

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากรากของเล็บเหยี่ยว (*Zizyphus oenoplia* (Linn.) Mill.)

ปริญญานิพนธ์

ของ

ณัฐชัย อุ่นใจ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ

พฤษภาคม 2545

ลิขสิทธิ์เป็นของ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

๕๕๖.๕๕

๖๕๖.๖๖

๘๘

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากรากของเล็บเหยี่ยว (*Zizyphus oenoplia* (Linn.) Mill.)

บทคัดย่อ

ของ

ณัฐชัย อุ่นใจ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ

พฤษภาคม ๒๕๔๕

๕๖ ๑๔๗๒๖๑

๕๕๖.๕๕ ๒๕๔๕

ณัฐชัย อุ่นใจ. (2545), การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากรากของเล็บเหยี่ยว (*Zizyphus oenoplia* (Linn.) Mill.). ปรินญาณิพนธ์ วท.ม. (เคมีชีวภาพ). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: รศ.ดร. สุนิตย์ สุขสำราญ, ผศ.ดร. พินิติ ระตะนกุล

ในการแยกสารจากรากของเล็บเหยี่ยว (*Zizyphus oenoplia* (Linn.) Mill.) พบสารประกอบ cyclopeptide alkaloid 3 ชนิด คือ zizyphine-A zizyphine-B และ zizyphine-F พร้อมกับสารประกอบ triterpene ซึ่งมีโครงสร้างแบบ lupane 3 ชนิด คือ betulinic acid betulin และ ceanothic acid ซึ่ง betulin และ ceanothic acid เป็นสารประกอบ triterpene ที่ยังไม่เคยรายงานการพบในพืชชนิดนี้ สำหรับการพิสูจน์โครงสร้างของสารใช้วิธีทางสเปกโตรสโคปีประกอบกับการเปรียบเทียบข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีกับข้อมูลของสารที่มีผู้รายงานไว้แล้ว

STUDY ON THE CHEMICAL CONSTITUENTS OF
ZIZYPHUS OENOPLIA (LINN.) MILL. ROOT

AN ABSTRACT
BY
NATTHACHAI AUNCHAI

Presented in partial fulfillment of the requirements
for the Master of Science degree in Biological Chemistry
at Srinakharinwirot University
May 2002

Natthachai Aunchai. (2002). *Study on the chemical constituents of Zizyphus oenoplia (Linn.) Mill. root*. Master Thesis, M.S. (Biological Chemistry). Bangkok : Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Assoc. Prof. Dr. Sunit Suksamrarn, Asst. Prof. Dr. Pinit Ratananukul

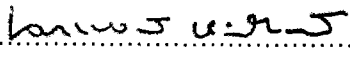
Three cyclopeptide alkaloids, zizyphine-A, zizyphine-B and zizyphine-F together with three lupane type triterpenes, betulinic acid, betulin and ceanothic acid were isolated from the root of *Zizyphus oenoplia* (Linn.) Mill.. Betulin and ceanothic acid have not been reported previously from this plant. The structure of these compounds were elucidated by spectroscopic methods and by comparison with the reported values in the literature.

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง

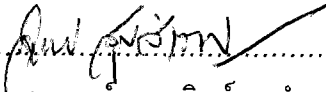
การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากรากของเล็บเหยี่ยว (*Zizyphus oenopia* (Linn.) Mill.)

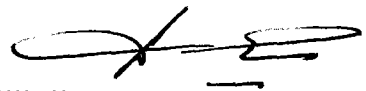
ของ
นายณัฐชัย อุ่นใจ

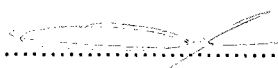
ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

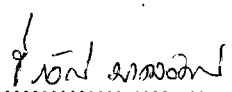
.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.นภาพร หะวานนท์)
วันที่ พฤษภาคม พ.ศ. 2545

คณะกรรมการสอบปริญญานิพนธ์

.....ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุนิตย์ สุขสำราญ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พินิต ระตะนกุล)

.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนันต์ พุทธิยาสถาพร)

.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีรวัฒน์ มงคลอัครวัฒน์)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยคำแนะนำ ความช่วยเหลือ และให้ความอนุเคราะห์อย่างดีจากคณาจารย์หลายท่าน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สุนิตย์ สุขสำราญ ประธานควบคุมปริญญานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิณิตี รตะนานุกุล กรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ในทุกขั้นตอนของการวิจัยและการเขียนปริญญานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนันต์ พุทธิยาสถาพร และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชีรวัฒน์ มงคลอัครวัฒน์ ในการเป็นกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำต่าง ๆ ที่ทำให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์มะยูโซ๊ะ กูโน ในการเก็บตัวอย่างพืช รองศาสตราจารย์ ดร. นิจศิริ เรืองรังษี แห่งภาควิชาเภสัชเวช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการตรวจสอบเอกลักษณ์ของพืช และคณาจารย์ภาควิชาเคมี และภาควิชาชีววิทยาทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และให้ความเมตตาแก่ผู้วิจัยมาตลอด

ขอกราบขอบพระคุณคุณณิธิรัตน์ ฉิมน้อย แห่งสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ในการบันทึก mass spectra ขอขอบพระคุณคุณณริศรา สุวรรณโกชน์ ที่ได้ช่วยเหลือ อำนวยความสะดวก และให้คำแนะนำปรึกษาด้านการปฏิบัติการแก่ผู้วิจัยเป็นอย่างดี ตลอดจนเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาเคมี เพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ นิสิตปริญญโททุกท่าน ที่ได้ให้คำแนะนำ ช่วยเหลือ อำนวยความสะดวก และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและขอขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

คุณค่าและประโยชน์ใด ๆ อันเกิดจากปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแต่บิดา มารดา ครูอาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่าน

ณัฐชัย อุ๋นใจ

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	2
ความสำคัญของการวิจัย.....	2
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	11
พืชที่ใช้ในการวิจัย.....	11
วัสดุ สารเคมี และอุปกรณ์/เครื่องมือ.....	11
การสกัดสารจากรากเล็บเหยี่ยว การแยกและการทำให้บริสุทธิ์.....	12
การศึกษาสมบัติทางกายภาพและสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้.....	30
4 ผลการวิจัย.....	31
1. ผลการสกัดสารจากรากเล็บเหยี่ยว.....	31
2. ผลการแยกสาร และการทำสารให้บริสุทธิ์.....	31
3. การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์.....	35
5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	38
การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์.....	38
การพิสูจน์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้.....	39
ข้อเสนอแนะ.....	78
บรรณานุกรม.....	79
ภาคผนวก.....	83
อภิธานศัพท์.....	112
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	115

บัญชีตาราง

ตาราง		หน้า
1	cyclopeptide alkaloid ที่พบใน <i>Zizyphus oenoplia</i>	6
2	ผลการแยกของแข็งที่ได้จากกลุ่ม 21 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	17
3	ผลการแยกสารกลุ่ม 2 โดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	21
4	ผลการแยกสารจากกลุ่มย่อยที่ 2.7 โดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	21
5	ผลการแยกส่วน filtrate ของสารกลุ่มย่อยที่ 2.7.6 โดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	22
6	ผลการแยกสารกลุ่ม 7 โดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	23
7	ผลการแยกสารกลุ่มย่อยที่ 7.2 โดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	24
8	ผลการแยกสารกลุ่มย่อยที่ 7.3 โดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	25
9	ผลการแยกสารกลุ่มย่อยที่ 7.4 โดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	26
10	ผลการแยกสารจากส่วนสกัดชั้น MeOH โดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	28
11	ผลการแยกสารจากส่วนสกัดชั้น hexane โดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	32
12	ผลการแยกสารจากส่วนสกัดชั้น EtOAc โดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	33
13	ผลการแยกสารจากส่วนสกัดชั้น MeOH โดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	34
14	สารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากรากเล็บเหยี่ยว.....	38
15	ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR ของ betulinic acid และสารประกอบ 1 และข้อมูล DEPT 90 และ DEPT 135 ของสารประกอบ 1.....	42
16	ข้อมูล ^1H NMR COSY HMQC และ HMBC ของสารประกอบ 1.....	43
17	ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR DEPT 90 และ DEPT 135 ของสารประกอบ 2 และข้อมูล ^{13}C NMR ของ betulin	47
18	ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR ของสารประกอบ 1 และสารประกอบ 2 และข้อมูล ^{13}C NMR ของ betulin	48
19	ข้อมูล ^1H NMR COSY HMQC และ HMBC ของสารประกอบ 2.....	49
20	ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR ของ ceanothic acid และสารประกอบ 3 และข้อมูล DEPT 90 และ DEPT 135 ของสารประกอบ 3.....	55
21	ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR ของ ceanothic acid betulinic acid และสารประกอบ 3.....	56
22	ข้อมูล ^1H NMR COSY HMQC และ HMBC ของสารประกอบ 3.....	57
23	ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR ของ zizypine-A และสารประกอบ 4 และข้อมูล DEPT 90 และ DEPT 135 ของสารประกอบ 4.....	62

บัญชีตาราง (ต่อ)

ตาราง		หน้า
24	ข้อมูล ^1H NMR COSY HMQC และ HMBC ของสารประกอบ 4.....	63
25	ข้อมูล ^1H NMR ของ zizyphine-F และข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR DEPT 90 และ DEPT 135 ของสารประกอบ 5.....	68
26	เปรียบเทียบข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR ของสารประกอบ 4 และสารประกอบ 5 และข้อมูล ^1H NMR ของ zizyphine-F.....	69
27	ข้อมูล ^1H NMR COSY HMQC และ HMBC ของสารประกอบ 5.....	70
28	ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR DEPT 90 และ DEPT 135 ของสารประกอบ 6 และข้อมูล ^1H NMR ของ zizyphine-B.....	75
29	เปรียบเทียบข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR ของสารประกอบ 4 และสารประกอบ 6 และข้อมูล ^1H NMR ของ zizyphine-B.....	76
30	ข้อมูล ^1H NMR COSY HMQC และ HMBC ของสารประกอบ 6.....	77

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 โครงสร้างทั่วไปของสารประกอบ cyclopeptide alkaloid.....	4
2 สูตรโครงสร้างของ betulinic acid (11) และ zizyotin (12).....	10
3 ขั้นตอนการสกัดสารจากรากเล็บเหยี่ยว.....	13
4 การแยกสารจากส่วนสกัดชั้น hexane ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	18
5 การแยกสารจาก fraction ที่ 18 19 และ 20.....	19
6 การแยกสารจากส่วนสกัดชั้น EtoAc	27
7 การแยกสารจากส่วนสกัดชั้น MeOH.....	29
8 ความสัมพันธ์ HMBC ที่สำคัญของสารประกอบ 1.....	40
9 ความสัมพันธ์ HMBC บางส่วนของสารประกอบ 2.....	45
10 triterpenes ที่พบในพืชสกุล <i>Zizyphus</i>	51
11 ความสัมพันธ์ HMBC ที่สำคัญของสารประกอบ 3.....	54
12 ความสัมพันธ์ HMBC ที่สำคัญของสารประกอบ 4.....	60
13 Mass fragmentation ion ของสารประกอบ 4.....	61
14 ความสัมพันธ์ HMBC ที่สำคัญของสารประกอบ 5.....	66
15 Mass fragmentation ion ของสารประกอบ 5.....	67
16 ความสัมพันธ์ HMBC ที่สำคัญของสารประกอบ 6.....	73
17 Mass fragmentation ion ของสารประกอบ 6.....	74
18 ¹ H NMR spectrum (CDCl ₃ , 300 MHz) ของสารประกอบ 1.....	84
19 ¹ H NMR spectrum (CDCl ₃ , 300 MHz) ของสารประกอบ 1 (ขยาย).....	85
20 ¹³ C NMR DEPT 90 และ 135 spectra (CDCl ₃ , 75 MHz) ของสารประกอบ 1.....	86
21 ¹ H NMR spectrum (CDCl ₃ , 300 MHz) ของสารประกอบ 2.....	87
22 ¹ H NMR spectrum (CDCl ₃ , 300 MHz) ของสารประกอบ 2 (ขยาย).....	88
23 ¹³ C NMR spectrum (CDCl ₃ , 75 MHz) ของสารประกอบ 5.....	89
24 ¹³ C NMR DEPT 90 และ 135 spectra (CDCl ₃ , 75 MHz) ของสารประกอบ 2.....	90
25 ¹ H NMR spectrum (CD ₃ OD+CDCl ₃ , 300 MHz) ของสารประกอบ 3.....	91
26 ¹³ C NMR spectrum (CD ₃ OD+CDCl ₃ , 75 MHz) ของสารประกอบ 3.....	92
27 ¹³ C NMR DEPT 90 และ 135 spectra (CD ₃ OD+CDCl ₃ , 75 MHz) ของสารประกอบ 3.....	93

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
28 ^1H NMR spectrum ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 300 MHz) ของสารประกอบ 3.....	94
29 ^{13}C NMR DEPT 90 และ 135 spectra ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 75 MHz) ของสารประกอบ 3.....	95
30 ^{13}C NMR DEPT 90 และ 135 spectra ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 75 MHz) ของสารประกอบ 3 (ขยาย).....	96
31 ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) ของสารประกอบ 4.....	97
32 ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) ของสารประกอบ 4 (ขยาย).....	98
33 ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) ของสารประกอบ 4 (ขยาย)	99
34 ^{13}C NMR DEPT 90 และ 135 spectra (CDCl_3 , 75 MHz) ของสารประกอบ 4.....	100
35 ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) ของสารประกอบ 5.....	101
36 ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) ของสารประกอบ 5 (ขยาย).....	102
37 ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) ของสารประกอบ 5 (ขยาย).....	103
38 ^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 75 MHz) ของสารประกอบ 5.....	104
39 ^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 75 MHz) ของสารประกอบ 5 (ขยาย).....	105
40 ^{13}C NMR DEPT 90 และ 135 spectra (CDCl_3 , 75 MHz) ของสารประกอบ 5.....	106
41 ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) ของสารประกอบ 6.....	107
42 ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) ของสารประกอบ 6 (ขยาย).....	108
43 ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) ของสารประกอบ 6 (ขยาย).....	109
44 ^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 75 MHz) ของสารประกอบ 6.....	110
45 ^{13}C NMR DEPT 90 และ 135 spectra (CDCl_3 , 75 MHz) ของสารประกอบ 6.....	111

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

เล็บเหยี่ยว มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Zizyphus oenoplia* (L.) Mill. (วงศ์สฤติย์ ฉั่วกุล. 2539 : 229) มีชื่อพ้องว่า *Rhamnus oenoplia* L. อยู่ในวงศ์ Rhamnaceae (นันทวัน บุญยะประกาศ และอรนุช โชคชัยเจริญพร. 2543 : 291-292) พืชในวงศ์นี้มีสมาชิกอยู่ 58 สกุล 900 ชนิด พืชในสกุล *Zizyphus* มี 100 ชนิดพบกระจายในบริเวณเขตร้อนของอเมริกา แอฟริกา แถบทะเลเมดิเตอร์เรเนียน อินโด-มาเลเชีย ออสเตรเลีย รวมทั้งยังพบในเขตร้อนของอินเดีย เนปาล ปากีสถาน ภูฏาน บังกลาเทศและศรีลังกา (Bhattacharyya and Johri. 1998 : 326-328) พืชในสกุลนี้ที่พบในประเทศไทยได้แก่ กำลังเสือโคร่ง (*Zizyphus attopensis* Pierre) หนามเล็บแมว (*Zizyphus brunoniana* Clarke ex Brandis หรือ *Zizyphus oenoplia* Mill. var *brunoniana* Tardieu) ชินชี หรือ ต้นรอก หรือ น้าม (*Zizyphus calophylla* Wall.) หนามคอม หรือ ตะครอง หรือ หมากกะทันช้าง (*Zizyphus cambodiana* Pierre) ดาฉูแม (*Zizyphus incurva* Roxb.) พุทรา (*Zizyphus mauritiana* Lam.) พุทราจีน (*Zizyphus jujuba* Mill.) อ้อยช้าง หรือ มะควัด (*Zizyphus rugosa* Lam.) (เต็ม สมิตินันท์. 2544 : 564-565)

พืชในสกุลนี้หลายชนิดที่ใช้เป็นยาสมุนไพรพื้นบ้าน เช่น *Zizyphus cambodiana* Pierre ใช้ส่วนคุ่มหนามของต้น แก้วฝี่ *Zizyphus mauritiana* Lam. ใช้ส่วนเปลือก แก้วท้องร่วง อาเจียน ฝีในคอ ตกโลหิต ใบใช้แก้หวัดคัดจมูก พิษฝี ขับพยาธิ แก้วบวม ตกโลหิต ท้องเสีย อาเจียน บิดมูกเลือด ส่วนผลใช้แก้ ท้องร่วง แก้วไข้ ฟอกเลือด เป็นยาระบาย ขับเสมหะ แก้วไอ (นันทวัน บุญยะประกาศ และอรนุช โชคชัยเจริญพร. 2542 : 328-329) *Zizyphus rugosa* Lam. ใช้แก่นแก้วประดง บิด ท้องร่วง และส่วนของรากใช้แก้โรคงูสวัด (วงศ์สฤติย์ ฉั่วกุล และฉวีวรรณ ใจแก้ว. 2541 : 28-56)

เล็บเหยี่ยวมีชื่ออื่นคือดาฉูแม ไหลซูมี และมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปในแต่ละท้องถิ่นดังนี้ ภาคเหนือ เรียกว่า หนามเล็บเหยี่ยว เล็ดเหยี่ยว มะตันขอ หมากหนาม ภาคกลาง เรียกว่า เล็บเหยี่ยว เล็ดเหยี่ยว พุทราขอ และภาคใต้ เรียกว่า ยับยั่ว สังคัน แสงคำ (เต็ม สมิตินันท์. 2544 : 564-565 ; วงศ์สฤติย์ ฉั่วกุล. 2539 : 229) เล็บเหยี่ยวเป็นไม้พุ่มพาดพันหรือเลื้อยหรือไม้เถาขนาดเล็กเป็นไม้เนื้อแข็ง สูงประมาณ 3-5 เมตร กิ่งอ่อนมีขนสั้นหนานุ่มและขนแข็งเอนสีน้ำตาล มีหนามแหลมเดี่ยวหรือคู่โค้งคล้ายเล็บเหยี่ยวเล็ก ๆ ทั่วทั้งต้น มักโค้งยาว 3.5-6.0 มิลลิเมตร และมีขนสั้นหนานุ่มสีน้ำตาลที่โคนหนาม มีใบเดี่ยวเรียงสลับเป็นรูปไข่แกมใบหอก เบี้ยว ใบมีขนาดกว้าง 1.5-3.0 เซนติเมตร ยาว 2.4-6.5 เซนติเมตร ใบอ่อนจะมีขนปกคลุม เมื่อเริ่มแก่หลังใบจะเกลี้ยงหรือมีขน ท้องใบมีขนแบนชิดสีน้ำตาลทอง โคนใบแหลมเบี้ยว ปลายใบ

แหลมกิ่งแหลมเรียว ขอบใบหยักฟันเลื่อยละเอียด มีเส้นใบออกจากโคนใบ 3-4 เส้น ก้านใบยาว 3.0-6.0 มิลลิเมตร มีขนหนาแน่นสีน้ำตาล ดอกเป็นดอกช่อกระจุกออกที่ซอกใบ ประกอบด้วย ดอกย่อย 20-25 ดอก ก้านดอกยาวประมาณ 3.0 มิลลิเมตร มีขนสั้นหนาแน่นสีน้ำตาล กลีบเลี้ยง เชื่อมติดกันปลายแยกเป็นแฉกรูปสามเหลี่ยมหรือรูปไข่ ยาว 1.5-2.0 มิลลิเมตร กลีบดอกเป็นรูป ไข่กลับ ยาวประมาณ 1 มิลลิเมตร ปลายเว้าตื้นสีเขี้ยว เกสรตัวผู้ยาวเท่า ๆ กลีบดอก ผลสด เมล็ดแข็ง มีรูปทรงกลมหรือทรงรูปไข่ มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-5 มิลลิเมตร เมื่อผลสุกจะมีสีดำผิวเป็นมันมีรสหวานอมเปรี้ยว เมล็ดเป็นทรงรูปไข่มี 1-2 เมล็ดต่อผล จะพบเล็บเหยี่ยว ขึ้นตามปลายเมือะทั่วไป และมีการขยายพันธุ์โดยเมล็ด (นันทวัน บุญยะประกิต และอรนุช โชคชัยเจริญพร. 2543 : 291-292 ; วงศ์สฤติย์ ฉั่วกุล. 2539 : 229)

ในตำรายาพื้นบ้านล้านนาใช้ส่วนรากของเล็บเหยี่ยวผสมกับสมุนไพรดำรับที่ 11 ตำ ปรคบ แก้วตะคริว ในตำรายาไทยใช้ส่วนรากเปลือกต้น ขั้ระดูขาว ขั้ปัสสาวะ แก้มตุ๊กพิการ ฝีมุดกิด เบาหวาน ในตำรายาพื้นบ้านใช้ส่วนรากผสมกับสมุนไพรดำรับที่ 68 ต้มน้ำดื่มแก้ไอ (วงศ์สฤติย์ ฉั่วกุล. 2539 : 229) ใช้ส่วนของหนาม แก้วฝั้ประคำร้อย (นันทวัน บุญยะประกิต และอรนุช โชคชัยเจริญพร. 2543 : 292) และยังพบว่าในจังหวัดอุบลราชธานีได้ใช้ส่วนรากแช่ น้ำอาบแก้ไออีกด้วย (วงศ์สฤติย์ ฉั่วกุล และฉวีวรรณ ใจแก้ว. 2541 : 28-56)

ด้วยเหตุที่ต้นเล็บเหยี่ยวมีสรรพคุณมากมาย ประกอบกับในเมืองไทยยังไม่มี การศึกษาเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีของต้นเล็บเหยี่ยว ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาองค์ ประกอบทางเคมีโดยเริ่มจากส่วนราก เพื่อเป็นแหล่งข้อมูลเบื้องต้นด้านองค์ประกอบทางเคมี และอาจเป็นพื้นฐานสำหรับการวิจัยทางเภสัชวิทยาและพัฒนาให้เป็นยาในอนาคต

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาวิธีการสกัด การแยกสาร และการทำสารให้บริสุทธิ์
2. เพื่อศึกษาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากรากเล็บเหยี่ยว

ความสำคัญของการวิจัย

1. ทำให้ทราบวิธีการแยกสารและการทำสารให้บริสุทธิ์
2. ทำให้ทราบสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากรากเล็บเหยี่ยว ซึ่งอาจเป็น สารใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคได้
3. ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้อาจเป็นแนวทางในการศึกษาวิจัยทั้งด้านเคมีและ เภสัชวิทยาต่อไปในอนาคต

ขอบเขตของการวิจัย

1. ใช้รากของเล็บเหยี่ยว เก็บจากอำเภอจะนะ จังหวัดนราธิวาส เมื่อเดือนมีนาคม พ.ศ. 2543
2. การสกัดสารจากรากเล็บเหยี่ยวใช้วิธีสกัดด้วยตัวทำละลาย hexane EtOAc และ MeOH ตามลำดับ
3. นำส่วนสกัดชั้น hexane EtOAc และ MeOH มาแยก และนำสารที่เป็นองค์ประกอบหลักมาทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี (chromatography techniques) และการตกผลึก (crystallization)
4. การศึกษาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์โดยใช้วิธีทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่ อัลตราไวโอเลตสเปกโทรสโกปี (ultraviolet spectroscopy) อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (infrared spectroscopy) นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (nuclear magnetic resonance spectroscopy) และแมสสเปกโทรสโกปี (mass spectroscopy)

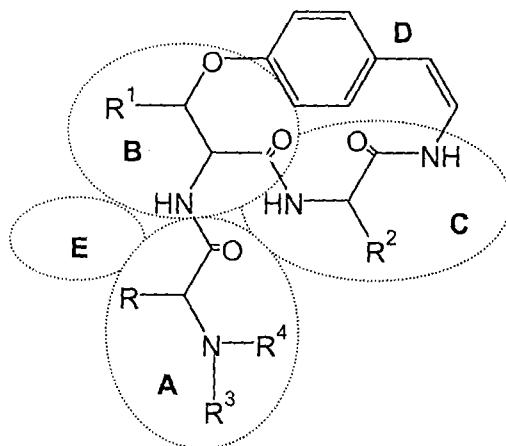
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากรายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของต้นเล็บเหยี่ยวพบสารประกอบหลัก 2 กลุ่ม คือ cyclopeptide alkaloid และ triterpene

cyclopeptide alkaloid เป็น alkaloid ชนิดเป็นวง มีสาย peptide ขนาด 10 หรือ 12 atom เชื่อมกับวง benzene ที่ตำแหน่ง 1,3 หรือ 1,4 เกิดเป็นวงขนาด 13, 14 และ 15 atom cyclopeptide alkaloid พบได้ในพืชวงศ์ Rhamnaceae และพืชวงศ์อื่น ๆ โดยพบได้ในส่วนใบ เปลือกต้น เปลือกรากและเมล็ด ปกติจะพบเพียงเล็กน้อยในลักษณะของผลสมที่เชิงซ้อน ปริมาณของ cyclopeptide alkaloid ที่พบ อยู่ระหว่าง 0.01-1 % ของน้ำหนักพืชที่แห้งซึ่งขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น ท้องถิ่นที่พืชเจริญเติบโต ฤดูกาลเก็บเกี่ยว ความอ่อน-แก่ของพืชที่ใช้ รวมถึงวิธีการแยกสาร (Gournelie, Laskaris and Verpoorte. 1998 : 2-5)

โครงสร้างทั่วไปของ cyclopeptide alkaloid (ภาพประกอบ 1) ประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ คือ



ภาพประกอบ 1 โครงสร้างทั่วไปของ cyclopeptide alkaloid

1. basic terminal (end) amino acid (ส่วนย่อย A)
2. β-hydroxy-amino acid (ส่วนย่อย B)
3. ring-bound amino acid (ส่วนย่อย C)
4. hydroxy-styrylamine unit (ส่วนย่อย D)

ในบางชนิดมี amino acid เพิ่มขึ้น (ส่วนย่อย E) ระหว่างส่วนย่อย A และ B

สารประกอบ cyclopeptide alkaloid สามารถจำแนกตามขนาดของวงเป็นประเภท 13-, 14- และ 15-membered ring system และยังอาจจำแนกตามจำนวนของหน่วยย่อยที่มีคือ 4 หรือ 5 หน่วยย่อย เช่น 4(15)cyclopeptide alkaloid คือ cyclopeptide alkaloid ที่มีวงขนาด 15 อะตอม และประกอบด้วย 4 ส่วนย่อย คือส่วนย่อย A B C และ D

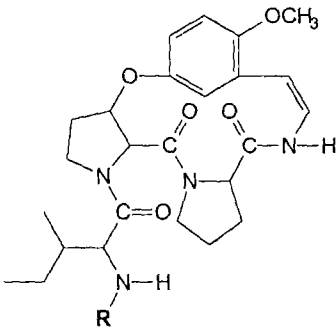
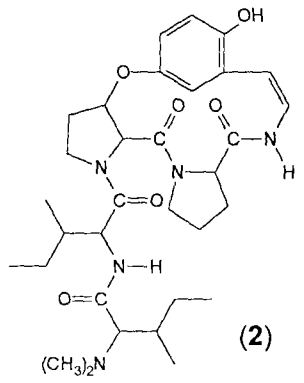
ประเภทของ cyclopeptide alkaloid ที่พบใน *Zizyphus oenoplia* สามารถจำแนกได้ดังตาราง 1 ซึ่งแบ่งเป็น

1) 5(13)cyclopeptide alkaloid คือ cyclopeptide alkaloid ที่เป็นวงขนาด 13 อะตอม และมี 5 ส่วนย่อย ได้แก่ zizyphine-A (**1a**), zizyphine-B (**1b**), zizyphine-C (**1c**), zizyphine-F (**2**), zizyphine-I (**3**) และ zizyphine-K (**4**) (Cassels, et al. 1974 : 2461-2466 ; Tschsche, et al. 1974 : 2941-2944 ; Gournelis, Laskaris and Verpoorte. 1998 : 102-103)

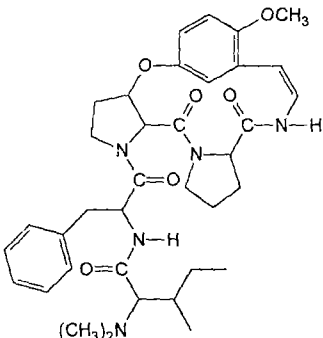
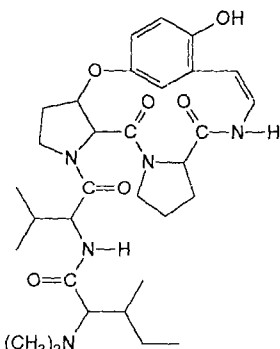
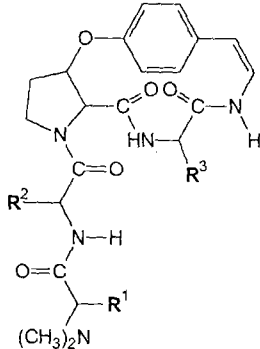
2) 5(14)cyclopeptide alkaloid คือ cyclopeptide alkaloid ที่เป็นวงขนาด 14 อะตอม และมี 5 ส่วนย่อย ได้แก่ amphibine-B (**5**), frangufoline (**6**), mauritine-D (**7**) และ zizyphine-G (**8**) (Maurya, et al. 1995 : 372 ; Tschsche, et al. 1974 : 2941-2944)

3) 4(15)cyclopeptide alkaloid คือ cyclopeptide alkaloid ที่มีโครงสร้างหลักประกอบด้วยวงขนาด 15 อะตอม และประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย ได้แก่ abyssinine-A (**9a**), abyssinine-B (**9b**) และ zizyphine-D (**10a**) และ zizyphine-E (**10b**) (Cassels, et al. 1974 : 2461-2466)

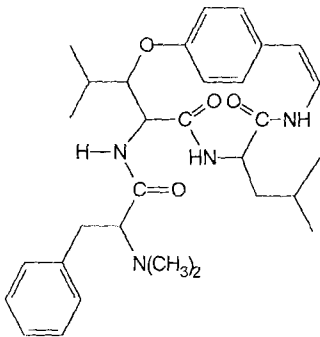
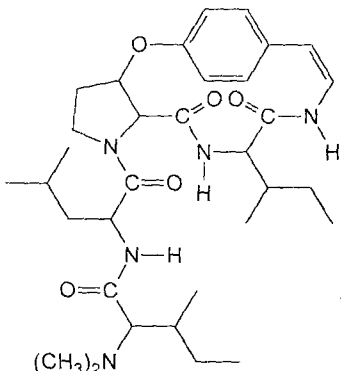
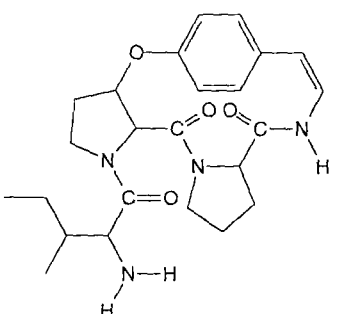
ตาราง 1 cyclopeptide alkaloids ที่พบใน *Zizyphus oenoplia*

สารประกอบ	โครงสร้าง	ส่วนของพืช	เอกสารอ้างอิง
<u>13-membered ring</u>			
	 (1)		
zizyphine-A or zizyphine (1a)	R = <i>N,N</i> -dimethyl-Ile	เปลือกกราก	Menard, et al. 1963 : 1801-1811 Cassels, et al. 1974 : 2461-2466
zizyphine-B or zizyphinine or <i>N</i> -desmethyl- zizyphine-A(1b)	R = <i>N</i> -methyl-Ile	เปลือกกราก เปลือกต้น	Menard, et al. 1963 : 1801-1811 Cassels, et al. 1974 : 2461-2466
zizyphine-C (1c)	R = <i>N,N</i> -dimethyl-Phe	เปลือกต้น	Cassels, et al. 1974 : 2461-2466
zizyphine-F or <i>O</i> -desmethyl- zizyphine-A (2)	 (2)	เปลือกต้น	Tschesche, et al. 1974 : 2941-2944

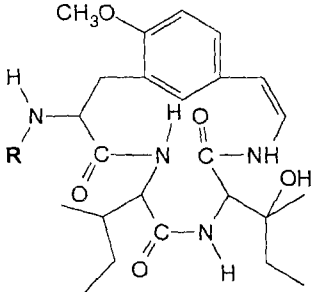
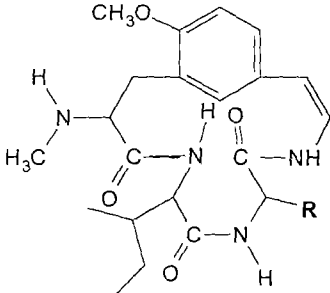
ตาราง 1 (ต่อ)

สารประกอบ	โครงสร้าง	ส่วนของพืช	เอกสารอ้างอิง
<u>13-membered ring</u>			
zizyphine-I (3)	 (3)	เปลือกต้น	Gournelis, Laskaris and Verpoorte. 1998 : 103
zizyphine-K (4)	 (4)	เปลือกต้น	Gournelis, Laskaris and Verpoorte. 1998 : 102
<u>14-membered ring</u>			
amphibine-B (5)	 (5) $R^1 = R^3 = \text{CH}_2\text{Ph}$ $R^2 = \text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$	เปลือกต้น	Maurya. et al. 1995 : 107751f

ตาราง 1 (ต่อ)

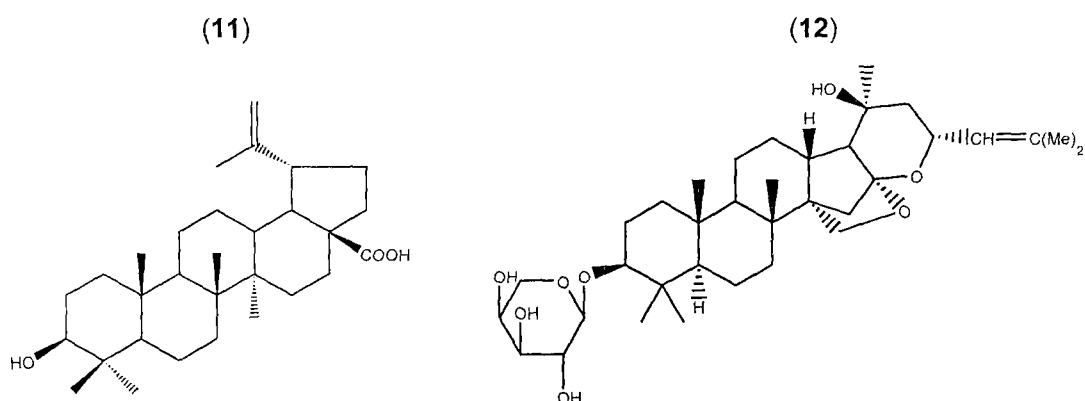
สารประกอบ	โครงสร้าง	ส่วนของพืช	เอกสารอ้างอิง
<u>14-membered ring</u>			
frangufoline (6)	 (6)	เปลือกต้น	Maurya, et al. 1995 : 107751f
mauritime-D (7)	 (7)	เปลือกต้น	Maurya, et al. 1995 : 107751f
zizyphine-G (8)	 (8)	เปลือกต้น	Tschesche, et al. 1974 : 2941-2944

ตาราง 1 (ต่อ)

สารประกอบ	โครงสร้าง	ส่วนของพืช	เอกสารอ้างอิง
<u>15-membered ring</u>			
	 (9)		
zizyphine-D (9a)	R = CH ₃	เปลือกต้น	Cassels, et al. 1974 : 2461-2466
zizyphine-E or N-desmethyl- zizyphine-D (9b)	R = H	เปลือกต้น	Cassels, et al. 1974 : 2461-2466
	 (10)		
abyssinine-A or N-desmethyl- mucronine-C (10a)	R = s-buthyl	เปลือกต้น	Cassels, et al. 1974 : 2461-2466
abyssinine-B (10b)	R = i-buthyl	เปลือกต้น	Cassels, et al. 1974 : 2461-2466

Phe = phenylalanine, Ile = isoleucine, i-buthyl = isobuthyl, s-buthyl = secondarybuthyl

สารประกอบ triterpene ที่พบในพืชชนิดนี้คือ betulinic acid (11) โดยพบในส่วนเปลือก
รากของ *Zizyphus oenoplia* (Menard, et al. 1963 : 1801-1811) และ triterpenoid saponin
คือ zizyotin (12) จากส่วนเปลือกต้นของ *Zizyphus oenoplia* (Maurya, et al. 1995 : 107751f)



ภาพประกอบ 2 สูตรโครงสร้างของ betulinic acid (11) และ zizyotin (12)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

พืชที่ใช้ในการวิจัย

ใช้รากเล็บเหยี่ยวเก็บจากอำเภोजะแนะ จังหวัดนราธิวาส เมื่อเดือนมีนาคม พ.ศ. 2543 และได้รับการตรวจเอกลักษณ์โดย รองศาสตราจารย์ ดร.นิจิตติ เรืองรังษี ภาควิชาเภสัชเวช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุปกรณ์/เครื่องมือ และสารเคมี ที่ใช้ในการสกัดสารจากรากเล็บเหยี่ยว และทำสารให้บริสุทธิ์
วัสดุและสารเคมี

1. ตัวทำละลายอินทรีย์ (กลั่น)
2. silica gel สำหรับ column chromatography
 - silica gel (< 0.063 mm Merck 1.07729.5000)
 - silica gel (0.063-0.200 mm Merck 1.07734.2500)
3. silica gel สำหรับ thin-layer chromatography
 - silica gel 60GF₂₅₄ (Merck 7730.1000)
4. spray reagent (anisaldehyde : conc. H₂SO₄ : glacial acetic acid : methanol ในอัตราส่วน 0.50 : 8.00 : 10.00 : 85.00) (Jork, et al. 1990 : 196)
5. pre-coated TLC aluminium sheets of silica gel 60GF₂₅₄ (Merck 1.05554)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. คอลัมน์แก้วขนาดต่าง ๆ
2. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Precisa 240A)
3. หลอดอัลตราไวโอเลต (Spectroline ENF-260 C/F)
4. เครื่องหาจุดหลอมเหลว (Griffin)
5. Fourier transform infrared spectrophotometer
(Perkin Elmer FT-IR spectrum BX)
6. glass drying oven (Buchi B-580)
7. mass spectrometer (Finnigan MAT 90)
8. nuclear magnetic resonance spectrometer (Bruker Avance 300)

9. polarimeter (Jasco DIP-370)
10. rotary evaporator (Buchi Rotavapor R-114)
11. UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu UV-2401PC)

การสกัดสารจากรากเล็บเหยี่ยว การแยกและทำสารให้บริสุทธิ์

1. การสกัดสารจากรากเล็บเหยี่ยว (ภาพประกอบ 3)

สกัดสารจากรากเล็บเหยี่ยวที่แห้งและบดละเอียด โดยการแช่ใน hexane EtOAc และ MeOH ตามลำดับ

1.1 การสกัดด้วย hexane

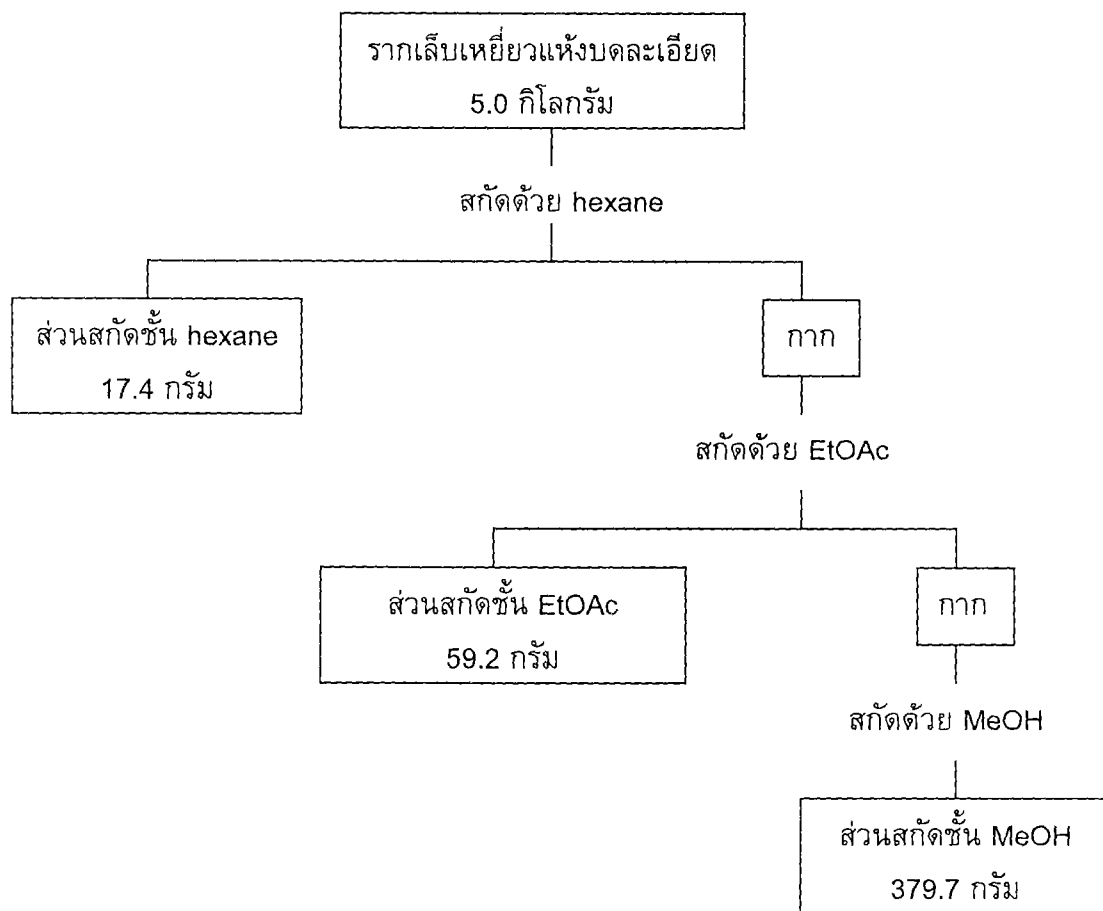
สกัดรากเล็บเหยี่ยวที่แห้ง บดละเอียด น้ำหนัก 5.0 กิโลกรัม ด้วย hexane 3 ครั้ง ครั้งละ 15 ลิตร ที่อุณหภูมิ 60 °C บนอ่างน้ำร้อน แต่ละครั้งใช้เวลา 36 ชั่วโมง กรอง แล้วระเหย hexane ออกจนแห้ง ได้ส่วนสกัดชั้น hexane น้ำหนัก 17.4 กรัม

1.2 การสกัดด้วย EtOAc

ตากกากที่ผ่านการสกัดด้วย hexane ให้แห้ง แล้วนำมาสกัดด้วย EtOAc 3 ครั้ง โดยทำเช่นเดียวกับขั้นตอนการสกัดด้วย hexane ได้ส่วนสกัดชั้น EtOAc น้ำหนัก 59.2 กรัม

1.3 การสกัดด้วย MeOH

กากที่ผ่านการสกัดด้วย EtOAc ตากให้แห้ง นำมาสกัดด้วย MeOH 3 ครั้ง โดยทำเช่นเดียวกับขั้นตอนการสกัดด้วย hexane และ EtOAc ได้ส่วนสกัดชั้น MeOH น้ำหนัก 379.7 กรัม



ภาพประกอบ 3 ขั้นตอนการสกัดสารจากรากเล็บเหยี่ยว

2. วิธีการแยกสารและการทำสารให้บริสุทธิ์

2.1 การแยกสารจากส่วนสกัดชั้น hexane และทำสารให้บริสุทธิ์

นำส่วนสกัดชั้น hexane 15.5 กรัม มาแยกด้วย Quick column chromatography [บรรจุด้วยซิลิกาเจล 100 กรัม ชะด้วย hexane-CHCl₃ เพิ่มสภาพขั้วด้วย CHCl₃ ครั้งละ 5% จนถึง 100% ตามด้วยการเพิ่มขั้วโดย EtOAc ครั้งละ 5% จนถึง 100% สุดท้ายชะด้วย 100% MeOH ชะด้วยตัวทำละลายระบบละ 500 มิลลิลิตร เก็บส่วนละ 100 มิลลิลิตร] แต่ละส่วนที่เก็บได้รวมให้เป็นกลุ่ม ๆ โดยการตรวจสอบด้วยโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง (TLC) การหาตำแหน่งของสารใน TLC ทราบได้จากการมองเห็นภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV ; 254 และ/หรือ 365 nm) หรือใช้ spray reagent บนแผ่น TLC นำไปให้ความร้อนที่ 80-120 °C นาน 1-2 นาที จะปรากฏเป็นสีที่แตกต่างกัน รวมส่วนที่ให้ผล TLC เหมือนกันเข้าด้วยกัน แต่ละกลุ่มที่รวมได้นำไประเหยตัวทำละลายให้แห้ง กลุ่มสารต่าง ๆ ที่ได้นำไปแยกและทำสารให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (CC) และ/หรือแบบเยื่อบาง (prep. TLC) กลุ่มสารทั้งหมดที่แยกได้มี 27 กลุ่ม

2.1.1 กลุ่ม 1 เป็นของแข็งสีขาวปนกับ oil สีเหลือง (1.9 กรัม) นำมารองแยกได้ของแข็งสีขาวหนัก 94.0 มิลลิกรัม เมื่อพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิค ¹H NMR พบว่าเป็นของผสมระหว่าง steroid กับ long chain hydrocarbon ส่วน filtrate เป็น oil สีเหลือง (1.8 กรัม) จากการวิเคราะห์สเปกตรัมของ IR พบว่าเป็นกลุ่มของสารประกอบ long chain hydrocarbon

กลุ่ม 2 มีลักษณะเป็น oil สีเหลือง (0.1 กรัม) จากการวิเคราะห์สเปกตรัมของ IR พบว่าเป็นกลุ่มของสารประกอบ long chain hydrocarbon

2.1.2 กลุ่ม 3 เป็นสารกึ่งของแข็งสีเหลือง (26.1 มิลลิกรัม)

กลุ่ม 4 เป็นสารกึ่งของแข็งสีเหลืองน้ำตาล (241.2 มิลลิกรัม)

กลุ่ม 5 เป็นของแข็งสีเหลือง (0.3 กรัม)

และกลุ่ม 6 เป็นของแข็งสีเหลือง (125.8 มิลลิกรัม) จาก TLC พบว่ามีองค์ประกอบส่วนใหญ่คล้ายกัน และจากสเปกตรัมของ IR พบว่าเป็นกลุ่มของสารประกอบ long chain hydrocarbon

2.1.3 กลุ่ม 7 เป็นสารกึ่งของแข็งสีน้ำตาล (1.1 กรัม)

กลุ่ม 8 เป็นสารกึ่งของแข็งสีเหลือง (724.3 มิลลิกรัม)

และกลุ่ม 9 เป็นสารกึ่งของแข็งสีเหลือง (1.2 กรัม) เมื่อพิจารณาจาก TLC พบว่ามีองค์ประกอบส่วนใหญ่คล้ายกัน และสเปกตรัมของ IR พบว่าเป็นกลุ่มของสารประกอบ long chain hydrocarbon

2.1.4 กลุ่ม 10 เป็นสารกึ่งของแข็งสีเหลืองปน oil สีเหลือง (869.2 มิลลิกรัม) จากสเปกตรัมของ IR พบว่าเป็นกลุ่มของสารประกอบ long chain hydrocarbon

2.1.5 กลุ่ม 11 เป็นของแข็งสีขาวปนเหลือง (577.4 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วยระบบ hexane-CHCl₃ (45-50%)

และกลุ่ม 12 เป็นของแข็งสีขาวปนเหลือง (640.5 มิลลิกรัม) เมื่อพิจารณาจาก TLC พบว่ามีองค์ประกอบส่วนใหญ่คล้ายกัน ได้นำกลุ่ม 11 มาตกผลึกด้วย EtOAc-MeOH ได้ของแข็งสีขาว (253.3 มิลลิกรัม) จาก ¹H NMR spectrum พบว่าเป็นของผสมระหว่าง steroids กับ long chain hydrocarbon

filtrate เป็น oil สีเขียวอ่อน (398.0 มิลลิกรัม) นำมาแยกโดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.0 เซนติเมตร ซิลิกาเจล <0.063 mm, 10 กรัม) ด้วย hexane-CHCl₃, CHCl₃-EtOAc จนถึง 100% EtOAc (ใช้ตัวทำละลายระบบละ 100 มิลลิลิตร เก็บส่วนละ 7 มิลลิลิตร) แยกได้ทั้งหมด 13 กลุ่มย่อย

2.1.5.1 กลุ่มย่อยที่ 11.5 เป็นของแข็งสีขาวปนเหลือง (46.1 มิลลิกรัม) จะออกมาด้วย hexane-CHCl₃ (40-50%) เมื่อตกผลึกด้วย MeOH ได้ผลึกไม่มีสี (5.2 มิลลิกรัม) ซึ่งข้อมูล ¹H NMR พบว่าเป็นสารผสมของสารกลุ่ม steroid ระหว่าง β -sitosterol กับ stigmasterol ซึ่งเป็นสารที่พบในต้นไม้ทั่วไป

2.1.6 กลุ่ม 13 เป็นของแข็งสีขาวปนเหลืองน้ำตาล (1.2 กรัม) นำมาตกผลึกด้วย (EtOAc-MeOH) ได้ของแข็งสีขาว จาก ¹H NMR spectrum พบว่าเป็นของผสมของสารกลุ่ม steroid กับ long chain hydrocarbon

2.1.7 กลุ่ม 14 เป็น oil สีน้ำตาลแดง (0.3 กรัม)

กลุ่ม 15 เป็น oil สีน้ำตาลแดง (320.2 มิลลิกรัม)

กลุ่ม 16 เป็น oil สีน้ำตาล (328.0 มิลลิกรัม)

และกลุ่ม 17 เป็น oil สีน้ำตาล (401.1 มิลลิกรัม,) จากการวิเคราะห์สเปกตรัมของ IR พบว่าเป็นของผสมระหว่างสารประกอบ long chain ester กับของผสมของสารกลุ่ม steroid

2.1.8 กลุ่ม 18 เป็นของแข็งสีขาวปนเหลืองอ่อน (1.2 กรัม) จะออกมาด้วยระบบ CHCl₃-EtOAc (95 : 5) เมื่อล้างด้วย EtOAc ได้ของแข็งสีขาว (134.6 มิลลิกรัม) และ filtrate (1.1 กรัม) จาก TLC พบว่ามีองค์ประกอบหลักเหมือนกับส่วนของแข็ง นำส่วนของแข็งมาตกผลึกด้วย MeOH ได้ของแข็งสีขาว (67.5 มิลลิกรัม) และ filtrate (31.7 มิลลิกรัม) ส่วนของแข็งสีขาวพบว่าประกอบด้วยสาร 2 ชนิด (จาก TLC) จึงนำมาแยกต่อโดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ [ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร, ซิลิกาเจล <0.063 mm, 9.0 กรัม] ด้วย

hexane-CHCl₃ (50 : 50) เพิ่มสภาพความเป็นขี้ด้วย CHCl₃ และสุดท้ายชะด้วย CHCl₃-MeOH (80 : 20) ชะด้วยระบบตัวทำละลายระบบละ 150 มิลลิลิตร เก็บส่วนละ 1 มิลลิลิตร] แยกได้สารบริสุทธิ์ 2 ชนิด คือ สารประกอบ 2 เป็นผลึกรูปเข็มไม่มีสี (47.9 มิลลิกรัม) ถูกชะออกมาด้วยระบบ hexane-CHCl₃ (60-70%) และสารประกอบ 1 เป็นผลึกรูปเข็มไม่มีสี (13.8 มิลลิกรัม) ชะออกมาด้วยระบบ CHCl₃-MeOH (80 : 20)

2.1.9 กลุ่ม 19 เป็นของแข็งสีขาวปนเหลือง (0.6 กรัม) ชะออกมาด้วยระบบ CHCl₃-EtOAc (90 : 10) เมื่อล้างด้วย CHCl₃ ได้สารประกอบ 1 เป็นของแข็งไม่มีสี (236.5 มิลลิกรัม) และ filtrate (374.2 มิลลิกรัม) ซึ่งมีองค์ประกอบหลักส่วนใหญ่เหมือนกับส่วนของแข็ง

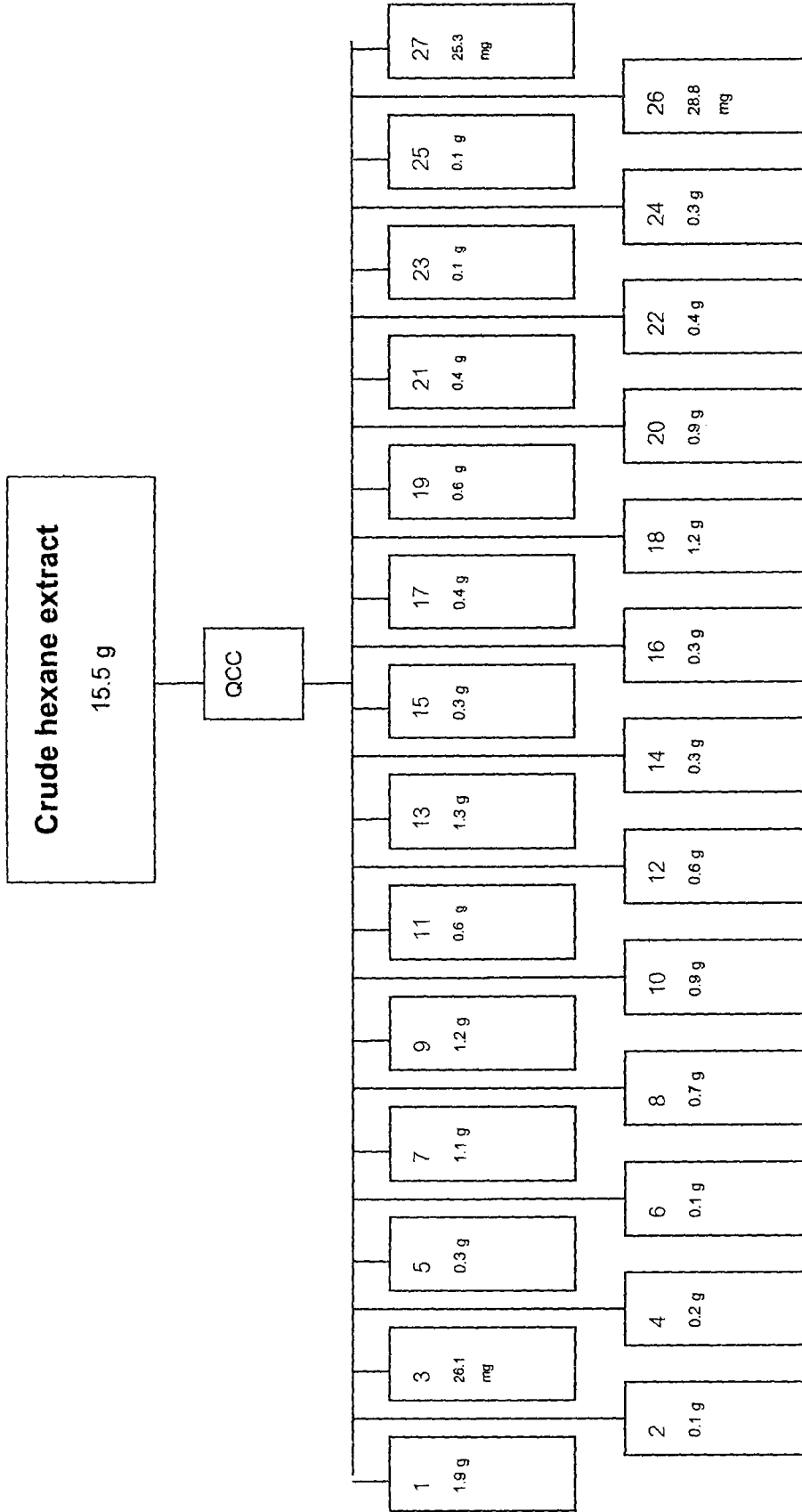
กลุ่ม 20 เป็นสารกึ่งของแข็งสีเหลืองน้ำตาล (886.4 มิลลิกรัม) TLC เหมือนกับกลุ่ม 19 เมื่อทำการล้างของแข็งด้วย CHCl₃-EtOAc ได้ของแข็งซึ่งคือสารประกอบ 1 (510.8 มิลลิกรัม) และ filtrate (403.3 มิลลิกรัม) ซึ่งมีองค์ประกอบหลักส่วนใหญ่เหมือนกับส่วนของแข็ง

2.1.10 กลุ่ม 21 เป็นสารกึ่งของแข็งสีเหลืองน้ำตาล (0.4 กรัม) ทำการตกผลึกด้วย CHCl₃-EtOAc ได้ของแข็งไม่มีสี (101.4 มิลลิกรัม) จาก TLC พบว่าประกอบด้วยสารหลายชนิดจึงนำมาแยกโดยโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ [ซิลิกาเจล <0.063 mm, เริ่มชะด้วย CHCl₃-EtOAc จนถึง EtOAc (100 %) และสุดท้ายชะด้วย EtOAc-MeOH (80 : 20)] แยกได้ทั้งหมด 11 กลุ่มย่อย (ตาราง 2) เนื่องจากแต่ละกลุ่มย่อยมีปริมาณน้อยมากและประกอบด้วยสารหลายชนิดจึงไม่ทำการแยกต่อ

2.1.11 กลุ่ม 22 เป็นของแข็งสีน้ำตาล (384.6 มิลลิกรัม) กลุ่ม 23 เป็นของแข็งสีน้ำตาล (89.1 มิลลิกรัม) กลุ่ม 24 เป็นของแข็งสีเหลือง (322.0 มิลลิกรัม) กลุ่ม 25 เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน (93.6 มิลลิกรัม) กลุ่ม 26 เป็นของแข็งสีน้ำตาลแดง (28.2 มิลลิกรัม) และกลุ่ม 27 เป็นของแข็งสีเหลือง (25.3 มิลลิกรัม) TLC พบว่าไม่พบสารที่น่าสนใจ

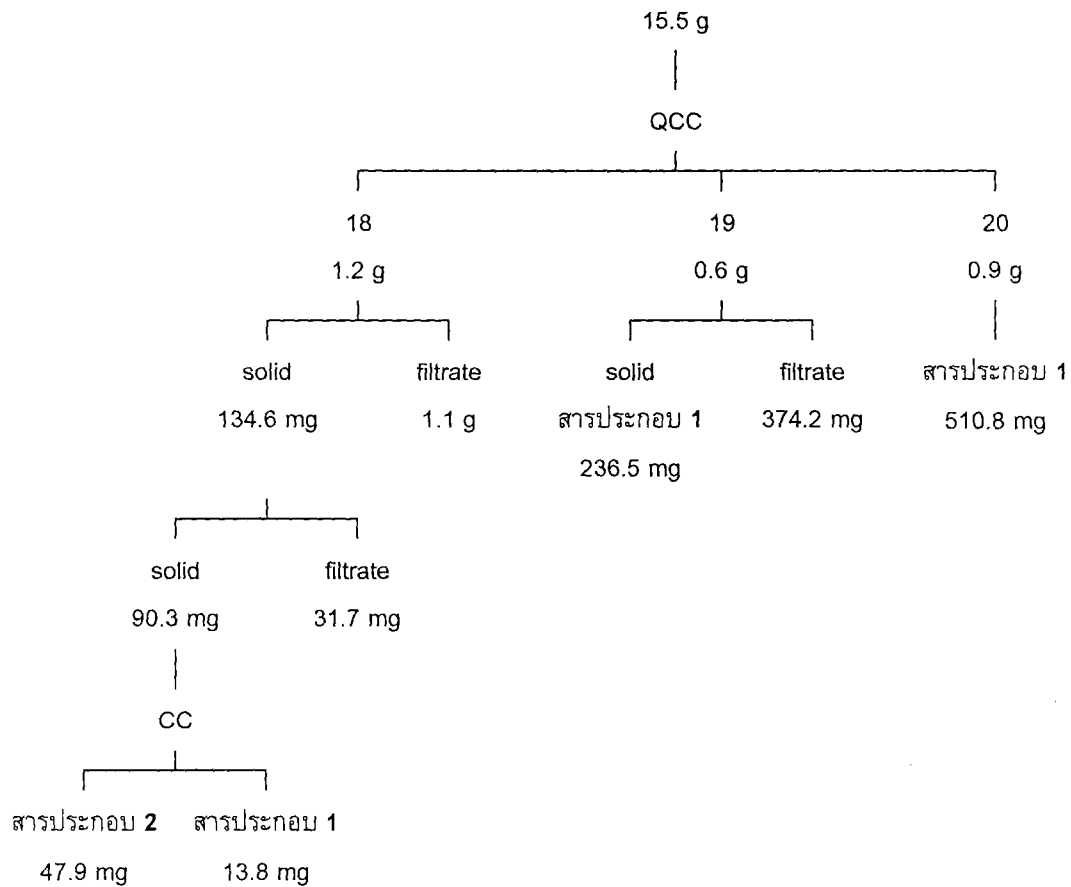
ตาราง 2 ผลการแยกของแข็งที่ได้จากกลุ่ม 21 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ระบบตัวชะ	กลุ่มย่อย	น้ำหนัก (mg)	ลักษณะสาร
CHCl ₃ -EtOAc			
94 : 6	21.1	1.4	ของแข็งสีเหลือง
	21.2	2.5	ของแข็งสีขาว
	21.3	2.7	"
	21.4	11.2	"
	21.5	2.8	"
90 : 10	21.6	32.6	"
80 : 20	21.7	9.1	"
50 : 50	21.8	5.0	"
	21.9	1.6	"
EtOAc	21.10	1.8	"
EtOAc-MeOH			
80 : 20	21.11	7.7	ของแข็งสีขาวปนเหลือง



ภาพประกอบ 4 การแยกสารจากส่วนสกัดขึ้น hexane ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

crude hexane extract



ภาพประกอบ 5 การแยกสารจากกลุ่มที่ 18 19 และ 20

2.2 การแยกสารจากส่วนสกัดชั้น EtOAc และทำสารให้บริสุทธิ์ (ภาพประกอบ 6)

ส่วนสกัดชั้น EtOAc เป็นของแข็งสีน้ำตาลแดงปนขาว (59.2 กรัม) เมื่อล้างด้วย EtOAc ได้ของแข็งสีขาวปนน้ำตาล (6.2 กรัม) และเมื่อตกผลึกด้วย MeOH ได้ผลึกไม่มีสีของสารประกอบ 1 (174.0 มิลลิกรัม)

ส่วน filtrate (44.7 กรัม) นำมาแยกด้วย Quick column chromatography [ซิลิกาเจล (60 GF₂₅₄), 125 กรัม, และใช้ซิลิกาเจล (60 GF₂₅₄), 44 กรัม ผสมกับ filtrate, ๒๕ ด้วยระบบ CHCl₃-EtOAc EtOAc-MeOH และสุดท้ายชะด้วย MeOH (100%) โดยเพิ่มสภาพชั่วคราว ๕% ๒๕ ด้วยตัวทำละลายระบบละ 500 มิลลิลิตร เก็บส่วนละ 100 มิลลิลิตร] แยกได้ 8 กลุ่ม

2.2.1 กลุ่ม 1 เป็นของแข็งสีเหลือง (14.7 กรัม) ชะออกมาด้วย CHCl₃-EtOAc (85 : 15) จาก TLC พบว่าเป็นสารประกอบ 1

2.2.2 กลุ่ม 2 เป็นของแข็งสีเหลือง (4.7 กรัม) ชะออกมาด้วยระบบ CHCl₃-EtOAc (20-35%) นำมาแยกโดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ [ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร, ซิลิกาเจล (<0.063 mm), 110.0 กรัม, ใช้ซิลิกาเจล 5.0 กรัม ผสมกับสาร ๒๕ ด้วยระบบ CHCl₃-MeOH จนถึง CHCl₃-MeOH (50 : 50) ๒๕ ด้วยระบบตัวทำละลายระบบละ 200 มิลลิลิตร เก็บส่วนละ 100 มิลลิลิตร] แยกได้ 10 กลุ่มย่อย (ตาราง 3)

2.2.2.1 กลุ่มย่อยที่ 2.5 เป็นของแข็งสีขาวปนเหลือง (1.4 กรัม) ชะออกมาด้วยระบบ CHCl₃-MeOH (96 : 4) นำมาตกผลึกด้วย CHCl₃ ได้ของแข็งสีขาวหนัก 418.8 มิลลิกรัม TLC พบว่าเป็นสารประกอบ 1 เป็นส่วนใหญ่

filtrate เมื่อทิ้งไว้พบของแข็งไม่มีสีที่ข้างขวด จึงทำการดูดสารละลายออกและล้างของแข็งนี้ด้วย acetone ได้ของแข็งไม่มีสี (16.3 มิลลิกรัม) จากการเปรียบเทียบ TLC รวมทั้งข้อมูลของ IR NMR และ MS spectra กับสารประกอบ 1 พบว่าเป็นสารชนิดเดียวกัน และ filtrate ที่เหลือพบว่าเป็นสารประกอบ 1 เป็นส่วนใหญ่โดย TLC

2.2.2.2 กลุ่มย่อยที่ 2.7 เป็นของแข็งสีขาวปนเหลือง (735.2 มิลลิกรัม) ชะออกมาด้วย CHCl₃-MeOH (95 : 5) นำมาแยกโดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ [ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร, ซิลิกาเจล (<0.063 mm) 30 กรัม และใช้ซิลิกาเจลหนัก 1 กรัม ผสมกับสาร ๒๕ ด้วยระบบ CHCl₃-MeOH ๒๕ ด้วยตัวทำละลายระบบละ 200 มิลลิลิตร เก็บส่วนละ 10 มิลลิลิตร] แยกได้ 9 กลุ่มย่อย (ตาราง 4)

ตาราง 3 ผลการแยกสารกลุ่ม 2 โดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ระบบตัวชะ	กลุ่มย่อย	น้ำหนัก (mg)	ลักษณะสาร
CHCl ₃	2.1	6.5	ของแข็งสีเหลือง
	2.2	2.1	"
CHCl ₃ -MeOH			
99.7 : 0.3	2.3	5.3	ของแข็งสีขาวปนเหลือง
97 : 3	2.4	15.6	"
96 : 4	2.5	1.4	ของแข็งสีขาว
95 : 5	2.6	2.1	ของแข็งสีขาวปนเหลือง
	2.7	735.2	ของแข็งสีน้ำตาล
93 : 7	2.8	295.7	ของแข็งสีน้ำตาลแดง
90 : 10	2.9	63.9	"
50 : 50	2.10	328.4	คราบสีน้ำตาล

ตาราง 4 ผลการแยกสารจากกลุ่มย่อยที่ 2.7 โดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ระบบตัวชะ	กลุ่มย่อย	น้ำหนัก (mg)	ลักษณะสาร
CHCl ₃ -MeOH			
99 : 1	2.7.1	68.7	ของแข็งสีขาว
	2.7.2	3.1	"
98.5 : 1.5	2.7.3	2.0	Oil สีเหลือง
98 : 2	2.7.4	7.0	ของแข็งสีเหลืองปนน้ำตาล
	2.7.5	73.9	ของแข็งสีขาวปนเหลือง
97.5 : 2.5	2.7.6		ผลึกรูปเข็มสีขาวในสารละลายสีเหลือง
96 : 4	2.7.7	337.8	ของแข็งสีขาวปนน้ำตาล
90 : 10	2.7.8	79.6	ของแข็งสีเหลืองใส
50 : 50	2.7.9	72.2	ของแข็งสีขาวปนเหลือง

2.2.2.2.1 กลุ่มย่อยที่ 2.7.1 เป็นผลึกไม่มีสี (68.7 มิลลิกรัม) ะออกมาด้วยระบบ CHCl_3 -MeOH (99 : 1) เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลของ TLC IR และ NMR spectra กับสารประกอบ 1 พบว่าเป็นสารชนิดเดียวกัน

2.2.2.2.2 กลุ่มย่อยที่ 2.7.6 ะออกมาด้วยระบบ CHCl_3 -MeOH (77.5 : 2.5) ระหว่างระเหยให้แห้งมีผลึกรูปเข็มไม่มีสีตกออกมาในสารละลายสีเหลือง ดูดสารละลายสีเหลืองออกแล้วล้างผลึกด้วย CHCl_3 ได้สารประกอบ 3 เป็นผลึกรูปเข็มไม่มีสี (40.8 มิลลิกรัม)

ส่วน filtrate เป็นของแข็งสีเหลือง (48.9 มิลลิกรัม) นำมาแยกโดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ [ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร, ซิลิกาเจล (< 0.063 mm) 3.0 กรัม ะด้วยระบบ CHCl_3 -MeOH จนถึง CHCl_3 -MeOH (92 : 8) ใช้ตัวทำละลายระบบละ 20 มิลลิลิตร เก็บส่วนละ 1 มิลลิลิตร] แยกได้ 6 กลุ่มย่อย (ตาราง 5)

ตาราง 5 ผลการแยกส่วน filtrate ของสารกลุ่มย่อยที่ 2.7.6 โดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ระบบตัวชะ	กลุ่มย่อย	น้ำหนัก (mg)	ลักษณะสาร
CHCl_3 -MeOH			
99 : 1	2.7.6.1	0.9	ของแข็งสีเหลือง
	2.7.6.2	8.8	ของแข็งสีเหลืองอ่อน
98 : 2	2.7.6.3	31.3	ของแข็งสีขาวปนเหลือง
	2.7.6.4	12.7	"
97 : 3	2.7.6.5	3.4	ของแข็งสีเหลืองใส
92 : 8	2.7.6.6	6.5	ของแข็งสีเหลือง

2.2.2.2.2.1 กลุ่มย่อยที่ 2.7.6.4 เป็นผลึกรูปเข็มไม่มีสี (12.7 มิลลิกรัม) เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลของ TLC และ NMR spectrum กับสารประกอบ 3 พบว่าเป็นสารชนิดเดียวกัน

2.2.2.2.3 กลุ่มย่อยที่ 2.7.7 เป็นของแข็งสีขาวปนน้ำตาล (377.8 มิลลิกรัม) เมื่อล้างด้วย MeOH ได้ของแข็งสีขาว (54.7 มิลลิกรัม) นำมาแยกโดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ [ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร, ซิลิกาเจล (< 0.063 mm) 7.0 กรัม ะด้วยระบบ CHCl_3 -EtOAc EtOAc-MeOH จนถึง EtOAc-MeOH (80 : 20) ใช้ตัวทำละลายระบบละ 50 มิลลิลิตร เก็บส่วนละ 10 มิลลิลิตร] แยกได้ 7 กลุ่มย่อย

2.2.2.2.1 กลุ่มย่อยที่ 2.7.7.1 เป็นผลึกรูปเข็มไม่มีสี (20.7 มิลลิกรัม) เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลของ TLC และ NMR spectrum กับสารประกอบ 3 พบว่าเป็นสารชนิดเดียวกัน

2.2.3 กลุ่ม 3 เป็นสารกึ่งของแข็งสีน้ำตาล (2.8 กรัม) ชะออกมาด้วย $\text{CHCl}_3\text{-EtOAc}$ (50 : 50)

กลุ่ม 4 เป็นของแข็งสีเหลืองน้ำตาล (2.5 กรัม) ชะออกมาด้วย $\text{CHCl}_3\text{-EtOAc}$ (25 : 75)

กลุ่ม 5 เป็นของแข็งสีเหลืองน้ำตาล (2.7 กรัม) ชะออกมาด้วย $\text{CHCl}_3\text{-EtOAc}$ (10 : 90)

กลุ่ม 6 เป็นสารกึ่งของแข็งสีน้ำตาลเข้ม (1.3 กรัม) ชะออกมาด้วย EtOAc-MeOH (97 : 03)

และกลุ่ม 7 เป็นสารกึ่งของแข็งสีน้ำตาล (7.1 กรัม) ชะออกมาด้วย EtOAc-MeOH (80 : 20) จากข้อมูล TLC พบว่าสารกลุ่มเหล่านี้มีองค์ประกอบหลักเป็นสารกลุ่มเดียวกัน จึงนำสารกลุ่ม 7 มาแยกโดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ [ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร, ซิลิกาเจล (<0.063 mm) 135 กรัม และใช้ซิลิกาเจล 7.1 กรัม ผสมกับสารชะด้วยระบบ $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ จนถึง MeOH (100%) ชะด้วยระบบตัวทำละลายระบบละ 200 มิลลิลิตร เก็บส่วนละ 50 มิลลิลิตร] สามารถแยกได้ 7 กลุ่มย่อย (ตาราง 6)

ตาราง 6 ผลการแยกสารกลุ่ม 7 โดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ระบบตัวชะ	กลุ่มย่อย	น้ำหนัก (mg)	ลักษณะสาร
$\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$			
97 : 3	7.1	1.7	ของแข็งสีเหลือง
95 : 5	7.2	825.7	ของแข็งสีขาวปนน้ำตาล
	7.3	110.5	ของแข็งสีเหลือง
94 : 6	7.4	132.5	"
93 : 7	7.5	126.9	"
90 : 10	7.6	973.4	"
85 : 15	7.7	1.1	ของแข็งสีน้ำตาล

2.2.3.1 กลุ่มย่อยที่ 7.2 เป็นของแข็งสีขาวปนน้ำตาล (825.7 มิลลิกรัม) ซะออกมาด้วยระบบ $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ (95 : 5) แบ่งสาร 87.6 มิลลิกรัม มาแยกโดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ [ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร, ซิลิกาเจล (< 0.063 mm) 9 กรัม และใช้ซิลิกาเจล 80.0 มิลลิกรัม ผสมกับสาร] ซะด้วยระบบ EtOAc-acetone acetone-MeOH สุดท้ายด้วย acetone-MeOH (95 : 5) ซะด้วยระบบตัวทำละลายระบบละ 100 มิลลิลิตร เก็บส่วนละ 1 มิลลิลิตร] แยกได้ 7 กลุ่มย่อย (ตาราง 7)

ตาราง 7 ผลการแยกสารกลุ่มย่อยที่ 7.2 โดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ระบบตัวชะ	กลุ่มย่อย	น้ำหนัก (mg)	ลักษณะสาร
EtOAc	7.2.1	2.2	ของแข็งสีขาวปนเหลือง
	7.2.2	43.2	ของแข็งไม่มีสี
	7.2.3	6.9	ของแข็งสีขาวปนเหลือง
	7.2.4	10.8	ของแข็งสีขาว
	7.2.5	4.3	ของแข็งสีขาวปนเหลือง
EtOAc-acetone			
98 : 2	7.2.6	3.7	ของแข็งสีเหลือง
acetone-MeOH			
95 : 5	7.2.7	7.9	คราบสีน้ำตาล

2.2.3.1.1 กลุ่มย่อยที่ 7.2.2 เป็นของแข็งไม่มีสี (43.2 มิลลิกรัม) ซะออกมาด้วยระบบ EtOAc (100%) คือ สารประกอบ 4

2.2.3.2 กลุ่มย่อยที่ 7.3 เป็นของแข็งสีเหลือง (110.5 มิลลิกรัม) ซะออกมาด้วย $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ (95 : 5) นำมาแยกโดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ [ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร, ซิลิกาเจล (< 0.063 mm) 9.0 กรัม และใช้ซิลิกาเจล 110.0 มิลลิกรัม ผสมกับสาร] ซะด้วยระบบ $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ จนถึง $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ (50 : 50) ซะด้วยระบบตัวทำละลายระบบละ 50 มิลลิลิตร เก็บส่วนละ 10 มิลลิลิตร] แยกได้ 9 กลุ่มย่อย (ตาราง 8)

ตาราง 8 ผลการแยกสารกลุ่มย่อยที่ 7.3 โดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ระบบตัวชะ	กลุ่มย่อย	น้ำหนัก (mg)	ลักษณะสาร
CHCl ₃ -MeOH			
99 : 1	7.3.1	0.9	คราบสีเหลือง
98.5 : 1.5	7.3.2	2.2	"
98 : 2	7.3.3	15.0	สารกึ่งของแข็งสีเหลือง
97.8 : 2.2	7.3.4	29.5	ของแข็งสีเหลือง
	7.3.5	6.0	"
97 : 3	7.3.6	10.0	"
96.6 : 3.4	7.3.7	7.6	"
95 : 5	7.3.8	20.9	"
50 : 50	7.3.9	11.3	คราบสีเหลือง

2.2.3.2.1 ส่วนย่อยที่ 7.3.4 เป็นของแข็งสีเหลืองใส (24.5

มิลลิกรัม) ชะออกมาด้วย CHCl₃-MeOH (98 : 2) คือ สารประกอบ 6

2.2.3.3 กลุ่มย่อยที่ 7.4 เป็นของแข็งสีเหลือง (132.5 มิลลิกรัม) ชะออกมาด้วย CHCl₃-MeOH (94 : 6) นำมาแยกโดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ [ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร, ซิลิกาเจล (<0.063 mm) 9.0 กรัม และใช้ซิลิกาเจล 130.0 มิลลิกรัม ผสมกับสาร ชะด้วยระบบ CHCl₃-MeOH จนถึง CHCl₃-MeOH (90 : 10) ชะด้วยตัวทำละลายระบบละ 100 มิลลิลิตร เก็บส่วนละ 1 มิลลิลิตร] แยกได้ 8 กลุ่มย่อย (ตาราง 9)

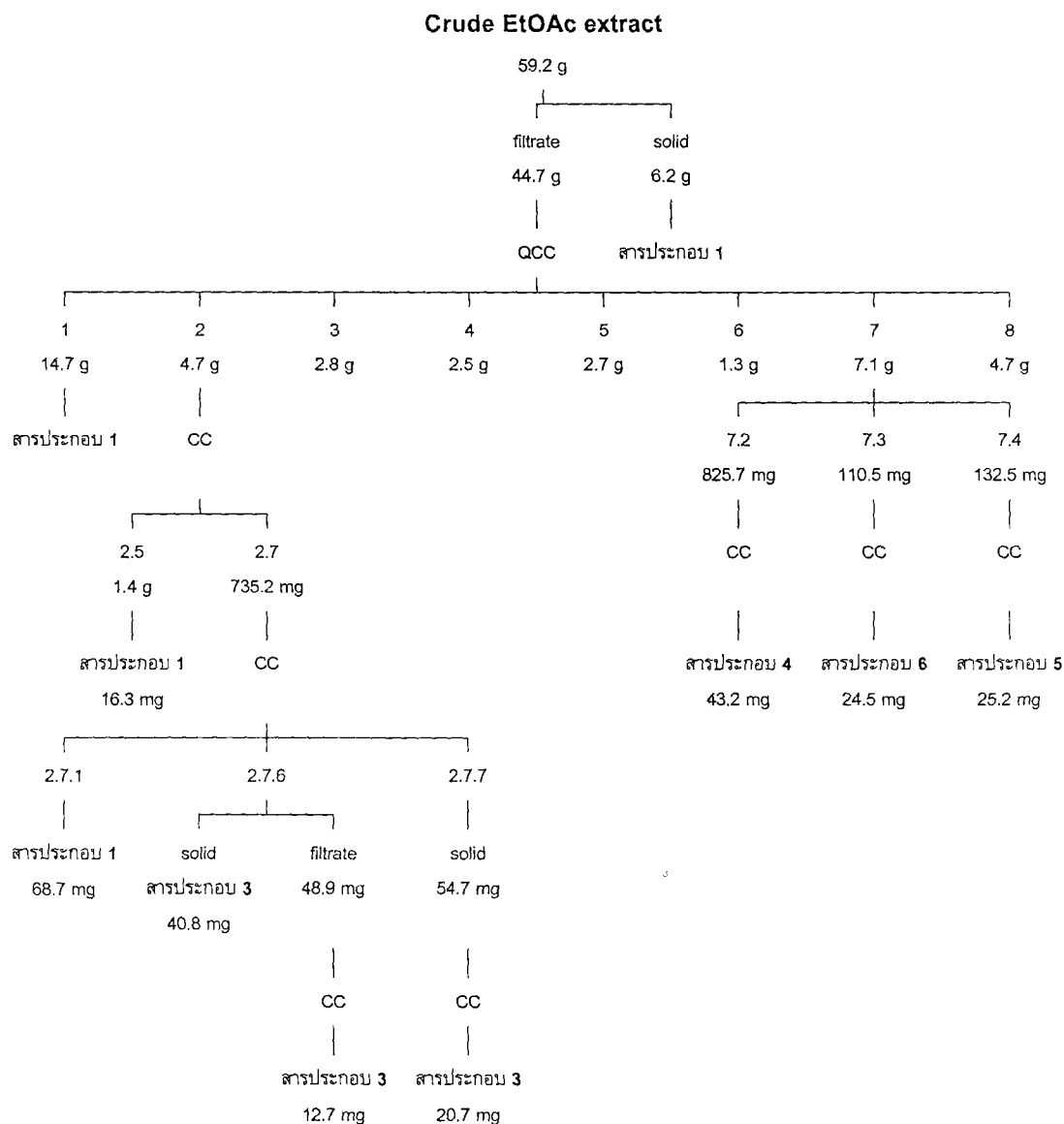
2.2.3.3.1 ส่วนย่อยที่ 7.44 เป็นของแข็งไม่มีสี (25.2 มิลลิกรัม)

ชะออกมาด้วย CHCl₃-MeOH (97 : 3) คือ สารประกอบ 5

2.2.4 สารกลุ่ม 8 เป็นของแข็งสีน้ำตาลดำ (4.3 กรัม) จาก TLC พบว่าไม่มีสารที่น่าสนใจ

ตาราง 9 ผลการแยกสารกลุ่มย่อยที่ 7.4 โดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ระบบตัวชะ	กลุ่มย่อย	น้ำหนัก (mg)	ลักษณะสาร
CHCl ₃ -MeOH			
99 : 1	7.4.1	0.5	คราบสีเหลือง
98 : 2	7.4.2	1.6	ของแข็งสีเหลือง
97 : 3	7.4.3	4.2	ของแข็งสีขาวปนเหลือง
	7.4.4	25.2	ของแข็งไม่มีสี
	7.4.5	1.4	ของแข็งสีขาวปนเหลือง
	7.4.6	12.2	ของแข็งสีน้ำตาล
96 : 4	7.4.7	46.2	ของแข็งสีน้ำตาลเหลือง
90 : 10	7.4.8	11.2	ของแข็งสีน้ำตาล



ภาพประกอบ 6 การแยกสารจากส่วนสกัดชั้น EtOAc

2.3 การแยกสารจากส่วนสกัดชั้น MeOH และทำสารให้บริสุทธิ์

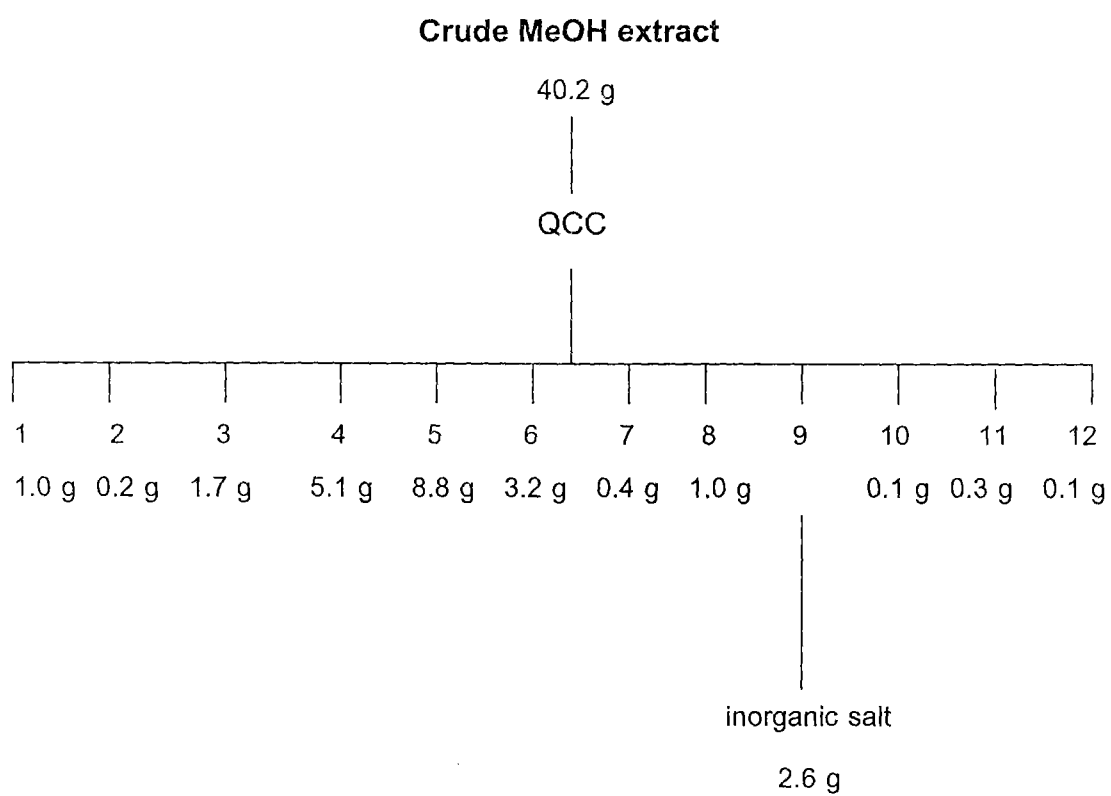
แบ่งส่วนสกัดชั้น MeOH 40.2 กรัม นำมาแยกด้วย Quick column chromatography [บรรจุด้วย ซิลิกาเจล (60 GF₂₅₄) 100 กรัม และใช้ซิลิกาเจล 40 กรัม ผสมกับสาร ชะด้วย CHCl₃-EtOAc CHCl₃-MeOH MeOH-H₂O เพิ่มสภาพขั้วทีละ 10% จนถึง 100% H₂O จากนั้นชะด้วย EtOH -NH(Et)₂ สุดท้ายชะด้วย 100% NH(Et)₂ ชะด้วยตัวทำละลายระบบละ 200 มิลลิลิตร เก็บส่วนละ 100 มิลลิลิตร] แยกได้ 12 กลุ่ม (ตาราง 10)

ตาราง 10 ผลการแยกสารจากส่วนสกัดชั้น MeOH โดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ระบบตัวชะ	กลุ่ม	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสาร
CHCl ₃ -EtOAc			
50 : 50	1	1.0	ของแข็งสีเหลืองปนน้ำตาล
20 : 80	2	0.2	ของแข็งสีน้ำตาลอ่อน
EtOAc-MeOH			
70 : 30	3	1.7	ของแข็งสีน้ำตาลแดง
50 : 50	4	5.1	"
40 : 60	5	8.8	"
MeOH	6	3.2	"
MeOH-H ₂ O			
80 : 20	7	0.4	"
30 : 70	8	1.0	ของแข็งสีน้ำตาล
H ₂ O	9		ของแข็งสีขาวในสารละลายใส
EtOH-NH(Et) ₂			
80 : 20	10	0.1	ของแข็งสีขาว
	11	0.3	กึ่งของแข็งสีน้ำตาล
50 : 50	12	0.1	ของแข็งสีน้ำตาลแดง

2.3.1 กลุ่มย่อยที่ 2.3.9 จะออกมาด้วย H₂O (100%) มีของแข็งสีขาวตกออกมา นำมากรองแยกได้ของแข็งสีขาวหนัก 2.6 กรัม จากการพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิคของ NMR ประกอบกับข้อมูลของ mp และ IR พบว่าเป็นเกลือของสารประกอบอินทรีย์ โดยจากข้อมูลของ ¹H NMR และ ¹³C NMR ไม่พบสัญญาณใด ๆ ส่วนข้อมูลของ mp พบว่ามีค่าสูงมาก (>360 °C) และละลายน้ำได้ดีมาก

TLC ของ กลุ่มสารต่าง ๆ ที่ได้จาก Quick column chromatography ของส่วนสกัดชั้น MeOH พบว่ามีลักษณะเป็นทางและเนื่องจากเป็นกลุ่มสารที่มีความเป็นขั้วสูงมากจึงมิได้ทำการศึกษาต่อ



ภาพประกอบ 7 การแยกสารจากส่วนสกัดชั้น MeOH

การศึกษาสมบัติทางกายภาพและสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

สารบริสุทธิ์ที่แยกได้ รายงานค่าจุดหลอมเหลว (mp) ในหน่วย องศาเซลเซียส ($^{\circ}\text{C}$)
 แถบของการดูดกลืนหลักของรังสีอินฟราเรด ($\nu_{\max}$) รายงานในหน่วย reciprocal centimetre (cm^{-1}) แถบการดูดกลืนหลัก ($\lambda_{\max}$) ของ ultraviolet (UV) absorption spectra รายงานในหน่วย nanometre (nm) และ $\log \varepsilon$ ในตัวทำละลายที่เหมาะสม 300 MHz ^1H และ 75 MHz ^{13}C NMR spectra ใช้ deuteriochloroform เป็นตัวทำละลาย (นอกจากจะบ่งว่าเป็นตัวทำละลายอื่น) และรายงานในหน่วย δ ที่ downfield จาก TMS ซึ่งใช้เป็น internal standard (δ 0.00) ค่า Optical rotation บันทึกโดยใช้ microcell 50 mm ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด โครมาโทกราฟี และการตกผลึก ผ่านการกลั่นก่อนนำมาใช้ pre-coated TLC aluminium sheets ใช้ silica gel 60 GF₂₅₄ เป็นตัวดูดซับ ความหนา 0.2 mm ตรวจสอบสารบน TLC ใช้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ 254 หรือ 356 nm และ spray reagent สำหรับ preparative TLC plate ใช้ silica gel GF₂₅₄ เป็น ตัวดูดซับ หนา 0.5 mm ซึ่งนำไปอบที่ 120 $^{\circ}\text{C}$ ก่อนนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. ผลการสกัดสารจากรากเล็บเหยี่ยว

สกัดรากเล็บเหยี่ยวแห้ง บดละเอียดน้ำหนัก 5.0 กิโลกรัม ด้วย hexane 3 ครั้ง ครั้งละ 15 ลิตร ที่อุณหภูมิ 60 °C บนอ่างน้ำร้อน แต่ละครั้งใช้เวลา 36 ชั่วโมง กรอง แล้วระเหย hexane ออกจนแห้ง ได้ส่วนสกัดชั้น hexane เป็นสารกึ่งของแข็งสีเหลืองน้ำหนัก 17.4 กรัม

กากที่ผ่านการสกัดด้วย hexane ตากให้แห้งนำมาสกัดด้วย EtOAc และ MeOH ตามลำดับ โดยทำเช่นเดียวกับขั้นตอนการสกัดด้วย hexane ได้ส่วนสกัดชั้น EtOAc เป็นของแข็งสีน้ำตาลแดง ปนขาวน้ำหนัก 59.2 กรัม และส่วนสกัดชั้น methanol เป็นสารกึ่งของแข็งสีดำน้ำหนัก 379.7 กรัม

2. ผลการแยกสารและการทำสารให้บริสุทธิ์

2.1 การแยกสารจากส่วนสกัดชั้น hexane และทำสารให้บริสุทธิ์

แบ่งส่วนสกัดชั้น hexane 15.5 กรัม มาแยกด้วย Quick column chromatography (ซิลิกาเจล 60 GF₂₅₄ 100 กรัม) ะด้วย hexane-CHCl₃ เพิ่มสภาพขั้วด้วย CHCl₃ ครั้งละ 5% จนถึง 100% จากนั้นเพิ่มขั้วโดย EtOAc ครั้งละ 5% จนถึง 100% สุดท้ายชะด้วย MeOH 100% ะด้วยตัวทำละลายระบบละ 500 มิลลิลิตร เก็บส่วนละ 100 มิลลิลิตร) สามารถแยกสารได้ทั้งหมด 27 กลุ่ม ดังแสดงในตาราง 11

ตาราง 11 ผลการแยกสารจากส่วนสกัดชั้น hexane โดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ระบบตัวชะ	กลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะสาร
Hexane	1	1.9 g	ของแข็งสีขาวปน oil สีเหลือง
	2	0.1 g	oil สีเหลือง
	3	26.1 mg	กึ่งของแข็งสีเหลือง
Hexane : CHCl_3			
95 : 05	4	241.2 mg	กึ่งของแข็งสีเหลืองน้ำตาล
90 : 10	5	0.3 g	ของแข็งสีเหลือง
85 : 15	6	125.8 mg	ของแข็งสีเหลือง
	7	1.1 g	กึ่งของแข็งสีเหลืองน้ำตาล
80 : 20	8	724.3 mg	กึ่งของแข็งสีเหลือง
70 : 30	9	1.2 g	กึ่งของแข็งสีเหลือง
60 : 40	10	869.2 mg	กึ่งของแข็งสีเหลืองปน oil สีเหลือง
50 : 50	11	577.4 mg	ของแข็งสีขาวปนเหลือง
45 : 55	12	640.5 mg	ของแข็งสีขาวปนเหลือง
25 : 75	13	1.2 g	ของแข็งสีขาวปนเหลืองน้ำตาล
20 : 80	14	0.3 g	oil สีน้ำตาลแดง
15 : 85	15	320.2 mg	oil สีน้ำตาลแดง
10 : 90	16	328.0 mg	oil สีน้ำตาล
CHCl_3	17	0.4 g	oil สีน้ำตาล
CHCl_3 : EtOAc			
95 : 05	18	1.2 g	ของแข็งสีขาวปนเหลืองอ่อน
90 : 10	19	0.6 g	ของแข็งสีขาวปนเหลือง
85 : 15	20	886.4 mg	กึ่งของแข็งสีเหลืองน้ำตาล
	21	0.4 g	กึ่งของแข็งสีเหลืองน้ำตาล
80 : 20	22	384.6 mg	ของแข็งสีน้ำตาล
75 : 25	23	89.1 mg	ของแข็งสีน้ำตาล
EtOAc	24	322.0 mg	ของแข็งสีเหลือง
	25	93.6 mg	ของแข็งสีเหลืองอ่อน
	26	28.2 mg	ของแข็งสีน้ำตาลแดง
	27	25.3 mg	ของแข็งสีเหลือง

2.1.1 นำสารกลุ่มต่าง ๆ มาแยกให้บริสุทธิ์โดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ และ/หรือแบบเยื่อบาง ได้สารบริสุทธิ์ทั้งหมด 2 ชนิด คือสารประกอบ 1 และ 2

2.2 การแยกสารจากส่วนสกัดชั้น EtOAc และทำสารให้บริสุทธิ์

ส่วนสกัดชั้น EtOAc เป็นของแข็งสีน้ำตาลแดงปนขาว (59.2 กรัม) เมื่อล้างด้วย EtOAc ได้ของแข็งสีขาวปนน้ำตาล (6.2 กรัม) นำไปตกผลึกด้วย methanol ได้ผลึกไม่มีสีของสารประกอบ 1 (174.0 มิลลิกรัม)

ส่วน filtrate (44.7 กรัม) นำมาแยกด้วย Quick column chromatography [ซิลิกาเจล (60 GF₂₅₄) 125 กรัม และใช้ซิลิกาเจล 44 กรัม ผสมกับสาร ชะด้วย CHCl₃-EtOAc EtOAc-MeOH และสุดท้ายชะด้วย MeOH (100%) โดยเพิ่มสภาพขั้วทีละ 5% ชะด้วยตัวทำละลายระบบละ 500 มิลลิลิตร เก็บส่วนละ 100 มิลลิลิตร] แยกสารได้ 8 กลุ่ม (ตาราง 12)

ตาราง 12 ผลการแยกสารจากส่วนสกัดชั้น EtOAc โดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ระบบตัวชะ	กลุ่ม	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสาร
CHCl ₃ : EtOAc			
85 : 15	1	14.7	ของแข็งสีเหลือง
65 : 35	2	4.7	ของแข็งสีเหลือง
50 : 50	3	2.8	กึ่งของแข็งสีน้ำตาล
25 : 75	4	2.5	ของแข็งสีเหลืองน้ำตาล
10 : 90	5	2.7	ของแข็งสีเหลืองน้ำตาล
EtOAc : MeOH			
97 : 3	6	1.3	กึ่งของแข็งสีน้ำตาลเข้ม
80 : 20	7	7.1	กึ่งของแข็งสีน้ำตาล
MeOH	8	4.7	กึ่งของแข็งสีน้ำตาลดำ

2.2.1 นำสารกลุ่มต่าง ๆ มาแยกให้บริสุทธิ์โดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ และ/หรือแบบเยื่อบาง แยกได้สารบริสุทธิ์ทั้งหมด 5 ชนิด คือ สารประกอบ 1 3 4 5 และ 6

3. การแยกสารจากส่วนสกัดชั้น MeOH และทำสารให้บริสุทธิ์

แบ่งส่วนสกัดชั้น MeOH 40.2 กรัม นำมาแยกด้วย Quick column chromatography [ซิลิกาเจล (60 GF₂₅₄) 100 กรัม และใช้ซิลิกาเจล 40 กรัม ผสมกับสาร ชะด้วยระบบ CHCl₃-EtOAc EtOAc-MeOH MeOH-H₂O EtOH-NH(Et)₂ โดยเพิ่มสภาพขั้วครั้งละ 10 % สุดท้ายชะด้วย 100 % NH(Et)₂ ชะด้วยตัวทำละลายระบบละ 200 มิลลิลิตร เก็บส่วนละ 100 มิลลิลิตร] แยกได้ 12 กลุ่ม (ตาราง 13) TLC ของกลุ่มสารต่าง ๆ ที่ได้จาก Quick column chromatography ของส่วนสกัดชั้น MeOH พบว่ามีลักษณะเป็นทางและเนื่องจากเป็นกลุ่มสารที่มีความเป็นขั้วสูงมากจึงมิได้ทำการศึกษาต่อ

ตาราง 13 ผลการแยกสารจากส่วนสกัดชั้น MeOH โดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ระบบตัวชะ	กลุ่ม	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสาร
CHCl ₃ -EtOAc			
50 : 50	1	1.0	ของแข็งสีเหลืองปนน้ำตาล
20 : 80	2	0.2	ของแข็งสีน้ำตาลอ่อน
EtOAc-MeOH			
70 : 30	3	1.7	ของแข็งสีน้ำตาลแดง
50 : 50	4	5.1	"
40 : 60	5	8.8	"
MeOH	6	3.2	"
MeOH-H ₂ O			
80 : 20	7	0.4	"
30 : 70	8	1.0	ของแข็งสีน้ำตาล
H ₂ O	9		ของแข็งสีขาวในสารละลายใส
EtOH-NH(Et) ₂			
80 : 20	10	0.1	ของแข็งสีขาว
	11	0.3	กึ่งของแข็งสีน้ำตาล
50 : 50	12	0.1	ของแข็งสีน้ำตาลแดง

3. การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์

สารบริสุทธิ์ที่แยกได้นำมาวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างโดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

3.1 สารประกอบ 1

เป็นผลึกรูปเข็มไม่มีสี น้ำหนัก 236.5 มิลลิกรัม mp 296-298 °C (d)

ค่า $R_f = 0.59$ (CHCl_3 -EtOAc, 4.5 : 0.5)

$[\alpha]_D^{30} = +6.56^\circ$ (c, 0.1525, pyridine)

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ nm (log ϵ) : 253 (2.16)

FT IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3449, 3072, 2943, 2870, 1687, 1646, 1044 และ 884

^1H NMR และ ^{13}C NMR δ , (CDCl_3) : แสดงในตาราง 15

ESMS (positive ion mode) m/z : 479 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

3.2 สารประกอบ 2

เป็นผลึกรูปเข็มไม่มีสี น้ำหนัก 47.9 มิลลิกรัม mp 235-237 °C (d) ค่า $R_f = 0.65$

(CHCl_3 -EtOAc, 4.5 : 0.5)

$[\alpha]_D^{31} = +40.52^\circ$ (c, 0.153, CHCl_3)

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ nm (log ϵ) : 253 (2.19)

FT IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3393, 3072, 2942, 2870, 1646, 1457, 1375, 1028 และ

883

^1H NMR และ ^{13}C NMR δ , (CDCl_3) : แสดงในตาราง 17

ESMS (positive ion mode) m/z : 465 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

3.3 สารประกอบ 3

เป็นผลึกรูปเข็มไม่มีสี น้ำหนัก 40.8 มิลลิกรัม mp 306-308 °C (d) ค่า $R_f = 0.68$

(CHCl_3 -acetone, 1 : 1)

$[\alpha]_D^{29} = +36.25^\circ$ (c, 0.160 pyridine)

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ nm (log ϵ) : 253 (2.5)

FT IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3442, 3065, 2947, 2870, 2717, 2623, 1688, 1639, 1458,

1376, 1205, 1032 และ 880

^1H NMR และ ^{13}C NMR δ , (CDCl_3) : แสดงในตาราง 20

^1H NMR และ ^{13}C NMR δ , ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) : แสดงในตาราง 21

FABMS m/z (% relative intensity) : 485 $[M-H]^-$ (100), 483 (4), 325 (5), 275 (14), 205 (5), 183 (64), 181 (8), 113 (7) และ 91 (19)

HRFABMS m/z : 485.3277 (คำนวณสำหรับ $C_{30}H_{46}O_5$, 485.3266)

3.4 สารประกอบ 4

เป็นของแข็งไม่มีสี น้ำหนัก 43.2 มิลลิกรัม mp 117-119 °C ค่า R_f = 0.64
($CHCl_3$ -MeOH, 4.5 : 0.5)

$[\alpha]_D^{30} = -326.67^\circ$ (c, 0.18, $CHCl_3$)

UV λ_{max}^{EtOH} nm (log ϵ) 216 (4.78) 266 (4.40) และ 319 (4.28)

FT IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3399, 2960, 2928, 2860, 2826, 2783, 1700, 1689, 1657, 1642, 1512, 1422, 1223 และ 1054

1H NMR และ ^{13}C NMR δ , ($CDCl_3$) : แสดงในตาราง 23

FABMS (positive ion mode) m/z (% relative intensity) : 612 $[M+H]^+$, 5.3), 358 (0.5), 324 (0.3), 255 (0.2), 227 (0.1), 216 (0.1), 193 (0.2), 165 (0.4) และ 114 (100.0)

3.5 สารประกอบ 5

เป็นของแข็งไม่มีสี น้ำหนัก 25.2 มิลลิกรัม mp 127-129 °C (d) ค่า R_f = 0.45
($CHCl_3$ -MeOH, 4.5 : 0.5)

$[\alpha]_D^{31} = -385.43^\circ$ (c, 0.151, $CHCl_3$)

UV λ_{max}^{MeOH} nm (log ϵ) : 228 (4.77) 265 (4.73) และ 321 (4.59)

FT IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3395, 2960, 2935, 2877, 2833, 2783, 1685, 1642, 1513, 1430, 1320, 1210, 1162, 1053, 811, 786 และ 668

1H NMR และ ^{13}C NMR δ , ($CDCl_3$) : แสดงในตาราง 25

EIMS (positive ion mode) m/z (% relative intensity) : 598 $[M+H]^+$, 0.1), 540 (0.2), 344 (0.03), 202 (0.1), 193 (0.2), 165 (0.2) และ 114 (100.0)

HREIMS m/z : 598.3595 (คำนวณสำหรับ $C_{32}H_{47}N_5O_6$, 598.3604)

3.6 สารประกอบ 6

เป็นของแข็งสีเหลืองใส น้ำหนัก 24.5 มิลลิกรัม mp 106-108 °C ค่า R_f = 0.58
($CHCl_3$ -MeOH, 9 : 1)

$[\alpha]_D^{31} = -380.20^\circ$ (c, 0.1515, $CHCl_3$)

UV λ_{max}^{EtOH} nm (log ϵ) : 211 (4.52) 268 (4.01) และ 319 (3.89)

FT IR $\nu_{\max}^{KBr}$ cm^{-1} : 3399, 3072, 2964, 2935, 2877, 2797, 1700, 1686, 1654, 1639, 1509, 1418, 1321, 1263, 1223, 1183, 1053, 772 และ 667

^1H NMR และ ^{13}C NMR δ , (CDCl_3) : แสดงในตาราง 28

EIMS m/z (% relative intensity) : 597 ($[\text{M}]^+$, 1), 540 (1), 385 (3), 358 (6), 216 (2), 193 (2) และ 100 (100)

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์

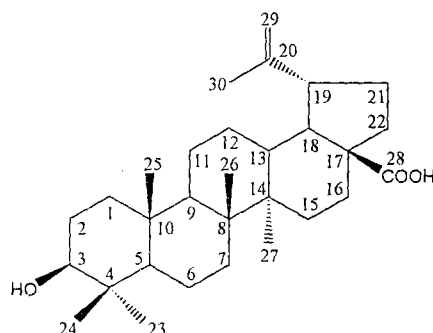
ในการพิสูจน์โครงสร้างของสารใช้เทคนิคทางสเปกโตรสโคปีชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเทคนิค NMR และ MS พร้อมทั้งใช้วิธีเปรียบเทียบค่า mp และข้อมูล IR ^1H NMR ^{13}C NMR และ MS กับที่มีผู้รายงานไว้แล้ว

ตาราง 14 สารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากรากเล็บเหยี่ยว

สารประกอบ	ชื่อสาร	น้ำหนัก	ได้จากส่วนสกัดชั้น
1	betulinic acid	236.5 mg	hexane
2	betulin	47.9 mg	hexane
3	ceanothic acid	40.8 mg	EtOAc
4	zizyphine-A	43.2 mg	EtOAc
5	zizyphine-F	25.2 mg	EtOAc
6	zizyphine-B	24.5 mg	EtOAc

การพิสูจน์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

สารประกอบ 1



สารประกอบ 1 เป็นผลึกรูปเข็มไม่มีสี mp 296-298 °C (d) (CHCl₃-MeOH) ให้สีม่วงกับ anisaldehyde-sulphuric spray reagent แสดงว่าเป็นสารประกอบ triterpene (Ikram and Tomlinson, 1976 : 289-290) จาก IR spectrum (KBr) แสดงแถบการสั่นแบบยืดที่ 3500-2500 (O-H), 1687 (C=O), 1044 (C-O), 3070 (=C-H), 1646 (C=C) และ 884 (C-H out of plane)

การกำหนด chemical shift ใน ¹H- และ ¹³C-NMR spectrum กระทำโดยใช้เทคนิค 1D- และ 2D-NMR สเปกโทรสโกปี รวมทั้งเปรียบเทียบกับข้อมูลของ betulinic acid (Sholichin, et al. 1980 : 1006-1008 ; Yagi, et al. 1978 : 1798-1802) ซึ่งแสดงไว้ในตาราง 15 จากข้อมูล ¹H NMR spectrum (ภาพประกอบ 18 และ 19) พบสัญญาณของหมู่ tertiary methyl ทั้งหมด 6 สัญญาณ ที่ δ_H 0.73 (3H, s, 24-Me), δ_H 0.80 (3H, s, 25-Me), δ_H 0.91 (3H, s, 26-Me), δ_H 0.94 (3H, s, 23-Me), δ_H 0.95 (3H, s, 27-Me) และ δ_H 1.67 (3H, s, 30-Me) สัญญาณของ vinylic proton ของหมู่ terminal methylene ที่ δ_H 4.58 (1H, br s, H-29a) และ δ_H 4.72 (1H, br s, H-29b) สัญญาณของ methine proton ที่ δ_H 2.99 (1H, m, H-19) และที่ δ_H 0.66 (1H, d, J = 9.0 Hz, H-5) และสัญญาณของ carbinol proton ที่ δ_H 3.16 (1H, dd, J = 10.8 และ 5.1 Hz, H-3)

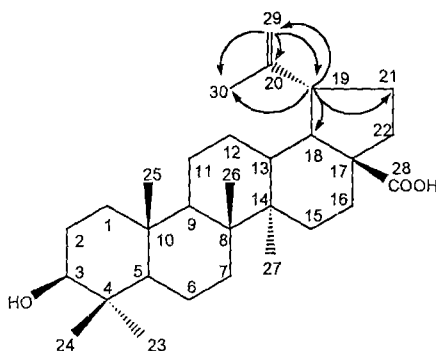
จากข้อมูล ¹³C NMR spectrum (ตาราง 15) พบสัญญาณทั้งหมด 30 คาร์บอนในโมเลกุล จากข้อมูล DEPT 90 และ DEPT 135 (ภาพประกอบ 20) พบว่าประกอบด้วย 6 methyl carbon ที่ δ_C 14.7 (C-27), 15.3 (C-24), 16.0 (C-26), 16.1 (C-25), 19.4 (C-30) และ 28.0 (C-23)

11 methylene carbon ที่ δ_C 18.3 (C-6), 20.8 (C-11), 25.5 (C-12), 27.4 (C-2), 29.7 (C-21), 30.5 (C-15), 32.1 (C-16), 34.3 (C-7), 37.0 (C-22), 38.7 (C-1) และ 109.7 (C-29)

6 methine carbon ที่ δ_c 38.4 (C-13), 46.9 (C-19), 49.3 (C-18), 50.5 (C-9), 55.3 (C-5) และ 79.0 (C-3)

และ 7 quaternary carbon ที่ δ_c 37.2 (C-10), 38.9 (C-4), 40.7 (C-8), 42.6 (C-14) และ 56.3 (C-17) สัญญาณที่ δ_c 150.4 เป็น quaternary carbon (C-20) ของหมู่ isopropenyl และ δ_c 180.0 เป็นของหมู่ carbonyl (C-28) นั้นเอง

จากการวิเคราะห์ข้อมูลของ ^1H NMR และ ^{13}C NMR ของสารประกอบ 1 และ betulinic acid (ตาราง 15) พบว่าใกล้เคียงกัน ข้อมูล HMBC ที่สำคัญของสารประกอบ 1 (ตาราง 16, ภาพประกอบ 8) พบความสัมพันธ์ระหว่างหมู่ methylene proton H-29 (δ_H 4.58 และ 4.72) ของ isopropenyl กับ C-19 (δ_c 46.9), C-20 (δ_c 150.4) และ C-30 (δ_c 19.4) และพบความสัมพันธ์ระหว่าง H-19 (δ_H 2.99) กับ C-18 (δ_c 49.3), C-21 (δ_c 29.7), C-29 (δ_c 109.7) และ C-30 (δ_c 19.4)



ภาพประกอบ 8 ความสัมพันธ์ HMBC ที่สำคัญของสารประกอบ 1

สารประกอบ 1 มีค่า mp 296-298 °C (d) [mp 264 °C (Schuly, et al. 1999 : 740-743), mp 270-285 °C (de Mayo and Starratt. 1962 : 788-795), mp 275-278 °C (Robinson and Martel. 1970 : 907-909), mp 291-297 °C (Otsuka, et al. 1981 : 3099-3104), mp 293-295 °C (Yagi, et al. 1978 : 1798-1802), mp 315 °C (Bringmann, et al. 1997 : 255-257), mp 290-292 °C (Miles, et al. 1974 : 613-615)]

ค่า $[\alpha]_D^{30} +6.56^\circ$ (c, 0.1525, pyridine) $\{[\alpha]_D^{20} +6.7^\circ$ (c, 0.4, pyridine) (Bringmann, et al. 1997 : 255-257), $[\alpha]_D^{22} +6.8^\circ$ (Otsuka, et al. 1981 : 3099-3104), $[\alpha]_D^{23} +7.9^\circ$ (c, 0.057, pyridine) (Robinson and Martel. 1970 : 907-909), $[\alpha]_D^{23} +6.6^\circ$ (c, 2.5, pyridine) (Yagi, et al. 1978 : 1798-1802), $[\alpha]_D^{20} -8.5^\circ$ (c, 1.0, MeOH) (Schuhly, et al.

1999 : 740-743)} รวมทั้งข้อมูล ESMS (positive ion mode) พบ m/z 479 $[M+Na]^+$ ซึ่งตรงกับสูตรโมเลกุล $C_{30}H_{48}O_3$ ข้อมูลทั้งหมดสอดคล้องกับข้อมูลของ betulinic acid สรุปได้ว่าสารประกอบ 1 คือ 3β -hydroxy-lup-20 (29)-en-28-oic acid หรือ betulinic acid

betulinic acid เป็นสารประกอบ triterpene เคยพบในพืชสกุลอื่นหลายชนิด เช่น พบในรากของ *Sarracenia flava* (Miles, et al. 1974 : 613-615), พบในเปลือกต้นของ *Arbutus menziesii* (Robinson and Martel. 1970 : 907-909), พบในใบของ *Diospyros leucomelas* Poir. (Recio, et al. 1995 : 9-12), พบในลำต้น ใบ และดอกของ *Hyptis emoryi* (Labiatae) (Sheth, et al. 1972 : 1819), พบในเปลือกรากของ *Triphyophyllum peltatum* และ *Ancistrocladus heyneanus* (Bringmann, et al. 1997 : 255-257) และเคยพบในพืชสกุล *Zizyphus* โดยพบในเปลือกต้นของ *Z. joazeiro* C. Mart. (Schuhly, et al. 1999 : 740-743) และส่วนเหนือดินของ *Z. spina cristi* (Ikram and Tomlinson. 1976 : 289-290)

ตาราง 15 ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR ของ betulinic acid และสารประกอบ 1 และข้อมูล DEPT 90 กับ DEPT 135 ของสารประกอบ 1

ตำแหน่ง	betulinic acid		สารประกอบ 1 ^c			
	δ_c^a	δ_H^b	δ_c	DEPT 90	DEPT 135	δ_H
1	39.0		38.7 ^d		38.7	
2	27.6		27.4		27.4	
3	78.2	3.10 (1H, m)	79.0	79.0	79.0	3.16 (1H, dd, $J = 10.8, 5.1$ Hz)
4	39.0		38.9 ^d			
5	55.5	ไม่ได้รายงานไว้	55.3	55.3	55.3	0.66 (1H, d, $J = 9.0$ Hz)
6	18.4		18.3		18.3	
7	34.5		34.3		34.3	
8	40.8		40.7			
9	50.7		50.5	50.5	50.5	
10	37.3		37.2			
11	21.0		20.8		20.8	
12	25.6		25.5		25.5	
13	38.2		38.4	38.4	38.4	
14	42.5		42.4			
15	30.8		30.5		30.5	
16	32.6		32.1		32.1	
17	56.3		56.3			
18	47.1		49.3	49.3	49.3	
19	49.4	3.25 (1H, m)	46.9	46.9	46.9	2.99 (1H, m)
20	150.9		150.4			
21	29.9		29.7		29.7	
22	37.3		37.0		37.0	
23	28.2	0.83 (3H, s)	28.0		28.0	0.94 (3H, s)
24	15.6	0.99 (3H, s)	15.3		15.3	0.73 (3H, s)
25	16.1	1.01 (3H, s)	16.1 ^e		16.1	0.80 (3H, s)
26	16.1	1.04 (3H, s)	16.0 ^e		16.0	0.91 (3H, s)
27	14.7	0.83 (3H, s)	14.7		14.7	0.95 (3H, s)
28	178.9		180.0			
29	109.4	4.63 (1H, d, $J = 2.0$ Hz) 4.79 (1H, d, $J = 2.0$ Hz)	109.7		109.7	4.58 (1H, br s) 4.72 (1H, br s)
30	19.4	1.73 (3H, s)	19.4		19.4	1.67 (3H, s)

^a บันทึกใน $\text{CDCl}_3 + \text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ (1:1), 25 MHz (Sholichin, et al. 1980 : 1006-1008), ^b บันทึกใน $\text{CDCl}_3 + \text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ (10:1) (Yaki, et al. 1978 : 1798-1802), ^c บันทึกใน CDCl_3 , ^{d,e} ภายใต้เครื่องหมายเดียวกันสัญญาณอาจเปลี่ยนที่กันได้

ตาราง 16 ข้อมูล ^1H NMR COSY HMQC และ HMBC ของสารประกอบ 1

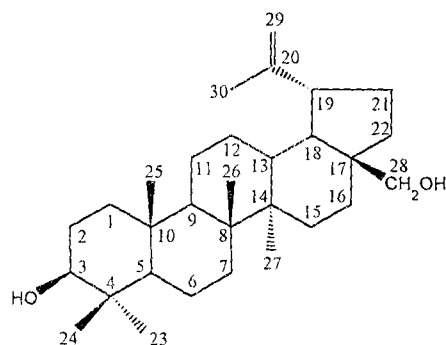
ตำแหน่ง	^1H NMR	COSY ^a	HMQC ^b	HMBC ^c
3	3.16 (1H, dd, $J = 10.8, 5.1$ Hz)		C-3	C-23 C-24
5	0.66 (1H, d, $J = 9.0$ Hz)		C-5	C-4 C-10 C-24 C-25
19	2.99 (1H, dt, m)		C-19	C-18 C-21 C-29 C-30
23	0.94 (3H, s)		C-23	C-3 C-4 C-5 C-24
24	0.73 (3H, s)		C-24	C-3 C-4 C-5 C-23
25	0.80 (3H, s)		C-25	C-1 C-5 C-9 C-10
26	0.91 (3H, s)		C-26	C-7 C-8 C-9 C-14
27	0.95 (3H, s)		C-27	C-8 C-13 C-14 C-15
29	4.58 (1H, br s)		C-29	C-19 C-20 C-30
	4.72 (1H, br s)			
30	1.67 (3H, s)	(H-29)	C-30	C-19 C-20 C-29

^a proton-proton correlation

^b 1-bond heteronuclear ^1H - ^{13}C correlation

^c long range heteronuclear ^1H - ^{13}C correlation

สารประกอบ 2



สารประกอบ 2 เป็นผลึกรูปเข็มไม่มีสี mp 235-237 °C (d) (CHCl₃-MeOH) ให้สีม่วงกับ anisaldehyde-sulphuric spray reagent แสดงว่าเป็นสารประกอบ triterpene (Ikram and Tomlinson, 1976 : 289-290) ESMS (positive ion mode) แสดง m/z 465 [M+Na]⁺ ซึ่งสอดคล้องกับสูตรโมเลกุล C₃₀H₅₀O₂

IR spectrum (KBr) แสดงแถบการสั่นแบบยืดที่ 3393 (O-H), 1028 (C-O), 3072 (=C-H), 1646 (C=C), 1457 (C-Me) และที่ 883 (C-H out of plane)

การกำหนด chemical shift ใน ¹H- และ ¹³C-NMR spectrum กระทำโดยใช้เทคนิค 1D- และ 2D-NMR สเปกโทรสโคปี รวมทั้งเปรียบเทียบกับข้อมูลของ betulin

จาก ¹H NMR spectrum (ภาพประกอบ 21 และ 22) พบสัญญาณของหมู่ tertiary methyl 6 สัญญาณ ที่ δ_H 0.74 (3H, s, 24-Me), δ_H 0.80 (3H, s, 25-Me), δ_H 0.95 (3H, s, 23-Me), δ_H 0.96 (3H, s, 27-Me), δ_H 1.00 (3H, s, 26-Me) และ δ_H 1.66 (3H, s, 30-Me, isopropenyl group) พบสัญญาณระบบ AB ของ methylene proton ที่ δ_H 3.31 (1H, d, J = 10.8 Hz, H-28) และ δ_H 3.78 (1H, d, J = 10.8 Hz, H-28) สัญญาณของ terminal methylene proton ที่ δ_H 4.56 (1H, br s, H-29) และ δ_H 4.66 (1H, br s, H-29) สัญญาณของ methine proton ที่ δ_H 0.71 (1H, d, J = 9.4 Hz, H-5) และที่ δ_H 2.36 (1H, dt, J = 10.6 และ 6.0 Hz, H-19) และสัญญาณของ carbinol proton ที่ δ_H 3.16 (1H, dt, J = 10.6 และ 5.0 Hz, H-3)

¹³C NMR spectrum (ภาพประกอบ 23) พบสัญญาณทั้งหมด 29 peak แสดงถึง 30 คาร์บอนในโมเลกุล จากข้อมูลของ DEPT 90 และ 135 (ภาพประกอบ 24) พบว่าประกอบด้วย

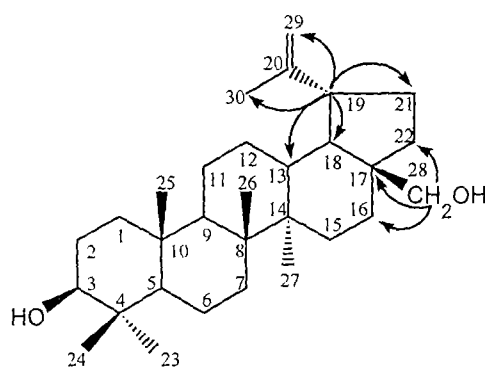
6 methyl carbon ที่ δ_C 4.8 (C-27), 15.4 (C-24), 16.0 (C-26), 16.1 (C-25), 19.1 (C-30) และ 28.0 (C-23)

12 methylene carbon ที่ δ_c 18.3 (C-6), 20.8 (C-11), 25.2 (C-12), 27.0 (C-15), 27.4 (C-2), 29.2 (C-16), 29.7 (C-21), 34.0 (C-22), 34.2 (C-7), 38.7 (C-1), 60.6 (C-28), และ 109.7 (C-29)

6 methine carbon ที่ δ_c 37.2 (C-13), 47.8 (C-19), 48.7 (C-18), 50.4 (C-9), 55.3 (C-5) และ 79.0 (C-3)

และ 6 quaternary carbon ที่ δ_c 37.3 (C-10), 38.9 (C-4), 40.9 (C-8), 42.7 (C-14), 47.8 (C-17) และ 150.5 (C-20)

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลของ ^1H - และ ^{13}C -NMR ของสารประกอบ **2** กับ สารประกอบ **1** (ตาราง 18) พบว่าคล้ายคลึงกัน ยกเว้นไม่พบสัญญาณของ CO_2H ใน ^{13}C NMR ของสารประกอบ **2** แต่พบสัญญาณระบบ AB ที่ δ_H 3.31 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-28a) และ δ_H 3.78 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-28b) สอดคล้องกับ IR spectrum ของสารประกอบ **2** ที่ไม่พบหมู่ carboxyl ดังนั้นสารประกอบ **2** จึงคาดว่ามีหมู่ CH_2OH ที่ C-28 แทนที่หมู่ carboxyl ใน betulinic acid นั่นคือโครงสร้างของสารประกอบ **2** ควรเป็น betulin ข้อมูล HMBC ของสารประกอบ **2** (ตาราง 19, ภาพประกอบ 9) ยืนยันว่าโครงสร้างเป็น betulin ที่สำคัญคือพบความสัมพันธ์ระหว่าง H-28 (δ 3.31 และ 3.78) กับ C-16 (δ 29.2) C-17 (δ 47.8) และ C-22 (δ 34.0)



ภาพประกอบ 9 ความสัมพันธ์ HMBC ที่สำคัญของสารประกอบ **2**

และเมื่อเปรียบเทียบข้อมูลของ ^{13}C NMR ของสารประกอบ **2** กับ betulin (ตาราง 17) พบว่าคล้ายคลึงกัน ข้อมูล ESMS (positive ion mode) แสดง m/z 465 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ซึ่งสอดคล้องกับสูตรโมเลกุล $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_2$ ประกอบกับสารประกอบ **2** มี mp 233-237 °C (d) [mp 214-217 °C (Miles, et al. 1974 : 613-615), mp 237-240 °C (Robinson and Martel. 1970 : 907-909), mp 250-261 °C (Hayek, et al. 1989 : 2229-2242)]

ค่า $[\alpha]_D^{31} = +40.52^\circ$ (c, 0.153, CHCl_3) $\{[\alpha]_D^{31} = +18^\circ\}$ (Sheth, et al. 1973 : 139-140) จึงสรุปได้ว่า สารประกอบ 2 คือ lup-20(29)-en-3,28-diol (3 β) หรือ betulin หรือ betulinol หรือ betulol หรือ trochol (Hayek, et al. 1989 : 2229-2242) และสารประกอบ 2 ยังไม่เคยมีรายงานการพบในพืชชนิดนี้

betulin เป็นสารที่พบได้ในพืชหลายชนิด (Hayek, et al. 1989 : 2229-2242) เช่นพบในเมล็ดของ *Zizyphus jujuba* ลำต้นของ *Zizyphus mauritiana* เปลือกของ *Zizyphus sativa* และในส่วนของเมล็ดของ *Zizyphus spinosus* พบในรากของ *Sarracenia flava* (Miles, et al. 1974 : 613-615), เปลือกต้นของ *Alnus oregona* Nutt. (Sheth, et al. 1973 : 139-140), และใบของ *Diospyros leucomelas* Poir. (Recio, et al. 1995 : 9-12)

ตาราง 17 ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR DEPT 90 และ DEPT 135 ของสารประกอบ **2**
และข้อมูล ^{13}C NMR ของ betulin

ตำแหน่ง	Betulin ^a		สารประกอบ 2 ^b		
	δ_{C}	δ_{C}	DEPT 90	DEPT 135	δ_{H}
1	38.7	38.7		38.7	
2	27.4	27.4		27.4	
3	79.1	79.0	79.0	79.0	3.16 (1H, dd, $J = 10.6, 5.0$ Hz)
4	38.8	38.9			
5	55.3	55.3	55.3	55.3	0.71 (1H, d, $J = 9.4$ Hz)
6	18.3	18.3		18.3	
7	34.3	34.2		34.2	
8	41.0	41.0			
9	50.5	50.4	50.4	50.4	
10	37.3	37.3			
11	20.9	20.8		20.8	
12	25.2	25.2		25.2	
13	37.2	37.2	37.2	37.2	
14	42.8	42.7			
15	27.1	27.0		27.0	
16	29.2	29.2		29.2	
17	47.9	47.8			
18	47.9	47.8	47.8	47.8	
19	48.8	48.7	48.7	48.7	2.36 (1H, dt, $J = 10.6, 6.0$ Hz)
20	150.5	150.5			
21	29.8	29.7		29.7	
22	34.0	34.0		34.0	
23	28.1	28.0		28.0	0.95 (3H, s)
24	15.4	15.4		15.4	0.74 (3H, s)
25	16.1	16.1 ^c		16.1	0.80 (3H, s)
26	16.1	16.0 ^c		16.0	1.00 (3H, s)
27	14.8	14.8		14.8	0.96 (3H, s)
28	60.6	60.6		60.6	3.31 (1H, d, $J = 10.8$ Hz) 3.78 (1H, d, $J = 10.8$ Hz)
29	109.7	109.7		109.7	4.56 (1H, br s) 4.66 (1H, br s)
30	19.1	19.1		19.1	1.66 (3H, s)

^a บันทึกใน CDCl_3 , 25.15 MHz (Sholichin, et al. 1980 : 1006-1008), ^b บันทึกใน CDCl_3 , ^c ภาย
ได้เครื่องหมายเดียวกันอาจเปลี่ยนที่กันได้

ตาราง 18 ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR ของสารประกอบ 1 และสารประกอบ 2
และข้อมูล ^{13}C NMR ของ betulin

ตำแหน่ง	^a		^b		^b	
	Betulin	สารประกอบ 2		สารประกอบ 1		
	δ_c	δ_c	δ_H	δ_c	δ_H	
1	38.7	38.7		38.7 ^c		
2	27.4	27.4		27.4		
3	79.1	79.0	3.16 (1H, dd, $J = 10.6, 5.0$ Hz)	79.0	3.16 (1H, dd, $J = 10.8, 5.1$ Hz)	
4	38.8	38.9		38.9 ^c		
5	55.3	55.3	0.71 (1H, d, $J = 9.4$ Hz)	55.3	0.66 (1H, d, $J = 9.0$ Hz)	
6	18.3	18.3		18.3		
7	34.3	34.2		34.3		
8	41.0	41.0		40.7		
9	50.5	50.4		50.5		
10	37.3	37.3		37.2		
11	20.9	20.8		20.8		
12	25.2	25.2		25.5		
13	37.2	37.2		38.4		
14	42.8	42.7		42.4		
15	27.1	27.0		30.5		
16	29.2	29.2		32.1		
17	47.9	47.8		56.3		
18	47.9	47.8		49.3		
19	48.8	48.7	2.36 (1H, dt, $J = 10.6, 6.0$ Hz)	46.9	2.99 (1H, m)	
20	150.5	150.5		150.4		
21	29.8	29.7		29.7		
22	34.0	34.0		37.0		
23	28.1	28.0	0.95 (3H, s)	28.0	0.94 (3H, s)	
24	15.4	15.4	0.74 (3H, s)	15.3	0.73 (3H, s)	
25	16.1	16.1 ^d	0.80 (3H, s)	16.1 ^d	0.80 (3H, s)	
26	16.1	16.0 ^d	1.00 (3H, s)	16.0 ^d	0.91 (3H, s)	
27	14.8	14.8	0.96 (3H, s)	14.7	0.95 (3H, s)	
28	60.6	60.6	3.31 (1H, d, $J = 10.8$ Hz) 3.78 (1H, d, $J = 10.8$ Hz)	180.0		
29	109.7	109.7	4.56 (1H, br s) 4.66 (1H, br s)	109.7	4.58 (1H, br s) 4.72 (1H, br s)	
30	19.1	19.1	1.66 (3H, s)	19.4	1.67 (3H, s)	

^aบันทึกใน CDCl_3 , 25.15 MHz (Sholichin, et al. 1980 : 1006-1008), ^bบันทึกใน CDCl_3 ,

^{c,d} ภายใต้เครื่องหมายเดียวกันอาจเปลี่ยนที่กันได้

ตาราง 19 ข้อมูล ^1H NMR COSY HMQC และ HMBC ของสารประกอบ 2

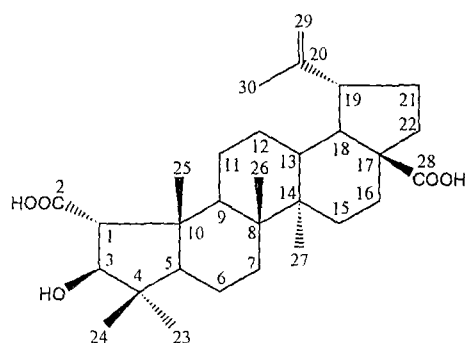
ตำแหน่ง	^1H NMR	COSY ^a	HMQC ^b	HMBC ^c
3	3.16 (1H, dd, $J = 10.6, 5.0$ Hz)		C-3	C-1 C-4 C-23 C-24
5	0.71 (1H, d, $J = 9.4$ Hz)		C-5	C-4 C-6 C-7 C-9 C-10 C-25
19	2.36 (1H, dt, $J = 10.6, 6.0$ Hz)		C-19	C-13 C-18 C-20 C-21 C-29 C-30
23	0.95 (3H, s)		C-23	C-3 C-4 C-5 C-24
24	0.74 (3H, s)		C-24	C-3 C-4 C-5 C-23
25	0.80 (3H, s)		C-25	C-1 C-5 C-9 C-10
26	1.00 (3H, s)		C-26	C-7 C-8 C-9 C-14
27	0.96 (3H, s)		C-27	C-8 C-13 C-14 C-15
28	3.31 (1H, d, $J = 10.8$ Hz) 3.78 (1H, d, $J = 10.8$ Hz)	(H-28)	C-28	C-16 C-17 C-22
29	4.56 (1H, br s) 4.66 (1H, br s)	(H-29)	C-29	C-19 C-30
30	1.66 (3H, s)	(H-29)	C-30	C-19 C-20 C-29

^a proton-proton correlation

^b 1-bond heteronuclear ^1H - ^{13}C correlation

^c long range heteronuclear ^1H - ^{13}C correlation

สารประกอบ 3



สารประกอบ 3 เป็นผลึกรูปเข็มไม่มีสี mp 306-308 °C (d) ให้สีม่วงกับ

anisaldehyde-sulphuric spray reagent แสดงว่าสารประกอบ 3 เป็น triterpene (Ikram and Tomlinson. 1976 : 289-290) HRFABMS แสดง 485.32776 ซึ่งตรงกับสูตรโมเลกุล $C_{30}H_{46}O_5$ จากข้อมูล IR spectrum แสดงแถบการสั่นแบบยืดที่ 3442 และ 2500-3500 (OH), 1688 (C=O), 1639 880 (C=CH₂) และ 1032 (C-O)

การกำหนด ¹H- และ ¹³C-chemical shift กระทำโดยใช้เทคนิค 1D-NMR (¹H-, ¹³C-, DEPT 90 และ DEPT 135) และ 2D-NMR (COSY, HMQC และ HMBC) ซึ่งแสดงในตาราง 20 และ 22 นั่นคือพบสัญญาณของหมู่ tertiary methyl 6 หมู่ ที่ δ_H 0.85 (3H, s, 24-Me), δ_C 19.6 (C-24); δ_H 0.91 (3H, s, 26-Me), δ_C 16.8 (C-26); δ_H 0.92 (3H, s, 27-Me), δ_C 15.1 (C-27); δ_H 1.02 (3H, s, 25-Me), δ_C 19.1 (C-25); δ_H 1.04 (3H, s, 23-Me), δ_C 31.2 (C-23) และ δ_H 1.61 (3H, s, 30-Me), δ_C 19.5 (C-30) พบหมู่ isopropenyl group ที่ δ 4.51 (1H, br s, H-29), δ_C 109.9 (C-29); δ_H 1.61 (3H, s, 30-Me), δ_C 19.5 (C-30) และ δ_C 151.2 (C-20) พบสัญญาณของ methine proton ที่ δ 2.46 (1H, s, H-1), δ_C 66.2 (C-1); δ 2.96 (1H, m, H-19), δ_C 47.6 (C-19) และสัญญาณของ carbinol proton ที่ δ 4.07 (1H, s, H-3), δ_C 85.2 (C-3) พบหมู่ carbonyl ของ acid 2 หมู่ที่ δ_C 178.3 (C-2) และ δ_C 179.7 (C-28)

จากข้อมูล NMR (ใน CDCl₃+CD₃OD) พบว่าสารประกอบ 3 คล้ายกับ betulinic acid (ตาราง 21) ต่างกันที่

1. สารประกอบ 3 มีหมู่ carboxyl 2 หมู่ ที่ δ_C 178.3 (C-2) และ δ_C 179.7 (C-28) แต่ betulinic acid มีหมู่ carboxyl หนึ่งหมู่ ที่ δ_C 180.0 (C-28) (ใน CDCl₃)

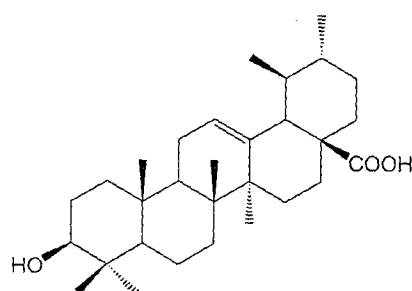
2. สารประกอบ 3 มี 8 quaternary carbon, 9 methylene carbon และ 7 methine carbon ในขณะที่ betulinic acid มี 7 quaternary carbon, 11 methylene carbon และ 6 methine carbon สารทั้งสองมี 6 methyl carbon เท่ากัน

3. carbinol proton (H-3) ของสารประกอบ 3 พบที่ δ 4.07 (s) ซึ่ง low field กว่าของ H-3 (δ 3.16, 1H, dd, J = 10.8 และ 5.2 Hz) ของ betulinic acid แสดงว่า H-3 ของสาร

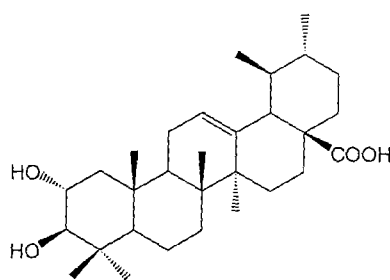
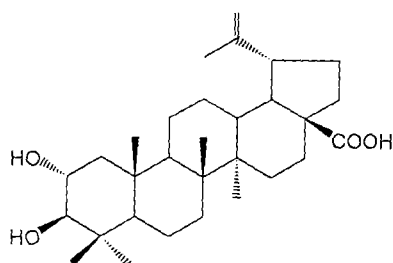
ประกอบ 3 ได้รับอิทธิพล deshielding ของหมู่ CO_2H ที่ตำแหน่ง 1 ประกอบกับ multiplicity ของ H-3 ในสารประกอบ 3 เป็น singlet แต่ของ betulinic acid เป็น doublet of doublet แสดงถึงจำนวน adjacent proton ของ H-3 ในสารประกอบ 3 ต่างจากของ betulinic acid

ดังนั้นสารประกอบ 3 จึงควรมีโครงสร้างที่มีส่วนของ betulinic acid อยู่ด้วย ต่างกันที่สารประกอบ 3 มีวง A ต่างจาก betulinic acid โดยที่หมู่ CO_2H ที่เพิ่มขึ้นน่าจะอยู่ที่ตำแหน่ง C-1 ซึ่งทำให้ H-3 อยู่ low field กว่า

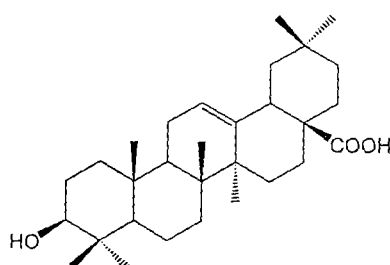
จากการศึกษาวรรณกรรมพบว่า triterpene อื่น ๆ นอกเหนือจาก betulinic acid ที่เคยพบในพืชสกุล *Zizyphus* ต่าง ๆ ได้แก่ betulin จากรากของ *Z. jujuba* Mill. var. *spinosa* (Lee, Lin and Liu. 1996 : 847-851), ursolic acid alphitolic acid และอนุพันธ์ benzoate ของ betulinic acid จากเปลือกต้นของ *Z. joazeiro* C. Mart. (Schuhly, et al. 1999 : 740-743), ceanothic acid จากส่วนเหนือดินของ *Z. spina christi* (Ikram and Tomlinson. 1976 : 289-290), oleanolic acid, alphitolic acid, 2α -hydroxyursolic acid, ceanothic acid และอนุพันธ์ *p*-coumaroylate ของ alphitolic acid จากผลของ *Z. jujuba* (Yagi, et al. 1978 : 1798-1802) ซึ่งพบว่าโครงสร้างของ ceanothic acid น่าจะใกล้เคียงกับสารประกอบ 3 มากที่สุด



ursolic acid

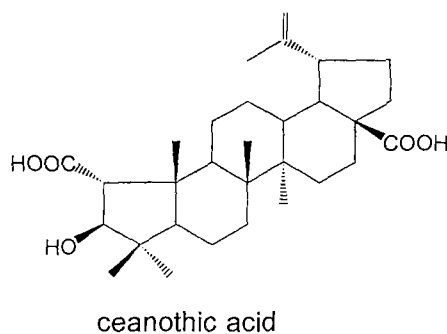
 2α -hydroxyursolic acid

alphitolic acid



oleanolic acid

ภาพประกอบ 10 triterpene ที่พบในพืชในสกุล *Zizyphus*



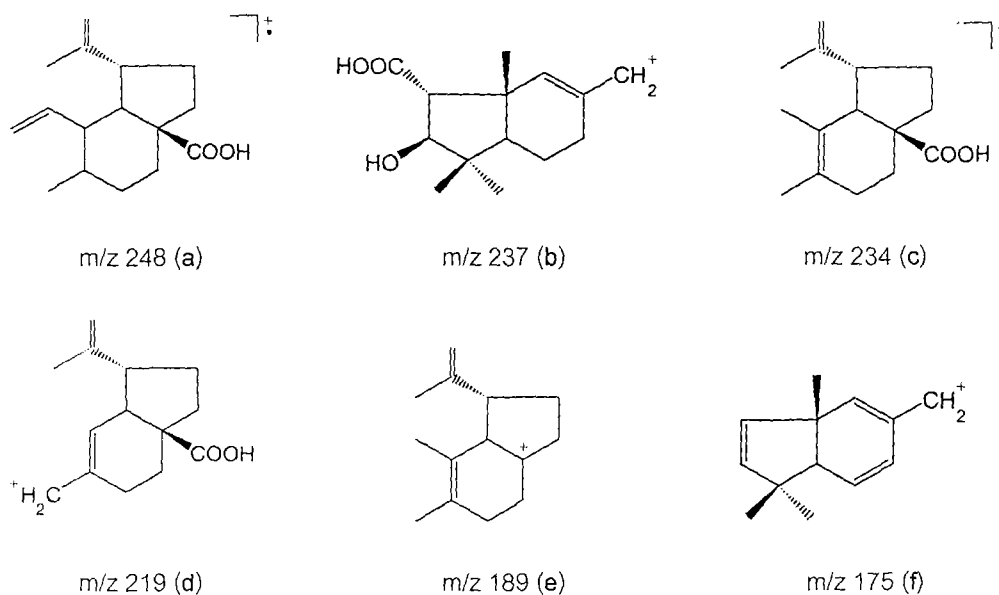
ภาพประกอบ 10 (ต่อ)

จากการเปรียบเทียบข้อมูล ^{13}C NMR ($\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$) ของสารประกอบ **3** (ภาพประกอบ 26 และ 27) กับ ceanothic acid ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) ดังตาราง 20 พบว่ามีความคล้ายคลึงกัน แม้ว่าบันทึกในตัวทำละลายที่ต่างกัน แต่ ^1H NMR spectrum (บันทึกใน $\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$) ของสารประกอบ **3** (ภาพประกอบ 25) กับ ceanothic acid (บันทึกใน $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) พบว่ามีความแตกต่างกัน น่าจะเป็นเพราะอิทธิพลของตัวทำละลายที่ใช้ในการบันทึกข้อมูล ดังนั้นจึงได้ทำการบันทึกข้อมูล ^1H NMR ของสารประกอบ **3** ใน $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ซึ่งแสดงไว้ในตาราง 21 (ภาพประกอบ 28) พร้อมกับข้อมูล ^{13}C NMR (ภาพประกอบ 29 และ 30) จากข้อมูลที่ได้พบว่าสอดคล้องกับของ ceanothic acid ที่บันทึกใน $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$

ข้อมูล HMBC (ตาราง 22, ภาพประกอบ 11) ยืนยันโครงสร้างของสารประกอบ **3** เป็น ceanothic acid ที่สำคัญ คือ

1. พบ correlation ระหว่างหมู่ methylene proton H-29 (δ_{H} 4.51) ของ isopropenyl กับ C-19 (δ_{C} 47.6), C-20 (δ_{C} 151.2) และ C-30 (δ_{C} 19.5)
2. H-1 (δ_{H} 2.46) มีความสัมพันธ์กับ C-2 (δ_{C} 178.3), C-3 (δ_{C} 85.2), C-4 (δ_{C} 43.8), C-5 (δ_{C} 57.2), C-10 (δ_{C} 49.8) และ C-25 (δ_{C} 19.1)
3. H-3 (δ_{H} 4.07) มีความสัมพันธ์กับหมู่ CO_2H (δ_{C} 178.3), C-1 (δ_{C} 66.2), C-4 (δ_{C} 43.8), C-23 (δ_{C} 31.2) และ C-24 (δ_{C} 19.6)

EIMS ที่มีผู้รายงานไว้ (Roitmann and Jurd, 1978 : 491-494) พบ m/z (% relative intensity) : 486 (M^+ , 20), 468 ($\text{M}^+-\text{H}_2\text{O}$, 13), 440 ($\text{M}^+-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}$, 25), 248 (a, 37), 237 (b, 22), 234 (c, 16), 219 (d, 29), 205 (23), 203 (26), 189 (e, 48), 175 (f, 52), 147 (34), 133 (43) และ 121 (80) โดยมี fragmentation ion ตามที่แสดง



อย่างไรก็ตามจาก FABMS ของสารประกอบ **3** พบ m/z 485 ($[M-H]^{-}$, 100) และ HRFABMS แสดง 485.3277 สอดคล้องกับสูตรโมเลกุล $C_{30}H_{46}O_5$ (คำนวณ = 485.3266)

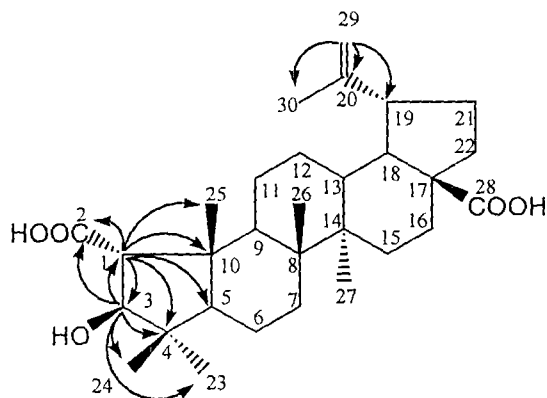
สารประกอบ **3** มี mp 306-308 °C (d) [mp 333-335 °C (acetone-MeOH) (Lee, Su and Liu. 1991 : 615-618 ; Roitmann and Jurd. 1978 : 491-494), mp 333-335 °C (MeOH) (Lee, Lin and Liu. 1992 : 602-606), mp 356-357 °C (ether-MeOH) (de Mayo and Starratt. 1962 : 788-795)]

สารประกอบ **3** มีค่า $[\alpha]_D^{29} +36.25^{\circ}$ (c, 0.160, pyridine) $\{[\alpha]_D^{24} +38^{\circ}$ (c, 0.8, MeOH) (Lee, Su and Liu. 1991 : 615-618 ; Lee, Lin and Liu. 1992 : 602-606), $[\alpha]_D +38^{\circ}$ (c, 1.20, EtOH) (de Mayo and Starratt. 1962 : 788-795)}

จากข้อมูลข้างต้นจึงสรุปได้ว่าสารประกอบ **3** คือ ceanothic acid หรือ emmolic acid (Guise Ritchie and Taylor. 1962 : 314-321) หรือ 2 α -carboxy-3 β -hydroxy-nor-A(1)-lup-20 (29)-en-28-oic acid (Roitmann and Jurd. 1978 : 491-494)

ceanothic acid เป็น triterpene ชนิด lupane ที่ยังไม่เคยรายงานการพบในพืชชนิดนี้ แต่เคยพบในพืช genus เดียวกัน คือพบในรากของ *Z. jujuba* Mill. var. *spinosa* (Lee, Lin and Liu. 1996 : 847-851); ผลของ *Z. jujuba* Yagi, et al. 1978 : 1798-1802) และ ส่วนเหนือดินของ *Z. spina christi* (Ikram and Tomlinson. 1976 : 289-290) และเคยพบในพืช genus อื่น เช่น จาก stem bark ของ *Paliurus ramosissimus* (Lee, Su and Liu. 1991 : 615-618), จาก root bark ของ *Ceanothus americanus* (de Mayo and Starratt. 1962 : 788-795), จาก

heart wood ของ *Colubrina granulosa* (Roitmann and Jurd. 1978 : 491-494), จาก wood ของ *Emmenospermum alphitonioides* F. Muell. (Boyer, et al. 1958 : 236-245 ; Eade, et al. 1971 : 621-632) และพบใน wood ของ *Alphitonia excelsa* Reiss. (Birch, Ritchie and Speake. 1960 : 3593-3599)



ภาพประกอบ 11 ความสัมพันธ์ HMBC ที่สำคัญของสารประกอบ 3

ตาราง 20 ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR ของ ceanothic acid และสารประกอบ **3** และข้อมูล DEPT 90 กับ DEPT 135 ของสารประกอบ **3**

ตำแหน่ง	ceanothic acid ^a		สารประกอบ 3 ^b			
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	DEPT 90	DEPT 135	δ_{H}
1	67.2	3.18 (s)	66.2	66.2	66.2	2.46 (1H, s)
2	177.9		178.3			
3	85.0	4.79 (s)	85.2	85.2	85.2	4.07 (1H, s)
4	43.9		43.8 ^c			
5	57.2		57.2	57.2	57.2	
6	19.2		19.1		19.1	
7	34.9		34.6		34.6	
8	43.7		42.2			
9	45.2		45.0	45.0	45.0	
10	49.7		49.8			
11	24.4		24.1		24.1	
12	26.4		26.1		26.1	
13	39.3	2.76 (dt, $J = 11.3, 2.5$ Hz)	39.3	39.3	39.3	2.18 (m)
14	42.3		43.5 ^c			
15	30.7		30.5		30.5	
16	33.1		32.9		32.9	
17	56.8		56.8			
18	50.1	1.67 (t, $J = 11.3$ Hz)	49.8	49.8	49.8	ca 1.48 (m)
19	47.7	3.49 (m)	47.6	47.6	47.6	2.96 (m)
20	152.4		151.2			
21	31.5		31.2		31.2	
22	37.6		37.7		37.7	
23	31.6	1.42 (s)	31.2		31.2	1.04 (3H, s)
24	20.1	1.27 (s)	19.6		19.6	0.85 (3H, s)
25	19.0	1.37 (s)	19.1		19.1	1.02 (3H, s)
26	17.1	1.14 (s)	16.8		16.8	0.91 (3H, s)
27	15.2	1.03 (s)	15.1		15.1	0.92 (3H, s)
28	178.7		179.7			
29	109.6	4.64 (br s) 4.85 (br s)	109.9		109.9	4.51 (1H, br s) ca 4.65 (1H, masked by water)
30	19.7	1.60 (s)	19.5		19.5	1.61 (3H, s)

^aบันทึกใน $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 250 MHz (Lee Su and Liu. 1991 : 615-618), ^bบันทึกใน $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$, 300 MHz,

^cภายใต้เครื่องหมายเดียวกันสัญญาณอาจเปลี่ยนที่ได้

ตาราง 21 ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR ของ ceanothic acid betulinic acid และสารประกอบ 3

ตำแหน่ง	ceanothic acid ^a		สารประกอบ 3				betulinic acid	
	δ_{C}	δ_{H}	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{c}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{d}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{e}}$
1	67.2	3.18 (s)	67.0	3.19 (1H, s)	66.2	2.46 (1H, s)	39.0	
2	177.9		178.2		178.3		27.6	
3	85.0	4.79 (s)	84.7	4.81 (1H, s)	85.2	4.07 (1H, s)	78.2	3.10 (1H, m)
4	43.9		43.9		43.8 ^o		39.0	
5	57.2		57.0		57.2		55.5	ไม่ได้รายงานไว้
6	19.2		19.1		19.1		18.4	
7	34.9		34.7		34.6		34.5	
8	43.7		43.5		42.2		40.8	
9	45.2		45.1		45.0		50.7	
10	49.7		49.7		49.8		37.3	
11	24.4		24.2		24.1		21.0	
12	26.4		26.3		26.1		25.6	
13	39.3	2.76 (dt, $J = 11.3$, 2.5 Hz)	39.1	2.75 (dt)	39.3	2.18 (m)	38.2	
14	42.3		42.1		43.5 ^a		42.5	
15	30.7		30.6		30.5		30.8	
16	33.1		33.0		32.9		32.6	
17	56.8		56.7		56.8		56.3	
18	50.1	1.67 (t, $J = 11.3$ Hz)	49.7	1.66 (m)	49.8	ca 1.48 (m)	47.1	
19	47.7	3.49 (m)	47.6	3.48 (m)	47.6	2.96 (m)	49.4	3.25 (1H, m)
20	152.4		151.2		151.2		150.9	
21	31.5		31.3		31.2		29.9	
22	37.6		37.6		37.7		37.3	
23	31.6	1.42 (s)	31.5	1.40 (3H, s)	31.2	1.04 (3H, s)	28.2	0.83 (3H, s)
24	20.1	1.27 (s)	20.4	1.25 (3H, s)	19.6	0.85 (3H, s)	15.6	0.99 (3H, s)
25	19.0	1.37 (s)	18.9	1.36 (3H, s)	19.1	1.02 (3H, s)	16.1	1.01 (3H, s)
26	17.1	1.14 (s)	17.1	1.12 (3H, s)	16.8	0.91 (3H, s)	16.1	1.04 (3H, s)
27	15.2	1.03 (s)	15.1	1.05 (3H, s)	15.1	0.92 (3H, s)	14.7	0.83 (3H, s)
28	178.7		178.9		179.7		178.9	
29	109.6	4.64 (br s) 4.85 (br s)	109.8	4.64 (1H, br s) 4.83 (1H, br s)	109.9	4.51 (1H, br s) ca 4.65 (1H, masked by water)	109.4	4.63 (1H, d, $J = 2.0$ Hz) 4.79 (1H, d, $J = 2.0$ Hz)
30	19.7	1.60 (s)	19.6	1.63 (3H, s)	19.5	1.61 (3H, s)	19.4	1.73 (3H, s)

^a บันทึกใน $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 250 MHz (Lee Su and Liu. 1991 : 615-618), ^b บันทึกใน $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 300 MHz, บันทึกใน $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$, 300 MHz, ^c บันทึกใน $\text{CDCl}_3 + \text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ (1:1), 25 MHz (Sholichin, et al. 1980 : 1006-1008), ^d บันทึกใน $\text{CDCl}_3 + \text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ (10:1) (Yagi, et al. 1978 : 1798-1802), ภายใต้อุปกรณ์เดียวกันสัญญาณอาจเปลี่ยนก็ได้

ตาราง 22 ข้อมูล ^1H NMR COSY HMQC และ HMBC ของสารประกอบ 3

ตำแหน่ง	δ_{H} (ppm)	COSY ^a	HMQC ^b	HMBC ^c
1	2.46 s		C-1	C-2 C-3 C-4 C-5 C-10 C-25
3	4.07 s	H-1	C-3	C-1 C-2 C-4 C-5 C-10 C-23 C-24
13	2.18 m			C-12 C-8 C-18 C-27
18	ca 1.48 m	H-19	C-18	C-13 C-16 C-17 C-19 C-20 C-28
19	2.96 m		C-19	C-13 C-18 C-20 C-21 C-22 C-29 C-30
21		H-19	C-21	C-17 C-18 C-19 C-20 C-22
22				C-17 C-18 C-19 C-21 C-28
23	1.04 s		C-23	C-3 C-4 C-5 C-24
24	0.85 s		C-24	C-3 C-4 C-5 C-23
25	1.02 s		C-25	C-1 C-5 C-9 C-10
26	0.91 s		C-26	C-7 C-8 C-9 C-14
27	0.92 s		C-27	C-13 C-14 C-15 C-8
29	4.51 br s		C-29	C-19 C-20 C-30
30	1.61 s	H-29	C-30	C-19 C-20 C-29

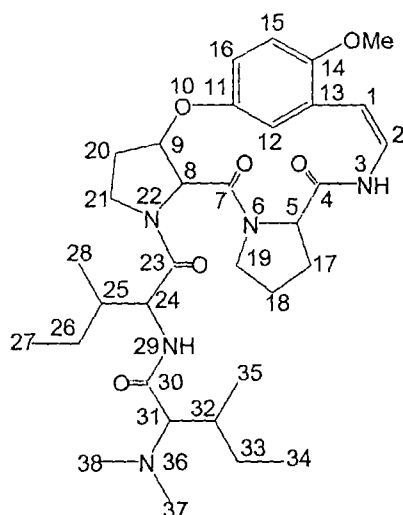
บันทึกใน $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$, 300 MHz

^a proton-proton correlation

^b 1-bond heteronuclear ^1H - ^{13}C correlation

^c long range heteronuclear ^1H - ^{13}C correlation

สารประกอบ 4



เป็นของแข็งไม่มีสี mp 117-119 °C ให้สีเหลือง-เขียว-สีน้ำเงิน กับ anisaldehyde-sulphuric spray reagent จาก IR (KBr) spectrum พบแถบของการสั่นแบบยืดที่ 3399 (NH), 3070 (=C-H), 2960, 2928, 2860 (C-H), 2826 (aromatic OMe), 2783 (NMe), 1704, 1693, 1653, 1641 (C=O), 1625 (styryl double bond), 1223 (phenol ether) และ 1054 (C-O) ซึ่งเป็นลักษณะการดูดกลืนของ cyclopeptide alkaloid (Gournelis, Laskaris and Verpoorte. 1998 : 7)

จากข้อมูล UV พบแถบการดูดกลืนรังสี UV ที่ $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ) : 216 (4.78), 266 (4.40) และ 319 (4.28) แสดงการดูดกลืนรังสี UV ของ styrylamine moiety ใน 13-membered ring system cyclopeptide alkaloid (Gournelis, Laskaris and Verpoorte. 1998 : 31 ; Hindenlang, et al. 1980 : 447-450)

ข้อมูล ^1H NMR spectrum (ภาพประกอบ 31, 32 และ 33) และ ^{13}C NMR spectrum (ภาพประกอบ 34) ของสารประกอบ 4 แสดงไว้ในตาราง 11 การกำหนดตำแหน่ง ^1H - และ ^{13}C -NMR chemical shift กระทำโดยใช้เทคนิค 1D- และ 2D-NMR จาก ^1H - และ ^{13}C -NMR spectrum พบสัญญาณของหมู่ต่าง ๆ คือ

1. หมู่ *N,N*-dimethylisoleucine ที่ δ_{H} 2.62 (1H, br s, H-31), δ_{C} 74.0 (C-31); δ_{H} 1.77 (1H, m, H-32), δ_{C} 34.3 (C-32); δ_{H} 1.10-1.98 (2H, m, H-33), δ_{C} 26.8 (C-33); δ_{H} 0.80-0.95 (3H, m, H-34), δ_{C} 14.6 (C-34); δ_{H} 0.80-0.95 (3H, m, H-35), δ_{C} 23.1 (C-35); δ_{H} 2.25 (6H, s, 37-Me และ 38-Me), δ_{C} 43.0 (C-37 และ C-38) และ δ_{C} 171.6 (C-30)
2. หมู่ isoleucine ที่ δ_{H} ca 6.95 (1H, br s, H-29, D_2O exchanged); δ_{H} 4.73 (1H, dd, $J = 14.6, 8.0$ Hz, H-24), δ_{C} 47.9 (C-24); δ_{H} 1.10-1.98 (1H, m, H-25), δ_{C} 24.6

(C-25); δ_H 1.10-1.98 (2H, m, H-26), δ_C 40.6 (C-26); δ_H 0.80-0.95 (3H, m, H-27), δ_C 11.9 (C-27); δ_H 0.80-0.95 (3H, m, H-28), δ_C 21.6 (C-28) และ δ_C 171.6 (C-23)

3. หมู่ hydroxyproline amino acid ที่ δ_H 4.35 (1H, d, J = 5.6 Hz, H-8), δ_C 62.7 (C-8); δ_H 5.21 (1H, m, H-9), δ_C 78.5 (C-9); δ_H 2.32 และ 2.42 (2H, m, H-20), δ_C 32.7 (C-20); δ_H 3.57 (1H, m, H-21_a) และ δ_H 4.21 (1H, br t, H-21_b), δ_C 45.3 (C-21) และ δ_C 171.2 (C-7)

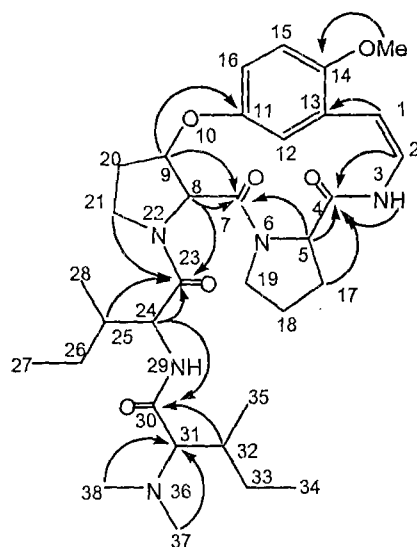
4. หมู่ proline ที่ δ_H 4.50 (1H, dd, J = 9.0, 3.6 Hz, H-5), δ_C 62.0 (C-5); δ_H 1.95 และ 2.18 (2H, m, H-17), δ_C 29.0 (C-17); δ_H 1.40-1.95 (2H, m, H-18), δ_C 24.9 (C-18); δ_H 3.25 (1H, m, H-19_a) และ δ_H 4.21 (1H, br t, H-19_b), δ_C 47.8 (C-19) และ δ_C 167.8 (C-4)

5. หมู่ styrylamine ที่ δ_H 5.91 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-1), δ_C 107.0 (C-1); δ_H 6.87 (1H, m, H-2), δ_C 121.6 (C-2); δ_H 8.31 (1H, d, J = 11.5 Hz H-3, D₂O exchanged); δ_H 6.76 (1H, s, H-12), δ_C 110.7 (C-12); δ_H 6.81 (2H, m, H-15 และ H-16), δ_C 113.8 (C-15) และ δ_C 116.9 (C-16) และสัญญาณของ quaternary carbon ที่ δ_C 150.8 (C-11), δ_C 124.0 (C-13) และ δ_C 151.2 (C-14)

ข้อมูลของ ¹H- และ ¹³C-NMR ของสารประกอบ 4 คล้ายกับของ zizyphine-A (Gournelis, Laskaris and Verpoorte. 1998 : 50 ; Hindenlang, et al. 1980 : 447-450) ดังตาราง 23 ข้อมูล COSY, HMQC และ HMBC แสดงในตาราง 24 และข้อมูล HMBC (ภาพประกอบ 12) ใช้ในการยืนยันโครงสร้างของสารประกอบ 4 และพบความสัมพันธ์ที่สำคัญคือ

1. พบความสัมพันธ์ระหว่าง δ_H 5.91 (H-1) กับ δ_C 124.0 (C-13)
2. พบความสัมพันธ์ระหว่าง H-9 (δ_H 5.21) กับ C-11 (δ_C 150.8) แสดงถึงหมู่ hydroxyproline ต่อกับวง benzene ที่ C-11
3. หมู่ methoxyl δ_H 3.75 มีความสัมพันธ์กับ δ_C 151.2 (C-14) ยืนยันว่าหมู่ methoxyl อยู่ที่ C-14
4. พบความสัมพันธ์ระหว่าง C-4 (δ_C 167.8) กับ H-2 (δ_H ca 6.87) H-3 (δ_H 8.31) H-5 (δ_H 4.50) และ H-17 (δ_H 1.95 และ 2.18) แสดงว่าหมู่ carbonyl (C-4) ของ proline amino acid เชื่อมกับหมู่ styryl ที่ C-2
5. พบความสัมพันธ์ระหว่าง C-7 (δ_C 171.2) และ H-5 (δ_H 4.50) H-8 (δ_H 4.35) และ H-9 (δ_H 5.21) แสดงถึง carbonyl (C-7) ของหมู่ hydroxyproline มีพันธะ amide กับ proline ที่ตำแหน่ง N-6
6. พบความสัมพันธ์ระหว่าง C-23 (δ_C 171.6) กับ H-8 (δ_H 4.35) H-21 (δ_H 3.57 และ 4.21) H-24 (δ_H 4.73) และ H-25 (δ_H 1.92) แสดงถึงหมู่ hydroxyproline เชื่อมกับ isoleucine amino acid

7. พบความสัมพันธ์ระหว่าง C-30 (δ_c 171.9) กับ H-24 (δ_H 4.73) และ H-32 (δ_H 1.77) เป็นการยืนยันว่าหมู่ isoleucine และ *N,N*-dimethylisoleucine อยู่ใกล้กัน
8. พบความสัมพันธ์ระหว่าง C-31 (δ_c 74.0) กับ 37-Me และ 38-Me (δ_H 2.25) แสดงถึงส่วนของ terminol amino acid ที่เป็น *N,N*-dimethylisoleucine



ภาพประกอบ 12 ความสัมพันธ์ HMBC ที่สำคัญของสารประกอบ 4

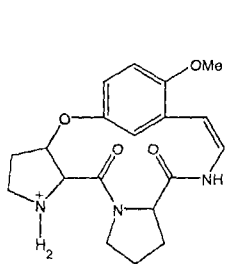
FABMS (positive ion mode) พบ m/z 612 $[M+H]^+$ แสดงถึงสูตรโมเลกุล $C_{33}H_{49}N_5O_6$ จากการวิเคราะห์ mass spectrum พบ fragment ion (ภาพประกอบ 13) ที่ m/z 358 ซึ่งยืนยันถึง cyclopeptide alkaloid ประเภท 5(13)-membered ring system ของ zizyphine-A ที่มีหมู่ methoxyl บน aromatic ring ที่ตำแหน่ง C-14 ;base peak ที่ m/z 114 เป็นส่วนสำคัญที่แสดงถึง basic terminal (end) amino acid ของสารประกอบ 4 เป็น *N,N*-dimethylisoleucine นอกจากนี้ยังพบ fragment ion ที่ m/z 255 227 216 193 165 โดยที่ m/z 227 และ 165 เกิดจากการแตกออกของ CO ของ fragment ion m/z 255 และ 193 ตามลำดับและสอดคล้องกับที่มีผู้รายงานไว้ (Tschesche, Kaussmann and Eckhardt. 1973 : 2577-2580)

สารประกอบ 4 มี mp 117-119 °C [mp 121 °C (Menard, et al. 1963 : 1801-1811), mp 124-126 °C ($CHCl_3$ -pet.ether) (Tschesche, Kaussmann and Eckhardt. 1973 : 2577-2580)]

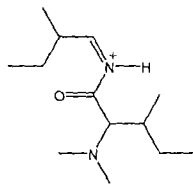
และค่า $[\alpha]_D^{30}$ -326.67 ° (c, 0.18, $CHCl_3$) $\{[\alpha]_D^{20}$ -430 ° (c, 0.093, $CHCl_3$) (Schmidt et al. 1983 : 2680-2685), $[\alpha]_D^{20}$ 411 ° (c, 0.086, $CHCl_3$) (Tschesche,

Kaussmann and Eckhardt. 1973 : 2577-2580), $[\alpha]_D^{24} -464.7 \pm 1^\circ$ (c, 1.0, CHCl_3)
(Menard, et al. 1963 : 1801-1811)}

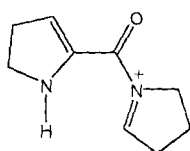
จากข้อมูลข้างต้นสรุปได้ว่าสารประกอบ **4** คือ zizyphine-A



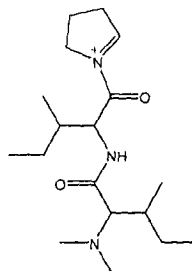
m/z 358 (0.5)



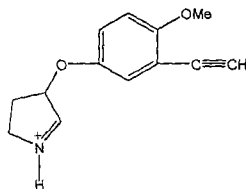
m/z 227 (0.1)



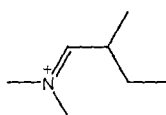
m/z 165 (0.4)



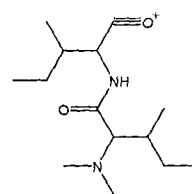
m/z 324 (0.3)



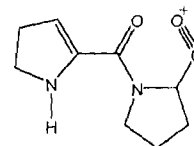
m/z 216 (0.1)



m/z 114 (100.0)



m/z 255 (0.2)



m/z 193 (0.2)

ภาพประกอบ 13 Mass fragmentation ion ของสารประกอบ **4**

ตาราง 23 ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR ของ zizyphine-A และสารประกอบ 4 และข้อมูล DEPT 90 กับ DEPT 135 ของสารประกอบ 4

ตำแหน่ง	zizyphine-A		สารประกอบ 4 ^c			
	δ_c^a	δ_H^b	δ_c	DEPT 90	DEPT 135	δ_H
1	106.6	5.95 (1H, d, $J = 8.7$ Hz)	107.0	107.0	107.0	5.91 (1H, d, $J = 8.8$ Hz)
2	121.4	6.93 (1H, dd, $J = 12.2, 8.7$ Hz)	121.6	121.6	121.6	ca 6.87 (1H, m)
3	-	8.36 (1H, d, $J = 12.2$ Hz)	-			8.31 (1H, d, $J = 11.5$ Hz)
4	167.6		167.8			
5	62.0	4.50 (1H, dd, $J = 9.0, 4.2$ Hz)	62.0	62.0	62.0	4.50 (1H, dd, $J = 9.0, 3.6$ Hz)
7	171.3		171.2			
8	62.6	4.39 (1H, d, $J = 5.8$ Hz)	62.7	62.7	62.7	4.35 (1H, d, $J = 5.6$ Hz)
9	78.6	5.26 (1H, ddd, $J = 9.5, 6.0, 5.8$ Hz)	78.5	78.5	78.5	5.21 (1H, m)
11	151.2		150.8			
12	110.6	6.82 (1H)	110.7	110.7	110.7	6.76 (1H, s)
13	124.0		124.0			
14	150.8		151.2			
14-OMe	55.8	3.80 (3H, s)	55.9		55.9	3.75 (3H, s)
15	113.8	6.89 (1H, d, $J = 10.0$ Hz)	113.8	113.8	113.8	ca 6.81 (1H, m)
16	116.8	6.82 (1H, d, $J = 10.0$ Hz)	116.9	116.9	116.9	ca 6.81 (1H, m)
17	29.5	1.95 (m)	29.0		29.0	1.95 (1H, m), 2.18 (1H, m)
18	24.8	1.95 (m)	24.9		24.9	1.40-1.95 (2H, m)
19	45.4	3.28 1H, 4.35 1H	47.8		47.8	3.25 (1H, m), 4.21 (1H, br t)
20	32.5	2.50 (2H)	32.7		32.7	2.32 (1H, m), 2.42 (1H, m)
21	47.7	3.65 1H, 4.25 1H	45.3		45.3	3.57 (1H, m), 4.21 (1H, br l)
23	172.0		171.6			
24	53.6	4.50 (1H, t, $J = 8.5$ Hz)	47.9	47.9	47.9	4.73 (1H, dd, $J = 14.6, 8.0$ Hz)
25	34.2	1.95 (m)	24.6	24.6	24.6	1.92 (1H, m)
26	26.8	1.20-1.90 (m)	40.6		40.6	1.40-1.60 (m)
27	11.0	0.88 (3H, t, $J = 7.0$ Hz)	11.9		11.9	0.80-0.95 (3H, m)
28	14.6	0.91 (3H, d, $J = 6.7$ Hz)	21.6		21.6	0.80-0.95 (3H, m)
29	-	7.15 (1H, d, $J = 8.5$ Hz)	-			ca 6.95 (1H, br s)
30	170.9		171.6			
31	74.3	2.40 (1H)	74.0	74.0	74.0	2.62 (1H, br s)
32	36.9	1.20-1.90 (m)	34.3	34.3	34.3	1.77 (m)
33	28.8	1.20-1.90 (m)	26.8		26.8	1.16 (1H, m), 1.55 (1H, m)
34	11.7	0.96 (3H, d, $J = 7.3$ Hz)	14.6		14.6	0.80-0.95 (3H, m)
35	15.0	0.92 (3H, d, $J = 6.7$ Hz)	23.1		23.1	0.80-0.95 (3H, m)
37, 38	42.95	2.45 (6H, s)	43.0		43.0	2.25 (6H, s)

^a บันทึกใน CDCl_3 , 20 และ 25.03 MHz (Hindenlang, et al. 1980 : 447-450), ^b บันทึกใน CDCl_3 , 250 MHz (Gournelis, Laskaris and Verpoorte. 1998 : 50), ^c บันทึกใน CDCl_3

ตาราง 24 ข้อมูล ^1H NMR COSY HMQC และ HMBC ของสารประกอบ 4

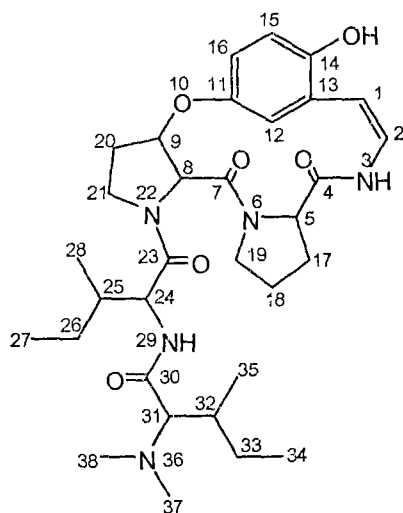
ตำแหน่ง	^1H NMR	COSY ^a	HMQC ^b	HMBC ^c
1	5.91 d		C-1	C-2 C-12 C-13 C-14
2	ca 6.87 m	(H-1)	C-2	C-1 C-4 C-13
3	8.31 d	(H-2)		C-1 C-2 C-4
5	4.50 dd	(H-17)	C-5	C-4 C-7 C-17 C-18 C-19
8	4.35 d	(H-9)	C-8	C-7 C-9 C-21 C-23
9	5.21 m	(H-20)	C-9	C-7 C-11 C-20
12	6.76 s		C-12	C-1 C-11 C-13 C-14 C-16
14-OMe	3.75 s		C-14OMe	C-14
15	ca 6.81 m		C-15	C-11 C-13 C-14 C-16
16	ca 6.81 m		C-16	C-11 C-12 C-14 C-15
17	1.92, 2.18 m		C-17	C-4 C-5 C-18 C-19
18	1.40-1.95 m	(H-19)	C-18	C-5 C-19 C-17
19	3.25 m, 4.21 br t	(H-19)	C-19	C-5 C-7 C-17 C-18
20	2.32, 2.42 m	(H-21)	C-20	C-8 C-9 C-21
21	3.57 m, 4.21 br t	(H-21)	C-21	C-8 C-9 C-20 C-23
24	4.73 dd	(H-25)	C-24	C-23 C-26 C-30
25	1.92 m		C-25	C-23 C-24 C-27
26	1.40-1.60 m		C-26	C-24 C-25 C-27 C-28
27	0.80-0.95 m		C-27	C-25 C-26
28	0.80-0.95 m		C-28	C-24 C-25 C-26
31	2.62 br s		C-31	
32	1.77 m		C-32	C-30 C-31 C-33 C-35
33	1.16, 1.55 m		C-33	C-31 C-32 C-34
34	0.80-0.95 m		C-34	C-33
35	0.80-0.95 m		C-35	C-31 C-32
37, 38	2.25 s		C-37, C-38	C-31

^a proton-proton correlation

^b 1-bond heteronuclear ^1H - ^{13}C correlation

^c long range heteronuclear ^1H - ^{13}C correlation

สารประกอบ 5



สารประกอบ 5 เป็นของแข็งไม่มีสี mp 127-129 °C (d) ให้สีเหลือง-เขียว-สีน้ำเงินกับ anisaldehyde-sulphuric spray reagent จาก IR (KBr) spectrum พบว่าสารประกอบ 5 เป็น cyclopeptide alkaloid เช่นเดียวกับสารประกอบ 4 ซึ่งแสดงลักษณะการดูดกลืนของ cyclopeptide alkaloid (Gournelis, Laskaris and Verpoorte. 1998 : 7) โดยแสดงแถบการสั่นแบบยืดที่ 3500-3000 (OH), 3395 (NH), 2960, 2935, 2877 (CH), 2783 (NMe), 1686, 1642 (C=O), 1513 (styryl double bond) และ 1210 (phenol ether)

จากข้อมูล UV พบแถบการดูดกลืนรังสี UV ที่ $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ) : 228 (4.8), 265 (4.7) และ 321 (4.6) แสดงถึงลักษณะการดูดกลืนรังสี UV ของ styrylamine moiety ใน 13-membered ring system cyclopeptide alkaloid (Gournelis, Laskaris and Verpoorte. 1998 : 31 ; Hindenlang, et al. 1980 : 447-450)

ในทำนองเดียวกับสารประกอบ 4 การกำหนด chemical shift ใน ^1H - และ ^{13}C -NMR spectrum ของสารประกอบ 5 กระทำโดยใช้เทคนิค 1D- และ 2D-NMR ซึ่งแสดงไว้ในตาราง 12 และ 13 และโดยการเปรียบเทียบข้อมูล NMR กับสารประกอบ 4 ซึ่งพบว่าสารประกอบ 5 เป็น cyclopeptide alkaloid ประเภท 5(13)-membered ring system เช่นเดียวกับสารประกอบ 4

จาก ^1H NMR spectrum (ภาพประกอบ 35, 36 และ 37) และ ^{13}C NMR spectrum (ภาพประกอบ 38, 39 และ 40) สารประกอบ 5 แสดงสัญญาณดังนี้

1. หมู่ *N,N*-dimethylisoleucine ที่ δ_{H} 2.55 (1H, d, J = 5.3 HZ, H-31), δ_{C} 74.4 (C-31); δ_{H} ca 1.40 (1H, m, H-32), δ_{C} 34.4 (C-32); δ_{H} 1.16-1.94 (2H, m, H-33), δ_{C} 27.4 (C-33); δ_{H} 0.84-0.93 (6H, m, 34-Me, 35-Me), δ_{C} 14.6 (C-34) และ 23.2 (C-35); δ_{H} 2.22 (6H, s, 37-Me, 38-Me), δ_{C} 43.2 (C-37 และ C-38) และ δ_{C} 172.2 (C-30)

2. หมู่ isoleucine ที่ δ_H 6.89 (1H, br s, H-29, D₂O exchange); δ_H 4.74 (1H, dd, $J = 14.0, 8.5$ Hz, H-24), δ_C 48.0 (C-24); δ_H 1.16-1.94 (3H, m, H-25, H-26), δ_C 34.4 (C-25) และ 40.6 (C-26); δ_H 0.84-0.93 (6H, m, 27-Me, 28-Me), δ_C 12.1 (C-27) และ 21.6 (C-28) และ δ_C 171.3 (C-23)

3. หมู่ hydroxyproline ที่ δ_H 4.34 (1H, d, $J = 5.7$ Hz, H-8), δ_C 62.8 (C-8); δ_H 5.20 (1H, m, H-9), δ_C 78.4 (C-9); δ_H 2.29-2.47 (2H, m, H-20), δ_C 32.7 (C-20); δ_H 4.20 (1H, m, H-21_a) และ 3.60 (1H, m, H-21_b), δ_C 45.4 (C-21) และ δ_C 171.8 (C-7)

4. หมู่ proline ที่ δ_H 4.52 (1H, dd, $J = 9.1, 3.8$ Hz, H-5), δ_C 62.0 (C-5); δ_H ca 1.94 และ 2.20 (2H, m, H-17), δ_C 29.1 (C-17); δ_H 1.16-1.94 (2H, m, H-18), δ_C 24.9 (C-18); δ_H 3.23 (1H, m, H-19_a) และ 4.20 (1H, m, H-19_b), δ_C 47.9 (C-19) และ δ_C 168.0 (C-4)

5. หมู่ styrylamine ที่ δ_H 5.89 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-1), δ_C 106.0 (C-1); δ_H ca 6.92 (1H, m, H-2), δ_C 122.6 (C-2); δ_H 8.33 (1H, d, $J = 11.5$ Hz, H-3, D₂O exchanged); δ_H 6.68 (1H, br s, H-12), δ_C 110.3 (C-12); δ_H 6.84 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, H-15), δ_C 118.8 (C-15); δ_H 6.73 (1H, dd, $J = 8.8, ca 1.0$ Hz, H-16), δ_C 117.8 (C-16) และ สัญญาณของ quaternary carbon ที่ δ_C 150.8 (C-11) และ δ_C 148.0 (C-14)

ข้อมูล NMR ของสารประกอบ 5 ต่างจากสารประกอบ 4 (ตาราง 26) ตรงที่ไม่พบสัญญาณของ methoxyl group ในสเปกตรัมของสารประกอบ 5 และเมื่อเปรียบเทียบข้อมูลของสารประกอบ 5 กับ zizyphine-F (ตาราง 25) พบว่าคล้ายคลึงกัน

การเชื่อมโยงของหมู่ต่าง ๆ เป็นโครงสร้างของสารประกอบ 5 ยืนยันได้จาก HMBC spectrum (ภาพประกอบ 14) โดยพบความสัมพันธ์ของสัญญาณต่าง ๆ ที่สำคัญ คือ

1. พบความสัมพันธ์ระหว่าง H-1 (δ_H 5.89) กับ C-2 (δ_C 122.6), C-12 (δ_C 110.3), C-13 (δ_C 121.6) และ C-14 (δ_C 148.0)

2. พบความสัมพันธ์ของ H-3 (δ_H 8.33) ของ styrylamine กับหมู่ carbonyl C-4 (δ_C 168.0) ของ proline

3. พบความสัมพันธ์ของ H-5 (δ_H 4.52) ของ proline กับหมู่ carbonyl C-4 (δ_C 168.0) และหมู่ carbonyl ของ β -oxyproline ที่ δ_C 171.8 (C-7)

4. H-8 (δ_H 4.34) ของ β -oxyproline มีความสัมพันธ์กับ C-7 (δ_C 171.8), C-9 (δ_C 78.4) และ C-23 (δ_C 171.3)

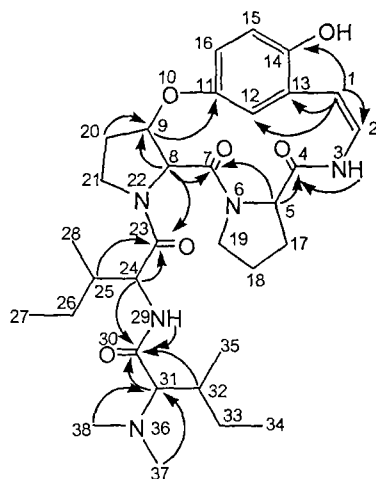
5. พบความสัมพันธ์ระหว่าง H-9 (δ_H 5.20) ของ β -oxyproline กับ C-11 (δ_C 150.8) ของ styrylamine

จากข้อ 1. ถึงข้อ 5. แสดงถึงส่วนของ 13-membered ring system cyclopeptide alkaloid

6. พบความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณของ carbonyl C-23 (δ_c 171.3) ของ isoleucine กับ H-8 (δ_H 4.34) ของ β -oxyproline, H-24 (δ_H 4.74) และ H-25 (δ_H 1.16-1.94)

7. พบความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณของ carbonyl C-30 (δ_c 172.2) ของ *N,N*-dimethylisoleucine กับ H-31 (δ_H 2.55) และ H-32 (δ_H ca 1.40) และยังพบความสัมพันธ์กับ isoleucine อีกหมู่ที่ δ_H 4.74 (H-24) และ (δ_H 6.89) H-29

8. พบความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณที่ δ_H 2.22 (37-Me และ 38-Me) กับ C-31 (δ_c 74.4)

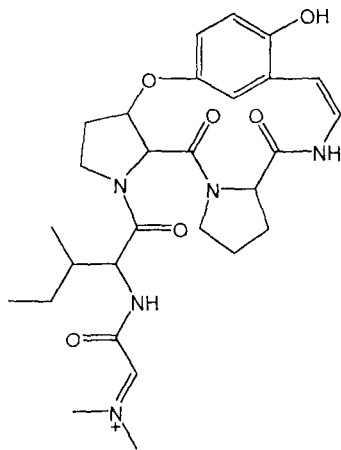


ภาพประกอบ 14 ความสัมพันธ์ HMBC ที่สำคัญของสารประกอบ 5

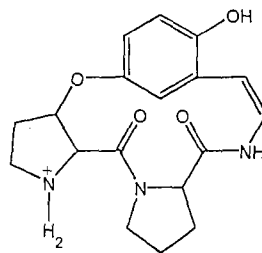
EIMS (positive ion mode) พบ m/z 598 $[M+H]^+$ ตรงกับสูตรโมเลกุล $C_{32}H_{47}N_5O_6$ และพบ fragment ion m/z 540, 344, 202, 193, 165 และ 114 (100) ดังแสดงในภาพประกอบ 15 สอดคล้องกับข้อมูลของ zizyphine-F ที่มีผู้รายงานไว้ (Tschesche, et al. 1974 : 2941-2944) ซึ่งคล้ายคลึงกับของ zizyphine-A (Tschesche, Kaussmann and Eckhardt. 1973 : 2577-2580) fragment ion m/z 202 ยืนยันถึงหมู่ OH บนส่วนของวง benzene ส่วน base peak ที่ m/z 114 ยืนยันส่วนของ terminal amino acid ซึ่งเป็น *N,N*-dimethylisoleucine

สารประกอบ 5 มี mp 127-129 °C (d) [mp 235 °C (Tschesche, et al. 1974 : 2941-2944)]; มีค่า $[\alpha]_D^{31}$ -385.43° (c, 0.15, $CHCl_3$) $\{[\alpha]_D^{20}$ -277° (c, 0.15, MeOH) (Tschesche, et al. 1974 : 2941-2944)} ข้อมูล UV λ_{max}^{MeOH} nm (log ϵ) พบแถบการดูดกลืนแสง ที่ 228 (4.8), 265 (4.7) และ 321 (4.6) $[UV \lambda_{max}^{MeOH}$ nm (log ϵ) : 225 (4.3), 265 (4.0) และ 322 (3.8); UV $\lambda_{max}^{MeOH+NaOH}$ nm (log ϵ) : 225 (4.3), 268 (4.1) และ 351 (3.8)] (Tschesche, et al. 1974 : 2941-2944)]

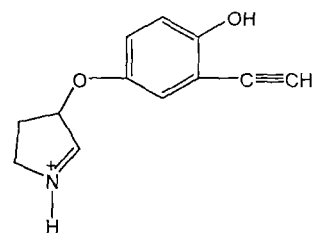
จากข้อมูลข้างต้นแม้ว่าค่า mp ของสารประกอบ **5** ต่างจากที่มีผู้รายงานไว้ค่อนข้างมากอย่างไรก็ตามจากข้อมูลอื่น ๆ ทำให้สรุปได้ว่าสารประกอบ **5** มีโครงสร้างเป็น O-desmethyl-zizyphine-A ซึ่งคือ zizyphine-F



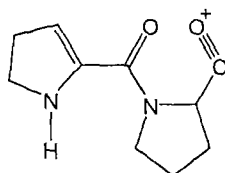
m/z 540 (0.2)



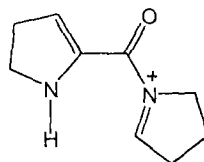
m/z 344 (0.03)



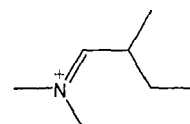
m/z 202 (0.1)



m/z 193 (0.2)



m/z 165 (0.2)



m/z 114 (100.0)

ภาพประกอบ 15 Mass fragmentation ion ของสารประกอบ **5**

ตาราง 25 ข้อมูล ^1H NMR ของ zizyphine-F และข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR DEPT 90 และ DEPT 135 ของสารประกอบ 5

ตำแหน่ง	zizyphine-F ^a	สารประกอบ 5 ^b			
	δ_{H}	δ_{C}	DEPT 90	DEPT 135	δ_{H}
1	5.90	106.0	106.0	106.0	5.89 (1H, d, $J = 8.3$ Hz)
2	6.50-6.80 (1H, m)	122.6	122.6	122.6	ca 6.92 (1H, m)
3		-			8.33 (1H, d, $J = 11.5$ Hz)
4		168.0			
5		62.0	62.0	62.0	4.52 (1H, dd, $J = 9.1, 3.8$ Hz)
7		171.8			
8		62.8	62.8	62.8	4.34 (1H, d, $J = 5.7$ Hz)
9		78.4	78.4	78.4	5.20 (1H, m)
11		150.8			
12	6.50-6.80 (1H, m)	110.3	110.3	110.3	6.68 (1H, br s)
13		121.6			
14		148.0			
15	6.50-6.80 (1H, m)	118.8	117.8	117.8	6.84 (1H, d, $J = 8.8$ Hz)
16	6.50-6.80 (1H, m)	117.8	118.8	118.8	6.73 (1H, dd, $J = 8.8, \text{ca } 1.0$ Hz)
17		29.1		29.1	ca 1.94 (1H, m), 2.20 (1H, m)
18		24.9		24.9	1.16-1.94 (2H, m)
19		47.9		47.9	4.20 (1H, m), 3.23 (1H, m)
20		32.7		32.7	2.29-2.47 (2H, m)
21		45.4		45.4	4.20 (1H, m), 3.60 (1H, m)
23		171.3			
24		48.0	48.0	48.0	4.74 (1H, dd, $J = 14.0, 8.5$ Hz)
25		24.7	24.7	24.7	ca 1.40 (1H, m)
26		40.6		40.6	1.16-1.94 (2H, m)
27		12.1 ^c		12.1	0.89 (3H, m)
28	0.95 (3H)	21.6		21.6	0.89 (3H, m)
29					6.89 (1H, br s)
30		172.2			
31		74.4	74.4	74.4	2.55 (1H, d, $J = 5.3$ Hz)
32		34.4	34.4	34.4	1.16-1.94 (m)
33		27.0		27.0	1.16-1.94 (2H, m)
34		14.6		14.6	0.89 (3H, m)
35	0.95 (3H)	23.2 ^c		23.2	0.89 (3H, m)
37, 38	2.23 (6H, s)	43.2		43.2	2.22 (6H, s)

^aบันทึกใน CDCl_3 (Tschesche, et al. 1974 : 2941-2944), ^bบันทึกใน CDCl_3 , ^cสัญญาณภายใต้เครื่องหมายเดียวกันอาจเปลี่ยนที่กันได้

ตาราง 26 เปรียบเทียบข้อมูล ^1H - และ ^{13}C -NMR ของสารประกอบ **4** และ สารประกอบ **5** และ ข้อมูล ^1H -NMR ของ zizyphine-F

ตำแหน่ง	zizyphine-F ^a	สารประกอบ 5 ^b		สารประกอบ 4 ^c	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	5.90	106.0	5.89 (1H, d, $J = 8.3$ Hz)	107.0	5.91 (1H, d, $J = 8.8$ Hz)
2	6.50-6.80 (1H, m)	122.6	ca 6.92 (1H, m)	121.6	ca 6.87 (1H, m)
3	ไม่ได้รายงานไว้	-	8.33 (1H, d, $J = 11.5$ Hz)	-	8.31 (1H, d, $J = 11.5$ Hz)
4		168.0		167.8	
5	ไม่ได้รายงานไว้	62.0	4.52 (1H, dd, $J = 9.1, 3.8$ Hz)	62.0	4.50 (1H, dd, $J = 9.0, 3.6$ Hz)
7		171.8		171.2	
8	ไม่ได้รายงานไว้	62.8	4.34 (1H, d, $J = 5.7$ Hz)	62.7	4.35 (1H, d, $J = 5.6$ Hz)
9	ไม่ได้รายงานไว้	78.4	5.20 (1H, m)	78.5	5.21 (1H, m)
11		150.8		150.8	
12	6.50-6.80 (1H, m)	110.3	6.68 (1H, br s)	110.7	6.76 (1H, s)
13		121.6		124.0	
14		148.0		151.2	
14-OMe		-		55.9	3.75 (3H, s)
15	6.50-6.80 (1H, m)	118.8	6.84 (1H, d, $J = 8.8$ Hz)	113.8	ca 6.81 (1H, m)
16	6.50-6.80 (1H, m)	117.8	6.73 (1H, dd, $J = 8.8, ca 1.0$ Hz)	116.9	ca 6.81 (1H, m)
17	ไม่ได้รายงานไว้	29.1	ca 1.94 (1H, m), 2.20 (1H, m)	29.0	1.95 (1H, m), 2.18 (1H, m)
18	ไม่ได้รายงานไว้	24.9	1.16-1.94 (2H, m)	24.9	1.40-1.95 (2H, m)
19	ไม่ได้รายงานไว้	47.9	4.20 (1H, m), 3.23 (1H, m)	47.8	3.25 (1H, m), 4.21 (1H, br t)
20	ไม่ได้รายงานไว้	32.7	2.29-2.47 (2H, m)	32.7	2.32 (1H, m), 2.42 (1H, m)
21	ไม่ได้รายงานไว้	45.4	4.20 (1H, m), 3.60 (1H, m)	45.3	3.57 (1H, m), 4.21 (1H, br t)
23		171.3		171.6	
24	ไม่ได้รายงานไว้	48.0	4.74 (1H, dd, $J = 14.0, 8.5$ Hz)	47.9	4.73 (1H, dd, $J = 14.6, 8.0$ Hz)
25	ไม่ได้รายงานไว้	24.7	ca 1.40 (1H, m)	24.6	1.92 (1H, m)
26	ไม่ได้รายงานไว้	40.6	1.16-1.94 (2H, m)	40.6	1.40-1.60 (m)
27	ไม่ได้รายงานไว้	12.1 ^d	0.89 (3H, m)	11.9	0.80-0.95 (3H, m)
28	0.95 (3H)	21.6	0.89 (3H, m)	21.6	0.80-0.95 (3H, m)
29	ไม่ได้รายงานไว้	-	6.89 (1H, br s)	-	ca 6.95 (1H, br s)
30		172.2		171.6	
31	ไม่ได้รายงานไว้	74.4	2.55 (1H, d, $J = 5.3$ Hz)	74.0	2.62 (1H, br s)
32	ไม่ได้รายงานไว้	34.4	1.16-1.94 (m)	34.3	1.77 (m)
33	ไม่ได้รายงานไว้	27.0	1.16-1.94 (2H, m)	26.8	1.16 (1H, m), 1.55 (1H, m)
34	ไม่ได้รายงานไว้	14.6	0.89 (3H, m)	14.6	0.80-0.95 (3H, m)
35	0.95 (3H)	23.2 ^d	0.89 (3H, m)	23.1	0.80-0.95 (3H, m)
37, 38	2.23 (6H, s)	43.2	2.22 (6H, s)	43.0	2.25 (6H, s)

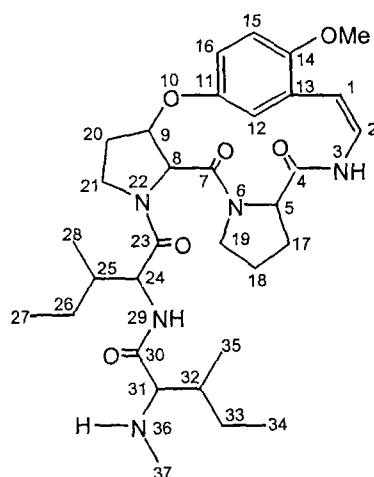
^a บันทึกใน CDCl_3 (Tschesche, et al. 1974 : 2941-2944), ^{b, c} บันทึกใน CDCl_3 , ^d สัญญาณภายใต้เครื่องหมายเดียวกันอาจเปลี่ยนที่กันได้

ตาราง 27 ข้อมูล ^1H NMR COSY HMQC และ HMBC ของสารประกอบ 5

ตำแหน่ง	^1H NMR	COSY ^a	HMQC ^b	HMBC ^c
1	5.89 d		C-1	C-2 C-12 C-13 C-14
2	ca 6.92 m	(H-1)	C-2	C-1 C-13
3	8.33 d	(H-2)		
5	4.52 dd	(H-17)	C-5	C-4 C-7 C-17 C-18
8	4.34 d	(H-9)	C-8	C-9 C-21 C-23
9	5.20 m	(H-20)	C-9	C-7 C-11 C-20
12	6.68 br s		C-12	C-1 C-11 C-13 C-14 C-16
15	6.84 d		C-15	C-11 C-13 C-14
16	6.73 dd		C-16	C-11 C-14 C-15
17	ca 1.94, 2.20 m		C-17	C-4 C-5 C-18 C-19
18	1.16-1.94 m	(H-19)	C-18	C-5 C-19
19	4.20, 3.23 m	(H-19)	C-19	C-7 C-17 C-18
20	2.29-2.47 m	(H-21)	C-20	C-8
21	4.20, 3.60 m	(H-21)	C-21	C-8 C-20
24	4.74 dd	(H-25)	C-24	C-23 C-30
25	ca 1.40 m		C-25	C-23 C-24 C-27 C-28
26	1.16-1.94 m		C-26	C-24 C-25 C-27 C-28
27	0.89 m		C-27	C-25 C-26 C-28
28	0.89 m		C-28	C-25 C-26
29	6.89 br s	(H-24)		
31	2.55 d		C-31	C-30 C-37 C-38
32	1.16-1.94 m		C-32	C-30 C-33 C-34
33	1.16-1.94 m		C-33	C-31 C-32 C-34 C-35
34	0.89 m		C-34	C-32
35	0.89 m		C-35	C-31 C-32
37, 38	2.22 s		C-37, C-38	C-31

^a proton-proton correlation^b 1-bond heteronuclear ^1H - ^{13}C correlation^c long range heteronuclear ^1H - ^{13}C correlation

สารประกอบ 6



สารประกอบ 6 เป็นของแข็งสีเหลืองใส mp 106-108 °C ให้สีเหลือง-เขียว-สีน้ำเงิน กับ anisaldehyde-sulphuric spray reagent จาก EIMS แสดงค่า molecular ion ที่ m/z 597 ตรงกับสูตรโมเลกุล $C_{32}H_{47}N_5O_6$

จาก IR (KBr) spectrum พบว่าสารประกอบ 6 เป็น cyclopeptide alkaloid โดยแสดงลักษณะการดูดกลืนของ cyclopeptide alkaloid เช่นเดียวกับสารประกอบ 4 และสารประกอบ 5 ซึ่งแสดงแถบการสั่นแบบยืดที่ 3399 (NH), 3073 (=CH), 2964, 2935, 2877 (CH), 2797 (NMe), 1700, 1686, 1654, 1639 (C=O, 2° amide), 1509 (C=C, styryl double bond), 1223 (C-O, aryl ether or phenol ether) และ 1053 (C-O)

จากข้อมูล UV แสดงแถบการดูดกลืนรังสี UV ซึ่งเป็นของ styrylamine moiety ใน 13-membered ring system cyclopeptide alkaloid เช่นเดียวกับสารประกอบ 4 และสารประกอบ 5 ที่ $\lambda_{\max}^{EtOH}$ nm (log ϵ): 211 (4.5), 268 (4.0) และ 319 (3.9)

ข้อมูลของ 1H - และ ^{13}C -NMR ของสารประกอบ 6 (ตาราง 15) การกำหนดตำแหน่งของ 1H -และ ^{13}C -NMR chemical shift กระทำโดยใช้เทคนิค 1D-และ 2D-NMR จาก 1H NMR spectrum (ภาพประกอบ 41, 42 และ 43) และ ^{13}C NMR spectrum (ภาพประกอบ 44 และ 45) พบสัญญาณของหมู่ต่าง ๆ คือ

1. หมู่ *N*-methylisoleucine ที่ δ_H 2.83 (1H, d, J = 4.7 Hz, H-31), δ_C 69.8 (C-31); δ_H 1.43-1.95 (1H, 1H, m, H-32), δ_C 24.7 (C-32); δ_H 1.15 (2H, m, H-33), δ_C 25.4 (C-33); δ_H 0.85-0.93 (6H, m, 34-Me, 35-Me), δ_C 15.8 (C-34) และ 23.1 (C-35); δ_H 2.37 (3H, s, 37-Me), δ_C 36.1 (C-37) และ δ_C 173.5 (C-30)

2. หมู่ isoleucine ที่ δ_H 4.77 (1H, dd, J = 15.5, 7.4 Hz, H-24), δ_C 47.9 (C-24); δ_H 1.43-1.48 (3H, m, H-25, H-26), δ_C 38.3 (C-25) และ 40.9 (C-26); δ_H 0.85-0.93 (6H, m,

27-Me, 28-Me), δ_C 11.9 (C-27) และ 21.9 (C-28); δ_H 7.50 (1H, d, J = 8.6 Hz, 29, D₂O exchanged) และ δ_C 171.3 (C-23)

3. หมู่ hydroxyproline ที่ δ_H 4.38 (1H, d, J = 5.8 Hz, H-8), δ_C 62.8 (C-8); δ_H 5.24 (1H, m, H-9), δ_C 78.6 (C-9); δ_H 2.30 และ 2.45 (2H, m, H-20), δ_C 32.7 (C-20); δ_H 3.61 (1H, m, H-21a) และ 4.25 (1H, m, H-21b), δ_C 45.5 (C-21) และ δ_C 171.6 (C-7)

4. หมู่ proline ที่ δ_H 4.52 (1H, dd, J = 9.1, 3.9 Hz, H-5), δ_C 62.0 (C-5); δ_H 1.85-2.25 (2H, m, H-17), δ_C 29.1 (C-17); δ_H 1.43-1.95 (2H, m, H-18), δ_C 24.9 (C-18); δ_H 3.28 (1H, m, H-19a) และ 4.25 (1H, m, H-19b), δ_C 47.9 (C-19) และ δ_C 167.8 (C-4)

5. หมู่ styrylamine ที่ δ_H 5.93 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-1), δ_C 106.7 (C-1); δ_H 6.87-6.94 (1H, m, H-2), δ_C 121.6 (C-2); δ_H 8.33 (1H, d, J = 11.5 Hz, H-3, D₂O exchanged); δ_H 6.78 (1H, br s, H-12), δ_C 110.7 (C-12); δ_H 6.87-6.94 (2H, m, H-15 และ H-16), δ_C 113.8 (C-15) และ δ_C 117.0 (C-16); δ_C 151.9 (C-11); δ_C 124.0 (C-13) และ δ_C 151.3 (C-14)

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูล NMR ของสารประกอบ 6 กับสารประกอบ 4 (ตาราง 29) พบว่ามีลักษณะคล้ายกัน ต่างกันตรงที่สารประกอบ 6 แสดงสัญญาณของหมู่ *N*-methyl หนึ่งหมู่ที่ δ_H 2.37 (3H, s, 37-Me) ส่วนสารประกอบ 4 แสดงสัญญาณของหมู่ *N*-methyl สองหมู่ที่ δ_H 2.25 (6H, s, 37-Me และ 38-Me) และเมื่อเปรียบเทียบข้อมูล ¹H NMR ของสารประกอบ 6 กับ zizyphine-B (ตาราง 28) พบว่าคล้ายคลึงกัน

ข้อมูล HMBC spectrum ของสารประกอบ 6 (ภาพประกอบ 16) พบความสัมพันธ์ต่าง ๆ ที่สำคัญดังนี้

1. พบความสัมพันธ์ระหว่าง olefinic proton H-1 (δ_H 5.93) กับ C-2 (δ_C 121.6) และ C-13 (δ_C 124.0)

2. พบความสัมพันธ์ระหว่าง H-3 (δ_H 8.33) ของ styrylamine กับหมู่ carbonyl C-4 (δ_C 167.8) ของ proline

3. พบความสัมพันธ์ของ H-5 (δ_H 4.52) กับ C-4 (δ_C 167.8) และ C-7 (δ_C 171.6)

4. พบความสัมพันธ์ระหว่าง H-8 (δ_H 4.38) กับ C-7 (δ_C 171.6) และ C-9 (δ_C 78.6)

5. พบความสัมพันธ์ระหว่าง H-9 (δ_H 5.24) ของ β -oxyproline กับ C-11 (δ_C 151.9)

ของ styrylamine

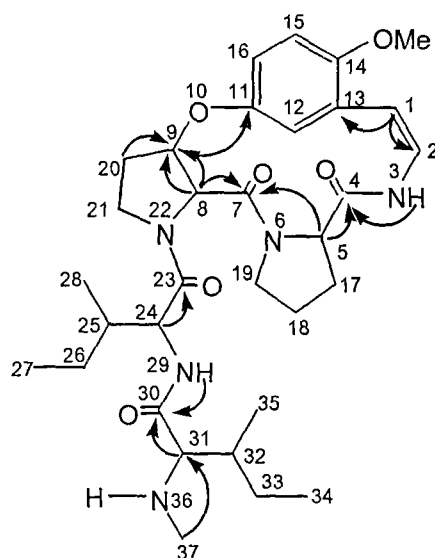
ข้อมูลข้างต้นยืนยันถึงส่วนของ 13-membered ring system

6. พบความสัมพันธ์ระหว่าง H-20 (δ_H 2.30 และ 2.45) กับ C-9 (δ_C 78.6)

7. พบความสัมพันธ์ของ H-24 (δ_H 4.77) กับ C-23 (δ_C 171.3)

8. พบความสัมพันธ์ระหว่างหมู่ carbonyl C-30 (δ_c 173.5) ของ *N*-methyloisoleucine กับ H-29 (δ_H 7.50) และ H-31 (δ_H 2.83)

9. พบความสัมพันธ์ระหว่าง δ_H 2.37 (37-Me) กับ C-31 (δ_c 69.8)

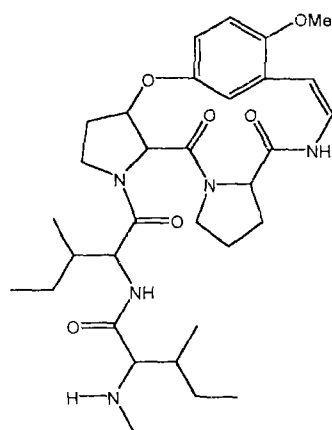


ภาพประกอบ 16 ความสัมพันธ์ HMBC ที่สำคัญของสารประกอบ 6

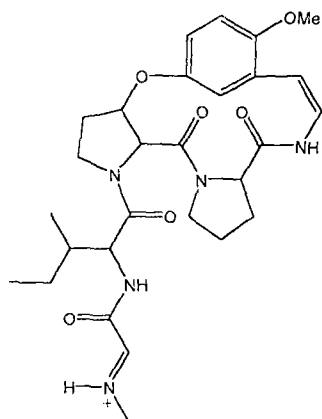
EIMS (positive ion mode) พบ m/z 598 $[M+H]^+$ ตรงกับสูตรโมเลกุล $C_{32}H_{47}N_5O_6$ และพบ fragment ion m/z 540, 385, 358, 216, 193 และ 100 (base peak) ดังแสดงในภาพประกอบ 18 ข้อมูลของ base peak ที่ m/z 100 สอดคล้องกับหมู่ basic terminal amino acid ของ zizyphine-B ซึ่งเป็น *N*-methyloisoleucine

สารประกอบ 6 มีค่า $[\alpha]_D^{31} -380.20^\circ$ (c, 0.1515, $CHCl_3$) $\{[\alpha]_D^{24} -457^\circ$ (c, 1.0, $CHCl_3$) (Menard, et al. 1963 : 1801-1811)} และข้อมูล UV λ_{max}^{EtOH} (log ϵ) ของสารประกอบ 6 พบแถบการดูดกลืนแสงที่ 211 (4.5) 268 (4.0) และ 319 (3.9) $[UV \lambda_{max}^{EtOH}$ (log ϵ) : 267 (4.00) และ 320 (3.88) (Gournelis, Laskaris and Verpoorte. 1998 : 47)]

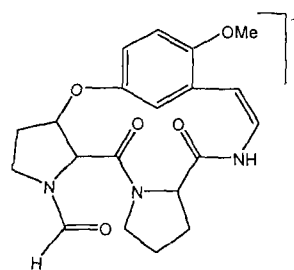
จากข้อมูลข้างต้นจึงสรุปได้ว่าสารประกอบ 6 คือ zizyphine-B หรือ zizyphinine หรือ *N*-desmethyl-zizyphine-A



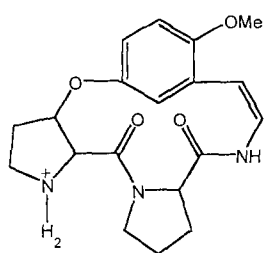
m/z 597 (1)



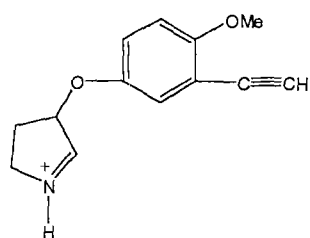
m/z 540 (1)



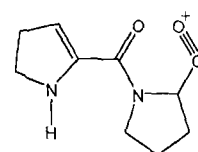
m/z 385 (3)



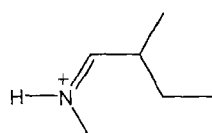
m/z 358 (6)



m/z 216 (2)



m/z 193 (2)



m/z 100 (100)

ภาพประกอบ 17 Mass fragmentation ion ของสารประกอบ 6

ตาราง 28 ข้อมูล ^1H NMR ^{13}C NMR DEPT 90 และ DEPT 135 ของสารประกอบ 6
และข้อมูล ^1H NMR ของ zizyphine-B

ตำแหน่ง	zizyphine-B ^a		สารประกอบ 6 ^b		
	δ_{H}	δ_{C}	DEPT 90	DEPT 135	δ_{H}
1	5.95 (1H, d, $J = 9$ Hz)	106.7	106.7	106.7	5.93 (1H, d, $J = 8.8$ Hz)
2	7.23 (1H, s)	121.6	121.6	121.6	6.87-6.94 (1H, m)
3		-			8.33 (1H, d, $J = 11.5$ Hz)
4		167.8			
5		62.0	62.0	62.0	4.52 (1H, dd, $J = 9.1, 3.9$ Hz)
7		171.6 ^c			
8		62.8	62.8	62.8	4.38 (1H, d, $J = 5.8$ Hz)
9		78.6	78.6	78.6	5.24 (1H, m)
11		151.9 ^d			
12	6.77 (1H, s)	110.7	110.7	110.7	6.78 (1H, br s)
13		124.0			
14		151.3 ^d			
14-OMe	3.80 (3H, s)	55.9		55.9	3.77 (3H, s)
15	6.95 (1H, s)	113.8	113.8	113.8	6.87-6.94 (1H, m)
16	6.85 (1H, s)	117.0	117.0	117.0	6.87-6.94 (1H, m)
17		29.1		29.1	1.85-2.25 (2H, m)
18		24.9		24.9	1.43-1.95 (2H, m)
19		47.9		47.9	3.28 (1H, m), 4.25 (1H, m)
20		32.7		32.7	2.30 (1H, m), 2.45 (1H, m)
21		45.5		45.5	3.61 (1H, m), 4.25 (1H, m)
23		171.3 ^c			
24		47.9	47.9	47.9	4.77 (1H, dd, $J = 15.5, 7.4$ Hz)
25		24.6	24.6	24.6	1.43-1.48 (1H, m)
26		40.9		40.9	1.43-1.48 (2H, m)
27		11.9		11.9	0.85-0.93 (3H, m)
28		21.9		21.9	0.85-0.93 (3H, m)
29	7.62 (1H, d)	-			7.50 (1H, d, $J = 8.6$ Hz)
30		173.5			
31		69.8	69.8	69.8	2.83 (1H, d, $J = 4.7$ Hz)
32		38.2	38.2	38.2	1.43-1.95 (1H, m)
33		25.4		25.4	1.15 (2H, m)
34		15.8		15.8	0.85-0.93 (3H, m)
35		23.1		23.1	0.85-0.93 (3H, m)
36	7.23 (1H, s)	-			6.87-6.94 (1H, m)
37	2.40 (3H, s)	36.1		36.1	2.37 (3H, s)

^a บันทึกใน CDCl_3 , 60 MHz (Menard, et al. 1963 : 1801-1811), ^b บันทึกใน CDCl_3 , ^{c, d} ภายใต้เครื่องหมายเดียวกันสัญญาณอาจเปลี่ยนที่กันได้

ตาราง 29 เปรียบเทียบข้อมูล ^1H - และ ^{13}C -NMR ของสารประกอบ **4** และสารประกอบ **6** และข้อมูล ^1H -NMR ของ zizyphine-B

ตำแหน่ง	zizyphine-B ^a		สารประกอบ 6 ^b		สารประกอบ 4 ^c	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	
1	5.95 (1H, d, $J = 9$ Hz)	106.7	5.93 (1H, d, $J = 8.8$ Hz)	107.0	5.91 (1H, d, $J = 8.8$ Hz)	
2	7.23 (1H, s)	121.6	6.87-6.94 (1H, m)	121.6	ca 6.87 (1H, m)	
3		-	8.33 (1H, d, $J = 11.5$ Hz)	-	8.31 (1H, d, $J = 11.5$ Hz)	
4		167.8	-	167.8		
5		62.0	4.52 (1H, dd, $J = 9.1, 3.9$ Hz)	62.0	4.50 (1H, dd, $J = 9.0, 3.6$ Hz)	
7	-	171.6 ^c	-	171.2		
8		62.8	4.38 (1H, d, $J = 5.8$ Hz)	62.7	4.35 (1H, d, $J = 5.6$ Hz)	
9		78.6	5.24 (1H, m)	78.5	5.21 (1H, m)	
11	-	151.9 ^d	-	150.8		
12	6.77 (1H, s)	110.7	6.78 (1H, br s)	110.7	6.76 (1H, s)	
13	-	124.0	-	124.0		
14	-	151.3 ^d	-	151.2		
14-OMe	3.80 (3H, s)	55.9	3.77 (3H, s)	55.9	3.75 (3H, s)	
15	6.95 (1H, s)	113.8	6.87-6.94 (1H, m)	113.8	ca 6.81 (1H, m)	
16	6.85 (1H, s)	117.0	6.87-6.94 (1H, m)	116.9	ca 6.81 (1H, m)	
17		29.1	1.85-2.25 (2H, m)	29.0	1.95 (1H, m), 2.18 (1H, m)	
18		24.9	1.43-1.95 (2H, m)	24.9	1.40-1.95 (2H, m)	
19		47.9	3.28 (1H, m), 4.25 (1H, m)	47.8	3.25 (1H, m), 4.21 (1H, br t)	
20		32.7	2.30 (1H, m), 2.45 (1H, m)	32.7	2.32 (1H, m), 2.42 (1H, m)	
21		45.5	3.61 (1H, m), 4.25 (1H, m)	45.3	3.57 (1H, m), 4.21 (1H, br t)	
23		171.3 ^c	-	171.6		
24		47.9	4.77 (1H, dd, $J = 15.5, 7.4$ Hz)	47.9	4.73 (1H, dd, $J = 14.6, 8.0$ Hz)	
25		24.6	1.43-1.48 (1H, m)	24.6	1.92 (1H, m)	
26		40.9	1.43-1.48 (2H, m)	40.6	1.40-1.60 (m)	
27		11.9	0.85-0.93 (3H, m)	11.9	0.80-0.95 (3H, m)	
28		21.9	0.85-0.93 (3H, m)	21.6	0.80-0.95 (3H, m)	
29	7.62 (1H, d)	-	7.50 (1H, d, $J = 8.6$ Hz)	-	ca 6.95 (1H, br s)	
30		173.5	-	171.6		
31		69.8	2.83 (1H, d, $J = 4.7$ Hz)	74.0	2.62 (1H, br s)	
32		38.2	1.43-1.95 (1H, m)	34.3	1.77 (m)	
33		25.4	1.15 (2H, m)	26.8	1.16 (1H, m), 1.55 (1H, m)	
34		15.8	0.85-0.93 (3H, m)	14.6	0.80-0.95 (3H, m)	
35		23.1	0.85-0.93 (3H, m)	23.1	0.80-0.95 (3H, m)	
36	7.23 (1H, s)	-	6.87-6.94 (1H, m)			
37	2.40 (3H, s)	36.1	2.37 (3H, s)	43.0	2.25 (6H, s)	
38	-	-	-	43.0	2.25 (3H, s)	

^a บันทึกใน CDCl_3 , 60 MHz (Menard, et al. 1963 : 1801-1811), ^b บันทึกใน CDCl_3 , ^{c, d} ภายใต้อุปกรณ์เดียวกันสัญญาณอาจเปลี่ยนที่กันได้

ตาราง 30 ข้อมูล ^1H NMR COSY HMQC และ HMBC ของสารประกอบ 6

ตำแหน่ง	^1H NMR	COSY ^a	HMQC ^b	HMBC ^c
1	5.93 d		C-1	C-2 C-12 C-13 C-14
2	6.87-6.94 m	H-1	C-2	C-13 C-1 C-4
3	8.33 d	H-2		C-1 C-4
5	4.52 dd	H-17	C-5	C-4 C-7 C-17 C-18 C-19
8	4.38 d	H-9	C-8	C-7 C-9 C-21
9	5.24 m	H-20	C-9	C-7 C-20
12	6.78 br s		C-12	C-1 C-11 C-13 C-16
14-OMe	3.77 s		C-14OMe	C-14
15	6.86 d		C-15	C-11 C-13 C-14 C-16
16	6.79 d		C-16	C-11 C-12 C-14
17	1.85-2.25 m		C-17	C-4 C-5 C-18 C-19
18	1.43-1.95 m	H-19	C-18	C-5
19	3.28 m, 4.25 m	H-19	C-19	C-5 C-7 C-17 C-18
20	2.30 m, 2.45 m	H-21	C-20	C-8 C-9
21	3.61 m, 4.25 m	H-19,H-21	C-21	C-8 C-9 C-20
24	4.77 dd	H-25	C-24	C-23 C-26 C-30
25	1.43-1.48 m	H-28		C-23 C-24 C-27 C-28
26	1.43-1.48 m			C-23 C-24 C-25 C-27 C-28
27	0.85-0.93 m			C-25 C-26
28	0.85-0.93 m			C-25 C-26
29	7.50 d	H-24		C-30
31	2.83 d	H-32	C-31	C-30 C-32 C-33 C-37
32	1.43-1.95 m	H-35	C-32	C-33
33	1.15 m	H-34	C-33	C-31 C-34
34	0.85-0.93 m		C-34	C-32 C-33
35	0.85-0.93 m		C-35	C-31 C-32 C-33
37	2.37 (3H, s)		C-37	C-31

^a proton-proton correlation

^b 1-bond heteronuclear ^1H - ^{13}C correlation

^c long range heteronuclear ^1H - ^{13}C correlation

ข้อเสนอแนะ

ควรศึกษาการแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนอื่น ๆ ของเล็บเหยี่ยวต่อไป ซึ่งอาจจะพบสารชนิดอื่น ๆ ที่เป็นสารใหม่และมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีเหมาะสมที่จะพัฒนาให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคได้

บรรณานุกรม

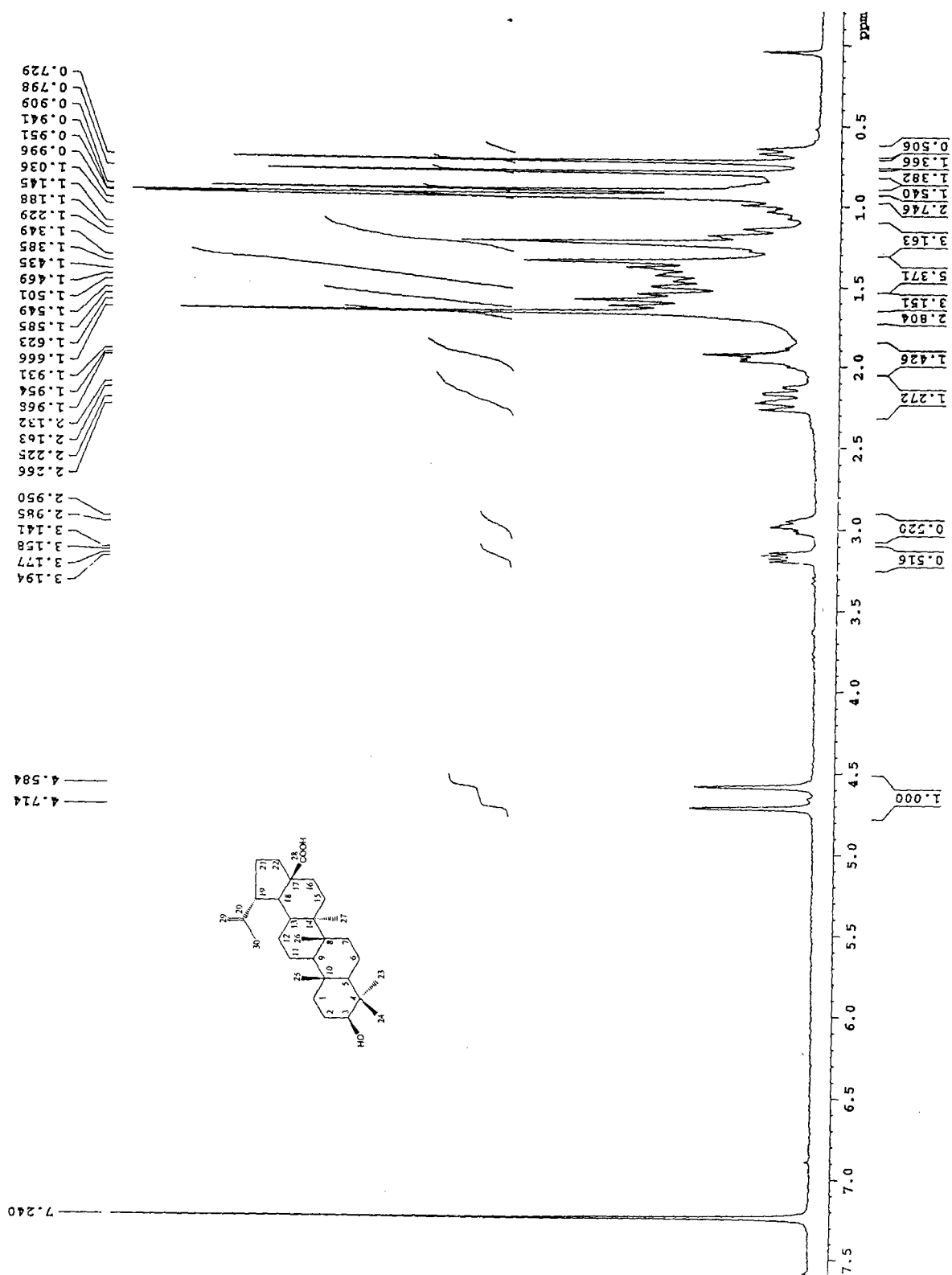
บรรณานุกรม

- เต็ม สมิตินันท์. (2544). ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2544. กรุงเทพฯ : สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้.
- นันทวัน บุญยะประภัศร และอรนุช โชคชัยเจริญพร. (2542). สมุนไพรไม้พุ่มบ้าน (3). กรุงเทพฯ : ประชาชน.
- _____. (2543). สมุนไพรไม้พุ่มบ้าน (4). กรุงเทพฯ : ประชาชน.
- วงศ์สฤติย์ ฉั่วกุล. (2539). สมุนไพรพุ่มบ้านล้านนา. กรุงเทพฯ : อัมรินทร์พรินติ้ง แอนด์ พับลิชชิ่ง.
- วงศ์สฤติย์ ฉั่วกุล และฉวีวรรณ ใจแก้ว. (2541). "สมุนไพรพุ่มบ้านจังหวัดอุบลราชธานี (3)," *วารสารสมุนไพร*. 5(2) : 28-56.
- Bhattacharyya, B. & Johri, B.M. (1998). *Flowering Plant : Taxonomy and Phylogeny*. New Delhi: Narosa Publishing House.
- Birch, A. J., Ritchie, E. and Speake, R. N. (1960). "The Structure of Alphonitoin," *J. Chem. Soc.* 1960 : 3593-3599.
- Boyer, J. P. et al. (1958). "Extractives of Australian Timbers II. Emmolic Acid, A New Triterpene Acid from *Emmenospermum alphonitonioides* F. Muell.," *Aust. J. Chem.* 11 : 236-245.
- Bringmann, G. et al. (1997). "Betulinic acid : Isolation from *Triphyophyllum peltatum* and *Ancistrocladus heyneanus*, Antimalarial Activity, and Crystal Structure of Benzyl Ester," *Planta. Med.* 63 : 255-257.
- Cassels, B. K. et al. (1974). "Cyclopeptide Alkaloids of *Zizyphus oenoplia*," *Tetrahedron*. 30 : 2461-2466.
- de Mayo, P. and Starratt, A. N. (1962). "Terpenoids I. The Constitution and Stereochemistry of Ceanothic Acid," *Can. J. Chem.* 40 : 788-794.
- Eade, R. A. et al. (1971). "Extractive of Australian Timbers XI. The Stereochemistry of Ceanothic acid," *Aust. J. Chem.* 24 : 621-632.
- Eade, R. A., Kornis, G. and Simes, J. J. H. (1964). "Extractives of Australian Timbers V. Ceanothic Acid," *Aust. J. Chem.* 17 : 141-153.
- Gournelis, D. C., Laskaris, G. G. and Verpoorte, R. (1998). "Cyclopeptide Alkaloids," In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Vol. 75. Herz, W., et al. 1-179. Austria : Springer-Verlag/Wien.

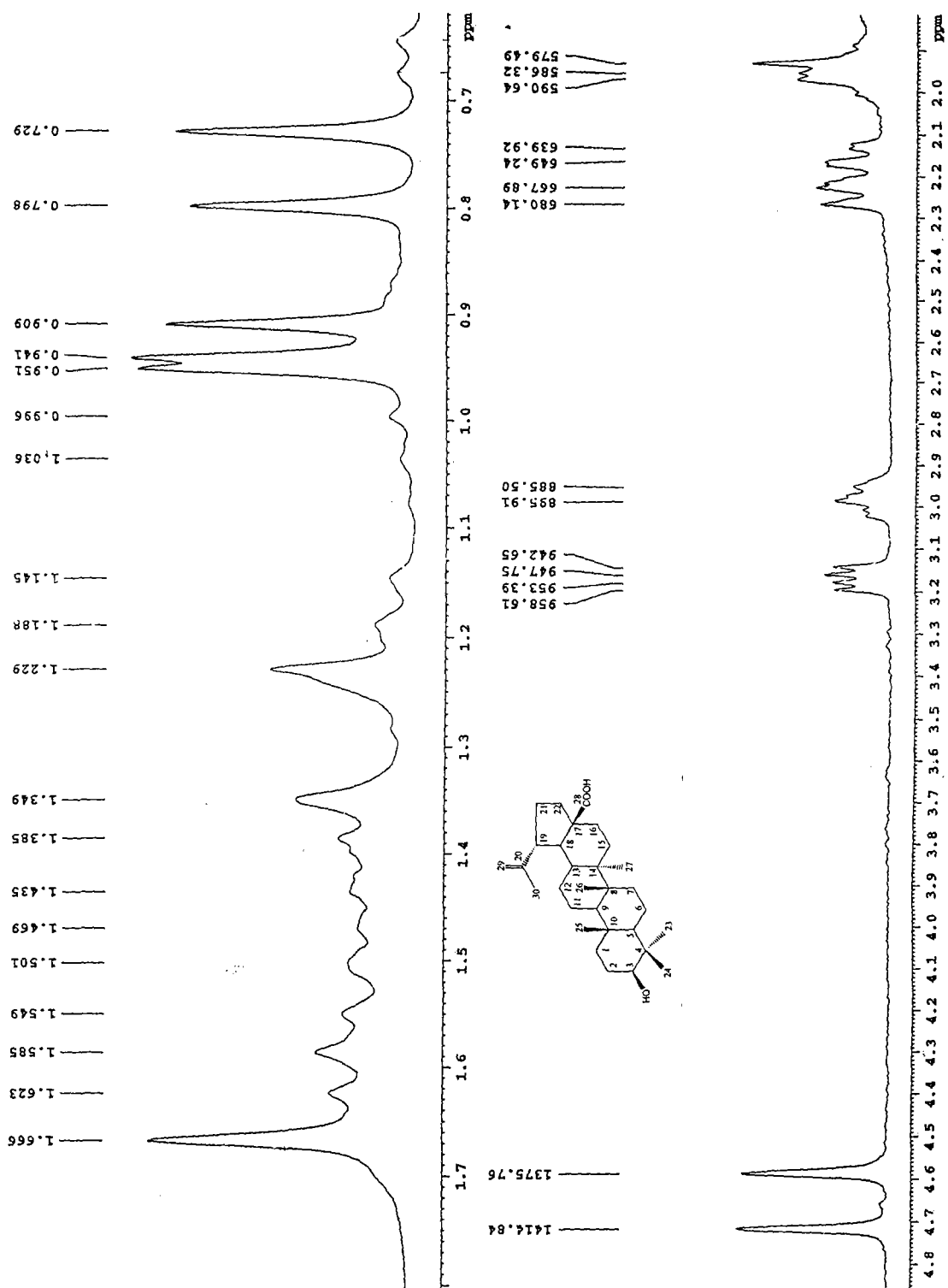
- Guise, G. B., Ritchie, E. and Taylor, W. C. (1962). "Further Constituents of *Alphitonia* Species," *Aust. J. Chem.* 15 : 314-321.
- Harborne, B. J. and Baxter, H. (1993). *Phytochemical Dictionary : A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*. London: Taylor & Francis.
- Hayek, E. W. H. et al. (1989). "A Bicentennial of Betulin," *Phytochemistry*. 28(9) : 2229-2242.
- Hindenlang, D. M. et al. (1980). "The ¹³C-NMR Spectra of Cyclopeptide Alkaloids," *Liebigs Ann. Chem.* 41 : 447-450.
- Ikram, M. and Tomlinson, H. (1976). "Chemical Constituents Of *Zizyphus spina christi*," *Planta. Med.* 29 : 289-290.
- Jork, H. et.al. (1990). *Thin Layer Chromatography Reagent and Detection Method*. Vol.19 VCH-Vehlag. Weinheim.
- Lee, S., Lin, B. and Liu, K. C. (1996). "Three Triterpene Esters from *Zizyphus jujuba*," *Phytochemistry*. 43(4) : 847-851.
- Lee, S., Lin, C. and Liu, K. C. (1992). "Two Triterpenes from *Paliurus ramosissimus*," *J. Nat. Prod.* 55(5) : 602-606.
- Lee, S., Su, W. and Liu, K. C. (1991). "Two New Triterpene Glucosides from *Paliurus ramosissimus*," *J. Nat. Prod.* 54(2) : 615-618.
- Mauya, S. K. et al. (1995). "Constituents of *Zizyphus oenoplia*," *Chemical Abstract*. 123 : 107751f.
- Menard, E. L. et al. (1963). "Über die Inhaltstoffe von *Zizyphus oenoplia* Mill. 1. Mitteilung : Isolierung der inhaltstoffe," *Helv. Chim. Acta.* 46 : 1801-1811.
- Miles, D. H. et al. (1974) "Tumor Inhibitors I: Preliminary Investigation of Antitumor Activity of *Sarracenia flava*," *J. Pharm. Sci.* 63(4) : 613-615.
- Otsuka, H. et al. (1981). "Studies on Anti-inflammatory Agents. V. A New Anti-inflammatory Constituent of *Pyracantha crenulata* Roem.," *Chem. Pharm. Bull.* 29(11) : 3099-3104.
- Recio, M. C. et al. (1995). "Investigations on the Steroidal Anti-Inflammatory Activity of Triterpenoids from *Diospyros leucomelas*," *Planta. Med.* 61 : 9-12.
- Robinson, F. P. and Martel, H. (1970). "Betulinic acid from *Arbutus menziesii*," *Phytochemistry*. 9 : 907-909.
- Roitmann, J. N. and Jurd, L. (1978). "Triterpenoid and Phenolic Constituents of *Colubrina granulosa*," *Phytochemistry*. 17 : 491-494.

- Schmidt, U. et al. (1983). "Total Synthesis of Zizyphine A. Synthesis of Peptide Alkaloids. 8. Amino Acid and Peptides. 40," *J. Org. Chem.* 48 : 2680-2685.
- Schuhly, W. et al. (1999). "New Triterpenoids with Antibacterial Activity from *Zizyphus joazeiro*," *Planta. Med.* 65 : 740-743.
- Sheth, K. et al. (1972). "Tumor-Inhibitory Agent from *Hyptis emoryi* (Labiatae)," *J. Pharm. Sci.* 61(11) : 1819.
- _____. (1973). "Antitumor Agents from *Alnus oregona* (Betulaceae)," *J. Pharm. Sci.* 62(1) : 139-140.
- Sholichin, M. et al. (1980). "¹³C Nuclear Magnetic Resonance of Lupane-Type Triterpenes, Lupeol, Betulin and Betulinic Acid," *Chem. Pharm. Bull.* 23(3) : 1006-1008.
- Tschesche, R. et al. (1974). "Alkaloide aus Rhamnaceen, XXVI Zizyphin-F und -G, neue Cyclopeptidalkaloide aus *Zizyphus oenoplia* Mill.," *Tetrahedron Lett.* 34 : 2941-2944.
- Tschesche, R., & Kaussmann, E.U. (1975). "The Cyclopeptide Alkaloids," In *The Alkaloids-Chemistry and Physiology. Vol. 15.* Manske, R. H. F. 165-205. London : Academic press.
- Tschesche, R., Kaussmann, E. U. and Eckhardt, G. (1973). "Alkaloide Aus Rhamnaceen, XVI Über die Struktur des Zizyphins-A," *Tetrahedron Lett.* 28 : 2577-2580.
- Yagi, K. et al. (1978). "Studies on the Constituents of Zizyphi Fructus. I. Structure of Three New *p*-Coumaroylates of Alphitolic Acid," *Chem. Pharm. Bull.* 26(6) : 1798-1802.

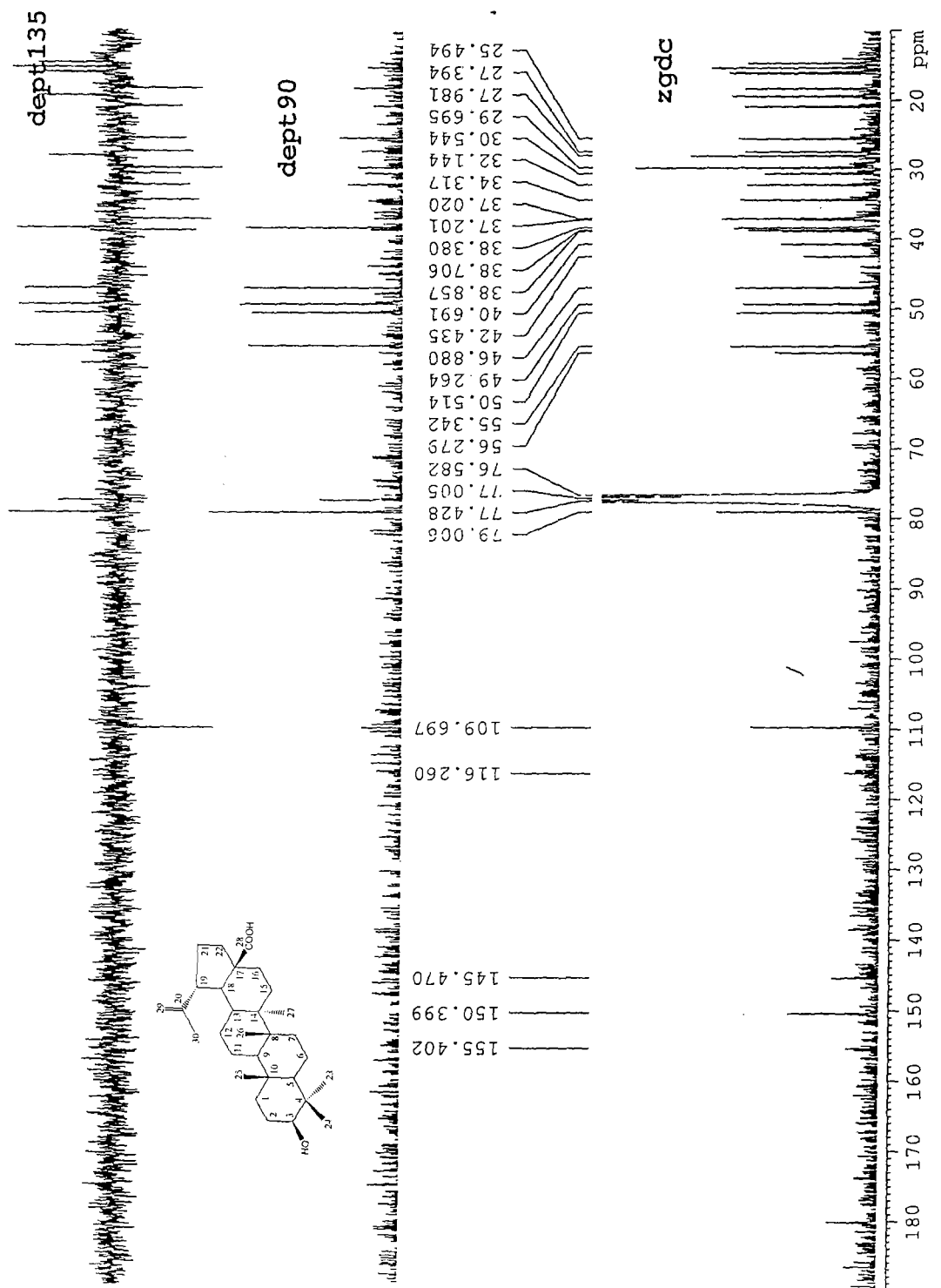
ภาคผนวก



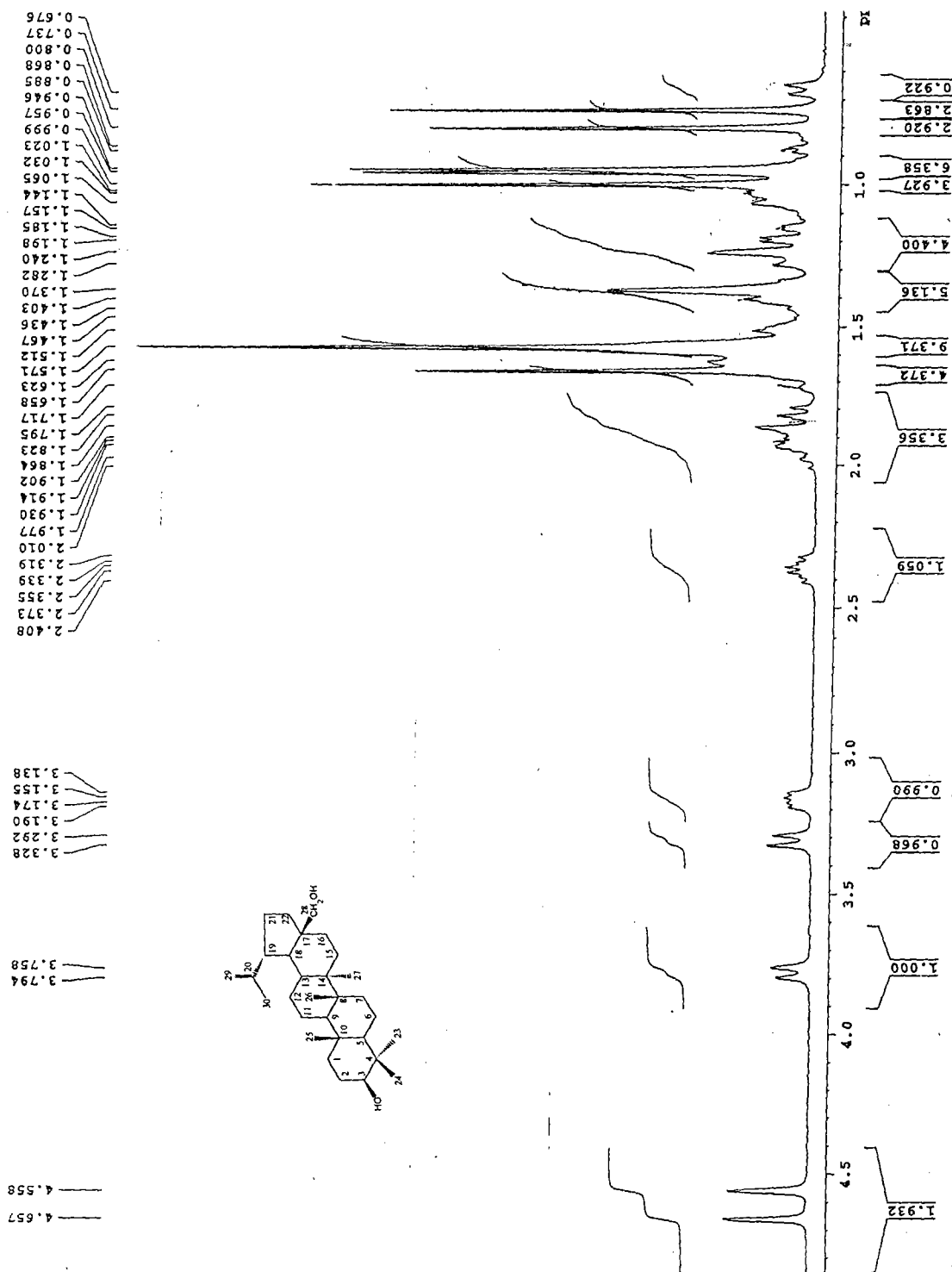
ภาพประกอบ 18 ¹H NMR spectrum (CDCl₃, 300 MHz) ของสารประกอบ 1

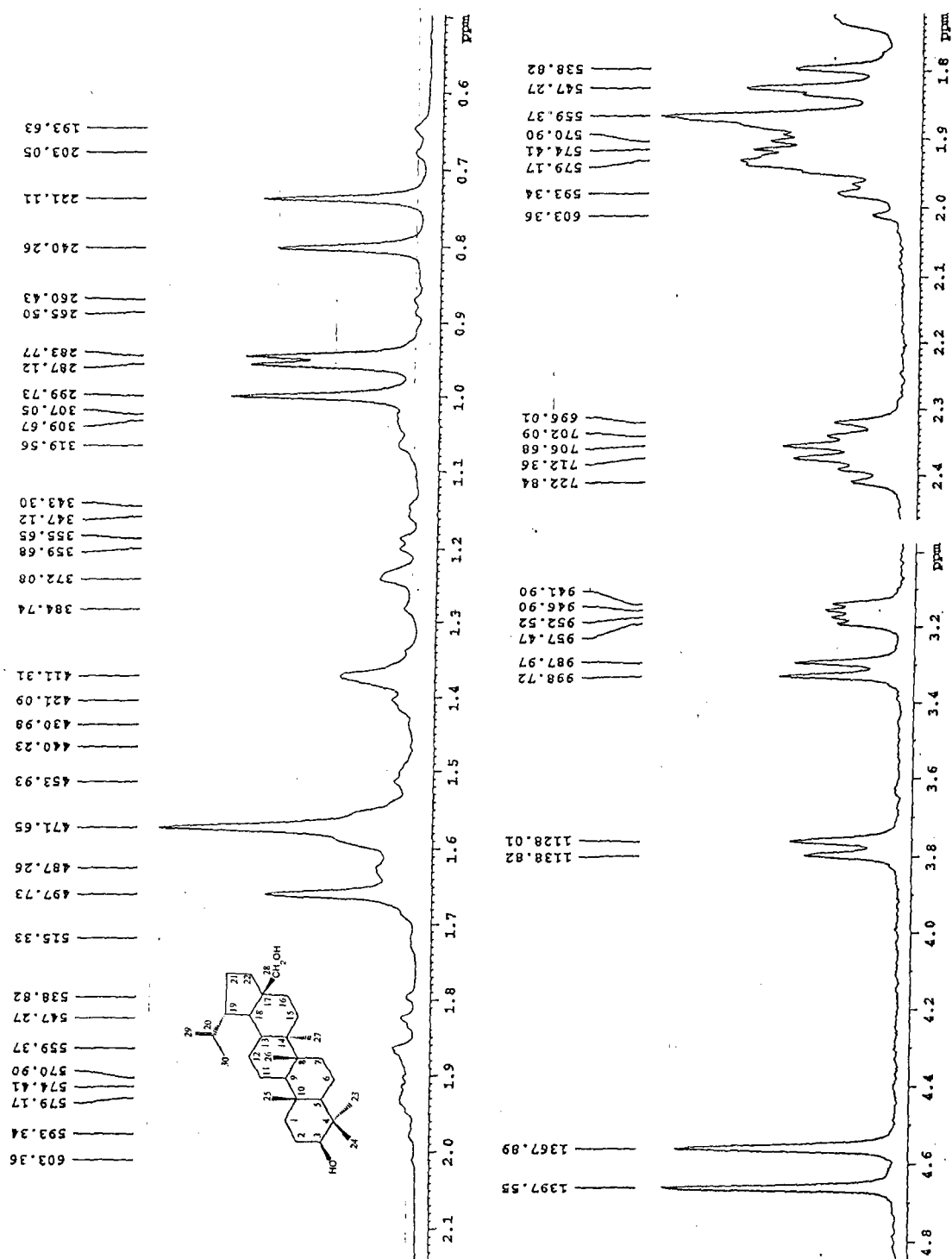


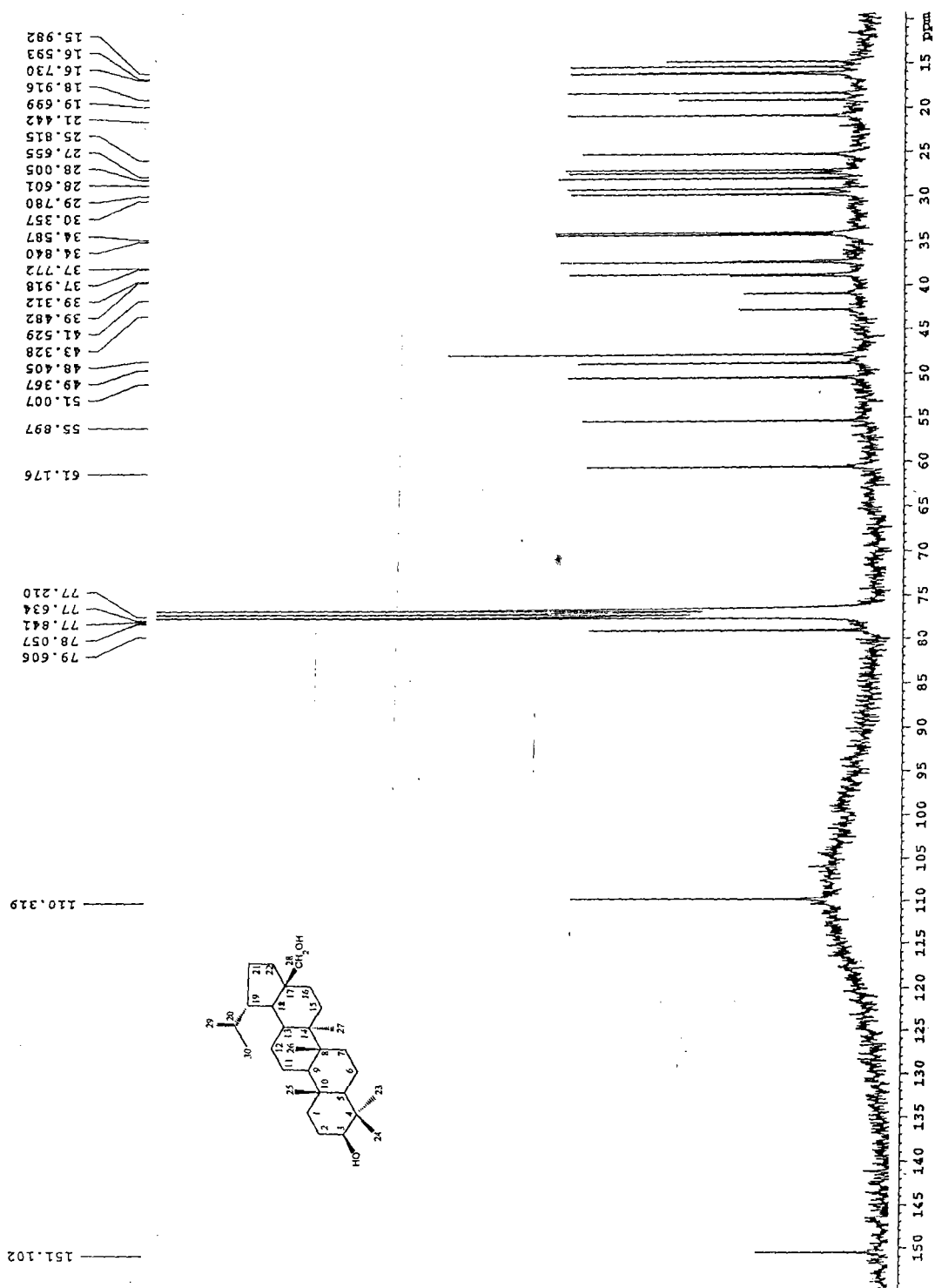
ภาพประกอบ 19 ¹H NMR spectrum (CDCl₃, 300 MHz) ของสารประกอบ 1 (ขยาย)



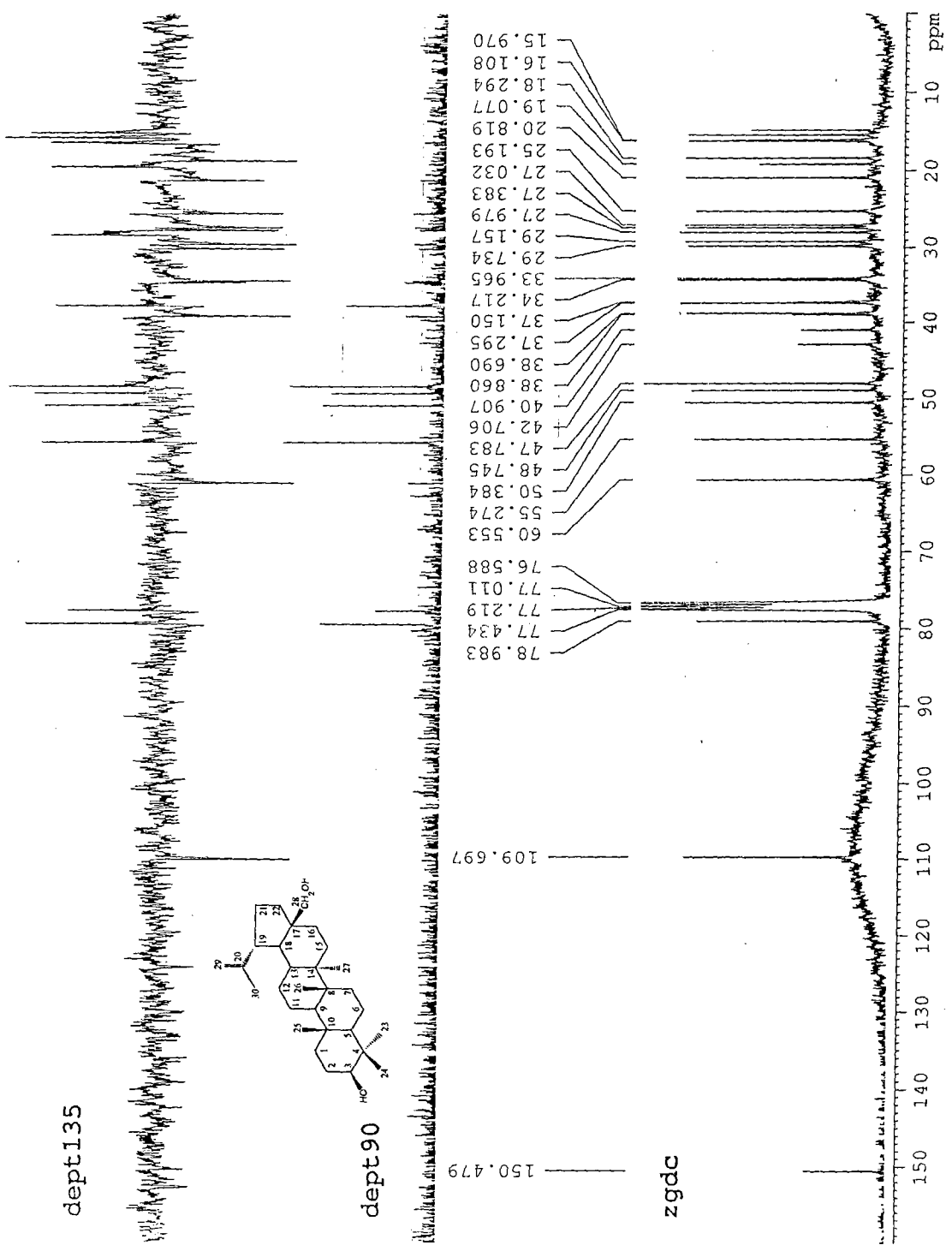
ภาพประกอบ 20 ¹³C NMR DEPT 90 และ 135 spectra (CDCl₃, 75 MHz) ของสารประกอบ 1

ภาพประกอบ 21 ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) ของสารประกอบ 2

ภาพประกอบ 22 ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) ของสารประกอบ 2 (ขยาย)

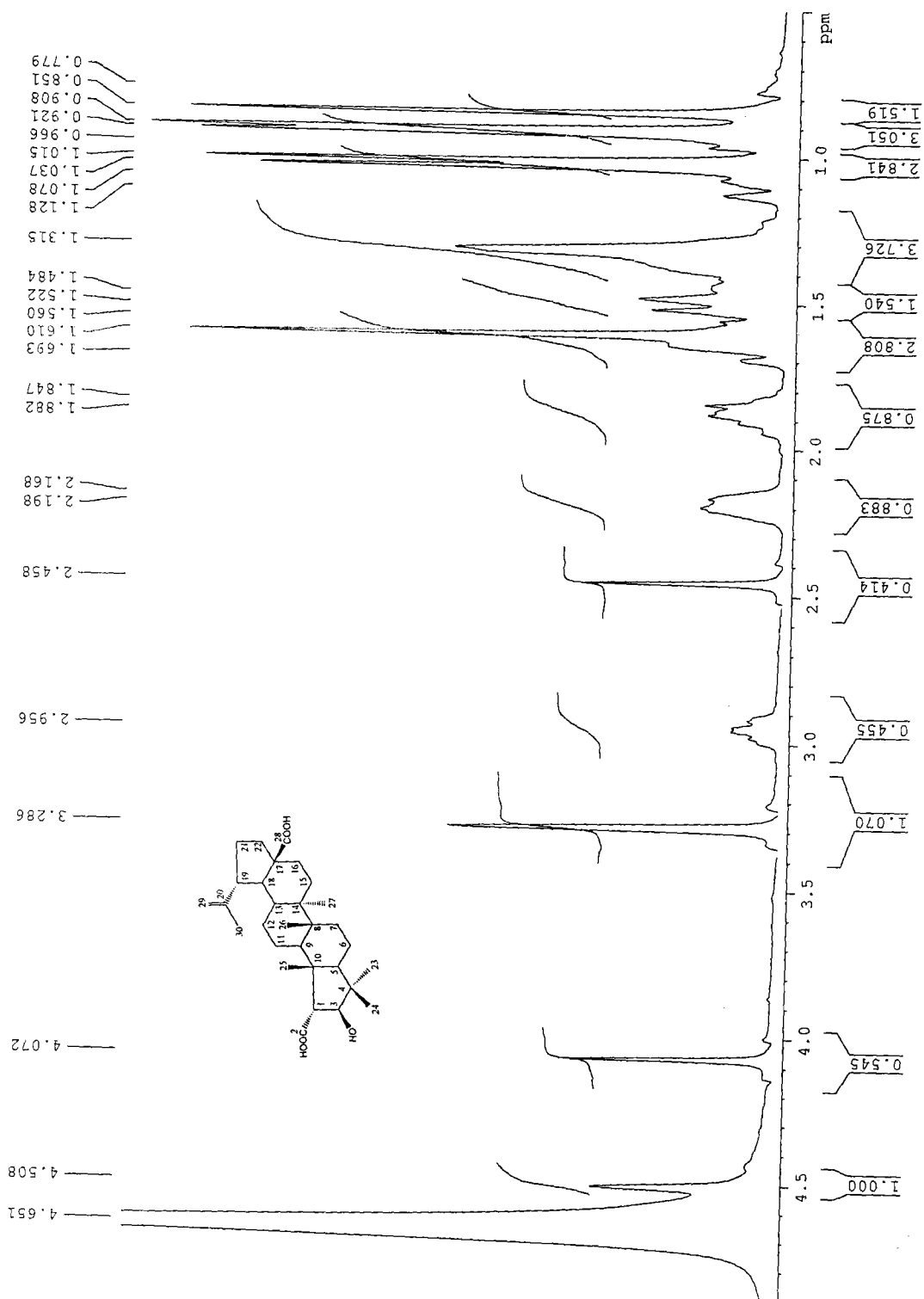


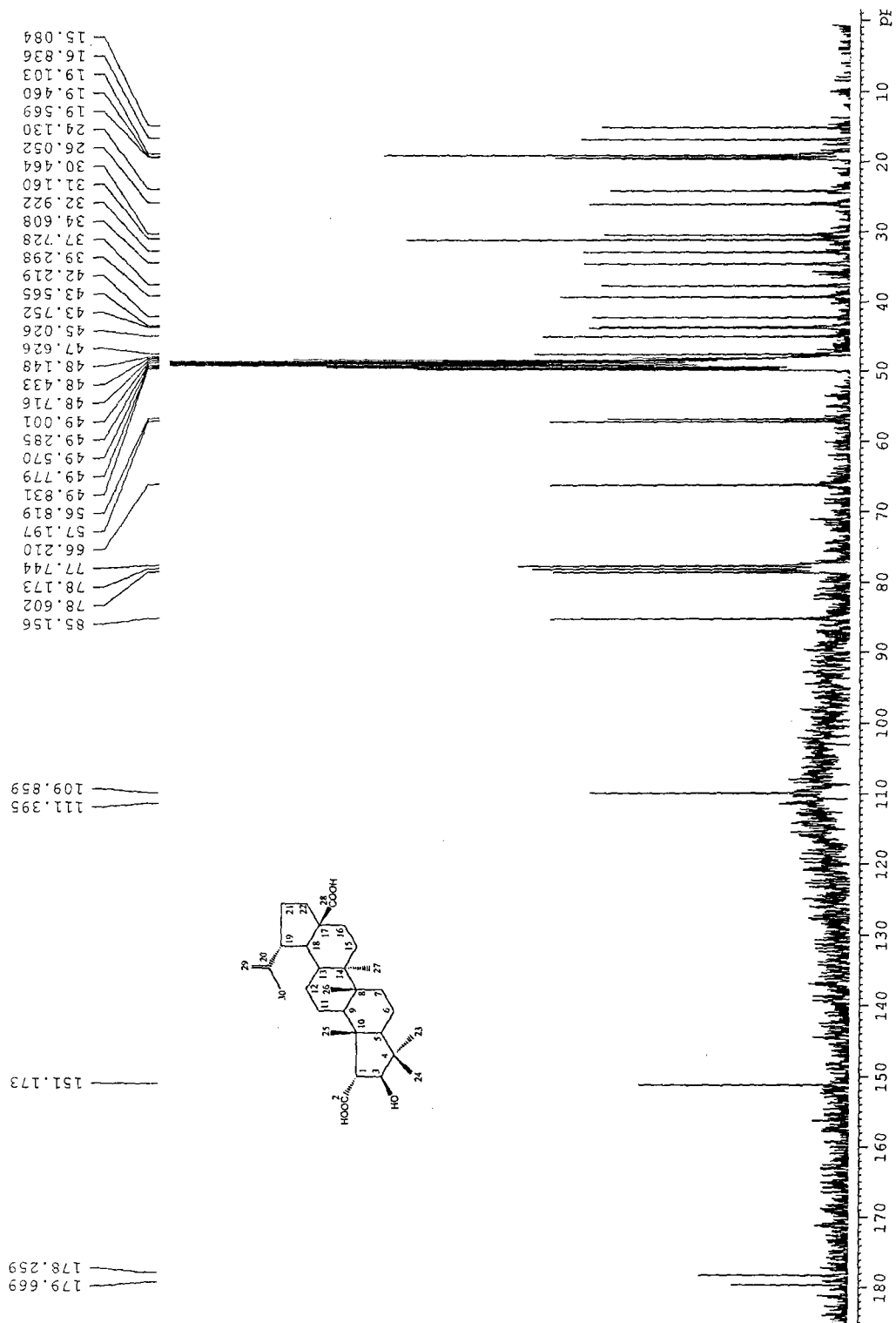
ภาพประกอบ 23 ¹³C NMR spectrum (CDCl₃, 75 MHz) ของสารประกอบ 2



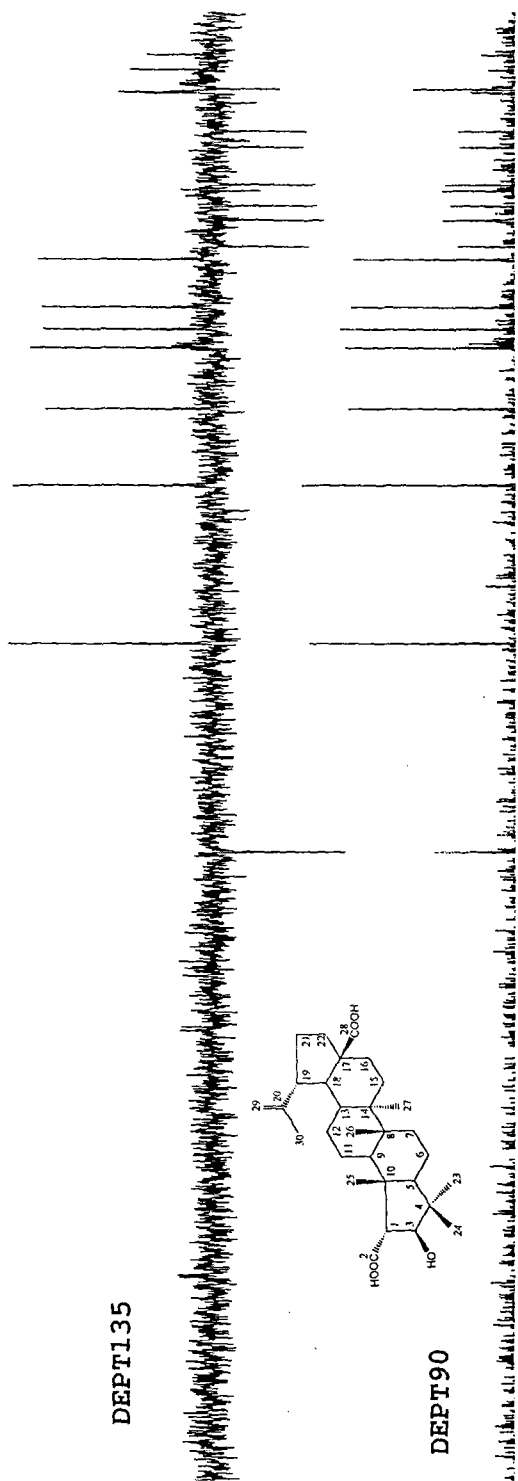
ภาพประกอบ 24 ¹³C NMR DEPT 90 และ 135 spectra (CDCl₃, 75 MHz) ของสารประกอบ 2

ภาพประกอบ 25 ^1H NMR spectrum ($\text{CD}_3\text{OD}+\text{CDCl}_3$, 300 MHz) ของสารประกอบ 3

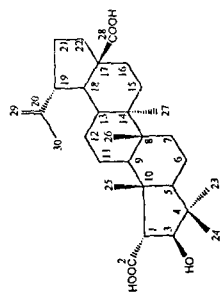




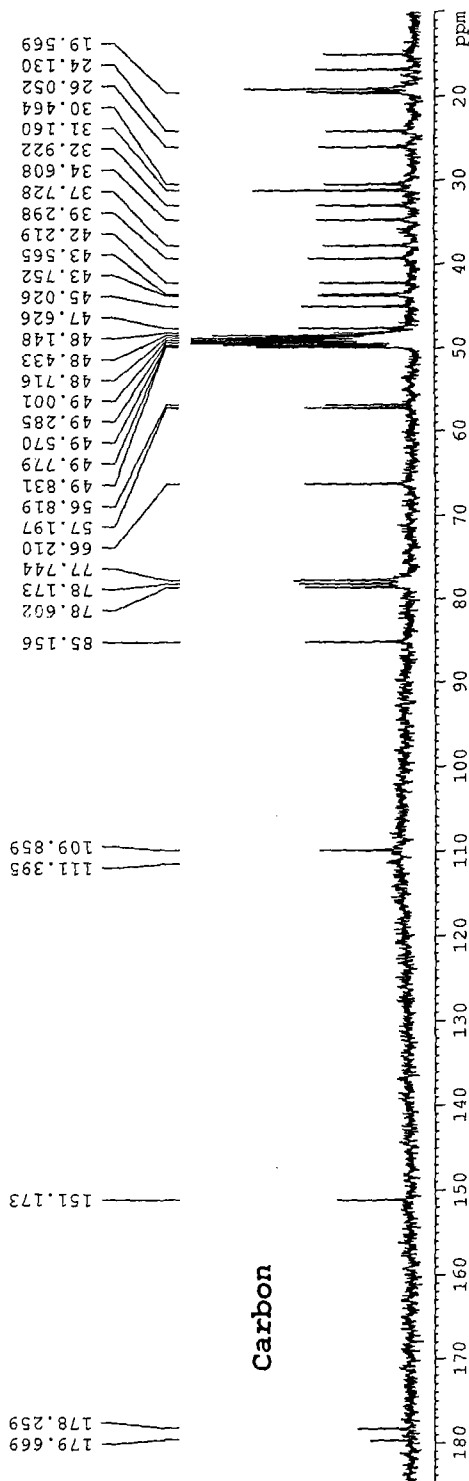
DEPT135



DEPT90

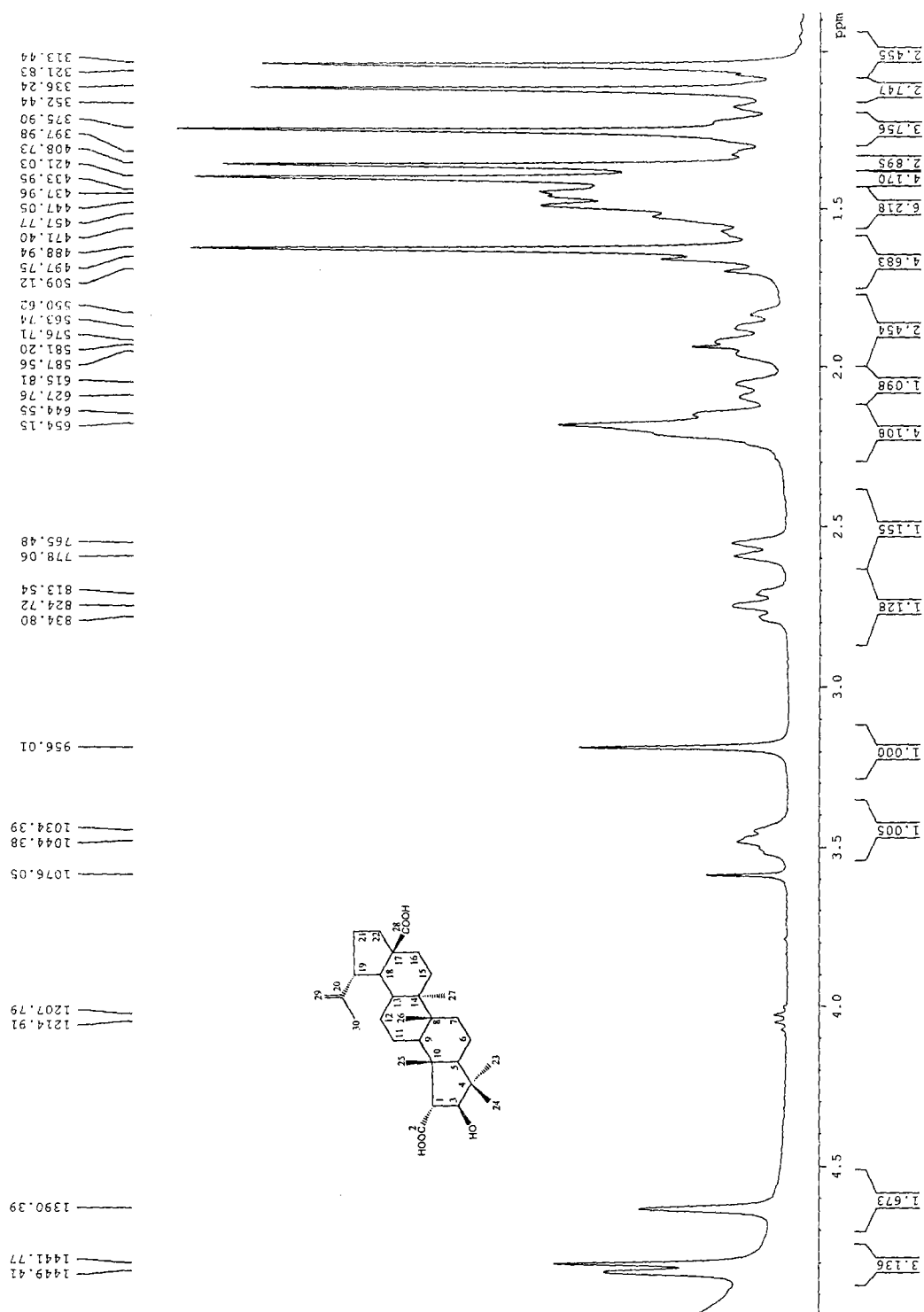


2 ZO(R)-E-89/109-122 (s) 10mg
CD3OD+CDCl3 13CNMR



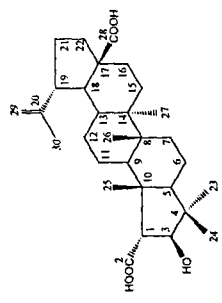
ภาพประกอบ 27 ¹³C NMR DEPT 90 และ 135 spectra (CD₃OD+CDCl₃, 75 MHz) ของสารประกอบ 3

ภาพประกอบ 28 ^1H NMR spectrum ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 300 MHz) ของสารประกอบ 3



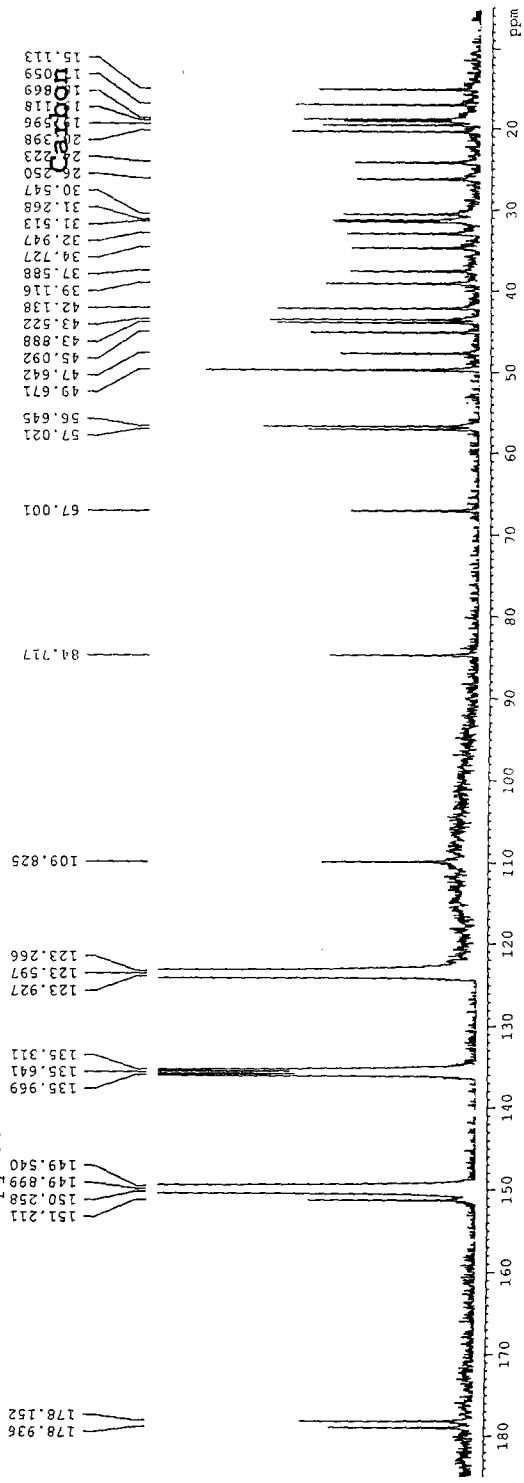
DEPT135

DEPT90



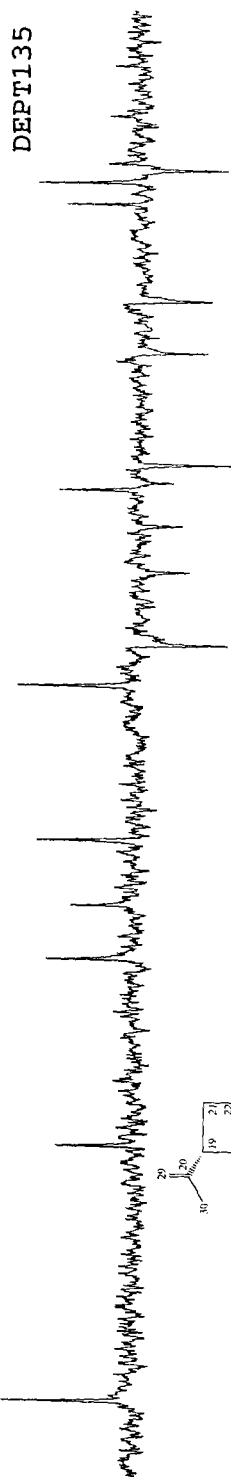
sss264 21 ZO(R)-E-89/109-122 (s) 10mg ¹³CNMR

py-d5

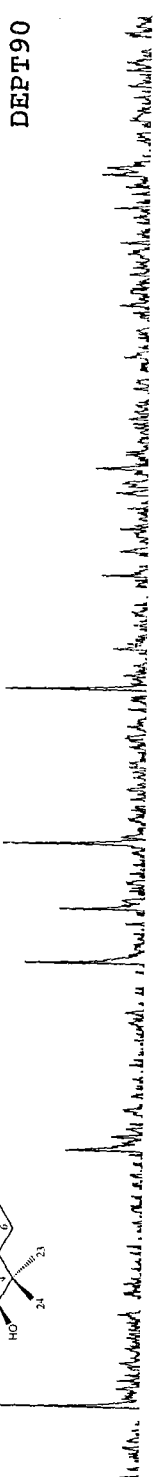


ภาพประกอบ 29 ¹³C NMR DEPT 90 และ 135 spectra (C₅D₅N, 75 MHz) ของสารประกอบ 3

DEPT135

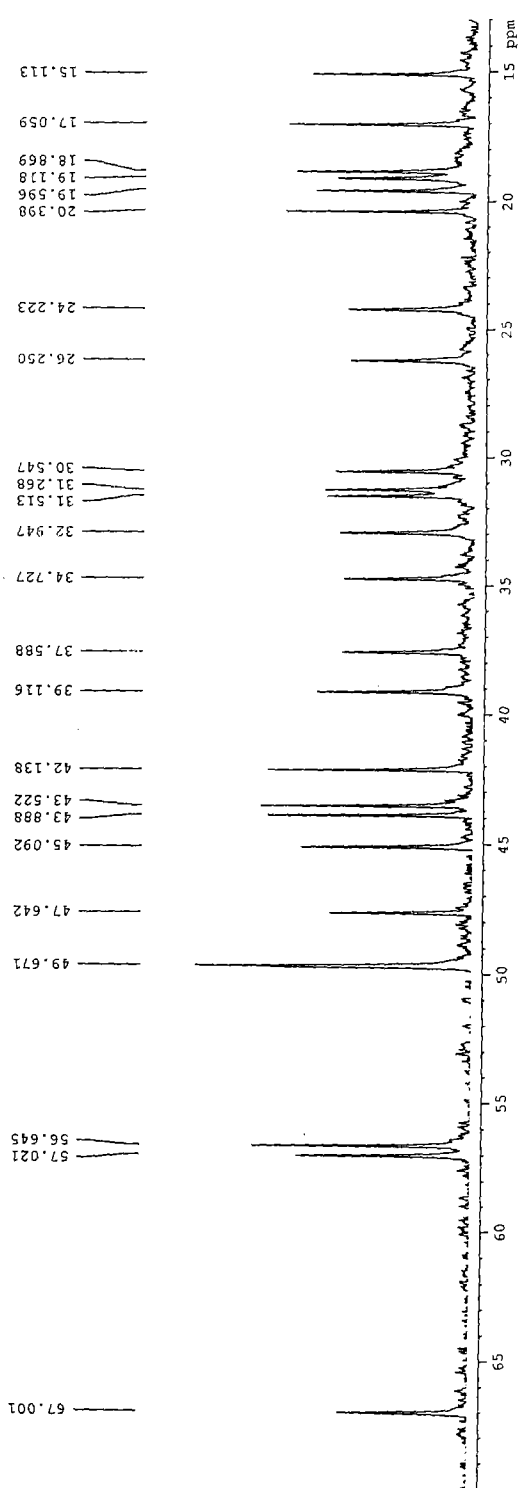


DEPT90

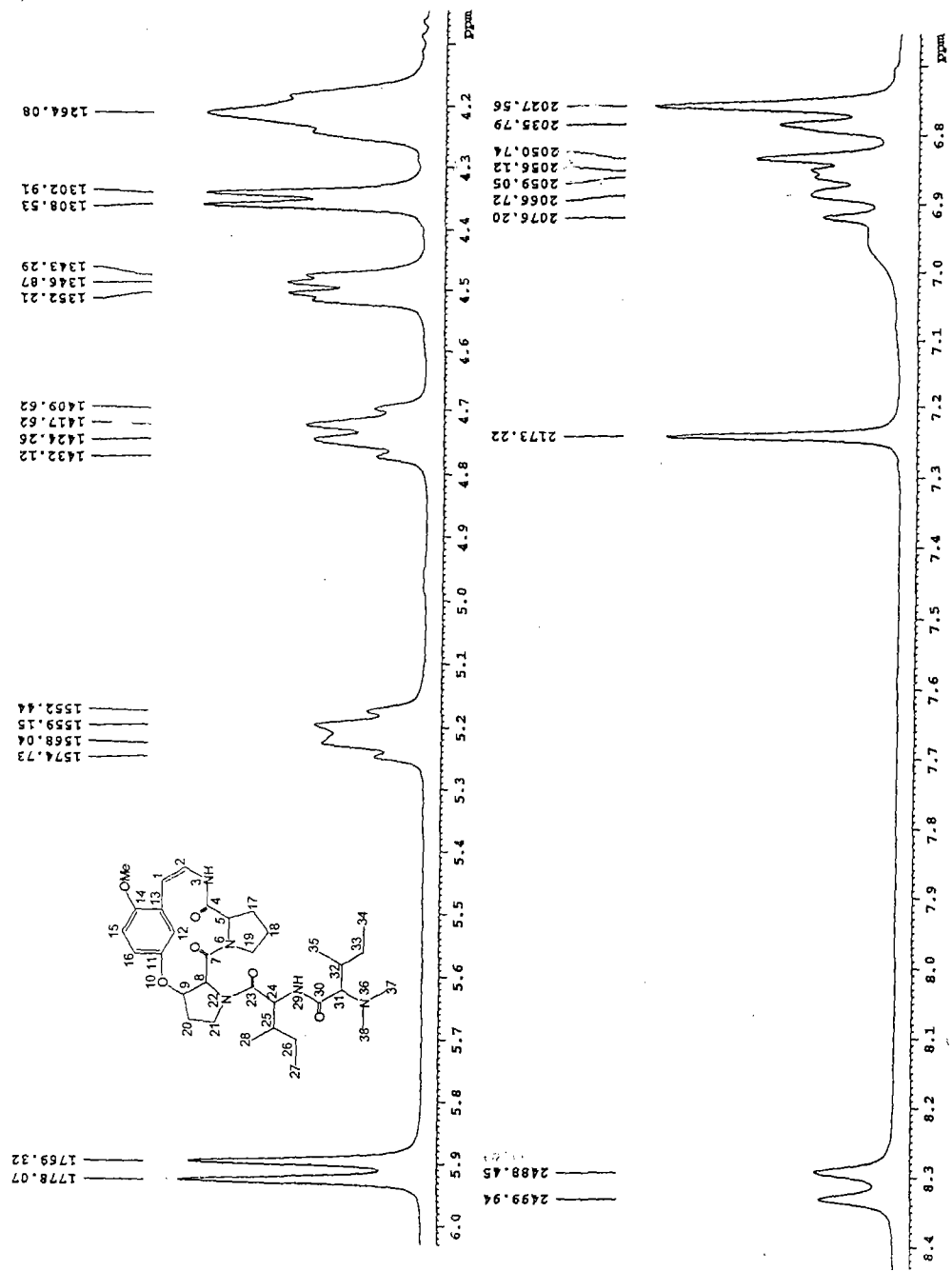


SSS264 21 ZO(R)-E-89/109-122 (s) 10mg 13CNMR
py-d5

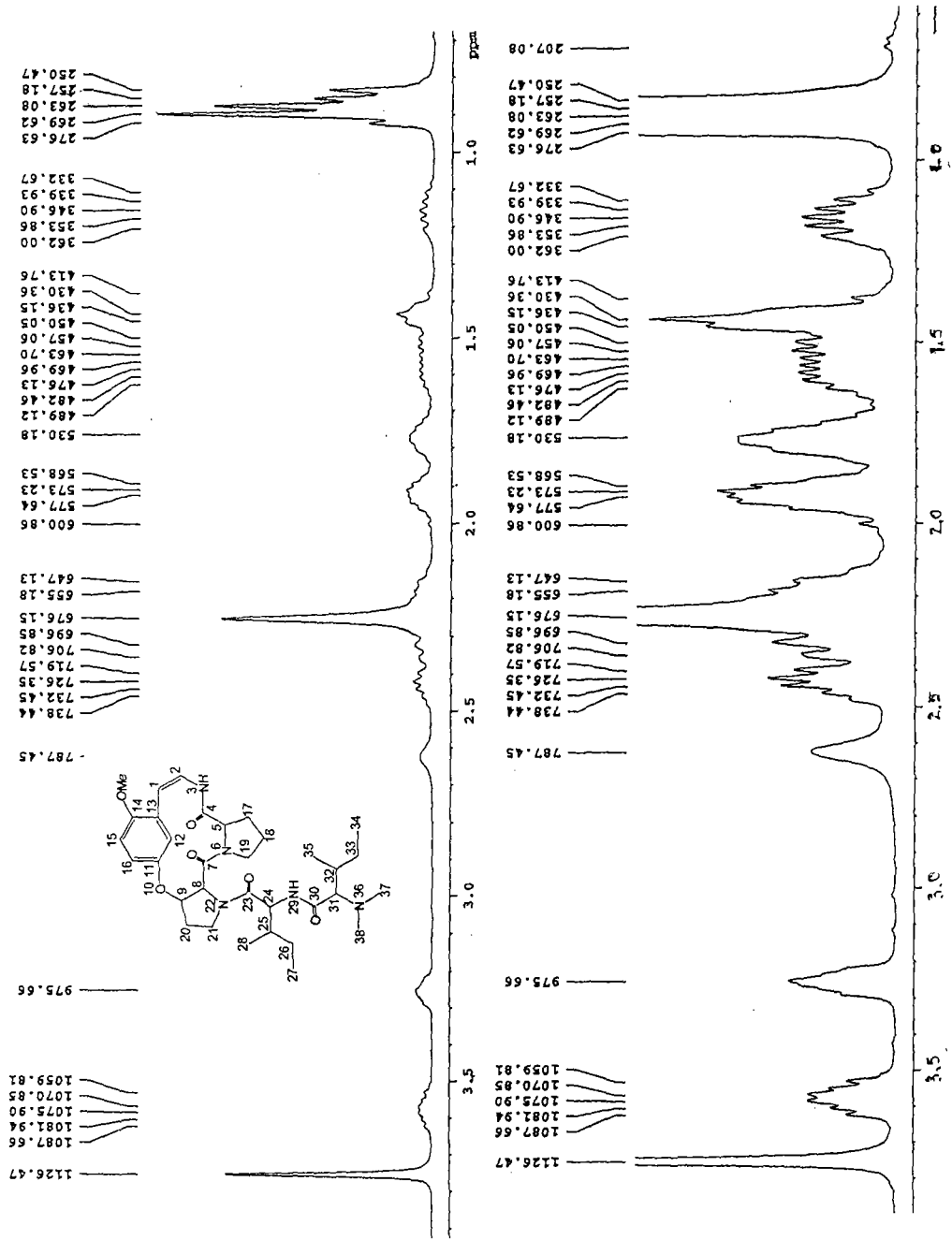
Carbon



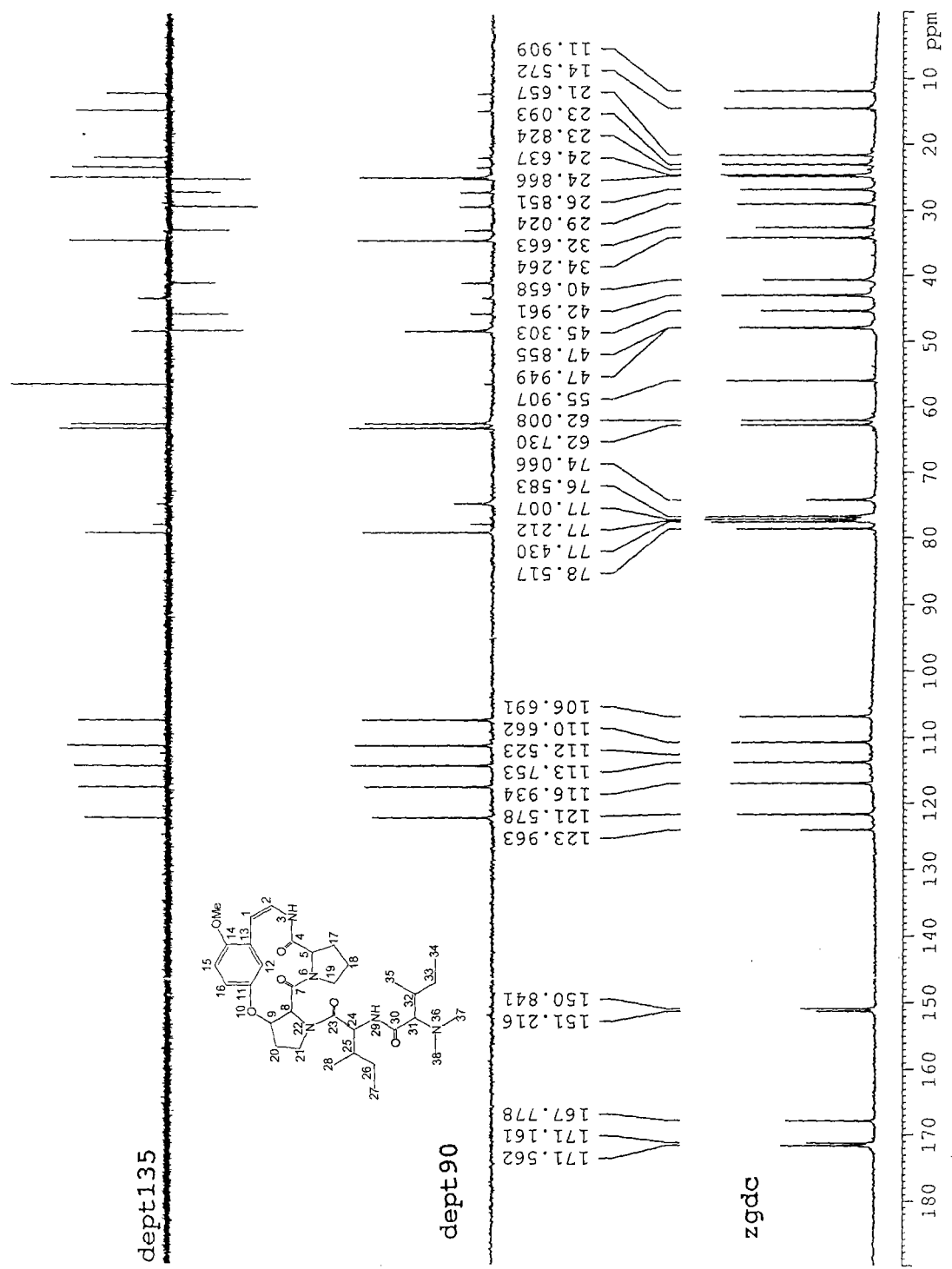
ภาพประกอบ 30 ¹³C NMR DEPT 90 และ 135 spectra (C₃D₈N, 75 MHz) ของสารประกอบ 3 (ขยาย)



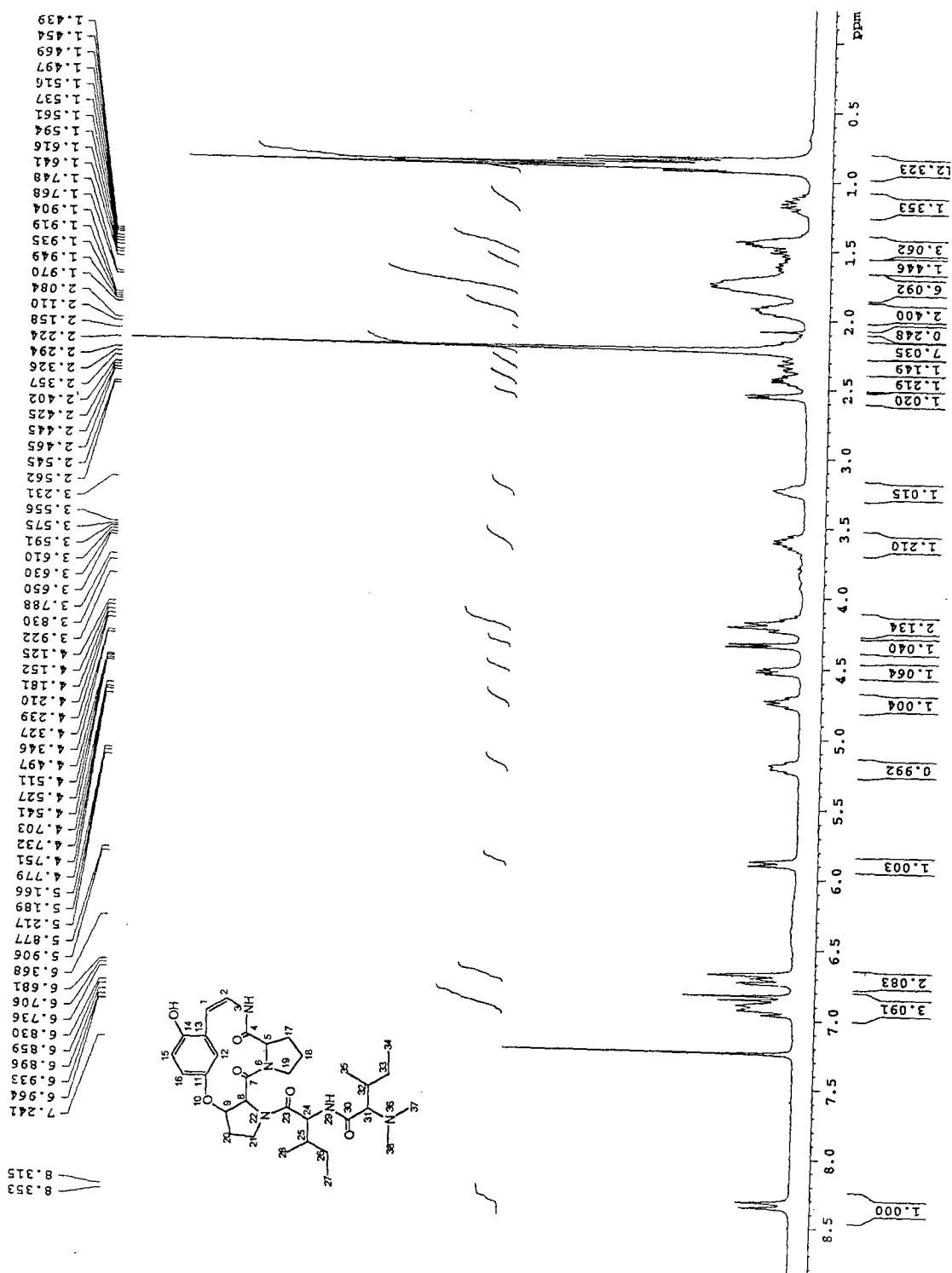
ภาพประกอบ 32 ¹H NMR spectrum (CDCl₃, 300 MHz) ของสารประกอบ 4 (ขยาย)



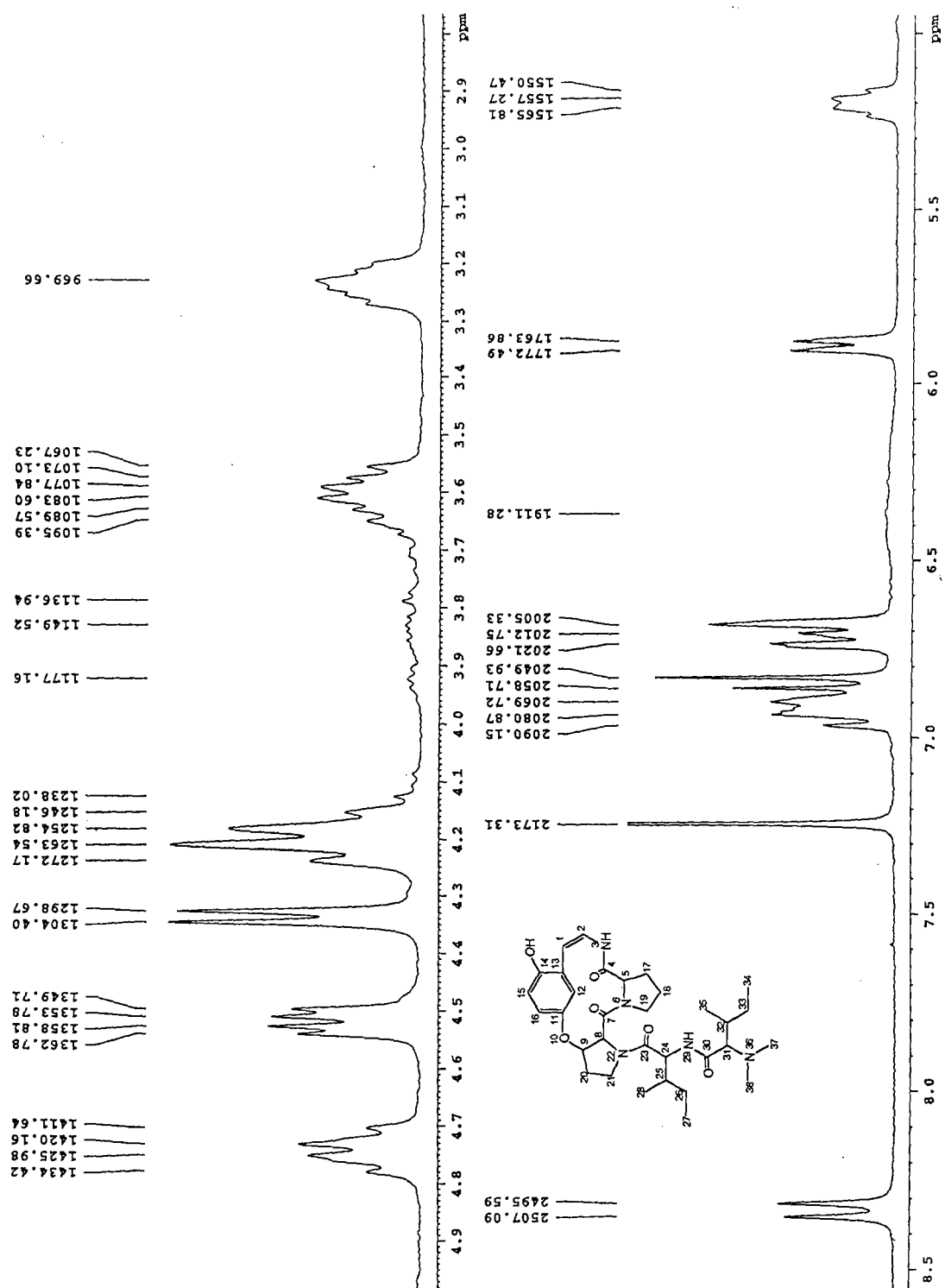
ภาพประกอบ 33 ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) ของสารประกอบ 4 (ขมลาย)



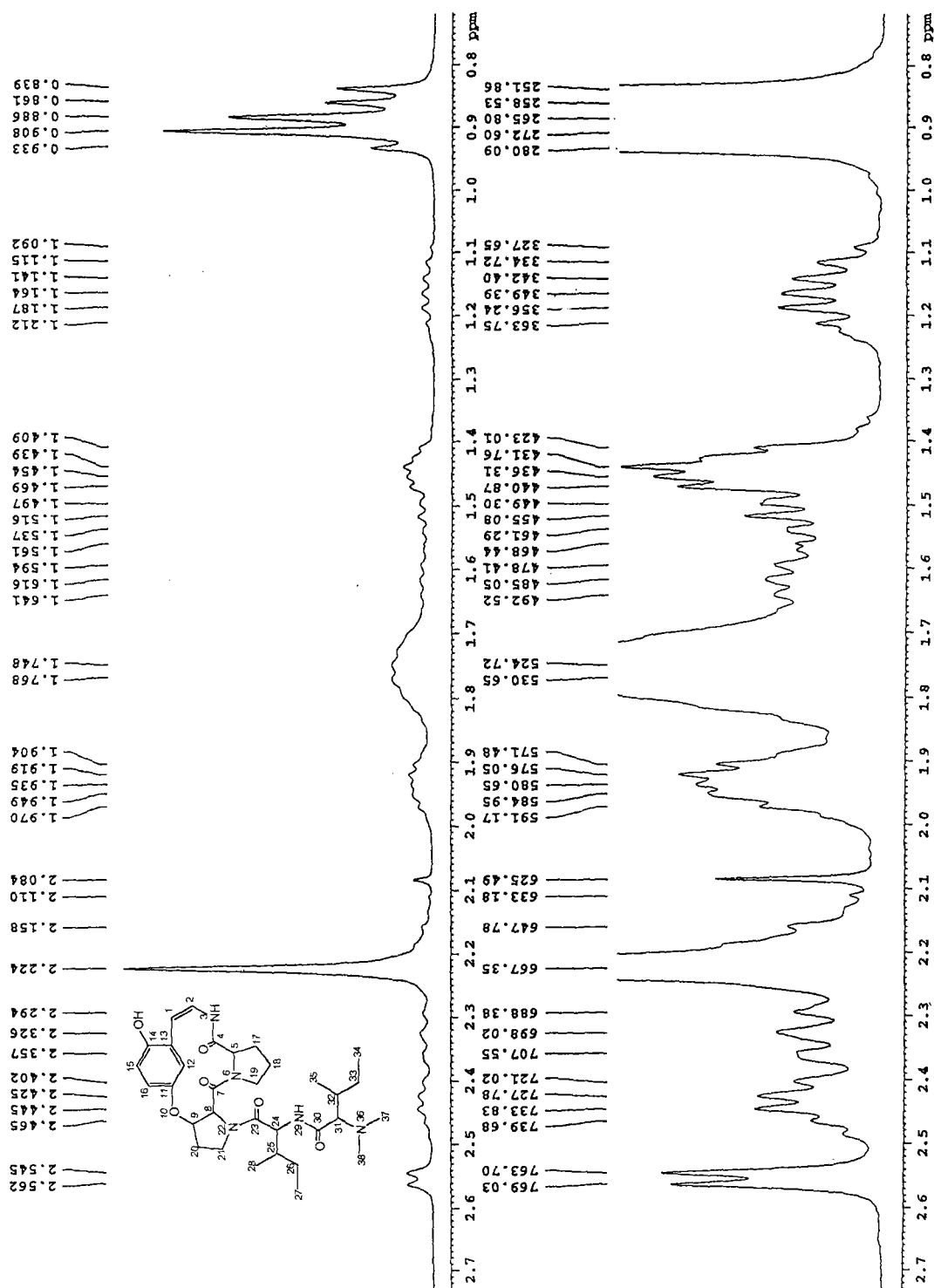
ภาพประกอบ 34 ¹³ C NMR DEPT 90 และ 135 spectra (CDCl₃, 75 MHz) ของสารประกอบ 4



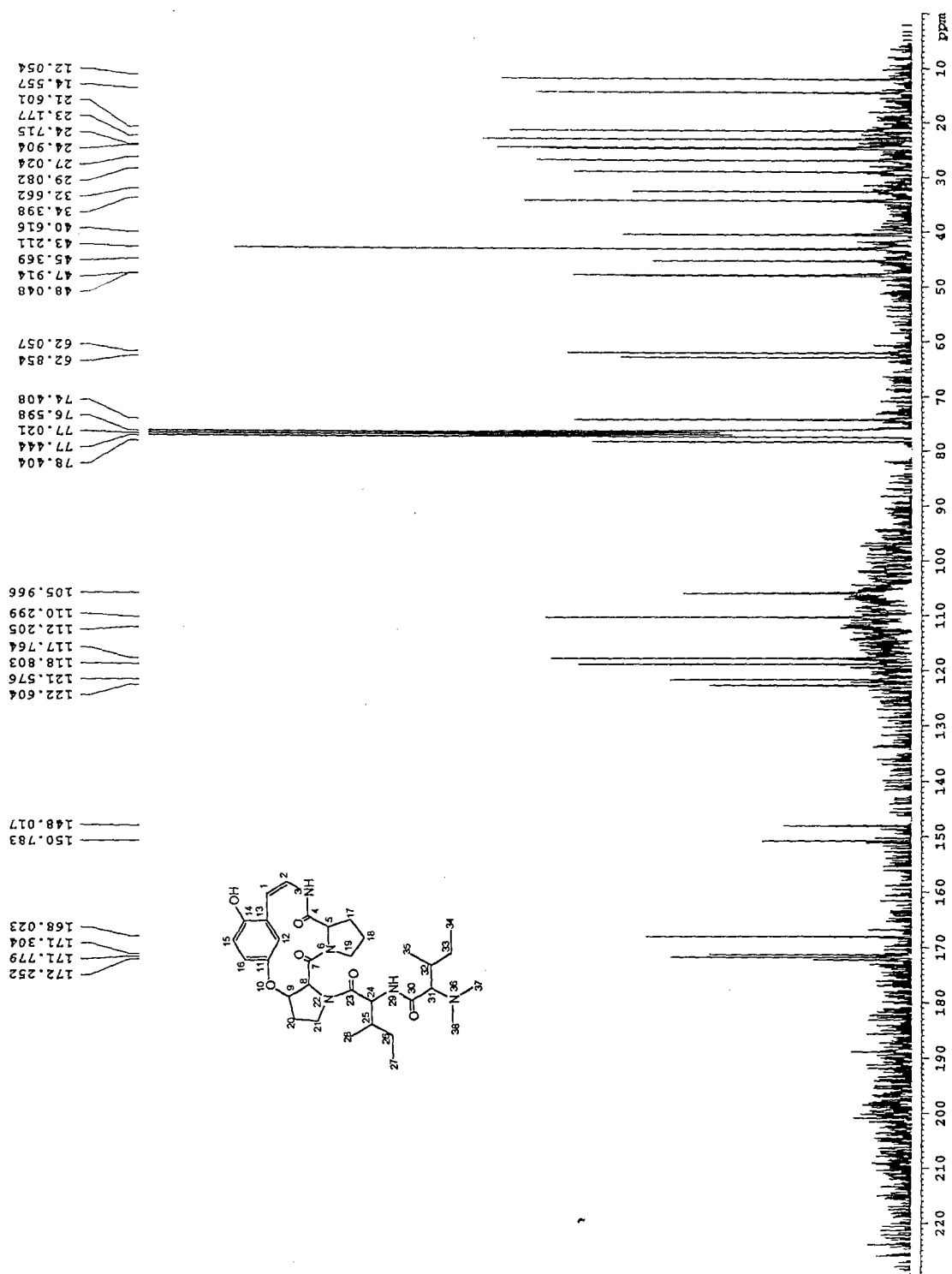
ภาพประกอบ 35 ¹H NMR spectrum (CDCl₃, 300 MHz) ของสารประกอบ 5



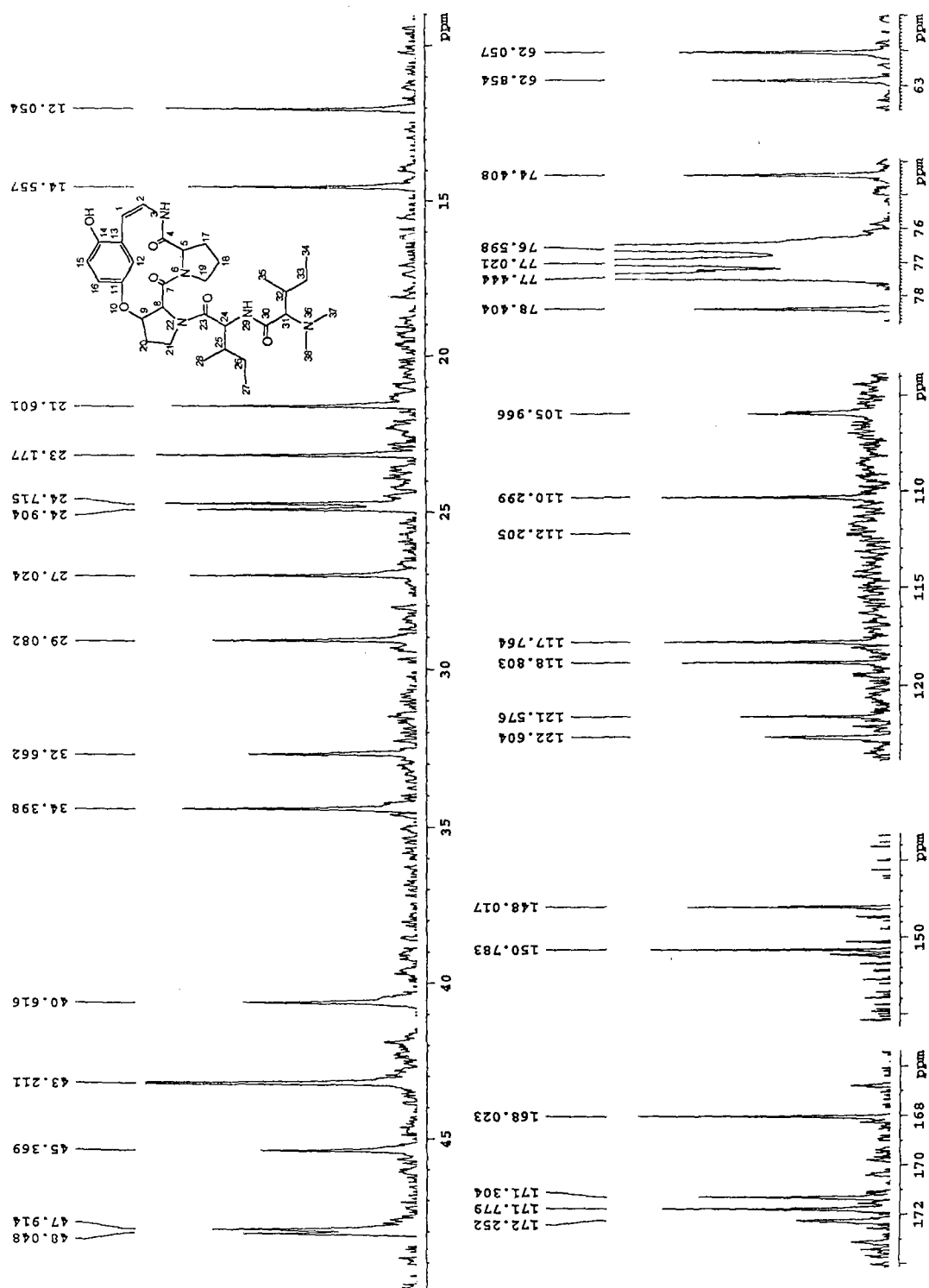
ภาพประกอบ 36 ¹H NMR spectrum (CDCl₃, 300 MHz) ของสารประกอบ 5 (ขยาย)



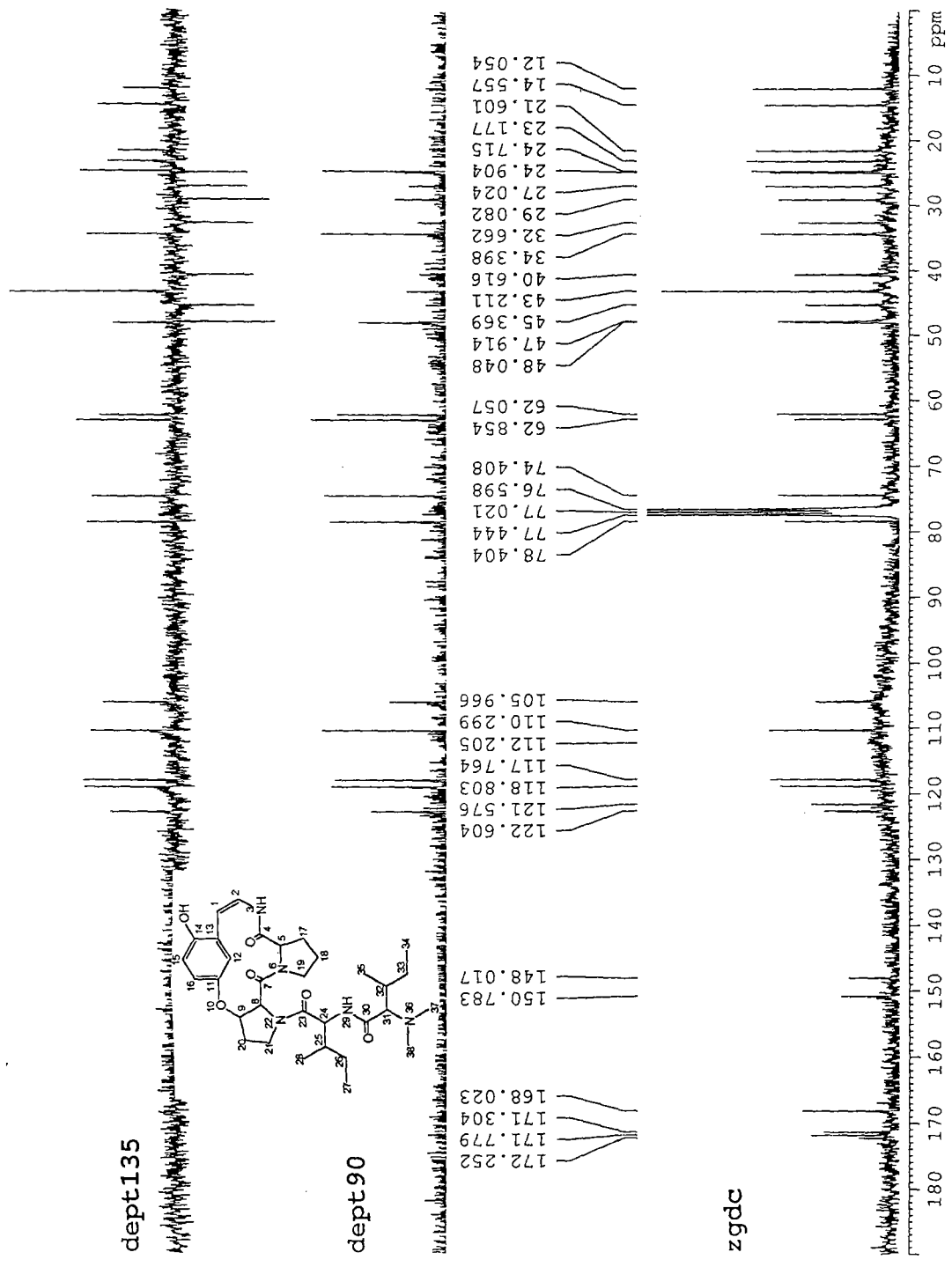
ภาพประกอบ 37 ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) ของสารประกอบ 5 (ขยาย)



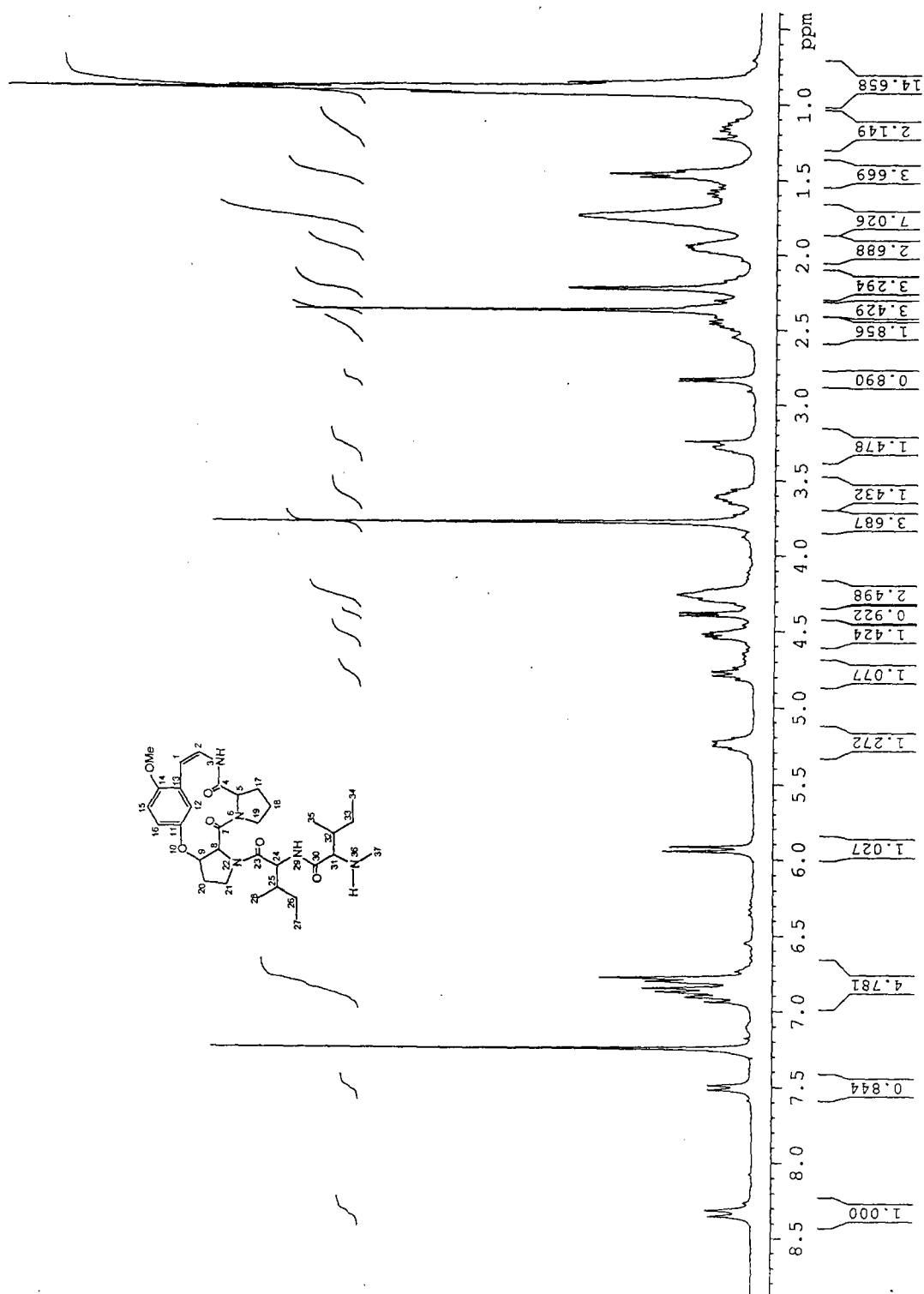
ภาพประกอบ 38 ¹³C NMR spectrum (CDCl₃, 75 MHz) ของสารประกอบ 5



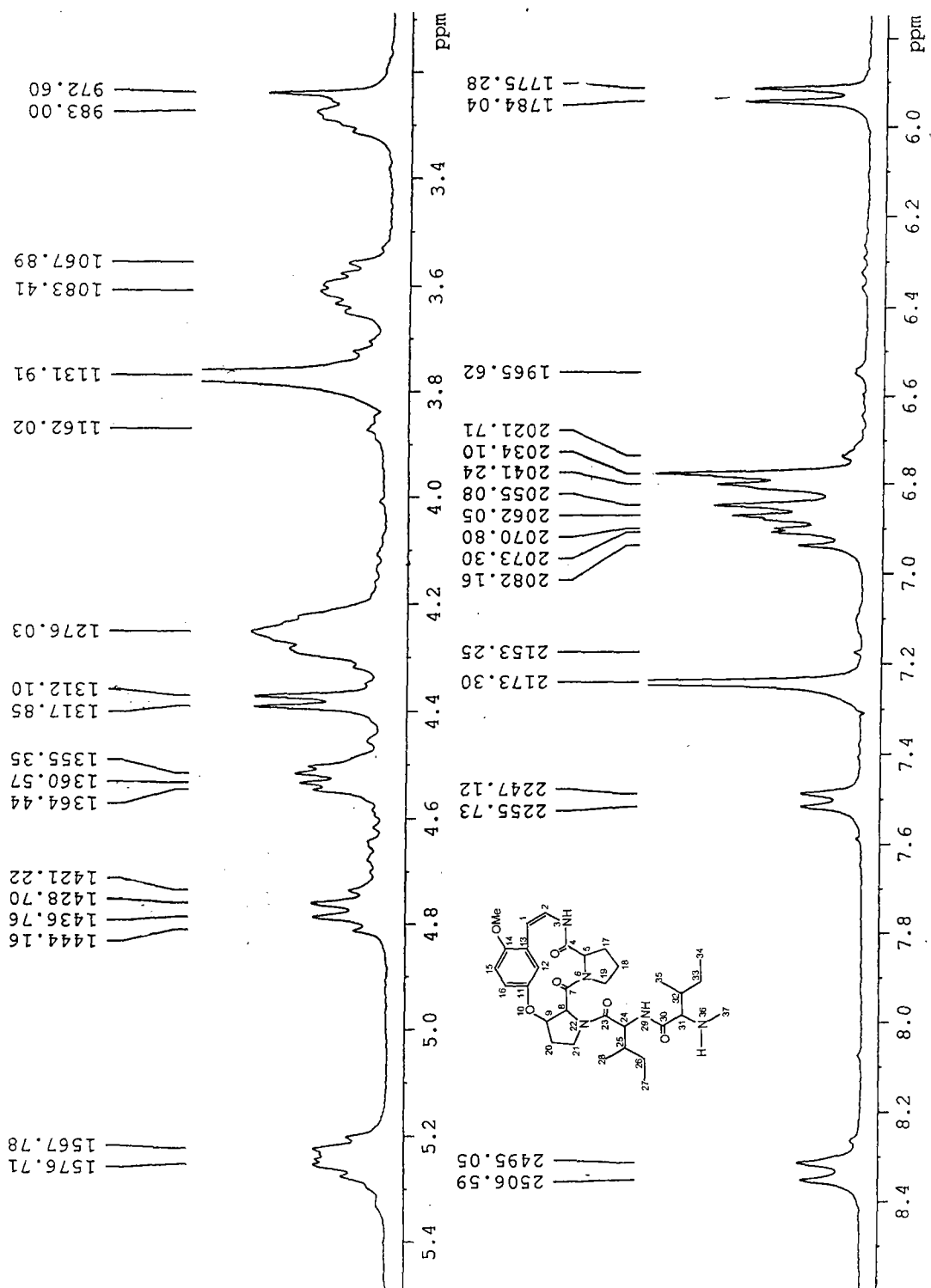
ภาพประกอบ 39 ^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 75 MHz) ของสารประกอบ 5 (ขยาย)



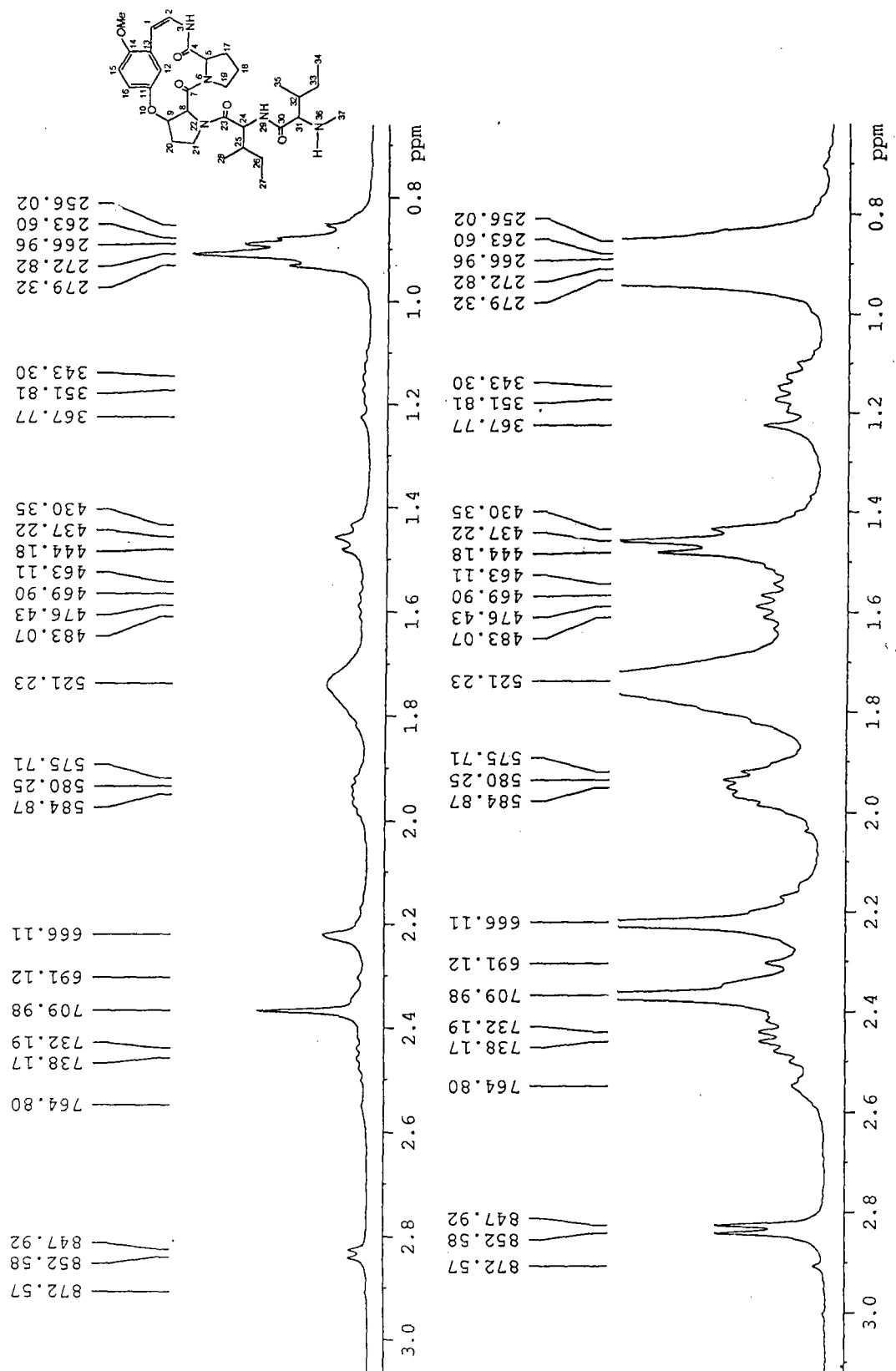
ภาพประกอบ 40 ¹³C NMR DEPT 90 และ 135 spectra (CDCl₃, 75 MHz) ของสารประกอบ 5



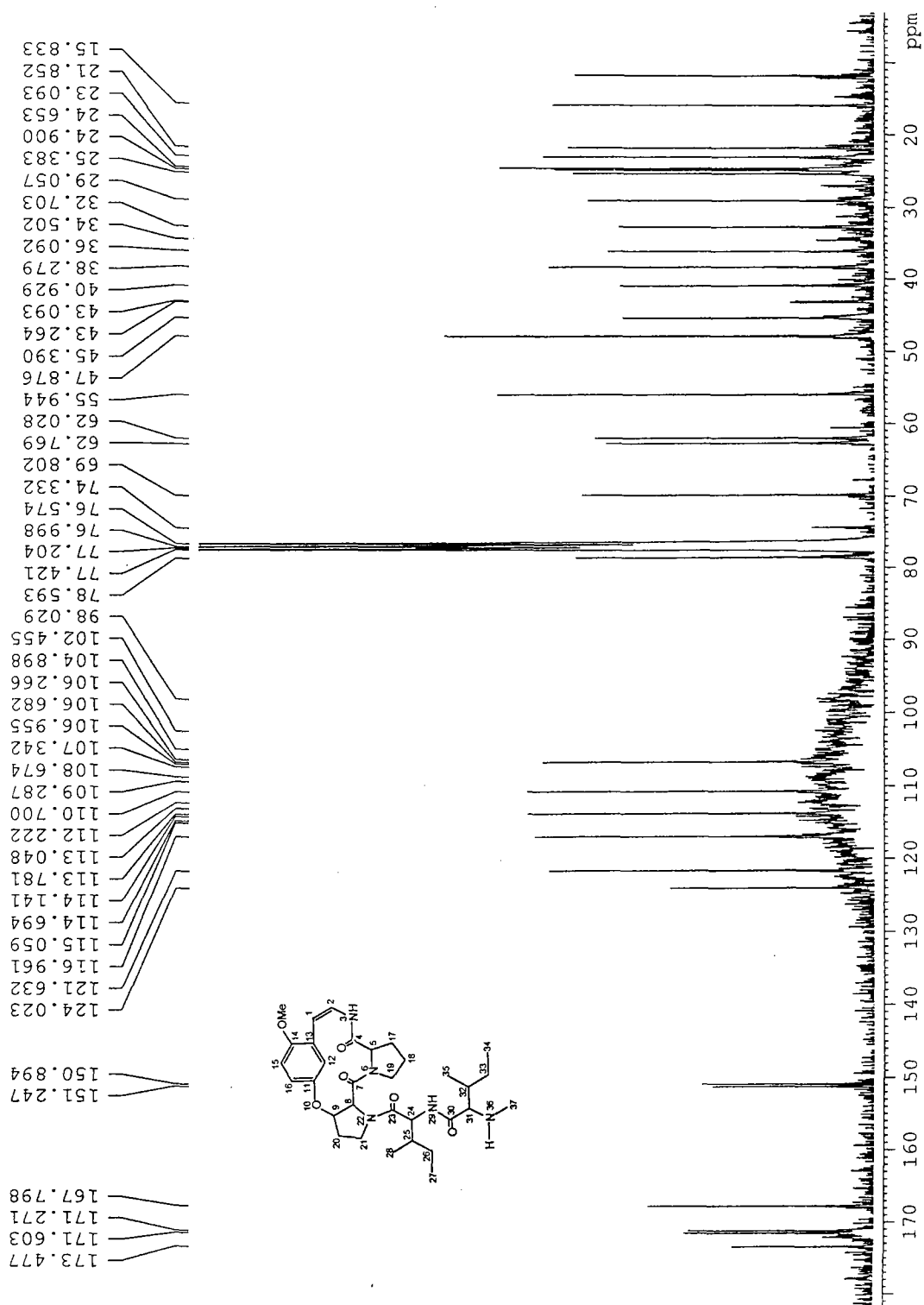
ภาพประกอบ 41 ¹H NMR spectrum (CDCl₃, 300 MHz) ของสารประกอบ 6



ภาพประกอบ 42 ¹H NMR spectrum (CDCl₃, 300 MHz) ของสารประกอบ 6 (ขยาย)

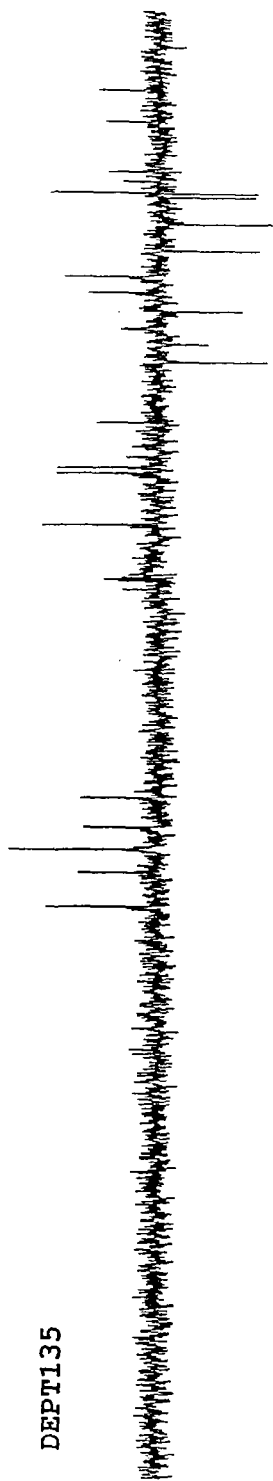


ภาพประกอบ 43 ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) ของสารประกอบ **6** (ขยาย)

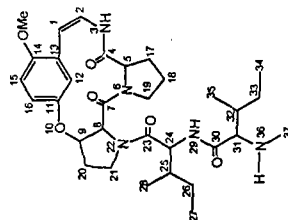
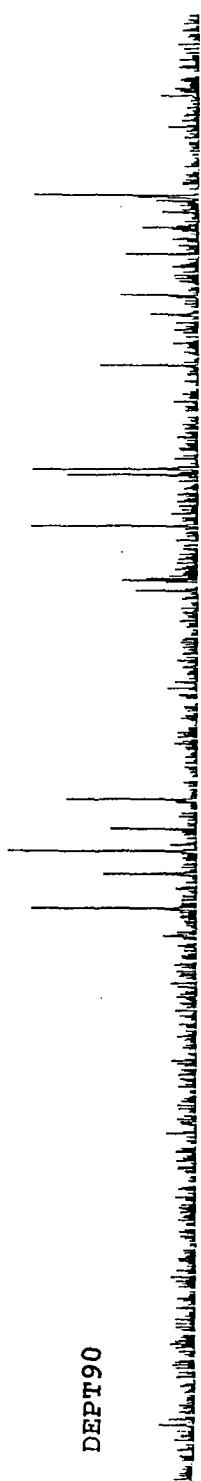


ภาพประกอบ 44 ^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 75 MHz) ของสารประกอบ 6

DEPT135

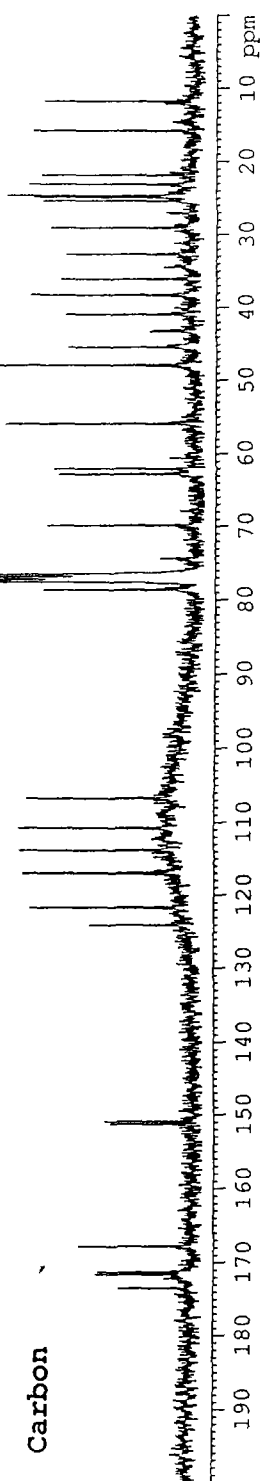


DEPT90



173.477	151.247	47.876	23.093
171.603	150.894	45.390	24.653
171.271	124.023	43.264	24.900
167.798	121.632	40.929	25.383
	116.961	38.279	29.057
	115.059	36.092	32.703
	114.694	34.502	34.502
	114.141	32.703	36.092
	113.781	32.703	38.279
	113.048	32.703	40.929
	112.222	32.703	43.264
	110.700	32.703	45.390
	109.287	32.703	47.876
	108.674	32.703	55.944
	107.342	32.703	62.028
	106.982	32.703	62.769
	106.266	32.703	69.802
	104.898	32.703	74.332
	102.455	32.703	76.574
	98.029	32.703	76.998
	78.593	32.703	77.421
	77.421	32.703	77.421
	77.204	32.703	77.204
	76.998	32.703	76.998
	74.332	32.703	74.332
	69.802	32.703	69.802
	62.769	32.703	62.769
	62.028	32.703	62.028
	55.944	32.703	55.944
	47.876	32.703	47.876
	45.390	32.703	45.390
	43.264	32.703	43.264
	40.929	32.703	40.929
	38.279	32.703	38.279
	36.092	32.703	36.092
	34.502	32.703	34.502
	32.703	32.703	32.703
	29.057	32.703	29.057
	25.383	32.703	25.383
	24.900	32.703	24.900
	24.653	32.703	24.653
	23.093	32.703	23.093

Carbon



ภาพประกอบ 45 ^{13}C NMR DEPT 90 และ 135 spectra (CDCl_3 , 75 MHz) ของสารประกอบ 6

อภิธานศัพท์

อภิธานศัพท์

δ	= chemical shift
μg	= microgram
λ_{max}	= maximum absorption wave length
ν_{max}	= maximum absorption frequencies
br	= broad
c	= concentration
$\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	= deuterated pyridine
^1H NMR	= Proton Nuclear Magnetic Resonance
^{13}C NMR	= Carbon Nuclear Magnetic Resonance
CD_3OD	= deuterated methanol
CDCl_3	= deuteriochloroform
CHCl_3	= chloroform
cm^{-1}	= wave number
COSY	= ^1H -relayed correlated spectroscopy
d	= doublet
dd	= doublet of doublet
DEPT	= Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
EIMS	= electron impact mass spectrum
ESMS	= electron spray mass spectrum
EtOAc	= ethyl acetate
FABMS	= fast atom bombardment mass spectrum
FT IR	= <i>Fourier Transform Infrared</i>
HMBC	= Heteronuclear Multiple Bond Connectivity
HMQC	= ^1H -detected Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HREIMS	= high resolution electron impact mass spectrum
HRFABMS	= high resolution fast atom bombardment mass spectrum
J	= coupling constant
m	= multiplet
m/z	= mass to charge ratio
M^+	= molecular ion

อภิศัพท์ (ต่อ)

MeOH	= methanol
MHz	= Mega Hertz
mp	= melting point
nOe	= nuclear Overhauser effect
s	= singlet
t	= triplet
TLC	= thin layer chromatography
TMS	= tetramethylsilane
UV	= Ultraviolet

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นายณัฐชัย อุ๋นใจ
วันเดือนปีเกิด	5 ตุลาคม 2519
สถานที่เกิด	อำเภอวังหิน จังหวัดศรีสะเกษ
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	57 หมู่ 5 ตำบลดวนใหญ่ อำเภอวังหิน จังหวัดศรีสะเกษ 33270
ตำแหน่งหน้าที่การงานในปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2538	มัธยมศึกษาตอนปลาย (แผนกวิทยาศาสตร์) โรงเรียนนครศรีลำดวนวิทยา จังหวัดศรีสะเกษ
พ.ศ. 2542	การศึกษาศาสตรบัณฑิต (วิทย์-เคมี) มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
พ.ศ. 2545	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เคมีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร