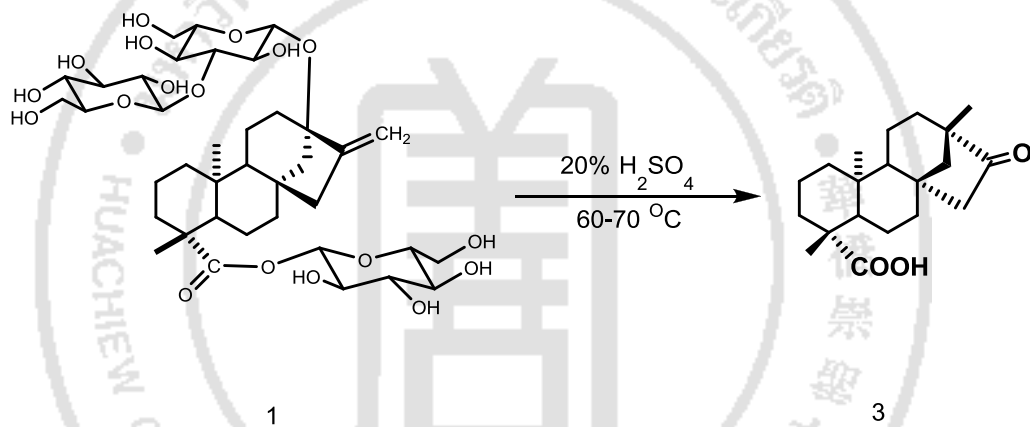


บทที่ 4 ผลการวิจัย

4.1 สังเคราะห์สารตั้งต้นและวิเคราะห์โครงสร้าง

จากการทดลองนำสเตียอิลิโกลไซด์ (1) มาทำปฏิกิริยาแอซิดไฮโดรไลซิส แล้วนำมาแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟีให้ได้สารตั้งต้นคือสารไอโซสเตียออล (3) ที่บริสุทธิ์ นำมาวิเคราะห์หาโครงสร้างที่แน่นอนด้วยโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกโทรสโกปี ($^1\text{H-NMR}$ spectroscopy) แมสสเปกโทรเมตรี (Mass spectrometry) และเปรียบเทียบกับสารที่มีรายงานอยู่แล้ว



ภาพที่ 4-1 ปฏิกิริยาแอซิดไฮโดรไลซิสของสารสเตียอิลิโกลไซด์ (1)

ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีของสารไอโซสเตียออล (3)

สารตั้งต้น isosteviol (3)

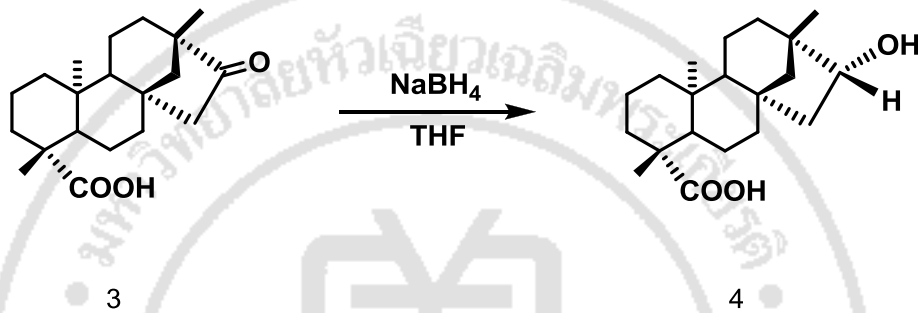
ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ แสดงดังตารางที่ 4-1

ข้อมูล ESMS (+ve): m/z (% rel. abund.) 659 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ (100)

4.2 ปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารไอโซสตีวียอลโดยวิธีการทางเคมีและวิเคราะห์โครงสร้างของสาร ดังต่อไปนี้

4.2.1 สังเคราะห์สารไดไฮโดรไอโซสตีวียอล (4)

จากปฏิกิริยารีดักชันของสารไอโซสตีวียอล (3) ได้สารไดไฮโดรไอโซสตีวียอล (4) นำมาวิเคราะห์หาโครงสร้างที่แน่นอนด้วยโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกโตรสโกปี ($^1\text{H-NMR}$ spectroscopy) แมสสเปกโตรเมตรี (Mass spectrometry) และเปรียบเทียบกับสารที่มีรายงานอยู่แล้ว



ภาพที่ 4-2 ปฏิกิริยารีดักชันของสารไอโซสตีวียอล (3)

ข้อมูลทางสเปกโตรสโกปีของสารไดไฮโดรไอโซสตีวียอล (4)

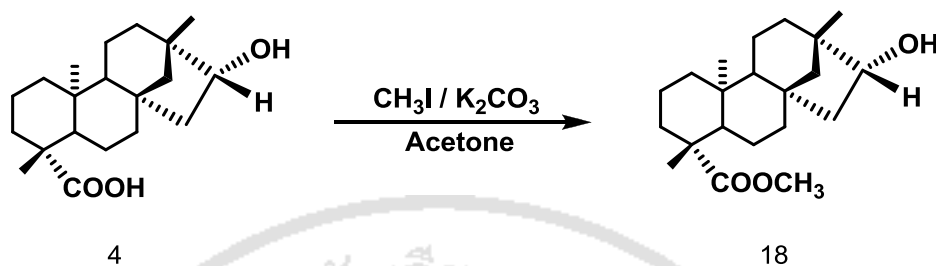
สาร Dihydroisosteviol (4)

ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ แสดงดังตารางที่ 4-2

ข้อมูล ESMS (-ve): m/z (% rel. abund.) 639 $[2\text{M-H}]^-$ (100)

4.2.2 สังเคราะห์สารไดไฮโดรไอโซสตีวียอลเมทิลเอสเทอร์

จากการทดลองนำสารไดไฮโดรไอโซสตีวียอล (4) มาทำปฏิกิริยามีทิลเลชันได้สารไดไฮโดรไอโซสตีวียอลเมทิลเอสเทอร์ (18)



ภาพที่ 4-3 ปฏิกิริยามีทิลเลชันของสารไดไฮโดรไอโซสตีวียอล (4)

ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีของสารไดไฮโดรไอโซสตีวียอลเมทิลเอสเทอร์ (18)

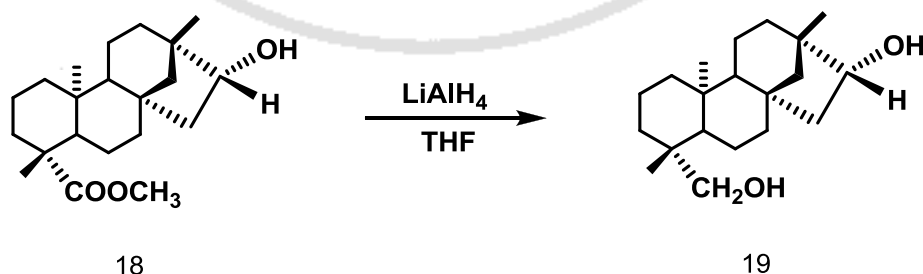
สาร Dihydroisosteviol methyl ester (18)

ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ แสดงดังตารางที่ 4-3

ข้อมูล ESMS (+ve): m/z (% rel. abund.) 335 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100)

4.2.3 สังเคราะห์สารแอลกอฮอล์แอนาลอกที่ตำแหน่ง 19

จากการทดลองนำสารไดไฮโดรไอโซสตีวียอลเมทิลเอสเทอร์ (18) มาทำปฏิกิริยารีดักชันได้สารแอลกอฮอล์แอนาลอกที่ตำแหน่ง 19 (19)



ภาพที่ 4-4 ปฏิกิริยารีดักชันของสารไดไฮโดรไอโซสตีวียอลเมทิลเอสเทอร์ (18)

ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีของสารแอลกอฮอล์แอนาล็อกที่ตำแหน่ง 19 (19)

สาร Dihydroisosteviol C-19 alcoholic analogue (19)

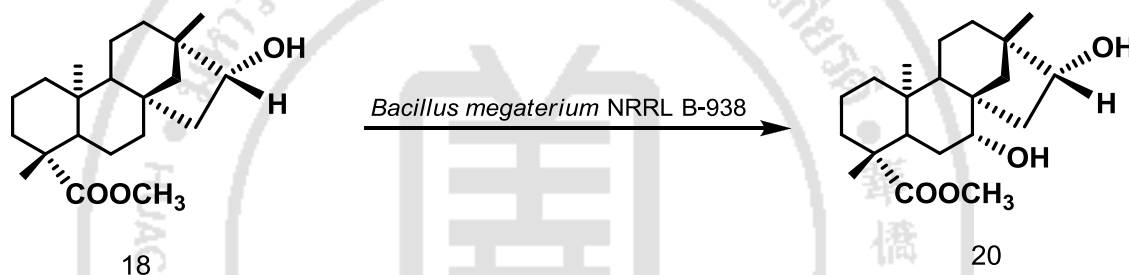
ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ แสดงดังตารางที่ 4-4

ข้อมูล ESMS (+ve): m/z (% rel. abund.) 635 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ (100)

4.3 ปรับเปลี่ยนโครงสร้างโดยกระบวนการทางชีวภาพ

4.3.1 ปรับเปลี่ยนโครงสร้างโดยกระบวนการทางชีวภาพด้วยสารไดไฮโดรไอโซสเตวีโอลเมทิลเอสเตอ์ (18)

นำสาร 18 มาทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างโดยกระบวนการทางชีวภาพโดยเชื้อ *Bacillus megaterium* NRRL B-938 ได้สารเมแทบอไลต์ 20 ดังแสดง



ภาพที่ 4-5 การปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสารไดไฮโดรไอโซสเตวีโอลเมทิลเอสเตอ์ (18) โดยกระบวนการทางชีวภาพด้วย *Bacillus megaterium* NRRL B-938

ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีของสารเมแทบอไลต์ (20)

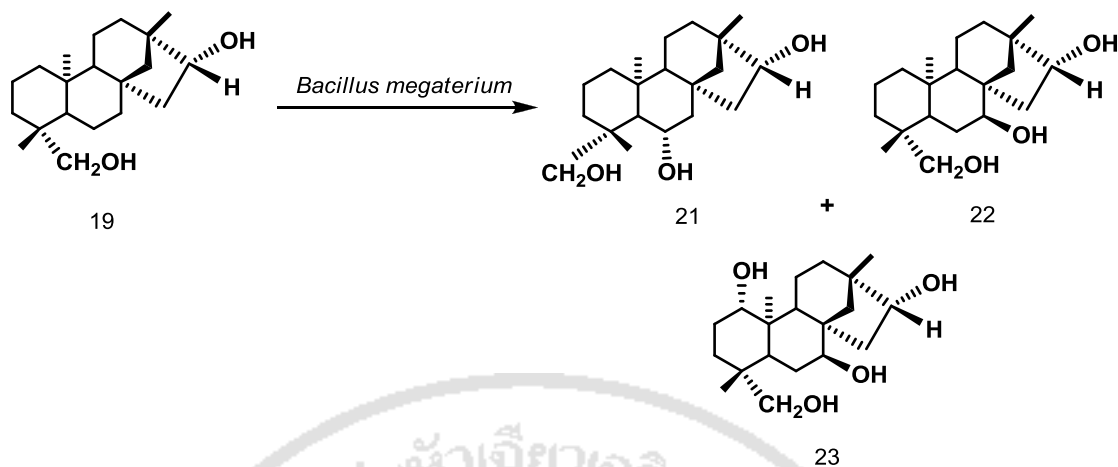
สารเมแทบอไลต์ (20)

ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ แสดงดังตารางที่ 4-5

ข้อมูล ESMS (+ve): m/z (% rel. abund.) 701 $[2\text{M}+\text{H}]^+$ (100)

4.3.2 ปรับเปลี่ยนโครงสร้างโดยกระบวนการทางชีวภาพด้วยสารแอลกอฮอล์แอนาล็อกที่ตำแหน่ง 19 (5)

นำสารแอลกอฮอล์แอนาล็อกที่ตำแหน่ง 19 (19) มาทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างโดยกระบวนการทางชีวภาพโดยเชื้อ *Bacillus megaterium* NRRL B-938 ได้สารเมแทบอไลต์ 21, 22 และ 23 ดังแสดง



ภาพที่ 4-6 การปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสารแอลกอฮอล์แอนาโลกที่ตำแหน่ง 19 (19) โดย
กระบวนการทางชีวภาพด้วย *Bacillus megaterium* NRRL B-938

ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีของสารเมแทบอลิท์ (21)

สารเมแทบอลิท์ (21)

ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ แสดงดังตารางที่ 4-6

ข้อมูล ESMS (-ve): m/z (% rel. abund.) 693 $[\text{M}+2\text{Cl}]^-$ (100)

ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีของสารเมแทบอลิท์ (22)

สารเมแทบอลิท์ (22)

ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ แสดงดังตารางที่ 4-7

ข้อมูล ESMS (-ve): m/z (% rel. abund.) 693 $[\text{M}+2\text{Cl}]^-$ (100)

ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีของสารเมแทบอลิท์ (23)

สารเมแทบอลิท์ (23)

ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ แสดงดังตารางที่ 4-8

ข้อมูล ESMS (+ve): m/z (% rel. abund.) 699 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ (100)

ตารางที่ 4-1 ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของสาร 3

ตำแหน่ง	Isosteviol (3)	
	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$
1	0.89 (td, 13.9, 3.3), 1.63-1.75 (m)	39.7
3	1.02 (dd, 13.9, 3.4), 2.13 (br d, 13.9)	37.7
7	1.46 (dd, 13.7, 3.2), 1.63-1.75 (m)	41.4
12	1.30-1.47 ^a , 1.60 (d, 13.9)	37.3
14	1.30-1.47 ^a , 1.53 (d, 11.7)	54.3
15	1.79 (d, 18.8), 2.62 (dd, 18.8, 2.6)	48.4
16	-	222.8
17-CH ₃	0.95 (s)	19.8
18-CH ₃	1.23 (s)	29.0
19	-	183.5
20	0.76 (s)	13.3

บันทึกใน CDCl_3

^a มีการซ้อนทับของสัญญาณในตำแหน่งเดียวกัน

ตารางที่ 4-2 ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของสาร 4

ตำแหน่ง	Dihydroisosteviol (4)	
	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$
1	0.81 (m), 1.65 (m)	39.8
3	0.91 (m), 2.06 (br d, 13.1)	37.9
7	1.24 ^a , 1.46 (m)	41.6
12	1.68 (m), 1.74 (m)	33.6
14	0.94 (m), 1.24 ^a	55.1
15	1.24 ^a , 1.78 (m)	42.4
16	3.77 (dd, 10.5, 4.3)	80.2
17-CH ₃	0.84 (s)	24.7
18-CH ₃	1.13 (s)	28.9
19	-	181.1
20	0.76 (s)	13.1

บันทึกใน $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ 2 หยด

^a มีการซ้อนทับของสัญญาณในตำแหน่งเดียวกัน

ตารางที่ 4-3 ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของสาร 18

ตำแหน่ง	Dihydroisosteviol methyl ester (18)	
	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$
1	0.84 (m), 1.73 ^a	40.0
3	0.99 (m), 2.13 (br d, 13.3)	38.0
7	1.28 ^b , 1.46 (m)	41.7
12	1.28 ^b , 1.73 ^a	33.7
14	0.99 (m), 1.25 (m)	55.2
15	1.73 ^a , 1.79 (m)	42.8
16	-	80.5
17-CH ₃	0.88 (s)	24.8
18-CH ₃	1.13 (s)	28.8
19	-	178.0
20	0.69 (s)	13.0
-OCH ₃	3.59 (s)	51.1

บันทึกใน CDCl₃

^{a,b}มีการซ้อนทับของสัญญาณในตำแหน่งเดียวกัน

ตารางที่ 4-4 ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของสาร 19

ตำแหน่ง	Dihydroisosteviol 19 alcoholic analogue (19)	
	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$
1	0.83 (td, 13.1, 3.6), 1.65 ^a	39.5
3	0.94 (m), 1.77 (m)	35.5
7	1.37 (m), 1.48 (m)	41.9
12	1.18 (m), 1.73 (m)	33.6
14	1.03 (m), 1.25 (m)	55.4
15	1.65 ^a , 1.82 (m)	42.9
16	3.83 (dd, 10.7, 4.4)	80.6
17-CH ₃	0.88 (s)	24.8
18-CH ₃	0.93 (s)	27.0
19	3.39 (d, 10.9), 3.73 (d, 10.9)	65.6
20	0.86 (s)	15.4

บันทึกใน CDCl₃

^a มีการซ้อนทับของสัญญาณในตำแหน่งเดียวกัน

ตารางที่ 4-5 ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของสาร 20

ตำแหน่ง	metabolite (20)	
	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$
1	0.83 (td, 13.0, 4.0), 1.66	39.6
3	0.98 (dd, 13.4, 4.2), 2.17 (br d, 13.4)	37.8
7	3.29 (dd, 11.8, 4.0)	75.7
12	1.77 (m), 1.20 (m)	33.4
14	0.87 (br d, 2.4), 1.82 (br d, 2.4)	49.8
15	1.37 (m), 2.26 (dd, 13.8, 11.2)	32.9
16	3.82 (dd, 11.2, 4.0)	80.2
17-CH ₃	0.91 (s)	24.7
18-CH ₃	1.16 (s)	28.7
19	-	177.7
20	0.70 (s)	13.1
-OCH ₃	3.60 (s)	51.2

บันทึกใน CDCl₃

ตารางที่ 4-6 ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของสาร 21

ตำแหน่ง	metabolite (21)	
	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$
1	0.93 (m), 1.66 (m)	39.3
3	1.02 (m), 1.78 (m)	35.6
6	3.51 (br s, $W_{1/2} = 8.55$ Hz)	76.9
7	1.56 (m), 1.74 (m)	27.6
12	1.16 (m), 1.76 (m)	33.5
14	1.31 (m), 1.38 (m)	50.5
15	1.63 (m), 1.80 (m)	41.4
16	3.86 (dd, 10.6, 4.3)	80.1
17- CH_3	0.92 (s)	25.0
18- CH_3	0.95 (s)	26.8
19	3.41 (d, 10.9) , 3.73 (d, 10.9)	65.9
20	0.88 (s)	15.1

บันทึกใน CDCl_3

ตารางที่ 4-7 ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของสาร 22

ตำแหน่ง	metabolite (22)	
	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$
1	0.73 (td, 12.8, 3.3), 1.59 (m)	39.2
3	0.85 (m), 1.70 ^a	35.5
7	3.12 (m)	75.7
12	1.13 (m), 1.70 ^a	33.3
14	0.76 (m), 1.70 ^a	50.1
15	1.31 (m), 2.11 (dd, 13.6, 11.3)	32.2
16	3.69 (dd, 11.3, 4.7)	79.8
17-CH ₃	0.82 (s)	24.6
18-CH ₃	0.87 (s)	27.0
19	3.30 (d, 10.9), 3.59 (d, 10.9)	65.1
20	0.80 (s)	15.2

บันทึกใน $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ 8 หยด

^a มีการซ้อนทับของสัญญาณในตำแหน่งเดียวกัน

ตารางที่ 4-8 ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของสาร 23

ตำแหน่ง	metabolite (23)	
	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$
1	3.25 (br d, 5.5)	80.5
3	0.96 (td, 13.6, 4.0), 1.63 ^a	33.2
7	3.31 (m, $W_{1/2} = 6.8$ Hz)	76.4
12	1.06 (br d, 9.7), 1.63 ^a	33.5
14	1.09 (m), 1.22 (m)	50.5
15	1.45 (m), 1.63 ^a (m)	41.1
16	3.67 (dd, 10.8, 4.2)	79.5
17-CH ₃	0.77 (s)	24.5
18-CH ₃	0.78 (s)	26.1
19	3.15 (d, 11.1), 3.56 (d, 11.1)	64.3
20	0.80 (s)	10.5

บันทึกใน $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ 16 หยด

^a มีการซ้อนทับของสัญญาณในตำแหน่งเดียวกัน