



การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากแคนาและมะพร้าวทะเลทรายและการปรับเปลี่ยนโครงสร้าง
ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเพื่อเพิ่มฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง



โดย
นางสาววิชราภา จิตต์การุณย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมี แผน ก แบบ ก 2 ปริญญามหาบัณฑิต

ภาควิชาเคมี

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2566

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากแคนาและมะพร้าวทะเลทรายและการปรับเปลี่ยน
โครงสร้างผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเพื่อเพิ่มฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมี แผน ก แบบ ก 2 ปริญญามหาบัณฑิต
ภาควิชาเคมี
มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2566
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

STUDIES OF CHEMICAL CONSTITUENTS FROM *DOLICHANDRONE SERRULATE*
(DC). SEEM. AND *DORSTENIA FOETIDA* SCHWEINF. AND STRUCTURAL
MODIFICATION OF NATURAL PRODUCTS FOR ENHANCING ANTICANCER
ACTIVITY



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for Master of Science CHEMISTRY
Department of CHEMISTRY
Silpakorn University
Academic Year 2023
Copyright of Silpakorn University

หัวข้อ	การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากแคนาและมะพร้าวทะเลทราย และการปรับเปลี่ยนโครงสร้างผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเพื่อเพิ่มฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง
โดย	นางสาววัชรภา จิตต์การุณย์
สาขาวิชา	เคมี แผน ก แบบ ก 2 ปริญญาโทบริหารธุรกิจ
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. กนกอร ระย้านิล

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

	คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นรงค์ ฉิมพาลี)	
พิจารณาเห็นชอบโดย	
	ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. พัลลภ คันธียงค์)	
	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. กนกอร ระย้านิล)	
	ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(ศาสตราจารย์ ดร. ปรีชา ภูวไพโรศิรศาล)	

640720026 : เคมี แผน ก แบบ ก 2 ปริญญาโทบัณฑิต

คำสำคัญ : แคนา, มะพร้าวทะเลทราย, อนุพันธ์ของ ursolic acid, การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง

นางสาว วัชรภา จิตต์การุณย์: การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากแคนาและมะพร้าวทะเลทรายและการปรับเปลี่ยนโครงสร้างผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเพื่อเพิ่มฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รองศาสตราจารย์ ดร. กนกอร ระย้านิล

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากดอกแคนา (*Dolichandrone serrulata* (DC.) Seem.) พบสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทั้งหมด 12 ชนิด เป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติใหม่ 1 ชนิดคือ 2-O-stearoyl-1-O-(3-O-stearoyl olenoyl)- α -L-arabinopyranose (DSS8) และสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีรายงาน 11 ชนิด ได้แก่ ursolic acid (DSS1), beta-sitosterol (DSS11), beta-sitosterol-3-O-beta-D-glucopyranoside (DSS12), (-)-rengyolone (DSS2), cleroidicin C (DSS3), cleroidicin D (DSS4), 6-O-trans-feruloyl catalpol (DSS5), 24-methylenecycloartane (DSS6), 24-methylenecycloartane-3,28-diol (DSS7), salidroside (DSS9) และ verbascoside (DSS10) โดยรายงาน DSS1, DSS3, DSS4, DSS5, DSS6, DSS7, DSS9, DSS11 และ DSS12 เป็นครั้งแรกในแคนา

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนสกัด hexane ของมะพร้าวทะเลทราย (*Dorstenia foetida* Schweinf.) สามารถแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ beta -sitosterol (DF1), สารผสมระหว่าง psoralen (DF2) และ bergapten (DF3), 5-Methoxy-3-(3-methyl-2,3-dihydroxybutyl)-psoralen-diacetate (DF4) และ 5-methoxy-3-(3-methyl-2,3-dihydroxybutyl)-psoralen (DF5) โครงสร้างของสารทั้งหมดถูกอธิบายโดยการวิเคราะห์ด้วยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์โดยรายงานค่า IC₅₀ ของ ursolic acid (DSS1) เท่ากับ 19.83 μ M (HCT116) และ 24.60 μ M (MDA-MB-231), 24-methylenecycloartane (DSS6) เท่ากับ 62.55 μ M (MDA-MB-231) และ 5-Methoxy-3-(3-methyl-2,3-dihydroxybutyl)-psoralen-diacetate (DF4) เท่ากับ 126.1 μ M (HCT116) นอกจากนี้มีการศึกษา Molecular docking ของ ursolic acid (DSS1) นำไปสู่การสังเคราะห์อนุพันธ์ต่างๆ



640720026 : Major CHEMISTRY

Keyword : *Dolichandrone serrulata*, *Dorstenia foetida* Schweinf, furanocoumarins, pentacyclic triterpene, cycloartane, ursolic derivatives, cytotoxic activity

MISS Watcharapa JITKAROON : Studies of chemical constituents from *Dolichandrone serrulata* (DC). Seem. and *Dorstenia foetida* Schweinf. and structural modification of natural products for enhancing anticancer activity Thesis advisor : Associate Professor Kanok-On Rayanil, Ph.D.

Phytochemical investigation of the flowers of *Dolichandrone serrulata* (DC.) Seem. (Bignoniaceae) lead to the isolation of a new acylate triterpenoid, 2-O-stearoyl-1-O-(3-O-stearoyl oleanoyl)- α -L-arabinopyranose (DSS8), and eleven known compounds including ursolic acid (DSS1), beta-sitosterol (DSS11), beta-sitosterol-3-O-beta-D-glucopyranoside (DSS12), (-)-rengyolone (DSS2), cleroidicin C (DSS3), cleroidicin D (DSS4), 6-O-trans-feruloyl catalpol (DSS5), 24-methylene cycloartenol (DSS6), 24-methylenecycloartane-3,28-diol (DSS7), solidoside (DSS9) and verbascoside (DSS10). Compounds DSS1, DSS3, DSS4, DSS5, DSS6, DSS7, DSS9, DSS11, and DSS12 were isolated for the first time from *Dolichandrone serrulata*.

The hexane extract of the whole plant of *Dorstenia foetida* Schweinf was investigated. Five known compounds were isolated and elucidated as beta-sitosterol (DF1), a mixture of psoralen (DF2) and bergapten (DF3), 5-Methoxy-3-(3-methyl-2,3-dihydroxybutyl)-psoralen-diacetate (DF4), and 5-methoxy-3-(3-methyl-2,3-dihydroxybutyl)-psoralen (DF5)

In this study, we investigated the cytotoxic activity of all isolated compounds in six cancer cell lines including HN22, HCT116, MCF7, MDA-MB-231, HT29, and HeLa using MTT assay. Ursolic acid (DSS1) displayed selective cytotoxic activity against HN22 (26.55 μ M), MDA-MB-231 (24.60 μ M), MCF-7 (34.06 μ M) and HCT116 (19.83 μ M). Meanwhile, 24-methylene cycloartanol (DSS6) showed cytotoxic activity specifically against MDA-MB-231 (62.55 μ M), and 5-methoxy-3-(3-methyl-2,3-dihydroxybutyl)-psoralen-diacetate (DF4) demonstrated cytotoxicity against HCT116 (126.1 μ M) cells. Furthermore, the molecular docking studies of ursolic acid (DSS1)

led to the synthesising of ursolic acid derivatives.



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความกรุณาช่วยเหลือจากหลายฝ่าย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. กนกอร รัชยานิล ที่ได้ให้คำปรึกษาในระหว่างการทำวิจัย ให้ความรู้ ข้อเสนอแนะ แนวทางการปรับปรุงแก้ไข พัฒนาและติดตามความก้าวหน้าในการดำเนินงานวิจัยด้วยความดูแลเอาใจใส่อย่างดีตลอดการทำวิจัย และขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร. พัลลภ คันธียงค์ และศาสตราจารย์ ดร. ปรีชา ภูวไพโรศิริสกาล ที่กรุณาสละเวลามาร่วมเป็นประธานและผู้ทรงคุณวุฒิในการสอบวิทยานิพนธ์พร้อมทั้งให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์

ขอขอบพระคุณอาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ ให้คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือ รวมถึงอำนวยความสะดวกในเรื่องเครื่องมือ สารเคมี และอุปกรณ์การทดลองต่าง ๆ ตลอดการทำงานวิจัย

ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่างานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับผู้สนใจที่จะทำงานวิจัยด้านนี้ต่อไป และหากมีข้อผิดพลาดประการใด ผู้วิจัยขออภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

วัชรภา จิตต์การุณย์



สารบัญ

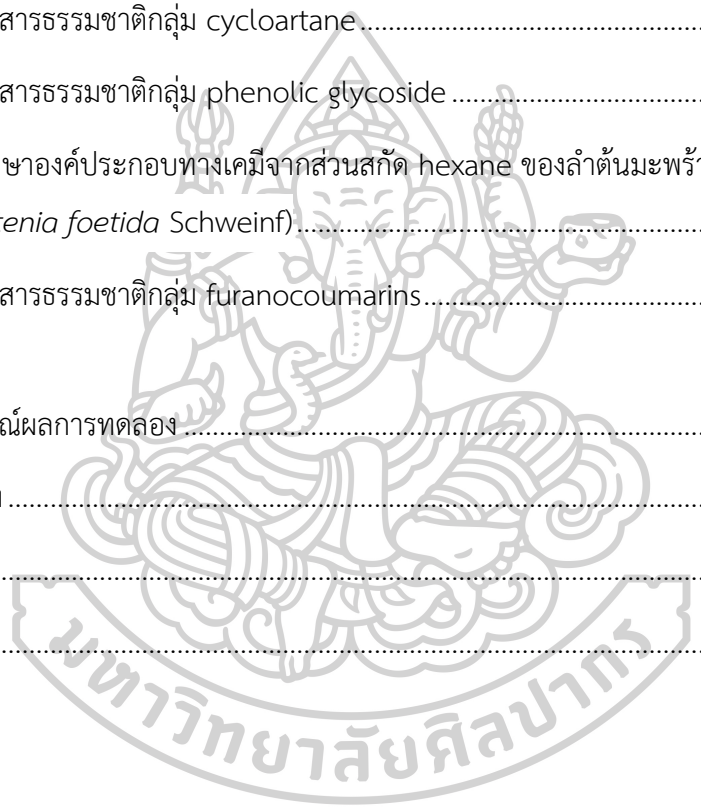
	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ณ
สารบัญตาราง.....	จ
สารบัญภาพ	ต
บทที่ 1 บทนำ	21
1.1 ที่มาและความสำคัญ.....	21
1.1.1 ข้อมูลทั่วไปของแคนา (<i>Dolichandrone serrulata</i> (DC.) Seem.).....	22
1.1.2 ข้อมูลทั่วไปของมะพร้าวทะเลทราย (<i>Dorstenia foetida</i> Schweinf.).....	24
1.2 วัตถุประสงค์	25
1.3 แนวเหตุผล ทฤษฎีสำคัญ หรือสมมติฐาน	26
1.4 ขอบเขตงานวิจัย	26
บทที่ 2	
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	27
2.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องสำหรับพืชในสกุล <i>Dolichandrone</i> (วงศ์ Bignoniaceae).....	27
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการแยกองค์ประกอบทางเคมีของ <i>Dolichandrone serrulata</i> (DC.) Seem.....	31
2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องสำหรับพืชในสกุล <i>Dorstenia</i> (วงศ์ Moraceae).....	33
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องสำหรับพืช <i>Dorstenia foetida</i> Schweinf.	38
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของ ursolic acid	40
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อนุพันธ์ที่มี piperazine เป็นหมู่แทนที่	42

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน.....	44
3.1 ศึกษาค้นคว้ารายงานวิจัยและข้อมูลที่มีความเกี่ยวข้องกับหัวข้อวิจัย.....	44
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	44
3.3 การเตรียมส่วนสกัดหยาบ (crude-DSS) จากดอกแคนา (<i>Dolichandrone Serrulata</i> Seem.)	45
3.4 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของส่วนสกัดหยาบจากดอกแคนา	46
3.5 การแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดจากดอกแคนา	47
3.5.1 การแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัด ethyl acetate จากดอกแคนา	47
3.5.1.1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วน DSS-E-10, DSS-E-11, DSS-E-12 และ DSS-E-13 โดยใช้เทคนิค recrystallization.....	47
3.5.1.2 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วน DSS-E-17 โดยใช้เทคนิค column chromatography.....	51
3.5.1.3 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วน DSS-E-18 โดยใช้เทคนิค column chromatography.....	53
3.5.1.4 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วน DSS-E-18-(4-7) โดยใช้เทคนิค preparative TLC.....	53
3.5.1.5 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วน DSS-E-18-9 และ DSS-E-18-10 โดยใช้เทคนิค preparative TLC	55
3.5.1.6 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วน DSS-E-27 โดยใช้เทคนิค column chromatography.....	56
3.5.2 การแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัด hexane จากดอกแคนา	58
3.5.2.1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วน DSS-H-33 และ DSS-H-111 โดยใช้เทคนิค recrystallization.....	58
3.5.2.2 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วน DSS-H-21 โดยใช้เทคนิค column chromatography.....	63

3.5.2.2.1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วน DSS-H-21-3-1 โดยใช้เทคนิค Reverse Phase chromatography (RP18).....	63
3.5.2.3 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วน DSS-H-76 โดยใช้เทคนิค column chromatography.....	65
3.5.2.4 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วน DSS-H-77	68
3.5.2.4.1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วน DSS-H-77 โดยใช้เทคนิค column chromatography	68
3.5.2.4.2 ปฏิกิริยา hydrolysis ของ DSS8.....	70
3.5.2.4.3 Acid hydrolysis.....	70
3.5.2.4.4 Basic hydrolysis.....	72
3.5.3 การแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัด <i>n</i> -butanol จากดอกแคนา	75
3.5.3.1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วน DSS-Bu-4 โดยใช้เทคนิค column chromatography.....	75
3.5.3.2 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วน DSS-Bu-28 โดยใช้เทคนิค column chromatography.....	77
3.5.3.3 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วน DSS-Bu-43 โดยใช้เทคนิค column chromatography.....	79
3.6 การเตรียมส่วนสกัดหยาบ (crude-DF) จากต้นมะพร้าวทะเลทราย (<i>Dorstenia foetida</i> Schweinf)	81
3.7 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของส่วนสกัดหยาบจากต้นมะพร้าวทะเลทราย	82
3.8 การแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดจากต้นมะพร้าวทะเลทราย (<i>Dorstenia foetida</i> Schweinf.)	84
3.8.1 การแยกสารจากส่วนสกัดชั้น hexane ของต้นมะพร้าวทะเลทราย.....	84
3.8.1.1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วน DF-H-11 ถึง DF-H-13 โดยใช้เทคนิค recrystallization.....	86

3.8.1.2 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วน DF-H-11 ถึง DF-H-13 โดยใช้เทคนิค preparative TLC.....	86
3.8.1.3 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วน DF-H-39 ถึง DF-H-42 โดยใช้เทคนิค preparative TLC.....	88
3.8.1.4 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วน DF-H-59 ถึง DF-H-60 โดยใช้เทคนิค column chromatography	89
3.9 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์.....	91
3.9.1 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์จากดอกแคนา (<i>Dolichandrone serrulata</i> (DC.) Seem).....	91
3.9.2 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์จากมะพร้าวทะเลทราย (<i>Dorstenia foetida</i> Schweinf.).....	93
3.10 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ ursolic acid.....	93
3.10.1 การออกแบบอนุพันธ์ที่เกี่ยวข้องกับหมู่ piperazine และศึกษา Molecular Docking เพื่อเป็นแนวทางในการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของ ursolic acid	93
3.10.1.1 การศึกษาทาง molecular docking เพื่อหาตำแหน่งการเข้าจับของระหว่างโมเลกุล ursolic acid UAD1 UAD2 และ UAD3 กับโปรตีน human glucokinase.....	94
3.10.1.2 การศึกษาทาง molecular docking เพื่อหาตำแหน่งการเข้าจับของระหว่างโมเลกุล ursolic acid UAD1 UAD2 และ UAD3 กับโปรตีน complex of wild type B-RAF with sorafenib (PDB ID: 1uwH).....	96
3.10.1.3 การศึกษาทาง molecular docking เพื่อหาตำแหน่งการเข้าจับของระหว่างโมเลกุล ursolic acid UAD1 UAD2 และ UAD3 กับโปรตีน EGFR (PDB ID:1M17).....	97
3.10.2 การออกแบบอนุพันธ์ที่เกี่ยวข้องกับหมู่เอมีนชนิดอื่นและศึกษา Molecular Docking เพื่อเป็นแนวทางในการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของ ursolic acid	99
3.10.2.1 การศึกษาทาง molecular docking เพื่อหาตำแหน่งการเข้าจับของระหว่างโมเลกุล ursolic acid UAD4 UAD5 และ UAD6 กับโปรตีน HER2 (PDB ID: 3RCD)	100
3.10.3 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ ursolic acid (ursolic derivatives)	102
3.10.3.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ UAD1 ผ่านปฏิกิริยา Acetylation.....	103

3.10.3.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ UAD2 ถึง UAD6 ผ่านปฏิกิริยา Amide formation.....	104
บทที่ 4	
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	110
4.1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากดอกแคนา <i>Dolichandrone serrulata</i> (DC.) Seem	110
4.1.1 สารธรรมชาติกลุ่ม terpene และ phytosterol.....	110
4.1.3 สารธรรมชาติกลุ่ม iridoid.....	128
4.1.2 สารธรรมชาติกลุ่ม cycloartane.....	142
4.1.4 สารธรรมชาติกลุ่ม phenolic glycoside	151
4.2 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนสกัด hexane ของลำต้นมะพร้าวทะเลทราย (<i>Dorstenia foetida</i> Schweinf).....	159
4.2.1 สารธรรมชาติกลุ่ม furanocoumarins.....	159
บทที่ 5	
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	169
รายการอ้างอิง	173
ประวัติผู้เขียน	175
ภาคผนวก.....	181



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ค่า IC ₅₀ ของอนุพันธ์ ursolic acid ที่สังเคราะห์โดย Kai-Kai Bai และคณะ.....	41
ตารางที่ 2 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของส่วนสกัดหยาบจากดอกแคนา	46
ตารางที่ 3 แสดงข้อมูล ¹ H และ ¹³ C NMR spectrum ของ DSS1a (CDCl ₃) โดยค่า J รายงานในหน่วย Hz	50
ตารางที่ 4 แสดงข้อมูล ¹ H และ ¹³ C NMR spectrum ของ DSS-E-17-4 หรือ DSS2 (CDCl ₃) โดยค่า J รายงานในหน่วย Hz	52
ตารางที่ 5 แสดงข้อมูล ¹ H และ ¹³ C NMR spectrum ของ DSS-E-18(4-7)-2 หรือ DSS3 (MeOD) โดยค่า J รายงานในหน่วย Hz.....	54
ตารางที่ 6 แสดงข้อมูล ¹ H และ ¹³ C NMR spectrum ของ DSS-E-18-10-2 หรือ DSS4 (MeOD) โดยค่า J รายงานในหน่วย Hz.....	55
ตารางที่ 7 แสดงข้อมูล ¹ H และ ¹³ C NMR spectrum ของ DSS-E-27-6 หรือ DSS5 (MeOD) โดยค่า J รายงานในหน่วย Hz.....	56
ตารางที่ 8 แสดงข้อมูล ¹ H NMR และ ¹³ C NMR ของ DSS-H-33-S หรือ DSS11 (CDCl ₃) โดยค่า J รายงานในหน่วย Hz.....	60
ตารางที่ 9 แสดงข้อมูล ¹ H และ ¹³ C NMR ของ DSS12a (CDCl ₃) โดยค่า J รายงานในหน่วย Hz... 61	61
ตารางที่ 10 แสดงข้อมูล ¹ H NMR และ ¹³ C NMR ของ DSS-H-21-3-1 หรือ DSS6 (CDCl ₃) โดยค่า J รายงานในหน่วย Hz.....	64
ตารางที่ 11 แสดงข้อมูล ¹ H NMR และ ¹³ C NMR ของ DSS-H-76-7 หรือ DSS7 (CDCl ₃) โดยค่า J รายงานในหน่วย Hz.....	66
ตารางที่ 12 แสดงข้อมูล ¹ H NMR และ ¹³ C NMR ของ DSS-H-77-2 หรือ compound 8 (CDCl ₃) โดยค่า J รายงานในหน่วย Hz	68
ตารางที่ 13 แสดงข้อมูล ¹ H และ ¹³ C NMR spectrum ของ DSS8a (MeOD) โดยค่า J รายงานในหน่วย Hz	71

ตารางที่ 14 แสดงข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR spectrum DSS8b (MeOD) โดยค่า J รายงานในหน่วย Hz.....	73
ตารางที่ 15 แสดงข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR ของ DSS-Bu-28-(17-29)-2 หรือ DSS9 (MeOD) โดยค่า J รายงานในหน่วย Hz.....	78
ตารางที่ 16 แสดงข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR ของ DSS-Bu-43-(30-40) หรือ DSS10 (MeOD) โดยค่า J รายงานในหน่วย Hz.....	79
ตารางที่ 17 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของส่วนสกัดหยาบจากต้นมะพร้าวทะเลทรายที่ความเข้มข้น 500 $\mu\text{g/ml}$	82
ตารางที่ 18 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของส่วนสกัดหยาบจากต้นมะพร้าวทะเลทรายที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$	83
ตารางที่ 19 แสดงข้อมูล ^1H -NMR และ ^{13}C -NMR ของ DF2 + DF3 (CDCl_3) โดยค่า J รายงานในหน่วย Hz.....	87
ตารางที่ 20 แสดงข้อมูล ^1H -NMR และ ^{13}C -NMR ของ DF-H-3(39-42) หรือ DF4 (CDCl_3) โดยค่า J รายงานในหน่วย Hz.....	88
ตารางที่ 21 แสดงข้อมูล ^1H -NMR และ ^{13}C -NMR ของ DF-H-4(59-60) หรือ DF5 (CDCl_3) โดยค่า J รายงานในหน่วย Hz.....	90
ตารางที่ 22 แสดงเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ไลน์ชนิดต่าง ๆ (% Cell viability) ต่อ DSS1 ถึง DSS12 ที่ความเข้มข้น 30.00 μM เทียบกับ Irinotecan 100 μM และ Doxorubicin 2 μM รายงานเป็นค่าเฉลี่ย (mean \pm SD, n=3).....	92
ตารางที่ 23 แสดงการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง ursolic acid UAD1 UAD2 และ UAD3 กับโปรตีน 1v4s.....	95
ตารางที่ 24 แสดงการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง UAD2 และ UAD3 กับโปรตีน 1uwH.....	96
ตารางที่ 25 แสดงการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง ursolic acid UAD2 และ UAD3 กับโปรตีน EGFR (PDB ID:1M17).....	98
ตารางที่ 26 แสดงการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง ursolic acid UAD4 UAD5 และ UAD6 กับโปรตีน HER2 (PDB ID: 3RCD).....	101

ตารางที่ 27 แสดงข้อมูลการเปรียบเทียบค่า chemical shift (δ) จาก $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของ ursolic acid acetate และ DSS1a.....	112
ตารางที่ 28 แสดงข้อมูลการเปรียบเทียบค่า chemical shift (δ) จาก $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของ β -sitosterol และ DSS11.....	115
ตารางที่ 29 แสดงข้อมูลการเปรียบเทียบค่า chemical shift (δ) จาก $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของ β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside ^[27] และ DSS12a.....	119
ตารางที่ 30 แสดงข้อมูลการเปรียบเทียบค่า proton chemical shift (δ_{H}) ตำแหน่งที่สำคัญของ DSS8b กับ oleanolic acid และ 3-epi-oleanolic acid	125
ตารางที่ 31 แสดงข้อมูลการเปรียบเทียบค่า carbon chemical shift (δ_{C}) ของ DSS8b กับ oleanolic acid และ 3-epi-oleanolic acid.....	126
ตารางที่ 32 แสดงข้อมูลการเปรียบเทียบค่า chemical shift (δ) จาก $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของ renygolone และ DSS2.....	130
ตารางที่ 33 แสดงข้อมูลการเปรียบเทียบค่า chemical shift (δ) จาก $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$..	133
ตารางที่ 34 แสดงข้อมูลการเปรียบเทียบค่า chemical shift (δ) จาก $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$..	136
ตารางที่ 35 แสดงข้อมูลการเปรียบเทียบค่า chemical shift (δ) จาก $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของ 6-O-trans-feruloyl catapol และ DSS5	140
ตารางที่ 36 แสดงข้อมูลการเปรียบเทียบค่า chemical shift (δ) จาก $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของ DSS6 และ 24-methylenecycloartanol.....	144
ตารางที่ 37 แสดงข้อมูลการเปรียบเทียบค่า chemical shift (δ) จาก $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของ DSS7 และ 24-methylenecycloartane-3,28-diol	149
ตารางที่ 38 แสดงข้อมูลการเปรียบเทียบค่า chemical shift (δ) จาก $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของ salidroside และ DSS9.....	153
ตารางที่ 39 แสดงข้อมูลการเปรียบเทียบค่า chemical shift (δ) จาก $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของ verbascoside และ DSS10	157
ตารางที่ 40 แสดงข้อมูลการเปรียบเทียบค่า chemical shift (δ) จาก $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของ psoralen และ DF2.....	161

ตารางที่ 41 แสดงข้อมูลการเปรียบเทียบค่า chemical shift (δ) จาก $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของ bergapten และ DF3.....	163
ตารางที่ 42 แสดงข้อมูลการเปรียบเทียบค่า chemical shift (δ) จาก $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของ 5-Methoxy-3-(3-methyl-2,3-dihydroxybutyl)-psoralen-diacetate และ DF4.....	165
ตารางที่ 43 แสดงข้อมูลการเปรียบเทียบค่า chemical shift (δ) จาก $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของ 5-Methoxy-3-(3-methyl-2,3-dihydroxybutyl)-psoralen และ DF5.....	168



สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 แสดงลักษณะลำต้นแคนา	22
ภาพที่ 2 แสดงใบของแคนา.....	22
ภาพที่ 3 แสดงดอกแคนา	23
ภาพที่ 4 แสดงต้นมะพร้าวทะเลทราย	24
ภาพที่ 5 แสดงองค์ประกอบของต้นมะพร้าวทะเลทราย (<i>Dorstenia foetida</i> Schweinf.).....	25
ภาพที่ 6 แสดงองค์ประกอบทางเคมีจากต้น <i>Dolichandrone heterophylla</i> ^[6]	27
ภาพที่ 7 แสดงองค์ประกอบทางเคมีจากต้น <i>Dolichandrone spathacea</i> ^[8]	29
ภาพที่ 8 แสดงองค์ประกอบทางเคมีจากต้น <i>Dolichandrone spathacea</i> ^[9]	30
ภาพที่ 9 แสดงสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติใหม่ (18) จากกิ่งของแคนา.....	31
ภาพที่ 10 แสดงองค์ประกอบทางเคมีจากดอกแคนา.....	32
ภาพที่ 11 แสดงองค์ประกอบทางเคมีจากต้น <i>Dorstenia mannii</i>	33
ภาพที่ 12 แสดงองค์ประกอบทางเคมีจากต้น <i>Dorstenia gigas</i>	35
ภาพที่ 13 แสดงองค์ประกอบทางเคมีจากต้น <i>Dorstenia contrajerua</i>	35
ภาพที่ 14 แสดงองค์ประกอบทางเคมีจากต้น <i>Dorstenia dinklagei</i>	36
ภาพที่ 15 แสดงองค์ประกอบทางเคมีจากต้น <i>Dorstenia ciliata</i>	37
ภาพที่ 16 แสดงองค์ประกอบทางเคมีจากต้น <i>Dorstenia kameruniana</i>	38
ภาพที่ 17 แสดงองค์ประกอบทางเคมีจากต้นมะพร้าวทะเลทราย (<i>Dorstenia foetida</i>).....	39
ภาพที่ 18 อนุพันธ์ ursolic acid สังเคราะห์โดย Kai-Kai Bai และคณะ ^[20]	40
ภาพที่ 19 อนุพันธ์ ursolic acid ของ Haiyan Dong และคณะ	42
ภาพที่ 20 โมเลกุลเลียนแบบ artemisinin ของ Shu Li และคณะ.....	43
ภาพที่ 21 แผนผังแสดงขั้นตอนการเตรียมส่วนสกัดหยาดดอกแคนา.....	45

ภาพที่ 22	แผนผังการแยกองค์ประกอบทางเคมีของจากส่วนสกัด ethyl acetate จากดอกแคนา .	49
ภาพที่ 23	แผนผังการแยกองค์ประกอบทางเคมีของจากส่วนสกัด hexane จากดอกแคนา	59
ภาพที่ 24	แผนผังการแยกองค์ประกอบทางเคมีของจากส่วนสกัด n-butanol จากดอกแคนา.....	76
ภาพที่ 25	แผนผังแสดงขั้นตอนการเตรียมส่วนสกัดหยาบมะพร้าวทะเลทราย.....	81
ภาพที่ 26	แผนผังการแยกองค์ประกอบทางเคมีของจากส่วนสกัด hexane จากลำต้นมะพร้าวทะเลทราย.....	85
ภาพที่ 27	แสดงอนุพันธ์ของ ursolic acid ที่ออกแบบเพื่อศึกษาผลของ Molecular Docking.....	94
ภาพที่ 28	แสดงตำแหน่งในโครงสร้างของโมเลกุล ursolic acid UAD1 UAD2 และ UAD3 ที่สร้างพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโนของโปรตีน human glucokinase	95
ภาพที่ 29	แสดงโครงสร้าง 2 มิติและ 3 มิติ ของยา Erlotinib	97
ภาพที่ 30	แสดงอนุพันธ์ UAD4, UAD5 และ UAD6 ของ ursolic acid ที่ออกแบบเพื่อศึกษาผลของ Molecular Docking	99
ภาพที่ 31	แสดงโครงสร้างของอนุพันธ์ของ ursolic acid UAD1 ถึง UAD6.....	102
ภาพที่ 32	แสดงการสังเคราะห์ UAD1 ผ่านปฏิกิริยา Acetylation.....	103
ภาพที่ 33	แสดงผลการสังเคราะห์อนุพันธ์ UAD2 ถึง UAD4.....	104
ภาพที่ 34	แสดงโครงสร้างของ UAD4 และ UAD4-dimer	105
ภาพที่ 35	แสดงผลการสังเคราะห์อนุพันธ์ UAD5 และ UAD6.....	107
ภาพที่ 36	แสดงโครงสร้างของ UAD6.....	109
ภาพที่ 37	แสดงโครงสร้าง DSS1 และ DSS1a.....	110
ภาพที่ 38	แสดงโครงสร้าง DSS12 และ DSS12a	117
ภาพที่ 39	แสดงโครงสร้าง DSS8 และ Lugustin C.....	121
ภาพที่ 40	แสดงโครงสร้างของ DSS8a จากการทำปฏิกิริยา Acid hydrolysis	123
ภาพที่ 41	แสดงโครงสร้างของ 3-epi-oleanolic acid และ oleanolic acid.....	124
ภาพที่ 42	แสดงโครงสร้างของ DSS2.....	128
ภาพที่ 43	แสดงโครงสร้างของ DSS3.....	131

ภาพที่ 44 แสดงโครงสร้างของ DSS4.....	134
ภาพที่ 45 แสดงโครงสร้างของ DSS5.....	137
ภาพที่ 46 แสดงโครงสร้างของ DSS6.....	142
ภาพที่ 47 แสดงโครงสร้างของ DSS7.....	147
ภาพที่ 48 แสดงโครงสร้างของ DSS9.....	151
ภาพที่ 49 แสดงโครงสร้างของ DSS10.....	154
ภาพที่ 50 แสดงโครงสร้างของ DF2.....	159
ภาพที่ 51 แสดงโครงสร้างของ DF3.....	162
ภาพที่ 52 แสดงโครงสร้างของ DF4.....	164
ภาพที่ 53 แสดงโครงสร้างของ DF5.....	167



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

แคนนา (*Dolichandrone serrulata* (DC.) Seem.) เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Bignoniaceae เป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็กถึงขนาดกลาง ออกดอกเป็นช่อขนาดใหญ่มีลักษณะเป็นรูปแตร มีรายงานสรรพคุณมากมายของแคนนาในแต่ละส่วนดังนี้ ดอกใช้เป็นยาขับเสมหะ โลหิต ลม และเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ส่วนราก ช่วยขับลม ขับเสมหะ แก้อาการท้องเสีย และลดอาการท้องอืด ส่วนฝัก และเมล็ด ใช้เป็นยาถ่ายแก้อาการท้องเสีย แก้วริดสีดวง และช่วยขับปัสสาวะ^{[1] [2]}

ในงานวิจัยครั้งนี้จะศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของดอกแคนนาซึ่งเป็นผักพื้นบ้านที่นิยมรับประทานกันอย่างแพร่หลาย จากการสืบค้นข้อมูลพบว่า มีรายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพของ ดอกแคนนาค่อนข้างน้อย ดังนั้นจึงมีโอกาที่ผู้วิจัยจะค้นพบองค์ประกอบทางเคมีชนิดใหม่และมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ โดยทั้งนี้ได้มุ่งเน้นในการศึกษาการออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งในดอกแคนนาเป็นครั้งแรก

นอกจากนี้คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้ศึกษาการออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของมะพร้าวทะเลทราย (*Dorstenia foetida* Schweinf.) ในเบื้องต้นพบว่าในส่วนของสกัดหยาบชั้น hexane, *n*-butanol, และ ethyl acetate มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HCT116 และ HT29), เซลล์มะเร็งเต้านม (MDA-MB-231), เซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) และเซลล์มะเร็งลำคอ (HN22) แต่ยังไม่มียาการศึกษาการแยกและระบุสารที่ออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง จึงทำให้เกิดงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการค้นหาสารที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของมะพร้าวทะเลทราย

1.1.1 ข้อมูลทั่วไปของแคนา (*Dolichandrone serrulata* (DC.) Seem.)

ลำต้นแคนา

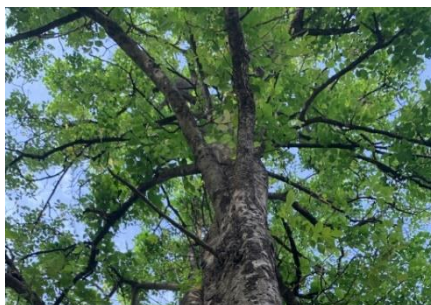
แคนาเป็นไม้ยืนต้นขนาดปานกลางถึงใหญ่ มีลำต้นสูงได้มากกว่า 25 เมตร เปลือกลำต้นมีสี ขาวอมเทา และมีสะเก็ดเปลือกสีดำประปราย สะเก็ดนี้จะร่วงออกเรื่อย ๆ ลำต้นมีกิ่งจำนวนมาก และ แต่ละกิ่งจะแตกกิ่งย่อยออกจำนวนมากเช่นกันเนื้อไม้ และกิ่งแคนาค่อนข้างเปราะ และหักง่าย ไม้ นิยมแปรรูปเป็นไม้โครงสร้าง แต่จะแปรรูปเป็นไม้ตกแต่ง หรือ ทำเฟอร์นิเจอร์ได้^[1]



ภาพที่ 1 แสดงลักษณะลำต้นแคนา

ใบแคนา

ใบแคนาเป็นใบประกอบแทงออกตรงข้ามกันบนกิ่ง มีก้านใบหลัก ยาว 20-30 เซนติเมตร แต่ ละก้านใบประกอบด้วยใบย่อย 3-5 คู่ และส่วนปลายก้านใบหลักเป็นใบเดี่ยว แต่ละใบมีก้านใบสั้น ยาวประมาณ 10 มิลลิเมตร ใบมีลักษณะเป็นรูปไข่ค่อนข้างอ้วน ปลายใบเป็นติ่งแหลม ขอบใบหยัก และโค้งเป็นลูกคลื่น ใบกว้างประมาณ 2.5-5 เซนติเมตร และยาวประมาณ 7-10 เซนติเมตร ใบมีเส้น ใบประมาณ 4 คู่ แยกออกตรงข้ามกันจากเส้นใบตรงกลาง และมองเห็นเส้นใบได้ชัดเจน^[1]



ภาพที่ 2 แสดงใบของแคนา

ดอกแคนา

ดอกแคนา ออกเป็นดอกเดี่ยว แต่จะออกกระจุกตัวบริเวณปลายกิ่ง 1-8 ดอก ทำให้มองดูคล้ายออกเป็นช่อ ดอกมีลักษณะเป็นรูปกรวยหรือรูปแตรยาว 12-17 เซนติเมตร ประกอบด้วยก้านดอกยาวประมาณ 2-3 เซนติเมตร ถัดมาเป็นกลีบเลี้ยงสีเขียวหุ้มกลีบดอกไว้ ดอกตูมมีสีเขียว ลักษณะอวบอูมตรงกลาง ส่วนปลายเป็นติ่งแหลม เมื่อดอกเริ่มบาน กลีบเลี้ยงจะคลี่ออกทำให้กลีบดอกขยายออกมาก มีโคนกลีบดอกเป็นกรวยยาว^[1]



ภาพที่ 3 แสดงดอกแคนา

ฝักแคนา

ผลของแคนาจะออกเป็นฝัก ที่พัฒนามาจากดอก 1 ดอก ที่ผสมเกสรแล้ว ฝักอ่อนมีสีเขียว เป็นแท่งแบนยาวคล้ายถั่วฝักยาวแบน ฝักแก่จะแห้ง มีสีน้ำตาลอมขาว ยาวประมาณ 30-60 เซนติเมตร เมื่อฝักแห้งเต็มที่ ฝักจะโค้งงอ และปิดตัว จนถึงระยะแก่มากซึ่งฝักจะปริแตกตามเป็นรอยแยกตามขอบทั้งสองข้างของฝัก ภายในฝักมีเมล็ดจำนวนมาก เมล็ดมีสีน้ำตาลอมดำ เป็นรูปสี่เหลี่ยม และมีปีกเป็นเยื่อคล้ายกระดาษแก้วหุ้มรอบข้าง^[1]

1.1.2 ข้อมูลทั่วไปของมะพร้าวทะเลทราย (*Dorstenia foetida* Schweinf.)

มะพร้าวทะเลทราย (ชื่อวิทยาศาสตร์: *Dorstenia foetida* Schweinf.) จัดเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Moraceae เป็นไม้อวบน้ำขนาดเล็ก นิยมปลูกในกระถางเล็ก ๆ สำหรับเลี้ยงไว้เพื่อความสวยงาม เนื่องจากมีลักษณะเหมือนต้นมะพร้าวย่อส่วน จึงเรียกว่า "ต้นมะพร้าวทะเลทราย" [3, 4]



ภาพที่ 4 แสดงต้นมะพร้าวทะเลทราย

ลำต้นมะพร้าวทะเลทราย

มะพร้าวทะเลทรายเป็นไม้อวบน้ำขนาดเล็ก มีลำต้นกลมใหญ่ เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.5 นิ้วพุด ลำต้นเดี่ยว ไม่แตกกิ่งก้าน ตามลำต้นจะมีรอยแผลใบนูนรอบต้น [3, 4]

ใบมะพร้าวทะเลทราย

ใบมะพร้าวทะเลทรายเป็นใบเดี่ยว แทงออกเรียงสลับรอบลำต้น มีก้านใบยาวประมาณ 2 ซม. เนื้อใบค่อนข้างหนา สีเขียวสด [3, 4]

ดอกมะพร้าวทะเลทราย

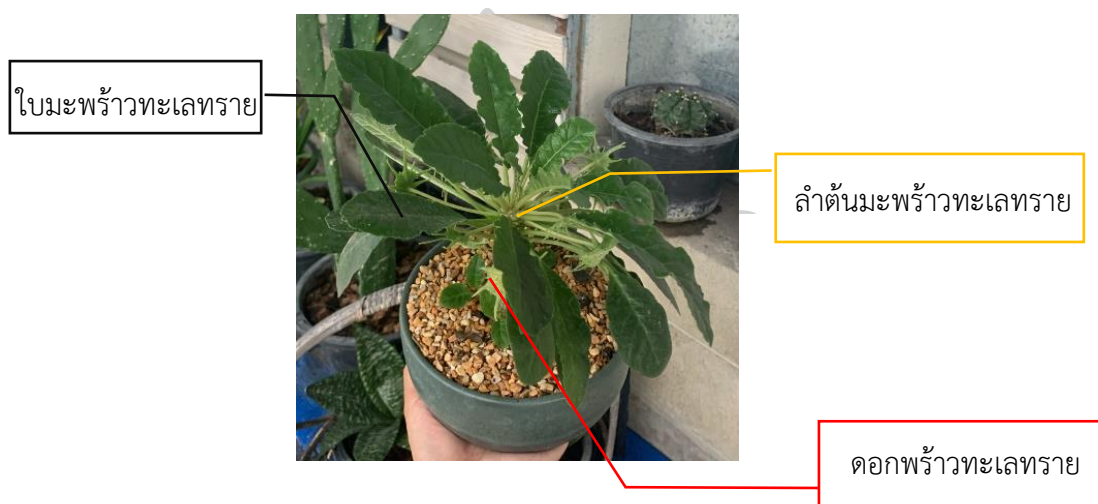
ดอกมะพร้าวทะเลทรายออกเป็นดอกเดี่ยว ๆ จำนวนมากโดยเรียงกันเป็นระเบียบที่ปลายยอดของต้น ก้านช่อดอกยาวและมีขนละเอียด ลักษณะโคนดอกจะเชื่อมกันแล้วบานเป็นกลีบ ดอกรูปปากแตรทรงกลม ขอบกลีบดอกจะมีกลีบย่อยเป็นแฉกๆ ปลายแหลมอีกชั้นหนึ่ง จำนวน 10-12 แฉก ดอกมีหลายสี คือ สีขาว สีส้ม สีชมพู และสีน้ำตาล ตามความแก่ของดอก [3, 4]

เมล็ดมะพร้าวทะเลทราย

เมล็ดมะพร้าวทะเลทรายมีขนาดเล็กสีน้ำตาลอ่อนติดบนดอกจำนวนมาก เมื่อดอกแก่จะติดเมล็ดออกจากฝักโดยอัตโนมัติ^[3, 4]

สรรพคุณของมะพร้าวทะเลทราย

หัวมีฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ และส่วนรากมีฤทธิ์ป้องกันโรคเรื้อน โรคตับ และโรกระบบทางเดินอาหาร^[5]



ภาพที่ 5 แสดงองค์ประกอบของต้นมะพร้าวทะเลทราย (*Dorstenia foetida* Schweinf.)

1.2 วัตถุประสงค์

- 1) เพื่อแยกองค์ประกอบทางเคมีจากดอกแคนา (*Dolichandrone serrulata* (DC.) Seem.) และทำให้บริสุทธิ์เพื่อวิเคราะห์หาโครงสร้างโดยใช้ เทคนิคทาง spectroscopy
- 2) เพื่อแยกองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนสกัด hexane ของมะพร้าวทะเลทราย (*Dorstenia foetida* Schweinf.) ทั้งต้นและพิสูจน์โครงสร้าง ด้วยทาง spectroscopy
- 3) เพื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งของส่วนสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์จากดอกแคนาและมะพร้าวทะเลทราย
- 3) ศึกษาการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ได้จากดอกแคนาเพื่อเพิ่มฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง

1.3 แนวเหตุผล ทฤษฎีสำคัญ หรือสมมติฐาน

จากการสืบค้นข้อมูลพบว่าพืชในวงศ์ *Bignoniaceae* มีองค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสำคัญหลายชนิดเช่น phenylethanoids, flavonoids, cycloartanes, iridoid และ triterpenoids เป็นต้น โดยมีรายงานการแยกองค์ประกอบทางเคมีจากดอกแคนา (*Dolichandrone serrulata* (DC.) Seem.) เพียง 6 ชนิด ได้แก่ hallerone, protocatechuic acid, renygolone, cleroidicin B, ixoside และ isomaltose ซึ่งสารบางตัวมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ เช่น ต้านสารอนุมูลอิสระ ต้านเบาหวาน และยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ดังนั้นผู้วิจัยคาดว่าจะพบองค์ประกอบทางเคมีชนิดใหม่ในดอกแคนาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ดี เช่นเดียวกัน รวมทั้งศึกษาการปรับเปลี่ยนโครงสร้าง ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่แยกได้เพื่อเพิ่มฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง

นอกจากนี้จากการสืบค้นข้อมูลพบว่าพืชในวงศ์ *Dorstenia* มีองค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในกลุ่ม furanocoumarin, benzyl benzofuran, chalcone, และ flavonoids โดยมีรายงานการแยกองค์ประกอบทางเคมีจากมะพร้าวทะเลทราย (*Dorstenia foetida* Schweinf.) เพียงแค่กลุ่ม coumarins จำนวน 14 ชนิด โดยยังไม่มีรายงานการศึกษาการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ดังนั้นผู้วิจัยคาดว่าจะพบองค์ประกอบทางเคมีกลุ่มอื่น ๆ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ดีในมะพร้าวทะเลทรายเช่นเดียวกับที่พบในพืชวงศ์ *Dorstenia*

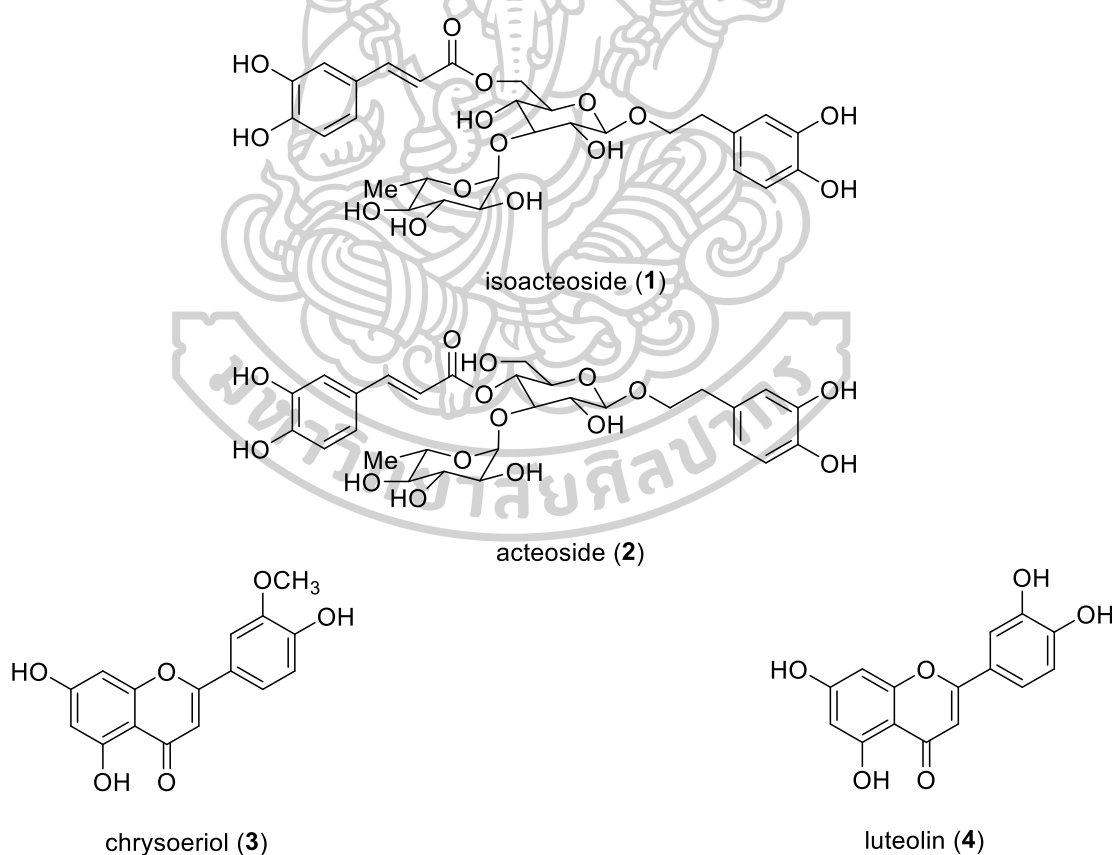
1.4 ขอบเขตงานวิจัย

- 1) แยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากดอกแคนา (*Dolichandrone serrulata* (DC.) Seem.) และต้นมะพร้าวทะเลทราย (*Dorstenia foetida* Schweinf.) จากนั้นนำไปตรวจสอบและยืนยันโครงสร้างโดยใช้เทคนิคทาง spectroscopy
- 2) ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากดอกแคนาและต้นมะพร้าวทะเลทราย
- 3) ออกแบบและสังเคราะห์อนุพันธ์ของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่แยกได้จากดอกแคนาโดยใช้ Molecular docking

บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องสำหรับพืชในสกุล *Dolichandrone* (วงศ์ Bignoniaceae)

ปี 2008 Thomas Dzeha และคณะ^[6] สามารถแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในกลุ่ม phenylethanoids ได้ 2 ชนิด (ภาพที่ 6) คือ isoacteoside (1) และ acteoside (2) ในกลุ่ม flavonoids 2 ชนิด คือ chrysoeriol (3) และ luteolin (4) จากส่วนสกัดน้ำจากใบและกิ่งของ *Dolichandrone heterophylla* นอกจากนี้ได้ศึกษาผลของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ HaCaT keratinocytes และแบคทีเรียแกรมลบ *Pseudomonas aeruginosa* พบว่า chrysoeriol (3) มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ HaCaT keratinocytes โดยมีค่า IC_{50} ($\mu M \pm SD$) เท่ากับ $31 \mu M$ ส่วน isoacteoside (1) มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *Pseudomonas aeruginosa* ค่า IC_{50} เท่ากับ $50 \mu M$

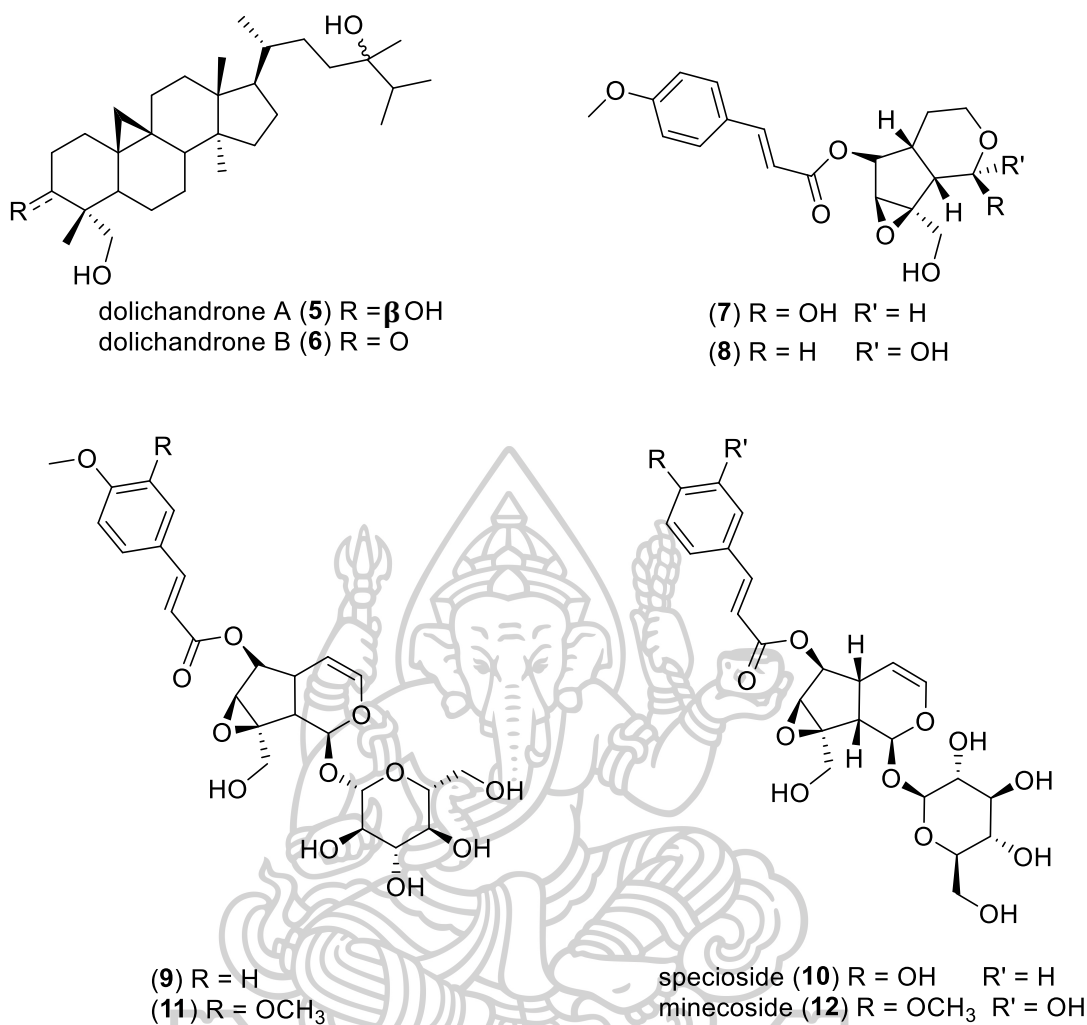


ภาพที่ 6 แสดงองค์ประกอบทางเคมีจากต้น *Dolichandrone heterophylla*^[6]

ปี 2010 Badgujar Vishal B และคณะ^[7] ได้ศึกษาผลของส่วนสกัด methanol ส่วนสกัด ethyl acetate และสารประกอบ flavanoid จากส่วนสกัด methanol จากเปลือกของต้น *Dolichandrone falcata* Seem ต่อการออกฤทธิ์ anxiolytic (ลดความวิตกกังวล) โดยทำการทดลองในหนูด้วยวิธี MBT assay พบว่าส่วนสกัด methanol, ส่วนสกัด ethyl acetate และสารประกอบ flavanoid จากส่วนสกัด methanol สามารถออกฤทธิ์ anxiolytic โดยมีค่า marble burying test ลดลงเมื่อมีการเพิ่มปริมาณความเข้มข้น ของทั้งส่วนสกัด methanol, ethyl acetate และสารประกอบ flavonoid ซึ่งค่า marble burying test ที่ความเข้มข้นสูงสุดเป็นดังนี้ ส่วนสกัด methanol (400 mg/kg) มีค่า 16 ± 0.87 ส่วนสกัด ethyl acetate (400 mg/kg) มีค่า 9.3 ± 0.92 และสารประกอบ flavonoid (200 mg/kg) มีค่า 2.7 ± 0.76 ซึ่งแสดงถึงความวิตกกังวลของหนูที่ลดลง

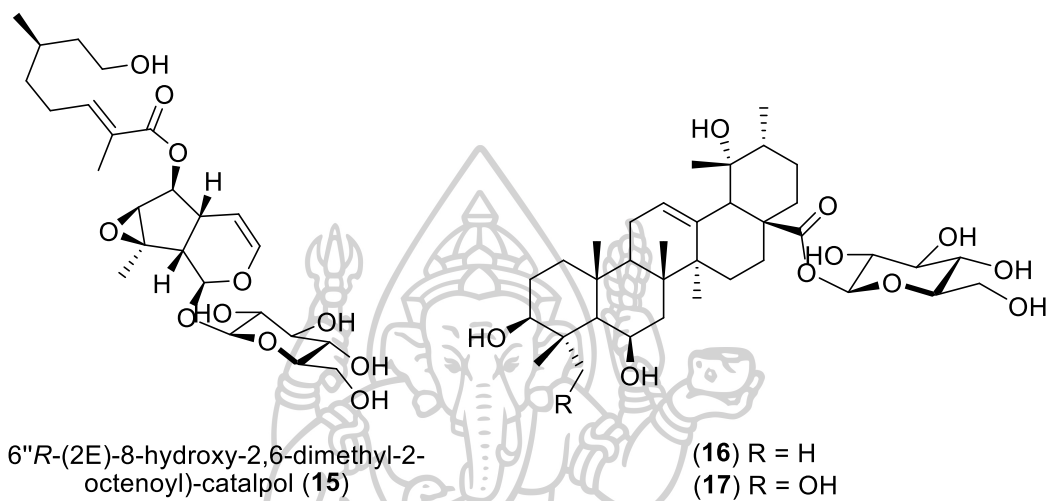
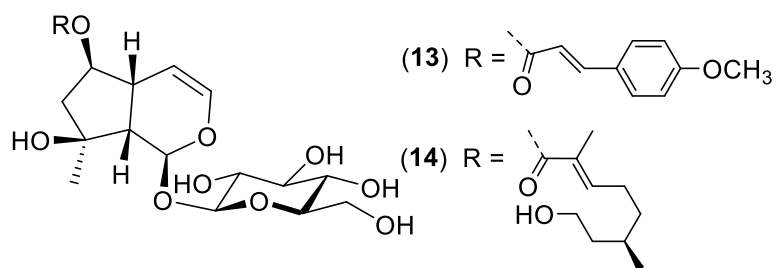
ปี 2017 Van Tuan Nguyen และคณะ^[8] สามารถแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติใหม่ในกลุ่ม cycloartanes 2 ชนิด คือ dolichandrone A (5) และ dolichandrone B (6) ในกลุ่ม iridoid 2 ชนิด คือ 6-O-[(E)-4-methoxycinnamoyl]-1 β -hydroxy-dihydrocatalpolgenin (7) และ 6-O-[(E)-4-methoxycinnamoyl]-1 α -hydroxy-dihydrocatalpolgenin (8) และสามารถแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีรายงานในกลุ่ม iridoid อีก 4 ชนิด คือ 6-O-[(E)-4-methoxycinnamoyl]catalpol (9), specioside (10), 6-O-[(E)-3,4-dimethoxycinnamoyl]catalpol (11) และ mine-coside (12) จากส่วนสกัด n-hexane, dichloromethane, acetone, methanol และน้ำจากใบและเปลือกของ *Dolichandrone spathacea* (ภาพที่ 7)

นอกจากนี้ได้นำสารผลิตภัณฑ์หมายเลข 5, 6, 9 และ 11 ไปทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB), เซลล์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) พบว่าสารหมายเลข 6 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 18.77 μ M



ภาพที่ 7 แสดงองค์ประกอบทางเคมีจากต้น *Dolichandrone spathacea*^[8]

ปี 2018 Phuc-Dam Nguyen และคณะ^[9] สามารถแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติใหม่ ใน กลุ่ม iridoid glycosides 3 ชนิด คือ 6-O-(p-methoxy-E-cinnamoyl)-ajugol (13), 6''R-(2E)-8-hydroxy-2,6-dimethyl-2-octenoyl)-ajugol (14) และ 6''R-(2E)-8-hydroxy-2,6-dimethyl-2-octenoyl)-catalpol (15) ใน กลุ่ม triterpenoid saponins 2 ชนิด คือ 28-O- β -D-glucopyranosyl uncaric acid (16) และ 28-O- β -D-glucopyranosyl-23-hydroxyuncaric acid (17) จากส่วนสกัด methanol ของใบ *Dolichandrone spathacea* (ภาพที่ 8)

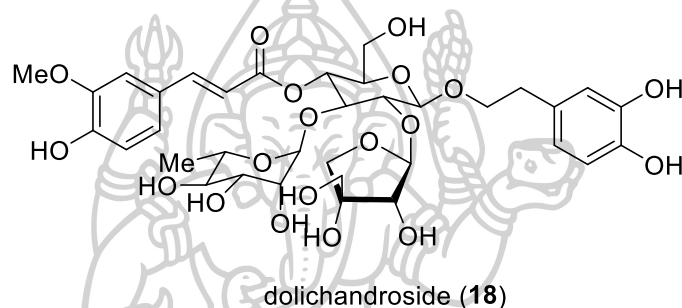


ภาพที่ 8 แสดงองค์ประกอบทางเคมีจากต้น *Dolichandrone spathacea*^[9]



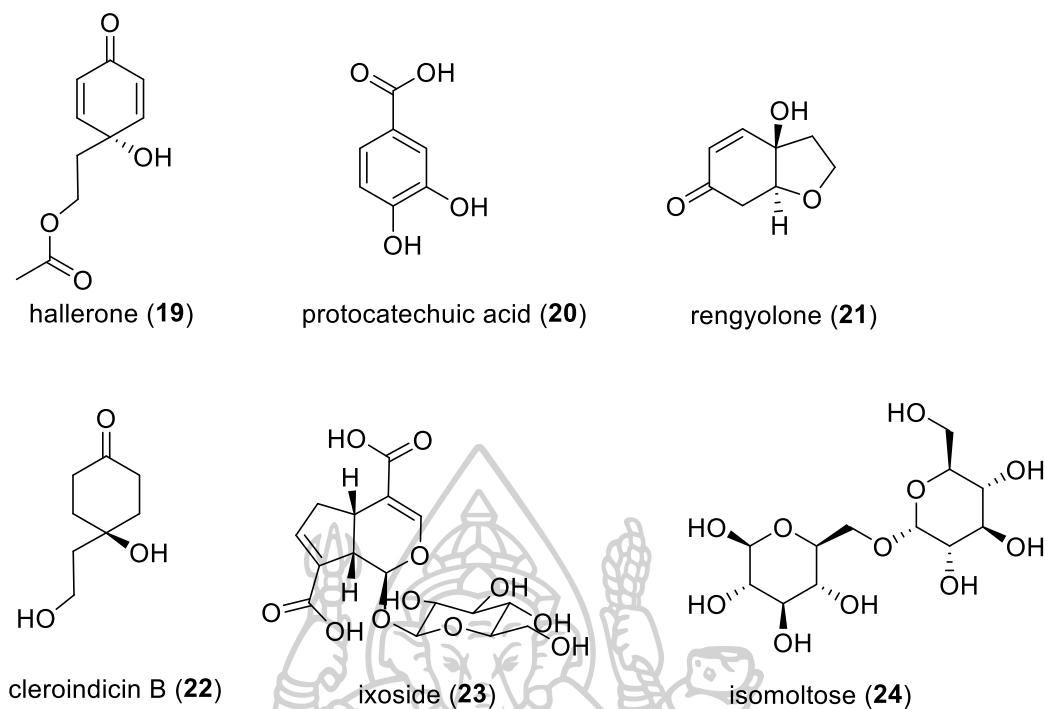
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการแยกองค์ประกอบทางเคมีของ *Dolichandrone serrulata* (DC.) Seem.

ปี 2006 Bounmy Sinaphet^[10] และคณะวิจัยจากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น รายงานการแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติชนิดใหม่จากส่วนสกัด methanol จากกิ่งของแคนนา ในกลุ่ม phenolic triglycoside 1 ชนิด (ภาพที่ 9) คือ dolichandroside (18) และสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีรายงานแล้วในกลุ่ม phenolic triglycoside อีก 7 ชนิด ได้แก่ decaffeoylverbascoside, verbascoside, isoverbascoside, markhamioside A, 2''-O-apiosylverbascoside และ luteoside B กลุ่ม iridoid glucoside 1 ชนิด คือ ixoside



ภาพที่ 9 แสดงสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติใหม่ (18) จากกิ่งของแคนนา

ปี 2015 Phanida Phanthong^[11] และคณะวิจัยจากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล สามารถแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติได้ 6 ชนิด คือ hallerone (19), protocatechuic acid (20), renyolone (21), cleroidicin B (22), ixoside (23) และ isomaltose (24) จาก ส่วนสกัด ethyl acetate, methanol และ dichloromethane ซึ่ง 19, 20, 21, 22 และ 24 เป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่สามารถแยกได้เป็นครั้งแรกจากส่วนดอกของต้น *Dolichandrone serrulata* (DC.) Seem (ภาพที่ 10) นอกจากนี้ได้ศึกษาการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ crude n-hexane, ethyl acetate, methanol, dichloromethane และสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่แยกได้ทั้ง 6 ชนิด โดยมี Trolox เป็น positive control ซึ่งทดสอบกับสารอนุมูลอิสระ 3 ชนิด ได้แก่ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radicals, hydroxyl radicals และ superoxide radicals พบว่า protocatechuic acid (20) มีฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระชนิด 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radicals และ hydroxyl radicals โดยมีค่า IC_{50} ($\mu M \pm SD$) เท่ากับ 25.6 ± 0.6 และ 29.6 ± 0.4 μM ตามลำดับ ส่วน hallerone และ renyolone มีฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูล superoxide โดยมีค่า IC_{50} ($\mu M \pm SD$) เท่ากับ 39.7 ± 0.2 และ 40.6 ± 1.8 μM ตามลำดับ



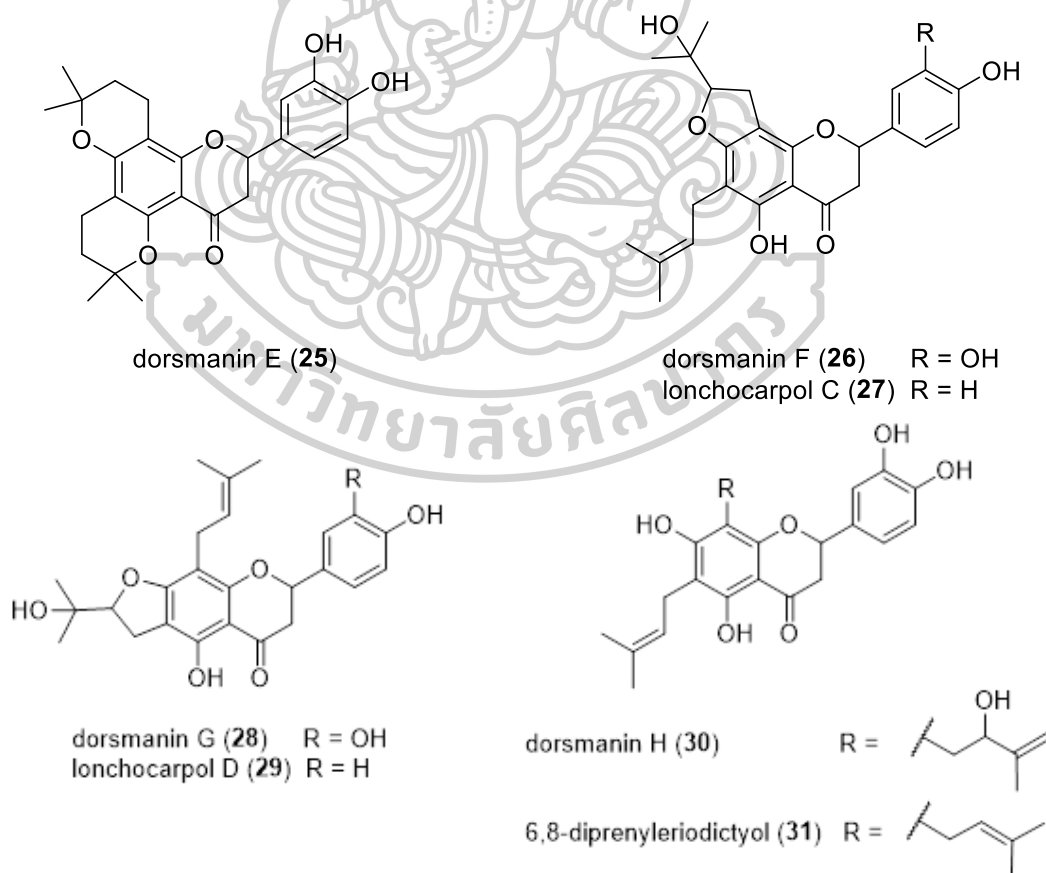
ภาพที่ 10 แสดงองค์ประกอบทางเคมีจากดอกแคนา

ปี 2020 Supataechasit Yannasithinon และคณะ^[12] ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านเบาหวานของส่วนสกัดเอทานอลของดอกแคนา (DSF) ต่อความเสียหายของระบบสืบพันธุ์เพศผู้ในหนูที่เป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 หรือดื้อต่ออินซูลิน (T2DM) โดยการให้อาหารที่มีไขมันสูงและ streptozotocin (สารประกอบ glucosamine-nitrosourea จากธรรมชาติเมื่อเข้าสู่ร่างกายของหนูทดลองจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอ) โดยในการทดลองแบ่งหนูเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ 1. หนูควบคุม 2. หนูที่เป็นเบาหวาน (T2DM) 3. หนูที่เป็นเบาหวานแล้วได้รับสาร DSF 200 mg/kg BW (DSF200 + T2DM) และ 4. หนูที่เป็นเบาหวานแล้วได้รับสาร DSF 600 mg/kg (DSF600 + T2DM) หลังจากให้หนูทั้ง 4 กลุ่มอดอาหารแล้วทำการเจาะเลือดเพื่อวัดปริมาณน้ำตาลในเลือด พบว่าระดับกลูโคสในเลือด (FBG) ในหนูกลุ่ม 2 ที่ไม่ได้รับสาร DSF นั้นเพิ่มขึ้น (318.8 ± 63.2 mg / dl) ที่ 180 นาที หลังจากทดสอบความทนต่อน้ำตาล (OGTT) เมื่อเทียบกับหนูที่เป็นตัวควบคุม (87.6 ± 10.8 mg / dl) ในทางตรงกันข้ามกลุ่ม 3 และ 4 มีระดับกลูโคสในเลือด (FBG) ปกติ แสดงให้เห็นว่าสาร DSF สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ ถัดมาศึกษาผลของสาร DSF ต่อสัณฐานวิทยาและน้ำหนักอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของหนูทดลอง พบว่าหนูกลุ่ม 3 และ 4 ที่ได้รับสาร DSF มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นเล็กน้อยและมีขนาดของอัณฑะและหลอดน้ำอสุจิเพิ่มขึ้น ถัดมาผลของสาร DSF ต่อการปรับปรุงเนื้อเยื่อหลอดน้ำอสุจิในหนูทดลอง พบว่าหนูในกลุ่ม 3 และ 4 ที่ได้รับสาร DSF มีการสร้างเยื่อผิว

หลอดน้ำอสุจิขึ้น เพื่อทดแทนเนื้อเยื่อที่ถูกกำจัด เมื่อเทียบกับหนูกลุ่ม 2 ต่อมาผลของสาร DSF ต่อความเข้มข้นอสุจิพบว่าสาร DSF ทำให้มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นอสุจิเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าสาร DSF มีผลช่วยให้ MDA ของอณฑะและระดับฮอร์โมนเพศชายเพิ่มขึ้น และลดการแสดงออกของ androgen receptor อีกด้วย นั่นแสดงให้เห็นว่าสาร DSF ช่วยปรับปรุงความเสียหายของระบบสืบพันธุ์ในหนู T2DM ตัวผู้ได้

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องสำหรับพืชในสกุล *Dorstenia* (วงศ์ Moraceae)

ปี 1999 Berhanu M. Abegaz และคณะ^[13] สามารถแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากส่วนสกัด $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (1:1), MeOH และ น้ำ จากกิ่งของต้น *Dorstenia mannii* ได้เป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในกลุ่ม flavanones 7 ชนิด (ภาพที่ 11) โดยเป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติใหม่ 6 ชนิด คือ dorsmanin E (25), dorsmanin F (26), lonchocarpol C (27), dorsmanin G (28), lonchocarpol D (29) และ dorsmanin H (30) และเป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีรายงานแล้ว 1 ชนิด คือ 6,8-diprenyleriodictyol (31)

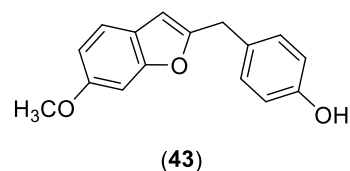
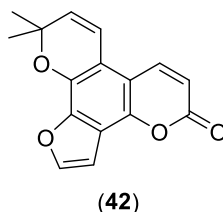


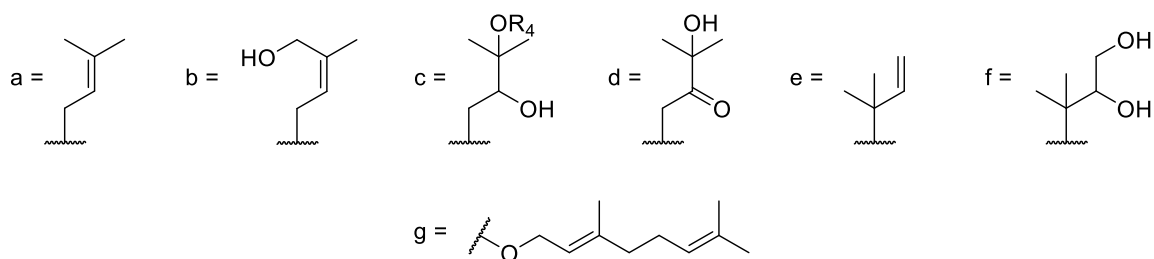
ภาพที่ 11 แสดงองค์ประกอบทางเคมีจากต้น *Dorstenia mannii*

ปี 2001 Jürgen Schmidt และคณะ^[14] สามารถแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากส่วนสกัด n-heptane และ ethylacetate จากใบและกิ่งของต้น *Dorstenia gigas* ได้เป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในกลุ่ม coumarins 21 ชนิด โดยเป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติใหม่ 12 ชนิด คือ 5-methoxy-3-(3-methyl-but-2-enyl)-psoralen (32), 5,8-dimethoxy-3-(3-methyl-but-2-enyl)-psoralen (33), 5-methoxy-3-(3-methyl-2,3-dihydroxybutyl)-psoralen (34), 5,8-dimethoxy-3-(3-methyl-2,3-dihydroxybutyl)-psoralen (35), 5-methoxy-8-(1,1-dimethyl-2,3-dihydroxypropyl)-psoralen (36), 6-methoxy-5-(3-methyl-but-2-enyl)-angelicin (37), 6-methoxy-5-(3-methyl-2,3-dihydroxybutyl)-angelicin (38), 6-methoxy-5-13-(β-glucopyranosyloxy)-2-hydroxy-3-methyl-butyl]-angelicin (39), 6-methoxy-5-(3-hydroxy-2-oxo-3-methyl-butyl)-angelicin (40), 6-methoxy-5-(4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl)-angelicin (41), Dorstegin (42) และ 2-(p-hydroxy-benzyl)-6-methoxy-benzofuran (43) และเป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีรายงานแล้ว 9 ชนิด คือ dimethoxychalepensisin (44), isoimperatorin (45), furopinnarin (46), swietenocoumarin B (47), 5-methoxy-8-geranyloxypsoralen (48), cnidilin (49), oxypeucedaninhydrate (50), byakangelicin (51) และ swietenocoumarin F (52)



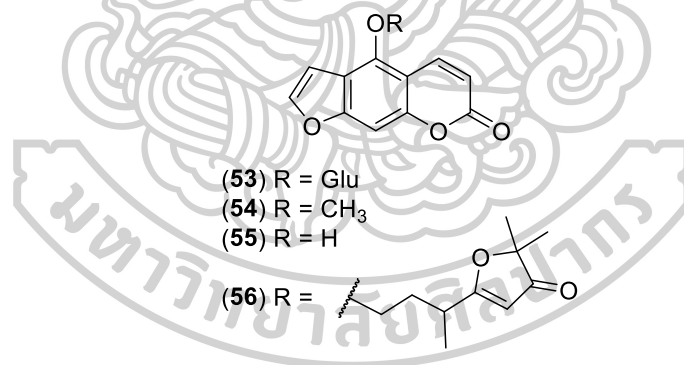
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄		R ₁	R ₄
(32)	CH ₃	H	a	-	(37)	a	-
(33)	CH ₃	OCH ₃	a	-	(38)	c	H
(34)	CH ₃	H	c	H	(39)	c	Glc
(35)	CH ₃	OCH ₃	c	H	(40)	d	-
(36)	CH ₃	f	H	-	(41)	b	-
(44)	CH ₃	OCH ₃	e	-			
(45)	a	H	H	-			
(46)	CH ₃	e	H	-			
(47)	CH ₃	a	H	-			
(48)	CH ₃	g	H	-			
(49)	a	OCH ₃	H	-			
(50)	c	H	H	H			
(51)	CH ₃	O-c	H	H			
(52)	CH ₃	c	H	H			





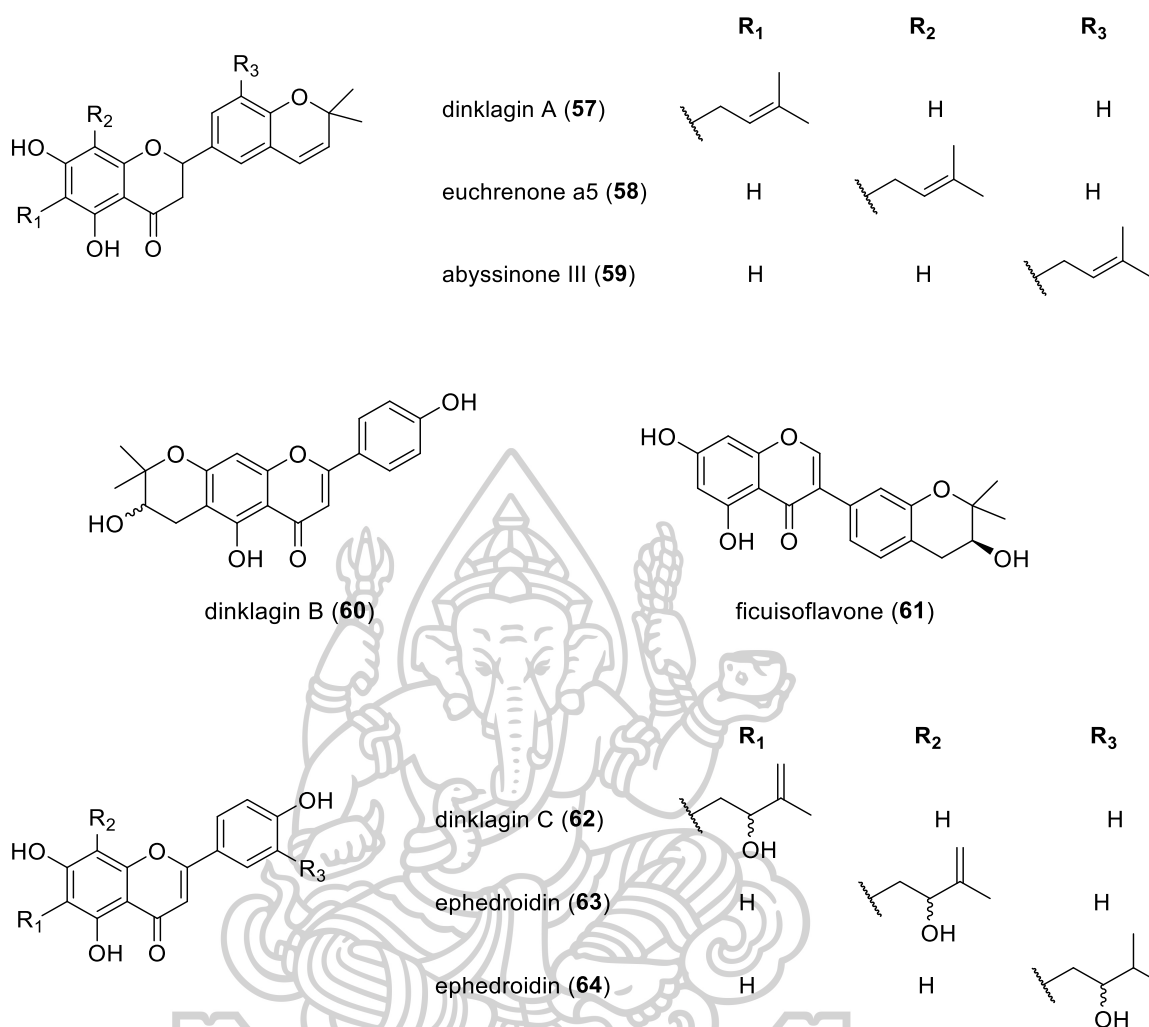
ภาพที่ 12 แสดงองค์ประกอบทางเคมีจากต้น *Dorstenia gigas*

ปี 2001 R. Aquino และคณะ^[15] สามารถแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากส่วนสกัด methanol จากส่วนเหนือดินของต้น *Dorstenia contrajerva* ได้เป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในกลุ่ม furanocoumarin 4 ชนิด โดยเป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติใหม่ 1 ชนิด คือ glycosylated furanocoumarin (53) และเป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีรายงานแล้ว 3 ชนิด คือ bergapten (54), bergaptol (55) และ 4-[[3-(4,5-dihydro-5,5-dimethyl-4-oxo-2-furanyl)butyl]oxy]-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-one (56)



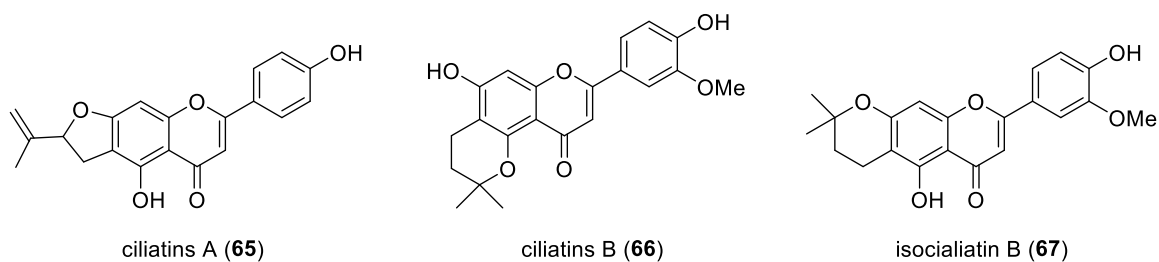
ภาพที่ 13 แสดงองค์ประกอบทางเคมีจากต้น *Dorstenia contrajerva*

ปี 2002 Bonaventure T. Ngadjui และคณะ^[16] สามารถแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากส่วนสกัด CH₂Cl₂: MeOH (1:1) และ MeOH จากกิ่งของต้น *Dorstenia dinklagei* ได้เป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในกลุ่ม flavonoids 8 ชนิด คือ dinklagin A (57), euchrenone a5 (58), abyssinone III (59), dinklagin B (60), ficuisoflavone (61), dinklagin C (62), ephedroidin (63) และ ephedroidin (64)

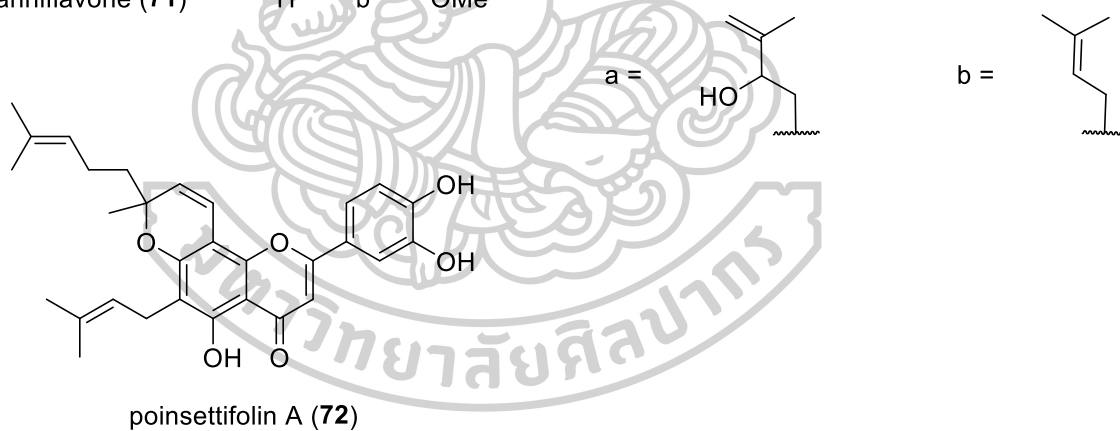


ภาพที่ 14 แสดงองค์ประกอบทางเคมีจากต้น *Dorstenia dinklagei*

ปี 2002 Bonaventure T. Ngadjui และคณะ^[17] สามารถแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจาก ส่วนสกัด CH₂Cl₂:MeOH (1:1) และ MeOH จากส่วนเหนือดินของต้น *Dorstenia ciliata* ได้เป็นสาร ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในกลุ่ม flavonoids 9 ชนิด โดยเป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติใหม่ 3 ชนิด คือ ciliatins A (65), ciliatins B (66) และ isocialiatin B (67) และเป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มี รายงานแล้ว 6 ชนิด คือ dinklagin C (62), 8-prenylapigenin (68), 6-prenylapigenin (69), gancaonin P (70), canniflavone (71) และ poinsettifolin A (72) นอกจากนี้ยังสามารถแยกสาร ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในกลุ่ม chalcones ได้ 2 ชนิด คือ stipulin (73) และ isobavachalcone (74)



	R ₁	R ₂	R ₃		R ₁	R ₂	R ₃
dinklagin C (62)	H	a	H	stipulin (73)	b	H	b
8-prenylapigenin (68)	b	H	H	isobavachalcone (74)	H	b	H
6-prenylapigenin (69)	H	b	H				
gancaonin P (70)	H	H	OH				
canniflavone (71)	H	b	OMe				

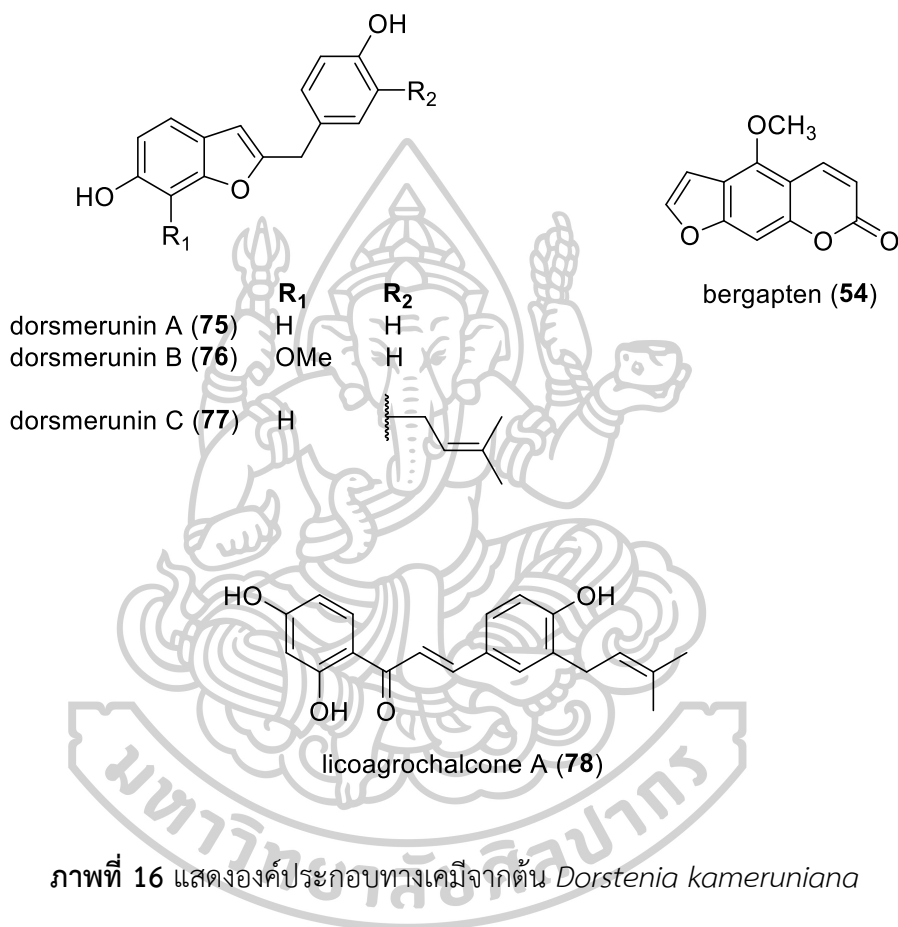


ภาพที่ 15 แสดงองค์ประกอบทางเคมีจากต้น *Dorstenia ciliata*

ปี 2018 Abiy Yenesew และคณะ^[18] สามารถแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากส่วนสกัด CH₂Cl₂:MeOH (1:1) จากรากและกิ่งของต้น *Dorstenia kameruniana* ได้เป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติใหม่ในกลุ่ม benzyl benzofuran 3 ชนิด คือ dorsmerunin A (75), dorsmerunin B (76) และ dorsmerunin C (77) และสามารถแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีรายงานแล้วในกลุ่ม

furanocoumarin ได้ 1 ชนิด คือ bergapten (54) และในกลุ่ม chalcone ได้ 1 ชนิด คือ licoagrochalcone A (78)

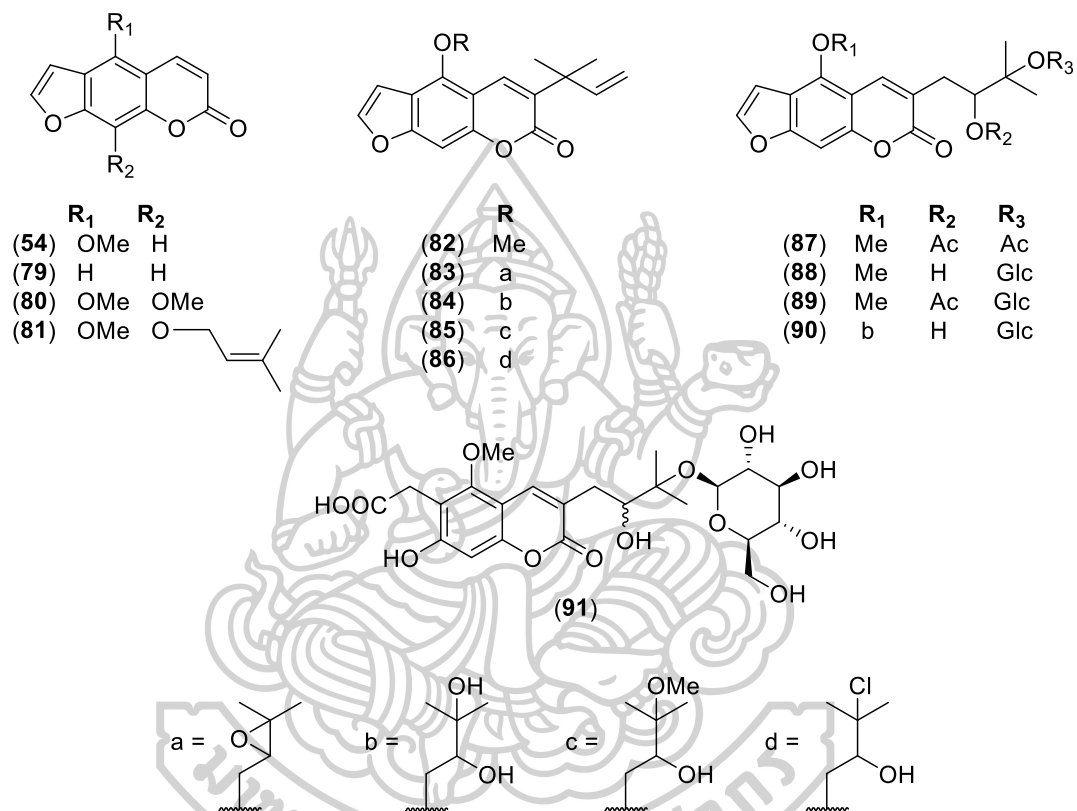
นอกจากนี้ได้ศึกษาความเป็นพิษของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (CCRF-CEM และ CEM/ADR5000) พบว่า bergapten (54) และ licoagrochalcone A (78) มีความเป็นพิษต่อ CCRF-CEM โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $7.17 \mu\text{M}$ และ $5.16 \mu\text{M}$ ตามลำดับ



2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องสำหรับพืช *Dorstenia foetida* Schweinf.

ปี 2011 Jürgen Schmidt และคณะ^[19] สามารถแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากส่วนสกัด Ethanol จากใบของต้นมะพร้าวทะเลทราย (*Dorstenia foetida*) ได้เป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในกลุ่ม coumarins 14 ชนิด คือ bergapten (54), psoralen (79), isopimpinellin (80), phellopterin (81), 5-methoxychalepensin (82), 5-(2,3-epoxy-3-methyl-butoxy)-chalepensin (83), 5-(2,3-dihydroxy-3-methyl-butoxy)-chalepensin (84), 5-(2-hydroxy-3-methoxy-3-methyl-butoxy)-chalepensin (85), 5-(3-chloro-2-hydroxy-3-methyl-butoxy)-

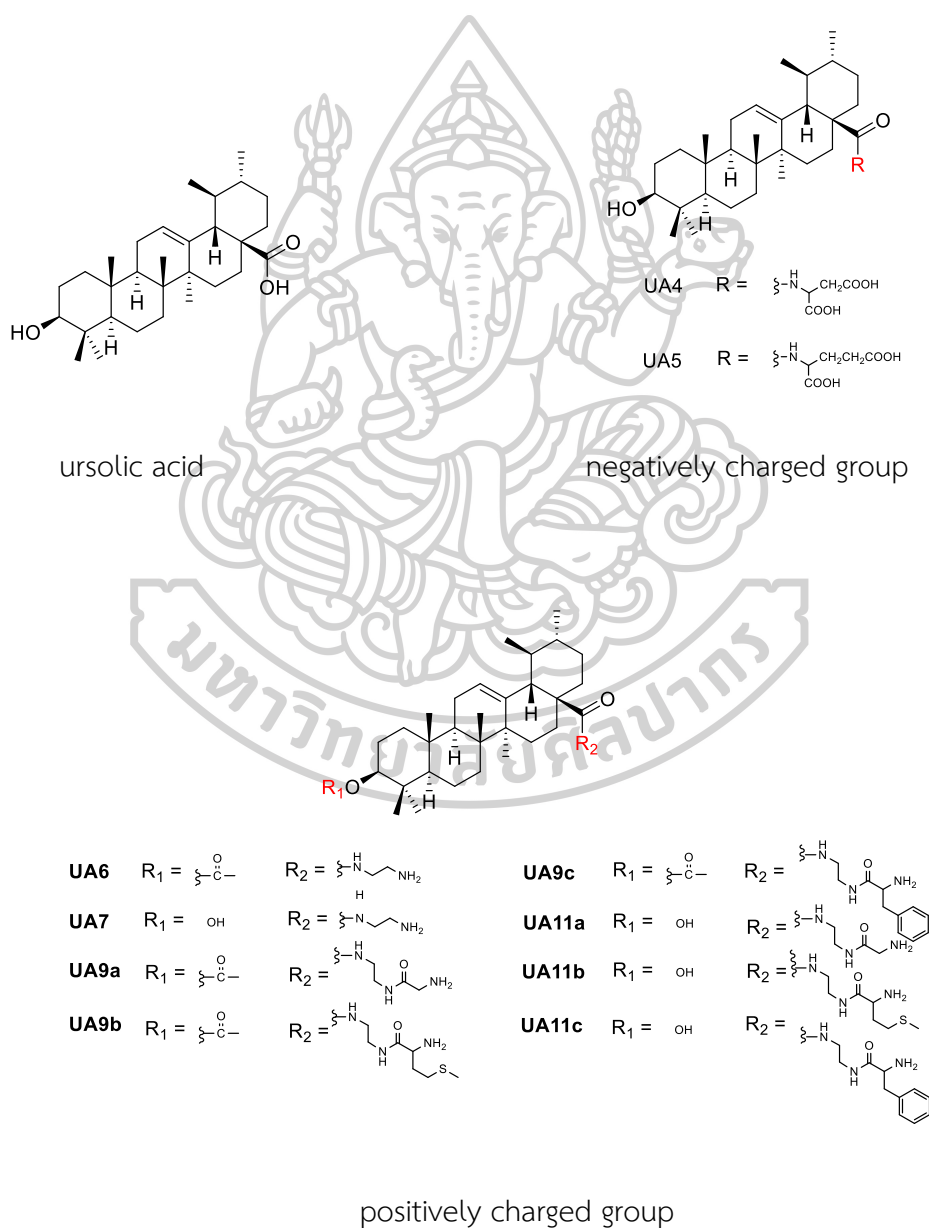
chalepensin (86), 5-methoxy-3-(3-methyl-2,3-dihydroxybutyl)-psoralen-diacetate (87), turbinatocumarin (88), 5-methoxy-3-[3-(b-D-glucopyranosyloxy)-2-acetyloxy-3-methyl-butyl]-psoralen (89), 5-(3-methyl-2,3-dihydroxybutyloxy)-3-[3-(b-D-glucopyranosyloxy)-2-hydroxy-3-methyl-butyl]-psoralen (90) และ 7-hydroxy-5-methoxy-6-carboxymethyl-3-[3-(b-D-glucopyranosyloxy)-2-hydroxy-3-methyl-butyl]-coumarin (91)



ภาพที่ 17 แสดงองค์ประกอบทางเคมีจากต้นมะพร้าวทะเลทราย (*Dorstenia foetida*)

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของ ursolic acid

ปี ค.ศ. 2012 Kai-Kai Bai และคณะ^[20] ได้สังเคราะห์อนุพันธ์ของ ursolic acid เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง โดยแบ่งการสังเคราะห์อนุพันธ์เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม negatively charged ที่มีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างบริเวณหมู่ carboxylic acid ตำแหน่งที่ 28 เป็นหมู่ amide ที่มี side chain เป็น carboxylic acid และกลุ่ม positively charged มีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างบริเวณหมู่ hydroxy ตำแหน่งที่ 3 เป็นหมู่ acetate และบริเวณหมู่ carboxylic acid เป็นหมู่ amide ที่มี side chain เป็น amine ดังแสดงในภาพที่ 4



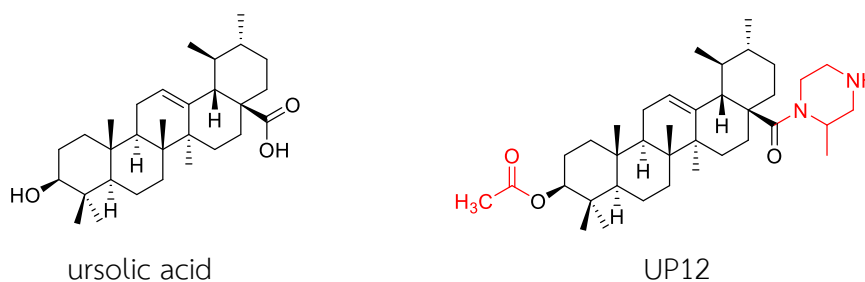
ภาพที่ 18 อนุพันธ์ ursolic acid สังเคราะห์โดย Kai-Kai Bai และคณะ^[20]

อนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้ถูกนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 4 ชนิด คือ HepG2, AGS, HT-29 และ PC-3 ด้วยวิธี MTT assay เปรียบเทียบกับ ursolic acid พบว่าอนุพันธ์ในกลุ่ม positively charged ที่เติมหมู่แทนที่ amine มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเพิ่มขึ้น โดยรายงานค่า IC_{50} (μM) ดังตารางที่ 1 ในขณะที่อนุพันธ์ในกลุ่ม negatively charged (UA4 และ UA5) มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลดลง ($IC_{50} > 100 \mu M$)

ตารางที่ 1 ค่า IC_{50} ของอนุพันธ์ ursolic acid ที่สังเคราะห์โดย Kai-Kai Bai และคณะ

compounds	ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ (IC_{50} (μM))			
	AGS	HepG2	HT-29	PC-3
ursolic acid	20.6	53.4	25.3	22.3
UA6	<10	12.4	<10	<10
UA7	11.4	21.3	14.3	<10
UA9a	<10	15.5	20.2	14.3
UA9b	<10	<10	<10	<10
UA9c	<10	<10	<10	<10
UA11a	10.2	nt	nt	19.6
UA11b	<10	16.0	nt	<10
UA11c	<10	nt	nt	<10
Taxol	<10	30.7	<10	57.2

ปี ค.ศ. 2015 Haiyan Dong และคณะ^[21] ได้พัฒนาโครงสร้างทางเคมีของ ursolic acid เพื่อเพิ่มฤทธิ์การต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง โดยออกแบบอนุพันธ์ (UP12) และศึกษาพลังงานในการสร้างพันธะกับโปรตีนที่ตำแหน่ง binding site การออกแบบโมเลกุลนั้นได้มีการเปลี่ยนหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง 3 จากหมู่ hydroxy เป็น acetate และตำแหน่ง carboxylic acid ที่ 28 มีการเติมหมู่ piperazine ดังแสดงในภาพที่ 5 จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็ง 4 ชนิด คือ HepG2, HeLa, L02 และ HELF พบว่าสารอนุพันธ์มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ดีกว่า ursolic acid ที่เป็นโมเลกุลต้นแบบโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.15, 6.34, 12.76 และ 14.77 μM ตามลำดับ

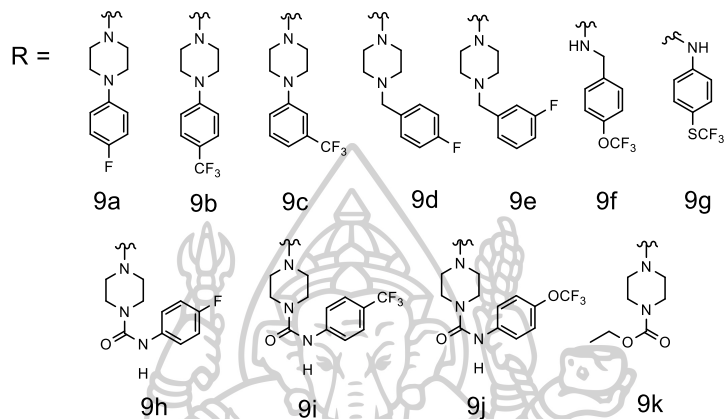
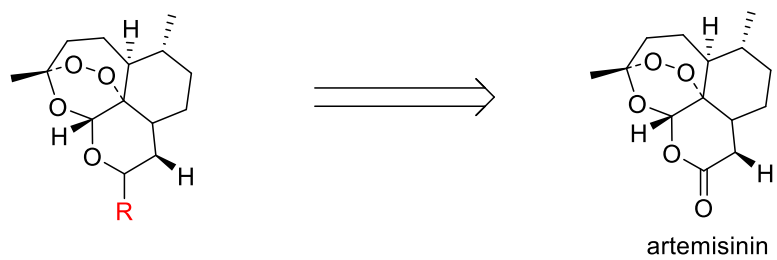


ภาพที่ 19 อนุพันธ์ ursolic acid ของ Haiyan Dong และคณะ

นอกจากนี้ได้เปรียบเทียบผลของการเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ของเซลล์มะเร็งระหว่างอนุพันธ์ UP12 ที่สังเคราะห์ขึ้นกับ 2-deoxy-D-glucose (2-DG) ซึ่งเป็นยาที่ใช้ยับยั้งกระบวนการ glucose metabolism ของเซลล์มะเร็ง เมื่อเกิดการสะสม 2-DG ขึ้นในเซลล์จะส่งผลให้เกิดการยับยั้งการทำงานของ HK-2 หรือเอนไซม์สำคัญที่มีหน้าที่สร้างพลังงานและยับยั้งการตายของเซลล์มะเร็ง ส่งผลให้ลดการสร้างพลังงานภายในเซลล์ ยับยั้งวัฏจักรเซลล์ กระตุ้นให้เกิดการตายแบบ apoptosis พบว่า UP12 ส่งผลต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งโดยไปยับยั้งกระบวนการสร้าง glucose ของเซลล์มะเร็งส่งผลให้ลดการสร้าง ATP ทำให้เซลล์มะเร็งหยุดการเจริญเติบโตในระยะ S และ G2/M และกระตุ้นการทำงานของ caspase 3 และ 9 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการเกิด apoptosis เช่นเดียวกันเมื่อทำการ combination ระหว่าง UP12 และ 2-DG พบว่าส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตได้ดีขึ้น

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์อนุพันธ์ที่มี piperazine เป็นหมู่แทนที่

ในปี ค.ศ. 2018 คุณ Shu Li และคณะ^[22] ได้สังเคราะห์อนุพันธ์ของ artemisinin ที่ส่งผลทำให้เพิ่มความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง โดยเติมหมู่แทนที่บนวงของ artemisinin เป็น piperazine และ piperazine urea ต่างชนิดกัน ดังแสดงในภาพที่ 7 หลังจากสังเคราะห์อนุพันธ์สำเร็จได้นำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ได้แก่ U87MG, SH-SY5Y, MCF-7, MDA-MB-231, A549 และ A375 พบว่าเมื่อมีหมู่แทนที่บน piperazine urea เป็น fluorine 9h 9i 9j ทำให้ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ดีกว่า artemisinin ที่เป็นยาต้นแบบโดยมีผลทำให้เกิดการเหนี่ยวนำของการเกิด apoptosis



ภาพที่ 20 โมเลกุลเลียนแบบ artemisinin ของ Shu Li และคณะ



บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน

ส่วนที่ 1 ศึกษาค้นคว้าข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับหัวข้อวิจัย

3.1 ศึกษาค้นคว้ารายงานวิจัยและข้อมูลที่มีความเกี่ยวข้องกับหัวข้อวิจัย

ศึกษาค้นคว้ารายงานการแยกองค์ประกอบทางเคมีจากแคนนาและฤทธิ์ทางชีวภาพของแคนนาและมะพร้าวทะเลทรายรวมทั้ง รายงานการสังเคราะห์อนุพันธ์ของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างที่ทำให้เพิ่ม ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง

ส่วนที่ 2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

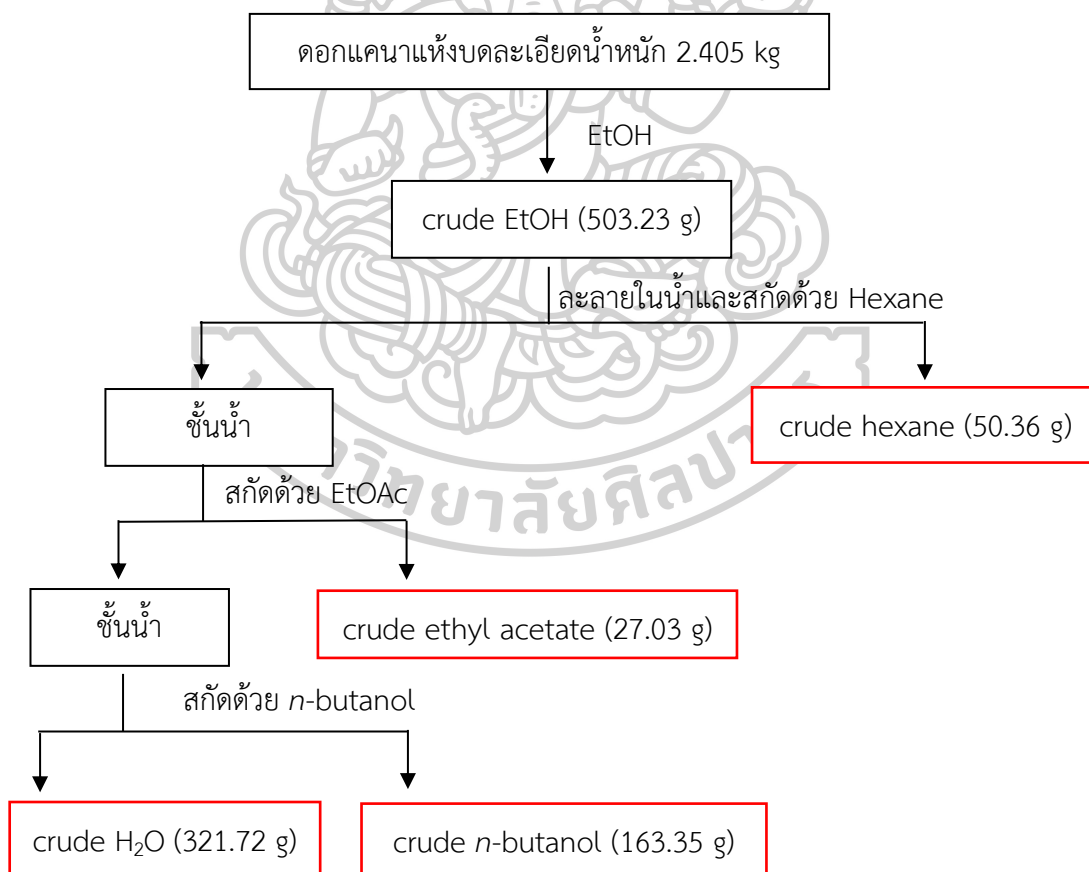
การตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิค 1D และ 2D ด้วยเครื่อง Bruker AVANCE 300 MHz spectrometer ซึ่ง $^1\text{H-NMR}$ spectrum วัดที่ความถี่ 300 MHz และ $^{13}\text{C-NMR}$ วัดที่ความถี่ 75 MHz สำหรับการตรวจสอบหมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค Infrared spectroscopy วัดด้วยเครื่อง Perkin Elmer GX FT-IR spectrophotometer การหาค่าหมุนโพลาไรเซชัน (polarization rotation) วัดด้วย A.Krüss P3000 digital polarimeter และการหาค่า mass สำหรับเทคนิค High resolution mass spectrometry ทดสอบโดยใช้ Micro TOF Bruker Daltonic mass spectrometer Agilent 1290 Infinity II LC/6545 Q-TOF mass spectrometer

สำหรับ Column chromatography ใช้ silica gel ของ Merck, 70-230 mesh หรือ 230-400 mesh และ RP-18 ของ Merck, 40-63 mesh สำหรับแผ่น TLC ชนิด silica gel 60 F₂₅₄ และ RP-18 F₂₅₄ และตรวจสอบการดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่น 540 และ 365 นาโนเมตร และตรวจสอบ TLC ด้วยการย้อมด้วย 1% CeSO₄ ใน 10% H₂SO₄ ตามด้วยการให้ความร้อน นอกจากนี้ตัวทำละลายที่ใช้ มีดังนี้ methanol, hexane, ethyl acetate, dichloromethane, *n*-butanol, 95% ethanol และ acetone นำมากลั่น 1 ครั้งก่อนนำไปใช้งาน benzene (Merck, GC grade) ตัวทำละลายสำหรับทดสอบ NMR ดังนี้ deuterated chloroform (CDCl₃) (Fluka, Purum), deuterated methanol (CD₃OD) (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.) และ dideuterium oxide (D₂O)

ส่วนที่ 3 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของดอกแคณา

3.3 การเตรียมส่วนสกัดหยาบ (crude-DSS) จากดอกแคณา (*Dolichandrone Serrulata* Seem.)

นำตัวอย่างดอกแคณาแห้ง (น้ำหนัก 2.405 kg) มาบดละเอียดจากนั้นแช่ด้วย 95% EtOH ปริมาตร 7 ลิตร ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมากรองเพื่อแยกส่วนสารละลายออกจากส่วน residue และนำส่วน residue มาแช่ด้วย EtOH ต่อ โดยทำซ้ำเช่นนี้จนกว่าสารละลายที่ได้จะใส นำส่วนสารละลายมาระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ ที่อุณหภูมิประมาณ 45°C จะได้ส่วนสกัดหยาบดอกแคณาที่มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้มน้ำหนัก 503.23 g จากนั้นนำส่วนสกัดหยาบดอกแคณา (น้ำหนัก 503.23 g) มาสกัดด้วย hexane, ethyl acetate และ *n*-butanol ได้ 4 ส่วนสกัดดัง (ภาพที่ 21)



ภาพที่ 21 แผนผังแสดงขั้นตอนการเตรียมส่วนสกัดหยาบดอกแคณา

3.4 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของส่วนสกัดหยาบจากดอกแคนา

จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของส่วนสกัดหยาบจากดอกแคนา (*Dolichandrone Serrulata* Seem.) โดยใช้เทคนิค MTT assay โดยนำส่วนสกัดหยาบเข้มข้น hexane, EtOAc, *n*-BuOH และ H₂O ที่ความเข้มข้น 500 µg/ml ทดสอบความเป็นพิษต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ไลน์ MDA-MB231, MCF-7, HaCaT, Hela, HN22 และ HCT116 ผลการทดสอบเบื้องต้นพบว่าในส่วนสกัดหยาบ hexane และ EtOAc มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งทุกชนิด ส่วนสกัดหยาบ *n*-BuOH มีฤทธิ์ที่ดีในการต้านเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB231 ดังแสดงในตารางที่ 2 ดังนั้นส่วนสกัดหยาบ hexane, EtOAc และ *n*-BuOH จึงมีแนวโน้มที่ดีในการนำมาศึกษาแยกองค์ประกอบทางเคมีต่อ

ตารางที่ 2 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของส่วนสกัดหยาบจากดอกแคนา

cells	% Inhibition ที่ความเข้มข้น 500 µg/ml			
	hexane	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H ₂ O
MDA-MB231	94.86	90.6	93.75	N/A
MCF-7	51.22	89.08	37.39	28.78
Hela	78.44	85.65	11.34	N/A
HN22	83.56	83.26	37.17	34.35
HCT116	98.50	92.97	41.87	30.25
HaCaT	84.30	95.85	9.56	31.81

	Inhibit ≥ 75%
	25% ≤ Inhibit ≤ 75%
	Inhibit ≤ 25%
	Non inhibit

3.5 การแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดจากดอกแคนา

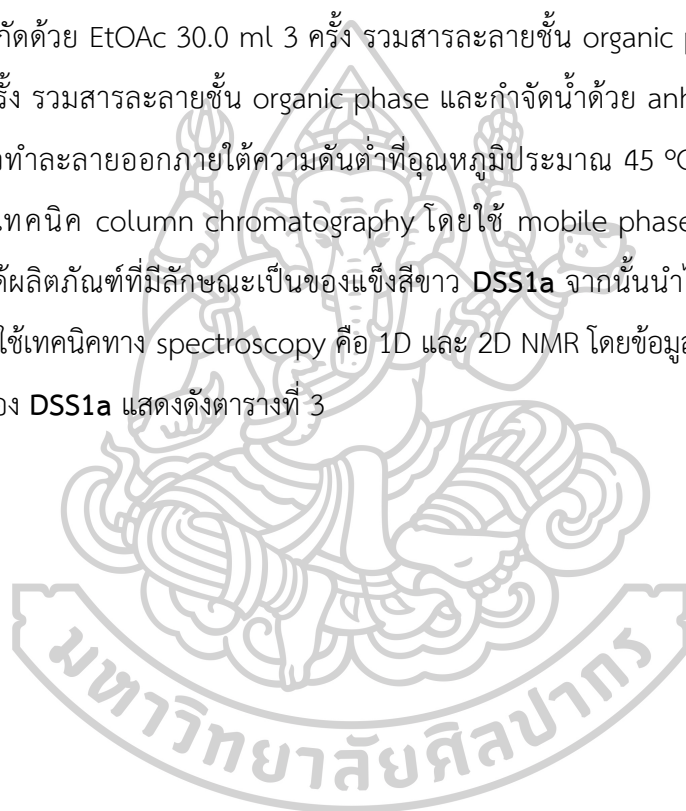
3.5.1 การแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัด ethyl acetate จากดอกแคนา

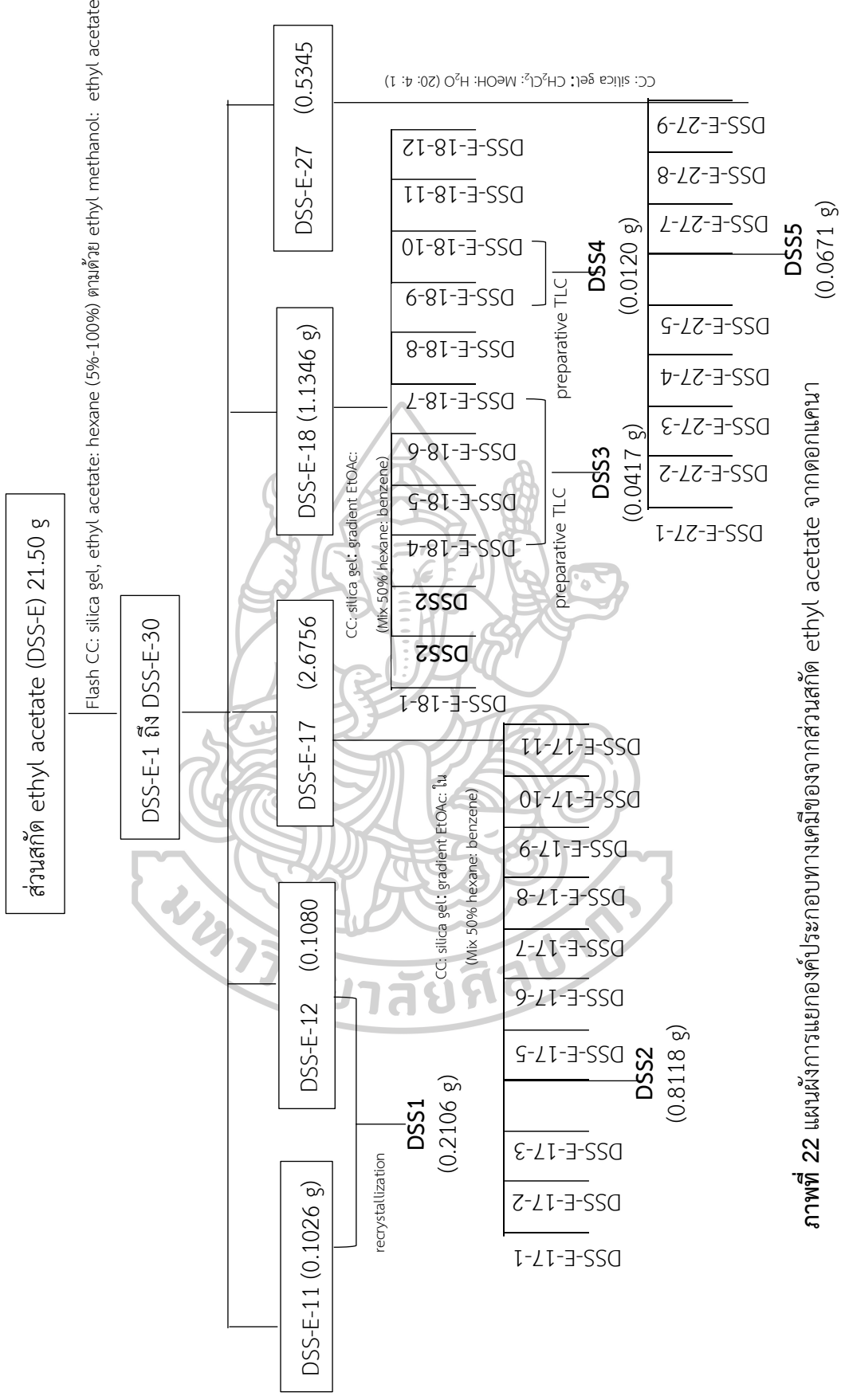
การแยกสารจากส่วนสกัดชั้น ethyl acetate ของดอกแคนาโดยใช้ flash column เริ่มจากนำส่วนสกัดหยาบ ethyl acetate (ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้มน้ำหนัก 21.50 g) มาเคลือบลงบน silica gel 64.50 g จากนั้นใช้ flash column ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 15.0 cm โดยใช้ solvent gradient condition ครั้งละ 500 ml โดยเริ่มจาก 100% hexane และเพิ่ม EtOAc ในอัตราส่วนต่าง ๆ ดังนี้ 1%, 3%, 5%,... 100% EtOAc จนถึง 60% MeOH ใน EtOAc ได้สารทั้งหมด 30 fractions โดยแบ่งสารได้ 30 กลุ่ม DSS-E-1 ถึง DSS-E-30 จากนั้นนำ fractions ต่าง ๆ มาศึกษาต่อดังภาพที่ 22

3.5.1.1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วน DSS-E-10, DSS-E-11, DSS-E-12 และ DSS-E-13 โดยใช้เทคนิค recrystallization

จาก fraction DSS-E-10, DSS-E-11, DSS-E-12 และ DSS-E-13 พบว่าส่วนที่เป็นผลึกสามารถแยกออกจากส่วนสารละลายได้จึงทำ TLC ตรวจสอบผลึกดังกล่าวและได้นำไปทำการตกผลึกซ้ำ (recrystallization) โดยนำ Fractions DSS-E-10-C (0.0189 g), DSS-E-11-C (0.1026 g), DSS-E-12-C (0.1080 g) และ DSS-E-13-C (0.0483 g) มาทำการตกผลึกซ้ำด้วย ethanol และให้ความร้อนบน hotplate พบว่า DSS-E-11-C, DSS-E-12-C, DSS-E-13-C ได้ผลึกที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวและนำไปตรวจสอบโครงสร้างโดยใช้เทคนิค $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, mass spectrometry, Infrared spectroscopy และ optical rotation พบว่าผลึก DSS-E-11-C และ DSS-E-12-C เป็นสารชนิดเดียวกันคือ **DSS1** โดย mass spectrum ปรากฏสัญญาณที่ m/z 457.3682 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ทำให้ทราบว่า **DSS1** มีสูตรโมเลกุลเป็น $\text{C}_{30}\text{H}_{49}\text{O}_3$ มีค่า specific rotation $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +37.04^\circ$ (c 0.0009, MeOH) และปรากฏสัญญาณการดูดกลืนรังสี Infrared (neat): ν_{max} 3420, 2931, 2871, 2349, 1687, 1463, 1388, 1281, 1033, cm^{-1}

เนื่องจากคุณสมบัติการละลายของสารที่ได้นั้นค่อนข้างละลายยากในตัวทำละลาย CDCl_3 จึงทำให้การพิสูจน์โครงสร้างทำได้ด้วยความยากลำบาก เนื่องจากสารมีความเป็นขี้ผึ้งและจาก IR spectrum ทำให้ทราบว่าสาร **DSS1** มีหมู่ hydroxyl อยู่ในโครงสร้างจึงนำสารดังกล่าวมาทำปฏิกิริยา acetylation โดยเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันจาก hydroxyl เป็น acetate เพื่อลดความมีขี้ผึ้งและเพิ่มการละลายของสารในตัวทำละลายอินทรีย์ทำให้สามารถยืนยันโครงสร้างได้ โดยทำปฏิกิริยาระหว่าง **DSS1** (20 mg) กับ pyridine (1.0 ml) และ acetic anhydride (1.0 ml) จากนั้น reflux ที่ 120 องศาเป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที ตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย TLC หลังจากปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์หยุดปฏิกิริยาโดย sat. NH_4Cl และสกัดด้วย EtOAc 30.0 ml 3 ครั้ง รวมสารละลายชั้น organic phase และสกัดด้วยน้ำ 20.0 ml 2 ครั้ง รวมสารละลายชั้น organic phase และกำจัดน้ำด้วย anhydrous Na_2SO_4 กรองและระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำที่อุณหภูมิประมาณ 45 °C จากนั้นทำการแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ mobile phase เป็น 20% EtOAc ใน hexane จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว **DSS1a** จากนั้นนำไปตรวจสอบและยืนยันโครงสร้างโดยใช้เทคนิคทาง spectroscopy คือ 1D และ 2D NMR โดยข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR spectrum ของ **DSS1a** แสดงดังตารางที่ 3





ตารางที่ 3 แสดงข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR spectrum ของ DSS1a (CDCl_3) โดยค่า J รายงานในหน่วย Hz

position	DSS1a	
	δ_{H} (ppm) (CDCl_3 , 300 MHz)	δ_{C} (ppm) (CDCl_3 , 75 MHz)
1	1.60-1.70 (m)	38.3
2	1.00-1.18 (m)	23.6
3	4.50 (1H, t, $J = 8.1$ Hz)	81.0
4	-	37.7
5	0.85 (1H, d $J = 5.13$ Hz)	55.3
6	1.31-1.41 (m) 1.48-1.58 (m)	18.2
7	1.27-1.36 (m) 1.45-1.53 (m)	32.8
8	-	39.5
9	1.47-1.59 (m)	47.5
10	-	36.9
11	1.02-1.12 (m) 0.88-0.94 (m)	23.3
12	5.24 (1H, t, $J = 3.3$ Hz)	125.7
13	-	138.0
14	-	41.9
15	0.80-0.94 (m) 1.05-1.14 (m)	28.0
16	1.58-1.69 (m) 2.01 (dd, $J = 4.1, 13.4$ Hz)	24.1
17	--	48.0
18	2.18 d (1H, $J = 11.2$ Hz)	52.2
19	1.59-1.69 (m)	39.0

20	1.59-1.69 (m)	38.8
21	1.23-1.39 (m)	30.6
22	1.69-1.73 (m)	36.7
23	0.85 (3H, s)	16.7
24	0.87 (3H, s)	28.1
25	0.95 (3H, s)	15.5
26	0.77 (3H, s)	17.0
27	1.07 (3H, s)	23.6
28	-	183.7
29	0.86 (3H, d, $J = 5.0$ Hz)	17.1
30	0.95 (H, d, $J = 5.5$ Hz)	21.2
C=O	-	171.1
<u>CH₃CO</u>	2.05 (3H, s)	21.3

3.5.1.2 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วน DSS-E-17 โดยใช้เทคนิค column chromatography

การแยกสารใน fraction DSS-E-17 น้ำหนัก 2.6756 g (ของเหลวหนืดสีน้ำตาลปนเขียว) โดยใช้เทคนิค column chromatography ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.5 เซนติเมตร สูง 30.0 เซนติเมตร ใช้ gradient mobile phase ระหว่าง EtOAc ใน hexane: benzene (1:1) โดยแยกได้ทั้งหมด 11 fractions DSS-E-17-1 ถึง DSS-E-17-11 จากนั้นนำ DSS-E-17-4 น้ำหนัก 0.8118 g ไปตรวจสอบโครงสร้างโดยใช้เทคนิค $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ และ 2D NMR จากข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR spectrum ดังตารางที่ 4 และ mass spectrometry พบว่าเป็นสารบริสุทธิ์ (DSS2) โดย mass spectrum ปรากฏสัญญาณที่ m/z 177.0522 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_3\text{Na}$, 177.0528) ทำให้ทราบว่า DSS2 มีสูตรโมเลกุลเป็น $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_3$ นอกจากนี้ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค Infrared spectroscopy ปรากฏสัญญาณการดูดกลืนรังสี Infrared ที่ wave number (U_{max}) 3376, 2889, 1668, 1387, 1268, 1190, 1098, 1062, 1016 cm^{-1} และทดสอบ optical rotation มีค่า specific rotation $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -23.81^\circ$ (c 0.0017, MeOH)

ตารางที่ 4 แสดงข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR spectrum ของ DSS-E-17-4 หรือ DSS2 (CDCl_3) โดยค่า J รายงานในหน่วย Hz

position	DSS2	
	δ_{H} (ppm) (CDCl_3 , 300 MHz)	δ_{C} (ppm) (CDCl_3 , 75 MHz)
1	2.27 (2H, m)	39.5
2	2.60 (1H, dd, $J = 16.9, 5.7$ Hz)	40.1
	2.78 (1H, dd, $J = 16.9, 4.7$ Hz)	
3	3.94 (1H, ddd, $J = 15.1, 8.6, 2.1$ Hz)	66.3
	4.07 (1H, ddd, $J = 14.8, 8.3, 2.0$ Hz)	
4	-	75.4
5	4.24 (1H, td, $J = 5.9, 1.4$ Hz)	81.5
6	6.02 (1H, d, $J = 10.1$ Hz)	128.6
7	6.76 (1H, dd, $J = 10.2, 1.4$ Hz)	148.4
8	-	197.3

3.5.1.3 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วน DSS-E-18 โดยใช้เทคนิค column chromatography

นำ fraction DSS-E-18 หนัก 1.1346 g (ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม) แยกให้บริสุทธิ์โดยใช้ column ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.0 เซนติเมตร สูง 50.0 เซนติเมตร จากนั้นจะ column โดยใช้ gradient mobile phase ของ EtOAc ใน สารผสม 50% hexane: benzene สามารถแยกได้ทั้งหมด 12 fractions DSS-E-18-1 ถึง DSS-E-18-12 นำ DSS-E-18-2 และ DSS-E-18-3 ไปพิสูจน์โครงสร้างโดยใช้เทคนิค $^1\text{H-NMR}$ พบว่า เป็นสารชนิดเดียวกันกับสารที่แยกได้หรือ **DSS2** นอกจากนี้ตรวจสอบ fraction DSS-E-18-4 ถึง DSS-E-18-7 และ DSS-E-18-9 ถึง DSS-E-18-10 ด้วยเทคนิค thin layer chromatography (tlc) พบว่ามีองค์ประกอบชนิดเดียวกันตามลำดับ จึงนำ fraction ดังกล่าวไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

3.5.1.4 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วน DSS-E-18-(4-7) โดยใช้เทคนิค preparative TLC

นำ fraction DSS-E-18-4 ถึง DSS-E-18-7 รวมน้ำหนัก 0.1575 g มาละลายด้วย CH_2Cl_2 และ MeOH จากนั้นนำมาเคลือบลงบน preparative TLC ขนาด 1.0 มิลลิเมตร จำนวน 2 plate นำไป develop ในแท็งค์ โดยใช้ mobile phase คือ 35% EtOAc ใน hexane: benzene (1:1) 6 รอบ ชูด plate silica gel แล้วนำไปชะใน column โดยใช้อัตราส่วน solvent CH_2Cl_2 : MeOH (1:1) ทำให้แยกสารได้ทั้งหมด 4 กลุ่ม DSS-E-18(4-7)-1 ถึง DSS-E-18(4-7)-4 นำ DSS-E-18(4-7)-2 น้ำหนัก 0.0417 ไปตรวจสอบโครงสร้างโดยใช้เทคนิค เทคนิค 1D และ 2D NMR โดยข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR spectrum แสดงข้อมูลดังตารางที่ 5 ซึ่งเป็นสารบริสุทธิ์ **DSS3** และนำ **DSS3** ไปพิสูจน์โครงสร้างโดยใช้เทคนิค mass spectrometry, Infrared spectroscopy และ optical rotation โดย mass spectrum ปรากฏสัญญาณที่ m/z 157.0867 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{O}_3$, 157.0864) มีสูตรโมเลกุลคือ $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{O}_3$ มีค่า specific rotation $[\alpha]_D^{25} = -55.30^\circ$ (c 0.0015, MeOH) และปรากฏสัญญาณการดูดกลืนที่ wave number (U_{max}) 3414, 2949, 2885, 1714, 1377, 1244, 1113, 1063, 994 cm^{-1}

ตารางที่ 5 แสดงข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR spectrum ของ DSS-E-18(4-7)-2 หรือ DSS3 (MeOD) โดยค่า J รายงานในหน่วย Hz

position	DSS3	
	δ_{H} (ppm) (MeOD, 300 MHz)	δ_{C} (ppm) (MeOD, 75 MHz)
2	3.82 (2H, m)	67.1
3	2.07 (2H, m)	41.1
4	-	78.0
5	2.40 (1H, d, $J = 6.3$ Hz) 2.07 (1H, m)	34.2
6	2.45 (1H, ddd, $J = 10.5, 7.4, 1.4$ Hz) 2.07 (1H, m)	36.1
7	-	213.0
8	2.75 (1H, dd, $J = 16.0, 4.6$ Hz) 2.50 (1H, dd, $J = 4.2, 0.8$ Hz)	43.3
9	3.91 (1H, m)	85.0

3.5.1.5 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วน DSS-E-18-9 และ DSS-E-18-10 โดยใช้เทคนิค preparative TLC

นำ fraction DSS-E-18-9 น้ำหนัก 0.037 g และ fraction DSS-E-18-10 0.0456 g มาเคลือบลงบน preparative TLC ขนาด 0.5 มิลลิเมตร จำนวน 2 plate และใช้ mobile phase เป็น 35% EtOAc ใน hexane: benzene (1:1) 5 รอบ แยกสารได้ทั้งหมด 4 กลุ่ม DSS-E-18-9-1, DSS-E-18-9-2, DSS-E-18-10-1 และ DSS-E-18-10-2 ถัดมานำ DSS-E-18-9-2 และ DSS-E-18-10-2 รวมน้ำหนัก 0.0212 g ไปตรวจสอบและพิสูจน์โครงสร้างโดยใช้เทคนิค 1D และ 2D NMR โดยข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR spectrum แสดงข้อมูลดังตารางที่ 6 ได้สารบริสุทธิ์ **DSS4** mass spectrum ของ **DSS4** ปรากฏสัญญาณที่ m/z 195.0647 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{O}_4\text{Na}$, 195.0634) มีสูตรโมเลกุลเป็น $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{O}_4$ เทคนิค Infrared spectroscopy ปรากฏสัญญาณการดูดกลืนรังสี Infrared ที่ wave number (U_{max}) 3401, 2924, 2880, 1711 และ 1053 cm^{-1} และมีค่า specific rotation. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -33.33^\circ$ (c 0.002, MeOH)

ตารางที่ 6 แสดงข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR spectrum ของ DSS-E-18-10-2 หรือ **DSS4** (MeOD) โดยค่า J รายงานในหน่วย Hz

position	DSS4	
	δ_{H} (ppm) (MeOD, 300 MHz)	δ_{C} (ppm) (MeOD, 75 MHz)
2	3.83 (2H, m)	67.3
3	2.20 (2H, m)	39.4
4	-	79.7
5	3.93 (1H, m)	71.8
6	2.45 (1H, dd, $J = 16.5, 3.5$ Hz) 2.54 (1H, d, $J = 5.9$ Hz)	42.9
7	-	211.0
8	2.45 (1H, dd, $J = 16.5, 3.5$ Hz) 2.54 (1H, d, $J = 5.9$ Hz)	43.8
9	3.93 (1H, m)	84.1

3.5.1.6 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วน DSS-E-27 โดยใช้เทคนิค column chromatography

การแยกสารใน fraction DSS-E-27 น้ำหนัก 0.5345 g (ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม) โดยใช้เทคนิค column chromatography ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.0 เซนติเมตร สูง 30.0 เซนติเมตร ใช้ mobile phase คือ CH₂Cl₂: MeOH: H₂O ที่อัตราส่วน (20: 4: 1) ได้ทั้งหมด 9 fractions คือ DSS-E-27-1 ถึง DSS-E-27-11 ถัดมานำ DSS-E-27-6 น้ำหนัก 0.0671 g หรือ **DSS5** มาตรวจสอบโดยใช้เทคนิค ¹H-NMR, ¹³C-NMR, 2D NMR, mass spectrometry, Infrared spectroscopy และทดสอบ optical rotation จากข้อมูล ¹H และ ¹³C spectrum NMR เป็นดังตารางที่ 7 ข้อมูล mass spectrum ปรากฏสัญญาณที่ m/z 561.1591 [M+Na]⁺ (calcd for C₂₅H₃₀O₁₃Na, 561.1584) มีสูตรโมเลกุลเป็น C₂₅H₃₀O₁₃ ปรากฏสัญญาณการดูดกลืนรังสี Infrared ที่ wave number (**U**max) 3378, 2926, 1705, 1596, 1515, 1271, 1159, 1034, 751 cm⁻¹ และมีค่า specific rotation [α]_D²⁵ = +78.43 ° (c 0.0020, MeOH)

ตารางที่ 7 แสดงข้อมูล ¹H และ ¹³C NMR spectrum ของ DSS-E-27-6 หรือ **DSS5** (MeOD) โดยค่า *J* รายงานในหน่วย Hz

position	DSS5	
	δ_{H} (ppm) (MeOD, 300 MHz)	δ_{C} (ppm) (MeOD, 75 MHz)
1	5.15 (1H, d, <i>J</i> = 9.1 Hz)	95.2
3	6.36 (1H, d, <i>J</i> = 5.6 Hz)	142.5
4	4.93-5.04 (1H, m)	103.1
5	2.50-2.66 (1H, m)	36.9
6	4.93-5.09 (1H, m)	81.5
7	3.70 (1H, brs)	60.4
8	-	67.0

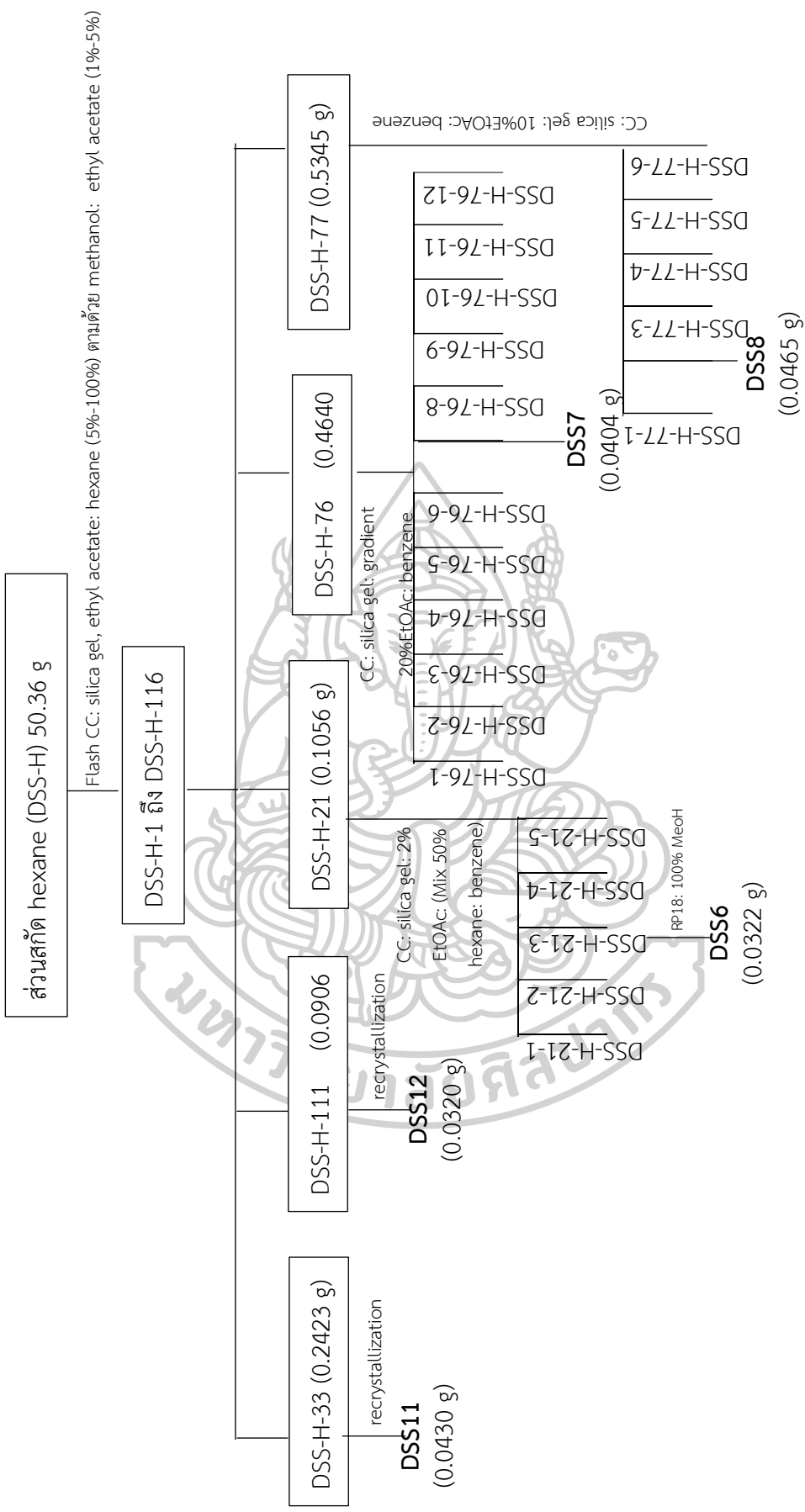
9	2.50-2.66 (1H, m)	43.3
10	4.17 (1H, d, $J = 13.2$ Hz) 3.83 (1H, d, $J = 13.2$ Hz)	61.4
11	-	169.1
12	6.40 (1H, d, $J = 15.8$ Hz)	115.0
13	7.65 (1H, d, $J = 15.8$ Hz)	147.8
14	3.87 (3H, s)	56.6
1'	4.81 (1H, d, $J = 7.9$ Hz)	99.8
2'	3.20-3.35 (1H, m)	75.0
3'	3.28-3.35 (1H, m)	78.8
4'	3.20-3.35 (1H, m)	71.9
5'	3.35-3.48 (1H, m)	77.8
6'	3.95 (1H, d, $J = 11.9$ Hz) 3.65 (1H, dd, $J = 11.9, 6.2$ Hz)	63.0
1''	-	127.8
2''	7.18 (1H, d, $J = 1.6$ Hz)	111.9
3''	-	149.5
4''	-	150.9
5''	6.80 (1H, d, $J = 8.2$ Hz)	116.6
6''	7.08 (1H, d, $J = 8.2, 1.6$ Hz)	124.4

3.5.2 การแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัด hexane จากดอกแคนา

การแยกสารจากส่วนสกัดชั้น hexane ของดอกแคนาโดยใช้ flash column เริ่มจากนำ ส่วนสกัดหยาบ hexane น้ำหนัก 50.36 g เคลือบลงบน silica gel 151.08 g แยกโดยใช้ flash column ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 30.0 cm โดยใช้ solvent gradient condition ครั้งละ 1000 ml โดยเริ่มจาก 100% hexane และเพิ่ม EtOAc ในอัตราส่วนต่าง ๆ ดังนี้ 1%, 2%, 3%,... 100% จนถึง 5% MeOH ใน EtOAc ได้สารทั้งหมด 116 fractions โดยแบ่งสารได้ 116 กลุ่ม DSS-H-1 ถึง DSS-H-116 จากนั้นนำ fractions ต่าง ๆ มาศึกษาต่อดังภาพที่ 23

3.5.2.1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วน DSS-H-33 และ DSS-H-111 โดยใช้เทคนิค recrystallization

นำ DSS-H-33 (0.2423 g) และ DSS-H-111 (0.0906 g) ไปทำการตกผลึกซ้ำ (recrystallization) ด้วย methanol และ dichloromethane ตามลำดับ ได้ผลึกที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวและนำไปตรวจสอบโครงสร้างโดยเทคนิค 1D-NMR, mass spectrometry, Infrared spectroscopy และทดสอบ optical rotation พบว่าผลึก DSS-H-33-S (0.0430 g) คือ **DSS11** และ DSS-H-111-S (0.0320 g) คือ **DSS12** และจากข้อมูล mass spectrum ของ **DSS11** ปรากฏสัญญาณที่ m/z 429.3738 $[M+H]^+$ มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{29}H_{50}O$ ปรากฏสัญญาณการดูดกลืนรังสี Infrared ที่ wave number (U_{max}) 3416, 2932, 2851, 1464, 1376, 1051, 1021 cm^{-1} และมีค่า specific rotation $[\alpha]_D^{25} = -11.47^\circ$ (c 0.0017, MeOH) ข้อมูล 1D NMR แสดงดังตารางที่ 8 ส่วน **DSS12** จากข้อมูล mass spectrum ปรากฏสัญญาณที่ m/z 599.4284 $[M+Na]^+$ มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{35}H_{60}O_6$ ปรากฏสัญญาณการดูดกลืนรังสี Infrared ที่ wave number (U_{max}) 3378, 2932, 2867, 1462, 1366, 1165, 1052, 1069 cm^{-1} และมีค่า specific rotation $[\alpha]_D^{25} = +17.31^\circ$ (c 0.0017, MeOH) เนื่องจากปัญหาในการละลายของ **DSS12** ที่ละลายได้ยากใน $CDCl_3$ และ MeOH จึงทำให้การพิสูจน์โครงสร้างทำได้ด้วยความยากลำบาก เนื่องจากสารมีความเป็นขั้วสูง จึงนำสารดังกล่าวมาทำปฏิกิริยา acetylation โดยเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันจาก hydroxyl เป็น acetate (**DSS12a**) เพื่อลดความมีขั้วและเพิ่มการละลายของสารในตัวทำละลายอินทรีย์ โดยมีข้อมูล 1D NMR ของ **DSS12a** ดังแสดงในตารางที่ 9



ภาพที่ 23 แผนผังการแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัด hexane จากดอกแคนา

ตารางที่ 8 แสดงข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR ของ DSS-H-33-S หรือ DSS11 (CDCl_3) โดยค่า J รายงานในหน่วย Hz

position	DSS11	
	δ_{H} (ppm) (CDCl_3 , 300 MHz)	δ_{C} (ppm) (CDCl_3 , 75 MHz)
1	1.42-1.59 (2H, m)	37.3
2	1.42-1.59 (2H, m)	31.6
3	3.52 (1H, m)	71.8
4	2.18-2.33 (2H, m)	42.3
5	-	140.8
6	5.35 (1H, d, $J = 5.2$ Hz)	121.7
7	1.94-2.04 (2H, m)	31.9
8	1.60-1.70 (1H, m)	31.9
9	1.42-1.59 (1H, m)	50.1
10	-	36.5
11	1.42-1.59 (2H, m)	21.1
12	1.42-1.59 (2H, m)	39.8
13	-	42.3
14	1.42-1.59 (1H, m)	56.8
15	1.60-1.70 (2H, m)	24.3
16	1.80-1.87 (2H, m)	28.3
17	1.42-1.59 (1H, m)	56.1
18	0.68 (1H, s)	11.9
19	1.01 (3H, s)	19.4
20	1.60-1.70 (2H, m)	36.2
21	0.92 (2H, d, $J = 6.5$ Hz)	18.8
22	1.03-1.22 (1H, m)	33.9
23	1.03-1.22 (2H, m)	26.1
24	1.42-1.59 (3H, m)	45.8
25	1.60-1.70 (1H, m)	29.1

26	0.83 (3H, d, $J = 6.5$ Hz)	19.8
27	0.81 (3H, d, $J = 6.6$ Hz)	19.0
28	1.03-1.22 (3H, m)	23.1
29	0.85 (3H, t, $J = 7.1$ Hz)	12.0

ตารางที่ 9 แสดงข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR ของ DSS12a (CDCl_3) โดยค่า J รายงานในหน่วย Hz

position	DSS12a	
	δ_{H} (ppm) (CDCl_3 , 300 MHz)	δ_{C} (ppm) (CDCl_3 , 75 MHz)
1	1.42-1.59 (2H, m)	37.2
2	1.42-1.59 (2H, m)	40.0
3	3.50 (1H, quintet, $J = 5.5$ Hz)	80.1
4	2.18-2.33 (2H, m)	42.3
5	-	140.4
6	5.35 (1H, d, $J = 5.0$ Hz)	122.2
7	1.94-2.04 (2H, m)	31.9
8	1.60-1.70 (1H, m)	31.9
9	1.42-1.59 (1H, m)	50.2
10	-	36.7
11	1.42-1.59 (2H, m)	21.1
12	1.42-1.59 (2H, m)	39.8
13	-	42.3
14	1.42-1.59 (1H, m)	56.8
15	1.60-1.70 (2H, m)	24.3
16	1.80-1.87 (2H, m)	28.3
17	1.42-1.59 (1H, m)	56.1
18	0.68 (1H, s)	11.9
19	1.01 (3H, s)	19.4

20	1.60-1.70 (2H, m)	36.1
21	0.92 (2H, d, $J = 6.5$ Hz)	18.8
22	1.03-1.22 (1H, m)	34.0
23	1.03-1.22 (2H, m)	26.1
24	1.42-1.59 (3H, m)	45.9
25	1.60-1.70 (1H, m)	29.2
26	0.83 (3H, d, $J = 6.5$ Hz)	19.8
27	0.81 (3H, d, $J = 6.6$ Hz)	19.0
28	1.03-1.22 (3H, m)	23.1
29	0.85 (3H, t, $J = 7.1$ Hz)	12.0
1'	4.59 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)	99.7
2'	4.95 (1H, t, $J = 9.8$ Hz)	71.5
3'	3.68 (1H, m)	71.7
4'	5.21 (1H, t, $J = 9.8$ Hz)	72.9
5'	5.08 (1H, t, $J = 9.8$ Hz)	68.6
6'	4.11 (1H, dd, $J = 12.2, 2.4$ Hz) 4.25 (1H, dd, $J = 12.3, 4.8$ Hz)	62.1
<u>CH₃CO</u>	-	169.3, 169.4 170.4 170.7
<u>CH₃CO</u>	2.00 (3H, s)	20.6
	2.02 (3H, s)	20.6
	2.05 (3H, s)	20.7
	2.08 (3H, s)	20.8

3.5.2.2 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วน DSS-H-21 โดยใช้เทคนิค column chromatography

นำ fraction DSS-H-21 น้ำหนัก 0.1056 g มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วย column chromatography ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 เซนติเมตร สูง 50.0 เซนติเมตร ใช้ mobile phase เป็น 2% EtOAc ใน สารผสม 50% hexane: benzene สามารถแยกได้ทั้งหมด 5 fractions DSS-H-21-1 ถึง DSS-H-21-5 จากนั้นนำ DSS-H-21-3 (0.0410 g) ตรวจสอบโครงสร้างโดยใช้เทคนิค $^1\text{H-NMR}$ ปรากฏสัญญาณที่ δ_{H} 0.55 ppm (d, $J = 4.0$ Hz) และ 0.33 ppm (d, $J = 4.1$ Hz) เป็นสัญญาณของโปรตอนบนวง cyclopropane ซึ่งเป็นที่น่าสนใจดังนั้นจึงนำ fraction ดังกล่าวไปแยกให้บริสุทธิ์ต่อไป

3.5.2.2.1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วน DSS-H-21-3-1 โดยใช้เทคนิค Reverse Phase chromatography (RP18)

นำ fraction DSS-H-21-3 (0.0410 g) แยกให้บริสุทธิ์ด้วย reverse phase chromatography (RP18) โดยใช้ methanol 100% เป็น mobile phase ทำให้ได้ DSS-H-21-3-1 (0.0322 g) เป็น **DSS6** ตรวจสอบโครงสร้างโดยใช้เทคนิค $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ และ 2D NMR โดยข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR spectrum แสดงดังตารางที่ 10 และนำไปพิสูจน์โครงสร้างโดยใช้เทคนิค mass spectrometry, Infrared spectroscopy และ optical ration โดย mass spectrum ปรากฏสัญญาณที่ m/z 441.4096 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{53}\text{O}$, 441.4096) มีสูตรโมเลกุลคือ $\text{C}_{31}\text{H}_{52}\text{O}$ มีค่า specific rotation $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +27.27^\circ$ (c 0.0015, MeOH) และปรากฏสัญญาณการดูดกลืนที่ wave number (U_{max}) 3431, 2932, 2871, 1465, 1380 cm^{-1}

ตารางที่ 10 แสดงข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR ของ DSS-H-21-3-1 หรือ DSS6 (CDCl_3) โดยค่า J รายงานในหน่วย Hz

Position	DSS 6	
	δ_{H} (ppm) (CDCl_3 , 300 MHz)	δ_{C} (ppm) (CDCl_3 , 75 MHz)
1	1.20-1.30 (1H, m) 1.47-1.62 (1H, m)	32.0
2	1.50-1.70 (1H, m) 1.72-1.83 (1H, m)	30.4
3	3.29 (1H, dd, $J = 10.6, 4.4$ Hz)	78.8
4	-	40.5
5	1.20-1.38 (1H, m)	47.1
6	1.50-1.67 (1H, m) 0.70-0.83 (1H, m)	21.1
7	1.02-1.20 (1H, m) 1.25-1.40 (1H, m)	26.0
8	1.41-1.59 (1H, m)	48.0
9		20.0
10	-	26.1
11	1.99-2.10 (1H, m) 1.25-1.40 (1H, m)	26.5
12	1.54-1.70 (2H, m)	32.9
13	-	45.3
14	-	48.8
15	1.23-1.38 (2H, m)	35.6
16	1.91-2.00 (1H, m)	28.2

	1.23-1.36 (1H, m)	
17	1.55-1.68 (1H, m)	52.3
18	0.98 (3H, S)	18.0
19	0.55 (1H, d, $J = 4.0$ Hz) 0.33 (1H, d, $J = 4.1$ Hz)	29.9
20	1.50 (1H, m)	36.1
21	0.90 (3H, brs)	18.3
22	1.50-1.68 (1H, m) 1.06-1.20 (1H, m)	35.0
23	1.80-1.95 (1H, m) 2.05-2.20 (1H, m)	31.3
24	-	156.9
25	2.30 (1H, m)	33.8
26	1.03 (3H, d, $J = 6.8$ Hz)	22.0
27	1.03 (3H, d, $J = 6.8$ Hz)	21.9
28	0.98 (3H, S)	25.4
29	0.80 (3H, S)	14.0
30	0.90 (3H, brs)	19.3
31	4.72 (1H, brs) 4.67 (1H, brs)	105.9

3.5.2.3 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วน DSS-H-76 โดยใช้เทคนิค column chromatography

นำ fraction DSS-H-76 น้ำหนัก 0.4640 g มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วย column chromatography ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.0 เซนติเมตร สูง 50.0 เซนติเมตร ใช้ mobile phase เป็น 20% EtOAc ใน สารผสม 50% hexane: benzene สามารถแยกได้ทั้งหมด 12 fractions ได้แก่ DSS-H-76-1 ถึง DSS-H-76-12 นำ DSS-H-76-7 (0.0404 g) ตรวจสอบโครงสร้างโดยใช้

เทคนิค $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ และ 2D NMR โดยข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR spectrum แสดงดังตารางที่ 11 และนำไปพิสูจน์โครงสร้างโดยใช้เทคนิค mass spectrometry, Infrared spectroscopy และ optical ration โดย mass spectrum ปรากฏสัญญาณที่ m/z 439.3929 $[\text{M-H}_2\text{O+H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{55}\text{O}_3$ 439.3939) มีสูตรโมเลกุลคือ $\text{C}_{31}\text{H}_{52}\text{O}_2$ มีค่า specific rotation $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +180.00^\circ$ (c 0.0007, MeOH) และปรากฏสัญญาณการดูดกลืนที่ wave number (U_{max}) 3369, 1694, 1603, 1518, 1445, 1373, 1263, 1159, 1035 cm^{-1} สรุปได้ว่าเป็น **DSS7**

ตารางที่ 11 แสดงข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR ของ DSS-H-76-7 หรือ **DSS7** (CDCl_3) โดยค่า J รายงานในหน่วย Hz

Position	DSS7	
	δ_{H} (ppm) (CDCl_3 , 300 MHz)	δ_{C} (ppm) (CDCl_3 , 75 MHz)
1	1.20-1.30 (1H, m)	31.7
	1.48-1.62 (1H, m)	
2	1.58-1.60 (2H, m)	30.2
3	3.76 (1H, dd, $J = 10.7, 3.2$ Hz)	77.2
4	-	43.7
5	1.40-1.52 (1H, m)	42.5
6	1.38-1.49 (1H, m)	21.0
	0.75-0.89 (1H, m)	
7	1.00-1.15 (2H, m)	25.8
8	1.50 (1H, dd, $J = 13.9, 4.6$ Hz)	47.9
9	-	19.9
10	-	25.3
11	1.24-1.34 (2H, m)	28.2
12	1.24-1.34 (2H, m)	35.6

13	-	45.3
14	-	48.8
15	1.55-1.65 (2H, m)	32.9
16	1.64 (2H, m)	26.4
17	1.57-1.64 (1H, m)	52.3
18	0.97 (3H, S)	18.1
19	0.60 (1H, d, $J = 4.3$ Hz)	30.0
	0.39 (1H, d, $J = 4.1$ Hz)	
20	1.45 (1H, m)	36.1
21	0.90 (3H, d, $J = 6.3$ Hz)	18.3
22	1.56-1.70 (2H, m)	35.0
23	1.80-2.20 (2H, m)	31.3
24	-	156.9
25	2.20-2.30 (1H, m)	33.8
26	1.03 (3H, d $J = 6.8$ Hz)	21.8
27	1.03 (3H, d $J = 6.8$ Hz)	22.0
28	3.74 (1H, d $J = 10.5$ Hz)	71.2
	3.53 (1H, d $J = 10.4$ Hz)	
29	0.94 (3H, S)	10.1
30	0.89 (3H, S)	19.3
31	4.70 (2H, d, $J = 15.4$ Hz)	105.9

3.5.2.4 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วน DSS-H-77

3.5.2.4.1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วน DSS-H-77 โดยใช้เทคนิค column chromatography

นำ fraction DSS-H-77 น้ำหนัก 0.5345 g มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วย column chromatography ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร สูง 50.0 เซนติเมตร ใช้ mobile phase เป็น 10% EtOAc ใน hexane สามารถแยกได้ทั้งหมด 6 fractions ได้แก่ DSS-H-77-1 ถึง DSS-H-77-6 นำ DSS-H-77-2 (**DSS8**, 0.0465 g) ตรวจสอบโครงสร้างโดยใช้เทคนิค $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ และ 2D NMR แสดงข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ดังตารางที่ 12 และนำไปพิสูจน์โครงสร้างโดยใช้เทคนิค mass spectrometry และ optical rotation โดย mass spectrum ปรากฏสัญญาณที่ m/z 1138.9562 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ ทำให้ทราบว่า **DSS8** มีสูตรโมเลกุลคือ $\text{C}_{71}\text{H}_{124}\text{O}_9$ จาก IR spectrum ปรากฏสัญญาณที่ wave number (ν_{max}) 3456, 2923, 2853, 1734, 1463, 1378, 1248, 1170, 1033 cm^{-1} มีค่า specific rotation $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +120.86^\circ$ (c 0.0017, MeOH)

ตารางที่ 12 แสดงข้อมูล $^1\text{H NMR}$ และ $^{13}\text{C NMR}$ ของ DSS-H-77-2 หรือ **compound 8** (CDCl_3) โดยค่า ν รายงานในหน่วย Hz

Position	DSS8	
	δ_{H} (ppm) (CDCl_3 , 300 MHz)	δ_{C} (ppm) (CDCl_3 , 75 MHz)
1	1.35 (1H, m) 1.18 (1H, m)	33.6
2	1.18 (2H, m)	25.2
3	4.63 (1H, brs)	78.0
4	-	36.5
5	1.22 (1H, m)	50.3
6	1.30 (1H, m) 1.45 (1H, m)	18.1
7	1.53 (2H, m)	32.8

8	-	39.5
9	1.65 (1H, m)	47.5
10	-	37.0
11	1.80-2.09 (2H, m)	22.7
12	5.33 (1H, brs)	122.8
13	-	143.1
14	-	41.8
15	1.05 (1H, m) 1.53 (1H, m)	27.8
16	1.80-2.09 (2H, m)	23.3
17	-	46.9
18	2.85 (dd, $J = 13.8, 3.7$ Hz),	41.1
19	1.15 (1H, m) 1.65 (1H, m)	45.9
20	-	30.6
21	1.35 (1H, m) 1.18 (1H, m)	33.8
22	1.25 (2H, m)	31.9
23	0.85 (3H, s)	27.9
24	0.89 (3H, s)	21.9
25	0.94 (3H, s)	15.4
26	0.77 (3H, s)	17.0
27	1.18 (3H, s)	25.8
28	-	175.8
29	0.90 (3H, s)	33.0
30	0.90 (3H, s)	23.5
1'	5.55 (1H, d, $J = 6.9$ Hz)	91.8
2'	5.07 (1H, t, $J = 7.8$ Hz)	71.4

3'	3.79 (1H, dd, $J = 8.2, 3.3$ Hz)	71.5
4'	3.97 (1H, m)	67.6
5'	4.02 (1H, d, $J = 3.6$ Hz) 3.65 (1H, d, $J = 11.0$ Hz)	65.4
-OCO(CH ₂) ₁₆ CH ₃	1.25 (3H, m)	14.1
-OCOCH ₂		173.4, 173.6
-OCOCH ₂	2.33 (2H, m)	34.2
-OCOCH ₂	2.33 (2H, m)	34.7

3.5.2.4.2 ปฏิกิริยา hydrolysis ของ DSS8

จาก ¹H และ ¹³C-NMR spectrum ของ DSS8 ทำให้ทราบว่า DSS8 มีโครงสร้างหลักที่ประกอบด้วย triterpene, fatty acid และน้ำตาลโดยจากสเปกตรัมของ ¹H และ ¹³C-NMR ปรากฏสัญญาณของ anomeric proton ที่ $\delta_{\text{H}} 5.55$ (d, $J = 6.9$ Hz) และปรากฏสัญญาณของ anomeric carbon ที่ $\delta_{\text{C}} 91.8$ ดังนั้นจึงทำปฏิกิริยา hydrolysis เพื่อให้สามารถยืนยันโครงสร้างของ triterpene และน้ำตาลในโครงสร้าง

3.5.2.4.3 Acid hydrolysis

นำ DSS8 น้ำหนัก 0.0116 g ทำปฏิกิริยากับ 1M hydrochloric acid ใน dioxane และน้ำที่อัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 2.00 ml จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาโดยการ reflux เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถัดมาระเหยตัวทำละลาย dioxane ออกจากไต้ความดันต่ำ ที่อุณหภูมิประมาณ 45 °C จากนั้นสกัดด้วย ethyl acetate ครั้งละ 3.00 ml จำนวน 3 ครั้ง ตามด้วยสกัดด้วยน้ำ 2 ครั้ง ครั้งละ 3.00 ml นำชั้นน้ำไปตรวจสอบ TLC พบว่ามีองค์ประกอบตรงกับน้ำตาลชนิด Arabinose และนำไปทดสอบ optical rotation พบว่ามีค่า specific rotation $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +56.57^{\circ}$ (c 0.0012, H₂O) จึงยืนยันได้ว่าโครงสร้างมีน้ำตาลชนิด L-arabinose เป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้ชั้น ethyl acetate ไปตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิค ¹H-NMR และ ¹³C-NMR แสดงข้อมูลดังตารางที่ 13 ซึ่งข้อมูลดังกล่าวทำให้ทราบว่าองค์ประกอบในชั้น ethyl acetate คือ DSS8a (0.0087 g)

ตารางที่ 13 แสดงข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR spectrum ของ DSS8a (MeOD) โดยค่า J รายงานในหน่วย Hz

Position	DSS8a	
	δ_{H} (ppm) (CDCl_3 , 300 MHz)	δ_{C} (ppm) (CDCl_3 , 75 MHz)
1	1.35 (1H, m) 1.18 (1H, m)	33.6
2	1.18 (2H, m)	25.2
3	4.62 (1H, brs)	78.0
4	-	36.5
5	1.22 (1H, m)	50.3
6	1.30 (1H, m) 1.45 (1H, m)	18.1
7	1.53 (2H, m)	32.8
8	-	39.5
9	1.65 (1H, m)	47.5
10	-	37.0
11	1.80-2.09 (2H, m)	22.7
12	5.30 (1H, brs)	122.8
13	-	143.1
14	-	41.8
15	1.05 (1H, m) 1.53 (1H, m)	27.8
16	1.80-2.09 (2H, m)	23.3
17	-	46.9
18	2.85 (dd, $J = 13.8, 3.7$ Hz)	41.1
19	1.15 (1H, m) 1.65 (1H, m)	45.9

20	-	30.6
21	1.35 (1H, m) 1.18 (1H, m)	33.8
22	1.25 (2H, m)	31.9
23	0.85 (3H, s)	27.9
24	0.89 (3H, s)	21.9
25	0.94 (3H, s)	15.4
26	0.77 (3H, s)	17.0
27	1.18 (3H, s)	25.8
28	-	183.1
29	0.90 (3H, s)	33.0
30	0.90 (3H, s)	23.5
-OCO(CH ₂) ₁₆ CH ₃	1.25 (3H, m)	14.1
-OCOCH ₂		173.4, 173.6
-OCOCH ₂	2.33 (2H, m)	34.2

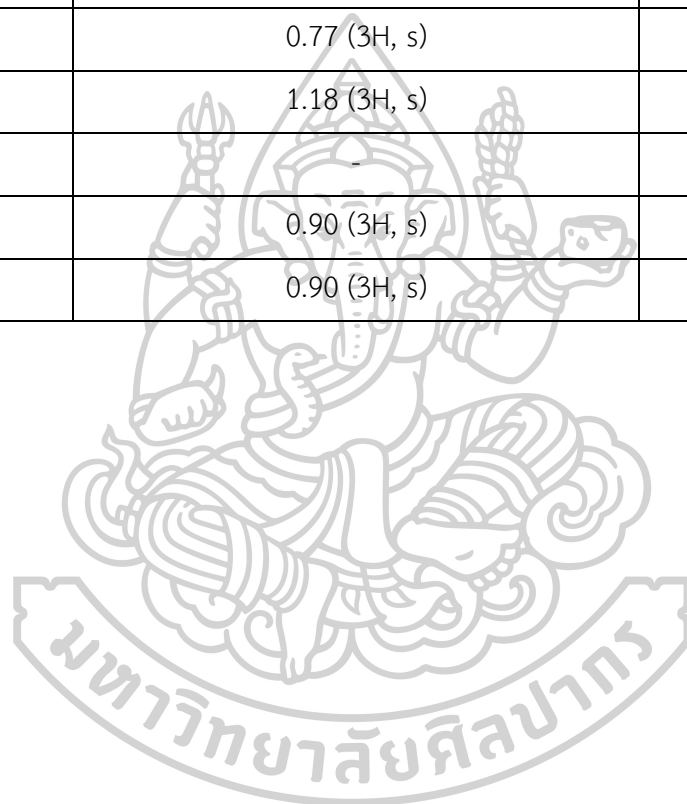
3.5.2.4.4 Basic hydrolysis

เนื่องจากการทำปฏิกิริยา acid hydrolysis ของ **DSS8** นั้นพบว่าปฏิกิริยายังเกิดการตัดพันธะเอสเทอร์ได้ไม่สมบูรณ์ จึงนำ **DSS8a** ไปทำปฏิกิริยา basic hydrolysis ต่อเพื่อตัดพันธะเอสเทอร์ระหว่าง fatty acid กับ terpene โดยนำ **DSS8a** น้ำหนัก 0.0087 g ทำปฏิกิริยากับสารละลาย 10% potassium hydroxide ในน้ำ ปริมาตร 2.00 ml จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศา โดยการ reflux เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สกัดสารละลายด้วย chloroform ครั้งละ 3.00 ml จำนวน 3 ครั้ง ตามด้วยสกัดด้วยน้ำ 2 ครั้ง ครั้งละ 3.00 ml ระเหยชั้น chloroform ภายใต้ความดันต่ำ ที่อุณหภูมิประมาณ 45 °C ได้สารประกอบ **DSS8b** และนำสารประกอบที่ได้ไปตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิค ¹H-NMR และ ¹³C-NMR ได้ข้อมูลดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 แสดงข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR spectrum DSS8b (MeOD) โดยค่า J รายงานในหน่วย Hz

Position	DSS8b	
	δ_{H} (ppm) (CDCl_3 , 300 MHz)	δ_{C} (ppm) (CDCl_3 , 75 MHz)
1	1.35 (1H, m) 1.18 (1H, m)	33.6
2	1.18 (2H, m)	25.2
3	3.41 (1H, brs)	76.2
4	-	36.5
5	1.22 (1H, m)	50.3
6	1.30 (1H, m) 1.45 (1H, m)	18.1
7	1.53 (2H, m)	32.8
8	-	39.5
9	1.65 (1H, m)	47.5
10	-	37.0
11	1.80-2.09 (2H, m)	22.7
12	5.30 (1H, brs)	122.8
13	-	143.1
14	-	41.8
15	1.05 (1H, m) 1.53 (1H, m)	27.8
16	1.80-2.09 (2H, m)	23.3
17	-	46.9
18	2.85 (1H, dd, $J = 13.8, 3.7$ Hz)	41.1
19	1.15 (1H, m) 1.65 (1H, m)	45.9

20	-	30.6
21	1.35 (1H, m) 1.18 (1H, m)	33.8
22	1.25 (2H, m)	31.9
23	0.85 (3H, s)	27.9
24	0.89 (3H, s)	21.9
25	0.94 (3H, s)	15.4
26	0.77 (3H, s)	17.0
27	1.18 (3H, s)	25.8
28	-	183.1
29	0.90 (3H, s)	33.0
30	0.90 (3H, s)	23.5



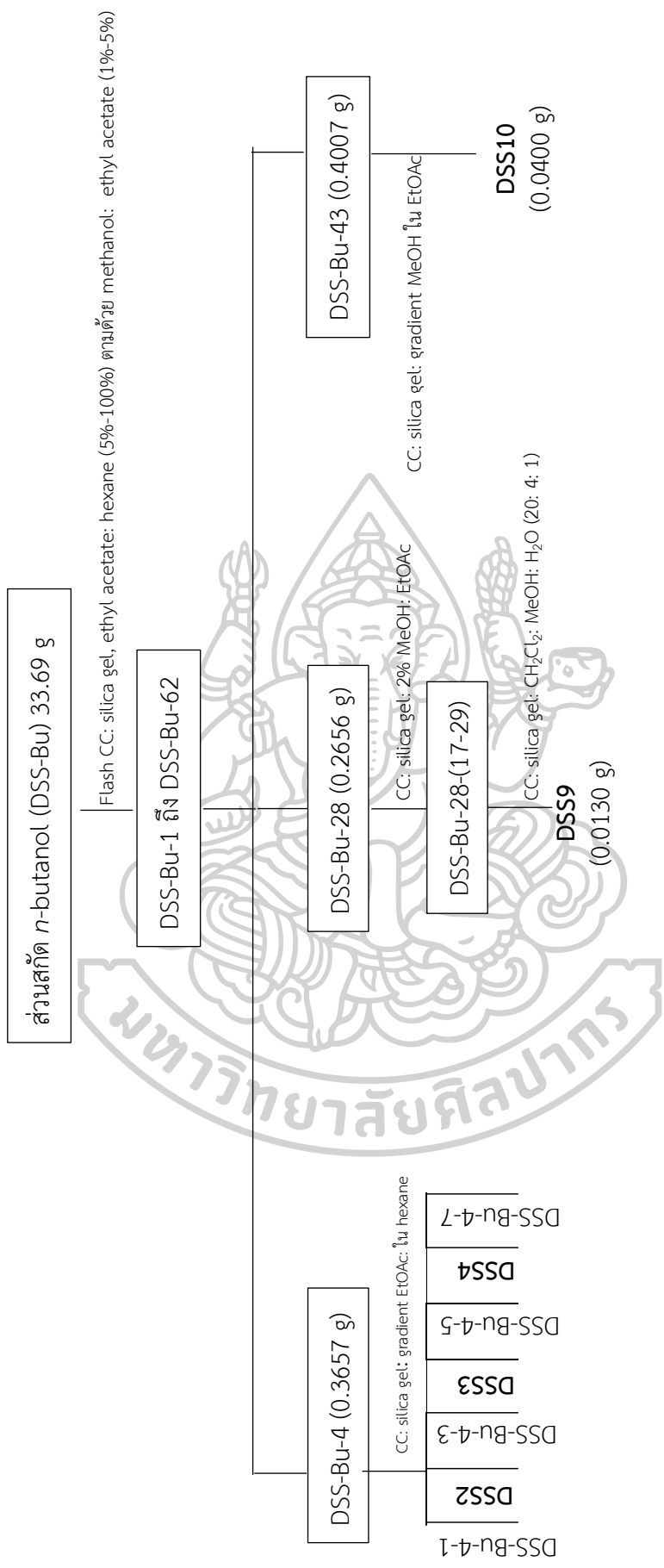
3.5.3 การแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัด *n*-butanol จากดอกแคนา

การแยกสารจากส่วนสกัดชั้น *n*-butanol ของดอกแคนาโดยใช้ flash column เริ่มจากนำส่วนสกัดหยาบ *n*-butanol น้ำหนัก 33.69 g เคลือบลงบน silica gel 101.07 g แยกโดยใช้ flash column ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 15.0 cm โดยใช้ solvent gradient condition ครั้งละ 500 ml โดยเริ่มจาก 50% EtOAc ใน hexane และเพิ่ม EtOAc ในอัตราส่วนต่าง ๆ ดังนี้ 55%, 60%, 65%,... 100% จนถึง 30% MeOH ใน EtOAc ได้สารทั้งหมด 62 fractions โดยแบ่งสารได้ 62 กลุ่ม DSS-Bu-1 ถึง DSS-Bu-62 จากนั้นนำ fractions ต่าง ๆ มาศึกษาต่อดังภาพที่ 27

3.5.3.1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วน DSS-Bu-4 โดยใช้เทคนิค column chromatography

นำ fraction DSS-Bu-4 น้ำหนัก 0.3657 g แยกให้บริสุทธิ์โดยใช้ column ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.0 เซนติเมตร สูง 50.0 เซนติเมตร จากนั้นใช้ column โดยใช้ gradient mobile phase ของ EtOAc ใน hexane สามารถแยกได้ทั้งหมด 7 fractions DSS-Bu-4 -1 ถึง DSS-Bu-4 -7 นำ DSS-Bu-4-2, DSS-Bu-4-4 และ DSS-Bu-4-6 ไปตรวจสอบโครงสร้างโดยใช้เทคนิค Thin layer chromatography (TLC), $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ เทียบกับสารประกอบที่สามารถแยกได้ก่อนหน้าพบว่า เป็นสารชนิดเดียวกันกับ DSS2, DSS3 และ DSS4 ตามลำดับ

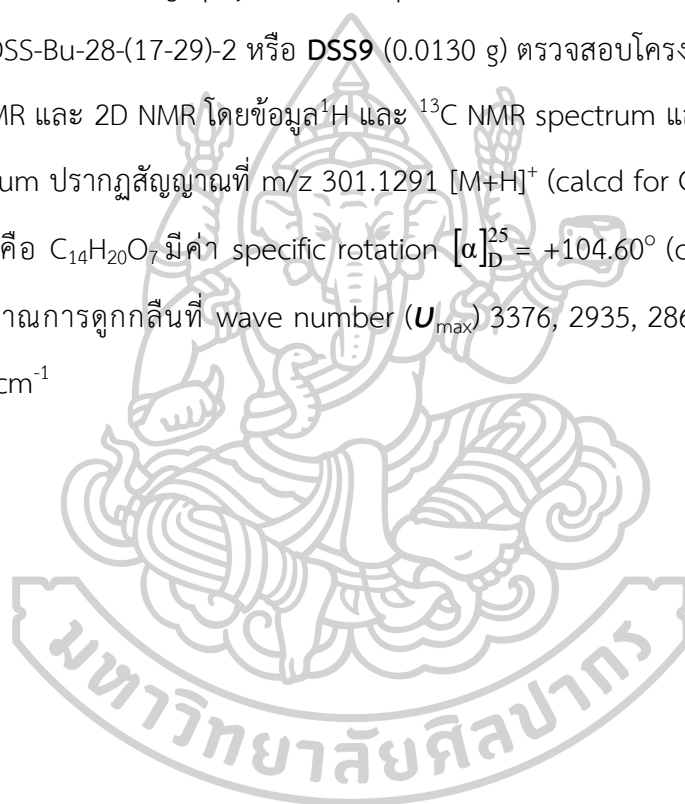




ภาพที่ 24 แผนผังการแยกองค์ประกอบทางเคมีของจากส่วนสกัด n-butanol จากดอกแคนา

3.5.3.2 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วน DSS-Bu-28 โดยใช้เทคนิค column chromatography

นำ fraction DSS-Bu-28 น้ำหนัก 0.2656 g แยกให้บริสุทธิ์โดยใช้ column ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.0 เซนติเมตร สูง 50.0 เซนติเมตร ใช้ mobile phase คือ 2% MeOH: EtOAc สามารถแยก DSS-Bu-28-(17-29) ได้ เมื่อตรวจสอบโครงสร้างโดยใช้เทคนิค Thin layer chromatography (TLC) พบว่า fraction ดังกล่าวยังไม่บริสุทธิ์จึงนำไปแยกให้บริสุทธิ์ต่อโดยใช้เทคนิค column chromatography ใช้ mobile phase คือ CH_2Cl_2 : MeOH: H_2O ที่อัตราส่วน 20: 4: 1 ได้เป็น DSS-Bu-28-(17-29)-2 หรือ **DSS9** (0.0130 g) ตรวจสอบโครงสร้างโดยใช้เทคนิค $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ และ 2D NMR โดยข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR spectrum แสดงข้อมูลดังตารางที่ 15 mass spectrum ปรากฏสัญญาณที่ m/z 301.1291 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{O}_7$, 301.1287) มีสูตรโมเลกุลคือ $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_7$ มีค่า specific rotation $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +104.60^\circ$ (c 0.0016, MeOH) และ ปรากฏสัญญาณการดูดกลืนที่ wave number (ν_{max}) 3376, 2935, 2868, 1668, 1465, 1378, 1051, 1022 cm^{-1}



ตารางที่ 15 แสดงข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR ของ DSS-Bu-28-(17-29)-2 หรือ DSS9 (MeOD) โดย
ค่า J รายงานในหน่วย Hz

position	DSS9	
	δ_{H} (ppm) (MeOD, 300 MHz)	δ_{C} (ppm) (MeOD, 75 MHz)
1	-	156.9
2	6.67 (1H, d, $J = 8.5$ Hz)	116.3
3	7.04 (1H, d, $J = 8.5$ Hz)	131.1
4	-	130.9
5	7.04 (1H, d, $J = 8.5$ Hz)	131.1
6	6.67 (1H, d, $J = 8.5$ Hz)	116.3
7	2.81 (2H, d, $J = 7.5$ Hz)	36.5
8	3.90-4.10 (1H, m)	72.2
	3.58-3.78 (1H, m)	
9	4.27 (1H, d, $J = 7.7$ Hz)	104.5
10	3.16 (1H, t, $J = 7.9$ Hz)	75.2
11	3.18-3.33 (1H, m)	78.1
12	3.18-3.35 (1H, m)	71.7
13	3.33-3.40 (1H, m)	78.2
14	3.85 (1H, dd, $J = 12.3, 2.0$ Hz)	62.8
	3.56-3.75 (1H, m)	

3.5.3.3 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วน DSS-Bu-43 โดยใช้เทคนิค column chromatography

นำ fraction DSS-Bu-43 น้ำหนัก 0.4007 g แยกให้บริสุทธิ์โดยใช้ column ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.0 เซนติเมตร สูง 50.0 เซนติเมตร ใช้ gradient mobile phase ของ EtOAc ใน MeOH สามารถแยก DSS-Bu-43-(30-40) หรือ **DSS10** (0.0400 g) ได้และนำไปตรวจสอบโครงสร้างโดยใช้เทคนิค $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ และ 2D NMR แสดงข้อมูลดังตารางที่ 16 และนำไปพิสูจน์โครงสร้างโดยใช้เทคนิค mass spectrometry, Infrared spectroscopy และ optical rotation โดย mass spectrum ปรากฏสัญญาณที่ m/z 625.2145 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{O}_{15}$, 625.2132) มีสูตรโมเลกุลคือ $\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_{15}$ มีค่า specific rotation $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -100.00^\circ$ (c 0.0017, MeOH) และปรากฏสัญญาณการดูดกลืนที่ wave number (\mathbf{u}_{max}) 3340, 2932, 2882, 1615, 1516, 1448, 1372, 1240, 1161, 1077, 1033 cm^{-1}

ตารางที่ 16 แสดงข้อมูล $^1\text{H NMR}$ และ $^{13}\text{C NMR}$ ของ DSS-Bu-43-(30-40) หรือ **DSS10** (MeOD) โดยค่า J รายงานในหน่วย Hz

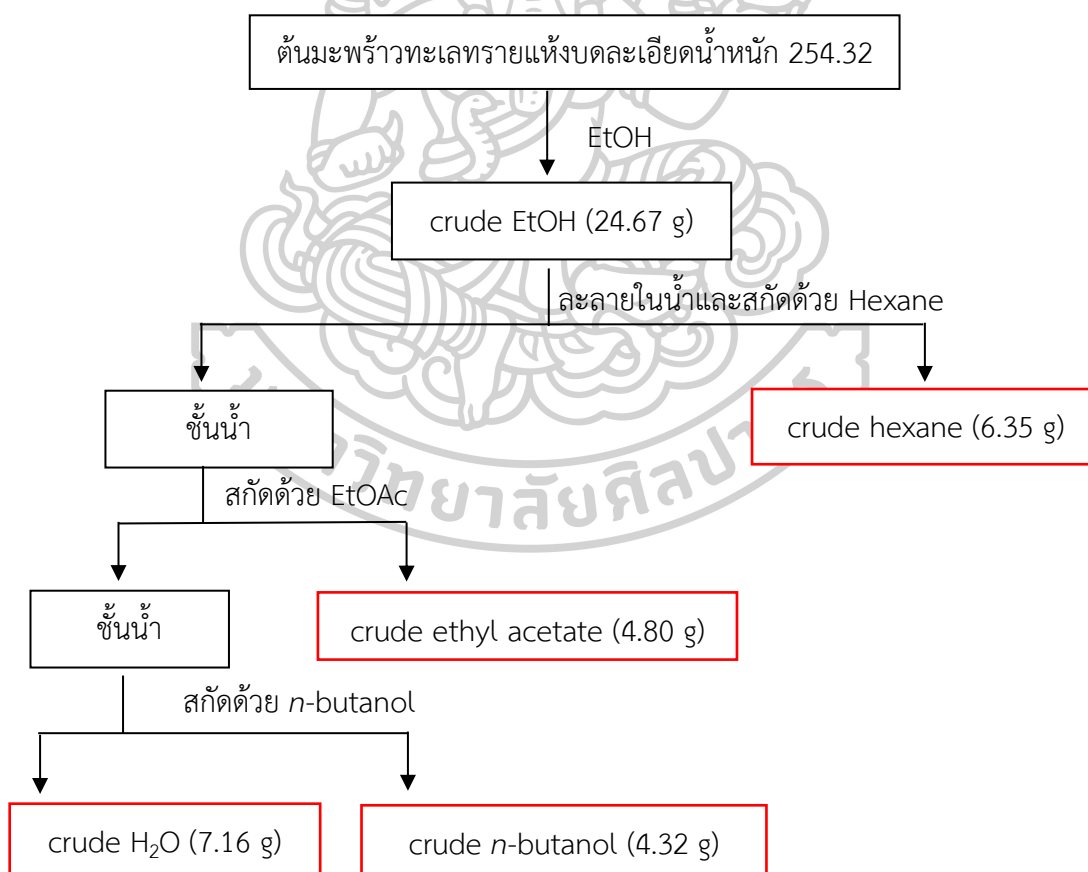
position	DSS10	
	δ_{H} (ppm) (MeOD, 300 MHz)	δ_{C} (ppm) (MeOD, 75 MHz)
1	4.40 (1H, d, $J = 7.9$ Hz)	104.2
2	3.45 (1H, t, $J = 9.1$ Hz)	76.2
3	3.83 (1H, t, $J = 9.2$ Hz)	81.8
4	4.86-5.06 (1H, m)	70.7
5	3.50-3.60 (1H, m)	76.0
6	3.46-3.60 (1H, m)	62.4
	3.60-3.78 (1H, m)	
1'	5.21 (1H, brs)	103.1
2'	3.87-4.00 (1H, m)	72.4

3'	3.54-3.70 (1H, m)	72.1
4'	3.25-3.42 (1H, m)	73.9
5'	3.50-3.68 (1H, m)	70.5
6'	1.15 (1H, d, $J = 7.2$ Hz)	18.6
1"	-	131.6
2"	6.65-6.78 (1H, m)	116.5
3"	-	144.7
4"	-	146.2
5"	6.72 (1H, d, $J = 8.2$ Hz)	117.2
6"	6.58 (1H, dd, $J = 8.3, 1.7$ Hz)	121.4
1'''	-	127.7
2'''	7.09 (1H, d, $J = 1.7$ Hz)	115.4
3'''	-	146.8
4'''	-	149.8
5'''	6.81 (1H, d, $J = 8.2$ Hz)	116.7
6'''	6.98 (1H, dd, $J = 8.3, 1.7$ Hz)	123.4
7	3.68-3.85 (1H, m)	72.3
	4.00-4.17 (1H, m)	
8	2.81 (2H, t, $J = 7.3$ Hz)	36.6
9	-	168.4
10	6.30 (1H, d, $J = 15.9$ Hz)	114.8
11	7.62 (1H, d, $J = 15.8$ Hz)	148.1

ส่วนที่ 3 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของมะพร้าวทะเลทราย

3.6 การเตรียมส่วนสกัดหยาบ (crude-DF) จากต้นมะพร้าวทะเลทราย (*Dorstenia foetida* Schweinf)

นำตัวอย่างต้นมะพร้าวทะเลทรายตากแห้งแล้วบดละเอียด (น้ำหนัก 254.32 g) มาแช่ด้วย ethanol ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นกรองแยกส่วนที่เป็น residue ออก เก็บส่วนสารละลาย และนำส่วนที่เป็น residue มาแช่ใน ethanol อีกครั้งหนึ่ง ทำเช่นนี้ 3 ครั้ง นำส่วนที่เป็นสารละลายทั้งหมดไปทำการระเหยตัวทำละลายออก ภายใต้ความดันต่ำ ที่อุณหภูมิประมาณ 45 °C จะได้ส่วนสกัดหยาบ (crude) มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเขียวปนดำน้ำหนัก 24.67 g จากนั้นนำส่วนสกัดหยาบที่ได้มาสกัดด้วย hexane, ethyl acetate และ n-butanol ได้ 4 ส่วนสกัดดังภาพที่ 28




ภาพที่ 25 แผนผังแสดงขั้นตอนการเตรียมส่วนสกัดหยาบมะพร้าวทะเลทราย

3.7 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของส่วนสกัดหยาบจากต้นมะพร้าวทะเลทราย

จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของส่วนสกัดหยาบจากต้นมะพร้าวทะเลทราย (*Dorstenia foetida* Schweinf.) โดยใช้เทคนิค MTT assay โดยทดสอบส่วนสกัดหยาบชั้น ethanol, hexane, n-butanol, ethyl acetate และ H₂O ที่ความเข้มข้น 500 µg/ml และ 50 µg/ml พบว่าในส่วนสกัดหยาบชั้น hexane, n-butanol, และ ethyl acetate มีฤทธิ์ต้าน เซลล์มะเร็งทุกชนิดที่ความเข้มข้น 500 µg/ml และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งบางชนิด ได้แก่ HCT116, HT29, MDA-MB-231, HN22 และ HeLa ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml ดังแสดงในตารางที่ 17 และ 18 ตามลำดับ

ตารางที่ 17 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของส่วนสกัดหยาบจากต้นมะพร้าวทะเลทรายที่ความเข้มข้น 500 µg/ml



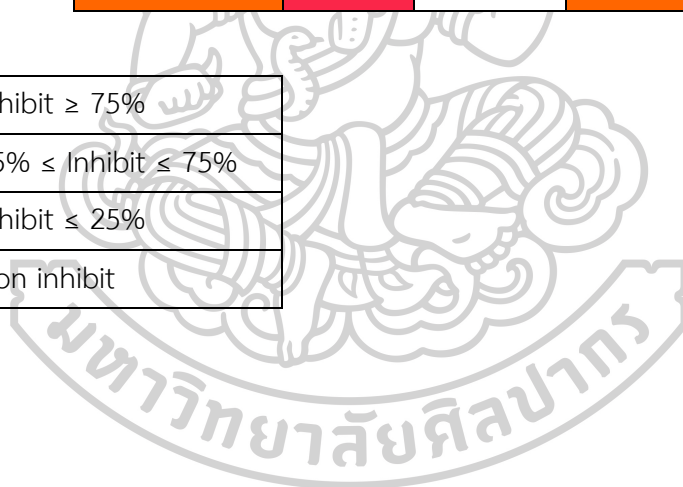
cells	% Inhibition ที่ความเข้มข้น 500 µg/ml				
	EtOH (crude)	hexane	n-BuOH	EtOAc	H ₂ O
HaCaT	91.05	95.09	93.65	88.42	67.40
HCT116	97.58	98.68	97.99	95.10	94.91
HT29	94.68	97.67	94.33	93.85	78.40
MCF-7	90.23	94.39	85.03	91.08	88.43
MDA-MB-231	97.41	98.60	95.60	94.38	78.71
HepG2	65.59	95.14	90.95	85.40	39.77
HN22	96.12	97.75	72.44	91.61	40.70
HeLa	94.17	95.83	90.89	94.15	8.77

	Inhibit \geq 75%
	25% \leq Inhibit \leq 75%
	Inhibit \leq 25%

ตารางที่ 18 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของส่วนสกัดหยาบจากต้นมะพร้าวทะเลทรายที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$

cells	% Inhibition ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$				
	EtOH (crude)	hexane	n-BuOH	EtOAc	H ₂ O
HaCaT	36.34	33.78	24.93	21.61	1.51
HCT116	47.07	95.94	91.68	83.42	11.21
HT29	30.28	93.97	82.54	52.25	9.66
MCF-7	2.80	18.44	11.98	5.46	0.95
MDA-MB-231	3.92	31.86	57.29	6.32	N/A
HepG2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
HN22	30.03	41.02	50.03	21.66	1.81
HeLa	60.90	91.96	N/A	67.11	N/A

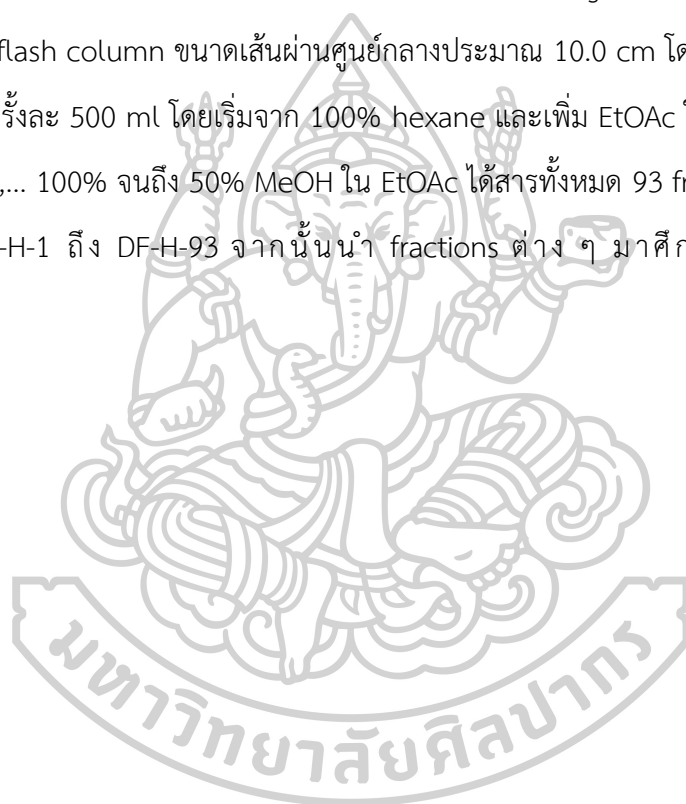
	Inhibit \geq 75%
	25% \leq Inhibit \leq 75%
	Inhibit \leq 25%
	Non inhibit

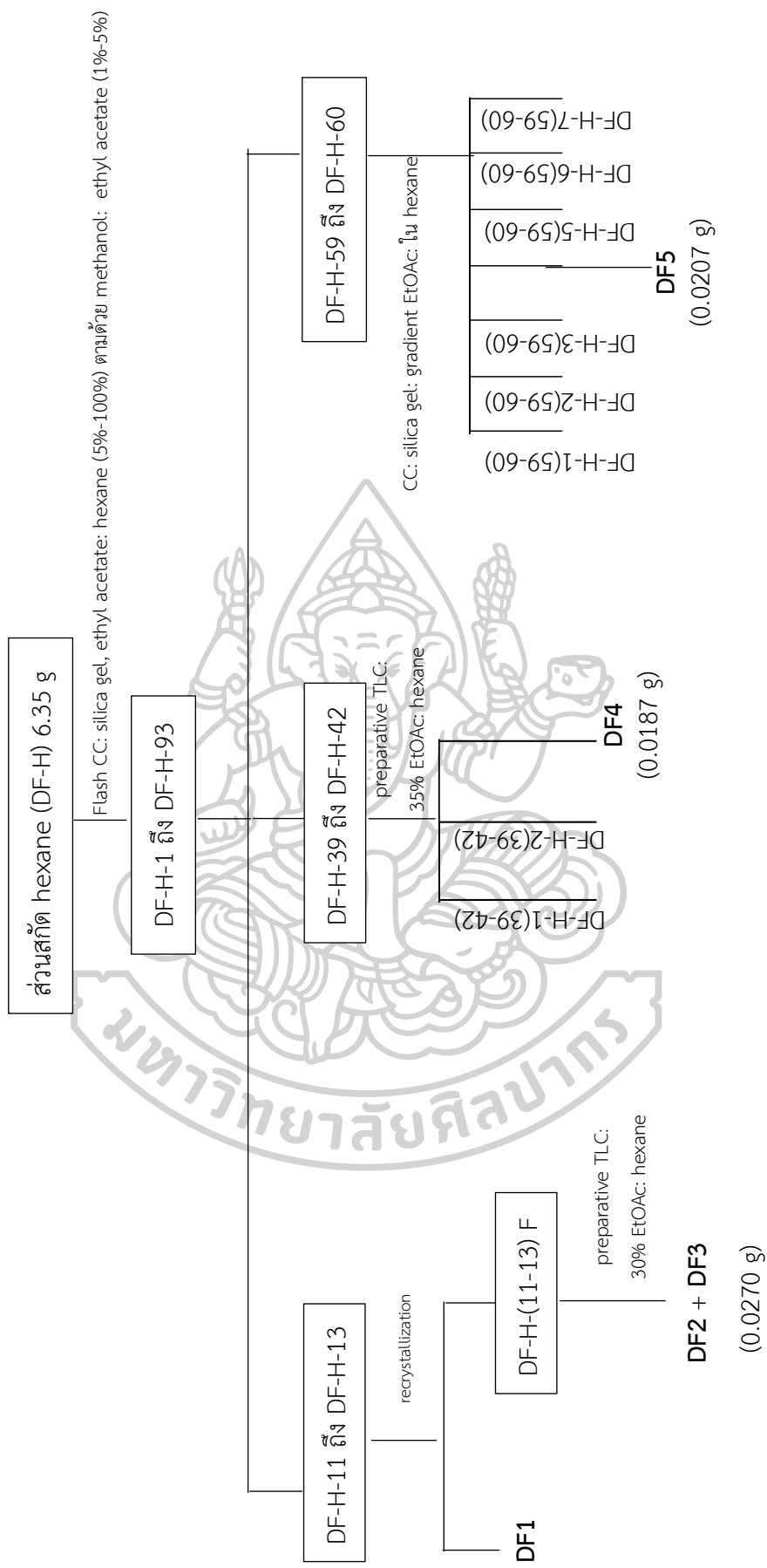


3.8 การแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดจากต้นมะพร้าวทะเลทราย (*Dorstenia foetida* Schweinf.)

3.8.1 การแยกสารจากส่วนสกัดชั้น hexane ของต้นมะพร้าวทะเลทราย

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของส่วนสกัดหยาบต่าง ๆ พบว่าส่วนสกัดหยาบชั้น hexane มีแนวโน้มออกมีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ได้ดีที่สุดใน จึงเลือกส่วนสกัดชั้น hexane มาทำการศึกษาโดยนำส่วนสกัดชั้น hexane ของมะพร้าวทะเลทรายมาแยกโดยใช้ flash column เริ่มจากนำส่วนสกัดหยาบ hexane น้ำหนัก 6.35 g เคลือบลงบน silica gel 19.05 g แยกโดยใช้ flash column ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10.0 cm โดยใช้ solvent gradient condition ครึ่งละ 500 ml โดยเริ่มจาก 100% hexane และเพิ่ม EtOAc ในอัตราส่วนต่าง ๆ ดังนี้ 1%, 2%, 3%,... 100% จนถึง 50% MeOH ใน EtOAc ได้สารทั้งหมด 93 fractions โดยแบ่งสารได้ 93 กลุ่ม DF-H-1 ถึง DF-H-93 จากนั้นนำ fractions ต่าง ๆ มาศึกษาต่อดังภาพที่ 29





ภาพที่ 26 แผนผังการแยกองค์ประกอบทางเคมีของทางเคมีจากส่วนสกัด hexane จากลำต้นมะพร้าวทะเลทราย

3.8.1.1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วน DF-H-11 ถึง DF-H-13 โดยใช้เทคนิค recrystallization

เนื่องจาก fraction DF-H-11, DF-H-12 และ DF-H-13 พบว่าส่วนที่เป็นผลึกสามารถแยกออกจากส่วนสารละลายได้ จึงตรวจสอบ fraction ทั้ง 3 ด้วย TLC และทำการตกผลึกซ้ำ (recrystallization) ด้วย ethanol โดยนำ Fraction DF-H-11 (0.0434 g), DF-H-12 (0.0430 g) และ DF-H-13 (0.0652 g) มาทำการตกผลึกซ้ำด้วย ethanol พบว่าได้สารบริสุทธิ์ **DF1** มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว และเมื่อนำ DF1 ไปตรวจสอบโครงสร้างโดยใช้เทคนิค $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ พบว่าข้อมูลตรงกับ DSS11 ที่แยกได้จากส่วนสกัด hexane ของดอกแคนา จึงสามารถสรุปได้ว่าผลึกที่ได้คือ **DSS11**

3.8.1.2 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วน DF-H-11 ถึง DF-H-13 โดยใช้เทคนิค preparative TLC

จากการตกผลึกซ้ำของ DF-H-11 ถึง DF-H-13 นำส่วนของ filtrate (85.8 mg, oil ชนิดสีเหลือง) มาแยกให้บริสุทธิ์ต่อโดยใช้ preparative TLC ความหนา 0.25 มิลลิเมตร จำนวน 3 plate และนำไป develop ในแท็งค์ โดยใช้ mobile phase ที่เป็นอัตราส่วน 30% EtOAc : hexane สามารถแยกสารได้ทั้งหมด 1 กลุ่มคือ DF-H-1(11-13)F นำไปตรวจสอบโครงสร้างโดยใช้เทคนิค ^1H , ^{13}C และ 2D-NMR พบว่ามีสาร 2 ตัวผสมกันคือ **DF2** และ **DF3** (0.0270 g) โดยไม่สามารถแยกออกจากกันได้ โดยมีอัตราส่วน 4.0:1.0 ดังแสดงข้อมูลในตารางที่ 19 นอกจากนี้ได้นำไปวิเคราะห์โครงสร้างโดยใช้เทคนิค mass spectrometry พบว่า mass spectrum ปรากฏสัญญาณที่ m/z 209.0206 และ 239.0311 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ทำให้ทราบว่า **DF2** และ **DF3** มีสูตรโมเลกุลเป็น $\text{C}_{11}\text{H}_6\text{O}_3$ และ $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{O}_4$ ตามลำดับ

ตารางที่ 19 แสดงข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของ DF2 + DF3 (CDCl_3) โดยค่า J รายงานในหน่วย Hz

position	DF2 + DF3			
	DF2 (major)		DF3 (minor)	
	δ_{H} (ppm) (CDCl_3 , 300 MHz)	δ_{C} (ppm) (CDCl_3 , 75 MHz)	δ_{H} (ppm) (CDCl_3 , 300 MHz)	δ_{C} (ppm) (CDCl_3 , 75 MHz)
2	-	161.1	-	161.2
3	6.38 (1H, d, $J = 9.6$ Hz)	114.6	6.26 (1H, d, $J = 9.8$ Hz)	112.5
4	7.81 (1H, d, $J = 9.6$ Hz)	144.1	8.15 (1H, d, $J = 9.8$ Hz)	139.3
4a	-	115.4	-	106.4
5	7.69 (1H, s)	119.9	-	149.6
6	-	124.9	-	124.9
7	-	156.4	-	158.4
8	7.47 (1H, s)	99.9	7.12 (1H, s)	93.8
8a	-	152.0	-	152.8
2'	7.70 (1H, d, $J = 2.3$ Hz)	146.9	7.59 (1H, d, $J = 2.4$ Hz)	144.8
3'	6.84 (1H, d, $J = 1.5$ Hz)	106.4	7.02 (1H, d, $J = 1.7$ Hz)	105.1
4'	-	-	4.27 (3H, s)	60.1

3.8.1.3 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วน DF-H-39 ถึง DF-H-42 โดยใช้เทคนิค preparative TLC

นำ fraction DF-H-39 ถึง DF-H-42 (108.2 mg, ของเหลวหนืดสีเขียวดำ) ละลายด้วย CH_2Cl_2 และ MeOH และนำมาเคลือบลงบน preparative TLC ขนาด 0.50 มิลลิเมตร จำนวน 2 plate จากนั้นนำไป develop ในแท็งค์ โดยใช้ mobile phase ที่เป็นอัตราส่วน 35% EtOAc ใน hexane สามารถแยกสารได้ทั้งหมด 3 กลุ่ม DF-H-1(39-42) ถึง DF-H-3(39-42) นำ DF-H-3(39-42) มาทำการศึกษาต่อสรุปได้ว่าเป็นสารบริสุทธิ์ DF4 (0.0187 g) โดยนำไปวิเคราะห์โครงสร้างโดยใช้เทคนิค $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, 2D-NMR และ mass spectrometry โดย mass spectrum ปรากฏสัญญาณที่ m/z 425.1211 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ทำให้ทราบว่า DF-H-3(39-42) มีสูตรโมเลกุลเป็น $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_8$ โดยข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ แสดงในตารางที่ 20

ตารางที่ 20 แสดงข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของ DF-H-3(39-42) หรือ DF4 (CDCl_3) โดยค่า J รายงานในหน่วย Hz

position	DF4	
	δ_{H} (ppm) (CDCl_3 , 300 MHz)	δ_{C} (ppm) (CDCl_3 , 75 MHz)
2	-	161.9
3	-	121.4
4	7.99 (1H, s)	136.0
4a	-	106.8
5	-	149.0
6	-	112.9
7	-	157.8
8	7.13 (1H, s)	93.8
8a	-	152.0
2'	7.58 (1H, d, $J = 2.4$ Hz)	144.7
3'	7.00 (1H, dd, $J = 2.3, 0.8$ Hz)	104.9
4'	4.26 (3H, s)	60.2

1''	3.05 (1H, ddd, $J = 14.5, 2.4, 1.5$ Hz)	30.9
	2.70 (1H, dd, $J = 14.4, 10.4$ Hz)	
2''	5.36 (1H, dd, $J = 10.3, 2.4$ Hz)	76.1
3''	-	82.3
4''	1.58 (3H, s)	22.4
5''	1.60 (3H, s)	22.5
6''	2.01 (3H, s)	22.1
7''	1.99 (3H, s)	20.8
8''	-	170.2
9''	-	170.1

3.8.1.4 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วน DF-H-59 ถึง DF-H-60 โดยใช้เทคนิค column chromatography

นำ fraction DF-H-59 ถึง DF-H-60 น้ำหนักรวม 0.1273 g ละลายด้วย CH_2Cl_2 และ MeOH จากนั้นนำมาเคลือบลงบน silica gel 0.3672 g แยกโดยใช้ column ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 เซนติเมตร สูง 50.0 เซนติเมตร จากนั้นใช้ column โดยใช้ mobile phase ที่เป็นอัตราส่วนระหว่าง EtOAc : hexane ในอัตราส่วนต่าง ๆ ดังนี้ 10%, 20%, 30% และ 40% EtOAc สามารถแยกได้ทั้งหมด 7 fractions นำ DF-H-4(59-60) มาทำการศึกษาต่อโดยนำไปวิเคราะห์โครงสร้างโดยใช้เทคนิค $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, 2D-NMR และ mass spectrometry พบว่าเป็น **DF5** (0.0207 g) และ mass spectrum ปรากฏสัญญาณที่ m/z 319.1174 ทำให้ทราบว่า **DF5** มีสูตรโมเลกุลเป็น $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_6$ ตามลำดับ โดยข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ แสดงในตารางที่ 21

ตารางที่ 21 แสดงข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของ DF-H-4(59-60) หรือ DF5 (CDCl_3) โดยค่า J รายงานในหน่วย Hz

	DF5	
	δ_{H} (ppm) (CDCl_3 , 300 MHz)	δ_{C} (ppm) (CDCl_3 , 75 MHz)
2	-	163.5
3	-	122.5
4	8.07 (1H, s)	137.2
4a	-	106.8
5	-	149.0
6	-	112.7
7	-	157.8
8	7.08 (1H, s)	93.4
8a	-	151.8
2'	7.57 (1H, d, $J = 2.4$ Hz)	144.7
3'	7.00 (1H, dd, $J = 3.2, 0.9$ Hz)	105.0
4'	4.25 (3H, s)	60.0
1''	2.86 (1H, dd, $J = 14.2, 1.2$ Hz) 2.55 (1H, dd, $J = 14.2, 10.2$ Hz)	34.0
2''	3.72 (1H, dd, $J = 10.2, 2.0$ Hz)	77.2
3''	-	73.0
4''	1.32 (3H, s)	26.2
5''	1.28 (3H, s)	23.9

3.9 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์

3.9.1 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์จากดอกแคนา (*Dolichandrone serrulata* (DC.) Seem)

การทดสอบการออกฤทธิ์ของ **DSS1** ถึง **DSS 12** ที่ความเข้มข้น 30 μM ต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์ไลน์ HN22, HCT116, HeLa, HaCaT, MDA-MB-231 และ MCF7 ที่ได้รับสารสกัดเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยมีกลุ่ม Positive control คือเซลล์ไลน์ที่เลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีความเข้มข้น 2 μM Doxorubicin เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และมีกลุ่ม Negative control คือเซลล์ไลน์ที่เลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีความเข้มข้น 0.5% DMSO และ 0.5% DMSO+HPBCD เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และวัดค่าการมีชีวิตของเซลล์ (Cell viability) โดยวิธี MTT assay ที่ 570 nM ดังแสดงในตารางที่ 22 จากผลการทดสอบพบว่า **DSS1** ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ไลน์ชนิด HN22, MDA-MB231, MCF-7, HCT116 มีค่าต่ำกว่า 60% และมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ปกติ (HaCaT) สูงกว่าเมื่อเทียบกับ Irinotecan 100 μM และ Doxorubicin 2 μM ส่วนของ **DSS6** พบว่าส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ไลน์ชนิด MDA-MB231 มีค่าต่ำกว่า 60% และมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ปกติ (HaCaT) สูงเมื่อเทียบกับ Doxorubicin 2 μM จากแนวโน้มความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งที่จึ้นำสารบริสุทธิ์ทั้ง 2 ไปศึกษา 50% Inhibitory Concentration (IC_{50}) โดยรายงานค่า IC_{50} ของ **DSS1** ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำคอ (HN22), มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HCT116), มะเร็งเต้านมชนิด MCF7 และชนิด MDA-MB-231 และเซลล์ปกติ (HaCaT) ดังนี้ 26.55, 19.83, 34.06, 24.60 และ 86.61 μM ตามลำดับ และรายงานค่า IC_{50} ของ **DSS6** ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 และเซลล์ปกติ (HaCaT) เท่ากับ 62.55 และ 49.23 μM ตามลำดับ

ตารางที่ 22 แสดงเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ไลน์ชนิดต่าง ๆ (% Cell viability) ต่อ DSS1 ถึง DSS12 ที่ความเข้มข้น 30.00 μM เทียบกับ Irinotecan 100 μM และ Doxorubicin 2 μM รายงานเป็นค่าเฉลี่ย (mean \pm SD, n=3)

compound	Cell Viability (%)					
	HaCaT	HN22	MDA-MB231	MCF-7	Hela	HCT116
DSS1	56.58 \pm 0.52	43.21 \pm 1.66	41.37 \pm 5.12	27.11 \pm 0.81	65.03 \pm 0.83	24.84 \pm 0.73
DSS2						
DSS3						
DSS4						
DSS5						
DSS6		69.90 \pm 3.11	59.62 \pm 1.32			
DSS7						
DSS8						
DSS9						
DSS10						
DSS11			74.99 \pm 0.43			
DSS12			61.33 \pm 1.03			
Irinotecan 100 μM	6.10 \pm 0.38	29.87 \pm 0.06	22.46 \pm 0.41	42.68 \pm 0.96	35.62 \pm 0.67	8.68 \pm 0.31
Doxorubicin 2 μM	2.55 \pm 0.36	15.17 \pm 0.60	54.94 \pm 3.38	29.97 \pm 5.56	31.07 \pm 1.82	4.78 \pm 2.24

หมายเหตุ

	% Cell Viability \leq 60%
	60% \leq % Cell Viability \leq 75%
	% Cell Viability \geq 75%

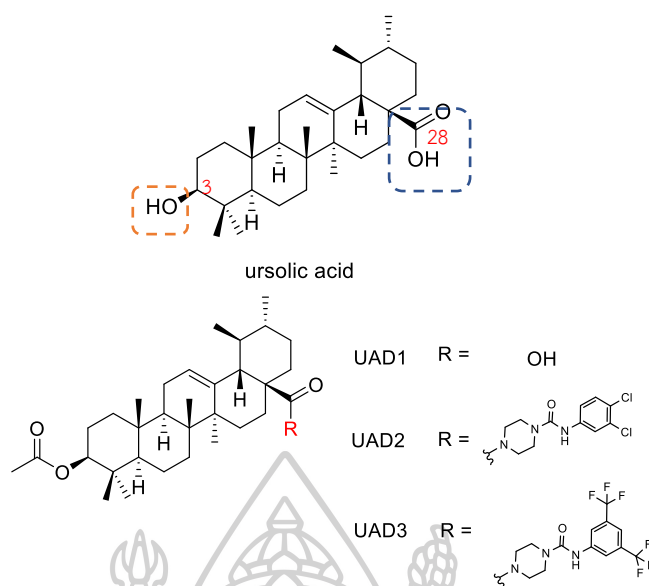
3.9.2 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์จากมะพร้าวทะเลทราย (*Dorstenia foetida* Schweinf.)

การทดสอบการออกฤทธิ์ของ DF1 ถึง DF5 ต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์ไลน์ HN22, HCT116, HT29, MDA-MB-231 และ HaCaT จากการศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารบริสุทธิ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต 50 % ของสิ่งมีชีวิต (IC_{50}) พบว่า DF4 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HCT116) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $126.1 \pm 13.2 \mu\text{M}$

3.10 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ ursolic acid

3.10.1 การออกแบบอนุพันธ์ที่เกี่ยวข้องกับหมู่ piperazine และศึกษา Molecular Docking เพื่อเป็นแนวทางในการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของ ursolic acid

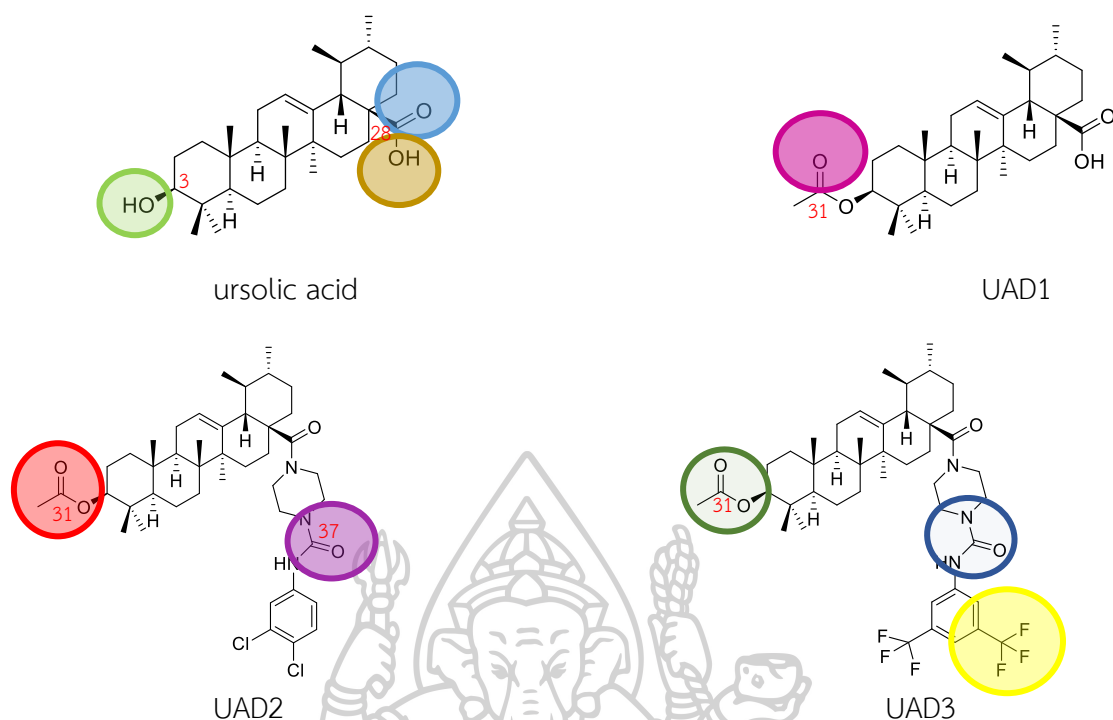
จากรายงานก่อนหน้าพบว่าเมื่อเปลี่ยนหมู่แทนที่ตำแหน่งที่ 3 และ 28 หรือบริเวณหมู่ hydroxy และหมู่ carboxylic ของ ursolic acid สามารถส่งผลต่อการเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยในรายงานของคุณ Haiyan Dong และคณะ^[21] พบว่าเมื่อมีการเปลี่ยนหมู่ hydroxy เป็น acetate และเติมหมู่ piperazine ไปยังตำแหน่ง carboxylic จะส่งผลต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งที่ดีขึ้น และนอกจากนี้ในรายงานของคุณ Shu Li และคณะ^[22] พบว่าเมื่อเติมหมู่แทนที่บน artemisinin เป็น piperazine urea ที่มี fluorine ส่งผลทำให้เพิ่มความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ดังนั้นจึงคาดว่าหากเปลี่ยน hydroxy ตำแหน่งที่ 3 เป็น acetate และเติมหมู่ piperazine urea ที่มี fluorine หรือ chlorine ซึ่งเป็น halogen ที่มีคุณสมบัติเหมือนกันเป็นองค์ประกอบ ดังแสดงในภาพที่ 12 จะสามารถทำให้มีความสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้เทียบเท่าหรือดีกว่า ursolic acid ทั้งนี้ได้ใช้ Molecular Docking ในการอธิบายพลังงานและศึกษาการเข้าจับกันระหว่างโมเลกุลกับบริเวณ active site ของโปรตีน ดังนี้



ภาพที่ 27 แสดงอนุพันธ์ของ ursolic acid ที่ออกแบบเพื่อศึกษาผลของ Molecular Docking

3.10.1.1 การศึกษาทาง molecular docking เพื่อหาคำแหน่งการเข้าจับของระหว่างโมเลกุล ursolic acid UAD1 UAD2 และ UAD3 กับโปรตีน human glucokinase

จากการศึกษาทาง molecular docking โดยใช้ iGEMDOCK v.2.1 software โดยทำการ docking ใน 3 enzymes คือ human glucokinase (PDB ID: 1v4s), complex of wild type B-RAF with SORAFENIB (PDB ID : 1uwh) และ EGFR (PDB ID:1M17) เพื่อใช้ในการทำนายการยับยั้งของโมเลกุลที่ออกแบบการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่สามารถมีส่วนช่วยในการยับยั้งต่อเซลล์มะเร็ง จากภาพที่ 13 แสดงผลของลักษณะของการเข้าจับระหว่างโมเลกุลกับบริเวณ active site ของโปรตีนพบว่าเกิดการสร้างพันธะในบริเวณปากโพรง โดย binding energy ของโมเลกุลทั้ง 4 ชนิด ursolic acid UAD1 UAD2 และ UAD3 มีค่าเท่ากับ -93.87, -90.80, -96.79 และ -91.93 kcal/mol ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า binding energy ของอนุพันธ์ที่ออกแบบนั้นใกล้เคียงกับ ursolic acid จากนั้นนำผลที่ได้จาก Molecular docking นำมาพิจารณาตำแหน่งตำแหน่งในโครงสร้างของโมเลกุลแต่ละชนิดที่เกิดการสร้างพันธะกับโปรตีน human glucokinase ซึ่งคือโปรตีนที่สำคัญในกระบวนการ glucose metabolism ของเซลล์ที่มีรหัสโครงสร้างโปรตีน 1v4s เพื่อหาอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างกรดอะมิโนกับโมเลกุลในบริเวณโพรงดังกล่าว



ภาพที่ 28 แสดงตำแหน่งในโครงสร้างของโมเลกุล ursolic acid UAD1 UAD2 และ UAD3 ที่สร้างพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโนของโปรตีน human glucokinase

ตารางที่ 23 แสดงการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง ursolic acid UAD1 UAD2 และ UAD3 กับโปรตีน 1v4s

โมเลกุล	Binding energy (kcal/mol)	position	amino acid residue	Hydrogenbond length (Å)
ursolic acid	-93.87	O (28)	LYS414	2.35
		OH (28)	SER441	2.49
		OH (3)	GLY80	2.61
UAD1	-90.80	O (31)	LYS414	1.66
UAD2	-96.79	O (31)	ARG333	2.10
		O (37)	SER445	1.77
UAD3	-91.93	O (31)	LYS169	2.41
			GLY229	2.67
		F	SER109	2.83

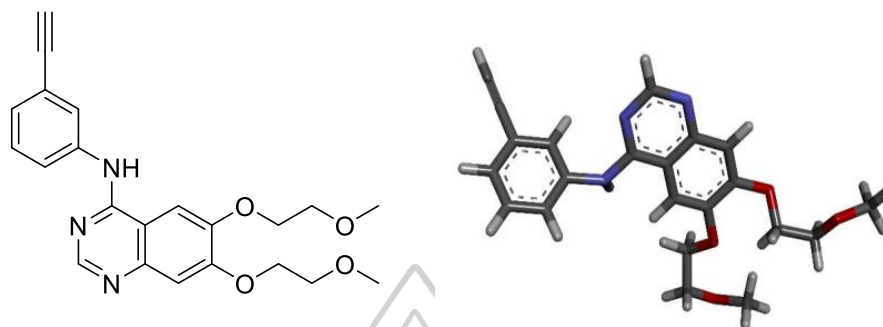
3.10.1.2 การศึกษาทาง molecular docking เพื่อหาตำแหน่งการเข้าจับของระหว่างโมเลกุล ursolic acid UAD1 UAD2 และ UAD3 กับโปรตีน complex of wild type B-RAF with sorafenib (PDB ID: 1uwH)

จากผลการเข้าจับในโพรงโปรตีนพบว่า มีบริเวณส่วนปลายที่เข้าไปในบริเวณปากโพรง โดย binding energy ของสารทั้ง 4 ชนิด ursolic acid UAD1 UAD2 และ UAD3 มีค่าเท่ากับ -104.59, -102.52, -127.51 และ -135.24 kcal/mol ตามลำดับ ต่อจากนั้นนำผลที่ได้จาก Molecular docking มาพิจารณาลักษณะของตำแหน่งในโครงสร้างของโมเลกุลที่เกิดพันธะกับโปรตีน complex of wild type B-RAF with sorafenib ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องในการส่งสัญญาณภายในเซลล์ที่เกิดการกลายพันธุ์มีรหัสโครงสร้างโปรตีน 1uwH เพื่อหาอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างกรดอะมิโนกับโมเลกุลในบริเวณโพรงดังกล่าวการเกิด interaction ระหว่าง UAD2 และ UAD3 กับโปรตีน 1uwH พบการเกิดอันตรกิริยาของพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลที่ออกแบบกับหมู่อะมิโน ดังแสดงในตารางที่ 24 ส่วน ursolic acid กับ UAD1 ไม่มีการเกิดพันธะไฮโดรเจนกับโปรตีน 1uwH แต่เกิดแรงแวนเดอร์วาลส์กับ 1uwH โดยเกิดอันตรกิริยากับกรดอะมิโนที่สำคัญคือ GLU500

ตารางที่ 24 แสดงการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง UAD2 และ UAD3 กับโปรตีน 1uwH

โมเลกุล	Binding energy (kcal/mol)	position	amino acid residue	Hydrogen bond length (Å)
ursolic acid	-104.59	-	-	-
UAD1	-102.52	-	-	-
UAD2	-127.51	O (37)	LYS482	2.49
		NH	GLU500	2.82
UAD3	-135.24	O (28)	ASN499	3.10
		O (37)	LYS482	2.48
		NH	GLU500	2.38

3.10.1.3 การศึกษาทาง molecular docking เพื่อหาดำแหน่งการเข้าจับของระหว่างโมเลกุล ursolic acid UAD1 UAD2 และ UAD3 กับโปรตีน EGFR (PDB ID:1M17)



ภาพที่ 29 แสดงโครงสร้าง 2 มิติและ 3 มิติ ของยา Erlotinib

จากของลักษณะของการเข้าจับระหว่างโมเลกุลกับบริเวณ active site ของโปรตีนพบว่าเกิดการซ้อนทับกันของโมเลกุลทั้ง 4 ชนิด ursolic acid UAD1 UAD2 และ UAD3 กับ Erlotinib ซึ่งเป็นยาที่อยู่ในตำแหน่ง receptor ของโปรตีน EGFR (PDB ID:1M17) ซึ่งเป็น receptor โปรตีนบริเวณผิวของเซลล์ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนเซลล์ซึ่งเกี่ยวข้องโดยตรงกับมะเร็งเต้านมและมะเร็งปอด โดย binding energy ของสารทั้ง 4 ชนิด ursolic acid UAD1 UAD2 และ UAD3 มีค่าเท่ากับ -86.51, -91.47, -92.56 และ -108.91 kcal/mol ตามลำดับและนำผลที่ได้จาก Molecular docking มาพิจารณาลักษณะของตำแหน่งในโครงสร้างของแต่ละโมเลกุลที่เกิดพันธะกับโปรตีน EGFR (PDB ID:1M17) เพื่อหาอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างกรดอะมิโนกับโมเลกุลในบริเวณโพรงดังกล่าว พบการเกิด interaction ระหว่าง UAD1 UAD2 และ UAD3 กับโปรตีน EGFR (PDB ID:1M17) โดยพบการเกิดอันตรกิริยาของพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลที่ออกแบบกับหมู่อะมิโน ดังแสดงในตารางที่ 25 ส่วน ursolic acid ไม่มีการเกิดพันธะไฮโดรเจนกับโปรตีนดังกล่าว

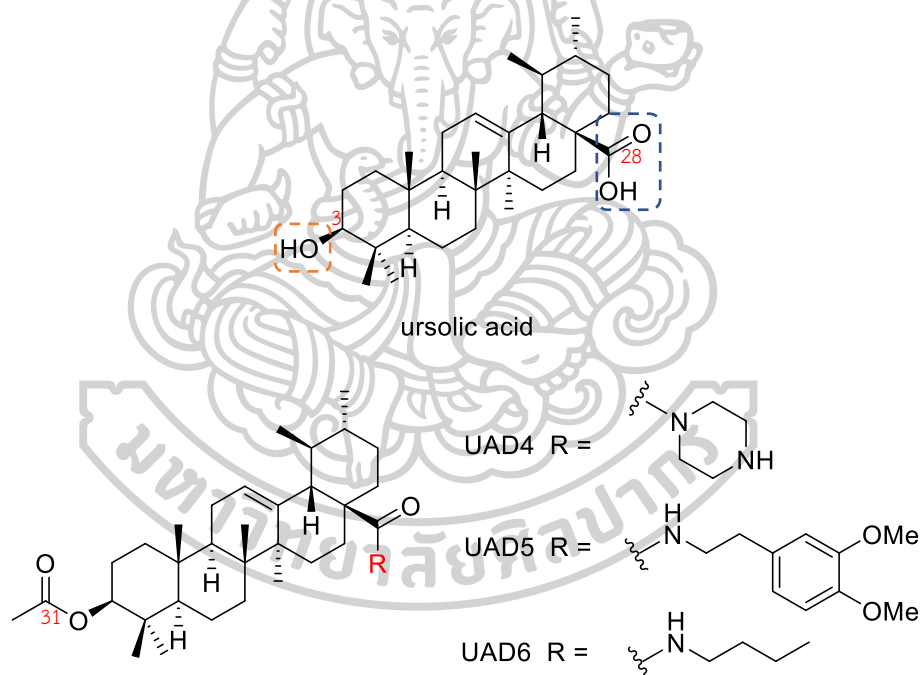
ตารางที่ 25 แสดงการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง ursolic acid UAD2 และ UAD3 กับโปรตีน EGFR (PDB ID:1M17)

โมเลกุล	Binding energy (kcal/mol)	position	amino acid residue	Hydrogen bond length (Å)
ursolic acid	-86.51	-	-	-
UAD1	-91.47	O (31)	THR830	2.77
UAD2	-92.56	O (37)	CYS773	2.12
		H (NH)	HIS781	2.60
UAD3	-108.91	O (37)	CYS773	2.03
		F	HIS781	2.42
		F	PHE771	2.31
Erlotinib	-96.089		LEU694	2.86
			THR766	3.01
			GLN767	1.67
			LEU768	2.66
			MET769	2.61
			GLY772	2.61

จากผลการศึกษาของ Molecular Docking พบว่า Binding energy ของอนุพันธ์ที่ออกแบบนั้นมีแนวโน้มการลดลงกว่า ursolic acid และมีการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลกับ amino acid residue เพิ่มขึ้นในตำแหน่ง acetate และ piperazine urea ของโมเลกุลที่เลียนแบบ นอกจากนี้ยังพบพันธะไฮโดรเจนที่ตำแหน่ง fluorine ที่เป็นหมู่แทนที่บนวง piperazine urea ซึ่งจากแนวโน้มค่า Binding energy ที่ลดลงและการสร้างพันธะไฮโดรเจนที่เพิ่มขึ้นคาดว่าจะทำให้อนุพันธ์ที่ออกแบบนั้นเพิ่มความสามารถในการจับกับโปรตีนได้ดีขึ้นและทำให้สามารถยับยั้งกระบวนการเกิด metabolism ของเซลล์มะเร็ง และนำไปสู่การเกิดการตายของเซลล์มะเร็ง จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของ ursolic acid และการศึกษา Molecular Docking ทำให้อนุพันธ์ ursolic acid ที่ออกแบบนั้นมีความน่าสนใจในการสังเคราะห์ดังนั้นในการวิจัยต่อไปผู้วิจัยสนใจจะทำการศึกษาการสังเคราะห์โมเลกุลที่ออกแบบ

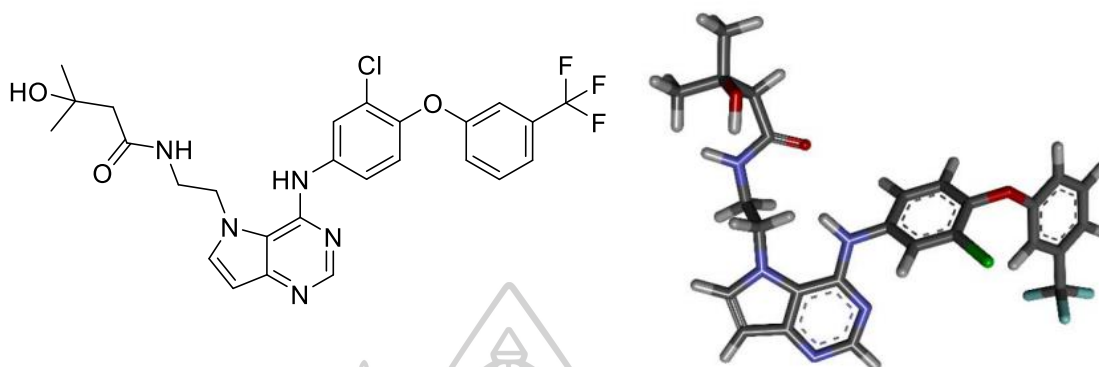
3.10.2 การออกแบบอนุพันธ์ที่เกี่ยวข้องกับหมู่เอมีนชนิดอื่นและศึกษา Molecular Docking เพื่อเป็นแนวทางในการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของ ursolic acid

จากการค้นคว้ารายงานก่อนหน้า^[20] พบว่านอกเหนือจากปรับเปลี่ยนโครงสร้างตำแหน่ง 28 ของ ursolic acid โดยการเติมหมู่ piperazine urea ซึ่งส่งผลทำให้อนุพันธ์มีความสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้เทียบเท่าหรือดีกว่า ursolic acid ยังมีรายงานวิจัย^[7] ในการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ ursolic acid โดยการเติมหมู่เอมีนชนิดอื่นในตำแหน่งที่ 28 และเปลี่ยนหมู่ hydroxy ตำแหน่งที่ 3 เป็น acetate ดังนั้นจึงทำให้ผู้วิจัยเกิดความสนใจและออกแบบโมเลกุลอนุพันธ์ของ ursolic acid โดยใช้เอมีนชนิดอื่น ๆ ที่มีในท้องปฏิบัติการ ทั้งนี้โดยใช้ Molecular Docking ในการอธิบายพลังงานและศึกษาการเข้าจับกันระหว่างโมเลกุลกับบริเวณ active site ของโปรตีน



ภาพที่ 30 แสดงอนุพันธ์ UAD4, UAD5 และ UAD6 ของ ursolic acid ที่ออกแบบเพื่อศึกษาผลของ Molecular Docking

3.10.2.1 การศึกษาทาง molecular docking เพื่อหาดำแหน่งการเข้าจับของระหว่างโมเลกุล ursolic acid UAD4 UAD5 และ UAD6 กับโปรตีน HER2 (PDB ID: 3RCD)



ภาพที่ แสดงโครงสร้าง 2 มิติและ 3 มิติ ของยา TAK-285

จากการศึกษาทาง molecular docking โดยใช้ iGEMDOCK v.2.1 software โดยทำการ docking ในโปรตีนชนิด HER2 (PDB ID: 3RCD) ซึ่งมีหน้าที่กระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง เต้านมเพื่อใช้ในการทำนายความสามารถของโมเลกุลที่ออกแบบการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันในการยับยั้งต่อเซลล์มะเร็ง จากภาพที่ แสดงผลของลักษณะของการเข้าจับระหว่างโมเลกุลกับบริเวณ active site และพบการซ้อนทับกับ TAK-285 ซึ่งเป็นลิแกนด์ที่จำเพาะต่อการยับยั้งการทำงานของโปรตีนชนิดนี้ พบว่าเกิดการสร้างพันธะในบริเวณปากโพรง โดย binding energy ของโมเลกุลทั้ง 4 ชนิด ursolic acid UAD4 UAD5 และ UAD6 มีค่าเท่ากับ -89.10, -102.89, -110.31 และ -102.74 kcal/mol ตามลำดับ จาก binding energy ของอนุพันธ์ที่ออกแบบนั้นต่ำกว่า ursolic acid แสดงให้เห็นว่าอนุพันธ์ที่ออกแบบนั้นมีการเข้าจับกับโปรตีนได้ดีกว่า ต่อจากนั้นนำผลที่ได้จาก Molecular docking นำมาพิจารณาลักษณะตำแหน่งในโครงสร้างของโมเลกุลแต่ละชนิดที่เพื่อหาอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างกรดอะมิโนกับโมเลกุลพบการเกิด interaction ระหว่าง ursolic acid UAD4 UAD5 และ UAD6 กับโปรตีน HER2 (PDB ID: 3RCD) โดยพบการเกิดอันตรกิริยาของพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลที่ออกแบบกับหมู่อะมิโน ดังแสดงในตารางที่ 26

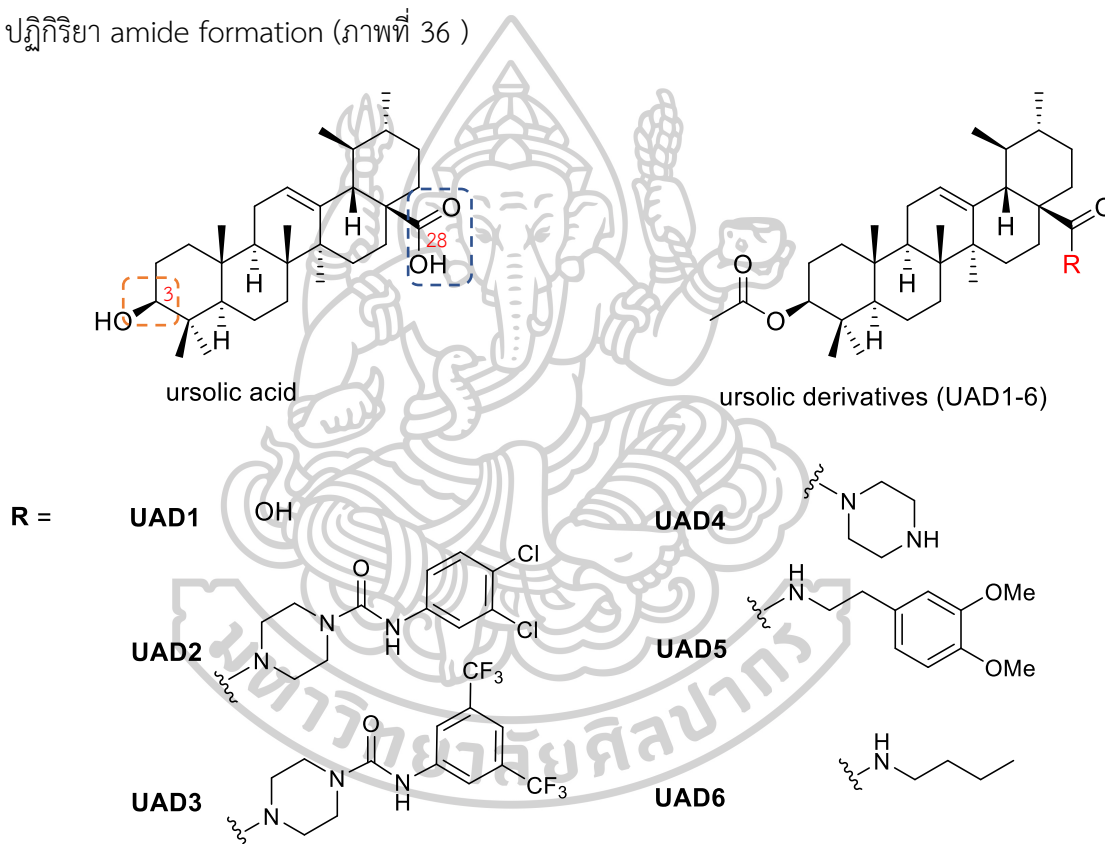
ตารางที่ 26 แสดงการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง ursolic acid UAD4 UAD5 และ UAD6 กับ โปรตีน HER2 (PDB ID: 3RCD)

โมเลกุล	Binding energy (kcal/mol)	position	amino acid residue	Hydrogen bond length (Å)
ursolic acid	-89.10	O (28)	THR862	2.29
		O (28)	ASP863	2.10
UAD4	-102.89	O (31)	ALA730	2.16
		H (NH)	MET80	2.86
UAD5	-110.31	O (31)	ARG849	2.89
UAD6	-102.74	O (31)	ARG849	2.54
		O (31)	ARG849	2.89
TAK-285	-133.75		GLY727	2.88
			SER783	2.92
			MET80	1.83

จากผลการศึกษาของ Molecular Docking พบว่า Binding energy ของอนุพันธ์ที่ออกแบบนั้นต่ำกว่า ursolic acid และมีการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างอนุพันธ์กับ amino acid residue เพิ่มขึ้นในตำแหน่ง acetate ของทุกอนุพันธ์และตำแหน่งเอมีนของ UAD4 ซึ่งจากแนวโน้มค่า Binding energy ที่ลดลงและการสร้างพันธะไฮโดรเจนที่เพิ่มขึ้นคาดว่าจะทำให้อนุพันธ์ที่ออกแบบนั้นมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเพิ่มขึ้น ซึ่งจากการศึกษา Molecular Docking จึงนำไปสู่การสังเคราะห์อนุพันธ์ UAD4 UAD5 และ UAD6

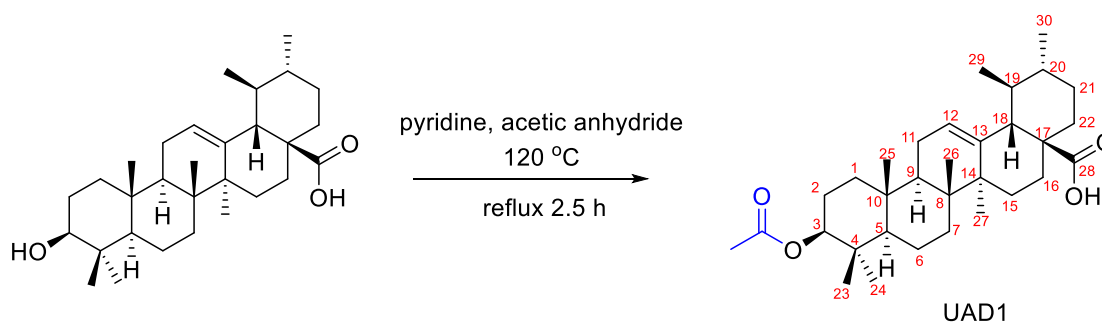
3.10.3 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ ursolic acid (ursolic derivatives)

จากผลการศึกษาของ Molecular Docking ของอนุพันธ์ที่ออกแบบนั้นพบว่ามีความไวต่อความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเพิ่มขึ้นจึงนำมาสู่การสังเคราะห์อนุพันธ์ โดยจะทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ทั้งหมด 6 ชนิด (UAD1 ถึง UAD6) จากผล Molecular Docking พบการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างตำแหน่ง acetate ของทุกอนุพันธ์กับ amino acid residue ที่ active site ดังนั้นจึงเปลี่ยนหมู่ hydroxy ที่ตำแหน่งที่ 3 ของ ursolic acid (1) เป็น acetate ด้วยปฏิกิริยา Acetylation และปรับเปลี่ยน carboxylic ตำแหน่งที่ 28 เป็น amide ชนิดต่าง ๆ ด้วยปฏิกิริยา amide formation (ภาพที่ 36)



ภาพที่ 31 แสดงโครงสร้างของอนุพันธ์ของ ursolic acid UAD1 ถึง UAD6

3.10.3.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ UAD1 ผ่านปฏิกิริยา Acetylation



ภาพที่ 32 แสดงการสังเคราะห์ UAD1 ผ่านปฏิกิริยา Acetylation

นำ ursolic acid (397 mg) เติม pyridine (1 ml, 0.869 mmol, 1.1 eq) และ acetic anhydride (1 ml, 0.869 mmol, 1.1 eq) reflux ที่ 120 องศาเป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที ตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย TLC หลังจากปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ร่อนสารละลายเย็นลงถึงอุณหภูมิห้องหยุดปฏิกิริยาโดย sat. NH_4Cl ปริมาตร 30 ml จากนั้นนำสารละลายมาสกัดด้วย EtOAc 30 ml ทั้งหมด 3 ครั้ง รวมสารละลายชั้น organic phase และสกัดด้วยน้ำ 20 ml ทั้งหมด 2 ครั้ง เก็บสารละลายชั้น organic phase และเติม anhydrous Na_2SO_4 เพื่อกำจัดน้ำ กรองและระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำที่อุณหภูมิประมาณ 45 °C จากนั้นทำการแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ตัวทำละลาย 20% EtOAc ใน hexane เป็น mobile phase จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว UAD1 (368 mg, 85%) จากนั้นนำไปตรวจสอบโครงสร้างโดยใช้เทคนิค $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ และทำการเปรียบเทียบข้อมูลกับ ursolic acetate ที่มีรายงานก่อนหน้า^[23] พบว่าสอดคล้องกัน

ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของ UAD1

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ_{H} (ppm) 5.24 (1H-12, t, $J = 3.3$ Hz), 4.50 (1H-3, t, $J = 8.1$ Hz), 2.18 (H-18, d, $J = 11.2$ Hz), 0.85 (3H-23, s), 0.85 (3H-24, s), 0.95 (3H-25, s), 0.77 (3H-26, s), 1.07 (3H-27, s), 0.77 (3H-29, d, $J = 5.0$ Hz), 0.95 (3H-30, d, $J = 5.5$ Hz) และ 2.05 ($\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$, s)

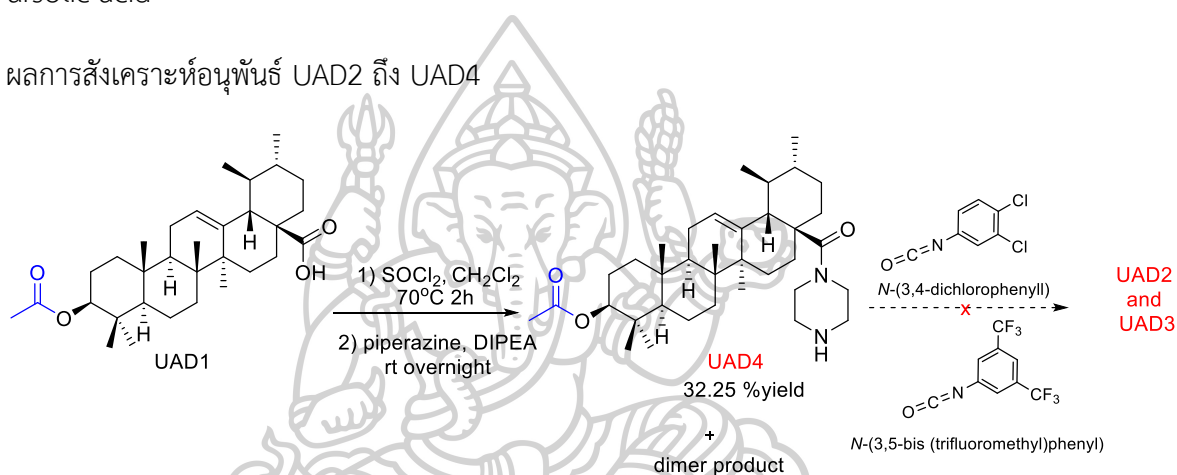
$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ_{C} (ppm) 125.7 (=CH-12), 138.0 (=CH-13), 183.7 (C-28), 171.1 (CH_3CO), 81.0 (C-3), 37.7 (C-4), 36.9 (C-10), 39.5 (C-8), 41.9 (C-14), 48.0 (C-17), 55.3 (C-5), 47.5 (C-9), 52.2 (C-18), 39.0 (C-19), 38.8 (C-20), 38.4 (C-1), 23.6 (C-2), 18.2 (C-6), 32.8 (C-7), 23.3 (C-11), 28.0 (C-15), 24.1 (C-16), 30.6 (C-21), 36.7 (C-22), 16.7 (C-23),

28.1 (C-24), 15.5 (C-25), 17.0 (C-26), 23.6 (C-27), 17.1 (C-29), 21.2 (C-30) และ 21.3 (CH₃CO)

3.10.3.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ UAD2 ถึง UAD6 ผ่านปฏิกิริยา Amide formation

การสังเคราะห์อนุพันธ์ UAD2 ถึง UAD6 ทำได้โดยเปลี่ยน ursolic acetate (UAD1) เป็น ursolic chloride ผ่านปฏิกิริยา Acid chloride formation จากนั้นทำปฏิกิริยาระหว่าง ursolic chloride กับ amide ชนิดต่าง ๆ ด้วยปฏิกิริยา amide formation ทำให้ได้อนุพันธ์เอไมด์ของ ursolic acid

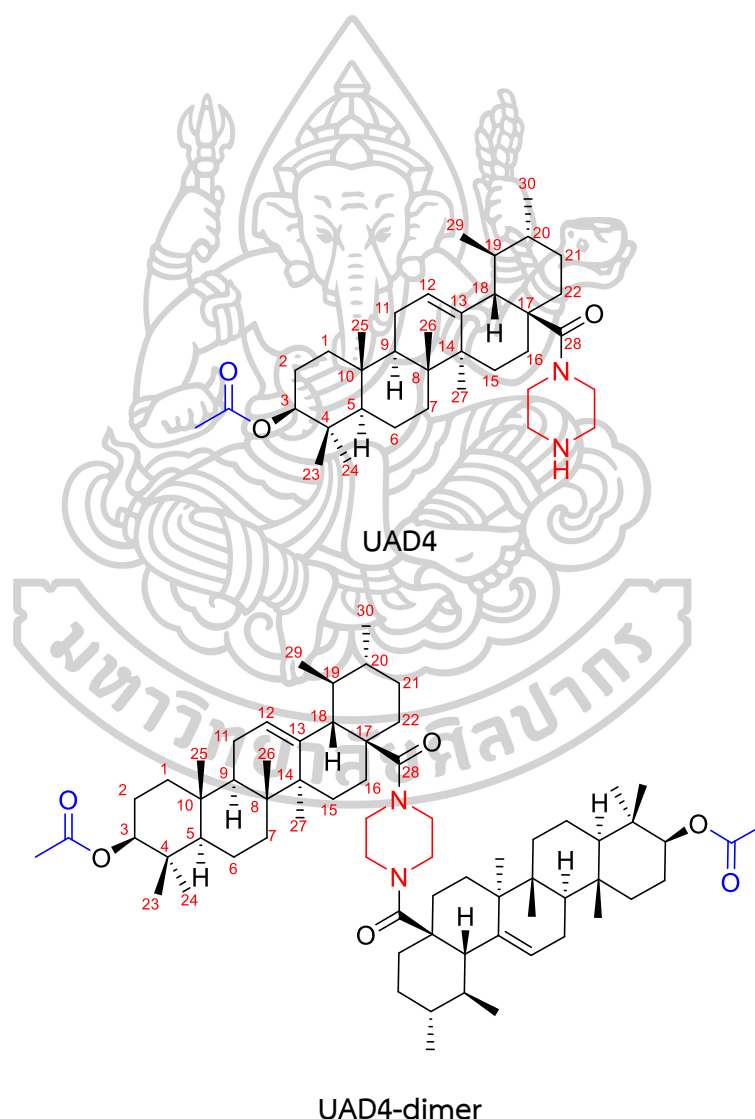
ผลการสังเคราะห์อนุพันธ์ UAD2 ถึง UAD4



ภาพที่ 33 แสดงผลการสังเคราะห์อนุพันธ์ UAD2 ถึง UAD4

นำ ursolic acetate UAD1 (30 mg, 0.06 mmol, 1.00 eq) ละลายใน CH₂Cl₂ (1.0 ml) เติม thionyl chloride (0.06 ml, 0.96 mmol, 16 eq) ทำปฏิกิริยาภายใต้แก๊ส Ar ที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วเช็ค TLC โดยย้อมด้วย 1% Ce(SO₄)₂ เพื่อติดตามปฏิกิริยา เมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ระเหยตัวทำละลายและ HCl ในสารละลายออกภายใต้ความดันต่ำที่อุณหภูมิประมาณ 45 °C จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม จากนั้นละลายผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วย CH₂Cl₂ (1.0 ml) เติม DIPEA (N,N-Diisopropylethylamine) (2.0eq) จากนั้นค่อยๆเติมสารละลาย piperazine (1.1 eq) ใน CH₂Cl₂ (1.0 ml) ที่หยุดและ stir ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบ TLC เพื่อติดตามปฏิกิริยา เมื่อปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม sat. NH₄Cl ปริมาตร 30 ml และนำสารละลายมาสกัดด้วย CH₂Cl₂ (3x20 ml) ล้างด้วยน้ำ (2x20 ml) รวมสารละลายชั้น organic phase และเติม anhydrous Na₂SO₄ เพื่อกำจัดน้ำ กรองและระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำที่อุณหภูมิประมาณ 45 °C

จากนั้นทำการแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค preparative chromatography โดยใช้ตัวทำละลาย 10% EtOAc ใน hexane เป็น mobile phase ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ทั้งหมด 2 ตัวจากนั้นนำไปตรวจสอบโครงสร้างโดยใช้เทคนิค $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ พบว่าเป็น **UAD4** (11 mg, 32.3%) และผลิตภัณฑ์ที่เป็นลักษณะ dimer ursolic piperazine (**UAD4-dimer**) เนื่องจาก ratio ของโปรตอนบนส่วนของ ursolic acetate และ piperazine มีลักษณะเป็น 1 : 4 จึงสรุปได้ว่าเกิด by product คือ dimer ursolic piperazine จากขั้นตอนนี้พบว่าได้ **UAD4** ปริมาณไม่เพียงพอและเกิดปัญหา ursolic acetate เข้าแทนที่บน piperazine ทั้ง 2 ด้านจึงไม่สามารถนำไปสู่การสังเคราะห์ **UAD2** และ **UAD3**



ภาพที่ 34 แสดงโครงสร้างของ UAD4 และ UAD4-dimer

ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของ **UAD4**

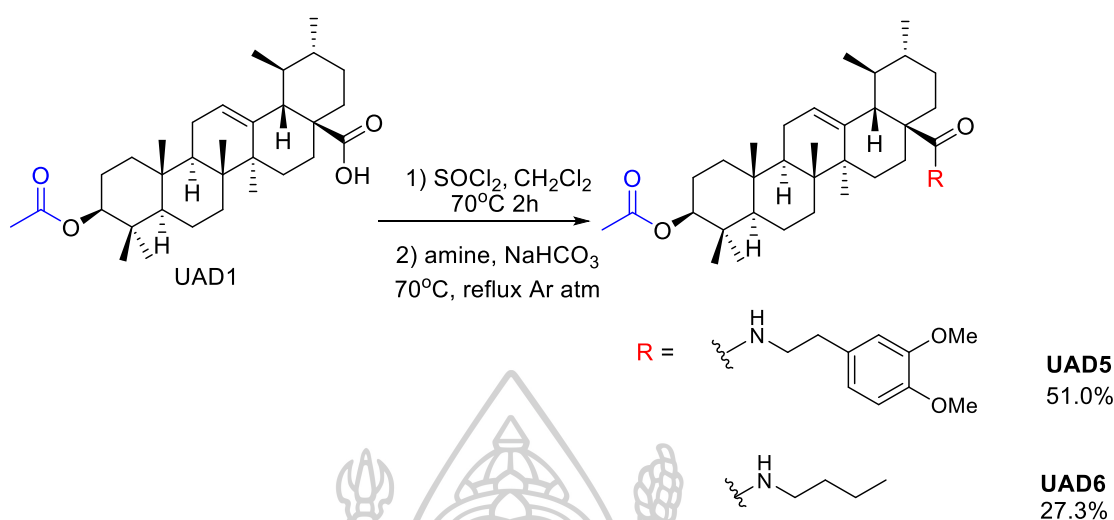
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ_{H} (ppm) 5.22 (1H-12, brs), 4.50 (1H-3, t, $J = 8.1$ Hz), 3.50-3.85 (8H- $\text{CH}_2\text{-N}$, m), 3.0 (1H-NH, brs), 2.03 (H-18, d, $J = 11.6$ Hz), 0.85 (3H-23, d, $J = 3.3$ Hz), 0.85 (3H-24, d, $J = 3.3$ Hz), 0.93 (3H-25, s), 0.77 (3H-26, s), 1.07 (3H-27, s), 0.77 (3H-29, s), 0.95 (3H-30, d, $J = 5.9$ Hz) และ 2.05 ($\text{CH}_3\text{C=O}$, s)

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ_{C} (ppm) 125.4 (=CH-12), 138.4 (=CH-13), 175.6 (C-28), 171.1 (CH_3CO), 81.0 (C-3), 37.7 (C-4), 36.9 (C-10), 39.5 (C-8), 41.8 (C-14), 48.6 (C-17), 55.3 (C-5), 47.5 (C-9), 53.4 (C-18), 39.5 (C-19), 38.7 (C-20), 38.3 (C-1), 23.7 (C-2), 18.2 (C-6), 32.9 (C-7), 23.3 (C-11), 28.0 (C-15), 25.1 (C-16), 30.4 (C-21), 36.9 (C-22), 16.7 (C-23), 28.1 (C-24), 15.5 (C-25), 17.4 (C-26), 23.6 (C-27), 16.9 (C-29), 21.2 (C-30), 21.3 (C-32) 44.3 ($\text{CH}_2\text{-NH}$) และ 55.0 ($\text{CH}_2\text{-N}$)

ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ ของ **UAD4-dimer**

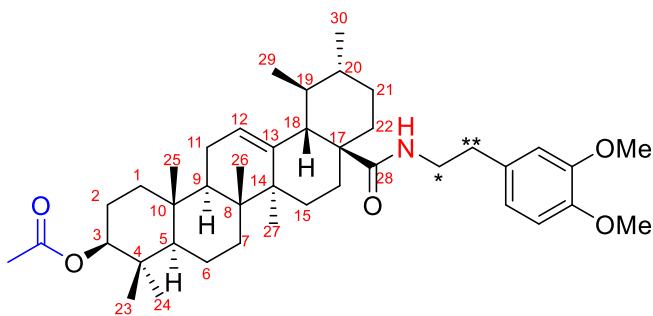
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ_{H} (ppm) 5.22 (2H-12, brs), 4.50 (2H-3, t, $J = 8.1$ Hz), 3.50-3.70 (8H- $\text{CH}_2\text{-N}$, m), 2.05 (2H-18, d, $J = 11.6$ Hz), 0.85 (6H-23, d, $J = 3.3$ Hz), 0.85 (6H-24, d, $J = 3.3$ Hz), 0.93 (6H-25, s), 0.77 (6H-26, s), 1.07 (6H-27, s), 0.77 (6H-29, s), 0.95 (6H-30, d, $J = 5.9$ Hz) และ 2.05 ($2\text{CH}_3\text{C=O}$, s)

ผลการสังเคราะห์อนุพันธ์ UAD5 และ UAD6



ภาพที่ 35 แสดงผลการสังเคราะห์อนุพันธ์ UAD5 และ UAD6

นำ ursolic acetate UAD1 (50 mg, 0.1 mmol, 1.00 eq) ละลายใน CHCl_3 (1.0 ml) เติม thionyl chloride (0.12 ml, 1.61 mmol, 16 eq) โดยทำปฏิกิริยาภายใต้แก๊ส Ar ที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วเช็ค TLC ย้อมด้วย 1% $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ เพื่อตรวจสอบว่าปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์หลังจากนั้นระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำที่อุณหภูมิประมาณ 45 °C จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม จากนั้นเตรียม amine (1.0 eq) ละลายใน CHCl_3 (1.0 ml) ในขวดก้นกลมแบบ 2 คอ จากนั้นเติม NaHCO_3 (0.1 eq) ตามค่อยๆเติมสารละลาย ursolic chloride ใน CHCl_3 (1.0 ml) โดยทำปฏิกิริยาภายใต้แก๊ส Ar โดย reflux ที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นตรวจสอบ TLC เพื่อติดตามการเกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ จากนั้นร่อนสารละลายเย็นลงถึงอุณหภูมิห้องถ่ายใส่กรวยแยกและหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม sat. NH_4Cl ปริมาตร 30 ml นำสารละลายมาสกัดด้วย CH_2Cl_2 (3x20 ml) และล้างด้วยน้ำ (2x20 ml) รวมสารละลายชั้น organic phase นำมาทำการกำจัดน้ำและเกลือด้วย anhydrous Na_2SO_4 กรองและระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำที่อุณหภูมิประมาณ 45 °C จะได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ผ่านกระบวนการใด ๆ จากการทำปฏิกิริยาหลังจากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography ได้เป็น อนุพันธ์ UAD5 และ UAD6

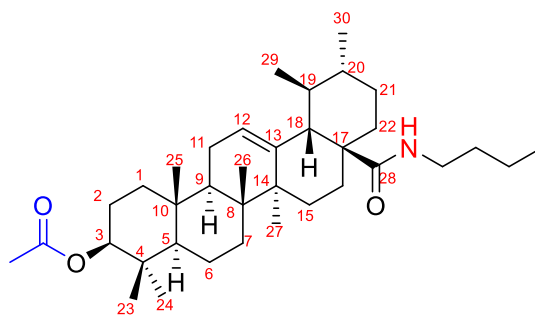


ภาพที่ แสดงโครงสร้างของ UAD5

การสังเคราะห์อนุพันธ์ UAD5 สังเคราะห์จาก amine ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา คือ 2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethan-1-amine (11.3 μL , 0.10 mmol, 1.0 eq) crude product ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography ได้สารประกอบ **UAD5** (32.4 mg, 51%) ที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง และนำไปตรวจสอบโครงสร้างโดยใช้เทคนิค $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ดังแสดง

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ_{H} (ppm) 6.85 (dd, 1H-Ar), 6.75 (m, 2H-Ar), 4.91 (brs, 1H-12), 4.48 (t, $J = 15$ Hz, 1H-3), 3.86 (s, 6H-OMe), 2.84-2.70 (m, 1H), 2.55-2.70 (m, 1H), 2.05 (s, $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 1.03 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.85 (s, 3H), 0.60 (s, 3H)

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ_{C} (ppm) 125.7 (=CH-12), 139.4 (=CH-13), 178.2 (C-28), 171.0 (CH_3CO), 80.9 (C-3), 37.7 (C-4), 36.9 (C-10), 39.7 (C-8), 42.3 (C-14), 47.7 (C-17), 55.1 (C-5), 47.4 (C-9), 53.8 (C-18), 39.5 (C-19), 39.1 (C-20), 38.3 (C-1), 23.2 (C-2), 18.1 (C-6), 32.5 (C-7), 23.2 (C-11), 27.8 (C-15), 23.5 (C-16), 30.8 (C-21), 36.7 (C-22), 16.8 (C-23), 28.0 (C-24), 15.4 (C-25), 17.2 (C-26), 23.2 (C-27), 17.3 (C-29), 21.2 (C-30), 21.3 (CH_2CO), 131.6 (Ar), 120.7 (Ar), 111.7 (Ar), 111.2 (Ar), 149.1 (Ar-OCH₃), 147.8 (Ar-OCH₃), 55.9 (OCH₃), 55.8 (OCH₃), 40.6 (C*) และ 29.7 (C**)



ภาพที่ 36 แสดงโครงสร้างของ UAD6

การสังเคราะห์อนุพันธ์ UAD6 สังเคราะห์จาก amine ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา คือ n-butylamine (9.6 μ L, 0.10 mmol, 1.0 eq) crude product ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column chromatography ได้สารประกอบ UAD6 (13 mg, 27.3%) ที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวและนำไปตรวจสอบโครงสร้างโดยใช้เทคนิค $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ดังแสดง

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ_{H} (ppm) 5.24 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H-12), 4.50 (t, $J = 9.5$ Hz, 1H-3), 4.02-4.14 (m, 3H- $\text{CH}_2\text{-NH}$), 2.05 (s, $\text{CH}_3\text{C=O}$), 1.07 (s, 7H), 0.95 (s, 7H), 0.87 (s, 7H), 0.86 (d, $J = 6.0$ Hz, 12H), 0.85 (s, 5H), 0.76 (s, 3H)

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ_{C} (ppm) 125.4 (=CH-12), 138.2 (=CH-13), 177.5 (C-28), 171.0 (CH_3CO), 81.0 (C-3), 37.7 (C-4), 36.9 (C-10), 39.6 (C-8), 42.1 (C-14), 47.9 (C-17), 55.3 (C-5), 47.5 (C-9), 52.9 (C-18), 39.1 (C-19), 38.9 (C-20), 38.3 (C-1), 23.6 (C-2), 18.2 (C-6), 33.0 (C-7), 23.3 (C-11), 28.0 (C-15), 24.2 (C-16), 30.7 (C-21), 36.7 (C-22), 16.8 (C-23), 28.1 (C-24), 15.5 (C-25), 17.1 (C-26), 23.5 (C-27), 17.1 (C-29), 21.2 (C-30), 21.3 (CH_3CO), 60.0 ($\text{CH}_2\text{-NH}$), 38.9 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 29.7 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$) และ 14.2 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2$)

จากผลการศึกษาของ Molecular Docking ของอนุพันธ์ที่ออกแบบนั้นพบว่ามีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเพิ่มขึ้น ทั้งนี้อนุพันธ์ของ ursolic acid ที่สังเคราะห์ได้ทั้งหมดจะถูกนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ต่อไป

บทที่ 4

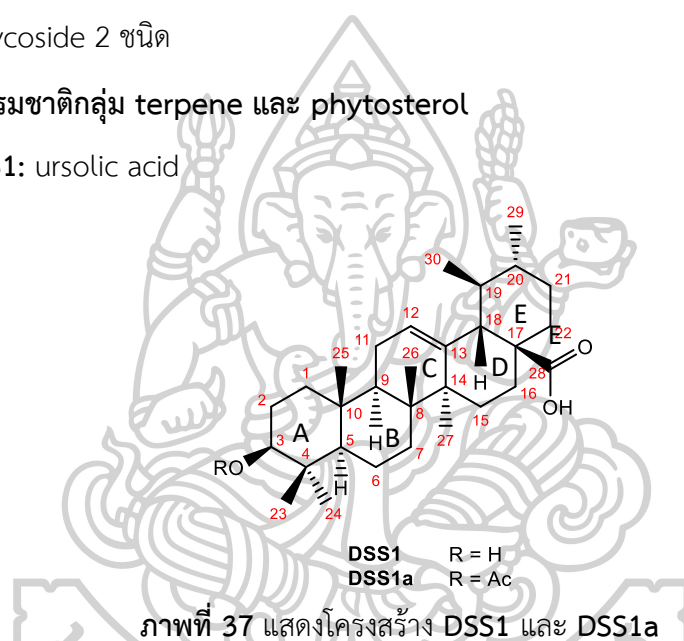
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากดอกแคนา *Dolichandrone serrulata* (DC.) Seem

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากดอกแคนา *Dolichandrone serrulata* (DC.) Seem โดยใช้เทคนิค column chromatography, reverse phase (RP 18) chromatography และ preparative TLC สามารถแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติได้ 4 กลุ่ม ได้แก่ 1) terpene และ phytosterol 4 ชนิด 2) iridoid และ iridoid glucoside 4 ชนิด 3) cycloartane 2 ชนิด และ phenolic glycoside 2 ชนิด

4.1.1 สารธรรมชาติกลุ่ม terpene และ phytosterol

➤ DSS1: ursolic acid



ภาพที่ 37 แสดงโครงสร้าง DSS1 และ DSS1a

DSS1 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว โดย mass spectrum ปรากฏสัญญาณที่ m/z 457.3682 $[M+H]^+$ ทำให้ทราบว่าโมเลกุลเป็น $C_{30}H_{48}O_3$ และมีค่า degree of unsaturation (Ω) เท่ากับ 7 จาก IR spectrum ปรากฏสัญญาณที่ wave number (U_{max}) 3420, 2931, 2871, 2349, 1687, 1463, 1388, 1281, 1033 cm^{-1} แสดงว่ามีหมู่ hydroxyl และ carboxylic ในโครงสร้าง และมีค่า specific rotation $[\alpha]_D^{25} = +37.04^\circ$ (c 0.0009, MeOH) และเนื่องจากความสามารถในการละลายที่ไม่ดีในตัวทำละลาย $CDCl_3$ จึงทำการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมี จากอนุพันธ์ในรูป acetate (DSS1a) ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา acetylation ของ DSS1 จาก ^{13}C NMR, DEPT และ HMQC spectra พบสัญญาณของคาร์บอน 32 ตัว ประกอบไปด้วยสัญญาณของ olefinic carbon 2 ตัว ที่ δ_C 125.7 (C-12) และ δ_C 138.0 (C-13) สัญญาณของ carboxylic acid carbon ที่ δ_C 183.7 (C-28) สัญญาณของ acetate carbon ที่ δ_C 171.1 (CH_3CO) สัญญาณของ oxygenated methine carbon ที่ δ_C 81.0 (C-3) สัญญาณของ quaternary carbon 5 ตัว ที่ δ_C

37.7 (C-4), 36.9 (C-10), 39.5 (C-8), 41.9 (C-14) และ 48.0 (C-17) สัญญาณของ methine carbon 5 ตัว ที่ δ_C 55.3 (C-5), 47.5 (C-9), 52.2 (C-18), 39.0 (C-19) และ 38.8 (C-20) สัญญาณของ methylene carbon 9 ตัว ที่ δ_C 38.4 (C-1), 23.6 (C-2), 18.2 (C-6), 32.8 (C-7), 23.3 (C-11), 28.0 (C-15), 24.1 (C-16), 30.6 (C-21) และ 36.7 (C-22) และสัญญาณของ methyl carbon 8 ตัว ที่ δ_C 16.7 (C-23), 28.1 (C-24), 15.5 (C-25), 17.0 (C-26), 23.6 (C-27), 17.1 (C-29), 21.2 (C-30) และ 21.3 (C-32)

^1H NMR spectrum พบสัญญาณของ olefinic proton ที่ δ_H 5.24 (H-12, t, $J = 3.3$ Hz) สัญญาณของ oxygenated methine proton ที่ δ_H 4.50 (H-3, t, $J = 8.1$ Hz) สัญญาณของ methine proton ที่ δ_H 2.18 (H-18, d, $J = 11.2$ Hz) และสัญญาณของ methyl proton ที่ δ_H 0.85 (H-23, s), 0.87 (H-24, s), 0.95 (H-25, s), 0.77 (H-26, s), 1.07 (H-27, s), 0.86 (H-29, d, $J = 5.0$ Hz), 0.95 (H-30, d, $J = 5.5$ Hz) และนอกจากนี้ยังปรากฏสัญญาณของ methyl proton บนหมู่ acetate 1 หมู่ที่ δ_H 2.05 ($\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$, s) จากข้อมูลดังกล่าวสาร **DSS1a** เป็นสารในกลุ่ม pentacyclic triterpene

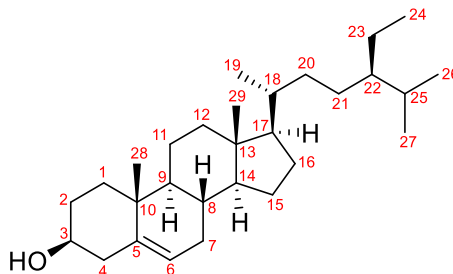
สำหรับ HMBC spectrum พบ correlation ของ H-3 (δ_H 4.50) กับ C-4 (δ_C 37.7), C-5 (δ_C 55.3), C-23 (δ_C 16.7) และ C-24 (δ_C 28.1) correlation ของ H-12 (δ_H 4.50) กับ C-9 (δ_C 47.5), C-13 (δ_C 138.0), C-14 (δ_C 41.9) และ C-18 (δ_C 52.2) correlation ของ H-18 (δ_H 2.18) กับ C-12 (δ_C 125.7) และ C-28 (δ_C 183.7) correlation ของ H-25 (δ_H 0.95) กับ C-1 (δ_C 38.4), C-5 (δ_C 55.3) และ C-9 (δ_C 47.5) correlation ของ H-26 (δ_H 0.77) กับ C-9 (δ_C 47.5) และ C-14 (δ_C 41.9) correlation ของ H-27 (δ_H 1.07) กับ C-8 (δ_C 39.5), C-13 (δ_C 138.0) และ C-15 (δ_C 28.0) correlation ของ H-29 (δ_H 0.86) กับ C-19 (δ_C 39.0) และ C-20 (δ_C 38.8) และ correlation ของ H-30 (δ_H 0.95) กับ C-19 (δ_C 39.0) และ C-20 (δ_C 38.8) ทำให้สามารถยืนยันการเชื่อมต่อกันของวง pentacyclic triterpene ได้ และจากการเปรียบเทียบข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR ระหว่าง **DSS1a** กับ ursolic acid acetate ในตารางที่ 28 พบว่ามีค่าใกล้เคียงกันจึงทำให้สามารถยืนยันและสรุปได้ว่า **DSS1a** มีโครงสร้างเป็น ursolic acid acetate^[23, 24] ดังนั้นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ **DSS1** คือ ursolic acid ซึ่งเป็นรายงานการพบสารชนิดนี้ในแคนาเป็นครั้งแรก

ตารางที่ 27 แสดงข้อมูลการเปรียบเทียบค่า chemical shift (δ) จาก $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของ ursolic acid acetate และ DSS1a

position	ursolic acid acetate ^[23]		DSS1a	
	δ_{H} (ppm) (CDCl_3 , 270 MHz)	δ_{C} (ppm) (CDCl_3 , 67.5 MHz)	δ_{H} (ppm) (CDCl_3 , 300 MHz)	δ_{C} (ppm) (CDCl_3 , 75 MHz)
1	1.03–1.19 (m) 1.46–1.58 (m)	38.3	1.60-1.70 (m)	38.3
2	1.60–1.73 (m) 1.83–1.92 (m)	23.6	1.00-1.18 (m)	23.6
3	4.50 (1H, dd, $J = 9.8, 6.3$ Hz)	80.9	4.50 (1H, t, $J = 8.1$ Hz)	81.0
4	-	37.7	-	37.7
5	0.82–0.91 (m)	55.2	0.85 (1H, d $J = 5.13$ Hz)	55.3
6	1.25–1.39 (m) 1.46–1.58 (m)	18.2	1.31-1.41 (m) 1.48-1.58 (m)	18.2
7	1.25–1.39 (m) 1.46–1.58 (m)	32.8	1.27-1.36 (m) 1.45-1.53 (m)	32.8
8	-	39.5	-	39.5
9	1.46–1.58 (m)	47.5	1.47-1.59 (m)	47.5
10	-	36.9	-	36.9
11	1.60–1.73 (m) 1.83–1.92 (m)	23.3	1.02-1.12 (m) 0.88-0.94 (m)	23.3
12	5.24 (1H, t, $J = 3.5$ Hz)	125.7	5.24 (1H, t, $J = 3.3$ Hz)	125.7
13	-	138.0	-	138.0
14	-	41.9	-	41.9
15	1.03–1.19 (m) 1.83–1.92 (m)	28.0	0.80-0.94 (m) 1.05-1.14 (m)	28.0

16	1.83–1.92 (m) 2.01 (1H, dt, $J = 13.5,$ 13.5, 4.0 Hz)	24.1	1.58-1.69 (m) 2.01 (1H, dd, $J = 4.1,$ 13.4 Hz)	24.1
17	-	48.0	--	48.0
18	2.18 (1H, d, $J = 11.2$ Hz)	52.5	2.18 (1H, d, $J = 11.2$ Hz)	52.2
19	1.25–1.39 (m)	39.0	1.59-1.69 (m)	39.0
20	1.25–1.39 (m)	38.8	1.59-1.69 (m)	38.8
21	1.25–1.39 (m) 1.46–1.58 (m)	30.6	1.23–1.39 (m)	30.6
22	1.60–1.73 (m)	36.7	1.69–1.73 (m)	36.7
23	0.85 s	28.1	0.85 (3H, s)	16.7
24	0.87 s	16.7	0.87 (3H, s)	28.1
25	0.96 s	15.5	0.95 (3H, s)	15.5
26	0.77 s	17.0	0.77 (3H, s)	17.0
27	1.07 s	23.6	1.07 (3H, s)	23.6
28	-	183.5	-	183.7
29	0.86 (1H, d, $J = 5.6$ Hz)	17.1	0.86 (1H, d, $J = 5.0$ Hz)	17.1
30	0.95 (1H, d, $J = 6.3$ Hz)	21.2	0.95 (1H, d, $J = 5.5$ Hz)	21.2
C=O	-	171.1	-	171.1
<u>CH</u> ₃ CO	2.05 s	21.3	2.05 (3H, s)	21.3

➤ DSS11: β -sitosterol



ภาพที่ 4.1 แสดงโครงสร้างของ DSS11

DSS11 มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว ปรากฏสัญญาณที่ m/z 429.3738 $[M+H]^+$ มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{29}H_{50}O$ มีค่า degree of unsaturation (Ω) เท่ากับ 5 จาก IR spectrum ปรากฏสัญญาณที่ wave number (U_{max}) 3416, 2932, 2851, 1464, 1376, 1051, 1021 cm^{-1} ทำให้ทราบว่า มีหมู่ hydroxyl ในโครงสร้าง และมีค่า specific rotation $[\alpha]_D^{25} = -11.47^\circ$ (c 0.0017, MeOH) และจาก ^{13}C NMR, และ 1H NMR พบสัญญาณของคาร์บอน 29 ตัว ประกอบด้วยสัญญาณของ olefinic carbon 2 ตัว ที่ δ_c 140.8 (C-5), และ 121.7 (C-6) สัญญาณของ oxygenated methine carbon ที่ δ_c 71.8 (C-3) สัญญาณของ quaternary carbon 2 ตัว ที่ δ_c 36.5 (C-10) และ 42.3 (C-13) สัญญาณของ methine carbon 7 ตัว ที่ δ_c 31.9 (C-8), 50.1 (C-9), 56.8 (C-14), 56.1 (C-17), 11.9 (C-18), 33.9 (C-22) และ 29.1 (C-25) สัญญาณของ methylene carbon 11 ตัว ที่ δ_c 37.3 (C-1), 31.6 (C-2), 42.3 (C-4), 31.9 (C-7), 21.1 (C-11), 39.8 (C-12), 24.3 (C-15), 28.3 (C-16), 36.2 (C-20), 18.8 (C-21) และ 26.1 (C-23) และสัญญาณของ methyl carbon 6 ตัว ที่ δ_c 19.4 (C-19), 45.8 (C-24), 19.8 (C-26), 19.0 (C-27), 23.1 (C-28) และ 12.0 (C-29)

จาก 1H NMR spectrum พบสัญญาณของ olefinic proton ที่ δ_H 5.31 (H-6, d, $J = 5.2$ Hz) สัญญาณของ oxygenated methine proton ที่ δ_H 3.49 (H-3, m) สัญญาณของ methine proton ที่ δ_H 0.68 (H-18, s) สัญญาณของ methylene proton ที่ δ_H 0.92 (H-21, d, $J = 6.5$ Hz) และสัญญาณของ methyl proton ที่ δ_H 1.01 (H-19, s), 0.82 (H-26, s), 0.80 (H-27, s), และ 0.85 (H-29, s) จากการเปรียบเทียบข้อมูล 1H และ ^{13}C NMR ระหว่าง DSS11 กับสารในกลุ่ม phytosterol คือ β -sitosterol ในตารางที่ 29 พบว่ามีค่าใกล้เคียงกันจึงทำให้สามารถยืนยันและสรุปได้ว่า DSS11 มีโครงสร้างเป็น β -sitosterol^[25, 26]

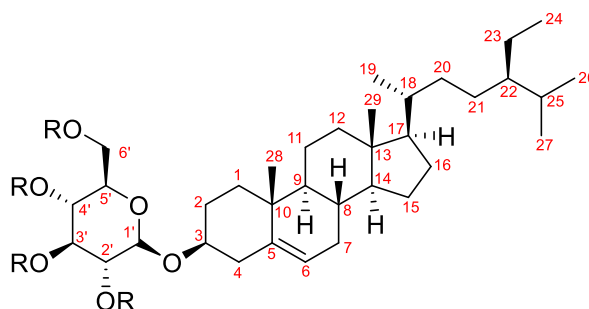
ตารางที่ 28 แสดงข้อมูลการเปรียบเทียบค่า chemical shift (δ) จาก $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของ β -sitosterol และ DSS11

position	β -sitosterol ^[25]		DSS11	
	δ_{H} (ppm) (CDCl_3 , 300 MHz)	δ_{C} (ppm) (CDCl_3 , 75 MHz)	δ_{H} (ppm) (CDCl_3 , 300 MHz)	δ_{C} (ppm) (CDCl_3 , 75 MHz)
1	1.47 (2H)	37.3	1.42-1.59 (2H, m)	37.3
2	1.56 (2H)	31.7	1.42-1.59 (2H, m)	31.6
3	3.52 (1H)	71.8	3.52 (1H, m)	71.8
4	2.28 (2H)	42.3	2.18-2.33 (2H, m)	42.3
5	-	140.7	-	140.8
6	5.36 (1H)	121.7	5.35 (1H, d, $J = 5.2$ Hz)	121.7
7	2.03 (2H)	31.7	1.94-2.04 (2H, m)	31.9
8	1.67 (1H)	31.9	1.60-1.70 (1H, m)	31.9
9	1.48 (1H)	50.2	1.42-1.59 (1H, m)	50.1
10	-	36.5	-	36.5
11	1.52 (2H)	21.1	1.42-1.59 (2H, m)	21.1
12	1.49 (2H)	39.8	1.42-1.59 (2H, m)	39.8
13	-	42.3	-	42.3
14	1.50 (1H)	56.8	1.42-1.59 (1H, m)	56.8
15	1.60 (2H)	24.4	1.60-1.70 (2H, m)	24.3
16	1.84 (2H)	28.3	1.80-1.87 (2H, m)	28.3
17	1.49 (1H)	56.1	1.42-1.59 (1H, m)	56.1
18	0.68 (1H)	11.9	0.68 (1H, s)	11.9
19	1.02 (3H)	19.4	1.01 (3H, s)	19.4
20	1.64 (2H)	36.5	1.60-1.70 (2H, m)	36.2
21	0.94 (2H)	18.8	0.92 (2H, d, $J = 6.5$ Hz)	18.8
22	0.88 (1H)	34.0	1.03-1.22 (1H, m)	33.9

23	1.04 (2H)	26.1	1.03-1.22 (2H, m)	26.1
24	1.50 (3H)	45.9	1.42-1.59 (3H, m)	45.8
25	1.65 (1H)	28.9	1.60-1.70 (1H, m)	29.1
26	0.83 (3H)	19.8	0.83 (3H, d, $J = 6.5$ Hz)	19.8
27	0.85 (3H)	18.8	0.81 (3H, d, $J = 6.6$ Hz)	19.0
28	1.04 (3H)	23.1	1.03-1.22 (3H, m)	23.1
29	0.88 (3H)	12.0	0.85 (3H, t, $J = 7.1$ Hz)	12.0



➤ **DSS12:** β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside



DSS12 R = H

DSS12a R = Ac

ภาพที่ 38 แสดงโครงสร้าง **DSS12** และ **DSS12a**

DSS12 มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว ปรากฏสัญญาณที่ m/z 599.4284 $[M+Na]^+$ มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{35}H_{60}O_6$ มีค่า degree of unsaturation (Ω) เท่ากับ 6 จาก IR spectrum ปรากฏสัญญาณที่ wave number (U_{max}) 3378, 2932, 2867, 1462, 1366, 1165, 1052, 1069 cm^{-1} แสดงว่ามีหมู่ hydroxyl ในโครงสร้างและมีค่า specific rotation $[\alpha]_D^{25} = +17.31^\circ$ (c 0.0017, MeOH) เนื่องจากปัญหาในการละลายของ **DSS12** ที่ละลายได้ยากใน $CDCl_3$ และ MeOH จึงนำ **DSS12** มาทำปฏิกิริยา acetylation โดยเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันจาก hydroxyl เป็น acetate (**DSS12a**) และตรวจสอบโครงสร้างของ **DSS12a** ด้วยเทคนิค 1D และ 2D NMR จากข้อมูล ^{13}C , dept135 และ HMQC NMR spectra พบสัญญาณของคาร์บอน 35 ตัว ประกอบด้วยสัญญาณของ olefinic carbon 2 ตัว ที่ δ_c 140.4 (C-5), และ 122.2 (C-6) สัญญาณของ oxygenated methine carbon ที่ δ_c 80.1 (C-3) สัญญาณของ quaternary carbon 2 ตัว ที่ δ_c 36.7 (C-10) และ 42.3 (C-13) สัญญาณของ methine carbon 7 ตัว ที่ δ_c 31.9 (C-8), 50.2 (C-9), 56.8 (C-14), 56.1 (C-17), 11.9 (C-18), 34.0 (C-22) และ 29.2 (C-25) สัญญาณของ methylene carbon 11 ตัว ที่ δ_c 37.2 (C-1), 30.0 (C-2), 42.3 (C-4), 31.9 (C-7), 21.1 (C-11), 39.8 (C-12), 24.3 (C-15), 28.3 (C-16), 36.1 (C-20), 18.8 (C-21) และ 26.1 (C-23) สัญญาณของ methyl carbon 6 ตัว ที่ δ_c 19.4 (C-19), 45.9 (C-24), 19.8 (C-26), 19.0 (C-27), 23.1 (C-28) และ 12.0 (C-29) พบสัญญาณของหมู่ acetate 4 หมู่ ประกอบไปด้วยสัญญาณของ carbonyl carbon 4 ตัวที่ δ_c 169.3, 169.4, 170.4 และ 170.7 และสัญญาณของ methyl carbon 4 ตัวที่ 20.6 (2 x CH_3), 20.7 และ 20.8 และพบ

สัญญาณของคาร์บอนบนวงน้ำตาลที่ δ_c 99.7 (C-1'), 71.5 (C-2'), 71.7 (C-3'), 72.9 (C-4'), 68.6 (C-5') และ 62.1 (C-6')

จาก ^1H NMR spectrum พบสัญญาณของ olefinic proton บนวงที่ δ_H 5.35 (H-6, d, $J = 5.0$ Hz) สัญญาณของ oxygenated methine proton ที่ δ_H 3.50 (H-3, quintet, $J = 5.5$ Hz) สัญญาณของ methine proton ที่ δ_H 0.68 (H-18, s) สัญญาณของ methylene proton ที่ δ_H 0.92 (H-21, d, $J = 6.5$ Hz) สัญญาณของ methyl proton ที่ δ_H 1.01 (H-19, s), 0.83 (H-26, d, $J = 6.5$ Hz), 0.81 (H-27, d, $J = 6.6$ Hz) และ 0.85 (H-29, s) สัญญาณ methyl proton ของหมู่ acetate ที่ δ_H 2.00 (s), 2.02 (s), 2.05 (s) และ 2.08 (s) และสัญญาณของโปรตอนบนวงน้ำตาลที่ δ_H 4.59 (H-1', d, $J = 8.0$ Hz), 4.95 (H-2', t, $J = 9.8$ Hz), 3.68 (H-3', m), 5.21 (H-4', t, $J = 9.8$ Hz), 5.08 (H-5', t, $J = 9.8$ Hz), 4.11 (H-6'a, dd, $J = 12.2, 2.4$ Hz) และ 4.25 (H-6'b, dd, $J = 12.3, 4.8$ Hz) แสดงว่ามีน้ำตาล glucose อยู่ในโครงสร้าง จากการเปรียบเทียบข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR ระหว่าง DSS11 กับ DSS12 พบว่ามีค่าใกล้เคียงกันยกเว้นตำแหน่งที่ 3 จึงทำให้สามารถยืนยันได้ว่า DSS12 มีส่วนของ aglycone ที่เป็น β -sitosterol

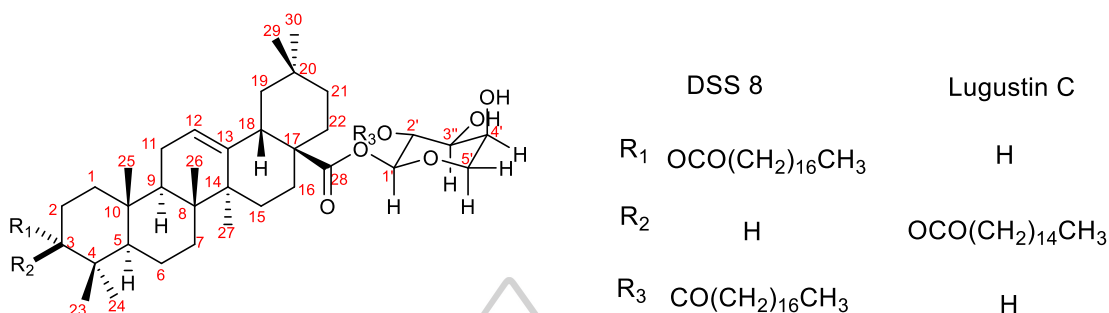
จาก HMBC NMR พบ correlation ของ H-3 (δ_H 3.50) กับ C-1' (δ_c 99.7) จึงทำให้ทราบว่าชิ้นส่วนน้ำตาล glucose ต่ออยู่กับ oxygen ที่ตำแหน่ง C-3 และจากค่า coupling constant ของ H-3 มีค่าเท่ากับ 5.5 Hz ทำให้ทราบว่าโปรตอนอยู่ในตำแหน่ง alpha และน้ำตาลต่ออยู่ในลักษณะ beta และจากการเปรียบเทียบค่า chemical shift ของ ^1H และ ^{13}C NMR กับ β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside ในตารางที่ 30 พบว่าเหมือนกันดังนั้น DSS12 คือ β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside^[27]

ตารางที่ 29 แสดงข้อมูลการเปรียบเทียบค่า chemical shift (δ) จาก $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของ β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside^[27] และ DSS12a

position	β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside ^[27]		DSD12a	
	δ_{H} (ppm) (CDCl_3 , 300 MHz)	δ_{C} (ppm) (CDCl_3 , 75 MHz)	δ_{H} (ppm) (CDCl_3 , 300 MHz)	δ_{C} (ppm) (CDCl_3 , 75 MHz)
1	-	37.5	1.42-1.59 (2H, m)	37.2
2	-	30.3	1.42-1.59 (2H, m)	30.0
3	3.99 (1H, m)	78.2	3.50 (1H, quintet, $J = 5.5$ Hz)	80.1
4	-	39.4	2.18-2.33 (2H, m)	39.9
5	-	140.9	-	140.4
6	5.36 (1H, m)	122.0	5.35 (1H, d, $J = 5.0$ Hz)	122.2
7	-	32.2	1.94-2.04 (2H, m)	31.9
8	-	32.1	1.60-1.70 (1H, m)	31.9
9	-	50.3	1.42-1.59 (1H, m)	50.2
10	-	37.0	-	36.7
11	-	21.3	1.42-1.59 (2H, m)	21.1
12	-	39.9	1.42-1.59 (2H, m)	39.8
13	-	42.5	-	42.3
14	-	56.9	1.42-1.59 (1H, m)	56.8
15	-	24.5	1.60-1.70 (2H, m)	24.3
16	-	28.6	1.80-1.87 (2H, m)	28.3
17	-	56.3	1.42-1.59 (1H, m)	56.1
18	0.67 (1H, s)	12.0	0.68 (1H, s)	11.9

19	0.95 (3H, s)	19.3	1.01 (3H, s)	19.4
20	-	36.4	1.60-1.70 (2H, m)	36.1
21	1.00 (2H, d, $J = 6.5$ Hz)	19.0	0.92 (2H, d, $J = 6.5$ Hz)	18.8
22	-	34.3	1.03-1.22 (1H, m)	34.0
23	-	26.4	1.03-1.22 (2H, m)	26.1
24	-	46.0	1.42-1.59 (3H, m)	45.9
25	-	29.5	1.60-1.70 (1H, m)	29.2
26	0.87 (3H, s)	19.5	0.83 (3H, d, $J = 6.5$ Hz)	19.8
27	0.88 (3H, s)	20.0	0.81 (3H, d, $J = 6.6$ Hz)	19.0
28	1.04 (3H)	23.4	1.03-1.22 (3H, m)	23.1
29	0.97 (3H, t, $J = 7.1$ Hz)	12.2	0.85 (3H, s)	12.0
1'	5.07 (1H, d $J = 7.7$ Hz)	102.6	4.59 (1H, d $J = 8.0$ Hz)	99.7
2'	4.08 (1H, brt, $J = 8.1$ Hz)	75.4	4.95 (1H, t, $J = 9.8$ Hz)	71.5
3'	4.31 (1H, m)	78.7	3.68 (1H, m)	71.7
4'	4.31 (1H, m)	71.8	5.21 (1H, t, $J = 9.8$ Hz)	72.9
5'	3.99 (1H, m)	78,6	5.08 (1H, t, $J = 9.8$ Hz)	68.6
6'	4.58 (1H, dd, $J = 11.7,$ 2.4 Hz)	62.9	4.11 (1H, dd, $J = 12.2, 2.4$ Hz) 4.25 (1H, dd, $J = 12.3, 4.8$ Hz)	62.1
<u>CH₃CO</u>				169.3,1 69.4,17 0.4, 170.7
<u>CH₃CO</u>			2.00 (3H, s)	20.6
			2.02 (3H, s)	20.6
			2.05 (3H, s)	20.7
			2.08 (3H, s)	20.8

➤ **DSS8: 2-O-stearoyl-1-O-(3-O-stearoyl olenoyl)- α -L-arabinopyranose**



ภาพที่ 39 แสดงโครงสร้าง DSS8 และ Lugustin C

DSS8 มีลักษณะเป็น oil สีเหลืองอ่อนโดย mass spectrum ปรากฏสัญญาณที่ m/z 1138.9562 $[M+NH_4]^+$ มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{71}H_{124}O_9$ และมีค่า degree of unsaturation (Ω) เท่ากับ 10 ปรากฏสัญญาณการดูดกลืนรังสี Infrared ที่ wave number (U_{max}) 3456, 2923, 2853, 1734, 1463, 1378, 1248, 1170, 1033 cm^{-1} แสดงว่ามีหมู่ hydroxyl และ carbonyl อยู่ในโครงสร้างและมีค่า specific rotation $[\alpha]_D^{25} = +120.86^\circ$ (c 0.0017, MeOH) จาก ^{13}C NMR, DEPT และ HMQC spectra พบสัญญาณของคาร์บอนที่สำคัญดังนี้ สัญญาณของ olefinic carbon 2 ตัว ที่ δ_C 122.8 (C-12) และ δ_C 143.1 (C-13) สัญญาณของ carbonyl carbon ที่ δ_C 175.8 (C-28), 173.4 (C=O), 173.6 (C=O) สัญญาณของ oxygenated methine carbon ที่ δ_C 78.0 (C-3) สัญญาณของ quaternary carbon 5 ตัว ที่ δ_C 36.5 (C-4), 37.0 (C-10), 39.5 (C-8), 41.5 (C-14) และ 46.9 (C-17) สัญญาณของ methine carbon 5 ตัว ที่ δ_C 50.3 (C-5), 47.5 (C-9), 41.1 (C-18), 45.9 (C-19) และ 30.6 (C-20) สัญญาณของ methylene carbon ที่ δ_C 33.6 (C-1), 25.2 (C-2), 18.1 (C-6), 32.8 (C-7), 22.7 (C-11), 27.8 (C-15), 23.3 (C-16), 33.8 (C-21) และ 31.9 (C-22) และสัญญาณของ methyl carbon ที่ δ_C 27.9 (C-23), 21.9 (C-24), 15.4 (C-25), 17.0 (C-26), 25.8 (C-27), 33.0 (C-29), 23.5 (C-30) และ 14.1 (CH_2CH_3) นอกจากนี้พบ methylene carbon ที่เหลือจำนวนมาก 34.9, 34.2, 31.9, 29.7, 29.67, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 29.18, 24.8 และ 22.9 ซึ่งทำให้ทราบว่า มี fatty acid side chain เป็นองค์ประกอบ และยังพบสัญญาณ

ของ anomeric carbon ที่ δ_C 91.8 (C-1') และตำแหน่งของน้ำตาลที่เหลือที่ δ_C 71.4 (C-2'), 71.5 (C-3'), 67.6 (C-4') และ 65.4 (C-5') ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า **DSS8** มีโครงสร้างประกอบไปด้วย triterpene, fatty acid และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว

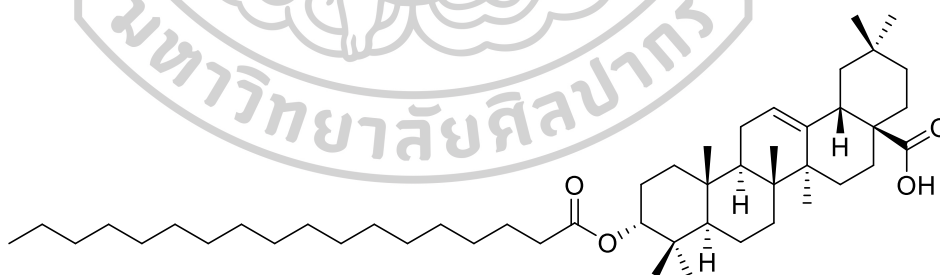
จาก ^1H NMR spectrum พบสัญญาณของ olefinic proton บนวง ที่ δ_H 5.33 (H-12, brs) สัญญาณของ oxygenated methine proton ที่ δ_H 4.63 (H-3, brs) สัญญาณของ methine proton ที่ δ_H 2.85 (H-18, dd, $J = 13.8, 3.7$ Hz) และสัญญาณของ methyl proton 7 หมู่ที่ δ_H 0.85 (H-23, s), 0.89 (H-24, s), 0.94 (H-25, s), 0.77 (H-26, s), 1.18 (H-27, s), 0.90 (H-29, s) และ 0.90 (H-30, s) และจากข้อมูล HMBC NMR พบ correlation ของ H-3 (δ_H 4.63) กับ C-2 (δ_C 25.2) และ C-4 (δ_C 36.5) correlation ของ H-12 (δ_H 5.33) กับ C-9 (δ_C 47.5), C-11 (δ_C 22.7) และ C-14 (δ_C 41.8) correlation ของ H-18 (δ_H 2.85) กับ C-13 (δ_C 143.1), C-14 (δ_C 41.8), C-17 (δ_C 46.9), C-19 (δ_C 45.9) และ C-28 (δ_C 175.8) correlation ของ H-23 (δ_H 0.85) กับ C-3 (δ_C 78.0) และ C-5 (δ_C 50.3) correlation ของ H-25 (δ_H 0.94) กับ C-1 (δ_C 33.6), C-5 (δ_C 50.3) และ C-9 (δ_C 47.5) correlation ของ H-27 (δ_H 1.18) กับ C-9 (δ_C 39.5), C-13 (δ_C 143.1), C-14 (δ_C 41.8) และ C-15 (δ_C 27.8) แสดงว่าโครงสร้าง aglycone ของ **DSS8** คือ oleanane triterpene

จากข้อมูล ^1H และ COSY NMR spectra พบสัญญาณโปรตอนบนวงน้ำตาลที่ δ_H 5.55 (H-1', d, $J = 6.9$ Hz), 5.07 (H-2', t, $J = 7.8$ Hz), 3.79 (H-3', dd, $J = 8.2, 3.3$ Hz), 3.97 (H-4', m), 4.02 (H-5'a, d, $J = 3.6$ Hz), 3.65 (H-5'b, d, $J = 11.0$ Hz) และพบ correlation ของ H-2' (δ_H 5.07) กับ H-3' (δ_H 3.79) correlation ของ H-3' (δ_H 3.79) กับ H-4' (δ_H 3.97) correlation ของ H-4' (δ_H 3.97) กับ H-5'a (δ_H 4.02) และ H-5'b (δ_H 3.65) จาก correlation ภายในวงน้ำตาล และค่า coupling constant ของ H-3' กับ H-4' เท่ากับ 3.3 Hz ทำให้ทราบว่าโปรตอนทั้งสองจัดอยู่ในลักษณะ *cis* จึงสามารถระบุชนิดน้ำตาลได้ว่าน้ำตาลดังกล่าวคือ arabinose และจาก HMBC NMR spectra พบ correlation ของ H-1' (δ_H 5.55) กับ carbonyl (C-28) จึงสรุปได้ว่า arabinose ต่ออยู่กับ C-28 ของ oleanane triterpene

จากข้อมูล HMBC NMR spectra พบ correlation ของ H-3 (δ_H 4.63) กับ carbonyl (δ_C 173.4) และพบ correlation ของ H-2' (δ_H 5.07) กับ carbonyl (δ_C 173.6) แสดงให้เห็นว่า fatty acid ต่ออยู่บน C-3 ของ oleanane triterpene และ C-2' ของ arabinose

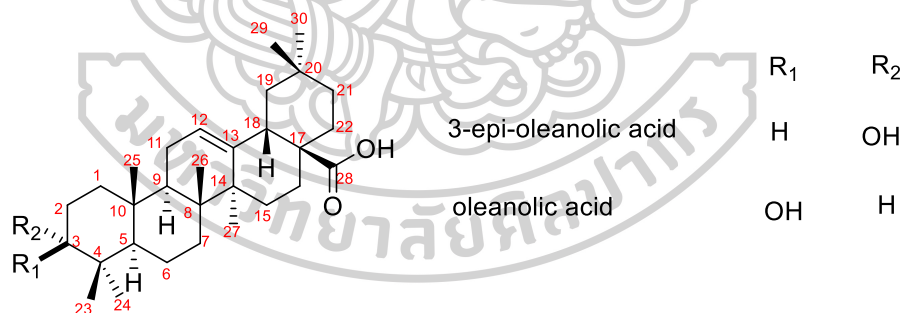
เมื่อเปรียบเทียบข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR กับ Lugustin C^[28] ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกันพบว่า ค่า chemical shift ใกล้เคียงกันมากแต่ chemical shift ของทั้งโปรตอนและคาร์บอน ในส่วนของวง A นั้นแตกต่างกับ Lugustin C^[28] คาดว่าตำแหน่งที่ 3 มี stereochemistry ที่ต่างกันจึงทำปฏิกิริยา hydrolysis ของ DSS8 เพื่อพิสูจน์ชิ้นส่วน aglycone นี้รวมถึงยืนยันชนิดของน้ำตาล

จากผลการทดลองการทำปฏิกิริยา acid hydrolysis ของ DSS8 กับ 1M hydrochloric acid เมื่อตรวจสอบชิ้นน้ำด้วยเทคนิค TLC พบว่ามีองค์ประกอบตรงกับน้ำตาลชนิด arabinose และนำไปทดสอบ optical ration พบว่ามีค่า specific rotation $[\alpha]_D^{25} = +56.57^\circ$ (c 0.0012, H₂O) จึงยืนยันได้ว่าโครงสร้างมีน้ำตาลชนิด L-arabinose เป็นองค์ประกอบ และนำชิ้น ethyl acetate ไปตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิค ^1H -NMR และ ^{13}C -NMR ทำให้ทราบว่าองค์ประกอบในชิ้น ethyl acetate คือ DSS8a ซึ่งเป็นส่วนของส่วนของ oleanane triterpene ที่ต่อกับ fatty acid เนื่องจาก ^1H และ ^{13}C NMR ยังคงปรากฏสัญญาณของส่วน fatty acid คือ δ_{H} (ppm) 2.33 (CH₂- α , m) และ δ_{C} (ppm) 173.4 (CO) และ 14.1 (CH₃-CH₂) นอกจากนี้พบสัญญาณของ carboxylic acid ที่ δ_{C} 183.1 ppm จึงยืนยันได้ว่าหมู่น้ำตาลถูกตัดอย่างสมบูรณ์แต่ยังมีพันธะ ester ของ fatty acid ตำแหน่งที่ 3 เหลืออยู่ จึงนำ DSS8a ไปทำปฏิกิริยา basic hydrolysis ต่อเพื่อพิสูจน์โครงสร้าง aglycone



ภาพที่ 40 แสดงโครงสร้างของ DSS8a จากการทำปฏิกิริยา Acid hydrolysis

จากผลการทดลองการทำปฏิกิริยา basic hydrolysis ของ **DSS8a** กับ 10% potassium hydroxide ได้ **DSS8b** พบว่าเมื่อเปรียบเทียบข้อมูลจากค่า chemical shift ตำแหน่งที่สำคัญของ **DSS8b** กับ oleanolic acid^[29] และ 3-epi-oleanolic acid^[30] ดังตารางที่ 30 และ 31 พบว่าค่า chemical shift ¹H-NMR และ ¹³C-NMR ของ **DSS8b** ใกล้เคียงกับ 3-epi-oleanolic acid จากค่า δ_{H} (ppm) 3.41 (H-3, brs) แสดงลักษณะของ H-3 ที่จัดอยู่ในตำแหน่ง beta hydrogen ดังนั้นเมื่อเกิดการ coupling กับ H-2 จะส่งผลให้ค่า coupling constant น้อยมากประมาณ 0-3 Hz ดังนั้นพีคของ ¹H-NMR ที่ตำแหน่งนี้จึงมีลักษณะเป็น broad singlet ขณะเดียวกันหาก H-3 จัดอยู่ในตำแหน่ง alpha hydrogen จะส่งผลให้สร้างมุม 180 องศาเป็นลักษณะ *trans* กับ H-2 หรือเรียกว่า dihedral angle เมื่อเกิดการ coupling กับ H-2 จะส่งผลให้ H-3 มีค่า coupling constant ที่ใหญ่ประมาณ 8-15 Hz และจะเห็นพีคเป็นลักษณะ doublet of doublet นอกจากนี้พบว่าค่า δ_{H} 3.41 (1H-3, brs) และ δ_{C} 76.2 (C-3) ของ **DSS8b** ตรงกับ ค่า δ_{C} (ppm) 76.2 (C-3) ของ 3-epi-oleanolic acid และตำแหน่งอื่น ๆ ในวง A ใกล้เคียงกับ 3-epi-oleanolic acid จึงสรุปได้ว่าโครงสร้างส่วน triterpene ของ **DSS8** คือ 3-epi-oleanolic acid



ภาพที่ 41 แสดงโครงสร้างของ 3-epi-oleanolic acid และ oleanolic acid

ตารางที่ 30 แสดงข้อมูลการเปรียบเทียบค่า proton chemical shift (δ_H) ตำแหน่งที่สำคัญของ DSS8b กับ oleanolic acid และ 3-epi-oleanolic acid

Position	oleanolic acid ^[29]	3-epi-oleanolic acid ^[30]	DSS8b
	δ_H (ppm) (CDCl ₃ , 75 MHz)	δ_H (ppm) (CDCl ₃ , 75.5 MHz)	δ_H (ppm) (CDCl ₃ , 300 MHz)
3	3.20 (1H, dd, $J = 12.0$, 4.3 Hz)	3.38 (1H, t, $J = 2.5$ Hz)	3.41 (1H, brs)
12	5.30 (1H, t, $J = 3.6$ Hz),	5.25 (1H, t, $J = 3.4$ Hz)	5.30 (1H, brs)
18	2.83 (1H, dd, $J = 13.9$, 4.1 Hz)	2.78 (1H-18, br.dd)	2.85 (1H, dd, $J =$ 13.8, 3.7 Hz)
23	0.99 (3H, s)	0.80 (3H, s)	0.85 (3H, s)
24	0.74 (3H, s)	0.88 (3H, s)	0.89 (3H, s)
25	0.91 (3H, s)	0.92 (3H, s)	0.94 (3H, s)
26	0.77 (3H, s)	0.72 (3H, s)	0.77 (3H, s)
27	1.14 (3H, s)	1.11 (3H, s)	1.18 (3H, s)
29	0.90 (3H, s)	0.90 (3H, s)	0.90 (3H, s)
30	0.93 (3H, s)	0.90 (3H, s)	0.90 (3H, s)

ตารางที่ 31 แสดงข้อมูลการเปรียบเทียบค่า carbon chemical shift (δ_c) ของ DSS8b กับ oleanolic acid และ 3-epi-oleanolic acid

Position	oleanolic acid ^[29]	3-epi-oleanolic acid ^[30]	DSS8b
	δ_c (ppm) (CDCl ₃ , 75 MHz)	δ_c (ppm) (CDCl ₃ , 75.5 MHz)	δ_c (ppm) (CDCl ₃ , 75 MHz)
1	38.4	32.5	33.6
2	27.2	25.2	25.2
3	79.0	76.2	76.2
4	38.8	37.3	36.5
5	55.3	49.0	50.3
6	18.3	18.2	18.1
7	32.7	32.5	32.8
8	39.3	39.5	39.5
9	47.7	47.4	47.5
10	37.2	37.2	37.0
11	23.4	22.9	22.7
12	122.7	122.7	122.8
13	143.5	143.6	143.1
14	41.7	41.7	41.8
15	27.7	27.6	27.8
16	23.0	23.3	23.3
17	46.3	46.5	46.9
18	41.2	40.9	41.1
19	45.9	45.9	45.9
20	30.7	30.7	30.6
21	33.8	33.8	33.8
22	32.4	32.9	31.9

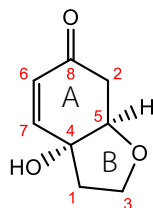
23	28.1	28.3	27.9
24	15.5	22.3	21.9
25	15.3	15.1	15.4
26	16.9	17.2	17.0
27	25.9	26.1	25.8
28	180.3	183.3	183.1
29	33.1	33.1	33.0
30	23.5	23.6	23.5

จากการทดสอบ HR-APCI-MS พบสัญญาณที่ m/z 1138.9562 $[M + NH_4]^+$ ซึ่งเป็นสัญญาณของ compound 8 สัญญาณที่ m/z 723.6265 เป็นสัญญาณของ compound 8-1 และสัญญาณที่ m/z 439.3586 เป็นสัญญาณของ compound 8-2 ดังนั้นเมื่อนำมาคำนวณหาความยาวของ fatty acid จะได้ fatty acid ที่มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{18}H_{36}O_2$ ซึ่งคือ stearic acid

ดังนั้นจากข้อมูลการวิเคราะห์หาโครงสร้างทั้งหมดจึงสรุปได้ว่า compound 8 คือ 2-O-stearoyl-1-O-(3-O-stearoyl otenoyl)- α -L-arabinopyranose (DSS8) โดยเป็นการรายงานครั้งแรกของสารประกอบใหม่ที่พบในธรรมชาติ

4.1.3 สารธรรมชาติในกลุ่ม iridoid

➤ DSS2: (-)-rengyolone



ภาพที่ 42 แสดงโครงสร้างของ DSS2

DSS2 มีลักษณะเป็น oil หนืดสีเหลืองเข้ม โดย mass spectrum ปรากฏสัญญาณที่ m/z 177.0521 $[M+Na]^+$ ทำให้ทราบว่าโมเลกุลเป็น $C_8H_{10}O_3$ และมีค่า degree of unsaturation (Ω) เท่ากับ 4 ปรากฏสัญญาณการดูดกลืนรังสี Infrared ที่ wave number (U_{max}) 3376, 2889, 1668, 1387, 1268, 1190, 1098, 1062, 1016 cm^{-1} แสดงว่ามีหมู่ hydroxyl และหมู่ carbonyl ในโครงสร้าง และมีค่า specific rotation $[\alpha]_D^{25} = -23.81^\circ$ (c 0.0017, MeOH) จาก ^{13}C NMR, DEPT และ HMQC spectra พบสัญญาณของคาร์บอน 8 ตัว ประกอบไปด้วยสัญญาณของ olefinic carbon 2 ตัว ที่ δ_C 128.6 (C-6) และ δ_C 148.4 (C-7) สัญญาณของ carbonyl carbon ที่ δ_C 197.3 (C-8) สัญญาณของ oxygenated quaternary carbon ที่ δ_C 75.4 (C-4) สัญญาณของ oxygenated methylene carbon ที่ δ_C 66.3 (C-3) สัญญาณของ oxygenated methine carbon ที่ δ_C 81.5 (C-5) และสัญญาณของ methylene carbon 2 ตัว ที่ δ_C 40.1 (C-2) และ 39.5 (C-1)

จาก 1H NMR spectrum พบสัญญาณของ olefinic proton บนวง cyclohexene ที่ δ_H 6.02 (H-6, d, $J = 10.1$ Hz) และ 6.76 (H-7, dd, $J = 10.2, 1.4$ Hz) สัญญาณของ oxygenated methylene proton ที่ δ_H 3.94 (H-3a, ddd, $J = 15.1, 8.6, 2.1$ Hz) และ 4.07 (H-3b, ddd, $J = 14.8, 8.3, 2.0$ Hz) สัญญาณของ oxygenated methine proton ที่ δ_H 4.24 (H-5, td, $J = 5.9, 1.4$ Hz) และสัญญาณของ methylene proton ที่ δ_H 2.27 (H-1, m), 2.60 (H-2a, dd, $J = 16.9, 5.7$ Hz), 2.78 (H-2b, dd, $J = 16.9, 4.7$ Hz) จากข้อมูลดังกล่าวทำให้ทราบว่าสารดังกล่าวมีโครงสร้างเป็นสารในกลุ่ม iridoid

สำหรับ HMBC spectrum พบ correlation ของ C-4 (δ_C 75.4) กับ H-1 (δ_H 2.27), H-2a (δ_H 2.60), H-2b (δ_H 2.78), H-3a (δ_H 3.94), H-3b (δ_H 4.07) และ H-5 (δ_H 4.24) correlation ของ C-5 (δ_C 81.5) กับ H-1 (δ_H 2.27), H-2a (δ_H 2.60), H-2b (δ_H 2.78), H-3a

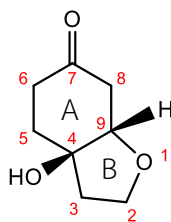
(δ_{H} 3.94) และ H-3b (δ_{H} 4.07) ซึ่งแสดงถึงการเชื่อมต่อของวง cyclohexene (A) และวง tetrahydrofuran (B) ที่ตำแหน่ง C-4 และ C-5 นอกจากนี้พบ correlation ภายในวง B ดังนี้ correlation ของ C-1 (δ_{C} 39.5) กับ H-3a (δ_{H} 3.94), H-3b (δ_{H} 4.07), H-5 (δ_{H} 4.24) และ H-7 (δ_{H} 6.76) correlation ของ C-3 (δ_{C} 66.3) กับ H-1 (δ_{H} 2.27) และ H-5 (δ_{H} 4.24) และ correlation ภายในวง A ดังนี้ correlation ของ C-2 (δ_{C} 40.1) กับ H-6 (δ_{H} 6.02) correlation ของ C-8 (δ_{C} 197.3) กับ H-2a (δ_{H} 2.60), H-2b (δ_{H} 2.78), H-5 (δ_{H} 4.24), H-6 (δ_{H} 6.02) และ H-7 (δ_{H} 6.76) correlation ของ C-6 (δ_{C} 128.6) กับ H-2a (δ_{H} 2.60), H-2b (δ_{H} 2.78) และ H-5 (δ_{H} 4.24) และ correlation ของ C-7 (δ_{C} 148.4) กับ H-1 (δ_{H} 2.27) และ H-5 (δ_{H} 4.24) จากการเปรียบเทียบข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR ระหว่าง DSS2 กับ renyolone ^[31, 32] ในตารางที่ 32 พบว่ามีค่าใกล้เคียงกันจึงทำให้สามารถยืนยันและสรุปได้ว่า DSS2 มีโครงสร้างเป็น (-)-renyolone ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการรายงานการพบ renyolone ในดอกแคนามาก่อนในปี 2015 ^[11]



ตารางที่ 32 แสดงข้อมูลการเปรียบเทียบค่า chemical shift (δ) จาก $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของ renyolone และ DSS2

position	renyolone ^[31, 32]		DSS2	
	δ_{H} (ppm) (CDCl_3)	δ_{C} (ppm) (CDCl_3 , 25.2 MHz)	δ_{H} (ppm) (CDCl_3 , 300 MHz)	δ_{C} (ppm) (CDCl_3 , 75 MHz)
1	2.30 (2H, t(br), $J = 7.0$ Hz)	39.2	2.27 (2H, m)	39.5
2	2.70 (2H, m, $J_{\text{gem}} = 16$ Hz and $J_{2-3} = 4$ Hz,	39.7	2.60 (1H, dd, $J = 16.9$, 5.7 Hz) 2.78 (1H, dd, $J = 16.9$, 4.7 Hz)	40.1
3	3.96 (2H, t(br)	65.9	3.94 (1H, ddd, $J = 15.1$, 8.6, 2.1 Hz) 4.07 (1H, ddd, $J = 14.8$, 8.3, 2.0 Hz)	66.3
4	-	74.7	-	75.4
5	4.28 (1H, dt, $J = 1.5$ Hz	80.8	4.24 (1H, td, $J = 5.9$, 1.4 Hz)	81.5
6	6.02 (1H, d, $J = 10$ Hz)	127.6	6.02 (1H, d, $J = 10.1$ Hz)	128.6
7	6.86 (1H, dd)	149.2	6.76 (1H, dd, $J = 10.2$, 1.4 Hz)	148.4
8	-	197.7	-	197.3

➤ DSS3: cleroidicin C



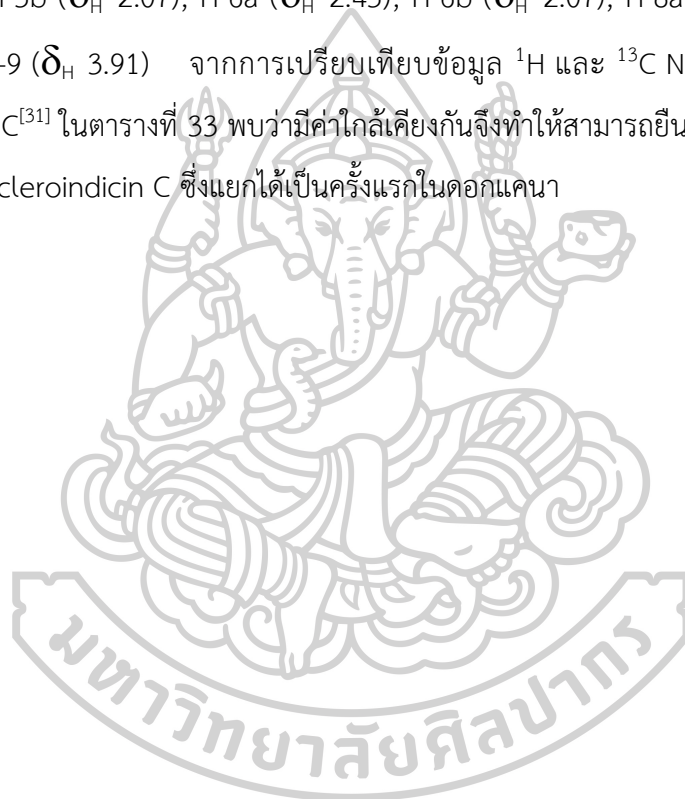
ภาพที่ 43 แสดงโครงสร้างของ DSS3

DSS3 มีลักษณะเป็น oil หนืดใส โดย mass spectrum ปรากฏสัญญาณที่ m/z 157.0867 $[M+H]^+$ ทำให้ทราบว่าโมเลกุลเป็น $C_8H_{12}O_3$ และมีค่า degree of unsaturation (Ω) เท่ากับ 3 ปรากฏสัญญาณการดูดกลืนรังสี Infrared ที่ wave number (U_{max}) 3414, 2949, 2885, 1714, 1377, 1244, 1113, 1063, 994 cm^{-1} พบว่ามีหมู่ hydroxyl และหมู่ carbonyl ในโครงสร้าง และมีค่า specific rotation $[\alpha]_D^{25} = -55.30^\circ$ (c 0.0015, MeOH) จาก ^{13}C NMR, DEPT และ HMQC spectra พบสัญญาณของคาร์บอน 8 ตัว ประกอบไปด้วยสัญญาณของ carbonyl carbon ที่ δ_C 213.0 (C-7) สัญญาณของ oxygenated quaternary carbon ที่ δ_C 78.0 (C-4) สัญญาณของ oxygenated methylene carbon ที่ δ_C 67.1 (C-2) สัญญาณของ oxygenated methine carbon ที่ δ_C 85.0 (C-9) และสัญญาณของ methylene carbon 4 ตัว ที่ δ_C 41.1 (C-3), 34.2 (C-5), 36.1 (C-6) และ 43.3 (C-8)

จาก 1H NMR spectrum พบสัญญาณของ oxygenated methylene proton ที่ δ_H 3.82 (H-2, m) สัญญาณของ oxygenated methine proton ที่ δ_H 3.91 (H-9, m) และสัญญาณของ methylene proton ที่ δ_H 2.07 (H-3, m), 2.45 (H-6a, ddd, $J = 10.5, 7.4, 1.4$ Hz), 2.07 (H-6b, m), 2.75 (H-8a, dd, $J = 16.0, 4.6$ Hz), 2.50 (H-8b, dd, $J = 4.2, 0.8$ Hz), 2.40 (H-5a, d, $J = 6.3$) และ 2.07 (H-5b, m) จากข้อมูลข้างต้นจะพบว่าสารดังกล่าวอยู่ในกลุ่ม iridoid และมีโครงสร้างใกล้เคียงกับ renygolone ต่างกันตรงที่ DSS3 ไม่มีพันธะคู่ในโครงสร้าง

สำหรับ HMBC spectrum พบ correlation ของ C-4 (δ_C 78.0) กับ H-2 (δ_H 3.82), H-3 (δ_H 2.07), H-5a (δ_H 2.40), H-5b (δ_H 2.07), H-6a (δ_H 2.45) และ H-6b (δ_H 2.07) correlation ของ C-9 (δ_C 85.0) กับ H-3 (δ_H 2.07), H-5a (δ_H 2.40), H-5b (δ_H 2.07), H-8a (δ_H

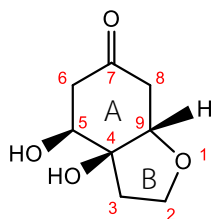
2.75) และ H-8b (δ_H 2.50) ซึ่งแสดงถึงการเชื่อมต่อกันของวง cyclohexane (A) และวง tetrahydrofuran (B) ที่ตำแหน่ง C-4 และ C-9 นอกจากนี้พบ correlation ภายในวง B ดังนี้ correlation ของ C-3 (δ_C 41.1) กับ H-2 (δ_H 3.82), H-5a (δ_H 2.40), H-5b (δ_H 2.07) และ H-9 (δ_H 3.91) correlation ของ C-2 (δ_C 67.1) กับ H-3 (δ_H 2.07) และพบ correlation ภายในวง A ดังนี้ correlation ของ C-6 (δ_C 36.1) กับ H-5a (δ_H 2.40) และ H-5b (δ_H 2.07) correlation ของ C-5 (δ_C 34.2) กับ H-6a (δ_H 2.45) และ H-6b (δ_H 2.07) และ correlation ของ C-7 กับ H-5a (δ_H 2.40), H-5b (δ_H 2.07), H-6a (δ_H 2.45), H-6b (δ_H 2.07), H-8a (δ_H 2.75), H-8b (δ_H 2.50) และ H-9 (δ_H 3.91) จากการเปรียบเทียบข้อมูล 1H และ ^{13}C NMR ระหว่าง **DSS3** กับ cleroidicin C^[31] ในตารางที่ 33 พบว่ามีค่าใกล้เคียงกันจึงทำให้สามารถยืนยันและสรุปได้ว่า **DSS3** คือโครงสร้าง cleroidicin C ซึ่งแยกได้เป็นครั้งแรกในดอกแคนา



ตารางที่ 33 แสดงข้อมูลการเปรียบเทียบค่า chemical shift (δ) จาก $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของ cleroundicin C และ DSS3

position	cleroundicin C ^[31]		DSS3	
	δ_{H} (ppm) ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 400 MHz)	δ_{C} (ppm) ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 100MHz)	δ_{H} (ppm) (CDCl_3 , 300 MHz)	δ_{C} (ppm) (CDCl_3 , 300 MHz)
1	-	-	-	-
2	3.91 (2H, m)	66.3	3.82 (2H, m)	67.1
3	2.07 (1H, m) 2.02 (1H, m)	40.9	2.07 (2H, m)	41.1
4	-	76.9	-	78.0
5	2.22 (1H, m)	34.3	2.40 (1H, d, $J = 6.3$ Hz) 2.07 (1H, m)	34.2
6	2.32 (1H, ddd, $J = 15.8$, 10.8, 3.6 Hz) 1.63 (1H, ddd, $J = 11.6$, 6.2, 3.4 Hz)	35.8	2.45 (1H, ddd, $J =$ 10.5, 7.4, 1.4 Hz) and 2.1 (1H, m)	36.1
7	-	209.9	-	213.0
8	2.97 (1H, dd, $J = 15.7$, 4.2 Hz) 2.76 (1H, dd, $J = 15.7$, 4.2 Hz)	43.1	2.75 (1H, dd, $J =$ 15.99, 4.6 Hz) 2.50 (1H, dd, $J = 4.2$, 0.8 Hz)	43.3
9	4.25 (1H, t $J = 4.2$ Hz)	84.6	3.91 (1H, m)	85.0

➤ DSS 4: cleroidicin D



ภาพที่ 44 แสดงโครงสร้างของ DSS4

DSS4 มีลักษณะเป็น oil หนืดใส โดย mass spectrum ปรากฏสัญญาณที่ m/z 195.0647 $[M+Na]^+$ ทำให้ทราบว่าโมเลกุลเป็น $C_8H_{12}O_4$ และมีค่า degree of unsaturation (Ω) เท่ากับ 3 ปรากฏสัญญาณการดูดกลืนรังสี Infrared ที่ wave number (U_{max}) 3401, 2924, 2880, 1711, 1053 cm^{-1} แสดงว่ามีหมู่ hydroxyl และหมู่ carbonyl ในโครงสร้าง และมีค่า specific rotation $[\alpha]_D^{25} = -33.33^\circ$ (c 0.002, MeOH) จาก ^{13}C NMR, DEPT และ HMQC spectra พบสัญญาณของคาร์บอน 8 ตัว ประกอบไปด้วยสัญญาณของ ketone carbon ที่ δ_C 211.0 (C-7) สัญญาณของ oxygenated quaternary carbon ที่ δ_C 79.1 (C-4) สัญญาณของ oxygenated methylene carbon ที่ δ_C 67.3 (C-2) สัญญาณของ oxygenated methine carbon 2 ตัว ที่ δ_C 84.1 (C-9) และ 71.7 (C-5) สัญญาณของ methylene carbon 3 ตัว ที่ δ_C 39.4 (C-3), 42.9 (C-6) และ 43.8 (C-8)

จาก 1H NMR spectrum พบสัญญาณของ oxygenated methylene proton ที่ δ_H 3.83 (H-2, m) สัญญาณของ oxygenated methine proton ที่ δ_H 3.93 (H-9, m) และ 3.93 (H-5, m) และสัญญาณของ methylene proton ที่ δ_H 2.20 (H-3, m), 2.45 (H-6a, dd, $J = 16.5, 3.5$ Hz), 2.54 (H-6b, d, $J = 5.9$ Hz), 2.45 (H-8a, dd, $J = 16.5, 3.5$ Hz) และ 2.54 (H-8b, d, $J = 5.9$ Hz) จากข้อมูลดังกล่าวจะพบว่า DSS4 มีโครงสร้างใกล้เคียงกับ cleroidicin C ต่างกันตรงที่ compound 4 มี oxygenate methine carbon แทนที่ methylene carbon 1 ตำแหน่ง

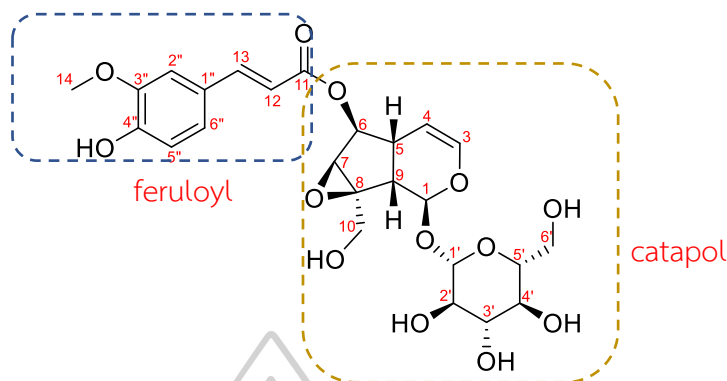
สำหรับ HMBC spectrum พบ correlation ของ C-4 (δ_C 79.1) กับ H-3 (δ_H 2.20), H-5 (δ_H 3.93), H-6b (δ_H 2.54), H-8b (δ_H 2.54) และ H-9 (δ_H 3.93) correlation ของ C-9 (δ_C 84.1) กับ H-3 (δ_H 2.20) และ H-5 (δ_H 3.93) ซึ่งแสดงถึงการเชื่อมต่อของวง cyclohexane(A) และวง tetrahydrofuran (B) ที่ตำแหน่ง C-4 และ C-9 นอกจากนี้พบ correlation ภายในวง B ดังนี้ correlation ของ C-3 (δ_C 39.4) กับ H-2 (δ_H 3.83), H-5 (δ_H 3.93) และ H-9 (δ_H 3.93) correlation ของ C-2 (δ_C 67.3) กับ H-3 (δ_H 2.20) และพบ correlation ภายในวง A ดังนี้ correlation ของ C-5 (δ_C 71.7) กับ H-3 (δ_H 2.20), H-6a (δ_H 2.45) และ H-9 (δ_H 3.93) correlation ของ C-7 (δ_C 211.0) กับ H-5 (δ_H 3.93), H-6a (δ_H 2.45), H-6b (δ_H 2.54), H-8a (δ_H 2.45), H-8b (δ_H 2.54) และ H-9 (δ_H 3.93) และ correlation ของ C-8 (δ_C 43.8) กับ H-9 (δ_H 3.93) จากการเปรียบเทียบข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR ระหว่าง **DSS4** กับ clerindicin D ในตารางที่ 34 พบว่ามีค่าใกล้เคียงกันจึงทำให้สามารถยืนยันและสรุปได้ว่า **DSS4** คือ clerindicin D^[31] ซึ่งเป็นรายงานการพบ clerindicin D ครั้งแรกในดอกแคนา



ตารางที่ 34 แสดงข้อมูลการเปรียบเทียบค่า chemical shift (δ) จาก $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของ cleroidicin D และ DSS4

position	cleroidicin D ^[31]		DSS4	
	δ_{H} (ppm) ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 400 MHz)	δ_{C} (ppm) ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 100MHz)	δ_{H} (ppm) (CDCl_3 , 300 MHz)	δ_{C} (ppm) (CDCl_3 , 75 MHz)
1	-	-	-	-
2	3.97 (2H, m)	66.6	3.83 (2H, m)	67.3
3	2.69 (2H, m)	39.2	2.20 (2H, m)	39.4
4	-	79.1	-	79.7
5	4.36 (1H, t, $J = 6.5$ Hz)	71.4	3.93 (1H, m)	71.7
6	3.01 (1H, dd, $J = 16.5$, 6.5 Hz) 2.86 (1H, dd, $J = 16.5$, 6.5 Hz)	42.7	2.45 (1H, dd, $J =$ 16.5, 3.5 Hz) 2.54 (1H, d, $J = 5.9$ Hz)	42.9
7	-	208.4	-	211.0
8	3.22 (1H, dd, $J = 16.6$, 4.6 Hz) 2.81 (1H, dd, $J = 16.6$, 4.6 Hz)	43.8	2.45 (1H, dd, $J =$ 16.5, 3.5 Hz) 2.54 (1H, d, $J = 5.9$ Hz)	43.8
9	4.34 (1H, t, $J = 4.6$ Hz)	83.9	3.93 (1H, m)	84.1

➤ DSS5 6-O-*trans*-feruloyl catapol



ภาพที่ 45 แสดงโครงสร้างของ DSS5

DSS5 มีลักษณะเป็นของหนืดสีน้ำตาล ปราบกฏสัญญาณที่ m/z 561.1591 $[M+Na]^+$ มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{25}H_{30}O_{13}$ มีค่า degree of unsaturation (Ω) เท่ากับ 11 ปราบกฏสัญญาณการดูดกลืนรังสี Infrared ที่ wave number (U_{max}) 3378, 2926, 1705, 1596, 1515, 1271, 1159, 1034, 751 cm^{-1} พบว่ามีหมู่ hydroxyl, carbonyl และ aromatic ในโครงสร้าง และมีค่า specific rotation $[\alpha]_D^{25} = +78.43^\circ$ (c 0.0020, MeOH) และจาก ^{13}C NMR, และ 1H NMR พบสัญญาณของคาร์บอน 25 ตัว ประกอบด้วยสัญญาณของ carbonyl carbon ที่ δ_c 169.1 (C-11) ซึ่งเป็นสัญญาณของ ester carbonyl พบสัญญาณของ olefinic carbon 4 ตัวที่ δ_c 142.5 (C-3), 103.1 (C-4), 115.0 (C-12) และ 147.8 (C-13) สัญญาณของ aromatic carbon 6 ตัวที่ δ_c 127.8 (C-1"), 111.9 (C-2"), 149.5 (C-3"), 150.9 (C-4"), 116.6 (C-5") และ 124.4 (C-6") โดยเป็นสัญญาณของ quaternary carbon 3 ตัวคือ 127.8 (C-1"), 149.5 (C-3") และ 150.9 (C-4") ทำให้ทราบว่าชิ้นส่วนวง aromatic มีหมู่แทนที่ 3 ตำแหน่ง พบสัญญาณของ oxygenated methine carbon 3 ตัวที่ δ_c 95.2 (C-1), 81.3 (C-6), และ 60.3 (C-7) สัญญาณของ quaternary carbon ที่ δ_c 66.9 (C-8) สัญญาณของ methine carbon 2 ตัว ที่ δ_c 36.9 (C-5) และ 43.3 (C-9) สัญญาณของ oxygenated methylene carbon ที่ δ_c 61.4 (C-10) สัญญาณของ methoxy carbon ที่ δ_c 56.6 (C-14) และพบสัญญาณของคาร์บอนบนวงน้ำตาลดังนี้ ที่ δ_c 99.8 (C-1'), 75.0 (C-2'), 78.8 (C-3'), 71.9 (C-4'), 77.8 (C-5') และ 63.0 (C-6')

จาก ^1H NMR spectrum พบสัญญาณของ aromatic proton ที่ δ_{H} 7.18 (H-2", d, $J = 1.6$ Hz), 6.80 (H-5", d, $J = 8.2$ Hz) และ 7.08 (H-6", d, $J = 8.3, 1.6$ Hz) ทำให้ทราบว่า มีวง aromatic 1 วงที่มีหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง 1, 3 และ 4 พบสัญญาณของ olefinic proton ที่ δ_{H} 6.36 (H-3, d, $J = 5.6$ Hz), 4.93-5.04 (H-4, m), 6.40 (H-12, d, $J = 15.8$ Hz) และ 7.65 (H-13, d, $J = 15.9$ Hz) ทำให้ทราบว่า มี double bond อีก 2 ตำแหน่ง สัญญาณของ oxygenated methine proton ที่ δ_{H} 5.15 (H-1, d, $J = 9.1$ Hz), 4.93-5.09 (H-6, m) และ 3.70 (H-7, brs) สัญญาณของ methine proton ที่ δ_{H} 2.50-2.66 (H-5, m) และ 2.50-2.66 (H-9, m) สัญญาณของ oxygenated methylene proton ที่ δ_{H} 4.17 (H-10a, d, $J = 13.2$ Hz) และ 3.83 (H-10b, d, $J = 13.2$ Hz) สัญญาณของ methoxy proton ที่ δ_{H} 3.87 (3H-14, s) และพบสัญญาณของโปรตอนบนวงน้ำตาล ดังนี้ ที่ δ_{H} 4.81 (H-1', d, $J = 7.9$ Hz), 3.20-3.35 (H-2', m), 3.28-3.35 (H-3', m), 3.20-3.35 (H-4', m), 3.35-3.48 (H-5', m), 3.95 (H-6'a, d, $J = 11.9$ Hz) และ 3.65 (H-6'b, dd, $J = 11.8, 6.2$ Hz) แสดงว่ามีน้ำตาล glucose ในโครงสร้าง

จาก COSY spectrum พบ correlation ของ H-5" (δ_{H} 6.80) กับ H-6" (δ_{H} 7.08) แต่ไม่พบ correlation ของ H-2" (δ_{H} 7.18) กับโปรตอนอื่นบนวง aromatic จึงยืนยันได้ว่ามีหมู่แทนที่ของวง aromatic อยู่ในตำแหน่ง 1, 3 และ 4 ถัดมาพบ correlation ของ olefinic proton ของ H-3 (δ_{H} 6.36) กับ H-4 (δ_{H} 4.93-5.04) จากค่า $J = 5.6$ Hz ทำให้ทราบว่า double bond คู่นี้อยู่ในลักษณะ *cis* และพบ correlation ของ olefinic proton H-12 (δ_{H} 6.40) กับ H-13 (δ_{H} 7.65) และจากค่า $J = 15.8$ Hz ทำให้ทราบว่า double bond คู่นี้อยู่ในลักษณะ *trans* นอกจากนี้ยังพบ correlation ของโปรตอนบนวงน้ำตาล ดังนี้ correlation ของ H-1' (δ_{H} 4.81) กับ H-2' (δ_{H} 3.20-3.35) correlation ของ H-2' (δ_{H} 3.20-3.35) กับ H-3' (δ_{H} 3.28-3.35) correlation ของ H-3' (δ_{H} 3.28-3.35) กับ H-4' (δ_{H} 3.20-3.35) correlation ของ H-4' (δ_{H} 3.20-3.35) กับ H-5' (δ_{H} 3.35-3.48) และ correlation ของ H-5' (δ_{H} 3.35-3.48) กับ H-6'a (δ_{H} 3.95) และ H-6'b (δ_{H} 3.65) จึงทำให้ยืนยันได้ว่ามีน้ำตาลชนิด glucose อยู่ในโครงสร้าง นอกจากนี้ยังพบ correlation อีกส่วนของโครงสร้างดังนี้ correlation ของ H-1 (δ_{H} 5.15) กับ H-9 (δ_{H} 2.50-2.66) correlation ของ H-9 (δ_{H} 2.50-2.66) กับ H-5 (δ_{H} 2.50-2.66) correlation ของ H-6 (δ_{H} 4.93-5.09) กับ H-7 (δ_{H} 3.70) และพบ correlation ที่สำคัญของ H-5 (δ_{H} 2.50-2.66) กับ H-6 (δ_{H} 4.93-5.09) และ olefinic proton H-4 (δ_{H} 4.93-5.04) จึงคาดว่าส่วนนี้น่าจะเป็น bicyclic ที่มี double bond ในวง

สำหรับ HMBC spectrum พบ correlation ภายในวงของ H-3 (δ_H 6.36) ซึ่งเป็น olefinic proton ที่อยู่บน oxygenated olefinic carbon กับ C-1 (δ_C 95.2) และพบ correlation ยืนยันตำแหน่งอื่น ๆ ดังนี้ correlation ของ H-1 (δ_H 5.15) กับ C-5 (δ_C 36.9), C-8 (δ_C 67.0) และ C-9 (δ_C 43.3) correlation ของ H-3 (δ_H 6.36) กับ C-4 (δ_C 103.1) และ C-5 (δ_C 36.9) correlation ของ H-5 (δ_H 2.50-2.66) กับ C-1 (δ_C 95.2), C-6 (δ_C 81.5), C-7 (δ_C 60.4), C-8 (δ_C 67.0) และ C-9 (δ_C 43.3) correlation ของ H-6 (δ_H 4.93-5.09) กับ C-4 (δ_C 103.1), C-5 (δ_C 36.9), C-7 (δ_C 60.4) และ C-9 (δ_C 43.3) correlation ของ H-7 (δ_H 3.70) กับ C-5 (δ_C 36.9), C-6 (δ_C 81.5), C-8 (δ_C 67.0) และ C-9 (δ_C 43.3) และ correlation ของ H-9 (δ_H 2.50-2.66) กับ C-1 (δ_C 95.2), C-5 (δ_C 36.9), C-6 (δ_C 81.5), C-7 (δ_C 60.4) และ C-8 (δ_C 67.0) นอกจากนี้พบ correlation ของ H-10a (δ_H 4.17) และ H-10b (δ_H 3.83) กับ C-7 (δ_C 60.4), C-8 (δ_C 67.0) และ C-9 (δ_C 43.3) จึงทำให้ทราบว่า oxygenated methylene carbon C-10 (δ_C 61.4) ต่ออยู่ที่ตำแหน่ง C-8 และสามารถยืนยันได้ว่าส่วนของวง bicyclic นี้คือ iridoid ที่มีการปิดวง epoxide ของ C-7 และ C-8 และพบว่าน้ำตาล glucose ต่ออยู่กับ iridoid ที่ตำแหน่ง C-1 จาก correlation ของ H-1' (δ_H 5.15) กับ C-1 (δ_C 95.2) ทำให้ได้ส่วนของ catapol

ในส่วนถัดมาจาก HMBC spectrum พบ correlation ของวง aromatic ดังนี้ correlation ของ H-2" (δ_H 7.18) และ H-6" (δ_H 7.08) กับ C-13 (δ_C 147.8) ซึ่งเป็น olefinic carbon จึงทำให้ทราบว่า มี double bond อยู่บน C-1" (δ_C 127.8) และยังมีพบ correlation ของ H-12 และ H-13 กับ carbonyl (C-11) จึงทำให้ทราบว่า C-12 (δ_C 115.0) และ C-13 (δ_C 147.8) เป็น alpha และ beta carbon ตามลำดับ และนอกจากนี้พบ correlation ของ H-14 (δ_H 3.87) กับ C-3" (δ_C 149.5) จึงทราบว่า มีหมู่ methoxy เป็นหมู่แทนที่บน C-3" ของ aromatic และจากค่า chemical shift ของ quaternary carbon ที่ตำแหน่ง C-4" (δ_C 150.9) ของ aromatic ค่อนข้าง downfield จึงทำให้ทราบว่า มีหมู่ hydroxyl เป็นหมู่ให้อิเล็กตรอนอยู่บนคาร์บอนตำแหน่ง C-4" ทำให้ได้ชิ้นส่วน feruloyl และจาก correlation ของ H-6 (δ_H 4.93-5.09) กับ C-11 (δ_C 169.1) ทำให้ทราบว่า ชิ้นส่วน feruloyl นั้นต่ออยู่บนวง iridoid ที่ตำแหน่ง C-6 ได้เป็นโครงสร้าง DSS5

เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างที่ได้จากข้อมูล 1H และ ^{13}C NMR กับสารประกอบที่มีรายงานก่อนหน้า จึงระบุได้ว่า DSS5 คือ 6-*o*-*trans*-feruloyl catapol^[33] โดยข้อมูลจาก 1H NMR และ ^{13}C NMR มีค่าใกล้เคียงกันดังตารางที่ 35 ซึ่งเป็นการรายงานการแยก 6-*O*-*trans*-feruloyl catapol ครั้งแรกในดอกแคนา

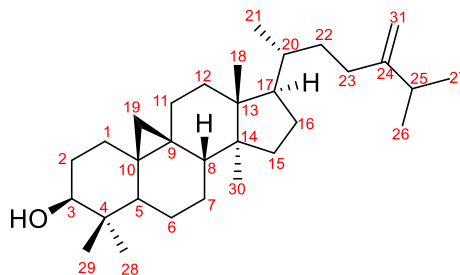
ตารางที่ 35 แสดงข้อมูลการเปรียบเทียบค่า chemical shift (δ) จาก $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของ 6-O-trans-feruloyl catapol และ DSS5

position	6-O-trans-feruloyl catapol ^[33]		DSS5	
	δ_{H} (ppm) (MeOD, 300 MHz)	δ_{C} (ppm) (MeOD, 75 MHz)	δ_{H} (ppm) (MeOD, 300 MHz)	δ_{C} (ppm) (MeOD, 75 MHz)
1	5.24 (1H, d, $J = 9.2$ Hz)	95.2	5.15 (1H, d, $J = 9.1$ Hz)	95.2
3	6.45 (1H, dd, $J = 5.9, 1.4$ Hz)	142.4	6.36 (1H, d, $J = 5.6$ Hz)	142.5
4	5.07 (1H, dd, $J = 6.0, 4.0$ Hz)	103.0	4.93-5.04 (1H, m)	103.1
5	2.69 (1H, m)	36.8	2.50-2.66 (1H, m)	36.9
6	5.11 (1H, dd, $J = 7.8, 1.1$ Hz)	81.3	4.93-5.09 (1H, m)	81.5
7	3.79 (1H, d, $J = 1.1$ Hz)	60.3	3.70 (1H, brs)	60.4
8	-	66.9	-	67.0
9	2.69 (1H, dd, $J = 9.2, 6.4$ Hz)	43.3	2.50-2.66 (1H, m)	43.3
10	4.25 (1H, d, $J = 13.1$ Hz) 3.92 (1H, d, $J = 13.1$ Hz)	61.3	4.17 (1H, d, $J = 13.2$ Hz) 3.83 (1H, d, $J = 13.2$ Hz)	61.4
11	-	169.0	-	169.1
12	6.48 (1H, d, $J = 15.9$ Hz)	114.7	6.40 (1H, d, $J = 15.8$ Hz)	115.0

13	7.74 (1H, d, $J = 15.9$ Hz)	147.6	7.65 (1H, d, $J = 15.9$ Hz)	147.8
14	3.97 (3H, s)	56.5	3.87 (3H, s)	56.6
1'	4.86 (1H, d, $J = 7.9$ Hz)	99.8	4.81 (1H, d, $J = 7.9$ Hz)	99.8
2'	-	74.9	3.20-3.35 (1H, m)	75.0
3'	-	78.6	3.28-3.35 (1H, m)	78.8
4'	3.20-3.50 (1H, m)	71.8	3.20-3.35 (1H, m)	71.9
5'	-	77.7	3.35-3.48 (1H, m)	77.8
6'	4.01 (1H, dd, $J = 11.9, 2.0$ Hz) 3.73 (1H, dd, $J = 11.8, 6.3$ Hz)	62.9	3.95 (1H, d, $J = 11.9$ Hz) 3.65 (1H, dd, $J = 11.8, 6.2$ Hz)	63.0
1''	-	127.3	-	127.8
2''	7.28 (1H, d, $J = 1.8$ Hz)	111.9	7.18 (1H, d, $J = 1.6$ Hz)	111.9
3''	-	149.6	-	149.5
4''	-	151.7	-	150.9
5''	6.88 (1H, d, $J = 8.2$ Hz)	116.7	6.80 (1H, d, $J = 8.2$ Hz)	116.6
6''	7.11 (1H, d, $J = 8.2, 1.9$ Hz)	124.4	7.08 (1H, d, $J = 8.3, 1.6$ Hz)	124.4

4.1.2 สารธรรมชาติกลุ่ม cycloartane

➤ DSS6 24-methylenecycloartanol



ภาพที่ 46 แสดงโครงสร้างของ DSS6

DSS6 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว mass spectrum ปรากฏสัญญาณที่ 441.4096 $[M+H]^+$ มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{31}H_{52}O$ มีค่า degree of unsaturation (Ω) เท่ากับ 6 ปรากฏสัญญาณการดูดกลืนรังสี Infrared ที่ wave number (U_{max}) 3431, 2932, 2871, 1465, 1380 cm^{-1} แสดงว่ามีหมู่ hydroxyl ในโครงสร้างและมีค่า specific rotation $[\alpha]_D^{25} = +27.27^\circ$ (c 0.0015, MeOH) และจาก ^{13}C NMR, DEPT และ HMQC spectra พบสัญญาณของคาร์บอน 31 ตัว ประกอบด้วยสัญญาณของ olefinic carbon 2 ตัวที่ δ_c 156.9 (C-24) และ 105.9 (C-31) สัญญาณของ quaternary carbon 5 ตัวที่ δ_c 40.5 (C-4), 20.0 (C-9), 26.1 (C-10), 45.3 (C-13) และ 48.8 (C-14) สัญญาณของ oxygenated methine carbon ที่ δ_c 78.8 (C-3) สัญญาณของ methine carbon 5 ตัวคือ 47.1 (C-5), 48.0 (C-8), 52.3 (C-17), 36.1 (C-20) และ 33.8 (C-25) สัญญาณของ methylene carbon 11 ตัวที่ δ_c 32.0 (C-1), 30.4 (C-2), 21.1 (C-6), 26.0 (C-7), 26.5 (C-11), 32.9 (C-12), 35.6 (C-15), 28.2 (C-16), 29.9 (C-19), 35.0 (C-22) และ 31.3 (C-23) และสัญญาณของ methyl carbon 7 ตัว ที่ δ_c 18.0 (C-18), 18.3 (C-21), 22.0 (C-26), 21.9 (C-27), 25.4 (C-28), 14.0 (C-29) และ 19.3 (C-30)

จาก 1H NMR spectrum พบสัญญาณของ olefinic proton ที่ δ_H 4.72 (H-31a, brs) และ 4.67 (H-31b, brs) สัญญาณของ oxygenated methine proton ที่ δ_H 3.29 (H-3, dd, $J = 10.6, 4.4$ Hz) สัญญาณของ methine proton ที่ δ_H 1.20-1.38 (H-5, m), 1.41-1.59 (H-8, m), 1.55-1.68 (H-17, m), 1.50 (H-20, m) และ 2.30 (H-25, m) โดยพบว่าสัญญาณที่ δ_H 0.55 (H-19a, d, $J = 4.0$ Hz) และ 0.33 (H-19b, d, $J = 4.1$ Hz) เป็นสัญญาณของ cyclopropane proton นอกจากนี้พบสัญญาณของ methyl proton ที่ δ_H 0.98 (H-18, s), 0.90 (H-21, brs), 1.03 (H-26,

d, $J = 6.8$ Hz), 1.03 (H-27, d, $J = 6.8$ Hz), 0.98 (3H-28, s), 0.80 (H-29, s) และ 0.90 (H-30, brs) ทำให้ทราบว่าโครงสร้างดังกล่าวเป็น terpene ในกลุ่ม cycloartane

จาก COSY spectrum พบ correlation ของ H-25 (δ_H 2.30) กับ H-26 (δ_H 1.03) และ H-27 (δ_H 1.03) correlation ของ H-22a (δ_H 1.50-1.68) และ H-22b (δ_H 1.06-1.20) กับ H-23a (δ_H 1.80-1.95) และ H-23b (δ_H 2.05-2.20) และ correlation บนวง cycloartane ของ H-19a (δ_H 0.55) กับ H-19b (δ_H 0.33)

สำหรับ HMBC spectrum พบ correlation ของ H-3 (δ_H 3.29) กับ C-2 (δ_C 30.4), C-4 (δ_C 40.5), C-28 (δ_C 14.0), และ C-29 (δ_C 19.3) correlation ของ H-8 (δ_H 1.41-1.59) กับ C-6 (δ_C 21.1), C-7 (δ_C 26.0), C-10 (δ_C 26.0), C-14 (δ_C 48.8) และ C-19 (δ_C 29.9) แสดงการเชื่อมต่อของวง B และ C พบ correlation ของ H-18 (δ_H 0.98) กับ C-12 (δ_C 32.9), C-13 (δ_C 45.3), C-14 (δ_C 48.8) และ C-17 (δ_C 52.3) และ correlation ของ H-30 (δ_H 0.90) กับ C-8 (δ_C 48.0), C-14 (δ_C 48.8) และ C-15 (δ_C 35.6) correlation ของ H-19a (δ_H 0.55) และ H-19b (δ_H 0.33) ซึ่งเป็นสัญญาณของ cyclopropane proton กับ C-1 (δ_C 32.0), C-5 (δ_C 47.1), C-8 (δ_C 48.0), C-9 (δ_C 20.0), C-10 (δ_C 26.0) และ C-11 (δ_C 26.5) ทำให้สามารถยืนยันได้ว่าวง cyclopropane อยู่บนวง terpene ที่ตำแหน่ง C-9 และ C-10 ทำให้ได้โครงสร้างหลักคือ cycloartane

พบ correlation บน side chain ของ H-26 (δ_H 1.03) และ H-27 (δ_H 1.03) กับ C-24 (δ_C 156.9) และ C-25 (δ_C 33.8) correlation ของ H-31a, H-31b (δ_H 4.72, 4.67) กับ C-24 (δ_C 156.9), C-25 (δ_C 33.8) และ C-23 (δ_C 31.3) สามารถยืนยัน methylenidene group ที่ตำแหน่ง 24 บน side chain และพบ correlation ของ H-21 (δ_H 0.90) กับ C-20 (δ_C 36.1) และ C-17 (δ_C 52.3) จึงสามารถยืนยันขึ้นส่วน side chain ที่ต่ออยู่บนวง cycloartane ที่ตำแหน่ง C-17 เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างที่ได้จากข้อมูล 1H และ ^{13}C NMR กับสารประกอบที่มีรายงานก่อนหน้านี้ จึงระบุได้ว่า DSS6 คือ 24-methylenecycloartanol^[34, 35] โดยข้อมูลจาก 1H NMR และ ^{13}C NMR มีค่าใกล้เคียงกันดังตารางที่ 36 ซึ่งเป็นการรายงานการแยก 24-methylenecycloartanol ครั้งแรกในดอกแคนา

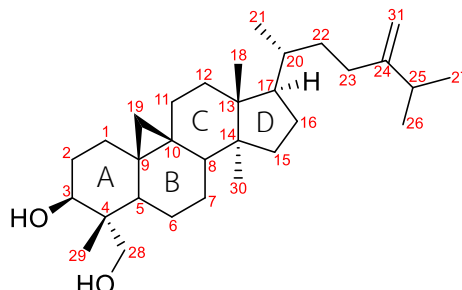
ตารางที่ 36 แสดงข้อมูลการเปรียบเทียบค่า chemical shift (δ) จาก $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของ DSS6 และ 24-methylenecycloartanol

Position	24-methylenecycloartanol ^[34]		DSS6	
	δ_{H} (ppm) (CDCl ₃ , 500 MHz)	δ_{C} (ppm) (pyridine- <i>d</i> ₆ , 125 MHz)	δ_{H} (ppm) (CDCl ₃ , 300 MHz)	δ_{C} (ppm) (CDCl ₃ , 75 MHz)
1	1.59 (1H, tdd, $J = 12.5$, 4.5, 1.0 Hz) 1.27 (1H, ddd, $J = 12.5$, 4.5, 3.0 Hz)	32.6	1.20-1.30 (1H, m) 1.47-1.62 (1H, m)	32.0
2	1.92 (1H, dtd, $J = 12.5$, 4.5, 3.0 Hz) 1.83 (1H, qd, $J = 12.5$, 4.5 Hz)	31.3	1.50-1.70 (1H, m) 1.72-1.83 (1H, m)	30.4
3	3.68 (1H, dd, $J = 12.5$, 4.5 Hz)	78.2	3.29 (1H, dd, $J =$ 10.6, 4.4 Hz)	78.8
4	-	41.1	-	40.5
5	1.37 (1H, dd, $J = 12.5$, 4.5 Hz)	47.7	1.20-1.38 (1H, m)	47.1
6	1.63 (1H, dtd, $J = 12.5$, 4.5, 3.5 Hz) 0.85 (1H, qd, $J = 12.5$, 3.0 Hz)	21.5	1.50-1.67 (1H, m) 0.70-0.83 (1H, m)	21.1

7	1.13 (1H, qd, $J = 12.5$, 3.5 Hz) 1.35 (1H, dddd, $J =$ 12.5, 6.0, 4.5, 3.0 Hz)	26.3	1.02-1.20 (1H, m) 1.25-1.40 (1H, m)	26.0
8	1.60 (1H, dd, $J = 12.5$, 6.0 Hz)	48.0	1.41-1.59 (1H, m)	48.0
9	-	20.3	-	20.0
10	-	26.9	-	26.1
11	2.01 (1H, ddd, $J = 15.0$, 9.5, 7.5Hz) 1.20 (1H, ddd, $J = 15.0$, 8.5, 7.5Hz)	26.9	1.99-2.10 (1H, m) 1.25-1.40 (1H, m)	26.5
12	1.67 (2H, m)	33.5	1.54-1.70 (2H, m)	32.9
13	-	45.8	-	45.3
14	-	49.3	-	48.8
15	1.35 (2H, m)	35.9	1.23-1.38 (2H, m)	35.6
16	1.35 (1H, m) 1.97 (1H, m)	28.4	1.91-2.00 (1H, m) 1.23-1.36 (1H, m)	28.2
17	1.69 (1H, m)	52.8	1.55-1.68 (1H, m)	52.3
18	1.05 (3H, S)	18.2	0.98 (3H, S)	18.0
19	0.62 (1H, d, $J = 4.5$ Hz) 0.32 (1H, d, $J = 4.5$ Hz)	29.9	0.55 (1H, d, $J = 4.0$ Hz) 0.33 (1H, d, $J = 4.1$ Hz)	29.9
20	1.50 (1H, ddqd, $J =$ 10.5, 9.0, 7.0, 3.0 Hz)	36.5	1.50 (1H, m)	36.1
21	0.98 (3H, d, $J = 7.0$ Hz)	18.7	0.90 (3H, brs)	18.3

22	1.27 (1H, dddd, $J = 15.0, 11.0, 9.0, 5.0$ Hz) 1.68 (1H, dddd, $J = 15.0, 11.0, 5.0, 3.0$ Hz)	35.7	1.50-1.68 (1H, m) 1.06-1.20 (1H, m)	35.0
23	2.01 (1H, ddd, $J = 15.0, 11.0, 5.0$ Hz) 2.23 (1H, ddd, $J = 15.0, 11.0, 5.0$ Hz)	31.8	1.80-1.95 (1H, m) 2.05-2.20 (1H, m)	31.3
24	-	156.9	-	156.9
25	2.30 (1H, sept, $J = 7.0$ Hz)	34.3	2.30 (1H, m)	33.8
26	1.08 (1H, d, $J = 7.0$ Hz)	22.2	1.03 (3H, d, $J = 6.8$ Hz)	22.0
27	1.08 (1H, d, $J = 7.0$ Hz)	22.1	1.03 (3H, d, $J = 6.8$ Hz)	21.9
28	1.18 (3H, S)	26.1	0.98 (3H, S)	25.4
29	1.05 (3H, S)	14.7	0.80 (3H, S)	14.0
30	0.97 (3H, S)	19.7	0.90 (3H, brs)	19.3
31	4.83 (1H, d, $J = 1.0$ Hz) 4.85 (2H, brs)	106.7	4.72 (1H, brs) 4.67 (1H, brs)	105.9

➤ DSS7 24-methylenecycloartane-3,28-diol



ภาพที่ 47 แสดงโครงสร้างของ DSS7

DSS7 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว mass spectrum ปรากฏสัญญาณที่ 439.3929 [M-H₂O+H]⁺ มีสูตรโมเลกุลคือ C₃₁H₅₂O₂ มีค่า degree of unsaturation (Ω) เท่ากับ 6 ปรากฏสัญญาณการดูดกลืนรังสี Infrared ที่ wave number (ν_{max}) 3369, 1694, 1603, 1518, 1445, 1373, 1263, 1159, 1035 cm⁻¹ และมีค่า specific rotation $[\alpha]_D^{25} = +180.00^\circ$ (c 0.0007, MeOH) และจาก ¹³C NMR, DEPT และ HMQC spectra พบสัญญาณของคาร์บอน 31 ตัว ประกอบด้วยสัญญาณของ olefinic carbon 2 ตัวที่ δ_C 156.9 (C-24) และ 105.9 (C-31) สัญญาณของ quaternary carbon 5 ตัวที่ δ_C 43.7 (C-4), 19.9 (C-9), 25.3 (C-10), 45.3 (C-13) และ 48.8 (C-14) สัญญาณของ oxygenated methine carbon ที่ δ_C 77.2 (C-3) สัญญาณของ oxygenated methylene carbon ที่ δ_C 71.2 (C-28) สัญญาณของ methine carbon 5 ตัวคือ 42.5 (C-5), 47.9 (C-8), 52.3 (C-17), 36.1 (C-20) และ 33.8 (C-25) สัญญาณของ methylene carbon 11 ตัวที่ δ_C 31.7 (C-1), 30.2 (C-2), 21.0 (C-6), 25.8 (C-7), 28.2 (C-11), 35.6 (C-12), 32.9 (C-15), 26.4 (C-16), 30.0 (C-19), 35.0 (C-22) และ 31.3 (C-23) และสัญญาณของ methyl carbon 6 ตัวที่ δ_C 18.1 (C-18), 18.3 (C-21), 21.8 (C-26), 22.0 (C-27), 10.1 (C-29) และ 19.3 (C-30) จากข้อมูลดังกล่าวทำให้ทราบว่าโครงสร้างของ DSS7 มีความใกล้เคียงกับ DSS6 แต่มีส่วนที่แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดที่ตำแหน่ง C-28 จาก methyl carbon เป็น oxygenated methylene carbon จึงส่งผลให้คาร์บอนบนวง A มีค่า δ_C แตกต่างไปจากเดิมเล็กน้อย

จาก ^1H NMR spectrum พบสัญญาณของ olefinic proton ที่ δ_{H} 4.70 (H-31, d, $J = 15.4$ Hz) สัญญาณของ oxygenated methine proton ที่ δ_{H} 3.76 (H-3, dd, $J = 10.7, 3.2$ Hz) สัญญาณของ oxygenated methylene proton ที่ δ_{H} 3.74 (H-28a, d $J = 10.5$ Hz) และ 3.53 (H-28b, d $J = 10.4$ Hz) สัญญาณของ cyclopropane proton ที่ δ_{H} 0.60 (H-19a, d, $J = 4.3$ Hz) และ 0.39 (H-19b, d, $J = 4.1$ Hz) และสัญญาณของ methyl proton ที่ δ_{H} 0.97 (3H-18, S), 0.90 (H-21, d, $J = 6.3$ Hz), 1.03 (H-26, d $J = 6.8$ Hz), 1.03 (H-27, d, $J = 6.8$ Hz), 0.94 (H-29, S) และ 0.89 (H-30, S) เมื่อพิจารณา ^1H NMR spectrum พบว่าปรากฏสัญญาณใกล้เคียงกับ DSS6 ซึ่งสอดคล้องกับ ^{13}C spectrum ทำให้ยืนยันได้ว่า DSS7 เป็นสารในกลุ่ม cycloartane เช่นเดียวกับ DSS6 แต่ต่างกันที่ตำแหน่ง 28 โดย DSS7 เกิดการออกซิไดซ์ที่ตำแหน่ง C-28 ทำให้เปลี่ยนจาก methyl proton เป็น oxygenated methylene proton

สำหรับ HMBC spectrum สามารถยืนยันการถูกออกซิไดซ์ที่ตำแหน่ง C-28 ได้โดยพบ correlation ของ oxygenated methylene proton H-28a (δ_{H} 3.74) และ H-28b (δ_{H} 3.53) กับ C-3 (δ_{C} 77.2), C-4 (δ_{C} 43.7), C-5 (δ_{C} 42.5) และ C-29 (δ_{C} 10.1) เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างที่ได้จากข้อมูล ^1H , ^{13}C และ 2D NMR กับสารประกอบที่มีรายงานก่อนหน้านี้ จึงระบุได้ว่า DSS7 คือ 24-methylenecycloartane-3,28-diol^[36] โดยข้อมูลจาก ^1H และ ^{13}C NMR ก็มีค่าใกล้เคียงกันดังตารางที่ 37 ซึ่งเป็นการรายงานการแยก 24-methylenecycloartane-3,28-diol ครั้งแรกในดอกแคนา

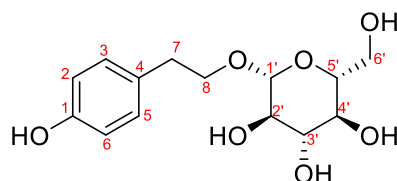
ตารางที่ 37 แสดงข้อมูลการเปรียบเทียบค่า chemical shift (δ) จาก $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของ DSS7 และ 24-methylenecycloartane-3,28-diol

Position	24-methylenecycloartane-3,28-diol ^[36]		DSS7	
	δ_{H} (ppm) (CDCl_3 , 500 MHz)	δ_{C} (ppm) (CDCl_3 , 125 MHz)	δ_{H} (ppm) (CDCl_3 , 300 MHz)	δ_{C} (ppm) (CDCl_3 , 75 MHz)
1	1.29-1.62 (2H, m)	31.8	1.20-1.30 (1H, m) 1.48-1.62 (1H, m)	31.7
2	1.62-1.82 (2H, m)	30.4	1.58-1.60 (2H, m)	30.2
3	3.82 (1H, dd, $J = 10.6$, 4.8 Hz)	77.1	3.76 (1H, dd, $J = 10.7$, 3.2 Hz)	77.2
4	-	43.8	-	43.7
5	1.52 (1H, m)	42.5	1.40-1.52 (1H, m)	42.5
6	0.88-1.49 (2H, m)	21.0	1.38-1.49 (1H, m) 0.75-0.89 (1H, m)	21.0
7	1.13-1.38 (2H, m)	25.9	1.00-1.15 (2H, m)	25.8
8	1.55 (1H, dd, $J = 12.2$, 5.2 Hz)	47.9	1.50 (1H, dd, $J = 13.9$, 4.6 Hz)	47.9
9	-	19.9	-	19.9
10	-	26.5	-	25.3
11	1.35-1.38 (2H, m)	28.1	1.24-1.34 (2H, m)	28.2
12	1.34 (2H, m)	35.7	1.24-1.34 (2H, m)	35.6
13	-	45.2	-	45.3
14	-	49.0	-	48.8
15	1.68 (2H, m)	32.8	1.55-1.65 (2H, m)	32.9
16	1.17-2.05 (2H, m)	26.5	1.64 (2H-, m)	26.4

17	1.65 (1H, m)	52.2	1.57-1.64 (1H, m)	52.3
18	1.01 (3H, S)	18.0	0.97 (3H, S)	18.1
19	0.65 (1H, d, $J = 3.9$ Hz) 0.44 (1H, d, $J = 4.2$ Hz)	30.2	0.60 (1H, d, $J = 4.3$ Hz) 0.39 (1H, d, $J = 4.1$ Hz)	30.0
20	1.45 (1H, m)	36.1	1.45 (1H, m)	36.1
21	0.95 (3H, d, $J = 5.2$ Hz)	18.3	0.90 (3H, d, $J = 6.3$ Hz)	18.3
22	1.19-1.62 (2H, m)	35.1	1.56-1.70 (2H, m)	35.0
23	1.93-2.18 (2H, m)	31.3	1.80-2.20 (2H, m)	31.3
24	-	156.9	-	156.9
25	2.29 (1H, sept, $J = 6.8$ Hz)	33.8	2.20-2.30 (1H, m)	33.8
26	1.08 (3H, d, $J = 6.8$ Hz)		1.03 (3H, d, $J = 6.8$ Hz)	21.8
27	1.07 (3H, d, $J = 6.8$ Hz)		1.03 (3H, d, $J = 6.8$ Hz)	22.0
28	3.80 (1H, d, $J = 10.3$ Hz) 3.59 (1H, d, $J = 10.5$ Hz)		3.74 (1H, d, $J = 10.5$ Hz) 3.53 (1H, d, $J = 10.4$ Hz)	71.2
29	1.00 (3H, S)		0.94 (3H, S)	10.1
30	0.94 (3H, S)		0.89 (3H, S)	19.3
31	4.77 (2H, brs)		4.70 (2H, d $J = 15.4$ Hz)	105.9

4.1.4 สารธรรมชาติกลุ่ม phenolic glycoside

➤ DSS9 salidroside



ภาพที่ 48 แสดงโครงสร้างของ DSS9

DSS9 มีลักษณะเป็น oil หนืดสีน้ำตาลเหลือง mass spectrum ปรากฏสัญญาณที่ m/z 301.1291 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{14}H_{21}O_7$, 301.1287) มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{14}H_{20}O_7$ มีค่า degree of unsaturation (Ω) เท่ากับ 5 มีค่า specific rotation $[\alpha]_D^{25} = +104.60^\circ$ (c 0.0016, MeOH) และ ปรากฏสัญญาณการดูดกลืนที่ wave number (u_{max}) 3376, 2935, 2868, 1668, 1465, 1378, 1051, 1022 cm^{-1} แสดงการมีหมู่ hydroxyl และ aromatic ในโครงสร้างจาก ^{13}C NMR, DEPT และ HMQC spectra พบสัญญาณของคาร์บอน 14 ตัว ประกอบไปด้วยสัญญาณของ aromatic carbon ที่ δ_C 156.9 (C-1), 116.3 (C-2), 131.1 (C-3), 130.9 (C-4), 131.1 (C-5) และ 116.3 (C-6) จากสัญญาณของ aromatic carbon พบว่ามี quaternary carbon 2 ตำแหน่งคือที่ δ_C 156.9 (C-1) และ 130.9 (C-4) และพบว่ามีคาร์บอน 2 คู่ที่มีค่า chemical shift เท่ากันคือ ที่ δ_C 116.3 (C-2 และ C-6) และ 131.1 (C-3 และ C-5) จึงทำให้ทราบว่าโครงสร้างมีส่วนของวง aromatic ที่มีหมู่แทนที่ 2 หมู่อยู่ในตำแหน่ง para นอกจากนี้พบสัญญาณของ anomeric carbon บนวงน้ำตาลที่ δ_C 104.5 (C-1') จึงทำให้ทราบว่าโครงสร้างมีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเป็นองค์ประกอบโดยพบสัญญาณของคาร์บอนอื่น ๆ บนวงน้ำตาลคือ δ_C 75.2 (C-2'), 78.1 (C-3'), 71.7 (C-4'), 78.2 (C-5') และ 62.8 (C-6') พบสัญญาณของ oxygenated methylene carbon ที่ δ_C 72.2 (C-8) และสัญญาณของ methylene carbon ที่ตำแหน่ง δ_C 36.5 (C-7)

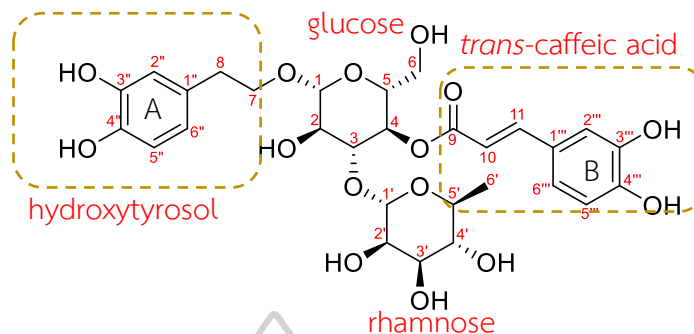
จาก ^1H NMR spectrum พบสัญญาณของ aromatic proton ที่ δ_{H} 7.04 (2H, d, $J = 8.5$ Hz) และ 6.67 (2H, d, $J = 8.5$ Hz) จากข้อมูลดังกล่าวสามารถยืนยันตำแหน่ง para ของหมู่แทนที่บนวง aromatic พบสัญญาณของ anomeric proton ของน้ำตาลที่ δ_{H} 4.27 (H-1', d, $J = 7.7$ Hz) สัญญาณของ proton อื่น ๆ บนวงน้ำตาลที่ δ_{H} 3.16 (H-2', t, $J = 7.9$ Hz), 3.18-3.33 (H-3', m), 3.18-3.35 (H-4', m), 3.33-3.40 (H-5', m), 3.85 (H-6'a, dd, $J = 12.3, 2.0$ Hz) และ 3.56-3.75 (H-6'b, m) ทำให้ทราบว่า มี glucose เป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้พบสัญญาณของ oxygenated methylene proton ที่ δ_{H} 3.90-4.10 (H-8a, m) และ 3.58-3.78 (H-8b, m) และสัญญาณของ benzylic methylene proton ที่ δ_{H} 2.81 (H-7, d, $J = 7.5$ Hz) ทำให้ทราบว่า **DSS9** น่าจะเป็นสารในกลุ่ม phenyl ethanoid glucoside

สำหรับ HMBC spectrum พบ correlation ของ H-3 (δ_{H} 7.04) และ H-5 (δ_{H} 7.04) กับ C-7 (δ_{C} 36.5) ซึ่งเป็น methylene carbon ของชิ้นส่วน ethoxy side chain ที่ได้จาก COSY spectrum จึงทราบว่า side chain นี้เป็นหมู่แทนที่บนวง aromatic นอกจากนี้พบ correlation ของ anomeric proton H-1' (δ_{H} 4.27) กับ C-8 (δ_{C} 72.2) ซึ่งเป็นสัญญาณของ oxygenated methylene carbon ของ side chain จึงทำให้ทราบว่าน้ำตาล glucose นั้นต่ออยู่กับ side chain บน aromatic และจากข้อมูล mass spectrum ทำให้ทราบว่ายังมี OH อีก 1 ตำแหน่งในโครงสร้างดังนั้นหมู่ OH นี้จึงเป็นหมู่แทนที่บนวง aromatic โดยต่อกับ quaternary carbon ตำแหน่ง C-1 (δ_{C} 156.5) ในลักษณะ para กับ side chain เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างที่ได้จากข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR กับสารประกอบที่มีรายงานก่อนหน้า จึงระบุได้ว่า **DSS9** คือ salidroside^[37] โดยข้อมูลจาก ^1H NMR และ ^{13}C NMR มีค่าใกล้เคียงกันดังตารางที่ 38 ซึ่งเป็นการรายงานการแยก salidroside ครั้งแรกในดอกแคนา

ตารางที่ 38 แสดงข้อมูลการเปรียบเทียบค่า chemical shift (δ) จาก $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของ salidroside และ DSS9

position	Salidroside ^[37]		DSS9	
	δ_{H} (ppm) (MeOD, 500 MHz)	δ_{C} (ppm) (MeOD, 125 MHz)	δ_{H} (ppm) (MeOD, 300 MHz)	δ_{C} (ppm) (MeOD, 75 MHz)
1	-	157.0	-	156.9
2	6.69 (1H, d, $J = 8.4$ Hz)	116.3	6.67 (1H, d, $J = 8.5$ Hz)	116.3
3	7.06 (1H, d, $J = 8.4$ Hz)	131.1	7.04 (1H, d, $J = 8.5$ Hz)	131.1
4	-	130.9	-	130.9
5	7.06 (1H, d, $J = 8.4$ Hz)	131.1	7.04 (1H, d, $J = 8.5$ Hz)	131.1
6	6.69 (1H, d, $J = 8.4$ Hz)	116.3	6.67 (1H, d, $J = 8.5$ Hz)	116.3
7	2.83 (2H, m)	36.6	2.81 (2H, d, $J = 7.5$ Hz)	36.5
8	4.03 (1H, m) 3.70 (1H, m)	72.3	3.90-4.10 (1H, m) 3.58-3.78 (1H, m)	72.2
1'	4.29 (1H, d, $J = 7.8$ Hz)	104.1	4.27 (1H, d, $J = 7.7$ Hz)	104.5
2'	3.17 (1H, m)	75.3	3.16 (1H, t, $J = 7.9$ Hz)	75.2
3'	3.27 (1H, m)	78.1	3.18-3.33 (1H, m)	78.1
4'	3.24 (1H, m)	71.8	3.18-3.35 (1H, m)	71.7
5'	3.35(1H, m)	78.3	3.33-3.40 (1H, m)	78.2
6'	3.86 (1H, dd, $J = 11.9,$ 2.0 Hz) 3.66 (1H, dd, $J = 11.9,$ 5.2 Hz)	63.0	3.85 (1H, dd, $J = 12.3,$ 2.0 Hz) 3.56-3.75 (1H, m)	62.8

➤ DSS10 verbascoside



ภาพที่ 49 แสดงโครงสร้างของ DSS10

DSS10 มีลักษณะเป็น oil ชนิดสีน้ำตาลเหลือง mass spectrum ปรากฏสัญญาณที่ m/z 625.2145 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{29}H_{37}O_{15}$, 625.2132) มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{29}H_{36}O_{15}$ มีค่า degree of unsaturation (Ω) เท่ากับ 12 มีค่า specific rotation $[\alpha]_D^{25} = -100.00^\circ$ (c 0.0017, MeOH) และปรากฏสัญญาณการดูดกลืนที่ wave number (U_{max}) 3340, 2932, 2882, 1615, 1516, 1448, 1372, 1240, 1161, 1077, 1033 cm^{-1} แสดงว่ามีหมู่ hydroxyl, carbonyl และ aromatic ในโครงสร้าง จาก ^{13}C NMR, DEPT และ HMQC spectra พบสัญญาณของคาร์บอน 29 ตัว ประกอบไปด้วยสัญญาณของ carbonyl carbon ชนิด ester ที่ δ_C 168.4 (C-9) สัญญาณของ olefinic carbon 2 ตัวที่ δ_C 114.8 (C-10) และ 148.1 (C-11) สัญญาณของ aromatic carbon 12 ตัวที่ δ_C 131.6 (C-1''), 116.5 (C-2''), 144.7 (C-3''), 146.2 (C-4''), 117.2 (C-5''), 121.4 (C-6''), 127.7 (C-1'''), 115.4 (C-2'''), 146.8 (C-3'''), 149.8 (C-4'''), 116.7 (C-5''') และ 123.4 (C-6''') ทำให้ทราบว่า มีวง aromatic 2 วงเป็นองค์ประกอบในโครงสร้าง นอกจากนี้พบสัญญาณของ anomeric carbon บนวงน้ำตาล 2 ตัวดังนี้ที่ δ_C 104.2 (C-1) และ 103.1 (C-1') จึงทำให้ทราบว่า มีน้ำตาล 2 โมเลกุล เป็นองค์ประกอบในโครงสร้าง

จาก 1H NMR spectrum พบสัญญาณของ trans-olefinic proton 2 ตัวที่ δ_H 6.30 (H-10, d, $J = 15.9$ Hz) และ 7.62 (H-11, d, $J = 15.9$ Hz) พบสัญญาณของ ABX aromatic proton 2 ชุด ที่ δ_H 6.73 (H-2'', d, $J = 1.8$ Hz), 6.72 (H-5'', d, $J = 8.2$ Hz), 6.58 (H-6'', dd, $J = 8.2, 1.8$ Hz) และ δ_H 7.09 (H-2''', d, $J = 1.7$ Hz), 6.81 (1H-5''', d, $J = 8.2$ Hz) และ 6.98 (H-6''',

dd, $J = 8.2, 1.7$ Hz) แสดงว่าหมู่แทนที่บนวงแหวน benzene ทั้งสองวงอยู่ที่ตำแหน่ง 1, 3 และ 4 นอกจากนี้พบสัญญาณของ oxygenated methylene proton ที่ δ_H 3.68-3.85 (H-7a, m) และ 4.00-4.17 (H-7b, m) และพบสัญญาณของ benzylic methylene proton ที่ δ_H 2.81 (H-8, t, $J = 7.3$ Hz) แสดงว่า **DSS10** น่าจะเป็นสารในกลุ่ม phenyl ethanoid

พบสัญญาณของโปรตอนบนวงน้ำตาลที่ δ_H 4.40 (H-1, d, $J = 7.9$ Hz), 3.45 (H-2, t, $J = 9.1$ Hz), 3.83 (H-3, t, $J = 9.2$ Hz), 4.86-5.06 (H-4, m), 3.50-3.60 (H-5, m), 3.46-3.60 (H-6a, m), 3.60-3.78 (H-6b, m), 5.21 (H-1', brs), 3.87-4.00 (H-2', m), 3.54-3.70 (H-3', m), 3.25-3.42 (H-4', m), 3.51-3.68 (H-5', m) และ 1.15 (H-6', d, $J = 7.2$ Hz) จาก COSY spectrum พบ correlation ภายในวงน้ำตาลทั้ง 2 โมเลกุลดังนี้ น้ำตาลชนิดแรกพบ correlation ของ H-1 (δ_H 4.40) กับ H-2 (δ_H 3.45), H-2 (δ_H 3.45) กับ H-3 (δ_H 3.83), H-3 (δ_H 3.83) กับ H-4 (δ_H 4.86-5.06), H-4 (δ_H 4.86-5.06) กับ H-5 (δ_H 3.50-3.60) และ H-5 (δ_H 3.50-3.60) กับ H-6a (δ_H 3.46-3.60) และ H-6b (δ_H 3.60-3.78) จึงระบุได้ว่าน้ำตาลชนิดนี้คือ glucose ถัดมาพบ correlation ภายในวงของน้ำตาลอีกชนิดดังนี้ H-1' (δ_H 5.21) กับ H-2' (δ_H 3.87-4.00), H-2' (δ_H 3.87-4.00) กับ H-3' (δ_H 3.54-3.70), H-3' (δ_H 3.54-3.70) กับ H-4' (δ_H 3.25-3.42), H-4' (δ_H 3.25-3.42) กับ H-5' (δ_H 3.51-3.68) และ H-5' (δ_H 3.51-3.68) กับ และ H-6' (δ_H 1.15) เนื่องจากโปรตอนตำแหน่งที่ 6 คือ methyl proton จึงสามารถระบุได้ว่าน้ำตาลชนิดนี้คือ rhamnose

จากข้อมูล HMBC spectrum พบ correlation ของ H-3 (δ_H 3.83) กับ C-1' (δ_C 103.1) จึงทราบว่าตำแหน่ง oxygen บนคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของน้ำตาล glucose ต่อกับ C-1' (δ_C 103.1) ของน้ำตาล rhamnose ถัดมาพิจารณา correlation ภายในวง aromatic A พบ correlation ของ H-2'' (δ_H 6.73) กับ C-1'' (δ_C 131.6), C-3'' (δ_C 144.7), C-4'' (δ_C 146.2), C-6'' (δ_C 121.4) และ C-8 (δ_C 36.6) correlation ของ H-6'' (δ_H 6.58) กับ C-2'' (δ_C 116.5), C-4'' (δ_C 146.2), C-5'' (δ_C 117.2) และ C-8 (δ_C 36.6) correlation ของ H-5'' (δ_H 6.72) กับ C-1'' (δ_C 131.6), C-3'' (δ_C 144.7), C-4'' (δ_C 146.2) และ C-6'' (δ_C 121.4) ทำให้ยืนยันตำแหน่งภายในวงได้ และจาก correlation ของ H-2'' (δ_H 6.73) และ H-6'' (δ_H 6.58) กับ C-8 (δ_C 36.6) จึงทำให้ทราบว่าหมู่ ethoxy ต่อกับ aromatic A ที่ตำแหน่ง C-1'' (δ_C 131.6) ของ aromatic A และจากสัญญาณของ oxygenated quaternary carbon ที่ C-3'' (δ_C 144.7) และ C-4'' (δ_C 146.2) บน aromatic A ทำ

ให้ทราบได้ว่าหมู่ hydroxyl คือหมู่แทนที่บน C-3" และ C-4" ได้เป็นชิ้นส่วนของ hydroxytyrosol และจาก correlation ของ H-7a (δ_H 3.68-3.85) และ H-7b (4.00-4.17) กับ C-1 (δ_C 104.2) จึงบอกได้ว่าชิ้นส่วนดังกล่าวต่ออยู่กับ oxygen ที่ตำแหน่ง C-1 ของน้ำตาล glucose

เมื่อพิจารณา correlation ภายในวง aromatic B พบ correlation ของ H-2" (δ_H 7.09) กับ C-1" (δ_C 127.7), C-3" (δ_C 146.8), C-4" (δ_C 149.8), C-6" (δ_C 123.4) และ C-11 (δ_C 148.1) correlation ของ H-6" (δ_H 6.98) กับ C-2" (δ_C 115.4), C-4" (δ_C 149.8), C-5" (δ_C 116.7) และ C-11 (δ_C 148.1) correlation ของ H-5" (δ_H 6.81) กับ C-1" (δ_C 127.7), C-3" (δ_C 146.8), C-4" (δ_C 149.8) และ C-6" (δ_C 123.4) ทำให้ยืนยันตำแหน่งภายในวงได้ และจาก correlation ของ H-2" (δ_H 7.09) และ H-6" (δ_H 6.98) กับ C-11 (δ_C 148.1) จึงทราบได้ว่าชิ้นส่วน alkene นั้นต่ออยู่บน quaternary carbon C-1" (δ_C 127.7) ของ aromatic B และจาก olefinic proton H-10 (δ_H 6.30) และ H-11 (δ_H 7.62) และพบว่ามี correlation กับ carbonyl carbon ชนิด ester ที่ δ_C 168.4 (C-9) และจากสัญญาณของ oxygenated quaternary carbon ที่ C-3" (δ_C 146.8) และ C-4" (δ_C 149.8) บน aromatic A ทำให้ทราบได้ว่า หมู่แทนที่บน C-3" และ C-4" คือหมู่ hydroxyl ทำให้ได้ชิ้นส่วน trans-caffeic acid และพบว่าชิ้นส่วนนี้ต่ออยู่บนตำแหน่ง C-4 (δ_C 70.7) ของวงน้ำตาล glucose เนื่องจากพบ correlation ของ H-4 (δ_H 4.86-5.06) กับ C-9 (δ_C 168.4) เป็นโครงสร้าง **DSS10**

เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างที่ได้จากข้อมูล 1H และ ^{13}C NMR กับสารประกอบที่มีรายงานก่อนหน้า จึงระบุได้ว่า **DSS10** คือ verbascoside ^[38] โดยข้อมูลจาก 1H NMR และ ^{13}C NMR มีค่าใกล้เคียงกันดังตารางที่ 39 ซึ่งเป็นการรายงานการแยก verbascoside ครั้งแรกในดอกแคนา

ตารางที่ 39 แสดงข้อมูลการเปรียบเทียบค่า chemical shift (δ) จาก $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของ verbascoside และ DSS10

position	verbascoide ^[38]		DSS10	
	δ_{H} (ppm) (MeOD, 300 MHz)	δ_{C} (ppm) (MeOD, 75.1 MHz)	δ_{H} (ppm) (MeOD, 300 MHz)	δ_{C} (ppm) (MeOD, 75 MHz)
1	4.34 (1H, d, $J = 8.7$ Hz)	105.1	4.40 (1H, d, $J = 7.9$ Hz)	104.2
2	3.45 (1H, t, $J = 8.5$ Hz)	77.2	3.45 (1H, t, $J = 9.1$ Hz)	76.2
3	3.83 (1H, t, $J = 8.9$ Hz)	82.6	3.83 (1H, t, $J = 9.2$ Hz)	81.8
4	4.94 (1H, t, $J = 8.5$ Hz)	71.7	4.86-5.06 (1H, m)	70.7
5	3.59 (1H, m)	77.1	3.50-3.60 (1H, m)	76.0
6	3.59 (1H, m)	63.4	3.46-3.60 (1H, m)	62.4
	3.66 (1H, m)		3.60-3.78 (1H, m)	
1'	5.20 (1H, d, $J = 1.6$ Hz)	103.8	5.21 (1H, brs)	103.1
2'	3.93 (1H, d, $J = 3.0$ Hz)	73.2	3.87-4.00 (1H, m)	72.4
3'	3.64 (1H, d, $J = 9.2$ Hz)	73.0	3.54-3.70 (1H, m)	72.1
4'	3.32 (1H, d, $J = 9.2$ Hz)	74.6	3.25-3.42 (1H, m)	73.9
5'	3.62 (1H, m)	71.4	3.51-3.68 (1H, m)	70.5
6'	1.15 (3H, d, $J = 7.2$ Hz)	19.3	1.15 (3H, d, $J = 7.2$ Hz)	18.6
1''	-	132.4	-	131.6
2''	6.74 (1H, m)	117.4	6.73 (1H, d, $J = 1.8$ Hz)	116.5
3''	-	145.5	-	144.7
4''	-	147.0	-	146.2
5''	6.74 (1H, m)	118.2	6.72 (1H, d, $J = 8.2$ Hz)	117.2
6''	6.58 (1H, dd, $J = 8.0, 1.9$ Hz)	122.3	6.58 (1H, dd, $J = 8.3,$ 1.7 Hz)	121.4

1"	-	128.9	-	127.7
2"	7.06 (1H, d, $J = 2.1$ Hz)	116.2	7.09 (1H, d, $J = 1.7$ Hz)	115.4
3"	-	147.7	-	146.8
4"	-	150.7	-	149.8
5"	6.81 (1H, d, $J = 7.8$ Hz)	117.6	6.81 (1H, d, $J = 8.2$ Hz)	116.7
6"	6.98 (1H, dd)	124.1	6.98 (1H, dd, $J = 8.3,$ 1.7 Hz)	123.4
7	3.76 (1H, m) 4.09 (1H, m)	73.1	3.68-3.85 (1H, m) 4.00-4.17 (1H, m)	72.3
8	2.82 (2H, brt)	37.4	2.81 (2H, t, $J = 7.3$ Hz)	36.6
9	-	169.3	-	168.4
10	6.25 (1H, d, $J = 18.1$ Hz)	115.8	6.30 (1H, d, $J = 15.9$ Hz)	114.8
11	7.60 (1H, d, $J = 18.1$ Hz)	148.8	7.62 (1H, d, $J = 15.8$ Hz)	148.1

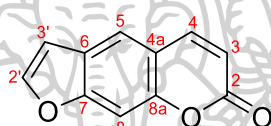


4.2 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนสกัด hexane ของลำต้นมะพร้าวทะเลทราย (*Dorstenia foetida* Schweinf)

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนสกัด hexane ของลำต้นมะพร้าวทะเลทราย (*Dorstenia foetida* Schweinf) โดยใช้เทคนิค column chromatography และ preparative TLC สามารถแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติกลุ่ม phytosterol 1 ชนิดซึ่งเป็นชนิดเดียวกับสารประกอบที่แยกได้จากดอกแคนาคือ β -sitosterol (DSS11) และกลุ่ม furanocoumarins 4 ชนิด

4.2.1 สารธรรมชาติกลุ่ม furanocoumarins

➤ DF2: psoralen



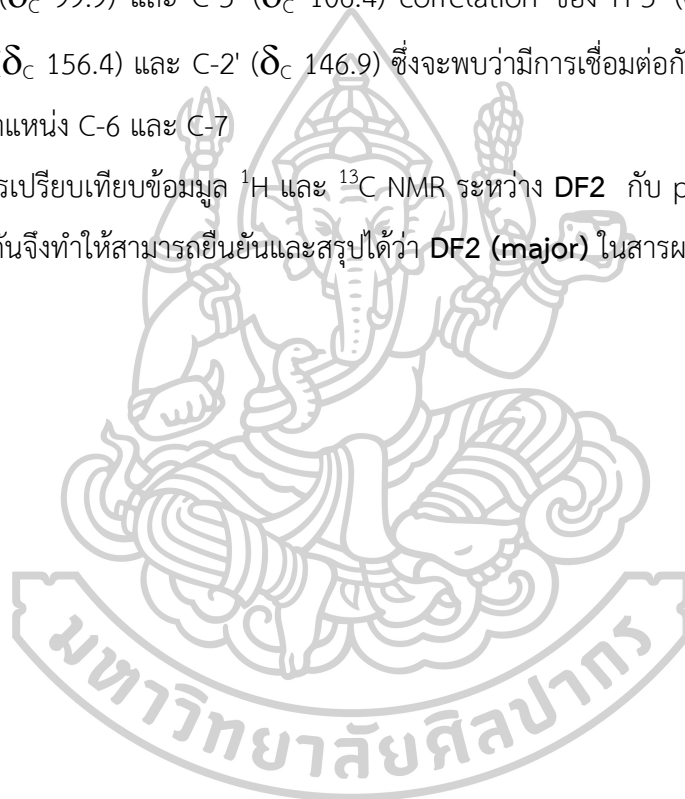
ภาพที่ 50 แสดงโครงสร้างของ DF2

DF2 มีลักษณะเป็นผลึกสีน้ำตาล โดย mass spectrum ปรากฏสัญญาณที่ m/z 209.0206 $[M+Na]^+$ ทำให้ทราบว่า DF2 มีสูตรโครงสร้างโมเลกุลเป็น $C_{11}H_6O_3$ และมีค่า degree of unsaturation (Ω) เท่ากับ 9 จาก ^{13}C NMR, DEPT และ HMQC spectrum พบสัญญาณของคาร์บอน 11 ตัว ซึ่งเป็นสัญญาณของ furanocoumarin skeleton โดยจะประกอบไปด้วยสัญญาณคาร์บอนของวง coumarin ที่ δ_C 161.1 (C-2), 114.6 (C-3), 144.1 (C-4), 115.4 (C-4a), 119.9 (C-5), 124.9 (C-6), 156.4 (C-7), 99.9 (C-8) และ 152.0 (C-8a) และสัญญาณคาร์บอนของวง furan ที่ δ_C 146.9 (C-2') และ 106.4 (C-3')

จาก 1H NMR spectrum พบสัญญาณของ proton บนวง coumarin ที่ δ_H 6.38 (H-3, d, $J = 9.6$ Hz), 7.81 (H-4, d, $J = 9.6$ Hz), 7.69 (H-5, s), 7.47 (H-8, s) และสัญญาณ proton บนวง furan ที่ δ_H 7.70 (H-2', d, $J = 2.3$ Hz) และ 6.84 (H-3', d, $J = 1.5$ Hz)

สำหรับ HMBC spectrum พบ correlation ที่สำคัญภายใน วง coumarin ดังนี้ correlation ของ H-3 (δ_{H} 6.38) กับ C-2 (δ_{C} 161.1) และ C-4a (δ_{C} 115.4) correlation ของ H-4 (δ_{H} 7.81) กับ C-2 (δ_{C} 161.1), C-5 (δ_{C} 119.9) และ C-8a (δ_{C} 152.0) correlation ของ H-5 (δ_{H} 7.69) กับ C-4 (δ_{C} 144.1), C-7 (δ_{C} 156.4), C-8 (δ_{C} 99.9), C-8a (δ_{C} 152.0) และ C-3' (δ_{C} 106.4) correlation ของ H-8 (δ_{H} 7.47) กับ C-4 (δ_{C} 144.1), C-4a (δ_{C} 115.4) และ C-6 (δ_{C} 124.9) และ correlation ภายในวง furan ดังนี้ correlation ของ H-2' (δ_{H} 7.70) กับ C-6 (δ_{C} 124.9), C-7 (δ_{C} 156.4), C-8 (δ_{C} 99.9) และ C-3' (δ_{C} 106.4) correlation ของ H-3' (δ_{H} 6.84) กับ C-6 (δ_{C} 124.9), C-7 (δ_{C} 156.4) และ C-2' (δ_{C} 146.9) ซึ่งจะพบว่าการเชื่อมต่อกันของวง coumarin กับ วง furan ที่ตำแหน่ง C-6 และ C-7

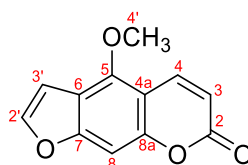
จากการเปรียบเทียบข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR ระหว่าง DF2 กับ psoralen ในตารางที่ 40 พบว่าเหมือนกันจึงทำให้สามารถยืนยันและสรุปได้ว่า DF2 (major) ในสารผสมคือ psoralen ^[39]



ตารางที่ 40 แสดงข้อมูลการเปรียบเทียบค่า chemical shift (δ) จาก $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของ psoralen และ DF2

position	Psoralen ^[39]		DF2	
	δ_{H} (ppm) (CDCl_3 , 300 MHz)	δ_{C} (ppm) (CDCl_3 , 75 MHz)	δ_{H} (ppm) (CDCl_3 , 300 MHz)	δ_{C} (ppm) (CDCl_3 , 75 MHz)
2	-	161.0	-	161.1
3	6.38 (1H, d, $J = 9.8$ Hz)	114.6	6.38 (1H, d, $J = 9.6$ Hz)	114.6
4	7.80 (1H, d, $J = 9.8$ Hz)	144.1	7.81 (1H, d, $J = 9.6$ Hz)	144.1
4a	-	115.4	-	115.4
5	7.68 (1H, s)	119.9	7.69 (1H, s)	119.9
6	-	124.9	-	124.9
7	-	156.4	-	156.4
8	7.46 (1H, s)	99.8	7.47 (1H, s)	99.9
8a	-	152.0	-	152.0
2'	7.70 (1H, d, $J = 2.0$ Hz)	146.9	7.70 (1H, d, $J = 2.3$ Hz)	146.9
3'	6.38 (1H, dd, $J = 2.0, 1.0$ Hz)	106.4	6.84 (1H, d, $J = 1.5$ Hz)	106.4

➤ DF3: bergapten



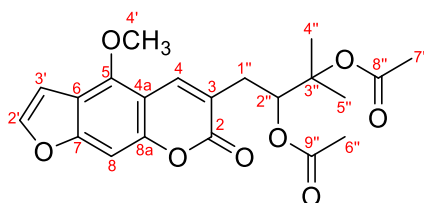
ภาพที่ 51 แสดงโครงสร้างของ DF3

DF3 มีลักษณะเป็นผลึกสีน้ำตาล โดย mass spectrum ปรากฏสัญญาณที่ m/z 239.0311 $[M+Na]^+$ ทำให้ทราบว่า DF3 มีสูตรโครงสร้างโมเลกุลเป็น $C_{12}H_8O_4$ และมีค่า degree of unsaturation (Ω) เท่ากับ 9 จากการเปรียบเทียบข้อมูล 1H และ ^{13}C NMR ของ DF3 และ DF2 พบว่า NMR มีความคล้ายกันมากแสดงว่า DF3 เป็นสารในกลุ่มของ furanocoumarins เช่นเดียวกัน สิ่งที่ DF3 แตกต่างจาก DF2 คือ NMR spectrum ของ DF3 ปรากฏสัญญาณของหมู่ methoxy โดยมี δ_C 60.1 และ δ_H 4.27 ซึ่งสอดคล้องกับ molecular mass ที่เพิ่มขึ้น 30 amu นอกจากนี้ 1H -NMR ไม่ปรากฏสัญญาณของ H-5 แสดงว่า aromatic proton ที่ตำแหน่ง C-5 ถูกแทนที่ด้วยหมู่ methoxy ข้อสรุปดังกล่าวได้รับการยืนยันจาก HMBC correlation ระหว่าง methoxy proton (δ_H 4.27) กับ C-5 (δ_C 146.9) และ correlation ของ H-4 และ H-3' กับ C-5 จึงสรุปได้ว่า DF3 คือ bergapten ^[39] และยืนยันจากการเปรียบเทียบข้อมูล 1H และ ^{13}C NMR ระหว่าง DF3 กับ bergapten ในตารางที่ 41

ตารางที่ 41 แสดงข้อมูลการเปรียบเทียบค่า chemical shift (δ) จาก $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของ bergapten และ DF3

position	Bergapten ^[39]		DF3	
	δ_{H} (ppm) (CDCl_3 , 300 MHz)	δ_{C} (ppm) (CDCl_3 , 75 MHz)	δ_{H} (ppm) (CDCl_3 , 300 MHz)	δ_{C} (ppm) (CDCl_3 , 75 MHz)
2	-	161.2	-	161.2
3	6.26 (1H, d, $J = 9.8$ Hz)	112.5	6.26 (1H, d, $J = 9.8$ Hz)	112.5
4	8.15 (1H, d, $J = 9.8$ Hz)	139.5	8.15 (1H, d, $J = 9.8$ Hz)	139.3
4a	-	106.4	-	106.4
5	-	149.6	-	149.6
6	-	122.7	-	124.9
7	-	158.4	-	158.4
8	7.12 (1H, s)	93.8	7.12 (1H, s)	93.8
8a	-	152.7	-	152.8
2'	7.59 (1H, d, $J = 2.5$ Hz)	144.8	7.59 (1H, d, $J = 2.4$ Hz)	144.8
3'	7.02 (1H, d, $J = 2.5$ Hz)	105.1	7.02 (1H, d, $J = 1.7$ Hz)	105.1
4'	4.27 (3H, s)	60.1	4.27 (3H, s)	60.1

➤ **DF4:** 5-Methoxy-3-(3-methyl-2,3-dihydroxybutyl)-psoralen-diacetate



ภาพที่ 52 แสดงโครงสร้างของ **DF4**

DF4 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวปนอยู่กับของเหลวหนืดสีเขียว โดย mass spectrum ปรากฏสัญญาณที่ m/z 425.1211 $[M+Na]^+$ ทำให้ทราบว่า **DF4** มีสูตรโครงสร้างโมเลกุลเป็น $C_{21}H_{22}O_8$ และมีค่า degree of unsaturation (Ω) เท่ากับ 11 จากการเปรียบเทียบข้อมูล 1H และ ^{13}C NMR ของ **DF4** และ **DF3** พบว่า NMR มีความใกล้เคียงกันแสดงว่า **DF4** เป็นสารในกลุ่มของ furanocoumarins เช่นเดียวกับ **DF3** และมีโครงสร้างหลักที่เหมือนกับ **DF3** แต่แตกต่างจาก **DF3** คือ NMR spectrum ของ **DF4** ปรากฏสัญญาณของ methylene group ที่ δ_C 30.9 (C-1''), δ_H 3.06 (H-1''a, ddd, $J = 14.5, 2.4, 1.5$ Hz) และ 2.70 (H-1''b, dd, $J = 14.4, 10.4$ Hz) สัญญาณของ oxygenated methine group ที่ δ_C 76.1 (C-2'') และ δ_H 5.36 (H-2'', dd, $J = 10.3, 2.4$ Hz) สัญญาณของ oxygenated quaternary carbon ที่ δ_C 82.3 (C-3'') สัญญาณของ methyl group 2 หมู่ ที่ δ_C 22.4 (C-4'') และ 22.5 (C-5'') และสัญญาณของ acetate group 2 หมู่ ได้แก่ carbonyl carbon 2 ตัวที่ δ_C 170.2 (C-8'') และ 170.1 (C-9'') และ methyl carbon 2 ตัวที่ δ_C 22.1 (C-6'') และ 20.1 (C-7'') และนอกจากนี้ไม่พบสัญญาณของ H-3 แสดงว่ามีหมู่แทนที่อยู่ที่ตำแหน่ง C-3

จาก HMBC correlation พบ correlation ของ H-1''a (δ_H 3.06) และ H-1''b (δ_H 2.70) กับ C-2'' (δ_C 76.1) และ C-3'' (δ_C 82.3) พบ correlation ของ H-2'' (δ_H 5.36) กับ C-9'' (δ_C 170.1) พบ correlation ของ H-4'' (δ_H 1.58) กับ C-2'' (δ_C 76.1), C-3'' (δ_C 82.3) และ C-5'' (δ_C 22.5) พบ correlation ของ H-5'' (δ_H 1.60) กับ C-2'' (δ_C 76.1), C-3'' (δ_C 82.3) และ C-4'' (δ_C 22.4) พบ correlation ของ H-6'' (δ_H 2.01) กับ C-9'' (δ_C 170.1) และ correlation ของ H-7'' (δ_H 1.99) กับ C-8'' (δ_C 170.2) ทำให้สามารถยืนยันได้ว่าสัญญาณที่เพิ่มขึ้นมาคือชิ้นส่วนของ acetylated 3-methyl-2,3-dihydroxybutyl side chain และจาก HMBC correlation ของ H-4'' (δ_H 7.99) กับ C-1'' (δ_C 30.9) ยืนยันได้ว่า side chain ดังกล่าวเป็นหมู่แทนที่ที่ต่ออยู่ที่ตำแหน่ง C-3

จากการเปรียบเทียบข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR ระหว่าง DF4 กับ 5-Methoxy-3-(3-methyl-2,3-dihydroxybutyl)-psoralen-diacetate ในตารางที่ 42 พบว่าเหมือนกันจึงทำให้สามารถยืนยันและสรุปได้ว่า DF4 คือ 5-Methoxy-3-(3-methyl-2,3-dihydroxybutyl)-psoralen-diacetate ^[19]

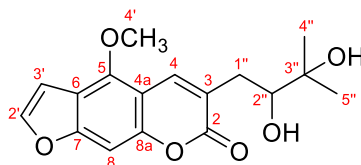
ตารางที่ 42 แสดงข้อมูลการเปรียบเทียบค่า chemical shift (δ) จาก ^1H -NMR และ ^{13}C -NMR ของ 5-Methoxy-3-(3-methyl-2,3-dihydroxybutyl)-psoralen-diacetate และ DF4

position	5-Methoxy-3-(3-methyl-2,3-dihydroxybutyl)-psoralen-diacetate ^[19]		DF4	
	δ_{H} (ppm) (CDCl ₃ , 300 MHz)	δ_{C} (ppm) (CDCl ₃ , 75 MHz)	δ_{H} (ppm) (CDCl ₃ , 300 MHz)	δ_{C} (ppm) (CDCl ₃ , 75 MHz)
2	-	161.9	-	161.9
3	-	121.3	-	121.4
4	7.99 (1H, d, $J=0.6$ Hz)	136.0	7.99 (1H, s)	136.0
4a	-	106.7	-	106.8
5	-	149.0	-	149.0
6	-	112.8	-	112.9
7	-	157.8	-	157.8
8	7.13 (1H, dd, $J = 1.0,$ 0.6 Hz)	93.7	7.13 (1H, s)	93.8
8a	-	152.0	-	152.0
2'	7.58 (1H, d, $J = 2.4$ Hz)	144.7	7.58 (1H, d, $J = 2.4$ Hz)	144.7
3'	7.00 (1H, dd, $J = 2.4,$ 1.0 Hz)	104.9	7.00 (1H, dd, $J = 2.3,$ 0.8 Hz)	104.9
4'	4.26 (3H, s)	60.1	4.26 (3H, s)	60.2

1''	3.04 (1H, dd, $J = 14.5$, 2.4 Hz) 2.70 (1H, dd, $J = 14.5$, 10.3 Hz)	30.8	3.05 (1H, ddd, $J = 14.5$, 2.4, 1.5 Hz) 2.70 (1H, dd, $J = 14.4$, 10.4 Hz)	30.9
2''	5.36 (1H, dd, $J = 10.3$, 2.4 Hz)	76.1	5.36 (1H, dd, $J = 10.3$, 2.4 Hz)	76.1
3''	-	82.3	-	82.3
4''	1.59 (3H, s)	22.43	1.58 (3H, s)	22.4
5''	1.58 (3H, s)	22.37	1.60 (3H, s)	22.5
6''	2.01 (3H, s)	22.0	2.01 (3H, s)	22.1
7''	1.98 (3H, s)	20.8	1.99 (3H, s)	20.8
8''	-	170.2	-	170.2
9''	-	107.1	-	170.1



- **DF5:** 5-methoxy-3-(3-methyl-2,3-dihydroxybutyl)-psoralen



ภาพที่ 53 แสดงโครงสร้างของ DF5

DF5 มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลือง โดย mass spectrum ปรากฏสัญญาณที่ m/z 319.1174 $[M+H]^+$ ทำให้ทราบว่า DF5 มีสูตรโครงสร้างโมเลกุลเป็น $C_{17}H_{18}O_6$ และมีค่า degree of unsaturation (Ω) เท่ากับ 9 จากการเปรียบเทียบข้อมูล 1H และ ^{13}C NMR ของ DF5 และ DF4 พบว่า NMR มีความใกล้เคียงกันมากแสดงว่า DF5 เป็นสารในกลุ่มของ furanocoumarins เช่นเดียวกัน แต่มีสิ่งที่ DF5 แตกต่างจาก DF4 คือ NMR spectrum ของ DF5 ไม่ปรากฏสัญญาณของหมู่ acetate ทั้ง 2 หมู่ ซึ่งสอดคล้องกับ molecular mass ที่ลดลง 84 amu ดังนั้น side chain คือ acetylated 3-methyl-2,3-dihydroxybutyl ซึ่งต่ออยู่ที่ตำแหน่ง C-3 โดยยืนยันจาก HMBC correlation ระหว่าง H-4 (δ_H 8.07) กับ C-1'' (δ_C 34.0) และจากการเปรียบเทียบข้อมูล 1H และ ^{13}C NMR ระหว่าง DF5 กับ 5-Methoxy-3-(3-methyl-2,3-dihydroxybutyl)-psoralen ในตารางที่ 43 พบว่าเหมือนกันจึงทำให้สามารถยืนยันและสรุปได้ว่า DF5 คือ 5-methoxy-3-(3-methyl-2,3-dihydroxybutyl)-psoralen ^[14]

ตารางที่ 43 แสดงข้อมูลการเปรียบเทียบค่า chemical shift (δ) จาก $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของ 5-Methoxy-3-(3-methyl-2,3-dihydroxybutyl)-psoralen และ DF5

position	5-Methoxy-3-(3-methyl-2,3-dihydroxybutyl)-psoralen ^[14]		DF5	
	δ_{H} (ppm) (CDCl_3 , 300 MHz)	δ_{C} (ppm) (CDCl_3 , 75 MHz)	δ_{H} (ppm) (CDCl_3 , 300 MHz)	δ_{C} (ppm) (CDCl_3 , 75 MHz)
2	-	163.4	-	163.5
3	-	122.6	-	122.5
4	8.09 (1H, s)	137.1	8.07 (1H, s)	137.2
4a	-	106.8	-	106.8
5	-	149.0	-	149.0
6	-	112.7	-	112.7
7	-	157.8	-	157.8
8	7.14 (1H, s)	93.5	7.08 (1H, s)	93.4
8a	-	151.8	-	151.8
2'	7.59 (1H, d, $J = 2.5$ Hz)	144.7	7.57 (1H, d, $J = 2.4$ Hz)	144.7
3'	7.02 (1H, dd, $J = 2.5$, 1.0 Hz)	105.0	7.00 (1H, dd, $J = 3.2$, 0.9 Hz)	105.0
4'	4.27 (3H, s)	60.0	4.25 (3H, s)	60.0
1''	2.88 (1H, dd, $J = 14.3$, 2.1 Hz) 2.58 (1H, dd, $J = 14.3$, 10.0 Hz)	34.2	2.86 (1H, dd, $J = 14.2$, 1.2 Hz) 2.55 (1H, dd, $J = 14.2$, 10.2 Hz)	34.0
2''	3.71 (1H, dd, $J = 10.0$, 2.1 Hz)	77.3	3.72 (1H, dd, $J = 10.2$, 2.0 Hz)	77.2
3''	-	72.9	-	73.0
4''	1.33 (3H, s)	26.2	1.32 (3H, s)	26.2
5''	1.29 (3H, s)	23.9	1.28 (3H, s)	23.9

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการศึกษาขององค์ประกอบทางเคมีจากดอกแคนา *Dolichandrone serrulata* (DC.) Seem. สามารถแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติได้ทั้งหมด 12 ชนิด เป็นสารธรรมชาติใหม่ 1 ชนิดคือ 2-O-stearoyl-1-O-(3-O-stearoyl olenoyl)- α -L-arabinopyranose (DSS8) และเป็นสารที่มีรายงาน 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 terpene และ phytosterol คือ ursolic acid (DSS1) β -sitosterol (DSS 11) และ β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside (DSS12) กลุ่มที่ 2 iridoid และ iridoid glucoside 4 ชนิด ได้แก่ (-)-rengyolone (DSS2), cleroidicin C (DSS3), cleroidicin D (DSS4) และ 6-O-trans-feruloyl catalpol (DSS5) กลุ่มที่ 3 cycloartane 2 ชนิด ได้แก่ 24-methylenecycloartane (DSS6) และ 24-methylenecycloartane-3,28-diol (DSS7) และกลุ่มสุดท้าย phenolic glycoside 2 ชนิด คือ salidroside (DSS9) และ verbascoside (DSS10) โดย เป็นการรายงานการแยก DSS1, DSS3, DSS4, DSS5, DSS6, DSS7, DSS9, DSS11 และ DSS12 ในแคนาเป็นครั้งแรก

ผลการศึกษาขององค์ประกอบทางเคมีจากส่วนสกัด hexane ของลำต้นมะพร้าวทะเลทราย (*Dorstenia foetida* Schweinf) สามารถแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติกลุ่ม phytosterol 1 ชนิดซึ่งเป็นชนิดเดียวกับสารประกอบที่แยกได้จากดอกแคนาคือ β -sitosterol (DF1) และกลุ่ม furanocoumarins 4 ชนิด สารผสมระหว่าง psoralen (DF2) และ bergapten (DF3), 5-Methoxy-3-(3-methyl-2,3-dihydroxybutyl)-psoralen-diacetate (DF4) และ 5-methoxy-3-(3-methyl-2,3-dihydroxybutyl)-psoralen (DF5)

จากการทดสอบการออกฤทธิ์ของส่วนสกัดหยาบต่าง ๆ ต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์ไลน์ HN22, HCT116, HT29, MDA-MB-231, MCF7, HeLa และ HaCaT พบว่าส่วนสกัด hexane, ethyl acetate และ *n*-BuOH จากดอกแคนาและส่วนสกัด hexane ของมะพร้าวทะเลทรายมีแนวโน้มของการออกฤทธิ์ที่ดี และจากการศึกษาการออกฤทธิ์ขององค์ประกอบทางเคมีจากส่วนสกัดดังกล่าวพบว่ามีสารบริสุทธิ์จากดอกแคนา 2 ชนิดที่มีความสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้แก่ ursolic acid (DSS1) มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำคอ (HN22), มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HCT116), มะเร็งเต้านมชนิด MCF7 และชนิด MDA-MB-231 โดยมีค่า IC₅₀ 26.55, 19.83, 34.06 และ 24.60 μ M ตามลำดับ และ 24-methylenecycloartanol

(DSS6) มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 62.55 และการทดสอบการออกฤทธิ์ของ สารบริสุทธิ์จากมะพร้าวทะเลทรายต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์ไลน์ชนิดต่าง ๆ พบว่า 5-Methoxy-3-(3-methyl-2,3-dihydroxybutyl)-psoralen-diacetate (DF4) มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HCT116) โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 126.1 ± 13.2 µM จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งพบว่า ursolic acid (DSS1) เป็นสารบริสุทธิ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งที่ดีที่สุด และมีปริมาณสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ค่อนข้างมาก ดังนั้น ursolic acid (DSS1) จึงเป็นที่น่าสนใจในการนำมาศึกษาการออกแบบและปรับเปลี่ยนโครงสร้างเพื่อเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดียิ่งขึ้น

จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งของ ursolic acid มีนำมาสู่การออกแบบและสังเคราะห์อนุพันธ์ของ ursolic acid โดยปรับเปลี่ยนหมู่แทนที่ hydroxy ตำแหน่งที่ 3 และ หมู่ carboxylic ตำแหน่งที่ 28 ของ ursolic acid เป็น acetate และ amide ตามลำดับ ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ออกแบบโมเลกุล 6 ชนิดได้แก่ UAD1, UAD2, UAD3, UAD4, UAD5 และ UAD6 ทั้งนี้ได้ใช้ Molecular Docking ในการอธิบายพลังงานและศึกษาการเข้าจับกันระหว่างโมเลกุลกับบริเวณ active site ของโปรตีนดังนี้ การเข้าจับระหว่างโมเลกุล 4 ชนิด ursolic acid UAD1 UAD2 และ UAD3 กับบริเวณ active site ของโปรตีน human glucokinase ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญในกระบวนการ glucose metabolism ของเซลล์ที่มีรหัสโครงสร้างโปรตีน 1v4s พบว่าเกิดการสร้างพันธะในบริเวณปากโพรง โดย binding energy ของโมเลกุลทั้ง 4 มีค่าเท่ากับ -93.87, -90.80, -96.79 และ -91.93 kcal/mol ตามลำดับ เมื่อพิจารณาอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างกรดอะมิโนกับโมเลกุลในบริเวณโพรงดังกล่าว พบการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่าง carbonyl, hydroxy ตำแหน่งที่ 28 และ hydroxy ตำแหน่งที่ 3 ของ ursolic acid กับกรดอะมิโน LYS414, SER441 และ GLY80 โดยมีความยาวพันธะ 2.35, 2.49 และ 2.61 Å ตามลำดับ การสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่าง acetate carbonyl ตำแหน่งที่ 31 ของ UAD1 กับกรดอะมิโน LYS414 มีความยาวพันธะเท่ากับ 1.66 Å พบพันธะไฮโดรเจนระหว่าง acetate carbonyl ตำแหน่งที่ 31 และ carbonyl ตำแหน่งที่ 37 ของ UAD2 กับกรดอะมิโน ARG333 และ SER445 ความยาวพันธะเท่ากับ 2.10 และ 1.77 Å ตามลำดับ และพบพันธะไฮโดรเจนระหว่าง acetate carbonyl ตำแหน่งที่ 31 ของ UAD3 กับกรดอะมิโน LYS169 และ GLY229 ความยาวพันธะเท่ากับ 2.41 และ 2.67 Å และหมู่ fluorine ของ UAD3 กับกรดอะมิโน SER109 ความยาวพันธะเท่ากับ 2.83 Å การเข้าจับระหว่างโมเลกุล 4 ชนิด ursolic acid, UAD1, UAD2 และ UAD3 กับบริเวณปากโพรงโปรตีน complex of wild type B-RAF with

sorafenib ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องในการส่งสัญญาณภายในเซลล์ที่เกิดการกลายพันธุ์ มีรหัสโครงสร้างโปรตีน 1uwh โดย binding energy ของสารทั้ง 4 ชนิดมีค่าเท่ากับ -104.59, -102.52, -127.51 และ -135.24 kcal/mol ตามลำดับ เมื่อพิจารณาอันตรกิริยาของพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลที่ออกแบบกับหมู่อะมิโน พบ carbonyl ตำแหน่งที่ 37, NH ของหมู่ amide และ carbonyl ตำแหน่งที่ 28 ของ UAD2 สร้างพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโน LYS482, GLU500 และ ASN499 ความยาวพันธะเท่ากับ 2.49, 2.82 และ 3.10 Å ตามลำดับ และยังพบการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่าง carbonyl ตำแหน่งที่ 37 และ NH ของหมู่ amide ของ UAD3 กับกรดอะมิโน LYS482 ที่ความยาวพันธะ 2.48 Å และ GLU500 ที่ความยาวพันธะ 2.38 Å ตามลำดับ ส่วน ursolic acid กับ UAD1 ไม่มีการเกิดพันธะไฮโดรเจนกับโปรตีน 1uwh แต่เกิดแรงแวนเดอร์วาลส์กับ 1uwh โดยเกิดอันตรกิริยากับกรดอะมิโนที่สำคัญคือ GLU500 การเข้าจับระหว่างโมเลกุล 4 ชนิด ursolic acid, UAD1, UAD2 และ UAD3 กับบริเวณ active site ของโปรตีน EGFR (PDB ID:1M17) ซึ่งเป็น receptor โปรตีนบริเวณผิวของเซลล์ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนเซลล์ซึ่งเกี่ยวข้องโดยตรงกับมะเร็งเต้านมและมะเร็งปอด พบว่าเกิดการซ้อนทับกันของโมเลกุลทั้ง 4 ชนิด กับ Erlotinib ซึ่งเป็นยาที่อยู่ในตำแหน่ง receptor ของโปรตีน โดย binding energy ของสารทั้ง 4 ชนิดมีค่าเท่ากับ -86.51, -91.47, -92.56 และ -108.91 kcal/mol ตามลำดับ จากการพิจารณาอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างกรดอะมิโนกับโมเลกุลพบพันธะไฮโดรเจนระหว่าง acetate carbonyl ตำแหน่งที่ 31 ของ UAD1 กับ THR830 ที่ความยาวพันธะ 2.77 Å พันธะไฮโดรเจนระหว่าง carbonyl ตำแหน่งที่ 37 และ H ของหมู่ amide ของ UAD2 กับ CYS773 และ HIS781 ความยาวพันธะ 2.12 และ 2.60 Å พันธะไฮโดรเจนระหว่าง carbonyl ตำแหน่งที่ 37 และหมู่ F ของ UAD3 กับ CYS773, HIS781 และ PHE771 มีความยาวพันธะ 2.03, 2.42 และ 2.31 Å ตามลำดับ การเข้าจับระหว่างโมเลกุล ursolic acid, UAD4, UAD5 และ UAD6 กับบริเวณ active site ของโปรตีนชนิด HER2 (PDB ID: 3RCD) ซึ่งมีหน้าที่กระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม พบการซ้อนทับกับ TAK-285 ซึ่งเป็นลิแกนด์ที่จำเพาะต่อการยับยั้งการทำงานของโปรตีนชนิดนี้ พบว่าเกิดการสร้างพันธะในบริเวณปากโพรง โดย binding energy ของโมเลกุลทั้ง 4 ชนิด มีค่าเท่ากับ -89.10, -102.89, -110.31 และ -102.74 kcal/mol ตามลำดับ จาก binding energy ของอนุพันธ์ที่ออกแบบนั้นต่ำกว่า ursolic acid แสดงให้เห็นว่าอนุพันธ์ที่ออกแบบนั้นมีการเข้าจับกับโปรตีนได้ดีกว่า เมื่อพิจารณาพันธะไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นระหว่างกรดอะมิโนกับโมเลกุลที่ออกแบบพบการสร้างพันธะระหว่าง carbonyl ตำแหน่งที่ 28 ของ ursolic acid กับ THR862 และ ASP863 ความยาว

พันธะ 2.29 และ 2.10 Å ตามลำดับ พันธะไฮโดรเจนระหว่าง acetate carbonyl ตำแหน่งที่ 31 และ H ของหมู่ amide ของ UAD4 กับ ALA730 และ MET80 ความยาวพันธะ 2.16 และ 2.86 Å พันธะไฮโดรเจนระหว่าง acetate carbonyl ตำแหน่งที่ 31 ของ UAD5 และ UAD6 กับ ARG849 ความยาวพันธะ 2.54 และ 2.89 Å ตามลำดับ จากผลการศึกษาของ Molecular Docking พบว่า Binding energy ของอนุพันธ์ที่ออกแบบส่วนใหญ่มีค่าต่ำกว่า ursolic acid และมีการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างอนุพันธ์กับ amino acid residue เพิ่มขึ้นในตำแหน่ง acetate ของทุกอนุพันธ์ และตำแหน่งเอมีนของ UAD4 ซึ่งจากแนวโน้มค่า Binding energy ที่ลดลงและการสร้างพันธะไฮโดรเจนที่เพิ่มขึ้นคาดว่าจะทำให้อนุพันธ์ที่ออกแบบนั้นมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเพิ่มขึ้น ซึ่งจากการศึกษา Molecular Docking จึงนำไปสู่การสังเคราะห์อนุพันธ์ UAD1 ถึง UAD6

ในงานวิจัยนี้สามารถสังเคราะห์อนุพันธ์ของ ursolic acid ได้ทั้งสิ้น 4 ตัวคือ UAD1, UAD4, UAD5 และ UAD6 โดยผ่านปฏิกิริยาหลัก 3 ปฏิกิริยา ได้แก่ปฏิกิริยา acetylation ปฏิกิริยา acid chloride formation และปฏิกิริยา amide formation ซึ่งมี การปรับเปลี่ยนโครงสร้างของ ursolic acid ที่ตำแหน่ง C-3 และ C-28 มีร้อยละผลผลิตที่ได้ดังนี้ 85.0% (UAD1), 32.3% (UAD4), 51.0% (UAD5) และ 27.3% (UAD6) โดยอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้จะถูกนำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งต่อไป และอย่างไรก็ตามในบางขั้นตอนของการสังเคราะห์อาจต้องมีการปรับเปลี่ยนสภาวะในการสังเคราะห์เพื่อให้ได้ร้อยละผลผลิตที่มากขึ้นและสามารถนำไปสู่การสังเคราะห์อนุพันธ์อีก 2 ตัวคือ UAD2 และ UAD3 ได้สำเร็จ

รายการอ้างอิง





ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	วัชรภา จิตต์การุณย์
วุฒิการศึกษา	ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมี
ผลงานตีพิมพ์	-Publication Rayanil, K., Sutassanawichanna, W., Jantham, J., Jitkaroon, W., Obsuwan, K., Sanongkiet, S. (2022). Phenanthrenes and bibenzyls from the stems of <i>Dendrobium sonia</i> 'Red Jo' and their anti-inflammatory activity. <i>J. Srinakharinwirot Univ. Sci. Technol.</i> 14 (27, January-June), 1–12. Pengnam, S., Jitkaroon, W., Srisuphan, R., Charoensuksai, P., Wongprayoon, P., Rayanil, K. (2023). Furanocoumarin compounds isolated from <i>Dorstenia foetida</i> potentiate irinotecan anticancer activity against colorectal cancer cells. <i>Acta Pharm.</i> accepted
	-Poster Presentation Jitkaroon, W., Sutassanawichanna, W., Rayanil, K. (2020). Phenanthrenes and bibenzyls from <i>Dendrobium</i> 'Suree Classic', International Congress on Science, Technology and Technology-based Innovation (STT46), 5-7 October 2020, Bangkok, Thailand.
	-Oral Presentation Jitkaroon, W., Charoensuksai, P., Wongprayoon, P., Rayanil, K. (2022). Cytotoxic chemical constituents from the flowers of <i>Dolichandrone serrulata</i> (DC.) Seem., The Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON 2022), 30 June - 01 July 2022, Bangkok, Thailand.
รางวัลที่ได้รับ	พ.ศ. 2561-2562 ได้รับทุนการศึกษาไทยปาร์คเกอร์โรซึ่งต่อเนื่องในการศึกษาระดับปริญญาตรี

พ.ศ. 2563 ได้รับรางวัลเพชรจรัสฟ้าวัฒนาศิลปากร
และเข้าร่วม Poster Presentation ในงานประชุมวิชาการ The
46th International Conference on Science and Technology of
Thailand - based Innovation (STT 46)

พ.ศ. 2564 ได้รับทุนการศึกษาสำหรับนักศึกษาในหลักสูตรวิทยาศาสตร
มหาบัณฑิตเพื่อเป็นผู้ช่วยวิจัย

พ.ศ. 2565 เข้าร่วม Oral Presentation ในงานประชุมวิชาการ Pure and
Applied Chemistry International Conference 2022 (PACCON
2022)

พ.ศ. 2566 ได้รับทุนการศึกษา Erasmus ของสหภาพยุโรป เพื่อเดินทางไป
ศึกษาแลกเปลี่ยนและทำวิจัยระยะสั้นที่ university of Bialystok ประเทศ
โปแลนด์



1. มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, ค. แคนา. 2553; Available from: <https://apps.phar.ubu.ac.th/phargarden/main.php?action=viewpage&pid=28>.
2. Medthai, แคนา สรรพคุณและประโยชน์ของต้นแคนา 23 ข้อ. 2020.
3. บุญก้อแก้ว, ร.ด.พ. ฐานข้อมูลเภสัชชาติวิถี ฐานข้อมูลพันธุ์ไม้ดอกไม้ประดับ. 2016; Available from: <https://www.addrun.org/>.
4. ไทยรัฐออนไลน์. “มะพร้าวทะเลทราย” ปลูกกระถางตั้งโต๊ะสวย. 2016; Available from: <https://www.thairath.co.th/content/630546>.
5. Marwah R., M.O., Mahrooqi R., Gouri B., Abadi H.A., Khamis S. , *Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman*. Food Chem., 2007. **101**: p. 465-470.
6. Thomas D., K.W., Manuela H., Ju Ju (Burriwee) W., Jim K., Subra V., Joanne J., Ulrike L, *Phytochemical Characterization of the Australian (Aboriginal) Medicinal Plant Dolichandrone heterophylla and Influence of Selected Isolated Compounds on Human Keratinocytes*. Nat. Prod. Commun, 2008. **3**: p. 1387-1394.
7. Badgujar V. B., S.S.J., *Anxiolytic effects of Dolichandrone falcata Seem, Bignoniaceae, stem-bark in elevated plus maze and marble burying test on mice*. Braz. J. Pharmacogn., 2010. **20**: p. 773-780.
8. Nguyen T. V., D.Q.L., Nguyen A. T., Nguyen T. T., Tran L. V., Ngoc A. H., Tran C. V., Tran S. V., Tran T. P. T., *New cycloartanes and new iridoids from Dolichandrone spathacea collected in the mangrove forest of Soc Trang province, Vietnam*. J. Asian Nat. Prod. Res. , 2017: p. 1477-2213.
9. Phuc-Dam N., A.A., Sophie C., Catherine L., *Antimicrobial Constituents from Leaves of Dolichandrone spathacea and Their Relevance to Traditional Use*. . Planta. Med. Int. , 2018. **5**: p. 17-23.
10. Sinaphet, B., Noiarsa, P., Rujirawat, S., Otsuka, H.i, Kanchanapoom T., *Dolichandroside, a new phenolic triglycoside from Dolichandrone serrulata (DC.) Seem*. Journal of natural medicines, 2006. **60**(3): p. 251-254.
11. Phanthong P., M.N.P., Chancharunee S., Mangmool S., Anantachoke N., Bunyapraphatsara N., *Biological activity of Dolichandrone serrulata flowers*

- and their active components. *Nat. Prod. Commun.*, 2015. **10**(8): p. 1934578X1501000819.
12. Yannasithinon S., C.C., Sawatpanich T., Iamsaard S., *Dolichandrone serrulata* flower extract ameliorates male reproductive damages in type 2 diabetic rats. *Andrologia*, 2021. **53**(2): p. e13911.
 13. Ngadjuia T. B., D.E., Tamboue H., Foguea K., Abegaz M. B., *Prenylated flavanones from the twigs of Dorstenia mannii*. *Phytochemistry*, 1999. **50**: p. 1401-1406.
 14. Franke K., P.A., Masaoud M., Adam G., Schmidt J., *Furanocoumarins from Dorstenia gigas*. *Phytochemistry*, 2001. **56**: p. 611-621.
 15. Caceresa A., R.L., Simoneb De F., Martinob De G., Saturninob C., Saturninob P., Aquino R., *Furanocoumarins from the aerial parts of Dorstenia contrajerva*. *Fitoterapia*, 2001. **72**: p. 376-381.
 16. Ngadjuia T. B., D.E., Abegazb M. B., Fotsoa S., Tamboue H., *Dinklagins A, B and C: three prenylated flavonoids and other constituents from the twigs of Dorstenia dinklagei*. *Phytochemistry*, 2002. **61**: p. 99-104.
 17. Ngadjui T. B., N.B., Dongo E., Kouam F. S., Abegaz M. B., *Prenylated and geranylated chalcones and flavones from the aerial parts of Dorstenia ciliata*. *Bull. Chem. Soc. Ethiop.*, 2002. **16**(2): p. 157-163.
 18. Adem A. F., K.V., Mbaveng T. A., Heydenreich M., Ndakala A., Irungu B., Efferth T., Yenesew A., *Cytotoxic benzylbenzofuran derivatives from Dorstenia kameruniana*. *Fitoterapia*, 2018. **128**: p. 26-30.
 19. Heinke R., F.K., Porzel A., Wessjohann A. L., Awadh Ali A. N., Schmidt J., *Furanocoumarins from Dorstenia foetida*. *Phytochemistry*, 2011. **72**: p. 929-934.
 20. Bai K.-K., Y.Z., Chen F.-L., Li F., Li W.-Y., Guo Y.-H., *Synthesis and evaluation of ursolic acid derivatives as potent cytotoxic agents*. *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 2012. **22**(7): p. 2488-2493.
 21. Dong H., Y.X., Xie J., Xiang L., Li Y., Ou M., Chi T., Liu Z., Yu S., Gao Y., *UP12, a novel ursolic acid derivative with potential for targeting multiple signaling*

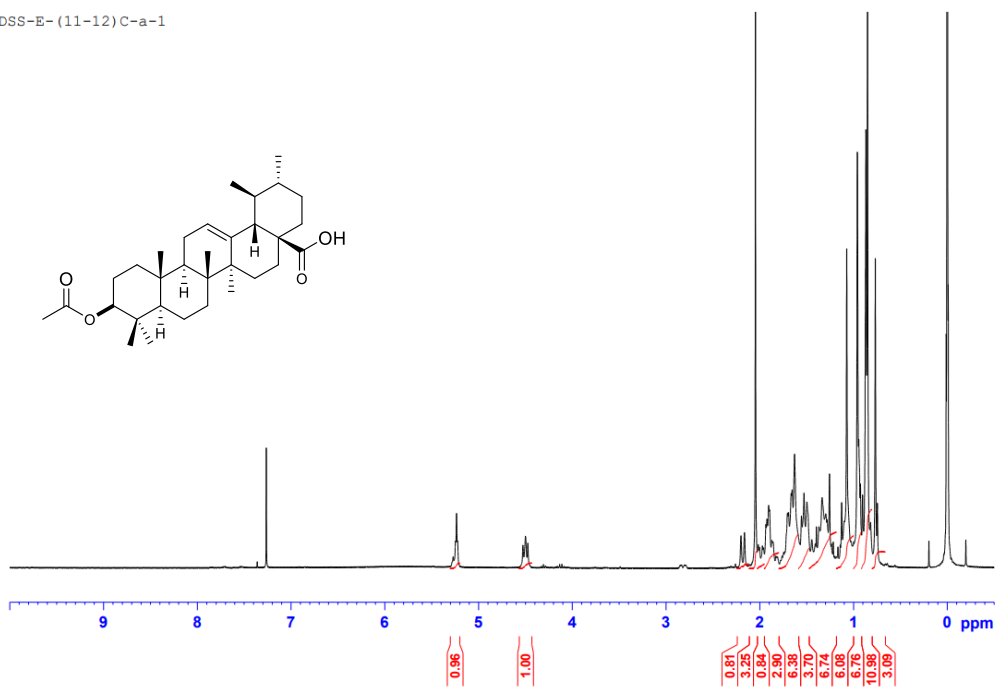
- pathways in hepatocellular carcinoma*. *Biochem. Pharmacol.*, 2015. **93**(2): p. 151-162.
22. Li S., L.G., Yang X., Meng Q., Yuan S., He Y., Sun D., *Design, synthesis and biological evaluation of artemisinin derivatives containing fluorine atoms as anticancer agents*. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* , 2018. **28**(13): p. 2275-2278.
 23. Marina E., K.S., Shinya M., Makoto I., Makoto U. , *Isolation, structure determination and structure–activity relationship of anti-toxoplasma triterpenoids from Quercus crispula Blume outer bark*. . *J. Wood Sci.*, 2019. **6**(3).
 24. M., J.R., *The occurrence of cy-amrrin and ursolic acid in the leave of Ilex paraguariensis*. . *J. Org. Chem.*, 1940. **5**(3): p. 235-237.
 25. Patra A., J.S., Murthy P. N., Sharoné A., *Isolation and Characterization of Stigmastero1-5-en-3B-ol (B-sitosterol) from the Leaves of Hygrophila spinosa T. Anders*. *Int. J. Pharm. Sci. Res*; 2010. **1**: p. 95-100.
 26. Arnold C. O., C.D.B., *The Isolation of Stigmasterol and 8-Sitosterol from the Common Bean, Phaseolus vulgaris*. *J. Am. Chem. Soc.*, 1944. **66**(3): p. 489-490.
 27. Yoshiyuki M., R.N., Isoko K., Kohei K., Toshiko S., Noriko S., Osamu K., Yukinobu U., Yuko Y., Masaharu T., Kengo S., Hiromi Y., **β -Sitosterol-3-O- β -d-glucopyranoside: A eukaryotic DNA polymerase λ inhibitor**. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*, 2006. **99**(2-3): p. 100-107.
 28. Koichi M., T.Y., Yoshiko K., Masao K., *Acylated triterpenoids from Ligustrum ovalifolium*. *Phytochemistry*, 1997. **46**(5): p. 977-979.
 29. Photis D., R.P., Kathryn W., Emmanuel H., *Complete 1H and 13C NMR assignment and 31P NMR determination of pentacyclic triterpenic acids*. *Anal. Methods*, 2017(6): p. 1-25.
 30. Hak C. K., K.R.L., Ok P. Z., *Cytotoxic Constituents of Pilea mongolica Arch*. *Pharm. Res*, 1997. **20**(2): p. 180-183.
 31. Jun T., Q.-S.Z., Hong-Jie Z., Zhong-Wen L., Han-Dong S. , *New Cleroindicins from Clerodendrum indicum*. *J. Nat. Prod*, 1997. **60**: p. 766-769.

32. Messana I., S.M., Multari G., Galeffi C., Marini B. , *A cyclohexadienone and a cyclohexenone from Halleria Lucida*. . Phytochemistry, 1984. **23**: p. 2617-2619.
33. Hermann S., H.W., *Minor Iridoid and Phenol Glycosides of Picrorhiza kurrooa*. . Planta Med. , 1989. **55**(5): p. 467-469.
34. Kumi Y., Y.H., Yutaka I., Tadao K., *Conformational Analysis of Cycloartenol, 24-Methylenecycloartanol and Their Derivatives*. Agric. Biol. Chem., 1989. **53**(7): p. 1901-1912
35. De Pascual T., U.J.G., Marcos I.S., Basabe P., Sexmero C. M. J., Fernandez M. R. , *Triterpenes from Euphorbia broteri*. . Phytochemistry, 1987. **26**: p. 1767-1767.
36. Hamada H., C.L., Hassina H., Abdulmagid A. M., Laurence M., Mohammed B. , *Diterpenoids and triterpenoids from Euphorbia guyoniana*. . Phytochemistry, 2007. **68**: p. 1255-1260.
37. Chu Y. H., C.C.J., Wu S. H., Hsieh J. F. , *Inhibition of Xanthine Oxidase by Rhodiola crenulata Extracts and Their Phytochemicals*. J. Agric. Food Chem., 2014. **62**: p. 3742-3749.
38. Howard I. D., M.C.d.K., Huib O., Gijs A. van der M., Jacques H. van B. , *Synthesis of Verbascoside: A Dihydroxyphenylethyl Glycoside with Diverse Bioactivity*. . J. Org. Chem., 1999. **10**: p. 2623-2632.
39. Masuda T., T.M., Anetai M., *Psoralen and other linear furanocoumarins as phytoalexins in Glehnia littoralis*. 47, 1998: p. 13-16.

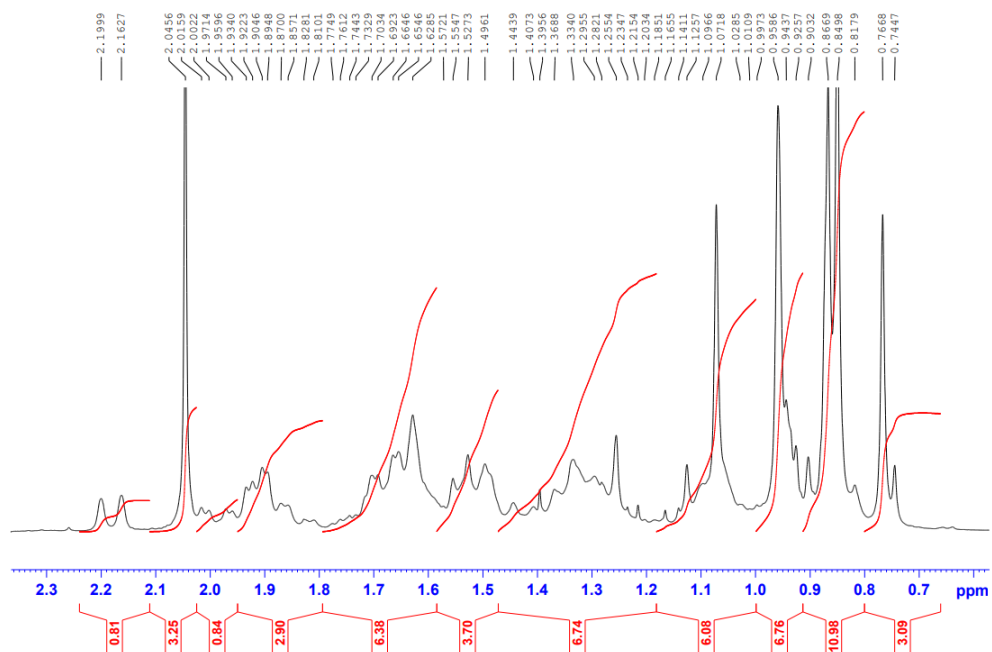


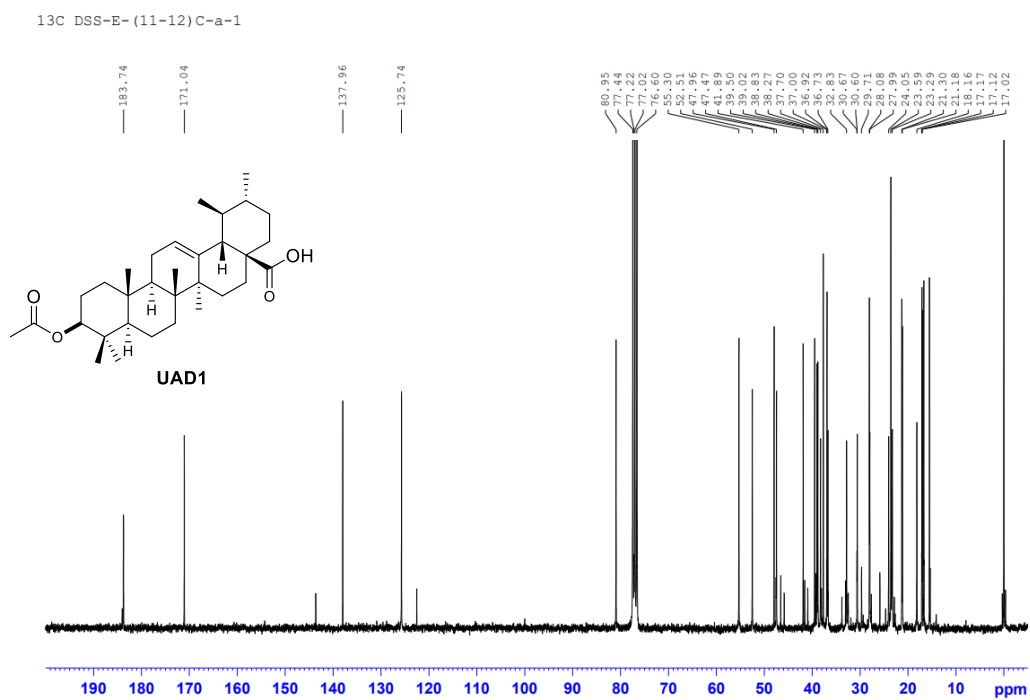
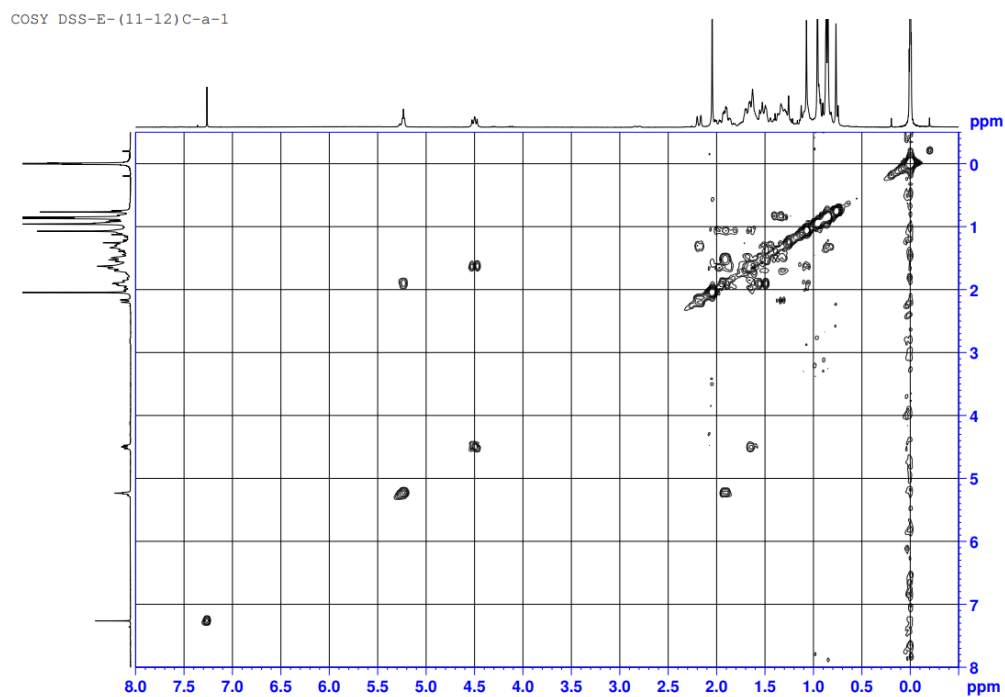
ภาคผนวก

DSS-E- (11-12)C-a-1

S1 แสดง $^1\text{H-NMR}$ ของ DSS1a

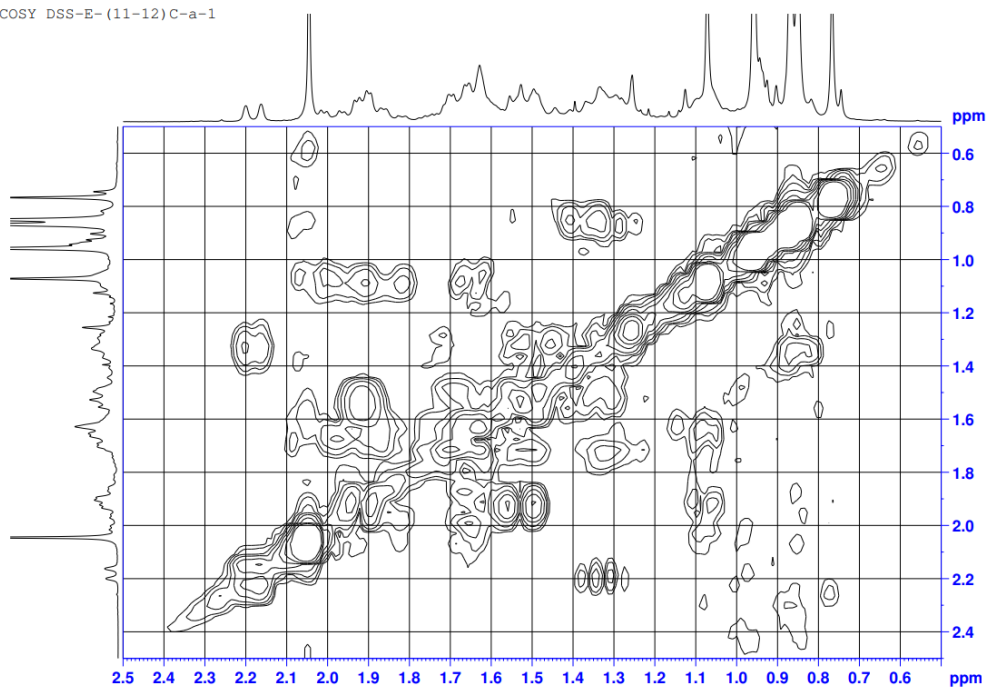
DSS-E- (11-12)C-a-1

S2 แสดง $^1\text{H-NMR}$ ของ DSS1a

S3 แสดง ¹³C-NMR ของ DSS1a

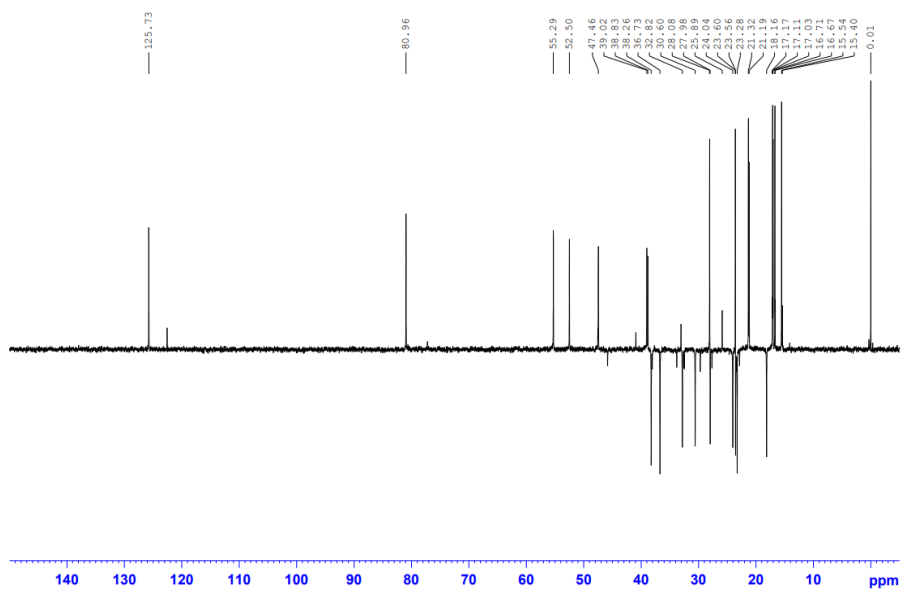
S4 แสดง COSY-NMR ของ DSS1a

COSY DSS-E-(11-12)C-a-1

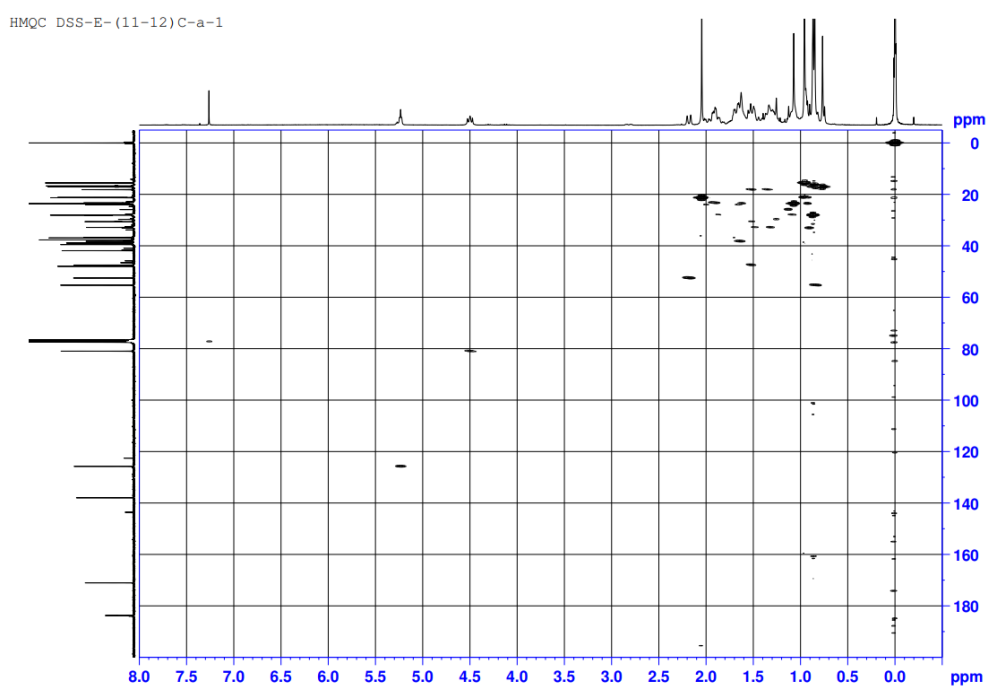


S5 แสดง COSY-NMR ของ DSS1a

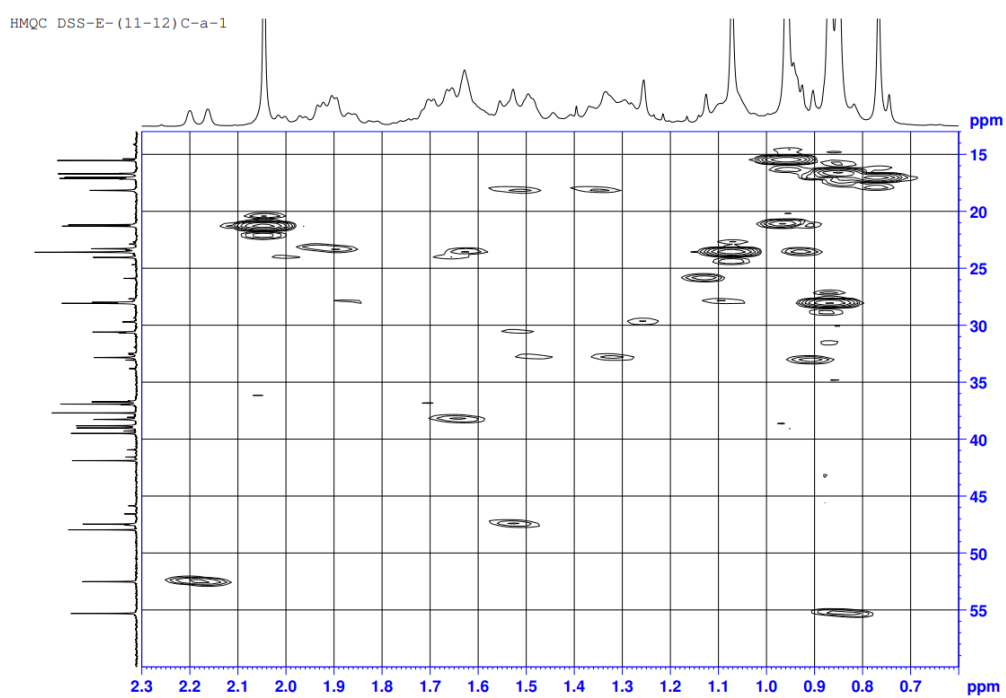
dept135 DSS-E-(11-12)C-a-1



S6 แสดง dept135-NMR ของ DSS1a

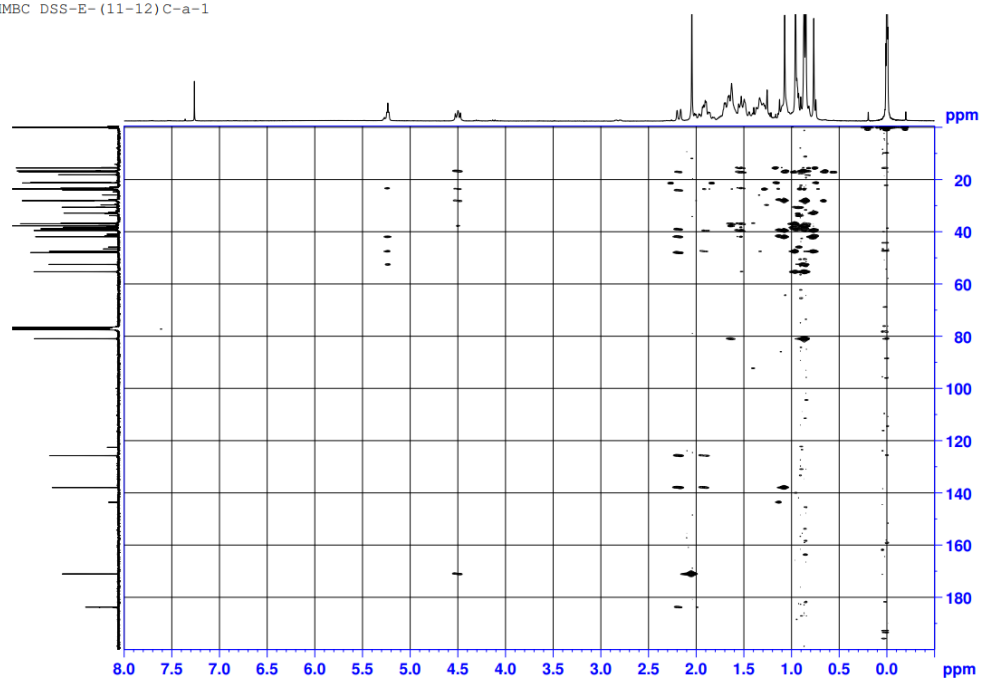


S7 แสดง HMQC-NMR ของ DSS1a



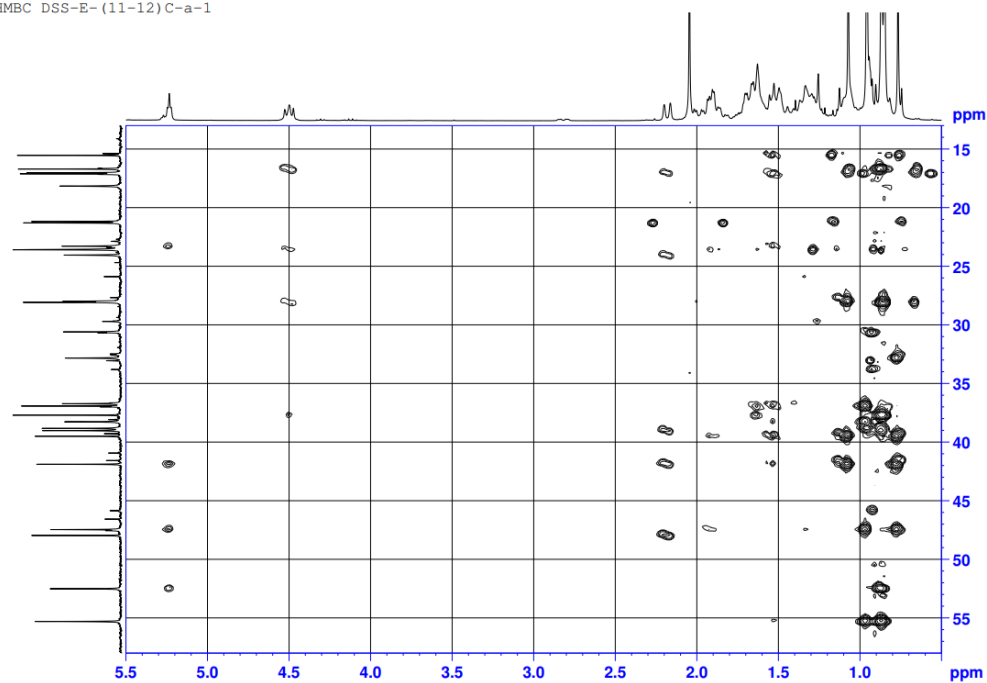
S8 แสดง HMQC-NMR ของ DSS1a

HMBC DSS-E- (11-12)C-a-1



S9 แสดง HMBC-NMR ของ DSS1a

HMBC DSS-E- (11-12)C-a-1



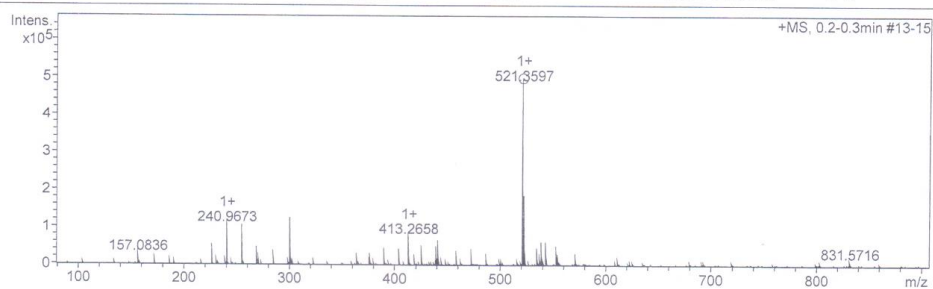
S10 แสดง HMBC-NMR ของ DSS1a

Mass Spectrum SmartFormula Report

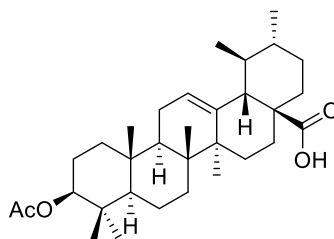
Analysis Info		Acquisition Date	10/16/2020 4:16:09 PM
Analysis Name	D:\Data\CR\I\QSLP7281 Kanok-on DSS-2 E+.d	Operator	BDAL@DE
Method	Nitirat esi pos low may2019-2.m	Instrument	compact
Sample Name	ESIpso		8255754.20094
Comment			

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.6 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	3000 V	Set Dry Heater	140 °C
Scan Begin	85 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	5.3 l/min
Scan End	900 m/z	Set Charging Voltage	2000 V	Set Divert Valve	Source
		Set Corona	0 nA	Set APCI Heater	0 °C

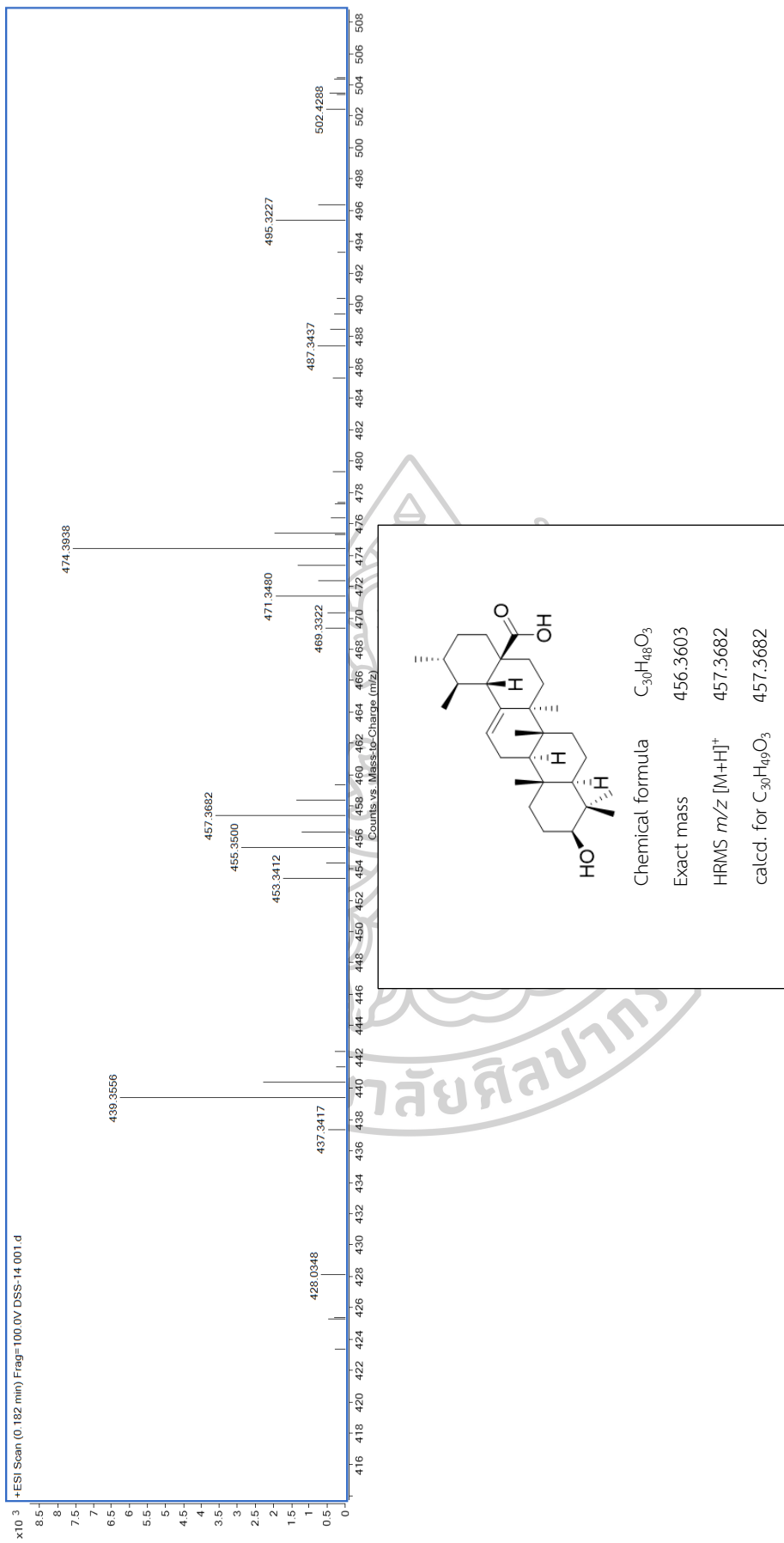


Meas. m/z #	Ion Formula	m/z	err [ppm]	Mean err [ppm]	rdB	N-Rule	e ⁻ Conf	mSigm	Std I a	Std Mean m/z	Std VarNor	Std I m	Std m/z	Std Diff	Std Comb Dev
521.359692	1 C ₃₂ H ₅₀ NaO ₄	521.360131	0.8	1.6	7.5	ok	even	3.8	6.3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	2 C ₃₄ H ₄₉ O ₄	521.362536	5.5	6.3	10.5	ok	even	7.7	11.8	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.



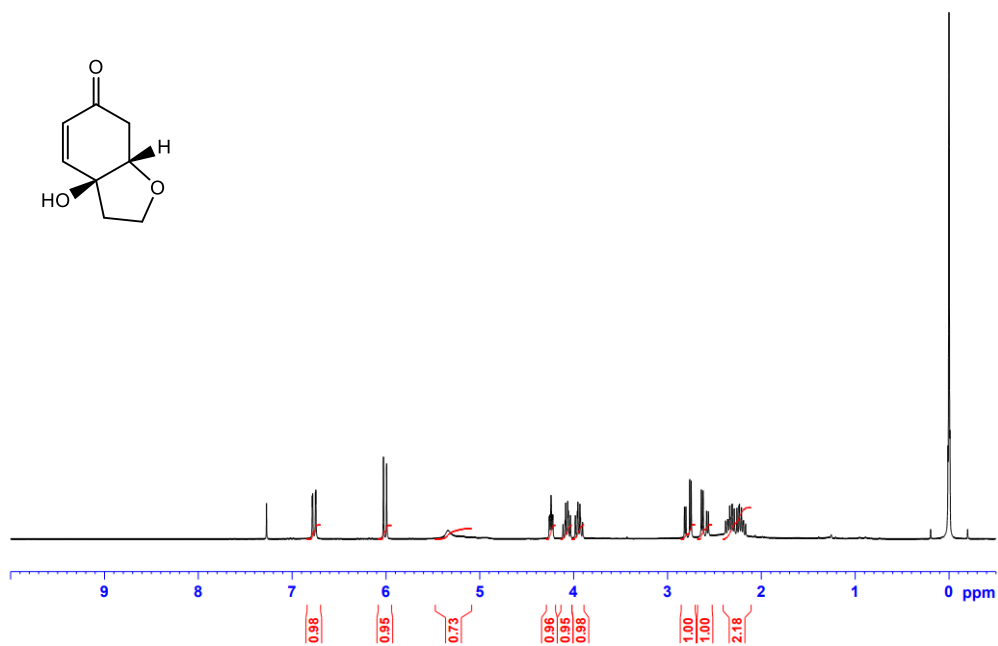
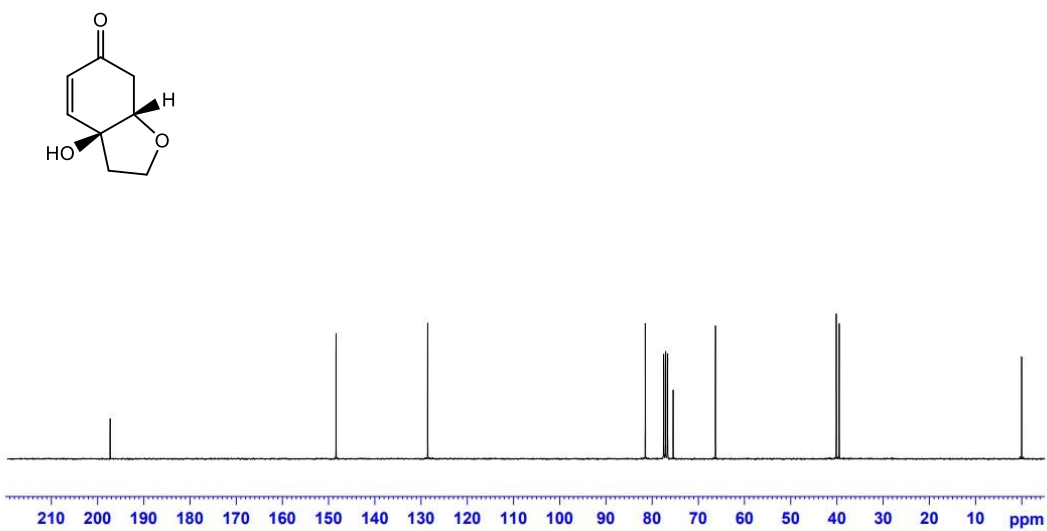
Chemical formula	C ₃₂ H ₅₀ O ₄
Exact mass	498.3709
HRMS <i>m/z</i> [M+Na] ⁺	521.3597
calcd. for C ₃₂ H ₅₀ O ₄ Na	521.3607

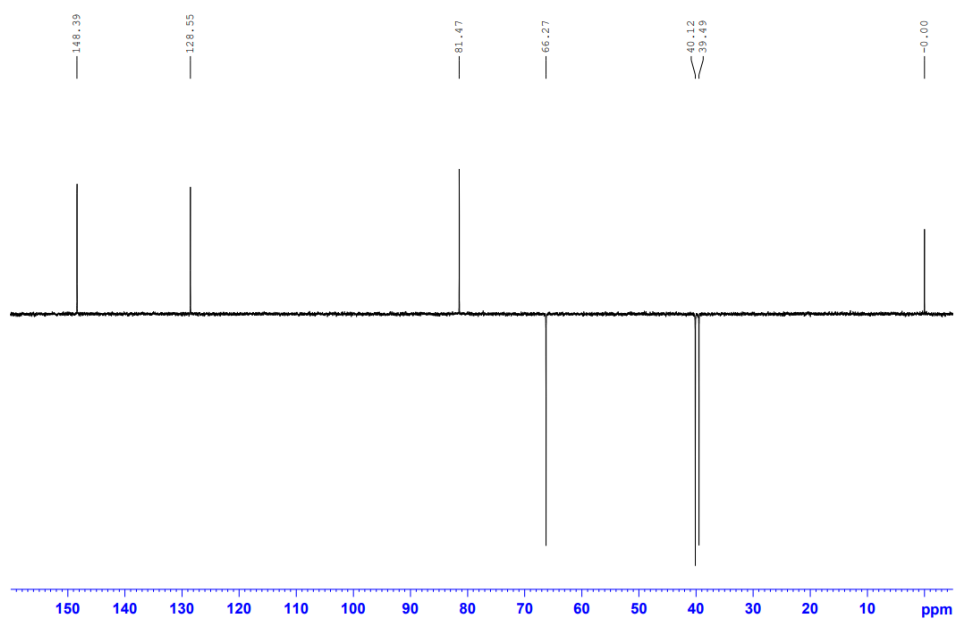
S11 แสดง mass spectrum ของ DSS1a



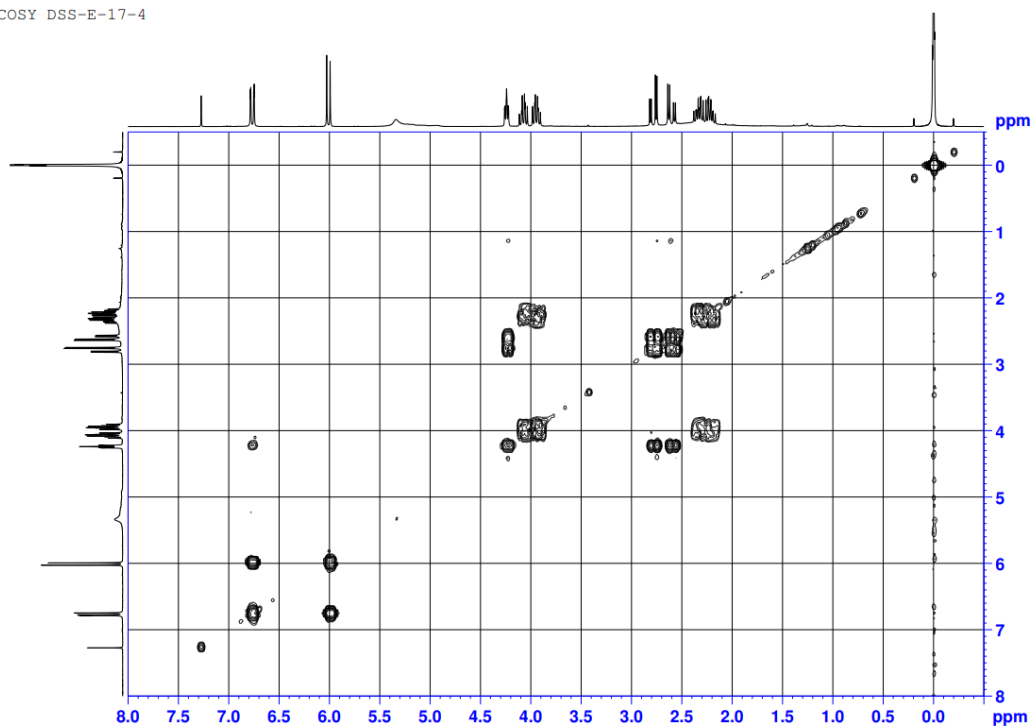
S12 แสดง mass spectrum ของ DSS1

DSS-E-17-4

S13 แสดง $^1\text{H-NMR}$ ของ DSS2S14 แสดง $^{13}\text{C-NMR}$ ของ DSS2

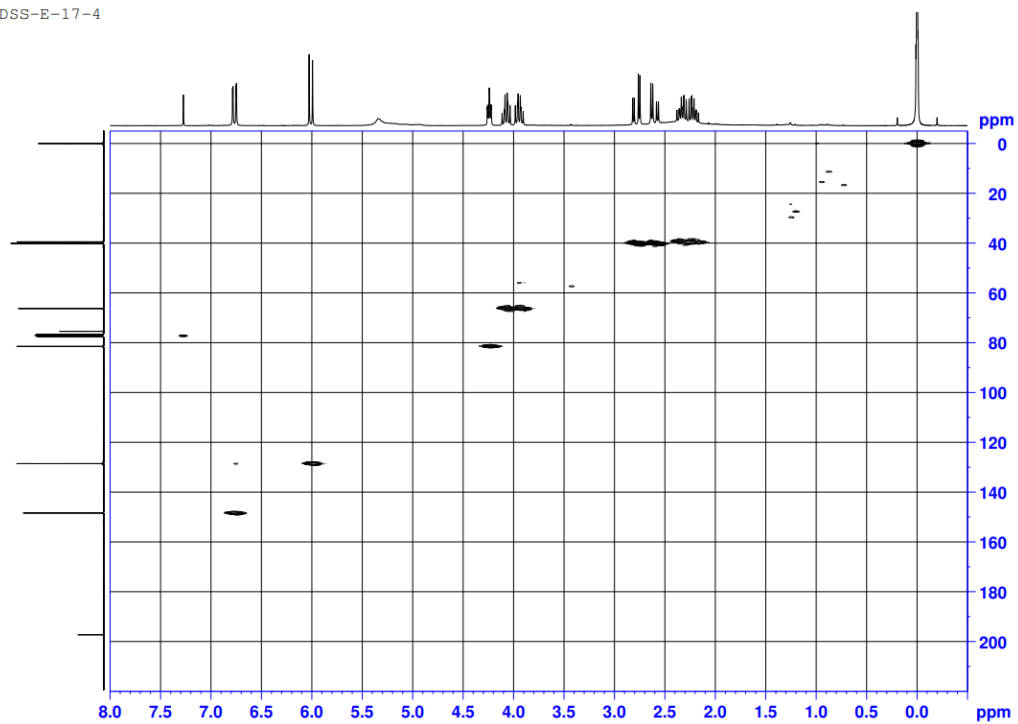


COSY DSS-E-17-4



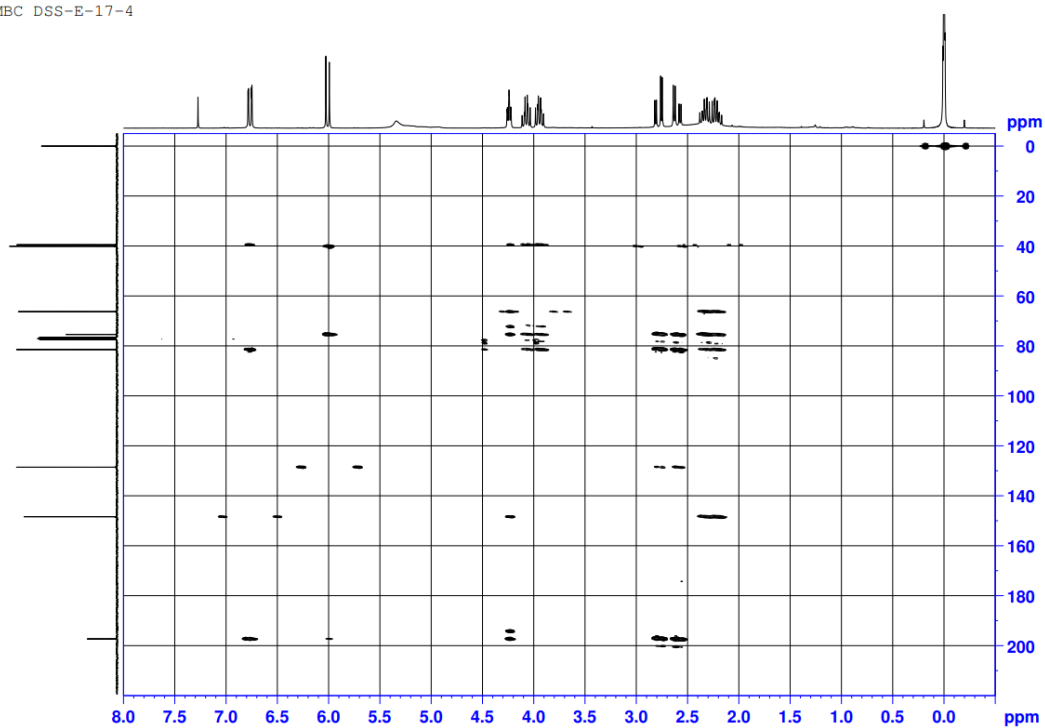
S16 แสดง COSY-NMR DSS2

HMQC DSS-E-17-4



S17 แสดง HMQC-NMR ของ DSS2

HMBC DSS-E-17-4

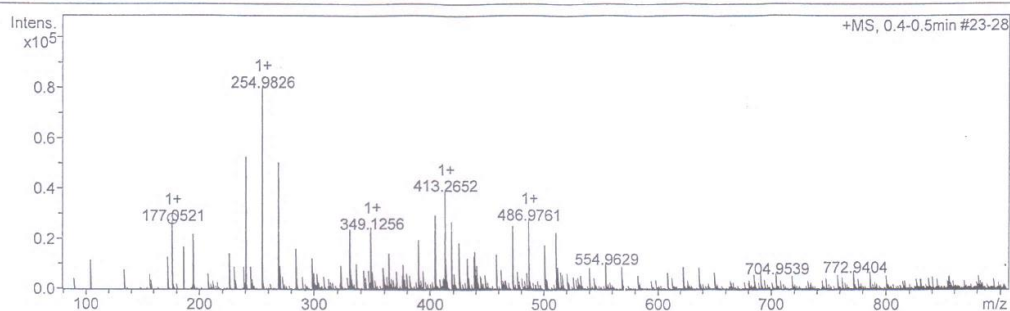


S18 แสดง HMBC-NMR ของ DSS2

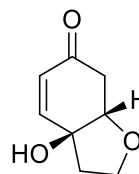
Mass Spectrum SmartFormula Report

Analysis Info		Acquisition Date	10/16/2020 4:19:05 PM	
Analysis Name	D:\Data\CR\QSLP7283 Kanok-on DSS-1 E+.d	Operator	BDAL@DE	
Method	Nitrat esi pos low may2019-2.m	Instrument	compact	8255754.20094
Sample Name	ESlpos	Comment		

Acquisition Parameter					
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.6 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	3000 V	Set Dry Heater	140 °C
Scan Begin	85 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	5.3 l/min
Scan End	900 m/z	Set Charging Voltage	2000 V	Set Divert Valve	Source
		Set Corona	0 nA	Set APCI Heater	0 °C



Meas. m/z # Ion	m/z	err [ppm]	Mean rdb	N-Rule	e ⁻ Conf	mSigma	Std I	Std Mean	Std Var	Std I	Std m	Std m/z	Std Diff	Std Comb	Std Dev
177.052057 1 C ₈ H ₁₀ NaO ₃	177.052215	0.9	-10.3	3.5	ok even	13.3	29.1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

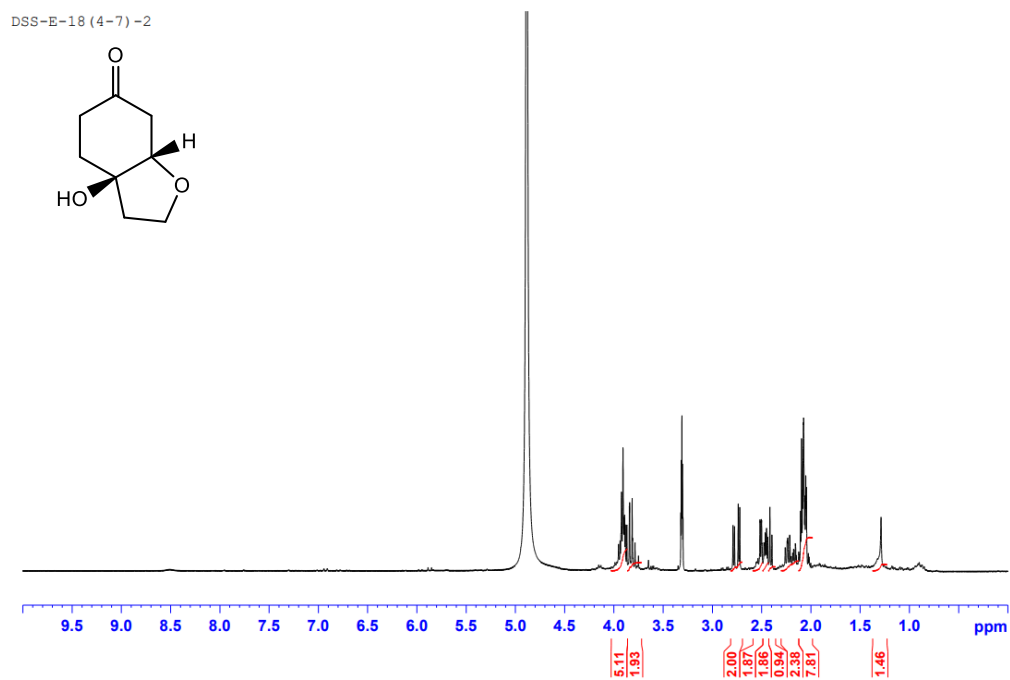
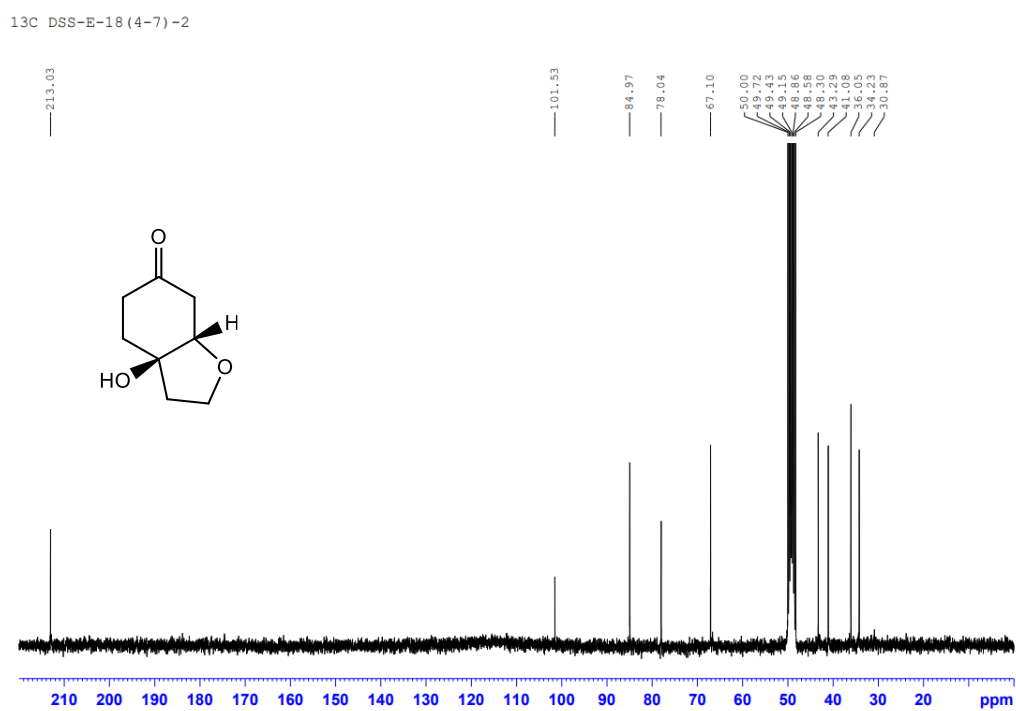


Chemical formula C₈H₁₀O₃

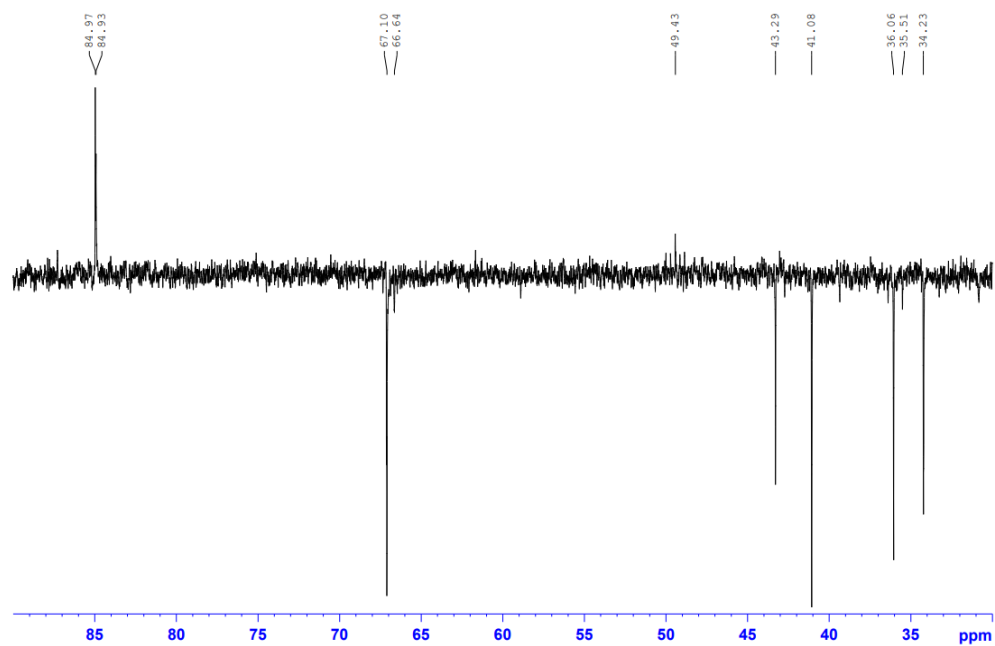
Exact mass 154.0630

HRMS *m/z* [M+Na]⁺ 177.0521

calcd. for C₈H₁₀O₃Na 177.0528

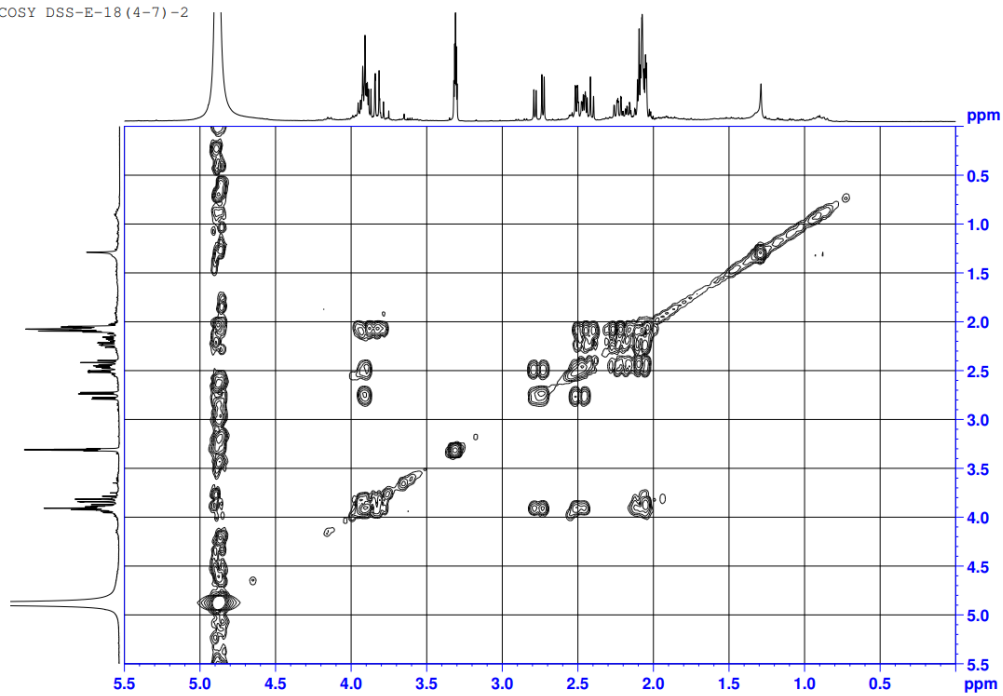
S20 แสดง $^1\text{H-NMR}$ ของ DSS3S21 แสดง $^{13}\text{C-NMR}$ ของ DSS3

dept135 DSS-E-18 (4-7) -2



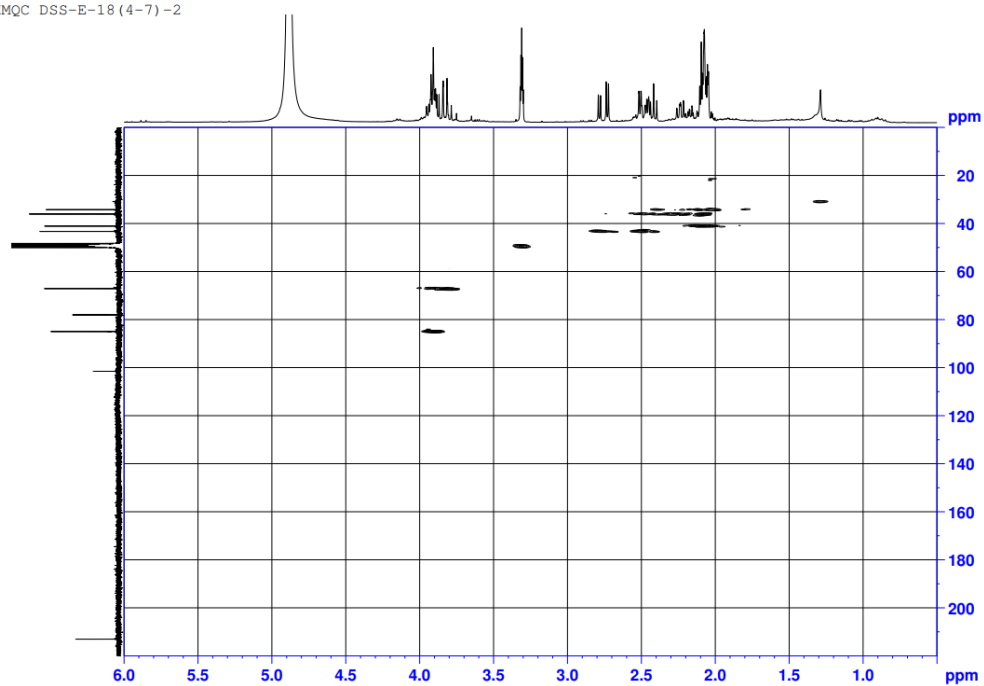
S22 แสดง dept135-NMR ของ DSS3

COSY DSS-E-18 (4-7) -2



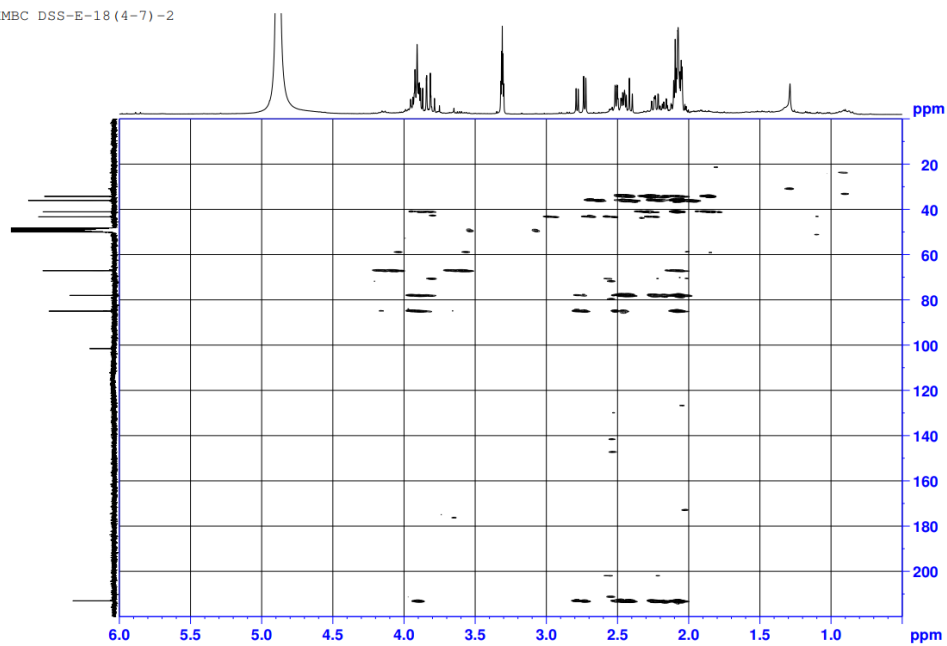
S23 แสดง COSY-NMR ของ DSS3

HMOC DSS-E-18 (4-7) -2

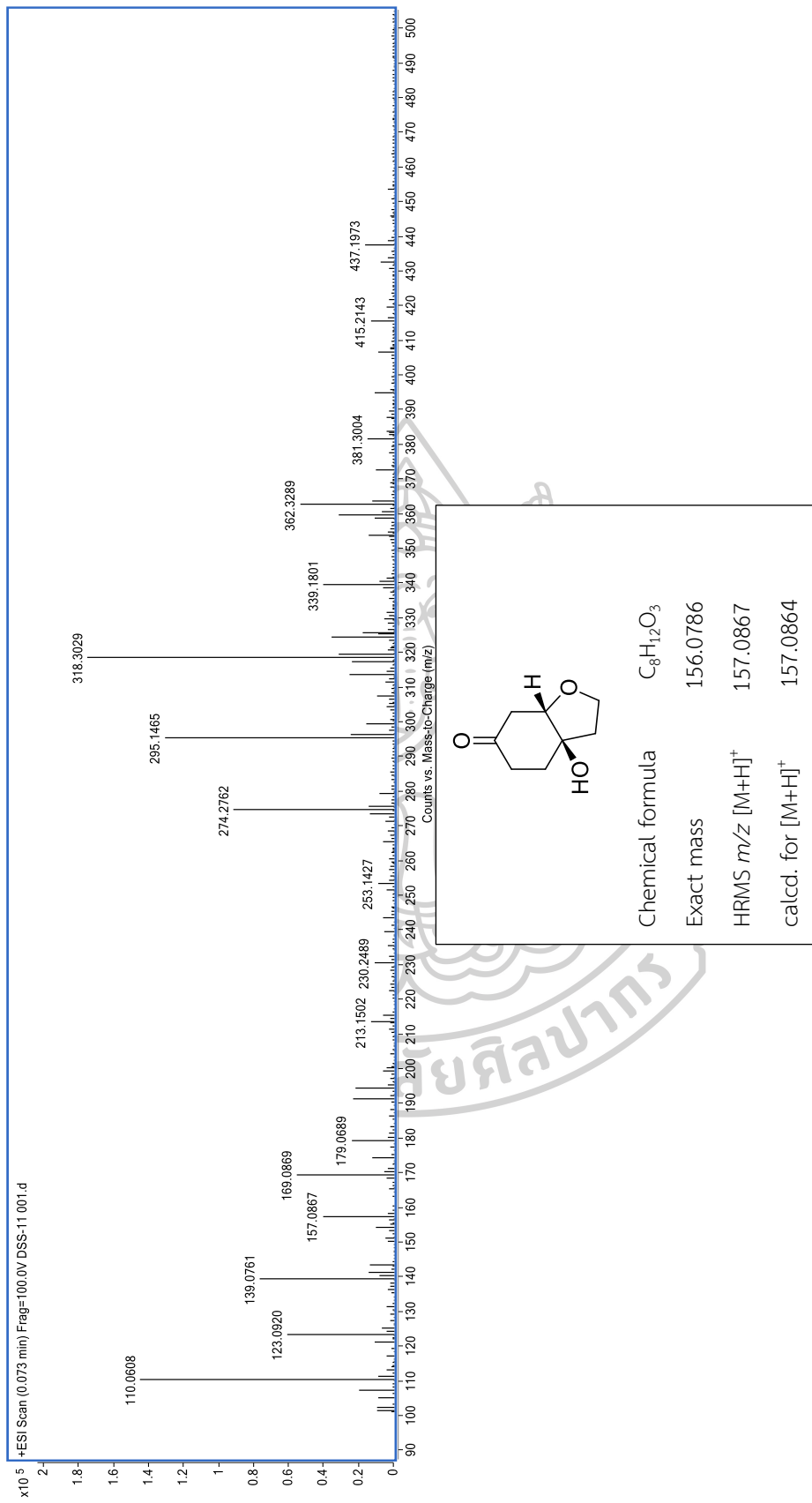


S24 แสดง HMOC-NMR ของ DSS3

HMBC DSS-E-18 (4-7) -2

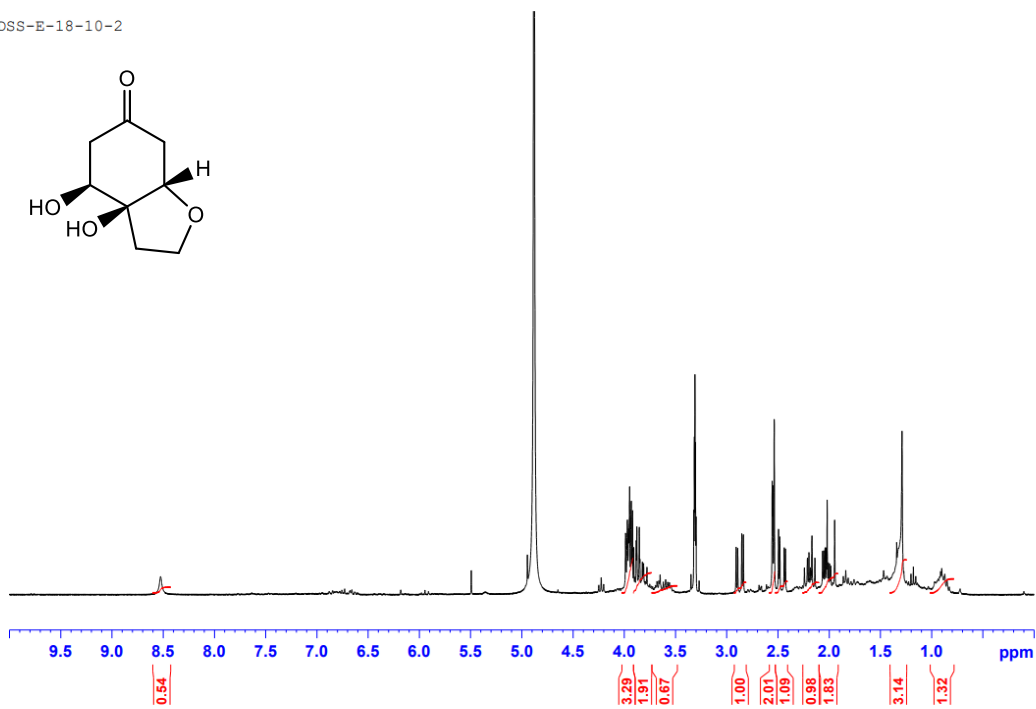
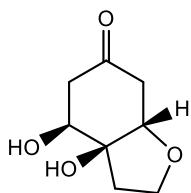
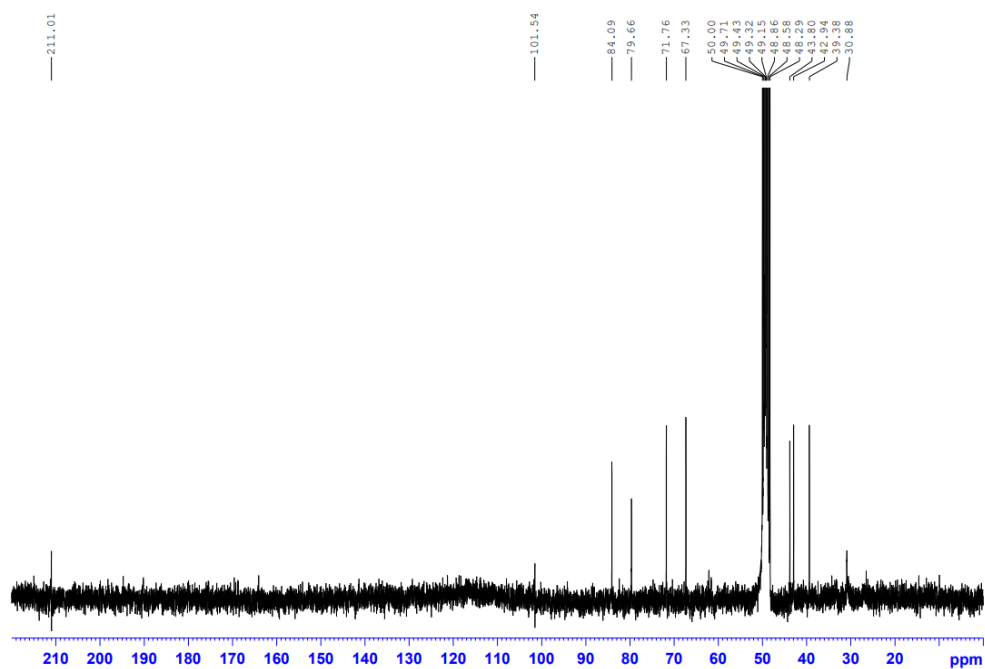


S25 แสดง HMBC-NMR ของ DSS3

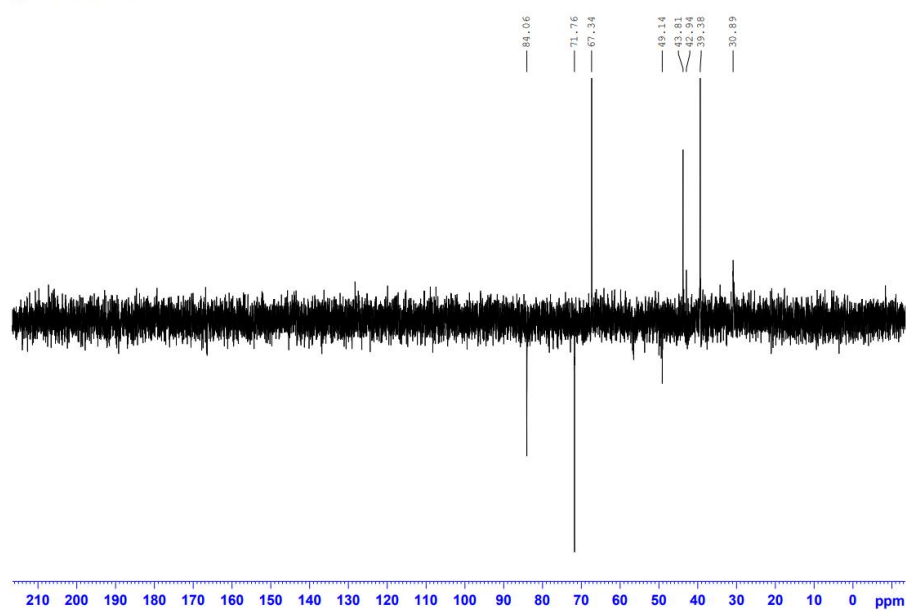


S26 แสดง Mass spectrum ของ DSS3

DSS-E-18-10-2

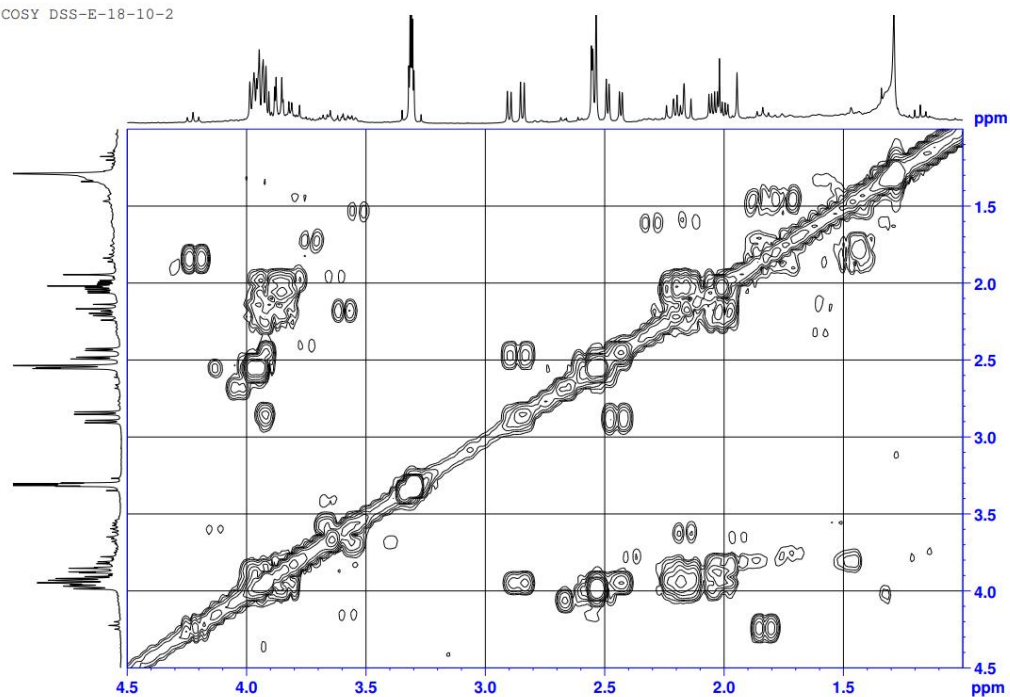
S27 แสดง $^1\text{H-NMR}$ ของ DSS4 ^{13}C DSS-E-18-10-2S28 แสดง $^{13}\text{C-NMR}$ ของ DSS4

dept135 DSS-E-18-10-2



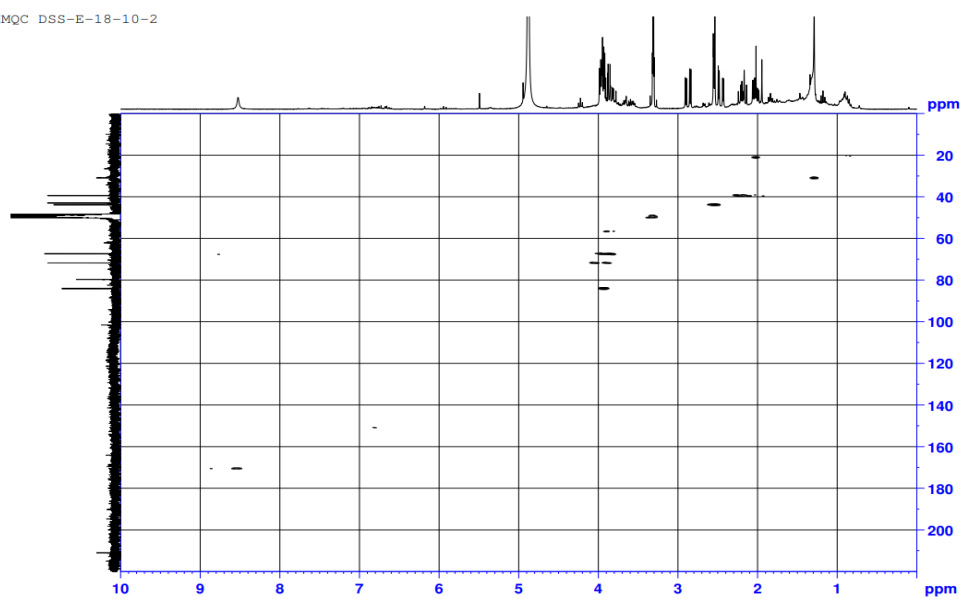
S29 แสดง dept135-NMR ของ DSS4

COSY DSS-E-18-10-2



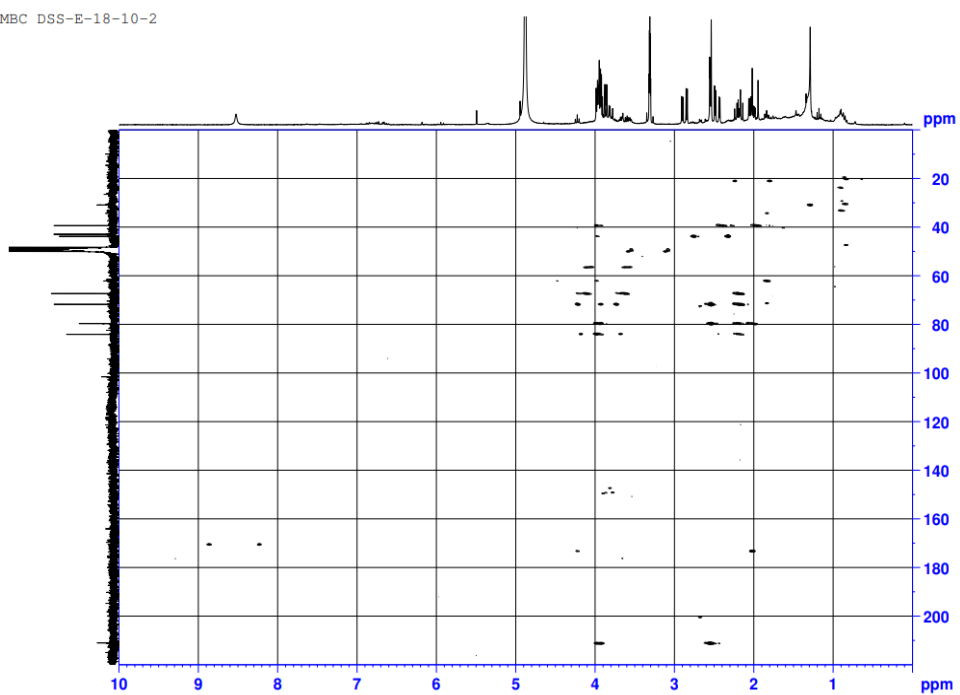
S30 แสดง COSY-NMR ของ DSS4

HMQC DSS-E-18-10-2

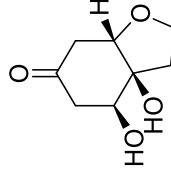
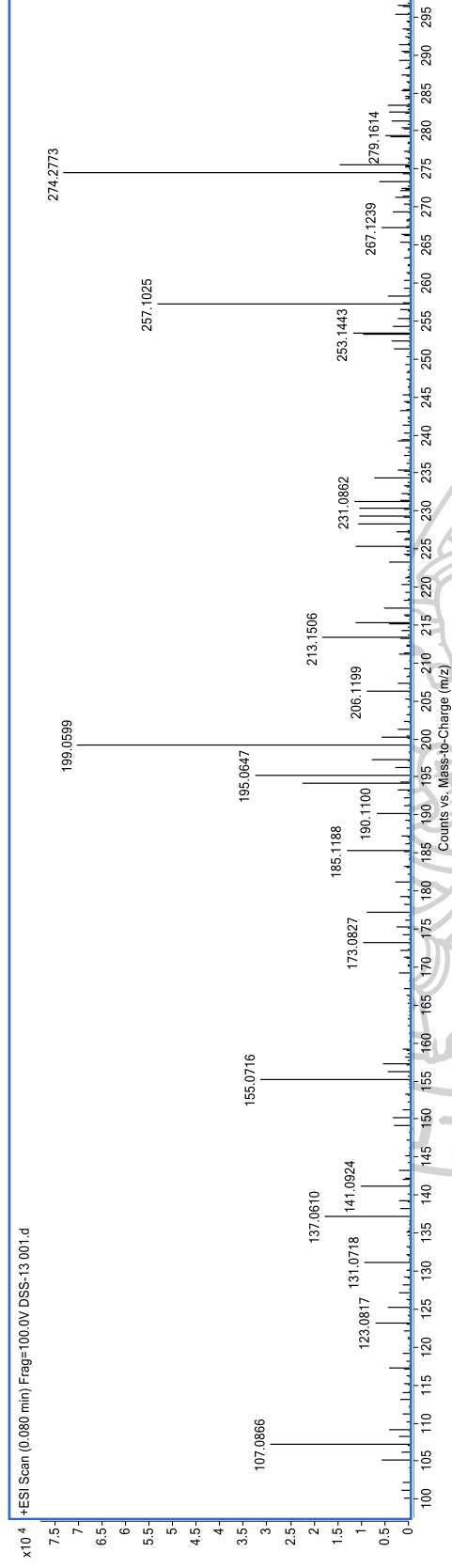


S31 แสดง HMQC-NMR ของ DSS4

HMBC DSS-E-18-10-2



S32 แสดง HMBC-NMR ของ DSS4



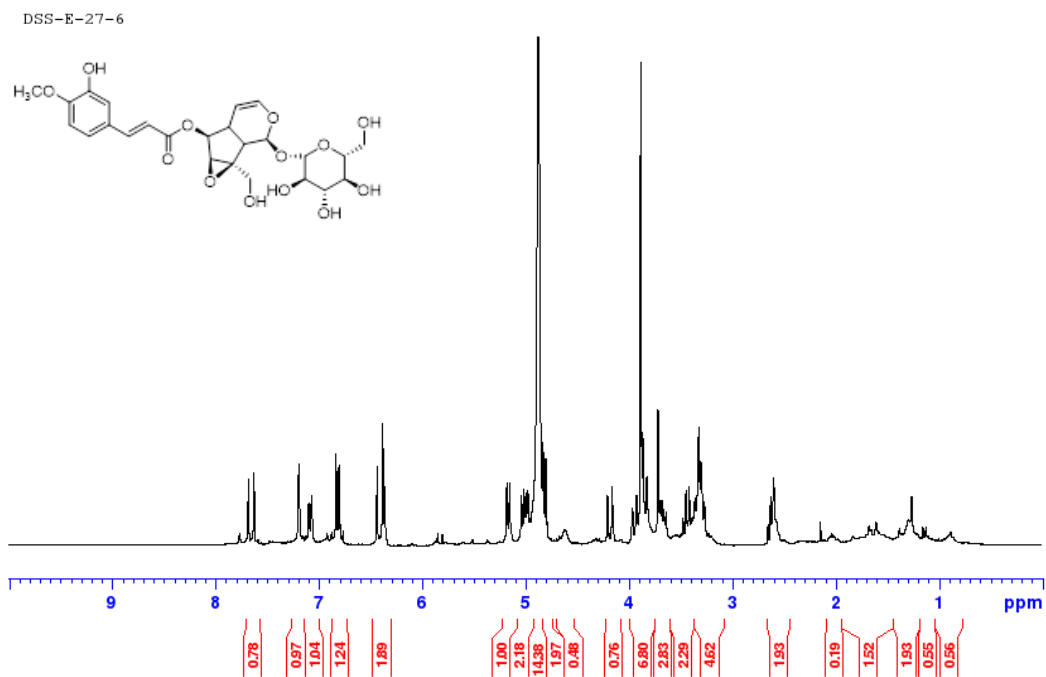
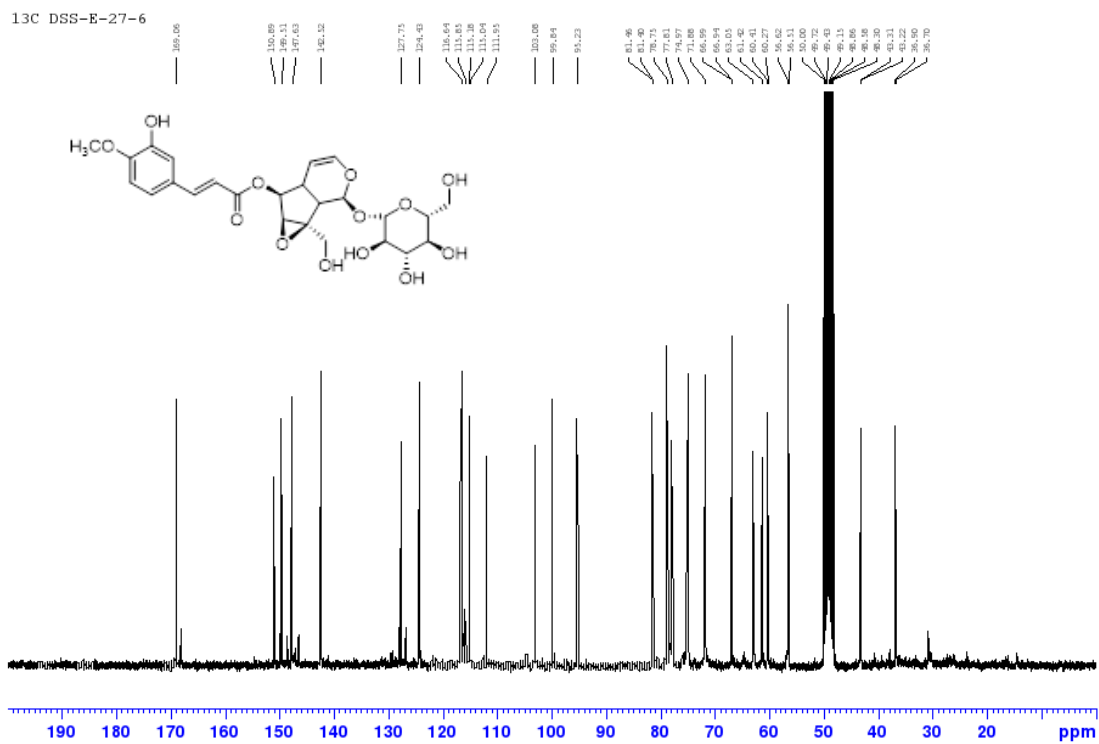
Chemical formula $C_8H_{12}O_4$

Exact mass 172.0736

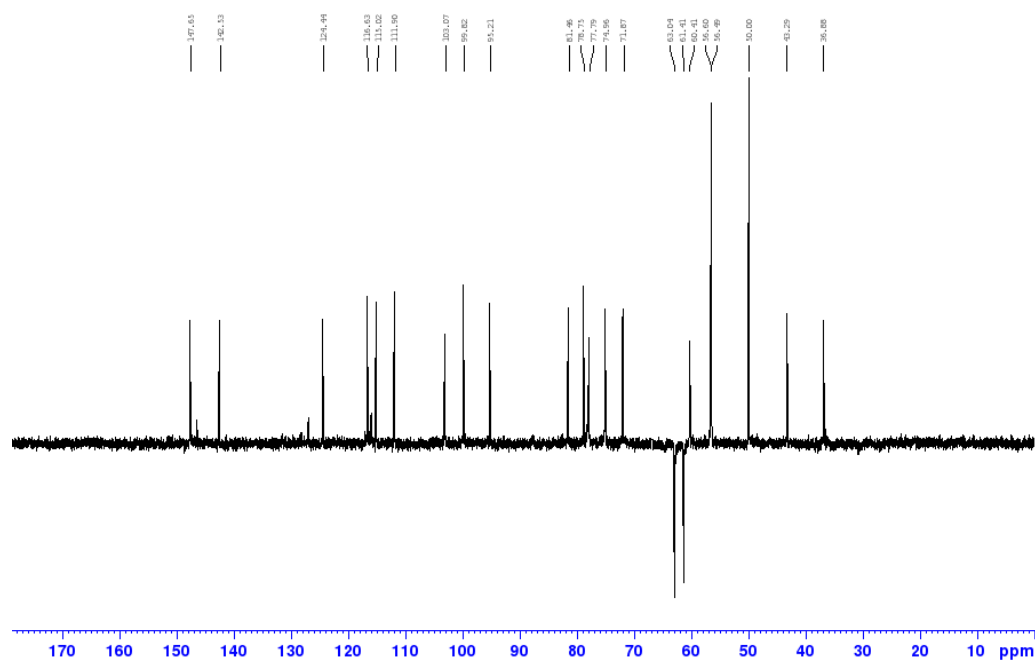
HRMS m/z $[M+Na]^+$ 195.0647

calcd. for $C_8H_{12}O_4Na$ 195.0634

S32 แสดง Mass spectrum ของ DSS4

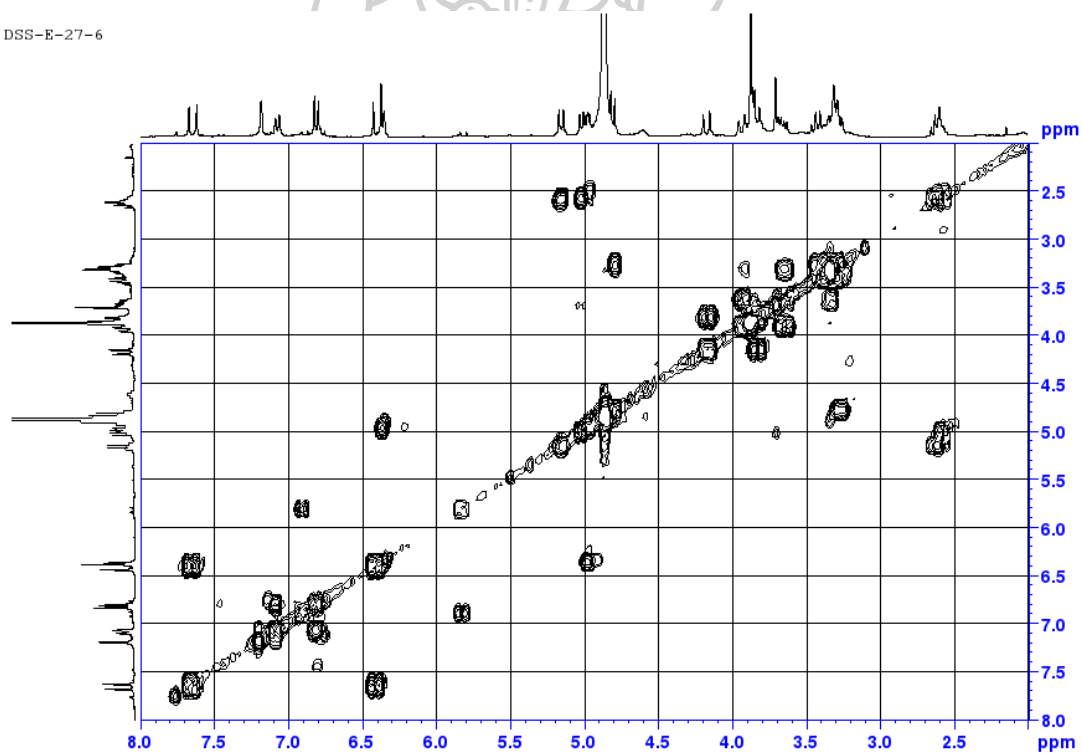
S33 แสดง $^1\text{H-NMR}$ ของ DSS4S34 แสดง $^{13}\text{C-NMR}$ ของ DSS5

dept135 DSS-E-27-6



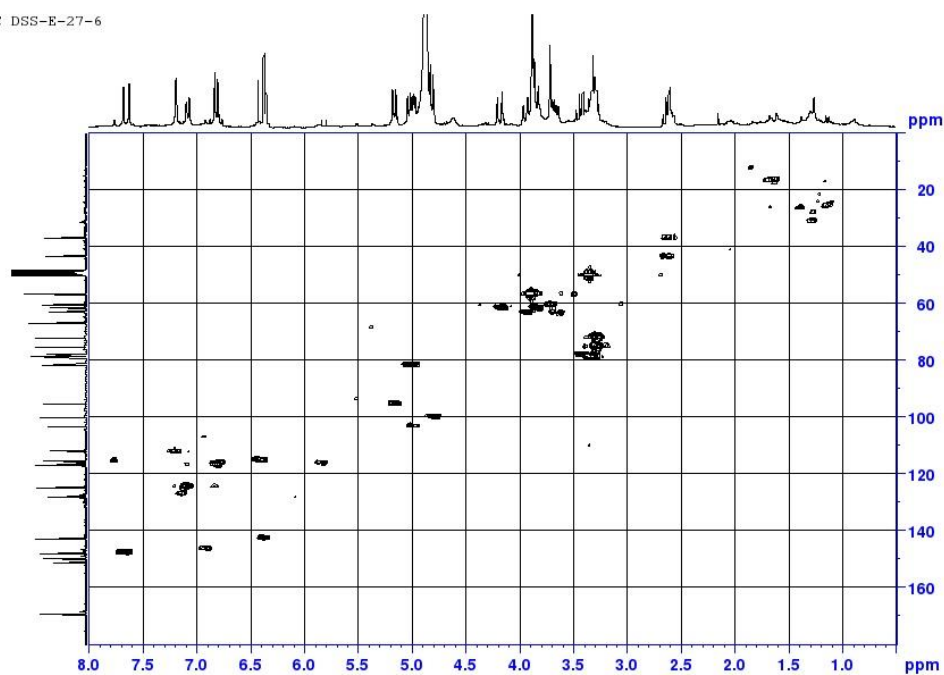
S35 แสดง dept135-NMR ของ DSS5

DSS-E-27-6



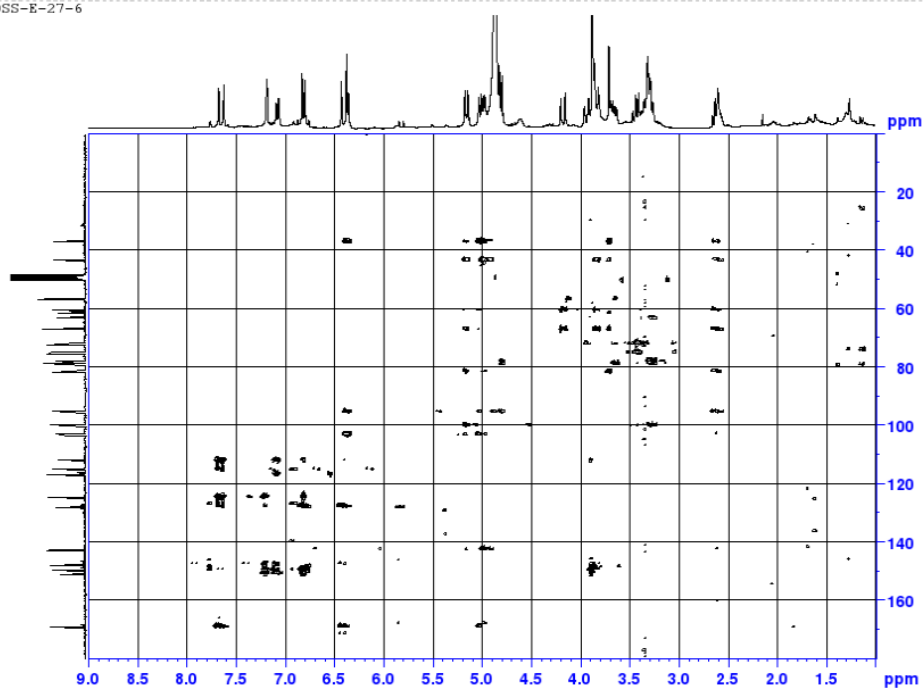
S36 แสดง COSY-NMR ของ DSS5

HMOC DSS-E-27-6

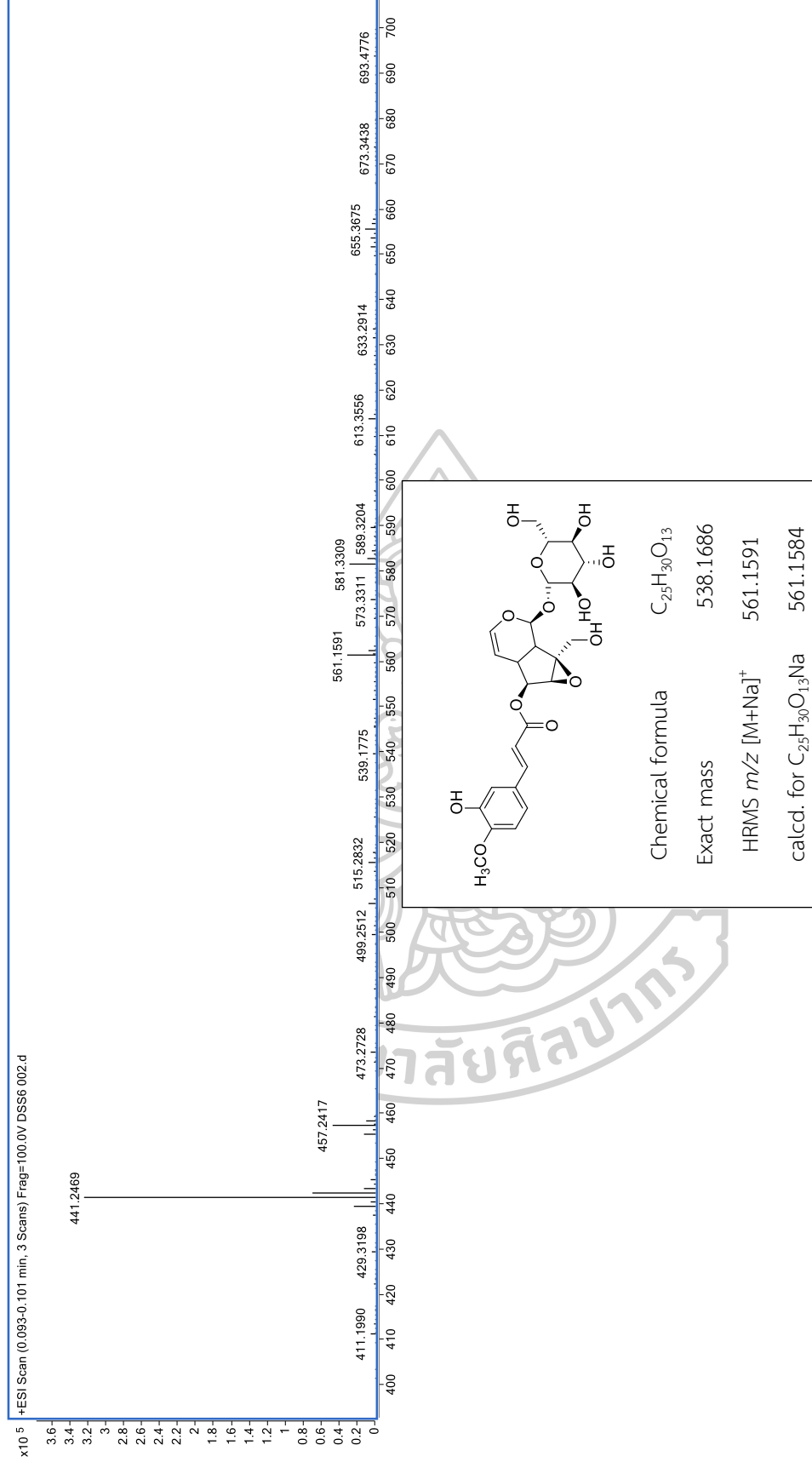


S37 แสดง HMOC-NMR ของ DSS5

HMBC DSS-E-27-6

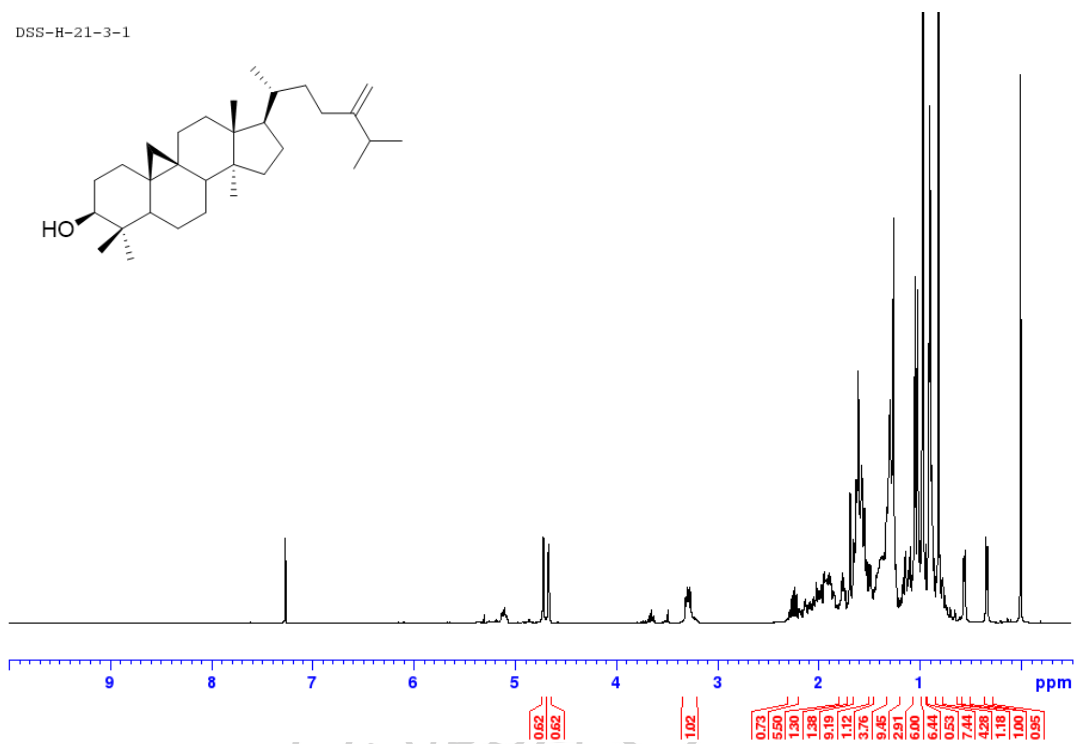
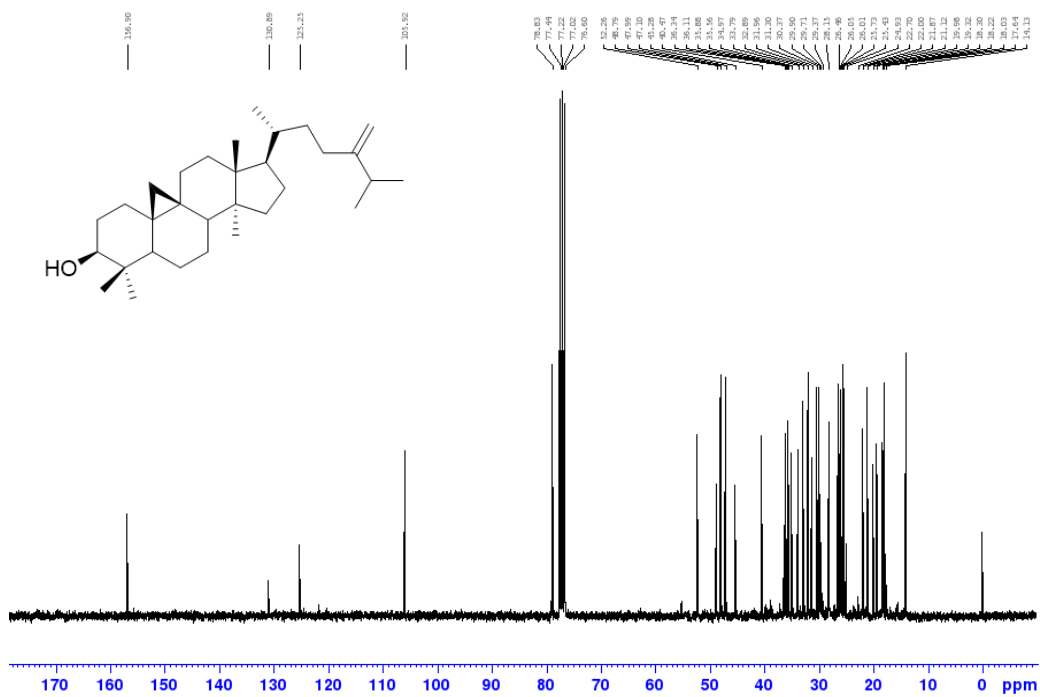


S38 แสดง HMBC-NMR ของ DSS5

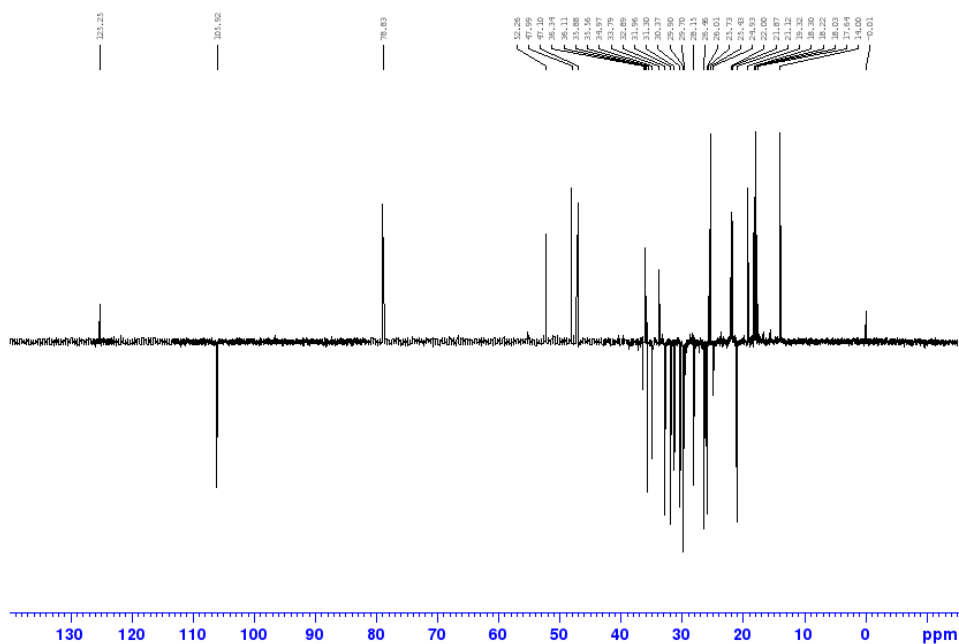


S39 แสดง Mass spectrum ของ DSS5

DSS-H-21-3-1

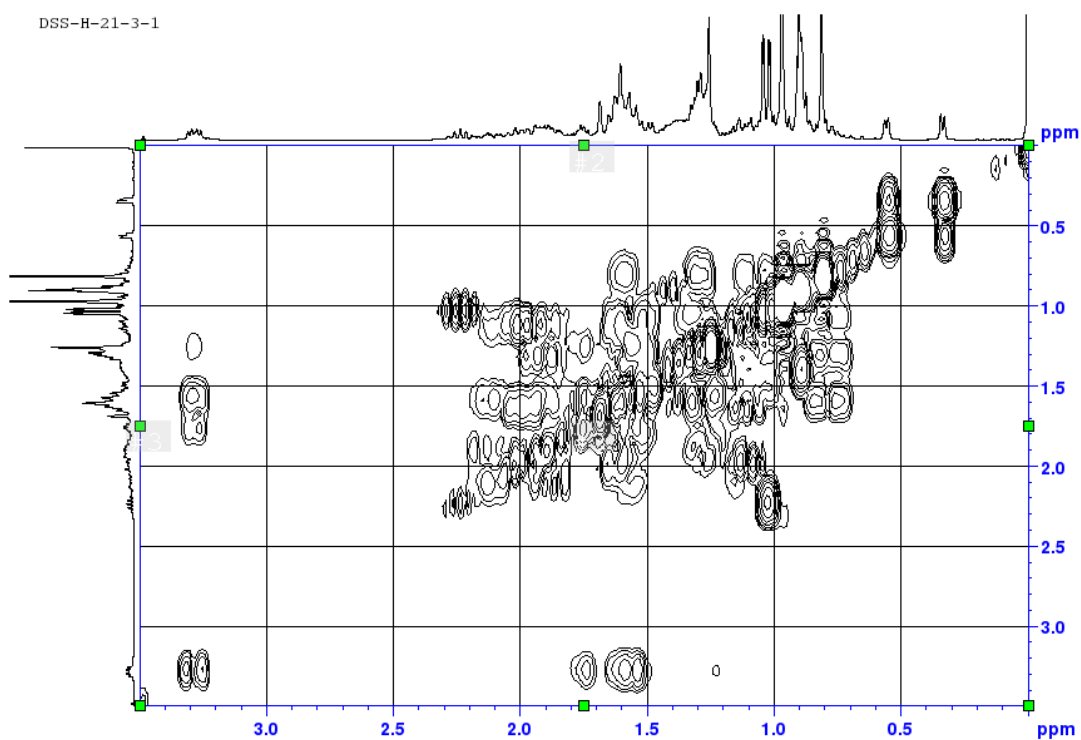
S40 แสดง $^1\text{H-NMR}$ ของ DSS6 ^{13}C DSS-H-21-3-1S41 แสดง $^{13}\text{C-NMR}$ ของ DSS6

dept135 DSS-H-21-3-1



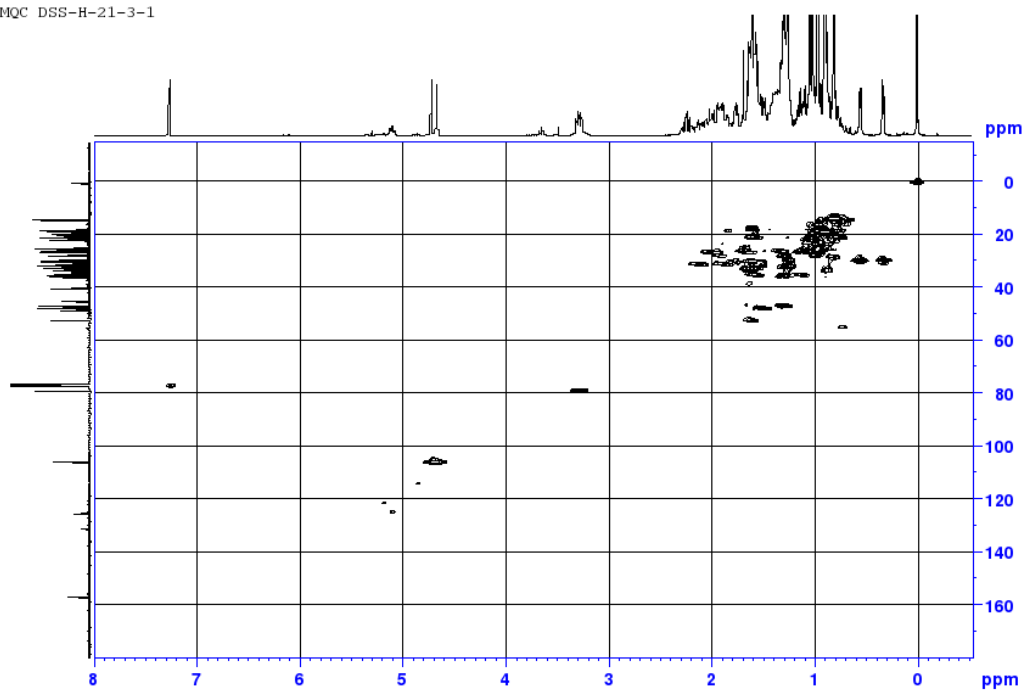
S42 แสดง dept135-NMR ของ DSS6

DSS-H-21-3-1



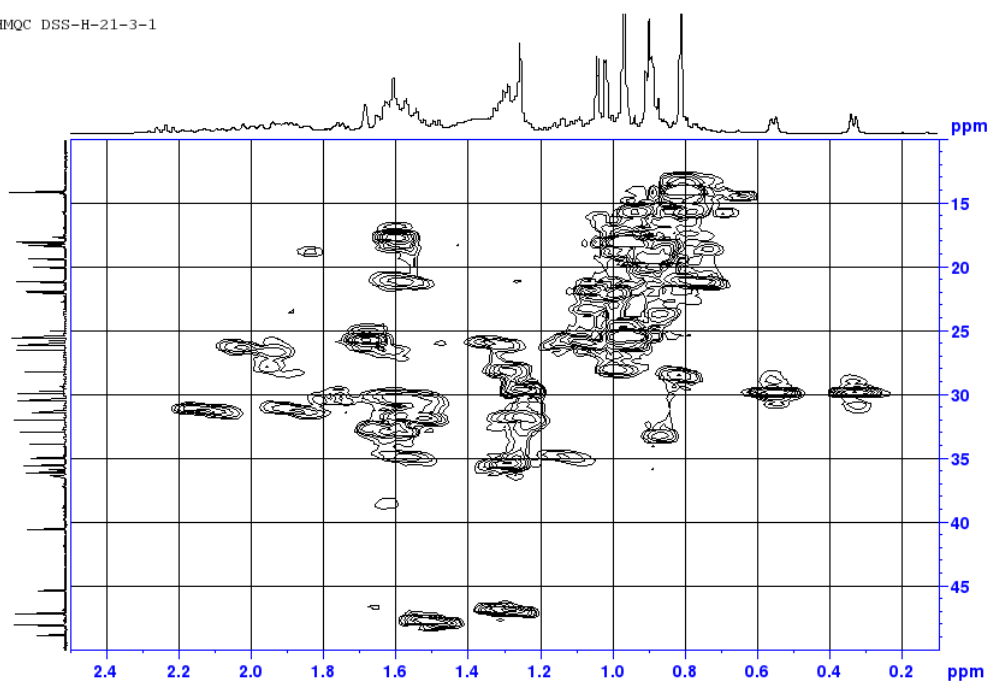
S43 แสดง COSY-NMR ของ DSS6

HMQC DSS-H-21-3-1



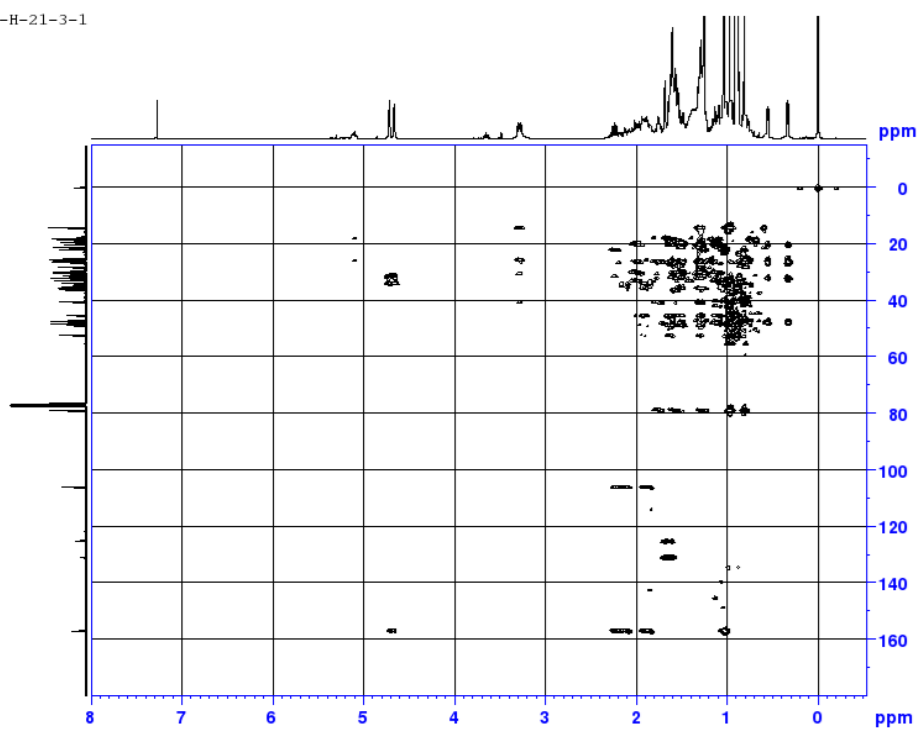
S44a แสดง HMQC-NMR ของ DSS6

HMQC DSS-H-21-3-1



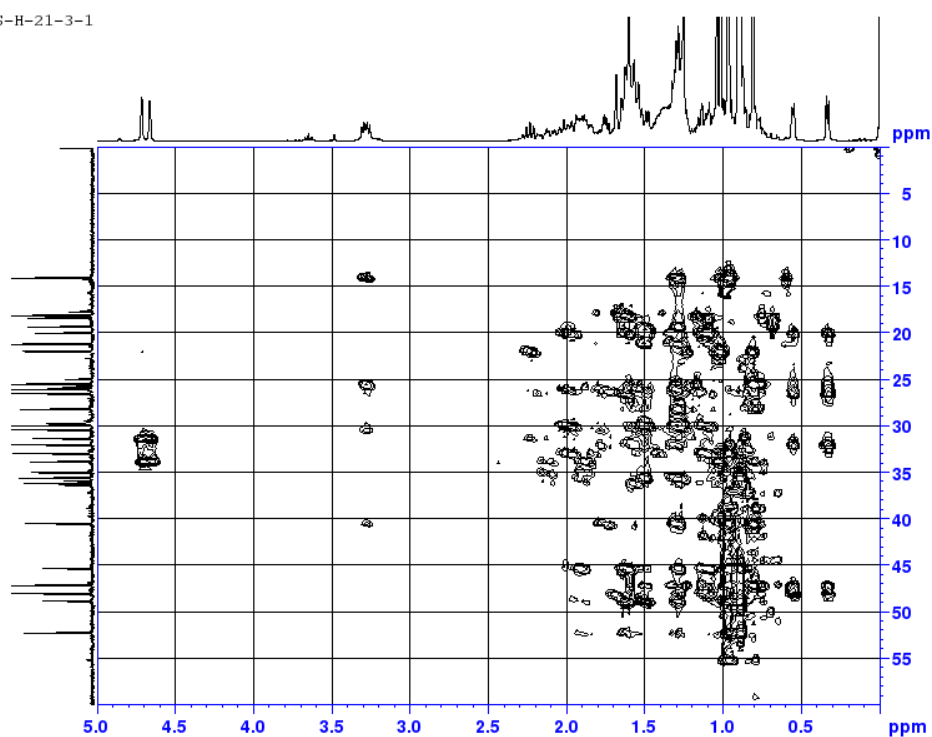
S44b แสดง HMQC-NMR ของ DSS6

HMBC DSS-H-21-3-1

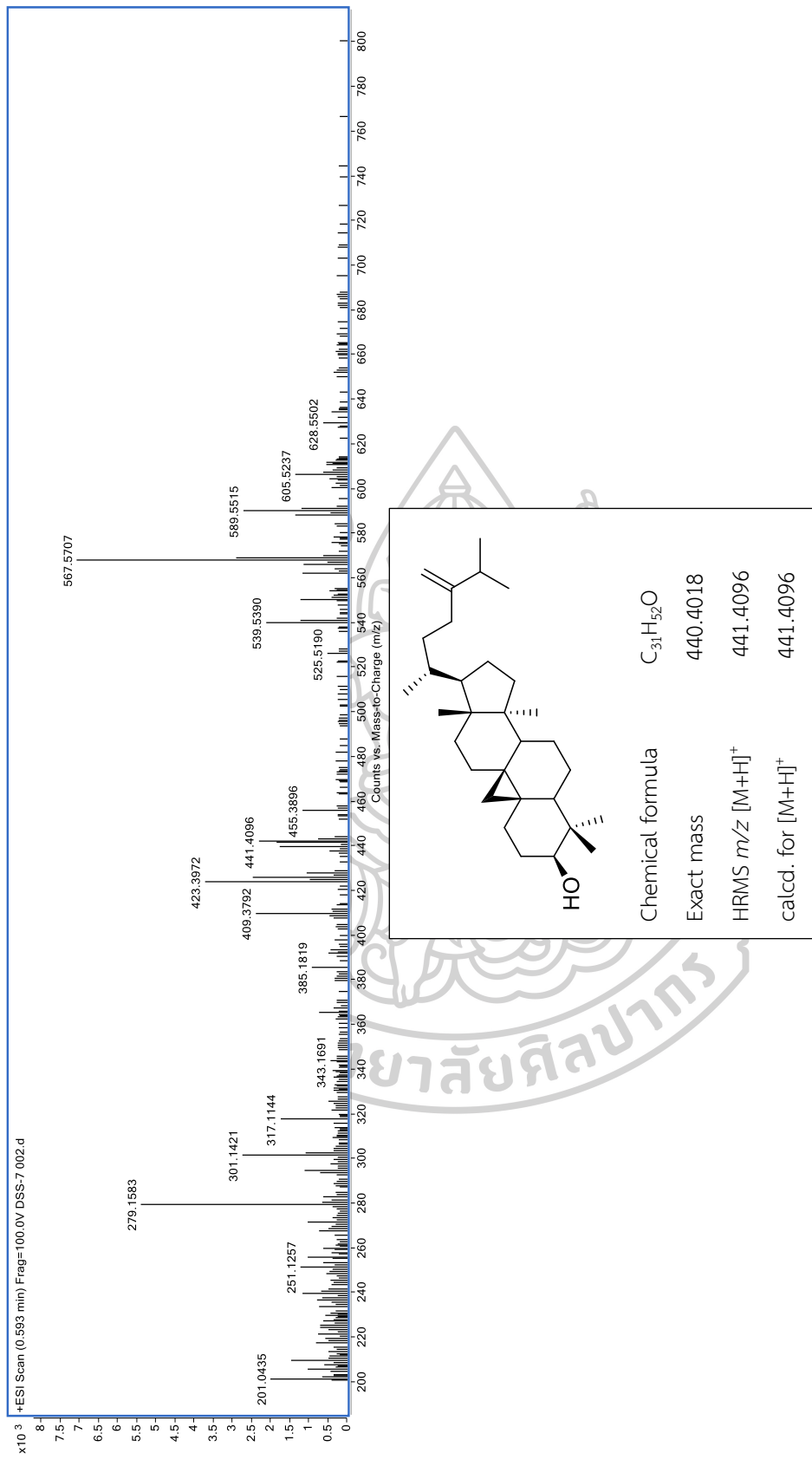


S45a แสดง HMBC-NMR ของ DSS6

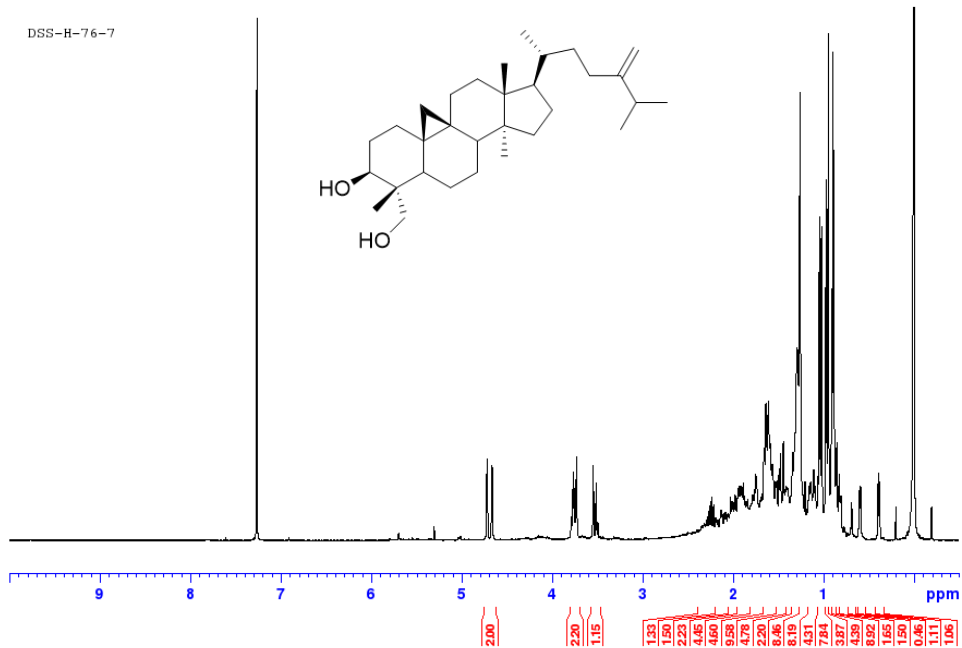
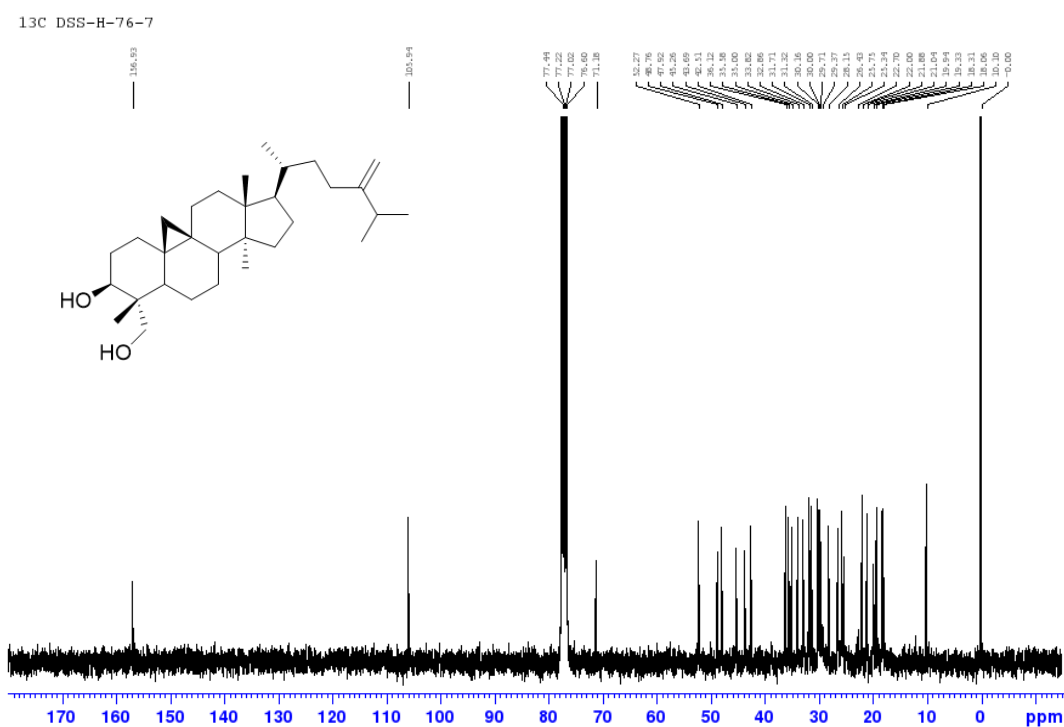
HMBC DSS-H-21-3-1



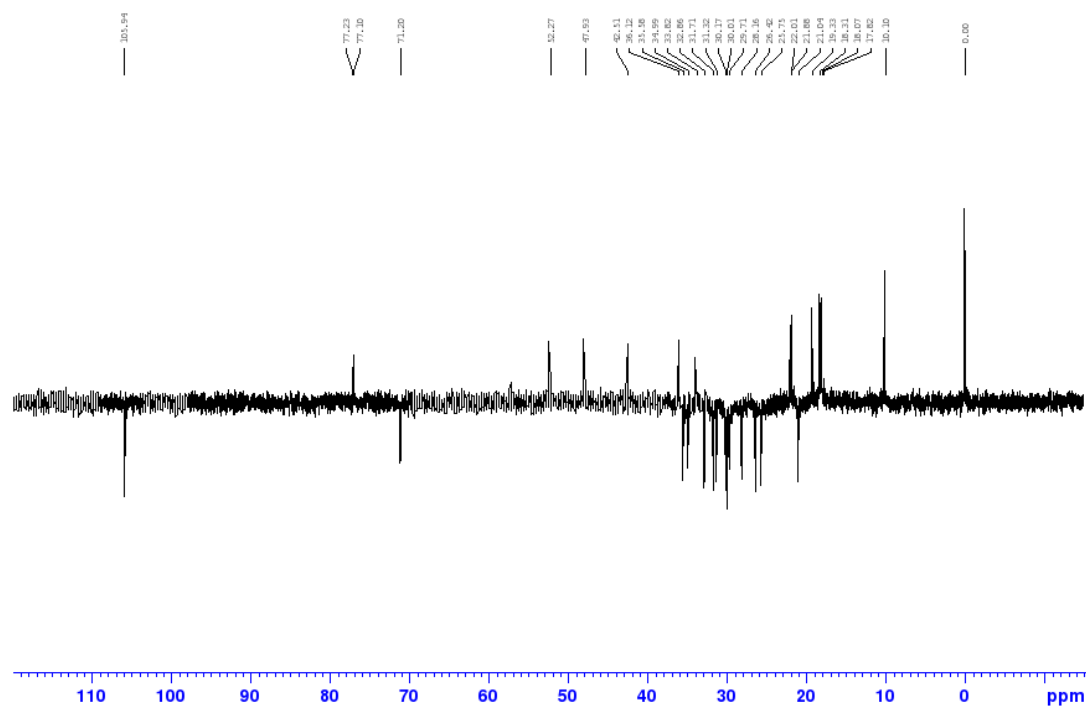
S45b แสดง HMBC-NMR ของ DSS6



S46 แสดง Mass spectrum ของ DSS6

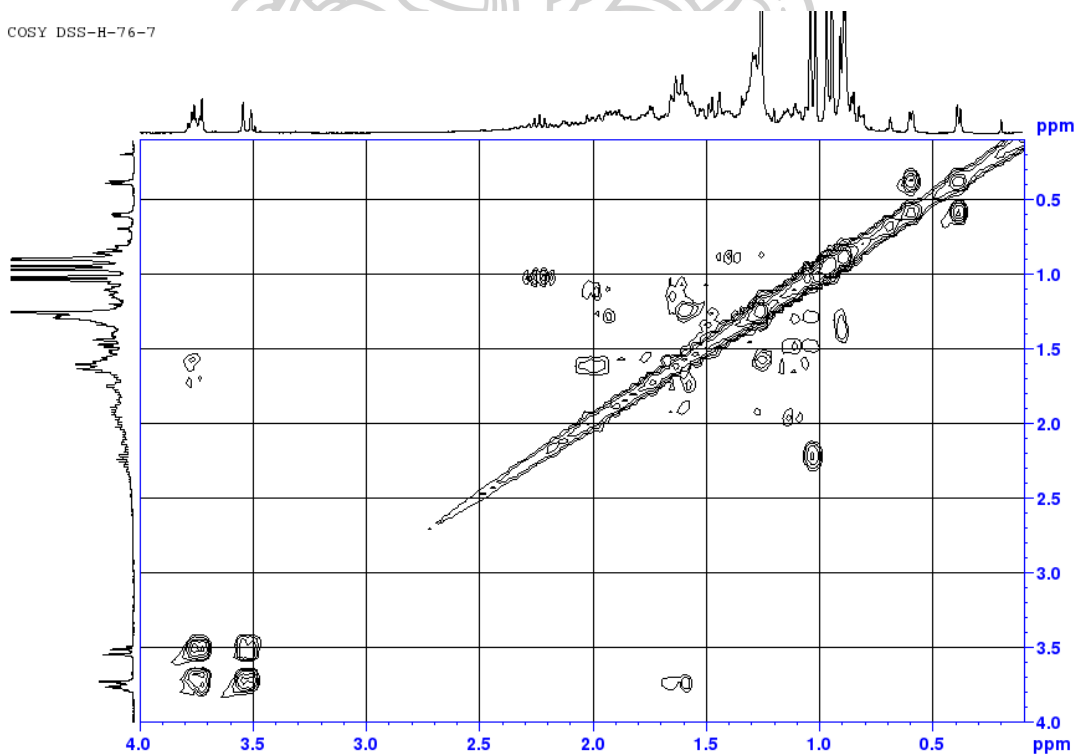
S47 แสดง $^1\text{H-NMR}$ ของ DSS7S48 แสดง $^{13}\text{C-NMR}$ ของ DSS7

DSS-H-76-7

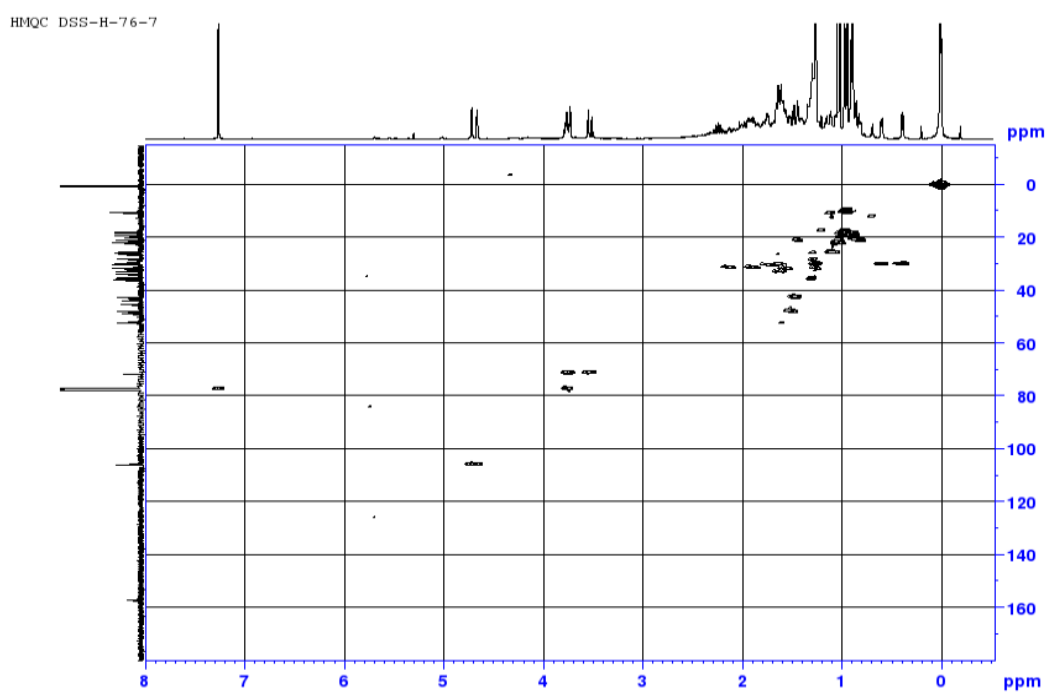


S49 แสดง dept135-NMR ของ DSS7

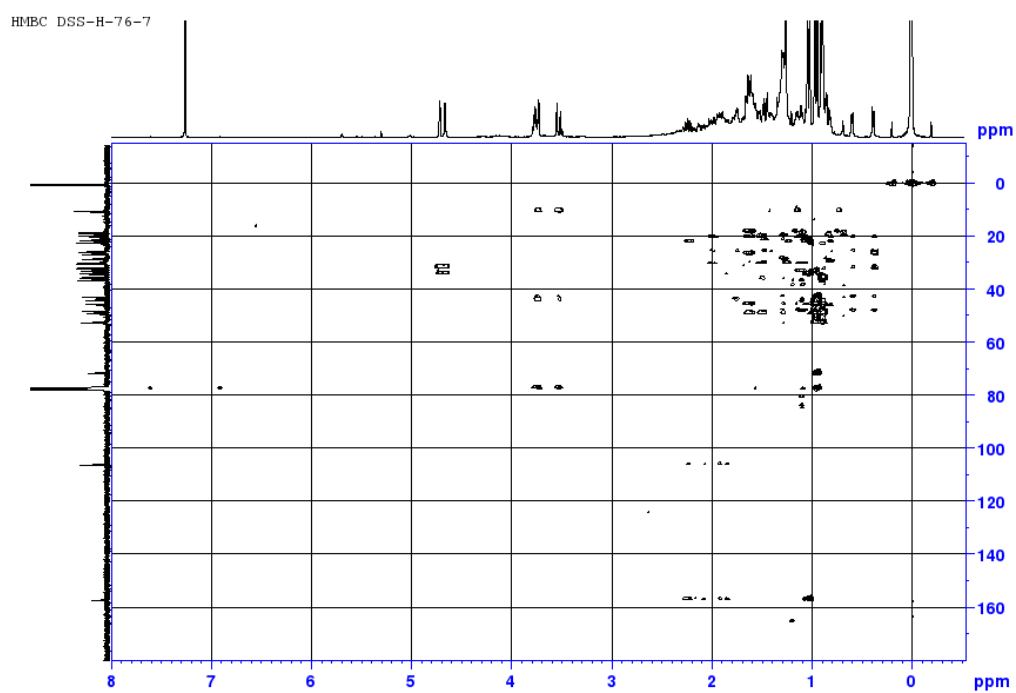
COSY DSS-H-76-7



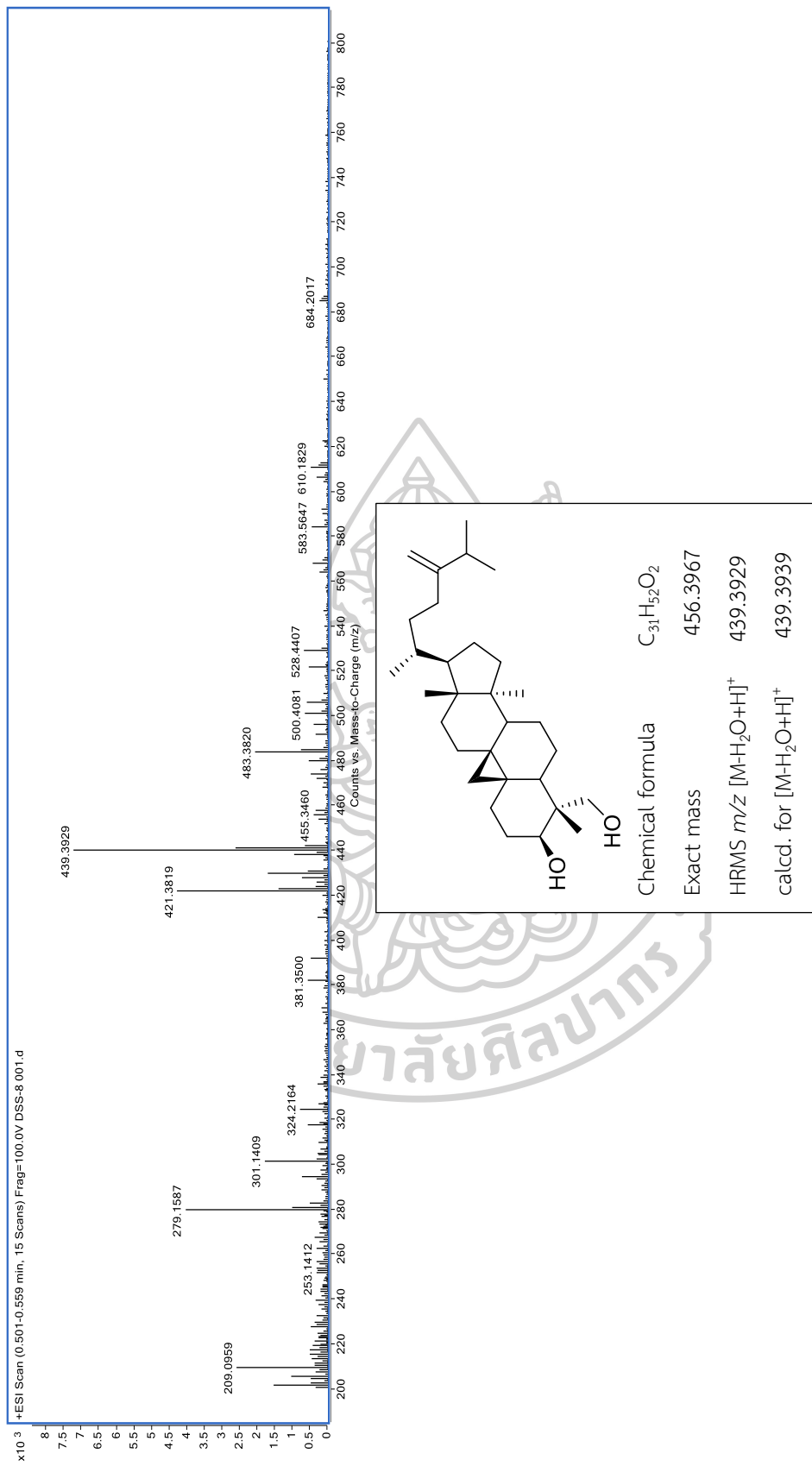
S50 แสดง COSY-NMR ของ DSS7



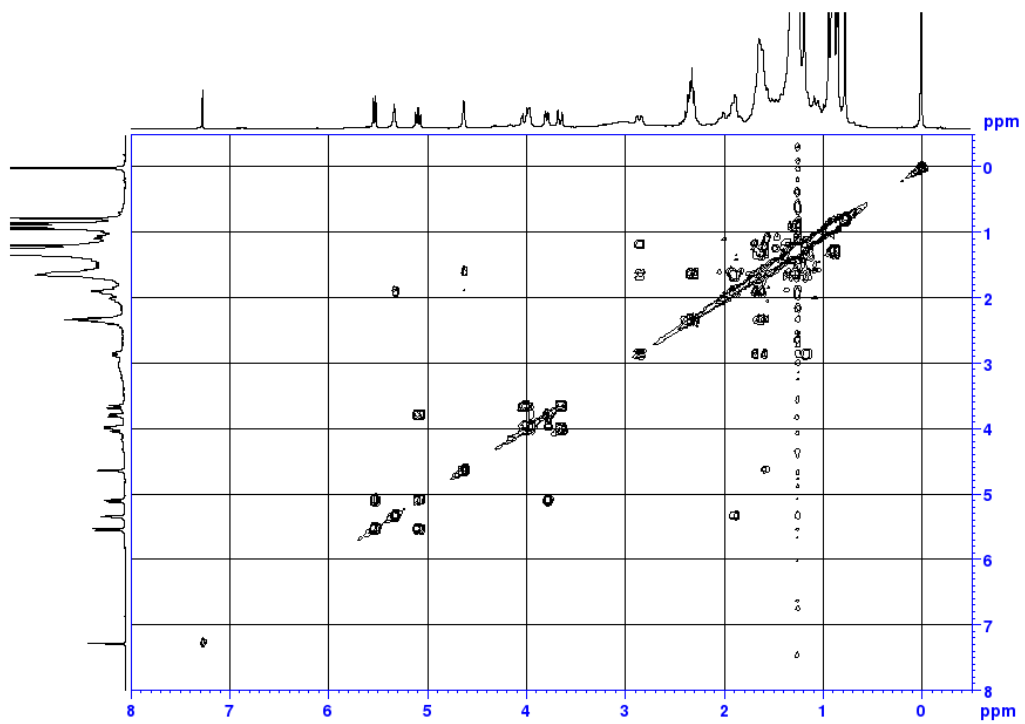
S51 แสดง HMQC-NMR ของ DSS7



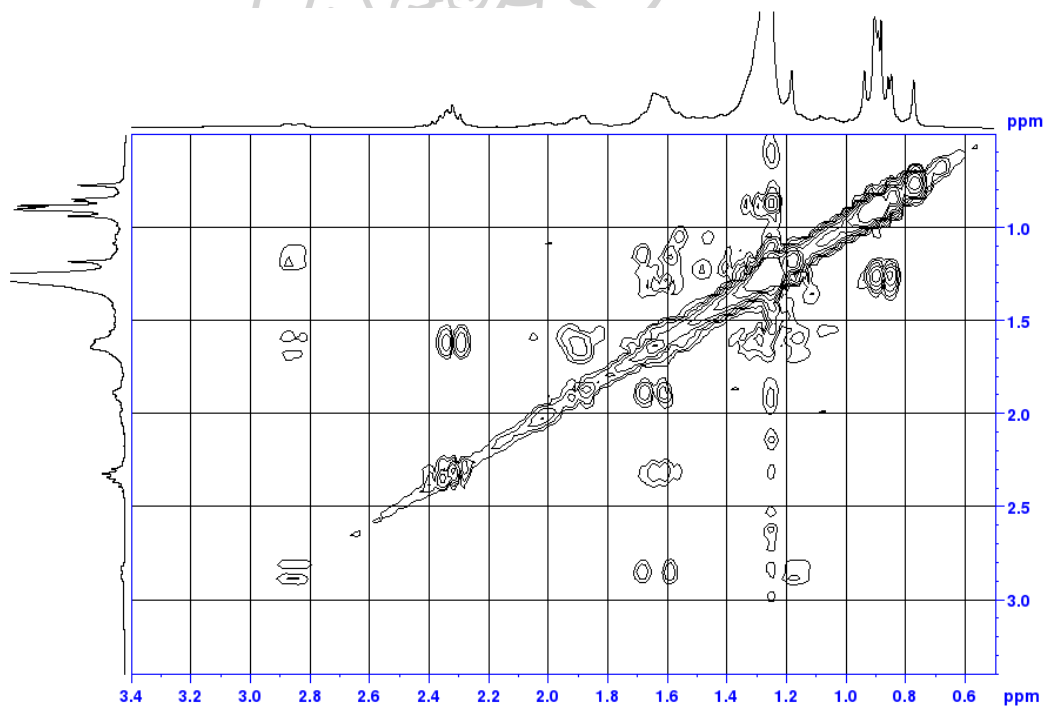
S52 แสดง HMBC-NMR ของ DSS7



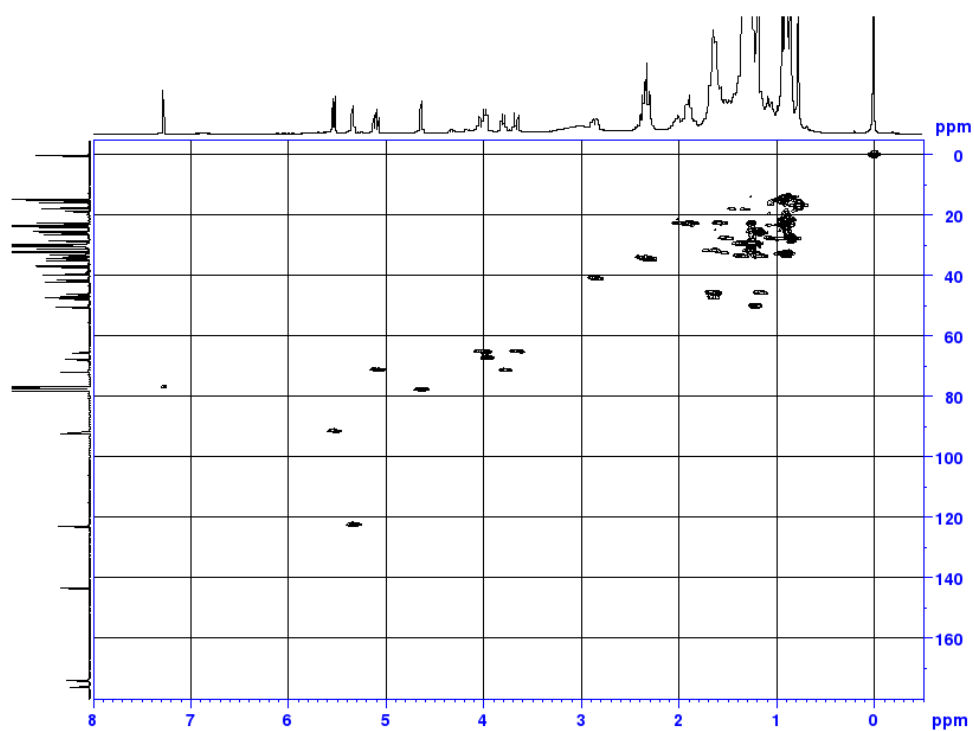
S53 แสดง Mass spectrum ของ DSS7



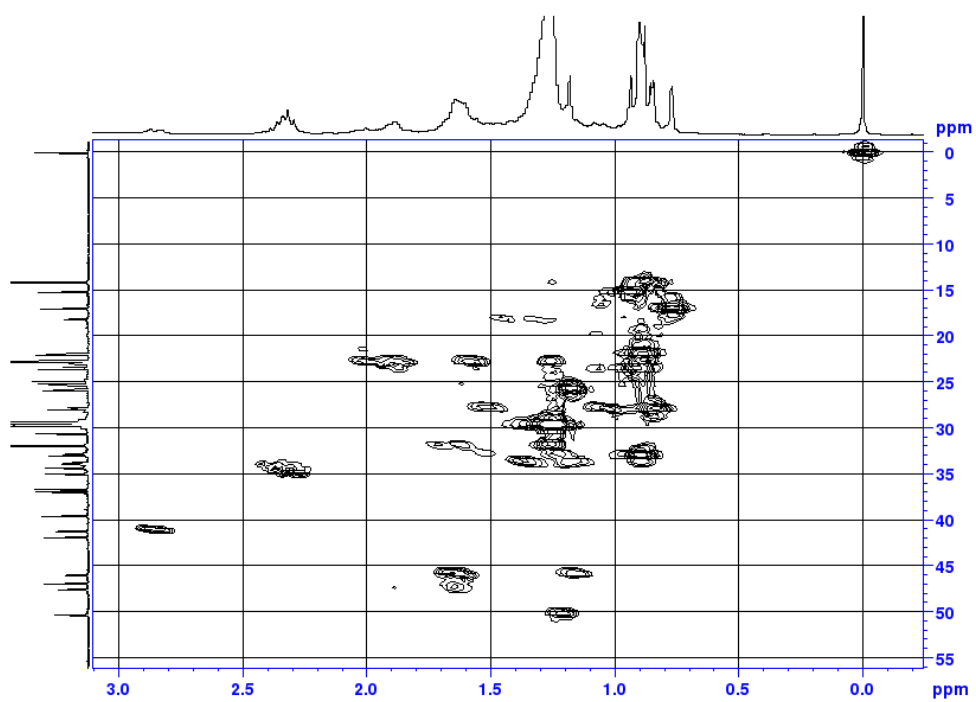
S56a แสดง COSY-NMR ของ DSS8



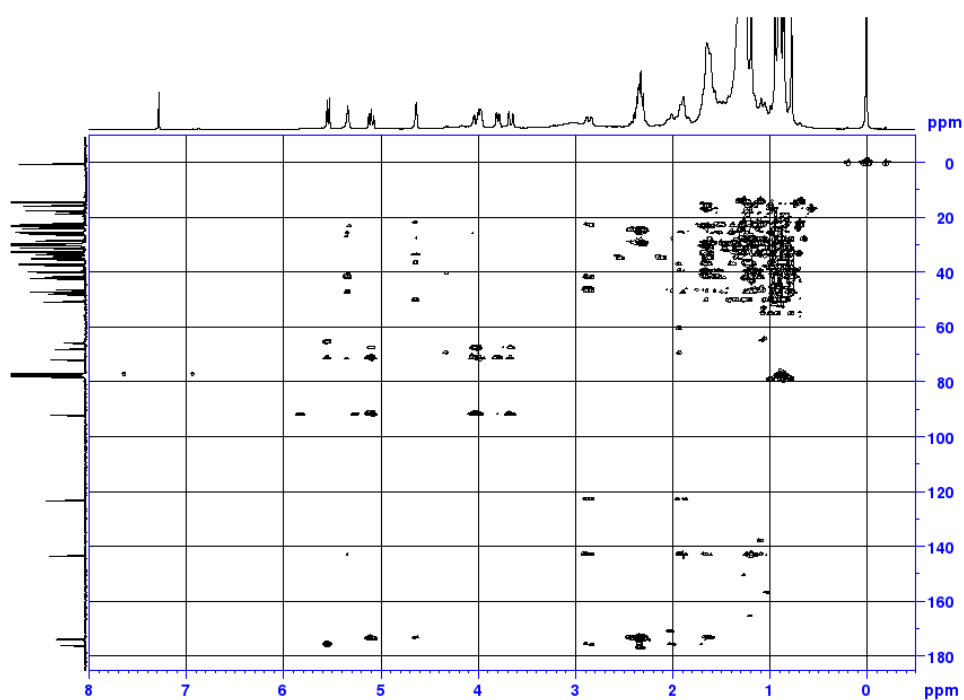
S56b แสดง COSY-NMR ของ DSS8



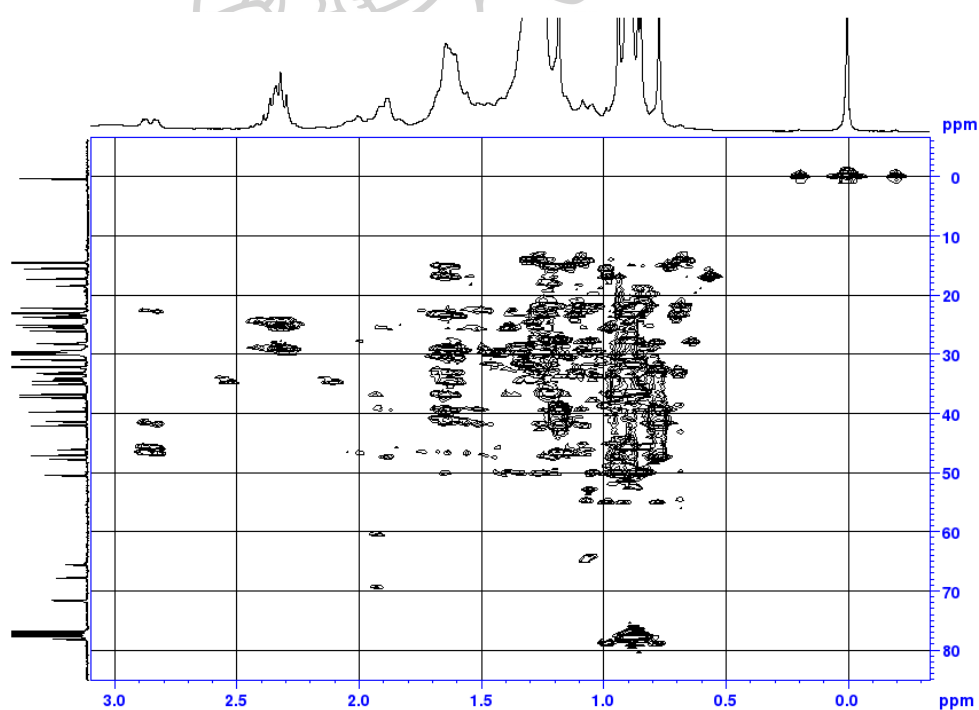
S57a แสดง HMQC-NMR ของ DSS8



S57b แสดง HMQC-NMR ของ DSS8

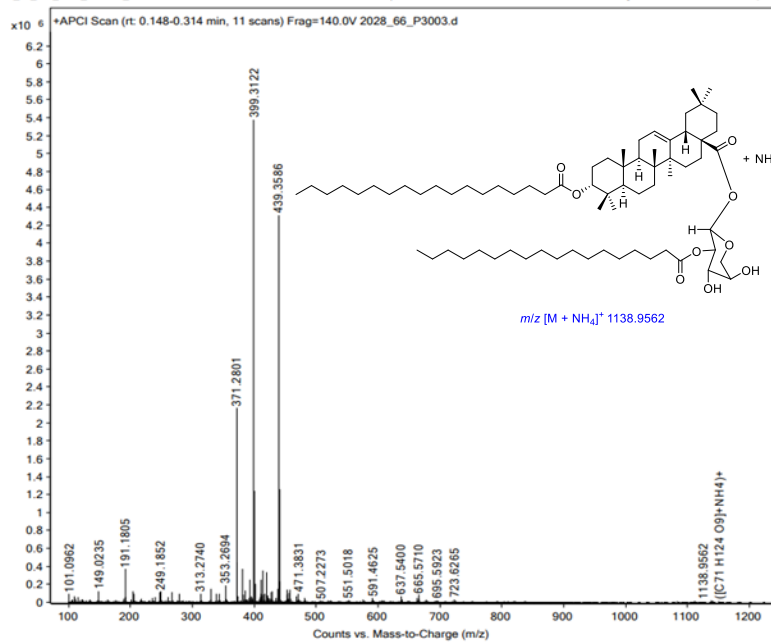


S58a แสดง HMBC-NMR ของ DSS8



S58b แสดง HMBC-NMR ของ DSS8

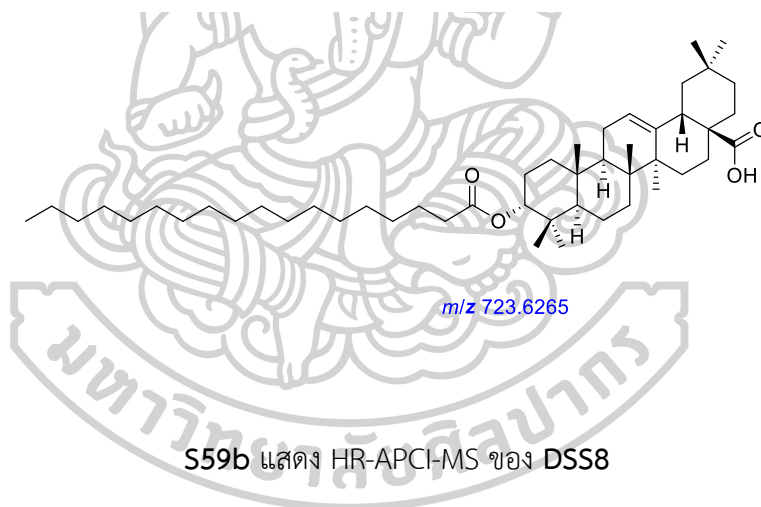
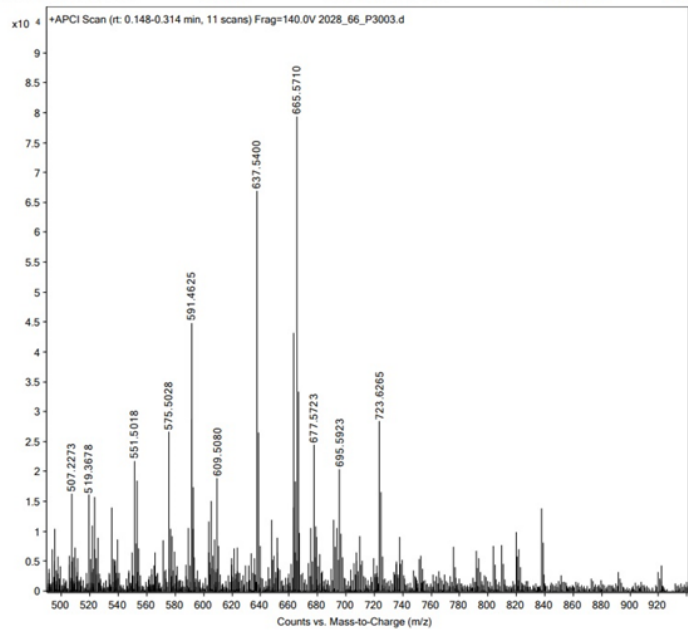
Sample Name	DSS-12	Position	P1-C1	Instrument Name	Instrument 1
User Name		Inj Vol	2	InjPosition	
Sample Type	Sample	IRM Calibration Status	Success	Data Filename	2028_66_P3003.d
ACQ Method	2028_66_Pos_APCI_ScanMS_M3.m	Comment	sample dissolved with MeOH	Acquired Time	2/17/2023 10:44:34 AM (UTC+07:00)



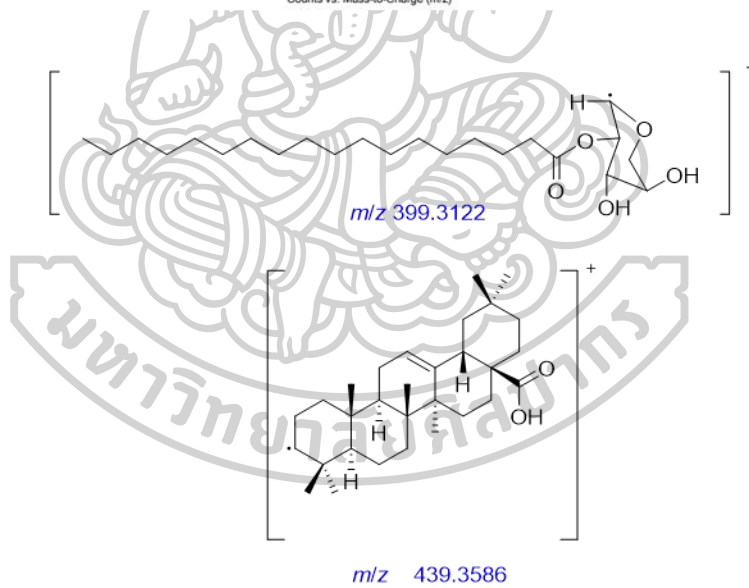
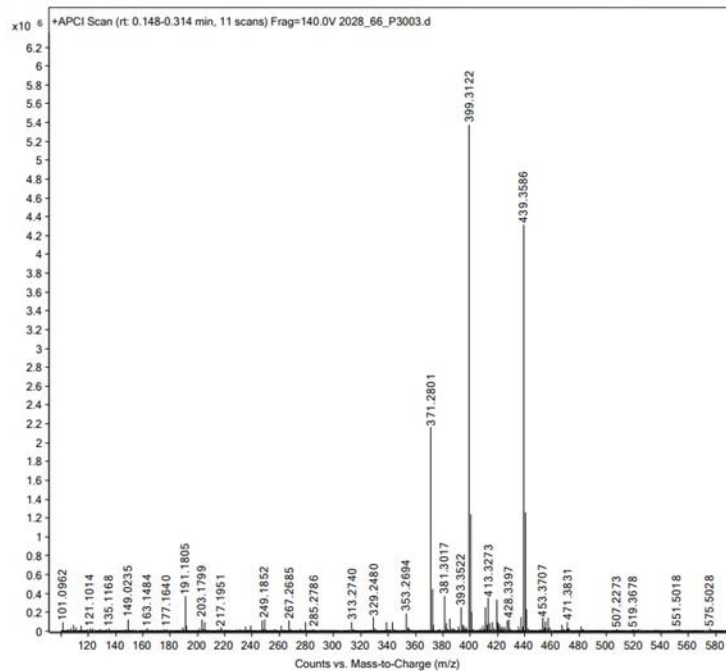
S59a แสดง HR-APCI-MS ของ DSS8



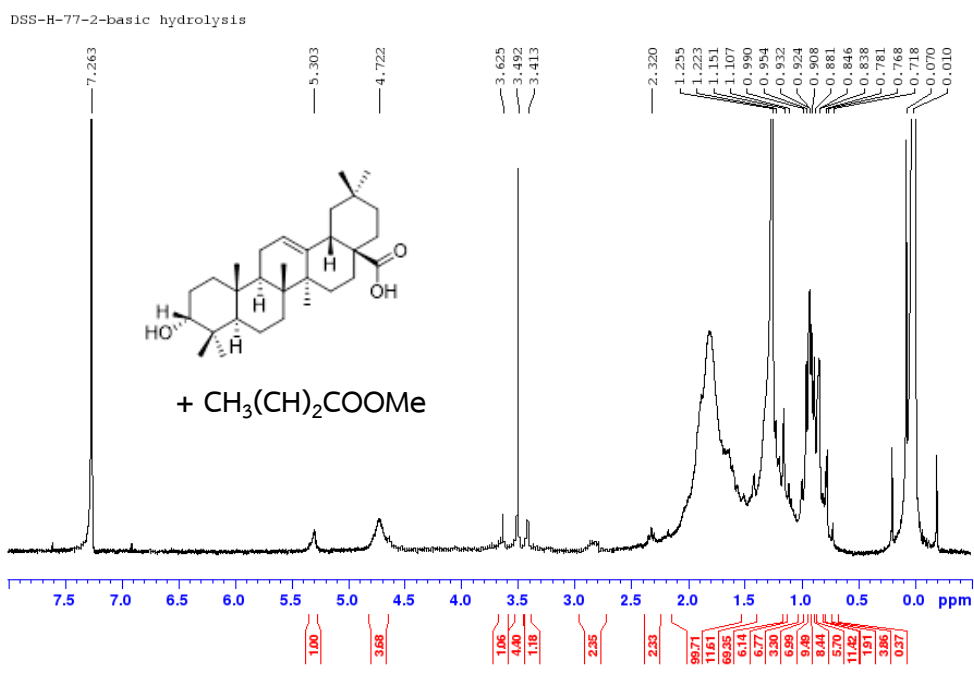
Sample Name	DSS-12	Position	PI-C1	Instrument Name	Instrument 1
User Name		Inj Vol	2	InjPosition	
Sample Type	Sample	IRM Calibration Status	Success	Data Filename	2028_66_P3003.d
ACQ Method	2028_66_Pos_APCI_SacrMS_M3.m	Comment	sample dissolved with MeOH	Acquired Time	2/17/2023 10:44:34 AM (UTC+07:00)



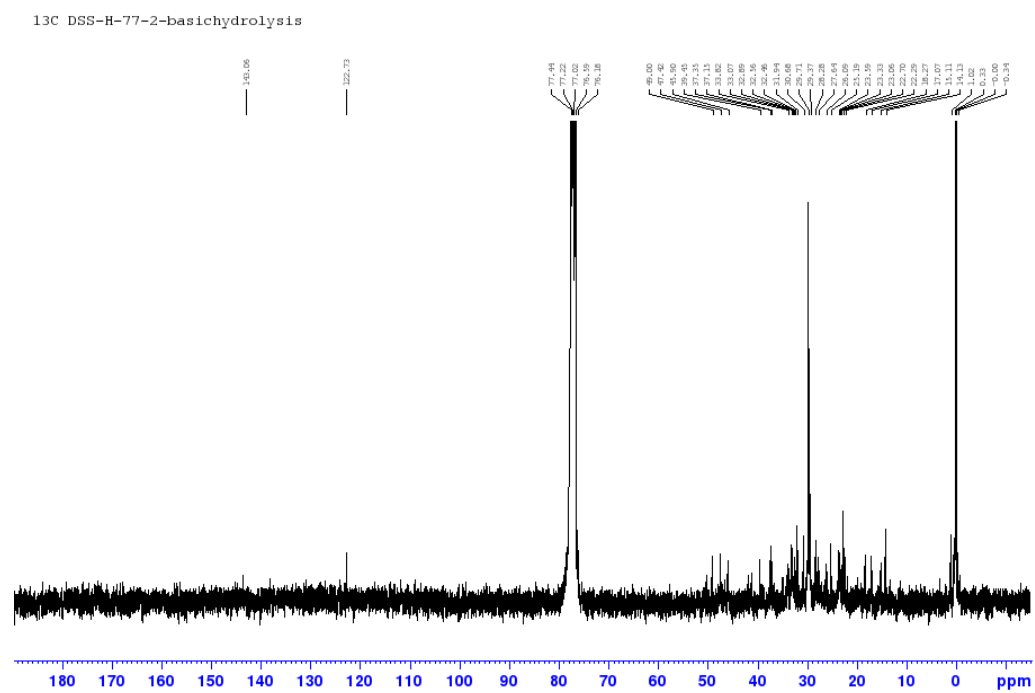
Sample Name	DSS-12	Position	P1-C1	Instrument Name	Instrument 1
User Name		Inj Vol	2	InjPosition	
Sample Type	Sample	IRM Calibration Status	Success	Data Filename	2028_66_P3003.d
ACQ Method	2028_66_Pos_APCI_SacrMS_M3.m	Comment	sample dissolved with MeOH	Acquired Time	2/17/2023 10:44:34 AM (UTC+07:00)



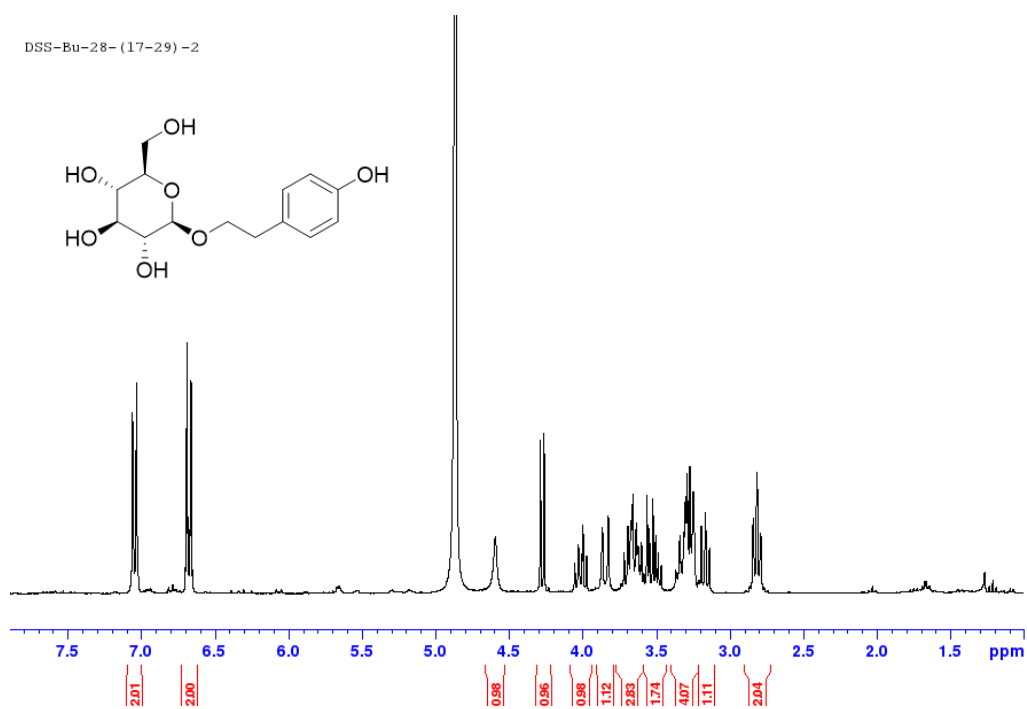
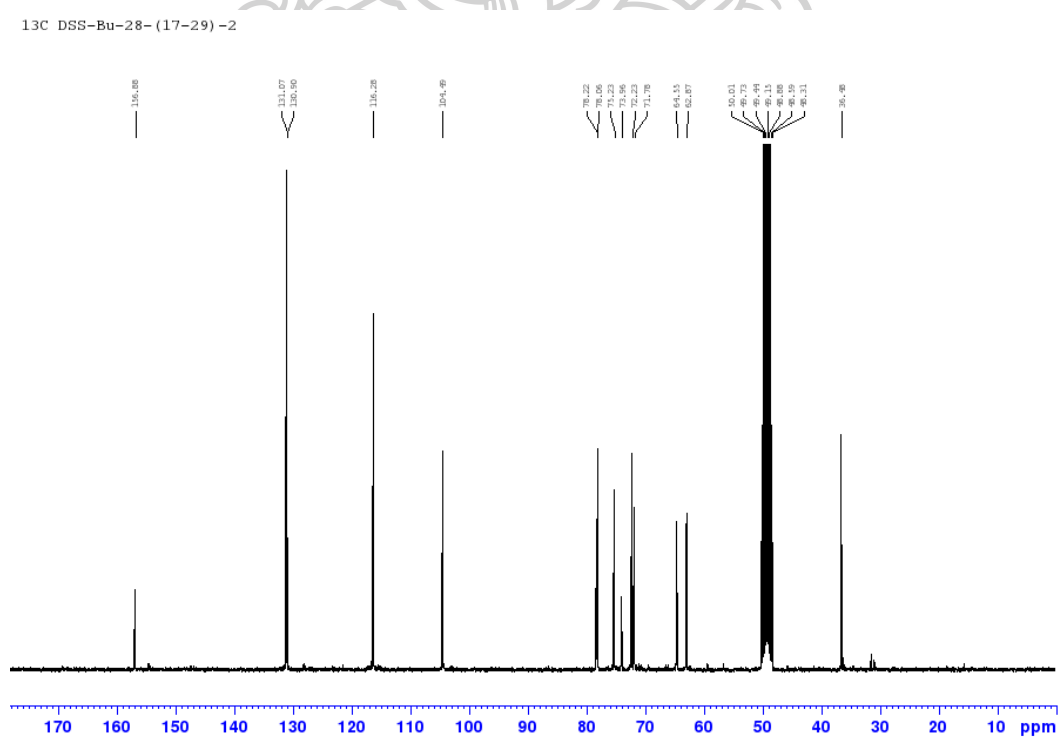
S59c แสดง HR-APCI-MS ของ DSS8

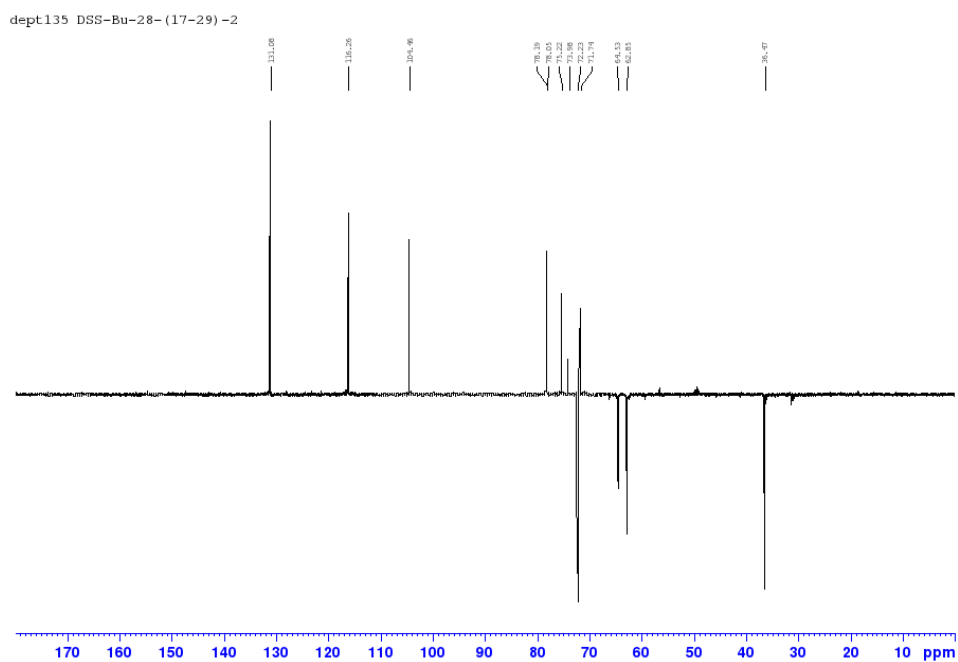


S62 แสดง $^1\text{H-NMR}$ ของสารผสม DSS8b และ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOMe}$

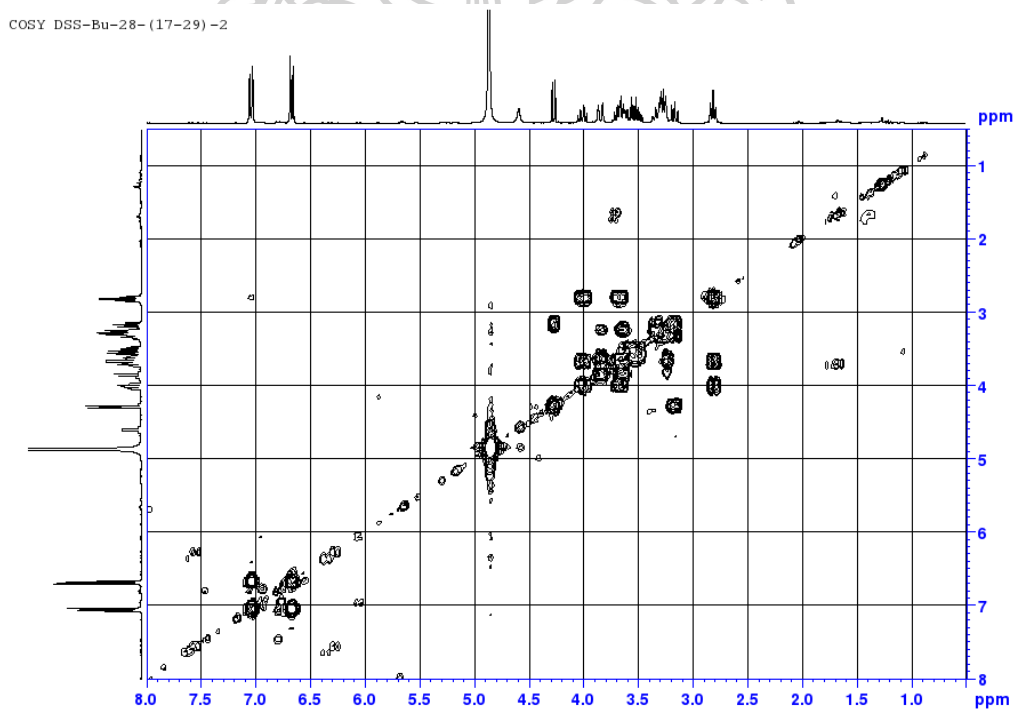


S63 แสดง $^{13}\text{C-NMR}$ ของสารผสม DSS8b และ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOMe}$

S64 แสดง $^1\text{H-NMR}$ ของ DSS9S65 แสดง $^{13}\text{C-NMR}$ ของ DSS9

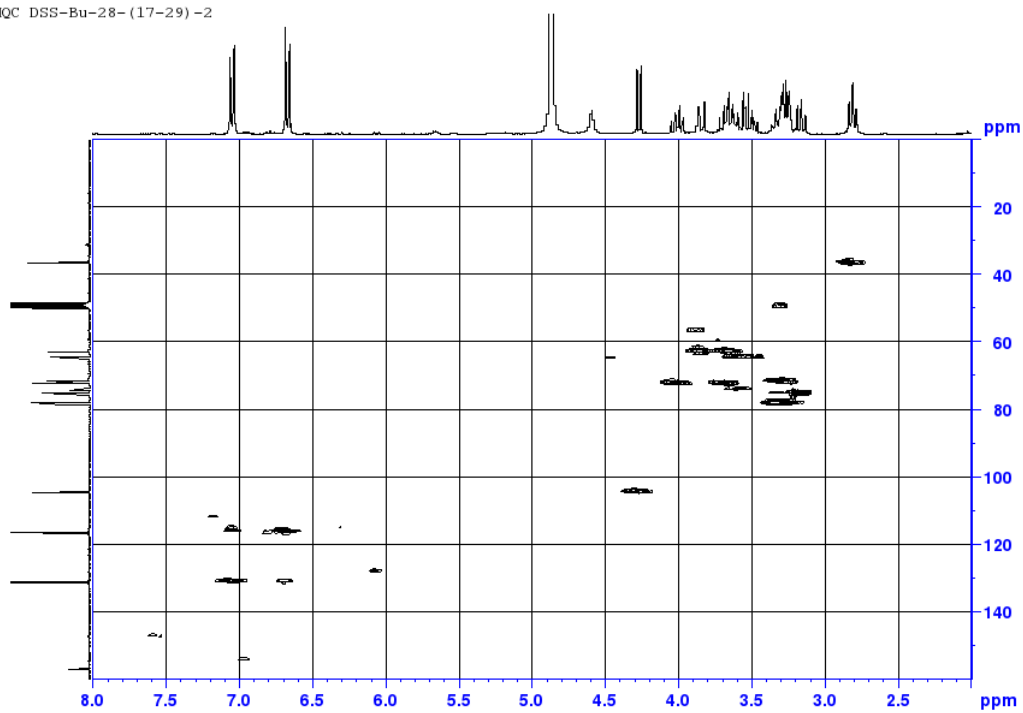


S66 แสดง dept135-NMR ของ DSS9



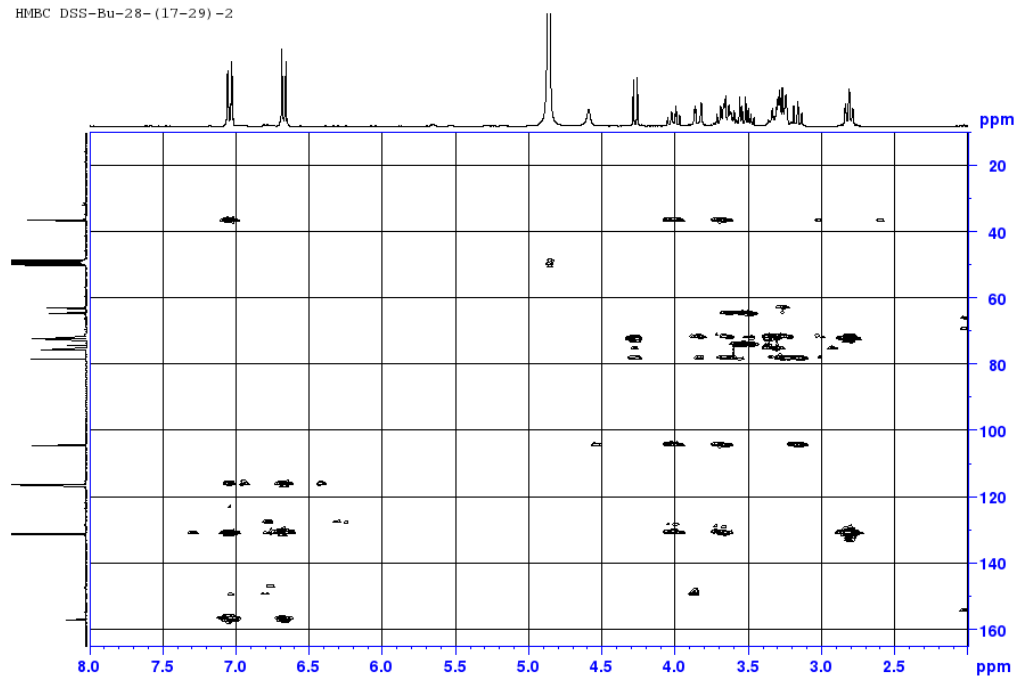
S67 แสดง COSY-NMR ของ DSS9

HMOC DSS-Bu-28- (17-29) -2

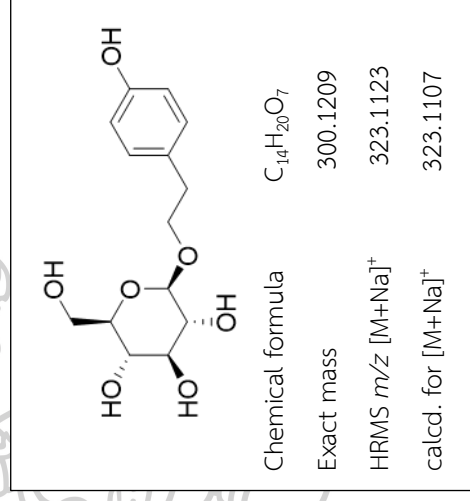
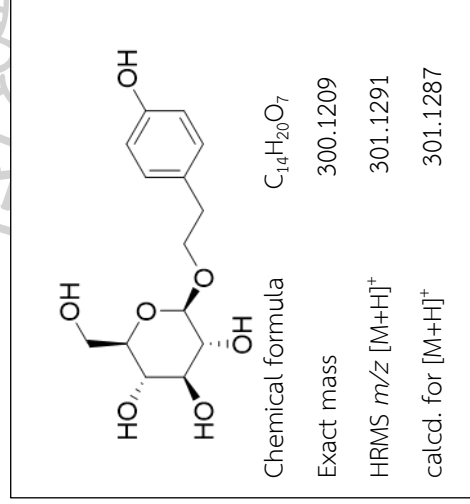
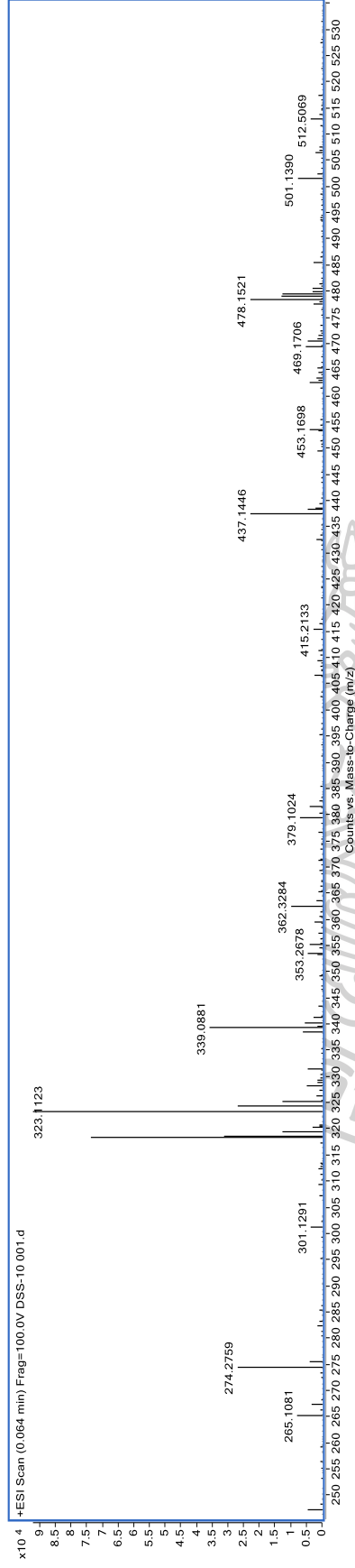


S68 แสดง HMOC-NMR ของ DSS9

HMBC DSS-Bu-28- (17-29) -2

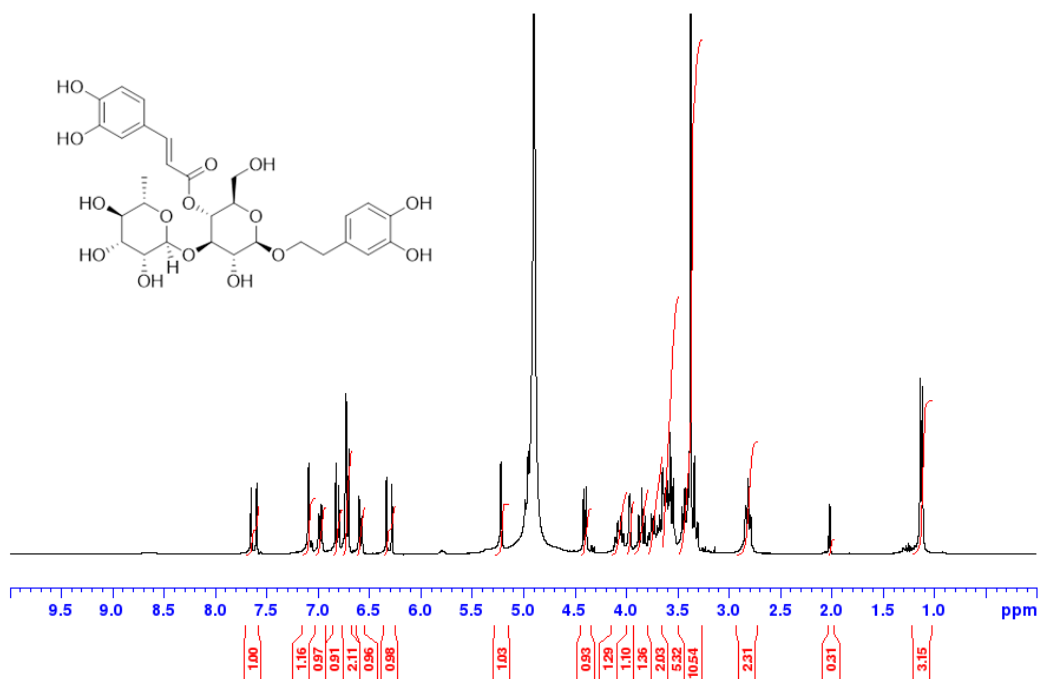
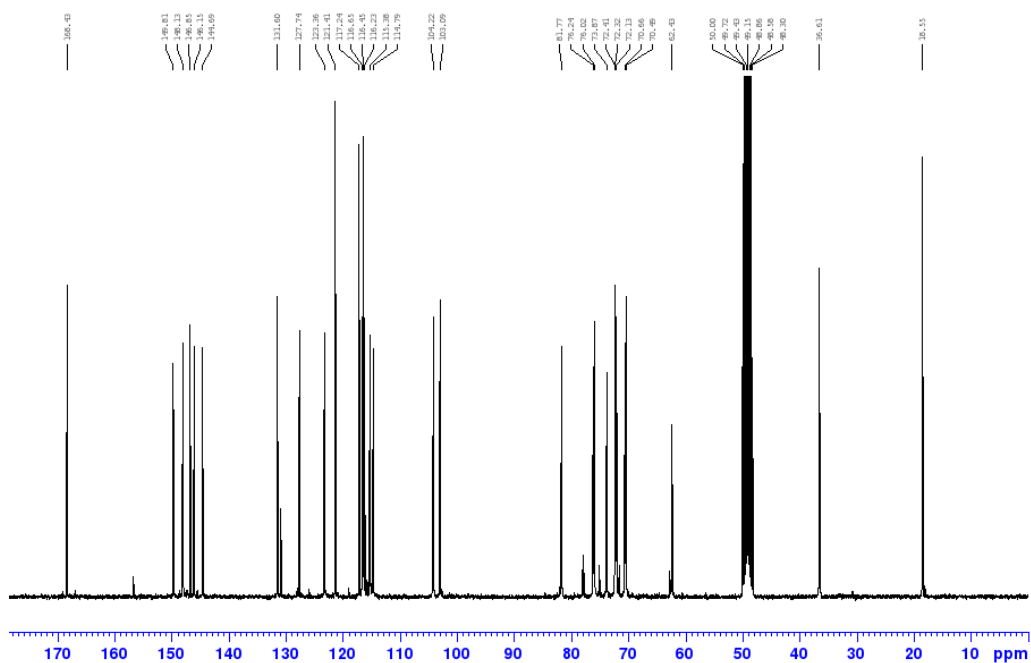


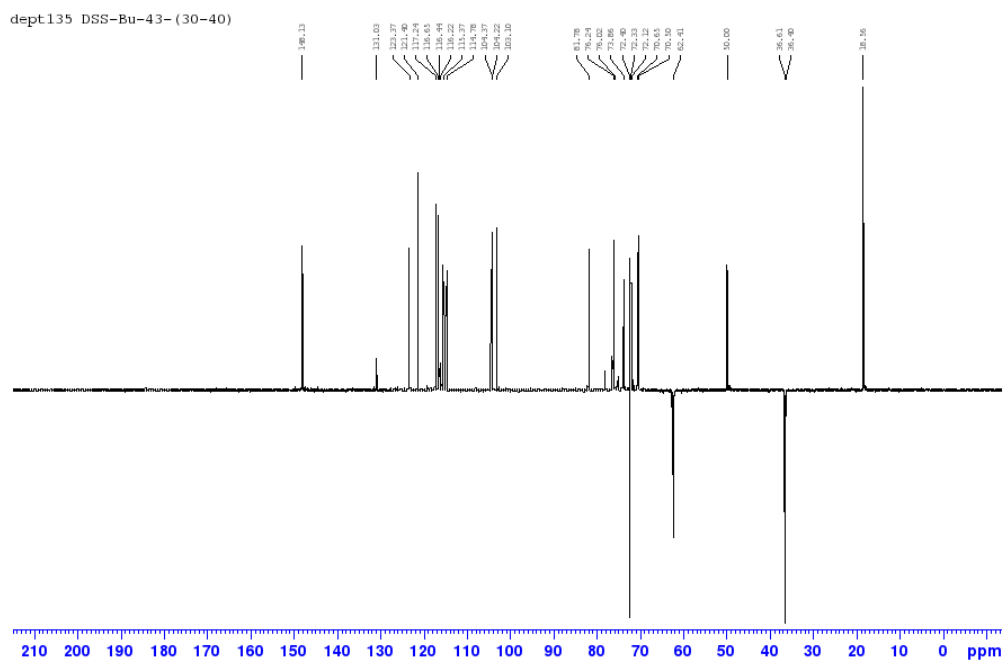
S69 แสดง HMBC-NMR ของ DSS9



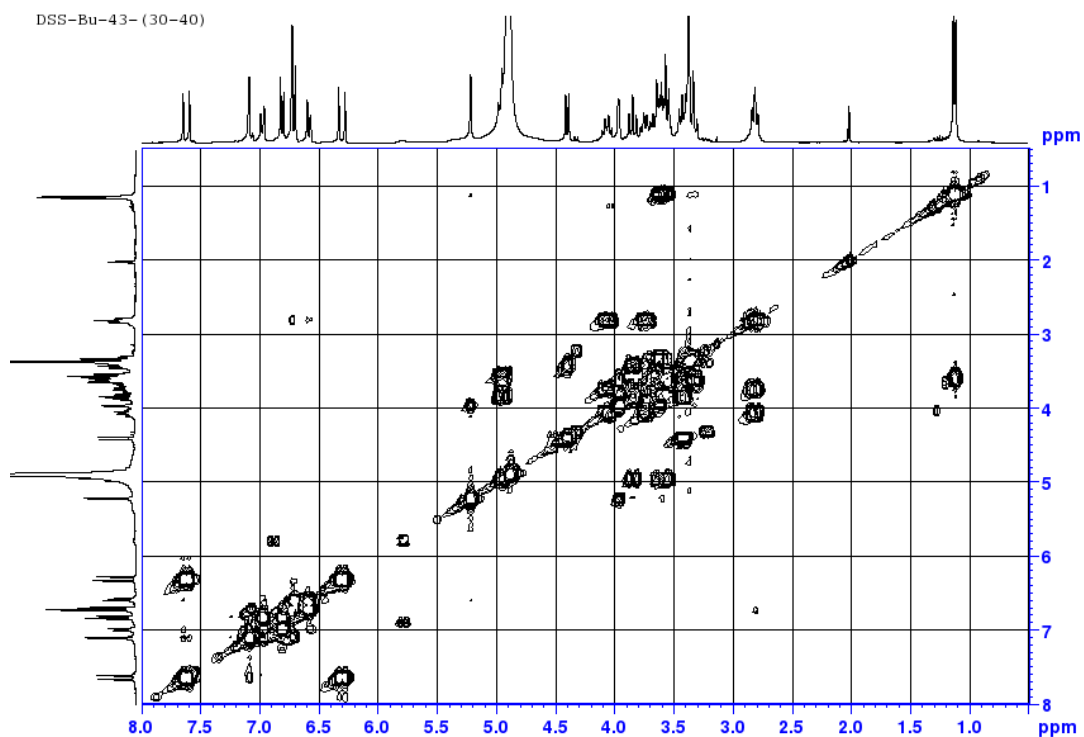
S70 ๒๕๓๓ Mass spectrum ๓๐๓ DSS9

DSS-Bu-43- (30-40)

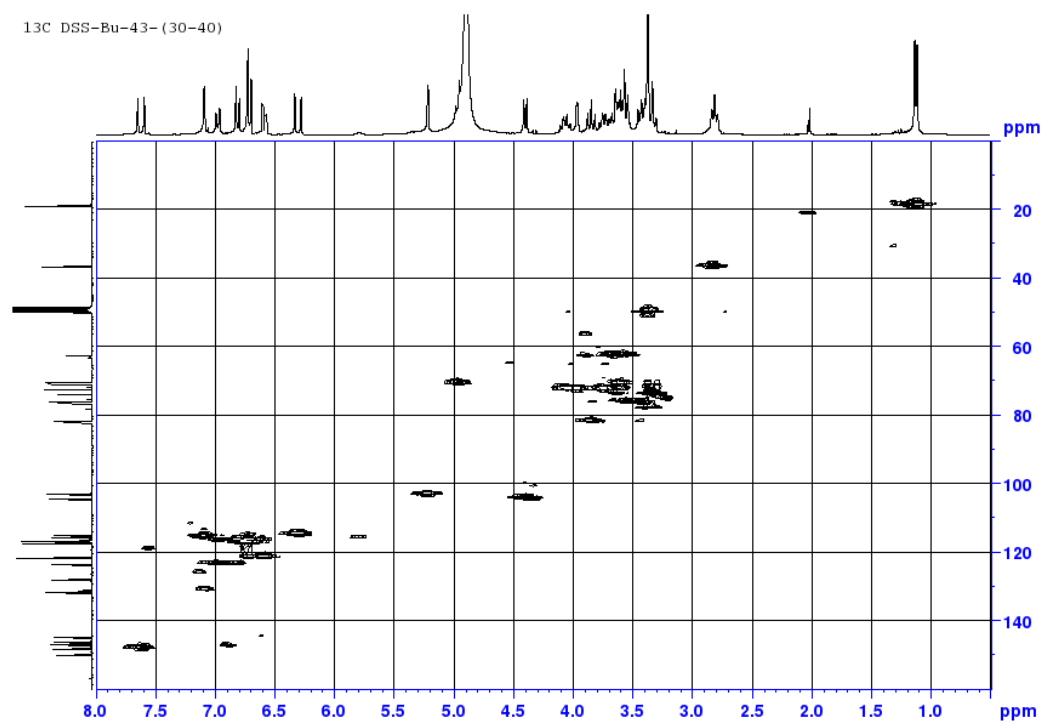
S71 แสดง $^1\text{H-NMR}$ ของ DSS10 $^{13}\text{C-NMR}$ DSS-Bu-43- (30-40)S72 แสดง $^{13}\text{C-NMR}$ ของ DSS10



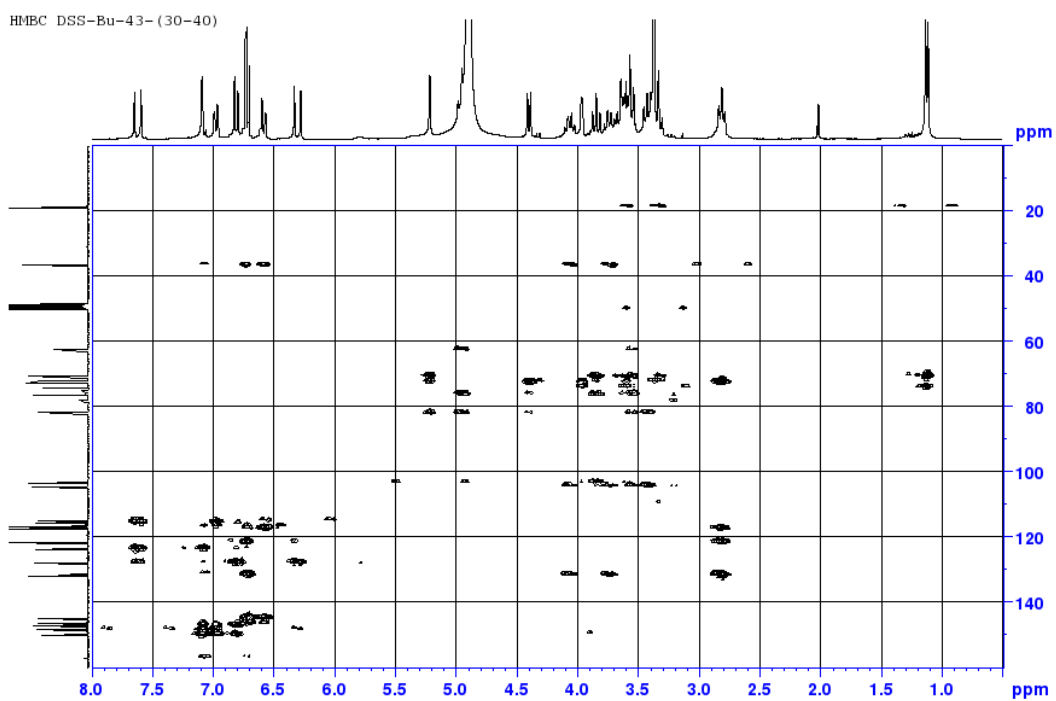
S73 แสดง dept135-NMR ของ DSS10



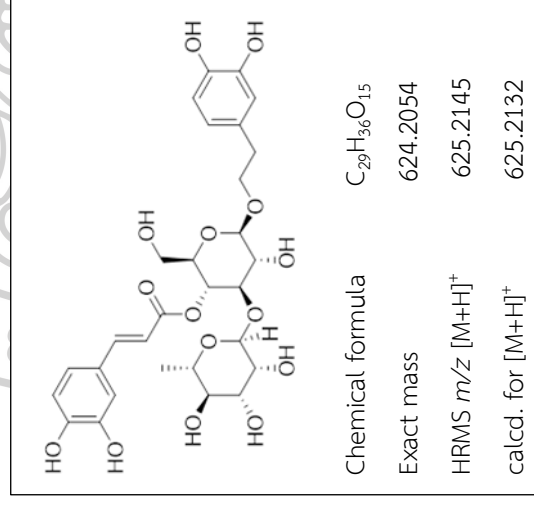
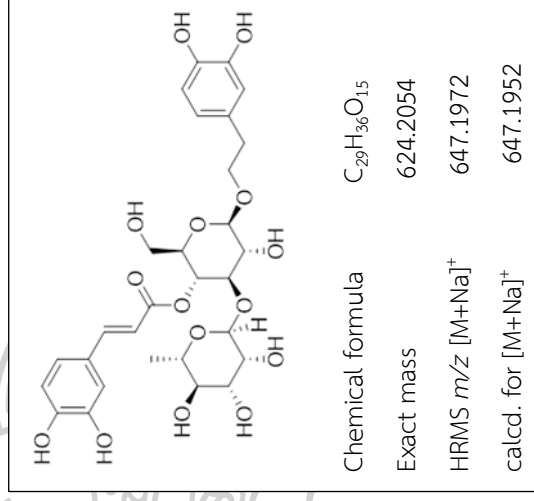
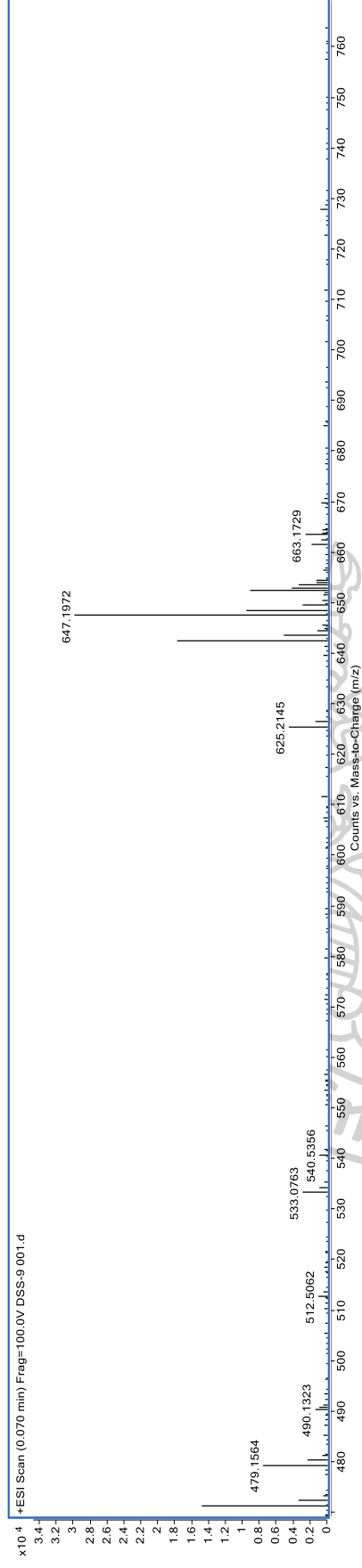
S74 แสดง COSY-NMR ของ DSS10



S75 แสดง HMQC-NMR ของ DSS10

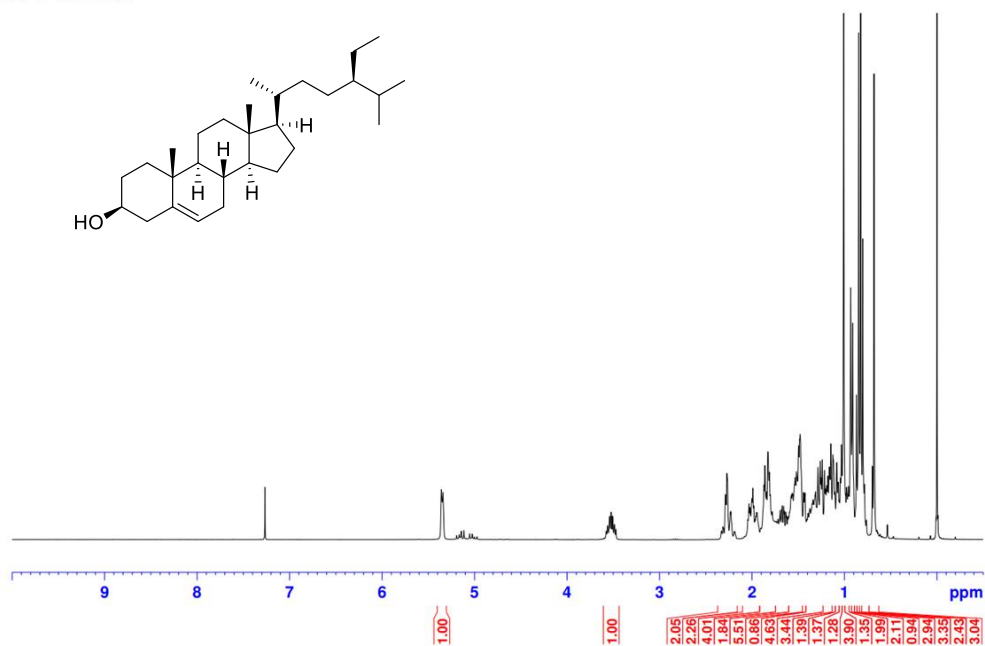


S76 แสดง HMBC-NMR ของ DSS10

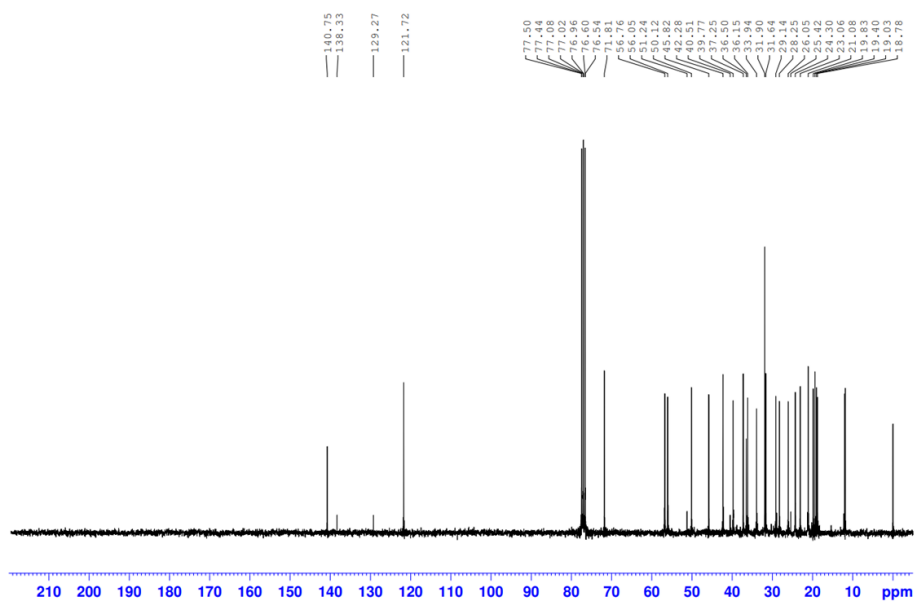


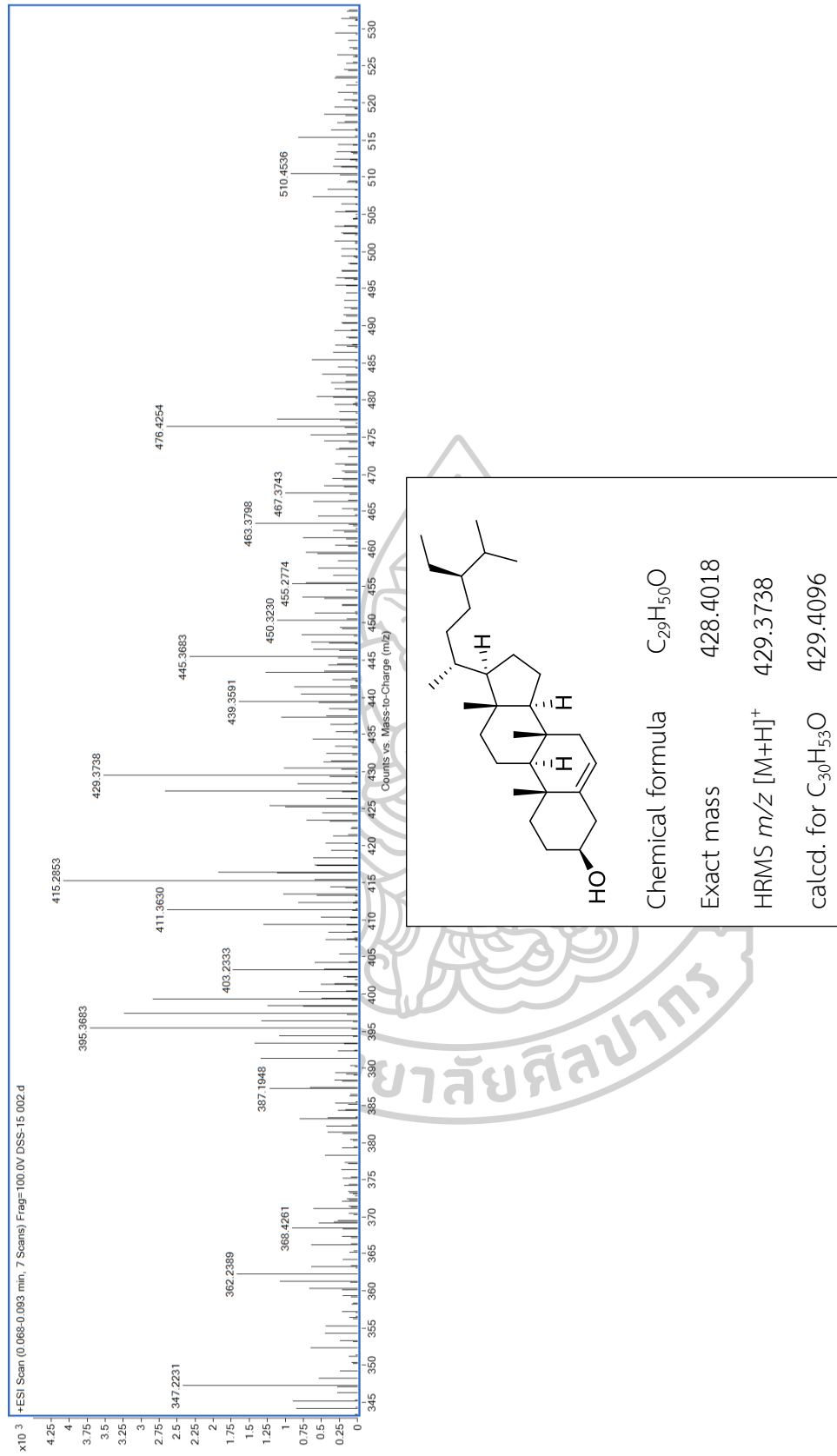
S77 46003 Mass spectrum ของ DSS10

DSS-H- (30+33) S

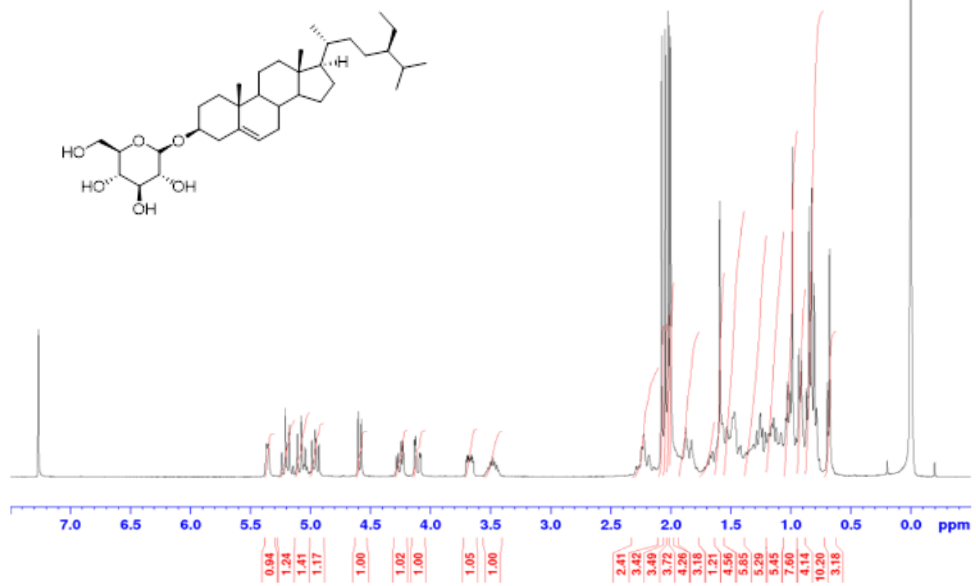
S78 แสดง $^1\text{H-NMR}$ ของ DSS11

13C DSS-H- (30+33) C

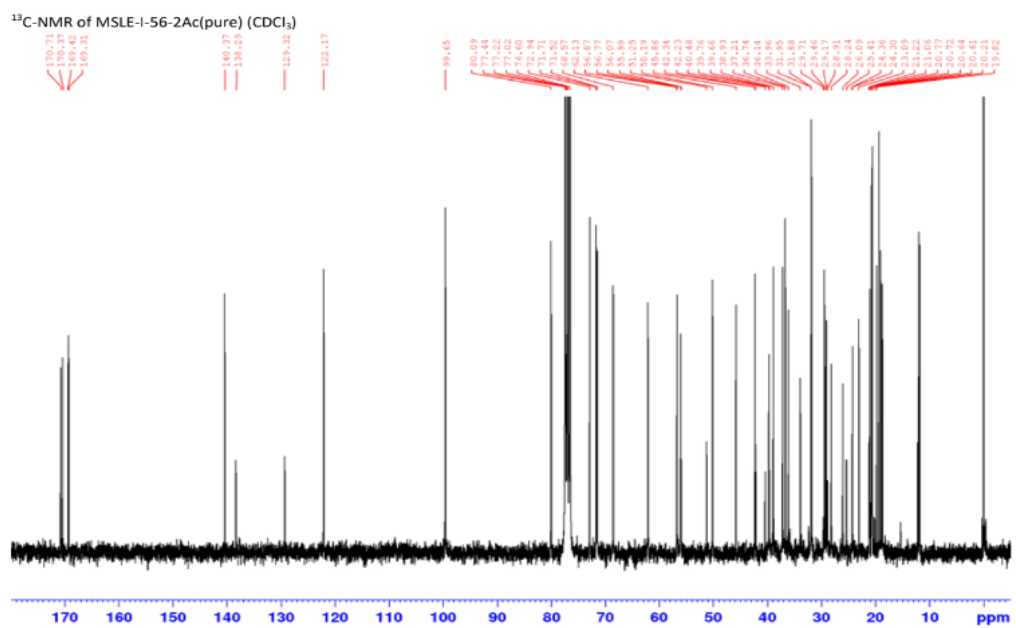
S79 แสดง $^{13}\text{C-NMR}$ ของ DSS11



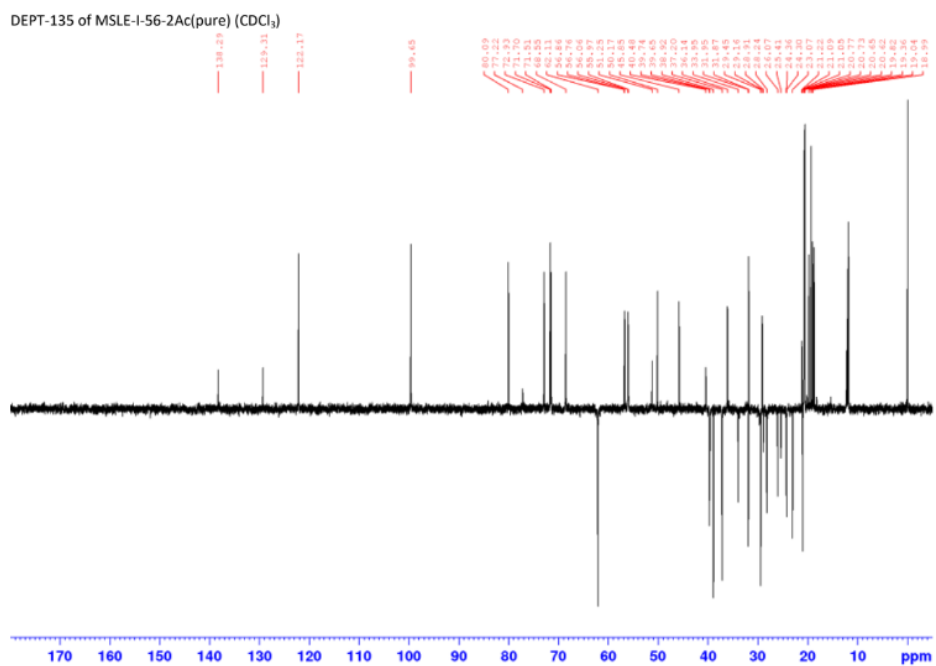
S80 แสดง mass spectrum ของ DSS11



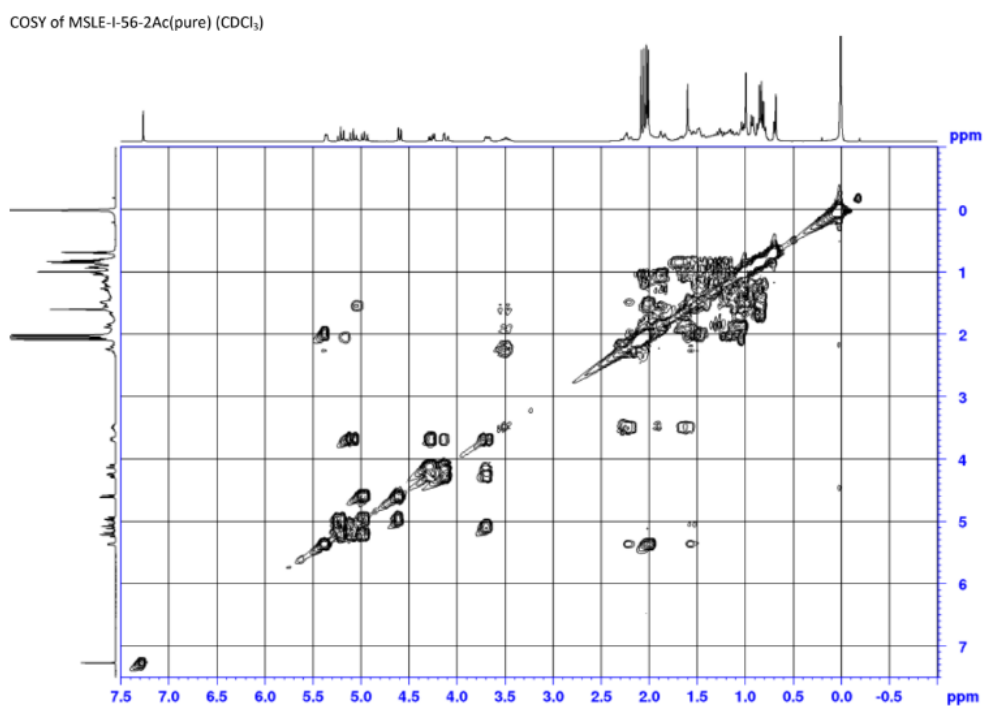
S81 แสดง $^1\text{H-NMR}$ ของ DSS12



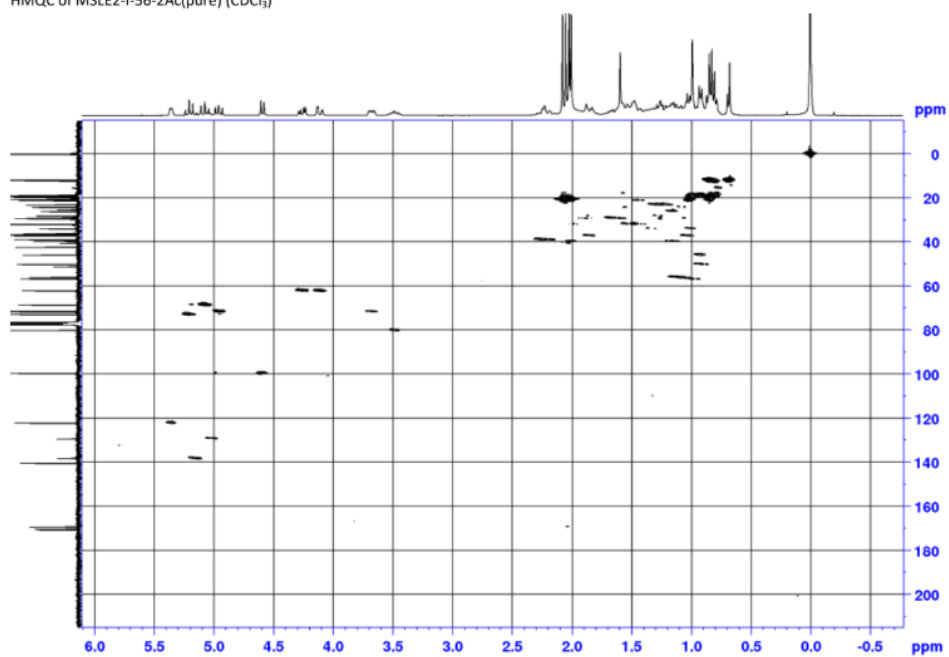
S82 แสดง $^{13}\text{C-NMR}$ ของ DSS12



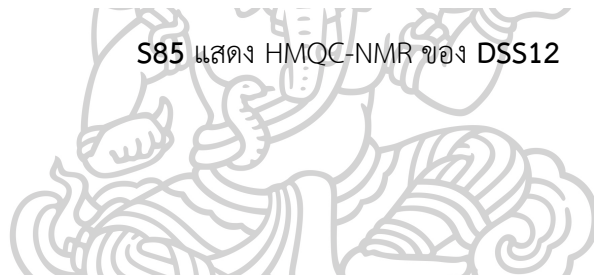
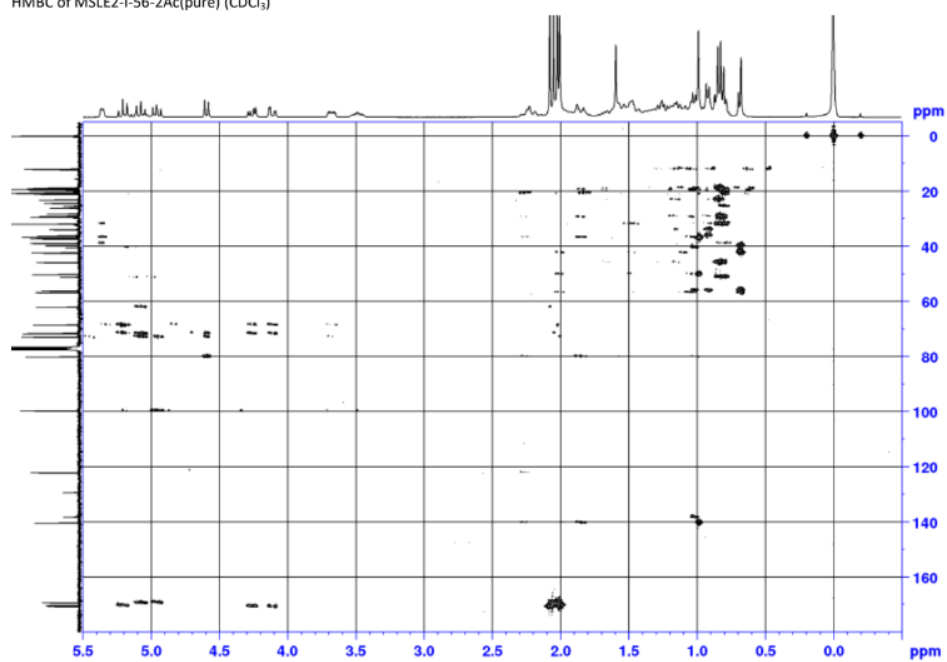
S83 แสดง dept135-NMR ของ DSS12



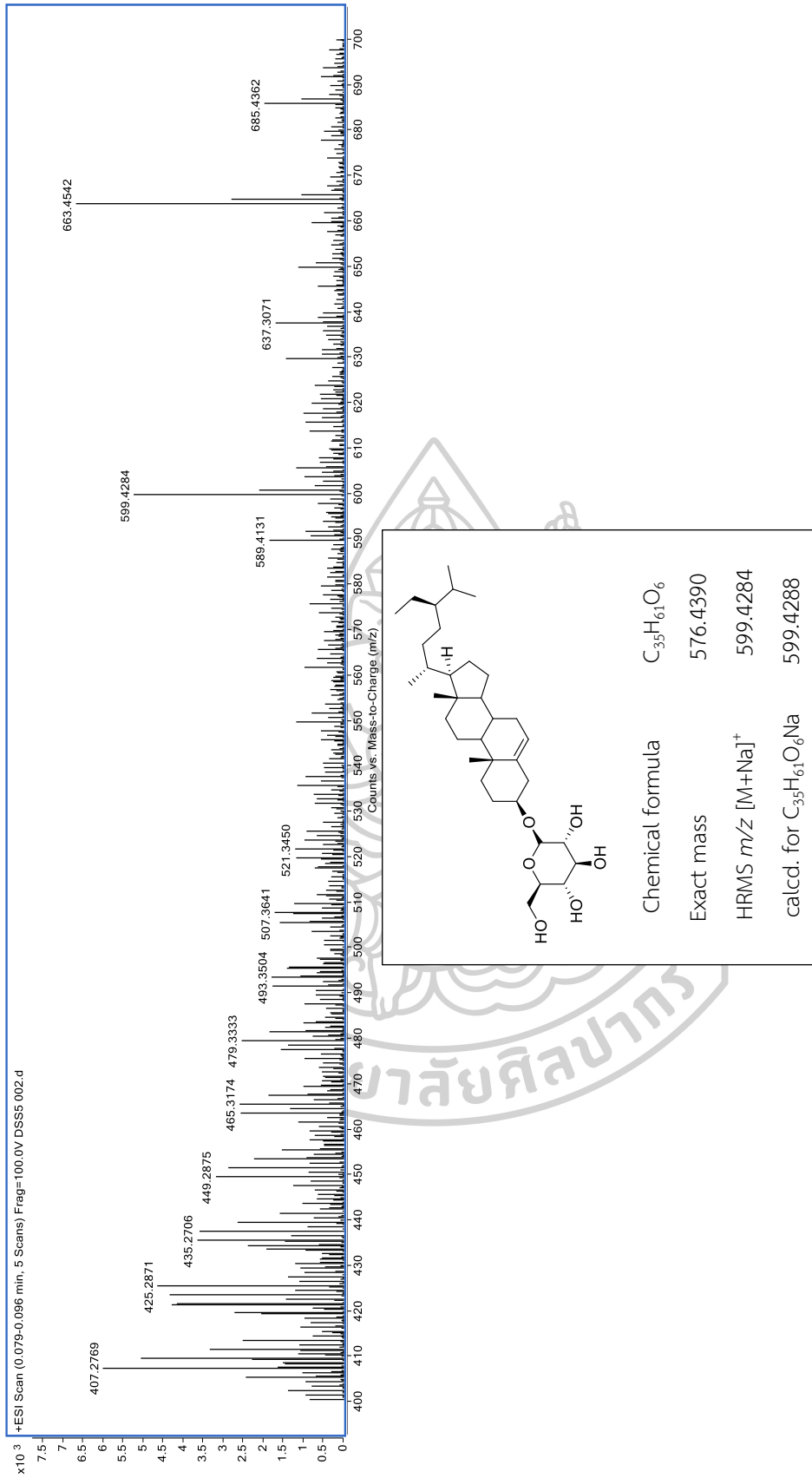
S84 แสดง COSY-NMR ของ DSS12

HMQC of MSLE2-I-56-2Ac(pure) (CDCl₃)

S85 แสดง HMQC-NMR ของ DSS12

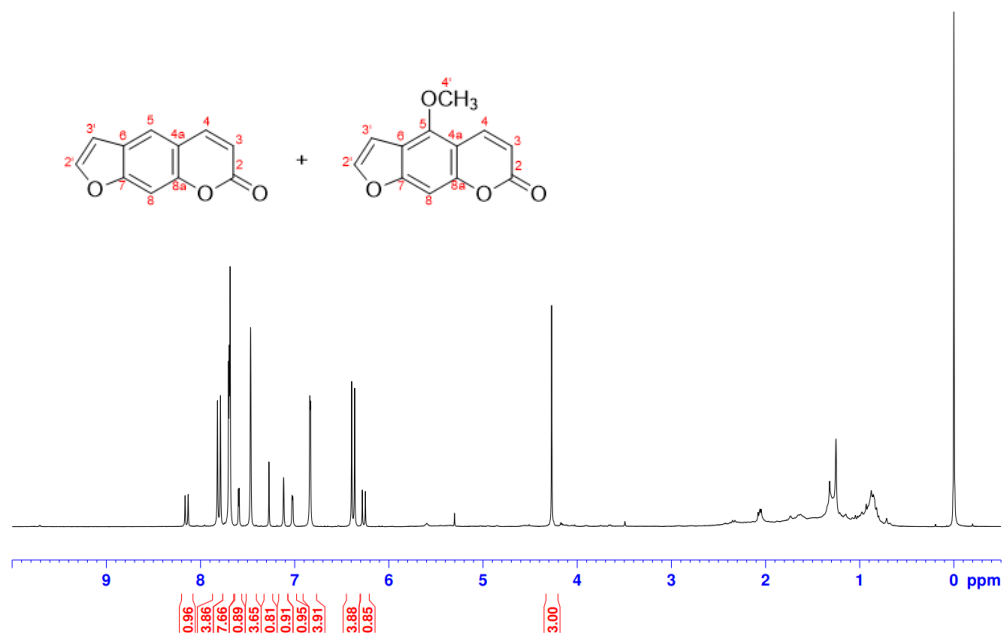
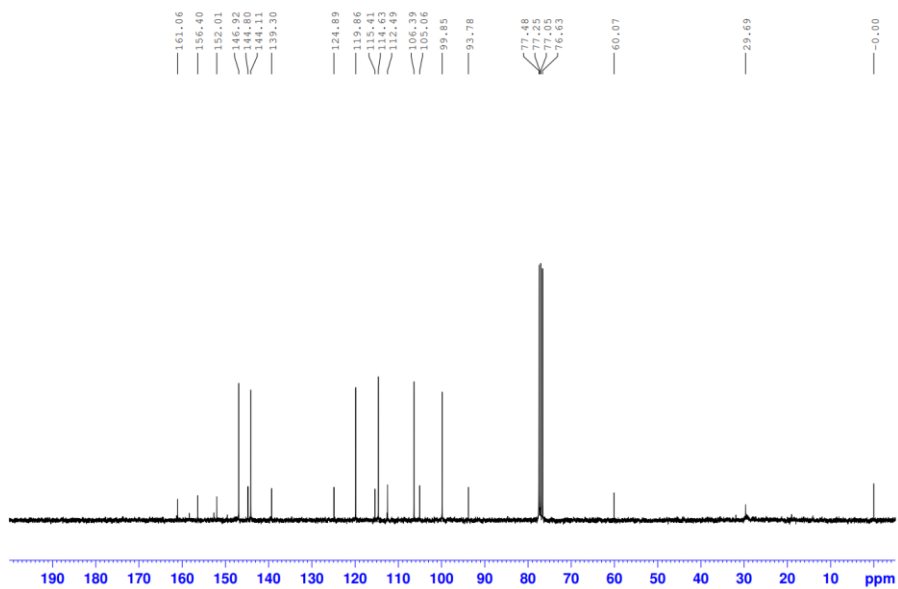
HMBC of MSLE2-I-56-2Ac(pure) (CDCl₃)

S86 แสดง HMBC-NMR ของ DSS12

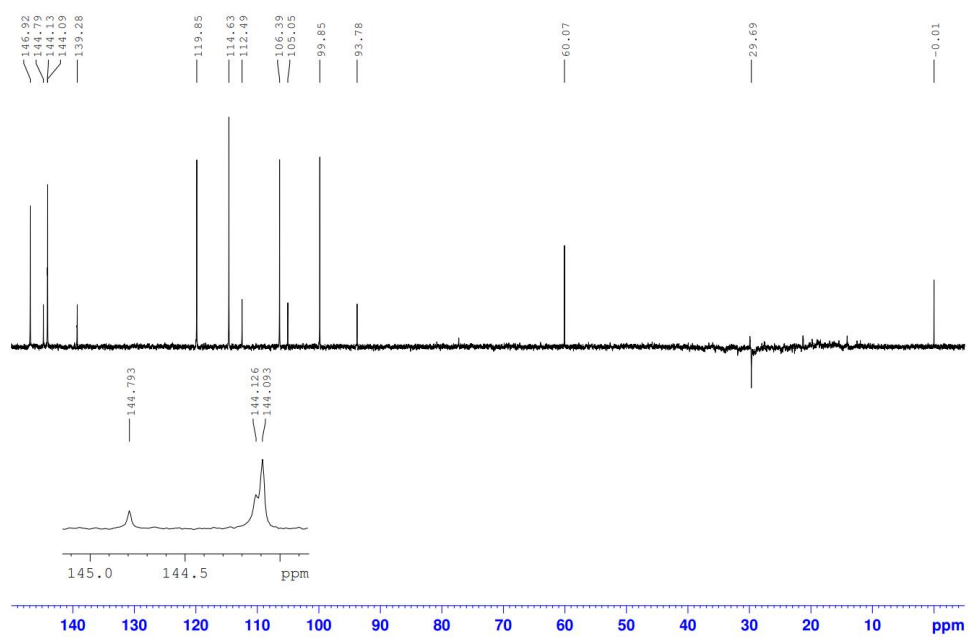


S87 แสดง HMBC-NMR ของ **DSS12**

DF-H-1 (11-13)F

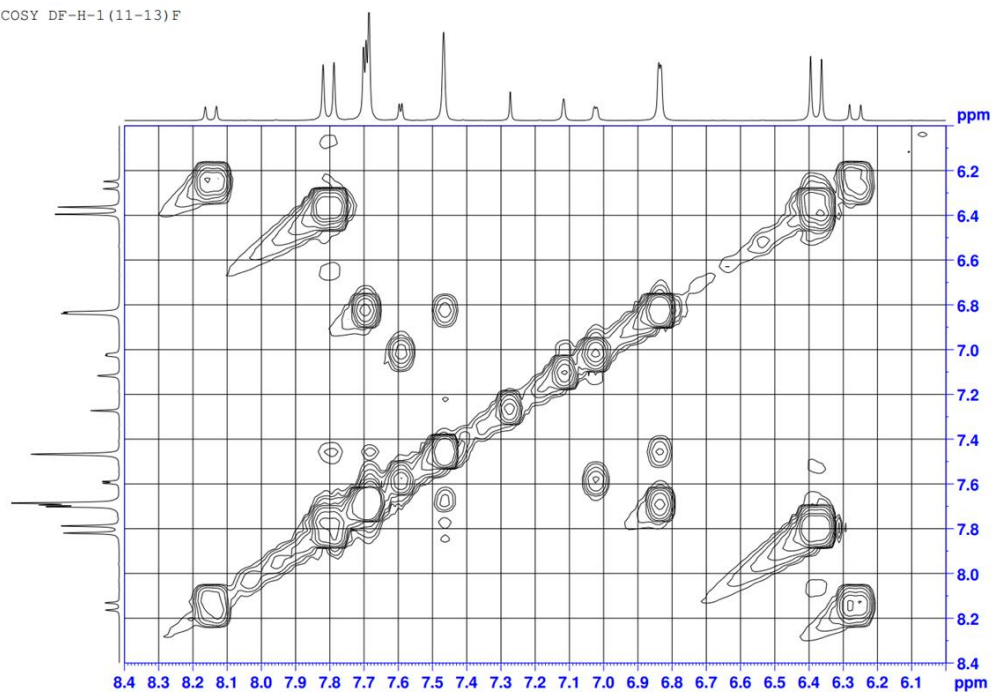
S88 แสดง $^1\text{H-NMR}$ ของสารผสม DF2 และ DF3 ^{13}C DF-H-1 (11-13)FS89 แสดง $^{13}\text{C-NMR}$ ของสารผสม DF2 และ DF3

dept135 DF-H-1(11-13)F

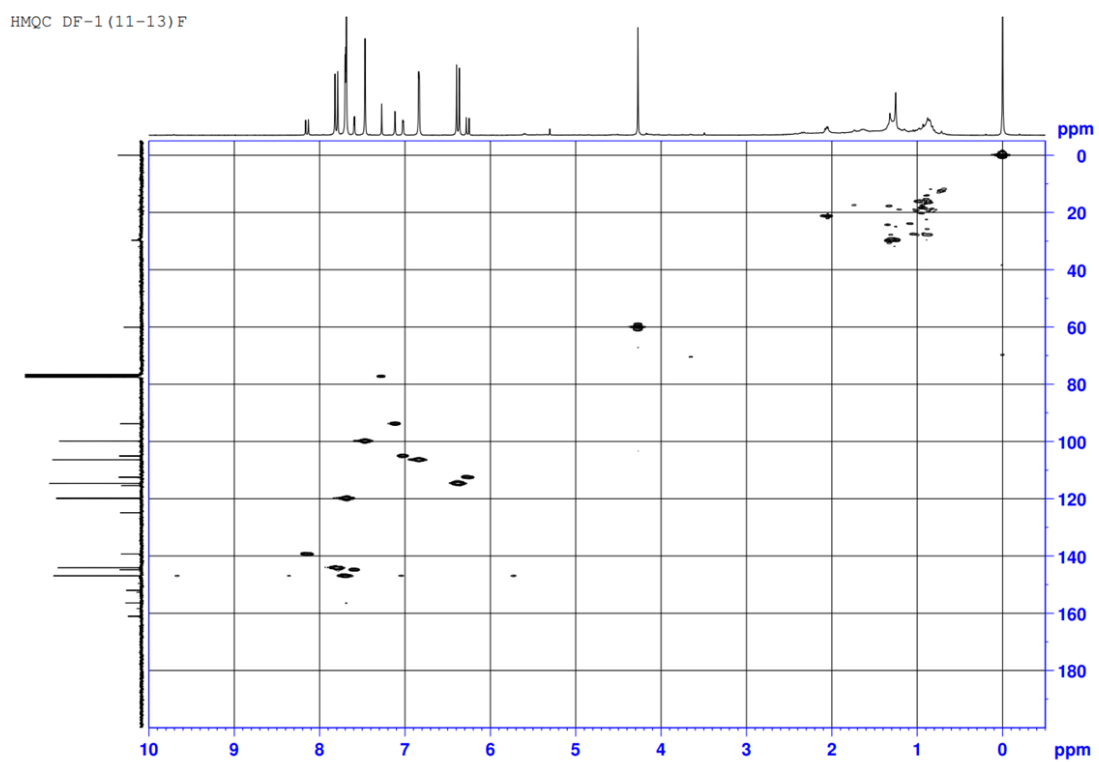


S90 แสดง dept135-NMR ของสารผสม DF2 และ DF3

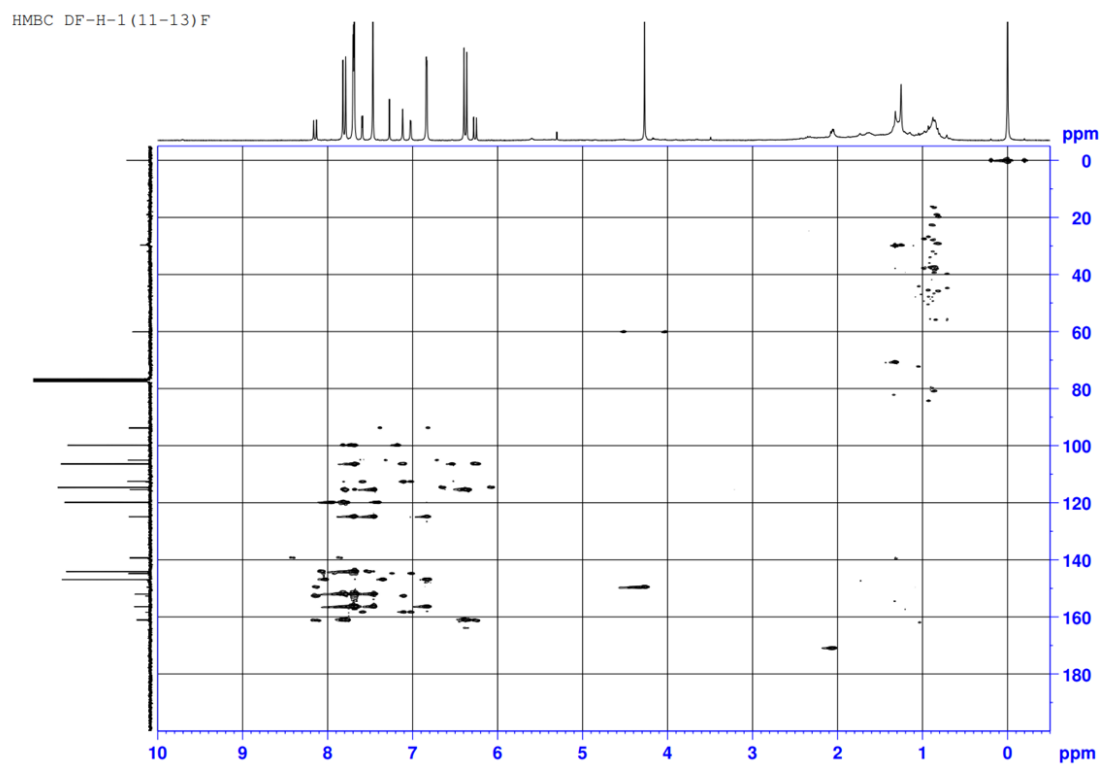
COSY DF-H-1(11-13)F



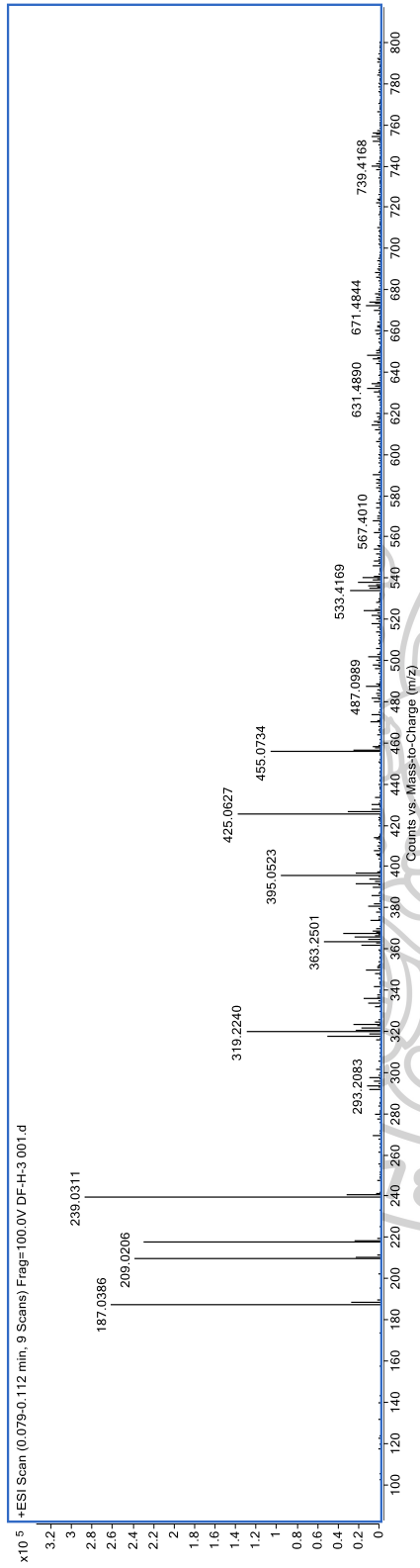
S91 แสดง COSY-NMR ของสารผสม DF2 และ DF3

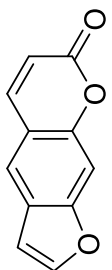


S92 แสดง HMQC-NMR ของสารผสม DF2 และ DF3



S93 แสดง HMBC-NMR ของสารผสม DF2 และ DF3



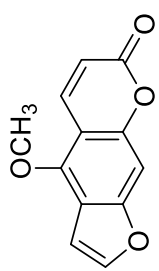


Chemical formula $C_{11}H_6O_3$

Exact mass 186.0317

HRMS m/z $[M+Na]^+$ 209.0206

calcd. for $C_8H_{12}O_3Na$ 209.0215



Chemical formula $C_{12}H_8O_4$

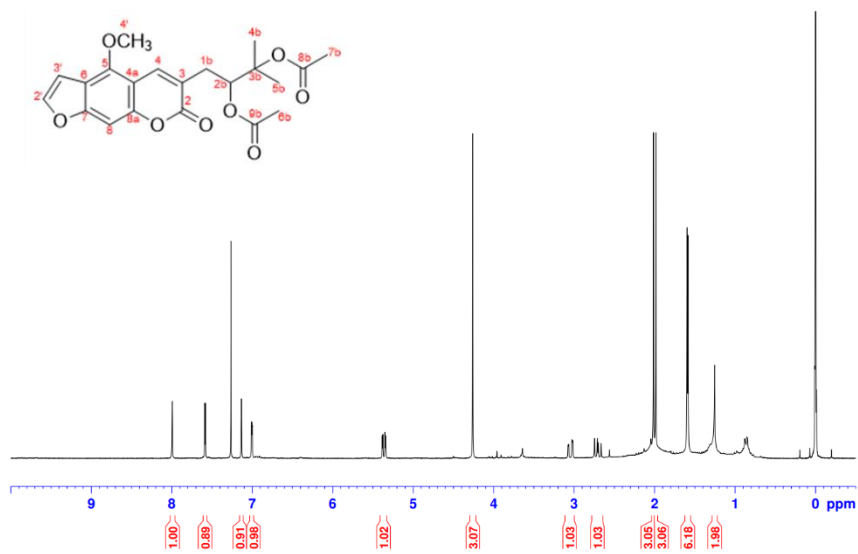
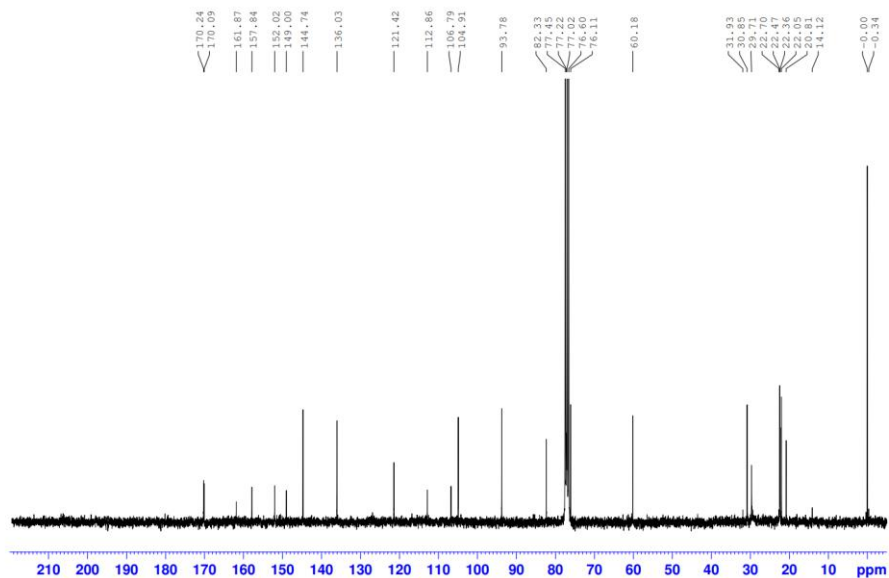
Exact mass 216.0423

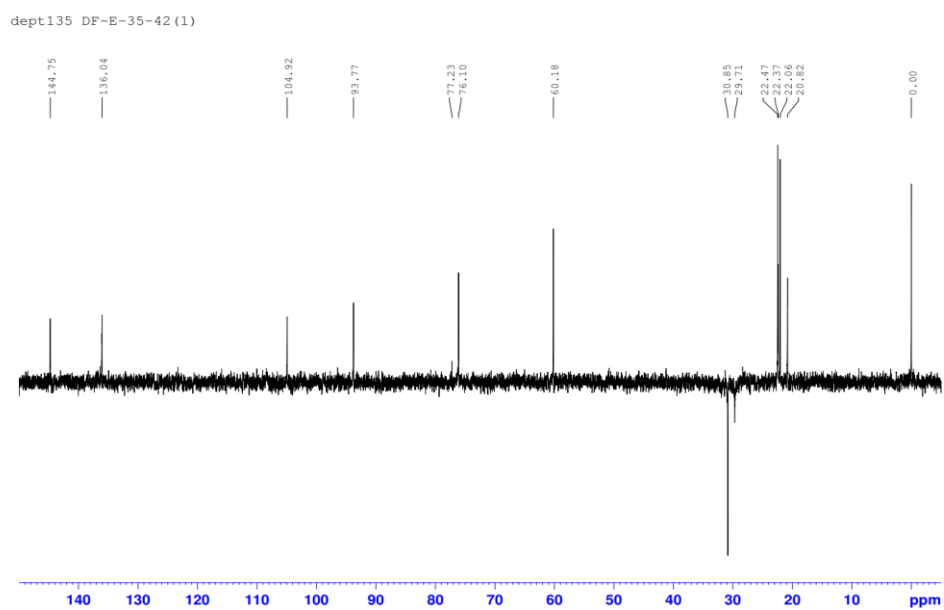
HRMS m/z $[M+Na]^+$ 239.0311

calcd. for $C_8H_{12}O_3Na$ 239.0320

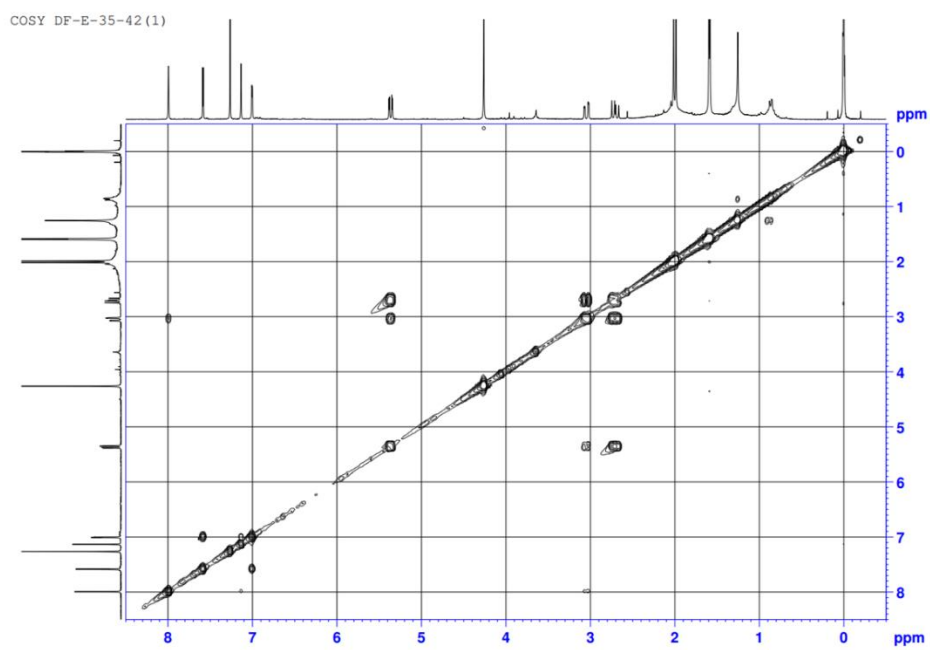
S94 แสดง Mass spectrum ของสารผสม DF2 และ DF3

DF-E-35-42 (1)

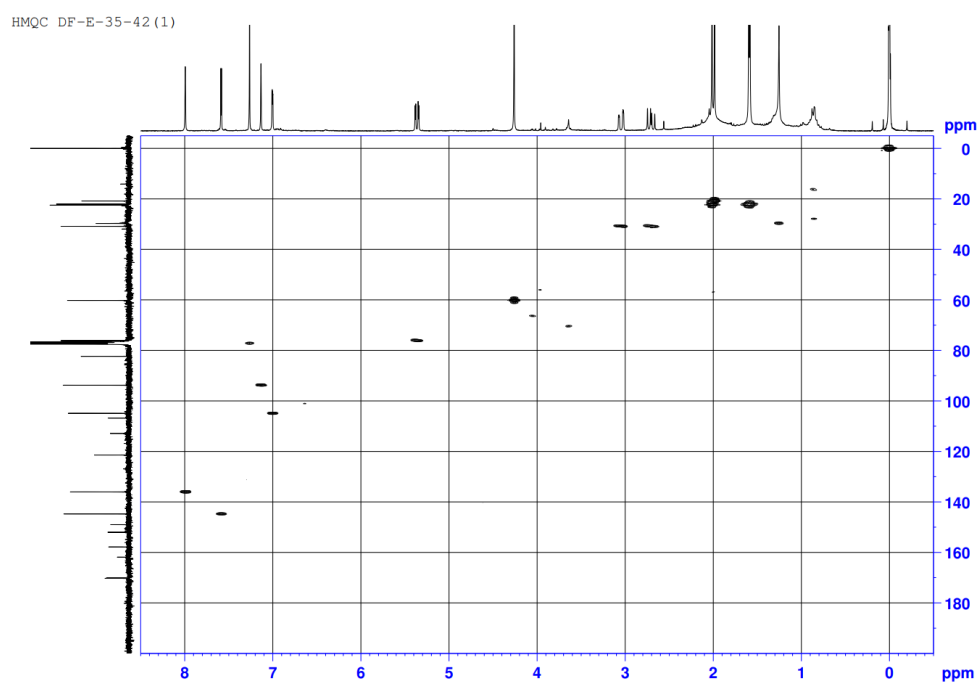
S95 แสดง ¹H-NMR ของ DF4¹³C DF-E-35-42 (1)S96 แสดง ¹³C-NMR ของ DF4



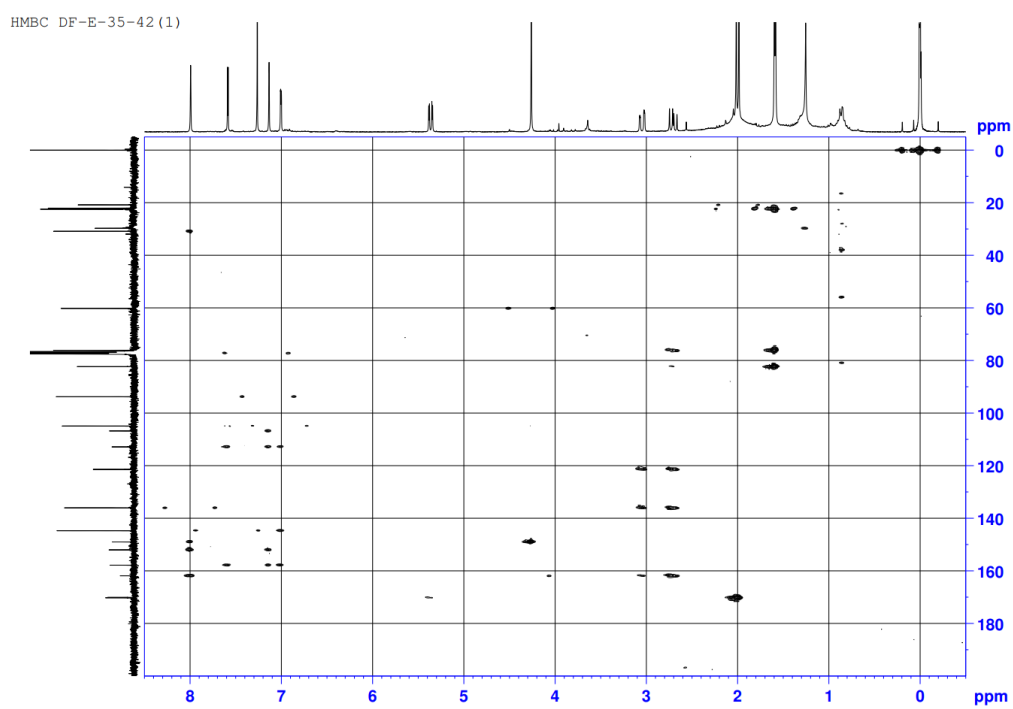
S97 แสดง dept135-NMR ของ DF4



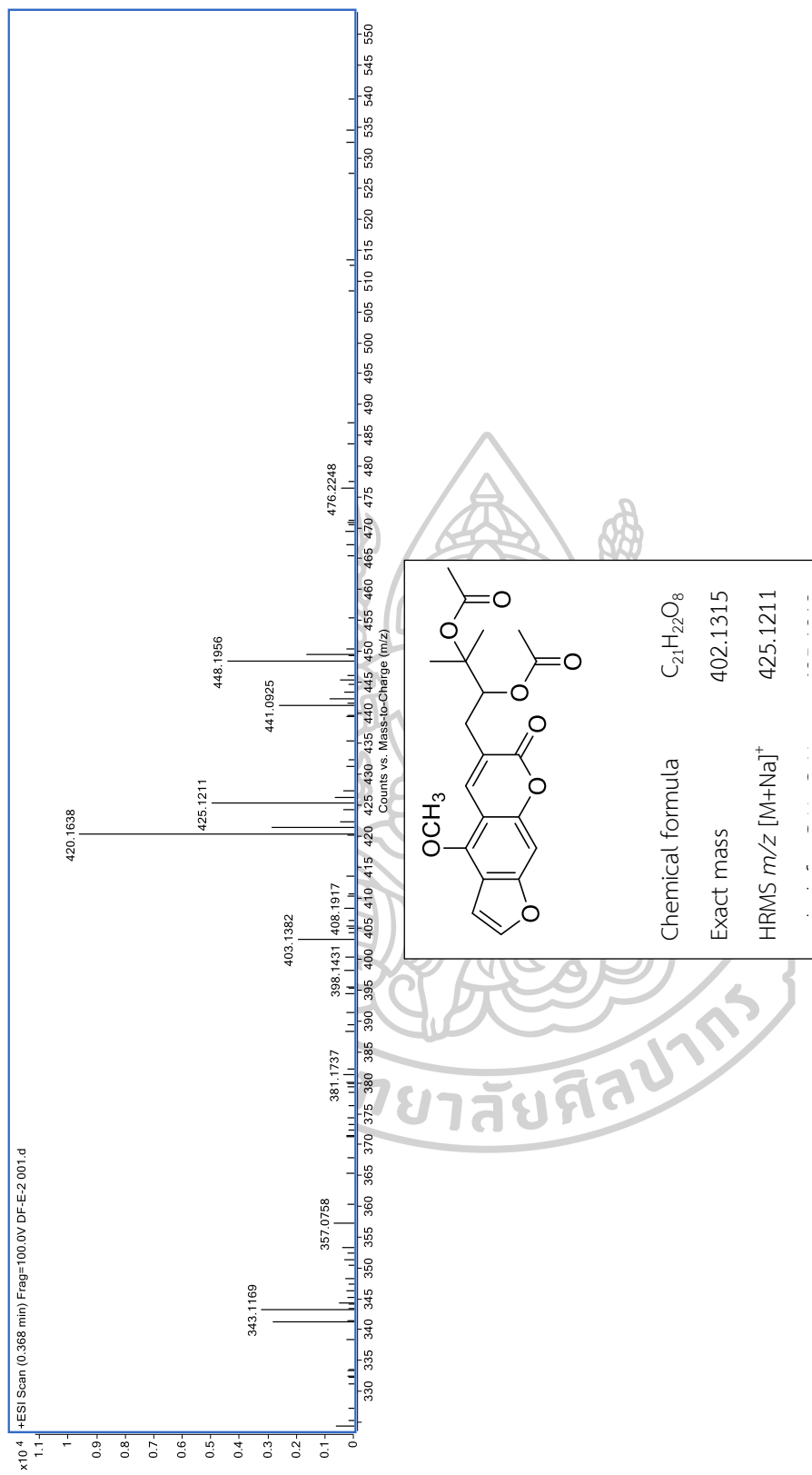
S98 แสดง COSY-NMR ของ DF4



S99 แสดง HMOC-NMR ของ DF4

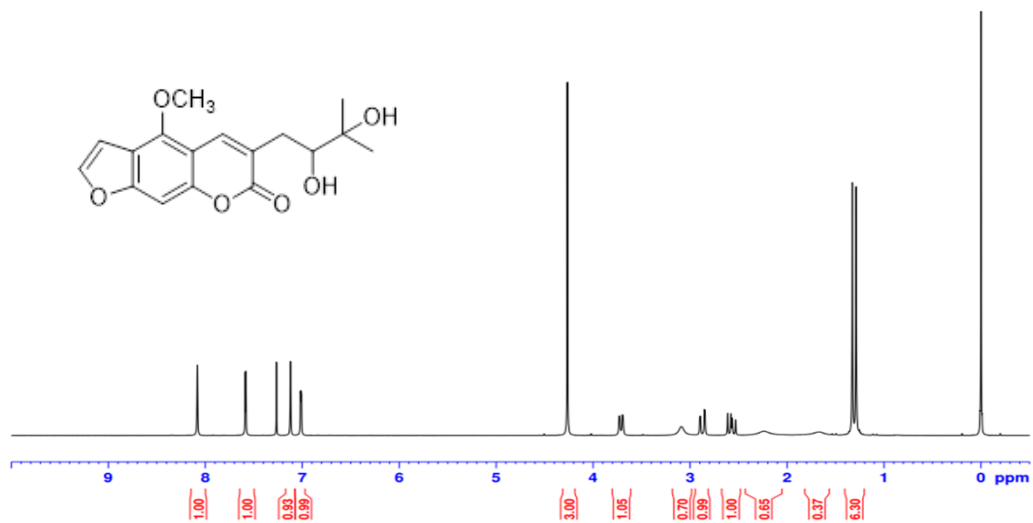
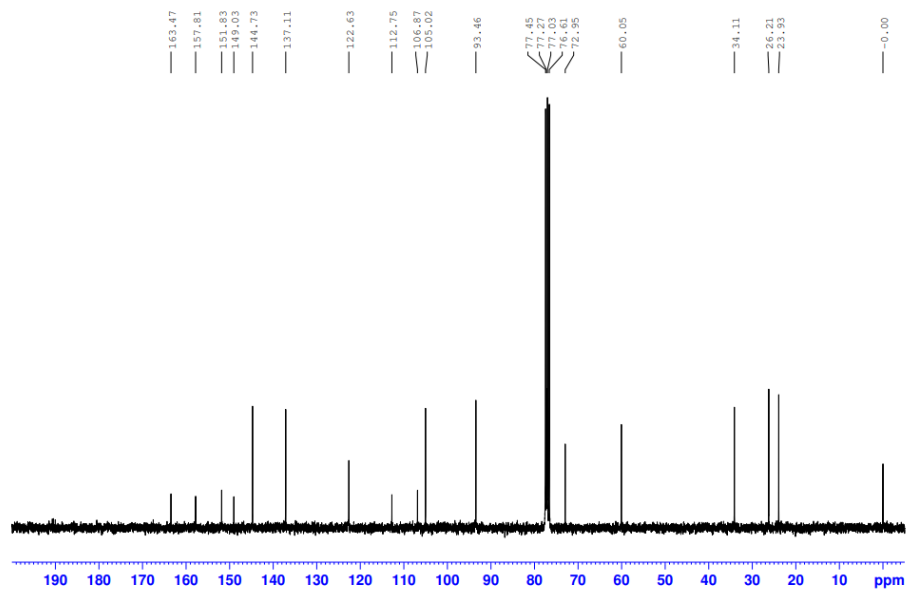


S100 แสดง HMBC-NMR ของ DF4

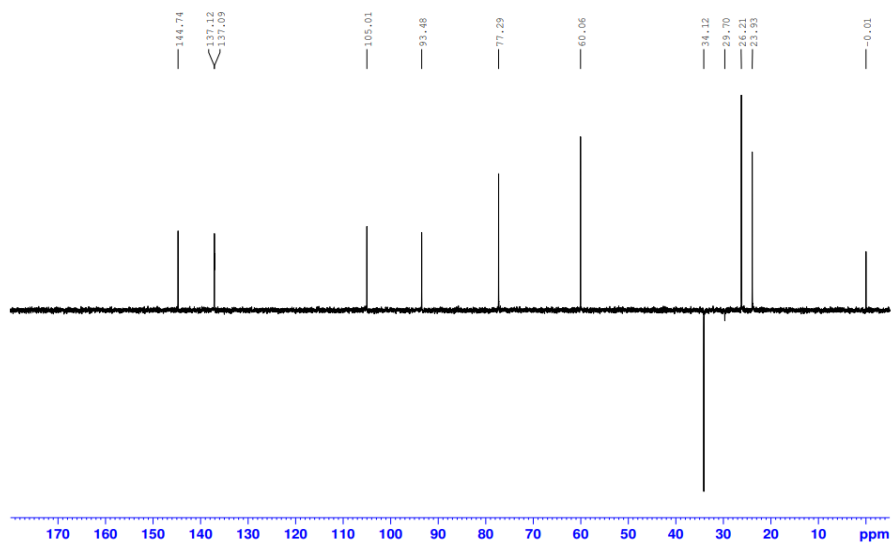


S101 แสดง Mass spectrum ของ DF4

DF-E-52 CRY5

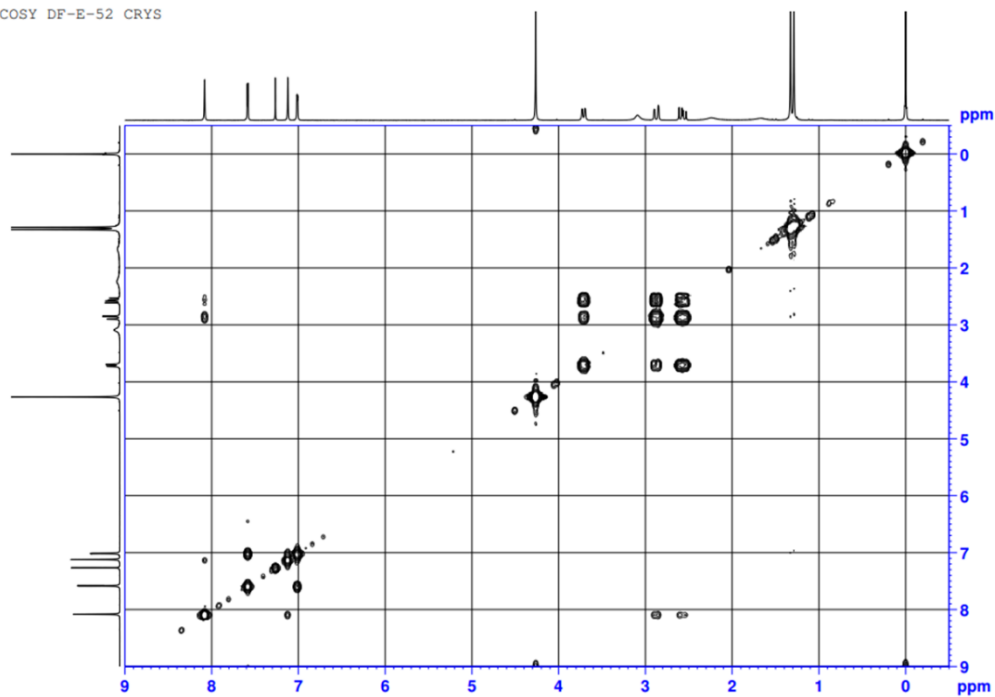
S102 แสดง $^1\text{H-NMR}$ ของ DF5 ^{13}C DF-E-52 CRY5S103 แสดง $^{13}\text{C-NMR}$ ของ DF5

dept135 DF-E-52 CRY5

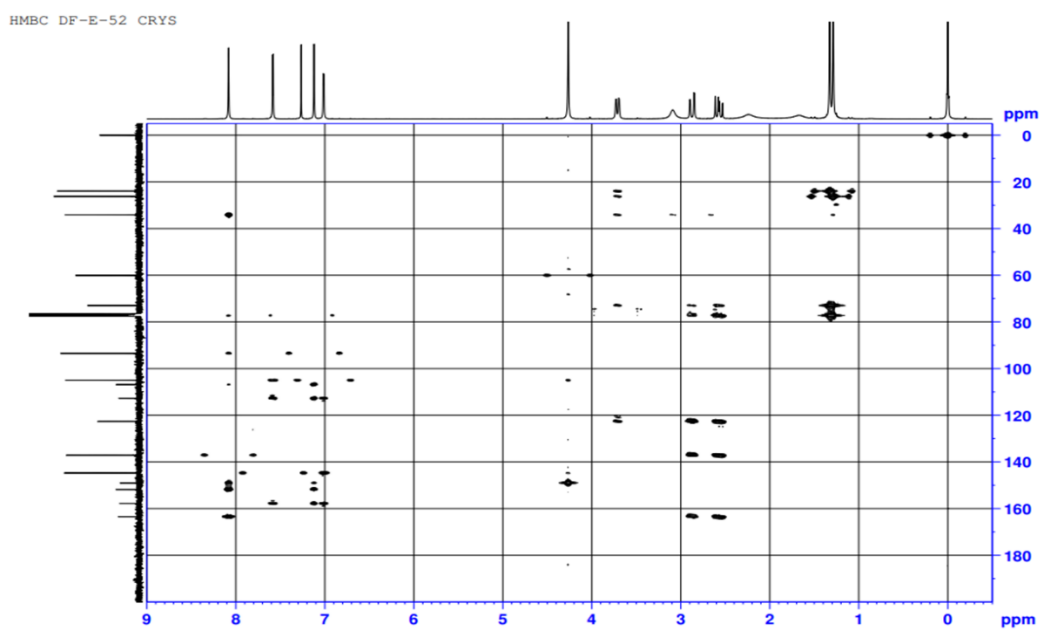


S104 แสดง dept135-NMR ของ DF5

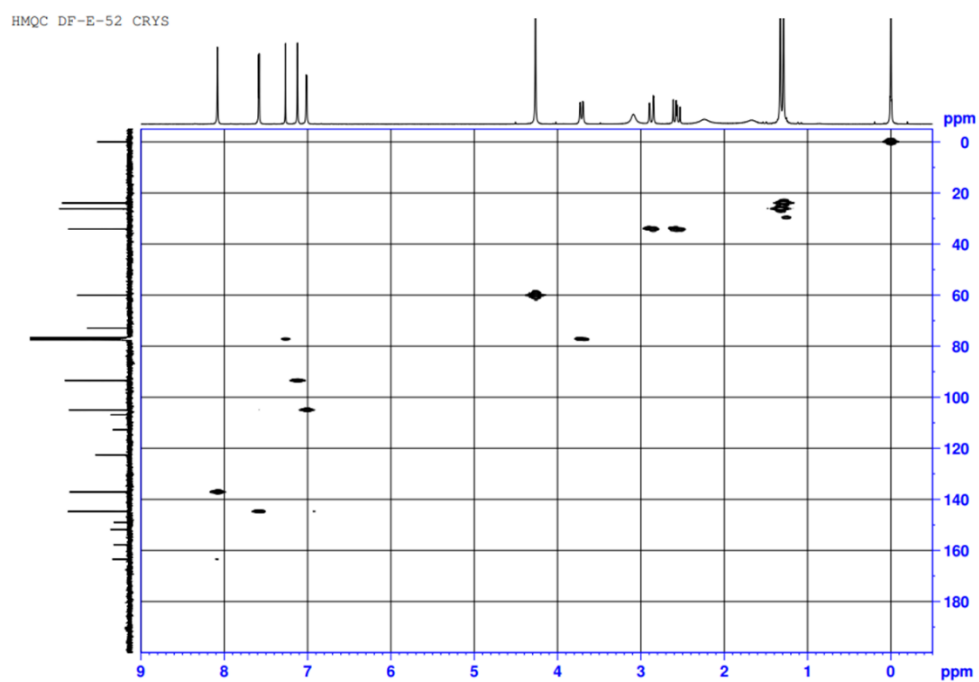
COSY DF-E-52 CRY5



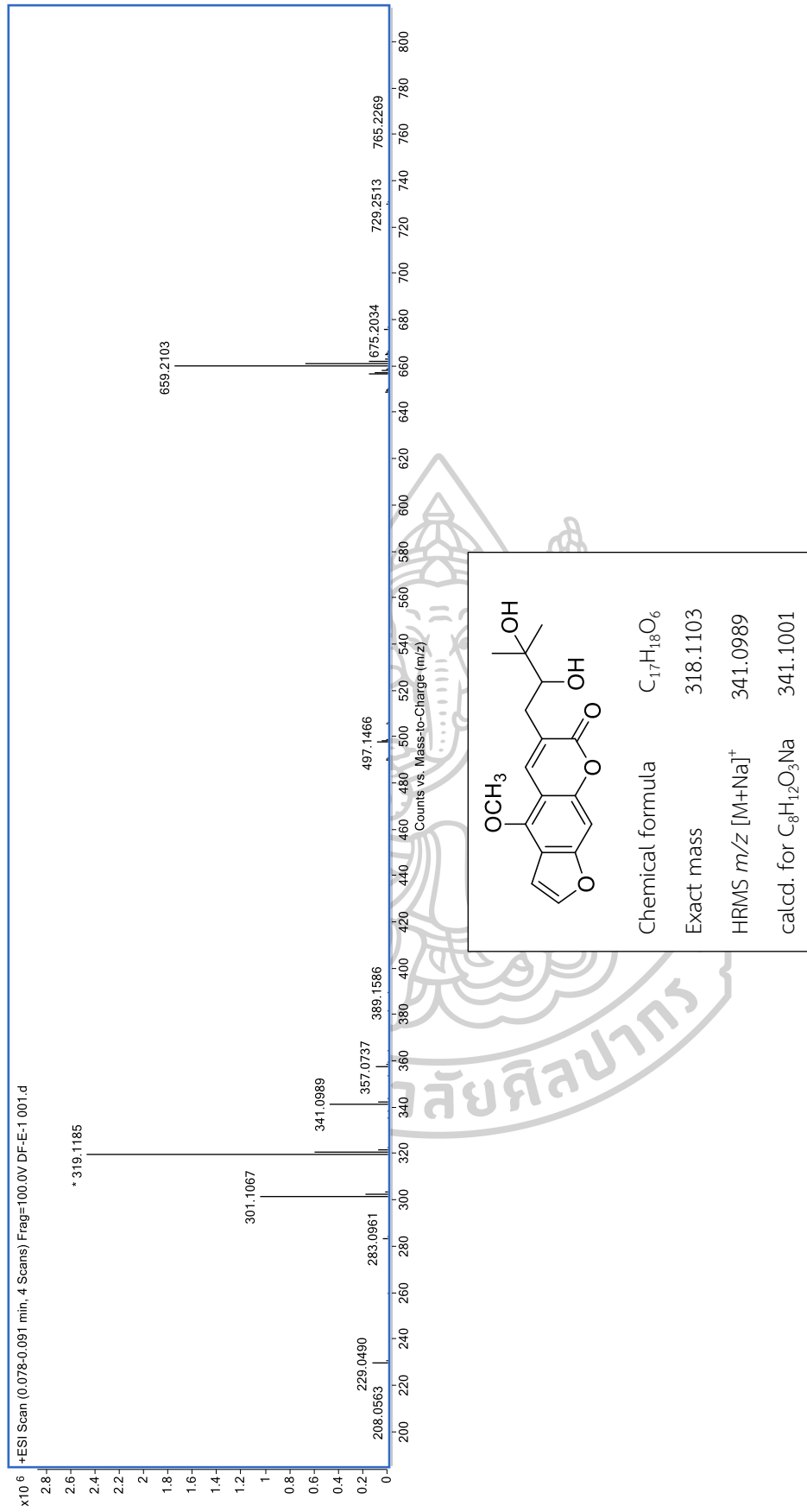
S105 แสดง COSY-NMR ของ DF5



S106 แสดง HMOC-NMR ของ DF5



S107 แสดง HMBC-NMR ของ DF5



S108 แสดง Mass spectrum ของ DF5