

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพ
จากเปลือกต้นมะควัด

Chemical constituents and biological activities from the stem
bark of *Ziziphus rugosa*.



โดย

นายสุวิศิษฎ์ กลัดสอาด

นายชนัท พึ่งโพธิ์

ภาควิชาเคมี

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

เรื่อง การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากเปลือกต้นมะควัด

Ziziphus rugosa

โดย นายสุวิศิษฐ์ กัดสอาด

นายธนัท พึ่งโพธิ์

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรวรรณ พันธุมนาวิน)

ประธานกรรมการ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.สันติ ทิพยวงศ์)

อาจารย์ที่ปรึกษา

.....
(อาจารย์ ดร.มนพิชา ศรีสะอาด)

กรรมการ

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดย หัวหน้าภาควิชาเคมี

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย พาราสุข)

หัวหน้าภาควิชาเคมี

วันที่ 21 เดือน พ.ค. พ.ศ. 2558

คุณภาพของรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ ดีมาก ดี พอใช้

ชื่อโครงการ การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากเปลือกต้นมะควัด

Ziziphus rugosa

นิสิตหัวหน้าโครงการ 1.นายสุวิศิษฎ์ กลัดสอาด 543 31542 23
 2.นายธนัท พึ่งโพธิ์ 543 30971 23
 อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร.สันติ ทิพยวงศ์
 ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2557

บทคัดย่อ

จากการนำเปลือกของต้นมะควัดที่แห้งมาสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนเมื่อนำสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนมาแยกโดยการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับร่วมกับเทคนิค TLC แล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทรอนตามลำดับ สามารถแยกสารในกลุ่มไตรเทอร์พีนอยด์ ได้สารหลัก 2 ชนิดคือ ลูฟิออล (1) และกรดพิบูลินิก (2) จากนั้นทำการเตรียมอนุพันธ์ของสารทั้งสองชนิด ได้สารทั้งหมด 18 ชนิด โดยเป็นอนุพันธ์ชนิดใหม่ 7 ชนิด คือ (1d และ 2g-2i) และอนุพันธ์ที่มีรายงานแล้ว 11 ชนิด คือ (1a-1c, 1e-1f และ 2a-2f) โดยการพิสูจน์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ทั้ง 20 ชนิดที่ได้ อาศัยสมบัติทางกายภาพและวิธีการทางสเปกโทรสโกปีร่วมกับการเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีการรายงานมาแล้ว จากการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของยีสต์พบว่า สาร 2 และ 2a มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสได้ดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 16.26 และ 28.07 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานอะคาร์โบส ($IC_{50} = 526.64$ ไมโครโมลาร์) ส่วนสารที่เหลือ มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ตั้งแต่ปานกลางถึงไม่มีฤทธิ์ เนื่องจากมี IC_{50} มากกว่า 600 ไมโครโมลาร์ จากการศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ด้วยการสร้างกราฟไลน์วีเวอร์-เบิร์ก พบว่า สาร 2 แสดงการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบแบบผสม

คำสำคัญ : มะควัด, ไตรเทอร์พีนอยด์, ลูฟิออล, กรดพิบูลินิก, ไดไซโคลเฮกซิลคาร์โบไดอิมิด, ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส

Title Chemical constituents and biological activities from the stem bark of *Ziziphus rugosa*.

Student names 1. Mr.Suwisit Kladsaard 543 31542 23
2. Mr.Thanat Phuengpho 543 30971 23

Advisor Associate Professor Santi Tip-pyang, Ph.D.

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic year 2014

Abstract

Air-dried and powdered stem bark of *Ziziphus rugosa* was extracted with methanol (MeOH). The MeOH crude extract was chromatographed on silica gel open column and monitored with TLC and further purified with chromatotron which led to the isolation of two major triterpenoids, lupeol (**1**) and betulinic acid (**2**). These triterpenoids (**1** and **2**) were derivatized to be seven new analogues (**1d** and **2g-2l**) and eleven known compounds (**1a-1c**, **1e-1f**, and **2a-2f**). Their structures were determined by spectroscopic methods as well as comparison with previous reports in the literature. Moreover, all compounds were evaluated for their α -glucosidase activity. Compound **2** and **2a** showed potent inhibitory activity towards α -glucosidase with an IC_{50} value of 16.26 and 28.07 μ M, respectively when compared to the standard acarbose (IC_{50} = 526.64 μ M), other compounds were regarded as moderate to no activities (IC_{50} > 600 μ M). Lineweaver-Burk plot indicated that **2** was a mixed mode inhibitor of α -glucosidase enzyme.

Keywords: *Ziziphus rugosa*, Rhamnaceae, triterpenoids, lupeol, betulinic acid, *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide, α -glucosidase inhibitory activity

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สันติ ทิพยางค์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการเป็นอย่างยิ่งที่กรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือเป็นอย่างดีตลอดระยะเวลาที่ทำการวิจัย รวมทั้งการเขียนรายงานฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรวรรณ พันธุมนาวิน และ อาจารย์ ดร.มนพิชา ศรีสะอาด ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขรายงานฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น รวมทั้งให้ความกรุณามาเป็นประธานการสอบและกรรมการสอบ ขอขอบคุณพี่ๆ ทุกคนในหน่วยวิจัยภัณฑศาสตร์ชาติที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์รวมทั้งคอยให้คำแนะนำและคอยช่วยเหลือในระหว่างการทำวิจัย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ดร.จีราพัทธ์ สีแจ่ม และขอกราบขอบพระคุณหน่วยวิจัยผลิตภัณฑ์ภัณฑศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ทำให้การวิจัยครั้งนี้ลุล่วงไปได้ด้วยดี

โครงการนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีการศึกษา 2557 ผู้วิจัยกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง



ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูปภาพ	ฉ
สารบัญแผนภาพ	ฎ
สารบัญภาคผนวก	ฏ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฑ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วิธีการทดลองและผลการทดลอง	10
2.1 พืชตัวอย่าง	10
2.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	10
2.3 สารเคมี	10
2.4 ขั้นตอนการทดลอง	11
2.5 เทคนิคต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง	11
2.6 การเตรียมวัตถุดิบและการสกัด	13
2.7 การแยกและทำสารให้บริสุทธิ์	13
2.8 การเตรียมอนุพันธ์ของ lupeol (1) และ betulinic acid (2)	15
2.9 การทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจากยีสต์	16
2.10 จลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาเอนไซม์	17
บทที่ 3 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างและผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้	27
3.1 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ 3-O-acetyl lupeol (1a)	27
3.2 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ 3-O-propanoyl lupeol (1b)	28
3.3 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ 3-O-butanoyl lupeol (1c)	29
3.4 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ 3-O-pentanoyl lupeol (1d)	30
3.5 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ 3-O-hexanoyl lupeol (1e)	31
3.6 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ 3-O-benzoyl lupeol (1f)	32
3.7 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ 3-O-acetyl betulinic acid (2a)	33
3.8 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ 3-O-propanoyl betulinic acid (2b)	34
3.9 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ 3-O-butanoyl betulinic acid (2c)	35

3.10	การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ 3-O-pentanoyl betulinic acid (2d)	36
3.11	การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ 3-O-hexanoyl betulinic acid (2e)	37
3.12	การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ 3-O-benzoyl betulinic acid (2f)	38
3.13	การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ 28-N-cyclohexyl-N- [(cyclohexylamino)carbonyl] betulinic acid (2g)	39
3.14	การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ 28-N-cyclohexyl-N- [(cyclohexylamino)carbonyl]-3-O-acetyl betulinic acid (2h)	41
3.15	การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ 28-N-cyclohexyl-N- [(cyclohexylamino)carbonyl]-3-O-propanoyl betulinic acid (2i)	42
3.16	การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ 28-N-cyclohexyl-N- [(cyclohexylamino)carbonyl]-3-O-butanoyl betulinic acid (2j)	44
3.17	การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ 28-N-cyclohexyl-N- [(cyclohexylamino)carbonyl]-3-O-pentanoyl betulinic acid (2k)	45
3.18	การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ 28-N-cyclohexyl-N- [(cyclohexylamino)carbonyl]-3-O-hexanoyl betulinic acid (2l)	47
3.19	ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสเบื้องต้นของ สิ่งสกัดเมทานอล	48
3.20	ผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของ สารที่แยกได้ และอนุพันธ์	49
3.21	ผลการศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ต่อตัวยับยั้ง	50
บทที่ 4	สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	53
	เอกสารอ้างอิง	55
	ภาคผนวก	57
	ประวัติผู้วิจัย	80

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของสิ่งสกัดเมทานอล และสารมาตรฐาน acarbose	48
3.2 ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของ 1, 2, 1a-1g, 2a-2f และสาร มาตรฐาน acarbose	49



ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูลภาพ

รูปที่		หน้า
1.1	ลักษณะต้นของมะควัด	2
1.2	ลักษณะของใบ ก้าน และผลของมะควัด	3
1.3	ลักษณะของดอกของมะควัด	3
1.4	สารในกลุ่ม cyclopeptide alkaloid และ isoquinoline alkaloid จากเปลือกและลำต้นมะควัด	4
1.5	สารในกลุ่ม cyclopeptide alkaloid จากเปลือกและลำต้นมะควัด	5
1.6	สารในกลุ่ม cyclopeptide alkaloid จากเปลือกมะควัด	6
1.7	สารในกลุ่ม flavonoid จากเปลือกมะควัด	7
1.8	สารในกลุ่ม triterpenoid จากรากมะควัด	8
2.1	โครงสร้างของ lupeol (1) และ betulinic acid (2)	15
2.2	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง V_0 กับ S_0 จากสมการไมเคลิส-เมนเทน	18
2.3	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $1/V$ กับ $1/[S]$ จากสมการไลน์วีเวอร์-เบอร์ก	19
2.4	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $1/V_0$ กับ $1/[S]_0$ จากสมการไลน์วีเวอร์-เบอร์ก ของตัวยับยั้งแบบแข่งขัน	20
2.5	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $1/V_0$ กับ $1/[S]_0$ จากสมการไลน์วีเวอร์-เบอร์ก ของตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (ปกติ)	21
2.6	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $1/V_0$ กับ $1/[S]_0$ จากสมการไลน์วีเวอร์-เบอร์ก ของตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (ผลสม)	21
2.7	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $1/V_0$ กับ $1/[S]_0$ จากสมการไลน์วีเวอร์-เบอร์ก ของตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (uncompetitive inhibitor)	22
2.8	กราฟแสดงสมการไลน์วีเวอร์-เบอร์กของตัวยับยั้งทั้ง 3 รูปแบบ	23
2.9	กราฟลำดับหนึ่งของสับสเตรตที่เติมตัวยับยั้ง ณ ความเข้มข้นต่าง ๆ	24
2.10	กราฟลำดับสองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความชัน (จากกราฟลำดับหนึ่ง) กับความเข้มข้นของตัวยับยั้งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ซึ่งใช้ในการหาค่า K_i	25
2.11	กราฟลำดับสองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจุดตัดแกน y (จากกราฟลำดับหนึ่ง) กับความเข้มข้นของตัวยับยั้งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ซึ่งใช้ในการหาค่า K_i'	26

รูปที่	หน้า
3.1 สูตรโครงสร้างของ 3-O-acetyl lupeol (1a)	27
3.2 สูตรโครงสร้างของ 3-O-propanoyl lupeol (1b)	28
3.3 สูตรโครงสร้างของ 3-O-butanoyl lupeol (1c)	29
3.4 สูตรโครงสร้างของ 3-O-pentanoyl lupeol (1d)	30
3.5 สูตรโครงสร้างของ 3-O-hexanoyl lupeol (1e)	31
3.6 สูตรโครงสร้างของ 3-O-benzoyl lupeol (1f)	32
3.7 สูตรโครงสร้างของ 3-O-acetyl betulinic acid (2a)	33
3.8 สูตรโครงสร้างของ 3-O-propanoyl betulinic acid (2b)	34
3.9 สูตรโครงสร้างของ 3-O-butanoyl betulinic acid (2c)	35
3.10 สูตรโครงสร้างของ 3-O-pentanoyl betulinic acid (2d)	36
3.11 สูตรโครงสร้างของ 3-O-hexanoyl betulinic acid (2e)	37
3.12 สูตรโครงสร้างของ 3-O-benzoyl betulinic acid (2f)	38
3.13 สูตรโครงสร้างของ 28-N-cyclohexyl-N- [(cyclohexylamino)carbonyl] betulinic acid (2g)	39
3.14 สูตรโครงสร้างของ 28-N-cyclohexyl-N- [(cyclohexylamino)carbonyl]-3-O-acetyl betulinic acid (2h)	41
3.15 สูตรโครงสร้างของ 28-N-cyclohexyl-N- [(cyclohexylamino)carbonyl]-3-O-propanoyl betulinic acid (2i)	42
3.16 สูตรโครงสร้างของ 28-N-cyclohexyl-N- [(cyclohexylamino)carbonyl]-3-O-butanoyl betulinic acid (2j)	44
3.17 สูตรโครงสร้างของ 28-N-cyclohexyl-N- [(cyclohexylamino)carbonyl]-3-O-pentanoyl betulinic acid (2k)	45
3.18 สูตรโครงสร้างของ 28-N-cyclohexyl-N- [(cyclohexylamino)carbonyl]-3-O-hexanoyl betulinic acid (2l)	47
3.19 กราฟไลน์วีเวอร์-เบิร์ก แสดงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส จากยีสต์ของสาร 2	50
3.20 Secondary plot ของความชันต่อความเข้มข้นของตัวยับยั้งสำหรับ หาค่า K_i ของสาร 2 ต่อเอนไซม์จากยีสต์	51
3.21 Secondary plot ของจุดตัดแกน y ต่อความเข้มข้นของตัวยับยั้ง สำหรับหาค่า K'_i ของสาร 2 ต่อเอนไซม์จากยีสต์	51

สารบัญแผนภาพ

แผนภาพที่		หน้า
2.1	ขั้นตอนการสกัดเปลือกของต้นมะควัด	13
2.2	ขั้นตอนการแยกสารประกอบของเปลือกต้นของมะควัดให้ได้สารบริสุทธิ์	14
2.3	ขั้นตอนการเตรียมอนุพันธ์จากสาร 1	15
2.4	ขั้นตอนการเตรียมอนุพันธ์จากสาร 2	16



ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

	หน้า
ภาคผนวก ก	57
รูปที่	
1 ^1H NMR spectrum ของ 3-O-acetyl lupeol (1a) ใน CDCl_3	58
2 ^{13}C NMR spectrum ของ 3-O-acetyl lupeol (1a) ใน CDCl_3	58
3 ^1H NMR spectrum ของ 3-O-propanoyl lupeol (1b) ใน CDCl_3	59
4 ^{13}C NMR spectrum ของ 3-O-propanoyl lupeol (1b) ใน CDCl_3	59
5 ^1H NMR spectrum ของ 3-O-butanoyl lupeol (1c) ใน CDCl_3	60
6 ^{13}C NMR spectrum ของ 3-O-butanoyl lupeol (1c) ใน CDCl_3	60
7 ^1H NMR spectrum ของ 3-O-pentanoyl lupeol (1d) ใน CDCl_3	61
8 ^{13}C NMR spectrum ของ 3-O-pentanoyl lupeol (1d) ใน CDCl_3	61
9 ^1H NMR spectrum ของ 3-O-hexanoyl lupeol (1e) ใน CDCl_3	62
10 ^{13}C NMR spectrum ของ 3-O-hexanoyl lupeol (1e) ใน CDCl_3	62
11 ^1H NMR spectrum ของ 3-O-benzoyl lupeol (1f) ใน CDCl_3	63
12 ^{13}C NMR spectrum ของ 3-O-benzoyl lupeol (1f) ใน CDCl_3	63
13 ^1H NMR spectrum ของ 3-O-acetyl betulinic acid (2a) ใน CDCl_3	64
14 ^{13}C NMR spectrum ของ 3-O-acetyl betulinic acid (2a) ใน CDCl_3	64
15 ^1H NMR spectrum ของ 3-O-propanoyl betulinic acid (2b) ใน CDCl_3	65
16 ^{13}C NMR spectrum ของ 3-O-propanoyl betulinic acid (2b) ใน CDCl_3	65
17 ^1H NMR spectrum ของ 3-O-butanoyl betulinic acid (2c) ใน CDCl_3	66
18 ^{13}C NMR spectrum ของ 3-O-butanoyl betulinic acid (2c) ใน CDCl_3	66
19 ^1H NMR spectrum ของ 3-O-pentanoyl betulinic acid (2d) ใน CDCl_3	67
20 ^{13}C NMR spectrum ของ 3-O-pentanoyl betulinic acid (2d) ใน CDCl_3	67
21 ^1H NMR spectrum ของ 3-O-hexanoyl betulinic acid (2e) ใน CDCl_3	68
22 ^{13}C NMR spectrum ของ 3-O-hexanoyl betulinic acid (2e) ใน CDCl_3	68
23 ^1H NMR spectrum ของ 3-O-benzoyl betulinic acid (2f) ใน CDCl_3	69
24 ^{13}C NMR spectrum ของ 3-O-benzoyl betulinic acid (2f) ใน CDCl_3	69

รูปที่	หน้า
25 ¹ H NMR spectrum ของ 28- <i>N</i> -cyclohexyl- <i>N</i> - [(cyclohexylamino)carbonyl] betulinic acid (2g) ใน CDCl ₃	70
26 ¹³ C NMR spectrum ของ 28- <i>N</i> -cyclohexyl- <i>N</i> - [(cyclohexylamino)carbonyl] betulinic acid (2g) ใน CDCl ₃	70
27 ¹ H NMR spectrum ของ 28- <i>N</i> -cyclohexyl- <i>N</i> - [(cyclohexylamino)carbonyl]-3- <i>O</i> -acetyl betulinic acid (2h) ใน CDCl ₃	71
28 ¹³ C NMR spectrum ของ 28- <i>N</i> -cyclohexyl- <i>N</i> - [(cyclohexylamino)carbonyl]-3- <i>O</i> -acetyl betulinic acid (2h) ใน CDCl ₃	71
29 ¹ H NMR spectrum ของ 28- <i>N</i> -cyclohexyl- <i>N</i> - [(cyclohexylamino)carbonyl]-3- <i>O</i> -propanoyl betulinic acid (2i) ใน CDCl ₃	72
30 ¹³ C NMR spectrum ของ 28- <i>N</i> -cyclohexyl- <i>N</i> - [(cyclohexylamino)carbonyl]-3- <i>O</i> -propanoyl betulinic acid (2i) ใน CDCl ₃	72
31 ¹ H NMR spectrum ของ 28- <i>N</i> -cyclohexyl- <i>N</i> - [(cyclohexylamino)carbonyl]-3- <i>O</i> -butanoyl betulinic acid (2j) ใน CDCl ₃	73
32 ¹³ C NMR spectrum ของ 28- <i>N</i> -cyclohexyl- <i>N</i> - [(cyclohexylamino)carbonyl]-3- <i>O</i> -butanoyl betulinic acid (2j) ใน CDCl ₃	73
33 ¹ H NMR spectrum ของ 28- <i>N</i> -cyclohexyl- <i>N</i> - [(cyclohexylamino)carbonyl]-3- <i>O</i> -pentanoyl betulinic acid (2k) ใน CDCl ₃	74
34 ¹³ C NMR spectrum ของ 28- <i>N</i> -cyclohexyl- <i>N</i> - [(cyclohexylamino)carbonyl]-3- <i>O</i> -pentanoyl betulinic acid (2k) ใน CDCl ₃	74
35 ¹ H NMR spectrum ของ 28- <i>N</i> -cyclohexyl- <i>N</i> - [(cyclohexylamino)carbonyl]-3- <i>O</i> -hexanoyl betulinic acid (2l) ใน CDCl ₃	75
36 ¹³ C NMR spectrum ของ 28- <i>N</i> -cyclohexyl- <i>N</i> - [(cyclohexylamino)carbonyl]-3- <i>O</i> -hexanoyl betulinic acid (2l) ใน CDCl ₃	75
ภาคผนวก ข	76

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

δ	chemical shift (ppm)
J	coupling constant (Hz)
d	doublet (NMR)
K_m	Michaelis-Menten constant
m	multiplet (NMR)
NMR	nuclear magnetic resonance
s	singlet (NMR)
t	triplet (NMR)



ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ

ในปัจจุบันพบว่าโรคเบาหวานและโรคมะเร็งเป็นโรคที่พบบ่อยในปัจจุบัน และเป็นหนึ่งในสาเหตุของอัตราการเสียชีวิตเป็นอันดับต้น ๆ ในหลาย ๆ ประเทศ ดังนั้นจะเห็นว่ามีหลากหลายงานวิจัยที่จะพยายามหาทางป้องกัน ลดความเสี่ยง รวมไปถึงยับยั้งหรือบรรเทาอาการของโรคเหล่านี้ เบาหวานเป็นโรคที่มีความเกี่ยวข้องกับระดับน้ำตาลในเลือด และสามารถถ่ายทอดผ่านทางพันธุกรรมได้ ซึ่งมักจะมีความผิดปกติมาจากฮอร์โมนอินซูลินซึ่งทำหน้าที่ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด โดยผู้ป่วยมักจะทราบว่าเป็นโรคนี้จากอาการแทรกซ้อนอื่น ๆ เช่น ความดันโลหิตสูง กล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด และโรคไตเสื่อม เป็นต้น การดูแลรักษาโรคเบาหวานจะขึ้นกับประเภทของโรคเบาหวาน โดยแบบที่ 1 จะต้องฉีดฮอร์โมนอินซูลิน ส่วนในแบบที่ 2 สามารถใช้อาหารที่เหมาะสม ออกกำลังกาย ควบคุมน้ำหนักและความดันก็สามารถใช้ชีวิตตามปกติได้

จากงานวิจัยที่ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของมะควัดที่ผ่านมา พบสารกลุ่มอัลคาลอยด์^{1,3,4} จากเปลือกและลำต้น ไตรเทอร์พีนอยด์² จากลำต้นและฟลาโวนอยด์⁵ จากเปลือก ซึ่งสารเหล่านี้มีโครงสร้างและฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ เช่น ฤทธิ์ยับยั้งโปรโตซัว (antiprotozoal) ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial) ฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ (anti-inflammatory) และฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง (anticancer) จะพบว่างานวิจัยก่อนหน้านี้ ยังไม่พบรายงานถึงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส (α -glucosidase inhibitory activity) จากเปลือกต้นของมะควัดมาก่อน ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการค้นคว้าและศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากเปลือกต้นมะควัด เพื่อนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าว และนำไปสู่การประยุกต์ใช้เพื่อใช้ประโยชน์ในทางเภสัชวิทยาและการแพทย์

ลักษณะทางพันธุศาสตร์ของมะควัด



รูปที่ 1.1 ลักษณะต้นของมะควัด

(ที่มา: <http://indiabiodiversity.org/observation/show/268679>)

มะควัด (*Ziziphus rugosa* Lam.) เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Rhamnaceae สกุล *Ziziphus* มีชื่อไทยเรียกต่างกัน เช่น มะควัด (ภาคกลาง ภาคเหนือ), หน่อควะ (กระเหรี่ยง แม่ฮ่องสอน), หมากคอก (เงี้ยว แม่ฮ่องสอน), อ้อยช้าง (กาญจนบุรี) และหมากมาย (ภาคอีสาน)

ลักษณะทั่วไปของมะควัด

ลักษณะต้น	เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่
สีเปลือกต้น	น้ำตาลปนเทา
ลักษณะใบ	ใบเป็นใบประกอบเรียงสลับมีลักษณะมนกลมมีขนสากทั่วไป
ช่อดอก	มีสีเหลือง
กลีบเลี้ยง	5 กลีบ ต่อ 1 ช่อดอก
กลีบดอก	5 กลีบ ต่อ 1 ช่อดอก
ผล	รูปร่างกลมเมื่อสดสีเขียว เมื่อแก่สีเหลือง มีรสหวาน
ถิ่นที่อยู่	ป่าผสมผลัดใบ ป่าดิบแล้ง และป่าดิบชื้นพบได้ในหลายพื้นที่ทั้งในภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย



รูปที่ 1.2 ลักษณะของใบ ก้าน และผลของมะควัด
(ที่มา: <https://www.inaturalist.org/observations/22191>)

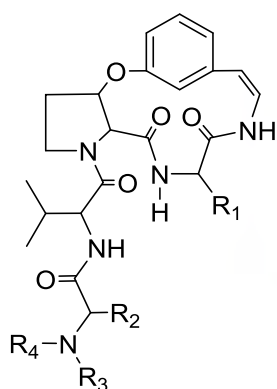


รูปที่ 1.3 ลักษณะของดอกของมะควัด
(ที่มา: <https://www.flickr.com/photos/wwwssncomphotos/5618010751>)

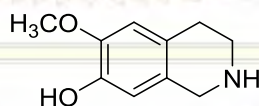
กรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Pandey และคณะ¹ สกัดสารจากเปลือกและลำต้นของมะควัด ด้วยตัวทำละลายผสมของ เบนซีน, เมทานอล และแอมโมเนีย ในอัตราส่วน 100:1:1 ที่อุณหภูมิห้อง สามารถแยกสารได้ ทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ rugosanine-A, sativanine-F, sativanine-C, nummularine-P และ sativanine-K ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม cyclopeptide alkaloids ส่วน norcorypalline เป็นสารในกลุ่ม isoquinoline alkaloid นอกจากนี้ Pandey และคณะ² ยังพบสารในกลุ่ม triterpenoid saponin ในส่วนของเปลือกและลำต้นของมะควัด



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
rugosanine-A	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₃	CHO	CH ₃
sativanine-F	CH ₂ Ph	CH(CH ₃) ₂	CHO	H
sativanine-C	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₃	H	CH ₃
nummularine-P	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₃	H	CH ₃
sativanine-K	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₃	CH ₃	CH ₃

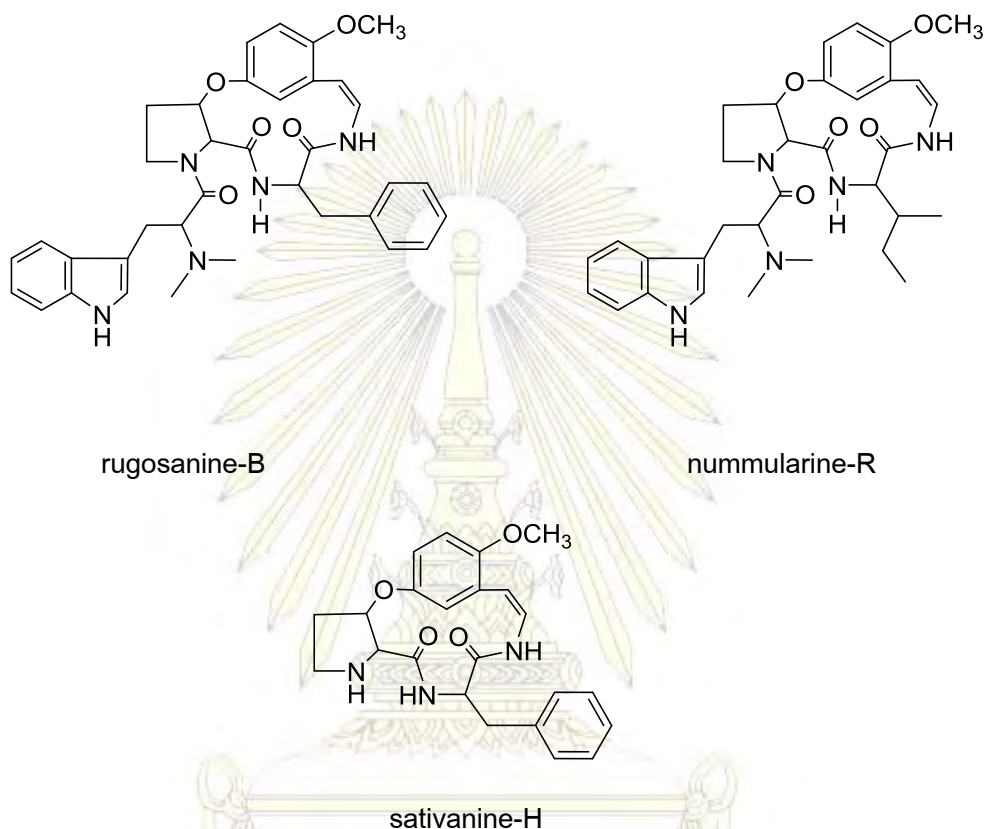


norcorypalline

รูปที่ 1.4 สารในกลุ่ม cyclopeptide alkaloid และ isoquinoline alkaloid จากเปลือก และลำต้นมะควัด

คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

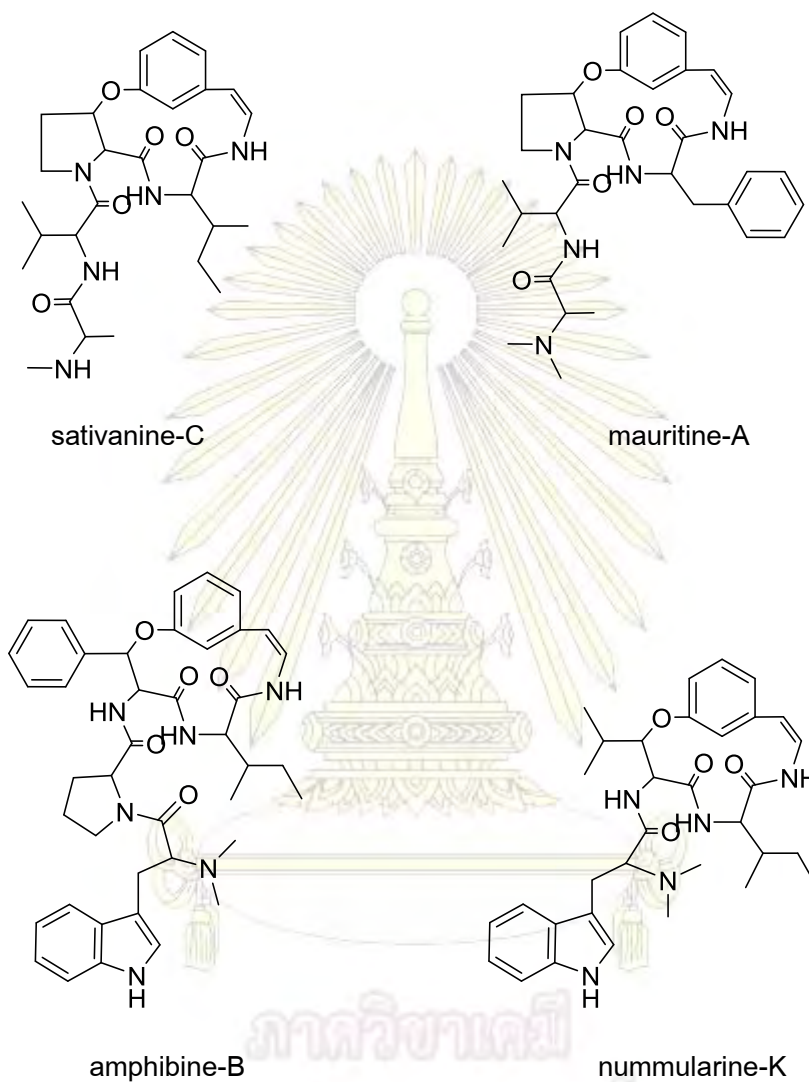
Tripathi และคณะ³ สกัดสารจากเปลือกและลำต้นของมะควัด ด้วยตัวทำละลายผสมของ เบนซีน, เมทานอล และแอมโมเนีย ในอัตราส่วน 100:1:1 ที่อุณหภูมิห้อง สามารถแยกสารได้ ทั้งหมด 3 ชนิด โดยเป็นสารใหม่หนึ่งชนิด คือ rugosanine-B และสารที่มีรายงานแล้วอีกสอง ชนิด ได้แก่ nummularine-R และ sativanine-H ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม cyclopeptide alkaloids



รูปที่ 1.5 สารในกลุ่ม cyclopeptide alkaloid จากเปลือกและลำต้นมะควัด

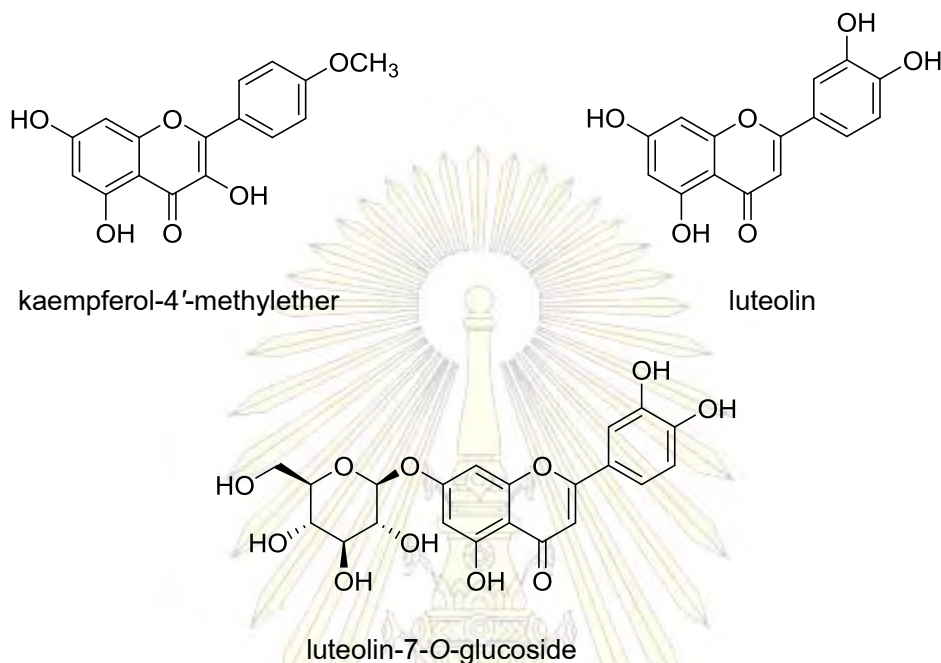
ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Singh และคณะ⁴ สกัดสารจากเปลือกมะควัด สามารถแยกสารได้ทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ sativanine-C, mauritine-A, amphibine-B และ nummularine-K ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม cyclopeptide alkaloids



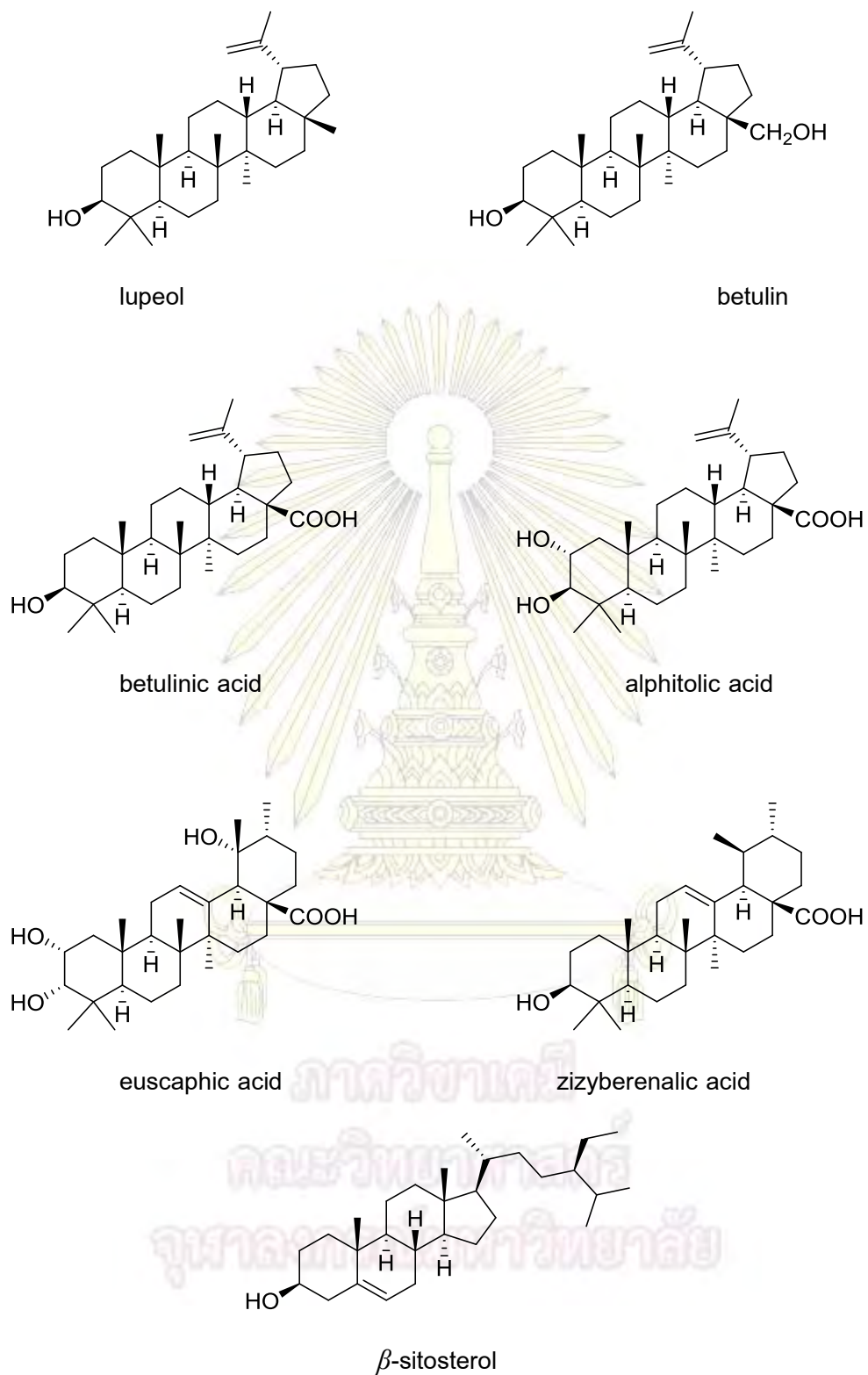
รูปที่ 1.6 สารในกลุ่ม cyclopeptide alkaloid จากเปลือกมะควัด

Singh และคณะ⁵ สกัดสารจากเปลือกมะควัด สามารถแยกสารได้ทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ kaempferol-4'-methylether, luteolin และ luteolin-7-O-glucoside ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม flavonoids



รูปที่ 1.7 สารในกลุ่ม flavonoid จากเปลือกมะควัด

Kaennakam และคณะ⁶ สกัดสารจากรากมะควัด ด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนและเมทานอล สามารถแยกสารได้ทั้งหมด 13 ชนิด ได้แก่ lupeol, betulin, betulinic anhydride, betulinic acid, alphitolic acid, euscaphic acid, zizyberenic acid และ β -sitosterol ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม triterpenoids สารในกลุ่ม coumarin ได้แก่ scopoletin และสารในกลุ่ม flavonoids ได้แก่ kaempferol, afzelin, quercitrin และ (+)-catechin



รูปที่ 1.8 สารในกลุ่ม triterpenoid จากรากมะควัด

จากงานวิจัยที่ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากมะควัด พบสารกลุ่มอัลคาลอยด์จากเปลือกและลำต้น ไตรเทอร์ปีนอยด์จากรากและลำต้น และฟลาโวนอยด์จากเปลือก ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมายังไม่เคยมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจากส่วนเปลือกต้นมะควัดมาก่อน ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการค้นคว้าและศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าวจากเปลือกต้นมะควัด เพื่อนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยทางผู้วิจัยมีความคาดหวังว่าจะนำสารที่มีฤทธิ์ดังกล่าวไปทำการวิจัย ต่อ ยอด และนำไปสู่การประยุกต์ใช้ประโยชน์ในทางเภสัชวิทยาและทางการแพทย์

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. แยกสารจากสิ่งสกัดเมทานอลจากเปลือกต้นมะควัด
2. พิสูจน์ทราบโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้โดยอาศัยข้อมูลทางกายภาพและเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี
3. สังเคราะห์อนุพันธ์ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้
4. ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วิธีการทดลองและผลการทดลอง

2.1 พืชตัวอย่าง

เปลือกต้นมะควัด (*Ziziphus rugosa* Lam.) เก็บมาจากจังหวัดกาฬสินธุ์ เดือนมกราคม พ.ศ.2557

2.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

นอกจากอุปกรณ์พื้นฐานและเครื่องแก้วที่ใช้ในห้องปฏิบัติการแล้ว ผู้วิจัยยังได้ใช้เครื่องมืออื่นเพิ่มเติมดังนี้

1. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporation)
2. เครื่อง nuclear magnetic resonance (NMR) Spectrometer
3. UV lamp ใช้สำหรับตรวจสอบสารที่ดูดกลืนแสงในช่วง UV บนแผ่น TLC ช่วงความยาวคลื่นที่ใช้ คือ short wavelength 254 nm และ long wavelength 365 nm
4. เครื่องดูดสุญญากาศ (suction pump)
5. เครื่องชั่งไฟฟ้า
6. เครื่องโครมาโทรอน (chromatotron)

2.3 สารเคมี

1. ตัวทำละลาย ได้แก่ hexane, dichloromethane, ethyl acetate และ methanol
2. รีเอเจนต์ ได้แก่ acetic anhydride, propionic anhydride, butanoic anhydride, valeric anhydride, hexanoic anhydride, benzoic anhydride, triethylamine (TEA), *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) และ sodium bicarbonate (NaHCO_3)
3. ซิลิกาเจล เบอร์ 7734 สำหรับใช้ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี (open column chromatography) และซิลิกาเจลเบอร์ 7749 สำหรับใช้ในโครมาโทรอน
4. แผ่น Thin-Layer Chromatography (TLC)
5. Sephadex LH-20

2.4 ขั้นตอนการทดลอง

1. คำนวณค่าเอกสารและข้อมูลที่เกี่ยวข้อง
2. เก็บเปลือกของต้นมะควัดจากจังหวัดกาฬสินธุ์ จากนั้นสกัดและแยกสารออกเป็น ส่วนๆ ด้วยตัวทำละลาย ไตคลอโรมีเทน และเมทานอล จากนั้นทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้ง เอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสเบื้องต้น
3. แยกสารบริสุทธิ์ด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟี เช่น silica gel, sephadex LH-20 column chromatography และ chromatotron เป็นต้น
4. พิสูจน์ทราบโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ โดยอาศัยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี เช่น 1D NMR, 2D NMR และ mass spectrometry เป็นต้น
5. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส⁷
6. วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผล และเขียนรายงาน

2.5 เทคนิคต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง

2.5.1 การกลั่น

การกลั่นเป็นวิธีการที่ทำให้ตัวทำละลายบริสุทธิ์ โดยต้มสารละลายให้กลายเป็นไอ จากนั้นไอของตัวทำละลายจะผ่านเครื่องควบแน่น ได้ออกมาเป็นตัวทำละลายที่บริสุทธิ์มากขึ้น การกลั่นมีหลายวิธี คือ การกลั่นอย่างง่าย (simple Distillation) การกลั่นลำดับส่วน (fractional distillation) การกลั่นภายใต้ความดันต่ำ (vacuum distillation) การกลั่นด้วยไอน้ำ (steam distillation) ในบทนี้จะกล่าวถึงเฉพาะการกลั่นที่ใช้ในการทดลองเท่านั้น คือ

- ก. การกลั่นอย่างง่าย ใช้กลั่นตัวทำละลายชนิดคอมเมอร์เชียลเกรดก่อนนำมาใช้ในการทดลอง
- ข. การกลั่นภายใต้ความดันต่ำ ใช้ในขั้นตอนการระเหยตัวทำละลายออกจากสิ่งสกัด การกลั่นวิธีนี้จะทำให้ตัวทำละลายกลายเป็นไอก่อนที่จะถึงจุดเดือด ซึ่งจะช่วยป้องกันการสลายตัวของสิ่งสกัดโดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporation)

2.5.2 คอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography)

ใช้เฟสคงที่ (stationary phase) คือ ซิลิกาเจล ชนิด 60G Art.7734 โดยใช้คอลัมน์แก้วที่มีขนาดที่เหมาะสมกับปริมาณสิ่งสกัดที่ต้องการแยก โดยอัตราส่วนของเฟสคงที่ต่อสารที่จะแยกประมาณ 20 ต่อ 1 โดยน้ำหนัก บรรจุคอลัมน์โดยวิธีแบบเปียกคือเริ่มแรกต้องผสมซิลิกาเจลกับตัวทำละลายให้เข้ากันให้ดีแล้วค่อยๆ เทของผสมลงในคอลัมน์ที่มีสำลีสูดที่ปลายเปิดและมีตัวทำละลายอยู่ประมาณครึ่งหนึ่งของคอลัมน์ ขณะที่เทซิลิกาเจลลงในคอลัมน์ เปิดวาล์วคอลัมน์ให้ตัวทำละลายไหลออกอย่างช้าๆ เพื่อให้ซิลิกาเจลอัดตัวในคอลัมน์อย่างสม่ำเสมอ ทำเช่นนี้

จนกระทั่งบรรจุซิลิกาเจลได้ระดับที่ต้องการ ผ่านตัวทำละลายอีก 2-3 ครั้งแล้วจึงปิดวาล์ว จากนั้นจึงบรรจุสิ่งสกปรกที่ต้องการแยกลงไป โดยนำซิลิกาเจลเบอร์ 7734 ในปริมาณที่น้อยที่สุด นำไปบดและร่อนผ่านตะแกรงได้เป็นผงที่ละเอียดเท่ากัน จากนั้นจึงเทซิลิกาเจลที่ได้นี้ผสมกับสิ่งสกปรกที่ต้องการแยก นำของผสมนี้ไประเหยตัวทำละลายออกให้แห้ง ใส่ลงในคอลัมน์ที่เตรียมไว้ ใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวกันปริมาตรเล็กน้อยล้างผิวด้านข้างในคอลัมน์ จากนั้นเติมซิลิกาเจลชนิดเดียวกันอีกเล็กน้อย เพื่อปิดผิวหน้าให้เรียบและป้องกันการกระแทกกระเทือนผิวหน้าของของผสมขณะเติมตัวทำละลาย จากนั้นเริ่มเปิดวาล์วเพื่อเก็บสารที่ได้จากการแยก เปลี่ยนชนิดของตัวทำละลายไปเรื่อยๆ โดยเริ่มจากตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยไปยังตัวทำละลายที่มีขั้วมากและตลอดการทดลองต้องระมัดระวังไม่ให้ตัวทำละลายแห้งจนถึงผิวหน้าซิลิกาเจล

2.5.3 ทิน-เลเยอร์โครมาโทกราฟี (thin-layer chromatography: TLC)

เป็นเทคนิคอย่างง่ายที่ใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารโดยใช้ TLC aluminum sheets silica gel 60 F₂₅₄ ตัดให้มีขนาดพอเหมาะ แล้วทำการระบุนระยะทางที่จะให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ แต่มีสารละลายของสารที่ต้องการตรวจสอบบนจุดเริ่มต้นด้วยหลอดคะพิลลารีขนาดเล็กให้มีระยะห่างระหว่างจุดประมาณ 0.5 เซนติเมตร นำแผ่น TLC ไปจุ่มในภาชนะปิดที่บรรจุด้วยกระดาษกรองและมีตัวทำละลายที่เหมาะสมบรรจุอยู่ ปล่อยให้ตัวทำละลายชะสารให้เคลื่อนที่ไปบนแผ่น TLC จนถึงจุดสูงสุด (solvent front) ที่ขีดไว้ ทิ้งให้แผ่น TLC แห้งแล้วนำไปตรวจหาตำแหน่งของสาร โดยส่องด้วย UV lamp ที่มีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร หรือนำไปจุ่มในสารละลาย anisaldehyde/H₂SO₄ แล้วอบที่อุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียส นาน 1-2 นาที แล้วบันทึกตำแหน่งของจุดดังกล่าว

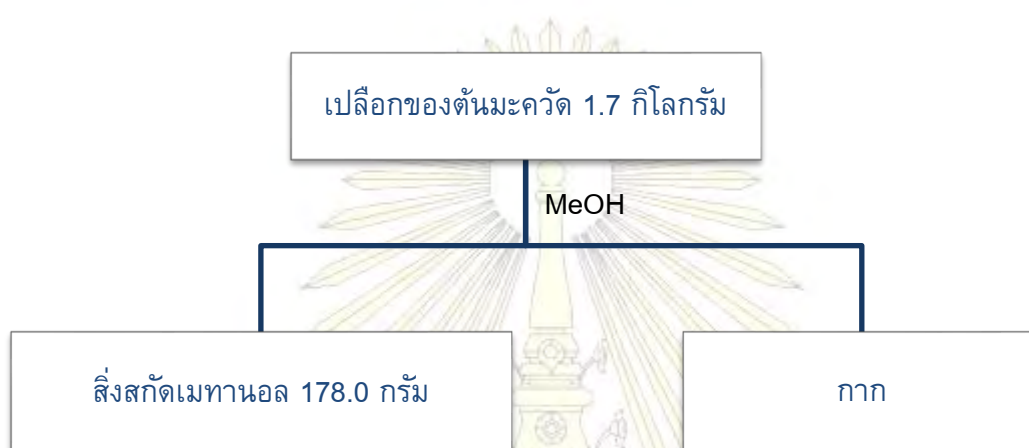
2.5.4 เรเดียลโครมาโทกราฟี (radial chromatography)

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารโดยอาศัยแรงเหวี่ยง (centrifugal force) ซึ่งจะมีหลักการทำงานคือ นำสารละลายของสารที่ต้องการแยกหยดลงไปในกลางแผ่นแก้วทรงกลมที่เคลือบด้วยซิลิกาเจลหนาประมาณ 1.0 มิลลิเมตร ใช้ตัวทำละลายที่บรรจุอยู่ในกรวยแยก แล้วจึงเปิดเครื่อง โดยแผ่นแก้วทรงกลมจะเกิดการหมุน สารจะเคลื่อนที่จากกึ่งกลางแผ่นพร้อมกับเกิดการแยกเป็นแถบสารขึ้นซึ่งจะมองเห็นได้โดยนำ UV Lamp มาส่องบนแผ่นแก้วทรงกลม แล้วทำการเก็บแฟรกชันตามแถบสารที่แยกได้ ดังนั้นข้อดีสำหรับเทคนิคนี้ คือ ลดระยะเวลาในการทำโครมาโทกราฟี กล่าวคือใช้เวลาประมาณ 20-30 นาที เนื่องจากแรงจากการหมุนเหวี่ยงจะช่วยทำให้เกิดการแยกได้ดีและเร็วขึ้นเมื่อเทียบกับเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี และนอกจากนี้ยังสามารถตรวจหาตำแหน่งของสารที่แยกได้ทันทีโดยใช้ UV lamp ทำให้ง่ายต่อการเก็บแฟรกชัน

2.6 การเตรียมวัตถุดิบและการสกัด

2.6.1 การสกัดด้วยเมทานอล

นำเปลือกของต้นมะควัดที่แห้งบดละเอียดและตากแห้งแล้วหนักประมาณ 1.7 กิโลกรัม มาสกัดด้วยเมทานอลที่อุณหภูมิห้อง 2 ครั้ง โดยแต่ละครั้งใช้เวลา 7 วัน จะได้สิ่งสกัดจากเมทานอล (methanol crude extract)



แผนภาพที่ 2.1 ขั้นตอนการสกัดเปลือกของต้นมะควัด

2.7 การแยกและทำสารให้บริสุทธิ์

2.7.1 การแยกสารจากสิ่งสกัดเมทานอล

1. นำสิ่งสกัดเมทานอลที่สกัดได้ 178.0 กรัม มาทำคอลลัมน์ โดยใช้ซิลิกาเจลเบอร์ 7730 เป็นตัวดูดซับ แล้วชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลาย โดยเรียงลำดับความมีขั้วจากน้อยไปหามาก โดยเริ่มจาก 100% เฮกเซน แล้วค่อยๆ เพิ่มความมีขั้วของตัวทำละลายด้วยไดคลอโรมีเทน ที่ละ 20% จนถึง 100% ไดคลอโรมีเทน และชะคอลัมน์ครั้งสุดท้ายออกด้วย 100% เมทานอล โดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ครั้งละ 500 มิลลิลิตร

2. นำสารแต่ละส่วนมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน

3. นำสารสกัดแต่ละส่วนมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายผสมของ 30% เอทิลอะซิเตต-เฮกเซน ซึ่งเป็นระบบที่ทำให้สารเกิดการแยกได้ดีมากที่สุดเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ จากนั้นรวมสารในแต่ละแฟรกชันที่มีลักษณะบนแผ่น TLC เหมือนกันเข้าด้วยกัน พบว่าได้ทั้งหมด 7 แฟรกชันใหญ่ (A-G) จากนั้นนำแต่ละแฟรกชันไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา กลูโคซิเดส เบื้องต้นพบว่าแฟรกชัน D มีฤทธิ์ที่ดีที่สุด (ตารางที่ 3.1)

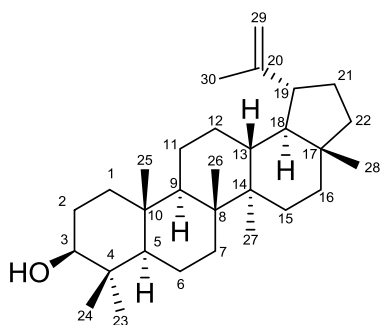
4. นำสารแฟรกชัน D มาทำการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ขนาด 30% และ 100% ไดคลอโรมีเทนต่อเฮกเซน, 30%, 50% และ 100% เอทิลแอสีเตตต่อเฮกเซน ให้แฟรกชันย่อยทั้งหมด 6 แฟรกชันย่อย (D1-D6)

5. จากการทดสอบฤทธิ์จึงนำแฟรกชันย่อย D4 มาทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นด้วยเทคนิค centrifugal ขนาด 100% ไดคลอโรมีเทน ได้สารบริสุทธิ์ 1 และ 2 ออกมา

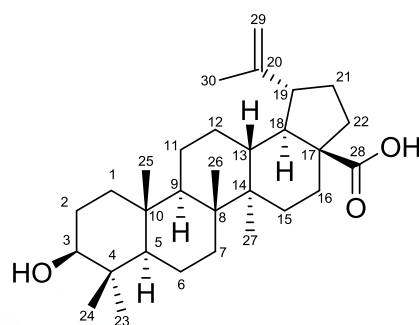
6. ทำการยืนยันสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ 1 และ 2 โดยเปรียบเทียบจากข้อมูลทาง เอ็นเอ็มอาร์สเปกโทรสโกปี พบว่าสารบริสุทธิ์ 1 คือ lupeol และสาร 2 คือ betulinic acid (รูปที่ 2.1)



แผนภาพที่ 2.2 ขั้นตอนการแยกสารประกอบของเปลือกต้นของมะควัดให้ได้สารบริสุทธิ์



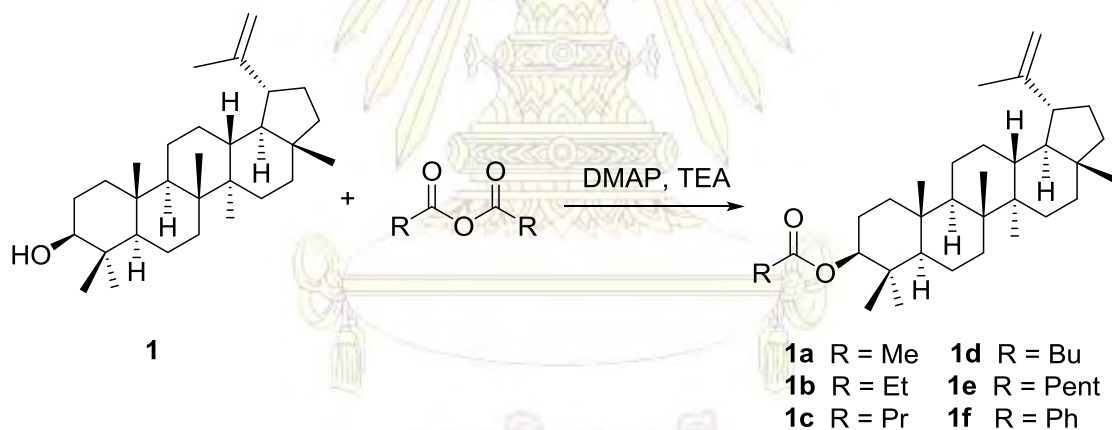
lupeol



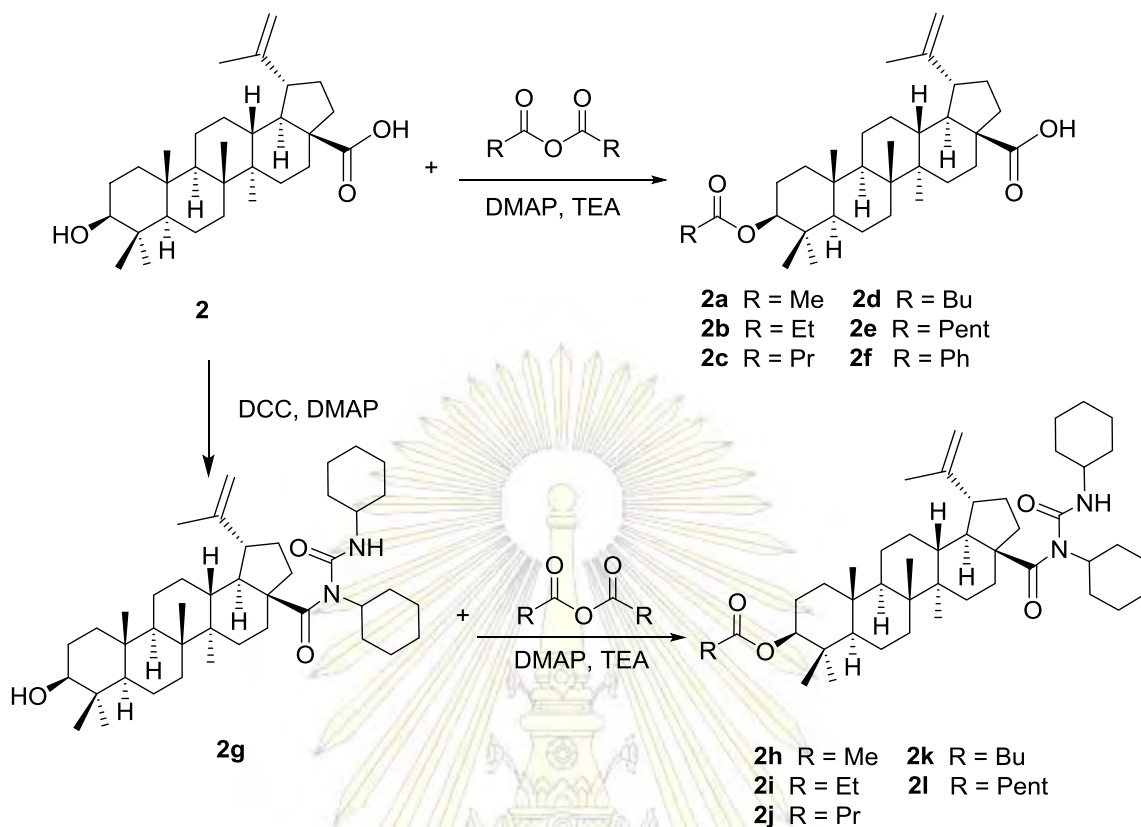
betulinic acid

รูปที่ 2.1 โครงสร้างของ lupeol (1) และ betulinic acid (2)

2.8 การเตรียมอนุพันธ์ของ lupeol (1) และ betulinic acid (2)



แผนภาพที่ 2.3 ขั้นตอนการเตรียมอนุพันธ์จากสาร 1



แผนภาพที่ 2.4 ขั้นตอนการเตรียมอนุพันธ์จากสาร 2

2.9 การทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจากยีสต์

1. เตรียมสารละลาย α -glucosidase (0.1 U/mL) และ substrate (1 mM *p*-nitrophenyl-(α -D-glucopyranoside) ใน 0.1 M phosphate buffer, pH 6.9
2. จากนั้นเติมสารตัวอย่างที่จะทดสอบ (1 mg/mL ใน DMSO) ปริมาตร 10 μ L ใน 96 well plate แล้วเติมสารละลาย α -glucosidase ปริมาตร 40 μ L จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 10 นาที
3. เติมสารละลาย substrate (PNPG) ปริมาตร 50 μ L แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 20 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย 1 M Na_2CO_3 ปริมาตร 100 μ L
4. นำ 96 well plate ไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 405 nm (Bio-Rad 3550 microplate reader)

5. นำผลที่ได้ไปคำนวณ % การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส

$$\text{โดย } \% \text{inhibition} = \left[1 - \left(\frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right) \right] \times 100$$

เมื่อ A_{sample} = ค่า absorbance ที่วัดได้โดยมีสารละลายตัวอย่างที่จะทดสอบผสม

A_{control} = ค่า absorbance ที่วัดได้โดยไม่มีสารละลายตัวอย่างที่จะทดสอบผสม

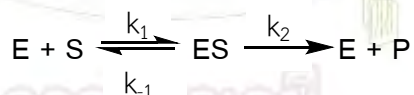
ในการรายงานค่าจะรายงานค่าเป็น IC_{50} (The half maximal inhibitory concentration) ซึ่งได้จากการสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition กับ ความเข้มข้น ซึ่งความเข้มข้นที่ 50% inhibition จะมีค่าเป็น IC_{50}

2.10 จลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาเอนไซม์

สมการไมเคิลิส-เมนเทน (Michaelis-Menten equation)

ศึกษาถึงอิทธิพลของความเข้มข้นของสับสเตรตต่ออัตราเร็วเริ่มต้น (เมื่อเวลา $t = 0$)

แบบจำลองกลไกการทำงานของเอนไซม์



(เมื่อ E คือ เอนไซม์, S คือ สับสเตรต, P คือ ผลิตภัณฑ์)

โดยสมการไมเคิลิส-เมนเทน สามารถแสดงได้ดังนี้

$$v_0 = \frac{V_{\text{max}}[S_0]}{K_m + [S_0]}$$

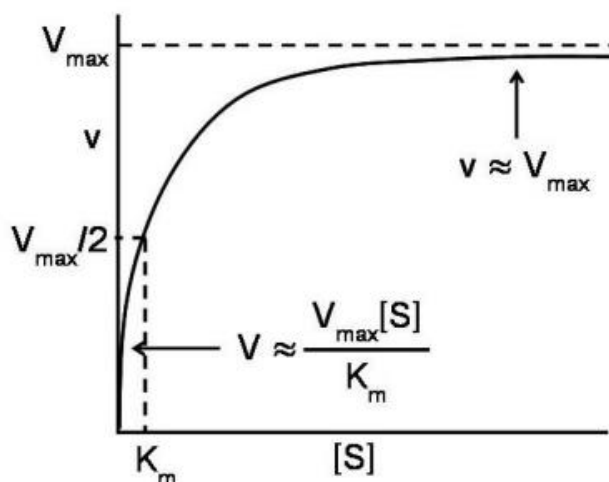
เมื่อ V_0 คือ อัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา

V_{max} คือ อัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา

K_m คือ ค่าคงที่ของไมเคลิส มีค่าเท่ากับ $(k_{-1} + k_2) / k_1$

S_0 คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของสับสเตรต

เมื่อนำมาเขียนกราฟระหว่าง V_0 กับ S_0 จะได้กราฟรูปไฮเพอโบลา ดังรูปที่ 2.2



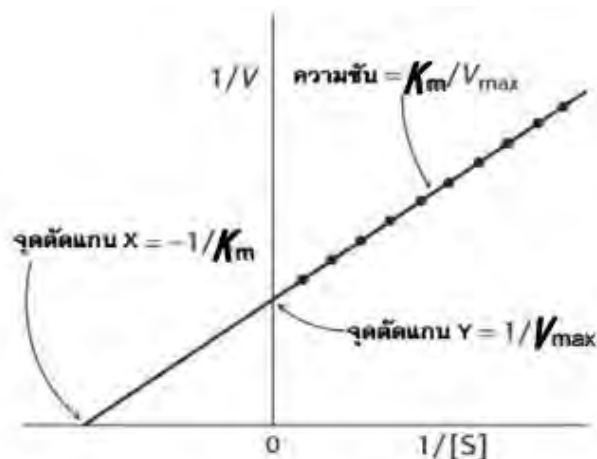
รูปที่ 2.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง V_0 กับ S_0 จากสมการไมเคลิส-เมนเทน

สมการไลน์วีเวอร์-เบิร์ก (Lineweaver-Burk equation)

เป็นสมการที่ดัดแปลงมาจากสมการไมเคลิส-เมนเทน เพื่อง่ายต่อการหาค่าต่างๆ แสดงสมการได้ดังนี้

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]_0} + \frac{1}{V_{max}}$$

เมื่อนำมาเขียนกราฟระหว่าง $1/V_0$ กับ $1/[S_0]$ ซึ่งกราฟที่ได้จะมีลักษณะเป็นเส้นตรงดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $1/V$ กับ $1/[S]$ จากสมการไลน์วีเวอร์-เบิร์ก

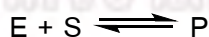
ตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme inhibitor)

ทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้สับสเตรตเข้าไปจับกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ได้ โดยส่วนใหญ่แล้วตัวยับยั้งมักจะมีโครงสร้างคล้ายกับสับสเตรต โดยตัวยับยั้งจะมีลักษณะของการยับยั้งแบบต่าง ๆ ดังนี้

1. การยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibition)

1) การยับยั้งแบบแข่งขันที่บริเวณเร่ง

เมื่อสับสเตรตทำปฏิกิริยากับเอนไซม์จะได้ผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น แม้ว่าจะเติมตัวยับยั้งลงไปหลังจากที่เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับสับสเตรตแล้วก็ตาม ตัวยับยั้งชนิดนี้จะจับเข้าที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ซึ่งสามารถแสดงได้ดังนี้



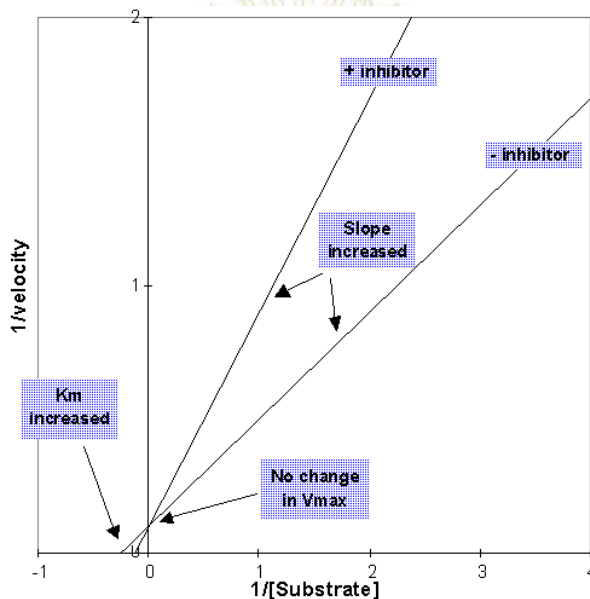
2) การยับยั้งแบบแข่งขันที่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง

เมื่อสารตั้งต้นหรือตัวยับยั้งทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ จะส่งผลให้เอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป ทำให้อีกตัวไม่สามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้ ซึ่งสามารถแสดงได้ดังนี้





จากการยับยั้งแบบแข่งขันทั้ง 2 แบบ จะเห็นว่าทั้งสับสเตรตและตัวยับยั้งจะแย่งกันทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ ดังนั้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรต พบว่าที่ความเข้มข้นที่สูงมาก ๆ อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะไม่เปลี่ยนแปลง



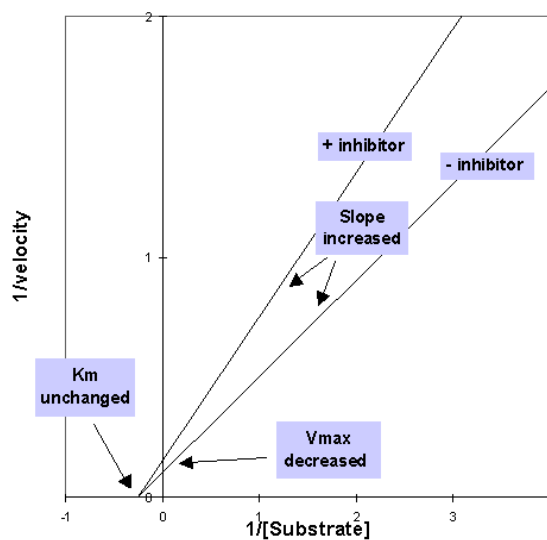
รูปที่ 2.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $1/V_0$ กับ $1/[S]_0$ จากสมการไลน์วีเวอร์-เบิร์กของตัวยับยั้งแบบแข่งขัน

- inhibition คือ สับสเตรตที่ไม่ได้เติมตัวยับยั้งลงไป
- + inhibition คือ สับสเตรตที่มีการเติมตัวยับยั้งลงไป

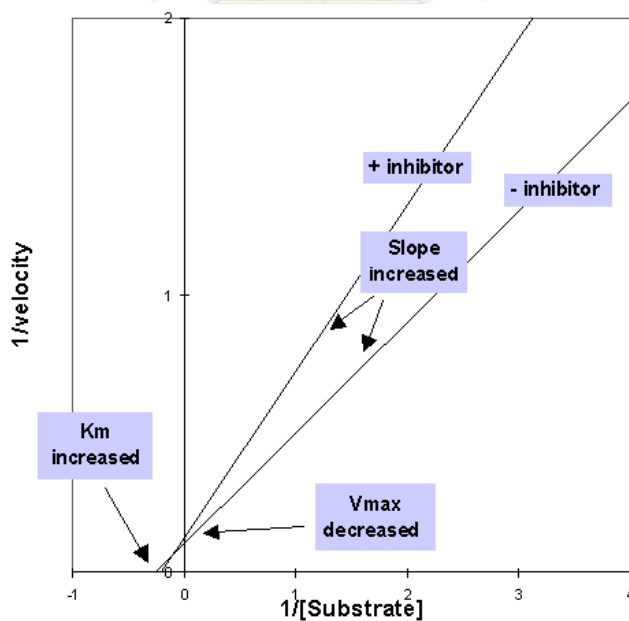
2. การยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (non-competitive inhibition)

ตัวยับยั้งชนิดนี้จะจับกับเอนไซม์ที่บริเวณอัลโลสเตอริกก่อน (allosteric site) เกิดเป็นสารเชิงซ้อนตัวยับยั้ง-เอนไซม์ และเมื่อสับสเตรตเข้าจับที่บริเวณเร่ง จะเกิดสารเชิงซ้อน ตัวยับยั้ง-เอนไซม์-สับสเตรต ซึ่งไม่เกิดเป็นผลิตภัณฑ์หรือเกิดช้า หรือในทางกลับกันหากสับสเตรตจับกับเอนไซม์อยู่แล้ว ตัวยับยั้งชนิดนี้ก็สามารถเข้าจับกับสารเชิงซ้อน เอนไซม์-สับสเตรต ได้ที่บริเวณอัลโลสเตอริก ซึ่งไม่เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ได้เช่นเดียวกัน ซึ่งการยับยั้งแบบ non-

competitive นี้ แบ่งได้ออกเป็น 2 แบบ ได้แก่ แบบปกติ (classical noncompetitive inhibitor) และแบบผสม (mixed noncompetitive inhibitor)



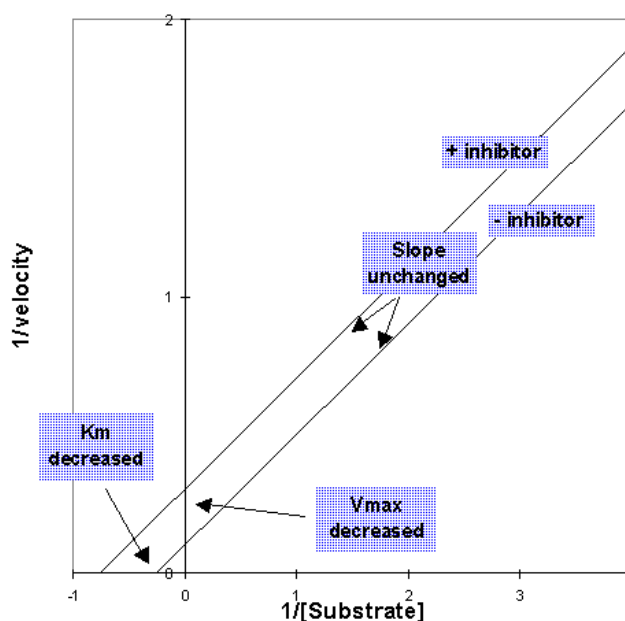
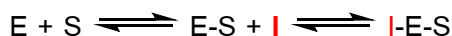
รูปที่ 2.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $1/V_0$ กับ $1/[S]_0$ จากสมการไลน์วีเวอร์-เบิร์ก ของตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (ปกติ)



รูปที่ 2.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $1/V_0$ กับ $1/[S]_0$ จากสมการไลน์วีเวอร์-เบิร์ก ของตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (ผสม)

3. การยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (uncompetitive inhibition)

ตัวยับยั้งชนิดนี้คล้ายกับตัวยับยั้งแบบ non-competitive โดยจะแตกต่างกันตรงที่ตัวยับยั้งชนิดนี้จะจับเข้ากับเอนไซม์บริเวณอัลโลสเตอริก หลังจากที่ซับสเตรตเข้าจับเอนไซม์แล้ว



รูปที่ 2.7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $1/V_0$ กับ $1/[S_0]$ จากสมการไลน์วีเวอร์-เบิร์กของตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (uncompetitive inhibitor)

การคำนวณค่าคงที่การยับยั้ง (inhibitor constant)

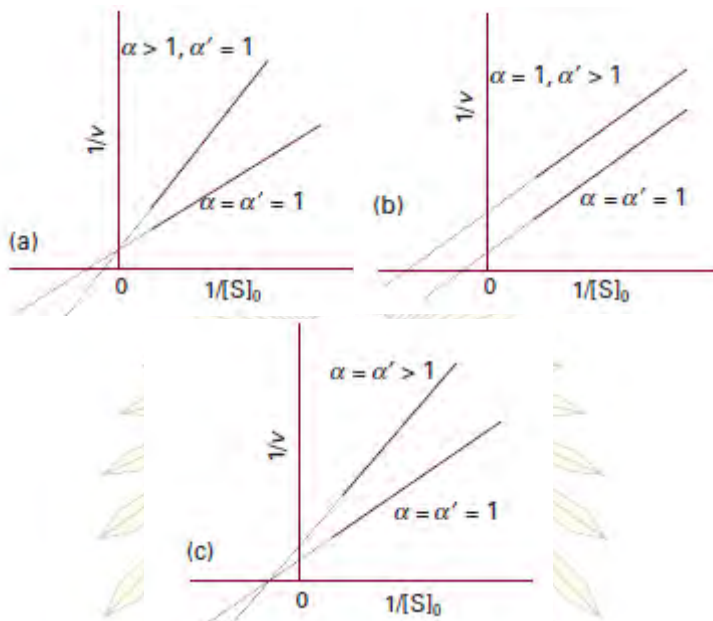
ถ้าหากตัวยับยั้งมีผลต่ออัตราของปฏิกิริยา จะได้สมการไลน์วีเวอร์-เบิร์กในรูปใหม่ ดังนี้

$$\frac{1}{V_0} = \frac{\alpha K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]_0} + \frac{\alpha'}{V_{max}}$$

โดย $\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i}$ และ $\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K'_i}$

การมีอยู่ของตัวยับยั้งจะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของค่า K_m และ V ของปฏิกิริยา ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของตัวยับยั้ง ซึ่งสามารถวัดได้ด้วยค่าคงที่การ

ยับยั้ง (inhibitor constant) โดยการเปลี่ยนแปลงของค่า K_m และ V สามารถอธิบายได้ด้วยค่า K_i และ K_i' ตามลำดับ



รูปที่ 2.8 กราฟแสดงสมการไลน์วีเวอร์-เบิร์กของตัวยับยั้งทั้ง 3 รูปแบบ:

(a) competitive inhibition, (b) uncompetitive inhibition, and

(c) non-competitive inhibition, showing the special case $\alpha = \alpha' > 1$.

จากรูปที่ 2.7 (c) จัดเป็น non-competitive inhibition แบบปกติ ซึ่งเป็นกรณีที่มีค่า $\alpha = \alpha' > 1$ แต่ถ้าหากเป็น non-competitive inhibition แบบผสม (mixed) จะมีค่า $\alpha \neq \alpha' > 1$ โดยกราฟจะมีรูปร่างเช่นเดียวกับรูปที่ 2.5

ดังนั้นจึงสามารถสรุปค่าคงที่การยับยั้งต่าง ๆ ได้ดังนี้

ตัวยับยั้งแบบแข่งขัน จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงค่า V_{max} ดังนั้นจึงไม่มีค่า K_i'

ตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขัน non-competitive (ปกติ) ค่าคงที่ K_i และ K_i' จะมีค่าเท่ากัน

ตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขัน non-competitive (ผสม) ค่าคงที่ K_i และ K_i' จะมีค่าต่างกัน

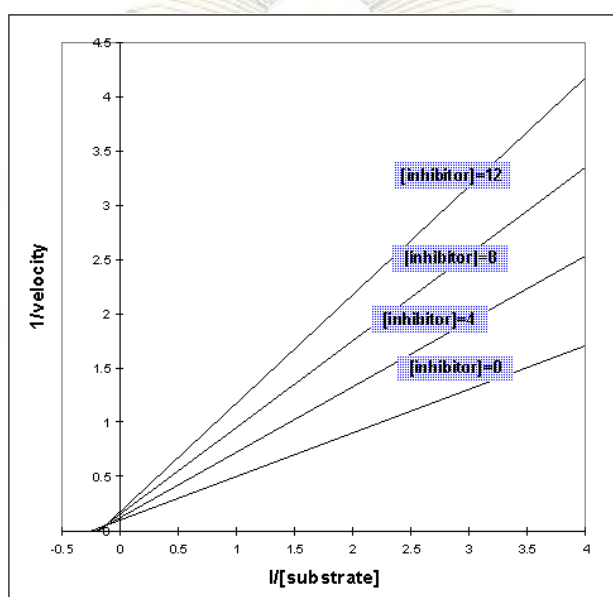
ตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขัน uncompetitive จะมีค่า slope หรืออัตราส่วนของ K_m กับ V_{max}

จะคงที่ ดังนั้นจึงไม่มีค่า K_i

หากต้องการทราบค่า K_i จึงต้องสร้างกราฟเพิ่มเติมเพื่อใช้ในการหาค่าพารามิเตอร์นี้ จากกราฟลำดับที่สอง (secondary plot) ซึ่งมีวิธีการดังต่อไปนี้ (กรณีตัวยับยั้งแบบ mixed non-competitive)

1) สร้างกราฟลำดับที่หนึ่ง (primary plot)

เพื่อสร้างความสัมพันธ์ระหว่าง $1/V$ กับ $1/[S]$ ในแต่ละสับสเตรตที่มีการเติมตัวยับยั้ง เพื่อนำไปสร้างกราฟ ทำให้ทราบค่าความชันและจุดตัดแกน y ซึ่งจะนำค่าเหล่านี้ไปสร้างกราฟลำดับที่สองซึ่งสัมพันธ์กับค่าความเข้มข้นของตัวยับยั้ง

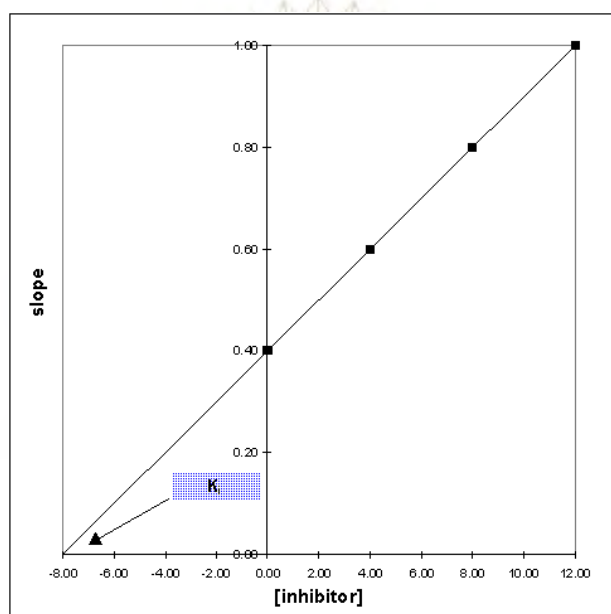


รูปที่ 2.9 กราฟลำดับหนึ่งของสับสเตรตที่เติมตัวยับยั้ง ณ ความเข้มข้นต่าง ๆ

2) สร้างกราฟลำดับสอง (secondary plot)

การหาค่า K_i (ในกรณีที่ $\alpha > 1$)

สามารถทำได้โดยการสร้างกราฟที่ได้จากความสัมพันธ์ระหว่างค่าความชันที่แต่ละความเข้มข้นของตัวยับยั้ง (จากกราฟลำดับหนึ่ง) กับความเข้มข้นของตัวยับยั้ง โดยจุดที่กราฟตัดแกน x คือค่า $-K_i$

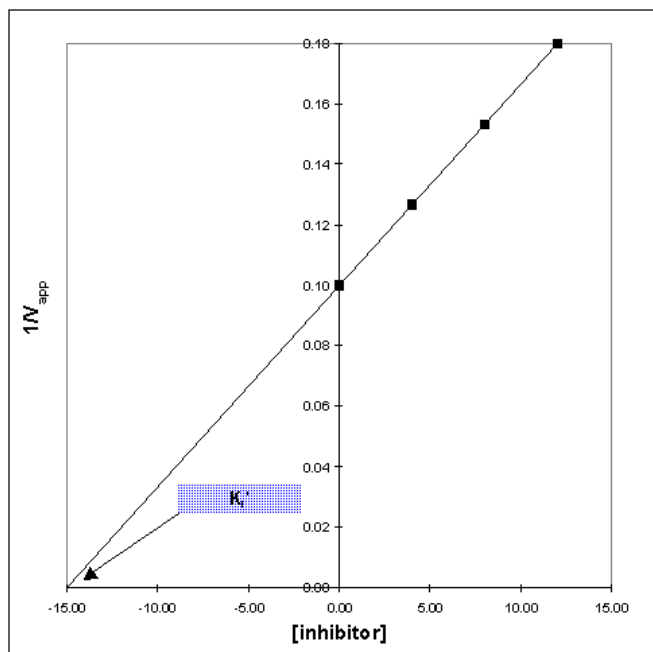


รูปที่ 2.10 กราฟลำดับสองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความชัน (จากกราฟลำดับหนึ่ง)

กับความเข้มข้นของตัวยับยั้งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ซึ่งใช้ในการหาค่า K_i

การหาค่า K_i' (ในกรณีที่ $\alpha' > 1$)

สามารถทำได้โดยการสร้างกราฟที่ได้จากความสัมพันธ์ระหว่างจุดตัดแกน y ที่แต่ละความเข้มข้นของสับสเตรต (จากกราฟลำดับหนึ่ง) กับความเข้มข้นของตัวยับยั้ง โดยจุดที่กราฟตัดแกน x คือค่า $-K_i'$



รูปที่ 2.11 กราฟลำดับสองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจุดตัดแกน y (จากกราฟลำดับหนึ่ง) กับความเข้มข้นของตัวยับยั้งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ซึ่งในการหาค่า K_i'

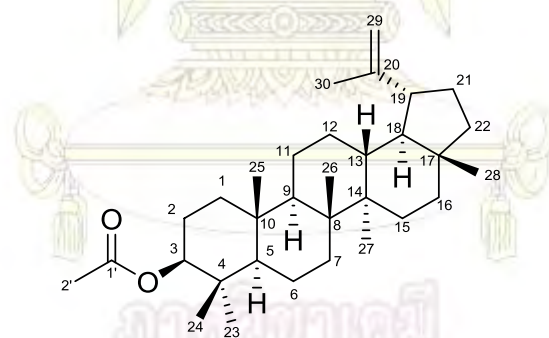


บทที่ 3

การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างและผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ของสารบริสุทธิ์ที่ได้

จากการสกัดแยกสารจากสิ่งสกัดเมทานอล พบว่าแฟรกชัน D มีสารที่น่าสนใจ เนื่องจากมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสได้ดี จึงได้เลือกแฟรกชัน D มาแยกต่อให้บริสุทธิ์ ซึ่งสามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 2 ชนิดคือ สาร **1** และ **2** (แสดงโครงสร้างในรูปที่ 2.1) เพื่อที่จะศึกษาความสัมพันธ์ทางโครงสร้างกับฤทธิ์ทางชีวภาพ (Structure Activity Relationship, SAR) ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ (**1** และ **2**) ซึ่งได้นำไปสังเคราะห์อนุพันธ์ (**1a-1f** และ **2a-2l**) ต่อไป โดยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีของสารต่าง ๆ มีดังนี้

3.1 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ 3-O-acetyl lupeol (**1a**)



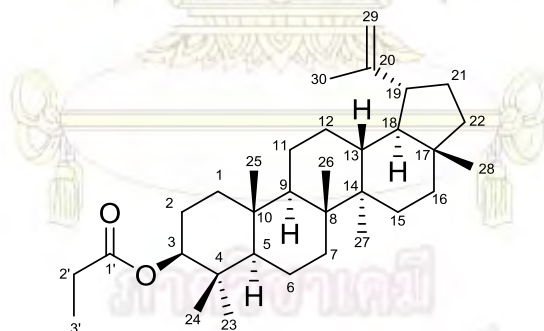
รูปที่ 3.1 โครงสร้างของ 3-O-acetyl lupeol (**1a**)

3-O-acetyl lupeol (1a)⁸: White Solid; mp. 191-193 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ_H 4.68 (1H, s, H-29a), 4.57 (1H, s, H-29b), 4.47 (1H, q, J = 8.2 Hz, H-3), 2.37 (1H, m, H-19), 2.04 (3H, s, H-2'), 1.68 (3H, s, H-30), 1.64 (1H, m, H-21a), 1.62 (1H, m, H-7a), 1.61 (1H, m, H-16a), 1.56 (1H, m, H-22a), 1.50 (1H, m, H-12a), 1.49 (1H, m, H-11a), 1.45 (1H, m, H-16b), 1.44 (1H, m, H-15a), 1.42 (1H, m, H-6a), 1.40 (1H, m, H-1a), 1.37 (1H, m, H-

13), 1.35 (2H, m, H-2), 1.35 (1H, m, H-15b), 1.34 (1H, m, H-9), 1.26 (1H, m, H-22b), 1.24 (1H, m, H-21b), 1.24 (1H, m, H-12b), 1.21 (1H, m, H-5), 1.20 (1H, m, H-7b), 1.20 (1H, m, H-11b), 1.18 (1H, m, H-18), 1.16 (1H, m, H-6b), 1.04 (3H, s, H-25), 0.98 (1H, m, H-1b), 0.94 (3H, s, H-23), 0.93 (3H, s, H-24), 0.86 (3H, s, H-26), 0.84 (3H, s, H-28), 0.79 (3H, s, H-27).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ_{C} 171.1 (C-1'), 151.2 (C-20), 109.5 (C-29), 81.2 (C-3), 55.6 (C-5), 50.6 (C-9), 48.5 (C-18), 48.2 (C-19), 43.2 (C-17), 43.0 (C-14), 41.1 (C-8), 40.2 (C-22), 38.5 (C-4), 38.2 (C-13), 38.0 (C-1), 37.3 (C-10), 35.7 (C-16), 34.4 (C-7), 30.1 (C-21), 29.9 (C-23), 28.1 (C-2), 27.6 (C-15), 25.3 (C-12), 21.1 (C-2'), 21.1 (C-11), 19.5 (C-30), 18.4 (C-6), 18.2 (C-28), 16.7 (C-25), 16.4 (C-26), 16.2 (C-24), 14.7 (C-27).

3.2 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ 3-O-propanoyl lupeol (1b)



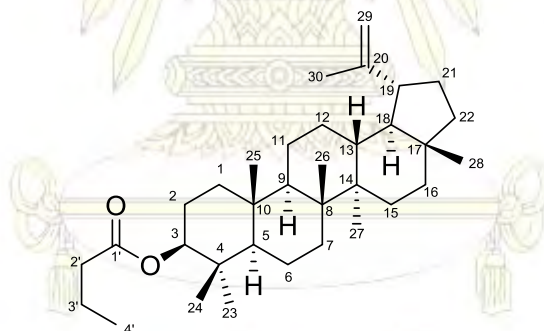
รูปที่ 3.2 โครงสร้างของ 3-O-propanoyl lupeol (1b)

3-O-propanoyl lupeol (1b)⁹: White Gum; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} 4.68 (1H, s, H-29a), 4.56 (1H, s, H-29b), 4.48 (1H, q, $J = 6.8$ Hz, H-3), 2.38 (1H, m, H-2a'), 2.33 (1H, m, H-19), 2.31 (1H, m, H-2b'), 1.68 (3H, s, H-30), 1.65 (1H, m, H-12a), 1.64 (1H, m, H-21a), 1.63 (1H, m, H-2a), 1.63 (1H, m, H-15a), 1.62 (1H, m, H-7a), 1.60 (1H, m, H-2b), 1.58 (1H, m, H-13), 1.56 (1H, m, H-22a), 1.50 (1H, m, H-11a), 1.49 (1H, m, H-6a), 1.47

(2H, m, H-16), 1.42 (1H, m, H-1a), 1.39 (1H, m, H-11b), 1.37 (1H, m, H-6b), 1.33 (1H, m, H-9), 1.28 (1H, m, H-12b), 1.26 (1H, m, H-22b), 1.24 (1H, m, H-21b), 1.21 (1H, m, H-5), 1.20 (1H, m, H-7b), 1.18 (1H, m, H-18), 1.14 (3H, t, $J = 7.6$ Hz, H-3'), 1.03 (3H, s, H-25), 1.00 (1H, m, H-1b), 0.99 (1H, m, H-15b), 0.94 (3H, s, H-24), 0.94 (3H, s, H-23), 0.86 (3H, s, H-26), 0.84 (3H, s, H-28), 0.78 (3H, s, H-27).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ_{C} 174.4 (C-1'), 151.1 (C-20), 109.5 (C-29), 80.8 (C-3), 55.6 (C-5), 50.5 (C-9), 48.5 (C-18), 48.2 (C-19), 43.2 (C-17), 43.0 (C-14), 41.0 (C-8), 40.2 (C-22), 38.6 (C-4), 38.2 (C-13), 38.0 (C-1), 37.3 (C-10), 35.8 (C-16), 34.4 (C-7), 29.8 (C-21), 28.2 (C-23), 28.1 (C-2), 28.0 (C-2'), 27.6 (C-15), 25.3 (C-12), 21.1 (C-11), 19.4 (C-30), 18.4 (C-6), 18.2 (C-28), 16.7 (C-25), 16.3 (C-26), 16.1 (C-24), 14.7 (C-27), 9.1 (C-3').

3.3 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ 3-O-butanoyl lupeol (1c)



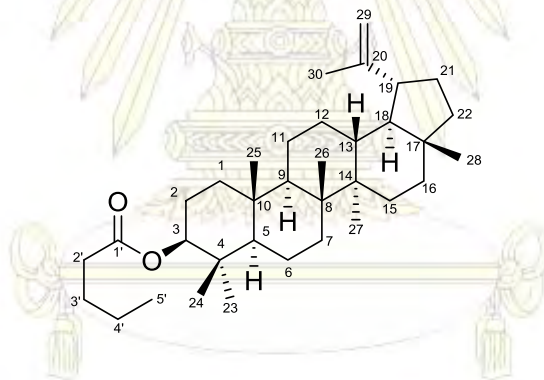
รูปที่ 3.3 โครงสร้างของ 3-O-butanoyl lupeol (1c)

3-O-butanoyl lupeol (1c)¹⁰: White Gum; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} 4.68 (1H, s, H-29a), 4.56 (1H, s, H-29b), 4.48 (1H, q, $J = 7.8$ Hz, H-3), 2.37 (1H, m, H-19), 2.27 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, H-2'), 1.68 (1H, s, H-30), 1.64 (1H, m, H-21a), 1.63 (2H, m, H-3'), 1.62 (1H, m, H-7a), 1.61 (1H, m, H-16a), 1.56 (1H, m, H-22a), 1.49 (1H, m, H-11a), 1.49 (1H, m, H-11a), 1.46 (1H, m, H-16b), 1.42 (1H, m, H-6a), 1.42 (1H, m, H-15a), 1.41 (1H, m, H-1a), 1.36 (1H, m, H-13), 1.35 (1H, m, H-15b), 1.34 (1H, m, H-9), 1.26 (1H, m, H-22b), 1.26

(2H, m, H-2), 1.24 (1H, m, H-21b), 1.20 (1H, m, H-7b), 1.20 (1H, m, H-5), 1.20 (1H, m, H-11b), 1.18 (1H, m, H-18), 1.17 (1H, m, H-6b), 1.09 (1H, m, H-12b), 0.97 (1H, m, H-1b), 0.95 (3H, t, $J = 7.4$ Hz, H-4'), 0.95 (3H, s, H-25), 0.94 (3H, s, H-24), 0.94 (3H, s, H-23), 0.85 (3H, s, H-26), 0.84 (3H, s, H-28), 0.79 (3H, s, H-27).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ_{C} 173.6 (C-1'), 151.1 (C-20), 109.5 (C-29), 80.8 (C-3), 55.6 (C-5), 50.5 (C-9), 48.5 (C-18), 48.2 (C-19), 43.2 (C-17), 43.0 (C-14), 41.0 (C-8), 40.2 (C-22), 38.6 (C-4), 38.3 (C-13), 38.0 (C-1), 37.3 (C-10), 36.9 (C-2'), 35.8 (C-16), 34.4 (C-7), 29.8 (C-21), 28.1 (C-23), 28.1 (C-2), 27.6 (C-15), 25.3 (C-12), 21.1 (C-11), 19.5 (C-30), 18.8 (C-3'), 18.4 (C-6), 18.4 (C-28), 16.7 (C-25), 16.3 (C-26), 16.2 (C-24), 14.7 (C-27), 14.0 (C-4').

3.4 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ 3-O-pentanoyl lupeol (1d)



รูปที่ 3.4 โครงสร้างของ 3-O-pentanoyl lupeol (1d)

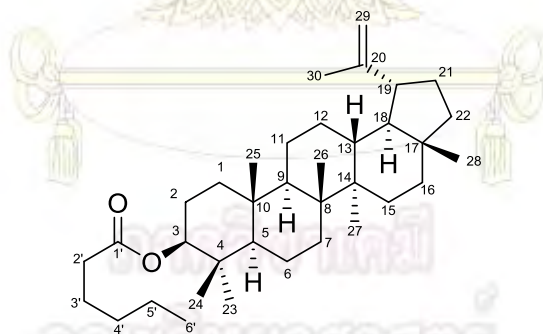
3-O-pentanoyl lupeol (1d): White Gum; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} 4.68 (1H, s, H-29a), 4.57 (1H, s, H-29b), 4.47 (1H, q, $J = 8.2$ Hz, H-3), 2.37 (1H, m, H-19), 2.29 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, H-2'), 1.68 (1H, s, H-30), 1.64 (1H, m, H-21a), 1.64 (1H, m, H-12a), 1.62 (1H, m, H-7a), 1.62 (2H, m, H-4'), 1.62 (1H, m, H-2a), 1.61 (1H, m, H-2b), 1.61 (1H, m, H-16a), 1.58 (1H, m, H-13), 1.56 (1H, m, H-22a), 1.52 (2H, m, H-3'), 1.49 (1H, m, H-11a), 1.45 (1H, m, H-16b), 1.44 (1H, m, H-15a), 1.42 (1H, m, H-6a), 1.41 (1H, m, H-1a), 1.35 (1H, m, H-15b), 1.34 (1H, m, H-9), 1.26 (1H, m, H-22b), 1.24 (1H, m, H-21b), 1.21 (1H,

m, H-5), 1.20 (1H, m, H-7b), 1.20 (1H, m, H-12b), 1.20 (1H, m, H-11b), 1.17 (1H, m, H-6b), 1.17 (1H, m, H-18), 1.03 (3H, s, H-25), 0.98 (1H, m, H-1b), 0.94 (3H, s, H-23), 0.93 (3H, s, H-24), 0.91 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, H-5'), 0.85 (3H, s, H-26), 0.84 (3H, s, H-28), 0.78 (3H, s, H-27).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ_{C} 173.8 (C-1'), 151.0 (C-20), 109.5 (C-29), 80.8 (C-3), 55.6 (C-5), 50.5 (C-9), 48.5 (C-18), 48.2 (C-19), 43.2 (C-17), 43.0 (C-14), 41.1 (C-8), 40.2 (C-22), 38.6 (C-1), 38.2 (C-13), 38.0 (C-4), 37.3 (C-10), 35.8 (C-16), 34.4 (C-7), 34.0 (C-2'), 29.8 (C-21), 28.1 (C-23), 27.6 (C-2), 27.4 (C-15), 25.5 (C-3'), 25.3 (C-12), 22.4 (C-4'), 21.1 (C-11), 19.4 (C-30), 19.3 (C-5'), 18.4 (C-6), 18.2 (C-28), 16.7 (C-25), 16.3 (C-26), 16.2 (C-24), 14.7 (C-27).

HRMS-ESI m/z [$\text{M}+\text{Na}^+$] calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{58}\text{O}_2\text{Na}$: 533.4335; found 533.4356.

3.5 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ 3-O-hexanoyl lupeol (1e)



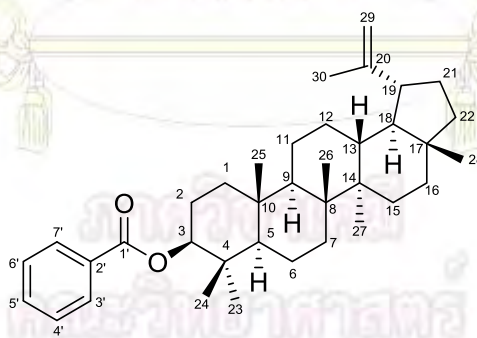
รูปที่ 3.5 โครงสร้างของ 3-O-hexanoyl lupeol (1e)

3-O-hexanoyl lupeol (1e)¹¹: White Solid; mp. 130-131 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} 4.68 (1H, s, H-29a), 4.56 (1H, s, H-29b), 4.48 (1H, q, $J = 7.8$ Hz, H-3), 2.38 (1H, m, H-19), 2.28 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, H-2'), 1.91 (2H, m, H-3'), 1.68 (1H, s, H-30), 1.64 (1H, m, H-21a), 1.62 (1H, m, H-7a), 1.61 (1H, m, H-16a), 1.56 (1H, m, H-22a), 1.49 (1H, m, H-

12a), 1.49 (1H, m, H-11a), 1.45 (1H, m, H-16b), 1.44 (1H, m, H-15a), 1.42 (1H, m, H-6a), 1.39 (1H, m, H-1a), 1.36 (1H, m, H-9), 1.36 (1H, m, H-13), 1.35 (1H, m, H-15b), 1.30 (2H, m, H-2), 1.26 (1H, m, H-22b), 1.24 (2H, m, H-5'), 1.24 (2H, m, H-4'), 1.24 (1H, m, H-21b), 1.20 (1H, m, H-7b), 1.20 (1H, m, H-5), 1.20 (1H, m, H-11b), 1.17 (1H, m, H-6b), 1.17 (1H, m, H-18), 1.09 (1H, m, H-12b), 1.03 (3H, s, H-24), 0.98 (1H, m, H-1b), 0.94 (3H, s, H-25), 0.94 (3H, s, H-23), 0.89 (3H, t, $J = 6.4$ Hz, H-6'), 0.84 (3H, s, H-26), 0.79 (3H, s, H-28), 0.78 (3H, s, H-27).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ_{C} 173.8 (C-1'), 151.1 (C-20), 109.5 (C-29), 80.8 (C-3), 55.6 (C-5), 50.5 (C-9), 48.5 (C-18), 48.2 (C-19), 43.2 (C-17), 43.0 (C-14), 41.0 (C-8), 40.2 (C-22), 38.6 (C-1), 38.2 (C-13), 38.0 (C-4), 37.3 (C-10), 35.8 (C-16), 34.8 (C-2'), 34.4 (C-7), 29.8 (C-21), 28.1 (C-23), 27.9 (C-4'), 27.6 (C-2), 25.3 (C-15), 25.0 (C-12), 24.8 (C-3'), 22.6 (C-5'), 21.1 (C-11), 19.4 (C-30), 18.3 (C-6), 18.2 (C-28), 16.7 (C-25), 16.3 (C-26), 16.2 (C-24), 14.7 (C-27), 14.0 (C-6').

3.6 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ 3-O-benzoyl lupeol (1f)



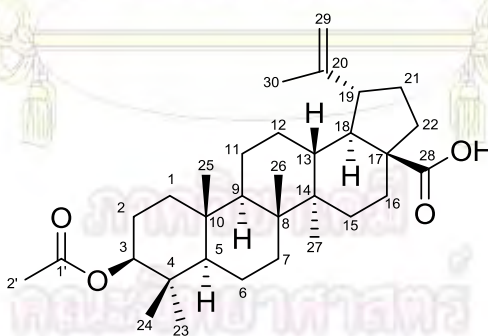
รูปที่ 3.6 โครงสร้างของ 3-O-benzoyl lupeol (1f)

3-O-benzoyl lupeol (1f)¹²: White Solid; mp. 190-193 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} 8.02 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-3', 7'), 7.55 (1H, t, $J = 7.1$ Hz, H-5'), 7.43 (1H, t, $J = 7.6$ Hz, H-4', 6'), 4.69 (1H, s, H-29a), 4.57 (1H, s, H-29b), 4.47 (1H, q, $J = 4.8$ Hz, H-3), 2.37 (1H, m, H-19), 1.68 (3H, s, H-30), 1.66 (1H, m, H-12a), 1.64 (1H, m, H-2a), 1.64 (1H, m,

H-21a), 1.64 (1H, m, H-15a), 1.63 (1H, m, H-7a), 1.63 (1H, m, H-2b), 1.61 (1H, m, H-16a), 1.58 (1H, m, H-13), 1.57 (1H, m, H-22a), 1.55 (1H, m, H-11a), 1.50 (1H, m, H-6a), 1.44 (1H, m, H-1a), 1.40 (1H, m, H-16b), 1.39 (1H, m, H-6b), 1.39 (1H, m, H-11b), 1.28 (1H, m, H-12b), 1.27 (1H, m, H-5), 1.26 (1H, m, H-22b), 1.25 (1H, m, H-9), 1.24 (1H, m, H-21b), 1.21 (1H, m, H-7b), 1.18 (1H, m, H-18), 1.06 (1H, m, H-1b), 1.03 (3H, s, H-23), 1.03 (1H, m, H-15b), 0.94 (1H, m, H-25), 0.88 (3H, s, H-24), 0.85 (1H, m, H-26), 0.78 (3H, s, H-27), 0.77 (3H, s, H-28).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ_{C} 166.2 (C-1'), 151.1 (C-20), 133.3 (C-5'), 129.7 (C-7'), 129.7 (C-3'), 129.3 (C-2'), 128.7 (C-6'), 128.7 (C-4'), 109.5 (C-29), 80.8 (C-3), 55.6 (C-5), 50.5 (C-9), 48.4 (C-18), 48.1 (C-19), 43.2 (C-17), 43.0 (C-14), 41.0 (C-8), 40.1 (C-22), 38.5 (C-4), 38.2 (C-13), 38.0 (C-1), 37.0 (C-10), 35.7 (C-16), 34.4 (C-7), 30.0 (C-21), 28.2 (C-23), 28.2 (C-2), 27.6 (C-15), 25.3 (C-12), 21.1 (C-11), 19.4 (C-30), 18.3 (C-6), 18.2 (C-28), 16.7 (C-25), 16.3 (C-26), 16.1 (C-24), 14.7 (C-27).

3.7 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ 3-O-acetyl betulinic acid (2a)



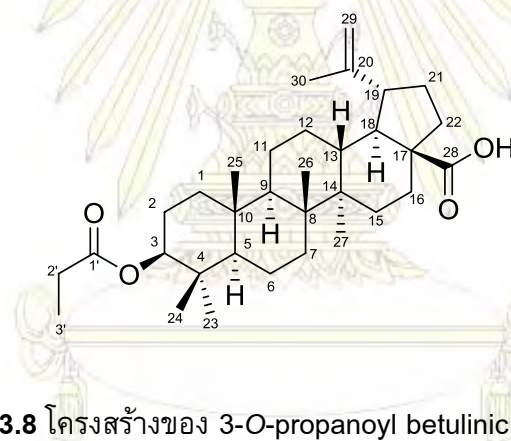
รูปที่ 3.7 โครงสร้างของ 3-O-acetyl betulinic acid (2a)

3-O-acetyl betulinic acid (2a)¹³: White Solid; mp. 288-290 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} 4.74 (1H, s, H-29a), 4.61 (1H, s, H-29b), 3.00 (1H, m, H-19), 2.17 (1H, m, H-16a), 2.03 (3H, s, H-2'), 1.97 (1H, m, H-18), 1.96 (1H, m, H-22a), 1.69 (3H, s, H-30), 1.67 (1H, m, H-12a), 1.66 (1H, m, H-21a), 1.61 (1H, m, H-11a), 1.57 (1H, m, H-13), 1.51 (1H,

m, H-22b), 1.46 (1H, m, H-16b), 1.40 (1H, m, H-15a), 1.36 (1H, m, H-21b), 1.23 (1H, m, H-12b), 1.20 (1H, m, H-11b), 1.03 (1H, m, H-9), 1.01 (1H, m, H-15b), 0.97 (3H, s, H-25), 0.93 (3H, s, H-23), 0.84 (3H, s, H-26), 0.84 (3H, s, H-24), 0.82 (3H, s, H-27).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ_{C} 181.8 (C-28), 170.8 (C-1'), 150.5 (C-20), 109.9 (C-29), 81.2 (C-3), 56.5 (C-17), 55.6 (C-5), 50.6 (C-9), 49.3 (C-18), 47.2 (C-19), 42.4 (C-14), 40.6 (C-8), 38.5 (C-13), 38.1 (C-1), 37.5 (C-4), 37.4 (C-22), 37.1 (C-10), 34.3 (C-7), 32.3 (C-16), 30.7 (C-21), 29.7 (C-15), 28.2 (C-23), 25.6 (C-12), 24.0 (C-2), 21.4 (C-2'), 21.1 (C-11), 18.3 (C-24), 18.2 (C-6), 16.3 (C-25), 16.2 (C-26), 14.8 (C-27), 1.69 (C-30).

3.8 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ 3-O-propanoyl betulinic acid (2b)



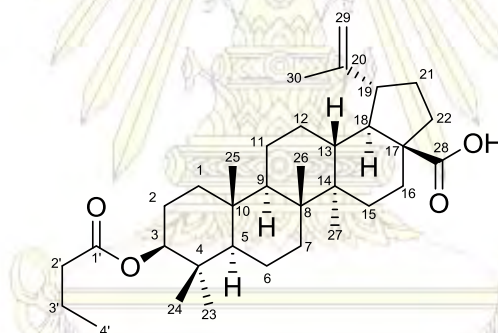
รูปที่ 3.8 โครงสร้างของ 3-O-propanoyl betulinic acid (2b)

3-O-propanoyl betulinic acid (2b)¹⁴: White Gum; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} 5.30 (1H, s, H-29a), 4.74 (1H, s, H-29b), 4.11 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, H-3), 3.02 (1H, m, H-19), 2.28 (1H, m, H-22a), 2.28 (2H, m, H-2'), 2.21 (1H, m, H-16a), 1.75 (1H, m, H-18), 1.74 (1H, m, H-2a), 1.74 (1H, m, H-12a), 1.69 (3H, s, H-30), 1.64 (1H, m, H-21a), 1.62 (1H, m, H-11a), 1.56 (1H, m, H-6a), 1.56 (1H, m, H-13), 1.48 (1H, m, H-22b), 1.46 (1H, m, H-16b), 1.43 (1H, m, H-1a), 1.40 (1H, m, H-15a), 1.39 (1H, m, H-2b), 1.38 (1H, m, H-21b), 1.32 (1H, m, H-7a), 1.25 (1H, m, H-6b), 1.25 (1H, m, H-12b), 1.25 (1H, m, H-11b), 1.09 (1H, m, H-7b), 1.08 (3H, m, H-3'), 1.07 (1H, m, H-9), 1.07 (1H, m, H-1b), 1.01 (1H, m, H-

15b), 1.00 (3H, s, H-25), 1.00 (3H, s, H-23), 0.97 (3H, s, H-24), 0.97 (1H, m, H-5), 0.93 (3H, s, H-26), 0.90 (3H, s, H-27).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ_{C} 181.5 (C-28), 174.5 (C-1'), 150.5 (C-20), 109.9 (C-29), 80.8 (C-3), 56.5 (C-17), 55.6 (C-5), 50.6 (C-9), 49.5 (C-18), 47.1 (C-19), 42.6 (C-14), 40.9 (C-8), 38.6 (C-1), 38.6 (C-4), 38.1 (C-13), 37.3 (C-22), 37.2 (C-10), 34.4 (C-7), 32.3 (C-16), 29.9 (C-15), 29.8 (C-21), 28.2 (C-23), 28.1 (C-2), 25.6 (C-12), 23.9 (C-2'), 21.0 (C-11), 19.5 (C-30), 18.3 (C-6), 16.7 (C-25), 16.3 (C-24), 16.2 (C-26), 14.8 (C-27), 9.5 (C-3').

3.9 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ 3-O-butanoyl betulinic acid (2c)



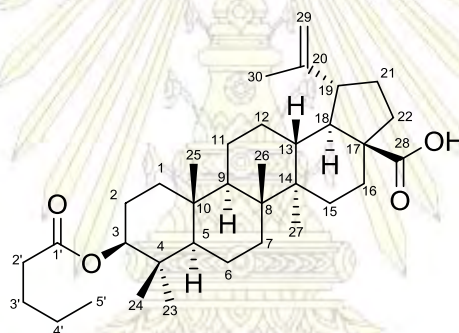
รูปที่ 3.9 โครงสร้างของ 3-O-butanoyl betulinic acid (2c)

3-O-butanoyl betulinic acid (2c)¹³: White Solid; mp. 265-269 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} 4.74 (1H, s, H-29a), 4.61 (1H, s, H-29b), 4.47 (1H, t, $J = 4.0$ Hz, H-3), 2.27 (2H, t, $J = 4.0$ Hz, H-2'), 1.99 (1H, m, H-19), 1.98 (1H, m, H-18), 1.98 (1H, m, H-16a), 1.96 (1H, m, H-2a), 1.69 (3H, s, H-30), 1.64 (2H, m, H-3'), 1.64 (1H, m, H-6a), 1.64 (1H, m, H-12a), 1.64 (1H, m, H-11a), 1.61 (1H, m, H-7a), 1.61 (1H, m, H-1a), 1.61 (1H, m, H-15a), 1.59 (1H, m, H-2b), 1.59 (1H, m, H-22a), 1.59 (1H, m, H-16b), 1.49 (1H, m, H-21a), 1.38 (1H, m, H-12b), 1.38 (1H, m, H-11b), 1.32 (1H, m, H-22b), 1.29 (1H, m, H-7b), 1.29 (1H, m, H-6b), 1.29 (1H, m, H-21b), 1.29 (1H, m, H-1b), 1.29 (1H, m, H-15b), 1.06 (1H, m, H-13), 1.00 (3H, s, H-24), 0.96 (3H, s, H-25), 0.95 (3H, t, $J = 4.0$ Hz, H-4'), 0.95 (1H, t, $J =$

8.0 Hz, H-9), 0.95 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, H-5), 0.88 (3H, s, H-23), 0.86 (3H, s, H-27), 0.86 (3H, s, H-26).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ_{C} 173.7 (C-1'), 150.5 (C-20), 109.9 (C-29), 80.8 (C-3), 56.5 (C-17), 55.6 (C-5), 50.6 (C-9), 49.5 (C-18), 47.1 (C-19), 42.6 (C-14), 40.9 (C-8), 38.6 (C-1), 38.0 (C-4), 37.3 (C-13), 37.2 (C-22), 36.9 (C-10), 35.4 (C-2'), 34.4 (C-7), 32.3 (C-16), 30.7 (C-15), 29.9 (C-21), 28.1 (C-23), 25.6 (C-12), 23.9 (C-11), 21.1 (C-6), 19.5 (C-30), 18.8 (C-3'), 18.3 (C-2), 16.7 (C-25), 16.3 (C-26), 16.2 (C-24), 14.8 (C-27), 13.9 (C-4').

3.10 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ 3-O-pentanoyl betulinic acid (2d)



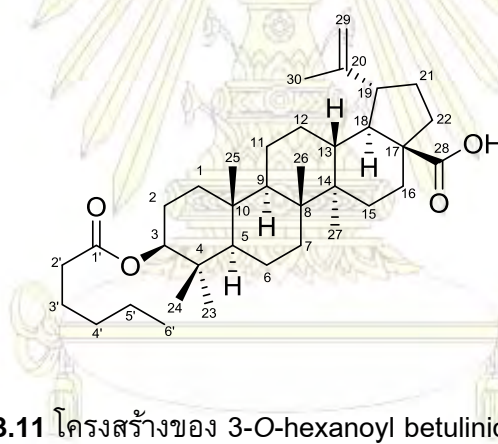
รูปที่ 3.10 โครงสร้างของ 3-O-pentanoyl betulinic acid (2d)

3-O-pentanoyl betulinic acid (2d)¹⁴: White Solid; mp. 259-261 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} 4.74 (1H, s, H-29a), 4.61 (1H, s, H-29b), 4.47 (1H, m, H-3), 3.00 (1H, m, H-19), 2.55 (1H, m, H-2a'), 2.20 (1H, m, H-2b'), 2.18 (1H, m, H-16a), 2.15 (1H, m, H-2a), 1.96 (1H, m, H-22a), 1.89 (1H, m, H-12b), 1.76 (1H, m, H-12a), 1.68 (3H, s, H-30), 1.61 (1H, m, H-21a), 1.61 (1H, m, H-13), 1.60 (1H, m, H-11a), 1.58 (1H, m, H-6a), 1.56 (1H, m, H-18), 1.53 (1H, m, H-22b), 1.51 (1H, m, H-1a), 1.49 (2H, m, H-3'), 1.49 (1H, m, H-16b), 1.41 (1H, m, H-2b), 1.41 (1H, m, H-15a), 1.36 (1H, m, H-21b), 1.32 (1H, m, H-7a), 1.29 (1H, m, H-4a'), 1.23 (1H, m, H-6b), 1.20 (1H, m, H-11b), 1.18 (1H, m, H-4b'), 1.06 (1H, m, H-9), 1.06 (1H, m, H-7b), 1.06 (1H, m, H-1b), 1.00 (1H, m, H-15b), 0.97 (3H, s, H-25),

0.91 (3H, t, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 0.91 (1H, m, H-5), 0.89 (3H, s, H-23), 0.85 (3H, s, H-24), 0.83 (3H, s, H-27), 0.83 (3H, s, H-26).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ_{C} 182.0 (C-28), 173.9 (C-1'), 150.5 (C-20), 109.9 (C-29), 80.8 (C-3), 56.6 (C-17), 55.6 (C-5), 50.6 (C-9), 49.5 (C-18), 47.1 (C-19), 42.6 (C-14), 40.9 (C-8), 38.6 (C-4), 38.6 (C-1), 38.0 (C-13), 37.3 (C-22), 37.2 (C-10), 34.7 (C-7), 34.4 (C-2'), 32.3 (C-16), 30.8 (C-15), 29.9 (C-21), 28.1 (C-23), 27.4 (C-2), 25.6 (C-3'), 23.9 (C-12), 22.4 (C-11), 21.0 (C-4'), 19.5 (C-30), 18.3 (C-6), 16.7 (C-25), 16.3 (C-24), 16.2 (C-26), 14.8 (C-27), 13.8 (C-5').

3.11 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ 3-O-hexanoyl betulinic acid (2e)



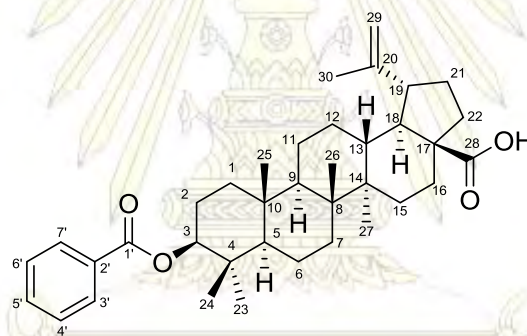
รูปที่ 3.11 โครงสร้างของ 3-O-hexanoyl betulinic acid (2e)

3-O-hexanoyl betulinic acid (2e)¹⁵: White Gum; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} 4.74 (1H, s, H-29a), 4.61 (1H, s, H-29b), 4.47 (1H, m, H-3), 2.98 (1H, m, H-19), 2.23 (2H, m, H-2'), 2.19 (1H, m, H-16a), 1.97 (1H, m, H-22a), 1.97 (1H, m, H-18), 1.92 (1H, m, H-3a'), 1.84 (1H, m, H-2a), 1.76 (1H, m, H-12a), 1.69 (3H, s, H-30), 1.66 (1H, m, H-21a), 1.62 (1H, m, H-11a), 1.60 (1H, m, H-6a), 1.58 (1H, m, H-13), 1.53 (1H, m, H-3b'), 1.49 (1H, m, H-22b), 1.49 (1H, m, H-1a), 1.47 (1H, m, H-16b), 1.41 (1H, m, H-2b), 1.41 (1H, m, H-15a), 1.33 (1H, m, H-21b), 1.31 (1H, m, H-7a), 1.29 (1H, m, H-12b), 1.25 (1H, m, H-5a'), 1.23 (1H, m, H-5b'), 1.22 (1H, m, H-4a'), 1.20 (1H, m, H-6b), 1.20 (1H, m, H-11b), 1.12 (1H, m, H-4b'), 1.12 (1H, m, H-1b), 1.08 (1H, m, H-7b), 1.06 (1H, m, H-9), 1.02 (1H, m,

H-15b), 0.97 (3H, s, H-24), 0.97 (1H, m, H-5), 0.93 (3H, s, H-25), 0.91 (3H, m, H-6'), 0.89 (3H, s, H-23), 0.83 (3H, s, H-26), 0.75 (3H, s, H-27).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ_{C} 182.0 (C-28), 173.9 (C-1'), 150.5 (C-20), 109.9 (C-29), 80.8 (C-3), 56.6 (C-17), 55.6 (C-5), 50.6 (C-9), 49.5 (C-18), 47.1 (C-19), 42.6 (C-14), 40.9 (C-8), 38.6 (C-4), 38.6 (C-1), 38.0 (C-13), 37.3 (C-22), 37.2 (C-10), 34.7 (C-7), 34.4 (C-2'), 32.3 (C-16), 30.8 (C-15), 29.9 (C-21), 28.1 (C-23), 27.4 (C-2), 25.6 (C-3'), 23.9 (C-12), 22.4 (C-11), 21.0 (C-4'), 19.5 (C-30), 18.3 (C-6), 16.7 (C-25), 16.3 (C-24), 16.2 (C-26), 14.8 (C-27), 14.0 (C-6'), 13.8 (C-5').

3.12 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ 3-O-benzoyl betulinic acid (2f)



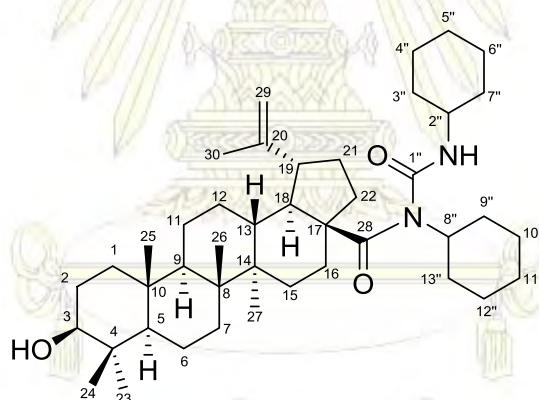
รูปที่ 3.12 โครงสร้างของ 3-O-benzoyl betulinic acid (2f)

3-O-benzoyl betulinic acid (2f)¹⁴: White Gum; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} 8.04 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3', 7'), 7.54 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 7.45 (2H, t, $J = 8.0$ Hz, H-4', 6'), 4.75 (1H, s, H-29a), 4.62 (1H, s, H-29b), 4.12 (1H, m, H-3), 2.25 (1H, m, H-19), 2.21 (1H, m, H-22a), 2.21 (1H, m, H-16a), 2.00 (1H, m, H-2a), 1.74 (1H, m, H-12a), 1.71 (1H, m, H-18), 1.70 (3H, s, H-30), 1.69 (1H, m, H-13), 1.64 (1H, m, H-6a), 1.64 (1H, m, H-11a), 1.56 (1H, m, H-2b), 1.55 (1H, m, H-22b), 1.54 (1H, m, H-16b), 1.51 (1H, m, H-21a), 1.51 (1H, m, H-1a), 1.42 (1H, m, H-15a), 1.34 (1H, m, H-7a), 1.29 (1H, m, H-21b), 1.22 (1H, m, H-6b), 1.22 (1H, m, H-12b), 1.22 (1H, m, H-11b), 1.09 (1H, m, H-7b), 1.07 (1H, m, H-1b),

1.06 (1H, m, H-9), 1.02 (1H, m, H-15b), 1.00 (3H, s, H-24), 1.00 (1H, m, H-5), 0.98 (3H, s, H-25), 0.93 (3H, s, H-26), 0.93 (3H, s, H-23), 0.90 (3H, s, H-27).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ_{C} 182.4 (C-28), 166.4 (C-1'), 150.5 (C-20), 132.8 (C-5'), 129.7 (C-7'), 129.7 (C-3'), 128.6 (C-6'), 128.6 (C-2'), 128.4 (C-4'), 109.8 (C-29), 84.8 (C-3), 56.6 (C-17), 50.6 (C-9), 49.4 (C-18), 47.1 (C-19), 42.6 (C-14), 40.9 (C-8), 38.8 (C-5), 38.6 (C-13), 38.6 (C-1), 38.4 (C-4), 37.4 (C-22), 37.2 (C-10), 34.4 (C-7), 32.3 (C-16), 30.7 (C-21), 29.7 (C-15), 28.3 (C-23), 25.6 (C-12), 23.9 (C-2), 21.1 (C-11), 19.5 (C-30), 18.3 (C-6), 16.9 (C-24), 16.3 (C-25), 16.2 (C-26), 14.8 (C-27).

3.13 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ 28-N-cyclohexyl-N-[(cyclohexylamino)carbonyl] betulinic acid (2g)



รูปที่ 3.13 โครงสร้างของ 28-N-cyclohexyl-N-[(cyclohexylamino)carbonyl] betulinic acid (2g)

28-N-cyclohexyl-N-[(cyclohexylamino)carbonyl] betulinic acid (2g): White Solid; mp. 193-194 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} 6.34 (1H, br, NH), 4.71 (1H, s, H-29a), 4.57 (1H, s, H-29b), 4.06 (1H, m, H-3), 4.04 (1H, br, H-8''), 3.66 (1H, br, H-2''), 3.11 (1H, m, H-19), 2.41 (1H, m, H-16a), 2.20 (1H, m, H-2a), 2.01 (1H, m, H-18), 1.90 (1H, m, H-13), 1.82 (1H, m, H-22a), 1.77 (2H, m, H-3''), 1.69 (1H, m, H-21a), 1.68 (3H, s, H-30), 1.67

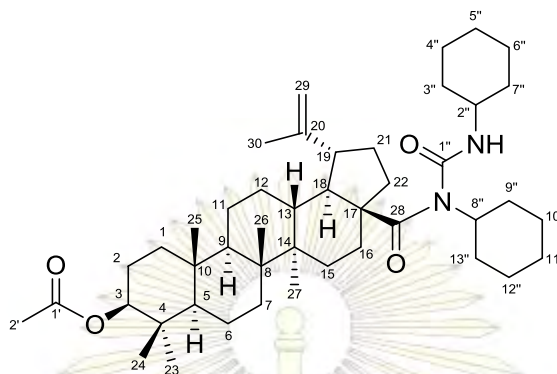
(2H, m, H-9"), 1.65 (2H, m, H-4"), 1.65 (2H, m, H-10"), 1.63 (2H, m, H-7"), 1.63 (1H, m, H-15a), 1.61 (2H, m, H-5"), 1.60 (2H, m, H-11"), 1.60 (1H, m, H-7a), 1.60 (2H, m, H-12"), 1.56 (1H, m, H-12a), 1.55 (2H, m, H-6"), 1.50 (1H, m, H-11a), 1.48 (1H, m, H-2b), 1.45 (1H, m, H-1a), 1.44 (1H, m, H-22b), 1.40 (1H, m, H-6a), 1.38 (2H, m, H-13"), 1.37 (1H, m, H-16b), 1.36 (2H, m, H-3"), 1.34 (1H, m, H-9), 1.27 (1H, m, H-21b), 1.26 (1H, m, H-11b), 1.25 (1H, m, H-5), 1.19 (1H, m, H-7b), 1.19 (2H, m, H-10"), 1.18 (2H, m, H-7"), 1.17 (2H, m, H-4"), 1.16 (2H, m, H-12"), 1.15 (1H, m, H-6b), 1.14 (1H, m, H-12b), 1.09 (2H, m, H-9"), 1.08 (1H, m, H-15b), 1.02 (2H, m, H-6"), 1.01 (1H, m, H-1b), 0.97 (3H, s, H-24), 0.95 (3H, s, H-25), 0.91 (3H, s, H-23), 0.82 (3H, s, H-26), 0.81 (2H, m, H-13"), 0.74 (3H, s, H-27).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ_{C} 176.6 (C-28), 155.1 (C-1"), 151.5 (C-20), 109.2 (C-29), 79.2 (C-3), 58.4 (C-8"), 56.6 (C-17), 55.6 (C-5), 54.0 (C-2"), 50.9 (C-9), 49.9 (C-18), 49.3 (C-19), 42.3 (C-14), 40.9 (C-8), 38.9 (C-4), 38.9 (C-1), 37.9 (C-13), 36.9 (C-22), 36.9 (C-10), 34.3 (C-7), 33.0 (C-9"), 33.0 (C-13"), 32.2 (C-7"), 32.2 (C-3"), 31.7 (C-16), 30.6 (C-21), 30.5 (C-15), 28.1 (C-23), 27.6 (C-2), 26.6 (C-12), 25.9 (C-5"), 25.8 (C-11"), 25.7 (C-12"), 25.7 (C-10"), 24.9 (C-6"), 24.9 (C-4"), 21.2 (C-30), 21.2 (C-11), 18.4 (C-6), 16.4 (C-24), 16.3 (C-25), 15.5 (C-26), 15.2 (C-27).

HRMS-ESI m/z [$\text{M}+\text{Na}^+$] calcd for $\text{C}_{43}\text{H}_{70}\text{N}_2\text{O}_3\text{Na}$: 685.5284; found 685.5288.

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**3.14 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ 28-N-cyclohexyl-N-
[(cyclohexylamino)carbonyl]-3-O-acetyl betulinic acid (2h)**



รูปที่ 3.14 โครงสร้างของ 28-N-cyclohexyl-N-[(cyclohexylamino)carbonyl]-3-O-acetyl betulinic acid (2h)

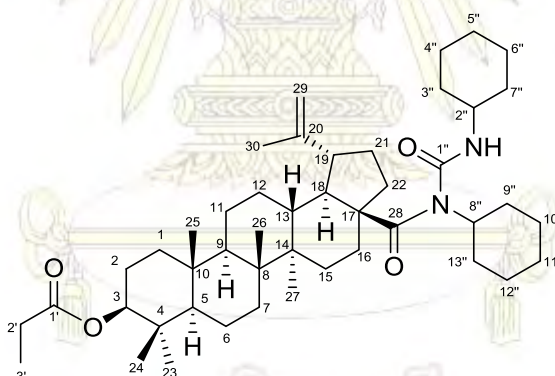
28-N-cyclohexyl-N-[(cyclohexylamino)carbonyl]-3-O-acetyl betulinic acid (2h):

White Gum; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} 5.42 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, NH), 4.72 (1H, s, H-29a), 4.57 (1H, s, H-29b), 4.46 (1H, m, H-3), 4.04 (1H, br, H-8''), 3.70 (1H, br, H-2''), 3.09 (1H, m, H-19), 2.33 (1H, m, H-16a), 2.11 (1H, m, H-2a), 2.03 (3H, s, H-2'), 1.96 (1H, m, H-22a), 1.96 (1H, m, H-18), 1.87 (1H, m, H-13), 1.86 (2H, m, H-7''), 1.77 (1H, m, H-3a''), 1.68 (1H, m, H-6a''), 1.67 (3H, s, H-30), 1.66 (1H, m, H-15a), 1.65 (1H, m, H-4a''), 1.62 (1H, m, H-9a''), 1.62 (1H, m, H-12a''), 1.62 (1H, m, H-10a''), 1.61 (2H, m, H-5''), 1.60 (2H, m, H-11''), 1.58 (1H, m, H-7a), 1.53 (1H, m, H-12a), 1.51 (1H, m, H-21a), 1.50 (1H, m, H-22b), 1.49 (1H, m, H-11a), 1.48 (1H, m, H-16b), 1.44 (1H, m, H-13a''), 1.41 (1H, m, H-6a), 1.41 (1H, m, H-1a), 1.34 (1H, m, H-3b''), 1.31 (1H, m, H-9), 1.30 (2H, m, H-7''), 1.27 (1H, m, H-21b), 1.26 (1H, m, H-2b), 1.25 (1H, m, H-10b''), 1.22 (1H, m, H-6b''), 1.21 (1H, m, H-15b), 1.21 (1H, m, H-11b), 1.20 (1H, m, H-5), 1.18 (1H, m, H-7b), 1.18 (1H, m, H-4b''), 1.18 (1H, m, H-12b''), 1.14 (1H, m, H-6b), 1.12 (1H, m, H-12b), 0.96 (1H, m, H-1b), 0.95 (3H, s, H-24), 0.93 (3H, s, H-25), 0.91 (1H, m, H-13b''), 0.86 (1H, m, H-9b''), 0.83 (3H, s, H-27), 0.83 (3H, s, H-23), 0.82 (3H, s, H-26).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ_{C} 175.5 (C-28), 171.2 (C-1'), 155.3 (C-1''), 151.1 (C-20), 109.5 (C-29), 81.1 (C-3), 58.4 (C-17), 55.6 (C-5), 53.9 (C-8''), 50.7 (C-9), 49.9 (C-18), 47.9 (C-2''), 47.8 (C-19), 42.6 (C-14), 41.1 (C-8), 38.6 (C-13), 37.9 (C-4), 37.8 (C-1), 37.2 (C-22), 37.1 (C-10), 34.3 (C-7), 32.9 (C-9''), 32.9 (C-13''), 32.2 (C-7''), 32.2 (C-3''), 31.1 (C-16), 30.6 (C-21), 29.6 (C-15), 28.2 (C-23), 26.6 (C-12), 25.9 (C-5''), 25.6 (C-11''), 25.0 (C-12''), 25.0 (C-10''), 23.9 (C-6''), 23.9 (C-4''), 23.9 (C-2), 21.5 (C-2'), 21.3 (C-11), 19.6 (C-30), 18.3 (C-24), 18.2 (C-6), 16.3 (C-25), 16.2 (C-26), 5.2 (C-27).

HRMS-ESI m/z [$\text{M}+\text{Na}^+$] calcd for $\text{C}_{45}\text{H}_{72}\text{N}_2\text{O}_4\text{Na}$: 727.5390; found 727.5399.

3.15 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ **28-N-cyclohexyl-N-[(cyclohexylamino)carbonyl]-3-O-propanoyl betulinic acid (2i)**



รูปที่ 3.15 โครงสร้างของ 28-N-cyclohexyl-N-[(cyclohexylamino)carbonyl]-3-O-propanoyl betulinic acid (2i)

28-N-cyclohexyl-N-[(cyclohexylamino)carbonyl]-3-O-propanoyl betulinic acid (2i):

White Gum; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} 4.72 (1H, s, H-29a), 4.58 (1H, s, H-29b), 4.46 (1H, m, H-3), 3.42 (1H, m, H-2''), 3.10 (1H, m, H-8''), 2.31 (2H, m, H-2'), 2.31 (1H, m, H-19), 2.16 (1H, m, H-2a), 2.00 (1H, m, H-16a), 1.89 (1H, m, H-18), 1.88 (1H, m, H-22a), 1.87 (1H, m, H-7a''), 1.77 (1H, m, H-3a''), 1.67 (3H, s, H-30), 1.67 (1H, m, H-6a''), 1.65

(1H, m, H-4a''), 1.63 (1H, m, H-12a''), 1.62 (1H, m, H-10a''), 1.61 (2H, m, H-5''), 1.61 (1H, m, H-21a), 1.60 (1H, m, H-16b), 1.58 (2H, m, H-11''), 1.58 (1H, m, H-9a''), 1.57 (1H, m, H-7a), 1.54 (1H, m, H-12a), 1.50 (1H, m, H-13), 1.49 (1H, m, H-13a''), 1.49 (1H, m, H-11a), 1.47 (1H, m, H-22b), 1.44 (1H, m, H-15a), 1.42 (1H, m, H-1a), 1.41 (1H, m, H-6a), 1.36 (1H, m, H-9), 1.35 (1H, m, H-3b''), 1.31 (1H, m, H-7b''), 1.29 (1H, m, H-15b), 1.26 (1H, m, H-2b), 1.25 (1H, m, H-5), 1.22 (1H, m, H-6b''), 1.20 (1H, m, H-10b''), 1.18 (1H, m, H-4b''), 1.18 (1H, m, H-12b''), 1.17 (1H, m, H-7b), 1.14 (1H, m, H-6b), 1.14 (1H, m, H-11b), 1.13 (3H, t, $J = 8.0$ Hz, H-3'), 1.12 (1H, m, H-21b), 1.10 (1H, m, H-12b), 1.00 (1H, m, H-1b), 0.96 (3H, s, H-24), 0.95 (3H, s, H-25), 0.93 (3H, s, H-23), 0.90 (3H, s, H-26), 0.89 (1H, m, H-9b''), 0.89 (1H, m, H-13b''), 0.82 (3H, s, H-27).

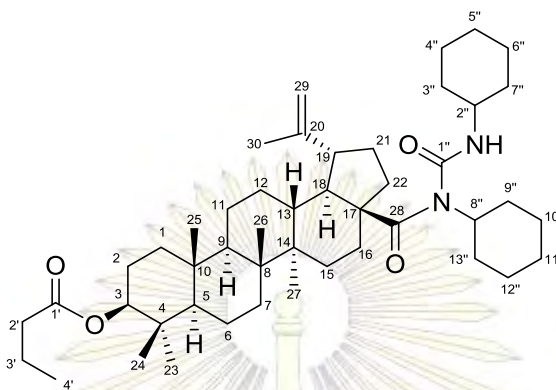
^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ_{C} 175.3 (C-28), 174.4 (C-1'), 155.2 (C-1''), 151.1 (C-20), 109.7 (C-29), 9.4 (C-3'), 80.8 (C-3), 56.6 (C-17), 55.7 (C-5), 54.0 (C-8''), 50.6 (C-9), 49.9 (C-18), 47.8 (C-2''), 47.1 (C-19), 42.6 (C-14), 41.0 (C-8), 38.6 (C-1), 38.0 (C-13), 37.8 (C-4), 37.3 (C-22), 37.3 (C-10), 34.3 (C-7), 33.0 (C-9''), 33.0 (C-13''), 32.2 (C-7''), 32.2 (C-3''), 31.1 (C-16), 30.6 (C-21), 28.2 (C-2''), 28.1 (C-23), 26.6 (C-12), 25.9 (C-15), 25.8 (C-5''), 25.8 (C-11''), 25.1 (C-12''), 25.1 (C-10''), 24.9 (C-2), 23.9 (C-6''), 23.9 (C-4''), 21.1 (C-11), 19.6 (C-30), 18.3 (C-6), 16.7 (C-24), 16.3 (C-25), 16.2 (C-26), 14.8 (C-27).

HRMS-ESI m/z [$\text{M}+\text{Na}^+$] calcd for $\text{C}_{46}\text{H}_{74}\text{N}_2\text{O}_4\text{Na}$: 741.5546; found 741.5540.

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.16 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ 28-N-cyclohexyl-N-

[(cyclohexylamino)carbonyl]-3-O-butanoyl betulinic acid (2j)



รูปที่ 3.16 โครงสร้างของ 28-N-cyclohexyl-N-[(cyclohexylamino)carbonyl]-3-O-butanoyl betulinic acid (2j)

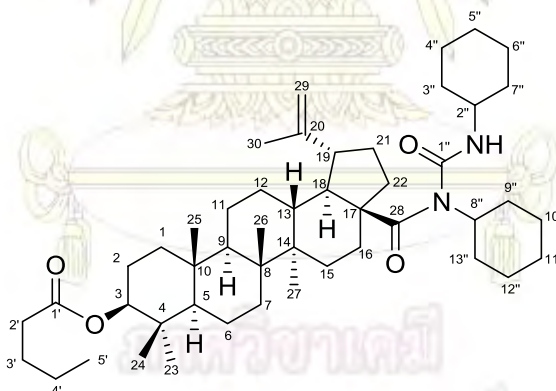
28-N-cyclohexyl-N-[(cyclohexylamino)carbonyl]-3-O-butanoyl betulinic acid (2j):

White Gum; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} 4.72 (1H, s, H-29a), 4.59 (1H, s, H-29b), 4.47 (1H, m, H-3), 3.38 (1H, m, H-2''), 3.07 (1H, m, H-8''), 2.28 (2H, t, $J = 8.0$ Hz, H-2'), 2.17 (1H, m, H-2a), 2.02 (1H, m, H-16a), 1.98 (1H, m, H-3a'), 1.98 (1H, m, H-19), 1.93 (1H, m, H-22a), 1.92 (1H, m, H-18), 1.78 (1H, m, H-7a''), 1.78 (1H, m, H-3a''), 1.69 (3H, s, H-30), 1.64 (1H, m, H-6a''), 1.64 (1H, m, H-4a''), 1.63 (1H, m, H-12a''), 1.62 (1H, m, H-21a), 1.62 (1H, m, H-16b), 1.62 (1H, m, H-10a''), 1.60 (1H, m, H-3b'), 1.59 (2H, m, H-5''), 1.59 (2H, m, H-11''), 1.59 (1H, m, H-9a''), 1.56 (1H, m, H-7a), 1.53 (1H, m, H-12a), 1.49 (1H, m, H-13a''), 1.48 (1H, m, H-13), 1.48 (1H, m, H-11a), 1.47 (1H, m, H-22b), 1.46 (1H, m, H-1a), 1.42 (1H, m, H-6a), 1.42 (1H, m, H-15a), 1.35 (1H, m, H-9), 1.35 (1H, m, H-7b''), 1.35 (1H, m, H-3b''), 1.26 (1H, m, H-2b), 1.25 (1H, m, H-5), 1.21 (1H, m, H-15b), 1.19 (1H, m, H-10b''), 1.18 (1H, m, H-7b), 1.18 (1H, m, H-6b''), 1.18 (1H, m, H-4b''), 1.18 (1H, m, H-12b''), 1.15 (1H, m, H-11b), 1.12 (1H, m, H-6b), 1.12 (1H, m, H-12b), 1.10 (1H, m, H-21b), 1.00 (1H, m, H-1b), 0.97 (3H, s, H-24), 0.94 (3H, m, H-4'), 0.94 (1H, m, H-13b''), 0.93 (1H, m, H-9b''), 0.91 (3H, s, H-25), 0.85 (3H, s, H-23), 0.84 (3H, s, H-26), 0.83 (3H, s, H-27).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ_{C} 176.4 (C-28), 173.8 (C-1'), 155.4 (C-1''), 151.4 (C-20), 109.3 (C-29), 80.8 (C-3), 56.7 (C-17), 55.7 (C-5), 54.1 (C-8''), 50.8 (C-9), 50.0 (C-18), 49.9 (C-2''), 46.6 (C-19), 42.3 (C-14), 40.9 (C-8), 38.6 (C-1), 38.0 (C-13), 37.8 (C-4), 37.3 (C-22), 36.9 (C-10), 35.4 (C-2'), 34.4 (C-7), 33.4 (C-7''), 32.4 (C-3''), 32.3 (C-9''), 32.3 (C-13''), 31.5 (C-16), 30.6 (C-21), 29.7 (C-15), 28.1 (C-23), 26.6 (C-5''), 26.6 (C-12), 25.9 (C-6''), 25.9 (C-4''), 25.7 (C-11''), 25.0 (C-12''), 25.0 (C-10''), 22.4 (C-2), 21.2 (C-11), 19.6 (C-30), 18.4 (C-3'), 18.3 (C-6), 18.3 (C-24), 16.4 (C-25), 16.2 (C-26), 15.2 (C-27), 14.1 (C-4').

HRMS-ESI m/z $[\text{M}+\text{Na}^+]$ calcd for $\text{C}_{47}\text{H}_{77}\text{N}_2\text{O}_4\text{Na}$: 755.5703; found 755.5710.

3.17 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ 28-N-cyclohexyl-N- [(cyclohexylamino)carbonyl]-3-O-pentanoyl betulinic acid (2k)



รูปที่ 3.17 โครงสร้างของ 28-N-cyclohexyl-N-[(cyclohexylamino)carbonyl]-3-O-pentanoyl betulinic acid (2k)

28-N-cyclohexyl-N-[(cyclohexylamino)carbonyl]-3-O-pentanoyl betulinic acid (2k):

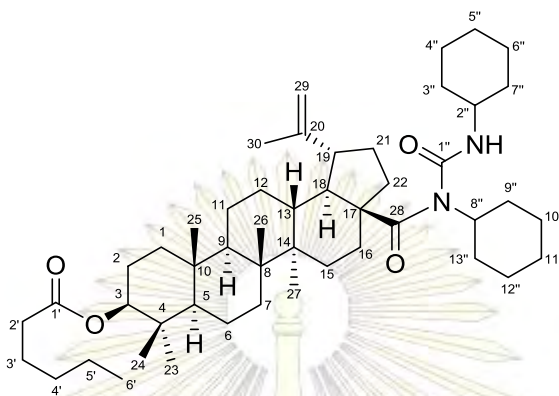
White Gum; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} 4.72 (1H, s, H-29a), 4.58 (1H, s, H-29b), 4.46 (1H, m, H-3), 3.08 (1H, m, H-8''), 3.05 (1H, m, H-2''), 2.47 (2H, m, H-2'), 2.29 (1H, m, H-19), 2.19 (1H, m, H-3a'), 2.19 (1H, m, H-16a), 1.93 (1H, m, H-5), 1.90 (1H, m, H-18), 1.82

(1H, m, H-22a), 1.75 (1H, m, H-2a), 1.74 (1H, m, H-12a), 1.69 (3H, s, H-30), 1.68 (1H, m, H-21a), 1.64 (1H, m, H-6a''), 1.64 (1H, m, H-4a''), 1.62 (2H, m, H-10a''), 1.62 (1H, m, H-12a''), 1.62 (1H, m, H-11a), 1.60 (1H, m, H-7a''), 1.60 (1H, m, H-6a), 1.60 (1H, m, H-3b'), 1.60 (1H, m, H-3a''), 1.58 (1H, m, H-9a''), 1.56 (2H, m, H-5a''), 1.55 (1H, m, H-11a''), 1.48 (1H, m, H-22b), 1.48 (1H, m, H-1a), 1.48 (1H, m, H-13), 1.45 (1H, m, H-16b), 1.40 (1H, m, H-2b), 1.40 (1H, m, H-15a), 1.35 (1H, m, H-7b''), 1.35 (1H, m, H-3b''), 1.35 (1H, m, H-13a''), 1.34 (1H, m, H-11b''), 1.33 (1H, m, H-9b''), 1.33 (1H, m, H-7a), 1.32 (1H, m, H-5b''), 1.30 (1H, m, H-12b''), 1.30 (1H, m, H-10b''), 1.28 (1H, m, H-21b), 1.25 (1H, m, H-6b''), 1.25 (1H, m, H-4b''), 1.25 (1H, m, H-12b), 1.21 (1H, m, H-6b), 1.18 (1H, m, H-9), 1.18 (1H, m, H-13b''), 1.18 (1H, m, H-11b), 1.15 (2H, m, H-4'), 1.12 (1H, m, H-1b), 1.09 (1H, m, H-7b), 0.97 (3H, s, H-24), 0.96 (3H, s, H-25), 0.96 (1H, m, H-15b), 0.91 (3H, t, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 0.89 (3H, s, H-23), 0.84 (3H, s, H-26), 0.83 (3H, s, H-27).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ_{C} 155.4 (C-1''), 151.4 (C-20), 176.8 (C-28), 173.8 (C-1'), 109.3 (C-29), 80.7 (C-3), 58.3 (C-17), 55.6 (C-5), 53.9 (C-8''), 50.8 (C-9), 50.0 (C-2''), 49.8 (C-18), 46.6 (C-19), 42.3 (C-14), 41.0 (C-8), 38.5 (C-1), 38.0 (C-13), 37.8 (C-4), 37.3 (C-22), 36.9 (C-10), 34.7 (C-7), 34.4 (C-2'), 33.0 (C-9''), 33.0 (C-13''), 32.2 (C-7''), 32.2 (C-3''), 31.7 (C-16), 30.5 (C-21), 30.5 (C-15), 28.1 (C-23), 26.7 (C-12), 26.6 (C-3'), 25.9 (C-5''), 25.7 (C-11''), 24.9 (C-12''), 24.9 (C-10''), 23.9 (C-6''), 23.9 (C-4''), 23.9 (C-2), 22.4 (C-4'), 21.8 (C-11), 19.7 (C-30), 18.3 (C-6), 16.7 (C-24), 16.3 (C-25), 16.2 (C-26), 14.8 (C-27), 13.8 (C-5').

HRMS-ESI m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{48}\text{H}_{79}\text{N}_2\text{O}_4$: 747.6040; found 747.6026.

**3.18 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ 28-N-cyclohexyl-N-
[(cyclohexylamino)carbonyl]-3-O-hexanoyl betulinic acid (2I)**



รูปที่ 3.18 โครงสร้างของ 28-N-cyclohexyl-N-[(cyclohexylamino)carbonyl]-3-O-hexanoyl betulinic acid (2I)

28-N-cyclohexyl-N-[(cyclohexylamino)carbonyl]-3-O-hexanoyl betulinic acid (2I):

White Gum; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} 5.40 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, NH), 4.73 (1H, s, H-29a), 4.60 (1H, s, H-29b), 4.47 (1H, m, H-3), 4.04 (1H, br, H-8''), 3.70 (1H, br, H-2''), 3.10 (1H, m, H-19), 2.42 (1H, m, H-16a), 2.30 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, H-2'), 2.04 (1H, m, H-2a), 1.97 (1H, m, H-22a), 1.91 (1H, m, H-13), 1.90 (1H, m, H-18), 1.85 (2H, m, H-7''), 1.77 (2H, m, H-3''), 1.69 (3H, s, H-30), 1.69 (2H, m, H-6''), 1.66 (1H, m, H-15a), 1.65 (2H, m, H-4''), 1.62 (2H, m, H-12''), 1.62 (2H, m, H-10''), 1.59 (1H, m, H-7a), 1.58 (2H, m, H-11''), 1.58 (2H, m, H-3'), 1.57 (2H, m, H-5''), 1.57 (2H, m, H-9''), 1.57 (1H, m, H-21a), 1.54 (1H, m, H-12a), 1.49 (1H, m, H-22b), 1.49 (1H, m, H-16b), 1.49 (1H, m, H-11a), 1.44 (2H, m, H-13''), 1.41 (1H, m, H-1a), 1.37 (1H, m, H-6a), 1.36 (2H, m, H-5'), 1.34 (1H, m, H-9), 1.34 (2H, m, H-7''), 1.34 (2H, m, H-3''), 1.27 (1H, m, H-2b), 1.26 (1H, m, H-21b), 1.22 (2H, m, H-6''), 1.22 (1H, m, H-5), 1.22 (1H, m, H-15b), 1.21 (1H, m, H-11b), 1.20 (2H, m, H-10''), 1.19 (1H, m, H-7b), 1.18 (2H, m, H-4''), 1.18 (2H, m, H-4'), 1.18 (2H, m, H-12''), 1.14 (1H, m, H-6b), 1.12 (1H, m, H-12b), 0.97 (3H, s, H-24), 0.97 (1H, m, H-1b), 0.95 (3H, s, H-25), 0.91 (2H, m, H-13''), 0.90 (3H, m, H-6'), 0.86 (2H, m, H-9''), 0.85 (3H, s, H-23), 0.83 (3H, s, H-27), 0.83 (3H, s, H-26).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ_{C} 182.6 (C-28), 173.7 (C-1'), 153.2 (C-1''), 151.0 (C-20), 110.0 (C-29), 80.6 (C-3), 58.3 (C-17), 55.3 (C-5), 53.4 (C-8''), 50.6 (C-9), 49.0 (C-18), 48.8 (C-2''), 47.8 (C-19), 42.7 (C-14), 41.1 (C-8), 38.6 (C-1), 38.0 (C-13), 37.8 (C-4), 37.3 (C-22), 37.3 (C-10), 34.8 (C-2'), 34.4 (C-7), 33.0 (C-9''), 33.0 (C-13''), 32.2 (C-7''), 32.0 (C-3''), 31.2 (C-16), 30.6 (C-21), 30.0 (C-15), 28.1 (C-4'), 27.8 (C-23), 26.7 (C-5''), 26.7 (C-12), 25.7 (C-11''), 25.0 (C-10''), 24.9 (C-3'), 24.9 (C-12''), 24.0 (C-6''), 24.0 (C-4''), 23.9 (C-2), 22.6 (C-5'), 21.3 (C-11), 19.9 (C-30), 18.4 (C-6), 17.1 (C-24), 16.3 (C-25), 16.2 (C-26), 14.8 (C-27), 14.0 (C-6').

HRMS-ESI m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{49}\text{H}_{81}\text{N}_2\text{O}_4$: 761.6196; found 761.6150.

3.19 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสเบื้องต้นของสิ่งสกัดเมทานอล

ตารางที่ 3.1 ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของสิ่งสกัดเมทานอล และสาร

มาตรฐาน acarbose

	IC ₅₀ (mg/mL)
	Barker's yeast
Crude	
MeOH	0.065
Fraction	
A	0.27
B	0.19
C	0.081
D	0.052
E	0.094
F	0.43
G	0.14
Acarbose	0.34

จากผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสเบื้องต้นของสิ่งสกัดเมทานอล พบว่าแฟรคชัน D มีฤทธิ์ในการยับยั้ง 0.052 mg/mL (ดีกว่าแฟรคชันอื่น ๆ) รวมถึงสารมาตรฐาน acarbose (0.34 mg/mL) จึงนำแฟรคชัน D ไปทำการแยกสารบริสุทธิ์ต่อไป

3.20 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของสารที่แยกได้และอนุพันธ์

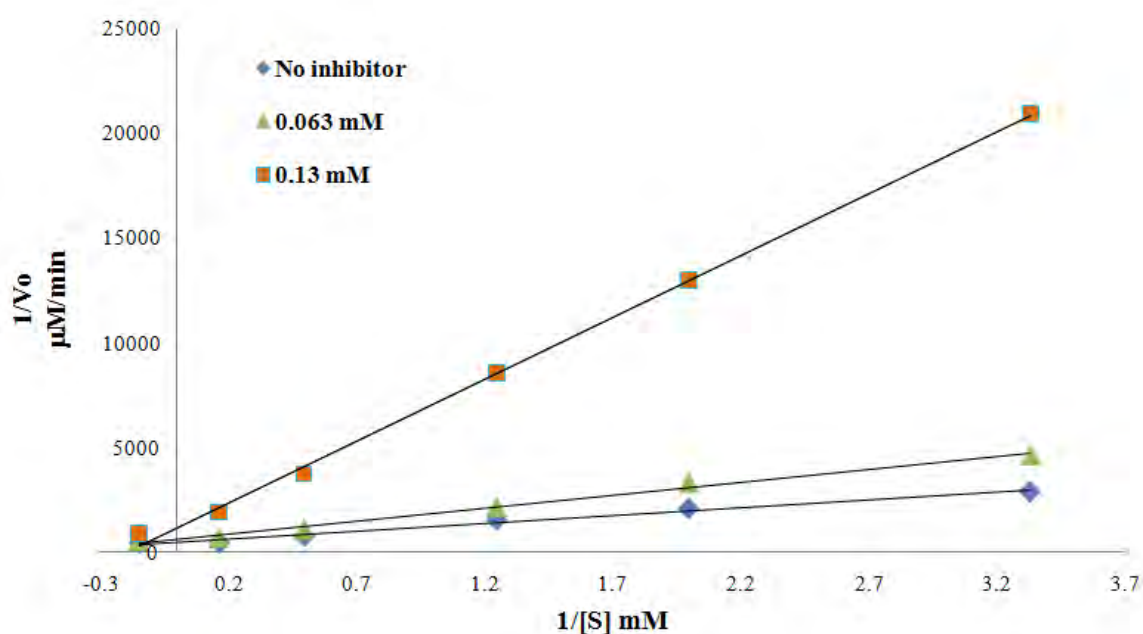
ตารางที่ 3.2 ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของ 1, 2, 1a-1g, 2a-2f และสารมาตรฐาน acarbose

Compounds	IC ₅₀ (μM)	Compounds	IC ₅₀ (μM)
	Barker's yeast		Barker's yeast
1	37.23	2d	269.59
2	16.26	2e	72.09
1a	490.66	2f	73.11
1b	441.19	2g	230.756
1c	> 600	2h	281.60
1d	> 600	2i	368.52
1e	> 600	2j	> 600
1f	> 600	2k	> 600
2a	28.07	2l	> 600
2b	43.29	Acarbose	526.64
2c	158.70		

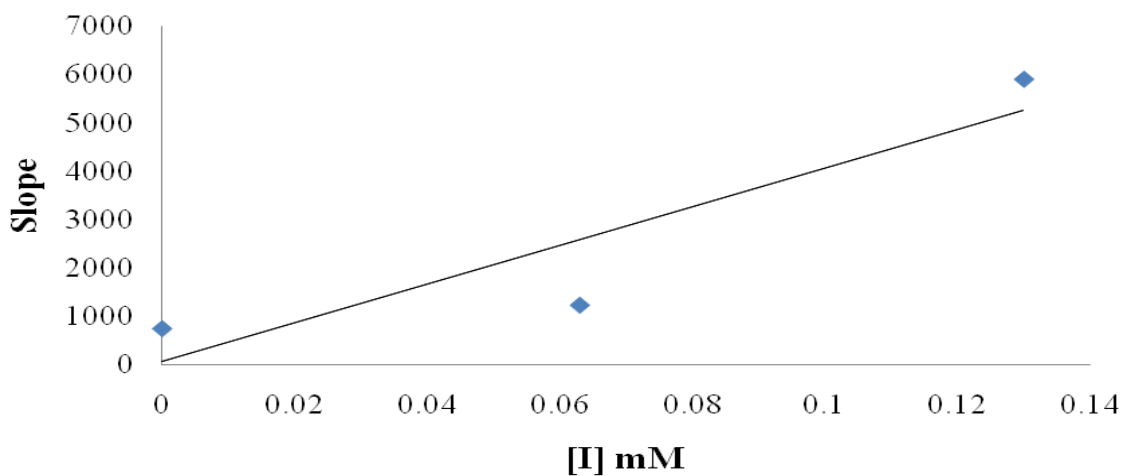
จากการนำแฟรคชัน D มาทำการแยกสารบริสุทธิ์ พบว่าได้สาร lupeol (**1**) และ betulinic acid (**2**) จึงนำสารทั้งสองชนิดไปทำการสังเคราะห์อนุพันธ์เพิ่ม และทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส พบว่า สารสังเคราะห์อนุพันธ์ (**2a**) มีฤทธิ์ที่ดีที่สุด (IC₅₀ = 28.07 μM) เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน acarbose (IC₅₀ = 526.64 μM) ส่วนอนุพันธ์ 17 ชนิด ที่

เหลือ มีฤทธิ์ในการยับยั้งปานกลางถึงไม่มีฤทธิ์ (มี IC_{50} มากกว่า $600 \mu\text{M}$ ที่ความเข้มข้น 5.0 mg/mL) เนื่องจากหมู่ไฮดรอกซิลในสาร 1 หรือหมู่ไฮดรอกซิลและหมู่คาร์บอกซิลในสาร 2 มีผลต่อฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสเป็นอย่างมากเมื่อทำการเปลี่ยนหมู่ดังกล่าวไปเป็นหมู่ฟังก์ชันอื่นจะทำให้ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสลดลงเป็นอย่างมาก

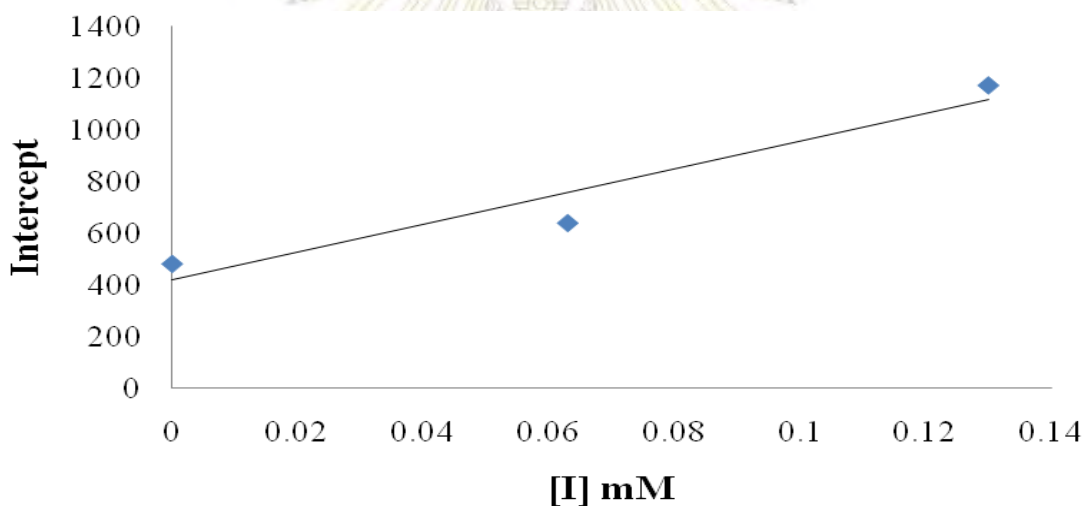
3.21 ผลการศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ต่อตัวยับยั้ง



รูปที่ 3.19 กราฟไลน์วีเวอร์-เบิร์ก แสดงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจากยีสต์ของสาร 2



รูปที่ 3.20 Secondary plot ของความชันต่อความเข้มข้นของตัวยับยั้งสำหรับหาค่า K_i ของสาร 2 ต่อเอนไซม์จากยีสต์



รูปที่ 3.21 Secondary plot ของจุดตัดแกน y ต่อความเข้มข้นของตัวยับยั้งสำหรับหาค่า K'_i ของสาร 2 ต่อเอนไซม์จากยีสต์

จากผลการศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ จากรูปที่ 3.19 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสาร 2 ซึ่งเป็นตัวยับยั้งพบว่าให้ค่า K_m เพิ่มขึ้น และ V_{max} ที่ลดลง และเมื่อพิจารณาตามกราฟ Lineweaver-Burk จึงสรุปได้ว่า สาร 2 เป็นตัวยับยั้งชนิด mixed inhibitor และเมื่อพิจารณาที่กราฟ secondary plot (รูปที่ 3.20 และ 3.21) จะสามารถคำนวณค่า K_i และ K'_i ได้ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 11.16 และ 0.019 mM ตามลำดับ โดยตามทฤษฎีแล้ว การยับยั้งแบบ mixed inhibition

หมายถึง การมีกลไกการยับยั้งอยู่ 2 แบบ คือ competitive inhibition และ noncompetitive inhibition และจากผลการทดลองที่ได้จะเห็นว่า K'_i มีค่าน้อยกว่า K_i นั้นหมายความว่า สารจะแสดงตัวเป็นตัวยับยั้งแบบ noncompetitive inhibitor



ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองสกัดเปลือกของต้นมะวัด (*Ziziphus rugosa* Lam.)หนัก 1.7 กิโลกรัม สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล จำนวนสองครั้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ได้สิ่งสกัดเมทานอลหนัก 178.0 กรัม จากนั้นนำสิ่งสกัดเมทานอลมาแยกด้วยการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ พบว่าสามารถแยกสิ่งสกัดย่อยได้ 7 แฟรกชัน (A-G) จากนั้นนำสิ่งสกัดย่อยทั้งหมดไปทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสเบื้องต้นพบว่าสิ่งสกัดย่อย D มีฤทธิ์ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.052 mg/mL (สารมาตรฐาน acarbose มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.34 mg/mL) จึงนำสิ่งสกัดส่วนย่อย D ไปแยกเพื่อหาองค์ประกอบทางเคมี พบว่า สามารถแยกสารในกลุ่ม triterpenoid ได้ 2 ชนิด คือ lupeol (1) และ betulinic acid (2) ต่อมาทำการเตรียมอนุพันธ์ของสารทั้งสองชนิด ได้สารทั้งหมด 18 ชนิด โดยเป็นอนุพันธ์ชนิดใหม่ 7 ชนิด คือ 1d และ 2g-2l และอนุพันธ์ที่มีรายงานแล้ว 11 ชนิด คือ 1a-1c, 1e-1f และ 2a-2f โดยหาสูตรโครงสร้างโดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี เช่น 1D NMR (1H NMR และ ^{13}C NMR) และ 2D NMR (COSY, HSQC และ HMBC) เป็นต้น จากการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของยีสต์พบว่า สาร 2 และ 2a มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสได้ดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 16.26 และ 28.07 μM ตามลำดับ เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน acarbose ($IC_{50} = 526.64 \mu M$) ส่วนสารที่เหลือ มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ตั้งแต่ปานกลางถึงไม่มีฤทธิ์ เนื่องจากมี IC_{50} มากกว่า 600 μM จากการศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ด้วยการสร้างกราฟไลน์วีเวอร์-เบิร์ก พบว่า สาร 2 แสดงการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบแบบผสม (mixed inhibitor)

จากข้อมูลทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่าหมู่ไฮดรอกซิลในสาร 1 หรือ หมู่ไฮดรอกซิลและหมู่คาร์บอกซิลในสาร 2 มีผลต่อฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสเป็นอย่างมากเมื่อทำการเปลี่ยนหมู่ดังกล่าวไปเป็นหมู่ฟังก์ชันนอลอื่นจะทำให้ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสลดลงเป็นอย่างมาก

ข้อเสนอแนะ

ในสิ่งสกัดย่อยอื่นๆ ที่แยกได้จากสิ่งสกัดเมทานอล อาจมีสารที่น่าสนใจและที่ผู้วิจัยยังไม่ได้ทำการแยกหาค่าองค์ประกอบทั้งหมด เนื่องจากเวลามีจำกัด ดังนั้นควรมีการแยกองค์ประกอบในส่วนอื่นต่อไป



ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

1. Pandey, V.B.; Tripathi, Y.C.; Devi, S.; Singh, J.P.; Shah, A.H.; A cyclopeptide alkaloid from the bark of *Zizyphus rugosa*. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 1915-1918.
2. Pandey, V.B.; Tripathi, Y.C.; A new triterpenoid saponin from *Zizyphus rugosa*. *Fitoterapia* **1993**, *64*, 341-343.
3. Tripathi, Y.C.; Maurya, S.K.; Singh, V.P.; Pandey, V.B. Cyclopeptide alkaloids from *Zizyphus rugosa* bark. *Phytochemistry* **1998**, *28*, 1563-1565.
4. Singh, A.; Pandey, M.B.; Singh, J.P.; Singh, S. Peptide alkaloids of *Zizyphus rugosa*. *Journal of the Indian Chemical Society* **2008**, *85*, 658-659.
5. Singh, A.; Pandey M.B.; Singh, S.; Singh, A.K.; Singh, J.P. Flavonoids of *Zizyphus rugosa*. *Journal of the Indian Chemical Society* **2009**, *86*, 177-178.
6. Kaennakam, S.; Sichaem, J.; Siripong, P.; Tip-pyang, S. Chemical constituents of the roots of *Zizyphus rugosa*. *Chemistry of Natural Compounds* **2013**, *49*, 767-768.
7. Damsud, T.; Adisakwattana, S.; Phuwapraisirisan, P. Three new phenylpropanoyl amides from the leaves of *Piper sarmentosum* and their α -glucosidase inhibitory activities. *Phytochemistry Letters* **2013**, *6*, 350-354.
8. Misra, G; Mitra, C.R.; Constituents of leaves, heartwood and root of *Mimusops elengi*. *Phytochemistry* **1968**, *7*, 501-502.
9. Jia, K.; Cai, A.; X. L.; Ye, S.; A new triterpene from *Vernonia chunii*. *Source of the Document Chinese Traditional and Herbal Drugs*. **2008**.
10. Wi Ikomirski B.I.; Kasprzyk Z.; Gas-liquid chromatographic separation of triterpene monohydroxyalcohol esters. *Journal of Chromatography A* **1975**, *103*, 376-380.
11. Brum R.L.; Honda N.K.; Hess S.C.; Cavalheiro A.J.; Delle Monache F; Acyl lupeols from *Cnidioscolus vitifolius*. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 1127-1128.
12. Yagishita, K.; Isolation and Identification of Betulin, Lupeol, and β -Amyrin from the Bird-lime of *Trochodendron aralioides* Siebold et Zuccarini. *Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan*. **1957**, *21*, 77-81.

13. Ahmad F.B.H.; Moghaddam M.G.; Basri M.; Abdul Rahman M.B.; Anticancer activity of 3-O-acylated betulinic acid derivatives obtained by enzymatic synthesis. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **2010**, *74*, 1025-1029.
14. De L.e. Silva M.; David J.P.; Silva L.C.R.C.; Santos R.A.F.; David J.M.; Lima L.S.; Reis P.S.; Fontana R.; Bioactive oleanane, lupane and ursane triterpene acid derivatives. *Molecules* **2012**, *17*, 12197-12205.
15. Zhang S.-J.; Ge Q.-F.; Guo D.-W.; Hu W.-X.; Liu H.-Z.; Synthesis and anticancer evaluation of α -lipoic acid derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2010**, *20*, 3078-3083.

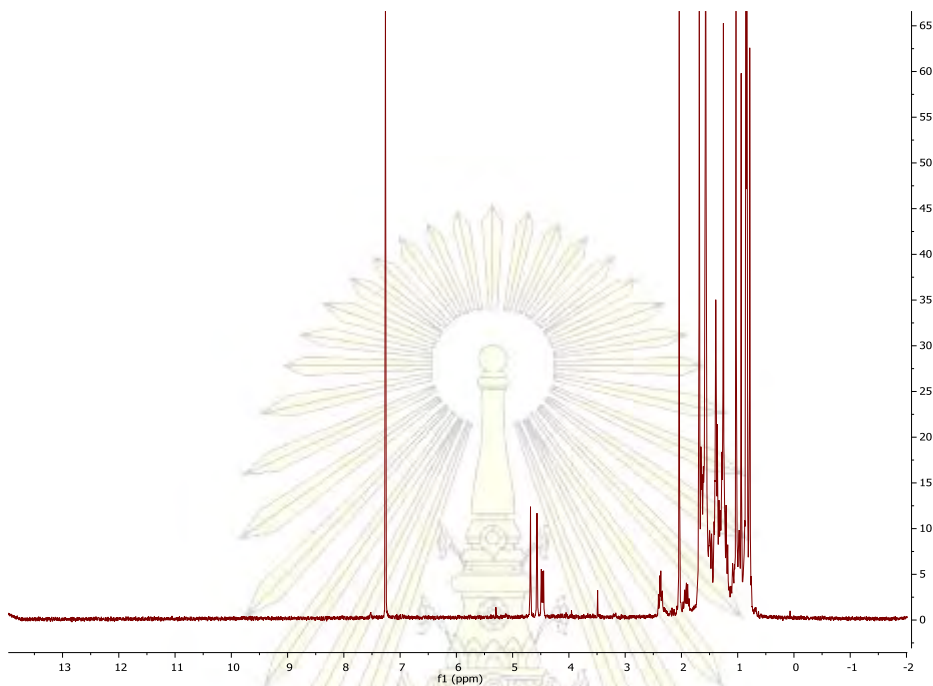
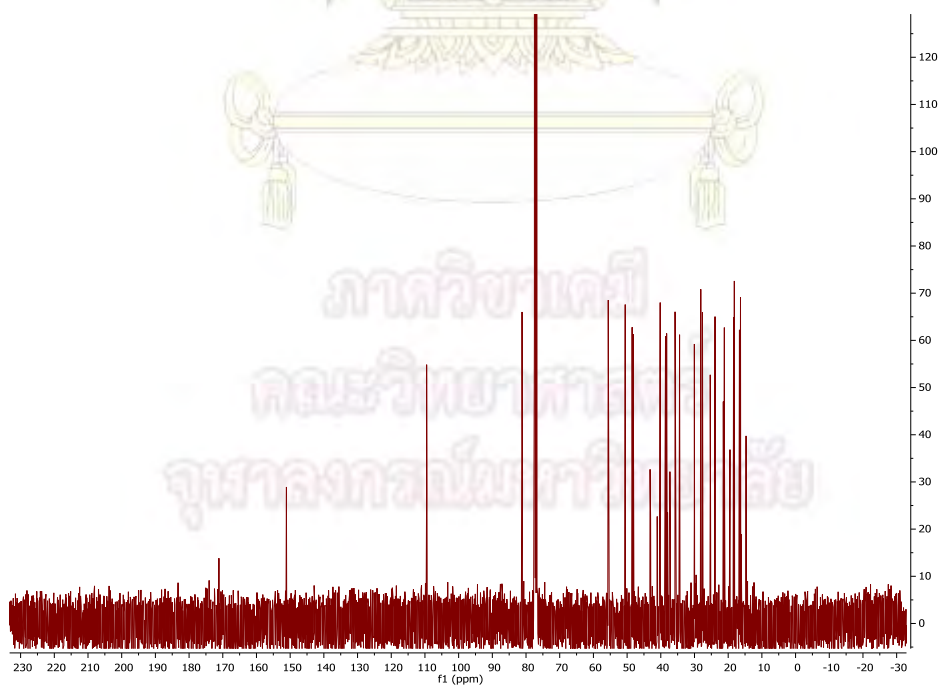


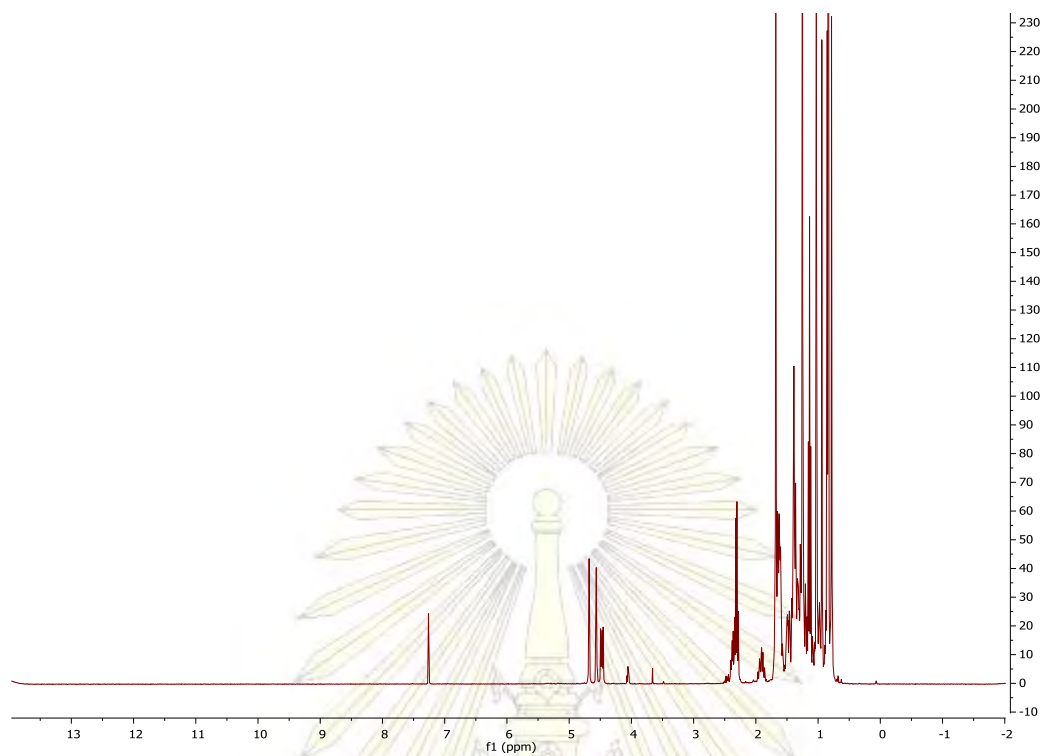


ภาคผนวก

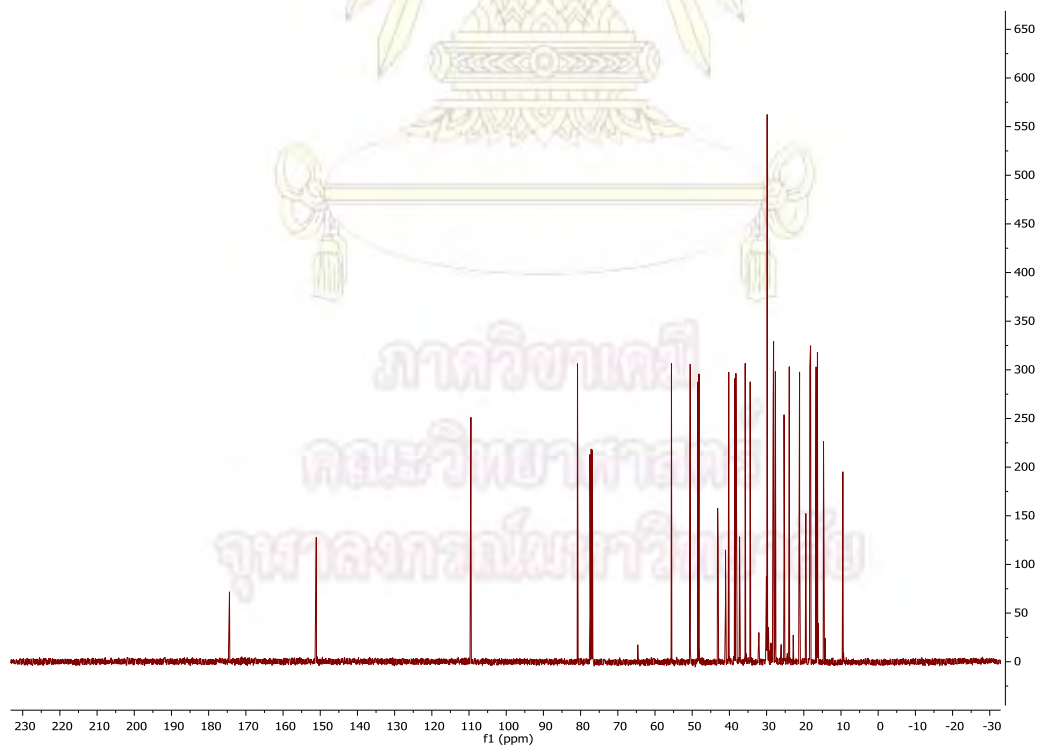
ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

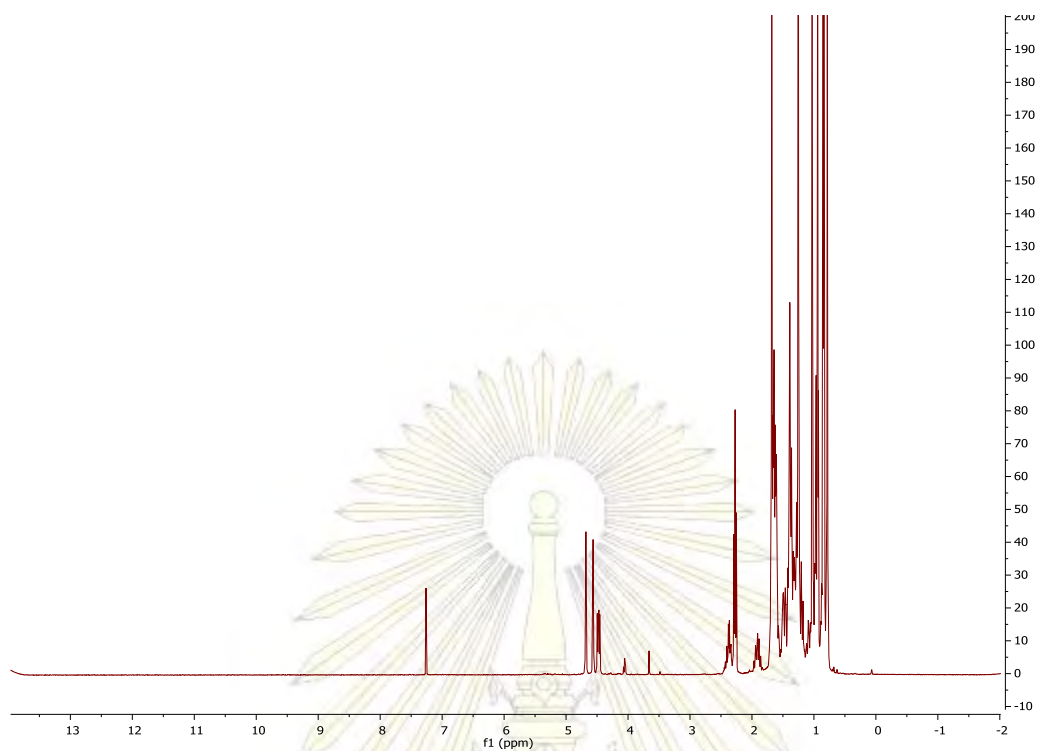
รูปที่ 1 ^1H NMR spectrum ของ 3-O-acetyl lupeol (1a) ใน CDCl_3 รูปที่ 2 ^{13}C NMR spectrum ของ 3-O-acetyl lupeol (1a) ใน CDCl_3



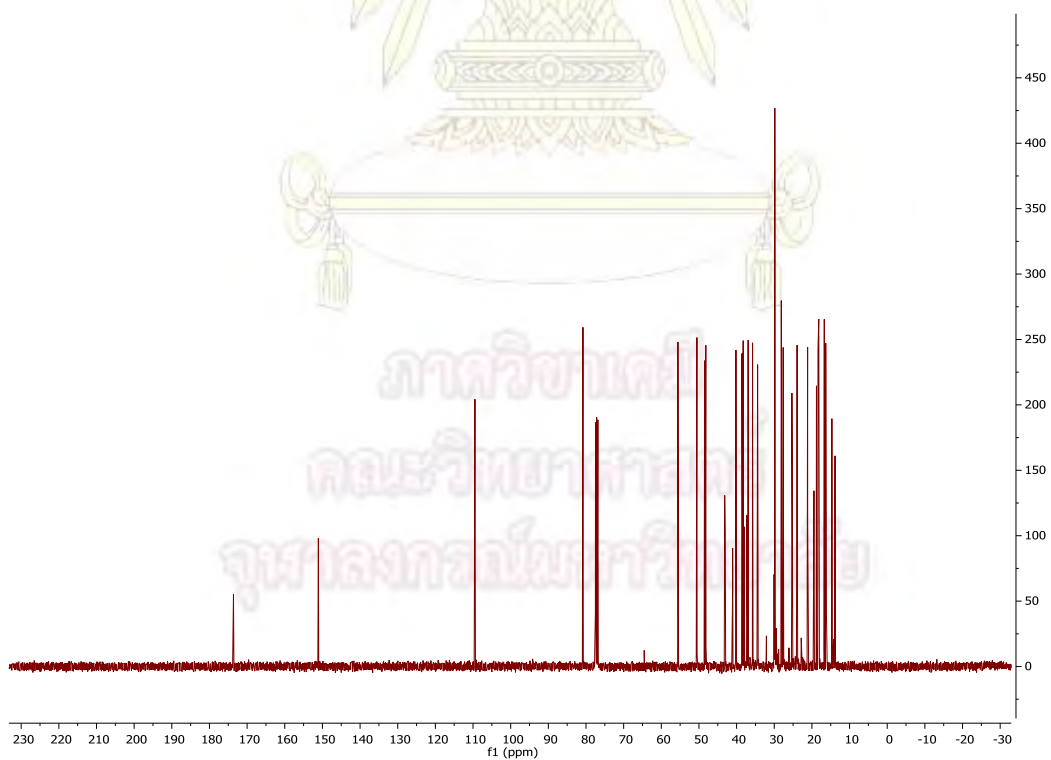
รูปที่ 3 ^1H NMR spectrum ของ 3-O-propanoyl lupeol (**1b**) ใน CDCl_3



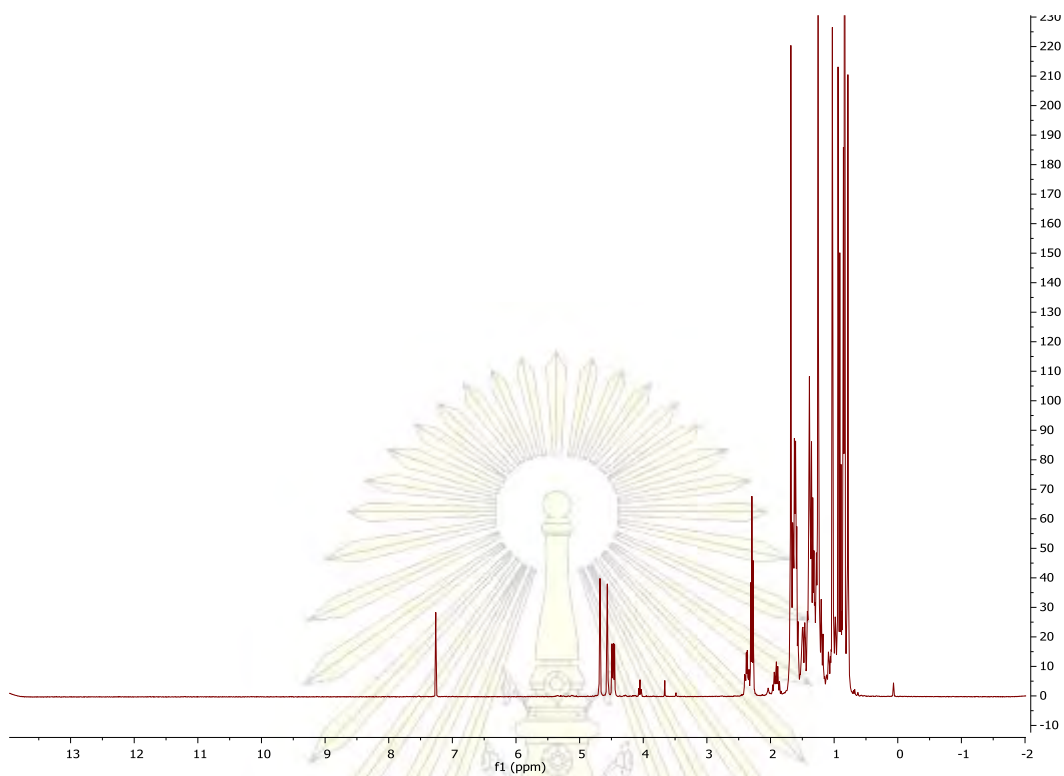
รูปที่ 4 ^{13}C NMR spectrum ของ 3-O-propanoyl lupeol (**1b**) ใน CDCl_3



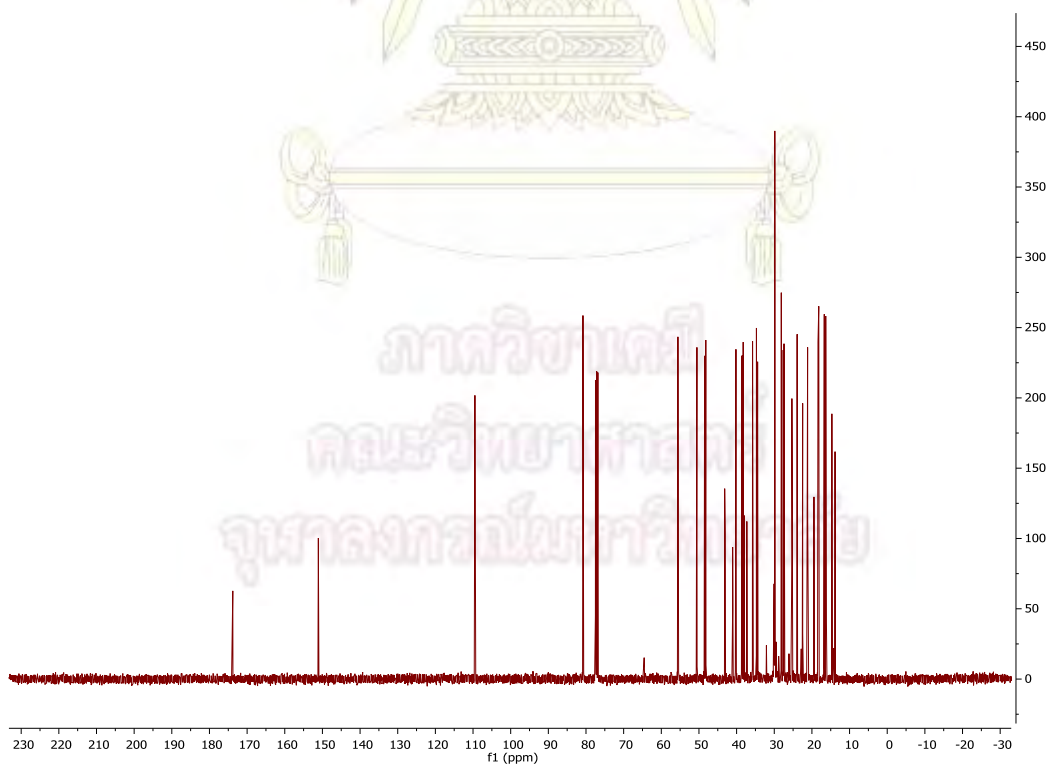
รูปที่ 5 ^1H NMR spectrum ของ 3-O-butanoyl lupeol (**1c**) ใน CDCl_3



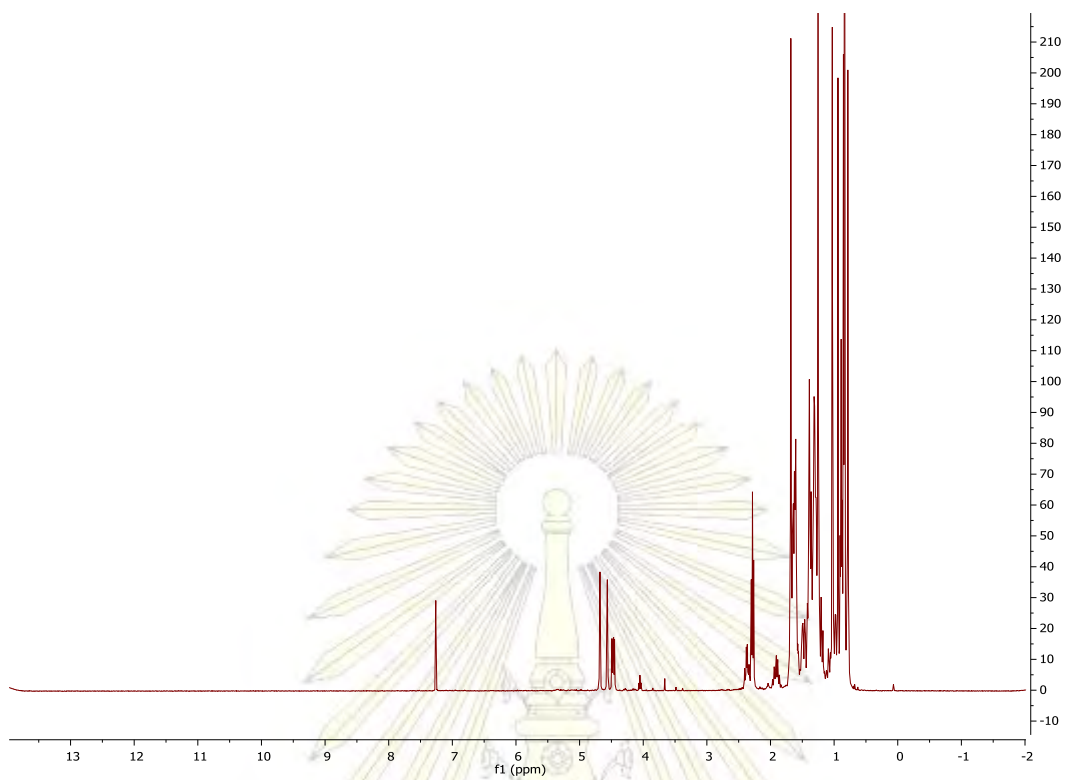
รูปที่ 6 ^{13}C NMR spectrum ของ 3-O-butanoyl lupeol (**1c**) ใน CDCl_3 .



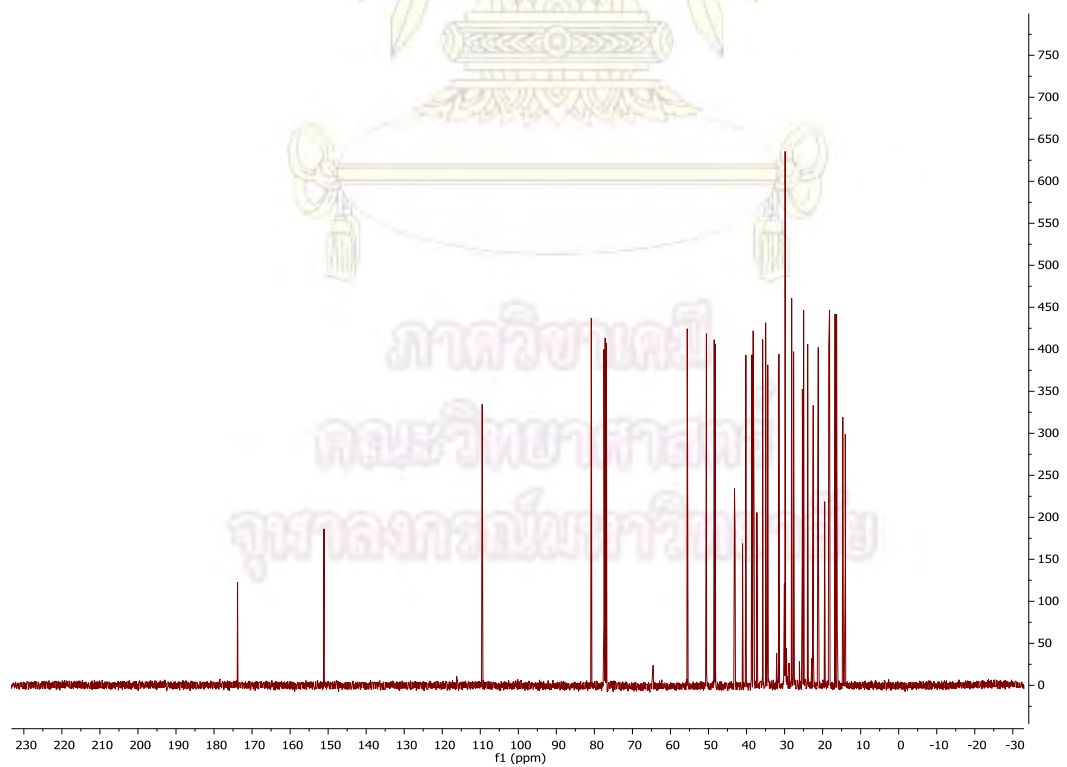
รูปที่ 7 ^1H NMR spectrum ของ 3-O-pentanoyl lupeol (**1d**) ใน CDCl_3



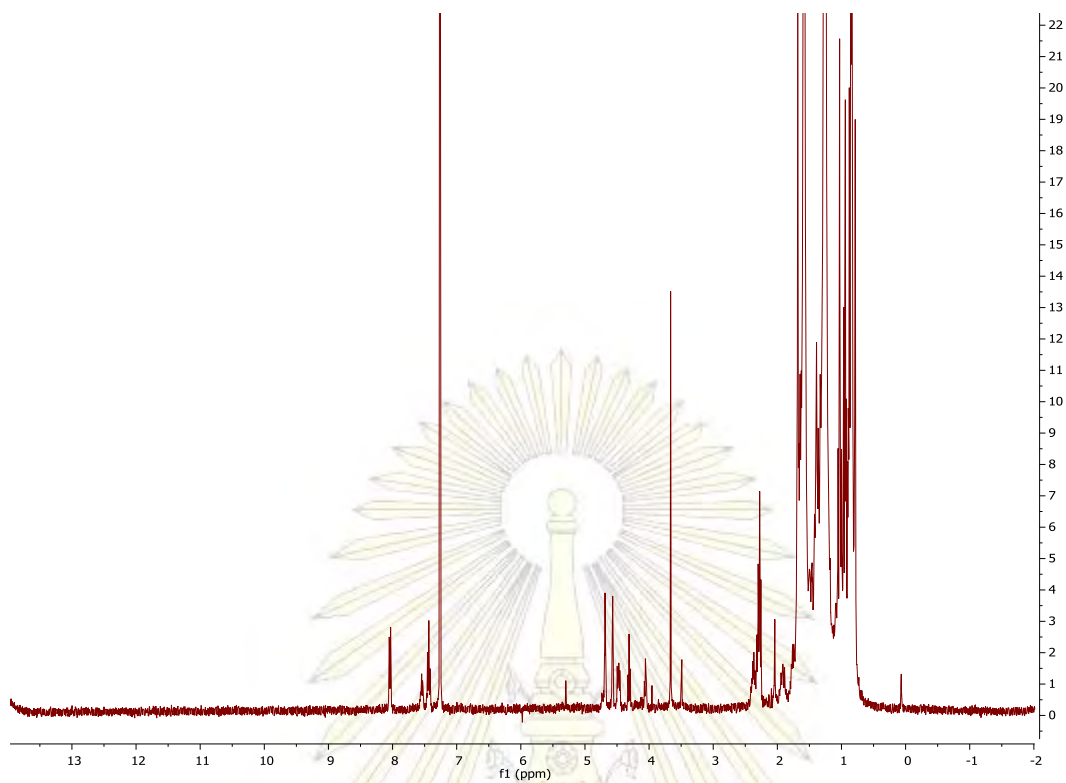
รูปที่ 8 ^{13}C NMR spectrum ของ 3-O-pentanoyl lupeol (**1d**) ใน CDCl_3



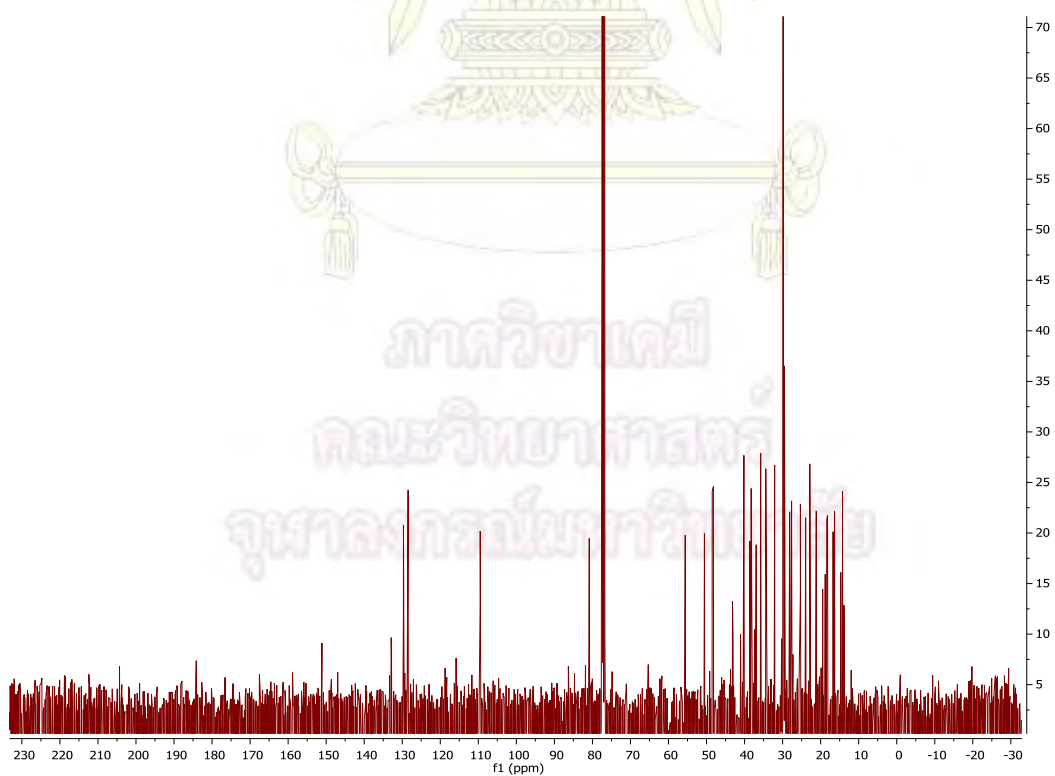
รูปที่ 9 ^1H NMR spectrum ของ 3-O-hexanoyl lupeol (**1e**) ใน CDCl_3



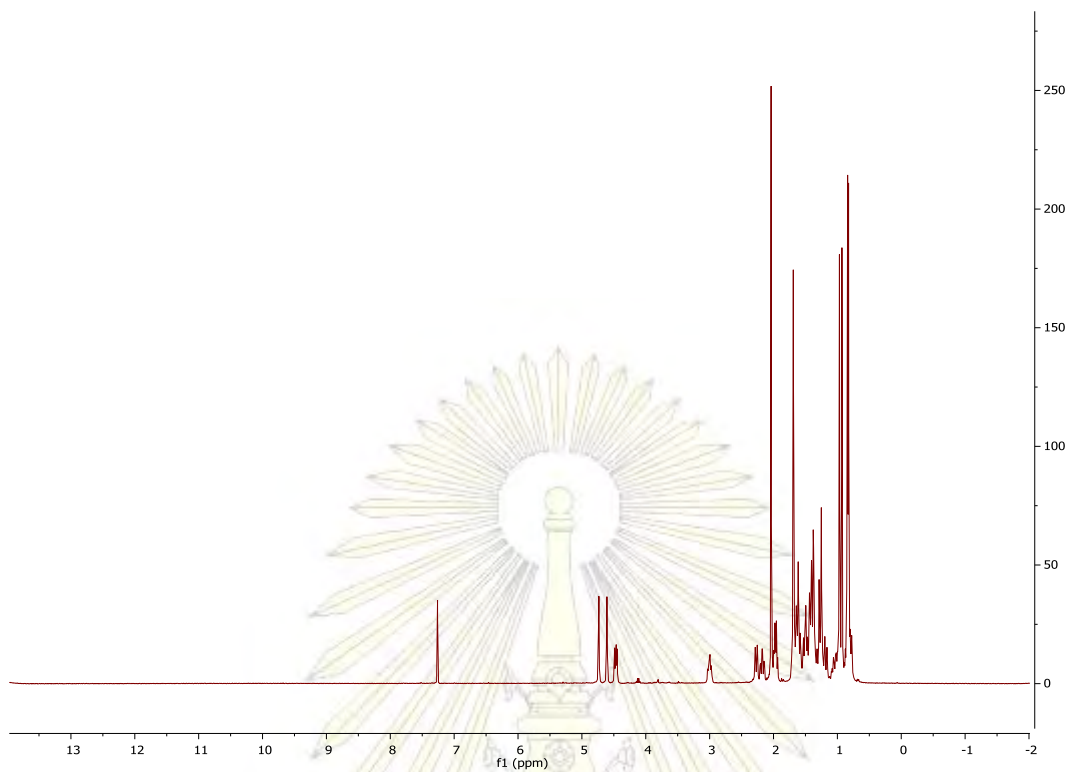
รูปที่ 10 ^{13}C NMR spectrum ของ 3-O-hexanoyl lupeol (**1e**) ใน CDCl_3



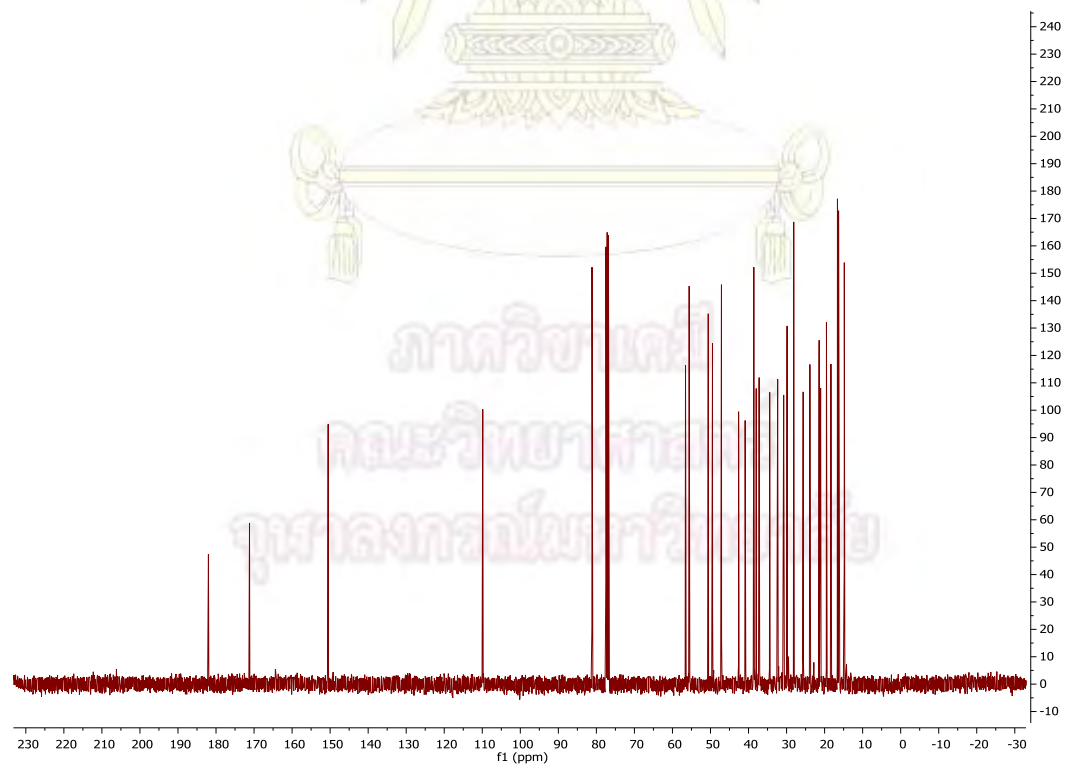
รูปที่ 11 ^1H NMR spectrum ของ 3-O-benzoyl lupeol (1f) ใน CDCl_3



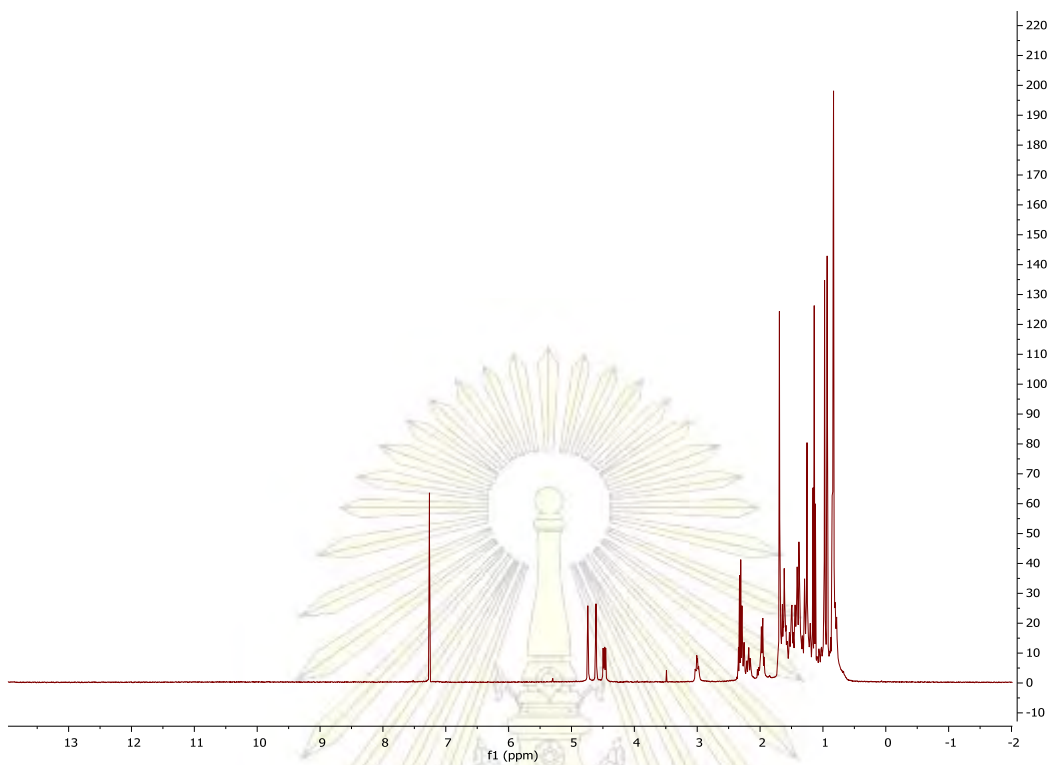
รูปที่ 12 ^{13}C NMR spectrum ของ 3-O-benzoyl lupeol (1f) ใน CDCl_3



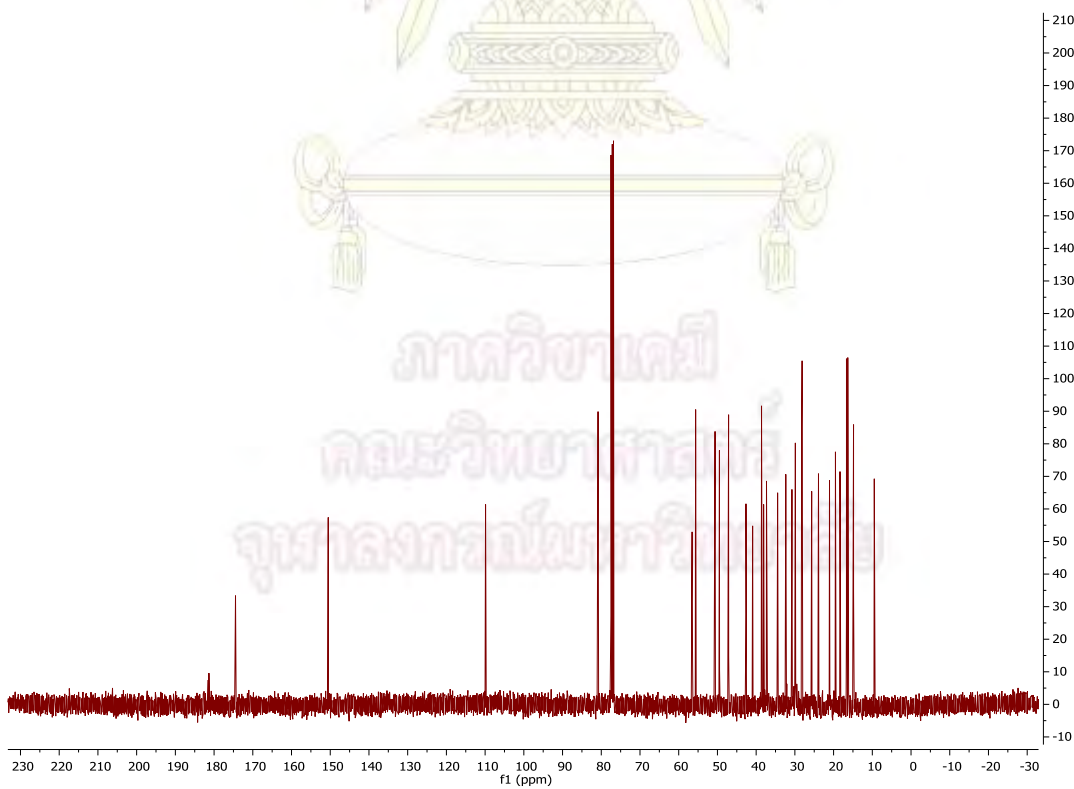
รูปที่ 13 ^1H NMR spectrum ของ 3-O-acetyl betulinic acid (2a) ใน CDCl_3



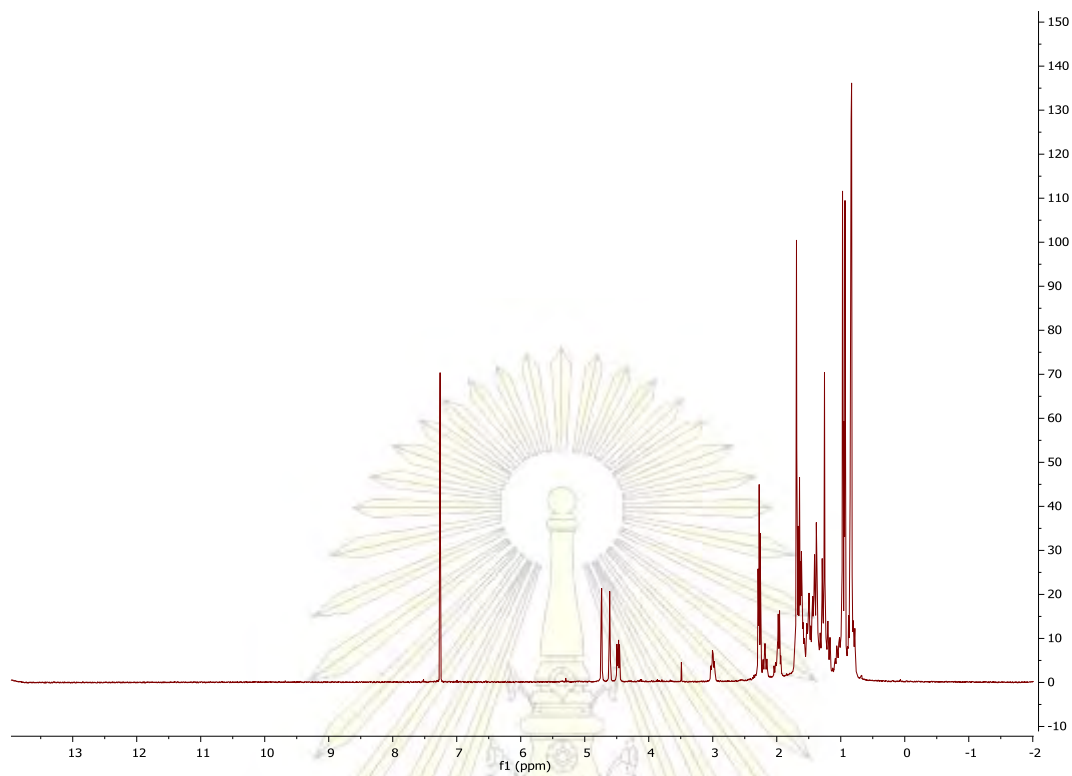
รูปที่ 14 ^{13}C NMR spectrum ของ 3-O-acetyl betulinic acid (2a) ใน CDCl_3



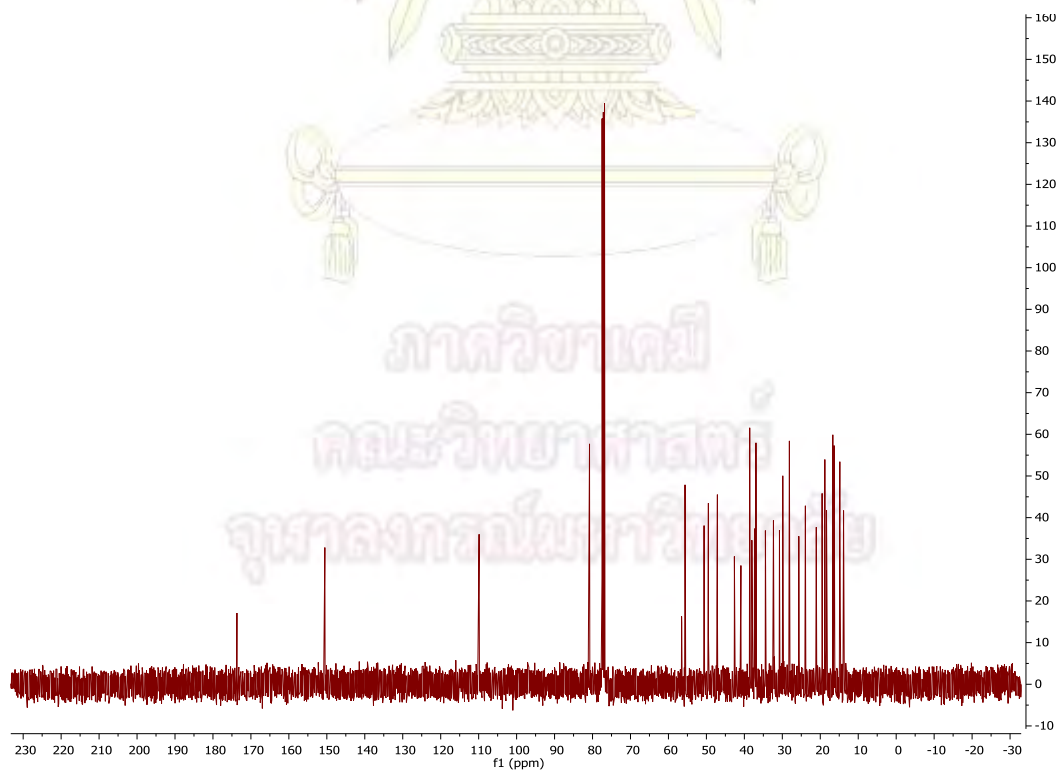
รูปที่ 15 ^1H NMR spectrum ของ 3-O-propanoyl betulinic acid (**2b**) ใน CDCl_3



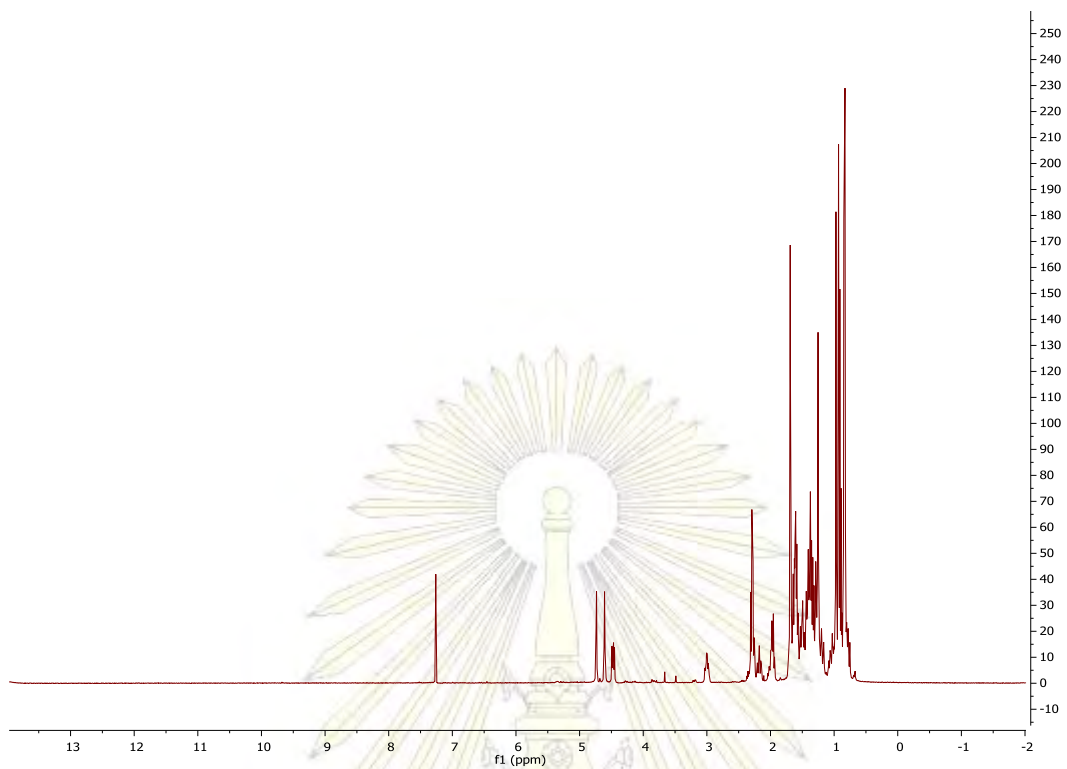
รูปที่ 16 ^{13}C NMR spectrum ของ 3-O-propanoyl betulinic acid (**2b**) ใน CDCl_3



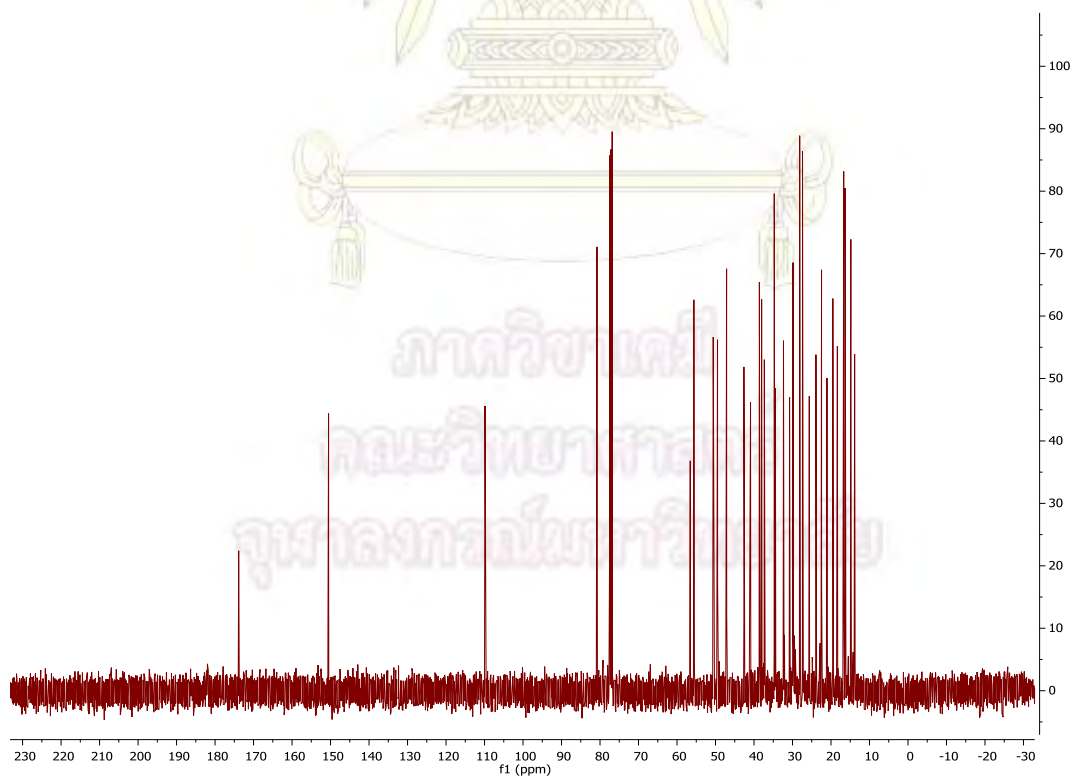
รูปที่ 17 ^1H NMR spectrum ของ 3-O-butanoyl betulinic acid (**2c**) ใน CDCl_3



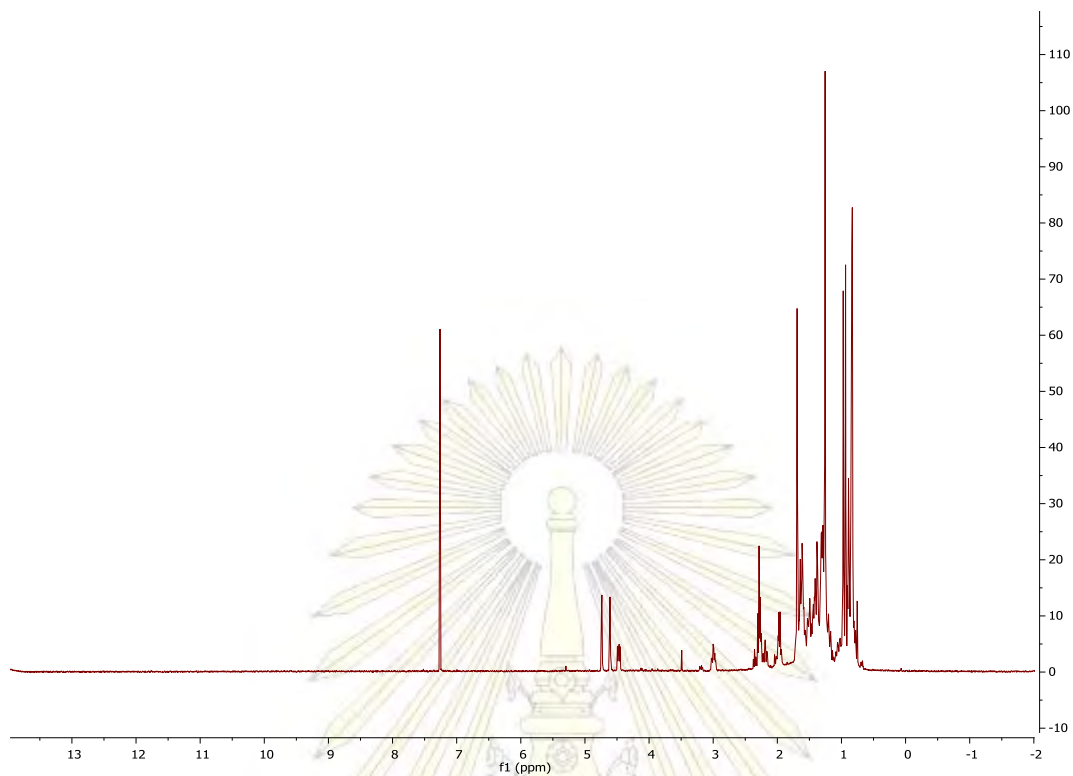
รูปที่ 18 ^{13}C NMR spectrum ของ 3-O-butanoyl betulinic acid (**2c**) ใน CDCl_3



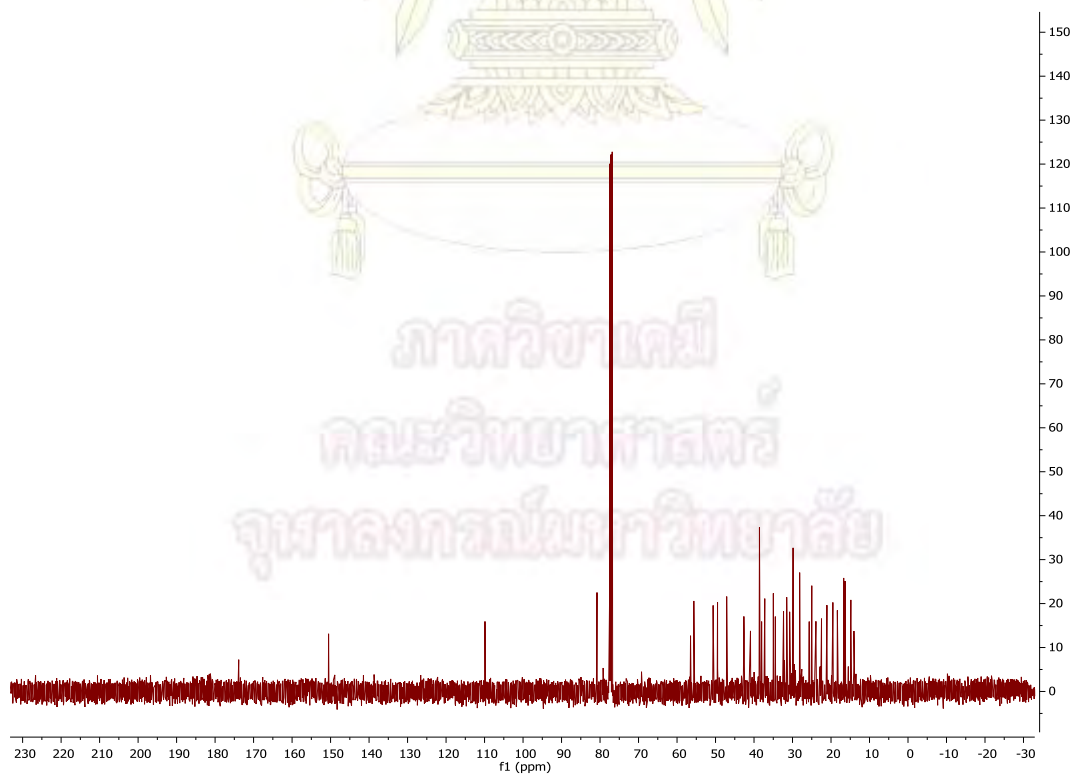
รูปที่ 19 ^1H NMR spectrum ของ 3-O-pentanoyl betulinic acid (**2d**) ใน CDCl_3



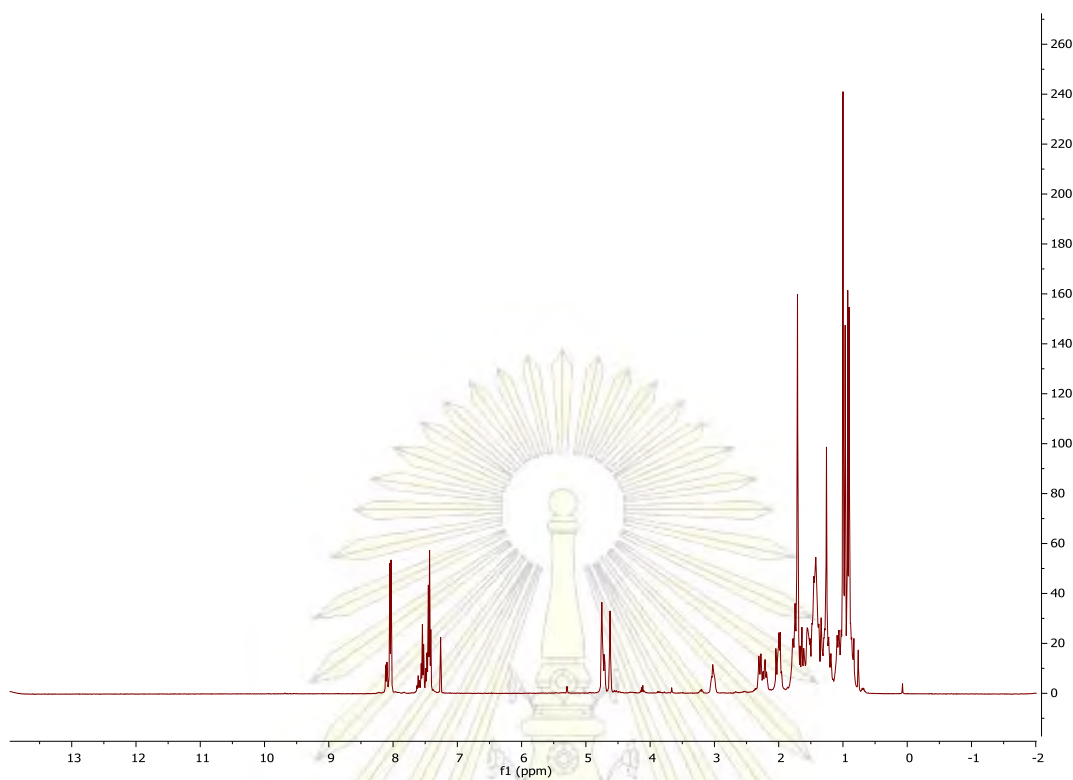
รูปที่ 20 ^{13}C NMR spectrum ของ 3-O-pentanoyl betulinic acid (**2d**) ใน CDCl_3



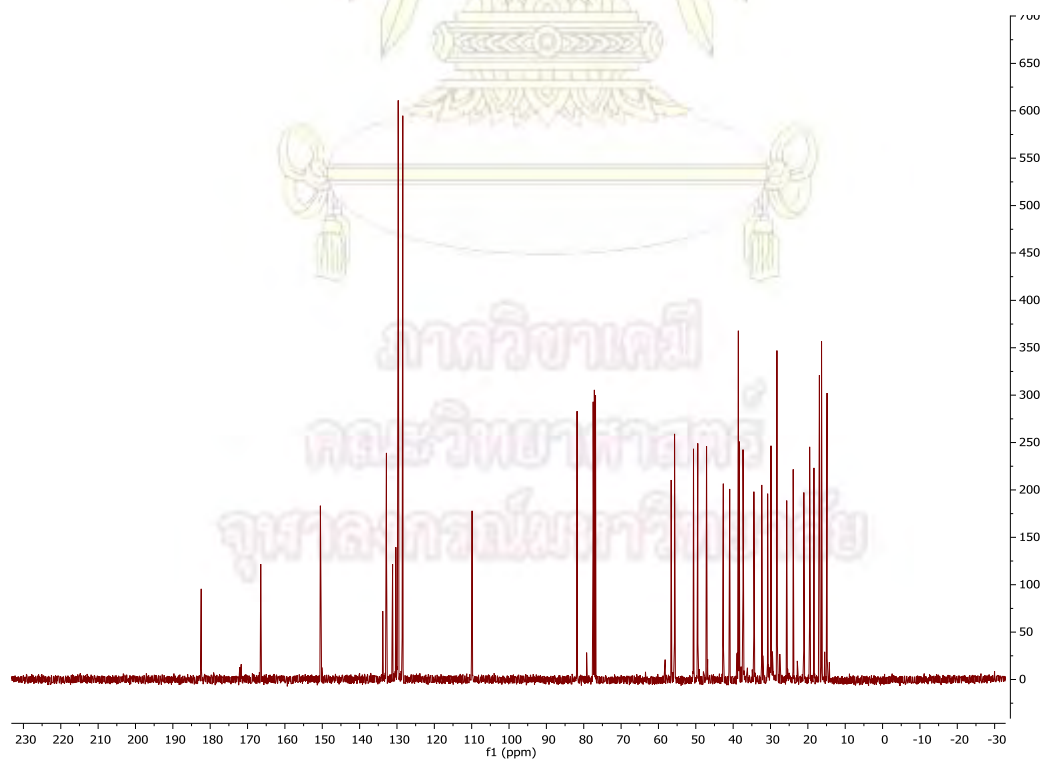
รูปที่ 21 ^1H NMR spectrum ของ 3-O-hexanoyl betulinic acid ใน (2e) CDCl_3



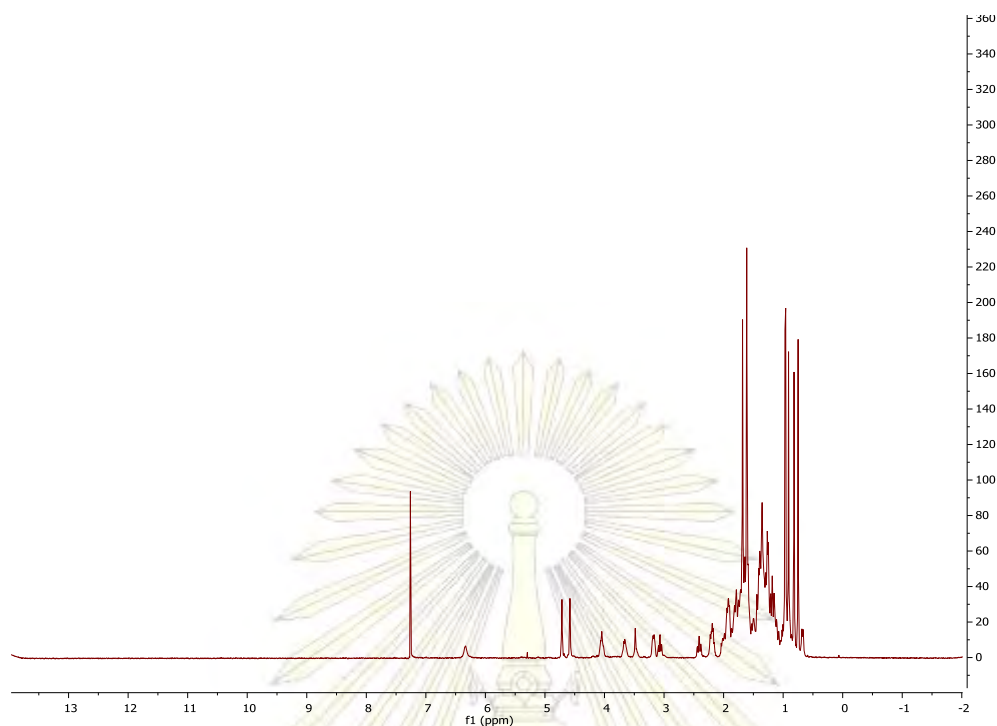
รูปที่ 22 ^{13}C NMR spectrum ของ 3-O-hexanoyl betulinic acid (2e) ใน CDCl_3



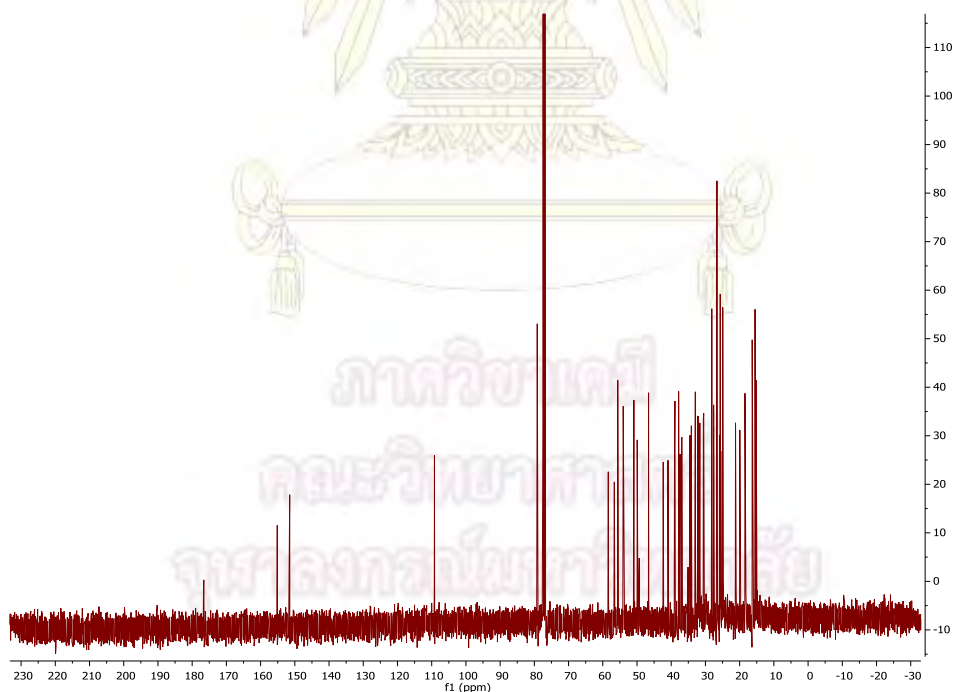
รูปที่ 23 ^1H NMR spectrum ของ 3-O-benzoyl betulinic acid (**2f**) ใน CDCl_3



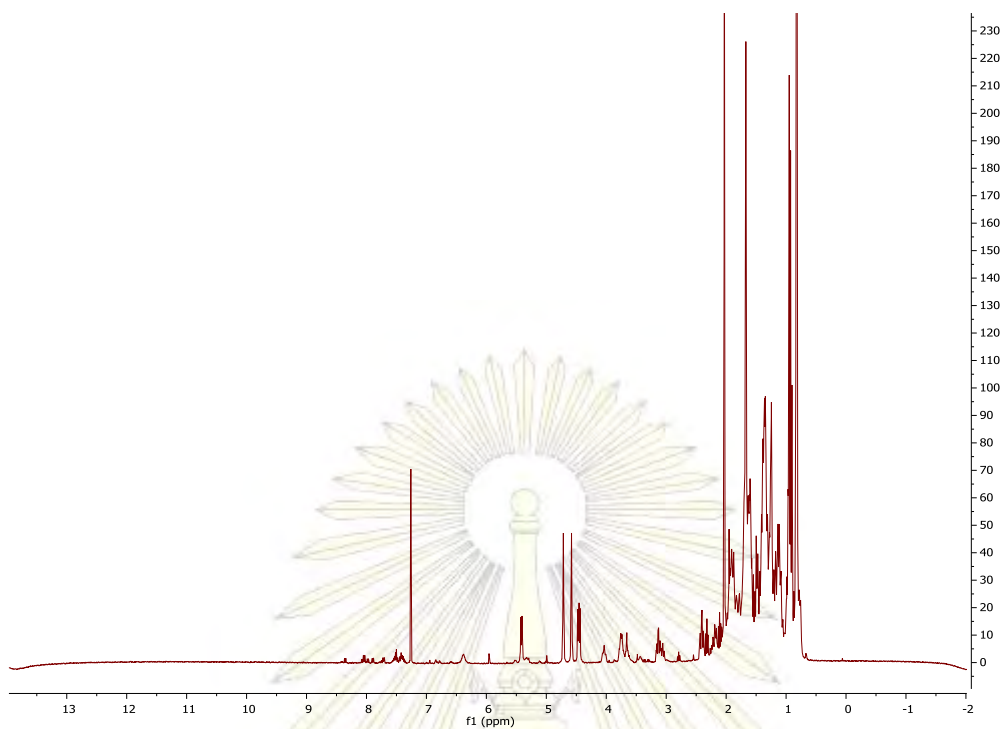
รูปที่ 24 ^{13}C NMR spectrum ของ 3-O-benzoyl betulinic acid (**2f**) ใน CDCl_3



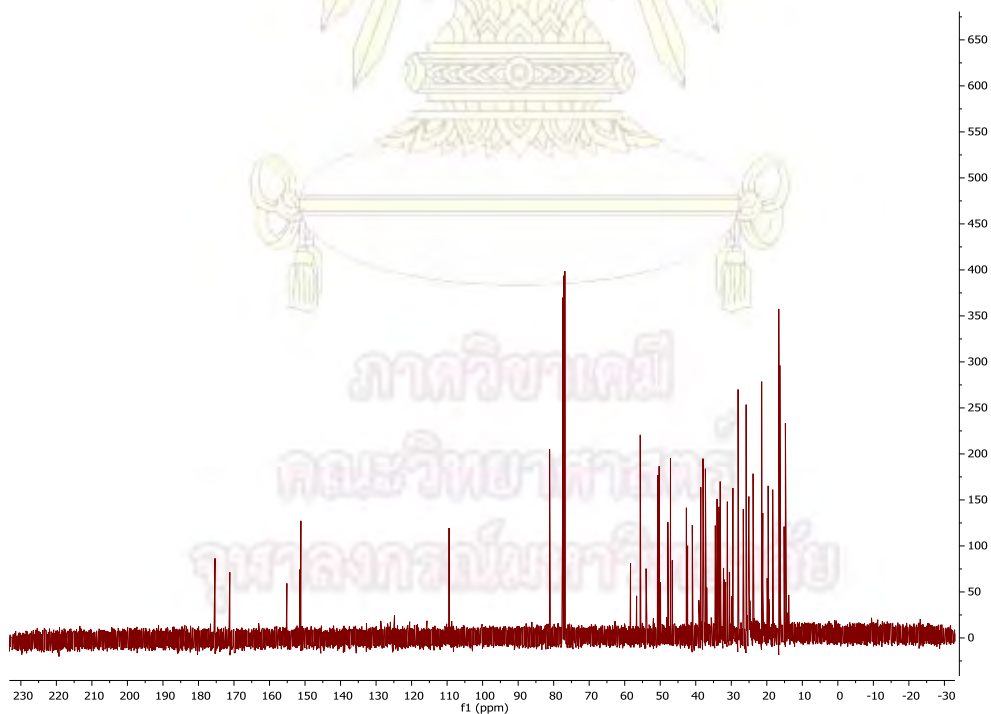
รูปที่ 25 ^1H NMR spectrum ของ 28-*N*-cyclohexyl-*N*-[(cyclohexylamino)carbonyl]-betulinic acid (2g) ใน CDCl_3



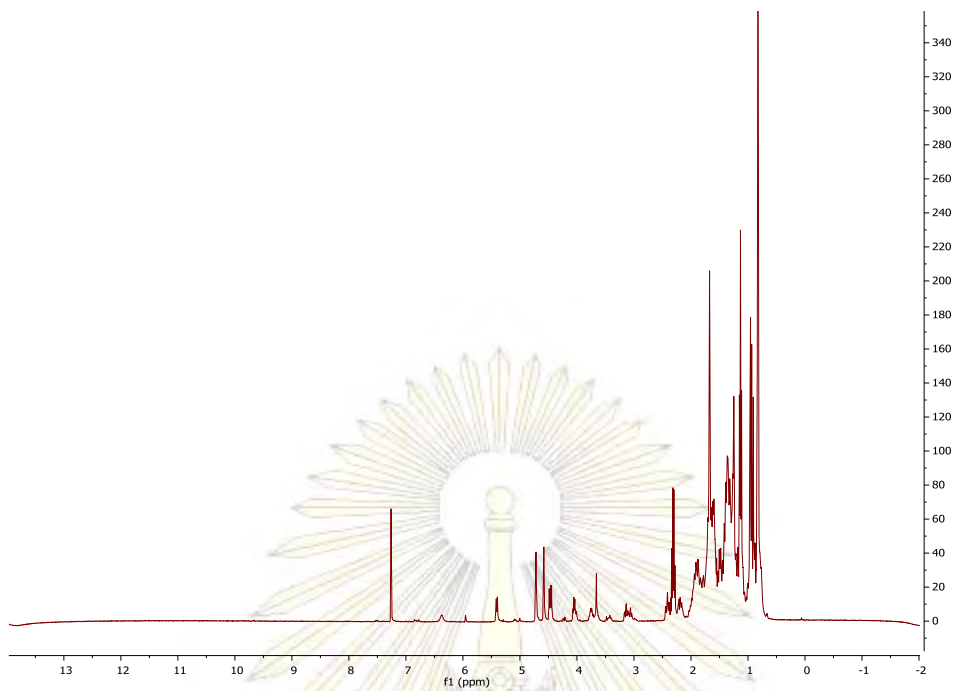
รูปที่ 26 ^{13}C NMR spectrum ของ 28-*N*-cyclohexyl-*N*-[(cyclohexylamino)carbonyl]-betulinic acid (2g) ใน CDCl_3



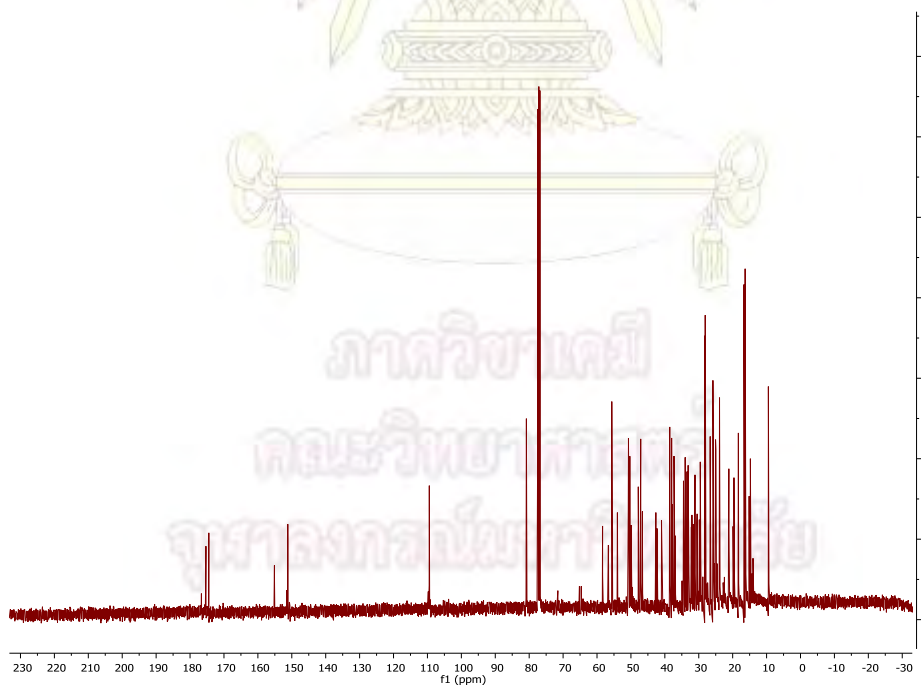
รูปที่ 27 ^1H NMR spectrum ของ 28-*N*-cyclohexyl-*N*-[(cyclohexylamino)carbonyl]-3-*O*-acetyl betulinic acid (**2h**) ใน CDCl_3



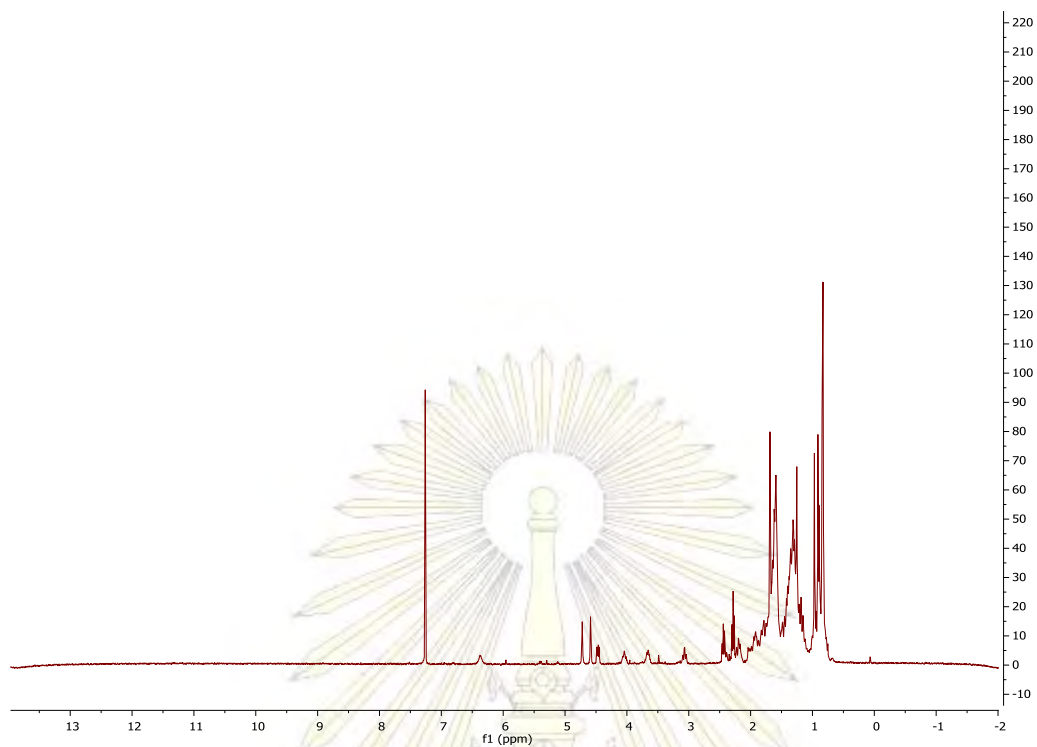
รูปที่ 28 ^{13}C NMR spectrum ของ 28-*N*-cyclohexyl-*N*-[(cyclohexylamino)carbonyl]-3-*O*-acetyl betulinic acid (**2h**) ใน CDCl_3



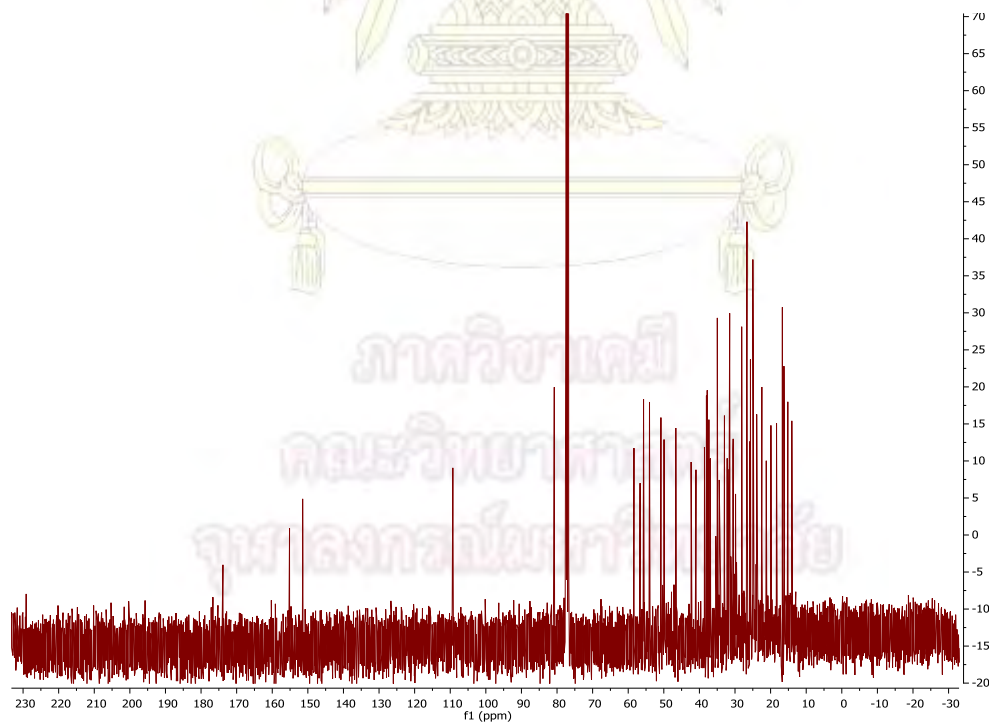
รูปที่ 29 ^1H NMR spectrum ของ 28-*N*-cyclohexyl-*N*-[(cyclohexylamino)carbonyl]-3-*O*-propanoyl betulinic acid (**2i**) ใน CDCl_3



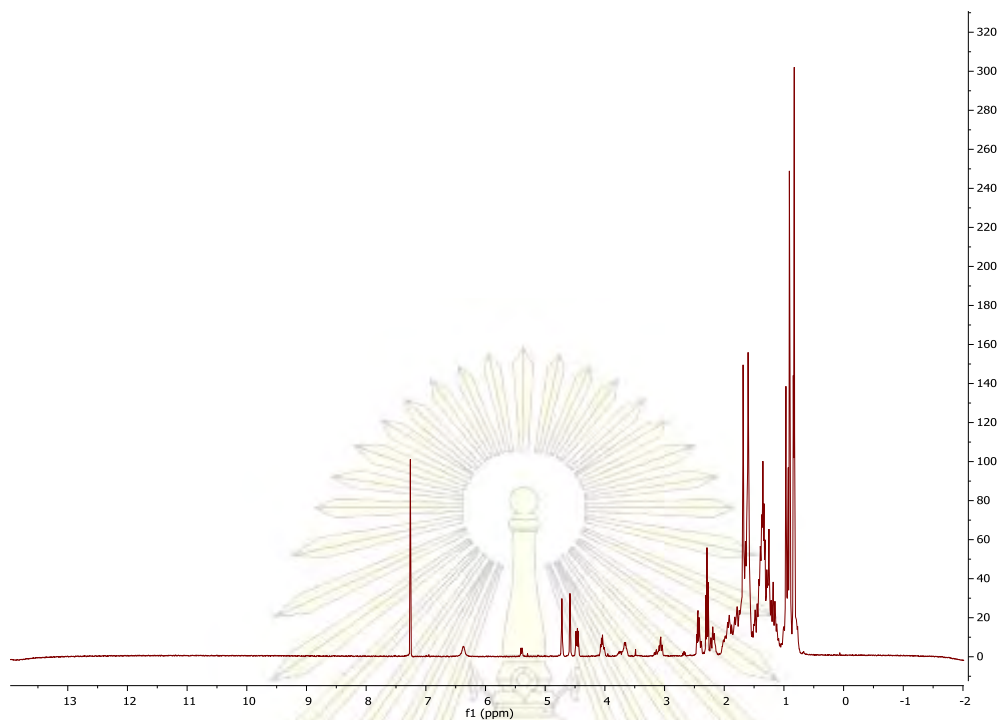
รูปที่ 30 ^{13}C NMR spectrum ของ 28-*N*-cyclohexyl-*N*-[(cyclohexylamino)carbonyl]-3-*O*-propanoyl betulinic acid (**2i**) ใน CDCl_3



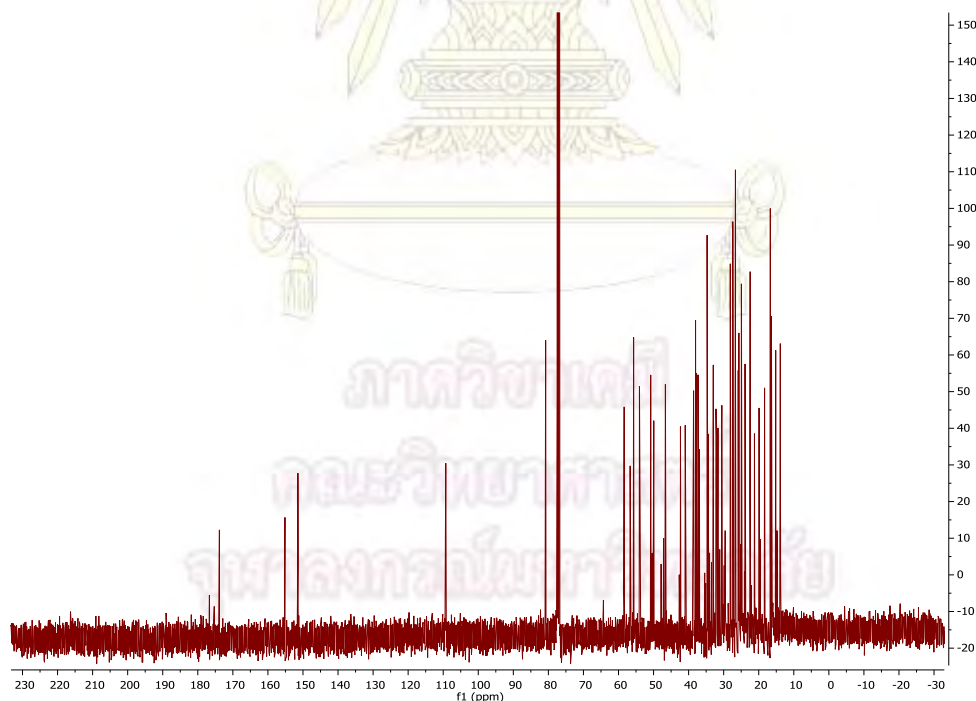
รูปที่ 31 ^1H NMR spectrum ของ ของ 28-*N*-cyclohexyl-*N*-[(cyclohexylamino)carbonyl]-3-*O*-butanoyl betulinic acid (2j) ใน CDCl_3



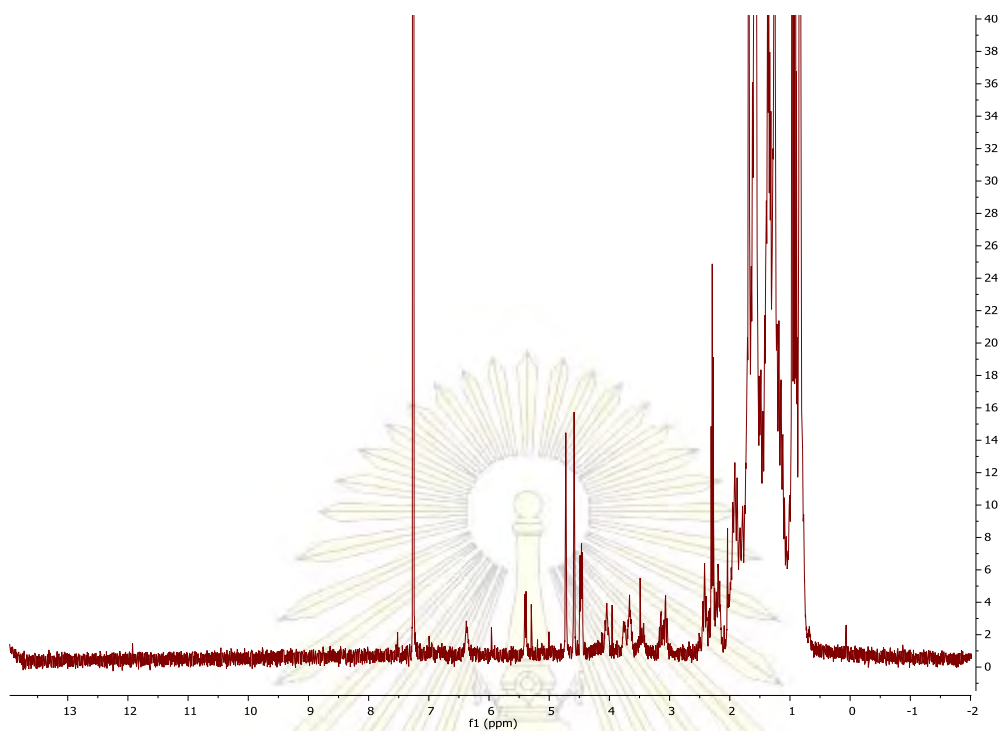
รูปที่ 32 ^{13}C NMR spectrum ของ ของ 28-*N*-cyclohexyl-*N*-[(cyclohexylamino)carbonyl]-3-*O*-butanoyl betulinic acid (2j) ใน CDCl_3



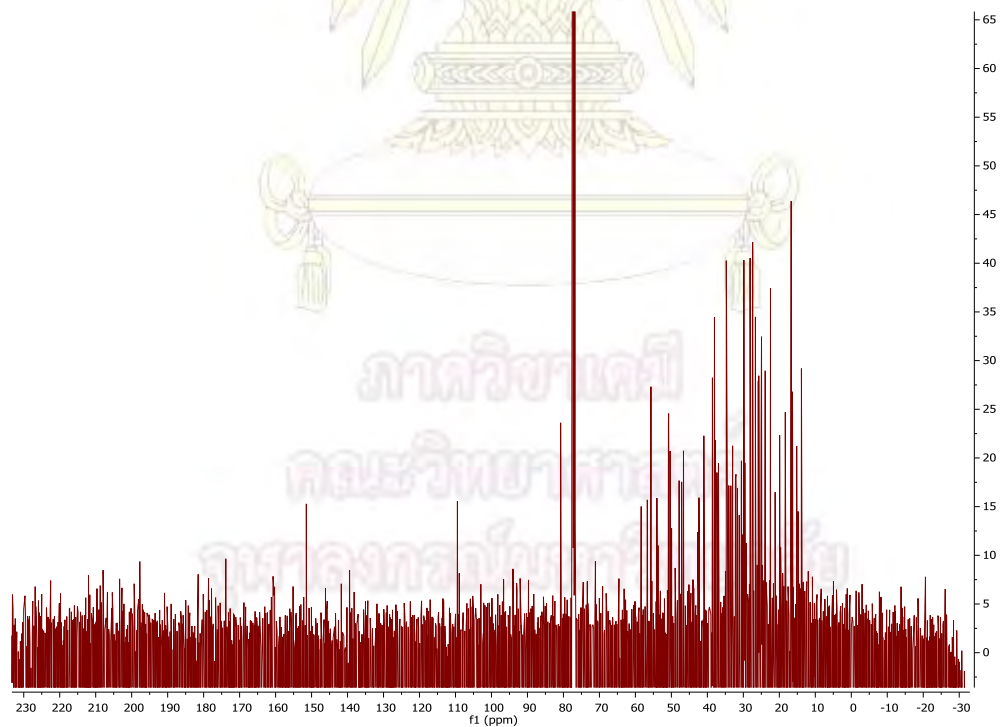
รูปที่ 33 ^1H NMR spectrum ของ 28-*N*-cyclohexyl-*N*-[(cyclohexylamino)carbonyl]-3-*O*-pentanoyl betulinic acid (**2k**) ใน CDCl_3



รูปที่ 34 ^{13}C NMR spectrum ของ 28-*N*-cyclohexyl-*N*-[(cyclohexylamino)carbonyl]-3-*O*-pentanoyl betulinic acid (**2k**) ใน CDCl_3



รูปที่ 35 ^1H NMR spectrum ของ ของ 28-*N*-cyclohexyl-*N*-[(cyclohexylamino)carbonyl]-3-*O*-hexanoyl betulinic acid (21) ใน CDCl_3



รูปที่ 36 ^{13}C NMR spectrum ของ ของ 28-*N*-cyclohexyl-*N*-[(cyclohexylamino)carbonyl]-3-*O*-hexanoyl betulinic acid (21) ใน CDCl_3

ภาคผนวก ข

3-O-acetyl lupeol (1a): Following the general procedure, reaction of **1** (50.0 mg, 0.12 mmol), acetic anhydride (33 μ L, 0.35 mmol), triethylamine (TEA, 49 μ L, 0.35 mmol), 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP, trace amount) in CH_2Cl_2 (1.17 mL) after 1 h yielded compound **1a** (20.9 mg, 38.1%)

3-O-propanoyl lupeol (1b): Following the general procedure, reaction of **1** (50.0 mg, 0.12 mmol), propionic anhydride (45 μ L, 0.35 mmol), triethylamine (TEA, 49 μ L, 0.35 mmol), 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP, trace amount) in CH_2Cl_2 (1.17 mL) after 1 h yielded compound **1b** (23.4 mg, 41.4%)

3-O-butanoyl lupeol (1c) : Following the general procedure, reaction of **1** (50.0 mg, 0.12 mmol), butanoic anhydride (58 μ L, 0.35 mmol), triethylamine (TEA, 49 μ L, 0.35 mmol), 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP, trace amount) in CH_2Cl_2 (1.17 mL) after 1 h yielded compound **1c** (25.3 mg, 43.5%)

3-O-pentanoyl lupeol (1d): Following the general procedure, reaction of **1** (50.0 mg, 0.12 mmol), valeric anhydride (71 μ L, 0.35 mmol), triethylamine (TEA, 49 μ L, 0.35 mmol), 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP, trace amount) in CH_2Cl_2 (1.17 mL) after 1 h yielded compound **1d** (27.3 mg, 45.6%)

3-O-hexanoyl lupeol (1e): Following the general procedure, reaction of **1** (50.0 mg, 0.12 mmol), hexanoic anhydride (81 μ L, 0.35 mmol), triethylamine (TEA, 49 μ L, 0.35 mmol), 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP, trace amount) in CH_2Cl_2 (1.17 mL) after 1 h yielded compound **1e** (28.6 mg, 46.5%)

3-O-benzyl lupeol (1f) : Following the general procedure, reaction of **1** (50.0 mg, 0.12 mmol), benzoic anhydride anhydride (79.5 mg, 0.35 mmol), triethylamine (TEA, 49 μ L, 0.35 mmol), 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP, trace amount) in CH_2Cl_2 (1.17 mL) after 1 h yielded compound **1f** (10.5 mg, 16.9%)

3-O-acetyl betulinic acid (2a): Following the general procedure, reaction of **2** (50.0 mg, 0.11 mmol), acetic anhydride (31 μ L, 0.35 mmol), triethylamine (TEA, 46 μ L, 0.33 mmol), 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP, trace amount) in CH_2Cl_2 (1.09 mL) after 1 h yielded compound **2a** (24.1 mg, 44.1%)

3-O-propanoyl betulinic acid (2b): Following the general procedure, reaction of **2** (50.0 mg, 0.11 mmol), propionic anhydride (42 μ L, 0.35 mmol), triethylamine (TEA, 46 μ L, 0.33 mmol), 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP, trace amount) in CH_2Cl_2 (1.09 mL) after 1 h yielded compound **2b** (29.7 mg, 52.9%)

3-O-butanoyl betulinic acid (2c): Following the general procedure, reaction of **2** (50.0 mg, 0.11 mmol), butanoic anhydride (54 μ L, 0.35 mmol), triethylamine (TEA, 46 μ L, 0.33 mmol), 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP, trace amount) in CH_2Cl_2 (1.09 mL) after 1 h yielded compound **2c** (24.8 mg, 43.0%)

3-O-pentanoyl betulinic acid (2d): Following the general procedure, reaction of **2** (50.0 mg, 0.11 mmol), valeric anhydride (66 μ L, 0.35 mmol), triethylamine (TEA, 46 μ L, 0.33 mmol), 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP, trace amount) in CH_2Cl_2 (1.09 mL) after 1 h yielded compound **2d** (30.1 mg, 50.8%)

3-O-hexanoyl betulinic acid (2e): Following the general procedure, reaction of **2** (50.0 mg, 0.11 mmol), hexanoic anhydride (76 μ L, 0.35 mmol), triethylamine (TEA, 46 μ L, 0.33 mmol), 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP, trace amount) in CH_2Cl_2 (1.09 mL) after 1 h yielded compound **2e** (27.3 mg, 44.9%)

3-O-benzoyl betulinic acid (2f): Following the general procedure, reaction of **2** (50.0 mg, 0.11 mmol), benzoic anhydride (66 mg, 0.35 mmol), triethylamine (TEA, 46 μ L, 0.33 mmol), 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP, trace amount) in CH_2Cl_2 (1.09 mL) after 1 h yielded compound **2f** (26.4 mg, 43.0%)

28-N-cyclohexyl-N-[(cyclohexylamino)carbonyl] betulinic acid (2g): Following the general procedure, reaction of **2** (10.0 mg, 0.02 mmol), *N,N'*-

dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 6 μ L, 0.05 mmol), 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP, trace amount) in CH_2Cl_2 (0.15 mL) after 1 h yielded compound **2g** (4.24 mg, 42.4%)

28-N-cyclohexyl-N-[(cyclohexylamino)carbonyl]-3-O-acetyl betulinic acid (2h):

Following the general procedure, reaction of **2g** (10.0 mg, 0.02 mmol), acetic anhydride (4 μ L, 0.05 mmol), triethylamine (TEA, 6 μ L, 0.05 mmol), 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP, trace amount) in CH_2Cl_2 (0.15 mL) after 1 h yielded compound **2h** (5.08 mg, 47.8%)

28-N-cyclohexyl-N-[(cyclohexylamino)carbonyl]-3-O-propanoyl betulinic acid (2i):

Following the general procedure, reaction of **2g** (10.0 mg, 0.02 mmol), propionic anhydride (6 μ L, 0.05 mmol), triethylamine (TEA, 6 μ L, 0.05 mmol), 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP, trace amount) in CH_2Cl_2 (0.15 mL) after 1 h yielded compound **2i** (5.32 mg, 49.1%)

28-N-cyclohexyl-N-[(cyclohexylamino)carbonyl]-3-O-butanoyl betulinic acid (2j):

Following the general procedure, reaction of **2g** (10.0 mg, 0.02 mmol), butanoic anhydride (7 μ L, 0.05 mmol), triethylamine (TEA, 6 μ L, 0.05 mmol), 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP, trace amount) in CH_2Cl_2 (0.15 mL) after 1 h yielded compound **2j** (4.14 mg, 37.4%)

28-N-cyclohexyl-N-[(cyclohexylamino)carbonyl]-3-O-pentanoyl betulinic acid (2k):

Following the general procedure, reaction of **2g** (10.0 mg, 0.02 mmol), valeric anhydride (9 μ L, 0.05 mmol), triethylamine (TEA, 6 μ L, 0.05 mmol), 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP, trace amount) in CH_2Cl_2 (0.15 mL) after 1 h yielded compound **2k** (4.36 mg, 38.7%)

28-N-cyclohexyl-N-[(cyclohexylamino)carbonyl]-3-O-hexanoyl betulinic acid (2l):

Following the general procedure, reaction of **2g** (10.0 mg, 0.02 mmol), hexanoic anhydride (10 μ L, 0.05 mmol), triethylamine (TEA, 6 μ L, 0.05 mmol), 4-

(dimethylamino)pyridine (DMAP, trace amount) in CH_2Cl_2 (0.15 mL) after 1 h yielded compound **2** (2.06 mg, 17.9%)



ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้วิจัย

นายสุวิศิษฐ์ กัลดสอาด เกิดเมื่อวันที่ 19 พฤศจิกายน พ.ศ.2535 ที่จังหวัดสงขลา สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายสายสามัญ แผนกวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์ จากโรงเรียนอัสสัมชัญระยอง จังหวัดระยอง เมื่อปีการศึกษา 2553 และเข้าศึกษาในหลักสูตร วิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2554 และจบการศึกษาในเดือนมิถุนายน พ.ศ.2558 ที่อยู่ปัจจุบัน 99/99 ถนนเลี้ยวเมืองทับมา ต.ทับมา อ.เมือง จ.ระยอง 21000

อีเมล suwisitk@hotmail.com

นายธนัท พึ่งโพธิ์ เกิดเมื่อวันที่ 5 มีนาคม พ.ศ.2534 ที่จังหวัดกรุงเทพฯ สำเร็จ การศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายสายสามัญ แผนกวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์ จากโรงเรียน ทวีธาภิเศก จังหวัดกรุงเทพฯ เมื่อปีการศึกษา 2551 และเข้าศึกษาในหลักสูตร วิทยาศาสตร์ บัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2554 และ จบการศึกษาในเดือนมิถุนายน พ.ศ.2558 ที่อยู่ปัจจุบัน 166/10 ถนนริมทางรถไฟเก่า แขวงบาง นา เขตบางนา จ.กรุงเทพฯ 10260

อีเมล natty_narak55@hotmail.com

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย