

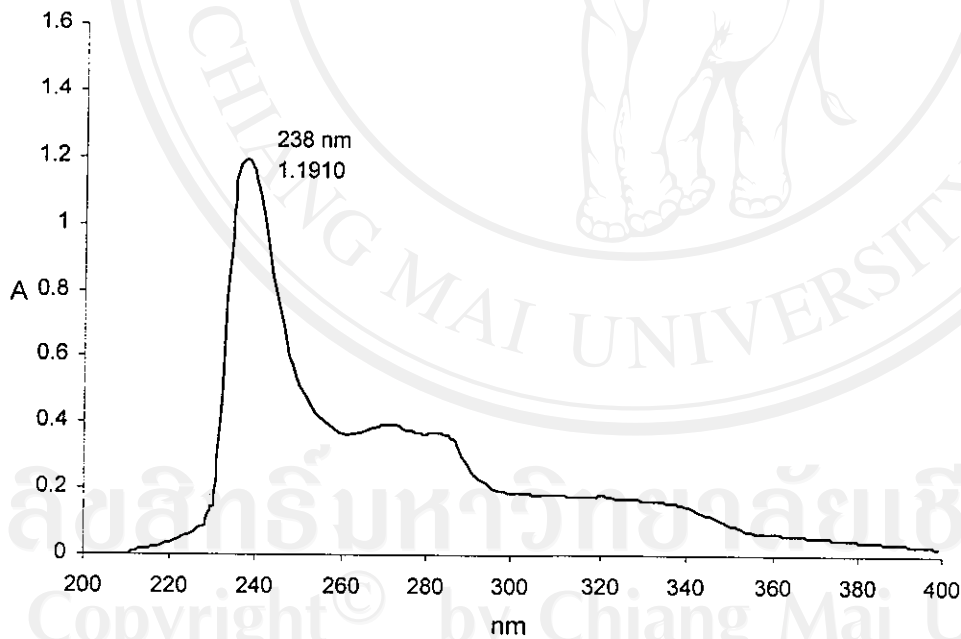
บทที่ 3

ผลการทดลอง

การหาสูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้ โดยนำสาร A, B และ C ที่แยกได้มาวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้าง ด้วยเทคนิคอินฟราเรด สเปกโทรสโกปี (Infrared Spectroscopy, IR) เทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโทรสโกปี (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR) และ แมสสเปกโตรเมตรี (Mass Spectrometry, MS)

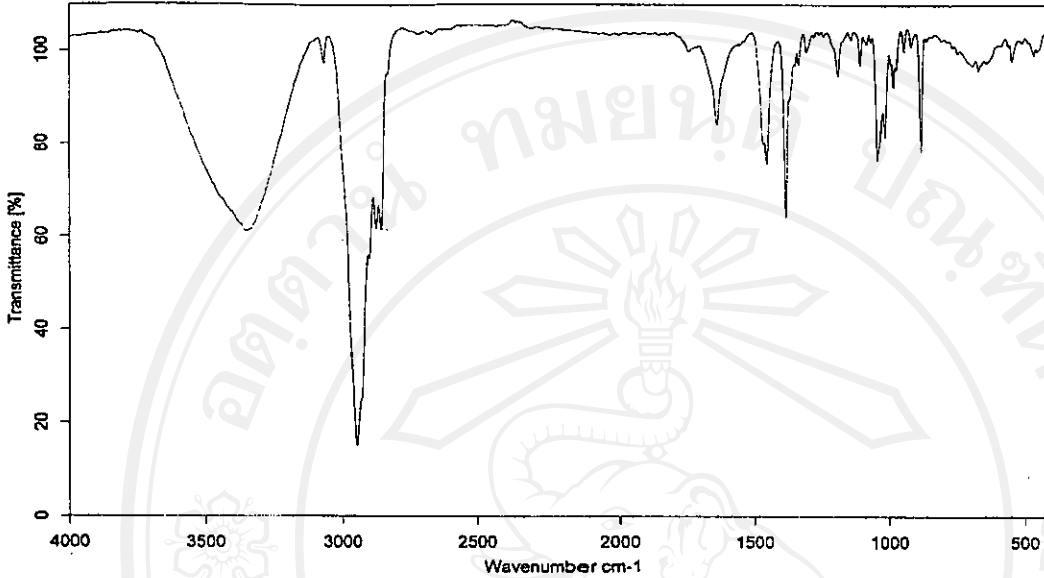
3.1 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสาร A

จากผลการวิเคราะห์พบว่าสาร A ($R_f = 0.15$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$; 0.1:9.9) มีค่า $\lambda_{\text{max}} = 238 \text{ nm}$ (รูป 2.3) ค่าจุดหลอมเหลว เท่ากับ $203 \text{ }^\circ\text{C}$ และ ค่า $[\alpha]_D^{20}$ เท่ากับ $+26.0^\circ$ ($c = 0.02$, MeOH)



รูป 2.3 UV Spectrum ของสาร A

ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอินฟราเรด สเปกโทรสโกปี (Infrared Spectroscopy, IR) ได้ผลแสดงดังรูป 2.4 และ ตาราง 3.1 ตามลำดับ



รูป 2.4 IR Spectrum (KBr) ของสาร A

จาก IR Spectrum แสดงให้เห็นพีกต่างๆ ที่สำคัญในโมเลกุล ซึ่งสามารถระบุหมู่ฟังก์ชันที่เกี่ยวข้องได้ดังแสดงในตาราง 3.1

ตาราง 3.1 การระบุหมู่ฟังก์ชันที่ตำแหน่งต่างๆ จาก IR Spectrum

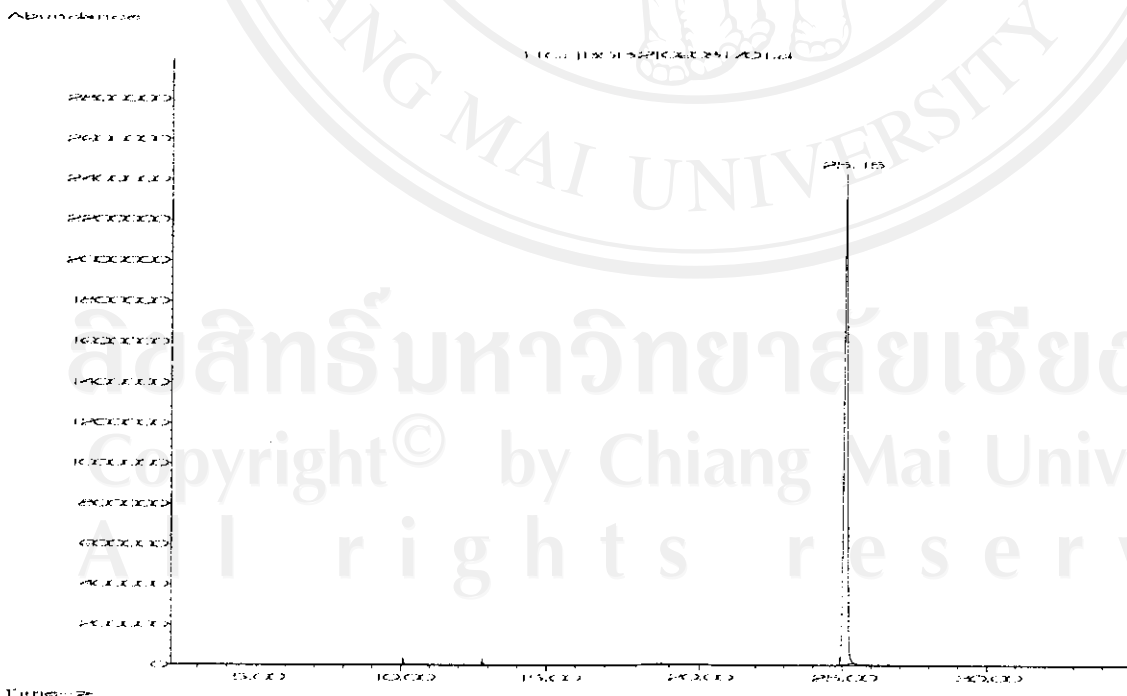
| Wavenumber (cm ⁻¹) | Functional group |
|--------------------------------|---------------------------|
| 3,353 | -OH Stretch |
| 2,951 | =C-H Stretch |
| 2,859 | C-H Stretch |
| 1,642 | C=C Stretch |
| 1,454 | -C-H Bending |
| 1,383 | -C-H Bending |
| 1,042 | C-O Stretch |
| 878 | C=CH ₂ Bending |

พิจารณาข้อมูลจาก IR สเปกตรัม ของสาร A ดังรูป 2.3 และตาราง 3.1 จะเห็นว่าสาร A มีหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญ คือ หมู่ไฮดรอกซิล ($\nu_{\text{O-H}} = 3,353 \text{ cm}^{-1}$ และ $\nu_{\text{C-O}} = 1,041 \text{ cm}^{-1}$) นอกจากนี้ ยังมีส่วนที่เป็นไฮโดรคาร์บอน ($-\text{CH}_2-$ และ CH_3) คือ $\nu_{\text{C-H}} = 2,951, 2,859 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_{\text{C=C}} = 1,642 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_{\text{C-H}} = 1,454, 1,383 \text{ cm}^{-1}$ และ $\nu_{\text{C=CH}_2} = 878 \text{ cm}^{-1}$

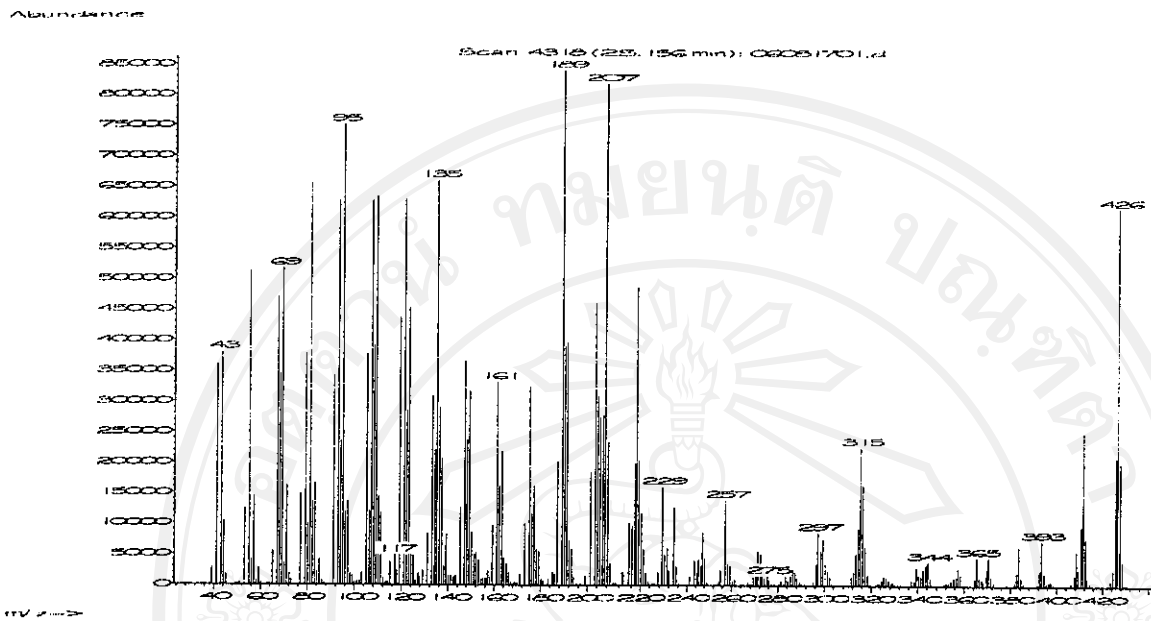
ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectroscopy) ได้ผล แสดงดังรูป 2.5-2.6 ตามลำดับ

สถานะที่ใช้ในการทดลอง

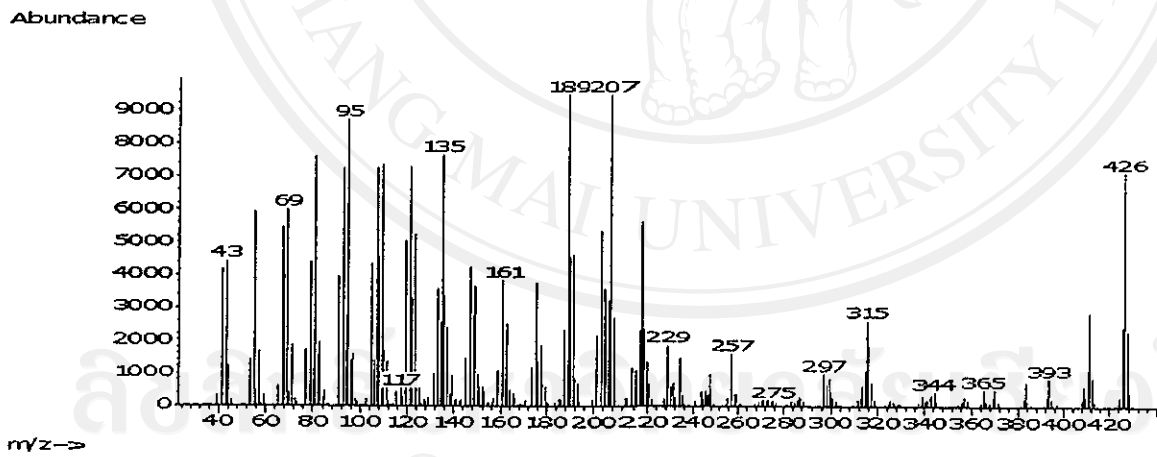
| | |
|---|--|
| GC inlet | 280 °C |
| splitless | 0.2 μl |
| Oven | 140 °C (1 min) - 15 °C/min --> 275 °C(30 min) |
| Carrier gas | Helium 1.0 ml/min |
| Column | HP-5MS 30 m x 0.75 mm ID x 0.25 μm film thickness |
| (MSD EI (70 eV) MS Quadrupole : 150 °C, MS Source : 230 °C) | |



รูป 2.5 GC-MS Chromatogram ของสาร A

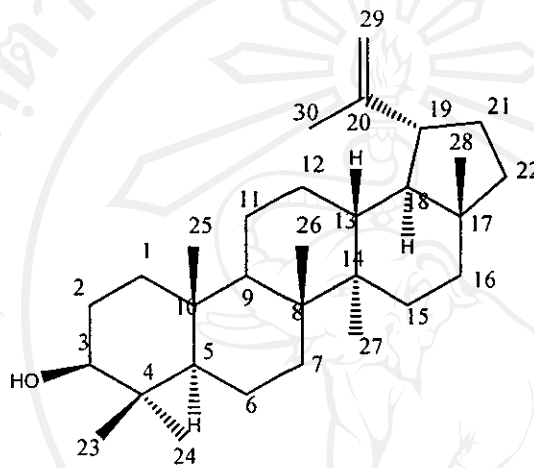


รูป 2.6 Mass Spectrum ของสาร A

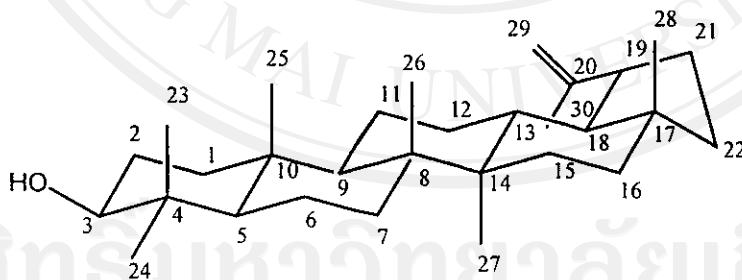


รูป 2.7 Mass Spectrum ของ 3β -hydroxylup-20(29)-ene จาก GC-MS library

จากการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค GC-MS เพื่อหามวลโมเลกุลของสาร พบว่าสาร A มีมวลโมเลกุล เท่ากับ 426 (รูป 2.6) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูล Mass Spectrum ที่มีอยู่ในเครื่อง GC-MS (รูป 2.7) พบว่าสาร A มี Mass Spectrum ใกล้เคียงกับ 3β -hydroxylup-20(29)-ene โดยมีค่าร้อยละความเหมือนถึง 95% ดังนั้น จึงอาจคาดได้ในเบื้องต้นว่าสาร A น่าจะเป็นสาร 3β -hydroxylup-20(29)-ene ($C_{30}H_{50}O$) ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม Lupeol triterpenoid ที่มีโครงสร้างดังต่อไปนี้

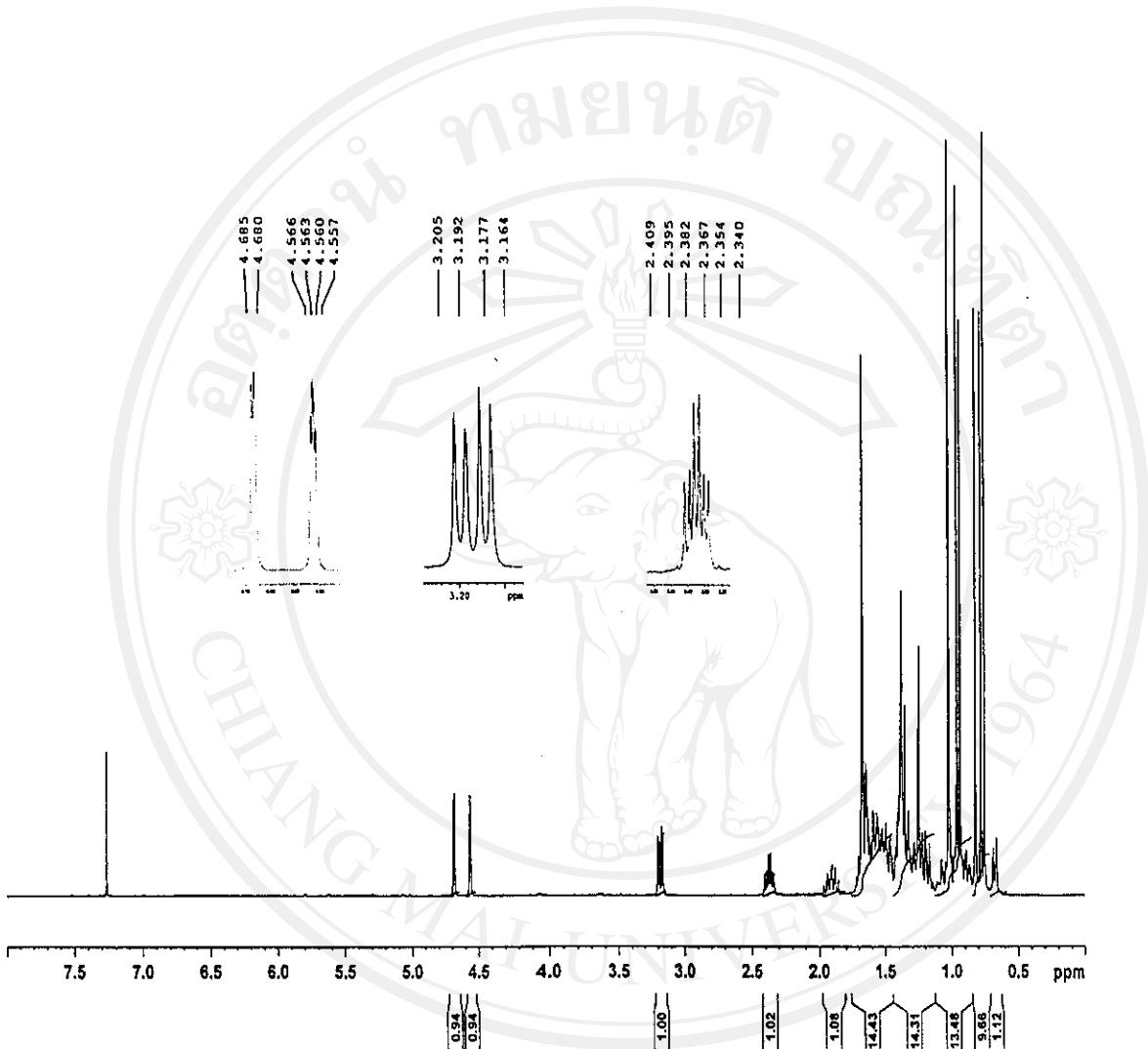


หรือ



รูป 2.8 โครงสร้างของ 3β -Hydroxylup-20(29)-ene

ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค NMR สเปกโทรสโกปี ได้ผลแสดงดังรูป 2.9-2.15 และ ตาราง 3.2-3.3 ตามลำดับ



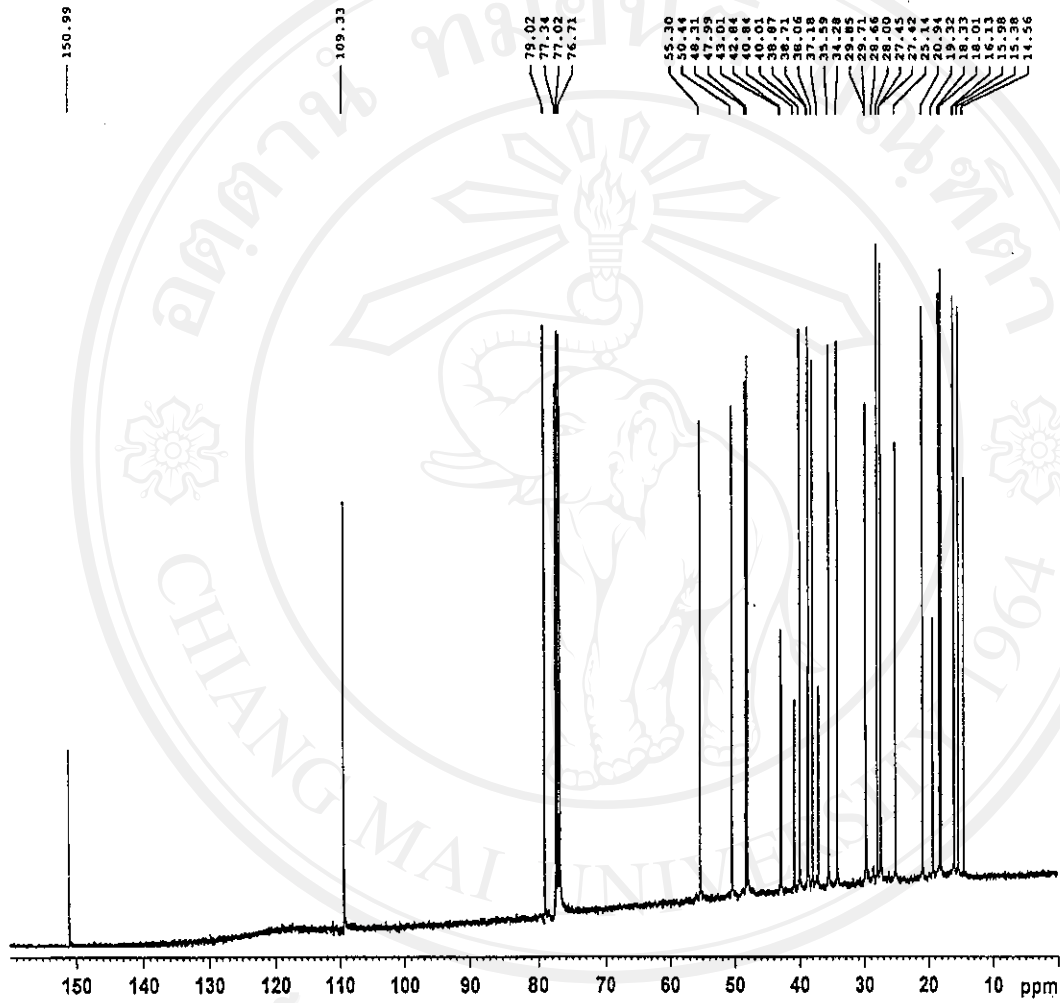
รูป 2.9 $^1\text{H-NMR}$ Spectrum (CDCl_3) ของสาร A

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3.2 ผลการวิเคราะห์สาร A ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy

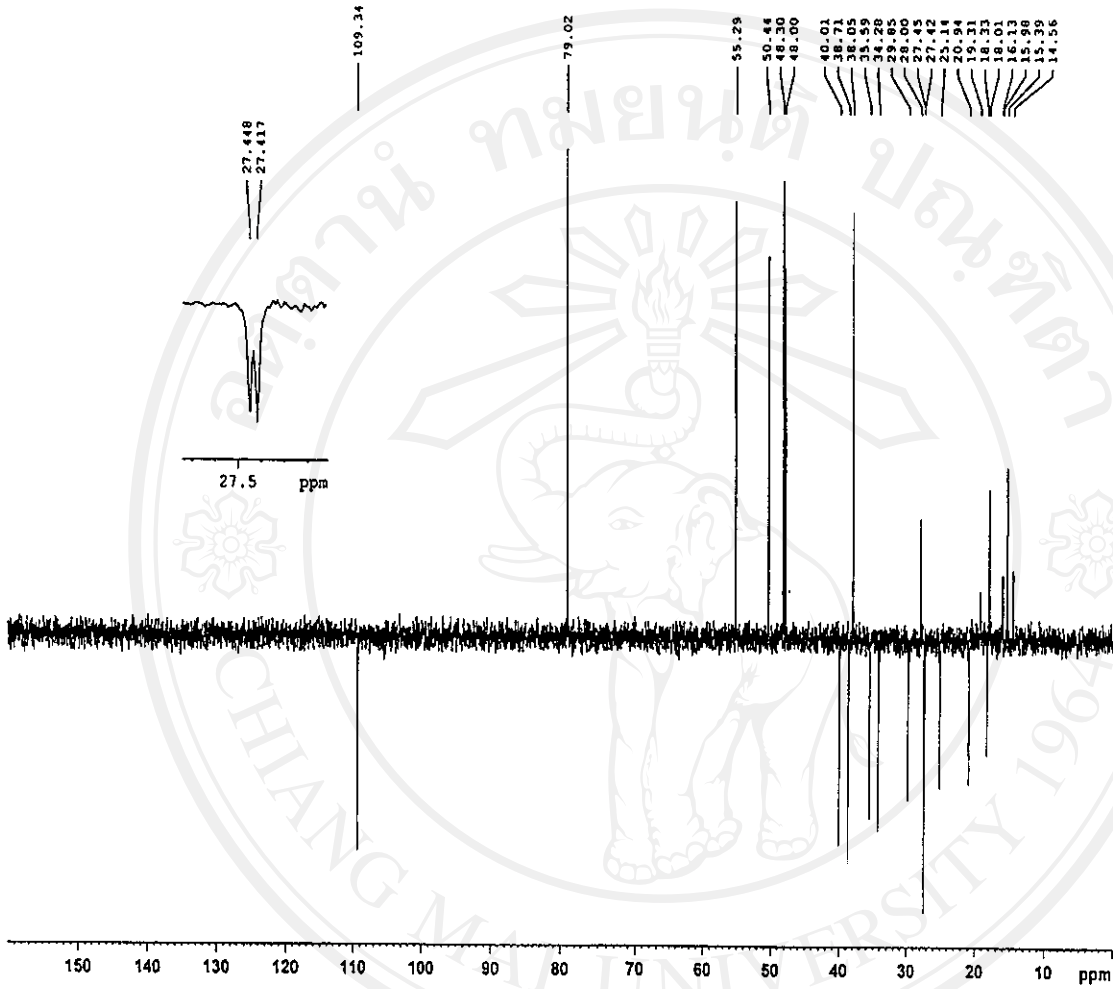
| Chemical Shift (ppm) | ชนิดของ H | จำนวน H | Splitting | Coupling constants (Hz) |
|----------------------|-------------------|---------|-----------|-------------------------|
| 4.68 | CH_2 | 1 | d | 2.0 |
| 4.56 | CH_2 | 1 | m | - |
| 3.18 | CH | 1 | dd | 5.2, 11.2 |
| 2.37 | CH | 1 | ddd | 5.6, 10.8, 10.8 |
| 1.93 | CH_2 | 1 | m | - |
| 1.72-1.69 | CH, CH_2 | 2 | m | - |
| 1.67 | CH_3 | 3 | s | - |
| 1.65-1.05 | CH, CH_2 | 19* | m | - |
| 1.02 | CH_3 | 3 | s | - |
| 0.96 | CH_3 | 3 | s | - |
| 0.94 | CH_3 | 3 | s | - |
| 0.91-0.85 | CH, CH_2 | 2 | m | - |
| 0.82 | CH_3 | 3 | s | - |
| 0.78 | CH_3 | 3 | s | - |
| 0.75 | CH_3 | 3 | s | - |
| 0.69 | CH | 1 | d | - |

* หักลบสัญญาณของ H_2O ใน CDCl_3 ที่ประมาณ 1.5 ppm แล้ว



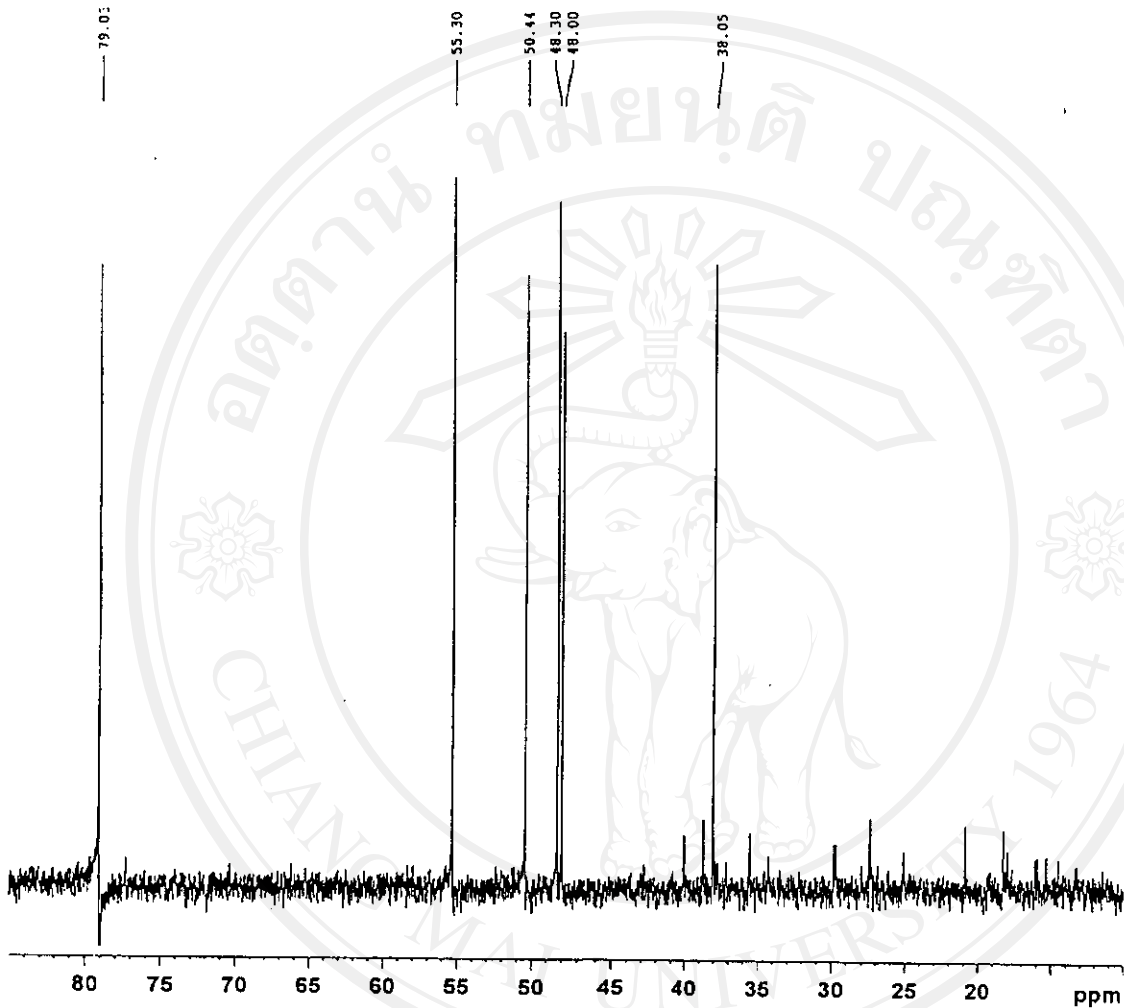
รูป 2.10 ^{13}C -NMR Spectrum (CDCl_3) ของสาร 17 A

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 2.11 DEPT 135 Spectrum (CDCl_3) ของสาร A

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright© by Chiang Mai University
 All rights reserved



รูป 2.12 DEPT 90 Spectrum (CDCl₃) ของสาร A

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

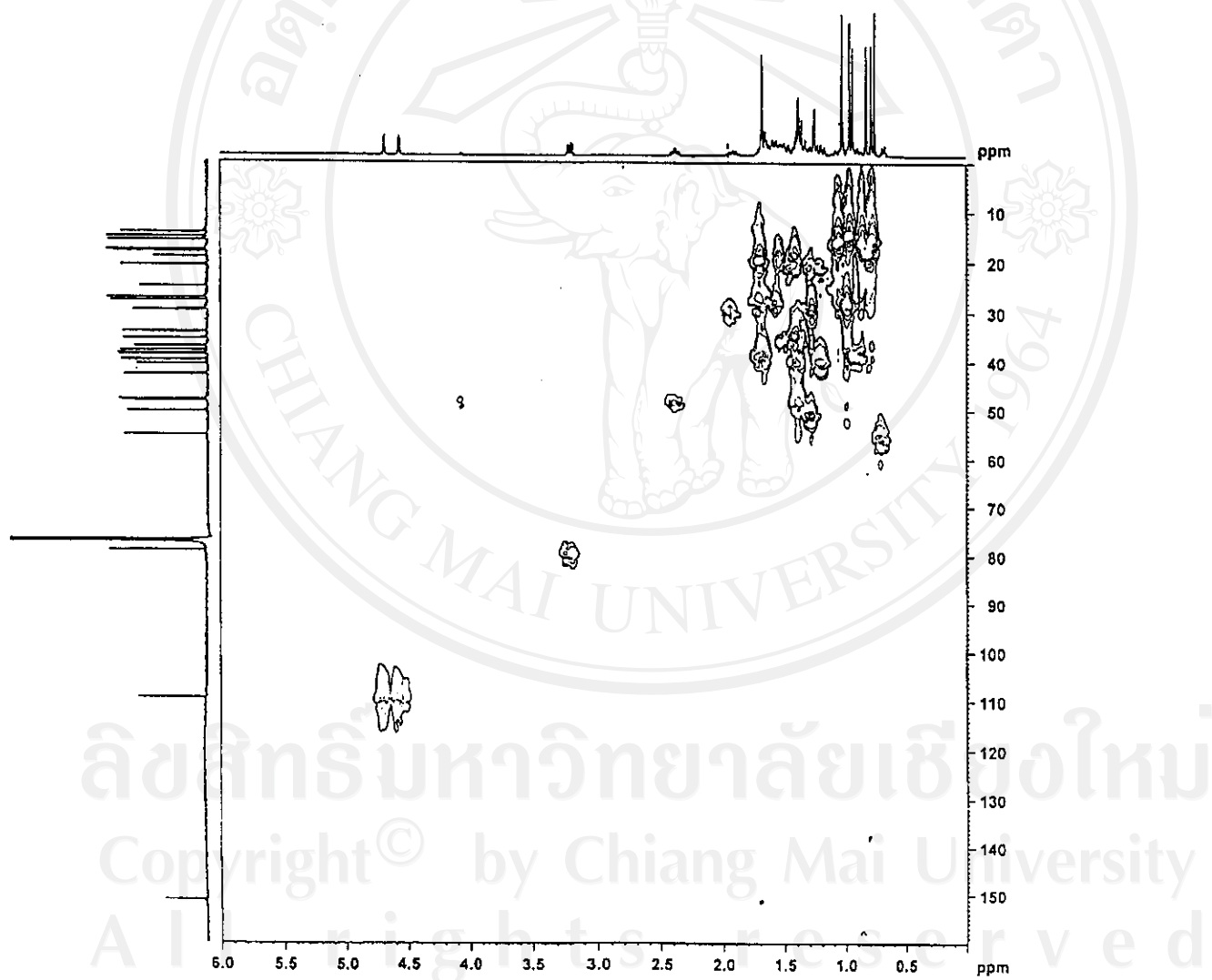
ตาราง 3.3 ผลการวิเคราะห์สาร A ด้วยเทคนิค ^{13}C -NMR spectroscopy, DEPT 135 และ DEPT 90

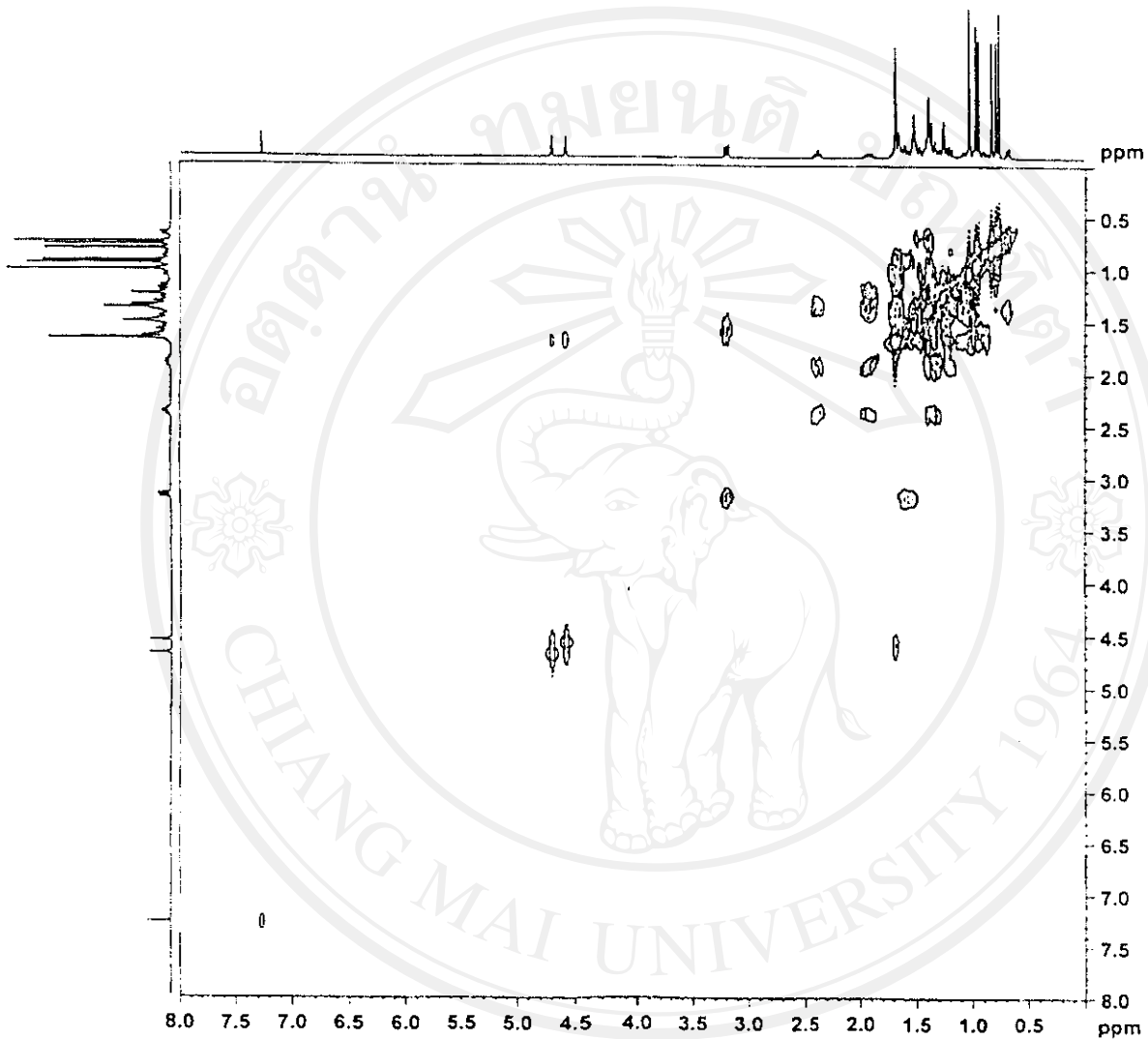
| Chemical Shift (ppm) | ชนิดของคาร์บอน |
|----------------------|-------------------|
| 150.9 | Quaternary C |
| 109.3 | = CH ₂ |
| 79.0 | CH-O |
| 55.3 | CH |
| 50.4 | CH |
| 48.3 | CH |
| 48.0 | CH |
| 43.0 | Quaternary C |
| 42.8 | Quaternary C |
| 40.8 | Quaternary C |
| 40.0 | CH ₂ |
| 38.9 | Quaternary C |
| 38.7 | CH ₂ |
| 38.1 | CH |
| 37.1 | Quaternary C |
| 35.6 | CH ₂ |
| 34.3 | CH ₂ |
| 29.8 | CH ₂ |
| 28.0 | CH ₃ |
| 27.5 | CH ₂ |
| 27.4 | CH ₂ |
| 25.1 | CH ₂ |
| 20.9 | CH ₂ |
| 19.3 | CH ₃ |
| 18.3 | CH ₂ |
| 18.0 | CH ₃ |
| 16.1 | CH ₃ |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright © by Chiang Mai University
 All rights reserved

ตาราง 3.3(ต่อ)

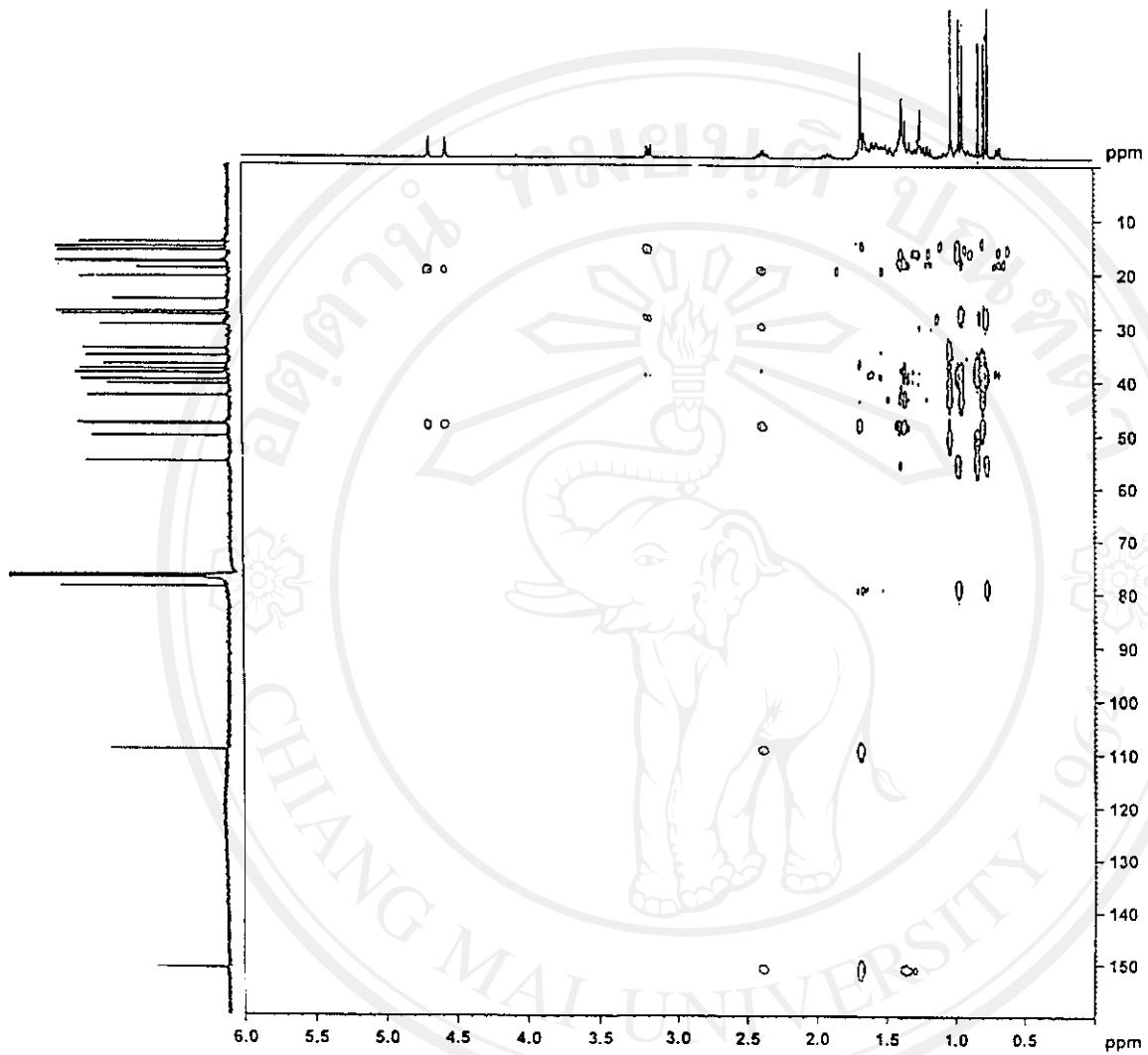
| Chemical Shift | ชนิดของคาร์บอน |
|----------------|-----------------|
| 15.9 | CH ₃ |
| 15.4 | CH ₃ |
| 14.5 | CH ₃ |

รูป 2.13 HMQC Spectrum (CDCl₃) ของสาร A



รูป 2.14 COSY Spectrum (CDCl_3) ของสาร A

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

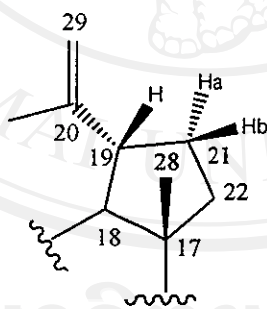


รูป 2.15 HMBC Spectrum (CDCl_3) ของสาร A
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร A โดยเทคนิค NMR Spectroscopy เพื่อพิจารณาความเป็นไปได้ที่สาร A จะเป็น 3 β -Hydroxylup-20(29)-ene ตามข้อมูลที่ได้จาก GC-MS ในเบื้องต้น พบว่าจำนวนโปรตอน และคาร์บอน ตลอดจนลักษณะทั่วไปของ $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัม มีความสอดคล้องกับลักษณะเฉพาะของสารในกลุ่ม tetracyclic triterpenoid ดังนี้

เมื่อพิจารณา $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัม จากรูป 2.9 และ ตาราง 3.2 พบสัญญาณที่มีค่า Chemical shift 4.68 และ 4.56 ppm ซึ่งมีลักษณะเป็น d ($J = 2.0$) และ m แสดงให้เห็นว่ามีโปรตอนของคาร์บอนที่มีพันธะคู่ ส่วนค่า Chemical shift 3.18 ppm ซึ่งมีลักษณะเป็น dd ที่มีค่า $J = 5.2, 11.2$ H แสดงว่าน่าจะเป็นโปรตอนของคาร์บอน ที่ต่ออยู่กับหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) และเมื่อมีพันธะคู่อยู่ในโมเลกุล ก็ต้องมีโปรตอนของคาร์บอน ที่ได้รับอิทธิพลจากพันธะคู่ ซึ่งก็น่าจะเป็น โปรตอน ที่ตำแหน่ง 2.37 ppm ซึ่งมีลักษณะเป็น ddd ที่มีค่า $J = 5.6, 10.8, 10.8$

สำหรับโปรตอนที่ตำแหน่ง 1.93 ppm มีลักษณะเป็น m ซึ่งมีค่า integration เป็น 1 โปรตอน ในขณะที่ข้อมูลจาก HMQC สเปกตรัม แสดงว่าโปรตอนตำแหน่งนี้ตรงกับคาร์บอนที่มีค่า Chemical shift เท่ากับ 29.8 ซึ่งเป็น $-\text{CH}_2-$ ดังนั้นแสดงว่าโปรตอนทั้งสองของ CH_2 อยู่ในสิ่งแวดล้อมที่ต่างกันชัดเจน เช่น เป็นส่วนหนึ่งของวง (HMQC สเปกตรัม แสดงสัญญาณของโปรตอนอีกตัวหนึ่งที่ 1.34 ppm) จึง resonance ที่ค่า Chemical shift ต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลจาก COSY สเปกตรัม ที่แสดงการคู่ควบระหว่างโปรตอนทั้งสองด้วยเช่นกันดังรูป



จากรูปจะเห็นว่า H_a อยู่ในตำแหน่งที่ชี้ลง โดยอยู่ในด้านเดียวกับหมู่ olefin จึงได้รับอิทธิพลจาก π -electron และถูก deshielded เป็นผลให้เกิด resonance ที่ chemical shift ต่ำลง คือ 1.93 ppm ในขณะที่ H_b ซึ่งชี้ขึ้น จะได้รับอิทธิพลจากหมู่ olefin น้อยกว่ามากจึง resonance ที่ chemical shift สูงกว่า (1.34 ppm)

นอกจากนั้น $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัม ยังแสดงสัญญาณของ $-\text{CH}_3$ ที่ชัดเจนอีก 7 กลุ่ม (singlet, 3H each) ตลอดจนสัญญาณของ aliphatic hydrocarbon ($-\text{CH}-$, $-\text{CH}_2-$) จำนวนหนึ่งในช่วง 1.65- 1.05 ppm ที่ไม่สามารถระบุ multiplicity ได้ชัดเจน เนื่องจากสัญญาณซ้อนทับกัน

จาก $^{13}\text{C-NMR}$ สเปกตรัม ในรูป 2.10 และ ตาราง 3.2 ทำให้ทราบว่า สาร A มี คาร์บอน อยู่ 30 ตัว DEPT 135 ทำให้ทราบว่าสาร A มี คาร์บอนที่เป็น Quaternary เท่ากับ 6 อะตอม เนื่องจากสัญญาณของคาร์บอนนี้จะหายไป (38.9 : C-4, 40.8 : C-8, 37.1 :C-10, 42.8 :C-14, 43.0 :C-17, 150.9 : C-20) และคาร์บอนที่เป็น CH_2 เท่ากับ 11 อะตอม เนื่องจาก DEPT 135 จะแสดงสัญญาณของพีค CH_2 กลับหัว (38.7 : C-1, 27.2 : C-2, 18.3 :C-6, 34.3 :C-7,20.9 :C-11, 25.1 :C-12, 27.4 : C-15, 35.6 : C-16, 29.8 :C-21, 10.0 :C-22,109.3 :C-29) ส่วน DEPT 90 ซึ่งแสดงเฉพาะสัญญาณของ $-\text{CH}-$ ทำให้ทราบว่ามีคาร์บอนที่เป็น CH เท่ากับ 6 อะตอม (79.0 : C-3, 55.3 : C-5, 50.4 :C-9, 38.1 :C-13,48.3 :C-18, 48.0 :C-19) ดังนั้นคาร์บอนที่เหลือจึงเป็น CH_3 เท่ากับ 7 อะตอม (28.0 : C-23, 15.4 : C-24, 16.1 :C-25, 15.9 :C-26,14.5 :C-27, 18.0 :C-28, 19.3 :C-30) ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลที่ได้จาก $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัม

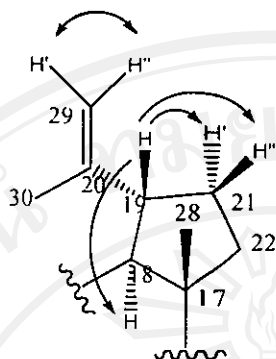
เมื่อพิจารณาค่า Chemical shift ที่ได้จาก $^{13}\text{C-NMR}$ สเปกตรัม จะพบสัญญาณของ คาร์บอนที่สำคัญ คือ คาร์บอนที่มีค่า Chemical shift 150.9 ppm ซึ่งเป็นสัญญาณของ Quaternary carbon ที่เป็น double bond คาร์บอนที่มีค่า Chemical shift 109.3 ppm เป็นสัญญาณของ CH_2 ที่เป็น double bond และ คาร์บอนที่มีค่า Chemical shift 79.0 ppm เป็นสัญญาณของ CH ที่ต่อกับ e⁻ withdrawing group

HMQC สเปกตรัม (รูป 2.13) แสดงการคู่ควบระหว่างโปรตอนกับคาร์บอนที่เชื่อมต่อกัน จากข้อมูลที่ได้ พบว่า โปรตอนที่มีค่า Chemical shift 3.18 ppm (CH) ตรงกับคาร์บอน ที่มีค่า Chemical shift 79.0 ppm โปรตอนที่มีค่า Chemical shift 0.69 ppm (CH) ตรงกับคาร์บอนที่มีค่า Chemical shift 55.3 ppm โปรตอนที่มีค่า Chemical shift 2.37 ppm (CH) ตรงกับคาร์บอนที่มีค่า Chemical shift 48.0 ppm โปรตอนที่มีค่า Chemical shift 1.93,1.34 ppm (CH_2) ตรงกับ คาร์บอนที่มีค่า Chemical shift 29.8 ppm (CH_2) โปรตอนที่มีค่า Chemical shift 4.56,4.68 ppm ตรงกับคาร์บอนที่มีค่า Chemical shift 109.3 ppm

และจาก $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมแสดงหมู่ methyl ($-\text{CH}_3$) ที่เป็นองค์ประกอบอยู่เท่ากับ 7 หมู่ คือค่า Chemical shift ที่ 0.96, 0.75, 1.02, 0.82, 0.94, 0.78, 1.67 ppm ตรงกับคาร์บอนตำแหน่ง ที่ 28.0, 15.4, 16.1, 15.9, 14.5, 18.0, 19.3 ตามลำดับ

ดังนี้

เมื่อพิจารณา COSY Spectrum (รูป 2.14) เพื่อยืนยันการคู่ควบกันของโปรตอน ซึ่งได้ผล



รูป 2.16 ตำแหน่งการคู่ควบที่สำคัญ จาก COSY Spectrum ของสาร A

H ของ C ตำแหน่งที่ 19 (2.37 ppm) คู่ควบกับ H ของ C ตำแหน่งที่ 18 (48.3 ppm), 21 (29.8 ppm) H ของ C ตำแหน่งที่ 21 (29.8 ppm) คู่ควบกับ H ของ C ตำแหน่งที่ 19 (2.37 ppm, $J = 5.6, 10.8, 10.8$), 22 (1.65-1.05 ppm) H ของ C ตำแหน่งที่ 29 (4.56, 4.68 ppm) คู่ควบกับ H ของ C ตำแหน่งที่ 29 (4.56 : 4.68 ppm, $J = 2.0 : 1.2, 2.4$), 30 (1.67 ppm) และ H ของ C ตำแหน่งที่ 30 (1.67 ppm) Coupling กับ H ของ C ตำแหน่งที่ 29 (4.56 : 4.68 ppm, $J = 2.0 : 1.2, 2.4$)

HMBC สเปกตรัม (รูป 2.15) แสดงข้อมูลการเชื่อมต่อกันของคาร์บอน โดยจะแสดงผลการคู่ควบระหว่างโปรตอน กับ คาร์บอนที่อยู่ห่างกัน 2-4 พันธะ (J_{2-4}) ทำให้สามารถยืนยันโครงสร้างทั้งหมดของสาร A ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น รูป 2.17 แสดงการคู่ควบของโปรตอน กับคาร์บอนใกล้เคียงในส่วนต่างๆ ของโครงสร้างดังนี้

- (1) โปรตอนที่มีค่า Chemical shift 3.18 ppm correlate กับ C-4 (38.9), C-24 (15.4), C-23 (28.0) และ โปรตอนที่มีค่า Chemical shift 0.82 ppm correlate กับ C-1 (38.7), C-5 (55.3), C-9 (50.4)
- (2) โปรตอนที่มีค่า Chemical shift 0.69 ppm correlate กับ C-4 (38.9), C-6 (18.3), C-24 (15.4)

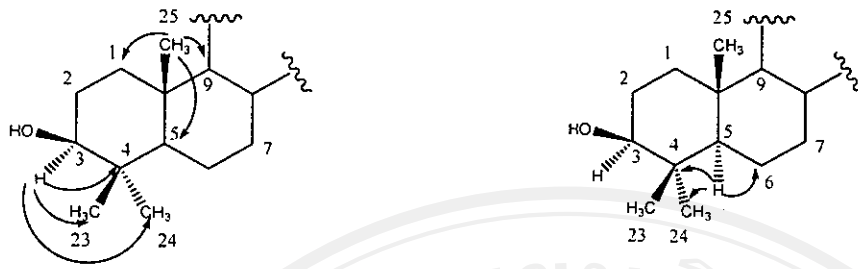
(3) โปรตอนที่มีค่า Chemical shift 2.37 ppm correlate กับ C-13 (38.1), C-18 (42.8), C-20 (150.9), C-21 (29.8), C-29 (109.3), C-30 (19.3) และ โปรตอนที่มีค่า Chemical shift 0.78 ppm correlate กับ C-16 (35.6), C-17 (43.0), C-18 (42.8), C-19 (48.0), C-22 (40.0)

(4) โปรตอนที่มีค่า Chemical shift 0.96 ppm correlate กับ C-2 (27.4), C-3 (79.0), C-4 (38.9), C-5 (55.3), C-24 (15.4)

(5) โปรตอนที่มีค่า Chemical shift 0.75 ppm correlate กับ C-13 (38.1), C-18 (42.8), C-20 (150.9), C-21 (29.8), C-29 (109.3), C-30 (19.3)

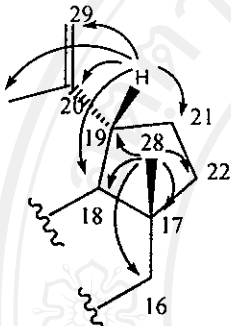
(6) โปรตอนที่มีค่า Chemical shift 1.02 ppm correlate กับ C-7 (34.3), C-8 (40.8), C-9 (50.4), C-11 (20.9), C-15 (27.4) และ โปรตอนที่มีค่า Chemical shift 0.94 ppm correlate กับ C-13 (38.1), C-14 (48.3)

(7) โปรตอนที่มีค่า Chemical shift 4.56 ; 4.68 ppm correlate กับ C-19, C-30 และ โปรตอนที่มีค่า Chemical shift 1.67 ppm correlate กับ C-19 (48.0), C-20 (150.9), C-29 (109.3)

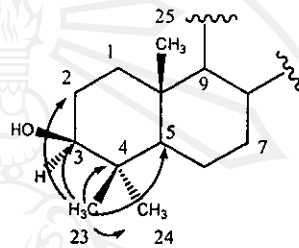


(1)

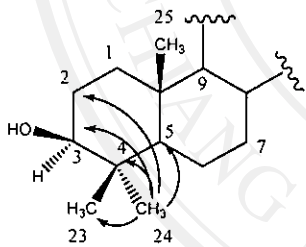
(2)



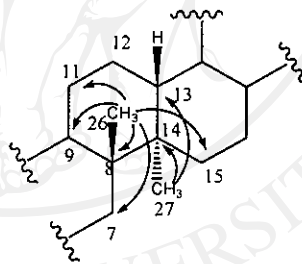
(3)



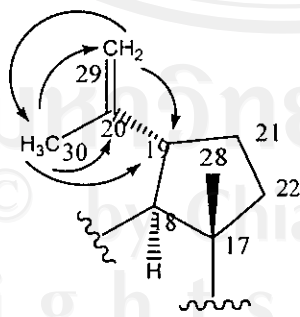
(4)



(5)



(6)



(7)

รูป 2.17 ตำแหน่งการคู่ควมที่สำคัญจาก HMBC Spectrum ของสาร A

จากข้อมูล NMR สเปกตรัมทั้งหมด สามารถสรุปได้ดังนี้

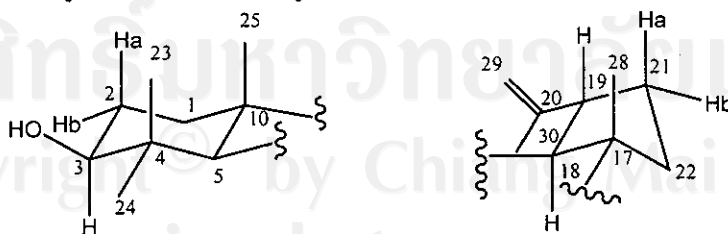
ตาราง 3.4 สรุปผลการวิเคราะห์สาร A ด้วยเทคนิค NMR Spectroscopy

| ตำแหน่ง | ^{13}C | ^1H ($J=\text{Hz}$) | HMBC |
|---------|-----------------|--------------------------------|------------------------------------|
| 1 | 38.7 | 1.65-1.05 | |
| 2 | 27.4 | 1.65-1.05 | |
| 3 | 79.0 | 3.18 dd (5.2, 11.2) | C-4, C-23, C-24 |
| 4 | 38.9 | - | - |
| 5 | 55.3 | 0.69 | C-4, C-6, C-24 |
| 6 | 18.3 | 1.65-1.05 | |
| 7 | 34.3 | 1.65-1.05 | |
| 8 | 40.8 | - | - |
| 9 | 50.4 | 1.65-1.05 | |
| 10 | 37.1 | - | - |
| 11 | 20.9 | 1.65-1.05 | |
| 12 | 25.1 | 1.65-1.05 | |
| 13 | 38.1 | 1.65-1.05 | |
| 14 | 42.8 | - | - |
| 15 | 27.4 | 1.65-1.05 | |
| 16 | 35.6 | 1.65-1.05 | |
| 17 | 43.0 | - | - |
| 18 | 48.3 | 1.65-1.05 | |
| 19 | 48.0 | 2.37 ddd (5.6, 10.8, 10.8) | C-13, C-18, C-20, C-21, C-29, C-30 |
| 20 | 150.9 | - | - |
| 21 | 29.8 | 1.93, 1.34 | |
| 22 | 40.0 | 1.65-1.05 | |
| 23 | 28.0 | 0.96 s | C-2, C-3, C-4, C-5, C-24 |
| 24 | 15.4 | 0.75 s | C-2, C-3, C-4, C-5, C-23 |

ตาราง 3.3 (ต่อ)

| ตำแหน่ง | ^{13}C | ^1H (J =Hz) | HMBC |
|---------|-----------------|--------------------------------------|------------------------------|
| 25 | 15.9 | 0.82 s | C-1, C-5, C-9 |
| 26 | 16.1 | 1.02 s | C-7, C-8, C-9, C-11, C-15 |
| 27 | 14.5 | 0.94 s | C-13, C-14 |
| 28 | 18.0 | 0.78 s | C-16, C-17, C-18, C-19, C-22 |
| 29 | 109.3 | 4.56; dd (2.4, 1.2) 4.68; d (2.0) | C-19, C-30 |
| 30 | 19.3 | 1.67 s | C-19, C-29, C-30 |

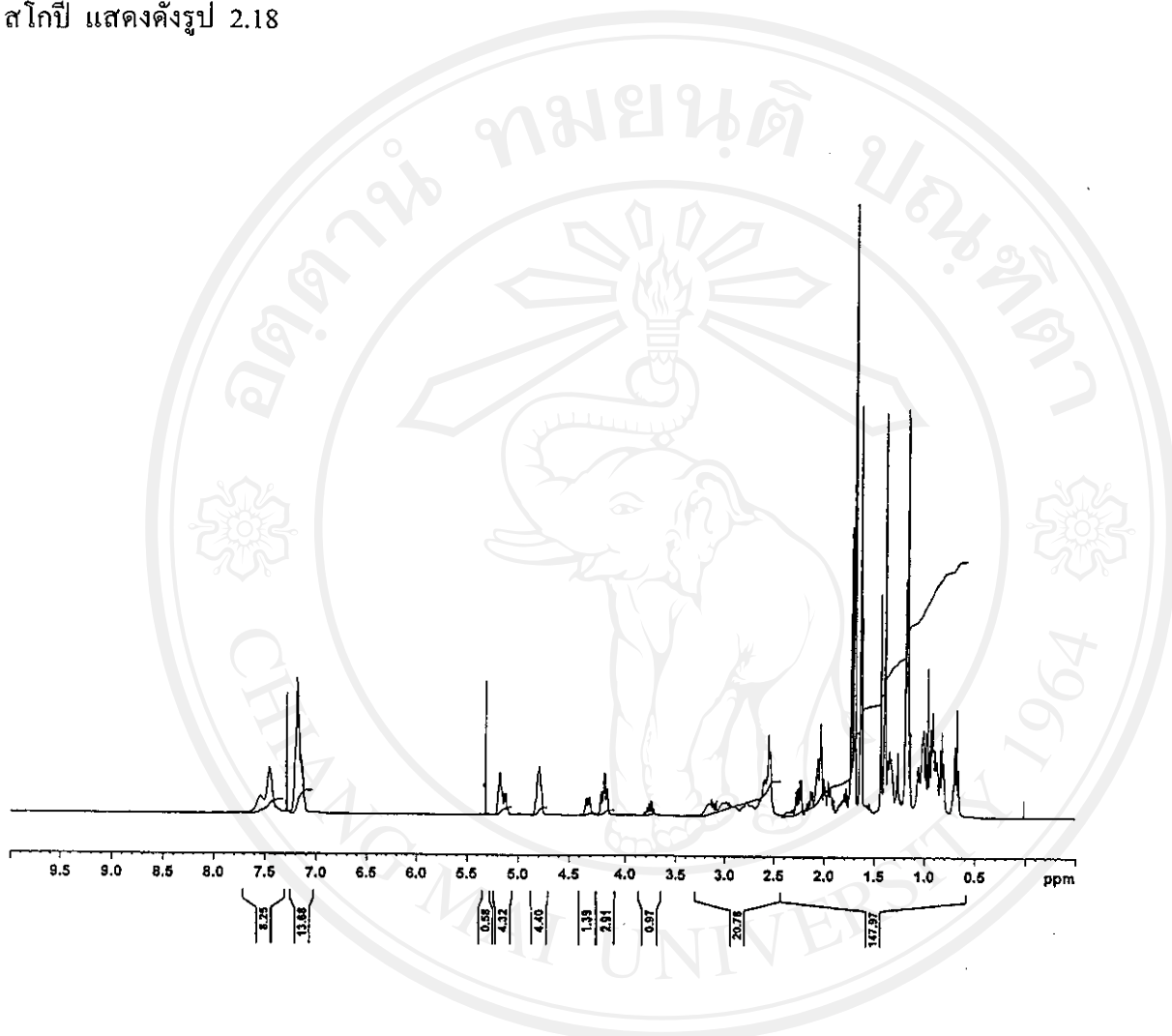
Relative stereochemistry ของคาร์บอนที่ตำแหน่ง 3 และ 19 นั้น สามารถพิจารณาได้จากค่า coupling constant (J) ของโปรตอนที่เกี่ยวข้อง จากตาราง 3.3 พบว่าค่า J ของโปรตอนตำแหน่งที่ 3 (δ 3.18, dd) เท่ากับ 5.2 และ 11.2 Hz ซึ่งเป็นค่าที่ต่างกันมาก แสดงว่าโปรตอนตำแหน่งนี้ อยู่ในตำแหน่งที่สามารถคู่ควบกับโปรตอนอื่นที่แตกต่างกัน จะเห็นว่าในกรณีนี้ โปรตอน C-3 ต้องอยู่ในตำแหน่ง axial จึงจะสามารถเกิดการคู่ควบกันระหว่าง $\text{H}-3_{(\text{axial})}$ กับ $\text{H}_{\text{a}(\text{axial})}$ ($J_{\text{ax-ax}}=11.2$ Hz) และ $\text{H}-3_{(\text{axial})}$ กับ $\text{H}_{\text{b}(\text{equatorial})}$ ($J_{\text{ax-eq}}=5.2$ Hz) ดังนั้นจากข้อมูลทั้งหมดซึ่งยืนยันว่า H-3 อยู่ในตำแหน่ง axial เป็นผลให้หมู่ hydroxyl จะต้องอยู่ในตำแหน่ง equatorial หรือ ตำแหน่ง β - ส่วนตำแหน่งที่ 19 (δ 2.37, ddd) ค่า J เท่ากับ 5.6, 10.8 และ 10.8 Hz ซึ่งแสดงว่า H-19 ต้องอยู่ในตำแหน่งซี้ขึ้น จึงจะสามารถเกิดการคู่ควบกันระหว่างตำแหน่ง H-19 กับ H-18 ($J=10.8$ Hz), H-19 กับ H_{a} ($J=10.8$ Hz) และ H-19 กับ H_{b} ($J=5.6$ Hz) จากข้อมูลทั้งหมดยืนยันว่า H-19 อยู่ในตำแหน่งซี้ขึ้น ดังนั้นจึงเป็นผลให้หมู่ olefin จะต้องอยู่ในตำแหน่งซี้ลงดังรูป



จากข้อมูล NMR สเปกตรัมต่างๆ ที่ได้ และนำผลการวิเคราะห์ มาเปรียบเทียบกับ ข้อมูล NMR สเปกตรัม ที่ได้เคยมีการรายงานไว้ รวมทั้งการเปรียบเทียบข้อมูลอื่นๆ ได้แก่ ค่าจุดหลอมเหลว และค่า $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงข้อมูลที่ตรงกัน จึงสามารถสรุปได้ว่าสาร A ที่แยกได้คือ 3 β -Hydroxylup-20(29)-ene

3.2 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสาร B

ผลการวิเคราะห์สาร B ($R_f = 0.15$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$; 0.1:9.9) ด้วยเทคนิค NMR สเปกโทรสโกปี แสดงดังรูป 2.18

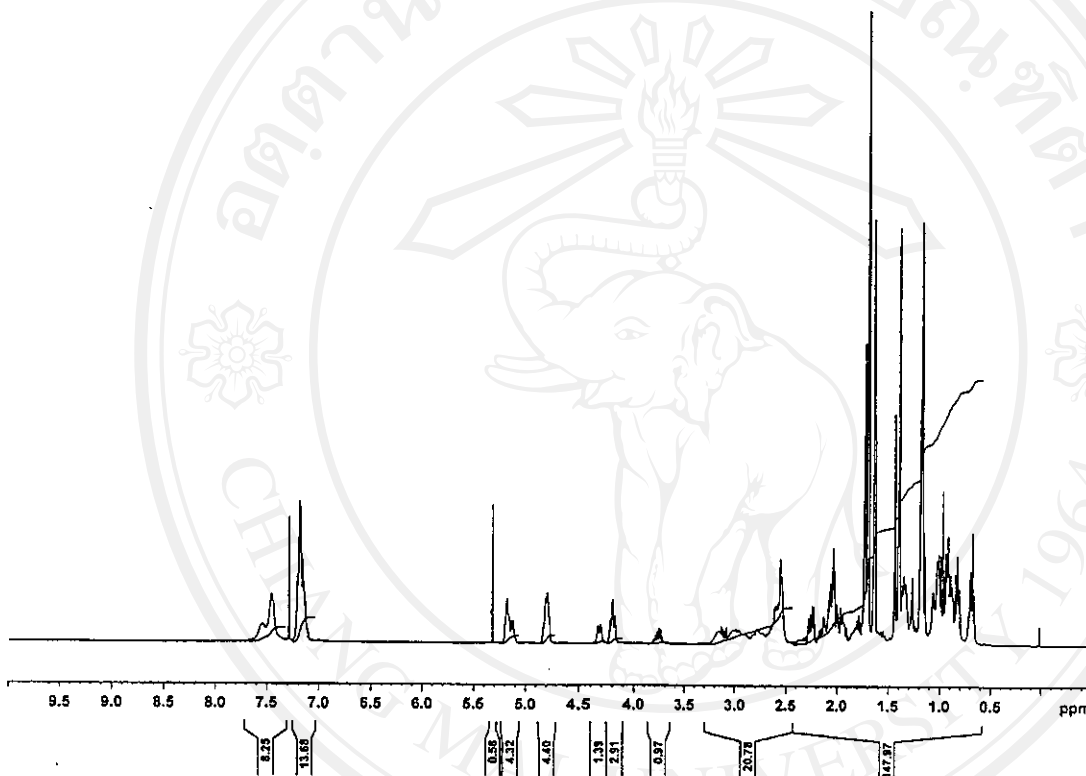


รูป 2.18 $^1\text{H-NMR}$ Spectrum (CDCl_3) ของสาร B

$^1\text{H-NMR}$ Spectrum แสดงค่า chemical shift (δ) ที่ตำแหน่งสำคัญ คือ 7.2 และ 7.45 ppm ซึ่งเป็นตำแหน่งของอะโรมาติก และแสดงค่า chemical shift (δ) ที่ตำแหน่ง 5.2-5.1, 4.8, 4.33, 4.2 และ 3.75 ppm ตามลำดับ เมื่อพิจารณาสัดส่วนของโปรตอน พบว่าสัดส่วนของโปรตอนที่ได้ไม่ค่อยสอดคล้องกัน จึงคาดได้ว่า สาร B เป็นสารที่ยังไม่บริสุทธิ์

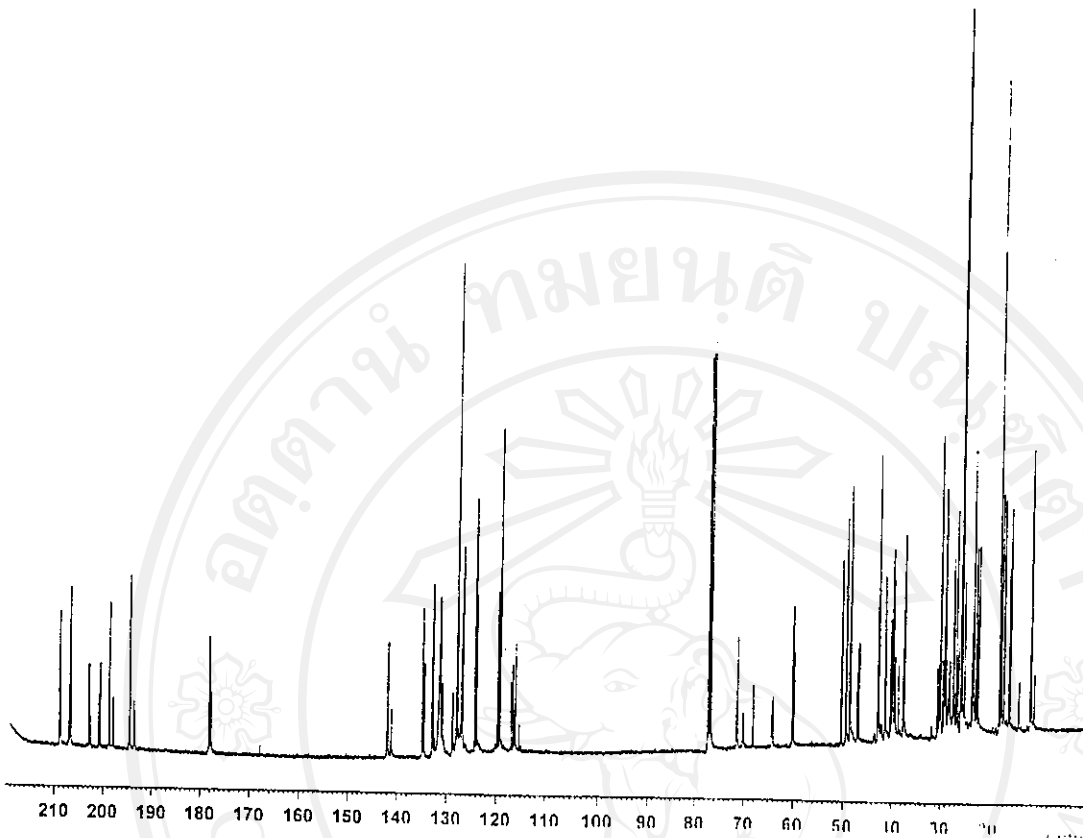
3.3 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสาร C

ผลการวิเคราะห์สาร C ($R_f = 0.15$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$; 0.1:9.9) ด้วยเทคนิค NMR สเปกโทรสโกปี แสดงดังรูป 2.18-2.19 ตามลำดับ



รูป 2.19 $^1\text{H-NMR}$ Spectrum (CDCl_3) ของสาร C

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

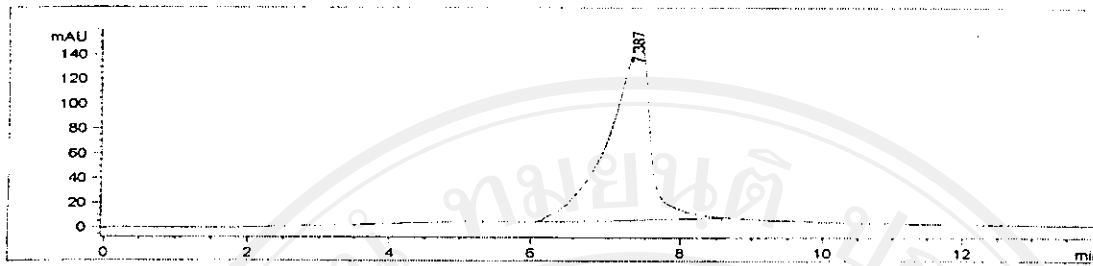


รูป 2.20 $^{13}\text{C-NMR}$ Spectrum (CDCl_3) ของสาร C

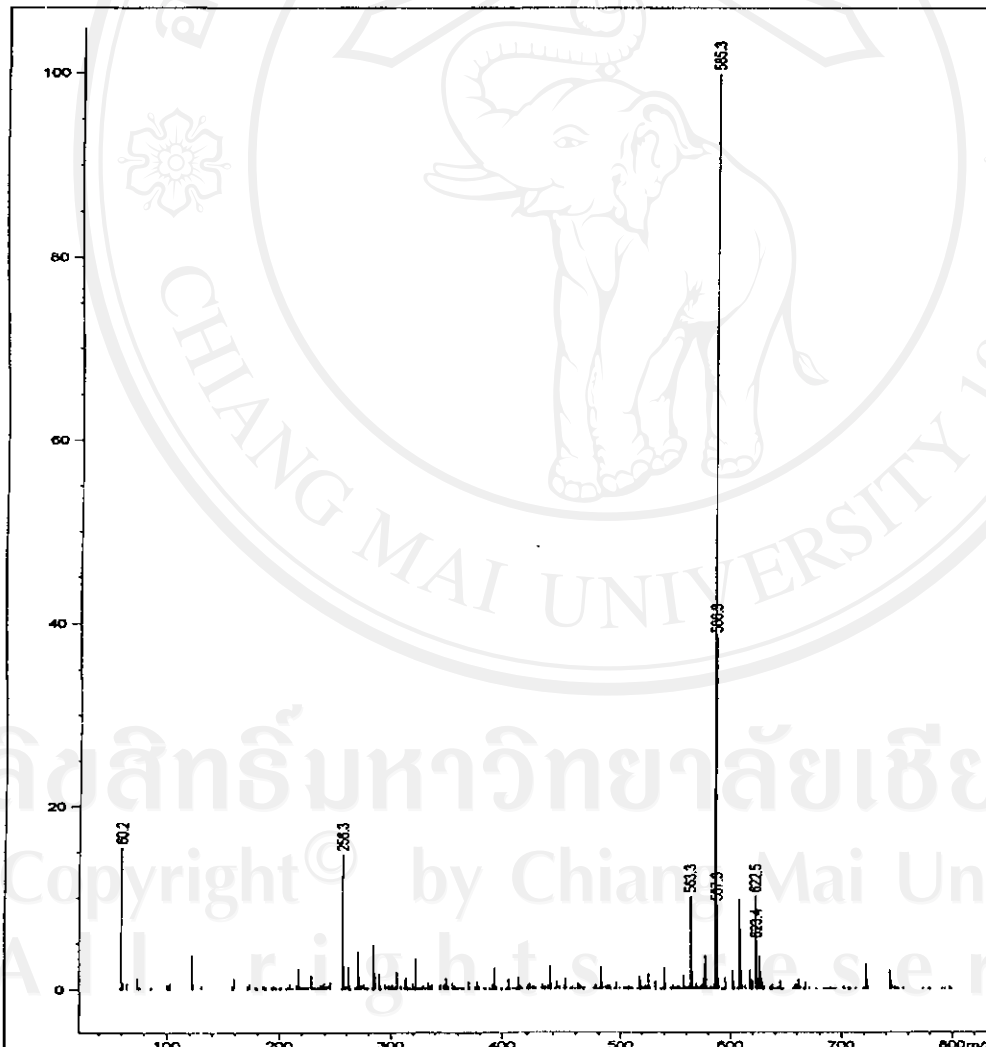
พิจารณา $^1\text{H-NMR}$ Spectrum พบค่า chemical shift (δ) ที่ตำแหน่งสำคัญ คือ 7.2 และ 7.45 ppm ซึ่งเป็นตำแหน่งของอะโรมาติกโปรตอน และแสดงค่า chemical shift (δ) ที่ตำแหน่ง 5.2-5.1, 4.8, 4.33, 4.2 และ 3.75 ppm ตามลำดับ เมื่อพิจารณาสัดส่วนของโปรตอน พบว่าสัดส่วนของโปรตอนที่ได้ไม่ค่อยสอดคล้องกัน และเมื่อยืนยันโครงสร้างด้วย $^{13}\text{C-NMR}$ สเปกตรัม พบคาร์บอนจำนวนมาก ซึ่งมากเกินไปที่จะเป็นสารตัวเดียว จึงคาดได้ว่าสาร C เป็นสารที่ยังไม่บริสุทธิ์

และเมื่อเปรียบเทียบ $^1\text{H-NMR}$ Spectrum ระหว่างสาร B กับ สาร C จะเห็นถึงความเหมือนกันของ ค่า chemical shift (δ) ที่ตำแหน่งต่างๆ ซึ่งมีความเหมือนกันมากพอที่จะสรุปได้ว่า สาร B เป็นสารตัวเดียวกันกับสาร C

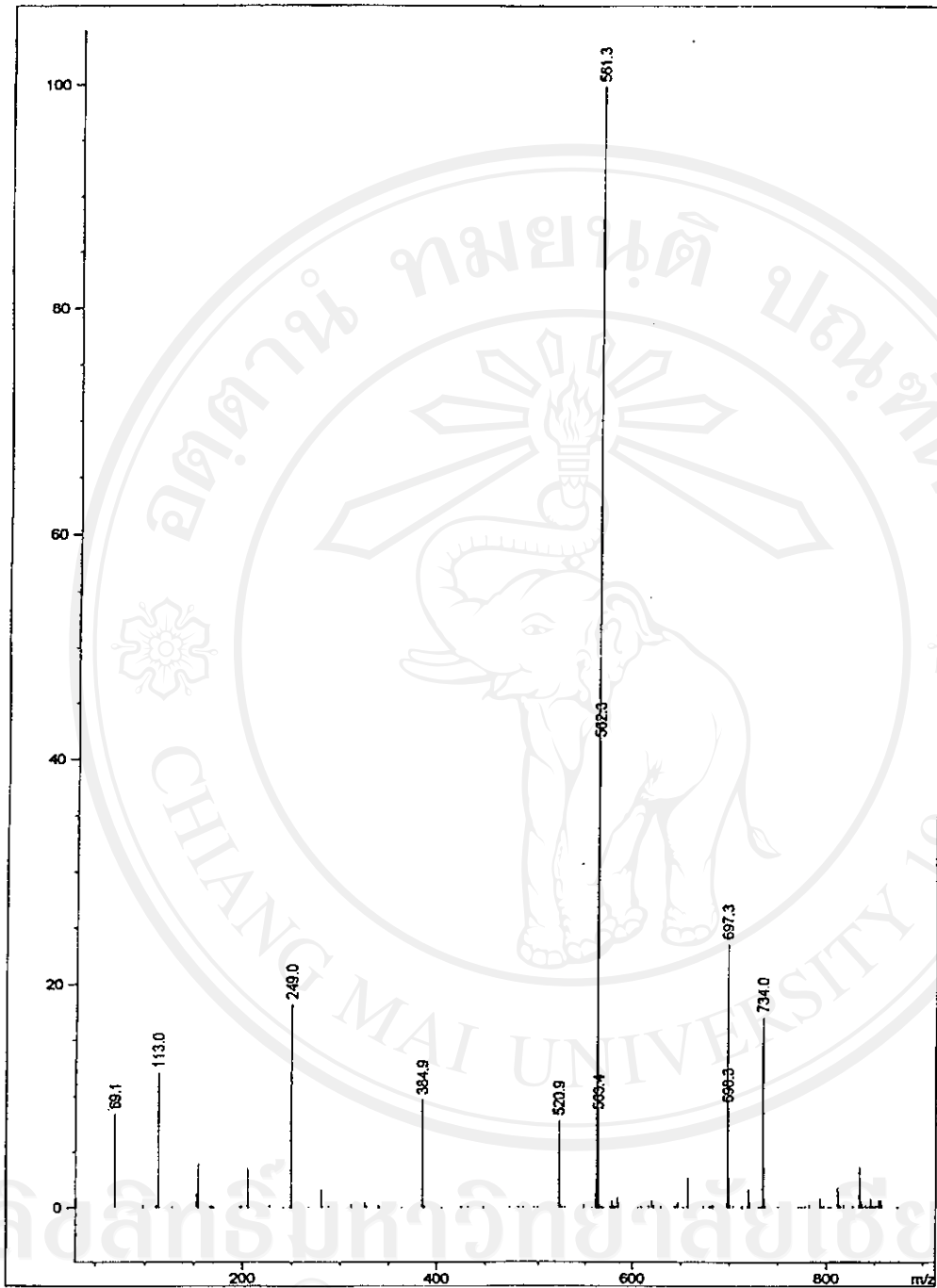
การยืนยันโครงสร้างด้วย LC-MS Chromatogram ได้ผลแสดงดังรูป 2.21-2.23 ตามลำดับ



รูป 2.21 LC-MS Chromatogram ของสาร C



รูป 2.22 Mass Spectrum (Positive mode) ของสาร C



รูป 2.23 Mass Spectrum (Negative mode) ของสาร C

เมื่อพิจารณาข้อมูลจาก LC-MS โครมาโทแกรม ของสาร C (รูป 2.22 และ 2.23) พบว่า สาร C มี Mass = 562 m/z (Positive mode : 585.3-23, Negative mode: 561.3+1) จากข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับขนาด พบว่ามีการรายงานสารที่มีมวลโมเลกุล เท่ากับ 562 ซึ่งพบในเอกสาร คือ สารกลุ่มไซโคลเฮกซะไดโอน (Cyclohexadione, $C_{15}H_{16}O_6$; Mesuanic acid และ Mesuaferrol) เมื่อนำโครงสร้างของ Cyclohexadione และ 1H -NMR สเปกตรัม ของสารทั้งสอง ที่คาดว่าอาจจะเป็นสาร C มาเทียบกับ 1H -NMR สเปกตรัมที่ได้ พบว่ามีส่วนที่คล้ายกัน ดังแสดงในตารางที่ 3.5 โดยจะเห็นว่าสาร C มีสัญญาณคล้ายคลึงกับทั้ง Mesuanic acid และ Mesuaferrol จึงคาดว่าสาร C น่าจะมีสารตัวใดตัวหนึ่ง หรือ ทั้งสองตัวเป็นองค์ประกอบหลัก

ตาราง 3.5 การเปรียบเทียบค่า δ จาก 1H -NMR สเปกตรัม ของสาร C กับ Mesuanic acid และ Mesuaferrol

| สาร C | Mesuanic acid | Mesuaferrol |
|--------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 7.45 (8.5 H), 7.2 (14 H) | 7.36 (5H) | 7.48 (2H, m), 7.12 (3H, m) |
| 5.2-5.1 (4 H) | 5.5-5.1(1H, m) | 5.18 (1H, m) |
| 4.8 (4.5 H) | 4.9 (1H, m) | 4.80 (1H, m) |
| 4.33 (1.5 H) | 4.33 (1H, m) | - |
| 4.2 (3 H) | - | 4.26 (1H, m) |
| 3.75 (1 H) | - | 3.76 (1H, d, $J = 7$ Hz) |
| 3.3-0.6 ppm (174 H) | - | 3.12 (1H, d, $J = 7$ Hz) |
| | 2.98 (2H, m) | 2.80 (1H, m) |
| | 2.6 (1H, m) | 2.54 (2H, m) |
| | - | 2.04 (3H, s) |
| | - | 1.70 (12H, m) |
| | 1.35 (3H, d, $J = 7.0$ Hz) | 1.40 (4H, m) |
| | - | 1.20 (6H, m), |
| | 1.00 (3H, d, $J = 7.0$ Hz) | 1.08 (3H, d, $J = 7$ Hz) |
| | (29 H complicated m) | 0.94 (3H, d, $J = 7$ Hz) |

อย่างไรก็ตาม $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัม ของสาร C ยังคงแสดงส่วนที่เพิ่มเติม และแตกต่าง ออกไปจาก Mesuanic acid และ Mesuaferrol โดยจะเห็นว่ามีส่วนโปรตอนในช่วง (3.3-0.6 ppm) จำนวนมาก นอกจากนี้ยังพบว่าจำนวนโปรตอนที่เป็นอะโรมาติก มีสัดส่วนที่ไม่สอดคล้องกับ โปรตอนที่ตำแหน่งอื่นอย่างชัดเจน ข้อมูลทั้งหมดยืนยันว่าสาร C เป็นสารผสมของสารอย่างน้อย 2 ชนิด จึงต้องนำไปหาวิธีการแยกใหม่ต่อไป สำหรับเทคนิค และสถานะที่ได้ทำการทดลองแล้วมี ดังต่อไปนี้

1. การแยกด้วย คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยหาสถานะการแยกที่เหมาะสมโดย ปรับเปลี่ยนตัวทำละลาย ชนิดต่างๆ ซึ่งได้แก่ Hexane, dichloromethane และ Ethyl Acetate สถานะ ที่ใช้คือ 1% เอทิลแอซีเตตในไดคลอโรมีเทนเป็นตัวชะ และใช้ Silica gel ทั้งแบบ column chromatography และแบบ thin layer chromatography เป็นตัวดูดซับ ซึ่งทั้งสองแบบได้ผลที่ ใกล้เคียงกัน

2. การแยกด้วย column chromatography โดยใช้ Alumina เป็นตัวดูดซับ และใช้ 1% เอทิลแอซีเตต ในไดคลอโรมีเทนเป็นตัวชะ ซึ่งวิธีนี้ผลของการแยกไม่ดีเท่ากับการใช้ Silica gel เป็นตัวดูดซับ

3. การแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีผิวบาง (Preparative layer chromatography) โดย ใช้ silica gel 60 PF₂₅₄ เป็นวัสดุภาคคงที่ และใช้ เอทิลแอซีเตต 1% ในไดคลอโรมีเทน เป็นวัสดุภาค เคลื่อนที่

4. การแยกด้วยเทคนิค Preparative HPLC โดยใช้สถานะดังที่ได้กล่าวมาแล้ว และได้ทำ การปรับเปลี่ยน Mobile phase เพื่อหาสถานะการแยกที่เหมาะสม ดังนี้

(1) Acetonitrile : Methanol อัตราส่วนที่ใช้ดังนี้ 0:10, 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1, 10:0 เมื่อพิจารณาโครมาโทแกรมที่ได้ พบว่า Acetonitrile ทำให้สารตกตะกอน คือยัง เพิ่ม Acetonitrile มากก็ยิ่งตกตะกอนมาก ซึ่งเป็นผลให้การแยกไม่ดี สำหรับสถานะที่ดีที่สุดของ Acetonitrile : Methanol คือ 1:9 (สถานะที่ใช้แยกสาร C) แม้ว่า Acetonitrile จะทำให้สารตกตะกอน แต่ถ้าใช้ในปริมาณที่ไม่มากนักก็จะสามารถช่วยในการแยกได้ เนื่องจากถ้าใช้ Methanol อย่างเดียว สารจะออกจากคอลัมน์อย่างรวดเร็วโดยไม่เกิดการแยกของสาร

(2) Acetonitrile : water อัตราส่วนที่ใช้ดังนี้ 7:3, 8:2, 9:1, 10:0 เมื่อพิจารณาโครมาโท- แกรมที่ได้ พบว่า Acetonitrile ซึ่งทำให้สารตกตะกอนอยู่แล้ว ผสมกับ water ซึ่งผลของ water ทำให้ เกิดการหน่วง สารไม่ยอมออกจากคอลัมน์ พิกที่ได้ออกกว้าง (broad) จนไม่สามารถที่จะเก็บ fraction ได้ สถานะนี้จึงไม่เหมาะสมสำหรับใช้แยกสาร C

(3) Methanol : water อัตราส่วนที่ใช้ดังนี้ ครั้งที่ 1 ใช้ 5% H₂O (10 นาที) 4-2% H₂O (25 นาที) และ 2% H₂O จนสารออกมามาก ครั้งที่ 2 ใช้ 5% H₂O (10 นาที) 4-3% H₂O (25 นาที) และครั้งที่ 3 ใช้ 5% H₂O (10 นาที) 4-3% H₂O (25 นาที) และกลับมาครั้งที่ 5% H₂O ครั้งที่ 4 ใช้ 5% H₂O และครั้งที่ 5 ใช้ 10% H₂O เมื่อพิจารณาโครมาโทแกรมทั้งหมดที่ได้พบว่า การเพิ่มน้ำทำให้การแยกช้าลง สังเกตได้จาก ค่า retention time ที่เพิ่มขึ้น แต่ไม่ได้ช่วยให้การแยกดีขึ้น สำหรับ 10% H₂O นั้นเป็นการใช้ H₂O ในปริมาณที่มากเกินไปทำให้สเปกตรัมที่ได้ไม่มีลักษณะเป็นพีค ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าอัตราส่วนทั้งหมดนี้ไม่สามารถแยกสาร C ให้บริสุทธิ์ได้

ปัญหาที่สำคัญที่สุดของการแยกสารตัวนี้ ก็คือ เมื่อนำสารมา spot บน TLC plate เพื่อหาสถานะที่เหมาะสมสำหรับการแยกสาร โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี พบว่าเป็น spot เดียวที่ไม่แยกออกจากกัน ไม่ว่าจะใช้ระบบตัวทำละลายแบบใด ดังนั้นจึงไม่สามารถแยกโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีได้ และเมื่อทำการแยกโดยใช้เทคนิค Preparative HPLC ปรากฏว่าไม่สามารถหาระบบ ตัวทำละลาย และสถานะที่จะแยกสารได้ ในขณะเดียวกัน ¹H-NMR และ ¹³C-NMR สเปกตรัม กลับแสดงอย่างชัดเจนว่าสารที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์ ซึ่งนั่นแสดงว่า spot และ พีค ที่ได้อาจจะซ้อนทับกันอยู่จึงต้องหาวิธีการแยกใหม่ แต่เนื่องจากสารมีอยู่ปริมาณจำกัด และไม่เพียงพอที่จะทำการแยกต่อไป จึงหยุดการทดลองไว้เพียงเท่านี้

จากข้อมูลและผลการทดลองที่ได้ทั้งหมด อาจสรุปได้ในเบื้องต้นว่า สาร C ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักทั้งในส่วนสกัด เอทิลแอซีเทต และ เฮกเซน เป็นสารผสมระหว่างสารกลุ่ม Cyclohexadione (Mesuanic acid และ/หรือ Mesuaferrol) ซึ่งยืนยันได้จาก Mass Spectrum และ ¹H-NMR Spectrum และสารอีกอย่างน้อย 1 ชนิด ที่มีจำนวน aliphatic carbon และ โปรตอนจำนวนมาก ทั้งนี้ หากพิจารณาลักษณะทั่วไปของ ¹H-NMR ในช่วง 0.6-2.5 ppm แล้วจะเห็นว่ามีลักษณะที่สอดคล้องกับลักษณะเฉพาะของสารกลุ่ม tetracyclic triterpenoid โดยเฉพาะสัญญาณของ methyl proton จำนวน 9 กลุ่ม ที่เห็นอย่างชัดเจน (รูป 2.19) คล้ายกับที่พบใน ¹H-NMR ของสาร A (รูป 2.9) ที่แยกได้ จึงอาจเป็นไปได้ว่าสารอีกชนิดหนึ่งที่ปนอยู่ในสารผสม C นั้นอาจเป็นสารในกลุ่ม tetracyclic triterpenoid ก็เป็นไปได้ อย่างไรก็ตามจะต้องทำการแยกสารทั้งหมดให้เป็นสารบริสุทธิ์ เพื่อนำมาหาโครงสร้างที่ชัดเจนต่อไป