

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 โดยวิธีการเดียวกันที่ใช้มาข้างต้น 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 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100), 549 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (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 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100), 549 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (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 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (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 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (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 2,2-methyl ether [1.2(8)] (2%)

ตามลำดับ

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

ตั้งต้นจาก 20-ECD 2,2,2-trimethyl 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 2,3,2,2-tetramethyl 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 2,14,2,2-tetramethyl 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 2,3,14,2,2-pentamethyl 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 2,2,2-diethyl ether [1.2(32)] และ 20-ECD 3,2,2-diethyl ether [1.2(33)]

ตั้งต้นจาก 20-ECD 2,2-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 (<i>m</i>)	3.40 (<i>m</i>)	3.51 (<i>m</i>)
3	3.48 (<i>br s</i>)	3.68 (<i>br s</i>)	4.10 (<i>br s</i>)
5	2.21 (<i>dd</i> , 13.4, 3.9)	2.30 (<i>dd</i> , 13.4, 3.6)	2.46 (<i>dd</i> , 13.2, 3.8)
7	5.81 (<i>d</i> , 2.4)	5.82 (<i>t</i> , 2.4)	5.83 (<i>d</i> , 2.4)
9	2.97 (<i>m</i>)	3.00 (<i>m</i>)	2.96 (<i>m</i>)
17	2.20 (<i>t</i> , 8.8)	2.21 (<i>dd</i> , 9.7, 8.2)	2.27 (<i>t</i> , 8.5)
22	2.91 (<i>dd</i> , 8.8, 2.4)	2.92 (<i>dd</i> , 8.5, 2.4)	3.04 (<i>dd</i> , 8.7, 2.5)
18-Me	0.82 (<i>s</i>)	0.83 (<i>s</i>)	0.86 (<i>s</i>)
19-Me	0.92 (<i>s</i>)	0.94 (<i>s</i>)	0.96 (<i>s</i>)
21-Me	1.14 (<i>s</i>)	1.15 (<i>s</i>)	1.18 (<i>s</i>)
26-Me	1.17 (<i>s</i>)	1.17 (<i>s</i>)	1.21 (<i>s</i>)
27-Me	1.19 (<i>s</i>)	1.20 (<i>s</i>)	1.22 (<i>s</i>)
2-OCH ₃	-	3.36 (<i>s</i>)*	
3-OCH ₃	3.35 (<i>s</i>)	3.34 (<i>s</i>)*	
14-OCH ₃			
22-OCH ₃	3.45 (<i>s</i>)	3.45 (<i>s</i>)	
2-OCH ₂ CH ₃			1.19 (<i>t</i> , 7) ^c 3.50 (<i>m</i>) ^d 3.52 (<i>m</i>) ^d
22-OCH ₂ CH ₃			1.20 (<i>t</i> , 7) ^c 3.59 (<i>m</i>) ^d 3.69 (<i>m</i>) ^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	Number Pupariation				Surviving		%Effectiveness	EC ₅₀
			Complete	Marked	Slight	None	Dead	Surviving		
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	0.0010	10	-	-	-	9	1	9	0	
[1.2(31)]	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 μg/3 μl	Amount	Number Pupariation				Dead	Surviving	%Effectiveness	EC ₅₀
			Complete	Marked	Slight	None				
20-Hydroxyecdysone	0.0100	10	-	-	-	10	-	10	0	2.000 x 10 ⁻⁴ M
2,14-dimethyl ether [1.2(23)]	0.0175	10	-	-	-	9	*1	9	0	
	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)]: $v_{\max}$: 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
1 α		2.38 (d, 13.7)
1 β		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 ของเอเคโดสเตียรอยด์ 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 $\times$ 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, $2\times 3\text{H}$, 18-Me and 19-Me), 1.36 (s, $2\times 3\text{H}$, 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.

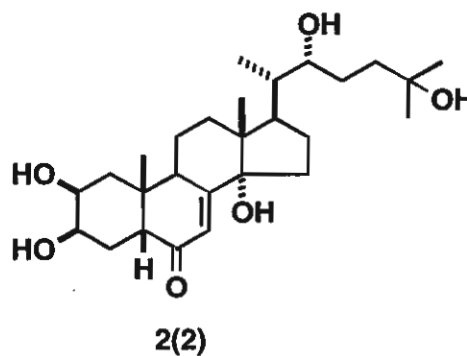
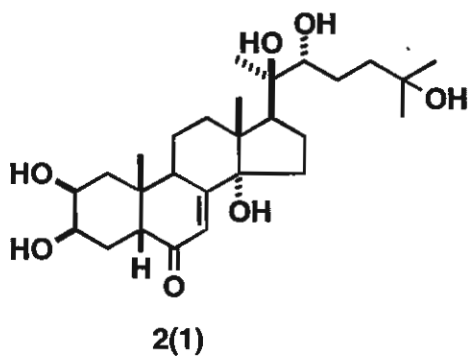
**โครงการย่อยกลุ่มที่2: การสังเคราะห์และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารยับยั้ง
เอนโดสเทียรอยด์**

โครงการย่อยกลุ่มที่2: การสังเคราะห์และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารยับยั้ง เอคไดสเตียรอยด์

บทนำ

1. คำนำ

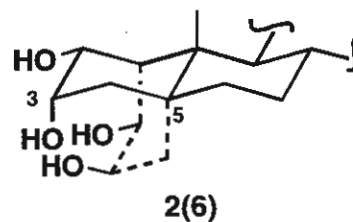
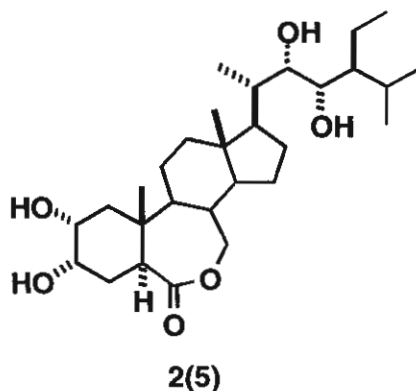
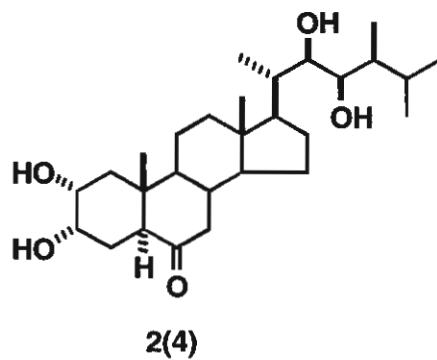
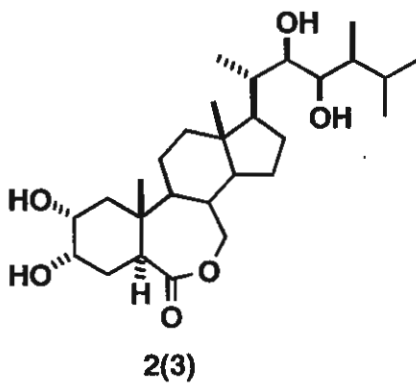
จากความสำคัญของเอคไดสเตียรอยด์ ดังได้กล่าวมาแล้วในโครงการวิจัยกลุ่มที่ 1 จะเห็นได้ว่าหากแมลง(และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังอีกหลายชนิด) ได้รับเอคไดสเตียรอยด์ เช่น 20-hydroxyecdysone [2(1)] หรือ ecdysone [2(2)] มากเกินไปจะทำให้ตายหรือเจริญเติบโตผิดปกติไป ในทางกลับกัน เนื่องจากเอคไดสเตียรอยด์มีความจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของแมลง หากแมลงขาดเอคไดสเตียรอยด์ก็จะไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ หากเราสามารถควบคุมแมลงไม่ให้สามารถนำเอคไดสเตียรอยด์ไปใช้ได้ ก็จะทำให้แมลงไม่เจริญเติบโต หรือต้องตายไป ฉะนั้นแนวทางหนึ่งที่จะนำไปสู่การปรับเปลี่ยนเอคไดสเตียรอยด์ให้เป็นสารควบคุมแมลงคือ หาทางยับยั้งที่จะไม่ให้เอคไดสเตียรอยด์มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบได้



2. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ในการที่จะยับยั้งไม่ให้เอคไดสเตียรอยด์มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการเป็นฮอร์โมนลอกคราบได้ ถึงแม้ว่างานวิจัยด้านนี้จะมีผู้ศึกษาน้อยมากก็ตาม แต่ก็พอจะแบ่งได้ 2 แนวทางคือ แนวทางแรกเป็นการศึกษาการหาสาร antiecdysteroids ในชั้นต้นได้มีผู้นำ brassinosteroids มาทดสอบการเป็น antiecdysteroids สารประเภท brassinosteroids เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulators) กลุ่มใหม่ที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับเอคไดสเตียรอยด์มาก^{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-homobrasinolid [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

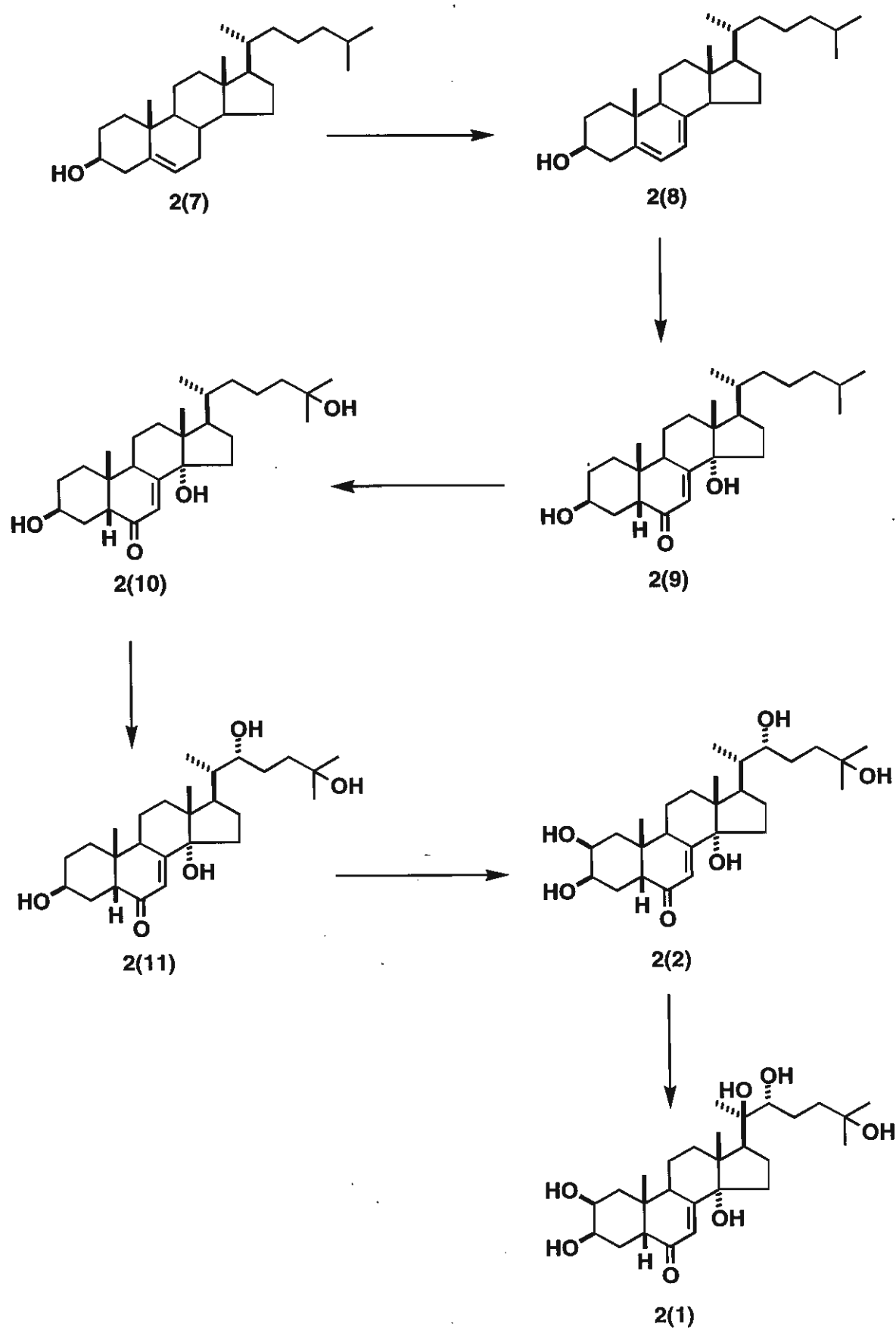
3. วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 1) เพื่อสังเคราะห์และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารยับยั้งเอคโดสเตียรอยด์
- 2) เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้าง กับฤทธิ์ทางชีวภาพของสารยับยั้ง เอคโดสเตียรอยด์

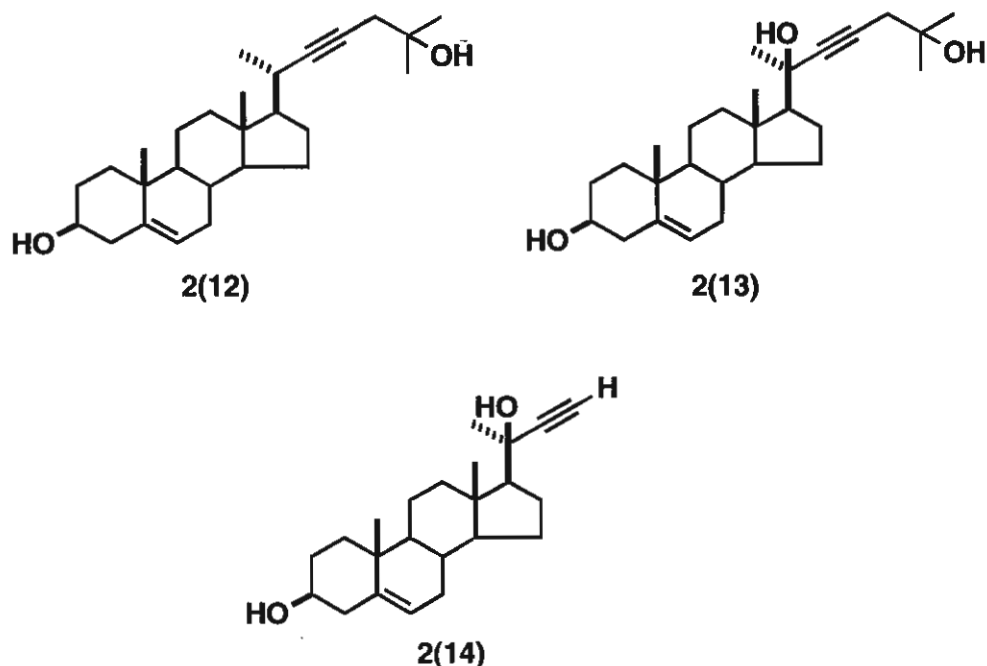
4. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

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

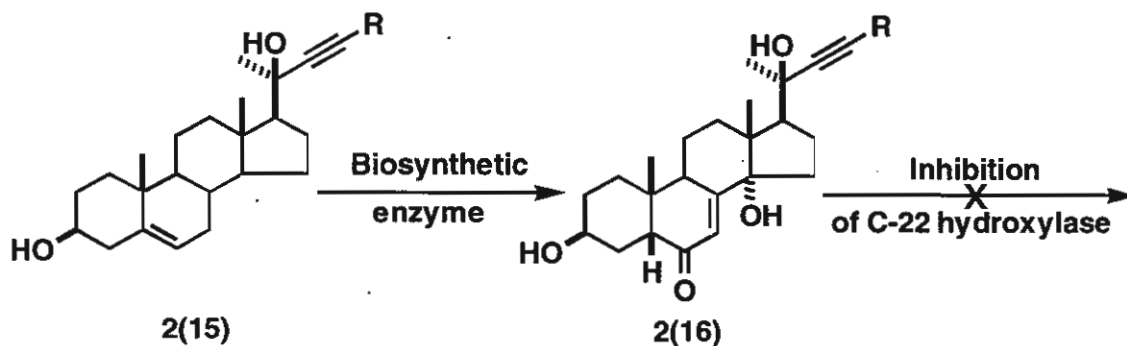
Scheme 2(1)



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 โดยเข้าใจว่าไปยับยั้งเอนไซม์ C-22 hydroxylase ดัง Scheme 2(2)

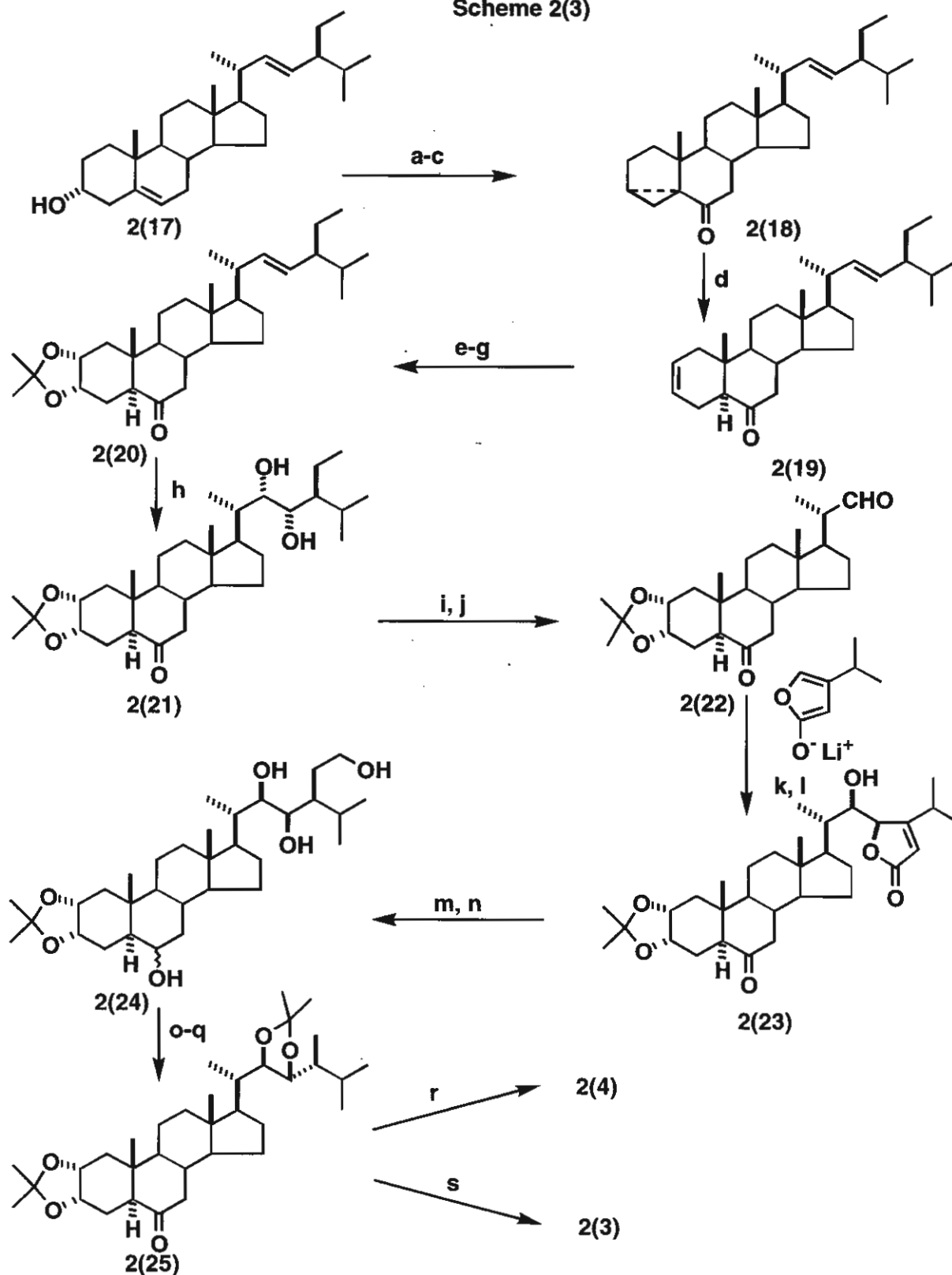


Scheme 2(2)



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)



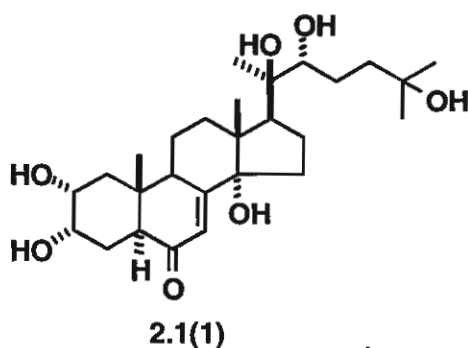
Reagents and conditions: a, MsCl/Py; b, KHCO_3 /aq. acetone/reflux, 6 h; c, $\text{CrO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ /acetone; d, LiBr/Py.HCl/DMA/160°C, 4 h; e, OsO_4 in Bu'OH/aq. acetone/NMO; f, aq. NaHSO_3 ; g, $\text{Me}_2\text{C}(\text{OMe})_2/\text{H}^+/\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeCN}$ /room temp., 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, $[(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{P}]_3\text{RhCl}/\text{C}_6\text{H}_6/\text{Ar}$, 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)]



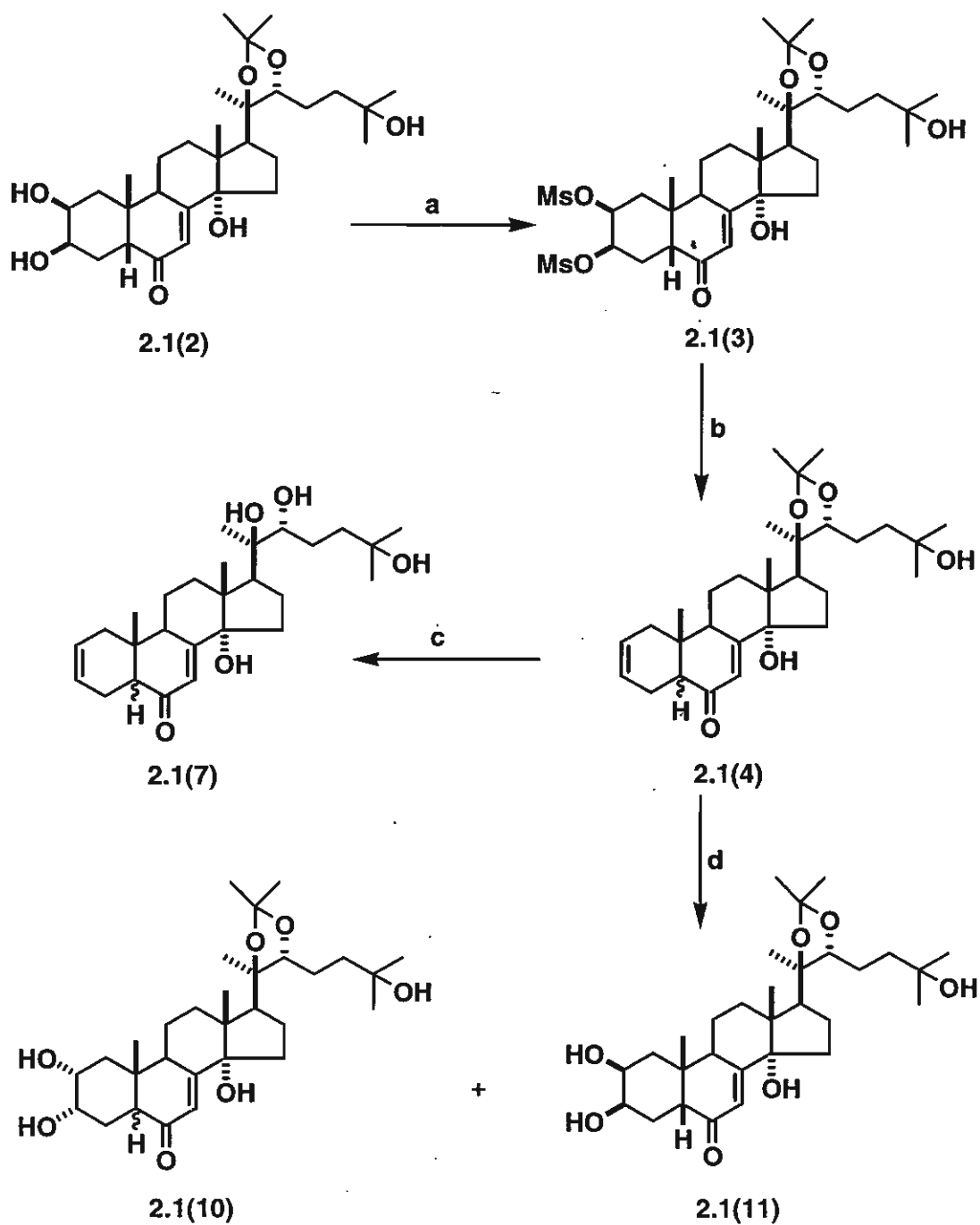
ในการปรับเปลี่ยน 20-hydroxyecdysone [2(1)] ให้เป็นสาร 2.1(1) ได้แสดงไว้ใน Scheme 1.2 (1) โดยมีการปรับเปลี่ยนไปจากที่ได้รายงานไว้ในครั้งที่ 2 เริ่มต้นด้วยการนำ 20-hydroxyecdysone 20,22-acetonide [2.1(2)] ซึ่งเตรียมได้จาก 2(1) ตามวิธีที่ปรากฏไว้ในวรรณกรรม^{2[14]} จากสาร 2.1(2) ทำปฏิกิริยากับ mesyl chloride 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 กล่าวคือเราได้เคยพบว่าเอคไดสเตียรอยด์ที่มี $5\beta\text{-H}$ 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

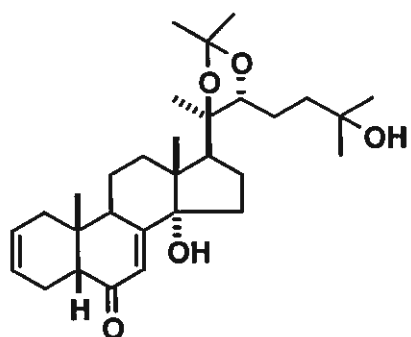
เนื่องจากหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 2 เกิด 1,3-diaxial interaction อาจทำให้เกิด epimerization ที่ตำแหน่ง 5 ได้เป็นสาร 2.1(11) ก็เป็นไปได้ เพื่อที่จะให้ทราบแน่ชัดว่า dihydroxylation product อีกชนิดหนึ่งเป็น 2.1(12) หรือ 2.1(13) เราได้ทำการศึกษาเทคนิคทาง 2D NMR อย่างละเอียด ทำให้สามารถ assign โปรตอนที่สำคัญต่างๆได้ (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

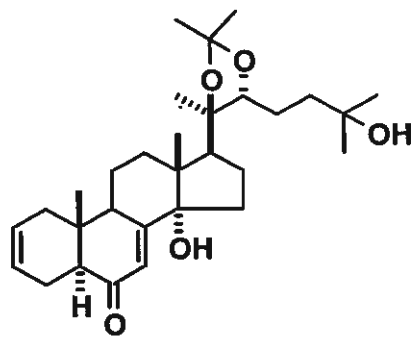
Scheme 2.1(1)



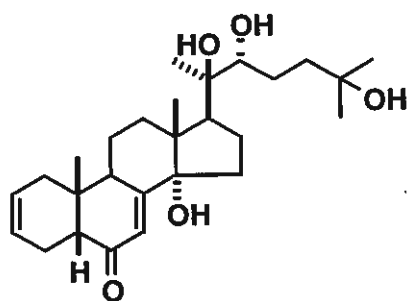
Reagents and conditions: a, MsCl/Pyr; b, NaI/DMF; c, 70% AcOH, PhCH₂N⁺Me₃Cl⁻; d, (i) OsO₄/Pyr; (ii) aq. NaHSO₃



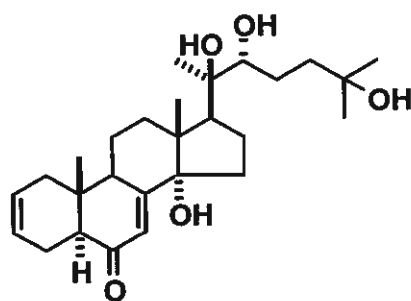
2.1(5)



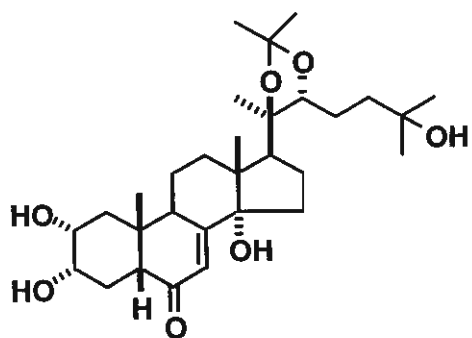
2.1(6)



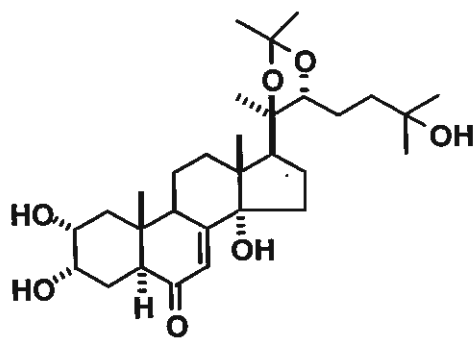
2.1(8)



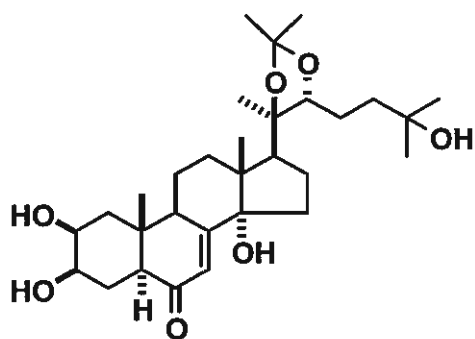
2.1(9)



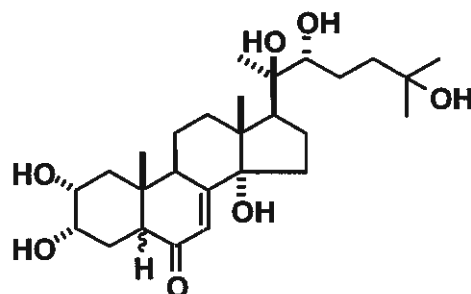
2.1(12)



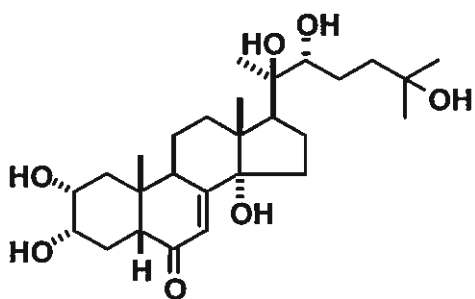
2.1(13)



2.1(14)



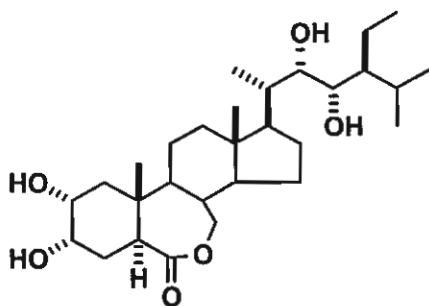
2.1(15)



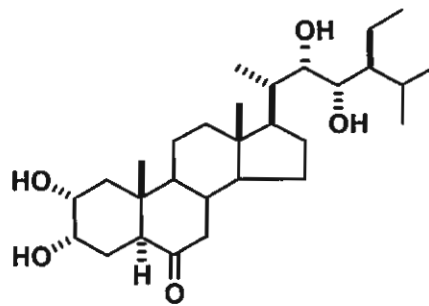
2.1(16)

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



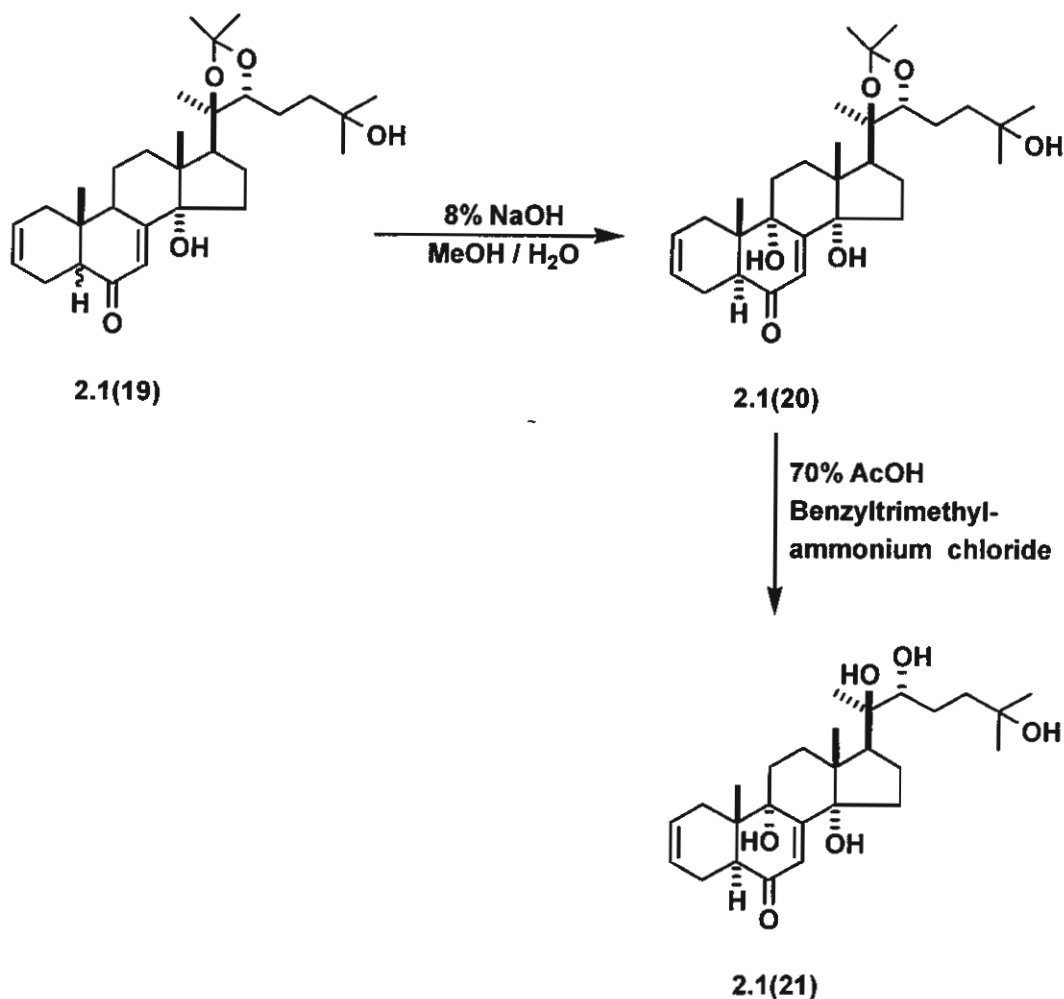
2.1(17)



2.1(18)

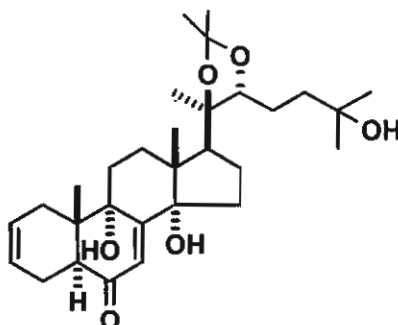
ในการสังเคราะห์ ecdysteroid analogues ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่งที่ 9 เราเริ่มจาก olefin 2.1(19) ซึ่งได้สังเคราะห์มาแล้วก่อนหน้านี้ ทำการคน olefin กับ 8% aq. NaOH ในเมทานอล เกิด autoxidation ซึ่งมีเบสเป็นคะตะลิสต์ได้สาร 2.1(20) ซึ่งสามารถกำจัดหมู่ป้องกัน acetonide ได้โดยทำปฏิกิริยากับ 70% AcOH

Scheme 2.1(2)

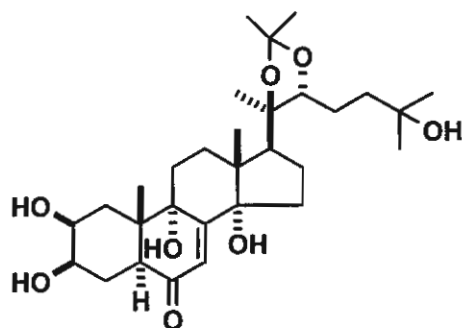
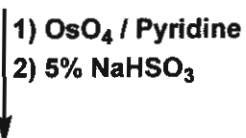


โครงสร้างของสาร 2.1(20) สามารถทราบได้จาก $^1\text{H-NMR}$ และแมสสเปกตรัม กล่าวคือ สัญญาณ H-7 ที่ δ 5.88 เป็น singlet (แทนที่จะเป็น doublet, ค่า J ประมาณ 2 Hz เหมือนเอดโดสแตียรอยด์ทั่วไป ซึ่งมีโปรตอนที่ตำแหน่ง 9) เนื่องจากไม่มี H-9 ที่จะเกิด allylic coupling แมสสเปกตรัมที่แสดงมวลเพิ่มขึ้นมาอีก 16 แสดงว่า 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)

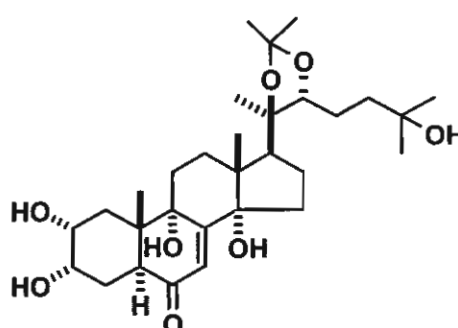
Scheme 2.1(3)



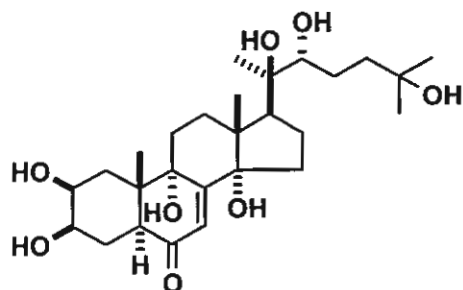
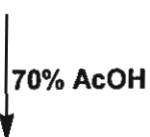
**2,3 Didehydro-2,3-dideoxy-5α-
9,20-dihydroxyecdysone 20,22-acetonide
2.1(20)**



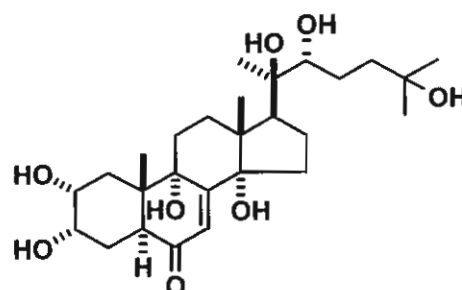
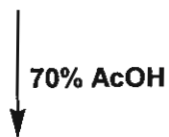
**5α-9,20-Dihydroxyecdysone
20,22-acetonide
2.1(22)**



2.1(23)



2.1(24)



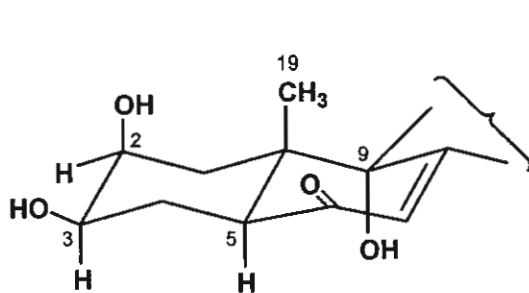
2.1(25)

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

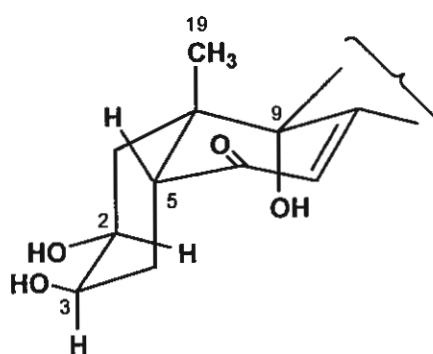
นำ olefin acetonide 2.1(20) มาทำปฏิกิริยา dihydroxylation ด้วย OsO_4 -pyridine และสลายสารเชิงซ้อนด้วย 5% aq. NaHSO_3 ได้สาร 2.1(22) และ 2.1(23) ในปริมาณ 20 และ 30% ตามลำดับ acetonide deprotection ของสาร 2.1(22) และ 2.1(23) ได้สาร 2.1(24) และ 2.1(25) ในปริมาณ 78 และ 90% ตามลำดับ (ดู Scheme 2.1(3))

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



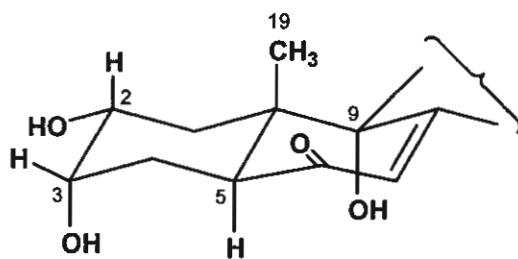
2.1(26)



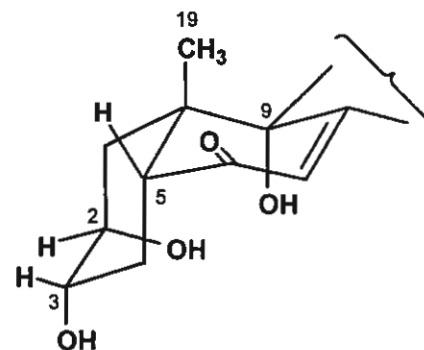
2.1(27)

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 ^1H -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 ทำสารผลิตภัณฑ์ในบรีสุทธีด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี (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 ทำสารให้บรีสุทธีด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี 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 ทำสารผลิตภัณฑ์ในบรีสุทธีด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี 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 CDCl_3 .^{*,‡} 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 CDCl₃.

^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

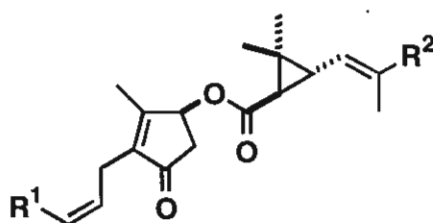
ในการศึกษาหาสารควบคุมศัตรูพืชนั้น สิ่งที่เราขาดไม่ได้คือต้องมีการศึกษาหาสารควบคุมศัตรูพืชจากธรรมชาติ เพราะเป็นที่ทราบกันดีว่า พืชได้พยายามสร้างสารขึ้นมาต่อสู้ป้องกันการรุกรานจากศัตรูที่มารุกราน^{3.1[1]} ไม่ว่าจะเป็นแมลง สัตว์ประเภทอื่นๆ แบคทีเรีย เชื้อรา หรือแม้แต่พืชด้วยกันเอง จากวิวัฒนาการอันยาวนาน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

3. วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อสกัดแยก หาสูตรโครงสร้าง และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารควบคุมศัตรูพืชที่ได้จากธรรมชาติ

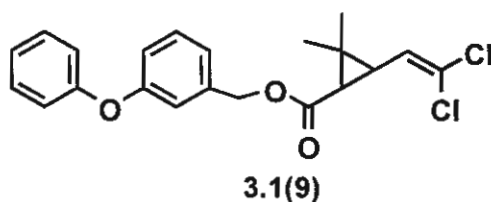
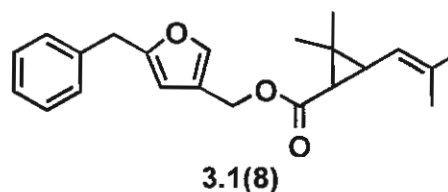
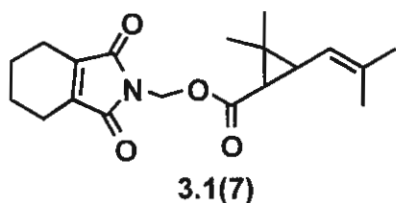
4. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

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 และมีความมีพิษน้อยหรือไม่มีพิษต่อมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่น 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)



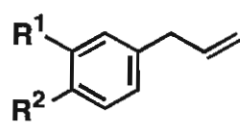
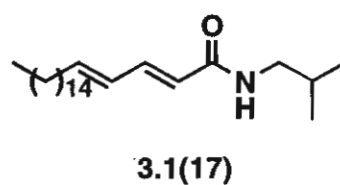
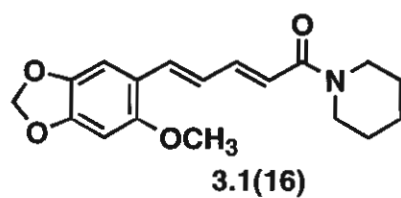
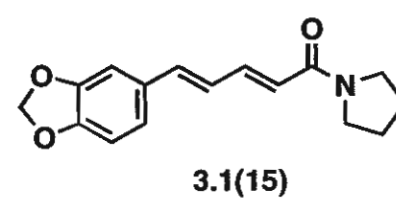
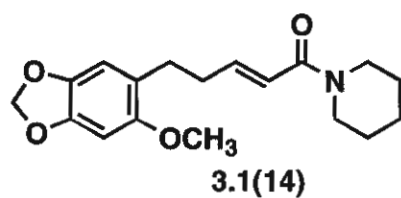
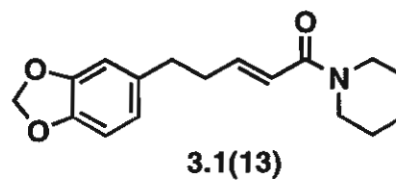
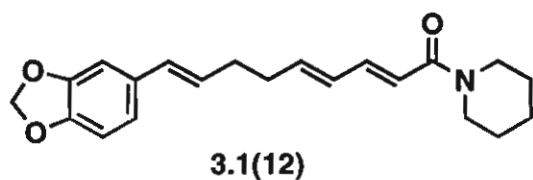
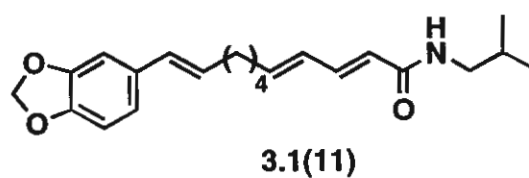
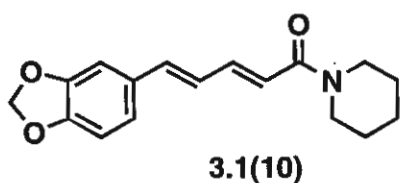
ความสำเร็จของการพัฒนาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติกลุ่ม pyrethroids มาเป็นสารป้องกันและกำจัดแมลงที่มีประสิทธิภาพสูงเป็นตัวอย่างที่ดีของการนำสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมาปรับเปลี่ยนจนได้สารที่เหมาะสมในการควบคุมแมลง ประเทศไทยมีพืชหลายชนิดที่มีฤทธิ์ในการป้องกันและกำจัดแมลง และเชื่อว่ยังมีพืชอีกจำนวนมากที่ยังไม่ได้มีการตรวจสอบว่ามีสารที่มีฤทธิ์ดังกล่าวนี้ อยู่ด้วย ฉะนั้นหากมีการนำพืชที่มีการศึกษาส่วนประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพมาแล้ว เช่น พืชในสกุล *Piper* มาทำการศึกษาอย่างละเอียดลึกซึ้ง และศึกษาในแง่ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ในการเป็นสารควบคุมแมลง ก็อาจจะนำไปสู่การค้นหาสารควบคุมแมลงใหม่ที่มี 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 (ดีปลี), *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 มีรายงานวาสตรีมาเลย์เคยใช้พริกไทยดำในการทำให้เกิดการแท้ง 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



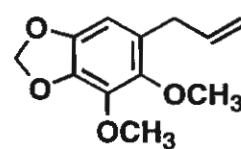
3.1(18) $R^1 = R^2 = \text{OAc}$

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)

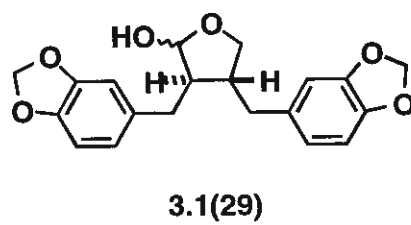
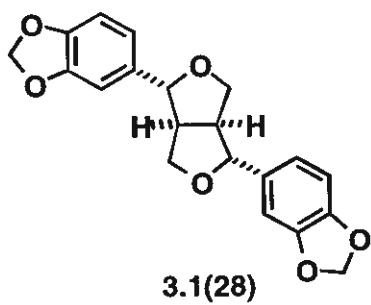
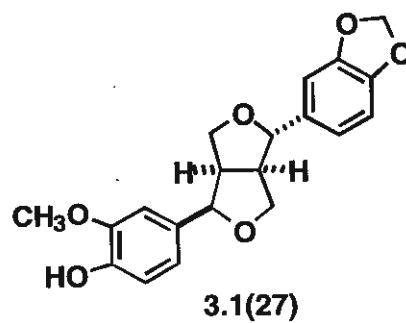
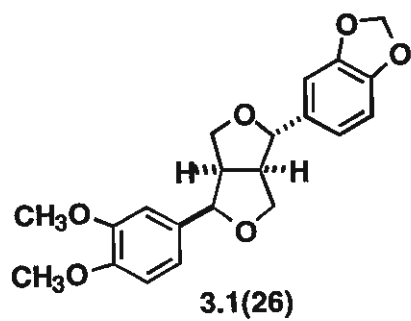
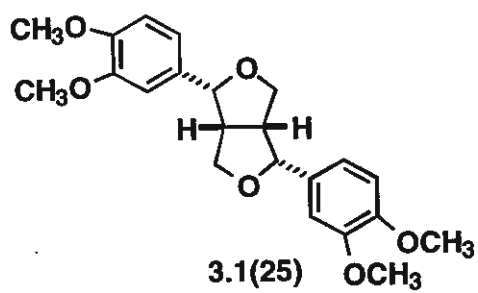
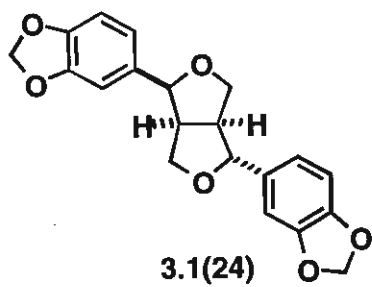
สารในพืชชนิดนี้เพิ่มเติม โดยศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ในการเป็นสารฆ่าแมลง^{3.1[27]} นอกจากนี้ยังมีสารพวก alkaloids/amides ที่ได้มีการค้นพบแล้วจากพืชสกุล *Piper* และได้มีการรวบรวมอ้างอิงไว้แล้ว^{3.1[11]}

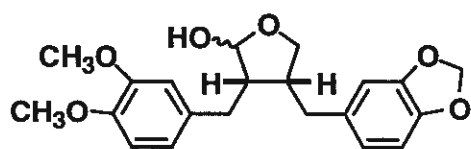
สารในกลุ่ม propenylphenols ที่แยกได้จากใบของ *P. betel* คือสาร [3.1(18)] ถึง [3.1(22)] มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อราและ nematode^{3.1[28]} สาร dillapiole [3.1(23)] ซึ่งแยกมาจาก *P. aduncum*^{3.1[29]} มีฤทธิ์ในการฆ่าพวกหอย *Biomphalaria glabrata* สารกลุ่ม lignans และ neolignans ที่พบในพืชสกุล *Piper* ก็มีโครงสร้างแตกต่างกันมากพอสมควร 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*

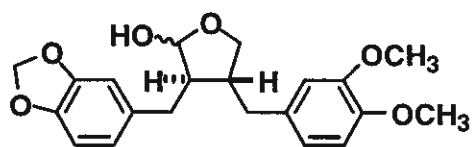
สารกลุ่ม piperolides เป็นสารพวก cinnamylidone butenolides เพิ่งพบใน *P. sanctum* เท่านั้น เช่น 7,8-epoxypiperolides [3.1(34)]^{3.1[35]} สารกลุ่ม chalcones และ dihydrochalcones ที่พบในพืชสกุลนี้ ก็เป็นกลุ่มเล็กๆที่พบในพืชเพียงไม่กี่ชนิด สารกลุ่มนี้ส่วนใหญ่พบใน *P. aduncum*^{3.1[36,37]} เช่น adunctin A [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]}

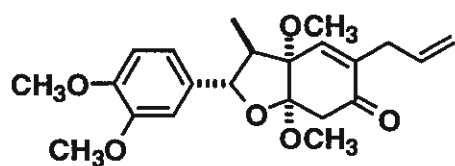




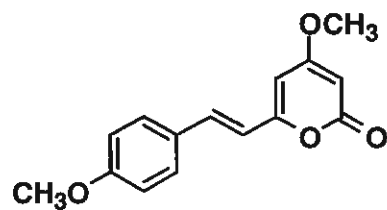
3.1(30)



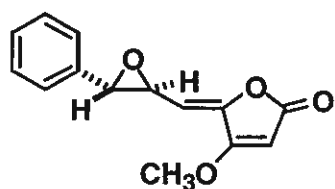
3.1(31)



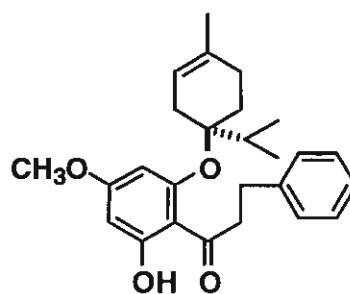
3.1(32)



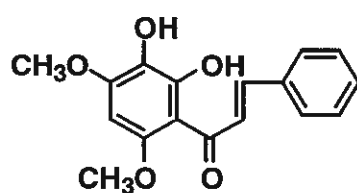
3.1(33)



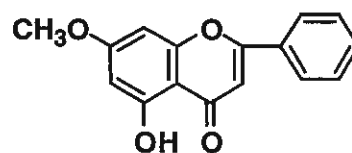
3.1(34)



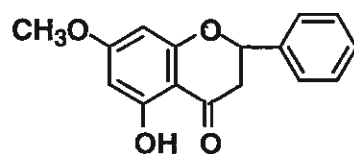
3.1(35)



3.1(36)



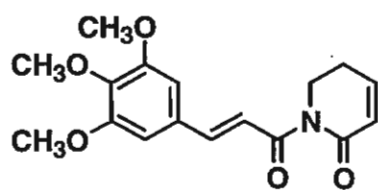
3.1(37)



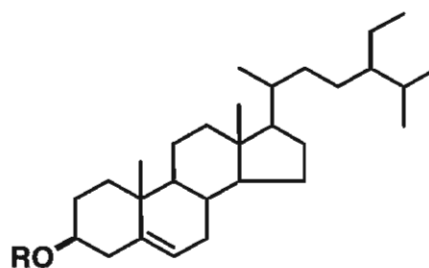
1. ดีปลี (*Piper chaba* Hunt)

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)], piperonaline [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-

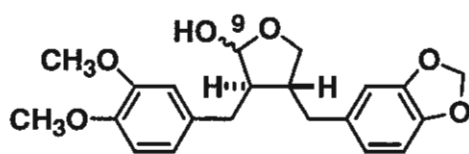


3.1(39)

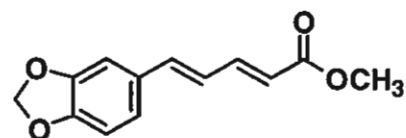


3.1(40) R = H

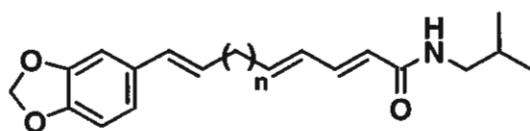
3.1(58) R = β -D-glucopyranosyl



3.1(41)



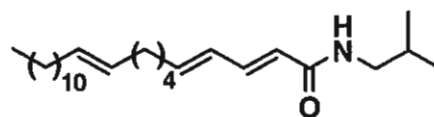
3.1(42)



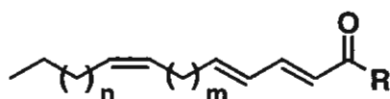
3.1(43) n = 6

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 =

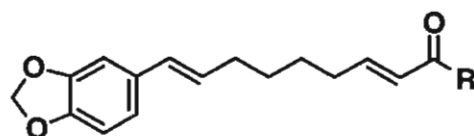
3.1(48) n = 1, m = 10, R =

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

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

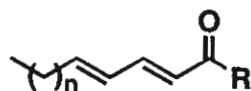
3.1(51) n = 3, m = 6, R =

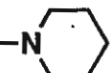
3.1(52) n = 3, m = 8, R =



3.1(46) R =

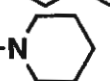
3.1(64) R =

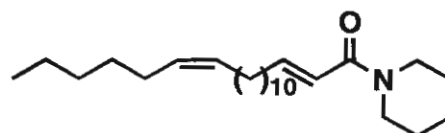


3.1(53) $n = 12$, $R = -N$ 

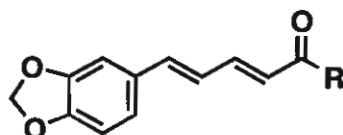
3.1(54) $n = 14$, $R = -N$ 

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

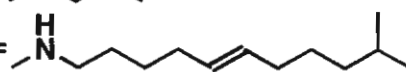
3.1(67) $n = 4$, $R = -N$ 

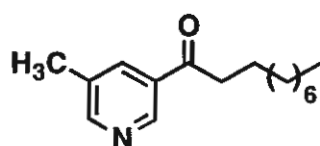


3.1(55)

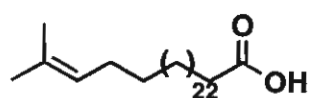


3.1(57) $R =$ 

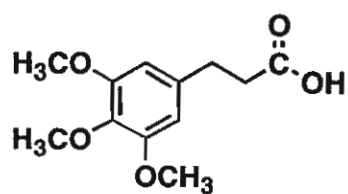
3.1(61) $R =$ 



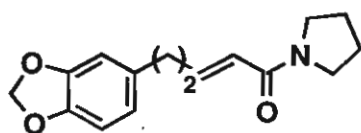
3.1(59)



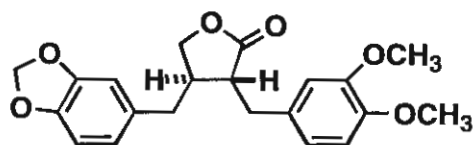
3.1(60)



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

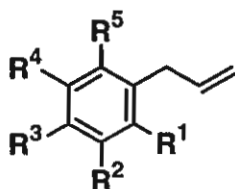
จากการศึกษาฤทธิ์ในการฆ่าแมลงของพืชเพื่อพัฒนาเป็นยาฆ่าแมลงในการเกษตร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและคณะ^{3.1[43]} ได้ระบุว่าสารผสมของ guineensine [3.1(43)], pipericide [3.1(11)] และ retrofractamide คือสารที่ออกเสริมกันในสารสกัดจากดีป्ली ซึ่งมีผลทำให้สามารถฆ่าหนอนกระทู้ผักได้เท่าเทียมกับ pyrethrins และยังใช้กำจัดหนอนใยผักในแปลงของเกษตรกรได้อย่างมีประสิทธิภาพทัดเทียมกับ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

จากรายงานข้างต้นนี้ทำให้เกิดความสนใจในการศึกษาส่วนประกอบทางเคมีของดีป्लीและพืชในสกุล *Piper* อื่นๆ ที่มีในประเทศไทยอย่างละเอียด โดยมุ่งหวังจะนำสารที่สกัดแยกได้จากพืชเหล่านี้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเน้นศึกษาฤทธิ์ในการเป็นสารควบคุมแมลง นอกจากนี้จะนำสารที่สกัดแยกได้ในปริมาณมากไปปรับเปลี่ยนโครงสร้าง เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ในการควบคุมแมลงต่อไป

2. ข้ำพลู (*Piper sarmentosum* Roxb.)

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

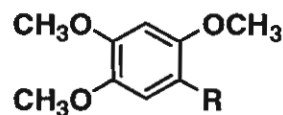
การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของข้ำพลูได้มีผู้ทำการวิจัยรวม 5 คน คนะของ Valyasevi^{3.1[75]} ได้วิเคราะห์หาปริมาณ oxalic acid จากใบข้ำพลู คนะของ Niamsa^{3.1[69]} ได้ทำการแยก hydrocinnamic acid [3.1(69)] และ β -sitosterol [3.1(40)] จากส่วนที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ของใบข้ำพลู คนะของ Masuda^{3.1[76]} ได้ทำการสกัดใบข้ำพลูด้วยเมทานอล 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* คนะของ Likhitwitayawuid^{3.1[77]} ได้ศึกษาส่วนที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ของผลข้ำพลูแห้ง 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) ของสารสกัดจากผลข้ำพลู สามารถแยกสารประกอบเพิ่มอีก 2 ชนิดคือ α -asarone [3.1(75)] และ asaronaldehyde [3.1(80)]^{3.1[78]} และเมื่อเร็ว ๆ นี้คนะของ Stohr^{3.1[79]} ได้ทำการแยกสารประกอบ amide 2 ชนิดจากส่วนเหนือดินของข้ำพลูได้แก่ (2E,4E)-N-2'-methylbutyldecadienamide [3.1(81)] และ (2E,4E)-N-isobutyloctadienamide [3.1(82)]



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

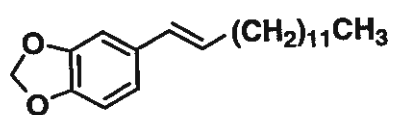
3.1(73) $R^1 = R^3 = R^4 = \text{OCH}_3$; $R^2 = R^5 = \text{H}$

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

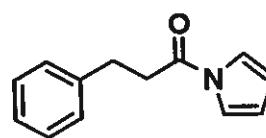


3.1(75) $R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$

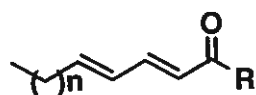
3.1(80) $R = \text{CHO}$



3.1(76)



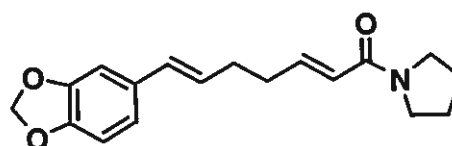
3.1(77)



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 สเปกตรัมพบว่า มี 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 cm^{-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

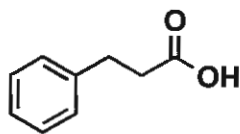
เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีข้างต้นกับข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีที่มีผู้รายงานไว้

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

7. การแยก hydrocinnamic acid [3.1(69)]

นำสารกลุ่มย่อย $\text{H}_{4.7}$ มาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีก 3 ครั้ง ได้สารสีขาวมีลักษณะกึ่งของแข็ง จาก IR สเปกตรัมให้แถบดูดกลืนสำคัญที่ 3450-2500 (เป็นแถบกว้าง) และ 1713 cm^{-1} ตรงกับ O-H และ C=O stretching ของกรดคาร์บอกซิลิก นอกจากนี้ยังพบแถบดูดกลืนที่ 751 และ 700 cm^{-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)

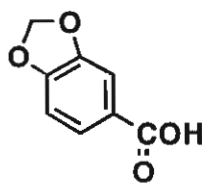
การยืนยันโครงสร้างของสาร 3.1(10) และ 3.1(42) โดยการทำให้ TLC เปรียบเทียบกับสารที่แยกได้จาก hexane extract

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)]

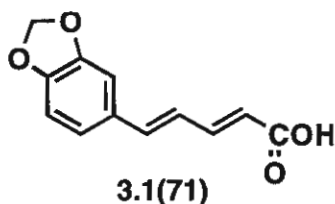


3.1(70)

10. การแยก piperic acid [3.1(71)]

สารกลุ่ม M_3 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 pipemonaline [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 H_1 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 เปรียบเทียบกับสารที่เคยแยกได้จากผลซ้ำพลู

4. การแยก β -sitosterol [3.1(40)]

นำสารกลุ่ม H_2 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)]

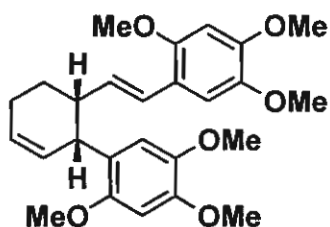
เมื่อนำสารกลุ่ม H_3 มาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำ 3 ครั้ง ได้สารสีเหลืองที่มีลักษณะกึ่งของแข็งของสาร 3.1(46) ซึ่งสามารถยืนยันโครงสร้างได้จาก 1H NMR สเปกตรัมและจากการทำ TLC เปรียบเทียบกับสารที่เคยแยกได้จากผลดีปัส

6. การแยก guineensine [3.1(43)]

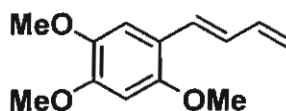
ภายหลังการทำคอลลัมน์โครมาโตกราฟีและคอลัมน์โครมาโตกราฟีของสารกลุ่ม H_4 อีกอย่างละครั้ง ได้ของแข็งสีขาวของสาร 3.1(43) โครงสร้างของสาร 3.1(43) ยืนยันได้จาก 1H NMR สเปกตรัมและจากการทำ TLC เปรียบเทียบกับสารที่เคยแยกได้จากผลดีปัส

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)

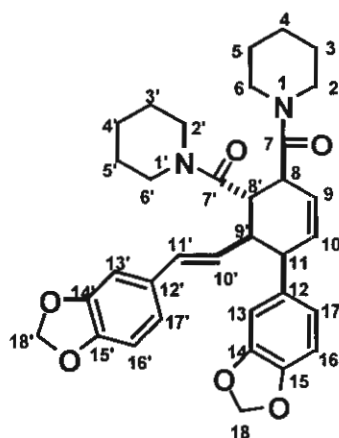
ตารางที่ 3.1(1) ข้อมูล NMR ของสาร 3.1(87)^a

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

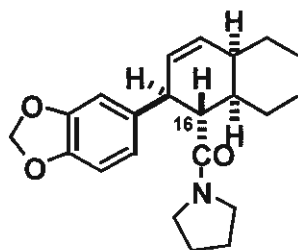
การกำหนดสัญญาณของ ^1H และ ^{13}C NMR สเปกตรัมดังแสดงในตารางที่ 3.1(1) ได้อาศัยเทคนิคของ ^1H - ^1H COSY, HETCOR และ HMBC ประกอบกัน จาก ^{13}C NMR และ DEPT สเปกตรัม (ตารางที่ 3.1(1)) แสดงว่ามีเฉพาะ methylene carbon, methine carbon และ quaternary carbon จำนวน 12, 14 และ 8 อะตอมตามลำดับ ข้อมูลนี้ช่วยสนับสนุนสูตรโมเลกุลของสาร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



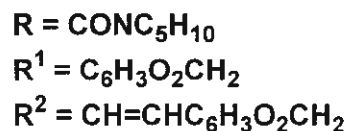
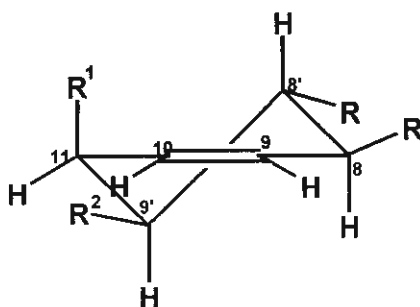
3.1(87)

^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]}



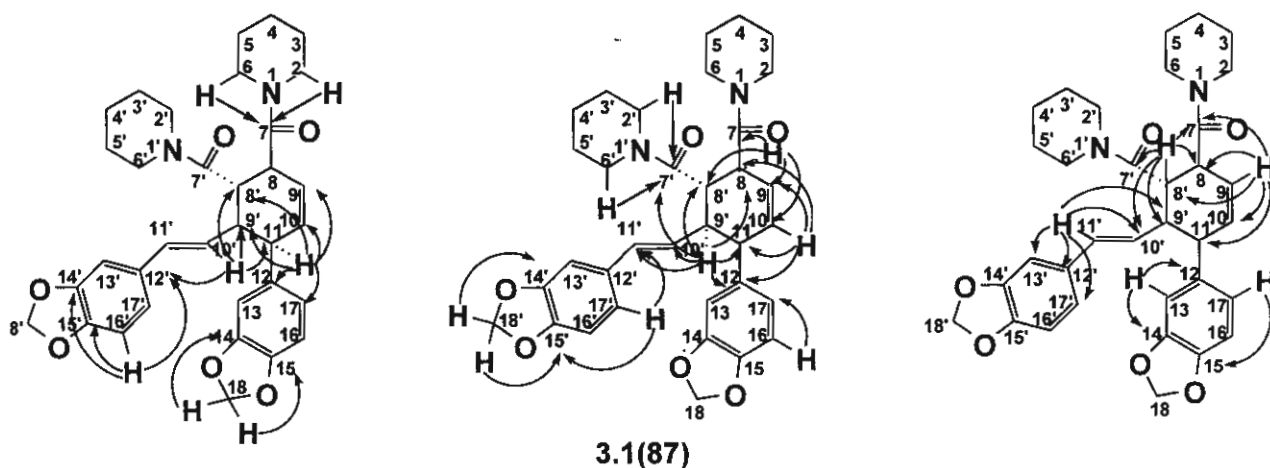
3.1(90)



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

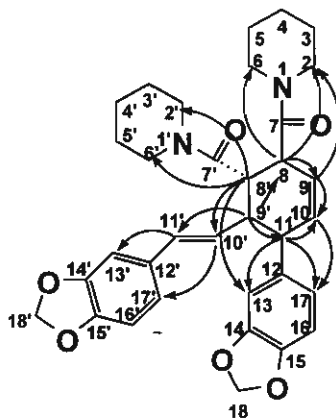
การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนกับโปรตอนโดยเทคนิค ^1H - ^1H COSY และ TOCSY และความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนกับคาร์บอนโดยเทคนิค HMBC ดังแสดงในรูปที่ 3.1(1) ช่วยยืนยันการเชื่อมต่อของหมู่อะตอมต่างๆรอบ cyclohexene ring ของสาร 3.1(87)



รูปที่ 3.1(1) ความสัมพันธ์ระหว่าง H กับ C โดยเทคนิค HMBC

สำหรับ stereochemistry ของสาร 3.1(87) สรุปได้จากเทคนิค NOESY ดังแสดงในรูปที่

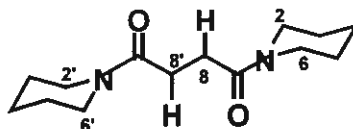
3.1(2)



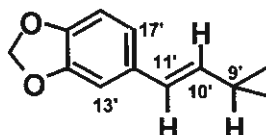
3.1(87)

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



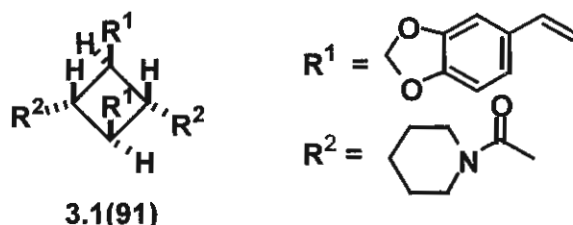
การจัดตัวของหมู่ acylpiperidine ดังกล่าวข้างต้นนี้ช่วยอธิบายการเกิด downfield shift ของ H_8 (δ 4.12) และ H_8 , (δ 3.64) ของสาร 3.1(87) เมื่อเปรียบเทียบกับ H_{16} (δ 2.76) ของสาร 3.1(90) คาดว่าน่าจะเป็นผลมาจากการเกิด diamagnetic anisotropy ของหมู่คาร์บอนิลซึ่งจัดตัวในลักษณะคล้าย 1,3 diaxial ของ cyclohexane 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. ข้ำพลู (*Piper sarmentosum* Roxb.)

1) ผลข้ำพลู

(1) การหาส่วนประกอบทางเคมี

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

(ก) Hexane extract

นำส่วนที่สกัดด้วยเฮกเซนมาทำคอลลัมน์โครมาโตกราฟี ได้ส่วนย่อย 4 กลุ่มที่สามารถนำไปแยกสารออกมาได้

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

เมื่อนำสารกลุ่ม H_2 มาทำคอลลัมน์โครมาโตกราฟีและคอลลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกอย่างละหนึ่งครั้ง 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

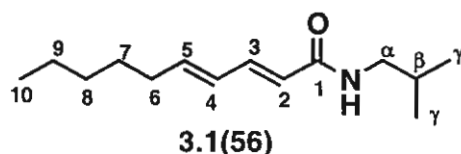
หมายเหตุ การอภิปรายผลของสาร 3.1(40) อยู่ในหัวข้อต่อไป

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)]

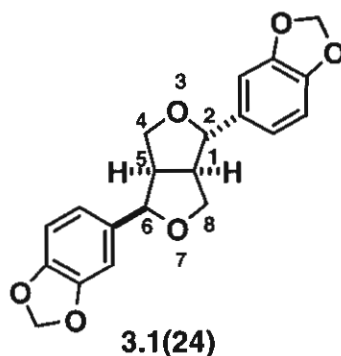


4. การแยก (+)-asarinin [3.1(24)]

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)]

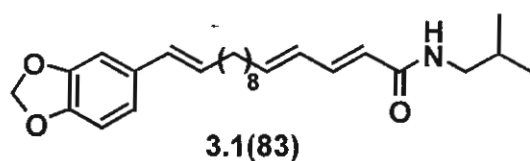
ผลึกสีขาวของสาร 3.1(43) กรองได้จากกลุ่มย่อย $H_{3.17}$ การยืนยันโครงสร้างของสาร 3.1(43) ได้จาก 1H NMR สเปกตรัมและจากการทำ TLC เปรียบเทียบกับสารที่แยกได้จากกลุ่มย่อย $H_{3.6.2}$ ของผลดีป्ली

6. การแยก brachystamide B [3.1(83)]

จากกลุ่มย่อย $H_{3.17}$ ได้ของแข็งสีขาว จุดหลอมเหลว $100-101^\circ C$ 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, $J = 15.8\text{ Hz}$) ตรงกับโปรตอนตำแหน่ง 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)]



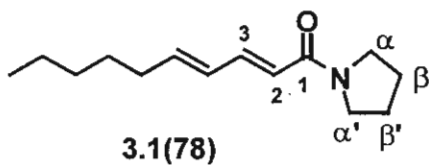
7. การแยก sarmentine [3.1(78)]

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 เกิดได้ยากเนื่องจากมีพลังงานขวางกันสูง^{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)]

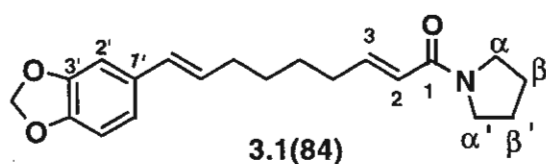


8. ការແຍក brachyamide B [3.1(84)]

เมื่อนำสารกลุ่มย่อย 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 ซม⁻¹ ส่วนแถบดูดกลืนที่ 1250, 1040 และ 932 ซม⁻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 $M_{1.6}$ เป็นสารสีขาวที่มีลักษณะกึ่งแข็งของสาร 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

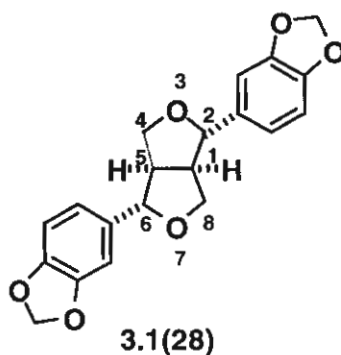
จากการเปรียบเทียบ ^1H NMR สเปกตรัมและ TLC กับสารที่แยกได้จากกลุ่ม H_2 ของผลดิบลิ สามารถยืนยันโครงสร้างของสาร 3.1(42)

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)

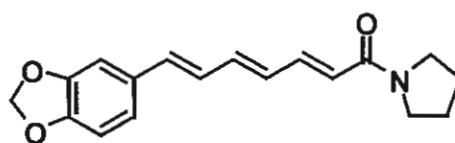
การยืนยันโครงสร้างของสาร 3.1(56) ได้จาก ^1H NMR สเปกตรัมและจากการทำ TLC เปรียบเทียบกับสารที่แยกได้จากกลุ่มย่อย $H_{2.9.5}$ ของผลข้าพลู

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