

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผล

การแยกองค์ประกอบทางเคมีจากน้ำยางของต้นตาลุ่มทะเล

เมื่อนำส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตท (6.03 กรัม) มาแยกองค์ประกอบออกจากกัน โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีและทำการตกผลึกจะได้สารประเภท triterpene 2 สาร ได้แก่สาร 1 และสาร 2 สารผสม triterpene 2 สาร (4 และ 5) และสารผสม diterpene (3) การวิเคราะห์หาโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ใช้เทคนิค 1D และ 2D NMR Spectroscopy

1. การวิเคราะห์โครงสร้างของสาร Olean-12-en-3 α -ol (1)

สาร 1 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว จุดหลอมเหลว 227 - 229 ° ซ แสดงค่า สเปซิฟิกโรเตชัน $[\alpha]_D^{25} = -53^\circ$ ในตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม เข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่าคงที่ของการเคลื่อนที่ (R_f) 0.22 ในตัวทำละลาย 10 % อีเธอร์ในเฮกเซน จากการค้นคว้าในเอกสารพบว่า Olean-12-en-3 α -ol มี mp. = 228 ° ซ และ Olean-12-en-3 β -ol มี mp. = 197-197.5 ° ซ, $[\alpha]_D^{19} = +88.4^\circ$ (CHCl₃) (Chapman & Hall 1994)

UV Spectrum ไม่ดูดกลืนแสงในช่วง UV แสดงว่าสารประกอบ 1 ไม่มีพันธะคู่ที่คอนจูเกตกัน

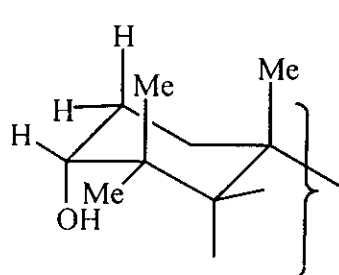
ให้สีม่วงกับสารทดสอบ vanillin sulfuric acid แสดงว่าสารประกอบ 1 เป็นสารประกอบประเภท triterpene

IR Spectrum (ภาพประกอบ 5) แสดงแถบดูดกลืนแสงที่ 3424 cm⁻¹ (br, OH Stretching) แสดงว่า มีหมู่ฟังก์ชันไฮดรอกซิล และแสดงแถบดูดกลืนแสงที่ 850 cm⁻¹ (trisubstituted double bond)

จาก ^{13}C NMR Spectrum (ภาพประกอบ 7) พบว่าสารประกอบ 1 มีคาร์บอนทั้งหมด 30 คาร์บอน และจากข้อมูล DEPT (ภาพประกอบ 8) ระบุได้ว่ามี methyl carbon 8 หมู่ มี methylene carbon 10 คาร์บอน มี methine carbon 5 คาร์บอน และมี quaternary carbon 7 คาร์บอน

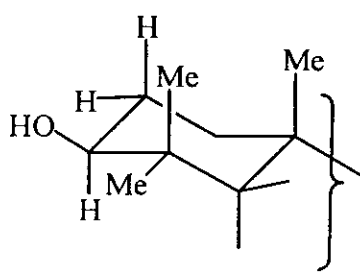
จาก ^1H NMR (ตารางที่ 3) พบว่ามี singlet methyl group 8 หมู่ มี olefinic proton เพียง 1 โปรตอน ที่ δ 5.19 (*t*, $J = 4$ Hz) แสดงว่าในโครงสร้างของสาร 1 มีพันธะคู่เพียง 1 พันธะเท่านั้น โครงสร้างของ triterpene ที่เป็นไปได้คือ oleanane ดังนั้นถ้าสารประกอบ 1 เป็น oleanane อาจจะมีพันธะคู่อยู่ระหว่าง C-5 กับ C-6 หรือ C-9 กับ C-11 หรือ C-12 กับ C-13 หรือ C-14 กับ C-15 หรือ C-18 กับ C-19

นอกจากนั้นข้อมูล ^1H NMR (ภาพประกอบ 6 และตารางที่ 3) ของสารประกอบ 1 พบสัญญาณ oxymethine protons 1 โปรตอน (H-3) ที่ δ 3.42 แสดงสัญญาณเป็น triplet มีค่า $J = 3$ Hz โดยทั่วไปโปรตอนในตำแหน่ง equatorial (βH) จะมีค่า J แคบ ($J \sim 4 - 5$ Hz) แต่ $\alpha\text{-H}$ มักจะมีสัญญาณเป็น *dd* และมีค่า J 2 ค่า ($J \sim 5$ Hz และ ~ 10 Hz) ค่า J กว้าง ($J \sim 10 - 14$ Hz) เกิดจากการคู่ควบของโปรตอน 2 ตัวในตำแหน่ง 1,2 diaxial (dihedral angle 180°) (Pavia, Lampman and Kriz., 1996) ดังแสดง



$$J_{e,e} = J_{e,a} = 4-5 \text{ Hz}$$

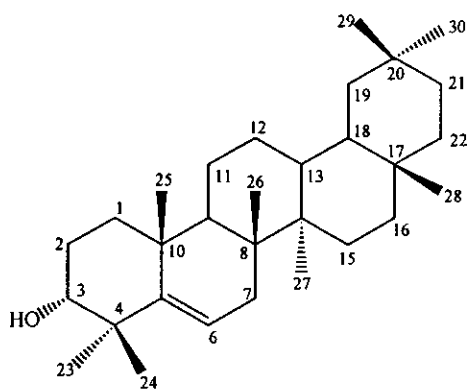
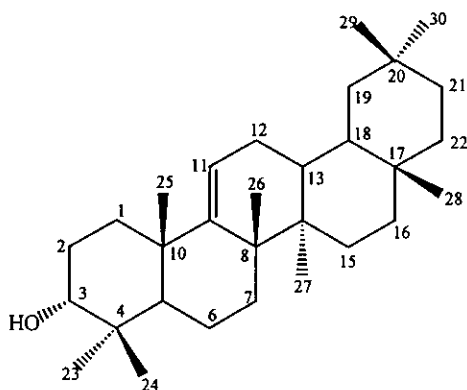
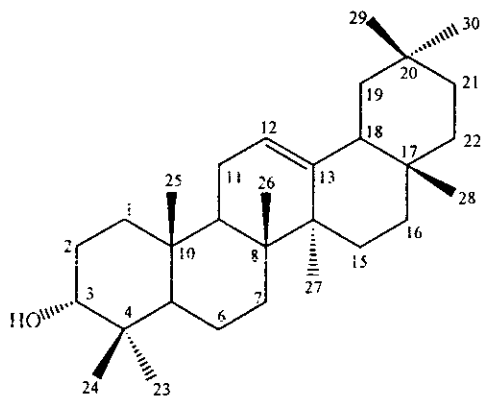
$$\alpha = 60^\circ$$

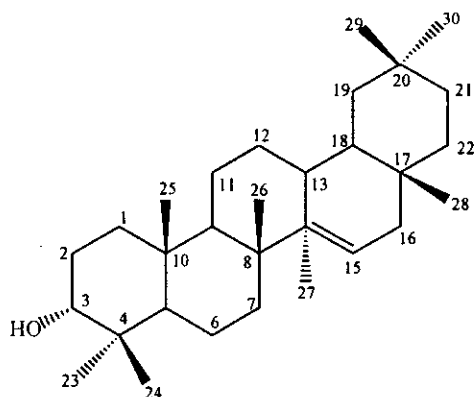
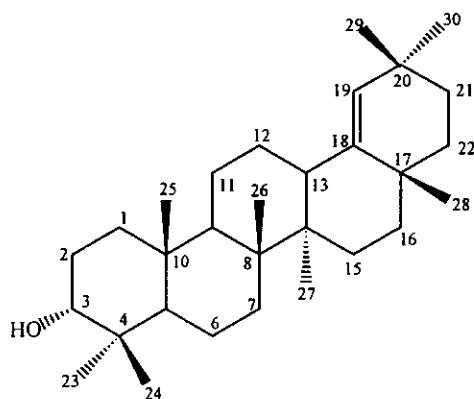


$$J_{a,e} = 4-5 \text{ Hz}, \alpha = 60^\circ$$

$$J_{a,a} = 10-14 \text{ Hz}, \alpha = 180^\circ$$

จากการเปรียบเทียบค่า J ของโปรตอนตำแหน่งที่ 3 ในสารประกอบ 1 ($J = 3$ Hz) แสดงว่าสารประกอบ 1 ควรจะมีลักษณะโปรตอนอยู่ในตำแหน่ง equatorial ของวง A เป็น βH ซึ่งจากข้อมูลนี้ทำให้สามารถทำนายโครงสร้างที่เป็นไปได้ของสาร 1 ดังนี้

1. olean-5(6)-en-3 α -ol (1)2. olean-9(11)-en-3 α -ol3. olean-12-en-3 α -ol

4. olean-14-en-3 α -ol (3-epi-taraxerol)5. olean-18(19)-en-3 α -ol

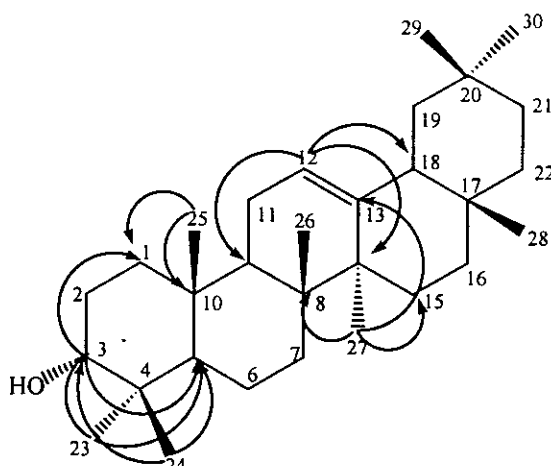
จากการเปรียบเทียบสัญญาณคาร์บอนที่เป็น sp^2 methine carbon และ sp^2 quaternary carbon ของสารประกอบ 1 พบสัญญาณที่ δ 121.77 และ δ 145.20 ตามลำดับ

เมื่อนำข้อมูลนี้ไปเปรียบเทียบกับสารประกอบที่มีรายงานแล้วพบว่าคาร์บอนที่เป็นพันธะคู่ในโครงสร้างของ olean-5(6)-en-3 α -ol มีค่า C-5 (δ 145.4), C-6 (δ 117.6) ของ olean-9(11)-en-3 α -ol มีค่า C-9 (δ 147.4), C-11 (δ 117.4) ของ olean-12-en-3 α -ol มีค่า C-12 (δ 122), C-13 (δ 145) ของ olean-14-en-3 α -ol มี

ค่า C-14 (δ 158.1), C-15 (δ 117.0) และของ olean-18(19)-en-3 α -ol มีค่า C-18 (δ 142.8), C-19 (δ 129.8) (Mahato and Kundu, 1994)

ในทางทฤษฎีถ้าพันธะคู่อยู่ระหว่าง C- 5 และ C- 6 ข้อมูล HMBC ควรพบ 3H-23, 3H-24 และ 3H-25 มีความสัมพันธ์กับ C-5 ถ้าพันธะคู่อยู่ระหว่าง C- 9 และ C- 11 ข้อมูล HMBC จะต้องพบ 3H-25 และ 3H-26 มีความสัมพันธ์กับ C-9 ถ้าพันธะคู่อยู่ระหว่าง C- 12 และ C- 13 ข้อมูล HMBC ควรพบ 3H-27 มีความสัมพันธ์กับ C-13 ถ้าพันธะคู่อยู่ระหว่าง C- 14 และ C- 15 ข้อมูล HMBC ควรพบ 3H-26 และ 3H-27 มีความสัมพันธ์กับ C-14 แต่ถ้าพันธะคู่อยู่ระหว่าง C- 18 และ C- 19 ข้อมูล HMBC ควรพบ 3H-29 และ 3H-30 มีความสัมพันธ์กับ C-19 และควรพบ 3H-28 มีความสัมพันธ์กับ C-18

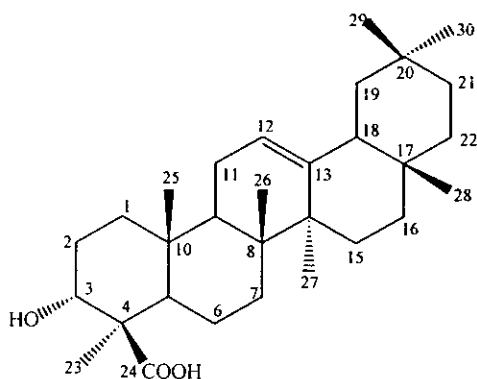
จากข้อมูล ^{13}C , DEPT, HMQC และ HMBC ของสารประกอบ 1 พบว่า สัญญาณ 1H-3 (δ 3.42) แสดงความสัมพันธ์กับ C-1 (δ 34.74) และ C-5 (δ 48.94) ; 3H-23 (δ 0.96) และ 3H-24 (δ 0.95) แสดงความสัมพันธ์กับ C-3 (δ 76.19) และ C-5 (δ 48.94) ; 3H-25 (δ 0.85) แสดงความสัมพันธ์กับ C-1 (δ 34.74) และ C-10 (δ 37.02) ; olefinic proton (δ 5.19) แสดงความสัมพันธ์กับ C (δ 47.40 ; methine carbon) และ C (δ 41.78 ; quaternary carbon) ดังนั้นโปรตอนที่มี δ 5.19, คาร์บอนที่มี δ 47.40 และ 41.78 ควรจะเป็น H-12, C-9 และ C-14 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบสัญญาณ methyl proton (δ 1.16) แสดงความสัมพันธ์กับคาร์บอนที่มี δ 39.96, δ 145.20, δ 26.29 ซึ่งควรจะเป็น C-8 (δ 39.96 ; quaternary carbon) C-13 (δ 145.20 ; quaternary sp^2) และ C-15 (δ 26.09 ; methylene sp^3) ดังนั้น δ_{H} 1.16, δ_{C} 39.96, δ_{C} 145.20 และ δ_{C} 26.09 ควรเป็น 3H-27, C-8, C-13 และ C-15 ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่าโครงสร้างนี้มีพันธะคู่อยู่ระหว่าง C-12 กับ C-13 ดังนั้นสารประกอบ 1 ควรจะมีโครงสร้างหลักเป็น olean-12-en-3 α -ol (1) ดังแสดงในภาพข้างล่าง รายละเอียดเพิ่มเติมดูได้จากตารางที่ 4

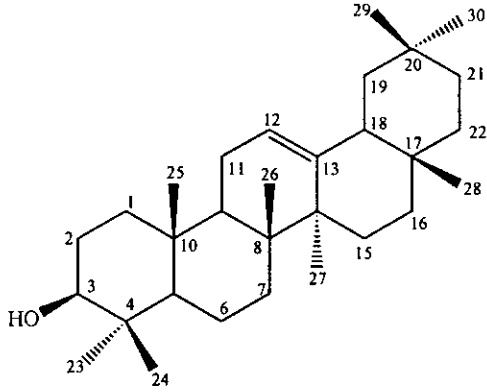


ภาพแสดงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนกับคาร์บอนบางส่วนจากข้อมูล 2D HMBC

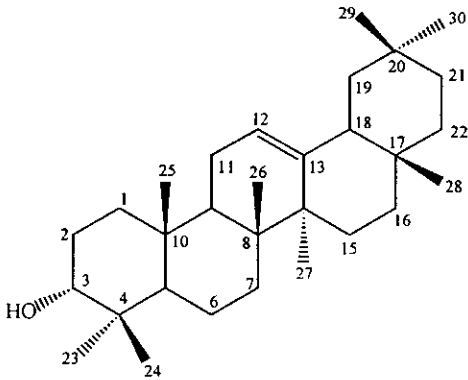
เมื่อเปรียบเทียบสัญญาณโปรตอน (ตารางที่ 5) ของสารประกอบ 1 กับสารประกอบ α -boswellic acid (6) และเทียบสัญญาณคาร์บอนของสารประกอบ 1 กับสารประกอบ α -boswellic acid และ β -amyrin (7) (ตารางที่ 6) ที่มีการรายงานในวารสาร (Culioli et al., 2003) และ (Mahato and Kundu, 1994) ตามลำดับ ซึ่ง α -boswellic acid มีโครงสร้างเหมือนสารประกอบ 1 ต่างกันที่ α -boswellic acid มี C-24 เป็น COOH แต่สารประกอบ 1 มี C-24 เป็น CH₃ พบว่ามีค่าใกล้เคียงกันเกือบทุกตำแหน่งที่ไม่ได้รับผลกระทบจากหมู่ COOH สำหรับ β -amyrin (7) มี H-3 เป็น α -H แต่สารประกอบ 1 มี H-3 เป็น β -H พบว่าสัญญาณคาร์บอนของสารประกอบ 1 ใกล้เคียงกับ β -amyrin เช่นกัน

6. α -boswellic acid



7. β -amyrin

จากข้อมูลทั้งหมดจึงสรุปได้ว่าสารประกอบ 1 คือ olean-12-en-3 α -ol ซึ่งมี
สูตรโครงสร้างดังแสดงในภาพ



โครงสร้างของ olean-12-en-3 α -ol

ตารางที่ 2 แสดงข้อมูล ^{13}C NMR และ DEPT ของสารประกอบ 1

δ_c (ppm)	DEPT 90	DEPT 135	ชนิดของ C
145.20	-	-	C
121.77	121.77	121.77	CH
76.19	76.19	76.19	CH
48.94	48.94	48.94	CH
47.40	47.40	47.40	CH
47.20	47.20	47.20	CH
46.82	-	46.82	CH ₂
41.78	-	-	C
39.96	-	-	C
37.37	-	-	C
37.17	-	37.17	CH ₂
37.02	-	-	C
34.75	-	34.75	CH ₂
33.35	-	33.35	CH ₃
33.03	-	33.03	CH ₂
32.52	-	32.52	CH ₂
32.49	-	-	C
31.10	-	-	C
28.42	-	28.42	CH ₃
28.28	-	28.28	CH ₃
26.93	-	26.93	CH ₂
26.15	-	26.15	CH ₃
26.09	-	26.09	CH ₂

ตารางที่ 2 (ต่อ)

δ_c (ppm)	DEPT 90	DEPT 135	ชนิดของ C
25.23	-	25.23	CH ₂
23.71	-	23.71	CH ₃
23.45	-	23.45	CH ₂
22.34	-	22.34	CH ₃
18.31	-	18.31	CH ₂
16.81	-	16.81	CH ₃
15.29	-	15.29	CH ₃

ตารางที่ 3 แสดงข้อมูลของ ¹H และ ¹³C NMR ของสารประกอบ 1

ตำแหน่ง	δ_c (ppm)		δ_H (ppm)
1	34.74	CH ₂	1.33 (1H, <i>m</i>), 1.02 (1H, <i>m</i>)
2	25.23	CH ₂	1.54 (1H, <i>m</i>), 1.96 (1H, <i>m</i>)
3	76.19	CH	3.42 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 3 Hz)
4	37.37	C	-
5	48.94	CH	1.24 (1H, <i>m</i>)
6	18.31	CH ₂	1.41 (1H, <i>m</i>), 1.39 (1H, <i>m</i>)
7	32.51	CH ₂	1.56 (1H, <i>m</i>), 1.31 (1H, <i>m</i>)
8	39.96	C	-
9	47.40	CH	1.67 (1H, <i>s</i>)
10	37.02	C	-
11	23.44	CH ₂	1.88 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 3.5 Hz)
12	121.77	=CH	5.19 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 4 Hz)
13	145.20	C	-
14	41.78	C	-

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ตำแหน่ง	δ_C (ppm)		δ_H (ppm)
15	26.09	CH ₂	1.74 (2H, <i>m</i>)
16	26.93	CH ₂	1.97 (1H, <i>m</i>), 1.54 (1H, <i>m</i>)
17	32.49	C	-
18	47.20	CH	1.94 (1H, <i>m</i>)
19	46.81	CH ₂	1.01 (1H, <i>m</i>), 1.03 (1H, <i>m</i>)
20	31.10	C	-
21	33.02	CH ₂	1.56 (1H, <i>m</i>), 1.33 (1H, <i>m</i>)
22	37.17	CH ₂	1.43 (1H, <i>m</i>), 1.23 (1H, <i>m</i>)
23	28.28	CH ₃	0.96 (3H, <i>s</i>)
24	15.29	CH ₃	0.95 (3H, <i>s</i>)
25	22.34	CH ₃	0.85 (3H, <i>s</i>)
26	16.81	CH ₃	0.95 (3H, <i>s</i>)
27	26.15	CH ₃	1.16 (3H, <i>s</i>)
28	28.41	CH ₃	0.83 (3H, <i>s</i>)
29	33.35	CH ₃	0.87 (3H, <i>s</i>)
30	23.70	CH ₃	0.87 (3H, <i>s</i>)

ตารางที่ 4 แสดง Major HMBC correlation ของสารประกอบ 1

ตำแหน่ง	δ_{H} (ppm)	HMBC correlation
1	1.33(1H, <i>m</i>),1.02(1H, <i>m</i>)	C-3 (76.19), C-5 (48.94) และ C-9 (47.40)
3	3.42 (1H, <i>t</i> , $J = 3$ Hz)	C-5 (48.94)
5	1.24 (1H, <i>dd</i> , $J = 2,11$ Hz)	C-3 (76.19), C-4 (37.37) และ C-10(37.02)
9	1.67 (1H, <i>s</i>)	C-1 (34.74), C-8 (39.96), C-10 (37.02), C-11(23.44), C-14 (41.78), C-25 (22.34) และ C-26 (16.81)
11	1.88 (1H, <i>m</i>)	C-8 (39.96), C-9 (47.40), C-12 (121.77) และ C-13 (145.20)
12	5.19 (1H, <i>t</i> , $J = 4$ Hz)	C-9 (47.40), C-14 (41.78)
18	1.94 (1H, <i>m</i>)	C-12 (121.77), C-13 (145.20), C-14 (41.78)
19	1.69 (1H, <i>m</i>), 1.02 (1H, <i>m</i>)	C-13 (145.20), C-21 (33.02), C-29 (33.35), และ C-30 (27.30)
22	5.33(1H, <i>m</i>), 1.23 (1H, <i>m</i>)	C-18 (47.20), C-28 (28.41)
23	0.96 (3H, <i>s</i>)	C-3 (28.28) และ C-5 (48.94)
24	0.95 (3H, <i>s</i>)	C-3 (28.28) และ C-5 (48.94)
25	0.85 (3H, <i>s</i>)	C-1 (34.74) และ C-10 (37.02)
26	0.95 (3H, <i>s</i>)	C-8 (22.34), C-9 (47.40) และ C-14 (41.78)
27	1.16 (3H, <i>s</i>)	C-8(39.96), C-13(145.20) และC-15(26.09)
28	0.83 (3H, <i>s</i>)	C-16(26.93), C-18(47.20) และ C-22(37.17)
29	0.87 (3H, <i>s</i>)	C-20 (31.10) และ C-22 (37.17)
30	0.87 (3H, <i>s</i>)	C-19 (46.81) และ C-21 (33.02)

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบ ^1H NMR ของสารประกอบ 1 กับ α -boswellic acid

ตำแหน่ง C	^1H NMR ของสารประกอบ 1	^1H NMR ของ α -boswellic acid
1	1.33(1H, <i>m</i>), 1.02 (1H, <i>m</i>)	1.45(1H, <i>m</i>), 1.29 (1H, <i>m</i>)
2	1.96 (1H, <i>m</i>), 1.54 (1H, <i>m</i>)	2.22(1H, <i>m</i>), 1.59 (1H, <i>m</i>)
3	3.42 (1H, <i>t</i> , $J = 3$ Hz)	4.08 (1H, <i>t</i> , $J = 2.5$ Hz)
5	1.24 (<i>m</i>)	1.49 (<i>m</i>)
6	1.41 (1H, <i>m</i>), 1.39 (1H, <i>m</i>)	1.85 (1H, <i>m</i>), 1.70 (1H, <i>m</i>)
7	1.56 (1H, <i>m</i>), 1.31 (1H, <i>m</i>)	1.52 (1H, <i>m</i>), 1.37 (1H, <i>m</i>)
9	1.67 (1H, <i>m</i>)	1.66 (1H, <i>m</i>)
11	1.88 (2H, <i>d</i> , $J = 3.5$ Hz)	1.88 (1H, <i>m</i>)
12	5.19 (1H, <i>t</i> , $J = 3.5$ Hz)	5.19 (1H, <i>t</i> , $J = 3.5$ Hz)
15	1.77 (1H, <i>m</i>), 0.97 (1H, <i>m</i>)	1.77 (1H, <i>m</i>), 1.00 (1H, <i>m</i>)
16	1.99 (1H, <i>m</i>), 0.79 (1H, <i>m</i>)	2.00 (1H, <i>m</i>), 0.81 (1H, <i>m</i>)
18	1.94 (1H, <i>m</i>)	1.96 (1H, <i>m</i>)
19	1.69 (1H, <i>m</i>), 1.02 (1H, <i>m</i>)	1.70 (1H, <i>m</i>), 1.02 (1H, <i>m</i>)
21	1.56 (1H, <i>m</i>), 1.33 (1H, <i>m</i>)	1.33(1H, <i>m</i>), 1.10 (1H, <i>m</i>)
22	1.43(1H, <i>m</i>), 1.23(1H, <i>m</i>)	1.44 (1H, <i>m</i>), 1.22 (1H, <i>m</i>)
23	0.96 (3H, <i>s</i>)	1.35 (3H, <i>s</i>)
24	0.95 (3H, <i>s</i>)	-
25	0.85 (3H, <i>s</i>)	0.89 (3H, <i>s</i>)
26	0.95 (3H, <i>s</i>)	0.96 (3H, <i>s</i>)
27	1.16(3H, <i>s</i>)	1.15 (3H, <i>s</i>)
28	0.83(3H, <i>s</i>)	0.84 (3H, <i>s</i>)
29	0.87(3H, <i>s</i>)	0.87 (3H, <i>s</i>)
30	0.87(3H, <i>s</i>)	0.87 (3H, <i>s</i>)

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบ ^{13}C NMR ของสาร 1 กับ α -boswellic acid และ β -amyrin

ตำแหน่ง C	δ (ppm) ของสารประกอบ 1	δ (ppm) ของ α -boswellic acid	δ (ppm) ของ β -amyrin
1	34.74	33.6	38.7
2	25.23	26.2	27.3
3	76.19	70.8	79.0
4	37.37	47.4	38.8
5	48.94	49.1	55.3
6	18.31	19.7	18.5
7	32.51	32.7	32.8
8	39.96	39.8	38.8
9	47.40	46.7	47.7
10	37.02	37.6	37.6
11	23.44	23.5	23.6
12	121.77	121.7	121.8
13	145.20	145.1	145.1
14	41.78	41.9	41.8
15	26.09	26.0	26.2
16	26.93	26.9	27.0
17	32.49	32.5	32.5
18	47.20	47.3	47.4
19	46.81	46.7	46.9
20	31.10	31.1	31.1
21	33.02	34.7	34.8
22	37.17	37.1	37.2
23	28.28	24.2	28.2

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ตำแหน่ง C	δ (ppm) ของสารประกอบ 1	δ (ppm) ของ α -boswellic acid	δ (ppm) ของ β -amyrin
24	15.29	183.5	15.5
25	22.34	13.1	15.6
26	16.81	16.7	16.9
27	26.15	25.9	26.0
28	28.41	28.4	28.4
29	33.35	33.3	33.3
30	23.70	23.7	23.7

2. การวิเคราะห์โครงสร้างของสาร Urs-12-en-3 α -ol (2)

สารประกอบ 2 มีลักษณะเป็นผงสีขาว จุดหลอมเหลว 110 - 112 °ซ แสดงค่าสเปซิฟิกโรเตชัน $[\alpha]_D^{25} = -47.2^\circ$ ในตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม เข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่าคงที่ของการเคลื่อนที่ (R_f) 0.22 ในตัวทำละลาย 10 % อีเธอร์ในเฮกเซน จากการค้นคว้าในเอกสารพบว่า Urs-12-en-3 α -ol มี mp. = 110 ° ซ และ Urs-12-en-3 β -ol มี mp. = 186 ° ซ, $[\alpha]_D^{17} = +83.5^\circ$ (CHCl₃) (Chapman & Hall 1994)

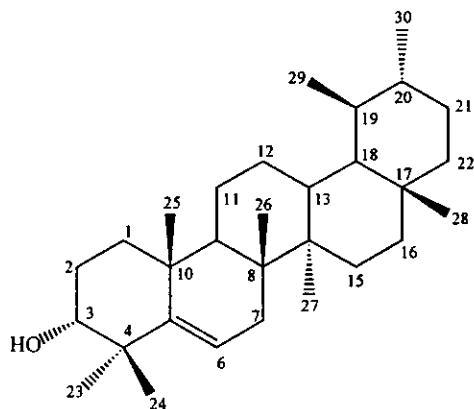
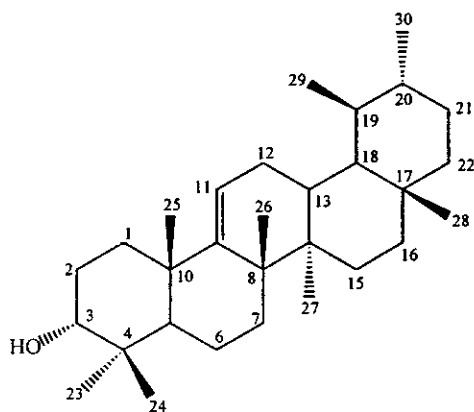
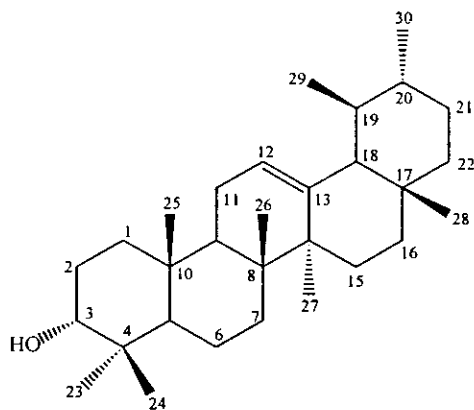
UV Spectrum ไม่ดูดกลืนแสงในช่วง UV แสดงว่าสารประกอบ 2 ไม่มีพันธะคู่ที่คอนจูเกตกัน

ให้สีม่วงกับสารทดสอบ vanillin sulfuric acid แสดงว่าสารประกอบ 2 เป็นสารประเภท triterpene

IR Spectrum (ภาพประกอบ 14) แสดงแถบดูดกลืนแสงที่ 3,424 cm⁻¹ (br, OH Stretching) แสดงว่า มีหมู่ไฮดรอกซิล และแสดงแถบดูดกลืนแสงที่ 850 cm⁻¹ (trisubstituted double bond)

จาก ¹³C NMR Spectrum (ภาพประกอบ 16) พบว่าสารประกอบ 2 มีคาร์บอนทั้งหมด 30 คาร์บอน และจากข้อมูล DEPT (ภาพประกอบที่ 17) ระบุได้ว่ามี methyl carbon 8 หมู่ มี methylene carbon 9 คาร์บอน มี methine carbon 7 คาร์บอน และมี quaternary carbon 6 คาร์บอน

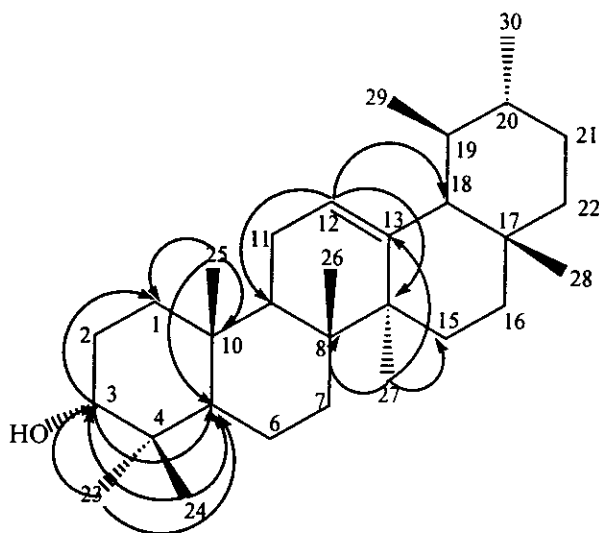
จาก ¹H NMR พบว่ามี singlet methyl group 6 หมู่ และ doublet methyl 2 หมู่ โครงสร้างของ triterpene ที่เป็นไปได้มีเพียงแบบเดียว คือ ursane จากข้อมูล ¹H NMR (ภาพประกอบ 13 และตารางที่ 8) ของสารประกอบ 2 พบ oxymethine proton 1 โปรตอน (H-3) ที่ δ 3.42 แสดงสัญญาณเป็น triplet มีค่า $J = 3$ Hz ดังนั้นสารประกอบ 2 ควรมีลักษณะโปรตอนอยู่ในตำแหน่ง equatorial ของวง A ซึ่งเป็น β H นอกจากนี้สัญญาณ olefinic proton 1 โปรตอนที่ δ 5.15 (t, $J = 3.5$ Hz) แสดงว่าในโครงสร้างของสาร 2 มีพันธะคู่ 1 พันธะ ซึ่งข้อมูลนี้สามารถทำนายโครงสร้างที่เป็นไปได้ของสาร 2 ดังนี้

1. Urs-5(6)-en-3 α -ol2. Urs-9(11)-en-3 α -ol (2)3. Urs-12-en-3 α -ol

เมื่อนำข้อมูลนี้ไปเปรียบเทียบกับสารประกอบที่มีรายงานแล้วพบว่าคาร์บอนที่เป็นพันธะคู่ในโครงสร้างของ ursane -12-en-3 α -ol (1) มีค่า C-12 ($\delta \sim 124$), C-13 ($\delta \sim 139$) (Mahato and Kundu, 1994) ส่วนของ ursane-5(6)-en-3 α -ol (4) และของ ursane -9(11)-en-3 α -ol (5) ยังไม่มีรายงาน

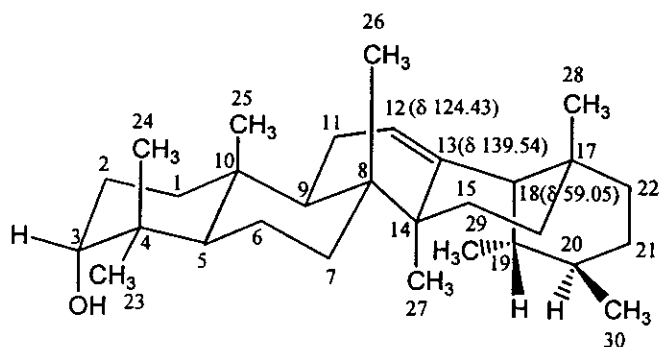
ในทางทฤษฎีถ้าพันธะคู่อยู่ระหว่าง C- 5 และ C- 6 ข้อมูล HMBC จะต้องพบ 3H-23, 3H-24 และ 3H-25 มีความสัมพันธ์กับ C-5 แต่ถ้าพันธะคู่อยู่ระหว่าง C-9 และ C-11 ข้อมูล HMBC จะต้องพบ 3H-25 และ 3H-26 มีความสัมพันธ์กับ C-9 แต่ถ้าพันธะคู่อยู่ระหว่าง C-12 และ C-13 ข้อมูล HMBC จะต้องพบ 3H-27 มีความสัมพันธ์กับ C-13

จากข้อมูล ^{13}C , DEPT, HMQC และ HMBC ของสารประกอบ 2 พบว่า สัญญาณ 1H-3 (δ 3.43) แสดงความสัมพันธ์กับ C-1 (δ 32.79) และ C-5 (δ 48.90) ; 3H-23 (δ 0.98) และ 3H-24 (δ 0.98) แสดงความสัมพันธ์กับ C-3 (δ 76.16) และ C-5 (δ 48.90) ; 3H-25 (δ 0.87) แสดงความสัมพันธ์กับ C-1 (δ 32.79) และ C-10 (δ 36.93) ; olefinic proton (δ 5.15) แสดงความสัมพันธ์กับ C (δ 47.49 ; methine carbon) และ C (δ 42.14 ; quaternary carbon) ดังนั้นโปรตอนที่ δ 5.15, คาร์บอนที่ δ 47.49 และ 42.14 ควรจะเป็น H-12, C-9, C-14 ตามลำดับ นอกจากนั้นยังพบสัญญาณ methyl proton (δ 1.10) แสดงความสัมพันธ์กับ C ที่ δ 40.15, δ 139.54, δ 26.54 ซึ่งควรจะเป็น C-8 (δ 40.15; quaternary carbon) C-13 (δ 139.54; quaternary sp^2) และ C-15 (δ 26.54; methylene sp^3) ดังนั้น δ_{H} 1.10, δ_{C} 39.54, δ_{C} 139.54 และ δ_{C} 26.54 ควรเป็น H-27, C-8, C-13 และ C-15 ตามลำดับ จึงสรุปได้ควรจะมีพันธะคู่อยู่ระหว่างคาร์บอนตัวที่ 12 กับ 13 สารประกอบ 2 ควรจะมีโครงสร้างหลักเป็น urs-12-en-3 α -ol (2) ดังแสดงในภาพข้างล่าง รายละเอียดเพิ่มเติมดูได้จากตารางที่ 9

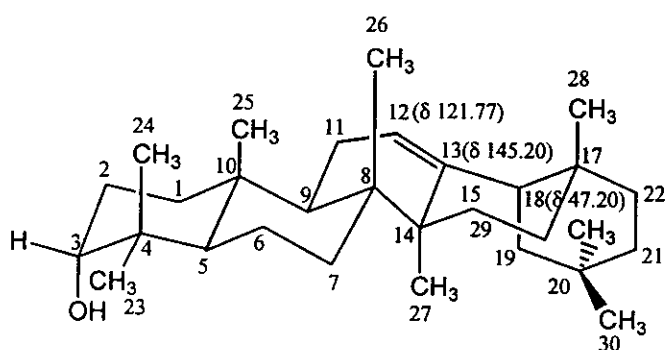


ภาพแสดงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนกับคาร์บอนบางส่วนจากข้อมูล 2D HMBC

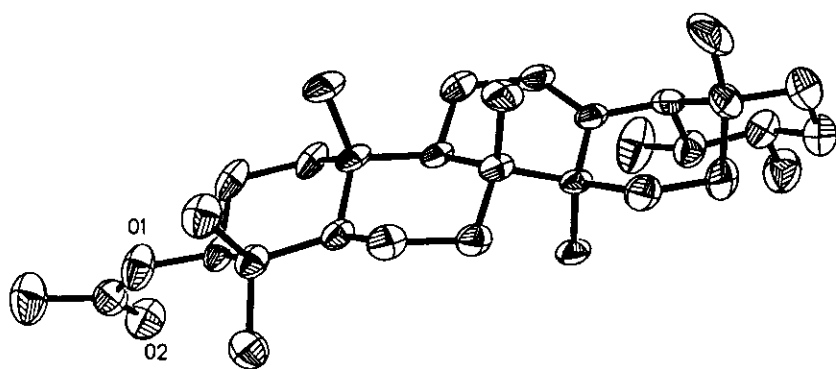
ความแตกต่างระหว่าง olean-12-enes และ ursane-12-enes สามารถพิจารณาได้จากค่าสัญญาณของ methyl proton คือ olean-12-enes มี 8 สัญญาณ methyl ที่เป็น singlet ส่วน ursane-12-enes มี 6 สัญญาณ methyl ที่เป็น singlet และ 2 methyl ที่เป็น doublet นอกจากนี้มีรายงานว่า olean-12-enes แสดงสัญญาณ C-12 ที่ $\delta \sim 122$ ppm และ C-13 ที่ $\delta \sim 145$ ppm แต่ urs-12-enes จะแสดงสัญญาณ C-12 ที่ $\delta \sim 124$ และ C-13 ที่ $\delta \sim 139$ เนื่องจากผลของ 19β (equatorial) methyl group ของ urs-12-enes จะอยู่ใกล้กับ C-12 และ C-13 และจะส่งผล deshield ต่อ C-12 ประมาณ 2 ppm (downfield shift) ภาพ X-ray ของสาร ursane-12-ene- 3β -acetate ประกอบ (ภาพประกอบ A) (Laphookhieo, 2002) ส่งผล shield ต่อ C-13 ประมาณ 5 ppm (upfield shift) แต่ olean-12-enes ไม่มี methyl group ที่ C-19 นอกจากนี้ยังพบว่า C-18 ของ olean-12-enes จะถูก shield โดย 20β (axial) methyl group ทำให้สัญญาณของ C-18 เกิด upfield shift ประมาณ 11.5 ppm (Mahato and Kundu, 1994) ภาพ X-ray ของสาร olean-12-ene- 3β -acetate (ภาพประกอบ B) (Laphookhieo 2002) ซึ่งสอดคล้องกับสัญญาณ C-18 ของสารประกอบ 1 ที่ $\delta 47.20$ ppm และสัญญาณ C-18 ของสารประกอบ 2 ที่ $\delta 59.05$ ppm



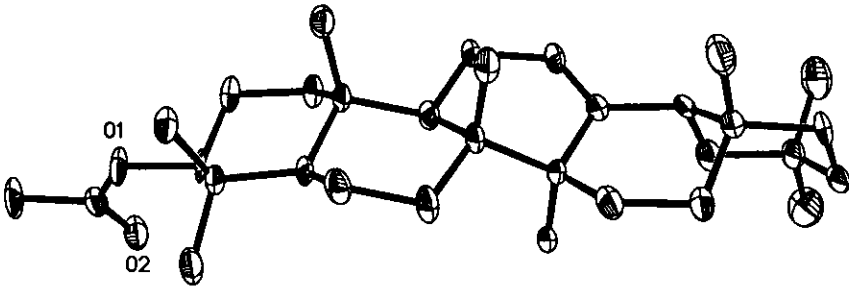
ภาพแสดงการถูก deshield ของ C-12 และ shield ของ C-13 จาก
19 β (equatorial) methyl group ของ ursane-12-enes



ภาพแสดงผลการถูก deshield ของ C-18 จาก 20 β (axial) methyl group
ของ olean-12-enes



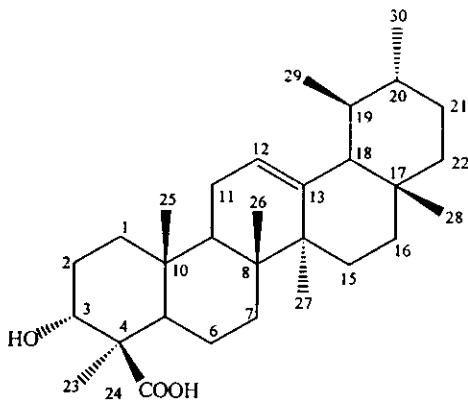
A : แสดง X-ray ORTEP diagram ของสารประกอบ
ursane-12-ene-3 β -acetate

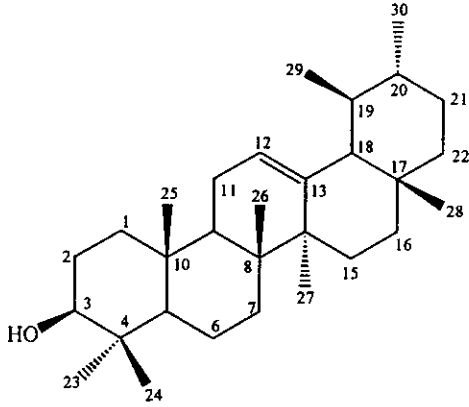


B : แสดง X-ray ORTEP diagram ของสารประกอบ
olean-12-ene-3 β -acetate

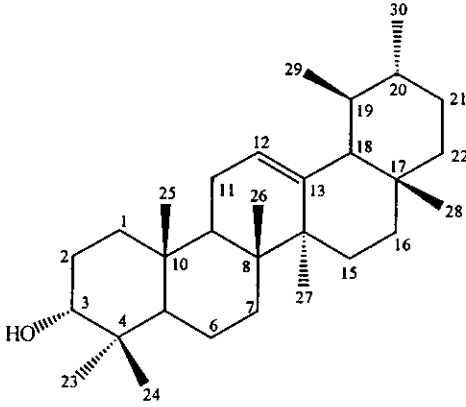
เมื่อเปรียบเทียบสัญญาณโปรตอน (ตารางที่ 10) ของสารประกอบ 2 กับสารประกอบ β -boswellic acid (4) และเทียบสัญญาณคาร์บอนของสารประกอบ 1 กับสารประกอบ β -boswellic acid และ α -amyrin (5) (ตารางที่ 11) ที่มีการรายงานในวารสาร (Culioli et al., 2003) และ (Mahato and Kundu, 1994) ตามลำดับ ซึ่ง β -boswellic acid มีโครงสร้างเหมือนสารประกอบ 1 ต่างกันที่ β -boswellic acid มี C-24 เป็น COOH แต่สารประกอบ 1 มี C-24 เป็น CH₃, พบว่ามีค่าใกล้เคียงกันเกือบทุกตำแหน่งที่ไม่ได้รับผลกระทบจากหมู่ COOH สำหรับ α -amyrin (5) มี H-3 เป็น α -H แต่สารประกอบ 1 มี H-3 เป็น β -H สัญญาณคาร์บอนของสารประกอบ 2 เทียบเคียงได้กับของ α -amyrin (5)

4. β -boswellic acid



5. α -amyrin

จากข้อมูลทั้งหมดจึงสรุปได้ว่าสารประกอบ 2 คือ Urs-12-en-3 α -ol ซึ่งมี
สูตร โครงสร้างดังแสดงในภาพ



โครงสร้างของสาร Urs-12-en-3 α -ol

ตารางที่ 7 แสดงข้อมูล ^{13}C NMR และ DEPT ของสารประกอบ 2

δ (ppm)	DEPT 90	DEPT 135	ชนิดของ C
139.54	-	-	C
124.43	124.43	124.43	CH
76.16	76.16	76.16	CH
59.05	59.05	59.05	CH
48.90	48.90	48.90	CH
47.50	47.50	47.50	CH
42.14	-	-	C
41.53	-	41.53	CH ₃
40.15	-	-	C
39.64	39.64	39.64	CH
39.60	-	-	C
37.35	-	-	C
36.93	-	-	C
33.73	-	-	C
33.23	-	33.23	CH ₂
32.79	-	32.79	CH ₂
31.26	-	31.26	CH ₃
28.75	-	28.75	CH ₂
28.27	-	28.27	CH ₂
28.09	-	28.09	CH ₃
26.54	-	26.54	CH ₂
25.22	-	25.22	CH ₃
23.37	-	23.37	CH ₃
23.24	-	23.24	CH ₂
22.34	-	22.34	CH ₂
21.40	-	21.40	CH ₂

ตารางที่ 7 (ต่อ)

δ_c (ppm)	DEPT 90	DEPT 135	ชนิดของ C
18.27	-	18.27	CH ₃
17.45	-	17.45	CH ₃
16.84	-	16.84	CH ₃
15.45	-	15.45	CH ₂

ตารางที่ 8 แสดงข้อมูลของ ¹³C และ ¹H NMR ของสารประกอบ 2

ตำแหน่ง	$\delta_c^{\#}$ (ppm)		δ_H (ppm)
1	32.79	CH ₂	1.57 (2H, <i>m</i>)
2	23.24	CH ₂	1.89 (1H, <i>m</i>), 1.92 (1H, <i>m</i>)
3	76.16	CH	3.43 (1H, <i>t</i>)
4	37.35	C	-
5	48.90	CH	1.25 (1H, <i>m</i>)
6	15.45	CH ₂	0.96 (1H, <i>s</i>), 1.40 (1H, <i>m</i>)
7	28.26	CH ₂	2.00 (1H, <i>m</i>), 0.89 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 12 Hz)
8	40.15	C	-
9	47.49	CH	1.55 (1H, <i>m</i>)
10	36.93	C	-
11	22.33	CH ₂	1.93 (2H, <i>m</i>)
12	124.43	=CH	5.15 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 3.5 Hz)
13	139.54	C	-
14	42.14	C	-
15	26.54	CH ₂	1.16 (1H, <i>s</i>) 0.96 (1H, <i>s</i>)
16	21.38	CH ₂	0.98 (2H, <i>m</i>)

ตารางที่ 8 (ต่อ)

ตำแหน่ง	δ_C (ppm)		δ_H (ppm)
17	33.73	C	-
18	59.05	CH	1.33 (1H, <i>m</i>)
19	41.53	CH	1.27 (1H, <i>m</i>)
20	39.64	CH	1.33 (1H, <i>m</i>)
21	28.75	CH ₂	1.58 (1H, <i>m</i>), 1.36 (1H, <i>m</i>)
22	33.22	CH ₂	1.42 (1H, <i>m</i>), 0.89 (1H, <i>m</i>)
23	28.09	CH ₃	0.98 (3H, <i>s</i>)
24	17.44	CH ₃	0.98 (3H, <i>s</i>)
25	23.37	CH ₃	0.87 (3H, <i>s</i>)
26	16.83	CH ₃	1.02 (3H, <i>s</i>)
27	25.22	CH ₃	1.10 (3H, <i>s</i>)
28	31.25	CH ₃	0.81 (3H, <i>s</i>)
29	18.26	CH ₃	0.80 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6 Hz)
30	21.39	CH ₃	0.94(3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6 Hz)

ตารางที่ 9 แสดง Major HMBC correlation ของสารประกอบ 2

ตำแหน่ง	δ_{H} (ppm)	HMBC correlation
1	1.57 (2H, <i>m</i>)	C-3 (76.16), C- 5(48.90) และ C-9 (47.49)
3	3.43 (1H, <i>t</i> , $J = 3$ Hz)	C-1 (32.79) และ C-5(48.90)
5	1.22 (1H, <i>m</i>)	C-4 (37.35) และ C-10 (36.93)
9	1.65 (1H, <i>m</i>)	C-1 (32.79), C-8 (40.15), C-10 (36.93), C-11 (22.33), C-14 (42.14), C-25 (23.37) และ C-26 (16.83)
11	1.93 (2H, <i>m</i>)	C-12 (124.43), C-13 (139.54) และ C-14 (42.14)
12	5.15 (1H, <i>t</i> , $J = 3.5$ Hz)	C-9 (47.49), C-14 (42.14) และ C-18 (59.05)
18	1.27 (1H, <i>m</i>)	C-12 (124.43), C-13 (139.54), และ C-20 (39.64)
19	1.31 (1H, <i>m</i>)	C-20 (39.64)
22	1.42 (1H, <i>m</i>), 0.89(1H, <i>m</i>)	C-18 (59.09) และ C-20 (39.64)
23	0.98 (3H, <i>s</i>)	C-3 (76.16) และ C-5 (48.90)
24	0.98 (3H, <i>s</i>)	C-3 (76.16) และ C-5 (48.90)
25	0.87 (3H, <i>s</i>)	C-1 (32.79), C-5 (48.90) และ C-10 (42.14)
26	1.02 (3H, <i>s</i>)	C-8 (40.15), C-9 (47.49) และ C-14 (42.14)
27	1.10 (3H, <i>s</i>)	C-8 (40.15), C-13 (139.54) , C-14 (42.14) และ C-15 (26.54)
28	0.81 (3H, <i>s</i>)	C-18 (59.05) และ C-22 (33.2)
29	0.78 (3H, <i>d</i> , $J = 6$ Hz)	-
30	0.92 (3H, <i>d</i> , $J = 6$ Hz)	C- 19 (41.53) และ C- 20 39.64)

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบ ^1H NMR ของสารประกอบ 2 กับ β boswellic acid

ตำแหน่ง C	δ_{H} (ppm) ของสารประกอบ 2	δ_{H} (ppm) ของ β boswellic acid
1	1.57 (2H, <i>m</i>)	1.49 (1H, <i>m</i>), 1.33 (1H, <i>m</i>)
2	1.92 (1H, <i>m</i>), 1.89 (1H, <i>m</i>)	2.24 (1H, <i>m</i>), 1.60 (1H, <i>m</i>)
3	3.43 (1H, <i>t</i> , $J = 3$ Hz)	4.08 (1H, <i>t</i> , $J = 2.5$ Hz)
5	1.25 (<i>m</i>)	1.50 (<i>m</i>)
6	1.40 (1H, <i>m</i>), 0.96 (1H, <i>m</i>)	1.83 (1H, <i>m</i>), 1.70 (1H, <i>m</i>)
7	1.98 (1H, <i>m</i>), 0.88 (1H, <i>m</i>)	1.58 (1H, <i>m</i>), 1.41 (1H, <i>m</i>)
9	1.55 (1H, <i>m</i>)	1.63 (1H, <i>m</i>)
11	1.93 (2H, <i>m</i>)	1.92 (2H, <i>m</i>)
12	5.15 (1H, <i>t</i> , $J = 3.5$ Hz)	5.14 (1H, <i>t</i> , $J = 3.5$ Hz)
15	1.16 (1H, <i>m</i>), 0.96 (1H, <i>m</i>)	1.86 (1H, <i>m</i>), 1.02 (1H, <i>m</i>)
16	0.98 (2H, <i>m</i>)	2.02 (2H, <i>m</i>)
18	1.33 (1H, <i>m</i>)	1.34 (1H, <i>m</i>)
19	1.27 (1H, <i>m</i>)	1.34 (1H, <i>m</i>)
20	1.33 (1H, <i>m</i>)	0.94 (1H, <i>m</i>)
21	1.58 (1H, <i>m</i>), 1.36 (1H, <i>m</i>)	1.41 (1H, <i>m</i>), 1.29 (1H, <i>m</i>)
22	1.42 (1H, <i>m</i>), 0.89 (1H, <i>m</i>)	1.45 (1H, <i>m</i>), 1.27 (1H, <i>m</i>)
23	0.98 (3H, <i>s</i>)	1.34 (3H, <i>s</i>)
24	0.98 (3H, <i>s</i>)	-
25	0.87 (3H, <i>s</i>)	0.91 (3H, <i>s</i>)
26	1.02 (3H, <i>s</i>)	1.05 (3H, <i>s</i>)
27	1.10 (3H, <i>s</i>)	1.11 (3H, <i>s</i>)
28	0.81 (3H, <i>s</i>)	0.83 (3H, <i>s</i>)
29	0.80 (3H, <i>d</i> , $J = 5.5$ Hz)	0.80 (3H, <i>d</i> , $J = 5.5$ Hz)
30	0.94 (3H, <i>d</i> , $J = 5.5$ Hz)	0.94 (3H, <i>d</i> , $J = 5.5$ Hz)

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบ ^{13}C NMR ของสาร 2 กับ β -boswellic acid และ α -amyrin

ตำแหน่ง C	δ_c (ppm) ของสาร 2	δ_c (ppm) ของ β -boswellic acid	δ_c (ppm) ของ α -amyrin
1	32.79	33.9	38.7
2	23.24	26.2	27.2
3	76.16	70.8	78.3
4	37.35	47.4	38.7
5	48.90	49.1	55.2
6	15.45	19.7	18.3
7	28.26	33.1	32.9
8	40.15	40.0	40.0
9	47.49	46.8	47.7
10	36.93	37.5	36.9
11	22.33	23.4	23.3
12	124.43	124.5	124.3
13	139.54	139.6	139.3
14	42.14	42.3	42.0
15	26.54	26.5	28.7
16	21.38	28.1	26.6
17	33.73	33.8	33.7
18	59.05	59.2	58.9
19	41.53	39.7	39.6
20	39.64	39.6	39.6
21	28.75	31.3	31.2
22	33.22	41.5	41.5
23	28.09	24.2	28.1

ตารางที่ 11 (ต่อ)

ตำแหน่ง C	δ_c (ppm) ของสาร 2	δ_c (ppm) ของ β -boswellic acid	δ_c (ppm) ของ α -amyrin
24	17.44	183.1	15.6
25	23.37	13.3	15.6
26	16.83	16.9	16.8
27	25.22	23.2	23.3
28	31.25	28.8	28.1
29	18.26	17.4	17.4
30	21.39	21.4	21.3

3. การวิเคราะห์โครงสร้างของสารผสม 3

สารผสม 3 นี้มีลักษณะเป็นของหนืดสีเหลืองใส แสดงค่าสเปซิฟิกโรเตชัน $[\alpha]_D^{25} = +50^\circ$ ในตัวทำละลายคลอโรฟอร์มเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีความหนืดของการเคลื่อนที่ (R_f) 0.30 ในตัวทำละลาย 30 % เอธิลอะซิเตทในเฮกเซน

UV Spectrum (ภาพประกอบ 23) แสดงแถบดูดกลืน (λ_{max}) ที่ 203 nm, 225 nm และ 241 nm แสดงว่าสารประกอบ 3 มีพันธะคู่ที่คอนจูเกตกัน

IR Spectrum (ภาพประกอบ 24) แสดงแถบดูดกลืนแสงที่ 3453 cm^{-1} (br, OH Stretching) 2929 cm^{-1} , 2853 cm^{-1} (CH_2 , CH_3 Stretching) 1733 cm^{-1} และ 1696 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$ Stretching) 1013 cm^{-1} (C-O Stretching) แสดงว่ามีหมู่ไฮดรอกซิล หมู่คาร์บอนิลของ ester และหมู่คาร์บอนิลที่คอนจูเกตกับพันธะคู่ ตามลำดับ (Pavia, Lampman and Kriz., 1996) แถบดูดกลืนของหมู่คาร์บอนิลสามารถยืนยันเพิ่มเติมได้จาก ^{13}C NMR Spectrum ซึ่งแสดงสัญญาณที่ δ 173.55 และ δ 209.66

^1H NMR Spectrum (ภาพประกอบ 21) แสดงลักษณะเฉพาะของสารผสม 3 ที่มีโครงสร้างหลักเป็น orthoester (ตารางที่ 13) โดยมีสัญญาณโปรตอนปรากฏที่ δ 7.62 (*m*) ซึ่งเป็นโปรตอนตำแหน่งที่ 1 ในโครงสร้างของ enone โปรตอนตำแหน่งที่ 20 ปรากฏสัญญาณที่ δ 4.75 (*d*, AB system, $J = 10.8$ Hz) และ δ 3.85 (*d*, AB system, $J = 10.8$ Hz) แสดงลักษณะการคู่ควบแบบ *geminal* และปรากฏสัญญาณที่สนามต่ำ แสดงว่าหมู่ hydroxymethylene นี้อยู่ในรูปของ ester olefinic protons (2H-16) 2 โปรตอนปรากฏสัญญาณที่ δ 5.02 (*s*) และ δ 4.91 (*br s*) 3 oxymethine protons ปรากฏสัญญาณที่ δ 4.40 (*m*), δ 4.26 (*s*) และ δ 3.34 (*m*) ซึ่งได้แก่ โปรตอนตำแหน่งที่ 14, 5 และ 7 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบ 2 methine protons ที่ตำแหน่ง 8 และ 11 แสดงสัญญาณที่ δ 2.96 (*d*, $J = 2.4$ Hz), 4.27 (*s*), δ 2.5 (*m*) พบสัญญาณของ allylic methyl proton 2 หมู่ที่ δ 1.80 (*m*) และ δ 1.80 (*m*) ซึ่งเป็นสัญญาณของ H-19 และ H-17 ตามลำดับ และพบสัญญาณ methyl proton ที่ δ 1.18 (*d*, $J = 6$ Hz) ซึ่งเป็นสัญญาณของ H-18 ส่วนสัญญาณโปรตอนที่เหลือสรุปไว้ในตารางที่ 13

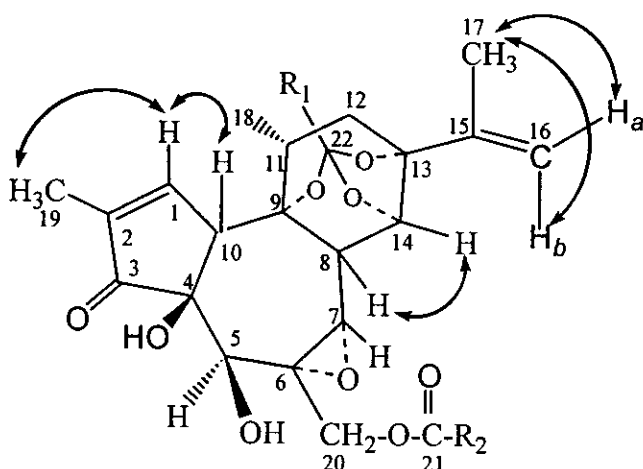
นอกจากนี้ยังพบสัญญาณ methylene protons ในช่วง δ 1.24 – δ 1.36 และมีพื้นที่ใต้ peak แสดงจำนวนโปรตอนค่อนข้างมาก และพบสัญญาณ olefinic proton ในช่วง δ 5.65 – δ 6.67

ข้อมูล ^{13}C NMR (ภาพประกอบ 26 และ ตารางที่ 12) แสดงจำนวนคาร์บอนมากกว่า 48 คาร์บอน ข้อมูล DEPT (ภาพประกอบที่ 27) ชี้ว่ามี quaternary carbon ทั้งหมด 12 คาร์บอน (δ 209.66, δ 173.55, δ 146.17, δ 136.62, δ 116.56, δ 114.11, δ 84.37, δ 79.58, δ 76.63, δ 72.32, δ 59.27, δ 37.13) และเมื่อพิจารณาข้อมูล HMQC และ HMBC ประกอบ พบว่าส่วนของโครงสร้างหลักมี quaternary carbon จำนวน 7 คาร์บอน ซึ่งเป็น sp^3 จำนวน 4 คาร์บอน (δ 84.37, δ 79.68, δ 76.63, δ 59.27) sp^2 จำนวน 2 คาร์บอน ซึ่งปรากฏที่ δ 136.62 และ δ 146.17 carbonyl carbon ปรากฏที่ δ 209.66 methine carbon มีทั้งหมด 7 คาร์บอน เป็น sp^3 จำนวน 6 คาร์บอน ปรากฏสัญญาณที่ δ 81.95, δ 69.93, δ 63.96, δ 48.00, δ 36.51, δ 34.81 เป็น sp^2 จำนวน 1 คาร์บอน ปรากฏสัญญาณที่ δ 161.02 methylene carbon 3 คาร์บอน เป็น sp^2 1 คาร์บอน และ sp^3 2 คาร์บอน ปรากฏสัญญาณที่ δ 111.3,

δ 65.74, δ 34.17 ตามลำดับ methyl carbon มีทั้งหมด 3 คาร์บอน ปรากฏสัญญาณที่ δ 20.38, δ 18.98 และ δ 9.93

ซึ่งเมื่อใช้ข้อมูลนี้ประกอบข้อมูลสัญญาณโปรตอนช่วง δ 1.24 – δ 1.36 และ δ 5.65 – δ 6.67 ดังที่กล่าวมาแล้ว คาดว่าสารผสม 3 มี side chain เป็น long chain hydrocarbon ของ unsaturated fatty acid ดังที่มีการรายงานมาแล้ว (Karalai *et al.*, 1994)

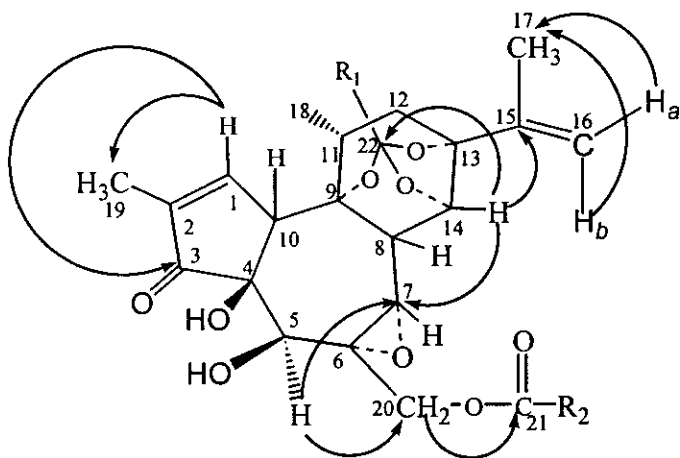
จากข้อมูล COSY พบว่า H-1(δ 7.62) แสดงความสัมพันธ์กับ H-10 (δ 3.85) และ H-19 (δ 1.80) H-17 (δ 1.79) แสดงความสัมพันธ์กับ H-16a (δ 4.91), H-16b (δ 5.02) และ H-8 (δ 2.96) แสดงความสัมพันธ์กับ H-14 (δ 4.40) ดังแสดงในภาพ



ภาพแสดงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนกับโปรตอนบางส่วนจากข้อมูล 2D COSY

จากข้อมูล HMBC พบว่า H-1 (δ 7.62) แสดงความสัมพันธ์กับ C-2 (δ 136.62), C-3 (δ 209.66), C-19 (δ 9.93) ; H-20 (δ 4.30) แสดงความสัมพันธ์กับ C-5 (δ 69.93), C-6 (δ 59.27), C-7 (δ 63.96) ซึ่ง C-6 และ C-7 นี้ เป็น epoxymethine carbon นอกจากนี้ยังพบว่า H-20 (δ 4.30) ยังแสดงความสัมพันธ์กับ C-21 ซึ่งแสดงว่า OH ของ C-20 อยู่ในรูป ester ; H-11 (δ 2.50) แสดงความสัมพันธ์กับ C-12 (δ 34.17), C-13 (δ 84.37), C-18 (δ 20.38) ; H-17 (δ 136.62) แสดงความสัมพันธ์กับ C-13 (δ 84.37), C-15 (δ 146.17), C-16 (δ 111.33) ส่วนของ orthoester สามารถพิจารณาได้จากความสัมพันธ์ระหว่าง H-14 (δ 4.40) ซึ่งมีความ

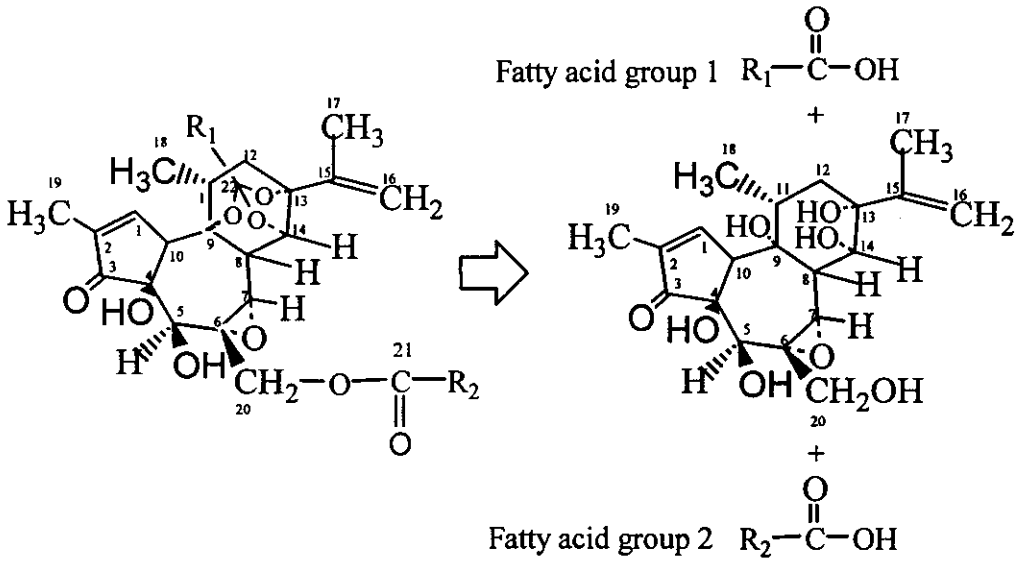
สัมพันธ์กับ C-22 (δ 116.56) ซึ่งสัญญาณคาร์บอนที่ตำแหน่งนี้ควรจะเป็น quaternary carbon ของ orthoester ดังแสดงในภาพ รายละเอียดดูได้จากตารางที่ 14



ภาพแสดงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนกับคาร์บอนบางส่วนจากข้อมูล 2D HMBC

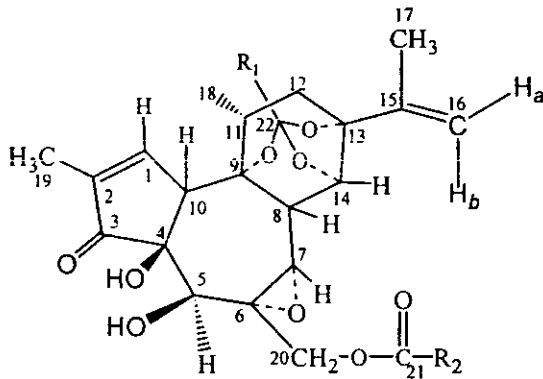
ข้อมูล ^1H NMR ของสารผสม 3 สอดคล้องกับข้อมูลของสาร Excoecaria Factor I ที่มีการรายงานมาแล้ว ดังแสดงในตารางที่ 15 (Karalai *et al.*, 1994) ดังนั้น สารผสม 3 ควรมีโครงสร้างหลักเป็น 9,13,14-orthoester-20-esters of 5 β -hydroxyresiniferonol-6 α ,7 α -epoxide โดยมี side chain เป็น long chain hydrocarbon ของ unsaturated fatty acid หลายตัวปนกัน และไม่สามารถแยกออกจากกันได้ด้วยวิธี TLC หรือ CC แบบธรรมดา เมื่อพิจารณาโครงสร้างของ orthoester (3) จะพบว่าในโครงสร้างนี้มี fatty acid อยู่ 2 กลุ่ม กลุ่มแรกอยู่ในรูป ester ตรง C-20 และกลุ่มที่ 2 อยู่ในรูป orthoester ตรง C-9, C-13 และ C-14 การที่จะศึกษาและแยกสารกลุ่มนี้ออกจากกันและทำให้บริสุทธิ์โดยตรงจำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีประสิทธิภาพและขีดความสามารถในการแยกสูง เช่น HPLC อีกวิธีหนึ่งที่จะศึกษาโครงสร้างของสารกลุ่มนี้อาจใช้การทำปฏิกิริยา *trans*-esterification ด้วย $\text{NaOCH}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ ที่อุณหภูมิห้อง โดยปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นได้ง่ายตรง C-20 ในขณะที่ C-9, C-13 และ C-14 ซึ่งมีหมู่ฟังก์ชันเป็น orthoester จะไม่เกิดปฏิกิริยาภายใต้เงื่อนไขนี้ (Karalai *et al.*, 1994) จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ fatty acid ในรูปของ methyl ester ด้วยวิธี GC-MS ซึ่งจะทำให้ทราบชนิดและปริมาณของ fatty acid ที่เกาะกับ C-20 นอกจากนี้ยังจำเป็น

ต้องรู้ชนิดและปริมาณของ fatty acid ที่อยู่ในรูป orthoester (C-9, C-13, C-14) ซึ่งอาจทำ complete ester hydrolysis ดังภาพประกอบ C แล้ววิเคราะห์หาชนิดและปริมาณ fatty acid ในรูป ester ด้วยวิธี GC-MS ดังที่กล่าวมาแล้ว เมื่อทราบปริมาณและชนิดของ fatty acid ทั้งสองกลุ่มแล้ว จากนั้นนำมาประกอบเป็นโครงสร้าง (3) ซึ่งจะพบว่าโครงสร้างได้มากมาย ดังนั้นโครงสร้าง (3) จึงเป็นเพียงโครงสร้างทั่วไปที่ใช้แทนสารผสมกลุ่มนี้ ซึ่งคล้ายกับโครงสร้างทั่วไปของ Triglyceride



C : แสดงแนวทางในการแยกและศึกษาองค์ประกอบของสารผสม

โครงสร้างทั่วไปของสารผสม 3 มีลักษณะดังแสดง



R_1 = หมู่ alkyls ของกรดไขมันไม่อิ่มตัว

R_2 = หมู่ alkyls ของกรดไขมันไม่อิ่มตัว

ตารางที่ 12 แสดงข้อมูล ^{13}C และ DEPT ของสารผสม 3

δ_c (ppm)	DEPT 135	ชนิดของ C
209.66	-	C
173.55	-	C
161.02	161.02	CH
146.17	-	C
138.85	138.85	CH
137.28	137.26	CH
136.62	-	C
136.45	136.45	CH
134.71	134.71	CH
134.51	134.71	CH
130.06	130.06	CH
128.81	128.81	CH
128.64	128.64	CH
124.03	124.03	CH
122.77	122.77	CH
116.56	-	C
114.11	-	C
111.33	111.33	CH ₂
84.37	-	C
81.95	81.95	CH
79.58	-	C
76.63	-	C
72.32	-	C
69.93	69.93	CH
65.74	65.74	CH ₂
63.96	63.96	CH

ตารางที่ 12 (ต่อ)

δ_c (ppm)	DEPT 135	ชนิดของ C
59.27	-	C
48.00	48.00	CH
40.89	40.89	CH ₂
37.13	-	C
36.66	36.66	CH ₂
36.50	36.50	CH
36.40	36.40	CH ₂
34.82	34.82	CH
34.17	34.17	CH ₂
31.94	31.94	CH ₂
28.46	28.46	CH ₂
24.94	24.94	CH ₂
24.70	24.94	CH ₂
23.85	23.85	CH
23.37	23.37	CH
22.70	22.70	CH ₂
20.38	20.38	CH ₃
22.70	22.70	CH ₂
18.98	18.98	CH ₃
14.12	14.12	CH ₃
9.93	9.93	CH ₃
7.93	7.93	CH ₃
7.93	7.93	CH ₃

ตารางที่ 13 แสดงข้อมูลของ ^{13}C และ ^1H NMR ของสารผสม 3

ตำแหน่ง	δ_{C} (ppm)		δ_{H} (ppm)
1	161.02	CH	7.62 (1H, <i>m</i>)
2	136.62	= C	-
3	209.66	C = O	-
4	76.63	O - C	-
5	69.93	O - CH	4.26 (1H, <i>s</i>)
6	59.27	O - C	-
7	63.96	O - CH	3.34 (1H, <i>m</i>)
8	36.51	CH	2.96 (1H, <i>d</i> , $J = 2.4$ Hz)
9	79.58	O - C	-
10	48.00	CH	3.85 (1H, <i>m</i>)
11	34.81	CH	2.50 (1H, <i>m</i> , $J = 8$ Hz)
12	34.17	CH ₂	2.25 (1H, <i>m</i>), 1.70 (1H, <i>m</i>)
13	84.37	O - C	-
14	81.95	O - CH	4.40 (1H, <i>d</i> , $J = 1.5$ Hz)
15	146.17	= C	-
16	111.33	= CH ₂	5.02 (1H _b , <i>m</i>), 4.91 (1H _a , <i>m</i>)
17	18.98	CH ₃	1.80 (3H, <i>m</i>)
18	20.38	CH ₃	1.18 (3H, <i>m</i>)
19	9.93	CH ₃	1.80 (3H, <i>m</i>)
20	65.74	CH ₂	4.30 (2H, AB, $J = 10.8$ Hz)
21	173.55	C=O	-
22	116.56	$\begin{array}{c} \text{O-} \\ \\ \text{---C---} \\ \\ \text{O-} \end{array}$	-

ตารางที่ 14 แสดง Major HMBC correlation ของสารผสม 3

ตำแหน่ง	δ_H (ppm)	HMBC correlation
1	7.62 (1H, <i>m</i>)	C-2(136.62), C-3(209.66), C-4(73.63), C-5(69.93), C-10(48.00) และ C-19(9.93)
5	4.26 (1H, <i>s</i>)	C-6(59.27), C-7(63.96)
7	3.34 (1H, <i>m</i>)	C-6(59.27), C-9(79.58), C-20(65.74)
8	2.96 (1H, <i>m</i>)	C-6(59.27), C-7(63.96), C-9(79.58)
10	3.85 (1H, <i>m</i>)	C-5(69.93)
11	2.50 (1H, <i>m</i>)	C-12(34.17), C-13(84.37), C-18(20.38)
12	2.25 (1H, <i>m</i>), 1.70 (1H, <i>m</i>)	C-18(20.38)
14	4.40 (1H, <i>m</i>)	C-7(63.96), C-9(79.58), C-15(146.17), C-22(116.56)
16	5.02 (1H, <i>s</i>), 4.91 (1H, <i>br s</i>)	C-13(84.37)
17	1.80 (3H, <i>m</i>)	C-13 (84.37), C-15(146.17), C-16 (111.33)
18	1.18 (3H, <i>m</i>)	C-9 (79.58), C-11 (34.81), C-13 (84.37)
19	1.80 (3H, <i>m</i>)	C-1 (161.02), C-2 (136.62), C-3 (209.66)
20	4.30 (2H, <i>m</i> , AB, <i>J</i> = 10.08 Hz)	C-5 (69.93), C-6 (59.27), C-7 (63.96), C-21(173.55)

ตารางที่ 15 เปรียบเทียบ ^1H NMR ของสารผสม 3 กับ Excoecaria Factor I

ตำแหน่งของโปรตอน	สารประกอบ 3	Excoecaria Factor I
1	7.62	7.63
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	4.26	4.27
6	-	-
7	3.34	3.34
8	2.96	2.96
9	-	-
10	3.85	3.88
11	2.50	2.51
12	-	-
13	-	-
14	4.40	4.40
15	-	-
16	5.02 , 4.91	5.03 , 4.92
17	1.79	1.80
18	-	-
19	1.79	1.80
20	4.30	4.31 \pm 0.45

4. การวิเคราะห์โครงสร้างของสารผสม 4 และ 5

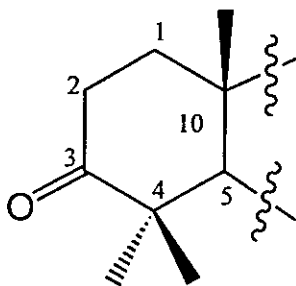
สารผสม 4 และ 5 นี้มีลักษณะเป็นของหนืดใสไม่มีสี มีค่าคงที่ของการเคลื่อนที่ (R_f) 0.3 ในตัวทำละลาย 5 % อีเทอร์ในเฮกเซน

UV Spectrum ไม่ดูดกลืนแสงในช่วง UV แสดงว่าสารผสม 4 และ 5 ไม่มีพันธะคู่ที่คอนจูเกตกัน

ให้สีม่วงกับสารทดสอบ vanillin sulfuric acid แสดงว่าสารผสม 4 และ 5 เป็นสารประเภท triterpene

IR Spectrum (ภาพประกอบ 31) แสดงการดูดกลืนแสงที่ $2943, 2858 \text{ cm}^{-1}$ (CH_2, CH_3 Stretching) $1702 \text{ cm}^{-1}, 1656 \text{ cm}^{-1}$ แสดงว่ามีหมู่ ไฮดรอกซิล และหมู่ คาร์บอนิล

^{13}C NMR Spectrum (ภาพประกอบ 33) พบว่าสารผสม 4 และ 5 มีคาร์บอนทั้งหมด 60 คาร์บอน พบ methine carbon (δ 124.19, δ 121.50), quaternary carbon (δ 145.28, δ 139.73) carbonyl carbon ของ ketone (δ 217.94, δ 217.89) ซึ่งเป็น carbonyl carbon ที่อยู่ในวง A ดังแสดงในภาพ



จาก ^1H NMR Spectrum (ภาพประกอบ 32) ของสารผสม 4 และ 5 พบว่าโปรตอนมีทั้งหมด 2 ชุด ที่เป็น olefinic protons 2 โปรตอน δ 5.25 (*t*, $J = 7 \text{ Hz}$) และ δ 5.19 (*dd*, $J = 7, 4 \text{ Hz}$) เมื่อพิจารณาหมู่ methyl จากพื้นที่ใต้ peak พบว่ามีพื้นที่เป็น 53 เท่าของ 1 โปรตอน จึงคาดว่าน่าจะมี methyl carbon 16 คาร์บอน ไม่มีสัญญาณโปรตอนที่ δ 3-3.5 แสดงว่าไม่มีโปรตอนที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3

เนื่องจากสารผสม 4 กับ 5 นี้ ไม่สามารถแยกออกจากกันโดยการใช้วิธีโครมาโทกราฟีแบบธรรมดาได้ ซึ่งอาจจะต้องหาวิธีการอื่นที่มีขีดความสามารถสูงในการแยกต่อไป เช่น HPLC