



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

**เคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารควบคุมศัตรูพืชจากธรรมชาติ
และสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติประเภทอื่น**

อภิชาติ สุขสำราญ และคณะ

พฤษภาคม 2545

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารควบคุมศัตรูพืชจากธรรมชาติ
และสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติประเภทอื่น

CHEMISTRY AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF
NATURAL PEST CONTROL AGENTS AND OTHER NATURAL PRODUCTS

คณะผู้วิจัย

1. อภิชาติ สุขสำราญ	มหาวิทยาลัยรามคำแหง
2. สมยศ สุทธิไวยกิจ	มหาวิทยาลัยรามคำแหง
3. ธิติมา รุกขไชยศิริกุล	มหาวิทยาลัยรามคำแหง
4. สมเดช กนกเมธากุล	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
5. เกษม สร้อยทอง	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง
6. บุญเอก ยิ่งยงณรงค์กุล	มหาวิทยาลัยรามคำแหง
7. อรไท สุขเจริญ	มหาวิทยาลัยรามคำแหง
8. บดินทร์ ชิตกุล	มหาวิทยาลัยรามคำแหง

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

ทุนส่งเสริมกลุ่มวิจัย

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ได้พิจารณาให้ทุนส่งเสริมกลุ่มวิจัย (ทุนเมธีวิจัยอาวุโส สกว.) ทำให้งานวิจัยประสบความสำเร็จตามความมุ่งหมาย

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) และโครงการวิจัยและพัฒนาเพื่อป้องกันและบำบัดรักษาโรคเขตร้อน (T-2) ที่ได้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารจากพืชและจุลินทรีย์ ขอขอบคุณ คุณนิติรัตน์ จิมน้อย สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ และคุณสุทธิพร ชัยชนะ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้บันทึกข้อมูลทางแมสสเปกโตรเมตรี และ ดร. บงกช ธารชมพู ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ คุณวรรณ ศรีรินทร์นุช และคุณวรรณวิมล เมฆบุญส่งลาภ ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้บันทึกข้อมูลทางนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปีบางส่วน

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ประนอม จันทรโณทัย ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้ตรวจสอบเอกลักษณ์ของพืชบางชนิดที่นำมาวิจัย ขอขอบคุณ Professor Rene Lafont, Pierre and Marie Curie University, Paris ที่ได้ช่วยเหลือและให้คำแนะนำเกี่ยวกับงานวิจัย และขอขอบคุณผู้บริหาร อาจารย์ และเจ้าหน้าที่ของมหาวิทยาลัยรามคำแหง และมหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้ให้การสนับสนุนและช่วยเหลือให้งานวิจัยดำเนินไปได้ด้วยดี

อภิชาติ สุขสำราญ และคณะ

ABSTRACT

Project Code: RTA/03/2541

Project Title: เคมี่และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารควบคุมศัตรูพืชจากธรรมชาติและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติประเภทอื่น

Investigators: Principal investigator: อภิชาติ สุขสำราญ. Co-investigators: สมยศ สุทธิไวกิจ ธิติมา รุกขไชยศิริกุล สมเดช กนกเมฆากุล เกษม สร้อยทอง บุญเอก ยิ่งยงณรงค์กุล อรไท สุขเจริญ และ บดินทร์ ชิตกุล

E-mail Address: apichart@ram1.ru.ac.th

Objectives: เพื่อสกัดแยก หาสูตรโครงสร้าง และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเอคไดสเตียรอยด์และสารควบคุมศัตรูพืชชนิดอื่น และเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ทางชีวภาพ (SAR) ของสารเหล่านี้ เพื่อศึกษาปะทะสัมพันธ์ระหว่างแมลงกับพืชบางชนิด เพื่อสกัดแยก หาสูตรโครงสร้าง และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติประเภทอื่น

Methodology: สกัดแยก หาสูตรโครงสร้าง และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเอคไดสเตียรอยด์และผลิตภัณฑ์ธรรมชาติประเภทอื่นที่ได้มาจากพืชและจุลินทรีย์บางชนิดที่คัดเลือกมาแล้ว สังเคราะห์และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเอคไดสเตียรอยด์และ analogues เพื่อการศึกษา SAR

Results: ได้แยกเอคไดสเตียรอยด์ 11 และ 13 ชนิดจากสัตว์ทะเล *Zoanthus* sp. และพืช *Vitex scabra* โดยเป็นเอคไดสเตียรอยด์ใหม่ 1 และ 2 ชนิดตามลำดับ จากการศึกษา SAR ของเอคไดสเตียรอยด์และ analogues ทำให้ทราบว่าหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 22 ไม่จำเป็นต้องอยู่อย่างอิสระก็ยังสามารถแสดงฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบที่สูงได้ ได้แยกสารทั้งชนิดใหม่และที่ทราบโครงสร้างแล้วจากพืช *Piper chaba*, *P. samentosum*, *Acalypha siamensis*, *Cinnamomum parthenoxylon*, *Jatropha podagrica*, *Macaranga denticulata*, *Garcinia mangostana* และ *Vitex peduncularis* และเชื้อรา *Chaetomium globosum* KMITL-N 0802, *C. cupreum* และ *Scleroderma citrinum* และได้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารส่วนใหญ่ที่แยกได้

Discussion and Conclusion: จากการที่ได้เอคไดสเตียรอยด์ทั้งจากธรรมชาติและที่สังเคราะห์ขึ้นมา ทำให้สามารถศึกษาและเข้าใจ SAR ของสารประเภทนี้ได้ดีขึ้น ได้พบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชและเชื้อราบางชนิดสามารถใช้เป็นสารนำ (lead compounds) ได้

Suggestions/ Further Implication/ Implementation: ควรทำการศึกษา SAR ของเอคไดสเตียรอยด์และฤทธิ์ทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติบางชนิดต่อไป

Keywords: Pest control, ecdysteroids, SAR study, natural products, bioactivity

ABSTRACT

Project Code: RTA/03/2541

Project Title: Chemistry and Biological Activities of Pest Control Agents and Other Natural Products

Investigators: Principal investigator: Apichart Suksamrarn. Co-investigators: Somyote Sutthivaiyakit, Thitima Rukachaisirikul, Somdej Kanokmedhakul, Kasem Soyong, Boon-ek Yingyongnarongkul, Orathai Sukcharoen and Bordin Chitkul

E-mail Address: apichart@ram1.ru.ac.th

Objectives: To isolate, determine structure and evaluate biological activities of ecdysteroids and other pest control agents and to study structure-activity relationships (SAR) of these compounds; to study some insect-plant interaction; to isolate, determine structure and evaluate biological activities of other natural products.

Methodology: Extraction, isolation and biological evaluation of ecdysteroids and other natural products from the selected plants and microorganisms. Synthesis and biological evaluation of some ecdysteroids and ecdysteroid analogues for SAR study.

Results: Eleven and thirteen ecdysteroids were respectively isolated from a marine zoanthid *Zoanthus* sp. and the plant *Vitex scabra*, one and two of which were new compounds. SAR study of ecdysteroids and ecdysteroid analogues indicated that a free 22-hydroxyl group was not necessary for high moulting activity. A number of new and known compounds were isolated from plant species (*Piper chaba*, *P. samentosum*, *Acalypha siamensis*, *Cinnamomum parthenoxylon*, *Jatropha podagrica*, *Macaranga denticulata*, *Garcinia mangostana* and *Vitex peduncularis*) and fungi (*Chaetomium globosum* KMITL-N 0802, *C. cupreum* and *Scleroderma citrinum*) and most of them were subjected to biological evaluation.

Discussion and Conclusion: The availability of ecdysteroids, both from natural sources and synthetic analogues, has led to a better understanding of SAR of these compounds. Some bioactive compounds from plants and fungi could be used as lead compounds.

Suggestions/ Further Implication/ Implementation: Further work on SAR study of ecdysteroids and biological evaluation of selected natural products should be continued.

Keywords: Pest control, ecdysteroids, SAR study, natural products, bioactivity

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	(1)
Abstract (ภาษาไทย).....	(3)
Abstract (ภาษาอังกฤษ).....	(5)
Executive Summary.....	(11)
โครงการย่อยกลุ่มที่ 1: เคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพและการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเอคไดสเตียรอยด์.....	1
บทนำ.....	3
ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	18
การสกัดแยก หาสูตรโครงสร้าง และการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเอคไดสเตียรอยด์.....	18
Zoanthid ชนิดที่ 1 (<i>Zoanthus</i> sp.).....	18
เอคไดสเตียรอยด์จากเปลือกต้น <i>Vitex scabra</i>	18
การสังเคราะห์ ปรับเปลี่ยนโครงสร้างและหมู่ฟังก์ชันของเอคไดสเตียรอยด์.....	32
การสังเคราะห์อนุพันธ์ของหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งต่างๆ ในโมเลกุลการสังเคราะห์ O-Alkyl ethers.....	32
การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่ตำแหน่ง 22: การเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 22 ให้เป็นอนุพันธ์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง.....	46
การปรับเปลี่ยนโครงสร้างและหมู่ฟังก์ชันของวง A.....	52
การสังเคราะห์ 2-Dehydro-3- <i>epi</i> -20-hydroxyecdysone.....	52
Stereoselective catalytic hydrogenation ของระบบ 7-en-6-one ของเอคไดสเตียรอยด์โดยมี sodium nitrite อยู่ด้วย.....	59
วัสดุและวิธีการ.....	65
Zoanthid ชนิดที่ 1 (<i>Zoanthus</i> sp.).....	65
เอคไดสเตียรอยด์จากเปลือกต้น <i>Vitex scabra</i>	72
การสังเคราะห์อนุพันธ์ของหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งต่างๆ ในโมเลกุลการสังเคราะห์ O-Alkyl ethers.....	78
การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่ตำแหน่ง 22: การเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 22 ให้เป็นอนุพันธ์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง.....	114

การสังเคราะห์ 2-Dehydro-3- <i>epi</i> -20-hydroxyecdysone.....	118
Stereoselective catalytic hydrogenation ของระบบ 7-en-6-one ของเคไคสเตียรอยด์โดยมี sodium nitrite อยู่ด้วย.....	123
เอกสารอ้างอิง.....	129
โครงการย่อยกลุ่มที่ 2: การสังเคราะห์และฤทธิ์ทางชีวภาพของ สารยับยั้งเคไคสเตียรอยด์.....	137
บทนำ.....	139
ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	147
การสังเคราะห์ (20R,22R)-2 α ,3 α ,14 α ,20,22,25-Hexahydroxy- 5 α -cholest-7-en-6-one	147
การสังเคราะห์ 9-Hydroxy-substituted ecdysteroid analogues	153
วัสดุและวิธีการ.....	159
การสังเคราะห์ (20R,22R)-2 α ,3 α ,14 α ,20,22,25-Hexahydroxy- 5 α -cholest-7-en-6-one	159
การสังเคราะห์ 9-Hydroxy-substituted ecdysteroid analogues.....	164
เอกสารอ้างอิง.....	168
โครงการย่อยกลุ่มที่ 3: การหาสารควบคุมศัตรูพืชจากธรรมชาติ.....	171
โครงการวิจัยหน่วยที่ 1: พืชสกุล <i>Piper</i>	173
บทนำ.....	173
ตีป्ली.....	181
ข้าพลุ.....	185
ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	187
ผลตีป्ली.....	187
ลำต้นตีป्ली.....	196
ผลข้าพลุ.....	205
รากข้าพลุ.....	217
วัสดุและวิธีการ.....	221
ผลตีป्ली.....	221
ลำต้นตีป्ली.....	228
ผลข้าพลุ.....	232
รากข้าพลุ.....	241
เอกสารอ้างอิง.....	244

โครงการวิจัยหน่วยที่ 2: เชื้อราคิโตเมียม โกลโบซัม (<i>Chaetomium globosum</i>).....	251
บทนำ.....	251
ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	257
วัสดุและวิธีการ.....	277
เอกสารอ้างอิง.....	282
โครงการวิจัยหน่วยที่ 3: พืชในสกุล <i>Acalypha</i>	283
บทนำ.....	283
ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	291
วัสดุและวิธีการ.....	300
เอกสารอ้างอิง.....	312
โครงการวิจัยหน่วยที่ 4: ราลูกบอล (<i>Scleroderma citrinum</i>).....	315
บทนำ.....	315
ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	316
วัสดุและวิธีการ.....	327
เอกสารอ้างอิง.....	330
โครงการวิจัยหน่วยที่ 5: ราคิโตเมียม คิวเปรัม (<i>Chaetomium cupreum</i>).....	331
บทนำ.....	331
ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	333
วัสดุและวิธีการ.....	341
เอกสารอ้างอิง.....	344
โครงการย่อยกลุ่มที่ 4: การศึกษาส่วนประกอบทางเคมีของพืชในแง่ นิเวศวิทยาเคมี.....	345
บทนำ.....	347
ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	352
มะระกับแมลงวันผลไม้.....	352
วัสดุและวิธีการ.....	356
เอกสารอ้างอิง.....	361
โครงการย่อยกลุ่มที่ 5: การศึกษาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพด้าน อื่น ๆ.....	363
โครงการวิจัยหน่วยที่ 1: พืชสกุล <i>Cinnamomum</i>	365
บทนำ.....	365

ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	386
เทพธาโร (<i>Cinnamomum parthenoxylon</i>).....	386
วัสดุและวิธีการ.....	392
เอกสารอ้างอิง.....	397
โครงการวิจัยหน่วยที่ 2: พืชสกุล <i>Jatropha</i>	407
บทนำ.....	407
ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	411
วัสดุและวิธีการ.....	414
เอกสารอ้างอิง.....	417
โครงการวิจัยหน่วยที่ 3: พืช <i>Macaranga denticulata</i>	419
บทนำ.....	419
ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	420
วัสดุและวิธีการ.....	427
เอกสารอ้างอิง.....	432
โครงการวิจัยหน่วยที่ 4: มังคุด (<i>Garcinia mangostana</i>).....	435
บทนำ.....	435
ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	445
วัสดุและวิธีการ.....	454
เอกสารอ้างอิง.....	459
โครงการวิจัยหน่วยที่ 5: กาสำปีก (<i>Vitex peduncularis</i>).....	463
บทนำ.....	463
ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	464
วัสดุและวิธีการ.....	465
เอกสารอ้างอิง.....	467
รายชื่อกลุ่มวิจัย.....	469
ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ.....	473
ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ แยกตามผู้วิจัย.....	475
ภาคผนวก: Reprints และ Proofs ผลงานวิจัย.....	481

EXECUTIVE SUMMARY

เคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารควบคุมศัตรูพืชจากธรรมชาติ และสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติประเภทอื่น

โครงการวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ส่วนใหญ่แต่ละกลุ่มยังแบ่งออกเป็นหน่วยย่อยๆ
อีก ผลงานวิจัยที่ได้ดำเนินการมาในรอบ 3 ปี มีดังต่อไปนี้

1. โครงการย่อยกลุ่มที่ 1: เคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของเอคไดสเตียรอยด์

1.1 การสกัดแยก หาสูตรโครงสร้างและการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของ เอคไดสเตียรอยด์

1) Zoanthid ชนิดที่ 1 (*Zoanthus* sp.)

ได้แยกเอคไดสเตียรอยด์รวม 11 ชนิดจากส่วนที่สกัดด้วยนอร์มัล
บิวทานอลของ marine zoanthid (*Zoanthus* sp.) คือ zoanthusterone, ponasterone A, 20-
hydroxyecdysone 2-acetate, viticosterone E, integristerone A 25-acetate, 2-deoxy-
20-hydroxyecdysone, ajugasterone C, inokosterone, 20-hydroxyecdysone, ecdysone
และ dacryhainansterone (5-deoxykaladasterone) โดยสารชนิดแรกเป็นเอคไดสเตียรอยด์
ใหม่

2) หมากคัง (*Vitex scabra*)

ได้นำเปลือกต้นหมากคัง (*Vitex scabra* Wall. ex Schauer) มาทำ
การแยกเอคไดสเตียรอยด์ สามารถแยกได้เอคไดสเตียรอยด์รวม 13 ชนิด คือ 24-*epi*-
pinnatasterone, scabrasterone, calonysterone, pterosterone, 24-*epi*-makisterone A, 20-
hydroxyecdysone, polypodine B, ajugasterone C, pinnatasterone, 11 α -
hydroxyecdysone, 24-*epi*-abutasterone, 20,26-dihydroxyecdysone และ turkesterone
โดยสาร 2 ชนิดแรกเป็นเอคไดสเตียรอยด์ใหม่

1.2 การสังเคราะห์ปรับเปลี่ยนโครงสร้างและหมู่ฟังก์ชันของเอคไดสเตียรอยด์

1) การสังเคราะห์อนุพันธ์ของหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งต่าง ๆ ใน-โมเลกุล

การสังเคราะห์ *O-Alkyl ethers* ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของเอคไดสเตียรอยด์กับฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบแมลง (structure-activity relationships, SAR). โดยศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 22R ซึ่งได้มีผู้ศึกษาในอดีตพบว่าเอคไดสเตียรอยด์ที่จะมีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงจะต้องมีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 22R และต้องเป็นหมู่ไฮดรอกซิลอิสระ โดยดูผลจากการลดลงของฤทธิ์ทางชีวภาพเมื่อหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 22R ของ 20-hydroxyecdysone ถูก acetylate ได้อนุพันธ์ 22-acetate คณะผู้วิจัยได้เตรียมอนุพันธ์ 22-methyl ether ของ 20-hydroxyecdysone พบว่าฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบกลับใกล้เคียงกับสารหลัก คือ 20-hydroxyecdysone แสดงว่าข้อสรุปเดิมที่มีผู้เสนอไว้ว่าหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 22 ต้องอยู่แบบอิสระ โดยเข้าใจว่าหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 22R เกิดพันธะไฮโดรเจน (H-bonding) กับ receptor ของแมลง (ซึ่งถือว่าเป็น electronic factor) เพื่อให้มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงนั้นอาจต้องนำมาพิจารณาใหม่ การที่คณะผู้วิจัยพบว่าอนุพันธ์ 22-methyl ether มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงอาจเป็นเพราะ electronic factor ไม่มีความสำคัญในกรณีนี้ หรือมีความสำคัญน้อยกว่า steric factor คือความเกะกะของหมู่ methyl อาจมีน้อยกว่าหมู่ acetyl ของอนุพันธ์ 22-acetate เพื่อพิสูจน์ว่า steric factor มีความสำคัญมากน้อยเพียงใด คณะผู้วิจัยจึงได้เตรียมอนุพันธ์ 22-ethyl ether ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าอนุพันธ์ 22-methyl ether และมีจำนวนคาร์บอนเท่ากับหมู่ acetyl ผลการทดสอบฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบ ปรากฏว่าอนุพันธ์ 22-ethyl ether ยังคงมีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงอยู่ แสดงว่า steric factor ไม่ใช่ปัจจัยสำคัญต่อการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ การค้นพบครั้งนี้นอกจากจะต้องเปลี่ยนข้อสรุปที่มีผู้เสนอไว้ในอดีตว่าเอคไดสเตียรอยด์ที่จะแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่สูงได้ หมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 22 จะต้องอยู่อย่างอิสระนั้น ไม่จำเป็นต้องอยู่อย่างอิสระ และการ block หมู่ไฮดรอกซิลด้วยหมู่แอลคิลยังจะเป็นการป้องกันไม่ให้ศัตรูพืช esterify เพื่อลดฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอก

คราบของเอคโดสเตียรอยด์ลงไป นอกจากนี้เป็นที่ทราบกันดีว่า สิ่งที่เป็นปัญหาสำคัญประการหนึ่งในการที่จะนำเอคโดสเตียรอยด์ไปใช้ในการควบคุมศัตรูพืชคือ สารประเภทนี้มีความเป็นขั้วสูง จึงสามารถ penetrate ผ่าน cuticle ของศัตรูพืชได้ยาก ฉะนั้นการเปลี่ยนเอคโดสเตียรอยด์ให้เป็นอนุพันธ์ O-alkyl ethers ทำให้ความมีขั้วของเอคโดสเตียรอยด์ลดลง ยิ่งเป็นอนุพันธ์ O-alkyl ethers ของหมู่ไฮดรอกซิลหลายหมู่ ก็จะทำให้ความมีขั้วของเอคโดสเตียรอยด์ลดลงมากขึ้น ทำให้มีโอกาสผ่านเข้าไปทำอันตรายต่อศัตรูพืชได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้ยังได้เตรียมอนุพันธ์ 14-methyl ether และ polymethyl ethers กรณีที่ตำแหน่ง 14 เป็น 14-methyl ether พบว่าฤทธิ์ทางชีวภาพลดลงอย่างมาก แสดงว่าหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 14 ต้องไม่มีหมู่แทนที่ ได้มีการเตรียม 2-, 3-methyl และ ethyl ethers พบว่าฤทธิ์ทางชีวภาพไม่ลดลง เมื่อเตรียม di-, tri- และ tetra-methyl ethers พบว่าฤทธิ์ทางชีวภาพยิ่งสูงมากกว่าพวก mono-methyl ethers โดยเฉพาะพวก diethyl ethers มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงกว่า 20-hydroxyecdysone แสดงว่ายิ่งเอคโดสเตียรอยด์มีความเป็นขั้วลดลง (มี lipophilicity สูงขึ้น) ฤทธิ์ทางชีวภาพจะเพิ่มขึ้น ทั้ง ๆ ที่ไปเพิ่ม steric hindrance และลดการเกิด hydrogen bonding กับ receptor ของแมลง ได้เตรียมอนุพันธ์ 22-alkyl ether ที่มีขนาดใหญ่กว่านี้บางชนิด และจะทดสอบฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบว่าจะลดลงหรือไม่ มากน้อยเพียงใด

2) การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่ตำแหน่ง 22: การเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 22 ให้เป็นอนุพันธ์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง

ได้สังเคราะห์อนุพันธ์เอซิลเอสเทอร์ตำแหน่ง 22 ของ 20-hydroxyecdysone เพิ่มเติมจากที่มีอยู่ แล้วศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพโดยใช้ *Musca* assay และเปรียบเทียบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบ พบว่าขนาดของ acyl esters ไม่ค่อยมีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพ แสดงว่า steric factor ไม่ใช่ปัจจัยที่สำคัญ ถึงแม้ว่าหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 22 ไม่ได้อยู่อย่างอิสระ แต่ฤทธิ์ทางชีวภาพกลับลดลงไม่มาก เมื่อหมู่เอสเทอร์เป็น pyrrole-2-carboxylate ester พบว่า อนุพันธ์นี้กลับมีฤทธิ์ทางชีวภาพประมาณ 2 เท่าของ 20-hydroxyecdysone แสดงว่าหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 22 ไม่ต้องอยู่อย่างอิสระ เมื่อเปลี่ยนเอสเทอร์เป็น 22-glycolate พบว่าฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มขึ้นถึง 5 เท่าของ 20-hydroxyecdysone

เป็นเอคไดสเตียรอยด์ที่มีฤทธิ์ *in vivo* สูงสุดเท่าที่เคยมีรายงานมา เป็นไปได้ที่หมู่ไฮดรอกซิลของ glycolate ester เกิดการ bind กับ ecdysteroid receptor ได้ดี ซึ่งเมื่อทำ acetylation หมู่ไฮดรอกซิลดังกล่าว ฤทธิ์ทางชีวภาพของเอคไดสเตียรอยด์ลดลง และเมื่อเปลี่ยนเป็น chloroacetate ฤทธิ์ทางชีวภาพลดลงไปจนต่ำกว่าฤทธิ์ของ 20-hydroxyecdysone จากผลที่ได้ข้างต้น สรุปได้ว่า เอคไดสเตียรอยด์สามารถแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่สูงได้ ถึงแม้ว่าไม่มีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระที่ตำแหน่ง 22 ถ้าหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง 22 มีหมู่ฟังก์ชันที่เหมาะสม ก็อาจแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่สูงกว่า parent ecdysteroid คือ 20-hydroxyecdysone

3) การสังเคราะห์ 2-Dehydro-3-*epi*-20-hydroxyecdysone

ได้สังเคราะห์ 2-dehydro-3-*epi*-20-hydroxyecdysone ซึ่งเป็นเอคไดสเตียรอยด์ที่มีผู้แยกจากพืชเมื่อปี ค.ศ. 1998 และแยกได้เพียง 0.15 มิลลิกรัมเท่านั้น การสังเคราะห์เริ่มต้นจาก 20-hydroxyecdysone ซึ่งเป็นเอคไดสเตียรอยด์ที่หามาได้ง่ายจากพืชสกุล *Vitex* ในประเทศ มีขั้นตอนการสังเคราะห์ที่สั้น จึงสะดวกมากต่อการสังเคราะห์สารนี้เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

4) Stereoselective catalytic hydrogenation ของระบบ 7-en-6-one ของเอคไดสเตียรอยด์ โดยมี sodium nitrite อยู่ด้วย

ได้พบวิธีไฮโดรจีเนตพันธะคู่ของระบบ 7-en-6-one ของเอคไดสเตียรอยด์ได้อย่างเฉพาะเจาะจง โดยใช้ palladium on charcoal เป็นคะตะลิสต์ และมี sodium nitrite อยู่ด้วย ปฏิกริยาทำได้สะดวก ให้ปริมาณผลผลิตสูง

2. โครงการย่อยกลุ่มที่ 2: การสังเคราะห์และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารยับยั้งเอคไดสเตียรอยด์

เนื่องจากได้เริ่มมีการค้นพบว่า brassinosteroids ซึ่งเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตของพืชกลุ่มใหม่ และมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับเอคไดสเตียรอยด์ มีฤทธิ์ทางชีวภาพเป็น antiecdysteroids ด้วย โดยสารประเภทนี้ไปแย่งเอคไดสเตียรอยด์ bind กับ ecdysteroid

receptor ของแมลง ทำให้แมลงไม่สามารถใช้เอคไดสเตียรอยด์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ งานวิจัยด้านนี้มีข้อจำกัดอยู่ค่อนข้างสูง เพราะ brassinosteroids ที่พืชสร้างขึ้นมามีปริมาณ น้อยมาก brassinosteroids บางชนิดไม่ได้มีการแยกออกมาตรวจสอบทางเคมีตามปกติ แต่ ใช้เทคนิคการตรวจสอบที่ทำให้รู้ได้ว่ามีอยู่ในพืช จึงเป็นข้อจำกัดอย่างยิ่งในการแยกสาร ประเภทนี้มาศึกษาด้านนี้ ได้มีผู้สังเคราะห์ brassinosteroids จากสเตียรอยด์พอลิเมอร์ แต่การ สังเคราะห์ส่วนใหญ่ผ่านขั้นตอนหลายขั้นตอน และส่วนใหญ่มีความเฉพาะในการสังเคราะห์ มากเกินไป จนเป็นอุปสรรคต่อการเปลี่ยนโครงสร้าง และ/หรือหมู่ฟังก์ชันของ brassinosteroids เพื่อศึกษา SAR คณะผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะปรับเปลี่ยนโครงสร้างและ/ หรือหมู่ฟังก์ชันของเอคไดสเตียรอยด์ไปเป็น brassinosteroids ที่ละน้อย ซึ่งจะสามารถศึกษา SAR ได้ทั้งในแง่ของเอคไดสเตียรอยด์ และ brassinosteroids ที่ได้รับการปรับเปลี่ยนดังกล่าว และดูฤทธิ์ในการเป็น antiecdysteroids ไปด้วย จากพื้นฐานนี้ได้ดำเนินการวิจัยดังนี้

2.1 การสังเคราะห์ 2,3-diepi-5 α -20-Hydroxyecdysone [(20R,22R)-2 α ,3 α ,14 α ,20,22,25-Hexahydroxy-5 α -cholest-7-en-6-one]

เป้าหมายคือ ต้องการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่งที่ 2 และ 3 ของ เอคไดสเตียรอยด์คือ 20-hydroxyecdysone จาก 2 β และ 3 β ให้เป็น 2 α และ 3 α และ เปลี่ยน configuration ที่ตำแหน่ง 5 จาก 5 β เป็น 5 α เพื่อให้ได้สารที่มีชื่อตามหัวข้อข้างต้น เพื่อที่จะได้ structural requirement จากเอคไดสเตียรอยด์ไปเป็น brassinosteroid analogues ที่วง A และ A/B ring fusion เราได้สังเคราะห์สารที่ต้องการได้ และมีโครงสร้างและ stereochemistry ถูกต้อง ซึ่งพิสูจน์โดยเทคนิคของ NMR สเปกโทรสโกปี

2.2 การสังเคราะห์ 9-Hydroxy-substituted ecdysteroid analogues

ได้สังเคราะห์ analogues ของเอคไดสเตียรอยด์ ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 9 รวม 2 ชนิด คือ 5 α -9,20-dihydroxyecdysone และ 2,3-diepi-5 α -9,20-dihydroxyecdysone เพื่อเลียนแบบสาร antiecdysteroids แต่เป็นสารที่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่ ตำแหน่ง 9 เพื่อใช้ทดสอบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบและสาร antiecdysteroids ต่อไป

3. โครงการย่อยกลุ่มที่ 3: การหาสารควบคุมศัตรูพืชจากธรรมชาติ

3.1 โครงการวิจัยหน่วยที่ 1: พืชสกุล *Piper*

1) ดีปลี

จากการสกัดผลดีปลี (*Piper chaba* Hunt) แห้งด้วยนอร์มัลเฮกเซนและเมทานอล แล้วนำส่วนที่สกัดได้มาแยกสารออกจากกันด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี แล้วนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาหาสูตรโครงสร้าง โดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี พบว่าในส่วนที่สกัดด้วยนอร์มัลเฮกเซนได้สารประเภท amide 4 ชนิด คือ (2*E*,4*E*,8*Z*)-*N*-isobutyl-eicosatrienamide, piperine และ guineensine และ pipermonaline ได้สารประเภทอื่นอีก 3 ชนิดคือ methyl piperate, β -sitosterol และ hydrocinnamic acid ส่วนสารที่แยกได้จากส่วนที่สกัดด้วยเมทานอลมี 4 ชนิดคือ piperine, methyl piperate, piperonylic acid และ piperic acid โดยมี piperine และ methyl piperate เป็นองค์ประกอบหลัก สำหรับ hydrocinnamic acid ยังไม่เคยมีผู้พบในดีปลีมาก่อน

จากการสกัดลำต้นดีปลีแห้งด้วยนอร์มัลเฮกเซนและเมทานอล แล้วนำส่วนที่สกัดได้มาแยกสารออกจากกันด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี แล้วนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาหาสูตรโครงสร้าง โดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี พบว่าในส่วนที่สกัดด้วยนอร์มัลเฮกเซนได้สารประเภท amide 5 ชนิด คือ piperine, guineensine, pipermonaline, pellitorine และ chabamide ซึ่งเป็น piperine dimer ได้สารประเภทอื่นอีก 2 ชนิดคือ methyl piperate และ β -sitosterol ส่วนสารที่แยกได้จากส่วนที่สกัดด้วยเมทานอลมี 1 ชนิดคือ piperine สำหรับ chabamide เป็นสารใหม่

2) ขำพลู

จากการสกัดผลขำพลู (*Piper samentosum* Roxb.) ด้วยนอร์มัลเฮกเซน แล้วนำส่วนสกัดที่ได้มาแยกสารออกจากกันด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี แล้วนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาหาสูตรโครงสร้าง โดยใช้เทคนิคสเปกโทรสโกปี สารที่แยกได้จากส่วนที่สกัดด้วยนอร์มัลเฮกเซนมี 8 ชนิด ได้แก่สารประเภท amide 5 ชนิดคือ pellitorine, guineensine, brachystamide B, sarmentine และ brachiamide B สารประเภท lignan 1 ชนิดคือ (+)-

asarinine และสารประเภทอื่นอีก 2 ชนิดคือ 1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-1*E*-tetradecene และ β -sitosterol ส่วนสารที่แยกได้จากส่วนที่สกัดได้จากเมทานอลมี 7 ชนิด ได้แก่ สารประเภท amide 4 ชนิด คือ pellitorine, 1-piperetyl pyrrolidine, 3',4',5'-trimethoxycinnamoyl pyrrolidine และ methyl piperate สำหรับ methyl piperate, guineensine, 1-piperetyl pyrrolidine, 3',4',5'-trimethoxycinnamoyl pyrrolidine brachystamide B, brachiamide B, sesamine และ (+)-asarinine ยังไม่เคยมีผู้พบในข้าวหลามก่อน

จากการสกัดรากข้าวหลามด้วยนอร์มัลเฮกเซนและเมทานอลตามลำดับ นำส่วนที่สกัดได้มาแยกสารออกจากกันด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี แล้วนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาหาสูตรโครงสร้างโดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี สารที่แยกได้จากส่วนที่สกัดด้วยนอร์มัลเฮกเซนมี 3 ชนิดได้แก่ β -sitosterol, asaricin และ 1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-1*E*-tetradecene ส่วนสารที่แยกได้จากส่วนที่สกัดด้วยเมทานอลมี 4 ชนิดได้แก่ pellitorine, sarmentosine, piperolactam และ *N-trans*-feruloyl tyramine สำหรับ piperolactam และ *N-trans*-feruloyl tyramine ยังไม่เคยมีผู้พบในข้าวหลามก่อน

3.2 โครงการวิจัยหน่วยที่ 2: เชื้อราสกุลคีโตเมียม (*Chaetomium*)

ในการแยกองค์ประกอบทางเคมีของเส้นใยแห้งของเชื้อรา *Chaetomium globosum* KMIT-N 0802 จากส่วนสกัดเอทิลอะซิเตต พบสาร 7 ชนิดคือ triglyceride, ergosterol, สารประเภท mitotoxin คือ chaetoglobosin C, อนุพันธ์ของ alternarinol, echinulin, chaetomanone ซึ่งเป็นสารชนิดใหม่ในกลุ่มของ anthraquinone-chromanone, isochaetoglobosin D จากส่วนสกัดเฮกเซนแยกได้สาร 2 ชนิดคือ ergosterol palmitate และ chrysophanol สำหรับ echinulin เป็นสารที่พบเป็นครั้งแรกในราสกุล *Chaetomium* ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของ chaetoglobosin C พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Collectotrichum gleosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงและส้มได้เป็นอย่างดี โดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโต และการสร้างสปอร์ที่ค่า ED₅₀ เท่ากับ 178 และ 0.09 μ g/ml ตามลำดับ และยังสามารถยับยั้งเชื้อ *Phytophthora parasitica* สาเหตุโรครากเน่าโคน

เน่าของส้มเขียวหวาน โดยผลการยับยั้งการเจริญเติบโต และการสร้างสปอร์ที่ค่า ED_{50} เท่ากับ 4 และ 35.43 ppm ตามลำดับ สำหรับอนุพันธ์ของ alternarinol, echinulin, chaetomanone, isochaetoglobosin D และสารอีก 1 ชนิด ซึ่งอยู่ระหว่างการพิสูจน์โครงสร้างนั้น ได้ทำการทดสอบฤทธิ์กับเชื้อราโรคพืช นอกจากนี้ยังได้ส่งสารไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพกับเชื้อก่อโรคในมนุษย์ พบว่าสารอนุพันธ์ของ alternarinol และ chaetomanone มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อวัณโรคโดยมีค่า MIC เท่ากับ 100 $\mu\text{g/ml}$ ส่วน echinulin ยังสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด KB โดยมีค่า ED_{50} เท่ากับ 8.7 $\mu\text{g/ml}$

3.3 โครงการวิจัยหน่วยที่ 3: พืชสกุล *Acalypha*

จากการศึกษาเบื้องต้นที่พบว่า ส่วนสกัดส่วนเหนือดินในชั้นเมทานอลของชาช้อย (*Acalypha siamensis* Oliv. ex Gage) ให้ผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* และเชื้อรา *Cladosporium cucurmerinum* ได้ดำเนินการแยกสารโดยใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟีแบบต่างๆ จนได้สารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดเมทานอลแล้ว 4 ชนิด จากข้อมูลสเปกโทรสโกปีทำให้สามารถหาเอกลักษณ์ของสารทั้ง 4 ชนิดได้ว่าเป็น gallic acid; 1,3,4,6-tetra-O-galloyl- β -D-glucopyranose; corilagin และ geraniin ซึ่งได้ส่งไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดเฮกเซนสามารถแยกได้สาร β -sitosterol; β -sitosteryl glucoside; ethyl gallate trimethyl ether และ triacontanol ส่วนสารอีก 2 ชนิด ได้ทำการหาโครงสร้างของสารที่แยกได้ นอกจากนี้ยังสามารถแยก chebulic acid trimethyl ester จากส่วนสกัดชั้นเมทิลีนคลอไรด์

3.4 โครงการวิจัยหน่วยที่ 4 : ราลูกบอล (*Scleroderma citrinum*)

ในการแยกส่วนสกัด MeOH (ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Phytophthora parasitica* สาเหตุโรครากเน่าในส้ม) ของราลูกบอล *Scleroderma citrinum* พบว่าสามารถแยกได้สาร 4 ชนิดคือ ergosterol, citrinone, 4,4'-dimethoxy methyl vulpinate และ 4,4'-dimethoxy vulpinic acid โดยที่ citrinone เป็นสารใหม่ประเภท lanostane steroid ส่วน 4,4'-dimethoxy methyl vulpinate และ 4,4'-dimethoxyvulpinic acid เป็นสารที่พบ

ได้เป็นครั้งแรกจากธรรมชาติ นอกจากนี้ได้สังเคราะห์อนุพันธ์ bromide ของ vulpinic acid คือ 3,3'-dibromo-4,4'-dimethoxy methyl vulpinate และ 3,3'-dibromo-4,4'-dimethoxyvulpinic acid สำหรับการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่า 4,4'-dimethoxy methyl vulpinate และ 4,4'-dimethoxyvulpinic acid สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Phytophthora palmivora* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียนและส้มที่ ED_{50} เท่ากับ 2114 และ 58 ppm ตามลำดับ และยังพบอีกว่าสารทั้งสองชนิดนี้สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *Collectotrichum gleosporioides* สาเหตุของโรค anthracnose ในมะม่วงและส้มที่ค่า ED_{50} เท่ากับ 45 และ 46 ppm ตามลำดับ สาร citrinone สามารถยับยั้งเชื้อ HSV-1 ได้ที่ค่า EC_{50} 5.25 $\mu\text{g/ml}$ ส่วนสารอนุพันธ์ dibromo ทั้ง 2 ชนิด สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด NCI-H-187 ที่ ED_{50} เท่ากับ 13.42 และ 5.78 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ นอกจากนี้สาร 4,4'-dimethoxyvulpinic acid และอนุพันธ์ dibromo ทั้งสองชนิดข้างต้น สามารถยับยั้งเชื้อวัณโรคที่ค่า MIC เท่ากับ 25, 100 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ

3.5 โครงการวิจัยหน่วยที่ 5: เชื้อราคีโตเมียม คิวเปรัม (*Chaetomium cupreum*)

ในการแยกส่วนสกัดเฮกเซนของเส้นใยแห้งของเชื้อรา *Chaetomium cupreum* ได้สาร 6 ชนิดคือ triglyceride, ergosterol, สารในกลุ่ม azaphilone ได้แก่ roborotiorin, rotiorin และที่เป็นสารใหม่ที่ยังไม่ทราบโครงสร้างแล้วคือ rotiorinol และสารที่มีโครงสร้างคล้าย rotiorin ในส่วนสกัด EtOAc แยกได้ rubrorotiorin สำหรับส่วนสกัด MeOH แยกได้สาร 7 ชนิดคือ rotiorinol และสารที่เป็นอนุพันธ์ของ rotiorinol อีก 6 ชนิด ซึ่งเป็นสารใหม่อย่างน้อย 2 สาร และอยู่ในระหว่างการพิสูจน์โครงสร้าง สาร rotiorinol, roborotiorin และ rotiorin และสารที่ยังไม่ทราบโครงสร้างอีก 1 ชนิด มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Canida albicans* ได้ที่ค่า EC_{50} เท่ากับ 10.5, 0.62, 24.32 และ 16.68 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ นอกจากนี้สาร rotiorinol ซึ่งเป็นสารหลักสามารถควบคุมเชื้อรา *Collectotrichum gleosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนส ของมะม่วงและส้มเขียวหวาน และ *C. dematium* สาเหตุโรคแอน

แตรคโนสในพริก โดยสามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ได้ที่ค่า ED_{50} เท่ากับ 616.68, 293.29 และ 45.23 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ

4. โครงการย่อยกลุ่มที่ 4: การศึกษาส่วนประกอบทางเคมีของพืชในแง่เคมีวิทยาเคมี

โครงการวิจัยกลุ่มนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาการปะทะสัมพันธ์ (interaction) ระหว่างพืชกับแมลงศัตรูพืช โดยผ่านทางสารเคมีที่มีอยู่ในพืชและ/หรือแมลง เพื่อให้มีความรู้ที่จะนำไปรวมใช้ควบคุมศัตรูพืชต่อไป คณะผู้วิจัยได้เลือกต้นแบบของการศึกษาด้านนี้เป็นมะระขึ้นกับแมลงศัตรูของพืชชนิดนี้ เพราะการปลูกชนิดนี้ทำได้โดยง่าย มีศัตรูเท่าที่เห็นได้ชัดอยู่ 2 ชนิดคือ แมลงวันผลไม้และแมลงเต่าทอง และเชื่อว่าพืชชนิดนี้จะเป็นตัวแทนที่ดีของพืชล้มลุกชนิดเถา

มะระขึ้นกับแมลงวันผลไม้ ได้ศึกษาเบื้องต้นว่า การที่แมลงวันผลไม้ *Bactrocera cucurbitae* มาวางไข่ที่ผลของมะระขึ้น (Momordica charantia L.) ซึ่งจะเรียกสั้นๆ ว่า “มะระ” มีสารเคมีนำทางหรือดึงดูดมาหรือไม่ และสารเคมีนั้นอยู่ส่วนใดของมะระ คณะผู้วิจัยได้สกัดน้ำมันหอมระเหยจากผลและใบของมะระ เพื่อนำไปทดสอบการดึงดูดแมลงวันผลไม้ โดยมี ผศ.ดร. รัตนา ปรมาคม ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง เป็นผู้ทดสอบ ผลการทดสอบเบื้องต้นปรากฏว่า น้ำมันหอมระเหยจากผลมะระไม่ดึงดูดแมลงวันผลไม้ แต่น้ำมันหอมระเหยจากใบดึงดูดแมลงชนิดนี้ ผลการวิจัยอาจนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมศัตรูพืชในแง่การหาสารล่อแมลงวันผลไม้ เพราะเท่าที่ทราบมา สารดึงดูดแมลงวันผลไม้ที่ใช้กันอยู่ เช่น methyleugenol ดึงดูดเฉพาะเพศผู้ แต่แมลงวันผลไม้ที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อผลไม้เป็นเพศเมีย และการล่อแมลงวันผลไม้โดยใช้เหยื่อล่อผสมสารฆ่าแมลง ก็ไม่เฉพาะเจาะจงเพราะแมลงชนิดอื่นๆ (ซึ่งอาจไม่ใช่ศัตรูพืช) ก็ถูกกำจัดไปด้วย ในการศึกษาเกี่ยวกับแมลงวันผลไม้ ได้ใช้การทดสอบระยะปานกลางและระยะไกล ผลการทดสอบยืนยันว่า น้ำมันหอมระเหยจากใบดึงดูดแมลง นอกจากนี้ยังพบว่าความสามารถในการดึงดูดแมลงยังขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่เก็บน้ำมันหอมระเหยไว้ ซึ่งจะได้ศึกษาในรายละเอียด และแยกสารที่ดึงดูดแมลงวันผลไม้

ต่อไปในอนาคต เราได้ดำเนินการวิจัยเพิ่มเติมเพื่อให้ทราบว่า สารกระตุ้นให้เกิดการวางไข่ (oviposition stimulant) รวมทั้งสารยับยั้งการวางไข่ (oviposition deterrent) (ถ้ามี) คือสารประเภทใด เพื่อที่จะหาทางนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมแมลงไม่ให้มารบกวนพืชต่อไป การวิจัยมีอุปสรรคหลายประการ ที่สำคัญคือ สถานที่ในการทดลอง ไม่สามารถควบคุมสภาวะต่าง ๆ ได้ เช่น ความแรงของลม แสงสว่าง และอุณหภูมิ นอกจากนี้ยังได้หารือกับนักกีฏวิทยาและนักชีววิทยา เพื่อนำผลในการดึงดูดแมลงวันผลไม้ของน้ำมันหอมระเหยไปทดลองในภาคสนามต่อไป

5. โครงการย่อยกลุ่มที่ 5: การศึกษาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพด้านอื่น ๆ

5.1 โครงการวิจัยหน่วยที่ 1: พืชสกุล *Cinnamomum*

จากการสกัดเนื้อไม้ที่แห้งของเทพธำโร (*Cinnamomum parthenoxylon* Meissn) ด้วยนอร์มัลเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอลโดยวิธี marceration แล้วนำส่วนที่สกัดได้มาแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟี และหาสูตรโครงสร้างโดยเทคนิคสเปกโทรสโกปี พบว่าได้สารประเภท phenylpropanoids 4 ชนิดคือ safrole ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลัก, ส่วนผสมของ alkyl *trans*-ferulate ที่มีโซ่อัลคิลประกอบขึ้นด้วย C_{22} และ C_{24} - C_{28} , 3,4-methylenedioxycinnamaldehyde และ 3-(3,4-methylenedioxyphenyl)-1,2-propanediol นอกจากนี้ยังพบ β -sitosterol สำหรับสารที่เป็นส่วนผสมของ alkyl *trans*-ferulate และ 3-(3,4-methylenedioxyphenyl)-1,2-propanediol ยังไม่เคยมีผู้พบในพืชสกุล *Cinnamomum* มาก่อน

5.2 โครงการวิจัยหน่วยที่ 2: พืชสกุล *Jatropha*

ในการสกัดแยกสารจากหนุมานนั่งแท่น (*Jatropha podagrica* Hook. f.) จากสารสกัดเฮกเซนและบิวทานอล จากส่วนของใบและส่วนของรากพบว่าได้สาร ethyl palmitate, β -sitosterol, β -sitosteryl glucopyranoside, jatropham, vitexin, jatrophin,

curculathyrane A, ellagic acid-4,4'-dimethylether และได้นำสารบางชนิดไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

5.3 โครงการวิจัยหน่วยที่ 3: ตองแตบ (*Macaranga denticulata*)

ได้แยกสารบริสุทธิ์ 9 ชนิดจากเปลือกและใบของต้นตองแตบ (*Macaranga denticulata* Muell. Arg.) คือ 3-acetylaeuritolic acid, 2-hydroxyaleuritolic acid-3-*p*-hydroxybenzoate, aleuritolic acid, ส่วนผสมระหว่าง β -sitosterol และ stigmasterol, scopoletin, denticulaflavonol, macarangin, sophoraflavanone B และ 3-*O*-methyl-macarangin สาร macarangin แสดงฤทธิ์เป็น antioxidant ได้ใกล้เคียงกับสารมาตรฐานคือ DPPH (IC_{50} มีค่าเท่ากับ 0.032 และ 0.031 mM ตามลำดับ) ส่วน scopoletin แสดงฤทธิ์ที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.342 mM

5.4 โครงการวิจัยหน่วยที่ 4: มังคุด (*Garcinia mangostana*)

ได้แยกแซนโทน 10 ชนิด และฟลาโวนอยด์ 1 ชนิดจากเปลือกผลมังคุดดิบ (*Garcinia mangostana* L.) คือ α - และ β -mangostins, garcinone B, mangostinone, mangostanol, tovophyllin B, trpezifolixanthone, (-)-epicatechin, mangostenol, mangostenone A และ mangostenone B โดยที่สาร 3 ชนิดหลังเป็นแซนโทนชนิดใหม่

5.5 โครงการวิจัยหน่วยที่ 5: กาสามปึก (*Vitex peduncularis*)

ได้นำเปลือกของต้นกาสามปึก (*Vitex peduncularis* Wall.) มาแยกสารประเภทอิริโดอยด์ (iridoids) ได้ 2 ชนิด คือ agnuside และ pedunculariside โดยอิริโดอยด์ชนิดหลังนี้เป็นชนิดใหม่ เมื่อนำอิริโดอยด์มาทดสอบฤทธิ์ anti-inflammatory พบว่าทั้ง 2 ชนิดสามารถยับยั้ง COX-2 ได้ดีกว่า COX-1 และสารทั้ง 2 ชนิดไม่แสดง cytotoxicity ต่อ vero cells

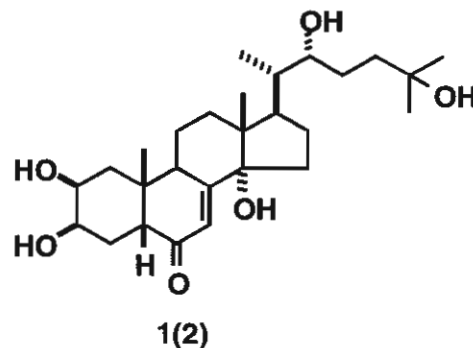
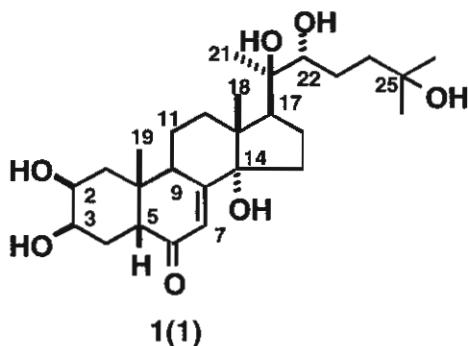
โครงการย่อยกลุ่มที่1: เคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของเเคไคโตสเตียรอยด์

โครงการย่อยกลุ่มที่1: เคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของเอคไดสเตียรอยด์

บทนำ

1. คำนำ

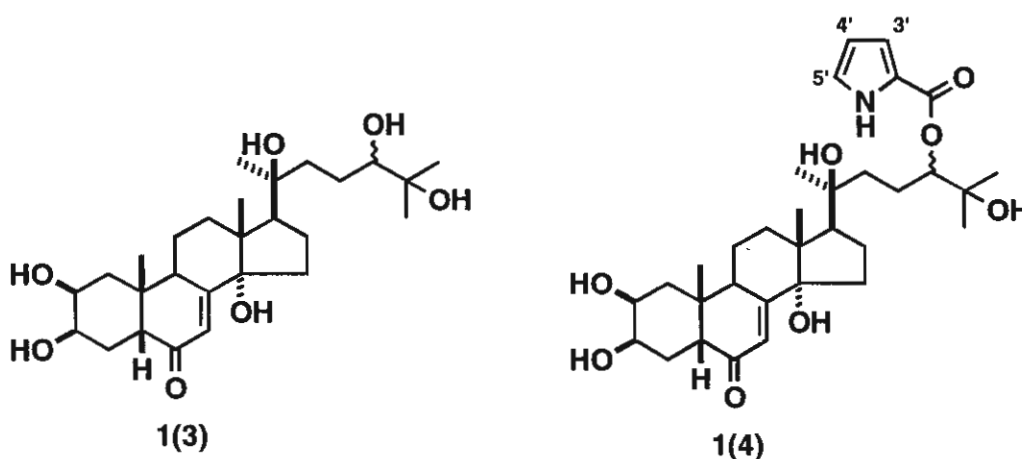
ในการกำจัดศัตรูพืชโดยใช้สารเคมีนั้น ก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสภาวะแวดล้อมและด้านสุขภาพความปลอดภัยของมนุษย์ จึงได้มีผู้สนใจที่จะป้องกันและกำจัดศัตรูพืชโดยใช้ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ แนวทางหนึ่งซึ่งน่าสนใจคือ ได้มีผู้หาทางนำฮอร์โมนประเภทหนึ่งที่แมลงผลิตขึ้นมาใช้เพื่อการเจริญเติบโตของแมลงคือ เอคไดสเตียรอยด์ (ecdysteroids) มาใช้ในการป้องกันและกำจัดแมลง สารประเภทนี้พบในแมลง และยังพบในกุ้ง ปู และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังอีกบาง Class ในไฟลัม Arthropoda และไฟลัมอื่นๆ เช่น Mollusca^[1] ตัวอย่างที่สำคัญของสารประเภทนี้คือ 20-hydroxyecdysone [1(1)] สารประเภทนี้ในตอนเริ่มแรกที่มีการค้นพบเรียกว่า ฮอร์โมนลอกคราบ (moulting hormone) เนื่องจากสามารถทำให้แมลงเปลี่ยนแปลงจากขั้นตอนของการเป็นตัวอ่อน (larvae) ไปสู่ตัวเต็ม (pupae) จากตัวเต็มจะเกิดการลอกคราบกลายเป็นแมลงต่อไป เมื่อมีการศึกษาค้นคว้ากันมากขึ้นได้พบว่าสารประเภทนี้มีหน้าที่ควบคุมกระบวนการต่างๆ ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังดังกล่าวคือ การลอกคราบ การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง และควบคุมกระบวนการสืบพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบว่าสารประเภทนี้ยังควบคุมกระบวนการทางสรีระอื่นๆ ด้วย เช่น เมแทบอลิซึมและการขับถ่าย^[2] ฮอร์โมนนี้ แมลงต้องการใช้ในปริมาณที่น้อยมาก ฉะนั้นเราจึงพบว่าสารประเภทนี้มีอยู่ในปริมาณที่น้อยมากในสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น Butenandt และ Karlson^[3] ได้นำตัวเต็มของตัวไหม (silk-worm pupae) ปริมาณ 0.5 ตัน มาผ่านขั้นตอนการสกัดแยกหลายขั้นตอนจนได้ ecdysone [1(2)] ซึ่งเป็นเอคไดสเตียรอยด์ชนิดหนึ่งเพียง 25 มิลลิกรัมเท่านั้น Horn และคณะ^[4] ได้นำ crayfish คือ *Jasus lalandei* มา 1 ตัน สามารถแยกสาร 1(1) ในปริมาณเพียง 2.3 มิลลิกรัมเท่านั้น ต่อมา Nakanishi และคณะ^[5] ได้นำพืช *Podocarpus nakaii* มาสกัดหาสารต้านมะเร็ง แต่กลับได้เอคไดสเตียรอยด์ออกมา 3 ชนิดในปริมาณที่มากกว่าที่พบในสัตว์มาก กล่าวคือ จากการใช้ใบของพืชชนิดนี้เพียง 900 กรัม สามารถแยกเอคไดสเตียรอยด์มีน้ำหนักรวมกันถึง 6.6 กรัม สารดังกล่าวมีฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมน



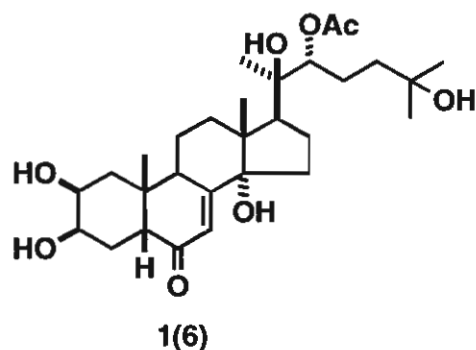
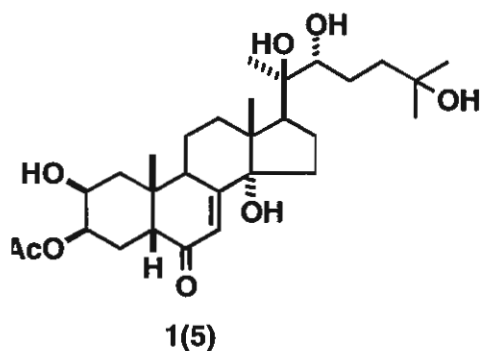
ลอกคราบแมลง และในเวลาใกล้เคียงกันนี้ Takemoto และคณะ^{1[6]} ได้ตรวจสอบหาส่วนประกอบสำคัญที่มีอยู่ในรากของพืช *Achyranthes fauriei* ซึ่งมีสรรพคุณในการขับปัสสาวะ ปรากฏว่าได้มีการพบสาร **1(1)** ด้วย และมีปริมาณค่อนข้างสูง

2. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

จากการค้นพบเอคโดสเตียรอยด์ในพืช ทำให้เชื่อกันว่า เป็นวิธีการหนึ่งที่พืชชนิดนั้นสร้างสารเคมีขึ้นมาต่อสู้กับแมลง^{1[7]} เพราะหากแมลงไปกินพืชที่มีเอคโดสเตียรอยด์อยู่ ก็จะเป็นอันตรายต่อแมลงเอง ได้มีการศึกษาพบว่าเอคโดสเตียรอยด์แต่ละชนิดมีฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบแตกต่างกัน เอคโดสเตียรอยด์บางชนิดมีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง บางชนิดมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่ำ และบางชนิดไม่มีฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าว อย่างไรก็ตาม ได้เป็นที่สงสัยกันว่าเหตุใดพืชจึงสร้างเอคโดสเตียรอยด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่ำ เพราะน่าจะเป็นผลเสียต่อพืชเองในการป้องกันตนเองจากศัตรู ผู้วิจัยมีความเชื่อว่า พืชจะต้องมีเหตุผลอยู่เบื้องหลังอย่างแน่นอน เมื่อไม่นานมานี้ Suksamram และคณะ ได้พบเอคโดสเตียรอยด์ชนิดหนึ่งคือ pinnasterone **1(3)** จากต้นสมอติ่นก (*Vitex pinnata*)^{1[8]} เอคโดสเตียรอยด์นี้มีฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบต่ำ ต่อมา ได้พบเอคโดสเตียรอยด์อีกชนิดหนึ่งจากพืชสกุล *Vitex* ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับ *V. pinnata* คือ ต้นผ้าเสียน (*V. canescens*) เอคโดสเตียรอยด์ใหม่นี้ให้ชื่อว่า canescensterone **1(4)**^{1[9]} จากโครงสร้างจะเห็นได้ว่า เอคโดสเตียรอยด์นี้ต่างจาก pinnasterone **1(3)** เพียงเป็น pyrrole-2-carboxylate ester ของ **1(1)** แต่สิ่งที่น่าแปลกใจก็คือ เป็นครั้งแรกที่มีการค้นพบเอคโดสเตียรอยด์จากพืชที่เป็นอนุพันธ์เอสเทอร์ของสารประกอบ nitrogen heterocycle เพราะโดยปกติแล้ว เอคโดสเตียรอยด์ที่พบในรูปของอนุพันธ์นั้นเป็นอนุพันธ์ซึ่งเป็นที่รู้จักกันดีเท่านั้นคือ อะซิเตต benzoate, *p*-coumarate, acetone และ glycoside เมื่อนำเอคโดสเตียรอยด์ **1(4)** มาทดสอบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบ ปรากฏว่ามีฤทธิ์ตรงข้ามกับที่คาดไว้ กล่าวคือ แทนที่จะมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่ำเช่นเดียวกับเอคโดสเตียรอยด์ **1(3)** แต่กลับแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพสูง^{1[9]}



ถึงแม้ว่ากรณีนี้จะเป็นอย่างแรกของการค้นพบว่าพืชสร้างเอคโดสเตียรอยด์ที่มีฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบตรงข้ามกับที่คาดไว้ แต่การที่ฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าวเป็นไปได้ในทางที่เป็นประโยชน์ต่อพืชเองในการป้องกันตนเองจากแมลง คณะผู้วิจัยค่อนข้างจะเชื่อว่า การที่พืชเติมหมู่ pyrrole-2-carboxylate เข้าไปที่ตำแหน่ง 24 ของ สาร 1(3) นั้น ไม่น่าจะเป็นเรื่องที่เกิดขึ้นโดยบังเอิญ แต่อาจเป็นการที่พืชได้มีวิวัฒนาการในการสร้างสารเคมีขึ้นมาต่อสู้กับศัตรูของพืช ฉะนั้นเป็นไปได้ที่การที่พืชสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่ำอย่าง pinnasterone [1(3)] แต่ความจริงแล้วสารนี้เป็นเพียงสารมัธยันตร์ (intermediate) สำหรับการสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงอย่าง canescensterone [1(4)] ก็ได้ และการที่พืชสร้างเอคโดสเตียรอยด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงโดยการเพิ่มหมู่อนุพันธ์ แทนที่จะสร้างเอคโดสเตียรอยด์ชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงโดยตรงเลยเช่นนี้ จะเป็นไปได้หรือไม่ที่เป็นวิธีการหนึ่งที่พืชได้พยายามหาวิธีการป้องกันไม่ให้แมลงลดพิษของการเป็นฮอร์โมนลอกคราบของเอคโดสเตียรอยด์ชนิดนั้นได้ เพราะได้มีผู้พบว่าแมลงหรือสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังบางชนิดสามารถลดพิษของเอคโดสเตียรอยด์ที่มีอยู่ในพืชที่สัตว์เหล่านั้นกินเข้าไปได้ เช่น Modde และคณะ^[10] พบว่าตั๊กแตน *Locusta migratoria* สามารถลดพิษของ 20-hydroxyecdysone [1(1)] ได้โดยการเปลี่ยน 1(1) ให้เป็น 20-hydroxyecdysone 3-acetate [1(5)] และ Garcia และคณะ^[11] ก็ได้พบว่าหอยทาก *Cepaea nemoralis* สามารถลดพิษของ 1(1) ได้โดยการเปลี่ยนให้เป็น 20-hydroxyecdysone 22-acetate [1(6)] อย่างไรก็ตาม คำถามข้างต้นคงจะยังไม่สามารถตอบได้ถ้าเรายังมีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของเอคโดสเตียรอยด์ กับฤทธิ์ทางชีวภาพที่แสดงออก (structure-activity relationships, SAR) น้อย และเรายังมีการศึกษาผลของหมู่แทนที่หลายๆชนิดที่อยู่ในตำแหน่งต่างๆในโมเลกุลของเอคโดสเตียรอยด์กันน้อยมาก ด้วยเหตุนี้กลุ่มของ Suksamrarn และคณะจึงได้ทำการศึกษา SAR ของเอคโดสเตียรอยด์ และเริ่มได้ข้อมูลเกี่ยวกับการ bind ของเอคโดสเตียรอยด์กับ receptor ของแมลง หากได้มีการศึกษาต่อไป อาจได้ข้อมูลพื้นฐานสำคัญสำหรับการนำไปประยุกต์ในการสร้างสารควบคุมศัตรูพืชในอนาคต



3. วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 1) เพื่อสกัดแยก หาสูตรโครงสร้าง และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเอคโดสเตียรอยด์ที่ได้จากธรรมชาติ
- 2) เพื่อสังเคราะห์เอคโดสเตียรอยด์ โดยการปรับเปลี่ยนโครงสร้างและหมู่ฟังก์ชัน และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเอคโดสเตียรอยด์ที่สังเคราะห์ได้
- 3) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ทางชีวภาพ ของเอคโดสเตียรอยด์ทั้งที่ได้จากธรรมชาติและที่สังเคราะห์ได้

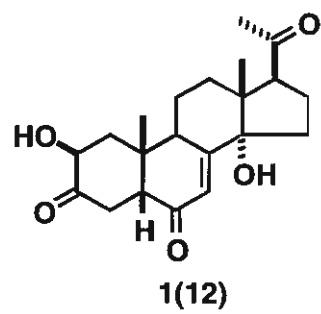
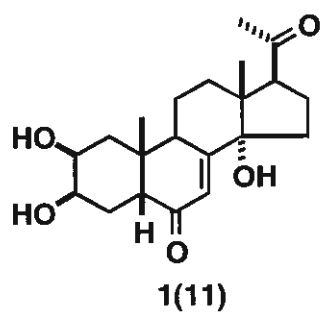
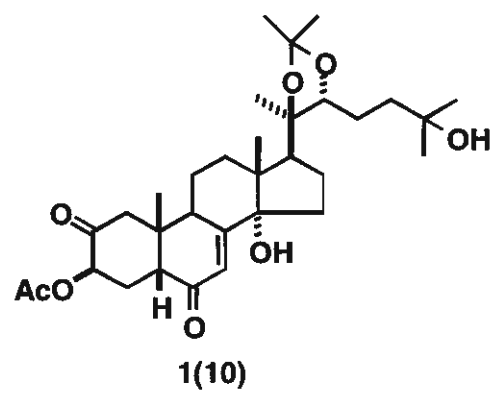
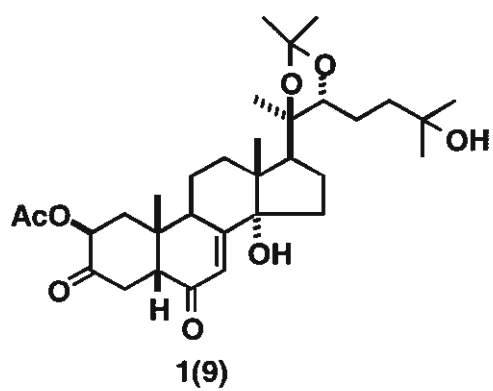
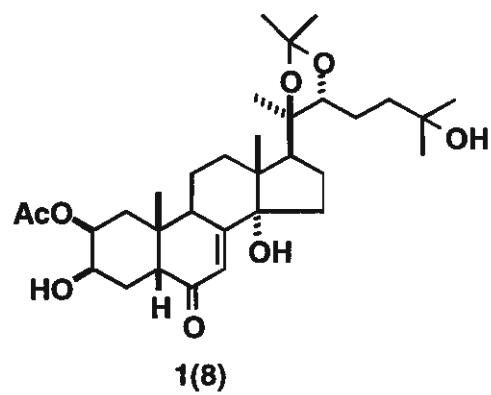
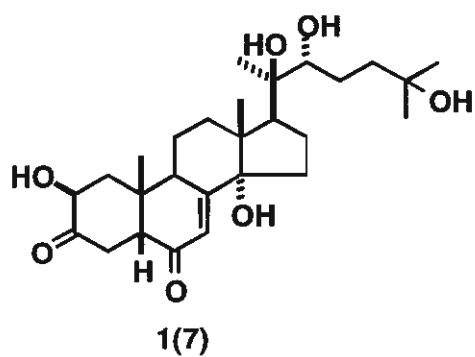
4. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

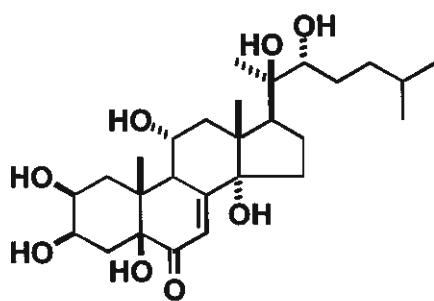
1) เคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของเอคโดสเตียรอยด์

ผลงานวิจัยทางด้านผลิตภัณฑ์ธรรมชาติของเอคโดสเตียรอยด์มีมากพอสมควร และได้มีการรวบรวมไว้แล้ว^{1[1,7,12]} ส่วนงานวิจัยด้านความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของเอคโดสเตียรอยด์กับฤทธิ์ทางชีวภาพในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบนั้น ยังมีค่อนข้างน้อย งานในช่วงแรก ส่วนใหญ่เป็นงานของกลุ่มของ Hom และกลุ่มของ Robbins กล่าวคือ Bergamasco และ Hom^{1[13]} ได้พบว่าลักษณะของโครงสร้างของเอคโดสเตียรอยด์หรือสารในกลุ่มเอคโดสเตียรอยด์ที่จะต้องมิจึงจะแสดงฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบคือ (1) การมีการเชื่อมต่อระหว่างวง A และ B เป็นแบบซิส (*cis*-A/B ring fusion) (2) การมีหมู่คีโตที่ตำแหน่ง 6 และต่อด้วยพันธะคู่ที่ตำแหน่ง 7 (6-keto-7-ene system) (3) การมีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระที่ตำแหน่ง 14 α (free 14 α -hydroxyl group) และ (4) การมีสายโซ่ด้านข้างที่มีคาร์บอนครบ (full sterol side chain) Robbins และคณะ^{1[14]} ก็พบเช่นเดียวกับกลุ่มของ Hom ว่าหมู่ไฮดรอกซิลอิสระที่ตำแหน่ง 14 α ก็มีความจำเป็นต่อการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพของเอคโดสเตียรอยด์ Suksamram และคณะ^{1[15]} ได้ค้นพบเพิ่มเติมอีกว่า ตำแหน่ง 9 จะต้องไม่มีหมู่แทนที่ ถ้าตำแหน่งดังกล่าวมีหมู่แทนที่ จะทำให้ฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบหมดไปทันที นอกจากนี้ กลุ่มของ Hom^{1[13]} ยังพบว่า หมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 3 β และ 22R จำเป็นต่อการแสดงฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบที่สูง และยังพบอีกว่า หมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 2 และ 25 ไม่มีความจำเป็นต่อการแสดงฤทธิ์ดังกล่าว

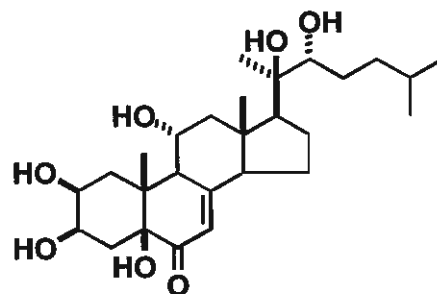
เนื่องจากแหล่งของเอคโดสเตียรอยด์ที่มีปริมาณมากมีอยู่จำกัดมาก ในช่วงแรกจึงมีงานเกี่ยวกับการนำสารนี้ไปศึกษาปฏิกิริยาต่างๆค่อนข้างน้อยตามไปด้วย ปฏิกิริยาส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับการเตรียมอนุพันธ์โดยทั่วไป เช่น อะซีเตต, acetonides, trimethylsilyl ethers, sulphates และ 22-long-chain fatty esters อย่างไรก็ตาม ได้มีการศึกษาปฏิกิริยาอื่นๆของเอคโดสเตียรอยด์กันบ้างคือ Galbraith และคณะ^{1[16]} ได้เตรียมอนุพันธ์อะซีเตตของเอคโดสเตียรอยด์ 1(1) โดยการทำ partial acetylation ของสาร 1(1) และทำ partial deacetylation ของสารอนุพันธ์อะซีเตต ได้สารอนุพันธ์อะซีเตตบางชนิด ต่อมา Suksamram และ

Pattanaprateep¹⁽¹⁷⁾ ได้หาวิธีใหม่ในการ เตรียมอนุพันธ์ monoacetates, diacetates และ triacetates ของสาร 1(1) โดยการทำให้ selective acetylation ของสาร 1(1) Spindler และ Koolman¹⁽¹⁸⁾ ได้นำสาร 1(1) มาออกซิไดส์โดยใช้แพลทินัมเป็นคะตะลิสต์ พบว่าได้ 3-dehydro-20-hydroecdydysone [1(7)] และสารอื่นที่ไม่ทราบโครงสร้างอีก 4-5 ชนิด Lloyd-Jones และคณะ¹⁽¹⁹⁾ ได้ใช้ Jones reagent ในการออกซิไดส์สาร 1(8) ปรากฏว่าได้สารผลิตภัณฑ์ 2 ชนิด คือ 1(9) และ 1(10) ในอัตราส่วน 3:1 แต่ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ Siddall และคณะ¹⁽²⁰⁾ ได้ออกซิไดส์สาร 1(1) ด้วย sodium metaperiodate พบว่าได้ poststerone [1(11)] เมื่อมีผู้ใช้เอเจนต์เป็น Collin reagent และ Jones reagent ก็ได้ผลเช่นเดียวกัน Petersen และคณะ¹⁽²¹⁾ ใช้เอเจนต์ชนิดหลังนี้ในการออกซิไดส์สาร 1(1) โดยเปลี่ยนสภาวะของปฏิกิริยาบางประการ ปรากฏว่าได้สาร 1(12) เพิ่มมาอีกนอกจากสาร 1(11) โดยการให้หลักการเดียวกันนี้ Davies และคณะ¹⁽²²⁾ และ Greenwood และคณะ¹⁽²³⁾ รวมทั้ง Girault และคณะ¹⁽²⁴⁾ สามารถเตรียม 3-dehydroecdysteroids ทำนองเดียวกับสาร 1(7) Dinan และคณะ¹⁽²⁵⁾ ได้นำสารพวก 3-dehydroecdysteroids มาทำการรีดิวส์ด้วย sodium borohydride ได้ epimeric alcohols ที่ตำแหน่ง 3 Galbraith และคณะ¹⁽²⁶⁾ และ Hedtmann และคณะ¹⁽²⁷⁾ ได้ใช้ poststerone [1(11)] เป็นสารมัธยันตร์ (intermediate) ในการสังเคราะห์เอคโดสเตียรอยด์ชนิดอื่น สำหรับการปรับเปลี่ยนส่วนอื่นๆของเอคโดสเตียรอยด์ก็ได้มีรายงานไว้บ้าง คือ Cherbas และคณะ¹⁽²⁸⁾ ได้พบว่าเมื่อนำ muristerone A [1(13)] มาทำปฏิกิริยากับ trimethylsilyl chloride-sodium iodide กลับได้ 14-deoxymuristerone A [1(14)] ซึ่งมีฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบสูง Lee และคณะ¹⁽²⁹⁾ ได้สังเคราะห์ 26-iodoponasterone A [1(15)] จาก inokosterone [1(16)] โดยผ่านปฏิกิริยาเคมี 4 ขั้นตอน ปรากฏว่าสาร 1(15)] นี้มีฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบสูง นอกจากนี้ Tomas และคณะ¹⁽³⁰⁾ ได้สังเคราะห์ 25-fluoroponasterone A [1(17)] จากสาร 1(1) แต่สารนี้ไม่มีรายงานว่ามียุทธวิธีทางชีวภาพดีกว่าสาร 1(1) แต่อย่างใด เมื่อเร็วๆนี้ Suksamram และคณะ¹⁽¹⁵⁾ ได้หาวิธีการสังเคราะห์ calonysterone [1(18)] ซึ่งเป็นเอคโดสเตียรอยด์ที่หายาก เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบ ปรากฏว่าสามารถสังเคราะห์สารนี้ได้ด้วยปฏิกิริยาขั้นตอนเดียว โดยนำสาร 1(1) มาออกซิไดส์ด้วยออกซิเจน และมีเบสเป็นคะตะลิสต์ เมื่อนำสาร 1(18) ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ปรากฏว่าสารนี้ไม่มีฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบ ซึ่งสอดคล้องกับผลที่กลุ่มของ Hom ได้เสนอไว้ เพราะสาร 1(18) นี้ขาดลักษณะทางโครงสร้างพื้นฐานของการมีฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบหลายประการ Galbraith และคณะ¹⁽³¹⁾ ได้หาทางปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของเอคโดสเตียรอยด์ 1(1) โดยการจัดหมู่ไฮดรอกซิลที่อยู่ตำแหน่ง 2 เริ่มต้นด้วยการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 2 ให้เป็นอนุพันธ์ tosylate แล้วจัดหมู่ tosyloxy ด้วย lithium aluminum hydride แล้วออกซิไดส์หมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 6 ซึ่งเกิดจากการที่หมู่คีโตถูกรีดิวส์ให้กลับเป็นหมู่คีโตตามเดิม แต่สารผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ 1(19) แทนที่จะเป็น 1(20) เนื่องจากขั้นตอนการรีดิวส์เกิดผ่านกลไกของปฏิกิริยาที่ต่างไปจากที่คาดไว้ อย่าง

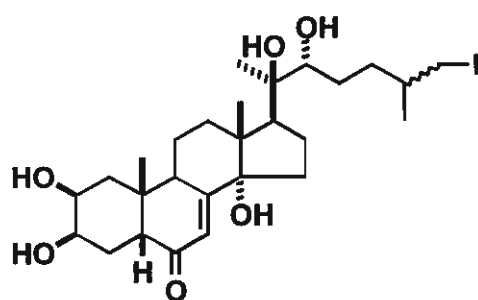




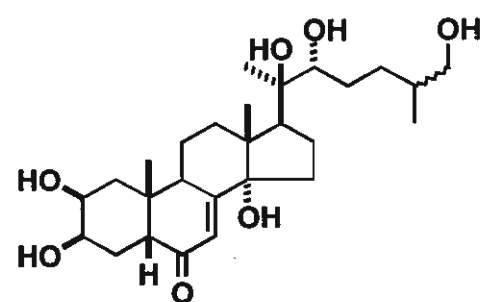
1(13)



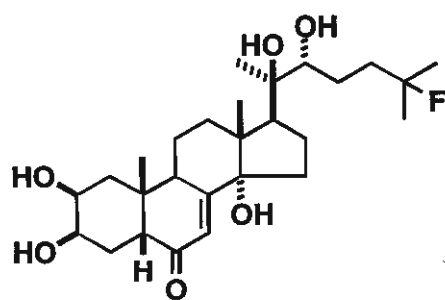
1(14)



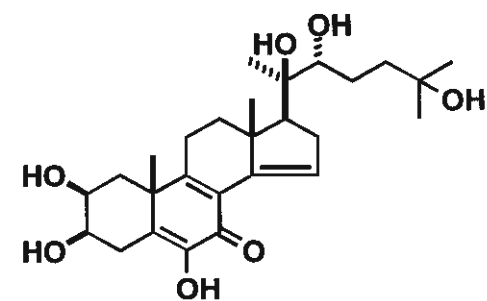
1(15)



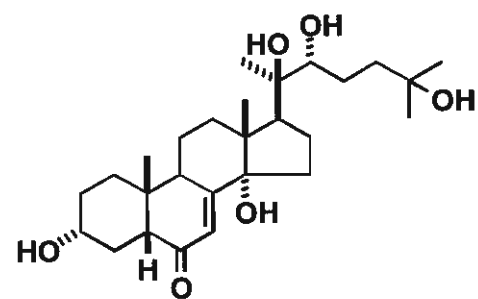
1(16)



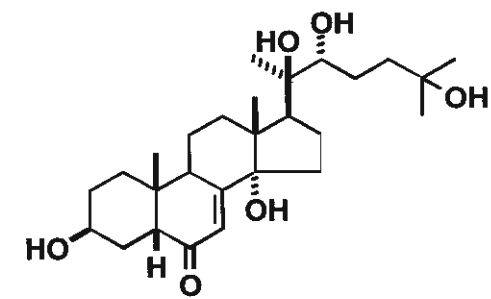
1(17)



1(18)



1(19)

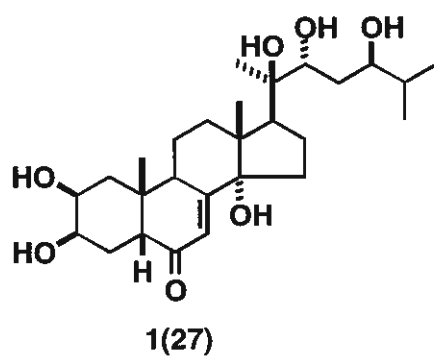
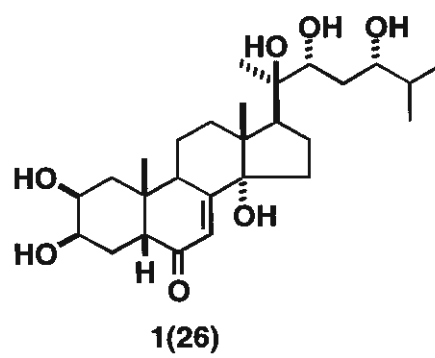
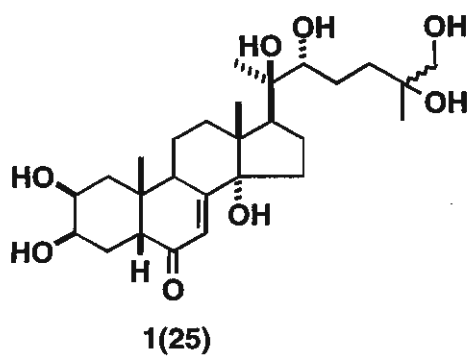
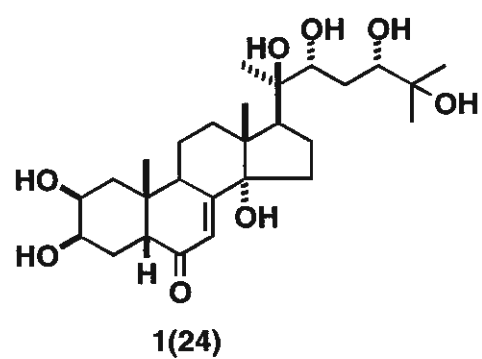
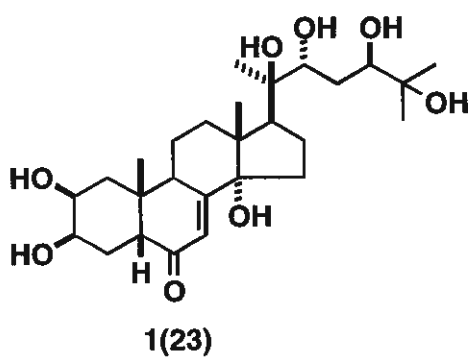
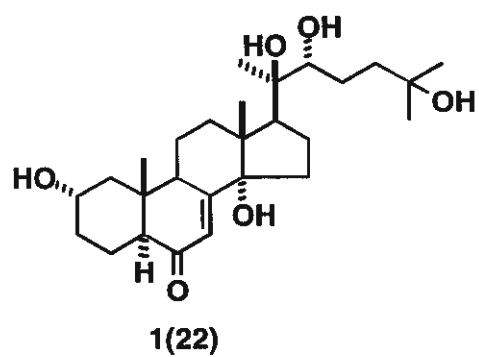
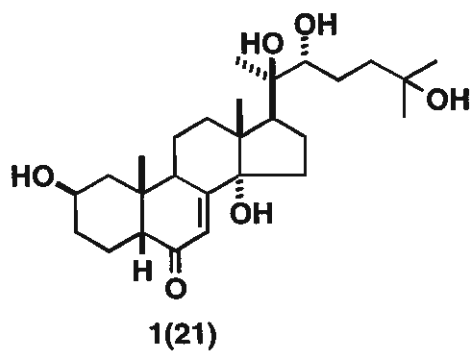


1(20)

โรกีตาม Kametani และคณะ^{1[32]} ได้สังเคราะห์สาร 1(20) ได้จาก pregnenolone แต่ต้องผ่านปฏิกิริยามากมายหลายขั้นตอน ตั้งต้นจากเอคโดสเตียรอยด์ 1(1) Suksamram และ Yingyongnarongkul^{1[33,34]} ได้สังเคราะห์สาร 1(19) และ 1(20) และ epimer ที่ตำแหน่ง 5 ของ 1(19) และ 1(20) รวมทั้งอนุพันธ์ acetate ที่ตำแหน่ง 3 และ 22 ของ 1(20) และอนุพันธ์ benzoate ที่ตำแหน่ง 22 ของ 1(20) เนื่องจากกลุ่มของ Hom ได้สรุปว่า หมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 2 ของเอคโดสเตียรอยด์ไม่จำเป็นต่อการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพของเอคโดสเตียรอยด์^{1[13]} Suksamram และคณะ^{1[35]} จึงได้สังเคราะห์ 3-deoxy-20-hydroxyecdysone [1(21)] และ analogue 1(22) จากอนุพันธ์ 20,22-acetonide ของ 20-hydroxyecdysone [1(1)] โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบ ปรากฏว่าสาร 1(21) มีฤทธิ์ทางชีวภาพค่อนข้างสูง ถึงแม้จะไม่สูงเท่าเอคโดสเตียรอยด์ 1(1) แสดงว่าหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 2 ก็ยังมีความสำคัญต่อการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ ฉะนั้น จึงเห็นได้ว่าความรู้ทางด้าน SAR ในส่วนของวง A ของเอคโด สเตียรอยด์ยังมีน้อยมาก น่าจะได้มีการศึกษาเพิ่มเติม

ทางด้านการสังเคราะห์เอคโดสเตียรอยด์จากสารตั้งต้นที่เป็นสเตียรอยด์ที่หาได้ง่ายก็ยังมีงานของ Siddall และคณะ^{1[36]}, Mori และคณะ^{1[37]}, Furlenmeier และคณะ^{1[38]} และ Barton และคณะ^{1[39]} แต่ทุกการสังเคราะห์นั้นผ่านขั้นตอนต่างๆหลายขั้นตอน เมื่อดูโครงสร้างโดยส่วนรวมของเอคโดสเตียรอยด์ จะเห็นว่าสารประเภทนี้น่าจะมีความเสถียรต่อการทำปฏิกิริยาโดยทั่วไป แต่สำหรับผู้ที่ยังไม่คุ้นเคยกับการทำปฏิกิริยาของเอคโดสเตียรอยด์กับรีเอเจนต์ชนิดต่างๆ แล้วจะพบว่า บางปฏิกิริยาที่ต้องการให้เกิดกลับไม่มีอะไรเกิดขึ้นเลย บางปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้โดยไม่คาดคิดว่าจะเกิด แต่สำหรับผู้ที่คุ้นเคยกับการทำปฏิกิริยาเคมีกับเอคโดสเตียรอยด์ก็จะพบจุดอ่อนจุดแข็งของสารประเภทนี้ต่อการทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์ชนิดต่างๆ เช่นในสภาวะที่เป็นเบส (เช่นในสารละลาย NaOH หรือ NH_4OH) ออกซิเจนในอากาศจะทำให้เกิด autoxidation ของเอคโดสเตียรอยด์ (เช่น สาร 1(1)) ได้^{1[15]} เบสที่ไม่แรงนัก เช่น K_2CO_3 และ KHCO_3 สามารถก่อให้เกิด epimerization ที่ตำแหน่ง 5 ได้^{1[23,40]} ในสภาวะที่เป็นกรด โดยเฉพาะกรดแร่อนินทรีย์ เช่น HCl แม้จะเป็นชนิดเจือจางก็ยังสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยา dehydration ที่ตำแหน่ง 14 ได้^{1[16]}

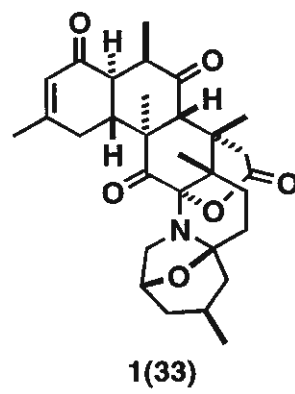
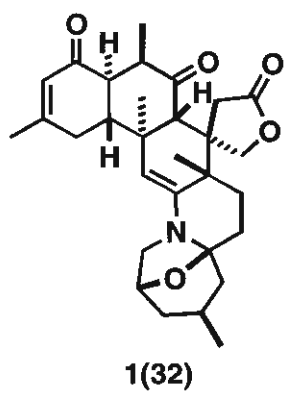
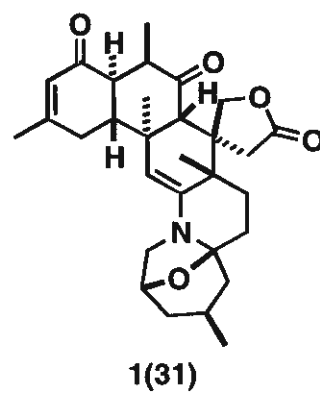
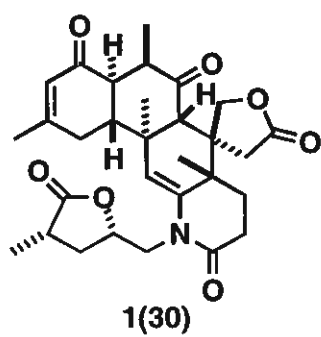
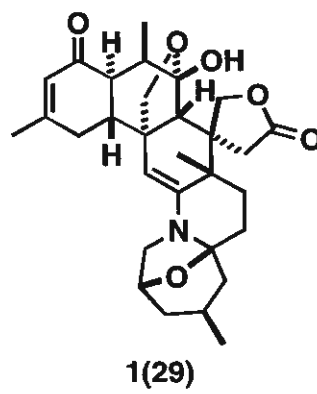
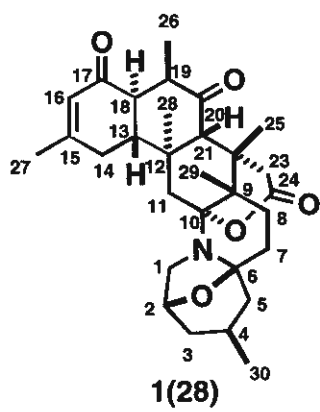
ในช่วงหลังของงานวิจัยด้านเอคโดสเตียรอยด์ Suksamram และคณะ^{1[41]} ได้แยก 24-*epi*-abutasterone [1(23)] ซึ่งเป็นเอคโดสเตียรอยด์ชนิดใหม่ได้จากเปลือกกรากของ *V. canescens* แต่ได้ในปริมาณน้อย Yingyongnarongkul และ Suksamram^{1[42]} จึงได้สังเคราะห์สาร 1(23) และ abutasterone [1(24)] เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ปรากฏว่าสาร 1(23) และ 1(24) มีฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบใกล้เคียงกัน แต่ทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ต่ำกว่า 20-hydroxyecdysone [1(1)] แสดงว่าการมีหมู่ไฮดรอกซิลเพิ่มเข้ามาที่ตำแหน่ง 24 ไม่ว่าจะเป็น 24S- หรือ 24R- ก็จะทำให้ฤทธิ์ทางชีวภาพลดลง ต่อมา Suksamram และคณะ^{1[43]}

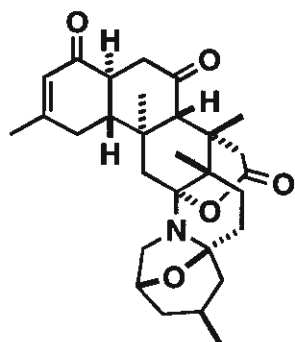


ได้แยก 20,26-dihydroxecdysone [1(25)] ทั้งสอง C-25 epimers ออกมาจากพืชสกุล *Vitex* 3 ชนิด ในปริมาณน้อย และได้ทำการสังเคราะห์เอคโดสเตียรอยด์นี้ทั้งสอง epimers เมื่อทดสอบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบแมลง พบว่า epimer ที่สองซึ่งเป็นสารที่ออกมาจาก reversed-phase HPLC column ในภายหลัง มีฤทธิ์สูงกว่า epimer แรกประมาณ 2 เท่า แสดงว่าการจัดเรียงตัวของหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 25 มีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของเอคโดสเตียรอยด์ อย่างไรก็ดีตามทั้งสอง epimers มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่ำกว่า 1(1) ค่อนข้างมาก แสดงว่าการเพิ่มหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 26 ลดฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบ Suksumram และ Yingyongnarongkul^{1[44]} จึงแยก pterosterone [1(26)] ออกจากเปลือก ของ *V. glabrata* และสังเคราะห์ 24-epi-pterosterone [1(27)] อย่าง regioselective และทดสอบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบ ปรากฏว่าสาร 1(26) มีฤทธิ์ใกล้เคียงกับ 20-hydroxecdysone [1(1)] และมีฤทธิ์ประมาณ 7 เท่าของสาร 1(27) แสดงให้เห็นว่า ถ้ามีหมู่ไฮดรอกซิลที่ 24R โดยไม่มีที่ตำแหน่ง 25 จะมีผลใกล้เคียงกับมีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 25 แต่ไม่มีที่ตำแหน่ง 24 และ stereochemistry ของหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 24 มีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของเอคโดสเตียรอยด์อย่างมาก

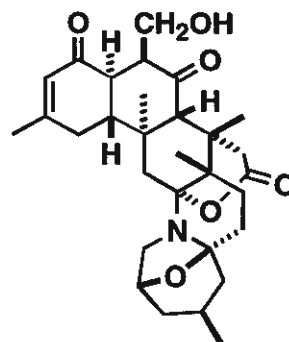
2) เอคโดสเตียรอยด์จาก Zoanthids และส่วนประกอบทางเคมีของ *Zoanthus* sp.

Zoanthids (phylum: Coelenterata; class: Anthozoa; subclass: Zoantharia; order: Zoanthidea) เป็นสัตว์ในทะเลซึ่งยังไม่เป็นที่รู้จักกันดีในแง่ของการวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สัตว์ในกลุ่มนี้มีหลายสกุล (genus) ด้วยกันคือ *Palythoa*, *Gerardia*, *Zoanthus*, *Parazoanthus* และ *Epizoanthus*^{1[45]} ทางด้านอนุกรมวิธานยังมีผู้ศึกษาสัตว์สกุลเหล่านี้บ้าง ฉะนั้นการพิสูจน์เอกลักษณ์ในระดับชนิด (species) จึงยังไม่ค่อยมีผู้เชี่ยวชาญทำได้มากนัก อย่างไรก็ตาม ในแง่ของเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สัตว์ในกลุ่มนี้น่าสนใจมากกว่ากลุ่มหนึ่ง เพราะสารที่พบส่วนใหญ่เท่าที่ผ่านมาเป็นพวกอัลคาลอยด์ และเป็นพวกที่มี skeleton ใหม่^{1[46-56]} สำหรับสกุล *Zoanthus* ชนิดต่างๆ ที่ยังไม่ทราบว่าเป็นชนิดใด ได้มีผู้พบอัลคาลอยด์หลายชนิด คือกลุ่มของ Rao และ Faulkner^{1[47,48]} ได้พบ zoanthamine [1(28)] และต่อมาได้พบ zoanthenamine [1(29)] และ zoanthamide [1(30)] พบ 28-deoxyzoanthenamine [1(31)] และ 22-epi-28-deoxyzoanthenamine [1(32)]^{1[49]} กลุ่มของ Atta-ur-Rahman และ Clardy^{1[50]} พบ zoanthaminone [1(33)]; Uemura และคณะ^{1[51,54]} พบ norzoanthamine [1(34)], oxyzoanthamine [1(35)], norzoanthaminone [1(36)], cyclozoanthamine [1(37)] และ epinorzoanthamine [1(38)] จาก *Zoanthus* อีกชนิดหนึ่ง Bhandari และคณะ^{1[55]} พบ sphingolipid ชนิดใหม่คือ hariamide [1(39)] เมื่อเร็วๆ นี้ Norte และคณะ^{1[56]} ได้พบอัลคา

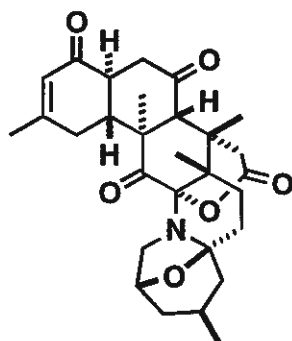




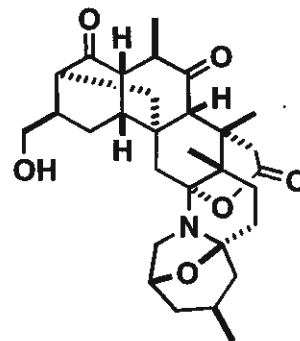
1(34)



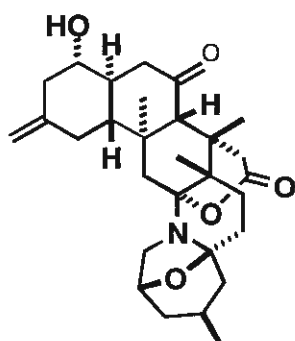
1(35)



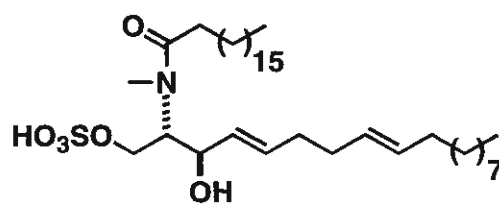
1(36)



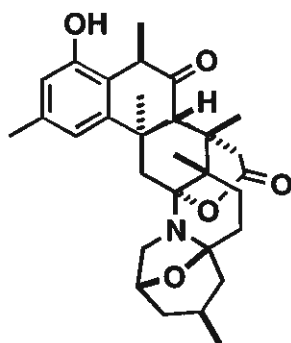
1(37)



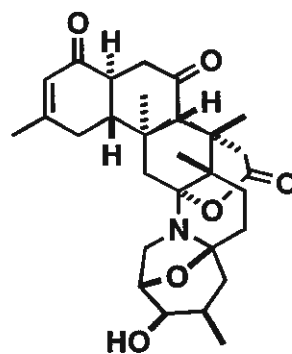
1(38)



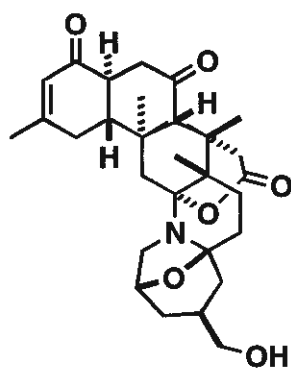
1(39)



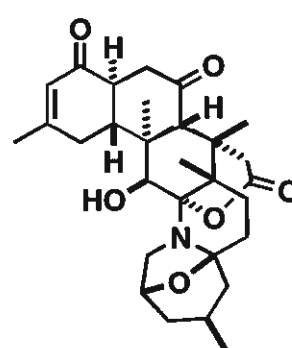
1(40)



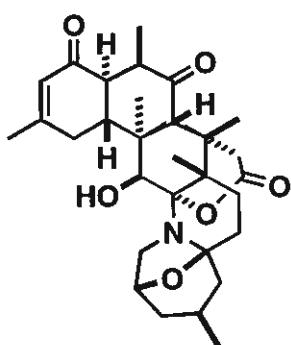
1(41)



1(42)



1(43)

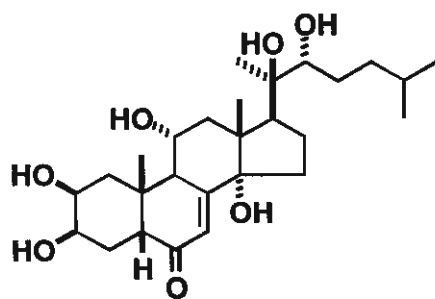


1(44)

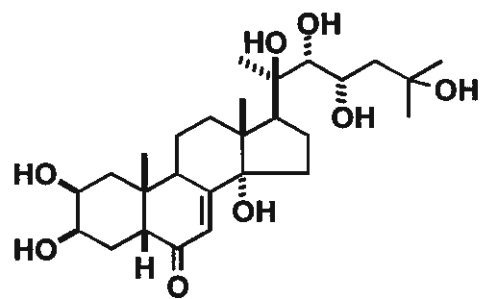
ลอยด์ใหม่อีก 5 ชนิดจาก *Zoanthus* อีกชนิดหนึ่งคือ zoanthenol [1(40)], 3-hydroxynorzoanthamine [1(41)], 30-hydroxynorzoanthamine [1(42)], 11-hydroxynorzoanthamine [1(43)] และ 11-hydroxyzoanthamine [1(44)]

สารอีกประเภทหนึ่งที่พบใน zoanthids คือ เอคโดสเตียรอยด์ ในปี ค.ศ.1982 Pietra และคณะ^{1[57]} ได้พบ 20-hydroxyecdysone [1(1)] ใน *Gerardia savaglia* และพบในปริมาณสูงมาก คือสามารถแยกสาร 1(1) ได้ถึง 6.1 มิลลิกรัมจากน้ำหนักของ zoanthid เพียง 20 กรัม นับเป็นรายงานครั้งแรกของการพบเอคโดสเตียรอยด์ในสัตว์กลุ่มนี้ ต่อมา Pietra และคณะได้แยก ecdysone 1(2) และ ajugasterone C [1(45)]^{1[58]} และ gerardiasterone [1(46)]^{1[59]} จาก zoanthids ชนิดเดียวกันนี้ ในครั้งแรกที่มีการพบสารนี้ยังไม่ได้หา stereochemistry ของหมู่ ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 20, 22 และ 23 ต่อมา Honda^{1[60]} ได้สังเคราะห์สารชนิดนี้และหา stereochemistry ที่ตำแหน่งดังกล่าว ดังได้แสดงไว้ในโครงสร้าง 1(45) ต่อมาในปี ค.ศ. 1995 Searle และ Molinski^{1[52]} ได้นำ *Parazoanthus* ชนิดหนึ่งจากออสเตรเลียมาสกัดแยกได้เอคโดสเตียรอยด์ที่ทราบโครงสร้างมาก่อนแล้วคือ 20-hydroxyecdysone [1(1)] และ ajugasterone C [1(45)] และพบเอคโดสเตียรอยด์ใหม่อีก 1 ชนิดคือ 4-dehydroecdysterone [1(47)] Kobayashi และคณะ^{1[61]} ได้แยกเอคโดสเตียรอยด์ใหม่ 2 ชนิดจาก *Palythoa australiae* คือ palythoalone A [1(48)] และ palythoalone B [1(49)] และยังพบเอคโดสเตียรอยด์ที่เคยมีผู้ค้นพบมาก่อนแล้วคือ makisterone B [1(50)] และ inokosterone [1(51)]

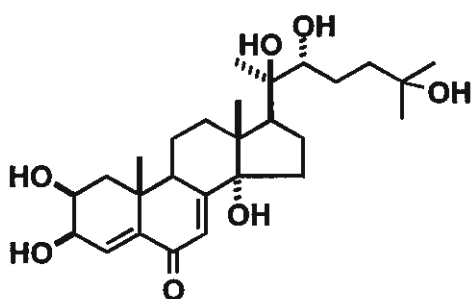
จากการค้นพบเอคโดสเตียรอยด์ใน zoanthids และพบในปริมาณที่สูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับเอคโดสเตียรอยด์ที่พบในสัตว์ชนิดอื่นๆ ทำให้กลุ่มของผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาส่วนประกอบทางเคมีของสัตว์ทะเลกลุ่มนี้ นอกจากเอคโดสเตียรอยด์แล้วการที่สัตว์กลุ่มนี้มีอัลคาลอยด์อยู่ก็ทำให้ยิ่งมีความสนใจมากยิ่งขึ้น เพราะอาจได้สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพด้านอื่นๆนอกเหนือจากการพบฮอร์โมนลอกคราบ



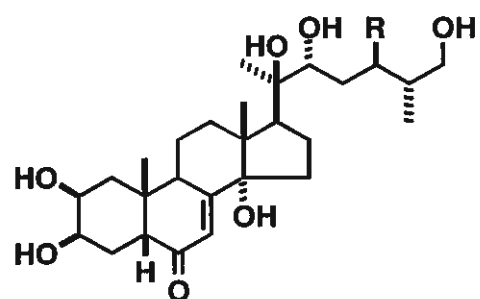
1(45)



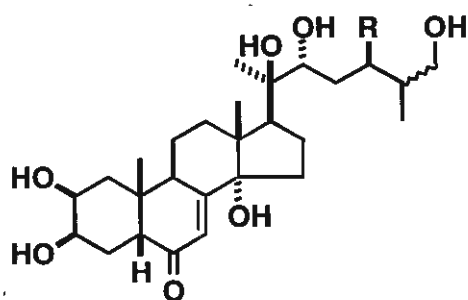
1(46)



1(47)



1(48), R = H
1(49), R = CH₃



1(50), R = CH₃
1(51), R = H

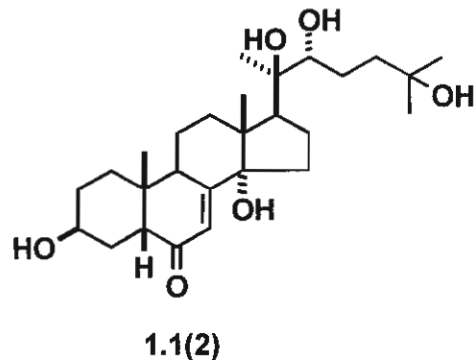
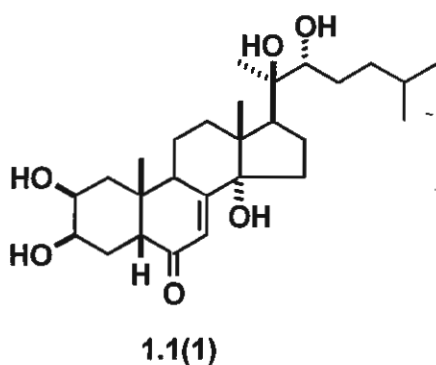
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1.1 การสกัดแยก หาสูตรโครงสร้าง และการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเอคโดสเตียรอยด์

1) Zoanthid ชนิดที่ 1 (*Zoanthus* sp.)

เมื่อมีการค้นพบเอคโดสเตียรอยด์ครั้งแรกใน *Gerardia savaglia* ซึ่งเป็น zoanthid ชนิดหนึ่งในปี ค.ศ. 1982¹⁵⁷¹ และพบในปริมาณที่สูงมาก ทำให้มีผู้สนใจศึกษาเอคโดสเตียรอยด์ในสัตว์กลุ่มนี้ ถึงแม้ว่ายังไม่มีรายงานออกมามากนัก แต่กลุ่มของผู้วิจัยก็มีความสนใจที่จะศึกษาเอคโดสเตียรอยด์ที่มีอยู่ในสัตว์กลุ่มนี้ เพื่อที่จะได้เอคโดสเตียรอยด์ที่อาจมีโครงสร้างที่น่าสนใจต่อการนำไปทดสอบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบ เพื่อให้มีความรู้ความเข้าใจมากขึ้นในแง่ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ทางชีวภาพ (structure-activity relationships, SAR) ประกอบกับการที่ได้มีการพบเอคโดสเตียรอยด์ในปริมาณที่สูงมากจากสัตว์กลุ่มนี้ ถึงแม้ว่าเอคโดสเตียรอยด์ชนิดอื่นๆที่มีรายงานการค้นพบจาก zoanthid ในเวลาต่อมาจะมีปริมาณน้อยกว่าเอคโดสเตียรอยด์ 1(1) ที่พบครั้งแรกก็ตาม แต่ก็ยังนับว่ามีปริมาณมากเมื่อเปรียบเทียบกับที่พบในสัตว์กลุ่มอื่นๆที่พบมา ซึ่งโดยปกติพบในปริมาณน้อยมาก เช่น จากดักแด้ของตัวไหม (*Bombyx mori*) ที่แห้งแล้ว 0.5 ตัน มีเอคโดสเตียรอยด์อยู่เพียง 25 มิลลิกรัมเท่านั้น¹³ สิ่งที่น่าสนใจก็คือ ได้มีรายงานว่า แมงมุมทะเล *Pycnogonum litorale* มีเอคโดสเตียรอยด์อยู่ด้วย และในการป้องกันตัวเองของ arthropod ชนิดนี้ต่อการไล่ล่าของปู *Carcinus maenas* กระทำโดยการพ่นส่วนผสมซึ่งมีเอคโดสเตียรอยด์ 8 ชนิด ในความเข้มข้น 1.0×10^{-3} โมลต่อลิตร โดยมี 20-hydroxyecdysone 22-acetate [1(6)] เป็นส่วนประกอบสำคัญ^{1,111} จากตัวอย่างนี้ ดูเหมือนจะเป็นตัวอย่างแรกที่บ่งบอกว่าสัตว์บางชนิดอาจใช้เอคโดสเตียรอยด์เป็นสารป้องกันตัวเองด้วย ซึ่งหากเป็นเช่นนั้นจริงก็น่าสนใจมาก เพราะก่อนหน้านี้ได้มีการกล่าวถึงเฉพาะการที่พืชสร้างเอคโดสเตียรอยด์ขึ้นมาเพื่อป้องกันตัวเองจากแมลงหรือศัตรูชนิดอื่น โดยเฉพาะในแง่ของนิเวศวิทยาเคมี นับว่าน่าสนใจเป็นพิเศษ

กลุ่มของผู้วิจัยได้ทดลองศึกษาเอคโดสเตียรอยด์จาก zoanthid เป็นครั้งแรก โดยได้ตัวอย่างมาจากจังหวัดระยอง แยกได้เอคโดสเตียรอยด์ 3 ชนิดคือ 20-hydroxyecdysone [1.1(1)], ponasterone A [1.1(1)] และ 2-deoxy-20-hydroxyecdysone [1.1(2)] และได้รายงานผลการวิจัยเบื้องต้นไปแล้ว^{1.1[2]} แต่เนื่องจากตัวอย่างสัตว์ที่เก็บมาได้มีปริมาณที่จำกัด จึงยังไม่ได้ทำการศึกษาเพิ่มเติม เมื่อผู้วิจัยได้รับทุนส่งเสริมกลุ่มวิจัย-เมธีวิจัยอาวุโส สกว. จึงมีความประสงค์ที่จะทำวิจัยหาเอคโดสเตียรอยด์ใน zoanthid จึงได้เก็บตัวอย่างสัตว์ทะเลกลุ่มนี้มาศึกษา ในช่วงแรกนี้ ยังไม่สามารถไปเก็บที่แหล่งเดิมที่จังหวัดระยองได้ จึงได้ไปเก็บที่แสมสาร จังหวัดชลบุรี ปรากฏว่าได้พบ zoanthid ชนิด (species) ที่ต่างไปจากที่ได้นำมาศึกษาจากจังหวัดระยอง แต่ก็มีความใกล้เคียงกันจากการเปรียบเทียบรูปร่าง สำหรับการพิสูจน์เอกลักษณ์ หรือการทราบชื่อทางวิทยาศาสตร์ของพวก zoanthid ประสบปัญหาที่ยังไม่สามารถหาผู้เชี่ยวชาญได้ ซึ่งก็เป็นปัญหายุ่ทั่วโลกขณะนี้ เพราะจากการดูผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ ส่วนประกอบทางเคมีของสัตว์ทะเลกลุ่มนี้ ส่วนใหญ่จะทราบเพียงชื่อสกุล (genus) เท่านั้น สำหรับ zoanthid ทั้ง 2 ชนิดที่เราได้เก็บตัวอย่างมาแล้วนี้ บัดนี้ทราบว่าอยู่ในสกุล *Zoanthus* ทั้งสองชนิด แต่ไม่ทราบว่าป็นชนิดใด ในการศึกษาครั้งนี้ ได้นำชนิดหลังมาสกัดแยก โดยให้ชื่อว่า Zoanthid ชนิดที่ 1 (*Zoanthus* sp.)



จากการนำ zoanthid สด 3 กิโลกรัมที่แช่อยู่ในเมทานอลมาบดและสกัดด้วยเมทานอล แล้วนำ methanol extract ทั้งหมดมาผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยตัวทำละลายจากชั้นน้อยไปหาตัวทำละลายที่มีขั้วมากคือ *n*-hexane, chloroform และ *n*-butanol จากการตรวจสอบส่วนที่สกัดได้ (extract) พบว่า butanol extract มี spots ที่ให้สีแบบเดียวหรือคล้ายคลึงกับสาร

พวกเอคโดสเตียรอยด์ ถัดไปคือ chloroform extract จึงนำ butanol extract ศึกษาเป็น extract แรก

(ก) Butanol extract

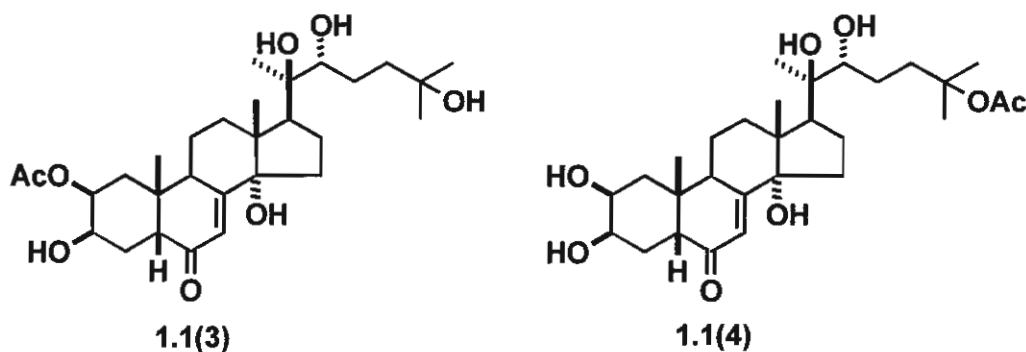
จากการนำ butanol extract ครึ่งหนึ่ง (30.1 กรัม) มาผ่านขั้นตอนการแยกสาร และทำให้บริสุทธิ์ สามารถแยกเอคโดสเตียรอยด์ได้ 5 ชนิด

(1) Ponasterone A [1.1(1)] เอคโดสเตียรอยด์ชนิดนี้แยกออกมาได้ 20 มิลลิกรัม เมื่อเปรียบเทียบกับ TLC และข้อมูล ^1H NMR สเปกตรัม (ตารางที่ 1.1(1)) กับ ponasterone A ที่กลุ่มของผู้วิจัยได้เคยสังเคราะห์จาก 20-hydroxyecdysone [1(1)] ปรากฏว่าเหมือนกันทุกประการ

(2) ส่วนผสมระหว่าง 20-Hydroxyecdysone 2-acetate [1.1(3)] กับ Viticosterone E [1.1(4)] แยกออกมาได้น้ำหนักรวมกัน 20 มิลลิกรัม อัตราส่วนประมาณ 1: 3 เอคโดสเตียรอยด์ 2 ชนิดนี้ TLC ให้ spot เดียว แต่สามารถวิเคราะห์ ^1H NMR สเปกตรัม (ตารางที่ 1.1(2)) ได้ โดยการเปรียบเทียบกับ ^1H NMR data ของสาร 1.1 (3) และ 1.1(4) ที่ได้จากการสังเคราะห์^[17] และเมื่อนำส่วนผสมของสาร 1.1(3) และ 1.1(4) มาทำ TLC เปรียบเทียบกับสาร 1.1(3) และ 1.1(4) ที่ได้จากการสังเคราะห์^[17] ก็ปรากฏว่าตรงกัน

(3) 2-Deoxy-20-hydroxyecdysone [1.1(2)] เอคโดสเตียรอยด์ชนิดนี้ทำให้บริสุทธิ์ได้ยาก เพราะมีสารประเภทอื่นปนอยู่ค่อนข้างมาก จึงต้องผ่านการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีหลายครั้ง (ดูวัสดุและวิธีการ) จนได้สาร [1.1(2)] ที่บริสุทธิ์ (6 มิลลิกรัม) ^1H NMR สเปกตรัมของสารนี้ใน pyridine- d_5 (ดูตารางที่ 1.1(1)) แตกต่างจากเอคโดสเตียรอยด์โดยทั่วไปคือ ไม่เห็นสัญญาณของ H-2 ในช่วงประมาณ δ 4.1 สิ่งที่แตกต่างกันออกไปจากเอคโดสเตียรอยด์โดยทั่วไปอีกประการหนึ่งคือ สัญญาณของ H-5 แทนที่จะเป็น dd (ค่า J อยู่ในช่วงประมาณ 13 และ 4 Hz) แต่กลับเป็น broad multiplet ที่ δ 2.97 การที่ไม่เห็นสัญญาณของ H-2 แสดงว่าสารนี้อาจเป็น 2-deoxy ecdysteroid เมื่อเปรียบเทียบกับ ^1H NMR สเปกตรัมกับ 2-deoxy-20-hydroxyecdysone ที่สังเคราะห์จากสาร 1^[23] ปรากฏว่า

ตรงกัน สารนี้จึงเป็น 2-deoxy-20-hydroxyecdysone [1.1(2)] และตรงกับ 1.1(2) ที่มาจาก zoanthid ที่เก็บจากจังหวัดระยอง



(4) 20-Hydroxyecdysone [1(1)] เป็นเอคไดสเตียรอยด์ที่มีขั้วมากที่สุดที่แยกมาได้ในครั้งนี้ และแยกได้ในปริมาณ 15 มิลลิกรัม สารนี้เป็นเอคไดสเตียรอยด์ที่รู้จักกันดีมากที่สุด ฉะนั้นการพิสูจน์เอกลักษณ์จึงทำได้ง่ายโดยการเปรียบเทียบ TLC และ ^1H NMR สเปกตรัม (ตารางที่ 1.1(1)) กับ authentic 1(1) ที่แยกได้จากเปลือกของต้นไช้เฒ่า (*Vitex glabrata*)^{1.1[3]}

โดยปกติแล้วการค้นพบเอคไดสเตียรอยด์ในสัตว์จะพบในปริมาณที่น้อยมาก แต่การที่พบสารประเภทนี้ใน zoanthid ทั้งจากที่มีผู้รายงานมาแล้วกับที่กลุ่มผู้วิจัยค้นพบ ทำให้เกิดความสงสัยว่า การที่สัตว์พวกนี้สร้างเอคไดสเตียรอยด์ขึ้นมาในปริมาณที่มากมายเกินความจำเป็นที่จะใช้กับตัวสัตว์เองเช่นนี้ อาจใช้เพื่อวัตถุประสงค์ของการป้องกันตัวเองก็ได้ เพราะจากตัวอย่างของแมงมุมทะเล *Pycnogonid litorale* ซึ่งสร้างเอคไดสเตียรอยด์ในปริมาณมาก ก็ถูกใช้ในการป้องกันตัวเองดังกล่าวมาแล้วข้างต้น สิ่งหนึ่งที่น่าจะกล่าวไว้ก็คือ กลุ่มของผู้วิจัยได้แยกอนุพันธ์อะซีเตตของ 20-hydroxyecdysone [1(1)] คือ 20-hydroxyecdysone 2-acetate [1.1(3)] และ viticosterone E หรือ 20-hydroxyecdysone 25-acetate [1.1(4)] ในปริมาณที่ค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับเอคไดสเตียรอยด์อีก 3 ชนิดที่แยกออกมาได้ เรายังไม่ทราบว่สารอนุพันธ์อะซีเตตดังกล่าวนี้มีหน้าที่อะไร แต่จากการที่มีผู้พบว่าเอคไดสเตียรอยด์ที่ *P. litorale* ปล่อยออกไปสกัดกั้นการตามล่าของศัตรูมี 20-hydroxyecdysone 22-acetate

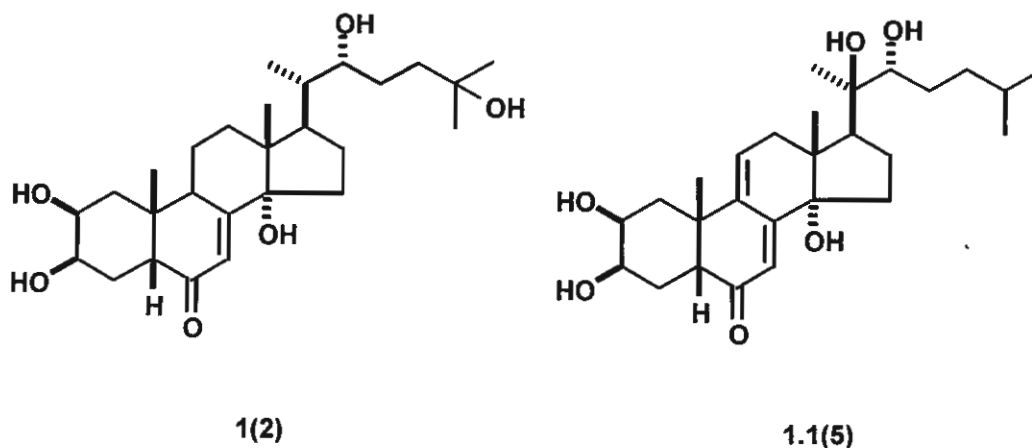
[1(6)] มากกว่าเอคโดสเตียรอยด์ชนิดอื่น ๆ^{1.1[1]} ทำให้น่าสนใจว่าสารอนุพันธ์อะซีเตตทั้งสองอาจมีบทบาทบางอย่างที่นอกเหนือจากการเป็นฮอร์โมนลอกคราบ

นอกจากเอคโดสเตียรอยด์ทั้ง 5 ชนิดข้างต้นแล้ว ยังแยกได้เอคโดสเตียรอยด์ที่มีอยู่ในปริมาณน้อยอีก 6 ชนิด ดังต่อไปนี้

(5) Ecdysone [1(2)] เอคโดสเตียรอยด์ชนิดนี้ ให้ NMR pattern ที่แตกต่างไปจากเอคโดสเตียรอยด์ที่กล่าวมาแล้วหลายตำแหน่ง ¹H NMR สเปกตรัมแสดง singlet ของหมู่เมทิลของ 18-Me และ 19-Me ที่ δ 0.70 และ δ 1.06 ส่วนสัญญาณของหมู่เมทิลตำแหน่ง 26 และ 27 เป็น singlet ที่ δ 1.37 สิ่งที่เป็นลักษณะเด่นเฉพาะคือมีสัญญาณ doublet ($J = 6.6$ Hz) ที่ δ 1.28 ซึ่งเป็นสัญญาณของหมู่เมทิลตำแหน่ง 21 ของสารกลุ่มเอคโดโซน คือไม่มีหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 20 เอคโดสเตียรอยด์นี้สัญญาณของ H-7 เป็น doublet ($J = 2.4$ Hz) อยู่ที่ δ 6.21 แสดงว่ามีไฮโดรเจนที่ตำแหน่ง 9 ตามปกติ H-22 อยู่ที่ δ 4.05 ซึ่ง downfield กว่ากลุ่มเอคโดสเตียรอยด์ทั้ง 5 ชนิดที่พบมาแล้ว ซึ่งเป็นพวกที่มี 20-hydroxyl group และมี H-22 อยู่ในช่วง δ 3.80-3.88 (ดูตารางที่ 1.1(1) และ 1.1(2)) ส่วนสัญญาณของ H-2, H-3, H-5, H-9 ก็มีลักษณะและค่า chemical shift ใกล้เคียงกับเอคโดสเตียรอยด์ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 20 ฉะนั้นสารนี้จึงเป็น ecdysone^{1[1]} กำลังรอข้อมูลยืนยันจากแมสสเปกตรัม

(6) Dacryhainansterone (5-Deoxykaladasterone) [1.1(5)] เป็น minor ecdysteroid ที่หายากชนิดหนึ่ง ¹H NMR สเปกตรัมแสดงว่าเป็น 25-deoxyecdysteroid โดยแสดงสัญญาณ doublet ($J=6.4$ Hz) ของ 26-Me และ 27-Me ที่ δ 0.81 และ 0.83 สัญญาณของ 18-Me และ 19-Me อยู่ที่ δ 1.26 จะเห็นว่าสัญญาณ 18-Me เกิด downfield shift อย่างมาก แสดงว่าสิ่งแวดล้อมบริเวณใกล้เคียงกับ 18-Me มีการเปลี่ยนแปลงไปจากเอคโดสเตียรอยด์ปกติโดยทั่วไป ซึ่งเมื่อดูสัญญาณของ H-2, H-3 และ H-22 พบว่าอยู่ในตำแหน่งที่ควรจะเป็นของเอคโดสเตียรอยด์ทั่วไป แต่เมื่อดูสัญญาณของ H-7 พบว่าแทนที่จะเป็น doublet กลับเป็น singlet ที่ δ 6.21 และไม่พบสัญญาณของ H-9 เพราะมีสัญญาณของ olefinic proton เป็น broad doublet ที่ δ 6.38 แสดงว่ามีพันธะคู่ที่ตำแหน่ง 9,11 และจะเห็นสัญญาณของ H-12 ทั้งสองที่ δ 2.54 (dd, $J = 17.7, 6.6$ Hz) และ 3.16 (d, $J =$

17.7 Hz) จากค่า ESMS ของสารนี้ซึ่งแสดงพีคของ $[M+Na]^+$ ที่ m/z 485 ก็จะตรงกับน้ำหนักโมเลกุลของ decryhainansterone คือ 462



(7) Ajagasterone C [1(45)] เป็นเอคโดสเตียรอยด์ที่แยกได้ในปริมาณน้อย (2 มิลลิ-กรัม) ข้อมูล ^1H NMR และ FAB mass spectra สอดคล้องกับที่มีผู้รายงานไว้^[11]

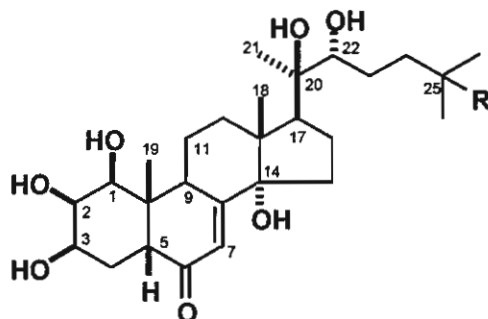
(8) Zoanthusterone [1.1(6)] เป็นเอคโดสเตียรอยด์ชนิดใหม่ มีปริมาณ 2 มิลลิกรัม เป็นของแข็ง amorphous HR-FABMS (negative ion mode, m/z 479.3007 $[M-H]^-$) แสดงสูตรโมเลกุล $C_{27}H_{44}O_7$ ข้อมูล IR แสดงว่ามีหมู่ hydroxyl และ α,β -unsaturated keto ตามลำดับจาก ^1H NMR spectrum (ตาราง 1.1(4), C_5D_5N และจากสีที่เกิดขึ้นบน TLC เมื่อทำปฏิกิริยากับ anisaldehyde reagent พบว่าสารนี้น่าจะเป็นเอคโดสเตียรอยด์ สัญญาณของหมู่ methyl ใน ^1H NMR spectrum ที่ δ 1.22, 1.40 และ 1.55 เป็นของหมู่ 18-Me, 19-Me และ 21-Me ตามลำดับ สัญญาณ singlet เกิดที่ downfield resonance แสดงว่าตำแหน่ง 20 มีหมู่ไฮดรอกซิล จากการที่ปราศจากสัญญาณ singlet (s) ของหมู่ 26-Me และ 27-Me ที่ δ 1.3 และการปรากฏของสัญญาณ two doublets ($J = 6.2$ Hz) ที่ δ 0.79 และ 0.80 แสดงว่าสารนี้มีโครงสร้างเป็น 25-deoxyecdysteroid เนื่องจากเอคโดสเตียรอยด์นี้มีน้ำหนักเป็นโมเลกุลเท่ากับ 20-hydroxyecdysone [1(1)] และถ้าสมมุติว่าสารทั้งสองมี oxygenation pattern เหมือนกัน ดังนั้นหมู่ 25-hydroxyl ควรอยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสมในโมเลกุลของ 1.1(6) หมู่ไฮดรอกซิลไม่ควรอยู่ในตำแหน่งที่ 24 ทั้งนี้เพราะควรเกิด downfield shift ของสัญญาณ H-22 และ H-25 ความจริงแล้ว สารนี้ควรเป็น pterosterone และ C-24 epimer ของสารนี้คือ 24-*epi*-pterosterone^[144] แต่ข้อมูลที่ ^1H NMR ของสารเหล่านี้ต่างจากของสาร 1.1(6) หมู่ไฮดรอกซิลไม่สามารถอยู่ที่ C-23 ด้วย

เหตุผลของค่า chemical shift และรูปแบบของสัญญาณ H-22 โดยใช้หลักการเดียวกัน หมูไฮดรอกซิลที่เพิ่มขึ้นนี้ไม่ควรอยู่ที่วง D ในเอคโดสเตียรอยด์ แต่เป็นไปได้ว่าหมูไฮดรอกซิลอาจอยู่ที่ C-11 ถ้าหมูไฮดรอกซิล อยู่ที่ C-11 จริง สารนี้ควรเป็น ajugasterone C [1 (45)] ซึ่งเป็นสารที่แยกได้จากสัตว์ชนิดนี้ และมี ^1H NMR สเปกตรัมต่างกัน สารนี้ไม่ควรเป็น C-11 epimer ของ 1(45) ทั้งนี้เพราะควรให้รูปแบบสัญญาณอย่างง่ายของ H-9 แทนที่จะเป็นสัญญาณ multiplet ที่ δ 3.56 นอกจากนี้ควรเกิด downfield shift ของ H-9^{1.171} ถ้ามีหมูไฮดรอกซิลที่ C-11

จากรูปแบบสัญญาณของ H-5 ที่เป็น multiplet (*br d*, $J \sim 12$ Hz) ใน $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ทำให้หมูไฮดรอกซิลที่เพิ่มขึ้นนี้ไม่สามารถอยู่ที่ตำแหน่ง 5 และ 4 ตามลำดับ ดังนั้นหมูไฮดรอกซิลควรอยู่ที่ตำแหน่ง 1 ซึ่งตอนแรกเรามีได้คำว่าสารจะเป็น 1,2,3-trihydroxy analogue ทั้งนี้เพราะเอคโดสเตียรอยด์ประเภทนี้เป็นกลุ่มเล็กๆ มีพบได้เฉพาะในพืชบางชนิด¹¹¹ เท่านั้น ดังนั้นสารนี้ควรมีโครงสร้างเป็น 1.1(6) ด้วยเหตุผลดังต่อไปนี้

การเปรียบเทียบข้อมูล ^1H NMR (ใน $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) ของสาร 1.1(6) กับ ponasterone A [1.1(1)] พบว่าค่า chemical shift ของสัญญาณหลัก 18-Me, 21-Me, 26-Me และ 27-Me และของ H-7, H-9, H-17 และ H-22 อยู่ใน magnitude เดียวกัน ในขณะที่สัญญาณ 19-Me, H-5, H-1, H-2 และ H-3 ต่างกัน แสดงว่าความแตกต่างอยู่ที่ ring A ของสาร 1.1(6) แต่มีความเหมือนกันในส่วนที่เหลือของโมเลกุล สัญญาณ 19-Me (δ 1.40) เกิดที่ downfield อย่างผิดปกติ เมื่อเทียบกับของสาร 1(45) (δ 1.07) การเกิด downfield shift (0.33 ppm) แสดงว่าตำแหน่ง 1^{1.1181} มี oxygen function การกำหนดตำแหน่ง 19-Me resonance ยืนยันโดยใช้การทดลอง HMBC ซึ่งเกิดขึ้นระหว่างหมู่เมทิลนี้กับ C-1 (δ 77.7), C-5 (δ 48.0), C-9 (δ 36.4) และ C-10 (δ 45.0) และการเกิด downfield shift อย่างมาก (0.27 ppm) ของ H-5 เป็นการยืนยันด้วยว่ามีหมูไฮดรอกซิลที่ C-1 เพราะเกิด interaction ระหว่าง axial 1-hydroxyl กับ H-5 ที่ตำแหน่ง β ในการยืนยันว่า หมู 1-ไฮดรอกซิลอยู่ตำแหน่ง β นั้นควรวิเคราะห์ค่า $W_{1/2}$ (ความกว้างของสัญญาณ ณ ที่ครึ่งของความสูง) ของ H-1 แต่เป็นที่น่าเสียดายว่าการวัดค่า $W_{1/2}$ ไม่สามารถกระทำได้ เพราะสัญญาณ H-1 ไม่แยกจากสัญญาณ H-3 อย่างชัดเจนใน $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ อย่างไรก็ตาม ^1H NMR spectrum ของ 1.1(6) ใน CD_3OD แสดงการแยกของสัญญาณ H-1 (δ 3.81, *br s*, $W_{1/2} = 7$ Hz), H-2 (δ 3.87, *br t*, $W_{1/2} = 2.8$ Hz) และ H-3 (δ 4.04, *br s*, $W_{1/2} = 12$ Hz) ค่า $W_{1/2}$ ของ H-1 มีค่าน้อย แสดงว่าอยู่ในตำแหน่ง equatorial หรือกล่าวได้ว่าหมู 1-ไฮดรอกซิลอยู่ในตำแหน่ง axial ดังแสดงใน 1.1(6) ซึ่งค่า coupling constant และค่า $W_{1/2}$ ของ H-2 และ H-3 เป็นตัวกำหนด configuration ที่ C-2 และ C-3 ค่า $W_{1/2}$ ของ H-1 และ H-3 และ coupling constant ของ H-2 มีค่าพอๆกับของ integristerone A [1.1(8)]

($W_{1/2}$ ของ H-1 และ H-3 ใน D_2O มีค่า 7 และ 8 Hz และ coupling constant ของ H-2 มีค่า 3.2 Hz)^{1.1(8)} คำอธิบายข้างต้นนี้ตั้งอยู่บนสมมุติฐานว่า H-5 อยู่ในตำแหน่ง β ถ้า H-5 อยู่ในตำแหน่ง α และในขณะที่หมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 1, 2 และ 3 อยู่ในตำแหน่ง β เช่นเดียวกับโครงสร้าง 1.1(6) ที่ทำให้เกิด $W_{1/2}$ ของ H-3 ควรมีค่าใหญ่ (18-25 Hz) ในทางกลับกัน ถ้า H-5 อยู่ในตำแหน่ง α และในหมู่ไฮดรอกซิลทุกหมู่ของวง A อยู่ในตำแหน่ง α ควรจะให้ค่า $W_{1/2}$ และ coupling constant ของ H-1, H-2 และ H-3 มีค่าใกล้เคียงกับของสาร 1.1(6) ถ้า H-5 อยู่ใกล้กับหมู่ 1α และ 3α -ไฮดรอกซิล ควรทำให้เกิด downfield shift ของสัญญาณ H-5 ในการกำหนด stereochemistry ที่ C-5 ใช้การทดลอง NOE นั่นคือถ้า H-5 อยู่ในตำแหน่ง β ควรพบ NOE interaction ระหว่าง 19-Me และ H-5^{1(33),1(44)} ดังนั้นเมื่อ irradiate สัญญาณ 19-Me ของ 1.1(6) ที่ δ 1.40 (ใน C_5D_5N) ทำให้เกิด NOE enhancement ของ H-5 ที่ δ 3.29 และ irradiation H-5 ทำให้เกิด NOE enhancement ของ 19-Me เช่นกัน ดังนั้นสรุปได้ว่า ring A/B เชื่อมกันแบบ *cis* และมีโครงสร้างของเอคไดสเตอริรอยด์ชนิดใหม่เป็น 1.1(6)



1.1(6) : R = H

1.1(7) : R = OAc

1.1(8) : R = OH

1.1(9) : epimer of 1.1(8)

เมื่อเร็ว ๆ นี้มีการแยก 1 α ,20R-dihydroxyecdysone [1.1(9)] ซึ่งเป็น C-1 epimer ของ integristerone A [1.1(8)] ได้จากพืช *Axyris amarathoides* และ stereochemistry ที่ C-1 ทราบได้โดยการทดลอง NOE^{1,2[100]} แม้ว่าสเตอริโอเคมีที่ C-1 มีความแตกต่างกัน แต่สาร 1.1(6) และ 1 α ,20R-dihydroxyecdysone [1.1(9)] แสดงข้อมูล ¹H NMR และ ¹³C NMR (ตารางที่ 1.1(4) และ ตาราง 1.1(5)) ที่ใกล้เคียงกันมาก ยกเว้นตำแหน่งที่ 25 และ 27 เป็นที่น่าแปลกใจว่าค่า W_{1/2} ของ H-1 (6.8 Hz) ของสาร 1.1(9) เกือบเท่ากับของสาร 1.1(6) และ coupling constant ของสอง axial proton (H-1 และ H-2) มีค่าเล็กน้อยผิดปกติ จากประสบการณ์ของผู้วิจัยพบว่า ค่า W_{1/2} ใช้เป็นตัวการกำหนดสเตอริโอเคมีของไฮโดรเจนได้นำเชื่อถือกว่าค่าจากการทดลองทาง NOE อย่างน้อยที่สุดในงานวิจัยของเอคโตสเตียรอยด์^{1[34],1[35]}

(9) Integristerone A 25-acetate [1.1(7)] เป็นเอคโตสเตียรอยด์ที่มีปริมาณน้อย (1 มิลลิกรัม) HR-FABMS (negative ion mode) แสดง m/z ที่ 537.3066 ซึ่งตรงกับสูตรโครงสร้าง C₂₉H₄₆O₉ พบหมู่ acetate ใน IR สเปกตรัม ¹H NMR สเปกตรัมของ 1.1(7) ใน C₅D₅N คล้ายคลึงกับสาร 1.1(6) มาก (ตาราง 1.1(4)) มีความแตกต่างที่สำคัญเพียงแห่งเดียวคือ มีสัญญาณ singlet ของหมู่ acetoxyl methyl ที่ δ 1.93 และสัญญาณ 26-Me และ 27-Me เคลื่อนจาก δ 0.79 (d, J = 6.2 Hz) และ 0.80 (d, J = 6.2 Hz) ไปยัง δ 1.41 (s) และ δ 1.47 (s) สัญญาณ 19-Me ซ้อนกับ 26-Me ที่ δ 1.41 ใช้ความสัมพันธ์ HMBC เป็นตัวกำหนดตำแหน่งหมู่เมทิลที่สายโซ่ด้านข้าง นั่นคือ 21-Me มีความสัมพันธ์กับ C-17 (δ 51.8), C-20 (δ 78.5) และ C-22 (δ 79.1), หมู่ 26-Me มีความสัมพันธ์กับ C-24 (δ 40.9), C-25 (δ 84.0) และ C-27 (δ 26.0) และหมู่ 27-Me มีความสัมพันธ์ C-24, C-25 และ C-26 ข้อมูลนี้แสดงว่า 1.1(7) (ตาราง 1.1(5)) มีโครงสร้างเป็น 25-oxygenated analogue ของ 1.1(6) หมู่ acetoxyl ควรอยู่ที่ตำแหน่ง 25 เนื่องจากเกิด downfield shift ของ chemical shift (0.05 และ 0.11 ppm) ของ 26-Me และ 27-Me ใน ¹H NMR สเปกตรัมของ 1.1(7) เมื่อเทียบกับ 20-hydroxyecdysone [1(1)] นอกจากนี้ยังพบการเกิด downfield shift ที่ C-25 (14.2 ppm) ใน ¹³C NMR ของสาร 1.1(7) ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีสอดคล้องกับที่ได้มีรายงานไว้^{1.1[9]} ดังนั้นสารนี้มีโครงสร้างเป็น 1 β -hydroxyviticosterone E

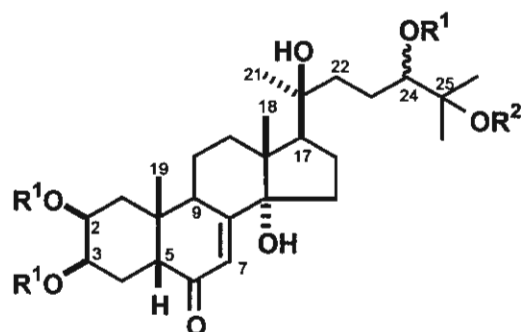
(10) Inokosterone [1(16)] เอคโตสเตียรอยด์นี้แยกได้ 2 มิลลิกรัม เมื่อเปรียบเทียบข้อมูล ¹H NMR และ ¹³C NMR กับที่เคยรายงานไว้^{1.1[10]} ปรากฏว่าเหมือนกัน

2) เอกโดสเตียรอยด์จากเปลือกต้น *Vitex scabra*

Vitex scabra Wall. ex Schauer มีชื่อภาษาไทยว่า หมากคัง เป็นไม้ขนาดกลาง พบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย จากการศึกษาวรรณกรรมทางงานวิจัยพบว่า ยังไม่มีการรายงานวิจัยเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีของไม้ต้นนี้ จึงได้ทำการศึกษาส่วนประกอบทางเคมีของเปลือกต้น *V. scabra*

จากการนำเปลือกต้น 1.4 กิโลกรัม ที่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยตัวทำละลาย MeOH ด้วย Soxhlet extraction apparatus นำสารละลายชั้น MeOH ที่ได้มาสกัดด้วย CHCl_3 และ *n*-BuOH ตามลำดับ จากการตรวจสอบ BuOH extract ด้วย TLC พบว่ามี spot ที่ให้สีคล้ายคลึงกับสารพวกเอกโดสเตียรอยด์ จึงนำ BuOH extract มาศึกษา พบเอกโดสเตียรอยด์ชนิดใหม่ 2 ชนิด พร้อมกับเอกโดสเตียรอยด์ที่เคยมีผู้รายงานไว้แล้ว 11 ชนิด

(1) **24-*epi*-Pinnasterone [1.1(10)]** เป็นเอกโดสเตียรอยด์ที่มีในปริมาณน้อย เมื่อทำการแยกโดยใช้ normal-phased TLC พบว่า สาร 1.1(10) ออกมาพร้อมกับ pinnasterone [1(3)] แต่สามารถแยกสารทั้งสองนี้ออกจากกันได้โดยใช้ reversed-phase HPLC สาร 1.1(10) มีสูตรโมเลกุลเป็น $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_7$ โดยใช้ HR-FABMS (negative ion mode, m/z 479.3008 $[\text{M}-\text{H}]^-$) สัญญาณ IR ที่ 3422 และ 1648 cm^{-1} แสดงว่า มีหมู่ไฮดรอกซิล และหมู่ α,β -unsaturated keto จากสีที่เกิดขึ้น เมื่อทำปฏิกิริยากับ anisaldehyde reagent พร้อมด้วยลักษณะของ ^1H NMR spectrum แสดงว่าสารนี้เป็น เอกโดสเตียรอยด์ ใน ^1H NMR สเปกตรัมลักษณะของสัญญาณหลักที่ H-2, H-3, H-5, H-7, H-9, H-17, 18-Me และ 19-Me (ตารางที่ 1.1(6) และ ตารางที่ 1.1(7)) แสดงถึงว่า สารนี้มีนิวเคลียสเหมือน 1(3) การกำหนดตำแหน่งของ ^1H และ ^{13}C resonance กระทำโดยใช้เทคนิค 1D และ 2D NMR และโดยการเปรียบเทียบกับสารอื่นที่มีลักษณะโครงสร้างคล้ายคลึงกัน เนื่องจาก ^1H NMR สเปกตรัมของสาร 1.1(10) และ 1(3) ไม่สามารถแยกแยะจากกันได้ ดังนั้น จึงต้องบันทึก ^1H NMR สเปกตรัมของส่วนผสมระหว่าง 1.1(10) และ 1(3) ในอัตราส่วน 3:1 เพื่อใช้เป็นตัวกำหนดตำแหน่งค่า chemical shift ของสารทั้งสอง เมื่อทำการเปรียบเทียบ ^1H NMR สเปกตรัมอย่าง



1.1(10) $R^1 = R^2 = H$

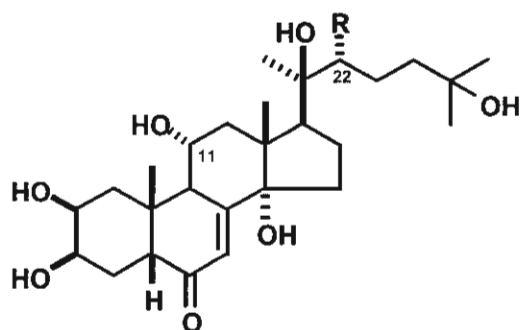
1(3) C-24 epimer of 1.1(10)

1.1(16) $R^1 = Ac; R^2 = H$

1.1(17) $R^1 = R^2 = Ac$

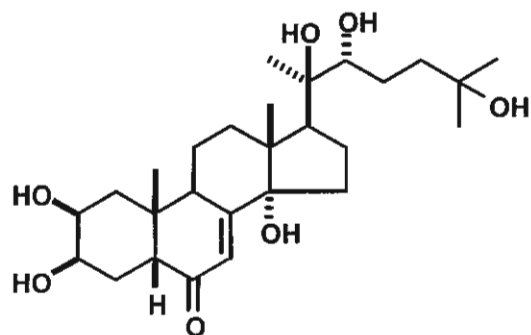
1.1(18) C-24 epimer of 1.1(16)

1.1(19) C-24 epimer of 1.1(17)



1.1(11) $R = H$

1.1(15) $R = OH$



1(1)

ระมัดระวัง ของส่วนผสมนี้กับของแต่ละสาร พบว่าคล้ายคลึงกันมาก ความแตกต่างที่สำคัญคือ ค่า chemical shift ของ H-17 และ H-24 (δ 0.05 และ 0.02 ppm ตามลำดับ) ความแตกต่างในค่า chemical shift ที่ H-24 ของสารทั้งสองนี้ สอดคล้องกับความแตกต่างในการกำหนด สเตอริโอเคมีที่ C-24 เป็นที่น่าสังเกตว่า ความแตกต่างของ chemical shift ที่ H-17 ของ epimer ทั้งสอง เป็นผลมาจากความแตกต่างในสิ่งแวดล้อมทางเคมีที่สายโซ่ด้านข้าง ซึ่งพบได้ใน เช่น abutasterone กับ 24-*epi*-abutasterone [1(23)]¹⁴⁴¹ และ pterosterone [1(26)] กับ 24-*epi*-pterosterone ความแตกต่างในสิ่งแวดล้อมทางเคมีบริเวณ C-24 ยังทำให้เกิดการเคลื่อนของ สัญญาณเล็กน้อยที่ 18-Me, 26-Me และ 27-Me และมีผลต่อ ¹³C chemical shift ที่สายโซ่ ด้านข้างด้วย ดังนั้น จึงเห็นความแตกต่างที่ C-20 และ C-24 resonance ของสาร [1.1(10)] และ 1(3) (ตารางที่ 1.1(7))) นั่นคือเอคโตสเตียรอยด์ทั้ง 2 นี้ ควรเป็น C-24 epimers กัน

ในการยืนยันความแตกต่างของสเตอริโอเคมีที่ C-24 ของ 1.1(10) และ 1(3) นั้น ใช้วิธีการเตรียมอนุพันธ์อะซีเตต ของสารทั้งสอง เมื่อทำ acetylation ของสาร 1.1(10) พบว่าได้ triacetate 1.1(16) และ tetraacetate 1.1(17) และสัญญาณของ H-24 ของสารทั้งสอง อยู่ที่ δ 4.80 และ δ 5.14 ตามลำดับ การเกิด downfield shift อย่างมาก (0.34 ppm) ของ H-24 เมื่อเปลี่ยนจาก triacetate 1.1(16) ไปเป็น tetraacetate 1.1(17) แสดงว่า H-24 ใกล้กับหมู่ acetoxyl ที่ตำแหน่ง 25 ใน 1.1(17) ดังนั้น หมู่ secondary hydroxyl ที่สายโซ่ด้านข้าง ควรอยู่ที่ตำแหน่ง 24 ¹H NMR สเปกตรัม ของ tetraacetate 1.1(17) ไม่มีความแตกต่างกับ pinnasterone 2,3,24,25-tetraacetate 1.1(18) อย่างไรก็ตาม เมื่อบันทึก ¹H NMR สเปกตรัม ของส่วนผสม 5:2 ของอนุพันธ์ของ acetate ของ C-24 epimers ทั้งสอง พบว่า เกิดความแตกต่างของค่า chemical shift โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ H-24 และ H-17 ดังนั้นสรุปได้ว่า สาร 1.1(10) คือ 24-*epi*-pinnasterone อย่างไรก็ตาม ข้อมูลสเปกโตรสโกปีที่มีอยู่ ไม่สามารถกำหนด absolute configuration ที่ C-24 ของเอคโตสเตียรอยด์ 1.1(10) และของ 1(3) ได้

(2) Scabrasterone [1.1(11)] เป็นเอคไดสเตียรอยด์ที่มีปริมาณน้อยอีกตัวหนึ่ง HR-FABMS แสดงสูตรโมเลกุลเป็น $C_{27}H_{44}O_7$ IR spectrum แสดงว่ามีหมู่ไฮดรอกซิล และหมู่ α,β -unsaturated keto ที่ 3422 และ 1654 cm^{-1} ตามลำดับ ^1H NMR สเปกตรัม ของสารนี้ แสดงว่าเป็นเอคไดสเตียรอยด์ อย่างไรก็ตามบางสัญญาณใน ^1H NMR พบว่ามีความแตกต่างกับ 20-hydroxyecdysone [1(1)] (ตาราง 1.1(6) และ ตาราง 1.1(7)) พบว่า H-9 resonance เคลื่อนจาก δ 3.55 ใน 1(1) ไปเป็น δ 3.84 ใน 1.1(10) และ multiplicity เปลี่ยนจาก multiplet ไปเป็น doublet ($J = 8.5$ และ 2.1 Hz) แสดงว่ามีหมู่ 11α -hydroxyl ซึ่งยืนยันได้โดยการสังเกตพบ downfield shift อย่างมาก (8 ppm) ของ C-9 resonance ในข้อมูล ^{13}C NMR นอกเหนือไปจากพบสัญญาณ C-11 carbinol proton และ carbon ที่ δ 4.56 และ δ 68.8 ตามลำดับ การเกิด downfield shift อย่างมาก ของ H-12ax (δ 2.99), H-12eq (δ 2.65), H-2 (δ 4.56 และ H-1 (δ 3.41) เป็นการยืนยันเพิ่มขึ้น การเกิด downfield shift อย่างมาก (0.27 ppm) ของ 19-Me resonance เมื่อเทียบกับของ 1(1) แสดงว่าเป็นหมู่ 11α -hydroxyl ความจริงแล้วข้อมูล ^1H NMR ของ 1.1(10) ใกล้เคียงกับ turkesterone [1.1(15)] มาก (ดูตารางที่ 1.1(6)) มีความแตกต่างเพียงแห่งเดียวคือ การไม่พบสัญญาณของ C-22 carbinol ทั้งใน ^1H และ ^{13}C NMR สเปกตรัมของ 1(3) ดังนั้น scabrasterone [1.1(11)] มีโครงสร้างเป็น 11α -hydroxy analogue ของ taxisterone^{1.1(11)}

(3) Calonysterone [1(18)] เป็นเอคไดสเตียรอยด์ที่แยกได้ในปริมาณน้อย (5 มิลลิกรัม) ข้อมูล ^1H NMR สอดคล้องกับที่เคยมีผู้รายงานไว้¹⁽¹⁵⁾

(4) Pterosterone [1(26)] และ 24-*epi*-Makisterone A [1.1(12)] เป็นเอคไดสเตียรอยด์ที่แยกได้ในปริมาณน้อยคือ 5 และ 3 มิลลิกรัม ตามลำดับ ข้อมูล ^1H NMR สอดคล้องกับที่เคยมีผู้รายงานไว้¹⁽⁴⁴⁾

(5) 20-Hydroxyecdysone [1(1)] เป็นเอคไดสเตียรอยด์ที่แยกได้ในปริมาณมาก (25.1 กรัม) เมื่อเทียบ TLC กับสาร authentic พบว่าเหมือนกัน ข้อมูล ^1H NMR สอดคล้องกับที่เคยมีผู้รายงานไว้^{1.1(12)}

(6) Polypodine B [1.1(13)] และ Ajugasterone C [1(45)] เป็นเอคโดสเตียรอยด์ที่มีความเป็นขั้วสูง แยกได้ด้วย reversed-phase column chromatography ข้อมูล ^1H NMR ของสารทั้งสองสอดคล้องกับที่เคยมีผู้รายงานไว้^{1[1]}

(7) Pinnatasterone [1(3)] เป็นเอคโดสเตียรอยด์ที่มีความเป็นขั้วสูงเช่นกัน สารนี้สามารถแยกให้บริสุทธิ์ด้วย reversed-phase HPLC โดยออกมาที่ R_f 32.72 นาที ซึ่งยืนยันโครงสร้างโดยการเปรียบเทียบข้อมูล ^1H NMR กับที่เคยมีผู้รายงานไว้^{1[15]}

(8) 11α -Hydroxyecdysone [1.1(14)] เป็นเอคโดสเตียรอยด์ที่แยกให้บริสุทธิ์ด้วย reversed-phase HPLC โดยออกมาที่ R_f 23.37 นาที ข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR สอดคล้องกับที่เคยมีผู้รายงานไว้^{1.1[13]}

(9) 24-*epi*-Abutasterone [1(23)] เป็นเอคโดสเตียรอยด์ที่แยกให้บริสุทธิ์ด้วย reversed-phase HPLC (2 มิลลิกรัม, MeOH-H₂O=40:60, R_f 17.53 นาที) ข้อมูล IR ^1H NMR และ mass สเปกตรัมสอดคล้องกับเอคโดสเตียรอยด์ที่มีแยกได้จากเปลือกกรากของ *V. canescens* ที่เคยมีผู้รายงานไว้^{1[34]}

(10) 20,26-Dihydroxyecdysone [1(25)] และ Turkesterone [1.1(15)] เป็นเอคโดสเตียรอยด์ที่แยกได้โดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟี สารทั้งสองมี TLC เหมือนกับสาร authentic ข้อมูล ^1H NMR ของสาร 1.1(15) และ ^{13}C NMR ของ 1(25) สอดคล้องกับที่เคยมีผู้รายงานไว้^{1[43],1.1[3]}

1.2 การสังเคราะห์ปรับเปลี่ยนโครงสร้างและหมู่ฟังก์ชันของเอคไดสเตียรอยด์

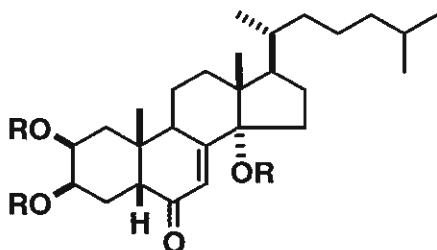
1) การสังเคราะห์อนุพันธ์ของหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งต่างๆในโมเลกุล

(1) การสังเคราะห์ *O*-Alkyl ethers

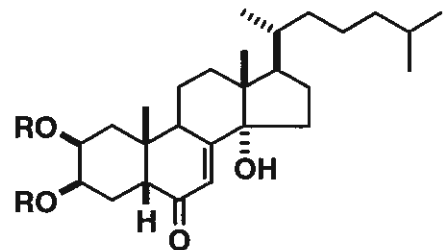
ดังได้กล่าวมาแล้วว่ากลุ่มของ Horn^{1[13]} ได้เสนอไว้ว่า ลักษณะโครงสร้างที่สำคัญที่เอคไดสเตียรอยด์จำเป็นต้องมีเพื่อให้แสดงฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบได้คือมี A/B ring junction เป็นแบบ *cis*, ระบบ 6-keto-7-ene, มีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 14 α และมีสายโซ่ด้านข้างที่มีจำนวนคาร์บอนครบ (full sterol side-chain) นอกจากนี้หมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 3 β และ 22R ก็จำเป็นต่อการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพด้วย ส่วนหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 2, 20 และ 25 ไม่จำเป็นต่อการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพของเอคไดสเตียรอยด์ เราจึงสนใจที่จะศึกษาว่า หากมีการเปลี่ยนแปลงที่หมู่ไฮดรอกซิลดังกล่าว จะมีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างไร ในครั้งนี้ได้เลือกศึกษาอนุพันธ์ *O*-alkyl ethers โดยเลือกเตรียม *O*-methyl ethers เป็นหลัก

14-Methyl ether

จากการศึกษาในอดีต^{1,2[1]} ได้แสดงให้เห็นว่าหมู่ไฮดรอกซิลอิสระที่ตำแหน่ง 14 เป็นสิ่งจำเป็นต่อการแสดงฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบ ปรากฏว่าอนุพันธ์ 14-trimethylsilyl 1.2(1) ไม่แสดงแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพใน *Musca* assay ส่วนสาร 1.2(2) ซึ่งมีหมู่ 14-ไฮดรอกซิลอิสระก็แสดงแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ (มีฤทธิ์เป็น 17% ของสาร 1(1)) การใช้ trimethylsilyl (TMS) ethers มีข้อเสียตรงที่อาจถูกไฮโดรไลส์ได้ง่ายกว่าหมู่ป้องกันชนิดอื่น ได้มีการพบว่าสาร 1.2(3) มีแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพเท่ากับสาร 1.2(2) อาจเป็นเพราะหมู่ TMS ที่ตำแหน่ง 2 และ 3 ของสาร 1.2(2) ถูกไฮโดรไลส์มาเป็นสาร 1.2(3) ได้ง่าย ฉะนั้นเราจึงต้องการศึกษาอนุพันธ์อัลคิลอีเทอร์ซึ่งสามารถทนต่อการไฮโดรไลส์ได้ดี และ 14-methyl ether 1.2(4) เป็นอนุพันธ์ที่เราเลือกสังเคราะห์เพื่อทดสอบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบ



1.2(1) R = Si(Me)₃

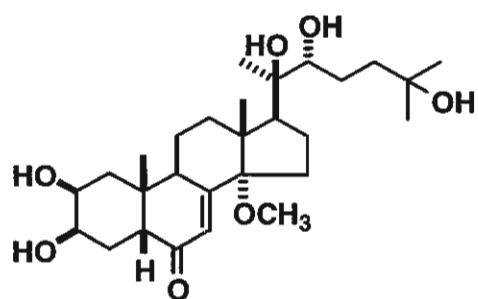


1.2(2) R = Si(Me)₃

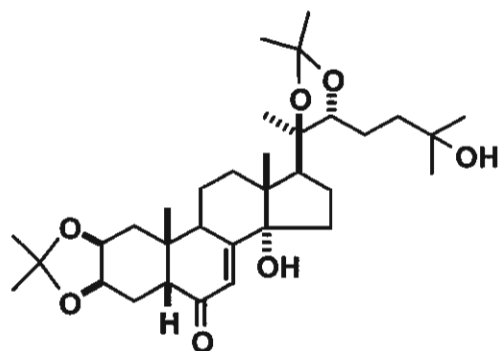
1.2(3) R = H

การสังเคราะห์ การสังเคราะห์ 20-hydroxyecdysone (20-ECD) 14-methyl ether [1.2(4)] เริ่มต้นจากสารตั้งต้นที่หาได้ง่ายจาก *Vitex glabrata* (ต้นไข่น้ำ) ^{1,1[3]} หลักการคือทำ selective methylation เข้าที่หมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 14 จากการศึกษาที่ผ่านมาในอดีตพบว่าความว่องไวของหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่งต่างๆต่อปฏิกิริยา acetylation มีดังนี้ 2>22>3>>25 ^{1[17]} จากผลงานที่ยังไม่ได้ตีพิมพ์ของเราพบว่า อัตราเร็วของหมู่ไฮดรอกซิลตติยภูมิ (tertiaryhydroxyl group) ต่อปฏิกิริยา acetylation เป็น 25>20>14 ถ้าอัตราเร็วของปฏิกิริยา methylation เป็นไปตามนี้เช่นกัน เราจะต้องป้องกันหมู่ไฮดรอกซิลทุกหมู่ ยกเว้นที่ตำแหน่ง 14 การป้องกันหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 2, 3, 20 และ 22 ของสาร 1(1) เป็น 2,3:20,22-diacetonide 1.2(5) ได้มีการทำมาเป็นอย่างดีแล้ว ^{1[17]} ฉะนั้นยังมีหมู่ไฮดรอกซิล อีกตำแหน่งที่ยังไม่ได้ป้องกันคือตำแหน่ง 25 ก่อนที่จะป้องกันหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่งดังกล่าวนี้ เราต้องการทราบว่าเมื่อนำ diacetonide 1.2(5) มาทำ methylation ควรจะได้ส่วนผสมของ 25-methyl ether 1.2(6) และ 14-methyl ether 1.2(7) หรือไม่ ถ้าได้สารผลิตภัณฑ์ทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถแยกออกจากกันได้หรือไม่ เมื่อนำ 1.2(5) มาทำปฏิกิริยากับ methyl iodide ใน DMF โดยมี silver oxide อยู่ด้วย สิ่งที่เราประหลาดใจมากคือได้สารผลิตภัณฑ์เป็น 14-methyl ether 1.2(7) เกิดขึ้น และมี traces ของสารผลิตภัณฑ์อื่นเกิดขึ้น แต่ปริมาณน้อยมาก และไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ การที่ทราบว่าสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเป็น 20-ECD 20,22-acetonide 14-methyl ether [1.2(7)] ดูจากข้อมูลสเปกโทรสโกปี ข้อมูลทาง ¹H NMR (ดูตารางที่ 1.2(1)) พบว่ามีสัญญาณของหมู่ OMe ที่ δ 3.04 ซึ่งจะเห็นว่าเกิด upfield shift อย่างผิดปกติ (คือประมาณ 0.4 ppm) เมื่อเทียบกับสัญญาณ aliphatic OMe ทั่วไป คำอธิบายที่เป็นไปได้มีประการเดียวคือ methylation เกิดขึ้นที่หมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 14 และหมู่เมทิลของ 14-OMe อยู่ใน shielding zone ของพันธะคู่ของวง B ข้อมูลอื่นๆของ ¹H NMR สอดคล้องกับโครงสร้าง 1.2(7) เป็นอย่างดี ข้อมูล electrospray mass spectrum (ESMS) แสดงค่าของ base peak ที่ m/z 597 ซึ่งตรงกับ $[M+Na]^+$ ข้อมูล IR สเปกตรัมก็สอดคล้องกับโครงสร้างที่แสดง เมื่อนำสาร 1.2(7) มาทำจัดหมู่ป้องกัน acetonide ออกไปด้วย 70% AcOH ได้ 20-ECD 14-methyl ether [1.2(4)] สาเหตุที่ methylation เกิดที่ตำแหน่ง 14 แทนที่จะเป็นตำแหน่งที่ 25 (หรือถ้ามี methylation เกิดที่ตำแหน่ง 25 ด้วยก็จะต้องมีเกิดน้อย จนไม่สามารถแยกสารผลิตภัณฑ์ออกมาได้) ยังไม่สามารถให้คำอธิบายที่เหมาะสมได้

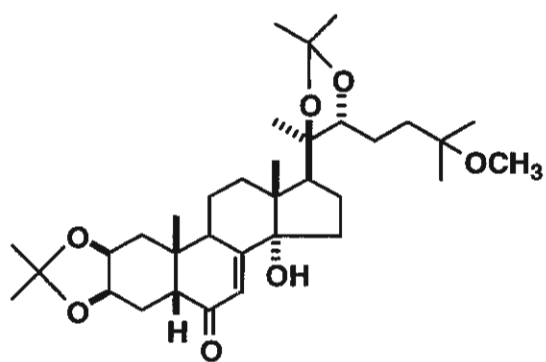
ฤทธิ์ทางชีวภาพ ในการทดสอบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบโดยใช้ *Musca* bioassay นั้น ใช้หนอนแมลงวันบ้าน (*Musca domestica*) ที่โตเต็มวัยและผูกประมาณปล้องที่ 7 นับจากทางด้านหัว เลือกเฉพาะตัวที่ส่วนหัว (anterior end) เข้าดักแด้ (pupariation) เป็นสีน้ำตาลมาใช้ในการทดสอบ ในการทดสอบได้ใช้หนอน 10 ตัวต่อเอกโดสเดียวรอด 1



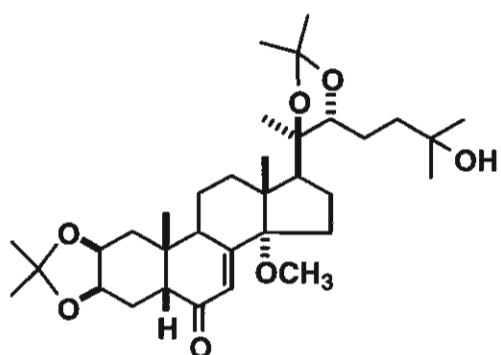
1.2(4)



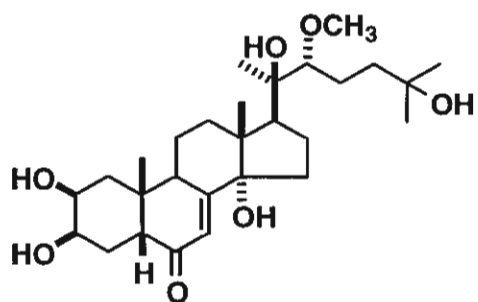
1.2(5)



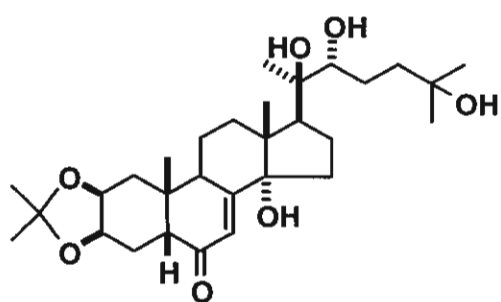
1.2(6)



1.2(7)



1.2(8)



1.2(9)

ความเข้มข้น จีดสารละลายที่ต้องการทดสอบเข้าทางด้านท้อง (posterior end) ปริมาณ 3 μ l โดยใช้เข็มจีดที่ทำด้วยหลอด capillary ที่ดัดให้แหลมและหักให้คม เมื่อจีดสารละลายที่ต้องการทดสอบแล้ว อีก 24 ชั่วโมงถัดมาทำการบันทึกผลที่ได้ โดยให้ score ตามวิธีการของ Ohtaki และคณะ^{1,2[2]} positive และ negative control ที่ใช้ คือ 20-hydroxyecdysone [20-ECD,1(1)] และตัวทำละลายที่ใช้ละลายเอคโดสเตียรอยด์ (ดูตารางที่ 1.2(11) และ 1.1(12)) ทำการพลอต % effectiveness ที่ได้กับความเข้มข้นเป็นโมลาร์ของเอคโดสเตียรอยด์ และหา EC₅₀ หรือความเข้มข้นเป็นโมลาร์ที่ทำให้เกิดการเข้าดักแด้ได้เฉลี่ย 50% (หรือมี % effectiveness เป็น 50)

สำหรับ 20-ECD 14-methyl ether [1.2(4)] พบว่าฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบของสารชนิดนี้ต่ำกว่าสาร 1(1) มาก (EC₅₀ ของ 1(1) และ 1.2(4) คือ 1.658×10^{-5} และ 60.00×10^{-5} M ตามลำดับ) คือมีฤทธิ์ต่ำกว่าสาร 1(1) ประมาณ 36 เท่า การที่เกิดการลดลงของฤทธิ์ทางชีวภาพเช่นนี้ อาจเนื่องมาจากความสามารถในการเกิด H-bonding ระหว่างไฮโดรเจนของหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 14 กับ receptor ของแมลงถูกกำจัดออกไปโดย methylation (เป็น electronic factor) หรือเกิดจากการเพิ่มขนาดที่ใหญ่ขึ้น ทำให้การ bind กับ receptor เกิดได้ไม่ดีเท่าเดิม หรือเป็นสอง factors นี้ รวมกัน

22-Alkyl ethers

จากผลงานของกลุ่มของ Horn^{1[13]} ที่ว่าหมู่ 22R-hydroxyl มีความจำเป็นต่อการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่สูงของเอคโดสเตียรอยด์ ฉะนั้น การที่ pinnasterone [1(3)] ซึ่งไม่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 22 แสดงฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบที่ต่ำ จึงเป็นสิ่งที่เป็นไปได้ตามคาดหมาย

ได้มีรายงานว่ายอยทากบก *Cepaea nemoralis* สามารถเปลี่ยนเอคโดสเตียรอยด์ 1(1) ซึ่งมีอยู่ในพืชที่กินอาหารให้เป็นอนุพันธ์ 22-acetate 1(6) โดยเชื่อว่าเพื่อต้องการลดอันตรายที่เกิดจากการได้รับสาร 1(1) ในปริมาณสูง^{1[11]} เราได้เตรียมอนุพันธ์ 22-acetate 1(6) แล้วทดสอบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบใน *Musca* bioassay (ตารางที่ 1.2(12)) ก็ปรากฏว่าฤทธิ์ทางชีวภาพของ 1(6) ลดลงเมื่อเทียบกับสารหลัก 1(1) ถึงแม้จะลดลงไปไม่มาก แต่ฤทธิ์ทางชีวภาพของเอคโดสเตียรอยด์ในสัตว์แต่ละชนิดอาจแตกต่างกันไปได้^{1[13]} จึงเป็นไปได้ที่กรณีของ *C. nemoralis* ฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์อะซิเตต 1(6) อาจลดลงมากเมื่อเทียบกับสาร 1(1) การลดลงของฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร 1(6) อาจเนื่องมาจาก acetylation ทำให้เกิด H-bonding ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 22 กับ receptor (electronic factor) หดไป หรือหมู่ acetyl ที่ใหญ่อาจทำให้เกิดขัดขวางต่อการ bind กับ receptor (steric factor) หรือเนื่องมาจากทั้งสองปัจจัยรวมกัน เพื่อเป็นการทดสอบเรื่องนี้เราได้เตรียม 22-methyl ether 1.2(8) ของสาร 1(1)

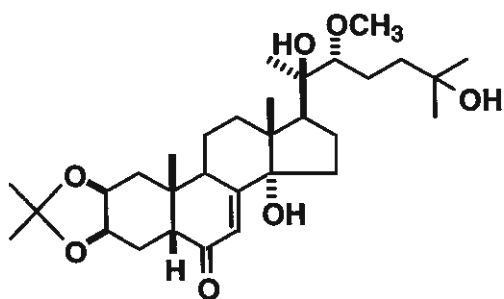
การสังเคราะห์ ในการสังเคราะห์ 20-ECD 22-methyl ether [1.2(8)] จากสารตั้งต้น 1(1) จะต้องป้องกันหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 2 และ 3 ก่อนทำ methylation โดยเตรียมเป็น 2,3-acetonide 1.2(9) ตามวิธีที่กลุ่มของเราได้เคยทำมาแล้ว¹¹⁷¹ นำ 1.2(9) มาทำ methylation ตามวิธีการเดียวกับที่ใช้เตรียมสาร 1.2(7) ได้ 20-ECD 2,3-acetonide 22-methyl ether [1.2(10)] และได้ 20-ECD 2,3-acetonide 14,22-dimethyl ether [1.2(11)] หลักฐานที่ทำให้ทราบว่า methylation เกิดที่ตำแหน่ง 22 ในสาร 1.2(10) คือนอกจากมีสัญญาณ ¹H NMR (ตารางที่ 1.2(2)) ของหมู่ OMe (ใน CDCl₃) ที่ δ 3.46 แล้วยังมีสัญญาณของ H-22 ที่ δ 2.93 (dd, J = 8.7, 2.6 Hz) ซึ่งสัญญาณหลังนี้จะเห็นว่าการเกิด upfield shift ไปอย่างมาก คือเกิด upfield shift ถึงประมาณ 0.7 ppm ES-mass spectrum ของสาร 1.2(10) แสดง peak [M+Na]⁺ ที่ค่า m/z 557 ข้อมูล ¹H NMR ของโปรตอนอื่นๆของ 1.2(10) ก็สอดคล้องกับโครงสร้าง

ส่วนสาร 1.2(11) ก็มีข้อมูล ¹H NMR (ตารางที่ 1.2(3)) สอดคล้องกับโครงสร้าง โดยเฉพาะสัญญาณที่ upfield ของ H-22 (ที่ δ 2.91) และ 14-OMe (δ 2.93) แสดงยืนยันว่าหมู่ methoxyl อยู่ที่ตำแหน่ง 14 และ 22 นอกจากนี้ ESMS ยังแสดงพีคของ [M+H]⁺ และ [M+Na]⁺ ที่ค่า m/z 549 และ 571 ตามลำดับ

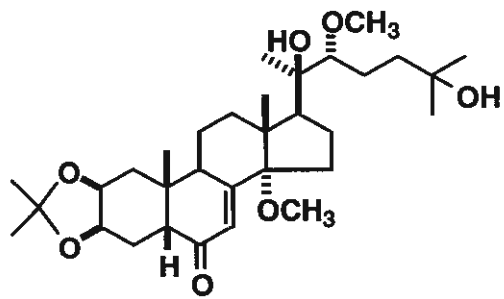
สิ่งที่เป็นข้อสังเกตคือ ในกรณีนี้ไม่ได้สารผลิตภัณฑ์ที่เกิดการ methylation ที่ตำแหน่ง 25 เช่นเคย คือไม่มีสารผลิตภัณฑ์ตามโครงสร้าง 1.2(12) เกิดขึ้น

เมื่อนำสาร 1.2(10) และ 1.2(11) มากำจัดหมู่ป้องกัน acetonide ออกไปโดยใช้ 70% AcOH เช่นเดียวกันกับกรณีของสาร 1.2(7) ได้ 20-ECD 22-methyl ether [(1.2(8))] และ 20-ECD 14,22-dimethyl ether [1.2(13)] จากผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร 1.2(8) และ 1.2(13) (ดูหัวข้อฤทธิ์ทางชีวภาพที่อยู่ถัดจากตอนนี) พบว่ามีความจำเป็นต้องสังเคราะห์ 20-ECD 22-ethyl ether [1.2(14)] ในการสังเคราะห์ 1.2(14) ได้ใช้วิธีการเดียวกันกับการสังเคราะห์ 22-methyl ether 1.2(8) โดยเริ่มจาก 20-ECD 2,3-acetonide [1.2(9)] ทำปฏิกิริยากับ ethyl iodide และ silver oxide ใน DMF ได้ 20-ECD 2,3-acetonide 22-ethyl ether [1.2(15)] การที่เราพบว่าหมู่เอทิลอยู่ที่ตำแหน่ง 22 ทราบได้จากข้อมูล ¹H NMR (ตารางที่ 1.2(4)) โดยสัญญาณหมู่ CH₃ เห็นเป็น triplet (J = 6.8 Hz) ที่ δ 1.20 และสัญญาณหมู่ CH₂ อยู่เป็น multiplet ที่ δ 3.54 และ δ 3.69 เนื่องจากโปรตอนทั้งสองไม่ equivalent กัน สัญญาณของ H-22 อยู่ที่ δ 3.03 ซึ่งเกิด upfield shift อย่างมาก (ประมาณ 0.6 ppm) ES-แมสสเปกตรัมแสดงพีคของ [M+H]⁺ และ [M+Na]⁺ ที่ m/z 549 และ 571 ตามลำดับ เมื่อนำ 1.2(15) มากำจัดหมู่ acetonide ออกไป ได้ 20-ECD 22-ethyl ether [1.2(14)]

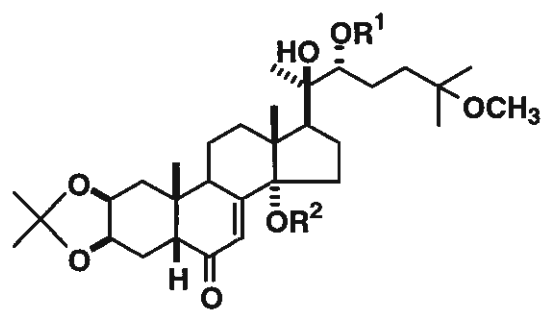
ฤทธิ์ทางชีวภาพ 20-ECD 22-methyl ether [1.2(8)] แสดงฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบที่สูง (EC₅₀ = 2.554x10⁻⁵ M, ตารางที่ 1.2(14)) โดยมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่ำกว่าสาร



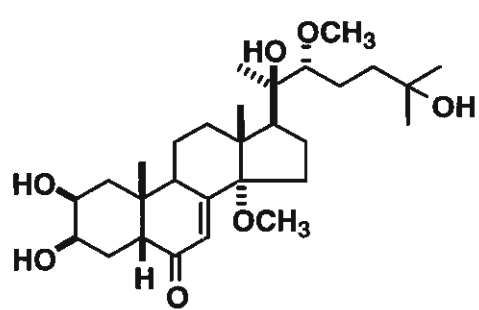
1.2(10)



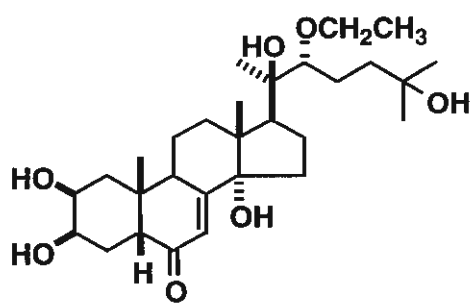
1.2(11)



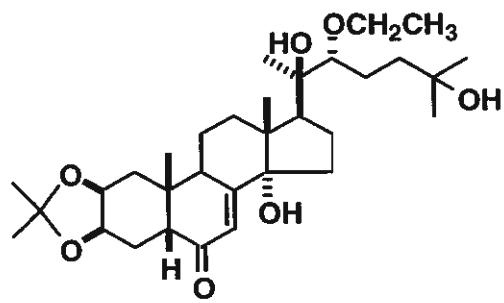
1.2(12)



1.2(13)



1.2(14)



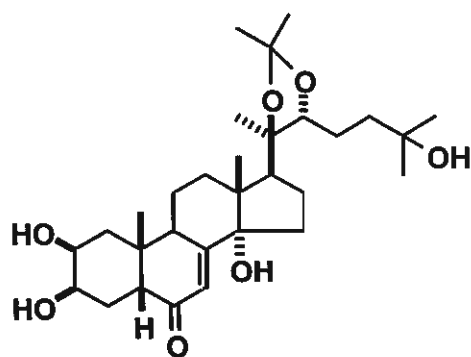
1.2(15)

1(1) แต่ไม่มาก การที่สาร 1.2(8) ยังแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่สูงอยู่เมื่อเกิด methylation ที่ตำแหน่ง 22 แสดงว่า การแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ หมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 22 ไม่จำเป็นต้องอยู่แบบอิสระ การลดลงของฤทธิ์ทางชีวภาพอาจเนื่องมาจากความสามารถในการเกิด H-bonding ของหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 22 ถูกจำกัดไป โดยการเป็น methyl ether (ซึ่งเป็น electronic factor) และ/หรือการเพิ่มความเกะกะของหมู่เมทิลเมื่อเทียบกับไฮโดรเจน (คือเป็น steric factor) ถ้าหาก factor ชนิดนี้มีความสำคัญ การเพิ่มขนาดของหมู่อัลคิลที่ตำแหน่ง 22 น่าจะทำให้ฤทธิ์ทางชีวภาพลดลง เราจึงได้สังเคราะห์ 20-ECD 22-ethyl ether [1.2(14)] เมื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพปรากฏว่า สาร 1.2(14) มีฤทธิ์ทางชีวภาพใกล้เคียงกับ 20-ECD 22-methyl ether [1.2(8)] โดยสูงกว่าเล็กน้อย ($EC_{50} = 2.375 \times 10^{-5}$ M, ตารางที่ 1.2(15)) จากผลที่ได้จะเห็นว่าเมื่อหมู่อัลคิลมีขนาดใหญ่ขึ้น ฤทธิ์ทางชีวภาพไม่ลดลง แสดงว่า steric factor ไม่มีความสำคัญต่อการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพของเอคโดสเตียรอยด์

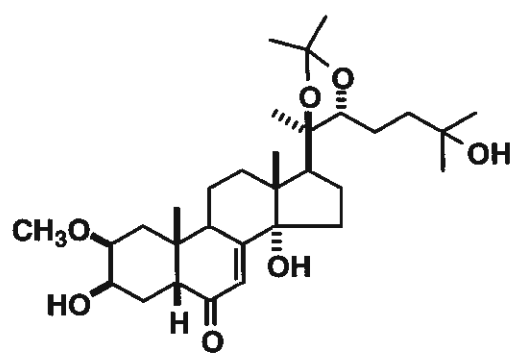
2-Alkyl และ 3-Alkyl ethers

จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของ 22-methyl และ 22-ethyl ethers (สาร [1.2(8)] และ [1.2(14)] ตามลำดับ พบว่า ยังสูงเกือบเท่ากับ 20-ECD [1(1)] อยู่ เราอยากทราบต่อไปว่าถ้าหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่งที่ 2 และ 3 ถูกเปลี่ยนไปเป็น alkyl ethers ฤทธิ์ทางชีวภาพจะยังคงใกล้เคียงกับสารหลัก 1(1) อยู่หรือไม่ อีกประเภทหนึ่งได้มีการศึกษาพบว่า การที่เอคโดสเตียรอยด์เป็นสารมีขั้วสูง ทำให้สามารถแทรกผ่าน (penetrate) เข้าไปทางเนื้อเยื่อของแมลงได้ยาก ทำให้เป็นข้อเสียเปรียบในการพัฒนาสารกลุ่มนี้เป็นสารควบคุมแมลง^{1(13), 1.2(3)} ฉะนั้น ถ้าเราสามารถทำให้เอคโดสเตียรอยด์มีความมีขั้วน้อยลง คือมีความเป็น lipophilicity มากขึ้น ก็อาจจะเกิดผลดีต่อการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ เราจึงสนใจที่จะทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์ alkyl ethers ของเอคโดสเตียรอยด์ ที่ตำแหน่ง 2 และ 3 โดยจะให้เป็นอนุพันธ์ methyl และ ethyl ethers

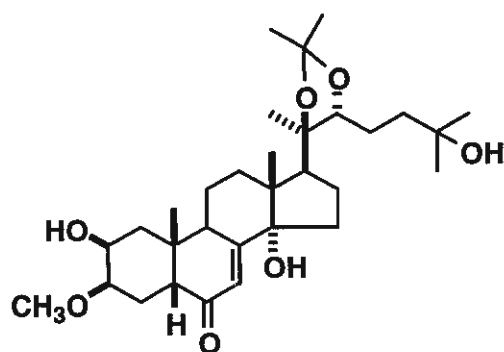
การสังเคราะห์ เมื่อทำการ methylation 20-ECD 20,22-acetonide [1.2(16)] โดยวิธีที่กล่าวมาข้างต้น ได้ 20-ECD 20,22-acetonide 2-methyl ethers [1.2(17)] เป็น major product (42%) และ 20-ECD 20,22-acetonide 3-methyl ether [1.2(18)] เป็น minor product (15%) นอกจากนี้ยังได้ 20-ECD 20,22-acetonide 2,14 dimethyl ether [1.2(19)] และ 20-ECD 20,22-acetonide 2,3,14-trimethyl ether [1.2(20)] ในปริมาณเล็กน้อย โครงสร้างสารของสาร 1.2(7) เราทราบว่า ¹H NMR (ตารางที่ 1.2(4)) ของหมู่ methoxyl อยู่ที่ตำแหน่ง 2 เพราะสัญญาณของ H-2 ซึ่งอยู่ที่ δ 3.39 ซึ่งเกิด upfield shift ถึง 0.41 ppm เมื่อเทียบกับสารตั้งต้น 1.2(16) ซึ่ง H-2 อยู่ที่ δ 3.80¹⁽¹⁷⁾ นอกจากนี้ FAB mass spectrum (negative ion mode) แสดงถึงพีคของ $[M-H]^-$ ที่ m/z 533. สำหรับโครงสร้างของสาร 1.2(18) ก็สามารถทราบได้จากข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี โดยเฉพาะ



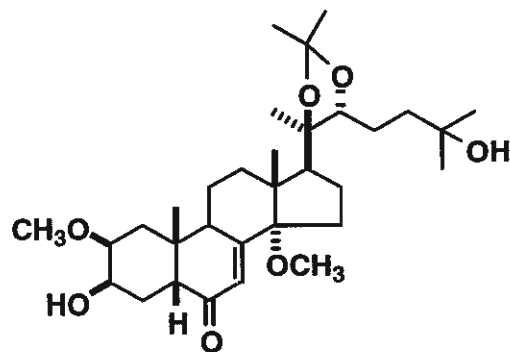
1.2(16)



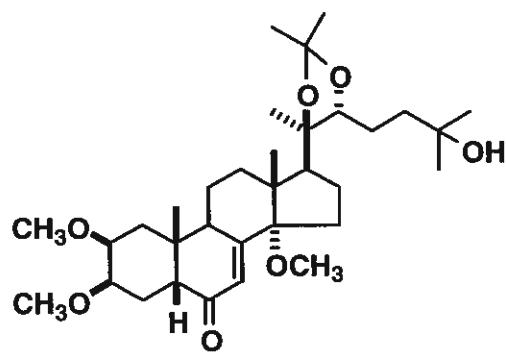
1.2(17)



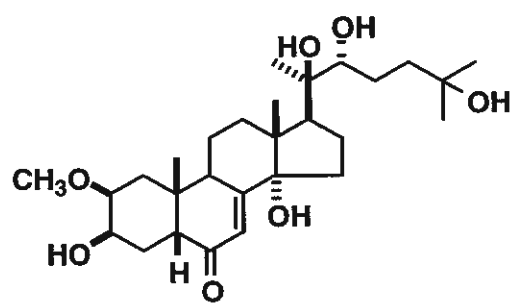
1.2(18)



1.2(19)



1.2(20)



1.2(21)

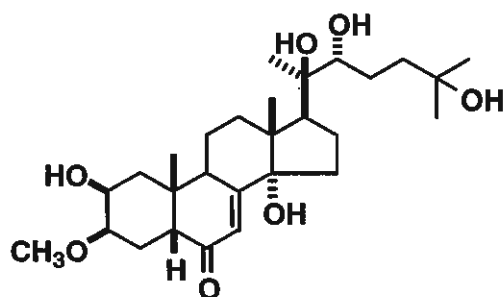
^1H NMR (ดูตารางที่ 1.2(5)) สัญญาณของ H-3 อยู่ที่ δ 3.53 (ใช้ CDCl_3) ซึ่งเกิด upfield shift 0.5 ppm เมื่อเทียบกับ 20-ECD 20,22-acetonide [1.2(16)] ซึ่ง H-3 อยู่ที่ δ 4.03¹¹⁷¹ แมสสเปกตรัมของ 1.2(18) ก็ตรงกับที่ควรจะเป็น ส่วนข้อมูลทางสเปกโตรสโกปีของสาร 1.2(19) และ 1.2(20) (ตารางที่ 1.2(5)) ก็สอดคล้องกับโครงสร้างของสาร

สิ่งที่น่าสังเกตคือ ในปฏิกิริยา methylation ของสาร 1.2(16) พบว่าได้สารผลิตภัณฑ์ที่ปฏิกิริยาเกิดที่ตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิลแตกต่างไปจากปฏิกิริยา acetylation คือได้ methylation product ที่ตำแหน่ง 2 และ 3 ในขณะที่ acetylation product เกิดที่ตำแหน่ง 2 เมื่อตำแหน่ง 2 ถูก acetylate หมดแล้ว จึงจะเข้าทำปฏิกิริยาที่ตำแหน่ง 3 ได้ 2,3-diacetate และการเกิด methylation ที่ตำแหน่ง 14 ก็เกิดขึ้นง่ายกว่าที่คาดไว้ เพราะหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งที่ 14 มี steric hindrance สูงที่สุด แต่กลับได้สารผลิตภัณฑ์ 2,14-dimethyl ether 1.2(19) ทั้ง ๆ ที่หมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่งที่ 3 ยังว่างอยู่ สำหรับการเกิดสารผลิตภัณฑ์ 1.2(19) และ 1.2(20) เราไม่ได้ทดลองปรับสภาวะของปฏิกิริยาใหม่เพื่อให้ไม่เกิดสารเหล่านี้ เพราะเป็นสารที่เราต้องการจะนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้วย

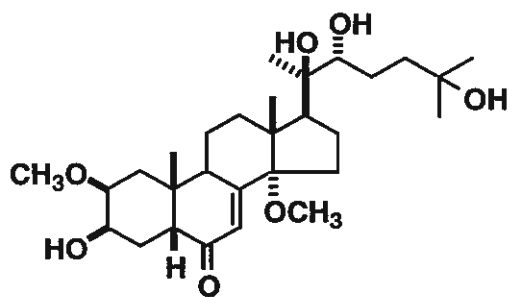
เมื่อนำสาร 1.2(17), 1.2(18), 1.2(19) และ 1.2(20) มากำจัดหมู่ป้องกัน acetonide ออกไป ได้ 2-methyl ether 1.2(21), 3-methyl ether 1.2(22), 2,14-dimethyl ether 1.2(23) และ 2,3,14-trimethyl ether 1.2(24) ตามลำดับ

20-ECD 2-ethyl ether [1.2(25)] และ 20-ECD 3-ethyl ether [1.2(26)] ได้ถูกเตรียมโดยวิธีเดียวกับ methyl ether analogues โดยใช้ ethyl iodide กับ silver oxide ใน DMF ทำปฏิกิริยากับ 20,22-acetonide 1.2(16) ได้สารผลิตภัณฑ์ 1.2(27) และ 1.2(28) ตามลำดับ เมื่อกำจัดหมู่ป้องกัน acetonide จากสาร 2 ชนิดหลังออกไป ได้ 2-ethyl ether 1.2(25) และ 3-ethyl ether 1.2(26) โครงสร้างของสารเหล่านี้ได้หาและยืนยันโดยข้อมูลทางสเปกโตรสโกปีเช่นเดียวกัน

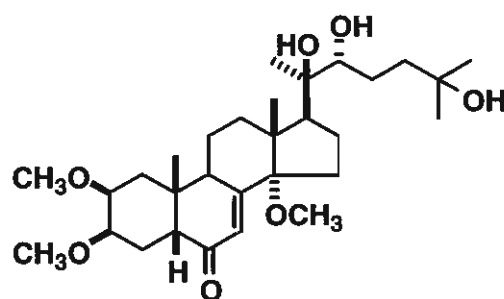
ฤทธิ์ทางชีวภาพ ทั้ง 20-ECD 2-methyl ether 1.2(21) และ 20-ECD 3-methyl ether 1.2(22) แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 1.2(16) และ 1.2(17) ตามลำดับ, $\text{EC}_{50} = 1.204 \times 10^{-5}$ และ 1.460×10^{-5} M ตามลำดับ) และมีฤทธิ์ทางชีวภาพพอๆกับ 20-ECD [1(1)] หรือสูงกว่าเล็กน้อย ในกรณีของ 3-methyl ether 1.2(22) ผลที่ได้แสดงว่าหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 3β ซึ่งจำเป็นต่อการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่สูงของเอคโดสเตียรอยด์ ไม่จำเป็นต้องอยู่แบบอิสระ โดยเหตุผลเดียวกับกรณีของ 22-methyl ether 1.2(8) แสดงว่าการเกิด H-bonding ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่งที่ 3 (ซึ่งเป็น electronic factor) ไม่ใช่ปัจจัยที่สำคัญ จากการศึกษาในอดีต¹¹³⁾ พบว่าหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่งที่ 2 ไม่จำเป็นต่อการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ ในกรณีของ 2-methyl ether 1.2(21) มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงกว่าสารหลัก 1(1) เล็กน้อย แสดงว่าการเปลี่ยนจากไฮโดรเจนไปเป็นหมู่เมทิล ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าไม่ได้ทำให้ฤทธิ์ทางชีวภาพลดลง สิ่งที่นาสังเกตคือ การเปลี่ยนจากสารหลัก 1(1)



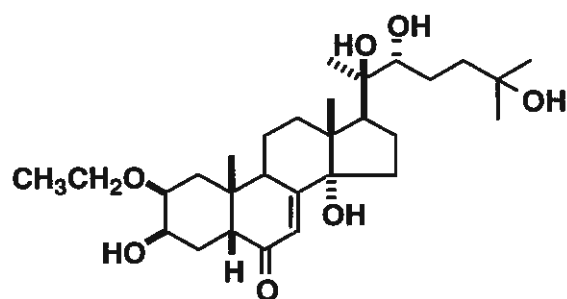
1.2(22)



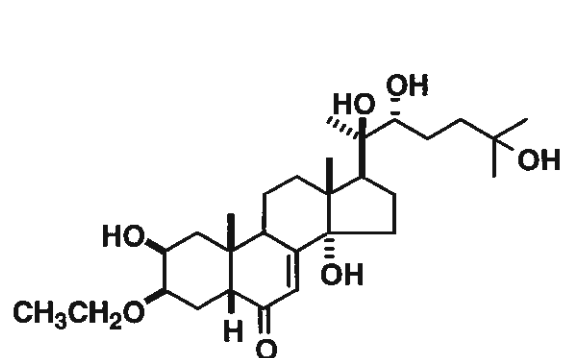
1.2(23)



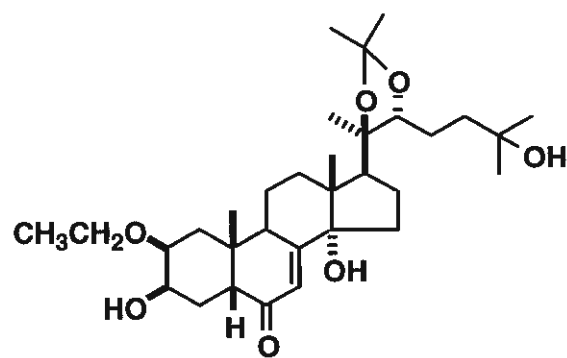
1.2(24)



1.2(25)



1.2(26)



1.2(27)

ไปเป็นสารที่มีขั้วน้อยลงคือ 2-methyl ether 1.2(21) และ 3-methyl ether 1.2(22) ไม่ได้ทำให้ฤทธิ์ทางชีวภาพลดลง

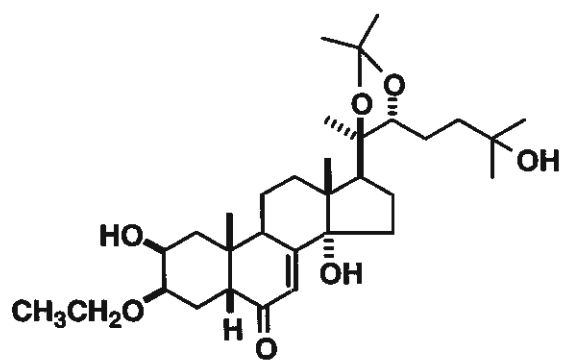
การที่จะทราบว่า steric factor มีบทบาทสำคัญในการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์ 2- และ 3-alkyl ethers ได้มีการเตรียมอนุพันธ์ 2-ethyl ether 1.2(25) และ 3-ethyl ether 1.2(26) เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบ ด้วยความประหลาดใจ เราพบว่า 2-ethyl ether 1.2(25) ($EC_{50} = 0.523 \times 10^{-5}$ M) มีฤทธิ์ทางชีวภาพประมาณ 3 เท่าของ 20-ECD [1(1)] ส่วน 3-ethyl ether 1.2(26) ($EC_{50} = 1.023 \times 10^{-5}$ M) มีฤทธิ์ทางชีวภาพประมาณ 1.5 เท่าของสาร 1(1) (ดูตารางที่ 1.2(18) และ 1.2(19) ตามลำดับ) การค้นพบนี้แสดงให้เห็นว่า ในระบบที่ใช้ทดสอบกันนั้น steric factor ที่ตำแหน่ง 2 และ 3 ไม่มีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของเอคโดสเตียรอยด์ อย่างไรก็ตาม ยังไม่เป็นที่กระจ่างว่า เหตุใดฤทธิ์ทางชีวภาพของ 2- และ 3-ethyl ethers จึงเพิ่มขึ้น ถึงแม้ว่าจะเปรียบเทียบกับ methyl ether เหตุผลหนึ่งที่อาจอธิบายได้คือการเพิ่มความเป็น lipophilicity เป็นการทำให้ฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มขึ้น แต่ก็ยังไม่ได้มีการพิสูจน์สมมุติฐานในข้อนี้

2,2,2-Dialkyl, 3,2,2-dialkyl และ 2,3,2,2-trialkyl ethers

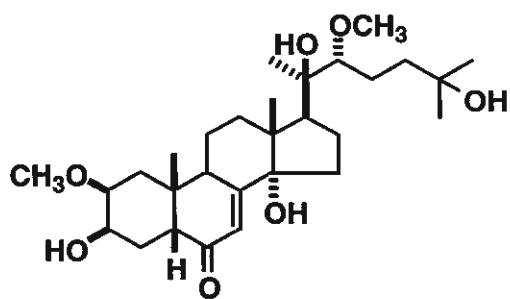
จากผลการทดสอบข้างต้น สรุปได้ว่า methylation และ ethylation หมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 22 ของเอคโดสเตียรอยด์ 1(1) ไปเป็นอนุพันธ์ ethers 1.2(8) และ 1.2(14) เกิดการลดลงของฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เมื่อทำ methylation หมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 2 และ 3 ไปเป็น 2- และ 3-methyl ethers 1.2(21) และ 1.2(22) เกิดการเพิ่มขึ้นของฤทธิ์ทางชีวภาพเล็กน้อย และเมื่อทำ ethylation หมู่ไฮดรอกซิลดังกล่าวไปเป็น 2- และ 3-ethyl ethers 1.2(25) และ 1.2(26) พบว่าฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ผลที่ได้นี้แสดงว่าเมื่อทำ alkylation ที่หมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 2, 3 และ 22 ไม่ทำให้เอคโดสเตียรอยด์เสียฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบ เราจึงมีความประสงค์จะศึกษาต่อไปว่า เมื่อเปลี่ยนไปเป็น polyalkyl ethers แล้ว จะทำให้ฤทธิ์ทางชีวภาพลดลงไปหรือไม่ เราจึงวางแผนศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของ 20-ECD 2,2,2-dimethyl ether

การสังเคราะห์ ทำการสังเคราะห์ 20-ECD 2,2,2-dimethyl ether [1.2(29)] และ 20-ECD 3,2,2-dimethyl ether [1.2(30)] โดยปฏิกิริยาระหว่างสาร 1(1) กับ methyl iodide ใน DMF โดยมี silver oxide อยู่ด้วย ปรากฏว่าได้สารที่ต้องการทั้ง 2 ชนิด คือ 2,2,2-dimethyl ether 1.2(29) และ 3,2,2-dimethyl ether 1.2(30) และยังได้สารที่เคยเตรียมมาแล้วคือ 2,2-methyl ether 1.2(8), 3-methyl ether 1.2(22) และ 2-methyl ether 1.2(21) สาร 2 ชนิดแรกมีข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีสอดคล้องกับโครงสร้าง

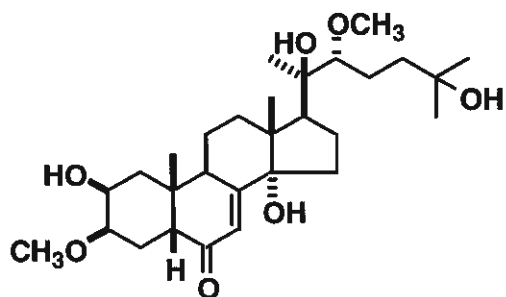
เราได้พยายามสังเคราะห์ 20-ECD 2,3,2,2-trimethyl ether [1.2(31)] โดยทำ methylation สาร 1(1) เป็นเวลานานขึ้นกว่าเดิม แต่ผลที่ได้ไม่เป็นที่น่าพอใจ จึงได้นำ 2,2,2-



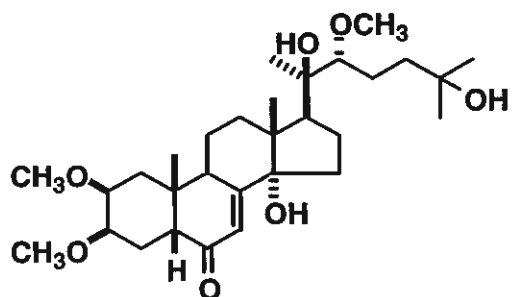
1.2(28)



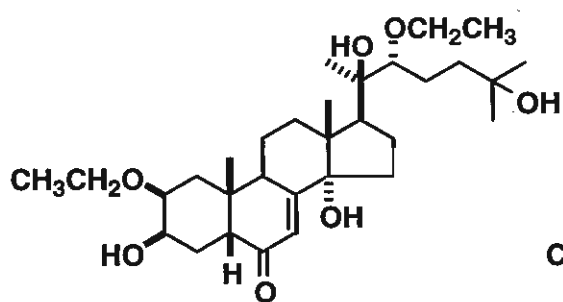
1.2(29)



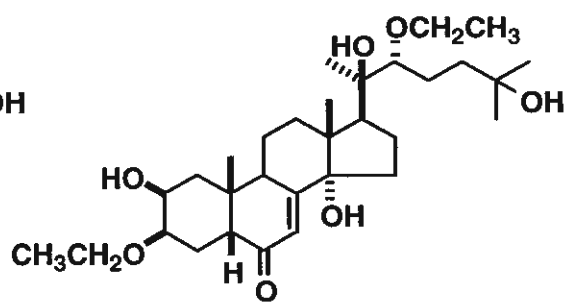
1.2(30)



1.2(31)



1.2(32)



1.2(33)

dimethyl ether [1.2(29)] มาเป็นสารตั้งต้น ปรากฏว่าได้สาร 2,3,22-trimethyl ether 1.2 (31) เป็น major products และมี 20-ECD 2,14,22-tetramethyl ether [1.2(35)] และ 20-ECD 2,3,14,22-tetramethyl ether [1.2(36)] เป็น minor products ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีของสารเหล่านี้สอดคล้องกับโครงสร้างทุกประการ

เมื่อทำการสังเคราะห์สารในกลุ่ม diethyl ether พบว่า 20-ECD 2,22-diethyl ether [1.2 (32)] และ 3,22-diethyl ether [1.2(33)] สามารถเกิดขึ้นได้ดีจากการใช้สารตั้งต้น 20-ECD 22-ethyl ether [1.2(14)] ที่ได้เคยสังเคราะห์มาแล้ว โครงสร้างของสารเหล่านี้ สอดคล้องกับข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี (ตารางที่ 1.2(9)) และ 1.2(10)) อย่างไรก็ตาม เรายังไม่สามารถสังเคราะห์ 2,3,22-trimethyl ether [1.2(34)]

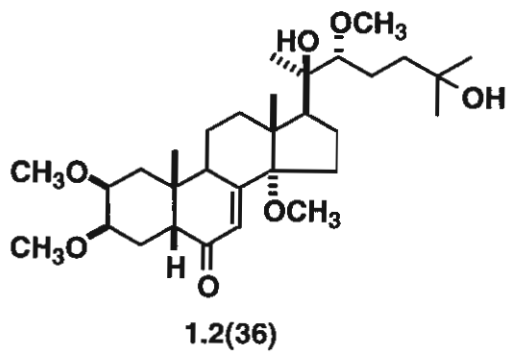
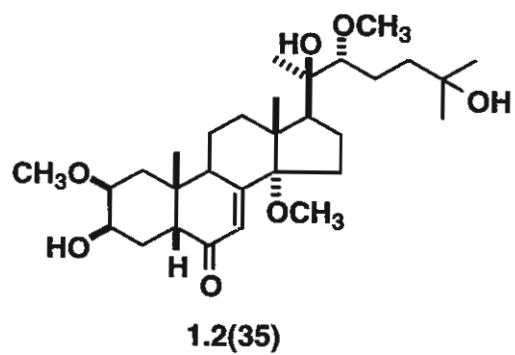
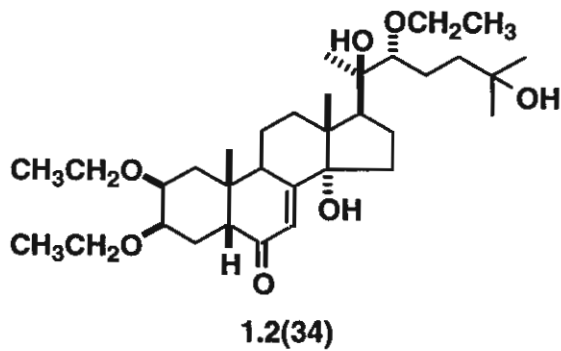
ฤทธิ์ทางชีวภาพ ในกลุ่มของ dialkyl ethers ของ 20-ECD [1(1)] 20-ECD 2,22-dimethyl ether [1.2(29)] และ 20-ECD 3,22-dimethyl ether [1.2(30)] มีฤทธิ์ทางชีวภาพพอๆกัน ($EC_{50} = 1.683 \times 10^{-5}$ และ 1.452×10^{-5} M ตามลำดับ, ตาราง 1.2(20) และ 1.2 (21) ตามลำดับ) และพอกับสารหลัก 20-ECD [1(1)] อย่างไรก็ตาม 20-ECD 2,22-diethyl ether [1.2(32)] และ 20-ECD 3,22-diethyl ether [1.2(33)] แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่สูงกว่า corresponding dimethyl ether (EC_{50} ของสาร 1.2(32) และ 1.2(33) คือ 0.937×10^{-5} และ 0.891×10^{-5} M ตามลำดับ, ตารางที่ 1.2(22) และ 1.2(23) ตามลำดับ) กล่าวคือ 2,22-diethyl ether 1.2(32) มีฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นประมาณ 1.8 เท่า ของ 2,22-dimethyl ether 1.2(29) ส่วน 3,22-diethyl ether 1.2(33) มีฤทธิ์ทางชีวภาพเป็น 1.6 เท่า ของ 3,22-dimethyl ether 1.2(30)

สิ่งที่น่าสนใจคือ 2,3,22-trimethyl ether 1.2(31) มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงกว่าสารที่กล่าวมาแล้ว ($EC_{50} = 0.271 \times 10^{-5}$ M, ตารางที่ 1.2(24)) คือมีฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นประมาณ 6 เท่า ของ 2,22-dimethyl ether 1.2(29) และประมาณ 5 เท่าของ 3,22-dimethyl ether 1.2(30)

จากผลที่ได้แสดงว่าอัลคิลอีเทอร์ที่มีหมู่อัลคิลอยู่ที่หมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 2,3 และ 22 เฉพาะหมู่เมทิลและเอทิลอาจสรุปได้ว่า steric factor ไม่ใช่ปัจจัยที่สำคัญ และ electronic factor ก็ดูเหมือนไม่มีบทบาทสำคัญ แต่การลดความมีขั้วของเอคโดสเตียรอยด์ลง หรือพูดอีกอย่างหนึ่งคือการเพิ่ม lipophilicity ของเอคโดสเตียรอยด์ทำให้ฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มขึ้น

Methyl ethers ที่มีหมู่ 14-methyl ether อยู่ในโมเลกุล

จากผลการทดสอบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบข้างต้น แสดงให้เห็นว่า methylation หมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่งที่ 14 ทำให้เกิดการลดลงของฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างมาก ในระหว่างที่มี การสังเคราะห์อนุพันธ์ methyl ethers เราได้อนุพันธ์ methyl ethers ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 14 ถูก methylate ด้วย และสารเหล่านี้ถูกนำไปทดสอบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบด้วย นอกจาก 20-ECD 14-methyl ether [1.2(4)] ที่ได้กล่าวมาแล้ว มีอนุพันธ์ methyl ethers ที่มีหมู่ 14-



methyl ether อยู่ด้วยกันรวม 5 ชนิด คือ 20-ECD 14,22-dimethyl ether [1.2(13)], 20-ECD 2,14-dimethyl ether [1.2(23)], 20-ECD 2,14,22-trimethyl ether [1.2(35)], 20-ECD 2,3,14-trimethyl ether [1.2(24)] และ 20-ECD 2,3,14,22-tetramethyl ether [1.2(36)] ปรากฏว่าฤทธิ์ทางชีวภาพของสารเหล่านี้มีค่าต่ำมาก (ดูตารางที่ 1.2(25), 1.2(26), 1.2(27), 1.2(28) และ 1.2(29) ตามลำดับ) จะเห็นได้ว่าลักษณะสำคัญ ทางโครงสร้างที่จะทำให้เอคโดสเตียรอยด์มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง คือหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 14 จะต้องอยู่อย่างอิสระ

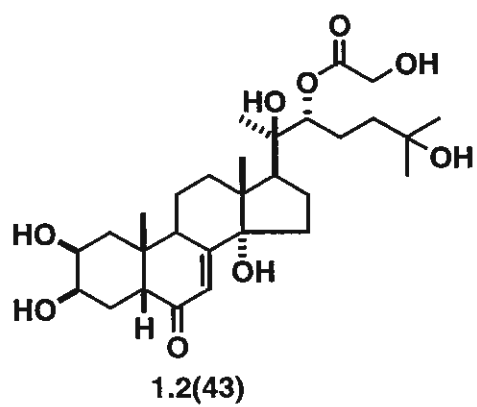
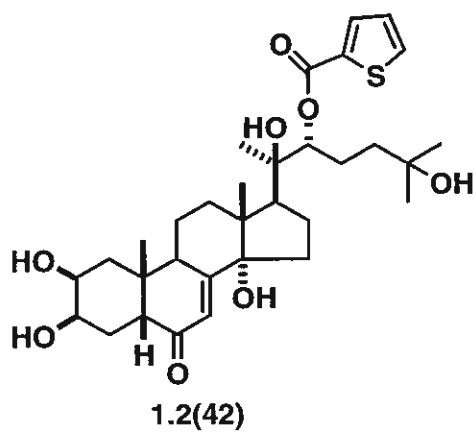
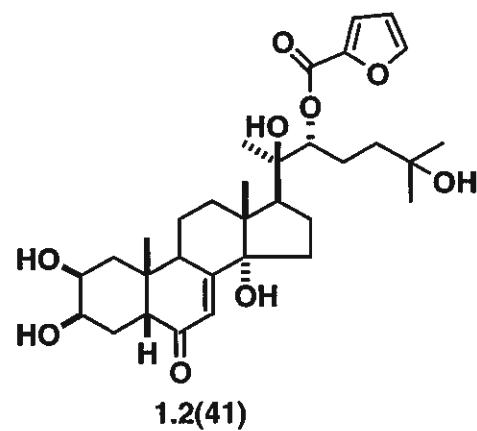
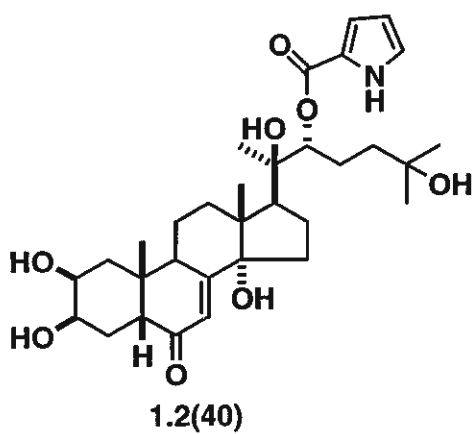
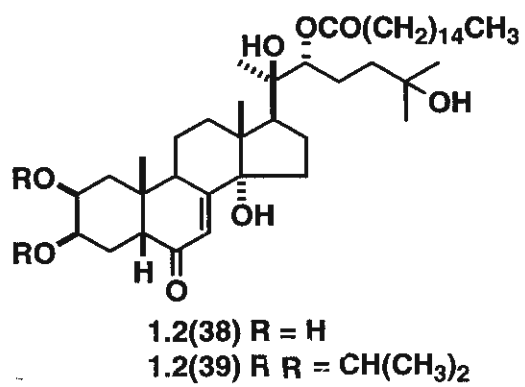
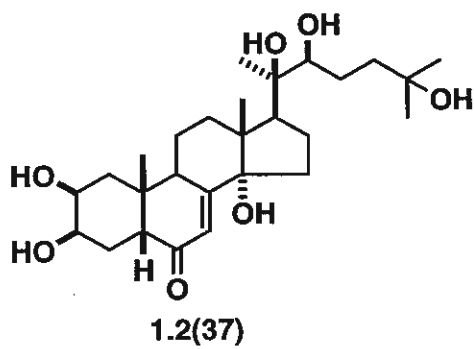
2) การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่ตำแหน่ง 22: การเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 22 ให้เป็นอนุพันธ์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง

ได้กล่าวมาแล้วว่า ลักษณะสำคัญทางโครงสร้างประการหนึ่งที่เอคไดสเตียรอยด์ เช่น 20-hydroxyecdysone [1(1)] จำเป็นต้องมีการมีฤทธิ์เป็นฮอร์โมนลอกคราบได้คือต้องมี หมู่ 22R-hydroxyl ที่อิสระ ¹¹³ ฉะนั้น จึงไม่น่าแปลกใจที่ 22-*epi*-20-hydroxyecdysone [1.2 (37)] ซึ่งเป็นเอคไดสเตียรอยด์ที่มีหมู่ 22S-hydroxyl ไม่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพใน *Calliphora* assay ¹¹³ และจากตัวอย่างที่เคยกล่าวมาแล้ว คือ pinnatasterone [1(3)] ซึ่งเป็นเอคไดสเตียรอยด์ที่ไม่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 22 ¹¹⁸ แสดงฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบต่ำกว่าสาร 1 (1) ถึง 43 เท่า (ดูตารางที่ 1.2(30)) อย่างไรก็ตาม canescensterone [1(4)] ซึ่งเป็น 24-O-(pyrrole-2-carboxylate) ester ของสาร 1(3) กลับมีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง ¹¹⁹ คือสูงกว่าสาร 1(3) ถึง 36 เท่า (ดูตารางที่ 1.2 (30)) จากการที่สาร 22-deoxy ecdysteroid 1(4) มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงนี้ ไม่สามารถอธิบายได้จากข้อมูลที่มีอยู่ จำเป็นจะต้องศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ทางชีวภาพของเอคไดสเตียรอยด์ ซึ่งมีหมู่ฟังก์ชันที่แตกต่างกัน และ/หรือเป็นอนุพันธ์ที่ตำแหน่ง 22

ในการศึกษาที่ผ่านมา (ดูหัวข้อ “1.2 การสังเคราะห์ปรับเปลี่ยนโครงสร้างและหมู่ฟังก์ชันของเอคไดสเตียรอยด์ 1). การสังเคราะห์อนุพันธ์ของหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งต่างๆ ในโมเลกุล (1) การสังเคราะห์ O-Alkyl ethers”) เราได้ศึกษาพบว่า เมื่อเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 22 เป็นอนุพันธ์ 22-methyl ethers 1.2(8) สารนี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพลดลงพอควร (ดูตารางที่ 1.2(30)) ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากการที่ตำแหน่ง 22 ขาดหมู่ไฮดรอกซิลที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับ ecdysteroid receptor ได้ และ/หรือเนื่องมาจากการที่มีหมู่เมทิลที่เกะกะกว่าไฮโดรเจน ทำให้เอคไดสเตียรอยด์ bind กับ receptor ได้ไม่ค่อยดี (เป็น steric factor) เพื่อศึกษาว่า factor ใดมีความสำคัญมากกว่า เราได้เตรียม 22-ethyl ether 1.2(14) ก็ปรากฏว่าฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบไม่ลดลงไปกว่า 22-methyl ether 1.2(8) แสดงว่า steric factor ไม่ค่อยมีความสำคัญในกรณีนี้ ในครั้งนี้เราได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงการเปลี่ยนแปลงที่หมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 22 เริ่มด้วยการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของ 20-hydroxyecdysone 22-acetate [1(6)] โดยใช้ *Musca* bioassay เหตุที่ทำการศึกษาอีกทั้งๆ ที่ในวรรณกรรมได้มีผู้ศึกษา

เสร็จแล้วก็เพราะยังไม่มีการศึกษาโดยใช้ assay system นี้ สาร [1(6)] ได้เตรียมขึ้นมาเพื่อการทดสอบโดยวิธีที่เราเคยตีพิมพ์มาแล้ว¹¹⁷¹ ผลการทดสอบเป็นไปตามที่คาดไว้ คือสาร 1(6) มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่ำกว่าสาร 1(1) (ดูตารางที่ 1.2(30)) แต่ที่ต่างจากที่คาดไว้พอควรคือ ฤทธิ์ทางชีวภาพต่ำกว่าสาร 1(1) ไม่มากนัก จากผลของการมีหมู่ methyl และ ethyl อยู่ที่ตำแหน่ง 22 ของสาร 1(1) แล้วฤทธิ์ทางชีวภาพของสารทั้งสองคือ 1.2(8) และ 1.2(14) แตกต่างกันน้อยมาก ทำให้เชื่อว่า steric factor ไม่ใช่ปัจจัยที่สำคัญต่อการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ เราจึงต้องการทดสอบว่า กรณีย acyl ester ที่หมู่ acyl มีขนาดใหญ่จะมีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพหรือไม่ เราจึงสังเคราะห์ 20-hydroxyecdysone 22-palmitate [1.2(38)] โดยปฏิกิริยาระหว่าง 20-hydroxyecdysone 2,3-acetonide [1.2(9)] กับ palmitoyl chloride ใน pyridine/benzene ตามด้วย deacetonation ได้สาร 1.2(38) ตามต้องการ เหตุที่เลือกสังเคราะห์อนุพันธ์ชนิดนี้ เพราะได้มีผู้เคยพบในตัวเห็บ (tick) ชนิดหนึ่งคือ *Ornithodoros moubata*^{1,2(4)} ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารนี้น่าแปลกใจ คือมีฤทธิ์ต่ำกว่า acetate 1(6) เพียงเล็กน้อยเท่านั้น (ดูตารางที่ 1.2(30)) แสดงว่า steric factor ที่ตำแหน่ง 22 ไม่ใช่ปัจจัยที่สำคัญต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของเอคไดสเตียรอยด์

ย้อนหลังการพิจารณา cenesensterone [1(4)] จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่า การที่สารนี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงกว่า pinnasterone [1(3)] มาก ทั้งๆที่เป็น 22-deoxyecdysteroid เช่นเดียวกัน เพราะมี pyrrole-2-carboxylate moiety อยู่ที่ตำแหน่ง 24 การที่สาร 1(4) มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงกว่าสาร 1(3) มากอาจเป็นเพราะความสามารถของหมู่ NH ในการ bind กับ receptor ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ฉะนั้นอาจเป็นไปได้ที่การขาดหมู่ไฮดรอกซิลที่ 22 อาจได้รับการชดเชยด้วยหมู่ NH ของ pyrrole เพื่อที่จะมีข้อมูลเกี่ยวกับอิทธิพลของหมู่ NH ต่อ receptor ได้มีการวางแผนเติมหมู่ pyrrole-2-carboxylate เข้าที่ตำแหน่ง 22 ของสาร 1(1) ความจริงแล้วสารนี้คือ 20-hydroxyecdysone 22-(pyrrole-2-carboxylate) [1.2(40)] ซึ่งกลุ่มของเราได้เคยสังเคราะห์มาแล้ว^{1,2(5)} สิ่งที่เราแปลกใจคือสาร 1.2(40) มีฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบเป็น 2 เท่าของ parent compound 1(1) (ดูตารางที่ 1.2(30)) การที่สารนี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง ไม่น่าเป็นเพราะการเกิดสาร 1(1) จากการไฮโดรไลส์ของสาร 1.2(40) เพราะถ้าฤทธิ์ทางชีวภาพเกิดจากสาร 1(1) จริงแล้ว ฤทธิ์ทางชีวภาพรวมไม่น่าจะสูงกว่าสาร 1(1) และถ้ามีการไฮโดรไลส์เกิด



ชั้นแล้วได้ pyrrole-2-carboxylic acid สารนี้ไม่น่าจะมีส่วนทำให้ฤทธิ์ทางชีวภาพสูงขึ้น เพราะเมื่อนำสารนี้มาทดสอบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบ ก็ไม่พบว่ามียฤทธิ์แต่อย่างใด สิ่งที่เป็นไปได้ก็คือ หมู่ NH อาจทำให้สาร 1.2(40) มีฤทธิ์สูง ซึ่งอาจจะทำหน้าที่เป็น ligand หรือเกิดพันธะไฮโดรเจนกับ receptor การที่ยืนยันว่า บทบาทสำคัญของหมู่ NH คือการเกิดพันธะไฮโดรเจนหรือเป็น ligand ที่ดี เราได้ศึกษาเปรียบเทียบกับ heterocyclic esters อีก 2 ชนิดคือ 22-(furan-2-carboxylate) 1.2(41) และ 22-(thiophene-2-carboxylate) 1.2(42) ซึ่งได้สังเคราะห์มาแล้วเช่นกัน^{1,2[5]} โดยเป็น oxygen และ sulphur analogues ตามลำดับ heterocyclic moiety เหล่านี้มีขนาดใกล้เคียงกันกับ nitrogen analogue คือ pyrrole-2-carboxylate แต่ 2 ชนิดแรกจะมีความสามารถในการ bind กับ receptor น้อยกว่าชนิดหลัง ปรากฏว่าสาร 1.2(41) และ 1.2(42) มีฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบต่ำกว่า 1.2(40) มาก (ดูตารางที่ 1.2(30)) ซึ่งเป็นไปตามที่คาดไว้ แสดงว่าหมู่ NH มีบทบาทสำคัญต่อฤทธิ์ทางชีวภาพ

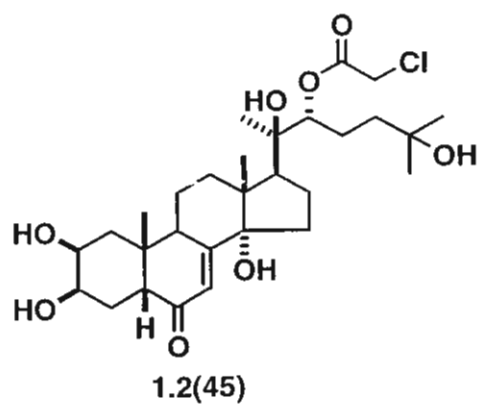
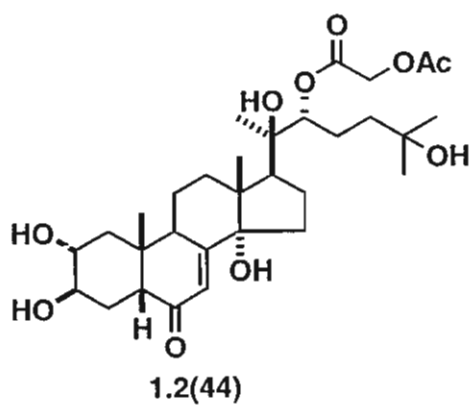
ตรงจุดนี้ เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร 1(1) กับ 1.2(40) ทำให้ได้ข้อสังเกตว่า หมู่ NH ของ pyrrole-2-carboxylate สามารถ bind กับ receptor ได้ดีกว่าหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 22 อย่างไรก็ตาม ข้อสรุปดังกล่าวไม่ค่อยสมเหตุสมผลมากนัก เพราะเป็นการเปรียบเทียบระหว่างหมู่ NH กับหมู่ OH ซึ่งมีความสามารถในการ bind แตกต่างกัน ฉะนั้นเราจึงมองหาหมู่ฟังก์ชันที่เหมาะสมกว่าหมู่ NH ซึ่งสาร 20-hydroxyecdysone 22-glycolate [1.2(43)] จะเป็นสารที่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่สามารถแทนหมู่ NH ได้ ความจริงแล้วสาร 1.2(43) นี้ ได้มีผู้พบมาแล้วในพวก pycnogonid ชื่อ *Pycnogonum littorale*^{1,2[6]} เราได้เตรียมสารนี้โดยปฏิกิริยาระหว่าง 20-hydroxyecdysone 2,3-acetonide [1.2(9)] กับ acid chloride ของ glycolic acid และตามด้วยการกำจัดหมู่ป้องกัน acetonide ตำแหน่ง 2,3 สิ่งที่น่าตื่นเต้นคือสาร 1.2(43) มีฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบสูงมาก คือสูงกว่า parent compound 1(1) ประมาณ 5 เท่า เป็น *in vivo* assay ที่สูงที่สุดที่เคยมีการรายงานมา และสูงกว่า 22-(pyrrole-2-carboxylate) 1.2(40) ถึงเกือบ 2.5 เท่า (ดูตารางที่ 1.2(30)) การที่สาร 1.2(43) มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงมากเช่นนี้น่าจะเป็นเพราะมีหมู่ไฮดรอกซิลอยู่ และเป็นตำแหน่งที่อยู่ไกลกว่าหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 22 ถึง 3 อะตอม หรือ 3 พันธะ เพื่อที่จะตรวจสอบว่าหมู่ไฮดรอกซิลของหมู่ glycolate ทำให้ฤทธิ์ทางชีวภาพสูงขึ้น เราได้เตรียม 20-hydroxyecdysone 22-acetyl glycolate

[1.2(44)] โดยใช้วิธีการคล้ายคลึงกับการเตรียมสาร 1.2(43) แต่ใช้ acetylglycolic acid แทน glycolic acid ผลการทดสอบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบเป็นไปตามที่คาด คือสาร 1.2(44) มีฤทธิ์ต่ำกว่าสาร 1.2(43) แสดงว่าหมู่ไฮดรอกซิลอิสระที่หมู่ glycolate ทำให้เอคไดสเตียรอยด์แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่สูง สิ่งที่ต้องกล่าวคือ ถึงแม้ว่าสาร 1.2(44) มีฤทธิ์ต่ำกว่าสาร 1.2(43) แต่ก็ยังมีฤทธิ์สูงกว่าสาร 1(1) การที่สาร 1.2(44) มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงกว่าสาร 1(1) อาจเป็นเพราะสาร 1.2 (44) สามารถถูก deacetylated *in vivo* ไปเป็นสาร 1.2(43) ที่มีฤทธิ์สูง เพื่อที่จะให้ได้ข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับหมู่ glycolate เราได้วางแผนเตรียมเอสเทอร์ที่มีหมู่อื่นแทนหมู่ไฮดรอกซิลของหมู่ glycolate เราจึงได้เตรียม 20-hydroxyecdysone 22-chloroacetate [1.2(45)] โดยปฏิกิริยาระหว่างสาร 1.2(9) กับ chloroacetyl chloride และตามด้วยการกำจัดหมู่ป้องกัน acetonide การเตรียมสาร 1.2(45) เป็นการแทนหมู่ไฮดรอกซิลของ glycolate ด้วยหมู่ chloro จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสาร 1.2(45) มีฤทธิ์ต่ำกว่าสาร 22-glycolate 1.2(43) และต่ำกว่าสาร 22-acetate 1(6) แสดงให้เห็นว่าหมู่ไฮดรอกซิลอิสระมีความสำคัญต่อฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งเข้าใจว่าทำให้สามารถ bind กับ receptor ได้ดีขึ้น

การให้เหตุผลของสาเหตุที่เอคไดสเตียรอยด์มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงกว่า parent ecdysteroid 1(1) นั้น มีพื้นฐานจากสมมุติฐานที่ว่า หมู่เอสเทอร์ที่ตำแหน่ง 22 ไม่ถูกไฮโดรไลส หรือถูกไฮโดรไลสด้วยอัตราเร็วใกล้เคียงกัน แต่ความจริงอาจไม่เป็นเช่นนั้น กล่าวคือการที่อนุพันธ์ของเอสเทอร์มีฤทธิ์สูงกว่า parent compound อาจอธิบายได้ 2 แนวทางที่แตกต่างกัน แนวทางแรก การที่อนุพันธ์มีหมู่ฟังก์ชันที่เหมาะสม เป็นการเพิ่มความสามารถในการ bind กับ receptor (เป็น intrinsic activity) ดังได้กล่าวมาแล้ว อีกแนวทางหนึ่งคือ การไฮโดรไลสอย่างช้าๆของเอสเทอร์เป็นการป้องกันไม่ให้เกิดการลดฤทธิ์ทางชีวภาพ (inactivation) อย่างรวดเร็วของ parent compound เมื่อฉีดเข้าไปในแมลง ฉะนั้นผลของการทดสอบที่ออกมาอาจเป็นผลจากอย่างใดอย่างหนึ่งหรือทั้งสองอย่างร่วมกัน สิ่งที่น่าสนใจในอนาคต ถ้าได้มีการเปรียบเทียบการทดลองนี้กับ *in vitro* assay จะช่วยให้เข้าใจทั้งสองแนวทางนี้มาก

การค้นพบข้างต้นนี้ แสดงให้เห็นว่าหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 22 ของเอคไดสเตียรอยด์ไม่จำเป็นต้องอยู่อย่างอิสระ จึงจะแสดงฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบที่สูงได้ ฤทธิ์ทางชีวภาพของ 22-O-substituted ecdysteroids อาจสูงกว่า parent compound ได้ ถ้ามีหมู่แทนที่ที่เหมาะสม

สม นอกจากนี้อาจพบอีกว่าฤทธิ์ทางชีวภาพขึ้นกับ steric factor ที่ตำแหน่ง 22 น้อย การศึกษาครั้ง
นี้ยังได้ข้อสรุปอีกว่า เอคโตสเตียรอยด์ที่ไม่มีหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 22 อาจแสดงฤทธิ์ทางชีว
ภาพที่สูงได้ หากมีหมู่ฟังก์ชันที่เหมาะสมอยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสม



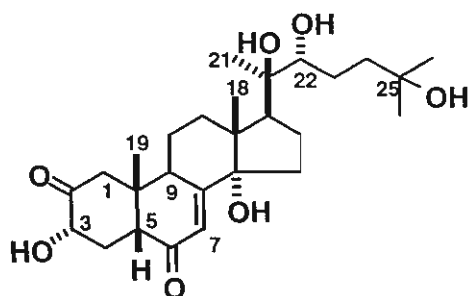
3) การปรับเปลี่ยนโครงสร้างและหมู่ฟังก์ชันของวง A

(1) การสังเคราะห์ 2-Dehydro-3-*epi*-20-hydroxyecdysone [1.2(100)]

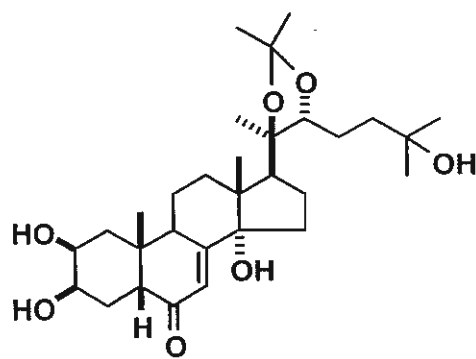
2-Dehydro-3-*epi*-20-hydroxyecdysone [1.2(100)] เป็น minor ecdysteroid ซึ่งแยกได้จากเมล็ดของ *Froelichia floridana* (Nutt.) Moq.^{1,2[100]} สารนี้เป็นเอคโดสเตียรอยด์ชนิดแรกจากธรรมชาติที่มี keto function ที่ตำแหน่ง 2^{1[1]} ฉะนั้นจึงดึงดูดความสนใจในแง่ของฤทธิ์ทางชีวภาพของสารนี้ เนื่องจากเอคโดสเตียรอยด์ 1.2(100) ถูกแยกออกมาได้เพียง 0.15 มิลลิกรัมจากพืช ฉะนั้นจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจมากที่จะสังเคราะห์สารนี้ขึ้นมา

เริ่มแรกได้พิจารณาแผนการสังเคราะห์สารนี้ โดยการออกซิไดส์หมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่งที่ 3 ของสารตั้งต้น 20-hydroxyecdysone [20-ECD, 1(1)] ไปเป็น 3-keto function แล้วจึงรีดิวส์อย่างเฉพาะเจาะจงให้เป็นหมู่ 3 α -hydroxyl จากนั้นจึงออกซิไดส์หมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่งที่ 2 อย่างเฉพาะเจาะจงไปเป็นหมู่คีโตก็ได้สาร 1.2(100) จากรายงานของการออกซิไดส์ 20-ECD [1(1)] ด้วยรีเอเจนต์ชนิดต่าง ๆ แต่ผลที่ได้ก็คือ เกิดการขาดของพันธะของสายโซ่ด้านข้างที่ตำแหน่ง 20,22 ได้ poststerone [1(11)]^{1[20, 21], 1.2[101-103]} ฉะนั้น เราต้องมีหมู่ป้องกันสำหรับระบบ dihydroxyl ที่ตำแหน่ง 20,22 จาก 1(1) จึงเตรียม 20-ECD 20,22-acetonide [1.2(101)] ตามวิธีที่เราเคยเตรียมมาแล้ว^{1[17]} เพื่อที่จะสามารถออกซิไดส์หมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 3 อย่างเฉพาะเจาะจง เราจึงป้องกันหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 2 ซึ่งว่องไวต่อปฏิกิริยามากกว่าด้วยการทำ selective acetylation^{1[17]} เป็น 20-ECD 2-acetate 20,22-acetonide [1(8)] เราหลีกเลี่ยงที่จะใช้ Jones reagent เพราะจากที่ได้กล่าวมาแล้วว่า ได้มีผู้รายงานว่า มีผู้ออกซิไดส์ 1(8) ด้วยรีเอเจนต์ชนิดนี้ ปรากฏว่าได้สาร 1(9) และ 1(10) ที่ไม่สามารถแยกออกจากกันได้^{1[19]} สารชนิดหลังเกิดจากสาร 1(8) เกิด C2→C3 acetyl migration ตามด้วยการออกซิไดส์หมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่งที่ 2 การเกิด acetyl migration นี้เป็นที่ทราบกันดีในวงการเอคโดสเตียรอยด์^{1[17], 1[19]} ได้มีผู้รายงานว่า DMSO/Ac₂O สามารถออกซิไดส์ 1(8) ได้ corresponding keto compound 1(9) แต่เมื่อเราใช้รีเอเจนต์นี้กลับได้สารอย่างน้อย 7 ชนิดเมื่อตรวจสอบด้วย TLC รวมทั้งสารตั้งต้น ในที่สุดเราพบว่า CrO₃-pyridine สามารถออกซิไดส์ 1(8) ไปเป็น 1(9) ได้ โครงสร้างของสาร 1(9) สอดคล้องกับข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี (IR, ¹H NMR และ MS) และค่า ¹H NMR ที่มีรายงานไว้^{1[22]} สำหรับสัญญาณ double doublet (J = 12.5, 5.5 Hz) ของ H-2 ที่ δ 5.07 และการหายไปของ H-3 สอดคล้องกับโครงสร้าง 1(9)

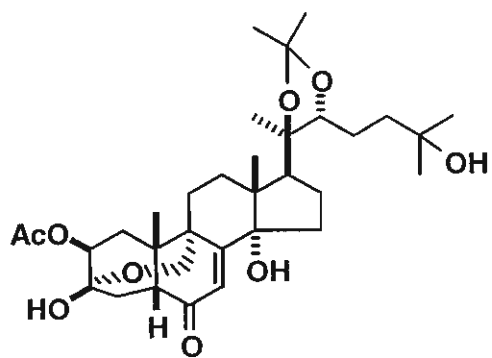
เราพบว่าในการออกซิไดส์ด้วยรีเอเจนต์ชนิดนี้ มีสารผลิตภัณฑ์อีกชนิดหนึ่งเกิดขึ้นคือสาร 1.2(102) สารนี้มีแบนด์การดูดกลืน IR ที่ 1738 และ 1678 ซม.⁻¹ แสดงว่ามีหมู่คาร์บอนิลของอะซีเตตและ α,β -unsaturated ketone ตามลำดับ ¹³C NMR สเปกตรัมแสดงสัญญาณคาร์บอนิลเพียง 2 ค่าที่ δ 171.3 และ 200.6 ซึ่งสอดคล้องกับค่า IR สเปกตรัม การที่ไม่มีหมู่คีโตชนิดอื่นในตัวอยู่ในโมเลกุลเหมือนกับสาร 1(9) แสดงว่าโครงสร้างทั้งสองนี้มี



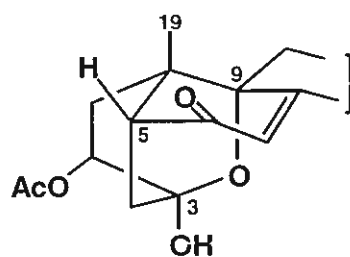
1.2(100)



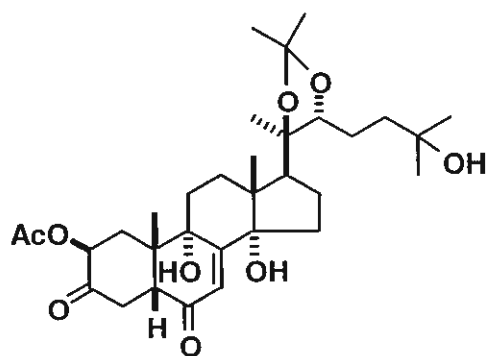
1.2(101)



1.2(102)



1.2(103)



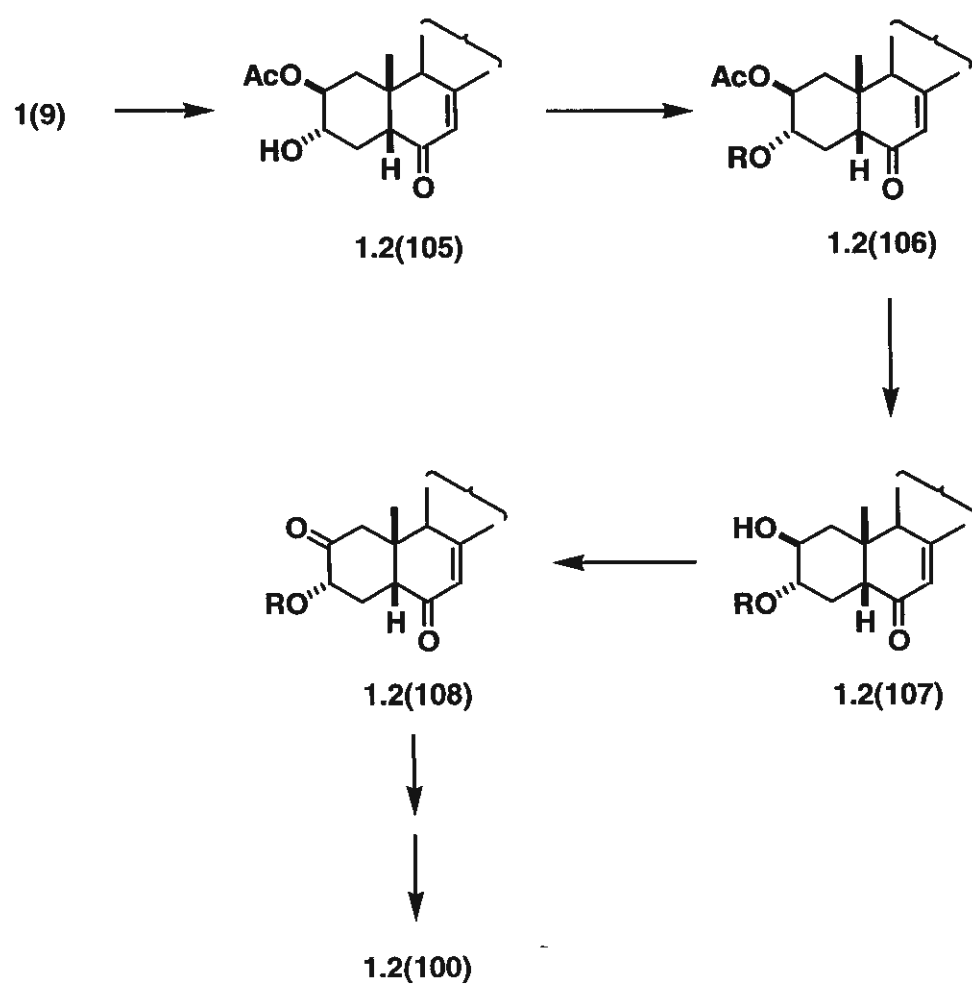
1.2(104)

ความแตกต่างกันมาก ค่า broad doublet ($J = \text{ca } 9 \text{ Hz}$) ของสัญญาณ $^1\text{H-NMR}$ ที่ $\delta 4.86$ สามารถกำหนดได้เป็นสัญญาณของ H-2 ส่วนสัญญาณของ H-3 นั้นหายไป จากข้อมูลเหล่านี้ รวมทั้งการที่มีสัญญาณที่ $\delta 96.6$ ใน $^{13}\text{C NMR}$ สเปกตรัม ได้ชี้แนะว่ามีหมู่ฟังก์ชัน hemiketal อยู่ในโมเลกุลของ 1.2(102) และโครงสร้างของสารนี้ตรงกับที่แสดงใน 1.2(102) จากความจริง 3 ประการคือ (1) สัญญาณ H-7 ที่ $\delta 5.91$ เป็น sharp singlet (แทนที่จะเป็น doublet, J ประมาณ 2.1 Hz เหมือนกับสาร 1(1)); (2) สัญญาณของ H-9 หายไป และ (3) ESMS (positive ion mode) ที่ค่า m/z 599 เป็นพีคของ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ไอออน ได้แสดงโครงสร้างบางส่วนเป็นแบบ 3 มิติดังรูปที่ 1.2(103) เข้าใจว่าสารนี้เกิดจากสาร 1.2(104) ซึ่งสารชนิดหลังนี้มาจาก 1(9) โดยเกิด allylic oxidation ที่ตำแหน่ง 9 ภายใต้สภาวะที่ทำให้ปฏิกิริยาออกซิเดชัน การเกิด allylic oxidation ของตำแหน่ง 9 ของสาร 1(1) ได้มีรายงานมาแล้วจากกลุ่มของเรา¹¹⁵⁾ การเกิดการ attack ของหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 9 ของสาร 1.2(104) ที่หมู่คีโตตำแหน่ง 3 เกิดได้ง่ายมาก เพราะแบบจำลองโมเลกุลของสารนี้หมู่ฟังก์ชันทั้งสองอยู่ใกล้กันมาก ทำให้สาร 1.2(102) เกิดเป็น hemiketal ที่เสถียร

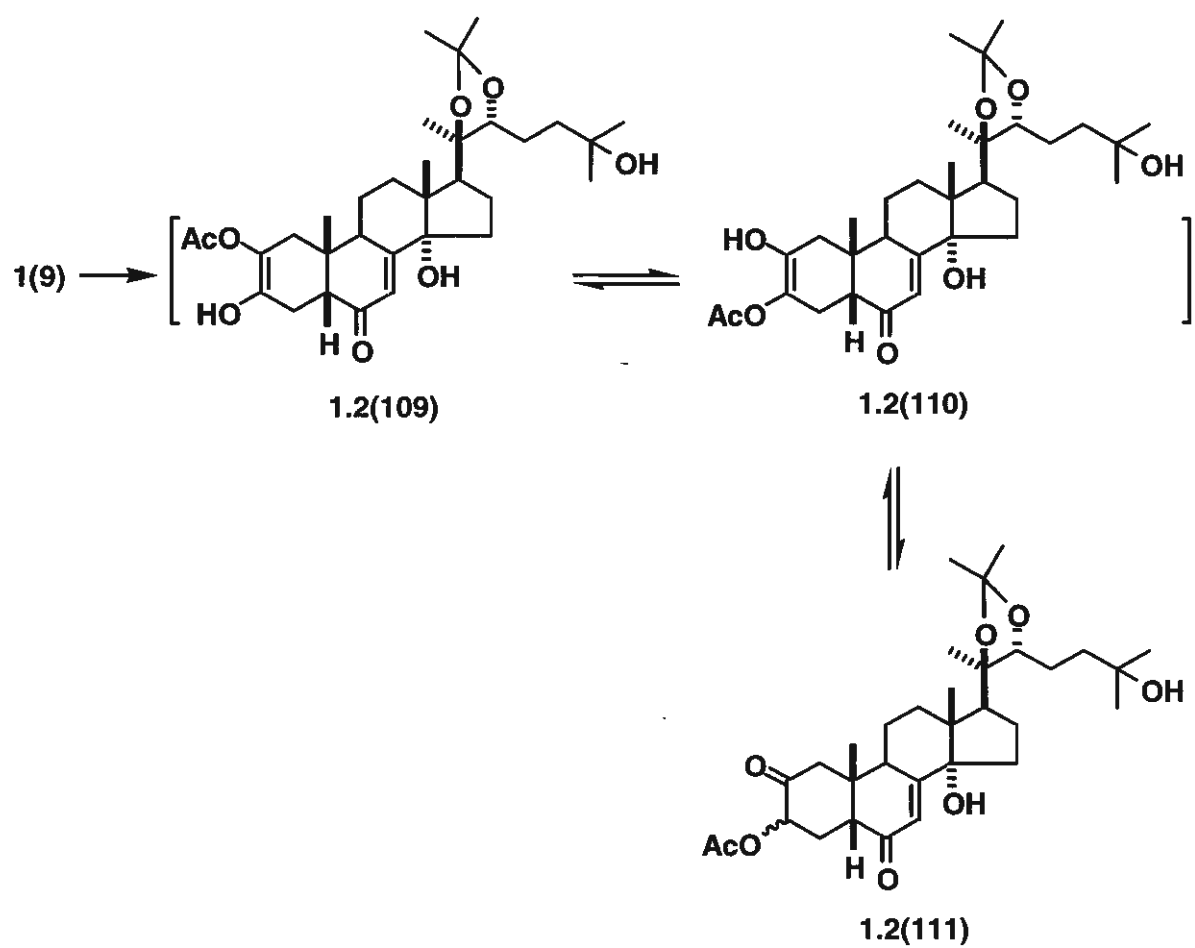
ขั้นตอนต่อไปเป็นการเปลี่ยนสาร 1(9) ไปเป็นสาร 1.2(100) ตามต้องการ แผนการสังเคราะห์เริ่มแรกได้แสดงไว้ใน Scheme 1.2(100) จาก Scheme ที่เสนอไว้นี้ ถ้าทำการรีดิวส์หมู่คีโตตำแหน่ง 3 ของสาร 1(9) ไปเป็นสารที่ตำแหน่ง 3 เป็น 3 α -hydroxyl คือ 1.2(105) ตามด้วยการป้องกันหมู่ไฮดรอกซิลนี้ด้วยหมู่ป้องกันที่เหมาะสม (R) ได้เป็นสาร 1.2(106) ซึ่งทำ deacetylation ได้เป็น 1.2(107) แล้วออกซิไดส์หมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 3 ไปเป็น 1.2(108) ต่อด้วยการกำจัดหมู่ป้องกัน R และ acetonide ควรได้สาร 1.2(100) ตามต้องการ แผนการสังเคราะห์ตาม Scheme 1.2(100) ดูสมเหตุสมผล และปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องก็เป็นที่รู้จักกันดี แต่อย่างไรก็ตาม ขั้นตอนที่เสนอไว้ค่อนข้างยาว และขั้นตอนการรีดิวส์สาร 1(9) อาจได้ส่วนผสมระหว่างแอลกอฮอล์ 1.2(105) กับ C-3 epimer ของสารนี้ เราจึงลองหาแนวทางอื่นมาพิจารณาด้วย

เป็นที่ทราบกันอยู่แล้วว่า α -keto alcohols และ α -keto acetates สามารถเกิด keto-enol tautomerism ได้ ในกรณีของเรานั้น ถ้าสาร 1(9) เกิด enolize ไปเป็น intermediate 1.2(109) และถ้าสารนี้เกิด C-2 $\rightarrow$ C-3 acyl migration ได้เช่นเดียวกับที่เกิดในกรณีของเอคไดสเตียรอยด์ในระบบอิมิตัว¹¹⁷⁾ ไปเป็น intermediate 1.2(110) ก็จะได้ keto acetate 1.2(111) ซึ่งอาจมี configuration ของหมู่ acetate ที่ตำแหน่ง 3 เป็นแบบ 1.2(112) หรือ 1.2(113) หรือเกิดขึ้นทั้ง 2 แบบ (ดู Scheme 1.2(101)) จากการตรวจสอบแบบจำลองโมเลกุลของโครงสร้าง 1.2(112) และ 1.2(113) พบว่าโครงสร้างแบบแรก ซึ่งมี stereochemical arrangement ที่ C-3 ตามที่ต้องการ เป็นโครงสร้างที่น่าจะเกิดได้มากกว่า เพราะโครงสร้างแบบหลัง หมู่อะซีเตตเกิด 1,3-diaxial interaction จากเหตุผลข้างต้นนี้เราจึงได้เลือกการสังเคราะห์ตามที่ปรากฏใน Scheme 1.2(101) เนื่องจาก C-2 $\rightarrow$ C-3 acetyl migration

Scheme 1.2(100)



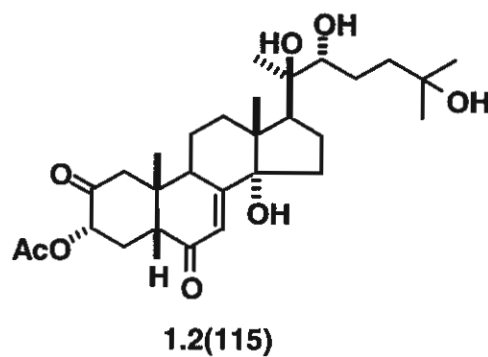
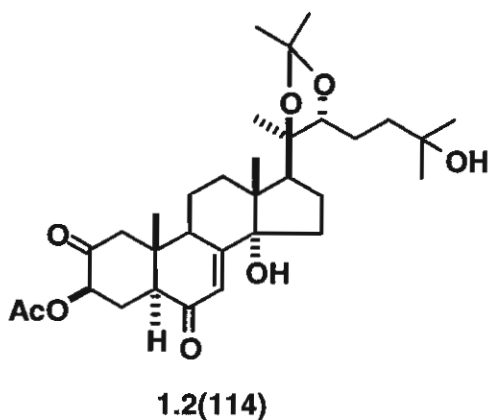
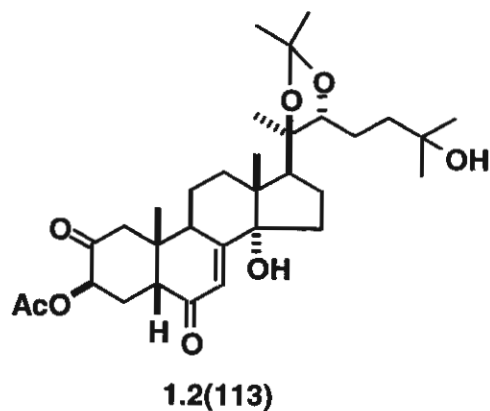
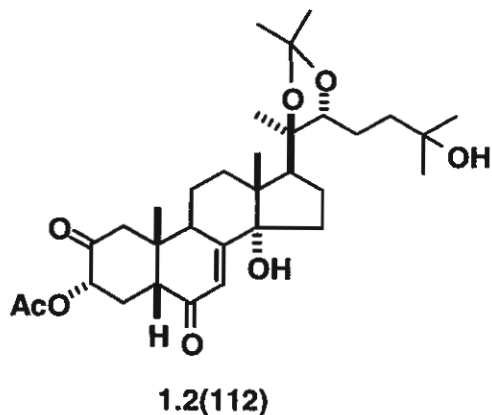
Scheme 1.2(101)



ของเอคไดสเตียรอยด์โดยทั่วไป เกิดได้ดีในสภาวะที่มีความเป็นกรด เราจึงเริ่มทดลอง acid-catalyzed isomerization ของสาร 1(9) แต่ผลเริ่มแรกไม่ค่อยดี กล่าวคือ ปฏิกริยาในกรดแร่ที่เจือจาง ทำให้เกิดการสลายตัวของสารตั้งต้น AcOH ชนิดเจือจางก็ไม่ได้สารผลิตภัณฑ์ เข้าใจว่าปฏิกิริยาเริ่มแรกเกิดการกำจัดหมู่ป้องกัน acetonide ที่ตำแหน่ง 20,22 และ p-TsOH ที่เจือจาง (1% ใน MeOH) ให้สารผลิตภัณฑ์ 1.2(112) เล็กน้อย แต่ส่วนใหญ่เกิดการกำจัดหมู่ acetonide และมีสารอื่นทั้งที่ดุดกกลืนและไม่ดุดกกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตหลายชนิดเกิดขึ้น ในขณะที่สารตั้งต้น 1(9) ยังเหลืออยู่ เราจึงเปลี่ยนไปใช้สภาวะที่ mild กว่านี้ ปรากฏว่าเมื่อนำสาร 1(9) มาคนกับ silica gel ในสารละลาย MeOH-CHCl₃ พบว่าสาร 1(9) ค่อยๆเปลี่ยนไปเป็นสาร 1.2(112) ตามต้องการ ในทางปฏิบัติ เมื่อสาร 1(9) ประมาณครึ่งหนึ่งเปลี่ยนไปเป็นสาร 1.2(112) ก็จะนำส่วนผสมมาแยกเอาสารผลิตภัณฑ์ 1.2(112) ออก แล้วสารตั้งต้น 1(9) ก็จะถูกนำไปทำปฏิกิริยา isomerization อีกครั้งหนึ่ง โครงสร้างของสาร 1.2(112) เป็นไปตามข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี (IR, ¹H NMR และ MS) เราทราบว่าหมู่คีโตที่อิมตัวอยู่ตำแหน่งที่ 2 เพราะ ¹H NMR สเปกตรัมมีสัญญาณ doublet 2 แห่ง ซึ่งมีค่า *J* = 13.9 Hz ที่ δ 2.22 และ 2.59 ซึ่งตรงกับ H-1 α และ H-1 β ตามลำดับ ถ้าหมู่คีโตอยู่ตำแหน่งที่ 3 ก็จะได้ splitting เป็นแบบนี้ จากค่า *W*_{1/2} ที่มีค่ามาก (21 Hz) ของ H-3 ที่ δ 5.18 แสดงว่าโปรตอนนี้เป็น axial orientation หมายความว่า หมู่อะซีเตตอยู่แบบ 3 α ตามโครงสร้าง 1.2(112) การที่สารผลิตภัณฑ์ให้ค่า *W*_{1/2} ที่กว้างมาก สารผลิตภัณฑ์อาจมีโครงสร้างตามแบบ 1.2(114) ก็ได้ ตามโครงสร้างนี้ H-5 อยู่แบบ α orientation และหมู่ acetoxyl ตำแหน่งที่ 3 เป็นแบบ β orientation แต่โครงสร้างหลังนี้สามารถตัดออกไปได้จากการทำ NOE experiment กล่าวคือ เป็นที่ทราบกันมาแล้วว่า เอคไดสเตียรอยด์โดยทั่วไปมี cis-A/B ring fusion (เช่นใน 1.2(112)) มี H-5 β และอยู่ใกล้ 19-Me ใน space แต่ถ้าเป็น trans-A/B ring fusion (เช่นใน 1.2(114)) มี H-5 α ซึ่งอยู่ได้ plane ของวงของ steroid nucleus กรณีแรกถ้าทำ NOE ที่ H-5 β จะเกิด NOE enhancement ของ 19-Me และกลับกัน ส่วน H-5 α ไม่เกิด NOE enhancement^[34, 35] ปรากฏว่าเมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทำ NOE experiment โดยการ irradiate สัญญาณ 19-Me ที่ δ 1.03 เกิด enhancement ของสัญญาณ H-5 ที่ δ 2.58 แสดงว่าสารผลิตภัณฑ์ต้องเป็น 1.2(112) ไม่ใช่ 1.2(114)

สิ่งที่ควรกล่าวไว้คือ ในระหว่างที่ทำสาร 1(9) ให้บริสุทธิ์ มี trace ของ minor compound เกิดขึ้น เมื่อมีการแยกสาร 1.2(112) ออกมาแล้ว ได้เปรียบเทียบกับสาร minor ดังกล่าวโดยใช้ TLC ปรากฏว่าเป็นสารชนิดเดียวกัน

นำสาร 1.2(112) มากำจัดหมู่ acetonide ออกไปด้วย 70% AcOH ได้สาร 1.2(115) ซึ่งนำมาทำการ deacetylate ด้วย 10% guanidine acetate ได้เอคไดสเตียรอยด์เป้าหมาย 1.2(110) ตามต้องการ overall yield จากสาร 1.2(112) คือ 35% สิ่งที่ควรทราบคือ ในขั้นตอน deacetylation จะต้องระมัดระวังในการเลือกใช้เบส โดยเฉพาะถ้าเลือกเบสที่ไม่ใช่กลุ่ม



ของ guanidine ทั้งนี้เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดปฏิกิริยาที่ไม่ต้องการ รวมทั้ง C-5 epimerization และการสลายตัวของสารตั้งต้น หรือสารผลิตภัณฑ์ ถึงแม้ว่าเบสในกลุ่ม guanidine จะมีอัตราเร็วในการไฮโดรไลซิสช้า แต่ก็ใช้ประโยชน์ได้เป็นอย่างดีในปฏิกิริยาของเอคไดสเตียรอยด์^{1[9],1[34]} สารผลิตภัณฑ์ 1.2(100) มีข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี (IR, ¹H NMR, ¹³C NMR และ MS) สอดคล้องกับโครงสร้างและมีข้อมูล ¹H NMR และ ¹³C NMR ตรงกับที่มีรายงานไว้^{1.2[100]}

4) Stereoselective catalytic hydrogenation ของ ระบบ 7-en-6-one ของเอคโดสเตียรอยด์ โดยมี sodium nitrite อยู่ด้วย

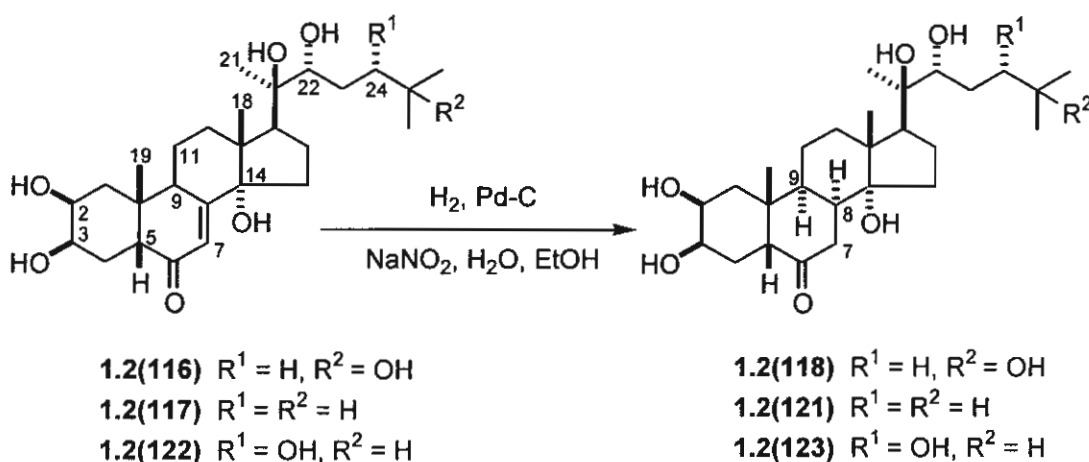
ในการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของ 20-hydroxyecdysone [1(1) หรือ 1.2(116)]^{1.1[3]} และเอคโดสเตียรอยด์อื่นๆ เพื่อให้มีโครงสร้างแตกต่างไปจากเดิม สิ่งหนึ่งที่เป็นเป้าหมายของการปรับเปลี่ยน คือ การรีดิวซ์พันธะคู่ตำแหน่งที่ 7 ให้เป็นพันธะเดี่ยว คือเป็น 7,8-dihydro analogues แต่เป็นที่ทราบกันมาแล้วว่า การรีดิวซ์ Δ^7 -6-ketosteroids ไปเป็นคีโตนที่อิ่มตัวเป็นการกระบวนการที่ยาก โดยทั่วไปทำได้โดยใช้ lithium ในแอมโมเนียเหลว^{1.2[104,105]} อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวนี้มีข้อเสียตรงที่วิธีการใช้ยุ่งยาก และการควบคุมไม่ให้หมู่คีโตนถูกรีดิวซ์เลยไป (overreduction) นั้นเป็นสิ่งที่ทำได้ยาก ซึ่งมีผลทำให้ปริมาณของผลผลิตต่ำ^{1.2[104-106]} ตัวรีดิวซ์ชนิดอื่น เช่น sodium dithionite ที่มีการใช้ phase transfer catalyst อยู่ด้วย ได้มีการรายงานว่าสามารถรีดิวซ์ ระบบ 7-en-6-one ได้อย่างเฉพาะเจาะจง^{1.2[109]} แต่ก็ยังมีข้อเสียคือต้องควบคุมสภาวะของปฏิกิริยาให้ดีมากจึงจะไม่เกิดปัญหาการถูกรีดิวซ์เลยไปของหมู่คีโตน

กลุ่มของเราจึงคิดค้นหาวิธีการอื่นในการรีดิวซ์ระบบ 7-en-6-one ของเอคโดสเตียรอยด์อย่างเฉพาะเจาะจง แต่สิ่งแรกที่ต้องคำนึงคือเอคโดสเตียรอยด์สามารถเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงที่ไม่ต้องการได้ง่าย เช่น ภายใต้สภาวะที่มีความเป็นกรด แม้แต่ความเป็นกรดที่ค่อนข้างอ่อน ก็อาจทำให้เกิดการจัดน้ำของหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 14^{1[16],1[30]} ส่วนในสภาวะที่เป็นเบสอาจเกิด epimerization ที่ตำแหน่ง 5^{1[23,24,40]} และ hydroxylation ที่ตำแหน่ง 9^{1[5]} ฉะนั้น สภาวะที่จะใช้ในการรีดิวซ์เอคโดสเตียรอยด์ต้อง mild พอที่จะไม่ทำให้เกิดปฏิกิริยาข้างเคียงดังกล่าว

Catalytic hydrogenation^{1.2[110]} เป็นวิธีการรีดิวซ์วิธีแรกที่เราเลือกมาใช้ เพราะในทางปฏิบัติเป็นวิธีที่สะดวกในการทำและสภาวะที่ใช้ก็ค่อนข้าง mild อย่างไรก็ตาม เราพบว่าเมื่อนำ 20-hydroxyecdysone [1.2(116)] มาทำ catalytic hydrogenation ในเอทานอล โดยใช้ 10% Pd-C เป็นคะตะลิสต์ เมื่อตรวจสอบส่วนผสมของปฏิกิริยา พบว่า มีสารผลิตภัณฑ์อยู่อย่างน้อย 7 ชนิด รวมทั้งสารตั้งต้น 1.2(116) อีก 30-40% เมื่อนำ ponasterone A [1.2(117)]^{1[43]} มาทำปฏิกิริยาก็ได้ผลคล้ายคลึงกัน เราจึงมองหาเอนไซม์ที่สามารถป้องกันหรือลดการเกิดการรีดิวซ์

เลยไป และ/หรือผลิตภัณฑ์ข้างเคียงได้ เมื่อทดลองเกลืออนินทรีย์ของโลหะที่มี oxidation state ต่ำ เราพบว่า เมื่อทำปฏิกิริยาคatalytic hydrogenation โดยใช้ Pd-C เป็นคะตะลิสต์ โดยมี 25% aqueous NaNO₂ อยู่ด้วย ปฏิกิริยาเกิดได้ clean มาก ได้สารผลิตภัณฑ์ dihydro analogue 1.2 (118) ถึง 96%ใช้อัตราส่วนของสารต่อคะตะลิสต์ คือ 1:3 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) และ NaNO₂ ที่ใช้มีปริมาณเป็น 20 equivalent ของสารตั้งต้น เมื่อใช้ Cerium (III) Chloride^{1.2[111]} พบว่าให้ผลคล้ายคลึงกัน แต่ปฏิกิริยาเกิดขึ้นช้ากว่า และถ้าใช้ NaNO₂ เป็นของแข็ง ปฏิกิริยาเกิดขึ้นช้ามาก

Scheme 1.2(102)



โครงสร้างของสาร 1.2 (118) ได้ทำการพิสูจน์โดยเปรียบเทียบข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี กับ 20-hydroxyecdysone [1.2(116)] และยืนยันด้วยเทคนิค 1D และ 2D NMR กล่าวคือ ความถี่การดูดกลืนของ IR ได้เปลี่ยนจาก 1665 cm⁻¹ ในสาร 1.2(116) ไปเป็น 1699 cm⁻¹ การที่สัญญาณ H-7 ที่ δ 5.8-6.2 หายไป แสดงว่า พันธะคู่ที่ตำแหน่ง 7 ในสาร 1.2(116) ถูกรีดิวซ์ไปแล้ว FABMS (negative ion mode) ที่ m/z 481 ซึ่งตรงกับค่า [M-H]⁻ และค่า elemental analysis สอดคล้องกับโครงสร้าง 1.2(118) การกำหนดสัญญาณ ¹H และ ¹³C NMR ใน C₅D₅N อาศัยเทคนิค COSY, DEPT, HMQC และ HMBC นอกจากนี้ยังได้บันทึก NMR

สเปกตรัม ใน CD_3OD เพื่อให้ได้ข้อมูลบางโปรตอนที่ไม่ชัดเจนเมื่อใช้ $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ โดยเฉพาะ H-4, H-5 และ H-7 α จาก splitting patterns และ ค่า J ของ H-7 α , H-7 β และโดยเฉพาะ H-8 ได้ระบุว่า H-8 อยู่ *cis* กับ H-9 ดังแสดงใน 1.2(118) สำหรับการที่ H-8 กับ H-9 อยู่แบบ *trans* ตามรูป 1.2(119) เป็นไปไม่ได้ เนื่องจากกรณีนี้จะได้ค่า J ที่สูง ทั้งระหว่าง H-8 กับ H-7 α และ H-8 กับ H-9 เนื่องจากได้มีรายงานในอดีตมาว่า epimerization ที่ตำแหน่ง 5 เกิดขึ้นได้ง่ายในบางกรณี^{1[34,35]} ฉะนั้นจึงได้ตรวจสอบสเตอริโอเคมีที่ตำแหน่ง 5 ถ้า H-5 ในสาร 1.2(118) อยู่ในลักษณะ β -orientation เช่นเดียวกับในสารตั้งต้น 1.2(116) จะเกิด NOE enhancement ระหว่าง 19-Me และ H-5 จากรูปแบบจำลองโมเลกุลของสาร 1.2(118) (ดู Figure 1.2(1)) จะเห็นว่า 19-Me และ H-5 อยู่ใกล้กัน เมื่อทำ irradiation ที่ 19-Me พบว่าเกิด NOE ของ H-5 ฉะนั้น โครงสร้าง 5 α -analogue (คือ 1.2(120)) ไม่สามารถเป็นไปได้

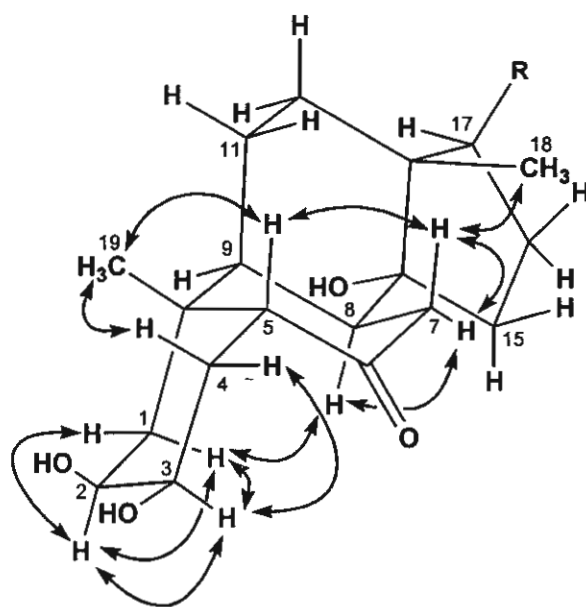
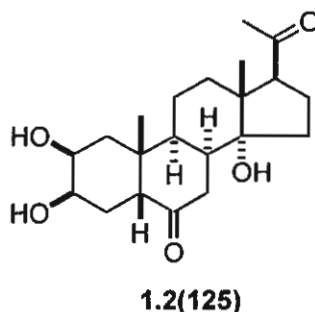
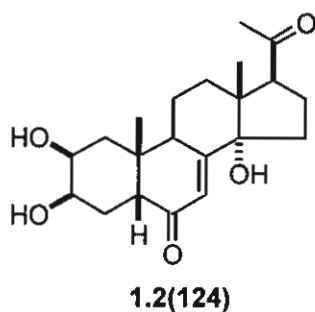
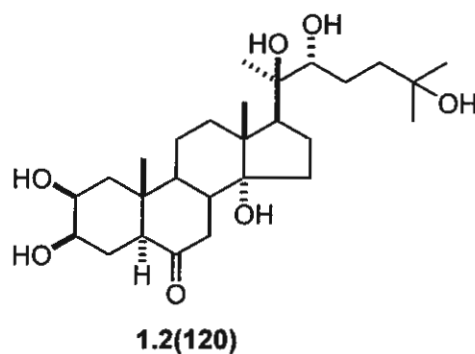
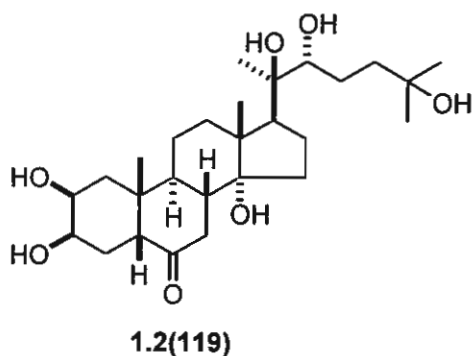


Figure 1.2(1) NOE correlations of compound 1.2(118)

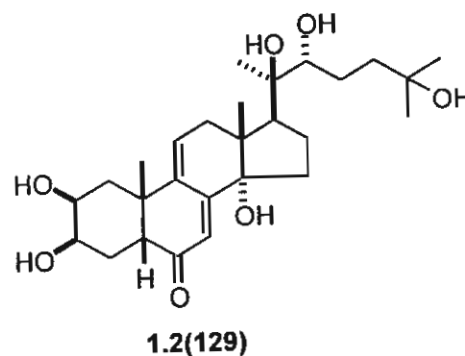
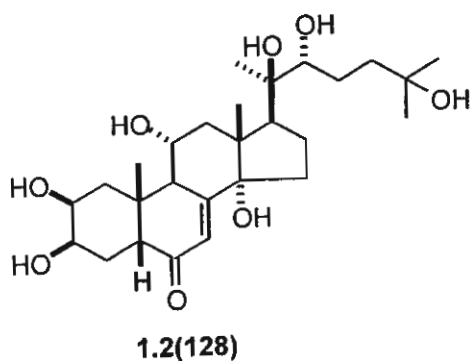
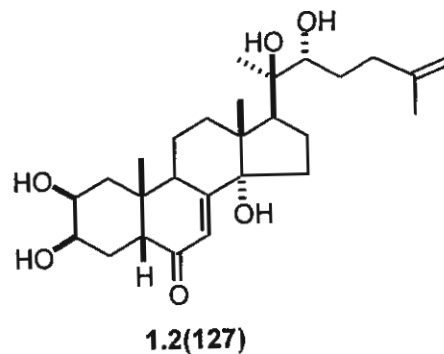
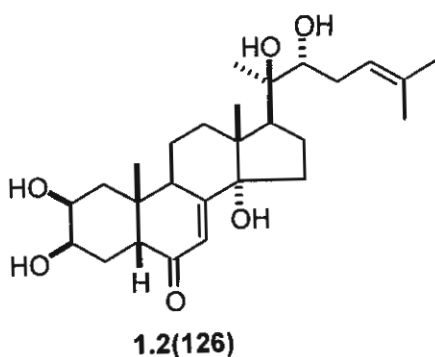
ถูกรีดิวส์ไปเป็น dihydro analogue 1.2(123) (88%) และ poststerone [1.2(124)]^{1[20]} ก็ถูกรีดิวส์ไปเป็น 7,8-dihydropoststerone [1.2(125)] (88% yield) (ดู Scheme 1.2(1)).



เนื่องจากระบบ 7-en-6-one มีลักษณะที่ sterically hindered ฉะนั้น เมื่อมีพันธะคู่ที่สายโซ่ด้านข้าง พันธะคู่เหล่านี้จะถูกรีดิวส์ก่อน โดยมีช่วงเวลานานพอก่อนที่พันธะคู่ที่ตำแหน่ง 7 จะถูกรีดิวส์ ฉะนั้น เมื่อมี NaNO_2 อยู่ด้วย stachysterone C [1.2 (126)]^{1[42]} ถูกรีดิวส์ไปเป็น ponasterone A [1.2(117)] (90%) เมื่อปล่อยให้เวลานานขึ้น (ดูตาราง 1.2(102)) ก็จะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็นสาร 1.2(121) (80%) ทำนองเดียวกัน 25,26-didehydroponasterone [1.2(127)]^{1[42]} ถูกไฮโดรจีเนตไปเป็น 1.2(117) (91%)

อย่างไรก็ตาม เราพบว่า turkesterone [1.2(128)]^{1.1[31]} ถูกเปลี่ยนไปเป็นสาร 1.2(116) อย่างไม่ได้คาดมาก่อน เข้าใจว่า ในขั้นตอนแรกเกิดการขจัดน้ำได้สารมัธยันตร์ 1.2(129) จาก

นั่นจึงเกิด hydrogenation ที่ γ,δ -conjugated olefinic function การเกิด 1.2(129) ได้รับการยืนยันจากการทำ hydrogenation โดยมี NaNO_2 ชนิดของแข็งอยู่ด้วย ปรากฏว่าได้สาร 1.2(129) ในปริมาณ 72% yield การเกิดการขจัดน้ำได้ง่ายมากของ 11α -hydroxy ecdysteroid เป็นสิ่งที่ทราบกันดีมาแล้ว^{1,1[6]} จึงสรุปได้ว่าเราได้พบวิธีที่สะดวกในการไฮโดรจีเนตพันธะคู่ตำแหน่ง 7 ของเอกไดสเตียรอยด์ได้อย่างมีประสิทธิภาพและให้ปริมาณของผลผลิตสูง



วัสดุและวิธีการ

1.1 การสกัดแยก หาสูตรโครงสร้าง และการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ของเอเคโดสเตียรอยด์

1) Zoanthid ชนิดที่ 1 (*Zoanthus sp.*)

นำ *Zoanthus sp.* (3 กิโลกรัม) ซึ่งเก็บมาจากแสมสาร จังหวัดชลบุรี และแช่ไว้ใน MeOH (1,500 มิลลิลิตร) มาแยกออกจากตัวทำละลาย บดด้วยเครื่องบด แล้วสกัดด้วย MeOH รวม 3 ครั้ง กรองส่วนที่สกัดด้วย MeOH ระเหยตัวทำละลายส่วนใหญ่ออกไป เติมน้ำ แล้วสกัดด้วย *n*-hexane, CHCl_3 และ *n*-BuOH ตามลำดับ ระเหยตัวทำละลายออกได้ hexane extract (30.1 กรัม) และ butanol extract (60.2 กรัม) จากการตรวจสอบด้วย TLC พบว่า butanol extract ให้ spot ซึ่งแสดงสีต่อรีเอเจนต์ anisaldehyde- H_2SO_4 ในเอทานอลที่คาดว่าคือเอเคโดสเตียรอยด์อยู่ จึงนำมาทำการแยกเป็น extract แรก

(ก) Butanol extract

นำ butanol extract (30.0 กรัม) มาแยกสารโดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจลชนิดปกติ (Merck's silica gel 60, 70–230 mesh) ใช้ตัวชะเริ่มจาก CHCl_3 และ CHCl_3 -MeOH โดยเพิ่มปริมาณของ MeOH ขึ้นเรื่อยๆ ตรวจสอบ fractions ต่างๆที่ได้ด้วย TLC รวมกลุ่มได้ 13 กลุ่ม

(1) กลุ่มที่ 6 น้ำหนัก 353 มิลลิกรัม นำมาแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ระบบตัวชะเป็น CHCl_3 และ CHCl_3 -MeOH โดยเพิ่มปริมาณของ MeOH เรื่อยๆ แยกกลุ่มย่อยออกได้รวม 16 กลุ่มย่อย

(i) กลุ่มย่อยที่ 9 เป็น ponasterone A [1.1(1)] (20 มิลลิกรัม) ^1H NMR ดูตารางที่ 1.1(1)

(ii) กลุ่มย่อยที่ 11 เป็นส่วนผสมของ 20-hydroxyecdysone 2-acetate [1.1(3)] กับ viticosterone E หรือ 20-hydroxyecdysone 25-acetate [1.1(4)] มีน้ำหนักรวมกัน 20 มิลลิกรัม สารทั้ง 2 ชนิดนี้ให้ spot เดียวบน TLC ^1H NMR ดูตารางที่ 1.1(2)

(iii) กลุ่มย่อยที่ 13 เมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีหลายครั้ง ตามด้วยการใช้ reversed-phase คอลัมน์โครมาโตกราฟีอีก 2 ครั้ง สามารถแยกได้เอคไดสเตียรอยด์ชนิดใหม่ คือ zoanthusterone [1.1(6)] (2 มิลลิกรัม) และ integristerone A 25-acetate [1.1(7)] (1 มิลลิกรัม) ข้อมูล และ แสดงไว้ในตารางที่ 1.1(4) และ 1.1(5) ตามลำดับ

(2) กลุ่มที่ 7 น้ำหนัก 897 มิลลิกรัม นำมาแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 6 ได้ 6 กลุ่มย่อย กลุ่มย่อยที่ 4 (23 มิลลิกรัม) เป็นเอคไดสเตียรอยด์จากการสังเคราะห์ TLC แต่ยังมีสารอื่นปนอยู่ จึงนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีได้สาร 15 มิลลิกรัม แต่ยังไม่บริสุทธิ์ ทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วยเทคนิคเดียวกันได้ 2-deoxy-20-hydroxyecdysone [1.1(2)] (6 มิลลิกรัม) ^1H NMR ดูตารางที่ 1.1(1)

(3) กลุ่มที่ 10 น้ำหนัก 653 มิลลิกรัม นำมาแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีเช่นเดียวกันได้ 20-hydroxyecdysone [1(1)] (15 มิลลิกรัม) ^1H NMR ดูตารางที่ 1.1(1)

(4) กลุ่มที่ 9 น้ำหนัก 2.282 กรัม นำมาแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี นำกลุ่มที่ 3 มา recolumn ได้ 7 กลุ่มย่อย

(i) กลุ่มย่อยที่ 6 น้ำหนัก 269 มิลลิกรัม นำมา recolumn รวม 3 ครั้ง ได้ ecdysone [1(2)] (4 มิลลิกรัม) เป็นเอคไดสเตียรอยด์ที่เคยมีผู้พบมาแล้ว ^1H NMR ดูตารางที่ 1.1(3) และ ajugasterone C [1(45)] (2 มิลลิกรัม) ซึ่งเป็นเอคไดสเตียรอยด์ที่เคยมีผู้พบมาแล้วเช่นกัน

(ii) กลุ่มย่อยที่ 7 น้ำหนัก 948 มิลลิกรัม นำมา recolumn รวม 4 ครั้ง ได้ dacryhainansterone หรือ 5-deoxykaladasterone [1.1(5)] (4 มิลลิกรัม) ^1H NMR ดูตารางที่ 1.1(3) และ inokosterone [1(16)] (2 มิลลิกรัม) เป็นเอคไดสเตียรอยด์ที่มีผู้พบมาแล้ว^{1.1[9]}

ตารางที่ 1.1(1) ^1H NMR data ของสาร 1(1), 1.1(1) และ 1.1(2)

H	1(1)	1.1(1)	1.1(2)
2	4.15 (m) [‡]	4.16 (m)	
3	4.20 (br s) [‡]	4.23 (br s)	4.12 (br s)
5	2.97 (m) ⁺	3.02 (dd, 13.2, 3.8)	2.97 (m)
7	6.22 (d, 2.1)	6.26 (d, 2.4)	6.25 (d, 2.1)
9	3.55 (m)	3.60 (m)	3.54 (m)
17	2.96 (m) ⁺	2.93 (t, 9.1)	3.03 (t, 9)
22	3.84 (br d, 8.9)	3.80 (br d, 10.4)	3.88 (br d, 10.3)
18-Me	1.18 (s)	1.23 (s)	1.23 (s)
19-Me	1.02 (s)	1.07 (s)	1.05 (s)
21-Me	1.56 (s)	1.57 (s)	1.60 (s)
26-Me	1.34 (s)	0.81 (d, 6.1)	1.36 (s)
27-Me	1.34 (s)	0.83 (d, 6.1)	1.36 (s)

Recorded in pyridine- d_5 .

^{‡,+} Signals within the same column denote partially overlapping signals.

ตารางที่ 1.1(2) ^1H NMR data ของสาร 1.1(3) และ 1.1(4)

H	1.1(3)	1.1(4)
2	5.24 (<i>m</i>)	4.16 (<i>br d</i> , 10.5)
3	4.28 (<i>br s</i>)	4.23 (<i>br s</i>)
5	3.01 (<i>dd</i> , 13.5, 3.6)	3.02 (<i>dd</i> , 13.2, 3.5)
7	6.23 (<i>d</i> , 2.3)	6.24 (<i>d</i> , 2.2)
9	3.63 (<i>m</i>)	3.58 (<i>m</i>)
17	2.96 (<i>t</i> , 9)	2.98 (<i>t</i> , 9.1)
22	3.85 (<i>br d</i> , 9.1)	3.83 (<i>br d</i> , 10)
18-Me	1.18 (<i>s</i>)	1.21 (<i>s</i>)
19-Me	1.06 (<i>s</i>)	1.05 (<i>s</i>)
21-Me	1.55 (<i>s</i>)	1.60 (<i>s</i>)
26-Me	1.37 (<i>s</i>)	1.39 (<i>s</i>)
27-Me	1.37 (<i>s</i>)	1.46 (<i>s</i>)
AcO	1.93 (<i>s</i>)	1.91 (<i>s</i>)

Recorded in pyridine- d_5 .

ตารางที่ 1.1(3) ^1H NMR data ของสาร 1(2) และ 1.1(5)

H	1(2)	1.1(5)
2	4.14 (<i>m</i> , $w_{1/2} = 24$ Hz)	4.14 (<i>m</i>)
3	4.22 (<i>brs</i> , $w_{1/2} = 9$ Hz)	4.16 (<i>brs</i>)
5	3.01 (<i>dd</i> , 13.1, 3.5)	3.07 (<i>dd</i> , 13.3, 4.2)
7	6.21 (<i>d</i> , 2.4)	6.21 (<i>s</i>)
9	3.55 (<i>m</i>)	-
11	-	6.38 (<i>brd</i> , 6.6)
12		3.16 (<i>brd</i> , 17.7); 2.54 (<i>dd</i> , 17.7, 6.6)
17	2.51 [*]	
22	4.05 (<i>m</i> , $w_{1/2} = 17$ Hz)	3.82 (<i>dd</i> , 8.5, <i>ca</i> 2)
18-Me	0.70 (<i>s</i>)	1.26 (<i>s</i>)
19-Me	1.06 (<i>s</i>)	1.26 (<i>s</i>)
21-Me	1.28 (<i>d</i> , 6.6)	1.57 (<i>s</i>)
26-Me	1.37 (<i>s</i>)	0.81 (<i>d</i> , 6.4)
27-Me	1.37 (<i>s</i>)	0.83 (<i>d</i> , 6.4)

Recorded in pyridine- d_5 .

^{*}Obscured signal.

ตารางที่ 1.1(4) ¹H NMR Data ของสาร 1(1), 1.1(6), 1.1(7), 1.1(1) และ 1.1(9)

H	1.1(1) (C ₅ D ₅ N)	1.1(6) (C ₅ D ₅ N)	1.1(6) (CD ₃ OD)	1.1(7) (C ₅ D ₅ N)	1.1(1) (C ₅ D ₅ N)	1.1(9) ^a (C ₅ D ₅ N)	1.1(9) (CD ₃ OD)
1		4.30 (<i>br s</i>)	3.81 (<i>br s</i> , W _{1/2} = 7)	4.31 (<i>br s</i>)		4.31 (<i>br s</i>)	3.82 (<i>br s</i> , W _{1/2} = 6.8)
2	4.18 (<i>m</i>)	4.24 (<i>br s</i>)	3.87 (<i>br t</i> , 2.8)	4.24 (<i>br s</i>)	4.16 (<i>m</i>)	4.29 (<i>m</i>)	3.87 (<i>br t</i>)
3	4.21 (<i>br s</i>)	4.30 (<i>br s</i>)	4.04 (<i>br s</i> , W _{1/2} = 12)	4.31 (<i>br s</i>)	4.23 (<i>br s</i>)	4.30 (<i>m</i>)	4.03 (<i>m</i>)
5	2.99 (<i>dd</i> , 12.5, 3.3)	3.29 (<i>br d</i> , ca 2)	2.60 (<i>dd</i> , 12.3, 4.7)	3.30 (<i>m</i>)	3.02 (<i>dd</i> , 13.2, 3.8)	3.30 (<i>m</i>)	2.60 (<i>dd</i> , 13, 4)
7	6.23 (<i>d</i> , 2.1)	6.27 (<i>br s</i>)	5.82 (<i>d</i> , 1.9)	6.27 (<i>br s</i>)	6.26 (<i>d</i> , 2.4)	6.30 (<i>d</i> , 2.5)	5.82 (<i>d</i> , 2.3)
9	3.57 (<i>m</i>)	3.56 (<i>m</i>)	3.07 (<i>m</i>)	3.58 (<i>m</i>)	3.60 (<i>m</i>)	3.60 (<i>m</i>)	3.07 (<i>m</i>)
17	2.98 (<i>t</i> , 8.5)	2.90 (<i>t</i> , 8.7)	2.36 (<i>t</i> , 8.3)	2.96 (<i>t</i> , 9)	2.93 (<i>t</i> , 9.1)	3.01 (<i>t</i> , 8)	2.38 (<i>t</i> , 8)
22	3.86 (<i>dd</i> , 8.5, 1.2)	3.79 (<i>br d</i> , 9.7)	3.32 ^b	3.83 (<i>br d</i> , 9.8)	3.80 (<i>br d</i> , 10.4)	3.87 (<i>m</i>)	3.33
18-Me	1.20 (<i>s</i>)	1.22 (<i>s</i>)	0.89 (<i>s</i>)	1.22 (<i>s</i>)	1.23 (<i>s</i>)	1.25 (<i>s</i>)	0.90 (<i>s</i>)
19-Me	1.05 (<i>s</i>)	1.40 (<i>s</i>)	1.06 (<i>s</i>)	1.41 (<i>s</i>)	1.07 (<i>s</i>)	1.44 (<i>s</i>)	1.08 (<i>s</i>)
21-Me	1.57 (<i>s</i>)	1.55 (<i>s</i>)	1.15 (<i>s</i>)	1.59 (<i>s</i>)	1.57 (<i>s</i>)	1.59 (<i>s</i>)	1.19 (<i>s</i>)
26-Me	1.36 (<i>s</i>)	0.79 (<i>d</i> , 6.2)	0.90 (<i>d</i> , 6.8)	1.41 (<i>s</i>)	0.81 (<i>d</i> , 6.1)	1.38 (<i>s</i>)	1.20 (<i>s</i>)
27-Me	1.36 (<i>s</i>)	0.80 (<i>d</i> , 6.2)	0.91 (<i>d</i> , 6.8)	1.47 (<i>s</i>)	0.83 (<i>d</i> , 6.1)	1.38 (<i>s</i>)	1.20 (<i>s</i>)
AcO	-	-	-	1.93 (<i>s</i>)	-	-	-

^a Data taken from ref. 1.2[100]. ^b Partially superimposed by solvent signal.

ตารางที่ 1.1(5) ^{13}C NMR data ของสาร 1(1), 1.1(6), 1.1(7) และ 1.1(9)

C	1(1) ^a	1.1(6)	1.1(7)	1.1(9) ^b
1	38.0	77.7	77.7	76.2
2	68.3	69.9	70.0	68.1
3	68.2	72.1	72.2	70.5
4	32.5	33.3	33.3	33.0
5	51.4	48.0	48.1	46.4
6	203.5	204.8	205.5	
7	121.7	123.3	123.3	121.6
8	166.1	167.2	166.9	
9	34.6	36.4	36.6	35.0
10	38.8	45.0	45.0	42.0
11	21.2	c	23.0	21.4
12	32.1	33.6	33.6	32.0
13	48.2	49.3	47.7	47.0
14	84.4	85.7	85.7	84.2
15	31.8	31.4	31.2	31.5
16	21.6	c	c	21.5
17	50.2	51.7	51.8	50.1
18	17.9	19.5	19.5	17.8
19	24.5	22.9	22.0	20.3
20	77.0	78.4	78.5	76.8
21	21.7	23.0	23.2	21.6
22	77.7	78.4	79.1	77.5
23	27.5	29.8	31.6	27.5
24	42.6	38.7	40.9	42.6
25	9.8	31.4	84.0	69.5
26	30.1	24.0	27.7	30.0
27	30.1	24.9	27.9	30.1
MeCO ₂	-	-	172.0	-
MeCO ₂	-	-	23.9	-

Recorded in pyridine- d_5 . ^aData taken from ref. 1[1]. ^bData taken from ref. 1.2[100].^cObscured signal.

2) เอคไดสเดียรอยด์จากเปลือกต้น *Vitex scabra*

นำเปลือกต้นที่แห้ง (1.4 กิโลกรัม) ของ *V. scabra* ซึ่งเก็บมาจากอำเภอม่วงสามสิบ จังหวัดอุบลราชธานี มาบด และสกัดด้วยเมทานอลในเครื่อง Soxhlet extractor สารละลายที่กรองได้ นำมาระเหยให้เหลือปริมาตรประมาณ 250 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำ (1,800 มิลลิลิตร) จากนั้นสกัดด้วย CHCl_3 (3x500 มิลลิลิตร) และ *n*-BuOH (5x500 มิลลิลิตร) เมื่อระเหยตัวทำละลายแล้ว ได้ส่วนสกัดชั้น CHCl_3 (1.7 กรัม) และชั้น *n*-BuOH (98.7 กรัม)

(ก) BuOH extract

นำส่วนสกัดชั้น BuOH มาแยกด้วยโครมาโทกราฟี (Merck, ซิลิกาเจล, 0.063-0.200 มิลลิเมตร) ตรวจสอบด้วย TLC พบว่าสามารถแยกได้ 17 กลุ่ม

(1) กลุ่มที่ 3 ทำการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี พบว่าได้สาร calonysterone [1(18)] (5 มิลลิกรัม) ข้อมูล ^1H NMR ตรงกับที่มีผู้รายงานไว้แล้ว^{1[15]}

(2) กลุ่มที่ 4 เมื่อแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี พบว่าได้ pterosterone [1(26)]^{1[44]} (5 มิลลิกรัม) และ 24-*epi*-makisterone A [1.1(12)] (13 มิลลิกรัม) ซึ่งข้อมูล ^1H NMR และ mass spectrum สอดคล้องกับที่รายงานไว้แล้ว

(3) กลุ่มที่ 6 และ 7 นำมารวมกัน และตกผลึกด้วย MeOH-EtOAc ให้ 20-hydroxyecdysterone ([1(1)], 25.1 กรัม), mp. 240-242 °C (lit.^{1-1[3]} mp. 242-244 °C) ซึ่งยืนยันโดยวิธีเปรียบเทียบ TLC กับสาร authentic และโดยการเปรียบเทียบ ^1H NMR สเปกตรัมกับที่รายงานไว้แล้ว^{1.1[11]} นำ filtrate ที่แยกสาร 1(1) ออกแล้วมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และคัดเลือกสองกลุ่มย่อยมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ตามด้วย reversed-phase คอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งชะด้วย H_2O และ H_2O -MeOH โดยการเพิ่มปริมาณ MeOH พบว่าได้ polypoline [1.1(13)] (2 มิลลิกรัม) และ ajugasterone C [1(45)] (5 มิลลิกรัม) ข้อมูล ^1H NMR ของสารนี้ตรงกับข้อมูลที่เคยมีผู้รายงานไว้แล้ว^{1[11]}

(4) กลุ่มที่ 9 นำมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้ 9 กลุ่มย่อย

กลุ่มย่อยที่ 4 เมื่อแยกด้วย reversed-phase HPLC (MeOH- H_2O ,

40:60) เก็บสารที่ R_f 27.97 นาที พบว่าสารนี้คือ 24-*epi*-pinnatasterone [1.1(10)] (3 มิลลิกรัม) และสารที่ออกมาที่ R_f 32.72 นาที คือ pinnatasterone [1(3)] (2 มิลลิกรัม) ยืนยันโครงสร้างของสาร 1(3) โดยการเปรียบเทียบกับเทคนิค reversed-phase HPLC และข้อมูล ^1H NMR

กลุ่มย่อยที่ 5 ในทำนองเดียวกัน เมื่อแยกด้วย reversed-phase HPLC ($\text{MeOH-H}_2\text{O} = 40:60$, $R_f = 23.37$ นาที) พบว่าได้ 11 α -hydroxyecdysone [1.1(14)] (1 มิลลิกรัม) ซึ่งข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR ตรงกับที่มีผู้รายงานไว้แล้ว

กลุ่มย่อยที่ 10 นำมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้ 7 กลุ่มย่อย กลุ่มย่อยที่ 2 และ 3 นำมาทำให้บริสุทธิ์ต่อยด้วย reversed-phase HPLC เช่นเดียวกับข้างต้น พบว่าได้ 24-*epi*-abutasterone ([1(23)] (2 มิลลิกรัม, $\text{MeOH-H}_2\text{O} = 40:60$, $R_f = 17.53$ นาที) และ scabrasterone ([1.1(11)], 2 มิลลิกรัม, $\text{MeOH-H}_2\text{O} = 30:70$, $R_f = 18.76$ นาที) สาร 1(23) มีข้อมูล IR, ^1H NMR และ MS ตรงกับสารที่ได้จากเปลือกกรากของ *V. canesens*^[34]

24-*epi*-Pinnatasterone [1.1(10)]: IR: ν_{max} 3422, 2929, 1648, 1384, 1057 cm^{-1} ; ข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR spectra แสดงไว้ในตารางที่ 1.1(6) และ 1.1(8) ตามลำดับ HR-FABMS (negative ion mode): m/z 479.3008 $[\text{M-H}]^-$. $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_7\text{-H}$ requires 479.3007.

Scabrasterone [1.1(11)] : IR: ν_{max} 3422, 2925, 1654, 1384 cm^{-1} ; ^1H และ ^{13}C NMR spectral data แสดงไว้ในตารางที่ 1.1(6) และ 1.1(8) ตามลำดับ; ESMS (positive ion mode): m/z 503 $[\text{M+Na}]^+(100)$. HR-FABMS (negative ion mode): m/z 479.3008 $[\text{M-H}]^-$. $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_7\text{-H}$ requires 479.3007.

Acetylation ของสาร 1.1(10)

ละลายสาร 1.1(10) (1 มิลลิกรัม) ใน dry pyridine (1 มิลลิลิตร) และเติม acetic anhydride (1 มิลลิลิตร) กวนส่วนผสมนี้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำ (1 มิลลิลิตร) แล้วสกัดด้วย CHCl_3 (3x15 มิลลิลิตร) ล้างชั้นสารละลายอินทรีย์ด้วยน้ำ และทำให้ปราศจากน้ำด้วยการเติม anhydrous Na_2SO_4 ระเหยให้แห้ง แล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้ $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (85.5:1.5) เป็นตัวชะ พบว่าได้สาร [1.1(16)] (0.2 มิลลิกรัม) และ [1.1(17)] (0.6 มิลลิกรัม)

24-*epi*-Pinnasterone 2,3,24-triacetate [1.1(16)]: IR: ν_{max} 3444, 2924, 2853, 1740, 1662, 1463, 1372, 1247, 1045, 1027 cm^{-1} ; ^1H spectral data แสดงไว้ในตารางที่ 1.1(7); HR-FABMS (negative ion mode): m/z 605.3324 $[\text{M}-\text{H}]^-$. $\text{C}_{33}\text{H}_{50}\text{O}_{10}-\text{H}$ requires 605.3325.

24-*epi*-Pinnasterone 2,3,24,25-tetraacetate [1.1(17)] : IR: ν_{max} 3359, 2922, 2851, 1724, 1658, 1632, 1467, 1423, 1266, 1135, 1112 cm^{-1} ; ^1H NMR spectral data แสดงไว้ในตารางที่ 1.1(7); HR-FABMS (negative ion mode): m/z 647.3433 $[\text{M}-\text{H}]^-$. $\text{C}_{35}\text{H}_{52}\text{O}_{11}-\text{H}$ requires 647.3431.

กลุ่มที่ 11 นำมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี 2 ครั้ง ตามด้วย reversed-phase คอลัมน์โครมาโทกราฟี

กลุ่มย่อยที่ 1 เมื่อนำกลุ่มย่อยนี้มาแยกด้วยโครมาโทกราฟี พบว่าได้ turkesterone [1.1(15)] (9 มิลลิกรัม)

กลุ่มย่อยที่ 2 ซึ่งได้จากการชะด้วย $\text{H}_2\text{O}-\text{MeOH}$ (60:40) พบว่าได้ 20,26-dihydroxyecdysone [1(25)] (3 มิลลิกรัม) เมื่อเปรียบเทียบกับ TLC ของสาร [1(25)] และ [1.1(15)] กับสาร authentic พบว่าเหมือนกัน และเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูล ^1H NMR ของสาร [1.1(15)] และ ^{13}C NMR ของสารทั้งสองพบว่าเหมือนกัน^{1[43], 1.1[3]}

ตารางที่ 1.1(6) ^1H NMR spectral data ของสาร 1.1(10), 1.1(11), 1(1), 1(3) และ 1.1(15) (in $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

H	1.1(10) ^a	1.1(11)	1(1)	1(3) ^a	1.1(15)
1		3.41 <i>dd</i> (12.8, 4.2)			3.42 <i>dd</i> (13.5, 4)
2	4.15 <i>m</i>	4.56 ^b	4.18 <i>m</i>	4.15 <i>m</i>	4.56 ^d
3	4.23 <i>br s</i>	4.21 <i>m</i> ($W_{1/2} = 7$)	4.21 <i>br s</i>	4.23 <i>br s</i>	4.20 <i>br s</i>
5	2.96 <i>dd</i> (13.1, 3.6)	3.00 <i>dd</i> (13.1, 3.6)	2.99 <i>dd</i> (12.5, 3.3)	2.96 <i>dd</i> (13, 4)	3.01 ^e
7	6.19 <i>d</i> (2.1)	6.26 <i>d</i> (2.1)	6.23 <i>d</i> (2.1)	6.19 <i>d</i> (2.5)	6.28 <i>br s</i>
9	3.56 <i>m</i>	3.84 <i>dd</i> (8.5, 2.1)	3.57 <i>m</i>	3.56 <i>m</i>	3.85 ^f
11		4.56 ^b			4.56 ^d
12ax		2.99 ^c			3.01 ^e
12eq		2.65 <i>dd</i> (11.9, 5.8)			2.67 <i>dd</i> (11.8,
5.5)					
17	2.90 <i>t</i> (9.3)	2.93 <i>t</i> (9)	2.98 <i>t</i> (8.5)	2.85 <i>t</i> (9)	3.08 <i>t</i> (9)
22			3.86 <i>dd</i> (8.5, 1.2)		3.85 ^f
24	3.76 <i>br d</i> (8.8)			3.74 <i>br d</i> (8.5)	
H ₃ -18	1.08 <i>s</i>	1.18 <i>s</i>	1.20 <i>s</i>	1.09 <i>s</i>	1.24 <i>s</i>
H ₃ -19	1.00 <i>s</i>	1.29 <i>s</i>	1.05 <i>s</i>	1.00 <i>s</i>	1.30 <i>s</i>
H ₃ -21	1.55 <i>s</i>	1.53 <i>s</i>	1.57 <i>s</i>	1.55 <i>s</i>	1.56 <i>s</i>
H ₃ -26	1.42 <i>s</i>	1.33 <i>s</i>	1.36 <i>s</i>	1.43 <i>s</i>	1.34 <i>s</i>
H ₃ -27	1.46 <i>s</i>	1.33 <i>s</i>	1.36 <i>s</i>	1.47 <i>s</i>	1.34 <i>s</i>

^a Chemical shift values were assigned from spectra of a 3:1 mixture of 1.1(10) and 1(3), whereas coupling constants were calculated from those of individual compound.

^{b-f} Overlapping signals.

ตารางที่ 1.1(7) ^1H NMR spectral data ของสาร 1.1(16)-1.1(19) (in CDCl_3)

H	1.1(16)	1.1(17) ^a	1.1(18)	1.1(19) ^a
2	5.06 <i>m</i>	5.06 <i>m</i>	5.06 <i>m</i>	5.06 <i>m</i>
3	5.35 <i>br s</i>	5.35 <i>br s</i>	5.35 <i>br s</i>	5.35 <i>br s</i>
5	2.38 <i>dd</i> (13.2, 3.8)	2.38 <i>dd</i> (13.2, 4)	2.38 <i>dd</i> (13.3, 4)	2.38 <i>dd</i> (13.1, 4.1)
7	5.86 <i>d</i> (2.1)	5.86 <i>d</i> (2.1)	5.86 <i>d</i> (2)	5.86 <i>d</i> (2.2)
9	3.09 <i>m</i>	3.09 <i>m</i>	3.09 <i>m</i>	3.09 <i>m</i>
17	2.25 <i>t</i> (9.4)	2.25 <i>t</i> (9.3)	2.27 <i>t</i> (9.2)	2.27 <i>t</i> (9.2)
24	4.80 <i>dd</i> (10.2, 2.3)	5.14 <i>dd</i> (10.2, 2.1)	4.74 <i>dd</i> (9.7, 2.6)	5.12 <i>dd</i> (9.9, 2.3)
H ₃ -18	0.821 <i>s</i>	0.819 <i>s</i>	0.810 <i>s</i>	0.812 <i>s</i>
H ₃ -19	1.01 <i>s</i>	1.01 <i>s</i>	1.01 <i>s</i>	1.01 <i>s</i>
H ₃ -21	1.26 <i>s</i>	1.26 <i>s</i>	1.26 <i>s</i>	1.26 <i>s</i>
H ₃ -26	1.20 <i>s</i>	1.43 <i>s</i>	1.20 <i>s</i>	1.43 <i>s</i>
H ₃ -27	1.20 <i>s</i>	1.47 <i>s</i>	1.20 <i>s</i>	1.47 <i>s</i>
AcO	1.99, 2.09, 2.10 each <i>s</i>	1.95, 1.99, 2.087, 2.09 each <i>s</i>	1.98, 2.09, 2.095 each <i>s</i>	1.95, 1.99, 2.081, 2.09 each <i>s</i>

^a Chemical shift values were assigned from spectra of a 2:5 mixture of 1.1(17) and 1.1(19), whereas coupling constants were calculated from those of individual compound.

ตารางที่ 1.1(8) ^{13}C NMR spectral data ของสาร 1.1(10), 1.1(11), 1(1), 1(3) และ 1.1(15) (ใน $\text{C}_8\text{D}_5\text{N}$)

C	1.1(10)	1.1(11)	1(1)	1(3)	1.1(15)
1	37.7	39.6	38.0	37.6	39.7
2	68.0	68.3	68.3	68.0	68.3
3	67.9	68.0	68.2	67.9	68.0
4	32.3	32.8	32.5	32.3	32.8
5	51.3	52.7	51.4	51.2	52.4
6	203.6	204.1	203.5	203.5	204.0
7	121.6	122.0	121.7	121.5	122.1
8	166.3	164.5	166.1	166.3	164.2
9	34.2	42.6	34.6	34.2	42.5
10	38.5	39.4	38.8	38.8	39.4
11	20.9	68.8	21.2	20.9	68.7
12	31.7	43.8	32.1	31.7	44.0
13	47.4	47.5	48.2	47.4	48.1
14	84.3	84.4	84.4	84.3	84.1
15	31.4	31.5	31.8	31.4	31.8
16	21.8	19.5	21.6	21.9	21.4
17	53.5	53.2	50.2	53.6	49.9
18	17.8	18.7	17.9	17.8	18.8
19	24.2	24.7	24.5	24.3	24.8
20	74.4	74.2	77.0	74.2	76.7
21	26.8	26.7	21.7	27.0	21.5
22	42.6	45.6	77.7	42.3	77.4
23	26.8	21.8	27.5	26.6	27.4
24	79.9	45.4	42.6	79.8	42.6
25	72.7	69.6	69.8	72.7	69.5
26	25.9	29.6	30.1	25.9	29.9
27	25.7	29.8	30.1	25.8	30.0

วัสดุและวิธีการ

1.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งต่าง ๆ ในโมเลกุล

1) การสังเคราะห์ *O*-Alkyl ethers

(1) 20-ECD 2,3:20,22-diacetonide 14-methyl ether [1.2(7)]

เติม MeI (2 มิลลิลิตร) ลงในสารละลายของ 20-ECD 2,3:20,22-diacetonide [1.2(5)] (584 มิลลิกรัม) ใน DMF (1 มิลลิลิตร) จากนั้นเติม silver oxide (206 มิลลิกรัม, เตรียมโดยเติมสารละลาย AgNO₃ ลงในสารละลาย NaOH กรองของแข็งที่เกิดขึ้น ล้างด้วยน้ำและอบให้แห้ง) ปิด aluminium foil เพื่อไม่ให้ส่วนผสมของปฏิกิริยาถูกแสงสว่าง คนส่วนผสมของปฏิกิริยาเป็นเวลา 22 ชั่วโมง เติมน้ำลงไปแล้วสกัดด้วย EtOAc (3x25 มิลลิลิตร) ล้างชั้นสารอินทรีย์ด้วยน้ำ แล้วทำให้ปราศจากน้ำด้วย anhydrous MgSO₄ ระเหยตัวทำละลายออกไปแล้วแยกสารด้วย Chromatotron โดยใช้ CHCl₃ เป็นตัวชะ ได้สาร 1.2(7) (139 มิลลิกรัม, 34%)

20-ECD 2,3:20,22-diacetonide 14-methyl ether [1.2(7)]: IR: $\nu_{\max}$ 3448, 2937, 1670, 1458, 1375, 1058 cm^{-1} ; ¹H NMR ดูตารางที่ 1.2(1); ESMS: m/z (% rel. intensity) 597 [M+Na]⁺(100).

(2) 20-ECD 14-methyl ether [1.2(4)]

เติม 70% AcOH (10 มิลลิลิตร) ลงในสารละลายของสาร 20-ECD 2,3-acetonide 14-methyl ether [1.2(7)] (39 มิลลิกรัม) ใน MeOH (0.5 ml) และ คนส่วนผสมเป็นเวลา 7 วัน เติม 0.1% NaHCO₃ (60 มิลลิลิตร) ลงไป สกัดสารด้วย *n*-BuOH (3x20 มิลลิลิตร) ล้างชั้นบิวทานอลด้วยน้ำ ระเหยตัวทำละลายออกโดยการกลั่นร่วมกับน้ำ ออกมาภายใต้ความดันต่ำ นำของแข็งที่เหลือ (54 มิลลิกรัม) มาทำสารทำให้บริสุทธิ์ด้วย Chromatotron ใช้ CHCl₃-MeOH (94:6) เป็นตัวชะ ได้ 1.2(4) (23 มิลลิกรัม, 77%)

20-ECD 14-methyl ether [1.2(4)]: IR: $\nu_{\max}$ 3423, 2966, 1656, 1069 cm^{-1} ; ¹H NMR ดูตารางที่ 1.2(1); ESMS: m/z (% rel. intensity) 517 [M+Na]⁺(100); Anal. Calcd. for C₂₈H₄₆O₇ · 3/2H₂O: C, 64.51; H, 9.47. Found; C, 64.27; H, 9.60.

(3) 20-ECD 2,3-acetonide 22-methyl ether [1.2(10)] และ 20-ECD 2,3-acetonide 14,22-dimethyl ether [1.2(11)]

เติม MeI (1 มิลลิลิตร) ลงในสารละลายของ 20-ECD 2,3-acetonide [1.2(9)] (115 มิลลิกรัม) ใน DMF (1 มิลลิลิตร) เติม silver oxide (145 มิลลิกรัม) ลงไปแล้วคนส่วนผสมโดยปิดขวดทำปฏิกิริยาให้ไม่มีแสงสว่างส่องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมน้ำลงไป แล้วสกัดส่วนผสมด้วย EtOAc (3x25 มิลลิลิตร) ดูนํ้าที่ยังเหลือในชั้นสารอินทรีย์ด้วย anhydrous Na_2SO_4 แล้วระเหยตัวทำละลายออกไป นำส่วนที่สกัดได้มาแยกสารออกจากกันด้วย Chromatotron ใช้ CHCl_3 -MeOH เป็นตัวชะ โดยเพิ่มปริมาณของเมทานอลเรื่อย ๆ Fraction ที่ใช้ตัวชะเป็น CHCl_3 -MeOH (98:2) ได้สาร 1.2(11) (44 มิลลิกรัม, 36%) Fraction กลุ่มที่สองซึ่งใช้ตัวชะเป็น CHCl_3 -MeOH (97:3) ได้สาร 1.2(10) (27 มิลลิกรัม, 23%)

20-ECD 2,3-acetonide 22-methyl ether [1.2(10)]: Aggregated needles จาก MeOH- CHCl_3 , mp. 243-245 °C; IR: ν_{max} 3446, 2960, 2880, 1651, 1460, 1379, 1143, 1101 cm^{-1} ; ^1H NMR ดูตารางที่ 1.2(2)

20-ECD 2,3-acetonide 14,22-dimethyl ether [1.2(11)]: Aggregated needles จาก MeOH- CHCl_3 , mp. 207-209 °C; IR: ν_{max} 3536, 2932, 2880, 1655, 1446, 1380, 1147, 1100, 763 cm^{-1} ; ^1H NMR ดูตารางที่ 1.2(3)

(4) 20-ECD 22-methyl ether [1.2(8)]

เติม 70% AcOH (3 มิลลิลิตร) ลงในสารละลายของสาร 1.2(10) (61 มิลลิกรัม) ใน MeOH (0.5 ml) และกวนส่วนผสมเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เติม 0.1% NaHCO_3 (60 มิลลิลิตร) ลงไป สกัดสารด้วย *n*-BuOH (3x25 มิลลิลิตร) ล้างชั้นบิวทานอลด้วยน้ำ ระเหยตัวทำละลายออกโดยการกลั่น azeotrope ร่วมกับน้ำ ทำสารทำให้บริสุทธิ์ด้วย Chromatotron ใช้ CHCl_3 -MeOH (92:8) เป็นตัวชะ ได้ โดยเพิ่มปริมาณของเมทานอลเรื่อย ๆ Fraction ที่ใช้ตัวชะเป็น CHCl_3 -MeOH (98:2) ได้ 20-ECD 22-methyl ether [1.2(8)] (48 มิลลิกรัม, 85%), rods จาก MeOH- CHCl_3 , mp. 263-265 °C; IR: ν_{max} 3420, 2960, 1648, 1461, 1442, 1382, 1149, 1103, 843 cm^{-1} ; ^1H NMR ดูตารางที่ 1.2(2)

(5) 20-ECD 14,22-dimethyl ether [1.2(13)]

นำสาร 1.2(11) มากำจัดหมู่ acetonide ออกไป โดยวิธีการเดียวกับที่กล่าวข้างต้น ได้สาร 1.2(13) (80%)

20-ECD 14,22-dimethyl ether [1.2(13)]: rods จาก MeOH-CHCl₃, mp. 115–130 °C; IR: $V_{\max}$ 3418, 2936, 1651, 1458, 1446, 1383, 1143, 1095, 794 cm^{-1} ; ¹H NMR ดูตารางที่ 1.2(3); ESMS: m/z (% rel. intensity) 531 [M+Na]⁺(100).

(6) 20-ECD 2,3-acetonide 22-ethyl ether [1.2(15)]

เติม EtI (2 มิลลิลิตร) และ silver oxide (122 มิลลิกรัม) ลงในสาร ละลาย 20-ECD 2,3-acetonide [1.2(9)] (172 มิลลิกรัม) ใน DMF (2 มิลลิลิตร) และคนส่วนผสมของปฏิกิริยาในที่มืดเป็นเวลา 27 ชั่วโมง เติมน้ำลงในส่วนผสมของปฏิกิริยา แล้วสกัดด้วย EtOAc (3x25 มิลลิลิตร) ทำชั้นสารอินทรีย์ให้แห้งด้วย anhydrous MgSO₄ และระเหยตัวทำละลายออกไป นำส่วนที่เหลือ (239 มิลลิกรัม) มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย Chromatotron ใช้ CHCl₃-MeOH เป็นตัวชะ โดยเพิ่มปริมาณของเมทานอลเรื่อยๆ Fraction ที่ชะด้วย CHCl₃-MeOH (97:3) ได้สารผลิตภัณฑ์ 1.2(15) (110 มิลลิกรัม, 61%)

20-ECD 2,3-acetonide 22-ethyl ether [1.2(15)]: IR: $V_{\max}$ 3448, 2968, 1654, 1382, 1244, 1058 cm^{-1} ; ¹H NMR ดูตารางที่ 1.2(4); ESMS: m/z (% rel. intensity) 571[M+Na]⁺(100), 549[M+H]⁺(6).

(7) 20-ECD 22-ethyl ether [1.2(14)]

เติม 70% AcOH (2 มิลลิลิตร) ลงในสารละลายของ 20-ECD 2,3-acetonide 22-ethyl ether [1.2(15)] (67 มิลลิกรัม) ใน MeOH (1 มิลลิลิตร) แล้วคนส่วนผสมเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เติม 0.1% NaHCO₃ (80 มิลลิลิตร) ลงไป สกัดสารด้วย *n*-BuOH (3x25 มิลลิลิตร) ล้างชั้นบิวทานอลด้วยน้ำ ระเหยตัวทำละลายออกโดยการกลั่น azeotrope ร่วมกับน้ำ นำของแข็งที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย Chromatotron ใช้ CHCl₃-MeOH (95:5) เป็นตัวชะ Fraction ที่ใช้ตัวชะเป็น CHCl₃-MeOH (95:5) ได้สารผลิตภัณฑ์ [1.2(14)] (44 มิลลิกรัม, 71%)

20-ECD 22-ethyl ether [1.2(14)] : needles จาก MeOH-CHCl₃, mp. 133-135 °C; IR: $V_{\max}$ 3448, 2969, 1654, 1382, 1057 cm⁻¹; ¹H NMR ดูตารางที่ 1.2(3); ESMS: m/z (% rel. intensity) 531[M+Na]⁺(100), 509[M+H]⁺(5).

(8) **20-ECD 20,22-acetonide 2-methyl ether [1.2(17)]**, **20-ECD 20,22-acetonide 3-methyl ether [1.2(18)]**, **20-ECD 20,22-acetonide 2,14-dimethyl ether [1.2(19)]**, **20-ECD 20,22-acetonide 2,3,14-trimethyl ether [1.2(20)]**

นำ 20-ECD 20,22-acetonide [1.2(16)] (373 มิลลิกรัม) มาทำปฏิกิริยา methylation ตามวิธีเดียวกับที่กล่าวมาข้างต้น แล้วทำการแยก crude products ได้สารผลิตภัณฑ์ที่ออกมาจาก Chromatotron ตามลำดับดังนี้ สาร 1.2(20) (16 มิลลิกรัม, 4%), สาร 1.2(19) (39 มิลลิกรัม, 10%), สาร 1.2(18) (48 มิลลิกรัม, 13%) และสาร 1.2(17) (161 มิลลิกรัม, 42%)

20-ECD 20,22-acetonide 2-methyl ether [1.2(17)] : prisms จาก MeOH-CHCl₃, mp. 230-234 °C; IR: $V_{\max}$ 3450, 2962, 2896, 2824, 1445, 1461, 1387, 1106, 1055 cm⁻¹; ¹H NMR ดูตารางที่ 1.2(4); FABMS (-ve): m/z (% rel. intensity) 533[M-H]⁻(100), 457(13), 339(11), 311(10); Anal. Calcd. for C₃₁H₅₀O₇·1/2H₂O: C, 68.48; H, 9.45. Found; C, 68.92; H, 9.46.

20-ECD 20,22-acetonide 3-methyl ether [1.2(18)] : IR: $V_{\max}$ 3532, 2934, 1447, 1462, 1375, 1164, 1112 cm⁻¹; ¹H NMR ดูตารางที่ 1.2(5); FABMS (-ve): m/z (% rel. intensity) 533[M-H]⁻ (100), 485(7), 457(12), 339(42), 311(22), 255(14); Anal. Calcd. for C₃₁H₅₀O₇·H₂O: C, 67.36; H, 9.48. Found; C, 67.72; H, 9.07.

20-ECD 20,22-acetonide 2,14-dimethyl ether [1.2(19)] : IR: $V_{\max}$ 3450, 2938, 2884, 1423, 1376, 1104, 1172, 1104, 1045, 796 cm⁻¹; ¹H NMR ดูตารางที่ 1.2(5); FABMS(-ve): m/z (% rel. intensity) 547[M-H]⁻(72), 530(3), 515(58), 501(13), 457(8), 381(6), 339(15), 253(4).

20-ECD 20,22-acetonide 2,3,14-trimethyl ether [1.2(20)] : IR: $V_{\max}$ 3481, 2973, 1670, 1376, 1315, 1108 cm^{-1} ; ^1H NMR ดูตารางที่ 1.2(5); ESMS: m/z (% rel. intensity) 585 $[\text{M}+\text{Na}]^+(100)$; Anal. Calcd. for $\text{C}_{33}\text{H}_{54}\text{O}_7 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$: C, 69.31; H, 9.69. Found: C, 69.49; H, 9.35.

(9) 20-ECD 2-methyl ether [1.2(21)], 20-ECD 3-methyl ether [1.2(22)], 20-ECD 2,14-dimethyl ether [1.2(23)] และ 20-ECD 2,3,14-trimethyl ether [1.2(24)]

นำสาร 1.2(17), 1.2(18), 1.2(19)-และ 1.2(20) แต่ละชนิด มากำจัดหมู่ป้องกัน acetonide โดยวิธีการเดียวกับที่ใช้มาข้างต้น ได้สารผลิตภัณฑ์ 1.2(21) (78%), 1.2(22) (76%), 1.2(23) (74%) และ 1.2(24) (55%)

20-ECD 2-methyl ether [1.2(21)] : IR: $V_{\max}$ 3436, 2967, 1655, 1382, 1087 cm^{-1} ; ^1H NMR ดูตารางที่ 1.2(6); ESMS: m/z (% rel. intensity) 517 $[\text{M}+\text{Na}]^+(100)$, 495 $[\text{M}+\text{H}]^+(8)$; Anal. Calcd. for $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$: C, 65.60; H, 9.44. Found: C, 65.16; H, 9.09.

20-ECD 3-methyl ether [1.2(22)] : IR: $V_{\max}$ 3414, 2967, 1642, 1379, 1088 cm^{-1} ; ^1H NMR ดูตารางที่ 1.2(6); ESMS: m/z (% rel. intensity) 517 $[\text{M}+\text{Na}]^+(100)$; Anal. Calcd. for $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$: C, 65.60; H, 9.44. Found: C, 65.92; H, 8.96.

20-ECD 2,14-dimethyl ether [1.2(23)] : IR: $V_{\max}$ 3528, 3448, 2966, 1657, 1474, 1383, 1286, 1148, 1099, 1041 cm^{-1} ; ^1H NMR ดูตารางที่ 1.2(6); ESMS: m/z (% rel. intensity) 531 $[\text{M}+\text{Na}]^+(100)$.

20-ECD 2,3,14-trimethyl ether [1.2(24)] : IR: $V_{\max}$ 3448, 2967, 1656, 1459, 1373, 1103, 1067 cm^{-1} ; ^1H NMR ดูตารางที่ 1.2(7); ESMS: m/z (% rel. intensity) 545 $[\text{M}+\text{Na}]^+(100)$.

(10) 20-ECD 20,22-acetonide 2-ethyl ether [1.2(27)] และ 20-ECD 20,22-acetonide 3-ethyl ether [1.2(28)]

นำ 20-ECD 20,22-acetonide [1.2(16)] (239 มิลลิกรัม) มาทำปฏิกิริยา ethylation ตามวิธีเดียวกับปฏิกิริยา ethylation ของ 20-ECD 2,3-acetonide [1.2(9)] แล้วทำสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการเดียวกัน ได้สาร 1.2(28) (18%) และสาร 1.2(27) (50%) ตามลำดับ

20-ECD 20,22-acetonide 2-ethyl ether [1.2(27)] : IR: $V_{\max}$ 3436, 2976, 1640, 1444, 1377, 1109 cm^{-1} ; ^1H NMR ดูตารางที่ 1.2(8); ESMS: m/z (% rel. intensity) 571[M+Na] $^+$ (100), 549[M+H] $^+$ (35).

20-ECD 20,22-acetonide 3-ethyl ether [1.2(28)] : IR: $V_{\max}$ 3436, 2974, 1656, 1450, 1372, 1105 cm^{-1} ; ^1H NMR ดูตารางที่ 1.2(8); ESMS: m/z (% rel. intensity) 571[M+Na] $^+$ (100), 549[M+H] $^+$ (16).

(11) 20-ECD 2-ethyl ether [1.2(25)]

นำสาร 20-ECD 20,22-acetonide 2-ethyl ether [1.2(27)] มากำจัดหมู่ acetonide ออกไปโดยวิธีการเดียวกับข้างต้น ได้สาร 1.2(25) (61%)

20-ECD 2-ethyl ether [1.2(25)] : IR: $V_{\max}$ 3448, 2969, 1665, 1447, 1382, 1319, 1089 cm^{-1} ; ^1H NMR ดูตารางที่ 1.2(7); ESMS: m/z (% rel. intensity) 531[M+Na] $^+$ (100).

(12) 20-ECD 3-ethyl ether [1.2(26)]

นำสาร 20-ECD 20,22-acetonide 3-ethyl ether [1.2(28)] มากำจัดหมู่ acetonide ออกไปโดยวิธีการเดียวกับข้างต้น ได้สาร 1.2(26) (71%)

20-ECD 3-ethyl ether [1.2(26)] : IR: $V_{\max}$ 3436, 2968, 1655, 1449, 1382, 1115 cm^{-1} ; ^1H NMR ดูตารางที่ 1.2(7); ESMS: m/z (% rel. intensity) 531[M+Na] $^+$ (100); Anal. Calcd. for $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: C, 63.95; H, 9.62. Found: C, 64.10; H, 9.29.

(13) 20-ECD 2,22-dimethyl ether [1.2(29)] และ 20-ECD 3,22-dimethyl ether [1.2(30)]

นำ 20-ECD [1(1)] มาทำปฏิกิริยาภายใต้สภาวะการ methylation ดังกล่าวข้างต้น เกิดสารผลิตภัณฑ์ ซึ่งเมื่อทำการแยกด้วย Chromatotron ตามปกติ ได้สารผลิตภัณฑ์ตามลำดับ

ดังนี้ 1.2(30) (9%), 1.2(29) (18%) และยังได้สารผลิตภัณฑ์ที่เคยสังเคราะห์มาแล้วคือ 20-ECD 3-methyl ether [1.2(22)] (8%), 20-ECD 2-methyl ether [1.2(21)] (6%) และ 20-ECD 22-methyl ether [1.2(8)] (2%)

ตามลำดับ

20-ECD 2,22-dimethyl ether [1.2(29)] : IR: $V_{\max}$ 3450, 2967, 1656, 1382, 1098 cm^{-1} ; ^1H NMR ดูตารางที่ 1.2(8); ESMS: m/z (% rel. intensity) 531[M+Na] $^+$ (100).

20-ECD 3,22-dimethyl ether [1.2(30)] : IR: $V_{\max}$ 3448, 2968, 1655, 1466, 1382, 1152, 1089 cm^{-1} ; ^1H NMR ดูตารางที่ 1.2(9); ESMS: m/z (% rel. intensity) 531[M+Na] $^+$ (100).

(14) 20-ECD 2,3,22-trimethyl ether [1.2(31)], 20-ECD 2,14,22-trimethyl ether [1.2(35)] และ 20-ECD 2,3,14,22-tetramethyl ether [1.2(36)]

ตั้งต้นจาก 20-ECD 2,22-dimethyl ether [1.2(29)] ทำปฏิกิริยา methylation เช่นเดียวกับปฏิกิริยาข้างต้นที่ผ่านมา แล้วแยกสารผลิตภัณฑ์ออกจากกันตามปกติ ได้สารผลิตภัณฑ์ตามลำดับดังนี้ สาร 1.2(36) (17%), สาร 1.2(35) (26%) และ 1.2(31) (32%)

20-ECD 2,3,22-trimethyl ether [1.2(31)] : IR: $V_{\max}$ 3449, 2967, 1655, 1459, 1380, 1319, 1101 cm^{-1} ; ^1H NMR ดูตารางที่ 1.2(9); ESMS: m/z (% rel. intensity) 545 [M+Na] $^+$ (100); Anal. Calcd. for $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_7\cdot\text{H}_2\text{O}$: C, 66.64; H, 9.69. Found; C, 67.01; H, 9.29.

20-ECD 2,14,22-trimethyl ether [1.2(35)] : IR: $V_{\max}$ 3422, 2961, 2826, 1654, 1466, 1387, 1277, 1144, 1106, 1038 cm^{-1} ; ^1H NMR ดูตารางที่ 1.2(10); ESMS: m/z (% rel. intensity) 545 [M+Na] $^+$ (100).

20-ECD 2,3,14,22-tetramethyl ether [1.2(36)] : IR: $V_{\max}$ 3482, 2968, 1664, 1459, 1382, 1317, 1102 cm^{-1} ; ^1H NMR ดูตารางที่ 1.2(10); ESMS: m/z (% rel. intensity) 559 [M+Na] $^+$ (100).

(15) 20-ECD 2,22-diethyl ether [1.2(32)] และ 20-ECD 3,22-diethyl ether [1.2(33)]

ตั้งต้นจาก 20-ECD 22-methyl ether [1.2(14)] ทำปฏิกิริยา ethylation เช่นเดียวกับปฏิกิริยาข้างต้นที่ผ่านมา แล้วแยกสารผลิตภัณฑ์ด้วย Chromatotron ได้สารผลิตภัณฑ์ตามลำดับดังนี้ สาร 1.2(33) (16%) และสาร 1.2(32) (47%)

20-ECD 2,22-diethyl ether [1.2(32)] : IR: $\nu_{\max}$ 3449, 2970, 1664, 1655, 1598, 1384, 1089 cm^{-1} ; ^1H NMR ดูตารางที่ 1.2(9); ESMS: m/z (% rel. intensity) 559 $[\text{M}+\text{Na}]^+(100)$.

20-ECD 3,22-diethyl ether [1.2(33)] : IR: $\nu_{\max}$ 3448, 2967, 2922, 1655, 1086 cm^{-1} ; ^1H NMR ดูตารางที่ 1.2(10); ESMS: m/z (% rel. intensity) 559 $[\text{M}+\text{Na}]^+(76)$.

ตารางที่ 1.2(1) ^1H NMR data ของสาร 1.2(4), 1.2(5), และ 1.2(7)

H	1.2(4) ^a	1.2(5) ^b	1.2(7) ^b
2	4.23 (<i>m</i>)	4.23 (<i>m</i>)	4.29 (<i>m</i>)
3	4.41 (<i>br s</i>)	4.26 (<i>br s</i>)	4.34 (<i>m</i>)
5	3.04 (<i>dd</i> , 13.7, <i>ca</i> 3)	2.36 (<i>dd</i> , 12.5, 4.7)	2.44 (<i>dd</i> , 11.7, 4.7)
7	6.01 (<i>d</i> , 2.4)	5.83 (<i>d</i> , 2.2)	5.84 (<i>d</i> , 2.1)
9	2.97 (<i>m</i>)	2.80 (<i>m</i>)	2.50 (<i>m</i>)
17	2.71 (<i>dd</i> , 9.1, 8.8)	2.22 (<i>t</i> , 8)	2.25 (<i>t</i> , 8.5)
22	3.81 (<i>br d</i> , 6.1)	3.65 (<i>d d</i> , 9.5, 2.5)	3.69 (<i>dd</i> , 9.1, 2.4)
18-Me	1.14 (<i>s</i>)	0.78 (<i>s</i>)	0.88 (<i>s</i>)
19-Me	1.02 (<i>br s</i>)	0.98 (<i>s</i>)	1.10 (<i>s</i>)
21-Me	1.51 (<i>s</i>)	1.16 (<i>s</i>)	1.21 (<i>s</i>)
26-Me	1.39 (<i>s</i>)	1.24 (<i>s</i>)	1.31 (<i>s</i>)
27-Me	1.39 (<i>s</i>)	-1.25 (<i>s</i>)	1.32 (<i>s</i>)
Acetonide Me	-	1.33, 1.41, 1.33, 1.49	1.39, 1.40, 1.48,
1.57		(each <i>s</i>)	(each <i>s</i>)
14-OCH ₃	2.89 (<i>s</i>)	-	3.04 (<i>s</i>)

^aRecorded in pyridine-*d*₅.

^bRecorded in CDCl₃.

ตารางที่ 1.2(2) ^1H NMR data ของสาร 1.2(8), 1.2(9) และ 1.2(10)

H	1.2(8) ^a	1.2(9) ^a	1.2(10) ^b
2	4.18 (<i>m</i>)	4.17 (<i>m</i>)	4.19 (<i>m</i>)
3	4.22 (<i>br s</i>)	4.08 (<i>br s</i>)	4.23 (<i>br s</i>)
5	2.09 (<i>dd</i> , 13.2, 3.5)	2.55 (<i>m</i>) [*]	2.31 (<i>d</i> , 12.6, 4.7)
7	6.24 (<i>d</i> , 2.1)	6.20 (<i>d</i> , 2)	5.79 (<i>d</i> , 2.1)
9	3.56 (<i>m</i>)	3.15 (<i>m</i>)	2.79 (<i>m</i>)
17	2.86 (<i>t</i> , 9.1)	3.00 (<i>t</i> , 8.9)	2.25 (<i>t</i> , 9)
22	3.26 (<i>dd</i> , 8.8, ca 1)	3.87 (<i>br d</i> , 8.1)	2.93 (<i>dd</i> , 8.7, 2.6)
18-Me	1.18 (<i>s</i>)	1.19 (<i>s</i>)	0.84 (<i>s</i>)
19-Me	1.06 (<i>br s</i>)	0.99 (<i>s</i>)	0.95 (<i>s</i>)
21-Me	1.51 (<i>s</i>)	1.60 (<i>s</i>)	1.15 (<i>s</i>)
26-Me	1.37 (<i>s</i>)	1.35 (<i>s</i>)	1.19 (<i>s</i>)
27-Me	1.38 (<i>s</i>)	1.35 (<i>s</i>)	1.21 (<i>s</i>)
Acetonide Me	-	1.31, 1.55 (each <i>s</i>)	1.29, 1.45 (each <i>s</i>)
14-OCH ₃	-	-	-
22-OCH ₃	3.61 (<i>s</i>)	-	3.46 (<i>s</i>)

^aRecorded in pyridine-*d*₅.

^bRecorded in CDCl₃.

^{*}Obscured by other signals

ตารางที่ 1.2(3) ^1H NMR data ของสาร 1.2(11), 1.2(13) และ 1.2(14)

H	1.2(11) ^a	1.2(13) ^b	1.2(14) ^b
2	4.18 (m)	4.23 (m)	4.19 (m)
3	4.24 (m)	4.40 (br s)	4.23 (br s)
5	2.34 (dd, 11.7, 4.7)	3.03 (br d, 10.6)	3.01 (dd, 13.1, 3.5)
7	5.75 (d, 2.4)	6.01 (d, 2.4)	6.25 (d, 2.1)
9	2.41 (m)	2.95 (m)	3.57 (m)
17	2.22 (dd, 9.4, 8.8)	2.58 (dd, 9.1, 8.5)	2.88 (t, 9)
22	2.91 (dd, 8.5, 2.7)	3.21 (dd, 8.5, 2.1)	3.37 (br d, 8.5)
18-Me	0.86 (s)	1.12 (s)	1.18 (s)
19-Me	1.00 (s)	1.03 (s)	1.07 (s)
21-Me	1.14 (s)	1.44 (s)	1.51 (s)
26-Me	1.21 (s)	1.41 (s)	1.38 (s)
27-Me	1.22 (s)	1.42 (s)	1.39 (s)
Acetonide Me	1.30, 1.46 (each s)	-	-
14-OCH ₃	2.93 (s)	2.89 (s)	-
22-OCH ₃	3.46 (s)	3.59 (s)	-
22-OCH ₂ CH ₃			1.17 (t, 7) 3.75 (m) 3.89 (m)

^aRecorded in CDCl₃.

^bRecorded in pyridine-*d*₅.

ตารางที่ 1.2(4) ^1H NMR data ของสาร 1.2(15), 1.2(16) และ 1.2(17)

H	1.2(15)	1.2(16)	1.2(17)
2	4.19 (m)	3.80 (m)	3.39 (m)
3	4.24 (br s)	4.03 (br s)	4.11 (br s)
5	2.32 (dd, 12.6, 4.6)	2.39 (m)*	2.41 (dd, 13.4, 3.9)
7	5.80 (d, 2.1)	5.84 (d, 2.1)	5.79 (d, 2.7)
9	2.78 (m)	2.97 (m)	2.95 (m)
17	2.24 (d, 8.7)	2.39 (m)*	2.18*
22	3.03 (dd, 8.7, 2.4)	3.60 (m)	3.61 (dd, 8.5, 2.1)
18-Me	0.84 (s)	0.78 (s)	0.74 (s)
19-Me	0.96 (s)	0.96 (s)	0.92 (s)
21-Me	1.17 (s)	1.15 (s)	1.11 (s)
26-Me	1.20 (s)	1.20 (s)	1.173 (s)
27-Me	1.22 (s)	1.29 (s)	1.179 (s)
Acetonide Me	1.31, 1.47 (each s)	1.32, 1.36 (each s)	1.27, 1.36 (each s)
2-OCH ₃			3.35 (s)
22-OCH ₂ CH ₃	1.20 (t, 6.8)		
	3.54 (m)		
	3.69 (m)		
22-OAc		2.02 (s)	

Recorded in CDCl₃.

*Signals within the same column denote partially overlapping signals.

*Partially superimposed signal.

ตารางที่ 1.2(5) ^1H NMR data ของสาร 1.2(18), 1.2(19) และ 1.2(20)

H	1.2(18)	1.2(19)	1.2(20)
2	3.80 (m)	3.37 (m)	3.37 (m)
3	3.53 (br s)	4.15 (br s)	3.71 (br s)
5	2.25 (dd, 13.6, 3.5)	2.48 (dd, 13.1, 3.9)	2.35 (dd, 13.3, 3.6)
7	5.85 (d, 2.1)	5.77 (d, 2.4)	5.78 (d, 2.1)
9	2.99 (m)	2.57 (m)	2.62 (m)
17	*	2.17 (t, 8.7)	2.16 (t, 8.5)
22	3.64 (d, 7.6)	3.61 (dd, 9.4, 2.4)	3.60 (dd, 11.8, 2.6)
18-Me	0.78 (s)	0.81 (s)	0.80 (s)
19-Me	0.95 (s)	0.97 (s)	0.97 (s)
21-Me	1.16 (s)	1.13 (s)	1.12 (s)
26-Me	1.23 (s)	1.22 (s)	1.22 (s)
27-Me	1.24 (s)	1.23 (s)	1.23 (s)
Acetonide Me	1.32, 1.41 (each s)	1.30, 1.38 (each s)	1.30, 1.38 (each s)
2-OCH ₃	-	3.39 (s)	3.39 (s)*
3-OCH ₃	3.39 (s)	-	3.38 (s)*
14-OCH ₃	-	2.94 (s)	2.93 (s)

Recorded in CDCl₃.

*Obscured signal.

ตารางที่ 1.2(6) ^1H NMR data ของสาร 1.2(21), 1.2(22) และ 1.2(23)

H	1.2(21)	1.2(22)	1.2(23)
2	3.48 (<i>m</i>)	4.09 (<i>m</i>)	3.59 (<i>m</i>)
3	4.25 (<i>br s</i>)	3.53 (<i>br s</i>)	4.44 (<i>br s</i>)
5	3.00 [*]	2.61 (<i>dd</i> , 13.2, 3.8)	3.05 (<i>dd</i> , 13.1, 3.1)
7	6.25 (<i>d</i> , 2.4)	6.24 (<i>d</i> , 2.4)	6.02 (<i>d</i> , 2.4)
9	3.52 (<i>m</i>)	3.53 (<i>m</i>)	2.94 (<i>m</i>)
17	3.01 (<i>t</i> , 9.1)	2.99 (<i>dd</i> , 9.1, 8.8)	2.74 (<i>t</i> , 8.8)
22	3.88 (<i>d</i> , 9.7)	3.87 (<i>dd</i> , 9.7, 3)	3.83 (<i>br d</i> , 9.1)
18-Me	1.22 (<i>s</i>)	1.20 (<i>s</i>)	1.16 (<i>s</i>)
19-Me	1.05 (<i>s</i>)	1.02 (<i>s</i>)	1.01 (<i>s</i>)
21-Me	1.61 (<i>s</i>)	1.58 (<i>s</i>)	1.54 (<i>s</i>)
26-Me	1.36 (<i>s</i>)	1.36 (<i>s</i>)	1.40 (<i>s</i>)
27-Me	1.36 (<i>s</i>)	1.36 (<i>s</i>)	1.40 (<i>s</i>)
2-OCH ₃	3.30 (<i>s</i>)	-	3.35 (<i>s</i>)
3-OCH ₃	-	3.34 (<i>s</i>)	-
14-OCH ₃	-	-	2.92 (<i>s</i>)

Recorded in pyridine-*d*₅.

^{*}Obscured signal.

ตารางที่ 1.2(7) ^1H NMR data ของสาร 1.2(24), 1.2(25) และ 1.2(26)

H	1.2(24) ^a	1.2(25) ^b	1.2(26) ^c
2	3.70 (<i>br s</i>)	3.49 (<i>m</i>)	4.10 (<i>m</i>)
3	3.35 (<i>m</i>)	4.07 (<i>br s</i>)	3.64 (<i>br s</i>)
5	2.33 (<i>dd</i> , 13.2, 3.8)	2.41 (<i>dd</i> , 13.2, 3.8)	2.67 (<i>dd</i> , 13.2, 3.8)
7	5.77 (<i>d</i> , 2.4)	5.78 (<i>d</i> , 2.1)	6.24 (<i>d</i> , 2.4)
9	2.62 (<i>m</i>)	2.96 (<i>m</i>)	3.54 (<i>m</i>)
17	2.27 (<i>t</i> , 9.1)	2.29 (<i>dd</i> , 9.1, 8.5)	2.99 (<i>t</i> , 9.1)
22	3.35 (<i>d</i> , 1.5)	3.35 (<i>dd</i> , 9.4, 1.2)	3.87 (<i>br d</i> , 8.8)
18-Me	0.87 (<i>s</i>)	0.81 (<i>s</i>)	1.20 (<i>s</i>)
19-Me	0.96 (<i>s</i>)	0.92 (<i>s</i>)	1.01 (<i>s</i>)
21-Me	1.16 (<i>s</i>)	1.15 (<i>s</i>)	1.58 (<i>s</i>)
26-Me	1.20 (<i>s</i>)	1.18 (<i>s</i>)	1.36 (<i>s</i>)
27-Me	1.21 (<i>s</i>)	1.18 (<i>s</i>)	1.36 (<i>s</i>)
2-OCH ₃	3.37 (<i>s</i>)*		
3-OCH ₃	3.36 (<i>s</i>)*		
14-OCH ₃	2.92 (<i>s</i>)		
2-OCH ₂ CH ₃		1.18 (<i>t</i> , 7) 3.49 (<i>m</i>) 3.57 (<i>m</i>)	-
3-OCH ₂ CH ₃			1.09 (<i>t</i> , 7) 3.49 (<i>m</i>) 3.60 (<i>m</i>)

^aRecorded in CDCl₃+CD₃OD.

^bRecorded in CDCl₃.

^cRecorded in pyridine-*d*₅.

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

ตารางที่ 1.2(8) ^1H NMR data ของสาร 1.2(27), 1.2(28) และ 1.2(29)

H	1.(27)	1.2(28)	1.2(29)
2	3.50 (<i>m</i>)	3.75 (<i>m</i>)	3.41 (<i>m</i>)
3	4.10 (<i>br s</i>)	3.61 (<i>br s</i>)	4.14 (<i>br s</i>)
5	2.45 (<i>dd</i> , 13.1, 3.8)	2.26 (<i>dd</i> , 13.7, 3.5)	2.45 (<i>dd</i> , 13.4, 3.9)
7	5.82 (<i>d</i> , 1.9)	5.83 (<i>d</i> , ca 2)	5.83 (<i>d</i> , 2.7)
9	2.94 (<i>m</i>)	2.96 (<i>m</i>)	2.96 (<i>m</i>)
17	2.20 (<i>dd</i> , 9, 8.3)	2.19 (<i>dd</i> , 9.1, 8)	2.27 (<i>dd</i> , 9.1, 8.8)
22	3.61*	3.63*	2.94 (<i>dd</i> , 8.5, 2.7)
18-Me	0.77 (<i>s</i>)	0.76 (<i>s</i>)	0.86 (<i>s</i>)
19-Me	0.94 (<i>s</i>)	0.94 (<i>s</i>)	0.96 (<i>s</i>)
21-Me	1.14 (<i>s</i>)	1.14 (<i>s</i>)	1.17 (<i>s</i>)
26-Me	1.21 (<i>s</i>)	1.21(<i>s</i>)	1.21 (<i>s</i>)
27-Me	1.22 (<i>s</i>)	1.22 (<i>s</i>)	1.22 (<i>s</i>)
Acetonide Me	1.30, 1.38 (each <i>s</i>)	1.30, 1.39 (each <i>s</i>)	
2-OCH ₃			3.37 (<i>s</i>)
3-OCH ₃			-
22-OCH ₃			3.47 (<i>s</i>)
2-OCH ₂ CH ₃	1.19 (<i>t</i> , 7) 3.50 (<i>m</i>) 3.60 (<i>m</i>)	-	
3-OCH ₂ CH ₃	-	1.19 (<i>d</i> , 6.9) 3.31 (<i>m</i>) 3.70 (<i>m</i>)	

Recorded in CDCl₃.

*Obscured signals.

ตารางที่ 1.2(9) ^1H NMR data ของสาร 1.2(30), 1.2(31) และ 1.2(32)

H	1.2(30) ^a	1.2(31) ^a	1.2(32) ^b
2	3.75 (m)	3.40 (m)	3.51 (m)
3	3.48 (br s)	3.68 (br s)	4.10 (br s)
5	2.21 (dd, 13.4, 3.9)	2.30 (dd, 13.4, 3.6)	2.46 (dd, 13.2, 3.8)
7	5.81 (d, 2.4)	5.82 (t, 2.4)	5.83 (d, 2.4)
9	2.97 (m)	3.00 (m)	2.96 (m)
17	2.20 (t, 8.8)	2.21 (dd, 9.7, 8.2)	2.27 (t, 8.5)
22	2.91 (dd, 8.8, 2.4)	2.92 (dd, 8.5, 2.4)	3.04 (dd, 8.7, 2.5)
18-Me	0.82 (s)	0.83 (s)	0.86 (s)
19-Me	0.92 (s)	0.94 (s)	0.96 (s)
21-Me	1.14 (s)	1.15 (s)	1.18 (s)
26-Me	1.17 (s)	1.17 (s)	1.21 (s)
27-Me	1.19 (s)	1.20 (s)	1.22 (s)
2-OCH ₃	-	3.36 (s)*	
3-OCH ₃	3.35 (s)	3.34 (s)*	
14-OCH ₃			
22-OCH ₃	3.45 (s)	3.45 (s)	
2-OCH ₂ CH ₃			1.19 (t, 7) ^c 3.50 (m) ^d 3.52 (m) ^d
22-OCH ₂ CH ₃			1.20 (t, 7) ^c 3.59 (m) ^d 3.69 (m) ^d

^aRecorded in CDCl₃+CD₃OD.

^bRecorded in CDCl₃.

^{c,d}Assignments may be reversed for signals with the same superscript.

ตารางที่ 1.2(10) ^1H NMR data ของสาร 1.2(33), 1.2(35) และ 1.2(36)

H	1.2(33)	1.2(35)	1.2(36)
2	3.75 (m)	3.33 (m)	3.34 (m)
3	3.61 (br s)	4.12 (br s)	3.69 (br s)
5	2.25 (dd, 13.7, 3.9)	2.42 (dd, 13.2, 3.8)	2.32 (dd, 13.4, 3.6)
7	5.82 (d, 2.4)	5.73 (d, 2.1)	5.76 (d, 2.1)
9	2.97 (m)	*	2.60 (m)
17	2.23 (t, ca 9)	2.18 (dd, 9.4, 8.8)	2.19 (dd, 9.4, 8.5)
22	3.03 (dd, 8.7, 2.3)	2.88 (dd, 8.5, 2.1)	2.89 (dd, 8.5, 2.4)
18-Me	0.84 (s)	0.85 (s)	0.86 (s)
19-Me	0.94 (s)	0.94 (s)	0.95 (s)
21-Me	1.17 (s)	1.12 (s)	1.13 (s)
26-Me	1.19 (s)	1.16 (s)	1.18 (s)
27-Me	1.21 (s)	1.17 (s)	1.19 (s)
2-OCH ₃	-	3.35 (s)	3.36 (s) ^c
3-OCH ₃		-	3.35 (s) ^c
14-OCH ₃		2.89 (s)	2.91 (s)
22-OCH ₃	-	3.43 (s)	3.44 (s)
2-OCH ₂ CH ₃			
3-OCH ₂ CH ₃	1.18 (t, 7) ^a 3.33 (m) ^b 3.53 (m) ^b		
22-OCH ₂ CH ₃	1.20 (t, 7) ^a 3.67 (m) ^b 3.69 (m) ^b		

Recorded in CDCl₃+CD₃OD.^{a-c} Assignments may be reversed for signals with the same superscript.

*Obscured signal

Table 1.2(11) Bioassay of Ecdysteroid **1(1)** and 16% EtOH with Positive and Negative Controls in Ligated *Musca* Larvae

Compound	Conc µg/3 µl	Amount	Number Pupariation				Dead	Surviving	%Effectiveness	EC ₅₀
			Complete	Marked	Slight	None				
20-Hydroxyecdysone [1(1)]	0.010	10	-	1	1	8	-	10	12.50	1.658 x 10 ⁻⁵ M
	0.025	10	4	1	2	3	-	10	57.50	
	0.050	10	10	-	-	-	-	10	92.50	
	0.100	10	10	-	-	-	-	10	100	
	0.250	10	10	-	-	-	-	10	100	
16% EtOH	-	10	-	-	-	10	-	0	0	-

Table 1.2(12) Bioassay of Synthetic Ecdysteroid 1.2(4) in Ligated *Musca* Larvae

Compound	Conc μg/3 μl	Amount	Complete	Number Pupariation Marked	Slight	None	Dead	Surviving	%Effectiveness	EC ₅₀
20-Hydroxyecdysone	0.100	10	-	-	-	10	-	10	0	6.000 x 10 ⁻⁴ M
14-methyl ether	0.175	10	-	-	-	10	-	10	0	
[1.2(4)]	0.250	10	-	-	-	10	-	10	0	
	0.500	10	4	-	-	6	-	10	40.00	
	0.600	10	3	1	-	5	1	9	41.67	
	0.800	10	3	-	3	1	3	7	50.00	
	1.000	10	6	1	1	2	-	10	72.50	
	5.000	10	9	-	-	-	1	9	100	

Table 1.2(13) Bioassay of Synthetic Ecdysteroid **1(6)** in Ligated *Musca* Larvae

Compound	Conc μg/3 μl	Amount	Complete	Number Pupariation			Dead	Surviving	%Effectiveness	EC ₅₀
				Marked	Slight	None				
20-Hydroxyecdysone	0.0050	10	-	-	-	9	1	9	0	2.060 x 10 ⁻⁵ M
22-acetate	0.0075	10	-	-	-	10	-	10	0	
[1(6)]	0.0100	10	1	1	1	7	-	10	22.50	
	0.0175	10	2	1	-	6	1	9	30.56	
	0.0250	10	1	1	4	3	1	9	41.67	
	0.0500	10	5	3	-	-	2	8	90.63	
	0.1000	10	10	-	-	-	-	10	100	
	0.1750	10	10	-	-	-	-	10	100	
	0.2500	10	10	-	-	-	-	10	100	
	1.0000	10	10	-	-	-	-	10	100	

Table 1.2(14) Bioassay of Synthetic Ecdysteroid **1.2(8)** in Ligated *Musca* Larvae

Compound	Conc µg/3 µl	Amount	Number Pupariation			%Effectiveness			EC ₅₀
			Complete	Marked	Slight	None	Dead	Surviving	
20-Hydroxyecdysone	0.010	10	1	-	3	6	-	10	2.554 x 10 ⁻⁵ M
22-methyl ether	0.025	10	1	4	-	5	-	10	
[1.2(8)]	0.050	10	4	2	-	1	3	7	78.57
	0.100	10	9	-	-	-	1	9	100
	0.175	10	9	-	-	-	1	9	100
	0.250	10	10	-	-	-	-	10	100
	0.500	10	10	-	-	-	-	10	100

Table 1.2(15) Bioassay of Synthetic Ecdysteroid **1.2(14)** in Ligated *Musca* Larvae

Compound	Conc µg/3 µl	Amount	Number Pupariation				Dead	Surviving	%Effectiveness	EC ₅₀
			Complete	Marked	Slight	None				
20-Hydroxyecdysone	0.0100	10	-	-	-	9	1	9	0	2.375 x 10 ⁻⁵ M
22-ethyl ether	0.0175	10	-	1	1	8	-	10	12.50	
[1.2(14)]	0.0250	10	1	2	-	7	-	10	25.00	
	0.0500	10	6	1	2	1	-	10	77.50	
	0.1000	10	8	2	-	-	-	10	95.00	
	0.1750	10	10	-	-	-	-	10	100	
	0.2500	10	9	-	-	-	1	9	100	
	0.500	10	10	-	-	-	-	10	100	

Table 1.2(16) Bioassay of Synthetic Ecdysteroid **1.2(21)** in Ligated *Musca* Larvae

Compound	Conc µg/3 µl	Amount	Number Pupariation				Dead	Surviving	%Effectiveness	EC ₅₀
			Complete	Marked	Slight	None				
20-Hydroxyecdysone	0.0100	10	1	1	-	7	1	9	19.44	1.204 x 10 ⁻⁵ M
2-methyl ether	0.0175	10	3	2	2	3	-	10	55.00	
[1.2(21)]	0.0250	10	7	-	3	-	-	10	85.00	
	0.0500	10	10	-	-	-	-	10	100	
	0.1000	10	10	-	-	-	-	10	100	
	0.1750	10	10	-	-	-	-	10	100	
	0.2500	10	10	-	-	-	-	10	100	
	1.0000	10	9	-	-	-	-	9	100	
	5.0000	10	9	-	-	-	-	9	100	

Table 1.2(17) Bioassay of Synthetic Ecdysteroid 1.2(22) in Ligated *Musca* Larvae

Compound	Conc μg/3 μl	Amount	Number Pupariation				%Effectiveness		EC ₅₀
			Complete	Marked	Slight	None	Dead	Surviving	
20-Hydroxyecdysone 3-methyl ether [1.2(22)]	0.0100	10	-	-	1	9	-	10	5.00
	0.0175	10	2	-	-	8	-	10	20.00
	0.0250	10	6	1	1	2	-	10	72.50
	0.0500	10	7	1	-	2	-	10	77.50
	0.1000	10	10	-	-	-	-	10	100
	0.1750	10	10	-	-	-	-	10	100
	0.2500	10	10	-	-	-	-	10	100
	1.0000	10	10	-	-	-	-	10	100
	5.0000	10	10	-	-	-	-	10	100

1.460 x 10⁻⁵ M

Table 1.2(18) Bioassay of Synthetic Ecdysteroid **1.2(25)** in Ligated *Musca* Larvae

Compound	Conc µg/3 µl	Amount	Complete	Marked	Slight	None	Dead	Surviving	%Effectiveness	EC ₅₀
20-Hydroxyecdysone	0.0100	10	1	-	-	8	1	9	11.11	5.230 x 10 ⁻⁶ M
2-ethyl ether	0.0175	10	6	1	-	2	1	9	75.00	
[1.2(25)]	0.0250	10	5	2	1	1	1	9	77.77	
	0.0500	10	8	2	-	-	-	10	95.00	
	0.1000	10	10	-	-	-	-	10	100	
	0.1750	10	10	-	-	-	-	10	100	
	0.2500	10	10	-	-	-	-	10	100	
	1.0000	10	10	-	-	-	-	10	100	
	5.0000	10	10	-	-	-	-	10	100	

Table 1.2(19) Bioassay of Synthetic Ecdysteroid **1.2(26)** in Ligated *Musca* Larvae

Compound	Conc μg/3 μl	Amount	Complete	Number Pupariation			Dead	Surviving	%Effectiveness	EC ₅₀
				Marked	Slight	None				
20-Hydroxyecdysone	0.0100	10	-	-	-	6	4	6	0	1.023 x 10 ⁻⁵ M
3-ethyl ether	0.0175	10	-	2	-	4	4	6	25.00	
[1.2(26)]	0.0250	10	4	1	-	3	2	8	59.38	
	0.0500	10	6	-	-	2	2	8	75.00	
	0.1000	10	9	-	1	-	-	10	95.00	
	0.1750	10	9	-	-	-	1	9	100	
	0.2500	10	8	-	-	-	2	8	100	
	1.0000	10	9	-	-	-	1	9	100	
	5.0000	10	9	-	-	-	1	9	100	

Table 1.2(20) Bioassay of Synthetic Ecdysteroid **1.2(29)** in Ligated *Musca* Larvae

Compound	Conc	Amount	Number Pupariation				%Effectiveness		EC ₅₀
	µg/3 µl		Complete	Marked	Slight	None	Dead	Surviving	
20-Hydroxyecdysone	0.0100	10	3	-	1	4	2	8	43.75
2,22-dimethyl ether	0.0250	10	4	-	3	1	2	8	68.75
[1.2(29)]	0.0500	10	9	1	-	-	-	10	97.50
	0.1000	10	10	-	-	-	-	10	100
	0.2500	10	9	-	-	-	1	9	100
									1.683 x 10 ⁻⁵ M

Table 1.2(21) Bioassay of Synthetic Ecdysteroid **1.2(30)** in Ligated *Musca* Larvae

Compound	Conc μg/3 μl	Amount	Complete	Marked	Slight	None	Dead	Surviving	%Effectiveness	EC ₅₀
20-Hydroxyecdysone	0.0100	10	2	-	-	8	2	8	25.00	1.452 x 10 ⁻⁵ M
3,22-dimethyl ether	0.0175	10	2	1	2	5	-	10	37.50	
[1.2(30)]	0.0250	10	6	2	-	2	-	10	75.00	
	0.0500	10	6	-	2	-	2	8	87.50	
	0.1000	10	10	-	-	-	-	10	100	
	0.1750	10	10	-	-	-	-	10	100	
	0.2500	10	10	-	-	-	-	10	100	
	0.5000	10	10	-	-	-	-	10	100	
	1.0000	10	10	-	-	-	-	10	100	

Table 1.2(22) Bioassay of Synthetic Ecdysteroid 1.2(32) in Ligated *Musca* Larvae

Compound	Conc µg/3 µl	Amount	Complete	Number Pupariation Marked	Slight	None	Dead	Surviving	%Effectiveness	EC ₅₀
20-Hydroxyecdysone	0.0025	10	-	-	-	8	2	8	0	9.375 x 10 ⁻⁶ M
2,22-diethyl ether	0.0050	10	-	-	-	10	-	10	0	
[1.2(32)]	0.0075	10	1	-	2	7	-	10	20.00	
	0.0150	10	4	-	2	2	2	8	62.50	
	0.0160	10	7	-	-	3	-	10	70.00	
	0.0175	10	10	-	-	-	-	10	100	
	0.0250	10	10	-	-	-	-	10	100	
	0.0500	10	10	-	-	-	-	10	100	
	0.1000	10	10	-	-	-	-	10	100	
	0.1750	10	10	-	-	-	-	10	100	
	0.2500	10	10	-	-	-	-	10	100	

Table 1.2(23) Bioassay of Synthetic Ecdysteroid 1.2(33) in Ligated *Musca* Larvae

Compound	Conc µg/3 µl	Amount	Complete	Marked	Slight	None	Dead	Surviving	%Effectiveness	EC ₅₀
20-Hydroxyecdysone	0.0025	10	-	-	-	10	-	10	0	8.915 x 10 ⁻⁶ M
3,22-diethyl ether	0.0050	10	-	-	-	10	-	10	0	
[1.2(33)]	0.0075	10	-	-	-	10	-	10	0	
	0.0100	10	-	-	-	8	2	8	0	
	0.0140	10	-	-	-	10	-	10	0	
	0.0150	10	-	-	1	9	-	10	5.00	
	0.0175	10	2	-	1	7	-	10	25.00	
	0.0250	10	2	-	5	3	-	10	45.00	
	0.0500	10	5	-	5	-	-	10	75.00	
	0.1000	10	10	-	-	-	-	10	100	
	0.2500	10	10	-	-	-	-	10	100	

Table 1.2(24) Bioassay of Synthetic Ecdysteroid **1.2(31)** in Ligated *Musca* Larvae

Compound	Conc µg/3 µl	Amount	Number Pupariation				Surviving		%Effectiveness	EC ₅₀
			Complete	Marked	Slight	None	Dead	Surviving		
20-Hydroxyecdysone	0.0005	10	-	-	-	7	3	7	0	2.715 x 10 ⁻⁶ M
2,3,22-trimethyl ether [1.2(31)]	0.0010	10	-	-	-	9	1	9	0	
	0.0025	10	-	-	-	8	2	8	0	
	0.0050	10	3	-	-	6	1	9	33.33	
	0.0075	10	5	2	1	-	2	8	87.50	
	0.0100	10	8	-	1	-	1	9	94.44	
	0.0175	10	10	-	-	-	-	10	100	
	0.0250	10	10	-	-	-	-	10	100	
	0.0500	10	10	-	-	-	-	10	100	
	0.1000	10	10	-	-	-	-	10	100	
	0.1750	10	10	-	-	-	-	10	100	
	0.2500	10	10	-	-	-	-	10	100	
	0.5000	10	10	-	-	-	-	10	100	
	1.0000	10	10	-	-	-	-	10	100	
	5.0000	10	10	-	-	-	-	10	100	

Table 1.2(25) Bioassay of Synthetic Ecdysteroid 1.2(13) in Ligated *Musca* Larvae

Compound	Conc µg/3 µl	Amount	Number Pupariation				Dead	Surviving	%Effectiveness	EC ₅₀
			Complete	Marked	Slight	None				
20-Hydroxyecdysone	0.050	10	-	-	-	10	-	10	0	4.000 x 10 ⁻⁴ M
14,22-dimethyl ether	0.100	10	-	-	-	10	-	10	0	
[1.2(13)]	0.175	10	-	-	-	10	-	10	0	
	0.250	10	-	-	-	10	-	10	0	
	0.300	10	-	-	-	10	-	10	0	
	0.400	10	2	-	1	7	-	10	25.00	
	0.500	10	4	-	1	5	-	10	45.00	
	0.600	10	5	-	2	3	-	10	60.00	
	0.700	10	6	1	2	1	-	10	77.50	
	0.900	10	10	-	-	-	-	10	100	
	1.000	10	7	-	-	-	3	7	100	
	5.000	10	10	-	-	-	-	10	100	

Table 1.2(26) Bioassay of Synthetic Ecdysteroid **1.2(23)** in Ligated *Musca* Larvae

Compound	Conc	Amount	Number Pupariation				%Effectiveness		EC ₅₀
	µg/3 µl		Complete	Marked	Slight	None	Dead	Surviving	
20-Hydroxyecdysone	0.0100	10	-	-	-	10	-	10	2.000 x 10 ⁻⁴ M
2,14-dimethyl ether	0.0175	10	-	-	-	9	*1	9	0
[1.2(23)]	0.0250	10	-	-	-	10	-	10	0
	0.0500	10	-	-	-	9	1	9	0
	0.1000	10	-	-	-	10	-	10	0
	0.1750	10	-	-	-	10	-	10	0
	0.2500	10	-	-	-	10	-	10	0
	0.5000	10	2	-	1	7	-	10	25.00
	0.6000	10	6	-	1	3	-	10	65.00
	0.8000	10	8	1	-	1	-	10	87.50
	1.0000	10	9	-	-	1	-	10	90.00
	5.0000	10	9	-	-	-	1	9	100

Table 1.2(27) Bioassay of Synthetic Ecdysteroid **1.2(35)** in Ligated *Musca* Larvae

Compound	Conc µg/3 µl	Amount	Complete	Marked	Slight	None	Dead	Surviving	%Effectiveness	EC ₅₀
20-Hydroxyecdysone	0.100	10	-	-	-	10	-	10	0	6.188 x 10 ⁻⁵ M
2,14,22-trimethyl ether	0.135	10	2	-	-	8	-	10	20.00	
[1.2(35)]	0.165	10	6	1	-	3	-	10	67.50	
	0.175	10	7	-	-	3	-	10	70.00	
	0.250	10	8	-	1	1	-	10	85.00	
	0.500	10	10	-	-	-	-	10	100	
	0.700	10	10	-	-	-	-	10	100	
	1.000	10	10	-	-	-	-	10	100	
	5.000	10	10	-	-	-	-	10	100	

Table 1.2(28) Bioassay of Synthetic Ecdysteroid **1.2(24)** in Ligated *Musca* Larvae

Compound	Conc µg/3 µl	Amount	Number Pupariation				%Effectiveness		EC ₅₀
			Complete	Marked	Slight	None	Dead	Surviving	
20-Hydroxyecdysone	0.0100	10	-	-	-	10	-	10	0
2,3,14-trimethyl ether	0.0175	10	-	-	-	10	-	10	0
[1.2(24)]	0.0250	10	-	-	-	10	-	10	0
	0.0500	10	-	-	-	9	1	9	0
	0.1000	10	-	-	-	10	-	10	0
	0.1750	10	-	-	-	10	-	10	0
	0.2500	10	-	-	-	9	1	9	0
	0.5000	10	-	1	-	7	2	8	9.38
	0.6000	10	4	1	1	3	1	9	58.33
	0.7000	10	7	-	-	1	2	8	87.50
	1.0000	10	8	-	-	1	1	9	88.88
	5.0000	10	10	-	-	-	-	10	100

4.000 x 10⁻⁴ M

Table 1.2(29) Bioassay of Synthetic Ecdysteroid **1.2(36)** in Ligated *Musca* Larvae

Compound	Conc µg/3 µl	Amount	Complete	Marked	Slight	None	Dead	Surviving	%Effectiveness	EC ₅₀
20-Hydroxyecdysone	0.100	10	-	-	2	8	-	10	10.00	1.000 x 10 ⁻⁴ M
2,3,14,22-tetramethyl ether	0.175	10	3	2	-	5	-	10	45.00	
[1.2(36)]	0.250	10	5	2	1	2	-	10	70.00	
	0.500	10	9	-	-	-	1	10	100	
	1.000	10	10	-	-	-	-	10	100	
	5.000	10	10	-	-	-	-	10	100	

2) การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่ตำแหน่ง 22: การเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 22 ให้เป็นอนุพันธ์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง

(1) การสังเคราะห์ 20-Hydroxyecdysone 22-palmitate [1.2(38)]

ละลาย 20-hydroxyecdysone 2,3-acetonide [1.2(4)] (40 มิลลิกรัม) ใน pyridine (1.5 มิลลิลิตร) และเบนซีน (3 มิลลิลิตร) คนส่วนผสมในอ่างน้ำแข็ง แล้วเติมสารละลายของ palmitoyl chloride ในเบนซีน (25% V/V) ลงไปอย่างช้าๆ พร้อมทั้งคน และตรวจสอบความก้าวหน้าของปฏิกิริยาด้วย TLC หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมน้ำลงไป แล้วสกัดด้วย CHCl_3 3 ครั้ง ล้างชั้น CHCl_3 ด้วยน้ำ 2 ครั้ง ทำชั้นสารอินทรีย์ให้แห้งด้วย anhydrous Na_2SO_4 แล้วทำสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ตัวชะตั้งแต่ CHCl_3 ตามด้วย CHCl_3 -MeOH โดยเพิ่มอัตราส่วนของ MeOH เรื่อยๆ fraction ที่ใช้ตัวชะ CHCl_3 -MeOH (98:2) ได้ 20-hydroxyecdysone 2,3-acetonide 22-palmitate (51 มิลลิกรัม, 87%) ซึ่งเมื่อนำส่วนหนึ่ง (41 มิลลิกรัม) ไปทำ deacetonation โดยตรงด้วย 70% AcOH ได้ 20-hydroxyecdysone 22-palmitate [1.2(38)] (38 มิลลิกรัม, 98%)

20-Hydroxyecdysone 22-palmitate [1.2(38)]: ν_{max} : 3442, 2992, 2852, 1713, 1651, 1465, 1378, 1227, 1054, 950, 721 cm^{-1} ; ^1H NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): δ 0.84 (3 H, s, $\text{OCOCH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$), 1.04 (3 H, s, 19- CH_3), 1.17 (3 H, s, 18- CH_3), 1.20 (26 H, br m, $\text{OCOCH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$), 1.35 (3 H, s, 26- CH_3), 1.36 (3 H, s, 27- CH_3), 1.65 (3 H, s, 21- CH_3), 2.42 (2 H, t, $J = 6.8$ Hz, OCOCH_2), 3.00 (2 H, m, H-5 and H-17), 3.57 (1 H, m, H-9), 4.16 (1 H, m, H-2), 4.21 (1 H, br s, H-3), 5.53 (1 H, br d, $J = 9.2$ Hz, H-22), 6.22 (1 H, d, $J = 1.8$ Hz, H-7); HR-FABMS (+ve) m/z : 719.5462. $\text{C}_{43}\text{H}_{74}\text{O}_8 + \text{H}$ requires 719.5461.

(2) การสังเคราะห์ 20-Hydroxyecdysone 22-glycolate [1.2(43)]

เข้สารละลาย 20-hydroxyecdysone 2,3-acetonide [1.2(9)] (90 มิลลิกรัม) ใน pyridine (1.5 มิลลิลิตร) และเบนซีน (3 มิลลิลิตร) ในอ่างน้ำแข็ง พร้อมทั้งคน หยดสารละลายของ glycolyl chloride (HOCH_2COCl) ในเบนซีนลงไปอย่างช้าๆ และคนส่วนผสมตลอดเวลาตรวจสอบความก้าวหน้าของปฏิกิริยาด้วย TLC work up ปฏิกิริยาตามปกติ และแยกสาร

ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ CHCl_3 -MeOH เป็นตัวชะ แยกสารได้ 3 กลุ่ม นำสารกลุ่มสุดท้าย มาทำให้บริสุทธิ์ได้สารผลิตภัณฑ์ 20-hydroxyecdysone 2,3-acetonide 22-glycolate (17 มิลลิกรัม, 17%) ซึ่งนำไปใช้ในการกำจัดหมู่ acetonation โดยตรงด้วย 70% AcOH โดยใช้สารตั้งต้น 10 มิลลิกรัม ได้สารผลิตภัณฑ์ [1.2(43)] (8 มิลลิกรัม, 84%)

20-Hydroxyecdysone 22-glycolate [1.2(43)]: ν_{max} : 3398, 2964, 1733, 1648, 1444, 1381, 1226, 1054 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD): δ 0.88 (3 H, s, 18- CH_3), 0.95 (3 H, s, 19- CH_3), 1.16 (3 H, s, 26- CH_3), 1.17 (3 H, s, 27- CH_3), 1.28 (3 H, s, 21- CH_3), 2.38 (2 H, m, H-5 and H-17), 3.15 (1 H, m, H-9), 3.81 (1 H, m, H-2), 3.85 (1 H, br s, H-3), 4.14 (1 H, d, $J = 17.1$ Hz, OCOCHaCHb), 4.21 (1 H, d, $J = 17.1$ Hz, OCOCHaCHb), 4.93 (1 H, dd, $J = 10.7, 2.1$ Hz, H-22), 5.80 (1 H, d, $J = 2.4$ Hz, H-7); HR-FABMS (+ve) m/z : 539.3227. $\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{O}_9 + \text{H}$ requires 539.3220.

(3) การสังเคราะห์ 20-Hydroxyecdysone 22-acetylglycolate [1.2(44)]

ใช้วิธีการเตรียมคล้ายคลึงกับสารการเตรียมสาร [1.2(43)] แต่ใช้ acetylglycolic acid แทน glycolic acid กรดชนิดแรกเตรียมจากกรดชนิดหลังโดยการทำ acetylation แล้วเตรียมให้เป็น acid chloride คือ acetylglycolyl chloride ($\text{AcOCH}_2\text{COCl}$) เมื่อทำปฏิกิริยากับ 20-hydroxyecdysone 2,3-acetonide [1.2(9)] ได้สารผลิตภัณฑ์ 20-hydroxyecdysone 2,3-acetonide 22-acetylglycolate (86%) ซึ่งนำไปกำจัดหมู่ acetonide ออกไปได้สารผลิตภัณฑ์[1.2(44)] (84%)

20-Hydroxyecdysone 22-acetylglycolate [1.2(44)]: ν_{max} : 3428, 2964, 1742, 1646, 1444, 1384, 1208, 1055 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD): δ 0.88 (3 H, s, 18- CH_3), 0.95 (3 H, s, 19- CH_3), 1.16 (3 H, s, 26- CH_3), 1.17 (3 H, s, 27- CH_3), 1.28 (3 H, s, 21- CH_3), 2.12 (3 H, s, OCOCH_3), 2.37 (2 H, m, H-5 and H-17), 3.15 (1 H, m, H-9), 3.82 (1 H, m, H-2), 3.95 (1 H, m, H-3), 4.68 (2 H, s, OCOCH_2), 4.94 (1 H, dd, $J = 10.4, 1.8$ Hz, H-22), 5.80 (1 H, d, $J = 2.1$ Hz, H-7); HR-FABMS (+ve) m/z : 581.3321. $\text{C}_{31}\text{H}_{48}\text{O}_{10} + \text{H}$ requires 581.3325.

(4) การสังเคราะห์ 20-Hydroxyecdysone 22-chloroacetate [1.2(45)]

ใช้วิธีการเตรียมคล้ายคลึงกับสารการเตรียมสาร [1.2(43)] โดยใช้ acid chloride เป็น chloroacetyl chloride (ClCH_2COCl) ได้สารผลิตภัณฑ์ [1.2(45)] ที่ต้องการ 75% overall yield จาก 2,3-acetonide 1.2(9)

20-Hydroxyecdysone 22-chloroacetate [1.2(45)] : ν_{max} : 3394, 2966, 2870, 1715, 1649, 1444, 1382, 1227, 1143, 1058 cm^{-1} ; ^1H NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): δ 1.02 (3 H, s, 19- CH_3), 1.16 (3 H, s, 18- CH_3), 1.24 (3 H, s, 26- CH_3), 1.33 (3 H, s, 27- CH_3), 1.78 (3 H, s, 21- CH_3), 2.87 (1 H, t, $J = 8.8$ Hz, H-17), 2.97 (1 H, dd, $J = 13.3, 3.4$ Hz, H-5), 3.53 (1 H, m, H-9), 4.15 (1 H, m, H-2), 4.21 (1 H, m, H-3), 5.58 (1 H, br d, $J = 10.4$ Hz, H-22), 6.15 (1 H, d, $J = 2.4$ Hz, H-7), 6.74 (1 H, d, $J = 16.3$ Hz, OCOCHaCHb), 7.46 (1 H, d, $J = 16.3$ Hz, OCOCHaCHb); HR-FABMS (+ve) m/z : 557.2881. $\text{C}_{29}\text{H}_{45}\text{ClO}_8 + \text{H}$ requires 557.2881.

ตารางที่ 1.2(30) EC_{50} * ของ ecdysteroids

Compound	EC_{50} (molar)
1(1)	1.6×10^{-5}
1(3)	6.9×10^{-4}
1(4)	1.9×10^{-5}
1(6)	2.1×10^{-5}
1.2(13)	2.5×10^{-5}
1.2(14)	2.4×10^{-5}
1.2(38)	3.1×10^{-5}
1.2(40)	7.6×10^{-6}
1.2(41)	5.4×10^{-5}
1.2(42)	1.4×10^{-4}
1.2(43)	3.1×10^{-6}
1.2(44)	5.8×10^{-6}
1.2(45)	2.8×10^{-5}

* ความเข้มข้นของสารละลายเอคโตสเตียรอยด์ ที่แสดง

% Effectiveness ในการเข้าตักแต่เป็น 50% (ปริมาตรที่ใช้

3 μ l ต่อ larva 1 ตัว)

3) การสังเคราะห์ 2-Dehydro-3-*epi*-20-hydroxyecdysone [1.2(100)]

(1) Chromium trioxide-pyridine oxidation ของ 20-ECD 2-acetate 20,22-acetonide [1(8)]

เติมสารละลายของสาร 1(8) (30 มิลลิกรัม) ใน dry CH_2Cl_2 (1.5 มิลลิลิตร) ลงในสารละลายของ CrO_3 (267 มิลลิกรัม) ใน dry pyridine (0.5 มิลลิลิตร) และ dry CH_2Cl_2 (6 มิลลิลิตร) คนส่วนผสมของปฏิกิริยาเป็นเวลา 3 นาที ระเหยตัวทำละลายออกภายใต้สุญญากาศที่อุณหภูมิไม่เกิน 40 °ซ เติม EtOAc (60 มิลลิลิตร) กรองตะกอนออกไปเติมสารละลาย 10% NaHSO_3 ลงในชั้น EtOAc พร้อมทั้งคนตลอดเวลา จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากสีเหลืองอ่อนไปเป็นสีเขียวอ่อน ล้างชั้น EtOAc ด้วยน้ำ (3x30 มิลลิลิตร) ตู้น้ำที่เหลือนด้วย anhydrous Na_2SO_4 ระเหยตัวทำละลาย ได้ crude product (21 มิลลิกรัม) แยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีได้ 3-dehydro-20-ECD 2-acetate 20,22-acetonide [1(9)] (13 มิลลิกรัม, 43%) และ 20-ECD 2-acetate 20,22-acetonide 3 α ,9 β -epoxide [1.2(102)] (7 มิลลิกรัม, 23 %)

3-Dehydro-20-ECD 2-acetate 20,22-acetonide [1(9)]: Mp. 235-237 °ซ จาก EtOAc-hexane; IR: ν_{max} 3440, 2970, 1731, 1678, 1452, 1372, 1324, 1244, 1170, 1105, 1042, 1000, 923, 756 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): ตารางที่ 1.2(100); EIMS: m/z (% rel. intensity) 467 [$\text{M}-\text{AcOH}-\text{H}_2\text{O}-\text{Me}$] $^+$ (1), 449 (3), 403 (4), 385 (12), 341 (13), 283 (3).

20-ECD 2-acetate 20,22-acetonide 3 α ,9 β -epoxide [1.2(102)] : IR: ν_{max} 3468, 2972, 1738, 1678, 1445, 1372, 1323, 1243, 1169, 1105, 1042, 998, 922, 871 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): ตารางที่ 1.2(100); ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 17.6 (C18), 20.8 (acetate Me), 21.1 (C11), 21.2 (C19)^a, 21.9 (C21)^a, 23.5 (C16), 26.8 (acetonide Me), 27.9, 28.0, 28.2, 30.5 (C4, C12, C15, C23), 28.9 (acetonide Me)^b, 29.2 (C26)^b, 29.3 (C27)^b, 36.4 (C10), 39.0 (C1), 41.2 (C24), 46.9 (C13), 48.6 (C17), 50.5 (C5), 70.3 (C25), 70.7 (C2), 78.4 (C20), 82.0 (C22), 84.3 (C14), 86.0 (C9), 96.6 (C3), 106.9 (acetonide C), 122.1 (C7), 157.9 (C8), 171.3 (acetate CO), 200.6 (C6), ^{a,b}Assignments may be reversed for signals with the same superscript; ESMS (+ve): m/z 599 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$; ESMS (-ve): 575 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$. Anal. Calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{O}_9$: C, 66.67; H, 8.33. Found: C, 66.82; H, 8.33.

(2) การเปลี่ยน 3-Dehydro-20-ECD 2-acetate 20,22-acetonide [1(9)]
ไปเป็น 2-Dehydro-3-*epi*-20-ECD 2-acetate 20,22-acetonide [1.2(112)]

เติม silica gel (Merck's silica gel 60, 0.063-0.200 มิลลิเมตร, 500 มิลลิกรัม) ลงในสารละลายของสาร 1(9) (20 มิลลิกรัม) ใน MeOH-CHCl₃ (1:10, 4 มิลลิลิตร) และคนส่วนผสมเป็นเวลา 10 ชั่วโมง กรองส่วนผสม ระเหยตัวทำละลายออกไป นำส่วนที่เหลือมาแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้สาร 1.2(112) (9 มิลลิลิตร) และสารตั้งต้น 1(9) (7 มิลลิกรัม) นำสาร 1(9) มาทำปฏิกิริยา isomerization ซ้ำอีกครั้งหนึ่ง แล้วแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้สารผลิตภัณฑ์ 1.2(112) (2 มิลลิกรัม) และสารตั้งต้น 1(9) (2 มิลลิกรัม) ปริมาณผลผลิตรวมของ 1.2(112) คือ 61% เทียบกับสารตั้งต้นที่ไม่สามารถนำกลับคืนมา

2-Dehydro-3-*epi*-20-ECD 2-acetate 20,22-acetonide [1.2(112)]:
IR: $\nu_{\max}$ 3496, 1735, 1714, 1652 cm⁻¹ ; ¹H NMR (CDCl₃): ตารางที่ 1.2(100);
FABMS (-ve): m/z 559.3269 [M-H]⁻. C₃₂H₄₈O₈-H requires 559.3270.

(3) การกำจัดหมู่ Acetonide ของสาร 1.2(112)

ละลายสาร 1.2(112) (55 มิลลิกรัม) ใน EtOH (0.5 มิลลิลิตร) เติม 70% AcOH (3 มิลลิลิตร) แล้วคนส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ 45 °C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง เติมน้ำลงไป (100 มิลลิลิตร) แล้วสกัดส่วนผสมด้วย EtOAc (3x50 มิลลิลิตร) ล้างชั้น EtOAc ด้วยน้ำ ทำให้แห้ง ได้สารผลิตภัณฑ์ 2-dehydro-3-*epi*-20-ECD 2-acetate [1.2(115)] (40 มิลลิกรัม) โดยบางส่วนจะถูกนำไปใช้ในปฏิกิริยาต่อไปเลย

(4) Deacetylation ของสาร 2-Dehydro-3-*epi*-20-ECD 2-acetate [1.2(115)]

ผสมสารละลายของสาร 1.2(115) (25 มิลลิกรัม) ใน EtOH (1 มิลลิลิตร) และ 10% guanidine acetate (1 มิลลิลิตร) และคนที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 2 วัน เติมน้ำ (50 มิลลิลิตร) สกัดส่วนผสมด้วย *n*-BuOH (4x30 มิลลิลิตร) นำชั้นสารอินทรีย์มาล้างด้วยน้ำ โดยการกลั่นร่วมออกไปกับน้ำภายใต้ความดันต่ำ ทำสารให้บริสุทธิ์ด้วย reversed-phase column chromatography (Merck's silica gel 60 RP-18 (40-63 μm) for preparative HPLC) ใช้ H₂O-MeOH เป็นตัวชะ Fraction ที่ชะด้วย H₂O-MeOH (7:3) ได้สารผลิตภัณฑ์ 1.2(100) (9 มิลลิกรัม, 35% overall จาก 1.2(112))

2-Dehydro-3-*epi*-20-hydroxyecdysone [1.2(100)]: IR: $\nu_{\max}$ 3400, 2964, 2830, 1718, 1662, 1552, 1453, 1383, 1315, 1208, 1072 cm⁻¹ ; ¹H NMR

(pyridine- d_5): ตารางที่ 1.2(100); ^{13}C NMR (pyridine- d_5): δ 17.7 (C18), 20.8 (C11), 21.3 (C16), 21.5 (C21), 22.9 (C19), 27.4 (C23), 29.8 (C26), 30.1 (C27), 31.4 (C15), 31.7 (C12), 36.1 (C4 and C9), 42.5 (C24), 42.9 (C10), 48.0 (C13), 49.1 (C1), 49.9 (C17), 55.7 (C5), 69.5 (C25), 74.8 (C3), 76.7 (C20), 77.4 (C22), 83.9 (C14), 121.1 (C7), 165.1 (C8), 200.3 (C6), 209.9 (C2); ESMS(+ve): m/z 501.

ตารางที่ 1.2(100) ¹H NMR data ของสาร 1(9) และ 1.2(100)

H	1(9) ^a	1.2(100) ^b
1α		2.38 (d, 13.7)
1β		2.73 (d, 13.7)
2	5.07 (dd, 12.5, 5.5)	-
3	-	4.58 (dd, 11.9, 7) W _{1/2} = 21 Hz
5	2.73 (dd, 12.5, 5.5)	2.86 (dd, 13.2, 4.1)
7	5.91 (br s)	6.20 (d, 2.1)
9	2.63 (m)*	3.27 (m)
17	2.28 (t, 8.7)	2.92 (t, 9)
22	3.64 (dd, 9.4, 2.1)	3.84 (br d, 9.6)
18-Me	0.76 (s)	1.16 (s)
19-Me	1.07 (s) [*]	1.07 (s)
21-Me	1.11 (s) [*]	1.53 (s)
26-Me	1.22 (s)	1.37 (s)
27-Me	1.23 (s)	1.38 (s)
Acetonide Me	1.30, 1.39 (each s)	-
AcO	2.12 (s)	-

^aRecorded in CDCl₃.

^bRecorded in pyridine-*d*₅.

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

*Obscured signal.

ตารางที่ 1.2(101) ^1H NMR data ของสาร 1.2(102) และ 1.2(112)

H	1.2(102)	1.2(112)
1 α		2.22 (d, 13.9)
1 β		2.59 (d, 13.9)
2	4.86 (br d, ca 9)	-
3	-	5.18 (dd, 12.5, 7) $W_{1/2} = 21$ Hz
5	*	2.58 (dd, 13.2, 4.1)
7	5.91 (s)	5.82 (d, 2.4)
9	-	2.72 (m)
17	2.22 (t, 9)	*
22	3.66 (br d, ca 8)	3.58 (dd, 9.4, 2.1)
18 - Me	0.77 (s)	0.72 (s)
19-Me	0.99 (s)	1.03 (s)
21-Me	1.15 (s)	1.08 (s)
26-Me	1.22 (s)	1.16 (s)
27-Me	1.24 (s)	1.17 (s)
Acetonide Me	1.33, 1.41 (each s)	1.25, 1.34 (each s)
AcO	2.10 (s)	2.08 (s)

Recorded in CDCl_3 .

*Obscured signal.

4) Stereoselective catalytic hydrogenation ของ ระบบ 7-en-6-one ของเอเคโดสเตีย รอยด์ โดยมี sodium nitrite อยู่ด้วย

(1) Catalytic hydrogenation ของสาร 1.2(116)

เติม 10% Pd-C (450 มิลลิกรัม) และ 25% aqueous NaNO₂ (1.8 มิลลิลิตร) ลงในสารละลายของสาร 1.2(116) (150 มิลลิกรัม) ใน EtOH (5 มิลลิลิตร) และส่วนผสมถูกไฮโดรจีเนตที่ความดันบรรยากาศ โดยใช้ลูกโป่งบรรจุก๊าซไฮโดรเจน กรองส่วนผสมผ่าน อลูมินาคอลัมน์ที่สั้น ล้าง residue ด้วย EtOH และระเหยตัวทำละลายออกไป ทำสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วย silica column chromatography ที่สั้น ได้ 7,8-dihydro-20-hydroxyecdysone [1.2(118)] (145 มิลลิกรัม, 96%) เป็น colourless needles (จาก MeOH), mp. 153–155 °C; IR: $\nu_{\max}$ 3429, 2963, 1699, 1382, 1323, 1273, 1225, 1152, 1128, 1064, 950 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, C₅D₅N) δ 1.35 (s, 2×3H, 26-Me and 27-Me), 1.53 (s, 3H, 18-Me), 1.54 (s, 3H, 21-Me), 1.56 (1H, H-15a),^a 1.68 (s, 3H, 19-Me), 1.70 (1H, H-1 β),^a 1.85 (1H, H-1 α),^a 2.08 (1H, H-16a),^a 2.10 (1H, H-15b),^a 2.20 (1H, H-4 β),^a 2.46 (1H, H-16b),^a 2.53 (1H, H-9),^a 2.54 (dd, J = 14.6, 4.5 Hz, 1H, H-7 α), 2.56 (2H, H-4 α and H-5),^a 2.72 (dt, J = 14.6, 4.5 Hz, 1H, H-8), 2.92 (t, J = 14.6 Hz, 1H, H-7 β), 2.96 (dd, J = 9.4, 8.5 Hz, 1H, H-17), 3.86 (br d, J = 9.4 Hz, 1H, H-22), 4.27 (m, $W_{1/2}$ = 9 Hz, 1H, H-2), 4.32 (m, $W_{1/2}$ = 20 Hz, 1H, H-3),^a obscured signal; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 1.14 (s, 3H, 21-Me), 1.17 (s, 2×3H, 18-Me and 26-Me), 1.18 (s, 3H, 27-Me), 1.37 (s, 3H, 19-Me), 1.45 (1H, H-1 β),^b 1.65 (1H, H-1 α),^b 1.77 (1H, H-4 β),^b 1.78 (1H, H-24a),^b 2.00 (1H, H-4 α),^b 2.24 (dd, J = 14.4, 4.4 Hz, 1H, H-7 α), 2.30 (t, J = 9.3 Hz, 1H, H-17), 2.36 (dt, J = 14.4, 4.4 Hz, 1H, H-8), 2.51 (br s, $W_{1/2}$ = 10 Hz, 1H, H-5), 2.77 (t, J = 14.4 Hz, H-7 β), 3.28 (1H, H-22),^b 3.75 (m, $W_{1/2}$ = 20 Hz, 1H, H-3), 3.90 (m, $W_{1/2}$ = 10 Hz, 1H, H-2),^b obscured signal; ¹³C NMR (100 MHz, C₅D₅N) δ 19.1 (C-

18), 19.2 (C-11), 21.2 (C-21), 21.6 (C-16), 26.6 (C-4), 27.5 (C-23), 27.7 (C-19), 30.0 (C-26), 30.2 (C-27), 31.7 (C-15), 34.4 (C-12), 39.7 (C-10), 40.4 (C-1), 41.6 (C-9), 41.8 (C-7), 42.6 (C-24), 43.6 (C-8), 48.0 (C-13), 50.3 (C-17), 51.7 (C-5), 67.5 (C-3), 69.6 (C-25), 70.5 (C-2), 76.9 (C-20), 77.6 (C-22), 83.9 (C-14), 212.4 (C-6); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 19.1 (C-18), 19.7 (C-11), 20.5 (C-21), 21.5 (C-16), 26.5 (C-4), 27.3 (C-23), 27.7 (C-19), 28.9 (C-26), 29.6 (C-27), 31.8 (C-15), 34.8 (C-12), 40.2 (C-10), 40.7 (C-1), 41.7 (C-9), 42.1 (C-7), 42.4 (C-24), 43.9 (C-8), 48.5 (C-13), 50.6 (C-17), 52.3 (C-5), 68.2 (C-3), 70.8 (C-2), 71.3 (C-25), 78.0 (C-20), 78.5 (C-22), 85.5 (C-14), 215.1 (C-6); HMBC correlations ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): H-2 (C-3, C-4, C-10), H-7 β (C-6, C-8, C-14), H-8 (C-6, C-9, C-13), H-17 (C-12, C-13, C-14, C-16, C-18, C-21), 18-Me (C-12, C-13, C-14, C-17), 19-Me (C-5, C-9, C-10), 21-Me (C-17, C-20), H-22 (C-20, C-21, C-23, C-24), 26-Me (C-24, C-25, C-27), 27-Me (C-24, C-25, C-26); HMBC correlations (CD_3OD): H-1 (C-2), H-2 (C-3, C-10), H-4 α (C-3, C-6), H-4 β (C-2, C-6), H-5 (C-3, C-6, C-10), H-7 α (C-8, C-14), H-7 β (C-6, C-8, C-14), H-8 (C-6, C-9, C-13, C-14), H-17 (C-13, C-14, C-16), 18-Me (C-12, C-13, C-14, C-17), 19-Me (C-5, C-9, C-10), 21-Me (C-17, C-20), H-22 (C-20, C-21, C-23), 26-Me (C-24, C-25, C-27), 27-Me (C-24, C-25, C-26); FABMS (negative ion mode) m/z 481 $[\text{M}-\text{H}]^-$. Anal. Calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: C, 62.52; H, 9.72. Found: C, 62.32; H, 9.91.

(2) Catalytic hydrogenation ของสาร 1.2(117), 1.2(122) และ 1.2(124)

นำสาร 1.2(117), 1.2(122) และ 1.2(124) มาไฮโดรจีเนตเช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น โดยใช้สภาวะตามข้อ 2-4 ในตาราง 1.2(102) ได้สาร 1.2 (121), 1.2(123) และ 1.2 (125) ตามลำดับ

7,8-Dihydroponasterone A [1.2(121)]: 14 มิลลิกรัม (93%) จาก 15 มิลลิกรัมของสาร 1.2(117). Colourless needles (acetone), mp. 201-203 °C; IR: $\nu_{\max}$ 3438, 2953, 1701, 1383, 1064 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ 0.79 (d, J = 6.5 Hz, 3H, 26-Me), 0.81 (d, J = 6.5 Hz, 3H, 27-Me), 1.54 (s, 2×3H, 18-Me and 21-Me), 1.67 (s, 3H, 19-Me), 2.55 (dd, J = 14.6, 4.5 Hz, 1H, H-7 α), 2.73 (dt, J = 14.6, 4.5 Hz, 1H, H-8), 2.90 (t, J = 9.1 Hz, H-17), 2.93 (t, J = 14.6 Hz, H-7 β), 3.79 (br d, J = 9.7 Hz, 1H, H-22), 4.27 (m, $W_{1/2}$ = 9 Hz, 1H, H-2), 4.33 (m, $W_{1/2}$ = 20 Hz, 1H, H-3); HRFABMS (negative ion mode) m/z 465.3217 $[\text{M}-\text{H}]^-$. $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}_6$ -H requires 465.3216.

7,8-Dihydropterosterone [1.2(123)]: 11.5 มิลลิกรัม (88%) จาก 13 มิลลิกรัมของสาร 1.2(122). Amorphous; IR: $\nu_{\max}$ 3418, 2925, 1697, 1465, 1383, 1064 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ 0.99 (d, J = 6.7 Hz, 3H, 26-Me), 1.00 (d, J = 6.7 Hz, 3H, 27-Me), 1.52 (s, 3H, 18-Me), 1.55 (s, 3H, 21-Me), 1.67 (s, 3H, 19-Me), 2.55 (dd, J = 14.5, 4.3 Hz, 1H, H-7 α), 2.73 (ddd, J = 14.5, 4.3, 4 Hz, 1H, H-8), 2.88 (t, J = 8.9 Hz, H-17), 2.92 (t, J = 14.5 Hz, H-7 β), 3.92 (m, $W_{1/2}$ = 17 Hz, 1H, H-24), 4.12 (br d, J = 9.6 Hz, 1H, H-22), 4.28 (m, $W_{1/2}$ = 8 Hz, 1H, H-2), 4.32 (m, $W_{1/2}$ = 20 Hz, 1H, H-3); HRFABMS (negative ion mode) m/z 481.3161 $[\text{M}-\text{H}]^-$. $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}_7$ -H requires 481.3165.

7,8-Dihydropoststerone [1.2(125)]: 9.5 มิลลิกรัม (86%) จาก 11 มิลลิกรัมของ 1.2 (124). Colourless prisms (จาก acetone), mp. 215-217 °C; IR: $\nu_{\max}$ 3518, 3398, 3347, 3178, 2951, 2882, 1707, 1691, 1440, 1355, 1332, 1272, 1206, 1172, 1072, 1050 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ 0.92 (s, 3H, 18-Me), 1.66 (s, 3H, 19-Me), 2.09 (s, 3H, 21-Me), 2.46-2.57 (m, 4H) and 2.69-2.74 (m, 2H) (two sets of overlapping signals, H-4 α , H-5, H-7 α , H-7 β , H-8 and H-9), 3.60 (br d, J = 8.4 Hz, H-17), 4.28 and 4.30 (two partially overlapping signals, H-2 and H-3); HRFABMS (negative ion mode) m/z 363.2173 $[\text{M}-\text{H}]^-$. $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_5-\text{H}$ requires 363.2171.

(3) Catalytic hydrogenation ของสาร 1.2(126) และ 1.2(127)

นำสาร 1.2(126) และ 1.2(127) มาไฮโดรจีเนตตามที่ระบุไว้ในตาราง 1.2(102) (ข้อ 5-8) พบว่าสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ตรงกับสาร 1.2(117) และ 1.2(121) โดยการเปรียบเทียบ TLC และ ^1H NMR

(4) Catalytic hydrogenation ของสาร 1.2(128)

นำสาร 1.2(128) (20 มิลลิกรัม) มาไฮโดรจีเนตเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ได้สาร 1.2(116) (13 มิลลิกรัม, 67%) ซึ่งมีข้อมูล ^1H NMR และแมสสเปกตรัมตรงกับสาร authentic 1.2 (116).

(5) Catalytic hydrogenation ของสาร 1.2(128) โดยใช้ NaNO_2 ชนิดของแข็ง

ทำการทดลองข้างต้นซ้ำ แต่ใช้ NaNO_2 ชนิดของแข็งแทน 25% aqueous NaNO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เกิดการสูญเสียโมเลกุลของน้ำ ได้สารผลิตภัณฑ์ 1.2(129) เป็น colourless needles (จาก MeOH-EtOAc), mp. 243-244 °C (9 มิลลิกรัม, 72%) จาก 13 มิลลิกรัมของสาร 1.2

(128); IR: $\nu_{\max}$ 3379, 2963, 2923, 1660, 1648, 1617, 1465, 1383, 1370, 1148, 1051, 925 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ 1.24 (s, 2 $\times$ 3H, 18-Me and 19-Me), 1.36 (s, 2 $\times$ 3H, 26-Me and 27-Me), 1.57 (s, 3H, 21-Me), 3.05–3.10 (m, 2H, H-5 and H-17), 3.88 (br d, $J = 9.4$ Hz, 1H, H-22), 4.15 (m, 1H, H-2), 4.17 (m, $W_{1/2} = 7$ Hz, 1H, H-3), 6.20 (br s, 1H, H-7), 6.35 (br d, $J = 6.4$ Hz, 1H, H-11) ; HRFABMS (negative ion mode) m/z 477.2844 $[\text{M}-\text{H}]^-$. $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_7-\text{H}$ requires 477.2852.

ตารางที่ 1.2(102) Catalytic hydrogenation ของเอคไดสเตียรอยด์ ใน EtOH โดยใช้ Pd-C^a และมี NaNO₂ อยู่ด้วย^b

Entry	Compound	Product	Time	Yield (%) ^c
1	1.2(116)	1.2(118)	3 h	96
2	1.2(117)	1.2(121)	2.5 h	93
3	1.2(122)	1.2(123)	2 h	88
4	1.2(124)	1.2(125)	2.5 h	86
5	1.2(126)	1.2(117)	25 min	90
6	1.2(126)	1.2(121)	3 h	86
7	1.2(127)	1.2(117)	20 min	91
8	1.2(127)	1.2(121)	3 h	88

^aStarting material:10% Pd-C was 1:3 (w/w).

^b20 equivalents of 25% aq NaNO₂ has been used throughout the experiments.

^cIsolated yield.

เอกสารอ้างอิง

บทนำ

- 1[1] Lafont, R.; Wilson, I. D. *The Ecdysone Handbook*, 2nd ed.; The Chromatographic Society: Nottingham, 1996.
- 1[2] Lafont, R. *Insect Biochem.* 1991, **21**, 697.
- 1[3] Butenandt, A.; Karlson, P. Z. *Naturforsch.* 1954, **9b**, 389.
- 1[4] Horn, D. H. S.; Middleton, E. J.; Wunderlich, J. A.; Hamshire, F. *Chem. Commun.* 1966, 339.
- 1[5] Nakanishi, K.; Koreeda, M.; Sasaki, S.; Chang M. L.; Hsu, H. Y. *Chem. Commun.* 1966, 915.
- 1[6] Takemoto, T.; Ogawa S.; Nishimoto, N. *Yakugaku Zasshi* 1967, **87**, 325.
- 1[7] Camps, F. Plant Ecdysteroids and Their Interaction with Insects. In *Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids*; Harborne, J. B.; Tomas-Babaran, F. A. Eds.; Clarendon Press: Oxford, 1991; pp. 331–376.
- 1[8] Suksamrarn A.; Sommechai, C. *Phytochemistry* 1993, **32**, 303.
- 1[9] Suksamrarn, A.; Sommechai, C.; Charulpong, P.; Chitkul, B. *Phytochemistry* 1995, **38**, 473.
- 1[10] Modde, J.-F.; Lafont R.; Hoffmann, J. A. *Int. J. Invert. Reprod. Devel.* 1984, **7**, 161.
- 1[11] Garcia, M.; Girault, J.-P.; Lafont, R. *Int. J. Invert. Reprod. Devel.* 1986, **9**, 43.
- 1[12] Rees, H. H. Zooecdysteroids : Structures and Occurrence. In *Ecdysone-From Chemistry to Mode of Action*; Koolman, J. Ed.; Georg Thieme : Stuttgart, 1989; pp. 28–38.
- 1[13] Bergamasco, R.; Horn, D. H. S. The Biological Activities of Ecdysteroids and Analogues. In *Progress in Ecdysone Research*; Hoffmann, J. A. Ed.; Elsevier/North-Holland Biomedical Press: Amsterdam, 1980; pp. 299–324.

- 1[14] Robbins, W. B.; Kaplanis, J. N.; Thompson, M. J; Shortino, T. J.; Joyner, S. C. *Steroids* 1970, **16**, 105.
- 1[15] Suksamrarn, A.; Ganpinyo, P.; Sommechai, C. *Tetrahedron Lett.* 1994, **35**, 4445.
- 1[16] Galbraith, M. N.; Horn, D. H. S. *Aust. J. Chem.* 1969, **22**, 1045.
- 1[17] Suksamrarn, A.; Pattanaprateep, P. *Tetrahedron* 1995, **51**, 10633.
- 1[18] Spindler, K.-D.; Koolman, J.; Mosora, F.; Emmerlich, H. *J. Insect Physiol.* 1977, **23**, 441.
- 1[19] Lloyd-Jones, J. G.; Rees, H. H.; Goodwin, T. W. *Phytochemistry* 1973, **12**, 569.
- 1[20] Siddall, J. B.; Horn, D. H. S.; Middleton, E. J. *Chem. Commun.* 1967, 899.
- 1[21] Petersen, Q. R.; Cambie, R. C.; Russell, G. B. *Aust. J. Chem.* 1993, **46**, 1961.
- 1[22] Davies, T. G.; Lockley, W. J. S.; Boid, R.; Rees, H. H.; Goodwin, T. W. *Biochem J.* 1980, **190**, 537.
- 1[23] Greenwood, D. R.; Dinan, L. N.; Rees, H. H. *Biochem. J.* 1984, **217**, 783.
- 1[24] Girault, J.-P.; Blais, C.; Beydon, P.; Rolando, C.; Lafont, R. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 1989, **10**, 199.
- 1[25] Dinan, L.; Rees, H. H. *Steroids* 1978, **32**, 629.
- 1[26] Galbraith, M. N.; Horn, D. H. S.; Middleton, E. J.; Hackney, R. J. *Aust. J. Chem.* 1969, **22**, 1517.
- 1[27] Hedtmann, U.; Klintz, R.; Hobert, K.; Frelek, J.; Vlahov, I.; Welzei, P. *Tetrahedron* 1991, **23**, 3753.
- 1[28] Cherbas, P.; Trainor, D. A.; Stonard, R. J.; Nakanishi, K. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1982, 1307.
- 1[29] Lee, S. S.; Nakanishi, K.; Cherbas, P. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1991, 51.

- 1[30] Tomas, J.; Camps, F.; Coll, J.; Mele, E.; Pascual, N. *Tetrahedron* 1992, **48**, 9809.
- 1[31] Galbraith, M. N.; Horn, D. H. S.; Middleton, E. J.; Hackney, R. J. *Aust. J. Chem.* 1969, **22**, 1059.
- 1[32] Kametani, T.; Tsubuki, M.; Higurashi, K.; Honda, T. *J. Org. Chem.* 1986, **51**, 2932.
- 1[33] Suksamrarn, A.; Yingyongnarongkul, B. *Tetrahedron* 1996, **52**, 12623.
- 1[34] Suksamrarn, A.; Yingyongnarongkul, B. *Tetrahedron* 1997, **53**, 3145.
- 1[35] Suksamrarn, A.; Charoensuk, S.; Yingyongnarongkul, B. *Tetrahedron* 1996, **52**, 10673.
- 1[36] Siddall, J. B.; Marshall, J. P.; Bowers, A.; Cross, A. D.; Edwards, J. A.; Fried, J. H. *J. Am. Chem. Soc.* 1966, **88**, 862.
- 1[37] Mori, H.; Shibata, K.; Tsuneda, K.; Sawai, M. *Chem. Pharm. Bull. (Japan)* 1968, **16**, 563.
- 1[38] Furlenmeier, A.; Furst, A.; Langemann, A.; Waldvogel, Y.; Hocks, P.; Kerb, U.; Wiechert, R. *Helv. Chim. Acta* 1967, **50**, 2387.
- 1[39] Barton, D. H. R.; Feakins, P. G.; Poyser, J. P.; Sammes, P. G. *J. Chem. Soc. (C)* 1970, 1584.
- 1[40] Ogawa, S.; Nishimoto, N.; Okamoto, N.; Takemoto, T. *Yakugaku Zasshi* 1971, **91**, 916.
- 1[41] Suksamrarn, A.; Promrangsarn, N.; Chitkul, B.; Homvisasevongsa, S.; Sirikate, A. *Phytochemistry* 1997, **45**, 1149.
- 1[42] Yingyongnarongkul, B.; Suksamrarn, A. *Tetrahedron* 1998, **54**, 2795.
- 1[43] Suksamrarn, A.; Yingyongnarongkul, B.; Promrangsarn, N. *Tetrahedron* 1998, **54**, 14565.
- 1[44] Suksamrarn, A.; Yingyongnarongkul, B.; Charoensuk, S. *Tetrahedron* 1999, **55**, 255.

- 1[45] Gosner, K. L. *Guide to Identification of Marine and Estuarine Invertebrates*; Wiley: New York, 1971.
- 1[46] Cariello, L.; Crescenzi, S.; Prota, G. *J. C. S., Chem. Commun.* 1973, 99.
- 1[47] Rao, C. B.; Anjaneyula, A. S. R.; Sarma, N. S.; Venkatateswarlu, Y.; Rosser, R. M.; Faulkner, D. J.; Chen, M. H. M.; Clardy, J. *J. Am. Chem. Soc.* 1984, **106**, 7984.
- 1[48] Rao, C. B.; Anjaneyula, A. S. R.; Sarma, N. S.; Venkatateswarlu, Y.; Rosser, R. M.; Faulkner, D. J. *J. Org. Chem.* 1985, **50**, 3757.
- 1[49] Rao, C. B.; Rao, D. V.; Raju, V. S. N.; Sullivan, B. W.; Faulkner, D. J. *Heterocycles* 1989, **28**, 103.
- 1[50] Atta-ur-Rahman; Alvi, K.A.; Abbas, S. A.; Choudhary, M. I.; Clardy, J. *Tetrahedron Lett.* 1989, **30**, 6825.
- 1[51] Fukusawa, S.; Hayashi, Y.; Uemura, D.; Nagatsu, A.; Yamada, K.; Ijuin, Y.; *Heterocyclic Communications* 1995, **1**, 207.
- 1[52] Searle, P. A.; Molinski, T. F. *J. Nat. Prod.* 1995, **58**, 264.
- 1[53] D'Ambrosio, M.; Roussis, V.; Fenical, W. *Tetrahedron Lett.* 1997, **38**, 717.
- 1[54] Kuramoto, M.; Hayashi, K.; Fujitani, Y.; Yamaguchi, K.; Tsuji, T.; Yamada, K.; Ijuin, Y.; Uemura, D. *Tetrahedron Lett.* 1997, **38**, 5683.
- 1[55] Babu, U. V.; Bhandari, S. P. S.; Garg, H. S. *J. Nat. Prod.* 1997, **60**, 1307.
- 1[56] Daranas, A. H.; Fernandez, J. J.; Gavin, J. A.; Norte, M. *Tetrahedron* 1999, **55**, 5539.
- 1[57] Sturaro, A.; Guerriero, A.; De Clauser, R.; Pietra, F. *Experientia* 1982, **38**, 1184.
- 1[58] Guerriero, A.; Pietra, F. *Comp. Biochem. Physiol. B* 1985, **80**, 227.
- 1[59] Guerriero, A.; Traldi, P.; Pietra, F. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1986, 40.

- 1[60] Tsubuki, M.; Takada, H.; Katoh, T.; Miki, S.; Honda, T. *Tetrahedron* 1996, **52**, 14515.
- 1[61] Shigemori, H.; Sato, Y.; Kagata, T.; Kobayashi, J. *J. Nat. Prod.* 1999, **62**, 372.

ผลการวิจัยและอภิปรายผล และวัสดุและวิธีการ

- 1.1[1] Tomaschko, K. H. *Z. Naturforsch C: Biosci.* 1994, **49**, 367.
- 1.1[2] Junkum, A.; Chullasorn, S.; Suksamram, A. *24th Congress on Science and Technology of Thailand*. Abstract. Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok. 19-21 October 1998; pp. 300-301.
- 1.1[3] Werawattanametin, K.; Podimuang, V.; Suksamram, A. *J. Nat. Prod.* 1986, **49**, 365.
- 1.1[4] Hou, S.; Wang, G.; Xia, K. *Zhiwu Xuebao* 1982, **24**, 347.
- 1.1[5] Girault, J.-P.; Lafont, R.; Varga, E.; Hajdu, Zs.; Herke, I.; Szendrei, K. *Phytochemistry* 1998, **27**, 737.
- 1.1[6] Szendrei, K.; Varga, E.; Hajdu, Zs.; Herke, I.; Lafont, R.; Girault, J.-P. *J. Nat. Prod.* 1988, **51**, 993.
- 1.1[7] Suksamram, A.; Promrangsang, N.; Jintasirikul, A. *Phytochemistry* 2000, **53**, 921-924.
- 1.1[8] Girault, J.-P.; Bathori, M.; Varga, E.; Szendrei, K.; Lafont, R. *J. Nat. Prod.* 1990, **53**, 279-293.
- 1.1[9] Sadikov, Z. T.; Saatov, Z. *Chem. Nat. Comp.* 1999, **35**, 440; *Khim. Prir. Soedin.* 1999, 492.
- 1.1[10] Yingyongarongkul, B.; Suksamram, A. *ScienceAsia* 2000, **26**, 15-20.

- 1.1[11] Nakano, K.; Nohara, T.; Tominatsu, T.; Nishikawa, M. *Phytochemistry* 1982, **21**, 2749.
- 1.1[12] Girault, J.-P.; Lafont, R. *J. Insect Physiol.* 1988, **34**, 701;
Imai, S.; Murata, E.; Fujioko, S. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1969, 546.
- 1.1[13] Zhang, M.; Stout, M. J.; Kubo, I. *Phytochemistry* 1992, **31**, 247.
- 1.2[1] Robbin, W. E.; Kaplannis, J. N.; Thompson, M. J.; Shortino, T. J.; Joyner, S. C. *Steroids* 1970, **16**, 105.
- 1.2[2] Otaki, T.; Milkman, R. D.; Williams, C. M. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 1967, **85**, 981.
- 1.2[3] Zhang, M.; Kubo, I. Mechanism of *Heliothis virescens* Resistance to Exogenous Ecdysteroids. In *Bioregulator for Crop Protection and Pest Control*; Hedin, P. A. Ed.; American Chemical Society: Washington, D. C., 1994; pp. 182-201.
- 1.2[4] Diehl, P. A.; Connat, J.-L.; Girault, J.-P.; Lafont, R. *Int. J. Invert. Redrod. Dev.* 1985, **8**, 1.
- 1.2[5] อภิชาติ สุขสำราญ; บุญเอก ยิ่งยงณรงค์กุล; ประเสริฐ พัฒนาประทีป. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ทางชีวภาพของฮอร์โมนลอกคราบแมลง. รายงานการวิจัยทุนองค์ความรู้ใหม่ที่เป็นพื้นฐานต่อการพัฒนา พ.ศ. 2542, 113 หน้า.
- 1.2[6] Buckman, D.; Starnecker, G.; Tomaschko, K.-H.; Wilhelm, E.; Lafont, R.; Girault, J.-P. *J. Comp. Physiol.* 1986, **156**, 759.

- 1.2[100] Sarker, S. D.; Sik, V.; Rees, H. H.; Dinan, L. *Phytochemistry* 1998, **49**, 2311.
- 1.2[101] Galbraith, M. N.; Horn, D. H. S.; Middleton, E. J.; Hackney, R. J. *Aust. J. Chem.* 1969, **22**, 1517.
- 1.2[102] Galbraith, M. N.; Horn, D. H. S.; Middleton, E. J.; Thomson, J. A.; Siddall, J. B.; Hafferl, W. *Chem. Commun.* 1969, 1134.
- 1.2[103] Dinan, L. N. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 1985, **2**, 295.
- 1.2[104] Dryden Jr., H. L. Reduction of steroids by metal-ammonia solutions. In *Organic Reactions in Steroids Chemistry*; Vol. 1; Fried, J.; Edwards, J. A., Eds.; Van Nostrand Reinhold: New York, 1972; pp. 1-60.
- 1.2[105] Caine, D. Reduction and related reactions of α,β -unsaturated carbonyl compounds with metals in liquid ammonia. In *Organic Reactions*; Vol. 23; Dauben, W. G., Ed.; John Wiley: New York, 1976; pp. 1-258.
- 1.2[106] Barton, D. H. R.; Robinson, C. H. *J. Chem. Soc.* 1954, 3054.
- 1.2[107] Mayor, P. A.; Meakins, G. D. *J. Chem. Soc.* 1960, 2800.
- 1.2[108] Brosa, C.; Puig, R.; Comas, X.; Fernandez, C. *Steroids* 1996, **61**, 540.
- 1.2[109] Brosa, C.; Rodriguez-Santamarta, C. *Tetrahedron* 1999, **55**, 1793.
- 1.2[110] Augustine, R. L. Steroid hydrogenation. In *Organic Reactions in Steroids Chemistry*; Vol. 1; Fried, J.; Edwards, J. A., Eds.; Van Nostrand Reinhold: New York, 1972; pp. 111-144.
- 1.2[111] Luche, J.-L.; Rodriguez-Hahn, L.; Crabbe, P. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1978, 601.

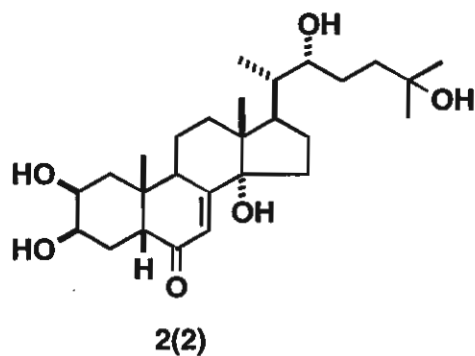
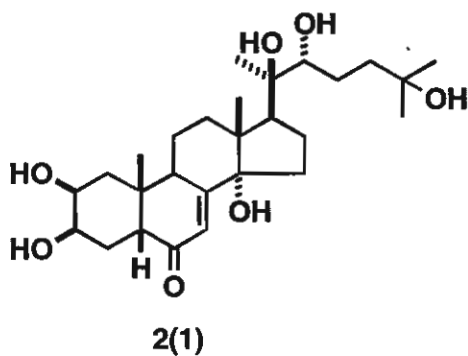
**โครงการย่อยกลุ่มที่2: การสังเคราะห์และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารยับยั้ง
เอนโดสเทียรอยด์**

โครงการย่อยกลุ่มที่2: การสังเคราะห์และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารยับยั้ง เอกไดสเตียรอยด์

บทนำ

1. คำนำ

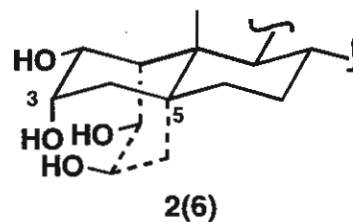
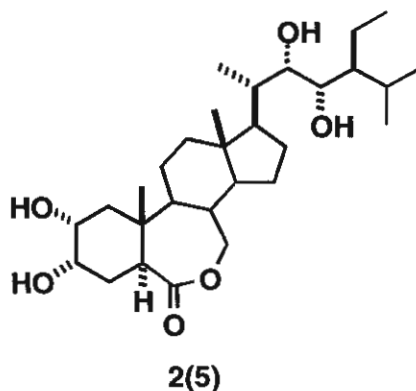
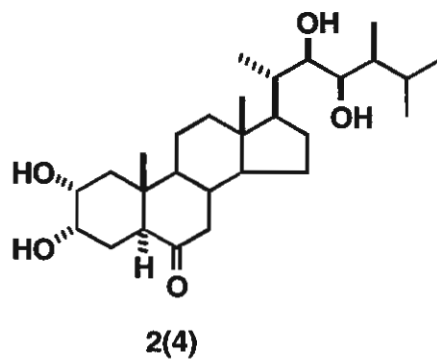
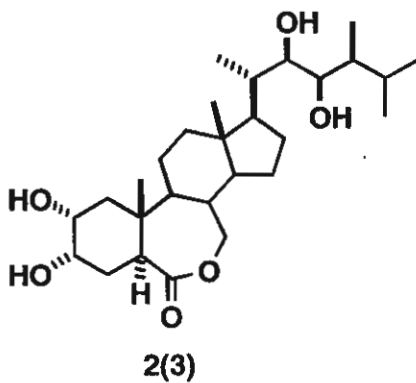
จากความสำคัญของเอกไดสเตียรอยด์ ดังได้กล่าวมาแล้วในโครงการวิจัยกลุ่มที่ 1 จะเห็นได้ว่าหากแมลง(และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังอีกหลายชนิด) ได้รับเอกไดสเตียรอยด์ เช่น 20-hydroxyecdysone [2(1)] หรือ ecdysone [2(2)] มากเกินไปจะทำให้ตายหรือเจริญเติบโตผิดปกติไป ในทางกลับกัน เนื่องจากเอกไดสเตียรอยด์มีความจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของแมลง หากแมลงขาดเอกไดสเตียรอยด์ก็จะไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ หากเราสามารถควบคุมแมลงไม่ให้สามารถนำเอกไดสเตียรอยด์ไปใช้ได้ ก็จะทำให้แมลงไม่เจริญเติบโต หรือต้องตายไป ฉะนั้นแนวทางหนึ่งที่จะนำไปสู่การปรับเปลี่ยนเอกไดสเตียรอยด์ให้เป็นสารควบคุมแมลงคือ หาทางยับยั้งที่จะไม่ให้เอกไดสเตียรอยด์มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบได้



2. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ในการที่จะยับยั้งไม่ให้เอกไดสเตียรอยด์มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบได้ ถึงแม้ว่างานวิจัยด้านนี้จะมีผู้ศึกษาน้อยมากก็ตาม แต่ก็พอจะแบ่งได้ 2 แนวทางคือ แนวทางแรกเป็นการศึกษาการหาสาร antiecdysteroids ในชั้นต้นได้มีผู้นำ brassinosteroids มาทดสอบการเป็น antiecdysteroids สารประเภท brassinosteroids เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulators) กลุ่มใหม่ที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับเอกไดสเตียรอยด์มาก^{2[1]} สามารถ

สกัดแยกมาได้จากพืชบางชนิดในปริมาณที่ต่ำมาก จนถึงปัจจุบันนี้มี brassinosteroids ที่พบแล้วมากกว่า 60 ชนิด เมื่อพิจารณาโครงสร้างของวง B สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติประเภทนี้แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่วง B เป็น 7-membered-ring lactone และกลุ่มที่วง B เป็น 6-membered-ring ketone ตัวอย่างได้แก่ brassinolide [2(3)] และ castasterone [2(4)] ตามลำดับ Hetru และคณะได้นำ 22S,23S-homobrasinolidide [2(5)] ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของแมลง *Phormia terra-novac* โดยทดสอบแบบ *in vitro* พบว่าสามารถยับยั้งกระบวนการลอกคราบได้^{2[2]} Richter และคณะพบว่าสาร 2(5) สามารถทำให้การเข้าดักแด้ของแมลงสาบ *Periplaneta americana* เกิดขึ้นได้ช้าลง^{2[3]} ต่อมาได้มีการศึกษาเพิ่มเติมว่า brassinosteroids สามารถแข่งกับเอคไดสเตียรอยด์ในการ bind กับ receptor ของเอคไดสเตียรอยด์^{2[4]} Luu และ Werner ได้ให้เหตุผลว่าการที่เอคไดสเตียรอยด์ซึ่งมี A/B ring junction เป็นแบบ *cis* และหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่งที่ 3 เป็นแบบ β และ brassinosteroids โดยปกติมี A/B ring junction เป็นแบบ *trans* และหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่งที่ 3 เป็นแบบ α นั้น ทำให้หมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่งดังกล่าวอยู่ในตำแหน่งใกล้เคียงกันมาก (ดูรูป 2(6))^{2[5]}



ถึงแม้ว่าการมีฤทธิ์ทางชีวภาพเป็น antiecdysteroids ของ brassinosteroids เป็นเรื่องที่น่าสนใจมาก แต่เนื่องจากสารประเภทนี้สามารถสกัดแยกจากพืชได้ในปริมาณที่ต่ำกว่าปริมาณของเอคไดสเตียรอยด์ที่มีอยู่ในพืชอย่างมากมาย ทำให้เป็นอุปสรรคอย่างสำคัญในการนำสารประเภทนี้ไปศึกษาด้านต่างๆ และถึงแม้ว่าได้มีผู้ทำการสังเคราะห์ brassinosteroids มาบ้างแล้ว แต่ก็ยังต้องอาศัยปฏิกิริยาหลายขั้นตอน^{2[6]} และมักมีความเฉพาะเจาะจงของการสังเคราะห์ จนขาดความหลากหลายของสารที่มี stereochemistry และหมู่ฟังก์ชันแตกต่างกัน ซึ่งเป็นสิ่งที่จำเป็นสำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ทางชีวภาพ

เนื่องจากเราต้องศึกษาการแข่งขันกัน bind ที่ receptor ของแมลงหรือศัตรูพืชประเภทอื่นระหว่างเอคไดสเตียรอยด์ที่มีอยู่ กับสารประเภทอื่น ซึ่งทำหน้าที่เป็น antiecdysteroids เช่น brassinosteroids ดังได้กล่าวมาแล้ว ฉะนั้นแทนที่จะสังเคราะห์สาร brassinosteroids หรือ analogues ของสารนี้ โดยตั้งต้นจากสารประเภทสเตียรอยด์ ตามที่ได้มีการสังเคราะห์กันมาเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งจะพบว่าการทำงานที่ปรับเปลี่ยนให้มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับเอคไดสเตียรอยด์ให้มากขึ้นนั้นทำได้ยาก แต่ถ้าเราสามารถปรับเปลี่ยนโครงสร้างและหรือหมู่ฟังก์ชันของเอคไดสเตียรอยด์ให้แตกต่างออกไปจากเดิมเรื่อยๆ ก็จะทำให้การศึกษาด้านความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของ antiecdysteroids กับฤทธิ์ทางชีวภาพในการแข่งขันกับเอคไดสเตียรอยด์เพื่อ bind กับ receptor ของแมลงได้อย่างมีระบบมากขึ้น ซึ่งแนวความคิดนี้น่าจะมีโอกาสเป็นไปได้ เนื่องจากเรามีแหล่งของเอคไดสเตียรอยด์ซึ่งจะใช้เป็นสารตั้งต้นในปริมาณมาก และการที่จะทำการเปลี่ยน (chemical transformation) เอคไดสเตียรอยด์ 2(1) ให้มีโครงร่างและหมู่ฟังก์ชันเปลี่ยนแปลงไป เช่นไปเป็นสารที่มีโครงร่างแบบ brassinosteroids โดยหลักการแล้วน่าจะทำได้ สิ่งที่จะเป็นผลพลอยได้จากการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คือ ทำให้ได้สารที่มีโครงร่างหลักแบบ brassinosteroids หรือเป็น analogues ของสารประเภทนี้ ซึ่งอาจมีการนำไปศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในแง่ของการเป็นสารควบคุมการเติบโตของพืช ซึ่งความจริงเป็นเรื่องที่ใหญ่มากอีกเรื่องหนึ่ง และเป็นเรื่องที่น่าสนใจศึกษากันมาก โดยเฉพาะทางด้านการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของ brassinosteroids กับฤทธิ์การเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งเท่าที่ผ่านมามีข้อจำกัดอยู่อย่างมาก เพราะ brassinosteroids ที่สกัดแยกได้จากธรรมชาติมีปริมาณน้อยมาก ทำให้ข้อสรุปที่ได้จากการศึกษา SAR ของ brassinosteroids มีข้อผิดพลาดหรือขาดความสมบูรณ์ เพราะขาดทั้งจำนวนและปริมาณของสารประเภทนี้ในการศึกษา

แนวทางที่สองเป็นการหาสารที่สามารถยับยั้งชีวสังเคราะห์ (biosynthesis) ของเอคโดสเตียรอยด์ โดยเป็นพวก suicide substrate inhibitor ซึ่งจะเข้าทำปฏิกิริยาที่ไม่ผันกลับที่ active site ของเอนไซม์ ในการออกแบบหรือสร้างสารยับยั้งดังกล่าวนี้ จะต้องทราบโครงสร้างที่แน่นอนของ substrate จากธรรมชาติหรือสารมัธยันตร์ทางชีวสังเคราะห์ (biosynthetic intermediates) ที่ให้เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยาด้วย สำหรับกรณีของเอคโดสเตียรอยด์นั้น วิถีชีวสังเคราะห์ (biosynthetic pathway) ได้ทราบกันแล้วบางขั้นตอน ที่ทราบกันคือจาก cholesterol [2(7)] (ซึ่งแมลงอาจได้มาจากสารพวกสเตียรอยด์จากพืช แล้วทำการ dealkylate คาร์บอนที่เกินมาที่ตำแหน่ง 24) ผ่านขั้นตอนชีวสังเคราะห์ (Scheme 2(1)) จนได้ ecdysone [2(2)] และในที่สุดได้ 20-hydroxyecdysone [2(1)] ขั้นตอนที่สำคัญคือเกิด hydroxylation ตามลำดับที่ตำแหน่ง 25, 22, 2 และ 20^[7,8] เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการ hydroxylation ที่ตำแหน่ง 22 และ 25 คือ cytochrome P-450-dependent monooxygenases^[9] และเป็นที่ทราบกันแล้วว่า เอนไซม์ดังกล่าวนี้ถูก inactivate โดย suicide substrate^[10]

ถึงแม้การศึกษาข้างต้นนี้ยังเพิ่งจะอยู่ในขั้นเริ่มต้น แต่ก็ก็เป็นแนวทางที่น่าสนใจ ฉะนั้นหากได้มีการศึกษาหาสารที่สามารถยับยั้งการสังเคราะห์เอคโดสเตียรอยด์ต่อไป ก็น่าจะเป็นประโยชน์ต่อการหาแนวทางใหม่อีกแนวทางหนึ่งในการควบคุมแมลง

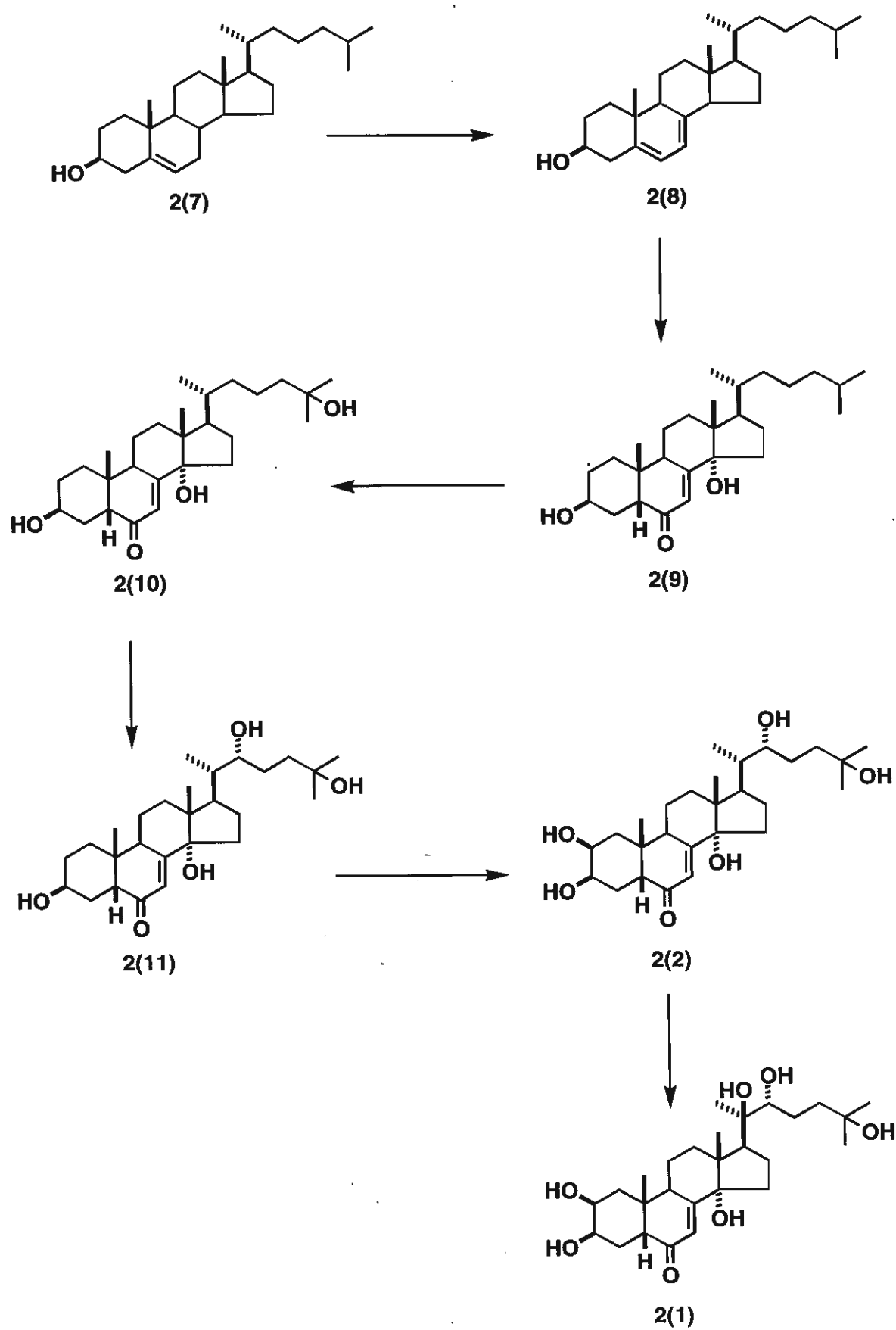
3. วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 1) เพื่อสังเคราะห์และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารยับยั้งเอคโดสเตียรอยด์
- 2) เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้าง กับฤทธิ์ทางชีวภาพของสารยับยั้ง เอคโดสเตียรอยด์

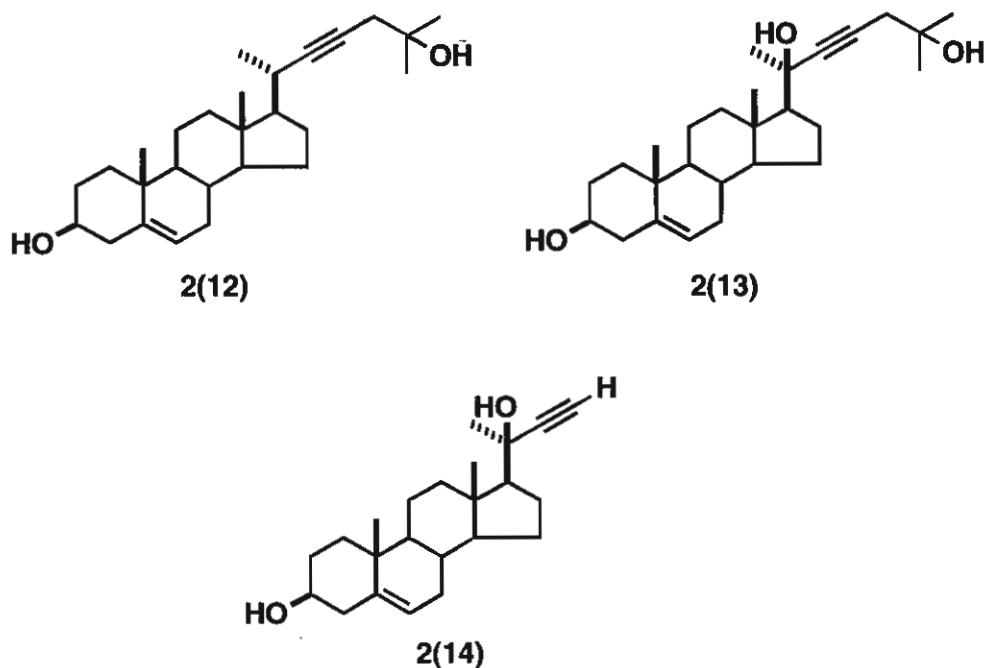
4. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาเกี่ยวกับสารยับยั้งเอคโดสเตียรอยด์ยังมีน้อยมาก เท่าที่ทราบ Luu และคณะเป็นกลุ่มเดียวที่เริ่มศึกษาเรื่องนี้ โดยมีพื้นฐานของการเข้าใจเบื้องต้นว่า การยับยั้งการสังเคราะห์เกิดที่ prothoracic gland ของแมลง โดย cholesterol [2(7)] จะถูกเปลี่ยนไปเป็นเอคโดสเตียรอยด์ จึงเกิดแนวคิดที่ว่า ถ้า cholesterol มีหมู่ฟังก์ชันที่สามารถทำปฏิกิริยากับ active site ของเอนไซม์ได้ ก็จะทำให้สามารถยับยั้งการสังเคราะห์เอคโดสเตียรอยด์ได้ Luu และคณะ

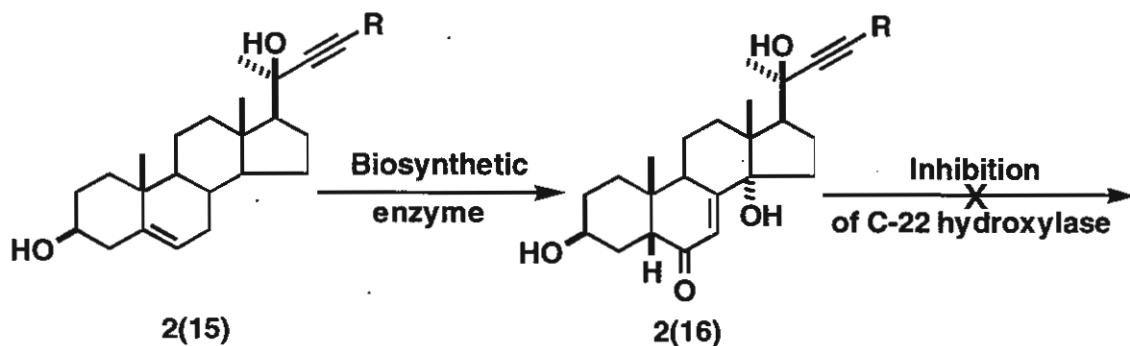
Scheme 2(1)



ได้เลือกหมู่ฟังก์ชันที่เป็นที่ทราบดีมาก่อนแล้วว่าสามารถเป็น suicide substrate ได้คือสารประเภท acetylenes^{2[11]} และได้สังเคราะห์สาร 2(12) และ 2(13) และ analogues ของสารเหล่านี้ พบว่าสารใน series ของสาร 2(13) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสังเคราะห์เอคโดสเตียรอยด์ดีกว่าสารใน series ของสาร 2(12) และพบว่าเมื่อปรับเปลี่ยนสายโซ่ด้านข้างของ 2(13) ให้ง่ายขึ้นจนได้สาร 2(14) ซึ่งแสดงฤทธิ์การยับยั้งการสังเคราะห์เอคโดสเตียรอยด์ได้ โดยเข้าใจว่าไปยับยั้ง เอนไซม์ C-22 hydroxylase ดัง Scheme 2(2)

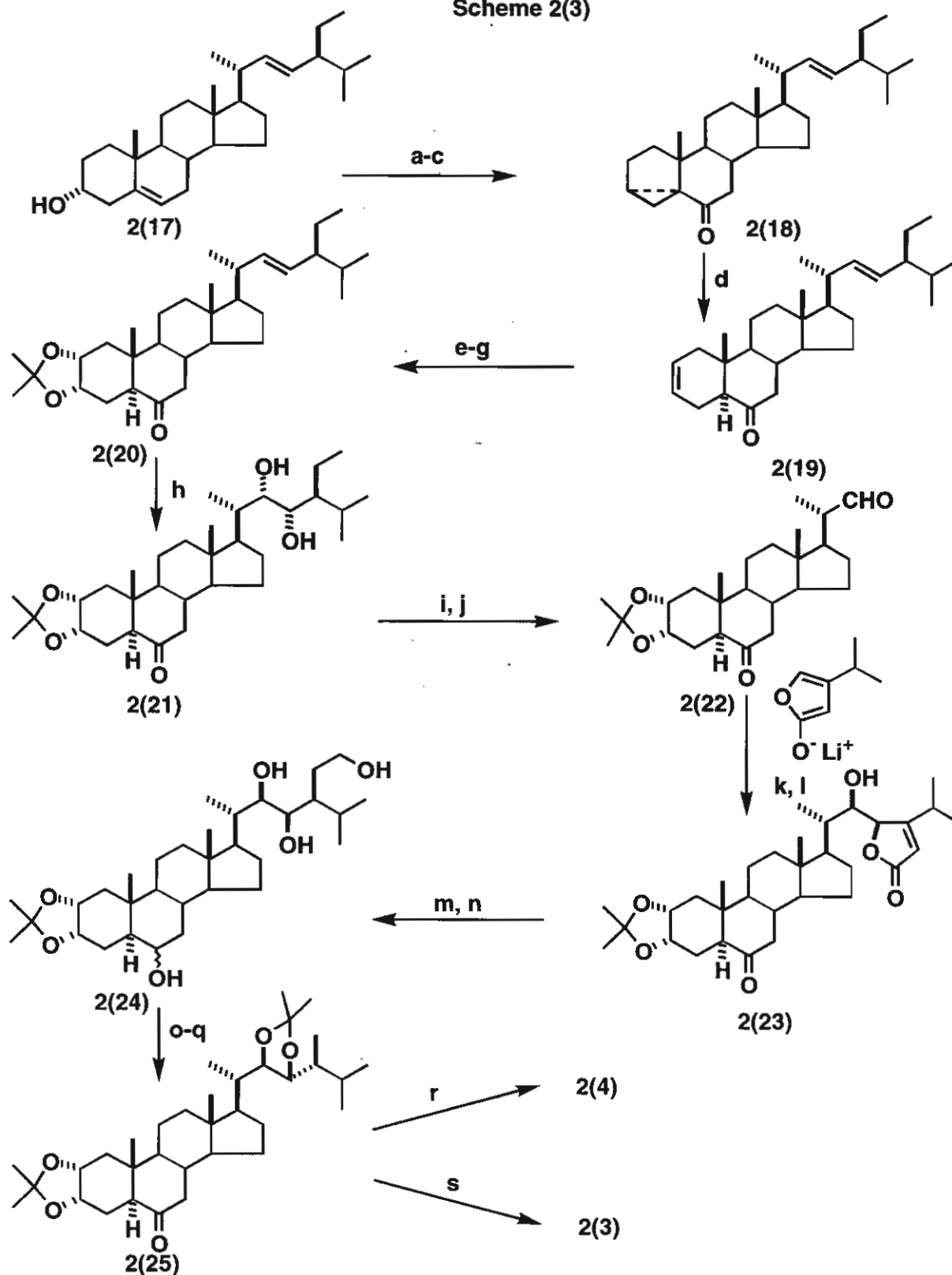


Scheme 2(2)



สำหรับสาร brassinosteroids นั้น เนื่องจากสามารถสกัดแยกได้ในปริมาณน้อยมาก ฉะนั้น การที่จะได้สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติประเภทนี้ไปศึกษาและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพจึงจำเป็นต้องใช้การสังเคราะห์เป็นส่วนใหญ่ การสังเคราะห์สารประเภทนี้ ทั้งหมดหรือเกือบทั้งหมด ตั้งต้นจากสเตียรอยด์ โดยเฉพาะสเตียรอยด์ที่ได้มาจากพืช การสังเคราะห์เกือบทั้งหมดผ่านขั้นตอนหลายขั้นตอน ตัวอย่างการสังเคราะห์ brassinolide [2(3)] และ castasterone [2(4)] จากสเตียรอยด์ 2(17) ได้แสดงไว้ใน Scheme 2(3)²⁽¹²⁾ จะเห็นได้ว่า การสังเคราะห์ต้องผ่านขั้นตอนหลายขั้นตอน ทั้งๆที่เป็นวิธีที่ได้ปรับปรุงมาแล้วจากวิธีการเดิม²⁽¹³⁾ การสังเคราะห์ทุกวิธีการที่ผ่านมาเหมาะสำหรับการสังเคราะห์ brassinosteroids โดยตรง แต่ถ้าต้องการศึกษา SAR ของ brassinosteroids และ analogues เปรียบเทียบกับเอคโดสเตียรอยด์ โดยเฉพาะการแข่งขัน bind กับ receptor ของแมลงเมื่อโครงสร้างของเอคโดสเตียรอยด์เริ่มเปลี่ยนแปลงไปทาง brassinosteroids มากขึ้นเรื่อยๆแล้ว การสังเคราะห์ดังกล่าวข้างต้นจะเริ่มความยุ่งยากขึ้น เช่นการที่ต้องการให้ brassinosteroids มีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 14 หรือมีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 2 และ/หรือ 3 เป็นแบบ β ก็ทำได้ยาก

Scheme 2(3)



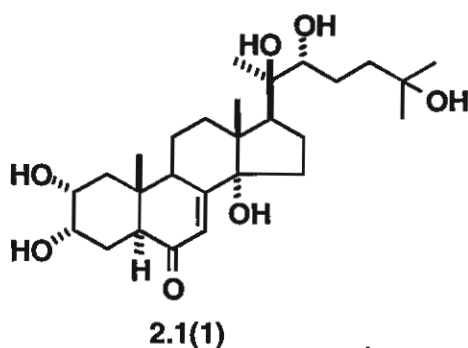
Reagents and conditions: a, MsCl/Py; b, KHCO_3 /aq. acetone/reflux, 6 h; c, $\text{CrO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ /acetone; d, LiBr/Py.HCl/DMA/160°C, 4 h; e, OsO_4 in Bu'OH/aq. acetone/NMO; f, aq. NaHSO_3 ; g, $\text{Me}_2\text{C}(\text{OMe})_2/\text{H}^+/\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeCN}$ /room temp., 1 h; h, OsO_4 in Bu'OH/NMO/aq. THF/7 d, 40 °C; i, dry THF/Py/ $\text{NaHCO}_3/\text{H}_5\text{IO}_6$ /room temp., 24 h; j, aq. NaHSO_3 ; k, THF/ -78°C, 14 h; l, aq. NH_4Cl / -78°C; m, H_2 /Pd/C/THF-EtOH-Py/room temp., 50 psi, 14 h; n, LAH/ THF/Ar, reflux, 12 h; o, acetone/CSA/room temp., N_2 , 24 h; p, CrO_3 -Py/ CH_2Cl_2 /room temp., 48 h; q, $[(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{P}]_3\text{RhCl}/\text{C}_6\text{H}_6$ /Ar, reflux, 5 h; r, TFA/MeOH; s, TFAA/ H_2O_2 (30%)/ CHCl_3 /room temp., 2 h

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

2.1 การปรับเปลี่ยนโครงสร้างและหมู่ฟังก์ชันของวง A และ B

1) การสังเคราะห์ (20R,22R)-2 α ,3 α ,14 α ,20,22,25-Hexahydroxy-5 α -cholest-7-en-6-one [2.1(1)]

จากการเปรียบเทียบโครงสร้างของ 20-hydroxyecdysone [2(1)] กับ castasterone [2(4)] จะเห็นว่าส่วนที่แตกต่างจากกันคือ stereochemistry ของหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 2 และ 3 ของวง A, A/B ring junction, การมีหรือไม่มีพันธะคู่ที่วง B, การมีหรือไม่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 14 และความแตกต่างของหมู่แทนที่ที่สายโซ่ด้านข้าง ในการปรับเปลี่ยนเอคไดสเตียรอยด์เพื่อให้มีโครงสร้างและ/หรือหมู่ฟังก์ชันบางส่วนเหมือนกับ brassinosteroids เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของการเป็น antiecdysteroids และ/หรือ brassinosteroids รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ทางชีวภาพของการเป็นฮอร์โมนลอกคราบที่มีอยู่เดิมแล้วนั้น เป้าหมายของการสังเคราะห์แรก เป็นการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของหมู่ฟังก์ชันของวง A และ B โดยเริ่มจากการที่จะเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลของวง A จาก 2 β , 3 β เป็น 2 α , 3 α และ A/B ring junction เปลี่ยนจาก *cis* เป็น *trans* คือ 2.1(1) ซึ่งจะเป็นโครงสร้างและหมู่ฟังก์ชันที่วง A และ A/B ring junction ตามแบบของ brassinosteroids เมื่อเป็นเช่นนี้จะได้เอคไดสเตียรอยด์ที่มี *trans*-A/B ring fusion และมีหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่งที่ 2 และ 3 ตรงกับเอคไดสเตียรอยด์โดยทั่วไป จึงเป็นการเปลี่ยนเอคไดสเตียรอยด์เพื่อให้เป็น brassinosteroids ที่เล็กน้อย เป้าหมายต่อไปที่เราตั้งไว้คือ การรีดิวส์พันธะคู่ที่ตำแหน่ง 7 ของวง B เพื่อที่จะได้วง A และ B เป็นของ castasterone [2(4)]



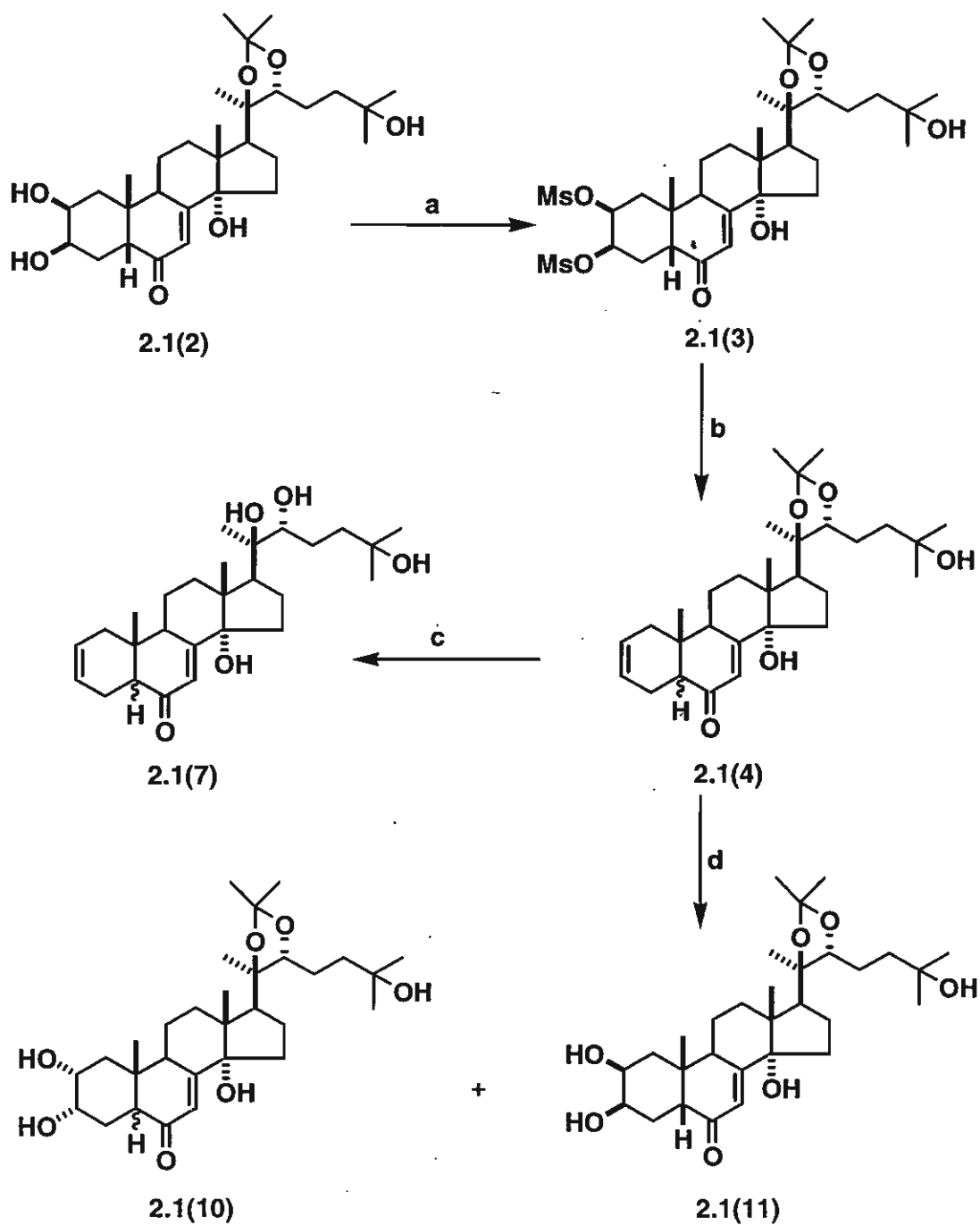
ในการปรับเปลี่ยน 20-hydroxyecdysone [2(1)] ให้เป็นสาร 2.1(1) ได้แสดงไว้ใน Scheme 1.2 (1) โดยมีการปรับเปลี่ยนไปจากที่ได้รายงานไว้ในครั้งที่ 2 เริ่มต้นด้วยการนำ 20-hydroxyecdysone 20,22-acetonide [2.1(2)] ซึ่งเตรียมได้จาก 2(1) ตามวิธีที่ปรากฏไว้ในวรรณกรรม^{2[14]} จากสาร 2.1(2) ทำปฏิกิริยากับ mesyl chloride ในสารละลาย pyridine ได้ dimesylate 2.1(3) ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับ NaI/Zn ใน DMF ได้ olefin acetonide 2.1(4) ซึ่งยังไม่ทราบ stereochemistry ที่ตำแหน่ง 5 ทั้งๆที่ได้ใช้เทคนิค NMR spectroscopy แล้ว เหตุที่เป็นเช่นนี้เพราะ เมื่อตำแหน่ง 2 และ 3 ไม่มีหมู่ไฮดรอกซิล แต่เป็นพันธะคู่แทน ปรากฏว่า NMR pattern แตกต่างไปจากเดิมจนไม่สามารถใช้ข้อมูลการ correlate ไฮโดรเจนตำแหน่ง 5 ว่าอยู่แบบ β หรือ α (คือเป็นสาร 2.1(5) หรือ 2.1(6)) นำสาร 2.1(4) มาทำการกำจัดหมู่ acetonide ด้วย 70% AcOH ได้ olefin 2.1(7) ซึ่งยังไม่ทราบ stereochemistry ตำแหน่งที่ 5 เช่นกัน คืออาจเป็นสาร 2.1(8) หรือ 2.1(9) ก็ได้

นำสาร 2.1(4) มาทำ dihydroxylation ด้วย OsO_4 ใน pyridine ได้สารผลิตภัณฑ์ 2.1(10) และ 2.1(11) สำหรับสาร 2.1(11) ซึ่งมีขั้วสูงกว่าสาร 2.1(10) มีโครงสร้างตรงกับ 20-hydroxyecdysone 20,22-acetonide ซึ่งเป็นสารที่ทราบโครงสร้างดีแล้ว^{1[17]} เนื่องจากสาร 2.1(10) และสาร 2.1(11) ต่างก็เกิดมาจากสาร 2.1(4) เหมือนกัน ฉะนั้นสาร 2.1(4) น่าจะมีไฮโดรเจนตำแหน่ง 5 อยู่แบบ β คือเป็นสาร 2.1(5) มากกว่า 2.1(6) ทำนองเดียวกันสาร 2.1(10) ก็น่าจะมีไฮโดรเจนที่ตำแหน่ง 5 เป็น β คือเป็น 2.1(12) มากกว่า 2.1(13) ข้อสรุปนี้ดูมีเหตุผลดี แต่ความเป็นจริงแล้วกลับสลับซับซ้อนกว่านี้ กล่าวคือเราได้เคยพบว่าเอคโดสเตียรอยด์ที่มี $5\beta\text{-H}$ ถ้าหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 3 อยู่แบบ α จะทำให้หมู่ฟังก์ชันดังกล่าวเกิด steric interaction กับไฮโดรเจนตำแหน่ง 9 และมีแนวโน้มจะเกิด 5-epimerization เพื่อเกิดเป็น $5\alpha\text{-ecdysteroid}$ เพื่อลด interaction ดังกล่าวลง และจะเกิดได้ง่ายโดยเฉพาะในสภาวะที่เป็นเบส^{1[35]} ฉะนั้น เป็นไปได้ที่เริ่มแรกของปฏิกิริยาเกิดเป็นสาร 2.1(12) แต่ก็อาจเกิด epimerization เป็น 2.1(13) ได้ ข้อมูลจากการใช้เทคนิค NMR ปรากฏว่าสลับซับซ้อนกว่าที่คาดไว้ แม้แต่สารผลิตภัณฑ์ 2.1(11) ถ้าเกิดจาก olefin acetonide 2.1(8) ก็จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆเกิดขึ้น เพราะ 2.1(11) เป็นไอโซเมอร์ที่เสถียร แต่ถ้าได้สารผลิตภัณฑ์เป็น 2.1(14) (คือเกิดจาก 2.1(6)) สาร 2.1(14) เสถียรน้อยกว่าสาร 2.1(11) เนื่องจากหมู่

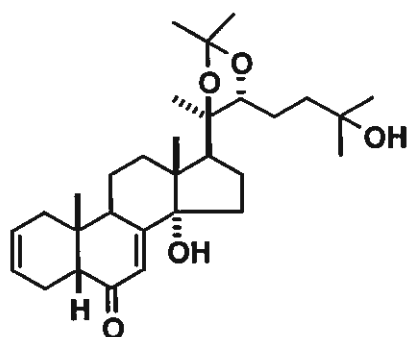
เนื่องจากหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 2 เกิด 1,3-diaxial interaction อาจทำให้เกิด epimerization ที่ตำแหน่ง 5 ได้เป็นสาร 2.1(11) ก็เป็นไปได้ เพื่อที่จะให้ทราบแน่ชัดว่า dihydroxylation product อีกชนิดหนึ่งเป็น 2.1(12) หรือ 2.1(13) เราได้ทำการศึกษาเทคนิคทาง 2D NMR อย่างละเอียด ทำให้สามารถ assign โปรตอนที่สำคัญต่างๆได้ (ดูตารางที่ 2.1(2)) เมื่อทำ NOE experiments พบว่าเมื่อ irradiate ที่ค่าความถี่ของ 19-Me ทำให้ H-5 เกิด NOE enhancement แสดงว่าสารผลิตภัณฑ์ 2.1(10) มีสเตอริโอเคมีที่ตำแหน่ง 5 เป็น 5- β ดังรูป 2.1(12) เมื่อนำสาร 2.1(12) มาทำ deacetonation ได้สาร 2.1(15) ซึ่งอาจเป็นสาร 2.1(1) หรือ 2.1(16) เมื่อนำมาศึกษาเทคนิคทาง 2D NMR ก็สามารถ assign โปรตอนได้ และทำให้ทราบว่าสารที่ได้คือ 2.1(16) (ดูค่า ^1H NMR data ตารางที่ 2.2(2)) ซึ่งยืนยันด้วยการเกิด NOE enhancement ของสัญญาณ H-5 เมื่อ irradiate ที่ 19-Me และได้เปรียบเทียบกับข้อมูลที่ได้ศึกษามาในอดีต¹⁽³³⁻³⁵⁾

เมื่อนำสาร 2.1(12) มาทำให้เกิด epimerization ที่ตำแหน่ง 5 โดยการใช้ aqueous Na_2CO_3 ในเอทานอล พบว่าสาร 2.1(12) เปลี่ยนไปเป็นสาร 2.1(13) ได้ โดยมีข้อมูล ^1H NMR ดังตารางที่ 2.1(2) เป็นที่น่าสังเกตว่า 2.1(12) เปลี่ยนไปเป็น 2.1(13) ได้ง่ายมาก แสดงว่าข้อสันนิษฐานที่ว่า การที่เอคโดสเตียรอยด์ที่หมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 2 อยู่แบบ α จะเกิด steric interaction กับ H-9 จนเกิด epimerization ที่ตำแหน่ง 5 ไปเป็น 5 α -epimer นั้น เป็นความจริง จากสาร 2.1(13) มากำจัดหมู่ป้องกัน acetonide ออกไปตามวิธีการปกติ ได้เอคโดสเตียรอยด์ 2.1(1) ตามต้องการ ทำการยืนยันสเตอริโอเคมีที่ตำแหน่ง 5 ว่าเป็น α โดยทำ NOE experiment โดย irradiate ที่ 19-Me พบว่า เกิด enhancement

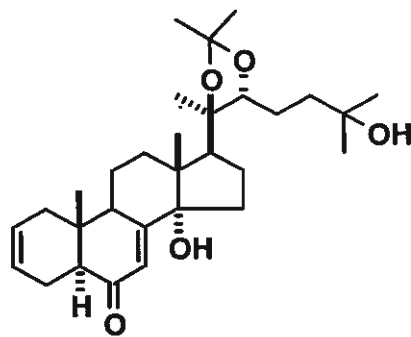
Scheme 2.1(1)



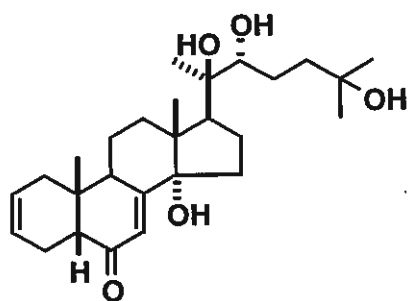
Reagents and conditions: a, MsCl/Pyr; b, NaI/DMF; c, 70% AcOH, PhCH₂N⁺Me₃Cl⁻; d, (i) OsO₄/Pyr; (ii) aq. NaHSO₃



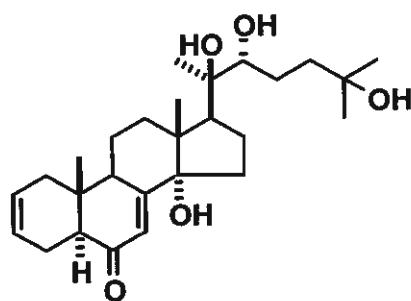
2.1(5)



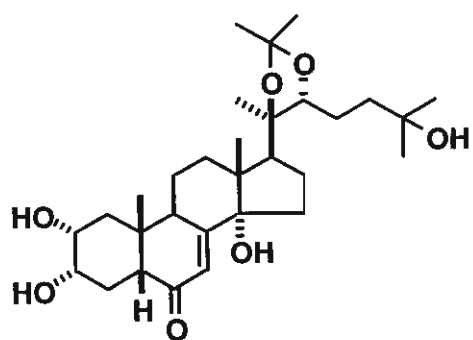
2.1(6)



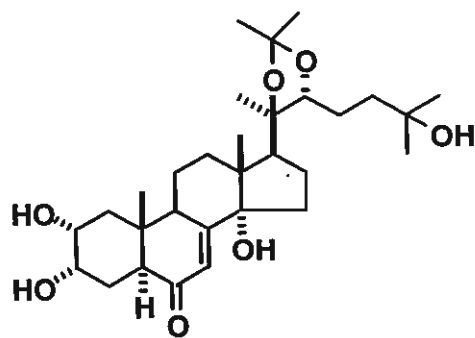
2.1(8)



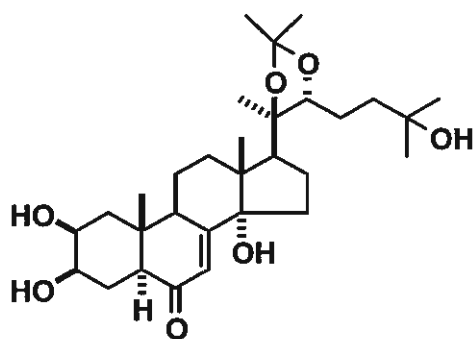
2.1(9)



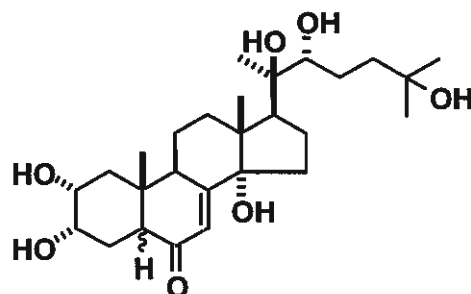
2.1(12)



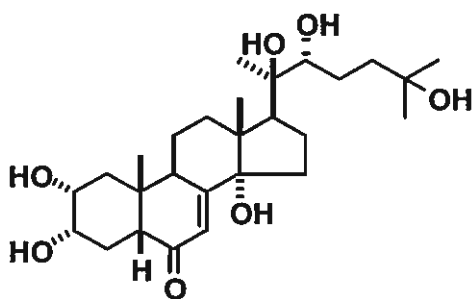
2.1(13)



2.1(14)



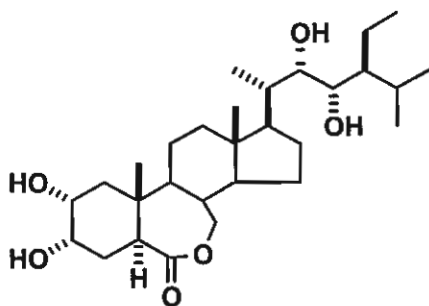
2.1(15)



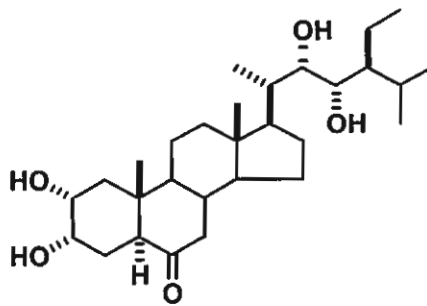
2.1(16)

2) การสังเคราะห์ 9-Hydroxy-substituted ecdysteroid analogues

จากการที่เอคไดสเตียรอยด์บางชนิดมีหมู่ไฮดรอกซิลเข้าที่ตำแหน่ง 9^{1[1]} และได้มีผู้พบวิธีการเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 9 ของเอคไดสเตียรอยด์^{2[15]} ทำให้เรามีแนวคิดว่า ถ้าเราสนใจสังเคราะห์ ecdysteroid analogues ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 9 โดยเฉพาะ พวกที่ไม่มีฤทธิ์ในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบ แต่คาดว่าจะสามารถ bind กับ receptor ของเอคไดสเตียรอยด์ได้เช่นเดียวกับ 22S,23S homobrasinolide [2.1(17)] และ 22S,23S-homocasterone [2.1(18)] ซึ่งได้มีผู้พบว่าสามารถ bind กับ receptor ของเอคไดสเตียรอยด์ที่แยกออกมาจากแมลงวัน *Calliphora vicina*^{1[15]} จะเป็นสิ่งที่น่าสนใจในการที่จะทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป



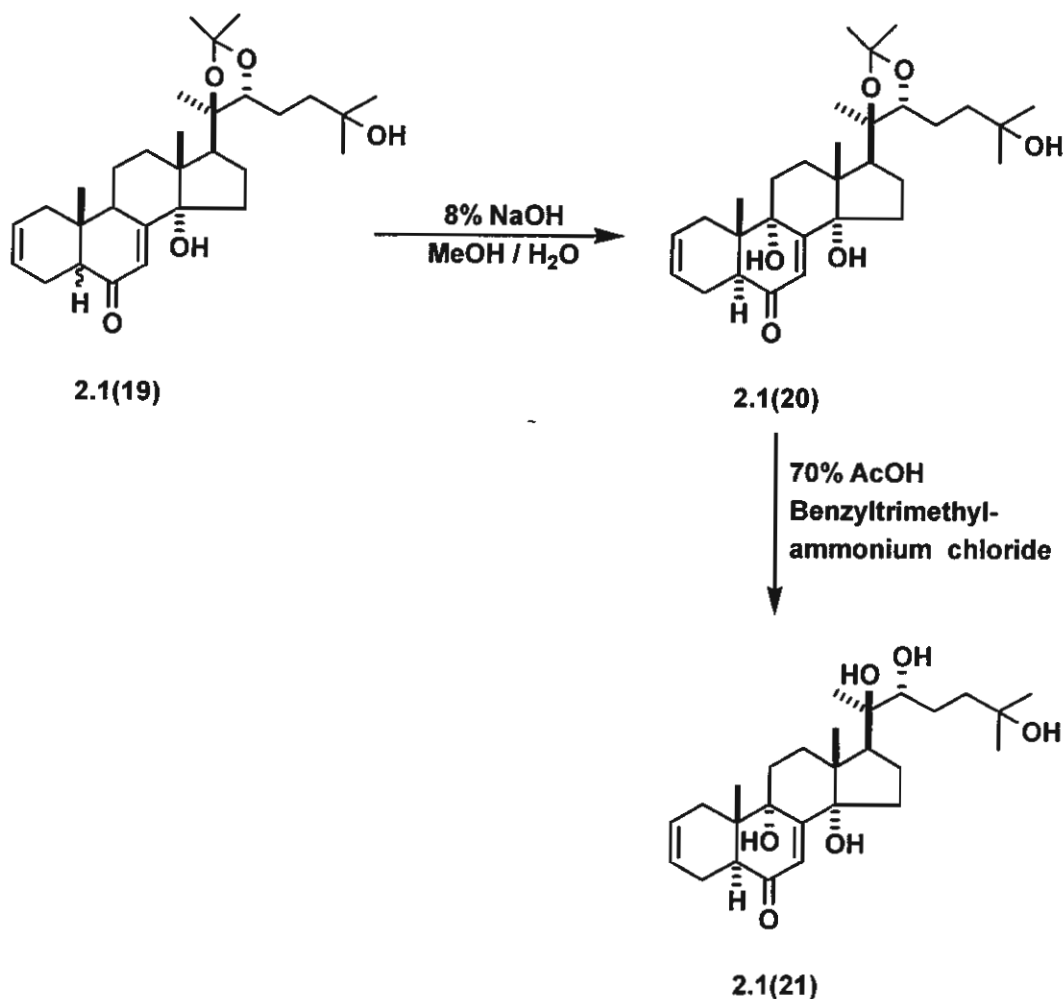
2.1(17)



2.1(18)

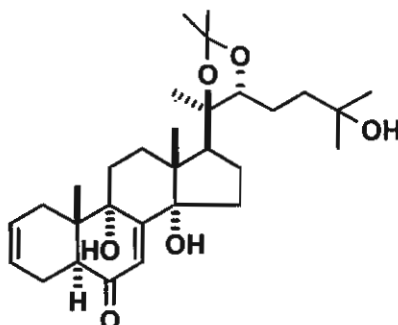
ในการสังเคราะห์ ecdysteroid analogues ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่งที่ 9 เราเริ่มจาก olefin 2.1(19) ซึ่งได้สังเคราะห์มาแล้วก่อนหน้านี้ ทำการคน olefin กับ 8% aq. NaOH ในเมทานอล เกิด autoxidation ซึ่งมีเบสเป็นคะตะลิสต์ได้สาร 2.1(20) ซึ่งสามารถกำจัดหมู่ป้องกัน acetonide ได้โดยทำปฏิกิริยากับ 70% AcOH

Scheme 2.1(2)

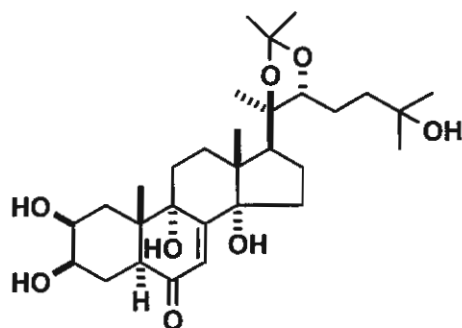
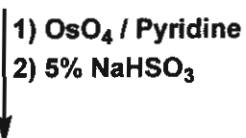


โครงสร้างของสาร 2.1(20) สามารถทราบได้จาก $^1\text{H-NMR}$ และแมสสเปกตรัม กล่าวคือ สัญญาณ H-7 ที่ δ 5.88 เป็น singlet (แทนที่จะเป็น doublet, ค่า J ประมาณ 2 Hz เหมือนเอดโดสแตียรอยด์ทั่วไป ซึ่งมีโปรตอนที่ตำแหน่ง 9) เนื่องจากไม่มี H-9 ที่จะเกิด allylic coupling แมสสเปกตรัมที่แสดงมวลเพิ่มขึ้นมาอีก 16 แสดงว่า มีหมู่ไฮดรอกซิลเพิ่มขึ้นที่ตำแหน่ง 9 สำหรับ stereochemistry ที่ตำแหน่ง 5 นั้น ทราบว่าเป็น 5α ด้วยเหตุผล 2 ประการ ประการแรก เมื่อนำ 2.1(20) มาทำ NOE experiment พบว่า เมื่อ irradiate สัญญาณของ H-5 พบว่า 19-Me ไม่เกิด enhancement ประการที่สอง เมื่อทำปฏิกิริยาไปจนถึงตอนท้าย พบว่าอัตราส่วนของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา dihydroxylation ของ 2.1(20)

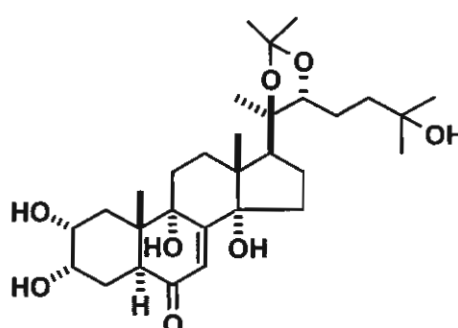
Scheme 2.1(3)



**2,3 Didehydro-2,3-dideoxy-5α-
9,20-dihydroxyecdysone 20,22-acetonide
2.1(20)**

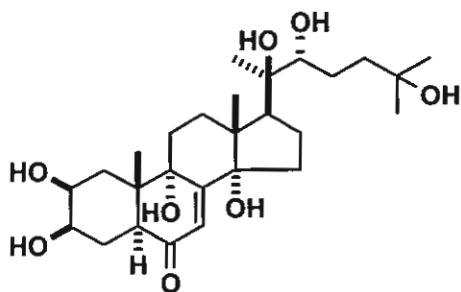


**5α-9,20-Dihydroxyecdysone
20,22-acetonide
2.1(22)**



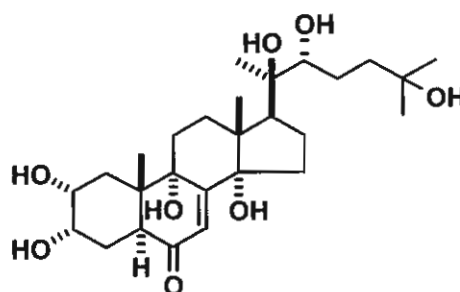
2.1(23)

70% AcOH



2.1(24)

70% AcOH



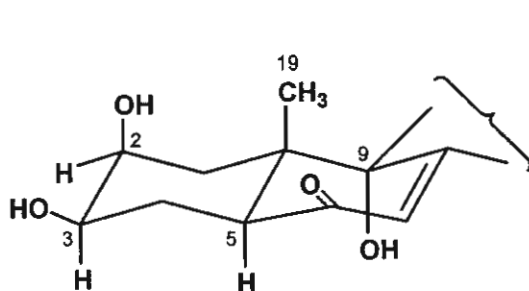
2.1(25)

สอดคล้องกับ stereochemistry ของตำแหน่ง 5 ตามโครงสร้าง 2.1(20) (ดูช่วงท้ายของการอภิปราย)

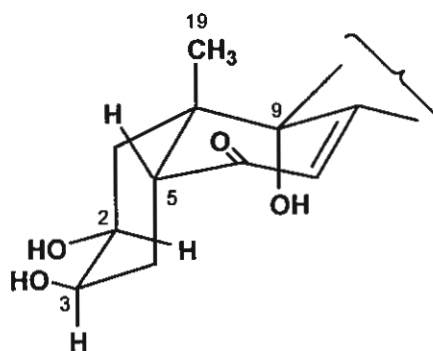
นำ olefin acetonide 2.1(20) มาทำปฏิกิริยา dihydroxylation ด้วย OsO_4 -pyridine และสลายสารเชิงซ้อนด้วย 5% aq. NaHSO_3 ได้สาร 2.1(22) และ 2.1(23) ในปริมาณ 20 และ 30% ตามลำดับ acetonide deprotection ของสาร 2.1(22) และ 2.1(23) ได้สาร 2.1(24) และ 2.1(25) ในปริมาณ 78 และ 90% ตามลำดับ (ดู Scheme 2.1(3))

โครงสร้างและ stereochemistry ที่ตำแหน่ง 2,3 และ 5 ของ 2.1(22) และ 2.1(23) และสารผลิตภัณฑ์จากการ deacetonation คือสาร 2.1(24) และ 2.1(25) หาได้จากข้อมูลทาง NMR และ mass spectroscopy ดังนี้

สาร 2.1(22) และ 2.1(24) สัญญาณ carbinol protons ของสาร 2.1(22) อยู่ที่ δ 4.51 (m, $W_{1/2} = 9$ Hz) และ δ 4.00 (m, $W_{1/2} = 21$ Hz) จากขนาดของ band width at half height ($W_{1/2}$) แสดงว่าโปรตอนทั้งสองอยู่แบบ equatorial และ axial ตามลำดับ สำหรับ conjugation ที่ตำแหน่ง 5 อาจเป็นการ *trans* หรือ *cis* ดังแสดงไว้เป็นรูปสามมิติบางส่วน 2.1(26) และ 2.1(27) ตามลำดับ



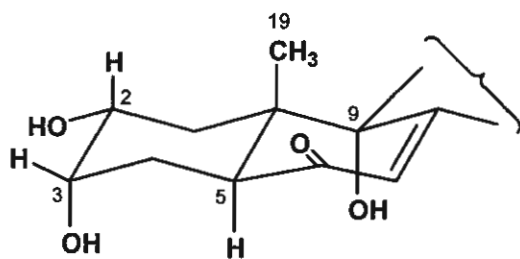
2.1(26)



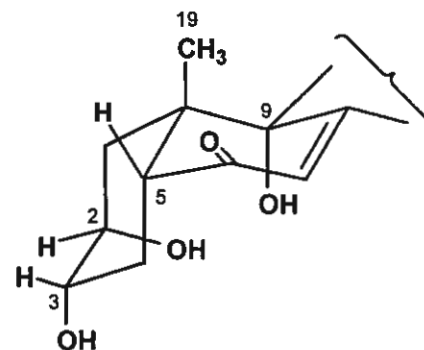
2.1(27)

ตามโครงสร้างที่ 2.1(26) สัญญาณที่ δ 4.51 และ δ 4.00 สามารถ assign ว่าเป็นของ H-2 และ H-3 ตามลำดับ แต่ถ้าสารที่ได้มี configuration ตำแหน่งที่ 5 เป็นแบบ 5 β คือโครงสร้าง 2.1(27) สัญญาณที่ตำแหน่งดังกล่าวเป็นของ H-3 และ H-2 ตามลำดับ โดยหลักการแล้ว เราสามารถบ่งความแตกต่างระหว่างโครงสร้าง 2.1(26) และ 2.1(27) ได้โดยเทคนิค NOE ถ้าสารที่กล่าวถึงมีโครงสร้างเป็น 2.1(22) ถ้า irradiate ที่ H-5 frequency ควรทำให้สัญญาณ H-3 เกิด enhancement แต่ถ้าสารที่กล่าวถึงมีโครงสร้างเป็น 2.1(23) ถ้า irradiate ที่ H-5 frequency ควรทำให้สัญญาณ 19-Me เกิด enhancement แต่เนื่องจาก $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของสาร 2.1(22) มีหมู่ methyl ถึง 7 หมู่ จึงเป็นการยากที่จะระบุว่า สัญญาณ 19-Me ตรงกับสัญญาณใด เราจึงนำสารดังกล่าวมาทำ deacetonation ได้สาร 2.1(24) ซึ่งมีหมู่ methyl 5 หมู่ แต่อยู่กันเป็น 4 กลุ่ม เมื่อทำ NOE experiment โดย irradiate H-5 ที่ δ 3.42 พบว่าเกิด NOE enhancement ของสัญญาณ H-3 ที่ δ 3.90 และเมื่อ irradiate H-3 ที่ δ 3.90 ทำให้เกิด enhancement ของสัญญาณ ที่ H-5 ที่ δ 3.42 และสัญญาณของ H-2 ที่ δ 4.46 ฉะนั้น stereochemistry จึงควรเป็น 2.1(26) คือเป็นสาร 2.1(24) สิ่งที่เป็นข้อสังเกตคือ สัญญาณของ H-5 (δ 3.42) อยู่ downfield กว่าสัญญาณของ 5 β ecdysteroid อื่นๆ เช่นสาร 2(1) ซึ่งอยู่ที่ δ 2.98 ¹¹⁷ การเกิด downfield shift ของ H-5 ของสาร 2.1(24) เข้าใจว่าเนื่องมาจากมีหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 9 α ส่วนสัญญาณของ 19-Me ซึ่งอยู่ที่ δ 1.40 เกิด downfield shift เพราะมีหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 2 β

สาร 2.1(23) และ 2.1(25) โดยหลักการ สาร 2.1(23) อาจมี configuration เป็น 5 α หรือ 5 β ตามโครงสร้างสามมิติบางส่วน 2.1(28) หรือ 2.1(29) เมื่อสร้าง molecular model ของโครงสร้าง 2.1(28) และ 2.1(29) พบว่าโครงสร้างแบบหลังเกิด steric interaction อย่างรุนแรงระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 2 กับตำแหน่ง 9 ฉะนั้นภายใต้สภาวะที่ทาปฏิกิริยา เอคโดสเตียรอยด์ที่เป็นแบบ 5 β และมีหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 2 อยู่แบบ α จะไม่เสถียร และจะเกิด epimerization ไปเป็น 5 α analogue เพราะเกิด steric interaction ระหว่างหมู่ 2 α -hydroxy กับไฮโดรเจนตำแหน่ง 9 ในกรณีของ 2.1(29) เป็นที่คาดหมายได้ว่าจะยังเกิด epimerization ที่ตำแหน่ง 5 ไปเป็น 2.1(28) ได้เร็วยิ่งขึ้น เพราะหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 9 มีขนาดใหญ่กว่าไฮโดรเจน นอกจากเหตุผลข้างต้นนี้ ยังพบว่าสาร



2.1(28)



2.1(29)

2.1(23) ควรมีโครงสร้างดังแสดงจากข้อมูล spectroscopy คือข้อมูล ESMS แสดงไอออน $[M+Na]^+$ ที่ m/z 559 ส่วน ^1H -NMR สเปกตรัมของ H-5 แสดงการเกิด downfield shift อย่างมากคืออยู่ที่ δ 4.16 เนื่องจากอยู่ใกล้กับหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 3α และ 9α

วัสดุและวิธีการ

2.1 การปรับเปลี่ยนโครงสร้างและหมู่ฟังก์ชันของวง A และ B

1) การสังเคราะห์ (20R,22R)-2 α ,3 α ,14 α ,20,22,25-Hexahydroxy-5 α -cholest-7-en-6-one [2.1(1)]

(1) 20-Hydroxyecdysone 20,22-acetonide 2,3-dimesylate [2.1(3)]

ละลายสาร 2.1(2) (1.15 กรัม) ใน pyridine (1.5 มิลลิลิตร) คนสารละลายที่อุณหภูมิประมาณ 5 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 5 นาที ค่อยๆเติม MsCl (รวม 0.4 มิลลิลิตร) คนส่วนผสมของปฏิกิริยาที่อุณหภูมิปกติเป็นเวลา 45 นาที เติมน้ำลงไป สกัดส่วนผสมด้วย CHCl₃ (4x25 มิลลิลิตร) ล้างชั้น CHCl₃ ด้วยน้ำ ตูดความชื้นด้วย anhydrous Na₂SO₄ แยกสารผลิตภัณฑ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ CHCl₃-MeOH เป็นตัวชะ สารผลิตภัณฑ์ 2.1(3) (950 มิลลิกรัม) ออกมากับตัวชะ CHCl₃-MeOH (98.5:1.5); IR: $\nu_{\max}$ 3436, 2971, 1659, 1449, 1353, 1252, 1176, 1106, 1024, 981, 909 cm⁻¹; ¹H NMR ดูตาราง 2.1(1); ESMS (+ve): m/z 699 [M+Na]⁺.

(2) สาร 2.1(4)

เติม NaI (320 มิลลิกรัม) และ Zn (200 มิลลิกรัม) ลงในสารละลายของ 20-hydroxyecdysone 20,22-acetonide 2,3-dimesylate [2.1(3)] (900 มิลลิกรัม) ใน DMF (1 มิลลิลิตร) และคนส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ 80 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 2 วัน เติมน้ำลงไป สกัดส่วนผสมด้วย CHCl₃ (3x25 มิลลิลิตร) ตูดความชื้นจากชั้นสารอินทรีย์ แล้วนำไปแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ตัวชะเป็น CHCl₃-MeOH สารผลิตภัณฑ์ 2.1(4) (301 มิลลิกรัม) ออกมากับ CHCl₃-MeOH (99:1); IR: $\nu_{\max}$ 3426, 2971, 1659, 1443, 1376, 1218, 1200, 668 cm⁻¹; ¹H NMR ดูตาราง 2.1(1); ESMS (+ve): m/z 487 [M+H]⁺, 509 [M+Na]⁺.

(3) Deacetonation ของสาร 2.1(4)

นำสาร 2.1(4) (8 มิลลิกรัม) มาละลายใน 70% AcOH (0.5 มิลลิลิตร) เติม benzyltrimethylammonium chloride (13 มิลลิกรัม) แล้วคนส่วนผสมเป็นเวลา 3 วัน เติมน้ำลงไป (10 มิลลิลิตร) สกัดด้วย EtOAc (5x7 มิลลิลิตร) ล้างชั้นสารอินทรีย์ด้วยน้ำ ตู้น้ำด้วย anhydrous Na_2SO_4 ทำสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ตัวชะ CHCl_3 -MeOH (93.5:6.5) ได้สารผลิตภัณฑ์ 2.1(7) (7 มิลลิกรัม, 95%)

สาร 2.1(7): IR : ν_{max} 3436, 2967, 1662, 1381, 757, 661 cm^{-1} ; ^1H NMR ดูตารางที่ 2.1(1); ESMS(-ve) : m/z 445 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

(4) Dihydroxylation ของสาร 2.1(4)

นำ olefin acetone 2.1(4)] (4 มิลลิกรัม) มาละลายใน pyridine (0.3 มิลลิลิตร) เติมสารละลาย OsO_4 (13.6 ไมโครลิตร หรือมี OsO_4 3.4 มิลลิกรัม, เป็นสารละลายที่เตรียมจาก OsO_4 250 มิลลิกรัม ใน pyridine 1000 ไมโครลิตร) คนส่วนผสมปฏิกิริยาเป็นเวลา 5 นาที แล้วเติมสารละลายของ 5% NaHSO_3 (2 มิลลิลิตร) คนเป็นเวลา 10 นาที แล้วสกัดด้วย EtOAc (4x7 มิลลิลิตร) ล้างชั้นอินทรีย์ด้วยน้ำ ตู้น้ำความชื้น แล้วระเหยตัวทำละลาย แยกสารผลิตภัณฑ์ออกจากกันด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ตัวชะ CHCl_3 -MeOH (95:5) ได้สารผลิตภัณฑ์ 2.1 (12) (1.4 มิลลิกรัม, 33%) และ 20-hydroxyecdysone 20,22-acetonide [1.2(11)] (2.7 มิลลิกรัม, 63%)

สาร 1.2(11) : ตรงกับ 20-hydroxyecdysone 20,22-acetonide ที่ได้มีการเตรียมมาแล้ว ¹¹⁷¹ ^1H NMR ดูตารางที่ 2.1(2)

สาร 2.1(12): IR: ν_{max} 3418, 2970, 1654, 1458, 1384, 1258, 1200, 1173, 1075, 1002, 927, 867 cm^{-1} ; ^1H NMR ดูตารางที่ 2.1(2); ESMS(+ve): m/z 543 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

(5) Deacetonation ของสาร 2.1(12)

ละลายสาร 2.1(12) (35 มิลลิกรัม) ใน 70% AcOH (1.2 มิลลิลิตร) คนส่วนผสมของปฏิกิริยาเป็นเวลา 4 วัน แล้ว work up ตามปกติ ทำสารผลิตภัณฑ์ในบรีสุท์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี (ระบบตัวชะ $\text{CHCl}_3:\text{MeOH} = 92:8$) ได้สารผลิตภัณฑ์ 2.1(16) (25 มิลลิกรัม, 77%)

สาร 2.1(16): Colourless needles, mp. 204–206 °C (MeOH-EtOAc); IR: ν_{max} 3420, 2965, 1654, 1383, 1065, 929 cm^{-1} ; ^1H NMR ดูตาราง 2.1(2)

(6) Epimerization ของสาร 2.1(12)

เติม 1 % Na_2CO_3 (0.2 ml) ลงในสารละลายของสาร 2.1(12) (35 มิลลิกรัม) ในเอทานอล (0.8 มิลลิลิตร) คนส่วนผสมเป็นเวลา 5 ชั่วโมง เติมน้ำลงไป (30 มิลลิลิตร) สกัดด้วย n-BuOH ระเหยตัวทำละลาย ทำสารให้บรีสุท์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้สาร 2.1(13) (28 มิลลิกรัม, 80%); ν_{max} 3422, 2971, 2942, 1664, 1458, 1375, 1219, 1175, 1105, 1054, 1001, 905, 868 cm^{-1} ; ^1H NMR ดูตารางที่ 2.1(2); HRFABMS (-ve): m/z 519.3313 $[\text{M}-\text{H}]^-$. $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_7-\text{H}$ requires 519.3322.

(7) Deacetonation ของสาร 2.1(13)

ละลายสาร 2.1(13) (28 มิลลิกรัม) ใน 70% AcOH (1.2 มิลลิลิตร) เติม benzyltrimethylammonium chloride (13 มิลลิกรัม) คนส่วนผสมของปฏิกิริยาเป็นเวลา 4 วัน แล้ว work up ตามปกติ ทำสารผลิตภัณฑ์ในบรีสุท์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้สารผลิตภัณฑ์ 2.1(1) (19 มิลลิกรัม, 74%); ν_{max} 3415, 2925, 1660, 1384, 1062 cm^{-1} ; ^1H NMR ดูตารางที่ 2.1(1); HRFABMS(-ve): m/z 479.3018 $[\text{M}-\text{H}]^-$. $\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{O}_7-\text{H}$ requires 479.3009.

ตารางที่ 2.1(1) ¹H NMR data ของสาร 2.1(1), 2.1(3), 2.1(4) และ 2.1(7)

H	2.1(1) ^a	2.1(3) ^b	2.1(4) ^b	2.1(7) ^a
2	4.01 (m)	4.94 (m)	5.52 [*] (br d, 10.1)	5.43 [‡] (brd, 10)
3	4.42 (br s)	5.12 (br s)	5.69 [*] (br d, 10.1)	5.61 [‡] (brd, 10)
5	3.00 [*]		*	
7	6.26 (br s)	5.87 (d, 2.1)	5.77 (d, 1.8)	6.12 (d, 1.3)
9	3.26 (m)	2.98 (m)	2.86 (br m)	
17	2.93 [*]	2.22 (dd, 9.1, 7.9)	2.23 (t, ca 9)	
22	3.87 (br d, 8.4)	3.63 (dd, 9.4, 2.4)	3.64 (dd, 9.7, 2.1)	3.87 (br d, 9.2)
18-Me	1.19 (s)	0.77 (s)	0.77 (s)	1.03 (s)
19-Me	0.97 (s)	1.03 (br s)	1.04 (s)	1.21 (s)
21-Me	1.56 (s)	1.14 (s)	1.13 (s)	1.55 (s)
26-Me	1.36 (s)	1.22 (s)	1.22 (s)	1.36 (s)
27-Me	1.36 (s)	1.23 (s)	1.23 (s)	1.36 (s)
Acetonide Me	-	1.31, 1.39 (each s)	1.31, 1.41 (each s)	-
MsO	-	3.10 (s), 3.11 (s)	-	-

^aRecorded in pyridine-*d*₅.^bRecorded in CDCl₃.^{*,‡} Assignments may be reversed for signals with the same superscript.^{*}Obscured signal.

ตารางที่ 2.1(2) ^1H NMR data ของสาร 2.1(11) - 2.1(13) และ 2.1(16)

H	2.1(11) ^a	2.1(12) ^b	2.1(13) ^b	2.1(16) ^b
2	4.15 (m)	4.33 (br s)	4.02 (m)	4.34 (br)
3	4.21 (br s)	3.92* (br s)	4.42 (br s)	3.90 [‡]
5	2.98 (dd, 13.1, 3.3)	2.37 [*]	3.02 (br d, 11.1)	2.40 [*]
7	6.24 (d, 2.1)	6.21 (d, 2.3)	6.16 (br s)	6.21 (d, 2.6)
9	3.54 (m)	4.70 (br)	3.23 (m)	4.76 (br)
17	2.74 (t, 8.6)	2.74 (t, 8.3)	2.74 (t, ca 8)	3.00 (t, 8.9)
22	3.93 (dd, 9.7, 2.1)	3.94 (dd, 9.3, 2.8)	3.93 (br d, 8.5)	3.87 (br d, 8.7)
18-Me	1.02 (s) ^c	1.01 (s)	0.99 (s)	1.00 (s)
19-Me	0.99 (s) ^c	0.97 (br s)	0.95 (s)	1.22 (s)
21-Me	1.52 (s)	1.29 (s)	1.30 (s)	1.54 (s)
26-Me	1.33 (s)	1.37 (s)	1.35 (s)	1.38 (s)
27-Me	1.34 (s)	1.37 (s)	1.35 (s)	1.38 (s)
Acetonide Me	1.31, 1.43 (each s)	1.44, 1.53 (each s)	1.43, 1.52 (each s)	-

^aRecorded in CDCl_3 .

^bRecorded in pyridine- d_5 .

^cAssignments may be reversed for signals with the same superscript.

*,[‡],^{*}Obscured signal.

2) การสังเคราะห์ 9-Hydroxy-substituted ecdysteroid analogues

(1) สาร 2.1(20)

นำสาร 2.1(19) (40 มิลลิกรัม) มาละลายใน MeOH (0.5 มิลลิลิตร) แล้วเติม 8% aq. NaOH จากนั้นคนส่วนผสมปฏิกิริยาที่อุณหภูมิปกติเป็นเวลา 35 นาที ทำส่วนผสมให้เป็นกรดด้วย AcOH ที่เจือจาง แล้วสกัดด้วย CHCl_3 (3x10 มิลลิลิตร) ล้างชั้นคลอโรฟอร์มด้วยน้ำ และทำให้แห้งด้วย anhydrous Na_2SO_4 แล้วระเหยตัวทำละลายออกไปภายใต้ความดันต่ำ ทำสารให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ CHCl_3 -MeOH เป็นตัวชะ โดยเพิ่มปริมาณของตัวชะที่มีขั้วสูงกว่า ส่วนย่อยที่ชะด้วย CHCl_3 -MeOH (98.5:1.5) ได้สาร 2.1(20) (35 มิลลิกรัม, 92%); IR: ν_{max} 3434, 2975, 1671, 1656, 1437, 1372, 1206, 1172, 1003, 759 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ ดูตาราง 2.1(3); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity) 525 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100).

(2) การขจัดหมู่ acetonide ของสาร 2.1(20)

นำสาร 2.1(20) มาขจัดหมู่ acetonide โดยใช้ 70% AcOH และมี benzyltrimethylammonium chloride อยู่ด้วย ได้สารผลิตภัณฑ์ 2,3-didehydro 2,3-dideoxy-5 α -9,20-didihydroxyecdysone [2.1(21)] (7 มิลลิกรัม, 76%); IR: ν_{max} 3422, 2967, 1671, 1655, 1437, 1383, 1314, 1199, 1155, 1067, 955, 916 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ ดูตาราง 2.1(3); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity) 485 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100).

(3) Dihydroxylation ของสาร 2.1(20): การสังเคราะห์สาร 5 α -9,20-dihydroxyecdysone 20,22-acetonide [2.1(22)] และ 2,3-diepi-5 α -9,20-didihydroxyecdysone 20,22-acetonide [2.1(23)]

เติมสารละลาย OsO_4 ใน pyridine (0.15 มิลลิลิตร, เตรียมจากการละลาย OsO_4 1 กรัม ใน pyridine 5 มิลลิลิตร ฉะนั้นปริมาณ OsO_4 ที่ใช้คือ 21 มิลลิกรัม) ลงในสารละลายของสาร 2.1(20) (42 มิลลิกรัม) ใน pyridine (0.5 มิลลิลิตร) คนส่วนผสมปฏิกิริยาเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติม 5% aq. NaHSO_3 ลงไป แล้วคนต่อไปอีก 5 นาที สกัดส่วนผสมด้วย n -BuOH (3x10 มิลลิลิตร) นำชั้นบิวทานอลมาล้างด้วยน้ำแล้วระเหยตัว

ทำละลายออกไปภายใต้ความดันต่ำ ทำการแยก crude product ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้สาร 2.1(22) (9 มิลลิกรัม, 20%) ออกมากับตัวชะ CHCl_3 -MeOH (94.5 : 5.5) และ สาร 2.1(23) ออกมากับตัวชะ CHCl_3 -MeOH (94 : 6)

สาร 2.1(22): IR: ν_{max} 3431, 2965, 2927, 1655, 1384, 1256, 1172, 1107, 1076 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ ดูตาราง 2.1(3); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity) 559 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100).

สาร 2.1(23): IR: ν_{max} 3408, 2975, 1676, 1377, 1255, 1173, 1109, 953, 806 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ ดูตาราง 2.1(4); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity) 559 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100).

(4) การขจัดหมู่ acetonide ของสาร 2.1(22)

นำสาร 2.1(22) มาขจัดหมู่ acetonide โดยใช้วิธีเดียวกับสาร 2.1(4) ได้ สารผลิตภัณฑ์ 5 α -9,20-dihydroxyecdysone [2.1(24)] (7 มิลลิกรัม, 84%); $^1\text{H-NMR}$ ดูตาราง 2.1(4); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity) 519 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100).

(5) การขจัดหมู่ acetonide ของสาร 2.1(23)

นำสาร 2.1(23) มาขจัดหมู่ acetonide โดยใช้วิธีเดียวกับสาร 2.1(22) ได้ สารผลิตภัณฑ์ 2,3-diepi-5 α -9,20-dihydroxyecdysone [2.1(25)] (13 มิลลิกรัม, 88%); $^1\text{H-NMR}$ ดูตาราง 2.1(4); ESMS (+ve): m/z (% rel. intensity) 519 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100).

ตารางที่ 2.1(3) ^1H NMR data ของสาร 2.1(20)-2.1(22)

H	2.1(20) ^a	2.1(21) ^b	2.1(22) ^b
2	5.64 (<i>m</i>)	5.70 (<i>m</i>)	4.51 (<i>m</i>)
3	5.64 (<i>m</i>)	5.70 (<i>m</i>)	4.00 (<i>m</i>)
5	3.08 (<i>dd</i> , 10.5, 6.2)		3.62 (<i>dd</i> , 12.1, 3.5)
7	5.88 (<i>s</i>)	6.13 (<i>s</i>)	6.18 (<i>s</i>)
9	-	-	-
17	2.24 (<i>dd</i> , 9, 8.5)	2.94 (<i>t</i> , 9)	2.70 (<i>t</i> , 8.5)
22	3.63 (<i>dd</i> , 8.8, 1.5)	3.87 (<i>brd</i> , 9.3)	3.94 (<i>dd</i> , 9.6, 2.9)
18-Me	0.81 (<i>s</i>)	1.21 (<i>s</i>)	1.00 (<i>s</i>)
19-Me	0.91 (<i>s</i>)	1.00 (<i>s</i>)	1.54 (<i>s</i>) [‡]
21-Me	1.16 (<i>s</i>)	1.59(<i>s</i>)	1.54 (<i>s</i>)
26-Me	1.22 (<i>s</i>)	1.39 (<i>s</i>)	1.37 (<i>s</i>)
27-Me	1.23 (<i>s</i>)	1.39 (<i>s</i>)	1.38 (<i>s</i>)
Acetonide Me	1.31, 1.40 (each <i>s</i>)	-	1.32, 1.44 [‡] (each <i>s</i>)

^aRecorded in CDCl_3 .^bRecorded in pyridine- d_5 .[‡]Assignments may be reversed for signals with the same superscript.

ตารางที่ 2.1(4) ^1H NMR data ของสาร 2.1(23)-2.1(25)

H	2.1(23) ^a	2.1(24) ^a	2.1(25) ^a
2	4.12 (m)	4.46 (m)	4.13 (m)
3	4.47 (m)	3.90 (m)	4.47(m)
5	4.16 (dd, 12.2, 3.9)	3.42 (dd, 11.5, 3.7)	4.17 (dd, 12.1, 3.8)
7	6.15 (s)	6.09 (s)	6.15 (s)
9	-	-	-
17	2.69 (t, 8.5)	2.82 (t, 8.7)	2.94 (t, 8.7)
22	3.94 (dd, 9.4, 3.1)	3.79 (br d, 8.8)	3.87 (br d, 8.8)
18-Me	1.10 (s) [‡]	1.05 (s)	1.11 (s)
19-Me	1.02 (s) [‡]	1.40 (s)	1.22 (s)
21-Me	1.54 (s)	1.51(s)	1.57 (s)
26-Me	1.38 (s)	1.34 (s)	1.39 (s)
27-Me	1.38 (s)	1.34 (s)	1.39 (s)
Acetonide Me	1.31, 1.45 (each s)	-	-

^aRecorded in pyridine- d_5 .

[‡]Assignments may be reversed for signals with the same superscript.

เอกสารอ้างอิง

บทนำ

- 2[1] Fujioka, S.; Sakurai, A. *Nat. Prod. Rep.* 1997, 1.
- 2[2] Hetru, C.; Rousel, J.-P.; Mori, K.; Nakatani, Y. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 1986, 302, 417.
- 2[3] Richter, K.; Adam, G.; Vorbrodt, H. M. *J. Appl. Entomol.* 1987, 103, 532.
- 2[4] Lehmann, M.; Vorbrodt, H.-M.; Adam, G.; Koolman, J. *Experientia* 1988, 44, 355.
- 2[5] Luu, B.; Werner, F. *Pestic. Sci.* 1996, 46, 49.
- 2[6] McMoris, T. C. *Lipids* 1997, 32, 1303 and references cited therein.
- 2[7] Rees, H. H. Pathways of Biosynthesis of Ecdysone. In *Ecdysone*; Koolman, J. Ed.; Thieme Verlag: Stuttgart, 1989; pp. 152-160.
- 2[8] Haag, T.; Hetru, C.; Kappler, C.; Moustier, A. M.; Hoffmann, J. A.; Luu, B. *Tetrahedron* 1988, 44, 1397.
- 2[9] Kappler, C.; Hetru, C.; Durst, F.; Hoffmann, J. A. Enzymes Involved in Ecdysone Biosynthesis. In *Ecdysone*; Koolman, J. Ed.; Thieme Verlag: Stuttgart, 1989; pp. 161-166.
- 2[10] Walsh, C. *Tetrahedron* 1982, 38, 871.
- 2[11] Burger, A.; Colobert, F.; Hetru, C.; Luu, B. *Tetrahedron* 1988, 44, 1141.
- 2[12] McMorris, T. C.; Chavez, R. G.; Patil, P. A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* 1996, 295.
- 2[13] Donaubaue, R.; Greaves, A. M.; McMorris, T. C. *J. Org. Chem.* 1984, 49, 2833.

ผลการวิจัยและอภิปรายผล และวัสดุและวิธีการ

2[14] Suksamram, A.; Pattanaprateep, P. *Tetrahedron* 1995, **51**, 10633.

โครงการย่อยกลุ่มที่3: การหาสารควบคุมศัตรูพืชจากธรรมชาติ

โครงการย่อยกลุ่มที่ 3: การหาสารควบคุมศัตรูพืชจากธรรมชาติ

โครงการวิจัยหน่วยที่ 1: พืชสกุล *Piper*

บทนำ

1. คำนำ

การใช้สารสังเคราะห์ในการกำจัดศัตรูพืช ทำให้เกิดปัญหาสารเคมีตกค้างในสิ่งแวดล้อมซึ่งเป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ เพราะสารเคมีสังเคราะห์มักสลายตัวได้ยากในธรรมชาติ ปัญหาการดื้อยาของศัตรูพืชที่เพิ่มมากขึ้นทำให้ต้องใช้สารเคมีในปริมาณมากหรือต้องใช้สารเคมีที่มีฤทธิ์รุนแรงมากขึ้นในการกำจัดศัตรูพืช และปัญหาจากการที่สารเคมีสังเคราะห์มีความเฉพาะเจาะจงน้อยในการกำจัดศัตรูพืช ตลอดจนกระแสความตื่นตัวในการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อมในปัจจุบัน เป็นแรงกระตุ้นให้นักวิทยาศาสตร์เริ่มหันกลับมาค้นหาสารกำจัดและ/หรือสารควบคุมศัตรูพืชจากธรรมชาติกันมากขึ้น

2. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

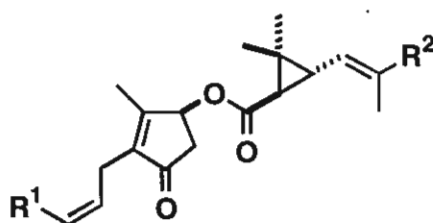
ในการศึกษาหาสารควบคุมศัตรูพืชนั้น สิ่งที่เราไม่ได้คิดถึงคือต้องมีการศึกษาหาสารควบคุมศัตรูพืชจากธรรมชาติ เพราะเป็นที่ทราบกันดีว่า พืชได้พยายามสร้างสารขึ้นมาต่อสู้ป้องกันการรุกรานจากศัตรูที่มารุกราน^{3.1[1]} ไม่ว่าจะเป็นแมลง สัตว์ประเภทอื่นๆ แบคทีเรีย เชื้อรา หรือแม้แต่พืชด้วยกันเอง จากวิวัฒนาการอันยาวนาน พืชได้พยายามปรับเปลี่ยนสร้างสารที่เหมาะสม ฉะนั้น จึงขาดไม่ได้ที่จะต้องศึกษาด้านนี้ เพื่อที่จะนำสารที่พืชสร้างขึ้นมาใช้ในการควบคุมศัตรูพืช หรือปรับเปลี่ยนสารเหล่านั้นให้มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการควบคุมศัตรูพืชให้ดียิ่งขึ้น สำหรับเรื่องนี้ค่อนข้างเป็นเรื่องที่ทราบกันดีแล้ว จึงจะไม่ขอก้าวในรายละเอียด

3. วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อสกัดแยก หาสูตรโครงสร้าง และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารควบคุมศัตรูพืชที่ได้จากธรรมชาติ

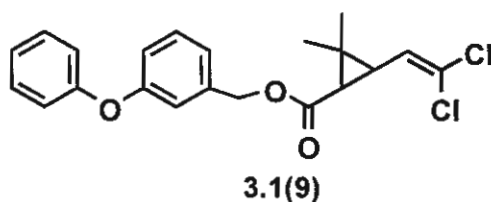
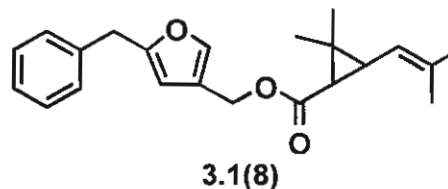
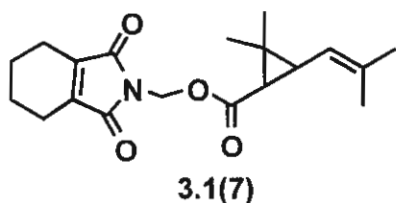
4. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

หากศึกษาประวัติการใช้สารควบคุมศัตรูพืชตั้งแต่อดีตจะเห็นได้ว่า ได้มีการใช้สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมาเป็นเวลานานมาแล้ว เช่นได้มีการนำใบยาสูบเข้าไปในประเทศอังกฤษตั้งแต่ปี ค.ศ. 1585 และภายในปี ค.ศ. 1700 ได้มีการใช้สารสกัดน้ำ (aqueous extract) จากยาสูบในการควบคุมเพลี้ย^{3.1[2]} ในปี ค.ศ. 1910 ได้มีการผลิต nicotine sulphate จากยาสูบออกขายเป็นสารป้องกันและกำจัดแมลงที่มีผู้นิยมใช้กันมาก^{3.1[3]} ตัวอย่างการใช้ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมาป้องกันและกำจัดแมลงที่ประสบความสำเร็จอย่างดียิ่ง ได้แก่การใช้สารพวก pyrethroids จากพืช *Pyrethrum cinerariaefolium* ในช่วงแรกได้มีการใช้ลักษณะพืชสดเป็นผง และใช้ในยุโรปในช่วงปี ค.ศ. 1820-1840 ซึ่งก่อนหน้านี้ได้มีการใช้กันในบางประเทศทางตะวันออกกลาง ได้มีการหาสารออกฤทธิ์ในพืชชนิดนี้ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1954 และได้สารในกลุ่ม pyrethroids หลายชนิด เช่น pyrethrin I [3.1(1)], pyrethrin II [3.1(2)], cinerin I [3.1(3)], cinerin II [3.1(4)], jasmolin I [3.1(5)] และ jasmolin II [3.1(6)] เป็นต้น^{3.1[4,5]} จากนั้นได้มีการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ (derivatives) ต่างๆ ตามมาด้วยการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ต่อแมลง และได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ทางชีวภาพ (SAR) พบว่าหมู่ cyclopropane carboxylate มีความจำเป็นต่อการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งบุคคลที่ถือว่าเป็นผู้บุกเบิกสำคัญด้านนี้คือ Elliott^{3.1[4,6]} ทำให้เกิดสาร pyrethroids สังเคราะห์เกิดขึ้นมากมาย โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้มีฤทธิ์ทางชีวภาพดีขึ้น มีโครงสร้างที่ง่ายขึ้นเพื่อลดต้นทุนในการผลิต และยังคงมีสมบัติไม่มีพิษต่อสัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยนม ทำให้เกิดสาร pyrethroids สังเคราะห์มากมาย เช่น tetramethrin [3.1(7)], resmethrin [3.1(8)], pyrethrin [3.1(9)] เป็นต้น จะเห็นได้ว่า การศึกษาด้าน SAR ได้นำไปสู่สารควบคุมแมลงที่มีประสิทธิภาพมากกว่าสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเดิม แต่ยังคงคุณลักษณะของความเฉพาะเจาะจงต่อแมลงเป้าหมาย และความมีพิษน้อยหรือไม่มีพิษต่อมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่น ๆ



Natural pyrethroids

R ¹	R ²		
CH ₂ =CH-	-CH ₃	Pyrethrin I	3.1(1)
CH ₂ =CH-	-CO ₂ CH ₃	Pyrethrin II	3.1(2)
CH ₃ -	-CH ₃	Cinerin I	3.1(3)
CH ₃ -	-CO ₂ CH ₃	Cinerin II	3.1(4)
CH ₃ -CH ₂ -	-CH ₃	Jasmolin I	3.1(5)
CH ₃ -CH ₂ -	-CO ₂ CH ₃	Jasmolin II	3.1(6)



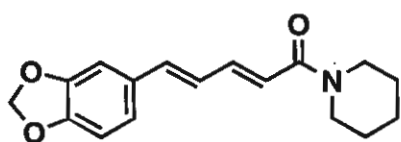
ความสำเร็จของการพัฒนาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติกลุ่ม pyrethroids มาเป็นสารป้องกันและกำจัดแมลงที่มีประสิทธิภาพสูงเป็นตัวอย่างที่ดีของการนำสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมาปรับเปลี่ยนจนได้สารที่เหมาะสมในการควบคุมแมลง ประเทศไทยมีพืชหลายชนิดที่มีฤทธิ์ในการป้องกันและกำจัดแมลง และเชื่อว่ยังมีพืชอีกจำนวนมากที่ยังไม่ได้มีการตรวจสอบว่ามีสารที่มีฤทธิ์ดังกล่าวนี้ อยู่ด้วย ฉะนั้นหากมีการนำพืชที่มีการศึกษาส่วนประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพมาแล้ว เช่น พืชในสกุล *Piper* มาทำการศึกษาอย่างละเอียดลึกซึ้ง และศึกษาในแง่ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ในการเป็นสารควบคุมแมลง ก็อาจจะนำไปสู่การค้นหายาควบคุมแมลงใหม่ที่มี สมบัติแตกต่างไปจากสารควบคุมแมลงกลุ่มต่างๆที่มีอยู่ ขณะเดียวกันการศึกษารวบรวม ส่วนประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชที่มีอยู่ ก็อาจนำไปสู่การค้นพบสารควบคุมแมลงหรือศัตรูพืช สัตว์หรือมนุษย์ชนิดอื่นๆได้

พืชในประเทศไทยหลายชนิดที่ได้มีรายงานว่ามฤทธิ์ในการป้องกันและกำจัดศัตรูพืช สัตว์ หรือมนุษย์ พืชบางชนิดในบางสกุล (genus) ก็มีรายงานอย่างประปรายว่ามีฤทธิ์ดังกล่าว แต่พืช หลายชนิดในบางสกุล (species) ได้มีรายงานค่อนข้างมากกว่ามฤทธิ์ในการป้องกันและกำจัดแมลง หรือศัตรูพืช สัตว์ รวมทั้งมนุษย์ รวมทั้งรายงานที่กล่าวถึงฤทธิ์ทางชีวภาพด้านอื่นๆ สิ่งที่น่าเสียดายคือ งานวิจัยส่วนใหญ่สิ้นสุดลงในขั้นตอนของการหาสูตรโครงสร้างของสารที่แยกออกมาได้จากพืช บางกรณีมีการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพสารบางชนิดที่แยกได้เท่านั้น

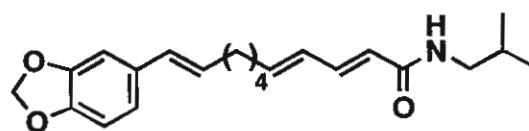
พืชในสกุล *Piper* เป็นสกุลใหญ่ในวงศ์ Piperaceae มีอยู่มากกว่า 700 ชนิด สำหรับประเทศไทยมีพืชในสกุลนี้อยู่มากกว่า 10 ชนิด^{3.1(7)} คือ *Piper aurantiacum* Miq. (ชะพลูป่า), *P. betel* Linn. (พลู), *P. chaba* Hunt (ติป्ली), *P. churva* Roxb. (พริกนก), *P. flavimarginatum* C. DC. (ย่านพริกนก), *P. kurzii* Ridl. (พริกนก), *P. longamentum* C. DC. (พริกนก), *P. longum* Linn. (พริกทาง), *P. nigrum* Linn. (พริกไทย), *P. porphyrophyllum* N.E. Br. (พลูตุ๊กแก), *P. ribesoides* Wall. (ตะค้ำนเล็ก), *P. sarmentosum* Roxb. (ข้าพลู), *P. subpeltatum* Kenth = *P.*

umbellatum Linn. (พลูตีนช้าง), *P. subpenninerve* Ridl. (พลูดง) พืช *P. aurantiacum* ตำรายาพื้นบ้านล้านนาใช้ทั้งต้นตำพอก แก้อักเสบจากแมลงสัตว์กัดต่อย สารสกัดด้วยแอลกอฮอล์มีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตที่ผิดปกติของหัวใจ ลดความดันโลหิต และกระตุ้นการบีบตัวของลำไส้และมดลูกในสัตว์ทดลอง^{3.1[8]} สรรพคุณทางแพทย์แผนโบราณของ *P. chaba* ได้มีรายงานไว้ว่า ส่วนรากและผลมีการนำไปใช้รักษาโรคมากมายหลายชนิด เช่นโรคหอบหืด หลอดลมอักเสบ เป็นไข้ อาการปวดท้อง และริดสีดวงทวาร^{3.1[9,10]} *P. betel* ก็มีสรรพคุณมากเช่นกัน เช่นใบพลูที่ปิ้งให้ร้อนแล้วเอามาปิดที่หน้าอกจะช่วยบรรเทาอาการไอและหอบหืด ใบใช้แก้ท้องผูกในเด็ก น้ำมันจากก้านใบใช้ทาแก้อาการบวม^{3.1[9]} ในสกุลนี้ *P. nigrum* เป็นชนิดที่มีการใช้กันอย่างกว้างขวางมาก ใช้แก้อาการระคายเคือง รูมาติซึม และอาการปวดศีรษะ มีรายงานว่สตรีมาเลเซียเคยใช้พริกไทยดำในการทำให้เกิดการแท้ง โดยรับประทานกับน้ำผึ้งและขิง^{3.1[9]} สำหรับ *P. porphyrophyllum* ได้มีรายงานว่าในมาเลเซียได้มีการใช้เมื่อมีอาการปวดที่กระดูก เจ็บหน้าอก รักษาโรคเรื้อน อาการปวดท้องในเด็กเล็ก และรักษาโรคผิวหนังบางชนิด^{3.1[9]} ใบของ *P. rebesoids* เมื่อนำมาตำแล้วใช้พอกแก้อาการบวมของผิวหนัง สำหรับ *P. sarmentosum* มีผู้ใช้รากรักษาอาการไอเรื้อรังและหอบหืดโดยการเคี้ยวกับผลหมาก ใช้ร่วมกับขิงเพื่อแก้อาการปวดฟัน^{3.1[9]} ส่วน *P. subpeltatum* นั้นได้มีรายงานการใช้เป็นยาพอกแผลสด ใช้รักษาการผิดปกติของกระเพาะและแผลฟกช้ำ และยังใช้เป็นยาขับปัสสาวะ^{3.1[9]}

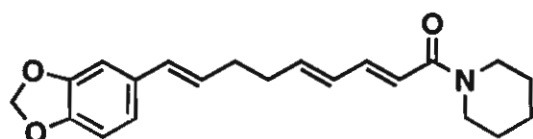
ในแง่เคมีของพืชสกุล *Piper* ได้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง ทำให้แยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติออกมาได้หลายประเภท^{3.1[11]} คือ alkaloids/amides, propenylphenols, lignans, neolignans, terpenes, steroids, kawapyrones, piperolides, chalcones, dihydrochalcones, flavones และ flavanones สำหรับสารกลุ่มแรกคือ alkaloids/amides นั้น ถือว่าเป็นสารหลักที่เป็นลักษณะสำคัญของพืชในตระกูลนี้ สาร amide ที่สำคัญคือ piperine [3.1(10)] เป็นสารที่พบในสกุล *Piper* หลายชนิด รวมทั้ง *P. aurantiacum*,^{3.1[12]} *P. album*,^{3.1[13]} *P. chaba*,^{3.1[14]} *P. longum*,^{3.1[15-17]} และ *P. nigrum*,^{3.1[18-21]} ได้มีผู้รายงานว่าสารนี้มีฤทธิ์กดระบบประสาทส่วนกลาง ลดไข้ บรรเทาปวด และลดการอักเสบ^{3.1[22]} จาก *P. nigrum* ยังได้มีการแยก pipericide [3.1(11)] ซึ่งมีฤทธิ์ในการฆ่าแมลง adzuki bean weevils (*Callosobruchus chinensis*)^{3.1[23]} จากพืชชนิดเดียวกันยังได้มีการแยกสารพวก amides อีก 7 ชนิด ซึ่งมีฤทธิ์ฆ่าตัวอ่อนของแมลง *Toxocara canis*^{3.1[24]} ได้มีการแยก dihydropipernonaline [3.1(12)] ซึ่งมีฤทธิ์ coronary vasorelaxant จากผลของ *P. longum*^{3.1[25]} ได้มีผู้แยกสารพวก amides 6 ชนิดจาก *P. guineense* ซึ่งมีฤทธิ์ anti-feedant ต่อตัวอ่อนของแมลง chilopartellus^{3.1[26]} ในจำนวนนี้ piperine [3.1(10)] และ $\Delta^{\alpha,\beta}$ -dihydropiperine [3.1(13)] มีฤทธิ์สูงสุด ส่วน $\Delta^{\alpha,\beta}$ -dihydrowisanine [3.1(14)] และ trichostachine [3.1(15)] มีฤทธิ์ปานกลาง ส่วน wisanine [3.1(16)] และ amide [3.1(17)] มีฤทธิ์ต่ำ ฉะนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีข้อสรุปว่า หมู่ methylenedioxyphenyl และ alicyclic amide มีความจำเป็นต่อการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่สูง ได้มีผู้ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของ



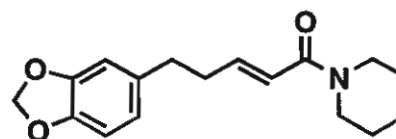
3.1(10)



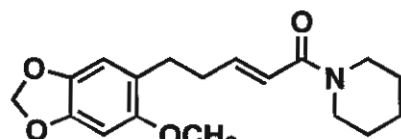
3.1(11)



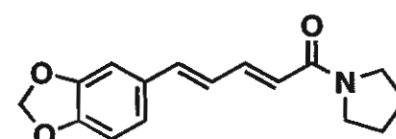
3.1(12)



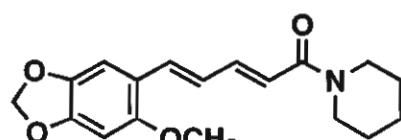
3.1(13)



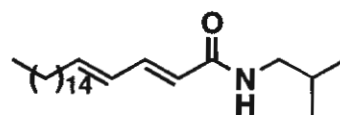
3.1(14)



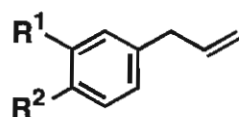
3.1(15)



3.1(16)



3.1(17)



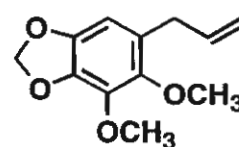
3.1(18) $R^1 = R^2 = \text{OAc}$

3.1(19) $R^1 = \text{OH}; R^2 = \text{OCH}_3$

3.1(20) $R^1 = \text{OAc}; R^2 = \text{OCH}_3$

3.1(21) $R^1 = \text{H}; R^2 = \text{OH}$

3.1(22) $R^1 = R^2 = \text{OH}$



3.1(23)

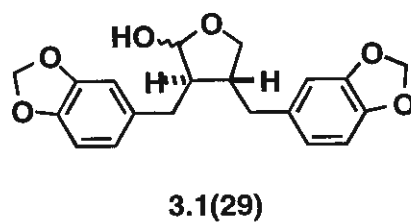
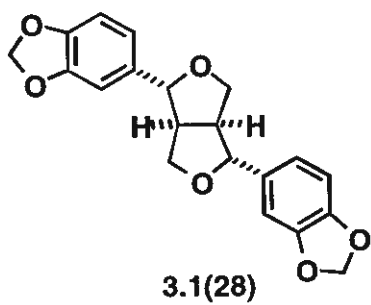
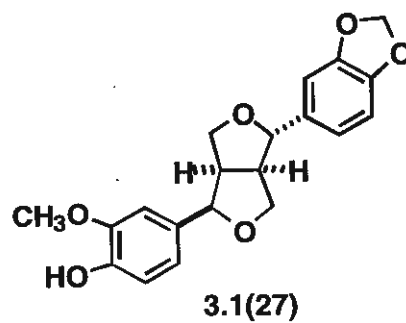
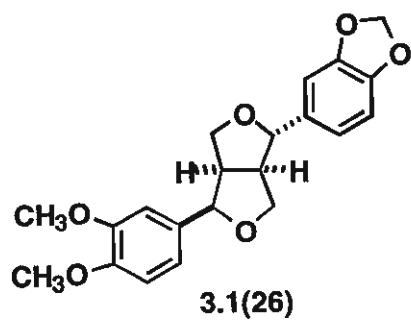
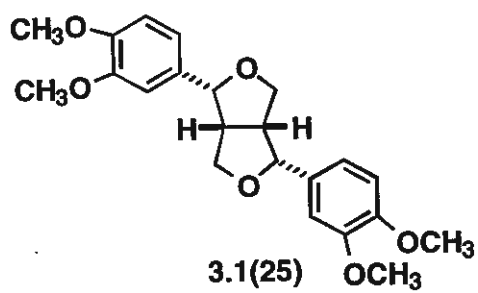
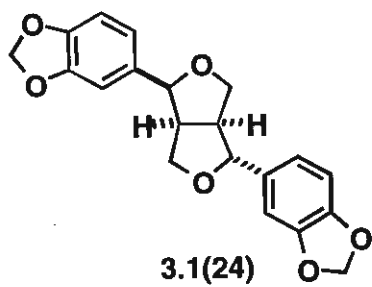
สารในพืชชนิดนี้เพิ่มเติม โดยศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ในการเป็นสารฆ่าแมลง^{3.1[27]} นอกจากนี้ยังมีสารพวก alkaloids/amides ที่ได้มีการค้นพบแล้วจากพืชสกุล *Piper* และได้มีการรวบรวมอ้างอิงไว้แล้ว^{3.1[11]}

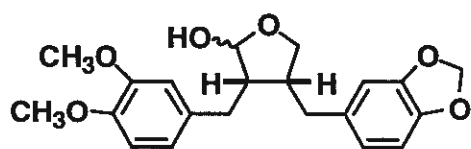
สารในกลุ่ม propenylphenols ที่แยกได้จากใบของ *P. betel* คือสาร [3.1(18)] ถึง [3.1(22)] มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อราและ nematode^{3.1[28]} สาร dillapiole [3.1(23)] ซึ่งแยกมาจาก *P. aduncum*^{3.1[29]} มีฤทธิ์ในการฆ่าพวกหอย *Biomphalaria glabrata* สารกลุ่ม lignans และ neolignans ที่พบในพืชสกุล *Piper* ก็มีโครงสร้างแตกต่างกันมากพอสมควร เช่นจาก *P. longum* พบ lignan (+)-asarinine [3.1(24)]^{3.1[30]}, (+)-diaudesmin [3.1(25)]^{3.1[31]}, fargesin [3.1(26)]^{3.1[30]}, pluviatilol [3.1(27)]^{3.1[30]} และ sesamin [3.1(28)]^{3.1[30]} ส่วน *P. nigrum* ได้มีการพบ lignans (-)-cubebin [3.1(29)]^{3.1[32]}, (-)-3,4-dimethoxy-3,4-desmethylenedioxycubebin [3.1(30)]^{3.1[32]}, (-)-3',4'-dimethoxy-3',4'-desmethylenedioxycubebin [3.1(31)]^{3.1[32]} พืชชนิดหลังนี้มีการพบ neolignan ด้วยคือ (-)-piperenone [3.1(32)]^{3.1[33]}

สารกลุ่ม terpenoids ที่พบในสกุล *Piper* เป็นพวก monoterpenoids และ sesquiterpenoids และแทบไม่มีรายงานการพบ diterpenoid เลย ส่วนพวก steroids และ triterpenoids นั้น เป็นชนิดที่รู้จักกันดีแล้วในพืชสกุลอื่นๆ^{3.1[11]} สาร kawapyrones เป็นสารพวก δ -lactones ซึ่งมีหมู่ styryl หรือ dihydroxystyryl อยู่ เป็นสารกลุ่มเล็กๆที่แยกจากพืชในสกุลนี้ ส่วนใหญ่ได้จาก *P. methylsticum* ตัวอย่างสารในกลุ่มนี้คือ yangonin [3.1(33)]^{3.1[34]} มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของอะมีบา *Entamoeba histolytica*

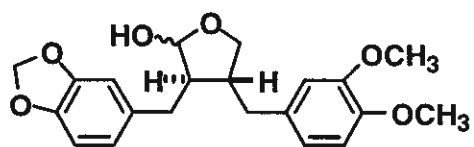
สารกลุ่ม piperolides เป็นสารพวก cinnamylidone butenolides เพิ่งพบใน *P. sanctum* เท่านั้น เช่น 7,8-epoxypiperolides [3.1(34)]^{3.1[35]} สารกลุ่ม chalcones และ dihydrochalcones ที่พบในพืชสกุลนี้ ก็เป็นกลุ่มเล็กๆที่พบในพืชเพียงไม่กี่ชนิด สารกลุ่มนี้ส่วนใหญ่พบใน *P. aduncum*^{3.1[36,37]} เช่น adunctin A [3.1(35)] ซึ่งได้มีการศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียด้วย^{3.1[10]} และ 2',3'-dihydroxy-4',6'-dimethoxychalcone [3.1(36)] จาก *P. hispidum*^{3.1[38]} ส่วนสารกลุ่ม flavones และ flavanones ที่พบในพืชสกุลนี้ เป็นกลุ่มที่ค่อนข้างเล็ก เช่นพบ tectochrysin [3.1(37)] จาก *P. sylvaticum*^{3.1[39]} และ pinostrobin [3.1(38)] จาก *P. aduncum*^{3.1[40]}

นอกจากนี้ยังพบสารประเภทต่างๆที่ไม่ได้จัดกลุ่มไว้ข้างต้น เช่น long chain alkanes, alcohols, acids และ esters รวมทั้ง oxygenated cyclohexanes สารบางชนิดก็มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ เช่นฤทธิ์ในการฆ่าหอย *Biomphalaria glabrata*^{3.1[29]}

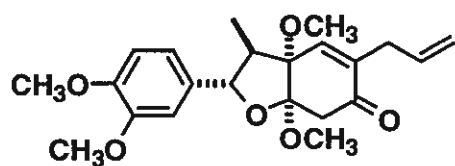




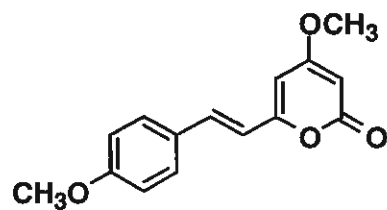
3.1(30)



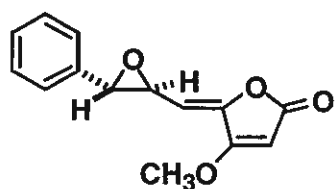
3.1(31)



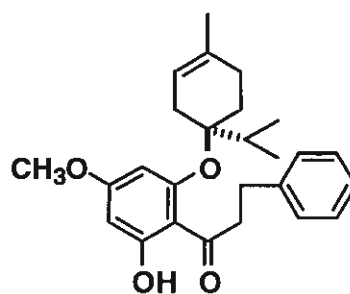
3.1(32)



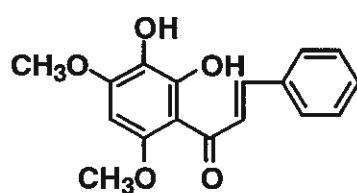
3.1(33)



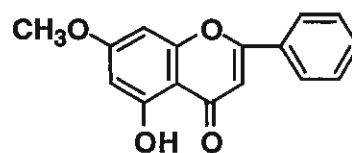
3.1(34)



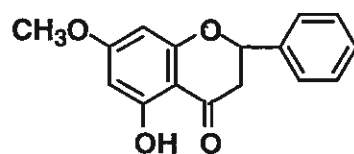
3.1(35)



3.1(36)



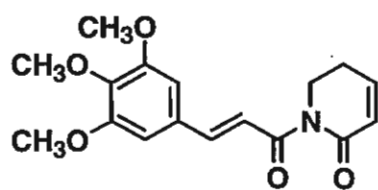
3.1(37)



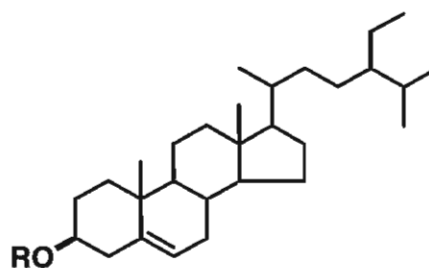
1. ดีปลี (*Piper chaba* Hunt)

ดีปลี (*Piper chaba* Hunt) เป็นพืชในวงศ์ Piperaceae ดีปลีมีชื่อพ้องหลายชื่อ ได้แก่ *P. arnotianum* C. DC, *P. callosum* Oprez, *P. longum* Blume, *P. maritimum* Opiz, *P. officinarum* C. DC, *P. retrofractum* Vahl. และ *P. sarmentosum* Wall.^{3.1[41]} สำหรับชื่อพื้นเมืองที่รู้จักกันคือ ดีปลีเชือก ประดงข้อ ปานนุและพิษพญาไฟ^{3.1[42]} ดีปลีเป็นพืชเมืองร้อน มีปลูกมากในอินเดีย อินโดนีเซีย มาเลเซียและไทย^{3.1[42]} ดีปลีเป็นไม้เถาที่มีรากยึดเกาะออกบริเวณข้อต่อของลำต้น ใบเป็นใบเดี่ยว ออกสลับกัน ปลายใบเรียวแหลม โคนใบเบี้ยว ใบหนาและมันคล้ายหนัง ดอกออกเป็นช่อ ดอกตัวผู้และตัวเมียอยู่คนละต้น ผลอัดกันแน่นเป็นช่อ^{3.1[41,42]} ดีปลีถูกนำมาใช้เป็นเครื่องเทศสำหรับแต่งกลิ่นและถนอมอาหาร^{3.1[42]} ประโยชน์ทางยาของดีปลีใช้เป็นยารักษาโรคหลายชนิดดังที่กล่าวข้างต้น^{3.1[9,10,41]} นอกจากนี้ดีปลียังแสดงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอีกมากมาย เช่น ใช้ดีปลีฆ่าตัวอ่อนของไส้เดือน *Toxocara canis*^{3.1[41]} Areekul และคณะ^{3.1[43]} ได้พบว่าส่วนที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ของใบดีปลีแห้งมีประสิทธิภาพปานกลางในการไล่ตัวแก่ของ oriental fruit fly, *Dacus dorsalis* นอกจากนี้ จุฑามาส ศตสุขและคณะ^{3.1[44]} ได้รายงานว่าสารสกัดจากดีปลีมีประสิทธิภาพสูงในการฆ่าหนอนใยผัก และยังมีพิษต่อหนอนกระทู้ผัก หนอนเจาะสมอฝ้าย เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ตัวงั่วเขียว ตัวงั่วขาวโพด แมลงวันทอง ลูกน้ำและยุง แต่มีพิษน้อยต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม คือเพียงครึ่งหนึ่งของสารสกัด pyrethrum ซึ่งใช้กันอย่างแพร่หลาย

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของดีปลีเริ่มในปี ค.ศ. 1935 Bose^{3.1[45]} ได้สกัดแยก piperine [3.1(10)] จากลำต้นของดีปลี ต่อมา Mishra และ Tewari^{3.1[46]} ได้ทำการแยก piperine [3.1(10)], pipartine [3.1(39)] และ β -sitosterol [3.1(40)] จากลำต้นของดีปลีในชั้นปิโตรเลียมอีเทอร์ เมื่อเร็ว ๆ นี้ Bhandari และคณะ^{3.1[47]} ได้ทำการสกัดลำต้นดีปลีด้วยเอทานอล แล้วนำสารสกัดที่ละลายในคลอโรฟอร์มมาทำโครมาโตกราฟี สามารถแยกสารผสมของสอง epimer ของ [8R,8'R]-9-hydroxy-3,4-dimethoxy-3',4'-methylenedioxy-9,9'-epoxy lignan [3.1(41)] โดยมี 9 α -isomer เป็นไอโซเมอร์หลัก . สำหรับการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของผลดีปลีได้มีผู้ทำวิจัย 4 คนคือ คณะของ Gupta ได้ทำการแยก methyl piperate [3.1(42)]^{3.1[48]}, N-isobutyl-trideca-13-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2,4,12-trienamide [3.1(43)]^{3.1[49]}, filifline [3.1(44)]^{3.1[50]} และ (2E,4E,8Z)- N-isobutyl-eicosatrienamide [3.1(45)]^{3.1[51]} จากผลดีปลี คณะของ Ahn^{3.1[52,53]} ได้ศึกษาส่วนที่สกัดด้วยเฮกเซนของผลดีปลีสามารถแยก piperine [3.1(10)], pipernonaline [3.1(46)], และ piperidide ใหม่ 2 ตัวคือ piperoctadecalidine [3.1(47)] และ pipereicosalidine [3.1(48)] Kikuzaki และคณะ^{3.1[54]} ได้วิเคราะห์ส่วนที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนของผลดีปลีโดยเทคนิค HPLC/APCI-MS พบ unsaturated amides ใหม่ 7 ชนิดคือ 1-(octadeca-2E,4E,12Z-trienoyl)piperidine [3.1(49)], 1-(eicosa-2E,4E,14Z-trienoyl)piperidine [3.1(50)], N-isobutyl-2E,4E,12Z-octadecatrienamide [3.1(51)], N-isobutyl-2E,4E,14Z-eicosatrienamide [3.1(52)], 1-

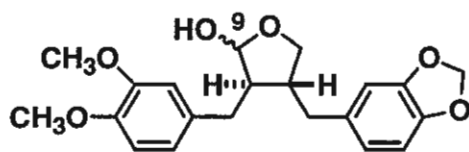


3.1(39)

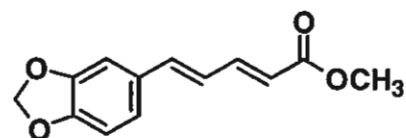


3.1(40) R = H

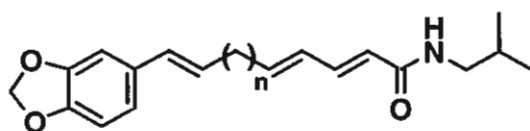
3.1(58) R = β -D-glucopyranosyl



3.1(41)



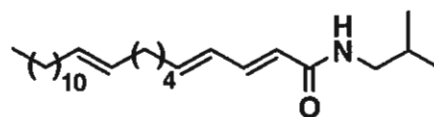
3.1(42)



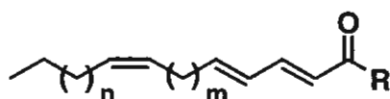
3.1(43) n = 6

3.1(63) n = 2

3.1(65) n = 3



3.1(44)



3.1(45) n = 10, m = 2, R =

3.1(47) n = 1, m = 8, R =

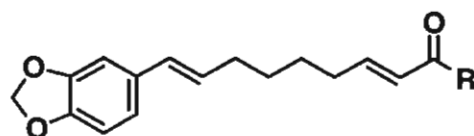
3.1(48) n = 1, m = 10, R =

3.1(49) n = 3, m = 6, R =

3.1(50) n = 3, m = 8, R =

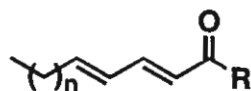
3.1(51) n = 3, m = 6, R =

3.1(52) n = 3, m = 8, R =



3.1(46) R =

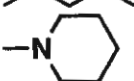
3.1(64) R =

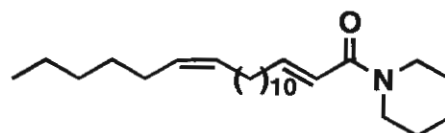


3.1(53) $n = 12$, $R = -N$ 

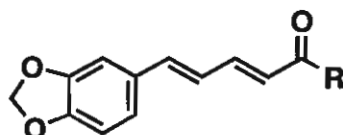
3.1(54) $n = 14$, $R = -N$ 

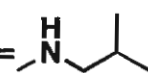
3.1(56) $n = 4$, $R =$ 

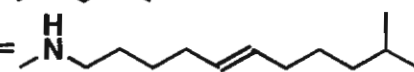
3.1(67) $n = 4$, $R = -N$ 

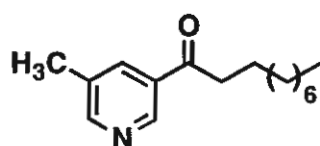


3.1(55)

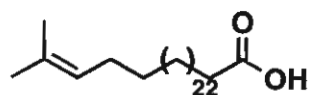


3.1(57) $R =$ 

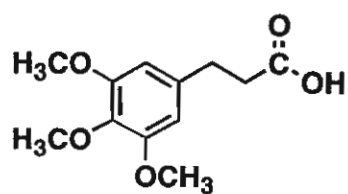
3.1(61) $R =$ 



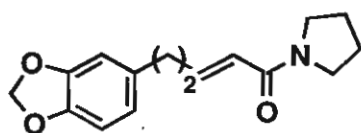
3.1(59)



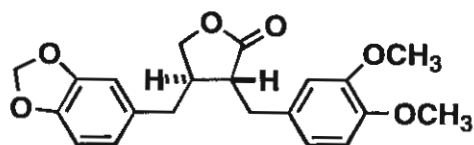
3.1(60)



3.1(62)



3.1(66)



3.1(68)

(octadeca-2*E*,4*E*-dienoyl)piperidine [3.1(53)], 1-(eicosa-2*E*,4*E*-dienoyl)piperidine [3.1(54)] และ 1-(eicosa-2*E*,14*Z*-dienoyl)piperidine [3.1(55)] นอกจากนี้ยังพบ amide ที่รู้จักกันแล้วอีก 5 ชนิดคือ pellitorine [3.1(56)], guineensine [3.1(43)], pipericide [3.1(11)], piperine [3.1(10)] และ piperlonguminine [3.1(57)] ส่วนคณะของ Pande^{3.1[55]} ได้ทำการแยก piperine [3.1(10)], methyl piperate [3.1(42)], N-isobutyl-2*E*,4*E*-eicosadienamide [3.1(17)], β -sitosterol- β -D-glucopyranoside [3.1(58)], 3-methyl-5-decanoylpyridine [3.1(59)] และ 28-methylnonacos-27-en-1-oic acid [3.1(60)] จากผลดีป्ली Patra และ Ghosh^{3.1[14]} ได้แยก piperine [3.1(10)], sylvatine [3.1(61)], piperlonguminine [3.1(57)] และ sitosterol [3.1(40)] จากส่วนที่สกัดด้วย petrol ของรากดีป्ली Banerji และคณะ^{3.1[56]} ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของส่วนเหนือดินของดีป्लीในชั้น petrol สามารถแยกสารประกอบได้ 6 ชนิดคือ sesamin [3.1(28)], 3,4,5-trimethoxydihydrocinnamic acid [3.1(62)], retrofractamide-A [3.1(63)], retrofractamide-C [3.1(64)], retrofractamide-B [3.1(11)] และ retrofractamide-D [3.1(65)] สำหรับสารประกอบสองตัวหลังคณะผู้วิจัยไม่สามารถแยกออกมาในสภาพสารบริสุทธิ์ ส่วน Connolly และคณะ^{3.1[57]} ได้รายงานการแยก piperamine [3.1(66)], pellitorine [3.1(56)], 2*E*,4*E*-decadienoylpiperidine [3.1(67)] และ kusunokinin [3.1(68)] จากเปลือกต้นของดีป्ली

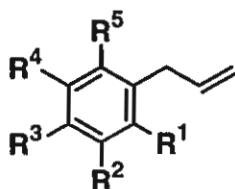
จากการศึกษาฤทธิ์ในการฆ่าแมลงของพืชเพื่อพัฒนาเป็นยาฆ่าแมลงในการเกษตร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและคณะ^{3.1[43]} ได้ระบุว่าสารผสมของ guineensine [3.1(43)], pipericide [3.1(11)] และ retrofractamide คือสารที่ออกเสริมกันในสารสกัดจากดีป्ली ซึ่งมีผลทำให้สามารถฆ่าหนอนกระทู้ผักได้เท่าเทียมกับ pyrethrins และยังใช้กำจัดหนอนใยผักในแปลงของเกษตรกรได้อย่างมีประสิทธิภาพทัดเทียมกับ permethrin และ *Bacillus thuringiensis*

จากรายงานข้างต้นนี้ทำให้เกิดความสนใจในการศึกษาส่วนประกอบทางเคมีของดีป्लीและพืชในสกุล *Piper* อื่นๆ ที่มีในประเทศไทยอย่างละเอียด โดยมุ่งหวังจะนำสารที่สกัดแยกได้จากพืชเหล่านี้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเน้นศึกษาฤทธิ์ในการเป็นสารควบคุมแมลง นอกจากนี้จะนำสารที่สกัดแยกได้ในปริมาณมากไปปรับเปลี่ยนโครงสร้าง เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ในการควบคุมแมลงต่อไป

2. ขำพลู (*Piper sarmentosum* Roxb.)

ขำพลู (*Piper sarmentosum* Roxb.) เป็นพืชในวงศ์ Piperaceae ขำพลูมีชื่อพ้องว่า *P. rostratum* Roxb. ส่วนชื่อพื้นเมืองที่รู้จักกันคือ นมวา ผักปุนา ผักพลูนก พลูลิง และเยเท้ย ขำพลูเป็นไม้ล้มลุก มีไหลงอกเป็นต้นใหม่ ใบเดี่ยวเรียงสลับรูปหัวใจ ดอกเป็นช่อออกที่ซอกใบเป็นรูปทรงกระบอก ดอกย่อยแยกเพศ ผลเป็นผลสด สรรพคุณทางยาและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของขำพลูมีมากมายเช่น ใช้ขับเสมหะและขับลม^{3.1[73]} อำไพ เกตุสถิตย์^{3.1[74]} ได้รายงานฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงลายของส่วนที่สกัดด้วยเฮกเซนและไดคลอโรมีเทนของส่วนเหนือดินของขำพลูว่ามีค่า LD₅₀ = 20.9 และ 111.3 ppm ตามลำดับ

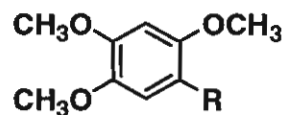
การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของขำพลูได้มีผู้ทำการวิจัยรวม 5 คณะ คณะของ Valyasevi^{3.1[75]} ได้วิเคราะห์หาปริมาณ oxalic acid จากใบขำพลู คณะของ Niamsa^{3.1[69]} ได้ทำการแยก hydrocinnamic acid [3.1(69)] และ β -sitosterol [3.1(40)] จากส่วนที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ของใบขำพลู คณะของ Masuda^{3.1[76]} ได้ทำการสกัดใบขำพลูด้วยเมทานอล แล้วนำสารสกัดที่ละลายในเบนซีนมาทำโครมาโตกราฟี สามารถแยก phenylpropanoid 4 ชนิดคือ 1-allyl-2,6-dimethoxy-3,4-methylenedioxybenzene [3.1(72)], γ -asarone [3.1(73)], asaricin [3.1(74)] และ α -asarone [3.1(75)] ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบทั้ง 4 ชนิดนี้พบว่ามียูทรีในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ *Escherichia coli* และ *Bacillus subtilis* คณะของ Likhitwitayawuid^{3.1[77]} ได้ศึกษาส่วนที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ของผลขำพลูแห้ง สามารถแยกสารประกอบได้ 6 ชนิดคือ β -sitosterol [3.1(40)], pellitorine [3.1(56)], 1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-1E-tetradecene [3.1(76)], N-(3-phenylpropanoyl)pyrrole [3.1(77)], sarmentine [3.1(78)] และ sarmentosine [3.1(79)] และเมื่อคณะวิจัยกลุ่มนี้ได้ทำการตรวจสอบกลุ่มย่อยที่ไม่มีขั้ว (non-polar) ของสารสกัดจากผลขำพลู สามารถแยกสารประกอบเพิ่มอีก 2 ชนิดคือ α -asarone [3.1(75)] และ asaronaldehyde [3.1(80)]^{3.1[78]} และเมื่อเร็ว ๆ นี้คณะของ Stohr^{3.1[79]} ได้ทำการแยกสารประกอบ amide 2 ชนิดจากส่วนเหนือดินของขำพลูได้แก่ (2E,4E)-N-2'-methylbutyldecadienamide [3.1(81)] และ (2E,4E)-N-isobutyloctadienamide [3.1(82)]



3.1(72) $R^1 = R^5 = \text{OCH}_3$; $R^2 + R^3 = \text{OCH}_2\text{O}$; $R^4 = \text{H}$

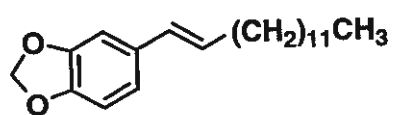
3.1(73) $R^1 = R^3 = R^4 = \text{OCH}_3$; $R^2 = R^5 = \text{H}$

3.1(74) $R^1 = \text{OCH}_3$; $R^2 = R^5 = \text{H}$; $R^3 + R^4 = \text{OCH}_2\text{O}$

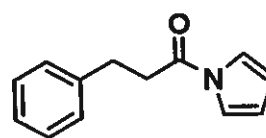


3.1(75) $R = \text{CH}_2\text{CH=CH}_2$

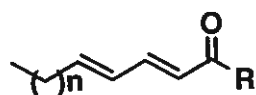
3.1(80) $R = \text{CHO}$



3.1(76)



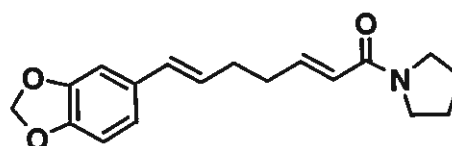
3.1(77)



3.1(78) $n = 4$; $R =$

3.1(81) $n = 4$; $R =$

3.1(82) $n = 2$; $R =$



3.1(79)

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. ดีปลี่ (*Piper chaba* Hunt)

1) ผลดีปลี่

(1) การหาส่วนประกอบทางเคมี

ในการสกัดแยกสารออกจากผลดีปลี่แห้งด้วยนอร์มัลเฮกเซน (n-hexane) และเมทานอล ตามลำดับโดยใช้ Soxhlet extraction apparatus แล้วนำส่วนที่สกัดได้ด้วยตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิด มาแยกสารออกจากกันด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ซิลิกาเจลชนิดหยาบหรือละเอียดแล้วแต่ความเหมาะสม ผลการแยกสารจากส่วนที่สกัดด้วยเฮกเซน (hexane extract) ได้สาร 7 ชนิด สำหรับการแยกสารจากส่วนที่สกัดด้วยเมทานอล (methanol extract) ได้สาร 4 ชนิดดังนี้

(ก) Hexane extract

ควิกคอลัมน์โครมาโตกราฟีของส่วนที่สกัดด้วยเฮกเซนทำให้ได้ส่วนย่อย 4 กลุ่มที่สามารถนำไปแยกสารออกมาได้

1. การแยก (2E,4E,8Z)-N-isobutyl-eicosatrienamide [3.1(45)]

เมื่อนำสารกลุ่ม H₁ มาทำควิกคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้ง ทำให้ได้สารกลุ่มย่อย H_{1.4} ซึ่งมีสารสีขาวปนอยู่ กรองและนำมาตกผลึกด้วยนอร์มัลเฮกเซน ได้ผลึกสีขาว จุดหลอมเหลว 64 °C UV สเปกตรัมให้แถบดูดกลืนที่ 265 นาโนเมตรแสดงถึงระบบคอนจูเกตของ 2E,4E-dienamide^{3.1[51]} จาก IR สเปกตรัมแถบดูดกลืนที่ 1670, 1614 และ 999 ซม⁻¹ ช่วยยืนยันระบบ 2E,4E-dienamide นอกจากนี้ยังพบแถบดูดกลืนที่ 3294 และ 1641 ซม⁻¹ ตรงกับ N-H stretching ของหมู่ 2° amide และ C=C stretching ของพันธะคู่ที่ไม่คอนจูเกตตามลำดับ จาก ¹H NMR สเปกตรัมแสดงสัญญาณของ olefinic protons ของระบบ 2E,4E-dienamide ปรากฏเป็น doublet ที่ δ 5.73 (1H, J = 15 Hz) และ doublet of doublets ที่ δ 7.16 (1H, J = 15 และ 9.9 Hz) ตรงกับ olefinic protons ที่ตำแหน่ง α และ β ของหมู่คาร์บอนิลตามลำดับ ส่วน olefinic protons ที่ตำแหน่ง γ และ δ ปรากฏเป็น multiplet ในช่วง δ 6.00-6.15 (2H) จากค่า coupling constant (J = 15 Hz) ของ olefinic protons ยืนยัน configuration ของพันธะคู่แบบ trans นอกจากนี้ยังพบสัญญาณของ olefinic protons อีก 2 โปรตอนในลักษณะ triplet ที่ δ

5.32 แสดงว่าเป็น olefinic protons ที่เกาะอยู่กับพันธะคู่ที่ไม่คอนจูเกตกับ dienamide และเป็นพันธะคู่ที่มี configuration แบบ *cis* ^1H NMR สเปกตรัมยังแสดงสัญญาณของหมู่ *N*-isobutyl ปรากฏเป็น doublet ที่ δ 0.90 (6H, $J = 6.7\text{Hz}$), multiplet ที่ δ 1.77 (1H) และ triplet ที่ δ 3.13(2H) ตรงกับ methyl, methine และ methylene protons ตามลำดับ ส่วนสัญญาณ broad singlet ที่ δ 5.59 ตรงกับโปรตอนที่อยู่กับไนโตรเจนอะตอม สัญญาณ triplet ที่ δ 0.85 (3H) ตรงกับ methyl protons ที่อยู่ส่วนปลายของโมเลกุล สำหรับสัญญาณ broad singlet ที่ δ 1.20 ถ้าพิจารณาจาก integration พบว่ามี 18 โปรตอน แสดงว่ามีหมู่ methylene อีก 9 หมู่ในโครงสร้าง นอกจากนี้ยังพบสัญญาณของ allylic methylene protons 6 โปรตอนในลักษณะ multiplet ที่ δ 1.94–2.15

ข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีข้างต้นนี้ ตรงกับข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีที่มีผู้รายงานไว้^{3.1[51]} เป็นการยืนยันโครงสร้างของ (2*E*,4*E*,8*Z*)-*N*-isobutyl-eicosatrienamide [3.1(45)]

2. การแยก methyl piperate [3.1(42)]

กรองของแข็งสีเหลืองในกลุ่ม H_2 แล้วตกผลึกด้วยคลอโรฟอร์ม-เมทานอล ได้ผลึกสีเหลืองอ่อน จุดหลอมเหลว 140–142 °C แถบดูดกลืนที่ 261 นาโนเมตรใน UV สเปกตรัมแสดงว่าระบบคอนจูเกตมีลักษณะคล้ายคลึงกับระบบของ 2*E*,4*E*-dienamide^{3.1[51]} จาก IR สเปกตรัมแถบดูดกลืนที่ 1707, 1618 และ 1004 cm^{-1} ช่วยยืนยัน diene อยู่ในลักษณะคอนจูเกตกับหมู่คาร์บอนิลของเอสเทอร์^{3.1[58]} โดยมี configuration ของ diene เป็นแบบ *trans* แถบดูดกลืนที่ 2849 cm^{-1} ตรงกับหมู่ methoxy ซึ่งยืนยันได้จากสัญญาณ singlet ที่ δ 3.73 (3H) ใน ^1H NMR สเปกตรัม ส่วนแถบดูดกลืนที่ 1265, 1040 และ 929 cm^{-1} แสดงถึงหมู่ methylenedioxy^{3.1[56]} ซึ่งยืนยันได้จากสัญญาณ singlet ที่ δ 5.95 (2H) สำหรับสัญญาณของ olefinic protons ของระบบ diene จำนวน 4 โปรตอนปรากฏเป็น doublet 2 ชุดที่ δ 5.91 และ 6.78 ($J = 15.4\text{ Hz}$) และ doublet of doublets ที่ δ 6.67 และ 7.38 ($J = 15.4$ และ 10.7 Hz) ตรงกับ olefinic protons ที่ตำแหน่ง α , δ , γ และ β ของหมู่คาร์บอนิลตามลำดับ นอกจากนี้ใน ^1H NMR สเปกตรัมยังให้สัญญาณ doublet 2 ชุดที่ δ 6.75 (1H, $J = 7.2\text{ Hz}$) และ 6.96 (1H, $J = 1.5\text{ Hz}$) และสัญญาณ doublet of doublets ที่ δ 6.88 (1H, $J = 7.2$ และ 1.5 Hz) ตรงกับ aromatic protons ที่ตำแหน่ง 5, 2 และ 6 ของวงอะโรเมติกตามลำดับ จาก splitting

pattern และค่า coupling constant ของ aromatic protons แสดงว่าเป็น 1,2,4-trisubstituted benzene ซึ่งยืนยันได้จากแถบดูดกลืนที่ 866 และ 815 cm^{-1} ใน IR สเปกตรัม

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีข้างต้นกับข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีที่มีผู้รายงานไว้^{3.1[59]} เป็นการยืนยันโครงสร้างของ methyl piperate [3.1(42)]

3. การแยก piperine [3.1(10)]

เมื่อนำสารกลุ่ม H_3 ซึ่งมีของแข็งสีเหลืองปนอยู่มากกรอง แล้วจึงตกผลึกสารที่ได้อด้วยเมทานอลได้ผลึกสีเหลืองอ่อน จุดหลอมเหลว 130–132 °C แถบดูดกลืนที่ 261 นาโนเมตรใน UV สเปกตรัมและแถบดูดกลืนที่ 1635, 1612 และ 998 cm^{-1} ใน IR สเปกตรัมยืนยันระบบ 2E,4E- dienamide^{3.1[51]} เช่นเดียวกับที่พบในสาร 3.1(45) ^1H NMR สเปกตรัมให้สัญญาณของ olefinic protons ของระบบ 2E,4E-dienamide จำนวน 4 โปรตอนในลักษณะ doublet 2 ชุดที่ δ 6.42 และ 6.76 (ค่า J ประมาณ 15 Hz) และ doublet of doublets 2 ชุดที่ δ 6.75 และ 7.39 (ค่า J ประมาณ 15 และ 8 Hz) ซึ่งตรงกับ olefinic protons ที่ตำแหน่ง α , δ , γ และ β ของ หมู่คาร์บอนิลตามลำดับ ส่วนแถบดูดกลืนที่ 1254, 1033 และ 930 cm^{-1} ใน IR สเปกตรัมและสัญญาณ singlet ที่ δ 5.96 (2H) ใน ^1H NMR สเปกตรัมยืนยันว่ามีหมู่ methylenedioxy อยู่ในโครงสร้าง การปรากฏของแถบดูดกลืนที่ 848 และ 805 cm^{-1} รวมทั้งสัญญาณของ aromatic protons จำนวน 3 โปรตอนซึ่งปรากฏเป็น doublet 2 ชุดที่ δ 6.74 (1H, $J = 8.0$ Hz) และ 6.97 (1H, $J = 1.6$ Hz) และ doublet of doublets ที่ δ 6.88 (1H, $J = 8.0$ และ 1.6 Hz) ซึ่งตรงกับโปรตอนที่ตำแหน่ง 5, 2 และ 6 ของวงอะโรเมติกตามลำดับ ยืนยันว่าเป็น 1,2,4-trisubstituted benzene จากข้อมูลข้างต้นนี้ยืนยันว่ามีหมู่ 3,4-methylenedioxyphenyl และ 2E,4E-dienamide ในโครงสร้างเหมือนสาร 3.1(42) โครงสร้างส่วนที่แตกต่างจากสาร 3.1(42) ได้จาก ^1H NMR สเปกตรัมซึ่งให้สัญญาณของโปรตอน ของ piperidine ring เป็น multiplet ที่ δ 1.60 (6H) ซึ่งตรงกับ methylene protons ที่ตำแหน่ง β และ γ ของ piperidine ring และสัญญาณ broad singlet 2 ชุดที่ δ 3.51 (2H) และ 3.62 (2H) ตรงกับ methylene protons ที่ตำแหน่ง α ของ piperidine ring

ข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีข้างต้นนี้ ตรงกับข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีที่มีผู้รายงานไว้^{3.1[60,61]} เป็นการยืนยันโครงสร้างของ piperine [3.1(10)]

4. การแยก β -sitosterol [3.1(40)]

เมื่อนำกลุ่มย่อย $H_{3.6.1}$ มาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีอีก 2 ครั้ง แล้วนำสารที่ได้มาตกผลึกด้วยคลอโรฟอร์ม-เอทานอล ได้ผลึกสีขาว จุดหลอมเหลว 135-137 °C IR สเปกตรัมแสดงแถบดูดกลืนสำคัญที่ 3429 และ 1635 cm^{-1} ตรงกับ O-H และ C=C stretching ^1H NMR สเปกตรัมแสดงสัญญาณ multiplet จำนวน 47 โปรตอนในช่วง δ 0.66-2.30 ตรงกับโปรตอนของหมู่ methyl หมู่ methylene และหมู่ methine สัญญาณ multiplet ที่ δ 3.50 ตรงกับ methine proton ที่ต่ออยู่กับหมู่ hydroxyl ส่วนสัญญาณของ olefinic proton ปรากฏเป็น broad doublet ที่ δ 5.33 นอกจากนี้ยังพบสัญญาณของ olefinic protons ที่มีความเข้มต่ำในลักษณะ doublet of doublet อีก 2 ชุดที่ δ 5.00 และ 5.13 (ค่า J ประมาณ 15 และ 9 Hz)

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีข้างต้นกับข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีที่มีผู้รายงานไว้^{3.1[62,63]} และทำ TLC เปรียบเทียบกับ authentic sample ยืนยันโครงสร้างของ β -sitosterol [3.1(40)] ที่มี stigmasterol ปนอยู่ด้วยในปริมาณเล็กน้อย

5. การแยก guineensine [3.1(43)]

ภายหลังการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีของกลุ่มย่อย $H_{3.6.2}$ ได้ผลึกสีขาว IR สเปกตรัมให้แถบดูดกลืนที่ 1257, 1045 และ 923 cm^{-1} แสดงว่ามีหมู่ methylenedioxy^{3.1[56]} ส่วนแถบดูดกลืนที่ 870 และ 800 cm^{-1} แสดงว่ามี 1,2,4-trisubstituted benzene นอกจากนี้ ^1H NMR สเปกตรัมยังช่วยยืนยันว่ามีหมู่ 3,4-methylenedioxyphenyl ในโครงสร้างเหมือนสาร 3.1(10) และ 3.1(42) โดยการปรากฏของสัญญาณ singlet ที่ δ 5.91 (2H) สัญญาณ doublet 2 ชุดที่ δ 6.71 (1H, $J = 8.1$ Hz) และ 6.87 (1H, $J = 1.5$ Hz) และสัญญาณ doublet of doublets ที่ δ 6.74 (1H, $J = 8.1$ และ 1.5 Hz) ตรงกับโปรตอนของหมู่ methylenedioxy และ aromatic protons ที่ตำแหน่ง 5, 2 และ 6 ของวงอะโรเมติกตามลำดับ แถบดูดกลืนที่ 3305 cm^{-1} ตรงกับ N-H stretching ซึ่งโปรตอนที่ต่ออยู่กับไนโตรเจนอะตอมนี้ให้สัญญาณเป็น broad singlet ที่ δ 5.44 ^1H NMR ให้สัญญาณของหมู่ N-isobutyl ปรากฏเป็น doublet ที่ δ 0.90 (6H, $J = 6.7$ Hz), multiplet ที่ δ 1.78 (1H) และ triplet ที่ δ 3.14 (2H) ตรงกับ methyl, methine และ methylene protons ตามลำดับ จากข้อมูลข้างต้นนี้ยืนยันว่าสารเป็น N-isobutylamide เหมือนสาร 3.1(45) UV สเปกตรัมให้แถบดูดกลืนที่มีความเข้มสูงที่ 267 นาโนเมตรแสดงว่ามีทั้งหมู่

styryl และ conjugated dienamide ในโครงสร้าง^{3.1[64]} แถบดูดกลืนที่ 1656, 1629 และ 964 cm^{-1} ใน IR สเปกตรัมช่วยยืนยันระบบ 2E,4E- dienamide^{3.1[51]} นอกจากนี้ ^1H NMR สเปกตรัมยังแสดงสัญญาณของ olefinic protons ของระบบ 2E,4E-dienamide จำนวน 4 โปรตอนเป็น doublet ที่ δ 5.72 ($J = 15$ Hz) doublet of doublets 2 ชุดที่ δ 6.10 และ 7.17 (ค่า J ประมาณ 15 และ 10 Hz) และ multiplet ในช่วง δ 5.98–6.07 ซึ่งตรงกับ olefinic protons ที่ตำแหน่ง α , γ , β และ δ ของหมู่คาร์บอนิลตามลำดับ สำหรับ olefinic proton ที่เหลืออีก 1 โปรตอนในช่วง δ 5.98–6.07 ตรงกับโปรตอนที่ตำแหน่ง β ของวงอะโรเมติก จาก splitting pattern และ integration ของสัญญาณในช่วง δ 5.98–6.07 แสดงว่า olefinic protons ทั้ง 2 โปรตอนต่ออยู่กับหมู่ methylene ข้อมูลเพิ่มเติมที่ยืนยันจุดนี้คือการปรากฏของหมู่ allylic methylene 2 หมู่ซึ่งให้สัญญาณ multiplet ที่ δ 2.13 (4H) ใน ^1H NMR สเปกตรัม ส่วนสัญญาณ multiplet ในช่วง δ 1.26–1.46 จาก integration มี 8 โปรตอนแสดงว่ามีหมู่ methylene อีก 4 หมู่ นอกจากนี้ยังพบสัญญาณ doublet ที่ δ 6.26 ($J = 15.9$ Hz) ตรงกับ olefinic proton ที่ตำแหน่ง α ของวงอะโรเมติก จากค่า coupling constant ของ olefinic proton นี้ช่วยยืนยัน configuration ของพันธะคู่ที่ต่อกับวงอะโรเมติกเป็นแบบ *trans* ข้อมูลข้างต้นนี้แสดงว่ามีหมู่ methylene 6 หมู่คั่นอยู่ระหว่าง 2E,4E-dienamide และหมู่ 3,4-methylenedioxystyryl EI mass spectrum แสดงพีคของ molecular ion ที่ m/z 383 ตรงกับสูตรโมเลกุล $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{NO}_3$

ข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีข้างต้นนี้ ตรงกับข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีที่มีผู้รายงานไว้^{3.1[64,65]} เป็นการยืนยันโครงสร้างของ guineensine [3.1(43)]

6. การแยก piperonaline [3.1(46)]

เมื่อนำกลุ่มย่อย $\text{H}_{3.6.3}$ มาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีก 2 ครั้ง ได้สารสีเหลืองอ่อน ลักษณะกึ่งของแข็ง (semi-solid) ^1H NMR สเปกตรัมแสดงสัญญาณของโปรตอนของ piperidine ring เป็น multiplet ในช่วง δ 1.40–1.60 (6H) และ broad singlet 2 ชุดที่ δ 3.45 (2H) และ 3.57 (2H) ซึ่งตรงกับ methylene protons ที่ตำแหน่ง β , γ และ α ของ piperidine ring นอกจากนี้ยังพบโปรตอนของหมู่ 3,4-methylenedioxyphenyl ปรากฏเป็นสัญญาณ singlet ที่ δ 5.90 (2H) สัญญาณ broad singlet ที่ δ 6.72 (2H) และสัญญาณ singlet ที่ δ 6.86 (1H) จาก IR สเปกตรัมแถบดูดกลืนที่ 1250, 1038 และ 931 cm^{-1} ช่วยยืนยันถึงหมู่

methylenedioxy^{3.1[51]} จาก integration ใน ¹H NMR สเปกตรัมพบว่ามี 4 olefinic protons เท่านั้น แสดงว่ามีพันธะคู่ในโครงสร้างเพียง 2 พันธะ โดยพันธะคู่ 1 พันธะนั้นจะต่อคอนจูเกตกับหมู่ 3,4-methylenedioxyphenyl ซึ่งยืนยันได้จากแถบดูดกลืนที่ 312 นาโนเมตรใน UV สเปกตรัม^{3.1}
^[66] ส่วนพันธะคู่ที่เหลือน่าจะต่อคอนจูเกตกับหมู่คาร์บอนิลในลักษณะ α,β-unsaturated amide ซึ่งยืนยันได้จากแถบดูดกลืนที่ 1658 และ 1613 ซม.⁻¹ ใน ¹H NMR สเปกตรัมสัญญาณของ olefinic protons ปรากฏเป็น doublet ที่ δ 6.26 (1H, J = 15.5 Hz) และ double triplet ที่ δ 6.00 (1H, J = 15.5 และ 7.1 Hz) ตรงกับ olefinic protons ที่ตำแหน่ง α และ β ของวงอะโรเมติก ส่วนสัญญาณ doublet ที่ δ 6.22 (1H, J = 14.6 Hz) และ double triplet ที่ δ 6.81 (1H, J = 14.6 และ 7.1 Hz) ตรงกับ olefinic protons ที่ตำแหน่ง α และ β ของหมู่คาร์บอนิล จากค่า coupling constant ของ olefinic protons ประมาณ 15 Hz แสดงว่า configuration ของพันธะคู่ทั้งสองเป็นแบบ *trans* นอกจากนี้ยังพบสัญญาณ multiplet 2 ชุดในช่วง δ 1.60-1.75 (4H) และ 2.10-2.25 (4H) ตรงกับโปรตอนของหมู่ methylene 2 หมู่และ โปรตอนของหมู่ allylic methylene 2 หมู่ตามลำดับ จาก splitting pattern ของ olefinic protons ในลักษณะ double triplet 2 ชุดแสดงว่ามีหมู่ methylene 4 หมู่คั่นอยู่ระหว่างพันธะคู่ทั้งสอง

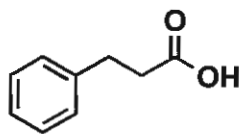
เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีข้างต้นกับข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีที่มีผู้รายงานไว้

^{3.1[66]} เป็นการยืนยันโครงสร้างของ pipernonaline [3.1(46)]

7. การแยก hydrocinnamic acid [3.1(69)]

นำสารกลุ่มย่อย H_{4.7} มาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีก 3 ครั้ง ได้สารสีขาวมีลักษณะกึ่งของแข็ง จาก IR สเปกตรัมให้แถบดูดกลืนสำคัญที่ 3450-2500 (เป็นแถบกว้าง) และ 1713 ซม.⁻¹ ตรงกับ O-H และ C=O stretching ของกรดคาร์บอกซิลิก นอกจากนี้ยังพบแถบดูดกลืนที่ 751 และ 700 ซม.⁻¹ แสดงว่าเป็น monosubstituted benzene จาก ¹H NMR สเปกตรัมให้สัญญาณ triplet 2 ชุดที่ δ 2.68 (2H) และ 2.96 (2H) ตรงกับ methylene protons ที่อยู่ต่อกับวงอะโรเมติกและหมู่คาร์บอกซีตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบสัญญาณ multiplet ในช่วง δ 7.18-7.33 (5H) ตรงกับ aromatic protons

ข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีข้างต้นนี้ ตรงกับข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีที่มีผู้รายงานไว้^{3.1[67,68]} เป็นการยืนยันว่าเป็น hydrocinnamic acid 3.1(69) สารชนิดนี้เคยมีผู้แยกได้จาก P. sarmentosum^{3.1(69)}



3.1(69)

(ข) Methanol extract

ควิกคอลัมน์โครมาโตกราฟีของส่วนที่สกัดด้วยเมทานอลทำให้ได้ส่วนย่อย 2 กลุ่มที่สามารถนำไปแยกสารออกมาได้

8. การแยก piperine [3.1(10)] และ methyl piperate [3.1(42)]

เมื่อนำสารกลุ่ม M_1 ซึ่งมีของแข็งปนอยู่มากกรอง แล้วทำการตกผลึกสารที่ได้ด้วยเมทานอล ได้ผลึกสีเหลืองอ่อนของสาร 3.1(10) ส่วน filtrate นำมาทำควิกคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้ง ทำให้ได้สารกลุ่มย่อย $M_{1.3}$ ซึ่งมีของแข็งปนอยู่มากกรอง แล้วตกผลึกสารที่ได้ด้วยคลอโรฟอร์ม-เมทานอล ได้ผลึกสีเหลืองอ่อนของสาร 3.1(42)

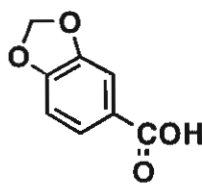
การยืนยันโครงสร้างของสาร 3.1(10) และ 3.1(42) โดยการทำให้ TLC เปรียบเทียบกับสารที่แยกได้จาก hexane extract

9. การแยก piperonylic acid [3.1(70)]

สารกลุ่ม M_3 เมื่อนำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำ 3 ครั้ง ทำให้ได้ผลึกสีขาวจากกลุ่มย่อย $M_{3.1.2}$ จุดหลอมเหลว 226–228 °C IR สเปกตรัมแสดงแถบดูดกลืนซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของกรดคาร์บอกซิลิกที่มีคอนจูเกตที่ 3300–2500 และ 1672 cm^{-1} นอกจากนี้ยังพบแถบดูดกลืนที่ 1243, 1044 และ 930 cm^{-1} แสดงถึงหมู่ methylenedioxy^{3.1[56]} ^1H NMR สเปกตรัมช่วยยืนยันว่ามีหมู่ 3,4-methylenedioxyphenyl ในโครงสร้างเหมือนสาร 3.1(10) และ 3.1(42) โดยการปรากฏของสัญญาณ singlet ที่ δ 5.95 (2H) ตรงกับโปรตอนของหมู่ methylenedioxy สัญญาณ doublet 2 ชุดที่ δ 6.76 (1H, $J = 8.2$ Hz) และ 7.39 (1H, $J = 1.7$ Hz) และสัญญาณ doublet of doublets 1 ชุดที่ δ 7.57 (1H, $J = 8.2$ และ 1.7 Hz) ตรงกับ aromatic protons ที่ตำแหน่ง 5, 2 และ 6 ของวงอะโรเมติกตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีข้างต้นนี้กับข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีที่มีผู้รายงานไว้

^{3.1[70,71]} เป็นการยืนยันโครงสร้างของ piperonylic acid [3.1(70)]

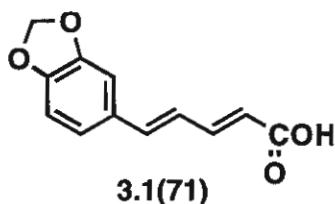


3.1(70)

10. การแยก piperic acid [3.1(71)]

สารกลุ่ม M_8 เมื่อนำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำ 4 ครั้ง ทำให้ได้ผลึกสีขาวจากกลุ่มย่อย $M_{3.1.5.9}$ จุดหลอมเหลว 211-212 °ซ UV สเปกตรัมแสดงแถบดูดกลืนที่ 221, 304 และ 332 นาโนเมตรแสดงถึง diene ซึ่งอยู่ในลักษณะคอนจูเกตกับหมู่คาร์บอนิลของกรดคาร์บอกซิลิกและวงอะโรมาติกที่อยู่ในโมเลกุล^{3.1[72]} แถบดูดกลืนที่ 3300-2200, 1678, และ 1619 cm^{-1} ใน IR สเปกตรัมช่วยยืนยันว่ามีกรดคาร์บอกซิลิกที่มีคอนจูเกตอยู่ในโมเลกุล ส่วนแถบดูดกลืนที่ 1258, 1036 และ 930 cm^{-1} แสดงถึงหมู่ methylenedioxy^{3.1[56]} สัญญาณซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของหมู่ 3,4-methylenedioxyphenyl ใน ^1H NMR สเปกตรัมประกอบขึ้นด้วยสัญญาณ singlet ที่ δ 5.92 (2H) ตรงกับโปรตอนของหมู่ methylenedioxy สัญญาณ doublet 2 ชุดที่ δ 6.72 (1H, $J = 8.2$ Hz) และ 6.93 (1H, $J = 1.4$ Hz) และสัญญาณ doublet of doublets 1 ชุดที่ δ 6.85 (1H, $J = 8.2$ และ 1.4 Hz) ตรงกับ aromatic protons ที่ตำแหน่ง 5, 2 และ 6 ของวงอะโรมาติกตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบสัญญาณของ olefinic protons 4 โปรตอนปรากฏเป็น doublet 2 ชุดที่ δ 5.86 (1H, $J = 15.2$ Hz) และ 6.75 (1H, $J = 15.2$ Hz) doublet of doublets 2 ชุดที่ δ 6.65 (1H, $J = 15.2$ และ 10.8 Hz) และ 7.35 (1H, $J = 15.2$ และ 10.8 Hz) ตรงกับ olefinic protons ที่ตำแหน่ง α , γ , δ และ β ของหมู่คาร์บอนิลตามลำดับ จาก splitting pattern และ coupling constant ($J = 15.2$ Hz) ของ olefinic protons ช่วยยืนยันว่ามีพันธะคู่ $\text{C}=\text{C}$ 2 พันธะที่คอนจูเกตกันและมี configuration แบบ *trans*, *trans*

ข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีข้างต้นนี้ ตรงกับข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีที่มีผู้รายงานไว้^{3.1[72]} เป็นการยืนยันโครงสร้างของ piperic acid [3.1(71)]



จากการสกัดผลดีป्लीแห้งด้วยนอร์มัลเฮกเซนและเมทานอล แล้วนำส่วนที่สกัดได้มาแยกสารออกจากกันด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี แล้วนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาหาสูตรโครงสร้าง โดยใช้เทคนิคทางสเปกโตรสโคปี สารที่แยกได้จากส่วนที่สกัดด้วยนอร์มัลเฮกเซนมี 7 ชนิดได้แก่สารประเภท amide 4 ชนิดคือ (2*E*,4*E*,8*Z*)-*N*-isobutyl-eicosatrienamide [3.1(45)], piperine [3.1(10)], guineesine [3.1(43)] และ pipernonaline [3.1(46)] และสารประเภทอื่นอีก 3 ชนิดคือ methyl piperate [3.1(42)], β -sitosterol [3.1(40)] และ hydrocinnamic acid [3.1(69)] ส่วนสารที่แยกได้จากส่วนที่สกัดด้วยเมทานอลมี 4 ชนิดได้แก่ piperine [3.1(10)], methyl piperate [3.1(42)] และกรดคาร์บอกซิลิก 2 ชนิดคือ piperonylic acid [3.1(70)] และ piperic acid [3.1(71)] สำหรับ piperine [3.1(10)] และ methyl piperate [3.1(42)] พบเป็นองค์ประกอบหลักในผลดีป्ली สำหรับ hydrocinnamic acid [3.1(69)], piperonylic acid [3.1(70)] และ piperic acid [3.1(71)] ยังไม่เคยมีผู้พบในดีป्लीมาก่อน

2) ลำต้นตีป्ली

(1) การหาส่วนประกอบทางเคมี

ในการสกัดแยกสารออกจากลำต้นตีป्लीแห้งด้วยนอร์มัลเฮกเซนและเมทานอลตามลำดับโดยใช้ Soxhlet extraction apparatus แล้วนำส่วนที่สกัดได้มาแยกสารออกจากกันด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี สามารถแยกสารจากส่วนที่สกัดด้วยเฮกเซนและส่วนที่สกัดด้วยเมทานอลจำนวน 7 และ 1 ชนิดตามลำดับดังนี้

(ก) Hexane extract

นำส่วนที่สกัดด้วยเฮกเซนมากรองเอาของแข็งสีเหลืองออกมา ส่วน filtrate นำมาทำคอลลัมน์โครมาโตกราฟี ได้ส่วนย่อย 5 กลุ่มที่สามารถนำไปแยกสารออกมาได้

1. การแยก piperine [3.1(10)]

นำของแข็งสีเหลืองที่กรองได้จากส่วนที่สกัดด้วยเฮกเซน มาทำคอลลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้ง ได้ผลึกสีเหลืองอ่อนของสาร 3.1(10) จากกลุ่มย่อย H_{5.9} ซึ่งสามารถยืนยันโครงสร้างได้จาก ¹H NMR สเปกตรัม และจากการทำ TLC เปรียบเทียบกับสารที่เคยแยกได้จากผลตีป्ली

2. การแยก methyl piperate [3.1(42)]

คอลลัมน์โครมาโตกราฟีของสารกลุ่ม H₁ ทำให้ได้สารกลุ่มย่อย H_{1.3} และ H_{1.5} ที่สามารถนำไปแยกสารออกมาได้ สำหรับกลุ่มย่อย H_{1.3} เมื่อนำมาทำคอลลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้ง ทำให้ได้ผลึกสีเหลืองอ่อนของสาร 3.1(42)

การยืนยันโครงสร้างของสาร 3.1(42) ได้จาก ¹H NMR สเปกตรัมและจากการทำ TLC เปรียบเทียบกับสารที่เคยแยกได้จากผลตีป्ली

3. การแยก pellitorine [3.1(56)]

จากกลุ่มย่อย H_{1.5} และ H_{3.2} ให้ของแข็งสีขาวของสาร 3.1(56) การยืนยันโครงสร้างของสารชนิดนี้ได้จาก ¹H NMR สเปกตรัมและจากการทำ TLC เปรียบเทียบกับสารที่เคยแยกได้จากผลชำพลู

4. การแยก β-sitosterol [3.1(40)]

นำสารกลุ่ม H₂ มาทำคอลลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้ง ได้ผลึกสีขาวของสาร 3.1(40) ที่มี stigmasterol ปนอยู่ด้วย โครงสร้างของสาร 3.1(40) ยืนยันได้จาก ¹H NMR สเปกตรัมและจาก

การทำ TLC เปรียบเทียบกับสารที่เคยแยกได้จากผลดีปัส

5. การแยก pipernonaline [3.1(46)]

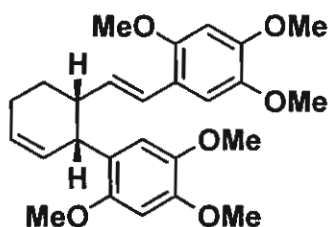
เมื่อนำสารกลุ่ม H_3 มาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำ 3 ครั้ง ได้สารสีเหลืองที่มีลักษณะกึ่งของแข็งของสาร 3.1(46) ซึ่งสามารถยืนยันโครงสร้างได้จาก ^1H NMR สเปกตรัมและจากการทำ TLC เปรียบเทียบกับสารที่เคยแยกได้จากผลดีปัส

6. การแยก guineensine [3.1(43)]

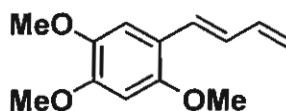
ภายหลังการทำคิกคอลัมน์โครมาโตกราฟีและคอลัมน์โครมาโตกราฟีของสารกลุ่ม H_4 อีกอย่างละครั้ง ได้ของแข็งสีขาวของสาร 3.1(43) โครงสร้างของสาร 3.1(43) ยืนยันได้จาก ^1H NMR สเปกตรัมและจากการทำ TLC เปรียบเทียบกับสารที่เคยแยกได้จากผลดีปัส

7. การแยก piperine dimer [3.1(87)]

เมื่อนำสารกลุ่ม H_5 มาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำ 3 ครั้ง ได้สารสีครีมอ่อนที่มีลักษณะกึ่งของแข็ง HREIMS ยืนยันสูตรโมเลกุลของสารคือ $C_{34}H_{38}N_2O_6$ EIMS แสดงพิก [M]⁺ ที่ m/z 570 และ base peak ที่ m/z 485 คาดว่าจะเกิดจาก [M-piperidine]⁺ สำหรับพิกที่ m/z 201, 173, 172, 143, 135, 115, 112, 105, 84, 77 และ 63 ตรงกับ fragment ions ที่เกิดจากการแตกหัก (fragmentation) ของ piperine 3.1(10)^{3.1[87]} โดยมีพิก [piperine]⁺ ปรากฏที่ m/z 285 พิกนี้มีค่า m/z เป็นครึ่งหนึ่งของพิก [M]⁺ ของสาร 3.1(87) คาดว่าพิก m/z 285 น่าจะเป็น fragment ion ที่เกิดจากการแตกหักผ่าน retro-Diels-Alder reaction ของพิก [M]⁺ การแตกหักชนิดนี้เคยมีรายงานการพบใน cyclohexene derivative 3.1(88) ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับสาร 3.1(87) แต่ไม่มีหลักฐานยืนยัน biosynthesis ของสาร 3.1(88) ซึ่งแยกได้จาก *Zingiber cassumunar* ว่าเกิดจาก dimerization ของสาร 3.1(89) ผ่าน Diels-Alder reaction^{3.1[88]}



3.1(88)



3.1(89)

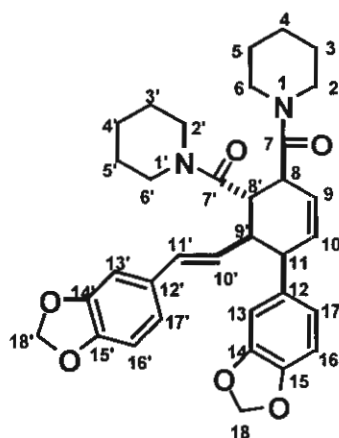
ตารางที่ 3.1(1) ข้อมูล NMR ของสาร 3.1(87)^a

ตำแหน่ง	¹ H	¹³ C	DEPT
2	3.54 <i>m</i>	47.1	CH ₂
3	1.58 <i>m</i>	26.7	CH ₂
4	1.63 <i>m</i>	24.6	CH ₂
5	1.51 <i>m</i>	25.8	CH ₂
6	3.54 <i>m</i>	43.3	CH ₂
7		171.1	CO
8	4.12 <i>ddt</i> (9.6, 2.3, 2.3)	42.9	CH
9	5.73 <i>ddd</i> (10.0, 2.3, 2.3)	125.5	CH
10	5.84 <i>ddd</i> (10.0, 5.0, 2.3)	130.3	CH
11	3.45 <i>m</i>	45.9	CH
12		133.6	C
13	6.79 <i>br s</i>	107.9	CH
14		147.5	C
15		146.4	C
16	6.80 <i>d</i> (11.4)	110.8	CH
17	6.80 <i>br d</i> (11.4)	123.5	CH
18	5.94 <i>d</i> (1.5), 5.96 <i>d</i> (1.5)	100.92	CH ₂
2'	3.26 <i>m</i> , 3.33 <i>m</i>	42.8	CH ₂
3'	1.12 <i>m</i> , 1.25 <i>m</i>	25.6	CH ₂
4'	1.34 <i>m</i> , 1.43 <i>m</i>	24.5	CH ₂
5'	1.25 <i>m</i> , 1.43 <i>m</i>	26.4	CH ₂
6'	3.26 <i>m</i> , 3.33 <i>m</i>	46.9	CH ₂
7'		172.2	CO
8'	3.64 <i>dd</i> (11.8, 9.6)	37.7	CH
9'	2.91 <i>ddd</i> (11.8, 10.2, 5.7)	45.4	CH
10'	5.19 <i>dd</i> (15.6, 10.2)	128.1	CH
11'	6.29 <i>d</i> (15.6)	131.0	CH
12'		132.0	C
13'	6.60 <i>d</i> (1.6)	105.3	CH
14'		147.8	C
15'		146.7	C
16'	6.67 <i>d</i> (6.9)	108.2	CH
17'	6.63 <i>dd</i> (6.9, 1.6)	120.7	CH
18'	5.899 <i>d</i> (1.6), 5.895 <i>d</i> (1.6)	100.89	CH ₂

^a บันทึกใน CDCl₃, ค่า J (Hz) อยู่ในวงเล็บ^{b, c} สัญญาณอาจสลับกันได้

UV สเปกตรัมของสาร 3.1(87) แสดงแถบดูดกลืนของหมู่ styryl ที่ 278 นาโนเมตร IR สเปกตรัมให้แถบดูดกลืนสำคัญที่ 1630 cm^{-1} ตรงกับ C=O stretching ของ 3° amide แถบดูดกลืนของหมู่ methylenedioxy ปรากฏที่ $1246, 1037$ และ 923 cm^{-1} ^{3.1[56]} นอกจากนี้ยังพบแถบดูดกลืนที่ 968 และ 719 cm^{-1} แสดงว่ามีทั้ง *trans* และ *cis* disubstituted double bonds อยู่ในโครงสร้าง

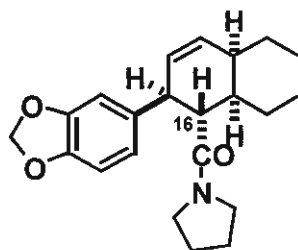
การกำหนดสัญญาณของ ^1H และ ^{13}C NMR สเปกตรัมดังแสดงในตารางที่ 3.1(1) ได้อาศัยเทคนิคของ ^1H - ^1H COSY, HETCOR และ HMBC ประกอบกัน จาก ^{13}C NMR และ DEPT สเปกตรัม (ตารางที่ 3.1(1)) แสดงว่ามีเฉพาะ methylene carbon, methine carbon และ quaternary carbon จำนวน 12, 14 และ 8 อะตอมตามลำดับ ข้อมูลนี้ช่วยสนับสนุนสูตรโมเลกุลของสาร 3.1(87) สำหรับสัญญาณที่ δ 171.1 และ 172.2 ใน ^{13}C NMR สเปกตรัมยังแสดงว่ามีหมู่คาร์บอนิล 2 หมู่อยู่ในโครงสร้าง



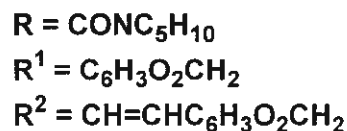
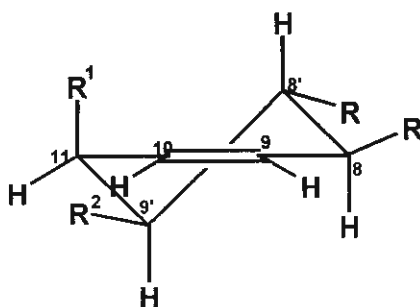
3.1(87)

^1H NMR สเปกตรัมแสดงสัญญาณ doublet of doublets ที่ δ 5.19 (1H, $J_{10',11'} = 15.6\text{ Hz}$, $J_{10',9} = 10.2\text{ Hz}$) และ doublet ที่ δ 6.30 (1H, $J_{11',10} = 15.6\text{ Hz}$) ตรงกับ olefinic protons ที่ตำแหน่ง 10' และ 11' ของหมู่ styryl ตามลำดับ ค่า coupling constant ประมาณ 15 Hz แสดง configuration ของพันธะคู่ $\text{C}_{10'}=\text{C}_{11'}$ แบบ *trans* นอกจากนี้ยังพบสัญญาณของ olefinic protons ในลักษณะ doublet of doublet of doublets อีก 2 ชุดที่ δ 5.73 (1H, $J_{9,10} = 10.0\text{ Hz}$, $J_{9,8} = 2.3\text{ Hz}$, $J_{9,11} = 2.3\text{ Hz}$) และ δ 5.84 (1H, $J_{10,9} = 10.0\text{ Hz}$, $J_{10,11} = 5.0\text{ Hz}$, $J_{10,8} = 2.3\text{ Hz}$) ตรงกับ olefinic protons ที่ตำแหน่ง 9 และ 10 ของ cyclohexene ring ตามลำดับ ค่า coupling constant 10 Hz ยืนยันพันธะคู่ $\text{C}_9=\text{C}_{10}$ มี configuration แบบ *cis* ส่วน

สัญญาณของ methine protons ของ cyclohexene ring 4 โปรตอนปรากฏให้เห็นในลักษณะ doublet of doublet of doublets ที่ δ 2.91 (1H, $J_{9',8'} = 11.8$ Hz, $J_{9',10'} = 10.2$ Hz, $J_{9',11} = 5.7$ Hz) doublet of doublet of triplets ที่ δ 4.12 (1H, $J_{8,8'} = 9.6$ Hz, $J_{8,9} = 2.3$ Hz, $J_{8,10} = 2.3$ Hz) multiplet ที่ δ 3.45 (1H) และ doublet of doublets ที่ δ 3.64 (1H, $J_{8',9'} = 11.8$ Hz, $J_{8',8} = 9.6$ Hz) ตรงกับโปรตอนที่ตำแหน่ง 9', 8, 11 และ 8' จากค่า $J_{8',8} = 9.6$ Hz และ $J_{8',9'} = 11.8$ Hz แสดงการจัดตัวแบบ *trans* diaxial ของ H_8 , $H_{8'}$ และ $H_{9'}$ ส่วนค่า $J_{8,9}$, $J_{9',11}$, และ $J_{10,11}$ ประมาณ 2-5 Hz แสดงการจัดตัวแบบ axial, equatorial และ/หรือแบบ diequatorial ของโปรตอนเหล่านี้ จากการเปรียบเทียบค่า coupling constants ของ methine protons ดังกล่าวข้างต้นกับ methine protons ของ cyclohexene ring ของ cyclostachine A [3.1(90)] ซึ่งแยกได้จาก *Piper trichostachyon* C. DC ^{3.1[89]} คาดว่าสาร 3.1(87) น่าจะมี conformation คล้ายสาร 3.1(90) ดังแสดงข้างล่างนี้ กล่าวคือมี H_8 อยู่ในตำแหน่ง pseudo-axial ซึ่งยืนยันได้จากค่า allylic coupling (2.5 Hz) กับ H_{10} ซึ่งมีค่าค่อนข้างมาก แสดงว่ามุมที่พันธะ C_8-H_8 ทำกับระนาบ $H_{10}-C_{10}-C_9$ มีค่าประมาณ 80° เพราะ allylic coupling จะมีค่าสูงสุดเมื่อมุม = 90° ^{3.1[89]}



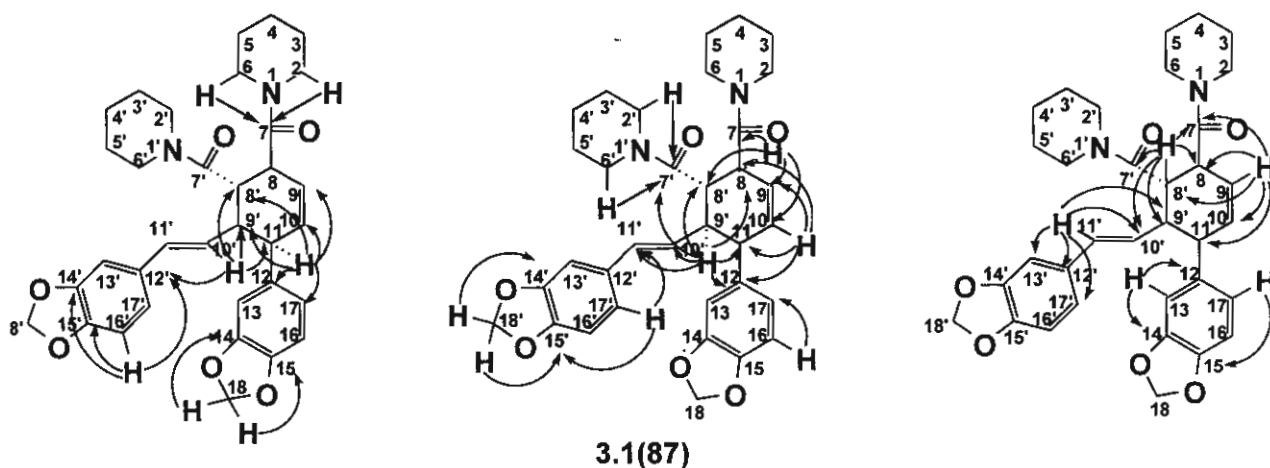
3.1(90)



สิ่งที่แตกต่างจากสาร 3.1(90) คือ splitting pattern ของ olefinic protons ที่ตำแหน่ง 9 และ 10 ของ cyclohexene ring ของสาร 3.1(87) จะแสดงทั้ง vicinal และ allylic coupling ให้เห็นอย่างชัดเจน

นอกจากนี้ ^1H NMR สเปกตรัมยังแสดงสัญญาณของ methylenedioxy protons ในลักษณะ doublet 4 ชุดที่ δ 5.899 (1H, $J = 1.6$ Hz), δ 5.895 (1H, $J = 1.6$ Hz), δ 5.94 (1H, $J = 1.5$ Hz) และ δ 5.96 (1H, $J = 1.5$ Hz) สำหรับสัญญาณของ aromatic protons 6 โปรตอน ปรากฏให้เห็นเป็นสัญญาณที่แยกออกจากกัน 2 ชุดๆละ 3 โปรตอน โดยสัญญาณชุดที่หนึ่ง ประกอบขึ้นด้วย doublet 2 ชุดที่ δ 6.60 (1H, $J = 1.6$ Hz) และ 6.67 (1H, $J = 6.9$ Hz) และ doublet of doublets ที่ δ 6.63 (1H, $J = 6.9$ และ 1.6 Hz) จาก splitting pattern ของ aromatic protons ชุดนี้ยืนยันว่าเป็น 1,2,4-trisubstituted benzene ส่วนสัญญาณของ aromatic protons อีก 1 ชุดปรากฏให้เห็นเป็น broad singlet ที่ δ 6.79 และ broad doublet ที่ δ 6.80 ซึ่งซ้อนทับกันจำนวน 3 โปรตอน ส่วนโปรตอนของ piperidine ring แสดงสัญญาณในลักษณะ multiplet หลายชุดในช่วง δ 1.07-1.67 และ δ 3.20-3.60 จำนวน 20 โปรตอน ถ้าพิจารณาจากตารางที่ 3.1(1) จะสังเกตเห็นว่า axial และ equatorial protons ของ piperidine ring ที่เกาะกับคาร์บอนที่ตำแหน่ง 8' จะปรากฏที่ chemical shift ต่างกัน ซึ่งแตกต่างจาก axial และ equatorial protons ของ piperidine ring ที่เกาะกับคาร์บอนที่ตำแหน่ง 8 จะปรากฏที่ chemical shift เดียวกัน คาดว่ามีสาเหตุจากการจัดตัวของ piperidine ring ทั้งสองบน cyclohexene ring

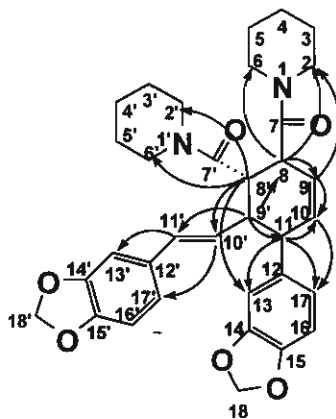
การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนกับโปรตอนโดยเทคนิค ^1H - ^1H COSY และ TOCSY และความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนกับคาร์บอนโดยเทคนิค HMBC ดังแสดงในรูปที่ 3.1(1) ช่วยยืนยันการเชื่อมต่อของหมู่อะตอมต่างๆรอบ cyclohexene ring ของสาร 3.1(87)



รูปที่ 3.1(1) ความสัมพันธ์ระหว่าง H กับ C โดยเทคนิค HMBC

สำหรับ stereochemistry ของสาร 3.1(87) สรุปได้จากเทคนิค NOESY ดังแสดงในรูปที่

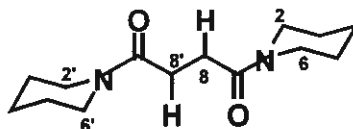
3.1(2)



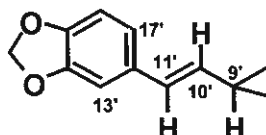
3.1(87)

รูปที่ 3.1(2) ความสัมพันธ์ระหว่าง H กับ H ที่สำคัญโดยเทคนิค NOESY

จาก NOESY สเปกตรัมความสัมพันธ์ระหว่าง H_8 กับ H_2 และ H_6 และระหว่าง H_8 กับ H_2 , และ H_6 , และจาก Dreiding model ยืนยันการการจัดตัวของหมู่ acylpiperidine ทั้ง 2 หมู่ดังนี้



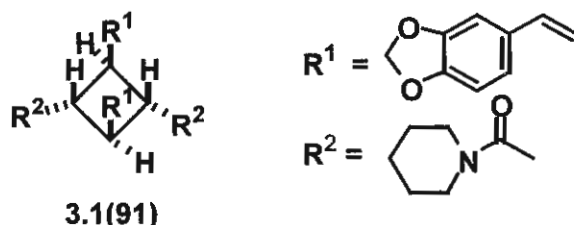
การจัดตัวของหมู่ acylpiperidine ดังกล่าวข้างต้นนี้ช่วยอธิบายการเกิด downfield shift ของ H_8 (δ 4.12) และ H_8 , (δ 3.64) ของสาร 3.1(87) เมื่อเปรียบเทียบกับ H_{16} (δ 2.76) ของสาร 3.1(90) คาดว่าน่าจะเป็นผลมาจากการเกิด diamagnetic anisotropy ของหมู่คาร์บอนิลซึ่งจัดตัวในลักษณะคล้าย 1,3 diaxial ของ cyclohexane ring ใน NOESY สเปกตรัมยังแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง H_{10} กับ H_{17} , และระหว่าง H_9 กับ H_{11} , และระหว่าง H_{11} กับ H_{13} , ซึ่งยืนยันการการจัดตัวของหมู่ styryl ว่าอยู่ในระนาบเดียวกับพันธะ C_9-H_9 , ดังนี้



ส่วนการจัดตัวของหมู่ methylenedioxyphenyl คาดว่าน่าจะอยู่ในระนาบเดียวกับพันธะ $C_{11}-H_{11}$ ข้อมูลที่สนับสนุนการจัดตัวในลักษณะนี้ได้จากความสัมพันธ์ระหว่าง H_8 กับ H_{13} หรือ H_{17} จาก Dreiding model จะเห็นการจัดตัวของหมู่ styryl และ หมู่ methylenedioxyphenyl อยู่ใน

ลักษณะเกือบขนานกัน ทำให้ steric hindrance ที่เกิดจากหมู่อะตอมทั้งสี่รอบ cyclohexene ring มีน้อยมาก

สาร 3.1(87) เป็นสารใหม่ซึ่งไม่เคยแยกได้จากธรรมชาติและไม่เคยมีการสังเคราะห์มาก่อน สำหรับ piperine dimer ที่เคยสังเคราะห์ได้จาก photolysis ของ piperine [3.1(10)] ในเมทานอลภายใต้อากาศโดยมี rose bengal เป็น sensitizer คือ *E, E*-piperylpiperine dimer [3.1(91)]^{3.1[90]} แม้จะไม่มีหลักฐานยืนยัน biosynthesis ของสาร 3.1(87) ว่าเกิดจาก dimerization ของ piperine 3.1(10) ผ่าน Diels-Alder reaction แต่จากการนำ piperine [3.1(10)] มาละลายในเมทานอลแล้วทำการรีฟลักซ์เป็นเวลาหลายวัน ไม่พบการเปลี่ยนแปลงใดๆเกิดขึ้น จึงเชื่อว่าสาร 3.1(87) ไม่น่าจะเป็น artefacts ที่เกิดจากการสกัดสารโดยใช้ Soxhlet เพราะไม่พบสาร 3.1(87) ในผลดีป्लीซึ่งมี piperine [3.1(10)] อยู่ในปริมาณมากกว่าและใช้วิธีสกัดสารวิธีเดียวกัน



(ข) Methanol extract

นำส่วนที่สกัดด้วยเมทานอลมาทำควิกคอลัมน์โครมาโตกราฟี 2 ครั้งได้กลุ่มย่อย 1 กลุ่มที่สามารถนำไปแยกสารออกมาได้

1. การแยก piperine [3.1(10)]

จากกลุ่มย่อย M_g ได้ผลึกสีเหลืองอ่อนของสาร 3.1(10) ซึ่งสามารถยืนยันโครงสร้างได้จาก ^1H NMR สเปกตรัมและจากการทำ TLC เปรียบเทียบกับสารที่เคยแยกได้จากผลดีป्ली

จากการสกัดลำต้นดีป्लीแห้งด้วยนอร์มัลเฮกเซนและเมทานอล แล้วนำส่วนที่สกัดได้มาแยกสารออกจากกันด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี แล้วนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาหาสูตรโครงสร้าง โดยใช้เทคนิคทางสเปกโตรสโคปี สารที่แยกได้จากส่วนที่สกัดด้วยนอร์มัลเฮกเซนมี 8 ชนิดได้แก่สารประเภท amide 5 ชนิดคือ piperine [3.1(10)], guineesine [3.1(43)], pipernonaline [3.1(46)], pellitorine [3.1(56)] และ piperine dimer [3.1(87)] และสารประเภทอื่นอีก 2 ชนิด

คือ β -sitosterol [3.1(40)] และ methyl piperate [3.1(42)] ส่วนสารที่แยกได้จากส่วนที่สกัดด้วยเมทานอลมี 1 ชนิดคือ piperine [3.1(10)] สำหรับ piperine dimer [3.1(87)] เป็นสารใหม่ซึ่งไม่เคยแยกได้จากธรรมชาติและไม่เคยมีการสังเคราะห์มาก่อน

2. ขำพลู (*Piper sarmentosum* Roxb.)

1) ผลขำพลู

(1) การหาส่วนประกอบทางเคมี

จากการสกัดแยกสารออกจากผลขำพลูแห้งด้วยนอร์มัลเฮกเซนและเมทานอลตามลำดับโดยใช้ Soxhlet extraction apparatus แล้วนำส่วนที่สกัดได้มาแยกสารออกจากกันด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี สามารถแยกสารจากส่วนที่สกัดด้วยเฮกเซน (hexane extract) จำนวน 8 ชนิด สำหรับการแยกสารจากส่วนที่สกัดด้วยเมทานอล (methanol extract) ได้สารจำนวน 7 ชนิดดังนี้

(ก) Hexane extract

นำส่วนที่สกัดด้วยเฮกเซนมาทำควิกคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้ส่วนย่อย 4 กลุ่มที่สามารถนำไปแยกสารออกมาได้

1. การแยก 1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-1E-tetradecene [3.1(76)]

เมื่อนำสารกลุ่ม H_2 มาทำควิกคอลัมน์โครมาโตกราฟีและคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกอย่างละหนึ่งครั้ง ได้สารกลุ่มย่อย $H_{2.2.5}$ ซึ่งเป็นของแข็งสีขาวที่มีจุดหลอมเหลวต่ำ (33–34 °C) UV สเปกตรัมให้แถบดูดกลืนที่ 312 นาโนเมตรแสดงว่ามีหมู่ styryl^{3.1[51]} สำหรับหมู่ 3,4-methylenedioxyphenyl ในโครงสร้างยืนยันได้จาก IR และ ^1H NMR สเปกตรัม ใน IR สเปกตรัมแถบดูดกลืนที่ 1259, 1038 และ 925 cm^{-1} แสดงว่ามีหมู่ methylenedioxy^{3.1[56]} ส่วนแถบดูดกลืนที่ 865 และ 801 cm^{-1} แสดงว่ามี 1,2,4-trisubstituted benzene ใน ^1H NMR สเปกตรัมสัญญาณของหมู่ methylenedioxy ปรากฏเป็น singlet ที่ δ 5.91 (2H) ส่วนสัญญาณของ aromatic protons ที่ตำแหน่ง 5, 6 และ 2 ของวงอะโรเมติกปรากฏเป็น multiplet ที่ δ 6.74 (2H) และ singlet ที่ δ 6.88 (1H) ตามลำดับ นอกจากนี้ ^1H NMR สเปกตรัมยังแสดงสัญญาณของ olefinic protons จำนวน 2 โปรตอนในลักษณะ double triplet ที่ δ 6.04 (1H, J = 15.7 และ 7.0 Hz) และ doublet ที่ δ 6.27 (1H, J = 15.7 Hz) ตรงกับโปรตอนที่ตำแหน่ง β และ α ของวงอะโรเมติกตามลำดับ จากค่า coupling constant (J = 15.7 Hz) ของ olefinic protons ยืนยัน configuration ของพันธะคู่แบบ *trans* นอกจากนี้ splitting pattern ของ olefinic protons ยังช่วยยืนยันพันธะคู่ C=C ที่ต่อคอนจุกต์กับวงอะโรเมติก ส่วนสัญญาณ double triplet ที่ δ 2.15 (2H, J = 7.0 และ 7.0 Hz) ตรงกับ allylic methylene protons สัญญาณ triplet ที่

δ 0.87 (3H) ตรงกับ methyl protons ที่อยู่ส่วนปลายของ alkenyl side chain สำหรับสัญญาณ broad singlet ที่ δ 1.25 ถ้าพิจารณาจาก integration พบว่ามี 18 โปรตอน แสดงว่ามีหมู่ methylene อีก 9 หมู่อยู่ในโครงสร้าง EI แมสสเปกตรัมแสดงพีคของ molecular ion ที่ m/z 316 ตรงกับสูตรโมเลกุล $C_{21}H_{32}O_2$

ข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีข้างต้นนี้ ตรงกับข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีที่มีผู้รายงานไว้^{3.1[77]} คาดว่าสารที่แยกได้คือ 1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-1*E*-tetradecene [3.1(76)]

2. การแยก β -sitosterol [3.1(40)]

จากกลุ่มย่อย $H_{2.7}$ ได้ผลึกสีขาว จุดหลอมเหลว 136-138 °C เมื่อเปรียบเทียบข้อมูล IR และ ^1H NMR สเปกตรัมของสารที่แยกได้กับข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีที่มีผู้รายงานไว้^{3.1[62,63]} และจากการทำ TLC เปรียบเทียบกับ authentic sample ยืนยันโครงสร้างของ β -sitosterol [3.1(40)] ที่มี stigmasterol ปนอยู่ด้วยในปริมาณเล็กน้อย

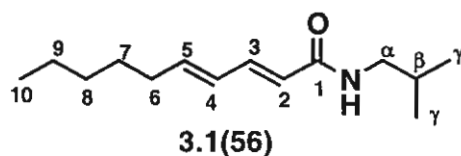
หมายเหตุ การอภิปรายผลของสาร 3.1(40) อยู่ในหัวข้อต่อไป

3. การแยก pellitorine [3.1(56)]

ภายหลังการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีของกลุ่มย่อย $H_{2.9}$ ได้ของแข็งสีขาว จุดหลอมเหลว 68-70 °C UV สเปกตรัมให้แถบดูดกลืนที่ 260 นาโนเมตรแสดงถึงระบบคอนจูเกตของ 2*E*,4*E*-dienamide^{3.1[51]} IR สเปกตรัมแสดงแถบดูดกลืนที่ 1656, 1629 และ 996 cm^{-1} ช่วยยืนยันระบบ 2*E*,4*E*-dienamide ส่วนแถบดูดกลืนที่ 3299 cm^{-1} ตรงกับ N-H stretching ของหมู่ 2° amide ^1H NMR สเปกตรัมแสดงสัญญาณของ olefinic protons ของระบบ 2*E*,4*E*-dienamide จำนวน 4 โปรตอนในลักษณะ doublet ที่ δ 5.74 (1H, J = 15.0 Hz) และ doublet of doublets ที่ δ 7.16 (1H, J = 15.0 และ 10.0 Hz) ตรงกับ olefinic protons ที่ตำแหน่ง α , และ β ของหมู่คาร์บอนิลตามลำดับ ส่วน olefinic protons ที่เหลืออีก 2 โปรตอนคือโปรตอนที่ตำแหน่ง γ และ δ ของหมู่คาร์บอนิลปรากฏเป็น multiplet ที่ δ 6.07 (2H) นอกจากนี้ยังพบสัญญาณของหมู่ N-isobutyl ปรากฏเป็น doublet ที่ δ 0.90 (6H, J = 6.7 Hz), multiplet ที่ δ 1.77 (1H), triplet ที่ δ 3.13 (2H) และ broad singlet ที่ δ 5.60 (1H) ตรงกับ methyl, methine, methylene และ NH protons ตามลำดับ สัญญาณ triplet ที่ δ 0.86 (3H), quintet ที่ δ 1.39 (2H), และ double triplet ที่ δ 2.11 (2H, J = 7.1 และ 6.7 Hz) ตรงกับ methyl

protons ที่อยู่ส่วนปลายของโมเลกุล, homoallylic และ allylic methylene protons ตามลำดับ ส่วนสัญญาณ broad singlet ที่ δ 1.27 (4H) แสดงว่ามีหมู่ methylene อีก 2 หมู่ในโครงสร้าง ^{13}C NMR สเปกตรัมแสดงสัญญาณของคาร์บอนเพียง 13 สัญญาณ ประกอบด้วยสัญญาณของ carbonyl carbon ที่ δ 166.4 สัญญาณของ tertiary carbon ของระบบ diene ปรากฏที่ δ 121.7, 128.2, 141.3 และ 143.2 สัญญาณของหมู่ isobutyl ปรากฏให้เห็นเพียง 3 สัญญาณที่ δ 20.1, 28.6 และ 46.9 ส่วนอีก 5 สัญญาณที่เหลือเป็นของ methylene carbon 4 หมู่และ methyl carbon 1 หมู่

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีข้างต้นกับข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีที่มีผู้รายงานไว้^{3.1[77]} คาดว่าสารที่แยกได้คือ pellitorine [3.1(56)]

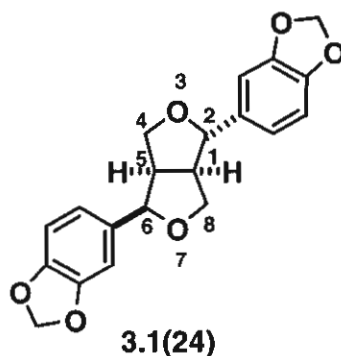


4. การแยก (+)-asarinin [3.1(24)]

จากกลุ่มย่อย $\text{H}_{3.4}$ ได้ผลึกสีขาว จุดหลอมเหลว 120–121 °C $[\alpha]_D^{31} = +121.9^\circ$ (CHCl_3) UV สเปกตรัมแสดงแถบดูดกลืนของวงอะโรมาติกที่ 244 และ 294 นาโนเมตร ใน IR สเปกตรัมแถบดูดกลืนที่ 1257, 1037 และ 931 cm^{-1} แสดงว่ามีหมู่ methylenedioxy^{3.1[56]} ส่วนแถบดูดกลืนที่ 881 และ 810 cm^{-1} แสดงว่ามี 1,2,4-trisubstituted benzene นอกจากนี้ ^1H NMR สเปกตรัมยังช่วยยืนยันว่ามีหมู่ 3,4-methylenedioxyphenyl ในโครงสร้างจากการปรากฏของสัญญาณ singlet 2 ชุดที่ δ 5.93 (2H) และ 5.94 (2H) ตรงกับโปรตอนของหมู่ methylenedioxy สัญญาณ multiplet ที่ δ 6.80 (4H) และ singlet ที่ δ 6.85 (2H) ตรงกับ aromatic protons ที่ตำแหน่ง 5, 6 และ 2 ของวงอะโรมาติกตามลำดับ จากค่า integration ของโปรตอนทั้งกล่าวข้างต้นนี้แสดงว่ามีหมู่ 3,4-methylenedioxyphenyl 2 หมู่อยู่ในโครงสร้าง นอกจากนี้ ^1H NMR สเปกตรัมยังแสดงสัญญาณ multiplet 3 ชุดคือที่ δ 2.84 (1H) ตรงกับโปรตอนที่ตำแหน่ง 1, δ 3.28 (2H) ตรงกับโปรตอนที่ตำแหน่ง 5 และ axial proton ที่ตำแหน่ง 4 และ δ 3.81 (2H) ตรงกับ equatorial proton ที่ตำแหน่ง 4 และ axial proton ที่ตำแหน่ง 8 สัญญาณ

broad doublet ที่ δ 4.08 (1H, $J = 9.4$ Hz) ตรงกับ equatorial proton ที่ตำแหน่ง 8 และสัญญาณ doublet อีก 2 ชุดที่ δ 4.33 (1H, $J = 7.1$ Hz) และ 4.81 (1H, $J = 5.3$ Hz) ตรงกับโปรตอนที่ตำแหน่ง 2 และ 6 ตามลำดับ

ข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีข้างต้นนี้ ตรงกับข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีที่มีผู้รายงานไว้^{3.1[80]} เป็นการยืนยันโครงสร้างของ (+)-asarinin [3.1(24)]



5. การแยก guineensine [3.1(43)]

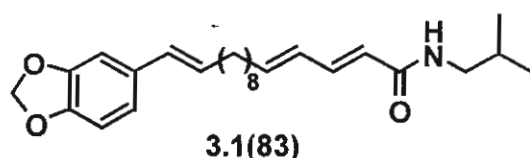
ผลึกสีขาวของสาร 3.1(43) กรองได้จากกลุ่มย่อย $H_{3.17}$ การยืนยันโครงสร้างของสาร 3.1(43) ได้จาก ^1H NMR สเปกตรัมและจากการทำ TLC เปรียบเทียบกับสารที่แยกได้จากกลุ่มย่อย $H_{3.6.2}$ ของผลดีป्ली

6. การแยก brachystamide B [3.1(83)]

จากกลุ่มย่อย $H_{3.17}$ ได้ของแข็งสีขาว จุดหลอมเหลว 100–101 °C ข้อมูลจาก IR และ ^1H NMR สเปกตรัมยืนยันว่ามีหมู่ 3,4-methylenedioxyphenyl ในโครงสร้าง สังเกตได้จากการปรากฏของแถบดูดกลืนของหมู่ methylenedioxy ที่ 1258, 1045 และ 923 cm^{-1} ^{3.1[56]} และแถบดูดกลืนของ 1,2,4-trisubstituted benzene ที่ 872 และ 819 cm^{-1} ใน IR สเปกตรัม และการปรากฏของสัญญาณ singlet ที่ δ 5.91 (2H), multiplet ที่ δ 6.72 (2H) และ singlet ที่ δ 6.87 (1H) ใน ^1H NMR สเปกตรัมซึ่งตรงกับโปรตอนของหมู่ methylenedioxy และ aromatic protons ที่ตำแหน่ง 5, 6 และ 2 ของวงอะโรมาติกตามลำดับ นอกจากนี้ ^1H NMR สเปกตรัมยังให้สัญญาณของหมู่ N-isobutyl ปรากฏเป็น doublet ที่ δ 0.90 (6H, $J = 6.7$ Hz), multiplet ที่ δ 1.78 (1H), triplet ที่ δ 3.14 (2H, $J = 6.3$ Hz) และ broad singlet ที่ δ 5.43 (1H) ตรงกับ methyl, methine, methylene และ N-H protons ตามลำดับ ใน IR สเปกตรัมแถบดูดกลืน

ของ N-H stretching ที่ 3305 cm^{-1} ช่วยยืนยันว่าเป็น 2° amide UV สเปกตรัมให้แถบดูดกลืนที่มีความเข้มสูงที่ 261 นาโนเมตรแสดงว่ามีทั้งหมู่ styryl และ conjugated dienamide ในโครงสร้าง^{3.1[64]} ใน IR สเปกตรัมแถบดูดกลืนที่ 1657 , 1628 และ 1001 cm^{-1} แสดงว่ามีระบบ $2E,4E$ -dienamide ส่วนแถบดูดกลืนอีก 1 แถบที่ 964 cm^{-1} แสดงว่ามีพันธะคู่อีก 1 พันธะที่มี configuration แบบ *trans*^{3.1[81]} ใน ^1H NMR สเปกตรัมสัญญาณของ olefinic protons ของระบบ $2E,4E$ -dienamide จำนวน 4 โปรตอนปรากฏเป็น doublet ที่ δ 5.72 (1H, $J = 14.9\text{ Hz}$), multiplet ที่ δ 6.06 (2H) และ doublet of doublets ที่ δ 7.17 (1H, $J = 14.9$ และ 10.0 Hz) ซึ่งตรงกับ olefinic protons ที่ตำแหน่ง α , γ , δ และ β ของหมู่คาร์บอนิลตามลำดับ สำหรับสัญญาณของ olefinic proton ที่เหลืออีก 2 โปรตอนปรากฏเป็น multiplet ที่ δ 6.06 (1H) และ doublet ที่ δ 6.26 (1H, $J = 15.8\text{ Hz}$) ตรงกับโปรตอนที่ตำแหน่ง β และ α ของวงอะโรเมติกตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบสัญญาณ multiplet อีก 3 ชุดที่ δ 1.27 (8H), δ 1.41 (4H) และ δ 2.13 (4H) ตรงกับ methylene, homoallylic และ allylic protons ตามลำดับ จากค่า integration ของโปรตอน 3 ชนิดหลังนี้แสดงว่ามีหมู่ methylene 8 หมู่คั่นอยู่ระหว่าง $2E,4E$ -dienamide และหมู่ 3,4-methylenedioxyethyl EI แมสสเปกตรัมแสดงพีคของ molecular ion ที่ m/z 411 ตรงกับสูตรโมเลกุล $\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{NO}_3$

ข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีข้างต้นนี้ ตรงกับข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีที่มีผู้รายงานไว้^{3.1[81]} คาดว่าสารที่แยกได้คือ brachystamide B [3.1(83)]



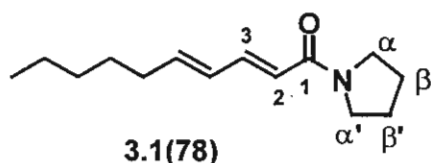
7. การแยก sarmentine [3.1(78)]

น้ำมันสีเหลืองที่แยกได้จากกลุ่มย่อย $\text{H}_{4.6}$ UV สเปกตรัมแสดงแถบดูดกลืนที่ 267 นาโนเมตรแสดงถึงระบบคอนจูเกตของ $2E,4E$ -dienamide^{3.1[51]} โครงสร้างส่วนที่คล้ายกับสาร 3.1 (56) ยืนยันได้จาก ^1H NMR สเปกตรัม ได้แก่สัญญาณของ olefinic protons ของระบบ diene จำนวน 4 โปรตอนซึ่งปรากฏเป็น doublet ที่ δ 6.05 (1H, $J = 14.7\text{ Hz}$), double triplets ที่ δ 6.05 (1H, $J = 14.7$ และ 7.0 Hz) และ doublet of doublets 2 ชุดที่ δ 6.15 และ 7.24 (ค่า J

ประมาณ 15 และ 11 Hz) ซึ่งตรงกับ olefinic protons ที่ตำแหน่ง α , δ , γ และ β ของหมู่คาร์บอนิลตามลำดับ ส่วนสัญญาณ triplet ที่ δ 0.86 (3H), quintet ที่ δ 1.39 (2H), และ double triplet ที่ δ 2.12 (2H, $J = 7.0$ และ 7.0 Hz) ตรงกับ methyl protons ที่อยู่ส่วนปลายของโมเลกุล, homoallylic และ allylic methylene protons ตามลำดับ ส่วนสัญญาณ multiplet ที่ δ 1.26 (4H) แสดงว่ามีหมู่ methylene อีก 2 หมู่ในโครงสร้าง สำหรับโครงสร้างส่วนที่แตกต่างจากสาร 3.1(56) คือมี pyrrolidine ring แทนหมู่ N-isobutyl ^1H NMR สเปกตรัมแสดงสัญญาณของโปรตอนของ pyrrolidine ring ในลักษณะ quintet 2 ชุดที่ δ 1.83 (2H) และ 1.93 (2H) และ triplet 2 ชุดที่ δ 3.49 (2H) และ 3.51 (2H) ซึ่งตรงกับ methylene protons ที่ตำแหน่ง β' , β , α และ α' ของ pyrrolidine ring ตามลำดับ สาเหตุที่ทำให้ methylene protons 4 หมู่ของ pyrrolidine ring เป็น chemically nonequivalent protons เพราะการหมุนรอบ carbonyl-nitrogen bond เกิดได้ยากเนื่องจากมีพลังงานขวางกั้นสูง^{3.1[83]} ^{13}C NMR สเปกตรัมแสดงสัญญาณของคาร์บอน 14 สัญญาณ ประกอบด้วยสัญญาณของ carbonyl carbon ที่ δ 165.2 สัญญาณของ tertiary carbon ของระบบ diene ปรากฏที่ δ 119.8, 128.6, 141.2 และ 143.1 สัญญาณของ pyrrolidine ring ปรากฏที่ δ 24.3, 26.1, 45.8 และ 46.4 ส่วนอีก 5 สัญญาณที่เหลือเป็นของ methylene carbon 4 หมู่และ methyl carbon 1 หมู่

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีข้างต้นกับข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีที่มีผู้รายงานไว้

^{3.1[77]} คาดว่าสารที่แยกได้คือ sarmentine [3.1(78)]

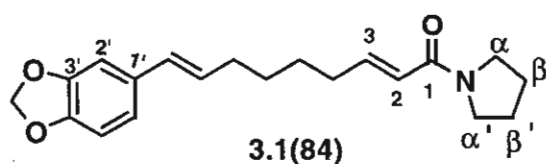


8. การแยก brachyamide B [3.1(84)]

เมื่อนำสารกลุ่มย่อย $\text{H}_{5.11}$ มาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีก 3 ครั้ง ได้สารสีขาวมีลักษณะกึ่งของแข็ง UV สเปกตรัมให้แถบดูดกลืนที่ 228, 275 และ 321 นาโนเมตรแสดงว่ามีระบบ α , β -unsaturated carbonyl และวงอะโรเมติกที่คอนจูเกตกับพันธะคู่แบบ *trans*^{3.1[82]} IR สเปกตรัมแสดงว่ามีระบบ unsaturated amide carbonyl จากการปรากฏของแถบดูดกลืนที่ 1660 และ 1606 cm^{-1} ส่วนแถบดูดกลืนที่ 1250, 1040 และ 932 cm^{-1} แสดงว่ามีหมู่ methylenedioxy^{3.1}

[56] ^1H NMR สเปกตรัมช่วยยืนยันถึงหมู่ methylenedioxyphenyl ในโครงสร้างจากการปรากฏของสัญญาณของ methylenedioxy protons ในลักษณะ singlet ที่ δ 5.91 (2H) และสัญญาณของ aromatic protons ในลักษณะ doublet 2 ชุดที่ δ 6.71 (1H, $J = 8.1$ Hz) และ 6.86 (1H, $J = 1.5$ Hz) และ doublet of doublets ที่ δ 6.73 (1H, $J = 8.1$ และ 1.5 Hz) ตรงกับโปรตอนตำแหน่ง 5, 2 และ 6 ของวงอะโรเมติกตามลำดับ นอกจากนี้ ^1H NMR สเปกตรัมยังแสดงสัญญาณของ pyrrolidine ring เช่นเดียวกับที่พบในสาร 3.1(78) ปรากฏเป็น quintet 2 ชุดที่ δ 1.83 (2H) และ 1.93 (2H) และ triplet 2 ชุดที่ δ 3.48 (2H) และ 3.50 (2H) ตรงกับ methylene protons ที่ตำแหน่ง β' , β , α และ α' ของ pyrrolidine ring ตามลำดับ ส่วนสัญญาณของ olefinic protons จำนวน 4 โปรตอนปรากฏให้เห็นในลักษณะ double triplet 4 ชุดที่ δ 6.01 (1H, $J = 15.6$ และ 7.0 Hz), δ 6.26 (1H, $J = 15.6$ และ 1.3 Hz), δ 6.08 (1H, $J = 15.3$ และ 1.4 Hz) และ δ 6.89 (1H, $J = 15.3$ และ 7.2 Hz) ตรงกับ olefinic protons ที่ตำแหน่ง β และ α ของวงอะโรเมติกและ α และ β ของหมู่คาร์บอนิลตามลำดับ จากค่า coupling constant (ประมาณ 15 Hz) ช่วยยืนยัน configuration ของพันธะคู่ทั้งสองแบบ *trans* ส่วน splitting pattern ในลักษณะ double triplet 4 ชุดยังช่วยยืนยันว่าพันธะคู่ทั้งสองไม่ได้ต่อกันโดยตรงกัน แต่มีหมู่ methylene 4 หมู่คั่นอยู่ระหว่างพันธะคู่ที่ต่อกันโดยตรงกับวงอะโรเมติกกับพันธะคู่ที่ต่อกันโดยตรงกับหมู่คาร์บอนิล เพราะพบสัญญาณ multiplet ที่ δ 2.18 (4H) ตรงกับ allylic methylene protons และสัญญาณ multiplet อีก 1 ชุดที่ δ 1.48 (4H) แสดงว่ามีหมู่ methylene อีก 2 หมู่ ^{13}C NMR สเปกตรัมแสดงสัญญาณของคาร์บอน 20 สัญญาณ ประกอบด้วยสัญญาณของ carbonyl carbon ที่ δ 164.9 สัญญาณของ olefinic carbon 4 สัญญาณปรากฏที่ δ 121.7, 129.6, 132.3 และ 145.5 สัญญาณของ aromatic ring 6 สัญญาณปรากฏที่ δ 105.3, 108.2, 120.2, 128.8, 146.5 และ 147.9 สัญญาณของ pyrrolidine ring 4 สัญญาณปรากฏที่ δ 24.3, 26.1, 45.7 และ 46.5 สัญญาณของหมู่ methylenedioxy ปรากฏที่ δ 100.9 ส่วนอีก 4 สัญญาณที่เหลือเป็นของ methylene carbon 4 หมู่

ข้อมูลทางสเปกโตรสโกปีข้างต้นนี้ ตรงกับข้อมูลทางสเปกโตรสโกปีที่มีผู้รายงานไว้^{3.1[82]} คาดว่าสารที่แยกได้คือ brachyamide B [3.1(84)]



(ข) Methanol extract

นำส่วนที่สกัดด้วยเมทานอลมาทำคอลลัมน์โครมาโตกราฟี ได้ส่วนย่อย 5 กลุ่มที่สามารถนำไปแยกสารออกมาได้

9. การแยก 1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-1*E*-tetradecene [3.1(76)]

เมื่อนำสารกลุ่ม M_1 มาทำคอลลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้ง ได้สารจากกลุ่มย่อย $M_{1.6}$ เป็นสารสีขาวที่มีลักษณะกึ่งของแข็งของสาร 3.1(76)

การยืนยันโครงสร้างของสาร 3.1(76) ได้จาก ^1H NMR สเปกตรัมและจากการทำ TLC เปรียบเทียบกับสารที่แยกได้จาก hexane extract ของผลข้าพลู

10. การแยก methyl piperate [3.1(42)]

ภายหลังการนำสารกลุ่ม M_3 มาแยกสารออกจากกันโดยใช้โครมาโตรอน ได้กลุ่มย่อยที่สามารถนำไปแยกสารออกมาได้ 2 กลุ่มคือกลุ่มย่อย $M_{3.4}$ และ $M_{3.5}$ สำหรับกลุ่มย่อย $M_{3.4}$ สามารถกรองเอาของแข็งสีเหลืองอ่อนของสาร 3.1(42) ออกมาได้

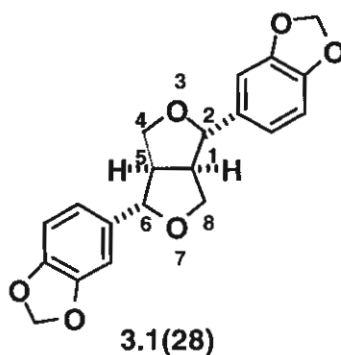
จากการเปรียบเทียบ ^1H NMR สเปกตรัมและ TLC กับสารที่แยกได้จากกลุ่ม H_2 ของผลดิบลิ สามารถยืนยันโครงสร้างของสาร 3.1(42)

11. การแยก sesamin [3.1(28)]

นำกลุ่มย่อย $M_{3.5}$ มาทำคอลลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีก 2 ครั้ง ได้ของแข็งสีขาวจากกลุ่มย่อย $M_{3.5.12.4}$ UV สเปกตรัมแสดงแถบดูดกลืนของวงอะโรเมติกที่ 211, 232 และ 293 นาโนเมตร การปรากฏของหมู่ 3,4-methylenedioxyphenyl ในโครงสร้างยืนยันได้จากแถบดูดกลืนที่ 1247, 1039 และ 931 cm^{-1} ใน IR สเปกตรัม^{3.1[56]} และจาก ^1H NMR สเปกตรัมซึ่งแสดงสัญญาณ singlet ที่ δ 5.94 (4H) ตรงกับโปรตอนของหมู่ methylenedioxy และสัญญาณ multiplet ที่ δ 6.78 (4H) และ broad singlet ที่ δ 6.83 (2H) ตรงกับ aromatic protons ที่ตำแหน่ง 5, 6 และ 2 ของวงอะโรเมติกตามลำดับ จากค่า integration ของโปรตอนดังกล่าวข้างต้นนี้แสดงว่ามีหมู่

3,4-methylenedioxyphenyl 2 หมู้อยู่ในโครงสร้าง นอกจากนี้ ^1H NMR สเปกตรัมยังแสดง สัญญาณ multiplet 1 ชุดที่ δ 3.04 (2H) ตรงกับโปรตอนที่ตำแหน่ง 1 และ 5 สัญญาณ doublet of doublets 2 ชุดที่ δ 3.86 (2H, $J = 9.2, 3.4$ Hz) ตรงกับ axial protons ที่ตำแหน่ง 4 และ 8 และที่ δ 4.22 (2H, $J = 9.1, 6.8$ Hz) ตรงกับ equatorial protons ที่ตำแหน่ง 4 และ 8 สำหรับสัญญาณ doublet 1 ชุดที่ δ 4.70 (2H, $J = 4.2$ Hz) ตรงกับ benzylic protons ที่ตำแหน่ง 2 และ 6

ข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีข้างต้นนี้ ตรงกับข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีที่มีผู้รายงานไว้^{3.1[80,84]} เป็นการยืนยันโครงสร้างของ sesamin [3.1(28)]



12. การแยก pellitorine [3.1(56)]

ภายหลังการนำสารกลุ่ม M_4 มาทำควิกคอลัมน์โครมาโตกราฟีและคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกอย่างละ 1 ครั้ง ได้ของแข็งสีขาวของสาร 3.1(56)

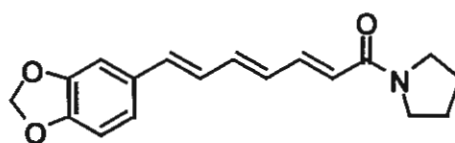
การยืนยันโครงสร้างของสาร 3.1(56) ได้จาก ^1H NMR สเปกตรัมและจากการทำ TLC เปรียบเทียบกับสารที่แยกได้จากกลุ่มย่อย $H_{2.9.5}$ ของผลข้าพลู

13. การแยก 1-piperetyl pyrrolidine [3.1(85)]

เมื่อนำสารกลุ่ม M_8 มาทำโครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้ง ได้ผลึกสีเหลืองจากกลุ่มย่อย $M_{8.5}$ จุดหลอมเหลว 145-147 °C แถบดูดกลืนที่ 378 นาโนเมตรใน UV สเปกตรัมแสดงว่ามีโครโมฟอร์คล้ายคลึงกับ pipertine^{3.1[85]} IR สเปกตรัมแสดงแถบดูดกลืนของ tertiary amide ที่ 1637 cm^{-1} แถบดูดกลืนของ olefinic double bond ที่มี configuration แบบ trans ปรากฏที่ 1617 และ 998 cm^{-1} นอกจากนี้ยังพบแถบดูดกลืนของหมู่ methylenedioxyphenyl ที่ 1253, 1038 และ 931 cm^{-1} ^{3.1[56]} ^1H NMR สเปกตรัมช่วยยืนยันถึงหมู่ methylenedioxyphenyl ในโครงสร้างจากการปรากฏของสัญญาณของ methylenedioxy protons ในลักษณะ singlet ที่ δ

5.94 (2H) และสัญญาณของ aromatic protons ในลักษณะ doublet 2 ชุดที่ δ 6.74 (1H, $J = 8.1$ Hz) และ 6.94 (1H, $J = 1.1$ Hz) และ doublet of doublets ที่ δ 6.84 (1H, $J = 8.1$ และ 1.1 Hz) ตรงกับโปรตอนที่ตำแหน่ง 5, 2 และ 6 ของวงอะโรเมติกตามลำดับ นอกจากนี้ ^1H NMR สเปกตรัมยังแสดงสัญญาณของ pyrrolidine ring เช่นเดียวกับที่พบในสาร 3.1(78) และ 3.1(84) ซึ่งประกอบด้วยสัญญาณ quintet 2 ชุดที่ δ 1.85 (2H) และ 1.95 (2H) และ triplet 2 ชุดที่ δ 3.51 (2H) และ 3.53 (2H) ตรงกับ methylene protons ที่ตำแหน่ง β' , β , α และ α' ของ pyrrolidine ring ตามลำดับ ส่วนสัญญาณของ olefinic protons จำนวน 6 โปรตอน ปรากฏในลักษณะ doublet 1 ชุดที่ δ 6.17 (1H, $J = 14.7$ Hz) multiplet 1 ชุดที่ δ 6.39 (1H) และ doublet of doublets 1 ชุดที่ δ 7.35 (1H, $J = 14.7$ และ 11.4 Hz) ตรงกับ olefinic protons ที่ตำแหน่ง α , γ และ β ของหมู่คาร์บอนิลตามลำดับ ส่วน multiplet อีก 1 ชุดที่ δ 6.63 (3H) ตรงกับ olefinic protons ที่ตำแหน่ง α , β และ γ ของวงอะโรเมติก จากค่า coupling constant (ประมาณ 15 Hz) ของ olefinic protons ช่วยยืนยัน configuration ของพันธะคู่ที่ตำแหน่ง α และ β ของหมู่คาร์บอนิล แบบ *trans* EI แมสสเปกตรัมแสดงพีคของ molecular ion ที่ m/z 297 ตรงกับสูตรโมเลกุล $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{NO}_3$

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีข้างต้นกับข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีที่มีผู้รายงานไว้^{3.1(85)} คาดว่าสารที่แยกได้คือ 1-piperetyl pyrrolidine [3.1(85)]



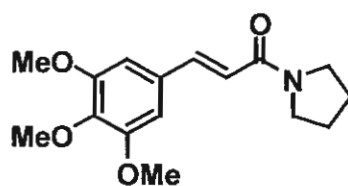
3.1(85)

14. การแยก 3', 4', 5'-trimethoxycinnamoyl pyrrolidine [3.1(86)]

จากกลุ่มย่อย $M_{8.7}$ ได้ผลึกสีขาว จุดหลอมเหลว 150-151 °C UV สเปกตรัมให้แถบดูดกลืนที่ 249 และ 322 นาโนเมตรแสดงว่ามีระบบ α , β -unsaturated amide ที่ต่อคอนจูเกตกับวงอะโรเมติก IR สเปกตรัมช่วยยืนยันระบบดังกล่าวจากการปรากฏของแถบดูดกลืนที่ 1646, 1604 และ 1005 cm^{-1} ^1H NMR สเปกตรัมแสดงสัญญาณของ pyrrolidine ring ปรากฏเป็น quintet 2 ชุดที่ δ 1.87 (2H) และ 1.98 (2H) และ triplet 2 ชุดที่ δ 3.56 (2H) และ 3.62 (2H) ตรงกับ methylene protons ที่ตำแหน่ง β' , β , α และ α' ของ pyrrolidine ring ตามลำดับ สัญญาณของหมู่ methoxy 3 หมู่ปรากฏเป็น singlet 2 ชุดที่ δ 3.84 (3H) และ 3.86 (6H) ตรงกับ methoxy protons ที่ตำแหน่ง 4, 3 และ 5 ของวงอะโรเมติกตามลำดับ สัญญาณของ olefinic

protons จำนวน 2 โปรตอนปรากฏเป็น doublet 2 ชุดที่ δ 6.58 (1H, $J = 15.4$ Hz) และ 7.58 (1H, $J = 15.4$ Hz) ตรงกับ olefinic protons ที่ตำแหน่ง α และ β ของหมู่คาร์บอนิลตามลำดับ ค่า coupling constant (ประมาณ 15 Hz) ของ olefinic protons ช่วยยืนยัน configuration ของพันธะคู่แบบ *trans* นอกจากนี้ยังพบสัญญาณของ aromatic protons ในลักษณะ singlet ที่ δ 6.72 (2H) ตรงกับโปรตอน ที่ตำแหน่ง 2 และ 6 ของวงอะโรเมติก

ข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีข้างต้นนี้ ตรงกับข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีที่มีผู้รายงานไว้^{3,11861} เป็นการยืนยันโครงสร้างของ 3', 4', 5'-trimethoxycinnamoyl pyrrolidine [3.1(86)]



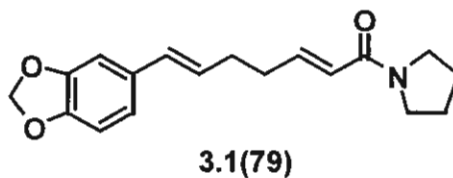
3.1(86)

15. การแยก sarmentosine [3.1(79)]

ภายหลังการนำสารกลุ่ม M_2 มาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีก 2 ครั้ง ได้ของแข็งสีเหลืองอ่อน จุดหลอมเหลว 78-79 °C แอบดูดกลืนที่ 217, 268 และ 309 นาโนเมตรใน UV สเปกตรัมและแอบดูดกลืนที่ 1663 และ 1603 cm^{-1} ใน IR สเปกตรัมแสดงว่ามีระบบ α , β -unsaturated amide นอกจากนี้แอบดูดกลืนที่ 1246, 1039 และ 927 cm^{-1} ใน IR สเปกตรัมแสดงว่ามีหมู่ methylenedioxy^{3,11561} ส่วนแอบดูดกลืนที่ 886 และ 818 cm^{-1} แสดงถึง 1,2,4-trisubstituted benzene ^1H NMR สเปกตรัมช่วยยืนยันว่ามีหมู่ 3,4-methylenedioxyphenyl ในโครงสร้างจากการปรากฏของสัญญาณ singlet ที่ δ 5.90 (2H) , multiplet ที่ δ 6.71 (2H) และ broad singlet ที่ δ 6.85 (1H) ตรงกับโปรตอนของหมู่ methylenedioxy และ aromatic protons ที่ตำแหน่ง 5, 6 และ 2 ของวงอะโรเมติกตามลำดับ นอกจากนี้ ^1H NMR สเปกตรัมยังแสดงสัญญาณของ pyrrolidine ring จากการปรากฏของสัญญาณ quintet 2 ชุดที่ δ 1.83 (2H) และ 1.92 (2H) และ triplet 2 ชุดที่ δ 3.47 (2H) และ 3.49 (2H) ตรงกับ methylene protons ที่ตำแหน่ง β' , β , α และ α' ของ pyrrolidine ring ตามลำดับ ส่วนสัญญาณของ olefinic protons จำนวน 4 โปรตอนปรากฏให้เห็นในลักษณะ double triplet 2 ชุดที่ δ 6.00 (1H, $J = 15.8$ และ 6.6 Hz) และ δ 6.91 (1H, $J = 15.1$ และ 6.6 Hz) ตรงกับ olefinic protons ที่ตำแหน่ง β ของวงอะโรเมติกและหมู่คาร์บอนิลตามลำดับ สำหรับสัญญาณ doublet 2 ชุดที่ δ 6.11 (1H, $J = 15.1$ Hz) และ δ 6.29 (1H, $J = 15.8$ Hz) ตรงกับ olefinic protons

ที่ตำแหน่ง α ของหมู่คาร์บอนิลและวงอะโรมาติกตามลำดับ จากค่า coupling constant (ประมาณ 15 Hz) ของ olefinic protons ช่วยยืนยัน *trans* configuration ของพันธะคู่ทั้งสอง จากการพบสัญญาณของ allylic methylene protons จำนวน 4 โปรตอนในลักษณะ broad singlet ที่ δ 2.33 และจาก splitting pattern ของ olefinic protons ในลักษณะ double triplets 2 ชุดช่วยยืนยันว่าพันธะคู่ทั้งสองไม่ได้ต่อกัน แต่มีหมู่ methylene 2 หมู่คั่นอยู่ระหว่างพันธะคู่ทั้งสอง ^{13}C NMR สเปกตรัมมีลักษณะคล้ายคลึงกับ ^{13}C NMR สเปกตรัมของสาร 3.1(84) แต่มีสัญญาณของคาร์บอนเพียง 18 สัญญาณ กล่าวคือจะมีสัญญาณของ methylene carbon เพียง 2 หมู่เท่านั้น

ข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีข้างต้นนี้ ตรงกับข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีที่มีผู้รายงานไว้^{3.1(77)} คาดว่าสารที่แยกได้คือ sarmentosine [3.1(79)]



จากการสกัดผลซ้ำพลูแห้งด้วยนอร์มัลเฮกเซนและเมทานอลตามลำดับ นำส่วนที่สกัดได้มาแยกสารออกจากกันด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี แล้วนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาหาสูตรโครงสร้างโดยใช้เทคนิคทางสเปกโตรสโคปี สารที่แยกได้จากส่วนที่สกัดด้วยนอร์มัลเฮกเซนมี 8 ชนิดได้แก่ สารประเภท amide 5 ชนิดคือ pellitorine [3.1(56)], guineensine [3.1(43)], brachystamide B [3.1(83)], sarmentine [3.1(78)] และ brachyamide B [3.1(84)] สารประเภท lignan 1 ชนิดคือ (+)-asarinin [3.1(24)] และสารประเภทอื่นอีก 2 ชนิดคือ 1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-1*E*-tetradecene [3.1(76)] และ β -sitosterol [3.1(40)] ส่วนสารที่แยกได้จากส่วนที่สกัดด้วยเมทานอลมี 7 ชนิดได้แก่ สารประเภท amide 4 ชนิดคือ pellitorine [3.1(56)], 1-piperetyl pyrrolidine [3.1(85)], 3', 4', 5'-trimethoxycinnamoyl pyrrolidine [3.1(86)] และ sarmentosine [3.1(79)] สารประเภท lignan 1 ชนิดคือ sesamin [3.1(28)] และสารประเภทอื่นอีก 2 ชนิดคือ 1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-1*E*-tetradecene [3.1(76)] และ methyl piperate [3.1(42)] สำหรับ (+)-asarinin [3.1(24)], sesamin [3.1(28)], methyl piperate [3.1(42)], guineensine [3.1(43)], brachystamide B [3.1(83)], brachyamide B [3.1(84)], 1-piperetyl pyrrolidine [3.1(85)] และ 3', 4', 5'-trimethoxycinnamoyl pyrrolidine [3.1(86)] ยังไม่เคยมีผู้พบในชาพลูมาก่อน

2) รากข้าวพุลู

(1) การหาส่วนประกอบทางเคมี

จากการสกัดแยกสารออกจากรากข้าวพุลูแห้งด้วยนอร์มัลเฮกเซนและเมทานอลตามลำดับโดยใช้ Soxhlet extraction apparatus แล้วนำส่วนที่สกัดได้มาแยกสารออกจากกันด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี สามารถแยกสารจากส่วนที่สกัดด้วยเฮกเซนจำนวน 3 ชนิดและส่วนที่สกัดด้วยเมทานอลจำนวน 4 ชนิดดังนี้

(ก) Hexane extract

นำส่วนที่สกัดด้วยเฮกเซนมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้กลุ่มย่อย 3 กลุ่มที่สามารถนำไปแยกสารออกมาได้

1. การแยก 1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-1*E*-tetradecene [3.1(76)]

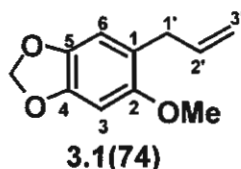
นำสารกลุ่ม H_{10} มากรองได้สารสีขาวที่มีลักษณะกึ่งของแข็งของสาร 3.1(76) การยืนยันโครงสร้างของสารชนิดนี้ได้จาก ^1H NMR สเปกตรัมและจากการทำ TLC เปรียบเทียบกับสารที่เคยแยกได้จากผลข้าวพุลู

2. การแยก asaricin [3.1(74)]

เมื่อนำสารกลุ่ม H_{22} มาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้ง ได้น้ำมันใสจากกลุ่มย่อย $H_{22.3}$ UV สเปกตรัมแสดงแถบดูดกลืนที่ 292 และ 299 (sh) นาโนเมตรแสดงว่ามีวงอะโรเมติกในโมเลกุล ^1H NMR สเปกตรัมแสดงสัญญาณ singlet 2 ชุดที่ δ 3.74 (3H) และ 5.87 (2H) ตรงกับโปรตอนของหมู่ methoxy และ methylenedioxy ตามลำดับ สัญญาณของ olefinic protons จำนวน 3 โปรตอนปรากฏให้เห็นในลักษณะ multiplet 2 ชุดที่ δ 5.01 (2H) และ 5.92 (1H) ตรงกับโปรตอนของหมู่ $-CH=CH_2$ สัญญาณ doublet 1 ชุดที่ δ 3.26 (2H, $J = 6.7$ Hz) ตรงกับ allylic methylene protons นอกจากนี้ยังพบสัญญาณ singlet อีก 2 ชุดที่ δ 6.50 (1H) และ 6.63 (1H) ตรงกับ aromatic protons ที่ตำแหน่ง 3 และ 6 ของวงอะโรเมติกตามลำดับ ^{13}C NMR สเปกตรัมแสดงสัญญาณของ 11 คาร์บอน ประกอบขึ้นด้วยสัญญาณของ methoxy และ methylenedioxy carbons ที่ δ 57.0 และ 101.6 ตามลำดับ สัญญาณของคาร์บอนของหมู่ allyl ที่ δ 34.2, 115.9 และ 138.1 และสัญญาณของวงอะโรเมติกที่ δ 95.6, 110.3, 121.6,

141.9, 147.2 และ 153.1 การกำหนดสัญญาณของคาร์บอนอาศัยข้อมูลที่ได้จาก HMQC และ HMBC สเปกตรัม

ข้อมูลทางสเปกโตรสโกปีข้างต้นนี้ ตรงกับข้อมูลทางสเปกโตรสโกปีที่มีผู้รายงานไว้^{3,176} เป็นที่ยืนยันโครงสร้างของ asaricin [3.1(74)]



3. การแยก β -sitosterol [3.1(40)]

ภายหลังการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีของกลุ่ม H_{29} ได้ผลึกสีขาวจากกลุ่มย่อย $H_{29.5}$ เมื่อเปรียบเทียบกับ ^1H NMR สเปกตรัมและ TLC กับสารที่เคยแยกได้จากผลข้าพลู สามารถยืนยันโครงสร้างของ β -sitosterol [3.1(40)] ที่มี stigmasterol ปนอยู่ด้วยในปริมาณเล็กน้อย

(ข) Methanol extract

นำส่วนที่สกัดด้วยเมทานอลมาทำคอลลัมน์โครมาโตกราฟี ได้กลุ่มย่อย 3 กลุ่มที่สามารถนำไปแยกสารออกมาได้

4. การแยก pellitorine [3.1(56)]

เมื่อนำสารกลุ่ม M_6 มาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้ง ได้ของแข็งสีขาวของสาร 3.1(56) การยืนยันโครงสร้างของ pellitorine [3.1(56)] ได้จาก ^1H NMR สเปกตรัมและจากการทำ TLC เปรียบเทียบกับสารที่เคยแยกได้จากผลข้าพลู

5. การแยก sarmentosine [3.1(79)]

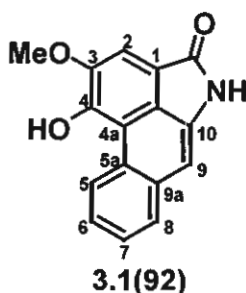
ภายหลังการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีของสารกลุ่ม M_{14} ซ้ำสองครั้ง ได้ของแข็งสีเหลืองอ่อนของสาร 3.1(79) จากกลุ่มย่อย $M_{14.6.4}$ โครงสร้างของ sarmentosine [3.1(79)] ยืนยันได้จาก ^1H NMR สเปกตรัมและจากการทำ TLC เปรียบเทียบกับสารที่เคยแยกได้จากผลข้าพลู

6. การแยก piperolactam [3.1(92)]

ภายหลังการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีของสารกลุ่มย่อย $M_{14.7}$ ได้ของแข็งสีขาว IR สเปกตรัมแสดงแถบดูดกลืนที่ 3474, 3181 และ 1691 cm^{-1} ตรงกับ O-H stretching, N-H stretching และ C=O stretching ตามลำดับ ^1H NMR สเปกตรัมแสดงสัญญาณของหมู่ methoxy 1 หมู่ในลักษณะ singlet ที่ δ 4.04 (3H) สัญญาณ singlet อีก 2 ชุดปรากฏที่ δ 7.06 (1H)

และ 7.69 (1H) ตรงกับโปรตอนที่ตำแหน่ง 9 และ 2 นอกจากนี้ยังพบสัญญาณ multiplet อีก 3 ชุดที่ δ 7.49 (2H), 7.75 (1H) และ 9.18 (1H) ตรงกับโปรตอนที่ตำแหน่ง 6, 7, 8 และ 5 ของวง phenanthrene ตามลำดับ การยืนยันตำแหน่งของหมู่ methoxy ที่ตำแหน่ง 3 ของวง phenanthrene ได้จาก NOESY สเปกตรัมซึ่งแสดง interaction ของหมู่ methoxy กับโปรตอนที่ตำแหน่ง 2

ข้อมูลทางสเปกโตรสโกปีข้างต้นนี้ ตรงกับข้อมูลทางสเปกโตรสโกปีที่มีผู้รายงานไว้^{3.1[91]} เป็นการยืนยันโครงสร้างของ piperolactam [3.1(92)]



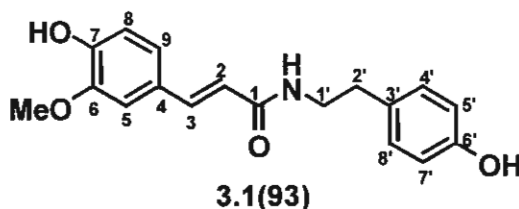
7. การแยก *N-trans-feruloyl tyramine* [3.1(93)]

เมื่อนำสารกลุ่ม M_{15} มาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้ง ได้ของแข็งใส แถบดูดกลืนที่ 223, 295 (sh) และ 320 นาโนเมตรใน UV สเปกตรัมแสดงถึงวงอะโรมาติกที่มีคอนจูเกต ^1H NMR สเปกตรัมแสดงสัญญาณ triplet 2 ชุดที่ δ 2.73 (2H, $J = 6.9$ Hz) และ 3.52 (2H, $J = 6.9$ Hz) ตรงกับ methylene protons ที่เกาะติดอยู่กับวงอะโรมาติกและไนโตรเจนอะตอมของหมู่ amide ตามลำดับ สัญญาณของหมู่ methoxy ปรากฏเป็น singlet ที่ δ 3.84 (3H) สัญญาณของ olefinic protons จำนวน 2 โปรตอนปรากฏในลักษณะ doublet 2 ชุดที่ δ 6.14 (1H, $J = 15.6$ Hz) และ 7.44 (1H, $J = 15.6$ Hz) ตรงกับโปรตอนที่ตำแหน่ง α และ β ของหมู่คาร์บอนิลตามลำดับ จากค่า coupling constant ($J = 15.6$ Hz) ของ olefinic protons ยืนยัน configuration ของพันธะคู่แบบ *trans* สัญญาณของ aromatic protons จำนวน 4 โปรตอนของ para-disubstituted benzene ปรากฏในลักษณะ doublet 2 ชุดที่ δ 6.73 (2H, $J = 8.5$ Hz) และ 7.00 (2H, $J = 8.5$ Hz) ตรงกับโปรตอนที่ตำแหน่งออร์โทและเมตาต่อหมู่ -OH ของวงอะโรมาติกตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบสัญญาณของ aromatic protons อีก 3 โปรตอนของ 1,2,4-trisubstituted benzene ปรากฏเป็น doublet 2 ชุดที่ δ 6.81 (1H, $J = 8.2$ Hz) และ 6.93 (1H, $J = 1.8$ Hz) และ doublet of doublets ที่ δ 6.97 (1H, $J = 8.2$ และ 1.8 Hz) ตรงกับโปรตอน

ที่ตำแหน่ง 8, 5 และ 9 ของวงอะโรเมติกตามลำดับ ^{13}C NMR สเปกตรัมแสดงสัญญาณของ 18 คาร์บอน โดยมีสัญญาณของ methoxy และ carbonyl carbons ปรากฏที่ δ 55.9 และ 166.6 ตามลำดับ สัญญาณของ methylene carbons ปรากฏที่ δ 34.6 และ 40.8 สัญญาณของ olefinic carbons ปรากฏที่ δ 117.9 และ 141.0 สัญญาณที่เหลือคือสัญญาณของคาร์บอนของวงอะโรเมติก การกำหนดสัญญาณของคาร์บอนอาศัยข้อมูลที่ได้จาก HMQC และ HMBC สเปกตรัม การยืนยันตำแหน่งของหมู่ methoxy ที่ตำแหน่ง 6 ของ 1,2,4-trisubstituted benzene ได้จาก NOESY สเปกตรัมซึ่งแสดง interaction ของหมู่ methoxy กับโปรตอนตำแหน่ง 5

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีข้างต้นกับข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีที่มีผู้รายงานไว้

3.1[92] คาดว่าสารที่แยกได้คือ *N-trans-feruloyl tyramine* [3.1(93)]



จากการสกัดรากข้าวพุดแห้งด้วยนอร์มัลเฮกเซนและเมทานอลตามลำดับ นำส่วนที่สกัดได้มาแยกสารออกจากกันด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี แล้วนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาหาสูตรโครงสร้างโดยใช้เทคนิคทางสเปกโตรสโคปี สารที่แยกได้จากส่วนที่สกัดด้วยนอร์มัลเฮกเซนมี 3 ชนิดได้แก่ β -sitosterol [3.1(40)], asaricin [3.1(74)] และ 1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-1*E*-tetradecene [3.1(76)] ส่วนสารที่แยกได้จากส่วนที่สกัดด้วยเมทานอลมี 4 ชนิดได้แก่ pellitorine [3.1(56)], sarmentosine [3.1(79)], piperolactam [3.1(92)] และ *N-trans-feruloyl tyramine* [3.1(93)] สำหรับสาร 3.1(92) และ 3.1(93) ยังไม่เคยมีผู้พบในข้าวพุดมาก่อน

วัสดุและวิธีการ

ตัวทำละลาย ที่ใช้สกัดสารและแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีเป็นตัวทำละลายเกรดทั่วไปซึ่งนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการกลั่นก่อนใช้ ส่วนตัวทำละลายที่ใช้ในการตกผลึกสารใช้เกรด AR การกำจัดตัวทำละลายออกจากสารจะใช้ rotary evaporator โดยใช้อุณหภูมิในช่วง 50-60 °C ในกรณีที่ต้องใช้อุณหภูมิสูงจะใช้ไม่เกิน 70 °C

โครมาโตกราฟี ใช้ silica gel ของ Merck ดังนี้

1. ควิกคอลัมน์โครมาโตกราฟี (quick column chromatography) ใช้ silica gel PF₂₅₄ สำหรับ preparative layer chromatography

2. คอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography) ใช้ silica gel 60 สำหรับคอลัมน์โครมาโตกราฟี ส่วนใหญ่ที่ใช้มี 2 ชนิดคือ ชนิดหยาบ (ขนาดอนุภาค 0.063-0.200 มิลลิเมตร) และชนิดละเอียด (ขนาดอนุภาคต่ำกว่า 0.063 มิลลิเมตร)

3. โครมาโตกราฟีแผ่นบาง (thin layer chromatography, TLC) ใช้แผ่นสำเร็จรูปที่ทำขึ้นจาก silica gel 60 PF₂₅₄ เคลือบบนแผ่นอะลูมิเนียม โดยมีความหนาของ silica 0.2 มิลลิเมตร

การตรวจสอบหาจุด (spot) ของสารบนแผ่น ใช้ 2 วิธี คือวิธีดูภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร และวิธีทาด้วยรีเอเจนต์ซึ่งประกอบด้วย anisaldehyde: กรดซัลฟูริกเข้มข้น: เอทานอล = 1: 1: 45 โดยปริมาตร จากนั้นนำแผ่น TLC ไปวางบนแผ่นให้ความร้อนจนเกิดสีขึ้นตรงจุดของสาร

วัตถุดิบในการวิจัย

ผลและลำต้นตีป्ली และผลชำพลูซื้อจากร้านไท้อันจัน เลขที่ 256-8 ถนนจักรวรรดิ เขตสัมพันธวงศ์ กรุงเทพฯ 10100 รากชำพลูเก็บจาก อ. พระประแดง จ. สมุทรปราการ

สเปกตรัม

1. อุลตราไวโอเลตสเปกตรัม บันทึกจากเครื่องอุลตราไวโอเลต-วิชิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ของ Perkin Elmer โมเดล Lambda 20

2. อินฟราเรดสเปกตรัม บันทึกจากเครื่องอินฟราเรดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ของ Perkin Elmer โมเดล Spectrum 2000

3. นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม บันทึกจากเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรมิเตอร์ของ Bruker โมเดล DPX400 และ ADVANCE 400 และ Jeol โมเดล JMN A 500 ใช้ TMS เป็นสารมาตรฐานภายใน

1. ตีป्ली (*Piper chaba* Hunt)

1) ผลตีป्ली

(1) การหาส่วนประกอบทางเคมี

นำผลดีปัสที่บดละเอียดแล้ว (2.93 กิโลกรัม) มาสกัดด้วยนอร์มัลเฮกเซน โดยใช้ Soxhlet extraction apparatus กรองสารละลายที่ได้แล้วนำไประเหยเอาตัวทำละลายออก ได้ส่วนที่สกัดด้วยเฮกเซนหนัก 174.54 กรัม สำหรับกากที่เหลือสกัดด้วยเมทานอล นำสารละลายที่ได้มากรองและระเหยเอาตัวทำละลายออก ได้ส่วนที่สกัดด้วยเมทานอลหนัก 143.73 กรัม

(ก) Hexane extract

นำส่วนที่สกัดด้วยเฮกเซน (144.33 กรัม) มาแยกโดยใช้ควิกคอลัมน์โครมาโตกราฟีใช้ตัวชะ (eluent) เป็นนอร์มัลเฮกเซน นอร์มัลเฮกเซน-คลอโรฟอร์ม คลอโรฟอร์ม-คลอโรฟอร์ม-เมทานอล และเมทานอลตามลำดับ โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าขึ้นเรื่อยๆ ตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC แล้วรวมส่วนย่อย (fraction) ที่มีสารเหมือนกันหรือคล้ายคลึงกันตามที่ปรากฏบน TLC เข้าด้วยกัน เลือกกลุ่มย่อยมาแยกต่อไป 4 กลุ่ม คือกลุ่ม H_1 ถึงกลุ่ม H_4

กลุ่ม H_1 (31.03 กรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมาพร้อมกับตัวชะนอร์มัลเฮกเซนถึงนอร์มัลเฮกเซน-คลอโรฟอร์ม 98:2 เมื่อนำมาทำควิกคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้งโดยใช้ระบบตัวชะชนิดเดียวกับที่กล่าวข้างต้น แต่ใช้อัตราส่วนที่แตกต่างกัน เมื่อตรวจสอบส่วนย่อยที่ชะออกมาด้วย TLC จัดกลุ่มย่อยได้ 5 กลุ่ม เลือกกลุ่มย่อย $H_{1,4}$ มาทำการแยกต่อไป

กลุ่มย่อย $H_{1,4}$ (1.04 กรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมาพร้อมกับตัวชะคลอโรฟอร์มถึงคลอโรฟอร์ม-เมทานอล 20:80 กรองสารสีขาวในกลุ่มย่อยนี้ออกมา แล้วนำมาตกผลึกด้วยนอร์มัลเฮกเซน ได้ผลึกสีขาว (0.43 กรัม) ของสาร 3.1(45) จุดหลอมเหลว 64°C (จุดหลอมเหลวที่มีผู้รายงานไว้^{3.1} [51] คือ $67-67.5^{\circ}\text{C}$); UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 265 nm; IR: $V_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ 3294, 2917, 1670, 1641, 1614, 1548, 1467, 1382, 1347, 1260, 1160, 999, 720 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.85 (3H, t, $J = 6.7$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{Me}$), 0.90 (6H, d, $J = 6.7$ Hz, CHMe_2), 1.20 (18H, br s, 9 x CH_2), 1.77 (1H, m-9 lines, $-\text{CHMe}_2$), 1.94-2.15 (6H, m, 6 x allylic H), 3.13 (2H, t, $J = 6.7$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{N}-$), 5.32 (2H, t, $J = 4.6$ Hz, *cis*- $\text{CH}=\text{CH}-$), 5.59 (1H, br s, $-\text{NH}$), 5.73 (1H, d, $J = 15$ Hz, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}$), 6.00-6.15 (2H, m, *trans*- $\text{CH}=\text{CH}-$), 7.16 (1H, dd, $J = 15, 9.9$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}$).

กลุ่ม H_2 (36.74 กรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมากับตัวชะนอร์มัลเฮกเซน-คลอโรฟอร์ม 95:5 ถึง 40:60 สารในกลุ่มนี้จะมีของแข็งสีเหลืองปนอยู่ กรองแล้วนำมาตกผลึกด้วยคลอโรฟอร์ม-เมทานอล ได้ผลึกสีเหลืองอ่อน (4.04 กรัม) ของสาร 3.1(42) จุดหลอมเหลว 140-142 °ซ (จุดหลอมเหลวที่มีผู้รายงานไว้^{3.1[59]} คือ 141-142 °ซ); UV: $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ 261, 316 (sh), 352 nm; IR: $V_{\max}^{\text{KBr}}$ 2918, 2849, 1707, 1618, 1608, 1496, 1453, 1438, 1373, 1310, 1265, 1244, 1194, 1175, 1142, 1040, 1004, 949, 929, 866, 840, 815 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 3.73 (3H, s, OMe), 5.91 (1H, d, $J = 15.4$ Hz, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}$), 5.95 (2H, s, $-\text{OCH}_2\text{O}-$), 6.67 (1H, dd, $J = 15.4, 10.7$ Hz, Ar-CH=CH-), 6.75 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, Ar-H-5), 6.78 (1H, d, $J = 15.4$ Hz, Ar-CH=CH-), 6.88 (1H, dd, $J = 7.2, 1.5$ Hz, Ar-H-6), 6.96 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, Ar-H-2), 7.38 (1H, dd, $J = 15.4, 10.7$ Hz, CH=CH-CO).

กลุ่ม H_3 (50.44 กรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมากับตัวชะนอร์มัลเฮกเซน-คลอโรฟอร์ม 20:80 ถึงคลอโรฟอร์ม-เมทานอล 98:2 กรองของแข็งสีเหลืองในกลุ่ม H_3 แล้วนำมาตกผลึกด้วยเมทานอล ได้ผลึกสีเหลืองอ่อน (3.88 กรัม) ของสาร 3.1(10) จุดหลอมเหลว 130-132 °ซ (จุดหลอมเหลวที่มีผู้รายงานไว้^{3.1[60,61]} คือ 130-132 °ซ); UV: $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ 261, 317 (sh), 349 nm; IR: $V_{\max}^{\text{KBr}}$ 3035, 2941, 1635, 1612, 1585, 1510, 1492, 1450, 1367, 1254, 1195, 1135, 1033, 998, 930, 848, 831, 805, 787 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 1.60 (6H, m, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ of piperidine ring), 3.51 (2H, br s, $-\text{CH}_2\text{NCH}_2-$ of piperidine ring), 3.62 (2H, br s, $-\text{CH}_2\text{NCH}_2-$ of piperidine ring), 5.96 (2H, s, $-\text{OCH}_2\text{O}-$), 6.42 (1H, d, $J = 14.7$ Hz, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}$), 6.74 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, Ar-H-5), 6.75 (1H, dd, $J = 15.4, 8.3$ Hz, Ar-CH=CH-), 6.76 (1H, d, $J = 15.4$ Hz, Ar-CH=CH-), 6.88 (1H, dd, $J = 8.0, 1.6$ Hz, Ar-H-6), 6.97 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, Ar-H-2), 7.39 (1H, dd, $J = 14.7, 8.3$ Hz, CH=CH-CO).

ส่วน filtrate ของกลุ่ม H_3 น้ำหนัก 45.39 กรัม นำมาแยกสารออกจากกันโดยใช้ควิกคอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ระบบตัวชะชนิดเดียวกับ hexane extract แต่ใช้อัตราส่วนที่แตกต่างกัน ตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC แล้วเลือกกลุ่มย่อย $H_{3.6}$ มาแยกต่อไป

กลุ่มย่อย $H_{3.6}$ (5.42 กรัม) นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้งหนึ่ง โดยใช้ซิลิกาเจล ชนิดหยาบ และใช้เอทิลอะซีเตต-นอร์มัลเฮกเซน 1:9 เป็นตัวชะ เมื่อตรวจสอบส่วนย่อยด้วย TLC เลือกกลุ่มย่อยมาแยกสารต่อไป 3 กลุ่ม คือกลุ่มย่อย $H_{3.6.1}$ ถึงกลุ่มย่อย $H_{3.6.3}$

กลุ่มย่อย $H_{3.6.1}$ (0.42 กรัม) นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีอีก 2 ครั้ง โดยใช้ซิลิกาเจล ชนิดละเอียด และใช้ตัวชะเอทิลอะซีเตต-นอร์มัลเฮกเซน 1:9 เมื่อนำมาตกผลึกด้วยคลอโรฟอร์ม -เอทานอล ได้ผลึกสีขาว (0.15 กรัม) ของสาร 3.1(40) จุดหลอมเหลว 135-137 °C (จุดหลอมเหลวที่มีผู้รายงานไว้^{3.1[62,63]} คือ 141 °C); IR: $V_{\max}^{KBr}$ 3429, 2937, 1635, 1466, 1383, 1054 cm^{-1} ; ^1H NMR ($CDCl_3$): δ 0.66-2.30 (47H, *m*, methyl, methylene และ methine protons), 3.50 (1H, *m*-7 lines, CH-OH), 5.33 (1H, *br d*, *J* = 5.1 Hz, olefinic H).

กลุ่มย่อย $H_{3.6.2}$ (0.17 กรัม) นำมาแยกสารให้บริสุทธิ์โดยทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีก 2 ครั้ง ใช้ซิลิกาเจลชนิดละเอียด และใช้เอทิลอะซีเตต-นอร์มัลเฮกเซน 3:7 เป็นตัวชะ ได้ผลึกสีขาว (10.4 มิลลิกรัม) ของสาร 3.1(43); UV: $\lambda_{\max}^{MeOH}$ 267, 313 (sh) nm; IR: $V_{\max}^{KBr}$ 3305, 2924, 2851, 1656, 1629, 1610, 1546, 1508, 1492, 1446, 1257, 1045, 1001, 964, 923, 870, 800, 793 cm^{-1} ; ^1H NMR ($CDCl_3$): δ 0.90 (6H, *d*, *J* = 6.7 Hz, $CHMe_2$), 1.26-1.46 (8H, *m*, 4 x CH_2), 1.78 (1H, *m*-7 lines, $-CHMe_2$), 2.13 (4H, *m*, 4 x allylic H), 3.14 (2H, *t*, *J* = 6.6 Hz, $-CH_2-N-$), 5.44 (1H, *br s*, $-NH$), 5.72 (1H, *d*, *J* = 15 Hz, $-CH=CH-CO$), 5.91 (2H, *s*, $-OCH_2O-$), 5.98-6.07 (2H, *m*, 2 x $CH_2-CH=CH$), 6.10 (1H, *dd*, *J* = 15.3, 10.2 Hz, $CH=CH-CH=CH-CO$), 6.26 (1H, *d*, *J* = 15.9 Hz, Ar-CH=CH), 6.71 (1H, *d*, *J* = 8.1 Hz, Ar-H-5), 6.74 (1H, *dd*, *J* = 8.1, 1.5 Hz, Ar-H-6), 6.87 (1H, *d*, *J* = 1.5 Hz, Ar-H-2), 7.17 (1H, *dd*, *J* = 15, 10.2 Hz, $CH=CH-CO$).

กลุ่มย่อย $H_{3.6.3}$ (0.17 กรัม) นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยใช้ซิลิกาเจล และระบบตัวชะเหมือนกับกลุ่มย่อย $H_{3.6.2}$ หลังจากตรวจสอบส่วนย่อยต่างๆด้วย TLC เลือกกลุ่มย่อยที่มีสารสีเหลืองอ่อนลักษณะกึ่งของแข็งของสาร 3.1(46)หนัก 30.5 มิลลิกรัม; UV: $\lambda_{\max}^{MeOH}$ 266, 312 nm; IR: $V_{\max}^{CHCl_3}$ 2930, 2848, 1658, 1613, 1496, 1444,

1250, 1038, 970, 931 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 1.40-1.60 (6H, *m*, - $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ - of piperidine ring), 1.60-1.75 (4H, *m*, 2 x CH_2), 2.10-2.25 (4H, *m*, 2 x allylic H), 3.45 (2H, *br s*, - CH_2NCH_2 - of piperidine ring), 3.57 (2H, *br s*, - CH_2NCH_2 - of piperidine ring), 5.90 (2H, *s*, - OCH_2O -), 6.00 (1H, *dt*, $J = 15.5$, 7.1 Hz, Ar-CH=CH-), 6.22 (1H, *d*, $J = 14.6$ Hz, -CH=CH-CO), 6.26 (1H, *d*, $J = 15.5$ Hz, Ar-CH=CH-), 6.72 (2H, *br s*, Ar-H-5,6), 6.81 (1H, *dt*, $J = 14.6$, 7.1 Hz, CH=CH-CO), 6.86 (1H, *s*, Ar-H-2).

กลุ่ม H_4 (18.35 กรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมากับตัวชะคลอโรฟอร์ม-เมทานอล 95:5 ถึง 20:80 เมื่อนำมาทำคอลลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้ง ใช้ตัวชะนอร์มัลเฮกเซน นอร์มัลเฮกเซน-เอทิลอะซิเตต เอทิลอะซิเตต เอทิลอะซิเตต-เมทานอล และเมทานอลตามลำดับ โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าขึ้นเรื่อยๆ ตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC แล้วเลือกกลุ่มย่อย $\text{H}_{4.7}$ มาแยกต่อไป

กลุ่มย่อย $\text{H}_{4.7}$ (2.36 กรัม) นำมาทำคอลลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำ 3 ครั้ง โดยใช้ซิลิกาเจลชนิดละเอียด และใช้เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน 1:99 เป็นตัวชะ ได้สารสีขาวที่มีลักษณะกึ่งของแข็งหนัก 51.3 มิลลิกรัมของสาร 3.1(69); IR: $V_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ 3450-2500, 3030, 1713, 1605, 1496, 1435, 1415, 1288, 1256, 1214, 1078, 1039, 934, 751, 700 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 2.68 (2H, *t*, $J = 7.8$ Hz, Ar- CH_2 -), 2.96 (2H, *t*, $J = 7.8$ Hz, - CH_2COOH), 7.18-7.33 (5H, *m*, 5 x Ar-H).

(ข) Methanol extract

นำส่วนที่สกัดด้วยเมทานอล (113.62 กรัม) มาแยกสารออกจากกันโดยใช้คอลลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ระบบตัวชะนอร์มัลเฮกเซน คลอโรฟอร์มและเมทานอลเหมือนกับที่ใช้ในการแยกสารจาก hexane extract แต่ใช้อัตราส่วนที่แตกต่างกัน หลังจากตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC เลือกกลุ่มย่อย M_1 และ M_3 มาแยกต่อไป

กลุ่ม M_1 (36.41 กรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมากับตัวชะนอร์มัลเฮกเซน-คลอโรฟอร์ม 10:90 กรองของแข็งสีเหลืองออกมา แล้วนำมาตกผลึกด้วยเมทานอลได้ผลึกสีเหลืองอ่อน (14.56 กรัม) ของสาร 3.1(10) ซึ่งยืนยันโดยการทำ TLC เปรียบเทียบกับผลึกสีเหลืองอ่อนที่ได้จาก

กลุ่ม H_3 ส่วน filtrate นำมาทำควิกคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้ง โดยใช้ระบบตัวชนอร์มัลเฮกเซน เอทิลอะซีเตต และเมทานอลเหมือนกับที่ใช้ในการแยกสารกลุ่ม H_4 แต่ใช้อัตราส่วนที่แตกต่างกัน เลือกกลุ่มย่อย $M_{1.3}$ ซึ่งมีของแข็งปนอยู่มากกรอง แล้วนำมาตกผลึกด้วยคลอโรฟอร์ม-เมทานอล ได้ผลึกสีเหลืองอ่อน (0.23 กรัม) ของสาร 3.1(42) ซึ่งยืนยันโดยการทำ TLC เปรียบเทียบกับผลึกสีเหลืองอ่อนที่ได้จากกลุ่ม H_2

กลุ่ม M_3 (24.65 กรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมากับตัวชะคลอโรฟอร์ม-เมทานอล 70:30 ถึง 60:40 นำมาทำควิกคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ระบบตัวชะคลอโรฟอร์ม คลอโรฟอร์ม-เอทิลอะซีเตต เอทิลอะซีเตต เอทิลอะซีเตต-เมทานอล และเมทานอลตามลำดับ โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลาย ที่มีขั้วมากกว่าขึ้นเรื่อยๆ ตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC แล้วเลือกกลุ่มย่อย $M_{3.1}$ มาแยกสารออกจากกันต่อไป

กลุ่มย่อย $M_{3.1}$ (10.83 กรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมากับตัวชะคลอโรฟอร์มถึงคลอโรฟอร์ม-เอทิลอะซีเตต (90:10) นำมาทำควิกคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้ง แต่ใช้ระบบตัวชะเริ่มต้นจากนอร์มัลเฮกเซน-ไดคลอโรมีเทน (1:1) ไดคลอโรมีเทน ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล และเมทานอลตามลำดับ โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าขึ้นเรื่อยๆ ตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC แล้วเลือกกลุ่มย่อย $M_{3.1.2}$ และ $M_{3.1.5}$ มาแยกต่อไป

กลุ่มย่อย $M_{3.1.2}$ (148 มิลลิกรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมากับตัวชนอร์มัลเฮกเซน-ไดคลอโรมีเทน (1:3) ถึงไดคลอโรมีเทน นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้ง ใช้ซิลิกาเจลชนิดละเอียด และใช้คลอโรฟอร์ม-เมทานอล 95:5 เป็นตัวชะ ได้ผลึกสีขาว (19.9 มิลลิกรัม) ของสาร 3.1(70) จุดหลอมเหลว 226–228 °ซ (จุดหลอมเหลวที่มีผู้รายงานไว้^{3.1[70,71]} คือ 230 °ซ); UV: $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ 234, 286 nm; IR: $V_{\max}^{\text{KBr}}$ 3300–2500, 1672, 1616, 1600, 1503, 1450, 1412, 1296, 1260, 1238, 1113, 1034, 930, 915, 870, 765 cm^{-1} ; ^1H NMR ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$): δ 5.95 (2H, s, $-\text{OCH}_2\text{O}-$), 6.76 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, Ar-H-5), 7.39 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, Ar-H-2), 7.57 (1H, dd, $J = 8.2, 1.7$ Hz, Ar-H-6).

กลุ่มย่อย $M_{3.1.5}$ (1.45 กรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมากับตัวชะคลอโรฟอร์ม-เมทานอล 98:2 ถึง 90:10 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยใช้ซิลิกาเจลชนิดละเอียด และใช้ระบบตัวชะ คลอโรฟอร์มถึงคลอโรฟอร์ม-เมทานอล (95:5) โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้ว

มากกว่าชิ้นอื่นๆ ตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC แล้วเลือกกลุ่มย่อย $M_{3.1.5.9}$ มาแยกสารออกจากกันต่อไป

กลุ่มย่อย $M_{3.1.5.9}$ เป็นกลุ่มที่ออกมากับตัวชะคลอโรฟอร์ม-เมทานอล 95:5 ได้ผลึกสีขาว (5 มิลลิกรัม) ของสาร 3.1(71) จุดหลอมเหลว 211-212 °C (จุดหลอมเหลวที่มีผู้รายงานไว้^{3.1[72]} คือ 216 °C); UV: $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ 221, 304, 332 nm; IR: $V_{\max}^{\text{KBr}}$ 3300-2200, 2923, 1678, 1619, 1606, 1502, 1492, 1451, 1422, 1369, 1330, 1310, 1258, 1194, 1149, 1107, 1036, 1001, 930, 852, 801, 704 cm^{-1} ; ^1H NMR ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$): δ 5.86 (1H, *d*, $J = 15.2$ Hz, =CHCOOH), 5.92 (2H, *s*, -OCH₂O-), 6.65 (1H, *dd*, $J = 15.2, 10.8$ Hz, CH=CH-CH=CHCOOH), 6.72 (1H, *d*, $J = 8.2$ Hz, Ar-H-5), 6.75 (1H, *d*, $J = 15.2$ Hz, CH=CH-CH=CHCOOH), 6.85 (1H, *dd*, $J = 8.2, 1.4$ Hz, Ar-H-6), 6.93 (1H, *d*, $J = 1.4$ Hz, Ar-H-2), 7.35 (1H, *dd*, $J = 15.2, 10.8$ Hz, CH=CHCOOH).

2) ลำต้นดิบปลี

(1) การหาส่วนประกอบทางเคมี

ในการสกัดแยกสารออกจากลำต้นดิบปลีแห้งด้วยนอร์มัลเฮกเซนและเมทานอลตามลำดับโดยใช้ Soxhlet extraction apparatus แล้วนำส่วนที่สกัดได้มาแยกสารออกจากกันด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี สามารถแยกสารจากส่วนที่สกัดด้วยเฮกเซนและส่วนที่สกัดด้วยเมทานอลจำนวน 7 และ 1 ชนิดตามลำดับดังนี้

(ก) Hexane extract

นำส่วนที่สกัดด้วยเฮกเซนมากรองเอาของแข็งสีเหลืองออกมา ส่วน filtrate นำมาทำคอกคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้ส่วนย่อย 5 กลุ่มที่สามารถนำไปแยกสารออกมาได้

1. การแยก piperine [3.1(10)]

นำของแข็งสีเหลืองที่กรองได้จากส่วนที่สกัดด้วยเฮกเซน มาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้ง ได้ผลึกสีเหลืองอ่อนของสาร 3.1(10) จากกลุ่มย่อย H_{5,9} ซึ่งสามารถยืนยันโครงสร้างได้จาก ¹H NMR สเปกตรัม และจากการทำ TLC เปรียบเทียบกับสารที่เคยแยกได้จากผลดิบปลี

2. การแยก methyl piperate [3.1(42)]

คอกคอลัมน์โครมาโตกราฟีของสารกลุ่ม H₁ ทำให้ได้สารกลุ่มย่อย H_{1,3} และ H_{1,5} ที่สามารถนำไปแยกสารออกมาได้ สำหรับกลุ่มย่อย H_{1,3} เมื่อนำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้ง ทำให้ได้ผลึกสีเหลืองอ่อนของสาร 3.1(42)

การยืนยันโครงสร้างของสาร 3.1(42) ได้จาก ¹H NMR สเปกตรัมและจากการทำ TLC เปรียบเทียบกับสารที่เคยแยกได้จากผลดิบปลี

3. การแยก pellitorine [3.1(56)]

จากกลุ่มย่อย H_{1,5} และ H_{3,2} ให้ของแข็งสีขาวของสาร 3.1(56) การยืนยันโครงสร้างของสารชนิดนี้ได้จาก ¹H NMR สเปกตรัมและจากการทำ TLC เปรียบเทียบกับสารที่เคยแยกได้จากผลชำพลู

4. การแยก β-sitosterol [3.1(40)]

นำสารกลุ่ม H₂ มาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้ง ได้ผลึกสีขาวของสาร 3.1(40) ที่มี stigmasterol ปนอยู่ด้วย โครงสร้างของสาร 3.1(40) ยืนยันได้จาก ¹H NMR สเปกตรัมและจากการทำ TLC เปรียบเทียบกับสารที่เคยแยกได้จากผลดิบปลี

กลุ่มย่อย $H_{1.5}$ (5.10 กรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมากับตัวชะคลอโรฟอร์ม-นอร์มัลเฮกเซน 80:20 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ซิลิกาเจลชนิดหยาบ และใช้เอทิลอะซีเตต-นอร์มัลเฮกเซน 21:79 เป็นตัวชะ ตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC จัดกลุ่มย่อยได้ 13 กลุ่ม เลือกกลุ่มย่อย $H_{1.5.5}$ มาแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $H_{1.5.5}$ ให้ของแข็งสีขาว (265.7 มิลลิกรัม) ของสาร 3.1(56) การยืนยันโครงสร้างของสารชนิดนี้ได้จาก ^1H NMR สเปกตรัมและจากการทำ TLC เปรียบเทียบกับสารที่เคยแยกได้จากผลข้าพลู

กลุ่ม H_2 (3.54 กรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมากับตัวชะเอทิลอะซีเตต-นอร์มัลเฮกเซน 8:92 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ซิลิกาเจลชนิดหยาบ และใช้เอทิลอะซีเตต-นอร์มัลเฮกเซน 13:87 เป็นตัวชะ ได้ผลึกสีขาว (334 มิลลิกรัม) ของสาร 3.1(40) ที่มี stigmasterol ปนอยู่ด้วย การยืนยันโครงสร้างของสารชนิดนี้ได้จาก ^1H NMR สเปกตรัมและจากการทำ TLC เปรียบเทียบกับสารที่เคยแยกได้จากผลดีป्ली

กลุ่ม H_3 (1.80 กรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมากับตัวชะเอทิลอะซีเตต-นอร์มัลเฮกเซน 14:86 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ซิลิกาเจลชนิดหยาบ และใช้เอทิลอะซีเตต-นอร์มัลเฮกเซน 20:80 เป็นตัวชะ เมื่อตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC จัดรวมกลุ่มย่อยได้ 7 กลุ่ม เลือกเฉพาะกลุ่มย่อย $H_{3.2}$ และ $H_{3.5}$ มาแยกต่อไป

กลุ่มย่อย $H_{3.2}$ ให้ของแข็งสีขาว (467 มิลลิกรัม) ของสาร 3.1(56) การยืนยันโครงสร้างของสารชนิดนี้ได้จาก ^1H NMR สเปกตรัมและจากการทำ TLC เปรียบเทียบกับสารที่เคยแยกได้จากผลข้าพลู

กลุ่มย่อย $H_{3.5}$ (284.1 มิลลิกรัม) นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีก 2 ครั้ง ใช้ซิลิกาเจลชนิดละเอียด และใช้เอทิลอะซีเตต-นอร์มัลเฮกเซน 23:77 และ 25:75 เป็นตัวชะในการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีครั้งที่ 1 และ 2 ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC เลือกเฉพาะกลุ่มย่อย $H_{3.5.2}$ มาแยกต่อไป

กลุ่มย่อย $H_{3.5.2}$ (130.4 กรัม) ให้สารสีเหลืองอ่อนที่มีลักษณะกึ่งของแข็งของสาร 3.1(46) ทำการยืนยันโครงสร้างจาก ^1H NMR สเปกตรัมและจากการทำ TLC เปรียบเทียบกับสารที่เคยแยกได้จากผลดีป्ली

กลุ่ม H_4 (10.50 กรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมากับตัวชะเอทิลอะซีเตต-นอร์มัลเฮกเซน 28:72 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้ง ใช้ระบบตัวชะนอร์มัลเฮกเซน นอร์มัลเฮกเซน-เอทิลอะซีเตต เอทิลอะซีเตต เอทิลอะซีเตต-เมทานอล และเมทานอลตามลำดับ โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าขึ้นเรื่อยๆ ภายหลังการตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC รวมกลุ่มย่อยได้ 10 กลุ่ม เลือกเฉพาะกลุ่มย่อย $H_{4.2}$ มาแยกต่อไป

กลุ่ม $H_{4.2}$ (285.8 มิลลิกรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมากับตัวชะเอทิลอะซีเตต-นอร์มัลเฮกเซน 19:81 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจลชนิดละเอียด และใช้เอทิลอะซีเตต-นอร์มัลเฮกเซน 15:85 เป็นตัวชะ ภายหลังตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC จัดกลุ่มย่อยได้ 8 กลุ่ม เลือกเฉพาะกลุ่มย่อย $H_{4.2.3}$ มาแยกต่อไป

กลุ่มย่อย $H_{4.2.3}$ ให้ของแข็งสีขาว (29.3 มิลลิกรัม) ของสาร 3.1(43) การยืนยันโครงสร้างของสารชนิดนี้ได้จาก ^1H NMR สเปกตรัมและจากการทำ TLC เปรียบเทียบกับสารที่เคยแยกได้จากผลดีปรี

กลุ่ม H_5 (1.73 กรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมากับตัวชะเอทิลอะซีเตต-นอร์มัลเฮกเซน 40:60 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ซิลิกาเจลชนิดหยาบ และใช้ตัวชะเริ่มต้นจากเอทิลอะซีเตต-นอร์มัลเฮกเซน 30:70 เอทิลอะซีเตตและเมทานอลตามลำดับ โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าขึ้นเรื่อยๆ ภายหลังตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC จัดรวมกลุ่มย่อยได้ 4 กลุ่ม เลือกเฉพาะกลุ่มย่อย $H_{5.2}$ มาแยกต่อไป

กลุ่มย่อย $H_{5.2}$ (564.0 มิลลิกรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมากับตัวชะเอทิลอะซีเตต-นอร์มัลเฮกเซน 45:55 ถึงเอทิลอะซีเตต นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยใช้ซิลิกาเจลชนิดละเอียด และใช้เอทิลอะซีเตต-นอร์มัลเฮกเซน 40:60 และ 30:70 เป็นตัวชะในการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีครั้งที่ 1 และ 2 ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC จัดกลุ่มย่อยได้ 3 กลุ่ม เลือกเฉพาะกลุ่มย่อย $H_{5.2.2}$ มาแยกต่อไป

กลุ่มย่อย $H_{5.2.2}$ ให้สารสีครีมอ่อนที่มีลักษณะกึ่งของแข็ง (213.3 มิลลิกรัม) ของสาร 3.1 (87) UV: λ_{max}^{MeOH} 212, 278, 297, 317 (sh) nm; IR: KBr_{max} 3031, 2943, 2895, 2858, 1630, 1601, 1500, 1486, 1441, 1355, 1246, 1209, 1189, 1162, 1137, 1123, 1097, 1037, 968, 937, 923, 900, 858, 815, 798, 787, 752, 719, 700 cm^{-1} ; HREIMS: Calcd for $C_{34}H_{38}N_2O_6$ $[M]^+$ 570.2731, Found: 570.2735; EIMS: m/z 570

(12) $[M]^+$, 486 (35), 485 (100), 458 (22), 374 (14), 373 (48), 372 (54), 345 (15), 311 (10), 310 (45), 286 (14), 285 (56), 202 (17), 201 (36), 174 (16), 173 (27), 172 (12), 143 (9.3), 135 (28), 115 (15), 112 (33), 105 (1), 84 (21), 77 (2), 69 (35), 63 (5); ^1H และ ^{13}C NMR (CDCl_3) แสดงในตารางที่ 3.1(1)

(ข) Methanol extract

นำส่วนที่สกัดด้วยเมทานอล (58.65 กรัม) มาแยกสารออกจากกันโดยใช้ควิกคอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ระบบตัวชะคลอโรฟอร์ม เอทิลอะซิเตตและเมทานอลตามลำดับ โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าขึ้นเรื่อยๆ หลังจากตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC รวมกลุ่มย่อยได้ 12 กลุ่ม เลือกเฉพาะกลุ่มย่อย M_1 มาแยกต่อไป

กลุ่ม M_1 (25.02 กรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมากับตัวชะคลอโรฟอร์ม นำมาทำควิกคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้ง ใช้ระบบตัวชะนอร์มัลเฮกเซน คลอโรฟอร์มและเมทานอลตามลำดับ โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าขึ้นเรื่อยๆ ตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC รวมกลุ่มย่อยได้ 11 กลุ่ม เลือกเฉพาะกลุ่มย่อย $M_{1.6}$ มาแยกต่อไป

กลุ่มย่อย $M_{1.6}$ เป็นกลุ่มที่ออกมากับตัวชะคลอโรฟอร์ม-นอร์มัลเฮกเซน 45:55 ให้ผลึกสีเหลืองอ่อน (1.29 กรัม) ของสาร 3.1(10) ซึ่งยืนยันได้จาก ^1H NMR สเปกตรัมและจากการทำ TLC เปรียบเทียบกับสารที่เคยแยกได้จากผลดีป्ली

2. ข้ำพลู (*Piper sarmentosum* Roxb.)

1) ผลข้ำพลู

(1) การหาส่วนประกอบทางเคมี

นำผลข้ำพลูแห้งที่บดละเอียดแล้ว (2.39 กิโลกรัม) มาสกัดด้วยนอร์มัลเฮกเซน โดยใช้ Soxhlet extraction apparatus กรองสารละลายที่ได้แล้วนำไประเหยเอาตัวทำละลายออก ได้ส่วนที่สกัดด้วยเฮกเซนหนัก 99.89 กรัม สำหรับกากที่เหลือสกัดต่อด้วยเมทานอล นำสารละลายที่ได้มากรองและระเหยเอาตัวทำละลายออก ได้ส่วนที่สกัดด้วยเมทานอลหนัก 129.09 กรัม

(ก) Hexane extract

นำส่วนที่สกัดด้วยเฮกเซน (70.70 กรัม) มาแยกโดยใช้ควิกคอลัมน์โครมาโตกราฟีใช้ตัวชะเป็นนอร์มัลเฮกเซน นอร์มัลเฮกเซน-คลอโรฟอร์ม คลอโรฟอร์ม คลอโรฟอร์ม-เมทานอล และเมทานอลตามลำดับ โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าขึ้นเรื่อยๆ ตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC แล้วจัดกลุ่มย่อยได้ 6 กลุ่ม นำกลุ่มย่อย H_2 ถึง H_5 มาแยกสารต่อไป

กลุ่ม H_2 (5.91 กรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมากับตัวชะคลอโรฟอร์ม-นอร์มัลเฮกเซน 2:98 ถึง 15:85 เมื่อนำมาทำควิกคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้ง โดยใช้ระบบตัวชะนอร์มัลเฮกเซน นอร์มัลเฮกเซน-เอทิลอะซีเตต เอทิลอะซีเตต เอทิลอะซีเตต-เมทานอล และเมทานอลตามลำดับ โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าขึ้นเรื่อยๆ ภายหลังการตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC รวมกลุ่มย่อยได้ 13 กลุ่ม เลือกกลุ่มย่อย $H_{2.2}$, $H_{2.7}$ และ $H_{2.9}$ มาทำการแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $H_{2.2}$ (649.1 มิลลิกรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมากับตัวชะเอทิลอะซีเตต-นอร์มัลเฮกเซน 0.1:99.9 ถึง 0.2:99.8 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้ง โดยใช้ซิลิกาเจลชนิดหยาบ และใช้นอร์มัลเฮกเซนเป็นตัวชะ เมื่อตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC สามารถจัดกลุ่มย่อยได้ 7 กลุ่ม นำกลุ่มย่อย $H_{2.2.5}$ มาแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $H_{2.2.5}$ (284.1 มิลลิกรัม) ให้สารสีขาวที่มีลักษณะกึ่งของแข็งของสาร 3.1(76) จุดหลอมเหลว 33–34 °ซ (จุดหลอมเหลวที่มีผู้รายงานไว้^{3.1(77)} คือ 33.5–36.5 °ซ); UV : $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 210, 267, 275(sh), 312 nm; IR: $\frac{\text{CHCl}_3}{\text{max}}$ 2954, 2920, 2848, 1608, 1501, 1464, 1446, 1259, 1247, 1100, 1038, 962, 925, 865, 801, 789, 777, 723 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.87 (3H, t, J = 6.7 Hz, $-\text{CH}_2-\text{Me}$), 1.25 (18H, br s, 9 x CH_2),

1.42 (2H, *m*, homoallylic CH₂), 2.15 (2H, *dt*, *J* = 7.0, 7.0 Hz, allylic CH₂), 5.91 (2H, *s*, -OCH₂O-), 6.04 (1H, *dt*, *J* = 15.7, 7.0 Hz, Ar-CH=CH-), 6.27 (1H, *d*, *J* = 15.7 Hz, Ar-CH=CH-), 6.74 (1H, *m*, Ar-H-5,6), 6.88 (1H, *s*, Ar-H-2); EIMS: *m/z* 316 (11) [M]⁺, 288 (100), 161 (43), 131 (38).

กลุ่มย่อย H_{2.7} เป็นกลุ่มที่ออกมากับตัวอะทิลอะซีเตต-นอร์มัลเฮกเซน 16:84 ได้ผลึกสีขาว (13.4 มิลลิกรัม) ของสาร 3.1(40) จุดหลอมเหลว 136-138 °ซ (จุดหลอมเหลวที่มีผู้รายงานไว้^{3.1[62,63]} คือ 141 °ซ); IR: $\frac{KBr}{max}$ 3427, 2938, 1633, 1466, 1384, 1056 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.70-2.29 (47H, *m*, methyl, methylene และ methine protons), 3.55 (1H, *m*-7 lines, CH-OH), 5.37 (1H, *br d*, *J* = 4.9 Hz, olefinic H).

หมายเหตุ stigmasterol แสดงสัญญาณเพิ่มเติมจากที่กล่าวข้างต้นที่ δ 5.04 (1H, *dd*, *J* = 15.1, 8.5 Hz, olefinic H ที่ side chain) และ 5.17 (1H, *dd*, *J* = 15.1, 8.5 Hz, olefinic H ที่ side chain).

กลุ่มย่อย H_{2.9} (482.2 มิลลิกรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมากับตัวอะทิลอะซีเตต-นอร์มัลเฮกเซน 30:70 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้ง โดยใช้ซิลิกาเจลชนิดละเอียด และใช้เอทิลอะซีเตต-นอร์มัลเฮกเซน 15:75 เป็นตัวชะ ภายหลังการตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC จัดกลุ่มย่อยได้ 10 กลุ่ม เลือกกลุ่มย่อย H_{2.9.5} มาแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย H_{2.9.5} (122.7 มิลลิกรัม) ให้ของแข็งสีขาวของสาร 3.1(56) จุดหลอมเหลว 68-70 °ซ (จุดหลอมเหลวที่มีผู้รายงานไว้^{3.1[77]} คือ 66-68 °ซ); UV: λ_{max}^{MeOH} 260 nm; IR: $\frac{KBr}{max}$ 3299, 3082, 3020, 2955, 2927, 2870, 1656, 1629, 1551, 1467, 1370, 1340, 1312, 1256, 1210, 1161, 996, 944, 876, 724 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.86 (3H, *t*, *J* = 6.9 Hz, -CH₂-Me), 0.90 (6H, *d*, *J* = 6.7 Hz, CHMe₂), 1.27 (4H, *m*, 2 x CH₂), 1.39 (2H, *quint*, *J* = 7.3 Hz, homoallylic CH₂), 1.77 (1H, *m*-7 lines, -CHMe₂), 2.11 (2H, *dt*, *J* = 7.1, 6.7 Hz, allylic CH₂), 3.13 (2H, *t*, *J* = 6.5 Hz, -CH₂-N-), 5.60 (1H, *br s*, -NH), 5.74 (1H, *d*, *J* = 15.0 Hz, -CH=CH-CO), 6.07 (2H, *m*, -CH=CH-CH=CH-CO), 7.16 (1H, *dd*, *J* = 15.0, 10.0 Hz, CH=CH-CO); ¹³C NMR (CDCl₃): δ 166.4 (C-1), 121.7 (C-2), 143.2 (C-3), 128.2 (C-4), 141.3 (C-5), 32.9 (C-6),

28.5 (C-7), 31.3 (C-8), 22.4 (C-9), 14.0 (C-10), 46.9 (C- α), 28.6 (C- β), 20.1 (C- γ).

กลุ่มย่อย H_3 (13.50 กรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมาพร้อมกับตัวชนอร์มัลเฮกเซน-คลอโรฟอร์ม 83:17 ถึงคลอโรฟอร์ม-เมทานอล 95:5 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้ง โดยใช้ซิลิกา เจลชนิดหยาบ และใช้ตัวชะเริ่มต้นจากนอร์มัลเฮกเซน-เอทิลอะซิเตต 99:1 ถึงเอทิลอะซิเตต ตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC สามารถจัดกลุ่มย่อยได้ 24 กลุ่ม เลือกกลุ่มย่อย $H_{3,4}$ และ $H_{3,17}$ มาแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $H_{3,4}$ (252.1 มิลลิกรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมาพร้อมกับตัวชะเอทิลอะซิเตต-นอร์มัลเฮกเซน 15.5:84.5 กรองของแข็งสีขาวที่ปนอยู่ออกมา แล้วนำมาตกผลึกด้วยเอทานอล ได้ผลึกสีขาว (17.5 มิลลิกรัม) ของสาร 3.1(24) จุดหลอมเหลว 120-121 °ซ (จุดหลอมเหลวที่มีผู้รายงานไว้^{3.1[80]} คือ 121-122 °ซ); $[\alpha]_D^{31} +121.9^\circ$ ($CHCl_3$) ($[\alpha]_D^{18}$ ที่มีผู้รายงานไว้^{3.1[80]} คือ $+121.7^\circ$ ($CHCl_3$)); UV: λ_{max}^{MeOH} 244, 294 nm; IR: λ_{max}^{KBr} 2868, 1612, 1505, 1491, 1442, 1376, 1257, 1225, 1193, 1181, 1101, 1076, 1037, 960, 931, 881, 825, 810, 796, 739 cm^{-1} ; ^1H NMR($CDCl_3$): δ 2.84 (1H, *m*, H-1), 3.28 (2H, *m*, H-4a, 5), 3.81 (2H, *m*, H-4e, 8a), 4.08 (1H, *br d*, *J* = 9.4 Hz, H-8e), 4.33 (1H, *d*, *J* = 7.1 Hz, H-2), 4.81 (1H, *d*, *J* = 5.3 Hz, H-6), 5.93 (2H, *s*, $-OCH_2O-$), 5.94 (2H, *s*, $-OCH_2O-$), 6.80 (4H, *m*, Ar-H-5,6), 6.85 (1H, *s*, Ar-H-2).

กลุ่มย่อย $H_{3,17}$ (196.0 มิลลิกรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมาพร้อมกับตัวชะเอทิลอะซิเตต-นอร์มัลเฮกเซน 18:82 ถึง 20:80 นำมากรองเอาผลึกสีขาว (91.5 มิลลิกรัม) ของสาร 3.1(43) การยืนยันโครงสร้างของสาร 3.1(43) ได้จาก ^1H NMR สเปกตรัมและจากการทำ TLC เปรียบเทียบกับสารที่แยกได้จากกลุ่มย่อย $H_{3,6,2}$ ของผลตีปัส

กลุ่มย่อย H_4 (5.79 กรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมาพร้อมกับตัวชะเมทานอล-คลอโรฟอร์ม 10:90 ถึง 20:80 นำมาทำควิกคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ระบบตัวชะเช่นเดียวกับกลุ่มย่อย H_2 แต่ใช้อัตราส่วนที่แตกต่างกัน ภายหลังการตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC สามารถจัดกลุ่มย่อยได้ 12 กลุ่ม เลือกกลุ่มย่อย $H_{4,4}$ และ $H_{4,6}$ มาแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $H_{4.4}$ (741.1 มิลลิกรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมาพร้อมกับตัวชะเอทิลอะซีเตต-นอร์มัลเฮกเซน 19.5:80.5 ถึง 20:80 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้ง ใช้ซิลิกาเจลชนิดละเอียด และใช้เอทิลอะซีเตต-นอร์มัลเฮกเซน 15:85 เป็นตัวชะ ทำการตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC เลือกเฉพาะกลุ่มย่อย $H_{4.4.2}$ มาแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $H_{4.4.2}$ ให้ผลึกสีขาว (98.9 มิลลิกรัม) ของสาร 3.1(83) จุดหลอมเหลว 100-101 °ซ (จุดหลอมเหลวที่มีผู้รายงานไว้^{3.1[81]} คือ 101 °ซ); UV: $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ 207, 261, 309 (sh) nm; IR: $\text{KBr}_{\max}$ 3305, 2924, 2851, 1657, 1628, 1614, 1548, 1508, 1493, 1467, 1367, 1258, 1191, 1165, 1102, 1045, 1001, 964, 923, 872, 819, 793, 721 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.90 (6H, d, $J = 6.7$ Hz, CHMe_2), 1.27 (8H, m, 4 x CH_2), 1.41 (4H, m, 2 x homoallylic CH_2), 1.78 (1H, m-7 lines, $-\text{CHMe}_2$), 2.13 (4H, m, 2 x allylic CH_2), 3.14 (2H, t, $J = 6.3$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{N}-$), 5.43 (1H, br s, $-\text{NH}$), 5.72 (1H, d, $J = 14.9$ Hz, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}$), 5.91 (2H, s, $-\text{OCH}_2\text{O}-$), 6.06 (3H, m, $\text{Ar}-\text{CH}=\text{CH}-$ and $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}$), 6.26 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, $\text{Ar}-\text{CH}=\text{CH}-$), 6.72 (2H, m, $\text{Ar}-\text{H}-5,6$), 6.87 (1H, s, $\text{Ar}-\text{H}-2$), 7.17 (1H, dd, $J = 14.9, 10.0$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}$); EIMS: m/z 411 (100) $[\text{M}]^+$, 396 (1), 383 (1), 312 (4), 278 (2), 180 (19), 152 (55), 147 (5), 136 (8), 135 (53), 115 (11), 107 (51), 105 (2), 72 (1).

กลุ่มย่อย $H_{4.6}$ (1.28 กรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมาพร้อมกับตัวชะเอทิลอะซีเตต-นอร์มัลเฮกเซน 21.5:78.5 ถึง 23:77 ให้น้ำมันสีเหลืองของสาร 3.1(78); UV: $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ 267 nm; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.86 (3H, t, $J = 6.9$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{Me}$), 1.26 (4H, m, 2 x CH_2), 1.39 (2H, quint, $J = 7.3$ Hz, homoallylic CH_2), 1.83 (2H, quint, $J = 6.8$ Hz, $-\text{NCH}_2\text{CH}_2-$ of pyrrolidine ring), 1.93 (2H, quint, $J = 6.8$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}-$ of pyrrolidine ring), 2.12 (2H, dt, $J = 7.0, 7.0$ Hz, allylic CH_2), 3.49 (2H, t, $J = 6.8$ Hz, $-\text{CH}_2\text{NCH}_2-$ of pyrrolidine ring), 3.51 (2H, t, $J = 6.8$ Hz, $-\text{CH}_2\text{NCH}_2-$ of pyrrolidine ring), 6.05 (1H, d, $J = 14.7$ Hz, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}$), 6.05 (1H, dt, $J = 14.7, 7.0$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$), 6.15 (1H, dd, $J = 14.8, 10.6$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$), 7.24 (1H, dd, $J = 14.8, 10.6$ Hz,

CH=CH-CO); ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 165.2 (C-1), 119.8 (C-2), 143.1 (C-3), 128.6 (C-4), 141.2 (C-5), 32.9 (C-6), 28.4 (C-7), 31.3 (C-8), 22.4 (C-9), 14.0 (C-10), 45.8 (C- α), 26.1 (C- β), 46.4 (C- α'), 24.3 (C- β').

กลุ่มย่อย H_5 (11.98 กรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมากับตัวชะคลอโรฟอร์ม-เมทานอล 70:30 ถึง 20:80 นำมาทำคอลลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ระบบตัวชะเช่นเดียวกับกลุ่มย่อย H_2 แต่ใช้อัตราส่วนที่แตกต่างกัน ภายหลังการตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC นำเฉพาะกลุ่มย่อย $\text{H}_{5.11}$ มาแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $\text{H}_{5.11}$ (3.41 กรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมากับตัวชะนอร์มัลเฮกเซน-เอทิลอะซีเตต 40:60 ถึงเอทิลอะซีเตต-เมทานอล 90:10 นำมาทำคอลลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีก 3 ครั้ง โดยใช้ซิลิกาเจลชนิดละเอียด และใช้เอทิลอะซีเตต-นอร์มัลเฮกเซน 25:75 เป็นตัวชะ ทำการตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC แล้วเลือกกลุ่มย่อย $\text{H}_{5.11.2}$ มาแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $\text{H}_{5.11.2}$ (14 มิลลิกรัม) ให้สารสีขาวที่มีลักษณะกึ่งของแข็งของสาร 3.1(84); UV : $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 228, 275, 321 nm; IR: KBr 2977, 2930, 2877, 1660, 1606, 1504, 1490, 1444, 1343, 1250, 1192, 1097, 1040, 964, 932, 863, 755, 666 cm^{-1} ; ^1H NMR(CDCl_3): δ 1.48 (4H, *m*, 2 x CH_2), 1.83 (2H, *quint*, $J = 6.8$ Hz, $-\text{NCH}_2\text{CH}_2-$ of pyrrolidine ring), 1.93 (2H, *quint*, $J = 6.8$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}-$ of pyrrolidine ring), 2.18 (4H, *m*, 2 x allylic CH_2), 3.48 (2H, *t*, $J = 6.8$ Hz, $-\text{CH}_2\text{NCH}_2-$ of pyrrolidine ring), 3.50 (2H, *t*, $J = 6.8$ Hz, $-\text{CH}_2\text{NCH}_2-$ of pyrrolidine ring), 5.91 (2H, *s*, $-\text{OCH}_2\text{O}-$), 6.01 (1H, *dt*, $J = 15.6, 7.0$ Hz, Ar-CH=CH-), 6.08 (1H, *dt*, $J = 15.3, 1.4$ Hz, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}$), 6.26 (1H, *dt*, $J = 15.6, 1.3$ Hz, Ar-CH=CH-), 6.71 (1H, *d*, $J = 8.1$ Hz, Ar-H-5), 6.73 (1H, *dd*, $J = 8.1, 1.5$ Hz, Ar-H-6), 6.86 (1H, *d*, $J = 1.5$ Hz, Ar-H-2), 6.89 (1H, *dt*, $J = 15.3, 7.2$ Hz, CH=CH-CO); ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 164.9 (C-1), 121.7 (C-2), 145.5 (C-3), 32.6 (C-4), 28.9 (C-5), 27.9 (C-6), 32.2 (C-7), 129.6 (C-8), 132.3 (C-9), 128.8 (C-1'), 105.3 (C-2'), 147.9 (C-3'), 146.5 (C-4'), 108.2 (C-5'), 120.2 (C-6'), 45.7 (C- α), 26.1 (C- β), 46.5 (C- α'), 24.3 (C- β'), 100.9 ($-\text{OCH}_2\text{O}-$).

(ข) Methanol extract

นำส่วนที่สกัดด้วยเมทานอล (99.11 กรัม) มาแยกสารออกจากกันโดยใช้คwikคอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ระบบตัวชะนอร์มัลเฮกเซน คลอโรฟอร์มและเมทานอล โดยทำในทำนองเดียวกับการแยกสารจาก hexane extract ของผลข้าพลู แต่ใช้อัตราส่วนที่แตกต่างกัน หลังจากตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC จัดรวมได้ 23 กลุ่ม เลือกกลุ่ม M_1 , M_3 , M_4 , M_8 และ M_9 มาทำการแยกสารต่อไป

กลุ่ม M_1 (492.0 มิลลิกรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมากับตัวชะนอร์มัลเฮกเซน นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้ง โดยใช้ซิลิกาเจลชนิดละเอียด และใช้นอร์มัลเฮกเซนเป็นตัวชะ ทำการตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC รวมกลุ่มย่อยได้ 7 กลุ่ม กลุ่มย่อย $M_{1.6}$ ให้สารสีขาวที่มีลักษณะกึ่งของแข็ง (152.2 มิลลิกรัม) ของสาร 3.1(76) ซึ่งยืนยันโครงสร้างได้จาก ^1H NMR สเปกตรัมและจากการทำ TLC เปรียบเทียบกับสารที่ได้จากกลุ่มย่อย $H_{2.2.5}$ ของผลข้าพลู

กลุ่ม M_3 (579.2 มิลลิกรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมากับตัวชะคลอโรฟอร์ม-นอร์มัลเฮกเซน 10:90 ถึง 15:85 นำมาแยกสารออกจากกันโดยใช้โครมาโตรอน ใช้คลอโรฟอร์ม-นอร์มัลเฮกเซน 5:95 เป็นตัวชะ ตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC แล้วเลือกกลุ่มย่อย $M_{3.4}$ และ $M_{3.5}$ มาแยกต่อไป

กลุ่มย่อย $M_{3.4}$ (62.5 มิลลิกรัม) นำมากรองเอาของแข็งสีเหลืองอ่อน (2.2 มิลลิกรัม) ของสาร 3.1(42) ออกมา การยืนยันโครงสร้างของสาร 3.1(42) ได้มาจาก ^1H NMR สเปกตรัมและจากการทำ TLC เปรียบเทียบกับสารที่ได้จากกลุ่ม H_2 ของผลดีปลี

กลุ่มย่อย $M_{3.5}$ (430.3 มิลลิกรัม) นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลชนิดละเอียด และใช้ระบบตัวชะเริ่มต้นจากนอร์มัลเฮกเซน-คลอโรฟอร์ม 80:20 คลอโรฟอร์ม และคลอโรฟอร์ม-เมทานอล 95:5 ตามลำดับ โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าขึ้นเรื่อย ๆ ตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC แล้วเลือกกลุ่มย่อย $M_{3.5.12}$ มาแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $M_{3.5.12}$ (29.8 มิลลิกรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมากับตัวชะคลอโรฟอร์ม-นอร์มัลเฮกเซน 55:45 ถึง 75:25 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้ง ใช้ซิลิกาเจลชนิดละเอียด แต่ใช้เอทิลอะซีเตต-นอร์มัลเฮกเซน 5:95 เป็นตัวชะ ภายหลังการตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC จัดกลุ่มย่อยได้ 6 กลุ่ม เลือกกลุ่มย่อย $M_{3.5.12.4}$ มาแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $M_{3.5.12.4}$ (2.2 มิลลิกรัม) ให้ของแข็งสีขาวของสาร 3.1(28) UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 211, 232, 293(sh) nm; IR: $\frac{\text{CHCl}_3}{\text{max}}$ 2920, 2848, 1600, 1500, 1490, 1443, 1247, 1039, 931, 812 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 3.04 (2H, *m*, H-1, 5), 3.86 (2H, *dd*, *J* = 9.2, 3.4 Hz, H-4a, 8a), 4.22 (2H, *dd*, *J* = 9.1, 6.8 Hz, H-4e, 8e), 4.70 (2H, *d*, *J* = 4.2 Hz, H-2,6), 5.94 (4H, *s*, 2 x -OCH₂O-), 6.78 (4H, *m*, Ar-H-5', 6', 5'', 6''), 6.83 (2H, *br s*, Ar-H-2', 2').

กลุ่ม M_4 (6.36 กรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมาพร้อมกับตัวชะคลอโรฟอร์ม-นอร์มัลเฮกเซน 20:80 ถึง 35:65 นำมาทำคอลลัมน์โครมาโตกราฟี- ใช้ตัวชะเริ่มต้นจากนอร์มัลเฮกเซนถึงนอร์มัลเฮกเซน-เอทิลอะซีเตต 15:85 โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าขึ้นเรื่อยๆ ภายหลังการตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC เลือกกลุ่มย่อย $M_{4.1}$ มาทำการแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $M_{4.1}$ (2.06 กรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมาพร้อมกับตัวชะนอร์มัลเฮกเซนถึงนอร์มัลเฮกเซน-เอทิลอะซีเตต 84:16 นำมาทำคอลลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้ง โดยใช้ซิลิกาเจลชนิดละเอียด และใช้ตัวชะเริ่มต้นจากนอร์มัลเฮกเซนถึงนอร์มัลเฮกเซน-เอทิลอะซีเตต 96.5:3.5 โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าขึ้นเรื่อยๆ ตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC จัดกลุ่มย่อยได้ 18 กลุ่ม เลือกกลุ่มย่อย $M_{4.1.17}$ มาแยกต่อไป

กลุ่มย่อย $M_{4.1.17}$ (158.5 มิลลิกรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมาพร้อมกับตัวชะนอร์มัลเฮกเซน-เอทิลอะซีเตต 97:3 ให้ของแข็งสีขาวของสาร 3.1(56) การยืนยันโครงสร้างของสาร 3.1(56) ได้มาจาก $^1\text{H NMR}$ สเปกตรัมและจากการทำ TLC เปรียบเทียบกับสารที่ได้จากกลุ่มย่อย $H_{2.9.5}$ ของผลข้าวพลู

กลุ่ม M_8 (1.02 กรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมาพร้อมกับตัวชะคลอโรฟอร์ม-นอร์มัลเฮกเซน 70:30 นำมาแยกสารออกจากกันโดยใช้โครมาโตรอน ใช้ตัวชะเริ่มต้นจากเอทิลอะซีเตต-นอร์มัลเฮกเซน 10:90 ถึง 13:87 โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าขึ้นเรื่อยๆ ตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC รวมกลุ่มย่อยได้ 8 กลุ่ม เลือกกลุ่มย่อย $M_{8.5}$ และ $M_{8.7}$ มาแยกต่อไป

กลุ่มย่อย $M_{8.5}$ (224.9 มิลลิกรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมาพร้อมกับตัวชะเอทิลอะซีเตต-นอร์มัลเฮกเซน 11.5:88.5 ให้ผลึกสีเหลืองของสาร 3.1(85) จุดหลอมเหลว 145-147 °ซ (จุดหลอมเหลวที่มีผู้รายงานไว้^{3.1[85]} คือ 147-149 °ซ); UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 378 nm; IR: $\frac{\text{KBr}}{\text{max}}$ 3026, 2987, 2893,

1637, 1617, 1602, 1579, 1499, 1487, 1445, 1420, 1367, 1336, 1253, 1193, 1145, 1117, 1038, 998, 961, 931, 854, 815, 785 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 1.85 (2H, *quint*, $J = 6.8$ Hz, $-\text{NCH}_2\text{CH}_2-$ of pyrrolidine ring), 1.95 (2H, *quint*, $J = 6.8$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}-$ of pyrrolidine ring), 3.51 (2H, *t*, $J = 6.8$ Hz, $-\text{CH}_2\text{NCH}_2-$ of pyrrolidine ring), 3.53 (2H, *t*, $J = 6.8$ Hz, $-\text{CH}_2\text{NCH}_2-$ of pyrrolidine ring), 5.94 (2H, *s*, $-\text{OCH}_2\text{O}-$), 6.17 (1H, *d*, $J = 14.7$ Hz, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}$), 6.39 (1H, *m*, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}$), 6.63 (3H, *m*, $\text{Ar}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$), 6.74 (1H, *d*, $J = 8.1$ Hz, $\text{Ar}-\text{H}-5$), 6.84 (1H, *dd*, $J = 8.1, 1.1$ Hz, $\text{Ar}-\text{H}-6$), 6.94 (1H, *d*, $J = 1.1$ Hz, $\text{Ar}-\text{H}-2$), 7.35 (1H, *dd*, $J = 14.7, 11.4$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}$); EIMS: m/z 297 (64) $[\text{M}]^+$, 227 (39), 199 (47), 169 (85), 141 (100), 135 (15), 98 (40), 70 (10).

กลุ่มย่อย $\text{M}_{8.7}$ (88.1 มิลลิกรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมาพร้อมกับตัวอะเอทิลอะซีเตต-นอร์มัลเฮกเซน 12.5:87.5 ให้ผลึกสีขาวของสาร 3.1(86) จุดหลอมเหลว 150-151 °ซ; UV : $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 249, 322 nm; IR: KBr_{max} 2964, 2873, 2841, 1646, 1604, 1581, 1506, 1451, 1414, 1330, 1259, 1244, 1229, 1199, 1129, 1052, 1005, 839, 821, 783 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 1.87 (2H, *quint*, $J = 6.8$ Hz, $-\text{NCH}_2\text{CH}_2-$ of pyrrolidine ring), 1.98 (2H, *quint*, $J = 6.8$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}-$ of pyrrolidine ring), 3.56 (2H, *t*, $J = 6.8$ Hz, $-\text{CH}_2\text{NCH}_2-$ of pyrrolidine ring), 3.62 (2H, *t*, $J = 6.8$ Hz, $-\text{CH}_2\text{NCH}_2-$ of pyrrolidine ring), 3.84 (3H, *s*, OMe), 3.86 (6H, *s*, $-2 \times \text{OMe}$), 6.58 (1H, *d*, $J = 15.4$ Hz, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}$), 6.72 (1H, *s*, $\text{Ar}-\text{H}-2,6$), 7.58 (1H, *d*, $J = 15.4$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}$).

กลุ่ม M_9 (1.38 กรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมาพร้อมกับตัวอะคลอโรฟอร์ม-นอร์มัลเฮกเซน 75:25 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยใช้ซิลิกาเจลชนิดละเอียด และใช้ตัวอะเริ่มต้นจากคลอโรฟอร์มถึงเมทานอล-คลอโรฟอร์ม 10:90 โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าขึ้นเรื่อย ๆ ตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC แล้วเลือกกลุ่มย่อย $\text{M}_{9.4}$ มาแยกต่อไป

กลุ่มย่อย $\text{M}_{9.4}$ (318.7 มิลลิกรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมาพร้อมกับตัวอะคลอโรฟอร์ม ให้ของแข็งสีเหลืองอ่อนของสาร 3.1(79) จุดหลอมเหลว 78-79 °ซ (จุดหลอมเหลวที่มีผู้รายงานไว้^{3.1[77]} คือ 77.5-79.5 °ซ); UV : $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 217, 268, 309 nm; IR: KBr_{max} 2879, 1663, 1603,

1502, 1486, 1441, 1335, 1246, 1193, 1105, 1039, 986, 964, 927, 886, 818, 789, 756, 714, 697 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 1.83 (2H, *quint*, $J = 6.7$ Hz, $-\text{NCH}_2\text{CH}_2-$ of pyrrolidine ring), 1.92 (2H, *quint*, $J = 6.7$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}-$ of pyrrolidine ring), 2.33 (4H, *br s*, 2 x allylic CH_2), 3.47 (2H, *t*, $J = 6.7$ Hz, $-\text{CH}_2\text{NCH}_2-$ of pyrrolidine ring), 3.49 (2H, *t*, $J = 6.7$ Hz, $-\text{CH}_2\text{NCH}_2-$ of pyrrolidine ring), 5.90 (2H, *s*, $-\text{OCH}_2\text{O}-$), 6.00 (1H, *dt*, $J = 15.8, 6.6$ Hz, $\text{Ar}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$), 6.11 (1H, *d*, $J = 15.1$ Hz, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}$), 6.29 (1H, *d*, $J = 15.8$ Hz, $\text{Ar}-\text{CH}=\text{CH}-$), 6.71 (2H, *m*, $\text{Ar}-\text{H}_{5,6}$), 6.85 (1H, *br s*, $\text{Ar}-\text{H}_{2,3}$), 6.91 (1H, *dt*, $J = 15.1, 6.6$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}$); ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 164.8 (C-1), 120.4 (C-2), 144.6 (C-3), 32.3 (C-4), 31.7 (C-5), 130.2 (C-6), 127.5 (C-7), 132.0 (C-1'), 105.4 (C-2'), 147.9 (C-3'), 146.7 (C-4'), 108.1 (C-5'), 122.2 (C-6'), 45.8 (C- α), 26.1 (C- β), 46.5 (C- α'), 24.3 (C- β'), 100.9 ($-\text{OCH}_2\text{O}-$).

2) รากข้าวพุลู

(1) การหาส่วนประกอบทางเคมี

นำรากข้าวพุลูแห้งที่บดละเอียดแล้ว (210.17 กรัม) มาสกัดด้วยนอร์มัลเฮกเซน โดยการต้มที่อุณหภูมิต่ำๆ กรองสารละลายที่ได้แล้วนำไประเหยเอาตัวทำละลายออก ได้ส่วนที่สกัดด้วยเฮกเซนหนัก 5.50 กรัม สำหรับกากที่เหลือสกัดต่อด้วยเมทานอล นำสารละลายที่ได้มากรองและระเหยเอาตัวทำละลายออก ได้ส่วนที่สกัดด้วยเมทานอลหนัก 19.68 กรัม

(ก) Hexane extract

นำส่วนที่สกัดด้วยเฮกเซน (4.90 กรัม) มาแยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟีใช้ตัวชะนอร์มัลเฮกเซน นอร์มัลเฮกเซน-เอทิลอะซีเตต เอทิลอะซีเตต เอทิลอะซีเตต-เมทานอล และเมทานอลตามลำดับ โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าขึ้นเรื่อยๆ ตรวจสอบส่วนที่ชะด้วย TLC แล้วจัดกลุ่มย่อยได้ 33 กลุ่ม นำกลุ่มย่อย H_{10} , H_{22} และ H_{29} มาแยกสารต่อไป

กลุ่ม H_{10} (152 มิลลิกรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมากับตัวชะนอร์มัลเฮกเซน ให้สารสีขาวที่มีลักษณะกึ่งของแข็งของสาร 3.1(76) การยืนยันโครงสร้างของสาร 3.1(76) ได้จาก ^1H NMR สเปกตรัมและจากการทำ TLC เปรียบเทียบกับสารที่แยกได้จากผลข้าวพุลู

กลุ่ม H_{22} (181.2 มิลลิกรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมากับตัวชะเอทิลอะซีเตต-นอร์มัลเฮกเซน 0.6:99.4 ถึง 0.8:99.2 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้ง โดยใช้ซิลิกาเจลชนิดละเอียดและใช้เอทิลอะซีเตต-นอร์มัลเฮกเซน 0.5:99.5 เป็นตัวชะ เมื่อตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC รวมกลุ่มย่อยได้ 4 กลุ่ม นำกลุ่มย่อย $H_{22.3}$ มาแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $H_{22.3}$ (69.3 มิลลิกรัม) ให้น้ำมันใสของสาร 3.1(74) UV: λ_{max}^{MeOH} 292, 299 (sh) nm; ^1H NMR ($CDCl_3$): δ 3.26 (2H, d, $J = 6.5$ Hz, Ar- CH_2 -), 3.74 (3H, s, - OCH_3), 5.01 (2H, m, - $CH=CH_2$), 5.87 (2H, s, - OCH_2O -), 5.92 (1H, m, - $CH=CH_2$), 6.50 (1H, s, Ar-H-3), 6.63 (1H, s, Ar-H-6); ^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 34.2 (C-1'), 57.0 (- OCH_3), 95.6 (C-3), 101.6 (- OCH_2O -), 110.3 (C-6), 115.9 (C-3'), 121.6 (C-1), 138.1 (C-2'), 141.9 (C-5), 147.2 (C-4), 153.1 (C-2).

กลุ่ม H_{29} (683.7 มิลลิกรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมากับตัวชะเอทิลอะซีเตต-นอร์มัลเฮกเซน 8:92 ถึง 20:80 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้ง โดยใช้ซิลิกาเจลชนิดละเอียดและใช้ตัวชะนอร์มัลเฮกเซน นอร์มัลเฮกเซน-เอทิลอะซีเตต และเอทิลอะซีเตตตามลำดับ โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าขึ้นเรื่อยๆ ตรวจสอบส่วนที่ชะด้วย TLC สามารถจัดกลุ่มย่อยได้ 20 กลุ่ม นำกลุ่มย่อย $H_{29.5}$ มาแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $H_{29.5}$ (22.1 มิลลิกรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมากับตัวชะเอทิลอะซีเตต-นอร์มัลเฮกเซน 7.2:92.8 ได้ผลึกสีขาว (22.1 มิลลิกรัม) ของสาร 3.1(40) ที่มี stigmasterol ปนอยู่ด้วยการยืนยันโครงสร้างของสารชนิดนี้ได้จาก ^1H NMR สเปกตรัมและจากการทำ TLC เปรียบเทียบกับสารที่เคยแยกได้จากผลดีป्लीและผลข้าวพุลู

(ข) Methanol extract

นำส่วนที่สกัดด้วยเมทานอล (19.68 กรัม) มาแยกสารออกจากกันโดยใช้ควิกคอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ระบบตัวชะนอร์มัลเฮกเซน เอทิลอะซิเตตและเมทานอลตามลำดับ โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าขึ้นเรื่อย ๆ ภายหลังการตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC รวมกลุ่มย่อยได้ 20 กลุ่ม เลือกเฉพาะกลุ่มย่อย M_6 , M_{14} และ M_{15} มาแยกสารต่อไป

กลุ่ม M_6 (105.40 มิลลิกรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมาพร้อมกับตัวชะเอทิลอะซิเตต-นอร์มัลเฮกเซน 15:85 ถึง 16:84 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้ง โดยใช้ซิลิกาเจลชนิดละเอียดและใช้ตัวชะเอทิลอะซิเตต-นอร์มัลเฮกเซน 10:90 เมื่อตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC รวมกลุ่มย่อยได้ 13 กลุ่ม เลือกกลุ่มย่อย $M_{6.10}$ มาแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $M_{6.10}$ (41.3 มิลลิกรัม) ให้ของแข็งสีขาวของสาร 3.1(56) โครงสร้างของสารชนิดนี้ยืนยันได้จากการเปรียบเทียบ ^1H NMR สเปกตรัมและ TLC กับสารที่เคยแยกได้จากผลข้าพลู

กลุ่ม M_{14} (267.8 มิลลิกรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมาพร้อมกับตัวชะเอทิลอะซิเตต-นอร์มัลเฮกเซน 45:55 ถึง 60:40 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลชนิดละเอียดและใช้ตัวชะเมทานอล-คลอโรฟอร์ม 0.3:99.7 ถึง 50:50 โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าขึ้นเรื่อย ๆ ภายหลังการตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC จัดกลุ่มย่อยได้ 15 กลุ่ม เลือกกลุ่มย่อย $M_{14.6}$ และ $M_{14.7}$ มาแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $M_{14.6}$ (60.9 มิลลิกรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมาพร้อมกับตัวชะเมทานอล-คลอโรฟอร์ม 0.3:99.7 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้ง โดยใช้ซิลิกาเจลชนิดละเอียด ใช้เอทิลอะซิเตต-นอร์มัลเฮกเซน 38:62 ถึง 42:58 เป็นตัวชะ ตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC จัดกลุ่มย่อยได้ 6 กลุ่ม เลือกกลุ่มย่อย $M_{14.6.4}$ มาแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $M_{14.6.4}$ (21.6 มิลลิกรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมาพร้อมกับตัวชะเอทิลอะซิเตต-นอร์มัลเฮกเซน 40:60 ได้ของแข็งสีเหลืองอ่อนของสาร 3.1(79) จากการเปรียบเทียบ ^1H NMR สเปกตรัมและ TLC กับสารที่เคยแยกได้จากผลข้าพลูสามารถยืนยันโครงสร้างของสารชนิดนี้

กลุ่มย่อย $M_{14.7}$ (35.0 มิลลิกรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมาพร้อมกับตัวชะเมทานอล-คลอโรฟอร์ม 0.3:99.7 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้ง โดยใช้ซิลิกาเจลชนิดละเอียด ใช้ตัวชะเอทิลอะซิเตต-นอร์มัลเฮกเซน 45:55 เมื่อตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC จัดกลุ่มย่อยได้ 3 กลุ่ม เลือกกลุ่มย่อย $M_{14.7.2}$ มาแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $M_{14.7.2}$ (4.0 มิลลิกรัม) ได้ของแข็งสีขาวของสาร 3.1(92) IR: $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ 3474, 3181, 2921, 2850, 1691, 1654, 1600, 1501, 1459, 1384, 1326, 1271, 1180, 1131, 1055, 1032, 886, 852, 802, 754, 732 cm^{-1} ; ^1H NMR ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$): δ 4.04 (3H, s, $-\text{OCH}_3$), 7.06 (1H, s, H-9), 7.49 (2H, m, H-6,7), 7.69 (1H, s, H-2), 7.75 (1H, m, H-8), 9.18 (1H, m, H-5).

กลุ่ม M_{15} (222.8 มิลลิกรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมาพร้อมกับตัวชะเอทิลอะซีเตต-นอร์มัลเฮกเซน 70:30 ถึง 80:20 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้ง โดยใช้ซิลิกาเจลชนิดละเอียดและใช้เมทานอล-คลอโรฟอร์ม 0.5:99.5 ถึง 50:50 เป็นตัวชะ เมื่อตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC รวมกลุ่มย่อยได้ 29 กลุ่ม เลือกกลุ่มย่อย $M_{15.20}$ มาแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $H_{15.20}$ (4.0 มิลลิกรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมาพร้อมกับตัวชะเมทานอล-คลอโรฟอร์ม 2.5:97.5 ได้ของแข็งใสของสาร 3.1(93) UV: $\lambda_{\max}^{MeOH}$ 223, 295 (sh), 320 nm; ^1H NMR ($CDCl_3 + CD_3OD$): δ 2.73 (2H, t, $J = 6.9$ Hz, Ar-CH₂-), 3.52 (2H, t, $J = 6.9$ Hz, -NH-CH₂-), 3.84 (3H, s, -OCH₃), 6.14 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, -CO-CH=CH-), 6.73 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, Ar-H-5',7'), 6.81 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, Ar-H-8), 6.93 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, Ar-H-5), 6.97 (1H, dd, $J = 8.2, 1.8$ Hz, Ar-H-9), 7.00 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, Ar-H-4',8'), 7.44 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, Ar-CH=CH-CO); ^{13}C NMR ($CDCl_3 + CD_3OD$): δ 34.6 (C-2'), 40.8 (C-1'), 55.9 (-OCH₃), 110.0 (C-5), 114.8 (C-8), 115.4 (C-5',7'), 117.9 (C-2), 122.0 (C-9), 127.2 (C-4), 129.7 (C-4',8'), 129.9 (C-3'), 141.0 (C-3), 146.9 (C-6), 147.5 (C-7), 155.2 (C-6'), 166.6 (C-1).

เอกสารอ้างอิง

- 3.1[1] Camps, F. Plant Ecdysteroids and Their Interaction with Insects. In *Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids*; Harborne J. B.; Tomas-Babaran, F. A. Eds.; Claredon Press: Oxford, 1991; p. 331.
- 3.1[2] Heaton, A. Agrochemicals: Naturally Occurring Insecticides. In *The Chemical Industry*, 2nd ed., Heaton, A. Ed.; Blackie Academic and Professional: London, 1994; p. 253.
- 3.1[3] Schmeltz, I. Nicotine and Other Tobacco Alkaloids. In *Naturally Occurring Insecticides*; Jacobsen, M.; Crosby, D. G. Eds.; Marcel Dekker Inc.: New York, 1971; p. 101.
- 3.1[4] Elliott, M.; Janes, N. F. *Chem. Soc. Rev.* 1978, 7, 473.
- 3.1[5] Nisha, G.; Kalyanasundaram, M. *Pestic. Sci.* 1992, 35, 21 and references cited therein.
- 3.1[6] Elliott, M.; Farnham, A. W.; Janes, N. F.; Johnson, D. W.; Pulman, D. A. *Pestic. Sci.* 1987, 18, 211.
- 3.1[7] Smitinand, T. *Thai Plant Names: Botanical Names-Vernacular Names*; Funny Publishing: Bangkok, 1980; p. 265.
- 3.1[8] วงศ์สถิตย จั่วกุล; พร้อมจิต ศรีลัมพ์; วิจิต เปานิล; รุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุล บรรณาธิการ. *สมุนไพรพื้นบ้านล้านนา. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล: กรุงเทพฯ, พ.ศ. 2539; หน้า 167.*
- 3.1[9] Burkill, I. H. *A Dictionary of the Economic Products of the Malay Peninsula*, Vol.II; Ministry of Agriculture and Co-operatives: Kuala Lumpur, 1966; p. 1766.
- 3.1[10] Kirtikar, K. R.; Basu, B. D. *Indian Medicinal Plants*, 2nd ed., Vol. III; Periodical Experts: Delhi, 1943.
- 3.1[11] Parmar, V. S.; Jain, S. C.; Bisht, K. S.; Jain, R.; Taneja, P.; Jha, A.; Tyagi, O. D.; Prasad, A. K.; Wengel, J.; Olsen, C. E.; Boll, P.M. *Phytochemistry* 1997, 46, 597 and references cited therein.
- 3.1[12] Sengupta, S.; Ray, A. B. *Fitoterapia* 1987, 58, 147.
- 3.1[13] Glasl, H.; Borup-Grochtmann, I.; Wagner, H. *Chem. Abstr.* 1976, 86, 78710.

- 3.1[14] Patra, A.; Ghosh, A. *Phytochemistry* 1974, **13**, 2889.
- 3.1[15] Atal, C. K.; Banga, S. S. *Indian J. Pharmacol.* 1962, **24**, 105 (*Chem. Abstr.* **59**, 15329).
- 3.1[16] Chatterjee, A.; Dutta, C. P. *Sci. Culture* 1963, **29**, 568 (*Chem. Abstr.* **62**, 16314).
- 3.1[17] Dutta, C. P.; Bannerjee, N.; Sil, A. K. *Indian J. Chem.* 1977, **15B**, 583.
- 3.1[18] Tunmann, O.; *Apotheker Zeitung* 1918, **33**, 353 (*Chem. Abstr.* **19**, 2940).
- 3.1[19] Kiuchi, F.; Nakamura, N.; Tsuda, Y.; Kaoru, K.; Yoshimura, H. *Chem. Pharmaceutic. Bull.* 1988, **36**, 2452.
- 3.1[20] Spring, F. S.; Stark, J. J. *Chem. Soc.* 1950, 1177.
- 3.1[21] Singh, J. Vasudevan, K.; Rai, R. S. *Indian J. Chem. Soc.* 1976, **53**, 1162.
- 3.1[22] Lee, E. B.; Shin, K. H.; Woo, W. S. *Arch. Pharmacol. Res.* 1984, **7**, 127.
- 3.1[23] Miyakado, M.; Nakayama, I.; Yoshioka, H.; Nakatani, N. *Agri. Biolog. Chem.* 1979, **43**, 1609.
- 3.1[24] Su, H. C. F.; Horvat, R. J. *Agri. Food Chem.* 1981, **29**, 115.
- 3.1[25] Shoji, N.; Umeyama, A.; Saito, N.; Takemoto, T.; Kajiwara, A.; Ohizumi, Y. *J. Pharmacol. Sci.* 1986, **75**, 118.
- 3.1[26] Baldwyn, T.; Ivan, A. M.; Lambert, M. *Insect Sci. Appl.* 1992, **13**, 705 (*Chem. Abstr.* **121**, 3248).
- 3.1[27] Orjala, J.; Wright, A. D.; Rali, T.; Sticher, O. *Nat. Prod. Lett.* 1993, **2**, 231.
- 3.1[28] Evans, P. H.; Bowers, W. S.; Funk, E. J.; Evangeline, J. J. *Agri. Food Chem.* 1984, **32**, 1254.
- 3.1[29] Orjala, J.; Erdelmeier, C. A. J.; Wright, A. D.; Rali, T.; Sticher, O. *Planta Med.* 1993, **59**, 546.
- 3.1[30] Koul, S. K.; Taneja, S. C.; Aggarwal, V. K.; Dhar, K. L. *Phytochemistry* 1988, **27**, 3523.
- 3.1[31] Dutta, C. P.; Banerjee, N.; Roy, D. N. *Phytochemistry* 1975, **14**, 2090.
- 3.1[32] Sumathykutty, M. A.; Rao, J. M. *Indian J. Chem.* 1988, **27B**, 388.
- 3.1[33] Kollmannsberger, H.; Nitz, S.; Drawert, F. *Chem. Abstr.* 1992, **118**, 123262.
- 3.1[34] Young, R. L.; Hylin, J. W.; Pluckrett, D. L.; Kawano, Y.; Nakayama, R. T.

- Phytochemistry* 1966, 5, 795.
- 3.1[35] Pelter, A.; Haensel, R. *Z. Naturforsch.* 1972, 27, 1186 (*Chem. Abstr.* 78, 40397).
- 3.1[36] Orjala, J.; Wright, A. D.; Erdelmeier, C. A. J.; Sticher, O.; Rali, T. *Helv. Chim. Acta* 1993, 76, 1481.
- 3.1[37] Orjala, J.; Wright, A.; Behrends, H.; Folkers, G.; Sticher, O. *J. Nat. Prod.* 1994, 57, 18.
- 3.1[38] Vieira, P. C.; DeAlvarenga, M. A.; Gottlieb, O. R.; Gottlieb, H. E. *Planta Med.* 1980, 39, 153.
- 3.1[39] Malhotra, S.; Koul, S. K.; Taneja, S. C.; Pushpangadan, P.; Dhar, K. L. *Phytochemistry* 1990, 29, 2773.
- 3.1[40] Burke, B.; Nair, M. *Phytochemistry* 1986, 25, 1427.
- 3.1[41] นันทวัน บุญยประภัศร; อรุณ โชคชัยเจริญพร *สมุนไพร ไม้พื้นบ้าน*(2), บริษัท ประชาชน จำกัด: กรุงเทพฯ, พ.ศ. 2541; หน้า 23 และเอกสารอ้างอิงในหัวข้อ ดีปลี.
- 3.1[42] วันดี กฤษณพันธ์ *สมุนไพรสารพัดประโยชน์*, พิมพ์ครั้งที่ 2; คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล: กรุงเทพฯ, พ.ศ. 2539; หน้า 120.
- 3.1[43] Areekul, S.; Sinchaisri, P.; Tigvatananon, S. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 1988, 22, 56.
- 3.1[44] จุฬามาศ ศตสุข; จันทร์ทิพย์ จันทร์ประเสริฐ; พิเชษฐ วิริยะจิตรา; ปรัชวา สุกุมล นันท์; วิเชียร เสงส์สวัสดิ์; สุชาติ อุปลัมภ์ *การประชุมทางวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 19*: สงขลา, 27-29 ตุลาคม 2536; หน้า 91.
- 3.1[45] Bose, P. K. *Sci. & Cult.* 1935, 1, 111.
- 3.1[46] Mishra, S. S.; Tewari, J. P. *J. Pharm. Sci.* 1964, 53, 1423.
- 3.1[47] Bhandari, S. P. S.; Babu, U. V.; Garg, H. S. (Late) *Phytochemistry* 1998, 47, 1435.
- 3.1[48] Gupta, O. P.; Atal, C. K.; Gaiind, K. N. *Indian J. Chem.* 1972, 10, 874.
- 3.1[49] Gupta, O. P.; Dhar, K. L.; Atal, C. K. 1976, 15, 425.
- 3.1[50] Gupta, O. P.; Gupta, S. C.; Dhar, K. L.; Atal, C. K. *Indian J. Chem.* 1976, 14B, 912.
- 3.1[51] Gupta, O. P.; Gupta, S. C.; Dhar, K. L.; Atal, C. K. *Phytochemistry* 1977, 16, 1436 and references cited therein.
- 3.1[52] Ahn, J. W.; Lee, C. O.; Kim, E. J.; Zee, O. P.; Kim, H. J. *Bulletin of the*

- Korean Chemical Society 1992, **13**, 388 (*Chem. Abstr.* **117**, 230116).
- 3.1[53] Ahn, J. W.; Ahn, M. J.; Zee, O. P.; Kim, E. J.; Lee, S. G.; Kim, H. J.; Kubo, I. *Phytochemistry* 1992, **31**, 3609.
- 3.1[54] Kikuzaki, H.; Kawabata, H.; Ishida, E.; Akazawa, Y.; Takei, Y.; Nakatani, N. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 1993, **57**, 1329.
- 3.1[55] Pande, A.; Shukla, Y. N.; Srivastava, R.; Verma, M. *Indian J. Chem.* 1997, **36B**, 377.
- 3.1[56] Banerji, A.; Bandyopadhyay, D.; Sarkar, M.; Siddhanta, A. K.; Pal, S. C.; Ghosh, S.; Abraham, K.; Shoolery, J. N. *Phytochemistry* 1985, **24**, 279.
- 3.1[57] Connolly, J. D.; Deans, R.; Haque, M. E. *Fitoterapia* 1995, **66**, 188 (*Chem. Abstr.* **123**, 193656h).
- 3.1[58] Price, S. J.; Pinder, A. R. *J. Org. Chem.* 1970, **35**, 2568.
- 3.1[59] Kijjoa, A.; Pinto, Madalena M. M.; Tantisewie, B.; Herz, W. *Planta Med.* 1989, **55**, 193.
- 3.1[60] Pouchert, C. J. *The Aldrich Library of FT-IR Spectra*; Aldrich Chemical Company, Inc.: U.S.A., 1985, **2**, 362C.
- 3.1[61] Pouchert, C. J.; Behnke, J. *The Aldrich Library of ^{13}C and ^1H FT NMR Spectra*, 3rd ed.; Aldrich Chemical Company, Inc.: U.S.A., 1993, **2**, 1379B.
- 3.1[62] Pouchert, C. J. *The Aldrich Library of FT-IR Spectra*; Aldrich Chemical Company, Inc.: U.S.A., 1985, **2**, 1048C.
- 3.1[63] Pouchert, C. J.; Behnke, J. *The Aldrich Library of ^{13}C and ^1H FT NMR Spectra*, 3rd ed.; Aldrich Chemical Company, Inc.: U.S.A., 1993, **3**, 569A.
- 3.1[64] Okogun, J. I.; Ekong, E. U. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* 1974, 2195.
- 3.1[65] Koul, S. K.; Taneja, S. C.; Agarwal, V. K.; Dhar, K. L. *Phytochemistry* 1988, **27**, 3523.
- 3.1[66] Tabuneng, W.; Bando, H.; Amiya, T. *Chem. Pharm. Bull.* 1983, **31**, 3562.
- 3.1[67] Pouchert, C. J. *The Aldrich Library of FT-IR Spectra*; Aldrich Chemical Company, Inc.: U.S.A., 1985, **2**, 139C.
- 3.1[68] Pouchert, C. J.; Behnke, J. *The Aldrich Library of ^{13}C and ^1H FT NMR Spectra*, 3rd ed.; Aldrich Chemical Company, Inc.: U.S.A., 1993, **2**, 985A.
- 3.1[69] Niamsa, N.; Chantrapromma, K. *Warasan Songkhla Nakkharin* 1983, **5**, 151 (*Chem Abstr.* **101**, 167142).

- 3.1[70] Pouchert, C. J. *The Aldrich Library of FT-IR Spectra*; Aldrich Chemical Company, Inc.: U.S.A., 1985, 2, 212C.
- 3.1[71] Pouchert, C. J.; Behnke, J. *The Aldrich Library of ^{13}C and ^1H FT NMR Spectra*, 3rd ed.; Aldrich Chemical Company, Inc.: U.S.A., 1993, 2, 1111A.
- 3.1[72] Grewe, R.; Frieist, W.; Neumann, H.; Kerten, S. *Chem. Ber.* 1970, **103**, 3752.
- 3.1[73] นันทวัน บุญประภัสร์; อรุณ โชคชัยเจริญพร *สมุนไพร ไม้พื้นบ้าน(1)*, บริษัทประชาชน จำกัด: กรุงเทพฯ, พ.ศ. 2539; หน้า 827 และเอกสารอ้างอิงในหัวข้อข้าวปลู
- 3.1[74] อำไพ เกตุสถิตย์ วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เคมี), มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2535.
- 3.1[75] Valyasevi, A.; Dhanamitta, S. *Am. J. Clin. Nutr.* 1974, **27**, 879 (*Chem. Abstr.* 82, 81472).
- 3.1[76] Masuda, T.; Inazumi, A.; Yamada, Y.; Padolina, W. G.; Kikuzaki, H.; Nakatani, N. *Phytochemistry* 1991, **30**, 3227.
- 3.1[77] Likhitwitayawuid, K.; Ruangrungs, N.; Lange, G. L.; Decicco, C. P. *Tetrahedron* 1987, **43**, 3689.
- 3.1[78] Likhitwitayawuid, K.; Ruangrungs, N.; Lange, G. L.; Decicco, C. P. *Journal of the Science Society of Thailand* 1988, **14**, 77 (*Chem. Abstr.* **109**, 226710).
- 3.1[79] Stohr, J. R.; Xiao, P. G.; Bauer, R. *Planta Med.* 1999, **66**, 175.
- 3.1[80] Pelter, A.; Ward, R. S.; Rao, E. V.; Sastry, K. V. *Tetrahedron* 1976, **32**, 2783.
- 3.1[81] Banerji, A.; Das, C. *Phytochemistry* 1989, **28**, 3039.
- 3.1[82] Koul, S. K.; Taneja, S. C.; Aggarwal, V. K.; Dhar, K. L. *Phytochemistry* 1988, **27**, 3523.
- 3.1[83] Pinto, B. M.; Grindley, T. B.; Sarek, W. A. *Magn. Reson. Chem.* 1986, **24**, 323.
- 3.1[84] Anjaneyulu, A. S. R.; Rao, A. M.; Rao, V. K.; Row, L. R.; Pelter, A.; Ward, R. S. *Tetrahedron* 1977, **33**, 133.
- 3.1[85] Singh, J.; Potdar, M. A.; Atal, C. K.; Dhar, K. L. *Phytochemistry* 1974, **13**, 677.

- 3.1[86] Achenbach, H.; Fietz, W.; Woerth, J.; Waibel, R.; Portecop, J. *Planta Med.* 1986, 12.
- 3.1[87] Loder, J. W.; Moorhouse, A.; Russell, G. B. *Aust. J. Chem.* 1969, 22, 1531.
- 3.1[88] Amatayakul, T.; Cannon, J. R.; Dampawan, P.; Dechatiwongse, T.; Giles, R. G. F.; Huntrakul, C.; Kusamran, K.; Mokkahasamit, M.; Raston, C. L.; Reutrakul, V.; White, A. H. *Aust. J. Chem.* 1979, 32, 71.
- 3.1[89] Joshi, B. S.; Viswanathan, N.; Gawad, D. H.; Balakrishnan, V.; Philipsborn, W. von *Helvetica Chimica Acta* 1975, 58, 2295.
- 3.1[90] Kumar, A.; Krupadanam, G. L. D.; Srimannarayana, G. *Indian J. Chem.* 1992, 31B, 784.
- 3.1[91] Desai, S. J.; Prabhu, B. R.; Mulchandani, N. B. *Phytochemistry* 1988, 27, 1511.
- 3.1[92] Fukuda, N.; Yonemitsu, M.; Kimura, T. *Chem. Pharm. Bull.* 1983, 31, 156.

โครงการย่อยกลุ่มที่ 3 : การหาสารควบคุมศัตรูพืชจากธรรมชาติ

โครงการวิจัยหน่วยที่ 2 : เชื้อคีโตเมียม โกลโบซัม (*Chaetomium globosum*)

บทนำ

1. คำนำ

การเพิ่มผลผลิตทางเกษตรกรรมยังคงเป็นปัญหาท้าทายให้ทุกฝ่ายหาทางปรับปรุง แก้ไข และพัฒนา เพื่อให้มีปริมาณเพียงพอกับจำนวนประชากรของโลกที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นทุกวัน ดังนั้น วิชาการด้านต่าง ๆ จึงมีบทบาทสำคัญในการบรรเทาปัญหานี้ เพื่อปรับสัดส่วนของประชากรและปริมาณอาหารให้มีความสมดุลกัน การหาสารจากธรรมชาติปราบศัตรูพืชก็เป็นวิชาการด้านหนึ่ง ที่นอกจากจะมีบทบาทในการรักษาผลผลิตแล้ว ยังมีความสำคัญในการรักษาสีสิ่งแวดล้อมด้วย

2. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปัจจุบันการใช้สารเคมีในด้านการเกษตร ในรูปของยาฆ่าแมลง ยาฆ่าเชื้อรา ตลอดจนยาปราบศัตรูพืชในรูปอื่น ๆ มีจำนวนเพิ่มขึ้นจนเป็นที่น่าวิตก เนื่องจากการใช้สารเคมีจำนวนมาก ขึ้นเรื่อย ๆ อันเป็นผลจากการดื้อยา นอกจากนี้ยังต้องเพิ่มความแรงของยาด้วย สิ่งเหล่านี้เป็นผลโดยตรงกับเกษตรกร และนับวันจะก่อให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์ในฐานะผู้บริโภคและยังมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ดังจะเห็นได้จากรายงานสารพิษจากยากำจัดศัตรูพืชที่ตกค้างในดิน และแม่น้ำลำคลองในปริมาณเพิ่มขึ้นทุกปี ดังนั้นการหาวิธีเพิ่มผลผลิตทางด้านการเกษตรกรรม โดยลดการใช้สารเคมีสังเคราะห์ที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน จึงเป็นเรื่องที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เช่น การใช้สารจากธรรมชาติควบคุมศัตรูพืช สารธรรมชาติเหล่านี้ได้จากพืช รา และจุลินทรีย์ เป็นต้น มีรายงานการใช้ราบางชนิดสำหรับยับยั้งการเจริญของราที่เป็นสาเหตุโรคพืชบางชนิดอย่างได้ผล เช่น เชื้อราสกุล *Chaetomium* มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (สาเหตุของโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ) และ *Sclerotium rolfsii* (สาเหตุของโรคลำต้นเหี่ยวของข้าวโพด) เป็นต้น มีรายงานการแยกองค์ประกอบทางเคมีของราสกุล *Chaetomium* สายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่าได้สารที่น่าสนใจหลายชนิด สำหรับกลไกการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชของราเหล่านี้ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่แนวทางหนึ่งเชื่อว่าราสร้างสารไมโคทอกซิน (mycotoxin) ซึ่งมีพิษต่อราที่เป็นสาเหตุโรคพืช ฉะนั้นการศึกษาเพื่อแยกองค์ประกอบทางเคมีของราที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืช เพื่อนำไปทดสอบสมบัติดังกล่าวจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจอย่างยิ่ง สำหรับราสกุล *Chaetomium* จัดเป็นราที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ เป็นราที่เจริญบนเศษซากพืชและสัตว์ที่เน่าเปื่อยผุพัง ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ สัตว์ และพืช ชนิดที่พบว่ามีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อราโรคพืช ได้แก่ *Chaetomium cupreum* และ *C. globosum* สำหรับที่นี้จะศึกษารายละเอียดซึ่ง ดร. เกษม สร้อยทอง^{3,2[1]} แยกได้จากดินของประเทศไทย และให้ชื่อว่า *Chaetomium*

globosum KMIT-N 0802 และได้ทำการทดสอบสมบัติการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิดพบว่าให้ผลที่ดี กลุ่มของเราจึงได้สนใจและแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัด EtOAc และส่วนสกัด hexane จากเชื้อรา *C. globosum* KMIT-N 0802 ซึ่งจากการศึกษาขั้นต้นพบสาร triglyceride [3.2(1)] ergosterol [3.2(2)] และ chaetoglobosin C [3.2(3)] ซึ่งสารชนิดหลังนี้แสดงค่า ED₅₀ ในการยับยั้งการสร้างโคโลนีและสปอร์ของเชื้อรา *Phytophthora parasitica* สาเหตุของโรครากเน่าในส้มโชกุนเท่ากับ 370 และ 196 ppm ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 500 ppm สามารถยับยั้งเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงได้ 100 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบสารอนุพันธ์ของ chaetoglobosin อีก 1-2 สาร และสารอื่นที่น่าสนใจอีกหลายสารที่ยังไม่ได้แยกเป็นสารบริสุทธิ์ เนื่องจากสารเหล่านี้มีปริมาณไม่มากพอ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงต้องดำเนินการต่อเพื่อสกัดแยกสารดังกล่าวให้มีปริมาณมากขึ้นและทำให้บริสุทธิ์ก่อนนำไปหาสูตรโครงสร้างและนำไปทดสอบเพื่อหาสารองค์ประกอบที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพจากราชนิดนี้ ซึ่งเป็นงานวิจัยที่น่าจะเป็นประโยชน์ในแง่ที่จะนำไปใช้ในการเกษตรต่อไป

3. วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. แยกองค์ประกอบทางเคมีจากรา *C. globosum* KMIT-N 0802
2. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้กับเชื้อก่อโรคพืชและโรคมนุษย์บางชนิด

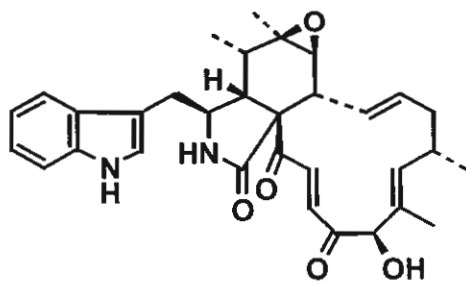
4. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มีรายงานการใช้รา *C. globosum* ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุของโรคพืชชนิดต่าง ๆ อย่างได้ผลทั้งในห้องปฏิบัติการและในแปลงทดลองได้แก่ การศึกษาของ Kommedahl และ Chang^{3.2[2]} ที่ใช้ในการควบคุมเชื้อ *Fusarium roseum* สาเหตุโรคต้นกล้าไหม้ของข้าวโพด Heye และ Andrews^{3.2[3]} ใช้ควบคุมเชื้อ *Venturia inaequalis* สาเหตุโรคแอปเปิลสแคป Soyong และ Quimio^{3.2[4]} ใช้ควบคุมเชื้อ *Pyricularia oryzae* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคใบไหม้ของข้าว นอกจากนี้ยังมีรายงานอีกหลายฉบับโดย Soyong และคณะ^{3.2[1,5,6,7]} ในการใช้รา *C. globosum* ที่แยกได้จากดินในประเทศไทยใช้ควบคุมโรคพืชชนิดต่าง ๆ

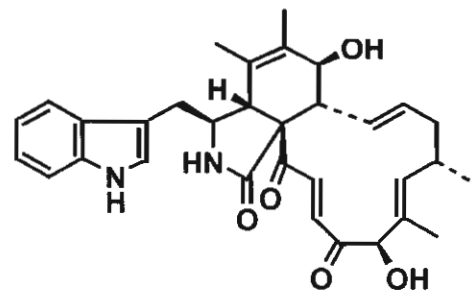
มีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของราสกุล *Chaetomium* ที่เลี้ยงในรำข้าวพบว่ากว่า 40 สปีชีส์ สร้างสารพิษ (mycotoxins)^{3.2[8,9]} เช่น *C. globosum* สร้างสารพิษ chaetoglobosin ส่วนสารพิษอื่น ๆ ที่พบในราสกุล *C. globosum* แสดงในตารางที่ 3.2(1) และรูปที่ 3.2(1) สำหรับสารเคมีอื่นที่พบได้แก่ในรายงานของ Natori^{3.2[10]} พบสารประกอบ azapilones คือ chaetoviridin A-D จาก *C. globosum* var. flavo-viridae Abraham และคณะ^{3.2[11]} ได้แยกสารประกอบอนุพันธ์ของ tetrahydrofurans คือ aureonitol และสารประเภท spiroketal จาก *C. cochlioides* สำหรับกลุ่มของเรา^{3.2[12]} ได้ศึกษาและแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเอทิลอะซิเตตของรา *C. globosum* KMIT-N 0820 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว PDB (Potato dextrose broth) พบสาร triglyceride [3.2(1)] ergosterol [3.2(2)] และ chaetoglobosin C [3.2(3)]

ตารางที่ 3.2(1) ตัวอย่างของไมโคทอกซินในราสกุล *Chaetomium*

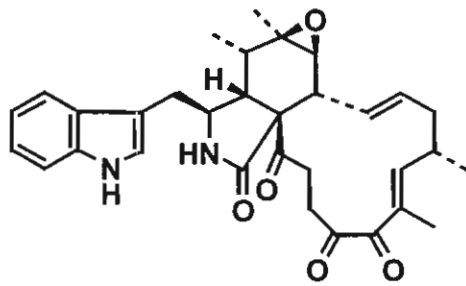
Species	Mycotoxin
<i>C. globosum</i>	Chaetoglobosins A-J
<i>C. mollipilium</i> (QM1007)	Chaetoglobosins A-E
<i>C. rectum</i> (CBS164.62)	Chaetoglobosins A-E
<i>C. subaffine</i> (IF08361)	Chaetoglobosins A-C
<i>C. subaffine</i> (IFM4490)	Chaetoglobosins A, B, C, E
<i>C. farrowia</i> sp. (NHL2783)	Sterigmatocystin
<i>C. thielavioideum</i> (NHL2876)	Sterigmatocystin
	O-Methylsterigmatocystin
	Chaetocin
	Chaetochromin
<i>C. sp.</i> (NHL2829)(soil Thailand)	Chaetocin
	Sterigmatocystin
	O-Methylsterigmatocystin
	Phenolic compound
<i>C. udagawae</i> (NHL2868)	Sterigmatocystin
<i>C. caprium</i> NHL(78-D-56-B)	Chaetochromin
(TRTC 66.1440 b)	Chaetochromin
NHL(73-S-T-Y-3)	Chaetochromin
NHL(78-9-91)	Chaetochromin
<i>C. elatom</i> (NHL77-SP-8)	Cochliodinol (VI)
<i>C. murorum</i> (NHL78-SH-271-4)	Isocochliodinol
and NHL 2246	Neocochliodinol
<i>C. amygdalisporum</i> (NHL 2874)	Molocellin G



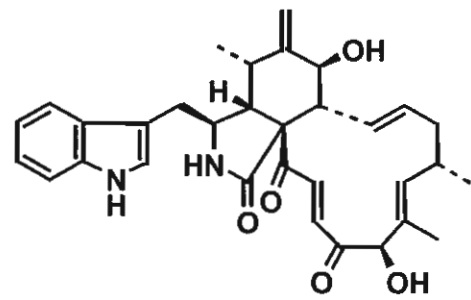
Chaetoglobosin A



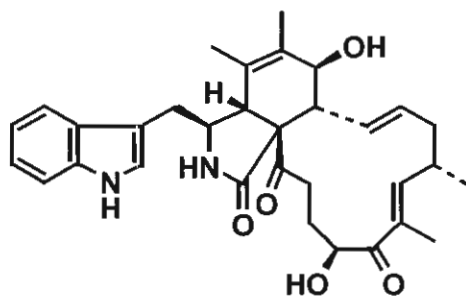
Chaetoglobosin B



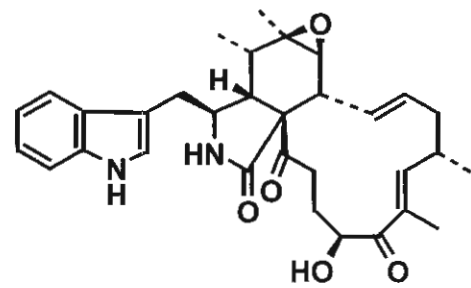
Chaetoglobosin C



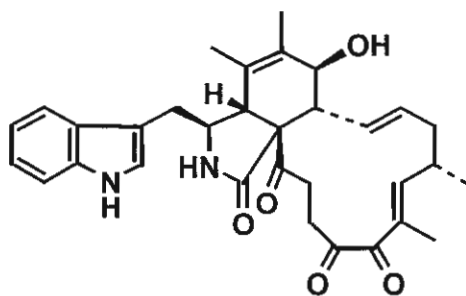
Chaetoglobosin D



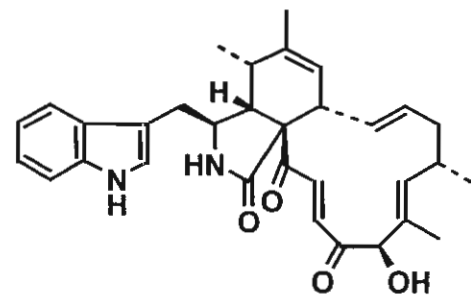
Chaetoglobosin E



Chaetoglobosin F

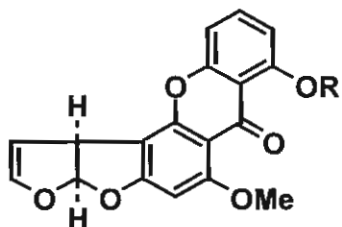


Chaetoglobosin G



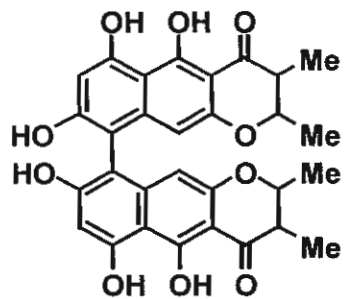
Chaetoglobosin J

รูปที่ 3.2(1) ตัวอย่างโครงสร้างของสารไมโคโทกซินที่พบในราสกุล *Chaetomium*

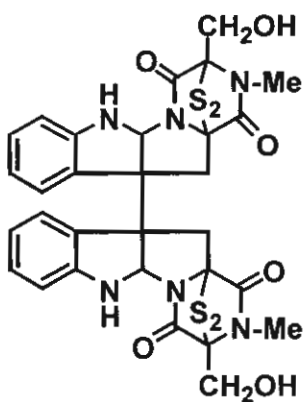


R = H Sterigmatocystin

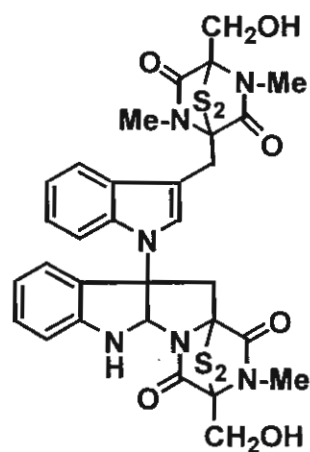
R = Me o-Methylsterigmatocystin



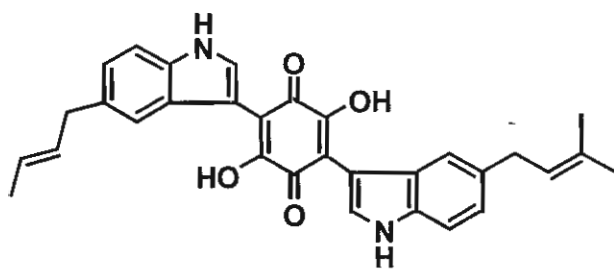
Chaetochromin



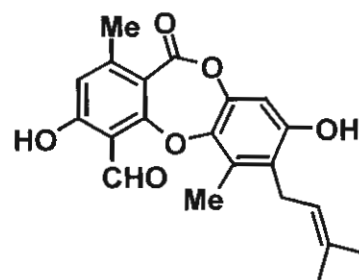
Chaetocin



Chaetomin

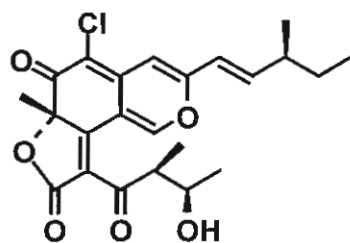


Cochliodinol

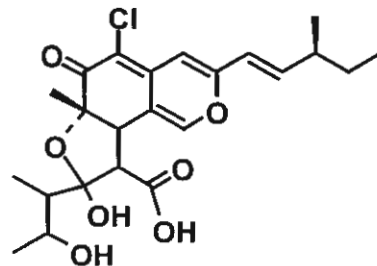


Mollicellin G

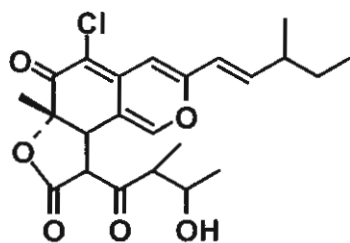
รูปที่ 3.2(1) ตัวอย่างโครงสร้างของสารไมโคทอกซินที่พบในราสกุล *Chaetomium* (ต่อ)



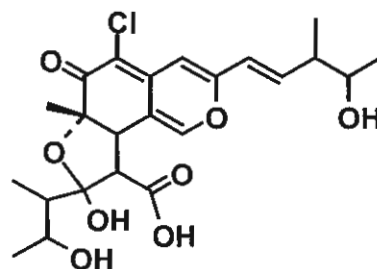
Chaetoviridin A



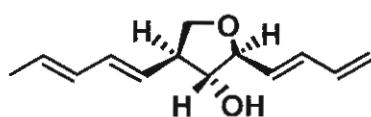
Chaetoviridin B



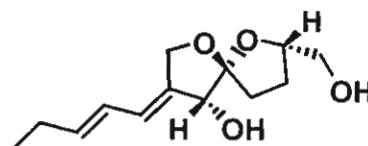
Chaetoviridin C



Chaetoviridin D



Aureonitol



Spiroketal

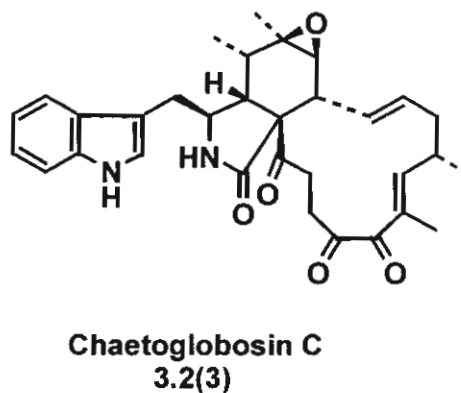
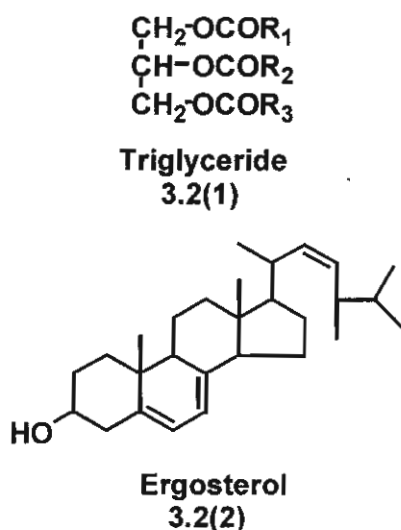
รูปที่ 3.2(1) ตัวอย่างโครงสร้างของสารไมโคโทกซินที่พบในราสกุล *Chaetomium* (ต่อ)

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. เชื้อรา *Chaetomium globosum* KMIT-N 0802

1) การหาส่วนประกอบทางเคมี

จากการแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเอทิลอะซิเตตจากเชื้อรา *C. globosum* KMIT-N 0802 ในเบื้องต้นพบ triglyceride [3.2(1)] ergosterol [3.2(2)] และ chaetoglobosin C [3.2(3)] ดังได้กล่าวมาแล้ว^{3,2[12]} สำหรับงานวิจัยนี้จะปรับปรุงวิธีแยกเพื่อให้ได้สารในปริมาณมากขึ้น และแยกสารอื่นๆที่ยังแยกไม่ได้ เพื่อทำการพิสูจน์โครงสร้างของสารเหล่านั้นต่อไป



(1) การสกัดและการแยก

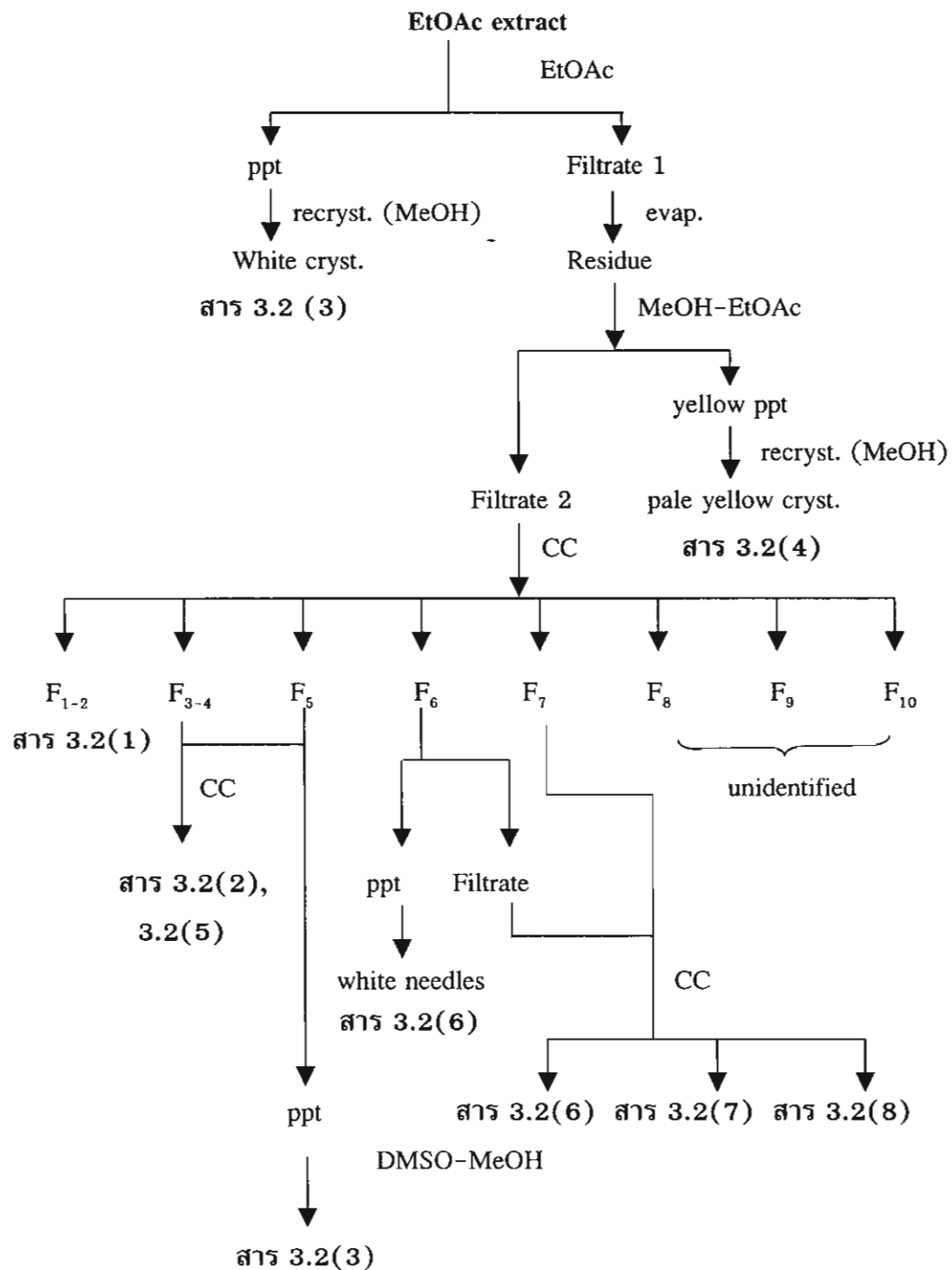
จากการสกัดเส้นใยแห้งของรา *C. globosum* 562 กรัม ซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลว (PDB) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ได้สารสกัด *n*-hexane (*n*-Hexane extract) หนัก 27 กรัม (4.8%) สารสกัด EtOAc (EtOAc extract) หนัก 47.9 กรัม (8.52%) และสารสกัด MeOH (MeOH extract) หลังการแยกน้ำตาลออกหนัก 11.5 กรัม (2.05%)

(ก) EtOAc extract

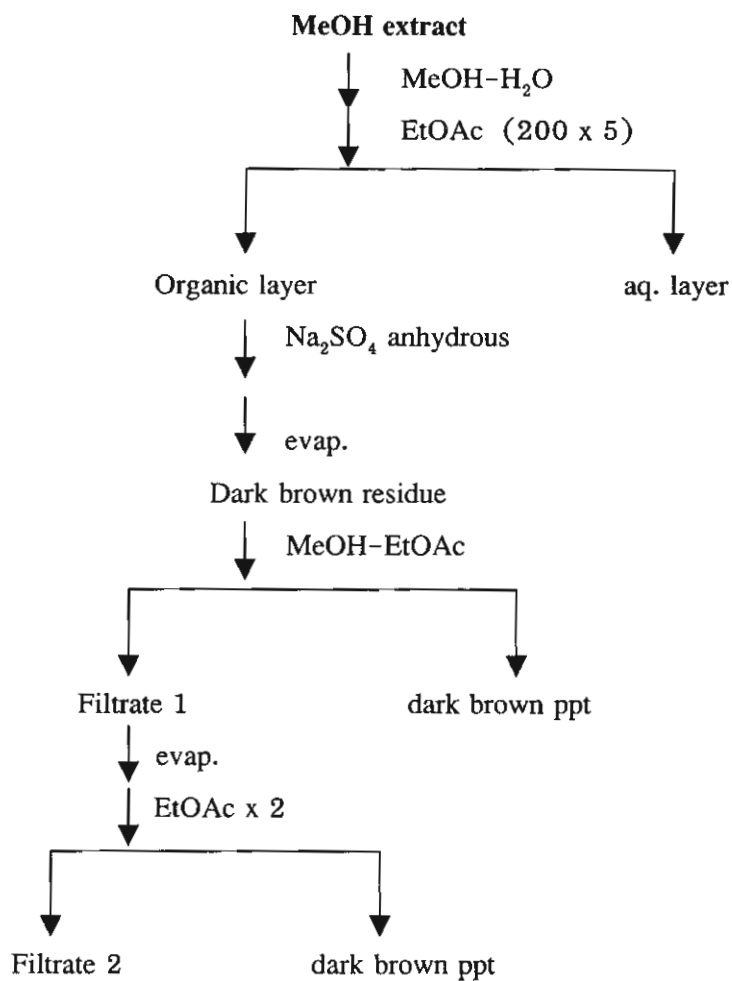
จากการแยก EtOAc extract โดยวิธีที่ผ่านมาซึ่งใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี พบว่าต้องทำการแยกซ้ำหลายครั้งจึงจะได้ chaetoglobosin C [3.2(3)] และกลุ่มของ chaetoglobosin ในปริมาณไม่มากนัก จึงได้ปรับปรุงวิธีการแยกโดยใช้การตกตะกอนแยกสาร โดยมีขั้นตอนแสดงดังแผนภาพที่ 3.2(1)

(ข) MeOH extract

ในส่วนสกัด MeOH extract จะประกอบด้วยน้ำตาล dextrose ซึ่งติดมากับเส้นใย เนื่องจากเป็นส่วนผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อ ขณะเดียวกันสารที่มีขั้วสูง ๆ (polar compounds) ก็จะถูกสกัดมาด้วย จึงสกัดได้แผนภาพที่ 3.2(2)



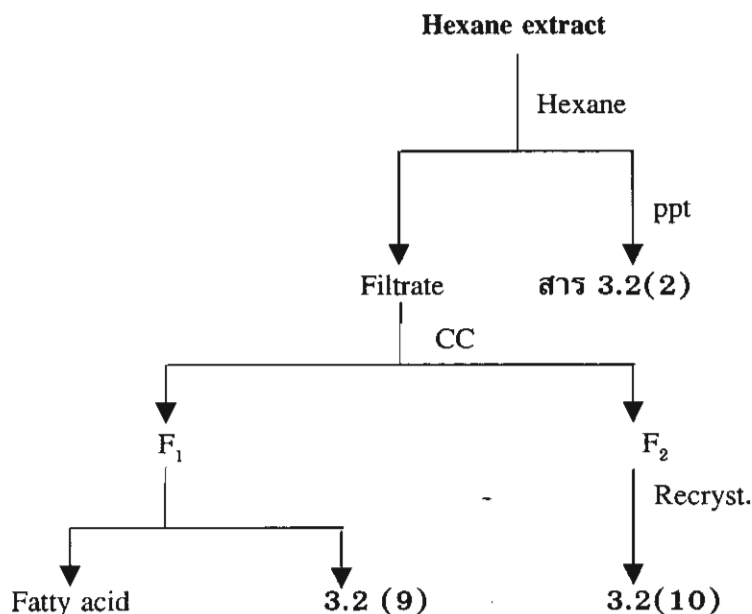
แผนภาพที่ 3.2(1) แสดงการแยก EtOAc extract



แผนภาพที่ 3.2(2) แสดงการแยก MeOH extract

(ค) Hexane extract

จากการแยก hexane extract โดยการตกตะกอนทำให้แยกสาร 3.2(2) ออกมาก่อน นำ ส่วนของสารละลายไปแยกแบบหยาบๆ ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีได้ 12 fractions (F₁-F₁₂) ในส่วนของ F₁ นำไปตกผลึก ได้ผลึกสีขาวของสาร 3.2(9) และเมื่อนำ F₂ ไปแยกด้วยคอลัมน์ โครมาโทกราฟี ได้ผลึกสีส้มของสาร 3.2(10) ดังแสดงตามแผนภาพที่ 3.2(3)



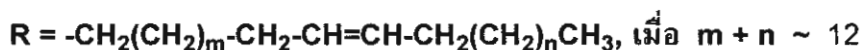
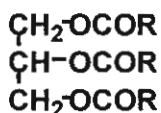
แผนภาพที่ 3.2(3) แสดงการแยก Hexane extract

(2) การวิเคราะห์สูตรโครงสร้าง

สาร 3.2(1) ได้จากการแยก EtOAc extract และ MeOH extract โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีได้สารเป็นของเหลวชั้น น้หนัก 12.6 กรัม (2.24%) $R_f = 0.62$ (10% EtOAc:Hexane) จาก IR สเปกตรัม แสดงค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 2920 และ 2853 cm^{-1} เป็นลักษณะของ C-H ยืด (C-H stretching) ที่ 1759 และ 1732 cm^{-1} เป็นเอกลักษณ์ เฉพาะของ C=O ยืดของ ester ที่ 1446 cm^{-1} เป็น C-H งอ และที่ 1163 cm^{-1} เป็น C-O ยืด จาก $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัม แสดงค่า chemical shift ที่ $5.38\text{--}5.31\text{ ppm}$ เป็น multiplet จำนวน 6 โปรตอน ของ olefinic โปรตอน ซึ่งไม่สามารถระบุได้ว่าเป็น cis หรือ trans ที่ 5.25 ppm เป็น doublet of quintet จำนวน 1 โปรตอน ของ CH-O ที่ 4.28 และ 4.13 ppm เป็น doublet of doublet (AB) จำนวน 4 โปรตอน ซึ่งมีค่า J เป็น $12.0, 4.2\text{ Hz}$ และ $12.0, 6.2\text{ Hz}$ คาดว่าเป็นโปรตอนของหมู่ $\text{-O-CH}_2\text{-CH(O)-CH}_2\text{-O-}$ ของหมู่เอสเตอร์โดยมีโปรตอนของ $2\text{(-CH}_2\text{-)}$ สมมาตรกัน และโดยที่โปรตอนของ $\text{-CH}_2\text{-}$ นี้เป็น geminal โปรตอนที่ไม่สมมาตรจึงเกิด coupling กันเป็น AB quartet (ชุดละ 2 โปรตอน) มีค่า $J = 12.0\text{ Hz}$ ขณะเดียวกันโปรตอนของ $2\text{(-CH}_2\text{-)}$ แต่ละชุดเกิดการ coupling กับ -CH(O)- เป็น doublet โดยมีค่า J ไม่เท่ากันคือ 4.2 และ 6.0 Hz ที่ 2.30 ppm เป็น triplet มีค่า $J = 7.5\text{ Hz}$ จำนวน 2 โปรตอน คาดว่าเป็นหมู่เมทิลีนที่ต่ออยู่กับหมู่คาร์บอนิล $\text{CH}_2\text{-C=O}$ และที่ 2.29 ppm มีค่า $J = 7.5\text{ Hz}$ จำนวน 4 โปรตอน คาดว่าเป็นหมู่เมทิลีนที่ต่ออยู่กับหมู่คาร์บอนิล $\text{CH}_2\text{-C=O}$ ซึ่งเมทิลีนทั้งสองหมู่ปรากฏที่เดียวกัน ที่ 1.99 และ 1.59 ppm เป็น multiplet จำนวน 12 โปรตอน คาดว่าเป็นหมู่เมทิลีนที่ด้านหนึ่งต่ออยู่กับอัลคีนและอีกด้าน

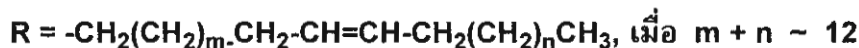
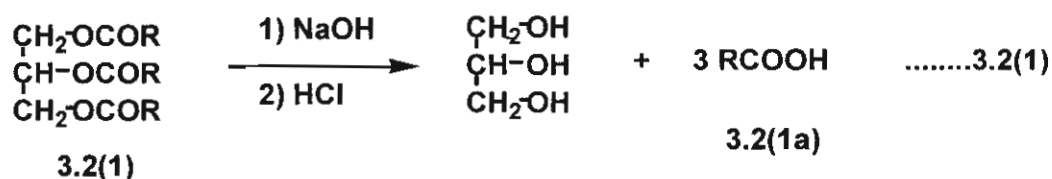
ต่อกับสายโซ่อัลเคน $3(-\text{CH}_2-\text{HC}=\text{CH}-\text{CH}_2-)$ ที่ 1.29-1.25 ppm ปรากฏเป็น broad singlet จำนวน 72 โปรตอน จัดให้เป็น $3(-\text{CH}_2-)_{12}$ ของสายโซ่อัลเคน และที่ 0.87 ppm เป็น triplet มีค่า $J = 6.6$ Hz จำนวน 9 โปรตอนจัดเป็นหมู่เมทิลที่อยู่ปลายโซ่อัลเคน $3(-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3)$

จาก ^{13}C -NMR สเปกตรัม แสดงสัญญาณที่ 173.3 และ 172.8 ppm จัดให้เป็นหมู่คาร์บอนิลของเอสเทอร์ 3 หมู่ ($2\text{CO}_2-\text{CH}_2$ และ $-\text{CO}_2-\text{CH}-$) ที่ 129.6 และ 129.3 ppm จัดให้เป็นคาร์บอนของอัลคีน ที่ 68.8 และ 62.0 ppm จัดให้เป็นคาร์บอนที่ติดกับออกซิเจนของเอสเทอร์ (CO_2-CH และ $2\text{CO}_2-\text{CH}_2-$) 3 หมู่ สำหรับสัญญาณที่เหลือระหว่าง 34.1-22.6 ppm เป็นสายโซ่ของหมู่เมทิลีน ($(-\text{CH}_2)_{m+n}-$) และที่ 14.0 เป็นหมู่เมทิลที่ปลายสายโซ่ เมื่อประมวลข้อมูลจาก IR และ ^1H , ^{13}C -NMR คาดว่าสาร 3.2(1) น่าจะมีสูตรโมเลกุลเป็น $\text{C}_{60}\text{H}_{110}\text{O}_6$ ซึ่งเป็นสารประกอบประเภท glyceride ที่มีสายโซ่ ($-\text{R}$) ที่เหมือนกันดังโครงสร้างข้างล่างนี้



Triglyceride 3.2(1)

เพื่อเป็นการยืนยันว่าสาร 3.2(1) เป็น triglyceride โดยมีสายโซ่ ($-\text{R}$) ที่เหมือนกัน จึงทำปฏิกิริยา saponification ใน NaOH แล้ว acidified ด้วยกรด ดังสมการ ที่ 3.2(1) แยกผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี และตกผลึกด้วยเอทานอล ได้ สาร 3.2(1a) เป็นของแข็งสีขาว mp 39-42 °C



จากข้อมูล IR สเปกตรัมของสาร 3.2(1a) แสดงค่าการดูดกลืนกว้างและอ่อน (br, weak) ของกรดคาร์บอกซิลิก ที่ 3249 cm^{-1} และหมู่คาร์บอนิล ($\text{C}=\text{O}$) ที่ 1713 cm^{-1}

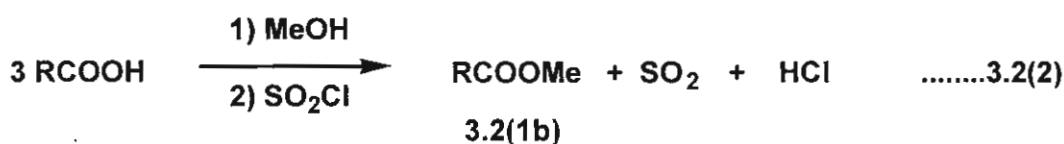
จาก ^1H -NMR สเปกตรัมของสาร 3.2(1a) แสดงสัญญาณคล้ายกับสาร 3.2(1) เพียงแต่โปรตอนลดลง 3 เท่า

^{13}C -NMR สเปกตรัมของสาร 3.2(1a) แสดงค่า chemical shift ที่ 180.38 ppm ซึ่งเป็นคาร์บอนของหมู่คาร์บอกซี ($-\text{COOH}$) ที่ 130.01 และ 129.72 ppm เป็นเอกลักษณ์ของ

คาร์บอนที่เป็นอัลคีน (C=C) จาก ^{13}C -NMR สเปกตรัมโดยเทคนิค DEPT 135 พบว่าในโครงสร้างของสาร 3.2(1a) มีหมู่ $-\text{CH}_3$ 1 หมู่ $-\text{CH}-$ 2 หมู่ และคาร์บอนที่ไม่มีไฮโดรเจน 1 คาร์บอน นอกนั้นเป็นหมู่ $-\text{CH}_2-$ ซึ่งซ้อนกันอยู่ จากจำนวนโปรตอนใน ^1H -NMR สเปกตรัม คาดว่าน่าจะมีหมู่ $-\text{CH}_2-$ ประมาณ 15 หมู่

จากข้อมูลของ IR และ NMR สเปกตรัม สามารถบอกข้อมูลว่าโครงสร้างของสาร 3.2 (1a) เป็นกรดไขมันสายโซ่ยาว และน่าจะมีสูตรโมเลกุลเป็น $\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{O}_2$

เพื่อยืนยันว่าสาร 3.2(1a) เป็นกรดไขมัน จึงได้เตรียมอนุพันธ์เป็นเมทิลเอสเทอร์ (methyl ester) ให้ชื่อว่าสาร 3.2(1b) ดังสมการที่ 3.2(2) เป็นของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน (R_f = 0.72, 10% EtOAc:Hexane)



จาก IR สเปกตรัมของสาร 3.2(1b) แสดงค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 1746 cm^{-1} ซึ่งเป็นเอกลักษณ์ของหมู่คาร์บอนิลของเอสเทอร์ จึงยืนยันได้ว่า สาร 3.2(1a) เป็นกรดคาร์บอกซิลิก

นอกจากนี้ข้อมูลของ ^1H -NMR ปรากฏสัญญาณโปรตอนของหมู่ $-\text{OCH}_3$ ของเอสเทอร์ ที่ 3.65 ppm และ ^{13}C -NMR พบสัญญาณที่ 172.23 และ 49.33 ppm ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของหมู่เอสเทอร์ ($-\text{CO}_2\text{CH}_3$)

สาร 3.2(4) ได้จากการตกตะกอน EtOAc extract ด้วย MeOH-EtOAc และตกผลึกซ้ำ ด้วย MeOH ได้ผลึกสีเหลืองอ่อน 0.147(0.026%) จากข้อมูล IR สเปกตรัม พบ C=C-H stretching ที่ 3200 cm^{-1} C-H stretching ที่ 2860 cm^{-1} สำหรับที่ 1780 cm^{-1} คาดว่าเป็น C=O stretching ของวงแล็กโตน และที่ 1745 cm^{-1} คาดว่าเป็น C=O stretching ของเอสเทอร์ นอกจากนี้ยังพบค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 1680 cm^{-1} (ความเข้มของสัญญาณปานกลาง) และที่ 1640, 1620, 1600 และ 1560 cm^{-1} ซึ่งมีความเข้มสูง คาดว่าเป็นเอกลักษณ์ของ C=C, C-N และ C=N จากข้อมูลของ IR สเปกตรัมพบว่าสาร 3.2(4) นี้ไม่ใช่กลุ่มสาร chaetoglobosin

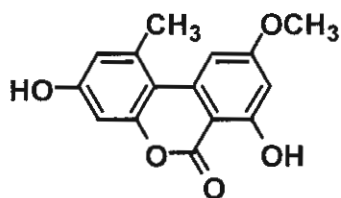
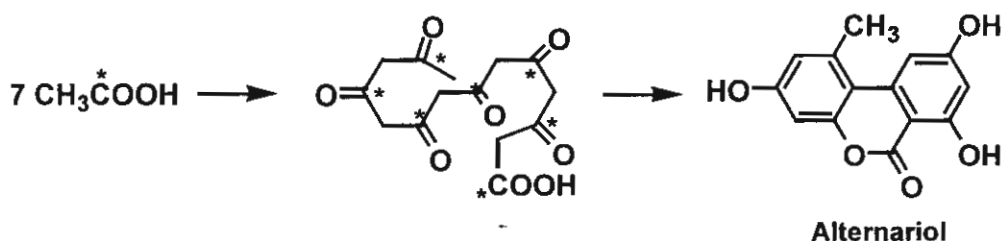
สาร 3.2(5) ได้จากการแยก Filtrate 2 โดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และนำ F_3 , F_4 และ F_5 ไปแยกด้วยคอลัมน์อีก 2 ครั้ง ได้ตะกอนสีน้ำตาลเหลือง ตกผลึกด้วย DMSO-MeOH ได้ผลึก รูปเข็มหนัก 0.064 กรัม (0.01%)

จากข้อมูล IR สเปกตรัมแสดงค่าการดูดกลืนคลื่นแสงในช่วง $3400\text{--}3240 \text{ cm}^{-1}$ ซึ่งค่อนข้าง sharp คาดว่าเป็นหมู่ $-\text{OH}$ หรือ N-H stretching ที่ 3080 cm^{-1} เป็น C-H stretching ของ

aromatic ที่ 2980 cm^{-1} เป็น C-H stretching ของหมู่ alkane ที่ 1660 เป็นสัญญาณเข้มคาดว่า เป็นหมู่ C=O stretching ของ amide หรือ carbonyl ที่ conjugate หรือ chelate ที่ 1610 และ 1590 cm^{-1} เป็น C=C stretching ของ aromatic จาก $^1\text{H-NMR}$ แสดงสัญญาณ singlet อ่อน และกว้าง (broad) ที่ δ 11.58 คาดว่าเป็นหมู่ OH ของ phenol ซึ่ง chelate กับหมู่ carbonyl สัญญาณของ 4 aromatic โปรตอนซึ่งเป็น doublet ที่ δ 7.22, 6.73 ($J=2.17\text{ Hz}$), 6.65 ($J=2.17\text{ Hz}$) และ 6.62 ($J=1.86\text{ Hz}$) แสดงถึงตำแหน่งของโปรตอนบนวงแหวน aromatic ที่ อยู่ตำแหน่ง meta ซึ่งกันและกัน นอกจากนี้ยังปรากฏสัญญาณที่ δ 3.90 เป็นของหมู่ $-\text{OCH}_3$ ที่ คาดว่าต่อกับวงแหวน aromatic และ δ 2.75 เป็นหมู่ $-\text{CH}_3$ ที่คาดว่าอยู่บนวงแหวน aromatic

จากข้อมูล $^{13}\text{C-NMR}$ และ DEPT มีหมู่ $-\text{CH}_3$ ปรากฏที่ δ 25.9 หมู่ $-\text{OCH}_3$ ปรากฏที่ δ 56.7 สัญญาณที่ 167.0, 165.6 และ 165.0 คาดว่าเป็นของหมู่ C=O และ aromatic carbon ที่ต่อกับอะตอมของออกซิเจน เช่น $-\text{OH}$, $-\text{OCH}_3$

เมื่อนำข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีประกอบกับข้อมูลของแมสสเปกตรัมซึ่งมีมวลโมเลกุล เป็น 272 $[\text{M}]^+$ สามารถกำหนดสูตรโมเลกุลของสาร 3.2(5) ได้เป็น $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$ และมีโครงสร้าง ตรงกับสาร alternariol monomethyl ether ซึ่งเป็อนุพันธ์ของ alternariol สำหรับ alternariol พบในรา *Alternaria tenuis* และมีผู้รายงานการพิสูจน์ชีวสังเคราะห์แล้วว่าผ่าน polyketide pathway^{3,2[13, 14]}



Alternariol monomethyl ether 3.2(5)

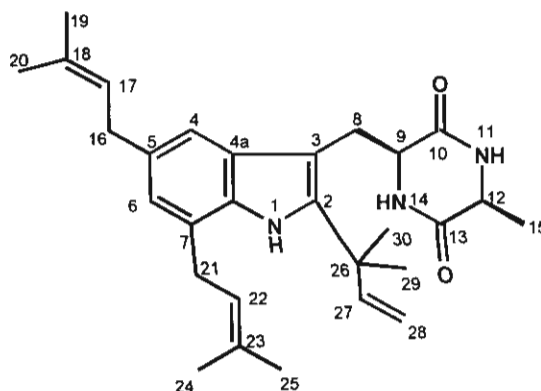
สาร 3.2(6) ได้จากการแยก filtrate 2 โดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และได้จากการกอง ของแข็งจาก F_6 และตกผลึกได้ผลึกรูปเข็มสีขาว 0.028 กรัม และจากส่วนของ filtrate ผสมกับ F_7 และนำไปแยกโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีอีก 0.0084 กรัม รวมเป็น 0.0364 กรัม (0.006%) จากข้อมูล IR สเปกตรัมแสดงค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 3460 และ 3200 cm^{-1} คาด

ว่าเป็น N-H stretching ของ 2^o amine และ amide ที่ 3055 cm⁻¹ จัดให้เป็น C-H stretching ของ aromatic ring ที่ 2970 และ 2945 cm⁻¹ คาดว่าเป็น C-H stretching ของ CH₂ และ CH₃ ที่ 1670 cm⁻¹ เป็นสัญญาณเข้มมาก คาดว่าเป็น C=O stretching ของกลุ่ม amide ที่ 1470 และ 1340 cm⁻¹ คาดว่าเป็น C-H bending ของหมู่ CH₂ และ CH₃ สัญญาณอื่นๆค่อนข้างอ่อน

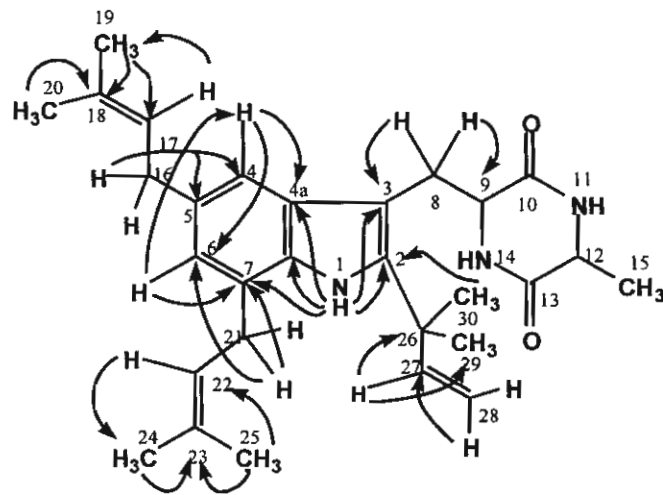
¹H-NMR สเปกตรัม (ตารางที่ 3.2(2)) แสดงสัญญาณที่ low field คือ δ 9.68 และ 8.16 คาดว่าเป็นของหมู่ N-H สัญญาณที่ δ 7.05 และ 6.65 ซึ่งเป็น singlet สัญญาณละ 1 โปรตอน จัดให้เป็นโปรตอนของ aromatic นอกจากนี้ยังพบสัญญาณของ isopentene อีก 3 กลุ่ม

จากข้อมูล ¹³C-NMR (ตารางที่ 3.2(2)) และ DEPT เทคนิคสามารถกำหนดจำนวนของ C และ H ได้เป็น C₂₉H₃₉ และจากแมสสเปกตรัมซึ่งแสดงค่ามวลโมเลกุล [M]⁺ เป็น 461 ได้สูตรโมเลกุลเป็น C₂₉H₃₉N₃O₂ เมื่อพิจารณาพร้อมกับเทคนิคอื่นๆ คือ HMQC HMBC (รูปที่ 3.2(2)) และ NOESY (รูปที่ 3.2(3)) พบว่า สาร 3.2(6) คือ echinulin ซึ่งเคยมีผู้รายงานแล้ว^{3,2[15]} ดังนั้นจึงเป็นการพบสารนี้ครั้งแรกในราสกุล chaetomium และเนื่องจากยังไม่มีกรายงานข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี จึงได้เสนอผลการวิเคราะห์โครงสร้างของสารนี้อย่างละเอียดเพื่อใช้เป็นบรรทัดฐานในการวิเคราะห์โครงสร้างของสารในกลุ่มนี้ต่อไป

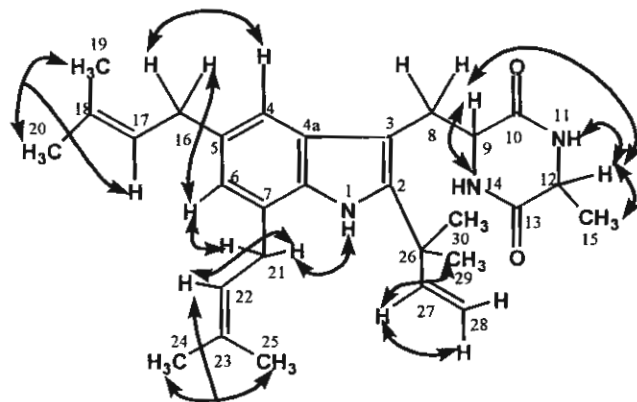
นอกจากนี้ยังพบว่าสาร 3.2(6) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อวัณโรค ที่ค่า MIC=100 µg/ml และต่อเซลล์มะเร็งชนิด BC ที่ ED₅₀=8.7 µg/ml



Echinulin 3.2(6)



รูปที่ 3.2(2) ความสัมพันธ์ระหว่าง H กับ C ของสาร 3.2(6) จากเทคนิค HMBC



รูปที่ 3.2(3) ความสัมพันธ์ระหว่าง H กับ H ของสาร 3.2(6) จากเทคนิค NOESY

ตารางที่ 3.2(2) ค่า chemical shift ของ ^1H และ ^{13}C -NMR ของสาร 3.2(6)

No	δ_{H}	δ_{C}
1	9.68 <i>s</i>	–
2	–	142.3
3	–	130.1
4	7.05 <i>s</i>	115.5*
4a	–	132.5
5	–	124.4
6	6.65 <i>s</i>	121.9
7	–	130.0
7a	–	105.9
8	3.34 <i>d</i> (9.60), 3.02 <i>dd</i> (14.37, 9.60)	32.1
9	3.93 <i>m</i>	56.5
10	–	168.8
11	8.16 <i>d</i> (2.26)	–
12	3.82 <i>dq</i> (7.03, 2.60, 2.55)	51.2
13	–	168.3
14	7.41 <i>d</i> (2.70)	–
15	1.33 <i>d</i> (7.03)	21.6
16	3.25 <i>d</i> (7.27)	35.0
17	5.30 <i>t</i> (7.20)	125.7
18	–	131.2
19, 24	1.69* <i>s</i>	26.4*
20, 25	1.74* <i>s</i>	18.6*
21	3.56 <i>d</i> (7.24)	29.9
22	5.38 <i>t</i> (7.20)	123.2
23	–	132.4
26	–	39.9
27	6.21 <i>dd</i> (17.45, 10.50)	147.6
28	5.03 <i>dd</i> (17.50, 10.90), 5.06 <i>dd</i> (17.50, 10.90)	111.9
29	1.50 <i>s</i>	28.9
30	1.52 <i>s</i>	28.9

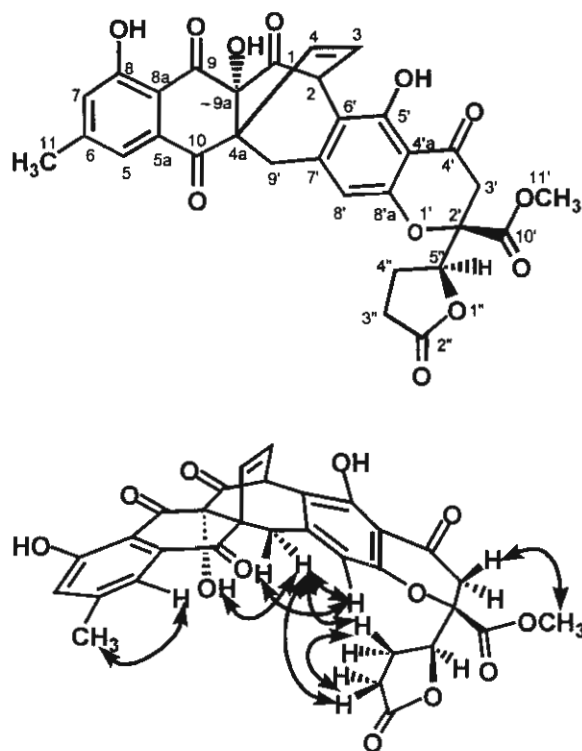
* สัญญาณอาจสลับกันได้

สาร 3.2(7) ได้จากการแยก filtrate ของ F_6 และส่วนของ F_7 ที่นำไปแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (แผนภาพที่ 3.2(1)) ได้สารเป็นสารสีเหลืองจางหนัก 0.054 กรัม (0.009%) จากผลของการวิเคราะห์ธาตุและ FABMS สรุปได้ว่าสารประกอบ 3.2(7) มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{31}H_{24}O_{12}$ ข้อมูล IR สเปกตรัมแสดงค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 3470 cm^{-1} ซึ่งกว้างเป็น O-H stretching ที่ 1790 cm^{-1} เป็น C=O stretching ของ lactone ที่ 1745 cm^{-1} เป็น C=O stretching ของ ester ที่ 1710 cm^{-1} เป็น C=O stretching ของ ketone ที่ 1650 และ 1640 cm^{-1} เป็น C=O stretching ของ ketone ที่ chelate กับหมู่ O-H ที่ 1620 และ 1570 cm^{-1} เป็น C=C stretching ของ aromatic

จากข้อมูลของ ^{13}C -NMR (ตารางที่ 3.2(3)) และ HMBC สเปกตรัม สามารถยืนยันว่ามีหมู่ carbonyl อยู่ 6 หมู่ ซึ่งเป็นองค์ประกอบของ quinone (δ 202.9, 196.0 และ 195.6), chromanone (δ 195.2), lactone (δ 177.2) และ ester (δ 169.8) จาก DEPT สเปกตรัมให้ผลสนับสนุนโครงสร้างของ 3.2(7) ด้วยจำนวน 31 คาร์บอนซึ่งจำแนกได้เป็น หมู่ methyl 2 หมู่ ซึ่งรวมถึงหมู่ methoxy ด้วย 4CH_3 7CH (รวมถึงอะโรมาติกคาร์บอน) และ 18 คาร์บอนชนิด quaternary ซึ่งรวมถึง 6หมู่คาร์บอนิล(C=O) จาก ^1H -NMR สเปกตรัม (ตารางที่ 3.2(3)) แสดงถึง *cis* vinyl โปรตอนของ H-4 ที่ δ 5.96 (d, $J = 8.8\text{ Hz}$) และ H-3 ที่ δ 6.58 (dd, $J = 8.8, 6.6\text{ Hz}$) ซึ่ง coupled กับโปรตอน H-2 ที่ bridge-head ซึ่งปรากฏที่ δ 4.60 (d, $J = 6.6\text{ Hz}$) หมู่ methyl ที่ตำแหน่ง 6 ของวงแหวนอะโรมาติก ปรากฏสัญญาณที่ δ 2.44 ขณะที่ สัญญาณที่ δ 3.68(s) สอดคล้องกับโปรตอนของหมู่ methyl ester สัญญาณของ AB quartets จำนวน 2 ชุด ที่ δ 3.03 และ 3.56 (d, $J = 17.2\text{ Hz}$) และ δ 3.35 และ 3.60 (d, $J = 19.9\text{ Hz}$) กำหนดให้เป็นโปรตอนของหมู่ methylene 2หมู่ คือของ H-3' α , 3' β และ H-9' α , 9' β , ตามลำดับ หมู่ methylene ในวงแหวน lactone คือ H-3'' และ H-4'' ปรากฏสัญญาณที่ δ 2.59 (t, $J = 8.2\text{ Hz}$) และที่ δ 2.35 (m) ตามลำดับ จากข้อมูล HMBC สเปกตรัม แสดง correlation ระหว่างโปรตอนของหมู่ methylene H-9' กับคาร์บอนที่อยู่ใกล้เคียงคือ C-4, C-4a, C-9a, C-10, C-6', C-7', C-8' และระหว่างโปรตอนของหมู่ methine H-2 กับคาร์บอน C-1, C-3, C-4, C-9a, C-5', C-6' และ C-7' แสดงถึงการเชื่อมต่อกันของหน่วย anthraquinone กับหน่วย chromanone (ตารางที่ 3.2(3)) ในที่สุดโครงสร้างของสาร 3.2(7) ได้รับการยืนยันด้วยวิธีของ 2D NMR (COSY HMQC HMBC และ NOESY) สำหรับการกำหนดสเตอริโอเคมีสัมพันธ์ในโครงสร้างของสาร 3.2(7) นั้น ได้จากการวิเคราะห์ผลจากข้อมูลของ NOESY สเปกตรัม (แสดงในรูปที่ 3.2(4)) โดยพบความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอน H-9' α กับหมู่ hydroxyl ที่ตำแหน่ง C-9a กำหนดได้ว่าหมู่ hydroxyl จัดตัวอยู่ในด้านใต้ของระนาบ (α orientation) ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอน H-3'' β และ H-4'' β กับ H-9' แสดงถึงการจัดตัวของวงแหวน lactone ที่ C-

2' อยู่ในตำแหน่งได้ของระนาบเช่นกัน (α orientation) นอกจากนี้ผลจากโครงรูปที่สร้างขึ้นจากแบบจำลองยังแสดงถึงโปรตอนของ H-3'' β และ H-4'' β นั้นอยู่ใกล้กับ H-9' β จากข้อมูลทั้งหมดนี้ยังสามารถกำหนดการจัดตัวของโปรตอน H-5'' ด้วย สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอน H-3' β กับ H-11' แสดงถึงหมู่ methoxyl carbonyl ที่ C-2' จัดตัวอยู่ในด้านบนของระนาบ (β orientation)

สาร 3.2(7) เป็นสารใหม่ที่ยังไม่เคยมีผู้รายงาน นอกจากนี้ยังพบว่าสาร 3.2(7) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อวัณโรคที่ค่า MIC=100 $\mu\text{g/ml}$



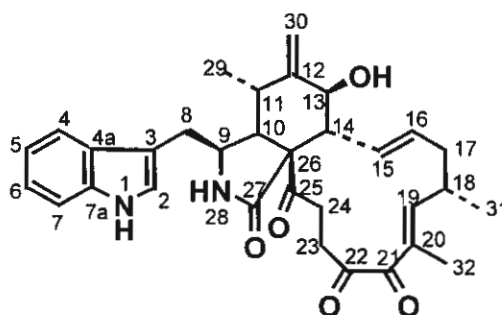
รูปที่ 3.2(4) ความสัมพันธ์ระหว่าง H กับ H ของสาร 3.2(7) จากเทคนิค NOESY

ตารางที่ 3.2(3) แสดงค่าข้อมูล ^1H และ ^{13}C -NMR (δ values) และ HMBC correlations ของ
สาร 3.2(7) (DMSO- d_6)

No	^1H	^{13}C	HMBC
1	-	202.9 s ^a	
2	4.60 d (6.6) ^b	44.5 d	C-1, 3, 4, 9a, 5', 6', 7'
3	6.58 dd (8.8, 6.6)	135.5 d	C-1, 2, 4a, 9a, 6'
4	5.96 d (8.8)	129.3 d	C-1, 2, 10', 4a, 9a, 6'
4a	-	54.8 s	
5	7.40 s	120.8 d	C-7, 4a, 8a, 11
6	-	148.8 s	
7	7.23 s	124.7 d	C-5, 8, 8a, 11
8	-	162.1 s	
8a	-	112.9 s	
9	-	196.0 s	
9a	-	84.4 s	
10	-	195.6 s	
11	2.44 s	22.5 q	C-5, 6, 7, 8
2'	-	84.4 s	
3' α	3.03 d (17.2)	39.6 t	C-4', 4'a, 2', 11', 5''
3' β	3.56 d (17.2)		
4'	-	195.2 s	
4'a	-	105.9 s	
5'	-	158.5 s	
6'	-	118.0 s	
7'	-	150.2 s	
8'	6.43 s	110.8 d	C-4', 4'a, 5', 6'
8'a	-	158.5 s	
9' α	3.35 d (19.9)	30.6 t	C-4, 4a, 9a, 10, 6', 7', 8'
9' β	3.60 d (19.9)		
10'	-	169.8 s	
11'	3.68 s	54.4 q	C-10'
2''	-	177.2 s	
3''	2.59 t (8.2)	28.3 t	C-2'', 4'', 5''
4''	2.35 m	22.3 t	C-2', 2'', 3''
5''	4.98 t (8.9)	81.5 d	C-2', 2'', 3''

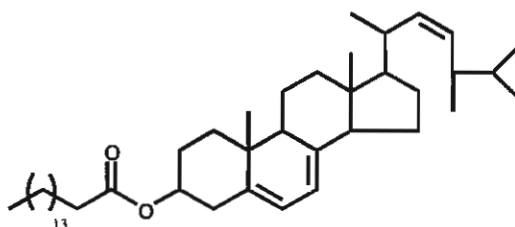
^a Multiplicity deduced by DEPT and indicated by usual symbol. ^b J values (in Hz) in parentheses.

สาร 3.2(8) ได้จากการแยก filtrate 2 ของ F_6 และส่วนของ F_7 ที่นำไปแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (แผนภาพที่ 3.2(1)) ได้เป็นของแข็งสีขาวหนัก 0.0274 กรัม (0.005%) จากข้อมูล IR แสดงค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 3510 3430 และ 3310 cm^{-1} เป็นเอกลักษณ์ของ 2° amine หรือ 2° amide ที่ 1680 cm^{-1} คาดว่าเป็น C=O ของกลุ่ม amide ที่ 1635 และ 1615 cm^{-1} เป็น C=C stretching $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัม (ตารางที่ 3.2(5)) แสดงสัญญาณของ aromatic โปรตอนของกลุ่ม indole เมื่อเปรียบเทียบค่า chemical shift กับสาร chaetoglobosin C พบว่าสาร 3.2(8) มีโครงสร้างหลักอยู่ในกลุ่มสาร chaetoglobosin เมื่อพิจารณาพร้อมกับ $^{13}\text{C-NMR}$ (ตารางที่ 3.2(5)) DEPT (90°, 135°) และ 2D-NMR เทคนิคคือ H-H COSY HMQC HMBC และ NOESY สรุปได้ว่าสาร 3.2(8) คือสาร isochaetoglobosin D ซึ่งเป็นการพบครั้งแรกจากราสกุล chaetomium



Isochaetoglobosin D 3.2(8)

สาร 3.2 (9) ได้จากการแยก F_1 ที่ได้จากการนำ hexane extract ไปแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และตกผลึกด้วย EtOAc/hexane (แผนภาพที่ 3.2 (3)) ได้ผลึกรูปเข็มไม่มีสีหนัก 0.052 กรัม (0.009%) จากข้อมูล IR และ NMR เปรียบเทียบกับสาร ergosterol (ซึ่งแยกได้จาก Hexane extract เช่นกัน) พบว่าคล้ายกัน มีส่วนที่แตกต่างกันที่สาร 3.2 (9) มีหมู่ ester แทนที่หมู่ hydroxyl ที่ตำแหน่ง 3 และมีหมู่ของไฮโดรคาร์บอน สายโซ่ยาวเพิ่มขึ้นมา เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม steroids โดยเปรียบเทียบคุณสมบัติทางฟิสิกส์ เช่น ค่าจุดหลอมเหลว และจากการวิเคราะห์ธาตุคาดว่าสาร 3.2(9) คือ ergosteryl palmitate



3.2(9)

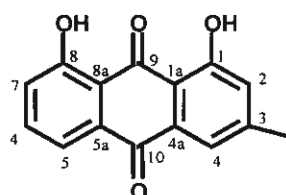
ตารางที่ 3.2(5) ค่า chemical shift ของ ^1H และ ^{13}C -NMR ของสาร 3.2(8)

NO	δ_{H}	δ_{C}
1	10.96 s	-
2	7.15 s	126.2
3	-	109.3
4	7.33 d(7.92)	112.2
4a	-	136.7
5	7.07 t (7.50)	121.9
6	7.00 t(7.34)	119.6
7	7.55 d(7.84)	119.4
7a	-	128.7
8	2.89 dd(14.62, 4.48), 2.60 m	32.9
9	3.29 m	53.1
10	2.22 t (4.0)	46.7
11	2.68 m	33.7
12	-	151.7
13	3.58 dd(10.75, 6.80)	69.5
14	2.52 q (10.32)	49.7
15	5.80 dd(15.14, 9.73)	128.3
16	4.87 m	134.0
17	2.28 m, 1.75 m	39.8
18	2.68 m	32.9
19	5.88 d (10.08)	156.7
20	-	131.7
21	-	196.9
22	-	206.2 ^c
23	2.44 m, 1.55 dd ^a (12.13, 7.46)	31.5 ^a
24	2.29 m, 1.20 dd ^a (overlap, 7.46)	37.7 ^a
25	-	208.9c
26	-	61.7
27	-	174.7
28	8.29 s	-
29	0.97 ^b d (6.73)	14.0 ^b
30	5.19 s 4.97 s	113.5
31	0.92 ^b d (6.70)	19.0 ^b
32	1.70 s	11.0

a, b, c สัญญาณอาจสลับกันได้

สาร 3.2 (10) ได้จากการแยก F_2 ที่ได้จากการนำ hexane extract ไปแยกต่อยด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และตกผลึกซ้ำด้วย EtOAc/hexane ได้ผลึกแผ่นบางสีเหลืองส้ม 19.8 มิลลิกรัม (0.004%) จากข้อมูล IR ปรากฏค่าการดูดกลืนแสงที่ 3060 cm^{-1} แสดงถึงหมู่ OH ที่ 1630 และ 1670 cm^{-1} เป็นลักษณะของหมู่ $C=O$ ซึ่ง chelate กับหมู่ไฮดรอกซิล และ α, β -unsaturated ketone ตามลำดับ ^1H NMR สเปกตรัมแสดงสัญญาณ singlets ที่ low field δ 12.05 และ 11.92 ของหมู่ OH ที่ chelate กับหมู่คาร์บอนิล ที่ δ 7.74 (1H, dd, $J = 7.44, 0.7\text{ Hz}$) 7.59 (1H, t, $J = 8.16\text{ Hz}$) และ 7.21 (1H, dd, $J = 9.93, 0.7\text{ Hz}$) เป็นโปรตอนของวงแหวน benzene ที่มีหมู่แทนที่ในตำแหน่ง 1 2 และ 3 สัญญาณ singlets 2 เส้น ของวงแหวน benzene ที่ δ 7.57 และ 7.02 เป็นลักษณะวงแหวน benzene ที่ถูกแทนที่ในตำแหน่ง 1 2 3 และ 6 ที่ δ 2.39 เป็นสัญญาณ singlet จำนวน 3 โปรตอนของหมู่ $-\text{CH}_3$ ที่อยู่บนวงแหวน benzene ^{13}C -NMR สเปกตรัม ปรากฏสัญญาณที่ δ 196.4 และ 181.9 ของหมู่ $C=O$ 2 หมู่ และคาร์บอนของ aromatic 12 สัญญาณ ช่วง δ 163–112 ระบุว่าสาร 3.2 (10) ประกอบด้วยวงแหวน benzene 2 วง

เมื่อพิจารณาประกอบกับข้อมูลของ 2D NMR เทคนิคต่าง ๆ คือ COSY HMQC HMBC และ NOESY สรุปได้ว่าสาร 3.2 (10) นี้คือ chrysophanol ซึ่งเป็นสารประกอบพวก anthraquinone สารชนิดนี้ได้มีการพบในรา *Trichoderma harzianum* Rifoi และ *Trichoderma hamatum* (Bon) แต่ยังไม่เคยมีการรายงานการพบในราสกุล *Chaetomium*



3.2 (10)

2) การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

ได้ทดสอบการใช้สาร 3.2(3), Chaetoglobocin C ในการควบคุมเชื้อ *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนส และเชื้อ *P. parasitica* สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของส้มเขียวหวานดังนี้

จากการทดลองพบว่าสาร Chaetoglobocin C ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100 และ 500 ppm ($\mu\text{g/ml}$) ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. gloeosporioides* isolate CFLS 012 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 500 ppm สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้มากที่สุดเฉลี่ยเท่ากับ 92.06 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อเฉลี่ยเท่ากับ 0.40 ซม รองลงมาที่ระดับความเข้มข้น 100, 50 และ 10 ppm

สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตโคโลนีของเชื้อเท่ากับ 23.21, 2.18 และ 0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อเฉลี่ย 3.87, 4.93 และ 5.10 ซม ตามลำดับ ในขณะที่ control (0 ppm) ไม่พบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อเฉลี่ย 5.04 ซม (ตารางที่ 3.2(6)) และ รูปที่ 3.2(5)) และพบค่า ED_{50} เท่ากับ 178.15 ppm (ตารางที่ 3.2(6)) สำหรับปริมาณการสร้างสปอร์ของเชื้อ *C. gloeosporioides* CFLS012 ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100 และ 500 ppm พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 500 ppm สามารถยับยั้งการสร้างปริมาณสปอร์ของเชื้อได้มากที่สุดเท่ากับ 99.50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีปริมาณการสร้างสปอร์ของเชื้อเฉลี่ยเท่ากับ 0.07×10^8 spore/ml รองลงมาคือที่ระดับความเข้มข้น 100, 50 และ 10 ppm สามารถยับยั้งการสร้างปริมาณสปอร์ของเชื้อเฉลี่ย 99.28, 98.08 และ 97.08 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยมีปริมาณการสร้างสปอร์ของเชื้อเฉลี่ย 0.10, 0.27 และ $0.41 (x 10^8)$ spore/ml ตามลำดับ ในขณะที่ control (0 ppm) ไม่พบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ ซึ่งมีปริมาณการสร้างสปอร์ของเชื้อเฉลี่ย 14.07×10^8 spore/ml (ตารางที่ 3.2(6)) และมีค่า $ED_{50}=0.09$ ppm (ตารางที่ 3.2(8))

สำหรับเชื้อ *P. parasitica* P101 พบว่าสาร Chaetoglobocin C ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100 และ 500 ppm มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. parasitica* P101 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 500 ppm สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้มากที่สุดเท่ากับ 92.00 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อเฉลี่ยเท่ากับ 0.44 ซม รองลงมาที่ระดับความเข้มข้น 100, 10 และ 50 ppm สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตโคโลนีของเชื้อเฉลี่ย 79.81, 63.63 และ 59.27 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อเฉลี่ย 1.11, 2.00 และ 2.24 ซม ในขณะที่ control (0 ppm) ไม่พบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อเฉลี่ยเท่ากับ 5.50 ซม (ตารางที่ 3.2(7) และรูปที่ 3.2(6)) และพบค่า ED_{50} เท่ากับ 4 ppm (ตารางที่ 3.2(9)) สำหรับปริมาณการสร้าง sporangium ของเชื้อ *P. parasitica* P101 ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100 และ 500 ppm พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 500 ppm สามารถยับยั้งการสร้างปริมาณ sporangium ของเชื้อได้มากที่สุดเท่ากับ 76.14 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณการสร้าง sporangium ของเชื้อเฉลี่ยเท่ากับ 1.88×10^5 sporangium/ml รองลงมาคือที่ระดับความเข้มข้น 50, 10 และ 100 ppm สามารถยับยั้งการสร้างปริมาณ sporangium ของเชื้อเฉลี่ย 66.62, 46.06 และ 27.03 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยมีปริมาณการสร้าง sporangium ของเชื้อเฉลี่ย 2.63, 4.25 และ $5.75 (x 10^5)$ sporangium/ml ตามลำดับ ในขณะที่ control (0 ppm) ไม่พบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง sporangium ของเชื้อ ซึ่งมีปริมาณการสร้าง sporangium ของเชื้อเฉลี่ย 7.88×10^5 sporangium/ml (ตารางที่ 3.2(8)) และพบค่า ED_{50} เท่ากับ 35.43 ppm (ตารางที่ 3.2(8)) สำหรับปริมาณการสร้าง oospore ของเชื้อ *P. parasitica* P101 ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100 และ 500 ppm พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยพบว่าที่ระดับ

ความเข้มข้น 500 ppm สามารถยับยั้งการสร้างปริมาณ oospore ของเชื้อได้มากที่สุดเท่ากับ 71.12 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีปริมาณการสร้าง oospore ของเชื้อเฉลี่ยเท่ากับ 0.69×10^6 oospore/ml รองลงมาคือที่ระดับความเข้มข้น 100, 50 และ 10 ppm สามารถยับยั้งการสร้างปริมาณ oospore ของเชื้อเฉลี่ย 39.33, 29.28 และ 26.77 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยมีปริมาณการสร้าง oospore ของเชื้อเฉลี่ย 1.45, 1.69 และ 1.75 ($\times 10^6$) oospore/ml ตามลำดับ ในขณะที่ control (0 ppm) ไม่พบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างปริมาณ oospore ของเชื้อ โดยมีปริมาณการสร้าง oospore ของเชื้อเฉลี่ย 2.39×10^6 oospore/ml (ตารางที่ 3.2(5)) และพบค่า ED_{50} เท่ากับ 125.71 ppm (ตารางที่ 3.2(8))

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร 3.2 (6) 3.2 (7) และ 3.2 (8) เนื่องจากปริมาณของสาร 3.2(6) 3.2(7) และ 3.2(8) มีจำนวนไม่มากพอที่จะทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชตามวิธีที่ใช้กับสาร Chaetoglobosin C [3.2(3)] ข้างต้น จึงใช้วิธี microdilution ซึ่งประยุกต์วิธีของ Desjardins^{3,2(17)} ซึ่งผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช 4 ชนิด คือ *Phytophthora paracitica* (โรครากเน่าโคนเน่าในส้มเขียวหวาน) *P. palmivora* (โรครากเน่าโคนเน่าในพริกไทย) *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* (โรคเหี่ยวของมะเขือเทศ) *Colletotrichum gloeosporioides* (โรค anthracnose ในส้มเขียวหวาน) พบว่าสาร 3.2(6) สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* ได้ดีที่สุดคือที่ค่า $ED_{50} = 140 \mu\text{g/ml}$ ขณะที่สาร 3.2 (7) สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *F. oxysporum* f. sp. *lycoporioides* ได้ดีที่สุดที่ค่า $ED_{50} = 44 \mu\text{g/ml}$ สำหรับสาร 3.2(8) สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่ค่า $ED_{50} = 223 \mu\text{g/ml}$ ดังแสดงในตารางที่ 3.2(9).

ตารางที่ 3.2(6) แสดงผลของสาร Chaetoglobocin C ต่อการเจริญเติบโตและปริมาณการสร้างสปอร์ของเชื้อ *C. gloeosporioides* CFLS012 อายุ 7 วัน ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

ระดับความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (ซม)	ปริมาณการสร้างสปอร์ ($\times 10^8$)	% ยับยั้งการเจริญเติบโต ^{2/}	% ยับยั้งการสร้างสปอร์ ^{3/}
0	5.04 a ^{1/}	14.07 a	0.00	0.00
10	5.10 a	0.41 b	0.00	97.08
50	4.93 a	0.27 b	2.18	98.08
100	3.87 b	0.10 b	23.21	99.28
500	0.40 c	0.07 b	92.06	99.50

^{1/} ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ ที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น $P = 0.01$ โดยเปรียบเทียบ Treatment mean แบบ Duncan's Multiple Range Test.

^{2/} % ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราบน control plate - เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราบน Treated plate/เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราบน control plate $\times 100$

^{3/} % ยับยั้งการสร้างปริมาณสปอร์ของเชื้อ = ปริมาณการสร้างสปอร์ของเชื้อราบน control plate - ปริมาณการสร้างสปอร์ของเชื้อราบน Treated plate/ปริมาณการสร้างสปอร์ของเชื้อราบน control plate $\times 100$

ตารางที่ 3.2(7) แสดงผลของสาร Chaetoglobocin C ต่อการเจริญเติบโตและปริมาณการสร้างสปอร์ของเชื้อ *P. parasitica* P101 อายุ 7 วัน ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ระดับความเข้มข้น (ppm)	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (ซม)	ปริมาณการสร้าง sporangium ($\times 10^5$)	ปริมาณการสร้าง Oospore ($\times 10^6$)	% ยับยั้งการเจริญเติบโต ^{2/}	% ยับยั้งการสร้าง sporangium ^{3/}	% ยับยั้งการสร้าง oospore
0	5.50 a ^{1/}	7.88 a	2.39 a	0.00	0.00	0.00
10	2.00 b	4.25 ab	1.75 b	63.63	46.06	26.77
50	2.24 b	2.63 b	1.69 b	59.27	66.62	29.28
100	1.11 c	5.75 ab	1.45 b	79.81	27.03	39.33
500	0.44 d	1.88 b	0.69 c	92.00	76.14	71.12

^{1/} ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ ที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น P= 0.01 โดยเปรียบเทียบ Treatment mean แบบ Duncan's Multiple Range Test.

^{2/} %ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราบน control plate - เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราบน Treated plate / เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราบน control plate $\times 100$

^{3/} %ยับยั้งการสร้างปริมาณ sporangium หรือ oospore ของเชื้อ = ปริมาณการสร้าง sporangium หรือ oospore ของเชื้อราบน control plate - ปริมาณการสร้าง sporangium หรือ oospore ของเชื้อราบน Treated plate / ปริมาณการสร้างสปอร์ของเชื้อราบน control plate $\times 100$

ตารางที่ 3.2(8) แสดงค่า ED₅₀ ของสาร Chaetoglobocin C 3.2(3) ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสร้างปริมาณสปอร์ของเชื้อราโรคพืช

เชื้อราโรคพืช	ค่า ED ₅₀ (ppm , $\mu\text{g/ml}$)		
	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อ	ปริมาณการสร้าง sporangium	ปริมาณการสร้าง oospore
<i>C. gloeosporioides</i> (Penz.)	178	0.09	
Penz.&Sacc isolate CFLS 012	-		
<i>P. parasitica</i> Dust isolate P 101	4	35.43	125.71

ตารางที่ 3.2 (9) แสดงค่า ED₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) ของสาร 3.2(6) 3.2(7) และ 3.2(8) ที่มีผลต่อการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืช

เชื้อราโรคพืช	สาร 3.2 (6)	3.2 (7)	3.2 (8)
<i>P. paracitica</i>	140	421	254
<i>P. palmivora</i>	2277	717	6634
<i>F. oxysporum</i>	1481	44	-
f.sp. <i>lycopersici</i>			
<i>C. gloeosporioides</i>	899	1584	223



รูปที่ 3.2(5) แสดงผลของสาร Chaetoglobocin C ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. gloeosporioides* (Penz.)Penz.&Sacc isolate CFLS 012 อายุ 7 วัน ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 3.2(6) แสดงผลของสาร Chaetoglobocin C ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. parasitica* Dust isolate P 101 อายุ 7 วัน ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

วัสดุและวิธีการ

1) สารเคมี เครื่องมือและอุปกรณ์

สารเคมีที่ใช้สำหรับแยกสารโดยวิธีโครมาโทกราฟี ชนิดต่างๆ ได้แก่ Merck's silica gel 60 (Art 7733, 7734) สำหรับคอลัมน์โครมาโทกราฟี silica gel 60PF₂₅₄ สำหรับ preparative TLC และ silica gel 60 F₂₅₄ สำหรับ TLC

ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดและแยกสารชนิดต่างๆ ได้แก่ n-hexane, CH₂Cl₂, EtOAc และ MeOH ถ้าเป็น commercial grade จะนำมากลั่นก่อนใช้ เครื่องมือหาจุดหลอมเหลวใช้ Electrothermal IA9000 seriee IR spectra บันทึกด้วยเครื่อง BIO-RAD FTS-7/PC และ Perkein Elmer 683 สำหรับ NMR spectra บันทึกด้วยเครื่อง Jeol-EX90A, Bruker DPX300 และ DPX400

2) การเลี้ยงเชื้อรา *C. globosum* KMIT-N 0802

การเลี้ยงเชื้อราและการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพดำเนินการที่ ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร โดยเลี้ยงเชื้อรา *C. globosum* ในอาหาร potato dextrose broth (PDA) แล้วบ่มไว้ด้วยเครื่องเขย่า (shaker) ที่อุณหภูมิ 25-28°C เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ กรองเอาเส้นใย (mycelial mat) ด้วยผ้าขาวบางและผึ่งลมให้แห้ง

3) การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

เป็นการทดลองแบบ Completely Randomized Design จำนวน 4 ซ้ำ โดยมีระดับความเข้มข้นของสารตัวอย่างเป็น 0, 10, 50, 100 และ 500 ppm โดยซึ่งสารให้ได้น้ำหนักตามความเข้มข้นที่คำนวณไว้ นำสารสกัดแต่ละความเข้มข้นผสมกับอาหาร PDA แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที เทอาหารผสมนี้ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.5 ซม ที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ประมาณ 10 มล./1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ การทดลองนี้ทำ 4 ซ้ำๆ ละ 5 จาน ที่ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ เมื่ออาหารผสมและ control เย็นลงและแข็งตัวจึงพร้อมที่จะนำไปทดสอบการเจริญของเชื้อราโรคพืชที่ต้องการทดสอบได้แก่ *C. gloeosporioides* และ *P. parasitica* ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซม ที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วตัดส่วนรอบนอกของโคโลนีของเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ที่มีอายุ 10 วัน แล้วใช้เข็มเขี่ยที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว ย้ายชิ้นส่วนอาหารที่มีเชื้อราเจริญวางลงตรงกลางจานที่ใช้ทดสอบจานละ 1 ชิ้น ทำเช่นนี้กับทุกตัวอย่างสาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (25-28 °C) เป็นเวลา 5 วัน เมื่อจาน control มีเชื้อราเจริญเต็มจาน ทำการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อราที่เจริญ โดยการวัดตามแนวเส้นที่ตัดกันเป็นรูปกากบาท แล้วหาค่าเฉลี่ยคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต ED₅₀ และตรวจนับจำนวนการสร้าง sporangia เปรียบเทียบกับ control

4) การสกัดด้วยตัวทำละลาย

จากการสกัดเส้นใยแห้งของรา *C. globosum* 562 กรัม ซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลว (PDB) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ได้ *n*-Hexane extract น้ก 27 กรัม (4.8%) สารสกัด EtOAc extract น้ก 47.9 กรัม (8.52%) และสารสกัด MeOH extract หลังการแยกน้ำตาลออกน้ก 11.5 กรัม (2.05%)

5) การแยกสารให้บริสุทธิ์

(ก) EtOAc extract

นำ EtOAc extract ละลายด้วย EtOAc จะได้ตะกอนสีน้ำตาลอ่อน 0.74 กรัม กรองตะกอนที่ได้และตกผลึกซ้ำด้วย MeOH ได้ผลึกละเอียดสีขาวของสาร 3.2(3) น้ก 0.311 กรัม (0.05%) ส่วนของ Filtrate 1 นำไประเหย EtOAc ออกได้เป็น EtOAc extract และละลายด้วย MeOH-EtOAc ได้ตะกอน ซึ่งเมื่อดตกผลึกด้วย MeOH ได้ผลึกสีเหลืองอ่อนของสาร 3.2(4) น้ก 0.147 กรัม (0.026%) นำ Filtrate 2 ไประเหยตัวทำละลายออกแล้วแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้ 10 fractions (F_1 - F_{10}) โดย F_{1-2} เป็นน้ำมันซึ่งส่วนใหญ่เป็น triglyceride [3.2(1)] นำ F_{3-4} และ filtrate ที่กรองตะกอน F_5 ออกแล้ว มารวมกัน และแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้สาร 3.2(2) และ 3.2(5) 0.064 กรัม (0.01%) สำหรับตะกอนที่กรองจาก F_5 นำไปตกผลึกด้วย DMSO-MeOH ได้สาร 3.2(3) น้ก 0.18 กรัม (0.032%) ส่วน F_6 เมื่อแยกตะกอนออกและตกผลึกซ้ำด้วย DMSO-MeOH ได้ผลึกรูปเข็มสีขาวของสาร 3.2(6) น้ก 0.028 กรัม และยังได้จากส่วนของ filtrate ของ F_6 ผสมกับ F_7 แล้วนำไปแยกโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีอีก 0.0084 กรัม น้ำหนักรวมเป็น 0.036 กรัม (0.006%) และจากส่วนนี้ยังแยกได้สาร 3.4(7) เป็นของแข็งสีเหลืองจาง น้ก 0.054 กรัม (0.009%) และสาร 3.2(8) เป็นของแข็งสีขาวน้ก 0.0274 กรัม (0.005%) สำหรับ fraction อื่นๆ กำลังอยู่ในระหว่างการดำเนินการแยกให้บริสุทธิ์

(ข) MeOH extract

นำ MeOH extract มาละลายด้วย MeOH แล้วเติมน้ำจนกระทั่งสารละลายขุ่น สกัดด้วย EtOAc ครั้งละ 200 มล. จำนวน 5 ครั้ง เก็บเอาชั้นสารละลายอินทรีย์รวมกันแล้วดูความชื้นด้วย anhydrous Na_2SO_4 กรองและระเหยตัวทำละลายออกและได้ MeOH extract 11.5 กรัม (2.05%) นำไปละลายใน MeOH-EtOAc ได้ตะกอนสีน้ำตาลเข้ม กรองตะกอนออกและทำการตกตะกอนโดย EtOAc อีก 2 ครั้งได้ตะกอนสีน้ำตาลเข้มเหมือนกัน เมื่อตรวจสอบตะกอนที่ได้นี้กับกลุ่มของ chaetoglobosin พบว่าแตกต่างกัน สำหรับส่วนของ filtrate เมื่อระเหยตัวทำละลายออกแล้วจะนำไปแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีต่อไป

(ค) Hexane extract

จากการแยก hexane extract โดยวิธีตกตะกอน ได้ ergosterol 0.214 กรัม (0.38 %) นำส่วนของสารละลายไปแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีซึ่งใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ ใช้ hexane:EtOAc เป็นตัวชะ ได้ 12 fractions (F_1 - F_{12}) นำ F_1 (100% hexane) ไปตกผลึก ได้ผลึกสีขาวของสาร 3.2(9) 0.052 กรัม (0.009%) เมื่อนำ F_2 ไปแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้ผลึกสีส้มของสาร 3.2(10) 0.0198 กรัม (0.004%) จากส่วนชะ 90% hexane:EtOAc

ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของสาร 3.2(1) นำสาร 3.2(1)หนัก 2.2665 กรัม ไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย 6M NaOH 4.5 มล เติม EtOH 95% ในปริมาตร 4.5 มล แล้ว reflux ในอ่างน้ำร้อน ประมาณ 1 ชั่วโมง ทั้งให้เย็นในอุณหภูมิห้อง เติม 6M HCl 4 มล และน้ำเล็กน้อย นำมาสกัดด้วย ether 2 ครั้ง (40 มล) ดูดความชื้นด้วย anhydrous Na_2SO_4 ระเหยตัวทำละลายออกได้เป็นของแข็ง (ไข) สีน้ำตาลอ่อนหนัก 2.0243 กรัม ตรวจสอบด้วย TLC พบว่ามีสารหลัก 1 สาร $R_f = 0.48$ (30% EtOAc:Hexane) แยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้ 15-20% EtOAc:Hexane เป็นตัวชะ ได้สาร 3.2(1a) เป็นไขสีขาวหนัก 1.6399 กรัม IR (neat) : $V_{\max}$ 3202 (w, br), 2923 (s), 2851 (s), 1713 (s), 1464 (m), 1298 (w) cm^{-1} ; ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3 , TMS) : δ 5.34 (1H, m, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$), 2.34 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, $\text{HOOC}-\text{CH}_2-$), 2.00 (2H, q, $J = 6.4$ Hz, $-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.625 (2H, quint, $J = 7.4$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$), 1.29 (3H, s, $-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$), 1.24 (22H, (br s), $-(\text{CH}_2)_{11}-$), 0.90 (3H, t, $J = 6.4$ Hz, $-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$); ^{13}C -NMR (CDCl_3 , TMS) : δ 180.38 ($-\text{CO}_2\text{H}$), 130.01, 129.72 ($-\text{C}=\text{C}-$), 34.08, 31.90, 29.66, 29.49, 29.40, 29.33, 29.29, 29.21, 29.10, 29.03, 27.18, 27.11, 24.64, 22.65 ($-\text{CH}_2$, CH_3), 14.05 ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$)

ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของสาร 3.2(1a) เตรียมโดยนำสาร 3.2(1a) 0.5143 กรัม ละลายใน anhydrous MeOH 4 มล หยด SOCl_2 2-3 หยด stir ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที ได้สารละลายสีน้ำตาลอ่อน ตรวจสอบด้วย TLC พบว่ามีสารหลักเพียงจุดเดียวที่ $R_f = 0.70$ (10% EtOAc:Hexane) นำสารละลายที่ได้ไปแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ชะด้วย 5% EtOAc:Hexane ได้สาร 3.2(1b) เป็นของเหลวสีเหลืองอ่อนหนัก 0.5011 กรัม IR (neat) : $V_{\max}$ 2925 (vs), 2858 (s), 1746 (vs), 1652 (m), 1458 (m), 1168 (m) cm^{-1} ; ^1H -NMR (90 MHz, CDCl_3 , TMS) : δ 5.34 (2H, m, $-\text{CH}=\text{CH}-$), 3.65 (3H, s, $-\text{OCH}_3$), 2.32 (2H, t, $-\text{COCH}_3$), 2.0 (2H, m), 1.65 (2H, m), 1.4-1.5 (26, br s, 13

CH_2); ^{13}C -NMR (15 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 172.2 (C=O), 130.0, 129.8 (-CH=CH-), 49.3 (OCH_3), 34.1, 32.0, 29.7, 29.5, 29.4, 29.3, 27.3, 25.0, 22.7, 14.1.

สาร 3.2(4) ได้จากการนำ Filtrate 1 ไประเหย EtOAc ออกได้เป็น crude EtOAc และละลายด้วย MeOH-EtOAc ได้ตะกอนและตกผลึกด้วย MeOH ได้ผลึกสีเหลืองอ่อนหนัก 0.147 กรัม (0.026%) mp 139-141 $^{\circ}\text{C}$ IR (KBr): ν_{max} 2900 (s), 2860 (vs), 2780 (s), 1780 (vs), 1745 (vs), 1680 (m), 1640 (vs), 1620 (s), 1600 (s), 1565 (s), 1430 (s), 1290 (s), 1215 (s), 790 (m), 730 (m) cm^{-1} ; จาก ^1H และ ^{13}C NMR สเปกตรัมพบว่าสาร 3.2(4) ยังไม่บริสุทธิ์ แต่ก็พอจะทราบได้ว่าเป็นสารในกลุ่มสเตอรอยด์

สาร 3.2(5) ได้จากการนำ Filtrate 2 ไประเหยตัวทำละลายออกแล้วแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้ 10 fractions (F_1-F_{10}) โดยนำ F_{3-4} และ filtrate ที่กรองตะกอน F_5 ออกแล้วมารวมกัน และแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้สาร 3.2(5) หนัก 0.064 (0.01%) กรัม R_f = 0.60 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$; 9:1) mp 275-276 $^{\circ}\text{C}$ (decomposed) IR(KBr): ν_{max} 3400 (w), 3310 (m), 3240 (w), 3080 (vw), 2980 (vw), 1660 (vs), 1615 (vs), 1590 (s), 1520 (w), 1460 (m), 1285 (s), 1230 (s), 1200 (s), 1155 (s), 850 (m), 730 (m) cm^{-1} ; ^1H -NMR (DMSO): δ 11.58 (1H, br s, OH), 7.22 (1H, s, Ar-H), 6.73 (1H, d, J = 2.17 Hz, Ar-H), 6.65 (1H, d, J = 2.17 Hz, Ar-H), 6.62 (1H, d, J = 1.86 Hz, Ar-H), 3.90 (3H, s, OCH_3), 2.75 (3H, s, Ar- CH_3); ^{13}C -NMR (DMSO): δ 167.0, 165.6, 164.9, 159.5, 139.3, 138.7, 118.5, 109.7, 104.3, 102.5, 100.0, 99.3, 56.7, 25.9 EIMS, m/z : $[M]^+$ 272, 257, 243, 241, 229, 215, 210, 185, 171, 145, 128, 115, 102, 91, 77, 69, 63, 51

สาร 3.2(6) ได้จากตะกอนที่กรองจาก F_5 และตกผลึกด้วย DMSO-MeOH ได้ผลึกรูปเข็มสีขาว หนัก 0.028 กรัม (0.005%) R_f = 0.44 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$, 9:1) mp 245-246 $^{\circ}\text{C}$ (decomposed) $[\alpha]_D^{28}$: -33.6 $^{\circ}$ (c 0.125, CHCl_3) IR(KBr): ν_{max} 3465 (w), 3200 (w), 3055 (vw), 2970 (vw), 2945 (vw), 1670 (vs), 1470 (m), 1340 (w), 850 (w), 825 (w), 780 (w) cm^{-1} สำหรับ ^1H และ ^{13}C -NMR ดูจากตารางที่ 3.2(2) EIMS, m/z : $[M]^+$ 461, 392, 366, 335, 334, 332, 319, 278, 248, 220, 194, 167, 139, 113, 99, 69 55 41 32

สาร 3.2(7) ได้จากการแยก filtrate ของ F_6 และส่วนของ F_7 ที่นำไปแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้สารเป็นสารสีเหลืองจางหนัก 0.054 กรัม (0.009%) mp 175 $^{\circ}\text{C}$ (decomp.) $[\alpha]_D^{30}$: -62.0 $^{\circ}$ (c 0.110, MeOH) UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (log ϵ): 219(4.37), 240(4.49), 280(4.24), 342(3.95); ^1H และ ^{13}C NMR แสดงในตารางที่ 3.2(3), FABMS(+ve): m/z =

589 $[M+H]^+$, Anal calcd for $C_{31}H_{24}O_{12}$: C, 54.86%; H, 5.01% (Found: C, 55.05%; H, 5.10%)

สาร 3.2(8) ได้จากการแยก filtrate ของ F_6 และส่วนของ F_7 ที่นำไปแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้เป็นสารสีขาวหนัก 0.027 กรัม (0.005%) mp 260–263 °C (decomp.) $[\alpha]_D^{31}$: +20.0° (c 0.130, MeOH) IR(KBr): V_{max} 3510 (w), 3430 (m), 3310 (m), 2950 (w), 1680 (vs), 1635 (m), 1615 (m), 740 (s) cm^{-1} ^1H และ ^{13}C -NMR แสดงในตาราง 3.2(5)

สาร 3.2(9) (ergosterol palmitate) ได้จากการแยก F_1 ที่ได้จากการนำ hexane extract ไปแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และตกผลึกด้วย EtOAc/hexane เป็นผลึกสีขาว 0.052 กรัม (0.009%), R_f 0.72 (CH_2Cl_2 :Hexane, 50%), mp 102–103 °C; $[\alpha]_D^{28}$: -55.1° (c 0.145, $CHCl_3$) IR(KBr): V_{max} 3040 (H-C=C, vw), 2960–2860 (C-H, s), 1740 (C=O, s), 1190 (m), 1170 (C-O, m). ^1H NMR (90 MHz; $CDCl_3$): δ 5.58 (1H, m, C=CH), 5.40 (1H, m, C=CH), 5.20 (2H, m, CH=CH), 2.60–1.10 (48H, m, CH_2), 1.06 (3H, d, CH_3), 0.90 (6H, d, 2 CH_3), 0.82 (6H, d, 2 CH_3), 0.62 (3H, s, CH_3). ^{13}C NMR (22 MHz; $CDCl_3$): δ 173.3 (C=O), 141.5 (C=C), 138.7 (C=C), 135.6 (C=C), 132.0 (C=C), 120.2 (C=C), 116.4 (C=C), 72.5 (C-O), 55.8 (C-C), 54.6 (C-C), 46.1 (C-C), 42.9 (C-C), 40.4, 39.1, 37.9, 37.1, 36.7, 34.7, 33.1, 31.9, 29.7, 29.4, 29.1, 28.2, 25.1, 23.0, 22.7 (CH, CH_2), 21.1 (CH_3), 19.9 (CH_3), 19.7 (CH_3), 17.6 (CH_3), 16.2 (CH_3), 14.1 (CH_3), 12.1 (CH_3).

สาร 3.2(10) ได้จากการแยก F_2 ที่ได้จากการนำ hexane extract ไปแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และตกผลึกด้วย EtOAc/hexane เป็นผลึกสีขาวหนัก 0.0198 กรัม (0.004%), R_f 0.58 (CH_2Cl_2), mp 197–198 °C. IR (KBr): V_{max} 3060 (C-H, vw), 2920 (C-H, vw), 1670 (m), 1630 (C=O, s), 1470 (w), 1450 (w), 1380 (w), 1270 (s), 1100 (m), 735 (m), 730 (m). ^1H NMR (300 MHz; $CDCl_3$): δ 12.05 (1H, s, OH), 11.94 (1H, s, OH), 7.74 (1H, dd, J = 7.44, 0.7 Hz, Ar-H), 7.59 (1H, t, J = 8.16, Hz, Ar-H), 7.57 (1H, s, Ar-H), 7.21 (1H, dd, J = 9.93, 0.72 Hz, Ar-H), 7.02 (1H, s, Ar-H), 2.39 (3H, s, Ar- CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz; $CDCl_3$): δ 196.4 (C-10), 181.9 (C-9), 162.7 (C-1), 162.4 (C-8), 149.3 (C-3), 134.9 (C-6), 133.6 (C-4a), 133.2 (C-4a), 124.6 (C-7), 124.4 (C-2), 120.9 (C-4), 119.5 (C-5), 116.4 (C-8a), 113.7 (C-1a), 22.3 (CH_3)

เอกสารอ้างอิง

- 3.2[1] Soyong, K. *Thai Phytopathology*, 1991, 11, 86.
- 3.2[2] Kommedahl, T.; Chang I-pin *Phytopathology* 1968, 56, :885.
- 3.2[3] Heye, G.C.; Andrews, J. H. *Phytopathology* 1983, 73, 650.
- 3.2[4] Soyong, K.; Quimio, T. H. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 1989, 23, 198.
- 3.2[5] Soyong, K. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 1992, 14, 59.
- 3.2[6] Soyong, K. IFS Research Report 1993.
- 3.2[7] Petcharat, V.; Soyong, K. *Songklanakarin J.* 1991, 13, 129.
- 3.2[8] Udagawa, S. T.; Muroi, H. Kurata; Sekita, S.; Yoshihira, K.; Natori, S.; Umeda, M. *Can. J. Microbiol.* 1979, 25, 170.
- 3.2[9] Sekita, S.; Yoshihira, K.; Natori, S.; Udagawa, S.; Muroi, T.; Sugiyama, Y. Umeda, M. *Can. J. Microbiol.* 1981, 27, 766.
- 3.2[10] Takahashi, M.; Koyama, K.; Natori, S. *Chem. Pharm. Bull.* 1990, 38, 625.
- 3.2[11] Abraham, W.R. ; Arfmann, H. A. *Phytochemistry* 1992, 31, 2405.
- 3.2[12] สมเดช กนกเมธากุล; ขวัญใจ กนกเมธากุล; เกษม สร้อยทอง รายงานการวิจัยทุนอุดหนุนทั่วไป มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปีงบประมาณ 2538.
- 3.2[13] Gatenbeck, S. and Hermodson, S. *Acta Chem. Scand.* 1965, 19, 65.
- 3.2[14] Torssel, K. G., *Natural Product Chemistry*, John Wiley & Son Lit. , 1983, 125.
- 3.2[15] Casnati, G.; Quilico, A., Ricca, A. *Gazzetta* 1962, 92, 129.
- 3.2[16] Zeid, A.H.S. Abou; Haggag, M.Y. ; Saleh, M. M.; Mohamed, R.S. *Bull. Natl. Res. Cent. (Egypt)* 2000, 25(3), 207-222.
- 3.2[17] Desjardins, R.E.; Canfield, J.C.; Haynes, J.D.; Chalay, J.D. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1979, 16, 710-718.

โครงการย่อยกลุ่มที่ 3: การหาสารควบคุมศัตรูพืชจากธรรมชาติ

โครงการวิจัยหน่วยที่ 3: พืชในสกุล *Acalypha*

บทนำ

1. คำนำ

พืชใน genus *Acalypha* เป็นพืชที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีรายงานไว้หลายชนิด อาทิเช่น โพธิ์แดง (*Acalypha wilkesiana*) มีผู้รายงานการใช้น้ำต้มจากใบเพื่อรักษาโรคผิวหนังในเด็ก^{3.3[1]} และพบว่าส่วนสกัดเอทานอลแสดงฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราหลายชนิด^{3.3[2]} และสำหรับต้นตำแยแมว (*Acalypha indica*) มีรายงานการใช้น้ำคั้นที่ได้จากใบในการรักษาโรคผิวหนังรักษาแผลสดได้^{3.3[3,4]} เป็นต้น จากสรรพคุณหลายชนิดดังกล่าวทำให้เชื่อว่า สารประกอบบางชนิดจากพืชใน genus *Acalypha* น่าจะมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราบางชนิดได้

2. ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

จากสรรพคุณยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราบางชนิดของพืชใน genus *Acalypha* และจากการศึกษาวรรณกรรมทางเคมี พบว่า ยังไม่มีการศึกษาทางองค์ประกอบทางเคมีของต้นชาข่อย (*Acalypha siamensis*) เลย ทำให้ผู้วิจัยมุ่งศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพืชต้นนี้ และจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า ส่วนสกัดโดยเฉพาะส่วนสกัดเมทานอล และ ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuriensis* และเชื้อรา *Cladosporium cucurmerinum* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคพืชได้ และจากการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับคุณสมบัติ antifeeding ของส่วนสกัดต่างๆโดยใช้แมลงเต่าทอง (*Epilachna varivestis*) พบว่า ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนที่ความเข้มข้น 1% สามารถยับยั้งการกินพืชอาหารของแมลงเต่าทองได้ ต้นชาข่อยจึงน่าจะมีสารองค์ประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ

ชาช้อย มีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า *Acalypha siamensis* หรือ *Acalypha fruticosa* (วงศ์ Euphorbiaceae) มีรายงานการใช้เป็นยารักษาแผล และเป็นยาระงับประสาท น้ำสกัดเย็นของใบใช้ แก้กูกเสียด น้ำสกัดร้อนใช้แก้ไอ เจ็บหน้าอก ปวดท้อง และอหิวาตกโรค^{3.3[5]} ครีมน้ำจากรากสดแก้ โรคผิวหนัง เป็นต้น

3. วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 1) เพื่อทำการแยกสารองค์ประกอบจากส่วนสกัด (crude extract) หรือส่วนย่อย (fraction) โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมศัตรูพืชจากธรรมชาติ
- 2) เพื่อหาสูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้บริสุทธิ์ โดยอาศัยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี
- 3) ในกรณีที่ได้อะไรบริสุทธิ์ปริมาณมากพอจะทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องด้วย

4. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

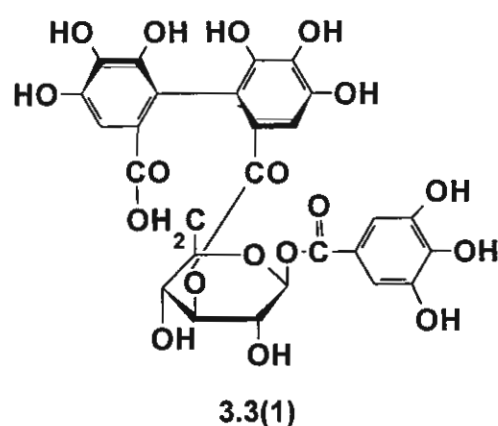
ได้มีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพืชใน genus *Acalypha* บ้างพอสมควรได้แก่ *Acalypha australis*, *Acalypha indica*, *Acalypha diversifolia*, และ *Acalypha macrostachya* เช่น

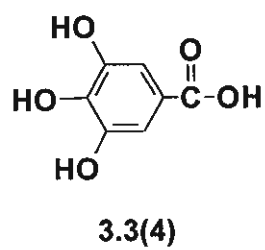
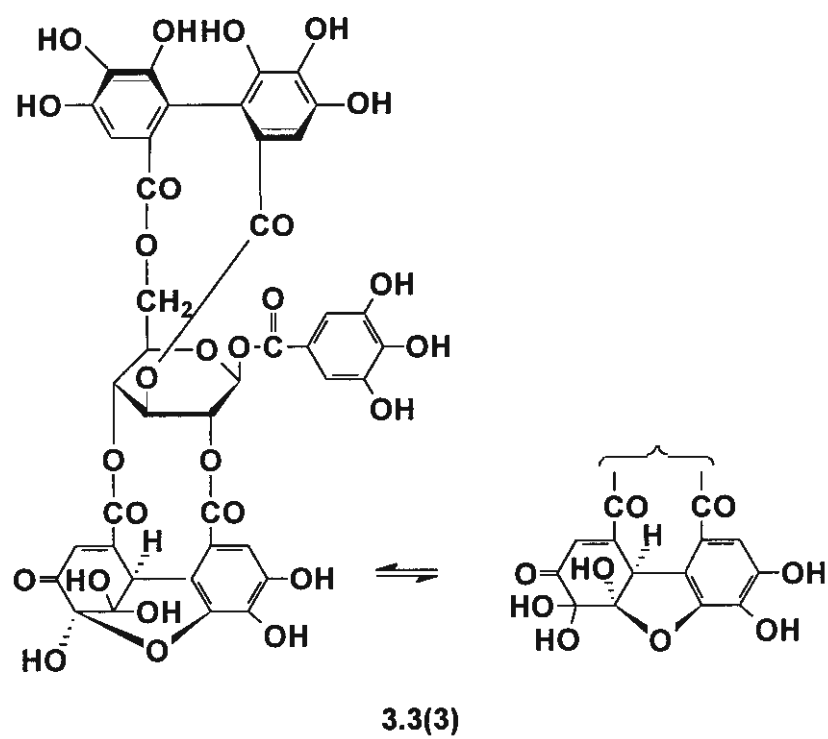
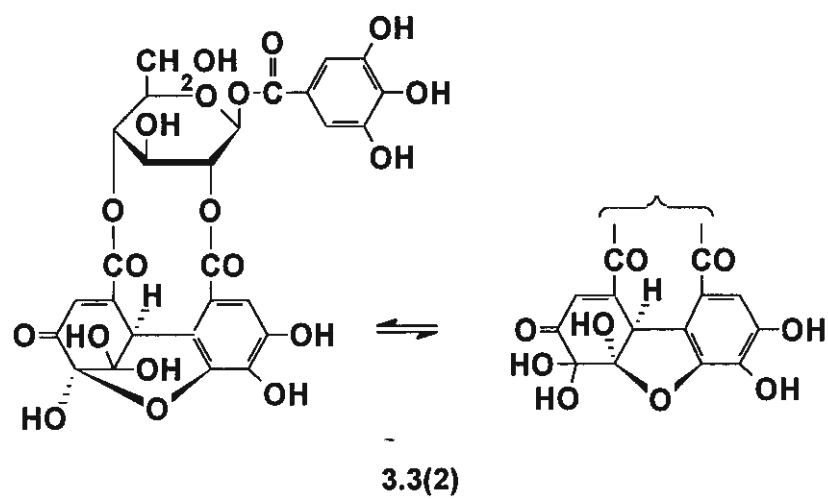
Acalypha australis: ใน ค.ศ. 1993 Park และคณะ^{3.3[6]} สามารถแยกสารแทนนินจากพืชทั้งต้น ได้แก่ corilagin [3.3(1)], fugosin [3.3(2)], geraniin [3.3(3)], gallic acid [3.3(4)], protocatechuic acid, isoquercetin, rutin [3.3(5)], และ caffeic acid [3.3(6)]; ในปี ค.ศ. 1994 Zhan และคณะ^{3.3[7]} รายงานการแยก palmityl palmitate, 1-triacontanol, β -sitosterol [3.3(7)], saccharose, D-fructose, และ raffinose จากส่วนต้น และในปี ค.ศ. 1995 Weifeng และคณะ^{3.3[8]} สามารถแยก australisin [3.3(8)], β -sitosterol และ daucosterol จากพืชทั้งต้น

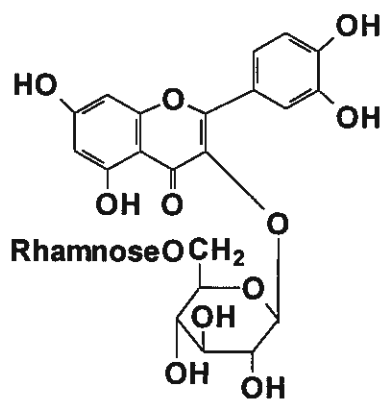
Acalypha diversifolia: ในปี ค.ศ. 1996 Siems และคณะ^{3.3[9]} รายงานการแยก anomalamide [3.3(9)] ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ phenylalanine derivative จากพืชชนิดนี้

Acalypha indica (ตำแยแมว): ในปี ค.ศ. 1982 Nahrstedts และคณะ^{3.3[10]} รายงานการแยกสาร acalyphin [3.3(10)] ซึ่งเป็น cyanogenic alkaloid glucoside จากส่วนสกัดเมทานอลของใบแห้ง และในปี ค.ศ. 1997 Ma และคณะ^{3.3[11]} สามารถแยกสารแทนนินซึ่งประกอบด้วย potassium brevifolin carboxylate [3.3(11)], acaindinin [3.3(12)], 1-O-galloyl- β -D-glucose [3.3(13)], 1,2,3,6-tetra-O-galloyl- β -D-glucose [3.3(14)], corilagin, geraniin, acetonyl geraniin [3.3(15)], euphomisin M₂ [3.3(16)], repandusinic acid [3.3(17)], chebulagic acid [3.3(18)] รวมทั้ง flavonoid glycosides อีก 2 ชนิด คือ quercetin-3-O- β -D-glucose [3.3(19)] และ rutin จากใบของต้นตำแยแมว

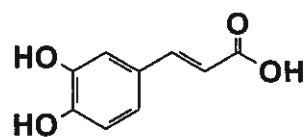
Acalypha macrostachya: ปี ค.ศ. 1996 Siems และคณะ^{3.3[9]} สามารถแยกสาร diterpenes ชื่อ 18-hydroxy-7-oxo-15,16-epoxyfriedolabda-5,13(16),14-triene [3.3(20)], 3- α -hydroxy-7-oxo-15,16-epoxyfriedolabda-5,13(16),14-triene [3.3(21)], และ sesquiterpene ชื่อ 7, 8-dihydroxy-a-curcumene [3.3(22)] พร้อมกับ N-trans-feruloyl tyramine [3.3(23)] และ β -stigmasterone จากส่วนสกัดลำต้นของ *Acalypha macrostachya*



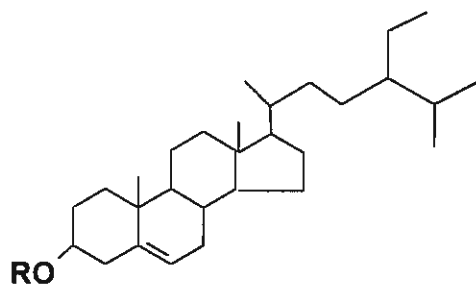




3.3(5)

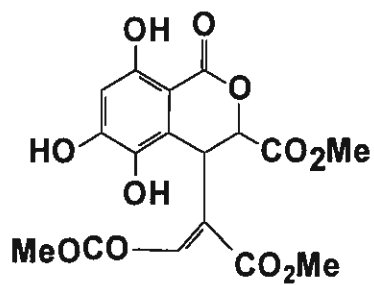


3.3(6)

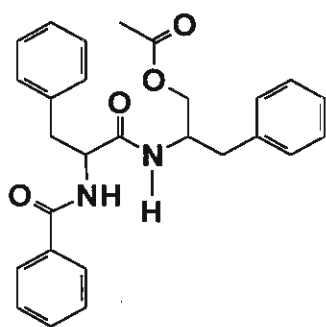


3.3(7) R = H

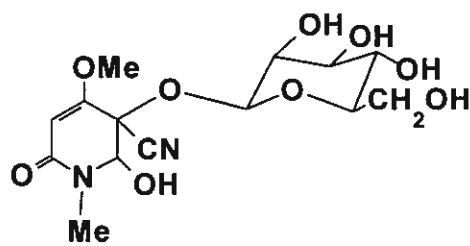
3.3(25) R = Glucose



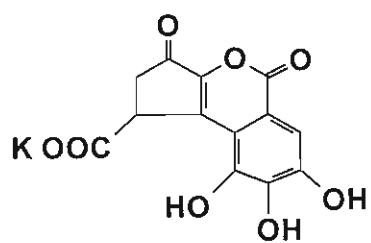
3.3(8)



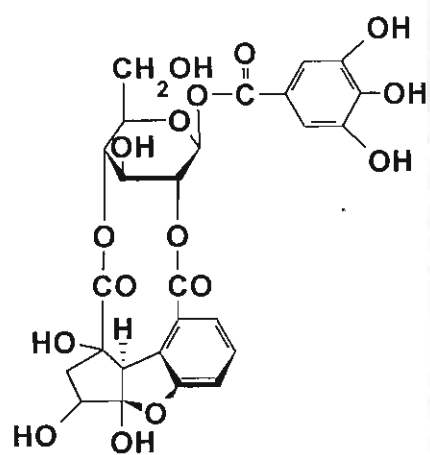
3.3(9)



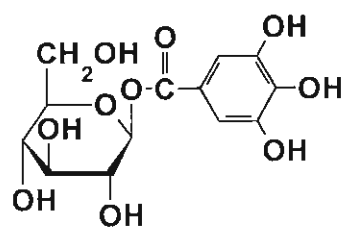
3.3(10)



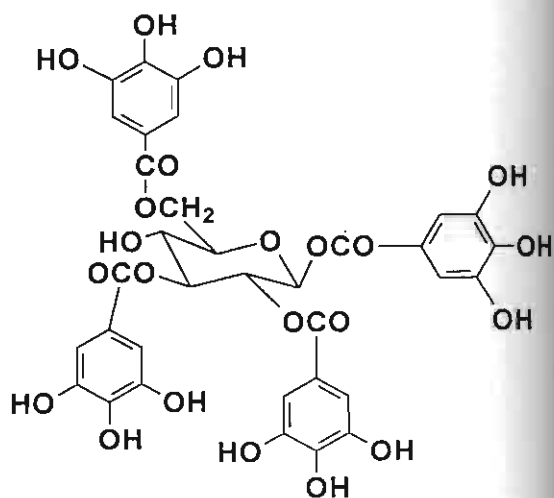
3.3(11)



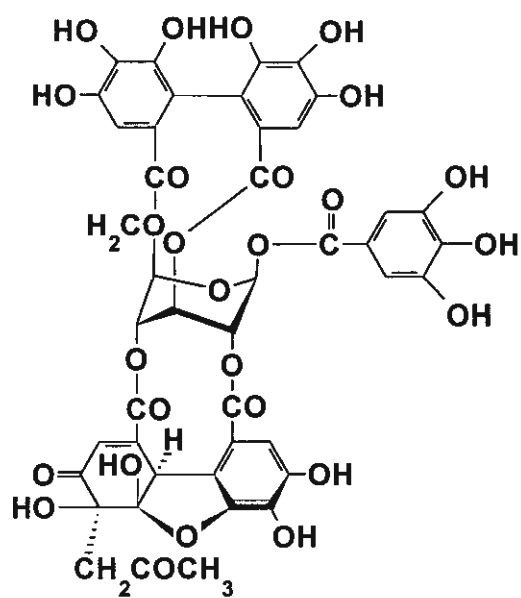
3.3(12)



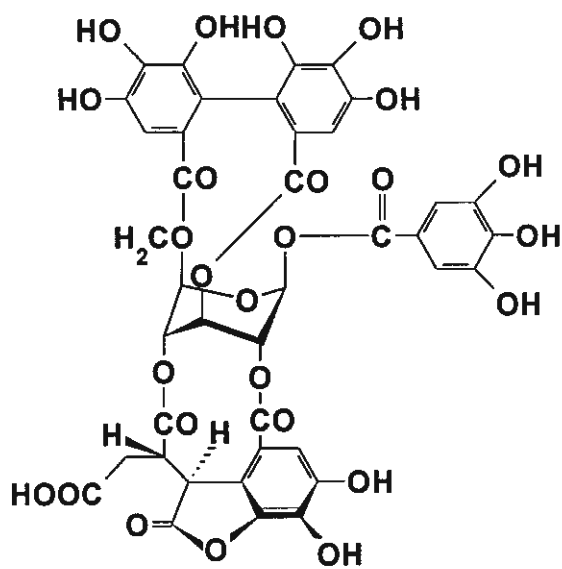
3.3(13)



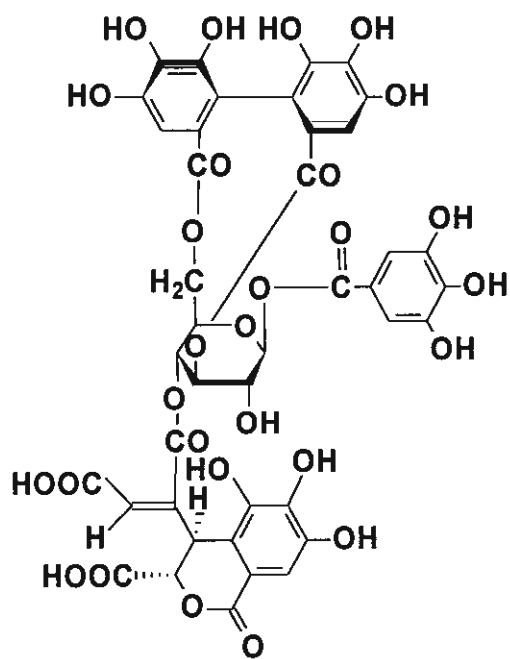
3.3(14)



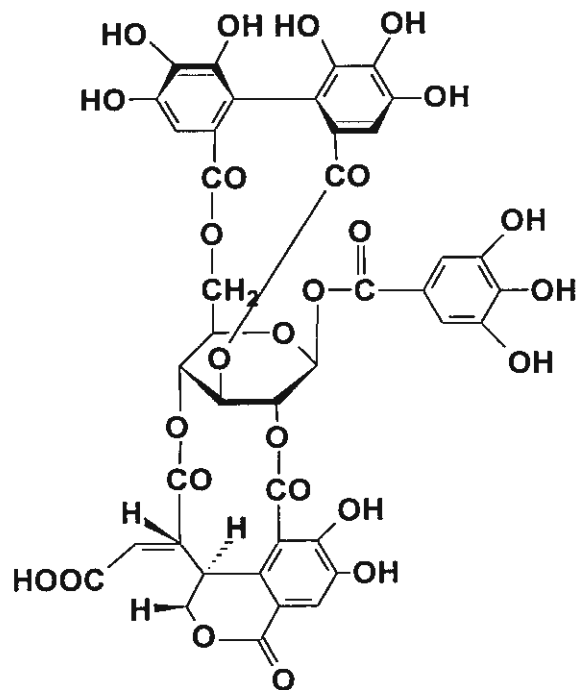
3.3(15)



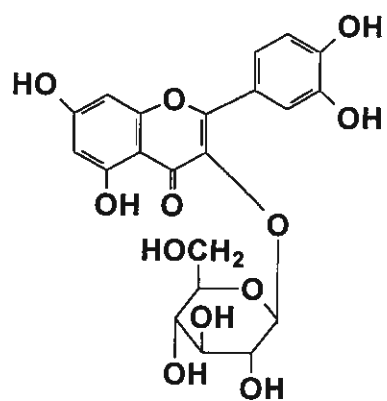
3.3(16)



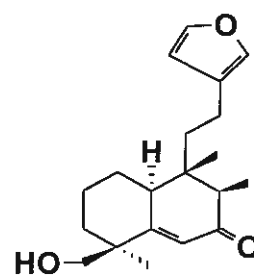
3.3(17)



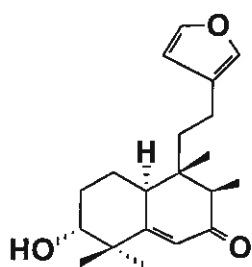
3.3(18)



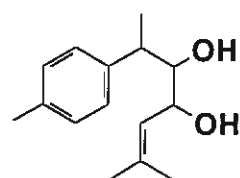
3.3(19)



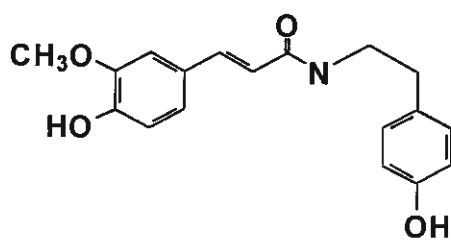
3.3(20)



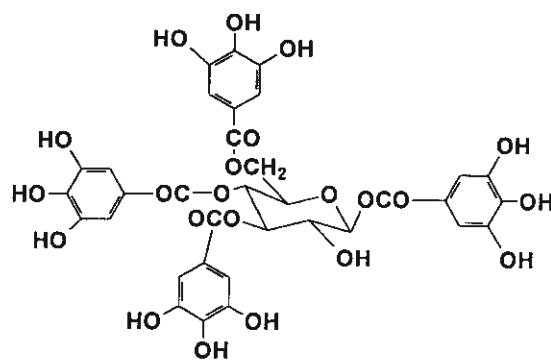
3.3(21)



3.3(22)



3.3(23)



3.3(24)

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

จากการแยกโดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟีแบบต่าง ๆ ทำให้สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้จากส่วนสกัดเมทานอลโดยตรง 4 ชนิด และจากส่วนย่อยที่เตรียมให้เป็นสารอนุพันธ์ที่มีชั้วน้อยลง 1 ชนิด สารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดเฮกเซน 5 ชนิด จากส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนได้ 1 ชนิด การหาเอกลักษณ์ของสารดังกล่าวใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

1. Gallic acid [3.3(4)]

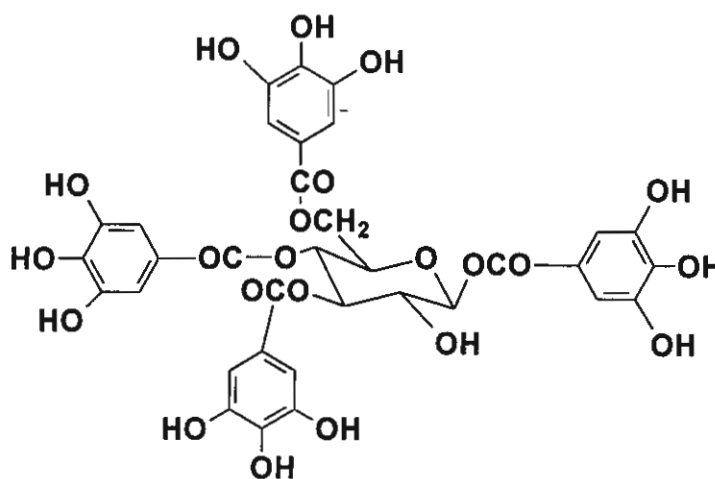
สาร [3.3(4)] เป็นผงสีน้ำตาล mp. 110 °C; EI-MS สเปกตรัมให้ base peak ที่ m/z 170 แสดงว่าสูตรโมเลกุลของสารนี้เป็น $C_7H_6O_6$; มี UV λ_{max} 215 และ 270 nm ซึ่งแสดงเอกลักษณ์ของหมู่ phenyl; FT-IR สเปกตรัมแสดงการดูดกลืนที่ 3395 cm^{-1} ของหมู่ OH และ 1690 cm^{-1} การยืดของหมู่ C=O ที่ 1612 cm^{-1} แสดงการยืดของหมู่ phenyl; ^1H NMR สเปกตรัมแสดงสัญญาณของ aromatic proton เพียงสัญญาณเดียวที่ δ 7.13; ^{13}C NMR สเปกตรัม แสดง 5 สัญญาณของคาร์บอน ในจำนวนนี้มี 4 quaternary C (2 quaternary C ที่ δ 150.3, 142.9 เป็น oxygenated C และที่ δ 172.1 ของ C=O ของกรด) จากข้อมูลข้างต้นแสดงว่าสาร [3.3(4)] คือ gallic acid

2. 1,3,4,6-Tetra-O-galloyl- β -D-glucopyranose [3.3(24)]

สาร [3.3(24)] เป็นผงสีน้ำตาลแกมเหลือง mp. 180 °C ทั้ง EI-MS และ FAB-MS ไม่ให้ molecular ion; FT-IR สเปกตรัม แสดงแถบดูดกลืนที่ 3407 และ 1212 cm^{-1} เกี่ยวข้องกับการยืดของพันธะ O-H และ C-O ของฟีนอล แถบที่คมชัดระหว่าง 1740-1700 และ 1614 cm^{-1} แสดงการยืดของพันธะ C=O ของ phenyl ester และของพันธะ C=C ในหมู่ phenyl

การที่ ^1H NMR สเปกตรัมที่แสดง 4x2H singlet ที่ δ 7.14, 7.07, 7.03 และ 6.99 และสัญญาณของ ^{13}C NMR สเปกตรัมที่ δ 163.0, 162.9, 162.5, และ 162.1 แสดงว่าสาร [3.3(24)] มีหมู่ galloyl 4 หมู่ สำหรับ 1H doublet ที่ δ 5.94 (J = 8.2 Hz) แสดงว่า anomeric

proton ของวง glucopyranose มีการจัดตัวของโปรตอนดังกล่าวเป็น α ซึ่งแสดงว่าโครงรูปของ glucose ในสาร [3.3(24)] เป็นแบบ $^1C_1$ ซึ่งมีหมู่ OH ทุกหมู่ในลักษณะ equatorial เมื่อพิจารณา ^1H NMR สเปกตรัมโดยละเอียดทำให้สามารถวิเคราะห์สัญญาณต่างๆได้ ดังแสดงในตารางที่ 3.3.1 จากการวิเคราะห์สัญญาณดังกล่าวทำให้สรุปได้ว่า สาร [3.3(24)] คือ 1,3,4,6-tetra-O-galloyl- β -D-glucopyranose ซึ่งผลวิเคราะห์ตรงกับค่าที่เคยมีรายงานไว้^{3.3[14]}



3.3(25)

3. Corilagin [3.3(1)]

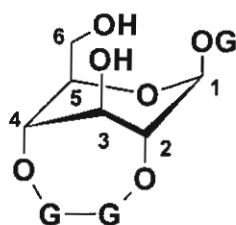
สาร [3.3(1)] เป็นผงสีน้ำตาลแกมเหลือง mp. 167-172°C ให้สีน้ำเงินกับ ferric chloride รีเอเจนต์บนแผ่น TLC แสดงว่าสารนี้เป็นสาร phenolic^{3.3[15]} EI-MS และ FAB-MS ไม่ให้ molecular ion; FT-IR แสดงแถบดูดกลืนที่ 3410 และ 1201 cm^{-1} ซึ่งเกี่ยวข้องกับการยืดของพันธะ O-H และ C-O ของหมู่ฟีนอลตามลำดับ แถบที่ 1740-1720 cm^{-1} เกี่ยวข้องกับการยืดของพันธะ C=O ของ phenyl ester และที่ 1615 cm^{-1} ของพันธะ C=C^{3.3[13]}

^1H NMR สเปกตรัมแสดง 2H singlet ที่ δ 7.10 ซึ่งเป็นสัญญาณของหมู่ galloyl สัญญาณ 1H singlet 2 สัญญาณที่ δ 6.68 และ 6.83 ซึ่งอยู่ upfield จากสัญญาณของ galloyl H เป็นของหมู่ aromatic H ในหมู่ hexahydroxydiphenoyl (HHDP)^{3.3[16]} สัญญาณ 1H broad singlet ที่ δ 6.37 เป็นสัญญาณของ anomeric proton ของ glucopyranose ซึ่งหมู่ anomeric hydroxy ถูก

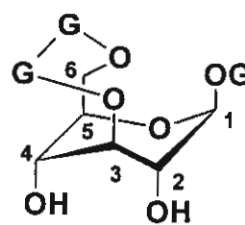
acylated และการที่ anomeric proton ให้สัญญาณเป็น broad singlet แสดงว่า vicinal coupling constant ระหว่าง H-1 และ H-2 มีค่าเล็ก ซึ่งบ่งบอกว่า โครงแบบของน้ำตาลในสาร [3.3(1)] เป็นแบบ $^1C_4$ คืออยู่ในรูป chair form ที่มีหมู่ OH จัดตัวในลักษณะ axial ทั้งหมด

การมีสัญญาณ carbonyl carbon 3 สัญญาณ ใน ^{13}C NMR สเปกตรัมที่ δ 165.2, 163.7 และ 161.7 แสดงว่ามีหมู่ acyl อยู่เพียง 3 หมู่ หรือหมู่ OH ของน้ำตาล 3 หมู่เท่านั้นถูก acylated สัญญาณที่ δ 165.2 และ 163.7 เป็นของ HHDP carbonyl carbon เนื่องจาก carbonyl carbon ของหมู่ HHDP ปรากฏ downfield กว่า carbonyl carbon ของหมู่ galloyl ^{3.3[16]}

จากโครงสร้างของ glucose ที่พบว่าเป็นแบบ $^1C_4$ และการมีหมู่ galloyl 1 หมู่ และ หมู่ HHDP 1 หมู่แสดงว่าการเชื่อมหมู่ OH 2 หมู่ใน glucose กับหมู่ HHDP สามารถเกิดขึ้นได้หากสาร [3.3(1)] เป็น 1-O-galloyl-2,4-HHDP- β -D-glucose [3.3(1)] A หรือ 1-O-galloyl-3,6-HHDP- β -D-glucose [3.3(1)] B



3.3(1) A



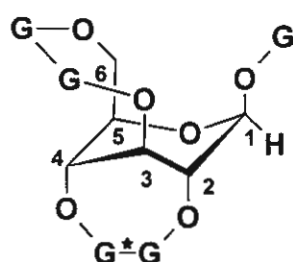
3.3(1) B

แต่เนื่องจากใน ^1H NMR สเปกตรัมไม่มีสัญญาณอันเนื่องมาจาก C-CH₂OH ที่ประมาณ δ 3.6 ที่ควรจะได้หากโครงสร้างของสาร [3.3(1)] เป็นแบบ [3.3(1)] A ทำให้สรุปได้ว่า โครงสร้างของ [3.3(1)] คือ [3.3(1)] B ค่า chemical shift ของโครงสร้าง [3.3(1)] B สามารถกำหนดได้ดังแสดงในตาราง 3.3(2) ฉะนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า สาร [3.3(1)] คือ 1-O-galloyl-3,6-HHDP- β -D-glucopyranose หรืออีกชื่อหนึ่งคือ corilagin ค่า chemical shift ที่กำหนดสอดคล้องกับค่าที่มีรายงานไว้ ^{3.3[16,18]}

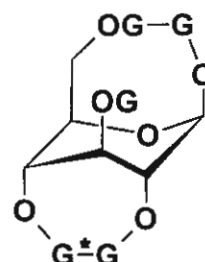
4. Geraniin [3.3(3)]

สาร [3.3(3)] เป็นผงสีน้ำตาลแกมเหลือง mp. 235–237 °C ให้สีน้ำเงินเข้มกับ ferric chloride รีเอเจนต์ แสดงว่าเป็นสาร phenolic; EI-MS และ FAB-MS ไม่ให้ molecular ion; FT-IR แสดงแถบดูดกลืนที่ 3432 และ 1354 cm^{-1} ซึ่งเกี่ยวข้องกับการยืด และบิดของพันธะ O-H แถบที่ 1723 และ 1608 cm^{-1} เกี่ยวข้องกับการยืดของพันธะ C=O ของหมู่ ester และพันธะ C=C ของวง aromatic^{3,3[13]}

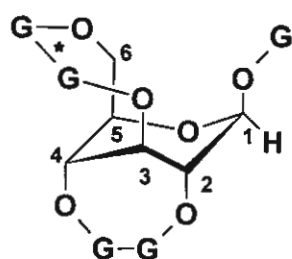
^1H NMR สเปกตรัมมีสัญญาณของ sugar proton ที่ค่อนข้าง low field ที่ประมาณ δ 4.3–5.1 ซึ่งแสดงว่าหมู่ไฮดรอกซิลทุกหมู่ถูก acylated ค่า chemical shift ของ anomeric proton ของวง glucopyranose ที่หมู่ anomeric hydroxy ถูก acylated สัญญาณที่ δ 6.59 มีลักษณะเป็น singlet แสดงว่า vicinal coupling ระหว่าง H-1 และ H-2 มีค่าน้อย บ่งบอกว่าวง glucopyranose มีโครงแบบ $^1\text{C}_4$ สัญญาณ proton singlet ที่ δ 7.17 หรือ 7.19 และสัญญาณ carbonyl carbon ที่ δ 164.9 หรือ 165.4 แสดงว่าโมเลกุลมีหมู่ galloyl สัญญาณ ^1H singlets ที่ δ 7.07 หรือ 7.14 และ 6.64 หรือ 6.66 บ่งบอกว่ามีหมู่ 4,4',5,5',6,6'-hexahydroxydiphenyl (HHDP) อยู่ สัญญาณโปรตอนที่ δ 6.25 ของ vinylic proton รวมกับสัญญาณของ carbonyl carbon ของหมู่ α, β -unsaturated carbonyl ที่ δ 191.78 และ 194.53 แสดงให้เห็นว่าโมเลกุลมีหมู่ didehydrohexahydroxydiphenyl (DHHDP) อยู่ สาร [3.3(3)] จึงเป็นสารประเภท penta-acylated- β -D-glucopyranose



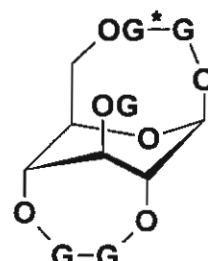
3.3(3) A



3.3(3) B



3.3(3) C



3.3(3) D

G = Galloyl
G—G = HHDP
G*-G = DHHDP

จากลักษณะของสัญญาณทั้งใน ^1H และ ^{13}C NMR สเปกตรัมที่ประกอบด้วยสัญญาณ 2 ชุด แสดงว่า สาร [3.3(3)] อาจเป็นสารผสม 2 ชนิด หรือ เป็นสารที่มี 2 interconvertible isomers การมีหมู่ DHHDP ภายในโมเลกุลน่าจะทำให้ได้สัญญาณเป็น 2 ชุดดังกล่าว

โครงสร้างที่เป็นไปได้ของสาร [3.3(3)] คือ [3.3(3)]A, [3.3(3)]B, [3.3(3)]C และ [3.3(3)]D สำหรับโครงสร้างแบบ [3.3(3)]C และ [3.3(3)]D ที่มี DHHDP เกาะที่ C-3-O/C-6-O และ C-1-O/C-6-O มีรายงานว่าพบน้อย ^{3.3[19,20]} จากการใช้ 2D NMR เทคนิค และจากข้อมูล chemical shifts ต่างๆของ D-glucopyranose ($^{13}\text{C}_4$) ในสารจำพวกแทนนิน และค่า ^{13}C chemical shift ของ carbonyl carbons ของหมู่ galloyl, HHDP และ DHHDP ในวรรณกรรมทางเคมีที่รายงานไว้ ^{3.3[21,22]} ทำให้สามารถเห็นความเกี่ยวข้อง long range ^1H - ^{13}C correlation ที่สำคัญได้ เมื่อพบ long range ^1H - ^{13}C correlation ระหว่าง H-1/C-7A; H-2/C-7D; H-3/C-7D และ H-6/C-7C ทำให้สรุปได้ว่าโครงสร้างที่ถูกต้องคือ โครงสร้าง [3.3(3)]A ซึ่งโครงสร้างดังกล่าวคือโครงสร้างของ geraniin และเนื่องจากโครงสร้างพื้นฐานของ geraniin มีส่วน cyclohexenetrione อยู่ จึงอยู่ได้ 2 form สัญญาณ NMR จึงเห็นเป็น 2 ชุดดังแสดงในตารางที่ 3.3(4) และ 3.3(5)

5. β -Sitosterol [3.3(8)]

สาร [3.3(8)] เป็นผลึกไม่มีสี mp. 138 °C: EI-MS สเปกตรัมให้น้ำหนักโมเลกุลที่ m/z 414 ซึ่งบอกว่ามีสูตรโมเลกุล $C_{29}H_{50}O$; ^1H NMR สเปกตรัมแสดงสัญญาณ doublet ที่ δ 5.35 (1H, $J = 4.9$ Hz) ซึ่งแสดง vinylic proton ของ trisubstituted double bond สัญญาณระหว่าง δ 5.2–5.0 เป็น multiplet แสดงว่ามี olefinic proton สำหรับ multiplet ที่ δ 3.50 (1H, $w_{1/2} = 9.5$ Hz) แสดง carbinolic methine proton และ ช่วง δ 1.1–0.68 แสดงสัญญาณของโปรตอนของหมู่ methyl ข้อมูลข้างต้นสอดคล้องกับค่า chemical shift ที่เคยมีรายงานไว้ของ β -sitosterol^{3.3[23]} จึงสรุปว่าสาร [3.3(5)] คือ β -sitosterol ซึ่งมี stigmasterol ผสมอยู่บ้าง

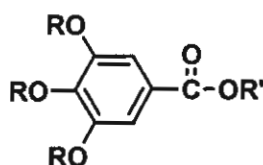
6. β -Sitosteryl glucoside [3.3(25)]

สาร [3.3(25)] เป็นผลึกไม่มีสี mp. 230 °C ; EI-MS แสดง base peak ที่ m/z 396; IR สเปกตรัมแสดงการดูดกลืนที่ 3410 cm^{-1} ของหมู่ OH ค่าที่เห็นไม่ชัดเจนนักที่ 1650 และ 838 cm^{-1} แสดงการยืดของพันธะ $C=C$ และการบิดของ trisubstituted double bond; ^1H NMR มีสัญญาณ br. singlet ที่ δ 5.35 แสดง trisubstituted vinyl proton สัญญาณ doublet ที่ δ 5.12 ($J = 7.6$ Hz) แสดง anomeric proton ของวง glucopyranose สัญญาณในช่วง δ 4.6–4.0 เป็นสัญญาณของ methine protons ที่เกาะที่ oxygenated carbons และในช่วง δ 0.68–1.01 เป็นสัญญาณของหมู่ methyl ข้อมูลดังกล่าวสอดคล้องกับค่า ^1H chemical shifts ของ β -sitosterylglucoside ที่เคยมีรายงานไว้แล้ว^{3.3[24,25]} จึงสรุปได้ว่า สาร [3.3(25)] คือ β -sitosteryl glucoside

7. Ethyl gallate trimethyl ether [3.3(26)]

สาร 3.3(26) เป็นของเหลวหนืดไม่มีสี EI-MS แสดง M^+ ที่ m/z 240 ซึ่งบอกว่ามีสูตรโมเลกุล $C_{12}H_{16}O_5$ ^1H NMR สัญญาณที่ δ 1.36 (3H, t, $J = 7.1$ Hz) และ 4.34 (2H, q, $J = 7.1$ Hz) แสดงว่าโมเลกุลมีหมู่ OCH_2CH_3 ที่ต่อกับหมู่ CO สัญญาณที่ δ 3.87 (3H, s) และ 3.88 (6H, 2xs) แสดงว่ามีหมู่ OMe 3 หมู่ โดย 2 หมู่อยู่ในสิ่งแวดล้อมที่เหมือนกัน การมี

สัญญาณใน ^1H NMR สเปกตรัมที่ δ 7.27 (2H, s) ประกอบกับ ^{13}C NMR สเปกตรัมที่แสดงสัญญาณที่ δ 106.6 (d), 125.39 (s), 141.94 (s) และ 152.75 (2xs) บ่งบอกว่าโมเลกุลประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติกที่เป็น tetrasubstituted และสัญญาณ ^{13}C ที่ δ 166.08 (s) แสดงสัญญาณของ carbonyl carbon ของหมู่เอสเทอร์ จากข้อมูลข้างต้นแสดงว่า สาร [3.3(26)] คือ ethyl gallate trimethylether จากผลการเตรียม และแยกสารอนุพันธ์ที่ได้ ทำให้สรุปได้ว่า สารองค์ประกอบที่เป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในส่วนสกัดเมทานอลส่วนย่อยนี้มี ethyl gallate [3.3(27)] อยู่ด้วย



3.3(26) R = Me, R' = Et

3.3(27) R = H, R' = Et

8. Triacontanol [3.3(28)]

สาร [3.3(28)] เป็นผลึกละเอียดไม่มีสี mp. 79-81 °C; EI-MS สเปกตรัมไม่ให้ M^+ แต่ให้ไอออนสูงสุดที่ m/z 420 เกี่ยวข้องกับ $\text{C}_{30}\text{H}_{60}$ ^1H NMR สเปกตรัมแสดงสัญญาณ triplet ของหมู่เมทิลที่ δ 0.87 (3H, J = 6.8 Hz) สัญญาณที่ δ 1.25 (br s) ซึ่งคำนวณปริมาณโปรตอนได้ประมาณ 70 H แสดงว่าโมเลกุลมีหมู่เมทิลในสายโซ่ไฮโดรคาร์บอน สัญญาณที่ δ 3.65 (2H, q, J = 6.5 Hz) แสดง methylene proton ที่เกาะอยู่กับหมู่ OH จากข้อมูลข้างต้นทำให้สรุปได้ว่า สาร [3.2(28)] คือสารจำพวก long chain alcohol ที่มีหมู่ OH อยู่ที่ปลายสายโซ่ สารประเภทนี้มักแสดง $\text{M}-\text{H}_2\text{O}$ ion ในแมสสเปกตรัม ทำให้ทราบได้ว่า สารนี้มีสูตรโมเลกุล $\text{C}_{30}\text{H}_{62}\text{O}$ จึงสรุปว่าสาร [3.3(28)] คือ triacontanol

9. สาร [3.3(29)]

สาร [3.3(29)] เป็นของเหลวไม่มีสี ^1H NMR (CDCl_3) แสดงสัญญาณที่ δ 0.75(m) ของหมู่เมทิล δ 1.20 (br s) ของหมู่เมทิลีนในสายโซ่ไฮโดรคาร์บอน และสัญญาณของหมู่เมทิลีนที่เกาะอยู่กับหมู่ CO (CH_2CO) ที่ δ 2.3 ทำให้เชื่อว่า สารนี้คือสารจำพวกกรดไขมันสายโซ่ยาว เนื่องจากยังไม่มีข้อมูล EI-MS จึงยังสรุปไม่ได้ว่าสาร [3.3(29)] เป็นกรดชนิดใด

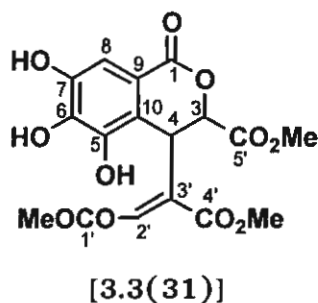
10. สาร [3.3(30)]

สาร [3.3(30)] เป็นของเหลวไม่มีสี ^1H NMR (CDCl_3) แสดงสัญญาณที่ δ 0.9 (t) ของหมู่เมทิล δ 1.25 (br s) ของหมู่เมทิลีนในสายโซ่ไฮโดรคาร์บอน δ 1.6 (br m) ของหมู่เมทิลีน และสัญญาณที่ δ 2.3 แสดงว่าเป็นหมู่ CH_2CO จากข้อมูลที่มีอยู่ขณะนี้ เชื่อว่า สาร [3.3(30)] คือ long chain fatty acid ผลจาก EI-MS จะทำให้ทราบว่าสาร [3.3(30)] เป็นกรดชนิดใด

11. Chebulic acid trimethyl ester [3.3(31)]

สาร [3.3(31)] ซึ่งแยกได้จากส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน เป็นของแข็งไม่มีสี mp. 193-196 $^{\circ}\text{C}$ มีลักษณะบนแผ่น TLC เป็นทางเมื่อใช้ตัวทำละลายหลายระบบ ให้สีน้ำเงินเมื่อย้อมด้วย 3% FeCl_3 แสดงว่า สารเป็นสารประกอบฟีนอล; EI-MS สเปกตรัมให้น้ำหนักโมเลกุลที่ m/z 396 ซึ่งบอกว่ามีสูตรโมเลกุล $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_{11}$; IR สเปกตรัมแสดงการดูดกลืนที่ 3413 cm^{-1} ของหมู่ OH ค่ารระหว่าง $1730\text{--}1713\text{ cm}^{-1}$ สังเกตเห็นเป็น 4 peak แสดงหมู่ C=O ของเอสเทอร์ จากสัญญาณใน ^1H NMR spectrum (CD_3COCD_3) ที่มี aromatic H เพียงตัวเดียวที่ δ 7.09 (1H, s) และ ^{13}C NMR สเปกตรัมที่มี aromatic methine proton เพียงสัญญาณเดียวที่ δ 109.2 (d) แสดงว่าโมเลกุลมี pentasubstituted aromatic ring จากลักษณะของ ^1H NMR สเปกตรัมที่ไม่ค่อยแสดงการ couple กันระหว่างโปรตอนต่างๆ ทำให้จำเป็นต้องใช้เทคนิค 2D NMR ช่วย จาก $^1\text{H}\text{--}^1\text{H}$ COSY สเปกตรัมแสดงให้เห็นว่าทั้งสเปกตรัมมีสัญญาณที่ δ 5.25 (1H, d, $J = 1.6\text{ Hz}$, H-3) couple กับสัญญาณที่ δ 5.36 (1H, br s, H-4) เท่านั้น ความเกี่ยวข้องกันระหว่าง

$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ (long range $^1\text{H}-^{13}\text{C}$) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ^3J ที่พบใน HMBC สเปกตรัม ระหว่าง H-8 (δ 7.09) กับ C-1 (δ 163.15), C-7 (δ 145.45). C-6 (δ 138.23), C-9 (δ 117.35) และ C-10 (δ 114.82); ระหว่าง H-3 (δ 5.24) กับ C-1, C-10, C-3' (δ 141.90), C-5' (δ 169.65); ระหว่าง H-4 (δ 5.36) กับ C-10, C-2' (δ 128.88), C-4' (δ 165.19), และ C-3' และระหว่าง H-2' กับ C-4 (δ 34.17) และ C-4' ทำให้ทราบโครงสร้างของสาร [3.3(31)] ได้ ข้อมูลที่ได้จาก $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY, HMQC และ HMBC สเปกตรัม ทำให้สามารถกำหนดค่า chemical shifts ของ ^1H และ ^{13}C ของสาร [3.3(31)] ได้ดังแสดงในตารางที่ 3.3 (6) จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นทำให้สรุปได้ว่าสาร [3.3(31)] คือ chebulic acid trimethylester



วัสดุและวิธีการ

การสกัดและการแยก

นำส่วนเหนือดินแห้งที่ได้รับการบดเป็นชิ้นเล็ก (2 kg) มาแช่ในเมทานอลเป็นเวลา 7 วัน ภายหลังจากระเหยเอาเมทานอลออกจนแห้ง นำไปสกัดกับเฮกเซน และ ไดคลอโรมีเทนตามลำดับ ทำให้สามารถแยกสารเป็นส่วนสกัดเฮกเซน (15.34 g) ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน (2.80 g) และ ส่วนสกัดเมทานอล (107.3 g)

คอลัมน์โครมาโทกราฟีส่วนสกัดเมทานอล

นำส่วนสกัดเมทานอล (49 g) มาทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีใช้ซิลิกาเจล (1 kg) เป็นตัวดูดซับ ส่วนผสมระหว่างเอธิลอะซิเตต-เมทานอล-น้ำ (5:1:0.5) เป็นตัวชะ ทำให้แยกสารผสมได้เป็น 11 ส่วนย่อย (ส่วน 1-11) นำส่วนย่อยที่ 2 (0.601 g) มาทำการแยกโดยใช้ Sephadex LH-20 เป็นตัวดูดซับ ตัวทำละลายผสมระหว่าง MeOH-H₂O (30-100%) เป็นตัวชะ ทำให้ได้ 8 ส่วนย่อย (ส่วน 2.1-2.8) เมื่อนำส่วนย่อยที่ 2.7 มาทำการตกผลึกด้วย CHCl₃-MeOH ทำให้ได้ของแข็ง (0.055 g) และ filtrate (0.097 g) นำของแข็งดังกล่าวมาทำการแยกซ้ำอีก (Sephadex LH-20, 30%MeOH-H₂O) ทำให้ได้สาร [3.3(4)] (0.0112 g) การแยกสารผสมจากส่วน filtrate (Sephadex LH-20, 100%MeOH ในครั้งแรก และ 50% MeOH-H₂O ในการแยกครั้งที่ 2) ทำให้ได้ของแข็งที่ยังไม่บริสุทธิ์นัก การแยกต่อด้วย HPLC (RP C-8, 60%MeOH-H₂O) ทำให้ได้สาร [3.3(24)] (0.0057 g)

นำส่วนย่อยที่ 5 มาทำการแยก (Sephadex-LH 20, 50%MeOH-H₂O) ทำให้ได้ 6 ส่วนย่อย (ส่วน 4.1-4.6) เมื่อนำส่วนย่อยที่ 4.2 มาทำการแยกซ้ำ (Sephadex LH 20, 30-100% MeOH-H₂O ในครั้งแรก และ reversed phase open column RP C-18, 20%CH₃CN-H₂O ทำให้ได้สาร [3.3(1)] (0.0177 g) ส่วนย่อยที่ 4.4 ทำการแยกโดยใช้ RP-C-18 open CC (H₂O-CH₃CN 9:1 - 1:9) ทำให้ได้สาร [3.3(3)] (0.105 g) ส่วนย่อยที่ 4.6 ทำการแยก

โดย reversed phase CC (RP-C-18, H₂O-CH₃CN 9:1 - 1:9) ทำให้ได้สาร [3.3(24)] (0.020 g) เพิ่มเติม

จากความสูญเสียที่พบเมื่อใช้ซิลิกาเจลธรรมดาเป็นตัวดูดซับเมื่อทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ และจากลักษณะ TLC ของส่วนย่อยที่ 2, 4 และ 5 ที่คล้ายคลึงกัน แต่ความเข้มข้นขององค์ประกอบแตกต่างกันบ้าง จึงนำส่วนย่อยที่ 4 (0.600 g) มาทำการเตรียมสารอนุพันธ์โดยใช้ CH₂N₂^{3.3[24]} ซึ่งเตรียมจาก diazal (5 g) ทำปฏิกิริยากับ KOH (2.0 g) ในเอทานอล (8 ml)/ น้ำ (2 ml) นำสารอนุพันธ์ผสมที่ได้ (0.747 g) มาทำการแยกโดยคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้เฮกเซน-เอธิลอะซิเตต (9:1)-เอธิลอะซิเตต-เมทานอล (95:5) เป็นตัวชะ ทำให้ได้ 6 ส่วนย่อย (ส่วน 4.1-4.6) ส่วนย่อยที่ 4.1 (0.020 g) ได้สาร [3.3(26)] เกือบบริสุทธิ์ นำส่วนย่อยที่ 4.2 (0.059 g) มาทำการแยกซ้ำ (silica gel CC, เฮกเซน-เอธิลอะซิเตต 9:1 - 1:1) ทำให้ได้ 5 ส่วนย่อย (ส่วนย่อย 4.2.1-4.2.5) ส่วนย่อยที่ 4.2.1 เป็นสาร [3.3(26)] (0.031 g) บริสุทธิ์ ส่วนย่อยอื่นกำลังอยู่ระหว่างดำเนินการแยกสารให้บริสุทธิ์

สาร [3.3(4)]: ผงสีน้ำตาล; IR: $\nu_{\max}$ 3395(br), 2925, 2850, 1690, 1384, 1347, 1332, 1254, 1026, 873, 769, 668 cm⁻¹; ¹H NMR (CD₃COCD₃): δ 7.13(s); ¹³C NMR (CD₃COCD₃): δ 172.1, 150.3 (s), 142.9 (s), 126.4 (s), 114.3 (d); EI-MS: m/z 170([M]⁺, 100), 153, 126

สาร [3.3(24)]: ผงสีเหลืองแกมน้ำตาล; IR: $\nu_{\max}$ 3407(br), 2920, 2839, 1707, 1614, 1449, 1343, 1212, 1030, 869, 763, 665 cm⁻¹; ¹H NMR (Table 3.3(1)); ¹³C NMR (CD₃COCD₃-D₂O): δ 163.03 (C=O), 162.94 (C=O), 162.46 (C=O), 142.1 (s), 142.03 (s), 141.95 (s), 135.95 (s), 135.66 (s), 135.31 (s), 135.25 (s), 116.85 (s), 116.71 (s), 116.01 (s), 115.95 (s), 106.39 (d), 106.16 (d), 106.14 (d), 106.03 (d), 91.46 (d), 71.83 (d), 69.58 (d), 67.88 (d), 65.63 (d), 59.27 (t)

สาร [3.3(1)]: ผงสีเหลืองแกมน้ำตาล; IR: $\nu_{\max}$ 3410 (br), 2932, 2853, 1720, 1615, 1447, 1350, 1201, 1026, 951, 746, 664 cm⁻¹; ¹H NMR (Table 3.3(2)); ¹³C NMR (Table 3.3(3))

สาร [3.3(3)]: ผงสีน้ำตาลแกมเหลือง; IR: $\nu_{\max}$ 3432 (br), 2917, 1723, 1608, 1444, 1354, 1209, 1078, 1015, 963, 761, 665 cm^{-1} ; ^1H NMR (Table 3.3(4)); ^{13}C NMR (Table 3.3(5))

สาร [3.3(26)]: ของเหลวหนืดไม่มีสี; ^1H NMR (CDCl_3): δ 1.36 (3H, t, $J = 7.1$ Hz), 3.87 (3H, s), 3.88 (6H, 2xs), 4.34 (2H, q, $J = 7.1$ Hz), 7.27 (2H, s); ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 14.25 (q, C-9), 56.07 (q, C-5-OMe and C-3-OMe), 60.74 (q, C-4-OMe), 60.98 (t, C-8), 106.60 (d, C-2 and C-6), 125.39 (s, C-1), 141.94 (s, C-4), 152.75 (s, C-3 and C-5) and 166.08 (s, C-7); EI-MS m/z (rel. int.): 240 ($[\text{M}^+]$ $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_5$, 100), 225(75), 202(12), 197(22), 195(60), 179(5), 153(12), 141(22), 125(18), 108(12), 93(18), 80(12), 66(18)

คอลัมน์โครมาโตกราฟีของส่วนสกัดเฮกเซน

นำส่วนสกัดเฮกเซน (7.027 g) มาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ส่วนผสมระหว่างเฮกเซน-คลอโรฟอร์ม และส่วนผสมระหว่างคลอโรฟอร์ม-เมทานอล ทำให้แยกสารผสมได้ 7 ส่วนย่อย นำส่วนย่อยที่ 3 (932.3 mg) มาทำการแยกซ้ำ (silica gel CC, hexane- CHCl_3 1:1-4:6) ทำให้ได้สารผสม 8 ส่วนย่อย (ส่วน 3.1-3.8) ส่วนย่อยที่ 3.8 (206.6 mg) ทำการแยกซ้ำ (silica gel CC, hexane- CHCl_3 7:3) ทำให้ได้สาร [3.3(7)] เมื่อ นำส่วนย่อยที่ 7 (1.840 g) มาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี (silica gel, CHCl_3 -MeOH 100:0 - 88:12) ทำให้ได้ 6 ส่วนย่อย (ส่วน 7.1-7.6) นำส่วนย่อยที่ 7.2 (121.0 mg) มาทำการตกผลึก ทำให้ได้สาร [3.3(25)]

เมื่อนำส่วนที่ 2 (321.0 mg) มาทำการแยกโดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี (silica gel, เฮกเซน-คลอโรฟอร์ม 4:1-3:7) ทำให้ได้ 10 ส่วนย่อย (ส่วน 2.1-2.10) ส่วนย่อยที่ 2.8 (63.5 mg) เมื่อทำการแยกซ้ำ (silica gel CC, เฮกเซน-เอธิลอะซิเตต 9:1) ทำให้ได้สารผสม 5 ส่วนย่อย (ส่วนย่อยที่ 2.8.1-2.8.5) เมื่อทำการตกผลึกส่วนย่อยที่ 2.8.4 (31.6 mg) ด้วยเมทานอล-เอธิลอะซิเตต ทำให้ได้สาร [3.3(27)] การทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีส่วนที่ 6 (422.8 mg)

(silica gel, คลอโรฟอร์ม-เมทานอล 10:0-9:1) ทำให้ได้สารผสม 3 ส่วนย่อย (ส่วน 6.1-6.3) ส่วนย่อยที่ 6.1 (57.6 mg) ทำการแยกซ้ำ (ซิลิกาเจล คลอโรฟอร์ม-เมทานอล 9:1) ทำให้ได้ 5 ส่วนย่อย (ส่วน 6.6.6-6.1.5) ส่วนย่อยที่ 6.1.5 เป็นสาร [3.3(29)] บริสุทธิ์ (4.2 mg)

เมื่อนำส่วนย่อยที่ 7.7 (200.1 mg) มาทำการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี (ซิลิกาเจล คลอโรฟอร์ม-เมทานอล 95:5-20:80) ได้สารผสม 13 ส่วนย่อย (ส่วน 7.7.1-7.7.13) นำส่วนย่อย 7.7.1 (30.6 mg) มาทำการแยกซ้ำ (ซิลิกาเจล, เอธิลอะซิเตต-คลอโรฟอร์ม 3:97-3:7) ทำให้ได้สารผสม 18 ส่วนย่อย (ส่วน 7.7.1.1-7.7.1.18) ส่วนย่อยที่ 7.7.1.15 เป็นสาร [3.3(30)] (3.2 mg)

สาร [3.3(7)]: ผลึกรูปเข็มจากคลอโรฟอร์ม-เมทานอล mp. 138 °C; IR: $\nu_{\max}$ 3428, 2936, 1643, 1462, 1381, 1054, 1022, 958, 820 cm^{-1} ; ^1H NMR: δ 0.69 (3H, s), 0.82 (6H, d, 8.6), 0.84 (3H, t, 9.6), 0.95 (3H, d, 5), 1.02 (3H, s), 3.50 (1H, m), 5.1 (1H, m), 5.35 (1H, d, 4.8) or 5.35 (1H, d, $J = 4.9$ Hz), 5.2-5.0 (m), 3.5 (1H, m), 1.1-0.68 (m, Me); EI-MS: 414 ($[\text{M}]^+$, 36), 396 (22), 381 (17), 351 (5), 329 (18), 303 (25), 273 (18), 255 (30), 231 (17), 213 (32), 199 (10), 163 (18), 159 (35), 145 (45), 107 (58), 81 (68)

สาร [3.3(25)]: ผลึกไม่มีสีจากคลอโรฟอร์ม-เมทานอล mp. 230 °C; IR: $\nu_{\max}$ 3410, 2936, 1650, 1460, 1025, 838 cm^{-1} ; ^1H NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): δ 3.25 (1H, m), 4.41 (1H, d, 7.6), 5.1 (1H, m), 5.38 (1H, d, $J = 7.2$ Hz); EI-MS: 396 (100), 381 (20), 288 (9), 272 (8), 255 (20), 213 (10), 161 (21), 147 (30), 109 (18), 95 (30), 83 (40)

สาร [3.3(28)]: ผลึกละเอียดไม่มีสีจากเมทานอล-เอธิลอะซิเตต mp. 79-81 °C; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.87 (3H, t, $J = 6.8$ Hz), 1.25 (br s, ~70 H), 3.65 (2H, q, $J = 6.5$ Hz); EI-MS m/z (rel. int.): 420 ($\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$, $\text{C}_{30}\text{H}_{60}$, 1.8), 392 (1.5), 364 (0.5), 225 (3), 209 (1), 195 (1), 165 (5), 153 (8), 139 (10), 125 (18), 111 (32), 97 (65), 83 (62), 69 (60), 57 (100)

สาร [3.3(29)]: ของเหลวไม่มีสี; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 0.75 (m), 1.20 (br s), 1.6 (br m), 2.3 (t); EI-MS: รอดผล

สาร [3.3(30)]: ของเหลวไม่มีสี; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 0.9 (t), 1.25 (br s), 1.6(m), 2.35 (t); EI-MS: รอดผล

คอลัมน์โครมาโทกราฟีส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน

นำส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน (2.8 g) มาทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้ซิลิกาเจล (200 g) เป็นตัวดูดซับ ส่วนผสมระหว่างไดคลอโรมีเทน-เมทานอล (10:0-3:2) เป็นตัวชะ ทำให้แยกสารผสมได้ 9 ส่วนย่อย ส่วน 1-9) นำส่วนที่ 7 (0.105 g) มาทำการแยกโดยใช้ซิลิกาเจลคอลัมน์ ส่วนผสมระหว่างไดคลอโรมีเทน-เมทานอล (19:1-7:3) เป็นตัวชะ ทำให้ได้ 11 ส่วนย่อย (7.1-7.11) ทำการแยกส่วนย่อยที่ 7.9 (0.105 g) ซ้ำ ใช้ซิลิกาเจล เฮกเซน-เอธิลอะซิเตต (1:9-0:10) ทำให้ได้ 4 ส่วนย่อย (ส่วน 7.9.9-7.9.4) ส่วน 7.9.2 และ 7.9.3 มีสาร [3.3(31)] เป็นองค์ประกอบหลัก แต่ระดับความบริสุทธิ์ต่างกัน นำเอาเฉพาะส่วนย่อยที่ 7.9.2 (0.020 g) มาทำการแยกโดยใช้ RP-C-18 silica gel คอลัมน์ เมทานอล-น้ำ (1:5) เป็นตัวชะ ทำให้ได้ 3 ส่วน (ส่วน 7.9.2.1-7.9.2.3) ส่วนที่ 7.9.2.1 เป็นสาร [3.3(31)] บริสุทธิ์ (6 mg)

เมื่อนำส่วนย่อยที่ 5 (200 mg) มาการแยกซ้ำ (silica gel CC เฮกเซน-เอธิลอะซิเตต 7:3-1:1) ทำให้แยกสารผสมได้ 10 ส่วน (ส่วน 5.1-5.10) นำส่วนย่อยที่ 5.4 (30 mg) มาทำการแยกซ้ำ (ซิลิกาเจล เอธิลอะซิเตต-เฮกเซน 3:7) ทำให้ได้ส่วนย่อย 8 ส่วน (ส่วน 5.4.1-5.4.8) ส่วน 5.4.8 ประกอบด้วยสาร [3.3(25)] (7 mg)

จากความพยายามแยกสารองค์ประกอบในส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนส่วนย่อยอื่นๆพบว่า การใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับในชั้นคอลัมน์โครมาโทกราฟีเกิดการสูญเสียมาก ส่วนย่อยต่างๆมีลักษณะปรากฏบนแผ่น TLC เป็นทางยาวกับระบบตัวทำละลายหลายชนิด เมื่อทำการแยกต่อพบว่า สารส่วนใหญ่ค้างติดตัวดูดซับในคอลัมน์ ส่วนย่อยที่พอมีเหลืออยู่กำลังอยู่ระหว่างดำเนินการแยก

สาร [3.3(31)]: เป็นของแข็งไม่มีสี mp. 193-196 °C; IR: $\nu_{\max}$ 3413, 2913, 2846, 1727, 1713, 1608, 1383, 1115; ^1H NMR (CD_3COCD_3) see Table 3.3(6); ^{13}C NMR (CD_3COCD_3) see Table 3.3(6); EI-MS m/z (rel. int.): 396(M^+ , $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_{11}$, 10), 364 (18), 337 (10), 332 (30), 305 (60), 287 (15), 277 (32), 273 (45), 261 (32), 245 (38), 231 (30), 217 (15), 204 (10), 191 (14), 174 (23), 162 (18), 153 (42), 138 (70), 133 (100), 127 (22), 97 (18), 92(30), 83 (46), 77 (45), 55 (50)

ตารางที่ 3.3.1 ^1H NMR data ของสาร [3.3(24)]

H	[3.3(24)] (Acetone- d_6 / D_2O)
H-1	5.94 (d , $J_{1,2} = 8.2$ Hz)
H-2	4.02 (dd , $J_{2,1} = 8.3$; $J_{2,3} = 9.4$ Hz)
H-3	5.62 (t , $J_{3,2} = 9.5$ Hz)
H-4	5.44 (t , $J_{4,3} = 9.8$; $J_{4,5} = 9.8$ Hz)
H-5	4.35 (ddd , $J_{5,4} = 9.8$; $J_{5,6} = 5.1$; $J_{5,6'} = 1.8$ Hz)
H-6	4.49 (dd , $J_{6,6'} = 12.4$; $J_{5,6} = 1.8$ Hz)
H-6'	4.19 (dd , $J_{6,6'} = 12.4$; $J_{5,6'} = 5.1$ Hz)
galloyl H	7.14, 7.07, 7.03 and 6.99 (each 2H, s)

ตารางที่ 3.3.2 ^1H NMR Data of Corilagin [3.3(1)]

^1H	[3.3(1)]
<u>HHDP hydrogens</u>	
H-3b	6.82 (s)
H-3c	6.68 (s)
<u>Galloyl group hydrogens</u>	
H-2a, H-6a	7.10 (s)
<u>Glucose hydrogens</u>	
H-1	6.37 (br s)
H-2	4.05 (br s)
H-3	4.96 (br s)
H-4	4.82 (br s)
H-5	4.46 (br s)
H-6	4.52 (d, $J = 8.2$ Hz)
H-6'	4.09 (dd, $J = 8.0, 3.0$ Hz)
Recorded in $\text{CD}_3\text{COCD}_3\text{-D}_2\text{O}$.	

ตารางที่ 3.3.4 ^1H - ^{13}C Shift Correlation (HETCOR) of Compound [3.3(3)]

^1H chemical shifts (δ , ppm)	Correlated ^{13}C carbon (δ , ppm)
4.73 Glu, H-6 (a-form)	63.80
4.43 Glu, H-6 (a-form)	63.80
4.88 Glu, H-6 (b-form)	63.63
4.31 Glu, H-6 (b-form)	63.63
4.79 Glu, H-5 (a, b-form)	73.19, 72.55
5.52 Glu, H-4 (a-form)	65.85
5.42 Glu, H-4 (b-form)	66.79
5.60 Glu, H-3 (a-form)	62.31
5.47 Glu, H-3 (b-form)	63.24
5.60 Glu, H-2 (a, b-form)	70.46, 69.91
6.55 Glu, H-1 (a, b-form)	91.76, 90.75

ตารางที่ 3.3.3 ^{13}C NMR Data of Corilagin [3.3(1)] (Acetone- d_6 + D_2O)

Carbon	3.3(1)
<u>Ring A</u>	
1a	117.42
2a (6a)	107.46
3a (5a)	142.38
4a	135.81
<u>Ring B and C</u>	
1b	13.1
1c	12.5
2b	122.1
2c	122.3
3b	106.7
3c	104.8
4b	141.4
4c	142.4
5b	133.8
5c	133.3
6b	145.0
6c	142.0
<u>Glucose</u>	
C-1	90.8
C-2	65.3
C-3	66.8
C-4	58.7
C-5	72.1
C-6	60.9
<u>Ester</u>	
COO	165.2
COO	163.7
COO	161.7

ตารางที่ 3.3.5 ^{13}C NMR Data of Compound [3.3(3)]

Carbon	Compound [3.3(3)]	
	a-form	b-form
<u>Glucose</u>		
C-1	90.75	91.76
C-2	69.91	70.46
C-3	63.24	62.31
C-4	65.85	66.79
C-5	72.55	73.19
C-6	63.63	63.80
<u>Ring A</u>		
Galloyl group		
C-1	120.07	119.94
C-2, 6	110.78	110.57
C-3, 5	145.95	145.93
C-4	39.87	139.83
C-7	164.82	164.93
<u>Ring B</u>		
HHDP group		
C-1	117.16	116.95
C-2	124.36	124.54
C-3	110.50	110.20
C-4	144.50	144.50
C-5	137.81	137.75
C-6	145.11	144.96
C-7	166.15	166.15

Carbon	Compound [3.3(3)]	
	a-form	b-form
Ring C		
HHDP group		
C-1	115.08	-
C-2	125.53	125.35
C-3	107.90	107.78
C-4	145.42	145.40
C-5	136.46	136.42
C-6	144.91	145.19
C-7	168.42	168.36
Ring D		
DHHDP group		
C-1	115.71	-
	119.29	-
C-2	113.39	113.32
C-3	145.76	147.65
C-4	138.99	-
C-5	143.35	147.06
C-7	165.37	164.70
Ring E		
DHHDP group		
C-1	46.10	51.88
C-2	154.40	149.11
C-3	128.59	125.00
C-4	191.79	194.53
C-5	96.22	92.36
C-6	92.36	108.99
C-7	165.57	165.71

ตารางที่ 3.3.6 ^1H , ^{13}C NMR spectral data of [3.3(31)] in CD_3COCD_3

Atom	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	HMBC
1		163.15 (s)	
3	5.25(1H, d, $J = 1.6$)	78.31 (d)	C-1, 3', 5', 10
4	5.36 (1H, br s)	34.37 (d)	C-1, 2', 3', 10, 4'
5		142.81 (s)	
6		138.23 (s)	
7		145.45 (s)	
8	7.09 (1H, s)	107.77 (d)	C-1, 6, 7, 9, 10
9		117.35 (s)	
10		114.82 (s)	
1'		a	
2'	6.79 (1H, br s)	128.88 (d)	C-3', 4, 4', C-1'-OMe
3'		141.90 (s)	
4'		165.19 (s)	
5'		169.65 (s)	
C-1'-OMe	3.60 (3H, s)	52.27	
C-4'-OMe	3.61 (3H, s)	51.94	
C-5'-OMe	3.65(3H, s)	52.27	

^a obscured by other signal; J in Hz

เอกสารอ้างอิง

- 3.3[1] Alade, P. I.; Irobi, O. N. *J. Ethnopharmacol.* 1993, **39**, 171.
- 3.3[2] Adesina, S. K.; Ogumtimehen, B. J.; Akinvusi, D. D. *Quarterly J. Crude Drug Res.* 1980, **18**, 45.
- 3.3[3] Pushpangadan, P.; Atal, C. K.; *J. Ethnopharmacol.* 1984, **11**, 59.
- 3.3[4] Siddiqui, M. B.; Husain, W. *Fitoterapia* 1990, **61**, 41.
- 3.3[5] Samuelsson, G.; Farah, M. H.; Claeson, P.; Hagos, M.; Thulin, M.; Hedberg, O. A.; Warfa, A. M.; Hassam, A. O.; Elmi, A. S.; Abdurahman, A. D.; Elmi, A.S.; Abdi, Y. A.; Alin, M. H. *J. Ethnopharmacol.* 1992, **37**, 47.
- 3.3[6] Park, W. Y.; Lee, S. C.; Ahn, B. T.; Lee, S. H.; Ro, J. S.; Lee, K. S. *Korean J. Pharmacog*, 1993, **1**, 20.
- 3.3[7] Zhang, B.; Lin, R. C.; Koch, M. *Fitoterapia* 1994, **65**, 284.
- 3.3[8] Weifeng, D; Zhongwen, L.; Handong, S. *Acta Botanica Yunnanica* 1994, **16**, 413.
- 3.3[9] Siems, K.; Jakupovic, J.; Castro, V.; Poveda, L. *Phytochemistry* 1996, **41**, 851.
- 3.3[10] Nahrstedt, A.; Kant, J. D.; Wray, V. *Phytochemistry* 1982, **21**, 101.
- 3.3[11] Ma, Y. T.; Chuang, J. I.; Lin, J. H.; Hsu, F. L. *J. Chinese Chem. Soc.* 1997, **44**, 499.
- 3.3[12] Pouchert, C. J.; Behnke, J. *The Aldrich Library of ¹²C and ¹H FT NMR Spectra*, The Aldrich Chemical Co. 1993, **2**, 1147.
- 3.3[13] Williams, D. H.; Fleming, I. *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*, McGraw-Hill, London, 1966.
-

- 3.3[14] Yoshida, T.; Amakura, Y.; Liu, Y. Z.; Okuda, T. *Chem. Pharm. Bull.* 1994, **42**, 1803.
- 3.3[15] Yoshida, T.; Namba, O.; Lu, C. F.; Yang, L. L.; Yan, K. Y.; Okuda, T. *Chem. Pharm. Bull.* 1992, **40**, 338.
- 3.3[16] Haslem, E. *Plant polyphenols, vegetable tannins revisited*, Cambridge University Press: Cambridge, 1989, 112.
- 3.3[17] Yoshida, T.; Okuda, T. *Heterocycles*, 1980, **14** (11), 1743.
- 3.3[18] Yazaki, K.; Hatano, T.; Okada, T. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1989, 2289.
- 3.3[19] Okuda, T.; Yoshida, T.; Hatano, T., *Phytochemistry*, 1993, **32**, 507.
- 3.3[20] Yoshida, T.; Namba, O.; Kurokawa, K.; Amakura, Y.; Lin, Y. Z.; Okuda, T. *Chem. Pharm. Bull.* 1994, **42**, 2005.
- 3.3[21] Rubinstein, I.; Goad, L. J.; Claque, D. H.; Mulheirn, J. *Phytochemistry* 1976, **15**, 195.
- 3.3[22] Ruangrunsi, N.; Aukknibutra, A.; Phadungcharoen, T.; Lange, G. L.; Lee, M. C. *J. Sci. Soc. Thailand* 1987, **13**, 57.
- 3.3[23] Ott, A. C.; Ball, C. D. *J. Amer. Chem. Soc.* 1944, **66**, 489.
- 3.3[24] De Boer, J.; Backer, H. J. *Organic Syntheses Coll. Vol. 4* John Wiley, 1963, p.943.

โครงการย่อยกลุ่มที่ 3 : การหาสารควบคุมศัตรูพืชจากธรรมชาติ

โครงการวิจัยหน่วยที่ 4 : ราลูกบอล *Sclerotinia citrinum*

บทนำ

1. คำนำ

เป็นที่ทราบกันดีว่าการใช้สารเคมีในการกำจัดศัตรูพืชก่อปัญหาด้านสิ่งแวดล้อม และด้านสาธารณสุขของชุมชน และผลของการดื้อยาของศัตรูพืชทำให้ต้องเพิ่มปริมาณการใช้สารเคมีเพื่อป้องกันผลผลิต การค้นหาสารจากธรรมชาติเพื่อใช้แทนสารเคมีสังเคราะห์เป็นทางเลือกหนึ่งที่กำลังเป็นกระแสนี้ทั่วโลก

2. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

จากการค้นหา ราขนาดใหญ่และเห็ด ที่มีศักยภาพในการกำจัดเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจอันดับต้น ๆ ของประเทศคือ *Phytophthora palmivora* (สาเหตุโรครากเน่า โคนเน่าในทุเรียนและพริกไทย) *P. parasitica* (สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของส้ม) *Colletotrichum gloeosporioides* (สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงและส้ม) พบว่าราลูกบอล *Sclerotinia citrinum* ในส่วนสกัดหยาบ MeOH มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *P. parasitica* ให้ค่า $ED_{50} = 76 \mu\text{g/ml}$ ซึ่งนับว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ดี ดังนั้นการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของราขนาดใหญ่ (macro fungi) ชนิดนี้จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจเพื่อค้นหาสารที่ออกฤทธิ์และพัฒนาเพื่อใช้ด้านการเกษตรต่อไปในอนาคต

3. วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. แยกองค์ประกอบทางเคมีจาก *S. citrinum*
2. ศึกษาโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้
3. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้กับเชื้อก่อโรคพืชและโรคมนุษย์บางชนิด

4. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

องค์ประกอบทางเคมีของรา class *Gasteromycetes* โดยเฉพาะสกุล *Sclerotinia* sp.^{4,2[1]} นั้นยังไม่มีรายงานการศึกษา ได้เคยมีรายงานการใช้ราขนาดใหญ่คือรารังนก (*Cyathus* sp.) ซึ่งอยู่ใน class เดียวกัน *Gasteromycetes* ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและราชนิดต่าง ๆ อย่างได้ผล^{42[2]} โดยพบว่าองค์ประกอบหลักจากราประเภทนี้คือกลุ่มสาร cyathin ได้แก่ cyathin A₃ Cyathin A₄ allocyathin A₄ Cyathin B₃ Cyathin B₄ และ Cyathin C₅ เป็นต้น

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

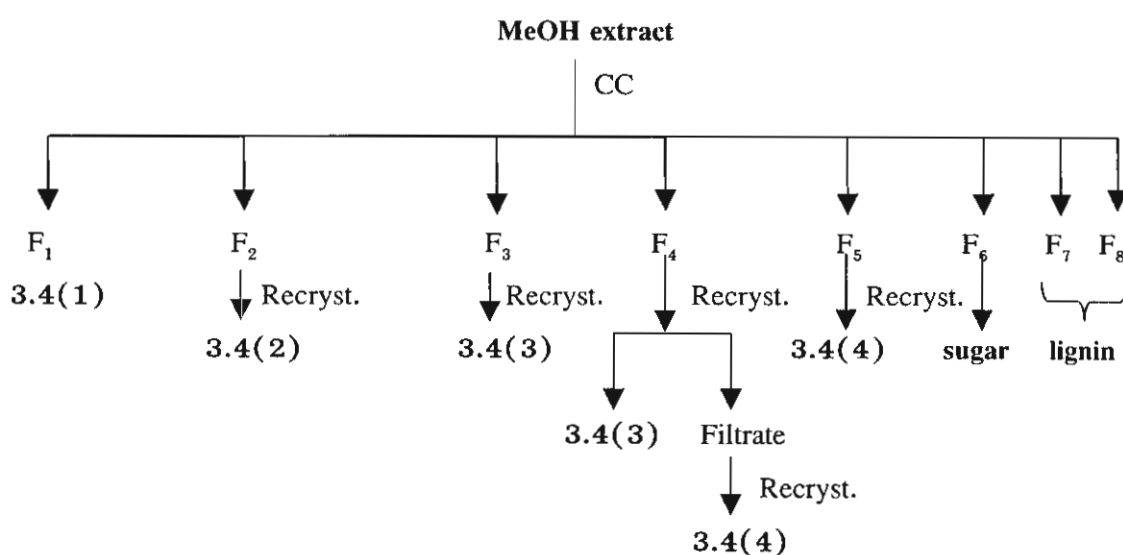
1. รากอบอล *Scleroderma citrinum*

1) การหาองค์ประกอบทางเคมี

ในการสกัดรากอบอลสดด้วยเมทานอลโดยวิธีบดละเอียดด้วยเครื่องปั่นก่อนนำไปแช่ในตัวทำละลายเมทานอล 2 วัน และทำซ้ำอีก 2 ครั้ง นำส่วนสกัดมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกผลึก ได้สาร 4 สาร

(1) การสกัดและแยก

จากการสกัดรากอบอลสด 554 กรัม ด้วย MeOH ซึ่งเก็บมาจากหมู่บ้านนาเกาะหาด อำเภอกาฬสินธุ์ จังหวัดสกลนคร เมื่อเดือนสิงหาคม 2541 ได้สารสกัด MeOH 18.2 กรัม (3.28%) นำไปแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับและชะด้วย hexane : EtOAc และ EtOAc : MeOH โดยเพิ่มความเข้มข้นขึ้น ๆ 500 มล. เก็บส่วนชะย่อยละ 150 มล. และรวมได้เป็นส่วนชะใหญ่ 8 ส่วน (F_1 - F_8) จากนั้นนำแต่ละส่วนไปทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีทางโครมาโทกราฟีและการตกผลึก ดังแผนภาพที่ 3.4(1)

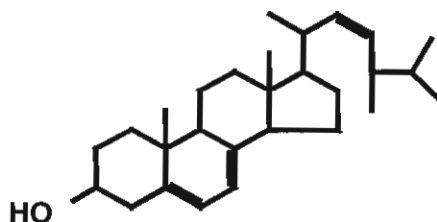


แผนภาพที่ 3.4(1) แสดงการแยกสารสกัด MeOH

(2) การวิเคราะห์โครงสร้าง

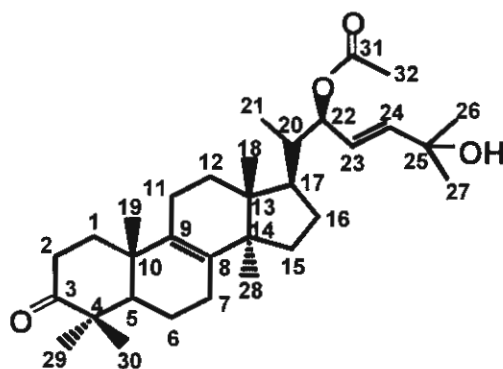
สาร 3.4(1) ได้จากการแยก MeOH extract โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีจาก F_1 ได้ผลึกรูปเข็มสีขาวหนัก 46.4 มก (0.008%) mp 151-152°C IR สเปกตรัม แสดงค่าการดูดกลืนที่ 3440 cm^{-1} ของหมู่ OH ที่ 2960 และ 2880 cm^{-1} เป็น C-H aliphatic stretching จาก $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัม แสดงลักษณะของสัญญาณของสารประเภทสเตียรอยด์ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสเปกตรัม

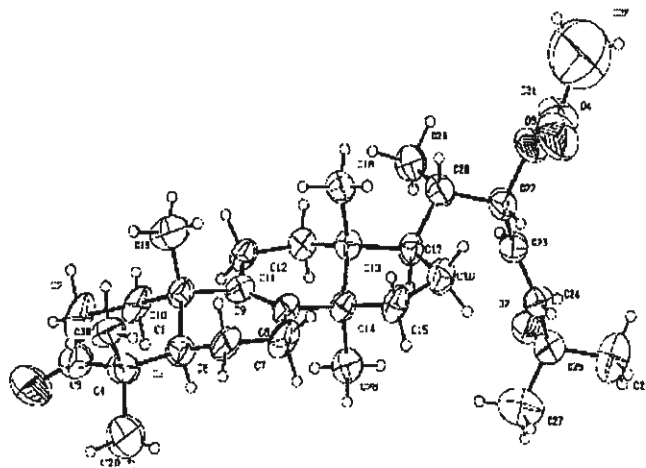
กับ ergosterol แล้วพบว่าเหมือน จึงทำให้การยืนยันโดยวิธี mix-TLC และหาจุดหลอมเหลวผสมกับ ergosterol จึงสรุปได้ว่าสาร 3.4(1) เป็น ergosterol



Ergosterol [3.4(1)]

สาร 3.4(2) ได้จากการตกผลึก F_2 ด้วย EtOAc : hexane ได้ผลึกแห้งสีหนัก 194.9 มก (0.035%) mp 166–168°C จากการวิเคราะห์ธาตุและ ES-MS ทำให้กำหนดสูตรโมเลกุลของสารได้เป็น $C_{32}H_{50}O_4$ (MW = 498) ข้อมูลจาก IR แสดงค่าการดูดกลืนที่ 3510 cm^{-1} ซึ่งมีลักษณะแหลมคมของหมู่ -OH อิสระที่ไม่เกิดพันธะไฮโดรเจน ที่ 2980 และ 2880 cm^{-1} เป็น C-H aliphatic stretching ที่ 1730 cm^{-1} เป็น C=O stretching ของเอสเทอร์ และที่ 1700 cm^{-1} เป็น C=O stretching ของคีโตน และที่ 1240 และ 1110 cm^{-1} เป็นของ C-O stretching $^1\text{H-NMR}$ (ตารางที่ 3.4(1)) แสดงค่า chemical shift ที่ δ 5.87 เป็น doublet ($J = 15.61\text{ Hz}$) และที่ δ 5.64 เป็น doublet of doublet ($J = 7.81$ และ 15.61 Hz) เป็นโปรตอนของ *trans* alkene กลุ่ม methyl 8 กลุ่ม แต่ละกลุ่มแสดงสัญญาณเป็น singlet และอีก 1 กลุ่มเป็น doublet หนึ่งในนี้เป็น -CH₃ ของหมู่ acetyl ซึ่งปรากฏที่ δ 2.06 สัญญาณในเบื้องต้นนี้พอจะทราบได้ว่าสาร 3.4(2) เป็นสารประเภทสเตียรอยด์ และเมื่อพิจารณาร่วมกับ $^{13}\text{C-NMR}$ (ตารางที่ 3.4(1)) พบสัญญาณของ C=C 2 ชุด และหมู่ C=O 2 หมู่ จากข้อมูล EDPT และเทคนิคของ 2D-NMR คือ COSY HMQC HMBC และ NOESY และเปรียบเทียบกับสเปกตรัมกับกลุ่มสารที่คล้ายกันจากรายงาน^{3.4[3],3.4[4]} สามารถกำหนดโครงสร้างของสาร 3.4(2) ได้เป็น สเตียรอยด์ประเภท lanostane และเพื่อยืนยันโครงสร้างที่ถูกต้องจึงใช้เทคนิคของ X-ray diffraction โดยโครงสร้างและ configuration ของสารนี้ได้เป็น (20S,22R)-3-oxolanosta-8,23(E)-diene-22-O-acetyl-25-ol (รูปที่ 3.4(1)) ซึ่งให้ชื่อสารนี้ว่า citrinone





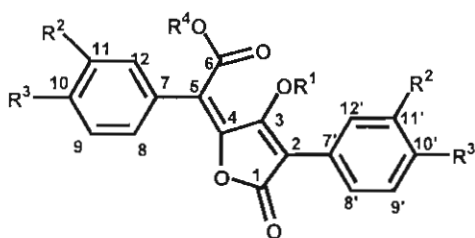
รูปที่ 3.4(1) แสดงโมเลกุลของ Citrinone [3.4(2)]

สาร 3.4(3) ได้จากการตกผลึก F_3 และ F_4 ได้ผลึกสีเหลือง-เขียว น้ำหนัก 1.530 กรัม (0.28%) mp 172-173°C จากการวิเคราะห์ธาตุและ EIMS สามารถกำหนดสูตรโมเลกุลของสารได้เป็น $C_{22}H_{20}O_7$ จาก IR สเปกตรัมแสดงค่าการดูดกลืนที่ 3011 cm^{-1} ของ =C-H stretching ที่ 1763 cm^{-1} เป็น C=O stretching ของแอลกอฮอล์ ที่ 1732 cm^{-1} เป็น C=O stretching ของคีโตน และ 1628 และ 1603 cm^{-1} เป็น C=C stretching และ 845 cm^{-1} เป็น para substitute ของวงแหวน benzene ^1H -NMR สเปกตรัม (ตารางที่ 3.4(2)) แสดงสัญญาณ AB quartet 2 ชุดของโปรตอนที่เหมาะสมจาก para substituted ของวงแหวน benzene 2 วง สัญญาณที่ δ 3.83 เป็น singlet จำนวน 6 โปรตอน เป็นหมู่ $-OCH_3$ 2 หมู่ที่เหมาะสมกัน ที่ δ 3.77 และ 3.90 เป็น siglet ทั้งคู่ ของหมู่ $-OCH_3$ จาก ^{13}C -NMR สเปกตรัมปรากฏสัญญาณของหมู่ C=O จำนวน 2 หมู่ ที่ δ 168.2 และ 167.4 สอดคล้องกับผลของ IR หมู่ $-CH_2O$ ทั้งสี่ปรากฏที่ δ 60.9 52.7 55.3 และ 55.3 อาศัยเทคนิค 2D-NMR (HMQC HMBC และ NOEDF) ทำให้วิเคราะห์โครงสร้างของสารเป็น 10,10'-dimethoxymethyl vulpinate ซึ่งมีรายงานการสังเคราะห์มาจากปฏิกิริยา methylation ของ artomentic, 3.4(8)^{3,4[5]} จึงเป็นการพบสาร 3.4(3) ครั้งแรกจากธรรมชาติ

ตารางที่ 3.4(1) ค่า chemical shift ของสาร 3.4(2) ใน CDCl_3

No.	δ_{H}	δ_{C}
1a	1.62 <i>m</i>	36.5
2a	2.41 <i>ddd</i> (3.57, 7.76, 15.70)	34.9
3	-	218.2
4	-	49.9
5	1.62 <i>m</i>	51.6
6	1.60 <i>m</i>	19.8
7a	1.63 <i>m</i>	27.5
8	-	133.7*
9	-	135.5*
10	-	37.3
11	2.03 <i>m</i>	21.5
12	2.08 <i>m</i>	26.8
13	-	45.1
14	-	47.7
15a	1.25 <i>m</i>	31.3
16	1.59 <i>m</i>	31.3
17	1.46 <i>m</i>	47.5
18	0.73 <i>s</i>	16.4
19	1.07 <i>s</i>	21.9
20	1.83 <i>m</i>	40.8
21	0.95 <i>d</i> (6.67)	13.7
22	5.31 <i>dd</i> (3.47, 7.81)	77.1
23	5.64 <i>dd</i> (7.81, 15.61)	121.1
24	5.87 <i>d</i> (15.61)	142.6
25	-	71.1
26	1.32 <i>s</i>	30.4*
27	1.32 <i>s</i>	30.2*
28	1.09 <i>s</i>	26.7
29	1.12 <i>s</i>	26.6
30	0.85	24.6
31	-	170.6
32	2.06 <i>s</i>	24.4

*สัญญาณอาจสลับกันได้



3.4(3) $R^1 = \text{Me}; R^2 = \text{H}; R^3 = \text{OMe}; R^4 = \text{Me}$

3.4(4) $R^1 = R^2 = \text{H}; R^3 = \text{OMe}; R^4 = \text{Me}$

3.4(5) $R^1 = \text{Me}; R^2 = \text{Br}; R^3 = \text{OMe}; R^4 = \text{Me}$

3.4(6) $R^1 = \text{H}; R^2 = \text{Br}; R^3 = \text{OMe}; R^4 = \text{Me}$

3.4(7) $R^1 = \text{Ac}; R^2 = \text{H}; R^3 = \text{OMe}; R^4 = \text{Me}$

3.4(8) $R^1 = R^2 = R^4 = \text{H}; R^3 = \text{OH}$

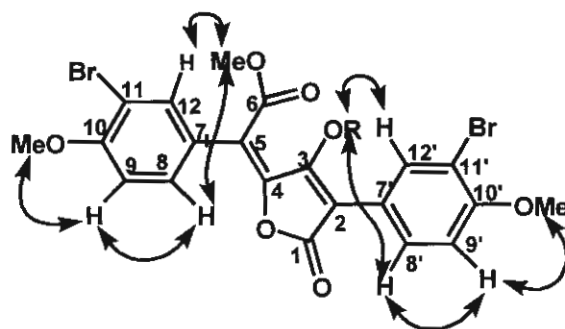
3.4(9) $R^1 = R^2 = R^3 = \text{H}; R^4 = \text{Me}$

สาร 3.4(4) ได้จากการตกผลึกส่วนของ filtrate F_4 และตกผลึก F_5 (แผนภาพ 3.4(1)) หนัก 1.897 กรัม (0.34%) mp 169-170 °C จากการวิเคราะห์ธาตุและ EIMS m/z 382 กำหนดสูตรโมเลกุลได้เป็น $C_{21}H_{18}O_7$ IR สเปกตรัมพบค่าดูดกลืนแสงที่ 2575 cm^{-1} กว้างและอ่อนเป็นเอกลักษณ์ของหมู่ -OH ที่เกิดจากการก่อพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ C=O ซึ่งปรากฏที่ 1678 cm^{-1} ค่าดูดกลืนที่ 1771 cm^{-1} เป็น C=O stretching ของวงแล็กโตน $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัม (ตารางที่ 3.4(2)) แสดงสัญญาณที่ δ 13.54 เป็นเอกลักษณ์ไฮโดรเจนของหมู่ -OH ซึ่ง chelate กับหมู่ carbonyl เหมือนกับที่มีผู้รายงาน^{3,4(6)} สัญญาณของโปรตอนอื่นๆ มีรูปแบบของ para-substituted เหมือนสาร 3.4(3) ต่างกันที่มีหมู่ -OCH₃ 3 หมู่ และค่า chemical shift ของโปรตอนบนวงแหวนปรากฏที่ตำแหน่งต่างกัน พบว่าโปรตอนตำแหน่งเดียวกันของ H-8',12' shift ไปที่ low field กว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสาร 3.4(3) ขณะที่ H-8,12 shift ไปที่ high field กว่า ซึ่งสามารถอธิบายได้จากผลของการ chelate ของหมู่ -OH กับ C=O ของเอสเทอร์ ทำให้หมู่ -OCH₃ ของเอสเทอร์เข้าใกล้ H-8,12 และบดบังสนามแม่เหล็ก (sheilded) ขณะเดียวกันผลของการ chelate ทำให้หมู่ -OH อยู่ห่างจาก H-8',12' ทำให้ไม่เกิดการบดบังสนามแม่เหล็ก (desheilded) และเมื่อพิจารณาจาก $^{13}\text{C-NMR}$ ประกอบกับเทคนิค 2D-NMR (HMQC HMBC และ NOESY) สามารถสรุปได้ว่าสาร 3.4(4) คือ 10,10'-dimethoxyvulpinic acid ซึ่งมีผู้รายงานเป็นสารผลิตภัณฑ์ในการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ vulpinic acid, 3.2(9)^{3,4(7)} จึงเป็นการพบสาร 3.4(4) เป็นครั้งแรกจากธรรมชาติ

เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร 3.4(3) และ 3.4(4) จึงเตรียมอนุพันธ์ของสารทั้งสองนี้จากปฏิกิริยา bromination และ acetylation ได้สาร 11,11'-dibromo-10,10'-dimethoxy vulpinate [3.4(5)] 11,11'-dibromo-10,10'-dimethoxyvulpinic acid [3.4(6)] และ 10,10'-dimethoxyacetyl vulpinate [3.4(7)]

สาร 3.4(5), 11,11'-dibromo-10,10'-dimethoxymethyl vulpinate ได้จากปฏิกิริยา bromination ของสาร 3.4(3) แยกและตกผลึกได้ผลึกสีเหลือง mp 201-202 °C อาศัยข้อมูลจาก $^{13}\text{C-NMR}$ ในเทคนิค DEPT ประกอบกับผลของ ESMS สเปกตรัมซึ่งแสดงค่าน้ำหนักโมเลกุลกับ Na เป็น 3 ค่า คือ 575 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 577 $[\text{M}^{+2} + \text{Na}]^+$ และ 579 $[\text{M}^{+4} + \text{Na}]^+$ ในอัตราส่วน

1:2:1 ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะตัวของสารประกอบที่มีโบรมีนอยู่ 2 อะตอม จึงสามารถกำหนดสูตรโมเลกุลได้เป็น $C_{22}H_{18}Br_2O_7$ IR สเปกตรัมของสารนี้แสดงค่าการดูดกลืนเหมือนกับสารประกอบแม่ คือ 3.4(3) แต่ลักษณะของสัญญาณใน ^1H -NMR (ตารางที่ 3.4(3)) และเทคนิคของ 2D-NMR ได้แก่ COSY HMQC HMBC และ NOESY ทำให้สามารถกำหนดสูตรโครงสร้างของสาร 3.4(5) ได้โดยมีหมู่ -Br เข้าแทนที่ -H ที่ตำแหน่ง C-11 และ C-11' และจาก NOESY สเปกตรัมที่แสดงถึงการ interact กันระหว่างโปรตอนที่อยู่ใกล้กัน แสดงถึง configuration ของโมเลกุล ดังแสดงในรูปที่ 3.4(2)



รูปที่ 3.4(2) แสดงการ interact กันของ $H \leftrightarrow H$ ใน NOESY ของสาร 3.4(5) และ 3.4(6)

ตารางที่ 3.4(2) ค่า chemical shift ^1H -NMR ของสารประกอบ 3.4(3), 3.4(4), 3.4(5), 3.4(6) และ 3.4(7) ($CDCl_3$)

δ_H	3.4(3) ^a	3.4(4) ^a	3.4(5) ^b	3.4(6) ^b	3.4(7) ^b
8	7.65 d (9.16)	7.20 d (8.85)	7.68 dd (8.78,2.30)	7.22 dd (8.42,2.17)	7.70 d (8.91)
8'	7.50 d (8.85)	8.12 d (9.16)	7.52 dd (8.56,2.11)	8.16 dd (8.69,2.10)	7.55 d (8.74)
9	6.93 d (9.16)	6.93 d (8.85)	6.95 d (8.78)	6.95 d (8.42)	6.94 d (8.91)
9'	6.96 d (8.85)	6.95 d (9.16)	6.99 d (8.56)	6.98 d (8.63)	6.91 d (8.74)
11	6.93 d (9.16)	6.93 d (8.85)	-	-	6.94 d (8.91)
11'	6.93 d (8.85)	6.95 d (9.16)	-	-	6.91 d (8.74)
12	7.65 d (9.16)	7.20 d (8.85)	7.83 d (2.30)	7.47 d (2.17)	7.70 d (8.91)
12'	7.50 d (8.85)	8.12 d (9.16)	7.77 d (2.11)	8.42 d (2.10)	7.55 d (8.74)
C_3 -OCH ₃	3.77 s	-	3.81 s	-	-
CO ₂ CH ₃	3.90 s	3.87 s	3.93 s	3.93 s	3.90 s
C_{10} -OCH ₃	3.83 s	3.83 s	3.95 s	3.96 s	3.83 s
$C_{10'}$ -OCH ₃	3.83 s	3.83 s	3.95 s	3.96 s	3.83 s
C_3 -OAc	-	-	-	-	2.29 s
OH	-	13.54 s	-	13.52 s	-

^a 500 MHz, ^b 400 MHz

ตารางที่ 3.4(3) ค่า chemical shift ^{13}C -NMR ของสารประกอบ 3.4(3), 3.4(4), 3.4(5), 3.4(6), และ 3.4(7) (CDCl_3)

δ_c	3.4(3) ^a	3.4(4) ^a	3.4(5) ^b	3.4(6) ^b	3.4(7) ^b
1	168.2	166.2	167.2	166.0	165.8
2	108.1	105.1	107.5	104.3	99.6
3	162.1	158.6	162.8	159.5	165.1
4	140.2	154.7	141.2	156.2	140.7
5	115.9	115.0	115.0	114.5	116.8
6	167.4	171.7	167.8	171.8	166.9
7/7'	123.6/120.6	124.2/121.7	125.2/122.2	125.7/123.3	123.8/120.2
8/8'	130.8/131.0	131.4/129.5	130.5/130.4	130.9/128.6	131.1/129.5
9/9'	114.3/114.0	113.6/113.9	112.2/112.0	111.8/112.0	114.4/144.3
10/10'	160.4/160.0	159.7/159.5	157.1/156.8	155.2/156.5	160.7/160.6
11/11'	114.3/114.0	113.6/113.9	112.5/112.5	111.7/112.2	114.4/144.3
12/12'	130.8/131.0	131.4/129.5	134.0/134.8	135.1/133.0	131.1/129.5
$\text{C}_3\text{-OCH}_3$	60.9	-	61.7	-	-
CO_2CH_3	52.7	54.3	53.3	54.9	52.9
$\text{C}_{10}\text{-OCH}_3$	55.3	55.3	56.8	56.7	55.3
$\text{C}_{10'}\text{-OCH}_3$	55.3	55.3	56.8	56.7	55.3
$\text{C}_3\text{-OCOCH}_3$	-	-	-	-	165.1
$\text{C}_3\text{-OCOCH}_3$	-	-	-	-	20.6

^a 125 MHz, ^b 100 MHz

*สัญญาณอาจสลับกันได้

สาร 3.4(6), 11,11'-dibromo-10,10'-dimethoxyvulpinic acid ได้จากปฏิกิริยา bromination ของสาร 3.4(4) แยกและตกผลึกได้ผลึกรูปเข็มสีเหลือง-ส้ม mp 208-209 °C จากมวลโมเลกุลที่วิเคราะห์โดย ESMS ซึ่งรวมกับอะตอม Na ปรากฏเป็น 3 ค่า คือ 561[M+Na], 563[M²⁺+Na]⁺ และ 565[M⁴⁺+Na]⁺ แสดงถึงมี 2Br ในองค์ประกอบ เมื่อพิจารณาร่วมกับ ^{13}C -NMR ในเทคนิค DEPT สามารถกำหนดสูตรโมเลกุลได้เป็น $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{Br}_2\text{O}_7$ IR สเปกตรัมแสดงการดูดกลืนแสงของหมู่ -OH ที่ 3555 cm^{-1} และหมู่ C=O ของเอสเทอร์ที่ chelate กับหมู่ -OH ปรากฏที่ 1678 cm^{-1} ^1H และ ^{13}C -NMR สเปกตรัม (ตารางที่ 3.4(2) และ 3.4(3)) วิเคราะห์เปรียบเทียบกับสาร 3.4(4) โดยสัญญาณของหมู่ -OH ที่ chelate กับ เอสเทอร์ปรากฏที่ δ 13.52

และจากการตรวจวัดโดยเทคนิค NOESY (แสดงดังรูปที่ 3.4(2)) สรุปได้ว่า Br ทั้งสองแทนที่ H ในตำแหน่ง C-11 และ C-11' และมี configuration แบบเดียวกับสาร 3.4(5)

สาร 3.4(7), 10,10'-dimethoxyacetyl vulpinate ได้จากปฏิกิริยา acetylation ของสาร 3.4(4) แยกและตกผลึกได้ผลึกรูปแท่งสี่เหลี่ยม mp 173-174 °C อาศัยการวิเคราะห์จาก ^{13}C -NMR เทคนิค DEPT และ ES-MS ซึ่งแสดงน้ำหนักโมเลกุลรวมกับ Na เป็น $447[\text{M}+\text{Na}]^+$ จึงกำหนดสูตรโมเลกุลได้เป็น $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{O}_8$ IR สเปกตรัมแสดงการดูดกลืนของ C=O แอลกอฮอล์ ที่ 1780 cm^{-1} ของเอสเทอร์ ที่ 1730 cm^{-1} และของ acetyl ที่ 1800 cm^{-1} การที่ carbonyl ของหมู่ acetyl ดูดกลืนที่พลังงานสูงเมื่อเทียบกับเอสเทอร์ปกติอาจเนื่องจากเป็นลักษณะของ vinyl ester - $\text{C}=\text{C}-\text{O}-\text{COCH}_3$ ^1H และ ^{13}C -NMR สเปกตรัม (ตารางที่ 3.4(2) และ 3.4(3)) แสดงสัญญาณของหมู่ acetyl (δ_{H} 2.30, δ_{C} 165.1) โดยที่สัญญาณอื่น ๆ เหมือนกับที่ปรากฏในสาร 3.4(3)

2) การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

(1) เชื้อก่อโรคพืช

ได้ทดสอบการใช้สาร 10,10'-dimethoxymethyl pulvinate [3.4(3)] และ 10,10'-dimethoxyvulpinic acid [3.4(4)] ในการควบคุมเชื้อ *Phytophthora palmivora* สาเหตุโรครากโคนเน่าของทุเรียน และ *Colletotrichum. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนส มะม่วงและส้มดังนี้

จากการทดลองพบว่าสาร 4.3 (3) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100 และ 500 ppm ($\mu\text{g/ml}$) ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. palmivora* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติโดยพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 500 ppm สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้มากที่สุดเฉลี่ยเท่ากับ 39.0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อเฉลี่ย 3.05 ซม. รองลงมาที่ระดับความเข้มข้น 100 50 และ 10 ppm มีเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อเฉลี่ย 3.40 3.71 และ 4.05 ซม ในขณะที่ control (0 ppm) ไม่พบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (รูปที่ 3.4(3)) และพบค่า ED_{50} เท่ากับ 2,114 ppm ดังตารางที่ 3.4 (4)

สำหรับการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *C. gloeosporioides* ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100 และ 500 ppm พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 500 ppm สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ได้มากที่สุดเท่ากับ 92.73 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีปริมาณการสร้างสปอร์ของเชื้อเฉลี่ยเท่ากับ 1.18×10^6 สปอร์/มล รองลงมาคือที่ระดับความเข้มข้น 100, 50 และ 10 ppm สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อเฉลี่ย 3.50, 10.37 และ 12.81 (1×10^6) สปอร์/มล ตามลำดับ โดยที่ control (0 ppm) ไม่พบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อซึ่งมีปริมาณการสร้างสปอร์ของเชื้อเฉลี่ย 16.25×10^6 สปอร์/มล และพบค่า ED_{50} เท่ากับ 45 ppm ดังตารางที่ 3.4(4)

จากการทดลองพบว่าสาร 4.3 (4) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100 และ 500 ppm ($\mu\text{g/ml}$) ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. palmivora* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 500 ppm สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้มากที่สุดเฉลี่ยเท่ากับ 60.8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อเฉลี่ย 1.26 ซม รองลงมาที่ระดับความเข้มข้น 100 50 และ 10 ppm มีเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อเฉลี่ย 1.96 2.23 และ 3.83 ซม ในขณะที่ control (0 ppm) ไม่พบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อเฉลี่ย 5.00 ซม (รูปที่ 3.4(4)) และพบค่า ED_{50} เท่ากับ 58 ppm ดังตารางที่ 3.4(4)

ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. gloeosporioides* ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100 และ 500 ppm พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 500 ppm สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ 78.74 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อเฉลี่ย 0.95 ซม รองลงมาที่ระดับความเข้มข้น 50, 100 และ 10 ppm มีเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 2.50 2.72 และ 3.05 ซม ตามลำดับ ในขณะที่ control (0 ppm) ไม่พบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต และมีเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 4.47 ซม มีค่า ED_{50} เท่ากับ 81 ppm (ตารางที่ 3.4(4))

สำหรับการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *C. gloeosporioides* ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100 และ 500 ppm พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 500 ppm สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ได้มากที่สุดเท่ากับ 92.18 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีปริมาณการสร้างสปอร์ของเชื้อเฉลี่ยเท่ากับ 1.25×10^6 สปอร์/มล รองลงมาคือที่ระดับความเข้มข้น 100, 50 และ 10 ppm สามารถยับยั้งการสร้างปริมาณสปอร์ของเชื้อเฉลี่ย 7.37 13.50 และ 14.00 (1×10^6) สปอร์/มล ตามลำดับ โดยที่ control (0 ppm) ไม่พบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อซึ่งมีปริมาณการสร้างสปอร์ของเชื้อเฉลี่ย 16.00×10^6 สปอร์/มล. และพบค่า ED_{50} เท่ากับ 68 ppm ดังตารางที่ 3.4 (4)

ตารางที่ 3.4(4) แสดงค่า ED_{50} ของสาร 3.4(3) และ 3.4(4) ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสร้าง สปอร์ของเชื้อราโรคพืช

สาร	$\text{ED}_{50}(\mu\text{g/ml})$			
	<i>P. palmivora</i>		<i>C. gloeosporioides</i>	
	Colony	conidia	Colony	Conidia
3.4(3)	2,114	-	5,231	45
3.4(4)	58	-	81	46



รูปที่ 3.4(3) แสดงผลของสาร 10,10'-dimethoxymethyl vulpinate [3.4(3)] ที่มีต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. palmivora* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



รูปที่ 3.4(4) แสดงผลของสาร 10,10'-dimethoxyvulpinic acid [3.4(4)] ที่มีต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. palmivora* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

(2) เชื้อก่อโรคมมนุษย์

ได้ทดสอบการใช้สาร สาร 3.4(2)- 3.4(7) ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพกับเชื้อก่อโรคในมนุษย์ต่างๆ คือ *Plasmodium falciparum* (เชื้อสาเหตุไข้มาลาเรีย) *Mycobacterium tuberculosis* (เชื้อวัณโรค) *Candida albicans* (เชื้อราก่อโรคผิวหนัง) และ HSV-1 (เชื้อไวรัสสาเหตุโรคเริม) นอกจากนี้ยังได้ทดสอบกับเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ได้แก่ KB BC และ NCI-H-187 ในที่นี้จะรายงานเฉพาะส่วนของผลที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อบางชนิด ซึ่งพบว่าสาร 3.4(2) แสดงฤทธิ์กับ HSV-1 และสาร 3.4(4), 3.4(6) และ 3.4(7) แสดงฤทธิ์กับเชื้อวัณโรค สาร 3.4(6) และ 3.4(7) ยังแสดงฤทธิ์กับเซลล์ NCI-H-187 ดังแสดงในตารางที่ 3.4(5)

ตารางที่ 3.4(5) แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร 3.4(2)- 3.4(7)

Compounds	Anti NCI-H-187 EC ₅₀ (µg/ml)	Anti HSV-1 EC ₅₀ (µg/ml)	Antimycobacterium MIC (µg/ml)
3.4(2)	inactive	5.25	Inactive 200 µg/ml
3.4(3)	Inactive	Inactive 50 µg/ml	Inactive 200 µg/ml
3.4(4)	Inactive	Inactive 50 µg/ml	25
3.4(5)	Inactive	Inactive 50 µg/ml	Inactive 200 µg/ml
3.4(6)	13.42	Inactive 50 µg/ml	100
3.4(7)	5.78	Inactive 50 µg/ml	100

วัสดุและวิธีการ

1) สารเคมี เครื่องมือ และอุปกรณ์

สารเคมีที่ใช้สำหรับแยกสารโดยวิธีโครมาโทกราฟี ชนิดต่างๆ ได้แก่ Merck's silica gel 60 (Art 7733, 7734) สำหรับคอลัมน์โครมาโทกราฟี silica gel 60 PF₂₅₄ สำหรับ preparative-TLC และ silica gel 60 F₂₅₄ สำหรับ TLC

ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดและแยกสารชนิดต่างๆ ได้แก่ n-hexane, CH₂Cl₂, EtOAc และ MeOH สำหรับที่เป็น commercial grade โดยจะนำมากลั่นก่อนใช้

เครื่องมือหาจุดหลอมเหลวใช้ Electrothermal IA9000 serie IR spectra บันทึกด้วยเครื่อง BIO-RAD FTS-7/PC และ Perkein Elmer 683 สำหรับ NMR spectra บันทึกด้วยเครื่อง Jeol-EX90A, Bruker DPX400 และ DPX500

2) วัตถุดิบในการวิจัย

รากอบอล *S. citrinum* เก็บที่บ้านนาคะหาด ตำบลนาฮี อำเภออากาศอำนวย จังหวัดสกลนคร เมื่อเดือน สิงหาคม 2541 วิจัยโดย รศ.ดร.เกษม สร้อยทอง และรักษาตัวอย่างไว้ที่ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

3) การสกัดด้วยตัวทำละลาย

รากอบอลสดหนัก 554 กรัม บดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น สกัดโดยแช่ใน MeOH 700 มล นาน 2 วัน กรองเอาสารละลายออกและสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยวิธีเช่นเดียวกัน หลังจากระเหยเอาตัวทำละลายออกได้ MeOH extract หนัก 18.2 กรัม (3.28%)

4) การแยกสารให้บริสุทธิ์

นำ MeOH extract ไปแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับและชะด้วย hexane EtOAc และ MeOH โดยค่อยๆ เพิ่มความเข้มข้น เริ่มจาก hexane : EtOAc 4:1 เก็บส่วนย่อยละ 150 มล หลังจากรวมส่วนย่อยโดยอาศัยผลของ TLC ได้ 8 ส่วนใหญ่ (F₁-F₈) ดังแผนภาพที่ 3.4 (1)

ในการแยกให้บริสุทธิ์นำ F₁(hexane : EtOAc, 2:1) ตกผลึกด้วย EtOAc/hexane ได้ผลึกสีขาวของ 3.4(1) หนัก 46.4 มก F₂ (hexane : EtOAc, 3:2) ตกผลึกด้วย EtOAc/hexane ได้ผลึกใสไม่มีสีของ 3.4(2) หนัก 194.9 มก (0.035%) F₃(hexane:EtOAc, 1:1) ตกผลึกด้วย EtOAc ได้ผลึกสีเหลือง-เขียวของ 3.4(3) หนัก 0.8372 กรัม และจากการตกผลึกของ F₄ (hexane : EtOAc, 2:3) อีก 0.6923 กรัม รวมหนัก 1.53 กรัม (0.27%) สาร 3.4(4) ได้จาก

การนำเอา filtrate ของ F_4 ไปตกผลึกซ้ำด้วย EtOAc และจากการนำ F_5 (hexane : EtOAc, 1:2) ไปตกผลึกใน EtOAc ได้เป็นผลึกสีส้มแดงหนัก 0.7631 และ 1.135 กรัมตามลำดับ รวมได้ 1.897 กรัม (0.34%)

สาร 3.4(1) เป็นผลึกรูปเข็มสีขาว 46.4 มก mp 151-152 °C R_f = 0.59 (hexane : EtOAc, 1:1) IR (KBr) : $\nu_{\max}$ 3440 (s, br), 3050 (w), 2960 (s), 2880 (s), 1460 (m), 1385 (m), 1040 (m) cm^{-1} ^1H -NMR (CDCl_3) : δ 5.20-5.60 (d, m), 2.5-0.6 (m,s) ^{13}C -NMR (CDCl_3) : δ 141.35, 139.85, 135.62, 132.09, 119.65, 116.38, 70.51, 55.87, 54.63, 46.36, 42.91, 40.42, 39.18, 38.47, 37.12, 33.15, 32.09, 28.31, 23.06, 21.15, 19.98, 19.68, 17.64, 16.34, 12.11

สาร 3.4(2) เป็นผลึกแท่งใสหนัก 194.2 มก mp 166-168 °C R_f = 0.63 (EtOAc:hexane, 1:1), IR (KBr) $\nu_{\max}$ cm^{-1} 3510 (OH, s), 2980, 2880 (C-H, s), 1730 (OAc, s), 1700 (C=O, s), 1240 (C-O, m), ES-MS, m/z 521 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 1019 $[2\text{M} + \text{Na}]^+$. ^1H and ^{13}C NMR ดูตารางที่ 3.4(2) และ ตารางที่ 3.4(3)

สาร 3.4(3) เป็นผลึกสีเหลือง-เขียว หนัก 1.53 กรัม mp 172-173 °C, R_f = 0.53 (EtOAc:hexane, 1:1), UV $\lambda_{\max}$ 237 nm, 362 nm IR (KBr) $\nu_{\max}$ cm^{-1} 3011 (=C-H, vw), 1763 (แอลกอฮอล์ C=O, s), 1732 (C=O, s), 1628 (C=C, m), 1603 (C=C, s), 1252, 1190, 1161 (C-O, s), 845 (C=C-H, m).), EIMS 70 eV, m/z (rel.int.) 396 $[\text{M}]^+$ (44), 337 $[\text{M}-\text{CO}_2\text{Me}]^+$ (32), 309 $[\text{M}-\text{CO}_2\text{Me}-\text{CO}]^+$ (10), 147 $[\text{M}-\text{CO}_2\text{Me}-\text{CO}-\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_2]^+$ (35), 119 $[\text{M}-\text{CO}_2\text{Me}-\text{CO}-\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_2-\text{CO}]^+$ (100), 89 $[\text{M}-\text{CO}_2\text{Me}-\text{CO}-\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_2-\text{C}_2\text{O}]^+$ (11), 76 (42), 59 (35). Found: C, 66.64; H, 5.33. $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_7$ requires: C, 66.66; H, 5.09 %. ^1H และ ^{13}C -NMR แสดงในตารางที่ 3.4(2) และ 3.4 (3)

สาร 3.4(4) เป็นผลึกรูปเข็มสีแดง-ส้ม หนัก 1.897 กรัม mp 169-170 °C R_f = 0.34 (EtOAc:hexane; 1:1), UV $\lambda_{\max}$ 230 nm, 258 nm, 308 nm, 390 nm IR(KBr) $\nu_{\max}$ cm^{-1} 3011 (=C-H, vw), 2575 (OH, br, w), 1773 (lactone C=O, s), 1678 (ester C=O, s), 1618 (C=C, m), 1603 (C=C, s), 1269, 1250, 1161 (C-O, s), 824 (C=C-H, m), EIMS 70 eV, m/z (rel.int.) 382 $[\text{M}]^+$ (7), 350 $[\text{M}-\text{MeOH}]^+$ (22), 294 $[\text{M}-\text{MeOH}-\text{C}_2\text{O}_2]^+$ (19), 238 $[\text{M}-\text{MeOH}-\text{C}_2\text{O}_2-\text{C}_2\text{O}_2]^+$ (27), 147 $[\text{M}-\text{MeOH}-\text{C}_2\text{O}_2-\text{C}_9\text{H}_7\text{O}_2]^+$ (56), 119 $[\text{M}-\text{MeOH}-\text{C}_2\text{O}_2-\text{C}_9\text{H}_7\text{O}_2-\text{CO}]^+$ (100), 76 (43), 59 (11) Found: C, 66.10; H, 4.33 $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_7$ requires: C, 65.97; H, 4.75 % ^1H และ ^{13}C -NMR แสดงในตารางที่ 3.4(2) และ 3.4 (3)

สาร 3.4(5) เตรียมโดยนำสาร 3.4(3) หนัก 0.4924 กรัม (1.24 มิลลิโมล) ละลายใน AcOH ชนิด glacial (10 มล) จากนั้นเติมสารละลาย Br_2 (1.0 มล) และกวนที่อุณหภูมิห้องนาน

30 นาที เทสารละลายลงน้ำประมาณ 250 มล กรองตะกอนและล้างด้วยน้ำ นำตะกอนที่ได้ไปตกผลึกใน EtOAc ได้ผลึกสีเหลืองของ 3.4(5)หนัก 260.1 มก (37.8%) mp 201-202°C R_f = 0.61 (hexane:EtOAc, 1:2.3) IR (KBr) $V_{\max}$ cm^{-1} 3110, 3005 (=C-H, vw), 1780 (lactone C=O, vs), 1735 (ester C=O, s), 1630, 1600 (C=C, s), 1500 (s), 1265, 1235, 1170 (C-O, s), 823 (=C-H, m). ES-MS, m/z 575 $[M + Na]^+$, 577 $[M^{+2} + Na]^+$, 579 $[M^{+4} + Na]^+$. ^1H และ ^{13}C -NMR แสดงในตารางที่ 3.4(2) และ 3.4 (3)

สาร 3.4(6) เตรียมโดยใช้วิธีเช่นเดียวกับ 3.4(5) โดยใช้สาร 3.4(3)หนัก 0.5049 กรัม (1.32 มิลลิโมล) ได้ผลึกรูปเข็มสีเหลือง-ส้ม 547.3 มก (76.68%) mp 208-209°C, R_f = 0.13 (hexane : EtOAc, 1 : 23) IR (KBr) $V_{\max}$ cm^{-1} 2550 (OH, br, w), 1770 (lactone C=O, vs), 1678 (ester C=O, s), 1620, 1595 (C=C, s), 1500 (m), 1260, 1090, 1060 (C-O, s), 830 (=C-H, m) ES-MS, m/z 561 $[M + Na]^+$, 563 $[M^{+2} + Na]^+$, 565 $[M^{+4} + Na]^+$ ^1H และ ^{13}C -NMR แสดงในตารางที่ 3.4(2) และ 3.4 (3)

สาร 3.4(7) ได้จากปฏิกิริยา acetylation ของ 3.4(4) โดยละลายสาร 3.4(4)หนัก 0.5153 กรัม (1.35 มิลลิโมล) ที่ 100°C นาน 3 ชั่วโมง เทลงในน้ำเย็น และกรองตะกอนออก แล้วล้างด้วยน้ำและตามด้วยสารละลายกรด HCl เจือจางและน้ำอีกครั้ง นำของแข็งที่ได้ไปตกผลึกด้วย EtOAc ได้ผลึกสีเหลืองหนัก 0.125 กรัม (21.9%) mp 173-174 °C R_f = 0.61 (hexane : EtOAc, 1 : 2.3) IR (KBr) $V_{\max}$ cm^{-1} 3020 (=C-H, vw), 1800 (C=O of Ac, s), 1780 (lactone C=O, s), 1730 (ester C=O, s), 1610, 1600 (C=C, s), 1260, 1245, 1190 (C-O), 840 (=C-H) ES-MS, m/z 447 $[M + Na]^+$ and 871 $[2M + Na]^+$ ^1H และ ^{13}C -NMR แสดงในตารางที่ 3.4(2) และ 3.4 (3)

เอกสารอ้างอิง

- 3.4[1] Bresinsky, A., Besl, H., Bisset, N. G. "A Colour Atlas of Poisonous Fungi"..Wolf Publishing, 1990 pp. 174-175.
- 3.4[2] Allbutt, A. D.; Ayer, W. A.; Brodie, H. J.; Johri, B. N.; Taube, H.
J. Can. Chem. 1970, **17**, 1401.
- 3.4[3] Cantell, C. L.; Lu, T., Fronczek, F. R.; Fischer, N. H. *J. Nat. Prod.* 1996,
59, 1131.
- 3.4[4] Takaishi, Y.; Murakami, K.; Ohashi, T.; Nakano, K.; Murakami, K.;
Tomimatsu, T. *Phytochemistry* 1987, **26**, 2341.
- 3.4[5] Singh, P.; Anchel, M. *Phytochemistry* 1971, **26**, 3259.
- 3.4[6] Beaumont, P. C.; Edwards, R. L.; Elsworth, G. C. *J. Chem. Soc. (C)*
1968, 2968.
- 3.4[7] Foden, F. R.; McCormick, J.; O'Mant, D. M. *J. Med Chem.* 1975, **18**, 199.

โครงการย่อยกลุ่มที่ 3 : การหาสารควบคุมศัตรูพืชจากธรรมชาติ

โครงการวิจัยหน่วยที่ 5 : ราคีโตเมียม คิวเปรม (*Chaetomium cupreum*)

บทนำ

1. คำนำ

ราคีโตเมียม คิวเปรม (*Chaetomium cupreum*) เป็นราในสกุลคีโตเมียม ที่มีคุณสมบัติในการควบคุมราสาเหตุโรคพืชได้เป็นอย่างดี เช่นเดียวกันกับราในสกุลเดียวกันคือ คีโตเมียม โกลโบซัม รายละเอียดอยู่ในโครงการวิจัยหน่วยที่ 2

2. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปัจจุบันการใช้สารเคมีในการเกษตร ในรูปของยาฆ่าแมลง ยาฆ่าเชื้อรา ตลอดจนยาปราบศัตรูพืชในรูปอื่น ๆ มีจำนวนเพิ่มขึ้นจนเป็นที่น่าวิตก เนื่องจากการใช้สารเคมีจำนวนมากขึ้นเรื่อย ๆ อันเป็นผลจากการดื้อยา นอกจากนี้ยังต้องเพิ่มความแรงของยาด้วย สิ่งเหล่านี้เป็นผลโดยตรงกับเกษตรกร และนับวันจะก่อให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์ในฐานะผู้บริโภคและยังมีผลกระทบโดยตรงต่อสิ่งแวดล้อม ดังจะเห็นได้จากรายงานสารพิษจากยากำจัดศัตรูพืชที่ตกค้างในดินและแม่น้ำลำคลองในปริมาณเพิ่มขึ้นทุกปี ดังนั้นการหาวิธีเพิ่มผลผลิตทางด้านเกษตรกรรม โดยลดการใช้สารเคมีสังเคราะห์ที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน จึงเป็นเรื่องที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เช่น การใช้สารจากธรรมชาติควบคุมศัตรูพืช สารธรรมชาติเหล่านี้ได้จากพืช รา และจุลินทรีย์ เป็นต้น มีรายงานการใช้ราบางชนิดสำหรับยับยั้งการเจริญของราที่เป็นสาเหตุโรคพืชบางชนิดอย่างได้ผล เช่น เชื้อราสกุล *Chaetomium* มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (สาเหตุของโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ) และ *Sclerotium rolfsii* (สาเหตุของโรคลำต้นเหี่ยวของข้าวโพด) เป็นต้น มีรายงานการแยกองค์ประกอบทางเคมีของราสกุล *Chaetomium* สายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่าได้สารที่น่าสนใจหลายชนิด สำหรับกลไกการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชของราเหล่านี้ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่แนวทางหนึ่งเชื่อว่าราสร้างสารไมโคทอกซิน (mycotoxin) ซึ่งมีพิษต่อราที่เป็นสาเหตุโรคพืช ฉะนั้นการศึกษาเพื่อแยกองค์ประกอบทางเคมีของราที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืช เพื่อนำไปทดสอบสมบัติดังกล่าวจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจอย่างยิ่ง สำหรับราสกุล *Chaetomium* จัดเป็นราที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ เป็นราที่เจริญบนเศษซากพืชและสัตว์ที่เน่าเปื่อยผุพัง ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ สัตว์ และพืช ชนิดที่พบว่ามีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช ได้แก่ *Chaetomium cupreum* และ *C. globosum* จากศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของรา *C. globosum* ในรายงาน โครงการย่อยกลุ่มที่ 3 โครงการวิจัยหน่วยที่ 2 พบสารประกอบที่น่าสนใจหลายสาร และทำการทดสอบสมบัติการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิดพบว่าให้ผลที่ดี กลุ่มของเราจึงสนใจที่จะแยกองค์ประกอบทางเคมีของรา *C. cupreum* ซึ่งเป็นราสกุลเดียวกัน

จากการศึกษาเบื้องต้นพบสาร triglyceride ergosterol และ rotiorinol ซึ่งเป็นสารใหม่ และเป็นสารหลักรองจาก triglyceride โดยมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคพืชหลายชนิด งานวิจัยนี้จึงเป็นการดำเนินการต่อเพื่อสกัดและแยกสารดังกล่าวให้มีปริมาณมากขึ้นและค้นหาสารใหม่ๆ เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

3. วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. แยกองค์ประกอบทางเคมีจากรา *C. cupreum*
2. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้กับเชื้อราก่อโรคบางชนิด

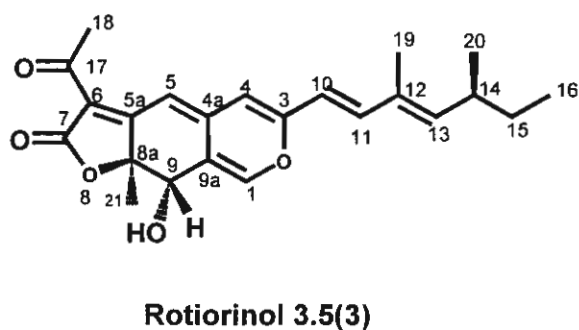
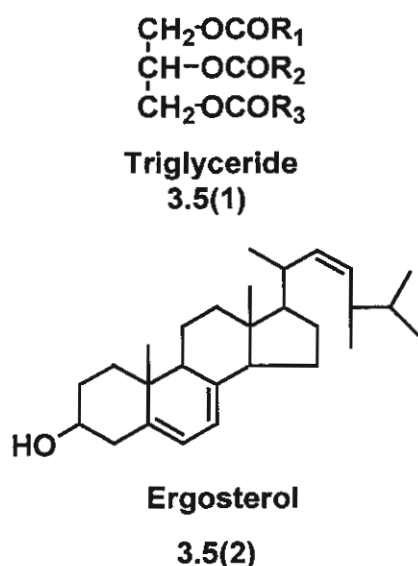
4. ผลงานที่เกี่ยวข้อง

ผลการศึกษาในสกุลคีโตเมียม ในแง่ขององค์ประกอบทางเคมีและการนำไปใช้ประโยชน์ด้านการเกษตร ได้กล่าวไว้ในโครงการวิจัยหน่วยย่อยที่ 2 แล้ว สำหรับ *C. cupreum* นั้นยังไม่มีรายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพ

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1) การหาส่วนประกอบทางเคมี

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัด hexane และ EtOAc ที่ผ่านมาพบ triglyceride [3.5(1)] ergosterol [3.5(2)] และสารใหม่ชื่อ Rotiorinol [3.5(3)]^{3.5(1)} สำหรับงานวิจัยนี้จะแยกสารในส่วนอื่นที่ยังไม่ได้มีการศึกษา พร้อมทั้งศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารนั้น ๆ ด้วย

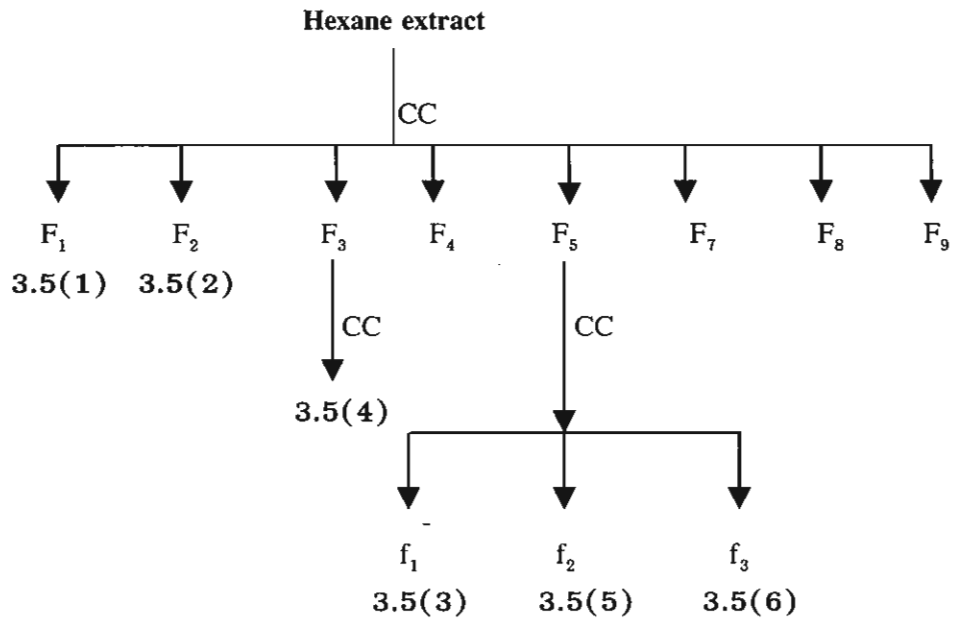


(1) การสกัดและการแยก

จากการสกัดเส้นใยแห้งของรา *C.cupreum* 300 กรัม ซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลว (PDB) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ได้สารสกัด hexane (hexane extract) 6.1 กรัม (2.03%) สารสกัด EtOAc (EtOAc extract) 2.5 กรัม (0.83%) และสารสกัด MeOH (MeOH extract) 20.3 กรัม (6.77%)

(ก) Hexane extract

จากการแยกส่วนสกัด hexane โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ และชะด้วยระบบตัวทำละลาย hexane : EtOAc และ EtOAc : MeOH ได้ 9 ส่วน แยกย่อย ($F_1 - F_9$) ทำการแยกแต่ละส่วนด้วยคอลัมน์และ Preparative TLC ได้สารจากส่วนต่าง ๆ คือ F_1 เป็น Triglyceride [3.5(1)] F_2 เป็น ergosterol [3.5(2)] F_3 แยกได้สารสีแดงส้ม 3.5(4) F_5 ได้สารสีแดง rotiorinol 3.5(3) ซึ่งเป็นสารหลัก สารสีแดง 3.5(5) และสารสีเหลือง 3.5(6) โดยมีขั้นตอนแสดงดังแผนภาพที่ 3.5 (1)

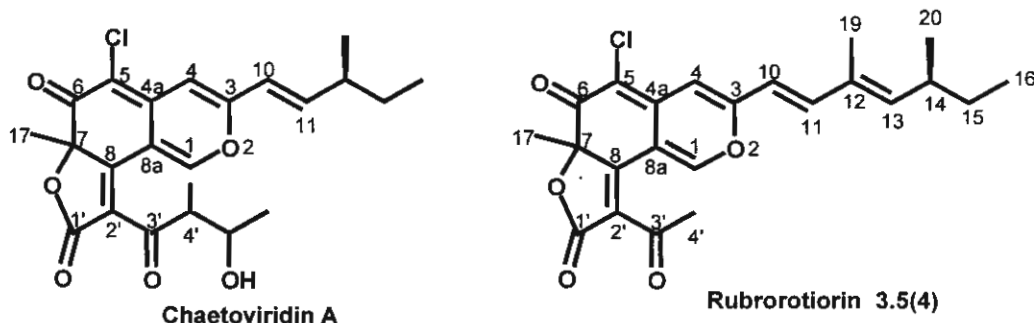


แผนภาพที่ 3.5 (1) แสดงการแยก hexane extract

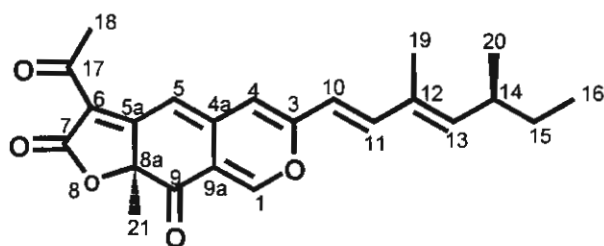
(2) การวิเคราะห์สูตรโครงสร้าง

สาร 3.5(4) มีลักษณะเป็นผงสีส้มแดง ซึ่งได้จากการแยกส่วนสกัด hexane IR สเปกตรัม แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 1768 cm^{-1} ของหมู่ carbonyl ของ lactone ที่ 1685 cm^{-1} เป็นหมู่ carbonyl ของ α,β -unsaturated ketone สำหรับสัญญาณค่อนข้างเข้มที่ 1629 cm^{-1} และปานกลางที่ 1504 cm^{-1} คาดว่าเป็นของ C=C stretching ^1H NMR สเปกตรัม แสดงสัญญาณ singlet ที่ $\delta 8.82$ ของกลุ่ม olefinic โปรตรอนที่ต่อกับหมู่ดึงอิเล็กตรอน สัญญาณที่ $\delta 7.15$ และ 6.10 เป็น AB quartet ($J = 15.8\text{ Hz}$) ซึ่งเป็นเอกลักษณ์ของ trans alkene ของ 2 โปรตรอน ที่ $\delta 6.60$ เป็นสัญญาณ singlet ของ 1 โปรตรอน ที่ $\delta 5.75$ เป็นสัญญาณ doublet ของ 1 โปรตรอน ที่ $\delta 1.85$ เป็น doublet ที่มีค่า coupling constant น้อยมาก ($J = 1.2\text{ Hz}$) คาดว่าเป็นหมู่ methyl ที่มีผลจาก long range coupling ของโปรตรอนอื่น สัญญาณ singlet ที่ $\delta 1.70$ เป็นโปรตรอนของหมู่ methyl ที่ $\delta 1.40$ เป็นสัญญาณ multiplet ของ 2 โปรตรอนของหมู่ methylene สัญญาณที่ $\delta 1.00$ และที่ $\delta 0.82$ เป็นสัญญาณ doublet และ triplet โดยมีค่า $J = 6.4$ และ 7.4 ตามลำดับ ซึ่งเป็นโปรตรอนของหมู่ methyl 2 หมู่ สำหรับ ^{13}C NMR สเปกตรัม แสดงสัญญาณของหมู่ carbonyl 3 หมู่โดยที่ $\delta 194.1$ และ 182.9 คาดว่าเป็นของ ketone และที่ $\delta 167.8$ เป็นของเอสเทอร์ สำหรับสัญญาณของคาร์บอนอื่น ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับ rotirinol 3.5(3) พบว่ามีส่วนที่เป็น side chain จากตำแหน่ง C-3 ถึง C-16 เหมือนกันและส่วนที่เหลือมีส่วนคล้ายกับ ตำแหน่งของ C-4 และ C-4' ใน Chaetoviridin A ซึ่งพบในรา *C. globosum* var. *flavo viridal* ^{3.5[2]} จากสเปกตรัมของ 2D-NMR ได้แก่ COSY

HMQC และ HMBC สามารถกำหนดโครงสร้างของสาร 3.5(4) เป็น Rubrorotiorin ซึ่งมีผู้แยกได้จากรา *Penicillium hirayamae* Udagawa^{3,5[3,4]}



สาร 3.5(5) เป็นผลึกรูปเข็มสีแดง แยกได้จากส่วนสกัด hexane จำนวน 18 มิลลิกรัม จากข้อมูล ^1H NMR สเปกตรัมแสดงสัญญาณคล้ายกับสเปกตรัมของสาร Rotiorinol 3.5(3) โดยต่างกันที่สาร 3.5(5) ไม่ปรากฏสัญญาณที่ $\delta 4.8$ ซึ่งเป็นตำแหน่งของโปรตอน H-9 ซึ่งมีหมู่ hydroxyl ต่ออยู่ และที่ $\delta 1.40$ ซึ่งเป็นหมู่ CH_3 ที่ตำแหน่ง 8a แต่ปรากฏที่ $\delta 1.70$ แทน และจากการเปรียบเทียบ ^{13}C NMR สเปกตรัมระหว่างสารทั้งสองพบว่าสาร 3.5(5) มีหมู่ carbonyl 3 หมู่ โดยมีสัญญาณของหมู่ $\text{C}=\text{O}$ ที่ $\delta 190.7$ เพิ่มขึ้น ขณะที่สัญญาณที่ $\delta 71.7$ ไม่ปรากฏ จากเทคนิค 2D NMR (COSY และ HMBC) สามารถยืนยันได้ว่าสาร 3.5(5) คือ Rotiorin ซึ่งสารนี้มีผู้รายงานการพบจากรา *Penicillium sclerotiorum*^{3,5[5]} แต่ยังไม่เคยมีรายงานการพบในราสกุล Chaetomium สำหรับการเปรียบเทียบค่า chemical shift ของ ^1H และ ^{13}C NMR ของสาร 3.5(3) และสาร 3.5(5) แสดงดังตารางที่ 3.5(1) และตารางที่ 3.5(2) ตามลำดับ



Rotiorin 3.5(5)

ตารางที่ 3.5(1) แสดงค่า chemical shift ใน ^1H NMR ของสาร 3.5(3)^a 3.5(5)^b
3.5(7)^c และสาร 3.5(8)^c

No	δ_H			
	3.5(3)	3.5(5)	3.5(7)	3.5(8)
1	7.48 <i>d</i> (2.0)	7.89	7.40	7.46
3	-	-	-	-
4	6.20 <i>s</i>	6.24 <i>s</i>	6.19	6.18
4a	-	-	-	-
5	6.72 <i>s</i>	6.45 <i>s</i>	6.71	6.70
5a	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	-	-	-	-
8a	-	-	-	-
9	4.78 <i>d</i> (2.0)	-	4.75 <i>s</i>	4.74 <i>s</i>
9a	-	-	-	-
10	6.00 <i>d</i> (15.7)	5.98 <i>d</i> (15.63)	6.06 <i>d</i> (15.64)	5.98 <i>d</i> (15.67)
11	7.02 <i>d</i> (15.7)	7.00 <i>d</i> (15.63)	6.96 <i>d</i> (15.64)	6.98 <i>d</i> (15.67)
12	-	-	-	-
13	5.65 <i>d</i> (9.75)	5.68 <i>d</i> (9.75)	5.84 <i>s</i>	5.65 <i>d</i> (9.75)
14	2.46 <i>m</i>	2.46 <i>m</i>	-	2.75
15	1.42, 1.31 <i>m</i>	1.42, 1.28 <i>m</i>	1.67 <i>m</i> (8, 7.40)	1.70, 1.59 <i>m</i>
16	0.85 <i>t</i> (7.37)	0.83 <i>t</i> (7.37)	0.92 <i>t</i> (7.39)	0.92 <i>t</i> (7.39)
17	-	-	-	-
18	2.52 <i>s</i>	2.51 <i>s</i>	2.51 <i>s</i>	2.50 <i>s</i>
19	1.82 <i>d</i> (1.2)	1.81 <i>s</i>	2.06 <i>s</i>	1.82 <i>s</i>
20	1.00 <i>d</i> (6.62)	0.98 <i>d</i> (6.62)	1.37 <i>s</i>	1.02 <i>d</i> (6.61)
21	1.40 <i>s</i>	1.70 <i>s</i>	1.37 <i>s</i>	1.37 <i>s</i>
OH	3.50 <i>br</i>	-	3.18	-

^a NMR 600 MHz

^b NMR 400 MHz

^c NMR 300 MHz

ตารางที่ 3.5(2) แสดงค่า chemical shift ใน ^{13}C NMR ของสาร 3.5(3)^a 3.5(5)^b
3.5(7)^c และสาร 3.5(8)^c

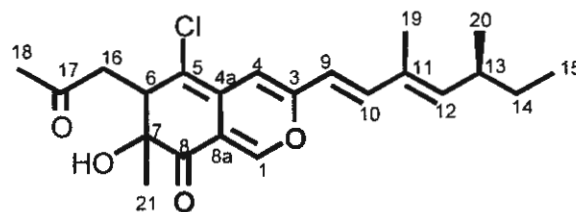
No	δ_c			
	3.5(3)	3.5(5)	3.5(7)	3.5(8)
1	146.3	152.9	146.1	146.3
3	159.9	157.8	158.3	158.7
4	109.4	110.3	109.9	109.6
4a	145.8	124.2	145.2	145.9
5	102.9	103.9	103.2	103.0
5a	173.1	171.6	172.8	173.2
6	110.4	112.7	110.7	110.3
7	171.6	169.5	171.5.5	171.8
8a	83.2	85.7	83.1	83.3
9	71.7	190.8	71.7	71.5
9a	120.6	116.2	120.4	120.7
10	116.4	115.5	117.4	115.8
11	141.9	142.6	142.1	141.4
12	132.0	131.9	134.6	132.3
13	147.8	148.9	145.2	146.6
14	35.0	35.1	74.0	30.0
15	30.1	30.0	36.3	39.8
16	11.9	11.9	8.3	61.0
17	195.1	194.7	195.2	195.2
18	29.4	29.6	29.5	29.4
19	12.3	12.3	12.8	12.3
20	20.2	20.2	28.6	20.6
21	19.3	28.5	19.2	19.3

^a NMR 150 MHz

^a NMR 100 MHz

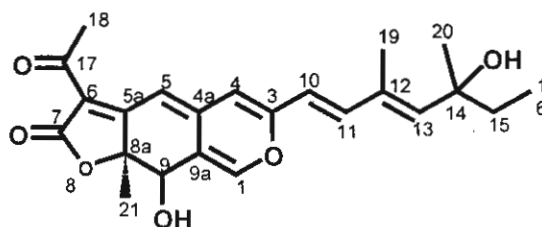
^a NMR 75 MHz

สาร 3.5(6) เป็นสารสีเหลืองได้จากส่วนสกัด hexane ^1H NMR สเปกตรัมแสดงสัญญาณ ABquartet ที่ δ 7.02 และ 6.07 โดยมีค่า $J = 15.7$ Hz ซึ่งเป็นลักษณะของ *trans* alkene ที่ δ 6.96 6.57 และ 5.64 เป็น singlets ของ olefinic โปรตรอน สัญญาณ doublet of doublet จำนวน 2 ชุดที่ δ 3.23 มีค่า $J = 2.02$ และ 17.39 Hz และ δ 2.76 มีค่า $J = 9.71$ และ 17.39 Hz เป็นโปรตรอนของหมู่ methylene (H-16) ซึ่ง coupling กับสัญญาณที่ δ 3.36 ซึ่งเป็น doublet และมีค่า $J = 9.59$ Hz ของ H-6 สำหรับสัญญาณอื่นๆเมื่อเปรียบเทียบกับสาร 3.5(5) พบว่าในส่วนที่เป็น side chain ปรากฏสัญญาณเหมือนกัน จากข้อมูลของ ^{13}C NMR และเทคนิค 2D-NMR ได้แก่ COSY HMQC และ HMBC สามารถกำหนดโครงสร้างของสาร 3.5(6) ดังแสดงข้างล่าง จากการสืบค้นข้อมูลยังไม่มีรายงานการค้นพบสารนี้



3.5(6)

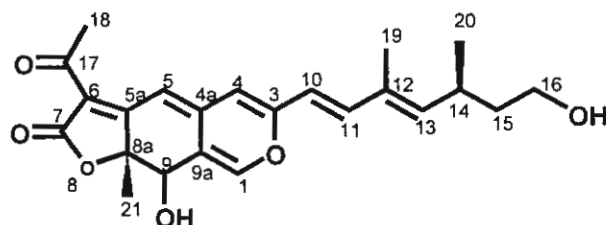
สาร 3.5(7) เป็นสารสีส้มแยกได้จากส่วนสกัด MeOH จากข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR สเปกตรัมแสดงในตารางที่ 3.5(1) และ 3.5(2) พบว่าสัญญาณส่วนใหญ่เหมือนกับสาร Rotiorinol (3.5(3)) โดยต่างกันในส่วนของ side chain โดยค่า chemical shift ของ H-13 ที่ δ 5.84 เป็น singlet และไม่พบโปรตรอนที่ตำแหน่ง 14 ซึ่งสอดคล้องกับสัญญาณของหมู่ CH_3 ที่ต่ออยู่กับตำแหน่ง C-14 ซึ่งเป็น singlet สำหรับ ^{13}C NMR สเปกตรัมพบคาร์บอนชนิด quaternary ที่ δ 74.0 ซึ่งกำหนดเป็น C-14 โดยการยืนยันด้วยเทคนิค HMBC จากข้อมูลทั้งหมดนี้สามารถกำหนดโครงสร้างของสาร 3.5(7) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสาร 3.5(3) ดังแสดงข้างล่างนี้ จากการสืบค้นข้อมูลยังไม่มีรายงานการค้นพบสารนี้



3.5(7)

สาร 3.5(8) เป็นสารสีส้มแยกได้จากส่วนสกัด MeOH จากข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR สเปกตรัมแสดงในตารางที่ 3.5(1) และ 3.5(2) พบว่าสัญญาณส่วนใหญ่เหมือนกับสาร Rotiorinol (3.5(3)) โดยต่างกันว่า H-16 จะพบเป็น multiplet ของ 2 โปรตรอนที่ δ 3.62 และใน

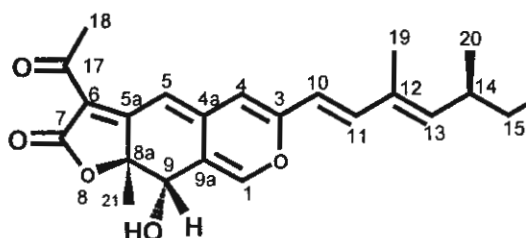
^{13}C NMR สเปกตรัมพบที่ $\delta 61.0$ จึงสามารถสรุปโครงสร้างของสาร 3.5(8) ได้เหมือนโครงสร้างของสาร 3.5(3) ต่างกันที่ปลาย side chain จะมีหมู่ OH ที่เป็น primary alcohol โดยมีค่า HRFABMS $[m/z\ 398.17884\ [M]^+, C_{23}H_{26}O_6]$ จากการสืบค้นข้อมูลยังไม่มีรายงานการค้นพบสารนี้



3.5(8)

การพิสูจน์ absolute configurations ของสารประกอบ Rotiorinol 3.5(3)

จากการวิเคราะห์ผลของ NOE Difference และ NOESY สเปกตรัม ไม่พบ correlation ระหว่าง H-9 กับ H-21(CH_3) แสดงถึงการจัดตัวของโปรตอนทั้งสองอยู่ต่างระนาบกัน เมื่อเปรียบเทียบกับสาร rotiorin 3.5(5) จากที่มีผู้รายงานว่าหมู่ CH_3 ที่ตำแหน่ง 8a วางตัวได้ระนาบ(α) แล้ว คาดว่าหมู่ CH_3 ที่ C-8a ของสาร rotiorinol 3.5(3) จะวางตัวในทิศทางเดียวกันกับสาร rotiorin จากการใช้วิธีของ Mosher^{3,5[6]} โดยการเตรียม R- และ S-MPTA เอสเทอร์ ยืนยันได้ว่า configuration ที่ C-9 เป็น R ดังแสดง



2) การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

ได้ทดสอบการใช้สาร Rotiorinol 3.5(3) ซึ่งเป็นสารหลัก ในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนส ของมะม่วงและส้มเขียวหวาน และ *C. dematium* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในพริก ผลการทดลองพบว่าสาร Rotiorin สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของโคโลนีและการสร้างสปอร์ ได้ในระดับหนึ่ง ดังแสดงในตารางที่ 3.5(3) และรูปที่ 3.5(1)

นอกจากนี้สาร 3.5(3) 3.5(4) 3.5(5) และ 3.5(8) ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Candida albicans* ได้ที่ค่า EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) เท่ากับ 10.5 0.62 24.32 และ 16.68 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.5(1) แสดงค่า ED₅₀ ของสาร Rotiorinol 3.5(3) ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสร้างปริมาณสปอร์ของเชื้อราโรคพืช

เชื้อราโรคพืช	ค่า ED ₅₀ (μg/ml)	
	โคโลนี	ปริมาณการสร้างสปอร์
<i>C. gloeosporioides</i> (มะม่วง)	3306.20	616.68
<i>C. gloeosporioides</i> (ส้ม)	-	293.29
<i>C. dematium</i> (พริก)	86.31	45.23



รูปที่ 3.5(1) แสดงผลของสาร Rotiorinol 3.5(3) ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. dematium* อายุ 7 วัน ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

วัสดุและวิธีการ

1) สารเคมี เครื่องมือและอุปกรณ์

สารเคมีที่ใช้สำหรับแยกสารโดยวิธีโครมาโทกราฟี ชนิดต่างๆ ได้แก่ Merck's silica gel 60 (Art 7733, 7734) สำหรับคอลัมน์โครมาโทกราฟี silica gel 60PF₂₅₄ สำหรับ preparative TLC และ silica gel 60 F₂₅₄ สำหรับ TLC ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดและแยกสารชนิดต่างๆ ได้แก่ hexane, CH₂Cl₂, EtOAc และ MeOH ถ้าเป็น commercial grade จะนำมากลั่นก่อนใช้

เครื่องมือหาจุดหลอมเหลวใช้ Electrothermal IA9000 serie IR spectra บันทึกด้วยเครื่อง Shimadzu FTIR 8000 และ Perkein Elmer 683 สำหรับ NMR spectra บันทึกด้วยเครื่อง Jeol-EX90A, Bruker DPX300, DPX400 และ DPX600

2) การเลี้ยงเชื้อรา *C. cupreum*

การเลี้ยงเชื้อราและการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพดำเนินการที่ ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร โดยเลี้ยงเชื้อรา *C. cupreum* ในอาหาร potato dextrose broth (PDB) แล้วบ่มไว้ด้วยเครื่องเขย่า (shaker) ที่อุณหภูมิ 25-28°C เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ กรองเอาเส้นใย (mycelial mat) ด้วยผ้าขาวบางและผึ่งลมให้แห้ง

3) การสกัดด้วยตัวทำละลาย

จากการสกัดเส้นใยแห้งของรา *C. cupreum* 300 กรัม ซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลว (PDB) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ได้สารสกัด hexane (hexane extract) 6.1 กรัม (2.03%) สารสกัด EtOAc (EtOAc extract) 2.5 กรัม (0.83%) และสารสกัด MeOH (MeOH extract) 20.3 กรัม (6.77%) ตามลำดับ

4) การแยกสารให้บริสุทธิ์

(ก) Hexane extract

นำ hexane extract 6.0 กรัม ไปแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้ 9 fractions (F₁-F₉) โดย F₁ เป็นของเหลวซึ่งส่วนเป็น triglyceride ส่วน F₂ นำไปตกตะกอนได้ ergosterol จากการนำ F₃ ไปแยกอีกครั้งด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้สารสีส้มแดงของ 3.5(4) 0.083 กรัม (0.027%) และเมื่อนำ F₅ ไปแยกอีกครั้งด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้ส่วนแยกหลักๆ อยู่ 3 fractions (f₁-f₃) เมื่อนำ f₁ ไปตกผลึกซ้ำด้วย CH₂Cl₂/hexane ได้ผลึกรูปเข็มสีแดงของสาร 3.5(3) 0.152 กรัม (0.05%) ส่วน f₂ นำไปแยกต่อโดยวิธี PLC บน silica gel ชะด้วยตัวทำละลาย CH₂Cl₂ และตกผลึกด้วย CH₂Cl₂/hexane ได้ผลึกรูปเข็มสีแดงของสาร 3.5(5) หนัก 0.018 กรัม (0.006%) สำหรับ f₃ นำไปแยกต่อด้วย PLC เช่นเดียวกับสาร 3.5(5) ได้สารสีเหลืองของสาร 3.5(6) หนัก 0.022 กรัม (0.007%) สำหรับส่วนแยกย่อยอื่น ๆ อยู่ระหว่างการแยกให้บริสุทธิ์

(ข) EtOAc extract

นำ EtOAc extract 2.5 กรัม ไปแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับและชะด้วย hexane EtOAc และ MeOH รวมได้ 10 fractions (F_1 - F_{10}) นำ F_5 ไปแยกต่อโดยวิธี PLC บน silica gel โดยใช้ 30% EtOAc:hexane ได้สาร 3.5(4)หนัก 0.087 กรัม (0.029%)

(ค) MeOH extract

นำ MeOH extract มาละลายด้วย MeOH: CH_2Cl_2 (30:70) 500 มล เมื่อระเหยตัวทำละลายออกได้สารสกัดหนัก 8.5 กรัม แล้วนำไปแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบใช้แรงดัน โดยใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับและชะด้วย hexane : EtOAc และ MeOH รวมได้ 13 fractions (F_1 - F_{13}) พบว่า F_1 เป็นของเหลวที่เป็นสารผสมของกรดไขมันและ ergosterol F_2 เมื่อแยกแล้วได้ rotiorinol (3.5(3))หนัก 0.186 กรัม (0.062%) นำ F_6 ไปแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบใช้แรงดัน และแยกต่อด้วยคอลัมน์แบบธรรมดา ตามด้วยวิธี PLC (90% Et_2O :hexane) ได้สาร 3.5(8)หนัก 0.011 กรัม (0.004%) นำ F_7 ไปแยกต่อด้วยคอลัมน์แบบใช้แรงดัน และแยกส่วนย่อยด้วย PLC ได้สาร 3.5(7)หนัก 0.089 กรัม (0.03%) 3.5(9)หนัก 0.09 กรัม (0.03%) 3.5(10)หนัก 0.089 กรัม (0.03%) 3.5(11)หนัก 0.07 กรัม (0.02%)และ 3.5(12)หนัก 0.079 กรัม (0.03%)

สาร 3.5(3) เป็นผลึกรูปเข็มสีแดง mp 134-137°C $R_f = 0.58$ (60% EtOAc:Hexane) UV : λ_{max} 492, 256 nm ($\log \epsilon = 4.58, 4.25$ ตามลำดับ) $[\alpha]_D = -2257.3$ (c 0.15, CHCl_3) IR (Neat) ν_{max} : 3393(w,br), 2926(s), 2853(s), 1732(s), 1651(s), 1539(s), 1239 (m), 1173 (m) cm^{-1}

สำหรับข้อมูลของ ^1H -NMR และ ^{13}C -NMR แสดงในตารางที่ 3.5(1)

สาร 3.5 (4) เป็นผงสีส้มแดง $R_f = 0.55$ (20% EtOAc : Hexane) IR(film) ν_{max} 3020 (vw) ; 2968, 2931 (w) 1769 (s), 1686 (m) 1630 (vs) ; 1504 (m) ; 1204 (w) cm^{-1} ^1H NMR (CDCl_3) : δ 8.82 (1H, s, CH = C), 7.15 and 6.10 AB quartet (2H, d, $J = 15.8$ Hz, *trans* CH=CH) 6.60 (1H, s, CH=C), 5.75 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, CH-CH=C), 2.60 (3H, s, COCH_3), 2.50 (m, CH-), 1.85 (3H, s - CH_3 -C=CH) 1.70 (3H, s, CH_3), 1.40 (2H, m, CH_2 -), 1.00 (3H, d, $J = 6.4$ Hz CH_3 -CH) 0.82 (3H, t, $J = 7.4$ Hz, CH_3) ppm. ^{13}C NMR (CDCl_3) : δ 194.1 (C=O), 182.9 (C=O), 167.8 (C=O), 163.7 (C=C), 158.0 (C=C), 152.0 (CH=C), 149.3 (CH=C) 143.5 (CH=C), 139.5 (C=C), 131.9 (C=C), 123.7, 115.6 (CH=C), 110.2 (C=C), 108.6 (C=C), 105 (CH=C), 87.5 (C- CH_3), 35.1 (CH- CH_3), 29.9 (CH_2), 29.9 (CH_3), 26.2 (CH_3), 20.0 (CH_3), 12.3 (CH_3), 11.8 (CH_3) ppm

สาร 3.5 (5) เป็นผลึกสีแดง $R_f = 0.60$ (CH_2Cl_2) สำหรับข้อมูลของ ^1H -NMR และ ^{13}C -NMR แสดงในตารางที่ 3.5(1) และตารางที่ 3.5(2) ตามลำดับ

สาร 3.5(6) เป็นผงสีเหลือง $R_f = 0.63$ (20% EtOAc : CH_2Cl_2) ^1H NMR (CDCl_3) : δ 7.02 (1H, d, $J = 15.70$ Hz, H-10), 6.96 (1H, d, $J = 1.54$ Hz, H-1), 6.57 (1H, s, H-4), 5.64 (1H, d, $J = 9.7$ Hz, H-12), 3.36 (1H, d, $J = 9.59$ Hz, H-6), 3.23 (1H, dd, $J = 2.02, 17.39$, Ha-16), 2.76 (1H, dd, $J = 4.86, 17.39$ Hz, Hb-16), 2.48 (2H, m, H-13), 2.30 (3H, s, H-18), 1.84 (3H, s, H-19), 1.44, 1.32 (2H, m, H-14), 1.12 (3H, s, H-21), 1.02 (3H, d, $J = 6.65$ Hz, H-20), 0.89 (3H, t, $J = 7.44$ Hz, H-15) ppm ^{13}C NMR (CDCl_3) : δ 207.4 (C-17), 192.5 (C-8), 158.5 (C-3), 148.1 (C-12), 143.9 (C-1), 142.4 (C-10), 132.3 (C-11), 119.6 (C-8a), 119.2 (C-5), 116.8 (C-9), 108.3 (C-4a), 105.3 (C-4), 74.4 (C-7), 40.6 (C-6), 40.2 (C-17), 35.4 (C-13), 30.7 (C-14), 30.5 (C-18), 21.6 (C-19), 20.6 (C-15) ppm

สาร 3.5(7) เป็นผงสีแดงส้ม ข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR แสดงในตารางที่ 3.5(1) และ 3.5(2) ตามลำดับ

สาร 3.5(8) เป็นผงสีแดงส้ม ข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR แสดงในตารางที่ 3.5(1) และ 3.5(2) ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

- 3.5 [1] สมเดช กนกเมธากุล ขวัญใจ กนกเมธากุล และ เกษม สร้อยทอง การศึกษาสารเคมีจากราดีโตเมียม คูเปรียม รายงานผลการวิจัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น 2538
- 3.5[2] Takahashi Y.; Koyama, K.; Natori, S. *Chem. Pharm. Bull.* 1990, **38**(3), 625.
- 3.5[3] Udagawa, S. *Chem. and Pharm. Bull. (Japan)* 1963, **11**, 366.
- 3.5[4] Gray, R.W. and Whalley, W. B. *J. Chem. Soc.(C)* 1971, 3575.
- 3.5[5] Jackman, G. B.; Robertson, A.; Travers, R. B.; Whalley, W. B. *J. Chem. Soc.* , 1958, 1825.
- 3.5[6] Ohtani, I.; Kusumi, T.; Kashman, Y.; Kakisawa, H. *J. Am. Chem. Soc.* 1991, **113**,2092.

**โครงการย่อยกลุ่มที่ 4: การศึกษาส่วนประกอบทางเคมีของพืชในแง่
นิเวศวิทยาเคมี**

โครงการย่อยกลุ่มที่ 4: การศึกษาส่วนประกอบทางเคมีของพืชในแง่

นิเวศวิทยาเคมี

บทนำ

1. คำนำ

นิเวศวิทยาเคมี (chemical ecology)^{4[1]} เป็นการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตซึ่งผ่านตัวกลางคือสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ซึ่งบางครั้งทำหน้าที่เป็นสารควบคุมศัตรูพืชด้วย การศึกษาทางด้านนี้ทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างพืชกับพืช สัตว์กับสัตว์ หรือพืชกับสัตว์ ซึ่งนำไปสู่ความเข้าใจถึงสายใยที่เชื่อมโยงกันซึ่งทำให้เกิดความสมดุลของธรรมชาติ หากความสมดุลดังกล่าวขาดไป อาจเกิดความเปลี่ยนแปลงที่เป็นผลเสียต่อสภาพแวดล้อม เช่นการระบาดของแมลง ซึ่งอาจจะรุนแรงจนทำให้สมดุลของธรรมชาติเสียมากขึ้นไปอีก สำหรับประเทศที่พัฒนาแล้วการศึกษาทางด้านนิเวศวิทยาเคมีได้มีการศึกษากันมาก แต่สำหรับประเทศกำลังพัฒนา การศึกษาวิจัยด้านนี้มีน้อยมาก บางประเทศเกือบจะไม่มีเลย เหตุที่เป็นเช่นนี้เพราะการศึกษาด้านนี้มองไม่ค่อยเห็นประโยชน์โดยตรงอย่างเด่นชัด และการวิจัยด้านนี้มักไม่ได้รับการสนับสนุนเหมือนกับโครงการประเภทอื่นๆ แต่ในอนาคต การศึกษาด้านนี้จะมีความสำคัญมากขึ้น เพราะปัญหาจากสมดุลธรรมชาติเสียไปจะมีมากขึ้นจนเกิดความจำเป็นที่จะต้องหันมาศึกษาสภาพแวดล้อมกันอย่างจริงจังมากขึ้น สำหรับในประเทศไทยการศึกษาด้านนี้ดูเหมือนจะยังไม่มี ส่วนใหญ่นักเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจะศึกษาส่วนประกอบทางเคมีของพืช และอาจจะต่อด้วยการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้ ส่วนนักกีฏวิทยาก็ศึกษาทางด้านของแมลงเท่านั้น ผู้วิจัยมีความสนใจในเรื่องนี้มานานพอสมควรแล้ว แต่ยังไม่มีโอกาสได้ลงมือทำวิจัยด้านนี้ เพราะไม่แน่ใจว่าจะมีโอกาสขอทุนมาทำวิจัยได้หรือไม่ เมื่อได้เขียนโครงการวิจัยครั้งนี้จึงถือว่าเป็นโอกาสดีที่จะผนวกเอาการศึกษาเรื่องนี้ไว้ในโครงการด้วย เพื่อที่จะไว้เป็นพื้นฐานเบื้องต้นในการศึกษาต่อไปทั้งของผู้วิจัยเองและนักเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติอื่นๆต่อไป

2. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

งานวิจัยทางด้านนิเวศวิทยาเคมีในประเทศที่พัฒนาแล้วได้เจริญก้าวหน้าไปค่อนข้างมาก การวิจัยทางด้านนี้มีหลายแนวทาง เช่น การศึกษาการเลือกพืชที่อาศัยของแมลงโดยดูสารเคมีที่ผิวของใบของพืช^{4[2]} การเลือกพืชสำหรับวางไข่ของแมลงชนิดกินพืช สิ่งเร้าทางเคมีจะมีบทบาทสำคัญในการที่แมลงชนิดกินพืช จะตัดสินใจเลือกชนิดของพืชในการวางไข่ โดยขึ้นอยู่กับการมีสารดึงดูด (attractants) การปราศจากสารขับไล่ (repellants) จากพืช^{4[3]} เมื่อแมลงลงมาเกาะสำรวจที่ต้นไม้อายุ สสารที่มีความสามารถในการระเหยได้น้อยกว่าก็จะมีบทบาทต่อการตัดสินใจของแมลงมากขึ้น หลังจากนั้นปัจจัยอื่นๆจะช่วยเสริมการตัดสินใจของแมลง เช่น สภาวะทางสรีรวิทยา สภาวะของสิ่งแวดล้อม ประสบการณ์ในอดีต และสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่มีอยู่ จากการศึกษาที่ผ่านมาในอดีตพอจะสรุปได้ว่า การกำหนดทิศทางและการตัดสินใจลงเกาะบนพืชของแมลงเกี่ยวข้องกับสารระเหยง่ายบนพืชชนิดนั้น ส่วนการตัดสินใจวางไข่ในเวลาต่อมาขึ้นอยู่กับสารเคมีที่ไม่ค่อยระเหยง่ายที่แมลงได้สัมผัสโดยตรง^{4[4]}

พืชอาจเป็นแหล่งสร้าง pheromones ของแมลงบางชนิด หรือมีสารที่เป็นสารตั้งต้น (precursors) ของ pheromones ของแมลงบางชนิด ในบางกรณีทำให้พืชถูกแมลงรบกวน เช่น แมลงปีกแข็งต้นสน *Dendroctonus brevicomis* เมื่อได้กลิ่นของ pheromone จากต้นสนที่มีบาดแผล ก็จะหาแหล่งของสารดังกล่าวจนพบ จากการศึกษาส่วนประกอบทางเคมีของ *D. brevicomis* พบว่ามูลของแมลงตัวเมียมี pheromone ชื่อ *exo-brevicomine* อยู่ด้วย และเมื่อตรวจสอบแมลงตัวผู้ก็พบ pheromone ชื่อ *frontalin* สาร pheromone แต่ละชนิดไม่ค่อยจะดึงดูดแมลง แต่เมื่อรวมกันอยู่จะดึงดูดแมลงได้ดีมาก^{4[5]} นอกจากนี้ยังมีการศึกษา pheromones ที่ทำหน้าที่ในการยับยั้งการเข้ารวมกลุ่มกันของแมลง เช่น สาร *verbenone* จะทำให้แมลงแต่ละตัวหลีกเลี่ยงการรวมกลุ่มกัน^{4[6]} สาร pheromones มีความสำคัญมากในกระบวนการสืบพันธุ์ของแมลง^{4[7]} จะเห็นได้ว่า ความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิต เช่น แมลงกับพืช มีความสลับซับซ้อนมากกว่าที่เราคิด จำเป็นที่จะต้องศึกษา มิเช่นนั้น ข้อมูลที่สามารถนำไปใช้ในการแก้ปัญหาที่เกี่ยวข้องกับสิ่งแวดล้อมจะไม่มีอยู่ในมือ เมื่อเกิดปัญหาขึ้นมาก็จะไม่สามารถแก้ปัญหาได้อย่างถูกต้องรวดเร็วและเหมาะสม

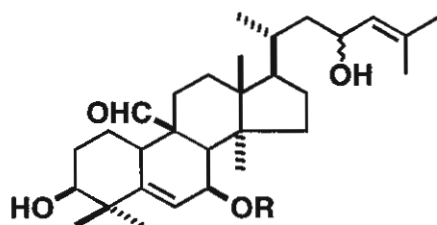
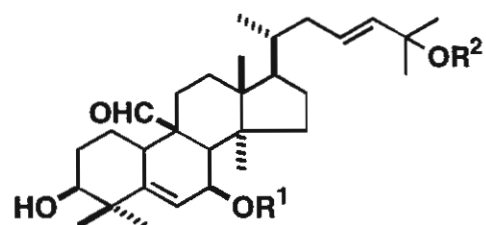
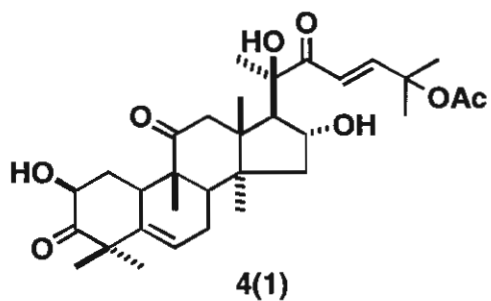
3. วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพืชกับศัตรูพืชบางชนิดในแง่ของนิเวศวิทยาเคมี

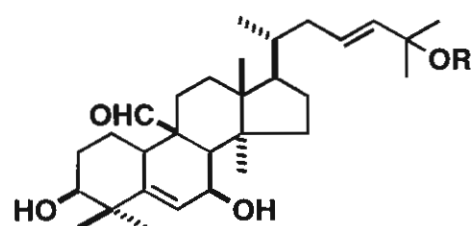
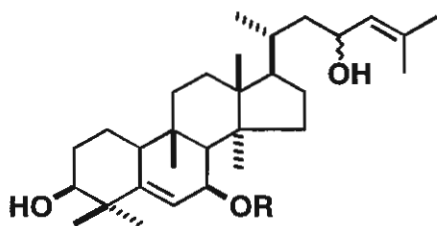
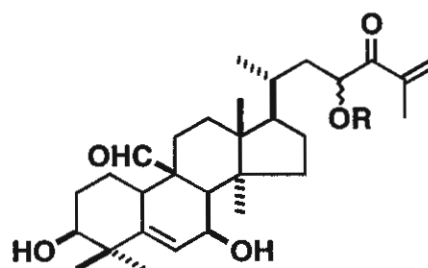
4. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มีพืชบางชนิดที่เป็นที่ทราบกันว่าผลิตสารที่มีพิษสำหรับป้องกันแมลง แต่ก็ยังมีแมลงที่สามารถกินพืชดังกล่าวได้ เช่นพืชในวงศ์ Cucurbitaceae ซึ่งเป็นวงศ์ใหญ่มีถึงประมาณ 130 สกุล และประมาณ 900 ชนิด เช่น *Cucumis* (กลุ่มแตงกวา) *Cucurbita* (กลุ่มฟักทอง) *Momordica* (กลุ่มมะระ) *Trichosanthes* (กลุ่มบวบขม) สารเคมีที่เป็นลักษณะเฉพาะของวงศ์นี้คือ cucurbitacins ซึ่งเป็น tetracyclic triterpenoids ที่มีรสขมเป็นอย่างยิ่ง และมีอยู่ไม่น้อยกว่า 30 ชนิด ตัวอย่างเช่น cucurbitacin B [4(1)] ถึงแม้ว่าสารกลุ่มนี้จะพิษต่อแมลง แต่ก็ยังมีแมลงสามารถทนหรือลดพิษของสารพวกนี้ลงจนสามารถกินพืชที่มีสารนี้เป็นอาหารได้ ซึ่งเป็นผลมาจากวิวัฒนาการ ตัวอย่างที่น่าสนใจเป็นการศึกษานิเวศวิทยาเคมีของแมลงปีกแข็งชนิดหนึ่งคือ Luperini rootworm beetles^{4[8]} จากการศึกษาที่ผ่านมาค่อนข้างยาวนาน ทำให้ได้ภาพวิวัฒนาการของแมลงชนิดนี้กับพืชในวงศ์ Cucurbitaceae คือในช่วงแรกแมลงกินพืชสามารถกินสาร cucurbitacins ได้ จากนั้นเกิด mutation ขึ้นในวงศ์ Cucurbitaceae ได้ cucurbitacins ที่ขมและเป็นพิษต่อแมลง จนมีพืชบางชนิดในวงศ์นี้ที่แมลงไม่มารบกวน ต่อมาแมลงปีกแข็งชนิดนี้ได้พัฒนาจนสามารถเกิดการลดพิษและกำจัดสารพวกนี้ จนใช้พืชพวกนี้เป็นอาหารได้ และต่อมาแมลงพวกนี้ได้พัฒนาจนมี receptor เฉพาะที่สามารถตรวจรับ cucurbitacins ได้ เพื่อที่จะใช้เป็นอาหาร พัฒนาการต่อมาของแมลงชนิดนี้คือ สะสมสาร cucurbitacins ปริมาณสูงไว้ในร่างกายเพื่อป้องกันตัวเองจากศัตรูของมัน ในแง่ของการใช้ประโยชน์ต่อไปจะเป็นการเลือกพันธุ์ เช่นพืชที่มีผลซึ่งมีปริมาณ cucurbitacins ต่ำเป็นต้น

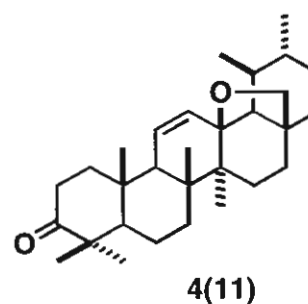
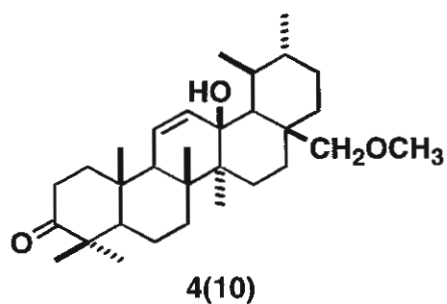
สำหรับพืชในสกุล *Momordica* ของวงศ์นี้ ไม่มีพวก cucurbitacins แต่มีสารขม cucurbitane triterpenoids ชนิดอื่นคือ momordicins ซึ่งยับยั้งการกินอาหารของแมลงปีกแข็ง *Aulacophora foveicollis*^{4[9,10]} สารที่แยกได้จาก *M. charantia* คือ momordicoside K [4(2)], momordicoside L [4(3)]^{4[9]}, momordicin I [4(4)], momordicin II [4(5)], momordin III [4(6)]^{4[10]} สาร 4(7), 4(8) และ 4(9)^{4[11]} เมื่อเร็วๆ นี้ได้มีการพบสารจากพืชชนิดนี้แตก



4(5) $R = \beta\text{-Glucopyranoside}$

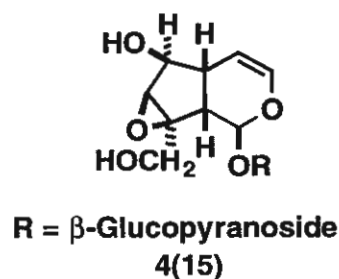
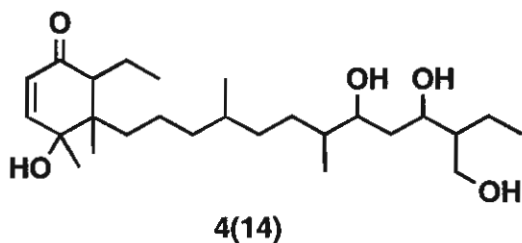
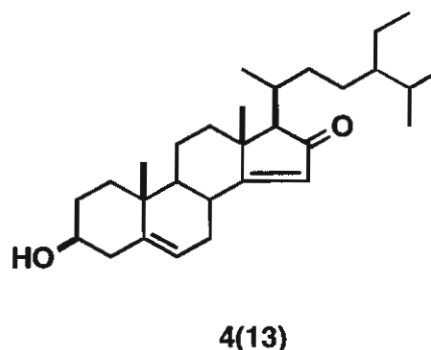
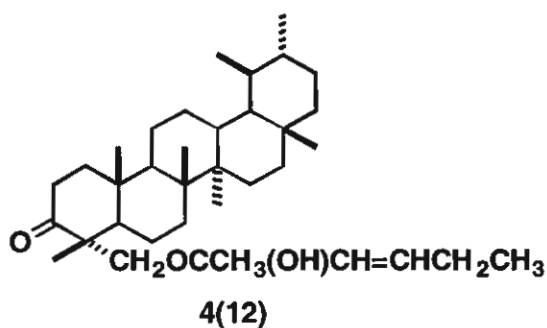


4(10) $R = \beta\text{-Glucopyranoside}$



ต่างไปจากที่เคยพบมาคือ pentacyclic triterpenoids **4(10)**-**4(12)**, steroid **4(13)** และ monocyclic compound **4(4)**^{4[12]}

แมลงหลายชนิดสามารถแยกเก็บ (sequester) สารจากพืชไว้ในร่างกายของมันเพื่อป้องกันตัวเองจากศัตรู ตัวอย่างที่มีการศึกษามากหลายกรณีแล้วคือสาร iridoids สารประเภทนี้พืชสร้างขึ้นมาเพื่อป้องกันตัวเองจากแมลง โดยทำให้แมลงเบื่ออาหาร แมลงบางชนิดสังเคราะห์ iridoids บางชนิดได้ และแมลงบางชนิดทนต่อสารพวกนี้ได้ แมลงบางชนิดยังสามารถแยกสารประเภทนี้จากพืชเก็บไว้ป้องกันตัวเอง เท่าที่ได้มีผู้ศึกษามา พบว่าส่วนใหญ่เป็นผีเสื้อและผีเสื้อกลางคืน นอกจากนี้ยังพบแมลงพวกอื่นบ้าง เช่น ตั๊กแตน และแมลงปีกแข็งบางชนิด^{4[13]} iridoid ที่ถูกแยกเก็บไว้ที่พบบ่อยคือ catapol [**4(15)**]^{4[14]} เมื่อนกกินแมลงที่เก็บสารนี้ไว้ในร่างกายจะทำให้มันต้องสำรอกออกมา



ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 มะระ (*Momordica charantia* Linn.) กับแมลงวันผลไม้ (*Bactrocera cucurbitae*)

1) การทดลองหาส่วนของมะระที่มีการปะทะสัมพันธ์กับแมลงวันผลไม้

มะระที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้เป็นมะระขี้นก แต่ในที่นี้จะเรียกสั้นๆเป็น “มะระ” กลุ่มของผู้วิจัยได้ตั้งสมมุติฐานว่า การที่แมลงวันผลไม้เข้าไปวางไข่ที่ผลมะระได้ แมลงวันผลไม้ น่าจะมีวิธีตรวจจับ (detect) แหล่งที่มันจะมาวางไข่ ซึ่งอาจพิจารณาได้ว่า วิธีการตรวจจับอาจ เป็นแบบกายภาพ คือการมองเห็นต้นหรือผลของมะระ หรือทางเคมีคือการได้กลิ่นสารเคมีเฉพาะ ซึ่งกรณีหลังเป็นเรื่องของนิเวศวิทยาเคมี เราได้ตั้งสมมุติฐานว่า การปะทะสัมพันธ์ (interaction) ระหว่างแมลงวันผลไม้กับมะระ ผ่านตัวกลางเป็นสารเคมี ซึ่งน่าจะเป็นน้ำมันหอมระเหย (essential oil) และในช่วงของการตรวจจับนี้ไม่น่าจะเป็นสารเคมีที่ไม่สามารถระเหยได้ง่าย สารเคมีที่น่าจะส่งผ่านถึงมันได้ น่าจะเป็นน้ำมันหอมระเหยจากมะระผ่านไปเข้าระบบตรวจจับสารของแมลงวัน ผลไม้ จากสมมุติฐานนี้ เราได้พิจารณาแหล่งของน้ำมันหอมระเหยที่แมลงวันผลไม้นำมายังแหล่ง วางไข่ว่าควรเป็นส่วนใดของมะระ ซึ่งน่าจะมาจากผลหรือไม่ก็มาจากใบ หรือทั้งสองแหล่งนี้ จากการที่แมลงวันผลไม้วางไข่ที่ผลดิบของมะระ เราจึงคาดหมายว่าผลมะระน่าจะเป็นแหล่งของ น้ำมันหอมระเหยที่ดึงดูดแมลงวันผลไม้มากกว่าส่วนใบ จึงใช้น้ำมันหอมระเหยจากผลเป็นอันดับแรก กลุ่มผู้วิจัยได้ติดต่อ ผศ.ดร.รัตนา ปรมาคม ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง เพื่อร่วมมือ ในการวิจัยนี้ โดยเป็นผู้ทดสอบว่าน้ำมันหอมระเหยจะดึงดูดแมลงวันผลไม้ได้หรือไม่ และ ดร.รัตนาเองก็ได้ทำวิจัยการศึกษาพฤติกรรมการวางไข่ของแมลงวันผลไม้ โดยดูว่าลักษณะ รูปร่างและสีของผลไม้ดึงดูดแมลงวันผลไม้ได้ดีกว่ากันอย่างไร จึงน่าจะเหมาะสมที่จะทดสอบ ในแง่ของการปะทะสัมพันธ์ระหว่างแมลงวันผลไม้กับมะระผ่านทางสารเคมี คือน้ำมันหอมระเหย

แนวทางจากการวิจัยนี้ อาจนำไปประยุกต์ใช้ในการดึงดูดแมลงวันผลไม้มาเพื่อการกำจัดต่อไป เนื่องจากการดึงดูดแมลงโดยวิธีนี้มีความเฉพาะเจาะจงเฉพาะแมลงวันผลไม้ที่ทำลายผลไม้บางชนิด จึงอาจเป็นวิธีการที่เฉพาะเจาะจงกว่าวิธีที่ใช้กันอยู่โดยทั่วไป คือใช้สารดึงดูด เช่น methyleugenol ซึ่งมีคุณสมบัติดึงดูดเฉพาะแมลงวันผลไม้ตัวผู้ แต่ความจริงแมลงวัน ผลไม้ตัวเมีย

ไปวางไข่ที่ผลไม้ การดึงดูดอีกวิธีหนึ่งคือ การใช้อาหารล่อผสมยาฆ่าแมลงก็ขาดความ เฉพาะเจาะจงอยู่มาก คือแมลงชนิดอื่น (ซึ่งรวมทั้งแมลงที่ไม่ใช่ศัตรูผลไม้ หรือมีประโยชน์ต่อพืช) อาจถูกกำจัดไปโดยวิธีนี้

การตรวจสอบการดึงดูดแมลงวันผลไม้ระยะปานกลาง

คณะผู้วิจัยได้นำผลมะระดิบมาทำการกลั่นด้วยไอน้ำ เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยจากผลมะระมีปริมาณน้อยมาก (ซึ่งเป็นไปตามที่คาดไว้) จึงนำส่วนที่เป็นน้ำที่กลั่นออกมา (steam distillate) มาสกัดด้วยตัวทำละลาย ในขั้นต้นนี้ได้ใช้ไดคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลาย เพราะยังไม่ทราบธรรมชาติของสารที่กลั่นออกมากับไอน้ำว่า หากสกัดด้วยตัวทำละลายมีขั้วน้อย เช่น pentane จะสามารถสกัดสารที่มีฤทธิ์ในการดึงดูดแมลงวันผลไม้ (ถ้ามี) ออกมาได้หรือไม่ จากการสกัดด้วย ไดคลอโรมีเทนพบว่า จากการใช้ผลมะระดิบ 5 กิโลกรัม ได้ oil เกือบไม่มีสี หรือสีเขียวจางมาก 222 มิลลิกรัม คณะผู้วิจัยได้นำน้ำมันหอมระเหยไปให้ดร.รัตนนาเป็นผู้ทดสอบ และมีนักศึกษา ผู้ร่วมงานวิจัยจากรามคำแหงเป็นผู้ช่วย โดยได้แบ่งการทดสอบน้ำมันหอมระเหย 3 ความเข้มข้น และตัวควบคุม (รายละเอียดโปรดดูวัสดุและวิธีการ) ใช้ทรงขนาด 1 ลูกบาศก์เมตร ซึ่งถือว่าเป็น การทดสอบระยะปานกลาง ปรากฏว่าการตอบสนองของแมลงต่อน้ำมันหอมระเหยของมะระ ทุกความเข้มข้น รวมทั้งไดคลอโรมีเทน ไม่มีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 4.1(1)) แสดงว่าน้ำมันหอมระเหยจากผลมะระในความเข้มข้นที่ทดลองไม่ดึงดูดแมลง ฉะนั้น อาจเป็นไปได้ที่แหล่งของน้ำมันหอมระเหยที่แมลงวันผลไม้ใช้นำทางมา (ถ้ามี) จะต้องมาจากแหล่งอื่น เราจึงหันมาพิจารณาใบมะระ

เมื่อนำใบมะระปริมาณ 1 กิโลกรัมมาทำการกลั่นด้วยไอน้ำ ตามวิธีการเดียวกับที่ใช้ กับผลมะระ เมื่อสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน พบว่าได้น้ำมันหอมระเหยสีน้ำตาลแดงจางมากหนัก 84 มิลลิกรัม อาจเป็นน้ำหนักที่ยังมีไดคลอโรมีเทนอยู่ส่วนหนึ่ง เพราะในขั้นต้นนี้ ยังไม่ทราบว่า ถ้าระเหยตัวทำละลายออกไปจนหมดแล้ว จะทำให้น้ำมันหอมระเหยที่ระเหยง่ายมากออกไปด้วย มากน้อยเพียงใด และถ้าเป็นสารที่ดึงดูดแมลงวันผลไม้ก็อาจจะได้ผลผิดไปจากความเป็นจริง เมื่อนำไปทดสอบการดึงดูดแมลงวันผลไม้ (ดูตารางที่ 4.1(1)) พบว่าแมลงตอบสนองน้ำมัน หอมระเหยจากใบมะระที่ความเข้มข้น 0.7 มิลลิกรัม/ 0.1 มิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าการตอบสนอง ต่อไดคลอโรมีเทนอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง แสดงว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบมะระดึงดูดแมลงแสดงว่า น้ำมันหอมระเหยจากใบมะระมีสารที่แมลงวันผลไม้ใช้เป็นตัวนำมาหาแหล่งวางไข่ งานขั้นต่อไป จะเป็นการแยกสารจากน้ำมันหอมระเหยเพื่อหาสูตรโครงสร้าง การทดลองขั้นต่อไปคือ แยกน้ำมันหอม

ระเหยออกเป็น fractions ต่างๆ แล้วนำไปทดสอบการดึงดูดแมลงวันผลไม้ เพื่อนำ fraction ที่ดึงดูดแมลงมาแยกสารต่อไป

การตรวจสอบการดึงดูดแมลงวันผลไม้ระยะไกล

ทำการทดลองเช่นเดียวกับการตรวจสอบการดึงดูดแมลงวันผลไม้ระยะปานกลาง แต่ใช้กรงขนาด 3 ลูกบาศก์เมตร ใช้น้ำมันหอมระเหยจากใบที่กลั่นใหม่ไม่เกิน 25 วัน และน้ำมันหอมระเหยจากใบที่เก็บไว้เป็นเวลา 3 เดือนหรือมากกว่า (ดูตารางที่ 4.1(2))

ผลการทดลองพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบมะระที่กลั่นใหม่ไม่เกิน 25 วัน แมลงตอบสนองต่อน้ำมันหอมระเหยความเข้มข้น 0.80 มิลลิกรัม/ 0.1 มิลลิลิตร มากกว่า ไคคโลโรมีเทนอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง แต่แมลงตอบสนองต่อน้ำมันหอมระเหยจากใบมะระที่กลั่นไว้นานกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับไคคโลโรมีเทนทุกความเข้มข้น ไม่มีความแตกต่างกัน ส่วนการตอบสนองของแมลงต่อน้ำมันหอมระเหยจากใบมะระที่กลั่นไว้นานกว่าที่ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัม/0.1 มิลลิลิตรนั้น สูงกว่าไคคโลโรมีเทนอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง แสดงว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบมะระที่กลั่นมาไม่นานสามารถดึงดูดแมลงระยะไกลได้ แต่ถ้ากลั่นมาไว้นาน ประสิทธิภาพในการดึงดูดแมลงจะหมดไป ซึ่งจากข้อมูลที่มีอยู่ขณะนี้ ไม่สามารถทราบได้ว่าเนื่องจากสารดึงดูดแมลง ที่มีอยู่สลายตัวไป หรือเกิดระเหยไปได้ง่ายในขณะเก็บไว้ หรือด้วยสาเหตุอื่น ส่วนน้ำมัน หอมระเหยจากผลมะระที่เก็บไว้นานที่ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัม/0.1 มิลลิลิตร กลับดึงดูด แมลงจากระยะไกล ซึ่งจากข้อมูลที่มีอยู่ก็ไม่สามารถทราบว่าเกิดจากสาเหตุใด

การทดสอบการดึงดูดแมลงของ Fractions ต่าง ๆ ของน้ำมันหอมระเหย

เมื่อนำใบมะระสดมากลั่นด้วยไอน้ำแล้ว นำน้ำมันหอมระเหยที่ได้มาแยกสารออกเป็นกลุ่มๆ โดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟีได้ 6 กลุ่ม นำแต่ละกลุ่มไปทดสอบกับแมลงวันผลไม้ *Bactrocera cucurbitae* จากผลการทดสอบเบื้องต้นพบว่า แมลงตอบสนอง fractions ต้นๆ มากกว่า fractions ท้ายๆ แต่เมื่อทำการทดสอบซ้ำ ปรากฏว่า ผลมีความแปรปรวนค่อนข้างมาก สาเหตุอาจเกิดจากสถานที่วิจัยเป็นระบบที่ไม่สามารถควบคุมความเร็วและทิศทางลม แสงสว่าง และอุณหภูมิได้ ซึ่งจะต้องมีการแก้ปัญหาพื้นฐานเหล่านี้ก่อน

การตรวจสอบสารกระตุ้นให้เกิดการวางไข่ของแมลง

ในการเลือกแหล่งของพืชเพื่อวางไข่ แมลงจะเลือกแหล่งที่จะให้อาหารแก่ลูกของมัน เพื่อให้เจริญเติบโตและมีพัฒนาการได้ดีที่สุด ในการเลือกพืช แมลงจะเลือกในแง่ของคุณค่าทาง

อาหาร และปัจจัยอื่นๆที่จะทำให้ลูกของมันเจริญเติบโตได้อย่างปลอดภัย เริ่มต้นแมลงจะมายังพืช และลงมาเกาะโดยสิ่งกระตุ้นที่เป็นน้ำมันหอมระเหย จากนั้นจะสำรวจผิวของพืช เช่นใบ ซึ่งจะขึ้นอยู่กับสิ่งเร้าที่เกิดจากการสัมผัส การเลือกพืชเพื่อวางไข่จะเกี่ยวข้องกับการใช้ receptor ตรวจรับสารเคมีที่หนวด (antennae), ส่วนที่เรียกว่า tarsi, ส่วนของปาก (mouthparts) และอวัยวะวางไข่ (ovipositors)⁴⁽¹⁵⁾ สิ่งที่น่าสนใจสำหรับนักเคมีคือ สารเคมีชนิดใดที่มีบทบาทในการตัดสินใจที่จะวางไข่หรือไม่วางไข่ของแมลง ซึ่งอาจจะนำไปสู่ความรู้ในการประยุกต์ใช้ควบคุมแมลงไม่ให้มาทำความเสียหายต่อพืชหรือล่อแมลงศัตรูพืชมากำจัดต่อไป

ในการทดลองหาสารกระตุ้นให้เกิดการวางไข่ (oviposition) ของแมลงวันผลไม้ เราได้เฟ่งเล็งไปที่ผลมะระดิบ โดยนำผลมะระดิบที่ปลูกเองมาสกัดสาร ในขั้นต้น เราได้ตั้งสมมุติฐานว่า สารกระตุ้นให้เกิดการวางไข่ของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera cucurbitae* อาจอยู่ที่ส่วนผิวของผลหรือส่วนเนื้อผลไม้เล็กน้อย จึงทำการสกัดผลทั้งผลโดยไม่ได้บด เริ่มจาก *n*-hexane และตามด้วย acetone จากการทดสอบการวางไข่ของแมลงวันผลไม้ พบว่าแมลงวางไข่มากกว่า control แต่เมื่อทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติ กลับไม่มีความแตกต่างกัน คาดว่าในอนาคตจะทำการทดลองใหม่

วัสดุและวิธีการ

4.1 มะระกับแมลงวันผลไม้

1) การสกัดแยกน้ำมันหอมระเหย

(1) การแยกน้ำมันหอมระเหยจากผลมะระโดยการกลั่นด้วยไอน้ำ

นำผลมะระสด (5 กิโลกรัม) มาบดด้วยเครื่องปั่น แล้วนำไปบรรจุ ในขวดก้นกลมขนาด 5 ลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปจนระดับน้ำถึงประมาณครึ่งขวด ด้านบนขวด ก้นกลมจัดเตรียมระบบกลั่นด้วยไอน้ำ ให้ส่วนล่างของน้ำที่กลั่นขึ้นไป สามารถไหลกลับมายัง ขวดก้นกลมได้นำไปต้มบน heating mantle ให้เดือดไม่แรงนัก ทำการกลั่นด้วยไอน้ำเป็นเวลา 5 ชั่วโมง เมื่อกลั่นไปได้ระยะหนึ่ง ไขแยกน้ำส่วนที่ถูกกลั่นขึ้นไปบนส่วนรองรับมาเก็บไว้ในฟลาสค์ และปิดฟลาสค์ด้วย aluminium foil และใส่ตุ้มน้ำ โดยไขแยกรวม 4 ครั้ง นำส่วนที่แยกไว้รวมทั้งส่วนที่อยู่บนส่วนรองรับครั้งสุดท้ายมารวมกัน สกัดด้วย CH_2Cl_2 รวม 3 ครั้ง ดูดความชื้นด้วย CH_2Cl_2 ด้วย anhydrous Na_2SO_4 ระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้ rotary evaporator ที่อุณหภูมิปกติ (ไม่ใช้ความร้อน) ได้ oil สีเกือบไม่มีสี หรือสีเขียวจางมาก 222 มิลลิกรัม ใส่ขวดบรรจุสารและแช่ไว้ในตู้แช่แข็งก่อนนำไปทดสอบกับแมลงวันผลไม้

(2) การแยกน้ำมันหอมระเหยจากใบมะระโดยการกลั่นด้วยไอน้ำ

นำใบมะระสดที่เก็บจากต้นไม่เกิน 3 ชั่วโมง (1 กิโลกรัม) มาบด ด้วยเครื่องบด แล้วนำไปกลั่นด้วยไอน้ำตามวิธีการเดียวกับที่ใช้กับผลมะระ ได้ oil สีน้ำตาลแดง จางมาก 84 มิลลิกรัม ใส่ขวดบรรจุสารเก็บไว้ในตู้แช่แข็งก่อนนำไปทดสอบ

2) การทดสอบการปะทะสัมพันธ์ระหว่างแมลงวันผลไม้กับน้ำมันหอมระเหย

(1) น้ำมันหอมระเหยจากผลมะระ

แบ่ง oil จากผลมะระมา 123 มิลลิกรัม เจือจางให้เป็น 0.7 มิลลิลิตร ด้วย CH_2Cl_2 (AR grade) ความเข้มข้นนี้เรียกว่า stock solution A แบ่ง stock solution A มา 0.1 มิลลิลิตร เจือจางด้วย CH_2Cl_2 ให้เป็น 1.0 มิลลิลิตร เรียกว่า stock solution B แบ่ง stock solution B มา 0.1 มิลลิลิตร เจือจางด้วย CH_2Cl_2 ให้เป็น 1.0 มิลลิลิตร เรียกว่า stock solution C นำ stock solution A, B, C และ control (คือ CH_2Cl_2) ไปทดสอบการดึงดูดแมลงวันผลไม้

โดยผศ.ดร.รัตนา ปรมาคม ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง ในแต่ละครั้งใช้สารละลาย 0.1 มิลลิลิตร หยดบนสำลีที่แขวนไว้กับผลแอปเปิลปลอมสีเหลือง ฉะนั้นแต่ละครั้ง stock solution A, B และ C ใช้ น้ำมันหอมระเหยหนัก 17.5, 1.75 และ 0.17 มิลลิกรัม ตามลำดับ ปรากฏว่าทุกความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยจากผลมะระไม่ดึงดูดแมลงวันผลไม้ ในการทดสอบช่วงแรกได้ใช้ระยะทางเป็นระยะปานกลาง (ขนาดของกรง 1 ลูกบาศก์เมตร) และต่อมาได้ทดสอบระยะไกล (ขนาดของกรง 3 ลูกบาศก์เมตร) (ดูตารางที่ 4.1(1) และ 4.1(2))

(2) น้ำมันหอมระเหยจากใบมะระ

แบ่ง oil จากใบมะระมา 14 มิลลิกรัม เจือจางด้วย CH_2Cl_2 (AR grade) ให้มีปริมาตรเป็น 2 มิลลิลิตร ความเข้มข้นนี้เรียกว่า stock solution A แบ่งมา 0.5 มิลลิลิตร เจือจางด้วย CH_2Cl_2 ให้เป็น 5.0 มิลลิลิตร เรียกว่า stock solution B แบ่งมา 0.5 มิลลิลิตร เจือจางด้วย CH_2Cl_2 ให้เป็น 5.0 มิลลิลิตร เรียกว่า stock solution C นำ stock solution A, B, C และ control (คือ CH_2Cl_2) ไปทดสอบเช่นเดียวกับกรณีของน้ำมันหอมระเหยจากผลมะระ โดยแต่ละการทดสอบใช้ stock solution 0.1 มิลลิลิตร ฉะนั้น stock solution A, B และ C ที่ใช้ในแต่ละครั้งมีน้ำหนัก 0.7, 0.07 และ 0.007 มิลลิกรัม ตามลำดับ ปรากฏว่าสารละลาย น้ำมันหอมระเหยดึงดูดแมลงวันผลไม้ที่ความเข้มข้นสูงสุด (stock solution A) ในการทดสอบ ช่วงแรกได้ใช้ระยะทางเป็นระยะปานกลาง ต่อมาจึงทดสอบระยะไกล เช่นเดียวกัน (ดูตารางที่ 4.1(1) และ 4.1(2))

3) การแยกสารจากน้ำมันหอมระเหยจากใบมะระออกเป็นกลุ่มและการทดสอบเบื้องต้น

นำน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการกลั่นใบมะระสดด้วยไอน้ำมาแยกสารเป็นกลุ่ม ๆ อย่างคร่าว ๆ ตามลำดับความมีขี้จากน้อยไปหามาก โดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ตัวชะเป็น *n*-pentane และ *n*-pentane- CH_2Cl_2 โดยเพิ่มสัดส่วนของ CH_2Cl_2 ที่ละน้อย ได้สารออกเป็น 6 กลุ่ม นำแต่ละกลุ่มไปทดสอบกับแมลงวันผลไม้ *Bactrocera cucurbitae* ผลการทดสอบเบื้องต้นนี้พบว่า fraction ต้น ๆ แมลงตอบสนองมากกว่า fraction ช่วงท้าย ๆ

ทำการทดลองซ้ำโดยใช้น้ำมันหอมระเหย lot ใหม่ พบว่าผลมีความแปรปรวนค่อนข้างมาก สาเหตุสำคัญเข้าใจว่าเกิดจากไม่สามารถควบคุมสภาวะของการทดลองได้ดีพอ โดยเฉพาะกระแสลมที่ไม่สามารถควบคุมได้ ปริมาณแสงสว่าง และอุณหภูมิ

4) การสกัดสารจากผลมะระเพื่อทดสอบการวางไข่ของแมลง

(1) การสกัดด้วย *n*-hexane

นำผลมะระดิบที่ปลูกเองมา 2.23 กิโลกรัม บรรจุลงใน conical flask ขนาด 4 ลิตร เติม *n*-hexane (AR) จนท่วม แล้วอุ่นบน water bath เป็นเวลา 20 นาที กรองสารละลาย เฮกเซน แล้วระเหยตัวทำละลายออกไป ได้ส่วนที่สกัดด้วยเฮกเซน (Hexane extract) รวม 120 มิลลิกรัม

(2) การสกัดด้วย acetone

นำผลมะระดิบที่ผ่านการสกัดด้วย *n*-hexane มาแล้ว มาสกัดด้วยอะซีโตน โดยใช้วิธีเดียวกันกับการสกัดด้วยเฮกเซน ได้ส่วนที่สกัดด้วยอะซีโตน (Acetone extract) 4,500 มิลลิกรัม

5) การทดสอบผลของสารสกัดมะระต่อการวางไข่ของแมลง

นำสารสกัดข้างต้นมาทำการทดสอบการวางไข่ของแมลงวันผลไม้ ข้อมูลเบื้องต้นระบุว่า สารสกัดทั้งสองให้ผลบวก แต่เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติกลับไม่มีความแตกต่างกัน

ตารางที่ 4.1(1) การดึงดูดแมลงวันผลไม้ *Bactrocera cucurbitae*
จากระยะห่างปานกลางด้วยน้ำมันหอมระเหยจากใบและผลมะระขึ้นก¹

มะระ	จำนวนแมลง		ค่าเฉลี่ยจำนวนครั้งที่แมลงดึงดูด/ซ้ำ ²			
	แมลงทดลอง	ครั้งที่ดึงดูด	0.7 mg	0.07 mg	0.007 mg	CH ₂ Cl ₂
ใบ ³	100	194	20.0 _a	7.4 _b	7.0 _b	4.4 _b
			17.6 mg	1.76 mg	0.17 mg	CH ₂ Cl ₂
ผล ³	60	254	17.7 _a	36.7 _a	15.0 _a	15.3 _a

¹ข้อมูลจากผศ.ดร.รัตนา ปรมาศม

²ตัวอักษรห้อยท้ายค่าเฉลี่ยซึ่งอยู่ในแนวนอนเดียวกัน

ถ้าต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ P = 0.01 โดยวิธี Duncan's multiple range test

³นำมาใช้ในระยะเวลา ≤ 25 วัน หลังจากกลั่นและแยกน้ำมันหอมระเหยออกมา

ตารางที่ 4.1(2) การดึงดูดแมลงวันผลไม้ *Bactrocera cucurbitae* จากระยะไกล
ด้วยน้ำมันหอมระเหยจากใบและผลมะระชั้น¹

มะระ	ปริมาณน้ำมัน ¹ (mg/0.1 ml)	จำนวนแมลง ทดลอง	ดึงดูด	ค่าเฉลี่ยจำนวนครั้งที่แมลงดึงดูด/ซ้ำ ² น้ำมันหอมระเหย	CH ₂ Cl ₂
ใบ ³	0.8	120	40	9.7 _a	3.7 _b
	0.08	120	22	4.3 _a	3.0 _a
ใบ ⁴	0.8	330	48	3.3 _a	1.1 _a
	0.16	120	7	1.7 _a	0.7 _a
	0.08	90	6	0.9 _a	1.0 _a
ผล ⁴	0.8	120	41	5.9 _a	2.8 _b
	0.16	120	13	2.3 _a	2.0 _a
	0.08	90	12	2.2 _a	1.9 _a

¹ข้อมูลจากผศ.ดร.รัตนา ปรมาคม

²ตัวอักษรห้อยท้ายค่าเฉลี่ยซึ่งอยู่ในแนวนอนเดียวกัน

ถ้าต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ P = 0.01 โดยวิธี Duncan's multiple range test

³นำมาใช้ในระยะเวลา ≤ 25 วัน หลังจากกลั่นและแยกน้ำมันหอมระเหยออกมา

⁴นำมาใช้ในระยะเวลา ≥ 3 เดือน หลังจากกลั่นและแยกน้ำมันหอมระเหยออกมา

เอกสารอ้างอิง

บทนำ

- 4[1] Isman, M. B. *Experientia* 1989, **45**, 213.
- 4[2] Chapman, R. F.; Bernays, E. A. *Experientia* 1989, **45**, 215.
- 4[3] Detheir, V. G. *Ent. Exp. Appl.* 1982, **31**, 49.
- 4[4] Renwick, J. A. A. Nonspecific Mechanisms: Plant Characteristics Insect Behavior. In *Plant Resistance to Insects*; Hedin, P. A. Ed; American Chemical Society: New York, 1983; pp. 199-213.
- 4[5] Kinzer, G. W.; Fentiman, A. F. Jr.; Page, T. F.; Foltz, R. L.; Vite, J. P.; Pitman, G. B. *Nature* 1969, **211**, 475.
- 4[6] Beddard, W. D.; Tilden, P. E.; Lindahl, K. Q. Jr.; Wood, D. L.; Ranch, P. A. *J. Chem. Ecol.* 1980, **6**, 997.
- 4[7] McNiel, J. N.; Delisle, J. *Experientia* 1989, **45**, 236.
- 4[8] Metcalf, R. L.; Lampman, R. L. *Experientia* 1989, **45**, 240 and references cited therein.
- 4[9] Okabe, H.; Miyahara, Y.; Yamauchi, T. *Chem. Pharm. Bull.* 1982, **30**, 4334.
- 4[10] Yasuda, M.; Iwamoto, M.; Okabe, H.; Yamauchi, T. *Chem. Pharm. Bull.* 1984, **32**, 2044.
- 4[11] Fatope, M.; Takeda, Y.; Yamashita, H.; Okabe, H.; Yamauchi, T. *J. Nat. Prod.* 1990, **53**, 1491.
- 4[12] Begum, S.; Ahmed, M.; Siddiqui, B. S.; Khan, A.; Saify, Z. S.; Arif, M. *Phytochemistry* 1997; **44**, 1313.
- 4[13] Rimpler, H. Sequestration of Iridoids by Insects. In *Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids*; Harborne, J. B.; Tomas-Barberan, F. A. Eds.; Claredon Press: Oxford, 1991; pp. 314-330.

- 4[14] Bowers, M. D. Iridoids Glycosides, Plant and Herbivorous Insects. In *Chemical Mediation of Coevolution, Chemistry and Coevolution*; Spencer, K. C. Ed.; Academic Press: New York, 1988; pp. 133-165.
- 4[15] Renwick, J. A. A. *Experientia* 1989, **45**, 223.

**โครงการย่อยกลุ่มที่ 5: การศึกษาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ
ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพด้านอื่น ๆ**

โครงการย่อยกลุ่มที่ 5: การศึกษาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพด้านอื่น ๆ

โครงการวิจัยหน่วยที่ 1: พืชสกุล *Cinnamomum*

บทนำ

1. คำนำ

พืชในสกุล *Cinnamomum* เป็นแหล่งกำเนิดของเครื่องเทศหลายชนิด ที่รู้จักกันอย่างกว้างขวางได้แก่ อบเชยและการบูร น้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากพืชในสกุลนี้ยังเป็นแหล่งของวัตถุดิบที่ใช้ในอุตสาหกรรมและในการสังเคราะห์ทางเคมีอินทรีย์ นอกจากนี้พืชในสกุล *Cinnamomum* ยังมีสรรพคุณทางยาและฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจมากมาย^{5.1[1-3]}

2. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

จากการศึกษาพืชในสกุล *Cinnamomum* พบว่าสารประกอบหลักบางชนิดในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากพืชในสกุลนี้มีประโยชน์และฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ เช่น camphor ที่แยกได้จากต้นอบเชยญวน (*C. camphora* Presl) ใช้ผสมเป็นยาเพื่อป้องกันแมลงและใช้ฆ่าเชื้อโรคบางชนิด^{5.1[3]} cinnamaldehyde ที่แยกได้จาก *C. cassia* Presl แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย^{5.1[4]} และเชื้อราหลายชนิดได้แก่ *Aspergillus nidurans*, *Cryptococcus neoformans*, *Penicillium rugulosum*, *Sporothrix schenckii*, *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. violaceum*, *Microsporum gypseum*, *Histoplasma capsulatum* และ *Blastomyces dermatitidis*^{5.1[5]} นอกจากนี้ยังมีผู้รายงานว่า cinnzeylanin [5.1(1)] และ cinnzeylanol [5.1(2)] ที่แยกได้จากเปลือกของ *C. zeylanicum* Nees มีฤทธิ์ในการฆ่าตัวอ่อนของ silkworm (*Bombyx mori*) และแมลงอีกหลายชนิด^{5.1[6]} และเมื่อเร็ว ๆ นี้ได้มีผู้รายงานว่าน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากใบเชียด (*C. iners* Bl.) แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus* และ *Candida albicans*^{5.1[7]} จากข้อมูลข้างต้นนี้ทำให้เชื่อได้ว่าสารประกอบที่สกัดแยกได้จากพืชในสกุล *Cinnamomum* น่าจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ เนื่องจากประเทศไทยมีพืชในสกุล *Cinnamomum* อยู่หลายชนิด และจากการศึกษาวรรณกรรมทางเคมีพบว่ายังมีการศึกษาทางเคมีของพืชในสกุลนี้บางชนิดไม่มากนัก ทำให้ผู้วิจัยสนใจศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพืชในสกุล

Cinnamomum โดยมุ่งหวังที่จะนำสารที่แยกได้บริสุทธิ์ และ/หรือสารที่แยกได้ในปริมาณมากไปปรับเปลี่ยนโครงสร้าง แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

3. วัตถุประสงค์ของโครงการ

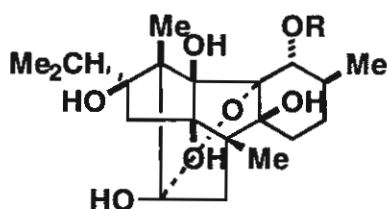
เพื่อสกัดแยก หาสูตรโครงสร้าง และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากพืชในสกุล *Cinnamomum*

4. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

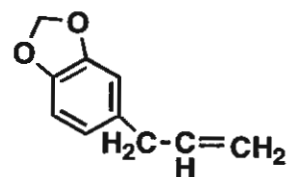
พืชในสกุล *Cinnamomum* จัดอยู่ในวงศ์ Lauraceae พืชในสกุลนี้พบเฉพาะในประเทศที่อยู่ในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงและทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้^{5.1[1]} ลักษณะเด่นของพืชในสกุลนี้ทั้งหมดคือมีกลิ่นหอม ซึ่งกลิ่นจะแตกต่างกันตามองค์ประกอบทางเคมีของพืชชนิดนั้นๆ ในประเทศไทยมีพืชในสกุลนี้อยู่ ประมาณ 17 ชนิด^{5.1[8]} ได้แก่ *C. bejolghota* Sweet = *C. obtusifolium* Nees = *C. sintoc* Bl. (อบเชย), *C. burmannii* Bl. = *C. subavenium* Miq. (สุรามะริด), *C. camphora* Th. Fries (อบเชยญวน), *C. cassia* Bl. = *C. tamala* Th. Fries (อบเชยจีน), *C. caudatum* Nees = *Neocinnamomum caudatum* Kosterm (จางหอม), *C. cinereum* Gamble (ลูกข่า), *C. crenulicupulum* Kosterm (ฮางแกง), *C. deschampsii* Gamble (เขียดตัวเมีย), *C. glaucescens* Drury (กะเพราต้น), *C. ilciodes* Cheval. = *C. siamense* Craib (ข่าต้น), *C. iners* Bl. (เขียด), *C. kerrii* Kosterm. (ละมุนละเม้ง), *C. mollissimum* Bl. (เขียดใบใหญ่), *C. parthenoxylon* Nees = *C. glanduliferum* Nees = *C. porrectum* Kosterm (เทพธำโร), *C. puberulum* Ridl. (เขียดตัวผู้), *C. tavoyanum* Meissn. (ปอยเลื่อม) และ *C. zeylanicum* Linn. (การบูร) นอกจากฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้กล่าวข้างต้น พืชในสกุล *Cinnamomum* ยังมีสรรพคุณทางยาที่น่าสนใจมากมาย^{5.1[1-3]} เช่น น้ำต้มเปลือกต้น *C. bejolghota* Sweet ใช้ดื่มแก้ตับอักเสบ อาหารไม่ย่อย แก้อท้องเสีย ลำไส้เล็กทำงานผิดปกติ และขับพยาธิ เนื้อไม้ของ *C. camphora* Presl. เมื่อนำมากลั่นจะได้ camphor ใช้เป็นยาระงับประสาท แก้อาการชักบางประเภท แก้ไข้หวัด และขับลม และใช้ทาถูแก้ปวด เปลือกต้นของ *C. cassia* Presl ใช้เป็นยาบำรุงแก้มือและเท้าเย็น แก้ปวดท้อง แก้อท้องเสีย ช่วยย่อย ขับลม เพิ่มโลหิตและแก้ปวดศีรษะ ส่วนราก เปลือกต้น ใบและเมล็ดของ *C. iners* Bl. สามารถนำมาใช้เป็นยารักษาโรคได้หลายชนิด เช่น ใบตำเป็นยาพอกแก้ปวด rheumatism เปลือกต้นของ *C. subavenium* Miq. ใช้แก้ไข้มาเลเรียและแก้อท้องเดิน เป็นต้น^{5.1[3]} นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าส่วนที่สกัดด้วยน้ำจากเปลือกของ *C. cassia* ซึ่งประกอบด้วย diterpene หลายชนิดแสดง antiallergic activity^{5.1[9]} และ anticomplement activity^{5.1[10]} นอกจากนี้ 3-(2-hydroxyphenyl)propanoic acid และสารอนุพันธ์ glucoside ซึ่งแยกได้จากเปลือกของ

C. cassia แสดง antiulcerogenic activity^{5.1[11]} ส่วนที่สกัดด้วยตัวทำละลายผสมของน้ำกับเมทานอลจากเปลือกของ *C. sieboldii* แสดง antiinflammatory activity^{5.1[12]}

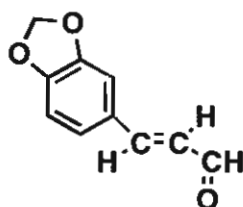
การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพืชในสกุล *Cinnamomum* คณะวิจัยส่วนใหญ่ได้มุ่งเน้นศึกษาน้ำมันหอมระเหยซึ่งสกัดได้จากส่วนต่างๆของพืช สำหรับสารประกอบที่แยกได้จากพืชในสกุลนี้ส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่ม monoterpene, diterpene, sesquiterpene และ phenylpropanoid ดังแสดงในตารางที่ 5.1(1)



5.1(1) R = Ac
5.1(2) R = H



5.1(3)



5.1(4)

1. เทพธำโร (Cinnamomum parthenoxylon Meissn)

เทพธำโรมีชื่อพ้องว่า *C. porrectum* Kosterm ชื่อพื้นเมืองที่รู้จักกันคือ จวง จวงหอม จะไคตัน จะไคหอม พลูตันขาว มือแตกมะจิง เทพธำโรเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง ไม่ผลัดใบ ลำต้นมีกลิ่นหอม พืชชนิดนี้ขึ้นกระจายทั่วไปในป่าดิบทั่วประเทศ แต่มีมากทางภาคใต้ ประโยชน์ทางยาของเทพธำโรมีมากมาย เช่น เปลือกต้นมีกลิ่นหอม ใช้แต่งกลิ่นอาหาร เป็นยาบำรุงโดยเฉพาะในสตรีวัยเจริญพันธุ์ น้ำมันจากเมล็ดใช้เป็นยาถอนปวด rheumatism เป็นต้น^{5.1[1-3,13]}

ในปี ค.ศ. 1987 Tao และคณะ^{5.1[14]}ได้รายงานว่าน้ำมันที่สกัดได้จากเทพธำโรที่ขึ้นในประเทศไทยจีน ประกอบด้วย linalool สูงถึง 81.4% Yaacob และคณะ^{5.1[15]}ได้วิเคราะห์น้ำมันจากเนื้อไม้ของเทพธำโรที่ขึ้นในประเทศมาเลเซียพบ methyl eugenol (45%) และ safrole [5.1(3)] (20%) เป็นสารประกอบหลัก ต่อมา Dung และคณะ^{5.1[16]}ได้ศึกษาน้ำมันที่สกัดได้จากเนื้อไม้และเปลือกของเทพธำโรซึ่งขึ้นอยู่ทั่วไปในประเทศเวียดนาม โดยใช้เทคนิคของ GC และ GC/MS พบ safrole [5.1(3)] (90.3%) และ benzyl benzoate (52.0%) เป็นสารประกอบหลักตามลำดับ สำหรับสารประกอบอื่นๆที่เป็นองค์ประกอบของเทพธำโรดังแสดงในตารางที่ 5.1(1)

ตารางที่ 5.1(1) สารประกอบของพืชในสกุล *Cinnamomum*

ชื่อพันธุ์ไม้	ส่วนที่ศึกษา	สารประกอบ
<i>C. bodinieri</i>	stem*	camphene, (+)-camphor, 1,8-cineol, citral, eugenol, methyl heptenone, (±)-limonene, linalool, α-pinene, saffrole [5.1(3)], α-terpineol ^{5.1[17]}
<i>C. burmannii</i>	leaf* leaf, bark* leaf, branchlet* leaf, bark, branchlet*	(+)-borneol ^{5.1[19,20]} camphene, cinnamyl acetate, β-pinene ^{5.1[18]} linalool, spathulenol ^{5.1[18]} borneol, borneol acetate, camphor, β-caryophyllene, 1,8-cineol, p-cymene, elemol, β-eudesmol, α-humulene, myristicin, α-pinene, terpinen-4-ol, α-terpineol ^{5.1[18]}
<i>C. burmannii</i> chemical type borneol	leaf*	borneol ^{5.1[21]}
<i>C. burmannii</i> chemical type cineol	leaf*	1,8-cineol ^{5.1[21]}
<i>C. burmannii</i> chemical type cineol/borneol	leaf*	borneol, 1,8-cineol ^{5.1[21]}
<i>C. burmannii</i> chemical type cymene/cineol	leaf*	1,8-cineol, cymene ^{5.1[21]}
<i>C. burmannii</i> fa. heyneanum	leaf*	saffrole [5.1(3)] ^{5.1[22]}

ชื่อพันธุ์ไม้	ส่วนที่ศึกษา	สารประกอบ
<i>C. cambodianum</i>	wood*	δ-cadinene, α-cadinol, δ-cadinol, camphene, camphor, caryophyllene oxide, 1,8-cineol, α-copaene, <i>p</i>-cymene, eugenol, germacrene B, α-humulene, limonene, linalool, myrcene, α-pinene, β-pinene, sabinene, safrole [5.1(3)], spathulenol, terpinen-4-ol, α-terpinene, γ-terpinene, α-terpineol, α-thujene^{5.1[23]}
<i>C. camphora</i>	bark	camphor^{5.1[31]}, 4'-hydroxy-3',5,7-trimethoxyflavan-3-ol, 5,7-dimethoxy-3',4'-methylenedioxyflavan-3-ol, 1-(24-hydroxytetraacosanoyl)glycerol, 1-(28-hydroxy-octacosanoyl)glycerol, obtusilactone, iso-obtusilactone^{5.1[46]}, proanthocyanidin A-1^{5.1[53]}
	branches	camphene, camphor, dipentane^{5.1[27]}, limonene, pinene^{5.1[49]}, safrole [5.1(3)]^{5.1[27]}
	entire plant* essential oil	2,3-methylenedioxy-naphthlene^{5.1[52]} alcanfor^{5.1[24]}, α-bisabolol, β-bisabolol^{5.1[25]}, borneol, borneol acetate^{5.1[24]}, (+)-cadinenol, T-cadinol^{5.1[25]}, camphor^{5.1[32,35]}, carvacrol^{5.1[24]}, 1,8-cineol^{5.1[24,32,40]}, cresol^{5.1[24]}, cubenol, epicubenol^{5.1[25]}, eugenol^{5.1[24]}, (-)-junenol^{5.1[25]}, kusunol^{5.1[48]}, limonene^{5.1[24]}, linalool^{5.1[32,50]}, T-murolol^{5.1[25]}, nerolidol^{5.1[25,40]}, α-pinene, β-pinene^{5.1[24]}, safrole [5.1(3)]^{5.1[32,35,56]}, α-terpineol^{5.1[39]}
	heartwood*	(-)-trans-2-(3,4-dimethoxybenzyl)-3-(3,4,5-trimethoxybenzyl) butyrolactone^{5.1[28]}, 4-hydroxy-4-methyl-5-dodecanyl cyclopenten-2-

ชื่อพันธุ์ไม้	ส่วนที่ศึกษา	สารประกอบ
<i>C. camphora</i> (continued)	heartwood*	one ^{5.1[45]} , <i>trans</i> -3-hydroxy-5,7-dimethoxy-3',4'-methylenedioxyflavan, ^{5.1[28]} kusunokinin, matairesinol dimethyl ether ^{5.1[28]}
	leaf	cinnamic alcohol, <i>trans</i> -dotriacontanyl- <i>p</i> -coumarate, daucosterol, dotriacontan-1-ol ^{5.1[42]} , gentisic acid ^{5.1[47]} , piperitol, sesamin, β -sitosterol, xanthoxylol ^{5.1[42]}
	leaf*	borneol ^{5.1[27]} , camphor ^{5.1[27,34,36]} , 1,8-cineol ^{5.1[27,36,41]} , limonene ^{5.1[36]} , linalool ^{5.1[27]} , (-)-linalool ^{5.1[51]} , isonerolidol ^{5.1[27]} , 3,7-dimethyl-octa-1,5-dien-3,7-diol, 3,7-dimethyl-octa-1,7-dien-3,6-diol ^{5.1[51]} , α -pinene, β -pinene ^{5.1[36]} , safole [5.1(3)] ^{5.1[36,54]}
	part not specified	isoboldine, reticuline ^{5.1[26]}
	seed	camphorin, cinnamomin ^{5.1[39]} , safole [5.1(3)] ^{5.1[55]}
	stem*	(+)-camphor, 1,8-cineol, linalool, safole [5.1(3)] ^{5.1[37]}
	wood	camphor ^{5.1[31,33]}
	wood*	(+)-borneol, isoborneol ^{5.1[25]} , campherenol, campherenone ^{5.1[29,30]} , (+)-camphor ^{5.1[38]} , ($\pm$)-citronellol ^{5.1[44]} , eugenol, ($\pm$)-linalool, myristaldehyde, <i>trans</i> -1,2,3-trimethyl-prop-4-enyl naphthalene ^{5.1[44]} , safole [5.1(3)] ^{5.1[38,44]} , terpinen-4-ol, α -terpineol ^{5.1[44]}
<i>C. camphora</i> ssp. <i>formosana</i>	leaf*	camphor, 1,8-cineol, <i>p</i> -cymene, linalool, α -pinene, sabinene, safole [5.1(3)], terpinen-4-ol, α -terpineol ^{5.1[57]}

ชื่อพันธุ์ไม้	ส่วนที่ศึกษา	สารประกอบ
<i>C. camphora</i> var. <i>glaucescens</i>	leaf*	camphene, camphor, β -caryophyllene, 1,8-cineol, <i>p</i> -cymene, geraniol, limonene, (-)-linalool, (+)- α -pinene, β -pinene, saffrole [5.1(3)], ($\pm$)- α -terpineol ^{5.1[58]}
<i>C. camphora</i> var. <i>linaloolifera</i>	entire plant* essential oil fruit* leaf*	linalool ^{5.1[61]} (-)-linalool ^{5.1[62]} , α -pinene ^{5.1[63]} eugenol methyl ether, saffrole [5.1(3)], β -terpeneol ^{5.1[60]} camphor, β -caryophyllene, 1,8-cineol, α -copaene, α -humulene, limonene, linalool, <i>cis</i> -linalool oxide, <i>trans</i> -linalool oxide, myrcene, <i>cis</i> -nerolidol, ocimene, 4-methyl-pentan-2-ol, β -pinene, saffrole [5.1(3)], α -terpineol, <i>cis</i> -thujenol ^{5.1[59]}
<i>C. cassia</i>	bark	caffeic acid ^{5.1[67]} , camphor, car-3-ene ^{5.1[68]} , (+)-catechin, 4',5,7-tri- <i>O</i> -methyl-(+)-catechin, 4',7-di- <i>O</i> -methyl-(+)-catechin, 4'- <i>O</i> -methyl-(+)-catechin ^{5.1[70]} , (-)-epicatechin ^{5.1[70,71]} , 3',4'-methylene-5,7-di- <i>O</i> -methyl-($\pm$)-epi-catechin, 3',5,7-tri- <i>O</i> -methyl-($\pm$)-epicatechin ^{5.1[72]} , 3',5-di- <i>O</i> -methyl-($\pm$)-epicatechin, 3',5,7-trimethyl-($\pm$)-epicatechin ^{5.1[72]} , 3',5-di- <i>O</i> -methyl-($\pm$)-epicatechin, 3'- <i>O</i> -methyl-($\pm$)-epicatechin, (-)-epicatechin 3'- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside ^{5.1[70]} , 5,7-dimethyl-3',4'-di- <i>O</i> -methylene-($\pm$)-epicatechin ^{5.1[72]} , epicatechin 6-C- β -D-glucopyranoside, epicatechin 8-C- β -D-glucopyranoside ^{5.1[71]} , choline ^{5.1[73]} , cinnamaldehyde ^{5.1[68,75,77,78,81,82,84]} ,

ชื่อพันธุ์ไม้	ส่วนที่ศึกษา	สารประกอบ
C. cassia (continued)	bark	methoxycinnamaldehyde^{5.1[75]}, o-methoxycinnamaldehyde^{5.1[88]}, 2',9-cis-cinnamaldehyde-cyclic-glycerol-1,3-acetal, 2',9-trans-cinnamaldehyde-cyclic-glycerol-1,3-acetal^{5.1[72]}, cinnaman AX^{5.1[89,90]}, cinnamic acid^{5.1[78,81,91-93]}, trans-cinnamic acid^{5.1[73]}, cinnamic alcohol^{5.1[78]}, cinnamtannin A-2, cinnamtannin A-3, cinnamtannin A-4^{5.1[71]}, cinnamyl acetate^{5.1[81]}, cinnamyl alcohol^{5.1[81]}, cinnassiol A^{5.1[95-97]}, 19-acetyl-cinnassiol A^{5.1[97]}, cinnassiol A 19-O-β-D-glucoside^{5.1[95,97]}, cinnassiol B^{5.1[96,98]}, cinnassiol B 19-O-β-D-glucopyranoside^{5.1[98]}, cinnassiol C^{5.1[96]}, cinnassiol C-1^{5.1[99]}, cinnassiol C 1-glucoside, cinnassiol C-2, cinnassiol C-3^{5.1[100]}, cinnassiol D-1, cinnassiol D-1 19-O-β-D-glucoside^{5.1[10]}, cinnassiol D-1-glucoside, cinnassiol D-2, cinnassiol D-2 glucoside, cinnassiol D-3^{5.1[101]}, cinnassiol D-4, cinnassiol D-4 glucoside^{5.1[102]}, cinnassiol E^{5.1[9]}, cinnzeylanin^{5.1[96]}, cinnzeylanine^{5.1[95,103]}, 12,13-dehydrocinnzeylanine^{5.1[103]}, anhydrocinnzeylanine^{5.1[95,97]}, cinnzeylanol^{5.1[95,103]}, 12,13-dehydrocinnzeylanol, 19-hydroxy-12,13-dehydrocinnzeylanol, 12,13-dehydrocinnzeylanol 19-O-β-D-glucoside, 19-hydroxy-13,14-dehydroto-7,8-seco-cinnzeylanol, 19-hydroxycinnzeylanol^{5.1[103]}, anhydrocinnzeylanol^{5.1[95,97]}, cinnzeylanol-19-O-β-D-glucoside^{5.1[103]}, p-coumaric acid^{5.1[67]}, coumarin^{5.1[73,81,84]}, eugenol^{5.1[68]}, D-glucose^{5.1[73]}, lyoniresinol 3-α-O-β-D-glucopyranoside^{5.1[73]}

ชื่อพันธุ์ไม้	ส่วนที่ศึกษา	สารประกอบ
C. cassia (continued)	bark	^{72]}, oxalic acid^{5.1[104]}, 3,4,5-trimethoxyphenol-β-D-apiofuranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside^{5.1[72]}, procyanidin A-2, procyanidin B 6-C-β-D-glucopyranoside, procyanidin B 8-C-β-D-glucopyranoside, procyanidin B-1^{5.1[105]}, procyanidin B-2^{5.1[71,105]}, procyanidin B-5^{5.1[71,105,106]}, procyanidin B-7^{5.1[105]}, procyanidin C-1^{5.1[71]}, protocatechuic acid^{5.1[73]}, safrone [5.1(3)]^{5.1[68]}, β-sitosterol^{5.1[73]}, (±)-syringaresinol^{5.1[72]}, syringic acid, vanillic acid^{5.1[73]}
	bark*	benzyl benzoate^{5.1[66]}, cinnamaldehyde^{5.1[66,80,83]}, 2-methoxycinnamaldehyde^{5.1[74]}, 2-methoxy-cis-cinnamaldehyde, 2-methoxy-trans-cinnamaldehyde^{5.1[66]}, 2-methoxy-trans-cinnamyl acetate^{5.1[64,66]}, trans-cinnamyl acetate, S-guaiazulene, 2-methyl-6-(4'-methylphenyl)-hept-1-en-3-one, 2-methyl-6-(4'-methylphenyl)-heptan-3-one, 1-phenyl-heptanone, 6,10,14-trimethyl-pentadecan-2-one, rimuene, tetradecan-1-al, 4,8,12-trimethyl-tridecan-1-al^{5.1[66]}
	entire plant* essential oil	trans-cinnamic acid, coumarin, protocatechuic acid, β-sitosterol^{5.1[94]} benzaldehyde^{5.1[64,65]}, 2-methoxy benzaldehyde, benzene ethanol, benzene propanol, 2-methyl benzofuran, benzyl benzoate, borneol, camphene^{5.1[64]}, cinnamaldehyde^{5.1[65,79]}, cis-cinnamaldehyde^{5.1[64,87]}, o-methoxy-cis-cinnamaldehyde, trans-cinnamaldehyde, o-methoxy-trans-cinnamaldehyde^{5.1[64]}, cinnamic acid acetate^{5.1[65]}, cinnamyl acetate^{5.1[64]}, 2-methoxy trans-

ชื่อพันธุ์ไม้	ส่วนที่ศึกษา	สารประกอบ
<i>C. cassia</i> (continued)	essential oil	cinnamyl acetate ^{5.1[64]} , cinnamyl alcohol ^{5.1[64,66]} , copaene ^{5.1[64,67]} , coumarin, 1-(methoxyphenyl)-ethanone ^{5.1[64]} , eugenol ^{5.1[65]} , nerolidol, phenethyl acetate ^{5.1[64]} , phenylethyl benzoate, phenylethylene, phenylpropanal ^{5.1[87]} , salicylaldehyde, styrene ^{5.1[64]}
	leaf*	2-methoxycinnamaldehyde ^{5.1[74]} , cinnamaldehyde ^{5.1[83]}
	stem bark*	cassioside ^{5.1[69]} , cinnamaldehyde ^{5.1[76]} , 2'-hydroxycinnamaldehyde ^{5.1[85,86]} , cinnamoside ^{5.1[76]} , 3,4,5-trimethoxyphenol- β -D-apiofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranoside ^{5.1[69]} , 3-(2-hydroxyphenyl)-propanoic acid, 3-(2-O- β -D-glucosylphenyl)-propanoic acid ^{5.1[11]}
<i>C. cassia</i> var. <i>macrophyllum</i>	bark, branchlet, leaf*	cinnamaldehyde ^{5.1[107]}
<i>C. cecidodaphne</i>	kernel	lauric acid, oleic acid, β -sitosterol, trilaurin ^{5.1[108]}
<i>C. glanduliferum</i>	leaf*	camphene, (+)-camphor, 1,8-cineol, citral, <i>p</i> -cymene, decan-1-al, eugenol, methyl heptenone, linalool, α -pinene, α -terpineol ^{5.1[7]}
<i>C. impressinervium</i>	leaf*	car-3-ene, β -caryophyllene, <i>p</i> -cymene, eugenol, eugenol acetate, guaiacol, limonene, α -pinene, β -pinene, α -terpineol ^{5.1[109]}
<i>C. iners</i>	bark*	camphene, camphor, β -caryophyllene, 1,8-cineol + limonene, cinnamaldehyde, cuminaldehyde, <i>p</i> -cymene, eugenol, linalool, ocimene + γ -terpinene, α -phellandrene, α -pinene, β -pinene + sabinene, piperitone,

ชื่อพันธุ์ไม้	ส่วนที่ศึกษา	สารประกอบ
<i>C. iners</i> (continued)	bark* leaf*	safrole [5.1(3)], terpinen-4-ol, α -terpinene, α -terpineol, α -ylangene ^{5.1} [110] bicyclovetivenol, α -calacorene, camphene, δ -2-carene, (<i>E</i>)-caryophyllene, α -copaene, cypere, <i>n</i> -decane, β -elemene, δ -elemene, α -eudesmol acetate, geraniol, gerjunene, germacrene, germacrene B, <i>trans</i> - β -guaiene, α -gurjunene, <i>n</i> -heneicosane, himachalol, hinesol acetate, α -humulene, (<i>Z</i>)-isoeugenol, juniper camphor acetate, limonene, linalool, α -muurolene, α -muurolol, (<i>E</i>)-nerolidol, 2-nonanone, (<i>E</i>)- <i>b</i> -ocimene, β -patchoulene, β -phellandrene, α -pinene, β -pinene, sabinene, selin-11-en-4- α -ol, selina-3-7(11)-diene, α -selinene, β -selinene, spathulenol, terpin-4-ol, γ -terpinene, α -terpineol, terpinolene, verbenene ^{5.1(7)}
<i>C. laubatii</i>	part not specified	(+)-reticulene ^{5.1(26)}
<i>C. longipaniculatum</i>	leaf*	borneol ^{5.1(111)} , camphene, camphene hydrate ^{5.1(112)} , camphor ^{5.1(111,112)} , car-3-ene, <i>cis</i> -caryophyllene, 1,4-cineol ^{5.1(112)} , 1,8-cineol ^{5.1(111,112)} , <i>p</i> -cymene, δ -elemene, γ -elemene ^{5.1(112)} , eugenol methyl ether ^{5.1(111)} , humulene ^{5.1(112)} , linalool ^{5.1(111)} , δ -longifolene, myrcene, myrcenol, nerol, α -phellandrene, α -pinene, β -pinene, <i>cis</i> -piperitol, sabinene, terpinen-4-ol, α -terpinene, β -terpinene, α -terpineol, α -terpinolene, α -thujene ^{5.1(112)}
<i>C. massoia</i>	bark*	eugenol, safrole [5.1(3)] ^{5.1(113)}

ชื่อพันธุ์ไม้	ส่วนที่ศึกษา	สารประกอบ
<i>C. micranthum</i>	essential oil	1,8-cineol, laurool, linalool, micranene, micranol, microl, stearic aldehyde ^{5.1} [114]
	leaf*	3,4-methylenedioxcinnamaldehyde [5.1(4)] ^{5.1} [74]
<i>C. obtusifolium</i>	bark	(+)-catechin, (+)-epicatechin, 3',4'-methylene-5,7-di-O-methyl-(±)-epicatechin, 3',5,7-tri-O-methyl-(+)-epicatechin, 3',5-di-O-methyl-(+)-epicatechin, 3'-O-methyl-(+)-epicatechin ^{5.1} [70], catechin 5-O-β-D-(2"-O-feruloyl-6"-O-p-coumaroyl)-glucopyranoside ^{5.1} [106], cinnamaldehyde, cinnamic acid, cinnamic alcohol ^{5.1} [76], procyanidin A-2, procyanidin B-1, procyanidin B-2, procyanidin B-5 ^{5.1} [105]
<i>C. osmophloeum</i>	leaf	trans-cinnamaldehyde ^{5.1} [115], coumarin ^{5.1} [116], fumaric acid, kaempferitrin, kaempferol-7-O-α-L-rhamnoside ^{5.1} [116]
	leaf*	benzaldehyde, camphene, trans-cinnamaldehyde, p-cymene, estragole, eugenol, limonene, α-pinene, β-pinene, 3-phenyl-propan-1-al, terpinen-4-ol ^{5.1} [115]
	leaf + stem stem	coumarin, fumaric acid, kaempferitrin, kaempferol-7-rhamnoside ^{5.1} [117] coumarin, kaempferitrin ^{5.1} [116]
<i>C. parthenoxylon</i>	rootbark*	aromadendrene epoxide, allo-aromadendrene, benzaldehyde, benzyl benzoate, β-bisabolene, δ-cadinene, α-cadinol, δ-cadinol, calamenene, caryophyllene oxide, α-copaene, α-cubebene, β-elemene, elemicin, germacrene D, globulol, epiglobulol, guaiazulene, α-gurjunene, α-

ชื่อพันธุ์ไม้	ส่วนที่ศึกษา	สารประกอบ
<i>C. parthenoxylon</i> (continued)	rootbark*	humulene, α -muurolene, myristic acid, palmitic acid, pentadecanoic acid, safole [5.1(3)], β -selinene, spathulenol, tetradecan-1-al, valencene, viridiflorol ^{5.1[16]}
	wood*	benzaldehyde, benzyl benzoate, cadalene, α -cadinol, δ -cadinol, calamenene, α -cubebene, elemicin ^{5.1[16]} , eugenol methyl ether ^{5.1[15,16]} , myristic acid, palmitic acid, pentadecanoic acid, piperonal ^{5.1[16]} , safole [5.1(3)] ^{5.1[15,16]} , tetradecan-1-al ^{5.1[16]}
<i>C. pauciflorum</i>	leaf*	β -bisabolene, camphene, β -caryophyllene, 1,8-cineol, <i>p</i> -cymene, decylaldehyde, eugenol, linalool, nerolidol, nonyl aldehyde, α -pinene, safole [5.1(3)], α -terpineol ^{5.1[19]}
<i>C. philippinense</i>	root	cinnamophilin, (+)-guaiaicin, dihydroguaiaietic acid, vanillic acid ^{5.1[120]}
<i>C. platyphyllum</i>	leaf*	camphor ^{5.1[121]}
<i>C. porrectum</i>	leaf*	cubebin ^{5.1[123]}
	leaf	<i>allo</i> -aromadendrene, aromophilene, azulene, β -bisabolene, borneol, camphene, camphor, epi-camphor, car-3-ene, caryophyllene, cedrol, 1,8-cineol, <i>trans</i> -cinnamic acid, methyl citronellate, α -copaene, β -cubebene, <i>p</i> -cymene, <i>n</i> -dodecane, α -elemene, β -elemene, γ -elemene, <i>cis</i> - β -farnesene, <i>trans</i> - β -farnesene, methyl geranate, geranial, geraniol, geranyl formate, α -guaiene, β -guaiene, β -gurjunene, (+)-linalool, α -limonene, linalool ^{5.1[122]} ,

ชื่อพันธุ์ไม้	ส่วนที่ศึกษา	สารประกอบ
<i>C. porrectum</i> (continued)	leaf	(+)-linalool ^{5.1[124]} , cis-linalool oxide, myrcene, neral, nerol, <i>n</i> -pentadecane, α -phellandrene, β -phellandrene, α -pinene, β -pinene, sabinene, safrrole [5.1(3)], epi- β -santalene, β -selinene, α -thujene, <i>n</i> -undecane ^{5.1[122]}
<i>C. rigidissimum</i>	bark* leaf*	eugenol methyl ether, safrrole [5.1(3)] ^{5.1[125]} terpinen-4-ol ^{5.1[125]}
<i>C. septentrionale</i>	leaf*	camphor, 1,8-cineol, methyl isoeugenol, 9-oxo-nerolidol ^{5.1[126]}
<i>C. sieboldii</i>	bark branchlet*	(+)-catechin, (-)-epicatechin, cinnamonal D-2, cinnamonal D-1, cinnamonal D-1, procyanidin B-2, procyanidin B-4 ^{5.1[12]} , tannin ^{5.1[129]} dihydro-abietane, acetic acid, acetone, benzaldehyde, <i>p</i> -vinyl benzaldehyde, <i>trans</i> - α -bergamotene, β -bisabolene, borneol acetate, 2-methyl-but-3-en-2-ol, α -cadinene, δ -cadinene, γ -cadinene, α -cadinol, δ -cadinol, T-cadinol, α -calacorene, calamenene, camphene, camphor, caryophyllene oxide, β -caryophyllene, chavicol, 1,8-cineol, cinnamaldehyde, hydrocinnamaldehyde, cinnamyl acetate, cinnamyl alcohol, cinnamyl alcohol, citronellal, citronellol, citronellol acetate, α -copaene, coumarin, epicubenol, α -curcumene, <i>p</i> -cymen-8-ol, <i>p</i> -cymene, elemol, ethanol, ethyl acetate, eugenol, eugenol methyl ether, farnesol, fenchone, geranial, geraniol, geraniol acetate, 6-methyl-hept-5-en-2-one, hex-cis-3-en-1-ol, hex- <i>trans</i> -3-en-1-ol, α -himachalene, α -humulene, limonene, linalool, cis-

ชื่อพันธุ์ไม้	ส่วนที่ศึกษา	สารประกอบ
<i>C. sieboldii</i> (continued)	leaf*	[5.1(3)], salicylaldehyde, sandaracopimaradiene, spathulenol, terpinen-4-ol, γ -terpinene, α -terpineol, α -terpineol acetate, terpinolene, α -zingiberone ^{5.1(127)}
	root*	benzaldehyde, <i>p</i> -vinyl benzaldehyde, <i>trans</i> - α -bergamotene, β -bisabolene, borneol acetate, α -cadinene, δ -cadinene, γ -cadinene, α -calacorene, calamenene, camphene, camphor, caryophyllene oxide, β -caryophyllene, chavicol, 1,8-cineol, cinnamaldehyde, hydrocinnamaldehyde, cinnamyl acetate, cinnamyl alcohol, citronellol, citronellol acetate, α -copaene, coumarin, α -curcumen, <i>p</i> -cymen-8-ol, <i>p</i> -cymene, ethanol, ethyl acetate, eugenol, eugenol methyl ether, α -fenchene, fenchone, geranial, geraniol, geraniol acetate, 6-methyl-hept-5-en-2-one, hex-cis-3-en-1-ol, α -himachalene, α -humulene, limonene, linalool, γ -muurolene, β -myrcene, neral, 3,6-dihydroxy-3,7-dimethyl-octa-1,7-diene, α -phellandrene, pimaradiene, α -pinene, β -pinene, neo-isopulegole, sabinene, safrole [5.1(3)], salicylaldehyde, terpinen-4-ol, α -terpinene, γ -terpinene, α -terpineol, terpinolene ^{5.1(127)}
	rootbark	(+)-catechin, (-)-epicatechin, epicatechin-(4 β →6)-epicatechin-(4 β →8,2 β →7)-epicatechin-(4 α →8)-catechin, epicatechin-(4 β →8)-epicatechin-(4 β →8)-epicatechin-(4 β →8,2 β →7)-epicatechin-(4 α →8)-catechin, epicatechin-(4 β →8)-epicatechin-(4 β →8)-catechin, epicatechin

ชื่อพันธุ์ไม้	ส่วนที่ศึกษา	สารประกอบ
<i>C. sieboldii</i> (continued)	rootbark	-(4β→8)-epicatechin-(4β→8,2β→7)-epicatechin-(4α→8)-catechin, epicatechin-(4β→8,2β→7)-epicatechin-(4α→8)-catechin, cinnamomum sieboldii catechin pentamer 12, cinnamomum sieboldii catechin tetramer 10, cinnamomum sieboldii catechin tetramer 11, cinnamomum sieboldii catechin trimer 9, procyanidin B-1, procyanidin B-2, procyanidin B-5^{5.1[128]} cinnamolaurine^{5.1[130]} cinnamolaurine, (-)-cinnamolaurine, <i>nor</i>-cinnamolaurine, (+)-corydine, (+)-reticuline^{5.1[26]} camphene, citronellol, geraniol, limonene, (-)-linalool, nerol, α-pinene, β-pinene^{5.1[131]} <i>trans</i>-carveol, cinnamaldehyde, citronellol acetate, isoeugenol, isoeugenol methyl ether, farnesol^{5.1[133]} benzaldehyde, benzyl acetate, borneol, cadinene, camphor, β-caryophyllene^{5.1[132]}, cinnamaldehyde^{5.1[132,134]}, cinnamic acid benzyl ester, cinnamic acid cinnamate ester^{5.1[132]}, <i>p</i>-cymene^{5.1[132,134]}, eugenol, eugenol acetate, geraniol^{5.1[132]}, limonene, linalool^{5.1[132,134]}, ocimene, β-phellandrene^{5.1[132]}, α-pinene, β-pinene^{5.1[132,134]}, γ-terpinene, α-terpineol^{5.1[132]}
<i>C. species</i>	bark part not specified	
<i>C. sulphuratum</i>	leaf*	
<i>C. tamala</i>	essential oil leaf*	
<i>C. tenuipil</i>	leaf*	δ-cadinene^{5.1[135]}, camphor^{5.1[136]}, β-caryophyllene^{5.1[135]}, 1,8-cineol^{5.1[136]},

ชื่อพันธุ์ไม้	ส่วนที่ศึกษา	สารประกอบ
<i>C. tenuipil</i> (continued)	leaf*	α -copaene, diphenylamine ^{5.1[135]} , elemicin ^{5.1[136]} , eugenol methyl ether ^{5.1[137]} , <i>cis</i> - β -farnesene, <i>trans</i> - β -farnesene ^{5.1[135]} , farnesol, geraniol ^{5.1[135,137]} , hex-3-en-1-ol, α -humulene ^{5.1[135]} , linalool ^{5.1[135-137]} , ocimene ^{5.1[135]}
<i>C. triplinervis</i>	leaf	(<i>trans</i> -3-methyl-sulfonylallyl)- <i>trans</i> -cinnamate, 3-(2- <i>trans</i> -cinnamoylamino)-ethyl-3-hydroxy-indolin-2-one ^{5.1[138]}
<i>C. zeylanicum</i>	bark	arabinoxylan ^{5.1[140,141]} , caffeic acid ^{5.1[67]} , camphene, β -caryophyllene ^{5.1[110]} , (-)-epicatechin, (4 β →6)-epicatechin-(4 β →8,2 β →7)-epicatechin-(4 α →8)-epicatechin, (4 β →8)-epicatechin-(4 β →8,2 β →7)-epicatechin-(4 α →8)-epicatechin, (4 β →8)-epicatechin-(4 β →8,2 β →7)-epicatechin-(4 α →8)-epicatechin, (4 β →8)-epicatechin-(4 β →8,2 β →7)-epicatechin-(4 α →8)-epicatechin ^{5.1[148]} , cinnamaldehyde ^{5.1[78,84,149,156]} , 2-methoxycinnamaldehyde ^{5.1[84,149,156]} , <i>trans</i> -cinnamaldehyde ^{5.1[157,158]} , cinnamic acid ^{5.1[78,84]} , cinnamyl acetate ^{5.1[84,156]} , cinnamyl alcohol ^{5.1[78,84,151]} , cinnzeylanin ^{5.1[160,161]} , cinnzeylanine ^{5.1[6,162]} , cinnzeylanol ^{5.1[6,160-162]} , <i>p</i> -coumaric acid ^{5.1[67]} , coumarin ^{5.1[149]} , eugenol ^{5.1[84,149,151]} , oxalic acid ^{5.1[104]} , proanthocyanidin, procyanidin A-2, procyanidin B-1, procyanidin B-2, procyanidin B-5, procyanidin C-1 ^{5.1[148]} , prostaglandin F-2- α ^{5.1[160]} , β -sitosterol ^{5.1[163]}
	bark*	benzaldehyde ^{5.1[65]} , camphene, camphor, β -caryophyllene, 1,8-cineol ^{5.1[110]} , cinnamaldehyde ^{5.1[65,83,110,152,155]} , <i>trans</i> -cinnamaldehyde ^{5.1[147]} , cinnamic acid acetate ^{5.1[65,155]} , cinnamyl alcohol ^{5.1[65]} , cuminaldehyde, <i>p</i> -cymene ^{5.1[110]}

ชื่อพันธุ์ไม้	ส่วนที่ศึกษา	สารประกอบ
<i>C. zeylanicum</i> (continued)	bark*	eugenol ^{5.1[65,83,110,152]} , limonene, linalool, ocimene + γ -terpinene, α -phellandrene, α -pinene, β -pinene + sabinene, piperitone, saffrole [5.1(3)], terpinen-4-ol, α -terpinene, α -terpineol, α -ylangene ^{5.1[110]90}
	essential oil	benzaldehyde ^{5.1[142]} , benzyl benzoate, camphor, 1,8-cineol ^{5.1[143]} , cinnamaldehyde ^{5.1[143,153,154]} , cinnamic acid acetate ^{5.1[143]} , eugenol ^{5.1[143,154]} , eugenol acetate ^{5.1[143]}
	leaf	coniferaldehyde ^{5.1[74]}
	leaf*	benzaldehyde ^{5.1[65,139]} , benzyl benzoate ^{5.1[139,144-147]} , benzyl acetate ^{5.1[145]} , γ -cadinene ^{5.1[139]} , car-3-ene ^{5.1[143]} , β -caryophyllene ^{5.1[144,145]} , 1,8-cineol ^{5.1[139,144]} , cinnamaldehyde ^{5.1[65,139,144,145,152]} , cinnamic acid ethyl ester ^{5.1[139,144]} , cinnamic acid methyl ester ^{5.1[144]} , cinnamyl acetate ^{5.1[145]} , cinnamyl alcohol ^{5.1[65,144]} , coumarin ^{5.1[139]} , <i>p</i> -cymene ^{5.1[144,145]} , eugenol ^{5.1[65,83,139,144,-147,152]} , eugenol acetate ^{5.1[65,144,145]} , eugenol methyl ether, eugenol methyl ether, isoeugenol, isoeugenol methyl ether, farnesol, geranial ^{5.1[139]} , geraniol ^{5.1[144]} , hexan-1-ol ^{5.1[139]} , α -humulene, limonene ^{5.1[144]} , linalool ^{5.1[144,145]} , nerol, nonan-1-ol ^{5.1[139]} , α -phellandrene ^{5.1[144,145]} , (+)- α -phellandrene ^{5.1[164]} , 2-vinyl phenol, 2-phenylethyl benzoate ^{5.1[139]} , α -pinene ^{126,127} , β -pinene, piperitone ^{5.1[144]} , saffrole [5.1(3)] ^{5.1[139,144]} , β -selanene ^{5.1[139]} , α -terpinene ^{5.1[144]} , α -terpineol ^{5.1[144,145]} , α -ylangene ^{5.1[139]}
	root*	cinnamaldehyde ^{5.1[150]} , 2-vinyl phenol ^{5.1[139]} , α -terpinene, γ -terpinene ^{5.1[144]} ,

ชื่อพันธุ์ไม้	ส่วนที่ศึกษา	สารประกอบ
<i>C. zeylanicum</i> (continued)	root*	vanillin ^{5.1[139]}
	rootbark*	2-phenyl acetaldehyde ^{5.1[139]} , benzyl benzoate ^{5.1[139,144]} , benzyl alcohol, borneol, borneol acetate ^{5.1[139]} , camphene ^{5.1[139,144]} , camphor, car-3-ene ^{5.1[139,144]} , caryophyllene, caryophyllene oxide ^{5.1[139]} , 1,8-cineol, cinnamaldehyde ^{5.1[139,144]} , hydrocinnamaldehyde ^{5.1[139]} , cinnamic acid acetate, cinnamic acid ethyl ester ^{5.1[139,144]} , cinnamic acid methyl ester ^{5.1[139]} , cinnamyl alcohol ^{5.1[139]} , cuminaldehyde ^{5.1[139]} , p-cymene ^{5.1[139,144]} , estragole ^{5.1[139]} , eugenol ^{5.1[139,144]} , eugenol acetate ^{5.1[144]} , acetyl eugenol ^{5.1[139]} , fenchone, furfural ^{5.1[139]} , geraniol ^{5.1[139,144]} , hexan-1-ol ^{5.1[139]} , α -humulene ^{5.1[139,144]} , limonene ^{5.1[139]} , linalool ^{5.1[139,144]} , linalool acetate, trans-linalool oxide, myrcene, cis-ocimene, trans-ocimene ^{5.1[139]} , α -phellandrene ^{5.1[139,144]} , phenol, 2-phenyl-propyl acetate, 2-phenylethanol, phenylethyl acetate ^{5.1[139]} , α -pinene, β -pinene, piperitone, sabinene, safrole [5.1(3)] ^{5.1[139,144]} , terpin-4-en-1-ol ^{5.1[144]} , terpinen-4-ol ^{5.1[139]} , α -terpinene ^{5.1[139,144]} , γ - terpinene ^{5.1[139]} , α -terpineol ^{5.1[139,144]} , terpinolene ^{5.1[139]} , α -ylangene ^{5.1[144]}
	stembark	cinnamomum zeylanicum polysaccharide ^{5.1[159]}
	stembark*	benzaldehyde ^{5.1[139]} , benzyl benzoate ^{5.1[139,143]} , camphene, camphor, car-3- ene, β -caryophyllene ^{5.1[144]} , 1,8-cineol ^{5.1[139,144]} , cinnamaldehyde ^{5.1[139,144]} , cinnamic acid acetate ^{5.1[144]} , cinnamyl alcohol ^{5.1[144]} , coumarin ^{5.1[139]} , cuminaldehyde ^{5.1[144]} , p-cymene ^{5.1[144]} , eugenol ^{5.1[139,144]} , eugenol acetate ^{5.1}

ชื่อพันธุ์ไม้	ส่วนที่ศึกษา	สารประกอบ
<i>C. zeylanicum</i> (continued)	stem bark*	[144] , eugenol methyl ether, isoeugenol, farnesol, geranial ^{5.1[139]} , geraniol ^{5.1[144]} , geraniol acetate, hexan-1-ol ^{5.1[139]} , α -humulene, limonene, linalool ^{5.1[144]} , nerol ^{5.1[139]} , α -phellandrene ^{5.1[144]} , 2-vinyl phenol, 2-phenylethyl benzoate ^{5.1[139]} , α -pinene, β -pinene, piperitone, sabinene ^{5.1[144]} , saffrole [5.1(3)] ^{5.1[139,144]} , β -selanene, α -terpinene, γ -terpinene, α -terpineol ^{5.1[144]} , vanillin, α -ylangene ^{5.1[139]}
	twig*	linalool ^{5.1[147]}
	wood*	tetradecan-1-ol ^{5.1[147]}
	leaf	mannitol ^{5.1[165]}
<i>C. zeylanicum</i> chemovar. benzyl benzoate		

- part where essential oil was obtained.
- หมายเลข ข้อมูลในตาราง 5.1(1) ได้จากฐานข้อมูล NAPRALERT ของ University of Illinois at Chicago ประเทศสหรัฐอเมริกา

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. เทพธาโร (*Cinnamomum parthenoxylon* Meissn)

1) เนื้อไม้

(1) การหาส่วนประกอบทางเคมี

การสกัดแยกสารออกจากเนื้อไม้ของเทพธาโรที่แห้งด้วยนอร์มัลเฮกเซน ไดคลอโรมีเทนและเมทานอลตามลำดับใช้วิธี marceration ได้ส่วนที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดซึ่งได้นำไป แยกสารออกจากกันด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ซิลิกาเจลชนิดหยาบหรือละเอียดแล้วแต่ความเหมาะสม ผลการแยกสารจากส่วนที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดได้สารรวม 5 ชนิด ดังนี้

(ก) Hexane extract

นำส่วนที่สกัดด้วยเฮกเซนมาทำคอลลัมน์โครมาโตกราฟีได้ส่วนย่อย 2 กลุ่มที่สามารถนำไปแยกสารออกมาได้

1. การแยก safrole [5.1(3)]

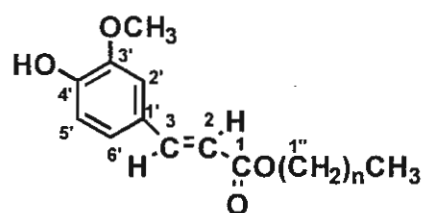
เมื่อนำสารกลุ่ม H_1 มาทำคอลลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้ง ทำให้ได้น้ำมันใสสีเหลืองอ่อน UV สเปกตรัมให้แถบดูดกลืนที่ 234 และ 286 นาโนเมตรแสดงว่ามีวงอะโรเมติกในโมเลกุล จาก IR สเปกตรัมแถบดูดกลืนที่ 1244, 1039 และ 932 cm^{-1} แสดงว่ามีหมู่ methylenedioxy^{5.1[166]} แถบดูดกลืนที่ 1639 cm^{-1} ตรงกับ C=C stretching ของอัลคีน ส่วนแถบดูดกลืนที่ 1606 และ 1501 cm^{-1} ตรงกับ C=C stretching ของวงอะโรเมติก นอกจากนี้ยังพบแถบดูดกลืนที่ 856 และ 806 cm^{-1} แสดงว่าเป็น 1,3,4-trisubstituted benzene ¹H NMR สเปกตรัมช่วยยืนยันว่ามีหมู่ 3,4-methylenedioxyphenyl จากการปรากฏของสัญญาณ singlet ที่ δ 5.90 (2H) ตรงกับโปรตอนของหมู่ methylenedioxy สัญญาณ doublet of doublets 1 ชุดที่ δ 6.62 (1H, J = 7.8, 1.6 Hz) และ doublet 2 ชุดที่ δ 6.67 (1H, J = 1.6 Hz) และ 6.72 (1H, J = 7.8 Hz) ตรงกับ aromatic protons ที่ตำแหน่ง 6, 2 และ 5 ของวงอะโรเมติกตามลำดับ สัญญาณ broad doublet ที่ δ 3.29 (2H, J = 6.4 Hz) ตรงกับ allylic methylene protons สัญญาณของ olefinic protons 2 โปรตอนที่อยู่ส่วนปลายของโมเลกุลปรากฏเป็น doublet of doublets of triplets 2 ชุดที่ δ 5.03 (1H, J = 10.1, 1.8 และ 1.2 Hz) และ 5.05

(1H, $J = 17.1, 1.8$ และ 1.5 Hz) ตรงกับ olefinic protons ที่อยู่ *trans* และ *cis* กับหมู่ 3,4-methylenedioxybenzyl ตามลำดับ สำหรับสัญญาณ doublet of doublets of triplets อีก 1 ชุดที่ δ 5.91 (1H, $J = 17.1, 10.1$ และ 6.7 Hz) ตรงกับ olefinic proton ที่ต่ออยู่กับหมู่ methylene ข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีข้างต้นนี้ ตรงกับข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีที่มีผู้รายงานไว้^{5.1[167,168]} เป็นการยืนยันโครงสร้างของ safrole [5.1(3)]

2. การแยกสารผสมของ alkyl *trans*-ferulate ที่มีโซ่อัลคิลประกอบด้วยชั้น C_{22} และ $C_{24}-C_{28}$ [5.1(5)]

นำสารกลุ่ม H_4 มาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีก 2 ครั้ง ได้ของแข็งสีขาว จุดหลอมเหลว $68-71^\circ\text{C}$ แถบดูดกลืนที่ $3450, 1713$ และ 1632 cm^{-1} ใน IR สเปกตรัมแสดงว่ามีหมู่ hydroxyl และหมู่เอสเทอร์ที่มีคอนจูเกตอยู่ในโมเลกุล แถบดูดกลืนที่ 980 cm^{-1} ยืนยันพันธะคู่ C=C แบบ *trans* แถบดูดกลืนที่ 1599 และ 1518 cm^{-1} ตรงกับ C=C stretching ของวงอะโรมาติก นอกจากนี้การปรากฏของแถบดูดกลืนที่ 840 และ 821 cm^{-1} ยังช่วยยืนยันว่าเป็น 1,3,4-trisubstituted benzene จาก UV สเปกตรัมแถบดูดกลืนที่ $216, 236$ และ 326 นาโนเมตร แสดง bathochromic shift ในสภาวะที่เป็นต่างแสดงว่ามีหมู่ฟีนอลอยู่ในโมเลกุล ^1H NMR สเปกตรัมแสดงสัญญาณซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ feruloyl moiety ได้แก่สัญญาณ singlet ที่ δ 3.95 (3H) ตรงกับ methoxy protons สัญญาณ broad singlet ที่ δ 5.91 (1H) ตรงกับ hydroxyl proton สัญญาณ doublet 2 ชุดที่ δ 6.32 และ 7.63 อย่างละ 1 โปรตอนตรงกับ olefinic protons ที่ตำแหน่ง α และ β ของหมู่คาร์บอนิลตามลำดับ และจากค่า coupling constant ($J = 15.9\text{ Hz}$) ของ olefinic protons ช่วยยืนยัน configuration ของพันธะคู่แบบ *trans* ส่วนสัญญาณที่ปรากฏเป็น doublet 2 ชุดที่ δ 6.94 (1H, $J = 8.2\text{ Hz}$) และ 7.06 (1H, $J = 1.7\text{ Hz}$) และ doublet of doublets 1 ชุดที่ δ 7.10 (1H, $J = 8.2$ และ 1.7 Hz) ตรงกับโปรตอนตำแหน่ง 5, 2 และ 6 ของวงอะโรมาติกตามลำดับ สำหรับ aliphatic alcohol moiety ยืนยันได้จากปรากฏของสัญญาณ triplet ที่ δ 0.90 (3H) ตรงกับ methyl protons ที่อยู่ส่วนปลายของโมเลกุล สัญญาณ broad singlet ที่ δ 1.27 ตรงกับโปรตอนของหมู่ methylene ในโซ่อัลคิล ส่วนสัญญาณ triplet ที่ δ 4.21 และสัญญาณ quintet ที่ δ 1.72 อย่างละ 2 โปรตอนตรงกับ methylene protons ที่ตำแหน่ง α และ β ของหมู่ oxycarbonyl ตามลำดับ จาก NOE

สเปกตรัมเมื่อทำการฉายรังสีตรง aromatic methoxy protons ที่ δ 3.95 ทำให้เกิดการเพิ่มของสัญญาณของ aromatic proton ที่ δ 7.06 ช่วยยืนยันว่าเป็น ferulic acid ester ไม่ใช่ isoferulic acid ester นอกจากนี้ ^{13}C NMR สเปกตรัมยังช่วยสนับสนุนโครงสร้างของ ferulic acid ester จากปรากฏของสัญญาณของคาร์บอนของหมู่คาร์บอนิลที่ δ 167.8 สัญญาณของ quaternary carbons ซึ่งต่ออยู่กับออกซิเจนอะตอมจำนวน 2 สัญญาณที่ δ 146.7 และ 148.3 สัญญาณของ methine carbons จำนวน 5 สัญญาณที่ δ 109.7, 115.1, 116.1, 123.5 และ 145.0 และสัญญาณของ aromatic quaternary carbon ที่ δ 127.5 การกำหนดสัญญาณของคาร์บอนได้อาศัยข้อมูลที่ได้จาก DEPT และ HMQC สเปกตรัมและจากการเปรียบเทียบกับ ^{13}C NMR สเปกตรัมของ alkyl *trans*-ferulate ester ที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกัน^{5.1[169]} EI แมสสเปกตรัมแสดงพีคที่ m/z 586, 572, 558, 544, 503 และ 502 ตรงกับ molecular ions ของ ferulic acid ester ซึ่งมีหมู่อัลคิลเป็น $\text{C}_{22}\text{H}_{45}$, $\text{C}_{24}\text{H}_{49}$, $\text{C}_{25}\text{H}_{51}$, $\text{C}_{26}\text{H}_{53}$, $\text{C}_{27}\text{H}_{55}$ และ $\text{C}_{28}\text{H}_{57}$ ตามลำดับสำหรับพีคที่ m/z 194 และ 177 ตรงกับ ferulic acid fragment และ feruloyl fragment ตามลำดับ การกำหนดพีคในแมสสเปกตรัมนี้ทำโดยการเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีผู้รายงานไว้สำหรับ alkyl *trans*-ferulate ester ที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกันซึ่งแยกได้จาก *Pavetta owariensis*^{5.1[169]} และ *Abies firma*^{5.1[170]} จากข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีเป็นการยืนยันโครงสร้างของสารผสมของ alkyl *trans*-ferulate 6 ชนิดที่มีโซ่อัลคิลประกอบขึ้นด้วย C_{22} และ C_{24} - C_{28} [5.1(5)] สาร [5.1(5)] ยังไม่เคยมีผู้แยกได้จากพืชในสกุล *Cinnamomum* มาก่อน



$n = 21, 23-27$

5.1(5)

(ข) Dichloromethane extract

นำส่วนที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนมาทำคอลลัมน์โครมาโตกราฟี ได้ส่วนย่อย 2 กลุ่มที่นำไปแยกสารออกมาได้ สำหรับสารกลุ่ม D_1 เมื่อนำมาทำคอลลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้ง ไดน้ำมัน

ไล่สีเหลืองอ่อนของ safrole [5.1(3)] ซึ่งยืนยันได้จากการทำ TLC เปรียบเทียบกับสารที่แยกได้จากกลุ่ม H₁

3. การแยก 3,4-methylenedioxycinnamaldehyde [5.1(4)]

จากกลุ่มย่อย D_{5.6.3} ได้ผลึกสีเหลืองอ่อน จุดหลอมเหลว 81-82 °ซ แถบดูดกลืนที่ 220, 247, 297 และ 338 นาโนเมตรใน UV สเปกตรัมแสดงถึงวงอะโรมาติกที่มีคอนจูเกต แถบดูดกลืนที่ 2832, 2704 และ 1666 ซม⁻¹ ใน IR สเปกตรัมตรงกับ C-H และ C=O stretching ของอัลดีไฮด์ที่มีคอนจูเกต แถบดูดกลืนที่ 1620 และ 961 ซม⁻¹ แสดงว่ามีพันธะคู่ C=C แบบ *trans* แถบดูดกลืนที่ 1259, 1037 และ 927 ซม⁻¹ ใน IR สเปกตรัมและสัญญาณ singlet ที่ δ 5.99 (2H) ใน ¹H NMR สเปกตรัมยืนยันว่ามีหมู่ methylenedioxy อยู่ในโครงสร้าง ส่วนแถบดูดกลืนที่ 860 และ 799 ซม⁻¹ ใน IR สเปกตรัมและสัญญาณของ aromatic protons จำนวน 3 โปรตอน ซึ่งปรากฏเป็น doublet 2 ชุดที่ δ 6.83 (1H, J = 6.8 Hz) และ 7.04 (1H, J = 1.8 Hz) และ doublet of doublets 1 ชุดที่ δ 7.05 (1H, J = 6.8 และ 1.8 Hz) ตรงกับโปรตอนที่ตำแหน่ง 5, 2 และ 6 ของวงอะโรมาติกตามลำดับ ช่วยยืนยันว่าเป็น 1,3,4-trisubstituted benzene ส่วนสัญญาณ doublet of doublets ที่ δ 6.54 (1H, J = 15.7 และ 7.7 Hz) และสัญญาณ doublet ที่ δ 7.36 (1H, J = 15.7 Hz) ตรงกับ olefinic protons ที่ตำแหน่ง α และ β ของหมู่คาร์บอนิลตามลำดับ ค่า coupling constant (J = 15.7 Hz) ของ olefinic protons ยืนยัน configuration ของพันธะคู่แบบ *trans* นอกจากนี้ยังพบสัญญาณ doublet ที่ δ 9.63 (1H, J = 7.7 Hz) ตรงกับ aldehydic proton

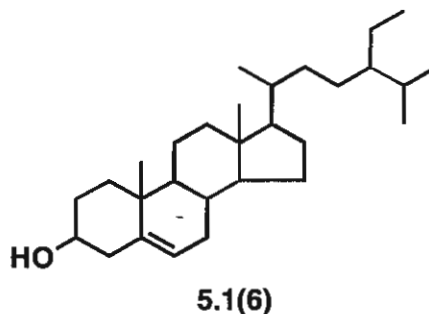
ข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีข้างต้นนี้ตรงกับข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีที่มีผู้รายงานไว้^{5.1[171]} เป็นการยืนยันโครงสร้างของ 3,4-methylenedioxycinnamaldehyde [5.1(4)] สาร 5.1(4) เคยมีรายงานการพบใน *Cinnamomum micranthum*^{5.1[74]}

4. การแยก β-sitosterol [5.1(6)]

จากกลุ่มย่อย D_{5.6.6} ได้ผลึกสีขาว จุดหลอมเหลว 135-136 °ซ IR สเปกตรัมแสดงแถบดูดกลืนสำคัญที่ 3429 และ 1635 ซม⁻¹ ตรงกับ O-H และ C=C stretching ¹H NMR สเปกตรัมแสดงสัญญาณ multiplet จำนวน 47 โปรตอนในช่วง δ 0.66-2.30 ตรงกับโปรตอนของหมู่ methyl หมู่ methylene และหมู่ methine สัญญาณ multiplet ที่ δ 3.50 ตรงกับ methine proton

ที่ต่ออยู่กับหมู่ hydroxyl ส่วนสัญญาณของ olefinic proton ปรากฏเป็น broad doublet ที่ δ 5.33

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีข้างต้นกับข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีที่มีผู้รายงานไว้^{5.1[172,173]} และทำ TLC เปรียบเทียบกับ authentic sample ยืนยันโครงสร้างของ β -sitosterol [5.1(6)]



(ค) Methanol extract

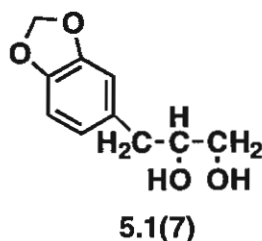
คwikคอลัมน์โครมาโตกราฟีของส่วนที่สกัดด้วยเมทานอลได้ส่วนย่อย 1 กลุ่มที่สามารถนำไปแยกสารออกมาได้

5. การแยก 3-(3,4-methylenedioxyphenyl)-1,2-propanediol [5.1(7)]

ภายหลังการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีของกลุ่มย่อย $M_{7.5}$ ได้ผลึกสีขาว จุดหลอมเหลว 76-77 °ซ จาก UV สเปกตรัมแถบดูดกลืนที่ 234 และ 286 นาโนเมตรแสดงว่ามีวงอะโรเมติกในโมเลกุล IR สเปกตรัมแสดงแถบดูดกลืนที่ 3248 cm^{-1} ตรงกับ O-H stretching ส่วนแถบดูดกลืนที่ 1244, 1044 และ 931 cm^{-1} แสดงถึงหมู่ methylenedioxy^{5.1[166]} ^1H NMR สเปกตรัมยังช่วยยืนยันว่ามีหมู่ 3,4-methylenedioxyphenyl ในโครงสร้างเหมือนสาร 5.1(3) และ 5.1(4) โดยการปรากฏของสัญญาณ singlet ที่ δ 5.95 (2H) ตรงกับโปรตอนของหมู่ methylenedioxy สัญญาณ doublet of doublets 1 ชุดที่ δ 6.68 (1H, $J = 7.9$ และ 1.4 Hz) และสัญญาณ doublet 2 ชุดที่ δ 6.74 (1H, $J = 1.4$ Hz) และ 6.78 (1H, $J = 7.9$ Hz) ตรงกับ aromatic protons ที่ตำแหน่ง 6, 2 และ 5 ของวงอะโรเมติกตามลำดับ สัญญาณ broad singlet ที่ δ 2.38 (2H) ตรงกับ hydroxyl protons สัญญาณ doublet of doublets 2 ชุดที่ δ 2.67 (1H, $J = 13.8$ และ 8.0 Hz) และ 2.73 (1H, $J = 13.8$ และ 5.5 Hz) ตรงกับ methylene protons ที่ benzylic

position นอกจากนี้ยังพบสัญญาณ doublet of doublets อีก 2 ชุดที่ δ 3.51 (1H, $J = 11.2$ และ 7.0 Hz) และ 3.69 (1H, $J = 11.2$ และ 3.0 Hz) ตรงกับ methylene protons ที่อยู่ปลายของโครงสร้าง สาเหตุที่ทำให้ methylene protons ทั้ง 4 โปรตอนไม่ equivalent กันเพราะมี chiral center อยู่ในโครงสร้าง ส่วนสัญญาณของ methine proton ซึ่งเป็น chiral center ปรากฏให้เห็นเป็น multiplet ที่ δ 3.90

ข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีข้างต้นนี้ ตรงกับข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีที่มีผู้รายงานไว้^{5.1[174]} เป็นการยืนยันโครงสร้างของ 3-(3,4-methylenedioxyphenyl)-1,2-propanediol [5.1(7)] สาร 5.1(7) เคยมีผู้แยกได้จาก sassafras root^{5.1[174]} สำหรับการกำหนดสัญญาณของคาร์บอนของสาร 5.1(7) (ดังแสดงในหัวข้อวัสดุและวิธีการ) ได้อาศัยข้อมูลจาก DEPT และ HMQC สเปกตรัม



การสกัดเนื้อไม้ที่แห้งของเทพธาโรด้วยนอร์มัลเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอลโดยวิธี marceration แล้วนำส่วนที่สกัดได้มาแยกสารออกจากกันด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ มาหาสูตรโครงสร้างโดยใช้เทคนิคทางสเปกโตรสโคปี ทำให้ได้สารประเภท phenylpropanoids 4 ชนิดคือ safrole [5.1(3)] ซึ่งพบเป็นองค์ประกอบหลัก, สารผสมของ alkyl *trans*-ferulate ที่มีไฮอัลซิลประกอบขึ้นด้วย C_{22} และ C_{24} - C_{28} [5.1(5)], 3,4-methylenedioxycinnamaldehyde [5.1(4)] และ 3-(3,4-methylenedioxyphenyl)-1,2-propanediol [5.1(7)] นอกจากนี้ยังพบ β -sitosterol [5.1(6)] สำหรับสาร 5.1(5) และ 5.1(7) ยังไม่เคยมีผู้พบในพืชสกุล *Cinnamomum* มาก่อน

วัสดุและวิธีการ

ตัวทำละลาย ที่ใช้สกัดสารและแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีเป็นตัวทำละลายเกรดทั่วไปซึ่งนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการกลั่นก่อนใช้ ส่วนตัวทำละลายที่ใช้ในการตกผลึกสารใช้เกรด AR การกำจัดตัวทำละลายออกจากสารจะใช้ rotary evaporator โดยใช้อุณหภูมิในช่วง 50-60 °C ในกรณีที่ต้องใช้อุณหภูมิสูงจะใช้ไม่เกิน 70 °C

โครมาโตกราฟี ใช้ silica gel ของ Merck ดังนี้

1. ควิกคอลัมน์โครมาโตกราฟี (quick column chromatography) ใช้ silica gel PF₂₅₄ สำหรับ preparative layer chromatography

2. คอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography) ใช้ silica gel 60 สำหรับคอลัมน์โครมาโตกราฟี ส่วนใหญ่ที่ใช้มี 2 ชนิดคือ ชนิดหยาบ (ขนาดอนุภาค 0.063-0.200 มิลลิเมตร) และชนิดละเอียด (ขนาดอนุภาคต่ำกว่า 0.063 มิลลิเมตร)

3. โครมาโตกราฟีแผ่นบาง (thin layer chromatography, TLC) ใช้แผ่นสำเร็จรูปที่ทำขึ้นจาก silica gel 60 PF₂₅₄ เคลือบบนแผ่นอะลูมิเนียม โดยมีความหนาของ silica 0.2 มิลลิเมตร

การตรวจสอบหาจุด (spot) ของสารบนแผ่น ใช้ 2 วิธี คือวิธีดูภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร และวิธีทาด้วยรีเอเจนต์ซึ่งประกอบด้วย anisaldehyde: กรดซัลฟูริกเข้มข้น: น้ำ: เอทานอล = 1: 1: 1.5: 45 โดยปริมาตร จากนั้นนำแผ่น TLC ไปวางบนแผ่นให้ความร้อนจนเกิดสีขึ้นตรงจุดของสาร

วัตถุดิบในการวิจัย

เนื้อไม้ของเทพธาโรได้มาจากอำเภอจะนะ จังหวัดสงขลา

สเปกตรัม

1. อุลตราไวโอเลตสเปกตรัม บันทึกจากเครื่องอุลตราไวโอเลต-วิชีเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ของ Shimadzu โมเดล UV-21011

2. อินฟราเรดสเปกตรัม บันทึกจากเครื่องอินฟราเรดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ของ Perkin Elmer โมเดล Spectrum 2000

3. นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม บันทึกจากเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรมิเตอร์ของ Jeol โมเดล JMN A 500 ใช้ TMS เป็นสารมาตรฐานภายใน

4. แมสสเปกตรัม บันทึกจากเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ของ Finnigan โมเดล MAT INCOS 50

1. เทพธาโร (*Cinnamomum parthenoxylon* Meissn.)

1) เนื้อไม้

(1) การหาส่วนประกอบทางเคมี

นำเนื้อไม้ของเทพธาโรที่แห้งและบดละเอียดแล้ว (1.93 กิโลกรัม) มาสกัดด้วยนอร์มัลเฮกเซน 2 ครั้ง ๆ ละ 5 ลิตร รวมเป็นเวลา 9 วัน โดยใช้วิธี marceration กรองสารละลายที่ได้ทั้งหมดแล้วนำไประเหยเอาตัวทำละลายออก ได้ส่วนที่สกัดด้วยเฮกเซนหนัก 33.89 กรัม สำหรับกากที่เหลือสกัดต่อด้วยไดคลอโรมีเทนและเมทานอลตามลำดับ โดยใช้วิธีสกัดเช่นเดียวกับนอร์มัลเฮกเซน ได้ส่วนที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนหนัก 43.55 กรัม และส่วนที่สกัดด้วยเมทานอลหนัก 88.35 กรัม

(ก) Hexane extract

นำส่วนที่สกัดด้วยเฮกเซน (33.89 กรัม) มาแยกโดยใช้ควิกคอลัมน์โครมาโตกราฟีใช้ตัวชะ (eluent) เป็นนอร์มัลเฮกเซน นอร์มัลเฮกเซน-คลอโรฟอร์ม คลอโรฟอร์ม คลอโรฟอร์ม-เมทานอล และเมทานอลตามลำดับ โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าขึ้นเรื่อย ๆ ตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC แล้วรวมส่วนย่อย (fraction) ที่มีสารเหมือนกันหรือคล้ายคลึงกันตามที่ปรากฏบน TLC เข้าด้วยกัน ได้กลุ่มย่อย 8 กลุ่ม เลือกกลุ่ม H_1 และกลุ่ม H_4 มาทำการแยกต่อไป

กลุ่ม H_1 (19.55 กรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมาพร้อมกับตัวชะนอร์มัลเฮกเซนถึงนอร์มัลเฮกเซน-คลอโรฟอร์ม 98:2 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้ง โดยใช้ซิลิกาเจลชนิดหยาบ และใช้นอร์มัลเฮกเซนเป็นตัวชะ ได้น้ำมันใสสีเหลืองอ่อน (14.04 กรัม) ของสาร 5.1(3); UV :

$\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ 234, 286 nm; IR: $V_{\max}^{\text{neat}}$ 3070, 2974, 2894, 1639, 1606, 1501, 1486, 1440, 1356, 1244, 1183, 1120, 1094, 1039, 993, 932, 856, 806, 774 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 3.29 (2H, br d, $J = 6.4$ Hz, allylic H), 5.03 (1H, ddt, $J = 10.1, 1.8, 1.2$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.05 (1H, ddt, $J = 17.1, 1.8, 1.5$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.90 (2H, s, $-\text{OCH}_2\text{O}-$), 5.91 (1H, ddt, $J = 17.1, 10.1, 6.7$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 6.62 (1H, dd, $J = 7.8, 1.6$ Hz, Ar-H-6), 6.67 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, Ar-H-2), 6.72 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, Ar-H-5).

กลุ่ม H_4 (5.06 กรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมาพร้อมกับตัวชะนอร์มัลเฮกเซน-คลอโรฟอร์ม 40:60 ถึง 20:80 เมื่อนำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยใช้ซิลิกาเจลชนิดละเอียด และใช้

นอร์มัลเฮกเซน-คลอโรฟอร์ม 30:70 เป็นตัวชะ ได้ของแข็งสีขาว (112 มิลลิกรัม) ของสาร 5.1(5) จุดหลอมเหลว 68-71 °ซ; UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ 216, 236, 326 nm; (NaOH) 214, 382 nm; IR: $V_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ 3450, 1713, 1632, 1599, 1518, 1269, 1177, 980, 840, 821, 718 cm^{-1} ; ^1H NMR(CDCl_3): δ 0.90 (3H, *t*, $J = 6.8$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{Me}$), 1.27 (*br s*, $-\text{CH}_2-$), 1.72 (2H, *quint*, $J = 6.9$ Hz, $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 3.95 (3H, *s*, $-\text{OMe}$), 4.21 (2H, *t*, $J = 6.9$ Hz, $-\text{CO}_2\text{CH}_2-$), 5.91 (1H, *br s*, $-\text{OH}$), 6.32 (1H, *d*, $J = 15.9$ Hz, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}$), 6.94 (1H, *d*, $J = 8.2$ Hz, Ar-H-5), 7.06 (1H, *d*, $J = 1.7$ Hz, Ar-H-2), 7.10 (1H, *dd*, $J = 8.2, 1.7$ Hz, Ar-H-6), 7.63 (1H, *d*, $J = 15.9$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}$); ^{13}C NMR(CDCl_3): δ 14.5 ($-\text{Me}$), 23.1 (C-n-1), 26.4 (C-3''), 29.2 (C-2''), 29.7-30.1 (C-4''-(n-3)), 32.3 (C-n-2), 56.3 ($-\text{OMe}$), 65.0 (C-1''), 109.7 (C-2'), 115.1 (C-5'), 116.1 (C-2), 123.5 (C-6'), 127.5 (C-1'), 145.0 (C-3), 147.1 (C-4'), 148.3 (C-3'), 167.8 (c-1); EIMS m/z (rel. int.): 586 (6), 572 (1), 558 (89), 544 (4), 530 (100), 502 (1) (each $[\text{M}]^+$), 194 (74), 177 (58), 150 (17), 137 (21).

(ข) Dichloromethane extract

นำส่วนที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน (43.55 กรัม) มาทำคอลลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ระบบตัวชะชนิดเดียวกับ hexane extract แต่ใช้อัตราส่วนที่แตกต่างกัน ตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC จัดกลุ่มย่อยได้ 8 กลุ่ม เลือกกลุ่ม D_1 และ D_5 มาแยกต่อไป

กลุ่ม D_1 (17.31 กรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมาพร้อมกับตัวชะนอร์มัลเฮกเซน นำมาทำคอลลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้งหนึ่ง โดยใช้ซิลิกาเจลชนิดหยาบ และใช้นอร์มัลเฮกเซนเป็นตัวชะ ได้น้ำมันใสสีเหลืองอ่อน (15.58 กรัม) ของสาร 5.1(3) ซึ่งยืนยันโดยการทำ TLC เปรียบเทียบกับสารประกอบที่แยกได้จากกลุ่ม H_1

กลุ่ม D_5 (13.32 กรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมาพร้อมกับตัวชะนอร์มัลเฮกเซน-คลอโรฟอร์ม 20:80 เมื่อนำมาทำคอลลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลชนิดหยาบ และใช้ตัวชะเริ่มต้นจากนอร์มัลเฮกเซน-คลอโรฟอร์ม 50:50 คลอโรฟอร์ม คลอโรฟอร์ม-เมทานอล และเมทานอลตามลำดับ โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าขึ้นเรื่อยๆ ตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC จัดกลุ่มย่อยได้ 13 กลุ่ม เลือกกลุ่มย่อย $D_{5,6}$ มาทำการแยกต่อไป

กลุ่มย่อย $D_{5.6}$ (1.51 กรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมาจากตัวชะคลอโรฟอร์มถึงคลอโรฟอร์ม-เมทานอล 95:5 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้งหนึ่ง โดยใช้ซิลิกาเจลชนิดละเอียด และใช้ตัวชะเริ่มต้นจากนอร์มัลเฮกเซน-คลอโรฟอร์ม 25:75 คลอโรฟอร์ม และคลอโรฟอร์ม-เมทานอล 95:5 ตามลำดับ โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าขึ้นเรื่อย ๆ ตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC แล้วเลือกกลุ่มย่อย $D_{5.6.3}$ และกลุ่ม $D_{5.6.6}$ มาแยกต่อไป

กลุ่มย่อย $D_{5.6.3}$ เป็นกลุ่มที่ออกมาจากตัวชะคลอโรฟอร์ม-เมทานอล 95.5:0.5 ได้ผลึกสีเหลืองอ่อน (45.8 มิลลิกรัม) ของสาร 5.1(4) จุดหลอมเหลว 81-82 °C (จุดหลอมเหลวที่มีผู้รายงานไว้^{5.1[171]} คือ 84-85 °C); UV: $\lambda_{\max}^{EtOH}$ 220, 247, 297, 338 nm; IR: $V_{\max}^{KBr}$ 2832, 2768, 2704, 1666, 1620, 1596, 1494, 1448, 1401, 1357, 1259, 1195, 1118, 1037, 961, 927, 860, 799 cm^{-1} ; ^1H NMR ($CDCl_3$): δ 5.99 (2H, s, $-OCH_2O-$), 6.54 (1H, dd, $J = 15.7, 7.7$ Hz, $CH=CH-CO$), 6.83 (1H, d, $J = 6.8$ Hz, Ar-H-5), 7.04 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, Ar-H-2), 7.05 (1H, dd, $J = 6.8, 1.8$ Hz, Ar-H-6), 7.36 (1H, d, $J = 15.7$ Hz, $CH=CH-CO$), 9.63 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, $-CHO$)

กลุ่มย่อย $D_{5.6.6}$ เป็นกลุ่มที่ออกมาจากตัวชะคลอโรฟอร์ม-เมทานอล 99:1 ได้ผลึกสีขาว (45.1 มิลลิกรัม) ของสาร 5.1(6) จุดหลอมเหลว 135-136 °C (จุดหลอมเหลวที่มีผู้รายงานไว้^{5.1[172,173]} คือ 141 °C); IR: $V_{\max}^{KBr}$ 3429, 2937, 1635, 1466, 1383, 1054 cm^{-1} ; ^1H NMR ($CDCl_3$): δ 0.66-2.30 (47H, m, methyl, methylene และ methine protons), 3.50 (1H, m-7 lines, $CH-OH$), 5.33 (1H, br d, $J = 5.1$ Hz, olefinic H).

(ค) Methanol extract

นำส่วนที่สกัดด้วยเมทานอล (88.35 กรัม) มาแยกโดยใช้คิวคอลลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ระบบตัวชะชนิดเดียวกับ hexane extract แต่ใช้อัตราส่วนที่แตกต่างกัน ตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC จัดกลุ่มย่อยได้ 13 กลุ่ม เลือกกลุ่ม M_7 มาแยกต่อไป

กลุ่ม M_7 (4.77 กรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมาจากตัวชะคลอโรฟอร์ม นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ซิลิกาเจลชนิดละเอียด และใช้ตัวชะเริ่มต้นจากนอร์มัลเฮกเซน-คลอโรฟอร์ม 20:80 คลอโรฟอร์ม และคลอโรฟอร์ม-เมทานอล 50:50 ตามลำดับ โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่

มีช้ามากกว่าขึ้นเรื่อย ๆ ตรวจสอบส่วนที่ชะออกมาด้วย TLC แล้วเลือกกลุ่มย่อย $M_{7.5}$ มาแยกต่อไป

กลุ่มย่อย $M_{7.5}$ (0.68 กรัม) เป็นกลุ่มที่ออกมากับตัวชะเมทานอล-คลอโรฟอร์ม 1:99 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีก 2 ครั้ง ใช้ซิลิกาเจลชนิดละเอียด และใช้ คลอโรฟอร์ม-เมทานอล 95.5:0.5 เป็นตัวชะ ได้ผลึกสีขาว (133 มิลลิกรัม) ของสาร 5.1(7) จุดหลอมเหลว 76-77 °ซ (จุดหลอมเหลวที่มีผู้รายงานไว้^{5.1[174]} คือ 79 °ซ); UV: $\lambda_{\max}^{EtOH}$ 234, 286 nm; IR: $V_{\max}^{CHCl_3}$ 3248, 1501, 1485, 1438, 1336, 1244, 1189, 1095, 1044, 931, 805 cm^{-1} ; ^1H NMR($CDCl_3$): δ 2.38 (2H, *br s*, 2xOH), 2.67 (1H, *dd*, $J = 13.8, 8.0$ Hz, Ar-CH₂-CH(OH)-), 2.73 (1H, *dd*, $J = 13.8, 5.5$ Hz, Ar-CH₂-CH(OH)-), 3.51 (1H, *dd*, $J = 11.2, 7.0$ Hz, -CH(OH)-CH₂OH), 3.69 (1H, *dd*, $J = 11.2, 3.0$ Hz, -CH(OH)-CH₂OH), 3.90 (1H, *m*, -CH(OH)-CH₂OH), 5.95 (2H, *s*, -OCH₂O-), 6.68 (1H, *dd*, $J = 7.9, 1.4$ Hz, Ar-H-6), 6.74 (1H, *d*, $J = 1.4$ Hz, Ar-H-2), 6.78 (1H, *d*, $J = 7.9$ Hz, Ar-H-5); ^{13}C NMR($CDCl_3$): δ 39.8 (C-3), 66.3 (C-1), 73.5 (C-2), 101.3 (-OCH₂O-), 108.8 (C-2'), 110.0 (C-5'), 122.6 (C-6'), 131.7 (C-1'), 146.7 (C-4'), 148.2 (C-3').

เอกสารอ้างอิง

- 5.1[1] Burkill, I. H. *A Dictionary of the Economic Products of the Malay Peninsula*, Vol. I; Ministry of Agriculture and Co-operatives: Kuala Lumpur, 1966; p. 549.
- 5.1[2] Kirtikar, K. R.; Basu, B. D. *Indian Medicinal Plants*, 3rd ed., Vol. 3; Periodical Export: New Delhi, 1981, p. 2143.
- 5.1[3] ดร. ก้องกานดา ชยามฤต *สมุนไพรไทย ตอนที่ 6*, สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้: กรุงเทพฯ, พ.ศ. 2540; หน้า 131 และเอกสารอ้างอิงในหัวข้อพืชในสกุล *Cinnamomum*.
- 5.1[4] Yousef, R. T.; Tawil, G. G. *Manuf. Chem. Aerosol News* 1979, **50**, 59. (*Chem. Abstr.* **91**, 151896b).
- 5.1[5] Kurita, N.; Miyaji, M.; Kurane, R.; Takahara, Y.; Ichimura, K. *Agric. Biol. Chem.* 1979, **43**, 2365.
- 5.1[6] Isogai, A.; Murakoshi, S.; Suzuki, A.; Tamura, S. *Agric. Biol. Chem.* 1977, **41**, 1779.
- 5.1[7] ชมกมล อุบลนุช; นางลักขณ์ ศรีอุบลมาศ; วันชัย ดีเอกนามกุล; นิจศิริ เรืองรังษี *การประชุมทางวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 25: พิษณุโลก*, 20-22 ตุลาคม 2542; หน้า 752.
- 5.1[8] Smitinand, T. *Thai Plant Names: Botanical Names-Vernacular Names*; Funny Publishing: Bangkok, 1980; p.80.
- 5.1[9] Nohara, T.; Kashiwada, Y.; Nishioka, I. *Phytochemistry* 1985, **24**, 1849 and references cited therein.
- 5.1[10] Nohara, T.; Kashiwada, Y.; Tomimatsu, T.; Kido, M.; Tokubuchi, N.; Nishioka, I. *Tetrahedron lett.* 1980, **21**, 2647.
- 5.1[11] Tanaga, S.; Yoon, Y. H.; Fukui, H.; Tabata, M.; Akira, T.; Okano, K.; Iwai, M.; Iga, Y.; Yokoyama, K. *Planta Med.* 1989, **55**, 245.
- 5.1[12] Otsuka, H.; Fujioka, S.; Komiya, T.; Mizuta, E.; Takamoto, M. *Yakugaku Zasshi* 1982, **102**, 162 (*Chem. Abstr.* **96**, 223079r).
- 5.1[13] นันทวัน บุญยประภัตร; อรุณช โศคชัยเจริญพร *สมุนไพร ไม้พื้นบ้าน(2)*, บริษัท ประชาชน จำกัด: กรุงเทพฯ, พ.ศ. 2541; หน้า 364 และเอกสารอ้างอิงในหัวข้อ เทพธาโร.

- 5.1[14] Tao, G.; Lu, A.; Jiang, Z.; Chen, H.; Zhang, X.; Sun, H.; Ding, J.; Ding, L.; Wu, Y. *Zhiwu Xuebao* 1987, **29**, 541 (*Chem. Abstr.* **108**, 72155a).
- 5.1[15] Yaacob, K. B.; Zakaria, Z.; Ramli, Z. *J. Essent. Oil Res.* 1990, **2**, 51.
- 5.1[16] Dung, N. X.; Moi, L. D.; Hung, N. D.; Leclercq, P. A. *J. Essent. Oil Res.* 1995, **7**, 53.
- 5.1[17] Tsai, Y.; Ting, C. K.; Nieh, S. L. *Yao Hsueh Hsueh Pao* 1964, **11**, 801.
- 5.1[18] Ji, X. D.; Pu, Q. I.; Garraffo, H. M.; Pannell, L. K. *J. Essent. Oil Res.* 1991, **3**, 373.
- 5.1[19] Li, Y. J.; Zhu, L. F.; Lu, B. Y.; Mei, L. T.; Li, Z. L.; Jia, L. Z. *Chih Wu Hsueh Pao* 1987, **29**, 527.
- 5.1[20] Li, Y. J.; Zhu, L. F.; Lu, B. Y.; Mei, L. T.; Li, Z. L.; Jia, L. Z. *Chin Wu Hsueh Pao* 1987, **29**, 527.
- 5.1[21] Wu, H.; Zhu, L. F.; Li, Y. L. *Chin Wu Hsueh Pao* 1992, **34**, 302.
- 5.1[22] Cheng, B. Q.; Xu, Y.; Zeng, F. X.; Yu, X. J.; Ding, J. K.; Wu, Y. *Yun-Nan Chih Wu Yen Chiu* 1992, **14**, 105.
- 5.1[23] Nhuyen, X. D.; Sothy, N.; Lo, V. N.; Leclercq, P. A. *J. Essent. Oil Res.* 1993, **5**, 667.
- 5.1[24] Huergo, H. H.; Retamar, J. A. *Rivital Essenze Profumi Piante Offic Aromi Saponi Cosmet Aer* 1978, **60**, 637.
- 5.1[25] Takaoka, D.; Takaoka, K.; Ohsita, T.; Hiroi, M. *Phytochemistry* 1976, **15**, 425B.
- 5.1[26] Ralph, I.; Bick, C.; Singhai, W. *Heterocycles* 1978, **9**, 903.
- 5.1[27] Shi, W. Y.; He, W.; Wen, G. Y.; Guo, D. X.; Long, G. Y.; Liu, X. O. *Chin Wu Hsueh Pao* 1989, **31**, 209.
- 5.1[28] Takaoka, D.; Imooka, M.; Hiroi, M. *Bull. Chem. Soc. Japan* 1977, **50**, 2821.
- 5.1[29] Hikino, H.; Suzuki, N.; Takemoto, T. *Chem. Pharm. Bull.* 1971, **19**, 87.
- 5.1[30] Hikino, H.; Suzuki, N.; Takemoto, T. *Tetrahedron Lett.* 1967, 5069.
- 5.1[31] Gallicano, K. D.; Park, H. C.; Young, L. M. *J. Anal. Toxicol.* 1985, **9**, 24.
- 5.1[32] Sattar, A.; Gilani, A. M.; Saeed, M. A. *Pak. J. Sci. Ind. Res.* 1991, **34**, 135.
- 5.1[33] Vignes, H. *Rev. Pathol. Comp. Med. Exp.* 1948, **48**, 456.
- 5.1[34] Pino, J. A.; Fuentes, V. *J. Essent. Oil Res.* 1998, **10**, 531.

- 5.1[35] Kidder, M. C.; Katz, A.; Hall, A. G.; Petersen, R.; Gathercoal, E. N.; Scott, W. D.; Finney, W. H.; Flinn, E. S.; O'flaherty, F.; Loller, R. M.; Warriner, C. E.; Aries, R. S. *Econ. Bot.* 1950, **4**, 3.
- 5.1[36] Pham, V. K.; Do, C. Y.; Au, V. Y.; Ma, D. D. *Tap Chi Duoc Hoc* 1988, **4**, 13.
- 5.1[37] Fujita, Y.; Fujita, S.; Tanaka, Y. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi* 1974, **48**, 697.
- 5.1[38] Fujita, Y.; Fujita, S.; Tanaka, Y. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi* 1974, **48**, 693.
- 5.1[39] Ling, J.; Liu, W. Y. *Cell Biochem. Funct.* 1996, **14**, 157.
- 5.1[40] Pham, V. K.; Ma, D. D.; Nguven, X. D. *Tap Chi Duoc Hoc* 1992, **4**, 15.
- 5.1[41] Baruah, A. K. S.; Bhagat, S. D.; Hazarika, J. N.; Saikia, B. K. *Indian J. Pharmacy* 1975, **37**, 39.
- 5.1[42] Kuo, Y. H.; Chen, W. C.; Lin, Y. T. *J. Chin. Chem. Soc. (Taipei)* 1984, **31**, 159.
- 5.1[43] Kubota, S. *Trans. 9th Congr. Far East Assco. Trop. Med.* 1935, **2**, 639.
- 5.1[44] Akengia, T. A. R.; Chhabra, S. C. *Int. J. Biochem. Physics* 1994, **3**, 37.
- 5.1[45] Takaoka, D.; Imooka, M.; Hiroi, M. *Phytochemistry* 1979, **18**, 488.
- 5.1[46] Mukherjee, R. K.; Fujimoto, Y.; Kakinuma, K. *Phytochemistry* 1994, **37**, 1641.
- 5.1[47] Griffiths, L. A. *J. Exp. Biol.* 1965, **10**, 437.
- 5.1[48] Hikino, H.; Suzuki, N.; Takemoto, T. *Chem. Pharm. Bull.* 1968, **16**, 832.
- 5.1[49] Petyaev, S. I. *Sov. Subtrop. (Moscow)* 1938, **3**, 63.
- 5.1[50] Hanneguelle, S.; Thibault, J. N.; Naulet, N.; Martin, G. J. *J. Agr. Food Chem.* 1992, **40**, 81.
- 5.1[51] Takaoka, D.; Hiroi, M. *Phytochemistry* 1976, **15**, 330A.
- 5.1[52] Yamaguchi, H.; Numata, A.; Marui, T.; Arimoto, M.; Takeda, H. *Yakugaku Zasshi* 1975, **95**, 477.
- 5.1[53] Nonaka, G. I.; Morimoto, S.; Kinjo, J. E.; Nohara, T.; Nishioka, I. *Chem. Pharm. Bull.* 1987, **35**, 149.
- 5.1[54] Noguchi, M.; Kitajima, M. *Nippon Ringaku Kaishi* 1959, **41**, 488.
- 5.1[55] Fujita, Y.; Fujita, S.; Akama, Y. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi* 1972, **46**, 17.

- 5.1[56] Shibeyuki, T.; Ono, T. *Bunseki Kagaku* 1965, **14**, 711.
- 5.1[57] Lin, Y. T.; Kou, Y. H.; Chen, T. T.; Kao S. T. *Int. Congr. Essent. Oils (PAP)* 7th, 1977, 7; p. 180.
- 5.1[58] Naito, T. *Nippon Kagaku Kaishi* 1943, **64**, 1125.
- 5.1[59] Dung, N. X.; Khien, P. V.; Chien, H. T. *J. Essent. Oil Res.* 1993, **5**, 451.
- 5.1[60] Gu, J. W.; Liu, L. D.; Zhang, Y. S. *Linchan Huaxue Yu Gongye* 1990, **10**, 77.
- 5.1[61] Suga, T.; Hirata, T.; Tange, K. *Chem. Lett.* 1975, 131.
- 5.1[62] Fujita, Y.; Fujita, S.; Akama, Y.; Morita, T. *Osaka Kogyo Gijutsu Shikensho Kiho* 1974, **25**, 193.
- 5.1[63] Fujita, Y.; Fujita, S.; Nishida, S. *Osaka Kogyo Gijutsu Shikensho Kiho* 1974, **25**, 244.
- 5.1[64] Zhu, M. S.; Liu, S.; Luo, R. J.; Bu, Y. L. *Yao Hsueh Hsueh Pao* 1996, **31**, 461.
- 5.1[65] Ross, M. S. F. *J. Chromatogr.* 1976, **118**, 273.
- 5.1[66] Thomas, A. F. *Helv. Chim. Acta* 1980, **63**, 1615.
- 5.1[67] Schultz, J. M.; Herrmann, K. *Z. Lebensm-Unters Forsch.* 1980, **171**, 193.
- 5.1[68] Kong, Y. C.; Hu, S. Y.; Lau, F. K.; Che, C. T.; Yeung, H. W.; Cheung, S.; Hwang, J. C. C. *Amer. J. Chinese Med.* 1976, **4**, 105.
- 5.1[69] Shiraga, Y.; Okano, K.; Akira, T.; Fukaya, C.; Yokoyama, K.; Tanaka, S.; Fukui, H.; Taba, M. *Tetrahedron* 1988, **44**, 4703.
- 5.1[70] Morimoto, S.; Nonaka, G. I.; Nishioka, I.; Ezaki, N.; Takizawa, N. *Chem. Pharm. Bull.* 1985, **33**, 2281.
- 5.1[71] Morimoto, S.; Nonaka, G. I.; Nishioka, I. *Chem. Pharm. Bull.* 1986, **34**, 633.
- 5.1[72] Miyamura, M.; Nohara, T.; Tomimatsu, T.; Nishioka, I. *Phytochemistry* 1983, **22**, 215.
- 5.1[73] Yuan, A.; Tan, L.; Jiang, D. *Chung Yao Tung Pao* 1982, **7**, 26.
- 5.1[74] Clifford, M. N.; Hole, M. *Process Biochem.* 1977, **12**, 5.
- 5.1[75] Neeman, I.; Tabak, M.; Armon, R. *Patent-Eur. Pat. Appl.*-689, 1996, 842: 14pp-.
- 5.1[76] Koh, W. S.; Yoon, S. Y.; Kwon, B. M.; Jeong, T. C.; Nam, K. S.; Han, M. Y. *Int. J. Immunopharmacol.* 1998, **20**, 643.

- 5.1[77] Liu, W. H.; Sun, X. J.; Zhang, L. Q. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 1992, **17**, 358.
- 5.1[78] Sakai, Y.; Meng, Z. M. *Gifu Ken Eisei Kenkyushoho* 1992, **37**, 24.
- 5.1[79] Hou, G.; Gu, L.; Deng, W. *Fenxi Ceshi Tongbao* 1986, **5**, 33.
- 5.1[80] Zhao, J. G.; Zhang, J. S.; Zhang, J. B.; Wang, G. L. *Chung Ts'ao Yao* 1988, **19**, 108.
- 5.1[81] Sagara, K.; Oshima, T.; Yoshida, T.; Tong, Y. Y.; Zhang, G.; Chen, Y. H. *J. Chromatogr.* 1987, **409**, 365.
- 5.1[82] Lee, H. S.; Ahn, Y. J. *J. Agr. Food Chem.* 1998, **46**, 8.
- 5.1[83] Rabha, L. C.; Baruah, A. K. S.; Bordoloi, D. N. *Indian Perfum.* 1979, **23**, 173.
- 5.1[84] Archer, A. W. *J. Chromatogr.* 1988, **447**, 272.
- 5.1[85] Kwon, B. M.; Cho, Y. K.; Lee, S. H.; Nam, J. Y.; Bok, S. H.; Chun, S. K.; Kim, J. A.; Lee, I. R. *Planta Med.* 1996, **62**, 183.
- 5.1[86] Kwon, B. M.; Lee, S. H.; Choi, S. U.; Park, S. H.; Lee, C. O.; Cho, Y. K.; Sung, N. D.; Bok, S. H. *Arch. Pharm. Res.* 1998, **21**, 147.
- 5.1[87] Guo, Z. D.; Liu, L. M.; Chen, X. L.; Yang, Z. Y. *Sepu* 1987, **5**, 31.
- 5.1[88] Satoshi, M. *Appl. Environ. Microbiol.* 1978, **36**, 577.
- 5.1[89] Kanari, M.; Tomoda, M.; Gonda, R.; Shimizu, N.; Kimura, M.; Kawaguchi, M.; Kawabe, C. *Chem. Pharm. Bull.* 1989, **37**, 3191.
- 5.1[90] Tomoda, M.; Shimizu, N.; Gonda, R.; Kanari, M. *J. Pharmacobio. Dyn.* 1990, **13**, S-47.
- 5.1[91] Guo, W.; Song, J. F.; Li, H.; Guo, Y. M. *Yaowu Fenxi Zazhi* 1995, **15**, 3.
- 5.1[92] Ko, S. R.; Kim, N. M.; Jeon, B. S.; Choi, K. J. *Korean J. Ginseng Sci.* 1991, **15**, 1.
- 5.1[93] Imamichi, T.; Hayashi, K.; Nakamura, T.; Kaneko, K.; Koyama, J. *J. Pharmacobio. Dyn.* 1989, **12**, 693.
- 5.1[94] Yuan, A. X.; Qin, L.; Jiang, D. Q. *Yao Hsueh Tung Pao* 1981, **16**, 55.
- 5.1[95] Yagi, A.; Tokubuchi, N.; Nohara, T.; Nonaka, G.; Nishioka, I.; Koda, A. *Chem. Pharm. Bull.* 1980, **28**, 1432.
- 5.1[96] Yagi, A.; Nohara, T.; Nishioka, I.; Koda, A.; Nagai, H.; Noda, K.; Tokubuchi, N. *Wakanyaku Shinpojumu(Kiroku)* 1980, **13**, 72.
- 5.1[97] Nakano, K.; Nohara, T.; Tomimatsu, T.; Nishioka, I. *Yakugaku Zasshi* 1981,

101, 1052.

- 5.1[98] Nohara, T.; Tokubuchi, N.; Kuroiwa, M.; Nishioka, I. *Chem. Pharm. Bull.* 1980, **28**, 2682.
- 5.1[99] Nohara, T.; Nishioka, I.; Tokubuchi, N.; Miyahara, K.; Kawasaki, T. *Chem. Pharm. Bull.* 1980, **28**, 1969.
- 5.1[100] Kashiwada, Y.; Nohara, T.; Tomimatsu, T.; Nishioka, I. *Chem. Pharm. Bull.* 1981, **29**, 2686.
- 5.1[101] Nohara, T.; Kashiwada, Y.; Murakami, K.; Tomimatsu, T.; Kido, M.; Yagi, A.; Nishioka, I. *Chem. Pharm. Bull.* 1981, **29**, 2451.
- 5.1[102] Nohara, T.; Kashiwada, Y.; Tomimatsu, T.; Nishioka, I. *Phytochemistry* 1982, **21**, 2130.
- 5.1[103] Nohara, T.; Tomimatsu, T.; Tokubuchi, N.; Yagi, A.; Nishioka, I.; Miyahara, K. *Symp. Chem. Nat. Prod. 22nd Fukuoka Japan 1979*, 1979; p. 87.
- 5.1[104] Duquenois, P. *Ann. Pharm. Fr.* 1947, **5**, 155.
- 5.1[105] Morimoto, S.; Nonaka, G. I.; Nishioka, I. *Chem. Pharm. Bull.* 1986, **34**, 643.
- 5.1[106] Takechi, M.; Tanaka, Y.; Takehara, M.; Nonaka, G. I.; Nishioka, I. *Phytochemistry* 1985, **24**, 2245.
- 5.1[107] Zhu, Z. Y.; Feng, Y. X.; Fang, H. J.; Liu, G. S.; Li, N.; Hu, Q.; Chen, H.; Wang, Y. C. *Chung Ts'ao Yao* 1985, **16**, 316.
- 5.1[108] Singh, A.; Srivastava, S. N.; Sharma, V. N.; Kaul, K. N. *Indian J. Chem.* 1964, **2**, 252.
- 5.1[109] Nath, S. C.; Baruah, A. K. S. *J. Essent. Oil Res.* 1994, **6**, 211.
- 5.1[110] Wijesekera, R. O. B.; Jayewardene, A. L. *J. Natl. Sci. Counc. Sri Lanka* 1975, **2**, 141.
- 5.1[111] Li, Y. J.; Li, B. L.; Zeng, H. T.; Lu, B. Y.; Zhu, L. F. *Zhiwu Ziyuan Yu Huanjing* 1993, **2**, 7.
- 5.1[112] Li, C. Y.; Cheng, W. S. *Yaowu Fenxi Zazhi* 1991, **11**, 346.
- 5.1[113] Anon *Soap Perfum. Cosmet.* 1945, **18**, 404.
- 5.1[114] Ikeda, T. *Nippon Kagaku Kaishi* 1930, **51**, 335.
- 5.1[115] Hussain, R. A.; Kim, J. W.; Hu, T. W.; Pezzuto, J. M.; Soejarto, D. D.; Kinghorn, A. D. *Planta Med.* 1986, **52**, 403.
- 5.1[116] Wu, T. S.; Chen, Z. S. *J. Taiwan Pharm. Ass.* 1977, **29**, 15.

- 5.1[117] Chen, Y. P. *Proc. Int. Symp. Recent Adv. Nat. Prod. Res.*; Seoul, Korea, Dec 14-16 1979; p. 18.
- 5.1[118] Brown, E.; Coomes, T. J.; Islip, H. T.; Matthews, W. S. A. *Colonial Plant Anim. Prod. (London)* 1954, **4**, 239.
- 5.1[119] Lin, Z. K.; Hua, Y. F. *Chih Wu Hsueh Pao* 1980, **22**, 252.
- 5.1[120] Wu, T. S.; Leu, Y. L.; Chan, Y. Y.; Yu, S. M.; Teng, C. M.; Su, J. D. *Phytochemistry* 1994, **36**, 785.
- 5.1[121] Huang, Y.; Wein, M.; Xiao, S.; Zhao, H.; Ren, W. *Yun-Nan Chin Wu Yen Chiu* 1986, **8**, 359.
- 5.1[122] Zhu, L. F.; Lu, B. Y.; Li, Y. J. *Chin Wu Hsueh Pao* 1984, **26**, 639.
- 5.1[123] Ogata, Y.; Ikeda, M.; Nagagawa, J. *Patent-Japan Kokai Tokkyo Koho-01* 180, 1988, 824: 3pp-.
- 5.1[124] Zhu, L.; Lu, B.; Li, Y.; Mai, L. *Chih Wu Hsueh Pao* 1985, **27**, 407.
- 5.1[125] Lu, B.; Li, Y.; Mai, L.; Sun, B.; Zhu, L. *Linchan Hua Hsueh Yu Gong Yi* 1986, **6**, 39.
- 5.1[126] Zhang, W. L.; Zhu, L. F.; Lu, B. Y.; Li, B. L. *Redai Yaredai Zhiwu Xuebao* 1996, **4**, 61.
- 5.1[127] Fujita, S. I. *Yakugaku Zasshi* 1986, **106**, 17.
- 5.1[128] Morimoto, S.; Nonaka, G. I.; Nishioka, I. *Chem. Pharm. Bull.* 1985, **33**, 4338.
- 5.1[129] Anon. *Patent Japan Kokai Tokkyo Koho-58* 154, 1983, 157: 10pp-.
- 5.1[130] Gellert, E.; Summons, R. E. *Tetrahedron Lett.* 1969, 5055.
- 5.1[131] Nath, S. C.; Hazarika, A. K.; Baruah, R. N.; Singh, R. S.; Ghosh, A. C. *J. Essent. Oil Res.* 1994, **6**, 77.
- 5.1[132] Agarwal, S. G.; Thappa, R. K.; Dhar, K. L. *Indian Perfum.* 1977, **21**, 15.
- 5.1[133] Nigam, M. C.; Ahmed, A. *Pafai J.* 1990, **12**, 24.
- 5.1[134] Upadhaya, S. P.; Kirihata, M.; Ichimoto, I. *Nippon Dhokuhin Kohyo Gakkaishi* 1994, **41**, 512.
- 5.1[135] Yu, X. J.; Cheng, B. Q. *Chin Wu Hsueh Pao* 1987, **29**, 537.
- 5.1[136] Cheng, B. Q.; Xu, Y.; Yu, X. J.; Ding, J. K.; Yi, Y. F. *Yun-Nan Chin Wu Yen Chiu* 1991, **13**, 219.
- 5.1[137] Cheng, B. Q.; Xu, Y.; Zeng, G.; Yu, X. J.; Ding, J. K. *Yun-Nan Chin Wu Yen Chiu* 1993, **15**, 78.

- 5.1[138] Ripperger, H.; Diaz, M.; Schreiber, K. *Phytochemistry* 1981, 20, 1453.
- 5.1[139] Senanayake, U. M.; Lee, T. H.; Wills, R. B. H. *J. Agr. Food Chem.* 1978, 26, 822.
- 5.1[140] Gowda, D. C.; Sarathy, C. *Carbohydr. Res.* 1987, 166, 263.
- 5.1[141] Gowda, J. P.; Gowda, D. C.; Anjaneyalu, Y. V. *Carbohydr. Res.* 1980, 87, 241.
- 5.1[142] Opdyke, D. L. *J. Food Cosmet. Toxicol.* 1976, 14, 693.
- 5.1[143] Wijesekera, R. O. B.; Fonseka, K. H. *J. Natl. Sci. Counc. Sri Lanka* 1974, 2, 35.
- 5.1[144] Wijesekera, R. O. B.; Jayewardene, A. L.; Rafapakse, L. S.; Fonseka, K. H. *J. Natl. Sci. Counc. Sri Lanka* 1975, 3, 101.
- 5.1[145] Yu, X. J.; Chen, X. R.; Cheng, B. Q. *Yun-Nan Chih Wu Yen Chiu* 1984, 6, 103.
- 5.1[146] Rao, Y. R.; Paul, S. C.; Dutta, P. K. *Indian Perfum.* 1988, 32, 86.
- 5.1[147] Cheng, B. L.; Yu, X. J. *Linchan Huaxue Yu Gongye* 1991, 11, 325.
- 5.1[148] Nonaka, G. I.; Morimoto, S.; Nishioka, I. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 1983, 9, 2139.
- 5.1[149] Karig, F. *Dtsch. Apoth. Ztg.* 1975, 115, 1781.
- 5.1[150] Hitomi, N.; Shimizu, K.; Yamamoto, K.; Miura, O.; Yumioka, E. *Bunseki Kagaku* 1986, 35, 202.
- 5.1[151] Namba, T.; Kikuchi, T.; Mikage, M.; Kodota, S.; Komatsu, K.; Shimizu, M.; Tomimor, T. *Shoyakugaku Zasshi* 1987, 41, 35.
- 5.1[152] Cheng, B. Q.; Yu, X. J. *Chung Ts'ao Yao* 1983, 14, 134.
- 5.1[153] Vincieri, F. F.; Mazzi, G.; Mulinacci, N.; Papini, P. *Pharm. Acta Helv.* 1988, 63, 282.
- 5.1[154] Seneayake, U. M.; Wills, R. B. H.; Lee, T. H. *Phytochemistry* 1977, 16, 2032.
- 5.1[155] Angmor, J. E.; Dewick, P. M.; Evans, W. C. *J. Pharm. Pharmacol. Suppl.* 1975, 27, 89P.
- 5.1[156] Morozumi, S. *Shinkin To Shinkinsho* 1978, 19, 172.
- 5.1[157] Tsal, S. Y.; Chen, S. C. *J. Nat. Prod.* 1984, 47, 536.
- 5.1[158] Bae, K. H.; Ji, J. M.; Park, K. L. *Arch. Pharm. Res.* 1992, 15, 239.
- 5.1[159] Sarathy, C.; Gowda, D. C. *Indian J. Chem.* 1988, 27B, 694.

- 5.1[160] Nohara, T.; Tomimatsu, T.; Tokubuchi, N.; Yagi, A.; Nishioka, I.; Miyahara, K. Koen Yoshishu Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai 22nd: 22, 1979; p. 87.
- 5.1[161] Nohara, T.; Tomimatsu, T.; Tokubuchi, N.; Yagi, A.; Nishioka, I.; Miyahara, K. Koen Yoshishu Tennen Yukikagobutsu Toronkai 22nd: 22, 1979; p. 87.
- 5.1[162] Isogai, A.; Suzuki, A.; Tamura, S.; Murakoshi, S.; Ohashi, Y.; Sasada, Y. *Agr. Biol. Chem.* 1976, **40**, 2305.
- 5.1[163] Opdyke, D. L. *J. Food Cosmet. Toxicol.* 1978, **16**, 843.
- 5.1[164] Govindachari, T. R.; Jadhav, S. J.; Joshi, B. S.; Kamat, V. N.; Mohamed, P. A.; Parthasarathy, P. C.; Patankar, S. J.; Prakash, D.; Rane, D. F.; Viswanathan, N. *Indian J. Chem.* 1969, **7**, 308.
- 5.1[165] Iyengar, M. A.; Ghosh, T. K.; Nayak, S. G. K. *Indian Drugs* 1994, **31**, 166.
- 5.1[166] Banerji, A.; Bandyopadhyay, D.; Sarkar, M.; Siddhanta, A. K.; Pal, S. C.; Ghosh, S.; Abraham, K.; Shoolery, J. N. *Phytochemistry* 1985, **24**, 279.
- 5.1[167] Pouchert, C. J. *The Aldrich Library of FT-IR Spectra*; Aldrich Chemical Company, Inc., U.S.A., 1985, **1**, 1054C.
- 5.1[168] Pouchert, C. J.; Behnke, J. *The Aldrich Library of ¹³C and ¹H FT NMR Spectra*, 3rd ed. Aldrich Chemical Company, Inc., U.S.A., 1993, **2**, 232B.
- 5.1[169] Balde, A. M.; Claeys, M.; Pieters, L. A.; Wray, V.; Vlietinck, A. J. *Phytochemistry* 1991, **30**, 1024.
- 5.1[170] Tanaka, R.; Inosiri, A.; Yoneda, M.; Ishida, T.; Namada, A.; Matsunaga, S. *Phytochemistry* 1990, **29**, 3263.
- 5.1[171] Dallacker, F.; Schubert, J. *Chem. Ber.* 1975, **108**, 95.
- 5.1[172] Pouchert, C. J. *The Aldrich Library of FT-IR Spectra*; Aldrich Chemical Company, Inc.: U.S.A., 1985, **2**, 1048C.
- 5.1[173] Pouchert, C. J.; Behnke, J. *The Aldrich Library of ¹³C and ¹H FT NMR Spectra*, 3rd ed.; Aldrich Chemical Company, Inc.: U.S.A., 1993, **3**, 569A.
- 5.1[174] Hoke, M.; Haensel, R. *Arch. Pharm. (weinstein)* 1972, **305**, 33 (Ger) (*Chem. Abstr.* **76**, 13818k).

โครงการการย่อยกลุ่มที่ 5: การศึกษาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพด้านอื่น ๆ

โครงการวิจัยหน่วยที่ 2: พืชสกุล *Jatropha*

บทนำ

1. คำนำ

เป็นที่ทราบกันดีว่าพืชในวงศ์ Euphorbiaceae มีสารองค์ประกอบที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจหลายชนิด การศึกษาองค์ประกอบของพืชในวงศ์ดังกล่าวจึงเป็นหนทางที่จะได้สารออกฤทธิ์ตัวใหม่จากแหล่งใหม่ หรือสารออกฤทธิ์เดิมจากแหล่งใหม่ได้

2. ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

จากการศึกษาวรรณกรรมทางเคมี พบว่าพืชในสกุล *Jatropha* แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจหลายประการ ตัวอย่างเช่น น้ำยางสดจากมะละกอฝรั่ง (*J. multifida*) และ สบู่แดง (*J. gossypifolia* Linn.) สามารถป้องกันการติดเชื้อแผลเปื่อย แผลพุพองได้^{5.2[1]} ผลที่ได้จากการบดรากแห้งของสบู่ดำ (*J. curcus*) สามารถใช้พอกแก้ปวดแสบ และ เมล็ดมีฤทธิ์เป็นยาระบาย^{5.2[2]} เป็นต้น จากรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ ทำให้ผู้วิจัยมุ่งเลือกศึกษาพืชใน genus นี้

ต้นหนุมานนั่งแท่น มีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า *Jatropha podagrica* Hook.f. (วงศ์ Euphorbiaceae) เป็นพืชที่มาจากต่างประเทศ มักใช้เป็นไม้ประดับ ต้นสูงประมาณ 5-6 ฟุต มีดอกสีส้มแดงขนาดเล็ก ลำต้นขรุขระ ใบมีลักษณะคล้ายมะละกอ แต่มีรอยหยักน้อยกว่า และขนาดเล็กกว่า มีสรรพคุณลดไข้ ขับปัสสาวะ แก้โรคดีซ่าน และ โกลโนเรีย^{5.2[3]} เป็นต้น

3. วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 1) เพื่อทำการแยกสารองค์ประกอบจากส่วนสกัด (crude extracts) และส่วนย่อย (fractions) ให้บริสุทธิ์
- 2) เพื่อหาสูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้บริสุทธิ์ โดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี
- 3) ในกรณีที่ได้สารบริสุทธิ์ปริมาณมากพอ จะทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่นฤทธิ์ด้านการเจริญเติบโตของจุลชีพ เป็นต้น

4. ผลการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มีรายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชใน genus *Jatropha* มากพอสมควร ได้แก่

J. gossypifolia: ในค.ศ. 1976 Kupchan และคณะ สามารถแยก macrocyclic diterpene Jatrophone [5.2(1)] ที่มีฤทธิ์ต้านการมีเม็ดเลือดขาวมาก และฉีดปกติได้^{5.2[4]} ในปี ค.ศ. 1981 Chatterjee และคณะ รายงานการแยกสาร lignan 2-piperonylidene-3-verytryl-3R- γ -butyrolactone [5.2(2)] จากส่วนสกัดปิโตรเลียมจากต้น ราก และเมล็ดของ สบู่แดง^{5.2[5]} ต่อมาในปี ค.ศ.1984 และ 1988 Banerji และคณะ สามารถแยกสาร lignan gadain [5.2(3)]ได้อีก^{5.2[6]}

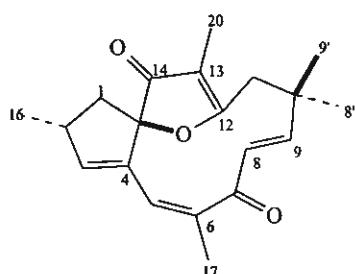
J. curcus: ในปี ค.ศ. 1986 Thebtaranonth และคณะ สามารถแยก curcusone A-D [5.2(4)]-5.2(7)] และสารอื่น^{5.2[7]} ได้จากส่วนสกัดเฮกเซนของราก และต่อมาใน ค.ศ. 1994 สามารถแยกสาร coumarino-lignan propacin , jatropin [5.2(8)] และสารอื่นเพิ่มเติมได้อีก^{5.2[6]}

J. glandulifera: ในปีค.ศ. 1984 Parthasarathy และคณะ สามารถแยก jatropholone A [5.2(9)] และ [5.2(8)] จากส่วนสกัดเมทานอลของรากได้^{5.2[9]}

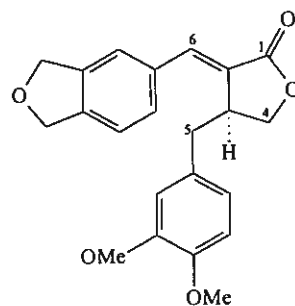
J. macrorhiza: ปี ค.ศ.1973 Wiedhopf และคณะ รายงานการแยก Jatropham [5.2(10)]^{5.2[3]} และใน ค.ศ. 1977 Torrence และคณะ ทำการศึกษารากสด และพบ acetylauritolic acid [5.2(11)] ซึ่งคุณสมบัติยับยั้งเซลล์มะเร็ง P-388 lymphocytic leukemia ได้^{5.2[10]}

J. podagrica มีรายงานการแยกสารองค์ประกอบได้บ้างแล้ว ได้แก่ citral, thymol, carvacrol, 5-hydroxy-7, 4'-dimethoxyflavone, β -amyrin, β -sitosterol [5.2(12)], quercitin, apigenin, vitexin [5.2(13)], isovitexin, rutin และ alkaloid tetramethylpyrazine [5.2(14)].

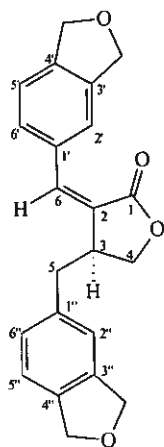
แต่จากการศึกษาเบื้องต้นของผู้วิจัยพบว่า ส่วนสกัดจากราก และใบยังมีสารอื่นอีก จึงทำการศึกษาต่อ



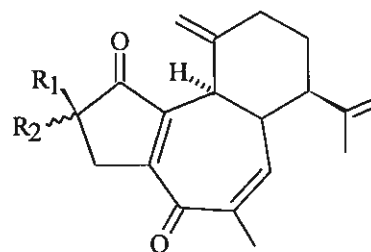
5.2(1)



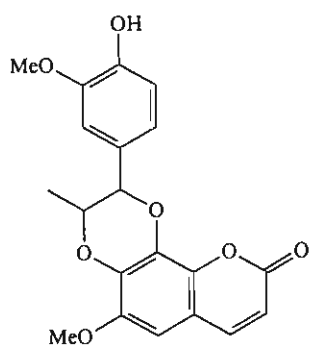
5.2 (2)



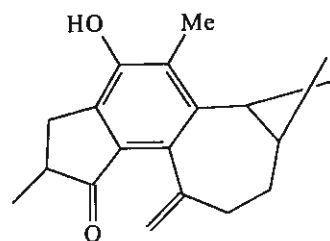
5.2 (3)



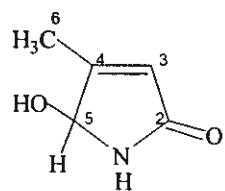
	R ₁	R ₂
5.2 (4)	Me	H
5.2 (5)	H	Me
5.2 (6)	Me	OH
5.2 (7)	OH	Me



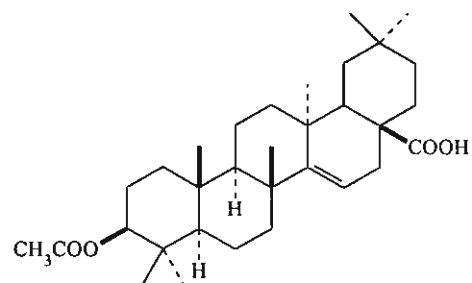
5.2 (8)



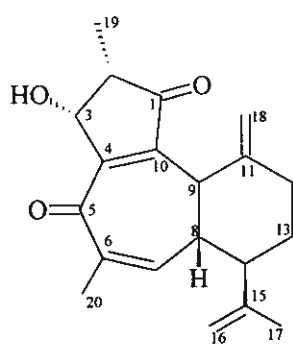
5.2 (9)



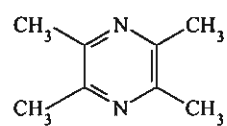
5.2 (10)



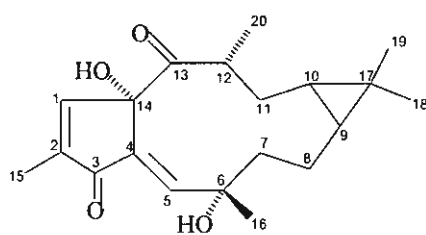
5.2 (11)



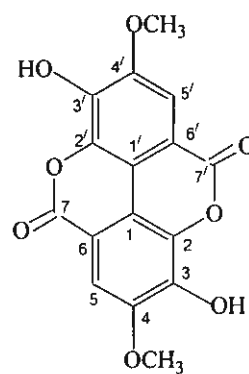
5.2 (13)



5.2 (14)



5.2 (17)



5.2 (18)

ผลการวิจัย และอภิปรายผล

จากการดำเนินการแยกโดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟี ทำให้สามารถแยกสารบริสุทธิ์ 5 ชนิดจากสารสกัดเฮกเซน และบิวทานอลของใบ และได้สาร 5 ชนิดจากส่วนสกัดเฮกเซน และบิวทานอลของราก การหาเอกลักษณ์ของสารดังกล่าวอาศัยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

1. Ethyl palmitate [5.2(15)]

สาร [5.2(15)] เป็นของเหลวใส (37 mg) EI-MS สเปกตรัมให้ molecular ion ที่ m/z 248 แสดงว่า สูตรโมเลกุลของสารนี้ = $C_{18}H_{36}O_2$ IR สเปกตรัมแสดงการดูดกลืนแสง ที่ ν_{max} 1735 cm^{-1} ของหมู่คาร์บอนิลของ ester ^1H NMR สเปกตรัมแสดงสัญญาณที่ δ_H 4.1 (q, 2H) ของหมู่ $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCO}-$ ที่ δ_H 2.2 (m, 2H) เป็นของหมู่ $-\text{CH}_2\text{CO}-$ สัญญาณที่ δ_H 1.2 (br s, ~28H) แสดงหมู่เมทิลิน ที่ δ_H 0.8 (t, 3H) ของหมู่เมทิล จากข้อมูลดังกล่าวทำให้สรุปได้ว่า สาร [5.2(15)] คือ ethyl palmitate

2. β -Sitosterol [5.2(12)]

สาร [5.2(12)] เป็นผลึกลักษณะเป็นแผ่น mp. $138-139^\circ\text{C}$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) ทั้งค่า R_f value และ ^1H NMR สเปกตรัม บ่งบอกความคล้ายคลึงกับ β -sitosterol ซึ่งเคยแยกได้แล้วในพืชต้นอื่น จึงสรุปได้ว่า สาร[5.2(12)] คือ β -sitosterol

3. β -Sitosteryl glucopyranoside [5.2(16)]

สาร [5.2(16)] เป็นของแข็งสีขาว mp. $277-278^\circ\text{C}$ ทั้ง R_f value และ ^1H NMR มีลักษณะเฉพาะ และคล้ายคลึงกับ β -sitosteryl glucopyranoside ที่เคยแยกได้แล้วในพืชต้นอื่น จึงสรุปว่า สาร [5.2(16)] คือ β -sitosteryl glucopyranoside

4. Jatropha [5.2(10)]

สาร [5.2(10)] เป็นผลึกรูปเข็มไม่มีสี mp. $114-116^\circ\text{C}$ (จาก CHCl_3) EI-MS แสดง molecular ion ที่ m/z 113 แสดงว่า สาร [5.2(10)] มีสูตรโมเลกุล $\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2$ IR สเปกตรัมแสดงการดูดกลืนแสงที่ ν_{max} $3450-3400\text{ cm}^{-1}$ (br OH and NH) ที่ 1675 และ 1640 cm^{-1} ของหมู่ C=O ที่ conjugated กับ double bond ^1H NMR แสดงสัญญาณของหมู่ methyl ที่เกาะอยู่ที่ β -C ของ α,β -unsaturated carbonyl ที่ δ_H 1.74 (3H, dd, $J=1.3, 1.5\text{ Hz}$) สัญญาณที่ δ_H 7.65 (br s) และ 5.00 (1H, br s) เป็นสัญญาณของ NH และ OH proton สัญญาณ multiplet ที่ δ_H 6.65 (1H) รวมกับสัญญาณใน ^{13}C NMR spectrum ที่ δ_C

172.2 (s, C=O), 141.5 (d, olefinic secondary carbon) และ 135.8 (s, olefinic quaternary carbon) แสดงว่า โมเลกุลมี β -substituted- α,β -unsaturated carbonyl อยู่ สัญญาณที่ δ_H 5.45 (1H, t, $J=1.3$ Hz) รวมกับ δ_C ที่ 78.8 (d) แสดงว่าโมเลกุลมีหมู่ CH-OH ที่เกาะอยู่กับ electron withdrawing group

จากข้อมูลทั้งทางกายภาพ และ ข้อมูลทางสเปกโตรสโคปี ทำให้สรุปได้ว่า สาร [5.2(10)] เป็นสารประกอบ lactam jatropham หรือที่เรียกว่า 5-hydroxy-4-methyl-3-pyrrolin-2-one ที่เคยมีรายงานไว้แล้วใน *Jatropha macrorrhiza* ^{5.2[3]}

5. Vitexin [5.2(13)]

สาร [5.2(13)] เป็นของแข็งสีเหลือง mp. 267-269°C EI-MS สเปกตรัม ให้ molecular ion ที่ m/z 432 ซึ่งแสดงว่าสารมีสูตรโมเลกุล $C_{21}H_{20}O_{10}$ IR สเปกตรัมแสดงการดูดกลืนแสงที่ ν_{max} 3600-3100 cm^{-1} ของหมู่ OH ที่ 1650 cm^{-1} ของหมู่ α,β -unsaturated carbonyl ^1H NMR สเปกตรัมแสดงสัญญาณที่ δ_H 13.2 (s) ของ phenolic OH ที่ตำแหน่ง 5 ของสารประกอบ flavonoid ที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้กับหมู่คาร์บอนิล สัญญาณ doublet 2 ชุด ที่ค่อนข้าง downfield ที่ δ_H 8.0 (2H, d, $J=8.6$ Hz) และ 6.9 (2H, d, $J=8.6$ Hz) แสดง p-disubstituted aromatic ring ที่ conjugated กับ electron withdrawing group สำหรับสัญญาณที่ δ_H 6.7 (1H, s) เป็นสัญญาณของ α -H ของ β -substituted α,β -unsaturated carbonyl หรือ C-3-H ใน flavone nucleus สัญญาณที่ δ_H 6.2 (1H, s) เป็น aromatic proton ในวง A ของ flavone สำหรับ doublet ที่ δ_H 4.75 (1H, $J=9.9$ Hz) และกลุ่มของสัญญาณ multiplet ระหว่าง δ_H 3.8-3.2 ซึ่งบางส่วนถูกบังโดยสัญญาณของตัวทำละลาย (DMSO- d_6) แสดงว่า สารมี glucose เกาะอยู่

จากข้อมูลข้างต้นซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ vitexin ที่มีรายงานไว้สอดคล้องกัน ทำให้สรุปได้ว่า สาร [5.2(13)] คือ vitexin

6. Jatrophin [5.2(8)]

สาร [5.2(8)] EI-MS ให้ molecular ion ที่ m/z 370 ($C_{20}H_{18}O_7$) การให้แสงสีม่วงภายใต้แสงยูวี ประกอบกับการมีสัญญาณที่ δ_H 7.70 (1H, d, $J=9.5$ Hz) และ 6.32 (1H, d, $J=9.4$ Hz) เป็นเอกลักษณ์ของ H-4 และ H-3 ของหมู่ coumarin สัญญาณที่แสดงว่าโมเลกุลมี trisubstituted aromatic ring ได้แก่ สัญญาณที่ δ_H 6.95 (1H, d, $J=8.1$ Hz) 6.91 (1H, dd, $J=1.8$ และ 8 Hz) และ 6.86 (1H, d, $J=1.8$ Hz) สัญญาณที่ δ_H 3.92 และ 3.88 เป็นของหมู่ OMe 2 หมู่ สำหรับสัญญาณที่ δ_H 4.7 (1H, d, $J=7.8$ Hz) ที่ 4.35 (1H, m) และ doublet ของหมู่ methyl ที่ 1.29 (3H, d, $J=6.4$ Hz) แสดงว่า สาร

[5.2(8)] เป็น coumarino-lignan ที่มีการเชื่อมต่อกันในลักษณะวงแหวน dioxan ระหว่าง coumarin กับ phenyl propane.

จากข้อมูลข้างต้นสอดคล้องกับข้อมูลของ jatrophin ที่เคยมีรายงานว่าแยกได้จาก *Jatropha glandulifera* และ *J. curcus*

7. Curculathyrane A [5.2(17)]

สาร [5.2(17)] ให้ ion ที่ mass สูงสุดที่ m/z 314 ซึ่งสอดคล้องกับ $C_{20}H_{26}O_3$ ^1H NMR สเปกตรัม แสดง downfield olefinic H singlet ที่ δ_H 6.98 และ 6.59 ของ β -H ในระบบ α, β -unsaturated carbonyl สัญญาณที่เป็น multiplet ที่ δ_H 2.83 (1H) c แสดงว่ามีหมู่ methine ที่เชื่อมกับหมู่คาร์บอนิล สำหรับสัญญาณ multiplet ที่ δ_H 0.53(1H) และ 0.46 (1H) แสดงว่าโมเลกุลมี cyclopropane ring อยู่ ^1H NMR แสดงว่ามีหมู่เมทิลอยู่ 5 หมู่ โดย 1 หมู่ที่ δ_H 1.95 (3H, d, $J = 1.3$ Hz) เป็นหมู่ที่เกาะอยู่ที่ β -C ของ α, β -unsaturated carbonyl หมู่เมทิลอีกหมู่หนึ่งที่ δ_H 1.32 เกาะอยู่กับ carbinolic carbon สำหรับหมู่ที่อยู่ high field ที่สุดที่ให้สัญญาณเป็น singlet ที่ δ_H 0.97(3H) และ 0.66 (3H) น่าจะอยู่ที่ cyclopropane ring และมีหมู่เมทิลหมู่เดียวที่แสดงสัญญาณเป็น doublet ที่ δ_H 1.05 (3H, d, $J = 6.8$ Hz)

จากข้อมูลข้างต้น ทำให้สรุปได้ว่า สาร [5.2(17)] คือ curculathyrane A โดยข้อมูล ^1H NMR ทั้งหมดสอดคล้องกับค่าที่มีรายงานไว้^{5.2[7]}

8. Ellagic acid-4, 4'-dimethylether [5.2(18)]

สาร [5.2(18)] เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน mp. $>330^\circ C$ EI-MS แสดง molecular ion ที่ m/z 330 ทำให้ทราบว่า สูตรโมเลกุลของสารนี้เท่ากับ $C_{16}H_{10}O_8$ IR สเปกตรัมแสดงการดูดกลืนแสงที่ ν_{max} 3295 (br OH), 1730 (lactone carbonyl) และที่ 1620, 1595, 1490 (aromatic) ^1H NMR (DMSO- D_6) สเปกตรัม แสดงสัญญาณที่ δ_H 4.05 (2x3H, s, OCH_3) สัญญาณ singlet ที่ δ_H 7.5 (2x1H, s) เป็นของ aromatic protons

จากข้อมูลทางกายภาพ และ ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี ทำให้สรุปได้ว่า สาร [5.2(18)] คือ ellagic acid-4,4'-dimethylether^{5.2[12]}

วัสดุ และวิธีการ

การสกัด และการแยก

นำส่วนของต้น ใบ และ รากสด ของหนุมานั่งแท่น มาบดเป็นชิ้น แล้วแช่ในเอทานอลเป็นเวลาประมาณ 5 วัน เมื่อนำส่วนที่กรองได้ไปทำให้เข้มข้นโดยใช้ rotary evaporator ให้เหลือปริมาตรประมาณร้อยละ 20 แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตรประมาณครึ่งหนึ่งของส่วนที่เหลือ แล้วทำการสกัดด้วยเฮกเซน และ บิวทานอล ตามลำดับ ทำให้แยกสารจากส่วนใบได้เป็นส่วนสกัดเฮกเซน (9.81 g) ส่วนสกัดบิวทานอล (13.6 g) และส่วนสกัดน้ำจากส่วนรากเป็น ส่วนสกัดเฮกเซน (2.474 g) ส่วนสกัดบิวทานอล (9.49 g) และ ส่วนสกัดน้ำ (10.622 g) และจากส่วนลำต้น เป็นส่วนสกัดบิวทานอล (8.8 g) ตามลำดับ

คอลัมน์โครมาโตกราฟีส่วนสกัดเฮกเซนของใบ

นำส่วนสกัดเฮกเซนของใบ (9.81 g) มาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี (silica gel, Hexane, Hexane-CHCl₃, CHCl₃-MeOH) ทำให้แยกสารผสมออกได้เป็น 16 ส่วน ส่วนที่ 4 (0.240 g) ทำการแยกซ้ำ (silica gel, 2% CHCl₃-hexane) ทำให้ได้ส่วนย่อย 7 ส่วน (ส่วน 4.1-4.7) ส่วนย่อยที่ 4.4 มีลักษณะเป็นของเหลว (37 mg) ประกอบด้วย สาร [5.2 (15)] เมื่อทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีส่วนที่ 10 (2.24 g) โดยใช้ silica gel, CHCl₃ ทำให้ได้ 8 ส่วนย่อย (ส่วน 10.1-10.8) ทำการแยกส่วนย่อย 10.5 (973.9 mg) โดยใช้ 1:1 CHCl₃: Hexane ทำให้ได้ 6 ส่วนย่อย ส่วนย่อยที่ 2 (0.245 mg) เป็นสาร [5.2(12)]

การทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีส่วน 16 (550.3 mg) silica gel, CHCl₃: MeOH 93:7 ทำให้ได้ 11 ส่วนย่อย (ส่วน 16.1-16.11) ส่วนย่อย 16.10 ไม่ค่อยละลายใน CHCl₃ เป็นสาร [5.5(16)].

คอลัมน์โครมาโตกราฟีของส่วนสกัดบิวทานอลของใบ

นำส่วนสกัดบิวทานอลของใบ (13.6 g) มาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี (silica gel, 8:2 CHCl₃: Hexane, CHCl₃/MeOH) ทำให้แยกสารผสมได้ 10 ส่วน นำส่วนที่ 8 (2.1646 g) ไปทำการแยกซ้ำ (silica gel, CHCl₃-CHCl₃/MeOH 3:1) ทำให้ได้ 10 ส่วนย่อย (8.1-8.10) ส่วนย่อยที่ 8.4 (472.4 mg) ทำการแยกซ้ำ (3-6% MeOH-CHCl₃) ทำให้ได้ 14 ส่วน (8.4.1-8.4.14) ส่วนที่ 8.4.9 ให้สาร [5.2(10)] เป็นของแข็งไม่มีสี (36.9 mg) นำส่วนที่ 8.6 (363.6 mg) มาทำการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี (silica gel, 3% MeOH/CHCl₃) ทำให้ได้ส่วนย่อย 14 ส่วน. (8.6.1-8.6.14) ส่วนย่อยที่ 8.6.11 ประกอบ

ด้วยสาร [5.2(16)] ส่วนที่ 10 (3.6004 g) เมื่อตั้งทิ้งไว้มีตะกอนสีเหลืองเกิดขึ้น เมื่อทำการตกผลึกตะกอนจาก pyridine ทำให้ได้สาร [5.2(13)]

คอลัมน์โครมาโตกราฟีของส่วนสกัดบิวทานอลของราก

นำส่วนสกัดบิวทานอลของราก (9.4785 g) มาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี (silica gel, 7:3 CHCl₃:Hexane -MeOH) ทำให้ได้ 13 ส่วน ทำการแยกส่วนที่ 3 ซ้ำ (1-5% MeOH/CHCl₃) ทำให้ได้ 19 ส่วนย่อย (3.1-3.19) ส่วน 3.9 (5.1 mg) ทำการแยกด้วย HPLC (RP-18, 6:4 MeOH:H₂O) ทำให้ได้ 9 ส่วน (ส่วน 3.9.1-3.9.9) ส่วน 3.9.4 (1.2 mg) ได้แก่ สาร [5.2(8)] ส่วนย่อย 3.9.9 (0.9 mg) ได้แก่ สาร [5.2(17)] ส่วนที่ 6 (309.3 mg) เมื่อทำการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ทำให้ได้ 7 ส่วนย่อย (6.1-6.7) ส่วน 6.3 ซึ่งมีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็ม (4.6 mg) mp. 112-115 °C ได้แก่ สาร [5.2(10)] ส่วนที่ 5 (383.5 mg) เมื่อทำการแยกซ้ำ (95:5 CHCl₃:MeOH) ได้ 9 ส่วนย่อย (5.1-5.9) ส่วนที่ 5.4 (198.7 mg) เมื่อตั้งทิ้งไว้มีของแข็งสีเหลืองตกตะกอน ตะกอนที่ได้คือ สาร [5.2(18)]

Jatropha ; 5-Hydroxy-4-methyl-3-pyrroline-2-one¹ [สาร [5.2(10)]]; ผลึกรูปเข็ม mp. 112-115 °C (CHCl₃-MeOH) (lit. mp. 131-132 °C); IR $\nu_{\max}$ (KBr) cm⁻¹: 3240 (br), 1675, 1640, 1405, 1300, 1280, 1220, 1055, 860; ¹H-NMR (CD₃COCD₃) δ_H 7.65 (br s), 6.65 (1H, m, H-3), 5.45 (1H, t, *J* = 1.3 Hz, H-5), 5.00 (1H, br s), 1.74 (3H, dd, *J* = 1.3, 1.5 Hz, H-6); ¹³C-NMR (CD₃COCD₃) δ_C 172.8 (s), 141.5 (d), 135.8 (s), 78.8 (d), 9.9 (q) EIMS *m/z* (rel. int.) 113 (*M*⁺, 25), 98 (63), 94.0 (18), 85 (48), 80 (12), 69 (50), 57 (15), 41 (100), 39 (68)

Vitexin; 8-C- β -D-glucopyranosylapigenin [5.2 (13)] mp. 267-269 °C (lit. mp. 264-265 °C); IR $\nu_{\max}$ (KBr) cm⁻¹: 3600-3100 (br), 1650, 1620, 1560, 1510, 1430, 1390, 1370, 1255, 1240, 1180, 1120, 1090, 1050, 1020, 890, 860, 840; ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ_H 13.2 (1H, s, C-5-OH), 8.0 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, H-2', H-6'), 6.9 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, H-3', H-5'), 6.7 (1H, s, H-3), 6.2 (1H, s, H-6), 4.75 (1H, d, *J* = 9.9 Hz, H-1''), 3.8-3.2 (m, glucose H obscured by solvent signal); EIMS *m/z* (rel. int.): 432 (*M*⁺, 5), 444 (12), 378 (4), 342 (8), 322 (6), 312 (12), 298 (8), 284 (20), 283 (100), 270 (12), 254 (4), 248 (8), 204 (4), 203 (4), 181 (4), 165 (30), 133 (4), 121 (9)

Jatrophin [5.2 (8)] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ_H 7.70 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-4), 6.95 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5'), 6.91 (1H, dd, $J = 8.0, 1.8$ Hz, H-6'), 6.86 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2'), 6.52 (1H, s, H-5), 4.7 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-7'), 4.35 (1H, m, H-8'), 3.92 (3H, s, OMe), 3.88 (3H, s, OMe), 1.29 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-9'); EIMS m/z (rel. int.): 370 (M^+ , 18.9), 328 (4), 311 (2), 295 (2), 165 (11), 164 (100), 163 (7), 149 (22), 132 (4), 121 (12), 103 (19), 91 (18), 79 (31), 65 (10), 51 (29)

Curculathyrane A [5.2 (17)] $^1\text{H-NMR}$ (MeOH-d_4): δ_H 6.98 (1H, s, H-1), 6.59 (1H, s, H-5), 4.61 (1H, br H), 2.83 (1H, m, H-12), 1.95 (3H, d, $J = 1.3$ Hz, H-15), 1.73 (m), 1.54 (m), 1.35 (m), 1.32 (3H, s, H-16), 1.05 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-20), 0.97 (3H, s, H-19), 0.90 (m), 0.66 (3H, s, H-18), 0.53 (m, H-10), 0.46 (m, H-9); EIMS m/z (rel. int.): 314 ($M^+ - \text{H}_2\text{O}$, 6), 299 (2), 296 (2), 286 (3), 282 (2), 271 (9), 257 (8), 253 (5), 245 (5), 243 (5), 231 (4), 229 (4), 225 (4), 215 (5), 201 (9), 189 (10), 175 (13), 163 (19), 161 (24), 149 (14), 147 (16), 137 (12), 135 (12), 124 (19), 123 (20), 109 (23), 95 (34), 91 (30), 81 (34), 79 (30), 69 (38), 67 (53), 55 (57), 53 (34), 43 (100)

Ellagic acid-4,4'-dimethyl ether [5.2 (18)]; mp. $> 330^\circ\text{C}$ (lit. mp. $360-363^\circ\text{C}$) IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 3295 (br), 2965, 1730, 1620, 1595, 1490, 1445, 1355, 1290, 1220, 1180, 1115, 1085, 1000, 930, 800, 775; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): δ_H 4.05 (2x3H, s), 7.5 (2x1H, s); EIMS m/z (rel. int.): 330 (M^+ , 100), 315 (50), 300 (5), 287 (13), 165 (5)

เอกสารอ้างอิง

- 5.2[1] Horsten, S. F. A. J.; van den Berg, A. J. J.; Kettenes-van den Bosch, J. J.; Leeftang, B. R.; Labadie, R. P. *Planta Med.* 1996, **62**, 46.
- 5.2[2] Oliver-Bever, B. J. *Ethnopharmacol.* 1983, **9**, 1.
- 5.2[3] Wiedhopf, R. M.; Trumgull, E. R.; Cole, J. R. *J. Pharm. Sci.* 1973, **62**, 1207.
- 5.2[4] Kupchan, S. M.; Sigel, C. W.; Matz, M. J.; Gilmore, C. J.; Bryan, R. F. *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 2295.
- 5.2[5] Chatterjee, A.; Das, B.; Pascard, C.; Prange, T. *Phytochemistry* 1981, **20**, 2047.
- 5.2[6] Banerji, J.; Das, B.; Chatterjee, A.; Shoolery, J. N. *Phytochemistry* 1984, **23**, 2323.
- 5.2[7] Naengchamnong, W.; Thebtaranonth, Y.; Wiriyaichitra, P. Okamoto, K. T.; Clardy, J. *Tetrahedron Lett.* 1986, **27**, 2439.
- 5.2[8] Naengchamnong, W.; Tarnchompoo, B.; Thebtaranonth, Y. *J. Sci. Soc. Thailand* 1994, **20**, 73.
- 5.2[9] Parthasarathy, M. R.; Saradhi, K. P. *Phytochemistry* 1984, **23**, 867.
- 5.2[10] Torrance, S. J.; Wiedhopf, R. M. and Cole, J. R. *J. Pharm. Sci.* 1977, **66**, 1348.
- 5.2[11] Odebiyi, O. O. *Planta Med.* 1980, **38**, 144.
- 5.2[12] Sato, T. *Phytochemistry* 1987, **26**, 2124.
- 5.2[13] Harborne J. B.; Mabry, T. J.; Mabry, H. *The Flavonoids*. Chapman & Hall: London, 1975.

โครงการการย่อยกลุ่มที่ 5: การศึกษาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพด้านอื่น ๆ

โครงการวิจัยหน่วยที่ 3: พืช *Macaranga denticulata*

บทนำ

1. คำนำ

เป็นที่ทราบกันดีว่า พืชในวงศ์ Euphorbiaceae มีสารองค์ประกอบที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจหลายชนิด การศึกษาองค์ประกอบของพืชในวงศ์ดังกล่าวจึงเป็นหนทางที่จะได้สารออกฤทธิ์ตัวใหม่จากแหล่งใหม่ หรือสารออกฤทธิ์เดิมจากแหล่งใหม่ได้

2. ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำวิจัย

จากการศึกษาวรรณกรรมทางเคมี พบว่า พืชในสกุล *Macaranga* แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจหลายประการ ตัวอย่างเช่น ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพ^{5.3[1]} และฤทธิ์ cytotoxic^{5.3[2]} เป็นต้น ผู้วิจัยจึงเลือกพืชในสกุลนี้ ได้แก่ ต้นตองเตบ ที่มีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า *Macaranga denticulata* เพื่อศึกษาโดยละเอียด

3. วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 1) เพื่อทำการแยกสารองค์ประกอบจากส่วนสกัด(crude extracts) และส่วนย่อย(fractions) ให้บริสุทธิ์
- 2) เพื่อหาสูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้บริสุทธิ์ โดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี
- 3) ในกรณีที่ได้สารบริสุทธิ์ปริมาณมากพอ จะทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่นฤทธิ์ด้านการเจริญเติบโตของจุลชีพ เป็นต้น

4. ผลการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

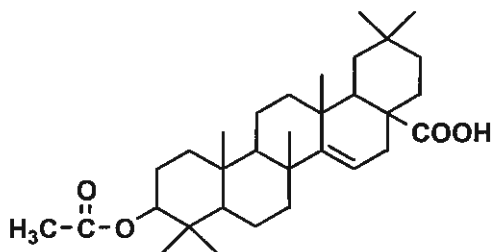
มีรายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชใน genus *Macaranga* มากพอสมควร เช่น *Macaranga indica*,^{5.3[3-5]} *M. peltata*,^{5.3[6-8]} *M. pleiostemona*,^{5.3[9]} *M. tanarius*,^{5.3[10-12,15]} *M. vedeliana*,^{5.3[13-14]} *M. sinensis*^{5.3[16]} เป็นต้น โดยสารประกอบที่แยกได้มีหลายชนิด เช่น flavonoids,^{5.3[3,7,9,13,14]} tannins,^{5.3[12,15,16]} bergenins^{5.3[8]} และ terpenes^{5.3[6,10,11]} เป็นต้น แต่มีรายงานเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีของต้นตองเตบน้อยมาก^{5.3[17]} และสารที่รายงานเป็นสารจำพวก triterpenes เท่านั้น แต่จากการศึกษาเบื้องต้นของผู้วิจัยพบว่า ส่วนสกัดจากเปลือก และใบยังมีสารอื่นอีก จึงทำการศึกษาต่อ

ผลการวิจัย และอภิปรายผล

จากการดำเนินการแยกโดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟี ทำให้สามารถแยกสารบริสุทธิ์ 3 ชนิดจากสารสกัดเฮกเซน 1 ชนิดจากส่วนสกัดคลอโรฟอร์มของเปลือก และ 5 ชนิดจากส่วนสกัดคลอโรฟอร์มของใบ การหาเอกลักษณ์ของสารดังกล่าวอาศัยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

1. 3-Acetylaleuritolic acid [5.3(1)]

สาร [5.3(1)] เป็นของแข็งไม่มีสี มีจุดหลอมเหลว 302-304 °C EI-MS สเปกตรัมให้ molecular ion ที่ m/z 498 แสดงว่ามีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{32}H_{50}O_4$ IR สเปกตรัมแสดงการดูดกลืนแสงที่ $\nu_{\max}$ 3384 (br) และ 1685 cm^{-1} ของหมู่คาร์บอกซิล และที่ $\nu_{\max}$ 1732 cm^{-1} ของหมู่คาร์บอนิลของเอสเตอร์ ^1H NMR สเปกตรัมแสดงสัญญาณของหมู่ quaternary methyl เป็น 7x singlets ที่ δ_{H} 0.83-0.94 และสัญญาณของหมู่เมทิลของ acetate ที่ δ_{H} 2.03 (s, 3H) ^{13}C NMR สเปกตรัมแสดง 32 คาร์บอน โดยที่ 8 คาร์บอนเป็นของหมู่ methyl 10 คาร์บอนเป็นของหมู่ methylene 5 คาร์บอนของหมู่ methine และ 9 คาร์บอนเป็น non protonated carbon สัญญาณจาก ^1H NMR ที่ δ_{H} 5.52(1H, dd, $J=3.3$ และ 9.9 Hz) พร้อมกับสัญญาณจาก ^{13}C NMR ที่ δ_{C} 116.9 (d) และ 160.5(s) คล้ายกับที่พบใน triterpene กลุ่ม taraxer-14-en.^{5.3[18]} สัญญาณใน ^1H NMR ที่ δ_{H} 4.45 (1H, dd, $J=3.3$, 9.9 Hz) แสดงสัญญาณของ oxymethine proton ที่เกาะอยู่กับหมู่ OAc ณ ตำแหน่ง C-3 ค่า ^3J coupling constant ที่วัดได้ = 3.3 และ 9.9 Hz แสดงว่า C-3-H เป็น α -oriented. MS spectrum ที่แสดง base peak ที่ m/z 234 และ 189 เป็นข้อมูลเสริมที่แสดงว่าสารนี้เป็น taraxer-14-ene เพราะไอออนดังกล่าวเกิดโดยการขาดออกของพันธะระหว่าง C-11-C-12 และ C-8-C-14.^{5.3[19]} จากข้อมูลข้างต้นทำให้สามารถสรุปได้ว่า สาร [5.3(1)] คือ 3-acetylaleuritolic acid ข้อมูลทางสเปกโตรสโกปีของสาร [5.3(1)] สอดคล้องกับข้อมูลของ 3-acetylaleuritolic acid ที่เคยมีรายงานไว้^{5.3[20]}



5.3 (1)

2. Aleuritolic acid [5.3(2)]

สาร [5.3(2)] เป็นผลึกไม่มีสี มีจุดหลอมเหลว 288-290 °C EI-MS ให้ molecular ion ที่ m/z 456 แสดงว่ามีสูตรโมเลกุล $C_{30}H_{48}O_3$ IR สเปกตรัมแสดงการดูดกลืนแสงที่ $\nu_{\max}$ 3416 (br) และ 1687 cm^{-1} ของหมู่คาร์บอกซิล แบนด์ที่ $\nu_{\max}$ 1633 cm^{-1} (weak) แสดง C-C double bond ^1H NMR สเปกตรัมแสดงสัญญาณของหมู่ quaternary methyl คล้ายที่พบในสาร [5.3(1)] แต่ไม่พบสัญญาณที่ δ_H 2.03 (3H, s) ของหมู่ acetyl และสัญญาณที่เป็น double doublet ที่ δ_H 4.45 ที่พบในสาร [5.3(1)] กลับถูกแทนที่ด้วยสัญญาณที่ high field กว่าที่ δ_H 3.2 (1H, br m) แสดงว่าสัญญาณนี้เป็นของ oxymethine proton ที่เกาะอยู่กับหมู่ hydroxyl MS spectrum ก็ให้ base peak ที่ m/z 234 และ 189 คล้ายของสาร [5.5(1)] แสดงว่าเป็นสารกลุ่มเดียวกัน

จากข้อมูลข้างต้นจึงสามารถสรุปได้ว่า สาร [5.3(2)] คือ aleuritolic acid

3. สารผสมระหว่าง β -Sitosterol และ stigmasterol [5.3(3)]

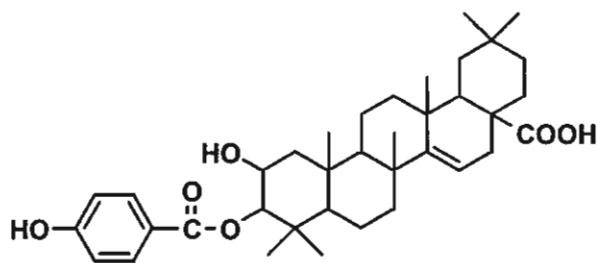
สาร [5.3(3)] เป็นผลึกลักษณะเป็นแผ่นไม่มีสี mp. 120-121 °C ^1H NMR สเปกตรัมแสดงสัญญาณของ methyl proton ระหว่าง δ_H 0.69-1.02 และสัญญาณที่ δ_H 3.5 (1H, m) และ 5.2 (br s) เป็นของ oxymethine proton และ vinylic proton ของ trisubstituted double bond

ทั้งค่า R_f value และ ^1H NMR สเปกตรัม บ่งบอกความคล้ายคลึงกับ β -sitosterol ซึ่งเคยแยกได้แล้วในพืชต้นอื่น แต่ ^1H NMR แสดงสัญญาณของ trans-disubstituted olefinic proton ที่ประมาณ δ_H 5.10 ด้วย แต่ค่า integration ไม่สอดคล้องกับสัญญาณทั้งหมดนัก จึงทราบได้ว่าสัญญาณดังกล่าวเป็นสัญญาณ olefinic proton ของ stigmasterol ซึ่งมีปะปนอยู่ด้วยในปริมาณน้อย จึงสรุปได้ว่า สาร [5.3(3)] คือ สารผสมระหว่าง β -sitosterol และ stigmasterol

4. สาร 2-Hydroxyaleuritolic acid-3-p-hydroxybenzoate [5.3(4)]

สาร [5.3(4)] เป็นของแข็งสีขาว mp. 276-280 °C EI-MS แสดง molecular ion ที่ m/z 592 แสดงว่ามีสูตรโมเลกุล $C_{37}H_{51}O_6$ IR สเปกตรัมแสดงแถบการดูดกลืนแสงที่ $\nu_{\max}$ 3408 (br) และ 1689 cm^{-1} ของหมู่คาร์บอกซิล และที่ $\nu_{\max}$ 1610, 1510 และ 1454 cm^{-1} ของหมู่ aryl ^1H NMR สเปกตรัม แสดงสัญญาณระหว่าง δ_H 0.9-1.19 (7x3H, s) ของ quaternary methyl group proton สัญญาณที่ δ_H 5.81 และ สัญญาณ ^{13}C ที่ δ_C 117.3 (d) และ 160.5 (s) แสดงว่าสาร [5.3(4)] มี taraxer-14-en skeleton คล้ายกับสาร [5.3(1)] และ [5.3(2)] สัญญาณ doublet ที่เห็นไม่ชัดเจนนักที่ δ_H 5.3 (1H, d, $J = 10\text{ Hz}$)

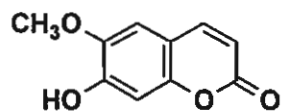
และ multiplet ที่ δ_H 4.3 (1H, dt, $J = 4.3$ และ 10 Hz) ร่วมกับสัญญาณของ ^{13}C ที่ δ_C 66.5 (d) และ 85.3 (d) แสดงว่าโมเลกุลมีหมู่ oxymethine proton อยู่ 2 หมู่ สัญญาณที่ δ_H 7.3 (2H, d, $J = 8.6$ Hz) และ 8.3 (2H, d, $J = 8.7$ Hz) ร่วมกับสัญญาณของ ^{13}C NMR ที่ δ_C 116.4 (d), 132.6 (d), 122.6 (s), 163.5 (s) และ 167.2 (s) บอกว่ามีหมู่ p-hydroxybenzoyl ester อยู่ การมีสัญญาณ ^1H NMR ที่ low field δ_H 5.3 (1H, d, $J = 10$ Hz) และหมู่ p-hydroxybenzoyl group อยู่ ทำให้ทราบได้ว่า หมู่ $OCOC_6H_4-OH-p$ เกาะอยู่ที่ตำแหน่ง C-3 จาก multiplicity ของ C-3-H ที่เป็น doublet ทำให้ทราบได้ว่า มีส่วน CH (R)-CH(OCOAr)-C(CH₃)₂- ในโมเลกุล จึงสามารถกำหนดตำแหน่งของหมู่ oxymethine H อีกหมู่หนึ่งที่ C-2 ได้ จากการศึกษาข้อมูล 2D NMR ทำให้ทราบได้ว่า สาร [5.3(4)] คือ 2-hydroxyaleuritic acid-3-p-hydroxy benzoate และสามารถกำหนดตำแหน่งของ ^1H และ ^{13}C ทุกสัญญาณได้โดยละเอียด มีรายงานว่า สารนี้ถูกค้นพบครั้งแรกในรากของต้น *Maprounea africana*^{5.3[21]}



5.3(4)

5. สาร Scopoletin [5.3(5)]

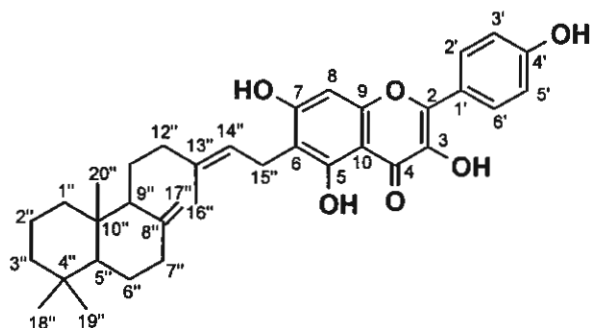
สาร [5.3(5)] เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน IR สเปกตรัมแสดงการดูดกลืนแสงที่ ν_{max} 3288 และ 1713 cm^{-1} ของหมู่ไฮดรอกซิล และหมู่คาร์บอนิล ตามลำดับ ^1H NMR สเปกตรัม (CDCl₃) แสดงสัญญาณเป็น AB doublet ที่ δ_H 7.56 (1H, d, $J = 9.5$ Hz) และ 6.20 (1H, d, $J = 9.5$ Hz) ของ olefinic proton ใน α,β -unsaturated carbonyl สัญญาณที่ δ_H 6.85 (1H, s) และ 6.78 (1H, s) เป็นสัญญาณของ aromatic protons และที่ δ_H 3.9 (3H, s) เป็นของหมู่ OMe ที่ติดอยู่ที่กับ aromatic ring จากคุณสมบัติที่สามารถเปล่งแสงสีม่วงเมื่อส่องดูด้วย UV lamp ประกอบกับข้อมูลข้างต้น ทำให้สรุปได้ว่า สาร [5.3(5)] คือ scopoletin^{5.3[22]}



5.3 (5)

6. สาร Denticulaflavonol [5.3(6)]

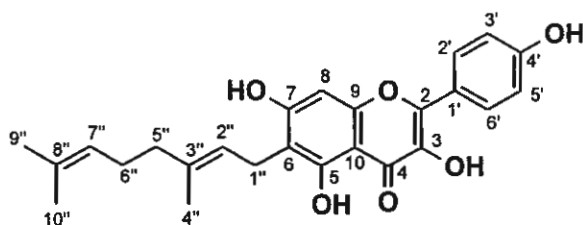
สาร [5.3(6)] เป็นสารเหนียวสีเหลือง HR-EIMS สเปกตรัมให้ molecular ion ที่ m/z 558.2981 แสดงว่ามีสูตรโมเลกุล $C_{35}H_{42}O_6$ IR สเปกตรัมแสดงการดูดกลืนแสงที่ ν_{max} 3232 และ 1647 cm^{-1} ของหมู่ไฮดรอกซิล และคาร์บอนิลตามลำดับ ^1H NMR ($CDCl_3$) ที่แสดงสัญญาณเป็น doublet 2 ชุดที่ δ_H 8.12 (d, $J = 8.9$ Hz) และ 6.97 (d, $J = 8.8$ Hz) ประกอบกับ ^{13}C NMR ที่ δ_C 157.3 (s), 129.6 (d), 123.5 (s) และ 115.6 (d) แสดงว่าโมเลกุลมี para-substituted phenol ring สัญญาณที่ δ_H 6.48 (1H, s) และที่ downfield δ_H 12.1 เป็นสัญญาณของ H-8 และ C-5-OH ของ flavonoid ซึ่งบ่งบอกว่ามี kaempferol unit, $C_{15}H_{10}O_6$ ในโมเลกุล ส่วนที่เหลือที่มีสูตร $C_{20}H_{31}$ สามารถคำนวณ double bond equivalent = 5 จากการมีสัญญาณของ exocyclic methylene group ที่ δ_H 4.80 (1H, d, $J = 1.2$ Hz) และ 4.49 (1H, s) สัญญาณของ vinylic proton ของ trisubstituted double bond ที่ δ_H 5.27 สัญญาณของ หมู่ $C=C-CH_3$ ที่ δ_H 1.84 (3H, s) พร้อมกับสัญญาณของหมู่ quaternary methyl 3 หมู่ที่ค่อนข้าง high field ที่ δ_H 0.86, 0.79 และ 0.67 ทำให้เสนอได้ว่าส่วนที่เหลือในโมเลกุลเป็น labdane type diterpene จากการศึกษโดยใช้เทคนิค 2D NMR ต่าง ๆ ซึ่งประกอบด้วย HMQC, HMBC, ^1H - ^1H COSY ทำให้ทราบเพิ่มเติมได้อีกว่าส่วน labdanyl unit เกาะอยู่ที่ C-6 ของ kaempferol nucleus จากการดูรายละเอียด ของข้อมูล 2D NMR และค่า ^{13}C chemical shift ของ labdane diterpene ที่เกี่ยวข้องต่าง ๆ จากวรรณกรรมทางเคมีที่มีรายงานไว้บ้างแล้ว^{5,3[23]} ทำให้สามารถกำหนดตำแหน่งของสัญญาณต่าง ๆ ทั้ง ^1H และ ^{13}C ได้ จึงสรุปได้ว่า สาร [5.3(6)] คือ 6-[15"-labda-8"(17"), 13"(14")-dienyl]-kaempferol



5.3 (6)

7. สาร Macarangenin [5.3(7)]

สาร [5.3(7)] เป็นของแข็งสีเหลือง มีจุดหลอมเหลว 140-144 °C EI-MS สเปกตรัมให้ molecular ion ที่ m/z 422 แสดงว่ามีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{25}H_{26}O_6$ IR สเปกตรัมแสดงการดูดกลืนแสงที่ $\nu_{\max}$ 3275 และ 1647 cm^{-1} ของหมู่ไฮดรอกซิล และหมู่คาร์บอนิล ตามลำดับ ^1H NMR สเปกตรัม (CDCl_3) ซึ่งแสดงสัญญาณเป็น AB doublet ที่ δ_{H} 8.1 (2H, d, $J = 8.5$ Hz) และ 6.95 (2H, d, $J = 8.3$ Hz) ประกอบกับสัญญาณจาก ^{13}C NMR ที่ δ_{C} 115.6(d), 123.4 (s), 129.6 (d), และ 157.6 (s) บ่งบอกว่าโมเลกุลมี para-disubstituted phenol ring การมีสัญญาณของ olefinic proton 2 สัญญาณที่ δ_{H} 5.2 (1H, m) และ 5.0 (1H, m) และ allylic protons ที่ δ_{H} 3.47 (2H, d, $J = 7.1$ Hz) พร้อมกับสัญญาณที่ δ_{H} 2.10 (4H, m) และ สัญญาณ singlets ของหมู่เมทิล 3 หมู่ ที่ δ_{H} 1.84, 1.68 และ 1.59 บ่งบอกว่า โมเลกุลมีหมู่ geranyl หรือ neryl อยู่ สัญญาณซึ่งมีลักษณะเป็น broad singlet ที่ δ_{H} 6.45 เป็นสัญญาณของ C-6-H หรือ C-8-H ในโครงสร้างของ flavonoid สัญญาณที่ค่อนข้าง downfield ที่ δ_{H} 12.1 (1H, s) บ่งบอกว่าเป็นสัญญาณของ C-5-OH ซึ่งสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้กับออกซิเจนอะตอมของหมู่คาร์บอนิลที่ C-4 ใน flavonoid nucleus จากการใช้เทคนิค 2D NMR ต่างๆ ทำให้ทราบว่า สาร [5.3(7)] คือ macarangenin ซึ่งมีรายงานว่าพบในต้น *Macaranga vedeliana* แล้ว^{5,3[14]}

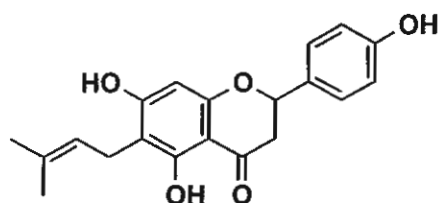


5.3 (7)

8. สาร Sophoraflavanone B [5.3(8)]

สาร [5.3(8)] เป็นของเหลวหนืดสีเหลือง CI-MS สเปกตรัมให้ $[M-1]^+$ ion ที่ m/z 339 แสดงว่ามีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{20}H_{20}O_5$ ^1H NMR สเปกตรัม ($MeOH-d_4$) ซึ่งแสดงเป็น AB doublet ที่ δ_H 7.29 (2H, d, $J = 8.5$ Hz) และ 6.80 (2H, d, $J = 8.6$ Hz) ประกอบกับสัญญาณจาก ^{13}C NMR ที่ δ_C 116.69 (d), 129.34 (d), 131.99 (s), 159.21 (s) บ่งบอกว่าโมเลกุลมี para-disubstituted phenol ring การมีสัญญาณของ olefinic proton ที่ δ_H 5.12 (1H, m) และ allylic protons ที่ δ_H 3.14 (2H, d, $J=6.8$ Hz) รวมกับสัญญาณ singlet ของหมู่เมทิล 2 หมู่ที่ δ_H 1.58 (3H, s) และ 1.54 (3H, s) บ่งบอกว่ามีหมู่ prenyl อยู่ในโมเลกุล สัญญาณที่ δ_H 5.23 (1H, br d, $J = 12.7$ Hz) ซึ่งแสดงความเกี่ยวข้องกับสัญญาณที่ δ_H 3.01 (1H, dd, $J = 16.9, 13.0$ Hz) และ 2.64 (1H, dd, $J = 17.1, 2.9$ Hz) ใน ^1H - ^1H COSY สเปกตรัม แสดงว่าสัญญาณดังกล่าวเป็นสัญญาณของ C-2-H, C-3-H_a, C-3-H_b ใน flavanone nucleus การใช้เทคนิค 2D NMR ต่างๆทำให้สามารถกำหนดตำแหน่งของ ^1H และ ^{13}C ต่างๆได้ทั้งหมด จึงสามารถสรุปได้ว่า สาร [5.3 (8)] คือ sophoraflavanone B ซึ่งเคยมีรายงานการค้นพบแล้วในต้น *Sophora tomentosa*.^{5.3}

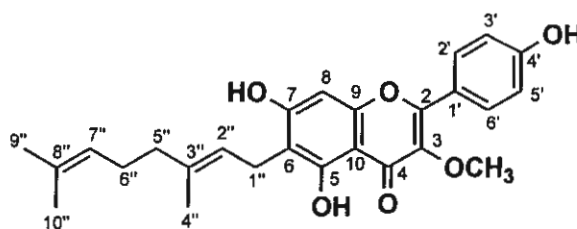
[24]



5.3 (8)

9. สาร 3-O-Methyl-macarangin [5.3(9)]

สาร [5.3(9)] เป็นของแข็งสีเหลือง HR-EIMS สเปกตรัมให้ molecular ion ที่ m/z 436.1894 แสดงว่ามีสูตรโมเลกุล $C_{26}H_{28}O_6$ IR สเปกตรัมแสดงการดูดกลืนแสงที่ $\nu_{\max}$ 3275, 1658 และ 1608 cm^{-1} ของหมู่ไฮดรอกซิล หมู่ α,β -unsaturated carbonyl และหมู่อะโรมาติก ตามลำดับ ^1H NMR ($\text{MeOH}-d_4$) ที่แสดงสัญญาณเป็น AB doublets ที่ δ_H 7.87 (2H, d, $J = 8.9\text{ Hz}$) และ 6.82 (2H, d, $J = 8.9\text{ Hz}$) ประกอบกับสัญญาณใน ^{13}C NMR ที่ δ_C 161.6 (s), 131.3 (d), 116.5 (d) และ 122.7 (s) แสดงว่าโมเลกุลมี para-disubstituted phenol ring อยู่ การมี base peak ใน MS สเปกตรัมที่ m/z 313 ($[\text{M}-\text{CH}=\text{CMeCH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{Me})_2]^+$, 100%) พร้อมกับการมีสัญญาณ olefinic proton 2 ตำแหน่ง ใน ^1H NMR สเปกตรัม ที่ δ_H 5.14 (1H, dd, $J = 7.2, 6.3\text{ Hz}$) และ 4.95 (1H, m) allylic protons ที่ δ_H 3.22 (2H, d, $J = 3.4, 1.7\text{ Hz}$) พร้อมกับการมีสัญญาณอีก 2 ชุดที่ δ_H 1.95 (2H, dd, $J = 7.6, 7.1\text{ Hz}$), 1.86 (2H, dd, $J = 7.4, 6.8\text{ Hz}$) และสัญญาณของหมู่เมทิล 3 หมู่ที่ δ_H 1.68 (s), 1.51(s) และ 1.45 (s) บอกให้รู้ว่ามีหมู่ geranyl อยู่ในโมเลกุล รายละเอียดส่วนใหญ่คล้ายสัญญาณที่พบใน macarangin [5.3(7)]^{5,3[14]} สัญญาณที่ δ_H 6.33 เป็นสัญญาณของ C-8-H ใน flavonoid nucleus สัญญาณที่ δ_H 3.66 เป็นของ OMe proton ซึ่งจากการใช้เทคนิค 2D NMR ทำให้ทราบว่า หมู่ OMe นี้เกาะอยู่ที่ C-3 จึงสรุปได้ว่า สาร [5.3(9)] คือ 3-O-methyl-macarangin



5.3 (9)

จากที่พบว่าสารสกัดส่วนคลอโรฟอร์มแสดงฤทธิ์เป็น antioxidant กับ DPPH บนแผ่น TLC จึงนำสารองค์ประกอบที่แยกได้บริสุทธิ์ในปริมาณมากพอไปทำการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันกับ DPPH เพื่อหา IC_{50} พบว่า สาร 5.3(5) และสาร 5.3(7) แสดง IC_{50} $0.342 \pm 0.026\text{ mM}$ และ $0.032 \pm 0.001\text{ mM}$ ตามลำดับ ผลที่ได้ชี้ให้เห็นว่าสาร 5.3(7) มีฤทธิ์ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน BHT (2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol, IC_{50} $0.031 \pm 0.001\text{ mM}$) ส่วนสาร 5.3(8) แสดงฤทธิ์ต่ำมากจึงไม่ได้หา IC_{50}

วัสดุ และวิธีการ

การสกัด และการแยก

นำส่วนเปลือกบดของต้นตองแตบ 1.796 kg มาทำการสกัดโดยเครื่อง Soxhlet extractor ใช้เฮกเซน คลอโรฟอร์ม และ เมทานอล ตามลำดับ ภายหลังการระเหยเอาตัวทำละลายออกทำให้ได้ สารสกัดเฮกเซน (7.394 g) สารสกัดคลอโรฟอร์ม (9.434 g) และ สารสกัดเมทานอล (369.71 g) การสกัดส่วนใบ (1.23 kg) ทำให้ได้สารสกัดเฮกเซน (57.74 g) ของใบ ส่วนสกัดคลอโรฟอร์ม (33.772 g) ของใบ และสารสกัดเมทานอล (123.0 g) ของใบ ตามลำดับ

คอลัมน์โครมาโตกราฟีของสารสกัดเฮกเซนของเปลือก

นำส่วนสกัดเฮกเซนของเปลือก (6.985 g) มาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี (silica gel, Hexane, Hexane-CHCl₃, CHCl₃-MeOH) ทำให้แยกสารผสมออกได้เป็น 7 ส่วน ส่วนที่ 2 (3.18 g) ทำการแยกซ้ำ (silica gel, Hexane-CHCl₃ 7:3) ทำให้ได้ส่วนย่อย 8 ส่วน (ส่วน 2.1-2.8) นำส่วนย่อยที่ 2.6 (2.55 g) มาทำการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีต่อ (silica gel, Hexane-CHCl₃ 1:1) ทำให้ได้ 7 ส่วนย่อย (ส่วน 2.6.1-2.6.7) ทำการแยกส่วนย่อยที่ 2.6.6 (0.222 g) ซ้ำอีก 1 ครั้ง โดยใช้ Hexane:CHCl₃ 1:4 ทำให้ได้สาร [5.3(3)] (0.0485 g) ส่วนย่อยที่ 2.6.7 (0.2899 g) ภายหลังการตกผลึกใหม่ให้สาร [5.3(1)] บริสุทธิ์ (0.1279 g) การทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีส่วนที่ 4 (1.743g) โดยใช้ silica gel, Hexane-CHCl₃ 3:7 ถึง 1:9 ทำให้ได้ 8 ส่วนย่อย (ส่วน 4.1-4.8) ส่วนย่อย 4.4 ภายหลังการตกผลึกให้สาร [5.3(2)] (0.0576 g)

สารสกัดส่วนคลอโรฟอร์มของเปลือก (9.434 g) เมื่อทำการแยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟี (silica gel, Hexane-CHCl₃ ถึง CHCl₃-MeOH) ได้ 8 ส่วน ส่วนที่ 7 (2.706 g) ทำการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ Hexane-EtOAc 85:15 ได้ 7 ส่วนย่อย (ส่วน 7.1-7.7) ส่วนย่อยที่ 7.5 (0.095 g) ภายหลังการแยกซ้ำด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี (CHCl₃) อีกครั้ง ได้สาร [5.3(4)] (0.014 g)

คอลัมน์โครมาโตกราฟีของสารสกัดคลอโรฟอร์มของใบ

นำส่วนสกัดคลอโรฟอร์มมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี (silica gel, Hexane-CH₂Cl₂ 15:85 ถึง CH₂Cl₂-MeOH 3:2) ทำให้แยกสารผสมออกได้เป็น 9 ส่วน นำส่วนที่ 6 (1.015 g) มาทำการแยกซ้ำ (silica gel, CH₂Cl₂ ถึง CH₂Cl₂-MeOH 3:2) ทำให้ได้ส่วนย่อย 6.1-6.5 ส่วนย่อยที่ 6.4 เมื่อทำการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี (silica gel, Hexane-

CH₂Cl₂ 1:4 ถึง CH₂Cl₂) ทำให้ได้ส่วยย่อยอีก 3 ส่วน (ส่วยย่อย 6.4.1-6.4.3) สาร [5.3(5)] (20 mg) อยู่ในส่วยย่อยที่ 6.4.1 สำหรับส่วยย่อยที่ 6.4.2 เมื่อแยกซ้ำอีก (silica gel, Hexane-EtOAc 9:1) ทำให้ได้สาร [5.3(6)] (3 mg) สาร [5.3(7)] บริสุทธิ์ (120 mg) ได้ภายหลังการนำส่วยย่อยที่ 6.4.3 มาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำ (silica gel, Hexane-CH₂Cl₂ 1:4 ถึง CH₂Cl₂-MeOH 9:1) ส่วนที่ 8 (6.895 g) เมื่อทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี (silica gel, Hexane-EtOAc 3:1 ถึง EtOAc-MeOH 9:1) ทำให้ได้ 6 ส่วยย่อย (ส่วยย่อย 8.1-8.6) เมื่อนำส่วยย่อยที่ 8.3 (3.2141 g) มาทำการแยกซ้ำ (silica gel, Hexane-EtOAc 9:1) สามารถแยกได้ 12 ส่วน (ส่วยย่อย 8.3.1-8.3.12) สาร [5.3(8)] (31 mg) และ สาร [5.3(9)] (20 mg) บริสุทธิ์ได้จากส่วยย่อย 8.3.6 (0.841 g) ภายหลังการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้ง (silica gel, Hexane-EtOAc 4:1)

สาร [5.3(1)]: ผลึกไม่มีสี mp. 302-304 °C; IR $\nu_{\max}$ (KBr) cm⁻¹: 3384, 2938, 2860, 1732, 1685, 1470, 1365, 1295, 1245, 1213, 1028, 1000, 830, 759; ¹H NMR (CDCl₃): δ_{H} 5.52 (1H, dd, $J = 3.3, 7.9$ Hz), 4.45 (1H, dd, $J = 3.3$ and 9.9 Hz), 2.30 (2H, m), 2.03 (3H, s), 0.94 (2x3H, s), 0.92 (3H, s), 0.90 (3H, s), 0.87 (3H, s), 0.83 (3H, s); ¹³C NMR (CDCl₃): δ_{C} 184.54 (s, C-28), 171.0 (s, CO), 160.5 (s, C-14), 116.86 (d, C-15), 80.84 (d, C-3), 55.54 (d, C-5), 51.52 (s, C-17), 49.03 (d, C-9), 41.30 (s, C-18), 40.68 (t, C-7), 39.0 (s, C-8), 37.90 (s, C-10), 37.65 (s, C-4), 37.34 (t, C-1), 37.27 (s, C-13), 35.28 (t, C-19), 33.62 (t, C-12), 33.28 (t, C-21), 31.80 (q, C-29), 31.24 (t, C-16), 30.63 (t, C-22), 29.30 (s, C-20), 28.63 (q, C-30), 27.93 (q, C-23), 26.50 (q, C-26), 23.43 (t, C-2), 22.46 (q, C-27), 21.29 (q, CH₃CO), 18.78 (t, C-6), 17.28 (t, C-11), 16.58 (q, C-24), 15.64 (q, C-25); EIMS m/z (rel. int.): 498 (1.3), 483 (3.4), 438 (3), 423 (8), 395 (3), 344 (8), 269 (9), 244 (26), 234 (100), 202 (22), 189 (91), 135 (30), 119 (23), 69 (29), 43 (53)

สาร [5.3(2)]: ผลึกไม่มีสี (72.1 mg) mp. 288-290 °C; IR $\nu_{\max}$ (KBr) cm⁻¹: 3416, 2932, 2864, 1687, 1467, 1337, 1360, 1294, 1251, 1212, 1032, 994, 830; ¹H NMR (CDCl₃): δ_{H} 5.81 (1H, m), 3.41 (1H, m), 2.78 (2H, m), 2.30 (1H, m), 1.19 (3H, s), 1.08 (3H, s), 1.01 (3H, s), 1.00 (3H, s), 0.90 (3H, s); EIMS m/z (rel. int.): 456 (4), 423 (4.4), 395 (3.7), 377 (2.4), 356 (0.4), 327 (0.8), 287 (22), 269 (7.3), 248 (75.5), 234 (100), 203 (33.2), 189 (98.8), 149 (15.7), 135 (44), 95 (35), 69 (98)

สาร [5.3(3)]: ของแข็งสีขาว mp. 120-121 °C; ^1H NMR (CDCl_3): δ_{H} 5.35 (1H, d, $J = 4$ Hz), 3.50 (1H, m), 1.02 (3H, s), 0.95 (3H, s), 0.82 (6H, s), 0.69 (3H, s)

สาร [5.3(4)]: ของแข็งไม่มีสี mp. 276-280 °C; IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 3408, 2936, 2856, 1689, 1610, 1510, 1454, 1400, 1330, 1275, 1165, 1111, 1048, 990, 850, 768; ^1H NMR(pyridine- d_5): δ_{H} 8.3 (2H, d, $J = 8.7$ Hz), 7.3 (2H, d, $J = 8.6$ Hz), 5.81 (1H, dd, $J = 3.2, 7.8$ Hz), 5.27 (1H, d, $J = 10$ Hz), 4.32 (1H, dt, $J = 4.3, 10$ Hz), 2.81 (2H, m), 2.31 (1H, dd, $J = 4.4, 12.6$ Hz), 1.58 (1H, m), 1.15 (3H, s), 1.09 (3H, s), 1.08 (3H, s), 1.06 (3H, s), 1.02 (2x3H, s), 0.95 (3H, s); ^{13}C NMR (pyridine- d_5): δ_{C} 180.5 (s, C-28), 167.17 (s, C-7'), 163.47 (s, C-4'), 160.58 (s, C-14), 132.58 (d, C-2', C-6'), 122.60 (s, C-1'), 117.33 (d, C-15), 116.44 (d, C-3', C-5'), 85.26 (d, C-3), 66.53 (d, C-2), 55.66 (d, C-5), 51.32 (s, C-17), 49.52 (d, C-9), 47.79 (t, C-1), 42.33 (s, C-18), 41.28 (t, C-7), 39.95 (s, C-4), 39.31 (s, C-10), 37.85 (s, C-13), 36.03 (t, C-19), 34.47 (t, C-12), 33.88 (t, C-21), 32.67 (t, C-16), 32.47 (q, C-29), 31.75 (t, C-22), 29.69 (s, C-20), 29.32 (q, C-30), 29.32 (q, C-30), 29.30 (s, C-8), 28.91 (q, C-23), 26.38 (q, C-26), 22.57 (q, C-27), 19.08 (t, C-6), 18.24 (q, C-24), 18.01 (t, C-11), 16.91 (q, C-25); EIMS m/z (rel. int.): 593 ($M^+ + 1$, 0.9), 547 (1.8), 439 (3.4), 393 (7.5), 359 (19.7), 285 (3.3), 234 (8.3), 203 (11.5), 189 (16.2), 121 (100)

สาร [5.3(5)]: IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 3288, 1713; ^1H NMR (CDCl_3): δ_{H} 7.56 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-4), 6.85 (1H, s), 6.78 (1H, s), 6.20 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-3), 3.9 (3H, s, OMe)

สาร [5.3(6)]: $[\alpha]_{\text{D}}^{26} -131.8^\circ$ (c 0.050, CHCl_3); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ): 207 (4.67), 270 (4.13), 329 (4.04) nm; IR ν_{max} (film) cm^{-1} : 3232, 2921, 1647, 1542, 1508, 1363, 1180, 1087, 883, 841; ^1H NMR (CDCl_3): δ_{H} 8.12 (2H, d, $J = 8.9$ Hz, H-2', 6'), 6.97 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3', 5'), 6.48 (1H, s, H-8), 5.27 (1H, dd, $J = 7.3, 6.5$ Hz, H-14"), 4.80 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-17"), 4.49 (1H, s, H-17b"), 3.49 (2H, d, $J = 7.0$ Hz, H-15"), 2.4 (1H, ddd, J

= 12.7, 4.1, 2.3 Hz, H-7_a"), 2.19 (1H, m, H-12_a"), 1.90 (1H, ddd, $J = 13.7, 13.3, 4.7$, H-7_b"), 1.85 (1H, m, H-12_b"), 1.84 (1H, m, H-16"), 1.56 (1H, m, H-9"), 1.47 (1H, m, H-11_a"), 1.43 (1H, m, H-11_b"), 1.37 (1H, m, H-3_a"), 1.15 (1H, ddd, $J = 13.4, 13.2, 4.0$ Hz, H-3_b"), 1.05 (1H, dd, $J = 9.9, 2.7$, H-5"), 0.97 (1H, ddd, $J = 12.8, 12.8, 3.9$ Hz, H-1_b"), 0.86 (3H, s, H-10"), 1.79 (3H, s, H-19"), 0.67 (3H, s, H-20"); ¹³C NMR (CDCl₃): δ_C 175.3 (s, C-4), 161.7 (s, C-7), 158.0 (s, C-5), 157.3 (s, C-4'), 155.0 (s, C-9), 148.6 (s, C-8"), 146.0 (s, C-2), 140.7 (s, C-13"), 135.5 (s, C-3), 129.6 (d, C-2', 6'), 123.5 (s, C-1'), 120.6 (d, C-14"), 115.6 (d, C-3', 5'), 109.4 (s, C-6), 106.2 (t, C-17"), 103.2 (s, C-10), 94.3 (d, C-8), 156.0 (d, C-9"), 55.5 (d, C-5"), 42.1 (t, C-3"), 39.6 (s, C-10"), 39.0 (t, C-1"), 38.5 (t, C-12"), 38.3 (t, C-7"), 33.6 (q, C-18"), 24.4 (t, C-6"), 21.7 (q, C-19"), 21.4 (t, C-15"), 19.4 (t, C-11"), 16.4 (q, C-16"), 14.5 (q, C-20"); HR-EIMS m/z 558.2978 [M]⁺ (calcd. for C₃₅H₄₂O₆, 558.2981)

สาร [5.3(7)]: IR ν_{max} (KBr) cm⁻¹: 3275, 2917, 1647, 1599, 1501, 1479, 1368, 1305, 1252, 1228, 1185, 1083 1035; ¹H NMR (CDCl₃): δ_H 12.10 (1H, s, C-5-OH), 8.10 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2', 6'), 6.9 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, H-3', 5'), 6.45 (1H, s, H-8), 5.25 (1H, m, H-2"), 5.05 (1H, m, H-7"), 3.47 (2H, d, $J = 7.1$ Hz, H-1"), 2.10 (4H, m, H-5", 6"), 1.83 (3H, s, H-4"), 1.68 (3H, s, H-10"), 1.59 (3H, s, H-9"); ¹³C NMR (CDCl₃): δ_C 175.2 (C-4), 161.8 (C-7), 157.6 (C-5), 157.4 (C-4'), 155.0 (C-9), 145.5 (C-2), 139.8 (C-3"), 135.4 (C-3), 132.1 (C-8"), 129.6 (C-2', 6'), 123.7 (C-7"), 121.3 (C-1'), 120.9 (C-2"), 115.6 (C-3'), 115.5 (C-5'), 109.4 (C-6), 103.5 (C-10), 94.3 (C-8), 39.7 (C-5"), 26.3 (C-6"), 25.7 (C-10"), 21.4 (C-1"), 17.7 (C-9"), 16.2 (C-4")

สาร [5.3(8)]: ¹H NMR (MeOH-d₄): δ_H 7.29 (2H, d, $J = 8.5$ Hz), 6.80 (2H, d, $J = 8.6$ Hz), 5.9 (1H, s), 5.23 (1H, br d, $J = 12.7$ Hz), 5.12 (1H, m), 3.01 (1H, dd, $J = 16.9, 13.0$ Hz), 2.64 (1H, dd, $J = 17.1, 2.9$ Hz), 1.58 (3H, s), 1.54 (3H, s); ¹³C NMR (MeOH-d₄): δ_C 198.5 (C-4), 166.7 (C-7), 163.5 (C-9), 162.0 (C-5), 159.2 (C-4'), 132.0 (C-1'), 131.8 (C-3"), 129.3 (C-2',

6'), 124.4 (C-2''), 116.7 (C-3', C-5'), 109.5 (C-6), 103.7 (C-10), 96.9 (C-8), 80.5 (C-2), 44.3 (C-3), 26.4 (C-5''), 22.9 (C-1''), 18.3 (C-4)

สาร [5.3(9)]: $[\alpha]_D^{26} -0.5254^\circ$ (c 0.590, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ): 204 (4.50), 214 (4.49), 270 (4.27), 339 (4.23) nm; IR (film) $\nu_{\max}$ cm^{-1} : 3275, 2936, 1658, 1608, 1568, 1471, 1359, 1286, 1233, 1177, 1089, 973, 815; ^1H NMR (MeOH- d_4): δ_{H} 7.87 (2H, d, $J = 8.9$ Hz, H-2', 6'), 6.82 (2H, d, $J = 8.9$ Hz, H-3', 5'), 6.33 (1H, s, H-8), 5.14 (1H, dd, $J = 7.22, 6.32$ Hz, H-2''), 4.95 (1H, m, H-7''), 3.66 (3H, s, 3-OMe), 3.22 (2H, m, H-1''), 1.95 (2H, dd, $J = 7.6, 7.1$ Hz, H-6''), 1.86 (2H, dd, $J = 7.4, 6.8$ Hz, H-5''), 1.68 (1H, s, H-4''), 1.51 (3H, s, H-9''), 1.45 (3H, s, H-10''); ^{13}C NMR (MeOH- d_4): δ_{C} 179.9 (C-4), 163.7 (C-7), 161.6 (C-4'), 159.7 (C-5), 156.3 (C-9), 139.8 (C-3), 135.7 (C-3''), 132.0 (C-8''), 131.3 (C-2', 6'), 130.6 (C-2), 125.4 (C-7''), 123.5 (C-2''), 122.7 (C-1'), 116.5 (C-3', 5'), 112.9 (C-6), 105.7 (C-10), 93.9 (C-8), 60.5 (C-3-OMe), 40.9 (C-5''), 27.7 (C-6''), 25.8 (C-9''), 22.2 (C-1''), 17.7 (C-10''), 16.3 (C-4''); EI-MS (70 eV) m/z (rel. int.): 437 ($[\text{M}+1]^+$, 1) 371 (21), 365 (11), 351 (18), 345 (21), 344 (61), 340 (16), 325 (15), 314 (20), 313 (100), 299 (10), 281 (5), 270 (13), 253 (6), 242 (9), 203 (10), 165 (8), 121 (55), 105 (11), 91 (18); HR-EIMS m/z 436.1894 $[\text{M}]^+$ (calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_6$, 436.1886)

วิธีทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน^{5.3 (25)}

นำสารที่จะทดสอบความเข้มข้นแน่นอน 50 μL ไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH ในเมทานอล ความเข้มข้น 0.004% 5 mL เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำสารผสมไปวัด absorbance ที่ความยาวคลื่น 517 nm คำนวณฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน เป็น IC_{50} ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ย

เอกสารอ้างอิง

- 5.3[1] Boily, Y.; Puyvelde, L. *J. Ethnopharmacol.* 1986, **16**, 1.
- 5.3[2] Han, G.; Che, C.; Fong, H.; Farnsworth, N.; Phoebe, J. C. *Fitoterapia* 1988, **59**, 242 (through Napralert, July 1, 1998).
- 5.3[3] Sultana, S.; Ilyas, M. *Phytochemistry* 1986, **25**, 953.
- 5.3[4] Sultana, S.; Ilyas, M. *Indian J. Chem.* 1987, **26B**, 801.
- 5.3[5] Parmar, V. S.; Gupta, S.; Sharma, V. K.; *Indian J. Chem.* 1989, **28B**, 268.
- 5.3[6] Anjaneyulu, A. S. R.; Reddy, D. S. K. *Indian J. Chem.* 1981, **20B**, 1033.
- 5.3[7] Anjaneyulu, A. S. R.; Redy, D. S. K. *Indian J. Chem.* 1980, **20B**, 251.
- 5.3[8] Ramaiah, P. A.; Row, L. R.; Reddy, D. S.; Anjaneyulu, A. S. R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans I* 1979, 2313.
- 5.3[9] Schutz, A. A.; Wright, A. D.; Rall, T.; Ticher, O. S. *Phytochemistry* 1995, **40**, 1273.
- 5.3[10] Hui, W. H.; Ng, K. K. *Phytochemistry* 1971, **10**, 1617.
- 5.3[11] Hui, W. H.; Li, M. M.; Ng, K. K. *Phytochemistry* 1975, **14**, 816.
- 5.3[12] Lin, J. H. *Arg. J. Food Drug Anal.* 1993, **1**, 273.
- 5.3[13] Thoison, O. E.; Hnawia, F. G.; Voegelien, F. G.; Sevenet, T. *Phytochemistry* 1992, **31**, 1439.
- 5.3[14] Hnawia, O.; Thoison, O.; Voegelien, F. G.; Bourret, D.; Sevenet, T. *Phytochemistry* 1990, **29**, 2367.
- 5.3[15] Lin, J. H.; Nonaka, G. I.; Nishioka, I. *Arg. Chem. Pharm. Bull.* 1990, **8**, 1218.
- 5.3[16] Lin, J. H. *Arg. J. Food Drug Anal.* 1994, **2**, 201.
- 5.3[17] Bose, S. N.; Khastgir, H. N. *Arg. Indian J. Chem.* 1973, **11**, 827.
- 5.3[18] Mahato, S. B.; Kundu, A. P. *Phytochemistry* 1994, **37**, 1517.
- 5.3[19] Budzikiewicz, H.; Djerassi, C.; Williams, D. H. *Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry*. Holden-Day: San Francisco, 1964.
- 5.3[20] Woo, W. S.; Wagner, H. *Phytochemistry* 1977, **16**, 2055.

- 5.3[21] Chaudhuri, S. K.; Fullas, ; Brown, D. M.; Wani, M. C.; Wall, M. E.
J. Nat. Prod. 1995, **58**, 1.
- 5.3[22] Pouchert, C. J.; Behnke, J. *The Aldrich Library of ^{13}C and ^1H FT NMR Spectra*. Edition I, Vol. II Aldrich Chemical Company, 1993, 1314.
- 5.3[23] Buckwalter, B. L.; Burfitt, I. R.; Nagel, A. A.; Wenkert, E.; Naf, F.
Helv. Chim. Acta 1975, **58**, 1567.
- 5.3[24] Komatsu, M.; Yokoe, I.; Shirataki, Y. *Chem. Pharm. Bull.* 1978, **26**, 3863.
- 5.3[25] Atta-ur-Rahman, Ngounou, F. N.; Choudhary, M. I.; Malik, S.; Makhmoor, T.; Nur-E-Alam, M.; Zareen, S.; Lontsi, D.; Ayafor, J. F.; Sondengam, B. L. *Planta Med.* 2001, **67**, 335.

โครงการย่อยกลุ่มที่ 5: การศึกษาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพด้านอื่น ๆ

โครงการวิจัยหน่วยที่ 4 มังคุด *Garcinia mangostana* L.

บทนำ

1. คำนำ

พืชในสกุล *Garcinia* หลายชนิดที่ใช้เป็นยาสมุนไพรพื้นบ้าน เช่น ผลมะปูด (*G. dulcis* (Roxb.) Kurz), มะดัน (*G. schomburgkiana* Pierre) ใช้เป็นยาแก้ไอ ละลายเสมหะ เป็นยาระบายอ่อน ๆ, ใบและรากของส้มแขก (*G. atroviridis* Griff.) ใช้เป็นยาแก้ปวดหู เปลือกและผลของรงทอง (*G. lateriflora* Blume) ใช้เป็นยาแก้ท้องเสียและโรคเกี่ยวกับลำไส้ ใบชะมวง (*G. cowa* Roxb.) ใช้เป็นยาระบาย แก้ไข้ แก้กระหายน้ำ ละลายเสมหะ เปลือกผลมังคุด (*G. mangostana* L.) ใช้รักษาบาดแผลที่เป็นหนอง แผลเปื่อย และแก้ท้องร่วง^{5,4[1]} เป็นต้น

2. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

จากรายงานวิจัยที่เกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากเปลือกผลมังคุด (*Garcinia mangostana* L.) พบสารประกอบ xanthone เป็นส่วนใหญ่^{5,4[2]} ซึ่งแสดงฤทธิ์ต่าง ๆ เช่น ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่าง ๆ^{5,4[3]} เช่น *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Epidermophyton floccosum*, *Alternaria solani* มีสมบัติต้าน HIV-1 protease^{5,4[4]} มีฤทธิ์เป็น antioxidant^{5,4[5]} เป็นต้น

ปริมาณสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ในสมุนไพรนั้นอาจมีไม่เท่ากันในแต่ละฤดูกาล ช่วงเวลาที่เก็บสมุนไพรจึงมีความสำคัญ เนื่องจากยังไม่เคยมีรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับองค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากเปลือกผลมังคุดในระยะที่ไม่สุก ทำให้ผู้วิจัยมุ่งศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเปลือกมังคุดดิบ ซึ่งคาดว่าจะได้ xanthone ชนิดใหม่และมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ

3. วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อทำการแยกสารองค์ประกอบจากส่วนสกัด หรือส่วนย่อย หาสูตรโครงสร้าง และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเปลือกผลมังคุดดิบ

4. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ได้มีรายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเปลือกผลมังคุดดังนี้ Yates และคณะ^{5.4[6]} (1958) แยก α -mangostin [5.4(1)] จากส่วนสกัด benzene ของเปลือกผล เปลือกต้น และยางมังคุด. Yates และคณะ^{5.4[7]} (1968) ได้แยก [5.4(1)] และ β -mangostin [5.4(2)] จากส่วนสกัด petroleum ether ของยางมังคุด Jefferson และคณะ^{5.4[8]} (1970) พบ γ -mangostin [5.4(3)] จากส่วนสกัด benzene ของเปลือกผลมังคุด Govindachari และคณะ^{5.4[9]} (1971) แยก gartanin [5.4(4)] และ 8-desoxygartanin [5.4(5)] นอกเหนือจาก mangostin, β -mangostin และ γ -mangostin จากส่วนสกัด hexane ของเปลือกผลมังคุด Sen และคณะ^{5.4[10]} (1980) พบ 1,6-dihydroxy-7-methoxy-8-(3-methylbut-2-enyl)-6',6'-dimethylpyrano(2',3':3,2)xanthone [5.4(6)] จากส่วนสกัด petroleum ether ของเปลือกผลมังคุด; Sen และคณะ^{5.4[11]} (1981) แยก trioxygenated xanthone 2 ชนิดคือ 1,5-dihydroxy-2-(3-methylbut-2-enyl)-3-methoxy-xanthone [5.4(7)] และ 1,7-dihydroxy-2-(3-methylbut-2-enyl)-3-methoxyxanthone [5.4(8)] จากส่วนสกัด petroleum ether ของเปลือกผลมังคุด ซึ่งคาดว่าสารทั้งสองนี้อาจเป็นสารต้นตอของการสังเคราะห์ polyoxygenated xanthone. Sen และคณะ^{5.4[12]} (1982) พบ tetraoxygenated xanthone 3 ชนิดได้แก่ garcinone A [5.4(9)], garcinone B [5.4(10)] และ garcinone C [5.4(11)] จากส่วนสกัด chloroform ของเปลือกผลมังคุด นอกเหนือไปจาก mangostin และ γ -mangostin Sen และคณะ^{5.4[13]} (1986) แยก garcinone D [5.4(12)] จากส่วนสกัด chloroform ของเปลือกผลมังคุด. Mahabusarakam และคณะ^{5.4[14]} (1987) แยก 1-isomangostin [5.4(13)], 3-

isomangostin [5.4(14)], 3-isomangostin hydrate [5.4(15)] และ 1-isomangostin hydrate [5.4(16)] จากส่วนสกัด benzene นอกจากนี้ยังสามารถแยก demethylcalabaxanthone [5.4(17)] และ 1,3,7-trihydroxy-2,8-di-(3-methylbut-2-enyl)xanthone [5.4(18)] จากส่วนสกัด acetone ของเนื้อผลมังคุด (aril). Balasubramanian และคณะ^{5.4[16]} (1988) แยก BR-xanthone A [5.4(19)] จากส่วนสกัด petroleum ether และ benzene สำหรับส่วนสกัด acetone แยกได้ mangostin, gartanin และ BR-xanthone B [5.4(20)] จากเปลือกผลมังคุด. Dutta และคณะ^{5.4[18]} (1987) และ Sakai และคณะ^{5.4[22]} (1993) แยก garcinone E [5.4(21)] จากส่วนสกัด benzene ของเปลือกผลมังคุด. Asai และคณะ^{5.4[17]} (1995) ได้แยก mangostinone [5.4(22)] ซึ่งเป็น xanthone ชนิดใหม่ที่มีหมู่ geranyl จากส่วนสกัด benzene ของเปลือกผลมังคุด. Chairungsrilerd และคณะ^{5.4[18]} (1996) พบกลุ่มสารที่มีขั้วต่ำได้แก่ mangostin, γ -mangostin, gartanin, 8-desoxygartanin, 1,6-dihydroxy-7-methoxy-8-(3-methylbut-2-enyl)-6',6'-dimethylpyrano(2',3':3,2)xanthone, garcinone E, 1,3,7-trihydroxy-2,8-di-(3-methylbut-2-enyl)xanthone และ epicatechin สำหรับกลุ่มสารที่มีขั้วสูงพบ mangostanol [5.4(23)] จากส่วนสกัด methanol ของเปลือกผลมังคุด. Gopalakrishnan และคณะ^{5.4[19]} (2000) แยก xanthone ชนิดใหม่ 2 ชนิด คือ 2,7-di-(3-methylbut-2-enyl)-1,3,8-trihydroxy-4-methylxanthone [5.4(24)] และ 2,8-di-(3-methylbut-2-enyl)-7-carboxy-1,3-dihydroxyxanthone [5.4(25)] จากส่วนสกัด methanol ของเปลือกผลมังคุดสด. Huang และคณะ^{5.4[20]} (2001) แยก xanthone ชนิดใหม่ 3 ชนิด และ benzophenone glucoside 1 ชนิด คือ garcimangosone A [5.4(26)], garcimangosone B [5.4(27)], garcimangosone C [5.4(28)] และ garcimangosone D [5.4(29)] จากส่วนสกัด ethanol ของเปลือกผลมังคุด นอกเหนือไปจากการพบ tovophyllin B [5.4(30)] ซึ่งเป็น xanthone ที่ไม่เคยมีการรายงานการพบในมังคุด

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้จากเปลือกผลมังคุดดังนี้

Mahabusarakam และคณะ^{5.4[21]} พบว่า mangostin [5.4(1)], γ -mangostin [5.4(3)], 1-isomangostin [5.4(13)], 3-isomangostin [5.4(14)] และ gartanin [5.4(4)] มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ทั้งสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา penicillin โดยที่ mangostin มีฤทธิ์ดีที่สุดในการต้าน *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ปกติ (MIC 15.6 $\mu\text{g/ml}$) และ มีฤทธิ์ในการต้าน *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา penicillin จำนวน 41 สายพันธุ์ (MIC 1.56–12.5 $\mu\text{g/ml}$)

Sakai และคณะ^{5.4[22]} (1993) พบว่า mangostin [5.4(1)], β -mangostin [5.4(2)], γ -mangostin [5.4(3)], 8-deoxygartanin [5.4(5)], gartanin [5.4(4)], garcinone B [5.4(10)] และ garcinone E [5.4(21)] สามารถต้านการระคายเคืองของหูหนูที่ถูกชักนำโดย teleocidin ซึ่งเป็น tumor promoter

Phongpaichit และคณะ^{5.4[23]} (1994) ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ mangostin ต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา methicillin (MRSA) จำนวน 49 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากผู้ป่วยของโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ MRSA 50 สายพันธุ์ และ *Enterococcus spp.* จำนวน 13 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลมหาราช นครเชียงใหม่ พบว่า MIC₉₀ ของ mangostin ต่อเชื้อ MRSA ทั้งสองกลุ่มมีค่าใกล้เคียงกัน คือ 3.125 และ 3.7 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ สำหรับเชื้อ *Enterococcus spp.* ทุกสายพันธุ์ mangostin มีฤทธิ์ในการต้านที่ดีเช่นกัน โดยมีค่า MIC₉₀ เท่ากับ 1 $\mu\text{g/ml}$

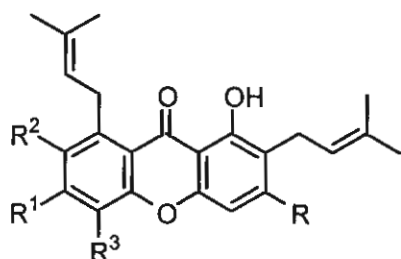
Iinuma และคณะ^{5.4[24]} (1996) พบว่า mangostin [5.4(1)] มีฤทธิ์ในการต้าน MRSA ที่แยกได้จากผู้ป่วยจากภาควิชาเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนาโกยา ประเทศญี่ปุ่นได้เช่นกัน โดยมีค่า MIC ในช่วง 1.57–12.5 $\mu\text{g/ml}$. Chairungsrilerd และคณะ^{5.4[18]} (1996) ได้นำ mangostanol [5.4(23)], α -mangostin [5.4(1)] และ γ -mangostin [5.4(3)] ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ cAMP phosphodiesterase โดยพบว่า มีค่า IC₅₀ ต่ำกว่า 47 24 และ 50 μM

ตามลำดับ ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวทำหน้าที่เปลี่ยน cAMP (ตัวสื่อสัญญาณตัวที่ 2 ของฮอร์โมน) เป็น AMP เมื่อเอนไซม์ถูกยับยั้งจึงทำให้การตอบสนองต่อฮอร์โมนของร่างกายยาวนานขึ้น

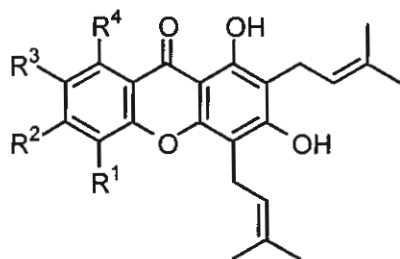
Chairungsrilerd และคณะ^{5.4[25]} (1996) พบว่า α -mangostin (ที่ความเข้มข้น 5 μ M) สามารถจับกับ receptor ของ histamine (histaminergic receptor blocking substance) โดยสามารถยับยั้งการหดตัวของเส้นเลือดแดงที่เกิดจากการชักนำของ histamine และ γ -mangostin (ที่ความเข้มข้น 5 μ M) สามารถจับกับ receptor ของ serotonin (serotonergic receptor blocking substance) โดยสามารถยับยั้งการหดตัวของเส้นเลือดแดงที่เกิดจากการชักนำของ serotonin. Chen และคณะ^{5.4[4]} (1996) พบว่าส่วนสกัดชั้น ethanol ของเปลือกผลมังคุดสด สามารถต้าน HIV-1 protease ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในการตัดโปรตีนสายยาวที่ไวรัสสร้างขึ้น ในขั้นตอนการเพิ่มจำนวน เพื่อให้ได้องค์ประกอบโปรตีน (protein components) ที่สามารถทำงานได้ เช่น โปรตีนบางชนิดทำหน้าที่เอนไซม์ หรือบางส่วนทำหน้าที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ไวรัส ดังนั้นเมื่อมีสมบัตียับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้จึงเท่ากับยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส และเมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายของส่วนสกัดชั้น ethanol ด้วย hexane ตามด้วย ethyl acetate และ butanol พบว่าส่วนสกัดชั้น ethyl acetate เป็นส่วนสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพดีที่สุด เมื่อทำการแยกต่อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ พบว่า mangostin [5.4(1)] และ γ -mangostin [5.4(3)] มีสมบัติในการยับยั้งการทำงานของ HIV-1 protease โดยมี IC_{50} 5.12 ± 0.41 และ 4.81 ± 0.32 μ M ตามลำดับ

Gopalakrishnan และคณะ^{5.4[26]} (1997) ศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *Fusarium oxysporum vasinfectum*, *Alternaria tenuis* และ *Dreschlera oryzae* ที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรคพืช โดยวิธี Petri-plate bioassay พบว่า xanthone ที่แยกได้จากเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราได้ดีกว่า alkylated mangostin และ acylated mangostin ที่ได้จากการสังเคราะห์ สารที่มีฤทธิ์ดีที่สุดคือ γ -mangostin ที่ 1000 ppm มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยลดรัศมีการเจริญของเชื้อราทั้ง 3 ชนิดได้ 64%, 58% และ 85% ตามลำดับ

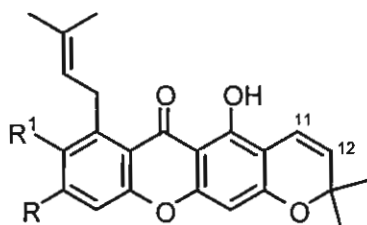
Tosa และคณะ^{5.4[27]} (1997) พบว่า mangostin, β -mangostin และ γ -mangostin สามารถยับยั้ง topoisomerase I และ II ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่คลายเกลียว supercoil ของ DNA ในกระบวนการถ่ายแบบ DNA (DNA Replication) เพื่อการดำรงชีพต่อไปของสิ่งมีชีวิต โดยมีค่า IC_{50} ต่อ topo I เท่ากับ 55, 150 และ 39 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ สำหรับ IC_{50} ต่อ topo II เท่ากับ 38, 80 และ 5 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ Fan และคณะ^{5.4[5]} (1997) พบว่า mangostin และ γ -mangostin มีฤทธิ์เป็น antioxidant และ Gedouin และคณะ^{5.4[28]} (1998) ได้ผสม 20% mangostin ลงในผลิตภัณฑ์ป้องกันแสงแดด . โดยมีค่าดัชนีในการป้องกันแสงแดด (sun protective factor, SPF) เท่ากับ 10.4



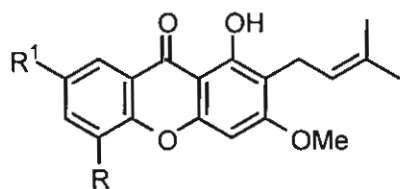
- 5.4(1) $R=R^1=OH$, $R^2=OMe$, $R^3=H$
 5.4(2) $R=R^2=OMe$, $R^1=OH$, $R^3=H$
 5.4(3) $R=R^1=R^2=OH$, $R^3=H$
 5.4(18) $R=R^2=OH$, $R^1=R^3=H$
 5.4(21) $R=R^1=R^2=OH$, $R^3=$ isoprenyl
 5.4(25) $R=OH$, $R^1=R^3=H$, $R^2=CO_2H$



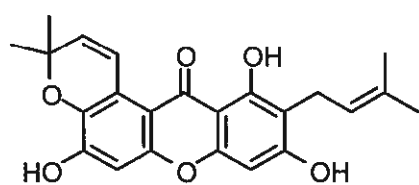
- 5.4(4) $R^1=R^4=OH$, $R^2=R^3=H$
 5.4(5) $R^1=OH$, $R^2=R^3=R^4=H$
 5.4(9) $R^1=R^3=R^4=H$, $R^2=OH$



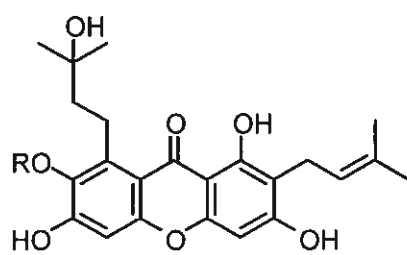
- 5.4(6) $R=OH$, $R^1=OMe$
 5.4(14) 11,12-Dihydro analogue of 5.4(6)
 5.4(17) $R=H$, $R^1=OH$



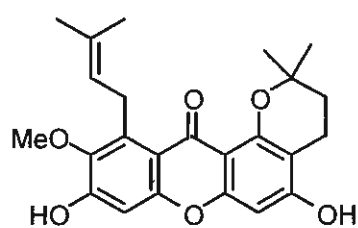
- 5.4(7) $R=OH$, $R^1=H$
 5.4(8) $R=H$, $R^1=OH$



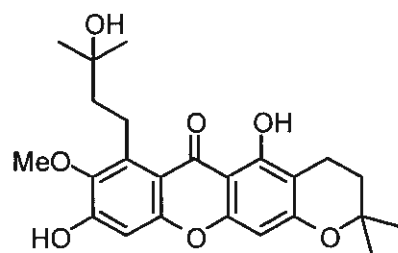
5.4(10)



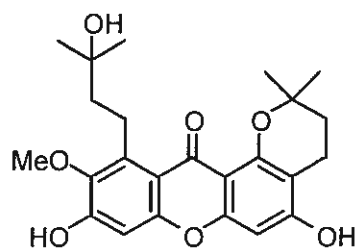
5.4(11) R=H
5.4(12) R=Me



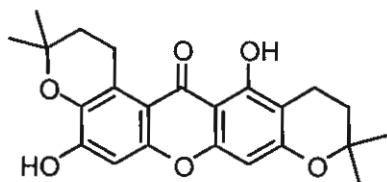
5.4(13)



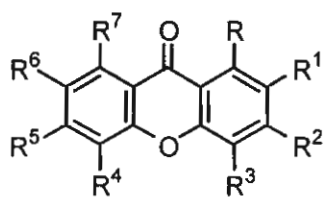
5.4(15)



5.4(16)

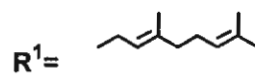


5.4(19)

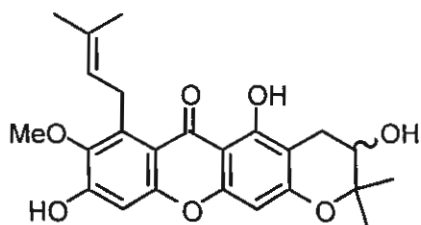


5.4(20) $R=OMe$, $R^1=R^3=R^4=OH$,
 $R^2=R^5=R^6=R^7=H$

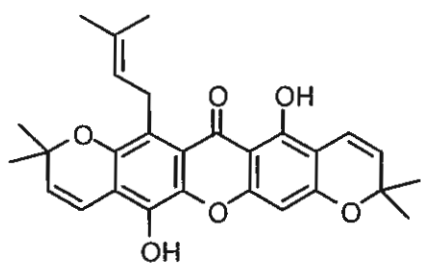
5.4(22) $R=R^2=R^4=OH$, $R^3=R^5=R^6=R^7=H$,



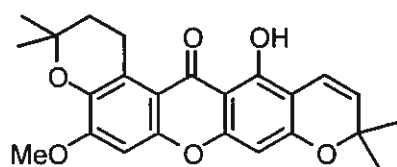
5.4(24) $R=R^2=OH$, $R^3=Me$, $R^4=R^5=R^7=H$,
 $R^1=R^6=$ isoprenyl



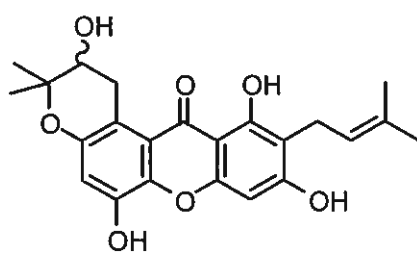
5.4(23)



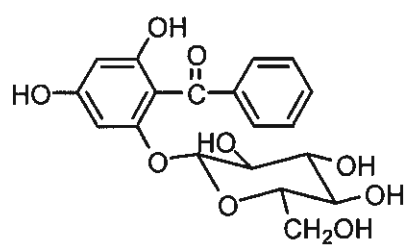
5.4(26)



5.4(27)



5.4(28)



5.4(29)

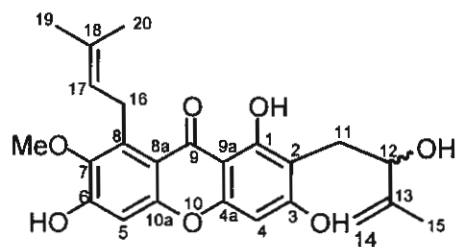
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ผลการสกัดสารจากเปลือกผลมังคุดดิบ

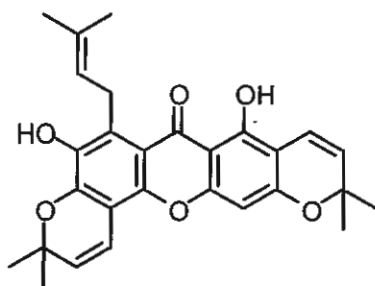
จากการนำเปลือกผลมังคุดดิบสด 7.03 กิโลกรัม ที่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วย MeOH ได้ส่วนสกัด MeOH ซึ่งประกอบด้วยของแข็งสีเหลือง และส่วนของ filtrate นำ filtrate มาสกัดด้วย CHCl_3 และ *n*-BuOH ได้ส่วนสกัด CHCl_3 และส่วนสกัด *n*-BuOH ตามลำดับ จากการตรวจสอบด้วย TLC พบว่าส่วนสกัด CHCl_3 ให้ผล TLC คล้ายกับส่วนของแข็งสีเหลือง จึงนำเฉพาะส่วนของแข็งสีเหลือง และส่วนสกัด *n*-BuOH มาศึกษา พบแซนโทนชนิดใหม่ 3 ชนิดได้แก่ mangostenol [5.4(31)], mangosenone A [5.4(32)], mangostenone B [5.4(33)] และ พร้อมกับแซนโทนที่เคยมีผู้รายงานไว้แล้ว 7 ชนิด และฟลาโวนอยด์ 1 ชนิด โดยที่ trapezifolixanthone [5.4(34)] เป็นแซนโทนที่ยังไม่เคยมีรายงานการพบใน *G. mangostana*

(1) Mangostenol [5.4(31)] แสดง $[\alpha]_D^{31} -20^\circ$ (c 0.10, MeOH); HREIMS แสดง m/z 426.1680 ตรงกับสูตรโมเลกุล $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}_7$; ข้อมูล UV แสดง $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ ที่ 243, 319 และ 358 nm; IR spectrum แสดงสัญญาณที่ 3420 (hydroxyl), 1645 (หมู่ conjugated carbonyl) cm^{-1} แสดงว่า [5.4(31)] เป็น xanthone

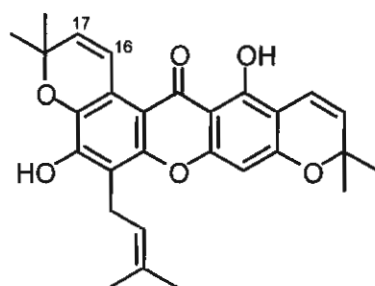
ข้อมูล ^1H NMR (ตาราง 5.4(1)) พบ aromatic proton [δ 6.22 (1H, s) และ 6.64 (1H, s)], หมู่ hydroxyl (δ 13.86), หมู่ methoxyl [3.69 (3H, s)], หมู่ isoprenyl [δ 4.00 (2H, d, $J = 6.1$ Hz), 5.16 (1H, m), 1.59 (3H, s) และ 1.75 (3H, s)] พบหมู่ 2-hydroxy-3-methylbut-3-enyl โดยมีสัญญาณ olefinic methylene proton ของ terminal double bond ที่ δ 4.73 (1H, br s) และ 4.90 (1H, br s) หมู่ methyl ที่ δ 1.74 (3H, s) และ hydroxymethine proton ที่ δ 4.22 (1H, dd, $J = 6.9$, ca 2.2 Hz) จากการเปรียบเทียบข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR ของ [5.4(31)] พบว่ามีความคล้ายกับของ α -mangostin [5.4(1)]^{5.4(4),5.4(6)} เพียงแต่มีหมู่ 2-hydroxy-3-methylbut-3-enyl แทนที่หมู่ isoprenyl ของ α -mangostin



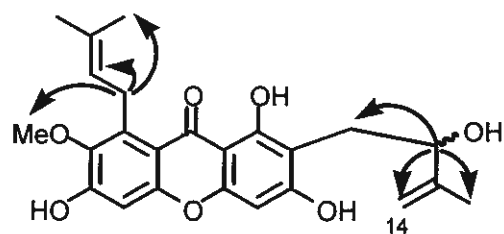
5.4(31)



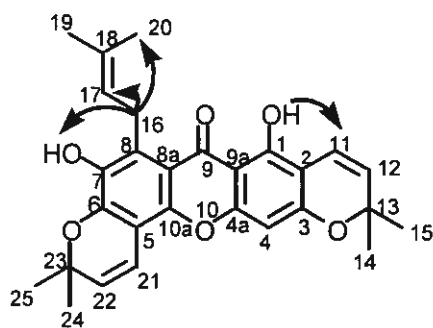
5.4(32)



5.4(33) 16,17-Dihydro analogue of 5.4(30)
5.4(30)



Selected NOE correlations for 5.4(31)



Selected NOE correlations for 5.4(32)

ข้อมูล HMBC (ตาราง 5.4(1)) พบ long range connectivity ระหว่าง δ 2.78 และ 3.01 (H-11) กับ C-1 (δ 160.6), C-2 (δ 107.7), C-3 (δ 162.7), C-12 (δ 76.1) และ C-13 (δ 146.9) ขณะที่ δ 4.22 (H-12) แสดงความสัมพันธ์กับ C-2 (δ 107.7), C-11 (δ 28.5), C-13 (δ 146.9), C-14 (δ 109.8) และ C-15 (δ 17.9) ซึ่งยืนยันได้ว่าหมู่ 2-hydroxy-3-methylbut-3-enyl อยู่ที่ตำแหน่ง 2 สำหรับหมู่ isoprenyl นั้นอยู่ที่ตำแหน่ง 8 เนื่องจากที่ H-16 (δ 4.00) มีความสัมพันธ์กับ C-7 (δ 143.0), C-8 (δ 137.2), C-8a (δ 111.3), C-17 (δ 123.2) และ C-18 (δ 131.5) หมู่ methoxyl ที่ δ 3.69 แสดงความสัมพันธ์กับ quaternary carbon C-7 (δ 143.1) ข้อมูล NOE พบว่า irradiate H-16 (δ 4.00) เกิด enhancement ของสัญญาณที่ δ 3.69 (7-OCH₃), 5.16 (H-17), 1.59 (H-19) และ 1.75 (H-20) ในทำนองเดียวกันเมื่อ irradiate H-12 ให้ NOE enhancement ที่สัญญาณของ H-11, H-14 และ H-15 จากข้อมูล NMR นี้พบว่า เป็นลักษณะของ 1,3,6,7-tetraoxygenated xanthone ที่มี methoxyl, หมู่ isoprenyl และหมู่ 2-hydroxy-3-methylbut-3-enyl อยู่ที่ C-7, C-8 และ C-2 ตามลำดับ ดังนั้น [5.4 (31)] มีโครงสร้างเป็น 1,3,5-trihydroxy-2-(2-hydroxy-3-methylbut-3-enyl)-7-methoxy-8-(3-methylbut-2-enyl)xanthone ซึ่งเป็นสารใหม่และให้ชื่อว่า mangostenol อย่างไรก็ตามข้อมูลข้างต้นยังไม่สามารถกำหนด absolute stereochemistry ที่ C-12 ได้

(2) Mangoatenone A [5.4(32)] เป็นแซนโทนที่พบในปริมาณน้อย HR-EIMS แสดง m/z 460.1895 ตรงกับสูตรโมเลกุล C₂₈H₂₈O₆, พบ $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ 286 และ 344 nm ใน UV spectrum, IR spectrum พบหมู่ hydroxyl ที่ 3434 หมู่ conjugated carbonyl ที่ 1649 หมู่ C=C ที่ 1611 และ 1441 และหมู่ C-O ที่ 1177 cm⁻¹ แสดงว่า [5.4(32)] เป็น xanthone เช่นกัน

ข้อมูล ¹H NMR และ ¹³C NMR (ตาราง 5.4(1) และ 5.4(2)) พบว่าประกอบด้วยหมู่ isoprenyl หนึ่งหมู่ [δ 4.10 (2H, d, J = 6.7 Hz), 5.28 (1H, br t, J = 6.7), 1.68 (3H, s) และ 1.84 (3H, s)]; 2,2-dimethylchromene ring สองหมู่ [δ 6.72 (1H, d, J = 10.0 Hz), 5.55 (1H, d, J = 11.5 Hz), 1.44 (6H, s) และ 6.85 (1H, d, J = 10.1 Hz), 5.65 (1H, d, J = 10.1 Hz), 1.51 (6H, s)] มี chelated OH ที่ C-1 (δ

13.82) และมี aromatic proton H-4 ที่ δ 6.24 เมื่อเปรียบเทียบข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR ของ [5.4(32)] กับ garcimangosone A [5.4(26)]^{5.4[20]} พบว่าคล้ายคลึงกัน โดยมี 2,2-dimethylchromene ring หมู่แรกเหมือนกันที่ C-2/C-3 และ O-ether ที่ C-3 แต่มีความต่างที่ตำแหน่งของหมู่ isoprenyl และ 2,2-dimethylchromene ring หมู่ที่สอง เมื่อวิเคราะห์ข้อมูล ^{13}C NMR ของ [5.4(32)] อย่างระมัดระวัง โดยเฉพาะอย่างยิ่งตำแหน่ง chemical shift ของ C-5 (δ 106.9) และ C-6 (δ 144.7) แสดงว่า 2,2-dimethylchromene ring หมู่ที่สองของ [5.4(32)] ควรอยู่ที่ C-5/C-6 โดยที่ ether oxygen อยู่ที่ C-6 ยืนยันโครงสร้างโดยใช้ข้อมูล HMBC (ตารางที่ 5.4(1)) และการทดลอง NOE ข้อมูล HMBC ที่สำคัญคือการพบ long range heteronuclear connectivity ของ H-21 (δ 6.85) กับ C-5 (δ 106.9), C-6 (δ 144.7), C-10a (δ 147.3) และ C-23 (δ 79.2) และความสัมพันธ์ระหว่าง C-23 และ cis olefinic proton ที่ δ 5.65 (H-22) ยืนยันได้ว่าหมู่ 2,2-dimethylchromene ring อยู่ที่ตำแหน่ง C-5/C-6 โดยมี O ether ที่ C-6 จากข้อมูล NOE พบว่า เมื่อ irradiate H-16 (δ 4.10) ให้ enhancement ของสัญญาณ 7-OH (δ 5.52), H-17 (δ 5.28) และ 20-Me (δ 1.84) และใน HMBC spectrum ยังพบความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณที่ δ 5.52 กับ C-6, C-7 และ C-8 จึงยืนยันได้ว่าหมู่ isoprenyl อยู่ที่ตำแหน่ง C-8, หมู่ hydroxyl อยู่ที่ตำแหน่ง C-7 ตามลำดับ จากข้อมูล NOE พบว่า chelated hydroxyl ที่ δ 13.82 มีความสัมพันธ์กับ H-11 (δ 6.72) พร้อมด้วยการพบความสัมพันธ์ระหว่าง H-11 กับ C-1, C-2 และ C-3 ใน HMBC ยืนยันได้ว่าหมู่ 2,2-dimethylchromene ring หมู่แรกอยู่ที่ตำแหน่ง C-2/C-3 และมี oxygen อยู่ที่ตำแหน่ง C-3 จากข้อมูลข้างต้นสรุปได้ว่า [5.4(32)] คือ 1,7-dihydroxy-8-(3-methylbut-2-enyl)-6',6'-dimethylpyrano(2',3':3,2)-6'',6''-dimethylpyrano(2'',3'':6,5)xanthone ซึ่งเป็นสารใหม่และให้ชื่อว่า mangostenone A

(3) **Mangostenone B** [5.4(33)] HREIMS แสดง m/z 462.2050 ตรงกับสูตรโมเลกุล $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{O}_6$ UV spectrum พบการดูดกลืนแสงที่ $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ 293, 334, 366 nm ; IR spectrum ให้แถบการสั่นแบบยืดของหมู่ hydroxyl ที่ 3413, หมู่ conjugated carbonyl ที่ 1597, หมู่ C=C ที่ 1597 และ 1456, และหมู่ C-O ที่ 1178 cm^{-1} ข้อมูล

^1H NMR (ตาราง 5.4(1)) พบ singlet aromatic proton ที่ δ 6.28, หมู่ hydroxyl ที่ δ 6.47 (1H, s), หมู่ isoprenyl หนึ่งหมู่ [δ 3.54 (2H, d, $J = 7.2$ Hz), 5.26 (1H, br t, $J = 7.4$ Hz), 1.66 (3H, s) และ 1.86 (3H, s)] 2,2-dimethylchromene ring หนึ่งหมู่ [δ 6.71 (1H, d, $J = 10.0$ Hz), 5.54 (1H, d, $J = 10.0$ Hz) และ 1.45 (6H, s)] เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลเหล่านี้กับของ tovophyllin B [5.4(30)]^{5.4[29]} พบว่าคล้ายคลึงกัน ต่างกันที่เฉพาะสัญญาณ doublet ที่ H-16 และ H-17 ของ tovophyllin [5.4(30)] ถูกแทนที่ด้วยสัญญาณ triplet [δ 3.44 (2H, t, $J = 6.7$ Hz), 1.84 (2H, t, $J = 6.6$ Hz)] ใน [5.4(33)] ข้อมูล HMBC (ตารางที่ 5.4(1)) พบ สัญญาณโปรตอน ที่ δ 6.71 (H-11) มีความสัมพันธ์กับ quaternary carbon ที่มี O-function ที่ δ 157.8 (C-1) และ 159.5 (C-3) สัญญาณ aromatic proton ที่ δ 6.28 (H-4) มีความสัมพันธ์กับ carbon ที่ 156.4 (C-4a) และ 104.0 (C-9a) สัญญาณของ methylene proton ที่ δ 3.54 (H-21) ของหมู่ isoprenyl มีความสัมพันธ์กับ quaternary carbon ที่ δ 113.0 (C-5), 149.2 (C-6) และ 151.0 (C-10a)

จากข้อมูลข้างต้น สรุปได้ว่า [5.4(33)] มีโครงสร้างเป็น 1,6-dihydroxy-5-(3-methylbut-2-enyl)-6',6'-dimethylpyrano(2',3':3,2)-6''6''-dimethyl-4'',5''-dihydropyrano(2'',3'':7,8)xanthone ซึ่งเป็นสารใหม่ และให้ชื่อว่า mangostenone B

(4) α -Mangostin [5.4(1)] เป็นแซนโทนที่พบในปริมาณมากที่สุด (758.2 มิลลิกรัม) ข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR (CDCl_3) สอดคล้องกับที่มีผู้รายงานไว้^{5.4[4],5.4[6]}

(5) β -Mangostin [5.4(2)] เป็นแซนโทนที่พบในปริมาณน้อย (24.6 มิลลิกรัม) ข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR (CDCl_3) สอดคล้องกับที่มีผู้รายงานไว้^{5.4[7]}

(6) Garcinone B [5.4(10)] เป็นแซนโทนที่พบในปริมาณน้อย (32.2 มิลลิกรัม) ข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR (CDCl_3) สอดคล้องกับที่มีผู้รายงานไว้^{5.4[12]}

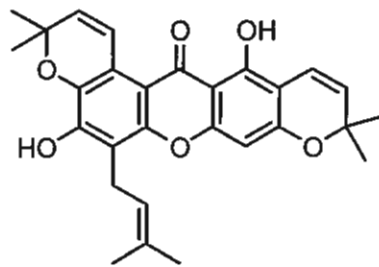
(7) Mangostinone [5.4(22)] เป็นแซนโทนที่พบในปริมาณน้อย (4.0 มิลลิกรัม) ข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) สอดคล้องกับที่ได้มีผู้รายงานไว้^{5.4[17]}

(8) **Mangostanol** [5.4(23)] เป็นแซนโทนที่พบในปริมาณน้อย (7.0 มิลลิกรัม) ข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) สอดคล้องกับที่มีผู้รายงานไว้^{5.4[18]}

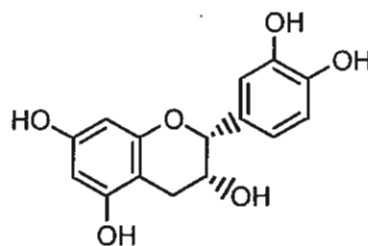
(9) **Tovophyllin B** [5.4(30)] เป็นแซนโทนที่พบในปริมาณน้อย (7.3 มิลลิกรัม) ข้อมูล ^1H (CDCl_3) สอดคล้องกับที่มีผู้รายงานไว้^{5.4[29]}

(10) **Trapezifolixanthone** [5.4(34)] เป็นแซนโทนที่พบในปริมาณน้อย (4.3 มิลลิกรัม) ข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR (CDCl_3) สอดคล้องกับที่มีผู้รายงานไว้^{5.4[30]-[32]}

(11) **(-) Epicatechin** [5.4(35)] (1.38 กรัม) เป็นฟลาโวนอยด์ที่แยกได้จาก ส่วนสกัด *n*-BuOH ข้อมูล ^1H NMR ($\text{acetone}-d_6$) สอดคล้องกับที่มีผู้รายงานไว้^{5.4[33]}



5.4(34)



5.4(35)

ตารางที่ 5.4(1) ^1H NMR และ HMBC data ของสาร 5.4(31), 5.4(32) และ 5.4(33)

position	Mangostenol [5.4(31)]		Mangostenone A [5.4(32)]		Mangostenone B [5.4(33)]	
	H^a	HMBC ^c	H^b	HMBC ^c	H^b	HMBC ^c
OH-1	13.86 s		13.82 s	1, 2, 9a	13.79 s	1
4	6.22 s	2, 3, 4a, 9, 9a	6.24 s	2, 3, 4a, 8a, 9, 9a	6.28 s	4a, 9a
5	6.64 s	6, 7, 8a, 9, 10a				
6 or OH-6					6.47 s	5, 6
OH-7 or OMe-7	3.69	7	5.52	6, 7, 8		
11	2.78 dd (14.6, 8.4)	1, 2, 3, 12, 13	6.72 d (10.0)	1, 2, 3, 12, 13	6.71 d (10.0)	1, 3
	3.01 dd (14.6, 2.2)					
12	4.22 dd (8.4, ca. 2.2)	2, 11, 13, 14, 15	5.55 d (10.0)	2, 11, 13, 14, 15	5.54 d (10.0)	13
14	4.73 br s, 4.90 br s	12, 13, 15	1.44 s	11, 12, 13	1.45 s	12, 13
15	1.74 s	12, 13, 14	1.44 s		1.45 s	
16	4.00 d (6.1)	7, 8, 8a, 17, 18	4.10 d (6.7)	7, 8, 8a, 17, 18	3.44 t (6.7)	7, 8, 17, 18
17	5.16 m	16, 18, 19, 20	5.28 br t (6.7)	19, 20	1.84 t (6.7)	8, 16, 18
19, 20	1.59 s, 1.75 s	16, 17, 18	1.68 s, 1.84 s	17, 18	1.36 s	17, 18
21			6.85 d (10.1)	5, 6, 10a, 23	3.54 d (7.2)	5, 6, 10a, 22, 23
22			5.65 d (10.1)	5, 23, 24, 25	5.26 m	
24, 25			1.51 s	21, 22, 23	1.66 s, 1.86 s	22, 23

^a Recorded in CDCl_3 + $\text{MeOH}-d_4$. ^b Recorded in CDCl_3 . ^c Correlated carbons.

ตารางที่ 5.4(2) ^{13}C NMR data ของสาร 5.4(31), 5.4(32), 5.4(33) และ 5.4(30)

Carbon	5.4(31) ^a	5.4(32) ^b	5.4(33) ^b	5.4(30) ^b
1	160.6	157.9	157.8	157.7
2	107.7	104.3	104.2	104.3
3	162.7	159.6	159.5	159.7
4	93.5	93.9	94.1	94.1
4a	155.8	156.0	156.5	156.4
5	101.6	106.9	113.0	115.2
6	155.4	144.7	149.2	148.6
7	143.0	139.4	137.7	136.5
8	137.2	127.9	118.7	117.1
8a	111.3	111.9	111.2	108.3
9	181.8	182.4	183.0	182.8
9a	102.9	103.8	104.0	103.8
10a	155.2	147.3	151.0	150.9
11	28.5	115.8	115.8	115.6
12	76.1	127.0	127.0	127.0
13	146.9	77.8	77.2	77.9
14	109.8	28.2	28.3	28.3
15	17.9	28.2	28.3	28.3
16	26.2	25.7	22.2	120.9
17	123.2	122.4	33.0	131.3
18	131.5	132.4	75.5	76.8
19, 20	18.1, 25.6	18.1, 26.0	26.5	27.4
21		115.5	22.4	22.5
22		129.0	121.3	120.9
23		79.2	132.5	132.6
24, 25		28.4	18.0, 25.8	17.9, 25.8
OMe	60.9			

^a Recorded in $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$. ^b Recorded in CDCl_3 .

วัสดุและวิธีการ

การสกัดและการแยก

ทำการสกัดเปลือกผลมังคุดดิบสดที่บดแล้ว (7.03 กิโลกรัม จากอำเภอบ้านค่าย จังหวัดจันทบุรี) ด้วย MeOH ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลานาน 50 ชั่วโมง จำนวน 4 ครั้ง ได้ของแข็งสีเหลือง (205.5 กรัม) และ filtrate (1500 มิลลิลิตร) นำ filtrate มา partition ด้วย CHCl_3 และ *n*-BuOH ตามลำดับ ได้ส่วนสกัด CHCl_3 (0.8 กรัม) และส่วนสกัด *n*-BuOH (133.0 กรัม) ตามลำดับ

การแยกและทำสารให้บริสุทธิ์

นำของแข็งสีเหลือง (45.0 กรัม) แยกและทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ โครมาโทกราฟี (silica gel, CHCl_3 , CHCl_3 -EtOAc, EtOAc-MeOH) ได้สาร 11 กลุ่ม

สารกลุ่ม 4 นำมาแยกต่อโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (silica gel, *n* hexane- CHCl_3) ได้ mangostenone A [5.4(32)] (2 มิลลิกรัม) จากการใช้ตัวชะ 20% CHCl_3 -*n* hexane

สารกลุ่ม 5 นำมาแยก โดยใช้วิธีเดียวกับสารกลุ่ม 4 (silica gel, ชะด้วย *n*-hexane : CHCl_3 4:6 เพิ่มความเป็นขั้วด้วย CHCl_3 และ EtOAc) ได้ β -mangostenone [5.4(2)] (24.6 มิลลิกรัม) โดยใช้ระบบตัวชะ 70% CHCl_3 -*n* hexane

สารกลุ่ม 6 ทำการแยกโดยใช้วิธีเช่นเดียวกับสารกลุ่ม 4 (silica gel ชะด้วย *n* hexane เพิ่มความเป็นขั้วด้วย CHCl_3 ตั้งแต่ 5% ถึง 100%) ได้สาร 10 กลุ่มย่อย

สารกลุ่มย่อย 6.1 เป็นของแข็งสีเหลือง (8.6 มิลลิกรัม) ได้จากการใช้ตัวชะ 50% CHCl_3 -*n* hexane จาก TLC พบว่าประกอบด้วยสาร 2 ชนิด เมื่อแยกโดยโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง (5% EtOAc-*n* hexane) ได้ tovoephyllinn B [5.4(30)] (7 มิลลิกรัม, R_f 0.42) และ mangostenone B [5.4(33)] (0.3 มิลลิกรัม, R_f 0.54)

สารกลุ่ม 7 ทำการแยกโดยใช้วิธีเช่นเดียวกับสารกลุ่ม 4 (silica gel ละด้วย CHCl_3 เพิ่มความเป็นขั้วด้วย MeOH ตั้งแต่ 5% ถึง 100%) สามารถแยกได้ trapezifolixanthone [5.4(34)] (4.3 มิลลิกรัม)

สารกลุ่ม 8 เมื่อรีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (silica gel, ละด้วย *n* hexane : CHCl_3 1 : 1 เพิ่มความเป็นขั้วด้วย CHCl_3 และ MeOH) ได้ α -mangostin [5.4(1)] จากการให้ 5% *n* hexane- CHCl_3 เป็นตัวชะ

สารกลุ่ม 9 เมื่อนำมารีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (silica gel, ละด้วย CHCl_3 เพิ่มความเป็นขั้วด้วย MeOH ตั้งแต่ 0.5 ถึง 100%) สามารถแยกได้ 16 กลุ่มย่อย

กลุ่มย่อย 9.8 เมื่อทำการแยกต่อ (silica gel, ละด้วย CHCl_3 เพิ่มความเป็นขั้วด้วย MeOH ตั้งแต่ 0.2 ถึง 100%) ได้ garcinone B [5.4(10)] (32.2 มิลลิกรัม) โดยใช้ตัวชะ 1.5% MeOH- CHCl_3

กลุ่มย่อย 9.9 นำมาแยกต่อโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (silica gel, ละด้วย CHCl_3 เพิ่มความเป็นขั้วด้วย MeOH ตั้งแต่ 0.2% ถึง 100%) ได้สารอีก 8 กลุ่มย่อย นำกลุ่มย่อยที่ 9.9.6 มาทำการแยกต่อโดยโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง (ใช้ 3% MeOH- CHCl_3 เป็นตัวพา) ได้ mangostenol [5.4(31)] (8.7 มิลลิกรัม, R_f 0.31)

กลุ่มย่อย 9.10 เมื่อทำรีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (silica gel ละด้วย CHCl_3 เพิ่มความเป็นขั้วด้วย MeOH ตั้งแต่ 0.2% ถึง 100%) ได้ 5 กลุ่มย่อย นำกลุ่มย่อยที่ 9.10.4 แยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง (ใช้ 3% MeOH- CHCl_3 เป็นตัวพา) ได้ mangostinone [5.4(22)] (4.0 มิลลิกรัม, R_f = 0.36)

สารกลุ่ม 10 นำมาแยกต่อโดยใช้วิธีเช่นเดียวกับสารกลุ่ม 4 (silica gel, ละด้วย CHCl_3 เพิ่มความเป็นขั้วด้วย MeOH 0.2 ถึง 100%) ได้ mangostanol [5.4(23)] (8 มิลลิกรัม)

ส่วนสกัด *n*-BuOH (33.0 กรัม) เมื่อนำมาแยกโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (silica gel ละด้วย CHCl_3 -MeOH 90:10) ให้ (-) epicatechin [5.4(35)] (1.38 กรัม)

α -Magostin [5.4(1)] : ของแข็งสีเหลือง (758.2 มิลลิกรัม) mp. 180-182 °C;
IR: $\nu_{\max}$ 3422, 2963, 2925, 1644, 1609, 1584, 1459, 1281, 1186 cm^{-1} ; ข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR สอดคล้องกับที่มีผู้รายงานไว้;^{5.4[4],[6]} EIMS: m/z (% relative intensity) 410 [M^+ , 36], 367 (22), 354 (31), 355 (2), 339 (100), 311 (26)

β -Mangostin [5.4(2)] : ของแข็งสีเหลือง (24.6 มิลลิกรัม) mp. 173-175 °C;
IR: $\nu_{\max}$ 3401, 2963, 2928, 1647, 1600, 1461, 1430, 1283, 1206, 1171, 1113 cm^{-1} ; ข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR สอดคล้องกับที่มีผู้รายงานไว้;^{5.4[7]} EIMS: m/z (% relative intensity) 424 [M^+ , 66], 381 (22), 369 (33), 353 (100), 299 (12)

Gacinone B [5.4(10)]: ของแข็งสีเหลือง (32.2 มิลลิกรัม) mp. 189-191 °C;
IR: $\nu_{\max}$ 3480, 2978, 2929, 1649, 1631, 1577, 1454, 1317, 1292, 1191, 1168 cm^{-1} , ข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR สอดคล้องกับที่มีผู้รายงานไว้;^{5.4[12]} ESMS: m/z (% relative intensity) 417 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺

Mangostinone [5.4(22)] : ของแข็งสีเหลือง (4.0 มิลลิกรัม) mp. 209-211 °C;
IR: $\nu_{\max}$ 3398, 2963, 2921, 2855, 1647, 1613, 1576, 1498, 1457, 1247, 1093 cm^{-1} ; ข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR สอดคล้องกับที่มีผู้รายงานไว้;^{5.4[17]} EIMS: m/z (% relative intensity) 380 [M^+ , 7], 337 (2), 311(31), 295 (19), 269 (15), 257 (100)

Mangostanol [5.4(23)] : ของแข็งสีเหลือง (7.0 มิลลิกรัม) mp. 240-245 °C;
IR: $\nu_{\max}$ 3385, 2978, 2934, 1601, 1459, 1382, 1275, 1194, 1090 cm^{-1} ; ข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR สอดคล้องกับที่มีผู้รายงานไว้;^{5.4[18]} EIMS: m/z (% relative intensity) 426 [M^+ , 33], 383 (18), 355 (43), 339 (100)

Tovophyllin B [5.4(30)] : ของแข็งสีเหลือง (7.3 มิลลิกรัม) mp. 188-190 °C;
UV: $\lambda_{\max}$ 290, 301, 336 nm; IR: $\nu_{\max}$ 3353, 2963, 2885, 1651, 1609, 1591, 1562, 1436, 1275, 1179, 1127 cm^{-1} ; ข้อมูล ^1H NMR สอดคล้องกับที่มีผู้รายงานไว้;
^{5.4[29]} ข้อมูล ^{13}C NMR แสดงในตารางที่ 5.4(2); EIMS: m/z (% relative intensity) 460

[M^+ , 37], 445 (100), 389 (17), 215 (19), 187 (45), 169 (19); HR-EIMS: m/z 460.1886 (คำนวณสำหรับ $C_{22}H_{28}O_6$, 460.1885)

Mangostenol [5.4(31)] : ของแข็งสีเหลือง (8.7 มิลลิกรัม) mp. 157-159 °C; $[\alpha]_D^{31}$ -20 (c = 0.10, MeOH); UV: λ_{max} 243, 319, 358 nm; IR: ν_{max} 3420, 2920, 1645, 1610, 1580, 1465, 1286, 1192, 1102 cm^{-1} ; ข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR แสดงในตาราง 5.4(1) และ 5.4(2); EIMS: m/z (% relative intensity) 426 [M^+ 15], 408 (6), 393 (11), 356 (22), 355 (100); HREIMS: m/z 426.1680 (คำนวณสำหรับ $C_{24}H_{26}O_7$, 426.1678)

Mangoatenone A [5.4(32)] : ของแข็งสีเหลือง (2.0 มิลลิกรัม) mp. 110-112 °C; UV: λ_{max} 286, 344 nm; IR: ν_{max} 3434, 2976, 2920, 1649, 1611, 1441, 1177, 1127 cm^{-1} ; ข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR δ , ($CDCl_3$): แสดงในตาราง 5.4(1) และ 5.4(2); EIMS: m/z (% relative intensity) : 460 [M^+ , 37], 445 (58), 417 (100), 401 (14), 389 (12); HR-EIMS: m/z 460.1895 (คำนวณสำหรับ $C_{22}H_{28}O_6$, 460.1885)

Mangostenone B [5.4(33)] : ของแข็งสีเหลือง (1 มิลลิกรัม); UV: λ_{max} 293, 334, 366 nm; IR: ν_{max} 3413, 2925, 2855, 1649, 1613, 1597, 1456, 1313, 1297, 1178, 1122 cm^{-1} ; ข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR แสดงในตาราง 5.4(1) และ 5.4(2); EIMS: m/z (% relative intensity) 462 [M^+ , 35], 447 (100), 391 (22), 335 (15), 307 (10); HR-EIMS: m/z 462.2050 (คำนวณสำหรับ $C_{28}H_{30}O_6$, 462.2042)

Trapezifolixanthone [5.4(34)]: ของแข็งสีเหลือง (4.3 มิลลิกรัม) mp. 170-172 °C; UV: λ_{max} (EtOH) 254, 271, 332 nm; IR: ν_{max} 3391, 2971, 2924, 1647, 1580, 1498, 1447, 1378, 1335, 1222, 1147, 1117 cm^{-1} ; ข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR สอดคล้องกับที่มีผู้รายงานไว้; ^{5.4[30]-[32]} EIMS: m/z (% relative intensity) 378 [M^+ , 17], 363 (100), 323 (6), 69 (8)

(-) Epicatechin [5.4(35)]: ของแข็งสีขาว (1.38 กรัม) mp. 229-230 °C (d); $[\alpha]_D^{31} -70.6^\circ$ (c 0.15, MeOH); IR: $\nu_{\max}$ 3456, 3100, 2932, 1625, 1522, 1469, 1441, 1288, 1260, 1100, 1016, 808, 627 cm^{-1} ; ข้อมูล ^1H NMR (acetone- d_6) สอดคล้องกับที่มีผู้รายงานไว้; ^{5.4[33]}

เอกสารอ้างอิง

- 5.4[1] นันทวัน บุณยะประภัศร; อรุณ ชัยเจริญพร. สมุนไพรพื้นบ้าน (3) 2541
ประชาชน: กรุงเทพฯ ฯ.
- 5.4[2] Peres, V.; Nagem, T. J.; de Oliveira, F.F. *Phytochemistry* 2000, 55, 683;
Peres,V.; Nagem, T. J. *Phytochemistry* 1997, 44, 191-214.
- 5.4[3] Sundaram, B. M.; Gopalakrishnan, G.; Subramanian, S.; Shankaranarayanan,
D.; Kameswaran, L. *Planta Med.* 1983, 48, 59.
- 5.4[4] Chen, S. X.; Wan, M.; Loh, B. N. *Planta Med.* 1996, 62, 381.
- 5.4[5] Fan, C.-T.; Su, J.-D. *Chemical Abstracts* 1998, 128: 47537.
- 5.4[6] Yates, P.; Stout, G. H. *J. Am. Chem. Soc.* 1958, 80, 1691.
- 5.4[7] Yates, P.; Bhat, H. B. *Can. J. Chem.* 1968, 46, 3770.
- 5.4[8] Jefferson, A.; Quillinan, A. J.; Scheinmann, F.; Sim, K. Y. *Aust. J. Chem.*
1970, 23, 2539.
- 5.4[9] Govindachari, T.R.; Kalynaraman, P. S.; Muthukumaraswamy, N. Pai, B. R.
Tetrahedron 1971, 27, 3919.
- 5.4[10] Sen, A. K.; Sarkar, K. K.; Mazumder, P. C.; Banerji, N.; Uusvuori, R.; Hase,
T. A. *Phytochemistry* 1980, 19, 2223.
- 5.4[11] Sen, A. K.; Sarkar, K. K.; Mazumder, P. C.; Banerji, N. *Phytochemistry*
1981, 20, 183.
- 5.4[12] Sen, A. K.; Sarkar, K. K.; Mazumder, P. C.; Banerji, N.; Hase, T. A.
Phytochemistry 1982, 21, 1747.
- 5.4[13] Sen, A. K.; Sarkar, K. K.; Mazumder, P. C.; Banerji, N. *Indian J. Chem.*
1986, 25B, 1157.

- 5.4[14] Mahabusarakam, W.; Wiriyaচিত্রা, P.; Taylor, W. C. *J. Nat. Prod.* 1987, **50**, 474.
- 5.4[15] Balasubramanian, K.; Rajagopalan K. *Phytochemistry* 1988, **27**, 1552.
- 5.4[16] Dutta, P. K.; Sen, A. K.; Sarkar, K. K.; Banerji, N. *Indian J. Chem.* 1987, **26B**, 281.
- 5.4[17] Asai, F.; Tosa, H.; Tanaka, T.; Iinuma, M. *Phytochemistry* 1995, **39**, 943.
- 5.4[18] Chairungsrilerd, N.; Takeuchi K., Ohizumi, Y.; Nozoe, S.; Tomihisa, O. *Phytochemistry* 1996, **43**, 1099.
- 5.4[19] Gopalakrishnan, G.; Balaganesan, B. *Fitoterapia* 2000, **71**, 607.
- 5.4[20] Huang, Y. L.; Chen, C. C.; Chen, Y. J.; Huang, R. L.; Shieh, B. J. *J. Nat. Prod.* 2001, **64**, 903.
- 5.4[21] Mahabusarakam, W.; Wiriyaচিত্রা, P.; Phongpaichit, S. *J. Sci. Soc. Thailand* 1986, **12**, 239.
- 5.4[22] Sakai, S. I.; Katsura, M.; Takayama, H.; Aimi, N.; Chokethaworn, N.; Suttajit, M. *Chem. Pharm. Bull.* 1993, **41**, 958.
- 5.4[23] Phongpaichit, S.; Ongsakul, M.; Nilrat, L.; Tharavichitkul, P.; Bunchoo, S.; Chuaprapaisil, T.; Wiriyaচিত্রা, P. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 1994, **16**, 399.
- 5.4[24] Iinuma, M.; Tosa, H.; Tanaka T.; Asai, F.; Kobayashi, Y.; Shimano, R.; Miyauchi, K. I. *J. Pharm. Pharmacol.* 1996, **48**, 861.
- 5.4[25] Chairungsrilerd, N.; Furukawa, K. I.; Ohta, T.; Nozoe, S.; Ohizumi, Y. *Planta Med.* 1996, **62**, 471.
- 5.4[26] Gopalakrishnan, G.; Banumathi, B.; Suresh, G. *J. Nat. Prod.* 1997, **60**, 519.

- 5.4[27] Tosa, H; Iinuma, M; Tanaka, T.; Nozaki, H.; Ikeda, S.; Tsutsui, K.; Tsutsui, K.; Yamada, M.; Fujimori, S. *Chem. Pharm. Bull.* 1997, **45**, 418.
- 5.4[28] Gedouin, J.; Valle, R. *Chemical Abstracts* 1998, **129**: 45128.
- 5.4[29] Mesquita, A. A. L.; de Oliveira, W. G. ; Neiva, R. M. T. *Phytochemistry* 1975, **14**, 803.
- 5.4[30] Somanathan, R.; Sultanbawa, M. U. S. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1974, 2515.
- 5.4[31] Deshpande, V. H.; Rao, A. V. R.; Varadan, M.; Venkataraman, K. *Indian J. Chem.* 1973, **11**, 518.
- 5.4[32] Seo, E.-K.; Wall, M. E.; Wani, M. C.; Navarro, H.; Mukherjee, R.; Fransworth, N. R.; Kinghorn, A. D, *Phytochemistry* 1999, **52**, 669.
- 5.4[33] Nonaka, G.; Kawahara, O.; Nishioka, I. *Chem. Pharm. Bull.* 1983, **31**, 3906.

โครงการย่อยกลุ่มที่ 5: การศึกษาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพด้าน อื่นๆ

โครงการวิจัยหน่วยที่ 5 : กาสามปีก *Vitex peduncularis* Wall.

บทนำ

1. คำนำ

พืชในสกุล *Vitex* มีสารองค์ประกอบที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ ต้นกาสามปีกเป็นพืชในสกุล *Vitex* ชนิดหนึ่ง การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของต้นนี้จึงน่าจะได้สารใหม่

2. ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำวิจัย

กาสามปีก (*Vitex peduncularis* Wall.) เป็นพืชในวงศ์ Verbenaceae เป็นไม้ขนาดเล็กถึงกลาง พบในอินเดีย ไทย^{5.5[1]} และประเทศใกล้เคียง สรรพคุณของพืชชนิดนี้ใช้ระงับไข้ (febrifuge)^{5.5[2]} เปลือกต้นใช้เป็นยาทาภายนอกลดอาการเจ็บหน้าอก^{5.5[3]}

3. วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อสกัดแยก หาสูตรโครงสร้าง และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเปลือกต้นกาสามปีก

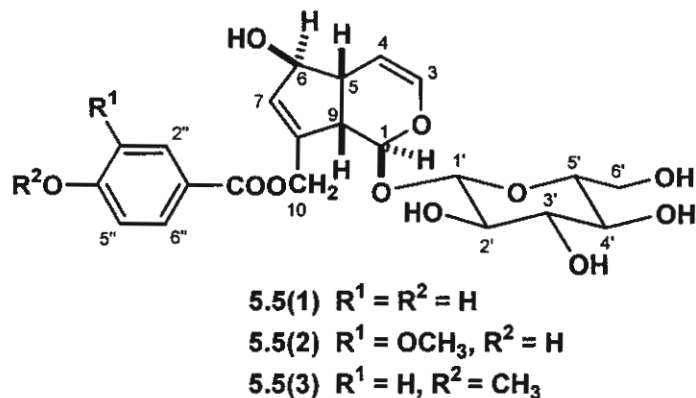
4. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากงานวิจัยที่มีผู้รายงานไว้ พบฟลาโวนอยด์ vitexin^{5.5[5]}, pachypodol และ peduncularisin^{5.5[5]} และพบไตรเทอร์พีนอยด์ friedelin, epi-friedelinol, ursolic acid, 2 α -hydroxyursolic acid และ β -sitosterol^{5.5[5]} จากใบของต้นกาสามปีก

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

จากการแยกโดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบต่าง ๆ ทำให้สามารถแยกอิริโดอยด์ได้ 2 ชนิดจากส่วนสกัดบิวทานอลของเปลือกต้นกาสามปีก เมื่อเปรียบเทียบข้อมูล IR, $^1\text{H-NMR}$ และ MS สเปกตรัมของอิริโดอยด์ชนิดแรก กับที่มีผู้รายงานไว้ พบว่าเป็น agnuside [5.5(1)] อิริโดอยด์ชนิดที่สอง ให้ชื่อว่า pedunculariside [5.5(2)] เป็นของแข็ง amorphous ข้อมูลจาก FAB mass spectrum และ elemental analysis พบว่ามีสูตรโมเลกุลเป็น $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_{12}$ เมื่อเปรียบเทียบ $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ สเปกตรัมของอิริโดอยด์นี้กับสาร [5.5(1)] และ limoniside [5.5(3)]^{5,5[6]} พบว่าคล้ายกัน ที่แตกต่างกันคือสัญญาณของ aromatic protons ใน $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของ [5.5(2)] ต่างจากของ [5.5(1)] และ [5.5(3)] นั่นคือ สัญญาณ δ 6.86 (d, $J = 8.2$, H-5''), 7.58 (d, $J = 2.1$ Hz, H-2'') และ δ 7.60 (dd, $J = 8.2$, 2.1 Hz, H-6'') แสดงว่ามีหมู่ 3-methoxy-4-hydroxybenzoyl ซึ่งข้อมูล $^{13}\text{C-NMR}$ ยืนยันว่ามีหมู่เช่นกัน NOESY สเปกตรัม แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณของ หมู่ methoxy ที่ δ 3.94 และของ H-2 ที่ δ 7.58 แสดงว่ามีหมู่ข้างต้น ไม่ใช่หมู่ 3-hydroxybenzoyl อย่างแน่นอน จากข้อมูลดังกล่าว แสดงว่า [5.5(2)] มีโครงสร้างเป็น aucubin 10-O-vanillate

เมื่อนำ iridoids [5.5(1)] และ [5.5(2)] มาทดสอบการยับยั้ง cyclooxygenase (COX, prostaglandin H synthase)-1 และ COX-2 regulated prostaglandin biosynthesis โดยใช้ COX deficient murine cell lines^{5,5[7]} พบว่า อิริโดอยด์ [5.5(1)] แสดงฤทธิ์การยับยั้ง COX-2 ได้ดีกว่า COX-1 (COX-2 มีค่า $\text{IC}_{50} = 0.026 \pm 0.15$ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และไม่แสดงผลต่อ COX-1 ณ ความเข้มข้นนี้ ในทุกการทดสอบใช้ aspirin เป็นตัวยับยั้ง ชนิด non-selective COX-2 ต่อ COX-1 และ COX-2 ที่ค่า IC_{50} 0.014 ± 0.008 และ 0.058 ± 0.053 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ทุกการทดสอบทำซ้ำ 3 ครั้งตาม mean SD นอกจากนี้อิริโดอยด์ [5.5(1)] และ [5.5(2)] ไม่แสดงความเป็นพิษ (cytotoxicity) ต่อ vero cells^{5,5[8]}



วัสดุและวิธีการ

นำเปลือกต้นกาสามปีก (*V. peduncularis*) (2 กิโลกรัม) ซึ่งเก็บมาจากจังหวัด เชียงใหม่ มาสกัดด้วย MeOH โดยใช้ Soxhlet เมื่อระเหยตัวทำละลายออกไปส่วนใหญ่ เติมน้ำ แล้วสกัดด้วย *n*-hexane, $CHCl_3$ และ *n*-BuOH ตามลำดับ จากการตรวจสอบด้วย TLC พบว่า *n*-butanol extract ให้ spot ซึ่งแสดงสีต่อรีเอเจนต์ anisaldehyde- H_2SO_4 ในเอทานอล ซึ่งคาดว่ามียิริโดไซด์ จึงนำมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจล ใช้ตัวชะเริ่มจาก $CHCl_3$ และ $CHCl_3$ -MeOH โดยเพิ่มปริมาณของ MeOH ขึ้นเรื่อยๆ ตรวจสอบ fractions ต่างๆ ที่ได้ด้วย TLC รวมกลุ่มได้ 4 กลุ่ม

กลุ่มที่ 3 ซึ่งใช้ตัวชะ $CHCl_3$ -MeOH (90:10) นำมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้ 7 กลุ่มย่อย กลุ่มย่อยที่ 5 นำมาทำการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีอีก 2 ครั้ง ได้ agnuside [5.5(1)] (20 มิลลิกรัม) $[\alpha]_D^{31} -106.0^\circ$ ($c = 0.10$, MeOH) เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูล IR, ^1H -NMR และ MS กับสารที่มีผู้รายงานไว้ ปรากฏว่าตรงกัน

กลุ่มย่อยที่ 3 เมื่อนำมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ตามด้วยการแยกด้วย reverse phase คอลัมน์ ใช้ SiO_2 60 RP-18 (40-63 μm) ให้ อิริ

ดอยด์ pedunculariside [5.5(2)] (8 มิลลิกรัม, 0.004%) $[\alpha]_D^{31} -64.0^\circ$ ($c = 0.05$, MeOH); IR: $\nu_{\max}$ 3390, 2916, 1705, 1595, 1514, 1428, 1378, 1284, 1214, 1044, 761 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): δ 2.71 (1H, m, H-5), 3.00 (1H, br t, $J = 7.4$ Hz, H-9), 3.23-3.40 (4H, m), 3.66 (1H, dd, $J = 11.9, 5.5$ Hz) and 3.85 (1H, dd, $J = 11.9, 2.2$ Hz) (H-2' to H-6'), 3.91 (3H, s, OCH_3), 4.47 (1H, m, H-6), 4.70 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-1'), 4.93 and 5.08 (2 $\times$ 1H, 2 br d, $J = 14.9$ Hz, 2 $\times$ H-10), 5.02 (1H, d, $J = 7$ Hz, H-1), 5.11 (1H, dd, $J = 6.1, 3.9$ Hz, H-4), 5.83 (1H, m, H-7), 6.34 (1H, dd, $J = 6.1, 1.8$ Hz, H-3), 6.86 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5''), 7.58 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2''), 7.60 (1H, dd, $J = 8.2, 2.1$ Hz, H-6''). $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD): δ 44.7 (C-5), 47.0 (C-9), 55.0 (OCH_3), 61.3 (C-6'), 62.3 (C-10), 70.0 (C-4'), 73.5 (C-2'), 76.5 and 76.8 (C-3' and C-5'), 81.4 (C-6), 96.4 (C-1), 98.8 (C-1'), 104.1 (C-4), 112.2 (C-2''), 114.6 (C-5''), 123.8 (C-6''), 131.1 (C-7), 140.3 (C-3), 141.5 (C-8), 147.4 (C-4''), 151.6 (C-3''), 166.4 (CO_2Ar); FABMS (-ve): m/z (% rel. intensity) 495 $[\text{M-H}]^-$ (14); Anal. Calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_{12}$: C, 55.64; H, 5.68. Found: C, 55.86; H, 5.89.

เอกสารอ้างอิง

5. 5[1] Chadha, S. Y. R. *The Wealth of India*. Vol. X. CSIR: New Delhi, 1976, 524.
- 5.5[2] Burkill, I. H. *A Dictionary of the Economic Products of the Malay Peninsula*. Vol. II. Ministry of Agriculture and Co-operatives: Kuala Lumpur, 1966, 2277.
- 5.5[3] Kirtikar, K. R.; Basu, B. D. *Indian Medicinal Plants*. Vol. III, 2nd ed. M/S Bishen Singh Mahendra Pal Singh and M/S Periodical Experts: Delhi, 1935, 1941.
- 5.5[4] Rao, C. B.; Venkateswarlu, V. *J. Sci. & Ind. Res. (India)* 1962, **21B**, 313.
- 5.5[5] Sahu, N. P.; Roy, S. K.; Mahato, S. B. *Planta Med.* 1984, **50**, 527.
- 5.4[6] Suksamrarn, S.; Kumcharoen, S.; Suksamrarn, A. *Planta Med.* 1999, **65**, 392.
- 5.5[7] Kirtikara, K.; Morham, S. G.; Raghov, R.; Laulederkind, S. J.; Kanekura, T.; Goorha, S.; Ballou, L. R. *J. Exp. Med.* 1998, **187**, 517.
- 5.5[8] Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. *J. Nat. Cancer Inst.* 1990, **82**, 1107.

รายชื่อกลุ่มวิจัย

ชื่อ-นามสกุล	เมื่อเข้าร่วมโครงการ			ปัจจุบัน		
	ตำแหน่งวิชาการ	สังกัด	ตำแหน่งในโครงการ	ตำแหน่งวิชาการ	สังกัด	สถานภาพปัจจุบัน
1. ดร. อภิชาติ สุขสำราญ	รศ.	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	หัวหน้าโครงการ	รศ.	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	ยังอยู่ในโครงการ
2. Dr. Rene Lafont	Professor	Department of Biology, CNRS, Paris	ที่ปรึกษาโครงการ	Professor	Pierre and Marie Curie University, Paris	ยังอยู่ในโครงการ
3. ดร. สมยศ สุทธิไวยกุล	รศ.	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	นักวิจัย	รศ.	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	ได้รับทุนองค์ความรู้ใหม่ฯ จาก สกว. เมื่อเดือน กพ. 2545
4. ดร. ธิติมา รุกขไชยศิริกุล	รศ.	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	นักวิจัย	รศ.	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	ยังอยู่ในโครงการ
5. ดร. สมเดช กนกมนตรีกุล	ผศ.	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. ขอนแก่น	นักวิจัย	ผศ.	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. ขอนแก่น	ยังอยู่ในโครงการ
6. ดร. เกษม สร้อยทอง	รศ.	ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหาร	นักวิจัย	รศ.	ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหาร	ได้มาช่วย ผศ.ดร. สมเดชทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นเวลา 6 เดือน (มค.-มิย. 43)
7. นาย บุญเอก ยิ่งยงณ์กุล	อ.	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	นักวิจัย	อ.	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	ได้รับทุนจากมหาวิทยาลัย Southampton ให้ไปศึกษาปริญญาเอกเมื่อปลายกันยายน 2543 จะกลับมาร่วมกลุ่มวิจัยอีกประมาณ ๑๓.-๑๕. 46

ชื่อ-นามสกุล	เมื่อเข้าร่วมโครงการ			ปัจจุบัน		
	ตำแหน่งวิชาการ	สังกัด	ตำแหน่งในโครงการ	ตำแหน่งวิชาการ	สังกัด	สถานภาพปัจจุบัน
8. น.ส. อรไท สุขเจริญ	รศ.	สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	นักวิจัย	รศ.	สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	เข้าร่วมโครงการเมื่อเดือน ธันวาคม 2544 ยังอยู่ในโครงการ
9. ดร. บดินทร์ ชิดกุล	อ.	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	นักวิจัย	อ.	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	เข้าร่วมโครงการเมื่อเดือน ธันวาคม 2544 ยังอยู่ในโครงการ
10. นาย ธนัต ณะฉัตรชัยรัตน์		ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	นักศึกษาระดับปริญญาโท		ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	จบปริญญาโทแล้ว กำลังศึกษาปริญญาเอก
11. น.ส. สุรีย์พร หอมวิเศษวงศา		ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	นักศึกษาระดับปริญญาโท		ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	จบปริญญาโทแล้ว กำลังศึกษาปริญญาเอก
12. น.ส. เสาวณีย์ คำพันธ์		ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	นักศึกษาระดับปริญญาโท		ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	จบปริญญาโทแล้ว ยังอยู่ในโครงการ
13. น.ส. อรุณ จันทรรักษ์		ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	นักศึกษาระดับปริญญาโท		ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	จบปริญญาโทแล้ว ยังช่วยงานในโครงการ
14. น.ส. นุชนาฏ ผลเกิด		ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. ขอนแก่น	นักศึกษาระดับปริญญาโท		ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. ขอนแก่น	จบปริญญาโทแล้ว กำลังเตรียมตัวศึกษาปริญญาเอก ณ ประเทศอังกฤษ
15. นาย พัทธกษ นาสมใจ		ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. ขอนแก่น	นักศึกษาระดับปริญญาโท		ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. ขอนแก่น	จบปริญญาโทแล้ว กำลังจะเป็นอาจารย์ภาควิชาเคมี ม. ขอนแก่น
16. น.ส. เนาวรัตน์ รัตนบุรี		ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	นักศึกษาระดับปริญญาโท		ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	ยังอยู่ในโครงการ

ชื่อ-นามสกุล	เมื่อเข้าร่วมโครงการ			ปัจจุบัน		
	ตำแหน่งวิชาการ	สังกัด	ตำแหน่งวิชาการ	สังกัด	ตำแหน่งวิชาการ	สังกัด
17. นาย ชนะ สิริการ		ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	ผู้ช่วยวิจัย	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง		นักศึกษาปริญญาโท ยังอยู่ในโครงการ
18. นาย อภรณ์ ช่วยนุกูล		ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	ผู้ช่วยวิจัย	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง		นักศึกษาปริญญาโท ยังอยู่ในโครงการ
19. น.ส. สุภาวดี พรหมจินดา		ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	ผู้ช่วยวิจัย	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง		นักศึกษาปริญญาโท ยังอยู่ในโครงการ
20. น.ส. ทิพวรรณ จูประจบ		ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	ผู้ช่วยวิจัย	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง		นักศึกษาปริญญาโท ยังอยู่ในโครงการ
21. น.ส. จิราพร ชูเนตร์		ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง	ผู้ช่วยวิจัย	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. รามคำแหง		นักศึกษาปริญญาโท ยังอยู่ในโครงการ

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

ผลงานวิจัยของโครงการที่ได้รับการตีพิมพ์แล้วหรืออยู่ระหว่างการตีพิมพ์มีดังนี้

1. Rukachaisirikul T, Intaraudom J, Chawanasak S, Suksamrarn A. Phenylpropanoids from *Cinnamomum parthenoxylon*. *ScienceAsia* 2000; 26: 159-161. (Impact factor = 0)*
2. Charoensuk S, Yingyongnarongkul B, Suksamrarn A. Synthesis of 2-dehydro-3-*epi*-20-hydroxyecdysone. *Tetrahedron* 2000; 56: 9313-9317. (Impact factor = 2.356)
3. Suksamrarn A, Kumpun S, Kirtikara K, Yingyongnarongkul B, Suksamrarn S. Iridoids with antiinflammatory activity from *Vitex peduncularis*. *Planta Med.* 2002; 68: 72-73. (Impact factor = 1.831)
4. Suksamrarn A, Pattanapratchep P, Tanachatchairatana T, Haritakun W, Yingyongnarongkul B, Chimnoi N. Chemical modifications at the 22-hydroxyl group of ecdysteroids: alternative structural requirements for high moulting activity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2002; 32: 193-197. (Impact factor = 1.920)
5. Sutthivaiyakit S, Unganont S, Sutthivaiyakit P, Suksamrarn A. Diterpenylated and prenylated flavonoids from *Macaranga denticulata*. *Tetrahedron* 2002; 58: 3619-3622. (Impact factor = 2.356)
6. Suksamrarn S, Suwannapoch N, Ratananukul P, Aroonlerk N, Suksamrarn A. Xanthones from the green fruit hulls of *Garcinia mangostana*. *J. Nat. Prod.* 2002; 65: 761-763. (Impact factor = 1.878)
7. Suksamrarn A, Jankam A, Tarnchompoo B, Puchakarn S. Ecdysteroids from a *Zoanthus* sp. *J. Nat. Prod.* 2002, in press. (Impact factor = 1.878)

8. Kanokmedhakul S, Kanokmedhakul K, Polkerd N, Soyong K, Kongseree P, Suksamrarn A. Antimicrobial anthraquinone-chromanone and diketopiperazine alkaloid from the fungus *Chaetomium globosum* KMITL-N0802. *Planta Med.* 2002, in press. (Impact factor = 1.831)
9. Rukachaisirikul T, Prabpai S, Champung P, Suksamrarn A. Chabamide, a novel piperine dimer from stems of *Piper chaba*. *Planta Med.* 2002, in press. (Impact factor = 1.831)
10. Suksamrarn A, Tanachatchairatana T, Sirigarn C. Stereoselective catalytic hydrogenation of Δ^7 -6-ketosteroids in the presence of sodium nitrite. *Tetrahedron* 2002, in press. (Impact factor = 2.356)
11. Suksamrarn A, Kumpun S, Yinyongnarongkul B. Ecdysteroids of *Vitex scabra* stem bark. *J. Nat. Prod.* 2002, in press. (Impact factor = 1.878)

*หมายเหตุ ค่า Impact factor ปี ค.ศ. 2000

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติแยกตามผู้วิจัย

ผลงานวิจัยของโครงการที่ได้รับการตีพิมพ์แล้วหรืออยู่ระหว่างการตีพิมพ์ในวารสาร
วิชาการระดับนานาชาติ แยกตามผู้วิจัยมีดังนี้

อภิชาติ สุขสำราญ

1. Rukachaisirikul T, Intaraudom J, Chawanasak S, Suksamrarn A. Phenylpropanoids from *Cinnamomum parthenoxylon*. *ScienceAsia* 2000; 26: 159-161. (Impact factor = 0)*
2. Charoensuk S, Yingyongnarongkul B, Suksamrarn A. Synthesis of 2-dehydro-3-*epi*-20-hydroxyecdysone. *Tetrahedron* 2000; 56: 9313-9317. (Impact factor = 2.356)
3. Suksamrarn A, Kumpun S, Kirtikara K, Yingyongnarongkul B, Suksamrarn S. Iridoids with antiinflammatory activity from *Vitex peduncularis*. *Planta Med.* 2002; 68: 72-73. (Impact factor = 1.831)
4. Suksamrarn A, Pattanapratchee P, Tanachatchairatana T, Haritakun W, Yingyongnarongkul B, Chimnoi N. Chemical modifications at the 22-hydroxyl group of ecdysteroids: alternative structural requirements for high moulting activity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2002; 32: 193-197. (Impact factor = 1.920)
5. Sutthivaiyakit S, Unganont S, Sutthivaiyakit P, Suksamrarn A. Diterpenylated and prenylated flavonoids from *Macaranga denticulata*. *Tetrahedron* 2002; 58: 3619-3622. (Impact factor = 2.356)
6. Suksamrarn S, Suwannapoch N, Ratananukul P, Aroonlerk N, Suksamrarn A. Xanthenes from the green fruit hulls of *Garcinia mangostana*. *J. Nat. Prod.* 2002; 65: 761-763. (Impact factor = 1.878)

7. **Suksamrarn A**, Jankam A, Tarnchompoo B, Putchakarn S. Ecdysteroids from a *Zoanthus* sp. *J. Nat. Prod.* 2002, in press. (Impact factor = 1.878)
8. Kanokmedhakul S, Kanokmedhakul K, Polkerd N, Soyong K, Kongseree P, **Suksamrarn A**. Antimicrobial anthraquinone-chromanone and diketopiperazine alkaloid from the fungus *Chaetomium globosum* KMITL-N0802. *Planta Med.* 2002, in press. (Impact factor = 1.831)
9. Rukachaisirikul T, Prabpai S, Champung P, **Suksamrarn A**. Chabamide, a novel piperine dimer from stems of *Piper chaba*. *Planta Med.* 2002, in press. (Impact factor = 1.831)
10. **Suksamrarn A**, Tanachatchairatana T, Sirigarn C. Stereoselective catalytic hydrogenation of Δ^7 -6-ketosteroids in the presence of sodium nitrite. *Tetrahedron* 2002, in press. (Impact factor = 2.356)
11. **Suksamrarn A**, Kumpun S, Yinyongnarongkul B. Ecdysteroids of *Vitex scabra* stem bark. *J. Nat. Prod.* 2002, in press. (Impact factor = 1.878)

*หมายเหตุ ค่า Impact factor ปี ค.ศ. 2000

สมยศ สุทธิไวยกิจ

1. **Sutthivaiyakit S**, Unganont S, Sutthivaiyakit P, **Suksamrarn A**. Diterpenylated and prenylated flavonoids from *Macaranga denticulata*. *Tetrahedron* 2002; 58: 3619-3622. (Impact factor = 2.356)

ธิดิมา รุกขไชยศิริกุล

1. Rukachaisirikul T, Intaraudom J, Chawanasak S, Suksamrarn A. Phenylpropanoids from *Cinnamomum parthenoxylon*. *ScienceAsia* 2000; 26: 159-161. (Impact factor = 0)
2. Rukachaisirikul T, Prabpai S, Champung P, Suksamrarn A. Chabamide, a novel piperine dimer from stems of *Piper chaba*. *Planta Med.* 2002, in press. (Impact factor = 1.831)

สมเดช กนกเมธากุล

1. Kanokmedhakul S, Kanokmedhakul K, Polkerd N, Soyong K, Kongseree P, Suksamrarn A. Antimicrobial anthraquinone-chromanone and diketopiperazine alkaloid from the fungus *Chaetomium globosum* KMITL-N0802. *Planta Med.* 2002, in press. (Impact factor = 1.831)

เกษม สร้อยทอง

1. Kanokmedhakul S, Kanokmedhakul K, Polkerd N, Soyong K, Kongseree P, Suksamrarn A. Antimicrobial anthraquinone-chromanone and diketopiperazine alkaloid from the fungus *Chaetomium globosum* KMITL-N0802. *Planta Med.* 2002, in press. (Impact factor = 1.831)

บุญเอก ชัยยงณรงค์กุล

1. Charoensuk S, Yingyongnarongkul B, Suksamrarn A. Synthesis of 2-dehydro-3-*epi*-20-hydroxyecdysone. *Tetrahedron* 2000; 56: 9313-9317. (Impact factor = 2.356)

2. Suksamrarn A, Kumpun S, Kirtikara K, **Yingyongnarongkul B**, Suksamrarn S. Iridoids with antiinflammatory activity from *Vitex peduncularis*. *Planta Med.* 2002; 68: 72-73. (Impact factor = 1.831)
3. Suksamrarn A, Pattanapratchee P, Tanachatchairatana T, Haritakun W, **Yingyongnarongkul B**, Chimnoi N. Chemical modifications at the 22-hydroxyl group of ecdysteroids: alternative structural requirements for high moulting activity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2002; 32: 193-197. (Impact factor = 1.920)
4. Suksamrarn A, Kumpun S, **Yinyongnarongkul B**. Ecdysteroids of *Vitex scabra* stem bark. *J. Nat. Prod.* 2002, in press. (Impact factor = 1.878)

อนันต์ ณะจักรชัยรัตน์

1. Suksamrarn A, Pattanapratchee P, **Tanachatchairatana T**, Haritakun W, Yingyongnarongkul B, Chimnoi N. Chemical modifications at the 22-hydroxyl group of ecdysteroids: alternative structural requirements for high moulting activity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2002; 32: 193-197. (Impact factor = 1.920)
2. Suksamrarn A, **Tanachatchairatana T**, Sirigarn C. Stereoselective catalytic hydrogenation of Δ^7 -6-ketosteroids in the presence of sodium nitrite. *Tetrahedron* 2002, in press. (Impact factor = 2.356)

เสาวณีย์ คำพันธ์

1. Suksamrarn A, Kumpun S, Kirtikara K, Yingyongnarongkul B, Suksamrarn S. Iridoids with antiinflammatory activity from *Vitex peduncularis*. *Planta Med.* 2002; 68: 72-73. (Impact factor = 1.831)
2. Suksamrarn A, Kumpun S, Yinyongnarongkul B. Ecdysteroids of *Vitex scabra* stem bark. *J. Nat. Prod.* 2002, in press. (Impact factor = 1.878)

อรุณ จันทร์คำ

1. Suksamrarn A, Jankam A, Tarnchompoo B, Putchakarn S. Ecdysteroids from a *Zoanthus* sp. *J. Nat. Prod.* 2002, in press. (Impact factor = 1.878)

นุชนาฏ ผลเกิด

1. Kanokmedhakul S, Kanokmedhakul K, Polkerd N, Soyong K, Kongseree P, Suksamrarn A. Antimicrobial anthraquinone-chromanone and diketopiperazine alkaloid from the fungus *Chaetomium globosum* KMITL-N0802. *Planta Med.* 2002, in press. (Impact factor = 1.831)

ชนะ สิริการ

1. Suksamrarn A, Tanachatchairatana T, Sirigarn C. Stereoselective catalytic hydrogenation of Δ^7 -6-ketosteroids in the presence of sodium nitrite. *Tetrahedron* 2002, in press. (Impact factor = 2.356)

ภาคผนวก

REPRINTS และ PROOFS ผลงานวิจัย

Phenylpropanoids from *Cinnamomum parthenoxylon*

Thitima Rukachaisirikul^{*}, Jukkamong Intaraudom, Suppachai Chawanasak and Apichart Suksamram

Department of Chemistry, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bangkok 10240, Thailand.

^{*} Corresponding author, E-mail: thitima@ram1.ru.ac.th

Received 2 Jun 2000

Accepted 28 Jul 2000

ABSTRACT Phenylpropanoids were isolated from the wood of *Cinnamomum parthenoxylon* and their structures were characterized by spectroscopic methods. These compounds include safrole (1), 3,4-methylenedioxycinnamaldehyde (2), (+)-3-(3,4-methylenedioxyphenyl)-1,2-propanediol (3), and a mixture of six alkyl *trans*-ferulates bearing alkyl groups of C₂₁ and C₂₄ to C₂₈ (4). This is the first report of the latter two components from *Cinnamomum* species.

KEYWORDS: *Cinnamomum parthenoxylon*, Lauraceae, phenylpropanoids.

INTRODUCTION

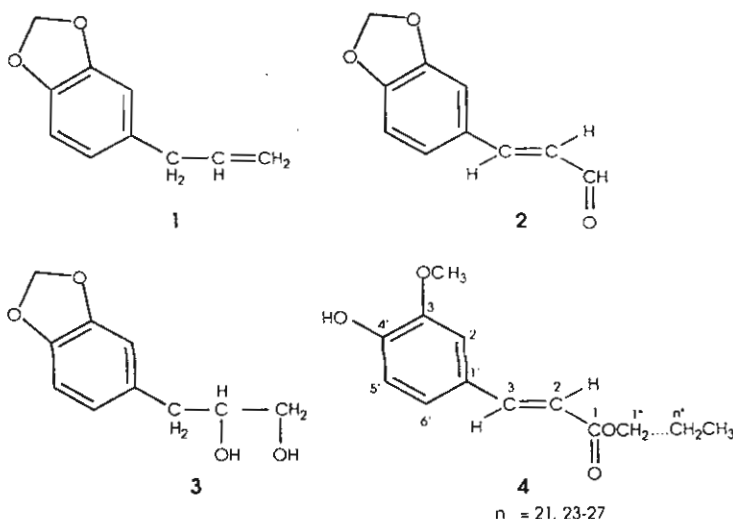
Cinnamomum parthenoxylon Meissn (Lauraceae) is a big tree, with whitish bark, distributed in Malay Peninsula.¹ Its bark is used as a spice in foods and as an excellent tonic, particularly for girls attaining maturity. The oil from the seeds is used for rheumatism.¹ Previous investigations of *C. parthenoxylon* wood oil obtained from China, Malaysia and Vietnam revealed the presence of linalool, methyl eugenol and safrole (1) as major components, respectively.²⁻⁴ We now report the isolation and identification of phenylpropanoids 1-4 from *C. parthenoxylon* wood.

RESULTS AND DISCUSSION

The hexane, dichloromethane and methanol extracts of dried powdered *C. parthenoxylon* wood on repeated column chromatography gave compounds 1-4. Compound 1, a major component, was identified as safrole by comparison of its IR and ¹H NMR spectra with literature data.^{5,6}

Compound 2 was identified as 3,4-methylenedioxycinnamaldehyde by its mp, UV⁷, IR and ¹H NMR spectral properties. This compound has previously been isolated from *Cinnamomum micranthum*.⁸

Compound 3 was identified as (+)-3-(3,4-methy-



lenedioxypheyl)-1,2-propanediol by comparison of its mp, optical rotation, UV, IR and ^1H NMR spectra.⁹ This compound was earlier isolated from sassafras root.⁹ With the aid of DEPTs and HMQC spectra, the assignment for all carbons of 3 is given for the first time (see Experimental).

Compound 4 was obtained as a white solid. Its IR spectrum indicated the presence of a hydroxyl group and a conjugated ester. The UV absorptions (see Experimental) suggested the presence of a phenolic hydroxyl group. The ^1H NMR spectrum of 4 exhibited the characteristics of a feruloyl moiety: a methoxy singlet at δ 3.95, a broad hydroxyl singlet at δ 5.91, two *trans* olefinic protons (δ 6.32 and 7.63, $J = 15.9$ Hz) and three aromatic protons in a 1,3,4-substitution pattern (δ 6.94, 7.06 and 7.10). The presence of an aliphatic alcohol moiety was indicated by a triplet signal at δ 0.90 (terminal methyl), a number of methylene protons at δ 1.27, a quintet signal at δ 1.72 for methylene next to the downfield methylene and the deshielded triplet at δ 4.21 corresponding to a methylene adjacent to an oxycarbonyl functionality. The NOE difference spectrum of 4 revealed that on irradiation of the aromatic methoxy protons at δ 3.95, a significant degree of enhancement was observed for the aromatic proton at δ 7.06. This confirmed the assignment of ferulic acid ester not the isoferulic acid ester. The ^{13}C NMR spectrum also supported the presence of a ferulate ester with resonances attributable to a carbonyl group (δ 167.8), two deshielded oxygen bearing quaternary carbons (δ 146.7 and 148.3), five methine carbons (δ 109.7, 115.1, 116.1, 123.5 and 145.0) and a shielded aromatic quaternary carbon (δ 127.5). The assignment of the ^{13}C NMR chemical shifts of 4 was achieved by the application of DEPTs and HMQC experiments and by comparison with those of reported compounds.¹⁰ The EI mass spectrum showed peaks at m/z 586, 572, 558, 544, 530 and 502 corresponding respectively to ferulate ester molecular ions with the alkyl portions of $\text{C}_{22}\text{H}_{45}$, $\text{C}_{21}\text{H}_{43}$, $\text{C}_{20}\text{H}_{41}$, $\text{C}_{19}\text{H}_{39}$ and $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$. The fragments at m/z 194 and 177 corresponded to ferulic acid and feruloyl fragments, respectively. Compound 4 was therefore a mixture of six alkyl *trans*-ferulates bearing alkyl groups of C_{22} and C_{24} to C_{28} . These assignments were based on the same analogy for the characterization of similar alkyl *trans*-ferulates previously isolated from *Pavetta owariensis*¹⁰ and *Abies firma*.¹¹ Previous works had indicated that ferulic acid esters are associated with suberin formation.¹²⁻¹⁴

It should be noted that this is the first report on the occurrence of compounds 3 and 4 in *Cinnamomum* species.

EXPERIMENTAL

General: UV and FT-IR spectra were recorded on a Shimadzu UV-2101 PC and Perkin Elmer Spectrum 2000 spectrophotometers, respectively. NMR spectra were recorded on a Jeol JMN A 500 spectrometer. EI mass spectrum was measured on a Finnigan MAT INCOS 50 spectrometer.

Plant material: The wood of *C. parthenoxylon* was collected from Jana, Songkhla province. A voucher specimen (No. 0024 (RU)) is kept at the Plant Collection Centre, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University.

Isolation: The dried, powdered wood (1.93 kg) was extracted successively with hexane, CH_2Cl_2 and MeOH by maceration. Separations and purifications of compounds were carried out on silica gel column chromatography (CC). From the hexane extract, after quick CC eluting by varying proportions of hexane, hexane- CHCl_3 , CHCl_3 -MeOH, 8 fractions were obtained. The first fraction, eluted by hexane to hexane- CHCl_3 (98:2), was rechromatographed using hexane to yield safrole (1) (14.04 g, 0.73 %). The fourth fraction, eluted with a gradient of hexane- CHCl_3 (40:60 to 20:80), was rechromatographed twice using hexane- CHCl_3 (30:70) to yield a mixture of alkyl *trans*-ferulate (4) (112 mg, 0.006 %). The CH_2Cl_2 extract was chromatographed using hexane, hexane- CHCl_3 , CHCl_3 -MeOH in increasing proportions as eluents, and 8 fractions were collected. Rechromatography of the first fraction, eluted by hexane, also afforded safrole (1) (15.58 g, 0.81 %), while the fifth fraction, eluted by hexane- CHCl_3 (20:80), on repeated chromatography twice using hexane- CHCl_3 (50:50) and CHCl_3 -MeOH in increasing proportions as eluents yielded 3,4-methylenedioxycinnamaldehyde (2) (45.8 mg, 0.002 %). The methanol extract was subjected to quick CC with a gradient of hexane, hexane- CHCl_3 , CHCl_3 -MeOH, and 13 fractions were obtained. The seventh fraction, eluted by CHCl_3 , was subjected to two repeated CC, and fractions eluted by MeOH- CHCl_3 (0.5:99.5) afforded (+)-3-(3,4-methylenedioxypheyl)-1,2-propanediol (3) (133 mg, 0.007 %).

safrole, 1. UV: EtOH λ_{max} 234, 286 nm; IR and ^1H NMR: see ref 5,6.

3,4-methylenedioxycinnamaldehyde, 2. M.p. 81-82°C (lit.⁷ m.p. 84-85°C); UV: see ref 7; IR: ν_{max} 2832, 2768, 2704, 1666, 1620, 1596, 1494, 1448, 1401,

1357, 1259, 1195, 1118, 1037, 961, 927, 860 and 799 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 5.99 (2H, s, OCH_2O), 6.54 (1H, dd, $J = 15.7, 7.7$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}$), 6.83 (1H, d, $J = 6.8$ Hz, Ar-H-5), 7.04 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, Ar-H-2), 7.05 (1H, dd, $J = 6.8, 1.8$ Hz, Ar-H-6), 7.36 (1H, d, $J = 15.7$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}$), 9.63 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, CHO).

(+)-3-(3,4-methylenedioxyphenyl)-1,2-propanediol, 3. M.p. 76-77°C (lit.⁹ m.p. 79°C); $[\alpha]_D^{20} +20.7^\circ$ (CHCl_3 , c 0.15) (lit.⁹ $[\alpha]_D^{20} +10^\circ$ (CHCl_3 , c 0.25)); UV, IR, ^1H NMR: see ref 9; ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 39.8 (C-3), 66.3 (C-1), 73.5 (C-2), 101.3 (OCH_2O), 108.8 (C-2'), 110.0 (C-5'), 122.6 (C-6'), 131.7 (C-1'), 146.7 (C-4'), 148.2 (C-3').

alkyl *trans*-ferulate mixture, 4. M.p. 68-71°C; UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ 216, 236, 326 nm; (NaOH) 214, 382 nm; IR: $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ 3450, 1713, 1632, 1599, 1518, 1269, 1177, 1028, 980, 840, 821, 718 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.90 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, CH_2-Me), 1.27 (br s, CH_2), 1.72 (2H, quint, $J = 6.9$ Hz, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.95 (3H, s, OMe), 4.21 (2H, t, $J = 6.9$ Hz, CO_2CH_2), 5.91 (1H, br s, OH), 6.32 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}$), 6.94 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, Ar-H-5), 7.06 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, Ar-H-2), 7.10 (1H, dd, $J = 8.2, 1.7$ Hz, Ar-H-6), 7.63 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}$); ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 14.5 (Me), 23.1 (C-n"), 26.4 (C-3"), 29.2 (C-2"), 29.7-30.1 (C-4" to (n-2)"), 32.3 (C-(n-1)"), 56.3 (OMe), 65.0 (C-1"), 109.7 (C-2'), 115.1 (C-5'), 116.1 (C-2), 123.5 (C-6'), 127.5 (C-1'), 145.0 (C-3), 147.1 (C-4'), 148.3 (C-3'), 167.8 (C-1); EIMS m/z (rel. int.): 586 (6), 572 (1), 558 (89), 544 (4), 530 (100), 502 (1) (each $[\text{M}]^+$), 194 (74), 177 (58), 150 (17), 137 (21).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Thailand Research Fund (TRF). We are indebted to Mrs. Wanna Sririnnuth and Miss Wanwimon Thabdee, Scientific and Technological Research Centre, Chulalongkorn University, for recording the NMR spectra, and to Miss Amporn Srisutthipruth, Faculty of Science, Mahidol University, for recording the mass spectrum.

REFERENCES

- Burkill I H (1966) *A Dictionary of the Economic Products of the Malay Peninsula*. Ministry of Agriculture and Co-operatives, Kuala Lumpur, Vol 1, p 561-2.
- Tao G, Lu A, Jiang Z, Chen H, Zhang X, Sun H, Ding J, Ding L and Wu Y (1987) New resource plants of natural camphor and linalool. *Zhiwu Xuebao* 29, 541-8. CA 108: 72155a (1988).
- Yaacob KB, Zakaria Z and Ramli Z (1990) Major constituents of *Cinnamomum parthenoxylon* wood oil. *J Essent Oil Res* 2, 51.
- Dung NN, Moi LD, Hung ND and Leclercq PA (1995) Constituents of the essential oils of *Cinnamomum parthenoxylon* (Jack) Nees from Vietnam. *J Essent Oil Res* 7, 53-6.
- Pouchert CJ (1985) *The Aldrich Library of FT-IR Spectra*. Aldrich Chemical Company, Inc, Wisconsin, Vol 1, p 1054C.
- Pouchert CJ and Behnke J (1993) *The Aldrich Library of ^{13}C and ^1H FT NMR Spectra*, 3rd ed. Aldrich Chemical Company, Inc., Wisconsin, Vol 2, p 232B.
- Dallacker F and Schubert J (1975) Derivatives of methylenedioxybenzene: on polycarboxylic imides of methylenedioxybenzene. *Chem Ber* 108, 95-108.
- Clifford MN and Hole M (1977) The naturally occurring cinnamaldehydes. *Process Biochem* 12, 5-9.
- Hoke M and Haensel R (1972) New investigation of sassafras root. *Arch Pharm (Weinheim)* 305, 33-9 (Ger). CA 76: 13818k (1972).
- Balde AM, Claeys M, Pieters LA, Wray V and Vlietinck AJ (1991) Ferulic acid esters from stem bark of *Pavetta owariensis*. *Phytochemistry* 30, 1024-6.
- Tanaka R, Inosiri A, Yoneda M, Ishida T, Namada A and Matsunaga S (1990) A tetracyclic triterpene lactone and other constituents from the bark of *Abies firma*. *Phytochemistry* 29, 3263-5.
- Laver ML and Fang HHL (1989) Ferulic acid esters from the bark of *Pseudotsuga menziesii*. *J Agric Food Chem* 37, 114-6.
- Kolattukudy PE and Dean BB (1974) Structure, gas chromatographic measurement, and function of suberin synthesized by potato tuber tissue slices. *Plant Physiol* 54, 116-21.
- Riley RG and Kolattukudy PE (1975) Evidence for covalently attached p-coumaric acid and ferulic acid in cutins and suberins. *Plant Physiol* 56, 650-4.



Synthesis of 2-Dehydro-3-*epi*-20-hydroxyecdysone

Siritron Charoensuk,^a Boon-ek Yingyongnarongkul^b and Apichart Suksamran^{b,*}

^aDepartment of Chemistry, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Bangkok 10110, Thailand

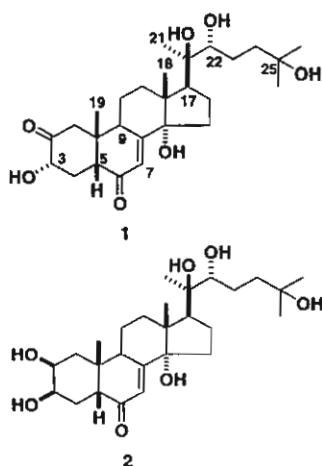
^bDepartment of Chemistry, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bangkok 10240, Thailand

Received 20 June 2000; revised 29 August 2000; accepted 14 September 2000

Abstract—2-Dehydro-3-*epi*-20-hydroxyecdysone, a novel ecdysteroid isolated from *Froelichia floridana*, has been partially synthesized from the readily available ecdysteroid, 20-hydroxyecdysone. © 2000 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Introduction

2-Dehydro-3-*epi*-20-hydroxyecdysone (**1**) is a minor ecdysteroid isolated recently from the seeds of *Froelichia floridana* (Nutt.) Moq.¹ This compound is the first naturally occurring ecdysteroid with a keto function at the 2-position² and hence has attracted attention in view of biological activity. Since ecdysteroid **1** was obtained in only 0.15 mg from the plant material, it was therefore interesting to obtain this compound by synthesis. 20-Hydroxyecdysone (**2**) was chosen as the readily available starting material³ in our synthesis.



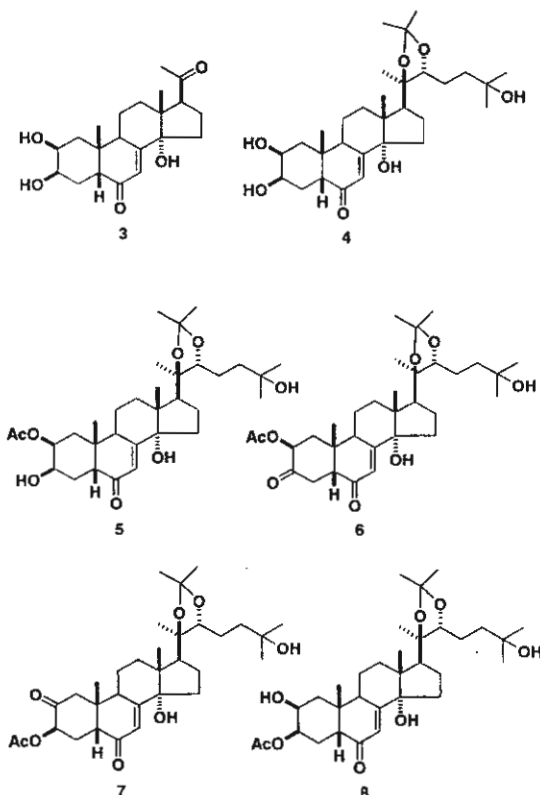
Results and Discussion

Initially, our synthetic strategy was to selectively oxidise the 3 β -hydroxyl group of compound **2** to the keto function, which would then be reduced to the corresponding 3 α -hydroxyl group. Oxidation of the 2-hydroxyl group to the keto function would then give compound **1**. It has been reported that oxidation of **2** with NaIO₄,⁴ Jones reagent,⁵ CrO₃–pyridine⁶ or pyridinium chlorochromate⁷ afforded the same product, poststerone (**3**). Compound **3** together with its 3-dehydro analogue were obtained when **2** was subjected to Jones oxidation, but with some modification.⁸ We found that reaction of **2** with other well-known oxidising agents also produced compound **3**.⁹ It was therefore obvious that the 20,22-dihydroxyl system had to be protected at early stage of the synthesis. Thus, starting from compound **2**, the 20,22-acetonide **4** was prepared by the literature procedure.¹⁰ In order to selectively oxidise the 3-hydroxyl group, the more active 2-hydroxyl group was protected as the acetate derivative **5**.¹⁰ We then turned to the oxidising agent. It has been reported¹¹ that upon oxidation of **5** with Jones reagent, an inseparable 3:1 mixture of the corresponding ketone **6** and its isomeric ketone **7** were yielded. The latter product was formed from compound **8**, which in turn was derived from **5** by C-2→C-3 acetyl migration. Acetyl migration is known in ecdysteroid field, especially in acidic condition.^{10,11} We therefore would like to consider using other oxidising agents. DMSO/Ac₂O has been employed in the oxidation of compound of type **5**.^{12,13} However, in our hands reaction of compound **5** with this reagent gave at least seven spots on TLC, including the starting material. Eventually CrO₃–pyridine has been chosen by our group to oxidise **5** to the corresponding ketone **6**, together with the hemiketal **9** in 43 and 23% yields, respectively. The structure of the major oxidation product was identified to be **6** by spectroscopic (IR, ¹H NMR and mass spectral) data and by comparison of ¹H NMR data with those of the reported data.¹² The double doublet (*J*=11 and 7 Hz) signal of H-2 at δ 5.07 and the

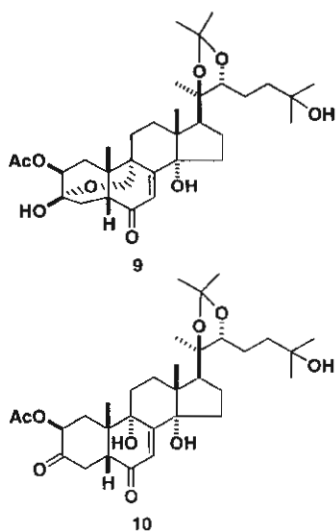
Keywords: ecdysteroids; 2-dehydro-3-*epi*-20-hydroxyecdysone; synthesis.

* Corresponding author. Tel.: +662-3191900; fax: +662-3108381; e-mail: apichart@ramf.ru.ac.th

absence of H-3 signal agreed well with structure 6.



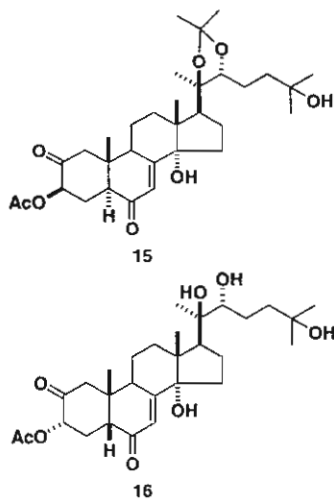
The structure of the minor product was concluded to be 9 on the basis of spectroscopic data, especially those of ^1H NMR and ^{13}C NMR data. The sharp singlet nature of H-7 at δ 5.91 and the absence of the H-9 signal in the ^1H NMR spectrum, together with the presence of the C-3 hemiketal signal at δ 96.6 in the ^{13}C NMR data agreed very well with structure 9.

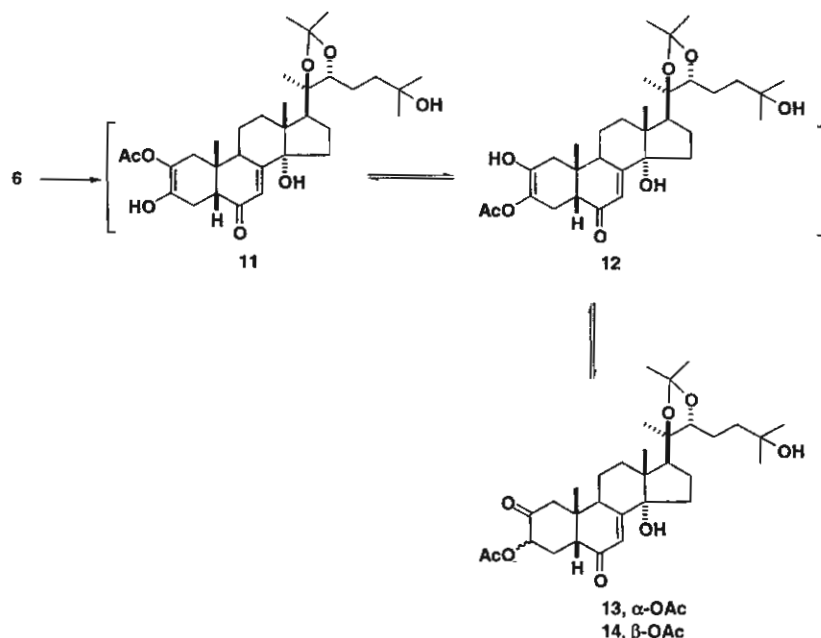


This compound was supposed to derive from 6 by allylic oxidation at the 9-position⁹ to give 10, followed by intramolecular nucleophilic attack of the 9-hydroxyl group at the 3-keto function to yield 9. It should be noted that the quantity of the product 9 could be lowered by reducing reaction time and quantity of the oxidising agent, but the products were accompanied by the starting material.

The next step was to convert compound 6 to the required ecdysteroid 1. It was known that α -keto alcohols and α -keto acetates could undergo keto-enol tautomerization. In our case, if compound 6 could enolize to the intermediate 11 and if C-2 $\rightarrow$ C-3 acetyl migration could take place as that occurred in saturated system¹⁰ to the isomeric intermediate 12, the keto acetates 13 and/or 14 would be obtained (see Scheme 1). Investigations of molecular models of 13 and 14 indicated that the former, which has the required stereochemical arrangement at C-3, would be a preferred structure since the acetate group at the 3-position of the latter suffered from di-axial interaction. From these reasons, we then decided to choose synthetic strategy according to Scheme 1.

Compound 6 was subjected to acid-catalyzed isomerization, but preliminary results were discouraging. Dilute mineral acids caused decomposition of compound 6. Dilute AcOH did not yield 13; initial reaction was deacetonation of 6. Dilute *p*-TsOH gave similar result and more concentrated *p*-TsOH caused dehydration of the starting material. However, when isomerization was performed in MeOH- CHCl_3 in the presence of silica gel, compound 6 slowly transformed to the isomeric keto acetate 13. In practice, when approximately half of compound 6 was changed to compound 13, the mixture was subjected to separation and isomerization of compound 6 was repeated. The structure of 13 was established on the basis of spectroscopic (IR, ^1H NMR and mass spectral) data. The saturated keto function was located at the 2-position as evident from the presence of two doublet signals of two H-1, with $J=13.9$ Hz, at δ 2.22 and 2.59. A large $W_{1/2}$ value (21 Hz) of H-3 resonance revealed its axial orientation. The alternative 3β -acetoxy- 5α - configuration (i.e. compound 15), which would result in a large $W_{1/2}$ value as well as that of compound 13, was ruled





Scheme 1.

out from NOE experiment. Thus irradiation of the 19-Me signal at δ 1.03 resulted in enhancement of the H-5 signal at δ 2.58. Such NOE enhancement occurred only when ecdysteroid adopted a *cis*-A/B ring fusion.^{14,15}

It should be noted that trace of a minor compound was noticed during purification of compound 6 by column chromatography. It was later shown that this compound was identical to compound 13 obtained from silica gel-catalyzed isomerization of compound 6 by TLC and ¹H NMR comparisons.

Compound 13 was subjected to acetonide deprotection using 70% AcOH to give the acetate 16, which was subsequently deacetylated with 10% aq guanidine acetate to yield the target ecdysteroid 1 in 35% from compound 13. The overall yield from compound 6 was 21%. ¹H NMR and ¹³C NMR data of compound 1 were consistent with the reported¹ values; most of the chemical shift values of our synthetic compound 1 were about 0.01 to 0.03 ppm higher than those of the reported natural ecdysteroid 1. It is noteworthy that care must be taken in the deacetylation step, especially when bases other than the guanidine class are employed, in order to avoid undesired side reactions including epimerization at the 5-position and decomposition of starting material or the product. Despite its relatively slow hydrolysis rate, base of this type has successfully been employed in ecdysteroid reactions.^{15,16}

Experimental

Melting points were determined on an Electrothermal melting point apparatus and were uncorrected. ¹H NMR and ¹³C

NMR spectra were recorded on a Jeol JNM-A500 spectrometer. Mass spectra were measured on a Bruker Esquire LC and a Finnigan MAT 90 instruments. Unless indicated otherwise, column chromatography and TLC were carried out using Merck's silica gel 60 (<0.063 mm) and precoated silica gel 60 F₂₅₄ plates, respectively. Spots on TLC were visualized under UV light and by spraying with anisaldehyde-H₂SO₄ reagent followed by heating.

Chromium trioxide–pyridine oxidation of compound 5

Compound 5 (30 mg, 0.053 mmol) was dissolved in dry CH₂Cl₂ (1.5 mL) and a solution of CrO₃ (267 mg, 2.67 mmol) in dry pyridine (0.5 mL) and dry CH₂Cl₂ (5 mL) was added. The reaction mixture was kept stirring at ambient temperature for 3 min and the solvent evaporated at ambient temperature in vacuo. EtOAc (60 mL) was added and the precipitate filtered off. 10% NaHSO₃ solution was added to the stirred EtOAc solution until light greenish aqueous layer was apparent. The organic phase was washed with water (3×30 mL); the moisture was removed by anhydrous Na₂SO₄ and the solvent evaporated under reduced pressure. The residue thus obtained was chromatographed, using CHCl₃–MeOH as eluent, to yield 3-dehydro-20-hydroxyecdysone 2-acetate 20,22-acetonide (6) (13 mg, 43%) and 20-hydroxyecdysone 2-acetate 20,22-acetonide 3 α , 9 α -epoxide (9) (7 mg, 23%). A small quantity (ca 0.5 mg) of the least polar component was also obtained in the synthesis.

6. Fine needles (from EtOAc–hexane), mp 235–237°C; $\nu_{\max}$ 3440, 2970, 1731, 1678, 1452, 1372, 1324, 1244, 1170, 1105, 1042, 1000, 923, 756 cm⁻¹; δ_{H} (500 MHz, CDCl₃) 0.76 (s, 18-Me), 1.07 (s, 19-Me), 1.11 (s, 21-Me), 1.22 (s,

26-Me), 1.23 (s, 27-Me), 1.30 and 1.39 (each s, acetonide Me), 2.12 (s, MeCOO), 2.28 (t, $J=8.7$ Hz, H-17), 2.73 (dd, $J=12.5, 5.5$ Hz, H-5), 3.64 (dd, $J=9.4, 2.1$ Hz, H-22), 5.07 (dd, $J=11, 7$ Hz, H-2), 5.91 (br s, H-7); HRMS (FAB (-ve): $[M-H]^-$, found 559.3271. $C_{32}H_{48}O_8-H$ requires 559.3270.

9. Fine needles (from CH_2Cl_2 -hexane), mp 236-238°C; [Found: C, 66.82; H, 8.33. $C_{32}H_{48}O_8$ requires C, 66.67; H, 8.33%]; ν_{max} 3468, 2972, 1738, 1678, 1445, 1372, 1323, 1243, 1169, 1105, 1042, 998, 922, 871 cm^{-1} ; δ_H (500 MHz, $CDCl_3$) 0.77 (s, 18-Me), 0.99 (s, 19-Me), 1.15 (s, 21-Me), 1.22 (s, 26-Me), 1.24 (s, 27-Me), 1.33 and 1.41 (each s, acetonide Me), 2.10 (s, MeCOO), 2.22 (t, $J=9$ Hz, H-17), 3.66 (br d, $J=ca 8$ Hz, H-22), 4.86 (br d, $J=ca 9$ Hz, H-2), 5.91 (s, H-7); δ_C (125.65 MHz, $CDCl_3$) 17.6 (C-18), 20.8 (acetate Me), 21.1 (C-11), 21.2 (C-19)^a, 21.9 (C-21)^a, 23.5 (C-16), 26.8 (acetonide Me), 27.9, 28.0, 28.2, 30.5 (C-4, C-12, C-15, C-23), 28.9 (acetonide Me)^b, 29.2 (C-26)^b, 29.3 (C-27)^b, 36.4 (C-10), 39.0 (C-1), 41.2 (C-24), 46.9 (C-13), 48.6 (C-17), 50.5 (C-5), 70.3 (C-25), 70.7 (C-2), 78.4 (C-20), 82.0 (C-22), 84.3 (C-14), 86.0 (C-9), 96.6 (C-3), 106.9 (acetonide C), 122.1 (C-7), 157.9 (C-8), 171.3 (acetate CO), 200.6 (C-6)^{a,b}. Assignments may be reversed for signals with the same superscript; m/z (ES, +ve) 599 $[M+Na]^+$; m/z (ES, -ve) 575 $[M-H]^-$.

Conversion of compound 6 to compound 13

To a solution of compound 6 (20 mg, 0.036 mmol) in MeOH- $CHCl_3$ (1:10, 4 mL) was added SiO_2 (Merck's silica gel 60, 0.063-0.200 mm, 500 mg) and the contents stirred for 10 h. The mixture was filtered, the solvents were evaporated and the residue chromatographed to yield compound 13 (9 mg) and the starting material 6 (7 mg). Compound 6 was subjected to another isomerization and column chromatography of the mixture gave compound 13 (2 mg) and compound 6 (2 mg). This gave a total yield of compound 13 of 61% based on the unrecovered starting material.

13. Amorphous; ν_{max} 3478, 2972, 1727 (br), 1663, 1461, 1372, 1312, 1233, 1169, 1136, 1106, 1084, 1057, 1000, 870 cm^{-1} ; δ_H (500 MHz, $CDCl_3$) 0.72 (s, 18-Me), 1.03 (s, 19-Me), 1.08 (s, 21-Me), 1.16 (s, 26-Me), 1.17 (s, 27-Me), 1.25 and 1.34 (each s, acetonide Me), 2.08 (s, MeCOO), 2.22 (d, $J=13.9$ Hz, H-1 α), 2.58 (dd, $J=13.2, 4.1$ Hz, H-5), 2.59 (d, $J=13.9$ Hz, H-1 β), 2.72 (m, H-9), 3.58 (dd, $J=9.4, 2.1$ Hz, H-22), 5.18 (dd, $J=12.5, 7$ Hz, H-3, $W_{1/2}=21$ Hz), 5.82 (d, $J=2.4$ Hz, H-7); HRMS (FAB, -ve): $[M-H]^-$, found 559.3269. $C_{32}H_{48}O_8-H$ requires 559.3270.

Acetonide deprotection of compound 13

To a solution of compound 13 (55 mg, 0.098 mmol) in EtOH (0.5 mL) was added 70% AcOH (3 mL) and the mixture stirred at 45°C for 5 h. Water (100 mL) was added and the mixture extracted with EtOAc (3x50 mL). The combined EtOAc extract was washed with water, dried and evaporated to dryness to give 46 mg of compound 16, part of which was used directly in subsequent reaction.

Deacetylation of compound 16

A solution of compound 16 (25 mg, 0.048 mmol) in EtOH (1 mL) and 10% aq guanidine acetate (1 mL, 0.840 mmol) was stirred at 50°C for 2 days. Water (50 mL) was added and the mixture extracted with *n*-BuOH (3x40 mL). The combined organic phase was washed with water and evaporated by co-distillation with water under reduced pressure. The residue was subjected to reversed-phase column chromatography (Merck's silica gel 60 RP-18 (40-63 μ m) for preparative HPLC) using H_2O -MeOH as eluting solvent and fractions eluted by H_2O -MeOH (7:3) gave pure compound 1 (9 mg, 35% overall from the acetate acetonide 13); Amorphous; ν_{max} 3400, 2964, 2830, 1718, 1662, 1552, 1453, 1383, 1315, 1208, 1072 cm^{-1} ; δ_H (500 MHz, C_5D_5N): 1.07 (s, 19-Me), 1.16 (s, 18-Me), 1.38 (s, 26-Me and 27-Me), 1.53 (s, 21-Me), 2.38 (d, $J=13.7$ Hz, H-1 α), 2.73 (d, $J=13.7$ Hz, H-1 β), 2.86 (dd, $J=13.2, 4.1$ Hz, H-5), 2.92 (t, $J=9$ Hz, H-17), 3.27 (m, H-9), 3.84 (br d, $J=9.6$ Hz, H-22), 4.58 (dd, $J=11.9, 7$ Hz, H-3, $W_{1/2}=21$ Hz), 6.20 (d, $J=2.1$ Hz, H-7); δ_C (125.65 MHz, C_5D_5N) 17.7 (C-18), 20.8 (C-11), 21.3 (C-16), 21.5 (C-21), 22.9 (C-19), 27.4 (C-23), 29.8 (C-26), 30.1 (C-27), 31.4 (C-15), 31.7 (C-12), 36.1 (C-4 and C-9), 42.5 (C-24), 42.9 (C-10), 48.0 (C-13), 49.1 (C-1), 49.9 (C-17), 55.7 (C-5), 69.5 (C-25), 74.8 (C-3), 76.7 (C-20), 77.4 (C-22), 83.9 (C-14), 121.1 (C-7), 165.1 (C-8), 200.3 (C-6), 209.9 (C-2); m/z (ES, +ve) 501 $[M+Na]^+$; HRMS (FAB (-ve): $[M-H]^-$, found 447.2855. $C_{27}H_{42}O_7-H$ requires 477.2852.

Acknowledgements

This work was supported by the Thailand Research Fund (TRF). We are grateful to Miss Wanwimon Thabdee, Scientific and Technological Research Equipment Centre, Chulalongkorn University, for recording the NMR spectra, to Miss Suttiporn Chaichana, Faculty of Science, Mahidol University, and Mr Nitirat Chimnoi, Chulabhorn Research Institute, for recording the mass spectra. We are also grateful to Mrs Patcharin Poochaiwatananon, Faculty of Science, Mahidol University, for performing elemental analysis.

References

- Sarker, S. D.; Sik, V.; Rees, H. H.; Dinan, L. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 2311-2314.
- Lafont, R.; Wilson, I. D. *The Ecdysone Handbook*, 2nd Ed.; The Chromatographic Society: Nottingham, 1996.
- Suksamrarn, A.; Sommechai, C. *Phytochemistry* **1993**, *32*, 303-306.
- Siddall, J. B.; Horn, D. H. S.; Middleton, E. J. *Chem. Commun.* **1967**, 899-900.
- Galbraith, M. N.; Horn, D. H. S.; Middleton, E. J.; Hackney, R. J. *Aust. J. Chem.* **1969**, *22*, 1517-1524.
- Galbraith, M. N.; Horn, D. H. S.; Middleton, E. J.; Thomson, J. A.; Siddall, J. B.; Hafferl, W. *Chem. Commun.* **1969**, 1134-1135.
- Dinan, L. N. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **1985**, *2*, 295-317.
- Petersen, Q. R.; Cambie, R. C.; Russell, G. B. *Aust. J. Chem.* **1993**, *46*, 1961-1964.
- Suksamrarn, A.; Ganpinyo, P.; Sommechai, C. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 4445-4448.

10. Suksamrarn, A.; Pattanaprateep, P. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 10633–10650.
11. Lloyd-Jones, J. G.; Rees, H. H.; Goodwin, T. W. *Phytochemistry* **1973**, *12*, 569–572.
12. Davies, T. G.; Lockley, W. J. S.; Boid, R.; Rees, H. H.; Goodwin, T. W. *Biochem. J.* **1980**, *190*, 537–544.
13. Davies, T. G.; Dinan, L. N.; Lockley, W. J. S.; Rees, H. H.; Goodwin, T. W. *Biochem. J.* **1981**, *194*, 53–62.
14. Suksamrarn, A.; Charoensuk, S.; Yingyongnarongkul, B. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 10673–10684.
15. Suksamrarn, A.; Yingyongnarongkul, B. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 3145–3154.
16. Suksamrarn, A.; Sommechai, C.; Charulpong, P.; Chitkul, B. *Phytochemistry* **1995**, *38*, 473–476.

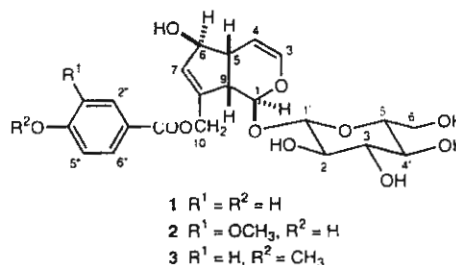
Iridoids with Anti-Inflammatory Activity from *Vitex peduncularis*

A. Suksamrarn¹, S. Kumpun¹, K. Kirtikara², B. Yingyongnarongkul¹, S. Suksamrarn³

Abstract

A new iridoid, pedunculariside, together with the known iridoid agnuside were isolated from the butanol extract of *Vitex peduncularis* stem bark. Both pedunculariside and agnuside showed preferential inhibition of COX-2, with IC₅₀ values of 0.15 ± 0.21 mg/ml and 0.026 ± 0.015 mg/ml respectively, while having only small inhibitory effects on COX-1. Both compounds did not exhibit cytotoxicity against vero cells.

Vitex peduncularis Wall. (Verbenaceae) is a small to moderate-sized tree found in India, Thailand and neighboring countries [1]. This plant is reported as a febrifuge [2]. Its bark is used for making an external application for pains of the chest [3]. Previous work on the leaves of this plant revealed the presence of the flavonoids vitexin [4], pachypodol, and peduncularisin [5] and the triterpenoids friedelin, *epi*-friedelinol, ursolic acid and 2 α -hydroxyursolic acid, including the steroid β -sitosterol [5].



Investigation of polar fractions of the butanol extract of *V. peduncularis* stem bark led to the isolation of two iridoids. The first compound was identified as agnuside (1) by spectroscopic (IR, ¹H-NMR and mass spectra) comparisons with the reported values [6]. Compound 2, pedunculariside, was obtained as an amorphous solid, with a molecular formula of C₂₃H₂₈O₁₂ from FAB mass spectral data and elemental analysis. Examination of the ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectra of 2 revealed that they were similar to those reported for both compounds 1 and limoniside (3) [6]. However, the splitting patterns of the aromatic protons in the ¹H-NMR spectrum of 2 were different from those of com-

Affiliation: ¹ Department of Chemistry, Ramkhamhaeng University, Bangkok, Thailand · ² National Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency, Bangkok, Thailand · ³ Department of Chemistry, Srinakharinwirot University, Bangkok, Thailand

Correspondence: Assoc. Prof. Dr. A. Suksamrarn · Department of Chemistry · Faculty of Science · Ramkhamhaeng University · Bangkok 10240 · Thailand · E-Mail: apichart@ram1.ru.ac.th · Fax: +66 2-3108381

Received: February 9, 2001 · **Accepted:** May 13, 2001

Bibliography: *Planta Med* 2002; 68: 72-73 · © Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York · ISSN 0032-0943

pounds **1** and **3**. Thus, signals at $\delta = 6.86$ (d, $J = 8.2$ Hz, H-5''), 7.58 (d, $J = 2.1$ Hz, H-2'') and 7.60 (dd, $J = 8.2, 2.1$ Hz, H-6'') agreed very well with the 3-methoxy-4-hydroxybenzoyl system. The ^{13}C -NMR data also supported this finding. The alternative 3-hydroxy-4-methoxybenzoyl system was ruled out by NOESY correlation between the methoxy signal at $\delta = 3.91$ and that of H-2'' at $\delta = 7.58$. Compound **2** was therefore concluded to be aucubin 10-O-vanillate. Copies of the original spectra can be obtained from the author of correspondence.

Iridoids **1** and **2** were tested for inhibition of cyclooxygenase (COX, prostaglandin H synthase)-1 and COX-2 regulated prostaglandin biosynthesis using COX deficient murine cell lines [7]. Compound **1** showed preferential inhibition of COX-2 over COX-1 (COX-2 $\text{IC}_{50} = 0.026 \pm 0.015$ mg/ml and less than 10% inhibition of COX-1 at this concentration). Similarly, compound **2** had a COX-2 IC_{50} value of 0.15 ± 0.21 mg/ml while having almost no effect on COX-1 activity as indicated by less than 10% inhibition at this concentration. In all our experiments, aspirin was employed as a non-selective COX-2 inhibitor with COX-1 and COX-2 IC_{50} values of 0.014 ± 0.008 and 0.058 ± 0.053 mg/ml, respectively. All values were derived from 3 separate experiments performed in triplicate and presented as mean $\pm$ SD. Iridoids **1** and **2** exhibited no cytotoxicity against vero cells [8].

Materials and Methods

The plants were collected in Chiang Mai Province, Thailand and a voucher specimen, No. 0025 (RU), is deposited at the Plant Collection Center, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University. The pulverized, dry stem bark (2 kg) of *V. peduncularis* was extracted with MeOH in a Soxhlet extraction apparatus. The concentrated MeOH solution was diluted with H_2O and extracted successively with *n*-hexane, CHCl_3 and *n*-BuOH. The butanol extract which gave a coloration indicative of iridoids on TLC with anisaldehyde reagent was subjected to silica gel CC using $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ as eluting solvent. The fraction eluted by $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (88:12) was rechromatographed to give four fractions. The third fraction, eluted by $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (90:10) was subjected to further silica gel CC to give seven fractions. The fifth fraction after two repeated CC afforded agnuside (**1**) (20 mg, 0.001%), $[\alpha]_D^{25} = -106.0$ ($c = 0.10$, MeOH). Spectroscopic (IR, ^1H -NMR and mass) data were consistent with those reported previously [6]. The third fraction after silica gel CC was subjected to repeated reversed-phase CC, using Merck's silica gel 60 RP-18 (40–63 μm), to yield a new iridoid pedunculariside (**2**) (8 mg, 0.0004%) as amorphous solid, $[\alpha]_D^{25} = -64.0$ ($c = 0.05$, MeOH). IR (KBr): $\nu_{\text{max}} = 3390, 2916, 1705, 1595, 1514, 1428, 1378, 1284, 1214, 1044, 761$ cm^{-1} . FABMS (-ve): m/z (rel. int.) = 495 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, 14). ^1H -NMR (CD_3OD): $\delta = 2.71$ (1H, m, H-5), 3.00 (1H, br t, $J = 7.4$ Hz, H-9), 3.23–3.40 (4H, m), 3.66 (1H, dd, $J = 11.9, 5.5$ Hz) and 3.85 (1H, dd, $J = 11.9, 2.2$ Hz) (H-2' to H-6'), 3.91 (3H, s, OCH_3), 4.47 (1H, m, H-6), 4.70 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-1'), 4.93 and 5.08 (2 $\times$ 1H, 2 br d, $J = 14.9$ Hz, 2 $\times$ H-10), 5.02 (1H, d, $J = 7$ Hz, H-1), 5.11 (1H, dd, $J = 6.1, 3.9$ Hz, H-4), 5.83 (1H, m, H-7), 6.34 (1H, dd, $J = 6.1, 1.8$ Hz, H-3), 6.86 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5''), 7.58 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2''), 7.60 (1H, dd, $J = 8.2, 2.1$ Hz, H-6''). ^{13}C -NMR (CD_3OD): $\delta = 44.7$ (C-5), 47.0 (C-9), 55.0 (OCH_3), 61.3 (C-6), 62.3 (C-10), 70.0 (C-4'), 73.5 (C-2'), 76.5 and 76.8 (C-3' and C-5'), 81.4 (C-6), 96.4 (C-1'), 98.8 (C-1'), 104.1 (C-4), 112.2 (C-2''), 114.6 (C-5'), 123.8 (C-6''), 131.1 (C-7), 140.3 (C-3), 141.5 (C-8),

147.4 (C-4''), 151.6 (C-3''), 166.4 (CO_2Ar). Anal calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_{12}$: C, 55.64; H, 5.68 (Found: C, 55.86; H, 5.89).

Acknowledgements

This work was supported by the Thailand Research Fund (TRF). We are grateful to Mr. Nitirat Chimnoi, Chulabhorn Research Institute, for recording the mass spectra.

References

- Chadha SYR. The Wealth of India. Vol. X New Delhi: CSIR, 1976: 524
- Burkill JH. A Dictionary of the Economic Products of the Malay Peninsula. Vol. II Kuala Lumpur: Ministry of Agriculture and Co-operatives, 1966: 2277
- Kirtikar KR, Basu BD. Indian Medicinal Plants. Vol. III, 2nd ed. Delhi: M/S Bisben Singh Mahendra Pal Singh and M/S Periodical Experts, 1935: 1941
- Rao CB, Venkateswarlu V. Chemical examination of *Vitex peduncularis*; I. Isolation of vitexin and its constitution. Journal of Scientific & Industrial Research (India) 1962; 21B: 313–7
- Sahu NP, Roy SK, Mahato SB. Triterpenoids and flavonoids of *Vitex peduncularis*. Planta Medica 1984; 50: 527
- Suksamrarn S, Kumcharoen S, Suksamrarn A. Iridoids of *Vitex limnifolia*. Planta Medica 1999; 65: 392
- Kirtikara K, Morham SG, Raghov R, Lauderkind SJ, Kanekura T, Goorha S, Ballou LR. Compensatory prostaglandin E2 biosynthesis in cyclooxygenase 1 or 2 null cells. Journal of Experimental Medicine 1998; 187: 517–23
- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. Journal of National Cancer Institute 1990; 82: 1107–12



Pergamon

Insect Biochemistry and Molecular Biology 32 (2002) 193–197

*Insect
Biochemistry
and
Molecular
Biology*

www.elsevier.com/locate/ibmb

Chemical modifications at the 22-hydroxyl group of ecdysteroids: alternative structural requirements for high moulting activity

Apichart Suksamrarn ^{a,*}, Prasert Pattanaprteep ^a, Tanud Tanachatchairatana ^a,
Woraphot Haritakun ^a, Boon-ek Yingyongnarongkul ^a, Nitirat Chimnoi ^b

^a Department of Chemistry, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bangkok 10240, Thailand

^b Chulabhorn Research Institute, Vipavadee-Rungsit Highway, Bangkok 10210, Thailand

Abstract

A number of 22-*O*-alkyl ether and acyl ester derivatives have been prepared and their moulting activity determined, using the *Musca* assay. It was found that a free 22-hydroxyl group is not an essential structural requirement for an ecdysteroid to exhibit high moulting activity. The activity of a 22-*O*-substituted ecdysteroid may even be higher than that of the parent compound, providing that the substituent constitutes a functional group that can enhance biological activity. The moulting activity is not sensitive to steric factors at the 22-position. Ecdysteroid without a 22-hydroxyl group may exhibit high moulting activity if a functional group that can enhance activity is present at an appropriate position. © 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Ecdysteroids; 22-*O*-acyl esters; Moulting activity; *Musca* assay

1. Introduction

One of the essential structural requirements for an ecdysteroid, e.g., 20-hydroxyecdysone (1) (Fig. 1),¹ to exhibit high moulting activity is the presence of a free 22*R*-hydroxyl group (Bergamasco and Horn, 1980). It is not surprising, therefore, that 22-*epi*-20-hydroxyecdysone (2), a 22*S*-hydroxy-ecdysteroid, was inactive in the *Calliphora* assay (Bergamasco and Horn, 1980). Recent CoMFA (comparative molecular field analysis) studies based on the in vitro *Drosophila* B₁₁ cell assay also indicated that a 22*R*-hydroxyl group enhances activity, but inversion of configuration at the 22-position depresses activity (Dinan et al., 1999). Pinnasterone (3), an ecdysteroid lacking a 22-hydroxyl group isolated from *Vitex pinnata*, showed very low moulting activity in the *Musca* assay; it was 43 times less active than ecdysteroid 1 (Table 1) (Suksamrarn and Sommechai, 1993). However, canescensterone (4), the 24-*O*-(pyrrole-2-carboxylate) ester of compound 3, was 36 times more active than ecdysteroid 3 (Table 1) (Suksamrarn et al.,

1995). The high moulting activity of this 22-deoxy-ecdysteroid could not be explained by existing data. Further work on structure-activity relationships of ecdysteroids with different functional groups and/or derivatives at the 22-position is therefore necessary.

2. Materials and methods

Infrared (IR) spectra were recorded in KBr on a Jasco IR-700 spectrophotometer. Proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR) spectra were recorded on a Jeol JNM-A500 spectrometer. Electrospray mass spectra (ESMS) and fast atom bombardment mass spectra (FABMS) were measured on a Bruker Esquire LC and a Finnigan MAT 90 instruments, respectively. Column chromatography and thin layer chromatography (TLC) were carried out using Merck's silica gel 60 (>230 mesh) and precoated silica gel 60 F₂₅₄ plates, respectively. Spots on TLC were visualized under ultraviolet (UV) light and by spraying with anisaldehyde-H₂SO₄ reagent followed by heating.

2.1. Preparations of ecdysteroid derivatives

Starting from 20-hydroxyecdysone 2,3-acetonide (5), which in turn was prepared from ecdysteroid 1, 20-hyd-

* Corresponding author. Tel.: +66-2-3191900; fax: +66-2-3108381.
E-mail address: apichart@ram1.ru.ac.th (A. Suksamrarn).

¹ See Fig. 1 for the structures of ecdysteroids 1 to 15 referred to in this paper.

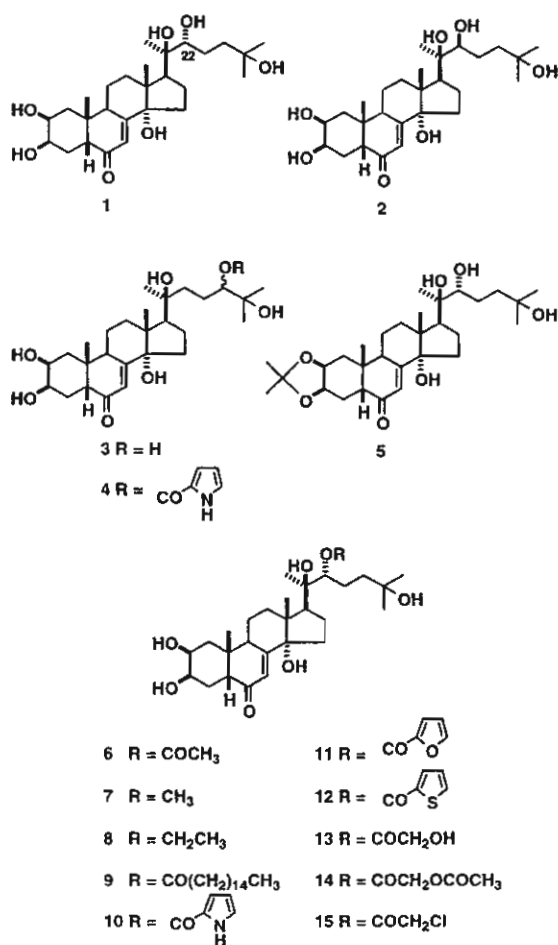


Fig. 1. Structures of ecdysteroids.

Table 1
EC₅₀ of ecdysteroids

Compound	EC ₅₀ (M) ^a
1	1.6×10 ⁻⁵
3	6.9×10 ⁻⁴
4	1.9×10 ⁻⁵
6	2.1×10 ⁻⁵
7	2.5×10 ⁻⁵
8	2.4×10 ⁻⁵
9	3.1×10 ⁻⁵
10	7.6×10 ⁻⁶
11	5.4×10 ⁻⁵
12	1.4×10 ⁻⁴
13	3.1×10 ⁻⁶
14	5.8×10 ⁻⁶
15	2.8×10 ⁻⁵

^a Concentration of ecdysteroid solution (3 μl per larva) required to effect puparium formation of 50% effectiveness (Ohtaki et al., 1967).

roxyecdysone 22-acetate (6) was prepared according to the published method (Suksamrarn and Pattanapateep, 1995). The 22-*O*-methyl ether 7 and 22-*O*-ethyl ether 8 were prepared from compound 5 by methylation and ethylation with appropriate alkyl iodide and silver oxide in dimethylformamide at ambient temperature, and the resulting products were subjected to deacetonation with 70% acetic acid.

Compound 7 — IR, $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 3436, 2960, 1678, 1461, 1442, 1382, 1149, 1103; ¹H NMR (C₅D₅N), δ (ppm): 1.06 (3H, s, 19-CH₃), 1.18 (3H, s, 18-CH₃), 1.37 (3H, s, 26-CH₃), 1.38 (3H, s, 27-CH₃), 1.51 (3H, s, 21-CH₃), 2.86 (1H, t, $J=9.1$ Hz, H-17), 2.99 (1H, dd, $J=13.2, 3.5$ Hz, H-5), 3.26 (1H, dd, $J=8.8, \sim 1$ Hz, H-22), 3.56 (1H, m, H-9), 3.61 (3H, s, 22-OCH₃), 4.18 (1H, m, H-2), 4.22 (1H, br s, H-3), 6.24 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-7); ESMS (+ve), m/z (amu) [species] (% rel. intensity): 517 [M+Na]⁺ (100). Found: C, 67.65; H, 9.03. C₂₈H₄₆O₇ requires C, 67.99; H, 9.37%.

Compound 8 — IR, $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 3448, 2969, 1654, 1382, 1057; ¹H NMR (C₅D₅N), δ (ppm): 1.07 (3H, s, 19-CH₃), 1.17 (3H, t, $J=7$ Hz, 22-OCH₂CH₃), 1.18 (3H, s, 18-CH₃), 1.38 (3H, s, 26-CH₃), 1.39 (3H, s, 27-CH₃), 1.51 (3H, s, 21-CH₃), 2.88 (1H, t, $J=9$ Hz, H-17), 3.01 (1H, dd, $J=13.1, 3.5$ Hz, H-5), 3.37 (1H, br d, $J=8.5$ Hz, H-22), 3.57 (1H, m, H-9), 3.75 (1H, m, 22-OCH₂CH₂Hb), 3.89 (1H, m, 22-OCH₂CH₂Hb), 4.19 (1H, m, H-2), 4.23 (1H, br s, H-3), 6.25 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-7); ESMS (+ve), m/z (amu) [species] (% rel. intensity): 531 [M+Na]⁺ (100), 509[M+H]⁺ (5). High-resolution FABMS (HR-FABMS) (+ve), m/z (amu): 509.3479. C₂₉H₄₈O₇+H requires 509.3478.

20-Hydroxyecdysone 22-*O*-palmitate (9) was prepared by reacting compound 5 with palmitoyl chloride in pyridine and benzene at ambient temperature, followed by deacetonation. 20-Hydroxyecdysone 22-*O*-(pyrrole-2-carboxylate) (10) was prepared by reacting compound 5 with pyrrole-2-carboxylic acid anhydride and 4-dimethylaminopyridine (DMAP) in triethylamine-dioxane under reflux, followed by deacetonation. The 22-*O*-(furan-2-carboxylate) 11, 22-*O*-(thiophene-2-carboxylate) 12, 22-*O*-glycolate 13, 22-*O*-acetylglycolate 14 and 22-*O*-chloroacetate 15 were prepared in the same manner as compound 9.

Compound 9 — IR, $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 3442, 2992, 2852, 1713, 1651, 1465, 1378, 1227, 1054, 950, 721; ¹H NMR (C₅D₅N), δ (ppm): 0.84 (3H, t, $J=6.6$ Hz, OCOCH₂(CH₂)₁₃CH₃), 1.04 (3H, s, 19-CH₃), 1.17 (3H, s, 18-CH₃), 1.20 (26H, br m, OCOCH₂(CH₂)₁₃CH₃), 1.35 (3H, s, 26-CH₃), 1.36 (3H, s, 27-CH₃), 1.65 (3H, s, 21-CH₃), 2.42 (2H, t, $J=6.8$ Hz, OCOCH₂), 3.00 (2H, m, H-5 and H-17), 3.57 (1H, m, H-9), 4.16 (1H, m, H-2), 4.21 (1H, br s, H-3), 5.53 (1H, br d, $J=9.2$ Hz, H-22), 6.22 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H-7); HR-FABMS (+ve), m/z (amu): 719.5462. C₄₃H₇₄O₈+H requires 719.5461.

Compound 10 — IR, $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 3409, 2968, 1657,

1450, 1412, 1384, 1318, 1171, 1054, 953, 880, 844; ^1H NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$), δ (ppm): 1.06 (3H, s, 19- CH_3), 1.19 (3H, s, 18- CH_3), 1.27 (2 $\times$ 3H, s, 26- CH_3 and 27- CH_3), 1.68 (3H, s, 21- CH_3), 3.00 (1H, dd, $J=13.2, 3.5$ Hz, H-5), 3.04 (1H, t, $J=8.8$ Hz, H-17), 3.57 (1H, m, H-9), 4.18 (1H, m, H-2), 4.23 (1H, br s, H-3), 5.72 (1H, dd, $J=10.8, 2$ Hz, H-22), 6.22 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-7), 6.37 (1H, m, H-4'), 7.23 (1H, m, H-3'), 7.28 (1H, m, H-5'), 13.18 (1H, br s, NH); HR-FABMS (–ve), m/z (amu): 572.3229. $\text{C}_{32}\text{H}_{47}\text{NO}_8\text{–H}$ requires 572.3223.

Compound 11 — IR, ν_{max} (cm^{-1}): 3141, 2926, 1702, 1651, 1576, 1472, 1394, 1301, 1227, 1183, 1122, 1055, 1016, 944, 880; ^1H NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$), δ (ppm): 1.06 (3H, s, 19- CH_3), 1.18 (3H, s, 18- CH_3), 1.29 (2 $\times$ 3H, s, 26- CH_3 and 27- CH_3), 1.74 (3H, s, 21- CH_3), 2.99 (1H, dd, $J=13.4, 3.6$ Hz, H-5), 3.03 (1H, t, $J=8.8$ Hz, H-17), 3.59 (1H, m, H-9), 4.18 (1H, m, H-2), 4.24 (1H, br s, H-3), 5.72 (1H, dd, $J=10.9, 1.8$ Hz, H-22), 6.22 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-7), 6.44 (1H, dd, $J=3.3, 1.5$ Hz, H-4'), 7.28 (1H, dd, $J=3.3, 0.9$ Hz, H-3'), 7.71 (1H, dd, $J=1.5, 0.9$ Hz, H-5'); HR-FABMS (+ve), m/z (amu): 575.3218. $\text{C}_{32}\text{H}_{46}\text{O}_9\text{+H}$ requires 575.3220.

Compound 12 — IR, ν_{max} (cm^{-1}): 3424, 2930, 1710, 1648, 1522, 1415, 1383, 1275, 1225, 1159, 1101, 1050, 946, 873; ^1H NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$), δ (ppm): 1.06 (3H, s, 19- CH_3), 1.19 (3H, s, 18- CH_3), 1.30 (2 $\times$ 3H, s, 26- CH_3 and 27- CH_3), 1.75 (3H, s, 21- CH_3), 3.00 (1H, dd, $J=13.4, 3.6$ Hz, H-5), 3.05 (1H, t, $J=9$ Hz, H-17), 3.58 (1H, m, H-9), 4.20 (1H, m, H-2), 4.24 (1H, br s, H-3), 5.70 (1H, dd, $J=10.8, 2$ Hz, H-22), 6.23 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-7), 7.03 (1H, dd, $J=4.8, 3.6$ Hz, H-4'), 7.65 (1H, dd, $J=4.8, 1.2$ Hz, H-3'), 7.93 (1H, dd, $J=3.6, 1.2$ Hz, H-5'); HR-FABMS (+ve), m/z (amu): 591.1994. $\text{C}_{32}\text{H}_{46}\text{SO}_8\text{+H}$ requires 591.1991.

Compound 13 — IR, ν_{max} (cm^{-1}): 3398, 2964, 1733, 1648, 1444, 1381, 1226, 1054; ^1H NMR (CD_3OD), δ (ppm): 0.88 (3H, s, 18- CH_3), 0.95 (3H, s, 19- CH_3), 1.16 (3H, s, 26- CH_3), 1.17 (3H, s, 27- CH_3), 1.28 (3H, s, 21- CH_3), 2.38 (2H, m, H-5 and H-17), 3.15 (1H, m, H-9), 3.81 (1H, m, H-2), 3.85 (1H, br s, H-3), 4.14 (1H, d, $J=17.1$ Hz, OCOCH_2CHb), 4.21 (1H, d, $J=17.1$ Hz, OCOCH_2CHb), 4.93 (1H, dd, $J=10.7, 2.1$ Hz, H-22), 5.80 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-7); HR-FABMS (+ve), m/z (amu): 539.3227. $\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{O}_9\text{+H}$ requires 539.3220.

Compound 14 — IR, ν_{max} (cm^{-1}): 3428, 2964, 1742, 1646, 1444, 1384, 1208, 1055; ^1H NMR (CD_3OD), δ (ppm): 0.88 (3H, s, 18- CH_3), 0.95 (3H, s, 19- CH_3), 1.16 (3H, s, 26- CH_3), 1.17 (3H, s, 27- CH_3), 1.28 (3H, s, 21- CH_3), 2.12 (3H, s, OCOCH_3), 2.37 (2H, m, H-5 and H-17), 3.15 (1H, m, H-9), 3.82 (1H, m, H-2), 3.95 (1H, m, H-3), 4.68 (2H, s, OCOCH_2), 4.94 (1H, dd, $J=10.4, 1.8$ Hz, H-22), 5.80 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-7); HR-FABMS (+ve), m/z (amu): 581.3321. $\text{C}_{31}\text{H}_{48}\text{O}_{10}\text{+H}$ requires 581.3325.

Compound 15 — IR, ν_{max} (cm^{-1}): 3394, 2966, 2870, 1715, 1649, 1444, 1382, 1227, 1143, 1058; ^1H NMR

($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$), δ (ppm): 1.02 (3H, s, 19- CH_3), 1.16 (3H, s, 18- CH_3), 1.24 (3H, s, 26- CH_3), 1.33 (3H, s, 27- CH_3), 1.78 (3H, s, 21- CH_3), 2.87 (1H, t, $J=8.8$ Hz, H-17), 2.97 (1H, dd, $J=13.3, 3.4$ Hz, H-5), 3.53 (1H, m, H-9), 4.15 (1H, m, H-2), 4.21 (1H, m, H-3), 5.58 (1H, br d, $J=10.4$ Hz, H-22), 6.15 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-7), 6.74 (1H, d, $J=16.3$ Hz, OCOCH_2CHb), 7.46 (1H, d, $J=16.3$ Hz, OCOCH_2CHb); HR-FABMS (+ve), m/z (amu): 557.2881. $\text{C}_{29}\text{H}_{45}\text{ClO}_8\text{+H}$ requires 557.2881.

2.2. Bioassay

The *Musca* assay was performed according to Kaplanis et al. (1966). Briefly, mature *Musca domestica* larvae were ligated on the seventh or eighth segment and those that had formed puparia at their anterior ends, whereas the abdominal compartments remained larval stage, were used. A 1 mg portion of ecdysteroid was dissolved in 24 to 48 μl of absolute ethanol [or Tween 80 in case of 20-hydroxyecdysone 22-*O*-palmitate (compound, g to 12)] and the solution was subsequently diluted with distilled water to a volume of 300 μl . The resulting ecdysteroid solution, the initial concentration of which was 10 $\mu\text{g}/3 \mu\text{l}$, was diluted with distilled water to appropriate concentrations depending on the activity of each ecdysteroid. 20-Hydroxyecdysone (1) and appropriate solvent were used as positive and negative controls, respectively. Three μl of each ecdysteroid concentration were injected into the abdominal part of the ligated insect. Ten ligated larvae were used in each ecdysteroid concentration. The results were scored according to Ohtaki et al. (1967) and EC_{50} s were determined by plotting concentrations (calculated in M) against % effectiveness of puparium formation (see Table 1).

3. Results and discussion

Conversions of 20-hydroxyecdysone (1) into its 22-*O*-acyl ester derivatives, e.g., the 22-*O*-acetate (6) in the terrestrial snail *Cepaea nemoralis* (Garcia et al., 1986) and the 22-*O*-long-chain fatty esters in the tobacco budworm *Heliothis virescens* (Zhang and Kubo, 1994), were regarded as one of the inactivation mechanisms of exogenous ecdysteroid. Inactivation by acetylation or other acylation at the 22-hydroxyl group could possibly be due to the bulkiness of the acetyl or acyl group (steric factor) and/or the lack of a free hydroxyl group at the 22-position to bind with the ecdysteroid receptor. To find out which factor is operating or dominating, the 22-*O*-methyl ether 7 was prepared and subjected to biological evaluation. The *in vivo Musca* assay has been used throughout the present study. It was found that compound 7 showed some decrease in moulting activity compared with the parent ecdysteroid 1 (Table 1). Decrease in biological activity of compound 7 could be

due to either the inability of the 22-hydroxyl group to form hydrogen bonding with the receptor and/or the increase in steric interaction of the methyl group in compound 7 compared with the hydrogen group in compound 1. To test whether the latter is dominating, the corresponding 22-*O*-ethyl ether 8 was prepared; no decrease in moulting activity of 8 in the same bioassay was observed. It was then assumed that the steric effect was not an important factor in this case. Next, we wished to study the effect of structural changes in substituent group at the 22-position. Since moulting activity of ecdysteroids is species-specific, it was decided to start with the activity of the 22-*O*-acetate 6. It was reported that this compound caused supernumerary moulting and reduced egg-laying in the tick *Ornithodoros moubata* (Savolainen et al., 1995). In the *Musca* assay, we found that this compound was slightly less active than the parent ecdysteroid 1 (Table 1). In case of the above methyl and ethyl ethers 7 and 8, steric factors did not have a strong influence in their activity. We therefore decided to study moulting activity of a higher acyl ester derivative, and the 22-*O*-palmitate 9 was prepared and tested for activity. This fatty ester was isolated previously from *O. moubata* (Diehl et al., 1985). Despite a very large acyl group, compound 9 was only slightly less active than the acetate 6. The result indicated that steric hindrance at the 22-position was not the important factor for moulting activity. However, the possibility of the esters 6 and 9 being hydrolysed in vivo to a relatively more active metabolite could not be ruled out. Inactivation through 22-*O*-substitution in the in vivo *Musca* experiments was in agreement with those obtained from the in vitro *Drosophila* B₁₁ cell line studies (Harmatha and Dinan, 1997; Dinan et al., 1999).

Turning back to canescensterone (4), it is obvious that the unexpectedly high moulting activity of this 22-deoxy-ecdysteroid compared with pinnasterone (3) was due to the presence of the pyrrole-2-carboxylate moiety at the 24-position. Lack of a 22-hydroxyl group has thus been compensated for by the nitrogen heterocyclic functionality. In order to have information about the influence of this functional group, it was planned to place the pyrrole-2-carboxylate moiety at the 22-position of compound 1 and compound 10 was therefore prepared. To our surprise, compound 10 was twice as active as the parent ecdysteroid 1, despite the bulkiness of the pyrrole-2-carboxylate moiety (Table 1). The high activity of compound 10 was not simply due to the ability of this compound to be hydrolysed to compound 1, since the activity of 10 was higher than that of compound 1. If hydrolysis of the heterocyclic ester did occur, the possibility that the released pyrrole-2-carboxylic acid would result in high moulting activity was ruled out, since pyrrole-2-carboxylic acid alone was inactive in the assay. The high activity of compound 10 as compared with the parent compound 1 could be accounted for a

number of possibilities. The first possible explanation was probably that the NH function was responsible for such high activity by acting as a ligand or by forming a hydrogen bond with the receptor. To see whether the central role of the NH function in 10 was to form hydrogen bonds or to act as a good ligand, the furan-2-carboxylate 11 and thiophene-2-carboxylate 12 were chosen as the oxygen and sulfur analogues. These two heterocyclic moieties are of the same size as the nitrogen analogue, the pyrrole-2-carboxylate moiety, but the former two analogues are unable to bind with the receptor as effectively as the latter. As expected, compounds 11 and 12 were much less active than compound 10 (Table 1).

The second possible explanation is based on the hydrolysis rate of the 22-ester derivatives of ecdysteroid 1. It is known that esters can be cleaved to the corresponding free ecdysteroids. In the case of the heterocyclic ester 10, the stable vinylogous-amide nature of the pyrrole-2-carboxylate moiety probably prevented rapid in vivo hydrolysis. Slow release of free ecdysteroid 1 would thus prevent rapid deactivation of this compound in the insect. The moulting activity of a free ecdysteroid was then prolonged. This was supported by the fact that chemical hydrolysis of compound 4 to compound 3 occurred with difficulty (Suksamrarn et al., 1995). In contrast, the corresponding furan- and thiophene-2-carboxylate esters 11 and 12, which were much less active than the ester 10, were hydrolysed more readily than compound 10. It should be noted that 20-hydroxyecdysone 2,3,22-triacetate induced moulting in the American lobster *Homarus americanus* more effectively than the parent ecdysteroid 1 (Gilgan and Burns, 1977).

Since hormonal activity is the net result of many variable contributing factors, the observed activity of the ester 10 could possibly be a result of these two combined factors: the intrinsic activity (affinity to the receptor) and kinetics of metabolism (rate of hydrolysis of the ester). In this respect, it would be of interest in a future work to compare the in vivo results with those of in vitro experiments using, e.g., the *Drosophila* B₁₁ cell assay (Clément et al., 1993).

Based on the intrinsic factor, comparison of the moulting activity of compound 1 with that of compound 10 led to the assumption that the NH function of the pyrrole-2-carboxylate moiety could bind with the receptor's active site more effectively than the 22-hydroxyl group. However, such conclusion is not quite logical, since the strength of binding of the NH and OH groups with the receptor is different. In order to compare biological activity with the 22-hydroxyl function, such functional group should be a hydroxyl group as well. We therefore considered choosing another model functional group. In order to see whether the hydroxyl group located at approximately the same distance as that of the NH group in compound 10 would bind to the receptor as efficiently as the NH group, the open-chain analogue 13, 20-hyd-

roxyecdysone 22-*O*-glycolate, was prepared. It should be mentioned that compound 13 is a rare ecdysteroid isolated from the pycnogonid *Pycnogonum littorale* (Bückmann et al., 1986). Compound 13 exhibited very high moulting activity in the *Musca* assay; it was about 5 times more active than the parent ecdysteroid 1 and was almost 2.5 times more active than the 22-pyrrole-(2-carboxylate) ester 10 (Table 1). The high activity of the glycolate ester 13 should result from the presence of the hydroxyl function at a distance of three bonds away from the original 22-hydroxyl group in compound 1. In order to see whether the hydroxyl function of the glycolate moiety was responsible for such high activity, the corresponding acetate derivative 14, 20-hydroxyecdysone 22-*O*-acetyl glycolate, was prepared and moulting activity determined. As expected, the acetate derivative 14 was less active than its parent compound 13, indicating the role of the hydroxyl group of the glycolate moiety. It should be noted that, although compound 14 was less active than compound 13, it was nevertheless more active than the ecdysteroid 1. The high activity of compound 14 was probably due to the ability of 14 to be hydrolysed in vivo to the highly active compound 13. In order to have more information about the glycolate group, it was planned to replace the hydroxyl function with another group that could not form hydrogen bonds or act as a ligand like that of compound 13, and the chloroacetate 15 was prepared. Again, the activity of compound 15 was less than that of compound 13 (Table 1), thus confirming the role of a free hydroxyl group in enhancing activity.

The biological activity of the glycolate series could also be considered in terms of the kinetics of metabolism, that is, the rate of hydrolysis of the ester functions. The unusually high activity of the glycolate ester 13 needs special attention. In order to have more insight into the contribution of the structure of the 22-*O*-acyl moiety to moulting activity, future work on biological activity of 22-*O*-acyl esters with a wider range of functional groups is required.

The findings indicated that a free 22-hydroxyl group is not an essential feature for an ecdysteroid to exhibit high moulting activity. The activity of the 22-*O*-substituted ecdysteroids may even be higher than that of the parent compounds, providing that the substituent constitutes a functional group that can enhance biological activity. It was also found that the activity is not sensitive to steric factors at the 22-position. It is further concluded that an ecdysteroid without a 22-hydroxyl group may exhibit high moulting activity, if a functional group that can enhance activity is present at an appropriate position.

Acknowledgements

This work was supported by the Thailand Research Fund (TRF). We are grateful to Wanna Sririnnuth and Suttiporn Chaichana for recording the NMR and electrospray mass spectra. We are also grateful to the referees for their valuable comments.

References

- Bergamasco, R., Horn, D.H.S., 1980. The biological activities of ecdysteroids and analogues. In: Hoffmann, J.A. (Ed.), *Progress in Ecdysone Research*. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 299–324.
- Bückmann, D., Starnecker, G., Tomaschko, K.-H., Wilhelm, E., Lafont, R., Girault, J.-P., 1986. Isolation and identification of major ecdysteroids from the pycnogonid *Pycnogonum littorale* (Strom) (Arthropoda, Pantopoda). *J. Comp. Physiol.* 156, 759–765.
- Clément, C.Y., Bradbrook, D.A., Lafont, R., Dinan, L., 1993. Assessment of a microplate-based bioassay for the detection of ecdysteroid-like or antiecdysteroid activities. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 23, 187–193.
- Diehl, P.A., Connat, J.-L., Girault, J.-P., Lafont, R., 1985. A new class of apolar ecdysteroids conjugates: esters of 20-hydroxyecdysone with long chain fatty acids in ticks. *Int. J. Invert. Reprod. Dev.* 8, 1–13.
- Dinan, L., Hormann, R.E., Fujimoto, T., 1999. An extensive ecdysteroid CoMFA. *J. Comput.-Aided Mol. Design* 13, 185–207.
- Garcia, M., Girault, J.-P., Lafont, R., 1986. Ecdysteroid metabolism in the terrestrial snail *Cepaea nemoralis* (L.). *Int. J. Invert. Reprod. Dev.* 9, 43–58.
- Gilgan, M.W., Burns, B.G., 1977. Molt induction in lobsters (*Homarus americanus*) by intramuscular injection of ecdysterone triacetate. *Experientia* 38, 114–115.
- Hammath, J., Dinan, L., 1997. Biological activity of natural and synthetic ecdysteroids in the B_{10} bioassay. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 35, 219–225.
- Kaplanis, J.N., Tabor, L.A., Thompson, M.J., Robbins, W.E., Shortino, T.J., 1966. Assay for ecdysone (molting hormone) activity using the house fly, *Musca domestica* L. *Steroids* 8, 625–631.
- Ohtaki, T., Milkman, R.D., Williams, C.M., 1967. Ecdysone and ecdysone analogues: their assay on the fleshfly *Sarcophaga peregrina*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58, 981–984.
- Savolainen, V., Wuest, J., Lafont, R., Connat, J.-L., 1995. Effect of ingested phytoecdysteroids in the female soft tick *Ornithodoros moubata*. *Experientia* 51, 596–600.
- Suksamrarn, A., Sommechai, C., 1993. Ecdysteroids from *Vitex pinnata*. *Phytochemistry* 32, 303–306.
- Suksamrarn, A., Pattanapratcep, P., 1995. Selective acetylation of 20-hydroxyecdysone. Partial synthesis of some minor ecdysteroids and analogues. *Tetrahedron* 51, 10633–10650.
- Suksamrarn, A., Sommechai, C., Charulpong, P., Chitkul, B., 1995. Ecdysteroids from *Vitex canescens*. *Phytochemistry* 38, 473–476.
- Zhang, M., Kubo, I., 1994. Mechanisms of *Heliothis virescens* resistance to exogenous ecdysteroids. In: Hedin, P.A. (Ed.), *Bioregulators for Crop Protection and Pest Control*. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 182–201.



Pergamon

Tetrahedron 58 (2002) 3619–3622

TETRAHEDRON

Diterpenylated and prenylated flavonoids from *Macaranga denticulata*

Somyote Sutthivaiyakit,^{a,*} Sasinee Unganont,^a Pakawadee Sutthivaiyakit^b
and Apichart Suksamrarn^a

^aDepartment of Chemistry, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Huamark, Ramkhamhaeng Road, Bangkok, Bangkok 10240, Thailand

^bDepartment of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

Received 27 November 2001; revised 6 February 2002; accepted 7 March 2002

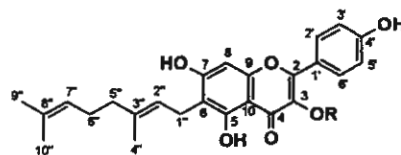
Abstract—An *O*-methylated analogue of macarangin (1) and denticulaflavonol (2) which possesses a diterpene substituent have been isolated along with other compounds from the leaves of *Macaranga denticulata*. Their detailed 1D and 2D spectral analysis are reported. The radical scavenging properties of compounds 3–5 were evaluated. Among the compounds tested, 4 showed a pronounced antioxidant activity (IC₅₀ 0.032±0.001 mM). © 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

In our investigation for bioactive constituents from plants, we studied the leaves of *Macaranga denticulata* Muell. Arg. (synonymous name *Macaranga henricorum* Hemsl., Euphorbiaceae), known in Thai as 'Tong Taeb'.¹ The plant is a shrubby tree which grows to about 20 m in height. The stem water decoction has been used traditionally for washing wounds and drunk as tonic by women after child labor.¹ Previously reported constituents from the species of this genus comprise terpenes, steroids, hydrolysable tannins and prenylflavanones from *M. tanarius*,^{2–5} bergenin derivatives from *M. peltata*,⁶ chromenoflavones from *M. indica*,⁷ a hexahydroxanthene derivative and a geranyl flavonol from *M. vedeliana*,^{8,9} prenylated flavanones from *M. pleiostemona*,¹⁰ and geranyl stilbenes from *M. schweinfurthii*.¹¹

Two flavonoids, one of which is named denticulaflavonol, features the presence of a unique labdane diterpene moiety, have been isolated from the leaves of this plant along with other compounds. To our knowledge, this is the first example of a flavonoid possessing a diterpene substituent. We herein describe the isolation, structural elucidation and radical scavenging properties of the isolates.

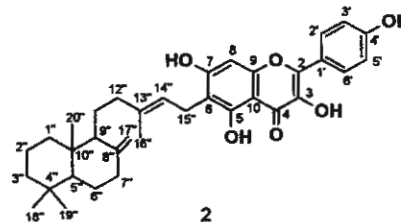
The chloroform extract of the dried leaves of *M. denticulata* was purified as described in the experimental section to yield two compounds (1, 2) as well as scopoletin (3),¹² macarangin (4)³ and sophoraflavanone B (5).¹³ The known

compounds were identified by comparison of their published spectral data.

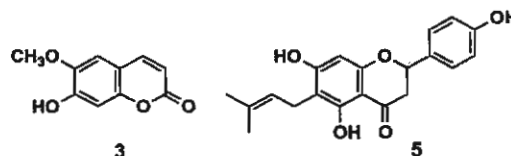


1, R = Me

4, R = H



2



3

5

Compound 1 was obtained as yellow sticky solid. It was assigned the molecular formula C₂₆H₂₈O₆ by HR-EIMS. The FT-IR showed absorption bands at ν_{max} 3275, 1658 and 1608 cm⁻¹ indicating the presence of a hydroxy, an

Keywords: *Macaranga denticulata*; Euphorbiaceae; diterpene; flavonoid; diterpenylated flavonoid; antioxidant.

* Corresponding author. Tel.: +662-319-1900; fax: +662-310-8401; e-mail: somyote_s@yahoo.com; somyote@ram1.ru.ac.th

Table 1. ^1H and ^{13}C NMR spectral data of 1 (in $\text{MeOH}-d_4$), 2 and 4 (in CDCl_3)

No.	2			1			4	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	HMBC	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	HMBC	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$
2		146.0 (s)			130.6 (s)			145.5 (s)
3	6.59 (s, 3-OH)	135.5 (s)	3-OH/C-2, 3, 4	3.66 (s, 3-OMe)	139.8 (s) ^c	3-OMe/C-3	5.9 (s, 3-OH)	135.4 (s)
4		175.3 (s)			179.9 (s)			175.2 (s)
5	12.1 (s, 5-OH)	158.0 (s)	5-OH/C-5, 6, 10		159.7 (s)		12.1 (s, 5-OH)	157.4 (s)
6		109.4 (s)			112.9 (s)			109.4 (s)
7	6.25 (s, 7-OH)	161.7 (s)	7-OH/C-6, 7, 8		163.7 (s)		6.6 (s, 7-OH)	161.8 (s)
8	6.48 (s)	94.3 (d)	C-6, 9, 10	6.33 (s)	93.9 (d)	C-4, 6, 7, 9, 10	6.45 (s)	94.3 (d)
9		155.0 (s)			156.3 (s)			155.0 (s)
10		103.2 (s)			105.7 (s)			103.5 (s)
1'		123.5 (s)			122.7 (s)			123.4 (s)
2',6'	8.12 (d, 8.9)	129.6 (d)	C-2, 4'	7.87 (d, 8.9)	131.3 (d)	C-2, 3', 5'	8.1 (d, 8.5)	129.6 (d)
3',5'	6.97 (d, 8.8)	115.6 (d)	C-1', 4'	6.82 (d, 8.9)	116.5 (d)	C-2', 4'	6.94 (d, 8.3)	115.6 (d)
4'	5.37 (s, 4'-OH)	157.3 (s)	4'-OH/C-3', 5'		161.6 (s)		5.5 (s, 4'-OH)	157.6 (s)
1''	a 1.74 (m), b 0.97 (ddd, 12.8, 12.8, 3.9)	39.0 (t)	C-3'', 5'', 9'', 20''	3.22 (m)	22.2 (t)	C-5, 7, 2'', 3''	3.48 (d, 7.1)	21.4 (t)
2''	n.o.	n.o.		5.14 (dd, 7.2, 6.3)	123.5 (d)	C-6, 4'', 5''	5.28 (m)	120.9 (d)
3''	a 1.37 m, b 1.15 (ddd, 13.4, 13.2, 4.0)	42.1 (t)	C-1'', 18'', 19''		135.7 (s)			139.8 (s)
4''		n.o.		1.68 (s)	16.3 (q)	C-3'', 5''	1.83 (s)	16.2 (q)
5''	1.05 (dd, 9.9, 2.7)	55.5 (d)	C-1'', 6'', 10'', 18'', 19'', 20''	1.86 (dd, 7.4, 6.8)	40.9 (t)	C-2'', 3'', 4'', 6''	2.10 (m)	39.7 (t)
6''	a 1.67 (m), b 1.27 (m)	24.4 (t)	C-8''	1.95 (dd, 7.6, 7.1)	27.7 (t)	C-3'', 5'', 7''	2.10 (m)	26.3 (t)
7''	a 2.4 (ddd, 12.7, 4.1, 2.3), b 1.90 (ddd, 13.7, 13.3, 4.7)	38.3 (t)	C-5'', 6'', 8'', 17''	4.95 (m)	125.4 (d)	C-9'', 10''	5.05 (m)	123.7 (d)
8''		148.6 (s)			132.0 (s)			132.1 (s)
9''	1.56 (m)	56.0 (d)	C-1'', 8'', 17'', 20''	1.51 (s)	25.8 (q)	C-7'', 10''	1.68 (s)	25.7 (q)
10''		39.6 (s)		1.45 (s)	17.7 (q)	C-7'', 9''	1.59 (s)	17.7 (q)
11''	a 1.47 (m), b 1.43 (m)	19.4 (t)	C-9'', 12''					
12''	a 2.19 (m), b 1.85 (m)	38.5 (t)	C-13''					
13''		140.7 (s)						
14''	5.27 (dd, 7.3, 6.5)	120.6 (d)	C-12'', 16''					
15''	3.49 (d, 7.0)	21.4 (t)	C-5, 6, 7, 13'', 14''					
16''	1.84 (s)	16.4 (q)	C-12'', 13''					
17''	a 4.80 (d, 1.2), b 4.49 (s)	106.2 (t)	C-7'', 8''					
18''	0.86 (s)	33.6 (q)	C-3'', 19''					
19''	0.79 (s)	21.7 (q)	C-3'', 18''					
20''	0.67 (s)	14.5 (q)	C-1'', 5'', 9''					

n.o. signal was not observed, may be obscured by other signals.

^a Multiplicities and J -values in Hz are given in parentheses.^b Multiplicities were deduced from DEPT experiments.^c Signal of 3-OCH₃ was found at δ_{C} 60.5 (q).

α,β -unsaturated carbonyl and aromatic groups, respectively. The ^1H NMR in $\text{MeOH}-d_4$ exhibiting one set of AB doublets at δ_{H} 7.87 (2H, d, $J=8.9$ Hz) and 6.82 (2H, d, $J=8.9$ Hz) together with the ^{13}C NMR signals at δ_{C} 161.6 (s), 131.3 (d), 116.5 (d) and 122.7 (s) indicated the *para*-disubstituted phenol ring. The presence of a geranyl group was deduced from the mass spectrum which showed base peak at m/z 313 ($[\text{M}-\text{CH}=\text{CMeCH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{Me})_2]^+$, 100 %) as well as the ^1H NMR showing two olefinic protons at δ_{H} 5.14 (1H, d, $J=7.2, 6.3$ Hz) and 4.95 (1H, m), allylic protons at δ_{H} 3.22 (2H, d, $J=3.4, 1.7$ Hz), two sets of two proton signals at δ_{H} 1.95 (dd, $J=7.6, 7.1$ Hz) and 1.86 (dd, $J=7.4, 6.8$ Hz) and three methyl group signals at δ_{H} 1.68 (s), 1.51 (s), and 1.45 (s). The lowfield signal at δ_{H} 12.98, an indicative evidence of a C-5-OH proton intramolecularly H-bonded to C-4 carbonyl oxygen atom of a flavonoid nucleus, could be detected when deuterated chloroform was used as solvent although the compound is sparingly soluble. A broad signal at δ_{H} 6.33 assigned to the C-8 H showed $^3J_{\text{CH}}$ correlations to the signals at δ_{C} 105.7 (C-10), 112.9 (C-6) as well as $^2J_{\text{CH}}$ and $^4J_{\text{CH}}$ correlations to the signals at δ_{C} 156.3 (C-9), 163.7 (C-7) and 179.9 (C-4),

respectively. A geranyl substitution at C-6 was deduced from the important $^3J_{\text{CH}}$ correlations of the signal at δ_{H} 3.22 (H-1'') to ^{13}C resonances at δ_{C} 112.9 (C-6), 123.5 (C-2''), 135.7 (C-3'') 159.7 (C-5) and 163.7 (C-7). This compound showed NMR data very similar to values published for macarangenin (4), a compound previously isolated from *M. vedeliana*⁸ and also isolated in the present study. The only difference observed was a methyl proton signal at δ_{H} 3.66. The $^3J_{\text{CH}}$ correlation between the signal at δ_{H} 3.66 with the signal at δ_{C} 139.8 (C-3) strongly indicated the presence of an *O*-methyl group at C-3. Compound 1 was proposed to be 3-*O*-methyl-macarangenin, 3-*O*-methyl-6-[(*E*)-3'',8''dimethyl-2'',7''-octadienyl]-kaempferol.

Compound 2 was obtained as yellowish sticky mass. The HR-EIMS gave a molecular formula of $\text{C}_{35}\text{H}_{42}\text{O}_6$. The IR spectrum showed the presence of a hydroxyl and a carbonyl groups at ν_{max} 3232 and 1647 cm^{-1} , respectively. The ^1H NMR spectrum measured in CDCl_3 showing two sets of doublets at δ_{H} 8.12 (H-2', 6') and 6.97 (H-3', 5'), a one proton singlet at δ_{H} 6.48 (H-8) and a downfield proton at δ_{H} 12.1 (C-5-OH) with the absence of the 3-OMe group

signal, as found in compound 1, indicated the existence of a kaempferol $C_{15}H_9O_6$ unit with the same substitution pattern as for 1. The remaining $C_{20}H_{31}$ moiety, establishing five double bond equivalents, was recognized as a labdane type diterpene conjugate by the presence of an exocyclic methylene group signals at δ_H 4.80 (1H, d, $J=1.2$ Hz) and 4.49 (1H, s), a vinylic proton of a trisubstituted double bond at δ_H 5.27 and a downfield methyl group signal at δ_H 1.84 (3H, s) assignable to $-C=C-CH_3$ in addition to the three shielded quaternary methyl group singlets at δ_H 0.86, 0.79 and 0.67 which have one-bond correlations with the ^{13}C shifts of the methyl groups commonly encountered in the labdane diterpenes¹⁴ at δ_C 33.6 (C-18"), 21.7 (C-19") and 14.5 (C-20") in the HMQC spectrum, respectively. Connection of the labdanyl unit to C-6 was established by the long range $^1H-^{13}C$ correlations of signals at δ_H 3.49 (assigned for H-15") to signals at δ_C 109.4 (C-6), 158.0 (C-5) and 161.7 (C-7). The placement of a trisubstituted double bond at C-13"-C-14" was further deduced by the $^1H-^1H$ COSY and HMBC correlations particularly of H-15" to C-13" (δ_C 140.7) and C-14" (δ_C 120.6). Detailed interpretation of the $^1H-^1H$ COSY, HMQC and HMBC spectra, in conjunction with the analysis of ^{13}C shifts of several representatives of the labdane diterpenes reported previously,¹⁴ permitted unambiguous assignments of ^1H and ^{13}C resonances as indicated in Table 1, the key long range $^1H-^{13}C$ correlations are also shown. Compound 2, trivially named denticulaflavonol, was identified as 6-[15"-labda-8" (17"), 13" (14")-dienyl]-kaempferol.

Due to the scarcity of pure samples, only compounds 3–5 were evaluated for their antioxidant properties using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) stable radical.¹⁵ Macarangin (4) exhibited an IC_{50} 0.032 ± 0.001 mM which is as pronounced as a standard antioxidant, 2,6-di-(*tert*-butyl)-4-methylphenol (BHT), IC_{50} 0.031 ± 0.001 mM. Scopoletin (3) also showed rather significant antioxidant property (IC_{50} 0.342 ± 0.026 mM). Since sophorafflavone B (5) showed only 31.8% reduction at 0.759 mM, its IC_{50} was therefore not determined.

1. Experimental

1.1. General

The specific rotations were measured by a Jasco DIP 1020 polarimeter. The IR spectra were obtained on a Perkin-Elmer 1760x FT-IR spectrophotometer. UV spectra were recorded on a Perkin-Elmer Lambda 6 instrument. EI-MS and HR-EIMS spectra were recorded on a Finnigan MAT 90 instrument. ^1H and ^{13}C spectra were obtained with a Bruker AVANCE 400 MHz spectrometer with the solvent signal as internal reference.

1.2. Plant material

Leaves of *M. denticulata* were collected from Trat Province in December 1997. The species was kindly identified by Dr K. Chayamarit of the Royal Forest Herbarium, Bangkok. A voucher specimen (SSMD/1997) is kept at the Chemistry Department, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University.

1.3. Extraction and isolation

The dried leaves (1230 g) were ground and extracted successively with *n*-hexane, chloroform and methanol, respectively. The chloroform extract (33.7 g) was separated on silica gel with gradient of *n*-hexane/ CH_2Cl_2 (15:85) to CH_2Cl_2 /MeOH (3:2) to afford nine fractions. Fraction 8 was purified by column chromatography over a Si gel, with gradient of *n*-hexane/EtOAc (3:1) to EtOAc/MeOH (9:1) to obtain six fractions (fractions 8.1–8.6). Additional Si gel chromatography of fraction 8.3 with *n*-hexane/EtOAc (9:1) afforded 12 subfractions (subfractions 8.3.1–8.3.12). Compounds 1 (20 mg, 0.00163% w/w) and 5 as a sticky gum (31 mg, 0.00252% w/w) were obtained from subfraction 8.3.6 after further column chromatography over Si gel (*n*-hexane/EtOAc 8:2). Fraction 6 was chromatographed over Si gel, eluted with a gradient of CH_2Cl_2 to CH_2Cl_2 /MeOH (6:4) and afforded subfractions 6.1–6.5. Subfraction 6.4 was further chromatographed over Si gel using gradient of *n*-hexane/ CH_2Cl_2 2:8 to CH_2Cl_2 and yielded subfractions 6.4.1–6.4.3. Subfraction 6.4.1 contained pure compound 3 as a pale yellow solid, mp 193–195°C, (20 mg, 0.00163% w/w). Subfraction 6.4.2 gave compound 2 (3 mg, 0.00024% w/w) after additional column chromatography over Si gel using *n*-hexane/EtOAc 9:1. Subfraction 6.4.3 was purified by Si gel column chromatography using gradient of *n*-hexane/ CH_2Cl_2 2:8 to CH_2Cl_2 /MeOH 9:1 to yield compound 4 as a yellow solid, mp 140–143°C, (120 mg, 0.00975% w/w).

1.3.1. 3-*O*-Methyl-macarangin (1). Yellow sticky solid; R_f 0.17 [silica gel, *n*-hexane/EtOAc 7:3]; $[\alpha]_D^{26} = -0.5254$ (c 0.590, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ): 204 (4.50), 214 (4.49), 270 (4.27), 339 (4.23) nm; IR (film) ν_{max} : 3275, 2936, 1658, 1608, 1568, 1471, 1359, 1286, 1233, 1177, 1089, 973, 815 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR data (measured in MeOH- d_4) see Table 1; EI-MS (70 eV) m/z (rel. int.): 437 ($[M+1]^+$, 1), 371 (21), 365 (11), 351 (18), 345 (21), 344 (61), 340 (16), 325 (15), 314 (20), 313 (100), 299 (10), 281 (5), 270 (13), 253 (6), 242 (9), 203 (10), 165 (8), 121 (55), 105 (11), 91 (18); HR-EIMS m/z 436.1894 $[M]^+$ (calcd for $C_{26}H_{28}O_6$, 436.1886, error in ppm=1.83).

1.3.2. Denticulaflavonol (2). Yellow sticky mass; R_f 0.32 [silica gel, *n*-hexane/EtOAc 7:3]; $[\alpha]_D^{26} = -131.8$ (c 0.050, $CHCl_3$); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ): 207 (4.67), 270 (4.13), 329 (4.04) nm; IR (film) ν_{max} : 3232, 2921, 1647, 1542, 1508, 1363, 1180, 1087, 883, 841 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR data (measured in $CDCl_3$) see Table 1; HR-EIMS m/z 558.2978 $[M]^+$ (calcd for $C_{35}H_{42}O_6$, 558.2981, error in ppm=0.53).

1.4. Bioassay

Compounds 3–5 were tested for radical scavenging properties using DPPH.¹⁵ 50 μL of a solution containing the compound to be tested was added to 5 ml of a 0.004% methanolic solution of DPPH. Absorbance at 517 nm was determined after 30 min at 37°C, and the percent of activity was calculated. IC_{50} is the mean $\pm$ standard deviation of three assays.

Acknowledgements

We are grateful to the Thailand Toray Science Foundation, the Thailand Research Fund and Ramkhamhaeng University for financial support. Thanks are due to Dr K. Chayamarit of the Forest Herbarium, Royal Forest Department, Bangkok, for the identification of the plant material, Mr N. Chimnoi, Chulabhorn Research Institute, for HRMS measurements and to Ms P. Srisomphot for some technical assistance.

References

- Phupattanapong, L.; Wongprasert, T. *Thai Medicinal Plants. Part 5*; Chutima: Bangkok, 1987, p 687 (in Thai).
- Hui, W. H.; Ng, K. K.; Fukamiya, N.; Koreeda, M.; Nakanishi, K. *Phytochemistry* **1971**, *10*, 1617–1620.
- Hui, W. H.; Li, M. M.; Ng, K. K. *Phytochemistry* **1975**, *14*, 816–817.
- Lin, J. H.; Nonaka, G. I.; Nishioka, I. *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38*, 1218–1223.
- Tseng, M. H.; Chou, C. H.; Chen, Y. M.; Kuo, Y. H. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 827–828.
- Ramaiah, P. A.; Row, L. R.; Reddy, D. S.; Anjaneyulu, A. S. R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1979**, 2313–2316.
- Sultana, S.; Ilyas, M. *Phytochemistry* **1986**, *25*, 953–954.
- Hnawia, E.; Thoison, O.; Gueritte-Voegelein, F.; Bourret, D.; Sevenet, T. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 2367–2368.
- Thoison, O.; Hnawia, E.; Gueritte-Voegelein, F.; Sevenet, T. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 1439–1442.
- Schutz, B. A.; Wright, A. D.; Rali, T.; Sticher, O. *Phytochemistry* **1995**, *40*, 1273–1277.
- Beutler, J. A.; Shoemaker, R. H.; Johnson, T.; Boyd, M. R. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1509–1512.
- Pouchert, C. J.; Behnke, J. 1st ed.; *The Aldrich Library of ¹³C and ¹H FT NMR Spectra*, Vol. 2; Aldrich Chemical, Wisconsin, 1993 p 1314.
- Komatsu, M.; Yokoe, I.; Shirataki, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1978**, *26*, 3863–3870.
- Buckwalter, B. L.; Burfitt, I. R.; Nagel, A. A.; Wenkert, E.; Naf, F. *Helv. Chim. Acta* **1975**, *58*, 1567–1573.
- Atta-Ur-Rahman; Ngounou, F. N.; Choudhary, M. I.; Malik, S.; Makhmoor, T.; Nur-E-Alam, M.; Zareen, S.; Lontsi, D.; Ayafor, J. F.; Sondengam, B. L. *Planta Med.* **2001**, *67*, 335–339.

Xanthenes from the Green Fruit Hulls of *Garcinia mangostana*

Sunit Suksamrarn,*[†] Narisara Suwannapoch,[†] Pinit Ratananukul,[†] Nantana Aroonlerk,[‡] and Apichart Suksamrarn[‡]

Department of Chemistry, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Bangkok 10110, Thailand, Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University, Bangkok 10110, Thailand, and Department of Chemistry, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bangkok 10240, Thailand

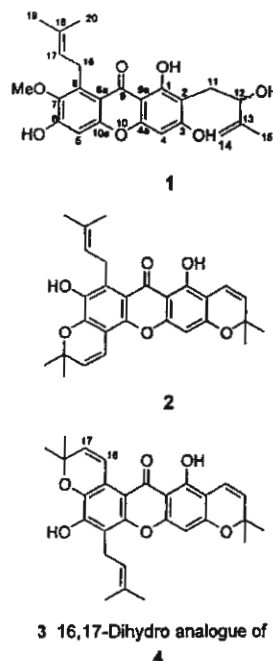
Received November 9, 2001

Three new xanthenes, mangostenol (1), mangostenone A (2), and mangostenone B (3), were isolated from the green fruit hulls of *Garcinia mangostana*, along with the known xanthenes, trapezifolixanthone, tovoophyllin B (4), α - and β -mangostins, garcinone B, mangostinone, mangostanol, and the flavonoid epicatechin. The structures of the new xanthenes were elucidated by analysis of their spectroscopic data.

Phytochemical studies have shown that *Garcinia mangostana* L. (Clusiaceae) is rich in a variety of oxygenated and prenylated xanthenes.^{1,2} Biological studies on the constituents of the fruit hulls have demonstrated antibacterial,³⁻⁶ antifungal,⁶ antitumor-promotion,⁷ and other biological activities.⁸⁻¹⁰ In Thai folk medicine, the fruit hulls of *G. mangostana* are used for healing skin infections and wounds and for the relief of diarrhea.¹¹ The present work on the green fruit hulls of *G. mangostana*, collected from Chanthaburi Province of Thailand, was initiated to determine whether any phytochemical differences exist between the ripe and the green fruit hulls. This led to the isolation and characterization of three new xanthenes, mangostenol (1), mangostenone A (2), and mangostenone B (3), and several known xanthenes, trapezifolixanthone,¹² tovoophyllin-B (4),¹³ α -mangostin,¹⁴ β -mangostin,¹⁵ garcinone B,¹⁶ mangostinone,¹⁷ mangostanol,¹⁸ and the flavonoid epicatechin.¹⁹ Among these known compounds, trapezifolixanthone has not been isolated previously from this plant. The structures of compounds 1-3 were determined unambiguously by 1D and 2D ¹H and ¹³C NMR experiments in conjunction with spectral comparison with data for known related compounds. Moreover, the ¹³C NMR data of tovoophyllin-B (4) are reported for the first time in this paper.

The fresh green fruit hulls of *G. mangostana* were extracted with MeOH, and the dried residue obtained was then separated by column chromatography to afford three new xanthenes, 1-3, and several known compounds.

Compound 1, mangostenol, was obtained as a yellow powder, with mp 157-159 °C, and [α]_D²⁰ -20.0° (c 0.10, MeOH). The molecular formula C₂₄H₂₆O₇ (m/z 426.1680) was determined by HREIMS. Its UV and IR spectra were indicative of a xanthone derivative. The ¹H NMR spectrum showed one chelated phenolic hydroxyl group [δ 13.86 (s)], two aromatic singlets [δ 6.22 (1H, s) and 6.64 (1H, s)], and one methoxyl group [δ 3.69 (3H, s)]. Signals due to a prenyl group were observed [δ 1.59 (3H, s) and 1.75 (3H, s), 4.00 (2H, d, J = 6.1 Hz), 5.16 (1H, m)]. Olefinic signals of a terminal double bond [δ 4.73 (1H, br s) and 4.90 (1H, br s)], as well as resonances for a methyl group [δ 1.74 (3H, s)] and a hydroxy methine proton [δ 4.22 (1H, dd, J = 8.4 and ca. 2.2 Hz)], established a 2-hydroxy-3-methylbut-3-enyl group. The ¹H and ¹³C NMR spectral data of 1 closely



resembled those of α -mangostin,^{10,14} except for the presence in 1 of a 2-hydroxy-3-methylbut-3-enyl moiety instead of a prenyl group. The structural assignments were substantiated by 2D NMR techniques (HMQC and HMBC) and NOE experiments. In the HMBC spectrum (Table 1), the protons resonating at δ 2.78 and 3.01 (H-11) showed long-range heteronuclear connectivities with C-1 (δ 160.6), C-2 (δ 107.7), and C-3 (δ 162.7) as well as with C-12 (δ 76.1) and C-13 (δ 146.9), whereas H-12 (δ 4.22) was coupled with C-2, C-11 (δ 28.5), C-13, C-14 (δ 109.8), and C-15 (δ 17.9). The H-16 proton, resonating at δ 4.00, exhibited HMBC interactions with C-7 (δ 143.0), C-8 (δ 137.2), C-8a (δ 111.3), C-17 (δ 123.2), and C-18 (δ 131.5). The methoxyl signal at δ 3.69 showed a cross-peak with a quaternary aromatic carbon signal at δ 143.0. In an NOE experiment, irradiation of H-16 (δ 4.00) gave rise to the enhancement of the methoxyl signal at δ 3.69. Similarly, irradiation of H-12 also resulted in NOE enhancements of the H-11, H-14, and

* To whom correspondence should be addressed. Tel: 66 2-6641000, ext. 8217. Fax: 66 2-2592097. E-mail: sunit@psm.swu.ac.th.

[†] Faculty of Science, Srinakharinwirot University.

[‡] Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University.

[§] Ramkhamhaeng University.

Table 1. ¹H NMR and HMBC Data of Compounds 1–3

position	mangostenol (1)		mangostenone A (2)		mangostenone B (3)	
	H ^a	HMBC ^c	H ^b	HMBC ^c	H ^b	HMBC ^c
OH-1	13.86 s		13.82 s	1, 2, 9a	13.79 s	1
4	6.22 s	2, 3, 4a, 9, 9a	6.24 s	2, 3, 4a, 8a, 9, 9a	6.28 s	4a, 9a
5	6.64 s	6, 7, 8a, 9, 10a				
6 or OH-6					6.47 s	5, 6
OH-7 or OMe-7	3.69	7	5.52	6, 7, 8		
11	2.78 dd (14.6, 8.4) 3.01 dd (14.6, 2.2)	1, 2, 3, 12, 13	6.72 d (10.0)	1, 2, 3, 12, 13	6.71 d (10.0)	1, 3
12	4.22 dd (8.4, ca. 2.2)	2, 11, 13, 14, 15	5.55 d (10.0)	2, 11, 13, 14, 15	5.54 d (10.0)	13
14	4.73 br s, 4.90 br s	12, 13, 15	1.44 s	11, 12, 13	1.45 s	12, 13
15	1.74 s	12, 13, 14	1.44 s		1.45 s	
16	4.00 d (6.1)	7, 8, 8a, 17, 18	4.10 d (6.7)	7, 8, 8a, 17, 18	3.44 t (6.7)	7, 8, 17, 18
17	5.16 m	16, 18, 19, 20	5.28 br t (6.7)	19, 20	1.84 t (6.7)	8, 16, 18
19, 20	1.59 s, 1.75 s	16, 17, 18	1.68 s, 1.84 s	17, 18	1.36 s	17, 18
21			6.85 d (10.1)	5, 6, 10a, 23	3.54 d (7.2)	5, 6, 10a, 22, 23
22			5.65 d (10.1)	5, 23, 24, 25	5.26 m	
24, 25			1.51 s	21, 22, 23	1.66 s, 1.86 s	22, 23

^a Recorded in CDCl₃ + MeOH-d₄. ^b Recorded in CDCl₃. ^c Correlated carbons.

H-15 resonances. Thus, the observed NMR signals are characteristic of a 1,3,6,7-tetraoxygenated xanthone with methoxyl, prenyl, and 2-hydroxy-3-methylbut-3-enyl moieties at C-7, C-8, and C-2, respectively. Therefore, mangostenol (1) could be assigned as 1,3,5-trihydroxy-2-(2-hydroxy-3-methylbut-3-enyl)-7-methoxy-8-(3-methylbut-2-enyl)xanthone. However, the data obtained did not permit the assignment of absolute configuration at C-12 for this compound.

Mangostenone A (2) was isolated as a yellow powder, mp 110–112 °C, and HREIMS at *m/z* 460.1895 established a molecular formula of C₂₈H₂₈O₈. The UV and IR spectra suggested that 2 is a xanthone derivative. Analysis of the ¹H NMR, ¹H–¹H COSY, and HMQC spectra of 2 revealed the presence of a chelated hydroxyl group (δ 13.82) which was placed at C-1, a phenolic hydroxyl [δ 5.52 (1H, s, D₂O exchangeable)], and a single aromatic proton at δ 6.24. The other series of signals could be attributed to a prenyl group [δ 4.10 (2H, d, *J* = 6.7 Hz), 5.28 (1H, br t, *J* = 6.7 Hz), 1.68 (3H, s), and 1.84 (3H, s)] and two 2,2-dimethylchromene rings [δ 6.72 (1H, d, *J* = 10.0 Hz), 5.55 (1H, d, *J* = 10.0 Hz), 1.44 (6H, s) and δ 6.85 (1H, d, *J* = 10.1 Hz), 5.65 (1H, d, *J* = 10.1 Hz), 1.51 (6H, s)]. The ¹H and ¹³C NMR chemical shifts of 2 were very similar to those obtained from garcimangosone A,²⁰ with the only difference being the occurrence of a second dimethylchromene ring. Careful comparison of the ¹³C NMR data of these compounds, particularly the chemical shifts of C-5 (δ 106.9) and C-6 (δ 144.7), indicated that the second dimethylchromene substituent in 2 should be affixed at C-5/C-6 with the ether oxygen at C-6. Conclusive proof of the structure of 2 came from the extensive analysis of the HMBC (Table 1) and NOE spectra. The most important observations in the HMBC spectrum were the connectivities observed between the doublet proton signal at H-21 (δ 6.85) and C-10a (δ 147.3) and C-23 (δ 79.2) and between C-23 and the *cis* olefinic proton at δ 5.65 (H-22). An NOE observed for H-16 (δ 4.10) and OH-7 (δ 5.52), as well as the HMBC correlations between the phenolic signal at δ 5.52 and C-6, C-7, and C-8, further confirmed the placement of the prenyl moiety at C-8 and the hydroxyl group at C-7, respectively. An NOE between the chelated hydroxyl and H-11 together with the HMBC cross-peaks between H-11 and C-1, C-2, and C-3 established the presence of a 2,2-dimethylchromene ring at C-2/C-3 of the xanthone with the ether oxygen affixed to position C-3. The structure of mangostenone A (2) was thus elucidated as 1,7-dihydroxy-8-(3-

methylbut-2-enyl)-6',6'-dimethylpyrano(2',3':3,2)-6'',6''-dimethylpyrano(2'',3'':6,5)xanthone.

Mangostenone B (3), isolated as a yellow amorphous resin, was found to have the molecular formula C₂₈H₂₈O₈ by HREIMS (*m/z* 462.2050). Its UV and IR data suggested that 3 also possesses a xanthone skeleton. In the ¹H NMR spectrum, signals for an aromatic proton [δ 6.28 (1H, s)], a prenyl group [δ 3.54 (2H, d, *J* = 7.2 Hz), 5.26 (1H, m), 1.66 (3H, s), and 1.86 (3H, s)], and a 2,2-dimethylchromene ring [δ 3.44 (2H, t, *J* = 6.7 Hz), 1.84 (2H, t, *J* = 6.7 Hz), and 1.36 (6H, s)], together with a dimethylchromene ring [δ 6.71 (1H, d, *J* = 10.0 Hz), 5.54 (1H, d, *J* = 10.0 Hz), and 1.45 (6H, s)], were observed, in addition to two hydroxyl groups [δ 6.47 (1H, s) and 13.79 (1H, s, chelated OH)]. The ¹H NMR data of 3 were similar to those of totophyllin B (4), a compound isolated from *Tovomitia pyrifolium*.¹³ The only difference was in one of the dimethylchromene rings in 3, when the two doublets at H-16 and H-17 in 4 were replaced by the two triplet methylenes at H-16 and H-17. This structure assignment was confirmed by its HMBC spectra (Table 1). The ¹³C NMR data for 4 are reported herein for the first time (Table 2). The structure of mangostenone B (3) was therefore concluded to be 1,6-dihydroxy-5-(3-methylbut-2-enyl)-6',6'-dimethylpyrano(2',3':3,2)-6'',6''-dimethyl-4'',5''-dihydropyrano(2'',3'':7,8)xanthone.

The known xanthone trapezifolixanthone¹² or toxyloxanthone A²¹ was isolated as a minor constituent, and this compound has not been reported previously from this plant.

Although many xanthones alkylated with a variation of structure in C₆ unit(s) have been reported,^{1,2} those with a 2-hydroxy-3-methylbut-3-enyl group in the C₆ unit have been found only in caged-polyprenylated xanthones.^{22,23} Mangostenol (1) represents the first simple xanthone with a C₆ moiety of this type. A number of tri-C₆-oxygenated xanthone derivatives have been isolated from *Garcinia* species. However, there have been only two reports^{20,24} on the isolation of compounds of this type from *G. mangostana*. It also appears that tri-C₆-oxygenated xanthones such as 2 and 3 are rare constituents of *G. mangostana*.

Experimental Section

General Experimental Procedures. Melting points were determined on a Griffin melting point apparatus and are uncorrected. Optical rotations were measured with a JASCO DIP-370 digital polarimeter. The UV spectra were run on a Shimadzu UV-2401 PC spectrophotometer. IR spectra were taken as KBr pellets on a Perkin-Elmer FT-IR Spectrum BX

Notes

Journal of Natural Products, 2002, Vol. 65, No. 5 763

Table 2. ^{13}C NMR Assignments for Compounds 1–4

carbon	1 ^a	2 ^b	3 ^b	4 ^b
1	160.6	157.9	157.8	157.7
2	107.7	104.3	104.2	104.3
3	162.7	159.6	159.5	159.7
4	93.5	93.9	94.1	94.1
4a	155.8	156.0	156.5	156.4
5	101.6	106.9	113.0	115.2
6	155.4	144.7	149.2	148.6
7	143.0	139.4	137.7	136.5
8	137.2	127.9	118.7	117.1
8a	111.3	111.9	111.2	108.3
9	181.8	182.4	183.0	182.8
9a	102.9	103.8	104.0	103.8
10a	155.2	147.3	151.0	150.9
11	28.5	115.8	115.8	115.6
12	76.1	127.0	127.0	127.0
13	146.9	77.8	77.2	77.9
14	109.8	28.2	28.3	28.3
15	17.9	28.2	28.3	28.3
16	26.2	25.7	22.2	120.9
17	123.2	122.4	33.0	131.3
18	131.5	132.4	75.5	76.8
19, 20	18.1, 25.6	18.1, 26.0	26.5	27.4
21		115.5	22.4	22.5
22		129.0	121.3	120.9
23		79.2	132.5	132.6
24, 25		28.4	18.0, 25.8	17.9, 25.8
OMe	60.9			

^a Recorded in $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$. ^b Recorded in CDCl_3 .

spectrophotometer. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 300 FT-NMR spectrometer, operating at 300 MHz (^1H) and 75 MHz (^{13}C). Low- and high-resolution EIMS were measured with a Finnigan MAT 90 instrument. Column chromatography and TLC were carried out using Merck silica gel 60 (>230 mesh) and pre-coated silica gel 60 F₂₅₄ plates, respectively. Plates of silica gel PF₂₅₄, thickness 1.25 mm, were utilized for preparative TLC. Spots on TLC were visualized under UV light and by spraying with anisaldehyde– H_2SO_4 reagent followed by heating.

Plant Materials. Green fruit hulls of *G. mangostana* were collected from Bahnkai District, Chanthaburi Province, Thailand, in April 1999. A voucher specimen (voucher #0032(RU)) of this plant is deposited at the Plant Collection Center, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bangkok, Thailand.

Extraction and Isolation. Pulverized fresh fruit hulls of *G. mangostana* (7.06 kg) were extensively extracted with MeOH. The combined extracts were concentrated in vacuo to give a yellow solid (205.5 g), and the filtrate was partitioned between *n*-BuOH and H_2O to afford an *n*-BuOH-soluble portion (133.0 g). A portion (45.0 g) of the yellow solid was subjected to column chromatography, eluting with CHCl_3 followed by stepwise addition of EtOAc and MeOH to yield 12 fractions (A–L). β -Mangostin (24 mg), trapezifolixanthone (4 mg), and mangostanol (8 mg) were obtained after repeated column chromatography of fraction E (1.2 g, eluting with hexane– CHCl_3 , 70:30), fraction G (309 mg, using CHCl_3 as eluent), and fraction J (3.5 g, eluting with CHCl_3 –MeOH, 94:6), respectively. Fraction D (83 mg) was rechromatographed on a silica gel column (eluted with hexane, hexane– CHCl_3 , CHCl_3 –MeOH in order of increasing polarity) to afford seven fractions, in which mangostenol (1, 5 mg) was obtained from the fifth fraction (CHCl_3 –hexane, 1:4). Fraction H (13.9 g) was purified by column chromatography eluting with a hexane– CHCl_3 system to furnish α -mangostin (400 mg) and a mixture (73 mg) of totophyllin B (4) and mangostenone B (3). The mixture was further separated on preparative TLC to yield 4 (7 mg) and 3 (1 mg). Fraction I (1.7 g) was subjected to column chromatography eluting with a CHCl_3 –MeOH system to afford 16 subfractions, in which two known compounds, garcinone B (32 mg) and mangostinone (4 mg), were identified from the subfractions 8 and 10, respectively. Subfraction 9, eluting with CHCl_3 –MeOH (94:4:0.6), was further separated by preparative TLC (CHCl_3 –MeOH, 97:3) to give mangostenone A (2, 8 mg).

A portion of the *n*-BuOH-soluble fraction (33.0 g), after being purified by column chromatography on silica gel (eluted with CHCl_3 –MeOH, 90:10), afforded (–)-epicatechin (1.38 g).

Mangostenol (1): yellow powder; mp 157–159 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ –20.0° (c 0.10, MeOH); UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ) 243 (4.40), 319 (4.08), 358 (4.00) nm; IR (KBr) ν_{max} 3420, 2920, 1645, 1610, 1580, 1465, 1286, 1192, 1102 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 + MeOH- d_4) and ^{13}C NMR (CDCl_3 + MeOH- d_4) data, Tables 1 and 2, respectively; EIMS m/z 426 [M]⁺ (15), 408 (6), 393 (11), 356 (22), 355 (100); HREIMS m/z 426.1680 (calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}_7$, 426.1678).

Mangostenone A (2): yellow powder; mp 110–112 °C; UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ) 285 (4.77), 344 (4.29) nm; IR (KBr) ν_{max} 3439, 2974, 1649, 1611, 1441, 1402, 1373, 1292, 1177, 1127, 886 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) and ^{13}C NMR (CDCl_3) data, Tables 1 and 2, respectively; EIMS m/z 460 [M]⁺ (37), 445 (58), 417 (100), 401 (14), 389 (12); HREIMS m/z 460.1895 (calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{O}_8$, 460.1885).

Mangostenone B (3): yellow amorphous resin; UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ) 293 (4.47), 334 (4.09), 366 (3.87) nm; IR (KBr) ν_{max} 3413, 2925, 2855, 1732, 1649, 1616, 1597, 1456, 1314, 1214, 1178, 1122, 757, 705 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) and ^{13}C NMR (CDCl_3) data, Tables 1 and 2, respectively; EIMS m/z 462 [M]⁺ (35), 447 (100), 391 (22), 335 (15), 307 (10); HREIMS m/z 462.2050 (calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{O}_8$, 462.2042).

Tovophyllin B (4): yellow powder; mp 185–186 °C (lit.²⁵ 190–191 °C); its UV, IR, ^1H NMR ($\text{Me}_2\text{CO}-d_6$), and MS spectra were in consistent with the reported values.²⁵ The ^{13}C NMR (CDCl_3) values are shown in Table 2.

Acknowledgment. This work was supported by The Thailand Research Fund. We are grateful to Mr. Nitirat Chimnoi, Chulabhorn Research Institute, Bangkok, Thailand, for recording the mass spectra.

References and Notes

- Peres, V.; Nagem, T. J.; de Oliveira, F. F. *Phytochemistry* 2000, 55, 683–710.
- Peres, V.; Nagem, T. J. *Phytochemistry* 1997, 44, 191–214.
- Iinuma, M.; Tosa, H.; Tanaka, T.; Asai, F.; Kobayashi, Y.; Shimano, R.; Miyauchi, K. I. *J. Pharm. Pharmacol.* 1996, 48, 861–865.
- Sundaram, B. M.; Gopalakrishnan, G.; Subramanian, S.; Shankaranarayanan, D.; Kameswaran, L. *Planta Med.* 1983, 48, 59–60.
- Mahaburakam, W.; Wiriyachitra, P.; Phongpaichit, S. *J. Sci. Soc. Thailand* 1988, 12, 239–242.
- Gopalakrishnan, G.; Banumathi, B.; Suresh, G. *J. Nat. Prod.* 1997, 60, 519–524.
- Sakai, S. I.; Katsura, M.; Takayama, H.; Aimi, N.; Chokethaworn, N.; Suttajit, M. *Chem. Pharm. Bull.* 1993, 41, 958–960.
- Tosa, H.; Iinuma, M.; Tanaka, T.; Nozaki, H.; Ikeda, S.; Tsutsui, K.; Tsutsui, K.; Yamada, M.; Fujimori, S. *Chem. Pharm. Bull.* 1997, 45, 418–420.
- Chairungsilard, N.; Furukawa, K. I.; Ohta, T.; Nozoe, S.; Ohizumi, Y. *Planta* 1996, 62, 471–472.
- Chen, S. X.; Wan, M.; Loh, B. N. *Planta Med.* 1996, 62, 381–382.
- Mahaburakam, W.; Wiriyachitra, P.; Taylor, W. C. *J. Nat. Prod.* 1987, 50, 474–478.
- Somanathan, R.; Sultanbawa, M. U. S. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1974, 2515–2517.
- Mesquita, A. A. L.; de Oliveira, W. G.; Neiva, R. M. T. *Phytochemistry* 1975, 14, 803–806.
- Yates, P.; Stout, G. H. *J. Am. Chem. Soc.* 1958, 80, 1691–1699.
- Yates, P.; Bhat, H. B. *Can. J. Chem.* 1968, 46, 3770–3772.
- Sen, A. K.; Sarkar, K. K.; Mazumder, P. C.; Banerji, N.; Uusvuori, R.; Hase, T. A. *Phytochemistry* 1982, 21, 1747–1750.
- Asai, F.; Tosa, H.; Tanaka, T.; Iinuma, M. *Phytochemistry* 1995, 39, 943–944.
- Chairungsilard, N.; Takeuchi, K.; Ohizumi, Y.; Nozoe, S.; Tomihisa, O. *Phytochemistry* 1996, 43, 1099–1102.
- Nonaka, G.; Kawahara, O.; Nishioka, I. *Chem. Pharm. Bull.* 1983, 31, 3906–3914.
- Huang, Y. L.; Chen, C. C.; Chen, Y. J.; Huang, R. L.; Shieh, B. J. *J. Nat. Prod.* 2001, 64, 903–905.
- Deshpande, V. H.; Rao, A. V. R.; Varadan, M.; Venkataraman, K. *Indian J. Chem.* 1973, 11, 518–524.
- Cao, S. G.; Song, Y. H. L.; Wu, X. H.; Sim, K. Y.; Tan, B. H. K.; Pereira, J. T.; Goh, S. H. *Tetrahedron* 1998, 54, 10915–10924.
- Rukachaisirikul, V.; Kaewrak, W.; Koyomboon, S.; Phongpaichit, S.; Taylor, W. C. *Tetrahedron* 2000, 56, 8539–8543.
- Dutta, P. K.; Sen, A. K.; Sarkar, K. K.; Banerji, N. *Indian J. Chem.* 1987, 26B, 281–282.
- de Oliveira, W. G.; Gottlieb, O. R.; Mesquita, A. A. L. *Phytochemistry* 1972, 11, 3323–3325.

NP10566G

H: np7a38 USER: ckt69 DIV: @xyv04/data1/CLS_pj/GRP_np/JOB_i07/DIV_np010645s DATE: June 12, 2002

Ecdysteroids from a *Zoanthus* sp.Apichart Suksamrarn,^{*} Aroon Jankam,[†] Bongkoch Tarnchompoo,[‡] and Sumaitt Puchakarn[§]^{*}Department of Chemistry, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bangkok 10240, Thailand, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency, Bangkok 10400, Thailand, and Institute of Marine Science, Burapha University, Bangsaen, Chonburi 20130, Thailand

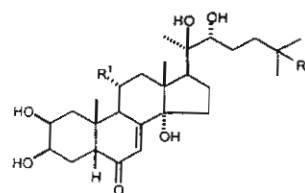
Received December 28, 2001

A new ecdysteroid, zoanthusterone, has been isolated from a marine zoanthid, *Zoanthus* sp. Ten known ecdysteroids, ponasterone A, 20-hydroxyecdysone 2-acetate, viticosterone E, integristerone A 25-acetate, 2-deoxy-20-hydroxyecdysone, ecdysone, ajugasterone C, dacryhainansterone, inokosterone, and 20-hydroxyecdysone, have also been isolated. This is the first report of ecdysteroids in a *Zoanthus* species.

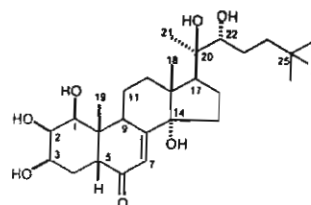
Chemical investigations on constituents of some marine zoanthids have been reported.^{1,2} Ecdysteroids, the arthropod moulting hormone, are among the constituents of these animals. The zoanthid *Gerardia savaglia* has been reported to contain 20-hydroxyecdysone (1),³ ecdysone, ajugasterone C (2),⁴ and the new ecdysteroid gerardinsterone.⁵ Compound 1 and a new ecdysteroid, 4-dehydroecdysterone, have been isolated from an Australian *Parazoanthus* species.⁶ Another zoanthid, *Palythoa australae*, has recently been investigated, and two new ecdysteroids, palythoalones A and B, including the known ecdysteroids, makisterone B and inokosterone, have been isolated.⁷ In this paper we report on the isolation of a new ecdysteroid, zoanthusterone (3), and 10 known ecdysteroids, including the rare ecdysteroid integristerone A 25-acetate (4),⁸ from a *Zoanthus* species (*Zoanthidae*).

The zoanthid *Zoanthus* sp., collected off Samae-sarn, Sattahip District, Chonburi Province, was subjected to extraction, and 10 known ecdysteroids were isolated and identified from the BuOH extract. These included ponasterone A (5),⁹ 20-hydroxyecdysone 2-acetate,¹⁰ viticosterone E,^{10,11} integristerone A 25-acetate (4),⁸ 2-deoxy-20-hydroxyecdysone,¹² ecdysone,¹³ ajugasterone C (2),¹⁴ dacryhainansterone (5-deoxykaladasterone),¹⁵ inokosterone,¹⁶ and 20-hydroxyecdysone (1).¹⁷ These ecdysteroids were identified by comparisons of spectroscopic data with those of reported compounds and, in some cases, TLC comparisons with authentic ecdysteroids (see Experimental Section). Along with these compounds, a new ecdysteroid, 3, was also isolated and characterized using spectroscopic techniques, especially 1D and 2D NMR.

Compound 3, zoanthusterone, was obtained as an amorphous solid, and the molecular formula was established as C₂₇H₄₄O₇ by HRFABMS (negative ion mode, *m/z* 479.3007 [M - H]⁻). The IR absorption bands at 3422 and 1654 cm⁻¹ indicated the presence of hydroxyl and unsaturated keto groups, respectively. ¹H NMR features in C₅D₅N as well as the color reaction on TLC with anisaldehyde reagent suggested this compound to be an ecdysteroid. The methyl resonances in the ¹H NMR spectrum at δ 1.22, 1.40, and 1.55 were assignable to those of 18-Me, 19-Me, and 21-Me, respectively. The singlet nature and relatively downfield resonance of the latter signal revealed the presence of a hydroxyl group at the 20-position. The absence of singlet



- 1: R¹ = H, R² = OH
 2: R¹ = OH, R² = H
 5: R¹ = R² = H



- 3: R = H
 4: R = OAc
 6: R = OH
 7: C-1 epimer of 6

signal(s) of 26- and 27-Me groups at ca. δ 1.3 and the presence of two doublets (J = 6.2 Hz) at δ 0.79 and 0.80 indicated that this compound is a 25-deoxyecdysteroid.

As the molecular weights of this ecdysteroid and 20-hydroxyecdysone (1) were the same, the 25-hydroxyl group should be located at another position in 3. Placement of this last hydroxyl group at the 24-position was not possible, since a considerable downfield shift of H-22 and H-25 signals should result. In fact, such expected compounds would be pterosterone and its C-24 epimer, 24-*epi*-pterosterone,¹⁸ the ¹H NMR data of which were different from those of compound 3. Placement of the hydroxyl group at C-23 was not possible on the basis of chemical shift value and splitting pattern of H-22. The presence of a hydroxyl group at C-11 seemed logical. However, the resulting structure would be ajugasterone C (2), which was also isolated from this animal and exhibited different ¹H NMR spectra. The argument that the expected compound could

^{*} To whom correspondence should be addressed. Tel: 662-3191900. Fax: 662-3108381. E-mail: apichart@ram1.ru.ac.th.

[†] Ramkhamhaeng University.

[‡] National Science and Technology Development Agency.

[§] Burapha University.

Table 1. ^1H NMR Data of Compounds 1, 3, 4, 5, and 7

H	1 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	3 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	3 (CD_3OD)	4 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	5 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	7 ^a ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	7 ^a (CD_3OD)
1		4.30 (br s)	3.81 (br s, $W_{12} = 7$)	4.31 (br s)		4.31 (br s)	3.82 (br s, $W_{12} = 6.8$)
2	4.18 (m)	4.24 (br s)	3.87 (br t, 2.8)	4.24 (br s)	4.16 (m)	4.29 (m)	3.87 (br t)
3	4.21 (br s)	4.30 (br s)	4.04 (br s, $W_{12} = 12$)	4.31 (br s)	4.23 (br s)	4.30 (m)	4.03 (m)
5	2.99 (dd, 12.5, 3.3)	3.29 (br d, ca. 2)	2.60 (dd, 12.3, 4.7)	3.30 (m)	3.02 (dd, 13.2, 3.8)	3.30 (m)	2.60 (dd, 13, 4)
7	6.23 (d, 2.1)	6.27 (br s)	5.82 (d, 1.9)	6.27 (br s)	6.26 (d, 2.4)	6.30 (d, 2.5)	5.82 (d, 2.3)
9	3.57 (m)	3.56 (m)	3.07 (m)	3.58 (m)	3.60 (m)	3.60 (m)	3.07 (m)
17	2.98 (t, 8.5)	2.90 (t, 8.7)	2.36 (t, 8.3)	2.96 (t, 9)	2.93 (t, 9.1)	3.01 (t, 8)	2.38 (t, 8)
22	3.86 (dd, 8.5, 1.2)	3.79 (br d, 9.7)	3.32 ^b	3.83 (br d, 9.8)	3.80 (br d, 10.4)	3.87 (m)	3.33 (m)
18-Me	1.20 (s)	1.22 (s)	0.89 (s)	1.22 (s)	1.23 (s)	1.25 (s)	0.90 (s)
19-Me	1.05 (s)	1.40 (s)	1.06 (s)	1.41 (s)	1.07 (s)	1.44 (s)	1.08 (s)
21-Me	1.57 (s)	1.55 (s)	1.15 (s)	1.59 (s)	1.57 (s)	1.59 (s)	1.19 (s)
26-Me	1.36 (s)	0.79 (d, 6.2)	0.90 (d, 6.8)	1.41 (s)	0.81 (d, 6.1)	1.38 (s)	1.20 (s)
27-Me	1.36 (s)	0.80 (d, 6.2)	0.91 (d, 6.8)	1.47 (s)	0.83 (d, 6.1)	1.38 (s)	1.20 (s)
AcO				1.93			

^a Data taken from ref 23. ^b Partially superimposed by solvent signal.

possibly be the C-11 epimer of 2 was also unlikely, since the H-9 signal should be resolved to a relatively simple splitting pattern, instead of a multiplet signal at δ 3.56. Moreover, the presence of an 11-hydroxyl group should give rise to a downfield shift of the H-9 resonance.¹⁹

The presence of the H-5 signal as well as its multiplicity (br d, $J \approx 12$ Hz in $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ and dd, $J = 12.3$ and 4.7 Hz in CD_3OD) did not permit the placement of an additional hydroxyl group at either the 5- or 4-positions. The last possibility was to locate the hydroxyl group at the 1-position. Structure 3 seemed to fit the spectroscopic data by the following observations. From comparisons of ^1H NMR data of compound 3 in $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ with those of compounds 4 and 5 (Table 1) it was concluded that the A-ring and the side chain of 3 were respectively the same as those of 4 and 5. It should be noted that the unusual downfield 19-Me signal (δ 1.40), as compared with that of compound 5 (δ 1.07), was due to the presence of an oxygen function at the 1-position.²⁰ Assignment of the 19-Me ^1H NMR resonance was confirmed by HMBC correlations of this methyl signal with C-1 (δ 77.7), C-5 (δ 48.0), C-9 (δ 36.4), and C-10 (δ 45.0). A large downfield shift (0.27 ppm) of H-5 on going from 5 to 3 was due to interaction between the axial 1-hydroxyl function and the H-5 β .²⁰ To confirm that the 1-hydroxyl group was β -oriented, analysis of the W_{12} (bandwidth at half-height) value of H-1 was made. The H-1 to H-3 signals in $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ were, unfortunately, not well separated; it was therefore not possible to accurately measure W_{12} values in this solvent. However, the ^1H NMR spectrum of 3 in CD_3OD provided individual H-1 (δ 3.81, br s, $W_{12} = 7$ Hz), H-2 (δ 3.87, br t, $J = 2.8$ Hz), and H-3 (δ 4.04, br s, $W_{12} = 12$ Hz) resonances. The relatively small W_{12} value of H-1 suggested its equatorial orientation. In other words, the 1-hydroxyl group was in axial orientation as indicated in structure 3. It followed that the coupling constant and W_{12} value of H-2 and H-3 fixed the configuration at C-2 and C-3 as shown. The magnitude of W_{12} values of H-1 and H-3 and the coupling constant of H-2 were approximately the same as those of integristerone A (6), the W_{12} of H-1 and H-3 in D_2O of which were 7 and 8

Hz, and the coupling constant of H-2 was 3.2 Hz.²⁰ It was noteworthy that the above argument was based on the assumption that H-5 was in the β -orientation. If H-5 was on the α -face, while those of the 1-, 2-, and 3-hydroxyl groups were on the same β -face as those of the structure 3, a large W_{12} value (18–25 Hz) of the H-3 signal should result. Alternatively, if H-5 was in the α -orientation and if all the A-ring hydroxyl groups were in the α -orientation, the W_{12} values and coupling constants of H-1, H-2, and H-3 would still be similar to those of structure 3. H-5 could be in relatively close proximity to the 1 α - and 3 α -hydroxyl groups and could possibly result in a downfield shift of the H-5 resonance.

To establish the stereochemistry at C-5, NOE measurements were employed. Thus, irradiation of 19-Me of 3 resulted in NOE enhancement of the H-5 signal. The α -orientation nature of H-2 was further confirmed by NOE correlation between this proton and H-9. It was therefore concluded that the A/B-ring fusion was *cis*^{21,22} and the structure of the new ecdysteroid is 3, i.e., 1 β -hydroxyponasterone A.

It should be noted that 1 α ,20R-dihydroxyecdysone (7), the C-1 epimer of integristerone A (6), has been isolated recently from the plant *Axyris amaranthoides*, and the stereochemistry at C-1 was established on the basis of NOE experiments, especially the NOE correlation between 19-Me and H-1 and the absence of NOEs between H-1 and H-2 and H-11.²³ Despite a different stereochemistry at C-1, compounds 3 and 7 gave very similar ^1H NMR and ^{13}C NMR data (Tables 1 and 2), except for those of the 25- to 27-positions. The W_{12} value of H-1 (6.8 Hz) of 7 was surprisingly almost the same as that of compound 3 and was unusually small for coupling of two axial protons (H-1 and H-2). It is noteworthy that a NOE correlation between 19-Me and H-1 was also observed in our case. A molecular model indicated that NOE interactions between 19-Me and H-1 α , and 19-Me and H-1 β , could possibly occur. In practice, the absence of an NOE should be used only as supporting evidence for assigning a particular stereochemistry. In our experience, the W_{12} value is more reliable in

Table 2. ^{13}C NMR Data of Compounds 1, 3, 4, and 7 in $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$

C	1 ^a	3	4	7 ^b
1	38.0	77.7	77.7	76.2
2	68.3	69.9	70.0	68.1
3	68.2	72.1	72.2	70.5
4	32.5	33.3	33.3	33.0
5	51.4	48.0	48.1	46.4
6	203.5	204.8	205.5	
7	121.7	123.3	123.3	121.6
8	166.1	167.2	166.9	
9	34.6	36.4	36.6	35.0
10	38.8	45.0	45.0	42.0
11	21.2	c	23.0	21.4
12	32.1	33.6	33.6	32.0
13	48.2	49.3	47.7	47.0
14	84.4	85.7	85.7	84.2
15	31.8	31.4	31.2	31.5
16	21.6	c	c	21.5
17	50.2	51.7	51.8	50.1
18	17.9	19.5	19.5	17.8
19	24.5	22.9	22.0	20.3
20	77.0	78.4	78.5	76.8
21	21.7	23.0	23.2	21.6
22	77.7	78.4	79.1	77.5
23	27.5	29.8	31.6	27.5
24	42.6	38.7	40.9	42.6
25	69.8	31.4	84.0	69.5
26	30.1	24.0	27.7	30.0
27	30.1	24.9	27.9	30.1
MeCO ₂			172.0	
MeCO ₂			23.9	

^a Data taken from ref. 1. ^b Data taken from ref. 23. ^c Obscured signal.

the assignment of stereochemistry of hydrogens in a molecule than the NOE experiment, at least in the ecdysteroid field.^{22,24}

In conclusion, the *Zoanthus* sp. investigated contained a complex mixture of ecdysteroids, including the two rare 1,2,3-trihydroxyecdysteroids (3 and 4) reported here. To our knowledge, this is the first report of ecdysteroids in a *Zoanthus* species.^{1,2}

Experimental Section

General Experimental Procedures. Melting points were determined on an Electrothermal apparatus and are uncorrected. ^1H and ^{13}C NMR spectra were measured with a JEOL JNM-A 500 and a Bruker AVANCE 400 spectrometer operating at 500, 100, and 125 and 100 MHz, respectively. The chemical shifts (δ) are reported in ppm, and coupling constants (J) are given in Hz. For the spectra taken in $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ and CDCl_3 (D), the residual nondetected solvent signals at δ 8.71 and 3.30 and the solvent signals at δ 149.90 and 49.00 were used as references for ^1H and ^{13}C NMR spectra, respectively. Mass spectra were measured on a Finnigan MAT 90 instrument. Unless indicated otherwise, Merck Si gel 60 (finer than 0.063 mm) was used for column chromatography. TLC was conducted on plates precoated with Merck Si gel 60 F₂₅₄. The eluting solvent system for column chromatography used throughout the experiments was CHCl_3 -MeOH, with increasing percentage of the more polar solvent. Reversed-phase column chromatography was conducted using Merck Si gel 60 RP-18 (40–63 μm). Spots on TLC were visualized under UV light and by spraying with anisaldehyde- H_2SO_4 reagent, followed by heating. Reversed-phase HPLC was performed on a Spherisorb S100DS2 column (5 μm , 250 $\times$ 10 mm) with MeOH- H_2O as a mobile phase at a flow rate of 2 mL min⁻¹, using a UV detector at 254 nm.

Animal Material. The zoanthids *Zoanthus* sp. were collected off Samae-sarn, Sattahip District, Chonburi Province. The voucher specimen (AS-RU-MA2) is deposited at the Faculty of Science, Ramkhamhaeng University.

Extraction and Isolation. Fresh zoanthids (3 kg) were milled and extracted exhaustively with MeOH, and most of the solvent was evaporated in vacuo. Water (600 mL) was added and the mixture extracted successively with *n*-hexane, CHCl_3 , and *n*-butanol to yield 30, 46, and 130 g of the hexane, CHCl_3 , and BuOH extracts, respectively. A portion (30 g) of the BuOH extract was subjected to column chromatography (Merck Si gel, 0.063–0.200 mm), eluting with CHCl_3 and CHCl_3 -MeOH with increasing MeOH content. The eluate was examined by TLC, and 13 combined fractions were obtained. Fraction 6 was chromatographed with the same adsorbent and eluting solvent system to give 13 subfractions. Subfraction 9 (16 mg) yielded colorless needles (from MeOH-EtOAc), mp 256–258 °C (lit. 259–260 °C),⁹ which was identified to be ponasterone A (5) from spectroscopic (^1H NMR and FAB/MS) data. Subfraction 11 (16 mg) was a mixture that was identified as 20-hydroxyecdysone 2-acetate and viticosterone E by TLC and ^1H NMR comparisons with authentic samples.^{10,11} Subfraction 13 was subjected to column chromatography, followed by two repeated reversed-phase column chromatographies eluting with H_2O and H_2O -MeOH with increasing MeOH content to afford compound 4 (1 mg) and compound 3 (2 mg). Compound 4 was identified to be integristerone A 25-acetate by spectroscopic (IR, ^1H NMR, and mass spectral) comparisons with those published previously⁹ and was confirmed by 2D NMR experiments.

Fraction 7 was subjected to repeated column chromatography to give 2-deoxy-20-hydroxyecdysone (4 mg), the spectroscopic (IR, ^1H NMR, and FAB mass spectral) data of which was consistent with those reported previously.^{12,21}

Fraction 9 was chromatographed and subfraction 6 was subjected to column chromatography to yield ecdysone (3 mg) and ajugasterone C (2, 2 mg). The spectroscopic (^1H NMR and FAB mass spectral) data of the two compounds were consistent with those reported previously.^{1,13,14} Subfraction 7 was similarly subjected to further separations using normal-phase and reversed-phase column chromatography to yield dactyrihainansterone (5-deoxykaladasterone, 2 mg) and inokosterone (2 mg). The identity of the former ecdysteroid was established by spectroscopic (^1H and ^{13}C NMR and FAB mass spectral) data.¹⁵ The latter ecdysteroid was identical to that reported previously by spectral comparisons.²⁸ Subfraction 10 was chromatographed, and the ecdysteroid thus obtained (14 mg) was crystallized from MeOH-EtOAc to give 20-hydroxyecdysone (1), mp 240–241 °C (lit. 240–242 °C).¹⁷ TLC and ^1H NMR spectral comparisons of 1 with those of an authentic sample revealed the identity of this compound.

Compound 3: colorless amorphous solid; IR (KBr) ν_{max} 3422, 2926, 1654, 1458, 1375, 1120, 1063 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR (Tables 1 and 2, respectively); HMBC correlations ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): H-7 (C-5, C-9, C-14), H-17 (C-18, C-20, C-21), 18-Me (C-12, C-13, C-14, C-17), 19-Me (C-1, C-5, C-9, C-10), 21-Me (C-17, C-20, C-22), H-22 (C-20, C-21), 26-Me (C-24, C-25, C-27), 27-Me (C-24, C-25, C-26); HRFAB/MS (negative ion mode) m/z 479.3007 [M - H]⁻ (calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{43}\text{O}_7$, 479.3008).

Acknowledgment. This work was supported by the Thailand Research Fund (TRF). We are grateful to J. S. Ryland, School of Biological Sciences, University of Wales Swansea, for identifying the zoanthid. We are also grateful to N. Chimnoi, Chulabhorn Research Institute, for recording the mass spectra. We thank the referees for their valuable comments.

References and Notes

- (1) Lafont, R.; Wilson, I. *The Ecdysone Handbook*, 2nd ed.; The Chromatographic Society: Nottingham, 1996.
- (2) Faulkner, D. J. *Nat. Prod. Rep.* 2001, 18, 1–49, and previous reports in this series.
- (3) Sturaro, A.; Guerriero, A.; De Clauser, R.; Pietra, F. *Experientia* 1982, 38, 1184–1185.
- (4) Guerriero, A.; Pietra, F. *Comp. Biochem. Physiol. B* 1985, 80, 277–278.
- (5) Guerriero, A.; Traldi, P.; Pietra, F. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1986, 40–41.
- (6) Searle, P. A.; Molinski, T. F. *J. Nat. Prod.* 1995, 58, 264–268.

p7a38 USER: ckt69 DIV: @xyv04/data1/CLS_pj/GRP_np/JOB_i07/DIV_np010645s DATE: June 12, 2002

D Journal of Natural Products

PAGE EST: 3.2

Notes

264	(7) Shigemori, H.; Sato, Y.; Kagata, T.; Kobayashi, J. <i>J. Nat. Prod.</i> 1999, 62, 372-374.	(18) Suksamrarn, A.; Yingyongnarongkul, B.; Charoensuk, S. <i>Tetrahedron</i> 1999, 55, 255-260.	283
265	(8) Sadikov, Z. T.; Saalov, Z. <i>Chem. Nat. Comput.</i> 1999, 35, 440-441; <i>Khim. Prir. Soedin.</i> 1999, 492-493.	(19) Suksamrarn, A.; Promrangsarn, N.; Jintansirikul, A. <i>Phytochemistry</i> 2000, 53, 921-924.	284
266	(9) Nakanishi, K.; Koreeda, M.; Sasaki, S.; Chang, M. L.; Hsu, H. Y. <i>Chem. Commun.</i> 1988, 915-917.	(20) Girault, J.-P.; Bathori, M.; Varga, E.; Szendrei, K.; Lafont, R. <i>J. Nat. Prod.</i> 1990, 53, 279-293.	285
267	(10) Suksamrarn, A.; Pattansprateep, P. <i>Tetrahedron</i> 1995, 51, 10633-10650.	(21) Suksamrarn, A.; Yingyongnarongkul, B. <i>Tetrahedron</i> 1996, 52, 12623-12630.	286
268	(11) Rimplar, H. <i>Tetrahedron Lett.</i> 1969, 329-333.	(22) Suksamrarn, A.; Yingyongnarongkul, B. <i>Tetrahedron</i> 1997, 53, 3145-3154.	287
269	(12) Galbraith, M. N.; Horn, D. H. S.; Middleton, E. J.; Hackney, R. J. <i>Chem. Commun.</i> 1968, 83-85.	(23) Sarker, S. D.; Sik, V.; Rees, H. H.; Dinan, L. <i>Phytochemistry</i> 1998, 49, 2305-2310.	288
270	(13) Girault, J.-P.; Lafont, R. <i>J. Insect Physiol.</i> 1988, 34, 701-706.	(24) Suksamrarn, A.; Charoensuk, S.; Yingyongnarongkul, B. <i>Tetrahedron</i> 1996, 52, 10673-10684.	289
271	(14) Inai, S.; Murata, E.; Fujioaka, S. <i>Chem. Commun.</i> 1969, 456-457.	(25) Yingyongnarongkul, B.; Suksamrarn, A. <i>ScienceAsia</i> 2000, 26, 15-20.	290
272	(15) Szendrei, K.; Varga, E.; Hajdu, Z.; Herke, I.; Lafont, R.; Girault, J.-P. <i>J. Nat. Prod.</i> 1988, 51, 993-995.		291
273	(16) Hikino, H.; Mohri, K.; Hikino, Y.; Arihara, S.; Takemoto, T.; Mori, H.; Shibata, K. <i>Tetrahedron</i> 1976, 32, 3015-3021.		292
274	(17) Werawattanametia, K.; Podimuang, V.; Suksamrarn, A. <i>J. Nat. Prod.</i> 1986, 49, 365-366.		293
275			294
276			295
277			296
278			297
279			
280			
281			
282			
		NP010645S	298

Antimycobacterial Anthraquinone-Chromanone Compound and Diketopiperazine Alkaloid from the Fungus *Chaetomium globosum* KMITL-N0802

Somdej Kanokmedhakul¹, Kwanjai Kanokmedhakul¹,
Nutchanat Phonkerd¹, Kasem Soyong², Palangpon Kongsaree³,
Apichart Suksamran⁴

Abstract

Investigation of the fungus *Chaetomium globosum* KMITL-N0802 led to the isolation of a novel anthraquinone-chromanone compound named chaetomanone along with seven known compounds, ergosterol, ergosteryl palmitate, chrysophanol, chaetoglobosin C, alternariol monomethyl ether, echinulin and isochaetoglobosin D. These compounds were characterized by spectroscopic methods. Chaetomanone and echinulin exhibited activity towards *Mycobacterium tuberculosis*.

Chaetomium globosum has been reported to produce numerous types of compounds such as tetra-5-methyl derivatives [1]; azaphilones [2]; and indol-3-yl-[13]cytochalasins [3], [4], [5] and recently, trans-epoxysuccinyl peptides, PF1138A and B were isolated as novel trans-epoxysuccinate-type cysteine protease inhibitors from *C. globosum* PF1138 [6]. As part of our ongoing project on medicinals from microorganisms, a fungus *C. globosum* KMITL-N0802, an isolated strain of Thai soil, were studied based on its potentially anti-TB activity. Searching for new anti-TB drugs is still an urgent need and recently antimycobacterial plant terpenoids were reviewed [7]. Investigation of the hexane and EtOAc extracts led to the isolation of a new compound named chaetomanone (7) which based on its structure belongs to a novel type consisting of anthraquinone-chromanone moieties. Seven known compounds, ergosterol (1), ergosteryl palmitate (2), chrysophanol (3) [8], chaetoglobosin C (4) [4], [5], alternariol monomethyl ether (5) [9], the diketopiperazine alkaloid echinulin (6) [10], [11] and isochaetoglobosin D (8) were also isolated. The last of these has been previously reported as a synthetic compound [4], and this is the first report of 8 as a new natural product. Compounds 2, 3, 5 and 6 are the first report from a *Chaetomium* species.

Affiliation: ¹ Department of Chemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand · ² Department of Plant Pest Management, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand · ³ Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand · ⁴ Department of Chemistry, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bangkok, Thailand

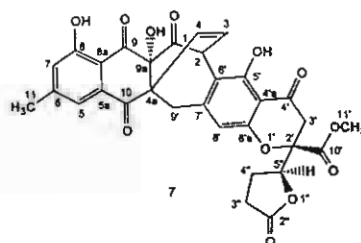
Correspondence: Dr. Somdej Kanokmedhakul · Department of Chemistry · Faculty of Science · Khon Kaen University · Khon Kaen 40002, Thailand · E-Mail: somdej@kku.ac.th · Fax: +66-04324-3338

Received: December 17, 2001 · **Accepted:** May 5, 2002

Bibliography: Planta Med 2002; 68: 1–3 · © Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York · ISSN 0032-0943

Imprimatur

Unterschrift und Datum



Compound 7 was analyzed for a molecular formula of $C_{31}H_{24}O_{12}$ by its FAB/MS and elemental analysis. The IR spectrum showed bands at 3450, 1780 and 1740 cm^{-1} consistent with the presence of hydroxy group, lactone, and ester, respectively, while those at 1650 and 1635 cm^{-1} were consistent with chelating carbonyl groups. Analyses of ^{13}C -NMR (Table 1) and HMBC spectra revealed six carbonyl resonances which consisted of quinone (δ 202.9, 196.0 and 195.6), chromanone (δ 195.2), lactone (δ 177.2) and ester (δ 169.8) components. The DEPT spectra provided strong support for these partial moieties by sorting thirty-one carbon signals into two methyl groups of which one was a meth-

Table 1 ^1H - and ^{13}C -NMR data (δ values) and HMBC correlations of 7 (in DMSO- d_6)

No	^1H	^{13}C	HMBC
1	-	202.9 d	
2	4.60 d (6.6) ^a	44.5 d	C-1, 3, 4, 9a, 5', 6', 7'
3	6.58 dd (8.9, 6.6)	135.3 d	C-1, 2', 4a, 9a, 6'
4	5.96 d (8.8)	129.3 d	C-1, 2, 10', 4a, 9a, 6'
4a	-	54.8 s	
5	7.40 s	120.8 d	C-7, 4a, 8a, 11
5'	-	145.8 s	
7	7.23 s	124.7 d	C-5, 8, 8a, 11
8	-	162.1 s	
8a	-	112.9 s	
9	-	196.0 s	
9a	-	84.4 s	
10	-	195.6 s	
11	2.44 s	22.5 q	C-5, 6, 7, 8
2'	-	84.4 s	
3' α	3.03 d (17.2)	39.6 t	C-4', 4a, 2', 11', 5''
3' β	3.56 d (17.2)		
4'	-	195.2 s	
4'a	-	105.9 s	
5''	-	158.5 s	
6''	-	118.0 s	
7'	-	150.2 s	
8'	6.43 s	110.8 d	C-4', 4a, 5', 6'
8a	-	158.5 s	
9' α	3.35 d (19.9)	30.6 t	C-4, 4a, 9a, 10, 6', 7', 8'
9' β	3.60 d (19.9)		
10'	-	169.8 s	
11'	3.68 s	54.4 q	C-10'
2''	-	177.2 s	
3''	2.59 t (8.2)	28.3 t	C-2'', 4'', 5''
4''	2.35 m	22.3 t	C-2'', 2'', 3''
5''	4.98 t (8.9)	81.5 d	C-2'', 2'', 3''

^a Multiplicity deduced by DEPT and indicated by usual symbol.

^b J values (in Hz) in parentheses.

oxy group, four methylene groups, seven methine groups including aromatic carbons and eighteen quaternary carbons including six carbonyl functions. The $^1\text{H-NMR}$ spectrum (Table 1) indicated *cis* vinyl protons of H-4 at δ 5.96 (d, 8.8 Hz) and H-3 at δ 6.58 (dd, 8.8, 6.6 Hz) which was coupled to a bridge-head proton, H-2, at δ 4.60 (d, 6.6 Hz). A methyl group at 6-position of the aromatic ring appeared at δ 2.44, whereas the signal at δ 3.68 (s) corresponded to the methoxy carbonyl group. The two sets of AB quartets at δ 3.03 and 3.56 (d, 17.2 Hz), and δ 3.35 and 3.60 (d, 19.9 Hz) were assigned to two geminal methylene protons of H-3 α , 3 β and H-9 α , 9 β , respectively. The methylene protons, H-3 and H-4 of the lactone ring appeared at δ 2.59 (t, 8.2 Hz) and δ 2.35 (m), respectively. The HMBC spectrum clearly demonstrated two sets of correlations between methylene protons H-9' and C-4, C-4a, C-9a, C-10, C-6', C-7', C-8' and between methine proton H-2 and C-1, C-3, C-4, C-9a, C-5', C-6' and C-7' which fix the linkage as connecting an anthraquinone unit to a chromanone unit (Table 1). The structure was then confirmed by COSY, HMQC, HMBC and NOESY experiments. The relative stereochemistry was assigned by analysis of the NOESY spectral data (see Fig. 1). A correlation between H-9 α and the hydroxy group at C-9a revealed the α orientation of the latter function. The correlations of H-3 β and H-4 β to H-9' indicated that the lactone ring at C-2' was in the α orientation. Inspection of a molecular model revealed that H-3 β and H-4 β were close to H-9 α . The finding has led to the assignment of the orientation of H-5 α . The correlation of H-3 β to H-11' indicated that the methoxycarbonyl group at C-2' was in the β orientation.

Compounds 6 and 7 exhibited antitubercular activity (MIC 169.92 and 216.62 μM , respectively) against *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra [isoniazide and kanamycin sulfate (MIC 0.37 and 4.29 μM , respectively) were used as a positive control [12].

Materials and Methods

NMR spectra were recorded on Bruker DRX400 or Jeol JNM-EX90A spectrometers, using residual of solvent as an internal standard. IR spectra were carried out on a Shimadzu FTIR 8000 spectrophotometer. FABMS was measured on a Finnigan MAT 90 mass spectrometer. Melting points were uncorrected.

The fungus was identified by Assoc.Prof. K. Soyong and a voucher specimen (KMITL-N0802) was deposited at the Department of Plant Pest Management, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand. Air-dried mycelial mat (562 g), cultivated in Potato Dextrose Broth, was extracted successively with hexane (3 L $\times$ 3) and EtOAc (3 L $\times$ 3) to yield the hexane extract (16.1 g) and EtOAc extract (47.9 g). Hexane (40 ml) was added to the hexane extract to give 1 (213 mg), m.p. 164–165 $^{\circ}\text{C}$, $[\alpha]_D^{25}$: -55.1 $^{\circ}$ (c 0.145, CHCl_3). The residue was then separated

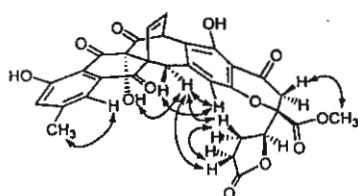


Fig. 1 Selected NOE correlations of chaetochromone (7)

over silica gel (320 g). Gradient elution with EtOAc-hexane afforded 120 (100 ml) fractions. Fractions 1–5 (EtOAc-hexane, 5:95, 6.6 g) yielded 2 (52 mg), m.p. 102–103 $^{\circ}\text{C}$, $[\alpha]_D^{25}$: -22.8 $^{\circ}$ (c 0.175, MeOH). Fractions 6–14 (EtOAc-hexane, 5:95, 3.0 g) yielded 3 (20 mg), m.p. 197–198 $^{\circ}\text{C}$. The EtOAc extract was added to EtOAc (200 ml) to give 4 (307 mg), m.p. 260–263 $^{\circ}\text{C}$, $[\alpha]_D^{25}$: -41.2 $^{\circ}$ (c 0.155, pyridine). The residue was subjected to CC over silica gel (1 kg), gradient elution with EtOAc-hexane and MeOH-EtOAc gave 250 (100 ml) fractions, which were combined into 8 major fractions, F₁–F₈. Purification of F₃ (EtOAc-hexane, 45:55, 2.2 L and 40:60, 400 ml, 4.4 g) gave 5 (15 mg), m.p. 275–276 $^{\circ}\text{C}$. Fraction F₅ (EtOAc-hexane, 80:20, 1.4 L and 90:10, 3 L, 10.7 g) afforded 6 (36 mg), m.p. 245–246 $^{\circ}\text{C}$, $[\alpha]_D^{25}$: -33.6 $^{\circ}$ (c 0.125, CHCl_3) by filtration. The residue (10.5 g) was combined with fraction F₆ (MeOH- CH_2Cl_2 , 5:95, 1.4 L, 2.2 g) and was purified by CC over silica gel (400 g) eluting with EtOAc-hexane (90:10) to give 6 sub-fractions, F_{5/1}–F_{5/6}. Subfractions F_{5/5} (600 ml) afforded light yellow crystals of 7 (55 mg) and F_{5/6} (1 L) yielded 8 (27 mg), m.p. 260–263 $^{\circ}\text{C}$ (decomp.), $[\alpha]_D^{25}$: +20.0 $^{\circ}$ (c 0.130, MeOH).

Chaetochromone (7): light yellow crystals; m.p. 175 $^{\circ}\text{C}$ (decomp.); $[\alpha]_D^{25}$: -62.0 $^{\circ}$ (c 0.110, MeOH); UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ) = 219 (4.37), 240 (4.49), 280 (4.24), 342 (3.95); IR (KBr): ν_{max} = 3450, 2940, 2870, 1780, 1740, 1650, 1635, 1620, 1570 cm^{-1} . For ^1H - and ^{13}C -NMR spectral data, see Table 1. FABMS (+ve): m/z = 589 [M+H] $^{+}$. Anal calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$: C, 54.86%; H, 5.01 (Found: C, 55.05; H, 5.10).

Acknowledgements

We acknowledge financial support from the Thailand Research Fund (TRF), the Postgraduate Education and Research Program in Chemistry (PERCH) and Khon Kaen University. The Thailand-Tropical Diseases Research Program (T-2)'s support to the antitubercular assay laboratory is gratefully acknowledged. We are grateful to Dr. B. Tarnchompoo, BIOTEC/NSTDA for the NMR measurements and Mr. N. Chimnoi, Chulabhorn Research Institute, for MS spectra.

References

- Safe S, Taylor A. Sporidesmins. Part XIII. Ovine III-thrift in Nova Scotia. Part III. The characterisation of chetomin a toxic metabolite of *Chaetomium cochliodes* and *Chaetomium globosum*. J Chem Soc, Perkin Trans 1, 1972: 472–9
- Takahashi M, Koyama K, Natori S. New azaphilones from *Chaetomium globosum* var. *flavo-viridae*. Chem Pharm Bull 1990; 38: 625–8
- Udagawa S, Muroi T, Kurata H, Sekita S, Yoshihira K, Natori S, Umeda M. The production of chaetoglobosins, sterigmatocystin, O-methylsterigmatocystin, and chaetocin by *Chaetomium* spp. and related fungi. Can J Microbiol 1979; 25: 170–7
- Sekita S, Yoshihira K, Natori S, Kuwano H. Chaetoglobosins, cytotoxic 10-(indole-3-yl)-[13]cytochalasans from *Chaetomium* spp. III. Structure of chaetoglobosins C, E, F, G, and J. Chem Pharm Bull 1982; 30: 1629–38
- Sekita S, Yoshihira K, Natori S. Chaetoglobosins, cytotoxic 10-(indole-3-yl)-[13]cytochalasans from *Chaetomium* spp. IV. ^{13}C -Nuclear magnetic resonance spectra and their application to a biosynthetic study. Chem Pharm Bull 1983; 31: 490–8
- Tabata Y, Miike N, Yaguchi T, Hatsu M, Ishii S, Imai S. PF1138A and B, novel trans-epoxysuccinate-type cysteine protease inhibitors produced by *Chaetomium globosum*. Meiji Seika Kenkyu Nenpo 2000; 39: 55–64

Letter 25/1201/721, 24.7.02/Druckerei Sommer

- ⁷ Cantrell CL, Franzblau SG, Fischer NH. Antimycobacterial plant terpenoids. *Planta Med* 2001; 67: 685–94
- ⁸ Ghisalberti EL, Narbey MJ, Dewan MM, Sivasithamparam K. Variability among strains of *Trichoderma harzianum* in their ability to reduce take-all and to produce pyrones. *Plant Soil* 1990; 121: 287–91
- ⁹ An Y, Zhao T, Miao J, Liu G, Zheng Y, Xu Y, Van Etten RL. Isolation, identification, and mutagenicity of alternariol monomethyl ether. *J Agric Food Chem* 1989; 37: 1341–3
- ¹⁰ Takamatsu N, Inoue S, Kishi Y. Synthetic study on echinulin and related compounds. Part II. A stereoselective total synthesis of optically active echinulin. *Tetrahedron Lett* 1971; 48: 4665–8
- ¹¹ Gatti G, Fuganti C. ¹³C N.m.r. spectra of echinuline and related compounds. *J Chem Res, Synop*, 1979: 366–7
- ¹² Collins I, Franzblau SG. Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrob Agents Ch* 1997; 41: 1004–9

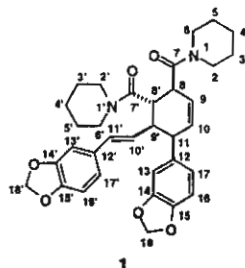
Chabamide, a Novel Piperine Dimer from Stems of *Piper chaba*

Thitima Rukachaisirikul, Samran Prabpai, Penprapa Champung, Apichart Suksamram

Abstract

A novel piperine dimer, named chabamide, was isolated from stems of *Piper chaba* Hunter and its structure was elucidated on the basis of spectroscopic evidence. Chabamide showed antimalarial activity with an IC_{50} value of 2.7 $\mu\text{g/ml}$ and antituberculosis activity with the minimum inhibitory concentration (MIC) of 12.5 $\mu\text{g/ml}$.

Piper chaba Hunter (Piperaceae) is a glabrous fleshy plant which is cultivated in various parts of Thailand. Its medicinal properties are briefly described [1]. Previous studies on this plant resulted in the isolation of various type of compounds including amide alkaloids [2], [3]. This study describes the isolation and structural elucidation of a new amide alkaloid named chabamide (1), together with five known compounds, piperine (2) [4], methyl piperate (3) [5], pellitorine (4) [6], pipernonaline (5) [7] and guineensine (6) [8], [9] from stems of *P. chaba*. This is the first report of compounds 3, 5 and 6 from the stems of *P. chaba*. Compound 1 was tested for antimalarial and antituberculosis activities.



Chabamide (1) was obtained as a pale yellow semi-solid. Its molecular formula was determined to be $C_{34}H_{38}N_2O_6$ from HREIMS. The IR spectrum showed the presence of tertiary amide (1630 cm^{-1}), while the UV spectrum indicated the presence of the styryl group (278 nm). The ^{13}C -NMR spectrum of 1 consisted of 34

resolved signals in agreement with the molecular formula (Table 1). The multiplicity of the individual resonances determined using the DEPT experiments indicated 12 methylenes, 14 methines and 8 quaternary carbons including 2 carbonyls ($\delta = 171.1$ and 172.2). The ^1H -NMR spectrum of 1 displayed two *trans*-olefinic protons of the styryl group at $\delta = 5.19$ and 6.29 and two *cis*-olefinic protons of the cyclohexene ring at $\delta = 5.73$ and 5.84. Four methine protons of the cyclohexene ring appeared at $\delta = 2.91$, 3.45, 3.64 and 4.12. The observed coupling constants (9.6 and 11.8 Hz) revealed the *trans*-diaxial arrangement of H-8, H-8' and H-9' while the smaller coupling constants of H-9' with H-11, H-8 with H-9 and H-10 with H-11 agreed well with the stereochemical arrangements of the rest of cyclohexene ring protons. Moreover, the ^1H -NMR spectrum showed four methylenedioxy protons as four sets of doublet and six aromatic protons as two sets of separated signals indicating the presence of two 3,4-methylenedioxyphenyl groups. In the ^1H -NMR spectrum, methylene protons typical of a piperidine ring appeared as unresolved signals. The complete assignment of ^1H - and ^{13}C -NMR signals of 1 was made by use of the ^1H - ^1H COSY, HETCOR and HMBC spectra and are summarized in Table 1. The location of a 3,4-methylenedioxyphenyl group, a 3,4-methylenedioxyphenyl group and two acylpiperidine moieties was clearly established by the HMBC experiments (Table 1). The relative stereochemistry of 1 was determined on the basis of the NOESY experiments (Table 1).

Furthermore, the EIMS exhibited the base peak at $m/z = 485$ corresponding to loss of piperidine from the molecular ion. A significant peak at $m/z = 285$ could best be assigned to piperine ion arising by retro-Diels-Alder cleavage of the molecular ion into two halves. On the basis of this evidence 1 was considered as a dimer of piperine (2) probably arising from Diels-Alder reaction. The structure of chabamide was concluded to be 1. Compound 1 is not an artefact formed in the isolation stage since it is optically active. It should be noted that a cyclobutane dimer of piperine (2), *E-E*-piperilpiperidine dimer, was synthesized by photochemical reaction of compound 2 [10].

Compound 1 exhibited antimalarial activity against *Plasmodium falciparum* (K1 strain) [12], [13] with an IC_{50} value of 2.7 $\mu\text{g/ml}$ and antituberculosis activity against *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra strain) [14] with the MIC of 12.5 $\mu\text{g/ml}$.

Materials and Methods

UV spectra were measured with a Perkin Elmer Lambda 20 spectrophotometer; IR spectra were obtained with a Perkin Elmer Spectrum 2000 spectrophotometer; ^1H - and ^{13}C -NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE 400 NMR spectrometer, operating at 400 and 100 MHz, respectively; mass spectra were recorded with a Finnigan MAT 90 instrument.

The stems of *P. chaba* were collected in Kanchanaburi province, Thailand. A voucher specimen [No. 0031 (RU)] is deposited at the Plant Collection Centre, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University.

The dried, powdered stems of *P. chaba* (3.52 kg) were extracted with *n*-hexane using a Soxhlet apparatus and concentrated in vacuo. The hexane extract (61.92 g) was filtered to give a solid (1.66 g)

Affiliation: Department of Chemistry, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bangkok, Thailand

Correspondence: Prof. Dr. Assoc. Thitima Rukachaisirikul · Department of Chemistry · Faculty of Science · Ramkhamhaeng University · Huamark, Bangkok · Bangkok 10240 · Thailand · E-Mail: thitima@ram1.ru.ac.th · Fax: +662-02-3108381

Received: December 19, 2001 · **Accepted:** April 21, 2002

Bibliography: *Planta Med* 2002; 68: 1-3 · © Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York · ISSN 0032-0943

Letter 29/1201/715, 15.7.02/Druckerei Sommer

Table 1 ¹H- and ¹³C-NMR data for 1 in CDCl₃

Position	¹ H	NOESY	¹³ C	HMBC
2	3.54 (m)	8, 9	47.1	
3	1.58 (m)		26.7	
4	1.63 (m)		24.6	
5	1.51 (m)		25.8	
6	3.34 (m)	8	43.3	
7			171.1	2, 6, 8, 9, 8'
8	4.12 (dd, <i>J</i> = 9.6, 7.3, 2.3 Hz)	2, 6, 8, 9'	42.5	9, 10, 8', 9'
9	5.73 (ddd, <i>J</i> = 10.0, 2.3, 2.3 Hz)	2, 8, 10	125.5	8, 10, 11
10	5.84 (ddd, <i>J</i> = 10.0, 5.0, 2.3 Hz)	9, 11, 12	130.3	8, 9, 11
11	3.45 (m)	10, 13, 17, 9'	45.9	9, 10, 9', 10'
12			133.5	10, 11, 13, 9'
13	6.79 (br s)	11, 8'	107.9	
14			147.5 ^a	13, 18
15			146.4 ^a	12, 18
16	8.60 (d, <i>J</i> = 11.4 Hz)		110.8	
17	6.80 (br d, <i>J</i> = 11.4 Hz)	10, 11	123.5	11, 16
18	5.94 (d, <i>J</i> = 1.5 Hz), 5.95 (d, <i>J</i> = 1.5 Hz)		100.82	
2'	3.26 (m), 3.33 (m)	8'	42.8	
3'	1.32 (m), 1.25 (m)		25.6	
4'	1.34 (m), 1.43 (m)		24.5	
5'	1.25 (m), 1.43 (m)		26.4	
6'	3.26 (m), 3.33 (m)	8'	46.9	
7'			172.2	2', 6', 8', 9'
8'	3.64 (dd, <i>J</i> = 11.8, 9.6 Hz)	13, 2', 6', 10'	37.7	8, 9, 11, 9', 10'
9'	2.81 (ddd, <i>J</i> = 11.8, 10.2, 5.7 Hz)	8, 11, 11'	45.4	11, 8', 10', 11'
10'	5.19 (dd, <i>J</i> = 15.6, 10.2 Hz)	8', 17'	128.1	8', 9', 11'
11'	6.20 (d, <i>J</i> = 15.6)	9', 13'	131.0	9', 12'
12'			132.0	10', 11', 16'
13'	8.60 (d, <i>J</i> = 1.6 Hz)	11'	105.3	11'
14'			147.8 ^a	16', 18'
15'			146.7 ^a	16', 17', 18'
16'	6.67 (d, <i>J</i> = 6.9 Hz)		108.2	
17'	6.83 (dd, <i>J</i> = 6.9, 1.6 Hz)	10'	120.7	11'
18'	5.899 (d, <i>J</i> = 1.6 Hz), 5.895 (d, <i>J</i> = 1.6 Hz)		100.89	

^a Values are interchangeable

which was further purified with silica gel (40 g) column using CHCl₃ (800 ml) to yield 2 (79 mg) [4]. The mother liquor was subjected to quick CC [11] (silica gel, 1.5 kg) eluting with a gradient of hexane, hexane-EtOAc, EtOAc, EtOAc-MeOH and MeOH (5% increment of the polar solvent for 250 ml of each proportion) to give 9 main fractions. Fr. 1 (28.83 g) was rechromatographed by quick CC (silica gel, 750 g) using a gradient of hexane, hexane-CHCl₃, CHCl₃-MeOH and MeOH in increasing proportions of the polar solvent (each 200 ml) to give 8 subfractions and subsequently Fr. 1.3 (4.74 g) was purified with silica gel (120 g) column eluting with EtOAc-hexane (7:93) (3 L) to furnish 3 (44 mg) [5]. Fr. 1.5 (5.10 g) was rechromatographed on silica gel (200 g) using EtOAc-hexane (21:79) (5 L) to afford 4 (265 mg) [6]. Fr. 3 (1.80 g) was separated by CC over silica gel (60 g) using EtOAc-hexane (20:80) (2 L) to give 7 subfractions. Fr. 3.2 yielded 4 (467 mg) [6]. Fr. 3.5 (284 mg) was rechromatographed on silica gel twice (each 20 g) using EtOAc-hexane (23:7) (each 600 ml) to give 5 (130 mg) [7]. Fr. 4 (10.50 g) was subjected to quick CC (silica gel, 300 g) using a gradient of hexane, hexane-EtOAc, EtOAc, EtOAc-MeOH and MeOH in increasing proportions of the

polar solvent (each 200 ml) to give 10 subfractions. Fr. 4.2 (285 mg) was purified with silica gel (20 g) column using EtOAc-hexane (15:85) (500 ml) to yield 6 (29 mg) [8], [9]. Fr. 5 (1.73 g) was rechromatographed on silica gel (80 g) using a gradient of EtOAc-hexane (30:70) and EtOAc in increasing proportions of the polar solvent (each 200 ml) to give 4 subfractions. Fr. 5.2 (564 mg) was further purified with silica gel column twice (each 15 g) using EtOAc-hexane (30:70) (each 500 ml) to furnish 1 (35 mg).

Chabamide (1): pale yellow semi-solid; $[\alpha]_D^{25}$: +11.6° (c 0.155, CHCl₃); UV: λ_{max}^{MeOH} = 278, 297, 317 (sh) nm; IR: ν_{max}^{KBr} = 3031, 2943, 2895, 2858, 1630, 1601, 1500, 1486, 1441, 1355, 1246, 1209, 1189, 1162, 1137, 1123, 1097, 1037, 968, 937, 923, 900, 858, 815, 798, 787, 752, 719, 700 cm⁻¹; EIMS: *m/z* (rel. int.) = 570 (M⁺, 12), 486 (35), 485 (100), 458 (22), 375 (14), 373 (48), 372 (54), 345 (15), 311 (10), 310 (45), 286 (14), 285 (56), 202 (17), 201 (36), 174 (16), 173 (27), 172 (12), 143 (9), 135 (28), 115 (15), 112 (33), 105 (1), 84 (21), 77 (2), 69 (35), 63 (5); HREIMS: C₁₄H₁₈N₂O₆ found: 570.2735, calcd: 570.2731; ¹H- and ¹³C-NMR, see Table 1.

Letter 29/1201/715, 15.7.02/Druckerei Sommer

Antimalarial activity against *Plasmodium falciparum* (K1, multi-drug resistant strain) was performed using the protocol previously reported [12] which follows the microculture radioisotope technique described by Desjardins et al. [13]. The IC_{50} value of a standard compound, chloroquine diphosphate is 0.16 $\mu\text{g/ml}$. The antimycobacterial activity was assessed against *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra strain using the Microplate Alamar Blue Assay (MABA) [14]. The MIC values of the standard drugs isoniazide and kanamycin sulfate are 0.050 and 2.5 $\mu\text{g/ml}$, respectively.

Acknowledgements

This work was supported by the Thailand Research Fund (TRF). We are grateful to Mr. Nitirat Chimnoi, Chulabhorn Research Institute, for recording the mass spectra. Thailand-Tropical Diseases Research Program (T-2)'s support to the antimalarial and antituberculosis assays is gratefully acknowledged. We thank Miss Kobkul Chindanoy and Miss Suwipa Sreesathat for assistance.

References

- Kirtikar KR, Basu BD. Indian medicinal plants. 2nd ed. Lalit Mohan Basu, Allahabad: 1933; 3: 2130-1
- Parmar VS, Jain SC, Bisht KS, Jain R, Taneja P, Jha A et al. Phytochemistry of the genus *Piper*. Phytochemistry 1997; 46: 597-673 and references therein
- Pande A, Shukla YN, Srivastava R, Verma M. 3-Methyl-5-decanoylpyridine and amides from *Piper retrofractum*. Indian Journal of Chemistry 1997; 36B: 377-9
- Pouchert CJ, Behnke J. The Aldrich Library of ^{13}C and ^1H FT NMR Spectra. 3rd ed. Aldrich Chemical Company, Inc., U.S.A. 1993; 2: 1379B
- Kijjoa A, Pinto MMM, Tantisewie B, Herz W. A new linalool derivative and other constituents from *Piper ribesoides*. Planta Medica 1989; 55: 193-4
- Likhitwitayawuid K, Ruangrunsi N, Lange GL, Decicco CP. Structural elucidation and synthesis of new components isolated from *Piper sarmentosum* (Piperaceae). Tetrahedron 1987; 43: 3689-94
- Tabuneng W, Bando H, Amiya T. Studies on the constituents of the crude drug "*Piperis longi* Fructus." On the alkaloids of fruits of *Piper longum* L. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 1983; 31: 3562-5
- Okogun JI, Ekong EU. Extracts from the fruits of *Piper guineense* Schum. and Thonn. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1974; 1: 2195-8
- Koul SK, Taneja SC, Agarwal VK, Dhar KL. Minor amides of *Piper* species. Phytochemistry 1988; 27: 3523-7
- Kumar A, Krupadanam GLD, Srimannarayana G. Photochemistry of *E,E*-piperylpiperidine. Indian Journal of Chemistry 1992; 31B: 784-5
- Pedersen DS, Rosenbohm C. Dry column vacuum chromatography. Synthesis 2001; 16: 2431-4 and references therein
- Isaka M, Punya J, Lertwerawat Y, Tanticharoen M, Thebtaranonth Y. Antimalarial activities of macrocyclic trichothecenes isolated from the fungus *Myrothecium verrucaria*. Journal of Natural Products 1999; 62: 329-31
- Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD, Chulay JD. Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1979; 16: 710-8
- Collins L, Franzblau SG. Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1997; 4: 1004-9