รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
โครงการวิจัย
เรื่อง

การเปลี่ยนโครงสร้างของสารสกัดจากสมุนไพรฟ้าทะลายโจร เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อโรคปริทันต์

Structure modification of compounds from *Andrographis paniculata* for study in inhibitory effect against periodontal disease

โดย
นางสาวรุ่งนภา แซ่เอ็งและคณะ

ทุนสนับสนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2554
มหาวิทยาลัยบูรพา

สารบัญ

บทคัดย่อ

จากรายงานการวิจัยว่าส่วนสกัดของสมุนไพรฟ้าทะลายโจรมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ Porphyromonas gingivalis ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคปริทันต์ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเจลซึ่งมีส่วนผสมของส่วนสกัดฟ้าทะลายโจรมีประสิทธิภาพรักษาโรคปริทันต์เช่นเดียวกับ minocyclin ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะ จากรายงานดังกล่าวทำให้กลุ่มผู้วิจัยสนใจที่จะเพิ่มประสิทธิภาพของสาร andrographolide ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในสมุนไพรไทยฟ้าทะลายโจรในการยับยั้งแบคทีเรียซึ่งเป็นสาเหตุของโรคปริทันต์ โดยทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสารสกัดสำคัญ คือ andrographolide ในฟ้าทะลายโจรให้เป็นอนุพันธ์ใหม่ๆ และศึกษาหาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อโรคปริทันต์ของอนุพันธ์ใหม่ที่ได้ จากการศึกษาการสังเคราะห์สารพบว่าสามารถประสบผลสำเร็จโดยสามารถสังเคราะห์สารอนุพันธ์ andrographolide ในปีแรกได้ 19 ตัว ด้วยวิธีที่ง่าย สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตและให้ร้อยละของการผลิตที่ดี

บทนำ

สืบเนื่องจากจากการสำรวจของกองทันตสาธารณสุข กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข ในปี 2552 พบว่าโรคปริทันต์ (Periodontal Disease) หรือโรคเหงือกอักเสบ เป็นโรคที่เกิดขึ้นกับคนไทยจำนวนมาก จากการสำรวจพบว่าเด็กไทยอายุ 12 ปีเป็นโรคปริทันต์อักเสบ หรือ โรคเหงือกอักเสบแล้วถึงร้อยละ 80 ของเด็กไทย และกลุ่มวัยทำงานเป็นโรคปริทันต์อักเสบถึงร้อยละ 40 และเพิ่มมากขึ้นถึงร้อยละ 80-90 ในผู้สูงอายุ กล่าวได้ว่าโรคปริทันต์เป็นโรคที่เกิดได้กับทุกคนในครอบครัวนั่นเอง นอกจากโรคนี้จะทำให้เกิดการสูญเสียฟันแล้วยังทำให้เกิดการติดเชื้อเรื้อรังในช่องปาก ทำให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพโดยเพิ่มความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหัวใจและหลอดเลือด ทำให้คนไข้เบาหวานควบคุมน้ำตาลในเลือดได้ยาก และในหญิงมีครรภ์ยังเพิ่มความเสี่ยงต่อการคลอดทารกก่อนกำหนด ปัญหาดังกล่าวได้ส่งผลให้นักวิทยาศาสตร์สนใจในการศึกษาการใช้สมุนไพรไทยในการรักษาโรคปริทันต์

รายงานที่เป็นที่สนใจอย่างมากคือเมื่อเร็วๆนี้ มีกลุ่มนักวิจัยไทยจากคณะเภสัชศาสตร์และคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้จดสิทธิบัตรเจลฟ้าทะลายโจรรักษาโรคปริทันต์อักเสบ ซึ่งเจลฟ้าทะลายโจรดังกล่าวได้ทดลองใช้รักษาคนไข้โรคปริทันต์อักเสบมาแล้วทั่วประเทศกว่า 2,000 ราย และอยู่ในระหว่างการทดลองระดับคลินิกเพื่อเก็บข้อมูลในการขอขึ้นทะเบียนยากับสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.)

นอกจากนี้ยังมีรายงานผลงานวิจัยของนักวิทยาศาสตร์ไทยว่าส่วนสกัดของสมุนไพรฟ้าทะลายโจรมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ Porphyromonas gingivalis ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคปริทันต์และมีประสิทธิภาพรักษาโรคปริทันต์เช่นเดียวกับ minocyclin ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะ รวมทั้งรายงานวิจัยถึงการเปรียบเทียบผลของการใช้เจลฟ้าทะลายโจรเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะ metronidazole รักษาโรคปริทันต์ พบว่าให้ผลเช่นเดียวกัน

จากความสำคัญดังกล่าวทำให้กลุ่มผู้วิจัยสนใจที่จะเพิ่มประสิทธิภาพของสาร andrographolide ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในสมุนไพรไทยฟ้าทะลายโจรในการยับยั้งแบคทีเรียซึ่งเป็นสาเหตุของโรคปริทันต์ นอกเหนือจากการใช้ในรูปของเจลที่มีส่วนสกัด กลุ่มผู้วิจัยสนใจพัฒนาต่อยอดโดยทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสารสกัดสำคัญ andrographolide ในฟ้าทะลายโจรให้เป็นอนุพันธ์ใหม่ๆ และศึกษาหาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อโรคปริทันต์ของอนุพันธ์ใหม่และปรับปรุงให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งโรคมากขึ้นเพื่อพัฒนาสู่การนำไปใช้เป็นยาแผนปัจจุบันและปรับปรุงจนสามารถแข่งขันกับยาปฏิชีวนะจากต่างประเทศได้ ซึ่งจะถือเป็นอีกก้าวหนึ่งของการส่งเสริมสมุนไพรไทย และเป็นการพัฒนาองค์ความรู้เพื่อรับมือกับปัญหาโรคปริทันต์ในประเทศไทย

ก่อนหน้ารายงานการจดสิทธิบัตรได้มีรายงานผลงานวิจัยของกลุ่มนักวิทยาศาสตร์ไทยว่าส่วนสกัดของสมุนไพรฟ้าทะลายโจรมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ Porphyromonas gingivalis ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคปริทันต์ [1,2] นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเจลซึ่งมีส่วนผสมของส่วนสกัดฟ้าทะลายโจรมีประสิทธิภาพรักษาโรคปริทันต์เช่นเดียวกับ minocyclin ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะ [3,4] มีรายงานวิจัยถึงการเปรียบเทียบผลของการใช้เจลฟ้าทะลายโจรเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะ metronidazole รักษาโรคปริทันต์ พบว่าให้ผลเช่นเดียวกันและให้ผล antibacterial ดีกว่าเจล monocyclin [5]

จากความสำคัญดังกล่าวทำให้กลุ่มผู้วิจัยสนใจที่จะเพิ่มประสิทธิภาพของสาร andrographolide ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในสมุนไพรไทยฟ้าทะลายโจรในการยับยั้งแบคทีเรียซึ่งเป็นสาเหตุของโรคปริทันต์ นอกเหนือจากการใช้ในรูปของเจลที่มีส่วนสกัด กลุ่มผู้วิจัยสนใจพัฒนาต่อยอดโดยทำการปรับเปลี่ยน

โครงสร้างของสารสกัดสำคัญ andrographolide ในฟ้าทะลายโจรให้เป็นอนุพันธ์ใหม่ๆ และศึกษาหาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อโรคปริทันต์ของอนุพันธ์ใหม่เปรียบเทียบกับสาร andrographolide และปรับปรุงอนุพันธ์ให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งโรคมากขึ้น รวมทั้งหาวิธีสังเคราะห์ของอนุพันธ์ดังกล่าวโดยใช้ต้นทุนต่ำและในระดับสเกลใหญ่

โรคปริทันต์ (Periodontal Disease) หรือโรคเหงือกอักเสบ เป็นโรคที่เกิดขึ้นกับได้กับอวัยวะรอบๆฟัน อันได้แก่ เหงือก, กระดูกเบ้าฟัน, เอ็นยึดปริทันต์ และผิวรากฟัน สาเหตุมาจากการขาดการดูแลรักษาความสะอาดช่องปากอย่างถูกวิธี ทำให้เกิดการสะสมของคราบจุลินทรีย์และหินปูน คราบจุลินทรีย์ประกอบด้วยเชื้อโรคจำนวนมากที่ทำให้เกิดเหงือกอักเสบ จุลินทรีย์หรือแบคทีเรียพวกนี้เมื่อมีการบริโภคอาหารจำพวกแป้งและน้ำตาลเข้าไปจะปล่อยกรดและสารพิษออกมาเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาการอักเสบ ผลคือทำให้เหงือกบวมแดงอักเสบและมีเลือดออก ทำให้เกิดการทำลายอวัยวะปริทันต์

เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคปริทันต์มีสาเหตุจากเชื้อ *Porphyromonas gingivalis* และแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* (แบคทีเรียในช่องปากที่เปลี่ยนน้ำตาลบนเคลือบฟันให้เป็นกรด อันเป็นสาเหตุของโรคฟันผุ) ดังนั้นรายงานวิจัยส่วนใหญ่จึงเน้นที่การหาสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อของโรคปริทันต์ทั้งสองชนิดดังกล่าว

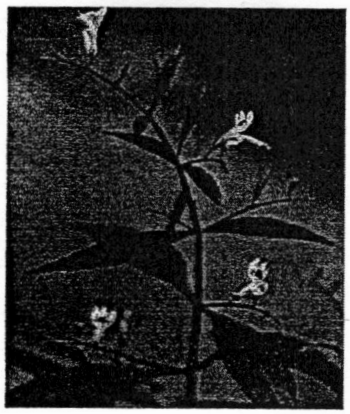
มีการรายงานการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อปริทันต์ชนิด *Streptococcus mutans* ในหลอดทดลองโดยนักวิทยาศาสตร์ชาวไทย Jittra Limsong และคณะ [6] โดยใช้ส่วนสกัด ethanol ของสมุนไพรไทยหกชนิด คือ ใช้ส่วนเหนือดินของต้นฟ้าทะลายโจร *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees (Acanthaceae), ใบชุมเห็ดเทศ. *Cassia alata* L. (Leguminosae), ใบชาจีน ชาดำ Chinese black tea *(Camellia sinensis)*, ใบข่อย *Streblus asper* Lour. (Moraceae), ใบฝรั่ง guava (*Psidium guajava* L. (Myrtaceae)) และกิ่งสีฟันคนทา *Harrisonia perforata* (Lour.) Merr. (Simaroubaceae) จากผลการทดสอบพบว่าฟ้าทะลายโจร ใบชุมเห็ดเทศ ใบชาจีนและกิ่งสีฟันคนทามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อปริทันต์ชนิด *Streptococcus mutans*

นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อของโรคปริทันต์อักเสบของสาร polyphenolic ที่แยกได้จากชาเขียว (*Camellia sinensis*) โดยนักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่น [7] ซึ่งพบว่าสารในชาเขียวสามารถยับยั้งเชื้อ *Porphyromonas gingivalis* *ไม่ให้สร้างสารพิษที่ก่อให้เกิดโรค*ปริทันต์ ปริมาณสารที่ใช้ในการศึกษา คือ ประมาณ 50-150 mg ซึ่งปริมาณนี้มีอยู่ในน้ำชา 1 แก้ว (100 ml)

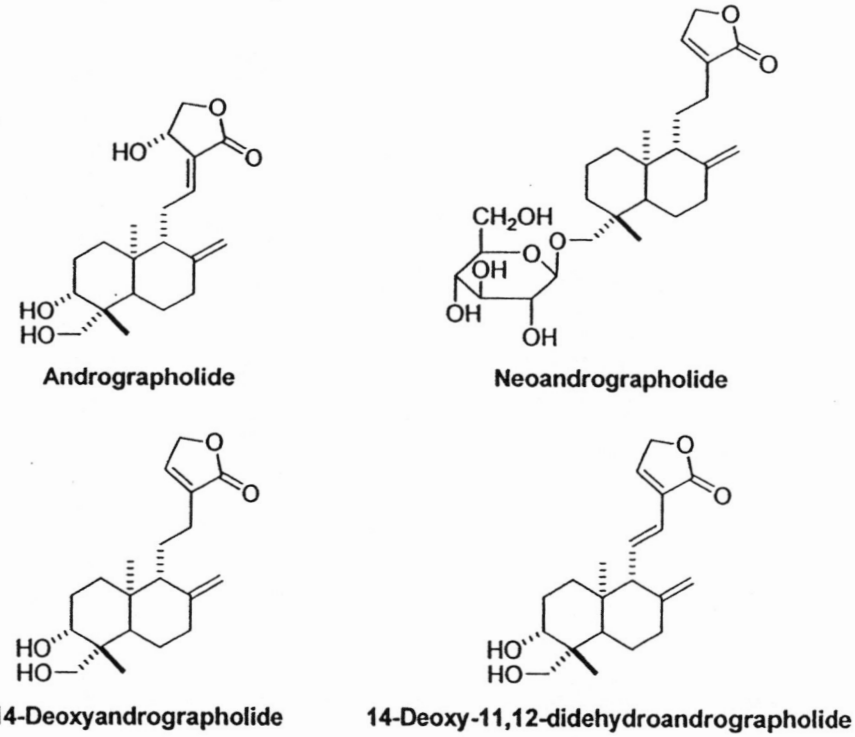
มีรายงานการใช้ศึกษาสารสกัดจากผลองุ่น Thompson seedless raisins (Vitis vinifera) พบว่า oleanolic acid, oleanolic aldehyde, และ β-sitosterol ในผลองุ่นสามารถยับยั้งเชื้อโรคปริทันต์เชื้อ *Porphyromonas gingivalis* และ *Streptococcus mutans* [8] นอกจากนี้มีรายงานอื่นๆ เช่นรายงานโดยนักวิจัยชาวไต้หวันพบว่าสมุนไพรจีน Ching-Wei-San สามารถยับยั้งเชื้อโรคปริทันต์ทั้งสองชนิดได้เช่นกัน [9] รวมถึง Binaphthalenone glycosides จากกิ่งไม้ต้น Diospyros lycioides [10] ในขณะที่สาร triterpenoid glycoside จากรากของ Mussaenda macrophylla ต้นไม้ในประเทศเนปาล [11] สามารถยับยั้งเชื้อโรคปริทันต์ เชื้อ *Porphyromonas gingivalis* แต่ไม่ยับยั้งเชื้อ *Streptococcus mutans*

ฟ้าทะลายโจร มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wall. ex Nees ซึ่งอยู่ในวงศ์ Acanthaceae มีชื่อท้องถิ่นว่า ซีปังกี ฟ้าทะลาย หรือหญ้ากันงู เป็นพืชพบในแถบเอเชีย ใช้เป็นสมุนไพรพื้นบ้านในประเทศจีน อินเดียและกลุ่มประเทศอาเซียน มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ว่าส่วนสกัดของฟ้าทะลาย

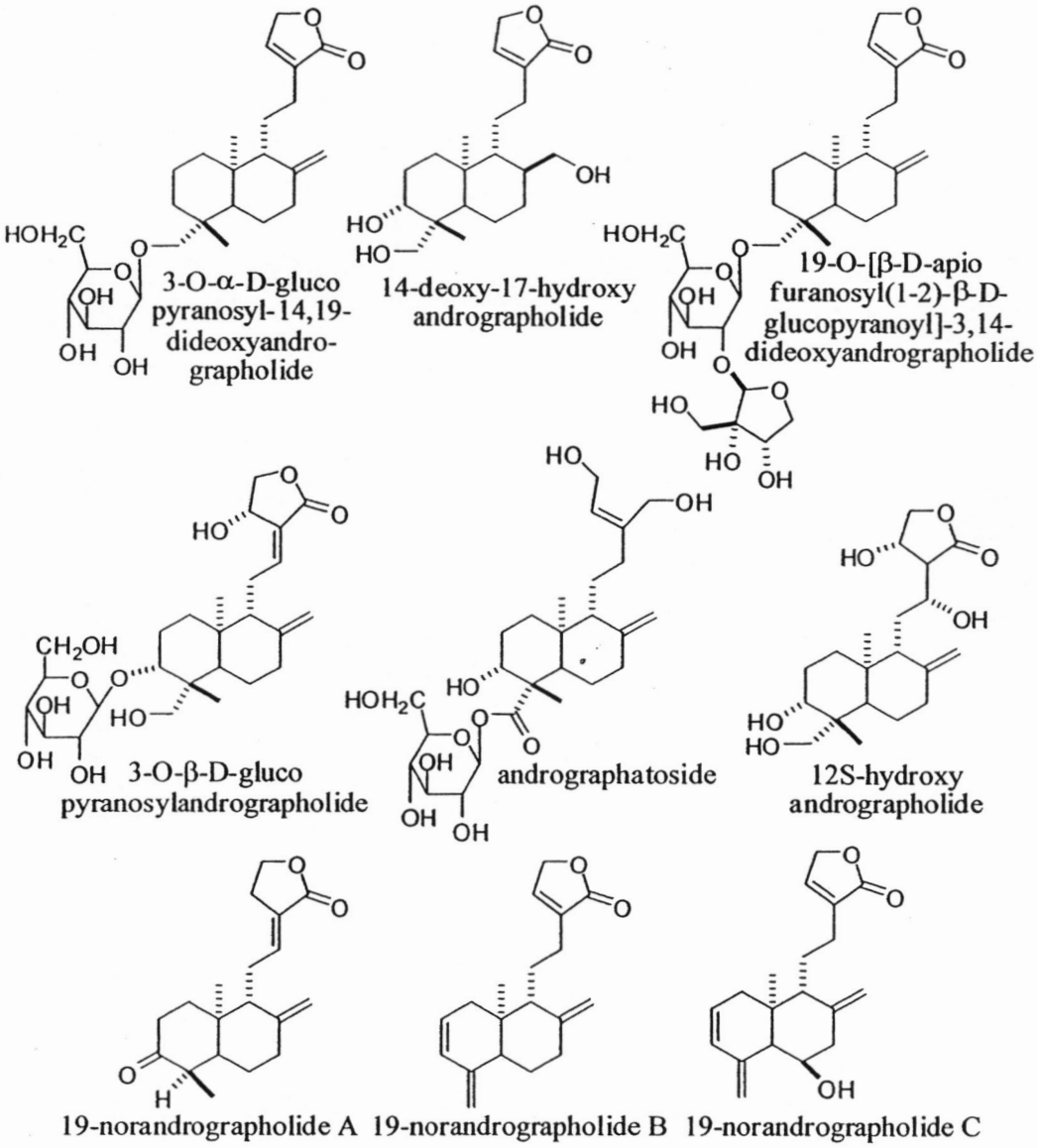
โจรมีสารสำคัญในกลุ่ม diterpene lactones และมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย เช่น antibacterial [12], anti-inflammatory [13], antimalarial [14], immuno stimulant [15], hepatoprotective [16] และ antithrombotic [17]



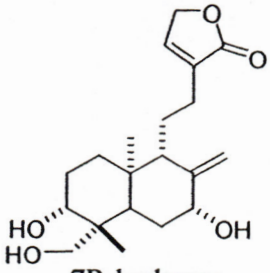
ส่วนเหนือดินฟ้าทะลายโจร มีสารสำคัญจำพวก diterpene lactones หลายชนิด [18] ได้แก่ andrographolide, neoandrographolide, deoxyandrographolide, deoxy-didehydro andrographolide ซึ่งมีโครงสร้างสารดัง**รูปที่ 1**



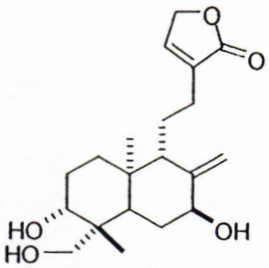
รูปที่ 1 สารสำคัญจำพวก diterpene lactones หลายชนิดในส่วนเหนือดินฟ้าทะลายโจร



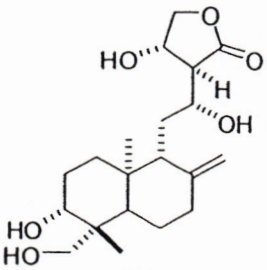
รูปที่ 1 สารสำคัญจำพวก diterpene lactones หลายชนิดในส่วนเหนือดินฟ้าทะลายโจร



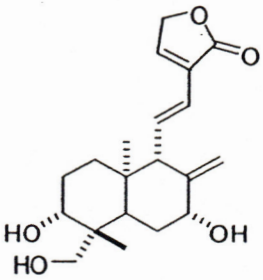
7R-hydroxy-14-deoxyandrographolide



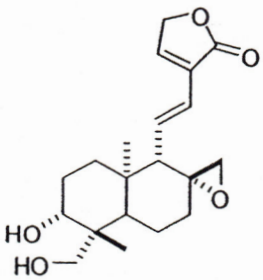
7S-hydroxy-14-deoxyandrographolide



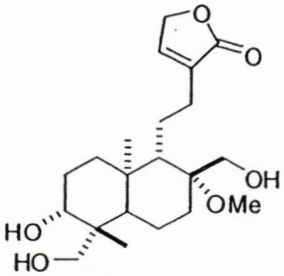
12S,13S-hydroxy andrographolide



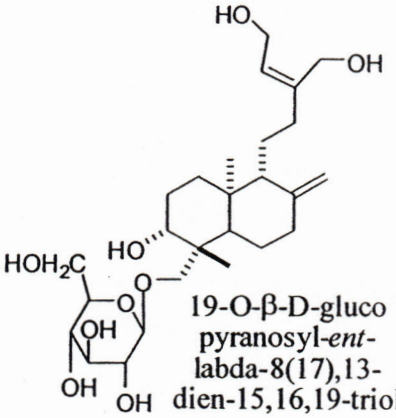
3,7,19-trihydroxy-8,11,13-ent-labdatrien-15,16-olide



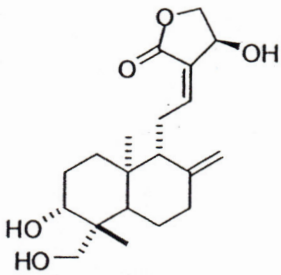
8α,17β-epoxy-3,19-dihydroxyl-11,13-ent-labdatrien-15,16-olide



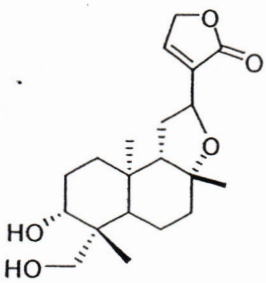
8α-methoxyl-14-deoxy-17β-hydroxy andrographolide



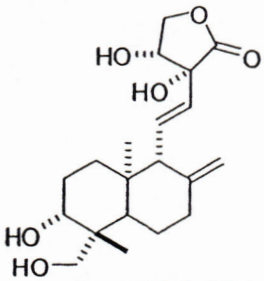
19-O-β-D-gluco pyranosyl-*ent*-labda-8(17),13-dien-15,16,19-triol



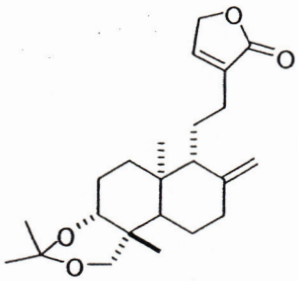
andropanolide



isoandrographolide



(13R,14R) 3,13,14,19-tetrahydroxy-ent-labda-8(17),11-dien-16,15-olide



3,19-isopropylidene-14-deoxy-ent-labda-8(17),13-dien-16,15-olide

รูปที่ 1 สารสำคัญจำพวก diterpene lactones หลายชนิดในส่วนเหนือดินฟ้าทะลายโจร

สำหรับสารสำคัญ คือ andrographolide มีโครงสร้างที่ประกอบด้วยหมู่ hydroxyl จำนวน 3 หมู่ ส่วนของ α-alkylidene χ-butyrolactone จัดตัวอยู่ในรูป envelop conformation และวงหกเหลี่ยม 2 วงติดกันโดยจัดตัวอยู่ในรูป chair conformation ทั้งคู่ [19]

จากผลการวิจัยต่างๆ ได้มีการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าสารสกัดหรือสารสำคัญของฟ้าทะลายโจรมีฤทธิ์หลายประการ แต่ฤทธิ์ที่สำคัญต่อการรักษาโรคปริทันต์ น่าจะอยู่ในกลุ่มของ

1. ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

ผงใบฟ้าทะลายโจรเมื่อสกัดด้วย alcohol แสดงฤทธิ์ต้านอักเสบ มีฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาว กลไกการออกฤทธิ์ต้านอักเสบของฟ้าทะลายโจร ส่วนหนึ่งอาจเนื่องมาจากฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้าง nitric oxide (NO)

2. ฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

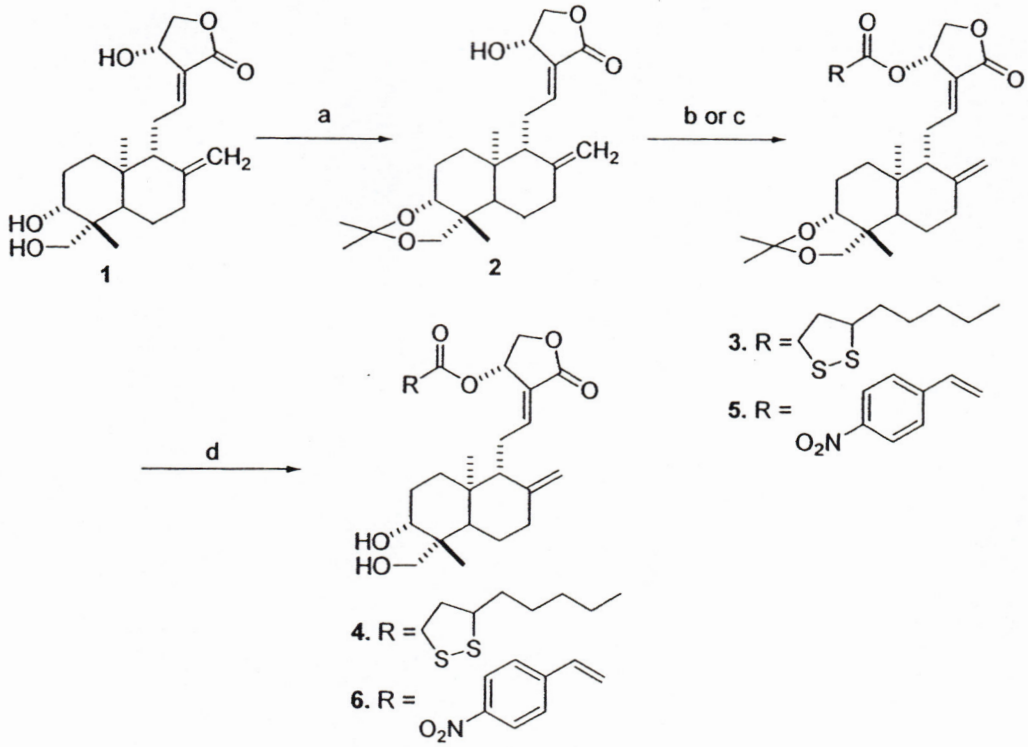
สารสกัดฟ้าทะลายโจรด้วย ethanol 70% และ 80% สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการท้องเสีย ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Vibrio cholerae* ซึ่งสารสำคัญในการออกฤทธิ์ คือ androgapholide และ deoxyandrographolide นอกจากนี้สารสกัดฟ้าทะลายโจรแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *Porphyromonas gingivalis* ซึ่งทำให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบ (periodontitis) ได้ จึงมีการนำไปพัฒนาเป็นเจลสำหรับรักษาโรคดังกล่าว นอกจากนี้สารสกัดหยาบของฟ้าทะลายโจร สามารถยับยั้งการจับของแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* (แบคทีเรียในช่องปากที่เปลี่ยนน้ำตาลบนเคลือบฟันให้เป็นกรด อันเป็นสาเหตุของโรคฟันผุ)

จากหลักฐานการตรวจสอบทางพิษวิทยา (toxicology) มีการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน พิษกึ่งเรื้อรัง และพิษเรื้อรัง พบว่าไม่ก่อให้เกิดพิษ และการทดสอบความเป็นพิษต่อระบบสืบพันธุ์ของหนูเพศผู้และเพศเมีย ไม่พบพิษต่อระบบสืบพันธุ์ จากการตรวจสอบพบว่าเมื่อสาร andrographolide เข้าสู่ร่างกายจะกระจายไปยังระบบประสาทส่วนกลาง (สมอง และไขสันหลัง (spinal cord) และอวัยวะอื่น ได้แก่ ลำไส้ ม้าม หัวใจ ปอด และไต ร่างกายสามารถกำจัดสารนี้ออกจากร่างกายในปริมาณ 80% ของสารที่ได้รับภายใน 8 ชั่วโมง และมากกว่า 90% ภายใน 48 ชั่วโมง

จากหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ ที่กล่าวข้างต้น ทั้ง ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา การศึกษาทางคลินิก และพิษวิทยา ทำให้ได้ข้อสรุปว่าฟ้าทะลายโจรมีความปลอดภัยที่จะนำมาใช้ในการรักษาโรค เนื่องจากไม่ปรากฏอาการเป็นพิษ แต่อย่างไรก็ตาม ควรใช้อย่างระมัดระวังในผู้ป่วยที่มีอาการติดเชื้อรุนแรง ในเด็กเล็ก และผู้สูงอายุ ตลอดจนคนที่เป็นโรคหัวใจ

งานวิจัยการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของ Andrographolide

รายงานวิจัยการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของ Andrographolide เพื่อเพิ่มฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียพบเพียงรายงานเดียว คือรายงานในปี 2009 Xiaojian Jiang และคณะ [20] ได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Andrographolide และทดสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย พบว่าสารประกอบชนิดใหม่นี้ให้ผลในการยับยั้งแบคทีเรียได้มากกว่า Andrographolide สารประกอบ 4 สามารถยับยั้งการสร้าง Pseudomonas aeruginosa biofilm ได้ และให้ฤทธิ์ต้านเชื้อโรคเพิ่มมากขึ้น จากการตรวจสอบพบว่าสารประกอบ 4 อาจจะพัฒนาเป็นยาได้ในอนาคต เนื่องจากสารนี้สามารถต้านการสร้าง biofilm ของแบคทีเรีย ขั้นตอนในการสังเคราะห์แสดงดัง**รูปที่** 2



Reagents and conditions: (a) 2,2-dimethoxypropane/benzene and DMSO/PPTS/8h; (b) for **3**, alphalipoic acid/ClCOOEt/NEt_3/CH_2Cl_2/2 d;; (c) for **5**, 4-nitrocinnamic acid/ClCOOEt/NEt_3/CH_2Cl_2/2 d; (d) AcOH/H_2O/1h.

รูปที่ 2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Andrographolide เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย

วิธีการทดลองและผลการทดลอง

การเตรียมตัวอย่างฟ้าทะลายโจร และการสกัด Andrographolide จากต้นฟ้าทะลายโจร

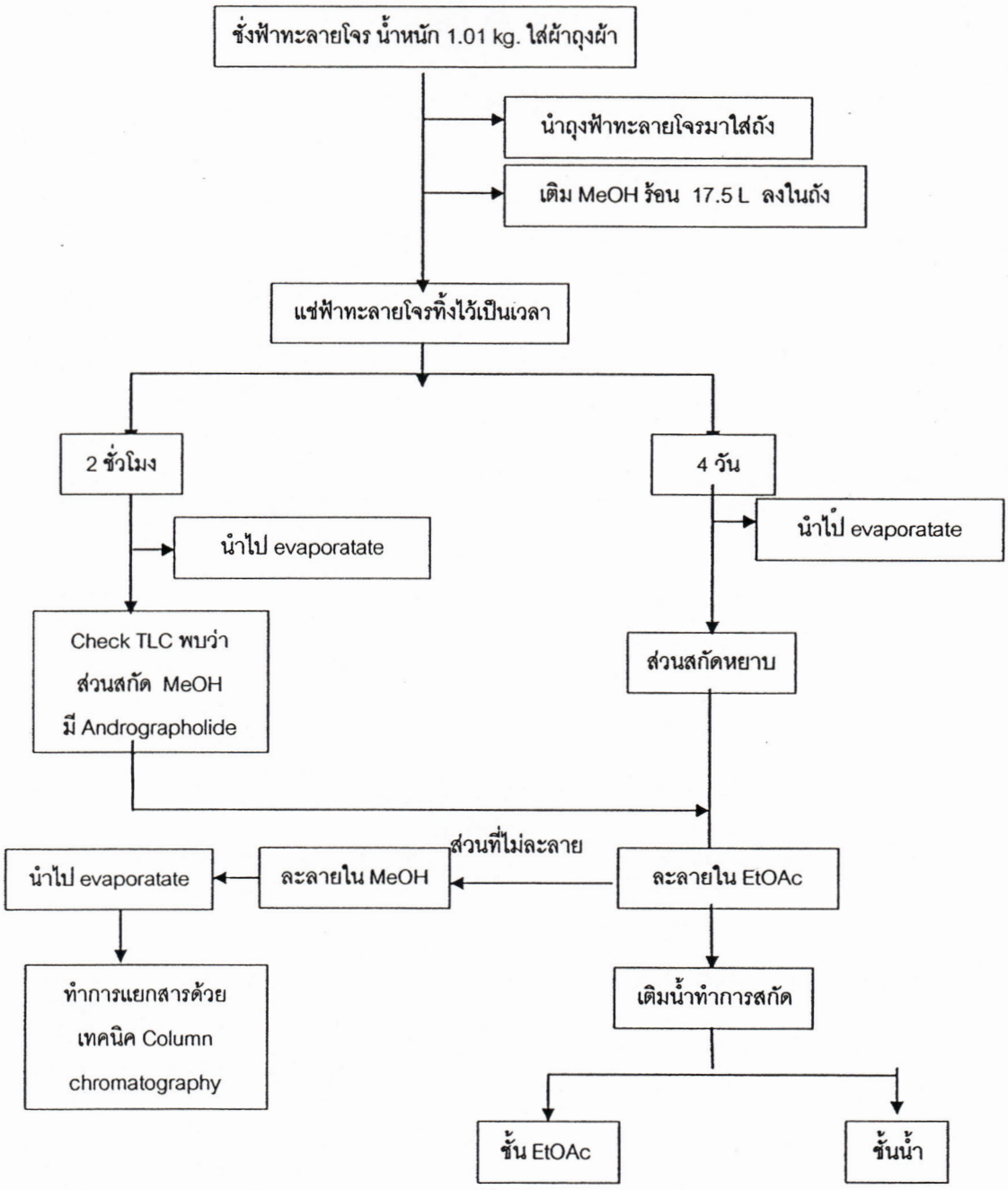
พืชสมุนไพร : ฟ้าทะลายโจร ส่วนเหนือดินและราก เก็บในช่วง 110 วัน ซึ่งผ่านการตากและอบแห้ง

แหล่งที่มา : ตำบลยางหัก อำเภอปากท่อ จังหวัดราชบุรี

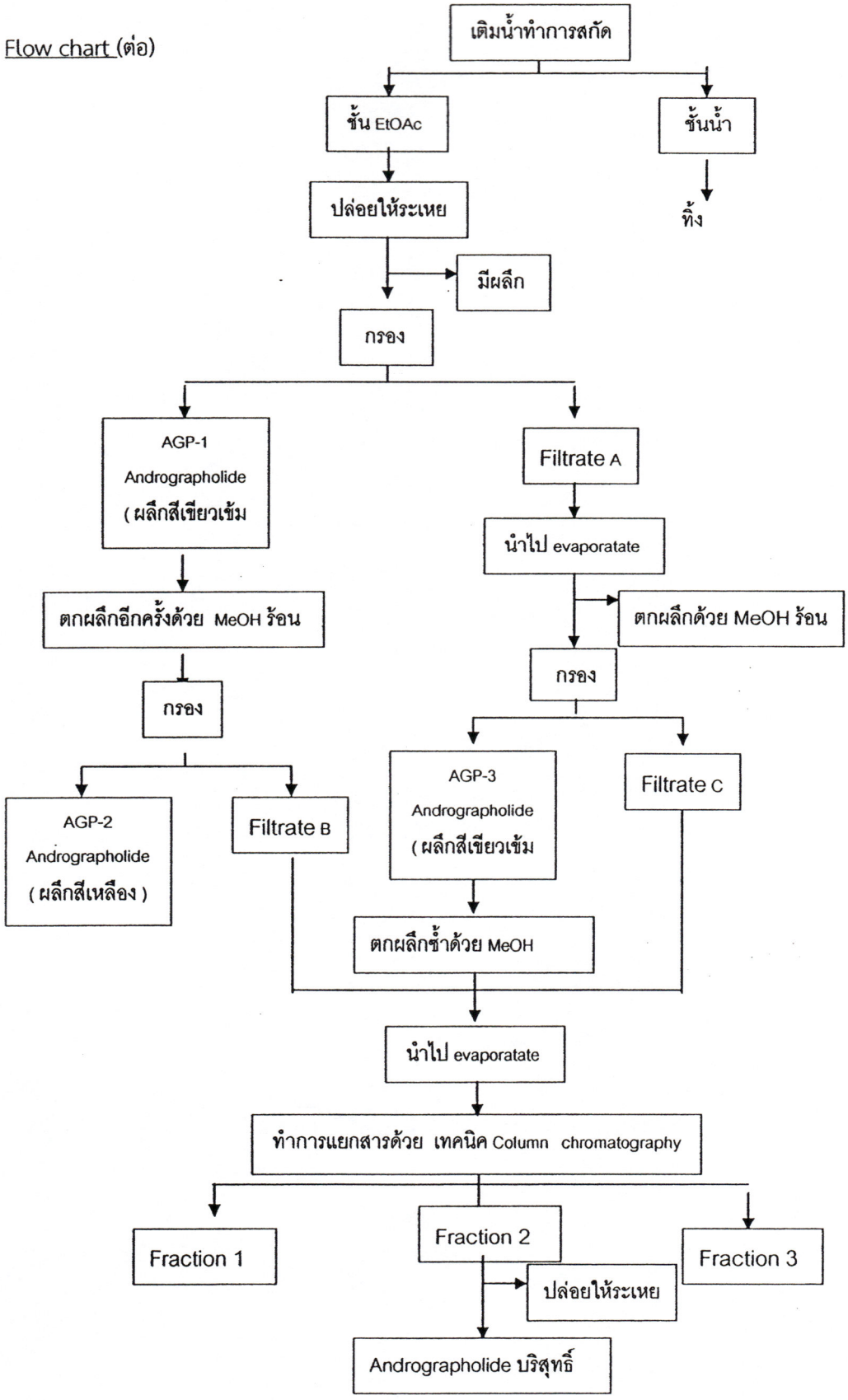
นำต้นฟ้าทะลายโจรน้ำหนัก 1.01 kg บรรจุลงในถุงผ้าดิบ และนำไปใส่ในถังสกัด ทำการสกัดด้วย Methanol ร้อน ปริมาตร 17.5 L แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 4 วัน ทำการตรวจสอบสารสกัดด้วย TLC เทียบกับสาร Andrographolide มาตรฐาน โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 70% EtOAc : Hexane แล้วนำมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator จะได้ ส่วนสกัดหยาบฟ้าทะลายโจร จากนั้นนำส่วนสกัดหยาบที่ได้มาละลายด้วย Ethyl acetate พบว่ามีทั้งส่วนที่ละลายและไม่ละลาย จากนั้นนำส่วนที่ไม่ละลายใน Ethyl acetate มาละลายด้วย Methanol แล้วนำมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator และทำการแยกสารด้วยเทคนิค Column chromatography นำส่วนที่ละลายใน Ethyl acetate มาสกัดด้วยน้ำ นำชั้น Ethyl acetate มาระเหยให้ปริมาณตัวทำละลายน้อยลง พบว่ามีผลึกเกิดขึ้นซึ่งเมื่อนำมากรองจะได้ผลึกสีเขียวเข้ม (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 นำผลึกAndrographolide 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

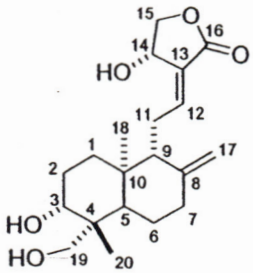
แผนผังวิธีการสกัด Andrographolide จากต้นฟ้าทะลายโจร



Flow chart (ต่อ)



นำสาร andrographolide **1** ที่สกัดแยกได้บริสุทธิ์จากต้นฟ้าทะลายโจรไปพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยเทคนิค NMR-spectroscopy แสดงได้ดังรูป



1

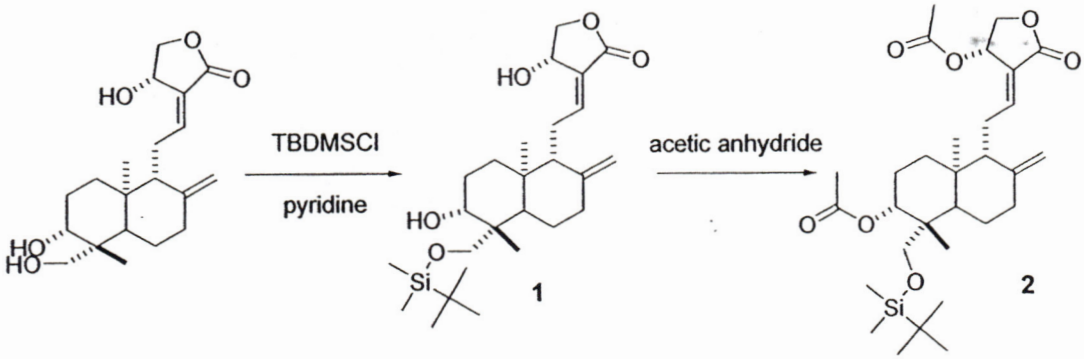
ข้อมูลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของ andrographolide

Andrographolide **1** : ^{1}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}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)

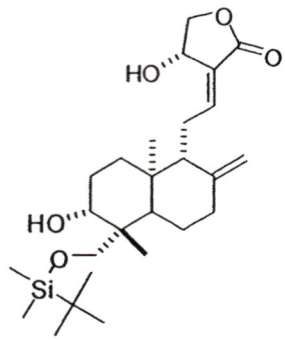
ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันของ andrographolide

1. ปฏิกิริยาของ Andrographolide และ TBDMSCl



นำ Andrographolide (0.0100 g, 0.03 mmol) ใส่ลงในหลอดทำปฏิกิริยา เติม pyridine 200 μL 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



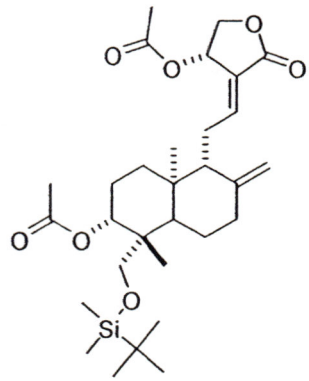
1

Compound **1** : ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 0.05 (3H, s, $Si(CH_3)_2$), 0.06 (3H, s, $Si(CH_3)_2$), 0.70 (3H, s, H-20), 0.88 (9H, s, $SiC(CH_3)_3$), 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}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) : δ -1.10 ($Si(CH_3)_2$), 15.45 (C-20), 18.03 ($SiC(CH_3)_3$), 23.14 (C-18), 23.84 (C-6), 24.63 (C-11), 25.74 ($SiC(CH_3)_3$), 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 $NaHCO_3$ ล้างด้วย H_2O และ sat. NaCl ทำให้แห้งด้วย anh. Na_2SO_4 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

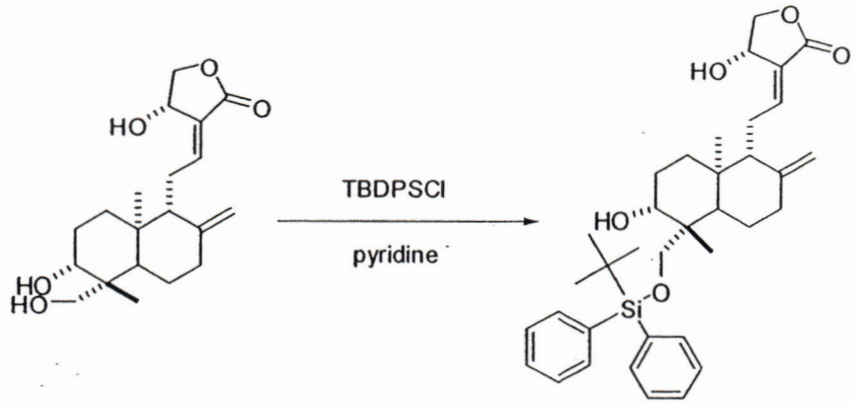


2

Compound **2** : ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 0.05 (6H, s, $Si(CH_3)_2$), 0.81 (3H, s, H-20), 0.89 (9H, s, $SiC(CH_3)_3$), 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, $COCH_3$), 2.12 (3H, s, $COCH_3$), 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)

^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) : δ -1.10 ($Si(CH_3)_2$), 14.37 (C-20), 18.25 ($SiC(CH_3)_3$), 20.73 ($COCH_3$), 21.27 ($COCH_3$), 23.30 (C-18), 24.40 (C-11), 25.32 (C-6), 25.89 ($SiC(CH_3)_3$), 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 ($COCH_3$), 170.76 ($COCH_3$)

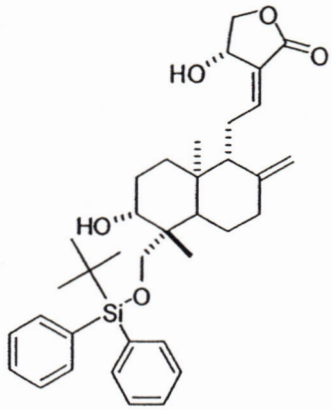
3. ปฏิกิริยาของ Andrographolide และ TBDPSCl



3

นำ Andrographolide (0.0100 g, 0.03 mmol) ใส่ลงในหลอดทำปฏิกิริยา เติม pyridine 200 μL คนด้วย magnetic stirrer หลังจากนั้นเติม TBDPSCl (100 μL, 0.39 mmol) และคนต่อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (ทำการตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 50% EtOAc : Hexane) หยุดปฏิกิริยาทำโดยการสกัดด้วย EtOAc ล้างด้วย H_2O และ sat. NaCl ทำให้แห้งด้วย anh. Na_2SO_4 กรองและระเหยตัวทำละลายทำให้แห้งด้วยเครื่อง 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

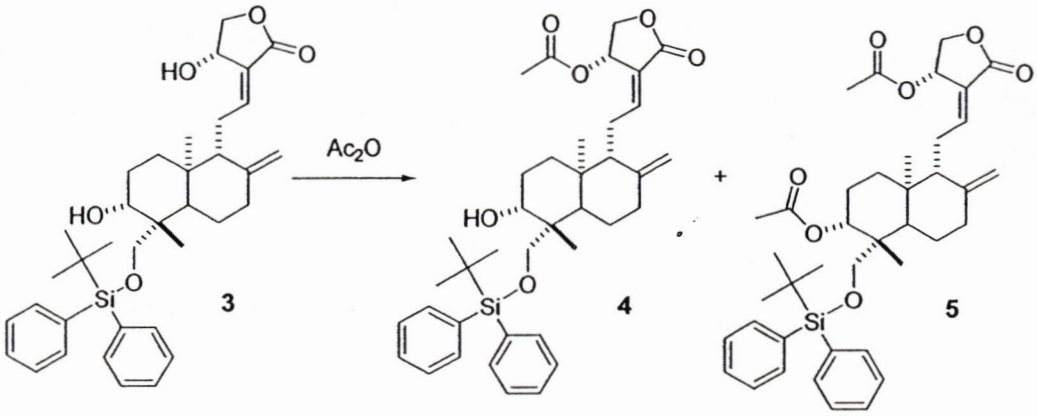


3

Compound 3 : ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 0.45 (3H, s, H-20), 1.04 (9H, s, $SiC(CH_3)_3$), 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)

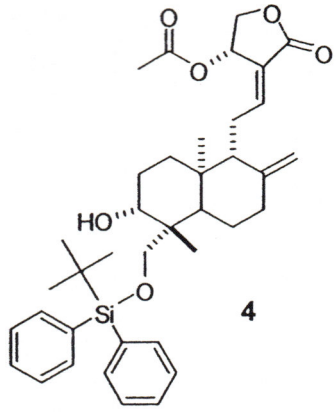
^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 15.22 (C-20), 19.05 (Si*C*(CH_3)$_3$), 23.11 (C-18), 23.58 (C-11), 24.62 (C-6), 26.79 (SiC(*C*H_3)$_3$), 28.49 (C-2), 37.09 (C-1), 37.65 (C-7), 38.86 (C-10), 42.78 (C-4), 55.27 (C-5), 56.02 (C-9), 65.91 (C-14), 66.08 (C-19), 74.30 (C-15), 80.30 (C-3), 108.60 (C-17), 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 anh. 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

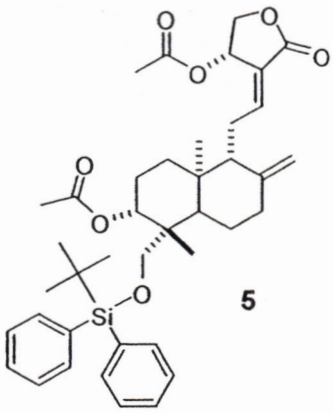


4

Compound **4**: ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 0.50 (3H, s, H-20), 1.08 (9H, s, $SiC(CH_3)_3$), 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}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 15.23 (C-20), 19.08 ($SiC(CH_3)_3$), 20.68 ($COCH_3$), 23.12 (C-18), 23.57 (C-11), 25.23 (C-6), 26.93 ($SiC(CH_3)_3$), 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

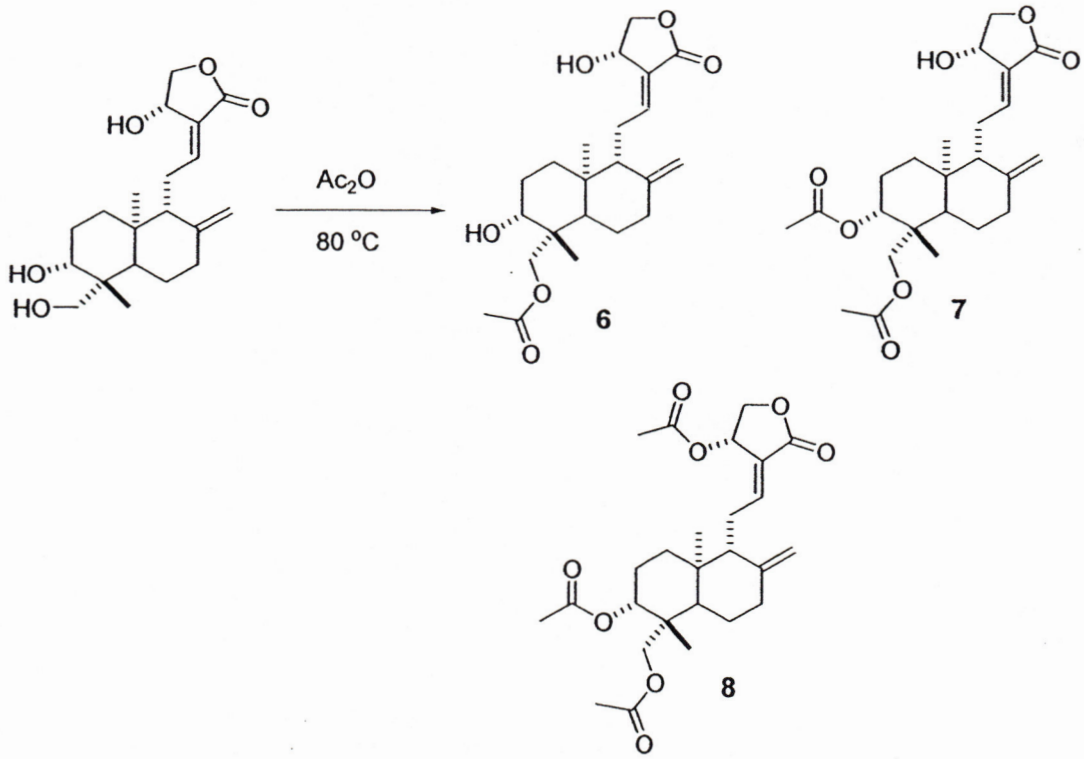


5

Compound **5** : ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 0.70 (3H, s, H-20), 1.05 (3H, s, H-18), 1.08 (9H, s, $SiC(CH_3)_3$), 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 = 10.5Hz, H-19a), 3.83 (1H, d, J = 10.5 Hz, H-19b), 4.25 (1H, dd, J = 11.5, 2.0 Hz, H-15a), 4.51 (1H, brs, H-17a), 4.55 (1H, dd, J = 11.5, 6.0 Hz, H-15b), 4.58 (1H, dd, J = 11.5, 4.0 Hz, H-3), 4.91 (1H, brs, H-17b), 5.93 (1H, bd, J = 6.0 Hz, H-14), 7.03 (1H, td, J = 7.0, 1.0 Hz, H-12), 7.37-7.48 (6H, m, PhH), 7.67-7.72 (4H, m, PhH)

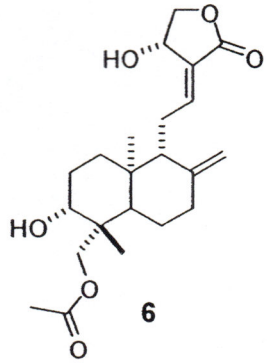
^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 14.52 (C-20), 19.27 ($SiC(CH_3)_3$), 20.70 ($COCH_3$), 21.12 ($COCH_3$), 22.67 (C-18), 24.24 (C-11), 25.18 (C-6), 26.91 ($SiC(CH_3)_3$), 29.68 (C-2), 37.13 (C-1), 38.06 (C-7), 38.96 (C-10), 43.02 (C-4), 55.45 (C-5), 55.93 (C-9), 63.67 (C-14), 67.79 (C-19), 71.56 (C-15), 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) หยุดปฏิกิริยาทำโดยการสกัดด้วย 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

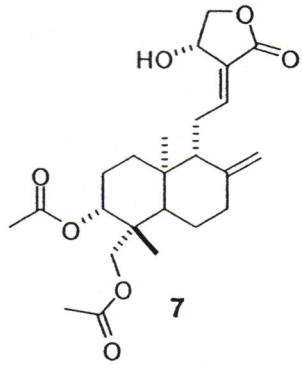


6

Compound 6 : ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : 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, $COCH_3$), 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)

^{13}C-NMR (100 MHz, MeOD) : δ 14.79 (C-20), 21.07 ($COCH_3$), 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 ($COCH_3$)

ข้อมูลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ 7

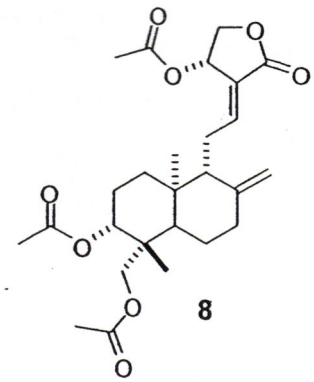


7

Compound **7** : ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : 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, $COCH_3$), 2.05 (3H, s, $COCH_3$), 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)

^{13}C-NMR (100 MHz, MeOD) : δ 14.58 (C-20), 21.09 ($COCH_3$), 21.19 ($COCH_3$), 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 ($COCH_3$), 170.92 ($COCH_3$)

ข้อมูลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ 8

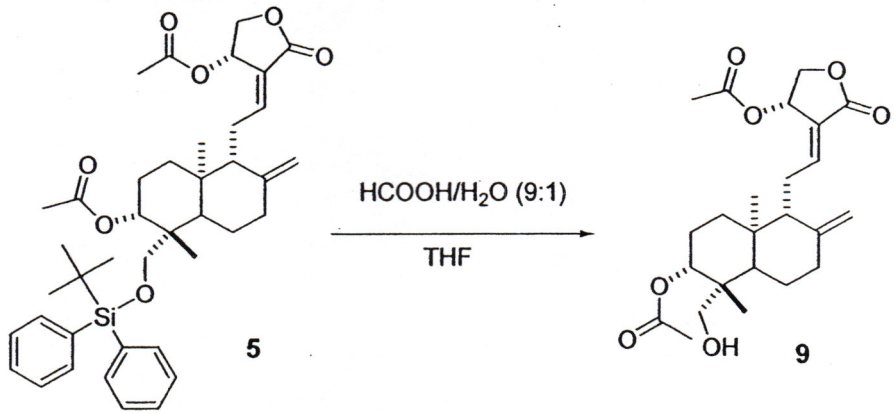


8

Compound **8** : ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : 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, $COCH_3$), 2.12 (3H, s, $COCH_3$), 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)

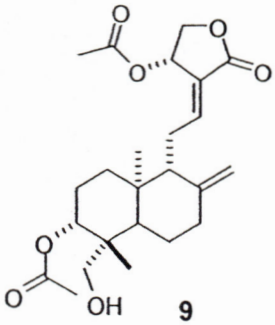
^{13}C-NMR (100 MHz, MeOD) : δ 14.51 (C-20), 20.70 ($COCH_3$), 21.07 ($COCH_3$), 21.16 ($COCH_3$), 22.70 (C-18), 24.22 (C-11), 24.60 (C-6), 25.18 (C-2), 37.00 (C-1), 37.88 (C-7), 38.94 (C-10), 41.28 (C-4), 55.27 (C-5), 55.85 (C-9), 64.70 (C-14), 67.78 (C-19), 71.58 (C-15), 79.65 (C-3), 108.90 (C-17), 124.04 (C-13), 146.50 (C-8), 150.13 (C-12) , 169.01 (C-16), 170.45 ($COCH_3$), 170.50 ($COCH_3$), 170.88 ($COCH_3$)

6. ปฏิกิริยาของสารอนุพันธ์ TBS-acetate-andrographolide 5 และ HCOOH/H_2O



นำสาร TBS-acetate-andrographolide 5 (0.0150 g, 0.03 mmol) ใส่ลงในหลอดทำปฏิกิริยา เติม THF 1 mLคนด้วย magnetic stirrer จนสาร 5 ละลายหมด หลังจากนั้นทำให้สารละลายเย็นที่ 0 °C และเติม HCOOH/H_2O (9:1) 1 mL และคนต่อเป็นเวลา 30 นาที (ทำการตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 30% EtOAc : Hexane) หยุดปฏิกิริยาทำโดยการสกัดด้วย 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 40% EtOAc : Hexane ระเหยตัวทำละลาย ทำให้แห้งด้วยเครื่อง vacuum pump ได้สาร 9 น้ำหนัก 0.0057 g (43% yield) มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว นำสาร 9 ที่สังเคราะห์ได้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยเทคนิค NMR-spectroscopy

ข้อมูลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ 9

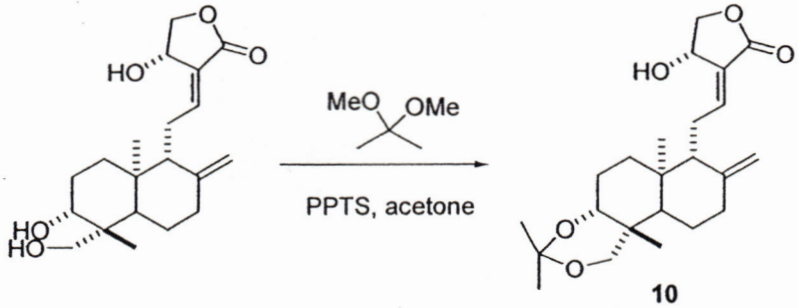


9

Compound **9** : ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : 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, $COCH_3$), 2.14 (3H, s, $COCH_3$), 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)

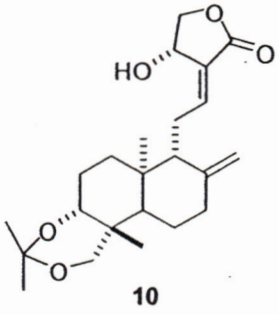
^{13}C-NMR (100 MHz, MeOD) : δ 14.92 (C-20), 20.70 ($COCH_3$), 21.35 ($COCH_3$), 22.41 (C-18), 23.89 (C-11), 24.17 (C-6), 25.21 (C-2), 36.88 (C-1), 37.65 (C-7), 38.76 (C-10), 42.61 (C-4), 55.47 (C-5), 55.74 (C-9), 63.54 (C-14), 67.75 (C-19), 71.57 (C-15), 82.32 (C-3), 108.99 (C-17), 124.03 (C-13), 146.46 (C-8), 150.14 (C-12) , 169.01 (C-16), 169.76 ($COCH_3$), 170.47 ($COCH_3$)

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

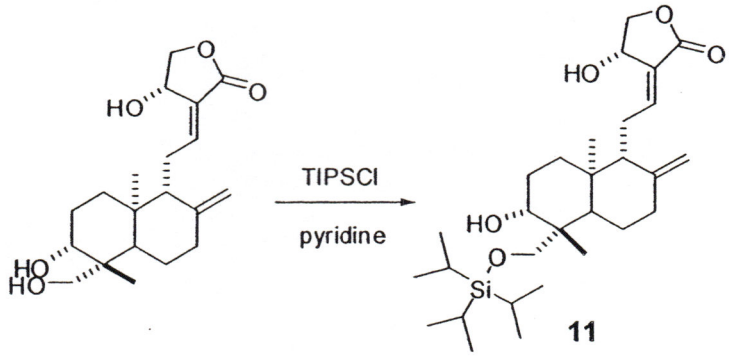
ข้อมูลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ **10**



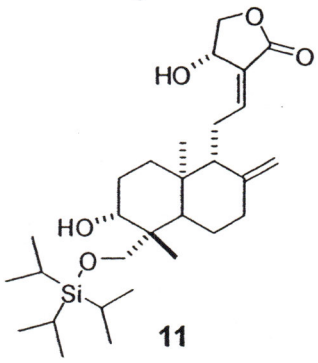
Compound **10** : ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 0.96 (3H, s, H-20), 1.20 (3H, s, H-18), 1.22-1.34 (4H, m, H-1a, H5, H-6), 1.36 (3H, s, H-22), 1.41 (3H, s, H-21), 1.70-1.78 (2H, m, H-1b, H-2a), 1.78-1.85 (1H, m, H-9), 1.92-2.05 (1H, m, H-2b), 2.42 (2H, dt, J = 12.5, 3.0 Hz, H-7), 2.57 (2H, m, H-11), 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}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)

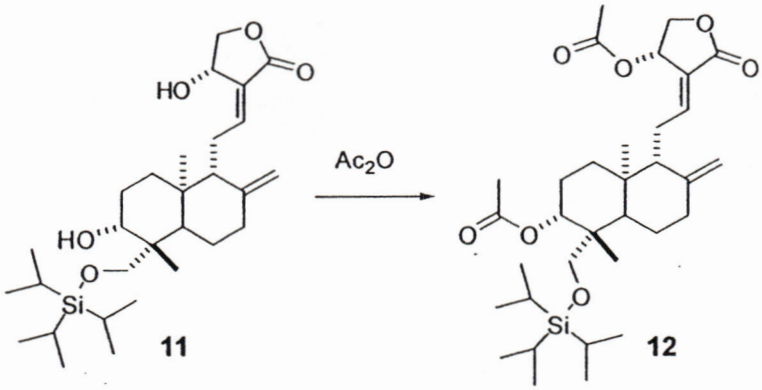


นำ Andrographolide (81.1 mg, 0.231 mmol) ใส่ลงในหลอดทำปฏิกิริยา เติม pyridine 500 μL คนด้วย magnetic stirrer หลังจากนั้นเติม TIPSCl (250 μL, 1.48 mmol) และคนต่อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง (ทำการตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย TLC) หยุดปฏิกิริยาทำโดยการสกัดด้วย EtOAc ล้างด้วย H_2O และ sat. NaCl ทำให้แห้งด้วย anh. Na_2SO_4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

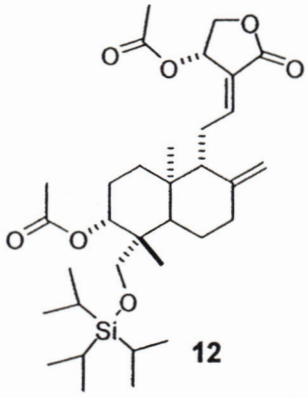


Compound **11** : Mp 62-65 °C; IR (Neat): 3377, 2941, 1745, 1674, 1460, 1054, 755 cm^{-1}; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 6.97 (1H, td, J = 7.0, 2.0 Hz, H-12), 5.04 (1H, brd, J = 6.0 Hz, H-14), 4.89 (1H, brs, H-17b), 4.59 (1H, brs, H-17a), 4.52 (1H, d, J = 7.0 Hz, OH), 4.46 (1H, dd, J = 10.5, 6.0 Hz, 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



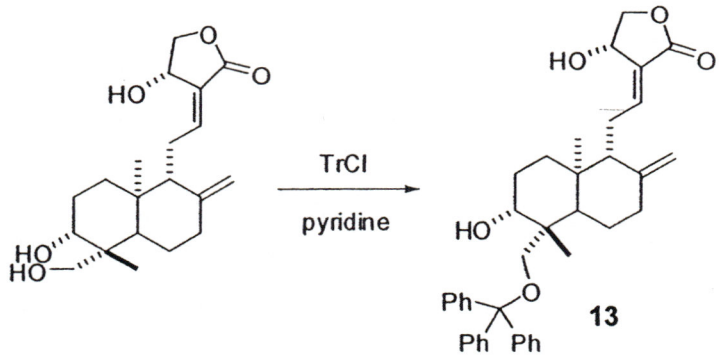
นำสาร TIPS-Andrographolide (41.1 mg, 0.0811 mmol) ใส่ลงในหลอดทำปฏิกิริยา เติม acetic anhydride 1 mL คนด้วย magnetic stirrer และให้ความร้อนปฏิกิริยา 140°C คนต่อเป็นเวลา 3 ชั่วโมง (ทำการตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย TLC) หยุดปฏิกิริยาทำโดยการสกัดด้วย EtOAc เติมสารละลายอิ่มตัว $NaHCO_3$ ล้างด้วย H_2O และ sat. NaCl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



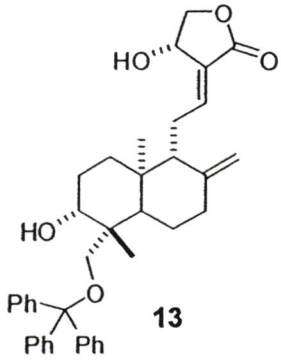
Compound 12: Mp 83-87 °C; IR (Neat): 3144, 2944, 1738, 1676, 1241, 1018, 753 cm^{-1} ;^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.02 (1H, td, J = 7.0, 2.0 Hz, H-12), 5.92 (1H, brd, J = 6.0 Hz, H-14), 4.89 (1H, brs, H-17b), 4.61-4.55 (1H, m, H-3), 4.54 (1H, dd, J = 11.5, 6.0 Hz, H-15b), 4.49 (1H, brs, H-17a), 4.25 (1H, dd, J = 11.5, 2.0 Hz, H-15a), 3.89 (1H, d, J = 10.5 Hz, H-19b), 3.80 (1H, d, J = 10.5 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 ($SiCH(CH_3)_2$)), 1.06 (3H, s, 3 x ($SiCH(CH_3)_2$)), 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

($COCH_3$), 24.3 (C-2), 22.9 (C-6), 21.2 (C-11), 20.7 (C-18), 18.1 (3 x ($SiCH(CH_3)_2$)), 14.7 (C-20), 11.9 (3 x ($SiCH(CH_3)_2$)); HRMS (ESI) *m/z* calcd for $C_{33}H_{54}O_7SiNa$ $[M+Na]^+$ 613.3537, found 613.3521.

9. ปฏิกิริยาของ Andrographolide และ Triphenylmethyl Chloride (TrCl)



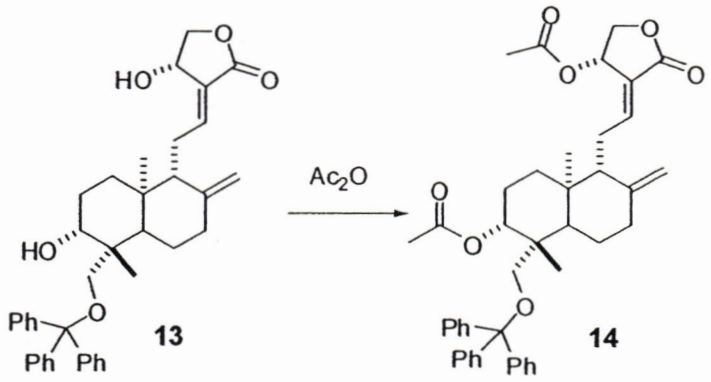
นำ Andrographolide (108 mg, 0.308 mmol) ใส่ลงในหลอดทำปฏิกิริยา เติม pyridine 500 μL คนด้วย magnetic stirrer หลังจากนั้นเติม triphenylmethyl chloride (TrCl) (400 mg, 1.43 mmol) ให้ความร้อนปฏิกิริยา 70°C และคนต่อเป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง (ทำการตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย TLC) หยุดปฏิกิริยาทำโดยการสกัดด้วย EtOAc ล้างด้วย H_2O และ sat. NaCl ทำให้แห้งด้วย anh. Na_2SO_4 กรองและระเหยตัวทำละลาย ทำให้แห้งด้วยเครื่อง vacuum pump และนำ crude product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 40% EtOAc : Hexane ระเหยตัวทำละลาย ทำให้แห้งด้วยเครื่อง vacuum pump ได้สาร **13** น้ำหนัก 182 mg (99% yield) มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว นำสาร **13** ที่สังเคราะห์ได้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยเทคนิค NMR- spectroscopy



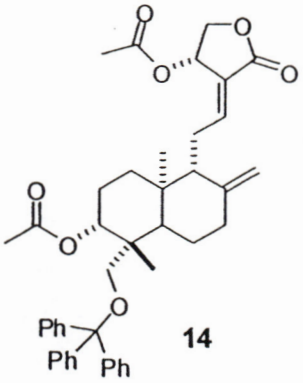
Compound **13**: Mp 113-117 °C; IR (Neat): 3418, 2933, 1756, 1674, 1491, 1449, 1184, 1048, 738, 706 cm^{-1}; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.44 (6H, d, J = 8.0 Hz, PhH), 7.31 (6H, t, J = 8.0 Hz, PhH), 7.23 (3H, t, J = 8.0 Hz, PhH), 6.90 (1H, td, J = 7.0, 2.0 Hz, H-12), 4.96 (1H, brd, J = 6.0 Hz, H-14), 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 $C_{39}H_{44}O_5Na$ $[M+Na]^+$ 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) หยุดปฏิกิริยาทำโดยการสกัดด้วย 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 20% EtOAc : Hexane ระเหยตัวทำละลาย ทำให้แห้งด้วยเครื่อง vacuum pump ได้สาร **14** น้ำหนัก น้ำหนัก 93.4 mg (33% yield) มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน นำสาร **14** ที่สังเคราะห์ได้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยเทคนิค NMR- spectroscopy

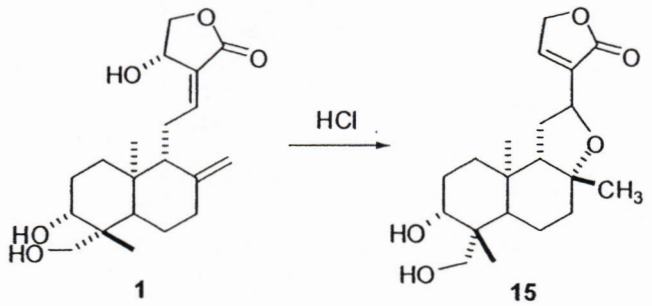


Compound **14**: Mp 78-81 °C; IR (Neat): 3107, 1744, 1395, 1237, 1023, 896, 708 cm^{-1}; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.47 (6H, d, J = 7.5 Hz, PhH), 7.32-7.19 (9H, m, PhH), 6.97 (1H, td, J = 7.0, 2.0 Hz, H-12), 5.88 (1H, brd, J = 6.0 Hz, H-14), 4.82 (1H, brs, H-17b), 4.57-4.52

(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, COCH_3), 2.01 (3H, s, COCH_3), 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); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 171.1 (COCH$_3$), 170.8 (COCH$_3$), 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 (COCH$_3$), 21.1 (COCH$_3$), 14.5 (C-20); HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{43}H_{48}O_7Na$ $[M+Na]^+$ 699.3298, found 699.3303.

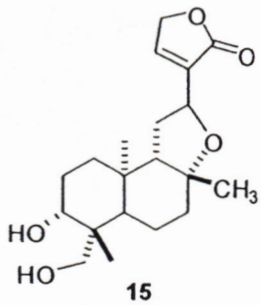
<u>ส่วนที่ 5</u> ปฏิกิริยาการสังเคราะห์และเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันของ andrographolide ตามแผนการนอกเหนือจากที่วางแผนไว้

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 คนจนสารละลายหมด ปล่อยให้น้ำแข็งละลายจนถึงอุณหภูมิห้อง คนต่อเป็นเวลา 7 ชั่วโมง (ทำการตรวจสอบปฏิกิริยาด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 70% EtOAc : Hexane ทุกๆ ชั่วโมง) สังเกตจนสารตั้งต้นหมดจึงหยุดปฏิกิริยา การหยุดปฏิกิริยาทำโดยนำสารละลายจากปฏิกิริยาที่สังเคราะห์ได้ค่อยๆ หยดลงในสารละลายอิ่มตัวของ $NaHCO_3$ ที่เย็น และสกัดด้วย EtOAc จำนวน 3 ครั้ง ล้างด้วยน้ำ และสารละลายอิ่มตัวของ NaCl อย่างละ 1 ครั้ง ตามลำดับ ทำให้แห้งด้วย anh. Na_2SO_4 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

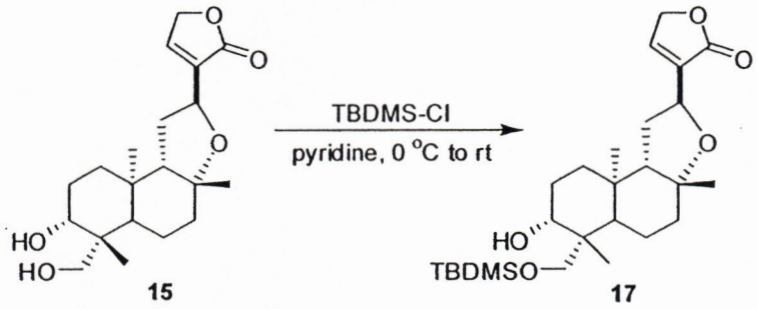
ข้อมูลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ 15



Compound **15** : ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : 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)

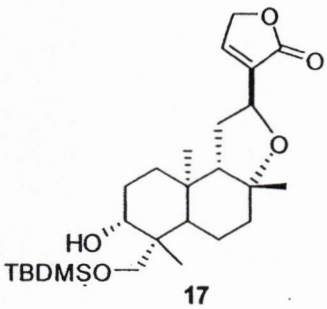
^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 16.38 (C-18), 18.10 (C-6), 22.70 (C-20), 27.38 (C-2), 31.50 (C-17), 32.81 (C-11), 35.58 (C-10), 36.16 (C-1), 38.94 (C-7), 42.45 (C-4), 52.63 (C-5), 57.89 (C-9), 64.15 (C-19), 70.54 (C-15), 73.07 (C-12), 80.82 (C-3), 82.67 (C-8), 138.35 (C-13), 143.20 (C-14), 172.58 (C-16)

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



นำ Isondrographolide **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) ทำการคนต่อโดยปล่อยให้น้ำแข็งละลายจนถึงอุณหภูมิห้อง 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 anh. 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

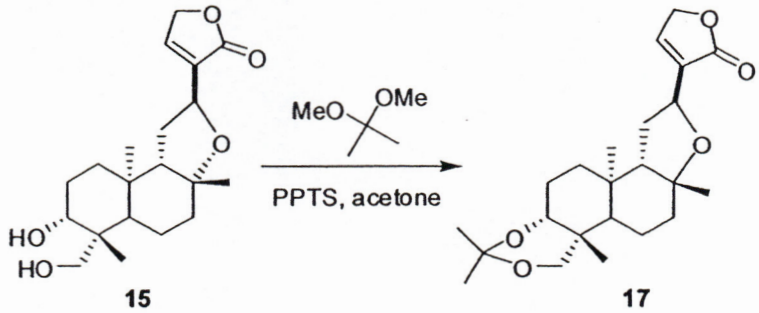


17

Compound **17** : ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 0.07 (3H, s, $Si(CH_3)_2$), 0.09 (3H, s, $Si(CH_3)_2$), 0.90 (9H, s, $SiC(CH_3)_3$), 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)

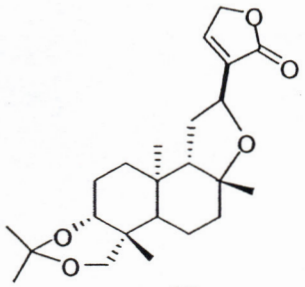
^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) : δ -5.18 ($Si(CH_3)_2$), 16.67 (C-18), 18.08 ($SiC(CH_3)_3$), 18.27 (C-6), 23.25 (C-20), 25.78 ($SiC(CH_3)_3$), 27.79 (C-2), 31.60 (C-17), 32.95 (C-11), 35.79 (C-10), 36.20 (C-1), 39.29 (C-7), 42.20 (C-4), 52.60 (C-5), 58.26 (C-9), 65.18 (C-19), 70.48 (C-15), 73.15 (C-12), 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 Isondrographolide **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 : Hexaneทุกๆ ครึ่งชั่วโมง) สังเกตจนสารตั้งต้นหมดจึงหยุดปฏิกิริยา การการหยุดปฏิกิริยาทำโดยนำสารละลายจากปฏิกิริยาที่สังเคราะห์ได้ใส่ลงในสารละลายอิ่มตัวของ $NaHCO_3$ ที่เย็น และสกัดด้วย EtOAc จำนวน 3 ครั้ง ล้างด้วยน้ำ และสารละลายอิ่มตัวของ NaCl อย่างละ 1 ครั้ง ตามลำดับ ทำให้แห้งด้วย anh. 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

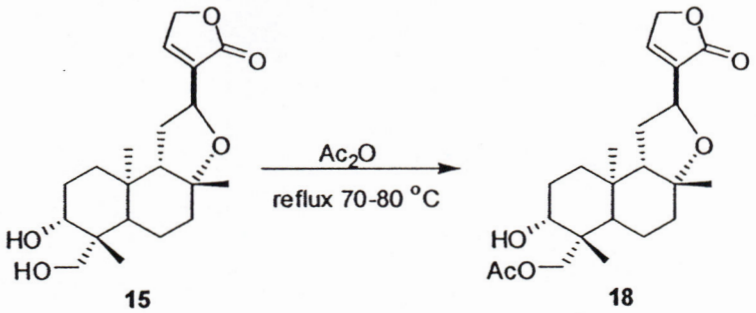


17

Compound **17** : ^{1}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)

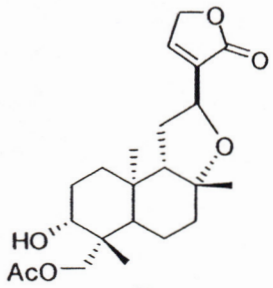
^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 17.22 (C-18), 17.55 (C-6), 25.12 (C-22), 22.89 (C-21), 26.60 (C-2), 27.73 (C-4), 31.68 (C-17), 32.82 (C-11), 35.11 (C-10), 36.00 (C-1), 37.08 (C-20), 37.10 (C-7), 50.51 (C-5), 57.88 (C-9), 63.69 (C-19), 70.49 (C-15), 73.09 (C-12), 77.70 (C-3), 82.81 (C-8), 98.70 (C-23),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

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



นำ Isondrographolide **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 anh. 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

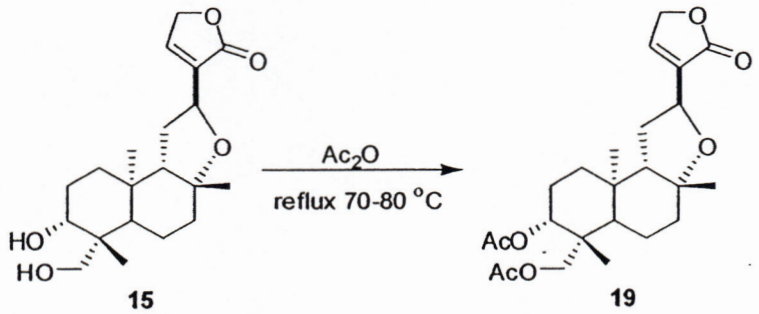


18

Compound **18** : ^{1}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)

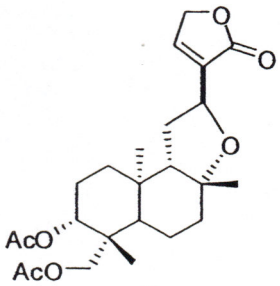
^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 16.07 (C-18), 18.53 (C-6), 21.07 ($COCH_3$), 22.70 (C-20), 27.05 (C-2), 31.47 (C-17), 32.88 (C-11), 35.85 (C-10), 36.38 (C-1), 39.35 (C-7), 42.14 (C-4), 52.90 (C-5), 57.99 (C-9), 65.04 (C-19), 70.48 (C-15), 73.21 (C-12), 79.27 (C-3), 82.69 (C-8), 138.43 (C-13), 143.14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

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



นำ Isondrographolide **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:Hexaneทุกๆ ครึ่งชั่วโมง) สังเกตจนสารตั้งต้นหมดจึงหยุดปฏิกิริยา การหยุดปฏิกิริยาทำโดยนำสารละลายจากปฏิกิริยาที่สังเคราะห์ได้ใส่ลงในสารละลายอิ่มตัวของ $NaHCO_3$ ที่เย็น และสกัดด้วย EtOAc จำนวน 3 ครั้ง ล้างด้วยน้ำ และสารละลายอิ่มตัวของ NaCl อย่างละ 1 ครั้ง ตามลำดับ ทำให้แห้งด้วย anh. 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



19

Compound **19** : ^{1}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)

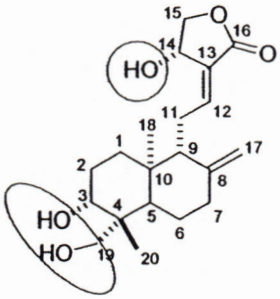
^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 15.77 (C-18), 18.84 (C-6), 21.03 ($COCH_3$), 21.14 ($COCH_3$), 23.05 (C-20), 23.53 (C-2), 31.44 (C-17), 32.84 (C-11), 35.73 (C-10), 36.42 (C-1), 39.02 (C-7), 40.88 (C-4), 52.88 (C-5), 57.84 (C-9), 65.02 (C-19), 70.48 (C-15), 73.22 (C-12), 80.08 (C-3), 82.59 (C-8), 138.40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

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

การดำเนินการวิจัยเพื่อปรับเปลี่ยนโครงสร้างของ andrographolide ได้วางแผนแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ต่อไปนี้

<u>ส่วนที่</u> 1	สกัดและแยกสาร andrographolide จากต้นฟ้าทะลายโจร
สถานที่ทำการทดลอง	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
<u>ส่วนที่ 2</u>	สังเคราะห์อนุพันธ์ใหม่ของสาร andrographolide จำนวน 40 ชนิด
สถานที่ทำการทดลอง	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

การปรับเปลี่ยนโครงสร้างของ andrographolide เพื่อให้ได้สารใหม่สำหรับศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของโรคปริทันต์ จะทำการวิจัยโดยแบ่งการสังเคราะห์และดัดแปลงหรือปรับแต่งโครงสร้างในส่วนต่างๆของ andrographolide โดยออกแบบการปรับเปลี่ยนโครงสร้างออกเป็น 3 แผนการ (ส่วนที่วงกลมไว้ คือส่วนที่ทำการปรับเปลี่ยน) แผนการที่ 1 และ 2 ทำในปีแรก และแผนที่ 3 ทำในปีที่ 2

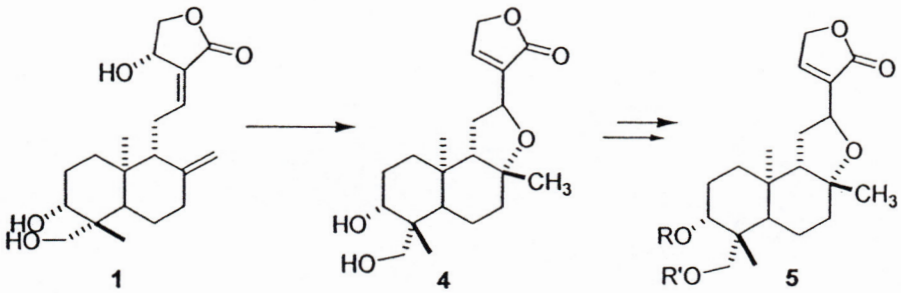


<u>แผนการที่ 1.</u> ปรับเปลี่ยนโครงสร้างของหมู่ hydroxyl ของ andrographolide ในตำแหน่งที่ 3, 14 และ 19 (ส่วนที่วงกลม) ให้เป็นหมู่ต่างๆ เช่น หมู่ ether และหมู่ ester

โครงสร้างทางเคมีของสารอนุพันธ์ใหม่ของ andrographolide ที่ได้จากการสังเคราะห์ตามแผนการที่ 1 จะมีจำนวนประมาณ 14 ตัว

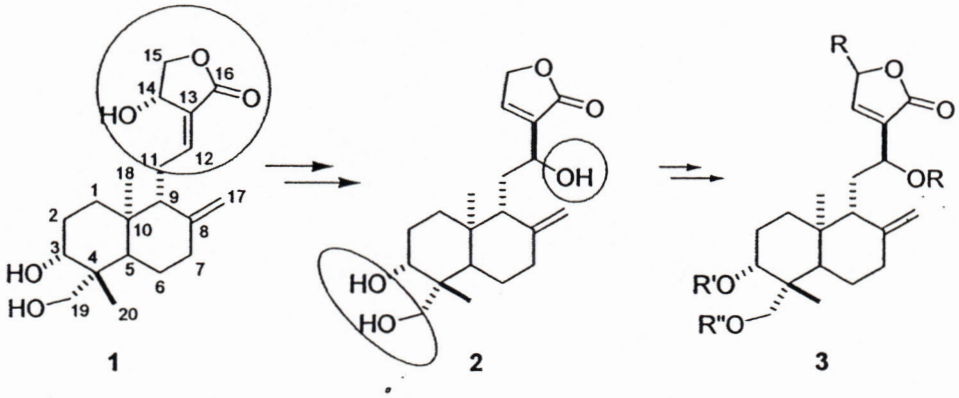
<u>แผนการที่ 2</u> ปรับเปลี่ยนโครงสร้างของ andrographolide ให้เป็น isoandrographolide (สาร 4) และเปลี่ยนหมู่ hydroxyl ตำแหน่ง C-3 และ C-19

โครงสร้างทางเคมีของสารอนุพันธ์ใหม่ของ andrographolide ที่ได้จากการสังเคราะห์ตามแผนการที่ 2 จะมีจำนวนประมาณ 5 ตัว เช่น หมู่ ether และหมู่ ester



<u>แผนการที่ 3.</u> ปรับเปลี่ยนโครงสร้างของวง α-alkylidene χ-butyrolactone ของ andrographolide (ส่วนที่วงกลมของ 1)และเพิ่มจำนวนสายโซ่คาร์บอนที่ตำแหน่ง C-15 ให้มีจำนวนต่างกัน ดังรูปข้างล่าง จากนั้นปรับเปลี่ยนโครงสร้างของหมู่ hydroxyl ในตำแหน่งที่ 3, 12 และ 19 ให้เป็นหมู่ต่างๆ เช่น หมู่ ether หมู่ ester หรือหมู่ amide

โครงสร้างทางเคมีของสารอนุพันธ์ใหม่ของ andrographolide ที่ได้จากการสังเคราะห์ตามแผนการที่ 3 จะมีจำนวนประมาณ 20 ตัว



ในระหว่างการสังเคราะห์จะทำการศึกษาพัฒนาวิธีการที่มีประสิทธิภาพ ใช้เคมีสะอาดและหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ได้สารที่มีโครงสร้างสามมิติตรงกับสารเป้าหมายและ %การผลิตของผลิตภัณฑ์สูง พร้อมทั้งวิเคราะห์ ตรวจสอบและศึกษาโครงสร้างสามมิติของสารโดยวิธีทาง spectroscopy

หลังจากนั้นนำสารอนุพันธ์ใหม่ที่ได้ทั้งหมดส่งไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

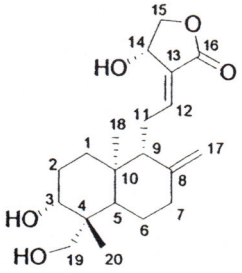
<u>ส่วนที่ 3</u> การตรวจสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Porphyromonas gingivalis* ซึ่งทำให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบ (periodontitis) และแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* (แบคทีเรียในช่องปากที่เปลี่ยนน้ำตาลบนเคลือบฟันให้เป็นกรด

ส่วนการสกัดและแยกสาร andrographolide จากต้นฟ้าทะลายโจร

ได้สกัดและแยกสาร andrographolide จากต้นฟ้าทะลายโจรจากแหล่งที่มาคือ บ้านดงบัง จ. ปราจีนบุรี ที่มีการเก็บเกี่ยวประมาณเดือน มีนาคม พ.ศ. 2553 (เก็บผลผลิตเมื่อมีดอก) และตากแดดและอบแห้งที่อุณหภูมิ 75-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

การสกัดและแยกสาร andrographolide จากต้นฟ้าทะลายโจร ทำโดยฟ้าทะลายโจรอบแห้ง ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ทำการสกัดโดยแช่ในถังที่บรรจุ Ethanol ทิ้งไว้เป็นเวลา 7 วัน แล้วระเหยตัวทำละลายออก จะได้ crude ฟ้าทะลายโจร และนำ crude ฟ้าทะลายโจรที่มาแยกให้บริสุทธิ์โดย column chromatrography จะได้สาร Andrographolide

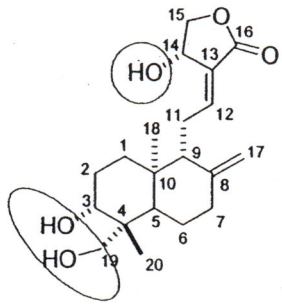
ตรวจสอบโครงสร้างโดย ^{1}H และ $^{13}CNMR$ spectroscopy ยืนยันโครงสร้างโดยเทคนิค 2D NMR (COSY, HMQC, HMBC และ NOESY)



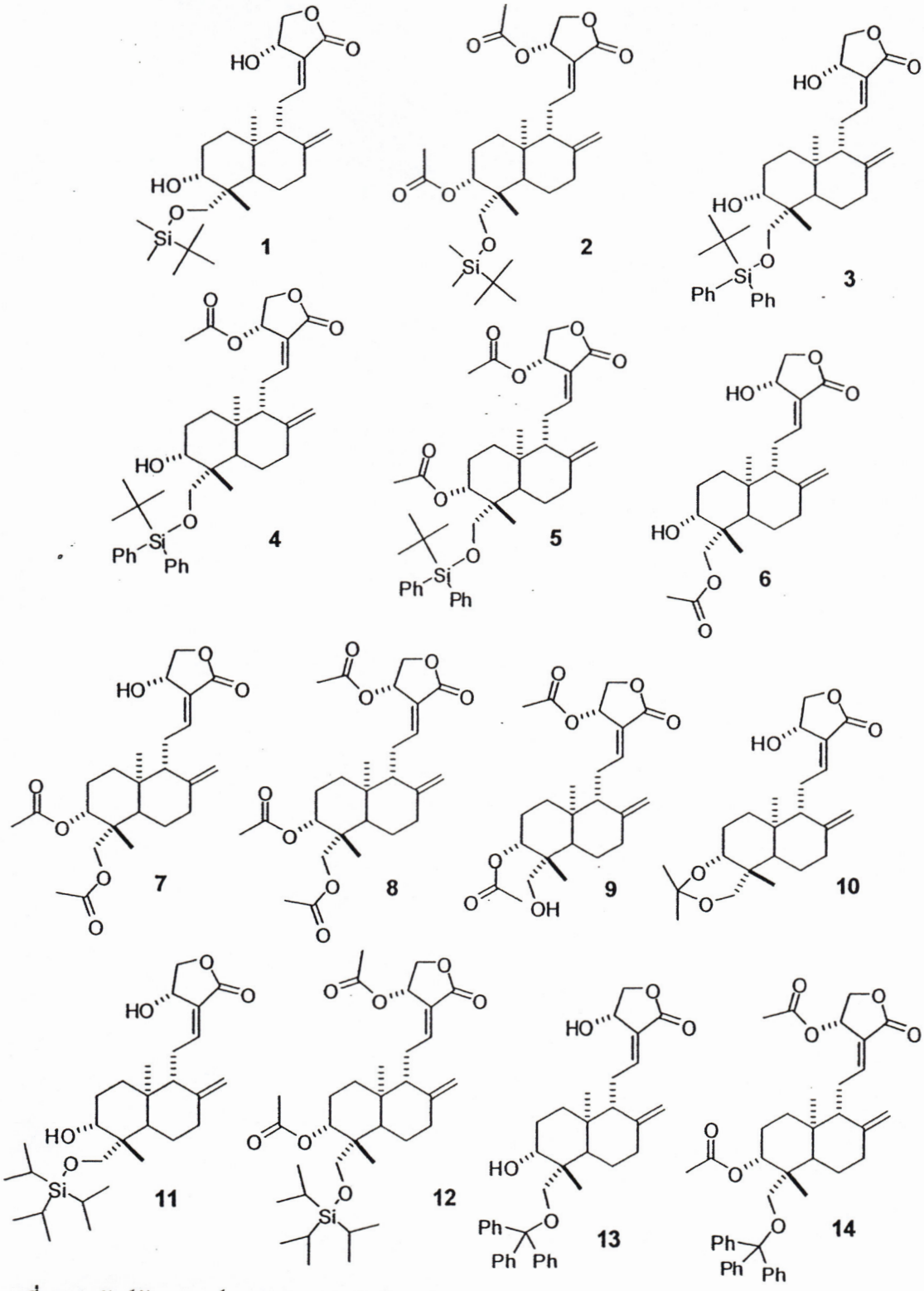
Andrographolide

2. สังเคราะห์อนุพันธ์ใหม่ของ andrographolide ตามแผนการที่ 1 พร้อมทั้งตรวจสอบโครงสร้าง

การปรับเปลี่ยนโครงสร้างของ andrographolide ตามแผนการที่ 1 เพื่อให้ได้สารใหม่สำหรับศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของโรคปริทันต์ จะทำการวิจัยโดยแบ่งการสังเคราะห์และดัดแปลงหรือปรับแต่งโครงสร้างในส่วนต่างๆของ andrographolide โดยออกแบบการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของหมู่ hydroxyl ของ andrographolide ในตำแหน่งที่ 3, 14 และ 19 (ส่วนที่วงกลม) ให้เป็นหมู่ต่างๆ



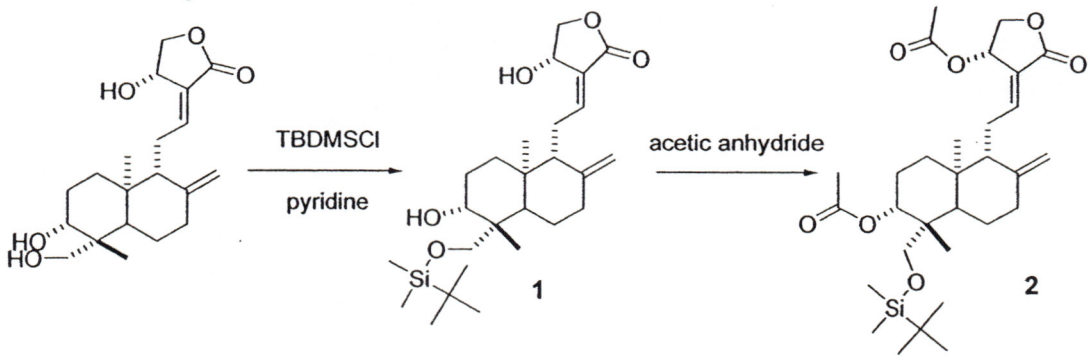
สำหรับการสังเคราะห์อนุพันธ์ใหม่ของ andrographolide ตามแผนการที่ 1 คือ ปรับเปลี่ยนโครงสร้างของหมู่ hydroxyl ของ andrographolide ในตำแหน่งที่ 3, 14 และ 19 ให้เป็นหมู่ต่างๆ ที่ได้ดำเนินการเสร็จไปแล้วนั้นได้สารอนุพันธ์ 14 ชนิดดังรูปต่อไปนี้



รูปที่ 1 อนุพันธ์สังเคราะห์ andrographolide

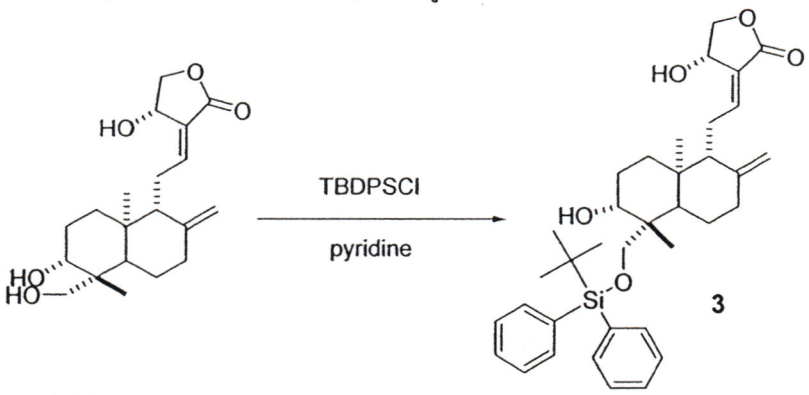
การสังเคราะห์อนุพันธ์ใหม่ของ andrographolide ตามแผนการที่ 1 ด้วยการเปลี่ยนแปลงหมู่ hydroxyl ตำแหน่ง C-3, C-14 หรือ C-19 เป็นหมู่ *tert*-butyldimethylsilylether โดยปฏิกิริยาของ Andrographolide และ *tert*-butyldimethylsilylchloride เริ่มด้วยการนำ Andrographolide ทำปฏิกิริยาโดยการเติม pyridine และ *tert*-butyldimethylsilylchloride คนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ได้สารอนุพันธ์ TBS-

andrographolide **1** 92% yield จากนั้นทำปฏิกิริยาของสาร **1** และ acetic anhydride และให้ความร้อนกับปฏิกิริยา นำ crude product ที่ได้จากปฏิกิริยามาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography ได้สาร **2** 44% yield (รูปที่ 2)

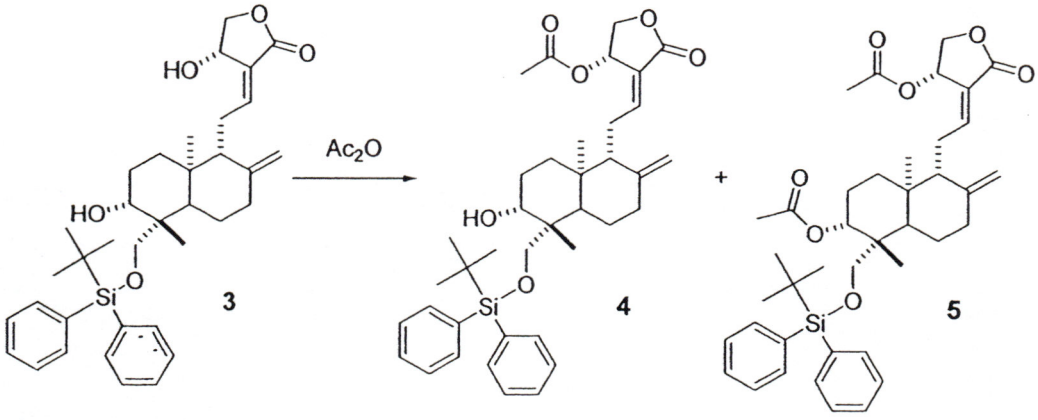


รูปที่ 2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ TBS-andrographolide

ทำการเปลี่ยนแปลงหมู่ hydroxyl ตำแหน่ง C-3, C-14 หรือ C-19 เป็นหมู่ *tert*-butyl diphenylsilylether โดยนำ Andrographolide ทำปฏิกิริยากับ pyridine และ *tert*-butyl diphenylsilylchloride เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ได้สาร **3** น้ำหนัก 100% yield (รูปที่ 3) เมื่อนำสารอนุพันธ์ TBDPS-andrographolide **3** ทำปฏิกิริยาต่อกับ acetic anhydride และให้ความร้อนปฏิกิริยา 70°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อเสร็จปฏิกิริยานำ crude product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography จะได้สาร **4** น้ำหนัก 18% yield และสาร **5** 33% yield (รูปที่ 4)

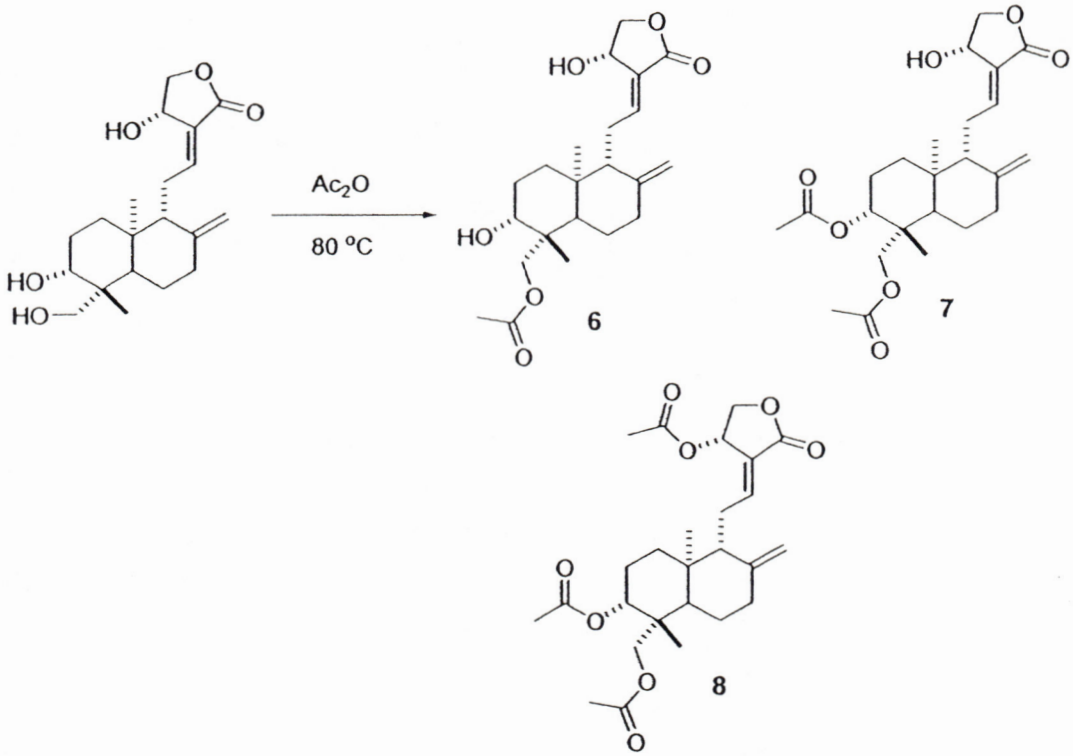


รูปที่ 3 การสังเคราะห์อนุพันธ์ TBDPS-andrographolide



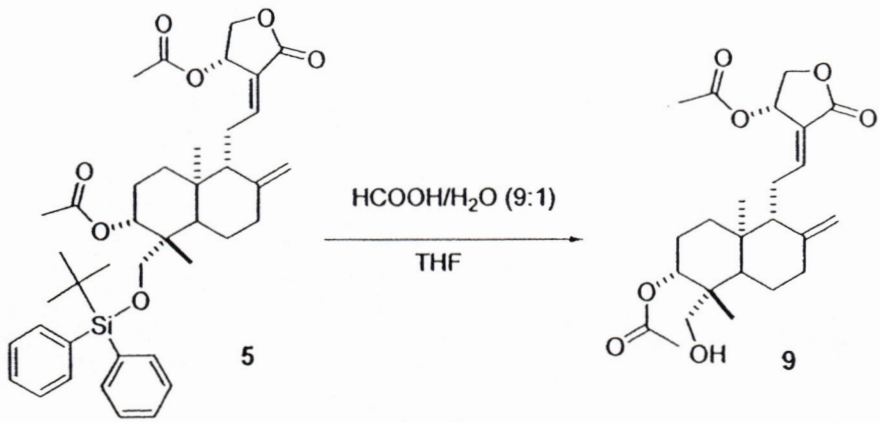
รูปที่ 4 การสังเคราะห์อนุพันธ์ TBDPS-acetyl-andrographolide

สำหรับการเตรียมอนุพันธ์ acetyl ของ andrographolide สามารถทำได้โดยนำสาร Andrographolide ทำปฏิกิริยากับ acetic anhydride 1 mL และให้ความร้อนแก่ปฏิกิริยา 80°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำ crude product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 50% EtOAc : Hexane จะได้สาร 6 36% yield สาร 7 42% yield และสาร 8 14 % yield (รูปที่ 5)



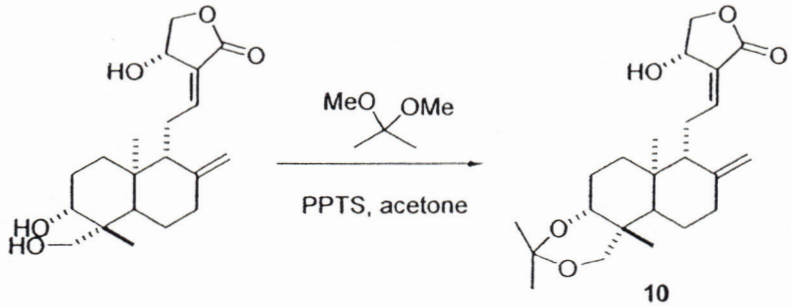
รูปที่ 5 การสังเคราะห์อนุพันธ์ acetyl-andrographolide

นอกจากนี้การเตรียมอนุพันธ์ acetyl ของ andrographolide 9 สามารถเตรียมจากปฏิกิริยาการ deprotection ของหมู่ TBS ของสารอนุพันธ์ TBS-acetate-andrographolide 5 ใน THF และ HCOOH/H_2O (9:1) ที่ 0 °C เป็นเวลา 30 นาที ได้สาร 9 43% yield ซึ่งมีหมู่ acetyl เฉพาะที่ตำแหน่ง C-3 และ C-14 (รูปที่ 6)

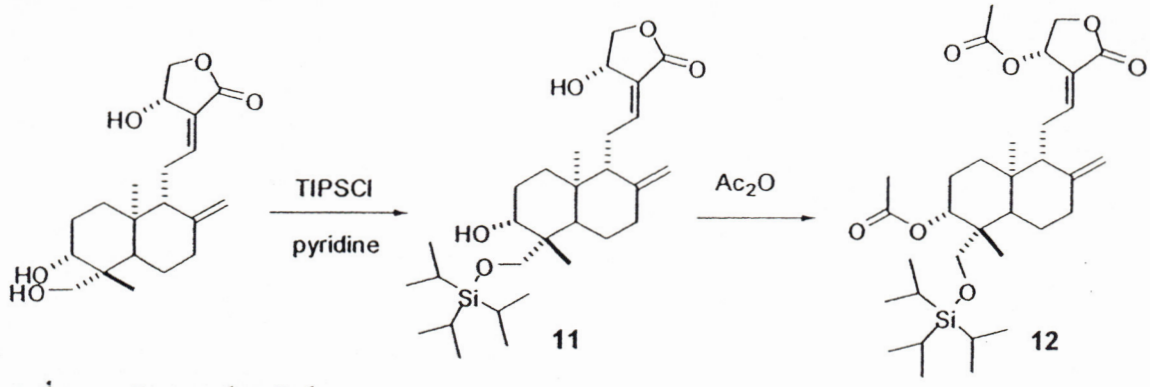


รูปที่ 6 การสังเคราะห์อนุพันธ์ diacetyl-andrographolide

การเตรียมอนุพันธ์ acetonide ของ andrographolide 10 เตรียมโดยปฏิกิริยาของ Andrographolide และ 2,2-dimethoxypropane ใน acetone โดยเติม PPTS เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ได้สาร 10 ซึ่งเกิดปฏิกิริยาที่หมู่ hydroxyl ที่ตำแหน่ง C-3 และ C-19 (รูปที่ 7)

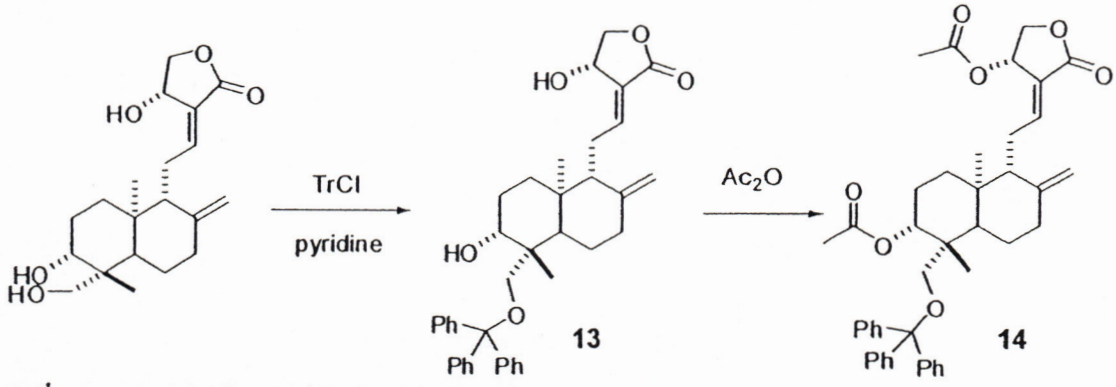


รูปที่ 7 การสังเคราะห์อนุพันธ์ acetonide-andrographolide



รูปที่ 8 การสังเคราะห์อนุพันธ์ TIPS-andrographolide

สำหรับการเตรียมอนุพันธ์ TIPS-andrographolide สามารถทำได้โดยนำสาร Andrographolide ทำปฏิกิริยากับ triisopropylsilylchloride คนที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จะได้สาร 11 65% yield ทำปฏิกิริยาต่อกับ acetic anhydride และให้ความร้อนปฏิกิริยา 140°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จะได้สาร 12 80% yield (รูปที่ 8)

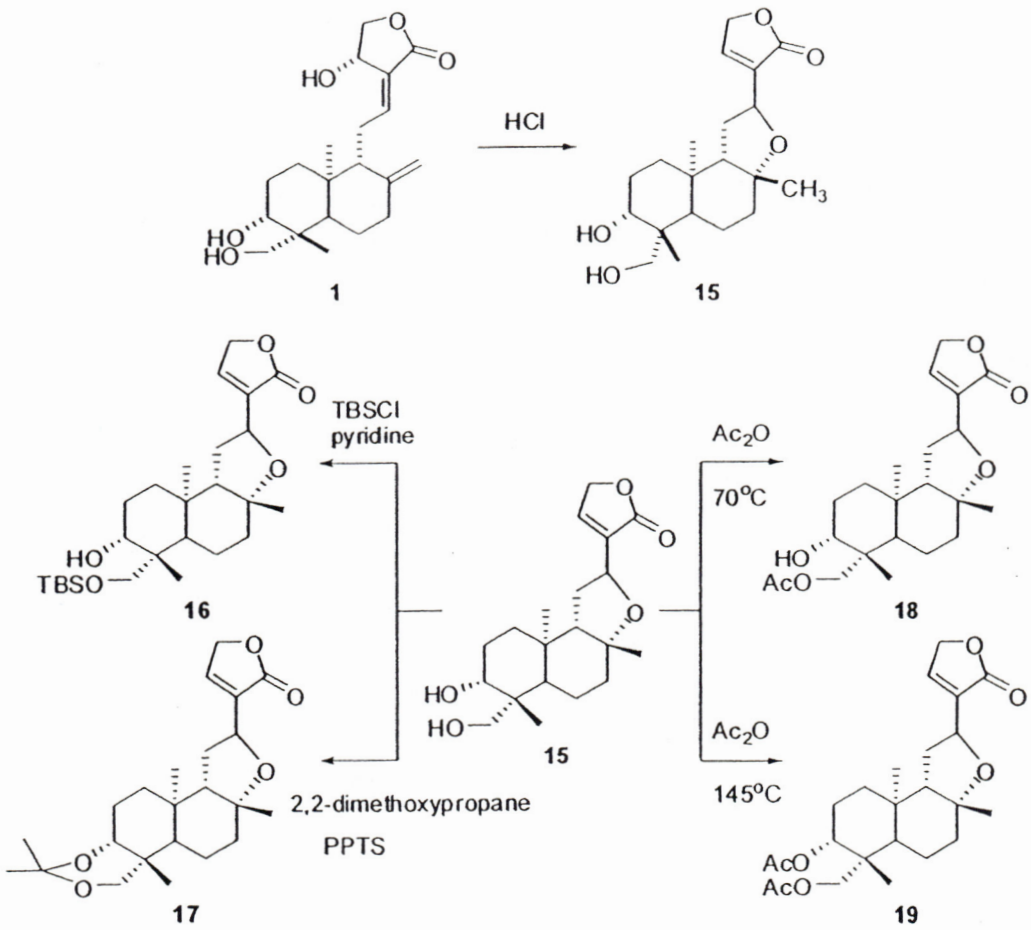


รูปที่ 9 การสังเคราะห์อนุพันธ์ Trityl-andrographolide

การสังเคราะห์อนุพันธ์ Trityl-andrographolide ทำโดยการเปลี่ยนแปลงหมู่ hydroxyl ตำแหน่ง C-3 เป็นหมู่ tritylether โดยนำ Andrographolide ทำปฏิกิริยากับ pyridine และ tritylchloride และให้ความร้อนปฏิกิริยา 70°C เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง ได้สาร 13 น้ำหนัก 99% yield เมื่อนำสารอนุพันธ์ 13 ทำปฏิกิริยาต่อกับ acetic anhydride และให้ความร้อนปฏิกิริยา 140°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อเสร็จปฏิกิริยานำ

crude product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography จะได้สาร 14 น้ำหนัก 33% yield (รูปที่ 9)

สำหรับการสังเคราะห์อนุพันธ์ใหม่ของ andrographolide ตามแผนการที่ 2 ได้ทำการปรับปรุงโครงสร้างสาร andrographolide ได้อนุพันธ์ใหม่คือ isoandrographolide จำนวน 5 ชนิด ดังแสดงต่อไปนี้



รูปที่ 10 การสังเคราะห์อนุพันธ์ isoandrographolide

การสังเคราะห์สาร 15-19 ทำโดยการทำปฏิกิริยาของ Andrographolide และ HCl เป็นเวลา 7 ชั่วโมง ได้สารอนุพันธ์ 15 80% yield จากนั้นทำปฏิกิริยาของสาร 15 และ TBDMSCl ใน pyridine เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ได้สาร 16 60 % yield เมื่อนำสาร 15 ทำปฏิกิริยากับ acetic anhydride และให้ความร้อนกับปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ได้สาร 18 81% yield แต่เมื่อทำปฏิกิริยากับ acetic anhydride และให้ความร้อนกับปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 145 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะได้สาร 19 81% yield เมื่อนำสาร 15 ทำปฏิกิริยากับ 2,2-dimethoxypropane ใน acetone โดยเติม PPTS เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 40 นาที ได้สารอนุพันธ์ andrographolide 17 83% yield (รูปที่ 10)

การสังเคราะห์สารตามแผนการที่ 1 และ 2 สามารถประสบผลสำเร็จ โดยสามารถสังเคราะห์สารได้ 19 ตัว ด้วยวิธีที่ง่ายและให้ร้อยละของการผลิตที่ดี สารทั้ง 19 ตัวถูกนำไปตรวจสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Porphyromonas gingivalis* ซึ่งทำให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบ (periodontitis) และแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* (แบคทีเรียในช่องปากที่เปลี่ยนน้ำตาลบนเคลือบฟันให้เป็นกรด และกำลังอยู่ระหว่างรอผลทดสอบ

เอกสารอ้างอิง

1. Komwatchara, T., 1996, The development of Andrographis paniculata Extract Gel for Microbial Inhibition in adult Periodontitis. M.Sc. Thesis, Graduate School, Mahidol University. Bangkok, Thailand.

2. Rassameemasmaung, S., 1996, Subgingival administration of Andrographis paniculate Gel as an Adjunct in the Treatment of Adult Periodontitis. M.Sc. Thesis, Graduate School, Mahidol University. Bangkok, Thailand.

3. Rassameemasmaung, S., Sirirat, M., Komwatchara, T., Roianapanthu, P. et al., 1998, Subgingival administration of Andrographis paniculata gel as an adjunct in the treatment of adult periodontitis. Mahidol, J 5(1): 9-15.

4. Atsawasuwan, P., 1996, Comparative Clinical and Microbiological Effects of Topical Subgingival Administration of Andrographis paniculata Gel and Metronidazole Gel as Adjunct in the treatment of Adult Periodontitis. M.Sc. Thesis, Graduate School, Mahidol University. Bangkok, Thailand.

5. Atsawasuwan, P., Sirirat, M., Amomchat, C., Yudhasarasitihi, S. et al., 1998, Subgingival administration of Andrographis paniculata gel and metronidazole gel as an adjunct in the treatment of adult periodontitis: clinical and microbiological effect effects. Mahidol, J 5(2): 97-101.

6. Limsong, J., Benjavongkulchai, E., Kuvatanasuchati, J., *Journal of Ethnopharmacology* **2004**, *92*, 281–289.

7. Sakakana, S., Okada, Y., *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 1688-1692.

8. Fausto, R.C., Min, Z.A., Douglas, K., Christine, D. W., *Phytochemistry Letters* **2008**, *1*, 151–154.

9. Shyh-Jyn, L. et.al., *Food and Chemical Toxicology* **2006**, *44*, 2078–2085.

10. Nam-Cheol, K., Anne E. D., Christine, D. W., Douglas, K., *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1379-1384.

11. Xing-Cong, L., Pieter, Bijl., Christine, D.W., *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 817-820.

12. Gupta, S.; Choudhry, M. A.; Yadava, J. N. S.; Srivastava, V.; Tandon, J. S. *Int. J. Crude Drug Res.* **1990**, *28*, 273.

13. Deng, W. L. *Drugs Future* **1990**, *15*, 809.

14. (a) Misra, P.; Pal, N. L.; Guru, P. Y.; Katiyar, J. C.; Srivastava, V.; Tandon, J. S. *Int. J. Pharmacognosy* **1992**, *30*, 263. (b) Najib, N. A. R. N.; Furuta, T.; Kojima, S.; Takane, K.; Ali, M. M. *J. Ethnopharmocol.* **1999**, *64*, 249.

15. (a) Puri, A.; Saxena, A.; Saxena, R. P.; Saxena, K. C.; Srivastava, V.; Tandon, J. S. *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 995. (b) Chiou, W. F.; Lin, J. J.; Chen, C. F. Br. *J. Pharmacol.* **1998**, *125*, 327.

16. (a) Choudhury, B. R.; Haque, S. J.; Poddar, M. K. *PlantaMedica* **1987**, *53*, 135. (b) Saraswat, B.; Visen, P. K.; Patnaik, G. K.; Dhawan, B. N. *Fitoterapia* **1995**, *66*, 415.

17. Zhao, H. Y.; Fang, W. Y. *Chinese Med. J.* **1991**, *104*, 770.

18 **T. Matsuda, M. Kuroyanagi, S. Sugiyama, et. al.** *Chem. Pharm. Bull.* 1994, *42*, **1216.**

19. Sambyal, V. S.; Goswami, K. N. *Cryst. Res. Technol.* **1995**, *30*, 629.

20. Jiang X. et al. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2009**, 1-8.