

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การศึกษาสารประกอบทางเคมีจากดอกเทียนบ้าน
และฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์

A Study of Chemical Constituents of
Impatiens balsamina Linn. and
Their Antimicrobial Activities.

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากฝ่ายวางแผนและพัฒนา
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ประจำปีงบประมาณ 2532

คณะผู้ดำเนินการงานวิจัย

สมาลี เหลืองสกุล สุนดา กาญจนเมธูร สุวดี นาคะผดุงรัตน์

581.63
ส842ร
ร.2

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

581.63

ส 8425

ร.๕

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การศึกษาสารประกอบทางเคมีจากดอกเทียนบ้าน
และฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์

A Study on Chemical Constituents of
Impatiens balsamina Linn. and
Their Antimicrobial Activities.

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากฝ่ายวางแผนและพัฒนา
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ประจำปีงบประมาณ 2532

คณะผู้ดำเนินงานวิจัย

สุมาลี เหลืองสกุล สุนิดา กาญจนมธุร ชูวดี นาคะผดุงรัตน์

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

174105

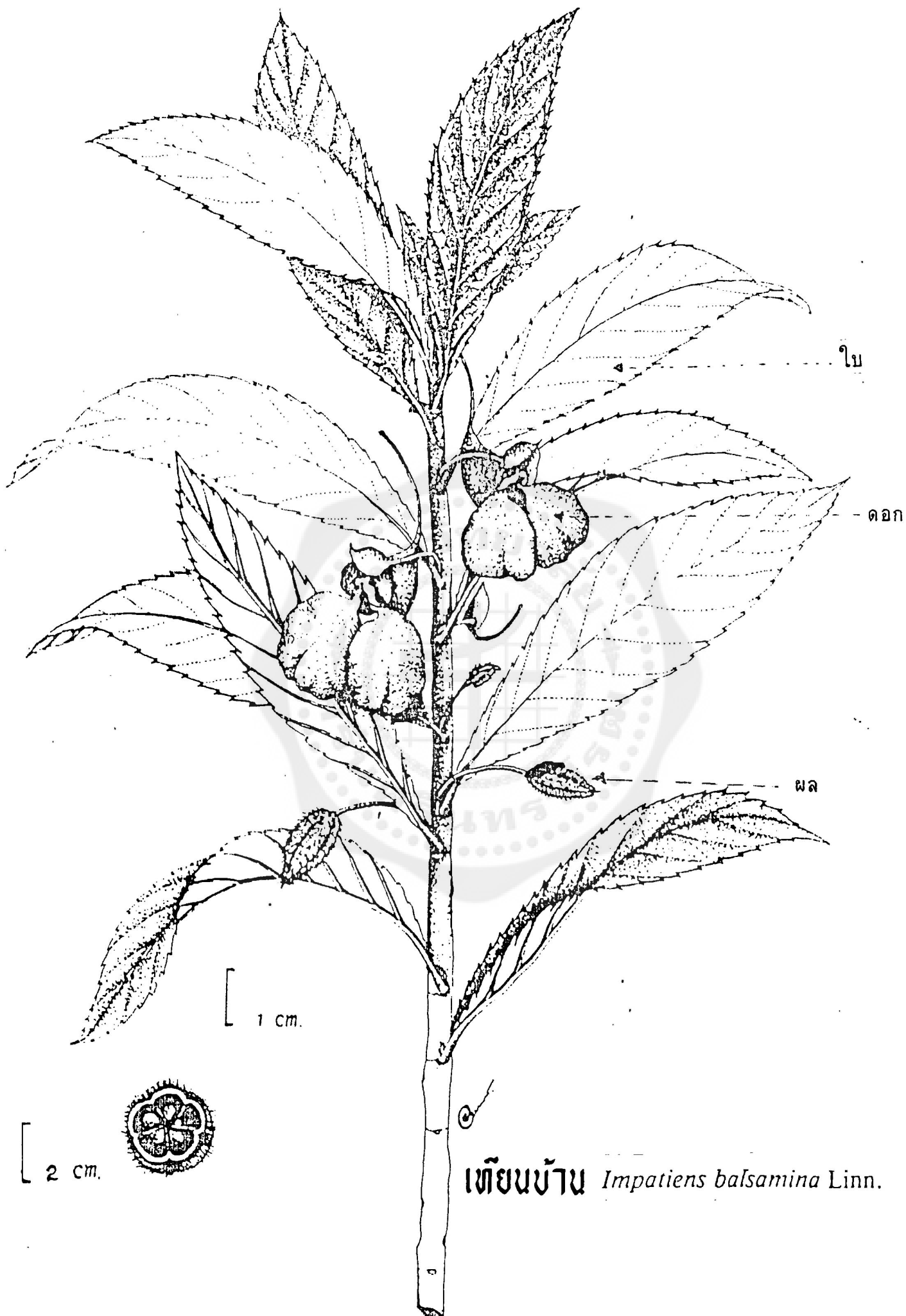
คำนำ

การที่ประเทศไทยอยู่ในเขตร้อนชื้น ทำให้ประชาชนมีเหงื่อออกมากในขณะทำงานก่อให้เกิดความอับชื้น และการที่มีจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนังแพร่กระจายอยู่ทั่วไปในบรรยากาศ จึงทำให้ประชาชนเป็นโรคผิวหนัง เช่น กลาก เกาฬอน ผื่นผื่นอักเสบ ผื่นผื่น คันมากเพราะมีสภาวะแวดล้อมเหมาะสมต่อการเกิดโรค โรคเหล่านี้แม้ว่าเป็นโรคที่ไม่ร้ายแรงก็ตาม แต่เป็นปัญหาต่อสังคมและต่อเศรษฐกิจของประเทศ เนื่องจากผู้ป่วยมักถูกมองว่าเป็นผู้ไม่รักษาความสะอาดของร่างกายและยาที่ใช้รักษาโรคเหล่านี้มักมีราคาแพง ส่วนใหญ่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ การรักษาโรคยังต้องใช้เวลานาน การที่ยามีราคาแพงและต้องใช้เวลานานในการรักษานานจึงทำให้ผู้ป่วยมักไม่ค่อยสนใจรักษาโรคให้หายขาด ก่อให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อโรคต่อไปอีกและยังทำให้เชื้อโรคดื้อยาด้วย แต่หากสามารถพัฒนาใช้สมุนไพรในประเทศที่มีคุณสมบัติในการรักษาโรคเหล่านี้ให้ใช้ได้สะดวกขึ้น มีราคาถูกและหาได้ง่าย ก็จะช่วยให้ผู้ป่วยหันมารักษาโรคอย่างจริงจังได้ เทียนบ้านเป็นสมุนไพรที่หาได้ง่ายและมีรายงานการนำมาใช้ในการรักษาโรคดังกล่าว แต่มักใช้ในรูปของสมุนไพรธรรมชาติ ยังไม่มีการพัฒนาเป็นยา คณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาสารประกอบทางเคมีจากดอกเทียนบ้านและฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ เพื่อเป็นข้อมูลในการพัฒนาเทียนบ้านให้เป็นยารักษาโรคในรูปที่เหมาะสมต่อไปซึ่งจะช่วยลดการนำเข้ายารักษาโรคลงด้วย

ผู้วิจัยขอขอบคุณฝ่ายวางแผนและพัฒนา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้การสนับสนุนการวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณภาควิชาเคมีที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ ขอขอบคุณสถาบันโรคผิวหนังและกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่อนุเคราะห์จุลินทรีย์มาใช้ในการวิจัยและขอขอบคุณท่านรองศาสตราจารย์ สาคร ศรีนันทวัน และดร. เสริมสิน ศิริวัฒนา ที่ให้คำแนะนำปรึกษาตลอด

สุมาลี เหลืองสกุล และคณะ

มิถุนายน 2533



บทคัดย่อ

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนังของสารสกัดหยาบด้วย hexane, chloroform และ methanol จากดอกเทียนบ้านสีม่วง โดยการสกัดแบบต่อเนื่อง พบว่าสารสกัดหยาบด้วย hexane และ chloroform มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ดีกว่าสารสกัดหยาบด้วย methanol คือ สามารถต้านจุลินทรีย์ทดสอบได้ 7 ใน 8 ชนิด จึงได้แยกสารจากสารสกัดหยาบด้วย hexane และ chloroform โดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี พบว่า ส่วนที่ตกผลึกรูปเข็มจากสารสกัดทั้งสองเท่านั้นที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เช่นเดียวกับการทดสอบเบื้องต้น จากการวิเคราะห์สมบัติและข้อมูลสเปกตรัมของผลึกบริสุทธิ์รูปเข็มสีทองที่แยกได้จากสารสกัดหยาบทั้งสองชนิด สรุปได้ว่าต่างก็เป็นสาร 2-methoxy-1, 4-naphthoquinone และให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดต่อเชื้อ Trichophyton mentagophytes, T. rubrum, Epidermophyton floccosum, Microsporum gypseum, Candida albicans, Staphylococcus aureus ATCC 25923 และ β -hemolytic Streptococcus group A เท่ากับ 15.6, 1.95, 15.6, 31.25, 31.25, 31.25 และ 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่สารนี้ไม่มีฤทธิ์ต้าน Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 เลย

Abstract

The sensitivity test of dermatophytic microorganisms to hexane, chloroform and methanol extracts which prepared from purple, garden balsam (Impatiens balsamina Linn.) flowers by continuous extraction showed that the hexane and chloroform extracts were more efficacy than methanol extract. They could inhibit growth of 7 of 8 tested species of microorganisms. Seperation of hexane and chloroform extracts by column chromatography was found that the most active fraction from both extracts were obtained in the form of golden needle crystal. The structure of purified golden needle crystals were elucidated to be 2-methoxy-1, 4-naphthoquinone by spectrum analysis. The minimal inhibitory concentrations of the compound to Trichophyton mentagophytes, T. rubrum, Epidermophyton floccosum, Microsporum gypseum, Candida albicans, Staphylococcus aureus ATCC 25923, and β -hemolytic Streptococcus group A are 15.6, 1.95, 15.6, 31.25, 31.25, 31.25 and 125 microgram per milliliter, respectively, but Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 was found to be a resistant strain to the extracts tested.

สารบัญ

	หน้า
บทนำ	1
- วัตถุประสงค์	1
- ขอบเขตการวิจัย	2
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
อุปกรณ์และวิธีทดลอง	3
ผลและวิจารณ์การทดลอง	6
สรุปผล	19
เอกสารอ้างอิง	20

บทนำ

เทียนบ้านหรือเทียนดอก (Impatiens balsamina Linn, Family Balsaminaceae) เป็นไม้ประดับที่ปลูกได้ง่าย พบได้ทั่วไปออกดอกดกตลอดปี และถูกนำมาใช้เป็นยารักษาโรคในหลาย ๆ ประเทศแถบเอเชีย โดยใช้เป็นยารักษาแผล ฝี หนอง ลดการอักเสบ แก้ปวดและถอนพิษต่างๆ โดยการตำพอกหรือใช้ใบแห้งบดเป็นผงผสมพิมเสนโรยแผล (2, 5, 10) จากการรายงานการวิจัยการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบ และดอกเทียนบ้านในการต้านการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนัง พบว่า สารสกัดด้วย chloroform ทั้งจากใบและดอกเทียนบ้านมีฤทธิ์ต้านเชื้อ Staphylococcus aureus และ Streptococcus ได้ดี โดยสารสกัดจากดอกให้ผลดีกว่าสารสกัดจากใบ (3) นอกจากนี้สารสกัดจากใบยังมีฤทธิ์ต้านเชื้อราโรคผิวหนังด้วย (4) แต่ยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากดอกเทียนบ้านต่อการเจริญของเชื้อราดังกล่าว สารประกอบในดอกเทียนบ้านที่มีผู้รายงานไว้ได้แก่ anthocyanin และ flavonol ชนิดต่างๆ นอกจากนี้ยังพบ lawsone (2-hydroxy -1, 4-naphthoquinone) และ 2-methoxy -1, 4-naphthoquinone (8) ซึ่งทำลายเชื้อราโรคพืชได้ดี (6) จากข้อมูลเบื้องต้นดังกล่าวคณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาแยกสารประกอบทางเคมีจากดอกเทียนบ้าน และฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนังทั้งแบคทีเรีย รา และยีสต์ เพื่อเป็นข้อมูลในการศึกษาและพัฒนาการใช้ดอกเทียนบ้านเป็นยาจนกระทั่งสามารถผลิตยารักษาโรคจากดอกเทียนบ้านได้ ซึ่งจะช่วยลดการนำเข้ายาจากต่างประเทศที่มีราคาแพงได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อสกัดแยกสารประกอบทางเคมีจากดอกเทียนบ้าน
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารประกอบทางเคมีจากดอกเทียนบ้านในการต้านจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนัง

ขอบเขตการวิจัย

1. ส่วนของดอกเทียนบ้านที่ใช้ คือ ดอกเทียนบ้านสีม่วงซึ่งเก็บจากต้นที่ปลูกไว้ที่บริเวณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร
2. การสกัดสารใช้ hexane, chloroform และ methanol เป็นตัวทำละลาย โดยใช้ชนิด analytical grade
3. แยกสารประกอบจากสารสกัดหยาบ (clude extract) ที่ได้จากดอกเทียนบ้าน โดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟี
4. ศึกษาฤทธิ์ของสารประกอบจากดอกเทียนบ้านในการต้านจุลินทรีย์ดังต่อไปนี้

เชื้อรา	<u>Trichophyton</u>	<u>mentagophytes</u> *
	<u>T. rubrum</u> *	
	<u>Epidermophyton</u>	<u>floccosum</u> *
	<u>Microsporum</u>	<u>gypseum</u> *
ยีสต์	<u>Candida</u>	<u>albicans</u> *
แบคทีเรีย	<u>Staphylococcus</u>	<u>aureus</u> ATCC 25923 **
	β hemolytic <u>Streptococcus</u>	group A **
	<u>Pseudomonas</u>	<u>aeruginosa</u> ATCC 27853 **

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบข้อมูลเกี่ยวกับสารประกอบทางเคมีที่พบในดอกเทียนบ้าน
2. ได้สารประกอบบริสุทธิ์จากดอกเทียนบ้านที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนัง
3. ได้ข้อมูลและสารประกอบซึ่งสามารถใช้ในการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและทางพิษวิทยาต่อไปก่อนจะพัฒนาเป็นยารักษาโรค
4. เมื่อพัฒนาเป็นยารักษาโรคได้แล้วจะสามารถลดอัตราการนำเข้าของยาบางชนิดจากต่างประเทศได้

* เชื้อจากสถาบันโรคผิวหนัง กรุงเทพฯ

** เชื้อจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี

อุปกรณ์ และวิธีทดลอง

การทดลอง แบ่งออกเป็นขั้นตอนดังนี้คือ

1. การสกัดสารประกอบจากดอกเทียนบ้าน

นำดอกเทียนบ้านสีม่วงที่อบแห้งแล้วที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง หนัก 300 กรัมมาบด และสกัดสารประกอบจากผงดอกเทียนบ้านครั้งละ 10 กรัม ด้วย hexane 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยใช้ soxhlet apparatus สกัดนาน 24 ชั่วโมง นำสารละลายสารสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary vacuum evaporator และนำผงดอกเทียนบ้านที่ผ่านการสกัดด้วย hexane แล้วมาสกัดต่อโดยวิธีเดียวกันด้วย chloroform และ methanol ตามลำดับ

2. การทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนังในคนของดอกเทียนบ้าน

การเตรียมเชื้อ

เลี้ยงเชื้อรา และยีสต์บน Sabouraud dextrose agar slant ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) นาน 10 วัน สำหรับเชื้อรา และ 48 ชั่วโมงสำหรับยีสต์

เลี้ยงแบคทีเรียใน tryptic soy broth (ในการเลี้ยงเชื้อ Streptococcus ต้องเติม plasma 1% ด้วยทุกครั้ง) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

เมื่อจะทำการทดสอบ ให้นำเกล็ดปราศจากเชื้อความเข้มข้น 0.85% ล้างเชื้อราและยีสต์จากอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วปรับ suspension ของเชื้อให้มีจำนวนสปอร์หรือเซลล์เท่ากับ 10^8 สปอร์หรือเซลล์ต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อแบคทีเรียนั้นปรับ suspension ให้มีจำนวนเซลล์ประมาณ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตรเช่นกัน

การทดสอบโดยวิธี disc diffusion test

ละลายสารสกัดหยาบที่ได้ด้วยตัวทำละลายเดิมให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 100,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเจือจางต่อด้วยตัวทำละลายเดิมให้มีความเข้มข้นของสารสกัดลดลงเท่าตัว ได้สารละลายสารสกัดเข้มข้น 50,000, 25,000, 12,500, 6,250, 3,125, 1,562.5, 390.625 และ 195.3125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ บรรจุสารละลายสารสกัดแต่ละความเข้มข้นลงใน disc ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร disc ละ 40 ไมโครลิตร นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ได้สารสกัดที่บรรจุใน disc เท่ากับ 4,000, 2,000, 1,000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625 และ 7.8 ไมโครกรัมต่อ disc ตามลำดับ แล้วทดสอบตามวิธีของ Treagan และ Pullium (13) โดยใช้ Sabouraud dextrose agar สำหรับเชื้อราและยีสต์ และ Mueller Hinton agar สำหรับแบคทีเรียทดสอบ 3 ซ้ำ

3. การแยกสารประกอบจากสารสกัดหยาบด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี

นำสารสกัดหยาบจากข้อ 1 เฉพาะที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์มาแยกสารประกอบโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ hexane, chloroform และ methanol ในอัตราส่วนต่าง ๆ กันเป็น eluent เริ่มต้นจาก hexane : chloroform ในอัตราส่วน 100:0 แล้วเพิ่ม chloroform ครั้งละ 5 มิลลิลิตร ได้ hexane: chloroform 95:5, 90:10 จนถึง methanol โดยมี chloroform:methanol ในอัตราส่วน 0:100 เป็น eluent สุดท้าย คอลัมน์ที่ใช้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.8 เซนติเมตร ยาว 90 เซนติเมตร บรรจุ silica gel 60 ขนาด 0.068-0.200 มิลลิเมตร (70-230 mesh ASTM) ที่ผสมกับ hexane ลงในคอลัมน์ให้มี silica gel สูงประมาณ 60 เซนติเมตร เติมสารสกัดหยาบ 3.5 กรัม ลงในส่วนผสมของ silica gel และ hexane คนให้สารสกัดละลายเข้ากันดี แล้วจึงเติมลงในคอลัมน์ ปิดทับด้วยทรายละเอียดที่ขจัดสิ่งเจือปนออกแล้วสูงประมาณ 2 เซนติเมตร แล้วค่อย ๆ เติม eluent ลงไป เริ่มจาก hexane ปล่อยให้สารถูกชะออกมา แยกเก็บส่วนที่ถูกชะออกมา ครั้งละ 100 มิลลิลิตร จนไม่มีสารถูกชะออกมาอีก จึงเปลี่ยน eluent ให้มี polarity สูงขึ้นเรื่อย ๆ จนถึง methanol นำแต่ละส่วนที่แยกได้มาตรวจสอบ

สารประกอบด้วยโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง (TLC) ตรวจหาค่า R_f ด้วยไอโอดีน รวมส่วนที่มีลักษณะของสารและ R_f เหมือนกันเข้าด้วยกัน แล้วนำสารประกอบ จากแต่ละส่วนไประเหยตัวทำละลายออกไป สารที่ได้ก็นำไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ และนำส่วนที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ซึ่งเป็นส่วนที่เป็นผลึกสีทองไปทำให้บริสุทธิ์ ด้วย absolute ethanol ที่ร้อนประมาณ 50 องศาเซลเซียส ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง ล้าง ผลึกด้วย methanol ที่เย็นประมาณ 4 องศาเซลเซียส และตกผลึกใหม่ด้วย methanol ที่ร้อนประมาณ 50 องศาเซลเซียส ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งแล้วล้างใหม่ด้วย methanol ที่เย็นอีก ทำเช่นนี้หลาย ๆ ครั้ง จนสารละลายที่กรองได้ใสไม่มีสี

4. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารผลึกบริสุทธิ์ที่ต้านจุลินทรีย์ได้ โดยวิธี broth dilution test

ละลายสารผลึกบริสุทธิ์ด้วย ethylene glycol ที่ร้อนประมาณ 50 องศาเซลเซียสให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose broth สำหรับเชื้อราและยีสต์ และ Mueller Hinton broth สำหรับแบคทีเรีย ให้มีความเข้มข้น 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

บรรจุสารละลายผลึกบริสุทธิ์ที่เตรียมไว้ลงในหลอดทดสอบขนาด 12 x 75 มิลลิเมตร ที่ปราศจากเชื้อ 1 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดี แล้วเจือจางต่อให้มีความเข้มข้นของสารลดลงเท่าตัวเรื่อย ๆ จนได้สารละลาย 10 ความเข้มข้น แล้วเติมเชื้อที่จะทดสอบ ซึ่งเป็น suspension ที่มีเชื้อประมาณ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงไปหลอดละ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดี ทำให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารในสารละลายในหลอดทดสอบเท่ากับ 1,000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8, 3.9 และ 1.95 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ทดสอบ 2 ซ้ำ และมี broth control, drug control และ solvent control (เตรียมโดยวิธีเดียวกันกับการเตรียมสารละลายผลึกบริสุทธิ์ แต่ใช้ ethylene glycol ที่ใช้ละลายผลึกแทน) บ่มเชื้อราและยีสต์ที่อุณหภูมิห้อง และบ่มแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนมีการเจริญของเชื้อใน broth control หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถต้านการเจริญของเชื้อได้ (MIC)

[illegible][illegible]

ตารางที่ 3 ฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดเหยาบด้วย methanol

เชื้อ	ความเข้มข้น ของสารสกัด µg/disc	Inhibition Zone (mm.)									
		4,000	2,000	1,000	500	250	125	62.5	31.25	15.63	7.81
<u>C. albicans</u>		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<u>T. rubrum</u>		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<u>T. mentagophytes</u>	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<u>E. floccosum</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<u>M. gypseum</u>	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<u>S. aureus</u>	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<u>Streptococcus</u>	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<u>P. aeruginosa</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

เมื่อนำสารสกัดเหยาบด้วย hexane และ chloroform ไปแยกสาร โดยวิธีโครมาโทกราฟี แบบคอลัมน์ด้วยการใช้ hexane, chloroform และ methanol ในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน เป็น eluent ตามวิธีตั้งได้กล่าวมาแล้ว และหาค่า R_f โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง รวมส่วนที่มีลักษณะของสาร เหมือนกันและให้ค่า R_f เท่ากันเข้าด้วยกัน ได้ผลดังแสดงไว้ในตารางที่ 4, 5

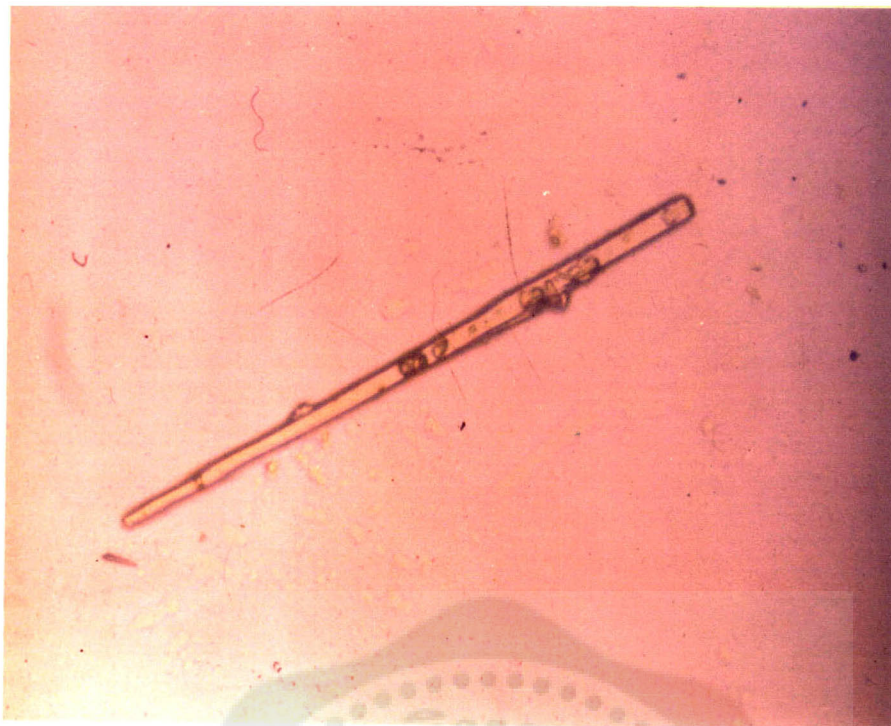
ตารางที่ 4 ส่วนต่าง ๆ ของสารที่แยกได้จากสารสกัดด้วย hexane

ส่วนที่	ลักษณะของสาร	น้ำหนักสารที่ได้ (กรัม)	R _f
3-10	คล้ายขี้ผึ้งสีขาวขุ่น	0.2168	0.5
11-13	คล้ายขี้ผึ้งสีขาวขุ่น	0.0509	0.44
14-24	คล้ายขี้ผึ้งสีขาวขุ่น	0.0542	0.5
25-44	คล้ายขี้ผึ้งสีเหลืองอ่อน	0.1342	0.83
45-48	คล้ายขี้ผึ้งสีเหลือง	0.0628	0.42
49-51	คล้ายขี้ผึ้งสีเหลืองเข้ม	0.1961	0.4, 0.35, 0.28
52-55	ผลึกรูปเข็มสีเขียวยอมเหลือง	0.7799	0.57, 0.33
56-81	คล้ายขี้ผึ้งสีเขียวเข้ม	0.2192	0.41, 0.38, 0.28, 0.18
82-106	คล้ายขี้ผึ้งสีเขียว	0.4298	0.92, 0.29, 0.25
107-116	คล้ายขี้ผึ้งสีเขียวอมเหลือง	0.2019	0.5, 0.3
117-169	คล้ายขี้ผึ้งสีเขียวออกดำ	0.5634	0.48, 0.21, 0.17, 0.13, 0.06
170-178	คล้ายขี้ผึ้งสีส้ม	0.0902	0.92

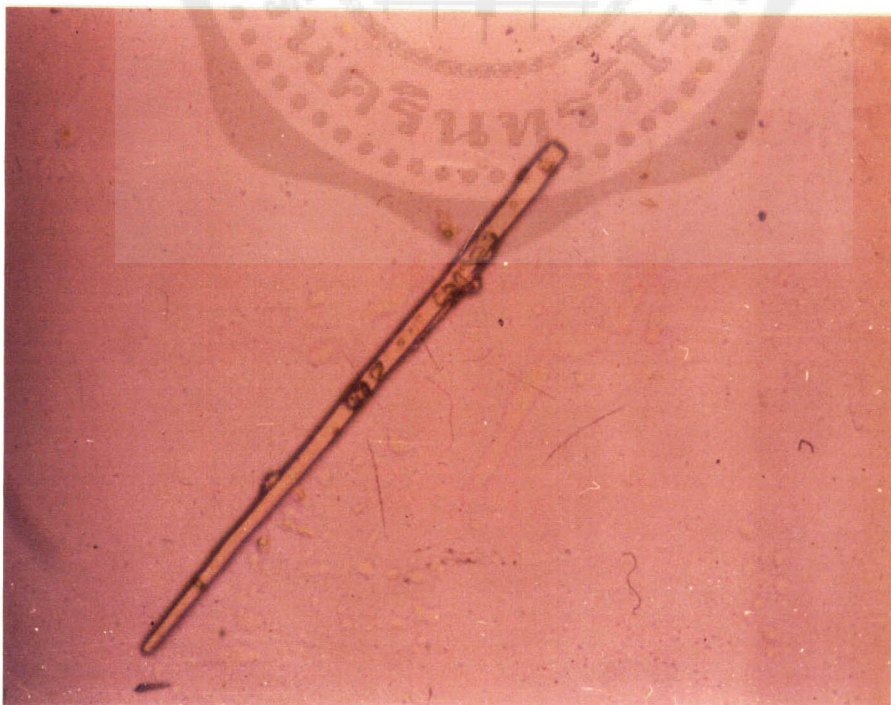
ตารางที่ 5 ส่วนต่าง ๆ ของสารที่แยกได้จากสารสกัดด้วย chloroform

ส่วนที่	ลักษณะของสาร	น้ำหนักสารที่ได้ (กรัม)	R _f
3-23	คล้ายขี้ผึ้งสีเหลืองอมเขียว	0.5254	0.5
24-41	คล้ายขี้ผึ้งสีเหลืองอมส้ม	0.5864	0.13
42-54	คล้ายขี้ผึ้งสีเหลือง	0.2020	0.97, 0.58, 0.43
55-63	ตกผลึกรูปเข็มสีเหลืองทอง	0.3135	0.67, 0.3
64-74	คล้ายขี้ผึ้งสีส้มมีผลึกรูปเข็มปน	0.2106	0.92, 0.35
75-78	สารเหนียวสีเขียวเข้ม	0.3725	0.75
79-102	สารเหนียวสีน้ำตาล	0.3211	0.89, 0.78, 0.67, 0.5
103-126	สารเหนียวสีน้ำตาลเข้ม	0.8228	0.77, 0.7, 0.25

จากการทดสอบฤทธิ์ด้านจุลินทรีย์ของสารในแต่ละส่วนที่แยกได้ พบว่า ส่วนที่ 52-55 ที่แยกได้จากการสกัดหยาบด้วย hexane และส่วนที่ 55-63 ที่แยกได้จากสารสกัดด้วย chloroform ซึ่งมีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มเท่านั้นที่มีฤทธิ์ด้านจุลินทรีย์ได้เช่นเดียวกับสารสกัดหยาบ จึงนำผลึกจากส่วนดังกล่าวมาทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีการดังกล่าวไว้แล้วข้างต้น ได้ผลึกบริสุทธิ์รูปเข็มสีทองจากสารสกัดด้วย hexane และ chloroform 1.5 กรัม และ 0.6 กรัม ตามลำดับ ดังภาพที่ 1 และ 2

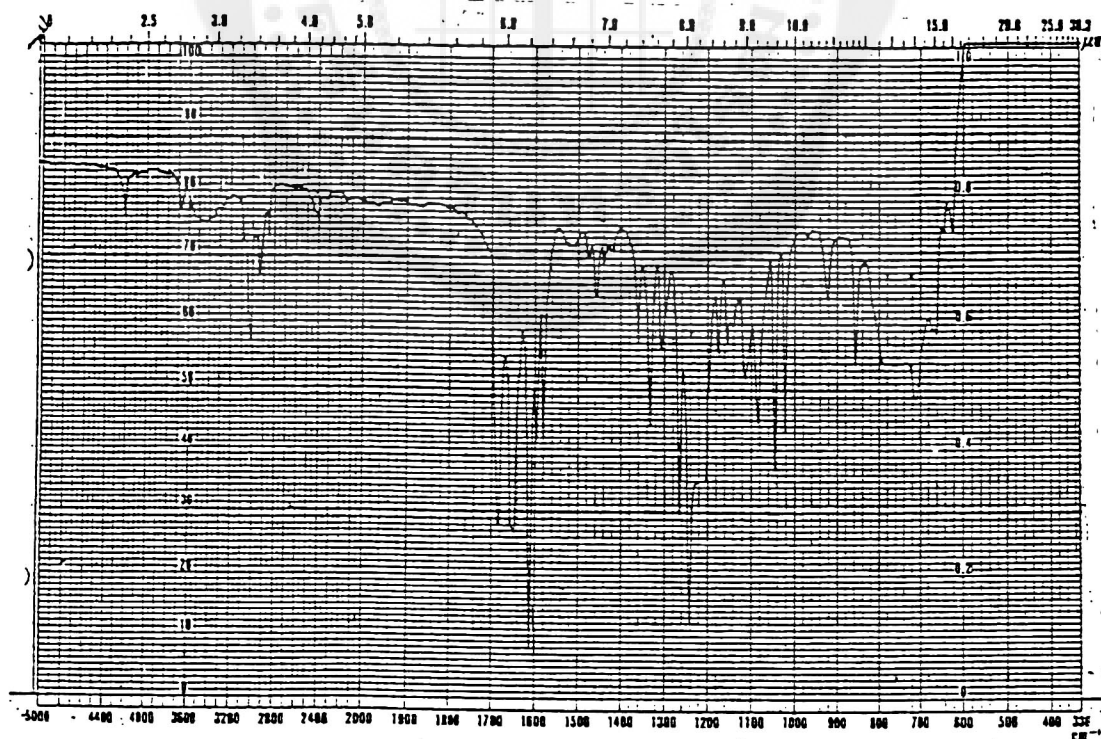


ภาพที่ 1 ผลักรูป: เซลล์ท่อน้ำที่แยกได้จากสารสกัดหยาดด้วย hexane

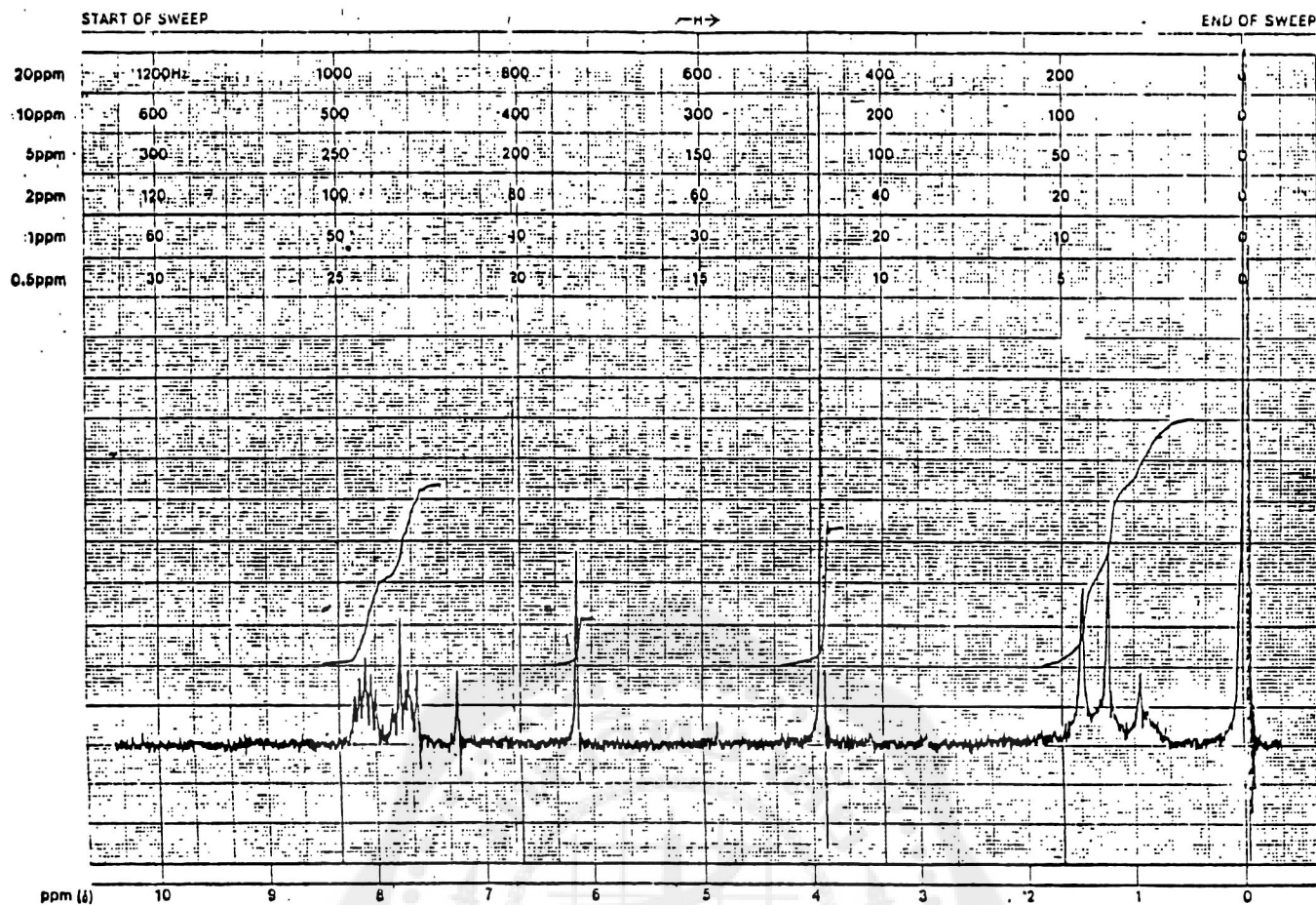


ภาพที่ 2 ผลักรูป: เซลล์ท่อน้ำที่แยกได้จากสารสกัดหยาดด้วย chloroform

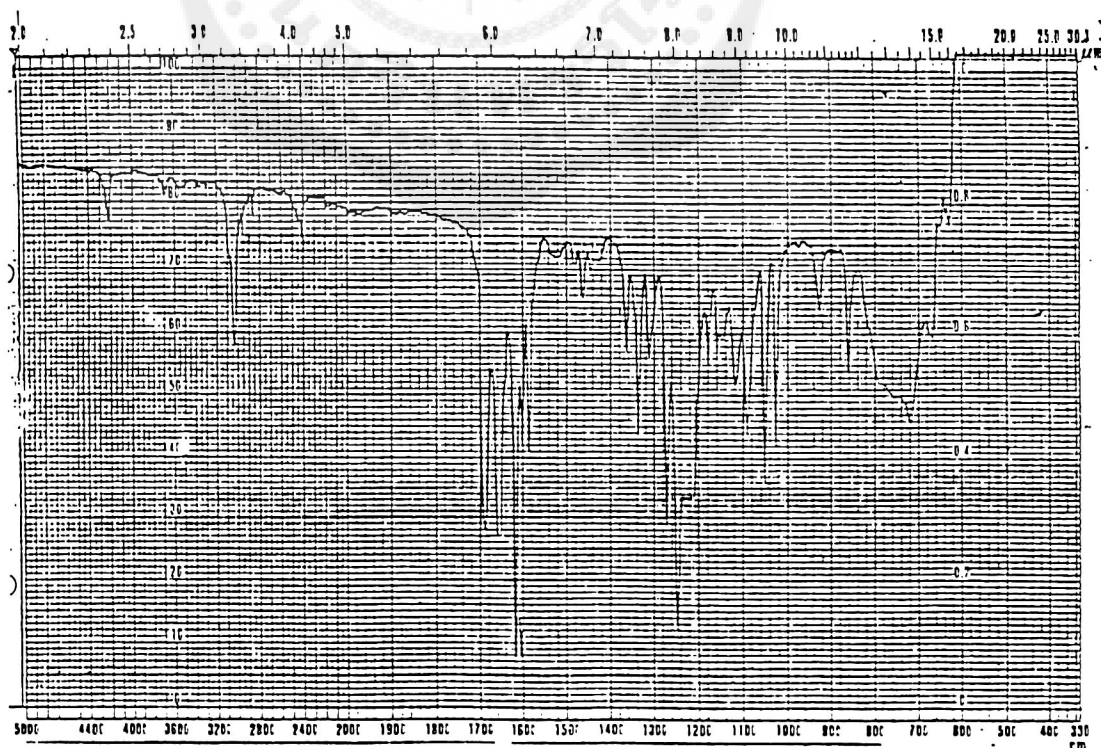
การศึกษาสมบัติของผลิตภัณฑ์รูปเข็มสีทองจากสารสกัดหยาบทั้งสองชนิด พบว่า ผลิตภัณฑ์จากสารสกัดหยาบทั้งสองชนิดมีสมบัติเหมือนกันทุกประการ คือ มีค่า R_f เท่ากับ 0.4 (ใช้ส่วนผสมของ hexane : chloroform = 3:7 เป็น eluent) มีจุดหลอมเหลว 183 องศาเซลเซียส และละลายได้ดีใน chloroform แต่ไม่ละลายใน methanol. IR spectrum ของผลิตภัณฑ์เท่ากับ $\lambda^{Br} \max (\text{cm}^{-1})$ 3050, 1680, 1645, 1600 และ 1245 ดังภาพที่ 3, 5 ^1H NMR spectrum (60 MHz- CDCl_3 , varuab model EM 360L) ได้ค่า δ 3.91 (3H, S, OCH_3), 6.19 (1H, S, H-3), 7.76 (2H, m aromatic proton) และ 8.10 (2H, m aromatic proton) ดังภาพที่ 4, 6



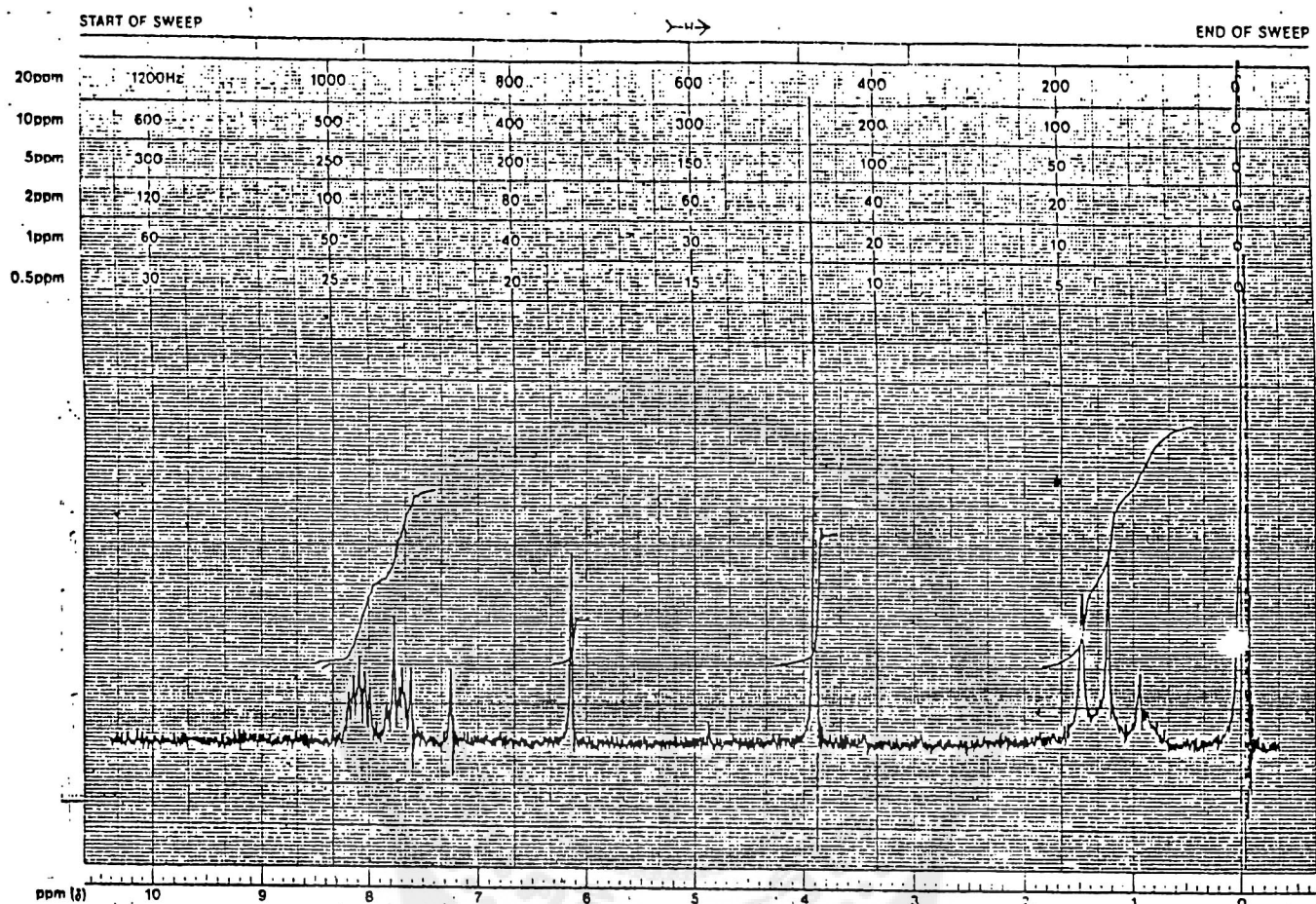
ภาพที่ 3 IR spectrum ของผลิตภัณฑ์เข็มสีทองจากสารสกัดด้วย hexane



ภาพที่ 4 ^1H NMR spectrum ของผลิตภัณฑ์ที่สกัดด้วย hexane



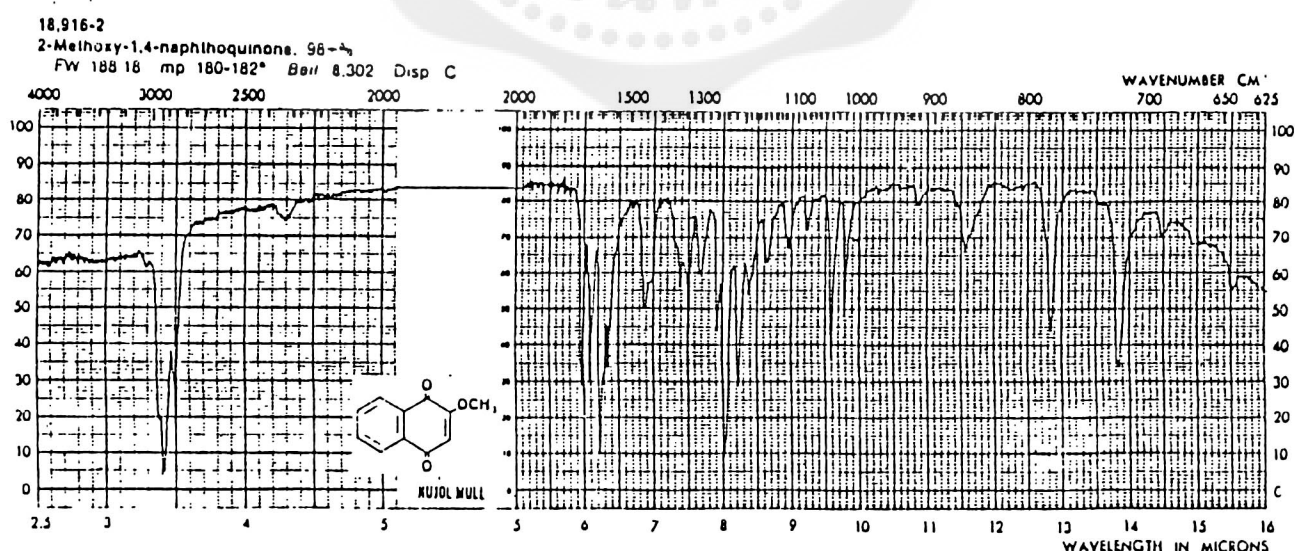
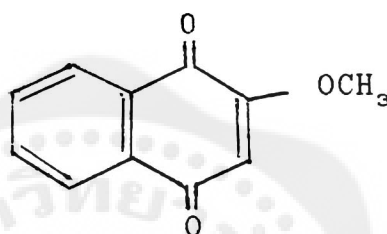
ภาพที่ 5 IR spectrum ของผลิตภัณฑ์ที่สกัดด้วย chloroform



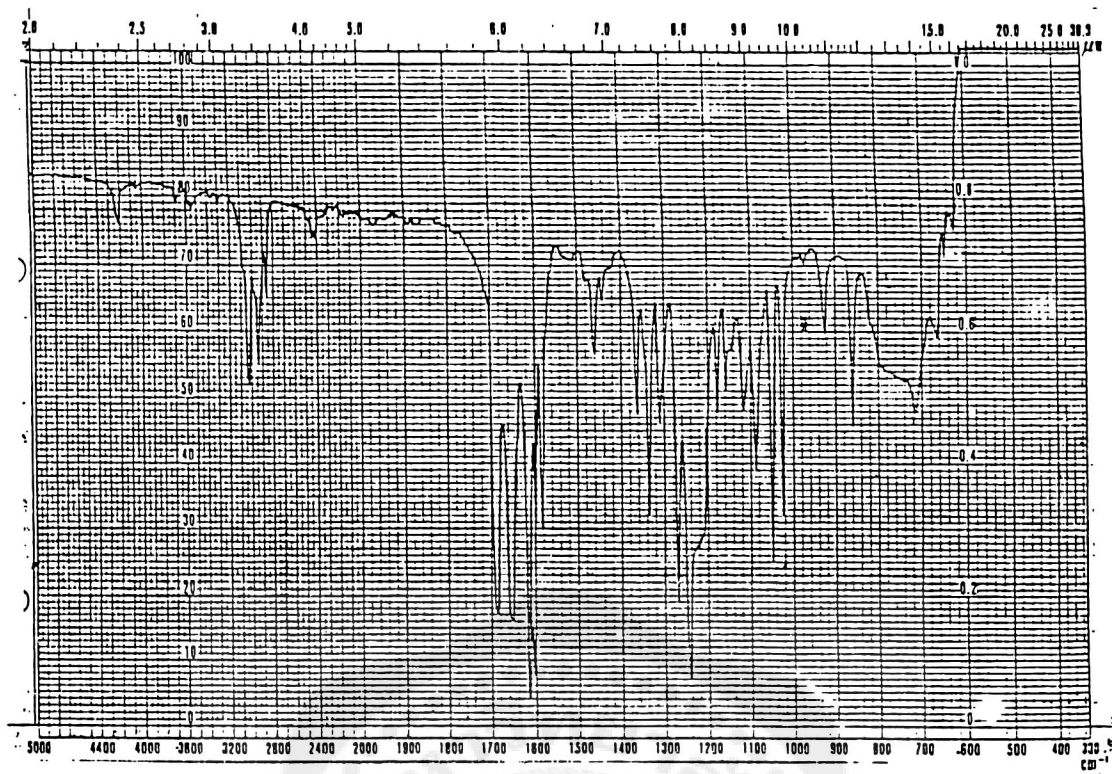
ภาพที่ 6 ^1H NMR spectrum ของผลิตภัณฑ์เพิ่มสีทองจากสารสกัดด้วย chloroform

จากการศึกษาข้อมูลต่าง ๆ ดังกล่าวเปรียบเทียบกับสมบัติของสาร 2-methoxy-1, 4-naphthoquinone ซึ่งมีรายงานไว้ว่าเป็นผลิตภัณฑ์เพิ่มสีทอง ในโครงสร้างที่เป็น p-quinone มีสูตรโครงสร้างเป็น $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{O}_3$ มีจุดหลอมเหลวในช่วง 182.5-183 องศาเซลเซียส (9) มีค่า IR spectrum เท่ากับ $\nu^{\text{KBr max}} (\text{cm}^{-1})$ 1680, 1645, 1600 และ 1240 และมีค่า ^1H NMR (CDCl_3) เท่ากับ δ 8.10 (2H, m), 7.75 (2H, m), 6.19 (1H, s) 3.93 (3H, s) (11, 12) ดังภาพที่ 7 และเมื่อเปรียบเทียบกับ spectrum ของผลิตภัณฑ์

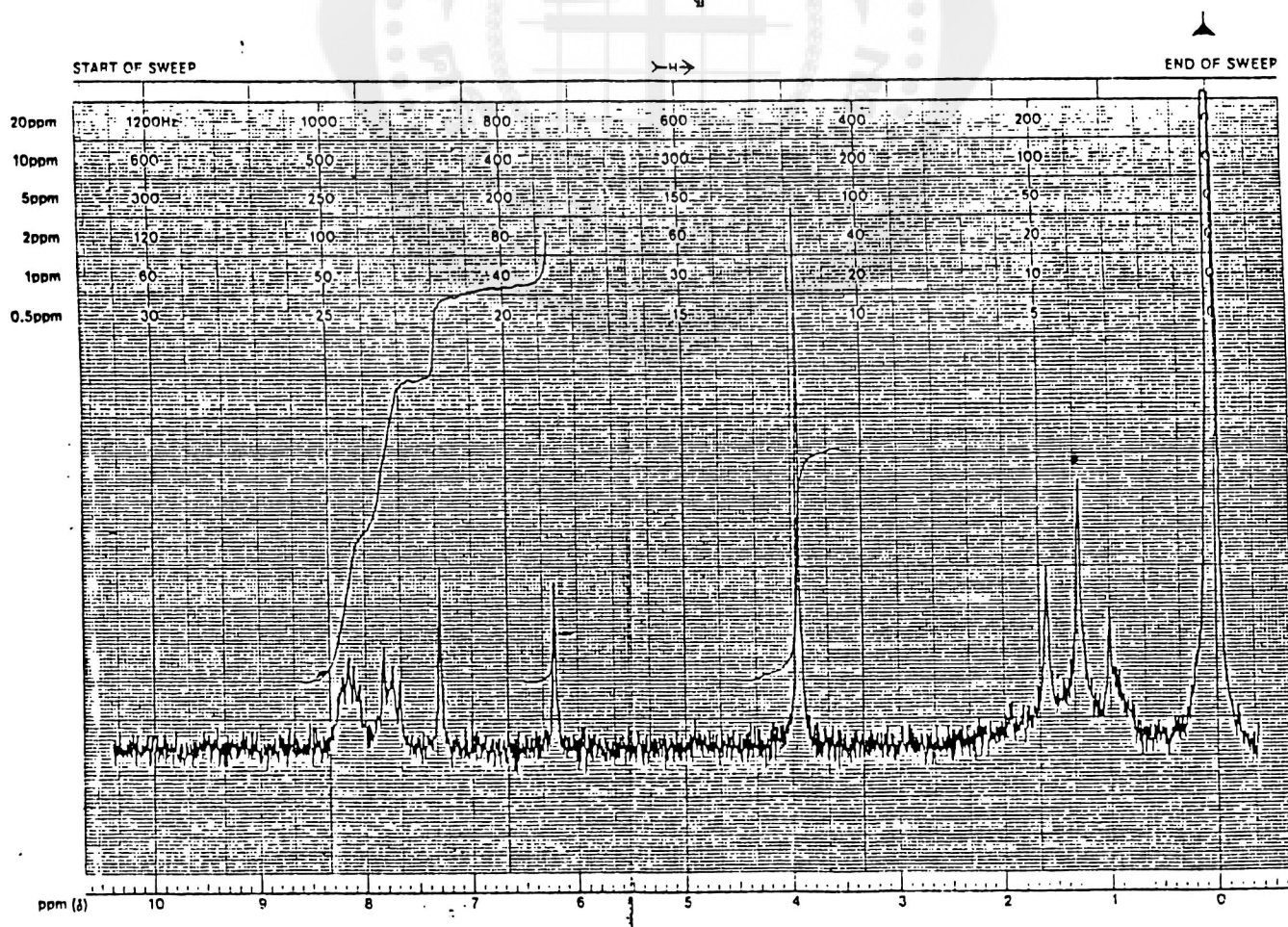
รูปเข็มสีทองที่ผู้วิจัยได้แยกจากใบเทียนบ้านตามวิธีของธาตรีผดุงเจริญ และคณะ (1) ในภาพที่ 8,9 ซึ่งได้รับการพิสูจน์แล้วว่าเป็นสาร 2-methoxy -1, 4-naphthoquinone ปราบกฏว่าได้ค่าเท่ากัน จึงสรุปได้ว่า ผลึกรูปเข็มสีทองที่แยกได้จากสารสกัดหยาบ ด้วย hexane และ chloroform เป็นสารชนิดเดียวกันคือ 2-methoxy -1, 4-naphthoquinone ในรูปของ p-quinone ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังนี้



ภาพที่ 7 IR spectrum ของ 2-methoxy -1, 4-naphthoquinone



ภาพที่ 8 IR spectrum ของผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีสีทองจากสารสกัดจากใบ



ภาพที่ 9 ¹H NMR spectrum ของผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีสีทองของสารสกัดจากใบ

จากการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสาร 2-methoxy -1, 4-naphthoquinone ที่ต้านจุลินทรีย์ได้ พบว่าสารนี้สามารถต้านจุลินทรีย์ได้ดี ให้ค่า MIC ต่ำ ดังแสดงในตารางที่ 6 แต่สารนี้ไม่สามารถต้านเชื้อ P. aeruginosa เลย

ตารางที่ 6 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของผลิตภัณฑ์ที่ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (MIC) โดยวิธี broth dilution test

เชื้อทดสอบ		MIC ($\mu\text{g/ml}$)
<u>C. albicans</u>	(3 วัน)	31.25
<u>T. rubrum</u>	(7 วัน)	1.95
<u>T. mentagophytes</u>	(7 วัน)	15.6
<u>E. floccosum</u>	(7 วัน)	15.6
<u>M. gypseum</u>	(7 วัน)	31.25
<u>S. aureus</u>	(24 ชม.)	31.25
<u>Streptococcus</u>	(24 ชม.)	125
<u>P. aeruginosa</u>	(24 ชม.)	R

R = เชื้อต้านสารได้

การแยกผลึกของ 2-methoxy -1, 4-naphthoquinone ในการทดลอง ครั้งนี้พบว่าผลึกแยกออกมาได้ดีที่สุดในช่วงที่ใช้ eluent ที่เป็นส่วนผสมของ hexane : chloroform เท่ากับ 75:25 ดังนั้น หากใช้ส่วนผสมดังกล่าวในการสกัดสาร จะช่วยย่นระยะเวลาในการสกัดแยกสารให้สั้นลง และแยกผลึกออกมาได้ง่ายขึ้น และพบว่าการทดลองครั้งนี้แยกได้ผลิตภัณฑ์ออกมาได้น้ำหนักมากกว่าการแยกผลึกโดยวิธีของชาติรี ผดุงเจริญและคณะ (1) ถึง 10 เท่า ดังนั้น การสกัดสาร จากดอกจึงน่าจะให้ผลทางเศรษฐกิจดีกว่าจากใบเทียนบ้าน

ค่า MIC ของสารต่อจุลินทรีย์ทดสอบที่ได้จากการทดลองครั้งนี้ ต่างจากรายงานของชาติรี ผดุงเจริญ และคณะ (1) อาจเป็นผลจากการใช้ตัวทำละลายต่างกัน การทดสอบครั้งนี้ใช้ ethylene glycol ซึ่งมี pH เท่ากับ 7 แทนการใช้ ammonium hydroxide ซึ่งเป็นด่าง เพื่อตัดปัญหาจากผลกระทบจาก pH ต่อการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ นอกจากนี้สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ทดสอบอาจต่างกันจึงมีผลต่อค่า MIC ที่ได้

จากการที่ 2-methoxy-1, 4-naphthoquinone สามารถต้านจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนังได้ดี ไม่เป็นพิษต่อเซลล์และไม่ทำให้เกิดการแพ้ (1) จึงเหมาะสมต่อการนำมาพัฒนาเป็นยารักษาโรคผิวหนัง ทดแทนการใช้ยาจากต่างประเทศ เพราะโรคนี้มีปัญหามากในประเทศไทย เนื่องจากอากาศร้อนชื้นเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ



สรุปผล

สารสกัดหยาบด้วย hexane และ chloroform จากดอกเทียนบ้านมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ 7 ใน 8 ชนิด ที่นำมาทดสอบที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 2,000 ไมโครกรัมต่อ disc ในขณะที่สารสกัดหยาบด้วย methanol ไม่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทุกชนิดที่นำมาทดสอบในระดับความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากัน เมื่อแยกสารจากสารสกัดหยาบด้วย hexane และ chloroform โดยวิธีทางโครมาโทกราฟีทั้งแบบคอลัมน์และเยื่อบาง พบว่าส่วนที่ตกผลึกรูปเข็มจากสารสกัดทั้ง 2 ชนิดเท่านั้นที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เช่นเดียวกับการทดสอบเบื้องต้น และจากการวิเคราะห์สมบัติของผลึกบริสุทธิ์รูปเข็มสีทองที่แยกได้จากสารสกัดหยาบทั้ง 2 ชนิด สรุปได้ว่าเป็นสาร 2-methoxy -1, 4-naphthoquinone เหมือนกัน และให้ค่า MIC ต่อเชื้อรา T. mentagophytes, T. rubrum, E. floccosum และ M. gypseum เท่ากับ 15.6, 1.95, 15.6 และ 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ MIC ต่อยีสต์ C. albicans เท่ากับ 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ MIC ต่อแบคทีเรีย S. aureus, Streptococcus เท่ากับ 31.25 และ 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ในขณะที่สารนี้ไม่มีฤทธิ์ต้าน P. aeruginosa เลย

เอกสารอ้างอิง

1. ชาทรี ผดุงเจริญ และคณะ 2531. "สารประกอบที่ฆ่าเชื้อราจากใบเทียนบ้าน" ไทยเภสัชสาร 13(2): 117-125.
2. สำลี ใจดี และคณะ 2522. การใช้สมุนไพรรักษา สารมวลชน กรุงเทพฯ
3. สุวรรณี เลิศสินทรัพย์ทวี และสุมาลี เหลืองสกุล 2529 คุณสมบัติของสารสกัดจากเทียนบ้านในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุให้เกิดหนอง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร
4. สันติ อุดสุวรรณ และคณะ 2528 รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์โครงการวิจัยสมุนไพรรักษา คณะเภสัชศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
5. เสงี่ยม พงษ์บุตรอด. 2512. ไม้เทศเมืองไทย เกษมบรรณกิจ กรุงเทพฯ
6. ศูนย์ข้อมูลสมุนไพรร ม.ป.ป. ก้าวไปกับสมุนไพรร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ
7. Chapelle, J.P. 1974. "2-Methoxy -1, 4-Naphthoquinone in Impatiens glandulifera and Related Species" Phytochemistry. 13: 662.
8. Chevenger, S. 1958. "The Flavonols of Impatiens balsamina L." Archives of Biochemistry and Biophysics. 76: 131-138.
9. Fieser, L.F. 1926. "The Alkylation of Hydroxynaphthoquinone I ortho-ethers" Journal of the American Chemical Society 48: 2922-2937.
10. Perry, L.M. 1980. Medical Plants of East and Southeast Asia. MIT. Press, Massachusetts.
11. Pouchert, C.J. 1981. The Aldrich Library of Infrared Spectra. 3rd. ed: Printed in U.S.A.

12. Pouchert, C.J. 1983. The Aldrich Library of NMR Spectra
2nd. ed : vol. 2. Printed in U.S.A.
13. Treagan, L. and L. Pulliam. 1982. Medical Microbiology
Laboratory Procedures. W.B. Saunders Co.
Philadelphia.

