บทที่ 1
บทนำ

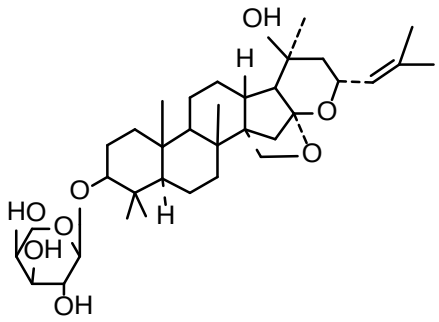
ตะครอง หรือ *Ziziphus cambodiana* Pierre เป็นพืชในสกุล *Ziziphus* อยู่ในวงศ์ Rhamnaceae (สมิตินันท์, 2544) พืชในสกุล *Ziziphus* มีหลายชนิดที่ใช้เป็นยาสมุนไพรพื้นบ้าน เช่น ส่วนเปลือกต้นของพุทรา (*Z. mauritiana* หรือ *Z. jujuba* Lam.) ใช้แก้ท้องร่วง อาเจียน ฝีในคอ ฝีเปื่อยพัง แก้บวม ขับพยาธิ ตกโลหิต ใบใช้แก้หวัดคัดจมูก พิษฝี ขับพยาธิ แก้บวม ตกโลหิต ท้องเสีย บิดมูกเลือด อาเจียน ส่วนผลพุทราใช้แก้ท้องร่วง แก้ไข้ ฟอกเลือด เป็นยาระบาย ขับเสมหะ แก้ไอ (บุณยะประภัสร และ โชคชัยเจริญพร, 2542) ในประเทศเกาหลีใช้ผลพุทราจีน (*Z. jujuba*) ที่เรียกว่า Dae-chu เป็นยากล่อมประสาท (sedative) ยาบำรุงกำลัง (Han and Park, 1987) รักษาโรคนอนไม่หลับและอาการอ่อนเพลียทางระบบประสาท (Woo. et al. 1980) ในทางการแพทย์ของอินเดียใช้มะควัด (*Z. rugosa*) รักษาโรคท้องร่วง อาการปวดขณะมีประจำเดือน และเชื้อโรคเกี่ยวกับฟัน (Acharya, et al. 1988) ในตำรายาสมุนไพรพื้นบ้านใช้ส่วนรากและเปลือกต้นของเล็บเหยี่ยว (*Z. oenoplia*) ต้มดื่มขับระดูขาว ขับปัสสาวะ แก้มดลูกพิการ แก้ฝีในมดลูก และเบาหวาน ส่วนผลใช้แก้เสมหะ แก้ไอ และทำให้ชุ่มคอ (วุฒิ ธรรมเวช. 2540) ส่วนของหนามใช้แก้ฝีประคำร้อย (บุณยะประภัสร และ โชคชัยเจริญพร, 2543) สำหรับตะครองนั้นไม่พบว่ามีรายงานการใช้เป็นสมุนไพร ในภาคอีสานของไทยใช้ไม้ตะครองเป็นไม้ทำถ่าน

จากสรรพคุณที่กล่าวมาของพืชในสกุล *Ziziphus* และจากงานวิจัยต่อเนื่องของพืชในสกุล *Ziziphus* ของกลุ่มผู้วิจัย (Suksamrarn, et al. 2005, 2006; Panseeta, et al. 2011) ซึ่งเป็นกลุ่มวิจัยแรกของประเทศที่ศึกษาทางด้านองค์ประกอบทางเคมีของพืชในสกุลนี้ ผู้วิจัยได้รายงานฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมาลาเรียจากพืชหมากเล็บแมว (Suksamrarn, et al. 2005) และพุทรา (Panseeta, et al. 2011) รายงานการพบสารไตรเทอร์พีนในสารสกัดเอทิลอะซีเตตที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมาลาเรียและยังยั้งเชื้อวัณโรคในตะครอง (Suksamrarn, et al. 2006) จึงมีความสนใจที่จะศึกษาองค์ ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเฉพาะอย่างยิ่งของสารประกอบไซโคลเปบไทด์ในสารสกัดของพืชตะครอง และคาดว่าน่าจะพบสารชนิดใหม่ และมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ

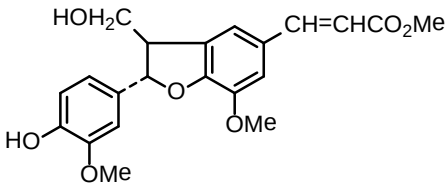
บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พืช *Ziziphus* ที่พบในประเทศไทยมี 10 ชนิด (สมิตินันท์, 2544) ได้แก่ พุทราใบเหลี่ยม (*Z. angustifolia*), กำลังเสือโคร่ง (*Z. attopoensis*), ชินชี่ (*Z. calophylla*), ตะครอง (*Z. cambodiana*), ตาฉู่แม (*Z. incurva*), พุทราจีน (*Z. jujuba* Mill.), พุทรา (*Z. mauritiana* หรือ *Z. jujuba* Lam.), เล็บเหยี่ยว (*Z. oenoplia* var. *oenoplia*), หนามเล็บแมว (*Z. oenoplia* var. *brunoniana*) และ มะควัด (*Z. rugosa*) ในต่างประเทศมีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพืชในสกุลนี้อย่างกว้างขวาง มีรายงานการพบสารประเภทไซโคลเปบไทด์อัลคาลอยด์ (Gournelis, et al. 1988; Tan and Zhou, 2006; Joullie and Richard, 2004; El-Seedi, et al. 2007) ไตรเทอร์พีน (Yagi, et al. 1978; Kundu, et al. 1989) ฟลาโวนอยด์ (Cheng, et al. 2000; Pandey, et al. 1985) ซาโปนิน (Maurya, et al. 1995) และสารประกอบประเภทอื่นๆ (Fukuyama, et al. 1986) พืชในสกุล *Ziziphus* เป็นแหล่งของสารไซโคลเปบไทด์อัลคาลอยด์ (Gournelis, et al. 1988; Tan and Zhou, 2006; Joullie and Richard, 2004; El-Seedi, et al. 2007) อย่างไรก็ตามมีการรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบไซโคลเปบไทด์ค่อนข้างน้อย ที่มีผู้รายงานไว้ เช่น ฤทธิ์ยังยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา (Maurya, et al. 1995) ฤทธิ์ยังยั้งเชื้อมาลาเรียและฤทธิ์การยับยั้งเชื้อวัณโรค (Suksamrarn, et al. 2005) สำหรับประเทศไทยกลุ่มผู้วิจัยเป็นรายแรกของประเทศที่ศึกษาทางด้านองค์ประกอบทางเคมีของพืชในสกุลนี้ ได้รายงานการพบสารไซโคลเปบไทด์ชนิดใหม่และยังเป็นรายแรกที่รายงานฤทธิ์ ยังยั้งเชื้อมาลาเรียและฤทธิ์การยับยั้งเชื้อวัณโรคของสารไซโคลเปบไทด์จากพืชหมากเล็บแมว (*Z. oenoplia* var. *brunoniana*) (Suksamrarn, et al. 2005) พุทรา (*Z. mauritiana* หรือ *Z. jujuba* Lam.) (Panseeta, et al. 2011) และได้รายงานการพบสารไตรเทอร์พีนชนิดใหม่จากสารสกัดเอทิลอะซีเตต ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมาลาเรียและยังยั้งเชื้อวัณโรคในตะครอง (*Z. cambodiana*) (Suksamrarn, et al. 2006) อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานการพบสารไซโคลเปบไทด์อัลคาลอยด์ในพืชตะครอง

องค์ประกอบทางเคมีของพืชในสกุล *Ziziphus* ได้แก่ สารไซโคลเปบไทด์อัลคาลอยด์ (Tan and Zhou, 2006) ไตรเทอร์พีน (Yagi, et al. 1978; Kundu, et al. 1989) ฟลาโว-นอยด์ (Cheng, et al. 2000; Pandey, et al. 1985) ซาโปนิน เช่น zizyotin (Maurya, et al. 1995) และสารประกอบประเภทอื่นๆเช่น neolignan (Fukuyama, et al. 1986) ดังแสดงในภาพประกอบ 1 โดยมีสารไซโคลเปบไทด์อัลคาลอยด์และไตรเทอร์พีนเป็นองค์ประกอบหลัก



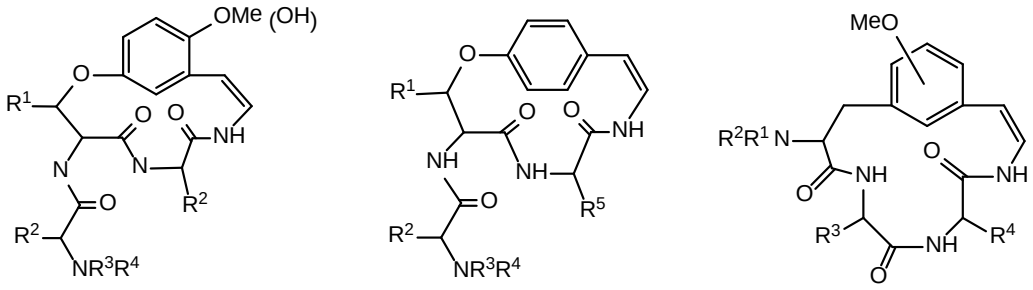
zizyotin



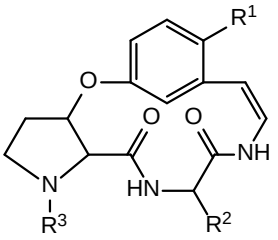
neolignan

ภาพประกอบ 1 สูตรโครงสร้างของสาร zizyotin และ neolignan

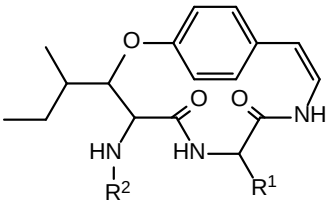
พืชในสกุล *Ziziphus* เป็นแหล่งของสารไซโคลเปบไทด์อัลคาลอยด์ ส่วนใหญ่มีสูตรโครงสร้างเป็นวง 14 เหลี่ยม รองลงไปเป็นชนิดวง 13 เหลี่ยม และชนิดวง 15 เหลี่ยม ตามลำดับ (Gournelis, et al. 1988; Tan and Zhou, 2006; Joullie and Richard, 2004; El-Seedi, et al. 2007) ดังแสดงในภาพประกอบ 2 โดยเชื่อมกับวงเบนซีนในตำแหน่งเมทา หรือ พารา ในทางเคมีโมเลกุลของไซโคลเปบไทด์อัลคาลอยด์มีความน่าสใจ เนื่องจากมีสเตอรีโอเคมีจำนวนมาก จึงมีผู้สนใจสังเคราะห์สารเหล่านี้ (Joullie and Richard, 2004) โดยเฉพาะอย่างยิ่งไซโคลเปบไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจและพบในปริมาณน้อยในธรรมชาติ เช่น frangufoline แสดงฤทธิ์ sedative และยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา (Maurya, et al. 1995) rugosanine A และ B แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา (Pandey, et al. 1988; Tripathi, et al. 1989) และ mauritine K แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา (Singh, et al. 1996) ดังแสดงในภาพประกอบ3



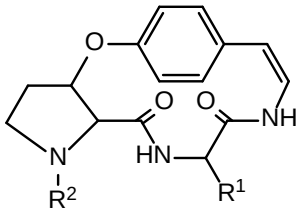
ภาพประกอบ 2 สูตรโครงสร้างของสารไซโคลเปบไทด์ชนิดวง 13-, 14- และ15-เหลี่ยม



rugosanine A : R^1 = OCH_3, R^2 = Leu (side chain), R^3 = *N*-CHO-*N*-MeAla-Val
rugosanine B : R^1 =OCH_3, R^2 = Phe (side chain), R^3 = *N,N*-Me_2Trp



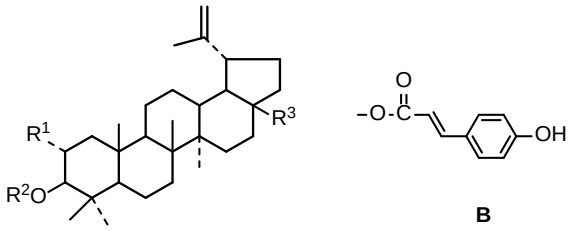
frangulaline A : R^1 = *L*-Ile (side chain)
R^2 = *L*-*N,N*-Me_2Phe



mauritine K : R^1 = Ile (side chain)
R^2 = Ile-Ile

ภาพประกอบ3 สูตรโครงสร้างของสาร rugosanine A, rugosanine B. frangulaline A และ mauritine K

สำหรับตะครองนั้น มีรายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีไม่มาก กลุ่มผู้วิจัยเป็นรายแรก ที่รายงานการพบสารไตรเทอร์พีนชนิด lupane และ ceanothane จากสารสกัดเอทิลอะซีเตต ได้แก่ lupeol, betulinaldehyde, betulinic acid, 2-*O*-*E*-*p*-coumaroylalphitolic acid, alphitolic acid, zizyberanalic acid, zizyberenalic acid และ ceanothic acid และพบสารชนิดใหม่ 3-*O*-(4-hydroxy-3-methoxybenzoyl)ceanothic acid หรือ 3-O-vanillylceanothic acid จากส่วนรากของตะครอง ดังแสดงในภาพประกอบ 4 สาร 3-*O*-vanillyl ceanothic acid, 2-*O*-*E*-*p*-coumaroylalphitolic acid และ zizyberenalic acid แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* ที่น่าสนใจที่ค่า IC_{50} 3.7, 0.9 and 3.0 μg/mL ตามลำดับ ส่วนสาร 3-*O*-vanillylceanothic acid, betulinaldehyde, betulinic acid, 2-*O*-*E*-*p*-coumaroylalphitolic acid, alphitolic acid, zizyberanalic acid และ zizyberenalic acid แสดงฤทธิ์ยังยั้งเชื้อวัณโรค *Mycobacterium tuberculosis* ที่ค่า MIC 25, 25, 25, 12.5, 50, 50 และ 100 μg/mL ตามลำดับ (Suksamrarn, et al. 2006)



B

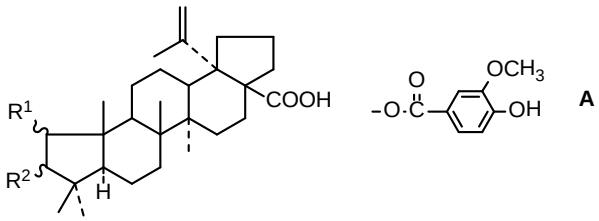
lupeol : $R^1 = R^2 = H$, $R^3 = CH_3$

betulinaldehyde : $R^1 = R^2 = H$, $R^3 = CHO$

betulinic acid : $R^1 = R^2 = H$, $R^3 = COOH$

alphitolic acid : $R^1 = R^2 = H$, $R^3 = COOH$

2-*O*-*E*-*p*-coumaroylalphitolic acid : $R^1 = B$, $R^2 = H$, $R^3 = COOH$

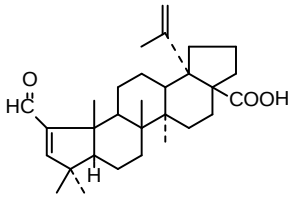


A

3-*O*-vanillylceanothic acid : $R^1 = \alpha$ COOH, $R^2 = \beta$ A

zizyberanalic acid : $R^1 = \beta$ CHO, $R^2 = \alpha$ OH

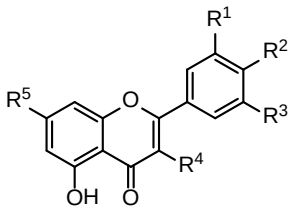
ceanothic acid : $R^1 = \alpha$ COOH, $R^2 = \beta$ OH



zizyberenalic acid

ภาพประกอบ 4 สูตรโครงสร้างของสารไตรเทอร์พีนจากพืชตะครอง

Li และคณะ (Li, et al. 2007) รายงานพบฟลาโวนอลและฟลาโวนอลไกลโคไซด์ quercetin-3-*O*-β-D-arabinosyl-(1→2)-α-L-rhamnoside, quercetin, isoquercitrin หรือ quercetin-3-*O*- β-D-glucoside จากใบตะครอง (ภาพประกอบ 5)



quercetin-3-*O*-β-D-arabinosyl-(1→2)-α -L-rhamnoside:

$R^1 = R^2 = R^5$ = OH, R^3 = H, R^4 = *O*-arabinosyl rhamnose

quercetin : $R^1 = R^2 = R^4 = R^5$ = OH, R^3= H

quercetin-3-*O*-β-D-glucoside : $R^1 = R^2 = R^5$ = OH, R^3 = H, R^4 = *O*-glucose

ภาพประกอบ 5 สูตรโครงสร้างของสารฟลาโวนอลและฟลาโวนอลไกลโคไซด์จากพืชตะครอง

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

พืชที่ใช้ในการวิจัย

ใช้เปลือกรากตะครองเก็บจากอำเภอชำนิ จังหวัดบุรีรัมย์

อุปกรณ์/เครื่องมือ และสารเคมี

วัสดุและสารเคมี

ตัวทำละลายอินทรีย์ (ทำให้บริสุทธิ์โดยการกลั่น)

ซิลิกาเจลสำหรับคอลัมน์โครมาโทกราฟี

- ซิลิกาเจล (< 0.063 mm, Merck 1.07729)
- ซิลิกาเจล (0.063-0.200 mm, Merck 1.07734)

ซิลิกาเจลสำหรับโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง

- ซิลิกาเจล60GF_{254} (Merck 1.07730)

Sephadex LH-20

developing reagent (ภาคผนวก)

pre-coated TLC aluminium sheets of silica gel 60GF_{254} (Merck 1.05554)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

หลอดกำเนิดแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 356 นาโนเมตร
(Spectroline® Model CM-10)

เครื่องหาจุดหลอมเหลว (Griffin)

อินฟราเรดสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Perkin Elmer FT-IR spectrum BX)

เครื่องระเหยสารภายใต้ความดัน (Buchi B-580)

แมสสเปกโทรมิเตอร์ (Finnigan MAT 90)

นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรมิเตอร์ (Bruker Avance 300)

โพลาริมิเตอร์ (Jasco DIP-370)

เครื่องระเหยตัวทำละลายภายใต้ความดัน (Buchi Rotavapor R-114)

ยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Shimadzu UV-2401PC)

การสกัดสารจากเปลือกรากตะครอง แยกและทำสารให้บริสุทธิ์

นำเปลือกรากตะครองแห้ง บดละเอียด 10 กิโลกรัม มาสกัดด้วย EtOAc ที่ 50 °C จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 15 ลิตร กรองแล้วระเหยตัวทำละลาย ได้สารสกัดชั้น EtOAc I (144 กรัม) เป็นของหนืดสีน้ำตาล แล้วนำกากมาสกัดต่อด้วย MeOH ที่ 50 °C จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 15 ลิตร กรองแล้วระเหยตัวทำละลาย ได้สารสกัดชั้น MeOH (1,500 กรัม) เป็นของหนืดสีน้ำตาลเข้ม จากการตรวจ สอบ ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy ของสารสกัดชั้น EtOAc I พบว่าประกอบด้วยสารไตรเทอร์พีนเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งได้เคยรายงานไว้แล้ว (Suksamrarn, et al. 2006: 535-537)

แบ่งสารสกัดชั้น MeOH (225 กรัม) เติมน้ำเกลือ 1% (100 มิลลิลิตร) แล้วนำของผสมมาสกัดด้วย EtOAc 4 ครั้งๆ ละ 400 มิลลิลิตร รวมชั้น EtOAc แล้วระเหยให้แห้ง ได้สารสกัดชั้น EtOAc II (12.7 กรัม) ซึ่งนำมาแยกโดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี (ใช้ระบบชะเป็น EtOAc-CH_2Cl_2 ตามด้วย MeOH-EtOAc) รวมกลุ่มสารที่แยกได้โดยการตรวจสอบด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง (TLC) สามารถรวมกลุ่มของสารได้ 6 กลุ่ม ได้

กลุ่ม 2 (1.2 กรัม ได้จากการชะด้วย CH_2Cl_2) นำมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทรกราฟี (silica gel ขนาดอนุภาคเล็กกว่า 0.063 มิลลิเมตร) ใช้ระบบชะเป็น EtOAc-CH_2Cl_2 (โดยเพิ่มความเป็นขั้วด้วย 1% EtOAc เก็บครั้งละ 10 mL) ตรวจสอบกลุ่มสารที่แยกได้ด้วย TLC สามารถรวมกลุ่มสารที่แยกได้ 17 กลุ่มย่อย (2.1-2.17)

นำกลุ่มย่อยที่ 2.12 (35.2 mg, ได้จากการชะด้วย 10% EtOAc-CH_2Cl_2) ซึ่งเป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน นำมาทำให้บริสุทธิ์อีกครั้ง ด้วยคอลัมน์โครมาโทรกราฟี (silica gel ขนาดอนุภาคเล็กกว่า 0.063 มิลลิเมตร) ใช้ระบบชะเป็น 10% EtOAc-CH_2Cl_2 ได้ผลึกรูปเข็ม ไม่มีสีของสาร ZC-M1 (29.4 มิลลิกรัม) (cambodine A) เป็น

นำกลุ่มย่อยที่ 2.13 (56.8 mg, ได้จากการชะด้วย 10% EtOAc-CH_2Cl_2) มาแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทรกราฟี (silica gel ขนาดอนุภาคเล็กกว่า 0.063 มิลลิเมตร) ใช้ระบบชะเป็น EtOAc-CH_2Cl_2 (โดยเพิ่มความเป็นขั้วด้วย 1% EtOAc เก็บครั้งละ 10 mL) ตรวจสอบกลุ่มสารที่แยกได้ด้วย TLC สามารถรวมกลุ่มสารที่แยกได้ 12 กลุ่มย่อย (2.13.1-2.13.12) พบสารกลุ่มย่อยที่ 2.13.7 พบสาร ZC-M2 (ซึ่งชะออกมาด้วย 8-10% EtOAc-CH_2Cl_2) เป็นผลึกรูปเข็ม ไม่มีสี (16.3 มิลลิกรัม) (frangufoline)

นำกลุ่มย่อยที่ 2.13.8 (19.8 mg, ได้จากการชะด้วย 10% EtOAc-CH_2Cl_2) มาแยกต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex LH-20 ชะด้วย MeOH-CH_2Cl_2 ตรวจสอบกลุ่มสารที่แยกได้ด้วย TLC พบสาร ZC-M3 (lotusanine B) เป็นของแข็ง ไม่มีสี (7.5 มิลลิกรัม) ชะออกมาด้วย 50% MeOH-CH_2Cl_2

นำกลุ่ม 3 (3.0 กรัม) มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทรกราฟี (silica gel ขนาดอนุภาคเล็กกว่า 0.063 มิลลิเมตร) ใช้ระบบชะเป็น *n*-hexane-EtOAc (โดยเพิ่มความเป็นขั้วด้วย 1% EtOAc) ตรวจสอบกลุ่มสารที่แยกได้ด้วย TLC สามารถรวมกลุ่มสารที่แยกได้ 10 กลุ่มย่อย (3.1-3.10)

นำกลุ่มย่อยที่ 3.9 มาแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทรกราฟี (silica gel ขนาดอนุภาคเล็กกว่า 0.063 มิลลิเมตร) ใช้ระบบชะเป็น EtOAc-CH_2Cl_2 ตรวจสอบกลุ่มสารที่แยกได้ด้วย TLC สามารถรวมกลุ่มสารที่แยกได้ 6 กลุ่มย่อย (3.9.1-3.9.6) ตามด้วยนำกลุ่มย่อยที่ 3.9.4 มาแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทรกราฟี (silica gel ขนาดอนุภาคเล็กกว่า 0.063 มิลลิเมตร) ใช้ระบบชะเป็น MeOH-CH_2Cl_2) ตรวจสอบกลุ่มสารที่แยกได้ด้วย TLC พบสารกลุ่มย่อยที่ 3.9.4.3 ซึ่งชะออกมาด้วย 2% MeOH-CH_2Cl_2 เป็นผลึกรูปเข็ม ไม่มีสี (12.8 มิลลิกรัม) (สาร ZC-M4) (cambodine B)

ส่วนสารกลุ่มอื่นๆ พบว่ามีสารไตรเทอร์พีน และสารกลุ่มอื่นเป็นส่วนใหญ่ ส่วนสารไซโคลเปปไทด์อัลคาลอยด์มีปริมาณน้อย

สมบัติทางกายภาพและสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่ได้

สาร ZC-M1 (Cambodine A)

เป็นผลึกรูปเข็ม ไม่มีสี 29.4 มิลลิกรัม

mp : 205-207 ^{o}C

$[\alpha]_D^{27}$: = -131.3^{o} (c = 0.20, CH_3OH)

UV $[\lambda]_{\max}^{MeOH}$ nm (log ε) : 247 (*sh*)

IR $[\nu]_{\max}^{KBr}$ cm^{-1} : 3446, 3289, 3036, 1682, 1670, 1656, 1624, 1507, 1291, 1228, 1158, 1000, 752 และ 699

ESIMS (+ve) *m/z* (% rel. intensity) : 533 $[M+H]^+$ (100)

ESIMS (-ve) *m/z* (% rel. intensity) : 531 $[M-H]^-$ (100)

HRTOFMS (APCI$^+$) : *m/z* 555.2929 $[M+Na]^+$ (calcd. 555.2941 for $C_{31}H_{40}N_4O_4$ + Na)

^{1}H NMR : δ ppm (300 MHz, $CDCl_3$); 7.52 (2H, dd, J = 7.7, 1.9 Hz, H-22 และ H-22′), 7.32-7.41 (5H, m, H-12, H-16, H-23, H-23′, H-24), 7.12 (2H, br t, J ca 8.5 Hz, H-13 และ H-15), 6.66 (1H, dd, J = 9.5 และ 7.6 Hz, H-2), 6.50 (1H, br d, J =

9.5 Hz, NH-3), 6.46 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-1), 5.99 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-9), 5.81 (1H, d, J = 8.5 Hz, NH-6), 5.09 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-8), 4.01 (1H, dd, J = 8.5 และ 4.4 Hz, H-5), 3.83 และ 3.22 (each 1H, each br dd, J ca 4.9 Hz, H-33), 2.48 (1H, br d, J = 2.6 Hz, H-27), 2.17 (1H, m, H-17), 2.11 (3H, s, NCH_3), 1.29 (1H, m, H-28), 1.08 (2H, m, H-29), 0.88 และ 1.17 (each 1H, each m, H-18), 0.81 (3H, t, J = 6.3 Hz, H-19), 0.77 (3H, t, J = 7.4 Hz, H-30), 0.70 (3H, t, J = 6.8 Hz, H-20), 0.55 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-31)

^{13}C NMR : δ ppm (75 MHz, $CDCl_3$) 172.8 (C-26), 168.2 (C-7), 166.8 (C-4), 155.0 (C-11), 136.2 (C-21), 132.3 (C-14), 131.6 (C-15), 130.2 (C-13), 129.2 (C-24), 128.8 (C-23 และ C-23′), 128.2 (C-22 และ C-22′), 125.4 (C-2), 123.3 (C-16), 122.8 (C-12), 117.8 (C-1), 80.7 (C-9), 70.4 (C-24), 67.6 (C-33), 59.3 (C-5), 57.9 (C-8), 41.1 (C-N(CH_3)), 35.8 (C-28), 34.4 (C-17), 24.7 (C-29), 23.9 (C-18), 16.5 (C-20), 14.7 (C-31), 11.9 (C-30), 11.4 (C-19)

สาร ZC-M2 (Frangufoline)

เป็นผลึกรูปเข็ม ไม่มีสี 16.3 มิลลิกรัม

mp : 216-218 °C [lit. 234-236 °C, Merkuza; & et al. 1974: 1279-1282]

R_f : 0.36 (20% EtOAc-CH_2Cl_2), ให้สี light-blue กับ anisaldehyde-H_2SO_4 reagent

$[\alpha]_D^{27}$: -218° (c 0.20, $CHCl_3$)

UV $[\lambda]_{\max}^{MeOH}$ nm (log Ɛ) : 223 (*sh*) [lit. 280 (4.49), Zarga; et al. 1995: 504-511]

IR $\nu_{\max}^{neat}$ cm^{-1} : 3446, 3266, 2923, 1645, 1632, 1521, 1508, 1237, 1125, 701

ESIMS (+ve) *m/z* (% rel. intensity) : 535 $[M+H]^{\square}$(100)

ESIMS (-ve) *m/z* (% rel. intensity) : 533 $[M-H]^{\square}$(100)

^{1}H NMR : δ ppm (300 MHz, $CDCl_3$) 7.90 (1H, d, J = 10.0 Hz, NH-24), 7.18 (11H, m), 6.67 (1H, dd, J = 10.1 และ 7.6 Hz, H-2), 6.46 (1H, br d, J = 10.6 Hz, NH-3), 6.36 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-1), 5.78 (1H, d, J = 7.9 Hz, NH-6), 5.00 (1H, dd, J = 7.1 และ 1.5 Hz, H-9), 4.50 (1H, dd, J = 10.3 และ 7.3 Hz, H-8), 4.04 (1H, ddd, J = 11.3, 7.8, 3.3 Hz, H-5), 3.20 (2H, m), 2.85 (1H, dd, J = 15.8 และ 8.3 Hz, H-27), 2.25 (6H, s, $N(CH_3)_2$), 1.93 (1H, m), 1.68 (1H, m), 1.28 (3H, d, J = 6.7 Hz, H-22), 1.01 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-23), 0.65 (1H, d, J = 6.5 Hz, H-19), 0.60 (1H, d, J = 6.5 Hz, H-20)

^{13}C NMR : δ ppm (75 MHz, $CDCl_3$) 172.6 (C-2), 171.6 (C-7), 167.4 (C-4), 155.9 (C-11), 140.3 (C-28), 131.8 (C-14), 131.7 (C-15), 130.2 (C-13), 128.9 (C-30), 128.5 (C-29), 126.1 (C-31), 125.6 (C-2), 123.0 (C-12), 122.7 (C-16), 115.6 (C-1), 81.7 (C-9), 70.4 (C-26), 55.2 (C-8), 52.6 (C-5), 41.8 (C-N(CH_3)$_2$), 39.1 (C-17), 30.6 (C-27), 29.3 (C-21), 24.3 (C-19), 23.1 (C-18), 20.4 (C-20), 20.3 (C-22), 15.0 (C-23)

สาร ZC-M3 (Lotusanine B)

เป็นของแข็ง ไม่มีสี 50.1 มิลลิกรัม

mp : 185-187 ^{o}C

R_f : 0.43 (20% EtOAc-CH_2Cl_2), ให้สี light-blue กับ anisaldehyde-H_2SO_4 reagent

$[\alpha]_D^{23}$: -117^{o} (c 0.20, $CHCl_3$)

UV $[\lambda]_{\max}^{MeOH}$ nm (log ε) : 216 (4.45), 224 (4.35), 279 (4.26) [lit. 244 (3.74), 280(3.120]

IR $\nu_{\max}^{neat}$ cm^{-1} : 3456, 3391, 3277, 2956, 2925, 1671, 1646, 1624, 1602, 1507, 1455, 1419,
1238, 985, 762, 699

ESIMS (-ve) *m/z* (% rel. intensity) : 619 $[M-H]^-$ (100), 620 $[M^+]$ (84)

ESIMS (+ve) *m/z* (% rel. intensity) : 643 $[M+Na]^+$ (24), 1263 $[2M+Na]^+$ (100)

^{1}H NMR : δ ppm (300 MHz, $CDCl_3$) 8.08 (1H, d, J = 9.4 Hz, NH-24), 7.73 (1H, d, J = 15.3 Hz, H-33), 7.56 (2H, dd, J = 5.9 และ 2.0 Hz, H-35), 7.20 (7H, m), 7.04 (6H, m, H-13), 6.69 (1H, d, J = 15.4 Hz, H-32), 6.56 (1H, d, J = 10.4 Hz, NH-3), 6.36 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-1), 4.94 (1H, dd, J = 6.9 และ 1.4 Hz, H-9), 4.62 (1H, ddd, J = 11.0, 7.9, 4.1 Hz, H-5), 4.32 (1H, dd, J = 9.4 และ 6.9 Hz, H-8), 4.16 (1H, d, J = 6.7 Hz, H-26), 3.58 (2H, m, H-29), 3.42 (1H, dd, J = 16.3 และ 3.3 Hz, H-17a), 2.75 (1H, dd, J = 16.3 และ 10.8 Hz, H-17b), 2.26 (1H, dd, J = 12.2 และ 4.4 Hz, H-27a), 2.03 (2H, m, H-28), 1.82 (1H, ddd, J = 6.7, 6.6 และ 1.6 Hz, H-21), 1.56 (1H, m, H-27b), 1.14 (3H, d, J = 6.7 Hz), 0.69 (3H, d, J = 6.6 Hz)

^{13}C NMR : δ ppm (75 MHz, $CDCl_3$) 171.4 (C-25), 171.1 (C-7), 166.9 (C-4), 166.5 (C-31), 156.0 (C-11), 144.1 (C-33), 136.6 (C-14), 134.6 (C-34), 131.8 (C-15), 130.3 (C-37), 130.1 (C-20), 128.9 (C-36), 128.5 (C-35), 128.2 (C-18), 128.0 (C-

19), 126.5 (C-13), 125.5 (C-2), 123.4 (C-12), 116.9 (C-32), 115.5 (C-1), 81.8 (C-9), 59.1 (C-26), 55.1 (C-8), 53.4 (C-5), 47.1 (C-29), 35.9 (C-17), 29.0 (C-21), 25.8 (C-27), 24.9 (C-28), 20.4 (C-23), 14.5 (C-22)

สาร ZC-M4 (Cambodine B)

เป็นผลึกรูปเข็ม ไม่มีสี 12.8 มิลลิกรัม

mp : 225-227 ^{o}C

R_f : 0.27 (4% MeOH-CH_2Cl_2), ให้สี light-blue กับ anisaldehyde-H_2SO_4 reagent

$[\alpha]_D^{27}$: = -198^{o} (c = 0.19, $CHCl_3$)

UV $[\lambda]_{\max}^{MeOH}$ nm (log ε) : 227 (*sh*)

IR $[\nu]_{\max}^{KBr}$ cm^{-1} : 3449, 3261, 2966, 2934, 1685, 1631, 1539, 1512, 1382, 1242, 1027, 746, 713, 701

ESIMS (+ve) *m/z* (% rel. intensity) : 668.3 $[M+H]^+$ (100)

ESIMS (-ve) *m/z* (% rel. intensity) : 666.5 $[M-H]^-$ (100)

HRTOFMS (APCI$^+$) : *m/z* 668.38079 $[M+H]^+$ (calcd. 668.38116 for $C_{39}H_{49}N_5O_5$ + H)

^{1}H NMR : δ ppm (300 MHz, $CDCl_3$); 7.30 (15H, m), 6.98 (11H, m), 6.67 (2H, br d, J = 6.2 Hz), 6.63 (2H, m), 6.41 (1H, d, J = 7.2 Hz), 6.17 (1H, d, J = 7.7 Hz), 6.09 (1H, d, J = 6.5 Hz), 4.77 (1H, dd, J = 8.4 และ 6.5 Hz), 4.16 (1H, m), 4.06 (1H, dd, J = 7.7 และ 4.4 Hz), 2.88 (1H, dd, J = 14.2 และ 4.7 Hz), 2.49 (1H, d, J = 4.0 Hz), 2.44 (1H, dd, J = 14.2 และ 10.6 Hz), 2.17 (3H, s, NCH_3), 2.04 (1H, m), 1.25 และ 0.96 (each 1H, each mz), 0.85 (3H, t, J = 7.0 Hz), 0.75 (3H, d, J = 6.8 Hz), 0.63 (3H, t, J = 7.5 Hz), 0.61 (3H, d, J = 6.9 Hz),

^{13}C NMR : δ ppm (75 MHz, $CDCl_3$) 174.3, 171.1, 170.9, 167.1, 155.2, 136.8, 136.4, 132.6, 132.0, 130.2, 128.9, 128.7, 128.1, 127.0, 125.5, 123.3, 123.0, 116.7, 81.6, 69.1, 59.4, 56.7, 54.8, 37.6, 36.5, 35.1, 24.2, 23.9, 1.9, 15.5, 12.0, 11.7

บทที่ 4
ผลการวิจัย

ผลการสกัดสาร การแยกสารและทำสารให้บริสุทธิ์ จากเปลือกรากตะครอง

จากการนำเปลือกรากตะครองแห้งที่บดละเอียด (10 กิโลกรัม) มาสกัดด้วย EtOAc และ MeOH ตามลำดับ ได้ส่วนสกัดจากชั้น EtOAc I (144 กรัม) เป็นของหนืดสีน้ำตาล และสารสกัดชั้น MeOH (1,500 กรัม) เป็นของหนืดสีน้ำตาลเข้ม ตามลำดับจากการตรวจ สอบ ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy ของสารสกัดชั้น EtOAc I พบว่าประกอบด้วยสารไตรเทอร์พีนเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งได้เคยรายงานไว้แล้ว (Suksamrarn, et al. 2006: 535-537)

เมื่อแแบ่งสารสกัดชั้น MeOH (225 กรัม) เติมน้ำเกลือ แล้วนำของผสมมาสกัดด้วย EtOAc แล้วระเหย EtOAc ให้แห้ง ได้สารสกัดชั้น EtOAc II (12.7 กรัม) เป็นของหนืดสีน้ำตาล ซึ่งนำมาแยกโดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี (ใช้ระบบชะเป็น EtOAc-CH_2Cl_2 ตามด้วย MeOH-EtOAc) รวมกลุ่มสารที่แยกได้โดยการตรวจสอบด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง (TLC) สามารถรวมกลุ่มของสารได้ 6 กลุ่ม

จากการแยกสารและทำสารให้บริสุทธิ์ของสาร 6 กลุ่มโดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทร-กราฟี พบว่าสามารถแยกสารไซโคลเปปไทด์อัลคาลอยด์ได้ 4 สาร ดังนี้

สาร ZC-M1 ผลึกรูปเข็ม ไม่มีสี (29.4 มิลลิกรัม) (cambodine A)

สาร ZC-M2 เป็นผลึกรูปเข็ม ไม่มีสี (16.3 มิลลิกรัม) (frangufoline)

สาร ZC-M3 เป็นของแข็ง ไม่มีสี (7.5 มิลลิกรัม) (lotusanine B)

สาร ZC-M4 เป็นผลึกรูปเข็ม ไม่มีสี (12.8 มิลลิกรัม) (cambodine B)

ส่วนสารกลุ่มอื่นๆ พบว่ามีสารไตรเทอร์พีน และสารกลุ่มอื่นเป็นส่วนใหญ่ ส่วนสารไซโคลเปปไทด์อัลคาลอยด์มีปริมาณน้อย

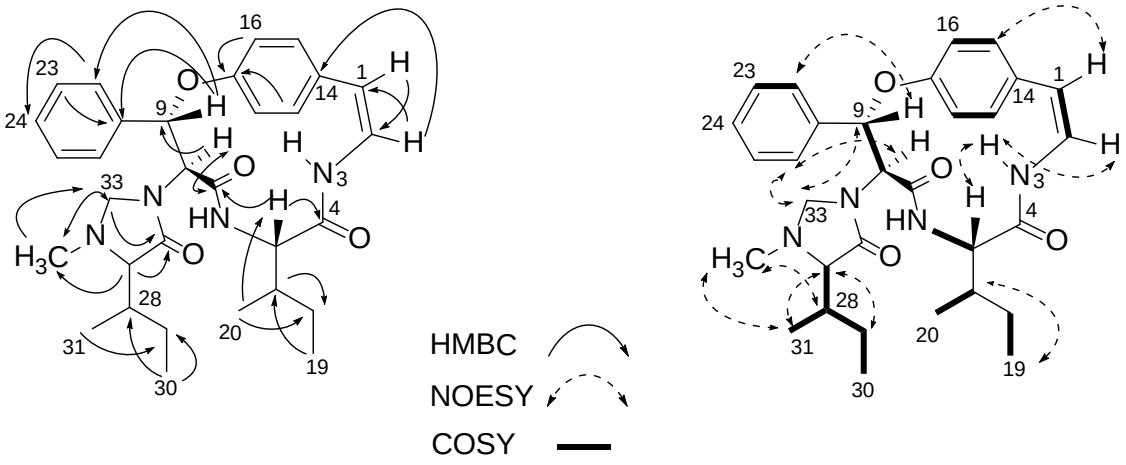
การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์

สาร ZC-M1

สาร ZC-M1 ให้สี light-blue กับ anisaldehyde-H_2SO_4 reagent แสดง *m/z* 533 $[M+H]^+$ และ *m/z* 531 $[M-H]^-$ ใน ESIMS ซึ่งสอดคล้องกับสูตรโมเลกุล $C_{31}H_{40}N_4O_4$ และสอดคล้องกับ ^{13}C NMR สเปกตรัมที่แสดง 31 คาร์บอน สารนี้ไม่แสดงการดูดกลืนแสงใน UV สเปกตรัม แสดงว่า สาร ZC-M1 เป็นสารไซโคลเปปไทด์อัลคาลอยด์ชนิดวง 14 เหลี่ยม เช่นเดียวกับ ZC-M3 IR สเปกตรัมแสดง peak ของหมู่ amino (3446 cm^{-1}), amide (1624-1682 cm^{-1}) และ aryl ether (1228-1291 cm^{-1})

^1H และ ^{13}C NMR, DEPT HMQC และ HMBC สเปกตรัม แสดงสัญญาณ 31 carbon ของ 4 methyls, *N*-methyl, 3 methylenes, 17 methines และ 8 quaternary carbons (ซึ่งรวมของ 3 หมู่คาร์บอนิลที่ C-4, C-7 และ C-26) พบหมู่ oxystyrylamine [δ_{H-1} 6.46 (1H, d, J = 7.6 Hz), δ_{C-1} 117.8; δ_{H-2} 6.66 (1H, dd, J = 9.5 และ 7.6 Hz), δ_{C-2} 125.4; δ_{NH-3} 6.50 (1H, br d, J = 9.5 Hz); $\delta_{H-12,16}$ 7.32-7.41 (2H, m), δ_{C-12} 122.8, δ_{C-16} 123.3; $\delta_{H-13,15}$ 7.12 (2H, br t, J ca 8.5 Hz, δ_{C-13} 130.2, δ_{C-15} 131.6; δ_{C-11} 155.0, δ_{C-14} 132.3] พบกรดอะมิโน isoleucine [δ_{H-5} 4.01 (1H, dd, J = 8.5 และ 4.4 Hz, δ_{C-5} 59.3; δ_{NH-6} 5.81 (1H, d, J = 8.5 Hz); δ_{H-17} 2.17 (1H, m), δ_{C-17} 34.4; δ_{H-18} 0.88 และ 1.17 (each 1H, each m), δ_{C-18} 23.9; δ_{H-19} 0.81 (3H, t, J = 6.3 Hz), δ_{C-19} 11.4; δ_{H-20} 0.70 (3H, t, J = 6.8 Hz), δ_{C-20} 16.5; δ_{C-4} 166.8] พบกรดอะมิโน *N*-methylisoleucine [δ_{H-27} 2.48 (1H, br d, J = 2.6 Hz), δ_{C-27} 70.4; δ_{H-28} 1.29 (1H, m), δ_{C-28} 35.8; δ_{H-29} 1.08 (2H, m), δ_{C-29} 24.7; δ_{H-30} 0.77 (3H, t, J = 7.4 Hz), δ_{C-30} 11.9; δ_{H-31} 0.55 (3H, d, J = 6.8 Hz), δ_{C-31} 14.7; δ_{N-Me} 2.11 (3H, s), δ_{N-Me} 41.1; δ_{C-26} 172.8] และกรดอะมิโน β-hydroxyphenylalanine [δ_{H-8} 5.09 (1H, d, J = 7.6 Hz, δ_{C-8} 57.9; δ_{H-9} 5.99 (1H, d, J = 7.6 Hz, δ_{C-9} 80.7; $\delta_{H-22,22'}$ 7.52 (2H, dd, J = 7.7, 1.9 Hz, $\delta_{C-22,22'}$ 128.2; $\delta_{H-23,23',24}$ 7.32-7.41 (3H, m), $\delta_{C-22,22'}$ 128.2; δ_{C-24} 129.2; δ_{C-7} 168.2; δ_{C-21} 136.2] นอกจากนี้ยังพบสัญญาณของเมทิลีนโปรตอน 2 แห่ง เป็น broad doublet of doublet ที่สนามต่ำมากที่ δ_H 3.83 และ 3.22 (J ca 4.9 Hz), δ_C 67.6

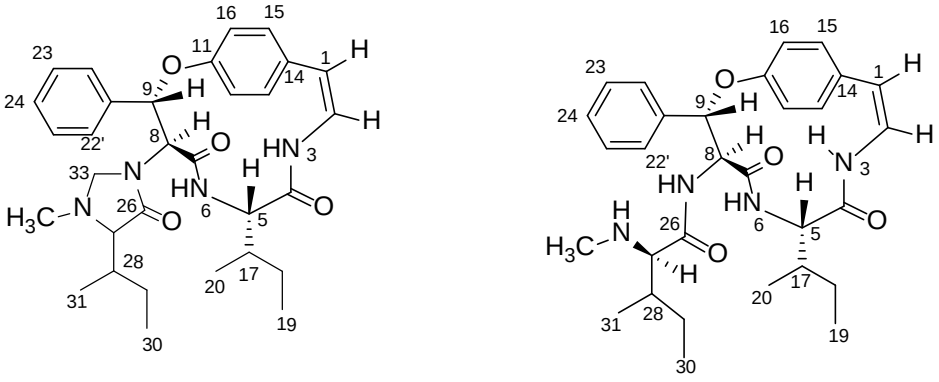
จากการวิเคราะห์ COSY, HMBC และ NOESY สเปกตรัม ของสารนี้ ทำให้สามารถเชื่อมหมู่ต่างๆเข้าด้วยกันดังแสดงในภาพประกอบ 6 ที่สำคัญได้แก่ พบความสัมพันธ์ NOESY ระหว่าง NH-3 (δ_H 6.50) ของ styrylamine กับ δ_H 4.01 (H-5) ของ isoleucine และ H-5 นี้ มีความสัมพันธ์แบบ HMBC กับ C-7 (δ_C 168.2) ของ hydroxyphenylalanine ในทำนองเดียวกัน H-8 (δ_H 5.09) ของ hydroxyphenylalanine มีความสัมพันธ์แบบ HMBC กับ C-7 (δ_C 168.2) ของกรดอะมิโน isoleucine δ_H 5.99 (H-9) มีความสัมพันธ์แบบ HMBC กับ C-11 (δ_C 155.0) ของ styrylamine ในทำนองเดียวกัน H-8 H-9 และ H-22 (δ_H 7.52) ของ hydroxyphenylalanine มีความสัมพันธ์แบบ NOESY กับเมทิลีนโปรตอนที่ δ_H 3.83 (H-33) ซึ่งโปรตอน H-33 มีความสัมพันธ์แบบ HMBC กับ C-26 (δ_C 172.8) และหมู่ *N*-methyl (δ_C 41.1) ของกรดอะมิโน *N*-methylisoleucine ข้อมูลเหล่านี้แสดงว่าหมู่เมทิลีนที่ δ_H 3.83 นี้เป็นส่วนหนึ่งของวง imidazolidinone ที่เชื่อมกับ hydroxyphenylalanine และ *N*-methylisoleucine ที่ตำแหน่ง N-25 และ N-32 ตามลำดับ ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า สาร ZC-M1 เป็นไซโคลเปปไทด์อัลคาลอยด์ชนิดวง 14 เหลี่ยม ชนิดใหม่ ที่มีวง imidazolidinone เป็นองค์ประกอบ และให้ชื่อ cambodine A ตามชื่อพืชชนิดนี้



ภาพประกอบ 6 สูตรโครงสร้างและความสัมพันธ์ COSY, HMBC และ NOESY ที่สำคัญของสาร ZC-M1

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูล ^{1}H และ ^{13}C NMR ของ ZC-M1 กับ mauritine L ซึ่งเป็นไซโคลเปปไทด์อัลคาลอยด์ที่พบในรากพุทรา (Panomwan, et al. 2011) พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน สาร ZC-M1 เป็นไซโคลเปปไทด์ชนิดวง 14 เหลี่ยมเหมือนกันกับ mauritine L และมีหมู่

องค์ประกอบต่างกันเฉพาะที่สาร ZC-M1 มีหมู่เมทิลีน –N-CH_2-N- ซึ่งเป็นส่วนของวง imidazolidinone (ภาพประกอบ 7) จากงานวิจัยของผู้วิจัยได้พิสูจน์ว่า mauritine L มีสเตอริโอเคมีในส่วนของวง 14 เหลี่ยมเป็น 5*S*, 8*S* และ 9*S* configuration และมีหมู่ *N*-methylisoleucine เป็นกรดอะมิโนชนิด *L* ด้วย ค่า optical rotation ของสารทั้งสองมีค่าเป็นลบ เหมือนกัน (สาร ZC-M1 หรือ cambodine A $[\alpha]_D^{23}$ = -131°, mauritine L $[\alpha]_D^{27}$ = -56°) จึงสามารถสรุปได้ว่าสาร ZC-M1 หรือ cambodine A น่าจะมีสเตอริโอเคมีทั้งในส่วนของวงและหมู่ imidazolidinone เหมือนกับของ mauritine L ดังแสดงในรูปที่ 2



Cambodine A Mauritine L

ภาพประกอบ 7 สเตอรีโอเคมีของสาร ZC-M1 หรือ cambodine A และ mauritine L

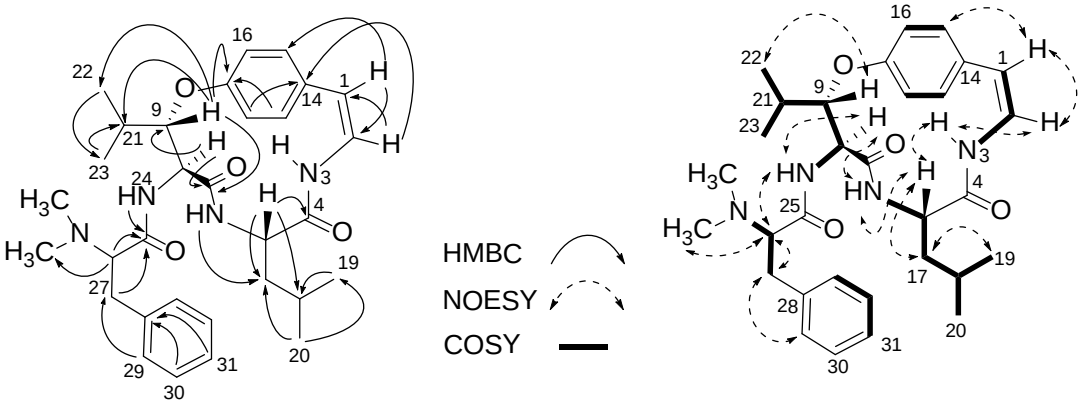
สาร ZC-M2

สาร ZC-M2 ให้สี light-blue กับ anisaldehyde-H_2SO_4 reagent เช่นเดียวกับสาร ZC-M1 และแสดง *m/z* 535 $[M+H]^+$ และ *m/z* 533 $[M-H]^-$ ใน ESIMS ซึ่งตรงกับสูตรโมเลกุลเป็น $C_{31}H_{42}N_4O_4$ และสอดคล้องกับ ^{13}C NMR สเปกตรัม สารนี้ไม่แสดงการดูดกลืนแสงใน UV สเปกตรัม ข้อมูลเหล่านี้แสดงว่า สาร ZC-M2 เป็นสารไซโคลเปปไทด์อัลคาลอยด์ชนิดวง 14 เหลี่ยม (Gournelis, et al. 1998) IR สเปกตรัมแสดง diagnostic peaks ของหมู่ amino (3266 cm^{-1}), amide (1632-1645 cm^{-1}) และ aryl ether (1237 cm^{-1})

^1H และ ^{13}C NMR, DEPT และ HMQC สเปกตรัมของสารนี้ร่วมกับข้อมูลที่มีการรายงานไว้ (Suksamrarn, et al. 2005) แสดง 31 carbon resonances ของหมู่ *N,N*-dimethyl, 4 methyls, 2 methylenes, 17 methines และ 6 quaternary carbons ของหมู่ oxystyrylamine, กรดอะมิโน leucine, β-hydroxyleucine และ *N*,*N*-dimethyl phenylalanine ข้อมูล 2D-NMR (COSY, HMBC และ NOESY) แสดงความสัมพันธ์ของ

กรดอะมิโน leucine เชื่อมกับหมู่ styrylamine และ กรดอะมิโน β-hydroxyleucine ที่ N-3 และ C-7 (δ_C171.6) ตามลำดับ และกรดอะมิโน β-hydroxyleucine เชื่อมกับหมู่ styrylamine และ *N*,*N*-dimethyl phenylalanine ที่ C-11 (δ_C155.9) และ C-25 (δ_C 172.6) ตามลำดับ ดังแสดงในภาพประกอบ 8 ข้อมูลเหล่านี้ ร่วมกับการสืบค้นข้อมูลที่มีการรายงานไว้ พบว่าสาร ZC-M2 มีสูตรโครงสร้างเป็นไซโคลเปปไทด์อัลคาลอยด์ชนิดวง 14 เหลี่ยม เหมือน frangufoline (Zarga, et al. 1995)

frangufoline เป็นไซโคลเปปไทด์อัลคาลอยด์ที่มีการรายงานการพบจากพืชตระกูล *Ziziphus* หลายชนิด เช่น พบในเมล็ดของ *Z. vulgularis* var. *spinosus* (Han, et al. 1990) frangufoline มีชื่ออื่นได้แก่ daechuine S1 (Han, et al. 1989) และ sanjoinine A (Han, et al. 1990)

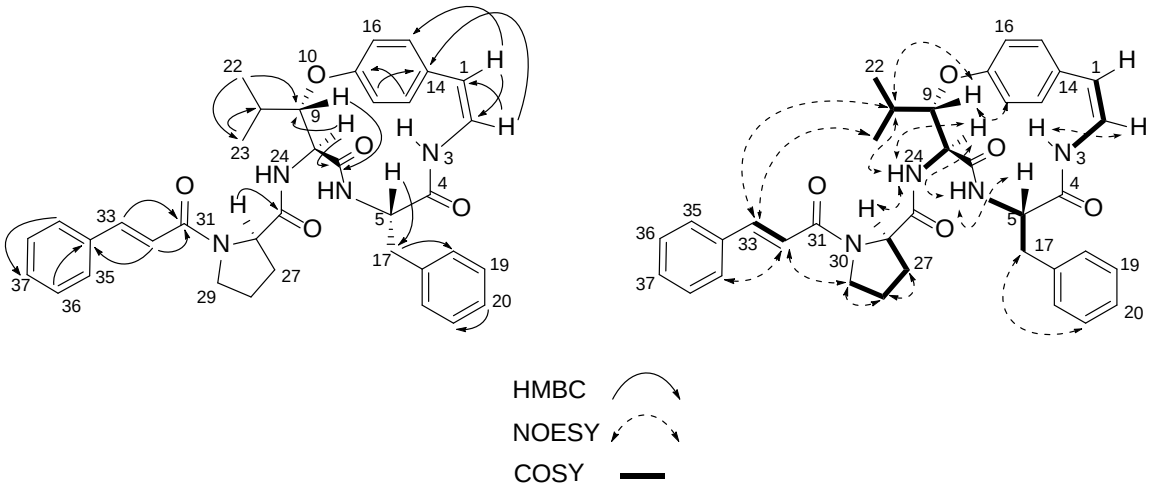


ภาพประกอบ 8 สูตรโครงสร้างและความสัมพันธ์ COSY, HMBC และ NOESY ของสาร ZC-M2

สาร ZC-M3

สาร ZC-M3 ให้สี light-blue กับ anisaldehyde-H_2SO_4 reagent เช่นเดียวกับสาร ZC-M1 แสดง *m/z* 619 $[M-H]^-$ ใน ESIMS ซึ่งตรงกับสูตรโมเลกุลเป็น $C_{37}H_{40}N_4O_5$ และสอดคล้องกับ ^{13}C NMR สเปกตรัม สารนี้แสดงการดูดกลืนแสงที่ 216, 224 และ 279 nm ใน UV สเปกตรัม แสดงว่า สาร ZC-M3 เป็นสารไซโคลเปปไทด์อัลคาลอยด์ชนิดวง 14 เหลี่ยมที่มีหมู่ coumaroyl (Zarga, et al. 1995: 504-511, Han, et al. 1990, Gonzalez, et al. 1974) IR สเปกตรัมแสดงหมู่ amino (3277 cm^{-1}), amide (1624-1646 cm^{-1}) และ aryl ether (1238 cm^{-1})

^{1}H และ ^{13}C NMR, DEPT, HMQC และ HMBC สเปกตรัมของสารนี้ร่วมกับข้อมูลที่มีการรายงานไว้ (Suksamrarn, et al. 2005) แสดง 37 carbon resonances ของ 2 methyl, 4 methylene, 23 methine และ 8 quaternary carbon ของหมู่ oxystyrylamine, กรดอะมิโน phenylalanine, β-hydroxyleucine, proline และหมู่ *trans*-coumaroyl [δ_{C-31} 166.5; δ_{H-32} 6.69 *d*, *J* = 15.4 Hz, δ_{C-32} 116.9; δ_{H-33} 7.73 *d*, *J* = 15.4 Hz, δ_{C-33} 144.1; และ $\delta_{H-35-37}$ 7.02-7.56, $\delta_{C-35-37}$ 128.5-134.6) ข้อมูล 2D-NMR (COSY, HMBC และ NOESY) แสดงความสัมพันธ์ของ กรดอะมิโน phenylalanine เชื่อมกับหมู่ styrylamine และ กรดอะมิโน β-hydroxyleucine ที่ N-3 และ C-7 (δ_C 171.1) ตามลำดับ และกรดอะมิโน β-hydroxyleucine เชื่อมกับหมู่ styrylamine และ proline ที่ C-11 (δ_C 156.0) และ C-25 (δ_C 171.4) ตามลำดับ และ proline เชื่อมกับหมู่ coumaroyl ที่ N-30 ดังแสดงในภาพประกอบ 9 ข้อมูลเหล่านี้ ร่วมกับการสืบค้นข้อมูลที่มีการรายงานไว้ พบว่าสาร ZC-M3 มีสูตรโครงสร้างเป็นไซโคลเปปไทด์อัลคาลอยด์ชนิดวง 14 เหลี่ยม ที่มีหมู่ coumaroyl และมีชื่อ lotosanine ซึ่งเป็นไซโคลเปปไทด์อัลคาลอยด์ ที่มีการรายงานพบจากราก ของ *Z. lotus* (Zarga, et al. 1995)



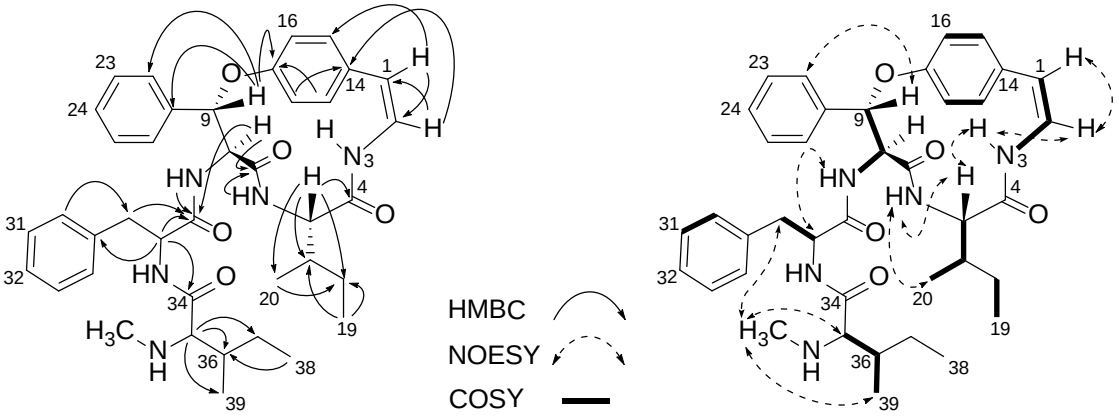
ภาพประกอบ 9 สูตรโครงสร้างและความสัมพันธ์ COSY, HMBC และ NOESY ที่สำคัญของสาร ZC-M3

สาร ZC-M4

สาร ZC-M4 ให้สี light-blue กับ anisaldehyde-H_2SO_4 reagent เช่นเดียวกัน และแสดง *m/z* 668 $[M+H]^+$ และ *m/z* 666 $[M-H]^-$ ใน ESIMS ซึ่งตรงกับสูตรโมเลกุลเป็น

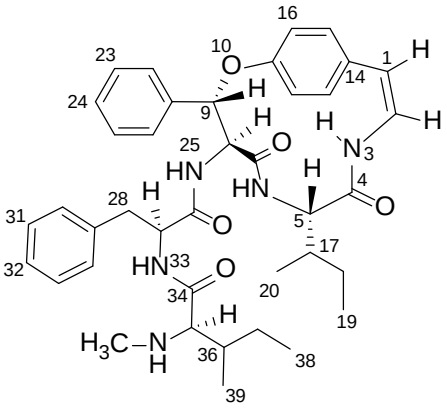
$C_{39}H_{49}N_5O_5$ และสอดคล้องกับ ^{13}C NMR สเปกตรัม สารนี้ไม่แสดงการดูดกลืนแสงใน UV สเปกตรัม แสดงว่า สาร ZC-M4 เป็นสารไซโคลเปปไทด์อัลคาลอยด์ชนิดวง 14 เหลี่ยม เช่นเดียวกับ ZC-M1 IR สเปกตรัมแสดง peak ของหมู่ amino (3338 cm^{-1}), amide (1631-1685 cm^{-1}) และ aryl ether (1230-1242 cm^{-1})

^1H และ ^{13}C NMR, DEPT และHMQC สเปกตรัม แสดง 39 carbon resonances ของ 4 methyl, *N*-methyl, 3 methylene, 23 methine และ 8 quaternary carbon ของหมู่ oxystyrylamine, กรดอะมิโน isoleucine, β-hydroxyphenylalanine, phenylalanine และหมู่ *N*-methyl isoleucine จากการวิเคราะห์ COSY, HMBC และ NOESY สเปกตรัม สามารถเชื่อมหมู่ต่างๆเข้าด้วยกันดังแสดงในภาพประกอบ 10 ที่สำคัญได้แก่ พบความสัมพันธ์ NOESY ระหว่าง NH-3 (δ_H 6.72) ของ styrylamine กับ δ_H 4.09 (H-5) ของ isoleucine และ H-5 นี้ มีความสัมพันธ์แบบ HMBC กับ C-7 (δ_C 171.0) ของ hydroxyphenylalanine δ_H 6.10 (H-9) มีความสัมพันธ์แบบ HMBC กับ C-11 (δ_C 155.1) ของ styrylamine ในทำนองเดียวกัน H-8 (δ_H 4.78) ของ hydroxyphenylalanine มีความสัมพันธ์แบบ HMBC กับ C-26 (δ_C 170.9) ของกรดอะมิโน phenylalanine และสัญญาณมัลติเพล็ตของ H-27 (δ_H 4.20) ของ phenylalanine มีความสัมพันธ์แบบ HMBC กับหมู่คาร์บอนิล C-34 (δ_C 174.2) ของกรดอะมิโน *N*-methylisoleucine ข้อมูลเหล่านี้ สามารถสรุปได้ว่า สาร ZC-M4 เป็นไซโคลเปปไทด์อัลคาลอยด์ชนิดใหม่ และให้ชื่อ cambodine B ตามชื่อพืชชนิดนี้เช่นกัน

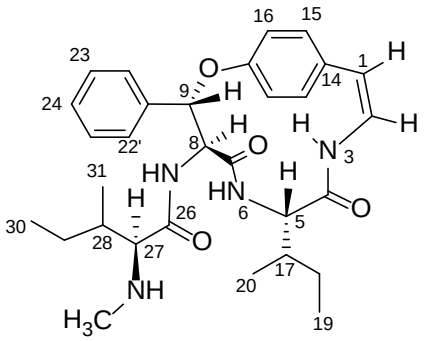


ภาพประกอบ 10 สูตรโครงสร้างและความสัมพันธ์ COSY, HMBC และ NOESY ที่สำคัญของสาร ZC-M4

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูล ^{1}H และ ^{13}C NMR ของสาร ZC-M4 หรือ cambodine B กับ mauritine L (Panomwan, et al. 2011) ซึ่งมีส่วนของวงเหมือนกัน (ภาพประกอบ 11) พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน และค่า optical rotation ของสารทั้งสองมีค่าเป็นลบ เหมือนกัน (ZC-M4 หรือ cambodine B $[\alpha]_D^{27}$ = -198°, mauritine L $[\alpha]_D^{27}$ = -56°) จากงานวิจัยของผู้วิจัยได้รายงานว่า mauritine L มีสเตอริโอเคมีในส่วนของวง เป็น 5*S*, 8*S* และ 9*S* configuration และในส่วนที่ไม่เป็นวงเป็นกรดอะมิโนชนิด *L* จึงสามารถสรุปได้ว่า cambodine B น่าจะมีสเตอริโอเคมีทั้งในส่วนของวงและในส่วนที่ไม่เป็นวง เหมือนกับของ mauritine L



Cambodine B



Mauritine L

ภาพประกอบ 11 สเตอริโอเคมีของสาร ZC-M4 หรือ cambodine B และ mauritine L

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

เมื่อนำสารไซโคลเปปไทด์อัลคาลอยด์ทั้ง 4 สาร ไปทดสอบฤทธิ์ต้านมาเลเรียต่อเชื้อ *Plasmodium falciparum* โดยใช้วิธีของ Trager และ Jensen, (Trager and Jensen, 1976) และ Desjardins (Desjardins, et al. 1979) พบว่าสารทั้งสี่ไม่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *Plasmodium falciparum*

บทที่ 5
สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากการแยกสารและทำสารให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี ของสารสกัดที่ได้จากรากตะครอง (*Z. cambodiana*) พบว่าสามารถแยกสารไซโคลเปปไทด์อัลคาลอยด์ได้ 4 สาร ดังนี้

สาร ZC-M1 ผลึกรูปเข็ม ไม่มีสี (cambodine A)

สาร ZC-M2 เป็นผลึกรูปเข็ม ไม่มีสี (frangufoline)

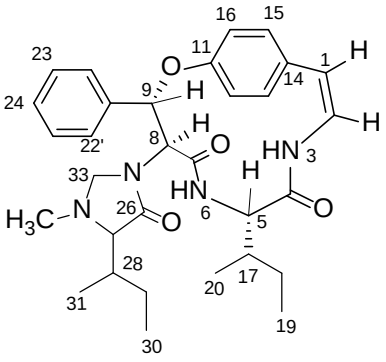
สาร ZC-M3 เป็นของแข็ง ไม่มีสี (lotusanine B)

สาร ZC-M4 เป็นผลึกรูปเข็ม ไม่มีสี (cambodine B)

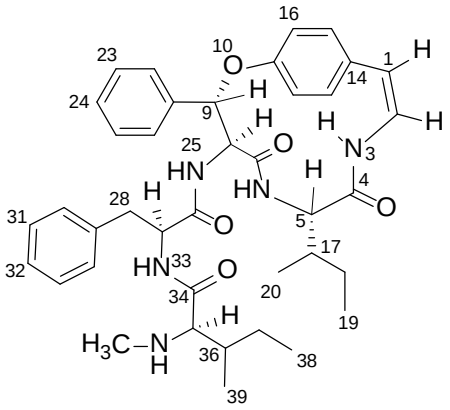
จากการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารทั้ง 4 สาร โดยใช้เทคนิคสเปกโทรสโกปีชนิดต่างๆ (UV, IR, NMR และ MS) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง 1D- และ 2D-NMR และร่วมกับการเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้กับข้อมูลที่มีผู้รายงานไว้แล้ว พบว่าสารทั้ง 4 เป็นไซโคลเปปไทด์อัลคาลอยด์เป็นชนิด 14 เหลี่ยม โดยที่สาร ZC-M1 และ ZC-M4 เป็นสารชนิดใหม่ และให้ชื่อ cambodine B และ cambodine B ตามลำดับ ตามชื่อพืชชนิดนี้ ส่วนสาร ZC-M2 และ ZC-M3 พิสูจน์ได้ว่าเป็นสารที่เคยมีผู้พบแล้ว มีสูตรโครงสร้างเป็น frangufoline และ lotosanine B ตามลำดับ ดังรูปที่ 7

การกำหนดสเตอรีโอเคมีของสารใหม่ใช้วิธีเปรียบเทียบข้อมูลสเปกโทรสโกปี รวมทั้งค่า optical rotation กับสารที่ทราบสเตอรีโอเคมีแล้ว ซึ่งสรุปได้ว่าไซโคลเปปไทด์อัลคาลอยด์ชนิดใหม่มีสเตอริโอเคมีในส่วนของวง 14 เหลี่ยม เป็น 5*S*, 8*S* และ 9*S* configuration และในส่วนที่ไม่เป็นวง น่าจะเป็นกรดอะมิโนชนิด *L*

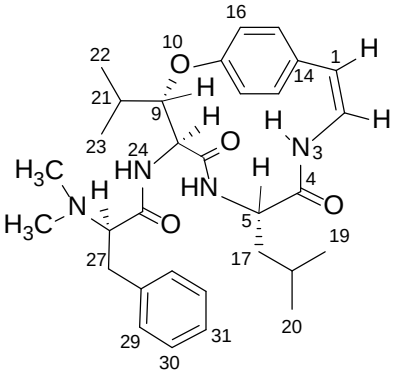
เมื่อนำไซโคลเปปไทด์อัลคาลอยทั้ง 4 สารนี้ ไปทดสอบฤทธิ์ต้านมาเลเรีย พบว่าสารทั้งสี่ไม่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *Plasmodium falciparum*



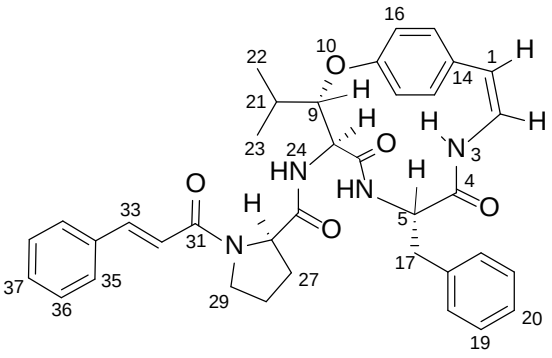
ZC-M1, Cambodine A



ZC-M4, Cambodine B



ZC-M2, Frangufoline



ZC-M3, Lotusanine B

รูปที่ 7 สูตรโครงสร้างและสเตรีโอเคมีของสาร ZC-M1, ZC-M2, ZC-M3 และ ZC-M4