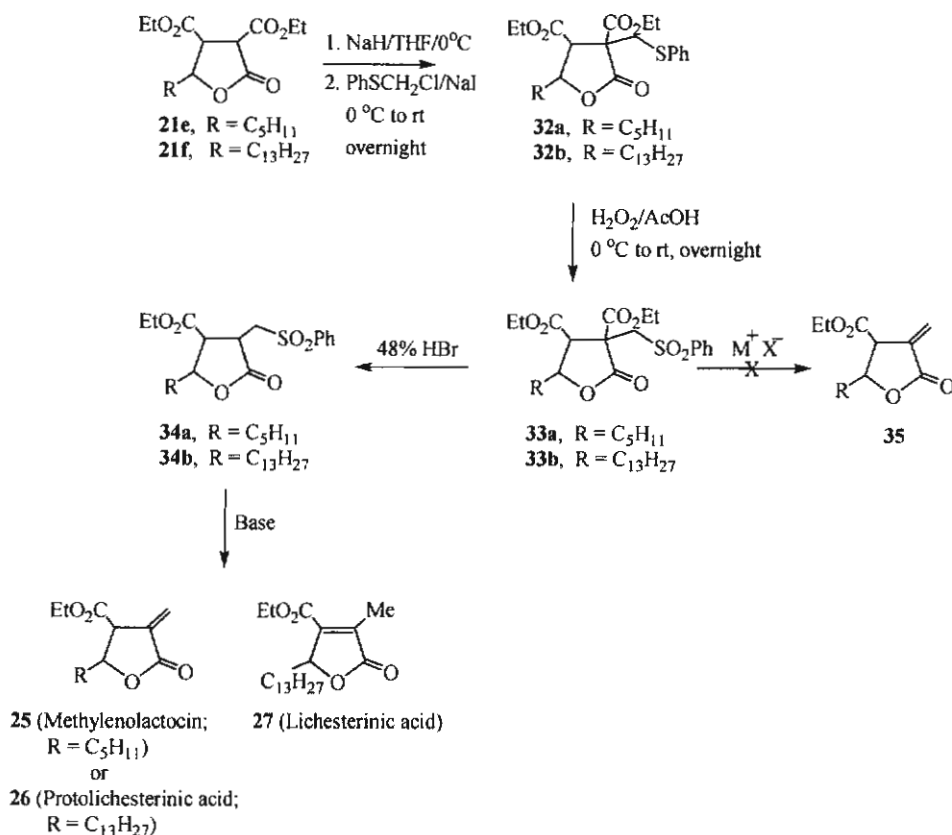
Roccellaric acid⁹

31

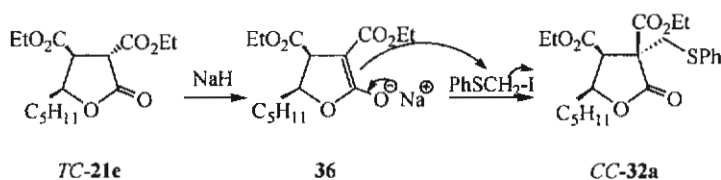
Dihydroprotolichesterinic acid¹⁰

ในขั้นนี้จะเป็นการศึกษาหาวิธีเตรียม (±)-methylenolactocin (25) และ (±)-protolichesterinic acid (26) โดยเริ่มต้นจากสาร γ -lactones 21e และ 21f

แผนผังที่ 8

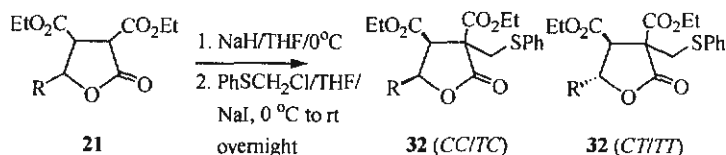


ได้เตรียมสาร **33a**, **33b**, **34a** และ **34b** ขึ้นมา เนื่องจากสารเหล่านี้ควรจะใช้เป็น intermediate ในการเตรียม methylenolactocin (**25**) และ protolichesterinic acid (**26**) ดังนั้นเมื่อนำ **21e** ที่เป็นส่วนผสมของ diastereomer (ดูตารางที่ 6) มาทำปฏิกิริยากับ chloromethyl phenyl sulfide (PhSCH₂Cl เตรียมได้โดยให้ thioanisole ทำปฏิกิริยากับ sulfonyl chloride ใน dichloromethane) โดยใช้ NaH เป็นเบส ที่ 0 °C ถึงอุณหภูมิห้อง คำนึง พบว่าจะไม่ได้ product **32a** ตามที่ต้องการ จะได้สาร **21e** กลับคืนมาทั้งหมด ดังนั้นจึงใช้ NaI ใส่ลงไปปฏิกิริยาด้วย จะทำให้ได้สาร **32a** ที่ต้องการถึง 96% yield และได้ CC-isomer ถึง 92% (ดูตารางที่ 6) การที่เราคาดว่าได้ CC-isomer ของสาร **32a** เป็น major isomer เนื่องจากว่าเราเริ่มจาก สาร **21e** ที่มี TC-isomer เป็นส่วนผสมมากที่สุด ดังนั้นเมื่อเกิดเป็น enolate anion **36** แล้ว PhSCH₂Cl ควรจะเข้าทำปฏิกิริยาในทิศทางตรงกันข้ามกับ -CO₂Et group ที่เกาะอยู่ที่ carbon-4 จึงทำให้ได้ CC-**32a** เป็น major isomer แต่อย่างไรก็ตาม การพิสูจน์ relative stereochemistry นี้จะต้องใช้เทคนิคทาง X-ray crystallography



ดังแสดงในตารางที่ 6 สาร **32b** ก็สามารถเตรียมได้ใน % yield ที่สูง โดยทำปฏิกิริยาแบบเดียวกัน

ตารางที่ 6 การเตรียมสาร 32



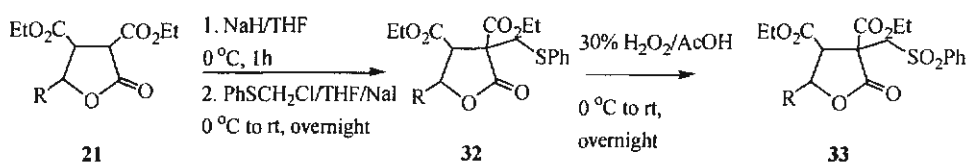
Entry	21 (TC/CC/TT/CT)	R	Product 32	% Yield ^a	
				(CC/TC) ^b	(CT/TT) ^b
1	21e (85:10:5:trace)	C ₅ H ₁₁ -	32a	92% (CC only)	4% (70:30)
2	21f (trace:0:69:31)	C ₁₃ H ₂₇ -	32b	6% (CC only)	84% (74:26)

^aIsolated yield.

^bDetermined by ¹H-NMR at H-5.

เนื่องจากสามารถเตรียมสาร 32 ได้ใน % yield ที่สูงจากสาร 21 จึงได้เตรียมสาร 33 โดยการทำปฏิกิริยา oxidation สาร 32 ต่อเลย โดยไม่ต้องทำการ purify ดังแสดงในตารางที่ 7 เราสามารถเตรียมสาร sulfone 33 ได้ใน % yield ที่สูง

ตารางที่ 7 การเตรียมสาร 33a และ 33b



Entry	21 (TC/CC/TT/CT)	R	Product 33	% Yield ^a (diastereomers)
1	21e (82:6:11:trace)	n-C ₅ H ₁₁ -	33a	92% (TC and small amount of the other isomers)
2	21f (TC and small amount of the other isomers)	n-C ₁₃ H ₂₇ -	33b	88% (CC) and 5% (CT:TT = 73:27) ^b

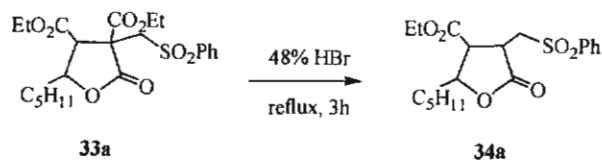
^aIsolated yield based on compound 21.

^bDetermined by ¹H-NMR from ArH of the isolated product.

6. การเตรียม paraconic acid 34a

เตรียมได้ใน % yield ปานกลาง โดยทำปฏิกิริยา hydrolysis ของสาร 33a โดยให้ทำปฏิกิริยากับ 48% HBr ที่ 120-130 °C (3 ชม.) ผลการทดลองสรุปไว้ในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 การเตรียมสาร 34a

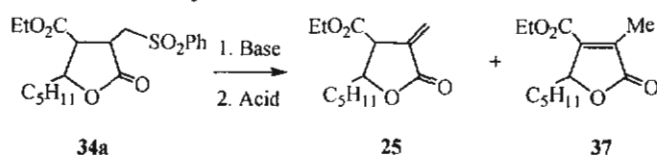


Entry	33a (CC:CT:TT)	R	Results
1	33a (CC and a small amount of the other diastereomers)	$n\text{-C}_5\text{H}_{11}\text{-}$	34a (48%, TC:CC:TT = 32:64:4)
2	33a (0:59:41)	$n\text{-C}_5\text{H}_{11}\text{-}$	34a (16%, TT isomer) and 34a (65%, CT:TT = 85:15)

7. การศึกษาวิธีการเตรียม Methyleneolactocin (25)

ได้พยายามทำปฏิกิริยา elimination ของหมู่ $\text{PhSO}_2\text{-}$ โดยใช้ base เช่น LDA หรือ DBU ภายใต้ conditions ต่าง ๆ กัน พบว่าปฏิกิริยาค่อนข้าง complex ถึงแม้ว่า $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของ crude product ที่ได้แสดงให้เห็นว่าเกิดปฏิกิริยา elimination ได้สาร 25 ที่ต้องการเช่นเดียวกัน (δ 5.96 และ 6.38 ppm, each doublet due to methylene protons) แต่บางส่วนได้เกิดการ double bond isomerise ให้ได้สาร 27 ซึ่งเสถียรกว่า ดังปรากฏใน $^1\text{H-NMR}$ spectrum (δ 2.17 ppm, $J = 1.9$ Hz, d, $\text{CH}_3\text{C}=\text{C}$ และ δ 2.15 ppm, d, $J = 1.8$ Hz) และนอกจากนี้จะเห็นว่า มี signal ของสารอื่นอีกด้วยนอกเหนือจากสารเริ่มต้น 34a ได้พยายามแยกให้ได้สาร 25 และ 37 ที่บริสุทธิ์ แต่ไม่สำเร็จ

ตารางที่ 9 การศึกษาการเตรียมสาร Methyleneolactocin 25



Entry	34a	Conditions ^a	Results ^b
1	34a	LDA (2 equiv) in THF at -78°C for 30 min and -20°C for 3h	34a and 25 containing a small amount of 37
2	34a	LDA (2 equiv) in THF at -78°C for 30 min and 0°C for 3h	34a as the major product containing a small amount of 25
3	34a	DBU (1.6 equiv) in THF at 0°C for 3h	34a as the major product containing a small amount of 37
4	34a	DBU (2 equiv) in THF at rt, overnight	37 as the major product containing a small amount of 34a
5	34a	DBU (2 equiv) in CH_2Cl_2 at 0°C for 3h	34a, 25 and 37

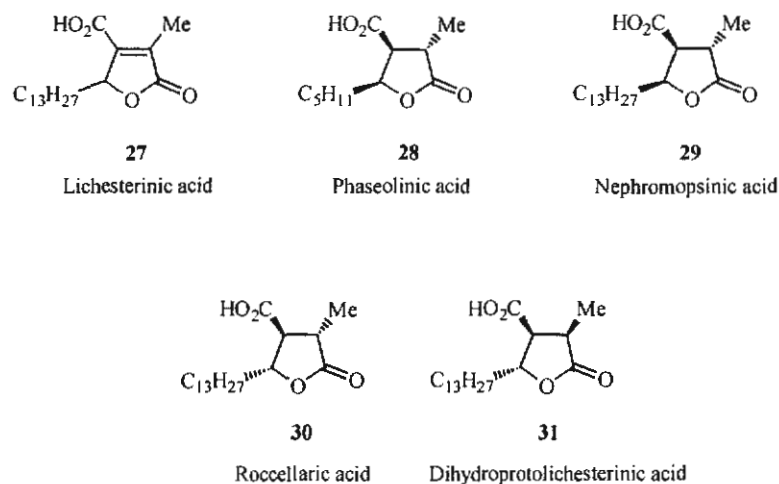
^aWhen using DBU, the reaction mixture was quenched with 0.5N HCl, whereas using LDA, it was quenched with glacial acetic acid and acidified with 1N HCl.

^bObserved by the $^1\text{H-NMR}$ spectra of the crude product.

^cA 32:64:4 mixture of TC:CC:TT isomers was used.

8. การเตรียมสาร (±)-Lichesterinic acid (27), (±)-Phaseolinic acid (28), (±)-Nephromopsinic acid (29), (±)-Rocellaric acid (30), และ (±)-Dihydroprotolichesterinic acid (31).

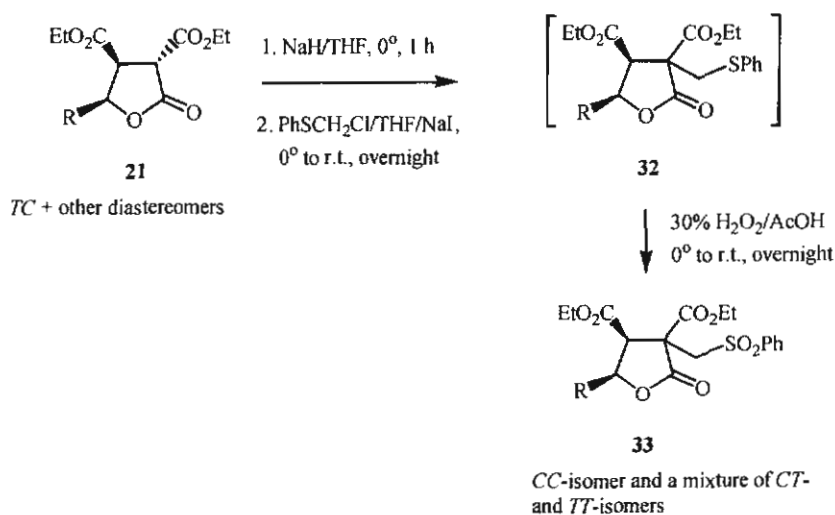
สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ 27-31 มี basic skeleton เหมือนกัน คือ เป็นอนุพันธ์ของ paraconic acid บางตัวจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น lichesterinic acid (27) และ dihydroprotolichesterinic acid (31) มีคุณสมบัติเป็น antibacteria ถึงแม้ว่านักวิจัยได้สังเคราะห์สารต่างๆ เหล่านี้โดยวิธีต่างๆ กันแล้วก็ตาม กลุ่มวิจัยของเราก็สนใจที่จะเตรียมสาร 27 ถึง 31 ได้โดยประยุกต์ใช้ปฏิกิริยาของ vicinal dianion 18 โดยใช้ γ -lactone ประเภท 21 เป็นสารเริ่มต้น ซึ่งเตรียมได้จาก vicinal dianion 18 ตามที่ได้กล่าวมาแล้ว



8.1 การเตรียม (±)-Lichesterinic acid (27)

ได้ศึกษาวิธีการเตรียม α -phenylsulfonylmethylated γ -lactone 33 เพิ่มเติมจากที่ได้รายงานไว้ในรายงานครั้งที่แล้ว ดังแสดงไว้ในแผนผังที่ 9 และตารางที่ 10

แผนผังที่ 9 การเตรียม α -Phenylsulfonylmethylated γ -Lactone 33



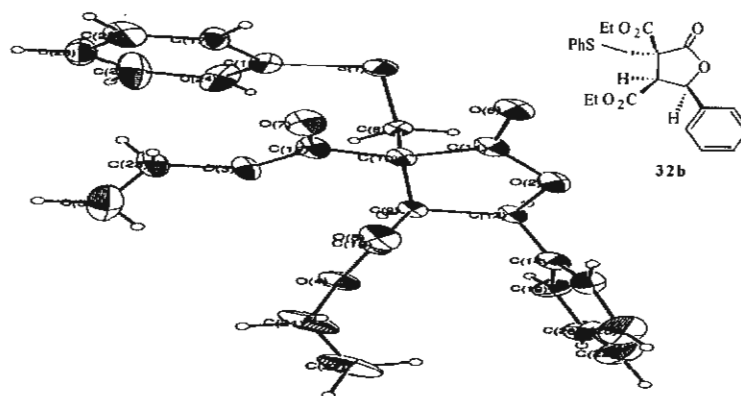
ตารางที่ 10 การเตรียมสาร 33

Entry	21 (TC/CC/TT/CT)	R	Product	33 % Yield ^a (diastereomers)
1	TC-21b	<i>p</i> -MeOC ₆ H ₄ -	33a	95% (CC:TC = 85:15) ^b
2	21c (TC as the major isomer)	Ph-	33b	92% (CC:CT:TT = 76:14:10) ^c
3	21e (82:6:11:trace)	<i>n</i> -H ₁₁ C ₅ -	33c	97% (CC and small amount of the others)
4	21f (TC and small amount of the others)	<i>n</i> -H ₂₇ C ₁₃ -	33d	88% (CC) and 5% (CT:TT = 73:27) ^d

^a Isolated yield based on compound 21.^b Determined by ¹H NMR from ArH of the crude product.^c Determined by ¹H NMR at H-5 of the isolated product.^d Determined by ¹H NMR from ArH of the isolated product.

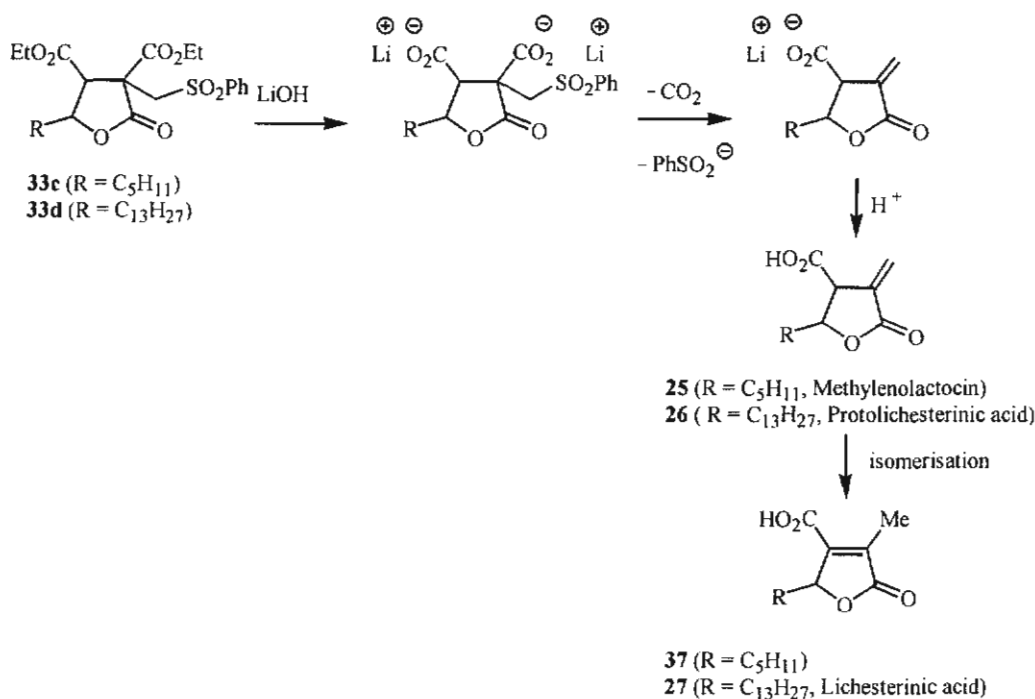
สามารถพิสูจน์ relative configuration ของ major diastereomer (CC-isomer) ของสาร 32b ได้โดยทำ single crystal X-ray diffraction ดังแสดงในรูปที่ 1

รูปที่ 1



จากการที่ได้ศึกษาปฏิกิริยา ester hydrolysis ของสาร 33c (mixture of diastereomer) โดยใช้ LiOH (4 equiv) ใน tetrahydrofuran/H₂O (reflux, 3 ชม.) จะได้สาร butenolide 37 69% yield การที่สามารถแยกสาร 37 ได้นั้นแสดงว่า ปฏิกิริยา ester hydrolysis ของสาร 33c เกิดผ่านปฏิกิริยา decarboxylative desulfonation นำไปสู่ methylenolactocin (25) หลังจาก acidic work-up ซึ่งเกิดปฏิกิริยา isomerization ต่อทำให้ได้ butenolide 37 จากการทำปฏิกิริยา hydrolysis แบบเดียวกันนี้ทำให้สามารถเตรียม (±)-lichesterinic acid (27) ได้ 26% yield จากสาร 33d ดังแสดงในแผนผังที่ 10

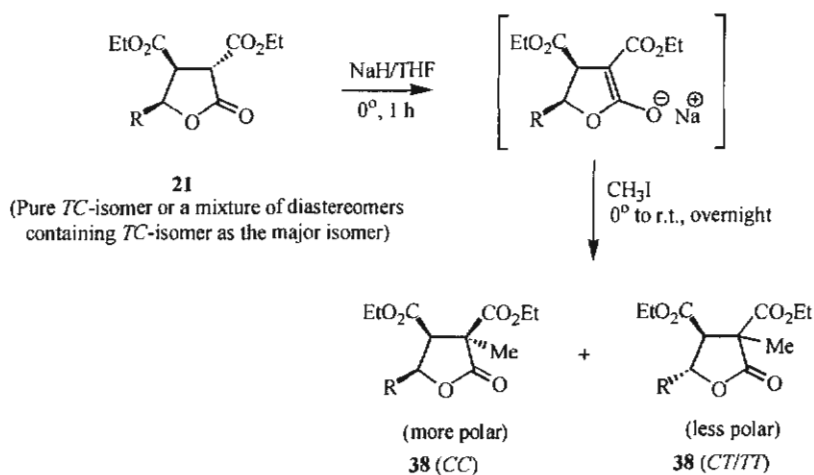
แผนผังที่ 10 การเตรียม (±)-Lichesterinic acid (27)



8.2 การเตรียมสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ 28, 29, 30 และ 31

ในขั้นแรกได้ศึกษาปฏิกิริยา base-catalyzed methylation ของสาร γ -lactone 21 โดยพบว่าเมื่อให้สาร γ -lactone 21 ทั้งที่เป็น pure diastereomer หรือเป็นของผสมของ diastereomer ทำปฏิกิริยา methylation โดยใช้ NaH/MeI/THF จะได้ CC-isomer ของสาร 38 เป็น major diastereomer ซึ่งสามารถแยกออกจาก diastereomer อื่นได้ (แผนผังที่ 11) ดังแสดงผลการทดลองไว้ในตารางที่ 11 สามารถพิสูจน์ relative stereochemistry ของ CC-isomer ของ 38a ได้โดย single crystal X-ray diffraction ดังแสดงในรูปที่ 2

แผนผังที่ 11 Base-catalyzed Methylation of γ -Lactone 21

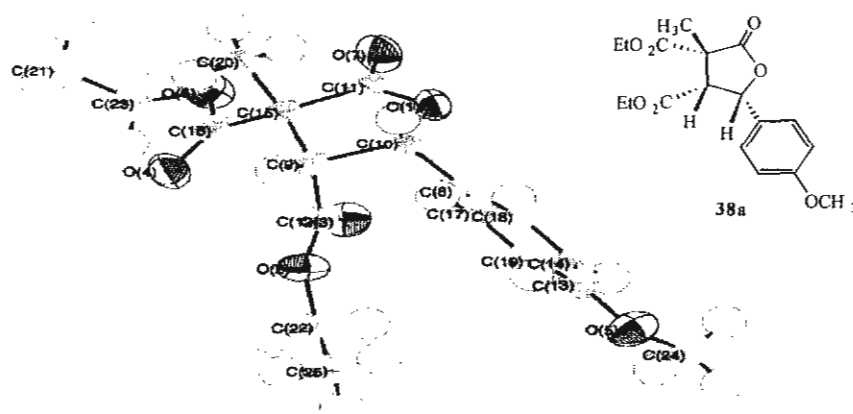


ตารางที่ 11 Methylation ของสาร 21b, e, f

Entry	21 TC:(TT+CC):CT	R	Product	%Yield ^a	
				CC-isomer	CT/TT isomers ^b
1	TC-21b	<i>p</i> -MeOC ₆ H ₄ -	38a	94%	-
2	21e (70:27:3)	H ₁₁ C ₅ -	38b	67%	23% (63:37)
3	21f (66:34:trace)	H ₂₇ C ₁₃ -	38c	67%	28% (51:49)

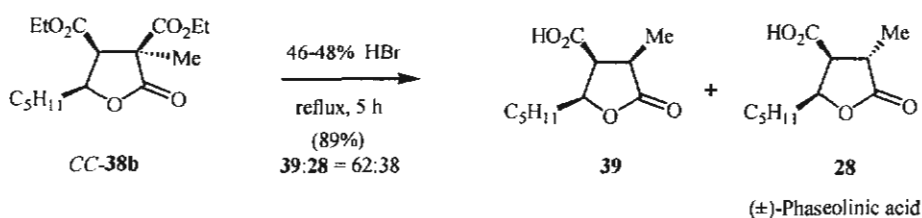
^a Isolated yield.^b Determined by ¹H NMR at H-5.

รูปที่ 2



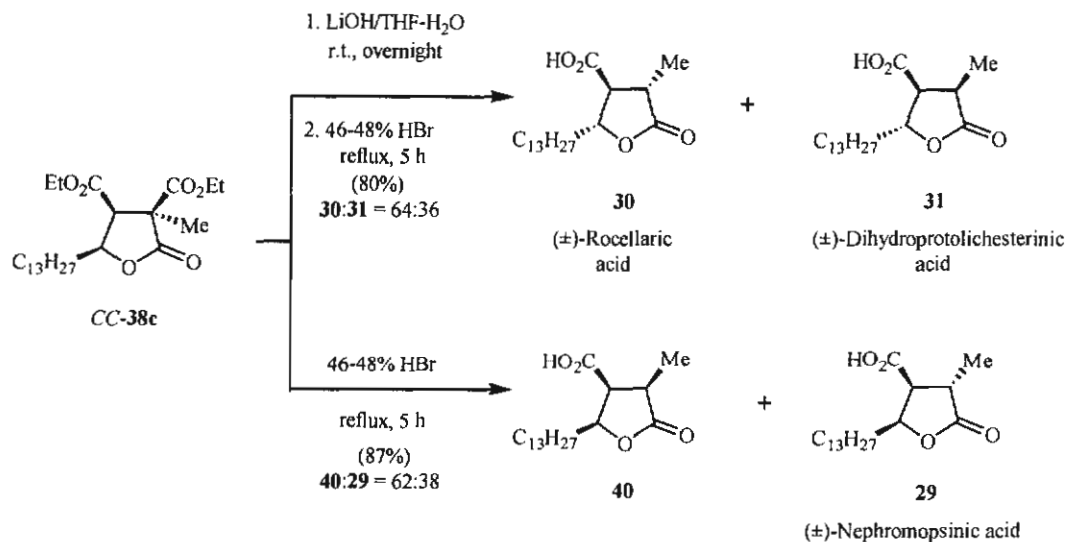
เมื่อนำ CC-38b มาทำ ester hydrolysis โดย reflux กับ 48% HBr นาน 5 ชม. จะได้ของผสมระหว่างสาร 39 และ (±)-phaseolinic acid (28) เป็นสัดส่วน 62:38 และได้ 89% yield ในทำนองเดียวกันเมื่อ CC-38c ทำปฏิกิริยา hydrolysis โดยใช้ 48% HBr (reflux, 5 ชม.) ก็จะได้ส่วนผสมของสาร 40 และ (±)-nephromopsinic acid (29) (62:38, 87% yield) เป็นที่น่าสังเกตว่าไม่เกิดการ isomerization ที่ตำแหน่งที่ 4 และ 5 ระหว่างปฏิกิริยา hydrolysis (ดูแผนผังที่ 11 และ 12) ได้พยายามแยกสาร 28 และสาร 29 ออกจากสาร 39 หรือสาร 40 โดยวิธี chromatography พบว่าไม่สำเร็จ แต่สามารถแยกออกจากกันได้โดยเปลี่ยนให้เป็น methyl esters โดยให้ทำปฏิกิริยาเป็น dicyclohexylcarbodiimide (DCC) และ methanol แล้วแยกโดย chromatography

แผนผังที่ 12 Preparation of (±)-Phaseolinic Acid (28)



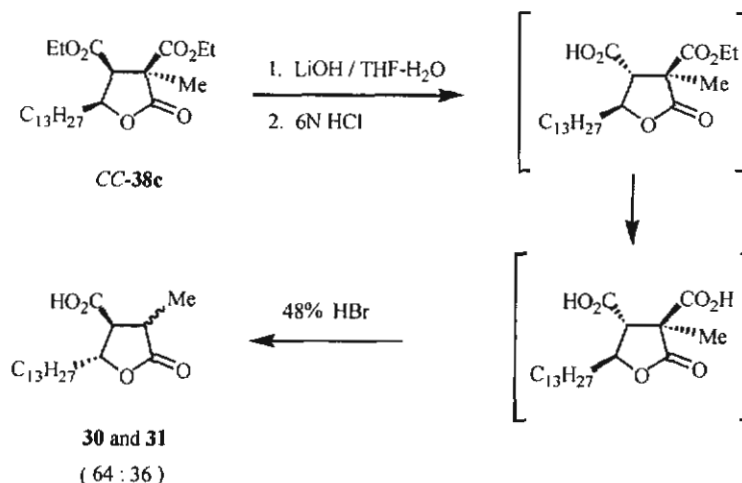
ได้ศึกษาปฏิกิริยา hydrolysis ของสาร CC-38c โดยใช้ LiOH/THF/H₂O ที่อุณหภูมิห้อง ปรากฏว่าปฏิกิริยา hydrolysis เกิดไม่ complete ¹H NMR ของ crude product ที่ได้แสดงให้เห็นว่ายังมี signals ของ ester group ยังเหลืออยู่ ดังนั้นจึงต้องนำ crude product ที่ได้มาทำปฏิกิริยา hydrolysis โดยใช้ 48% HBr/reflux อีกครั้งจะได้ 80% yield ของส่วนผสม 64:36 ของ (±)-roccellaric acid (30) และ (±)-dihydroprotolichesterinic acid (31) ซึ่งแยกออกจากกันได้โดยทำเป็น esters โดยใช้ DCC/MeOH (ดูแผนผังที่ 13)

แผนผังที่ 13 Preparation of 29, 30 and 31



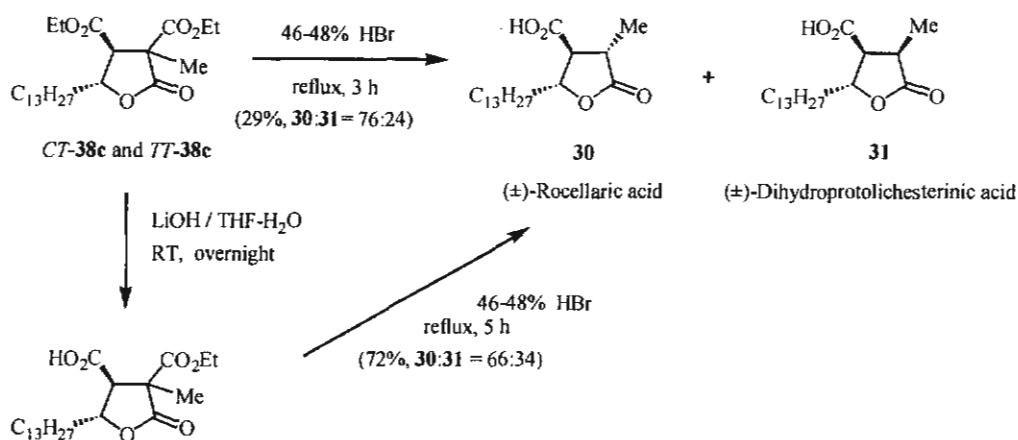
จากผลการทดลองที่ได้พบว่า ester hydrolysis ของ CC-38c โดยใช้ LiOH ทำให้เกิด epimerisation ที่ carbon ที่ 4 ทำให้ได้ *trans*-(4,5)-isomer ซึ่ง stable กว่า ดังแสดงในแผนผังที่ 14

แผนผังที่ 14



ได้ศึกษาปฏิกิริยา ester hydrolysis ของสารผสมของ isomers CT-38c และ TT-38c โดยใช้ 48% HBr (reflux, 3 ชม.) จะได้สารผสมของ (±)-roccellaric acid (30) และ (±)-dihydroprotolichesterinic acid (31) เป็นสัดส่วน 76:24 เพียง 29% yield พบว่าได้ % yield สูงขึ้นถึง 72% เมื่อให้สารผสมของ CT-38c และ TT-38c ทำปฏิกิริยากับ LiOH/THF/H₂O ก่อน แล้วทำการ hydrolyze crude product ที่ได้อีกครั้งด้วย 48% HBr ดังแสดงในแผนผังที่ 15

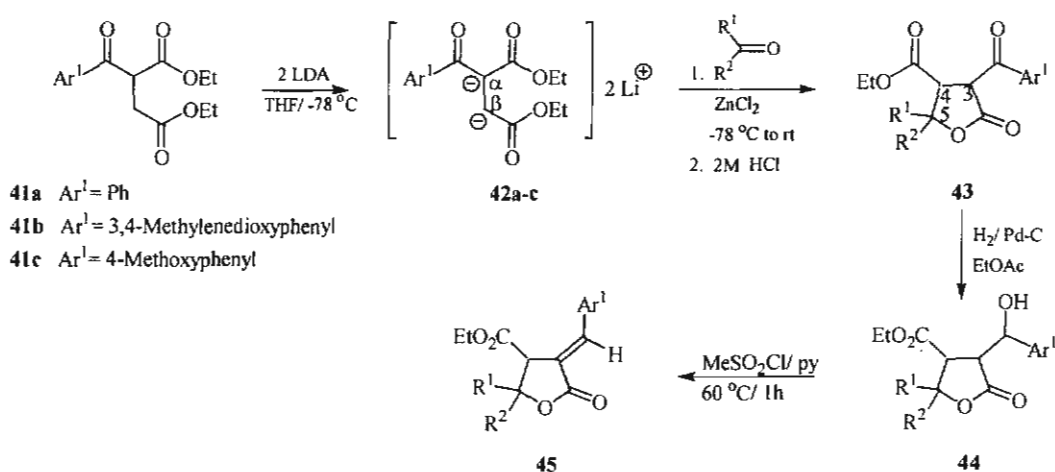
แผนผังที่ 15



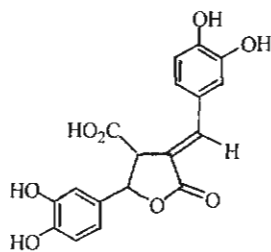
9. การศึกษาวิธีการเตรียมและปฏิกิริยาของ vicinal dianion 42

ได้ศึกษาปฏิกิริยาของ vicinal dianion **42** กับ carbonyl compounds ซึ่ง vicinal dianion **42** เตรียมได้โดยให้สาร α -aroylsuccinic ester **41** ทำปฏิกิริยากับ lithium diisopropylamide (LDA, 2 equiv) ใน THF ที่ -78°C ทำให้สามารถเตรียมสารประกอบ α -aroyl- γ -butyrolactone **43** ได้ นอกจากนี้ได้ใช้ประโยชน์ของสาร **43** สำหรับเป็นสารตั้งต้นในการเตรียมสารประกอบ α -arylidene- γ -butyrolactones **45** ดังสรุปไว้ในแผนผังที่ 16

แผนผังที่ 16



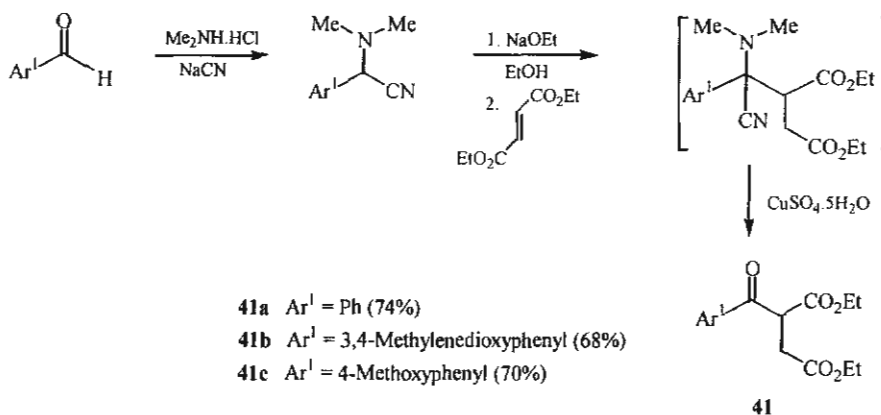
สารประเภท **45** นี้มีความสำคัญ เนื่องจากมี basic skeleton เหมือนสารที่เป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เช่น phellinsin A (**46**) ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็น antifungal agent ซึ่งแยกได้จาก *Phellinus* sp. PL3.¹¹

Phellinsin A (**46**)

9.1 การเตรียม α -aroylsuccinic ester 41

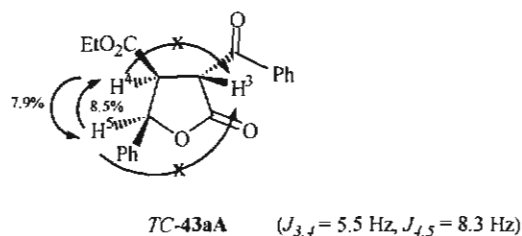
สามารถเตรียมสารตั้งต้น 41 ได้โดยทำปฏิกิริยา conjugate addition ของสารประกอบ aminonitrile¹² กับ diethyl fumarate แล้วนำ adduct ที่ได้ไปทำ hydrolysis โดยใช้ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ ดังแสดงไว้ในแผนผังที่ 17 พบว่าสามารถเตรียมสาร 41a, 41b และ 41c ได้ 74, 68 และ 70% yields ตามลำดับ % yield ของสารที่แสดงไว้ได้คำนวณจากสารเริ่มต้น aromatic aldehydes วิธีนี้นับว่าเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก เนื่องจากปฏิกิริยาเริ่มต้นจาก aromatic aldehyde ที่สามารถหาซื้อได้ จะเห็นได้ว่าสามารถที่จะเปลี่ยนหมู่ Ar^1 ของสาร 41 เป็นหมู่อะไรก็ได้

แผนผังที่ 17



10. การเตรียม vicinal dianions 42a-c และ การศึกษาปฏิกิริยากับ carbonyl compounds

ในขั้นแรกได้ศึกษาการเตรียม vicinal dianion 42a จาก α -benzoylsuccinic ester 41a โดยให้ทำปฏิกิริยากับ LDA (2 equiv) ใน THF ที่ -78°C (1 ชม.) จะได้สารละลายสีส้มของ vicinal dianion 42a เมื่อให้ทำปฏิกิริยากับ benzaldehyde (1 equiv) โดยมี ZnCl_2 (1 equiv) อยู่ด้วยที่ -78°C แล้วค่อย ๆ warm-up มาที่อุณหภูมิห้อง (~12-16 ชม.) แล้ว work-up โดย hydrolyze ด้วย 2M HCl จะได้สาร γ -lactone 43a ที่ต้องการ 74% yield เป็นส่วนผสมของ diastereomers พบว่าสามารถแยก 3,4-*trans*-4,5-*cis*-43a (TC-isomer) ซึ่งเป็น major isomer ของสาร γ -lactone 43a ได้ถึง 61% yield สำหรับ relative stereochemistry ของ TC-43a สามารถสรุปได้จาก NOE experiments ดังแสดงในรูป TC-43aA

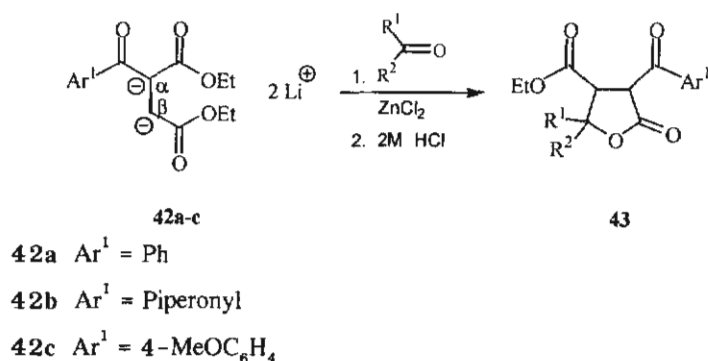


หลังจากประสบความสำเร็จที่ได้แสดงให้เห็นว่าเราสามารถเตรียม vicinal dianion 42a ได้โดยทำ double lithiation ของสารเริ่มต้น 41a โดยใช้ LDA (2 equiv) ใน THF ที่ -78°C และ vicinal dianion ทำปฏิกิริยากับ benzaldehyde โดยมี β -regioselectivity สูงมาก จึงได้ศึกษาปฏิกิริยาของ vicinal dianion กับ piperonal และ 4-methoxybenzaldehyde ก็พบว่า ได้ γ -lactones 43b และ 43c ในปริมาณ 71 และ 65% yields ตามลำดับ นอกจากนี้ vicinal dianion 42 ยังทำปฏิกิริยาได้ดีกับ acetone cyclohexanone isobutyralde-

hyde และ benzophenone ดังแสดงผลการทดลองไว้ในตารางที่ 12 (ลำดับที่ 1-7) พบว่าจะได้ TC-43b และ TC-43c isomers เป็น major isomers 43d, 43e และ 43g จะได้ 3,4-trans isomers ($J \cong 10.0-10.5$ Hz) เป็น major isomers

ในทำนองเดียวกัน ได้ศึกษาปฏิกิริยาของ vicinal dianions 42b และ 42c กับ carbonyl compounds ต่าง ๆ ซึ่งก็พบว่าได้ผลเช่นเดียวกัน คือสามารถเตรียมสาร γ -lactones 43h-43o และจะได้ TC-isomers เป็น major isomers สามารถแยก TC-isomer ของ γ -lactones ที่ได้จากการให้ vicinal dianions 42a-c ทำปฏิกิริยากับ aromatic aldehydes ได้โดยวิธี chromatography

ตารางที่ 12 ปฏิกิริยาของ vicinal dianions 42a-c กับ carbonyl compounds



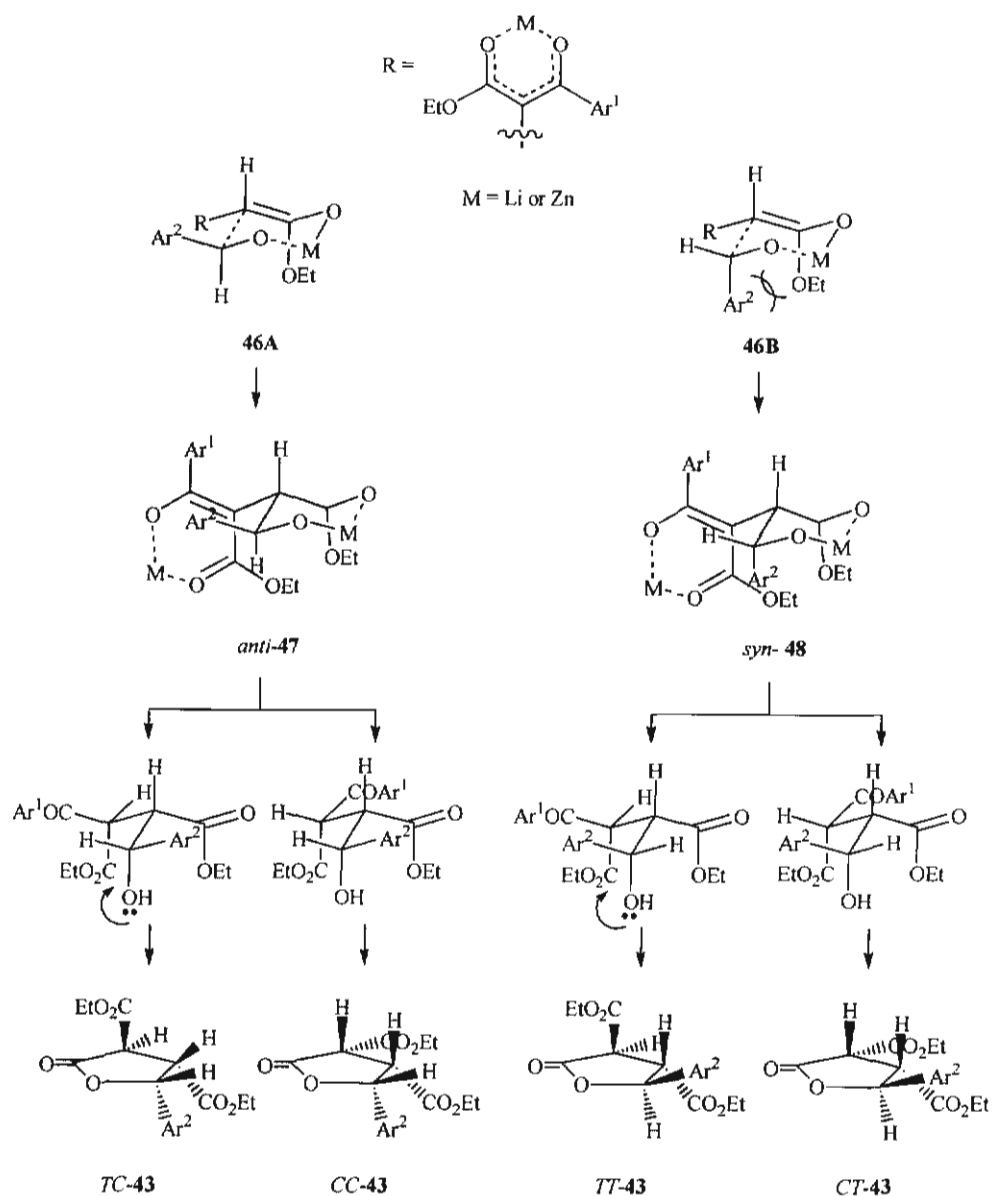
ลำดับที่	Dianion 42	RCHO or (R) ₂ CO	γ -Lactone 43	% yield ^{a,b}
1	42a	PhCHO	43a, Ar ¹ = Ph; R ¹ = Ph; R ² = H	74%
2	42a	Piperonal	43b, Ar ¹ = Ph; R ¹ = Piperonyl; R ² = H	71%
3	42a	4-MeOC ₆ H ₄ CHO	43c, Ar ¹ = Ph; R ¹ = 4-MeOC ₆ H ₄ ; R ² = H	65%
4	42a	Acetone	43d, Ar ¹ = Ph; R ¹ = R ² = Me	50%
5	42a	Cyclohexanone	43e, Ar ¹ = Ph; R ¹ -R ² = -(CH ₂) ₅ -	70%
6	42a	Isobutyraldehyde	43f, Ar ¹ = Ph; R ¹ = Pr ⁱ ; R ² = H	63%
7	42a	Benzophenone	43g, Ar ¹ = Ph; R ¹ = R ² = Ph	28%
8	42b	PhCHO	43h, Ar ¹ = Piperonyl; R ¹ = Ph; R ² = H	51%
9	42b	Piperonal	43i, Ar ¹ = Piperonyl; R ¹ = Piperonyl; R ² = H	47%
10	42b	4-MeOC ₆ H ₄ CHO	43j, Ar ¹ = Piperonyl; R ¹ = 4-MeOC ₆ H ₄ ; R ² = H	51%
11	42b	Isobutyraldehyde	43k, Ar ¹ = Piperonyl; R ¹ = Pr ⁱ ; R ² = H	60%
12	42b	Acetone	43l, Ar ¹ = Piperonyl; R ¹ = R ² = Me	40%
13	42c	PhCHO	43m, Ar ¹ = 4-MeOC ₆ H ₄ ; R ¹ = Ph; R ² = H	64%
14	42c	Piperonal	43n, Ar ¹ = 4-MeOC ₆ H ₄ ; R ¹ = Piperonyl; R ² = H	65%
15	42c	4-MeOC ₆ H ₄ CHO	43o, Ar ¹ = 4-MeOC ₆ H ₄ ; R ¹ = 4-MeOC ₆ H ₄ ; R ² = H	57%

^a % Yields หลังจากทำการ purify โดย preparative thin-layer chromatography

^b ได้เป็นส่วนผสมของ diastereomers

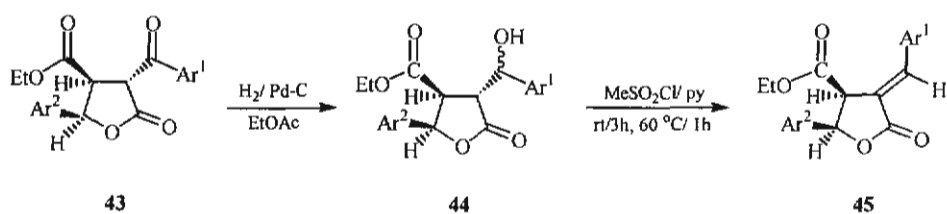
การที่ได้ TC-isomers ของ γ -lactones 43 สามารถอธิบายได้ดังแสดงไว้ในแผนผังที่ 18 ซึ่งจะเห็นได้ว่า transition state 46A จะเป็น transition state ที่มี steric interaction น้อยกว่า 46B ทำให้ได้ anti-adduct 47 และในที่สุด หลัง protonation และ lactonisation โดยกรด จะได้ TC-isomers เป็น major isomer

แผนผังที่ 18

11. การเตรียม α -arylidene- γ -butyrolactones 45 จาก α -aroyl- γ -butyrolactone 43

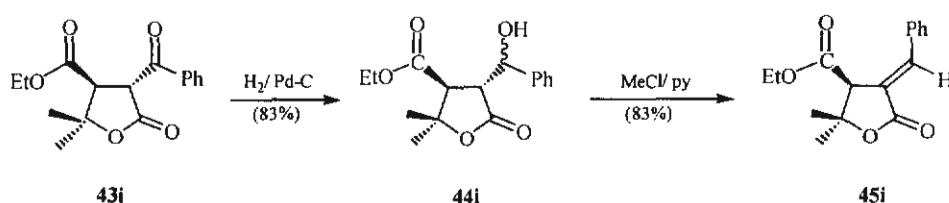
หลังจากที่สามารถเตรียมสารประกอบ α -aroyl- γ -butyrolactones 43 ได้แล้ว ได้พยายามแสดงให้เห็นถึงประโยชน์ของสาร 43 ว่า สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการเตรียมสารประกอบ α -arylidene- γ -butyrolactones 45 ได้ โดยจะใช้ TC-isomers ของสาร 43 เป็นสารเริ่มต้น เนื่องจากสามารถแยกออกมาได้บริสุทธิ์ตามที่กล่าวไว้ในเบื้องต้นแล้ว แผนผังการเตรียมสาร 45 ได้แสดงไว้ในแผนผังที่ 19

แผนผังที่ 19



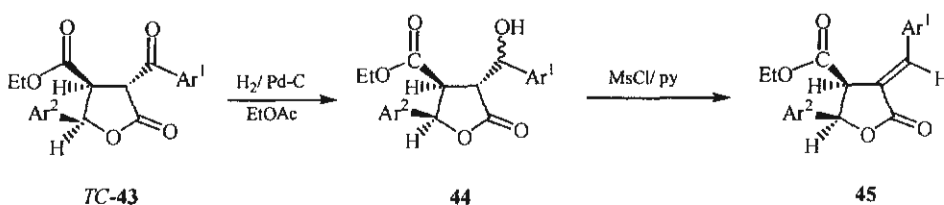
ในขั้นแรก ได้ศึกษาปฏิกิริยา reduction ของสาร 43i โดยได้ลองใช้ reducing agent ต่าง ๆ ภายใต้ conditions ต่าง ๆ กัน เช่น $\text{NaBH}_4/\text{MeOH}$ or EtOH , $\text{NaBH}_4/\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$, $\text{Zn}(\text{BH}_4)_2/\text{THF}$ ที่ อุณหภูมิ และเวลาต่าง ๆ กัน พบว่าจะได้สารเริ่มต้น 43i กลับคืนมาทั้งหมด ซึ่งเป็นเรื่องที่น่าแปลกใจที่ปฏิกิริยา reduction ไม่เกิดเลย ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ที่ว่าสารประเภท 43 เกิด enolisation ได้เร็ว เนื่องจากมี α -acidic proton แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อนำสาร 43i มาทำปฏิกิริยา catalytic hydrogenation โดยใช้ 10% Pd/C เป็น catalyst และใช้ THF หรือ EtOAc เป็นตัวทำละลาย จะได้สาร 44i 82-83% yield เป็นส่วนผสมของ 2 diastereomers เป็นสัดส่วนประมาณ 65:35 เมื่อนำ alcohol 44i มาทำปฏิกิริยากับ methanesulfonyl chloride (~2-3 equiv) โดยใช้ pyridine เป็น solvent ที่อุณหภูมิห้อง (3 ชม.) จะได้ (*E*)- α -benzylidene- γ -butyrolactone 45i 83% yield หลังจาก chromatography (แผ่นผั่งที่ 20)

แผ่นผั่งที่ 20



หลังจากนั้นได้เตรียม α -arylidene- γ -butyrolactones 45a-h จาก TC-isomers ของสาร 43a-h โดยใช้ conditions เดียวกันกับการเตรียมสาร (*E*)-45i จากสาร 43i ผลการทดลองได้รวบรวมไว้ในตารางที่ 13 ซึ่งจะ เห็นได้ว่าสามารถเตรียมสารประกอบ (*E*)- α -arylidene- γ -butyrolactones 45a-h ได้ใน % yield ที่ดี

ตารางที่ 13 การเตรียม α -arylidene- γ -butyrolactone 45



TC-43	Ar ¹	Ar ²	44 (%) ^{a,b}	(<i>E</i>)-45 (%)
TC-43a	Ph	Ph	44a, quant. ^c	45a, 60
TC-43b	Ph	Piperonyl	44b, 61	45b, 92
TC-43c	Ph	4-MeOPh	44c, 65	45c, 91
TC-43d	Piperonyl	Ph	44d, quant. ^c	45d, 75
TC-43e	Piperonyl	Piperonyl	44e, 93	45e, 90
TC-43f	Piperonyl	4-MeOPh	44f, quant. ^c	45f, 75
TC-43g	4-MeOPh	Ph	44g, 80	45g, 95
TC-43h	4-MeOPh	Piperonyl	44h, 87	45h, 91

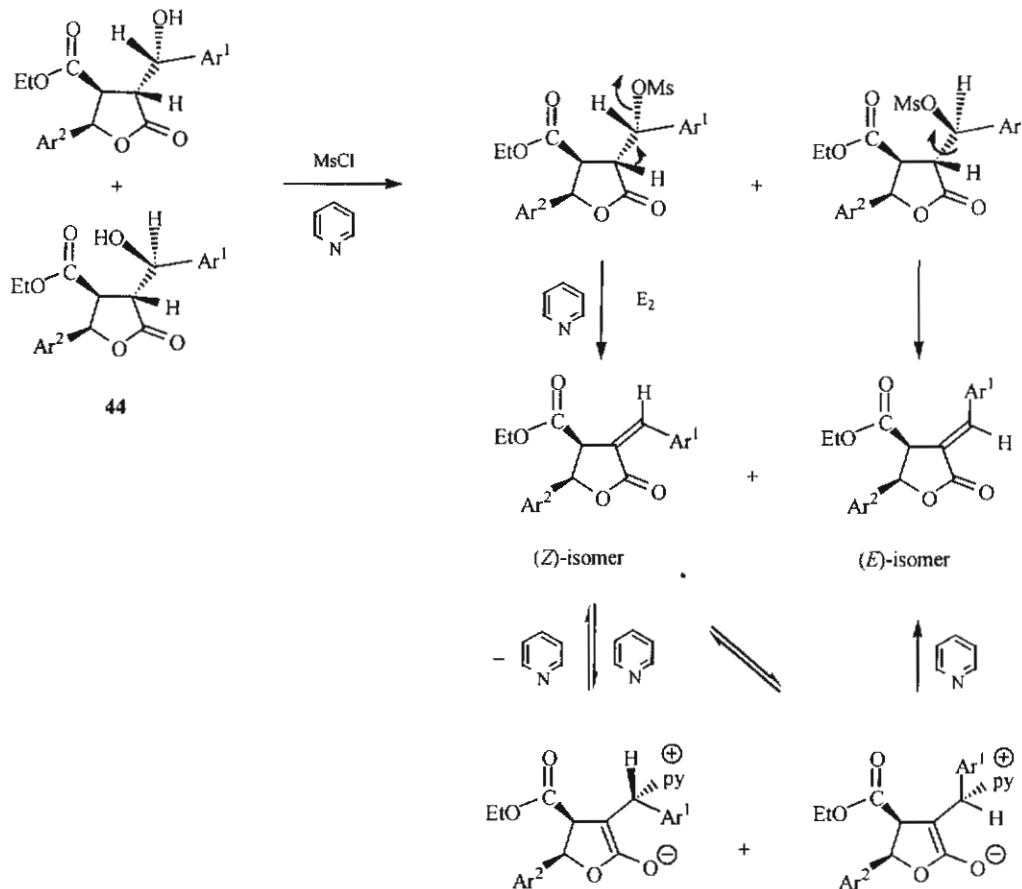
^a Yield หลังจาก chromatography

^b Obtained as mixtures of diastereomers.

^c Yields of the crude products.

การที่ปฏิกิริยานำไปสู่ *E*-isomer ของ α -arylidene- γ -butyrolactones 45a-i เท่านั้น สามารถอธิบายได้ดังนี้คือ ในขั้นแรกของปฏิกิริยาจะเกิด สาร mesylate ของ alcohol 44 ซึ่งเป็นส่วนผสมของ diastereomers แล้วเกิด E_2 -elimination ตามด้วย conjugate addition-elimination ของ pyridine α -arylidene- γ -butyrolactone ซึ่งจะนำไปสู่ (*E*)-isomer ของสาร α -arylidene- γ -butyrolactone 45 ซึ่งเป็น isomer ที่ stable ที่สุด ดังแสดงไว้ในแผนผังที่ 21

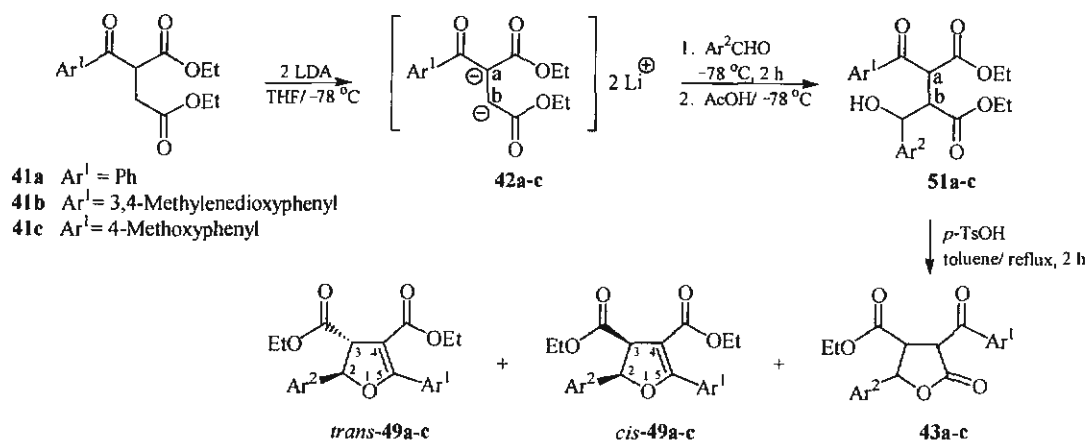
แผนผังที่ 21



12. การเตรียมสารประกอบ dihydrofuran 49

ตามที่เคยรายงานมาในหัวข้อที่ 10 พบว่า vicinal dianion 42 ทำปฏิกิริยากับ aromatic aldehydes โดยมี $ZnCl_2$ อยู่ด้วย จะได้เพียง γ -butyrolactone 43 เป็น product ระหว่างการศึกษาคหา conditions ที่เหมาะสม ได้พบว่า ถ้าให้ vicinal dianion 42a ทำปฏิกิริยากับ aromatic aldehyde โดยไม่มี $ZnCl_2$ อยู่ด้วย จะได้ product เป็นส่วนผสมของ γ -butyrolactone 43a (37%) กับ dihydrofuran 49a (16%) หลังการ work-up ด้วย 1N HCl ปริมาณของ dihydrofuran 49a จะขึ้นอยู่กับการ work-up ซึ่งจะทำให้ %yield ของ 49a จะค่อนข้างเปลี่ยนแปลง แต่พบว่าเมื่อให้ vicinal dianion 42a ทำปฏิกิริยากับ benzaldehyde (1 equiv) ที่ $-78^\circ C$ (2 ชม.) แล้ว quench ปฏิกิริยาด้วย glacial acetic acid ที่ $-78^\circ C$ จะได้ adduct 51a ซึ่งจากการตรวจสอบโดย 1H NMR พบว่าจะมี γ -butyrolactone 43a เกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เมื่อนำ crude adduct 51a มาทำปฏิกิริยากับ *p*-toluenesulfonic acid ใน toluene และ reflux 2 ชม. พบว่าจะได้ dihydrofuran 49a (*cis*- และ *trans*-isomers) 71% yield และได้ γ -butyrolactone 43a 13% yield นอกจากนี้พบว่า *cis*-dihydrofuran 49a เป็น major isomer (ดูแผนผังที่ 22) หลังจากที่ได้ conditions ที่ดีที่สุดของการเตรียมสาร dihydrofurans 49a แล้ว ได้ศึกษาปฏิกิริยาของ vicinal dianions 42a, 42b และ 42c กับ aldehydes ตัวอื่นๆ ตามที่ได้รวบรวมสรุปผลการ

แผนผังที่ 22



ทดลองไว้ในตารางที่ 14 ซึ่งพบว่าสามารถเตรียมสาร dihydrofurans **49a-49k** ได้ตั้งแต่ 37-71% yields และ ได้ γ -butyrolactones **43** ตั้งแต่ร้อยละ 15% yield ซึ่งพบว่าผลการทดลองที่ได้เป็นที่น่าสนใจ นอกจากนี้ยังสามารถแยก *cis*-dihydrofurans **49a-c**, **49e-g** และ **49i-k** ได้บริสุทธิ์ ซึ่งจะใช้เป็นสารเริ่มต้นสำหรับการเตรียม tetrasubstituted furans **50** ต่อไป

ตารางที่ 14 การเตรียม 2,3-dihydrofurans **49**

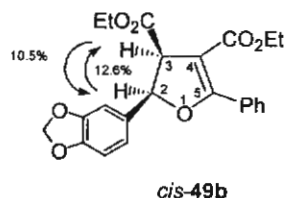
Entry	41	Electrophile	Ar ¹	Ar ²	% Yields ^a				
					49	<i>cis</i> -49	<i>trans</i> -49	<i>cis</i> -49 + <i>trans</i> -49	43 ^b
1	41a	Benzaldehyde	Ph	Ph	49a	59	12	–	13
2	41a	Piperonal	Ph	Piperonyl	49b	41	10	–	5
3	41a	4-Methoxybenzaldehyde	Ph	4-MeOPh	49c	50	13	–	11
4	41a	Isobutyraldehyde	Ph	<i>i</i> -Pr	49d	–	–	63 (66 : 34)	– ^c
5	41b	Benzaldehyde	Piperonyl	Ph	49e	41	7	–	7
6	41b	Piperonal	Piperonyl	Piperonyl	49f	26	–	13 (80 : 20)	8
7	41b	4-Methoxybenzaldehyde	Piperonyl	4-MeOPh	49g	30	–	11 (74 : 26)	10
8	41b	Isobutyraldehyde	Piperonyl	<i>i</i> -Pr	49h	–	–	55 (67 : 33)	– ^c
9	41c	Benzaldehyde	4-MeOPh	Ph	49i	53	– ^c	–	15
10	41c	Piperonal	4-MeOPh	Piperonyl	49j	39	11	–	11
11	41c	4-Methoxybenzaldehyde	4-MeOPh	4-MeOPh	49k	37	– ^c	–	13

^aIsolated yields. All compounds were fully characterized by IR, MS, 300 MHz ¹H and 75 MHz ¹³C NMR spectra as well as elemental analyses or HRMS.

^bContained mainly the 3,4-*trans*-4,5-*cis*-isomer.

^cCould not be isolated.

สำหรับ relative stereochemistry ของ *cis*-49 และ *trans*-49 ดูได้จาก ^1H NMR coupling constant ระหว่าง H-2 และ H-3 โดย $J_{\text{cis}} = 10.9\text{--}11.0\text{ Hz}$ และ $J_{\text{trans}} = 6.8\text{--}7.1\text{ Hz}$ นอกจากนี้ยังได้ confirm โดยทำ NOE experiment กับสาร *cis*-49b ดังแสดงในรูปข้างล่าง



13. การเตรียม tetrasubstituted furan 50

สามารถเตรียม furan 50 จาก *cis*-49 โดยทำปฏิกิริยา dehydrogenation (oxidation) โดยใช้ dichlorodicyanoquinone (DDQ) ใน benzene และ reflux เป็นเวลา 5 ชม. สามารถเตรียมสาร 50a-f ได้ตามที่ได้รวบรวมไว้ในตารางที่ 15



ตารางที่ 15 การเตรียม tetrasubstituted furans 50

<i>cis</i> -49	Ar ¹	Ar ²	% Yields ^a 50
<i>cis</i> -49a	Ph	Ph	50a, 85
<i>cis</i> -49b	Ph	Piperonyl	50b, 95
<i>cis</i> -49c	Ph	4-MeOPh	50c, 90
<i>cis</i> -49e	Piperonyl	Ph	50b, 93
<i>cis</i> -49f	Piperonyl	Piperonyl	50d, 94
<i>cis</i> -49i	4-MeOPh	Ph	50c, 96
<i>cis</i> -49j	4-MeOPh	Piperonyl	50e, 95
<i>cis</i> -49k	4-MeOPh	4-MeOPh	50f, 93

^aIsolated yields. All compounds were fully characterized by IR, MS, 300 MHz ^1H and 75 MHz ^{13}C NMR spectra as well as elemental analyses or HRMS.

^bThe reactions were not performed.

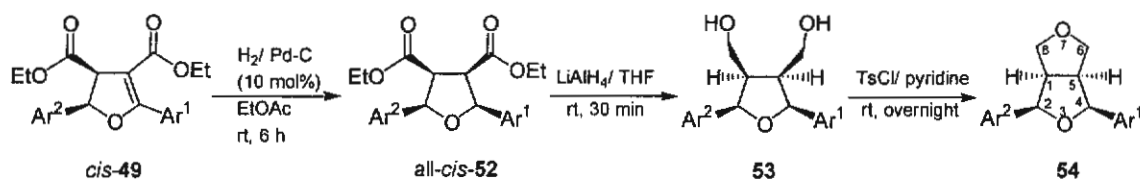
นอกจากนี้ยังพบว่า ปฏิกิริยา oxidation ของ *trans*-49 โดยใช้ DDQ/benzene/reflux (5 ชม.) จะเกิดช้ากว่า *cis*-49 มาก ดังเช่น เมื่อให้ mixture ของ *cis*-49b และ *trans*-49b ทำปฏิกิริยาภายใต้ standard conditions *cis*-49b จะถูก oxidized สมบูรณ์ให้ได้ 50b แต่ *trans*-49b ยังทำปฏิกิริยาไม่หมด แต่อย่างไรก็ตามเมื่อทำปฏิกิริยานานขึ้นเป็น 12 ชม. จะได้สาร 50b ถึง 92%

14. การเตรียมสารประกอบ 2,5-diaryl-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octanes 54

เนื่องจาก tetrahydrofurotetrahydrofuran เป็น nucleus ที่สำคัญของ furofuran natural products หลายตัวซึ่งมีคุณสมบัติทางชีวภาพที่น่าสนใจ เพื่อที่จะแสดงให้เห็นถึงประโยชน์ของ dihydrofurans *cis*-49 ว่าสามารถใช้เป็น intermediate สำหรับการเตรียม tetrahydrofurotetrahydrofuran ประเภท 54 ได้ ดังแสดงในแผนผังที่ 23 เมื่อทำปฏิกิริยา catalytic hydrogenation ของสาร 49 โดยใช้ Pd-C (10 mol%) ใน EtOAc ที่อุณหภูมิห้องเป็น

เวลา 6 ชม. จะได้ all-*cis*-52 ใน % ที่ดีมาก เมื่อนำสาร all-*cis*-52 มาทำปฏิกิริยา reduction โดยใช้ LiAlH_4 ใน THF จะได้ *cis*-diol 53 ซึ่งเกิด cyclodehydration เมื่อได้ทำปฏิกิริยากับ *p*-toluenesulfonyl chloride ใน pyridine ที่อุณหภูมิห้อง จะได้ tetrahydrofurotetrahydrofurans 54 ดังได้รวบรวมผลการทดลองไว้ในตารางที่ 16

แผนผังที่ 23



ตารางที่ 16 การเตรียม tetrahydrofurotetrahydrofurans 54

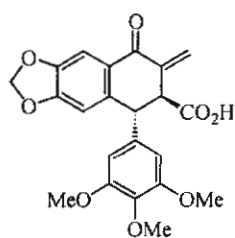
<i>cis</i> -49	Ar^1	Ar^2	% Yields ^a		
			52	53	54
<i>cis</i> -49a	Ph	Ph	52a, 85	53a, 83	54a, 70
<i>cis</i> -49b	Ph	Piperonyl	52b, 86	53b, 89	54b, 82
<i>cis</i> -49c	Ph	4-MeOPh	52c, 88	53c, 82	54c, 75
<i>cis</i> -49e	Piperonyl	Ph	— ^b	— ^b	— ^b
<i>cis</i> -49f	Piperonyl	Piperonyl	52d, 86	53d, 80	54d, 74
<i>cis</i> -49i	4-MeOPh	Ph	— ^b	— ^b	— ^b
<i>cis</i> -49j	4-MeOPh	Piperonyl	52e, 89	53e, 84	54e, 75
<i>cis</i> -49k	4-MeOPh	4-MeOPh	52f, 83	53f, 82	54f, 76

^aIsolated yields. All compounds were fully characterized by IR, MS, 300 MHz ^1H and 75 MHz ^{13}C NMR spectra as well as elemental analyses or HRMS.

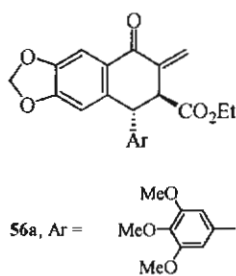
^bThe reactions were not performed.

15. การเตรียม thuriferic acid ethyl ester and analogues (56) และ การเตรียม picropodophyllone (57)

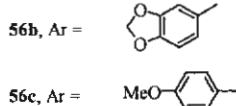
สาร thuriferic acid (55)¹³ เป็นสารประกอบประเภท cyclolignan แยกสารนี้ได้จากใบของ *Juniperus thurifera* มี cytotoxic activity ต่อ cancer cell lines หลายชนิด ส่วน picropodophyllone (56)¹⁴ ใช้เป็นสารเริ่มต้นที่สำคัญสำหรับการเตรียม podophyllotoxin ซึ่งเป็น anti-tumor agent ที่สำคัญ



Thuriferic acid (55)

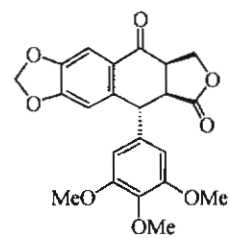


Thuriferic acid ethyl ester



56b, Ar =

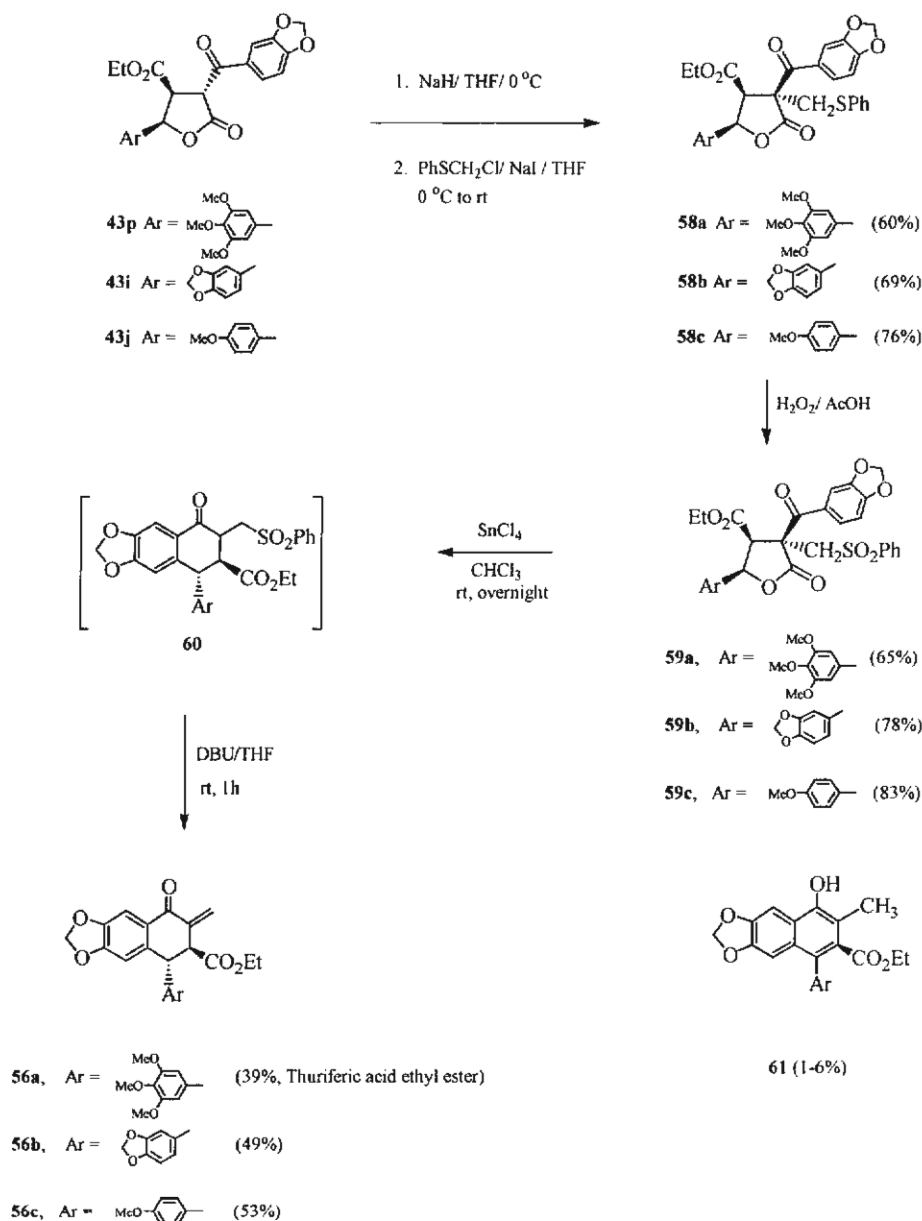
56c, Ar =



picropodophyllone (57)

เนื่องจากเป็นสารที่มีความสำคัญ จึงทำให้เราพยายามเตรียมสารเหล่านี้โดยใช้สารประกอบประเภท α -aroyl- γ -lactone **43** ที่เตรียมได้จากการให้ vicinal dianion **42** ทำปฏิกิริยากับ aromatic aldehyde ตามที่กล่าวมาแล้วเป็นสารเริ่มต้น แผนผังการเตรียม thuriferic acid ethyl ester **56a** เป็นไปตามที่แสดงไว้ในแผนผังที่ 24 โดยเริ่มต้นจาก **43p** (เตรียมได้จาก vicinal dianion **42b** ทำปฏิกิริยากับ 3,4,5-trimethoxybenzaldehyde, 56% yield; เป็น 63:3:25:5 mixture ของ TC:CC:TT:CT isomers; TC-isomer แยกได้โดยการทำให้ crystallisation)

แผนผังที่ 24



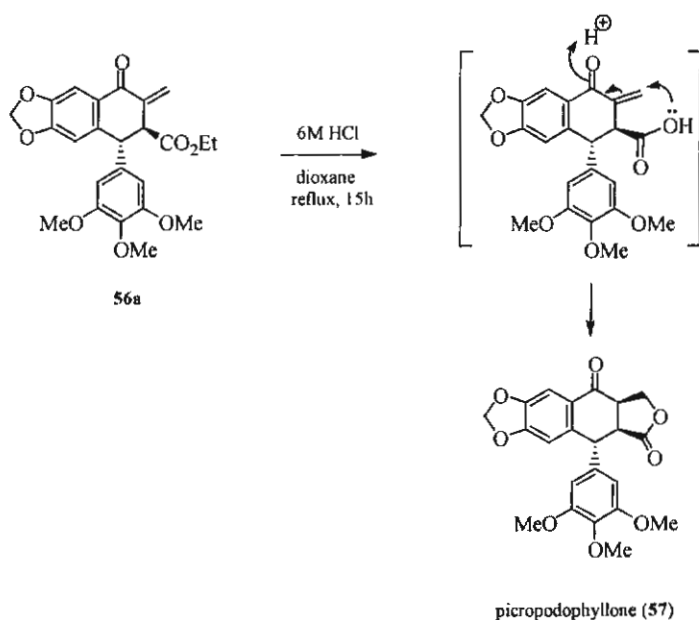
ในขั้นตอนแรกได้ทดลองเตรียมสารประกอบ thuriferic acid ethyl ester **56a** โดยเริ่มต้นจากสาร α -aroyl γ -lactone **43p** พบว่าเมื่อให้สาร **43p** ทำปฏิกิริยากับ PhSCH₂Cl/NaI/NaH ใน THF ที่ 0 °C ถึงอุณหภูมิห้อง (ค้างคืน) จะได้สาร **58a** (60% yield) เมื่อให้ **58a** ทำปฏิกิริยา oxidation โดยใช้ H₂O₂/AcOH ที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารประกอบ sulfone **59a** (65% yield) พิสูจน์ relative stereochemistry ของ **59a** โดย ¹H NMR

และ X-ray crystallography เมื่อนำสารประกอบ 59a มาทำปฏิกิริยากับ SnCl_4 (anh.) ใน CHCl_3 (dry) ที่อุณหภูมิห้อง (ค้างคืน) จะได้ส่วนผสมของสาร 60 ปนกับ 56a ซึ่งไม่ได้ทำการแยก แต่จะทำปฏิกิริยา elimination ของหมู่ phenylsulfonyl โดยใช้ DBU ใน THF ที่อุณหภูมิห้อง จะได้สาร thuriferic acid ethyl ester 56a (39% yield) และสารประกอบประเภท 61a (6% yield) สามารถอธิบายการเกิดสารประกอบ 56a จาก 59a ได้ คือปฏิกิริยาเกิดแบบ intramolecular Friedel-Crafts alkylation ส่วนสาร 61a เกิดจาก base-catalysed isomerization ของสาร 56a

หลังจากเตรียม thuriferic acid ethyl ester 56a สำเร็จ ได้ใช้วิธีการเดียวกันเตรียมสาร 56b และ 56c จากสาร 43i และ สาร 43j ตามลำดับดังได้แสดงผลการทดลองไว้ในแผนผังที่ 24

หลังจากที่สามารถเตรียมสาร 56a ได้แล้ว ได้พยายามที่จะทำปฏิกิริยา hydrolysis ของ ester group ของสาร 56a เพื่อให้ได้สาร thuriferic acid (55) โดยใช้ conditions ต่าง ๆ กัน เช่น $\text{LiOH}/\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$ (อุณหภูมิห้อง), 48% HBr/reflux , 6M HCl/reflux ซึ่งส่วนมากแล้วพบว่าจะได้ complex mixture ของ unidentified products แต่พบว่าเมื่อใช้ 6M $\text{HCl}/\text{dioxane}/\text{reflux}$, 15h สามารถแยกสาร picropodophyllone (57) ได้ถึง 43% yield สาร 57 เป็นสารที่สำคัญมาก เนื่องจากมีผู้ใช้เป็นสารเริ่มต้นที่สำคัญในการเตรียม podophyllotoxin¹⁵ (แผนผังที่ 25)

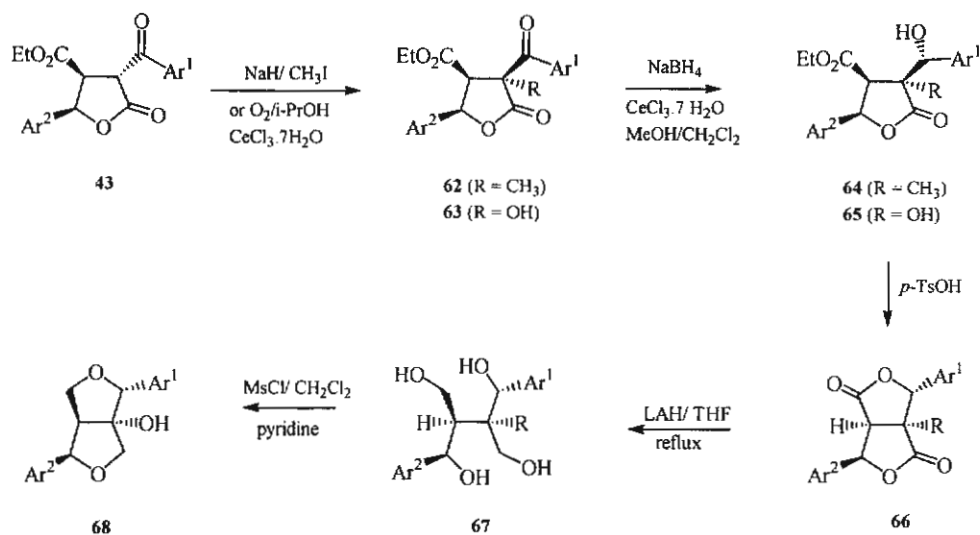
แผนผังที่ 25



16. การเตรียมสารประกอบ furofurans 68 จากสารประกอบ TC- α -aroyl- γ -lactones 43

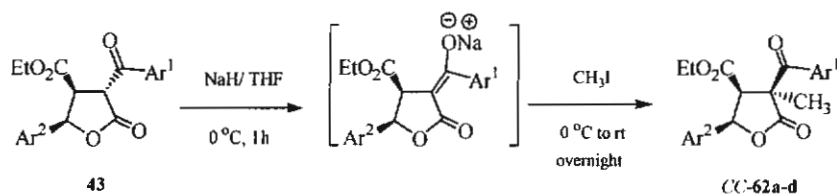
ได้ศึกษาวิธีการเตรียมสารประกอบ furofuran ประเภท 62 ซึ่งเป็น basic skeleton ที่สำคัญใน furofuran natural products หลายตัว โดยเริ่มต้นจาก TC-43 ซึ่งสามารถเตรียมได้โดยให้ vicinal dianion 42 ทำปฏิกิริยากับ aromatic aldehydes ตามที่ได้กล่าวมาแล้ว ดังแสดงไว้ในแผนผังที่ 26

แผนผังที่ 26



ในขั้นแรกได้ศึกษาปฏิกิริยา base-catalysed methylation ของ pure diastereomers TC-43a-d เพื่อเตรียม CC-62a-d โดยให้สาร TC-43a-d ทำปฏิกิริยากับ NaH (1.2 equiv) ใน THF ที่ 0 °C แล้วเติม MeI (2 equiv) ลงไปที่ 0 °C แล้วตั้งทิ้งไว้ค้างคืนโดยให้อุณหภูมิของปฏิกิริยาค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจาก 0 °C ถึงอุณหภูมิห้อง โดยรวบรวมผลการทดลองไว้ในตารางที่ 17

ตารางที่ 17 การเตรียม CC-62a-d

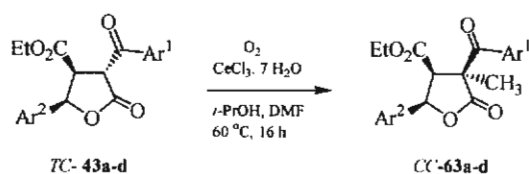


Entry	Products	Ar ¹	Ar ²	% yield ^a of CC-62
1	CC-62a			95
2	CC-62b			77
3	CC-62c			90
4	CC-62d			42

^aisolated yield.

หลังจากนี้ได้ศึกษาปฏิกิริยา hydroxylation ของสาร TC-43a-d โดยให้ทำปฏิกิริยากับ $\text{O}_2/\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ใน $i\text{-PrOH/DMF}$ (1:3) ที่ 60 °C เป็นเวลา 16 ชม. ทำให้สามารถเตรียม CC-63a-d ได้ใน % yield ที่ไม่ค่อยดีจนถึงดี ดังได้รวบรวมไว้ในตารางที่ 18 การที่ได้ CC-63c และ CC-63d ค่อนข้างต่ำอาจจะเป็นเพราะว่าสารเริ่มต้นละลายไม่ค่อยดีใน solvent ที่ใช้ ซึ่งจำเป็นในการ optimized conditions ต่อไป

ตารางที่ 18 Hydroxylation of TC-43a-d

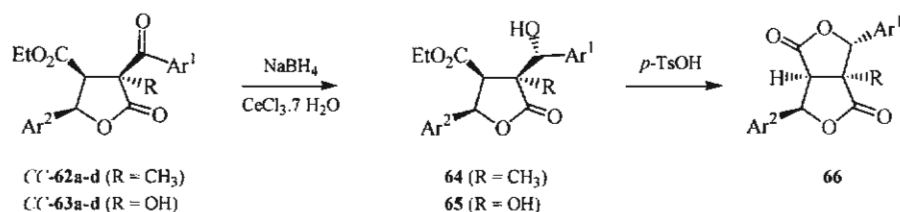


Entry	Products	Ar ¹	Ar ²	% yield ^a of CC-63
1	CC-63a			75
2	CC-63b			71
3	CC-63c			33
4	CC-63d			16

^aisolated yield.

เมื่อเตรียมสาร CC-62a-d และ CC-63a-d ได้แล้วก็ได้นำสารทั้งสองชนิดมาทำปฏิกิริยา reduction โดยใช้ NaBH₄/CeCl₃·7 H₂O ใน MeOH/CH₂Cl₂ ที่ 0 °C (3 ชม.) จะได้สาร 64 และ 65 ซึ่งไม่ได้ทำการแยกสารดังกล่าวออกมา แต่ได้นำไปทำปฏิกิริยา lactonisation ต่อเลย โดยใช้ *p*-TsOH/CH₂Cl₂ ที่อุณหภูมิห้อง (16 ชม.) จะได้สาร 66a-g ดังได้แสดงผลการทดลองไว้ในตารางที่ 19

ตารางที่ 19 การเตรียมสาร bislactones 66a-g



Entry	Products	R	Ar ¹	Ar ²	% yield ^a of 66
1	66a	-CH ₃			70
2	66b	-CH ₃			66
3	66c	-CH ₃			28
4	66d	-CH ₃			21
5	66e	-OH			66
6	66f	-OH			51
7	66g	-OH			43

^aisolated yield.

เมื่อนำสาร bislactone **66a-b** และ **66e-f** มาทำปฏิกิริยา reduction โดยใช้ LiAlH_4 (10 equiv) ใน THF ที่ 60°C เป็นเวลา 5 ชม. จะได้สาร **67a-b** และสาร **67e-f** ดังได้รวบรวมผลการทดลองไว้ในตารางที่ 20 สาร bislactone ที่เตรียมได้จะเป็น single diastereomer ทั้งหมด

ตารางที่ 20 การเตรียม tetraols **67a-b** และ pentaols **67e-f**

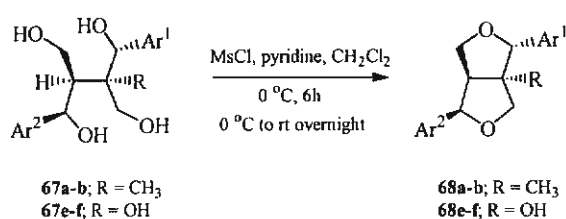


Entry	Products	R	Ar ¹	Ar ²	% yield ^a of 67
1	67a	-CH ₃			55
2	67b	-CH ₃			66
3	67e	-OH			59
4	67f	-OH			60

^aisolated yield.

ในขั้นสุดท้ายที่เตรียมสารประกอบ furofurans **68a-b** และ **68e-f** โดยให้สาร **67a-b** หรือ **67e-f** ทำปฏิกิริยากับ methanesulfonyl chloride ใน pyridine/ CH_2Cl_2 ที่ 0°C 6 ชม. และ 0°C ถึง อุณหภูมิห้อง 10 ชม. ผลการทดลองได้รวบรวมไว้ในตารางที่ 21

ตารางที่ 21 การเตรียมสาร furofurans **68a-b** และ **68e-f**



Entry	Products	R	Ar ¹	Ar ²	% yield ^a of 68
1	68a	-CH ₃			48
2	68b	-CH ₃			47
3	68e	-OH			62
4	68f	-OH			63

^aisolated yield.

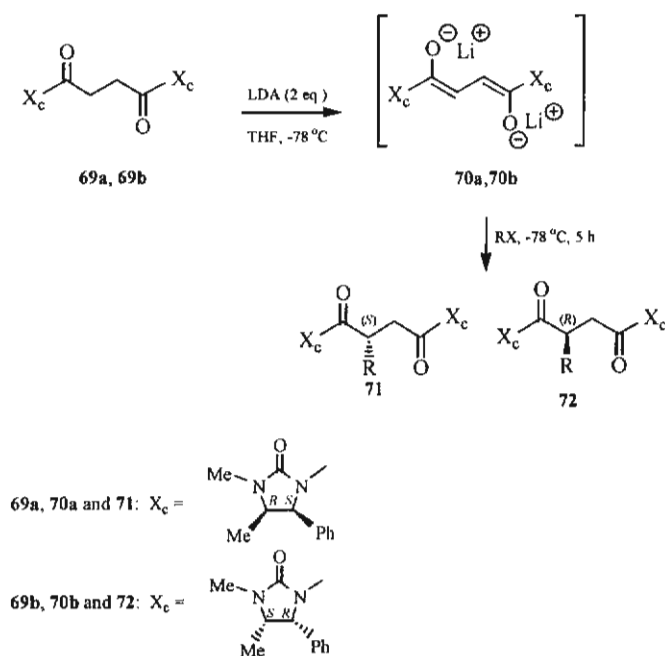
สาร 68f มีชื่อเรียกว่า Gmelinol ซึ่งเป็น natural product ที่แยกได้จาก heartwood ของต้น *Gmelina arborea*¹⁶ ซึ่งมี anti-malarial activity

17. การศึกษาปฏิกิริยาของ vicinal dianions ของ chiral succinic acid derivatives

จากการที่ได้รายงานในช่วงแรกว่าเราสามารถที่จะใช้ vicinal dianions ของ succinic acid derivatives ต่าง ๆ เป็น reagents ที่สำคัญสำหรับการเตรียมสารประเภท γ -butyrolactones ชนิดต่าง ๆ ได้ รวมทั้ง dihydrofurans, tetrasubstituted furans และ furofurans เป็นต้น จึงทำให้เราสนใจที่จะศึกษาปฏิกิริยาของ chiral vicinal dianion ซึ่งเตรียมมาจาก chiral succinic acid derivatives เพื่อใช้เป็นวิธีการเตรียม chiral β -arylmethylated γ -butyrolactones ซึ่งเป็น intermediate ที่สำคัญมากในการทำ asymmetric synthesis ของสารประเภท lignan natural products

ตามที่ได้แสดงไว้ในแผนผังที่ 27 ได้เตรียมสารเริ่มต้น 69a และ 69b โดยให้ (4S,5R)-(+)-1,5-dimethyl-4-phenyl-2-imidazolidinone หรือ (4R,5S)-(-)-1,5-dimethyl-4-phenyl-2-imidazolidinone ทำปฏิกิริยากับ *n*-BuLi/THF/0 °C/30 นาที แล้วเติม succinyl chloride ลงไปที่ 0 °C แล้ว stir ต่อ 1 ชม. จะทำให้สามารถแยกสารเริ่มต้น 69a และ 69b ได้ 65% และ 57% ตามลำดับ

แผนผังที่ 27



Chiral vicinal dianion 70a เตรียมได้โดยให้ 69a ทำปฏิกิริยากับ LDA (2 equiv)/THF ที่ -78°C เป็นเวลา 1 ชม. เมื่อให้ทำปฏิกิริยากับ benzyl bromide 1 equiv ที่ -78°C 5 ชม. จะได้ monobenzylated product 71a 50% yield แล้วได้สารเริ่มต้น 69a คืน 41% yield แต่เมื่อใช้ benzyl bromide 2.2 equiv พบว่า จะได้สาร 71a ถึง 75% yield และพบว่าไม่ว่าจะใช้ 1 หรือ 2.2 equiv ของ benzyl bromide ภายใต้ conditions ดังกล่าวจะได้เพียง monobenzylated product 71a เท่านั้น และเป็น single diastereomer เราสามารถพิสูจน์ absolute configuration ของ stereocenter ที่เกิดขึ้นว่าเป็น (S)-configuration โดยทำปฏิกิริยา hydrolysis ด้วย LiOH/THF/H₂O/reflux จะได้ (S)- α -benzylsuccinic acid ซึ่งเป็นสารที่ known โดยเปรียบเทียบค่า optical

rotation ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน และมีเครื่องหมายเป็น (-) เช่นเดียวกัน vicinal dianion **70a** ทำปฏิกิริยากับ methyl iodide และ allyl bromide จะได้สาร **71b** (48%) และ **71c** (49%) ตามลำดับ

ในทำนองเดียวกัน vicinal dianion **70b** ที่เตรียมได้โดยให้สาร **69b** ทำปฏิกิริยากับ LDA (2 equiv)/THF/-78 °C/1 ชม. ก็สามารถทำปฏิกิริยากับ arylmethyl bromides ต่าง ๆ ได้ product ที่ต้องการใน % yield ที่ค่อนข้างดี และทุกตัวเป็น single diastereomer ดังได้รวบรวมผลการทดลองไว้ในตารางที่ 22

ตารางที่ 22 Alkylation of vicinal dianions **70a** and **70b**

Entry	70	RX	71^b or 72^b , R =	Yield (%) ^a
1	70a	PhCH ₂ Br	71a , PhCH ₂	75
2	70a	MeI	71b , Me	48
3	70a	CH ₂ =CHCH ₂ Br	71c , CH ₂ =CHCH ₂	49
4	70b	3,4-MeOPhCH ₂ Br	72a , 3,4-MeOPhCH ₂	53
5	70b	3-MeOPhCH ₂ Br	72b , 3-MeOPhCH ₂	67
6	70b	3,4-CH ₂ (O) ₂ PhCH ₂ Br	72c , 3,4-CH ₂ (O) ₂ PhCH ₂	67

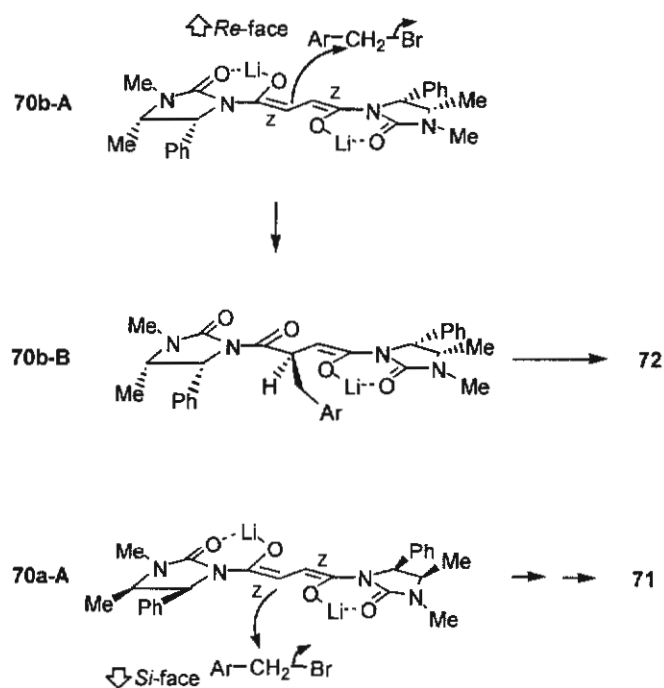
^a Isolated yields. All compounds were fully characterized by ¹H NMR, ¹³C NMR, MS and CHN analyses or HRMS.

^b The specific rotation values, [α]_D²⁸ of **71a-c** and **72a-c** are as follows: **71a**; +127.84° (c 0.51, MeOH); **71b**, +117.45° (c 0.55, CHCl₃); **71c**, +107.50° (c 0.64, CHCl₃); **72a**, -45.02° (c 0.31, CHCl₃); **72b**, -64.57° (c 0.70, CHCl₃); **72c**, +46.85° (c 0.29, CHCl₃).

จะเห็นได้ว่า vicinal dianions **70a** และ **70b** ทำปฏิกิริยากับ alkylating agent เป็นแบบ high diastereoselectivity และ high regioselectivity การที่เป็นแบบนี้สามารถอธิบายโดย transition state **70b-A**, **70b-B** และ **70a-A** ดังแสดงในแผนผังที่ 28 เราเชื่อว่า vicinal dianions **70a** และ **70b** จะอยู่ในรูปของ (Z,Z)-configuration สำหรับ vicinal dianion **70a** alkylating agent จะเข้ามาทางด้าน Si-face (ดู **70a-A**) ส่วน vicinal dianion **70b** alkylating agent จะเข้าทางด้าน Re-face (ดู **70b-A**) หลังจากที่เกิด alkylation ครั้งที่ 1 แล้ว จะไม่สามารถเกิด alkylation ครั้งที่ 2 ได้ เนื่องจากจะมี steric interaction กับ phenyl และ methyl group ของ chiral auxiliary และกับ α-arylmethyl group

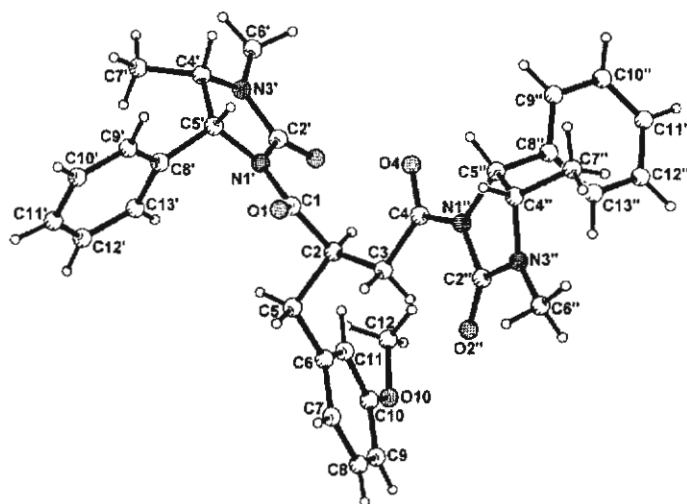
แผนผังที่ 27

Proposed models for the stereochemical course of the alkylation of the vicinal dianions **70a** and **70b**



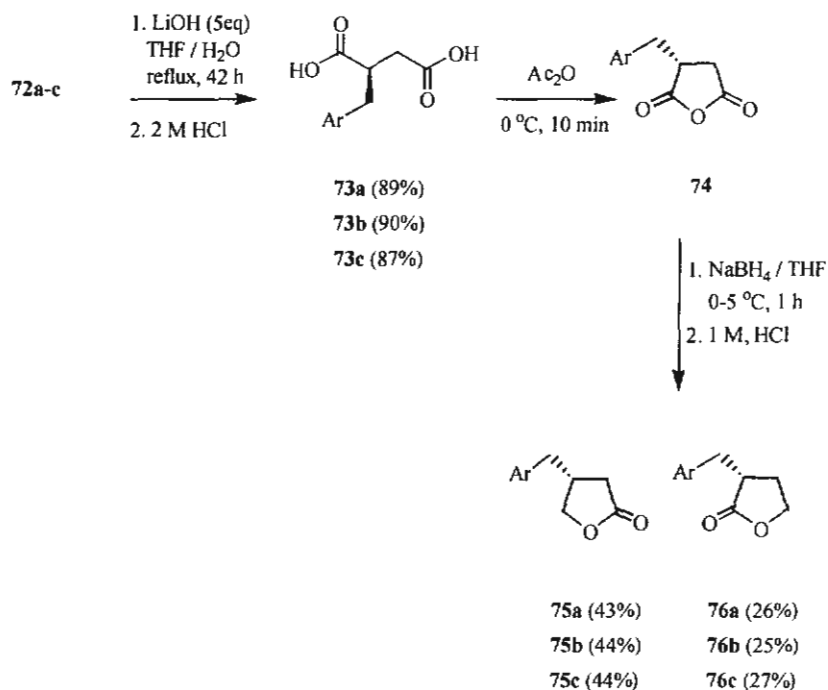
สามารถพิสูจน์ (*R*)-configuration ของ stereocenter ใหม่ของสาร **72b** ได้โดยทำ single crystal X-ray diffraction ดังแสดงในรูปที่ 3

รูปที่ 3



reflux, 42 ชม. จะได้ succinic acid derivatives **73a-c** ใน % yield ที่ดีมาก หลังจากนั้นให้สาร **73** ทำปฏิกิริยากับ acetic anhydride ที่ 0 °C จะให้ succinic anhydride **74** ซึ่งไม่จำเป็นต้อง purify ได้ใช้ทำปฏิกิริยา reduction ต่อเลยโดยใช้ NaBH₄ และ work-up ด้วย 1M HCl จะได้ส่วนผสมของสาร (+)-β-arylmethyl-γ-butyrolactones **75a-c** ที่ต้องการ ปนกับ (-)-α-arylmethyl-γ-butyrolactones **76a-c** ซึ่งสามารถแยกออกจากกันให้บริสุทธิ์ได้โดยง่าย ผลการทดลองได้สรุปไว้ในแผนผังที่ 29

แผนผังที่ 29



งานวิจัยด้านผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

1. การสำรวจและเก็บพืชสกุล *Phyllanthus*

ได้ร่วมมือกับนักพฤกษศาสตร์จากหอพรรณไม้ กรมป่าไม้ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ สืบเสาะหาแหล่งพืชในสกุล *Phyllanthus* จากข้อมูลที่ได้จากฐานข้อมูลที่หอพรรณไม้ กรมป่าไม้ รวมกับข้อมูลที่ค้นได้จากฐานข้อมูล NAPRALERT จึงได้ทำการเก็บพืชในสกุลนี้มาได้ทั้งหมด 18 สปีชีส์ (37 ตัวอย่าง) ดังปรากฏในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 น้ำหนักของส่วนต่าง ๆ และแหล่งเก็บของพืชในสกุล *Phyllanthus* ที่เก็บ

ตัวอย่างที่	ชื่อ genus และ species	ส่วนที่เก็บ	น้ำหนัก (kg)	แหล่งเก็บ
1	<i>P. columnaris</i>	LF+TW	1.3	เชียงใหม่
		ST	1.0	เชียงใหม่
		BK	1.3	เชียงใหม่
2	<i>P. milabile</i>	LF+TW	1.3	เชียงใหม่
		ST	1.1	เชียงใหม่
		BK	0.6	เชียงใหม่
3	<i>P. sootepensis</i>	PX	1.2	เชียงใหม่
4	<i>P. roseus</i>	LF+TW	0.6	เชียงใหม่
		ST	0.7	เชียงใหม่
5	<i>P. collinsae</i>	LF+TW	0.8	อุบลราชธานี
		ST	0.65	อุบลราชธานี
6	<i>P. taxodiifolius</i>	PX (ครั้งที่ 1)	1.7	อำนาจเจริญ
		PX (ครั้งที่ 2)	14.3	อำนาจเจริญ
		RT (ครั้งที่ 3)	1.7	อำนาจเจริญ
		RT (ครั้งที่ 4)	4.0	อำนาจเจริญ
7	<i>P. winittii</i>	PX	0.4	เชียงใหม่
8	<i>P. hullettii</i>	PX (ครั้งที่ 1)	0.5	เลย
		PX (ครั้งที่ 2)	2.3	เลย
		PX (ครั้งที่ 3)	18.3	เลย
9	<i>P. pulcher</i>	LF+TW	1.1	สกลนคร
		ST	0.8	สกลนคร
10	<i>P. sikkimensis</i>	PX (ครั้งที่ 1)	0.5	สุราษฎร์ธานี
		PX (ครั้งที่ 2)	10.2	สุราษฎร์ธานี
11	<i>P. albidiscus</i>	LF+TW (ครั้งที่ 1)	1.1	นครศรีธรรมราช
		LF+TW (ครั้งที่ 2)	3.7	นครศรีธรรมราช
		ST (ครั้งที่ 1)	0.7	นครศรีธรรมราช
		ST (ครั้งที่ 2)	3.35	นครศรีธรรมราช

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ชื่อ genus และ species	ส่วนที่เก็บ	น้ำหนัก (kg)	แหล่งเก็บ
12	<i>P. pachyphyllus</i>	LF+TW	1.5	ระนอง
		ST	1.0	ระนอง
13	<i>P. oxyphyllus</i>	PX	1.1	ตรัง
14	<i>P. geoffrayi</i>	LF+TW	1.2	สกลนคร
		ST	1.0	สกลนคร
15	<i>P. exyphyllus</i>	PX	1.1	นครราชสีมา
16	<i>P. acutissima</i>	PX	1.2	ขอนแก่น
	<i>P. acutissima</i>	PX	8.6	ขอนแก่น
17	<i>P. chamaepeuce</i>	PX	2.4	ชัยภูมิ
18	<i>P. gracilipes</i>	PX	1.4	ชัยภูมิ

LF+TW = leaves+twigs; ST = stems; BK = bark; PX = whole plant

2. การสกัดด้วยการแช่ในเมทานอลเพื่อ screen หา cytotoxic activity ในขั้นต้น

ในขั้นต้นได้ทำการสกัดพืชตัวอย่างด้วยการแช่ในเมทานอลตามขั้นตอนดังนี้

1. บดตัวอย่างพืชแต่ละตัวอย่างให้ละเอียด ในกรณีที่เป็น stems และ roots ต้องหั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ก่อนบด
2. บรรจุตัวอย่างพืชที่บดแล้วลงในถุงผ้า แล้วนำไปใส่ในถังสแตนเลสที่มีก๊อกสำหรับไขออก แล้วเติมเมทานอล
3. ไขสารละลายออกทุก ๆ 5-8 วัน ทำเช่นนี้จนกระทั่งสีของสารละลายจางมากที่สุดจึงเลิกแช่สกัด โดยเฉลี่ยจะแช่สกัดด้วยเมทานอล 5-6 ครั้ง ทั้งนี้แล้วแต่ว่าแต่ละครั้งจะได้สารออกมามากหรือน้อย ถ้าได้น้อยก็จะหยุดการแช่
4. สารละลายที่ไขออกทุก ๆ 5-8 วัน ให้เก็บรวมกันเป็นส่วนสกัดเมทานอล จากนั้นจึงนำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator เสร็จแล้วให้นำไปกำจัดตัวทำละลายขั้นสุดท้ายด้วย liophilizer อีกทีหนึ่ง
5. ชั่งน้ำหนักส่วนสกัดที่ได้จากพืชตัวอย่างต่าง ๆ ได้ผลการสกัดดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาณของส่วนสกัดจากตัวอย่างพืชต่าง ๆ และเวลาที่ใช้ในการสกัด

ชื่อ genus และ species	ส่วนของพืช	เวลาที่แช่สกัด เฉลี่ย(ครั้ง x วัน)	น้ำหนักแห้งที่บด ละเอียด (kg)	น้ำหนักที่สกัดได้ จาก MeOH (g)
1. <i>P. columnaris</i>	LF+TW	5 x 5	1.3	192.8
	ST	5 x 5	1.0	55.9
	BK	5 x 5	1.3	107.9
2. <i>P. milabile</i>	LF+TW	6 x 5	1.3	84.7
	ST	5 x 5	1.1	47.7
	BK	6 x 8	0.6	111.4
3. <i>P. sootepense</i>	PX	5 x 6	1.2	86.3
4. <i>P. roseus</i>	LF+TW	5 x 7	0.6	73.4
	ST	5 x 7	0.7	39.0
5. <i>P. collinsae</i>	LF+TW	5 x 8	0.8	117.3
	ST	5 x 8	0.65	25.4
6. <i>P. taxodiifolius</i>	PX (ครั้งที่ 1)	6 x 5	1.7	83.4
	PX (ครั้งที่ 2)	6 x 6	14.3	834.9
	RT (ครั้งที่ 3)	5 x 6	1.7	104.53
7. <i>P. winittii</i>	PX	6 x 5	0.4	58.8
8. <i>P. hullettii</i>	PX	6 x 7	0.5	37.3
9. <i>P. pulcher</i>	LF+TW	6 x 7	1.1	100.9
	ST	6 x 7	0.8	43.7
10. <i>P. sikkimensis</i>	PX	5 x 7	0.5	36.4
11. <i>P. albidiscus</i>	LF+TW	5 x 6	1.1	181.7
	ST	4 x 6	0.7	34.9
12. <i>P. pachyphyllus</i>	LF+TW	5 x 6	1.5	238.6
	ST	5 x 8	1.0	21.8
13. <i>P. oxyphyllus</i>	PX	5 x 6	1.1	54.9
14. <i>P. geoffrayi</i>	LF+TW	5 x 6	1.2	204.7
	ST	5 x 7	1.0	110.0
15. <i>P. exyphyllus</i>	PX	5 x 6	1.1	106.30
16. <i>P. acutissima</i>	PX (ครั้งที่ 1)	5 x 6	1.2	63.73
17. <i>P. chamaepeuce</i>	PX	5 x 6	2.4	296.97
18. <i>P. gracilipes</i>	PX	5 x 6	1.4	102.99

3. การทดสอบ cytotoxic activity ของส่วนสกัดต่าง ๆ ที่ได้จากการแช่ในเมทานอลอย่างเดียว

ได้จัดให้มีการทดสอบ cytotoxic activity โดยได้ส่งให้ทางกลุ่มของ รศ.ดร.สมัยศึก โสภาสรรค์ ภาควิชา สรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ส่วนที่เหลือได้เก็บไว้ทำการแยกทางเคมีและพิสูจน์โครงสร้าง ผลการทดสอบ cytotoxic activity เป็นไปตามที่แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผล cytotoxic activity จากส่วนสกัดเมทานอลของ *Phyllanthus* สปีชีส์ต่าง ๆ

ชื่อ genus และ species	ส่วนของพืช	EC ₅₀ (µg/mL)					
		Cell Line					
		P-388	KB	Col-2	BCA-1	Lu-1	ASK
1. <i>P. columnaris</i>	LF+TW	<4	>20	>20	>20	>20	-
	ST	>20	>20	>20	>20	>20	-
	BK	>20	>20	>20	>20	>20	-
2. <i>P. milabile</i>	LF+TW	>20	>20	>20	>20	>20	-
	ST	>20	>20	>20	>20	>20	-
	BK	>20	>20	>20	>20	>20	-
3. <i>P. sootepense</i>	PX	>20	>20	15.27	>20	>20	-
4. <i>P. roseus</i>	LF+TW	>20	>20	>20	>20	>20	-
	ST	>20	>20	>20	>20	>20	-
5. <i>P. collinsae</i>	LF+TW	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	ST	>20	>20	>20	>20	14.57	>20
6. <i>P. taxodiifolius</i>	PX (ครั้งที่ 1)	13.03	<4	9.36	<4	<4	11.82
	PX (ครั้งที่ 2)	11.05	<4	<4	<4	<4	9.45
	RT (ครั้งที่ 3)	16.52	<4	13.21	<4	1.0	-
7. <i>P. winitii</i>	PX	>20	>20	>20	>20	>20	>20
8. <i>P. hullettii</i>	PX	13.98	>20	>20	>20	14.79	11.54
9. <i>P. pulcher</i>	LF+TW	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	ST	>20	>20	>20	-	>20	>20
10. <i>P. sikkimensis</i>	PX	<4	>20	2.44	>20	>20	<4
11. <i>P. albidiscus</i>	LF+TW	>20	>20	>20	>20	>20	16.78
	ST	>20	>20	>20	>20	>20	>20
12. <i>P. pachyphyllus</i>	LF+TW	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	ST	>20	>20	>20	>20	>20	>20
13. <i>P. oxyphyllus</i>	PX	13.38	>20	12.61	>20	>20	>20
14. <i>P. geoffrayi</i>	LF+TW	>20	>20	-	>20	>20	>20
	ST	>20	12.11	19.34	>20	17.57	>20
15. <i>P. exyphyllus</i>	PX	14.07	>20	>20	>20	>20	-
16. <i>P. acutissima</i>	PX	<4	<4	<4	<4	>20	-
17. <i>P. chamaepeuce</i>	PX	>20	>20	>20	>20	>20	-
18. <i>P. gracilipes</i>	PX	15.7	>20	>20	>20	>20	-

หมายเหตุ คำ EC₅₀ ≤ 20 µg/mL จึงถือว่าแสดง activity, - = ยังไม่ได้ผลการทดสอบ

P-388: murine lymphocytic leukemia, KB: human nasopharyngeal carcinoma, COL-2: human colon cancer, BCA-1: human breast cancer, Lu-1: human lung cancer, ASK: rat glioma

จากผลการทดสอบในตารางที่ 3 จะเห็นได้ว่า มี *Phyllanthus* อยู่ 3 สปีชีส์ ที่มีผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์ดี มาก เพราะส่วนสกัดเมทานอลของทั้ง 3 สปีชีส์แสดง cytotoxic activity ด้วยค่า $EC_{50} < 4 \mu\text{g/ml}$ ใน 3-4 cell lines กล่าวคือ

ส่วนสกัดเมทานอลของ *P. taxodiifolius* (PX) แสดง cytotoxic activity ใน KB, BCA-1 และ Lu-1 cell lines ด้วยค่า $EC_{50} < 4 \mu\text{g/ml}$

ส่วนสกัดเมทานอลของ *P. sikkimensis* (PX) แสดง cytotoxic activity ใน P-388, Col-2 และ ASK cell lines ด้วยค่า $EC_{50} < 4 \mu\text{g/ml}$

ส่วนสกัดเมทานอลของ *P. acutissima* (PX) แสดง cytotoxic activity ใน P-388, KB, Col-2 และ BCA-1 cell lines ด้วยค่า $EC_{50} < 4 \mu\text{g/ml}$

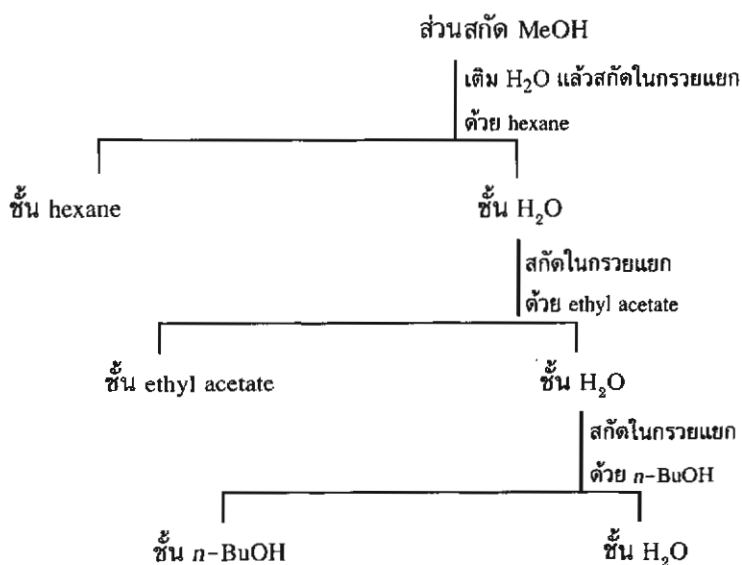
ด้วยเหตุนี้พืชทั้ง 3 สปีชีส์นี้จึงได้รับความสนใจจากกลุ่มของเรา และได้รับคัดเลือกที่จะศึกษาทางเคมีต่อไป ในระดับลึก ส่วน *P. columnaris* (LF+TW) นั้นมี cytotoxic activity < 4 เพียงใน P-388 เท่านั้น จึงไม่ได้เลือกศึกษาต่อ

เนื่องจาก cytotoxic activity ระดับปานกลางมีปรากฏอยู่บ้างในส่วนสกัดเมทานอลของ *Phyllanthus* สปีชีส์อื่นนอกเหนือจาก 3 สปีชีส์นี้ด้วย ดังนั้นจึงได้นำส่วนสกัดเมทานอลของ *Phyllanthus* ทุก ๆ สปีชีส์ที่เก็บมาได้มาทำการสกัดแยกด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำกว่าเมทานอล เพื่อแยกส่วนแล้วทำการทดสอบ cytotoxic activity อีก ทั้งนี้เพื่อให้แน่ใจว่าเมื่อสกัดแยกเป็นส่วนย่อยแล้วนั้น activity ยังคงมีอยู่ในส่วนสกัดย่อยหรือไม่ และในบางครั้งแม้ว่า activity จะไม่ปรากฏให้เห็นในส่วนสกัดเมทานอลก็ตาม เมื่อสกัดแยกเป็นส่วนสกัดย่อยแล้ว activity อาจมาปรากฏให้เห็นในส่วนสกัดย่อยก็ได้ ทั้งนี้เนื่องจากเชื่อว่า สารที่ active อาจถูกกลบด้วยสารอื่นๆ ที่ไม่ active ที่มีอยู่เป็นปริมาณมากกว่าก็ได้

4. การ partition เพื่อให้ได้ส่วนสกัดที่มีขั้วแตกต่างกัน และการทดสอบ cytotoxic activity

ได้ทำการแยกส่วนสกัดเมทานอลต่อไปในกรวยแยกเพื่อให้ได้ส่วนสกัดที่มีขั้วแตกต่างกัน และได้นำไปทดสอบ cytotoxic activity อีก ขั้นตอนการสกัดแยกเป็นดังแสดงในแผนผังที่ 1

แผนผังที่ 1



นำชั้นต่าง ๆ ที่สกัดได้ไประเหยแห้งโดยเครื่อง rotary evaporator ทำให้แห้งด้วย liophilizer อีกทีหนึ่ง แล้วจึงชั่งน้ำหนักและบันทึกผลการสกัด ซึ่งผลของการแยกสกัดในกรวยแยกแสดงไว้ในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ปริมาณของส่วนสกัดจากการสกัดแยกในกรวยแยกของ *Phyllanthus* สปีชีส์ต่าง ๆ

ชื่อ genus และ species	ส่วนของพืช	ส่วนสกัด	น้ำหนักที่ได้ (g)
1. <i>P. columnaris</i>	LF+TW	Hexane	43.98
	LF+TW	EtOAc	31.08
	LF+TW	<i>n</i> -BuOH	51.46
	LF+TW	H ₂ O	69.18
	ST	Hexane	*
	ST	EtOAc	5.96
	ST	<i>n</i> -BuOH	8.11
	ST	H ₂ O	43.94
	BK	Hexane	*
	BK	EtOAc	23.87
	BK	<i>n</i> -BuOH	21.31
	BK	H ₂ O	61.19
2. <i>P. milabile</i>	LF+TW	Hexane	26.28
	LF+TW	EtOAc	9.02
	LF+TW	<i>n</i> -BuOH	15.21
	LF+TW	H ₂ O	37.97
	ST	Hexane	2.61
	ST	EtOAc	2.34
	ST	<i>n</i> -BuOH	7.22
	ST	H ₂ O	39.23
	BK	Hexane	*
	BK	EtOAc	20.13
	BK	<i>n</i> -BuOH	19.61
	BK	H ₂ O	65.36
3. <i>P. sootepense</i>	PX	Hexane	22.99
	PX	EtOAc	7.02
	PX	<i>n</i> -BuOH	14.05
	PX	H ₂ O	44.66
4. <i>P. roseus</i>	LF+TW	Hexane	8.66
	LF+TW	EtOAc	16.08
	LF+TW	<i>n</i> -BuOH	27.15
	LF+TW	H ₂ O	20.15
	ST	Hexane	1.67
	ST	EtOAc	3.67
	ST	<i>n</i> -BuOH	9.42
	ST	H ₂ O	23.73

*ไม่สามารถสกัดแยกได้ด้วย Hexane เนื่องจากไม่ละลาย

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ชื่อ genus และ species	ส่วนของพืช	ส่วนสกัด	น้ำหนักที่ได้ (g)
5. <i>P. collinsae</i>	LF+TW	Hexane	17.15
	LF+TW	EtOAc	19.82
	LF+TW	<i>n</i> -BuOH	38.18
	LF+TW	H ₂ O	36.87
	ST	Hexane	0.51
	ST	EtOAc	1.33
	ST	<i>n</i> -BuOH	3.16
	ST	H ₂ O	17.91
6. <i>P. taxodiifolius</i>	LF+TW	Hexane	11.40
	LF+TW	EtOAc	15.63
	LF+TW	<i>n</i> -BuOH	3.85
	LF+TW	H ₂ O	38.04
	ST	Hexane	230.05
	ST	EtOAc	158.80
	ST	<i>n</i> -BuOH	140.06
	ST	H ₂ O	282.74
6. <i>P. taxodiifolius</i>	PX (ครั้งที่ 1)	Hexane	11.40
	PX	EtOAc	15.63
	PX	<i>n</i> -BuOH	3.85
	PX	H ₂ O	38.04
	PX (ครั้งที่ 2)	Hexane	230.05
	PX	EtOAc	158.80
	PX	<i>n</i> -BuOH	140.06
	PX	H ₂ O	282.74
	RT (ครั้งที่ 3)	Hexane	6.03
	RT	EtOAc	7.06
	RT	<i>n</i> -BuOH	13.79
	RT	H ₂ O	45.39
7. <i>P. winitii</i>	PX	Hexane	3.31
	PX	EtOAc	11.02
	PX	<i>n</i> -BuOH	20.40
	PX	H ₂ O	15.42
8. <i>P. hullettii</i>	PX	Hexane	3.19
	PX	EtOAc	2.84
	PX	<i>n</i> -BuOH	7.54
	PX	H ₂ O	27.63
9. <i>P. pulcher</i>	LF+TW	Hexane	30.25
	LF+TW	EtOAc	10.76
	LF+TW	<i>n</i> -BuOH	21.46
	LF+TW	H ₂ O	35.63
	ST	Hexane	1.23
	ST	EtOAc	3.05
	ST	<i>n</i> -BuOH	10.26
	ST	H ₂ O	27.30

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ชื่อ genus และ species	ส่วนของพืช	ส่วนสกัด	น้ำหนักที่ได้ (g)
10. <i>P. sikkimensis</i>	PX	Hexane	5.81
	PX	EtOAc	6.31
	PX	<i>n</i> -BuOH	7.26
	PX	H ₂ O	16.49
11. <i>P. albidiscus</i>	LF+TW	Hexane	23.75
	LF+TW	EtOAc	24.14
	LF+TW	<i>n</i> -BuOH	57.46
	LF+TW	H ₂ O	64.57
	ST	Hexane	2.36
	ST	EtOAc	4.06
	ST	<i>n</i> -BuOH	8.34
	ST	H ₂ O	18.45
12. <i>P. pachyphyllus</i>	LF+TW	Hexane	35.13
	LF+TW	EtOAc	29.64
	LF+TW	<i>n</i> -BuOH	45.41
	LF+TW	H ₂ O	103.16
	ST	Hexane	3.71
	ST	EtOAc	4.09
	ST	<i>n</i> -BuOH	3.96
	ST	H ₂ O	7.35
13. <i>P. oxyphyllus</i>	PX	Hexane	20.75
	PX	EtOAc	4.47
	PX	<i>n</i> -BuOH	12.34
	PX	H ₂ O	12.11
14. <i>P. geoffrayi</i>	LF+TW	Hexane	2.07
	LF+TW	EtOAc	34.47
	LF+TW	<i>n</i> -BuOH	37.05
	LF+TW	H ₂ O	215.19
14. <i>P. geoffrayi</i>	ST	Hexane	1.06
	ST	EtOAc	14.23
	ST	<i>n</i> -BuOH	60.55
	ST	H ₂ O	39.60
15. <i>P. exyphyllus</i>	PX	Hexane	10.43
	PX	EtOAc	8.46
	PX	<i>n</i> -BuOH	20.98
	PX	H ₂ O	63.39
	PX (ครั้งที่ 1)	Hexane	6.57
16. <i>P. acutissima</i>	PX	EtOAc	25.43
	PX	<i>n</i> -BuOH	13.87
	PX	H ₂ O	14.83
17. <i>P. chamaepeuce</i>	PX	Hexane	28.07
	PX	EtOAc	37.63
	PX	<i>n</i> -BuOH	51.96
	PX	H ₂ O	175.48

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ชื่อ genus และ species	ส่วนของพืช	ส่วนสกัด	น้ำหนักที่ได้ (g)
18. <i>P. gracilipes</i>	PX	Hexane	13.95
	PX	EtOAc	11.15
	PX	<i>n</i> -BuOH	9.16
	PX	H ₂ O	62.15

5. การสกัดตามลำดับความมีขั้วของตัวทำละลาย (sequential extraction)

เนื่องจากมีตัวอย่างพืชบางสปีชีส์ที่ประกอบด้วยสารที่มีขั้วสูง จึงทำการสกัดแบบ partition ได้ไม่ดี ดังนั้นจึงแช่ในตัวทำละลายตามลำดับความมีขั้ว ผลการสกัดแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการสกัดตามลำดับความมีขั้วของตัวทำละลาย (sequential extraction)

ชื่อ genus และ species	น้ำหนักแห้งที่บดละเอียด (kg)	ส่วนของพืช	ส่วนสกัด	เวลาที่แช่สกัดเฉลี่ย (ครั้ง x วัน)	น้ำหนักที่ได้ (g)
6. <i>P. taxodiifolius</i>	4.0	RT (ครั้งที่ 4)	Hexane	7 x 5	75.37
		RT (ครั้งที่ 4)	EtOAc	7 x 6	126.80
		RT (ครั้งที่ 4)	MeOH	7 x 6	145.72
8. <i>P. hullettii</i> ^a	2.3	PX (ครั้งที่ 2)	Hexane	5 x 5	11.0
		PX (ครั้งที่ 2)	EtOAc	5 x 5	24.37
		PX (ครั้งที่ 2)	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (1:1)	5 x 7	322.82
		PX (ครั้งที่ 2)	MeOH	5 x 5	44.22
10. <i>P. sikkimensis</i>	10.2	PX (ครั้งที่ 2)	Hexane	5 x 6	52.03
		PX (ครั้งที่ 2)	EtOAc	5 x 6	124.13
		PX (ครั้งที่ 2)	MeOH	5 x 7	694.59
11. <i>P. albidiscus</i> ^b	3.7	LF+TW (ครั้งที่ 2)	Hexane	5 x 5	86.26
		LF+TW (ครั้งที่ 2)	EtOAc	5 x 5	59.12
		LF+TW (ครั้งที่ 2)	Acetone	5 x 5	161.66
		LF+TW (ครั้งที่ 2)	MeOH	5 x 5	155.30
	3.35	ST (ครั้งที่ 2)	Hexane	**	**
		ST (ครั้งที่ 2)	EtOAc	5 x 7	23.19
		ST (ครั้งที่ 2)	Acetone	5 x 8	51.89
		ST (ครั้งที่ 2)	MeOH	5 x 10	94.61
16. <i>P. acutissima</i>	8.6	PX (ครั้งที่ 2)	Hexane	5 x 5	103.20
		PX (ครั้งที่ 2)	EtOAc	7 x 5	104.56
		PX (ครั้งที่ 2)	MeOH	6 x 7	442.96

** ไม่สามารถสกัดแยกได้ด้วย Hexane เนื่องจากไม่ละลาย

^a เก็บซ้ำ เพราะหลังจาก partition เป็น fractions ย่อยแล้ว พบว่ามี cytotoxic activity ในหลาย cell lines

^b มี anti-HIV activity อยู่ในเกณฑ์ดี จึงได้ทำการเก็บซ้ำอีก 2 ครั้งเพื่อศึกษาทางเคมีด้วย

ได้จัดทำมีการทดสอบ cytotoxic activity ของส่วนสกัดย่อยต่าง ๆ ซึ่งได้ผลการทดสอบตามที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบ cytotoxic activity ของส่วนสกัดย่อยต่าง ๆ ของ *Phyllanthus* สปีชีส์ต่าง ๆ

ชื่อ genus และ species	ส่วนของพืช	ส่วนสกัด	EC ₅₀ (μg/mL)					
			Cell Line					
			P-388	KB	Col-2	BCA-1	Lu-1	ASK
1. <i>P. columnaris</i>	LF+TW	Hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	LF+TW	EtOAc	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	LF+TW	<i>n</i> -BuOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	LF+TW	H ₂ O	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	ST	Hexane	**	**	**	**	**	**
	ST	EtOAc	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	ST	<i>n</i> -BuOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	ST	H ₂ O	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	BK	Hexane	**	**	**	**	**	**
	BK	EtOAc	>20	>20	>20	>20	>20	-
	BK	<i>n</i> -BuOH	>20	>20	>20	>20	>20	-
	BK	H ₂ O	>20	>20	>20	>20	>20	-
2. <i>P. milabile</i>	LF+TW	Hexane	17.44	>20	>20	>20	>20	>20
	LF+TW	EtOAc	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	LF+TW	<i>n</i> -BuOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	LF+TW	H ₂ O	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	ST	Hexane	>20	>20	>20	>20	>20	-
	ST	EtOAc	>20	>20	>20	>20	>20	-
	ST	<i>n</i> -BuOH	>20	>20	>20	>20	>20	-
	ST	H ₂ O	>20	>20	>20	>20	>20	-
	BK	Hexane	**	**	**	**	**	**
	BK	EtOAc	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	BK	<i>n</i> -BuOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	BK	H ₂ O	>20	>20	>20	>20	>20	>20
3. <i>P. sootepense</i>	PX	Hexane	>20	>20	>20	18.19	>20	-
	PX	EtOAc	>20	>20	>20	>20	>20	-
	PX	<i>n</i> -BuOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	PX	H ₂ O	>20	>20	>20	>20	>20	>20

**ไม่สามารถสกัดแยกได้ด้วย Hexane เนื่องจากไม่ละลาย จึงไม่มีผลการทดสอบ

หมายเหตุ ค่า EC₅₀ ≤ 20 μg/mL จึงถือว่าแสดง activity, - = ยังไม่ได้ผลการทดสอบ

P-388: murine lymphocytic leukemia, KB: human nasopharyngeal carcinoma, COL-2: human colon cancer, BCA-1: human breast cancer, Lu-1: human lung cancer, ASK: rat glioma

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ชื่อ genus และ species	ส่วนของ พืช	ส่วนสกัด	EC ₅₀ (μg/mL)					
			Cell Line					
			P-388	KB	Col-2	BCA-1	Lu-1	ASK
4. <i>P. roseus</i>	LF+TW	Hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	LF+TW	EtOAc	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	LF+TW	<i>n</i> -BuOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	LF+TW	H ₂ O	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	ST	Hexane	>20	>20	>20	>20	>20	-
	ST	EtOAc	>20	>20	>20	>20	>20	-
	ST	<i>n</i> -BuOH	>20	>20	>20	>20	>20	-
	ST	H ₂ O	>20	>20	>20	>20	>20	-
5. <i>P. collinsae</i>	LF+TW	Hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	LF+TW	EtOAc	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	LF+TW	<i>n</i> -BuOH	>20	>20	>20	12.05	18.66	>20
	LF+TW	H ₂ O	>20	>20	>20	13.08	>20	>20
	ST	Hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	ST	EtOAc	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	ST	<i>n</i> -BuOH	>20	>20	>20	>20	11.90	>20
	ST	H ₂ O	>20	>20	>20	>20	>20	>20
6. <i>P. taxodiifolius</i>	PX (ครั้งที่ 1)	Hexane	7.28	<4	5.25	<4	<4	>20
	PX (ครั้งที่ 1)	EtOAc	<4	<4	<4	<4	<4	<4
	PX (ครั้งที่ 1)	<i>n</i> -BuOH	>20	7.94	>20	0.71	8.53	-
	PX (ครั้งที่ 1)	H ₂ O	>20	>20	>20	>20	>20	-
	PX (ครั้งที่ 2)	Hexane	15.78	<4	<4	<4	<4	>20
	PX (ครั้งที่ 2)	EtOAc	<4	<4	<4	<4	<4	<4
	PX (ครั้งที่ 2)	<i>n</i> -BuOH	>20	0.09	12.45	4.88	12.26	>20
	PX (ครั้งที่ 2)	H ₂ O	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	RT (ครั้งที่ 3)	Hexane	<4	11.65	7.72	<4	3.89	16.55
	RT (ครั้งที่ 3)	EtOAc	<4	<4	<4	<4	<4	19.17
	RT (ครั้งที่ 3)	<i>n</i> -BuOH	>20	16.92	>20	>20	12.0	>20
	RT (ครั้งที่ 3)	H ₂ O	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	RT (ครั้งที่ 4)*	Hexane	7.98	<4	-	10.27	-	15.38
	RT (ครั้งที่ 4)*	EtOAc	-	-	-	-	-	-
	RT (ครั้งที่ 4)*	MeOH	-	-	-	-	-	-

* ทำการสกัดด้วยวิธี sequential extraction

หมายเหตุ ค่า EC₅₀ ≤ 20 μg/mL จึงถือว่าแสดง activity, - = ยังไม่ได้ผลการทดสอบ

P-388: murine lymphocytic leukemia, KB: human nasopharyngeal carcinoma, COL-2: human colon cancer, BCA-1: human breast cancer, Lu-1: human lung cancer, ASK: rat glioma

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ชื่อ genus และ species	ส่วนของพืช	ส่วนสกัด	EC ₅₀ (µg/mL)					
			Cell Line					
			P-388	KB	Col-2	BCA-1	Lu-1	ASK
7. <i>P. winitii</i>	PX	Hexane	12.12	19.95	>20	>20	>20	-
	PX	EtOAc	17.36	>20	>20	>20	>20	-
	PX	<i>n</i> -BuOH	>20	>20	>20	>20	>20	-
	PX	H ₂ O	>20	>20	>20	>20	>20	-
8. <i>P. hulletii</i>	PX (ครั้งที่ 1)	Hexane	<4	>20	>20	>20	14.96	-
	PX (ครั้งที่ 1)	EtOAc	<4	>20	12.15	>20	10.96	-
	PX (ครั้งที่ 1)	<i>n</i> -BuOH	14.27	>20	>20	>20	>20	13.63
	PX (ครั้งที่ 1)	H ₂ O	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	PX (ครั้งที่ 2)*	Hexane	<4	>20	12.45	9.66	16.52	-
	PX (ครั้งที่ 2)*	EtOAc	<4	<4	<4	<4	>20	8.86
	PX (ครั้งที่ 2)*	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (1:1)	18.66	<4	17.45	>20	<4	>20
	PX (ครั้งที่ 2)*	MeOH	>20	16.52	>20	>20	10.68	>20
9. <i>P. pulcher</i>	LF+TW	Hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	LF+TW	EtOAc	15.7	>20	>20	>20	>20	>20
	LF+TW	<i>n</i> -BuOH	11.94	>20	>20	>20	>20	>20
	LF+TW	H ₂ O	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	ST	Hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	ST	EtOAc	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	ST	<i>n</i> -BuOH	18.46	>20	>20	>20	11.27	>20
	ST	H ₂ O	>20	>20	>20	>20	>20	>20
10. <i>P. sikkimensis</i>	PX (ครั้งที่ 1)	Hexane	>20	>20	>20	<4	>20	>20
	PX (ครั้งที่ 1)	EtOAc	<4	>20	>20	<4	>20	>20
	PX (ครั้งที่ 1)	<i>n</i> -BuOH	<4	>20	>20	>20	>20	>20
	PX (ครั้งที่ 1)	H ₂ O	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	PX (ครั้งที่ 2)*	Hexane	<4	<4	>20	>20	16.62	<4
	PX (ครั้งที่ 2)*	EtOAc	<4	<4	>20	>20	>20	<4
	PX (ครั้งที่ 2)*	MeOH	19.11	>20	>20	>20	>20	11.2
	LF+TW	Hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20
11. <i>P. albidiscus</i>	LF+TW	EtOAc	9.58	>20	>20	17.59	11.11	>20
	LF+TW	<i>n</i> -BuOH	>20	>20	>20	>20	>20	16.74
	LF+TW	H ₂ O	>20	>20	>20	>20	>20	>20

* ทำการสกัดด้วยวิธี sequential extraction

หมายเหตุ ค่า EC₅₀ ≤ 20 µg/mL จึงถือว่าแสดง activity, - = ยังไม่ได้ผลการทดสอบ

P-388: murine lymphocytic leukemia, KB: human nasopharyngeal carcinoma, COL-2: human colon cancer, BCA-1: human breast cancer, Lu-1: human lung cancer, ASK: rat glioma

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ชื่อ genus และ species	ส่วนของพืช	ส่วนสกัด	EC ₅₀ (µg/mL)					
			Cell Line					
			P-388	KB	Col-2	BCA-1	Lu-1	ASK
11. <i>P. albidiscus</i>	ST	Hexane	17.91	>20	>20	>20	>20	-
	ST	EtOAc	14.74	>20	>20	>20	>20	-
	ST	<i>n</i> -BuOH	>20	>20	>20	>20	>20	-
	ST	H ₂ O	>20	>20	>20	>20	>20	-
12. <i>P. pachyphyllus</i>	LF+TW	Hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	LF+TW	EtOAc	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	LF+TW	<i>n</i> -BuOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	LF+TW	H ₂ O	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	ST	Hexane	10.28	>20	>20	19.9	>20	>20
	ST	EtOAc	18.85	>20	>20	>20	>20	>20
	ST	<i>n</i> -BuOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	ST	H ₂ O	>20	>20	>20	>20	>20	>20
13. <i>P. oxyphyllus</i>	PX	Hexane	11.13	>20	18.09	>20	>20	13.74
	PX	EtOAc	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	PX	<i>n</i> -BuOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	PX	H ₂ O	>20	>20	>20	>20	>20	>20
14. <i>P. geoffrayi</i>	LF+TW	Hexane	7.90	>20	>20	>20	>20	>20
	LF+TW	EtOAc	5.84	>20	-	>20	>20	>20
	LF+TW	<i>n</i> -BuOH	>20	>20	-	>20	>20	>20
	LF+TW	H ₂ O	>20	>20	-	>20	>20	>20
	ST	Hexane	12.04	>20	>20	>20	>20	>20
	ST	EtOAc	13.59	7.41	15.23	>20	16.80	>20
	ST	<i>n</i> -BuOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	ST	H ₂ O	>20	>20	>20	>20	>20	>20
15. <i>P. exyphyllus</i>	PX	Hexane	<4	>20	>20	8.2	>20	>20
	PX	EtOAc	<4	<4	18.05	13.1	>20	>20
	PX	<i>n</i> -BuOH	17.22	>20	>20	>20	>20	>20
	PX	H ₂ O	>20	>20	>20	>20	>20	>20
16. <i>P. acutissima</i>	PX (ครั้งที่ 1)	Hexane	11.31	>20	>20	16.5	>20	>20
	PX (ครั้งที่ 1)	EtOAc	<4	<4	<4	<4	14.13	2.89
	PX (ครั้งที่ 1)	<i>n</i> -BuOH	18.18	14.62	17.62	13.0	>20	>20
	PX (ครั้งที่ 1)	H ₂ O	>20	>20	>20	>20	>20	>20

หมายเหตุ ค่า EC₅₀ ≤ 20 µg/mL จึงถือว่าแสดง activity, - = ยังไม่ได้ผลการทดสอบ
P-388: murine lymphocytic leukemia, KB: human nasopharyngeal carcinoma, COL-2: human colon cancer, BCA-1: human breast cancer, Lu-1: human lung cancer, ASK: rat glioma

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ชื่อ genus และ species	ส่วนของพืช	ส่วนสกัด	EC ₅₀ (μg/mL)					
			Cell Line					
			P-388	KB	Col-2	BCA-1	Lu-1	ASK
16. <i>P. acutissima</i>	PX (ครั้งที่ 2)*	Hexane	-	-	-	-	-	-
	PX (ครั้งที่ 2)*	EtOAc	-	-	-	-	-	-
	PX (ครั้งที่ 2)*	MeOH	-	-	-	-	-	-
17. <i>P. chamaepeuce</i>	PX	Hexane	16.01	>20	>20	>20	>20	>20
	PX	EtOAc	15.77	15.97	>20	>20	16.35	14.11
	PX	<i>n</i> -BuOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	PX	H ₂ O	>20	>20	>20	>20	>20	>20
18. <i>P. gracilipes</i>	PX	Hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	PX	EtOAc	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	PX	<i>n</i> -BuOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20
	PX	H ₂ O	14.99	>20	>20	>20	>20	>20

* ทำการสกัดด้วยวิธี sequential extraction

หมายเหตุ ค่า EC₅₀ ≤ 20 μg/mL จึงถือว่าแสดง activity, - = ยังไม่ได้ผลการทดสอบ

P-388: murine lymphocytic leukemia, KB: human nasopharyngeal carcinoma, COL-2: human colon cancer, BCA-1: human breast cancer, Lu-1: human lung cancer, ASK: rat glioma

จากผลของการทดสอบ cytotoxic activity ของส่วนสกัดย่อยในตารางที่ 6 ปรากฏว่าพืชทั้ง 3 สปีชีส์ยังคงแสดง cytotoxic activity อยู่ในเกณฑ์ดีมากอยู่

นอกจากนี้ยังพบว่ามี *Phyllanthus* ที่แสดง cytotoxic activity ในส่วนสกัดย่อยต่าง ๆ อยู่ในเกณฑ์ดีมาก (EC₅₀ < 4 μg/ml) เพิ่มขึ้นอีก 2 สปีชีส์ คือ *Phyllanthus hullettii* และ *Phyllanthus exyphyllus* (ดูตารางที่ 6)

6. การแยกสารองค์ประกอบ และการศึกษาหาโครงสร้างของสารองค์ประกอบของพืชในสกุล

Phyllanthus

เนื่องจากมีพืชในสกุล *Phyllanthus* ที่แสดง cytotoxic activity ในเกณฑ์ดีมาก และได้รับความสนใจจากกลุ่มวิจัยของเราถึง 5 สปีชีส์ จากจำนวน 18 สปีชีส์ที่ได้ศึกษาและทดสอบ cytotoxic activity ในเบื้องต้น

ด้วยเหตุผลที่มีเวลาจำกัดที่จะศึกษาสารองค์ประกอบ จึงไม่สามารถที่จะทำการศึกษาได้ทั้ง 5 สปีชีส์พร้อม ๆ กัน

กลุ่มวิจัยของเราจึงได้เลือกทำการศึกษาย่างลึกใน 2 สปีชีส์ ได้แก่

1. *Phyllanthus taxodiifolius*

2. *Phyllanthus acutissima*

มีอีกสปีชีส์หนึ่งที่ได้ศึกษาไปบ้างแต่ยังไม่สามารถแยกสารได้ คือ *Phyllanthus sikkimensis* ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสารที่ได้ไม่ค่อย stable นัก จะเป็นสีดำและเชื่อว่าถูกออกซิไดซ์ได้ในอากาศ จึงพักการศึกษาสปีชีส์นี้ไว้ก่อน

Phyllanthus hullettii นั้น ได้เก็บพืชมาเพิ่มอีก และอยู่ในขั้นการพัฒนาการสกัด ทั้งนี้เพราะ *Phyllanthus* สปีชีส์นี้มีสารที่ค่อนข้างมีขี้สูง ถ้าสกัดแบบเดิมจะได้ส่วนสกัดออกมาน้อยมาก จึงได้ทำการสกัดพืชสปีชีส์นี้ที่เก็บมาใหม่โดยวิธีการแช่แบบ sequential extraction ด้วย hexane, EtOAc, CH_2Cl_2 :MeOH (1:1) และ MeOH ตามลำดับ สำหรับ *Phyllanthus exyphyllus* ยังไม่ได้ทำการแยกสารองค์ประกอบ แต่ในอนาคตจะได้ทำการศึกษาต่อดังนั้นในรายงานฉบับนี้จะได้รายงานเฉพาะการแยกและการหาโครงสร้างของพืช 2 ชนิดคือ *Phyllanthus taxodiifolius* และ *Phyllanthus acutissima* เท่านั้น

7. การแยกสารองค์ประกอบจากส่วนสกัดของ *Phyllanthus taxodiifolius*

ได้ทำการเก็บพืชสปีชีส์นี้มาทั้งหมด 4 ครั้ง ทั้งหมดมี 4 ตัวอย่าง ได้แก่

1. ส่วนที่อยู่เหนือดิน (aerial part, PX) (1.7 kg)
2. ส่วนที่อยู่เหนือดิน (aerial part, PX) (14.3 kg)
3. ส่วนใต้ดิน (root, RT) (1.7 kg)
4. ส่วนใต้ดิน (root, RT) (4.0 kg)

ได้ทำการศึกษา cytotoxic activity ของพืชสปีชีส์นี้ทุกตัวอย่าง ปรากฏว่าตัวอย่างที่ 1-3 ให้ผลในเกณฑ์ดีมาก แต่ตัวอย่างที่ 4 ยังรอผลการทดสอบอยู่

ได้ทำการแยกสารองค์ประกอบเฉพาะส่วนที่อยู่เหนือดิน (PX) เท่านั้น และได้ทำทั้ง 2 ตัวอย่าง แต่สำหรับตัวอย่างที่ 2 ยังไม่เสร็จดี แต่ก็สามารถแยกสารได้มากขึ้นทั้งจำนวนและปริมาณ ในกรณีของส่วนใต้ดิน (RT) ซึ่งเก็บมาทีหลังนั้นยังไม่ได้ทำการแยกสารองค์ประกอบ

7.1 การแยกสารจากส่วนเหนือดิน (aerial part, PX) ของตัวอย่างที่ 1 ของ *Phyllanthus taxodiifolius*

เนื่องจากส่วนสกัดจาก *Phyllanthus taxodiifolius* นั้น แสดงค่า cytotoxic activity อยู่ในเกณฑ์ดี ทั้งในส่วนสกัดจากเมทานอล และส่วนสกัดย่อยต่าง ๆ กลุ่มวิจัยของเราจึงได้เลือกทำการศึกษาอย่างละเอียดในส่วนสกัดจากพืชนี้ในขั้นต้นได้นำส่วนสกัด (จากการเก็บพืชครั้งที่ 1) ที่เหลือจากการทดสอบมาทำการแยกสารองค์ประกอบก่อน

- การแยกสารองค์ประกอบจากส่วนสกัด hexane ของ *Phyllanthus taxodiifolius* (ตัวอย่างที่ 1)

ได้นำส่วนสกัด hexane (11.4 g) มาแยกด้วย column chromatography โดยใช้ silica gel เป็น stationary phase โดยเริ่ม elute ด้วย pure hexane เพิ่ม % ของ ethyl acetate ไปเรื่อย ๆ จนถึง pure ethyl acetate แล้วค่อย ๆ เพิ่ม % ของ methanol ใน ethyl acetate ไปจนถึง pure methanol ได้ทำการเก็บสารละลายที่ออกจาก column ที่ละ 500 mL นำแต่ละส่วนที่เก็บไประเหยแห้งด้วย rotary evaporator แล้วรวมส่วนสกัดที่แสดง TLC คล้าย ๆ กันเข้าเป็น fractions ต่าง ๆ ปรากฏว่ารวมได้ 9 fractions ได้จัดให้มีการทดสอบ cytotoxic activity ของ fractions ต่าง ๆ ได้ผลตามที่แสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ผล cytotoxic activity ของ fractions จากส่วนสกัด hexane ที่ผ่านการแยก column chromatography ครั้งแรกแล้ว

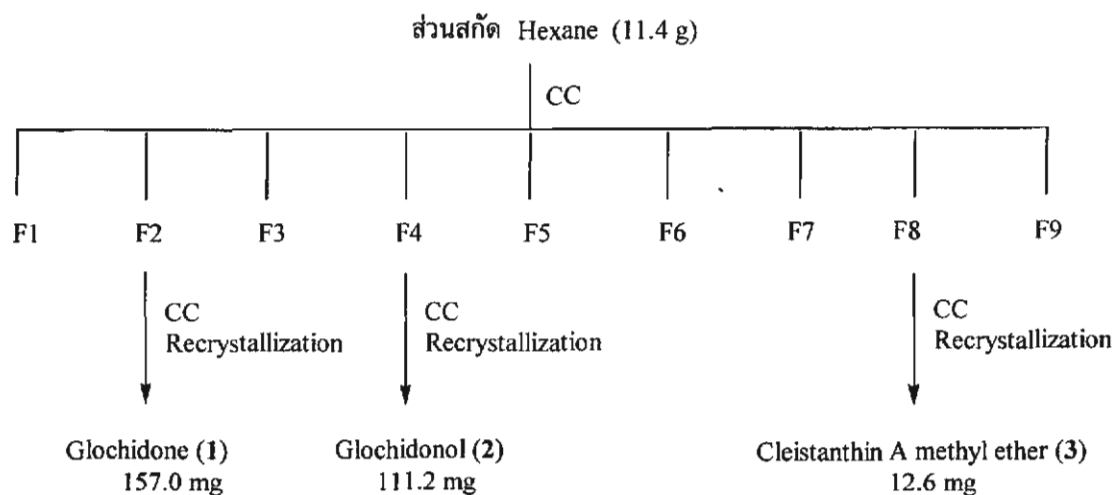
Fraction	EC ₅₀ (μg/mL)					
	Cell Line					
	P-388	KB	Col-2	BCA-1	Lu-1	ASK
F1	>20	>20	>20	>20	>20	-
F2	>20	>20	>20	>20	>20	-
F3	>20	>20	>20	>20	>20	-
F4	>20	>20	>20	>20	>20	-
F5	>20	>20	>20	>20	>20	-
F6	11.77	>20	>20	>20	>20	-
F7	11.64	12.97	15.92	18.21	15.66	-
F8	<4	<4	<4	<4	<4	-
F9	9.07	<4	6.17	<4	<4	-

หมายเหตุ ค่า EC₅₀ ≤ 20 μg/mL จึงถือว่าแสดง activity, - = ยังไม่ได้ผลการทดสอบ

P-388: murine lymphocytic leukemia, KB: human nasopharyngeal carcinoma, COL-2: human colon cancer, BCA-1: human breast cancer, Lu-1: human lung cancer, ASK: rat glioma

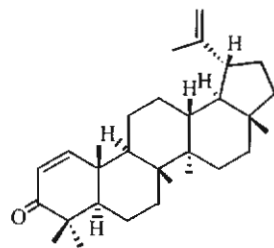
กลุ่มวิจัยของเราสามารถแยกสารจากส่วนสกัดเฮกเซนได้ 3 ตัว (สาร 1-3) จาก fractions F2, F4 และ F8 ตามลำดับ ดังแสดงในแผนผังที่ 2

แผนผังที่ 2

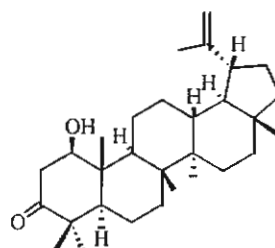


CC = column chromatography

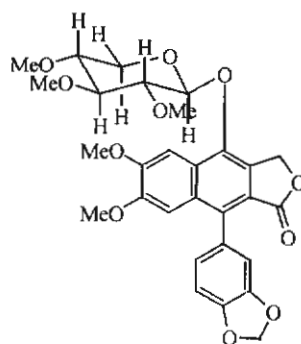
กลุ่มวิจัยได้ทำการพิสูจน์โครงสร้างโดยใช้เทคนิคต่าง ๆ ทางสเปกโทรสโกปี และโดยการเปรียบเทียบ ข้อมูลกับที่มีผู้รายงานมาก่อน พบว่าสารทั้งสามตัวมีโครงสร้างดังแสดงข้างล่าง



Glochidone (1)



Glochidonol (2)



Cleistanthin A methyl ether (3)

- การแยกสารองค์ประกอบจากส่วนสกัด ethyl acetate ของ *Phyllanthus taxodiifolius* (ตัวอย่างที่ 1)

ได้นำส่วนสกัด ethyl acetate (15.6 g) มาแยกด้วย column chromatography โดยใช้ silica gel เป็น stationary phase โดยเริ่ม elute ด้วย pure hexane เพิ่ม % ของ ethyl acetate ไปเรื่อย ๆ จนถึง pure ethyl acetate แล้วค่อย ๆ เพิ่ม % ของ methanol ใน ethyl acetate ไปจนถึง pure methanol ได้ทำการเก็บสารละลายที่ออกจาก column ทีละ 500 mL นำแต่ละส่วนที่เก็บไประเหยแห้งด้วย rotary evaporator แล้วรวมส่วนที่แยกได้ทีละ TLC คล้าย ๆ กันเข้าเป็น fraction เดียวกัน ปรากฏว่ารวมได้ 6 fractions ได้จัดให้มีการทดสอบ fractions ต่าง ๆ จาก column นี้ ได้ผลตามที่แสดงในตารางที่ 8

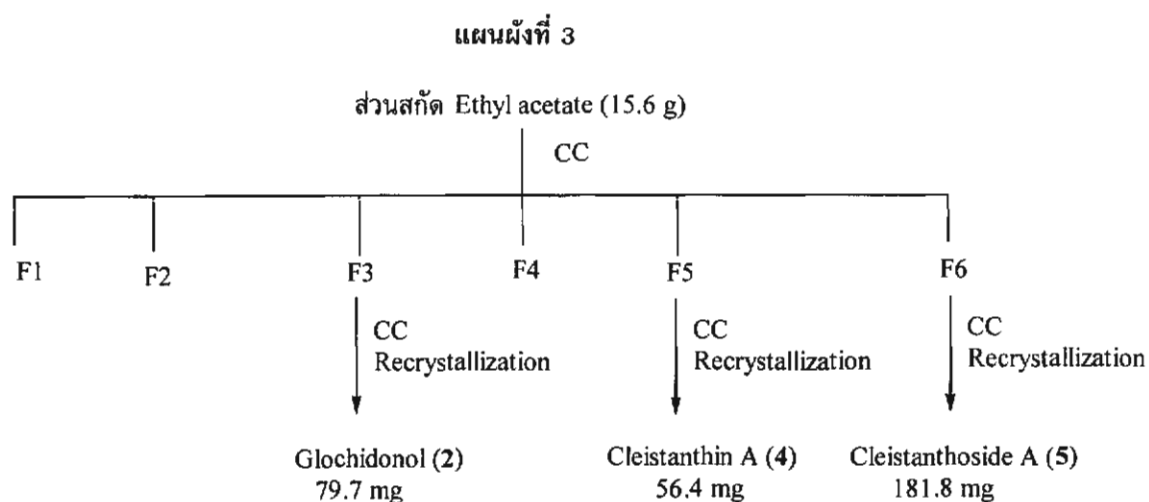
ตารางที่ 8 ผล cytotoxic activity ของ fractions จากส่วนสกัด ethyl acetate ที่ผ่านการแยก column chromatography ครั้งแรกแล้ว

Fraction	EC ₅₀ (μg/mL)					
	Cell Line					
	P-388	KB	Col-2	BCA-1	Lu-1	ASK
F1	>20	>20	>20	>20	>20	>20
F2	11.7	>20	>20	>20	>20	>20
F3	>20	>20	>20	>20	>20	>20
F4	<4	<4	<4	<4	<4	<4
F5	<4	<4	<4	<4	<4	<4
F6	>20	>20	>20	<4	<4	17.73

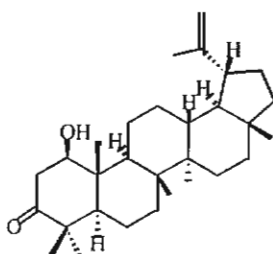
หมายเหตุ ค่า EC₅₀ ≤ 20 μg/mL จึงถือว่าแสดง activity, - = ยังไม่ได้ผลการทดสอบ

P-388: murine lymphocytic leukemia, KB: human nasopharyngeal carcinoma, COL-2: human colon cancer, BCA-1: human breast cancer, Lu-1: human lung cancer, ASK: rat glioma

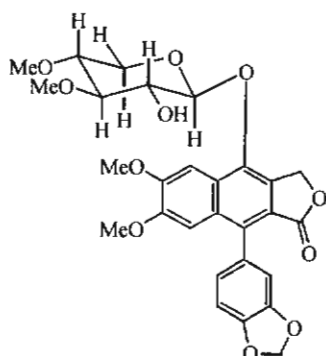
กลุ่มวิจัยของเราสามารถแยกสารได้จากส่วนสกัด ethyl acetate 3 ตัว ได้แก่ Glochidonol (2 จาก F3) Cleistanthin A (4 จาก F5) และ Cleistanthoside A (5 จาก F6) ดังแสดงในแผนผังที่ 3



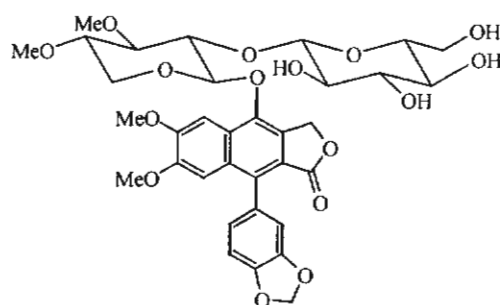
CC = column chromatography



Glochidonol (2)



Cleistanthin A (4)

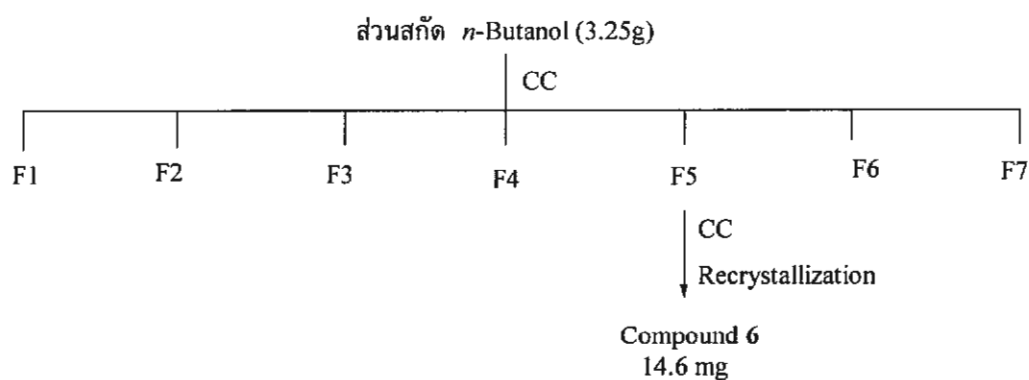


Cleistanthoside A (5)

- การแยกสารองค์ประกอบจากส่วนสกัด *n*-butanol ของ *Phyllanthus taxodiifolius* (ตัวอย่างที่ 1)

เนื่องจากกลุ่มวิจัยได้พบว่าส่วนสกัด *n*-butanol นั้นแสดง cytotoxic activity เช่นกัน จึงได้ทำการแยกสารจากส่วนสกัดนี้ด้วย แต่ว่าพบอุปสรรคมากมาย เนื่องมาจากส่วนสกัดนี้ประกอบด้วยสารที่มีขั้วสูง มักจะติด column ทำให้ได้ส่วนแยกในแต่ละ fraction เป็นปริมาณน้อย จึงไม่ได้ทำการทดสอบ cytotoxic activity ของแต่ละ fraction ที่ได้จาก column chromatography แต่ได้ทำการแยกบาง fraction ที่สามารถจะทำต่อได้ อย่างไรก็ตามสามารถแยกสาร lignan glycoside ออกมาได้อีก 1 ตัว คือสาร 6 จาก F5 เพียง 14.6 mg ดังแสดงในแผนผังที่ 4

แผนผังที่ 4



CC = column chromatography