

วิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้าง

3.1.1 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของ ZAP-1

ZAP-1 เป็นน้ำมันสีเหลือง จากอินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 10) พบแถบการดูดกลืนที่สำคัญ ได้แก่ 2923,2854 (CH stretching ของ CH_3 , CH_2), 1465 (CH bending ของ CH_3 , CH_2) และ 720 cm^{-1} (CH rocking ของ $(\text{CH}_2)_n$) ซึ่งพอจะบอกได้ว่า ZAP-1 น่าจะเป็นไฮโดรคาร์บอนโซ่ตรงยาว

หาจำนวนคาร์บอนได้โดยการเปรียบเทียบกราฟมาตรฐาน (กราฟระหว่าง log retention time กับจำนวนคาร์บอน) ของไฮโดรคาร์บอนโซ่ตรงยาวมาตรฐาน (รูปที่ 13) พบว่า ZAP-1 มีค่า retention time เป็น 13.55, 14.13, 14.50, 15.46, 15.93, 16.63, 17.88 และ 18.00 นาที โดยค่า log retention time เป็น 1.13, 1.15, 1.16, 1.19, 1.20, 1.22, 1.25 และ 1.26 ตามลำดับ ซึ่ง log retention time 1.20 และ 1.26 ตรงกับจำนวนคาร์บอน 16 และ 18 คาร์บอนตามลำดับ ส่วนตำแหน่งอื่นๆไม่สามารถบอกจำนวนคาร์บอนได้ เนื่องจากวิธีการเทียบจำนวนคาร์บอนในกราฟมาตรฐานใช้ได้เมื่อสารที่ต้องการวิเคราะห์เป็น homologous series เดียวกับสารมาตรฐานเท่านั้น สำหรับไฮโดรคาร์บอนโซ่ตรงยาวมาตรฐาน มีโครงสร้างคร่าวๆ ดังนี้



แสดงว่าสารที่มี retention time อื่นๆ น่าจะเป็นไฮโดรคาร์บอนที่มีโซ่กิ่งอยู่ด้วย ซึ่งไม่สามารถบอกจำนวนคาร์บอนที่แน่นอนได้

จากข้อมูลข้างต้นพอจะสรุปได้ว่า ZAP-1 เป็นของผสมไฮโดรคาร์บอน 8 ชนิด โดยที่ไฮโดรคาร์บอน 2 ชนิด เป็นแบบโซ่ตรงยาว ได้แก่ hexadecane ($\text{C}_{16}\text{H}_{34}$) และ octadecane ($\text{C}_{18}\text{H}_{36}$) มีโครงสร้างดังนี้



hexadecane



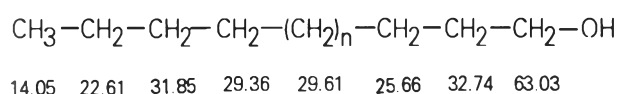
octadecane

3.1.2 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของ ZAP-2

ZAP-2 เป็นของแข็งอสัณฐานสีขาว จุดหลอมเหลว 76-78 °C จากอินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 14) พบแถบการดูดกลืนที่สำคัญ ได้แก่ 3200-3500 (OH) , 2919,2849 (CH stretching ของ CH₃ , CH₂) , 1468 (CH bending ของ CH₃ , CH₂) และ 724 cm⁻¹ (CH rocking ของ (CH₂)_n)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 15) พบสัญญาณที่ 0.88 (CH₃) , 1.20 (-(CH₂)_n) , 1.58 (-CH₂-CH₂-OH) และ 3.64 (-CH₂-OH)

จากข้อมูลอินฟราเรดและโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม พอลจะบอกได้ว่า ZAP-2 น่าจะเป็นแอลกอฮอล์โซ่ตรงยาวอิ่มตัว และเมื่อพิจารณาคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 16) พบสัญญาณที่ 14.05-32.74 ppm (CH₃ , CH₂) และ 63.03 ppm (-CH₂-OH) โดยสัญญาณที่ 29.61 ppm เป็นสัญญาณของ (CH₂)_n ซึ่งมีโครงสร้างคร่าวๆ ดังนี้



หาจำนวนคาร์บอนได้โดยการเปรียบเทียบกราฟมาตรฐาน (กราฟระหว่าง log retention time กับจำนวนคาร์บอน) ของแอลกอฮอล์โซ่ตรงยาวมาตรฐาน (รูปที่ 19) พบว่า ZAP-2 มีค่า retention time เป็น 5.04 , 7.66 , 12.60 และ 20.91 นาที โดยค่า log retention time เป็น -0.05 , 0.70 , 0.88 , 1.10 และ 1.32 ตามลำดับ ซึ่งตรงกับจำนวนคาร์บอน 22 , 24 , 26 และ 28 คาร์บอนตามลำดับ

นั่นคือ ZAP-2 เป็นของผสมแอลกอฮอล์โซ่ตรงยาว 4 ชนิด ได้แก่ doicosanol (C₂₂H₄₅OH) , tetracosanol (C₂₄H₄₉OH) , hexacosanol (C₂₆H₅₃OH) และ octacosanol (C₂₈H₅₇OH) ซึ่งสรุปได้ดังตารางที่ 11

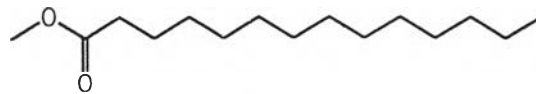
ตารางที่ 11 แอลกอฮอล์โซ่ตรงยาวที่พบใน ZAP-2

สูตรโครงสร้าง	ชื่อสาร	% ที่พบ
CH ₃ -(CH ₂) ₂₀ -CH ₂ OH	doicosanol	0.58
CH ₃ -(CH ₂) ₂₂ -CH ₂ OH	tetracosanol	3.84
CH ₃ -(CH ₂) ₂₄ -CH ₂ OH	hexacosanol	17.05
CH ₃ -(CH ₂) ₂₆ -CH ₂ OH	octacosanol	78.53

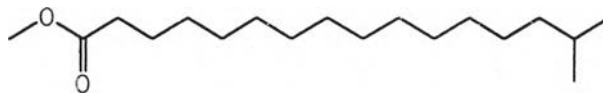
3.1.3 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของ ZAP-3

ZAP-3 เป็นของแข็งอสัณฐานสีขาว จุดหลอมเหลว 65-67 °C อินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 20) พบแถบการดูดกลืนที่สำคัญได้แก่ 3000-3500 (OH) , 1705 (COOH) และ 724 cm^{-1} (CH rocking ของ $(\text{CH}_2)_n$) แสดงว่า ZAP-3 เป็นกรดคาร์บอกซิลิกอิ่มตัว เมื่อเตรียม ZAP-3 เป็นอนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์แล้ววิเคราะห์ด้วย GC-MS พบว่าได้ค่า retention time (นาที) เป็น 16.05 , 19.44 , 20.76 , 21.87 , 27.61 , 30.08 , 30.34 , 33.05 , 35.73 , 38.90 , 42.68 , 47.45 และ 49.76 (รูปที่ 21) และทำการสืบค้นข้อมูลแมสสเปกตรัมของอนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ (library search) (รูปที่ 22-34) เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NIST (National Instituted of Standard Testing) (โดยการเปรียบเทียบไอออนเชิงโมเลกุลและชิ้นส่วนของการแตกมวล) แล้วพอจะคาดคะเนอนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ได้ดังนี้

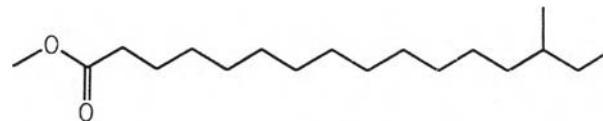
อนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ที่มี retention time เป็น 16.05 น่าจะเป็น tetradecanoic acid ,methyl ester ($\text{C}_{15}\text{H}_{30}\text{O}_2$) มีสูตรโครงสร้างดังนี้



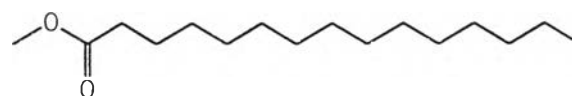
อนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ที่มี retention time เป็น 19.44 น่าจะเป็น hexadecanoic acid,15-methyl ,methyl ester ($\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$) มีสูตรโครงสร้างดังนี้



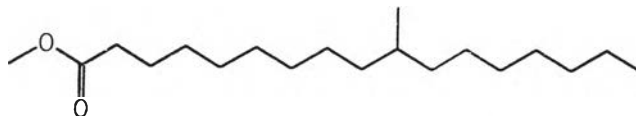
อนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ที่มี retention time เป็น 20.76 น่าจะเป็น hexadecanoic acid,14-methyl,methyl ester ($\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$) มีสูตรโครงสร้างดังนี้



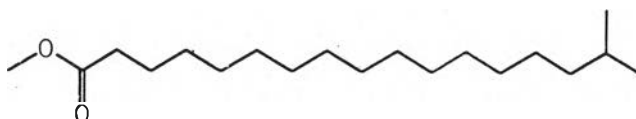
อนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ที่มี retention time เป็น 21.87 น่าจะเป็น pentadecanoic acid,methyl ester ($\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$) มีสูตรโครงสร้างดังนี้



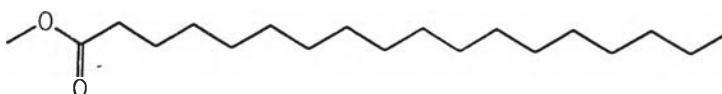
อนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ที่มี retention time เป็น 27.61 น่าจะเป็น heptadecanoic acid,10-methyl,methyl ester ($C_{19}H_{38}O_2$) มีสูตรโครงสร้างดังนี้



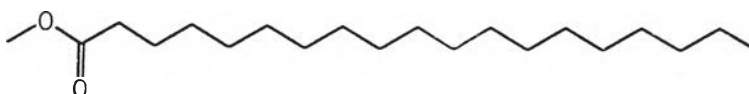
อนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ที่มี retention time เป็น 30.08 น่าจะเป็น heptadecanoic acid,16-methyl,methyl ester ($C_{19}H_{38}O_2$) มีสูตรโครงสร้างดังนี้



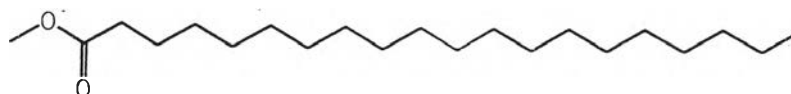
อนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ที่มี retention time เป็น 30.34 น่าจะเป็น octadecanoic acid,methyl ester ($C_{19}H_{38}O_2$) มีสูตรโครงสร้างดังนี้



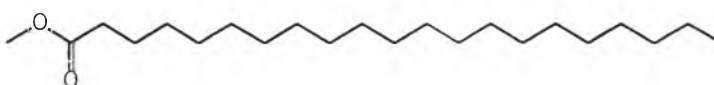
อนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ที่มี retention time เป็น 33.05 น่าจะเป็น nonadecanoic acid , methyl ester ($C_{20}H_{40}O_2$) มีสูตรโครงสร้างดังนี้



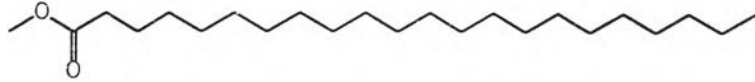
อนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ที่มี retention time เป็น 35.73 น่าจะเป็น eicosanoic acid , methyl ester ($C_{21}H_{42}O_2$) มีสูตรโครงสร้างดังนี้



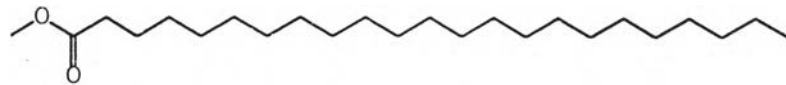
อนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ที่มี retention time เป็น 38.90 น่าจะเป็น heneicosanoic acid , methyl ester ($C_{22}H_{44}O_2$) มีสูตรโครงสร้างดังนี้



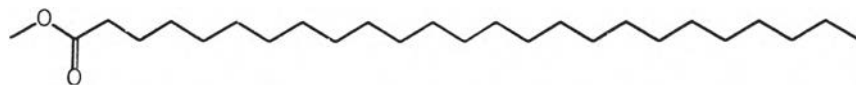
อนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ที่มี retention time เป็น 42.68 น่าจะเป็น docosanoic acid, methyl ester ($C_{23}H_{46}O_2$) มีสูตรโครงสร้างดังนี้



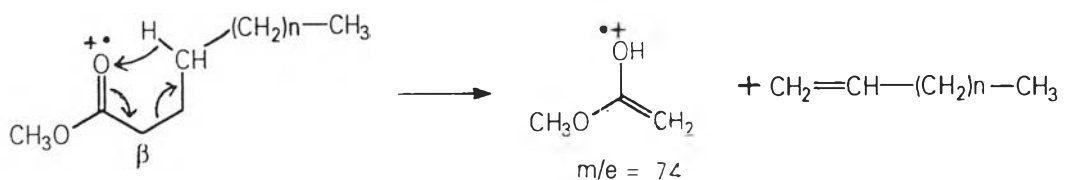
อนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ที่มี retention time เป็น 47.45 น่าจะเป็น tricosanoic acid, methyl ester ($C_{24}H_{48}O_2$) มีสูตรโครงสร้างดังนี้



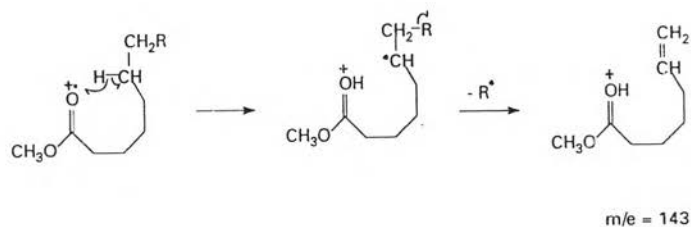
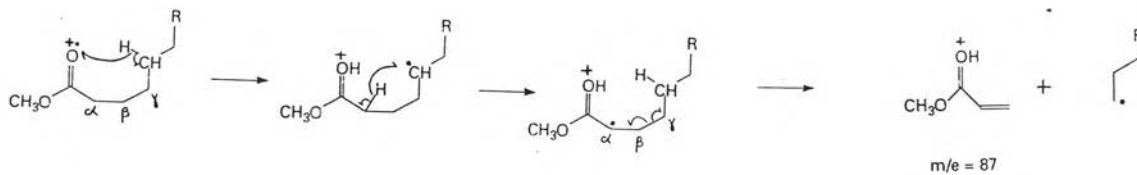
อนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ที่มี retention time เป็น 49.76 น่าจะเป็น pentacosanoic acid, methyl ester ($C_{26}H_{52}O_2$) มีสูตรโครงสร้างดังนี้



การเปรียบเทียบไอออนเชิงโมเลกุลและชิ้นส่วนของการแตกมวลจะเปรียบเทียบได้ยาก ถ้าหากว่าอนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์นั้น มีจำนวนคาร์บอนเท่ากัน มีโซ่กิ่ง (branch chain) เหมือนกัน แต่ต่างกันที่ตำแหน่ง และมีค่า retention time ใกล้เคียงกันด้วย ซึ่งทำให้สามารถสับเปลี่ยนลำดับของอนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ได้ และจากรูปแบบการแตกชิ้นส่วนของอนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ พบว่าที่ m/e เป็น 74 เป็นพีคสูงสุด (base peak) เกิดได้ดังนี้



นอกจากนี้ยังมีการแตกชิ้นส่วนที่ m/e เป็น 87 และ m/e เป็น 143 ซึ่งเกิดได้ดังนี้



จากผลการเปรียบเทียบแมสสเปกตรัมของอนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ กับฐานข้อมูล NIST พอจะสรุปได้ว่า ZAP-3 เป็นของผสมกรดคาร์บอกซิลิก 13 ชนิด ซึ่งสรุปได้ดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 กรดคาร์บอกซิลิกที่พบใน ZAP-3

retention time (นาที)	สูตรโมเลกุล	ชื่อสาร	% ที่พบ
16.05	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	tetradecanoic acid	0.53
19.44	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	15-methyl-hexadecanoic acid	8.22
20.76	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	14-methyl-hexadecanoic acid	21.92
21.87	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	pentadecanoic acid	1.06
27.61	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	10-methyl-hepadecanoic acid	1.49
30.08	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	16-methyl-hepadecanoic acid	10.83
30.34	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	octadecanoic acid	1.91
33.05	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	nonadecanoic acid	7.26
35.73	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	eicosanoic acid	18.54
38.90	C ₂₁ H ₄₂ O ₂	heneicosanoic acid	16.78
42.68	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	docosanoic acid	5.18
47.45	C ₂₃ H ₄₆ O ₂	tricosanoic acid	2.63
49.76	C ₂₅ H ₅₀ O ₂	pentacosanoic acid	3.64

3.1.4 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของ ZAP-4

ZAP-4 เป็นผลึกรูปเข็มใสไม่มีสี จุดหลอมเหลว 153-155 °C จากอินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 35) พบแถบการดูดกลืนที่สำคัญ ได้แก่ 3200-3600 (OH) , 1643 (C=C) , 970 (disubstituted vinyl, $R_1CH=CHR_2$) และ 802 cm^{-1} (trisubstituted vinyl, $R_1R_2C=CHR_3$)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 36) พบสัญญาณที่ 0.68-2.28 (CH_3 , CH_2 , CH) , 3.50 (C-OH) , 5.09 (-CH=CH-) และ 5.35 ppm (-CH=C)

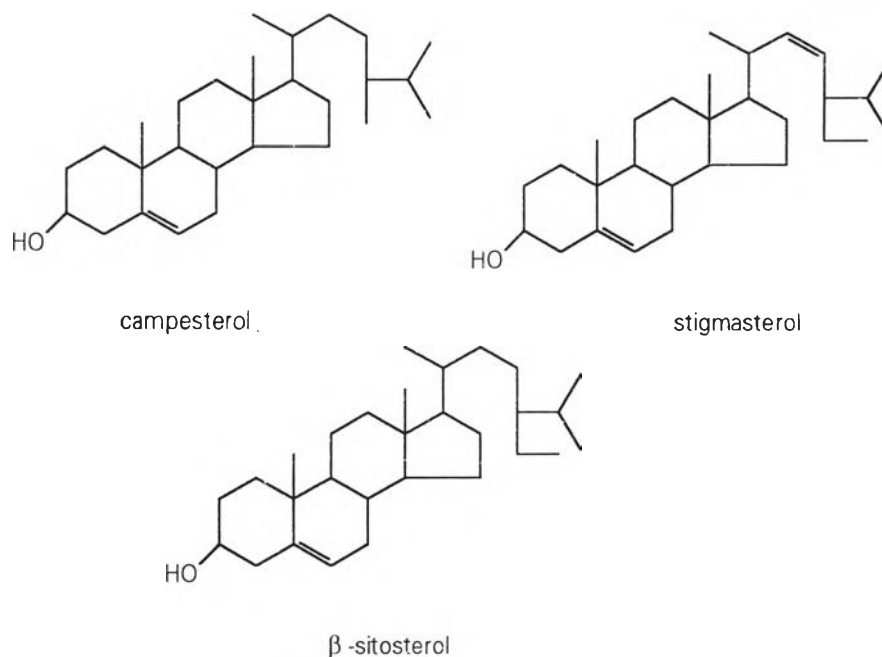
คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 37) พบสัญญาณที่ 11.78-56.79 (CH_3 , CH_2 , CH , C) , 71.72 (-C-OH) , 140.68 (-CH=C) , 121.63 (-CH=C) , 129.20 และ 138.23 ppm (-CH=CH-)

จากข้อมูลโปรตอนและคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม แสดงว่า ZAP-4 เป็นสารประเภทสเตอรอยด์ เมื่อเปรียบเทียบ retention time ของสเตอรอยด์มาตรฐาน กับ ZAP-4 (แก๊สโครมาโทแกรมรูปที่ 38) แสดงดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 retention time ของสเตอรอยด์มาตรฐาน และ ZAP-4

สเตอรอยด์มาตรฐาน	retention time (นาที)		%
	สเตอรอยด์มาตรฐาน	ZAP-4	
cholesterol	16.16	—	—
campesterol	19.96	20.22	4.87
stigmasterol	21.36	21.35	73.84
β -sitosterol	24.26	24.39	21.29

จากตารางที่ 13 จะเห็นว่า ZAP-4 มีค่า retention time ใกล้เคียงกับ campesterol , stigmasterol และ β -sitosterol ดังนั้น ZAP-4 น่าจะเป็นของผสมสเตอรอยด์ได้แก่ campesterol , stigmasterol และ β -sitosterol ซึ่ง stigmasterol และ β -sitosterol เป็นสเตอรอยด์ที่มีจำนวนคาร์บอน 29 อะตอมเท่ากัน แต่ต่างกันที่ stigmasterol มีพันธะคู่มากกว่า β -sitosterol 1 พันธะ (ตำแหน่ง C₂₂₋₂₃ เป็น disubstituted vinyl , -CH=CH-) โดยคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ปรากฏชัดเจนว่ามี 2 พันธะคู่ ดังนั้นพอจะสรุปได้ว่า ZAP-4 เป็นของผสมสเตอรอยด์ 3 ชนิด ได้แก่ campesterol (4.87%) , stigmasterol (73.84%) และ β -sitosterol (21.29 %) ซึ่งมีโครงสร้างดังนี้



3.1.5 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของ ZAP-5

ZAP-5 เป็นผลึกรูปเข็มสีขาว เป็นเงาวาว จุดหลอมเหลว 216-218 °C อินฟราเรด สเปกตรัม (รูปที่ 39) พบแถบการดูดกลืนที่สำคัญ ได้แก่ 3200-3500 (OH) , 1454 (C-Me) , 1373 (CMe₂) 1644 และ 885 cm⁻¹ (=CH₂)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 40) พบสัญญาณที่ 0.71-1.98 (CH₃ , CH₂ , CH) , 2.36 (allylic proton) , 3.18 (-CH-OH) , 3.34 และ 3.80 (AB quatet ,CH₂-OH) , 4.59 และ 4.68 ppm (=CH₂)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 41) พบสัญญาณของคาร์บอน 30 สัญญาณ DEPT-90 (รูปที่ 42) แสดงสัญญาณของคาร์บอนที่เป็น CH และ DEPT-135 (รูปที่ 43) แสดงสัญญาณของคาร์บอนที่เป็น CH , CH₃ (up phase) และ CH₂ (down phase) พบว่ามีหมู่ CH₃ 6 หมู่ ที่ 14.69 , 15.24 , 15.95 (CH₃ 2 หมู่) , 19.01 และ 27.90 ppm มีหมู่ CH 6 หมู่ ที่ 37.30 , 47.73 , 48.77 , 50.40 , 55.29 และ 78.90 ppm มีหมู่ CH₂ 12 หมู่ ที่ 18.25 , 20.80 , 25.22 , 27.03 , 27.35 , 29.17 , 29.76 , 33.90 , 34.22 , 38.78 , 60.51 และ 109.53 ppm ส่วนสัญญาณที่เหลือเป็นควอเทอร์นารีคาร์บอน 6 อะตอม ที่ 37.13 , 38.69 , 40.90 , 42.68 , 47.73 และ 150.35 ppm โดยสัญญาณที่ 150.35 ppm แสดง >C= สัญญาณที่ 109.53 ppm แสดง >C=CH₂ สัญญาณที่ 78.90 ppm แสดง -CH-OH และสัญญาณที่ 60.51 ppm แสดง -CH₂-OH

แมสสเปกตรัม (รูปที่ 47) พบไอออนเชิงโมเลกุล (M⁺) ที่ 442 มีสูตรโมเลกุล C₃₀H₅₀O₂ คำนวณจำนวนวงและพันธะคู่ได้เท่ากับ 6

จากข้อมูลข้างต้นแสดงว่า ZAP-5 เป็นไตรเทอร์พีนอยด์ที่มีหมู่ $-CH-OH$, CH_2-OH และ $C=CH_2$ อยู่ในโครงสร้าง เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ ZAP-5 กับ betulic acid acetate (75.5 MHz, pyridine, d_5) แสดงดังตารางที่ 14

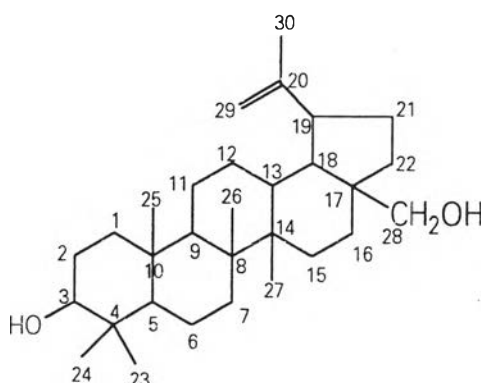
ตารางที่ 14 chemical shift คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ betulic acid acetate กับ ZAP-5
ZAP-6 และ ZAP-6A

ตำแหน่งคาร์บอน	betulic acid acetate (7)	ZAP-5	ZAP-6	ZAP-6A
1	38.28	38.78	38.40	38.35
2	18.07	18.25	17.88	18.09
3	80.90	78.90	77.93	80.89
4	37.71	37.13	38.40	37.73
5	55.31	55.29	55.02	55.35
6	20.76	20.80	20.48	20.79
7	34.14	34.22	33.99	34.17
8	40.62	40.90	40.36	40.63
9	50.29	50.40	50.16	50.33
10	37.05	37.13	36.57	37.05
11	23.59	25.22	25.16	23.63
12	25.34	27.03	26.98	25.37
13	38.35	37.30	37.81	38.35
14	42.34	42.68	42.01	42.35
15	30.50	29.76	30.28	30.50
16	32.08	33.90	31.89	32.09
17	56.35	47.43	55.62	56.32
18	49.19	48.77	48.88	49.20
19	46.87	47.73	46.47	46.87
20	150.23	150.35	150.29	150.30
21	29.60	29.17	29.26	29.62
22	36.97	37.13	36.77	36.97
23	27.86	27.90	27.65	27.87

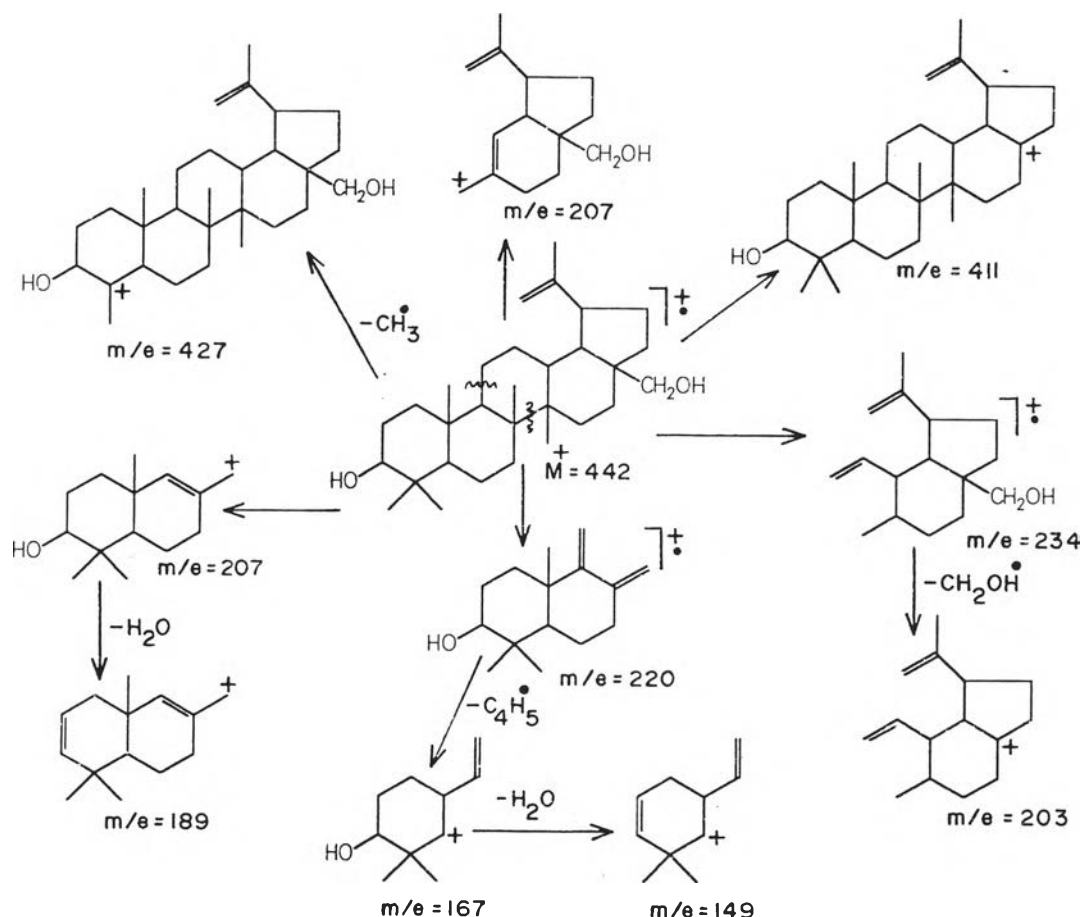
ตารางที่ 14 chemical shift คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ betulic acid acetate กับ ZAP-5 ZAP-6 และ ZAP-6A (ต่อ)

ตำแหน่งคาร์บอน	betulic acid acetate (7)	ZAP-5	ZAP-6	ZAP-6A
24	16.36	15.95	15.63	16.38
25	16.07	15.95	15.63	16.09
26	15.95	15.24	15.05	15.96
27	14.56	14.69	14.22	14.58
28	182.54	60.51	177.73	181.86
29	109.62	109.53	108.83	109.66
30	19.26	19.01	18.91	19.27
	O-CO-Me			C-CO-Me
	170.95 (C)			170.99 (C)
	21.20 (CH ₃)			21.24 (CH ₃)

จะเห็นว่าค่า chemical shift ของคาร์บอนตำแหน่งที่ 28 ของ ZAP-5 เป็น 60.51 ppm แสดงว่า คาร์บอนที่ตำแหน่งนี้ไม่ใช่หมู่ COOH ซึ่งจะส่งผลให้ค่า chemical shift ของคาร์บอนตำแหน่งที่ 17 น้อยกว่าค่า chemical shift ของ betulic acid acetate และจาก DEPT-135 (รูปที่ 29) ระบุว่า คาร์บอนตำแหน่งที่ 28 ของ ZAP-5 คือหมู่ CH₂OH นั่นคือ ZAP-5 น่าจะมีโครงสร้างหลักคล้ายกับ betulic acid โดย คาร์บอนตำแหน่งที่ 28 ของ ZAP-5 เป็น CH₂OH มีโครงสร้างดังนี้

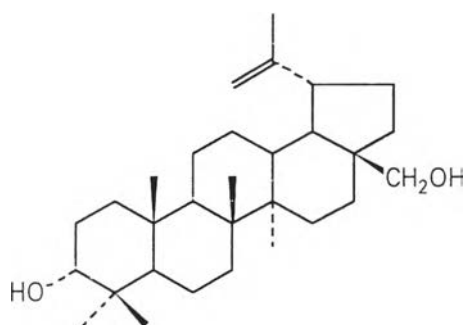


จากชิ้นส่วนของการแตกมวลที่สำคัญ คือ m/e ที่ 427 , 411 , 234 , 220 , 207 , 203 , 189 , 167 และ 149 (รูปที่ 56) แสดงการแตกของโมเลกุลได้ดังนี้



จะเห็นว่าการแตกชิ้นส่วนของโครงสร้างข้างต้น สอดคล้องกับข้อมูลแมสสเปกตรัมของ ZAP-5 และเพื่อที่จะยืนยันโครงสร้างที่แน่นอนของสารนี้จึงได้ทำการวิเคราะห์โดย 2D-NMR ได้แก่ ^{13}C - ^1H correlation (รูปที่ 55) และ ^1H - ^1H COSY (รูปที่ 53) พบว่า โปรตอนของคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 เกิด coupling กับโปรตอนของคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 โปรตอนของคาร์บอนตำแหน่งที่ 18 เกิด coupling กับโปรตอนของคาร์บอนตำแหน่งที่ 29 (long range coupling) และโปรตอนของคาร์บอนตำแหน่งที่ 28 เกิด interaction กันเองด้วย เนื่องจากคาร์บอนตำแหน่งที่ 28 อยู่ในตำแหน่งที่ rigid ทำให้พันธะ C(28)-H, C(27)-C(28) หมุนได้ไม่อิสระ (เพราะคาร์บอนนี้มีหมู่ OH ซึ่งมีขนาดใหญ่จึงต้องจัดตัวให้หมู่ OH เกิด interaction กับอะตอมอื่น ๆ น้อยที่สุด) ดังนั้นไฮโดรเจนทั้งสองอะตอมจึงมีสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน ในโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมจึงปรากฏเป็น AB quartet ที่ chemical shift 3.34-3.80 ppm (รูปที่ 49)

จากโครงสร้างข้างต้น ถ้า OH ของตำแหน่งที่ 3 เป็น β สารนี้คือ betulin (จุดหลอมเหลว 251-252 °C) เมื่อเตรียมเป็นอนุพันธ์ diacetate จะมีจุดหลอมเหลว 216-217 °C ถ้า OH ของตำแหน่งที่ 3 เป็น α สารนี้คือ 3-epi-betulin (จุดหลอมเหลว 215 °C) เมื่อเตรียมเป็นอนุพันธ์ diacetate จะมีจุดหลอมเหลว 148 °C แต่เนื่องจาก ZAP-5 ที่แยกได้มีปริมาณน้อย ไม่สามารถเตรียมอนุพันธ์ diacetate ได้ แต่เมื่อเปรียบเทียบจุดหลอมเหลวของ ZAP-5 กับสารทั้ง 2 ชนิด พบว่า ใกล้เคียงกับ 3-epi-betulin และจากข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีทั้งหมดจึงพอจะสรุปได้ว่า ZAP-5 น่าจะเป็น 3-epi-betulin (lup-20(29)-en-3,28 diol (3 α)) [35316-99-5] ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังนี้



3-epi-betulin พบครั้งแรกใน *Canthium dicoccum* Geartn พบโดย Subhas C. Das เมื่อปี 1971

3.1.6 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของ ZAP-6

ZAP-6 เป็นผลึกรูปเข็มสีขาว เป็นเงาวาว จุดหลอมเหลว 276-278 °C (สลายตัว) อินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 48) พบแถบการดูดกลืนที่สำคัญ ได้แก่ 3100-3500 (OH) , 1688 (COOH) , 1453 (C-Me) , 1375 (CMe₂) , 1643 และ 885 cm⁻¹ (=CH₂)

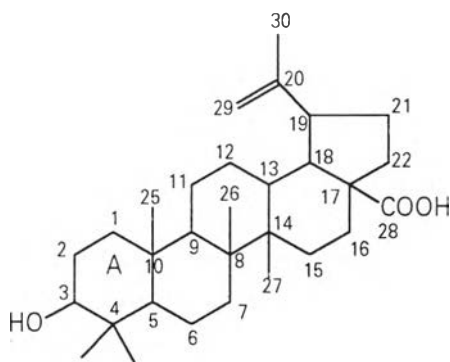
โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 49) พบสัญญาณที่ 0.66-2.30 (CH₃ , CH₂ , CH) , 3.00 (allylic proton) , 3.17 (CH-OH) และ 4.67 ppm (=CH₂)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 50) พบสัญญาณของคาร์บอน 30 สัญญาณ DEPT-90 (รูปที่ 51) แสดงสัญญาณของคาร์บอนที่เป็น CH และ DEPT-135 (รูปที่ 52) แสดงสัญญาณของคาร์บอนที่เป็น CH , CH₃ (up phase) และ CH₂ (down phase) พบว่ามีหมู่ CH₃ 6 หมู่ ที่ 14.22 , 15.05 , 15.63 (CH₃ 2 หมู่) , ,18.91 และ 27.65 ppm มีหมู่ CH 6 หมู่ ที่ 37.81 , 46.47 , 48.88 , 50.16 , 55.02 และ 77.93 ppm มีหมู่ CH₂ 11 หมู่ ที่ 17.88 , 20.48 , 25.16 , 26.98 , 29.26 , 30.28 , 31.89 , 33.99 , 36.77 , 38.40 และ 108.83 ppm ส่วนสัญญาณที่เหลือเป็นควอเทอร์นารีคาร์บอน 7 อะตอม ที่ 36.57 , 38.40 , 40.36 , 42.01 , 55.62 , 150.29 และ 177.73 ppm โดยสัญญาณที่ 177.73 ppm แสดงหมู่คาร์บอนิล

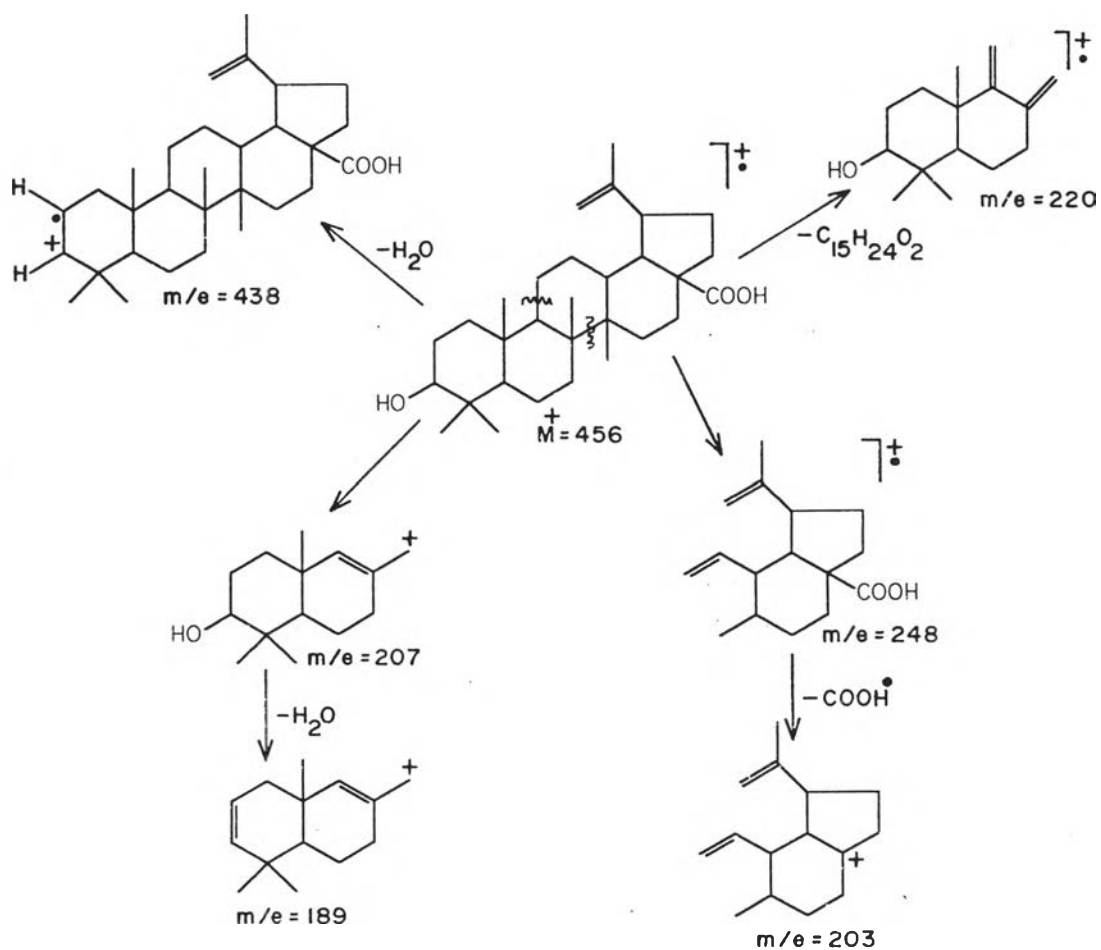
สัญญาณที่ 150.29 ppm แสดง >C= สัญญาณที่ 108.83 ppm แสดง >C=CH_2 และสัญญาณที่ 77.93 ppm แสดง -CH-OH

แมสสเปกตรัม (รูปที่ 56) พบไอออนเชิงโมเลกุล (M^+) ที่ 456 มีสูตรโมเลกุล $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ จำนวนจำนวนวงและพันธะคู่ได้เท่ากับ 7

จากข้อมูลข้างต้นแสดงว่า ZAP-6 เป็นไตรเทอร์พีนอยด์ที่มีหมู่ OH , COOH และ C=CH_2 อยู่ในโครงสร้าง จึงคาดว่า ZAP-6 มีโครงสร้างที่เป็นไปได้ คือ

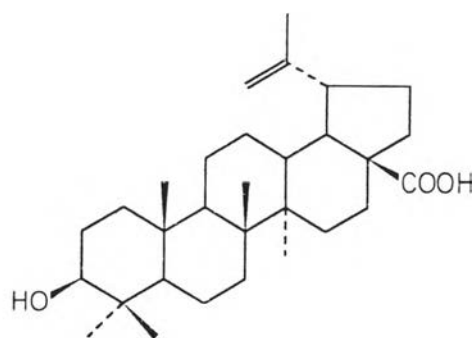


จากชิ้นส่วนต่างๆ ของการแตกมวลที่สำคัญคือ m/e ที่ 438, 248, 220, 207, 208 และ 189 (รูปที่ 56) แสดงการแตกของโมเลกุลได้ดังนี้



จะเห็นว่าการแตกชิ้นส่วนของโครงสร้างข้างต้น สอดคล้องกับข้อมูลแมสสเปกตรัมของ ZAP-6 และเพื่อที่จะยืนยันโครงสร้างที่แน่นอนของสารนี้จึงได้ทำการวิเคราะห์โดย 2D-NMR ได้แก่ ^{13}C - ^1H correlation (รูปที่ 55) และ ^1H - ^1H COSY (รูปที่ 53) พบว่า โปรตอนของคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 เกิด coupling กับโปรตอนของคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 โปรตอนของคาร์บอนตำแหน่งที่ 18 เกิด coupling กับโปรตอนของคาร์บอนตำแหน่งที่ 29 (long range coupling)

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ ZAP-6A (อนุพันธ์ acetate ของ ZAP-6) กับ betulinic acid acetate (ตารางที่ 14) พบว่าค่า chemical shift ของคาร์บอนทุกตำแหน่งใกล้เคียงกันมาก และจากข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีทั้งหมด พอจะสรุปได้ว่า ZAP-6 น่าจะเป็น betulinic acid หรือ betulonic acid (3 β -hydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid) [472-15-1] ซึ่งพบว่า betulonic acid มีฤทธิ์ในการยับยั้ง เชื้อไวรัสชนิด herpes simplex virus type 1 ได้ (ไวรัสที่ทำให้เกิดผิวน้ำพุ) เมื่อทำการทดลองแบบ *in vitro* โดยมีค่า EC50 เป็น 30 $\mu\text{g/ml}$ (42) นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ต่อต้านโรคเกี่ยวกับเม็ดเลือดขาว (P 338 lymphocytic leukemia) ด้วย (43) ซึ่งมีโครงสร้างดังนี้



3.1.7 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของ ZAP-7

ZAP-7 เป็นของแข็งอสัณฐานสีขาว จุดหลอมเหลว 268-269 $^{\circ}\text{C}$ อินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 61) พบแถบการดูดกลืนที่สำคัญ ได้แก่ 3300-3500 (OH), 1632 ($\text{C}=\text{C}$), 1070 ($\text{C}-\text{O}$) และ 892 cm^{-1} (anomeric axial proton of β -sugar) ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของไกลโคไซด์

เพื่อหาโครงสร้างที่แน่นอนของ ZAP-7 จึงแยกสลายด้วย 10% HCl ในเอทานอล ได้ส่วน agycone (ZAP-7A) และน้ำตาลในชั้นน้ำ (ZAP-7B)

ZAP-7A เป็นผลึกรูปเข็มใสไม่มีสี จุดหลอมเหลว 135-137 $^{\circ}\text{C}$ จากอินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 62) พบแถบการดูดกลืนที่สำคัญ ได้แก่ 3200-3500 (OH), 1638 ($\text{C}=\text{C}$), 971 (disubstituted vinyl, $\text{R}_1\text{CH}=\text{CHR}_2$) และ 802 cm^{-1} (trisubstituted vinyl, $\text{R}_1\text{R}_2\text{C}=\text{CHR}_3$)

เมื่อเปรียบเทียบ อินฟราเรดสเปกตรัมของ ZAP-7A กับ อินฟราเรดสเปกตรัมของ ZAP-4 (รูปที่ 35) พบว่าเหมือนกัน นั่นคือ ZAP-7A น่าจะเป็นสารประเภทสเตอรอยด์

เมื่อเปรียบเทียบ retention time ของสเตอรอยด์มาตรฐาน กับ ZAP-7A (แก๊สโครมาโทแกรมรูปที่ 63) แสดงดังตารางที่ 15

ตารางที่ 15 retention time ของสเตอรอยด์มาตรฐาน และ ZAP-7A

สเตอรอยด์มาตรฐาน	retention time (นาที)		%
	สเตอรอยด์มาตรฐาน	ZAP-7A	
cholesterol	16.06	—	—
campesterol	21.56	21.81	5.21
stigmasterol	23.23	22.75	72.73
β -sitosterol	26.23	26.15	22.06

จากตารางที่ 15 จะเห็นว่า ZAP-7A น่าจะเป็นของผสมสเตอรอยด์ได้แก่ campesterol , stigmasterol และ β -sitosterol

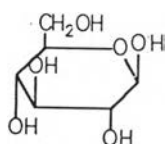
ส่วน ZAP-7B (น้ำตาล) เมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC เปรียบเทียบ retention time กับ retention time ของสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน ได้แก่ กลูโคส พบว่า retention time ของน้ำตาลกลูโคส เป็น 4.42 นาที และของ ZAP-7B เป็น 4.16 นาที แสดงว่า ส่วนของน้ำตาลใน ZAP-7 คือ น้ำตาลกลูโคส

ZAP-7C (acetate derivative) เป็นผลึกรูปเข็มใสแวววาว จุดหลอมเหลว 151-153 °C อินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 65) พบแถบการดูดกลืนที่สำคัญ ได้แก่ 1754 (CH_3COO) และ 1645 cm^{-1} (C=C)

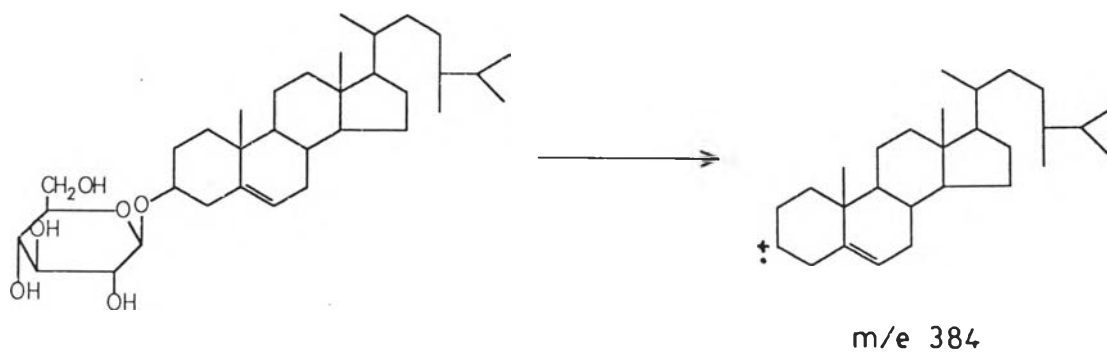
โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 66) พบสัญญาณที่ 0.66-1.87 (CH_3 , CH_2 , CH), 1.99, 2.01, 2.03, 2.06 (CH_3COO 4 หมู่), 4.12-5.03 (โปรตอนของน้ำตาล), 5.10 ($\text{CH}=\text{CH}$) และ 5.34 ppm ($\text{CH}=\text{C}$)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 67) เมื่อเปรียบเทียบกับคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ ZAP-4 (รูปที่ 37) พบว่า คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ ZAP-7C มีสัญญาณที่ 169.19-170.58 ppm แสดงหมู่คาร์บอนิล 4 หมู่ สัญญาณที่ 62.03 ppm แสดง $\text{C}_2\text{H}_2\text{OOCCH}_3$ สัญญาณที่ 68.48-99.55 ppm แสดง CH ของน้ำตาล โดยสัญญาณที่ 99.55 ppm แสดง คาร์บอนที่ต่อกับออกซิเจน 2 อะตอม ($\text{O}-\text{CH}-\text{O}$)

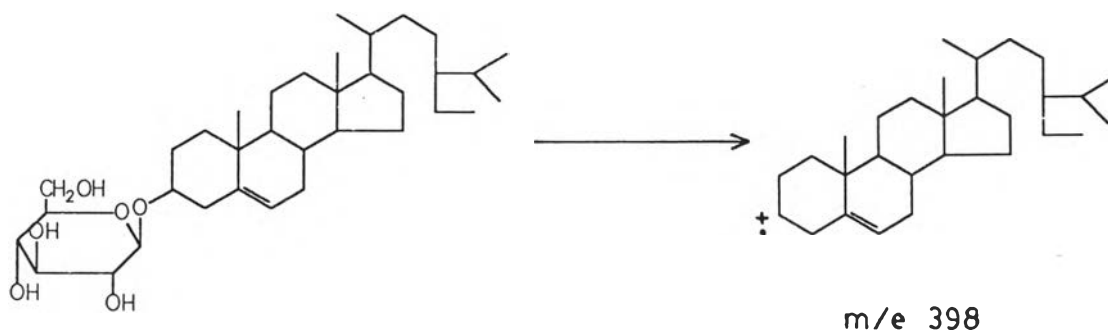
จากข้อมูลข้างต้นพบว่า ZAP-7B เป็นน้ำตาลกลูโคส มีโครงสร้างดังนี้



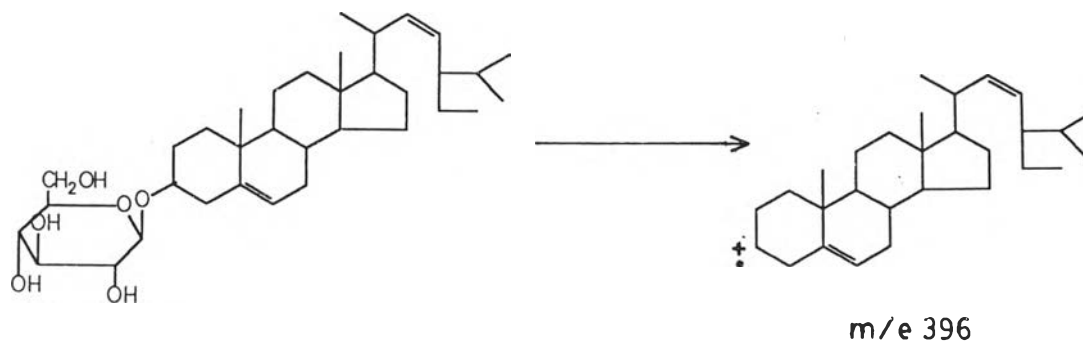
โดย OH ตำแหน่งหนึ่งจะเกิดพันธะกับสเตอรอยด์ทำให้มีหมู่ OH เหลือ 4 หมู่ เมื่อทำปฏิกิริยา acetylation จึงทำให้หมู่ acetyl เข้าไปในโมเลกุลน้ำตาล 4 หมู่ แสดงว่า ZAP-7 นี้ เป็นของผสมสเตอรอยด์ ซึ่งสเตอรอยด์แต่ละชนิดต่อกับน้ำตาลกลูโคสเพียง 1 โมเลกุลเท่านั้น ซึ่งมีโครงสร้างและการแตกโมเลกุลดังนี้



campesterol-3-O- β -D-glucopyranoside



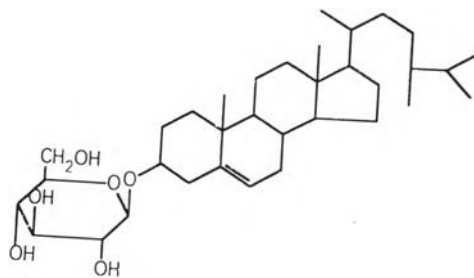
β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside



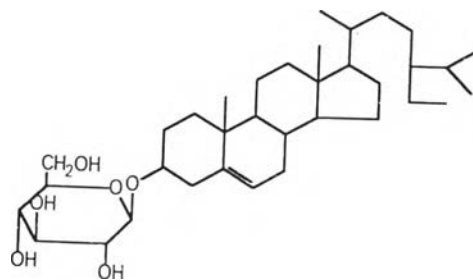
stigmasterol-3-O- β -D-glucopyranoside

เมื่อพิจารณาการแตกของไกลโคไซด์จะได้ชิ้นส่วนของการแตกมวลโดยการหลุดของโมเลกุลน้ำตาลก่อน เป็น 398 , 396 และ 384 ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลแมสสเปกตรัม (รูปที่ 69)

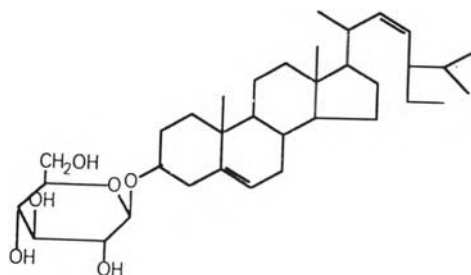
จากข้อมูลทั้งหมดจึงสรุปได้ว่า ZAP-7 เป็นของผสมสเตอรอยด์ไกลโคไซด์ ได้แก่ campesterol-3-O- β -D-glucopyranoside , stigmasterol-3-O- β -D-glucopyranoside และ β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside มีโครงสร้างดังนี้



campesterol-3-O- β -D-glucopyranoside



β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside



stigmasterol-3-O- β -D-glucopyranoside

3.1.8 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของ ZAP-8

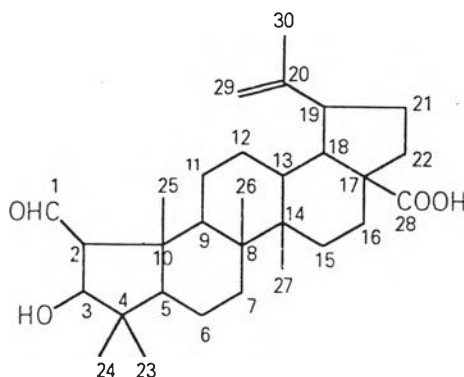
ZAP-8 เป็นผลึกรูปแท่งสีเหลืองอ่อน จุดหลอมเหลว 252-254 °C อินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 70) พบแถบการดูดกลืนที่สำคัญ ได้แก่ 3383 (OH) , 2741 (CHO) , 1701 (COOH,CHO) , 1644 และ 885 cm^{-1} ($=\text{CH}_2$)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 71) พบสัญญาณที่ 0.81-2.50 (CH_3 , CH_2 , CH) , 2.01 (CH ที่ตำแหน่ง 2) , 4.14 (CH-OH) , 4.51 , 4.62 ppm ($=\text{CH}_2$) และ 9.72 ppm (CHO)

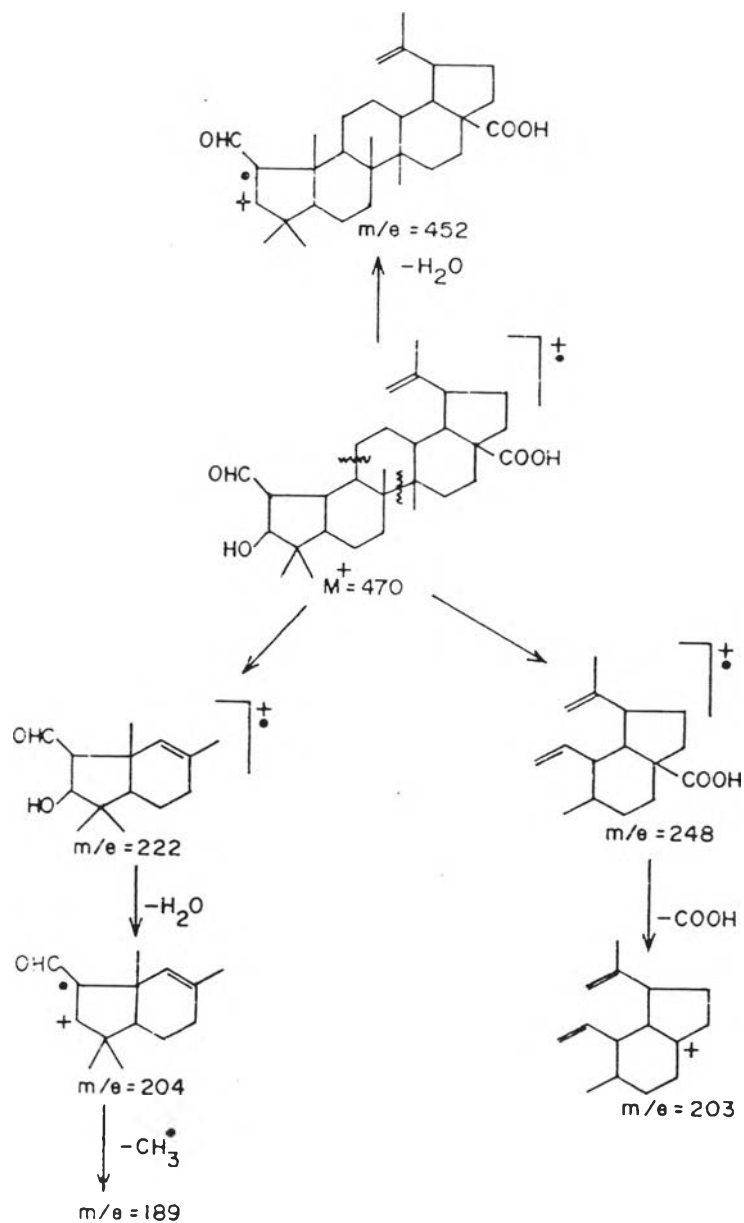
คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 72) พบสัญญาณของคาร์บอน 30 สัญญาณ DEPT-90 (รูปที่ 73) แสดงสัญญาณของคาร์บอนที่เป็น CH และ DEPT-135 (รูปที่ 74) แสดงสัญญาณของคาร์บอนที่เป็น CH , CH_3 (up phase) และ CH_2 (down phase) พบว่ามีหมู่ CH_3 6 หมู่ ที่ 14.33 , 14.44 , 16.29 , 18.93 , 24.97 และ 25.47 ppm มีหมู่ CH 8 หมู่ ที่ 37.50 , 46.56 , 48.65 , 49.53 , 61.82 , 72.35 , 79.83 และ 205.97 ppm มีหมู่ CH_2 9 หมู่ ที่ 17.72 , 23.94 , 24.69 , 29.30 , 30.12 , 31.86 , 37.74 , 36.53 และ 109.95 ppm ส่วนสัญญาณที่เหลือเป็นควอเทอร์นารีคาร์บอน 7 อะตอม ที่ 40.37 , 41.41 , 42.21 , 47.42 , 55.35 , 150.10 และ 177.80 ppm โดยสัญญาณที่ 177.80 ppm แสดงหมู่คาร์บอนิล สัญญาณที่ 150.10 ppm แสดง $>\text{C}=\text{}$ สัญญาณที่ 109.95 ppm แสดง $>\text{C}=\text{CH}_2$ และสัญญาณที่ 72.35 ppm แสดง CH-OH

แมสสเปกตรัม (รูปที่ 78) พบไอออนเชิงโมเลกุล (M^+) ที่ 470 มีสูตรโมเลกุล $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_4$ คำนวณจำนวนวงและพันธะคู่ได้เท่ากับ 8

จากข้อมูลข้างต้นแสดงว่า ZAP-8 เป็นไตรเทอร์พีนอยด์ที่มีหมู่ OH , CHO , COOH และ $\text{C}=\text{CH}_2$ อยู่ในโครงสร้าง เมื่อเปรียบเทียบคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ ZAP-6 กับ ZAP-8 พบว่าคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 และ 2 ของ ZAP-6 เป็น 38.40 และ 17.88 ppm ส่วนของ ZAP-8 เป็น 205.97 และ 79.83 ppm ซึ่งคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ของ ZAP-8 เป็นคาร์บอนของหมู่อัลดีไฮด์ แสดงว่าวง A ใน ZAP-8 น่าจะเป็นวงที่มีคาร์บอน 5 อะตอม (pentacyclic) ซึ่งโดยปกติแล้ววง A ในไตรเทอร์พีนอยด์จะเป็นวงที่มีคาร์บอน 6 อะตอม และคาร์บอนอีก 1 อะตอม เป็นหมู่อัลดีไฮด์ จึงคาดว่า ZAP-8 มีโครงสร้างที่เป็นไปได้คือ



จากชิ้นส่วนของการแตกมวลที่สำคัญคือ m/e ที่ 452 , 248 , 203 และ 189 (รูปที่ 78) แสดงการแตกของโมเลกุลได้ดังนี้



จะเห็นว่าการแตกชิ้นส่วนของโครงสร้างข้างต้น สอดคล้องกับข้อมูลแมสสเปกตรัมของ ZAP-8 และเพื่อที่จะยืนยันโครงสร้างที่แน่นอนของสารนี้จึงได้ทำการวิเคราะห์โดย 2D-NMR ได้แก่ ^{13}C - ^1H correlation (รูปที่ 77) และ ^1H - ^1H COSY (รูปที่ 75) พบว่า โปรตอนของคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 เกิด coupling กับโปรตอนของคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ทำให้โปรตอนของคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 เกิดเป็น doublet โปรตอนของคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 เกิด coupling กับโปรตอนของคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ทำให้โปรตอนของคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 เกิดเป็น double of doublet และโปรตอนของคาร์บอนตำแหน่งที่ 18 เกิด coupling กับโปรตอนของคาร์บอนตำแหน่งที่ 29 (long range coupling)

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ ZAP-8 กับ zizyberanalic acid (75.5 MHz, pyridine, d_5) แสดงดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16 chemical shift คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ zizyberanalic acid กับ ZAP-8

ตำแหน่งคาร์บอน	zizyberanalic acid (7)	ZAP-8
1	206.18	205.97
2	73.66	72.35
3	80.93	79.83
4	48.26	47.42
5	63.02	61.82
6	18.59	17.72
7	34.70	33.74
8	43.11	42.21
9	49.78	48.65
10	41.25	40.37
11	24.94	23.94
12	25.68	24.69
13	38.55	37.50
14	42.32	41.41
15	31.26	30.12

ตารางที่ 16 chemical shift คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ zizyberanaric acid กับ ZAP-8 (ต่อ)

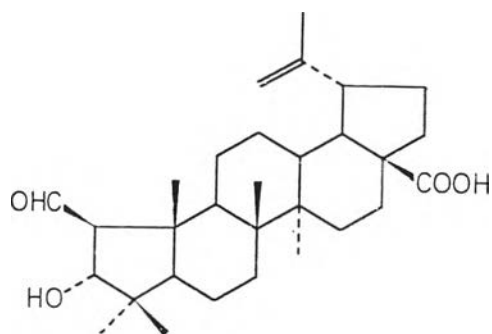
ตำแหน่งคาร์บอน	zizyberanaric acid (7)	ZAP-8
16	32.95	31.86
17	56.58	55.35
18	50.56	49.53
19	47.84	46.56
20	151.20	150.10
21	30.42	29.30
22	37.63	36.53
23	26.58	25.47
24	17.07	16.29
25	25.68	24.97
26	15.08	14.44
27	14.90	14.33
28	178.82	177.80
29	110.09	109.95
30	19.50	18.93

เมื่อเปรียบเทียบค่า coupling constant (J) ของ ZAP-8 กับ zizyberanaric acid (300 MHz, pyridine, d5) พบว่ามีค่าเท่ากัน แสดงดังตารางที่ 17

ตารางที่ 17 chemical shift โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม และ coupling constant (J) ของ zizyberanaric acid กับ ZAP-8

ตำแหน่งของโปรตอน	zizyberanaric acid (7)	ZAP-8
1 (CHO)	10.01 (d, J=4.6 Hz)	9.72 (d, J=4.6 Hz)
2 (CH-CHO)	2.52 (dd, J=4.6, 8.6 Hz)	2.01 (dd, J=4.7, 8.6 Hz)
3 (CH-OH)	4.57 (d, J=8.7 Hz)	4.14 (d, J=8.6 Hz)

จากข้อมูลทั้งหมดพอจะสรุปได้ว่า ZAP-8 น่าจะเป็น zizyberanaric acid (3 α -hydroxy-2 β -aldehydo-A(1)-norlup-20(29)-en-28-oic acid [67594-73-4] ซึ่งมีโครงสร้างดังนี้



zizyberanolic acid พบครั้งแรกใน *Zizyphus jujuba* (แยกได้จากส่วนของรากและเปลือก) โดย A.B. Kundu และคณะ เมื่อปี 1989 (7) โดยมีรายงานข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีได้แก่ อินฟราเรด สเปกตรัม , โปรตอนและคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม และแมสสเปกตรัมเท่านั้น ซึ่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ มีรายงานข้อมูลเพิ่มเติมได้แก่ ^{13}C - ^1H correlation , ^1H - ^1H COSY และ ^1H - ^1H NOESY ทำให้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีของ zizyberanolic acid สมบูรณ์มากขึ้น