

การศึกษาสารประกอบเคมีในฝอยลม



นางสาวนริศา คำแก่น

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรเกสัชศาสตรมหาบัณฑิต

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ภาควิชาเภสัชเวช

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2537

ISBN 974-584-096-3

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

T1713996X

**STUDY ON THE CONSTITUENTS OF  
*USNEA SIAMENSIS* WAINIO**

**Miss Narisa Kamkaen**

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement  
for the Degree of Master of Science in Pharmacy  
Department of Pharmacognosy**

**Graduate School**

**Chulalongkorn University**

**1994**

**ISBN 974-584-096-3**

Thesis Title           STUDY ON THE CONSTITUENTS OF  
                                  *USNEA SIAMENSIS* WAINIO

By                         Miss Narisa Kamkaen

Department            Pharmacognosy

Thesis Advisor         Associate Professor Nijsiri Ruangrungsi

Thesis Co-advisor     Assistant Professor Wanchai De-Eknamkul  
                                  Lecturer Mali Wirotasangthong



---

Accepted by the Graduated School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirement for the Master's Degree.

*Thavorn Vajrabhaya* ..... Dean of Graduate School  
( Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph. D. )

Thesis committee

*Chaiyo Chaichantipyuth* ..... Chairman  
( Associate Professor Chaiyo Chaichantipyuth, M. Sc. in Pharm. )

*Nijsiri Ruangrungsi* ..... Thesis advisor  
( Associate Professor Nijsiri Ruangrungsi, M. Sc. in Pharm. )

*Wanchai De-Eknamkul* ..... Thesis Co-advisor  
( Assistant Professor Wanchai De-Eknamkul, Ph. D. )

*Mali Wirotasangthong* ..... Thesis Co-advisor  
( Lecturer Mali Wirotasangthong, M.Sc. in Pharm. )

*Thatree Phadungcharoen* ..... Member  
( Assistant Professor Thatree Phadungcharoen, M. Sc. in Pharm. )

พิมพ์ต้นฉบับบทความวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว



นริศ คำแก่น : การศึกษาสารประกอบเคมีในฝอยลม (STUDY ON THE CONSTITUENTS OF *USNEA SIAMENSIS* WAINIO) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ฉวีศรี เรืองรังษี, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร.วันชัย ตีเอกราชกุล, อาจารย์มะลิ วิโรจน์แสงทอง. 155 หน้า. ISBN 974-584-096-3

การแยกสกัดสารบริสุทธิ์จากสิ่งสกัดของฝอยลม สามารถแยกสารประกอบเคมีได้จำนวน 3 ชนิด การวิเคราะห์ข้อมูลทางสเปกตรัมด้วย UV, IR, MS,  $^1\text{H-NMR}$  และ  $^{13}\text{C-NMR}$  พบว่าสูตรโครงสร้างของสารประกอบ 3 ชนิด เป็นอนุพันธ์ของ dibenzofuran คือ (+)-usnic acid, กลุ่ม depside คือ atranorin, และกลุ่ม depsidone คือ isomer ของ stictic acid การหาปริมาณของ (+)-usnic acid ได้พัฒนาเทคนิค TLC-densitometry พบว่าตัวอย่างฝอยลมจากดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ มี (+)-usnic acid อยู่ในปริมาณสูง 4.31% ของน้ำหนักพืชแห้ง ส่วนตัวอย่างฝอยลมจากภูหลวง จังหวัดเลย ให้ปริมาณสาร 3.43% ของน้ำหนักพืชแห้ง การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของโรคในระบบทางเดินอาหาร เช่น ท้องเสีย, บิดมีตัว, ไชโอฟอยด์และโรคผิวหนังอักเสบจากการติดเชื้อ พบว่า (+)-usnic acid มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียกลุ่มวง วิทยานิพนธ์นี้เป็นปริญญานิพนธ์ที่รายงานเกี่ยวกับการศึกษาสารประกอบเคมีในฝอยลมที่รายงานครอบคลุมการแยกสกัดสารประกอบ 3 ชนิด, การหาปริมาณ (+)-usnic acid และการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารบริสุทธิ์ที่สกัดได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ..... เกสย์เวท  
สาขาวิชา ..... เกสย์เวท  
ปีการศึกษา 2536 .....

ลายมือชื่อนิสิต ..... นริศ คำแก่น  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ..... ผศ.ฉวีศรี เรืองรังษี  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ..... ผศ.ดร.วันชัย ตีเอกราชกุล

#C575447 : MAJOR PHARMACOGNOSY

KEY WORD: *USNEA SIAMENSIS* WAINIO/ USNEACEAE

NARISA KAMKAEN : STUDY ON THE CONSTITUENTS OF *USNEA SIAMENSIS* WAINIO.

THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. NIJSIRI RUANGRUNGSI, THESIS CO-ADVISOR :

ASSIS. PROF. WANCHAI DE-EKNAMKUL, Ph.D., LECTURER MALI WIROTESANG-

THONG 155 pp. ISBN 974-584-096-3

Isolation and purification of crude extract of *Usnea siamensis* Wainio (Usneaceae) revealed the presence of three isolated compounds. Analysis of the UV, IR, MS,  $^1\text{H-NMR}$ , and  $^{13}\text{C-NMR}$  spectral data of the isolated compounds led to the structure elucidation of a dibenzofuran derivative : (+)-usnic acid, a lichen depside : atranorin, and a lichen depsidone : isomeric form of stictic acid. A simple TLC-densitometric method was developed for the determination of (+)-usnic acid in *Usnea siamensis* Wainio. It appeared that the sample from Doi Intanon, Chiangmai contained relatively high level of (+)-usnic acid, 4.31% of dry weight and the sample from Pu luang, Loei contained lower level at 3.43% of dry weight. Antibacterial activities of usnic acid was evaluated against the microorganisms which are suspected to be the cause of intestinal troubles such as diarrhoea, dysentery, typhoid fever and infectious skin diseases. The results showed that usnic acid had antibacterial activity against gram-positive bacteria. Apparently, this is the first report on the study of the constituents of *Usnea siamensis* Wainio with respect to the isolation of the three compounds, the quantitative analysis of usnic acid and the evaluation of the antibacterial activity of the isolated compound.

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา..... เภสัชเวท.....

สาขาวิชา..... เภสัชเวท.....

ปีการศึกษา..... 2536.....

ลายมือชื่อนิสิต..... นิสิต คำแทน.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... นิสิต คำแทน.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... นิสิต คำแทน.....



## ACKNOWLEDGEMENT

The author wishes to express her sincere gratitude to the following :

Associate Professor Nijsiri Ruangrunsi of the Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for his supervision of the research, keen interest, continual encouragement, and understanding during the course of practical work and presentation of the thesis.

Assistant Professor Wanchai De-Eknamkul of the Department of Pharmacognosy and Lecturer Mali Wirotasangthong of the Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for their co-supervision, encouragements, helpful guidance, ideas, keen interest, and kindness during the research.

Dr. Kittisak Likhitwitayawuid and Dr. Khanit Suwanborirux of the Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for their helpful guidance on the identification of the isolated compounds.

Assistant Professor Thatree Phadungcharoen of the Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for her kindness and keen interest during the present work.

Associate Professor Chaiyo Chaichantipyuth, Head of the Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for his kindness to accept her to study in the Department of Pharmacognosy.

Associate Professor Vimolmas Lipipun, Head of the Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for her kindly permission to use the facilities for antibacterial activities screening.

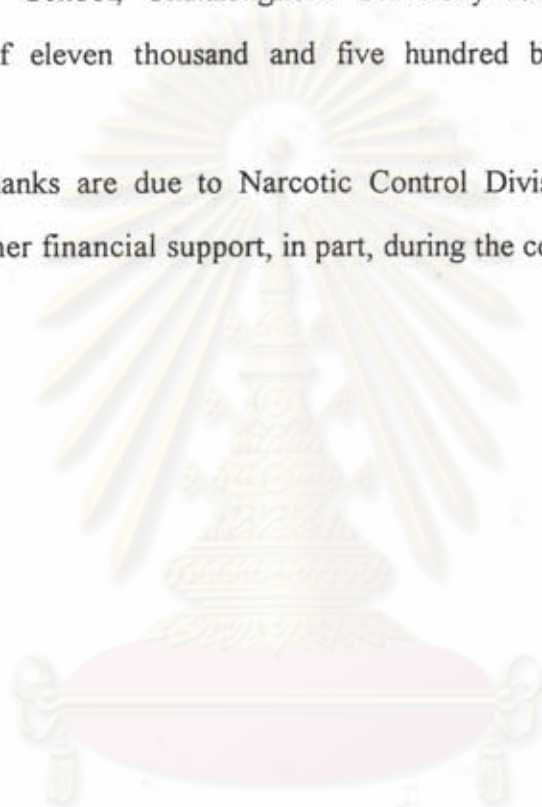
Dr. Amorn Petsom of the Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Chulalongkorn University for his kindly support in the 200 MHz and MS experiment.

All staff members of the Department of Pharmacognosy and of the Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for their kindness and valuable helps.

Her parents for their love, understanding, and continual encouragement.

Graduate School, Chulalongkorn University for granting her partial financial support (of eleven thousand and five hundred baht) to conduct this investigation.

Finally, thanks are due to Narcotic Control Division, Food and Drug Administration for her financial support, in part, during the course of this study.



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## CONTENTS

	page
ABSTRACT (THAI).....	iv
ABSTRACT (ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	viii
LIST OF FIGURES.....	xii
LIST OF SCHEMES.....	xiv
LIST OF TABLES.....	xv
ABBREVIATION.....	xvii
CHAPTERS	
I INTRODUCTION.....	1
II HISTORICAL.....	8
1. Usnic acid.....	33
1.1 Chemistry.....	33
1.2 Biological activities.....	34
1.2.1 Antibacterial activities.....	34
1.2.2 Effecton respiration.....	34
1.2.3 Tumor inhibition.....	35
1.2.4 Antituberculous activities.....	35
1.3 Biogenesis of usnic acid.....	36
1.4 Optical, crystallographic and x-ray diffraction data.....	38
1.4.1 Optical and crystallographic properties.....	38
1.4.2 X-ray diffraction analysis.....	39
1.5 Structure elucidation of usnic acid.....	40



1.5.1	Mass spectrum.....	40
1.5.2	Infrared spectrum.....	41
1.5.3	Nuclear magnetic resonance spectra.....	42
1.5.3.1	The PMR spectrum.....	42
1.5.3.2	The Carbon-13 NMR spectrum.....	43
1.6	Pharmacokinetic of usnic acid.....	45
1.7	Toxicology.....	46
1.7.1	Hypersensitivity.....	46
1.7.2	Antifeedant activity.....	46
2.	Depsidides.....	47
2.1	History.....	47
2.2	Chemistry.....	48
2.3	Chemical degradation.....	49
2.3.1	Hydrolyzation.....	49
2.3.2	Thermal degradation.....	51
2.4	Biosynthesis.....	53
2.5	Synthesis.....	54
3.	Depsidones.....	56
3.1	History.....	56
3.2	Chemistry.....	57
3.3	Chemical degradation.....	57
3.3.1	Hydrolyzation.....	57
III	EXPERIMENTAL.....	68
Part I	: Phytochemical study.....	68
1.	Source of plant material.....	68
2.	General technique.....	68
2.1	Thin layer chromatography.....	68

2.2	Column chromatography.....	70
2.3	Physical content.....	71
2.4	Spectroscopy.....	71
3.	The extraction and isolation of compounds.....	72
3.1	Extraction.....	72
3.2	Isolation and purification.....	73
4.	Identification of the isolated compounds.....	75
4.1	Identification of US-1 as usnic acid.....	75
4.2	Identification of US-2 as atranorin.....	79
4.3	Identification of US-3 as isomeric form of stictic acid.....	83
Part II :	Quantitative analysis.....	88
	Experimental.....	88
1.	Plant material.....	88
2.	General technique.....	88
2.1	Reagents and standards.....	88
2.2	Preparation of standard solutions.....	89
2.3	Sample preparation.....	89
2.4	Thin layer chromatographic conditions for usnic acid.....	89
2.5	Densitometric analysis.....	90
Results.....		91
1.	Optimization of TLC-densitometric condition for usnic acid determination.....	91
1.1	Extraction condition for pure usnic acid.....	91
1.2	Development of TLC solvent system.....	91
1.3	Identification of usnic acid by spectroscopy.....	92
1.4	TLC-densitometric determination of usnic acid.....	92

1.5 Calibration curve.....	92
1.6 Sample preparation.....	93
1.7 Usnic acid content in <i>Usnea siamensis</i> Wainio.....	93
Part III : Antibacterial activity of usnic acid.....	98
Experimental.....	98
1. Test medium.....	98
2. Preparation of samples.....	99
3. Preparation of the inoculum.....	99
4. Preparation of test plates.....	101
5. Inoculations of agar plates.....	101
6. Application of cups.....	102
Results.....	102
IV DISCUSSION.....	108
V CONCLUSION.....	119
REFERENCES.....	121
APPENDIX.....	134
VITA.....	155

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## LIST OF FIGURES

Figure		page
1	<i>Usnea siamensis</i> Wainio.....	7
2	Biogenesis of usnic acid.....	37
3	Optic orientation of usnic acid.....	38
4	<sup>13</sup> C-NMR chemical shift assignment of usnic acid.....	45
5	Hydrolyzation of evernic acid.....	49
6	Hydrolyzation of barbatinic acid.....	50
7	Hydrolyzation of atranorin.....	51
8	Thermal degradation of depsides.....	52
9	Biogenesis of depsides.....	54
10	Synthesis of depsides.....	55
11	Alcoholysis of depsidones.....	60
12	Thin layer chromatogram of US-1.....	134
13	Thin layer chromatogram of US-2.....	135
14	Thin layer chromatogram of US-3.....	136
15	UV absorption spectrum of US-1 in MeOH.....	137
16	IR absorption spectrum of US-1 in KBr.....	138
17	Mass spectrum of US-1.....	139
18	<sup>1</sup> H-NMR spectrum of US-1 in CDCl <sub>3</sub> .....	140
19	<sup>13</sup> C-NMR spectrum of US-1 in CDCl <sub>3</sub> .....	141
20	<sup>13</sup> C-NMR spectrum of US-1 (DEPT 135) in CDCl <sub>3</sub> .....	142
21	UV absorption spectrum of US-2 in MeOH.....	143
22	IR absorption spectrum of US-2 in Nujol.....	144
23	Mass spectrum of US-2.....	145
24	<sup>1</sup> H-NMR spectrum of US-2 in CDCl <sub>3</sub> .....	146

Figure	page
25	$^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of US-2 in $\text{CDCl}_3$ .....149
26	UV absorption spectrum of US-3 in MeOH.....150
27	IR absorption spectrum of US-3 in Nujol.....151
28	Mass spectrum of US-3.....152
29	$^1\text{H}$ -NMR spectrum of US-3 in $\text{DMSO-d}_6$ .....153
30	$^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of US-3 in $\text{DMSO-d}_6$ .....154
31	The calibration curve of standard usnic acid.....96
32	UV-absorption spectra of usnic acid.....97
33	TLC-densitometric chromatogram of usnic acid using optimization condition.....97
34	Activities of usnic acid against MRSA.....105
35	Activities of usnic acid against <i>Sarcina lutea</i> ATCC 10240.....105
36	Activities of usnic acid against coagulase negative staphylococcus oxacillin resistant strain from CU students.....106
37	Activities of usnic acid against coagulase negative staphylococcus oxacillin resistant strain from patients.....106
38	Activities of usnic acid against <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....107

## LIST OF SCHEMES

Scheme		page
1	The fragmentation of mass spectrum of usnic acid.....	41
2	The fragmentation of mass spectrum of US-2.....	111
3	The fragmentation of mass spectrum of US-3.....	114



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## LIST OF TABLES

Table		page
1	Chemical investigation of <i>Usnea</i> spp.....	8
2	Optical properties of usnic acid.....	39
3	X-ray diffraction results for usnic acid.....	40
4	<sup>1</sup> H-NMR of usnic acid ( $\delta$ -value).....	42
5	<sup>13</sup> C-NMR chemical shift assignments in CDCl <sub>3</sub> relative to TMS.....	44
6	Depsides found in Usneaceae.....	48
7	Depsidones found in Usneaceae.....	59
8	<sup>1</sup> H-NMR spectrum of US-1.....	77
9	<sup>13</sup> C-NMR spectrum of US-1.....	78
10	<sup>1</sup> H-NMR spectrum of US-2.....	81
11	<sup>13</sup> C-NMR spectrum of US-2.....	82
12	<sup>1</sup> H-NMR spectrum of US-3.....	85
13	<sup>13</sup> C-NMR spectrum of US-3.....	86
14	The effect of various solvent systems on the hRf values of usnic acid in the crude extracts of <i>Usnea siamensis</i> Wainio.....	94
15	The calibration curve of standard usnic acid.....	94
16	Comparison between soxhlet and reflux extractions using benzene on the extractable usnic acid content in <i>Usnea siamensis</i> Wainio .....	95
17	Effect of some organic solvents on the extractable usnic acid from <i>Usnea siamensis</i> Wainiounder reflux 60-70°C, one hour.....	95
18	Usnic acid contents in <i>Usnea siamensis</i> Wainio obtained from Doi-Intanon and Pu luang.....	95

Table

page

19	Antibacterial activities of usnic acid.....	103
----	---	-----



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## ABBREVIATION

$^{\circ}\text{A}$	=	Angstrom
C	=	Degree celcius
calcd.	=	Calculated
$\text{CDCl}_3$	=	Deuteriochloroform
$^{13}\text{C-NMR}$	=	Carbon-13 nuclear magnetic resonance
cm	=	Centimeter
CU	=	Chulalongkorn University
DEPT	=	Distortionless enhancement by polarization transfer
$\text{DMSO-d}_6$	=	Dimethylsulfoxide- $\text{d}_6$
EI	=	Electron impact
gm	=	Gram
$^1\text{H-NMR}$	=	Proton nuclear magnetic resonance
IR	=	Infrared
KBr	=	Potassium bromide
kg	=	Kilogram
L	=	Litre
m	=	Metre
$\text{M}^+$	=	Molecular ion
$m/z$	=	Mass to charge ratio
MeOH	=	Methanol
mg	=	Milligram
MHz	=	Mega hertz
MIC	=	Minimal inhibitory concentration
ml	=	Millilitre

mm	= Millimetre
m.p.	= Melting point
nm	= Nanometer
obs.	= Observed
s	= Singlet (for NMR spectra)
TLC	= Thin layer chromatography
UV	= Ultraviolet



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย