583.21604634
ส817ฤ
ว.3

ฤทธิ์ของสารสกัดจากดอกเทียนบ้านในการต้านเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนังบางชนิด

ปริญญานิพนธ์

ของ

สุนิดา กาญจนมยูร

12 พ.ย. 2533

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกชีววิทยา
กุมภาพันธ์ 2533

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

170989

คณะกรรมการที่ปรึกษาประจำตัวนิสิต และคณะกรรมการสอบได้พิจารณาปริญญานิพนธ์ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒได้

คณะกรรมการที่ปรึกษา

..... ประธาน
(ผศ. สุมาลี เหลืองสกุล)

..... กรรมการ
(ดร. ยุวดี นาคะผดุงรัตน์)

คณะกรรมการสอบ

..... ประธาน
(ผศ. สุมาลี เหลืองสกุล)

..... กรรมการ
(ดร. ยุวดี นาคะผดุงรัตน์)

..... กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(ดร. เสริมสิน ศิริวัฒนา)

บัณฑิตวิทยาลัยอนุมัติให้รับปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศ. ดร. สงพร บัวทอง)

วันที่ ...12... เดือน ...กันยายน... พ.ศ. 2533

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผศ. สุมาลี เหลืองสกุล ดร. ยุวดี นาคะผดุงรัตน์ และ ดร. เสริมสิน ศิริวัฒนา ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาแนะนำอย่างดียิ่งตลอดจนตรวจแก้ไขให้ถูกต้องไว้ ณ โอกาสนี้ ขอขอบคุณสถาบันโรคผิวหนัง และเจ้าหน้าที่ของสถาบันโรคผิวหนัง กรุงเทพมหานคร ที่ได้กรุณาให้ความสะดวกและเอื้อเฟื้อเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนัง เพื่อนำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้ ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่อนุเคราะห์อุปกรณ์ และสถานที่ในการทำวิจัยครั้งนี้ นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณสมบุญ แตงไทย คุณสุคนธา อรุณฤๅ คุณทัศนีย์ เปาสมบัติ คุณเกศริน ทิฆายุ คุณพนงศักดิ์ จักขุประเสริฐ และพี่ ๆ ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยเป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่และน้องที่ให้กำลังใจ และความช่วยเหลือแก่ผู้วิจัยด้วยดีตลอดมา

สุนิดา กาญจนมยูร

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	บทนำ	1
	ความมุ่งหมายของการค้นคว้า	2
	ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า	2
	ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า	2
	ข้อตกลงเบื้องต้น	3
	นิยามศัพท์เฉพาะ	3
2	เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย	5
	พืช	5
	เชื้อรา	10
3	วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า	13
	การเตรียมสารสกัดจากดอกเทียนบ้าน	13
	การเตรียมเชื้อรา	13
	การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากดอกเทียนบ้านในการต้านเชื้อรา	14
	การแยกสารประกอบจากสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราโดยขบวนการโครมาโทกราฟี	15
	การเตรียมสารที่แยกได้จากสารสกัดให้บริสุทธิ์	16
4	ผลการทดลอง	17
	การสกัดจากดอกเทียนบ้าน	17
	การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากดอกเทียนบ้านในการต้านเชื้อรา	17
	การแยกสารและการทำให้สารบริสุทธิ์	20

บทที่ หน้า

5 สรุปผล และอภิปราย 39
สรุปผล 39
อภิปรายผล 39

บรรณานุกรม 43

ภาคผนวก 46

ประวัติย่อของผู้วิจัย 50

บัญชีตาราง

ตาราง หน้า

1 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากดอกเทียนบ้านด้วยเฮกเซนในการต้านเชื้อราทดสอบ 18

2 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากดอกเทียนบ้านด้วยคลอโรฟอร์มในการต้านเชื้อทดสอบ 19

3 ผลการแยกสารสกัดด้วยเฮกเซนโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์โดยใช้ตัวทำละลายเดียวและผสมในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน 21

4 ส่วนต่าง ๆ ของสารที่แยกได้จากสารสกัดด้วยเฮกเซน 23

5 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราของสารสกัดแต่ละส่วนที่แยกได้จากสารสกัดด้วยเฮกเซน 24

6 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราของผลึกบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสารสกัดด้วยเฮกเซน 30

7 ผลการแยกสารสกัดด้วยคลอโรฟอร์มโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์โดยใช้ตัวทำละลายเดียวและผสมในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน 31

8 ส่วนต่าง ๆ ของสารที่แยกได้จากสารสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 33

9 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราของผลึกบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสารสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 35

10 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากดอกเทียนบ้านด้วยเฮกเซนในการต้านเชื้อราทดสอบ 48

11 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากดอกเทียนบ้านด้วยคลอโรฟอร์มในการต้านเชื้อทดสอบ 49

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ หน้า

1 สเปกตรัมมาตรฐานของ 2-hydroxy-1, 4-naphthoquinone 7

2 สเปกตรัมมาตรฐานของ 2-methoxy-1, 4-naphthoquinone 8

3 โครงสร้างของสารประกอบ 2-hydroxy-1, 4-naphthoquinone และ 2-methoxy-1, 4-naphthoquinone 9

4 โครงสร้างทางเคมีของ anthocyanidin (I) และ flavonols (II) 10

5 ลักษณะของผลึกบริสุทธิ์ที่แยกได้จากส่วนที่ 52-55 ของสารสกัดด้วยเฮกเซน 25

6 สเปกตรัมของการดูดกลืนแสงอินฟราเรด (IR) ของผลึกจากส่วนที่ 52-55 ของสารสกัดด้วยเฮกเซน 26

7 สเปกตรัมของ ^{1}H NMR ของผลึกจากส่วนที่ 52-55 ของสารสกัดด้วยเฮกเซน ... 27

8 สเปกตรัมของการดูดกลืนแสงอินฟราเรด (IR) ของผลึกจากใบ 28

9 สเปกตรัมของ ^{1}H NMR ของผลึกจากใบ 29

10 ลักษณะของผลึกบริสุทธิ์ที่แยกได้จากส่วนที่ 55-63 ของสารสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม .. 36

11 สเปกตรัมของการดูดกลืนแสงอินฟราเรด (IR) ของผลึกจาก 55-63 ของสารสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 37

12 สเปกตรัมของ ^{1}H NMR ของผลึกจากส่วนที่ 55-63 ของสารสกัดด้วย คลอโรฟอร์ม 38

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

โรคผิวหนังเป็นโรคที่มีปัญหามากทางด้านสาธารณสุข โดยเฉพาะโรคผิวหนังที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา เนื่องจากมีการแพร่กระจายมากและก่อให้เกิดโรคได้ทุกเพศทุกวัย ในประเทศไทยมีผู้ป่วยด้วยโรคผิวหนังมากเป็นอันดับ 4 - 5 ของโรคทั้งหมด และในจำนวนนี้เป็นโรคผิวหนังที่มีสาเหตุมาจากเชื้อราประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ (เรณู โคตรจรัส. 2520 : 1 - 33) และพบว่าเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนังที่มีความสำคัญได้แก่ Epidermophyton , Microsporum และ Trichophyton (พเยาว์ เหมือนวงษ์ญาติ. 2524 : 118)

ปัจจุบันการรักษาโรคผิวหนังยังต้องอาศัยยาจากต่างประเทศเป็นส่วนใหญ่ ยาที่ใช้ในการรักษาได้แก่ Griseofulvin , Tolnaftate , Polyene เป็นต้น ซึ่งมีราคาแพง และต้องทำการรักษาติดต่อกันเป็นเวลานานจึงจะหายขาด (Compbell and Stewart. 1980 : 33 - 34) ทำให้ประเทศไทยขาดดุลนี้ทางการค้ากับต่างประเทศ ในปัจจุบันมีการวิจัยเกี่ยวกับสมุนไพรมากขึ้นและมีรายงานว่าสมุนไพรไทยหลายชนิดสามารถรักษาโรคผิวหนังที่มีสาเหตุมาจากเชื้อราได้ เช่น กระเทียม (Tansey and Appleton. 1975 : 409 - 411 ; โครงการสมุนไพรเพื่อการพึ่งตนเอง. 2529 : 20), เปลือกมังคุด (เสงี่ยม พงษ์บุญรอด. 2519 : 433 - 444) และใบเทียนบ้าน (โครงการสมุนไพรเพื่อการพึ่งตนเอง. 2529 : 41 - 42) เป็นต้น

เทียนบ้าน (Impatiens balsamina linn.) เป็นพืชล้มลุกชนิดหนึ่ง ซึ่งให้ดอกที่มีสีสันสวยงาม และถูกนำมาใช้เป็นยามาแต่โบราณ ชาวจีนใช้ใบโขลกพอกแก้ปวดตามนิ้ว หรือแก้เลือดบ ถอนพิษปวดแสบปวดร้อนได้ (เสงี่ยม พงษ์บุญรอด. 2512 : 282) ในประเทศ

มาเลเซีย อินโดนีเซียและฟิลิปปินส์ได้นำเทียนบ้านมาทำเป็นยาพอกฝีและแผล (Perry. 1980 : 53) และเมื่อไม่นานมานี้มีรายงานว่าสารสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม (chloroform) และอัลกอฮอล์ (alcohol) จากใบเทียนบ้านสามารถฆ่าเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคกลากและฮ่องกงฟุตได้ (สันติ ถุงสุวรรณ และคนอื่น ๆ. 2528 : 1) ดังนั้นจึงเห็นสมควรที่จะศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากดอกเทียนบ้านในการต้านเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนังซึ่งหากได้ผลดีจะทำให้สามารถนำดอกเทียนบ้านมาใช้ประโยชน์ได้อย่างเต็มที่ทั้งใบและดอก เพราะเทียนบ้านเป็นพืชที่มีดอกดกและผลจากการวิจัยในครั้งนี้เป็นข้อมูลในการนำเทียนบ้านไปพัฒนาจนสามารถใช้เป็นยารักษาโรคในรูปแบบที่เหมาะสมต่อไป

ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า

เพื่อแยกหาสารประกอบจากดอกเทียนบ้านที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนังบางชนิด

ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า

เพื่อเป็นแนวทางในการนำสารประกอบจากพืชสมุนไพรมาใช้ในการรักษาโรคผิวหนังที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา

ขอบเขตการศึกษาค้นคว้า

1. การศึกษานี้ใช้ดอกเทียนบ้านสีม่วง ซึ่งเก็บจากต้นที่ได้ปลูกไว้ภายในเรือนเพาะชำ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

2. ศึกษาวิธีการสกัดสารประกอบต่าง ๆ จากดอกเทียนบ้านด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ คือ เฮกเซน คลอโรฟอร์ม เมธานอล และน้ำกลั่น ตามลำดับ ซึ่งสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

ใช้ชนิด analytical grade

3. แยกสารสกัดที่ได้จากดอกเทียนบ้านโดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟี (chromatography)

4. ศึกษาฤทธิ์ของสารประกอบต่าง ๆ จากดอกเทียนบ้านในการฆ่าเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนัง ได้แก่ Epidermophyton floccosum , Microsporum gypseum , Trichophyton mentagrophytes และ T. rubrum ซึ่งได้รับมาจากสถาบันโรคผิวหนัง กรุงเทพมหานคร

5. ทำการศึกษาทดลองที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาชีววิทยาและภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

ข้อตกลงเบื้องต้น

สารที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลาย เมื่อระเหยตัวทำละลายออกหมดถือได้ว่า สารสกัดสมุนไพรมีความเข้มข้นเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

นิยามศัพท์เฉพาะ

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการต้านเชื้อรา (minimal inhibitory concentration ; M.I.C.) หมายถึง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่สามารถต้านการเจริญของเชื้อราได้

โครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง (thin - layer chromatography ; TLC) หมายถึง วิธีการแยกสารโดยมีตัวค้ำจุนและส่วนคงที่เป็นผงเคลือบเป็นเยื่อบางบนแผ่นแก้วหรือพลาสติก และให้ตัวทำละลายชะแยกสารจากข้างล่างขึ้นไปข้างบน (กฤษณา รุ่งเรืองศักดิ์ และคนอื่น ๆ. 2521 : 41)

ค่า R_f (relative fraction) หมายถึง ค่าคงที่ซึ่งแสดงสมบัติในการละลายเฉพาะตัวของสารเคมีแต่ละชนิดในตัวทำละลายหนึ่งที่สภาวะหนึ่ง ที่ใช้ในการทำโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

(กฤษณา รุ่งเรืองศักดิ์ และคนอื่น ๆ. 2521 : 39 - 41)

โครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (column chromatography) หมายถึง วิธีการแยกสารที่มีตัวค้ำจุนและส่วนคงที่บรรจุอยู่ในหลอด ตัวชะ (eluent) ที่เป็นส่วนเคลื่อนที่จะชะสารตัวอย่างผ่านหลอดนี้ออกมาทางปลายหลอดและถูกแยกเก็บเป็นส่วน ๆ (กฤษณา รุ่งเรืองศักดิ์ และคนอื่น ๆ. 2521 : 39)

บทที่ 2

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

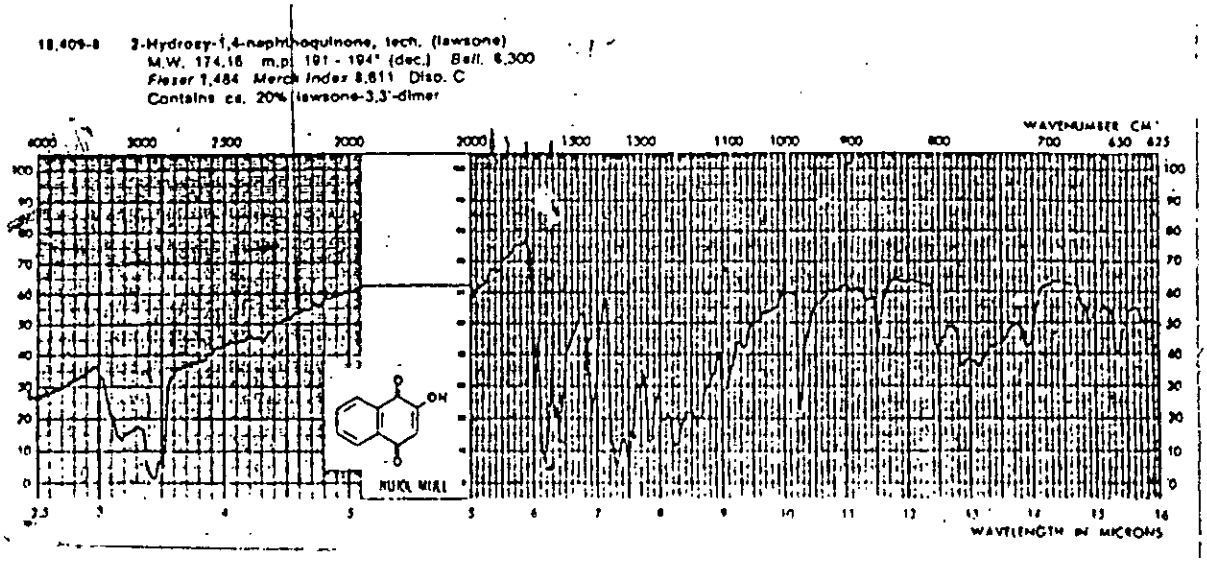
พืช

เทียนบ้านมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า Impatiens balsamina Linn. จัดอยู่ในวงศ์ Balsaminaceae มีชื่อพื้นเมืองว่า เทียนดอก เทียนไทย เทียนสวน เทียนขาว ห่งเชียง จึงกะฮวย ใจกะฮวย เชียวถ่ออั้ง ไจ่ยกะเช่า จี๋กะเช่า (พเยาว์ เหมือนวงษ์ญาติ. 2530 : 125) และการ์เดน บาลซัม (Garden Balsam) (Dhavadee and others. 1987 : 147) ซึ่งเป็นพืชล้มลุกที่ปลูกง่ายโดยใช้เมล็ด ลำต้นมีสีเขียวอ่อนอุ้มน้ำ เนื้อใส และโปร่งแสง ลำต้นสูงประมาณ 20 – 60 เซนติเมตร ใบเป็นใบเดี่ยวเรียงสลับเวียนรอบลำต้น ลักษณะใบจะมีโคนและปลายใบเรียวแหลม ขอบใบหยักลึกแบบฟันเลื่อย กว้าง 2 – 3 เซนติเมตร ยาว 8 – 10 เซนติเมตร ก้านใบสั้นมีตุ่มเรียงกันเป็นแนวยาว 2 ข้าง กลีบดอกมีหลายสี ได้แก่ สีแดง สีขาว สีชมพู สีม่วงหรือหลายสีผสมกัน ผลกลมยาวปลายแหลม เมื่อผลแก่จะแตกออก เมล็ดจำนวนมากจะถูกดีดออกไป เมล็ดมีลักษณะกลมขนาดเล็กสีน้ำตาล (ศูนย์ข้อมูลสมุนไพร. ม.ป.ป. : 137)

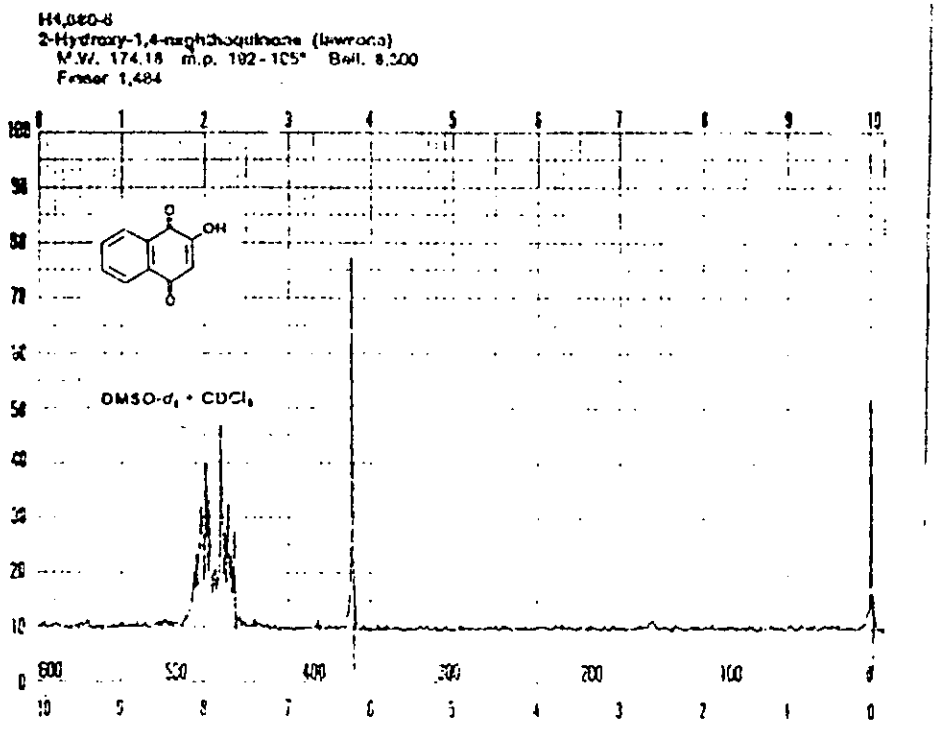
บอมและโทเวอร์ (Bohm and Towers. 1962 : 677 – 683) ได้ทำการศึกษาสารประกอบทางเคมีของพืชสกุล Impatiens พบว่าในใบของเทียนบ้าน (Impatiens balsamina Linn.) มีสาร 2 – hydroxy – 1 , 4 – naphthoquinone และ 2 – methoxy – 1 , 4 – naphthoquinone และจากรายงานฉบับสมบูรณ์ของโครงการวิจัยสมุนไพรตอนที่ 1 รายงานไว้ว่าสารสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม และอัลกอฮอล์จากใบเทียนบ้านสามารถฆ่าเชื้อรา Trichophyton rubrum , T. mentagrophytes และ Epidermophyton floccosum เชื้อราทั้ง 3 ชนิดนี้ จัดอยู่ในพวก Dermatophytes ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของโรคกลาก (Tinea หรือ Ring worm) โรคกลากบริเวณง่ามเท้า

(Tinea pedis) และฮ่องกงฟุต (สันติ ถุงสุวรรณ และคนอื่น ๆ. 2528 : 1) และพบว่ามี 2 - methoxy - 1, 4 - naphthoquinone ในสารสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม จากใบเทียนบ้าน ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ Trichophyton rubrum , T. mentagrophytes และ Microsporum gypseum โดยให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดเท่ากับ 2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถยับยั้งการเจริญของ Epidermophyton floccosum และ Candida albicans โดยให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัด เท่ากับ 1.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ธาตรี ผดุงเจริญ และคนอื่น ๆ. 2531 : 117 - 125)

จากการศึกษาทางเคมีพบว่าดอกเทียนบ้านประกอบด้วยสาร anthocyanidin ซึ่งเป็นสารประกอบที่ทำให้ดอกเทียนบ้านมีสีสันต่าง ๆ กัน สาร anthocyanidin ประกอบด้วย pelargonidin, peonidin และ malvidin ซึ่งสาร anthocyanidin ที่พบมักเป็น 3, 5 - diglucoside ซึ่งมักอยู่ในรูป ester กับ p - coumaric หรือ ferulic acid (ศูนย์ข้อมูลสมุนไพร. ม.ป.ป. : 138) และพบสารประกอบประเภท leucoanthocyanidins และ flavonols ซึ่งพบว่าเป็นสารประกอบที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะทางพันธุกรรมของสีดอก (Alston and Hagen. 1958 : 36 - 47) นอกจากนี้ยังพบสารประกอบ (2 - hydroxy -1, 4 - naphthoquinone) และ 2 - methoxy - 1, 4 - naphthoquinone ในดอกของเทียนบ้านด้วย (Clevenger. 1958 : 131 - 138) สาร (2 hydroxy - 1,4 - naphthoquinone) ที่พบมีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 192 - 195 องศาเซลเซียส มีค่าการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ค่า $\nu_{max}^{KBr}(cm^{-1})$ 3050, 2900, 1650, 1625, 1550, 1525 และวิเคราะห์ ^1H NMR (DMSO - ds + $CDCl_3$) ได้ค่า δ 8.0 (m,2H), 7.8 (m,2H) ดังสเปกตรัมมาตรฐานในภาพประกอบ 1 (Pouchert. 1981 : 897 ; Pouchert. 1983 : 85)



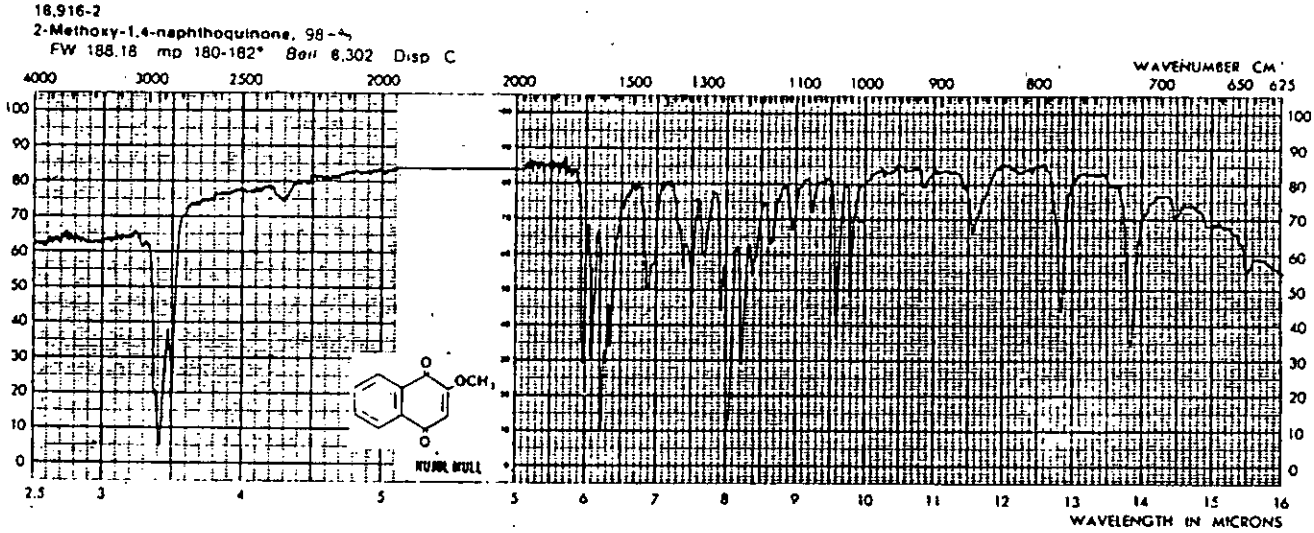
I สเปกตรัมของการดูดกลืนแสงอินฟราเรด (IR)



II สเปกตรัมมาตรฐานของ ^{1}H NMR

ภาพประกอบ 1 สเปกตรัมมาตรฐานของสาร 2-hydroxy-1, 4-naphthoquinone

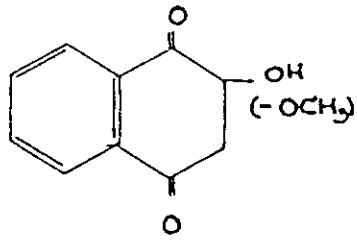
และสาร 2 - methoxy - 1, 4 - naphthoquinone ที่มีสูตรโครงสร้าง $C_{11}H_8O_3$ มีจุดหลอมเหลว 183 องศาเซลเซียส มีค่า λ^{EtOH}_{max} (nm) เป็น 243, 248, 277 และ 330 (log ε 4·22, 4·24, 4·16 และ 3·36) มีการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ค่า ν^{KBr}_{max} (cm^{-1}) 1680, 1645, 1600 และ 1240 มีค่า ^1H NMR ($CDCl_3$) ได้ค่า δ 8.10 (2H,m), 7.75 (2H,m), 6.19 (1H,S), 3.93 (3H,S) มีค่า Mass spect (m/e) เท่ากับ 188 (100), 173 (33), 159 (30), 158 (57), 130 (8), 104 (10), 102 (34), 89 (49), 76 (22), 69 (15), 50 (15) (Chapelle. 1974 : 662) และ ดังปรากฏในสเปกตรัมมาตรฐานใน ภาพประกอบ 2 (Pouchert. 1981 : 897 ; Pouchert. 1983 : 86)



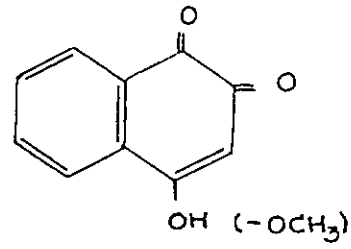
สเปกตรัมของการดูดกลืนแสงอินฟราเรด (IR)

ภาพประกอบ 2 สเปกตรัมมาตรฐานของสาร 2-methoxy-1, 4-naphthoquinone

และยังพบว่าทั้งสาร 2 hydroxy - 1,4 - naphthoquinone และ 2 - methoxy - 1, 4 - naphthoquinone ที่พบนี้มี 2 อนุพันธ์ คือ p - quinone และ o - quinone (Fieser. 1929 : 2922 - 2933) ดังภาพประกอบ 3



p - quinone form

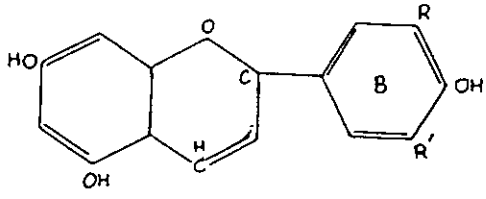


o - quinone form

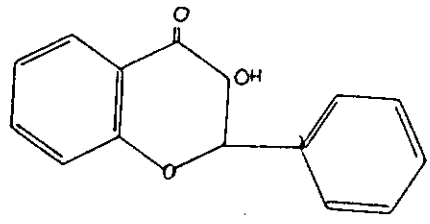
ภาพประกอบ 3 โครงสร้างของสารประกอบ 2 - hydroxy - 1,4 - naphthoquinone และ 2 - methoxy - 1,4 - naphthoquinone

จากการศึกษาของเพอรี่พบว่าสาร 2 - methoxy - 1,4 - naphthoquinone ในดอกของเทียนบ้านซึ่งสกัดด้วยแอลกอฮอล์มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราและแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรค (pathogenic fungi and bacteria) (Perry. 1980 : 53)

จากการศึกษา flavonols ในกลีบดอกและกลีบเลี้ยงของเทียนบ้าน พบว่า กลีบดอกและกลีบเลี้ยงที่แสดงลักษณะทาง phenotype สีม่วงจะมี genotype เป็น LLhhP^{r} P^{r} (Mansell and Kemerer. 1970 : 1751) และมีสารประกอบ anthocyanidins ชนิด malvidin และมีสารประกอบ flavonols ประเภท kaempherol และ myricetin ในกลีบดอก และพบ kaempherol กับ quercetin ในกลีบเลี้ยง (Clevenger. 1985 : 131 - 138) ซึ่งจากการศึกษาพบว่า โครงสร้างทางเคมีของ anthocyanidins และ flavonols ดังแสดงในภาพประกอบ 4 (Alston and Hagen. 1958 : 43 ; ชมรมพฤกษเคมีและคณะเภสัชศาสตร์. 2523 : 20)



I anthocyanidins



II flavonols

ภาพประกอบ 4 โครงสร้างทางเคมีของ anthocyanidins (I) และ flavonols (II)

เชื้อรา

เชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนังและพบว่ามีการแพร่กระจายเป็นปัญหากับผู้ป่วยในประเทศไทยเป็นอย่างมากได้แก่เชื้อ Epidermophyton floccosum, Microsporum gypseum , Trichophyton mentagrophytes และ T. rubrum เป็นเชื้อราที่มีการแพร่กระจายสูงถึงประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ (เรณู โคตรจรัส. 2520 : 31 - 32) การวิจัยครั้งนี้จึงได้นำเอาเชื้อราทั้ง 4 ชนิด (species) มาใช้ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากดอกเทียนบ้าน

Epidermophyton floccosum เชื้อราในสกุลนี้มีเพียงชนิดเดียว ซึ่งมักจะทำให้เกิดโรคที่ผิวหนัง และบางครั้งทำให้เกิดโรคที่เล็บได้ ลักษณะเฉพาะของเชื้อชนิดนี้คือโคโลนี (colony) มีลักษณะคล้ายกำมะหยี่ไปจนถึงลักษณะที่เป็นผงหยาบเล็กน้อย และมีสีเขียวมะกอกจนถึงสีเหลืองนวล ที่บริเวณขอบนอกของโคโลนีจะพบเส้นใยที่เจริญอยู่ในวุ้นแต่บริเวณส่วนกลางของเชื้อจะมีไมซีเลียมชนิดที่ชูขึ้นสู่อากาศ (aerial mycelium) เป็นสีขาว ทางด้านล่างของโคโลนีมีสีเขียวอมเหลืองหรือสีเขียวมะกอก เชื้อนี้ไม่สร้างไมโครโคนิเดีย (microconidia) มีแต่แมกโครโคนิเดีย (macroconidia) ขนาดใหญ่รูปร่างคล้ายกระบอง (clavate or club - shaped) และมีหลายเซลล์ (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2520 : 9 - 12) ลักษณะสำคัญทางคลินิคของโรค

ที่เกิดจากเชื้อนี้คือ ผิวหนังที่ง่ามเท้าและฝ่าเท้าจะเป็นขุย ต่อมามักจะยุ่ยและมีผื่นขึ้นล้อมรอบบริเวณที่เป็นอยู่ก่อน นานเข้าจะกลายเป็นสีน้ำตาล (กวี ภู่ไพบูลย์. 2524 : 66)

Microsporum gypseum เป็นเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคที่ผมและผิวหนัง เชื้อนี้จะเจริญเต็มที่ภายในเวลา 7 วัน ทางด้านบนของโคโลนีมีสีนวลมีลักษณะเป็นผงละเอียด ทางด้านล่างของโคโลนีมีสีส้มอมเหลือง ไมโครโคนิเดียมีรูปร่างคล้ายกระบอง ส่วนแมกโครโคนิเดียมีจำนวนมาก มีลักษณะรูปไข่ มีผนังบางขรุขระ (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2520 : 38 - 39) ลักษณะสำคัญทางคลินิคของโรคที่เกิดจากเชื้อนี้คือ หนังศีรษะอักเสบ บวมแดง เป็นหนอง โดยเริ่มเป็นเม็ดหนองรอบ ๆ ขุมขน และลุกลามรวมกันเป็นก้อนใหญ่นูนขึ้น พอแตกมีน้ำเหลืองกรังเรียกว่า ชันนะตุ (kerion) ผมจะร่วง (alopecia) มีอาการคันและปวด เมื่อหายแล้วจะเกิดเป็นแผลเป็นและผมไม่งอก (กวี ภู่ไพบูลย์. 2524 : 60 - 61)

Trichophyton mentagrophytes เป็นเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคที่ผม ผิวหนังและเล็บ ในระยะแรกของการเจริญโคโลนีมีสีขาวครีม เมื่ออายุของโคโลนีมากขึ้นสีจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อนและมีลักษณะเป็นปุยเบา (fluffy) เนื่องจากมีการสร้างไมซีเลียมที่ชูขึ้นสู่อากาศ สีด้านล่างของโคโลนีมีตั้งแต่สีเหลืองจนถึงสีน้ำตาลหรือสีน้ำตาลแดง ไมโครโคนิเดียมีขนาดเล็กและกลม ส่วนแมกโครโคนิเดียมีผนังเรียบพบน้อยมาก แต่จะพบมากขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเลี้ยงบน casein glucose medium จะเกิดปฏิกิริยาที่เป็นด่าง (alkaline reaction)(Julius, Sigler and Summerbell. 1987 : 2449 - 2452) ถ้าเลี้ยงเชื้อบน corn meal dextrose agar โคโลนีจะมีสีเหลืองซึ่งจะเห็นได้ชัดมากทางด้านล่างของโคโลนี เชื้อเจริญเต็มที่ภายใน 2 สัปดาห์ แต่ภายหลังจากการถ่ายเชื้อหลาย ๆ ครั้ง จะทำให้เชื้อเปลี่ยนสภาพได้ (pleomorphism) และไม่แสดงลักษณะเฉพาะของเชื้อ จะมีแต่ปุยสีขาว ๆ คล้ายขนสัตว์ ลักษณะที่เด่นชัดอีกอย่างหนึ่งคือ หากเชื้อนี้ทำให้เกิดโรคที่ผม ผมจะถูกเจาะทะลุเป็นช่องลงมาจากขอบนอกของเส้นผม คล้าย ๆ กับรอยถูกขวานผ่าลงไป (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2520 : 9 - 12)

Trichophyton rubrum เป็นเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคที่ผม ผิวหนังและเล็บ เมื่อเริ่มต้นเพาะเชื้อได้ 3 - 5 วัน โคโลนีจะมีขนาดเล็ก ผิวคล้ายกำมะหยี่ทางด้านล่างของโคโลนีจะมีสี

ดำแดง ลักษณะเด่นพิเศษของเชื้อชนิดนี้คือ เมื่อเลี้ยงบน corn meal dextrose agar จะมีสีแดงเข้มที่คงอยู่ตลอดไป แม้ว่าจะมีการถ่ายเชื้อหลายครั้งก็ตาม เมื่อเพาะเชื้อบนผม (hair culture) พบว่าเชื้อนี้จะไม่ทำให้เส้นผมทะลุ ไมโครโคนิเดียมีลักษณะคล้ายหยดน้ำ ส่วนแมกโครโคนิเดียมีลักษณะคล้ายดินสอ (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2520 : 14 - 16)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมสารสกัดจากดอกเทียนบ้าน

นำดอกเทียนบ้านที่มีดอกสีม่วงซึ่งผ่านการอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 6 ชั่วโมง จำนวน 100 กรัม มาบดและสกัดสารประกอบจากผงดอกเทียนบ้านครั้งละจำนวน 10 กรัม ด้วยเฮกเซน 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยใช้เครื่องสกัดซอกซ์เลต (soxhlet apparatus) สกัดนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายสารสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary vacuum evaporator แล้วชั่งน้ำหนักของสารสกัดที่ได้ และสกัดสารประกอบจากผงดอกเทียนบ้านที่เหลือในธิมเบิล (thimble) ต่อโดยวิธีเดียวกันด้วยคลอโรฟอร์ม เมธานอล และน้ำกลั่น ตามลำดับ (ที่อุณหภูมิ 50, 50 และ 80 องศาเซลเซียส ตามลำดับ) นำสารละลายที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิดไประเหยตัวทำละลายและชั่งน้ำหนักของสารสกัดที่ได้เช่นเดียวกัน

2. การเตรียมเชื้อรา

นำเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนัง จำนวน 4 ชนิดคือ *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* และ *T. rubrum* มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose agar slant นาน 10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (25 - 30 องศาเซลเซียส) แล้วถ่ายเชื้อมาใส่ในน้ำเกลือ (normal saline) 0.85 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผสม Tween 80 ลงไปให้มีความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ นำมาปรับปริมาณเชื้อโดยใช้เครื่อง spectronic 21 ที่ 530 นาโนเมตร ให้มีค่า transmission อยู่ระหว่าง 85 - 90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งทำให้ได้

เชื้อประมาณ 1.0 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Moore and Jaciow. 1979 : 263 ; พรพิพัฒน์ ณ พัทลุง, นวลจิรา ภัทรรังรอง และ พิเชษฐ์ วิริยะจิตรา. 2529 : 317)

3. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากดอกเทียนบ้านในการต้านเชื้อรา

การทดลองนี้จะทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากดอกเทียนบ้านที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิด ในการต้านเชื้อราทั้ง 4 ชนิด โดยจะทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดความเข้มข้นต่าง ๆ

เตรียมโดยละลายสารสกัดให้มีความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ในกรณีที่สารสกัดดอกเทียนบ้านไม่ละลายด้วยน้ำกลั่นจะใช้เอทิลีน ไกลคอล (ethylene glycol) ที่ร้อน 50 องศาเซลเซียส เป็นตัวทำละลายแทน จากนั้นเจือจางต่อด้วยตัวทำละลายเดิมให้มีความเข้มข้นของสารสกัดลดลงเท่าตัวแบบอนุกรม (serial two fold dilution) ดูดสารละลายสกัดที่เตรียมได้แต่ละหลอดปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose semisolid agar (SDSA) ปริมาตร 29.5 มิลลิลิตร (Moore and Jaciow. 1979 : 263) ซึ่งจะได้อาหารเลี้ยงเชื้อ SDSA ที่มีสารสกัดดอกเทียนบ้านเข้มข้นเท่ากับ 1,000 , 500 , 250 , 125 , 62.5 , 31.25 , 15.62 , 7.81 , 3.90 และ 1.95 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วดูดอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้ในแต่ละความเข้มข้นลงในหลอดทดสอบที่ปราศจากเชื้อหลอดละ 2 มิลลิลิตร

3.2 การเตรียม medium control

เตรียมโดยใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ SDSA ลงในหลอดทดสอบที่ปราศจากเชื้อหลอดละ 2 มิลลิลิตร

3.3 การเตรียม solvent control

เตรียมโดยเติมเฉพาะตัวทำละลาย (ที่ใช้ในข้อ 3.1) ปริมาตรเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ SDSA ปริมาตร 29.5 มิลลิลิตร จากนั้นดูดมาใส่ลงในหลอดทดสอบที่ปราศจากเชื้อหลอดละ 2 มิลลิลิตร

3.4 การทดสอบเชื้อรา

โดยดูดเชื้อราแต่ละชนิดที่เตรียมได้ตามข้อ 2 ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมตามข้อ 3.1 , 3.2 และ 3.3 แล้วทิ้งไว้ให้เชื้อราเจริญที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จึงอ่านผลการทดลอง และบันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดดอกเทียนบ้านที่สามารถต้านเชื้อราได้ (M.I.C.)

4. แยกสารประกอบจากสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราโดยกระบวนการโครมาโทกราฟี

นำสารสกัดดอกเทียนบ้านจากข้อ 1 เฉพาะที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรามาแยกสารประกอบต่าง ๆ โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง โดยใช้ซิลิกาเจล 60 จี (Silica gel 60 G) เพื่อหาระบบของตัวทำละลายที่เหมาะสม ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ใช้ตัวทำละลายเฮกเซน, คลอโรฟอร์ม, เมธานอล โดยเริ่มจากตัวทำละลายเดียว (single solvent) และตัวทำละลายผสม (mixed solvent) กรณีของตัวทำละลายผสมจะค่อย ๆ เพิ่มตัวทำละลายที่มีขั้ว (เพิ่ม polarity) มากขึ้นครั้งละ 0.5 มิลลิลิตร เช่น เฮกเซนต่อคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 9.5 : 0.5, 9:10,... จนถึงเมธานอล ที่มีอัตราส่วนของคลอโรฟอร์มต่อเมธานอล เท่ากับ 0:10 นำระบบที่ได้นี้มาใช้ในการแยกสารประกอบโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ขนาดของคอลัมน์ที่ใช้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.8 เซนติเมตร ยาวประมาณ 90 เซนติเมตร บรรจุซิลิกาเจล 60 [silica gel 60 particle size 0,068-0,200 mm (70-230 mesh ASTM)] ที่ผสมกับตัวทำละลายเฮกเซนลงในคอลัมน์ให้มีซิลิกาเจลสูงประมาณ 60 เซนติเมตร เติมสารสกัดด้วยเฮกเซนหรือคลอโรฟอร์มที่ต้องการแยกประมาณ 3-3.5 กรัม ลงในของผสมระหว่างซิลิกาเจลและเฮกเซน คนให้สารสกัดละลายเข้ากันดีแล้วจึงเติมลงในคอลัมน์ ชั้นของซิลิกาเจลที่มีสารสกัดผสมอยู่นี้จะมีความสูงประมาณ 6 เซนติเมตร ปิดทับอีกชั้นด้วยทรายละเอียดที่ขจัดสิ่งเจือปนออกแล้วสูงประมาณ 2 เซนติเมตร แล้วค่อย ๆ เติมตัวทำละลายเฮกเซนลงไปจนถึงระดับที่ต้องการ จึงเริ่มปล่อยให้สารถูกตัวทำละลายชะออกมา แยกเก็บส่วนที่ถูกตัวทำละลายชะออกมาครั้งละ 100 มิลลิลิตร เมื่อพบว่าไม่มีสารสกัดถูกชะออกมาอีก ให้เปลี่ยนตัวทำละลายให้มีขั้วมากขึ้น จนถึงเมธานอล แล้วนำแต่ละส่วนมาตรวจสอบด้วยโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง ตรวจหาค่า R_f ด้วยไอโอดีน เพื่อรวมส่วนที่มีลักษณะของสารและค่า R_f เหมือนกันเข้าด้วยกัน ตรวจซ้ำด้วย

โครมาโทกราฟีแบบเยื่อบางอีกครั้งหนึ่ง นำสารที่ได้ในแต่ละส่วนไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary vacuum evaporator ชั่งน้ำหนักสารที่แยกได้จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา เช่นเดียวกับข้อ 3

5. การเตรียมสารที่แยกได้จากสารสกัดให้บริสุทธิ์

โดยนำสารสกัดที่แยกได้มาตกผลึกด้วยเอธานอลที่บริสุทธิ์ (absolut ethanol) (ธาตรี ผดุงเจริญ และคนอื่น ๆ. 2531 : 119) ที่ร้อนประมาณ 50 องศาเซลเซียส ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง ล้างผลึกด้วยเมธานอลที่เย็นประมาณ 4 องศาเซลเซียส และตกผลึกใหม่ด้วยเมธานอลที่ร้อนประมาณ 50 องศาเซลเซียส ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นนำผลึกที่ได้มาล้างด้วยเมธานอลที่เย็นประมาณ 4 องศาเซลเซียส หลาย ๆ ครั้ง จนกระทั่งสารละลายที่กรองได้มีลักษณะใสไม่มีสี

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การสกัดสารจากดอกเทียนบ้าน

จากการสกัดสารจากดอกเทียนบ้านแห้งจำนวน 100 กรัม ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน, คลอโรฟอร์ม, เมธานอลและน้ำกลั่น พบว่าได้สารสกัด 3.2910, 3.4240, 69.3840 และ 23.70 กรัม ตามลำดับ

2. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากดอกเทียนบ้านในการต้านเชื้อรา

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากดอกเทียนบ้านที่ได้จากตัวทำละลายเฮกเซน, คลอโรฟอร์ม, เมธานอล และน้ำกลั่น ตามวิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้าข้อ 3 พบว่า สารสกัดด้วยเฮกเซนมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนังที่นำมาทดสอบได้ทั้ง 4 ชนิด และให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการต้านเชื้อรา (M.I.C.) Epidermophyton floccosum, Microsporum gypseum, Trichophyton mentagrophytes และ T. rubrum เท่ากับ 1,000, 1,000, 1,000 และ 7.81 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ผลแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากดอกเทียนบ้านด้วยเฮกเซนในการต้านเชื้อราทดสอบ

เชื้อรา	ความเข้มข้นของสารสกัดด้วยเฮกเซน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)											
	C_1	C_2	1,000	500	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	1.95
E. floccosum	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M.gypseum	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T. mentagrophytes	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T. rubrum	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

หมายเหตุ C_1 หมายถึง medium control

C_2 หมายถึง solvent control

\+ หมายถึง มีการเจริญของเชื้อราในวันที่ 7 หลังการทดสอบ

\- หมายถึง ไม่มีการเจริญของเชื้อราในวันที่ 7 หลังการทดสอบ

ส่วนสารสกัดด้วยคลอโรฟอร์มมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราเพียง 3 ชนิด คือ E. floccosum, M. gypseum, T. mentagrophytes. และให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดด้วยคลอโรฟอร์มในการต้านเชื้อราดังกล่าวที่ระดับ 250, 1,000 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับผลแสดงในตาราง 2

ตาราง 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากดอกเทียนบ้านด้วยคลอโรฟอร์มในการต้านเชื้อราทดสอบ

เชื้อรา	ความเข้มข้นของสารสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)											
	C_1	C_2	1,000	500	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	1.95
E. floccosum	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
M.gypseum	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T. mentagrophytes	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T. rubrum	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ C_1 หมายถึง medium control

C_2 หมายถึง solvent control

\+ หมายถึง มีการเจริญของเชื้อราในวันที่ 7 หลังการทดสอบ

\- หมายถึง ไม่มีการเจริญของเชื้อราในวันที่ 7 หลังการทดสอบ

ส่วนสารสกัดด้วยเมธานอลและน้ำกลั่น พบว่า ไม่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราที่นำมาทดสอบทั้ง 4 ชนิด ในทุกความเข้มข้นที่ศึกษา

3. การแยกสารและทำให้บริสุทธิ์

จากผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราของสารสกัดจากดอกเทียนบ้านในข้อ 2 พบว่าสารสกัดด้วยเฮกเซนและคลอโรฟอร์มมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา จึงได้ศึกษาสารบริสุทธิ์ทั้งจากสารสกัดด้วยเฮกเซนและคลอโรฟอร์ม โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ตามวิธีการดำเนินการศึกษาค้นคว้าข้อ 4

3.1 การแยกสารสกัดด้วยเฮกเซน

นำสารสกัดด้วยเฮกเซนจำนวน 3.0158 กรัม มาแยกสารโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ซิลิกาเจล 60 เป็นตัวดูดซับ แล้วชะด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ คือ เฮกเซน, คลอโรฟอร์ม และเมธานอล ในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน ตามลำดับ รวมส่วนที่มีลักษณะของสารและให้ค่า R_f เท่ากันเข้าด้วยกัน นำมาตรวจสอบอีกครั้งด้วยโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง ผลการทดลองแสดงในตาราง 3 และ 4

ตาราง 3 ผลการแยกสารสกัดด้วยเฮกเซนโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ตัวทำละลายเดียวและผสมในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน

ตัวทำละลายที่ใช้ชะ (อัตราส่วน)	ส่วนที่	ลักษณะของสาร	R_f
เฮกเซน (100:0)	1-2	ไม่มีสาร	
	3-4	คล้ายขี้ผึ้งสีขาวขุ่น	0.5
เฮกเซน:คลอโรฟอร์ม(95:5)	5-8	คล้ายขี้ผึ้งสีขาวขุ่น	0.5
(90:10)	9-10	คล้ายขี้ผึ้งสีขาวขุ่น	0.5
	11-12	คล้ายขี้ผึ้งสีขาวขุ่น	0.44
(85:15)	13-14	คล้ายขี้ผึ้งสีขาวขุ่น	0.44,0.5
	15-16	คล้ายขี้ผึ้งสีขาวขุ่น	0.5
(80:20)	17-20	คล้ายขี้ผึ้งสีขาวขุ่น	0.5
(75:25)	21-24	คล้ายขี้ผึ้งสีขาวขุ่น	0.5
	25-44	คล้ายขี้ผึ้งสีเหลืองอ่อน	0.83
	45-48	คล้ายขี้ผึ้งสีเหลือง	0.42
	49-51	คล้ายขี้ผึ้งสีเหลืองเข้ม	0.4,0.35,0.28
	52-55	ตกผลึกรูปเข็มสีเขียวอมเหลือง	0.57,0.33
	56-72	คล้ายขี้ผึ้งสีเขียวเข้ม	0.41,0.38,0.28,0.18
(70:30)	73-80	คล้ายขี้ผึ้งสีเขียวเข้ม	0.41,0.38,0.28,0.18
(60:40)	81-87	คล้ายขี้ผึ้งสีเขียว	0.18,0.92,0.29,0.25
(50:50)	88-92	คล้ายขี้ผึ้งสีเขียว	0.92,0.29,0.25
(40:60)	93-97	คล้ายขี้ผึ้งสีเขียว	0.92,0.29,0.25

170989

ตาราง 3 (ต่อ)

ตัวทำละลายที่ใช้ชะ	(อัตราส่วน)	ส่วนที่	ลักษณะของสาร	R_f
เฮกเซน :				
คลอโรฟอร์ม	(30:70)	98–106	คล้ายขี้ผึ้งสีเขียว	0.92,0.29,0.25
	(20:80)	107–116	คล้ายขี้ผึ้งสีเขียวอมเหลือง	0.5,0.3
	(10:90)	117–121	คล้ายขี้ผึ้งสีเขียวเข้มออกดำ	0.48,0.21,0.17,0.13,0.0
คลอโรฟอร์ม	(0:100)	122–125	คล้ายขี้ผึ้งสีเขียวเข้มออกดำ	0.48,0.21,0.17,0.13,0.0
คลอโรฟอร์ม :				
เมธานอล	(90:10)	126–133	คล้ายขี้ผึ้งสีเขียวเข้มออกดำ	0.48,0.21,0.17,0.13,0.0
	(80:20)	134–141	คล้ายขี้ผึ้งสีเขียวเข้มออกดำ	0.48,0.21,0.17,0.13,0.0
	(70:30)	142–148	คล้ายขี้ผึ้งสีเขียวเข้มออกดำ	0.48,0.21,0.17,0.13,0.06
	(60:40)	149–160	คล้ายขี้ผึ้งสีเขียวเข้มออกดำ	0.48,0.21,0.17,0.13,0.06
	(50:50)	161–166	คล้ายขี้ผึ้งสีเขียวเข้มออกดำ	0.48,0.21,0.17,0.13,0.06
	(40:60)	167–168	คล้ายขี้ผึ้งสีเขียวเข้มออกดำ	0.48,0.21,0.17,0.13,0.06
	(30:70)	169–170	คล้ายขี้ผึ้งสีเขียวเข้มออกดำ	0.48,0.21,0.17,0.13,0.06
	(20:80)	171–173	คล้ายขี้ผึ้งสีส้ม	0.92
เมธานอล	(0:100)	174–179	คล้ายขี้ผึ้งสีส้ม	0.92

ตาราง 4 ส่วนต่าง ๆ ของสารที่แยกได้จากสารสกัดด้วยเฮกเซน

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	ผลึกรูปเข็มสีเขียวอมเหลือง	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	คล้ายขี้ผึ้งสีเขียวเข้มออกดำ	0.5634	0.48,0.21,0.17,0.13,0.06
170-178	คล้ายขี้ผึ้งสีส้ม	0.0902	0.92

3.1.1 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดด้วยเฮกเซนที่แยกได้แต่ละส่วน

นำสารสกัดด้วยเฮกเซนที่แยกได้แต่ละส่วนมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราตามวิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้าข้อ 3 พบว่าส่วนที่ 52-55 ซึ่งให้สารที่มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีเขียวอมเหลืองเพียงส่วนเดียวเท่านั้นที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราทดสอบและให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการต้านเชื้อรา E. floccosum, M. gypseum, T. mentagrophytes และ T. rubrum เท่ากับ 62.5, 125, 62.5, และ7.81 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ส่วนอื่น ๆ ในทุกความเข้มข้นที่ศึกษาไม่สามารถต้านเชื้อราได้ ผลการทดลองแสดงในตาราง 5

ตาราง 5 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราของสารสกัดแต่ละส่วนที่แยกได้จากสารสกัดด้วยเฮกเซน

เชื้อรา	ส่วนที่แยกได้											
	3-10	11-13	14-24	25-44	45-48	49-51	52-55	56-81	88-106	107-116	117-169	170-178
E. floccosum	+	+	+	+	+	+	- (62.5)	+	+	+	+	+
M .gypseum	+	+	+	+	+	+	- (125)	+	+	+	+	+
T. mentagrophytes	+	+	+	+	+	+	- (62.5)	+	+	+	+	+
T. rubrum	+	+	+	+	+	+	- (7.81)	+	+	+	+	+

หมายเหตุ + หมายถึง มีการเจริญของเชื้อราบนอาหารที่ผสมสารสกัดในระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

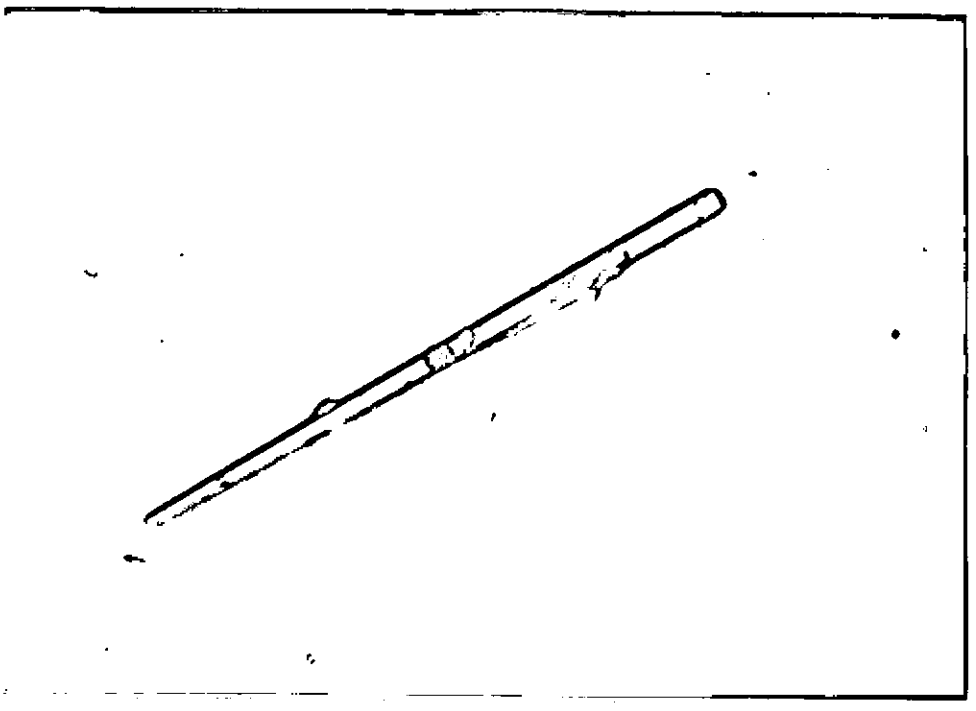
\- หมายถึง ไม่มีการเจริญของเชื้อราบนอาหารที่ผสมสารสกัดในระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตัวเลขใน( ) หมายถึง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถต้านการเจริญของเชื้อราได้ (M.I.C.)

3.1.2 การเตรียมสารที่แยกได้จากสารสกัดด้วยเฮกเซนให้บริสุทธิ์

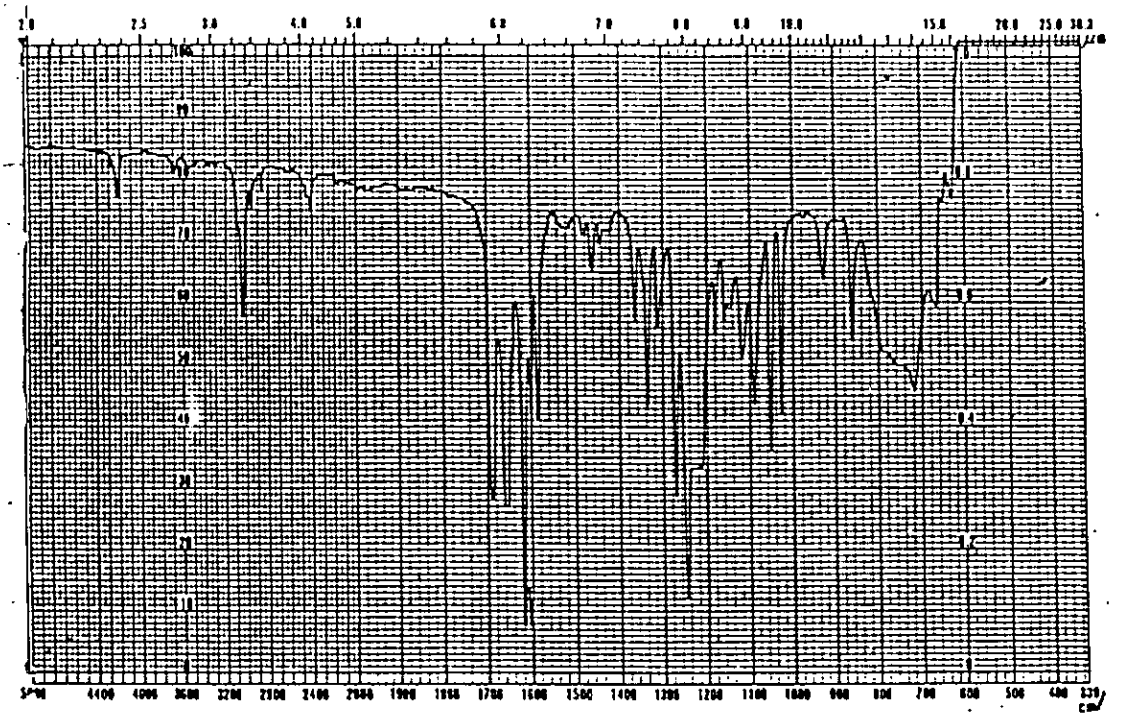
นำสารสกัดที่ได้จากส่วนที่ 52-55 มาเตรียมสารให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกตามวิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้าข้อ 5 พบว่าสารจะแยกออกเป็น 2 ส่วน ดังนี้

<u>ส่วนที่ 1</u> ได้ผลึกรูปเข็มสีเหลืองทองมันวาว ดังภาพในภาพประกอบ 5



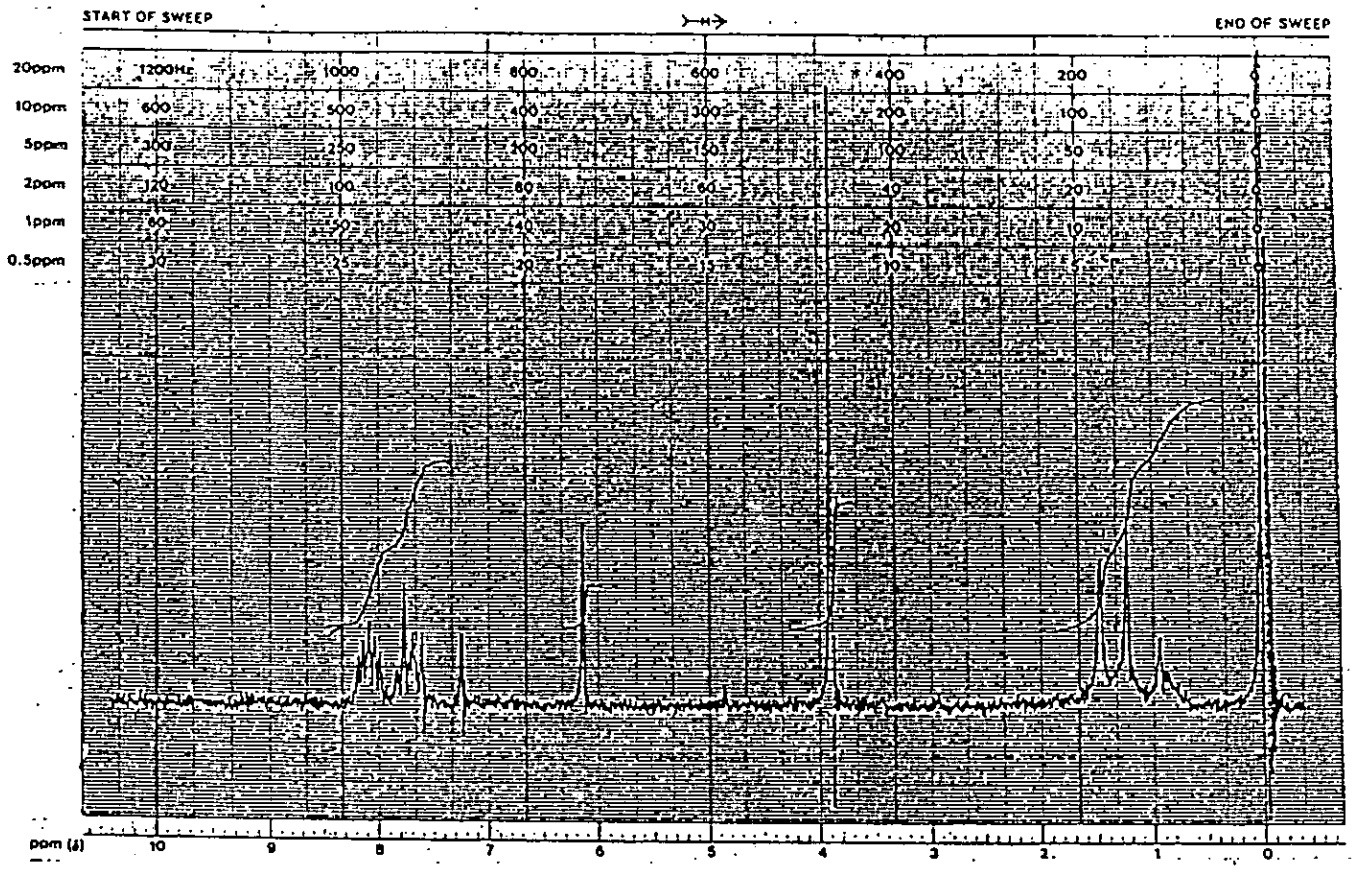
ภาพประกอบ 5 ลักษณะของผลึกบริสุทธิ์ที่แยกได้จากส่วนที่ 52 – 55 ของสารสกัดด้วยเฮกเซน

จำนวน 0.50 กรัม หรือ 0.5456 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้งดอกเทียนบ้าน มีค่า R_f เท่ากับ 0.4 (โดยตัวทำละลายที่ใช้ชะคือ เฮกเซน:คลอโรฟอร์ม เท่ากับ 3 : 7) มีจุดหลอมเหลว เท่ากับ 183 องศาเซลเซียส ผลึกที่ได้นี้ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม แต่ไม่ละลายในเมธานอล เพื่อนำผลึกนี้มาวิเคราะห์หาค่าการดูดกลืนแสงอินฟราเรด (IR) โดยใช้เครื่องอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ Jessco ได้ค่า ν_{max}^{KBr} (cm^{-1}) 3050,1680,1645,1600 และ 1245 ปรากฏสเปกตรัมในภาพประกอบ 6



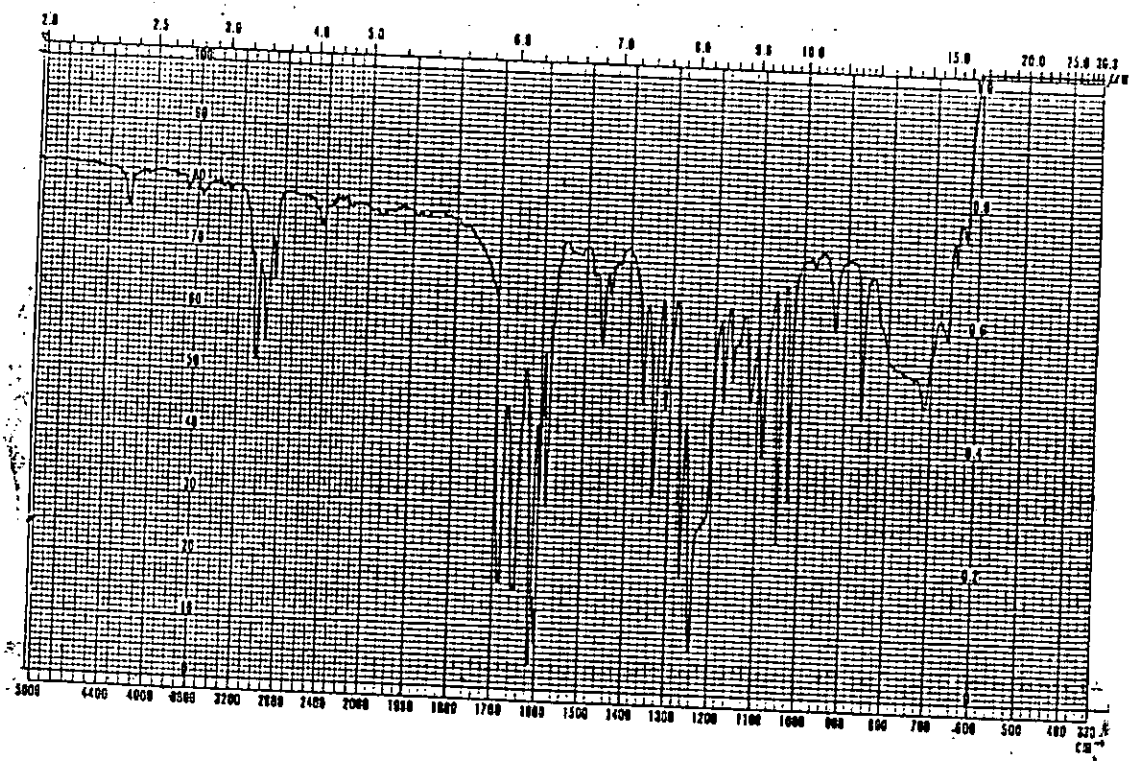
ภาพประกอบ 6 สเปกตรัมของการดูดกลืนแสงอินฟราเรด (IR) ของผลึกจากส่วนที่ 52 - 55 ของสารสกัดด้วยเฮกเซน

วิเคราะห์ ^{1}H NMR (60 MHz-$CDCl_3$, varuab model EM 360 L) ได้ค่า δ3.91 (3H,s,OCH_3), 6.19 (1H,s,H-3), 7.76 (2H,m aromatic proton) และ8.10 (2H,m aromatic proton) ดังปรากฏสเปกตรัมในภาพประกอบ 7

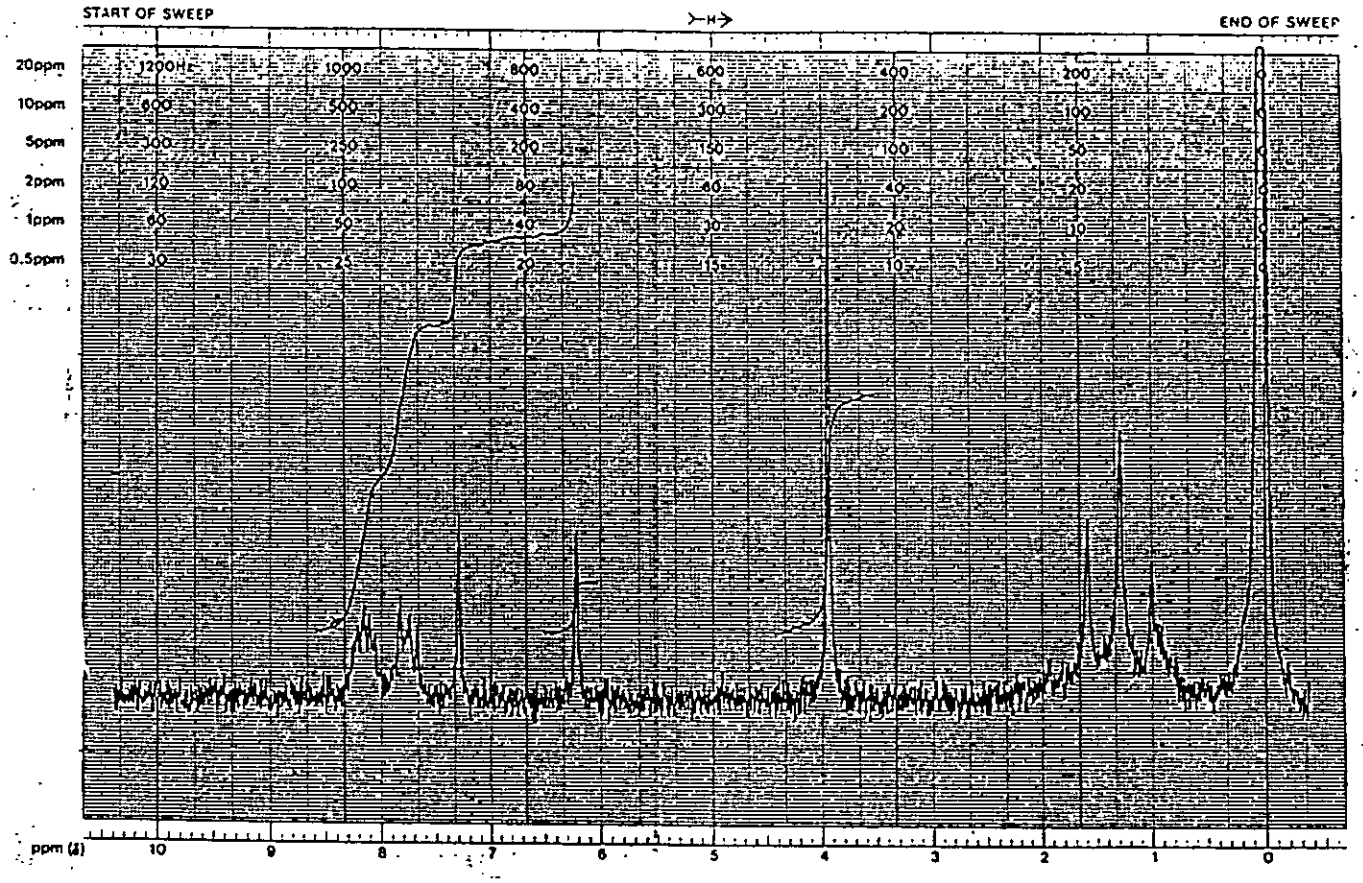


ภาพประกอบ 7 สเปกตรัมของ ^{1}H NMR ของผลึกจากส่วนที่ 52 - 55 ของสารสกัดด้วยเฮกเซน

จากข้อมูลดังกล่าวเมื่อเทียบกับสเปกตรัมมาตรฐานของสาร 2-methoxy-1, 4-naphthoquinone ในภาพประกอบ 2 และสเปกตรัมของผลึกรูปเข็มสีเหลืองทองที่ผู้วิจัยแยกได้จากใบตามวิธีการของ ธาตรี ผดุงเจริญ และคนอื่น ๆ ดังแสดงในภาพประกอบ 8 และ 9 สรุปได้ว่าผลึกนี้เป็น 2-methoxy-1, 4-naphthoquinone (p-quinone form) และมีโครงสร้างดังแสดงในภาพประกอบ 3



ภาพประกอบ 8 สเปกตรัมของการดูดกลืนแสงอินฟราเรด (IR) ของผลึกจากใบ



ภาพประกอบ 9 สเปกตรัมของ ^{1}H NMR ของผลึกจากใบ

<u>ส่วนที่ 2</u> ไม่ละลายในเอธานอลบริสุทธิ์ที่ร้อน มีลักษณะเป็นสารเหนียวสีเขียวอมดำ เมื่อนำมาละลายด้วยเมธานอลที่ร้อน 50 องศาเซลเซียส ได้ตะกอนสีขาวคล้ายแป้ง มีจำนวน 0.0043 กรัม

3.1.3 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราของผลึกบริสุทธิ์ที่ได้จากส่วนที่ 52-55 นำผลึกบริสุทธิ์ที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราอีกครั้งหนึ่งตาม

วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้าข้อ 3 ปรากฏว่า ผลึกบริสุทธิ์ที่ได้มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราทั้ง 4 ชนิด คือ E. floccosum, M. gypseum, T. mentagrophytes และ T. rubrum โดยให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการต้านเชื้อราเท่ากับ 31.25, 62.5, 31.25 และ 3.90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองแสดงในตาราง 6

ตาราง 6 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราของผลึกบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสารสกัดด้วยเฮกเซน

เชื้อรา	ความเข้มข้นของผลึกบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสารสกัดด้วยเฮกเซน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)											
	C_1	C_2	1,000	500	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	1.95
E. floccosum	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
M.gypseum	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
T. mentagrophytes	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
T. rubrum	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

หมายเหตุ C_1 หมายถึง medium control

C_2 หมายถึง solvent control

\+ หมายถึง มีการเจริญของเชื้อราในวันที่ 7 หลังการทดสอบ

\- หมายถึง ไม่มีการเจริญของเชื้อราในวันที่ 7 หลังการทดสอบ

เนื่องจากประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราของส่วนที่ 1 ดีขึ้นกว่าเดิมเท่าตัว ดังนั้นส่วนที่ 2 ซึ่งมีปริมาณน้อยมากจึงน่าจะเป็นสารที่เจือปนอยู่กับผลึกบริสุทธิ์ และไม่น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ในการต้านเชื้อราแต่อย่างไร ผู้วิจัยจึงมิได้นำมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา

3.2 การแยกสารสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม

นำสารสกัดด้วยคลอโรฟอร์มจำนวน 3.3856 กรัม มาแยกสารต่าง ๆ โดยวิธีเดียวกับการแยกสารสกัดด้วยเฮกเซน ได้ผลดังแสดงในตาราง 7 และ 8

ตาราง 7 ผลการแยกสารสกัดด้วยคลอโรฟอร์มโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ตัวทำละลายเดียวและผสมในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน

ตัวทำละลายที่ใช้ชะ	(อัตราส่วน)	ส่วนที่	ลักษณะของสาร	R_f
เฮกเซน	(100:0)	1-2	ไม่มีสาร	
		3-7	คล้ายขี้ผึ้งสีเหลือง	0.5
เฮกเซน :				
คลอโรฟอร์ม	(95:5)	8-12	คล้ายขี้ผึ้งสีเหลืองเข้ม	0.5
	(90:10)	13-18	คล้ายขี้ผึ้งสีเหลืองอมเขียว	0.5
		19-23	คล้ายขี้ผึ้งสีเหลืองอมเขียว	0.5
		24-32	คล้ายขี้ผึ้งสีเลือง	0.13
	(85:15)	33-41	คล้ายขี้ผึ้งสีเหลืองอมส้ม	0.13
		42-46	คล้ายขี้ผึ้งสีเหลือง	0.9,0.58,0.43
	(80:20)	47-51	คล้ายขี้ผึ้งสีเหลือง	0.9,0.58,0.43
	(75:25)	52-54	คล้ายขี้ผึ้งสีเหลือง	0.9,0.58,0.43
		55-63	ตกผลึกรูปเข็มสีเหลืองทอง	0.67,0.3
		64-69	คล้ายขี้ผึ้งสีส้มมีผลึกเข็มปน	0.92,0.35

ตาราง 7 (ต่อ)

ตัวทำละลายที่ใช้ชะ	(อัตราส่วน)	ส่วนที่	ลักษณะของสาร	R_f
เฮกเซน :				
คลอโรฟอร์ม	(70:30)	70-72	คล้ายขี้ผึ้งสีส้มมีผลึกรูปเข็มปน	0.92,0.35
	(50:50)	73-74	คล้ายขี้ผึ้งสีส้มมีผลึกรูปเข็มปน	0.92,0.35
		75-76	เป็นสารเหนียวสีเขียว	0.75
	(40:60)	77-78	เป็นสารเหนียวสีเขียวเข้ม	0.75
	(30:70)	79-87	เป็นสารเหนียวสีน้ำตาล	0.89,0.78,0.67,0.5
	(10:90)	88-95	เป็นสารเหนียวสีน้ำตาล	0.89,0.78,0.67,0.5
คลอโรฟอร์ม	(0:100)	96-100	เป็นสารเหนียวสีน้ำตาล	0.89,0.78,0.67,0.5
คลอโรฟอร์ม :				
เมธานอล	(95:5)	101-102	เป็นสารเหนียวสีน้ำตาลเข้ม	0.89,0.78,0.67,0.5
		103-104	เป็นสารเหนียวสีน้ำตาลเข้ม	0.7,0.25
	(90:10)	105-108	เป็นสารเหนียวสีน้ำตาลเข้ม	0.77,0.7,0.25
	(85:15)	109-111	เป็นสารเหนียวสีน้ำตาลเข้ม	0.77,0.7,0.25
	(75:25)	112-115	เป็นสารเหนียวสีน้ำตาลเข้ม	0.77,0.7,0.25
	(50:50)	116-118	เป็นสารเหนียวสีน้ำตาลเข้ม	0.77,0.7,0.25
	(30:70)	119-122	เป็นสารเหนียวสีน้ำตาลเข้ม	0.77,0.7,0.25
	(10:90)	123-124	เป็นสารเหนียวสีน้ำตาลเข้ม	0.77,0.7,0.25
เมธานอล	(0:100)	125-126	เป็นสารเหนียวสีน้ำตาลเข้ม	0.77,0.7,0.25

ตาราง 8 ส่วนต่าง ๆ ของสารที่แยกได้จากสารสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม

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

3.2.1 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดด้วยคลอโรฟอร์มที่แยกได้แต่ละส่วน

นำสารสกัดด้วยคลอโรฟอร์มที่แยกได้แต่ละส่วนมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราตามวิธีดำเนินศึกษาค้นคว้าข้อ 3 พบว่าส่วนที่ 3-23, 24-41 และ 75-78 ไม่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราทดสอบที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ส่วนที่ 42-54,55-63, 64-74, 79-102 และ 103-126 พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราทดสอบ ดังนี้

ส่วนที่ 42-54 พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา E. floccosum, M. gypseum และ T. mentagrophytes เท่านั้น โดยให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการต้านเชื้อราเท่ากับ 500, 1,000 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังผลแสดงในตาราง 9

ส่วนที่ 55-63 พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราที่นำมาทดสอบทั้ง 4 ชนิด คือ E. floccosum, M. gypseum T. mentagrophytes และ T. rubrum โดยให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการต้านเชื้อราเท่ากับ 62.5, 125, 62.5 และ 7.81 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังผลแสดงในตาราง 9

ส่วนที่ 64-74 พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราที่นำมาทดสอบเพียงชนิดเดียวคือ T. mentagrophytes โดยให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการต้านเชื้อราเท่ากับ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังผลแสดงในตาราง 9

ส่วนที่ 79-102 และ 103-126 พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อรา M. gypseum และ T. mentagrophytes เท่านั้น และให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการต้านเชื้อราทั้งสองชนิดเท่ากันคือ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังผลแสดงในตาราง 9

ตาราง 9 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราของสารสกัดแต่ละส่วนที่แยกได้จากสารสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม

เชื้อรา	ส่วนที่แยกได้							
	3-23	24-41	42-54	55-63	64-74	75-78	79-102	103-126
E. floccosum	+	+	- (500)	- (62.5)	+	+	+	+
M.gypseum	+	+	- (1,000)	- (125)	+	+	- (500)	- (500)
T. mentagrophytes	+	+	- (1,000)	- (62.5)	- (500)	+	- (500)	- (500)
T. rubrum	+	+	+	- (7.81)	+	+	+	+

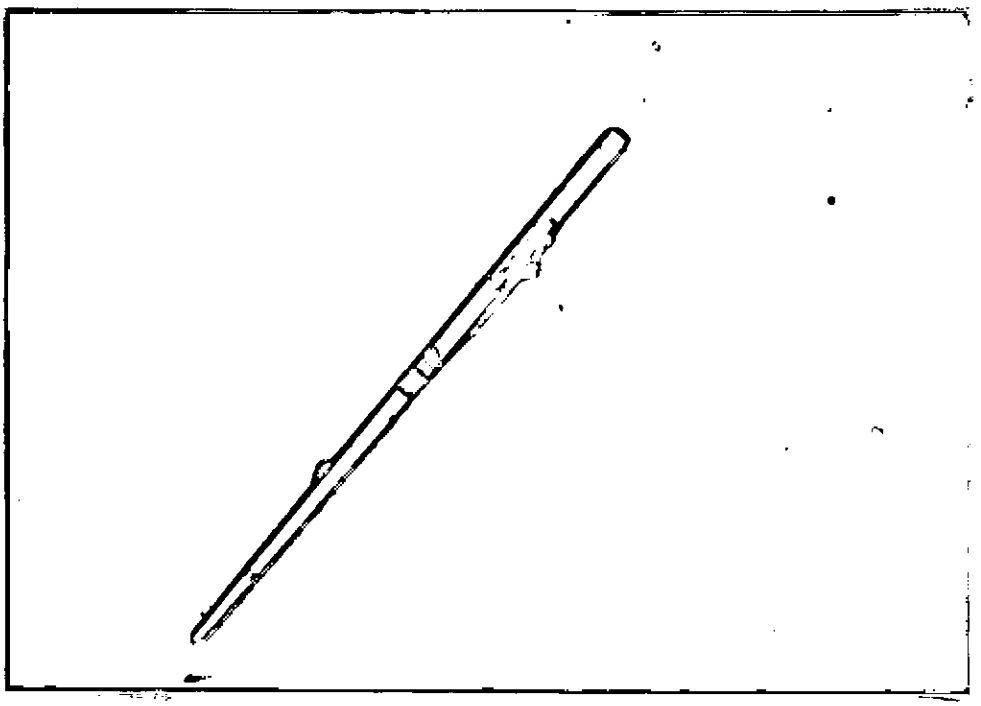
หมายเหตุ + หมายถึง มีการเจริญของเชื้อราบนอาหารที่ผสมสารสกัดในระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน วันที่ 7 หลังการทดสอบ

\- หมายถึง ไม่มีการเจริญของเชื้อราบนอาหารที่ผสมสารสกัดในระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 7 หลังการทดสอบ

ตัวเลขใน( ) หมายถึง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถต้านการเจริญของเชื้อราได้ (M.I.C.)

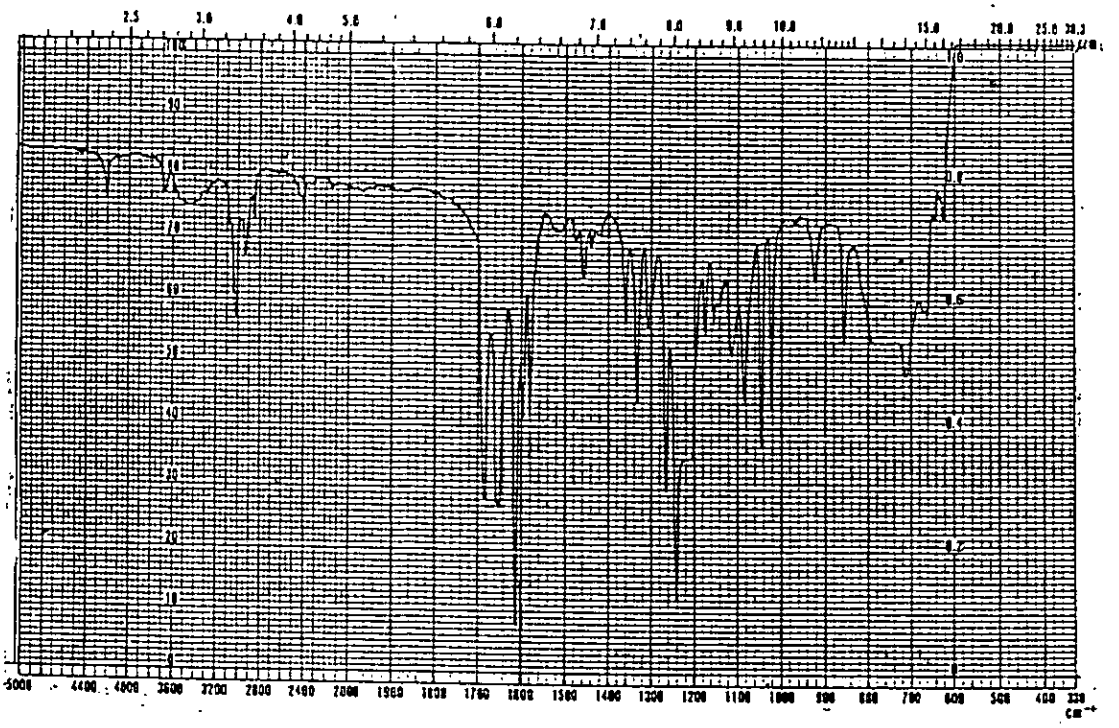
3.2.2 การเตรียมสารที่แยกได้จากสารสกัดด้วยคลอโรฟอร์มให้บริสุทธิ์และการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา

นำผลึกที่แยกได้จากส่วนที่ 55–63 มาแยกสารบริสุทธิ์โดยวิธีเดียวกันกับการแยกสารบริสุทธิ์ในสารสกัดด้วยเฮกเซน พบว่าได้ผลึกรูปเข็มสีเหลืองทองมันวาว ดังแสดงในภาพประกอบ 10



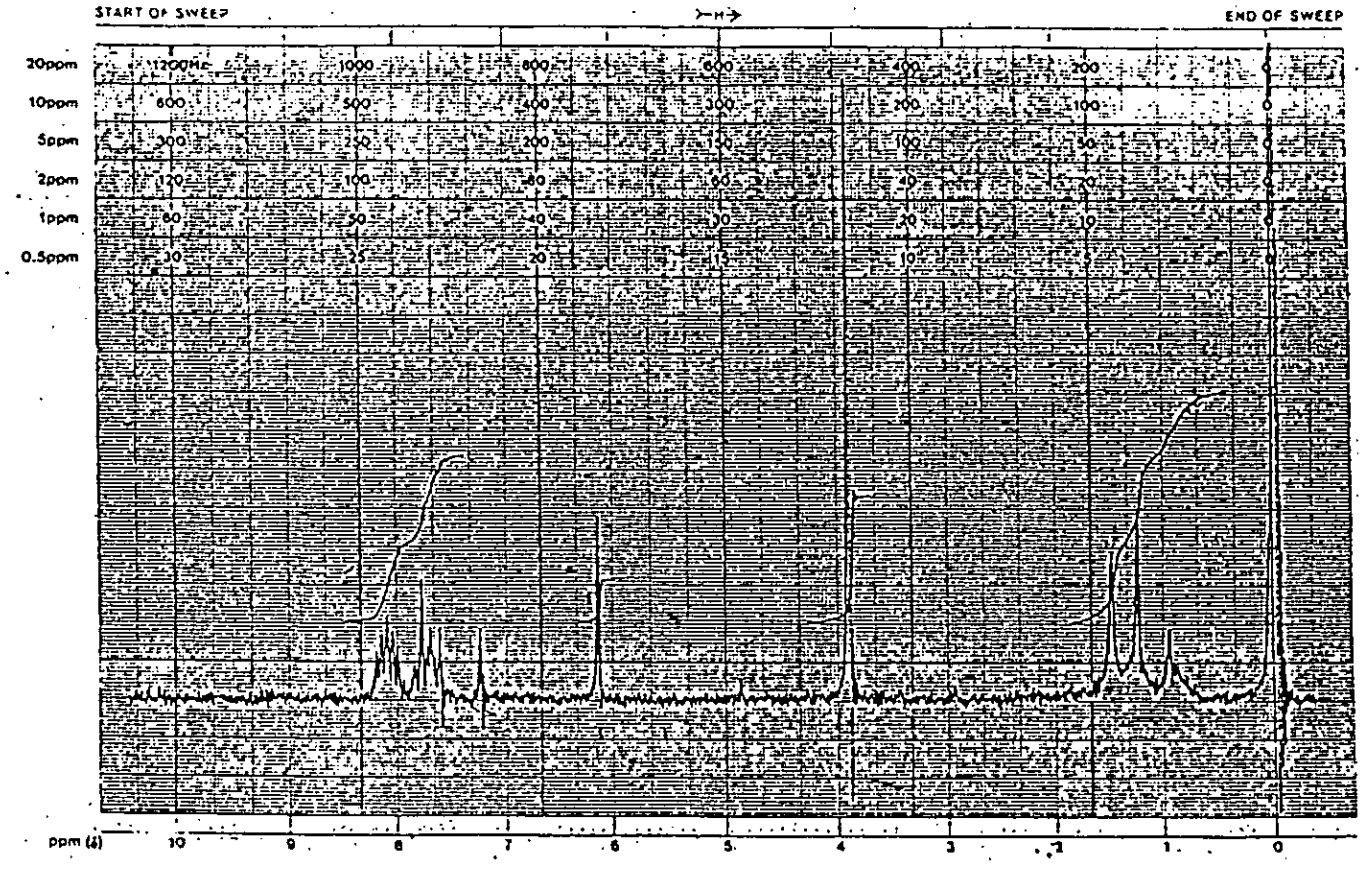
ภาพประกอบ 10 ลักษณะของผลึกบริสุทธิ์ที่แยกได้จากส่วนที่ 55 – 63 ของสารสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม

จำนวน 0.2 กรัม หรือ 0.2023 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้งดอกเทียนบ้าน มีค่า R_f เท่ากับ 0.4 (โดยตัวทำละลายที่ใช้ชะคือ เฮกเซน : คลอโรฟอร์มเท่ากับ 3:7) มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 183 องศาเซลเซียส และพบว่าผลึกที่ได้นี้ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์มแต่ไม่ละลายในเมธานอล นำผลึกนี้มาวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงอินฟราเรดได้ค่า ν_{max}^{KBr} (cm^{-1}) 3050, 1680, 1645, 1600 และ 1240 ปรากฏสเปกตรัมดังภาพประกอบ 11



ภาพประกอบ 11 สเปกตรัมของการดูดกลืนแสงอินฟราเรด (IR) ของผลึกจากส่วนที่ 55 -63 ของสารสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม

วิเคราะห์ ^{1}H NMR (60 MHz-$CDCl_3$) ได้ค่า δ 3.91 (3H,s,OCH_3), 6.19 (1H,S,H-3) 7.76 (2H,m aromatic proton), 8.1 (2H,m aromatic proton) ปรากฏสเปกตรัมดังภาพประกอบ 12



ภาพประกอบ 12 สเปกตรัมของ ^{1}H NMR ของผลึกจากส่วนที่ 55 - 63 ของสารสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม

จากข้อมูลดังกล่าวเมื่อเปรียบเทียบกับผลผลึกบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสารสกัดด้วยเฮกเซน และสเปกตรัมมาตรฐาน ดังผลแสดงในภาพประกอบ 2, 6 และ 7 และเมื่อนำผลึกบริสุทธิ์นี้ไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา ปรากฏผลเช่นเดียวกับผลึกบริสุทธิ์ของสารสกัดด้วยเฮกเซน จากข้อมูลดังกล่าว สรุปได้ว่าผลึกรูปเข็มสีเหลืองทองในสารสกัดด้วยเฮกเซนและคลอโรฟอร์มเป็นสารชนิดเดียวกัน คือ 2-methoxy-1, 4-naphthoquinone. (p-quinone form)

บทที่ 5

สรุปผลและอภิปราย

สรุปผล

การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราของสารสกัดจากดอกเทียนบ้านด้วยเฮกเซน คลอโรฟอร์ม เมธานอล และน้ำกลั่น พบว่าที่ระดับ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดด้วยเฮกเซนมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราทดสอบทั้ง 4 ชนิด แต่สารสกัดด้วยคลอโรฟอร์มมีฤทธิ์ต้านเชื้อราทดสอบเพียง 3 ชนิด คือ E. floccosum, M. gypseum, และ T. mentagrophytes แต่สารสกัดคลอโรฟอร์มไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา T. rubrum สำหรับเมธานอลและน้ำกลั่น พบว่า ไม่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราทดสอบทั้ง 4 ชนิด เมื่อแยกสารประกอบจากสารสกัดทั้งสองชนิดนี้ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ พบว่าส่วนที่เป็นผลึกรูปเข็มสีเหลืองทอง ของสารสกัดด้วยเฮกเซน และคลอโรฟอร์ม มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา E. floccosum, M. gypseum, T. mentagrophytes และ T. rubrum เหมือนกันโดยแสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการต้านเชื้อราเท่ากับ 62.5,125,62.5 และ 7.81 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อนำผลึกรูปเข็มสีเหลืองทองนี้มาทำให้บริสุทธิ์พบว่า มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา E. floccosum, M. gypseum, T. mentagrophytes และ T. rubrum เหมือนกันโดยแสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการต้านเชื้อราเท่ากับ 31.25,62.5,31.25 และ 3.90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์สมบัติของผลึกบริสุทธิ์ จากสารสกัดทั้ง 2 ชนิดพบว่าเป็นสาร 2-methoxy-1, 4-naphthoquinone.

อภิปรายผล

จากการแยกสารประกอบจากสารสกัดด้วยเฮกเซน และคลอโรฟอร์ม ได้สารประกอบหลักที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราที่นำมาทดสอบ คือ สารที่มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีเหลืองทอง ซึ่ง

สามารถสกัดได้ในทั้งตัวทำละลายเฮกเซน และคลอโรฟอร์ม โดยวิธีการสกัดอย่างต่อเนื่อง

และจากการศึกษาในครั้งนี้ได้พบว่าสมบัติของผลึกรูปเข็มสีเหลืองทองทั้งจากดอกและใบเทียนบ้าน ให้ค่าการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของผลึกเป็น aromatic ring, 2 carbonyl groups, olefinic proton และ methoxy group ที่ 3050,1680,1600 และ 1240 cm^{-1} ตามลำดับ และ ^1H NMR แสดงค่า disubstituted aromatic ring ที่ δ 8.10 และ 7.76 methoxy group ที่ δ 3.91 และ olefinic proton ปรากฏที่ δ 6.91 ซึ่งข้อมูลต่าง ๆ เหล่านี้ได้ผลสอดคล้องกับการรายงานของ ธาตรี ผดุงเจริญ และคนอื่น ๆ ในการหาสารประกอบที่ฆ่าเชื้อราของใบเทียนบ้าน ที่พบว่าเป็นสาร 2-methoxy-1, 4-naphthoquinone โดยทราบจากค่าการดูดกลืนแสงอินฟราเรดว่าเป็น aromatic ring, 2 carbonyl groups และ ether functional group ที่ 3400,1680,1645 และ 1240 cm^{-1} ตามลำดับ ^1H NMR แสดงว่า disubstituted aromatic ring ที่ δ 8.10 และ 7.76 methoxy group ที่ δ 3.91 และ olefinic proton ที่ δ 6.19 (ธาตรี ผดุงเจริญ และคนอื่น ๆ 2581 : 123-124)

นอกจากนี้ยังพบว่า การทดลองครั้งนี้ได้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของคาเพล ที่พบว่าสารที่เป็น 2-methoxy-1, 4-naphthoquinone มีสูตรโครงสร้างเป็น $C_{11}H_8O_3$ มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 183 องศาเซลเซียส มีค่า λ^{EtOH}_{max} (nm) เป็น 243,248,277 และ330 ($\log \epsilon$ 4·22,4·24,4·16 และ 3·36) มีค่าการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ค่า ν^{KBr}_{max} (cm^{-1}) 1680, 1645,1600 และ 1240 มีค่า ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 8.10 (2H,m), 7.75 (2H,m), 6.19 (1H,S), 3.93 (3H,S) มีค่า Mass spect (m/e) เท่ากับ 188 (100), 173 (33) 159 (30), 158 (57),130 (8), 104 (10),102 (34), 89 (49), 76 (22), 69 (15) 50 (15) (Chapelle. 1974 : 662) และยังได้ผลสอดคล้องกับการทดสอบของไฟเชอร์ ที่พบว่าสาร 2-methoxy-1, 4-naphthoquinone ที่บริสุทธิ์จะเป็นผลึกรูปเข็มสีเหลืองในโครงสร้างที่เป็น p-quinone มีสูตรโครงสร้างเป็น $C_{11}H_8O_3$ และมีจุดหลอมเหลวอยู่ในช่วง 182.5 - 183.0 องศาเซลเซียส (Fieser. 1926 : 2932) ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันว่า สารที่ได้จากการทดลองนี้ คือ 2-methoxy-1, 4-naphthoquinone และมีโครงสร้างดังภาพประกอบ 3

การแยกสารเพื่อให้ได้ผลึกรูปเข็มสีเหลืองทองนั้น จากการทดลองครั้งนี้พบว่า ผลึกจะแยกออกมาได้ดีที่สุดในช่วงของการใช้อัตราส่วนของตัวทำละลายที่ใช้ชะ คือ เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม เท่ากับ 75:25 ดังนั้นหากใช้ตัวทำละลายทั้งสองชนิดนี้ในอัตราส่วนดังกล่าวมาสกัดสารก็จะช่วยร่นระยะเวลาในการสกัด และได้สาร 2-methoxy-1, 4-naphthoquinone ในช่วงเวลาสั้นกว่าการใช้ตัวทำละลายทีละชนิด และเมื่อรวมน้ำหนักของผลึกบริสุทธิ์ที่ได้จากการสกัดด้วยเฮกเซน และคลอโรฟอร์มที่ได้จากการทดลองทั้งหมด พบว่าได้ผลึกบริสุทธิ์จำนวน 0.75 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้งดอกเทียนบ้านแห้ง เมื่อเทียบกับน้ำหนักของผลึกที่ได้จากการสกัดสารจากใบเทียนบ้านของ ธาตรี ผดุงเจริญ และคนอื่น ๆ ซึ่งได้น้ำหนักเพียง 0.07 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักใบแห้ง (ธาตรี ผดุงเจริญ และคนอื่น ๆ 2531 : 117- 124) จะเห็นได้ว่าได้ผลต่างกันถึงประมาณ 10 เท่า ดังนั้นการสกัดสารจากดอกเทียนบ้านจะมีผลดีทางด้านเศรษฐกิจดีกว่าการสกัดสารจากใบเทียนบ้าน

การทดสอบฤทธิ์ของผลึกบริสุทธิ์ในการต้านเชื้อราที่นำมาทดสอบ พบว่า ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของผลึกบริสุทธิ์ในการต้านเชื้อรา E. floccosum, M. gypseum, T. mentagrophytes และ T. ruburm เท่ากับ 31.25,62.5,31.25 และ3.90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งผลที่ได้จากการทดลองนี้แตกต่างจากรายงานของ ธาตรี ผดุงเจริญ และคนอื่น ๆ ที่รายงานไว้ว่า ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของผลึกในการต้านเชื้อราดังกล่าวเท่ากับ 1.25,2.5,2.5,2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ธาตรี ผดุงเจริญ และคนอื่น ๆ 2531 : 117-124) ทั้งนี้อาจเป็นผลจากการใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกันในการทดลองครั้งนี้ใช้เอทิลีน ไกลคอลที่ร้อน (50 องศาเซลเซียส) เป็นตัวทำละลาย ซึ่งไม่มีผลทางด้านความเป็นกรด-ด่าง ต่อเชื้อราที่นำมาทดสอบ ส่วนการทดลองของ ธาตรี ผดุงเจริญ และคนอื่น ๆ ใช้สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 10 เปอร์เซนต์ (10% ammonium hydroxide solution) แม้ว่าจะใช้บัฟเฟอร์ซึ่งมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.2 ในการเจือจาง (ธาตรี ผดุงเจริญ และคนอื่น ๆ 2531 : 120) ซึ่งอาจมีผลต่อการเจริญของเชื้อราที่นำมาทดสอบ จึงทำให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของผลึกบริสุทธิ์ที่ได้จากการทดลองของ ธาตรี ผดุงเจริญ และคนอื่น ๆ มีค่าความเข้มข้นต่ำกว่าการทดลองของผู้วิจัย นอกจากนี้การอ่านผลการทดลองครั้งนี้เป็นการอ่านผลเมื่อเชื้อราเจริญเป็นเวลา 7 วัน ในขณะที่การทดลองของ ธาตรี ผดุงเจริญ และคนอื่น ๆ อ่านผลเมื่อเชื้อราเจริญเป็นเวลา 3 วันและ 5 วัน จากการทดลองในครั้งนี้ได้สังเกตพบว่า

การอ่านผลการทดลองในวันแรก ๆ จะได้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของผลึกในการต้านเชื้อราต่ำกว่าวันหลัง ๆ ของการทดลอง ดังแสดงผลในตาราง 10 และ 11 ในภาคผนวกและมีการเปลี่ยนแปลงของค่าความเข้มข้นต่ำสุดของผลึกในการต้านเชื้อราเมื่อระยะเวลาในการเจริญเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเชื้อรามีอายุครบ 7 วัน หรือมากกว่า 7 วัน ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของผลึกจะไม่เปลี่ยนแปลง ดังแสดงผลในตาราง 1 และ 2

และเป็นที่น่าสังเกตว่าผลึกบริสุทธิ์ที่แยกได้เป็นสาร 2-methoxy-1, 4-naphthoquinone ซึ่งสามารถต้านเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนังได้ทั้ง 4 ชนิด ดังแสดงในตาราง 9 แม้ว่าผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราของสารสกัดด้วยคลอโรฟอร์มจะไม่สามารถต้านเชื้อรา T. rubrum ได้ดังแสดงในตาราง 2 ทั้งนี้เนื่องจากได้บันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการต้านเชื้อราที่ทดสอบในวันที่ 7 ของการทดสอบ อย่างไรก็ตามจากการสังเกตในช่วงวันที่ 3 ของการทดสอบพบว่า สารสกัดด้วยคลอโรฟอร์มสามารถต้านเชื้อรา T. rubrum ได้ โดยแสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดด้วยคลอโรฟอร์มต่อเชื้อราดังกล่าวเท่ากับ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตาราง 11 ในภาคผนวก

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

กวี ภู่ไพบูลย์. Medical Mycology. กรุงเทพฯ : ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2524.

กฤษณา รุ่งเรืองศักดิ์ และคนอื่น ๆ. ปฏิบัติการและหลักการเบื้องต้นในวิชาชีวเคมี. กรุงเทพฯ : อมรินทร์การพิมพ์, 2521.

โครงการสมุนไพรเพื่อการพึ่งตนเอง. ยาจากพฤกษ์ พืชสมุนไพรที่น่ารู้จัก. จุลสารลำดับที่ 10. กรุงเทพฯ : ม.ป.ท., มีนาคม 2529.

ธาตรี ผดุงเจริญ และคนอื่น ๆ. "สารประกอบที่ฆ่าเชื้อราจากใบเทียนบ้าน," ไทยเภสัชสาร. 13(2) : 117 - 125 ; เมษายน - มิถุนายน, 2531.

ชมรมพฤกษเคมีและคณะเภสัชศาสตร์ การสัมมนาเชิงปฏิบัติการพฤกเคมี ครั้งที่ 2 เรื่อง "Phytochemical Screening Techniques" 12 - 16; พฤษภาคม 2523 กรุงเทพ : มหาวิทยาลัยมหิดล คณะเภสัชศาสตร์

พเยาว์ เหมือนวงษ์ญาติ. คู่มือการใช้สมุนไพร. กรุงเทพฯ : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2524.

_____. คู่มือการใช้สมุนไพร. ชุดแนะแนวสุขภาพประชาชน พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์เรือนแก้วการพิมพ์, 2530.

พรพิพัฒน์ ณ พัทลุง, นวลจิรา ภัทรวังรอง และพิเชษฎ์ วิริยะจิตรา. "ฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพร," วารสารสงขลานครินทร์. 8(3) : 315 - 318 ; กรกฎาคม - กันยายน, 2529.

เรณู โคตรจรัส. โรคผิวหนัง เล่ม 1. กรุงเทพฯ : สถาบันวิจัยโรคผิวหนัง กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, 2520.

วิทยาศาสตร์การแพทย์, กรม. คู่มือการแยกและวินิจฉัยเชื้อรา. กรุงเทพฯ : กระทรวงสาธารณสุข, 2520.

ศูนย์ข้อมูลสมุนไพร. ก้าวไปกับสมุนไพร. กรุงเทพฯ : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, ม.ป.ป.

สันติ ถุงสุวรรณ และคนอื่น ๆ. รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์โครงการวิจัยสมุนไพร. กรุงเทพฯ : คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2528.

เสงี่ยม พงษ์บุญรอด. ไม้เทศเมืองไทย. กรุงเทพฯ : เกษมบรรณกิจ, 2512.

_____. ไม้เทศเมืองไทย. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : เกษมบรรณกิจ, 2519.

Alston, R.E and C.W, Hagen, Jr. "Chemical Aspects of the Inheritance of Flower Color in Impatiens balsamina L." Genetics. 43 : 35 - 47 ; February 1958.

Bohm, B.A. and G.H.N. Towers. "A Study of Phenolic Compounds in Impatiens," Canadian Journal of Botany. 40 : 677 - 683 ; January - June, 1962.

Campbell, M.C. and J.L. Stewart. The Medical Mycology Handbook. New York : John Wiley & Sons, Inc., 1980.

Chapelle, J.P. "2-Methoxy - 1, 4-Naphthoquinone in Impatiens glandulifera and related species" Phytochemistry. 13 : 662 ; January - June, 1974.

Clevenger, S. "The Flavonols of Impatiens balsamina L.," Archives of Biochemistry and Biophysics. 76 : 131 - 138 ; May - August, 1958.

Dhavadee P. and others. Medicinal Plants. Thailand : Victory Power Point Corp, Ltd., 1987.

Fieser, L.F. "The Alkylation of Hydroxynaphthoquinone I. orlho - ethers" Journal of the American Chemical Society. 48 : 2922 - 2937 ; August - November, 1926.

Julius, K., L. Sigler and R.C. Summerbell. "Improved Procedures for Differentiating Microsporum persicolor from Trichophyton mentagrophytes," Journal of Clinical Microbiology. 25(12) : 2449 - 2452, 1987.

Little, J.E., T.J. Sporston and M.W. Foote. "The Isolation and Antifungal Action of Naturally Occurring 2-Methoxy - 1, 4-Naphthoquinone," Journal of Biological Chemistry. 174 : 335 - 342, 1948.

Mansell, R.L. and V.L. Kemerer "Qualitative and Quantitative Comparisons of Hydroxycinnamic Acid Derivatives in Petals of the Red (11HHPrPr), White (11hhpp) and Purple (LLhhPrPr) Genotypes of Impatiens balsamina Phytochemistry. 9 : 1751 - 1755 ; May - August, 1970.

Moore, G.S. and D.M. Jaciow. Mycology for the Clinical Laboratory. Virginia : A Prentice Hall Company Restor, 1979.

Perry, L.M. Medical Plants of East and Southeast Asia. Massachusetts : MIT Press, 1980.

Pouchert, C.J. The Aldrich Library of Imfrared Spectra 3rd.ed. : Printed in the United States of America 1981.

_____. The Aldrich library of NMR Spectra. 2nd.ed : Volume 2 : Printed in the United States of America, 1983.

Tansey, M.R. and J.A. Appleton. "Inhibition of Fungal Growth by Garlic Extract," Mycologia. 67 : 409 - 411 ; January - June, 1975.

ภาคผนวก

สูตรอาหาร Sabouraud dextrose agar

Dextrose	20	กรัม
Neopeptone	10	กรัม
Agar	17	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

สูตรอาหาร Sabouraud dextrose semisolid agar (SDSA)

Dextrose	20	กรัม
Neopeptone	10	กรัม
Agar	10	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

(Moore and Jaciow 1979 : 263)

ตาราง 10 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากดอกเทียนบ้านด้วยเฮกเซนในการต้านเชื้อราทดสอบ

เชื้อรา	ความเข้มข้นของสารสกัดด้วยเฮกเซน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)											
	C_1	C_2	1,000	500	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	1.95
E. floccosum	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
M.gypseum	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T. mentagrophytes	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
T. rubrum	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

หมายเหตุ C_1 หมายถึง medium control

C_2 หมายถึง solvent control

\+ หมายถึง มีการเจริญของเชื้อราในวันที่ 3 หลังการทดสอบ

\- หมายถึง ไม่มีการเจริญของเชื้อราในวันที่ 3 หลังการทดสอบ

ตาราง 11 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากดอกเทียนบ้านด้วยคลอโรฟอร์มในการต้านเชื้อราทดสอบ

เชื้อรา	ความเข้มข้นของสารสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)											
	C_1	C_2	1,000	500	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	1.95
E. floccosum	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M.gypseum	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
T. mentagrophytes	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
T. rubrum	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ C_1 หมายถึง medium control

C_2 หมายถึง solvent control

\+ หมายถึง มีการเจริญของเชื้อราในวันที่ 3 หลังการทดสอบ

\- หมายถึง ไม่มีการเจริญของเชื้อราในวันที่ 3 หลังการทดสอบ

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ นางสาวสุนิดา	ชื่อสกุล กาญจนมยูร
เกิดวันที่ 29 เดือน พฤษภาคม	พุทธศักราช 2508
สถานที่เกิด	โรงพยาบาลจังหวัดลพบุรี จังหวัดลพบุรี
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	19/202 หมู่ 5 ซ.ปรีชา 2 ถ.สุขาภิบาล 1
	แขวงคลองกุ่ม เขตบึงกุ่ม กรุงเทพฯ 10240
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2526	เตรียมอุดมศึกษา (แผนกวิทยาศาสตร์)
	จากโรงเรียนสายปัญญา กรุงเทพมหานคร.
พ.ศ. 2529	กศ.บ. (ชีววิทยา) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
	บางเขน
พ.ศ. 2532	กศ.ม. (ชีววิทยา) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
	ประสานมิตร

ฤทธิ์ของสารสกัดจากดอกเทียนบ้านในการต้านเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนังบางชนิด

บทคัดย่อ

ของ

สุนิดา กาญจนมยูร

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกชีววิทยา

กุมภาพันธ์ 2533

การสกัดสารอย่างต่อเนื่องจากดอกเทียนบ้านสีม่วงด้วยตัวทำละลายเรียงลำดับจาก เฮกเซน คลอโรฟอร์ม เมธานอลและน้ำกลั่น แล้วทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดที่ได้ในการต้านเชื้อรา ที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนัง 4 ชนิด คือ Epidermophyton floccosum, Microsporum gypseum, Trichophyton mentagrophytes และ T. rubrum พบว่า สารสกัดด้วยเฮกเซน และคลอโรฟอร์ม มีประสิทธิภาพดีกว่าสารสกัดด้วยเมธานอลและน้ำกลั่น จึงได้นำสารสกัดดังกล่าวมาแยกสารโดยวิธี โครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ และจากการทดสอบฤทธิ์ ในการต้านเชื้อราของส่วนต่าง ๆ ที่แยกได้ พบว่าสารประกอบส่วนที่ 52-55 ของสารสกัดด้วย เฮกเซนและส่วนที่ 55-63 ของสารสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม ซึ่งมีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีเหลืองทอง เป็นส่วนที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราทดสอบ ซึ่งเมื่อนำผลึกบริสุทธิ์ที่ได้ไปวิเคราะห์สูตรโครงสร้างด้วย สเปกตรัม พบว่าเป็นสาร 2-methoxy-1, 4-naphthoquinone เหมือนกันและแสดงค่าความ เข้มข้นต่ำสุดของสารนี้ต่อเชื้อรา E. floccosum, M. gypseum, T. mentagrophytes และ T. rubrum เท่ากับ 31.25,62.5,31.25 และ3.90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ANTIFUNGAL ACTIVITIES OF THE EXTRACTS FROM GARDEN BALSAM FLOWERS (*IMPATIENS BALSAMINA* LINN.) ON SOME DERMATOPHYTIC FUNGI

AN ABSTRACT

BY

SUNIDA KARNJANAMAYOON

Presented in partial fulfillment of the requirements

for the Master of Education degree in Biology

at Srinakarinwirot University

February 1990

Hexane, chloroform, methanol and water extracts were prepared from purple, Garden Balsam (Impatiens balsamina Linn.) flowers by continuous extraction. The antifungal activities of these extracts were tested with 4 species of dermatophytes : Epidermophyton floccosum, Microsporum gypseum, Trichophyton mentagrophytes and T. rubrum. The result showed that the hexane and chloroform extracts had more efficiency than other extracts. Seperation of hexane and chloroform extracts by column chromatography was found that the active compound from fraction number 52-55 of hexane extract and 55-63 of chloroform extract 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 2-methoxy-1, 4-naphthoquinone to E. floccosum, M. gypseum, T. mentagrophytes and T. rubrum are 31.25, 62.5,31.25 and 3.90 micrograms per milliliter, respectively.