

วิจัยยืนยันว่า เอคโดสเตียรอยด์ที่มีหมู่ hydroxyl ตำแหน่งที่ 2 เป็นแบบ α และ H-5 เป็นแบบ β ชอบที่จะเกิด C-5 epimerization^{2[35], 2.1.1[10]}

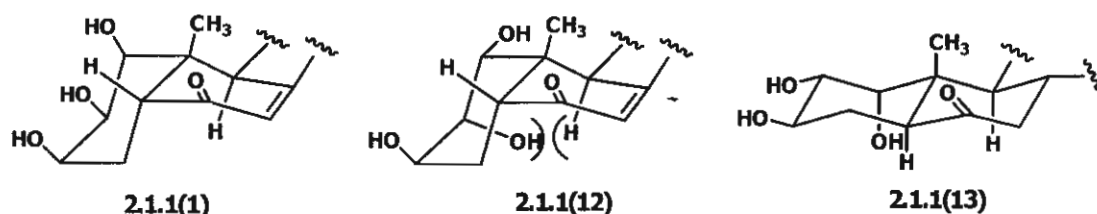


Figure 2.1.1(1). แบบจำลองโมเลกุลของสาร 2.1.1(1) สาร 2.1.1(12) และสาร 2.1.1(13)

วัสดุและวิธีการ

วัสดุและวิธีการทั่วไป

จุดหลอมเหลวหาจากเครื่อง Electrothermal melting point apparatus และไม่ได้มีการปรับแก้ IR สเปกตรัมบันทึกในลักษณะ KBr disc จากเครื่อง Perkin-Elmer FT-IR Spectrum BX spectrometer. NMR สเปกตรัมบันทึกด้วยเครื่อง Bruker AVANCE 400 spectrometer แมสสเปกตรัมบันทึกจากเครื่อง Finnigan MAT 90 spectrometer คอลัมน์โครมาโตกราฟีและ TLC ใช้ silica gel 60 (ขนาดเล็กกว่า 0.063 mm) และ silica gel 60 F₂₅₄ ชนิดเคลือบสำเร็จรูปของ Merck ตามลำดับ

Mesylation ของสาร 2.1.1(2)

ละลาย acetonide 2.1.1(2) (130 mg, 0.25 mmol) ซึ่งเตรียมได้จาก 2(1) ตามวิธีที่รายงานไว้แล้ว^{2[17]} ในพริตตินที่ปราศจากน้ำ (5 ml) กวนสารละลายนี้ที่ 0–4°C นาน 10 min แล้วเติม mesyl chloride (0.15 ml, 1.93 mmol) อย่างช้าๆ กวนต่อนาน 1 h จากนั้นทำการกวนต่อที่อุณหภูมิปกติ นาน 30 min เติมน้ำเย็น (200 ml) แล้วสกัดส่วนผสมด้วย EtOAc (3×300 ml) ล้างส่วนผสมด้วยน้ำ ทำให้ปราศจากน้ำด้วย anhydrous Na₂SO₄ ระเหยตัวทำละลายให้แห้งภายใต้สภาวะสุญญากาศ โดยควบคุมอุณหภูมิของอ่างน้ำร้อนที่ 35–40°C เมื่อทำ

คอลัมน์โครมาโตกราฟีของสาร crude ให้ mesylate 2.1.1(3) (129 mg, 86%) ข้อมูลสเปกโตรสโกปี (IR, ^1H NMR) ของ 2.1.1(3) สอดคล้องกับที่มีผู้รายงานไว้²¹⁷

Acetylation ของ mesylate 2.1.1(3)

กวนสารละลายผสมของ mesylate 2.1.1(3) (60 mg, 0.125 mmol) ในพีริดีน (1.2 ml) ที่อุณหภูมิ 0–4°C เป็นเวลา 5 min แล้วจึงเติม Ac_2O (1 ml) เมื่อปล่อยให้ปฏิกิริยาถึงอุณหภูมิปกติแล้วให้กวนต่อไปอีก 2 h เมื่อปฏิกิริยาลิ้นสุดแล้วให้เติมน้ำ (60 ml) แล้วสกัดของผสมด้วย EtOAc (3×50 ml) ล้างชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยน้ำ ทำให้ปราศจากน้ำด้วย anhydrous Na_2SO_4 ระเหยตัวทำละลายให้แห้ง เมื่อทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีของสาร crude โดยชะด้วย CHCl_3 -MeOH (98:2) ให้ 2.1.1(4) (61 mg, 95%) ซึ่งนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไปโดยตรง

ปฏิกิริยา Base-catalyzed elimination ของ mesylate 2.1.1(4): การเตรียม olefin 2.1.1(5)

เติม DBU (0.8 ml, 5.350 mmol) ลงในสารละลายของสาร 2.1.1(4) (32 mg, 0.050 mmol) ใน DMF (1.5 ml) กวนของผสมนี้ที่ 150°C ภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจนเป็นเวลา 6 h หลังจาก work up ตามปกติแล้ว นำของผสมของปฏิกิริยามาทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยชะด้วย CHCl_3 -MeOH (98.5:1.5) ได้สารที่มีชั้นน้อยกว่าในปริมาณเล็กน้อย (ca 0.2 mg) และให้สาร olefin 2.1.1(5) (20 mg, 74%) IR: ν_{max} 3447, 2971, 2934, 1735, 1716, 1654, 1374, 1249, 1020, 1002, 955, 879 cm^{-1} ; ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.78 (3H, s, Me-18), 1.08 (3H, s, Me-19), 1.13 (3H, s, Me-21), 1.20 (3H, s, Me-26), 1.21 (3H, s, Me-27), 1.30, 1.38 (2×3H, 2s, acetonide Me), 2.02 (3H, s, AcO), 2.20 (1H, dd, $J=9.2$, 7.8 Hz, H-17), 2.37 (1H, dd, $J=13.3$, 3.2 Hz, H-5), 2.85 (1H, m, H-9), 3.63 (1H, brd, $J=8.2$ Hz, H-22), 5.22 (1H, m, $W_{1/2}=10$ Hz, H-3), 5.73 (1H, dd, $J=10$, 4.4 Hz, H-2), 5.87 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H-7), 5.95 (1H, d, $J=10$ Hz, H-1); HRFABMS (positive ion mode): m/z 545.3476 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{O}_7+\text{H}$, 545.3478).

ในบางการทดลองพบว่าได้สารที่มีความเป็นชั้นน้อยกว่า (ซึ่งเรียกว่าสาร 2.1.1(9)) เป็น minor product (10–15%) พร้อมกับmajor product 2.1.1(5) (48–53%).

2.1.1(13)

Compound 2.1.1(9): IR: $\nu_{\max}$ 3448, 2970, 2934, 1736, 1716, 1676, 1376, 1249, 1031, 1002, 872 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 0.80 (s, 3H, 18-Me), 0.93 (s, 3H, 19-Me), 1.14 (s, 3H, 21-Me), 1.21 (s, 3H, 26-Me), 1.22 (s, 3H, 27-Me), 1.31 and 1.39 (each s, $2 \times 3\text{H}$, acetonide Me), 1.53 (obscured signal, 1H, H-4ax), 2.05 (s, 3H, AcO), 2.22 (dd, $J=7.9, 7.8$ Hz, 1H, H-17), 2.45 (brdd, $J=12.9, 6.7$ Hz, 1H, H-4eq), 2.57 (dd, $J=12.7, 2.1$ Hz, 1H, H-5), 2.82 (m, 1H, H-9), 3.64 (brd, $J=8.4$ Hz, 1H, H-22), 5.36 (m, $W_{1/2}=20$ Hz, 1H, H-3), 5.54 (brd, $J=10.1$ Hz, 1H, H-2), 5.88 (dd, $J=10.1, 1.8$ Hz, 1H, H-1), 5.93 (d, $J=2.5$ Hz, 1H, H-7); HRFABMS (positive ion mode): m/z 545.3477 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{O}_7+\text{H}$, 545.3478).

Deacetylation ของสาร 2.1.1(5)

เติม 10% KHCO_3 (0.3 ml) ลงในสารละลายของ 2.1.1(5) (19 mg, 0.035 mmol) ใน MeOH (0.3 ml) ทำการกวนของผสมนี้เป็นเวลา 6 h หลังจาก work up ตามปกติแล้ว นำของผสมของปฏิกิริยามาทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้สาร 2.1.1(6) (13 mg, 74%); IR: $\nu_{\max}$ 3422, 2967, 2934, 1654, 1458, 1375, 1252, 1215, 1172, 1103, 1024, 1002, 876 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 0.79 (s, 3H, 18-Me), 1.07 (s, 3H, 19-Me), 1.13 (s, 3H, 21-Me), 1.21 (s, 3H, 26-Me), 1.22 (s, 3H, 27-Me), 1.30, 1.39 (each s, $2 \times 3\text{H}$, acetonide Me), 2.19 (dd, $J=8.5, 8.4$ Hz, 1H, H-17), 2.39 (dd, $J=13.2, 2.8$ Hz, 1H, H-5), 2.84 (m, 1H, H-9), 3.63 (brd, $J=8.1$ Hz, 1H, H-22), 4.22 (brs, $W_{1/2}=10$ Hz, 1H, H-3), 5.79 (dd, $J=10, 4$ Hz, 1H, H-2), 5.84 (d, $J=10$ Hz, 1H, H-1), 5.89 (d, $J=1.9$ Hz, 1H, H-7); HRFABMS (negative ion mode): m/z 501.3216 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_6-\text{H}$, 501.3216).

การจัดหมู่ปกป้อง Acetonide ของสาร 2.1.1(6)

ทำการกวนของผสมระหว่าง 2.1.1(6) (12 mg, 0.024 mmol) และ $\text{PhCH}_2\text{N}^+\text{Me}_3\text{Cl}^-$ (3 mg) ใน MeOH (0.2 ml) และ 70% AcOH (0.5 ml) ที่อุณหภูมิปกติ นาน 4 วัน หลังจาก work up ตามปกติและทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้ olefin 2.1.1(7) (9 mg, 81%); IR: $\nu_{\max}$ 3420, 2971, 2934, 1653, 1378, 1031, 959, 901, 876 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$): δ 0.91 (s, 3H, 18-Me), 1.13 (s, 3H, 19-Me),

2.1.1(14)

1.24 (s, 3H, 21-Me), 1.27 (s, 3H, 26-Me), 1.28 (s, 3H, 27-Me), 2.37 (t, $J=8$ Hz, 1H, H-17), 2.45 (dd, $J=13.1, 2.9$ Hz, 1H, H-5), 2.91 (m, 1H, H-9), 3.45 (obscured by solvent signal, 1H, H-22), 4.25 (m, 1H, H-3), 5.84 (dd, $J=9.9, 3.9$ Hz, 1H, H-2), 5.89 (d, $J=9.9$ Hz, 1H, H-1), 5.93 (d, $J=2.3$ Hz, 1H, H-7); HRFABMS (negative ion mode): m/z 461.2904 $[M-H]^-$ (calcd for $C_{27}H_{42}O_6-H$, 461.2903).

Dihydroxylation ของ olefin 2.1.1(7)

เตรียมสารละลายผสมของ OsO_4 (1 g) ในพิริดีน (5 ml) เติมสารละลายนี้ส่วนหนึ่ง (50 μ l, 2.31-equivalent) ลงในของผสมระหว่าง olefin 2.1.1(7) (8 mg, 0.017 mmol) ในพิริดีน (1 ml) ทำการกวนของผสมปฏิกิริยาเป็นเวลา 1 h หลังจากนั้นเติมสารละลาย OsO_4 อีกส่วนหนึ่ง (50 μ l, 2.31 equivalent) กวนของผสมต่ออีก 3 h แล้วจึงเติม 5% $NaHSO_3$ (1 ml) และกวนของผสมนี้ต่ออีก 20 min สกัดของผสมของปฏิกิริยาด้วย n -BuOH หลายๆ ครั้งจนกระทั่งไม่มีสารผลผลิตตรวจพบในชั้นน้ำ ระเหยชั้นสารละลายอินทรีย์ออกโดยการ co-distillation กับน้ำ เมื่อทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีของสาร crude ได้สาร 2.1.1(12) (ca 0.2 mg, 2%) และ 2.1.1(1) (6.5 mg, 76%) เมื่อทำปฏิกิริยา dihydroxylation แบบเดียวกับการใช้ chiral ligand และตรวจสอบสารผลิตภัณฑ์ด้วย HPLC ได้ผลตามตาราง 2.1.1(1)

Compound 2.1.1(1): IR: ν_{max} 3442, 2971, 2934, 1654, 1385 cm^{-1} ; 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 0.89 (s, 3H, 18-Me), 1.07 (s, 3H, 19-Me), 1.18 (s, $2 \times 3H$) and 1.19 (s, 3H) (21-Me, 26-Me and 27-Me), 2.39 (dd, $J=9, 8.5$ Hz, 1H, H-17), 2.61 (dd, $J=12.5, 4.3$ Hz, 1H, H-5), 3.08 (m, 1H, H-9), 3.32 (obscured by solvent signal, H-22), 3.83 (brs, $W_{1/2}=8$ Hz, 1H, H-1), 3.89 (brt, $W_{1/2}=8$ Hz, 1H, H-2), 4.04 (m, $W_{1/2}=11$ Hz, 1H, H-3), 5.83 (d, $J=2.3$ Hz, 1H, H-7); 1H -NMR (400 MHz, C_5D_5N) δ 1.20 (s, 3H, 18-Me), 1.36 (s, $2 \times 3H$, 26-Me and 27-Me), 1.41 (s, 3H, 19-Me), 1.55 (s, 3H, 21-Me), 2.96 (t, $J=9.1$ Hz, 1H, H-17), 3.27 (m, 1H, H-5), 3.54 (m, 1H, H-9), 3.86 (brd, $J=8.9$ Hz, H-22), 4.27 (brs, 1H, H-2), 4.31 (brs, 2H, H-1 and H-3), 6.25 (brs, 1H, H-7); HRFABMS (negative ion mode): m/z 495.2954 $[M-H]^-$ (calcd for $C_{27}H_{44}O_8-H$, 495.2957).

Asymmetric Dihydroxylation ของ olefin 2.1.1(7)

วิธีการทั่วไป: ละลาย chiral ligand ในตัวทำละลาย *tert*-BuOH-THF-H₂O (7:4:1) แล้วเติมสารละลาย OsO₄ ใน THF คนสารละลายผสม 20 min จากนั้นเติมสารละลาย olefin 2.1.1(7) ใน *tert*-BuOH-THF-H₂O (7:4:1) อัตราส่วน ligand:OsO₄:Olefin คือ 2.5:4:1 คนส่วนผสมของปฏิกิริยานาน 4 h เติม 5% NaHSO₃ (2 ml) คนต่อไปอีก 30 min เติมน้ำ 30 ml สกัดด้วย *n*-BuOH หลายๆ ครั้งจนตรวจสอบไม่พบสารผลิตภัณฑ์ในชั้นน้ำ ทำการแยก ligand ออกจากสารผลิตภัณฑ์ผสมโดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี นำส่วนผสมไปตรวจสอบด้วย NMR spectroscopy และหาอัตราส่วนของสารผลิตภัณฑ์ 2.1.1(1) และ 2.1.1(12) รวมทั้งสารผลิตภัณฑ์ข้างเคียงอื่นๆ ด้วย HPLC (column: Spherisorb ODS2, 5 μ m, 250 $\times$ 4.6 mm; mobile phase: MeOH:H₂O (40:60); flow rate: 0.50 ml min⁻¹; UV detector: 254 nm) (ดูตาราง 2.1.1(1))

สิ่งที่น่าสังเกตคือ เมื่อใช้ (DHQD)₂-PYR เป็น chiral ligand พบว่าเมื่อทำปฏิกิริยาผ่านไป 30 min TLC เกิดเป็นทาง จึงหยุดปฏิกิริยาเมื่อเวลาผ่านไป 2 h หลังการ work up พบว่ามีสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น และยังมีสารตั้งต้นอยู่มากพอควร เมื่อทำซ้ำก็ได้ผลเหมือนเดิม

Asymmetric Dihydroxylation ของ olefin 2.1.1(7) โดยใช้ DHQD-PE

นำ olefin 2.1.1(7) (20 mg, 0.04 mmol) มาทำปฏิกิริยา dihydroxylation ตามวิธีการข้างต้น โดยใช้ OsO₄ (176 μ l, จาก stock solution OsO₄ 500 mg ละลายใน THF 2 ml) ใช้ DHQD-PE (87 mg) เป็น chiral ligand อัตราส่วนโดยโมลของ olefin:OsO₄:chiral ligand 1:4:4 ในตัวทำละลาย *tert*-BuOH-THF-H₂O (7:4:1) หลังจากแยก chiral ligand ออกจากส่วนผสมของสารผลิตภัณฑ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีแล้ว แยกสารผลิตภัณฑ์ออกจากกันด้วย HPLC (column: Hypersil BDS C18; mobile phase: MeOH:H₂O (40:60); flow rate: 0.50 ml min⁻¹; UV detector: 254 nm) เช่นเดียวกัน ได้สารผลิตภัณฑ์ 2.1.1(13) (*T_R* = 13.338 min, 7.5 mg, 35%) และ 2.1.1(1) (*T_R* = 15.511 min, 3 mg, 14%).

Compound 2.1.1(13): ¹H-NMR (400 MHz, C₅D₅N): δ 1.02 (s, 3H, 19-Me), 1.23 (s, 3H, 18-Me), 1.38 (s, 2 $\times$ 3H, 26-Me, 27-Me), 1.56 (s, 3H, 21-Me), 3.01 (t, *J* = 9.3 Hz, 1H, H-17), 3.03 (dd, *J* = 12.2, 3.6 Hz, 1H, H-5), 3.89 (br d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-22), 4.09 (dd, *J* = 9.3, 2.2 Hz, 1H, H-2), 4.24 (br s, 1H, H-1), 4.30 (m,

2.1.1(16)

1H, H-9), 4.50 (m, 1H, H-3), 6.20 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-7); HRFABMS (negative ion mode): m/z 495.2958 $[M-H]^-$ (calcd for $C_{27}H_{44}O_8-H$, 495.2958).

Deacetylation ของสาร 2.1.1(9)

เติม 10% $KHCO_3$ (0.3 ml) ลงในสารละลายของ 2.1.1(9) (50 mg, 0.09 mmol) ใน MeOH (0.3 ml) ทำการกวนสารผสมนี้เป็นเวลา 6 h ทำการ work up ตามปกติแล้ว นำของผสมของปฏิกิริยามาทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมโครมาโตกราฟี ได้สาร 2.1.1(16) (44 mg, 95%); IR: ν_{max} 3419, 2971, 2927, 1674, 1667, 1371, 1252, 1215, 1172, 1111, 1093, 1056, 999, 872 cm^{-1} ; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0.80 (s, 3H, 18-Me), 0.91 (s, 3H, 19-Me), 1.14 (s, 3H, 21-Me), 1.21 (s, 3H, 26-Me), 1.22 (s, 3H, 27-Me), 1.31 and 1.39 (each s, 2x3H, acetonide Me), 2.22 (m, 1H, H-17), 2.44 (br dd, $J = 13.2, 6.4$ Hz, 1H, H-4eq), 2.51 (dd, $J = 12.6, 1.9$ Hz, 1H, H-5), 2.80 (m, 1H, H-9), 3.64 (br d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H-22), 4.30 (m, 1H, H-3), 5.62 (br d, $J = 10.1$ Hz, 1H, H-2), 5.79 (dd, $J = 10.1, 1.6$ Hz, 1H, H-1), 5.93 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H, H-7); HRFABMS (negative ion mode): m/z 501.3218 $[M-H]^-$ (calcd for $C_{30}H_{46}O_6-H$, 501.3216).

การขจัดหมู่ป้องกัน Acetonide ของสาร 2.1.1(16)

ทำการกวนของผสมระหว่าง 2.1.1(16) (44 mg, 0.08 mmol) และ $PhCH_2N^+Me_3Cl^-$ (3 mg) ใน MeOH (0.2 ml) และ 70% AcOH (0.5 ml) ที่อุณหภูมิปกติ นาน 4 days หลังจาก work up ตามปกติและทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมโครมาโตกราฟี ได้สาร 2.1.1(14) (30 mg, 83%); colorless needles (from CH_2Cl_2 :hexane) mp. 224-226 $^{\circ}C$; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3 + CD_3OD$): δ 0.91 (s, 3H, 18-Me), 0.97 (s, 3H, 19-Me), 1.25 (s, 3H, 21-Me), 1.28 (s, 2x3H, 26-Me, 27-Me), 2.37 (m, 1H, H-17), 2.47 (m, 1H, H-4eq), 2.57 (br d, $J = 12.4$ Hz, 1H, H-5), 2.87 (m, 1H, H-9), 3.77 (obscured signal, 1H, H-22), 4.34 (m, 1H, H-3), 5.67 (br d, $J = 10.1$ Hz, 1H, H-2), 5.81 (br dd, $J = 10.6, 1.7$ Hz, 1H, H-1), 5.98 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-7); HRFABMS (negative ion mode): m/z 461.2906 $[M-H]^-$ (calcd for $C_{27}H_{42}O_6-H$, 461.2903).

ตารางที่ 2.1.1(1) การทำปฏิกิริยา Dihydroxylation ของ Olefin 2.1.1(7)

Entry	Ligand	Ratio of products 2.1.1(1):2.1.1(13) ^a
1	DHQ-MQE	93:7
2	DHQ-PE	97:3
3	(DHQ) ₂ -PHAL	94:6
4	(DHQ) ₂ -PYR	89:11
5	DHQD-MQE	18:51 ^b
6	DHQD-PE	15:46 ^b
7	(DHQD) ₂ -PHAL	50:30 ^b
8	(DHQD) ₂ -PYR	48:30 ^{b,c}
9	Pyridine	63:8 ^b

DHQ-MQE, dihydroquinine 4-methyl-2-quinolyl ether; DHQ-PE, dihydroquinine 9-phenanthryl ether; (DHQD)₂-PHAL, dihydroquinine 1,4-phthalazinediyl diether; (DHQD)₂-PYR, dihydroquinine 2,5-diphenyl-4,6-pyrimidinediyl diether; DHQD, dihydroquinidine.

^aหาโดยใช้ HPLC

^bมีสารผลิตภัณฑ์ข้างเคียงชนิดอื่นเกิดขึ้นด้วย

^cหยุดปฏิกิริยาก่อนสารตั้งต้นหมด

Dihydroxylation ของ olefin 2.1.1(14)

เติมสารละลาย OsO_4 ใน THF (105 μl , 2 equivalent) ลงในของผสมระหว่าง olefin 2.1.1(14) (16 mg, 0.05 mmol) ในพิริดีน (1 ml) ทำการกวนสารผสมปฏิกิริยานาน 1 h แล้วเติม 5% NaHSO_3 (1 ml) และกวนของผสมนี้ต่ออีก 10 min สกัดของผสมปฏิกิริยาด้วย *n*-BuOH หลายๆ ครั้งจนกระทั่งไม่มีสารผลผลิตตรวจพบในชั้นน้ำ ระเหยชั้นสารละลายอินทรีย์ออก โดยการ co-distillation กับน้ำ เมื่อทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีของสาร crude ได้สาร 2.1.1(13) (13 mg, 81%) ซึ่งมี TLC ตรงกับสารเดียวกันที่สังเคราะห์จาก asymmetric dihydroxylation ของสาร 2.1.1(7) โดยใช้ DHQD-PE เป็น chiral ligand ดังกล่าวมาแล้วข้างต้น

เอกสารอ้างอิง

- 2.1.1[1] Dinan, L. *Phytochemistry* 2001, **57**, 325.
- 2.1.1[2] Baltaev, U.; Gorovitz, M. B.; Rashkes, Y. V.; Abubakirov, N. K. *Khim. Prir. Soedin.* 1977, 813.
- 2.1.1[3] Kholodova, Y. D.; Baltaev, U.; Volovenko, V. D.; Gorovitz, M. B.; Abubakirov, N. K. *Khim. Prir. Soedin.* 1979, 171.
- 2.1.1[4] Saatov, Z.; Gorovitz, M. B.; Abdullaev, N. D.; Usmanov, B. Z.; Abubakirov, N. K. *Khim. Prir. Soedin.* 1981, 738.
- 2.1.1[5] Girault, J.-P.; Bathori, M.; Varga, E.; Szendrei, K.; Lafont, R. *J. Nat. Prod.* 1990, **53**, 279.
- 2.1.1[6] Werawattanametin, K.; Podimuang, V.; Suksamram, A. *J. Nat. Prod.* 1986, **49**, 365.
- 2.1.1[7] Paquette, L. A., Ed. *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*. Wiley: Chichester, 1995; Vol. 2, pp. 497–503.
- 2.1.1[8] Kovganko, N. V.; Sokolov, S. N. *Chem. Nat Comp.* 2000, **36**, 590.
- 2.1.1[9] Kolb, H. C.; VanNieuwenhze, M. S.; Sharpless, K. B. *Chem. Rev.* 1994, **94**, 2483.
- 2.1.1[10] Homvisasevongsa, S.; Chuaynugul, A.; Chimnoi, N.; Suksamram, A. *Tetrahedron* 2004, **60**, 3433.

โครงการย่อยกลุ่มที่ 2: เคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของเอคไดสเตียรอยด์และสารอื่นที่เกี่ยวข้อง

โครงการวิจัยหน่วยที่ 2.1.2 การสังเคราะห์อย่างเฉพาะเจาะจงทางสเตอริโอเคมีของสาร 2,3-*diepi*-20-Hydroxyecdysone และ 2,3-*diepi*-5 α -20-Hydroxyecdysone

บทนำ

1. คำนำ

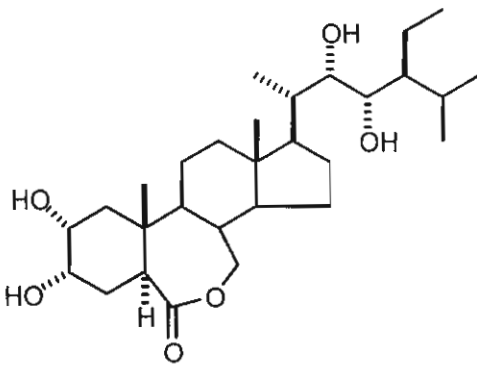
แมลงต้องใช้เอคไดสเตียรอยด์ในการลอกคราบและการเจริญเติบโต หากเราสามารถทำให้แมลงไม่สามารถใช้เอคไดสเตียรอยด์ได้ก็อาจเป็นวิธีหนึ่งในการควบคุมแมลง แนวทางหนึ่งที่น่าสนใจคือ หาสารที่มีโครงสร้างที่เหมาะสมในการ แข่งกับเอคไดสเตียรอยด์ในการ bind กับ receptor ของเอคไดสเตียรอยด์ในแมลง เพื่อให้แมลงไม่สามารถใช้เอคไดสเตียรอยด์ได้ หรือใช้ได้อย่างไม่มีประสิทธิภาพ อาจเป็นแนวทางหนึ่งในการควบคุมแมลง

2. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ท้าววิจัย

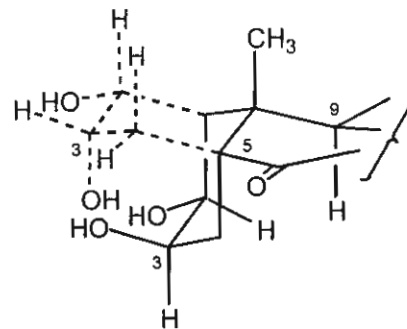
ได้มีผู้ค้นพบว่า บราสสิโนสเตียรอยด์ (brassinosteroid) 2.1.2(1) สามารถทำให้การเข้าดักแด้ของแมลงสาบ *Periplaneta americana* เกิดได้ช้าลง^{2.1.2(1)} ต่อมาได้มีการพบเพิ่มเติมว่า บราสสิโนสเตียรอยด์ สามารถแข่งกับเอคไดสเตียรอยด์ในการ bind กับ receptor ของเอคไดสเตียรอยด์^{2.1.2(2), 2.1.2(3)} เข้าใจว่า เมื่อ บราสสิโนสเตียรอยด์ bind กับ receptor ของเอคไดสเตียรอยด์ หมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่งที่ 3 (ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการ bind กับ receptor) จะอยู่ตรงกับหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่งที่ 3 ของเอคไดสเตียรอยด์ (ดูโครงสร้าง 2.1.2(2)) ฉะนั้น เราจึงสนใจที่จะศึกษาการสังเคราะห์สารที่สามารถ bind กับ receptor ของเอคไดสเตียรอยด์ เพื่อที่จะได้แนวทาง

2.1.2(2)

ในการหาสารที่สามารถนำมาใช้แข่งกับเอคไดสเตียรอยด์ ซึ่งอาจทำให้สามารถใช้เป็นสารควบคุมแมลงได้ แนวทางแรกที่เราต้องการทำคือ ปรับเปลี่ยนโครงสร้างของเอคไดสเตียรอยด์ให้บางส่วน ของโครงสร้างคล้ายคลึงกับบราสสิโนสเตียรอยด์ เพื่อให้มีโอกาส bind กับ receptor ของเอคไดสเตียรอยด์ได้ สารที่เราต้องการสังเคราะห์โดยการปรับเปลี่ยนโครงสร้างจาก 20-hydroxyecdysone [2(1)] คือ 2,3-*diepi*-20-hydroxyecdysone [2.1.2(3)] และ 2,3-*diepi*-5 α -20-hydroxyecdysone [2.1.2(4)] ซึ่งสารชนิดหลังนี้มีการจัดวางตัวของ วง A และ หมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งที่ 2 และ 3 เหมือนหรือคล้ายคลึงกับบราสสิโนสเตียรอยด์



2.1.2(1)



2.1.2(2)

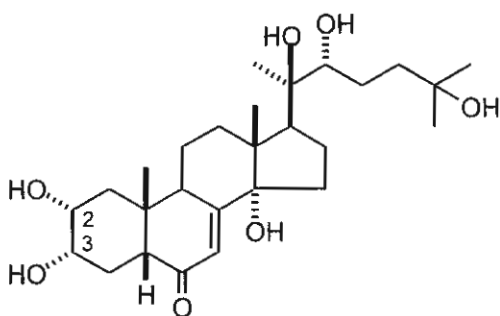
The A-ring geometry of ecdysteroid (solid line) and brassinosteroid (broken line)

3. วัตถุประสงค์ของโครงการ

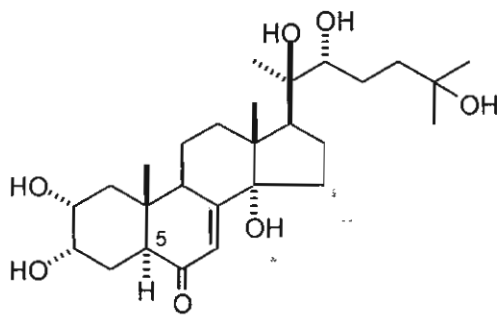
- 1) เพื่อสังเคราะห์ 2,3-*diepi*-20-hydroxyecdysone [2.1.2(3)] และ 2,3-*diepi*-5 α -20-hydroxyecdysone [2.1.2(4)] อย่างเฉพาะเจาะจงทางสเตอริโอเคมี (stereoselective)
- 2) เพื่อทดสอบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบของ 2,3-*diepi*-20-hydroxyecdysone [2.1.2(3)] และ 2,3-*diepi*-5 α -20-hydroxyecdysone [2.1.2(4)]

4. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2,3-*diepi*-20-hydroxyecdysone [2.1.2(3)] และ 2,3-*diepi*-5 α -20-hydroxyecdysone [2.1.2(4)] ยังไม่มีผู้ใดตีพิมพ์ผลงานการสังเคราะห์ แต่จากการวิจัยในช่วงท้ายของการวิจัย โครงการวิจัยเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ช่วงที่หนึ่งที่ผ่านมา กลุ่มของเราได้ทำการสังเคราะห์ 2,3-*diepi*-20-hydroxyecdysone [2.1.2(3)] และ 2,3-*diepi*-5 α -20-hydroxyecdysone [2.1.2(4)] ได้ ดังแสดงใน Scheme 2.1.2(1) แต่ยังไม่แน่ใจในการพิสูจน์ขั้นตอนสุดท้ายว่า สารที่สังเคราะห์ได้มีโครงสร้างดังแสดงหรือไม่ โดยเฉพาะ stereochemistry ที่ตำแหน่งที่ 5 และยังไม่ได้ทำการปรับเปลี่ยนวิธีการสังเคราะห์เพื่อให้ได้ปริมาณของผลผลิตสูงสุด รวมทั้งยังไม่ได้ลองทำ asymmetric dihydroxylation^{2.1.2[4]} ของโอเลฟิน 2.1.2(8) เพื่อให้ได้ปริมาณของผลผลิตของสาร 2.1.2(9) มากขึ้น จึงได้นำงานนี้มาทำซ้ำใหม่ ทำการปรับปรุงวิธีการสังเคราะห์บางขั้นตอนเพื่อให้ได้ปริมาณผลผลิตเพิ่มขึ้น ทำ asymmetric dihydroxylation ของโอเลฟิน และทำการทดสอบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบโดยใช้ *Musca bioassay*



2.1.2(3)



2.1.2(4)

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

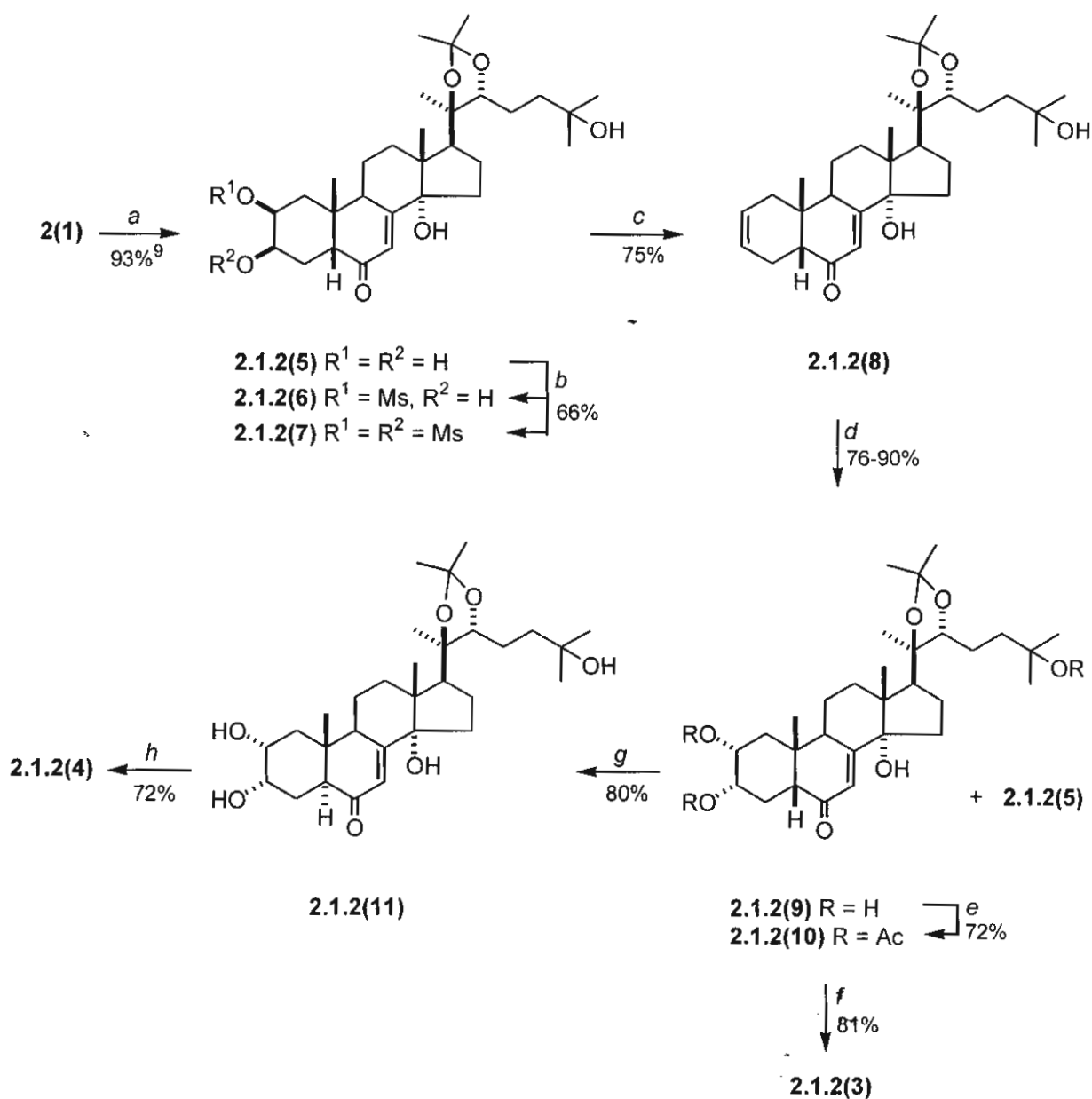
การสังเคราะห์และ Asymmetric Dihydroxylation

การสังเคราะห์ 2,3-*diepi*-20-hydroxyecdysone [2.1.2(3)] และ 2,3-*diepi*-5 α -20-hydroxyecdysone [2.1.2(4)] ที่ได้รับการปรับปรุงแล้ว ได้แสดงใน Scheme 2.1.2(1) โดยได้แสดงปริมาณของผลผลิตไว้ด้วย จากข้อมูลทาง 2D NMR ทำให้สามารถยืนยันโครงสร้าง โดยเฉพาะ stereochemistry ที่ตำแหน่ง 5 ของสาร 2.1.2(3) และ 2.1.2(4) ได้ดังแสดง ในขั้นตอน dihydroxylation ด้วย OsO₄ ในพริตติน อัตราส่วนของ 2.1.2(5) และ 2.1.2(9) เป็น 2:1 ซึ่งสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการเป็น minor product จึงได้ทดลองใช้ chiral ligands เพื่อทำ asymmetric dihydroxylation (ดูตารางที่ 2.1.2(1)) ปรากฏว่า dihydroquinidine 1,4-phthalazinediyl diether ((DHQD)₂-PHAL) ให้ผลดีที่สุด โดยได้อัตราส่วนของสารผลิตภัณฑ์ 2.1.2(5) ต่อ 2.1.2(9) เป็น 1:4 สำหรับรายละเอียดอื่นๆจะปรากฏอยู่ในผลงานที่ได้รับการตอบรับการตีพิมพ์จากวารสาร Tetrahedron แล้ว

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

การทดสอบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบได้ใช้ *Musca* bioassay โดยใช้หนอนแมลงวันบ้าน (*Musca domestica* L.) ผลการทดสอบพบว่า สาร 2.1.2(3) มีฤทธิ์ต่ำกว่า 2(1) ซึ่งเป็น parent ecdysteroid ถึง 30 เท่า การที่สาร 2.1.2(3) แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต่ำเช่นนี้ เป็นไปตามที่คาดไว้ คือ เอคโดสเตียรอยด์ที่มี 3 α -hydroxyl group จะแสดงฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบต่ำ^{2.1.2[5]} แต่สิ่งที่ทำให้ประหลาดใจมากคือ สาร 2.1.2(4) ซึ่งเป็น 5 α -ecdysteroid และควรไม่มีฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบเลย^{2.1.2[5]} กลับแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยมีฤทธิ์น้อยกว่าสาร 42 เท่า หรือมีฤทธิ์น้อยกว่าสาร 2(1) 1.5 เท่า การที่สาร 2.1.2(4) แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้ และไม่ต่างไปจากสาร 2.1.2(3) มากนักเช่นนี้ แสดงว่าสารนี้ bind กับ receptor ของเอคโดสเตียรอยด์ ของแมลงได้ในทำนองเดียวกับสารบราสสิโนสเตียรอยด์ 2.1.2(1) แต่สาร 2.1.2(4) ต่างจากบราสสิโนสเตียรอยด์ ตรงที่ยังมี 7-en-6-one system ซึ่งเป็น structural requirement ที่สำคัญของเอคโดสเตียรอยด์อยู่ จึงแสดงฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบได้^{2.1.2[5]} จากการค้นพบนี้ ทำให้ได้ข้อมูลว่า หากมีโครงสร้างใดที่สามารถ bind กับ receptor และไม่มี essential structural features ของเอคโดสเตียรอยด์อยู่ ก็อาจทำหน้าที่แย่งเอคโดสเตียรอยด์ bind กับ receptor ของเอคโดสเตียรอยด์ได้

2.1.2(5)



Scheme 2.1.2(1). Synthesis of ecdysteroids 2.1.2(3) and 2.1.2(4).

Reagents and conditions: a, CH_3COCH_3 , p -TsOH; b, $MsCl$, pyridine; c, NaI , Zn , DMF , $80^\circ C$; d, OsO_4 , ligand, solvent (see text); e, Ac_2O , pyridine; f, 70% $AcOH$, $PhCH_2NMe_3^+Cl^-$; g, 2% Na_2CO_3 , $MeOH$; h, 70% $AcOH$, $PhCH_2NMe_3^+Cl^-$.

วัสดุและวิธีการ

วัสดุและวิธีการสำหรับการสังเคราะห์สาร 2.1.2(3) และ 2.1.2(4) ได้เคยแสดงไว้ในรายงานที่อ้างไว้แล้วในผลการวิจัยและอภิปรายผล สำหรับการปรับปรุงวิธีการสังเคราะห์บางขั้นตอนให้ได้ผลดีขึ้น จะปรากฏในผลงานตีพิมพ์ในวารสาร *Tetrahedron* ที่ได้กล่าวไว้แล้วในผลการวิจัยและอภิปรายผลแล้ว

Asymmetric Dihydroxylation

สำหรับ chiral ligands ที่ใช้ทำ asymmetric dihydroxylation ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.1.2(1) แล้ว ส่วนวิธีการนั้น ใช้วิธีการที่กลุ่มของเราได้เคยทำมาแล้ว^{2.1.2[6]}

ตารางที่ 2.1.2(1) Asymmetric dihydroxylation ของสาร 2.1.2(8)

Entry	Ligand	Ratio of Products 2.1.2(5):2.1.2(9)	Yield (%)
1	DHQP-MQE	5:6	77
2	DHQP-PE	7:3	83
3	(DHQP) ₂ -PHAL	1:4	85
4	DHQ-MQE	7:3	76
5	DHQ-PE	3:1	80
6	(DHQ) ₂ -PHAL	5:4	84

The ratio of the ligand:OsO₄:compound 2.1.2(8) was 3:3:1.

tert-BuOH-THF-H₂O (7:4:1) was used as a solvent.

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

การทดสอบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบได้ใช้ *Musca* bioassay โดยใช้หนอนแมลงวันบ้าน (*Musca domestica* L.) ตามวิธีการที่เราเคยใช้มาแล้ว^{2.1.2[7]} ผลการทดสอบพบว่า สาร

2.1.2(7)

2.1.2(3) และ 2.1.2(4) มีค่า EC_{50} 5.0×10^{-4} และ 7.0×10^{-4} โมลาร์ ตามลำดับ ส่วนสาร 2(1) มีค่า EC_{50} เป็น 1.65×10^{-5} โมลาร์

เอกสารอ้างอิง

- 2.1.2[1] Richter, K.; Adam, G.; Vorbrodt, H. M. *J. Appl. Entomol.* 1987, **103**, 532.
- 2.1.2[2] Lehmann, M.; Vorbrodt, H. M.; Adam, G.; Koolman, J. *Experientia* 1988, **44**, 355.
- 2.1.2[3] Luu, B.; Verner, F. *Pestic. Sci.* 1996, **46**, 49.
- 2.1.2[4] Kolb, H. C.; VanNieuwenhze, M. S.; Sharpless, K. B. *Chem. Rev.* 1994, **94**, 2483.
- 2.1.2[5] 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.
- 2.1.2[6] Suksamrarn, A.; Yingyongnarongkul, B.; Promrangsang, N. *Tetrahedron* 1998, **54**, 14565.
- 2.1.2[7] Suksamrarn, A.; Pattanaprateep, P.; Tanachatchairatana, T.; Haritakun, W.; Yingyongnarongkul, B.; Chimnoi, N. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2002, **32**, 193.

โครงการย่อยกลุ่มที่ 2: เคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของเอคไดสเตียรอยด์และสารอื่นที่เกี่ยวข้อง

โครงการวิจัยหน่วยที่ 2.1.3 การสังเคราะห์ การพิสูจน์ Absolute configuration และการทดสอบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบของ 26-Haloponasterone A

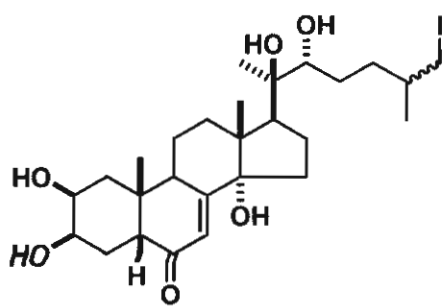
บทนำ

1. คำนำ

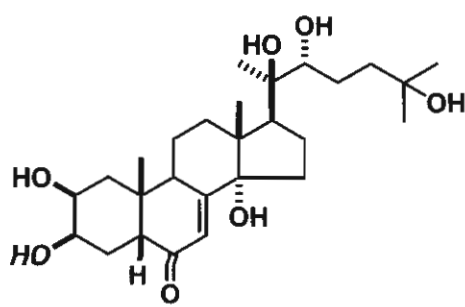
เอคไดสเตียรอยด์เป็นสารที่มีฤทธิ์เป็นฮอร์โมนลอกคราบที่พบได้ทั้งในกระดุกไม่มีสันหลังและในพืช^{2(7),2(42)} แผลงต้องใช้เอคไดสเตียรอยด์ในการลอกคราบและการเจริญเติบโต หากเราสามารถปรับเปลี่ยนโครงสร้างของเอคไดสเตียรอยด์ให้มีฤทธิ์สูงมากๆ อาจเป็นแนวทางหนึ่งในการควบคุมแผลง

2. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำวิจัย

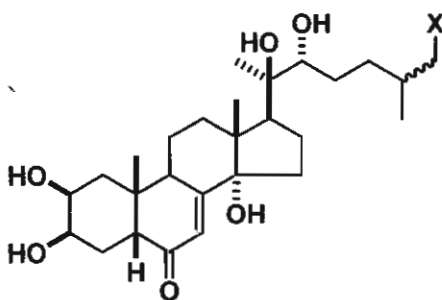
ได้มีการสังเคราะห์ 26-Iodoponasterone A [2(15)] และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยใช้วิธี *in vitro* Kc cell bioassay พบว่าสารดังกล่าวมีฤทธิ์สูงกว่า 20-hydroxyecdysone [2(1)] ถึง 160 เท่า²⁽²⁹⁾ เราจึงมีความสนใจที่จะทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ 26-haloponasterone A [2.1.3(1)] เนื่องจากสารตั้งต้นที่นำมาสังเคราะห์ คือ inokosterone (26-hydroxyponasterone A) [2(16)] นั้นมี 2 epimers คือ (25S)-inokosterone [2.1.3(2)] และ (25R)-inokosterone [2.1.3(3)] และ 2 epimers นี้แสดงฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบที่ต่างกัน^{2.1.3(1)} ซึ่งแสดงให้เห็นว่า stereochemistry ที่ปลายโซ่ด้านข้างของเอคไดสเตียรอยด์ มีผลต่อการ bind กับ receptor ดังนั้น จึงมีความจำเป็นที่จะต้องพิสูจน์ stereochemistry ของสารตั้งต้นก่อน



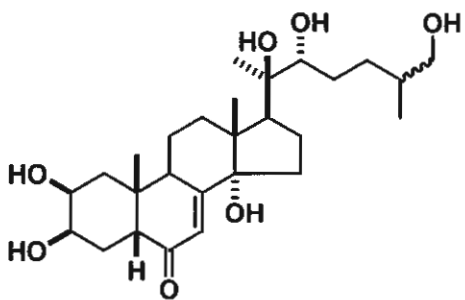
2(15)



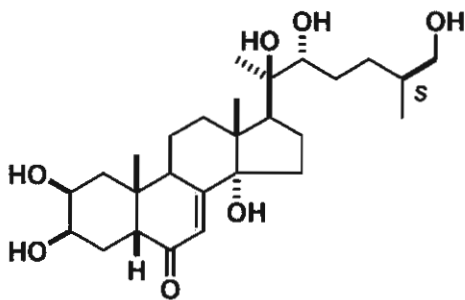
2(1)



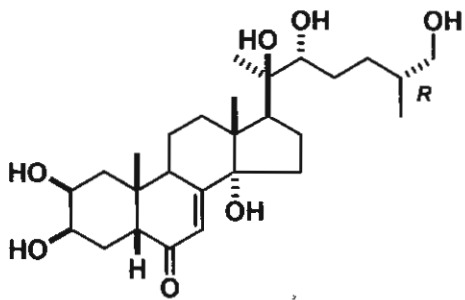
2.1.3(1)



2(16)



2.1.3(2)



2.1.3(3)

3. วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 1) เพื่อพิสูจน์ Absolute configuration ของ Inokosterone (26-Hydroxyponasterone A)
- 2) เพื่อสังเคราะห์ 26-Haloponasterone A
- 3) เพื่อทดสอบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบของ 26-Haloponasterone A

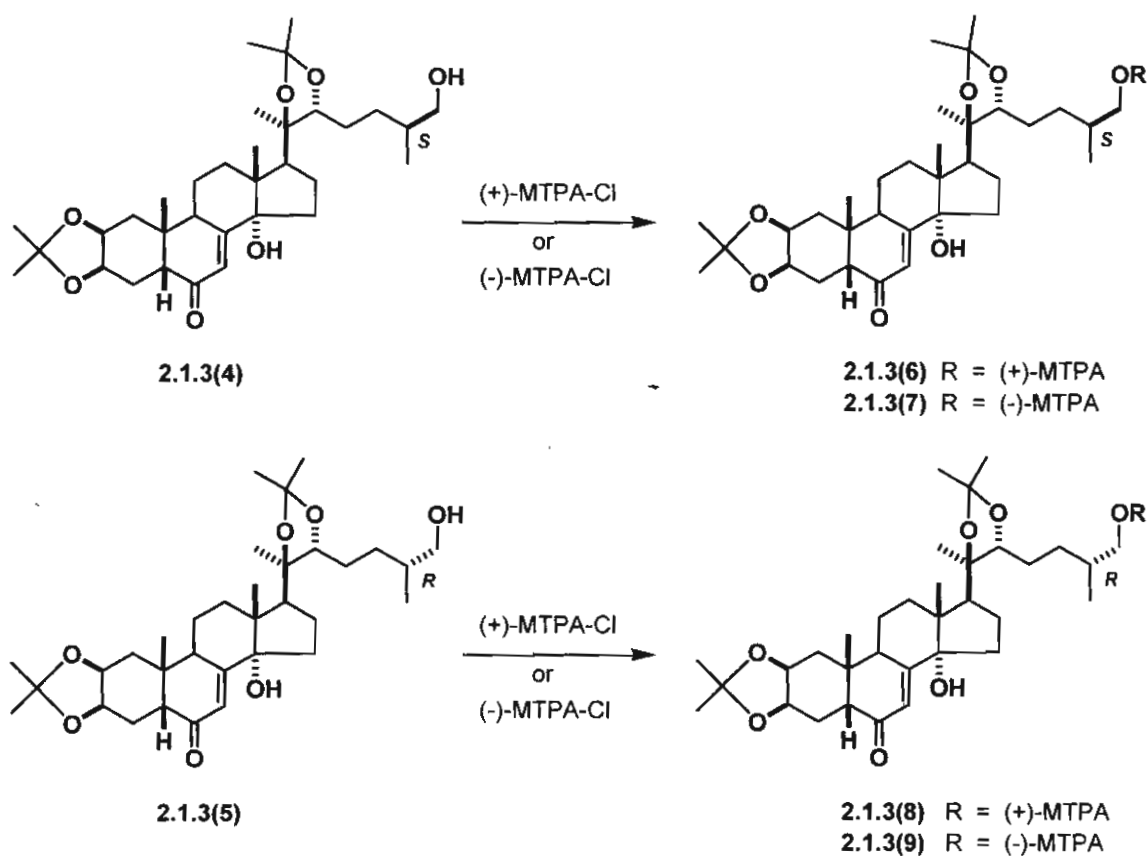
4. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Inokosterone (26-hydroxyponasterone A) [2(16)] พบครั้งแรก ในปี 1968 จากพืช *Achyranthes fauriei*^{2.1.3[2]} ซึ่งสารที่แยกมาได้นี้ เป็นสารผสมของ C-25 epimers ในอัตราส่วน 2:1 เมื่อทำการสังเคราะห์และแยกสารทั้งสองออกจากกันได้ และทำการทดสอบ พบว่าสารทั้งสองให้ฤทธิ์ต่างกัน เมื่อนำสารผสมนี้มาทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างเป็น 26-Iodoponasterone A [2(15)] พบว่าสารชนิดนี้แสดงฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบที่สูงมาก

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

การพิสูจน์ C-25 configuration ของ inokosterone

ในการพิสูจน์ C-25 configuration ของสารโสด้านข้างของสเตียรอยด์ สามารถทำได้โดยการเปรียบเทียบ ¹H NMR spectra ของอนุพันธ์ (-)-MTPA และ (+)-MTPA esters^{2.1.3[3]} กล่าวคือ ¹H NMR spectra ของอนุพันธ์ (+)-MTPA esters สัญญาณของ 26-methylene proton ของ 25S isomer จะปรากฏสัญญาณที่ใกล้กัน เมื่อเทียบกับสัญญาณเดียวกันนี้ในอนุพันธ์ของ 25R isomer ผลการทดลองจะให้ผลตรงกันข้ามเมื่อเตรียมเป็นอนุพันธ์ของ (-)-MTPA ดังนั้น เราจึงนำ inokosterone 2,3;20,22-acetonide (epimer 1) [2.1.3(4)] และ epimer 2 [2.1.3(5)] มาทำปฏิกิริยากับ (+)-MTPA-Cl และ (-)-MTPA-Cl ในตัวทำละลายฟิรีดิน ได้ผลิตภัณฑ์ 4 ชนิดคือ 2.1.3(6) 2.1.3(7) 2.1.3(8) และ 2.1.3(9) ดังแสดงใน Scheme 2.1.3(1) ค่าผลต่างของสัญญาณทาง ¹H NMR ของ 26-methylene proton แสดงในตารางที่ 2.1.3(1) จากการเปรียบเทียบข้อมูลจากตารางที่ 2.1.3(1) แล้วพบว่า inokosterone epimer 1 มี stereochemistry ที่ตำแหน่ง C-25 เป็น แบบ S และ inokosterone epimer 2 มี stereochemistry ที่ตำแหน่ง C-25 เป็น แบบ R และในการสังเคราะห์ 26-haloponasterone A จาก inokosterone นั้น จะไม่มีการเปลี่ยนแปลง stereochemistry ที่ C-25



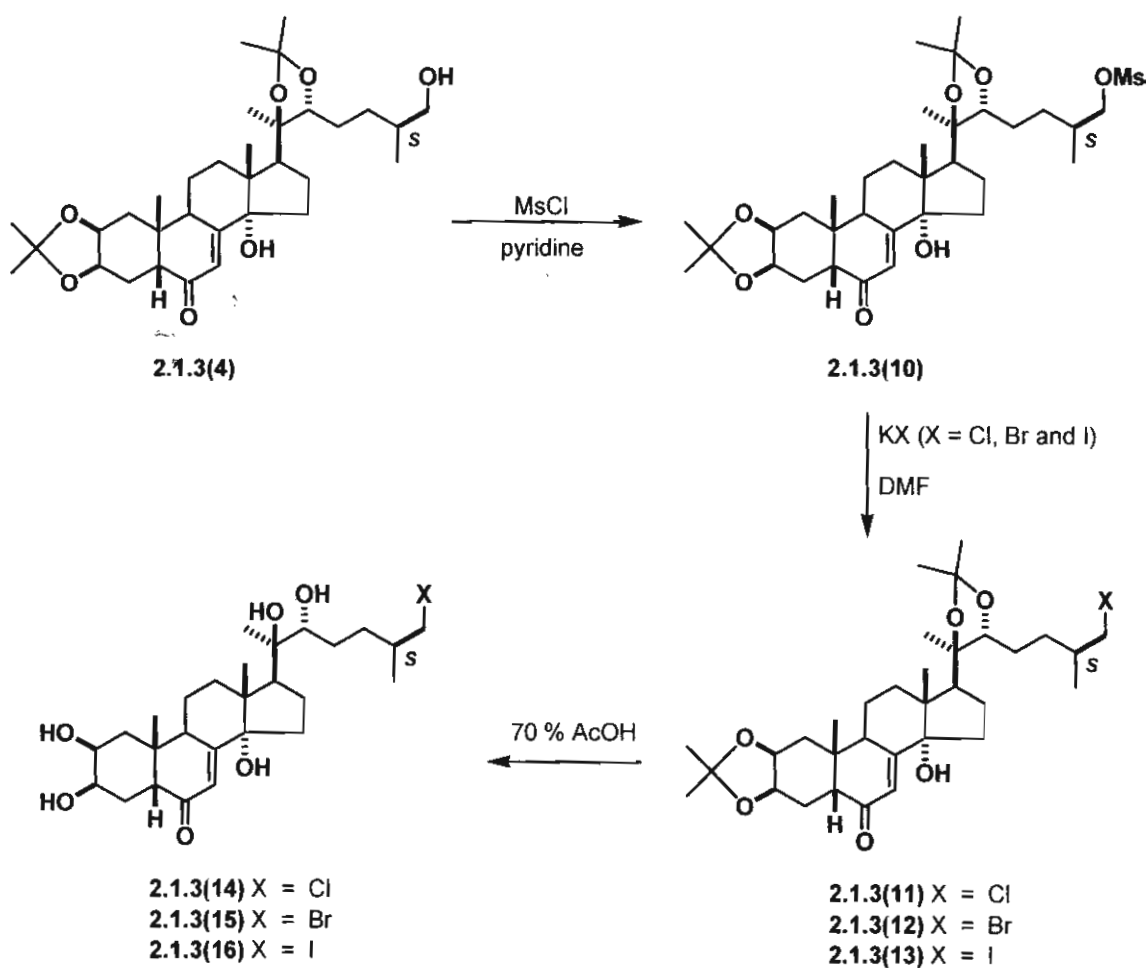
Scheme 2.1.3(1) การสังเคราะห์เพื่อพิสูจน์ C-25 stereochemistry ของ inokosterone

การสังเคราะห์ 26-Haloponasterone A

ในการสังเคราะห์อนุพันธ์ (25S)-26-chloroponasterone A [2.1.3(14)] (25S)-26-bromoponasterone A [2.1.3(15)] และ (25S)-26-iodoponasterone A [2.1.3(16)] ของ inokosterone (Scheme 2.1.3(2)) เตรียมได้ดังนี้ นำ (25S)-inokosterone 2,3;20,22-diacetonide [2.1.3(4)] ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่เคยสังเคราะห์มาแล้ว มาทำปฏิกิริยา mesylation ในพริตตินด้วย MsCl จากนั้นทำการแทนที่หมู่ OMs ด้วย halide ที่เหมาะสม ในตัวทำละลาย DMF หลังจากนั้นตามด้วย acetone deprotection โดยใช้ 70% aqueous AcOH ได้สาร (25S)-26-chloro 2.1.3(14) (25S)-26-bromo 2.1.3(15) และ (25S)-26-iodoinokosterone 2.1.3(16) ตามต้องการ สำหรับการสังเคราะห์ (25R)-26-chloroponasterone A [2.1.3(17)] (25R)-26-bromoponasterone A [2.1.3(18)] และ (25R)-26-

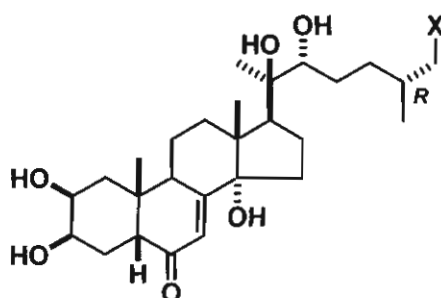
2.1.3(5)

iodoponasterone A [2.1.3(19)] ทำได้เช่นเดียวกันกับสารอนุพันธ์ในกลุ่ม 25S ข้อมูลทางด้าน ^1H NMR ของสารอนุพันธ์เหล่านี้แสดงดังตารางที่ 2.1.3(2)



Scheme 2.1.3(2) การสังเคราะห์ (25S)-haloponasterone A

2.1.3(6)



2.1.3(17) X = Cl

2.1.3(18) X = Br

2.1.3(19) X = I

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

การทดสอบการเป็นฮอร์โมนลอกคราบได้ใช้ *Musca* bioassay โดยใช้หนอนแมลงวันบ้าน (*Musca domestica* L.) จากรายงานพบว่า (25S)-inokosterone มีฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบสูงกว่า (25R)-inokosterone^{2.1.3(1)} ผลการตรวจสอบพบว่าอนุพันธ์ของ (25S)-26-halo มีฤทธิ์ที่สูงกว่าอนุพันธ์ของ (25R)-26-halo (ดูตารางที่ 2.1.3(3)) เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบระหว่างเฮไลด์ชนิดเดียวกัน พบว่า 25S-isomers มีฤทธิ์ที่สูงกว่า 25R-isomers เป็นที่น่าสังเกตว่าสารในกลุ่มอนุพันธ์ของ (25S)-isomers เมื่อขนาดของอะตอมของฮาโลเจนใหญ่ขึ้นยิ่งทำให้มีฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบที่สูงขึ้น แสดงให้เห็นว่า ผลของความเกะกะของสารอนุพันธ์กลุ่มนี้มีความสำคัญต่อการ bind กับ receptor มากกว่าผลของทาง electronic ในขณะที่สารในกลุ่มอนุพันธ์ของ (25R)-isomers มีฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบที่ต่ำลงเมื่อขนาดอะตอมของฮาโลเจนใหญ่ขึ้น แสดงให้เห็นว่า ผลของความเกะกะของสารอนุพันธ์กลุ่มนี้มีความสำคัญต่อการ bind กับ receptor น้อยกว่าผลของทาง electronic จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า configuration ที่ C-25 และ หมู่แทนที่ที่ C-26 นั้นมีผลต่อการ bind ของเอคโตสเตียรอยด์กับ receptor

วัสดุและวิธีการ

วัสดุและวิธีการสำหรับการสังเคราะห์ inokosterone epimer 1 [2.1.3(4)] และ epimer 2 [2.1.3(5)] ได้ทำตามวิธีการที่เราเคยใช้มาแล้ว^{2.1.3(1)}

การพิสูจน์ C-25 Absolute configuration of inokosterone

ละลาย (2S)-inokosterone 2,3;20,22-diacetonide [2.1.3(4)] (2 mg) ซึ่งเตรียมได้จาก 2(1) ตามวิธีที่รายงานไว้แล้ว^{2.1.3(1)} ในพริตตินที่ปราศจากน้ำ (200 μ l) กวนสารละลายนี้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม (+)- α -methoxy- α -(trifluoromethyl)-phenylacetyl chloride ((+)-MTPA-Cl) (10 μ l) กวนสารละลายผสมนี้เป็นเวลา 10 นาที เติม 1 M HCl (20 ml) สกัดด้วย CH_2Cl_2 (3 x 10 ml) ล้างส่วนผสมด้วย 10% NaHCO_3 ทำให้ปราศจากน้ำด้วย anhydrous Na_2SO_4 ระเหยตัวทำละลายให้แห้งภายใต้สภาวะสุญญากาศ โดยควบคุมอุณหภูมิของอ่างน้ำร้อนที่ 35-40 °C นำผลิตภัณฑ์ 2.1.3(6) ที่ได้มาบันทึกข้อมูลทาง ^1H NMR สำหรับการสังเคราะห์สาร 2.1.3(7) 2.1.3(8) และ 2.1.3(9) ทำได้เช่นเดียวกับการสังเคราะห์ 2.1.3(6) ผลต่างของสัญญาณของ 26-methylene proton แสดงในตารางที่ 2.1.3(1)

ตารางที่ 2.1.3(1) Chemical shifts of C-26 methylene protons of Mosher's ester

Compound	MTPA	$\delta\text{H}_{26(a)}$ (ppm)	$\delta\text{H}_{26(b)}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
2.1.3(6)	(+)-(S)	4.10	4.23	0.13
2.1.3(7)	(-)-(R)	4.03	4.29	0.26
2.1.3(8)	(+)-(S)	4.08	4.25	0.17
2.1.3(9)	(-)-(R)	4.17	4.22	0.05

การสังเคราะห์ 26-Haloponasterone A

กวนสารละลายผสมของ (2S)-inokosterone 2,3;20,22-diacetonide [2.1.3(4)] (60 mg) ในพริตติน (2 ml) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงเติม mesyl chloride (0.1 ml) กวนต่ออนาน 10 นาที เติมน้ำ (100 ml) แล้วสกัดส่วนผสมด้วย CHCl_3 (3x30 ml) ล้างส่วนผสมด้วยน้ำ ทำให้ปราศจากน้ำด้วย anhydrous Na_2SO_4 ระเหยตัวทำละลายให้แห้ง เมื่อทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีของสาร crude ให้สาร 2.1.3(10) ซึ่งนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไปโดยตรง โดยนำสารที่ได้มาละลายด้วย DMF แล้วเติม NaCl มากเกินพอ กวนส่วนผสมที่ได้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน หลังจาก work up ตามปกติแล้ว นำของผสมของปฏิกิริยามาทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจัดหมู่ปกป้อง acetonide ออกได้ผลิตภัณฑ์ (2S)-26-

chloroponasterone A [2.1.3(14)] (54 % คัดจากสารตั้งต้น diacetonide) ตามต้องการ สำหรับการสังเคราะห์ (25S)-26-bromoponasterone A [2.1.3(15)] และ (25S)-26-iodoponasterone A [2.1.3(16)] สามารถทำได้เช่นเดียวกับที่กล่าวมา โดยใช้ไฮไลต์จาก K Br และ KI ตามลำดับ

สำหรับการสังเคราะห์ (25R)-26-chloro- [2.1.3(17)] (25R)-26-bromo- [2.1.3(18)] และ (25R)-26-iodoponasterone A [2.1.3(19)] เหมือนกับการสังเคราะห์อนุพันธ์ในกลุ่ม 25S โดยใช้ (25R)-inokosterone 2,3;20,22-diacetonide [2.1.3(5)] เป็นสารตั้งต้น

(25S)-26-Chloroponasterone A [2.1.3(14)]: Mp: 186-187 °C; IR, $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 3420, 2956, 1645, 1383, 1053; ¹H NMR ดูตาราง 2.1.3(2); ESMS (+ve), *m/z* (% rel. intensity): 521 [M+Na]⁺ (100), 523 [M+Na]⁺ (38). HRFABMS (-ve), *m/z*: 497.2667. C₂₇H₄₃O₆Cl-H requires 497.2670.

(25S)-26-Bromoponasterone A [2.1.3(15)]: Amorphous; IR, $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 3395, 2929, 1642, 1447, 1382, 1055; ¹H NMR ดูตาราง 2.1.3(2); ESMS (+ve), *m/z* (% rel. intensity): 565 [M+Na]⁺ (83), 567 [M+Na]⁺ (82).

(25S)-26-Iodoponasterone A [2.1.3(16)]: Amorphous; IR, $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 3422, 2928, 1639, 1450, 1383, 1053; ¹H NMR ดูตาราง 2.1.3(2); ESMS (+ve), *m/z* (% rel. intensity): 613 [M+Na]⁺ (100). HRFABMS (-ve), *m/z*: 589.2026. C₂₇H₄₃O₆I-H requires 589.2025.

(25R)-26-Chloroponasterone A [2.1.3(17)]: Mp: 185-186 °C; IR, $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 3421, 2949, 1638, 1384, 1056; ¹H NMR ดูตาราง 2.1.3(2); ESMS (+ve), *m/z* (% rel. intensity): 521 [M+Na]⁺ (100), 523 [M+Na]⁺ (32). HRFABMS (-ve), *m/z*: 497.2673. C₂₇H₄₃O₆Cl-H requires 497.2670.

(25R)-26-Bromoponasterone A [2.1.3(18)]: Amorphous; IR, $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 3395, 2929, 1642, 1447, 1382, 1055; ¹H NMR ดูตาราง 2.1.3(2); ESMS (+ve), *m/z* (% rel. intensity): 565 [M+Na]⁺ (70), 567 [M+Na]⁺ (67). HRFABMS (-ve), *m/z*: 543.2314. C₂₇H₄₃O₆Br-H requires 543.2321.

(25R)-26-Iodoponasterone A [2.1.3(19)]: Amorphous; IR, $\nu_{\max}$ (cm⁻¹): 3431, 2929, 1645, 1380, 1063; ¹H NMR ดูตาราง 2.1.3(2); ESMS (+ve), *m/z* (% rel. intensity): 613 [M+Na]⁺ (100).

2.1.3(9)

ตารางที่ 2.1.3(2) ^1H NMR data of 26-haloponasterone A recorded in $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$

Proton	2.1.3(14)	2.1.3(15)	2.1.3(16)	2.1.3(17)	2.1.3(18)	2.1.3(19)
2	4.17 (m)	4.16 (m)	4.17 (m)	4.17 (m)	4.18 (m)	4.17 (m)
3	4.24 (brs)	4.22 (brs)	4.23 (brs)	4.23 (brs)	4.24 (brs)	4.23 (brs)
5	3.02 (dd, 13.1, 3.8)	3.00 (dd, 13.1, 3.7)	3.01 (dd, 13.3, 3.8)	3.02 (dd, 13.2, 3.8)	3.02 (dd, 13.2, 3.0)	3.02 (dd, 13.1, 3.0)
7	6.27 (d, 2.2)	6.24 (d, 2.4)	6.25 (d, 2.4)	6.27 (d, 2.4)	6.26 (brs)	6.26 (d, 2.1)
9	3.60 (m)	3.58 (m)	3.59 (m)	3.60 (m)	3.60 (m)	3.60 (m)
17	2.92 (t, 9.1)	2.90 (t, 9.0)	2.91 (t, 9.0)	2.91 (t, 9.1)	2.91 (t, 9.0)	2.91 (t, 9.0)
22	3.79 (dd, 10.2, 3.3)	3.78 (brd, 9.8)	3.78 (brd, 9.2)	3.80 (dd, 9.6, 3.3)	3.80 (brd, 9.9)	3.79 (brd, 7.9)
26a	3.51 (dd, 10.6, 4.7)	3.42 (dd, 9.8, 4.5)	3.24 (dd, 9.6, 4.1)	3.47 (dd, 10.6, 4.4)	3.41 (dd, 9.7, 3.6)	3.20 (dd, 9.5, 4.1)
26b	3.40 (dd, 10.6, 6.4)	3.32 (dd, 9.8, 6.3)	3.12 (dd, 9.6, 6.0)	3.38 (dd, 10.6, 5.8)	3.32 (dd, 9.5, 5.8)	3.11 (dd, 9.3, 6.3)
18	1.23 (s)	1.20 (s)	1.22 (s)	1.22 (s)	1.22 (s)	1.22 (s)
19	1.07 (s)	1.05 (s)	1.06 (s)	1.07 (s)	1.07 (s)	1.07 (s)
21	1.57 (s)	1.56 (s)	1.57 (s)	1.58 (s)	1.58 (s)	1.57 (s)
27	0.91 (d, 6.6)	0.90 (d, 6.6)	0.87 (d, 6.4)	0.92 (d, 6.3)	0.94 (d, 5.7)	0.88 (d, 6.4)

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

การทดสอบฤทธิ์การเป็นฮอร์โมนลอกคราบได้ใช้ *Musca* bioassay โดยใช้หนอนแมลงวันบ้าน (*Musca domestica* L.) ตามวิธีการที่เราเคยใช้มาแล้ว^{2.1.2[7]} ผลการตรวจสอบได้ผลการทดลองแสดงในตาราง 2.1.3(3)

ตาราง 2.1.3(3) EC_{50} ของเอกไดสเตียรอยด์

เอกไดสเตียรอยด์	EC_{50} (M)*
2.1.3(2)	3.4×10^{-5}
2.1.3(3)	7.4×10^{-5}
2.1.3(14)	7.6×10^{-5}
2.1.3(15)	5.0×10^{-5}
2.1.3(16)	3.7×10^{-5}
2.1.3(17)	1.1×10^{-4}
2.1.3(18)	1.3×10^{-4}
2.1.3(19)	5.4×10^{-4}

* Concentration in molar of ecdysteroid solution (3 μ l per larva) required to effect puparium formation of 50% effectiveness^{2.1.3[4]}

เอกสารอ้างอิง

- 2.1.3[1] Yingyongnarongkul, B.; Suksamrarn, A. *ScienceAsia* 2000; **26**, 15.
- 2.1.3[2] Takemoto, T.; Hikino, Y.; Arihara, S.; Hikino, H.; Ogawa, S.; Nishimoto, N. *Tetrahedron Lett* 1968, 2475.
- 2.1.3[3] Shigemori, H.; Sato, Y.; Kagata, T.; Kobayashi, J. *J. Nat. Prod.* 1999, **62**, 372.
- 2.1.3[4] Ohtaki, T.; Milkman, R.D.; Williams, C.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1967, **58**, 981.

โครงการย่อยกลุ่มที่ 3: การศึกษาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางยา

โครงการย่อยกลุ่มที่ 3: การศึกษาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางยา

3.1 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

โครงการวิจัยหน่วยที่ 3.1.1: การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเชื้อรา

บทนำ

1. คำนำ

ปัจจุบัน สารประกอบและสารสกัดได้มาจากพืชที่มีคุณสมบัติในการนำมาใช้เป็นยารักษา เป็นที่น่าสนใจศึกษากันมาก โดยเฉพาะในการรักษาโรคติดเชื้อ ดังนั้นการทดสอบคุณสมบัติในการต้านแบคทีเรียและเชื้อราจึงเป็นวิธีหนึ่งที่น่าสนใจเพื่อหาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากพืชต่าง ๆ ที่มีฤทธิ์ทางยา เพื่อนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด

2. ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ท้าววิจัย

การนำสารสกัดจากพืชสมุนไพรเพื่อประโยชน์ในการเตรียมผลิตภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ทางยา เป็นวิธีทางหนึ่งในการนำสมุนไพรที่มีในประเทศให้เกิดประโยชน์มากที่สุด ซึ่งก็พบว่า มีการแยกสารบริสุทธิ์ออกจากสารสกัดมากมาย แต่ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคนั้นมีการทดสอบกันน้อยมาก และเป็นการทดสอบกับจุลินทรีย์เพียง 2-3 ชนิด เท่านั้น ซึ่งอาจไม่ครอบคลุมเชื้อที่มีบทบาทในการก่อโรคได้ทั้งหมดหรือหลายชนิด ทั้งนี้เนื่องจาก จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการสร้างสารพิษ เอนไซม์ หรือมีคุณสมบัติในการก่อให้เกิดโรคแตกต่างกัน แม้กระทั่งความสามารถในเข้าเกาะกับเซลล์โฮสต์ซึ่งเป็นการเริ่มต้นในการก่อให้เกิดโรคของแบคทีเรียชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์ก็ยังคงแตกต่างกัน ดังนั้นคณะวิจัยจึงพยายามทดสอบกับจุลินทรีย์หลายชนิด เพื่อบ่งบอกถึงประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้อย่างจำเพาะ และเพื่อนำมาใช้เป็นแนวทางในการคัดเลือกสารสกัดที่จะเข้าสู่กระบวนการแยกสารบริสุทธิ์ต่อไป ทั้งนี้เพื่อให้ได้สารใหม่ที่มีคุณค่าในการนำไปใช้

3. วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคของสารสกัด, fractions รวมทั้งสารบริสุทธิ์จากพืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ที่คาดว่า มีสารที่มีศักยภาพต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค

4. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

4.1 ร้อยยอด (*Selaginella willdenowii*)

จากการค้นข้อมูลการทดสอบคุณสมบัติความสามารถในการต้านจุลชีพของ *Selaginella willdenowii* ซึ่งอยู่ในวงศ์ Selaginellaceae จากฐานข้อมูล Napralert พบว่ายังไม่มีรายงานด้านคุณสมบัติต้านจุลินทรีย์

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

จากการสกัดต้นร้อยยอด (*S. willdenowii*) ด้วย *n*-hexane (AS-NA042), CHCl_3 (AS-NA043) และ MeOH (AS-NA044) พบว่า สารสกัด hexane มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่า สารสกัด CHCl_3 และ MeOH แต่สารสกัด MeOH มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อราได้ดีกว่า โดยสามารถยับยั้งได้ดีมาก การทดสอบบางเชื้อมีความไวที่ระดับความเข้มข้น 30 $\mu\text{g}/\text{disc}$ ซึ่งจะได้เลือกสารสกัด MeOH ไปแยกเป็น fraction ต่อไป

ตารางที่ 3.1.1 Antimicrobial activity of *Selaginella willdenowii*

จุลินทรีย์	MIC ($\mu\text{g}/\text{disc}$)		
	AS-NA042	AS-NA043	AS-NA044
A. Gram positive bacteria			
<i>Streptococcus milleri</i>	250	R	R
<i>S. mutans</i> ATCC 27175	125	250	R
<i>Corynebacterium diptheriae</i>	R	R	500
B. Gram negative bacteria			
Resistant to all bacterial tests			
C. Fungi			
<i>Microsporum</i> spp.	R	R	250
<i>Candida krusei</i>	R	R	R
<i>Phialophora boydii</i>	R	R	250
<i>Trichophyton mentagophyte</i>	R	R	30
<i>T. rubrum</i>	R	R	30
<i>Acremonium</i> spp.	R	R	30
<i>Aspergillus fumigatus</i>	R	R	30
<i>A. flavus</i>	R	R	30

R= Resistant

วัสดุและวิธีการ

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียนี้ได้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Bauer และคณะ^{3.1.1[1]} และ Mahasneh และ El-Oqlah^{3.1.1[2]} โดยทำการทดสอบดังนี้ นำแบคทีเรียที่เก็บไว้บน Trypticase soy agar เพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่เหมาะสมกับชนิดของจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Brain Heart Infusion broth และบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อรา ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Sabouraud broth และบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำจุลินทรีย์ที่บ่มเพาะได้มาปรับความเข้มข้นที่ 660 nm เพื่อให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับความเข้มข้นของจำนวนแบคทีเรียประมาณ 10^5 – 10^6 cells/ml แล้วจึงนำแบคทีเรียที่เตรียมได้ปริมาตร 0.2 ml หยดลงบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller-Hinton Agar หลังจากนั้นใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อเกลี่ยบนหน้าวุ้น 3 ครั้ง ทำให้ได้จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่แบคทีเรียบนหน้าวุ้น หลังจากนั้นนำแผ่นดิสก์ที่มีสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ มาวางบนวุ้นที่มี จุลินทรีย์ชนิดต่างๆ และบ่มทิ้งไว้ที่ 37°C เป็นเวลา 16–18 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย แต่ถ้าเป็นราให้บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 48–72 ชั่วโมง แล้วแต่ชนิดของรา

การอ่านผล

ถ้าพบ clear zone รอบแผ่นดิสก์มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 2 mm แต่น้อยกว่า 5 mm แสดงว่า สารทดสอบมีผลต่อแบคทีเรียชนิดที่ทดสอบในระดับ อ่อน (weak)

ถ้าพบ clear zone รอบแผ่นดิสก์มากกว่าหรือเท่ากับ 5 mm แต่น้อยกว่า 8 mm แสดงว่า สารทดสอบมีผลต่อแบคทีเรียชนิดที่ทดสอบในระดับ ปานกลาง (moderate)

ถ้าพบ clear zone รอบแผ่นดิสก์มากกว่าหรือเท่ากับ 8 mm แสดงว่า สารทดสอบมีผลต่อแบคทีเรียชนิดที่ทดสอบในระดับ ดี (good)

เอกสารอ้างอิง

- 3.1.1[1] Bauer, A.; Kirby, M.; Sherris, J.; Turck, M. *Am. J. Clin. Pathol.* 1966, **45**, 493.
- 3.1.1[2] Mahasneh, A.; El-Oqlah, A. *J. Ethnopharmacol.* 1999, **64**, 271.

โครงการย่อยกลุ่มที่ 3: การศึกษาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางยา

3.1 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

โครงการวิจัยหน่วยที่ 3.1.2: การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

บทนำ

1. คำนำ

ภาวะการเกิด oxidative stress มีสาเหตุมาจากการผลิตออกซิเจนและไนโตรเจนที่ว่องไวต่อปฏิกิริยา (reactive oxygen and nitrogen) และอนุมูลอิสระ (free radical) ของสิ่งมีชีวิตกลุ่มที่ต้องใช้ออกซิเจนในการดำรงชีวิต เป็นหนึ่งในตัวการที่ทำให้เกิดความผิดปกติ ถึงขั้นทำให้เกิดโรคหลายชนิด การสังเคราะห์สารเคมีที่มีฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชันจึงมีผู้สนใจกันมาก แต่การสกัดสารที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันยังมีการศึกษากันน้อยมาก ดังนั้นคณะวิจัยจึงมุ่งสกัดสารจากพืชที่มีในประเทศที่มีคุณสมบัติลดภาวะการเกิดออกซิเดชันที่มีประสิทธิภาพสูง เพื่อเป็นแนวทางนำไปพัฒนาเป็นตัวยามาใช้ในอนาคต

2. ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำวิจัย

ออกซิเจนที่ว่องไวต่อปฏิกิริยา ได้แก่ superoxide, hydrogen peroxide, hydroxyl radical และ singlet oxygen อาจเป็นสาเหตุให้เกิดโรคมามากมาย เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจ โรคเบาหวาน โรคความดันโลหิตสูง ต้อกระจก ความเป็นพิษที่เกิดจากยา (drug-associated toxicity) การอักเสบ artherogenesis และการเข้าสู่วัยชรา รวมทั้งการทำให้อาหารเสื่อมสภาพ 3.1.2[1-4] ซึ่งโดยทั่วไปร่างกายสามารถสร้างสารต้านออกซิเดชัน หรือแอนติออกซิแดนท์ (antioxidant) ได้ นอกจากนี้ยังได้จากอาหารที่บริโภคโดยทั่วไป เช่น พืช ผักและผลไม้บางชนิด ทำให้ร่างกายสามารถปรับเข้าสู่สภาพที่สามารถลดความรุนแรงหรือหายจากภาวะการเกิดโรค^{3.1.2[5]} อย่างไรก็ตามจากภาวะเศรษฐกิจในปัจจุบัน สุขภาพ และสภาพแวดล้อม ทำให้ตระหนักถึงความต้องการที่จะได้สารต้านออกซิเดชันชนิดใหม่ขึ้น

พืชเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถใช้เป็นสารต้านออกซิเดชัน เนื่องจากเป็นแหล่งธรรมชาติของสารเคมีอินทรีย์ และยังมีคุณสมบัติในการย่อยสลายทางชีวภาพทำให้ได้ผลผลิตที่ไม่เป็นพิษ ดังนั้นจึงได้มีความพยายามในการมุ่งไปสู่การนำมาซึ่งสารที่มีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน สารต้านออกซิเดชันนี้พบมากในผลิตภัณฑ์ของพืชหลายชนิด เช่น น้ำมัน ผลไม้ ชา เมล็ดธัญพืช ถั่ว ตัวอย่างได้แก่ flavonoids, tannins, coumarins, curcuminoids, xanthenes, phenolics และ terpenoids 3.1.2[6-8]

3. วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัด, fraction รวมทั้งสารบริสุทธิ์จากพืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ ที่คาดว่า มีสารที่มีศักยภาพต้านออกซิเดชัน

4. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

4.1 ร้อยยอด (*Selaginella willdenowii*)

จากการสืบค้นด้วยฐานข้อมูลจาก Napralert ยังไม่มีรายงานด้านคุณสมบัติต้านออกซิเดชันของต้นร้อยยอด

4.2 สารสกัดจากพืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์

ส่วนใหญ่ยังไม่ได้ตรวจสอบว่ามีรายงานการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมาแล้วหรือไม่ แต่จะทำการทดสอบก่อน รวมทั้งการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธาน คือชื่อทางวิทยาศาสตร์ สารสกัดจากพืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ที่น่าสนใจ จะเลือกนำไปศึกษาเป็นกรณีไป

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

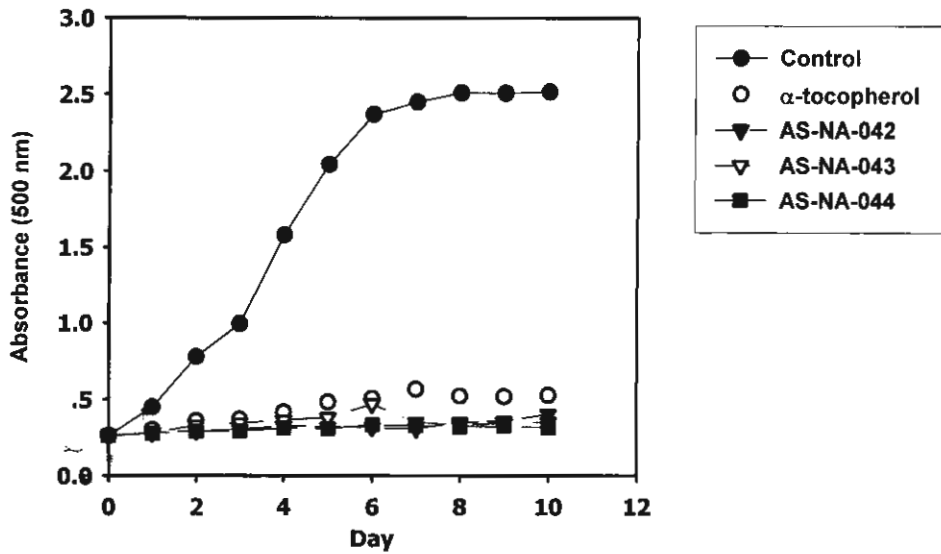
1) ต้นร้อยยอด

ต้นร้อยยอด (*S. willdenowii*) เป็นพืชตัวอย่างที่ใช้นำในการทดสอบเบื้องต้นของเรา เนื่องจากข้อมูลเบื้องต้นเราทราบว่า มีสารกลุ่ม flavonoids อยู่ ซึ่งควรจะให้ผลการทดสอบที่ดีจากการสกัดพืชทั้งต้นด้วย *n*-hexane (AS-NA042), CHCl_3 (AS-NA043) และ MeOH (AS-NA044) ตามลำดับ พบว่า มีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันได้ใกล้เคียงกันทั้ง 3 สารสกัด และมีคุณสมบัติดีกว่า α -tocopherol ดังแสดงในแผนภาพที่ 3.1.2(1) จึงดำเนินการทดสอบสารสกัดอื่นๆ ที่ทำการสกัดไว้ (ดูหัวข้อถัดไป) ขณะนี้ได้นำต้นร้อยยอดไปสกัดแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพแล้ว

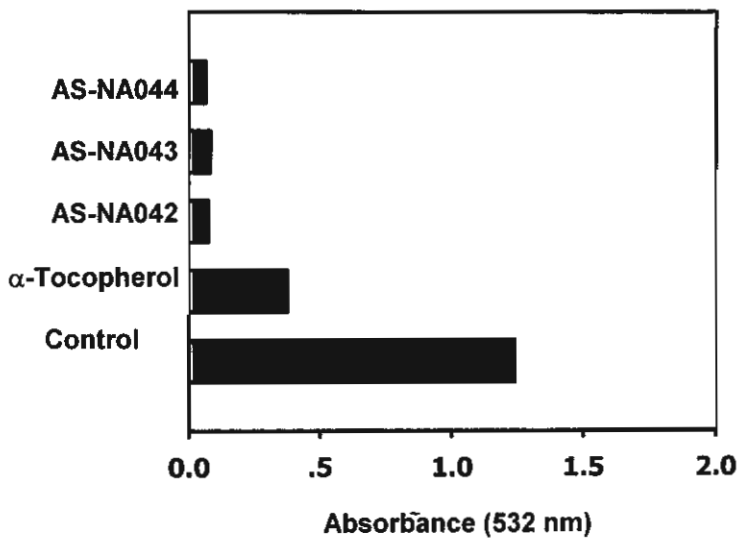
2) สารสกัด AS-NA003 ถึง AS-NA041

สารสกัดในกลุ่มนี้เป็นสารสกัดจากพืช (AS-NA003 ถึง AS-NA041 สำหรับ AS-NA001 ถึง AS-NA002 ไม่ใช่สารสกัด) ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้แสดงไว้ในแผนผัง 2 ถึง 8 และในครั้งนี้ได้ทดสอบ AS-NA042 ถึง AS-NA044 ข้างรวมกับกลุ่มสารสกัดอื่นๆ ด้วย

3.1.2(3)



(a) FTC method



(b) TBA method

แผนภาพที่ 3.1.2(1)

3) สารสกัด AS-NA307 ถึง AS-NA325

สารสกัดในกลุ่มนี้เป็นสารสกัดจากพืช ใช้ DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ในการทดสอบ และใช้ BHT [2,6-di-(*tert*-butyl)-4-methylphenol] เป็นสารเปรียบเทียบ ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้แสดงไว้ในตารางที่ 3.1.2(1) จะเห็นได้ว่าสารสกัดบางอย่างแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูง บางอย่างให้ฤทธิ์สูงกว่าสารมาตรฐาน BHT ซึ่งจะได้นำมาทำการแยกหาสารบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์ต่อไป

วัสดุและวิธีการ

นำสารสกัด *n*-hexane, CHCl_3 และ MeOH มาทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชัน 2 วิธี คือ Ferric Thiocyanate (FTC) method, Thiobarbituric acid (TBA) method และ การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน โดยใช้ DPPH ดังนี้คือ

วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

1) Ferric Thiocyanate (FTC) method

นำสารตัวอย่าง 4 mg ละลายใน 99.5% ethanol 4ml แล้วนำมาใส่สารละลาย 2.5% linoleic acid 4.1 ml, phosphate buffer saline 8 ml และน้ำกลั่น 3.9 ml หลังจากนั้น เก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 40 °C ตามวิธีของ Kikuzaki และ Nakatani^{3.1.2[9]} เติม 75% ethanol 9.7 ml และ 30% ammonium thiocyanate 0.1 ml ลงในสารละลายที่เตรียมไว้ข้างต้นปริมาตร 0.1 ml และใส่ 2×10^{-2} M ferrous chloride 0.1 ml (เตรียมใน 3.5% hydrochloric acid) ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 3 min นำมาวัดค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 nm ในขั้นตอนนี้ ทำซ้ำในทุก 24 h จนกระทั่งหลอดควบคุมมีค่าการดูดกลืนสูงสุด ในการทดสอบใช้ α -tocopherol เป็น positive control

2) Thiobarbituric acid (TBA) method

เป็นการทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ตามวิธีของ Ottolenghi^{3.1.2[10]} โดยการนำสารละลายที่เตรียมในวิธี FTC method (ในวันสุดท้าย) 2 ml ผสมกับ 20% trichloroacetic acid 2 ml และ 0.67% TBA 2 ml ผสมให้เข้ากัน นำมาให้ความร้อนในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 100 °C นาน 10 min ทิ้งไว้ให้สารละลายเย็นลง แล้วจึงนำไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 rpm นาน 20 min หลังจากนั้น นำไปวัดค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 nm

3) การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน โดยใช้ DPPH

นำสารสกัดมาทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน โดยใช้ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) วิธีการทดสอบคือ นำสารละลาย DMSO ของสารที่ต้องการทดสอบ (100 μ l) มาเติมใน สารละลาย DPPH (2.9 ml, เตรียมจากการละลาย DPPH 4.5 ml ใน EtOH 100 ml) ที่งไว้ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 30 นาที ทำการวัด absorbance ผลการจับแรติคัลของ สาร หาได้จากการเปรียบเทียบค่า absorbance ของสารละลายของสารตัวอย่างกับสารละลายที่ ปราศจากสารที่ทดสอบ จำนวนเปอร์เซ็นต์ของ DPPH ที่เหลือเมื่อเทียบกับความเข้มข้นมาตรฐาน จะถูก plot เพื่อหาปริมาณของ antioxidant ที่จะต้องใช้เพื่อลดความเข้มข้นเริ่มต้นของ DPPH ลงให้เหลือเพียง 50% (เป็นค่า EC_{50}) และมี 2,6-di-(*tert*-butyl)-4-methylphenol (BHT) เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบสำหรับ positive control (มีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.7 μ g/ml) ผลการทดสอบของสาร AS-NA307 ถึง AS-NA 325 โปรดดูตารางที่ 3.1.2(1)

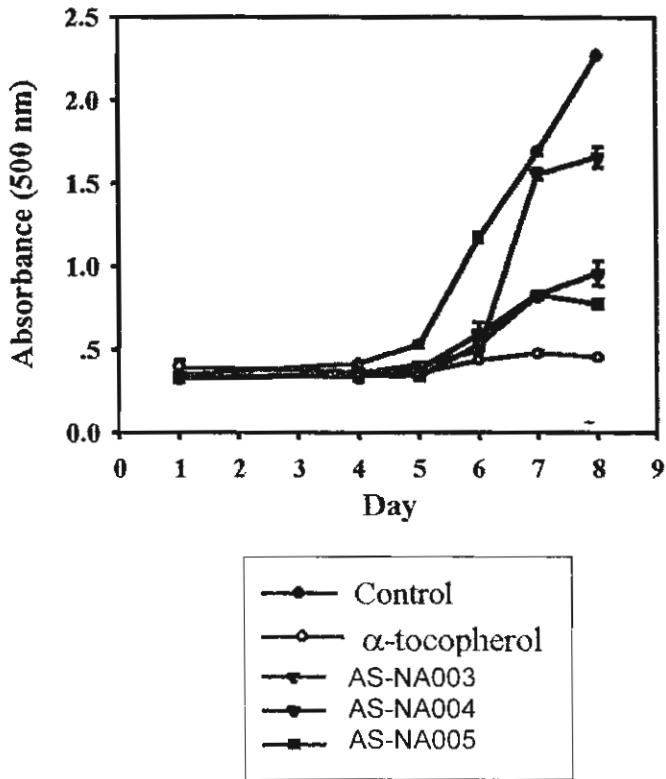
สารสกัดที่ใช้ทดสอบ

1) สารสกัดจากต้นร้อยยอด

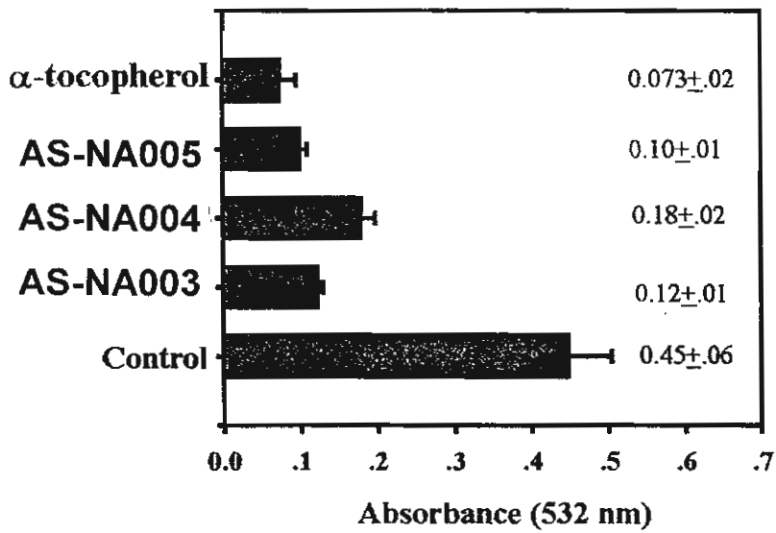
นำสารสกัด *n*-hexane, $CHCl_3$ และ MeOH ของต้นร้อยยอด (AS-NA042 ถึง AS-NA044) มาทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันตามวิธีการข้างต้น ผลการทดลอง ดูแผนภาพที่ 3.1.2(1)

2) สารสกัดจากพืชชนิดอื่น (AS-NA003 ถึง AS-NA041 และ AS-NA307 ถึง AS-NA325)

นำสารสกัด *n*-hexane, $CHCl_3$ (หรือ EtOAc) และ MeOH ของพืชชนิดอื่น (AS-NA003 ถึง AS-NA041 และ AS-NA307 ถึง AS-NA325) รวมทั้งสารสกัด *n*-hexane, $CHCl_3$ และ MeOH ของต้นร้อยยอด (AS-NA042 ถึง AS-NA044) มาทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันตามวิธีการข้างต้น ผลการทดลอง ดูแผนภาพที่ 3.1.2(2) ถึง 3.1.2(8) และตารางที่ 3.2.1(1)

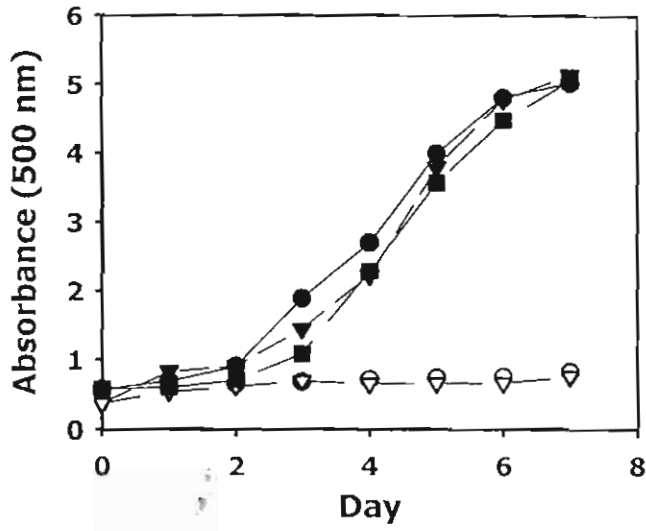


(a) FTC method

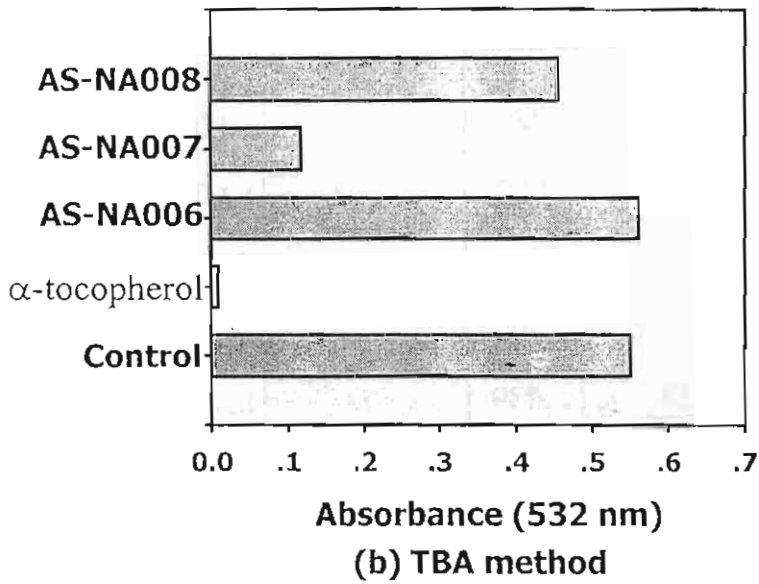


(b) TBA method

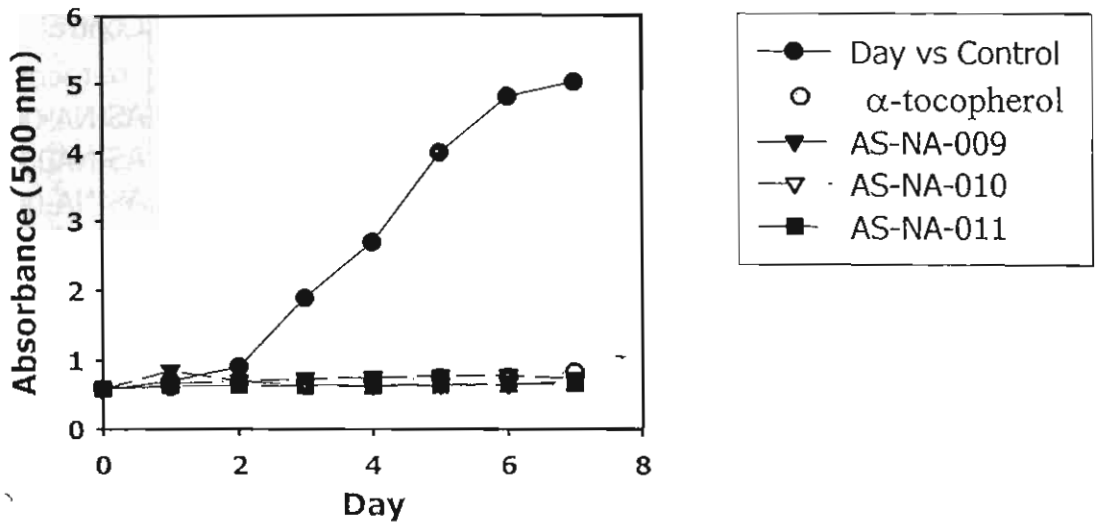
แผนภาพที่ 3.1.2(2)



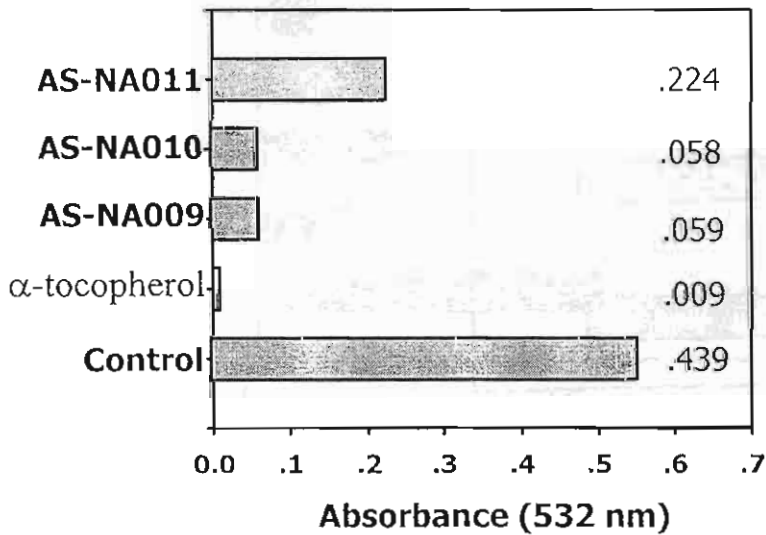
(a) FTC method



(b) TBA method



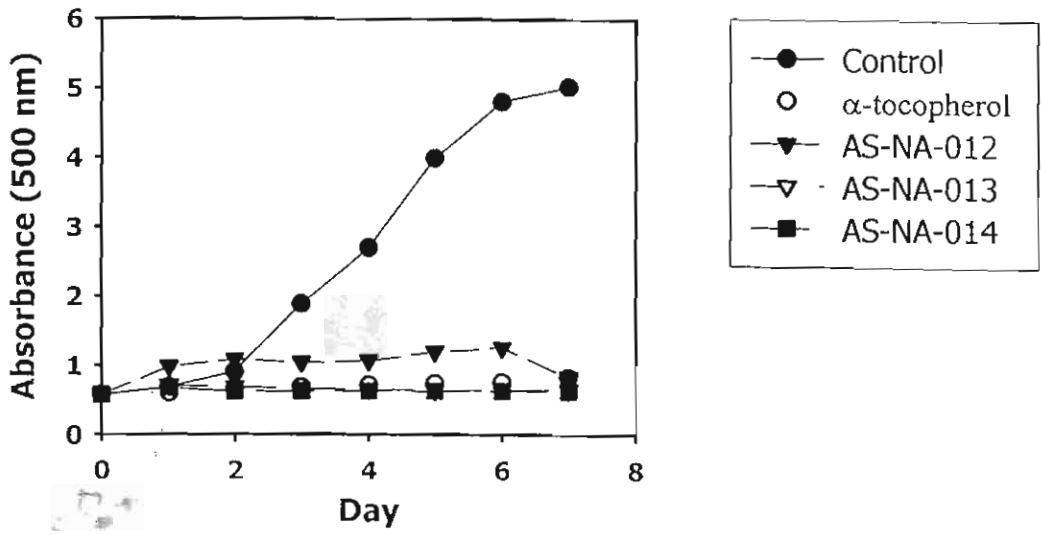
(a) FTC method



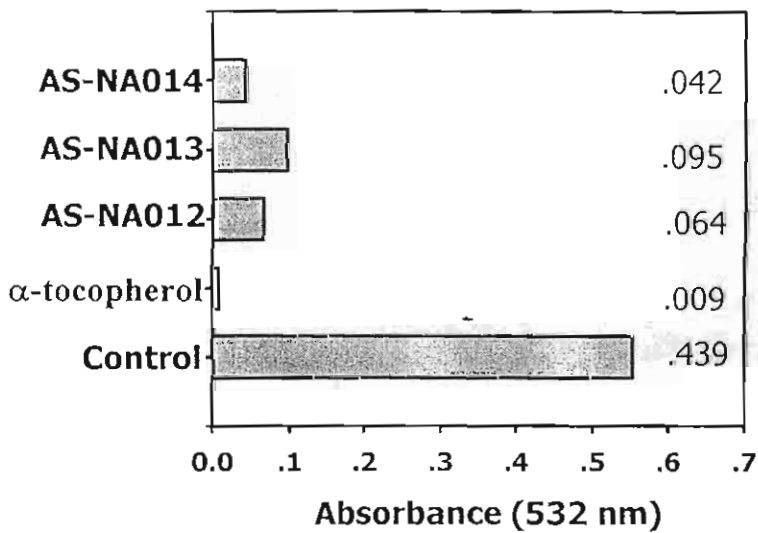
(b) TBA method

แผนภาพที่ 3.1.2(4)

3.1.2(9)

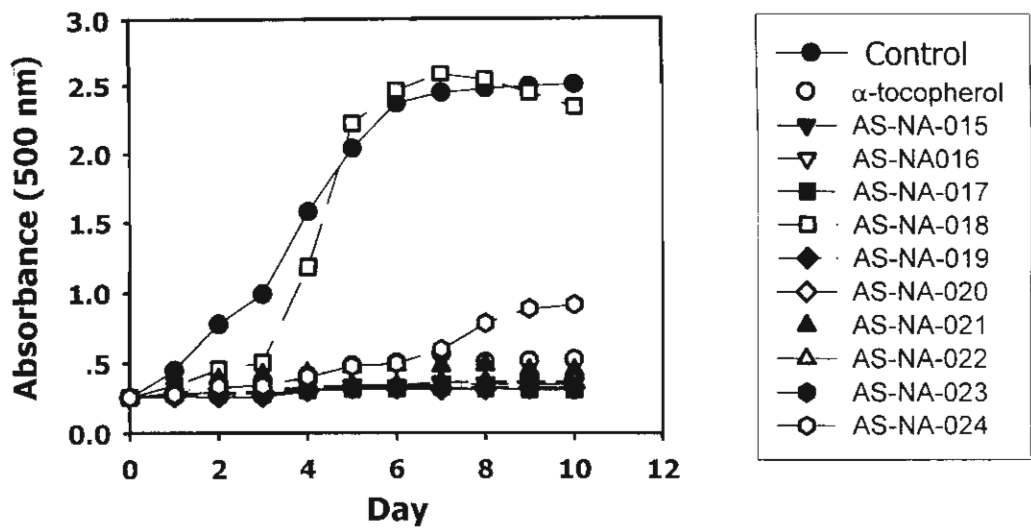


(a) FTC method

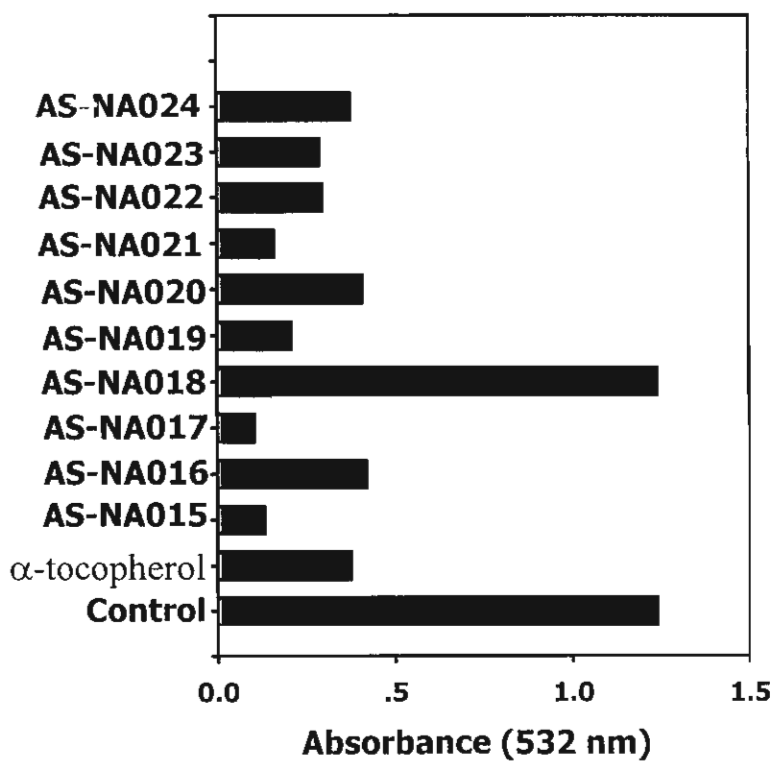


(b) TBA method

แผนภาพที่ 3.1.2(5)

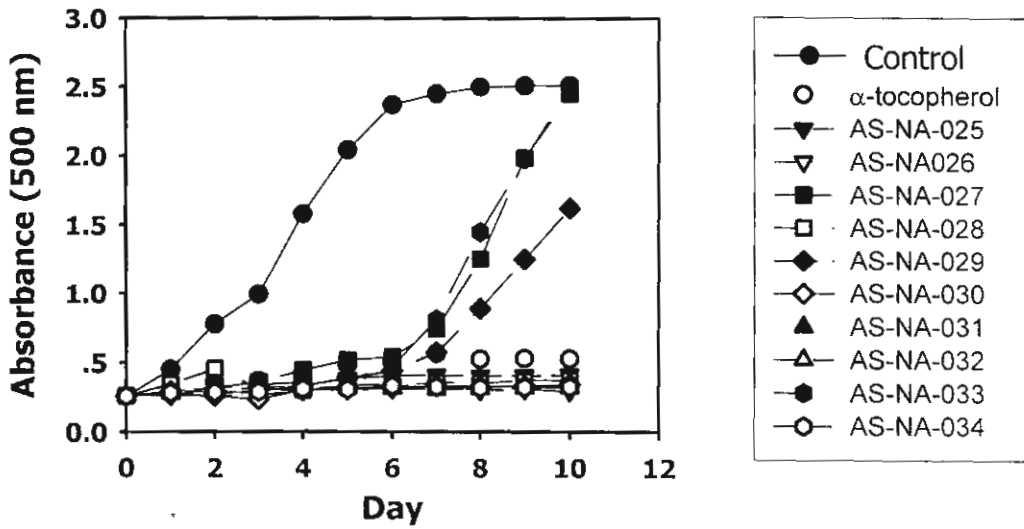


(a) FTC method

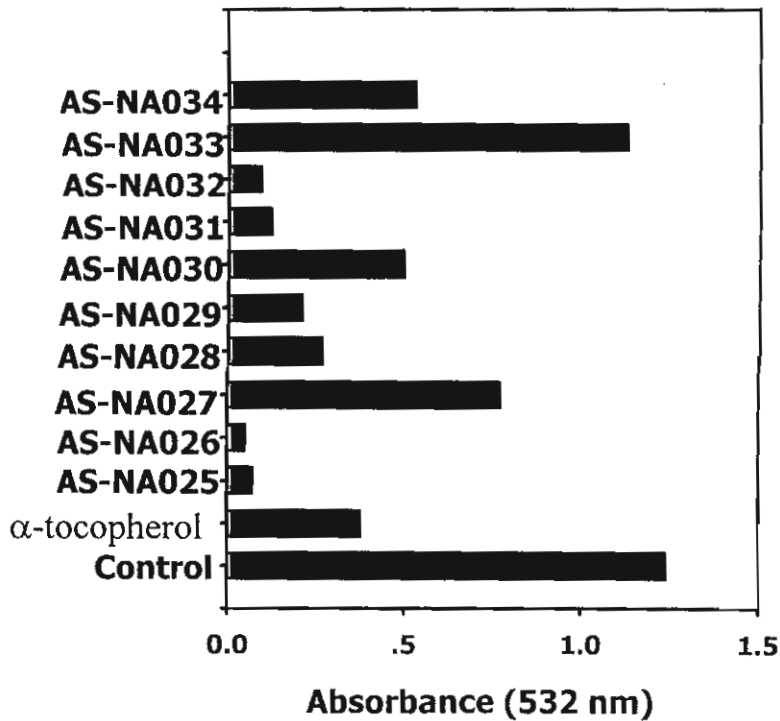


(b) TBA method

แผนภาพที่ 3.1.2(6)

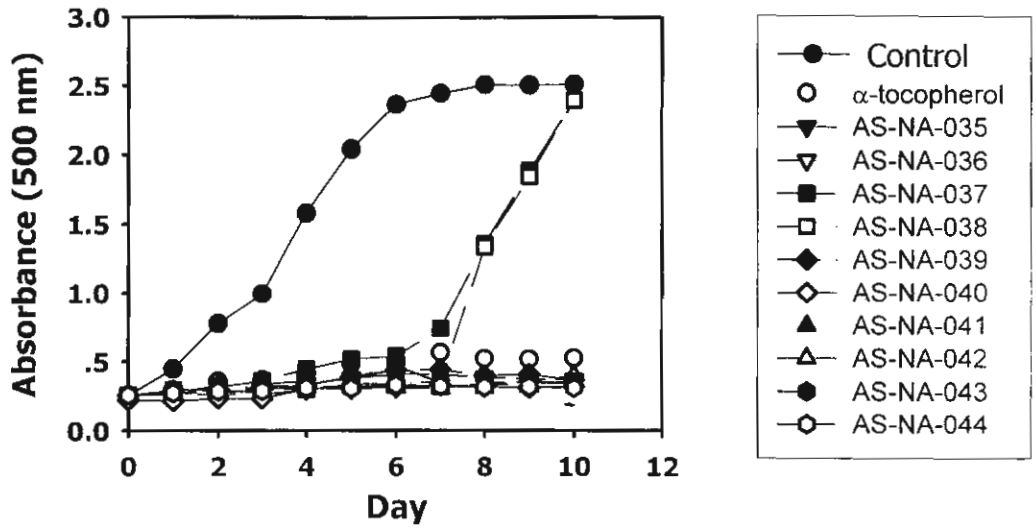


(a) FTC method

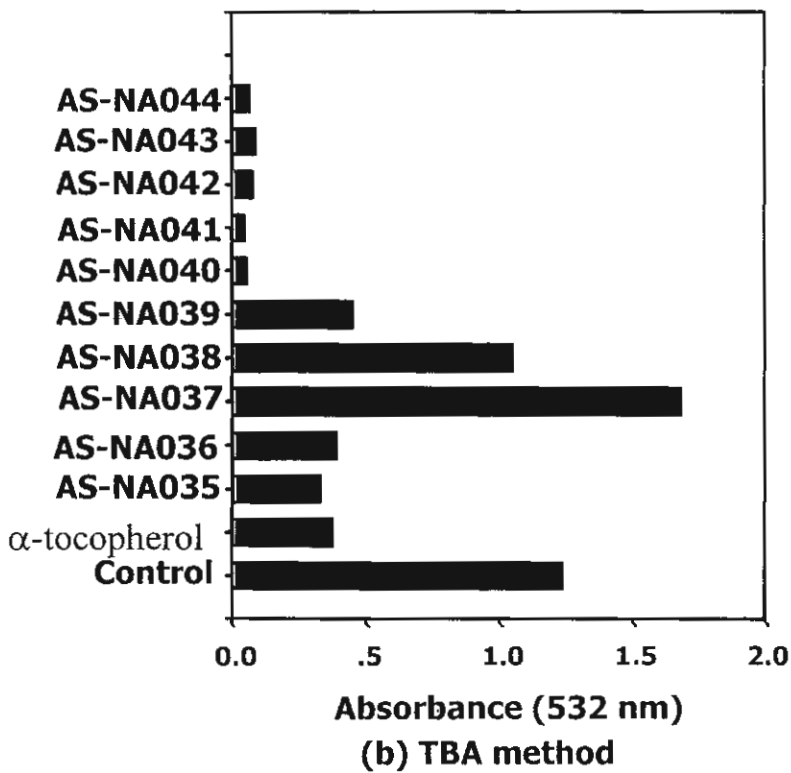


(b) TBA method

แผนภาพที่ 3.1.2(7)



(a) FTC method



(b) TBA method

แผนภาพที่ 3.1.2(8)

3.1.2(13)

ตารางที่ 3.1.2(1) ผลการทดสอบ Antioxidant activity โดยวิธี DPPH ของสารสกัด AS-NA307 - AS-NA325

Extract	Antioxidant activity (EC ₅₀ , µg/ml)
AS-NA307	26.8
AS-NA308	6.7
AS-NA309	45.2
AS-NA310	224.4
AS-NA311	53.6
AS-NA312	72.0
AS-NA313	10.1
AS-NA314	80.4
AS-NA315	3.4
AS-NA316	11.4
AS-NA317	35.2
AS-NA318	9.0
AS-NA319	60.3
AS-NA320	30.2
AS-NA321	25.1
AS-NA322	10.4
AS-NA323	negative
AS-NA324	negative
AS-NA325	negative
BHT	4.0

เอกสารอ้างอิง

- 3.1.2[1] Ames, B.; Shigenaga, M.; Hagen, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993, **90**, 7915.
- 3.1.2[2] Halliwell, B.; Gutteridge, J.; Cross, C. *J. Lab. Clin. Med.* 1992, **119**, 598.
- 3.1.2[3] Horton, A.; Fairhurst, S. *Crit. Rev. Toxicol.* 1992, **18**, 27.
- 3.1.2[4] Willett, W. *Cancer J. Clin.* 1999, **49**, 331.
- 3.1.2[5] Fang, X.; Wada, S. *Food Res. Int.* 1993, **26**, 405.
- 3.1.2[6] Bae, E.; Moon, G. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 1997, **26**, 203.
- 3.1.2[7] Yen, G.; Chen, H.; Peng, H. *Food Chem.* 1997, **58**, 1407.
- 3.1.2[8] Larson, R. *Phytochemistry* 1988, **27**, 969.
- 3.1.2[9] Kikuzaki, H.; Nakatani, N. *J. Food Sci.* 1993, **58**, 1407.
- 3.1.2[10] Ottolenghi, A. *Arch. Biochem. Biophys.* 1959, **79**, 355.

โครงการย่อยกลุ่มที่ 3: การศึกษาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางยา

3.2 เคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางยา

โครงการวิจัยหน่วยที่ 3.2.1: *Piper aff. pedicellatum*

บทนำ

1. คำนำ

พืชสกุล *Piper* จัดอยู่ในวงศ์ Piperaceae มีอยู่มากกว่า 700 ชนิดในโลก แต่ส่วนใหญ่ของพืชในสกุลนี้มีกระจายอยู่ทั่วไปในประเทศซึ่งอยู่ในเขตร้อนของโลก เป็นที่ทราบกันว่าพืชสกุล *Piper* หลายชนิดจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญและบางชนิดยังใช้เป็นยารักษาโรคได้ นอกจากนี้ยังมีผู้พบสารองค์ประกอบซึ่งแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆที่น่าสนใจอีกมากมายจากพืชสกุล *Piper* ทำให้มีผู้นำพืชในสกุลนี้มาศึกษากันอย่างกว้างขวาง

2. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

จากการศึกษาวรรณกรรมทางเคมีของพืชสกุล *Piper* พบว่ามีสารองค์ประกอบมากมายที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ^{3.2.1[1]} และเนื่องจากพืชสกุล *Piper* มีอยู่มากกว่า 10 ชนิดในประเทศไทย^{3.2.1[2]} ทำให้ผู้วิจัยสนใจศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพืชสกุล *Piper* โดยมุ่งหวังว่าอาจจะได้สารใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ

3. วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อสกัดแยก หาสูตรโครงสร้าง และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากรากของ *Piper aff. pedicellatum*

4. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับพืชสกุล *Piper* ได้เคยกล่าวถึงอย่างละเอียดในรายงานวิจัยประเภททุนส่งเสริมกลุ่มวิจัย (พ.ศ. 2541-4) ซึ่งได้รับการสนับสนุน

3.2.1(2)

จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยมาแล้ว จึงไม่ขอกล่าวซ้ำในที่นี้ จากการศึกษาพืชสกุล *Piper* อย่างต่อเนื่องทำให้พบว่ารากของ *P. aff. pedicellatum* ซึ่งเก็บมาจากอำเภอป่าซาง จังหวัดลำพูนน่าจะได้สารใหม่ซึ่งอาจมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ พืชชนิดนี้มีลักษณะของใบและผลคล้ายข้าวพุลูและสามารถนำมาประกอบอาหารได้

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

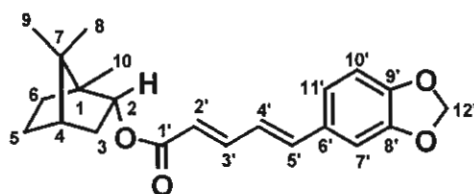
จากการนำส่วนสกัดเฮกเซนและส่วนสกัดเมทานอลของรากของ *Piper. aff. pedicellatum* มาแยกโดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟี สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 7 และ 2 ชนิดตามลำดับ การหาเอกลักษณ์ของสารดังกล่าวอาศัยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

1. (+)-Bornyl piperate [3.2.1(1)]

สาร 3.2.1(1) เป็นของแข็งสีขาว mp. 93–95 °C EI-MS สเปกตรัมแสดง molecular ion ที่ m/z 354 แสดงว่ามีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{22}H_{26}O_4$ UV สเปกตรัมแสดงแถบดูดกลืนที่ 261, 316 และ 353 nm คล้ายคลึงกับ UV สเปกตรัมของ methyl piperate ซึ่งเคยแยกได้จากผลดีป्ली จาก IR สเปกตรัมแถบดูดกลืนที่ 1710, 1624 และ 995 cm^{-1} แสดงว่ามี *E, E*-diene อยู่ในลักษณะคอนจูเกตกับหมู่คาร์บอนิลของเอสเทอร์^{3.2.1[3]} ส่วนแถบดูดกลืนที่ 1253, 1037 และ 931 cm^{-1} แสดงถึงหมู่ methylenedioxy^{3.2.1[4]} ^{13}C NMR และ DEPT สเปกตรัมแสดงว่ามี 22 คาร์บอนโดยมี 3 คาร์บอนเป็นของหมู่ methyl 4 คาร์บอนเป็นของหมู่ methylene 9 คาร์บอนเป็นของหมู่ methine และ 6 คาร์บอนเป็น quaternary carbon สัญญาณที่ δ 167.5 ใน ^{13}C NMR สเปกตรัมแสดงถึงหมู่คาร์บอนิลของเอสเทอร์ 1H NMR สเปกตรัมแสดงสัญญาณของหมู่ methylenedioxy ที่ δ 5.97 (2H, s) สัญญาณของ olefinic protons ของระบบ diene จำนวน 4 โปรตอนปรากฏเป็น doublet 2 ชุดที่ δ 5.96 (1H, $J = 15.3$ Hz) และ 6.80 (1H, $J = 15.7$ Hz) และ doublet of doublets 2 ชุดที่ δ 6.69 (1H, $J = 15.7$ และ 10.8 Hz) และ 7.38 (1H, $J = 15.3$ และ 10.8 Hz) ตรงกับ olefinic protons ที่ตำแหน่ง 2', 5', 4' และ 3' ตามลำดับ จากค่า coupling constant ของ olefinic protons ประมาณ 15 Hz ช่วยยืนยัน configuration ของ diene เป็นแบบ *trans, trans* นอกจากนี้ยังพบสัญญาณของ aromatic protons จำนวน 3 โปรตอนปรากฏเป็น doublet 2 ชุดที่ δ 6.98 (1H, $J = 1.5$ Hz) และ 6.77 (1H, $J = 8.2$

3.2.1(3)

Hz) และ doublet of doublets 1 ชุดที่ δ 6.90 (1H, $J = 8.2$ และ 1.5 Hz) ตรงกับ aromatic protons ที่ตำแหน่ง 7', 10' และ 11' ของวงอะโรเมติกตามลำดับ จาก splitting pattern และค่า coupling constant ของ aromatic protons แสดงว่าเป็น 1,2,4-trisubstituted benzene จากข้อมูลข้างต้นนี้บ่งบอกว่ามี *E*, *E*-piperoyl unit ($C_{12}H_{18}O_4$) อยู่ในโมเลกุล EI-MS สเปกตรัมแสดงพีคของ piperic acid ปรากฏที่ m/z 218 สำหรับพีคที่เกิดจาก cleavage ของ piperoyl unit ประกอบด้วยพีคที่ m/z 201 (base peak), 173, 143, 115 และ 69 ส่วนที่เหลือของโมเลกุลมีสูตร $C_{10}H_{17}$ นอกจากนี้ยังพบว่าหมู่ $C_{10}H_{17}$ แสดงสัญญาณใน 1H NMR และ ^{13}C NMR สเปกตรัมเหมือนสัญญาณของหมู่ bornyl ของ bornyl *p*-coumarate ซึ่งแยกได้จาก *P. ribesiods*^{3.2.1[12]} สำหรับ 1H NMR สเปกตรัมของหมู่ bornyl ของสาร 3.2.1(1) ประกอบด้วยสัญญาณ singlet 3 สัญญาณที่ δ 0.84, 0.87 และ 0.91 ตรงกับหมู่ quaternary methyl ที่ตำแหน่ง 10, 9 และ 8 ตามลำดับ สัญญาณ multiplet 5 ชุดที่ δ 1.24, 1.33, 1.74, 2.00 และ 2.38 ตำแหน่งละ 1 โปรตอนตรงกับโปรตอนที่ตำแหน่ง 5 α , 6 β , 5 β , 6 α และ 3 β ตามลำดับ สัญญาณ doublet of doublets 1 ชุดที่ δ 1.01 (1H, $J = 13.1$ และ 4.3 Hz) ตรงกับโปรตอนที่ตำแหน่ง 3 α สัญญาณ triplet 1 ชุดที่ δ 1.68 (1H, $J = 4.3$ Hz) ตรงกับโปรตอนที่ตำแหน่ง 4 และสัญญาณ doublet of triplets 1 ชุดที่ δ 4.96 (1H, $J = 9.6$ และ 2.6 Hz) ตรงกับโปรตอนที่ตำแหน่ง 2 HMBC สเปกตรัมแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง C-1' (δ 167.5) กับ H-2 (δ 4.96) นอกจากนี้ยังสามารถกำหนด stereochemistry ของหมู่ piperoyl ได้จาก NOE experiment จากการทำ irradiation ที่ H-2 พบว่าเกิด NOE enhancement กับหมู่ methylene ที่ตำแหน่ง 3 β และหมู่ methyl 2 หมู่ที่ตำแหน่ง 8 และ 10 ข้อมูลนี้ยืนยันว่าหมู่ piperoyl อยู่ *endo* side ของหมู่ bornyl จึงสรุปได้ว่าสาร 3.2.1(1) คือ (+)-bornyl piperate ซึ่งเป็นสารใหม่ สารชนิดนี้แสดง antituberculosis activity ต่อ *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra strain)^{3.2.1[13]} โดยมีค่า MIC 25 $\mu g/ml$



3.2.1(1)

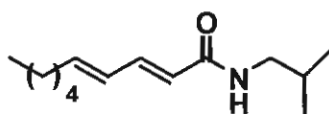
3.2.1(4)

2. สารผสมระหว่าง β -sitosterol และ stigmasterol [3.2.1(2)]

สาร 3.2.1(2) เป็นผลึกสีขาว mp. 136-138 °C การยืนยันโครงสร้างได้จากการเปรียบเทียบ TLC และ ^1H NMR กับสารที่เคยแยกได้จากผลดิบลีและผลข้าพลุ และสอดคล้องกับข้อมูลที่มีผู้รายงานไว้^{3.2.1[5]} จึงสรุปได้ว่าสาร 3.2.1(2) คือ สารผสมระหว่าง β -sitosterol และ stigmasterol

3. Pellitorine [3.2.1(3)]

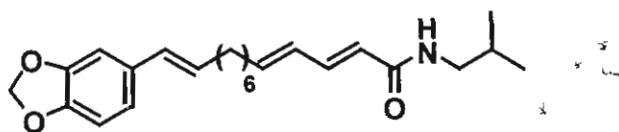
สาร 3.2.1(3) เป็นของแข็งสีขาว mp. 68-70 °C การยืนยันโครงสร้างได้จากการเปรียบเทียบ TLC และ ^1H NMR กับ pellitorine ที่เคยแยกได้จากผลข้าพลุ และสอดคล้องกับข้อมูลที่มีผู้รายงานไว้^{3.2.1[6]} สรุปได้ว่าสาร 3.2.1(3) คือ pellitorine



3.2.1(3)

4. Guineensine [3.2.1(4)]

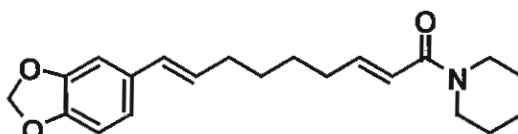
สาร 3.2.1(4) เป็นของแข็งสีขาว mp. 112-114 °C การยืนยันโครงสร้างได้จากการเปรียบเทียบ TLC และ ^1H NMR กับ guineensine ที่เคยแยกได้จากผลดิบลี และสอดคล้องกับข้อมูลที่มีผู้รายงานไว้^{3.2.1[7,8]} สรุปได้ว่าสาร 3.2.1(4) คือ guineensine



3.2.1(4)

5. Pipernonaline [3.2.1(5)]

สาร 3.2.1(5) เป็นสารสีเหลืองอ่อนมีลักษณะกึ่งของแข็ง การยืนยันโครงสร้างได้จากการเปรียบเทียบ TLC และ ^1H NMR กับ pipernonaline ที่เคยแยกได้จากผลดิบลี และสอดคล้องกับข้อมูลที่มีผู้รายงานไว้^{3.2.1[9]} สรุปได้ว่าสาร 3.2.1(5) คือ pipernonaline

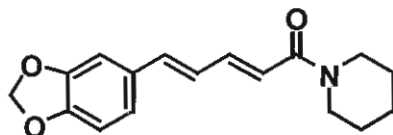


3.2.1(5)

3.2.1(5)

6. Piperine [3.2.1(6)]

สาร 3.2.1(6) เป็นผลึกสีเหลืองอ่อน mp. 130-132 °C การยืนยันโครงสร้างได้จากการเปรียบเทียบ TLC และ ¹H NMR กับ piperine ที่เคยแยกได้จากผลดีป्ली และสอดคล้องกับข้อมูลที่มีผู้รายงานไว้^{3.2.1[10]} สรุปได้ว่าสาร 3.2.1(6) คือ piperine



3.2.1(6)

7. สารผสมระหว่าง β -sitosteryl-3-O- β -glucopyranoside และ stigmasteryl-3-O- β -glucopyranoside [3.2.1(7)]

สาร 3.2.1(7) เป็นของแข็งสีขาว mp. 276-278 °C ¹H NMR สเปกตรัมแสดงสัญญาณของหมู่ methyl ในช่วง δ 0.56-0.95 สัญญาณ multiplet ที่ δ 3.26 (1H) แสดงถึง carbinolic methine proton สัญญาณ multiplet ซึ่งซ้อนทับกับสัญญาณของ CD₃OD ในช่วง δ 3.10-3.78 แสดงถึง methine protons ที่เกาะกับ oxygenated carbons สัญญาณ doublet ที่ δ 4.30 (1H, J = 7.6 Hz) แสดงถึง anomeric proton ของวง glucopyranose ส่วนสัญญาณ doublet ที่ δ 5.26 (1H, J = 4.8 Hz) แสดงถึง trisubstituted vinyl proton การยืนยันโครงสร้างของ β -sitosteryl-3-O- β -glucopyranoside ได้จากการเปรียบเทียบ TLC และ ¹H NMR กับสารที่เคยแยกได้จากพืชชนิดอื่น และสอดคล้องกับข้อมูลที่มีผู้รายงานไว้^{3.2.1[11]} เนื่องจากใน ¹H NMR สเปกตรัมยังพบสัญญาณ doublet of doublets อีก 2 ชุดของ trans-disubstituted olefinic protons ที่ δ 4.91 (1H, J = 15.1, 8.4 Hz) และ 5.04 (1H, J = 15.1, 8.4 Hz) แต่ค่า integration น้อยกว่าสัญญาณอื่นๆ จึงน่าจะเป็น olefinic protons ของ stigmasteryl-3-O- β -glucopyranoside ซึ่งมีปะปนอยู่ด้วยในปริมาณน้อย สรุปได้ว่าสาร 3.2.1(7) คือ สารผสมระหว่าง β -sitosteryl-3-O- β -glucopyranoside และ stigmasteryl-3-O- β -glucopyranoside

วัสดุและวิธีการ

นำรากของ *Piper aff. pedicellatum* แห้งที่บดละเอียดแล้ว (314.5 g) มาสกัดด้วยเฮกเซนโดยใช้ Soxhlet กรองสารละลายที่ได้แล้วนำไประเหยเอาตัวทำละลายออกได้ส่วนสกัดเฮกเซน (7.44 g) สำหรับกากที่เหลือสกัดต่อด้วยเมทานอลในทำนองเดียวกันกับข้างต้นได้ส่วนสกัดเมทานอล (7.37 g)

(ก) ส่วนสกัดเฮกเซน

นำส่วนสกัดเฮกเซน (7.44 g) มาแยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟีใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจล ใช้ตัวชะเริ่มจากเฮกเซน และเฮกเซน-เอทิลอะซีเตต โดยเพิ่มปริมาณของเอทิลอะซีเตตขึ้นเรื่อยๆ รวมกลุ่มได้ 20 กลุ่ม เลือกกลุ่ม H_5 , H_9 , H_{12} , H_{14} , H_{16} และ H_{18} มาแยกสารต่อไป

กลุ่ม H_5 (193.7 mg) เป็นกลุ่มที่ออกมากับตัวชะเอทิลอะซีเตต-เฮกเซน 7:93 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้งโดยใช้ซิลิกาเจล และใช้เอทิลอะซีเตต-เฮกเซน 1.5:98.5 เป็นตัวชะ จัดกลุ่มได้ 5 กลุ่ม นำเฉพาะกลุ่มย่อย $H_{5.3}$ มาทำการแยกต่อไป

กลุ่มย่อย $H_{5.3}$ (12.6 mg) ให้ของแข็งสีขาวของสาร 3.2.1(1) mp. 93–95 °C; $[\alpha]_D^{27} +7.80^\circ$ (c 0.1025, $CHCl_3$); UV: λ_{max}^{MeOH} 261, 316, 353 nm; IR: KBr_{max} 3024, 2951, 1710, 1624, 1502, 1489, 1447, 1375, 1325, 1253, 1196, 1175, 1139, 1037, 995, 931, 880, 848, 799, 754, 724 cm^{-1} ; EIMS: m/z (rel. int.) 354 (M^+ , 30), 218 (38), 202 (14), 201 (100), 173 (18), 143 (11), 137 (27), 115 (13), 81 (26), 69 (11); HRFABMS: calcd for $C_{22}H_{26}O_4$ $[M+H]^+$, 355.1909; found: 355.1905; 1H NMR ($CDCl_3$): δ 0.84 (3H, s, 10- CH_3), 0.87 (3H, s, 9- CH_3), 0.91 (3H, s, 8- CH_3), 1.01 (1H, dd, $J = 13.1, 4.3$ Hz, H-3 α), 1.24 (1H, m, H-5 α), 1.33 (1H, m, H-6 β), 1.68 (1H, t, $J = 4.3$ Hz, H-4), 1.74 (1H, m, H-5 β), 2.00 (1H, m, H-6 α), 2.38 (1H, m, H-3 β), 4.96 (1H, dt, $J = 9.6, 2.6$ Hz, H-2), 5.96 (1H, d, $J = 15.3$ Hz, H-2'), 5.97 (2H, s, H-12'), 6.69 (1H, dd,

3.2.1(7)

$J = 15.7, 10.8 \text{ Hz, H-4'}$, $6.77 (1\text{H, } d, J = 8.2 \text{ Hz, H-10'})$, $6.80 (1\text{H, } d, J = 15.7 \text{ Hz, H-5'})$, $6.90 (1\text{H, } dd, J = 8.2, 1.5 \text{ Hz, H-11'})$, $6.98 (1\text{H, } d, J = 1.5 \text{ Hz, H-7'})$, $7.38 (1\text{H, } dd, J = 15.3, 10.8 \text{ Hz, H-3'})$; $^{13}\text{C NMR (CDCl}_3\text{): } \delta 13.5 \text{ (C-10), } 18.9 \text{ (C-8), } 19.7 \text{ (C-9), } 27.2 \text{ (C-6), } 28.1 \text{ (C-5), } 36.9 \text{ (C-3), } 45.1 \text{ (C-4), } 47.8 \text{ (C-1), } 48.9 \text{ (C-7), } 79.7 \text{ (C-2), } 101.4 \text{ (C-12'), } 105.9 \text{ (C-7'), } 108.5 \text{ (C-10'), } 121.1 \text{ (C-2'), } 122.8 \text{ (C-11'), } 124.6 \text{ (C-4'), } 130.7 \text{ (C-6'), } 139.9 \text{ (C-5'), } 144.3 \text{ (C-3'), } 148.3 \text{ (C-9')*, } 148.5 \text{ (C-8')*, } 167.5 \text{ (C-1')}; (* \text{ interchangeable each other}).$

กลุ่ม H_9 (209.0 mg) เป็นกลุ่มที่ออกมาพร้อมกับตัวชะเอทิลอะซีเตต-เฮกเซน 12:88 ถึง 18:82 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้งโดยใช้ซิลิกาเจล และใช้ตัวชะเอทิลอะซีเตต-เฮกเซน 8:92 รวมได้ 4 กลุ่ม นำเฉพาะกลุ่มย่อย $\text{H}_{9,3}$ มาทำการแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $\text{H}_{9,3}$ (100.3 mg) นำไปกรองแล้วนำมาตกผลึกด้วยคลอโรฟอร์ม-เมทานอล ได้ผลึกสีขาว (63.5 mg) ของสารผสมระหว่าง β -sitosterol และ stigmasterol [3.2.1(2)] mp. $136-138^\circ\text{C}$ TLC และ $^1\text{H NMR}$ ของสารนี้ตรงกับสารที่เคยแยกได้จากผลดีป्लीและผลข้าพลู

กลุ่ม H_{12} (293.2 mg) เป็นกลุ่มที่ออกมาพร้อมกับตัวชะเอทิลอะซีเตต-เฮกเซน 25:75 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำโดยใช้ซิลิกาเจล และใช้ตัวชะเอทิลอะซีเตต-เฮกเซน 80:20 จัดกลุ่มได้ 4 กลุ่ม นำกลุ่มย่อย $\text{H}_{12,3}$ มาทำการแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $\text{H}_{12,3}$ (44.3 mg) ให้ของแข็งสีขาวของ pellitorine [3.2.1(3)] mp. $68-70^\circ\text{C}$ TLC และ $^1\text{H NMR}$ ของสารนี้ตรงกับสารที่เคยแยกได้จากผลข้าพลู

กลุ่ม H_{14} (211.0 mg) เป็นกลุ่มที่ออกมาพร้อมกับตัวชะเอทิลอะซีเตต-เฮกเซน 25:75 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้งโดยใช้ซิลิกาเจลและใช้เอทิลอะซีเตต-เฮกเซน 20:80 เป็นตัวชะ รวมกลุ่มได้ 7 กลุ่ม นำเฉพาะกลุ่มย่อย $\text{H}_{14,4}$ มาทำการแยกสารต่อไป

3.2.1(8)

กลุ่มย่อย $H_{14.4}$ (139.2 mg) ให้ของแข็งสีขาว (13.5 mg) ของ guineensine [3.2.1 (4)] mp. 112–114 °C TLC และ 1H NMR ของสารนี้ตรงกับสารที่เคยแยกได้จากผลดีป्ली

กลุ่ม H_{16} (110.5 mg) เป็นกลุ่มที่ออกมาพร้อมกับตัวอะทิลอะซีเตต-เฮกเซน 25:75 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้งโดยใช้ซิลิกาเจลและใช้ตัวอะทิลอะซีเตต-เฮกเซน 30:70 จัดกลุ่มได้ 6 กลุ่ม นำกลุ่มย่อย $H_{16.4}$ มาทำการแยกสารต่อไป

กลุ่มย่อย $H_{16.4}$ (50.8 mg) ให้สารสีเหลืองอ่อนมีลักษณะกึ่งของแข็งของ pipermonaline [3.2.1(5)] TLC และ 1H NMR ของสารนี้ตรงกับสารที่เคยแยกได้จากผลดีป्ली

กลุ่ม H_{18} (123.0 mg) เป็นกลุ่มที่ออกมาพร้อมกับตัวอะทิลอะซีเตต-เฮกเซน 25:75 ถึง 30:70 กรองแล้วนำมาตกผลึกด้วยคลอโรฟอร์ม-เมทานอล ได้ผลึกสีเหลืองอ่อน (71.4 mg) ของ piperine [3.2.1(6)] mp. 130–132 °C TLC และ 1H NMR ของสารนี้ตรงกับสารที่เคยแยกได้จากผลดีป्ली

(ข) ส่วนสกัดเมทานอล

นำส่วนสกัดเมทานอล (7.37 g) มาแยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟีใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจล ใช้ตัวอะทิลอะซีเตต-เฮกเซน 25:75 กรองแล้วนำมาตกผลึกด้วยคลอโรฟอร์ม-เมทานอล โดยเพิ่มปริมาณของเมทานอลขึ้นเรื่อยๆ รวมกลุ่มได้ 9 กลุ่ม เลือกเฉพาะกลุ่ม M_7 มาแยกสารต่อไป

กลุ่ม M_7 (540.0 mg) เป็นกลุ่มที่ออกมาพร้อมกับตัวอะทิลอะซีเตต-เฮกเซน 25:75 นำมาทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีซ้ำอีกครั้งโดยใช้ซิลิกาเจล และใช้เมทานอล-คลอโรฟอร์ม 2:98 เป็นตัวอะทิลอะซีเตต-เฮกเซน 25:75 จัดกลุ่มได้ 15 กลุ่ม นำกลุ่มย่อย $M_{7.12}$ มาทำการแยกต่อไป

กลุ่มย่อย $M_{7.12}$ (136.8 mg) นำไปกรองแล้วนำมาตกผลึกด้วยคลอโรฟอร์ม-เมทานอล ได้ผลึกสีขาว (56.5 mg) ของสารผสมระหว่าง β -sitosteryl-3-O- β -glucopyranoside และ stigmasteryl-3-O- β -glucopyranoside [3.2.1(7)] mp. 276–278 °C; 1H NMR ($CDCl_3$ + CD_3OD): δ 0.56–0.95 (methyl protons), 3.26 (1H, m, CH-OGlu), 4.30 (1H, d, J = 7.6 Hz), 4.91 (less than 1H, dd, J = 15.1, 8.4 Hz), 5.04 (less than

3.2.1(9)

1H, *dd*, $J = 15.1, 8.4$ Hz), 5.26 (1H, *d*, $J = 4.8$ Hz). TLC และ ^1H NMR ของสารนี้ ตรงกับสารที่เคยแยกได้จากพืชชนิดอื่น

หมายเหตุ ข้อมูล ^1H NMR สำหรับสารที่เคยแยกได้จากตีปลีและข้าพหลูเคยรายงานไว้ อย่างละเอียดในรายงานวิจัยประเภททุนส่งเสริมกลุ่มวิจัย (พ.ศ. 2541-4) จึงไม่ขอก้าวซ้ำ ในที่นี้

เอกสารอ้างอิง

- 3.2.1[1] Parmar, V. S.; Jain, S. C.; Bisht, K. S.; Jain, R.; Taneja, P.; Jha, A.; Tyagi, O. D.; Prasad, A. K.; Wengel, J.; Olsen, C. E.; Boll, P.M. *Phytochemistry* 1997, **46**, 597 and references cited therein.
- 3.2.1[2] Smitinand, T. *Thai Plant Names: Botanical Names-Vernacular Names*; Funny Publishing: Bangkok, 1980; p. 265.
- 3.2.1[3] Price, S. J.; Pinder, A. R. *J. Org. Chem.* 1970, **35**, 2568.
- 3.2.1[4] Banerji, A.; Bandyopadhyay, D.; Sarkar, M.; Siddhanta, A. K.; Pal, S. C.; Ghosh, S.; Abraham, K.; Shoolery, J. N. *Phytochemistry* 1985, **24**, 279.
- 3.2.1[5] Pouchert, C. J.; Behnke, J. *The Aldrich Library of ^{13}C and ^1H FT NMR Spectra*, 3rd ed.; Aldrich Chemical Company, Inc.: U.S.A., 1993, **3**, 569A.
- 3.2.1[6] Likhitwitayawuid, K.; Ruangrunsi, N.; Lange, G. L.; Decicco, C. P. *Tetrahedron* 1987, **43**, 3689.
- 3.2.1[7] Okogun, J. I.; Ekong, E. U. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* 1974, 2195.
- 3.2.1[8] Koul, S. K.; Taneja, S. C.; Agarwal, V. K.; Dhar, K. L. *Phytochemistry* 1988, **27**, 3523.
- 3.2.1[9] Tabuneng, W.; Bando, H.; Amiya, T. *Chem. Pharm. Bull.* 1983, **31**, 3562.
- 3.2.1[10] Pouchert, C. J.; Behnke, J. *The Aldrich Library of ^{13}C and ^1H FT NMR Spectra*, 3rd ed.; Aldrich Chemical Company, Inc.: U.S.A., 1993, **2**, 1379B.
- 3.2.1[11] De Boer, J.; Backer, H. J. *Organic Syntheses Coll. Vol. 4* John Wiley, 1963, p. 943.
- 3.2.1[12] Ruangrunsi, N.; Prathanturarug, S.; Lange, G. S.; Organ, M. G. *Phytochemistry* 1992, **31**, 2397.
- 3.2.1[13] Collins, L.; Franzblau, S. G. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997, **4**, 1004.

โครงการย่อยกลุ่มที่ 3: การศึกษาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางยา

3.2 เคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางยา

โครงการวิจัยหน่วยที่ 3.2.2: มังคุด (*Garcinia mangostana* L.)

บทนำ

1. คำนำ

ในปัจจุบันมนุษย์ยังคงใช้พืชในการรักษาโรคต่างๆ และประมาณ 2 ใน 3 ของประชากรในโลกยังพึ่งสมุนไพรพื้นบ้านในการใช้เป็นยารักษาโรค พืชในสกุล *Garcinia* หลายชนิดที่ใช้เป็นยาสมุนไพรพื้นบ้าน เช่น ผลมะขวิด (*G. dulcis* (Roxb.) Kurz), มะดัน (*G. schomburgkiana* Pierre) ใช้เป็นยาแก้ไอ ละลายเสมหะ เป็นยาระบายอ่อนๆ, ใบและรากของส้มแขก (*G. atroviridis* Griff.) ใช้เป็นยาแก้ปวดหู เปลือกและผลของรงทอง (*G. lateriflora* Blume) ใช้เป็นยาแก้ท้องเสียและโรคเกี่ยวกับลำไส้ ใบชะมวง (*G. cowa* Roxb.) ใช้เป็นยาระบาย แก้ไข้ แก้กระหายน้ำ ละลายเสมหะ

2. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำวิจัย

มังคุด (*Garcinia mangostana* L.) เป็นพืชที่พบในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ นอกจากเป็นที่ทราบกันว่าผลมังคุดเป็นราชินีของผลไม้ มังคุดยังเป็นสมุนไพรพื้นบ้าน ในประเทศไทยใช้เปลือกผลรักษาบาดแผลที่เป็นหนอง แผลเปื่อย และแก้ท้องร่วง^{3.2.2[1]} จากรายงานวิจัยที่เกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากเปลือกผลมังคุดพบ prenylated xanthone เป็นส่วนใหญ่^{3.2.2[2]} ซึ่งแสดงฤทธิ์ต่าง ๆ^{3.2.2[3]} เช่น ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่าง ๆ^{3.2.2[3b]} เช่น *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Epidermophyton floccosum*, *Alternaria solani* มีสมบัติต้าน HIV-1 protease^{3.2.2[3h]} มีฤทธิ์เป็น antioxidant^{3.2.2[3i]} เป็นต้น แต่ไม่มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านวัณโรคของสารที่ได้จากมังคุด

3. วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านวัณโรคต่อเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเปลือกผล และเนื้อและเมล็ดของผลมังคุด

4. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับ tuberculostatic effect ของ non-prenylated xanthone ที่ได้จาก การสังเคราะห์ และธรรมชาติ^{3.2.2[4]} Farhm และคณะ ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้าง และฤทธิ์ทางชีวภาพ ระหว่าง ^{13}C NMR chemical shifts, lipophilicity และ molar refractivities กับฤทธิ์ต้านวัณโรคของ non-prenylated xanthone ชนิดต่างๆที่ได้จากการสังเคราะห์^{3.2.2[5]} แต่ไม่มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านวัณโรคของ prenylated xanthone

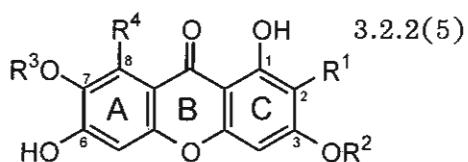
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

แซนโทน 3.2.2(1)-3.2.2(2), 3.2.2(5)-3.2.2(6), 3.2.2(9)-3.2.2(11) และ 3.2.2(14)-3.2.2(15) แยกได้จากเปลือกผลมังคุดดิบในงานวิจัยที่แล้ว^{3.2.2[6]} แซนโทน γ -mangostin [3.2.2(3)],^{3.2.2[3h]} garcinone D [3.2.2(4)],^{3.2.2[7]} mangostanin [3.2.2(8)]^{3.2.2[8]} และ 1,7-dihydroxy-2-(3-methylbut-2-enyl)-3-methoxyxanthone [3.2.2(12)]^{3.2.2[1]} สามารถแยกได้เพิ่มเติมจากการแยกและทำสารให้บริสุทธิ์ต่อเนื่องของส่วนสกัด MeOH ของเปลือกผลมังคุดดิบสด และสามารถแยกแซนโทน 3.2.2(7),^{3.2.2[9]} 3.2.2(13)^{3.2.2[1]} และ 3.2.2(1)^{3.2.2[6]} จากส่วนสกัด MeOH ของเนื้อและเมล็ดของผลมังคุดดิบสด

จากการนำ prenylated xanthone ทั้ง 15 ชนิดคือ 3.2.2(1)-3.2.2(15) ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* สายพันธุ์ H37Ra โดยวิธี Microplate Alamar Blue Assay (MABA)^{3.2.2[10]} ข้อมูล MIC ของแซนโทน 15 ชนิด ซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 3.2.2(1) พบว่าแซนโทนที่มีฤทธิ์ antimycobacterial ในระดับปานกลางถึงระดับสูง ควรเป็นแซนโทนชนิด tri- หรือ tetra-oxygenated ที่มีสายโซ่ข้าง C₅ 2 หมู่ หรือมีสายโซ่ข้าง C₅ 1 หมู่ และหมู่ modified C₅ 1 หมู่ ที่วง A และ C ดังนั้น แซนโทนชนิด 1,3,6,7-tetraoxygenated ที่มีสายโซ่ข้าง C₅ ที่ C-2 และ C-8 ใน α -mangostin [3.2.2(1)] ซึ่งเป็นสารหลัก, β -mangostin [3.2.2(2)] และ garcinone B [3.2.2(6)] แสดงฤทธิ์ antimycobacterial สูงสุดเท่ากันที่ค่า MIC 6.25 μ g/ml γ -mangostin [3.2.2(3)] ซึ่งเป็นสารหลักอันดับสองมีหมู่ไฮดรอกซิลที่ C-3 และ C-7 มีฤทธิ์ antimycobacterial ลดลง แสดงว่า methylation ที่หมู่ 3- และ 7-ไฮดรอกซิล มีผลต่อการเพิ่มฤทธิ์ยับยั้ง *M. tuberculosis* เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรโครงสร้างกับฤทธิ์ยับยั้ง *M. tuberculosis* ของสาร 3.2.2(1) กับ 3.2.2(4) และ mangostenol [3.2.2(5)] พบว่าหมู่ modified C₅ ที่ C-8 หรือ C-2 ทำให้ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรคเปลี่ยนแปลง นอกจากนี้การปิดวงของหมู่ C₅ ที่ตำแหน่ง C-2 ทำให้ฤทธิ์ยับยั้ง *M. tuberculosis* ลดลง ดังตัวอย่างใน 3.2.2(7), mangostanin [3.2.2(8)] และ mangostanol [3.2.2(9)] เป็นที่สังเกตพบว่า การเพิ่มความเป็นขั้วของสายโซ่ข้าง C₅ มีผลทำให้มีฤทธิ์ลดลง และการเพิ่มหมู่ C₅ หมู่ที่ 3 ใน mangostenone A [3.2.2(10)] และ tovophyllin B [3.2.2(11)] เมื่อเปรียบเทียบกับ garcinone B [3.2.2(6)] และ 3.2.2(7) ทำให้ฤทธิ์ลดลงเช่นกัน ในกรณีของแซนโทนชนิด 1,3,7-trioxygenated นั้น แซนโทน 3.2.2(12) ซึ่งมีหมู่ C₅ เพียงหมู่เดียวที่ C-2 พบว่าไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *M. tuberculosis* เลย เมื่อเทียบกับ demethylcalabaxanthone [3.2.2(13)] ซึ่งมีฤทธิ์ปานกลาง แสดงว่าสายโซ่ข้าง C₅ 2 หมู่ใน

3.2.2(4)

นิวเคลียสแซนโทนมีความสำคัญต่อฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *M. tuberculosis* ความสำคัญของสายโซ่ข้าง C_5 2 หมู่ในนิวเคลียสยังปรากฏในแซนโทนชนิด 1,3,5-trioxygenated นั่นคือ trapezifolixanthone [3.2.2(14)] มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *M. tuberculosis* ดีกว่า mangostinone [3.2.2(15)] มาก

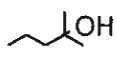


pre : 3,3-dimethylallyl
ger : geranyl

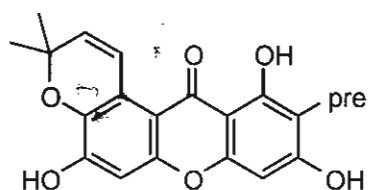
3.2.2(1) : $R^1 = R^4 = \text{pre}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{Me}$

3.2.2(2) : $R^1 = R^4 = \text{pre}$, $R^2 = R^3 = \text{Me}$

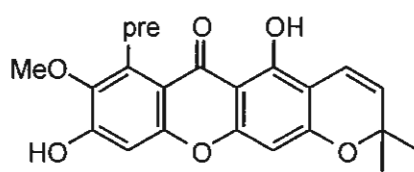
3.2.2(3) : $R^1 = R^4 = \text{pre}$, $R^2 = R^3 = \text{H}$

3.2.2(4) : $R^1 = \text{pre}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{Me}$, $R^4 =$ 

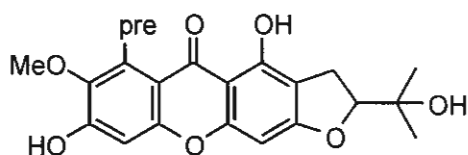
3.2.2(5) : $R^1 =$ **, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{Me}$, $R^4 = \text{pre}$**



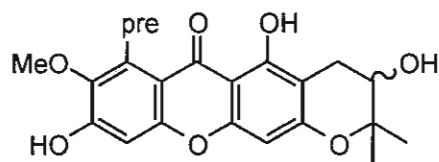
3.2.2(6)



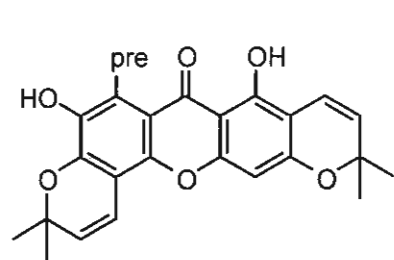
3.2.2(7)



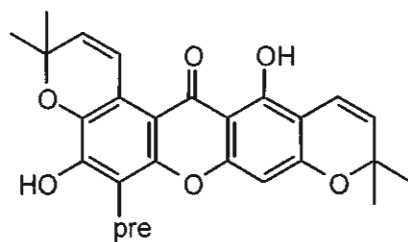
3.2.2(8)



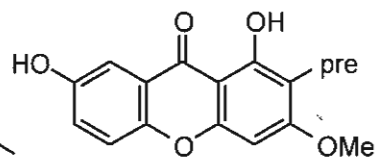
3.2.2(9)



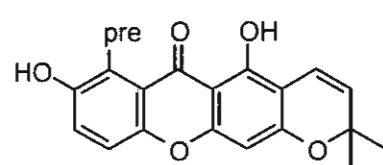
3.2.2(10)



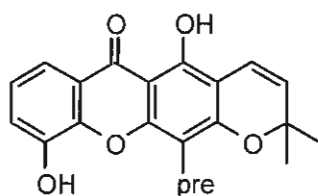
3.2.2(11)



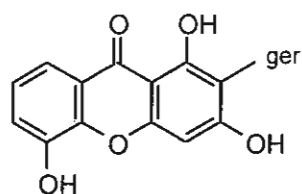
3.2.2(12)



3.2.2(13)



3.2.2(14)



3.2.2(15)

ตารางที่ 3.2.2(1) ค่า MIC ($\mu\text{g/ml}$) ของสาร 3.2.2(1)– 3.2.2(15) ต่อเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis*

สาร	3.2.2(1)	3.2.2(2)	3.2.2(3)	3.2.2(4)	3.2.2(5)	3.2.2(6)	3.2.2(7)	3.2.2(8)	3.2.2(9)	3.2.2(10)	3.2.2(11)	3.2.2(12)	3.2.2(13)	3.2.2(14)	3.2.2(15)
MIC	6.25	6.25	25	25	100	6.25	12.5	25	200	25	25	inactive*	12.5	12.5	200

* Inactive at $>200 \mu\text{g/ml}$.

3.2.2(6)

วัสดุและวิธีการ

การสกัด การแยกและทำสารให้บริสุทธิ์ของเปลือกผล

จากการแยกและทำสารให้บริสุทธิ์ต่อเนื่องของส่วนสกัด MeOH ของเปลือกผล มังคุดดิบสด สามารถแยกแซนโทนได้เพิ่มขึ้น 4 ชนิด ดังนี้

สารกลุ่ม 9 เมื่อนำมารีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (silica gel, ชะด้วย CHCl_3 เพิ่มความเป็นขั้วด้วย MeOH ตั้งแต่ 0.5 ถึง 100%) สามารถแยกได้ 16 กลุ่มย่อย

กลุ่มย่อย 9.9 นำมาแยกต่อโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (silica gel, ชะด้วย CHCl_3 เพิ่มความเป็นขั้วด้วย MeOH ตั้งแต่ 0.2% ถึง 100%) ได้สารอีก 8 กลุ่มย่อย

กลุ่มย่อย 9.9.4 นำมาทำการแยกต่อโดยโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง (10% acetone- CHCl_3 3 ครั้ง) ได้ mangostanin [3.2.2(8)] (7 mg, R_f 0.59), 3.2.2 (12) (2 mg, R_f 0.78)

สารกลุ่ม 10 เมื่อนำมาทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ (silica gel, ชะด้วย CHCl_3 เพิ่มความเป็นขั้วด้วย MeOH) สามารถแยกได้ γ -mangostin [3.2.2(3)] (100 mg), garcinone D [3.2.2(4)] (10 mg), mangostanol [3.2.2(9)] (8 mg) ที่ระบบตัวชะ 2.5% MeOH- CHCl_3 , 3% MeOH- CHCl_3 และ 6% MeOH- CHCl_3 ตามลำดับ

γ -Mangostin [3.2.2(3)] : ของแข็งสีเหลือง (100 mg) mp. 190–192 °C; IR: $\nu_{\max}$ 3414, 2966, 2925, 1645, 1615, 1588, 1458, 1283, 1228, 1197, 1169, 1078 cm^{-1} ; ข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR สอดคล้องกับที่มีผู้รายงานไว้^{3.2.2[3b]}

Gacinone D [3.2.2(4)] : ของแข็งสีเหลือง (10 mg) mp. 202–204 °C; ข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR สอดคล้องกับที่มีผู้รายงานไว้^{3.2.2[7]} EIMS: m/z (% rel. intensity) 428 [M^+] (16), 410 (25), 367 (35), 355 (39), 339 (100), 313 (46), 297 (19), 285 (10)

Mangostanin [3.2.2(8)] : ของแข็งสีเหลือง (7 mg) mp. 201–203 °C; $[\alpha]_D^{29}$ -18.6 (c = 0.075, CHCl_3); UV: $\lambda_{\max}$ (EtOH) 246, 275, 319, 439 nm; IR: $\nu_{\max}$ 3421, 2974, 2927, 2855, 1663, 1653, 1611, 1576, 1465, 1284, 1147, 1171, 1097 cm^{-1} ; ^1H NMR^{3.2.2[8]} ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$): δ 13.70 (H-1), 6.65 (1H, s, H-5), 6.11 (1H, s, H-4), 5.17 (1H, br t, H-17), 4.68 (1H, t, J = 8.4 Hz, H-12), 4.00 (2H, d, J = 6.0 Hz, H-16), 3.70 (3H, s, OMe), 3.05 (2H, m, H-11), 1.75 (3H, s, H-20), 1.67 (3H, s, H-19), 1.25 (3H, s, H-15), 1.16 (3H, s, H-14); ^{13}C -NMR ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$): δ 181.9 (C-9), 166.0 (C-3), 157.3 (C-1), 156.9 (C-

3.2.2(8)

4a), 155.7 (C-6), 155.4 (C-10a), 143.1 (C-7), 137.1 (C-8), 131.7 (C-18), 123.2 (C-17), 111.3 (C-8a), 107.2 (C-2), 103.8 (C-9a), 101.0 (C-5), 91.5 (C-12), 88.0 (C-4), 71.6 (C-13), 61.0 (OMe), 26.6 (C-11), 26.1 (C-16), 25.6 (C-19), 25.2 (C-15), 23.8 (C-14), 17.9 (C-20); FABMS(-ve): m/z (% rel. intensity) 425 $[M-H]^-$ (100); HR-FABMS: m/z 426.1736 (คำนวณสำหรับ $C_{24}H_{26}O_7$ 426.1678)

1,7-Dihydroxy-2-(3-methylbut-2-enyl)-3-methoxyxanthone [3.2.2(12)]: ของแข็งสีเหลือง (2 mg) mp. 217-219 °C (d); IR: ν_{max} 3448, 2963, 2926, 1654, 1649, 1609, 1578, 1477, 1234, 1172 cm^{-1} ; 1H NMR^{3.2.2[1]} (acetone- d_6): δ 13.11 (1H, s, H-1), 9.03 (1H, s, OH-7), 7.59 (1H, d, J = 2.8 Hz, H-8), 7.47 (1H, d, J = 9.0 Hz, H-5), 7.37 (1H, dd, J = 9.0, 2.8 Hz, H-6), 6.62 (1H, s, H-4), 5.20 (1H, t, J = 7.1 Hz, H-12), 4.00 (3H, s, OMe), 3.33 (2H, d, J = 7.1 Hz, H-11), 1.77 และ 1.63 (2x3H, 2s, H-19 และ H-20); ^{13}C -NMR (acetone- d_6): δ 181.5 (C-9), 165.3 (C-3), 160.0 (C-1), 157.2 (C-4a), 154.8 (C-7), 150.7 (C-8a), 131.7 (C-13), 125.1 (C-6), 123.0 (C-12), 121.8 (C-10a), 119.7 (C-5), 111.8 (C-2), 109.2 (C-8), 104.2 (C-9a), 90.6 (C-4), 56.6 (OMe), 25.8 (C-14), 21.8 (C-11), 17.8 (C-15); EIMS: m/z (% rel. intensity) 326 $[M]^+$ (5), 311 (8), 283 (62), 272 (18), 271 (100), 258 (7), 241 (18), 229 (7), 213 (7).

การสกัด การแยก และทำสารให้บริสุทธิ์ของเนื้อ (arils) และ เมล็ด

ทำการสกัดเนื้อ (arils) และ เมล็ดของผลมังคุดดิบสดที่บดแล้ว (4.70 kg จาก จังหวัดจันทบุรี) ด้วย MeOH ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 1 เดือน จำนวน 3 ครั้ง ได้ส่วนสกัด MeOH (487.0 g) นำมา partition ด้วย $CHCl_3$ และน้ำ ได้ส่วนสกัด $CHCl_3$ (11.3 g)

นำส่วนสกัด $CHCl_3$ (11.3 g) มาแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (silica gel, $CHCl_3$, Acetone และ MeOH) ได้สาร 28 กลุ่ม

สารกลุ่ม 3 คือ demethylcalabaxanthone หรือ 1,7-Dihydroxy-8-(3-methylbut-2-enyl)-6',6'-dimethylpyrano(2',3':3,2)xanthone [3.2.2(13)]: ของแข็งสีเหลือง (80 mg); IR: ν_{max} 3438, 2975, 2918, 1647, 1608, 1488, 1465, 1458, 1317, 1254, 1171, 1144, 1113, 1087 cm^{-1} ; ข้อมูล 1H NMR สอดคล้องกับที่มีผู้รายงานไว้;^{3.2.2[1]} ^{13}C -NMR ($CDCl_3$ + CD_3OD): δ 183.4 (C-9), 160.1 (C-3), 157.6 (C-1), 156.6 (C-4a), 151.5 (C-10a), 151.1 (C-7), 132.7 (C-8), 128.2 (C-

3.2.2(9)

18), 127.2 (C-12), 123.0 (C-6), 122.7 (C-17), 118.9 (C-8a), 116.1 (C-5), 115.7 (C-11), 104.1 (C-2), 94.4 (C-9a), 94.1 (C-4), 78.0 (C-13), 28.3 (C-14 และ C-15), 25.9 และ 18.1 (C-19 และ C-20), 25.7 (C-16)

สารกลุ่ม 4 นำมาแยกต่อโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (silica gel, 20% CHCl₃, acetone, MeOH) ได้ 1,6-Dihydroxy-7-methoxy-8-(3-methylbut-2-enyl)-6',6'-dimethylpyrano(2',3':3,2)xanthone [3.2.2(7)]: ขงแข็งสีเหลือง (180 mg) mp. 152-154 °C; ข้อมูล ¹H NMR และ ¹³C NMR สอดคล้องกับที่มีผู้รายงานไว้^{3.2.2[9]}

สารกลุ่ม 10 คือ α-mangostin [3.2.2(1)] (1.31 g) จากการใช้ตัวชะ 20% CHCl₃-acetone ข้อมูล ¹H NMR และ ¹³C NMR สอดคล้องกับที่มีผู้รายงานไว้^{3.2.2[6]}

3.2.2(10)

เอกสารอ้างอิง

- 3.2.2[1] Mahabusarakam, W.; Wiriyachitra, P.; Taylor, W. C. *J. Nat. Prod.* 1987, **50**, 474.
- 3.2.2[2] a) Pares, V.; Nagem, T. J.; de Oliveira, F. F. *Phytochemistry*, 2000, **55**, 683; Pares, V.; b) Nagem, T. J. *Phytochemistry* 1997, **44**, 191.
- 3.2.2[3] a) Iinuma, M.; Tosa, H.; Tanaka, T.; Asai, F.; Kobayashi, Y.; Shimano, R.; Miyauchi, K. I. *J. Pharm. Pharmacol.* 1996, **48**, 861; b) Sundaram, B. M.; Gopalakrishnan, G.; Subramanian, S.; Shankaranarayanan, D.; Kameswaran, L. *Planta Med.* 1983, **48**, 59; c) Mahabusarakam, W.; Wiriyachitra, P.; Phongpaichit, S. *J. Sci. Soc. Thailand* 1986, **12**, 239; d) Gopalakrishnan, G.; Banumathi, B.; Suresh, G. *J. Nat. Prod.* 1997, **60**, 519; e) Sakai, S. I.; Katsura, M.; Takayama, H.; Aimi, N.; Chokethaworn, N.; Suttajit, M. *Chem. Pharm. Bull.* 1993, **41**, 958; f) Tosa, H.; Iinuma, M.; Tanaka, T.; Nozaki, H.; Ikeda, S.; Tsutsui, K.; Tsutsui, K.; Yamada, M.; Fujimori, S. *Chem. Pharm. Bull.* 1997, **45**, 418; g) Chairungsrilerd, N.; Furakawa, K. I.; Ohta, T.; Nozoe, S.; Ohizumi, Y. *Planta Med.* 1996, **62**, 471; h) Chen, S. X.; Wan, M.; Loh, B. N. *Planta Med.* 1996, **62**, 381; i) Fan, C.-T.; Su, J.-D. *Chem. Abstr.* 1998, **128**, 47537.
- 3.2.2[4] a) Ghosal, S.; Biswas, K.; Chaudhuri, R. K. *J. Pharm. Sci.* 1978, **67**, 721; b) Hatsuda, Y.; Kuyama, S. *Chem. Abstr.* 1959, **53**, 16125; c) Goldberg, A. A.; Walker, H. A. *J. Chem. Soc.* 1953, 1348.
- 3.2.2[5] a) Schaper, K.-J.; Pickert, M.; Frahm, A. W. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 1999, **332**, 91; b) Hambloch, H.; Frahm, A. W.; Weidemann, B. *Eur. J. Med. Chem.* 1985, **20**, 71.
- 3.2.2[6] Suksamrarn, S.; Suwannapoch, N.; Ratananukul, P.; Aroonrerk, N.; Suksamrarn, A. *J. Nat. Prod.* 2002, **65**, 761.
- 3.2.2[7] a) Sen, A. K.; Sarkar, K. K.; Majumder, P. C.; Banerji, N. *Indian J. Chem.* 1986, **25B**, 1157; b) Bennett, G. J.; Harrison, L. J.; Sia, G.-L.; Sim, K.-Y. *Phytochemistry* 1993, **32**, 1245.
- 3.2.2[8] Nilar; Harrison, L. J. *Phytochemistry* 2002, **60**, 541.