

ถกชี้การตำแน็ชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคระบบทางเดินหายใจของสาร  
สกัดจากหัวของต้นว่านหอมแดงและสมุนไพรไทยบางชนิด



เรืออากาศเอกหญิงเรวดี ใจวัฒนาสวัสดิ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชา จุลชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2534

ISBN 974-578-474-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

017588

**ANTIBACTERIAL ACTIVITY ON RESPIRATORY TRACT INFECTION  
OF *Eleutherine palmifolia* BULB AND SOME  
THAI MEDICINAL PLANT EXTRACTS**

**Flt. Lt. REWADEE JHAIWATTANASWAT**

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Pharmacy**

**Department of Microbiology**

**Graduate School**

**Chulalongkorn University**

**1991**

**ISBN 974-578-474-5**



Thesis Title      Antibacterial Activity on Respiratory Tract  
                         Infection of *Eleutherine palmifolia* Bulb  
                         and Some Thai Medicinal Plant Extracts

By                      Flt. Lt. Rewadee Jhaiwattanaswat

Department        Microbiology

Thesis Advisor    Assistant Professor Areerat Laorpaksa, M.Sc. in Pharm.  
                         Associate Professor Surattana Amnuoypol, M.Sc. in Pharm.

---

Accepted by the Graduate 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

*Saree Virunhaphol*  
.....Chairman  
(Associate Professor Saree Virunhaphol, M.Sc. in Pharm.)

*Areerat Laorpaksa*  
.....Thesis Advisor  
(Assistant Professor Areerat Laorpaksa, M.Sc. in Pharm.)

*S. Amnuoypol*  
.....Thesis Co-advisor  
(Associate Professor Surattana Amnuoypol, M.Sc. in Pharm.)

*Pintip Ponpech*  
.....Member  
(Assistant Professor Pintip Ponpech, Ph. D.)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

เรวัต ใจวัฒนาสวัสดิ์ , ร.อ.หญิง : ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรกระบบทางเดินหายใจของสารสกัด จากหัวของต้นว่านหอมแดงและสมุนไพรไทยบางชนิด (ANTIBACTERIAL ACTIVITY ON RESPIRATORY TRACT INFECTION OF *Eleutherine palmifolia* BULB AND SOME THAI MEDICINAL PLANT EXTRACTS) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.อารีรัตน์ ลออภักษา , อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.สุรัตนา อำนวยผล , 128 หน้า. ISBN 974-578-474-5

พืชสมุนไพรไทย 11 ชนิด นำมาสกัดด้วย 95% เอทานอล และทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pyogenes* A 6/49, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 พบว่า สารสกัดส่วนใหญ่ให้ผลดีในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและมีเพียงส่วนน้อยที่สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ นำพืชสมุนไพรที่คัดเลือกมา 7 ตัวอย่างสกัดด้วยสารละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ ดังนี้ ปีโตรเลียม อีเธอร์ , คลอโรฟอร์ม และ เอทานอล ทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อ พบว่า สารสกัดด้วยปีโตรเลียม อีเธอร์ของหัวต้นว่านหอมแดง (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr.) ให้ค่าความเข้มข้นที่ใช้ต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

การแยกสารบริสุทธิ์จากหัวต้นว่านหอมแดงที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดด้วยปีโตรเลียม อีเธอร์ ใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีและพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารโดยใช้ข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีพบสารใหม่ที่ไม่เคยพบในพืชชนิดใดมาก่อน เป็นผลึกรูปเข็มสี่เหลี่ยม มีโครงสร้างเป็นอนุพันธ์ของ 1,4-naphthoquinone

เมื่อทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถต้านการเจริญต่อเชื้อ *S. aureus* และ *S. pyogenes* ของสารบริสุทธิ์ พบว่า มีค่าเท่ากับ 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 60 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ขณะที่ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถต้านการเจริญเชื้อได้ 90% ของสารบริสุทธิ์นี้ต่อเชื้อ *S. aureus* และ *S. pyogenes* เท่ากับ 29.2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 39.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ



ภาควิชา ..... จุลชีววิทยา  
สาขาวิชา .....  
ปีการศึกษา ..... 2533

ลายมือชื่อนิสิต .....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....  
๒ ๒

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมเพียงแผ่นเดียว

REWADEE JHAIWATTANASWAT , Flt.Lt. : ANTIBACTERIAL ACTIVITY ON  
RESPIRATORY TRACT INFECTION OF *Eleutherine palmifolia* BULB AND SOME  
THAI MEDICINAL PLANT EXTRACTS. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. AREERAT  
LAORPAKSA , M. Sc. in Pharm., THESIS CO-ADVISOR : ASSO. PROF.  
SURATTANA AMNOUYPOL , M. Sc. in Pharm., 128 PP., ISBN 974-578-474-5

Eleven Thai medicinal plants extracted with 95% ethanol were tested for antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pyogenes* A 6/49, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031. Most of the extracts showed good activity against gram positive bacteria and only a few of them showed activity against gram negative bacteria. Seven plant extracts were selected and extracted with petroleum ether, chloroform and ethanol. The residues were tested for antibacterial activity. *Eleutherine palmifolia* (L.) Merr. bulb with petroleum ether extraction provided the antibacterial activity with the lowest concentration.

*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr. with petroleum ether extraction was isolated by column chromatography technique for antibacterial substance and was identified by spectroscopy. The new compound which had never been found in plant was yellow needle crystal. Its structure was 1,4-naphthoquinone derivative.

The minimal inhibitory concentration of the pure compound against *S. aureus* and *S. pyogenes* were 40 µg/ml and 60 µg/ml. However, the MIC<sub>90</sub> of this compound against *S. aureus* and *S. pyogenes* were 29.2 µg/ml and 39.0 µg/ml, respectively.

ภาควิชา ..... จุลชีววิทยา  
สาขาวิชา .....  
ปีการศึกษา ..... 2533

ลายมือชื่อนิสิต .....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ..... Areerat Laopaksa

## Acknowledgements



vi

The author wishes to express her deepest appreciation and grateful thanks to her advisor, Assistant Professor. Areerat Laorpaksa of the Department of Microbiology, and her co-advisor, Associate Professor Surattana Amnouypol of the Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for their excellent instruction, encouragement and guidance throughout the course of this work.

The author also wishes to express her sincere thanks to Associate Professor Saree Virunhaphol, the former Head of the Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for her very useful suggestion and encouragement and her thanks are also to the staff members of the Department of Microbiology and Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for their kindness and helps.

Thanks are extended to the Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn Hospital and the Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Siriraj Hospital for providing her the organisms and their helpful suggestion.

The author is indebted to Royal Thai Air Force for providing a grant to enable her to undertake the work at Chulalongkorn University. Her grateful thanks are also express to the Graduate School, Chulalongkorn University for granting her partial financial support (nine thousand and four hundred baht) to conduct this study.


Finally, the author would like to thanks to her parents for their love and understanding and to all of those help her making this study a reality.



## Contents

	Page
Abstract (Thai).....	iv
Abstract (English).....	v
Acknowledgements.....	vi
Contents.....	vii
List of Tables.....	ix
List of Figures.....	xi
Abbreviations.....	xii
Chapter	
I Introduction.....	1
II Review of Literature.....	3
Antibiotics from higher plants.....	3
<i>Eleutherine palmifolia</i> (L.) Merr.....	19
Activities of naturally occurring naphthoquinones.....	26
III Materials and Methods.....	41
Preliminary screening for antibacterial activity of some Thai medicinal plants	41
Extraction Procedure.....	46
Determination and isolation of antibacterial substances.....	47
Laboratory evaluation of antibacterial activity of EP <sub>2</sub> to isolated pathogenic organism from patients.....	54
IV Results.....	60
Preliminary screening for antimicrobial activity of some Thai medicinal plants	60
Antibacterial activities of the plant extracts.....	62

	Page
Determination and isolation of antibacterial substances.....	67
Laboratory evaluation of antibacterial activity of EP <sub>2</sub> .....	71
V Discussion.....	82
VI Conclusion.....	89
References.....	91
Appendix.....	102
Vita.....	115



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## List of Tables

Table		Page
1	Antimicrobial activity from higher plants..	4
2	Antibacterial and antifungal activities of plumbagin.....	29
3	<i>In vitro</i> Cytotoxicity of diospyrin towards E.A.C. cells ( $1 \times 10^5$ cells/ml).....	36
4	Cytotoxicity in the KB cell culture assay of Psychorubrin and related naphthoquinone derivatives.....	37
5	Structure and activity of naphthoquinones..	40
6	Plant materials and their parts used.....	42
7	Informations of <i>Eleutherine palmifolia</i> (L.) Merr. extract column chromatographic isolation	52
8	Informations of Fraction C column chromatographic isolation.....	53
9	Informations of Fraction E column chromatographic isolation.....	53
10	Zone diameter interpretative standards.....	56
11	Antimicrobial activities of plant extracts.	61
12	Weight of crude extracts.....	62
13	Antibacterial activities of plant extracts with different solvents.....	63
14	The inhibitory concentrations of <i>Eleutherine palmifolia</i> (L.) Merr. and <i>Stephania glabra</i> (Roxb.) Miers.....	66
15	Location of antibacterial substances of <i>Eleutherine palmifolia</i> (L.) Merr. on TLC...	67
16	Antimicrobial susceptibility patterns against <i>Staphylococcus aureus</i> .....	72

## Table

## Page

17	Antimicrobial susceptibility patterns against <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	75
18	Cumulative percentage of <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Streptococcus pyogenes</i> to MIC (ug/ml) of EP <sub>2</sub> .....	78
19	The overall geometric and range of MIC <sub>s</sub> of EP <sub>2</sub> against <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	81
20	The antimicrobial susceptibility against <i>staphylococcus aureus</i> and <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	86

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## List of Figures

Figure		Page
I	<i>Eleutherine palmifolia</i> (L.) Merr. (ว่านหอมแดง), Iridaceae.....	21
II	Chemical constituents isolated from <i>Eleutherine palmifolia</i> (L.) Merr. bulb.....	23
III	Two possible structures of EP <sub>2</sub> .....	70
IV	The activity of EP <sub>2</sub> against <i>Staphylococcus aureus</i> .....	79
V	The activity of EP <sub>2</sub> against <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	80
VI	Mass fragmentation pattern of EP <sub>2</sub> .....	84
1	Yellow needle crystal of EP <sub>2</sub> .....	103
2	Thin layer chromatogram on pre-coated aluminium sheet of <i>Eleutherine palmifolia</i> (L.) Merr. petroleum ether extract.....	104
3	Thin layer chromatogram of EP <sub>2</sub> .....	105
4	Thin layer chromatogram of EP <sub>2</sub> .....	106
5	Thin layer chromatogram of EP <sub>2</sub> .....	107
6	Thin layer chromatogram of EP <sub>2</sub> .....	108
7	Thin layer chromatogram of EP <sub>2</sub> .....	109
8	Ultraviolet absorption spectrum of EP <sub>2</sub> (ethanol as solvent).....	110
9	Ultraviolet absorption spectrum of EP <sub>2</sub> (methanol as solvent).....	111
10	Infrared absorption spectrum of EP <sub>2</sub> (KBr disc)	112
11	Proton nuclear magnetic resonance spectrum of EP <sub>2</sub> (TMS as internal reference).....	113
12	Mass spectrum of EP <sub>2</sub> .....	114

### Abbreviations

A.R.	=	analytical reagent
body wt	=	body weight
°C	=	degree celsius
cm	=	centrimeter
cont.	=	continuous
d	=	doublet
dd	=	doublet of doublet
ddd	=	doublet of doublet of doublet
ED <sub>50</sub>	=	Effective dose which inhibits cell growth to 50% of the control growth
fig	=	figure
g	=	gram
hr	=	hour
IR	=	Infrared
ip	=	intraperitoneal
iv	=	intravenous
KB cell	=	human epidermoid carcinoma of the nasopharynx
kg	=	kilogram
L	=	Liter
u	=	micron
ug	=	microgram
ul	=	microliter
m	=	multiplet
mamp	=	milliampere
mg	=	milligram
M <sup>+</sup>	=	Molecular ion
MFC	=	Minimal Fungicidal Concentration
MIC	=	Minimal Inhibitory Concentration
min	=	minute
ml	=	milliliter

mm	=	millimeter
nm	=	nanometer
NMR	=	Nuclear Magnetic Resonance
p	=	page
pg	=	picogram
po	=	per oral
ppm	=	part per million
q	=	quartet
$R_f$	=	Ratio of movement of the band to the front of the solvent
sc	=	subcutaneous
sec	=	second
sh.	=	shoulder
t	=	triplet
TLC	=	Thin Layer Chromatography
UV	=	Ultraviolet

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย