

วิธีการทดลองและผลการทดลอง

การเตรียมตัวอย่างฟ้าทะลายโจร และการสกัด Andrographolide จากต้นฟ้าทะลายโจร

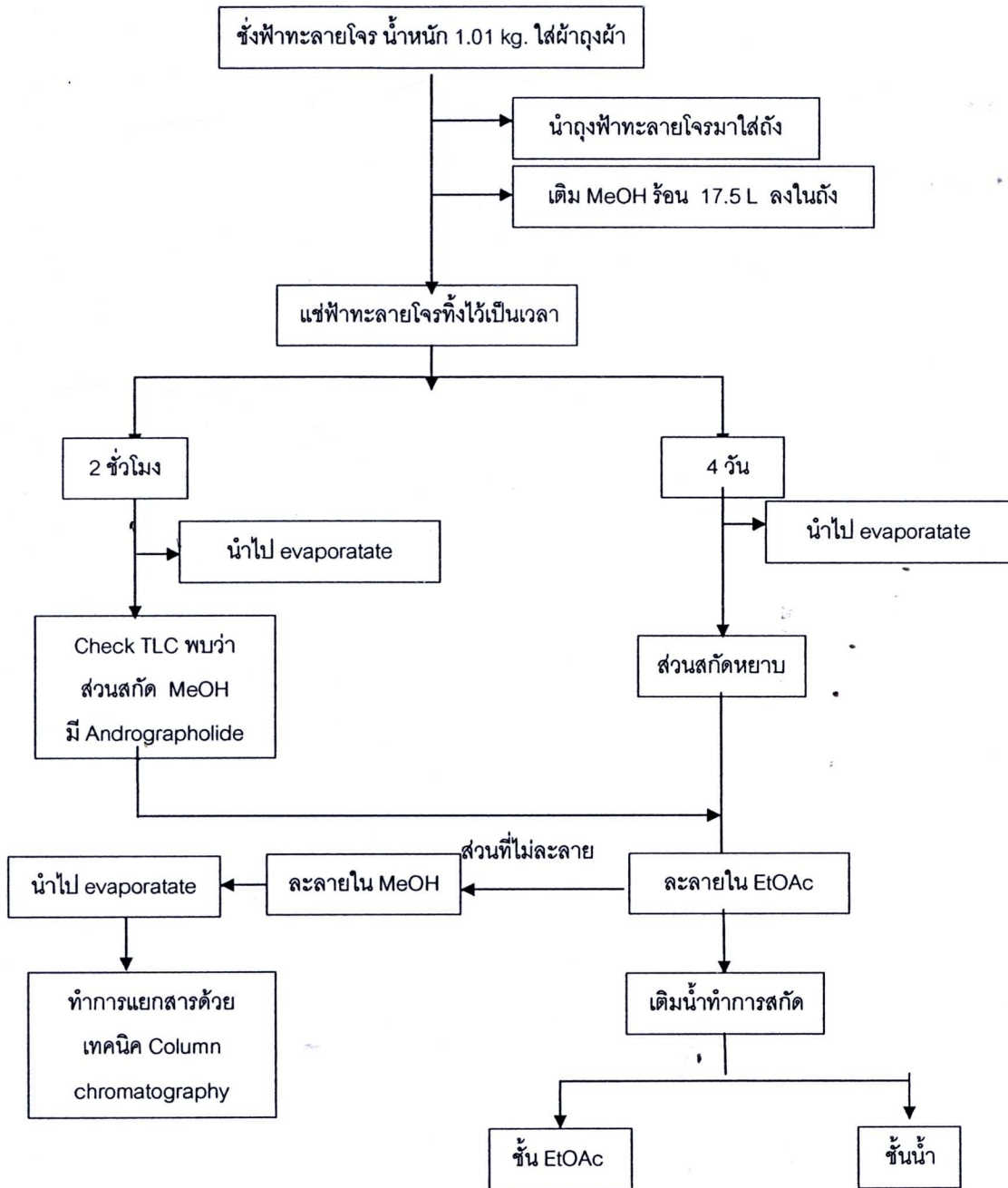
พืชสมุนไพร : ฟ้าทะลายโจร ส่วนเหนือดินและราก เก็บในช่วง 110 วัน ซึ่งผ่านการตากและอบแห้ง

แหล่งที่มา : ตำบลยางหัก อำเภอบางบาล จังหวัดราชบุรี

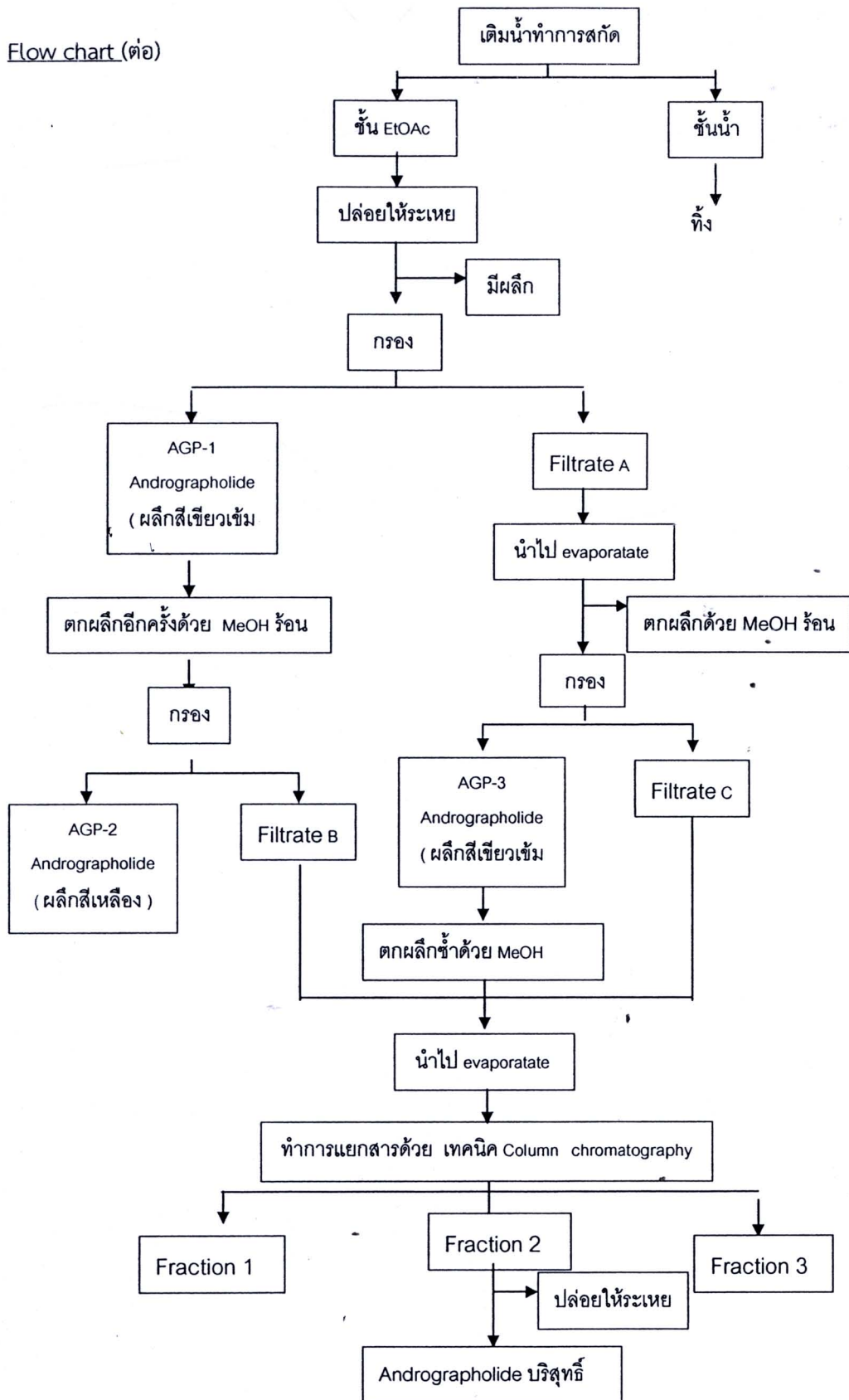
นำต้นฟ้าทะลายโจรน้ำหนัก 1.01 kg บรรจุลงในถุงผ้าดิบ และนำไปใส่ในถังสกัด ทำการสกัดด้วย Methanol ร้อน ปริมาตร 17.5 L แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 4 วัน ทำการตรวจสอบสารสกัดด้วย TLC เทียบกับสาร Andrographolide มาตรฐาน โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 70% EtOAc : Hexane แล้วนำมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator จะได้ ส่วนสกัดหยาบฟ้าทะลายโจร จากนั้นนำส่วนสกัดหยาบที่ได้มาละลายด้วย Ethyl acetate พบว่ามีทั้งส่วนที่ละลายและไม่ละลาย จากนั้นนำส่วนที่ไม่ละลายใน Ethyl acetate มาละลายด้วย Methanol แล้วนำมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator และทำการแยกสารด้วยเทคนิค Column chromatography นำส่วนที่ละลายใน Ethyl acetate มาสกัดด้วยน้ำ นำขึ้น Ethyl acetate มาระเหยให้ปริมาณตัวทำละลายน้อยลง พบว่ามีผลึกเกิดขึ้นซึ่งเมื่อนำมารองจะได้ผลึกสีเขียวเข้ม (AGP-1) และ Filtrate A จากนั้นนำผลึก Andrographolide สีเขียวเข้ม (AGP-1) มาตกผลึกซ้ำด้วย Methanol ร้อน แล้วทำการกรองจะได้ผลึก Andrographolide สีเหลือง (AGP-2) และ Filtrate B จากนั้นนำ Filtrate A มาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator และตกผลึกด้วย Methanol ร้อน แล้วทำการกรองจะได้ผลึกสีเขียวเข้ม และ Filtrate C นำผลึก Andrographolide สีเขียวเข้ม (AGP-3) มาตกผลึกซ้ำด้วย Methanol ร้อน แล้วนำไปรวมกับ Filtrate B และ C นำมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ทำการแยกสารด้วยเทคนิค Column chromatography ตรวจสอบแต่ละ fraction ด้วย TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 70% EtOAc : Hexane ทำการรวม fraction ที่มี R_f เท่ากัน แล้วระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator พบว่าได้สารออกมา 3 fraction คือ f.1, f.2 และ f.3

จากการตรวจสอบด้วย TLC พบว่าสาร f.1 และ f.3 ไม่มีสาร Andrographolide ที่เราสนใจ ส่วนใน f.2 มีสาร Andrographolide อยู่ จึงนำไประเหยตัวทำละลายออก แล้วนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง vacuum pump พบว่า f.2 ได้สาร andrographolide บริสุทธิ์ 1 หนัก 5.8961 g

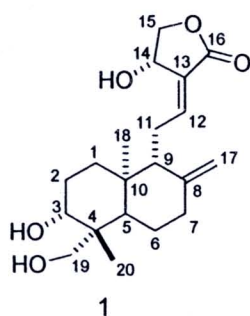
แผนผังวิธีการสกัด Andrographolide จากต้นฟ้าทะลายโจร



Flow chart (ต่อ)



นำสาร andrographolide 1 ที่สกัดแยกได้บริสุทธิ์จากต้นฟ้าทะลายโจรไปพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยเทคนิค NMR-spectroscopy แสดงได้ดังรูป



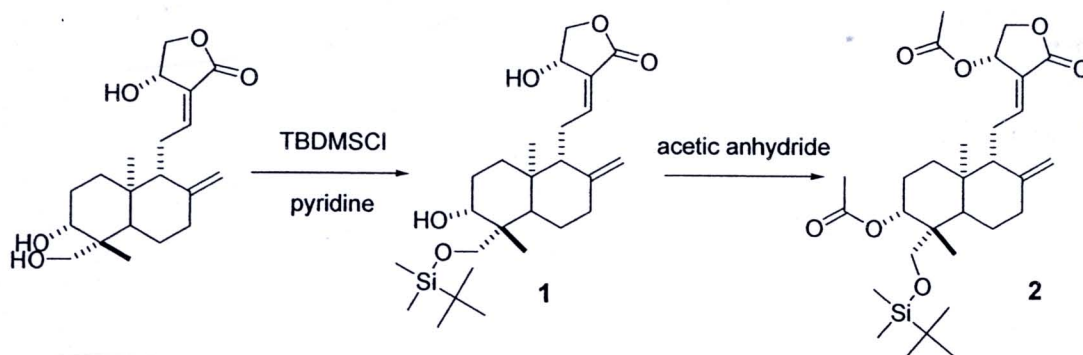
ข้อมูลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของ andrographolide

Andrographolide 1 : $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOD) : δ 0.77 (3H, s, H-20), 1.24 (3H, s, H-18), 1.37 (4H, m, H-1, H-6), 1.83 (3H, m, H-2, H-5), 2.01 (2H, m, H-7a, H-7b), 2.45 (1H, m, H-9), 2.62 (2H, m, H-11), 3.33 (1H, d, $J = 11.0$ Hz, H-19b), 3.40 (1H, m, H-3), 4.14 (1H, d, $J = 11.0$ Hz, H-19a), 4.18 (1H, dd, $J = 10.0, 1.0$ Hz, H-15b), 4.48 (1H, dd, $J = 10.0, 6.0$ Hz, H-15a), 4.69 (1H, s, H-17b), 4.89 (1H, s, H-17a), 5.03 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-14), 6.87 (1H, t, $J = 6.0$ Hz, H-12)

$^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, MeOD) : δ 14.14 (C-20), 21.98 (C-18), 23.81 (C-11), 24.31 (C-6), 27.63 (C-2), 36.73 (C-1), 37.57 (C-7), 38.57 (C-10), 42.28 (C-4), 54.92 (C-5), 56.00 (C-9), 63.58 (C-19), 65.25 (C-14), 74.75 (C-15), 79.52 (C-3), 107.83 (C-17), 128.40 (C-13), 147.37 (C-8), 147.96 (C-12), 171.26 (C-16)

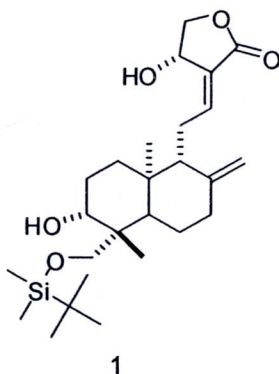
ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันของ andrographolide

1. ปฏิกิริยาของ Andrographolide และ TBDMSCl



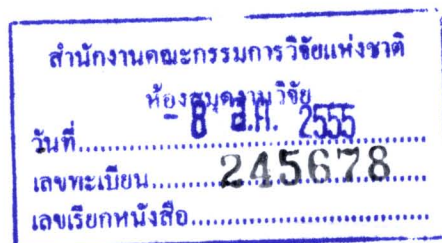
นำ Andrographolide (0.0100 g, 0.03 mmol) ใส่ลงในหลอดทำปฏิกิริยา เติม pyridine 200 μ L คนด้วย magnetic stirrer จนสาร 1 ละลายหมด หลังจากนั้นเติม TBDMSCl (50 mg, 0.33 mmol) และคนต่อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (ทำการตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 50% EtOAc : Hexane) หยุดปฏิกิริยาทำโดยการสกัดด้วย EtOAc ล้างด้วย H_2O และ sat. NaCl ทำให้แห้งด้วย anh. Na_2SO_4 กรองและระเหยตัวทำละลาย ทำให้แห้งด้วยเครื่อง vacuum pump และนำ crude product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 50% EtOAc : Hexane ระเหยตัวทำละลาย ทำให้แห้งด้วยเครื่อง vacuum pump ได้สาร 1 น้ำหนัก 0.0122 g (92% yield) มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว นำสาร 1 ที่สังเคราะห์ได้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยเทคนิค NMR--spectroscopy

ข้อมูลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ 1



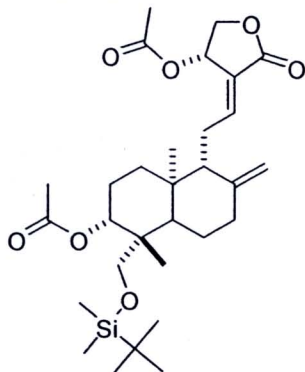
Compound 1 : $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ 0.05 (3H, s, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 0.06 (3H, s, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 0.70 (3H, s, H-20), 0.88 (9H, s, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 1.22 (3H, s, H-18), 1.23-1.33 (4H, m, H-1, H-6), 1.64-2.05 (5H, m, H-2, H-5, H-7), 2.40 (1H, dt, $J = 8.0, 3.0$ Hz, H-9), 2.49 (1H, ddd, $J = 16.0, 11.0, 6.5$ Hz, H-11a), 2.59 (1H, ddd, $J = 16.0, 7.5, 3.0$ Hz, H-11b), 3.30 (1H, dd, $J = 11.5, 4.0$ Hz, H-3), 3.38 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-19a), 4.18 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-19b), 4.23 (1H, dd, $J = 10.5, 2.0$ Hz, H-15a), 4.44 (1H, dd, $J = 10.5, 6.5$ Hz, H-15b), 4.59 (1H, brs, H-17a), 4.87 (1H, brs, H-17b), 5.01 (1H, brd, $J = 6.0$ Hz, H-14), 6.94 (1H, td, $J = 6.0, 1.0$ Hz, H-12)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) : δ -1.10 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 15.45 (C-20), 18.03 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 23.14 (C-18), 23.84 (C-6), 24.63 (C-11), 25.74 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 28.57 (C-2), 37.12 (C-1), 37.76 (C-7), 38.94 (C-10), 42.46 (C-4), 55.24 (C-5), 56.06 (C-9), 65.21 (C-19), 66.04 (C-14), 74.37 (C-15), 80.18 (C-3), 108.73 (C-17), 128.09 (C-13), 146.53 (C-8), 148.60 (C-12), 170.09 (C-16)



นำสาร TBS-Andrographolide 1 (0.0789 g, 0.17 mmol) ใส่ลงในหลอดทำปฏิกิริยา เติม acetic anhydride 1 mL คนด้วย magnetic stirrer และให้ความร้อนปฏิกิริยา 70°C คนต่อเป็นเวลา 18 ชั่วโมง (ทำการตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 30% EtOAc : Hexane ทุก 1 ชั่วโมง สังเกตจนสารตั้งต้นหมดจึงหยุดปฏิกิริยา) หยุดปฏิกิริยาทำโดยการสกัดด้วย EtOAc เติมสารละลายอิ่มตัว NaHCO₃ ล้างด้วย H₂O และ sat. NaCl ทำให้แห้งด้วย anh. Na₂SO₄ กรองและระเหยตัวทำละลาย ทำให้แห้งด้วยเครื่อง vacuum pump และนำ crude product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 30% EtOAc : Hexane ระเหยตัวทำละลาย ทำให้แห้งด้วยเครื่อง vacuum pump ได้สาร 2 น้ำหนัก น้ำหนัก 0.0406 g (44% yield) มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน นำสาร 2 ที่สังเคราะห์ได้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยเทคนิค NMR-spectroscopy

ข้อมูลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ 2

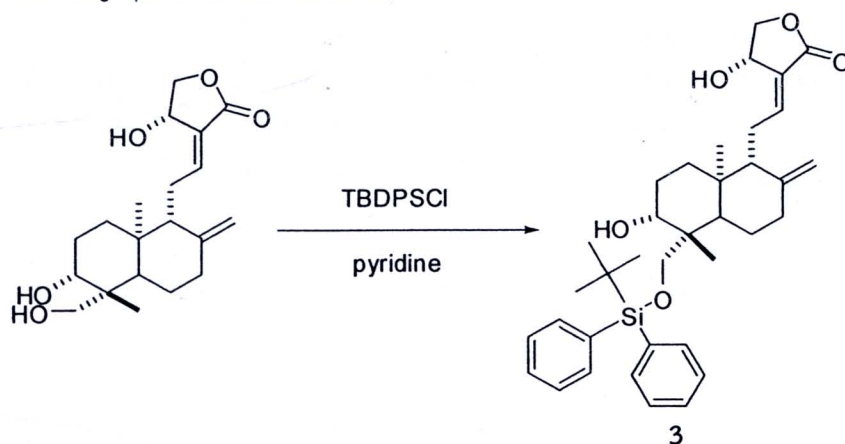


2

Compound 2 : ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 0.05 (6H, s, Si(CH₃)₂), 0.81 (3H, s, H-20), 0.89 (9H, s, SiC(CH₃)₃), 0.94 (3H, s, H-18), 1.24-1.36 (4H, m, H-1, H-6), 1.60-1.96 (5H, m, H-2, H-5, H-7), 2.05 (3H, s, COCH₃), 2.12 (3H, s, COCH₃), 2.32-2.44 (2H, m, H-11), 2.48 (1H, ddd, *J* = 16.5, 6.5, 3.0 Hz, H-9), 3.60 (1H, d, *J* = 10.5 Hz, H-19a), 3.82 (1H, d, *J* = 10.5 Hz, H-19b), 4.24 (1H, dd, *J* = 11.0, 1.5 Hz, H-15a), 4.49 (1H, brs, H-17a), 4.54 (1H, dd, *J* = 11.0, 6.0 Hz, H-15b), 4.58 (1H, dd, *J* = 11.0, 5.5 Hz, H-3), 4.88 (1H, brs, H-17b), 5.92 (1H, d, *J* = 6.0 Hz, H-14), 7.02 (1H, td, *J* = 7.0, 1.5 Hz, H-12)

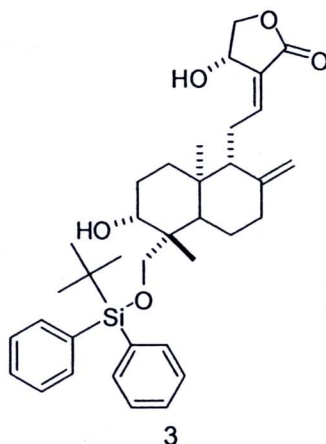
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) : δ -1.10 (Si(CH₃)₂), 14.37 (C-20), 18.25 (SiC(CH₃)₃), 20.73 (COCH₃), 21.27 (COCH₃), 23.30 (C-18), 24.40 (C-11), 25.32 (C-6), 25.89 (SiC(CH₃)₃), 29.36 (C-2), 37.40 (C-1), 38.27 (C-7), 39.05 (C-10), 42.47 (C-4), 55.57 (C-5), 56.11 (C-9), 63.73 (C-14), 67.85 (C-19), 71.59 (C-15), 80.12 (C-3), 108.36 (C-17), 123.83 (C-13), 147.31 (C-8), 150.63 (C-12), 169.08 (C-16), 170.51 (COCH₃), 170.76 (COCH₃)

3. ปฏิกิริยาของ Andrographolide และ TBDPSCI



นำ Andrographolide (0.0100 g, 0.03 mmol) ใส่ลงในหลอดทำปฏิกิริยา เติม pyridine 200 μ L คนด้วย magnetic stirrer หลังจากนั้นเติม TBDPSCI (100 μ L, 0.39 mmol) และคนต่อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (ทำการตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 50% EtOAc : Hexane) หยุดปฏิกิริยาทำโดยการสกัดด้วย EtOAc ล้างด้วย H₂O และ sat. NaCl ทำให้แห้งด้วย anhyd. Na₂SO₄ กรองและระเหยตัวทำละลาย ทำให้แห้งด้วยเครื่อง vacuum pump และนำ crude product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 50% EtOAc : Hexane ระเหยตัวทำละลาย ทำให้แห้งด้วยเครื่อง vacuum pump ได้สาร 3 น้ำหนัก 0.0171 g (100% yield) มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดใส นำสาร 6 ที่สังเคราะห์ได้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยเทคนิค NMR-spectroscopy

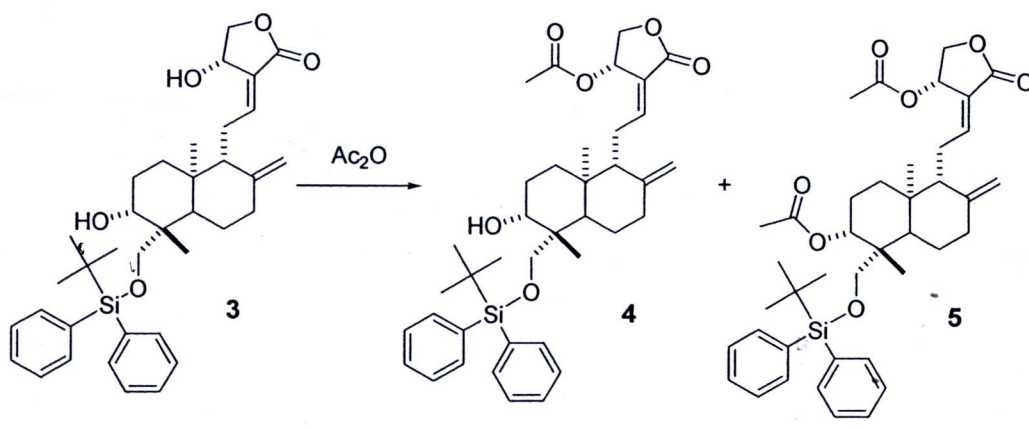
ข้อมูลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ 3



Compound 3 : ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 0.45 (3H, s, H-20), 1.04 (9H, s, SiC(CH₃)₃), 1.12-1.28 (4H, m, H-1, H-6), 1.31 (3H, s, H-18), 1.57-1.94 (5H, m, H-2, H-5, H-7), 2.29 (1H, ddd, J = 12.0, 3.5, 2.0 Hz, H-9), 2.43 (1H, ddd, J = 16.0, 11.0, 6.5 Hz, H-11a), 2.52 (1H, ddd, J = 16.0, 7.5, 3.0 Hz, H-11b), 3.35 (1H, dd, J = 12.0, 4.0 Hz, H-3), 3.37 (1H, d, J = 10.0 Hz, H-19a), 4.17 (1H, d, J = 10.0 Hz, H-19b), 4.22 (1H, dd, J = 10.5, 2.0 Hz, H-15a), 4.42 (1H, dd, J = 10.5, 6.0 Hz, H-15b), 4.51 (1H, brs, H-17a), 4.78 (1H, brs, H-17b), 4.98 (1H, brd, J = 6.0 Hz, H-14), 6.91 (1H, td, J = 6.0, 1.0 Hz, H-12), 7.38-7.48 (6H, m, PhH), 7.62-7.68 (4H, m, PhH)

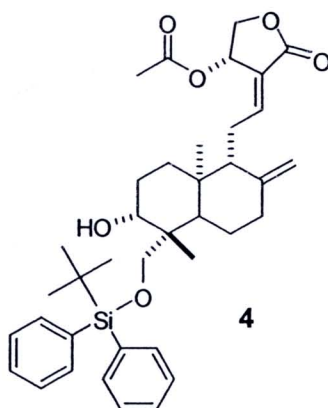
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) : δ 15.22 (C-20), 19.05 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 23.11 (C-18), 23.58 (C-11), 24.62 (C-6), 26.79 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 28.49 (C-2), 37.09 (C-1), 37.65 (C-7), 38.86 (C-10), 42.78 (C-4), 55.27 (C-5), 56.02 (C-9), 65.91 (C-14), 66.08 (C-19), 74.30 (C-15), 80.30 (C-3), 108.60 (C-17), 127.84 (Ph), 127.87 (Ph), 128.03 (C-13), (130.00 (Ph), 130.03 (Ph), 131.92 (Ph), 132.38 (Ph), 135.53 (Ph), 135.68 (Ph), 146.47 (C-8), 148.62 (C-12), 169.97 (C-16) ,

4. ปฏิกิริยาของสารอนุพันธ์ TBDPS-andrographolide 6 และ acetic anhydride



นำสาร TBDPS-Andrographolide 3 (0.0844 g, 0.14 mmol) ใส่ลงในหลอดทำปฏิกิริยา เติม acetic anhydride 1 mL คนด้วย magnetic stirrer และให้ความร้อนปฏิกิริยา 70°C คนต่อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ชั่วโมง (ทำการตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 50% EtOAc : Hexane ทุก 1 ชั่วโมง สังเกตจนสารตั้งต้นหมดจึงหยุดปฏิกิริยา) หยุดปฏิกิริยาทำโดยการสกัดด้วย EtOAc เติมสารละลายอิ่มตัว NaHCO_3 ล้างด้วย H_2O และ sat. NaCl ทำให้แห้งด้วย anhyd. Na_2SO_4 กรองและระเหยตัวทำละลาย ทำให้แห้งด้วยเครื่อง vacuum pump และนำ crude product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 30% EtOAc : Hexane ระเหยตัวทำละลาย ทำให้แห้งด้วยเครื่อง vacuum pump ได้สาร 4 น้ำหนัก 0.0158 g (18% yield) มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน และสาร 5 น้ำหนัก 0.0313 g (33% yield) มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน นำสาร 4 และ 5 ที่สังเคราะห์ได้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเทคนิค NMR-spectroscopy

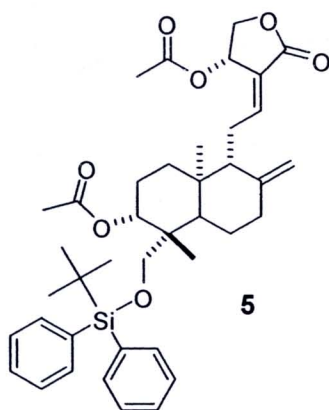
ข้อมูลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ 4



Compound 4: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ 0.50 (3H, s, H-20), 1.08 (9H, s, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 1.14-1.31 (4H, m, H-1, H-6), 1.06 (3H, s, H-18), 1.59-1.98 (5H, m, H-2, H-5, H-7), 2.11 (3H, s, COCH_3), 2.30 (1H, m, H-9), 2.31 (1H, ddd, $J = 16.5, 10.0, 6.5$ Hz, H-11a), 2.45 (1H, ddd, $J = 16.5, 6.5, 3.0$ Hz, H-11b), 3.39 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-19a), 4.18 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-19b), 4.25 (1H, dd, $J = 11.5, 2.0$ Hz, H-15a), 4.41 (1H, m, H-3), 4.44 (1H, brs, H-17a), 4.55 (1H, dd, $J = 11.5, 6.0$ Hz, H-15b), 4.79 (1H, brs, H-17b), 5.92 (1H, bd, $J = 6.0$ Hz, H-14), 6.99 (1H, td, $J = 7.0, 1.5$ Hz, H-12), 7.40-7.51 (6H, m, PhH), 7.65-7.71 (4H, m, PhH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) : δ 15.23 (C-20), 19.08 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 20.68 (COCH_3), 23.12 (C-18), 23.57 (C-11), 25.23 (C-6), 26.93 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 29.70 (C-2), 37.12 (C-1), 37.66 (C-7), 38.84 (C-10), 42.85 (C-4), 55.30 (C-5), 55.89 (C-9), 65.89 (C-14), 67.79 (C-19), 71.57 (C-15), 80.22 (C-3), 108.53 (C-17), 123.88 (Ph), 127.86 (Ph), 127.89 (C-13), 130.02 (Ph), 130.03 (Ph), 132.02 (Ph), 132.43 (Ph), 135.57 (Ph), 135.72 (Ph), 146.68 (C-8), 150.40 (C-12), 169.03 (C-16), 170.46 (COCH_3)

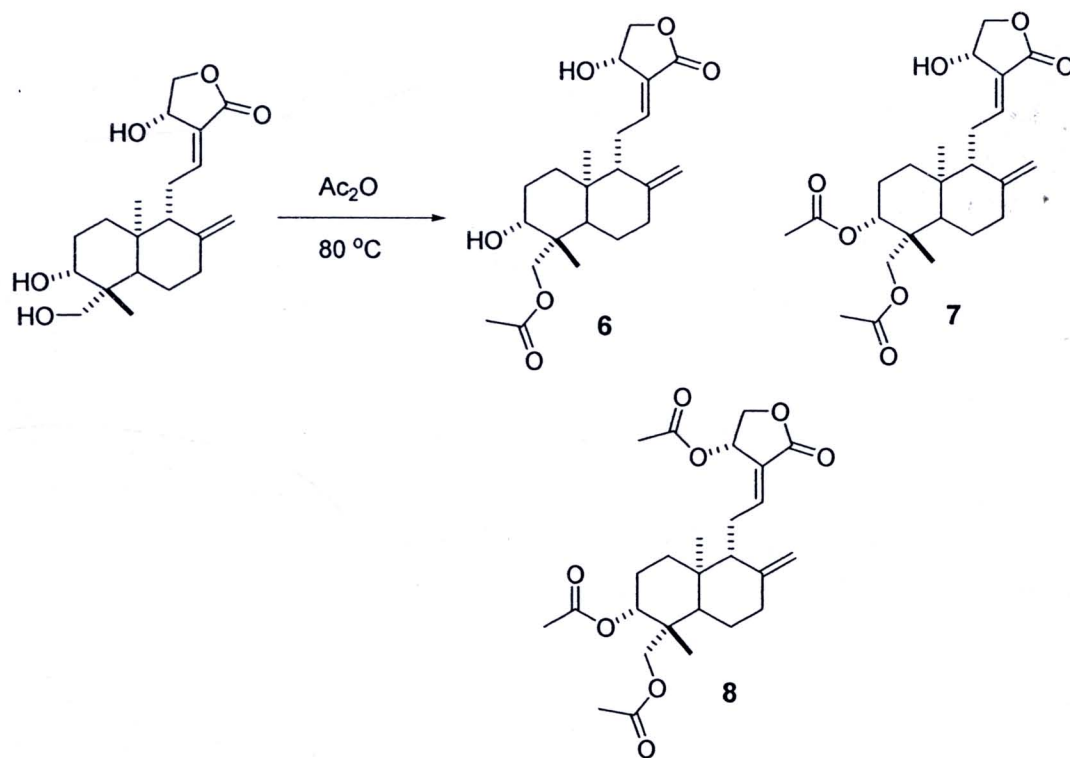
ข้อมูลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ 5



Compound **5** : $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ 0.70 (3H, s, H-20), 1.05 (3H, s, H-18), 1.08 (9H, s, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 1.22-1.36 (4H, m, H-1, H-6), 1.51-1.90 (5H, m, H-2, H-5, H-7), 1.92 (3H, s, COCH_3), 2.33-2.51 (3H, m, H-9, H-11), 3.75 (1H, d, $J = 10.5\text{ Hz}$, H-19a), 3.83 (1H, d, $J = 10.5\text{ Hz}$, H-19b), 4.25 (1H, dd, $J = 11.5, 2.0\text{ Hz}$, H-15a), 4.51 (1H, brs, H-17a), 4.55 (1H, dd, $J = 11.5, 6.0\text{ Hz}$, H-15b), 4.58 (1H, dd, $J = 11.5, 4.0\text{ Hz}$, H-3), 4.91 (1H, brs, H-17b), 5.93 (1H, bd, $J = 6.0\text{ Hz}$, H-14), 7.03 (1H, td, $J = 7.0, 1.0\text{ Hz}$, H-12), 7.37-7.48 (6H, m, PhH), 7.67-7.72 (4H, m, PhH)

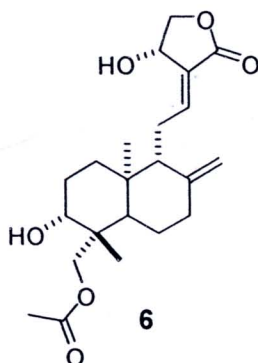
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) : δ 14.52 (C-20), 19.27 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 20.70 (COCH_3), 21.12 (COCH_3), 22.67 (C-18), 24.24 (C-11), 25.18 (C-6), 26.91 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 29.68 (C-2), 37.13 (C-1), 38.06 (C-7), 38.96 (C-10), 43.02 (C-4), 55.45 (C-5), 55.93 (C-9), 63.67 (C-14), 67.79 (C-19), 71.56 (C-15), 80.00 (C-3), 108.48 (C-17), 123.88 (Ph), 127.51 (Ph), 127.58 (C-13), 129.56 (Ph), 129.60 (Ph), 133.48 (Ph), 133.49 (Ph), 135.74 (Ph), 135.81 (Ph), 147.02 (C-8), 150.45 (C-12), 169.03 (C-16), 170.45 (COCH_3), 170.69 (COCH_3)

5. ปฏิกิริยาของ Andrographolide และ acetic anhydride



นำสาร Andrographolide (0.0401 g, 0.12 mmol) ใส่ลงในหลอดทำปฏิกิริยา เติม acetic anhydride 1 mL คนด้วย magnetic stirrer และให้ความร้อนปฏิกิริยา 80°C คนต่อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (ทำการตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 50% EtOAc : Hexane สังเกตจนสารตั้งต้นหมดจึงหยุดปฏิกิริยา) หยุดปฏิกิริยาทำการสกัดด้วย EtOAc เติมสารละลายอิ่มตัว NaHCO_3 ล้างด้วย H_2O และ sat. NaCl ทำให้แห้งด้วย anh. Na_2SO_4 กรองและระเหยตัวทำละลาย ทำให้แห้งด้วยเครื่อง vacuum pump และนำ crude product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 50% EtOAc : Hexane ระเหยตัวทำละลาย ทำให้แห้งด้วยเครื่อง vacuum pump ได้สาร 6 น้ำหนัก 0.0172 g (36% yield) มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว สาร 7 น้ำหนัก 0.0222 g (42% yield) มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว และสาร 8 น้ำหนัก 0.0083 g (14% yield) มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน

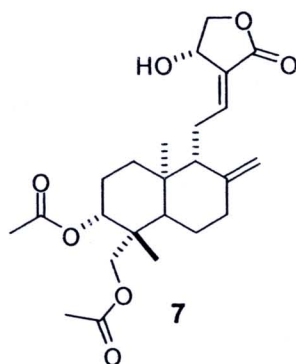
ข้อมูลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ 6



Compound 6 : ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 0.73 (3H, s, H-20), 1.15 (3H, s, H-18), 1.21-1.30 (4H, m, H-1, H-6), 1.60-2.02 (5H, m, H-2, H-5, H-7), 2.05 (3H, s, COCH₃), 2.44 (1H, ddd, *J* = 13.0, 4.0, 2.0 Hz, H-9), 2.48 (2H, m, H-11), 3.33 (1H, dd, *J* = 12.0, 4.0 Hz, H-3), 4.11 (1H, d, *J* = 11.5 Hz, H-19a), 4.25 (1H, dd, *J* = 10.5, 2.0 Hz, H-15a), 4.33 (1H, d, *J* = 11.5 Hz, H-19b), 4.45 (1H, dd, *J* = 10.5, 6.0 Hz, H-15b), 4.60 (1H, brs, H-17a), 4.91 (1H, brs, H-17b), 5.02 (1H, d, *J* = 6.0 Hz, H-14), 6.94 (1H, td, *J* = 7.0, 1.5 Hz, H-12)

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD) : δ 14.79 (C-20), 21.07 (COCH₃), 22.47 (C-18), 24.21 (C-11), 24.74 (C-6), 29.67 (C-2), 37.27 (C-1), 37.77 (C-7), 39.05 (C-10), 42.42 (C-4), 55.29 (C-5), 55.95 (C-9), 64.93 (C-14), 66.19 (C-19), 74.29 (C-15), 78.80 (C-3), 108.91 (C-17), 128.03 (C-13), 146.48 (C-8), 148.76 (C-12), 169.93 (C-16), 171.07 (COCH₃)

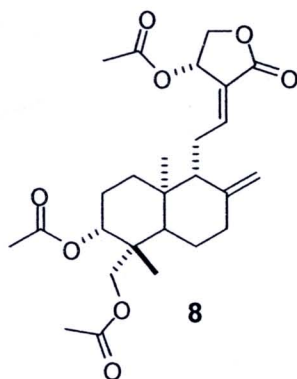
ข้อมูลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ 7



Compound 7 : ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 0.78 (3H, s, H-20), 1.03 (3H, s, H-18), 1.30-1.40 (4H, m, H-1, H-6), 1.46-2.01 (5H, m, H-2, H-5, H-7), 2.04 (3H, s, COCH₃), 2.05 (3H, s, COCH₃), 2.44 (1H, ddd, *J* = 12.5, 3.5, 2.0 Hz, H-9), 2.55 (2H, m, H-11), 4.10 (1H, d, *J* = 11.5 Hz, H-19a), 4.26 (1H, dd, *J* = 10.5, 2.0 Hz, H-15a), 4.38 (1H, d, *J* = 11.5 Hz, H-19b), 4.46 (1H, dd, *J* = 10.5, 6.0 Hz, H-15b), 4.59 (1H, dd, *J* = 11.5, 5.0 Hz, H-3), 4.61 (1H, brs, H-17a), 4.92 (1H, brs, H-17b), 5.03 (1H, t, *J* = 5.5 Hz, H-14), 6.96 (1H, td, *J* = 7.0, 1.5 Hz, H-12)

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD) : δ 14.58 (C-20), 21.09 (COCH₃), 21.19 (COCH₃), 22.69 (C-18), 24.23 (C-11), 24.68 (C-6), 29.71 (C-2), 37.09 (C-1), 37.93 (C-7), 39.03 (C-10), 41.31 (C-4), 55.34 (C-5), 56.04 (C-9), 64.71 (C-14), 66.28 (C-19), 74.23 (C-15), 79.79 (C-3), 108.97 (C-17), 128.15 (C-13), 146.39 (C-8), 148.57 (C-12), 169.72 (C-16), 171.58 (COCH₃), 170.92 (COCH₃)

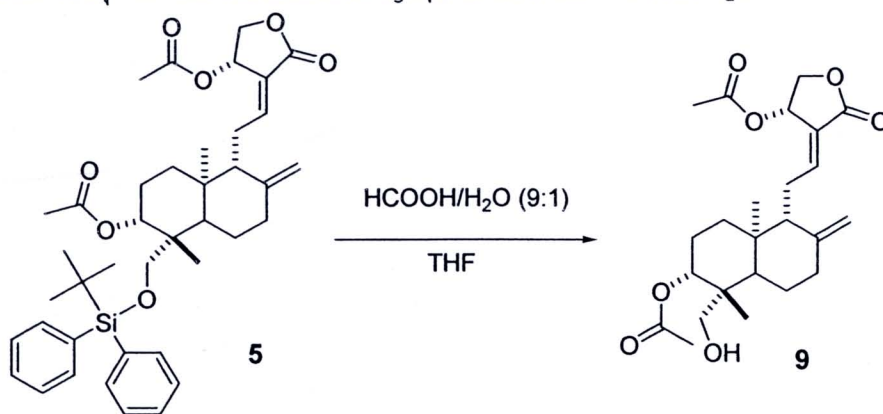
ข้อมูลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ 8



Compound 8 : ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 0.75 (3H, s, H-20), 1.02 (3H, s, H-18), 1.29-1.39 (4H, m, H-1, H-6), 1.45-2.01 (5H, m, H-2, H-5, H-7), 2.04 (3H, s, COCH₃), 2.12 (3H, s, COCH₃), 2.33-2.44 (2H, m, H-11), 2.47 (1H, ddd, *J* = 16.0, 6.5, 3.0 Hz, H-9), 4.12 (1H, d, *J* = 11.5 Hz, H-19a), 4.24 (1H, dd, *J* = 11.0, 2.0 Hz, H-15a), 4.35 (1H, d, *J* = 11.5 Hz, H-19b), 4.52 (1H, brs, H-17a), 4.54 (1H, dd, *J* = 11.0, 6.0 Hz, H-15b), 4.60 (1H, dd, *J* = 12.0, 4.0 Hz, H-3), 4.90 (1H, brs, H-17b), 5.92 (1H, dt, *J* = 6.0, 1.0 Hz, H-14), 7.00 (1H, td, *J* = 7.0, 1.5 Hz, H-12)

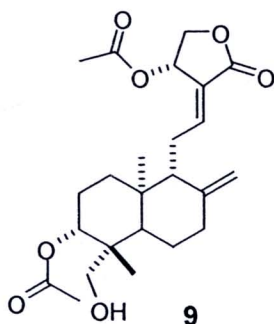
¹³C-NMR (100 MHz, MeOD) : δ 14.51 (C-20), 20.70 (COCH₃), 21.07 (COCH₃), 21.16 (COCH₃), 22.70 (C-18), 24.22 (C-11), 24.60 (C-6), 25.18 (C-2), 37.00 (C-1), 37.88 (C-7), 38.94 (C-10), 41.28 (C-4), 55.27 (C-5), 55.85 (C-9), 64.70 (C-14), 67.78 (C-19), 71.58 (C-15), 79.65 (C-3), 108.90 (C-17), 124.04 (C-13), 146.50 (C-8), 150.13 (C-12), 169.01 (C-16), 170.45 (COCH₃), 170.50 (COCH₃), 170.88 (COCH₃)

6. ปฏิกิริยาของสารอนุพันธ์ TBS-acetate-andrographolide 5 และ HCOOH/H₂O



นำสาร TBS-acetate-andrographolide 5 (0.0150 g, 0.03 mmol) ใส่ลงในหลอดทำปฏิกิริยา เติม THF 1 mL คนด้วย magnetic stirrer จนสาร 5 ละลายหมด หลังจากนั้นทำให้สารละลายเย็นที่ 0 °C และเติม HCOOH/H₂O (9:1) 1 mL และคนต่อเป็นเวลา 30 นาที (ทำการตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 30% EtOAc : Hexane) หยุดปฏิกิริยาทำโดยการสกัดด้วย EtOAc เติมสารละลายอิ่มตัว NaHCO₃ ล้างด้วย H₂O และ sat. NaCl ทำให้แห้งด้วย anhyd. Na₂SO₄ กรองและระเหยตัวทำละลาย ทำให้แห้งด้วยเครื่อง vacuum pump และนำ crude product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 40% EtOAc : Hexane ระเหยตัวทำละลาย ทำให้แห้งด้วยเครื่อง vacuum pump ได้สาร 9 น้ำหนัก 0.0057 g (43% yield) มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว นำสาร 9 ที่สังเคราะห์ได้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยเทคนิค NMR-spectroscopy

ข้อมูลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ 9

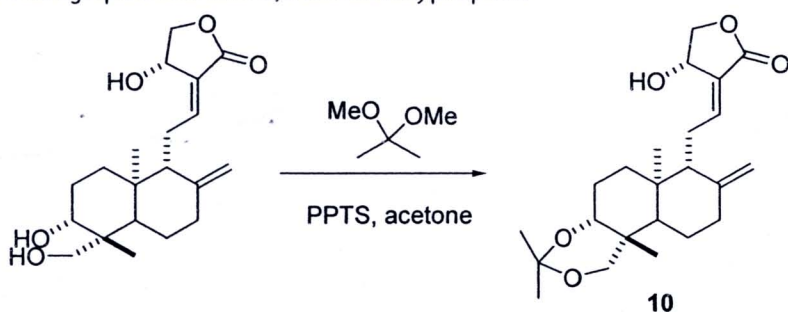


Compound 9 : ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 0.71 (3H, s, H-20), 1.11 (3H, s, H-18), 1.26-1.46 (4H, m, H-1, H-6), 1.69-2.08 (5H, m, H-2, H-5, H-7), 2.11 (3H, s, COCH₃), 2.14 (3H, s, COCH₃), 2.34-2.45 (2H, m, H-11), 2.49 (1H, ddd, *J* = 16.0, 6.5, 3.5 Hz, H-9), 3.40 (1H, d, *J* = 11.5 Hz, H-19a), 4.15 (1H, d, *J* = 11.5 Hz, H-19b), 4.27 (1H, dd, *J* = 11.0, 2.0 Hz, H-15a), 4.53 (1H, brs, H-17a), 4.46 (1H, dd, *J* = 11.0, 6.0 Hz, H-15b), 4.68 (1H, dd, *J* = 12.0, 5.0 Hz, H-3), 4.92 (1H, brs, H-17b), 5.94 (1H, dt, *J* = 6.0, 1.0 Hz, H-14), 7.02 (1H, td, *J* = 7.0, 1.5 Hz, H-12)

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD) : δ 14.92 (C-20), 20.70 (COCH₃), 21.35 (COCH₃), 22.41 (C-18), 23.89 (C-11), 24.17 (C-6), 25.21 (C-2), 36.88 (C-1), 37.65 (C-7), 38.76 (C-10), 42.61 (C-4), 55.47 (C-5), 55.74 (C-9), 63.54 (C-14), 67.75 (C-19), 71.57 (C-15), 82.32 (C-3), 108.99 (C-17), 124.03 (C-13), 146.46 (C-8), 150.14 (C-12), 169.01 (C-16), 169.76 (COCH₃), 170.47 (COCH₃)

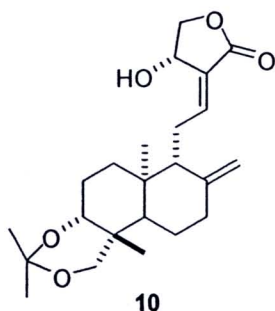


7. ปฏิกิริยาของ Andrographolide และ 2,2-dimethoxypropane



นำ Andrographolide (0.4000 g, 1.14 mmol) ใส่ลงในหลอดทำปฏิกิริยา เติม acetone 45 mL คนด้วย magnetic stirrer จนสาร 1 ละลายหมด หลังจากนั้นเติม 2,2-dimethoxypropane (1.0699 g, 10.2726 mmol) และเติม PPTS (0.0143 g, 0.0571 mmol) คนต่อเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ทำการตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 70% EtOAc : Hexane ทุก 1 ชั่วโมง สังเกตจนสารตั้งต้นหมดจึงหยุดปฏิกิริยา) การหยุดปฏิกิริยาทำโดยการสกัดด้วย EtOAc เติมสารละลายอิ่มตัว NaHCO_3 ล้างด้วย H_2O และ sat. NaCl ทำให้แห้งด้วย anh. Na_2SO_4 กรองและระเหยตัวทำละลาย และนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง vacuum pump ได้สาร 10 น้ำหนัก 0.4667 g มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว นำสาร 10 ที่สังเคราะห์ได้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยเทคนิค NMR-spectroscopy

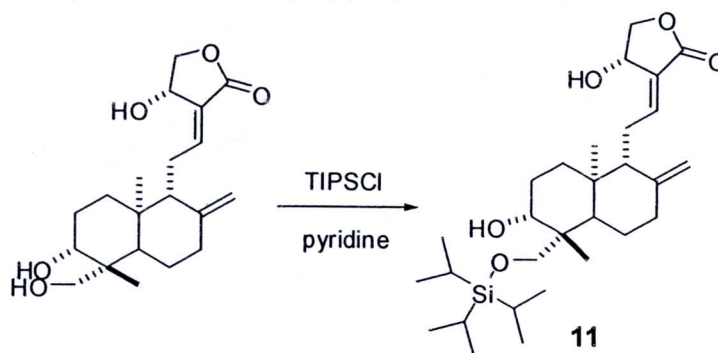
ข้อมูลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ 10



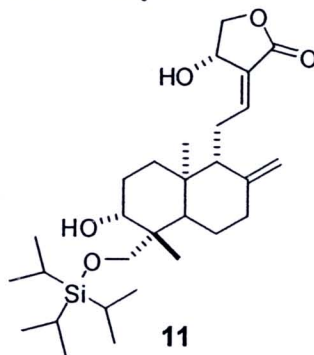
Compound 10 : $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ 0.96 (3H, s, H-20), 1.20 (3H, s, H-18), 1.22-1.34 (4H, m, H-1a, H5, H-6), 1.36 (3H, s, H-22), 1.41 (3H, s, H-21), 1.70-1.78 (2H, m, H-1b, H-2a), 1.78-1.85 (1H, m, H-9), 1.92-2.05 (1H, m, H-2b), 2.42 (2H, dt, $J = 12.5, 3.0$ Hz, H-7), 2.57 (2H, m, H-11), 3.18 (1H, d, $J = 11.5$ Hz, H-19b), 3.49 (1H, dd, $J = 9.0, 4.0$ Hz, H-3), 3.96 (1H, d, $J = 11.5$ Hz, H-19a), 4.27 (1H, dd, $J = 10.0, 1.5$ Hz, H-15b), 4.45 (1H, dd, $J = 10.0, 6.0$ Hz, H-15a), 4.62 (1H, s, H-17b), 4.91 (1H, s, H-17a), 5.03 (1H, brt, H-14), 6.96 (1H, t, $J = 7.0$ Hz, H-12)

$^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ 16.23 (C-20), 23.22 (C-11), 24.94 (C-21), 25.05 (C-22), 25.32 (C-18), 26.14 (C-2), 27.03 (C-6), 34.14 (C-1), 37.66 (C-7), 37.94 (C-10), 38.45 (C-4), 52.19 (C-5), 56.06 (C-9), 63.93 (C-19), 66.22 (C-14), 74.29 (C-15), 76.18 (C-3), 99.19 (C-23), 108.91 (C-17), 127.97 (C-13), 147.04 (C-8), 149.07 (C-12), 169.95 (C-16)

8. ปฏิกิริยาของ Andrographolide และ Triisopropylsilyl Chloride (TIPSCl)

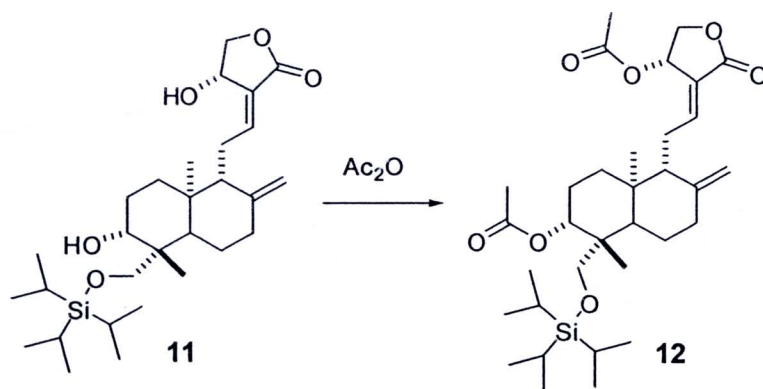


นำ Andrographolide (81.1 mg, 0.231 mmol) ใส่ลงในหลอดทำปฏิกิริยา เติม pyridine 500 μ L คนด้วย magnetic stirrer หลังจากนั้นเติม TIPSCl (250 μ L, 1.48 mmol) และคนต่อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง (ทำการตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย TLC) หยุดปฏิกิริยาทำโดยการสกัดด้วย EtOAc ล้างด้วย H_2O และ sat. NaCl ทำให้แห้งด้วย anhyd. Na_2SO_4 กรองและระเหยตัวทำละลาย ทำให้แห้งด้วยเครื่อง vacuum pump และนำ crude product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 50% EtOAc : Hexane ระเหยตัวทำละลาย ทำให้แห้งด้วยเครื่อง vacuum pump ได้สาร 1 น้ำหนัก 75.9 mg (65% yield) มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว นำสาร 6 ที่สังเคราะห์ได้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยเทคนิค NMR- spectroscopy

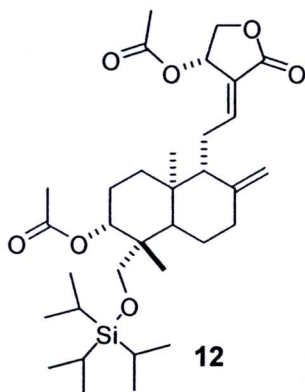


Compound 11 : Mp 62-65 $^{\circ}C$; IR (Neat): 3377, 2941, 1745, 1674, 1460, 1054, 755 cm^{-1} ; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 6.97 (1H, td, J = 7.0, 2.0 Hz, H-12), 5.04 (1H, brd, J = 6.0 Hz, H-14), 4.89 (1H, brs, H-17b), 4.59 (1H, brs, H-17a), 4.52 (1H, d, J = 7.0 Hz, OH), 4.46 (1H, dd, J = 10.5, 6.0 Hz, H-15b), 4.31 (1H, d, J = 10.0 Hz, H-19b), 4.26 (1H, dd, J = 10.5, 2.0 Hz, H-15a), 3.49 (1H, d, J = 10.0 Hz, H-19a), 3.32-3.29 (1H, m, H-3), 2.62-2.38 (3H, m), 2.07 (1H, d, J = 7.0 Hz, OH), 2.02-1.65 (5H, m), 1.29 (3H, s, H-18), 1.30-1.20 (4H, m), 1.06 (18H, s, 3 x $(SiCH(CH_3)_2)$), 1.06 (3H, s, 3 x $(SiCH(CH_3)_2)$), 0.69 (3H, s, H-20); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 170.0 (C-16), 148.7 (C-8), 146.6 (C-12), 128.1 (C-13), 108.7 (C-17), 80.3 (C-3), 74.3 (C-15), 66.2 (C-19), 65.7 (C-14), 56.1 (C-9), 55.2 (C-5), 42.7 (C-4), 39.0 (C-10), 37.8 (C-7), 37.2 (C-1), 28.6 (C-2), 24.7 (C-6), 23.9 (C-11), 23.0 (C-18), 17.9 (3 x $(SiCH(CH_3)_2)$), 15.5 (C-20), 11.7 (3 x $(SiCH(CH_3)_2)$); HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{29}H_{50}O_5SiNa$ $[M+Na]^+$ 529.3325, found 529.3325.

8. ปฏิกิริยาของ 19-TIPS-Andrographolide และ acetic anhydride



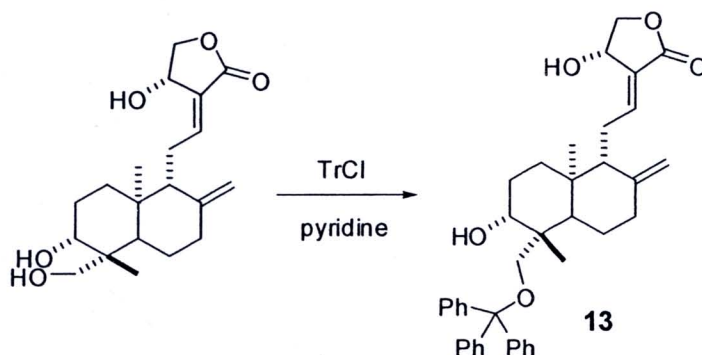
นำสาร TIPS-Andrographolide (41.1 mg, 0.0811 mmol) ใส่ลงในหลอดทำปฏิกิริยา เติม acetic anhydride 1 mL คนด้วย magnetic stirrer และให้ความร้อนปฏิกิริยา 140°C คนต่อเป็นเวลา 3 ชั่วโมง (ทำการตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย TLC) หยุดปฏิกิริยาทำการสกัดด้วย EtOAc เติมสารละลายอิ่มตัว NaHCO_3 ล้างด้วย H_2O และ sat. NaCl ทำให้แห้งด้วย anhyd. Na_2SO_4 กรองและระเหยตัวทำละลาย ทำให้แห้งด้วยเครื่อง vacuum pump และนำ crude product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 30% EtOAc : Hexane ระเหยตัวทำละลาย ทำให้แห้งด้วยเครื่อง vacuum pump ได้สาร 12 น้ำหนัก น้ำหนัก 38.1 mg (80% yield) มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน นำสาร 12 ที่สังเคราะห์ได้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยเทคนิค NMR- spectroscopy



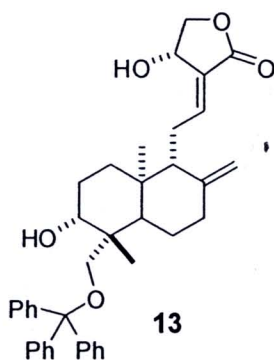
Compound 12: Mp $83-87^{\circ}\text{C}$; IR (Neat): 3144, 2944, 1738, 1676, 1241, 1018, 753 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.02 (1H, td, $J = 7.0, 2.0\text{ Hz}$, H-12), 5.92 (1H, brd, $J = 6.0\text{ Hz}$, H-14), 4.89 (1H, brs, H-17b), 4.61-4.55 (1H, m, H-3), 4.54 (1H, dd, $J = 11.5, 6.0\text{ Hz}$, H-15b), 4.49 (1H, brs, H-17a), 4.25 (1H, dd, $J = 11.5, 2.0\text{ Hz}$, H-15a), 3.89 (1H, d, $J = 10.5\text{ Hz}$, H-19b), 3.80 (1H, d, $J = 10.5\text{ Hz}$, H-19a), 2.52-2.34 (3H, m, H-9, H-11), 2.12 (3H, s, COCH_3), 2.04 (3H, s, COCH_3), 1.98-1.84 (3H, m), 1.79-1.61 (4H, m), 1.36-1.24 (2H, m), 1.08 (18H, s, 3 x $\text{SiCH}(\text{CH}_3)_2$), 1.06 (3H, s, 3 x $\text{SiCH}(\text{CH}_3)_2$), 1.01 (3H, s, H-18), 0.79 (3H, s, H-20); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 170.8 (COCH_3), 170.5 (COCH_3), 169.1 (C-16), 150.7 (C-12), 147.2 (C-8), 123.8 (C-13), 108.4 (C-17), 80.1 (C-3), 71.6 (C-15), 67.8 (C-19), 63.6 (C-14), 56.0 (C-9), 55.5 (C-5), 43.0 (C-4), 39.0 (C-10), 37.3 (C-7), 37.3 (C-1), 25.3 (COCH_3), 25.2

(COCH₃), 24.3 (C-2), 22.9 (C-6), 21.2 (C-11), 20.7 (C-18), 18.1 (3 x (SiCH(CH₃)₂)), 14.7 (C-20), 11.9 (3 x (SiCH(CH₃)₂)); HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₃₃H₅₄O₇SiNa [M+Na]⁺ 613.3537, found 613.3521.

9. ปฏิกิริยาของ Andrographolide และ Triphenylmethyl Chloride (TrCl)



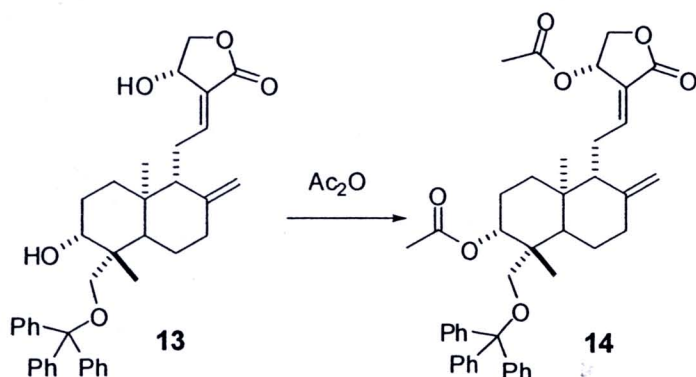
นำ Andrographolide (108 mg, 0.308 mmol) ใส่ลงในหลอดทำปฏิกิริยา เติม pyridine 500 μ L คนด้วย magnetic stirrer หลังจากนั้นเติม triphenylmethyl chloride (TrCl) (400 mg, 1.43 mmol) ให้ ความร้อนปฏิกิริยา 70°C และคนต่อเป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง (ทำการตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย TLC) หยุดปฏิกิริยาทำ โดยการสกัดด้วย EtOAc ล้างด้วย H₂O และ sat. NaCl ทำให้แห้งด้วย anh. Na₂SO₄ กรองและระเหยตัวทำ ละลาย ทำให้แห้งด้วยเครื่อง vacuum pump และนำ crude product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 40% EtOAc : Hexane ระเหยตัวทำละลาย ทำให้แห้ง ด้วยเครื่อง vacuum pump ได้สาร 13 น้ำหนัก 182 mg (99% yield) มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว นำสาร 13 ที่สังเคราะห์ได้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยเทคนิค NMR- spectroscopy



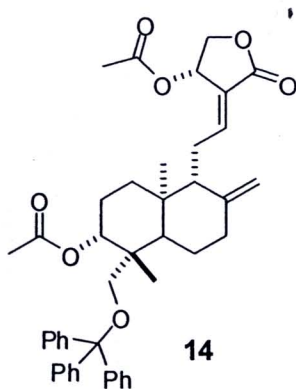
Compound 13: Mp 113-117 °C; IR (Neat): 3418, 2933, 1756, 1674, 1491, 1449, 1184, 1048, 738, 706 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.44 (6H, d, *J* = 8.0 Hz, PhH), 7.31 (6H, t, *J* = 8.0 Hz, PhH), 7.23 (3H, t, *J* = 8.0 Hz, PhH), 6.90 (1H, td, *J* = 7.0, 2.0 Hz, H-12), 4.96 (1H, brd, *J* = 6.0 Hz, H-14), 4.78 (1H, brs, H-17b), 4.48 (1H, brs, H-17a), 4.42 (1H, dd, *J* = 10.5, 6.0 Hz, H-15b), 4.22 (1H, dd, *J* = 10.5, 2.0 Hz, H-15a), 3.36 (1H, d, *J* = 10.0 Hz, H-19b), 3.26-3.18 (1H, m, H-3), 3.14 (1H, d, *J* = 10.0 Hz, H-19a), 2.48-2.27 (3H, m), 1.95-1.50 (5H, m), 1.55

(3H, s, H-18), 1.20-0.94 (4H, m), 0.17 (3H, s, H-20); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 169.7 (C-16), 148.8 (C-8), 146.5 (C-12), 143.4 (Ph), 128.4 (Ph), 128.1 (Ph), 127.9 (C-13), 127.3 (Ph), 108.4 (C-17), 87.6 (C(Ph)), 80.0 (C-3), 74.2 (C-15), 66.2 (C-19), 64.8 (C-14), 56.0 (C-9), 55.6 (C-5), 42.7 (C-4), 38.7 (C-10), 37.6 (C-7), 37.1 (C-1), 28.1 (C-2), 24.6 (C-6), 23.8 (C-11), 23.3 (C-18), 14.9 (C-20); HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{39}\text{H}_{44}\text{O}_5\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 615.3086, found 615.3082.

10. ปฏิกิริยาของ 19-TIPS-Andrographolide และ acetic anhydride



นำสาร TIPS-Andrographolide (250 mg, 0.422 mmol) ใส่ลงในหลอดทำปฏิกิริยา เติม acetic anhydride 1 mL คนด้วย magnetic stirrer และให้ความร้อนปฏิกิริยา 140°C คนต่อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (ทำการตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย TLC) หยุดปฏิกิริยาทำการสกัดด้วย EtOAc เติมสารละลายอิ่มตัว NaHCO_3 ล้างด้วย H_2O และ sat. NaCl ทำให้แห้งด้วย anhyd. Na_2SO_4 กรองและระเหยตัวทำละลาย ทำให้แห้งด้วยเครื่อง vacuum pump และนำ crude product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 20% EtOAc : Hexane ระเหยตัวทำละลาย ทำให้แห้งด้วยเครื่อง vacuum pump ได้สาร 14 น้ำหนัก น้ำหนัก 93.4 mg (33% yield) มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน นำสาร 14 ที่สังเคราะห์ได้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยเทคนิค NMR- spectroscopy

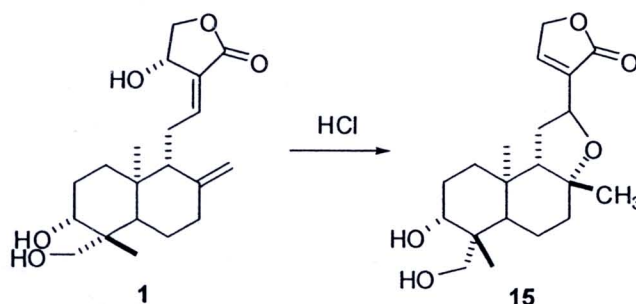


Compound 14: Mp $78-81^\circ\text{C}$; IR (Neat): 3107, 1744, 1395, 1237, 1023, 896, 708 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.47 (6H, d, $J = 7.5$ Hz, PhH), 7.32-7.19 (9H, m, PhH), 6.97 (1H, td, $J = 7.0, 2.0$ Hz, H-12), 5.88 (1H, brd, $J = 6.0$ Hz, H-14), 4.82 (1H, brs, H-17b), 4.57-4.52

(1H, m, H-3), 4.52 (1H, dd, $J = 11.5, 6.0$ Hz, H-15b), 4.42 (1H, brs, H-17a), 4.23 (1H, dd, $J = 11.5, 2.0$ Hz, H-15a), 3.33 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-19b), 3.10 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-19a), 2.41-2.22 (3H, m), 2.09 (3H, s, COCH₃), 2.01 (3H, s, COCH₃), 1.96-1.83 (2H, m), 1.77 (1H, d, $J = 10.0$ Hz), 1.64-1.54 (2H, m), 1.36-1.20 (4H, m), 1.17 (3H, s, H-18), 0.27 (3H, s, H-20); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 171.1 (COCH₃), 170.8 (COCH₃), 169.4 (C-16), 150.8 (Ph), 147.2 (C-8), 144.6 (C-12), 129.3 (Ph), 128.0 (Ph), 127.2 (Ph), 124.3 (C-13), 108.8 (C-17), 87.3 (C(Ph)₃), 80.6 (C-3), 71.9 (C-15), 68.1 (C-19), 62.7 (C-14), 56.3 (C-9), 56.0 (C-5), 42.9 (C-4), 39.2 (C-10), 38.2 (C-7), 37.4 (C-1), 25.5 (C-2), 25.1 (C-6), 24.6 (C-11), 23.4 (C-18), 21.7 (COCH₃), 21.1 (COCH₃), 14.5 (C-20); HRMS (ESI) m/z calcd for C₄₃H₄₈O₇Na [M+Na]⁺ 699.3298, found 699.3303.

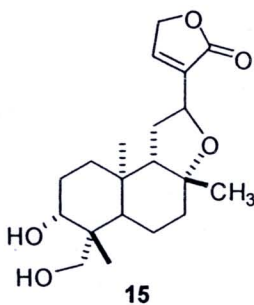
ส่วนที่ 5 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์และเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันของ andrographolide ตามแผนการนอกเหนือจากที่วางแผนไว้

11. ปฏิกิริยาของสารอนุพันธ์ Andrographolide และ Conc. hydrochloric acid (conc. HCl)



นำ Andrographolide (0.0223 g, 0.06 mmol) ใส่ลงในหลอดทำปฏิกิริยา นำหลอดทำปฏิกิริยาแช่ในน้ำเย็นที่อุณหภูมิ 0 °C จากนั้นค่อย ๆ หยด Conc. hydrochloric acid 0.50 mL คนจนสารละลายหมดปล่อยให้แห้งละลายจนถึงอุณหภูมิห้อง คนต่อเป็นเวลา 7 ชั่วโมง (ทำการตรวจสอบปฏิกิริยาด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 70% EtOAc : Hexane ทุกๆ ชั่วโมง) สังเกตจนสารตั้งต้นหมดจึงหยุดปฏิกิริยา การหยุดปฏิกิริยาทำโดยนำสารละลายจากปฏิกิริยาที่สังเคราะห์ได้ค่อยๆ หยดลงในสารละลายอิ่มตัวของ NaHCO₃ ที่เย็น และสกัดด้วย EtOAc จำนวน 3 ครั้ง ล้างด้วยน้ำ และสารละลายอิ่มตัวของ NaCl อย่างละ 1 ครั้ง ตามลำดับ ทำให้แห้งด้วย anhyd. Na₂SO₄ กรองและระเหยตัวทำละลายออกด้วยได้ Crude product เป็นของเหลวหนืดสีเหลือง นำ Crude product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Column chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 100% EtOAc : Hexane ได้ผลิตภัณฑ์ 15 0.0179 g (80% yield) ลักษณะของแข็งสีขาวมีค่า R_f = 0.40 (ในระบบตัวทำละลาย 100% EtOAc) นำสาร 15 ที่สังเคราะห์ได้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยเทคนิค NMR-spectroscopy

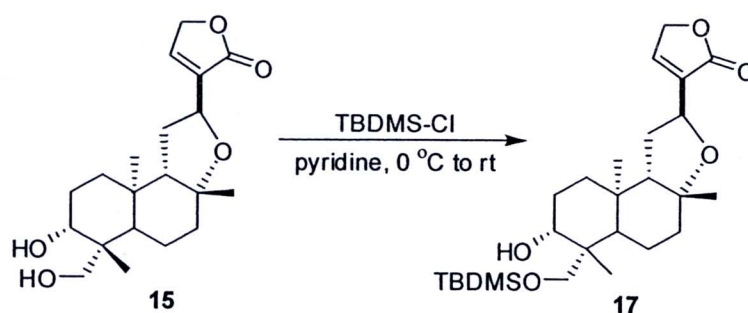
ข้อมูลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ 15



Compound 15 : ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ 0.94 (3H, s, H-18), 1.10 (3H, s, H-17), 1.25 (3H, s, H-20), 0.95-1.55 (6H, m, H-1a, H-5, H-6, H-7a, H-9), 1.65 -1.85 (3H, m, H-2, H-7b), 1.96-2.23 (2H, m, H-1b, H-11a), 2.43 (1H, dd, *J* = 14.0, 8.0 Hz, H-11b), 3.35 (1H, d, *J* = 11.0 Hz, H-19a), 3.46 (1H, dd, *J* = 11.5, 4.5 Hz, H-3), 4.25 (1H, d, *J* = 11.0 Hz, H-19b), 4.68 (1H, tm, *J* = 8.0 Hz, H-12), 4.80 (2H, brs, H-15), 7.27 (1H, dd, *J* = 3.5, 2.0 Hz, H-14)

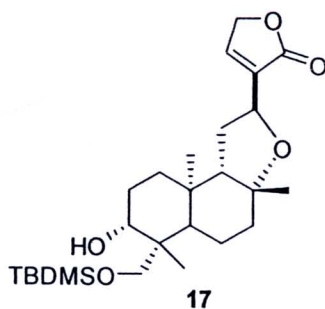
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) : δ 16.38 (C-18), 18.10 (C-6), 22.70 (C-20), 27.38 (C-2), 31.50 (C-17), 32.81 (C-11), 35.58 (C-10), 36.16 (C-1), 38.94 (C-7), 42.45 (C-4), 52.63 (C-5), 57.89 (C-9), 64.15 (C-19), 70.54 (C-15), 73.07 (C-12), 80.82 (C-3), 82.67 (C-8), 138.35 (C-13), 143.20 (C-14), 172.58 (C-16)

12 ปฏิกิริยาของสารอนุพันธ์ Isoandrographolide **15** และ *Tert*-butyldimethylsilyl chloride (TBDMS-Cl)



นำ Isoandrographolide **15** (0.0107 g, 0.03 mmol) ใส่ลงในหลอดทำปฏิกิริยา จากนั้นนำหลอดทำปฏิกิริยาแช่ในน้ำเย็นที่อุณหภูมิ 0°C เติม Pyridine 0.20 μL คน จนสารละลายหมด เติม *Tert*-butyldimethylsilyl chloride (0.0460 g, 0.30 mmol) ทำการคนต่อโดยปล่อยให้แห้งละลายจนถึงอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (ตรวจสอบปฏิกิริยาด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 50% EtOAc : Hexane ทุกๆ ครึ่งชั่วโมง) สังเกตจนสารตั้งต้นหมดจึงหยุดปฏิกิริยา การหยุดปฏิกิริยาทำโดยนำสารละลายจากปฏิกิริยาที่สังเคราะห์ได้ใส่ลงในสารละลายอิ่มตัวของ NH_4Cl ที่เย็น และสกัดด้วย EtOAc จำนวน 3 ครั้ง ล้างด้วยน้ำ และสารละลายอิ่มตัวของ NaCl อย่างละ 1 ครั้ง ตามลำดับ ทำให้แห้งด้วย anhyd. Na_2SO_4 กรองและระเหยตัวทำละลายออก ได้ Crude product เป็นของเหลวหนืดสีเหลือง นำ Crude product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Column chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 50% EtOAc:Hexane ได้ผลิตภัณฑ์ **17** 0.0086 g (60% yield) ลักษณะของแข็งสีขาว มีค่า $R_f = 0.51$ (ในระบบตัวทำละลาย 50% EtOAc : Hexane) นำสาร **17** ที่สังเคราะห์ได้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยเทคนิค NMR-spectroscopy

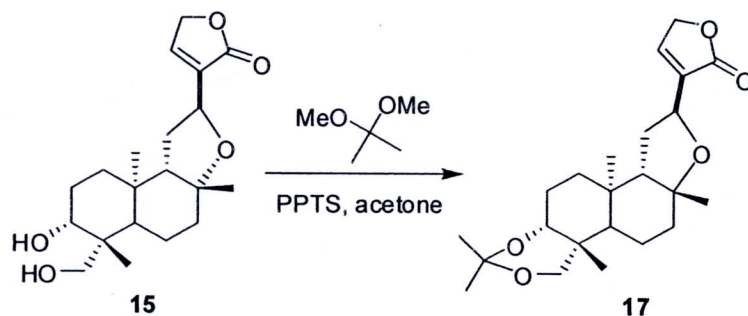
ข้อมูลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ 17



Compound 17 : $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ 0.07 (3H, s, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 0.09 (3H, s, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 0.90 (9H, s, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 0.96 (3H, s, H-18), 1.11 (3H, s, H-17), 1.23 (3H, s, H-20), 0.95-1.26 (2H, m, H-5, H-7a), 1.38 -1.82 (6H, m, H-2, H-6, H-7b, H-9), 1.99 (1H, dd, $J = 14.0, 8.0$ Hz, H-1a), 2.02 (1H, dd, $J = 13.5, 8.0$ Hz, H-11a), 2.14-2.21 (1H, m, H-1b), 2.44 (1H, dd, $J = 13.5, 8.0$ Hz, H-11b), 3.30 (1H, brd, $J = 10.0$ Hz, H-3), 3.43 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-19a), 4.26 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-19b), 4.69 (1H, tm, $J = 7.5$ Hz, H-12), 4.81 (2H, dd, $J = 3.5, 2.0$ Hz, H-15), 7.27 (1H, dd, $J = 3.0, 1.0$ Hz, H-14)

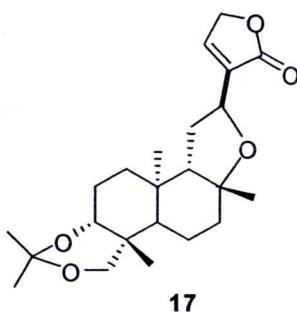
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) : δ -5.18 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 16.67 (C-18), 18.08 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 18.27 (C-6), 23.25 (C-20), 25.78 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 27.79 (C-2), 31.60 (C-17), 32.95 (C-11), 35.79 (C-10), 36.20 (C-1), 39.29 (C-7), 42.20 (C-4), 52.60 (C-5), 58.26 (C-9), 65.18 (C-19), 70.48 (C-15), 73.15 (C-12), 80.61 (C-3), 82.70 (C-8), 138.49 (C-13), 143.09 (C-14), 172.54 (C-16)

13. ปฏิกิริยาของสารอนุพันธ์ Isoandrographolide **15** และ 2,2-dimethoxy propane



นำ Isoandrographolide **15** (0.0505 g, 0.14 mmol) ใส่ลงในหลอดทำปฏิกิริยา จากนั้นเติม Acetone 1.50 mL คนด้วย magnetic stirrer จนสารละลายหมด แล้วเติม 2,2-dimethoxy propane (1.00 mL, 8.13 mmol) คนต่อจากนั้นเติม Pyridinium-*p*-toluenesulfonate (0.0280 g, 0.10 mmol) คนต่อเป็นเวลา 40 นาที (ตรวจสอบปฏิกิริยาด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 50% EtOAc : Hexane ทุกๆ ครึ่งชั่วโมง) สังเกตจนสารตั้งต้นหมดจึงหยุดปฏิกิริยา การหยุดปฏิกิริยาทำโดยนำสารละลายจากปฏิกิริยาที่สังเคราะห์ได้ใส่ลงในสารละลายอิ่มตัวของ NaHCO_3 ที่เย็น และสกัดด้วย EtOAc จำนวน 3 ครั้ง ล้างด้วยน้ำ และสารละลายอิ่มตัวของ NaCl อย่างละ 1 ครั้ง ตามลำดับ ทำให้แห้งด้วย anhyd. Na_2SO_4 กรองและระเหยตัวทำละลายออก ได้ Crude product เป็นของแข็งสีขาว นำ Crude product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Column chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 50% EtOAc:Hexane ได้ผลิตภัณฑ์ **17** 0.0466 g (83% yield) ลักษณะของแข็งสีขาว มีค่า $R_f = 0.51$ (ในระบบตัวทำละลาย 50% EtOAc:Hexane) นำสาร **17** ที่สังเคราะห์ได้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยเทคนิค NMR-spectroscopy

ข้อมูลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ 17

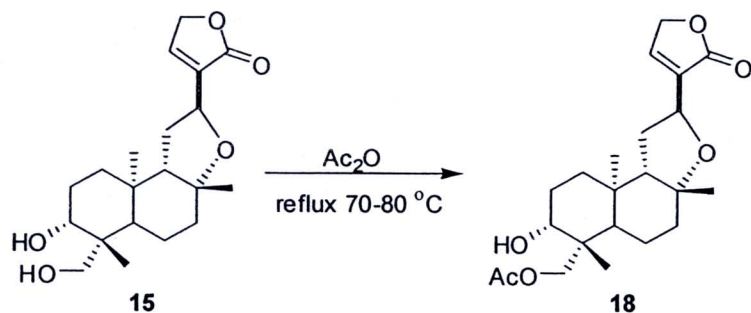


Compound 17 : $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ 0.93-1.06 (2H, m, H-5, H-7a), 1.11 (3H, s, H-18), 1.17 (3H, s, H-17), 1.23 (3H, s, H-20), 1.37 (3H, s, H-21), 1.44 (3H, s, H-22), 1.41 -1.78 (6H, m, H-2, H-6, H-7b, H-9), 1.97-2.08 (2H, m, H-1a, H-11a), 2.16-2.23 (1H, m, H-1b), 2.43 (1H, dd, $J = 14.0, 8.0$ Hz, H-11b), 3.26 (1H, d, $J = 11.5$ Hz, H-19a), 3.46 (1H, dd, $J = 10.0, 4.0$ Hz, H-3), 4.08 (1H, d, $J = 11.5$ Hz, H-19b), 4.72 (1H, tm, $J = 8.0$ Hz, H-12), 4.81 (2H, brdd, $J = 3.0, 1.5$ Hz, H-15), 7.28 (1H, dd, $J = 3.0, 1.5$ Hz, H-14)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) : δ 17.22 (C-18), 17.55 (C-6), 25.12 (C-22), 22.89 (C-21), 26.60 (C-2), 27.73 (C-4), 31.68 (C-17), 32.82 (C-11), 35.11 (C-10), 36.00 (C-1), 37.08 (C-20), 37.10 (C-7), 50.51 (C-5), 57.88 (C-9), 63.69 (C-19), 70.49 (C-15), 73.09 (C-12), 77.70 (C-3), 82.81 (C-8), 98.70 (C-23), 139.56 (C-13), 143.10 (C-14), 172.57 (C-16)

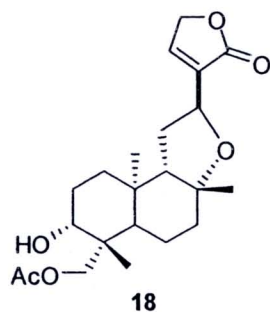


14. ปฏิกิริยาของสารอนุพันธ์ Isoandrographolide **15** และ Acetic anhydride (Ac_2O)



นำ Isoandrographolide **15** (0.0205 g, 0.06 mmol) ใส่ลงในหลอดทำปฏิกิริยา จากนั้นใส่ Acetic anhydride 1.0 mL คนจนสารละลายหมด reflux ที่อุณหภูมิ 70–80 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (ตรวจสอบปฏิกิริยาด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 50% EtOAc:Hexane ทุกๆ ครึ่งชั่วโมง) สังเกตจนสารตั้งต้นหมดจึงหยุดปฏิกิริยา การหยุดปฏิกิริยาทำโดยนำสารละลายจากปฏิกิริยาที่สังเคราะห์ได้ใส่ลงในสารละลายอิ่มตัวของ NaHCO_3 ที่เย็น และสกัดด้วย EtOAc จำนวน 3 ครั้ง ล้างด้วยน้ำ และสารละลายอิ่มตัวของ NaCl อย่างละ 1 ครั้ง ตามลำดับ ทำให้แห้งด้วย anhyd. Na_2SO_4 กรองและระเหยตัวทำละลายออก ได้ Crude product เป็นของเหลวหนืดสีเหลือง นำ Crude product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Column chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 50% EtOAc:Hexane ได้ผลิตภัณฑ์ **18** 0.0119 g (50% yield) ลักษณะของแข็งสีขาว มีค่า $R_f = 0.30$ (ในระบบตัวทำละลาย 50% EtOAc : Hexane) นำสาร **18** ที่สังเคราะห์ได้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยเทคนิค NMR-spectroscopy

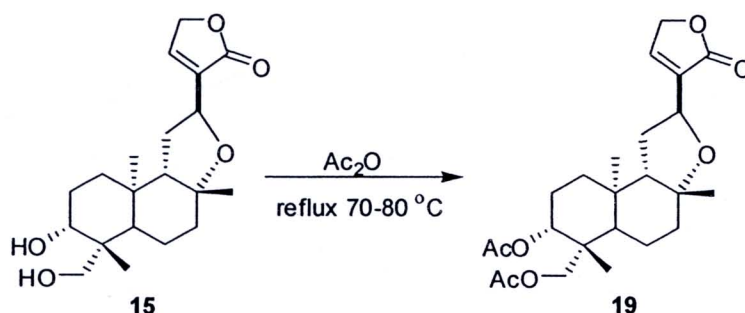
ข้อมูลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ 18



Compound **18** : $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ 0.95-1.85 (9H, m, H-1a, H-2, H-5, H-6, H-7, H-9), 0.98 (3H, s, H-18), 1.11 (3H, s, H-17), 1.17 (3H, s, H-20), 1.99-2.10 (1H, m, H-1b), 2.05 (3H, s, COCH_3), 2.18 -2.24 (1H, m, H-11a), 2.45 (1H, dd, $J = 14.0, 8.0$ Hz, H-11b), 3.30 (1H, dd, $J = 11.0, 5.0$ Hz, H-3), 4.17 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-19a), 4.40 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-19b), 4.71 (1H, tm, $J = 8.0$ Hz, H-12), 4.81 (2H, brs, H-15), 7.28 (1H, dd, $J = 3.5, 2.0$ Hz, H-14)

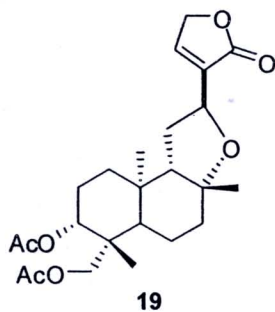
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) : δ 16.07 (C-18), 18.53 (C-6), 21.07 (COCH_3), 22.70 (C-20), 27.05 (C-2), 31.47 (C-17), 32.88 (C-11), 35.85 (C-10), 36.38 (C-1), 39.35 (C-7), 42.14 (C-4), 52.90 (C-5), 57.99 (C-9), 65.04 (C-19), 70.48 (C-15), 73.21 (C-12), 79.27 (C-3), 82.69 (C-8), 138.43 (C-13), 143.14 (C-14), 171.03 (COCH_3), 172.50 (C-16)

15. ปฏิกิริยาของสารอนุพันธ์ Isoandrographolide **15** และ Acetic anhydride (Ac_2O)



นำ Isoandrographolide **15** (0.0200 g, 0.06 mmol) ใส่ลงในหลอดทำปฏิกิริยา จากนั้นใส่ Acetic anhydride 1.0 mL คนด้วย magnetic stirrer จนสารละลายหมด แล้ว reflux ที่อุณหภูมิ 135 – 140 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (ตรวจสอบปฏิกิริยาด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 30% EtOAc:Hexane ทุกๆ ครึ่งชั่วโมง) สังเกตจนสารตั้งต้นหมดจึงหยุดปฏิกิริยา การหยุดปฏิกิริยาทำโดยนำสารละลายจากปฏิกิริยาที่สังเคราะห์ได้ใส่ลงในสารละลายอิ่มตัวของ NaHCO_3 ที่เย็น และสกัดด้วย EtOAc จำนวน 3 ครั้ง ล้างด้วยน้ำ และสารละลายอิ่มตัวของ NaCl อย่างละ 1 ครั้ง ตามลำดับ ทำให้แห้งด้วย anhyd. Na_2SO_4 กรองและระเหยตัวทำละลายออก ได้ Crude product เป็นของเหลวหนืดสีเหลือง นำ Crude product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Column chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 30% EtOAc:Hexane ได้ผลิตภัณฑ์ **19** 0.0162 g (81% yield) ลักษณะของแข็งสีขาว $R_f = 0.25$ (ในระบบตัวทำละลาย 30% EtOAc:Hexane) นำสาร **19** ที่สังเคราะห์ได้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเทคนิค NMR-spectroscopy

ข้อมูลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ 19



Compound **19** : $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ 0.99-1.26 (2H, m, H-5, H-7a), 1.00 (3H, s, H-18), 1.03 (3H, s, H-17), 1.09 (3H, s, H-20), 1.41-1.81 (7H, m, H-1a, H-2, H-6, H-7b, H-9), 1.98-2.08 (1H, m, H-1a), 2.02 (3H, s, COCH_3), 2.04 (3H, s, COCH_3), 2.19 (1H, dt, $J = 14.0$, 3.5 Hz, H-11a), 2.44 (1H, dd, $J = 14.0$, 8.0 Hz, H-11b), 4.17 (1H, d, $J = 11.5$ Hz, H-19a), 4.38 (1H, d, $J = 11.5$ Hz, H-19b), 4.56 (1H, dd, $J = 10.0$, 5.5 Hz, H-3), 4.70 (1H, tm, $J = 8.0$ Hz, H-12), 4.80 (2H, brs, H-15), 7.27 (1H, dd, $J = 3.0$, 1.5 Hz, H-14)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) : δ 15.77 (C-18), 18.84 (C-6), 21.03 (COCH_3), 21.14 (COCH_3), 23.05 (C-20), 23.53 (C-2), 31.44 (C-17), 32.84 (C-11), 35.73 (C-10), 36.42 (C-1), 39.02 (C-7), 40.88 (C-4), 52.88 (C-5), 57.84 (C-9), 65.02 (C-19), 70.48 (C-15), 73.22 (C-12), 80.08 (C-3), 82.59 (C-8), 138.40 (C-13), 143.11 (C-14), 170.55 (COCH_3), 170.85 (COCH_3), 172.47 (C-16)