รหัสโครงการ SUT 1-102-48-24-07

รายงานการวิจัย

การสกัดและพิสูจน์เอกลักษณ์สาร Galangin จากข่าไทย (*Alpinia spp.*)

The extraction and identification of Galanga from (*Alpinia spp.*)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT 1-102-48-24-07

รายงานการวิจัย

การสกัดและพิสูจน์เอกลักษณ์สาร Galangin จากข่าไทย (*Alpinia spp.*)
The extraction and identification of Galanga from (*Alpinia spp.*)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.สันติ ศักดารัตน์

สาขาวิชาเคมี

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ช่วยวิจัย

น.ส. ณัฐฐาพร สามารถ

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2548-2549

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กันยายน 2553

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2548 - 2549 หัวหน้าโครงการและผู้ร่วมวิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

ขอขอบคุณ ผศ.ดร. เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ สาขาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ได้ช่วยทดสอบฤทธิ์ Antibacterial activity and action of galangin

ขอขอบคุณ รศ.ดร. แจ่มใส เพียรทอง รศ. ทิพยา เอกลักษณานันท์ และ น.ส. ศศิธร ธงชัย สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ คณะ แพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้ช่วยทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ Herpes Simplex Virus (HSV) ของสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบจากข่าเล็ก

นางสาว ณัฐฐาพร สามารถ นักศึกษาระดับมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ ที่ช่วยดำเนินการวิจัยเกี่ยวกับสมุนไพรข่าไทย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

ข่าเล็กเป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae จัดเป็นพืชสมุนไพรไทยที่รู้จักและนำมาใช้ประโยชน์กันอย่างแพร่หลาย มีสรรพคุณด้านเชื้อแบคทีเรีย รักษาแผลพุพอง มีหนอง นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติเป็นยาฆ่าแมลงต่างๆ และเมื่อนำส่วนสกัดคลอโรฟอร์มของเหง้าจากข่าเล็ก มาแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว สามารถแยกสารประกอบได้ 3 ชนิดสารเหล่านี้ได้แก่ 3,5,7-trihydroxy flavone (galangin), 3,5,7-trihydroxy-4'-methoxy flavone (kaempferide) และ 5,7-dihydroxy-4'-methoxy-3-O-β-D-glucopyranoside flavone (kaempferide-3-O-β-D-glucoside), ที่บริสุทธิ์ โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ทั้ง 3 ชนิดนี้พิสูจน์ทราบโดยการใช้ข้อมูลทางสเปคโทสโคปีจาก UV, IR, MS, ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR, สารเหล่านี้ไม่เคยพบในพืชชนิดนี้มาก่อน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ABSTRACT

***Alpinia officinarum* Hance,** a Thai medicinal plant of family Zingiberaceae, is well-known plant used in Thai traditional medicine as an antibacterial and antiulcer. Moreover it has insecticidal properties. The chloroform crude extract of the rhizomes of smaller galanga (Alpinia officinarum Hance) was purified by column chromatography and preparative thin-layer chromatography to give three pure compounds. Structural elucidation of the isolated compounds was carried out on the basis of spectral analyses, including UV, IR, MS, ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR, as well as comparison with reported values. Two of these were identified as flavonol of flavonoids. They were 3,5,7-trihydroxy flavone (galangin) and 3,5,7-trihydroxy-4'-methoxy flavone (kaempferide). The other was 5,7-dihydroxy-4'-methoxy-3-O-β-D-glucopyranoside flavone (kaempferide-3-O-β-D-glucoside), which had not been previously reported in this species.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	จ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการทำวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	7
ขอบเขตของการวิจัย	7
ระเบียบวิธีวิจัย	7
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	8
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	10
บทที่ 3 ผลการวิจัย	10
บทที่ 4 บทสรุป	10
บรรณานุกรม	10

ใช้ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการทั้งในประเทศและนานาชาติ 2 ผลงานคือ

Sakdarat S., Samart N.,2008. Chemical Constituents from the rhizome of Smaller Galanga *(Alpinia officinarum* Hance). The 3rd Sino-Thai International Conference on Traditional Medicine and Natural Health Products,Nanning,Guangxi,P.R. China 29-31 October 2008

Griangsak Eumkeb[illegible], SantiSakdarat[illegible], SupatchareeSiriwong, 2010. Reversing β lactam antibioticresistanceof Staphylococcus aureus with galangin from Alpinia officinarum Hance andsynergismwithceftazidime. Phytomedicine. 1-6

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1. แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารเคมีในกลุ่ม Flavonoids	4
รูปที่ 2 แสดงรูปเหง้า ใบ ผลและดอก ของข่าเล็ก	5
รูปที่ 3 แสดงรูปของข่าเล็ก	5
รูปที่ 4 แสดงรูปเหง้าของข่าใหญ่และข่าเล็ก	6
รูปที่ 5 แสดงรูปลำต้นและเหง้าของข่า	6
รูปที่ 6 แสดง UV-Vis spectrum ของสารตัวที่ 1	23
รูปที่ 7 แสดง IR spectrum ของสารตัวที่ 1	24
รูปที่ 8 แสดง ^{1}H-NMR spectrum ของสารตัวที่ 1	25
รูปที่ 9 แสดง ^{13}C-NMR spectrum ของสารตัวที่ 1	26
รูปที่ 10 แสดง Mass spectrum ของสารตัวที่ 1	27
รูปที่ 11 แสดง UV-Vis spectrum ของสารตัวที่ 2	28
รูปที่ 12 แสดง IR spectrum ของสารตัวที่ 2	29
รูปที่ 13 แสดง IR spectrum ของสารตัวที่ 3	30
รูปที่ 14 แสดง ^{1}H-NMR spectrum ของสารตัวที่ 2	31
รูปที่ 15 แสดง ^{13}C-NMR spectrum ของสารตัวที่ 2	32
รูปที่ 16 แสดง ^{1}H-NMR spectrum ของสารตัวที่ 3	33
รูปที่ 17 แสดง ^{13}C-NMR spectrum ของสารตัวที่ 3	34

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ข่าใหญ่ (*Alpinia galanga* (L) Willd) จัดเป็นพืชอยู่ในวงศ์ Zingberaceae มีชื่อภาษาอังกฤษคือ False galangal, Galangal, Greater galanga มีชื่ออื่นๆในภาษาไทยคือ ข่าหลวง เป็นพืชไม้ล้มลุก เหง้ามีข้อและปล้องชัดเจน ใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปใบหอก รูปวงรีหรือเกือบขอบขนาน ดอกช่อออกที่ยอด ผลเป็นผลแห้งแตกได้ รูปกลม ส่วนข่าเล็ก (*Alpinia officinarum* Hance) จัดเป็นพืชในวงศ์เดียวกัน มีชื่อภาษาอังกฤษคือ Galangal, Galangal minor, Lesser galangal, Rhizoma galanga เป็นพืชไม้ล้มลุกเนื้ออ่อน เป็นข่าชนิดเล็กทั้งใบ ต้นดอก หัว ต้นสูงประมาณ 1 ฟุตเศษเท่านั้น เหง้าของข่าใหญ่ (ข่าหลวง) และข่าเล็กนั้นมี volatile oil (0.5-1.0 %), resin ,galangol, kaempferide, galangin, alpinin และ starch เป็นต้น ใช้เหง้าและรากเป็นยาขับลม รักษาอาการจุกเสียด แน่นท้อง อาหารไม่ย่อย ปวดท้อง ท้องเสีย ข่าไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และไม่พบความเป็นพิษทั้งเฉียบพลันและเรื้อรัง แม้ในขนาด 250 เท่าของขนาดที่ใช้ในตำราไทย จึงจัดเป็นสมุนไพรที่ปลอดภัย (สมิตินันทน์, 2544; เต็มศิริ ฤกษ์กุลและคณะ,2544; Heo, Sohn and Au, 2001) จากปัญหาสำคัญเรื่องสถานการณ์การดื้อยาของเชื้อในโรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา เราพบว่า มีเชื้อที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม β-lactam antibiotics ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่มีการใช้เป็นมูลค่าหลายพันล้านบาทต่อปีในประเทศไทย ตัวอย่างของเชื้อที่ดื้อยาในโรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมาที่ทำการทดสอบความไวต่อยาในหน่วยจุลชีววิทยา กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิค ได้แก่ เชื้อ Methicillin resistant *Staphylococcus aureus (MRSA)* มีการดื้อยาในตึกผู้ป่วย ไอซียูศัลยกรรม (85%) ไอซียูเด็ก (65 %) Premature (88 %) และ Sepsis (74 %) เชื้อที่ดื้อต่อยา Ceftazidime ซึ่งเป็นยาที่มีราคาแพงมาก และเป็นยาใหม่ ในกลุ่ม Cephalosporin (Third generation) ที่พบได้แก่ Ceftazidime-resistant *Escherichia coli* (CREsC) มีอัตราการดื้อยาเกือบ 100% ในทุกตึกผู้ป่วย และเชื้อ Ceftazidime-resistant *Enterobacter cloacae* (CREnC) มีอัตราการดื้อยานี้ถึง 100 % ในหลายตึกผู้ป่วย (ร.พ. มหาราชนครราชสีมา, 2001) เชื้อเหล่านี้ก่อให้เกิดการติดเชื้อกับป่วยที่นอนในโรงพยาบาลในอัตราที่สูงและเป็นจำนวนมาก โดยจะพบได้ในเลือดและสิ่งคัดหลั่งจากผู้ป่วยเช่น เสมหะ, น้ำมูก, น้ำลาย, ปัสสาวะ และอุจจาระ เป็นต้น จากปัญหานี้เอง นับเป็นปัญหาสำคัญของจังหวัดนครราชสีมาและของประเทศ ที่ต้องสูญเสียเงินค่ารักษาพยาบาลไปกับการใช้ยาที่มีราคาแพงเหล่านี้ แต่ใช้ไม่ได้ผล เนื่องจากการดื้อยาของเชื้อ ทำให้คนไข้ต้องสูญเสียเงินเป็นจำนวนมาก

และอาจเป็นอันตรายถึงชีวิตจากการดื้อยาที่มากขึ้นของเชื้อเหล่านี้มาก ประเทศไทยของเราต้องสูญเสียเงินตรานำยาเหล่านี้เข้ามาจากต่างประเทศเป็นมูลค่าหลายพันล้านบาทต่อปี

เพื่อที่จะหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถมาทดแทนยาในกลุ่ม β-lactam antibiotics ที่เชื้อเกิดการดื้อยาขึ้นแล้ว หรือใช้เพื่อเสริมฤทธิ์กับยาในกลุ่มนี้แล้วทำให้เชื้อไม่ดื้อต่อยาในกลุ่มนี้ จากการทำวิจัยเบื้องต้น พบว่า สารสกัดจากสมุนไพรไทย ได้แก่ พืชตระกูลข่า [*Alpinia galanga* (L) Willd, *Alpinia nigra* (Gaertn) Burtt.และ *Alpinia officinarum* Hance.] ซึ่งสามารถนำมาสกัดเอาสารกลุ่ม Flavonoids ได้แก่ Galagin สามารถมีฤทธิ์เสริมกับยาบางตัวในกลุ่ม β-lactam antibiotics เพื่อยับยั้งเชื้อที่ดื้อต่อยาในกลุ่มนี้ เช่น MRSA ได้ในเบื้องต้น (Eumkeb and Richards, 2003)

ดังนั้นในการค้นหายาตัวใหม่จากสมุนไพรไทย เพื่อนำมาทดแทนยาในกลุ่ม β-lactam หรือใช้เพื่อเสริมฤทธิ์กับยาในกลุ่มนี้ เพื่อให้ยาในกลุ่มนี้สามารถใช้ได้กับเชื้อเหล่านี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเชื้อเกิดการดื้อยาขึ้นแล้วในจังหวัดนครราชสีมา และยังเป็นปัญหาการดื้อยาทั้งในระดับประเทศและระดับนานาชาติ ซึ่งมีข้อมูลว่า เชื้อในกลุ่ม *Staphylococcus aureus.* มากกว่า 90% เกิดการดื้อยาในกลุ่ม β - lactam antibiotics ขึ้นแล้ว

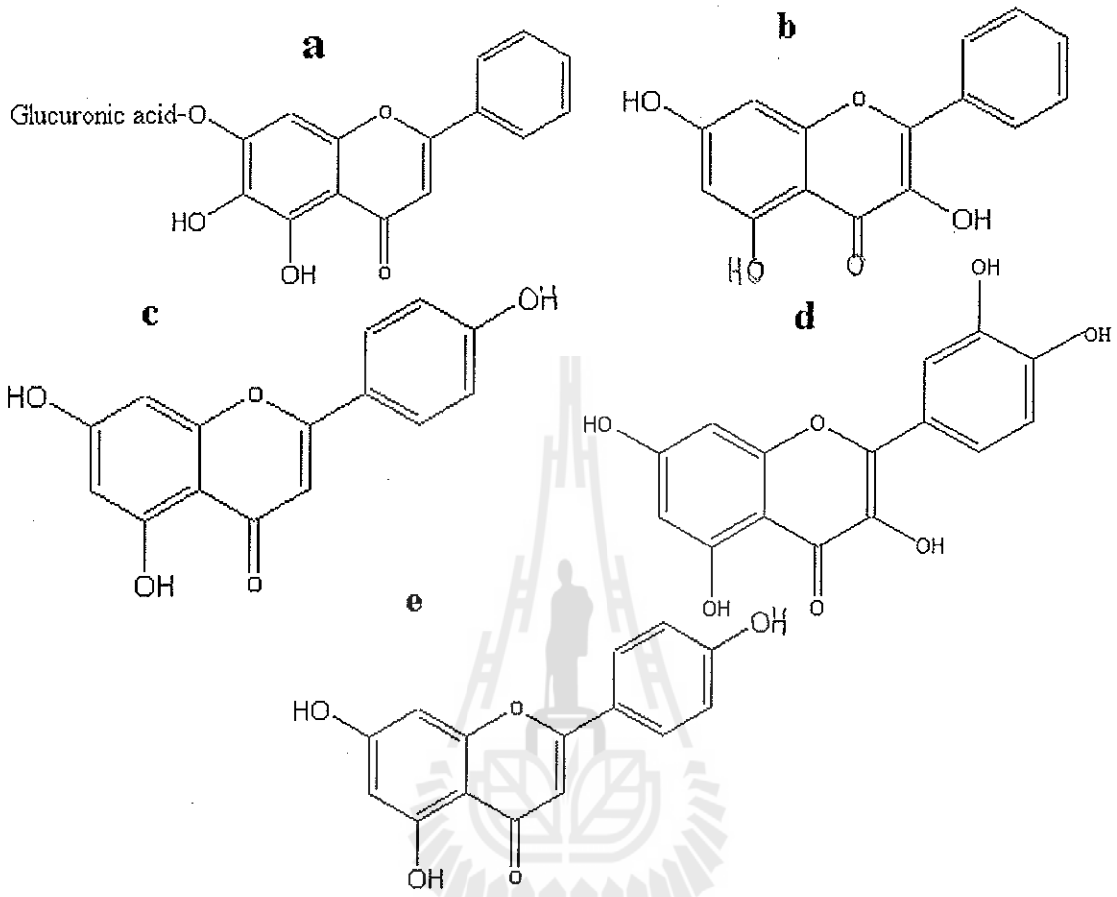
โครงการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ "เคมีทางยา" โดยการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารกลุ่ม Flavonoids ซึ่งสามารถสกัดได้จากพืชสมุนไพรไทยตระกูลข่าและพืชสมุนไพรไทยอื่นๆอีกหลายชนิดดังกล่าวข้างต้น ต่อเชื้อที่ดื้อยาในกลุ่ม β - lactam antibiotics. ซึ่งเป็นปัญหาของทั้งจังหวัดนครราชสีมา ของประเทศไทย และของโลกดังกล่าว เพื่อจะได้ทราบว่าสารกลุ่ม Flavonoids เหล่านี้มีฤทธิ์ต่อเชื้อที่ดื้อต่อยาในกลุ่มβ - lactam antibiotics ในโรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมาหรือไม่เมื่อใช้เดี่ยวๆและผสมกับยาอื่นๆดังกล่าว เพื่อดูการเสริมฤทธิ์กับยาในกลุ่มนี้ โดยข้อเสนอโครงการเช่นนี้ไม่มีผู้ใดทำมาก่อนในประเทศไทยโดยสารสกัดจากพืชสมุนไพรตระกูลข่าและพืชสมุนไพรที่ให้สารในกลุ่ม Flavonoids ดังกล่าวไม่น่าจะเป็นพิษต่อร่างกาย โดยเฉพาะข่าเป็นพืชที่มนุษย์ใช้บริโภคเป็นอาหารในชีวิตประจำวันอยู่แล้ว และเพื่อให้ประเทศไทยสามารถผลิตยาใหม่ๆหรือยาสูตรผสมใหม่ๆได้และเป็นยาที่สามารถส่งออกต่างประเทศได้ในที่สุด ได้มีผู้ทำการวิจัยโดยทำการสกัด Galangin จาก rhizome ของข่าเล็ก (*Alpenia officinarum* Hance) แล้วพบว่าสามารถยับยั้ง enzyme fatty-acid synthase ได้ (Li and Tian, 2003). นอกจากนั้น Luo *et al.*, (1998) ได้ทำการสกัด Galangin จากข่าเล็ก (*Alpenia officinarum* Hance) อย่างไรก็ตามยังไม่มีผู้ใดที่หาวิธีการสกัด Galangin จากข่าชนิด *Alpinia galanga* (L) Willd หรือข่าเล็ก (*Alpenia officinarum* Hance) ในเมืองไทยและยังไม่มีนักวิจัยผู้ใดทำการทดลอง การทดสอบฤทธิ์ของสารเคมีในกลุ่ม Flavonoids ได้แก่ Galangin, Baicalin, Apigenin, Luteolin และ Quercetin ต่อเชื้อที่ดื้อยาในกลุ่ม β-lactam antibiotics ซึ่งได้แก่

เชื้อ MRSA และ Ceftazidine - resistant *Enterobacter cloacae* (CREnC) ซึ่งมีอัตราการดื้อยาในหลายๆตึกผู้ป่วยที่โรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา ในอัตราที่สูงมากดังกล่าวข้างต้น

นอกจากนั้น การดื้อยาของเชื้อเหล่านี้ยังเป็นปัญหาระดับประเทศและระดับนานาชาติด้วย (Mulligan et al , 1993) จากปัญหาเหล่านี้ผู้วิจัยจึงได้สนใจที่จะทำการวิจัยว่า Galangin, Baicalin, Apigenin, Luteolin และ Quercetin มีฤทธิ์ที่จะยับยั้งเชื้อที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม β-lactam antibiotics. เมื่อใช้เดี่ยวๆและใช้ผสมกับยาในกลุ่มนี้หรือไม่ เพื่อนำมาเป็นข้อมูลในการพัฒนาสู่อุตสาหกรรมยาในอนาคต ตลอดจนช่วยให้ประเทศไทยสามารถผลิตยาโดยใช้วัตถุดิบในประเทศได้อย่างครบวงจร จนสามารถส่งออกได้ในที่สุด

คณะผู้วิจัยจึงจะได้ทำการวิจัยหาวิธีการสกัดที่เหมาะสมสำหรับข่าในเมืองไทย ตลอดจนพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน สำหรับการทดสอบฤทธิ์ของ Galangin นั้นเนื่องจากการที่มีเชื้อที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม β - lactam antibiotics ที่โรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา และโรงพยาบาลอื่นๆ ทั่วโลกมากขึ้นทุกวัน เพื่อที่จะหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถมาทดแทนยาในกลุ่ม β - lactam antibiotics ที่เชื้อเกิดการดื้อยาขึ้นแล้ว หรือใช้เพื่อเสริมฤทธิ์กับยาในกลุ่มนี้แล้วทำให้เชื้อไม่ดื้อต่อยาในกลุ่มนี้ ได้มีงานวิจัยบางชิ้นพบว่า Baicalin ซึ่งเป็นสารสกัดในกลุ่ม Flavonoids จากพืชสมุนไพรที่รับประทานได้ชื่อ *Scutellaria amoena* C. H. Wright สามารถ ออกฤทธิ์เสริมกับยาในกลุ่ม β - lactam antibiotics เพื่อต่อต้านเชื้อในกลุ่ม MRSA และ Penicillin-resistant *Staphylococcus aureus* บางตัวได้เป็นอย่างดี (Liu, Durham and Richards, 2000) และจากการทำวิจัยเบื้องต้น พบว่า Galagin สามารถมีฤทธิ์เสริมกับยาบางตัวในกลุ่ม β - lactam antibiotics เพื่อยับยั้งเชื้อที่ดื้อต่อยาในกลุ่มนี้ เช่น MRSA ได้ในเบื้องต้น (Eumkeb and Richards, 2003) ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะทำการทดสอบฤทธิ์ของ Galangin ต่อเชื้ออีกหลายชนิดที่ดื้อต่อยาบางตัวในกลุ่ม β - lactam antibiotics เพื่อจะได้นำสารตัวนี้มาใช้ปราบเชื้อที่ดื้อยาเหล่านี้ เพื่อเป็นการทดแทนยาที่มีราคาแพงและใช้ไม่ได้ผลแล้ว อย่างไรก็ตามมีผู้ทำวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ของ Galangin ในการเป็นสารป้องกันการเกิดมะเร็งจากสารเคมี (Heo *et al.*, 1996) แต่ยังไม่มีผู้ใดทำการวิจัยถึงพิษของ Galangin ที่มีต่อระบบต่างๆของสัตว์ทดลอง คณะผู้วิจัยจึงอยากทำการวิจัยว่าสารตัวนี้มีพิษต่อสัตว์ทดลองหรือไม่ เพื่อประกอบการพิจารณาในการจะพัฒนาเป็นยาต่อไปในอนาคต

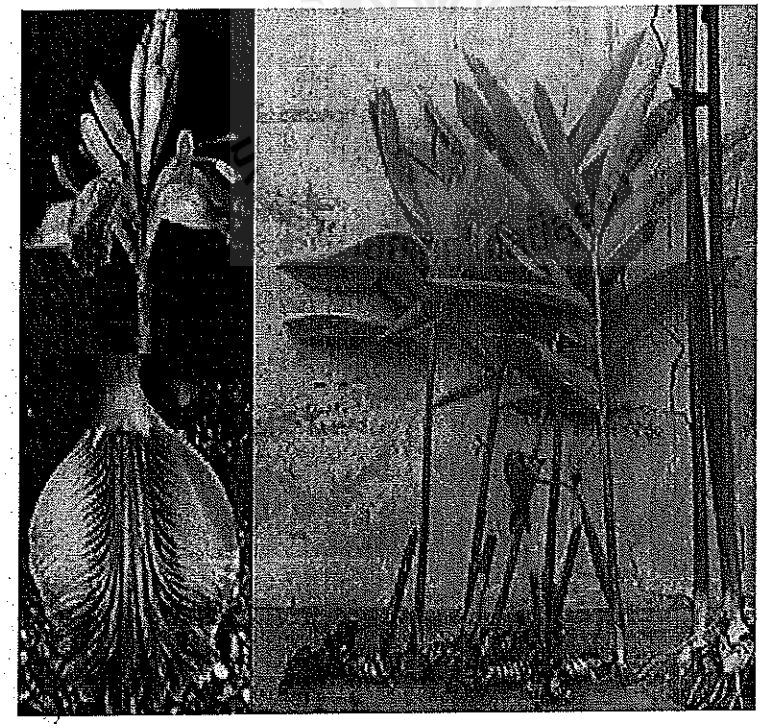
สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารเคมีในกลุ่ม Flavonoids ดังกล่าวได้แก่



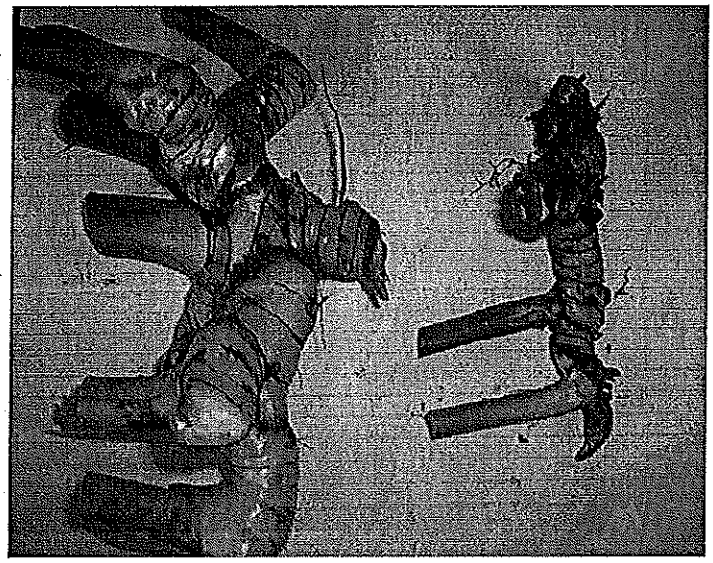
รูปที่ 1. แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารเคมีในกลุ่ม Flavonoids

a, baicalin ; b, galangin; c, apigenin; d, quercetin; e, luteolin

รูปที่2 แสดงรูปเหง้า ใบ ผลและดอก ของข่าเล็ก (Grieve, www, 1995-2008)



รูปที่3 แสดงรูปของข่าเล็ก



รูปที่4 แสดงรูปเหง้าของข่าใหญ่และข่าเล็ก

รูปที่5 แสดงรูปลำต้นและเหง้าของข่า

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อทดสอบหาวิธีการสกัดสาร Galangin จากข่า [*Alpinia galanga* (L) Willd or *Alpinia officinarum* Hance.] ที่เหมาะสมและ การพิสูจน์เอกลักษณ์
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสาร Galangin ซึ่งสามารถสกัดจากสมุนไพรไทย (พืชตระกูลข่า) ต่อเชื้อที่ดื้อยาในกลุ่ม β-lactam antibiotics
3. เพื่อทดสอบหาการเสริมฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสารสกัดจากสมุนไพรไทย (พืชตระกูลข่า) ได้แก่ Galangin เมื่อให้ร่วมกับยาในกลุ่ม β-lactam antibiotics ต่อเชื้อที่ดื้อยาในกลุ่ม β- lactam antibiotics
4. เพื่อหากลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้นของสาร Galangin เมื่อให้เดี่ยวๆและให้ร่วมกับยาในกลุ่ม β-lactam antibiotics ต่อเชื้อที่ดื้อยาในกลุ่ม β-lactam antibiotics โดยวิธีการดู morphology ของเชื้อด้วย Transmission Electron Microscope (TEM).
5. เพื่อทดสอบความเป็นพิษของ Galangin ในสัตว์ทดลองว่าเป็นพิษต่อสัตว์ทดลองหรือไม่ เพื่อเป็นข้อมูลประกอบการพิจารณาในการที่จะนำสารนี้มาเป็นยา เพื่อใช้กับมนุษย์ต่อไป
6. เพื่อหาข้อมูลในการจะทำการวิจัยขั้นต่อไป ได้แก่ การทดลองในสัตว์ใหญ่ เช่น กระต่าย ลิงฯล., การทดลองในคน, การพัฒนาเป็นตำรับยา และการทำเป็นอุตสาหกรรมยาในที่สุด

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. การทดสอบหาวิธีการสกัดสาร Galangin จากข่า [*Alpinia galanga* (L) Willd or *Alpinia officinarum* Hance.] จะใช้ข่าที่สามารถหาได้ในเมืองไทย และ การพิสูจน์เอกลักษณ์ จะใช้เครื่องมือหลายชนิด ที่มีอยู่ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เช่น HPLC, LC/MS, GC, NMR เป็นต้น
2. การทดสอบฤทธิ์ของสาร Galangin จะใช้ Galangin ที่เป็นสารมาตราฐานจากบริษัท Indifine, USA ส่วนเชื้อที่ดื้อยายาในกลุ่ม β-lactam antibiotics จะได้มาจากโรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา
3. การทดสอบความเป็นพิษของ Galangin ในสัตว์ทดลอง จะทดสอบกับหนู (mice) ที่ทราบสายพันธุ์ที่ แน่นอน และได้มาจากสำนักงานสัตว์ทดลองแห่งชาติ

1.4 ระเบียบวิธีวิจัย

1. รวบรวมข้อมูลรายงานการวิจัย และเอกสารวิชาการที่เกี่ยวข้องต่าง ๆ และวางแผนการศึกษาวิจัย
2. เตรียมตัวอย่างวัตถุดิบสมุนไพรข่าใหญ่ ข่าเล็ก
3. ทำการสกัดสารประกอบที่มีอยู่ในข่าใหญ่ ข่าเล็ก ด้วยวิธีการสกัดแบบต่อเนื่องโดยใช้ตัวทำ

ละลายชนิด ต่าง ๆ

4. หลังจากทำการสกัดสารประกอบดังกล่าวแล้วนำมาตรวจเอกลักษณ์ของสารสกัดนั้นโดยวิธีทางเคมีเพื่อหาสารสำคัญ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่มีอยู่
5. นำสารสกัดหยาบที่จากข้อ 12.3 มาแยกทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีทาง Chromatography (TLC, HPLC และ Column Chromatography)
6. พิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ โดยอาศัยเทคนิคทาง spectroscopic methods (^{1}H-NMR, ^{13}C- NMR, 2D NMR, LC-MS) เพื่อบ่งชี้ว่าเป็นสารชนิดใด
7. นำสารบริสุทธิ์ที่ได้พิสูจน์ ทราบโครงสร้างแล้วมาใช้เป็นสารมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพวิเคราะห์ หาปริมาณสารและบ่งชี้ว่าเป็นสารชนิดใด ที่มีอยู่ในข่าชนิดต่าง ๆ ด้วยเครื่อง HPLC หรือ LC-MS
8. นำสารบริสุทธิ์ที่ได้พิสูจน์ ทราบโครงสร้างแล้วไปทดสอบผลทางเภสัชวิทยา พิษวิทยา
9. จัดทำรายงานฉบับสมบูรณ์

เนื่องจากผลงานวิจัย(ฉบับสมบูรณ์) ทั้งหมดนี้ได้ตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการทั้งในประเทศและนานาชาติ คือ

Sakdarat S., Samart N.,2008. Chemical Constituents from the rhizome of Smaller Galanga *(Alpinia officinarum* Hance). The 3rd Sino-Thai International Conference on Traditional Medicine and Natural Health Products,Nanning,Guangxi,P.R. China 29-31 October 2008

จึงขอนำเสนอผลงานวิชาการทั้ง 2 ผลงาน มาแนบเพื่อเป็นเรื่องโดยสมบูรณ์ โดยมีเนื้อหาคือ Abstract, Introduction, Materials Methods, Result, Discussion, Summary และ Reference พร้อม Table และ Figures.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. จะสามารถจดสิทธิบัตรในการใช้สาร Galangin ได้ โดย มทส. จะสามารถช่วยเหลือภาคอุตสาหกรรมการ ผลิตยาซึ่งเป็นการสนับสนุน ภารกิจหลักและยุทธศาสตร์การพัฒนา มทส.
2. จะสามารถเป็นองค์ความรู้ในการวิจัยขั้นต่อไป เช่น การหากลไกการออกฤทธิ์ เพื่อพัฒนาเป็นยาได้ในที่สุด
3. การสกัดสาร Galangin จากข่า จะสามารถนำไป ผลิตเชิงพาณิชย์ได้ในอนาคต เนื่องจากสารนี้มี ประโยชน์ในทางยา ในหลายกลไก เช่น การทำวิจัยสารนี้ในแง่การเป็นสา anticancer
4. เป็นประโยชน์ต่อประเทศไทยในแง่การคิดค้นยาใหม่ๆ ที่ปราบเชื้อที่ดื้อต่อยาที่มีราคาแพง

ได้ และลดการนำเข้ายาจากต่างประเทศ ที่มีราคาแพงได้

5. เป็นประโยชน์ต่อแพทย์และผู้ป่วยทำให้สามารถได้ยาใหม่ๆ มาปราบเชื้อที่ดื้อยา โดยเฉพาะยาในกลุ่ม β-lactam antibiotics

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่2
วิธีดำเนินการวิจัย

บทที่ 3
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

บทที่ 4
บทสรุป

บรรณานุกรม

ใช้ผลงานวิชาการที่ได้ตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการทั้งในประเทศและนานาชาติ 2 ผลงาน คือ

Sakdarat S., Samart N.,2008. Chemical Constituents from the rhizome of Smaller Galanga *(Alpinia officinarum* Hance). The 3rd Sino-Thai International Conference on Traditional Medicine and Natural Health Products, Nanning, Guangxi,P.R. China 29-31 October 2008

Griangsak Eumkeb , , SantiSakdarat , SupatchareeSiriwong, 2010. Reversing β-lactam antibioticresistanceof Staphylococcus aureus with galangin from Alpinia officinarum Hance andsynergismwithceftazidime. Phytomedicine. 1-6

Chemical constituents from the rhizome of smaller galanga (*Alpinia officinarum* Hance)

Santi Sakdarat*, Nuttaporn Samart

School of Chemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 30000, Thailand.

*correspondence author E-mail: santi@sut.ac.th

Abstract: ***Alpinia officinarum* Hance,** a Thai medicinal plant of family Zingiberaceae, is well-known plant used in Thai traditional medicine as an antibacterial and antiulcer. Moreover it has insecticidal properties. The chloroform crude extract of the rhizomes of smaller galanga (Alpinia officinarum Hance) was purified by column chromatography and preparative thin-layer chromatography to give three pure compounds. Structural elucidation of the isolated compounds was carried out on the basis of spectral analyses, including UV, IR, MS, 1H-NMR and 13C-NMR, as well as comparison with reported values. Two of these were identified as flavonol of flavonoids. They were 3,5,7-trihydroxy flavone (galangin) and 3,5,7-trihydroxy-4'-methoxy flavone (kaempferide). The other was 5,7-dihydroxy-4'-methoxy--3-O-β-D-glucopyranoside flavone (kaempferide-3-O-β-D-glucoside), which had not been previously reported in this species.

Keywords: *Alpinia officinarum* Hance, galangin, kaempferide, kaempferide-3-*O*-β-D-glucoside.

1. Introduction

Smaller galanga (Alpinia officinarum Hance) is a pungent and aromatic rhizome, which is a member of the ginger family (Zingiberaceae). The rhizome is cultivated in India, Vietnam, southern China and Thailand because of its use as a spice and as a traditional medicine1 for several purposes such as treatment for ring worm, venereal diseases, carminative, abdominal discomfort, stomach discomfort and antiflatulent. In chemical and pharmacological studies of the rhizomes of small galanga have three groups of important chemical constituents, flavonoids, glycosides, and diarylheptanoids. It has been reported that smaller galanga has biological activities, including antitumor, antiulcer, antibacterial, and antifungal properties2-5. This present communication deals with the separation of compounds from the chloroform extract and the identification of three isolated compounds obtained from the rhizome of smaller galanga. Further study on purification and structure elucidation of the other isolated compounds are in progress.

2. Materials and methods

2.1 General

The UV spectra were obtained with a Hewlett Packard 8452A diode array UV-VIS spectrophotometer, whereas the IR spectra were measured with a Perkin-Elmer FT-IR 2000 spectrophotometer (by a KBr disk method). The 1H and 13C NMR spectra were recorded with a Bruker DRX 400 spectrometer in CD3OD solution and chemical shifts are expressed in δ (ppm) with reference to the solvent signals. Silica gel 60 (70-230 mesh) and silica gel 60 PF

254 were used for column chromatography and preparative thin-layer chromatography, respectively. Solvents of technical grade were used for chromatographic purposes.

2.2 Plant materials

The fresh rhizomes of smaller galanga were digged from Saengduan Konekratoke's paddy field located in Chokchai District, Nakhon Ratchasima province in July and December 2005, and June and November 2006. The specimens were authenticated by Dr. Paul J. Grote, School of Biology, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima province.

The rhizomes of smaller galanga was separated from the stems, washed thoroughly, and dried in an oven at 50 °C for three days. The dried samples were then ground to powder.

2.3 Extraction

The two kilograms of dried powder of rhizomes of smaller galanga were extracted consecutively with hexane by soxhlet extraction apparatus for 12 hours, chloroform for 12 hours, and methanol for 12 hours. The extracted solutions were then filtered through a filter paper (Whatman No. 1). The filtrates were concentrated by evaporation under reduced pressure to afford 13.79 g of hexane crude extract as dark yellow oil, 22.38 g of chloroform crude extract as dark yellow slush, and 30.12 g of methanol crude extract as dark brown gum.

2.4 Isolation

The chloroform crude extract was separated using a column (3 cm in diameter and 30 cm in length) packed with hexane slurry of silica gel 60 Art. 7734 to the height of 20 cm. The crude extract was dissolved in a small amount of chloroform and loaded onto the top of the column. The column was then eluted successively with hexane, hexane: chloroform (1:1), chloroform, chloroform: methanol (1:1), and methanol. Every fraction of 250 mL was collected and concentrated to a small volume and four major fractions (I 3.24 g, II 5.76 g, III 9.72 g and IV 13.93 g) were separated by monitoring with TLC (2 x 5 cm2 in size with chloroform: methanol, 9:1 as developing solvent) in order to combine the fractions with the same compounds.

A portion of fraction III (1.0085 g) was further separated by preparative TLC (20 x 20 cm^2 in size, coated with methanol suspension of silica gel 60 G Art. 7731 with layer thickness of 2 mm and chloroform: methanol, 9:1 as developing solvent). Two fractions (A 0.0433 g and B 0.0098 g) were afforded. Fraction A was further purified by preparative TLC using the same developing solvent to give crude compound 1 (0.0105 g), which was recrystallized from chloroform-methanol mixed solvents to obtain pure compound **1** (0.0007 g) as light yellow powder.

Fraction IV (13.93 g) was further separated using a column (3 cm in diameter and 30 cm in length) packed with hexane slurry of silica gel 60 Art. 7731 to the height of 20 cm. The column was eluted successively with hexane, hexane: chloroform (1:1), chloroform, chloroform: methanol (1:1), and methanol. Every fraction of 100 mL was collected and concentrated to a small volume. A portion of methanol fraction (1.0099 g) was further separated by preparative TLC (20 x 20 cm^2 in size, coated with methanol suspension of silica gel 60 G Art. 7731 with layer thickness of 2 mm and chloroform: methanol, 8:2 as developing solvent) to afford three fractions (C 0.0109 g, D 0.0127 g, and E 0.0155 g).

Fraction C (0.0109 g) was further purified by preparative TLC using the same developing solvent to give crude compound **2** (0.0069 g) which was recrystallized from methanol to obtain pure compound **2** (0.0027 g) as light yellow powder.

Fraction D (0.0127 g) was further purified by preparative TLC using the same developing solvent to give crude compound **3** (0.0103 g), which was recrystallized from methanol to obtain pure compound **3** (0.0031 g) as bright yellow powder.

2.5 Structures of compounds 1-3

3,5,7-trihydroxy flavone (galangin)**1**: UV ($CHCl_3$) λ_{max} values are 267 and 370 nm. FT-IR spectrum ν_{max} (KBr) values are 3607-3084, 1659, 1600, 1550 and 1260 cm^{-1}. ^{1}H-NMR δ (ppm) values, in CD_3OD are 12.43 (1H, *s*, 5-OH), 10.74 (1H, *s*, 7-OH), 9.59 (1H, *s*, 3-OH), 8.20 (2H, *dd*, 2', 6'-H), 7.62 (2H, *dd*, 3', 5'-H), 7.53 (1H, *m*, 4'-H), 6.43 (*J*H8/H6= 1.5 Hz, *d*, 1H, 8-H), 6.21 (1H, *d*, 6-H). ^{13}C-NMR δ (ppm) values, in CD_3OD, are 178.1 (4-C), 169.1 (5-C), 166.2 (7-C), 159.7 (9-C), 159.8 (2-C), 136.4 (3-C), 130.2 (1'-C), 128.5 (3', 5'-C), 127.9 (4'- C), 126.1 (2', 6'-C), 103.2 (10-C), 98.1 (6-C), 97.8 (8-C).

3,5,7-trihydroxy-4'-methoxy flavone (kaempferide)**2**: UV ($CHCl_3$) λ_{max} values are 272, 315 and 378 nm. FT-IR spectrum ν_{max} (KBr) values are 3650-3300, 2950, 2875, 1640, 1610, 1425 and 1125 cm^{-1}. ^{1}H-NMR δ (ppm), in CD_3OD, are 12.33 (1H, *s*, 5-OH), 10.81 (1H, *s*, 7-OH), 9.41 (1H, *s*, 3-OH), 8.07 (2H, *d*, 2', 6'-H), 7.05 (2H, *d*, 3', 5'-H), 6.41 (1H, *d*, 8- H), 6.25 (1H, *d*, 6-H), 3.79 (3H, *s*, 4'-OCH_3). $_{13}$C-NMR δ (ppm) values, in CD_3OD are 176.0 (4-C), 163.7 (7-C), 160.5 (5-C), 160.3 (4'-C), 156.1 (9-C), 146.0 (2-C), 135.9 (3-C), 129.2 (2', 6'-C), 123.0 (1'- C), 114.0 (3', 5'-C), 103.4 (10-C), 98.1 (6-C), 93.3 (8-C), 55.1 (4'-OCH_3)

5,7-dihydroxy-4'-methoxy-3-*O*-β-D-glucopyranoside flavone (kaempferide-3-*O*-β-D-glucoside)**3**: FT-IR spectrum ν_{max} (KBr) values are 3650-3200, 2970, 2825, 1639, 1625 and 1200 cm^{-1}. ^{1}H-NMR δ (ppm), in CD_3OD, are 12.41 (1H, *s*, 5-OH), 10.69 (1H, *s*, 7- OH), 8.03 (2H, *d*, *J* = 8.72 Hz, 21, 61), 7.01 (2H, *d*, *J* = 8.72 Hz, 31, 51), 5.95 (1H, *s*, H-6), 5.37 (1H, *d*, *J* = 7.90 Hz, 12-H), 3.80 (3H, *s* , 41- OMe), 3.21 (1H, *m*, 22-H), 3.30 (1H, *m*, 32-H), 3.13 (1H, *m*, 42-H), 3.42 (1H, *m*, 52, 62-H). ^{13}C-NMR δ ppm, in CD_3OD, are 176.84 (4-C), 163.6 (7-C), 160.6 (41-C), 160.6 (5-C), 155.7 (2-C), 155.3 (9-C), 133.0 (3-C), 130.2 (21,61-C), 122.0 (11-C), 113.3 (31,51-C), 103.7 (10-C), 100.4 (12-C), 98.2 (6-C), 93.3 (8-C), 76.4 (52-C), 76.0 (32-C), 73.8 (22-C), 69.4 (42-C), 60.5 (62-C), 55.0 (4-OMe).

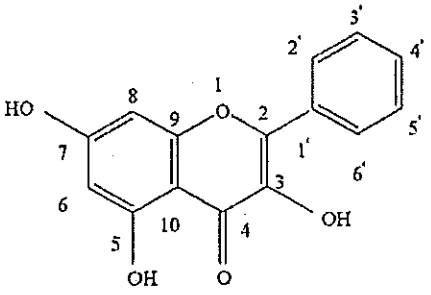
3. Results and discussion

Compound 1 was obtained as a light yellow and the UV spectrum displayed bands at 267 and 370 nm and the IR spectrum showed strong absorption band at 3607-3084, 1659, 1600, 1550 and 1260 cm^{-1} suggested that compound 1 is a flavonoid derivative compound[6]. The ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR spectra of compound 1 (Table 1) showed the necessary diagnostic peaks to be identified as a flavonoid derivative with hydroxyl group on C-3, C-5 and C-7, appearing as sharp singlets at δ 9.59, 12.43 and 10.74 ppm, respectively. The H-6 and H-8 occurred as sharp doublet at δ 6.21 and 6.43 ppm, respectively (*J*H8/H6 = 1.53 Hz). The B ring signals were easily assigned by consideration of symmetry. The H-2' and H-6' resonances occurred as sharp doublet at δ 8.20 ppm. The H-3' and H-5' resonances appeared as doublet of doublets at δ 7.62 ppm and H-4' occurred as muiltplet at δ 7.53 ppm. The ^{13}C experiments of compound 1 gave thirteen peaks. The most downfield shifted peak was 178.1 ppm which was assigned as ketone group (C-4). By direct comparison of the ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR data of conpound **1** (Table 1) with those of the known compound 3,5,7-trihydroxyflavone (galangin)[7]

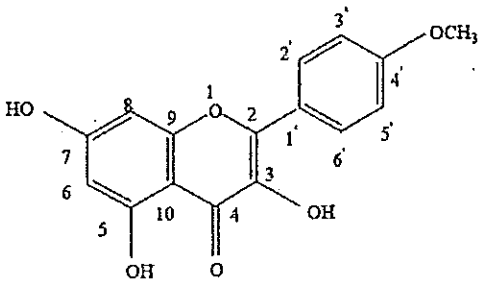
they were closely equivalent indicating that compound **1** is 3,5,7-trihydroxyflavone (galangin) (Fig. 1).

Compound 2 was obtained as a light yellow and the UV spectrum displayed bands 272, 315 and 378 nm and the IR spectrum showed strong absorption band at 3650-3300, 2950, 2875, 1640, 1610, 1425 and 1125 cm^{-1} suggested that compound 2 is a flavonoid derivative compound similar to compound 1[6]. The ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR spectra of compound 2 (Table 1) showed the necessary diagnostic peaks to be identified as a flavonoid derivative with hydroxyl group on C-3, C-5 and C-7, appearing as sharp singlets at δ 9.41, 12.33 and 10.81 ppm, respectively. The H-6 and H-8 occurred as sharp doublet at δ 6.25 and 6.41 ppm, respectively. The B ring signals were easily assigned by consideration of symmetry. The H-2' and H-6' occurred as sharp doublet at δ 8.07 ppm. The H-3' and H-5' appeared as doublet at δ 7.05 ppm, and 4'-OCH_3 occurred as a singlet at δ 3.79 ppm. The ^{13}C experiments of compound 2 gave fourteen peaks. The most downfield shifted peak was 176.0 ppm which was assigned as ketone group (C-4) and most upfield shifted peak was 55.1 ppm which was assigned as ether group (4'-OCH_3). By direct comparison of the ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR data of conpound **2** (Table 1) with those of the known compound 3,5,7-trihydroxy-4' -methoxyflavone (kaempferide)[8] they were closely equivalent indicating that compound **2** is 3,5,7-trihydroxy-4'-methoxyflavone (kaempferide) (Fig. 1).

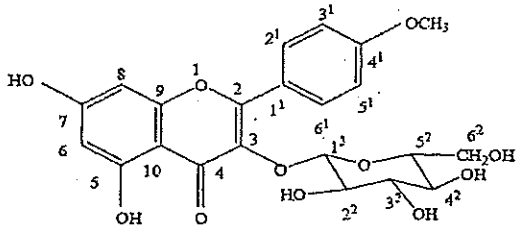
Compound 3 was obtained as a bright yellow and the IR spectrum showed strong absorption band at 3650-3200, 2970, 2825, 1639, 1625 and 1200 $cm^{-1}$of compound 3 suggested that compound 3 is a flavonoid glucoside derivative compound [9,10]. The ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR spectra of compound 3 (Table 1) showed that all the glucose units had β-linkages to either another glucose or glycone since the constant coupling between the anomeric protons and 22-H were always 7-8 Hz and anomeric carbon resonances were in the δ 100 ppm region[11]. The ^{13}C NMR spectral data suggested that glucose in compound 3 was attached to the flavonol aglycone at C-3, because of the lack of downfield shift for C-3 and the presence of a hydrogen bonding with the carbonyl group in position 4 at δ 176.84 ppm. By direct comparison of the ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR data of conpound **3** (Table 1) with those of the known compound kaempferide-3-*O*-*β*-D-glucoside[12] they were closely equivalent indicating that compound 3 is kaempferide-3-*O*-*β*-D-glucoside (Fig. 1).



1



2



3

Figure 1 Structure of compound **1, 2** and **3**

Table 1 The ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR chemical shifts of compound **1, 2** and **3**

Proton Position	Conpound				Carbon Position	Compound		
	1		2	3		1	2	3
1^2-glu		(d,*J*=7.90Hz)		5.37	1^1	130.2	123.0	122.0
2^1	8.20	(d,*J*=8.72Hz)	8.07	8.03	1^2			100.34
2^2		(m)		3.21	2	159.8	146.0	155.7
3-OH	9.59	(s)	9.41		2^1	126.1	129.2	130.2
3^1	7.62	(d,*J*=8.72Hz)		7.01	2^2			73.67
3^2		(m)		3.30	3	136.4	135.9	133.0
4^1	7.53	(m)			3^1	128.5	114.0	113.3
4^1-OCH_3		(s)	3.81	3.80	3^2			76.0
4^2		(m)		3.13	4	178.1	176.0	176.8
5-OH	12.43	(s)	12.33	12.41	4^1	127.9	160.3	160.6
5^1	7.62	(d,*J*=8.72Hz)	7.05	7.01	4^1-OCH_3		55.1	55.0
5^2		(m)		3.42	4^2			69.4
6	6.21	(d,s)	6.25	5.95	5	169.1	160.5	160.6
6^1	8.20	(d,*J*=8.72Hz)	8.07	8.03	5^1	128.5	114.0	113.3
6^2		(m)		3.42	5^2			76.4
7-OH	10.74	(s)	10.81	10.69	6	98.1	98.1	98.2
8	6.43	(s)	6.41	6.07	6^1	126.1	129.2	130.2
					6^2			60.5
					7	166.2	163.7	163.6
					8	97.8	93.3	93.3
					9	159.7	156.1	155.3
					10	103.2	103.4	103.7

4. Conclusion

The present study showed that the chloroform extract of the rhizomes of smaller galanga (*Alpinia officinarum* Hance) were separated to afford three pure compounds. They were characterized as 3,5,7-trihydroxy flavone (galangin)**1**, 3,5,7-trihydroxy-4'-methoxy flavone (kaempferide)**2** and 5,7-dihydroxy-4'-methoxy-3-*O*-β-D-glucopyranoside flavone (kaempferide-3-*O*-β-D-glucoside)**3**, which had not been previously reported in this species.

Further study on purification and structure elucidation of the other isolated compounds are in progress.

5. Acknowledgement

The authors are indebted to the following persons and institutions for their invaluable assistance in carrying out this study: Suranaree University of Technology Research Fund, National Research Council of Thailand and the scientific equipment staff, Department of Chemistry, Mahidol University for the NMR data acquisition.

6. References

1. Athamaprasangsa, S., Buntrarongroj, U., Dampawan, P., Ongkavoranan, N., Rukachaisirikul, V., Sethijinda, S., Sornnarintra, M., Sriwub, P. and Taylor, W. C. A 1,7-diarylheptanoid from Alpinia conchigera. Phytochemistry. 1994; 37(3): 871-873.
2. Itokawa, H., Morita, H., Midorikawa, I., Aiyama, R., and Morita, M. Diarylheptanoids from the Rhizome of Alpinia officinarum Hance. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 1985; 33(11): 4889-4893.
3. Newman, D. J., Cragg, G. M., and Snader, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. Journal of Natural Product. 2003; 66: 1022-1037.
4. Ly, T. N., Shimoyamada, M., Kato, K., and Yamauchi, R. Isolation and characterization of some antioxidative compounds from the rhizomes of smaller Galanga (Alpinia officinarum Hance). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2003; 51: 4924-4929.
5. Matsuda, H., Ando, S., Kato, T., Morikawa, T., and Yoshikawa, M. Inhibitors from the rhizomes of Alpinia officinarum on production of nitric oxide in lipopolysaccharide-activated macrophages and the structural requirements of diarylheptanoids for the activity. Bioorganic and Medicinal Chemistry. 2006; 14: 138-142.
6. Maria, C. B., Anna, R. B., Lorenzo, D. B., Giovanni, M., and Franco, F. V. Studies on the interactions between some flavonols and cyclodextrins. Bioorganic and Medicinal Chemistry. 2007; 17: 5744-5748.
7. Rubens F. V. de Souza., and Wangner F. De Giovani. Systesis, spectral and electrochemical properties of Al (III) and Zn (II) complexes with flavonoids. Spectrochimica Acta Part A. 2005; 61: 1985-1990.
8. Eunjung, L., Byoung-Ho, M., Younghee, P., Sungwon, H., Sunhee, L., Younggiu L, and Yoongho, L. Effect of hydroxy and methoxy substituents on NMR data in flavonols. Journal of Bulletin Korean Chemical Society. 2008; 29, 507-510.
9. Paolo, C., Marcello, D., Virginia, L., and Orazio, T. S. Kaempferide triglucoside: a possible factor pf resistance of carnation (Dianthus caryophyllus) to Fusarium oxysporum f. sp. Dianthi. Phytochemistry. 2001; 56: 717-721.
10. Xu, W., Liu, J., Li, C., Wu, H. Z., and Liu, Y. W. Kaempferol-7-o-β-Dglucoside (KG) isolated from Smilax china L. rhizome induces G2/M phase arrest and apoptosis on HeLa cells in a p53-independent manner. Cancer Letters. 2008; 264: 229-240.
11. Agrawal, P. K. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. Phytochemistry. 1992; 31: 3307-3330.
12. Juha-Pekka, S., Maria, L., Kyosti, L., Lauri K., Erkki, H., and Kalevi, P. Metabolic modifications of birch leaf phenolics by an herbivorous insect: Detoxification of flavonoid aglycones via glycosylation. Zeitschrift für Naturforschung B. 2004; 59: 437-444.

Phytomedicine xxx (2010) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Phytomedicine

journal homepage: www.elsevier.de/phymed

Reversing β-lactam antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* with galangin from *Alpinia officinarum* Hance and synergism with ceftazidime

Griangsak Eumkeb[a,*], Santi Sakdarat[b], Supatcharee Siriwong[a]

[a] School of Biology, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima 30000, Thailand
[b] School of Chemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima 30000, Thailand

ARTICLE INFO

Keywords:
Alpinia officinarum Hance
Galangin
Quercetin
Baicalein
The synergism with ceftazidime
Penicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

The purpose of this investigation was to extract and identify the bioactive phytochemicals from smaller galanga (*Alpinia officinarum* Hance). The antibacterial, synergy effects and primary mechanism of action of galangin and ceftazidime against *S. aureus* DMST 20651 are also investigated by minimum inhibitory concentration (MIC), checkerboard, killing curve determinations, enzyme assay and electronmicroscopy method. The rhizomes chloroform extract of this plant showed that these compounds were galangin, kaempferide and kaempferide-3-*O*-β-D-glucoside, which had not been previously reported in this species. Synergistic FIC indices were observed in the combination of test flavonoids (galangin, quercetin and baicalein) and all selected β-lactams (methicillin, ampicillin, amoxicillin, cloxacillin, penicillin G and ceftazidime) (FIC index, <0.02–0.11). The combination of ceftazidime at 5 μg/ml and 5 μg/ml of test flavonoids (galangin, quercetin and baicalein) exhibited synergistic effect by reduced the cfu/ml of this strain to 1×10^3 over 6 and throughout 24 h. Galangin showed marked inhibitory activity against penicillinase and β-lactamase. Electronmicroscopy clearly showed that the combination of galangin and ceftazidime caused damage to the ultrastructures of the cells of this strain. It was concluded that galangin, quercetin and baicalein exhibited the potential to reverse bacterial resistance to β-lactam antibiotics against penicillin-resistant *S. aureus* (PRSA). This may involve three mechanisms of action that galangin inhibit protein synthesis and effect on PBP 2a, interact with penicillinase and cause cytoplasmic membrane damage. These findings lead us to develop a new generation of phytopharmaceuticals that may use galangin, quercetin and baicalein in combination with ceftazidime to treat PRSA that currently almost untreatable microorganism. The anti-PRSA activity and mode of action of galangin is reported for the first time. These *in vitro* results have to be still confirmed in an animal test or in humans.

© 2010 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Bacterial resistance to β-lactam antibiotics is a global problem. Today around 90–95% and 70–80% of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) strains are resistant to penicillin, methicillin around the word and in most of the Asian countries (Casal et al. 2005; Chambers 2001) Strains of β-lactam-resistant *S. aureus* including methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) now pose serious problem to hospitalized patients, and their care providers (Mulligan et al. 1993). Antibiotics available for the treatment of MRSA infection are fairly toxic and their use is frequently associated with unwanted side-effects (Brumfitt and Hamilton-Miller 1989). Novel antibiotics and/or new generation of phytopharmaceuticals approaches that can reverse the resistance to well tried agents which have lost their original effectiveness or enable their use to treat diseases instead of synthetic drugs alone are research objectives of far reaching importance (Reading and Cole 1977; Wagner and Ulrich-Merzenich 2009).

Smaller galanga (*Alpinia officinarum* Hance) is a pungent and aromatic rhizome, which is a member of the ginger family (Zingiberaceae). The rhizome is cultivated in India, Vietnam, Southern China and Thailand because of its use as a spice and as a traditional medicine for several purposes such as treatment for pyogenic diseases (infectious acne, carbuncles, sty, pyoderma, pustular impetigo in Thailand), ring worm, venereal diseases, carminative, abdominal discomfort (Athamaprasangsa et al. 1994). The chemical and pharmacological studies of the rhizomes of small galanga have three groups of important chemical constituents, flavonoids, glycosides and diarylheptanoids. It has been reported that smaller galanga has biological activities, including antitumor, antiulcer, antibacterial, and antifungal properties (Itokawa et al.

* Corresponding author at: School of Pharmacology/Biology, Institute of Science, Suranaree University of Technology, 111 University Avenue, Suranaree Subdistrict, Muang District, Nakhonratchasima 30000, Thailand. Tel.: +66 44 224260; fax: +66 44 224633.
E-mail address: griang@sut.ac.th (G. Eumkeb).

0944-7113/$ – see front matter © 2010 Elsevier GmbH. All rights reserved.
doi:10.1016/j.phymed.2010.09.003

Please cite this article in press as: Eumkeb, G., et al., Reversing β-lactam antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* with galangin from *Alpinia officinarum* Hance and synergism with ceftazidime. Phytomedicine (2010), doi:10.1016/j.phymed.2010.09.003

1985; Newman et al. 2003; Ly et al. 2003; Matsuda et al. 2006). The purpose of this investigation was to separate and identify the bioactive compounds from the rhizome of smaller galanga. We have also investigated the *in-vitro* activity of galangin, a major bioactive constituent isolated from smaller galanga, and other test flavonoids (quercetin and baicalein) against β-lactam-resistant *S. aureus* when used alone and in combination with β-lactam antibiotics.

Materials and methods

General experimental procedures

The UV spectra were obtained with a Hewlett Packard 8452A diode array UV–vis spectrophotometer, whereas the IR spectra were measured with a Perkin-Elmer FT-IR 2000 spectrophotometer (by a KBr disk method). The ^{1}H and ^{13}C NMR spectra were recorded with a Bruker DRX 400 spectrometer in CD3OD solution and chemical shifts are expressed in δ (ppm) with reference to the solvent signals. Silica gel 60 (70–230 mesh) and silica gel 60 PF 254 were used for column chromatography and preparative thin-layer chromatography, respectively. Solvents of technical grade were used for chromatographic purposes.

Plant material, β-lactam antibiotics and bacterial strains sources

The fresh rhizomes of smaller galanga were digged from Saengduan Konekratoke's paddy field located in Chokchai District, Nakhonratchasima Province in July and December 2007, June and November 2008. The plant specimen has been deposited at the National Herbarium after it was identified by Dr. Paul J. Grote, School of Biology, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima Province. The rhizomes of smaller galanga was separated from the stems, washed thoroughly, and dried in an oven at 50 °C for three days. The dried samples were then ground to powder. Quercetin and baicalein were obtained from Indofine Chemical Company (USA). Ceftazidime, methicillin, ampicillin, amoxicillin, cloxacillin, penicillin G (benzylpenicillin), penicillinase (β-lactamase) and clavulanic acid were obtained from Sigma (Sigma–Aldrich, UK). Mueller-Hinton broth was obtained from Oxoid (Basingstoke, UK). Seven clinical isolates of penicillins-resistant *S. aureus* DMST 20651-655, 20661-2 (PRSA), were obtained from Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand. *S. aureus* ATCC 29213, positive control, was purchased from American Type Culture Collection (ATCC).

Extraction and isolation

The 2 kg of dried powder of rhizomes of smaller galangal were extracted consecutively with hexane, chloroform and methanol by soxhlet extraction apparatus. The extracted solutions were then filtered. The filtrates were concentrated by evaporation under reduced pressure to afford 13.79 g of hexane crude extract as dark yellow oil, 22.38 g of chloroform crude extract as dark yellow slush, and 30.12 g of methanol crude extract as dark brown gum.

The chloroform crude extract was separated using a column packed with hexane slurry of silica gel. Then, was dissolved in chloroform and loaded onto the column. Four major fractions (I 3.24 g, II 5.76 g, III 9.72 g and IV 13.93 g) were separated by TLC.

A portion of fraction III (1.0085 g) was further separated by preparative TLC to give crude compound **1** (0.0105 g), which was recrystallized from chloroform–methanol mixed solvents to obtain pure compound **1** (0.0007 g).

Fraction IV (13.93 g) was further separated using a column with hexane, then by preparative TLC to afford three fractions (C 0.0109 g, D 0.0127 g and E 0.0155 g). Fraction C and D were further purified by preparative TLC to give crude compounds **2** and **3** which

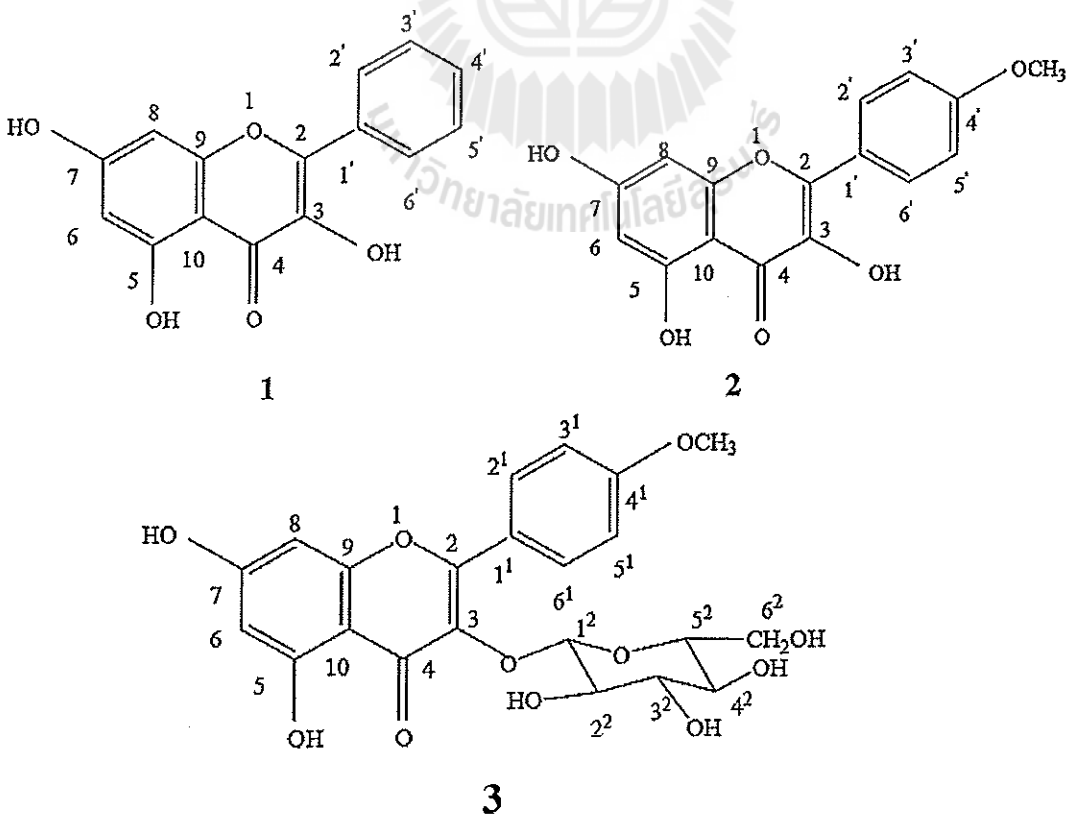


Fig. 1. Structure of compounds **1**, **2** and **3**.

Table 1
Minimum inhibitory concentration (MIC) of ceftazidime, clavulanic acid and test flavonoids alone and fractional inhibitory concentration (FIC) from checkerboard assay of ceftazidime plus clavulanic acid or test flavonoids against clinical isolates of *Staphylococci aureus* (PRSA).

Strain	MIC (μg/ml)					FIC (μg/ml)				FIC index			
	cef	gal	que	bai	cla	cef+gal	cef+que	cef+bai	cef+cla	cef+gal	cef+que	cef+bai	cef+cla
DMST 20652	50	300	>400	>400	>128	10+5	10+5	10+5	50+>128	0.22	<0.21	<0.21	2.0
DMST 20653	50	300	>400	>400	>128	10+5	10+5	10+5	50+>128	0.22	<0.21	<0.21	2.0
DMST 20654	50	300	>400	>400	>128	10+5	10+5	10+5	50+>128	0.22	<0.21	<0.21	2.0
DMST 20655	50	300	>400	>400	>128	10+5	10+5	10+5	50+>128	0.22	<0.21	<0.21	2.0
DMST 20661	50	200	>300	>400	>128	5+5	5+5	5+5	50+>128	0.13	<0.12	<0.11	2.0
DMST 20662	50	200	>300	>400	>128	5+5	5+5	5+5	50+>128	0.13	<0.12	<0.11	2.0
ATCC 29213[a]	0.12	100	>200	>300	4	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D

cef = ceftazidime, gal = galangin, que = quercetin, bai = baicalein, cla = clavulanic acid.
N/D, no data.
Each compound was measured three times.
[a] *S. aureus* ATCC 29213 and clavulanic acid were used as positive control.

were recrystallized from methanol to obtain pure compounds **2** (0.0027 g) and **3** (0.0031 g).

*Structures of compounds **1–3***

Structural elucidation of the isolated compounds was carried out on the basis of spectral analyses, including UV, IR, MS, ^{1}H NMR and ^{13}C NMR, as well as comparison with reported values in the literature.

Bacterial suspension standard curve

To select bacterial suspensions with a known viable count, the method of Liu et al. (2000) was followed.

Minimum inhibitory concentration (MIC) and checkerboard determinations

MIC and checkerboard determinations of selected β-lactam drugs against eight *S. aureus* strains were performed by following Liu et al. (2000) and Matthew et al. (2006).

Killing curve determinations

Viable counts for the determination of killing-curves were performed as previously described by Richards and Xing (1993).

Enzyme assays

The penicillinase of *Bacillus cereus* (*B. cereus*) and β-lactamase of *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*) were obtained from Sigma (Poole, England). Enzymes activities were followed Richards et al. (1995).

Electronmicroscopy

Ceftazidime and galangin that dramatically decreased the MICs against *S. aureus* DMST 20651 (PRSA) were chosen for electronmicroscopy study when used singly and in combination. Subculture of this strain was prepared to examine by TEM following Richards et al. (1995).

Table 2
Minimum inhibitory concentration (MIC) of β-lactams, clavulanic acid and test flavonoids alone and fractional inhibitory concentration (FIC) from checkerboard assay of β-lactams plus test flavonoids or clavulanic acid against clinical isolates of *S. aureus* DMST 20651.

Compound	MIC (μg/ml) alone	FIC (μg/ml) (β-lactam + flavonoid)	FIC index
Methicillin	>1000	–	–
Galangin	400	20+5	<0.03
Quercetin	>400	20+5	<0.03
Baicalein	>400	20+15	<0.06
Ampicillin	>1000	–	–
Galangin	400	15+5	<0.03
Quercetin	>400	15+5	<0.03
Baicalein	>400	15+10	<0.05
Amoxycillin	250	–	–
Galangin	400	10+5	0.05
Quercetin	>400	10+5	<0.05
Baicalein	>400	10+10	<0.07
Clavulanic acid[a]	>128	250+>128	2.0
Cloxacillin	>1000	–	–
Galangin	400	10+5	<0.02
Quercetin	>400	10+5	<0.02
Baicalein	>400	10+5	<0.02
Penicillin G	250	–	–
Galangin	400	10+5	0.05
Quercetin	>400	10+5	<0.05
Baicalein	>400	10+15	<0.08
Ceftazidime	50	–	–
Galangin	400	5+5	0.11
Quercetin	>400	5+5	<0.11
Baicalein	>400	5+5	<0.11
Clavulanic acid[a]	>128	50+>128	2.0

Each compound was measured three times.
[a] Clavulanic acid was used as positive control.

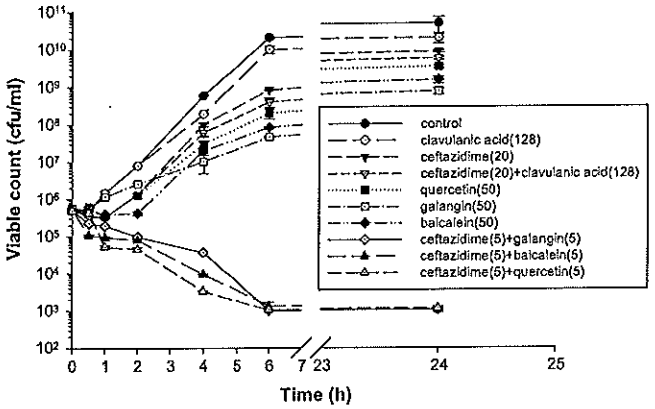


Fig. 2. The effect of ceftazidime combined with test flavonoids or clavulanic acid on the viable counts of *S. aureus* DMST 20651. - - ▼ - -, ceftazidime (20) means ceftazidime at 20 μg/ml; the values plotted are the means of 4 observations, and the vertical bars indicate the standard errors of the means.

Results and discussion

Compounds **1**, **2** and **3** were obtained and the UV, IR, ^{1}H NMR and ^{13}C NMR spectrum showed that compounds **1**, **2** and **3** are 3,5,7-trihydroxyflavone (galangin), 3,5,7-trihydroxy-4′-methoxyflavone (kaempferide) and kaempferide-3-*O*-β-D-glucoside, respectively (Fig. 1). All spectronic data agree with those reported in the literature (Rubens and Wangner 2005; Eunjung et al. 2008; Agrawal 1992; Juha-Pekka et al. 2004). Keampferide and kaempferide-3-*O*-β-D-glucoside had not been previously reported in this species.

MIC and checkerboard determinations

The MICs for test flavonoids (galangin, quercetin and baicalein) and ceftazidime against six clinical isolates strains of PRSA are shown in Table 1. The MICs of ceftazidime, test flavonoids (galangin, quercetin and baicalein) and clavulanic acid alone against six strains of *S. aureus* DMST were 50, 200 to >400 and >128 μg/ml, respectively. In the ceftazidime plus test flavonoids or clavulanic acid combination, the FICs of ceftazidime and test flavonoids or clavulanic acid were 5–50 μg/ml and 5 or >128 μg/ml, respectively. The FIC indices of ceftazidime plus test flavonoids or clavulanic acid were calculated as being between <0.11 and 0.22 or 2.0, respectively, in these combination against all isolates strains. It has been proposed that synergy be declared when the FIC index ≤ 0.5 (Johnson et al. 2004). Thus, the ceftazidime plus test flavonoids combination was synergistic against all isolates strains. *S. aureus* ATCC 29213 and clavulanic acid were used as positive control. Table 2 shows MICs and FIC index from checkerboard assay of β-lactam use alone and in combination with test flavonoids (galangin, quercetin and baicalein) or clavulanic acid against clinical isolates of *S. aureus* DMST 20651. Synergistic FIC indices were observed in the combination of test flavonoids and all selected β-lactams (methicillin, ampicillin, amoxicillin, cloxacillin, penicillin G and ceftazidime) (FIC index, <0.02–0.11). However, no interaction FIC indices of combination between amoxicillin or ceftazidime and clavulanic acid against this strain were observed (FIC index, 2.0).

Killing curve determinations (viable counts)

Fig. 2 shows that viable counts for *S. aureus* DMST 20651 were slight reduced by ceftazidime at 20 μg/ml, 50 μg/ml of test flavonoids and 128 μg/ml clavulanic acid alone when compared with the level of the untreated control culture between 6 and 24 h period. Ceftazidime at 5 μg/ml in combination with 5 μg/ml of test flavonoids reduced the cfu/ml by 5×10^3 over 6 h. The reduced counts did not recover in 24 h. Whereas, the combination of 20 μg/ml ceftazidime plus 128 μg/ml clavulanic acid was slightly lower than control cells.

Enzyme assays

The ability of flavonoids to inhibit the *in vitro* activity of penicillinase and β-lactamases varied considerably. Fig. 3a indicates that galangin has an inhibitory activity against penicillinase I from *B. cereus*. Galangin had some activity and tectochrysin and 6-chloro-7-methylflavone showed greater activity. Fig. 3b shows the effects of galangin against penicillinase (β-lactamase) type IV from *E. cloacae*. Galangin showed marked inhibitory activity. These results indicated that in addition to the direct effect on cell structure and cell division, the resistance reversing activity of galangin against PRSA might also include inhibition of penicillinase activity.

Electronmicroscopy

Electronmicroscope investigations clearly showed that the combination of ceftazidime antibiotic with galangin caused damage to the ultrastructures of *S. aureus* DMST 20651 cells. Fig. 4 indicates that galangin 50 μg/ml reduced the thickness of the cell walls compared with the cell walls of the control cells and also apparently

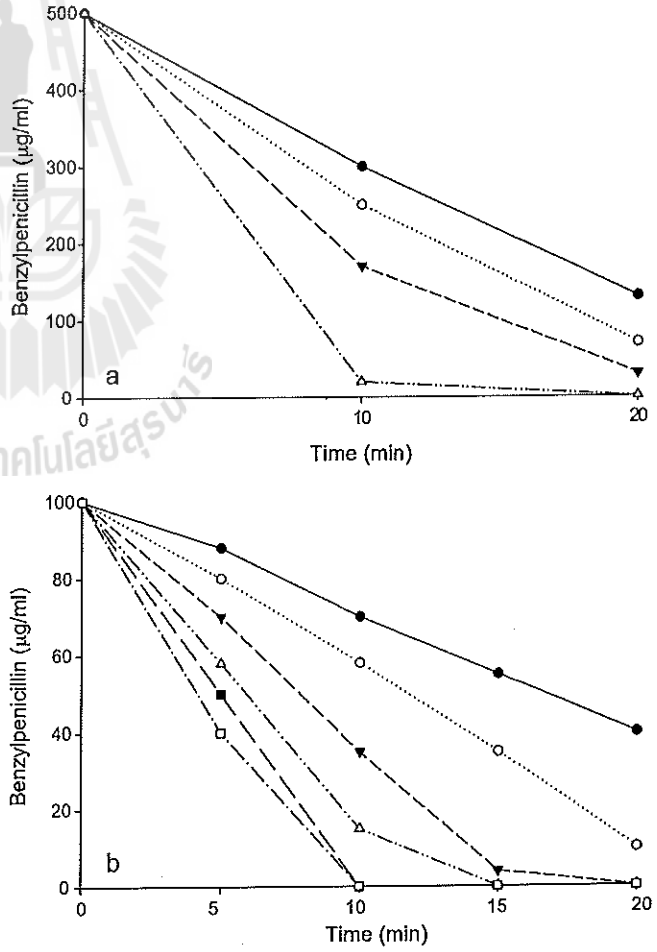


Fig. 3. The inhibitory activity of flavonoids against penicillinase in hydrolyzing. benzylpenicillin. (a) Penicillinase used from *B. cereus*; symbol represents flavonoids (200 μg/ml); △, control (without flavonoids); ▼, galangin; ○, 6-chloro-7-methylflavone; ●, tectochrysin. (b) β-Lactamase used from *E. cloacea*; symbol represents concentrations (μg/ml) of galangin; □, control (without apigenin); ■, 40; △, 80; ▼, 120; ○, 160; ●, 200.

Please cite this article in press as: Eumkeb, G., et al., Reversing β-lactam antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* with galangin from *Alpinia officinarum* Hance and synergism with ceftazidime. Phytomedicine (2010), doi:10.1016/j.phymed.2010.09.003

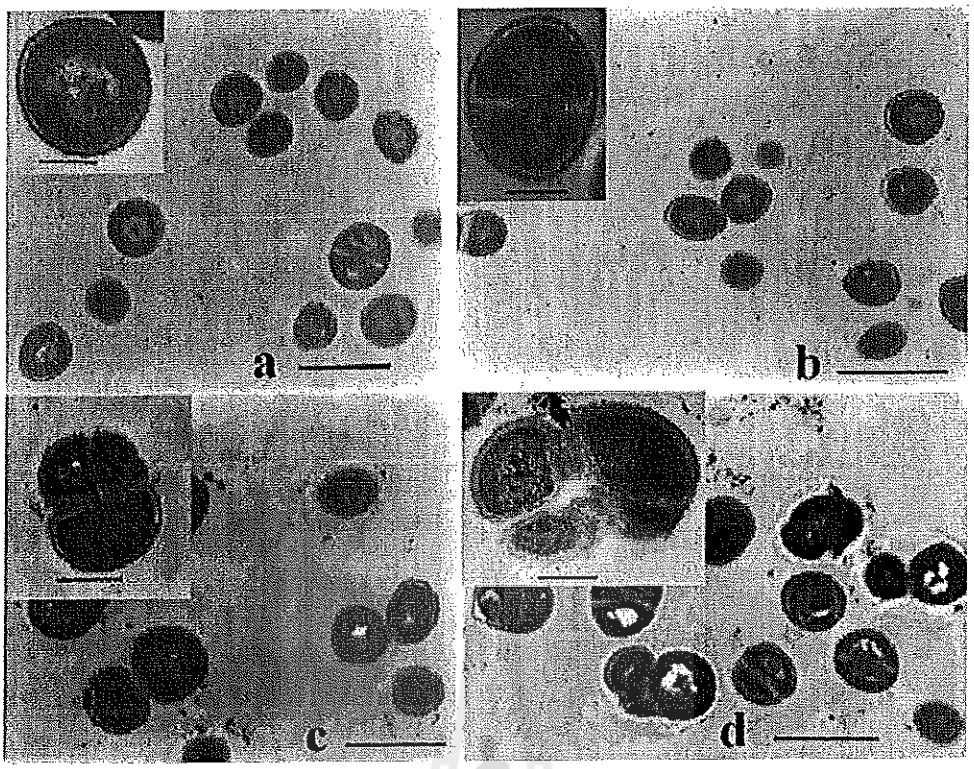


Fig. 4. Ultrathin sections of log phase *S. aureus* DMST 20651 grown in cation-adjusted Mueller-Hinton (MH) broth containing: (a) drug-free (control); (b) 25 μg/ml ceftazidime; (c) 50 μg/ml galangin; (d) 5 μg/ml ceftazidime plus 5 μg/ml galangin (a, b, c, d, original magnification, 17,480×; bar, 1 μm; Inset: a, b, d, original magnification, 42,800×; c, 32,500×; bar, 0.25 μm).

delayed cell division. The galangin treated cells were considerably bigger than the normal cells. Ceftazidime 25 μg/ml alone apparently had no effect on the cell wall structure but the combination of ceftazidime 5 μg/ml plus galangin 5 μg/ml was observed to have affected the integrity of the cell walls and led to an increase in cell size. This latter effect could due to inhibition of cell division.

The present study showed that the chloroform extract of the rhizomes of smaller galanga (*Alpinia officinarum* Hance) were separated to afford three pure compounds. They were characterized as 3,5,7-trihydroxy flavone (galangin) **1**, 3,5,7-trihydroxy-4′-methoxy flavone (kaempferide) **2** and 5,7-dihydroxy-4′-methoxy-3-*O*-β-D-glucopyranoside flavone (kaempferide-3-*O*-β-D-glucoside) **3**, which had not been previously reported in this species.

The results of MICs of test flavonoids (galangin, quercetin and baicalein) against all PRSA strains (200 to >400 μg/ml) are in substantial correspondence with Pepeljnjak and Kosalec (2004) that galangin isolated from propolis showed MIC of 160 ± 30 μg/ml against ten clinical isolates of MRSA strains. The results of checkerboard and viable counts of *S. aureus* DMST 20651 indicated that synergistic effects between test flavonoids (galangin, quercetin and baicalein) and ceftazidime or selected β-lactam against this strain were occurred. These findings are in substantial agreement with those of Hemaiswarya et al. (2008) reported that flavonoids and synthetic drugs exhibited synergistic activity against bacteria. The results from enzyme assay can be explained by assuming that galangin interact with penicillinase. Consequently, free benzylpenicillin remainder can overcome bacteria. These results are similar to those of Denny et al. (2002) that galangin inhibited metallo-β-lactamase by orientation at the active site of the enzyme. Moreover, epigallocatechin gallate, a flavan-3-ole flavonoid, showed penicillinase (from *S. aureus*) inhibition (Zhao et al. 2002). Furthermore, Cushnie and Lamb (2005) found that galangin caused potassium loss from *S. aureus* cells due to cytoplasmic membrane damage.

These results indicated that galangin not only have weak activity of their own against β-lactam-resistant staphylococci but also have the ability to reverse the resistance of such bacterial strains to the activity of the primary antibiotics. This may involve three mechanisms of action by galangin. The first is on the integrity of the cell wall and on septum formation prior to cell division. This implies an effect on protein synthesis including an effect on penicillin-binding protein 2a (PBP 2a). The second mechanism of galangin activity is via inhibition of the activity of certain penicillinase enzyme by interaction with this enzyme. The third is galangin causes cytoplasmic membrane damage results in potassium loss. Galangin was found that there was no cross-resistance between it and the 4-quinolone drugs (Cushnie and Lamb 2006).

In the last two decades, β-lactamase inhibitors like clavulanic acid have played an important role in fighting β-lactam-resistant bacteria. These inhibitors work as suicide compounds to react with the enzymes since they share the same key structure with β-lactam antibiotics (Coulton et al., 1994). Recent studies demonstrated that clavulanate caused a considerable induction of β-lactamase expression and an increase of clavulanate concentration was followed by an elevation in β-lactamase production (Tzouvelekis et al. 1997; Stapleton et al. 1995). This indicates that the presently available β-lactamase inhibitors can also lose their activity by the same mechanism as the β-lactam antibiotics. Our research provides a unique example that galangin, quercetin and baicalein without a β-lactam structure can reverse bacterial resistance to β-lactams via multiple mechanisms. Because of this structural dissimilarity, these compounds are unlikely to induce β-lactamase production. It should also be remembered that conventional β-lactamase inhibitors, unlike flavonoids, cannot reverse the resistance of penicillin resistant *S. aureus*, which is one of the most dangerous bacterial pathogens. Galangin, quercetin and baicalein as a new generation of phytopharmaceuticals, may be used with ceftazidime or β-lactam drugs for treating PRSA infection that cannot treat

Please cite this article in press as: Eumkeb, G., et al., Reversing β-lactam antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* with galangin from *Alpinia officinarum* Hance and synergism with ceftazidime. Phytomedicine (2010), doi:10.1016/j.phymed.2010.09.003

with this drugs alone. The anti-PRSA activity and mode of action of galangin is reported for the first time.

From the study, it was concluded that galangin, quercetin and baicalein have the potential to reverse bacterial resistance to β-lactam antibiotics against PRSA. In view of their limited toxicity, These test flavonoids offer for the development of a valuable adjunct to β-lactam treatments against otherwise resistant strains of currently almost untreatable microorganisms. These *in vitro* results have to be still confirmed in an animal test or in humans.

Acknowledgements

The authors are indebted grateful to the following persons and institutions for their invaluable assistance in carrying out this study: The Thailand Research Fund for grant support, Suranaree University of Technology Research and National Research Council of Thailand for research fund, Prof. R.M.E. Richards for encouragement and suggestion, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand, for bacterial strains support, Department of Chemistry, Mahidol University for the NMR data acquisition.

References

Agrawal, P.K., 1992. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. Phytochemistry 31, 3307–3330.

Athamaprasangsa, S., Buntrarongroj, U., Dampawan, P., Ongkavoranan, N., Rukachaisirikul, V., Sethijinda, S., et al., 1994. A 1,7-diarylheptanoid from *Alpinia conchigera*. Phytochemistry 37, 871–873.

Brumfitt, W., Hamilton-Miller, J., 1989. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. N. Engl. J. Med. 320, 1188–1196.

Casal, M., Vaquero, M., Rinder, H., Tortoli, E., Grosset, J., Rüsch-Gerdes, S., Gutiérrez, J., Jarlier, V., 2005. A case-control study for multidrug-resistant tuberculosis: risk factors in four European countries. Microb. Drug Resist. 11, 62–67.

Chambers, H.F., 2001. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? Emerg. Infect. Dis. 7, 178–182.

Coulton, S., Franois, I., Ellis, G.P., Luscombe, D.K., 1994. 6 [beta]-lactamases: targets for drug design. Progress in Medicinal Chemistry, Elsevier, pp. 297–349.

Cushnie, T.P.T., Lamb, A.J., 2005. Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. J. Ethnopharmacol. 101, 243–248.

Cushnie, T.P.T., Lamb, A.J., 2006. Assessment of the antibacterial activity of galangin against 4-quinolone resistant strains of *Staphylococcus aureus*. Phytomedicine 13, 187–191.

Denny, B.J., Lambert, P.A., West, P.W.J., 2002. The flavonoid galangin inhibits the L1 metallo-[beta]-lactamase from Stenotrophomonas maltophilia. FEMS Microbiol. Lett. 208, 21–24.

Eunjung, L., Byoung-Ho, M., Younghee, P., Sungwon, H., Sunhee, L., Younggiu, L., et al., 2008. Effect of hydroxy and methoxy substituents on NMR data in flavonols. J. Bull. Kor. Chem. Soc. 29, 507–510.

Hemaiswarya, S., Kruthiventi, A.K., Doble, M., 2008. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. Phytomedicine 15, 639–652.

Itokawa, H., Morita, H., Midorikawa, I., Aiyama, R., Morita, M., 1985. Diarylheptanoids from the rhizome of *Alpinia officinarum* Hance. Chem. Pharm. Bull. 33, 4889–4893.

Johnson, M.D., MacDougall, C., Ostrosky-Zeichner, L., Perfect, J.R., Rex, J.H., 2004. Combination antifungal therapy. Antimicrob. Agents Chemother. 48, 693–715.

Juha-Pekka, S., Maria, L., Kyosti, L., Lauri, K., Erkki, H., Kalevi, P., 2004. Metabolic modifications of birch leaf phenolics by an herbivorous insect: detoxification of flavonoid aglycones via glycosylation. Z. Naturforsch. B 59, 437–444.

Liu, I.X., Durham, D.G., Richards, R.M., 2000. Baicalin synergy with beta-lactam antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other beta-lactam-resistant strains of *S. aureus*. J. Pharm. Pharmacol. 52, 361–366.

Ly, T.N., Shimoyamada, M., Kato, K., Yamauchi, R., 2003. Isolation and characterization of some antioxidative compounds from the rhizomes of smaller Galanga (*Alpinia officinarum* Hance). J. Agric. Food Chem. 51, 4924–4929.

Matsuda, H., Ando, S., Kato, T., Morikawa, T., Yoshikawa, M., 2006. Inhibitors from the rhizomes of *Alpinia officinarum* on production of nitric oxide in lipopolysaccharide-activated macrophages and the structural requirements of diarylheptanoids for the activity. Bioorg. Med. Chem. 14, 138–142.

Matthew, A.W., Franklin, R.C., William, A.C., Micheal, N.D., George, M.E., David, W.H., et al., 2006. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. In: CLSI Document M7-A7, vol. 26, 7th edition. CLSI Publisher, Pennsylvania, pp. 14–24.

Mulligan, M.E., Murray-Leisure, K.A., Ribner, B.S., Standiford, H.C., John, J.F., Korvick, J.A., Kauffman, C.A., Yu, V.L., 1993. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a consensus review of microbiology, pathogenesis, and epidemiology with implications for prevention and management. Am. J. Med. 94, 313–328.

Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M., 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. J. Nat. Prod. 66, 1022–1037.

Pepeljnjak, S., Kosalec, I., 2004. Galangin expresses bactericidal activity against multiple-resistant bacteria: MRSA, *Enterococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol. Lett. 240, 111–116.

Reading, C., Cole, M., 1977. Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. Antimicrob. Agents Chemother. 11, 852–857.

Richards, R.M.E., Xing, D.K.L., 1993. In vitro evaluation of the antimicrobial activities of selected lozenges. J. Pharm. Sci. 82, 1218–1220.

Richards, R.M.E., Xing, J.Z., Gregory, D.W., Marshall, D., 1995. Mechanism of sulphadiazine enhancement of trimethoprim activity against sulphadiazine-resistant *Enterococcus faecalis*. J. Antimicrob. Chemother. 36, 607–618.

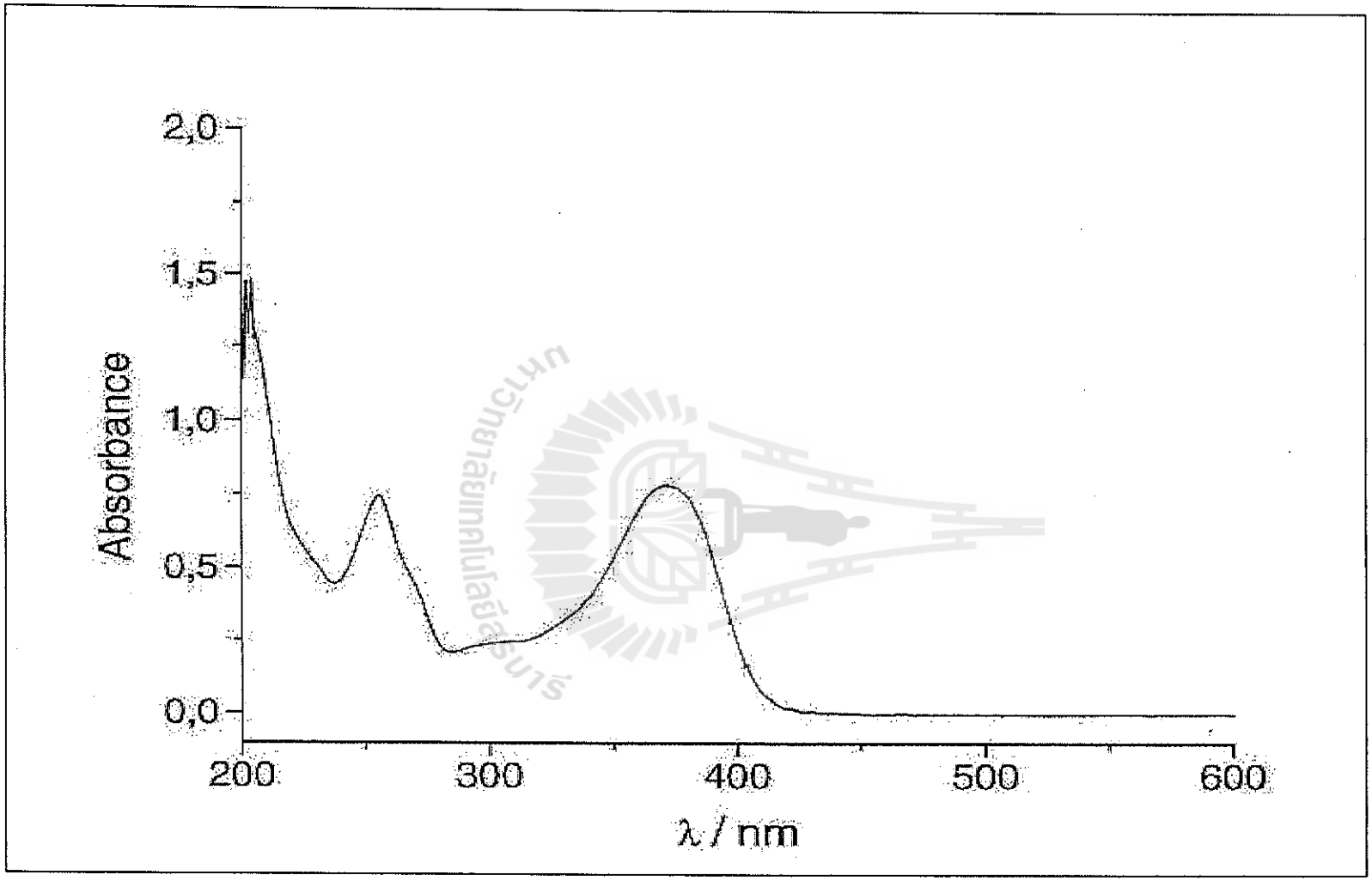
Rubens, F.V., Wangner, F., 2005. Synthesis, spectral and electrochemical properties of Al (III) and Zn (II) complexes with flavonoids. Spectrochim. Acta A 61, 1985–1990.

Stapleton, P., Wu, P.J., King, A., Shannon, K., French, G., Phillips, I., 1995. Incidence and mechanisms of resistance to the combination of amoxicillin and clavulanic acid in *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 39, 2478–2483.

Tzouvelekis, L.S., Zissis, N.P., Gazouli, M., Tzelepi, E., Legakis, N.J., 1997. In vitro comparative assessment of [beta]-lactamase inhibitors and their penicillin combinations against selected enterobacteria. Int. J. Antimicrob. Agents 8, 193–197.

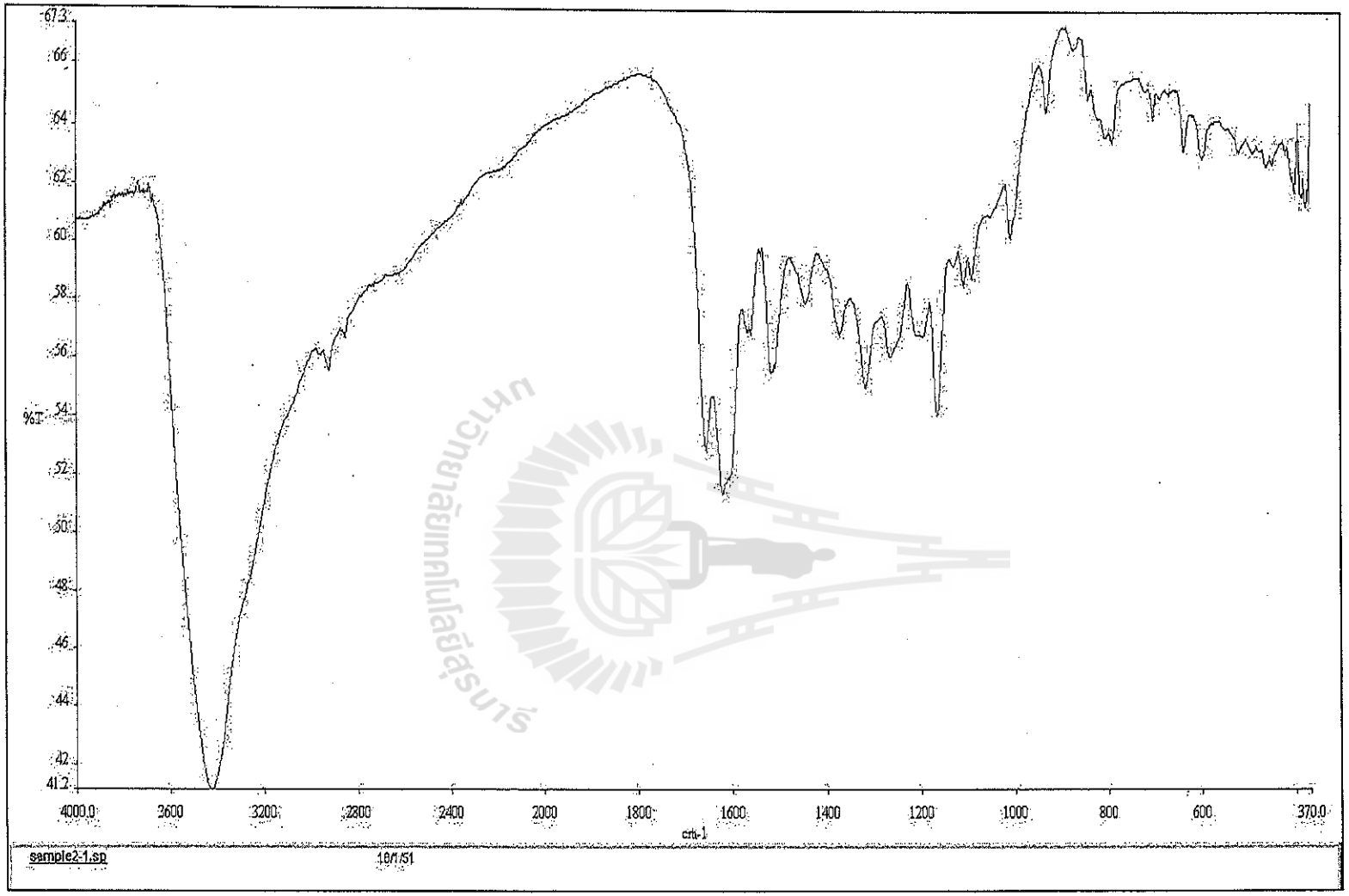
Wagner, H., Ulrich-Merzenich, G., 2009. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. Phytomedicine 16, 97–110.

Zhao, W.H., Hu, Z.Q., Hara, Y., Shimamura, T., 2002. Inhibition of penicillinase by epigallocatechin gallate resulting in restoration of antibacterial activity of penicillin against penicillinase-producing *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 46, 2266–2268.



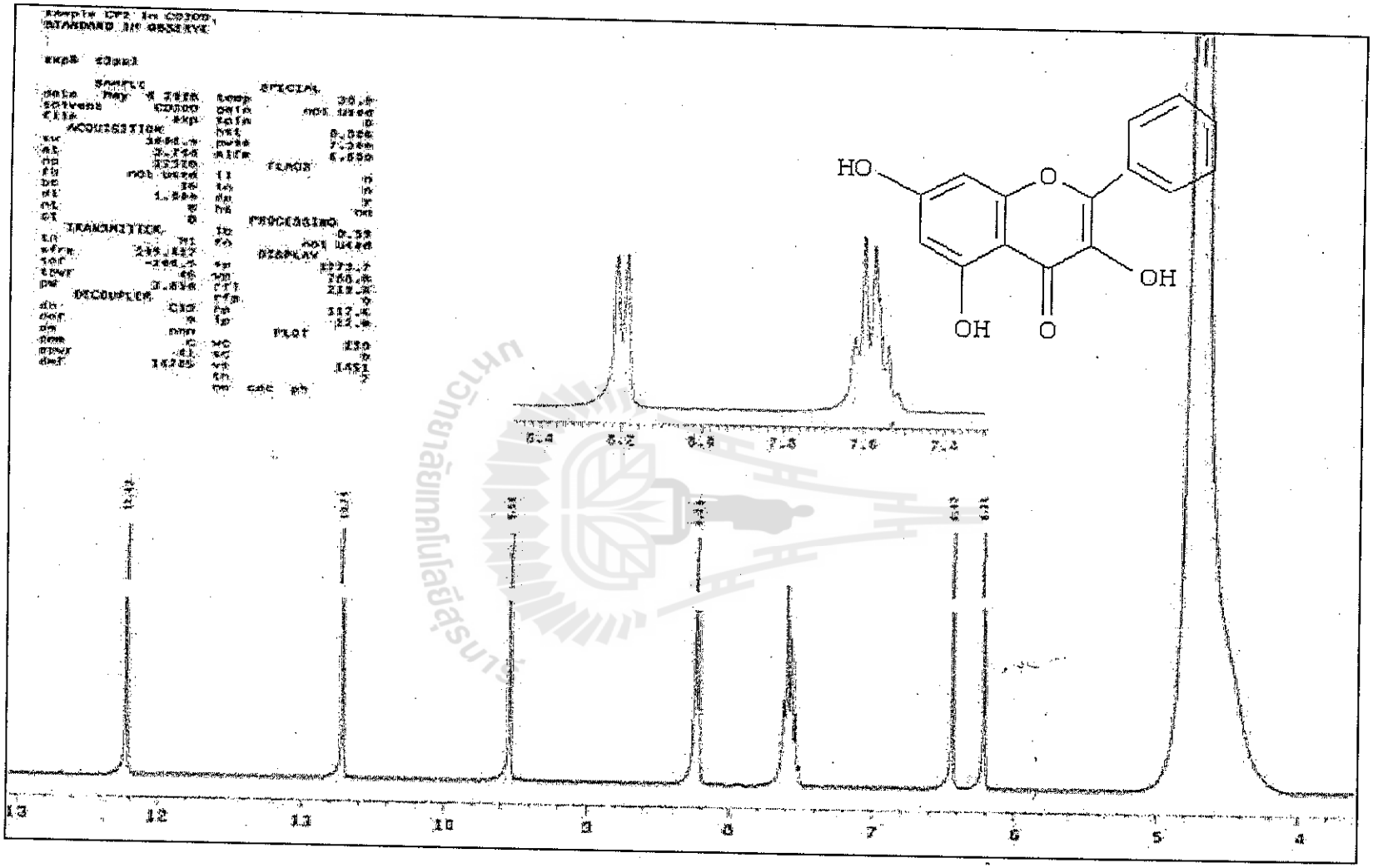
รูปที่ 6 แสดง UV-Vis spectrum ของสารตัวที่ 1

23

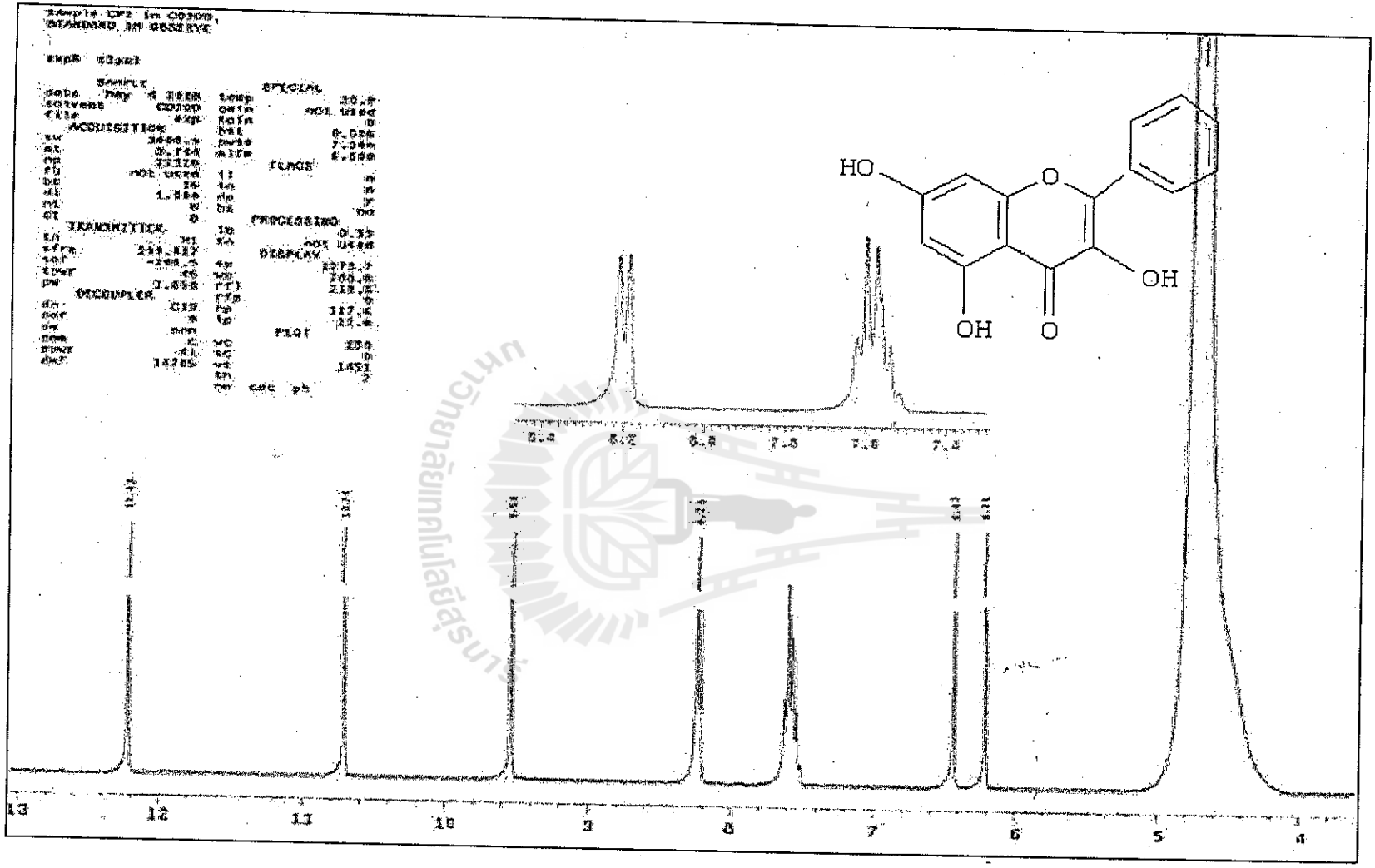


รูปที่ 7 แสดง IR spectrum ของสารตัวที่ 1

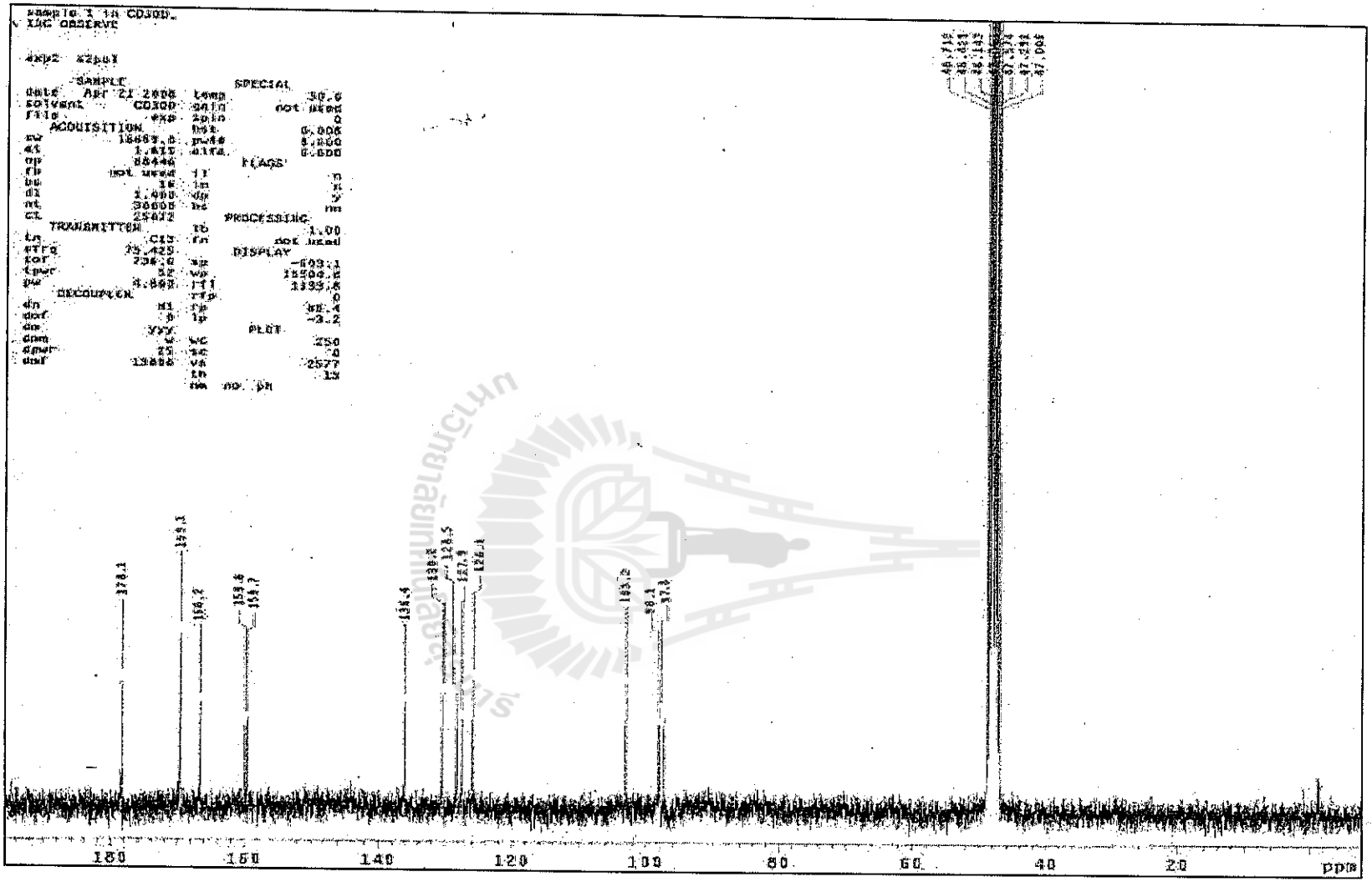
24



รูปที่ 8 แสดง ^{1}H-NMR spectrum ของสารตัวที่ 1

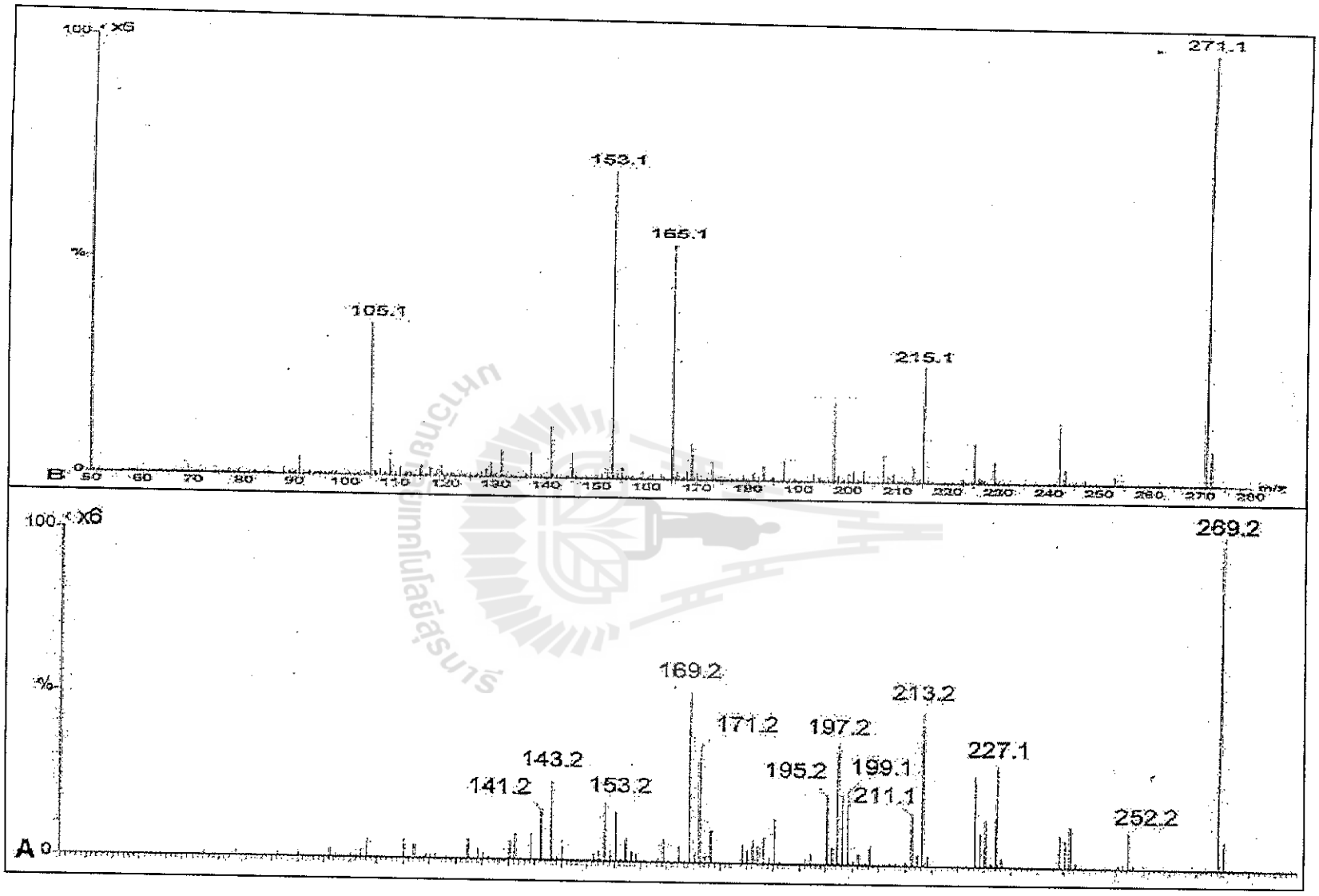


รูปที่ 8 แสดง ^{1}H-NMR spectrum ของสารตัวที่ 1



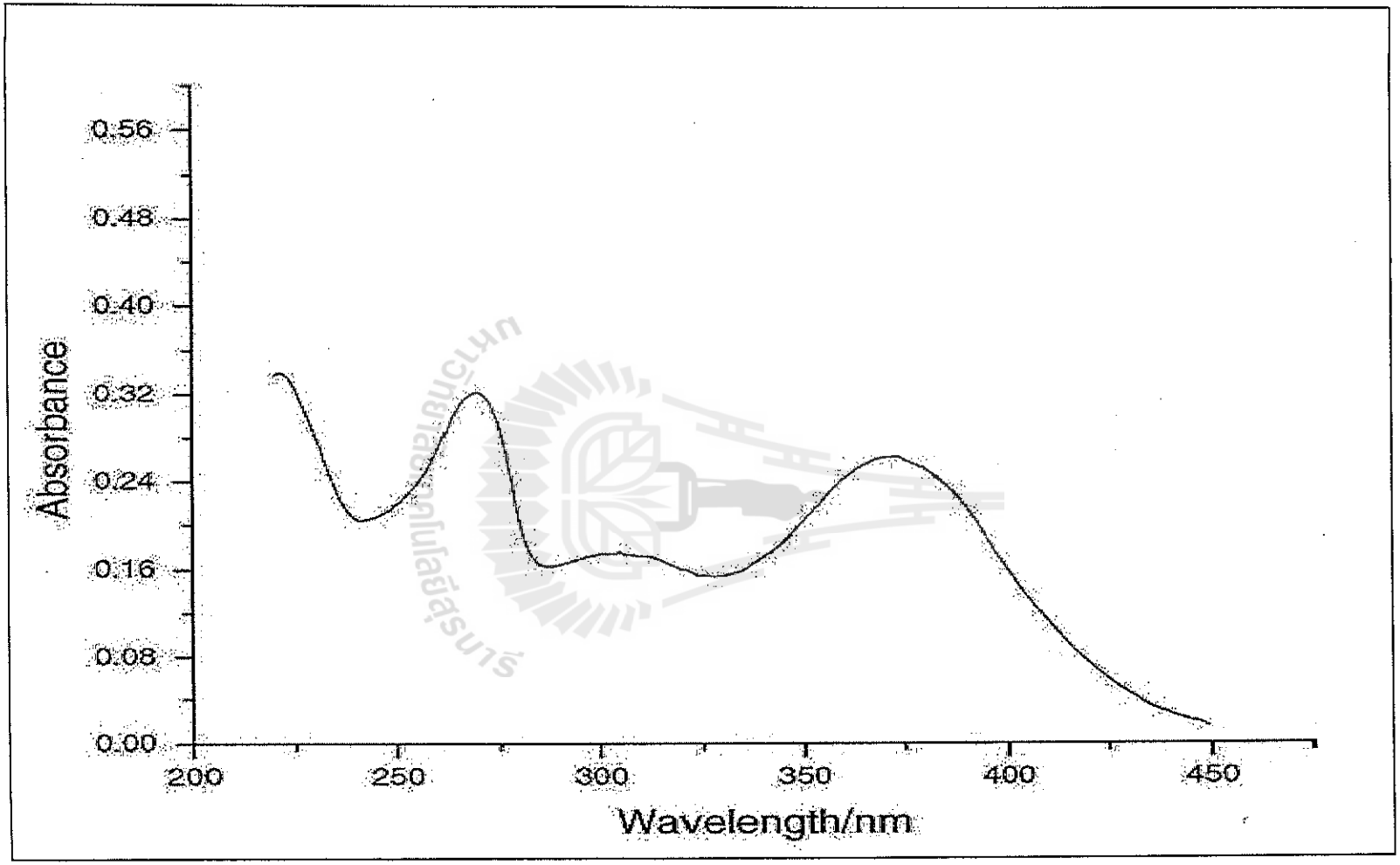
รูปที่ 9 แสดง ^{13}C-NMR spectrum ของสารตัวที่ 1

26



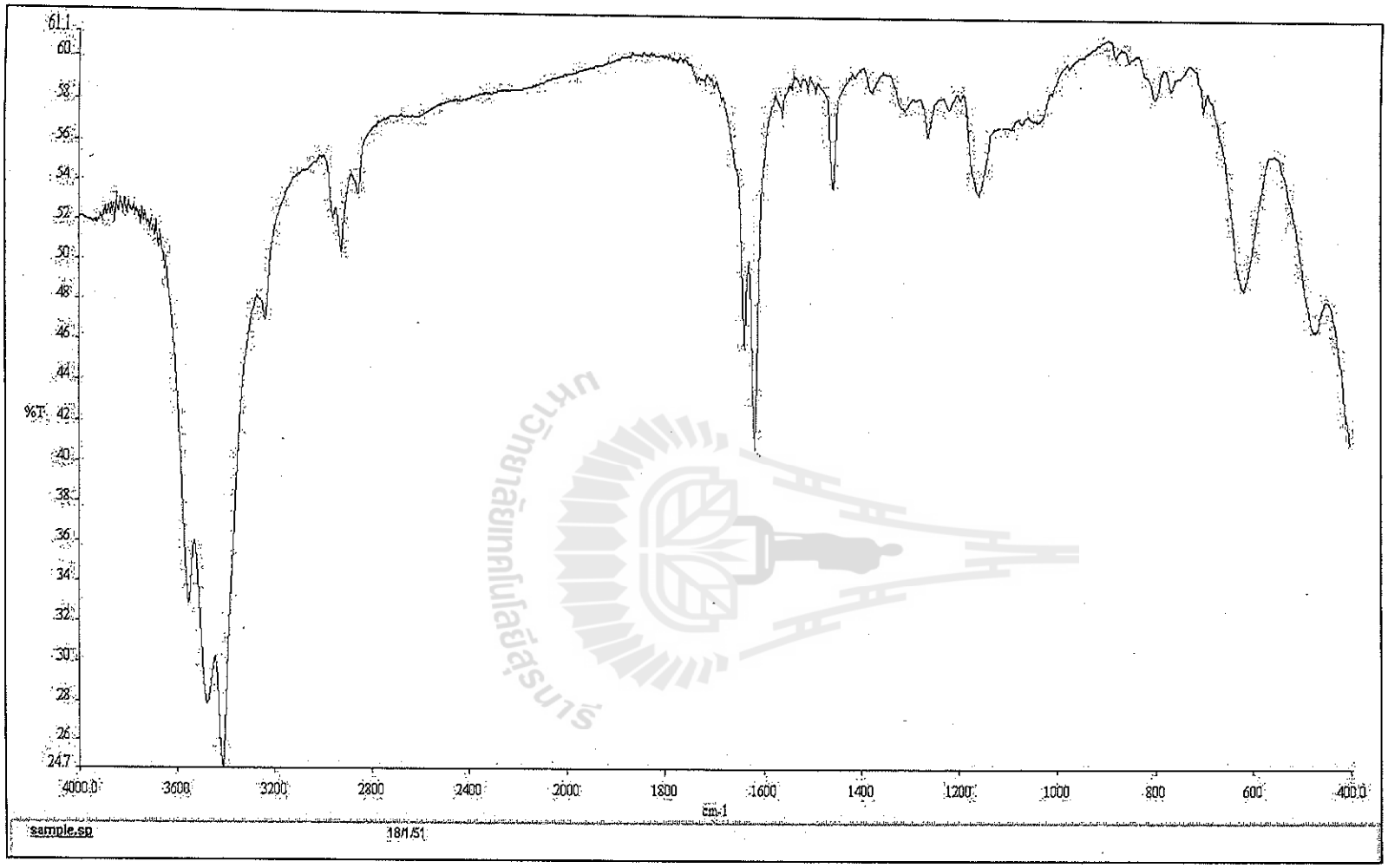
รูปที่ 10 แสดง Mass spectrum ของสารตัวที่ 1

27

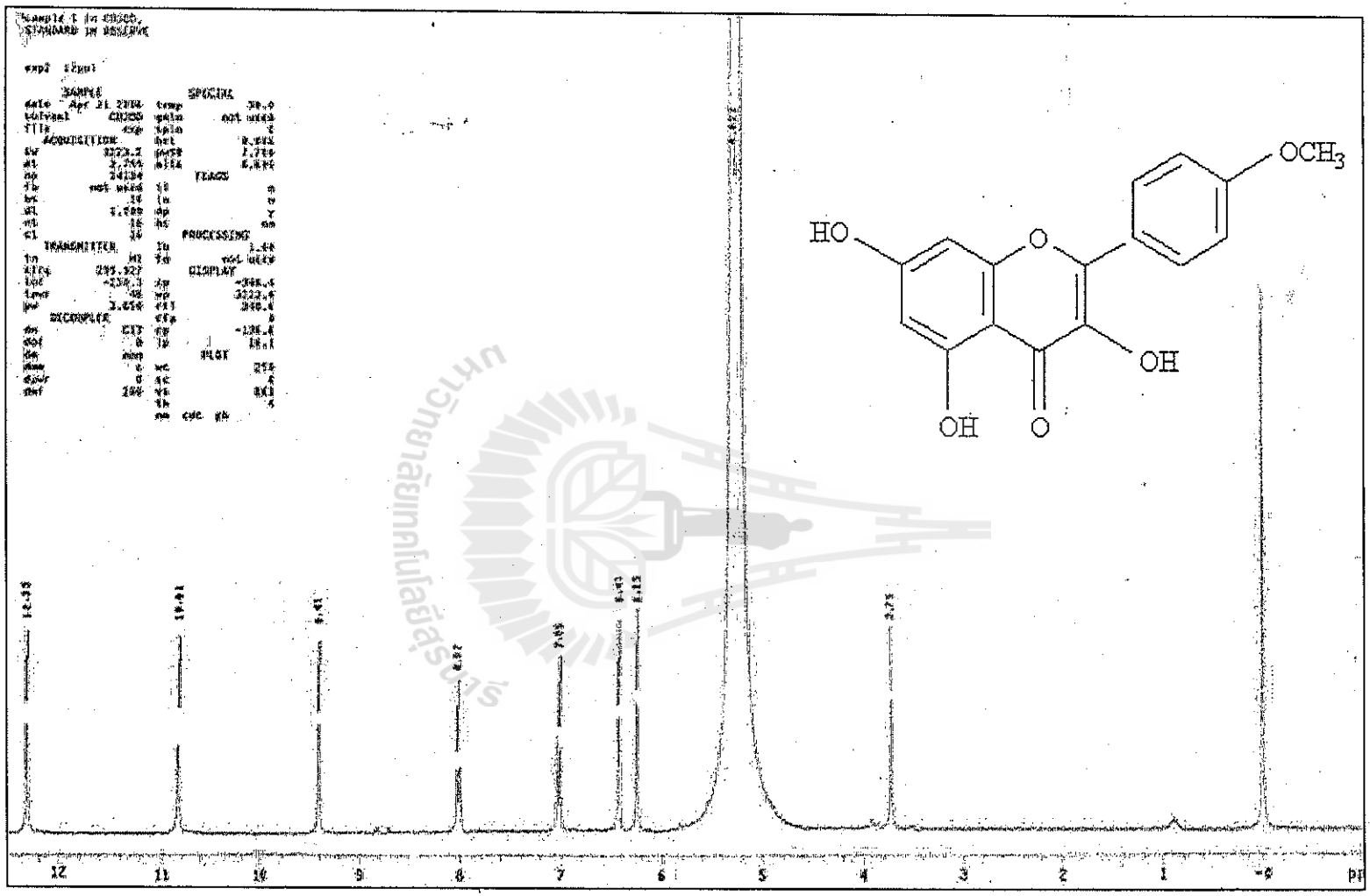


รูปที่ 11 แสดง UV-Vis spectrum ของสารตัวที่ 2

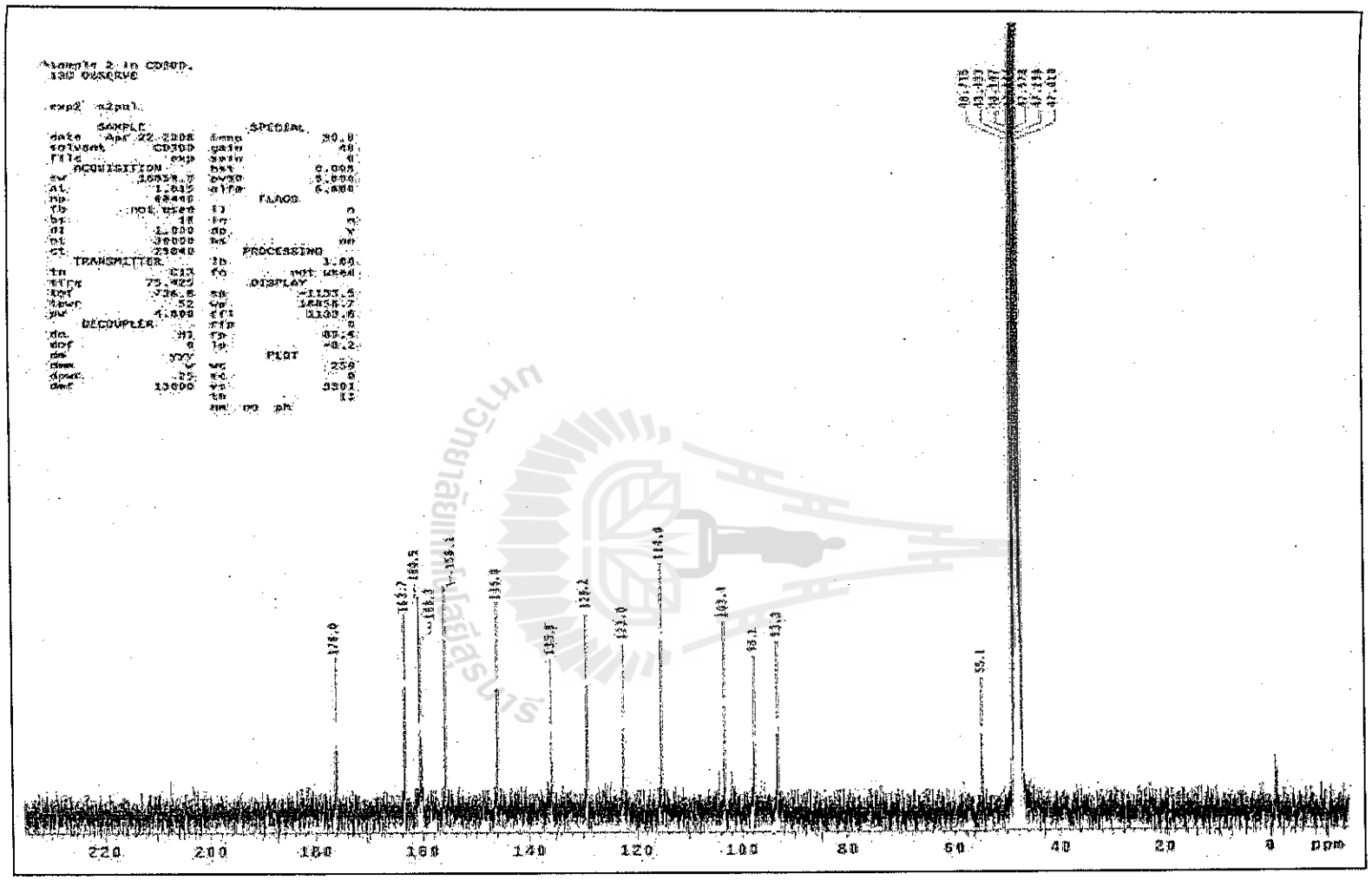
28



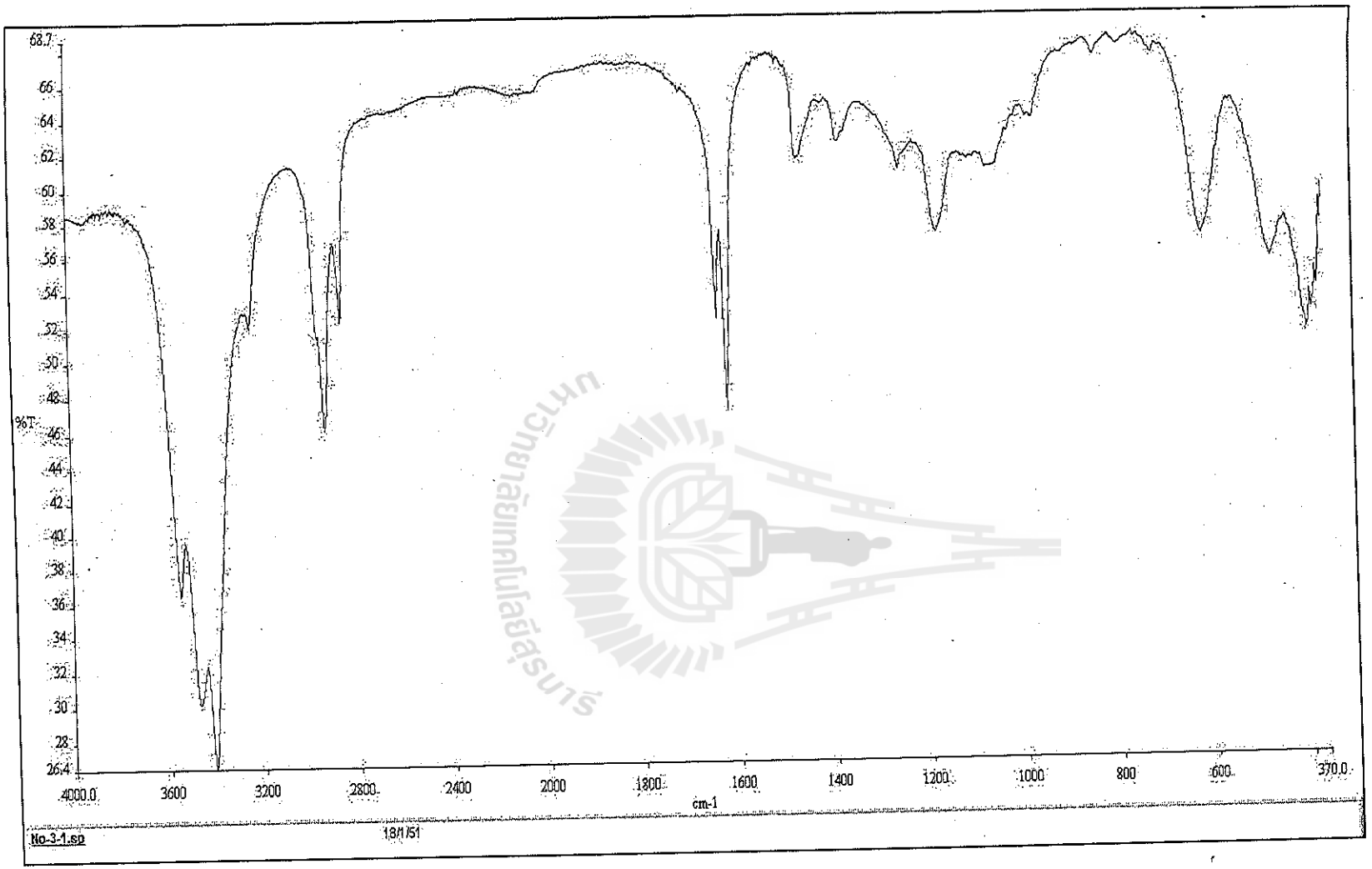
รูปที่ 12 แสดง IR spectrum ของสารตัวที่ 2



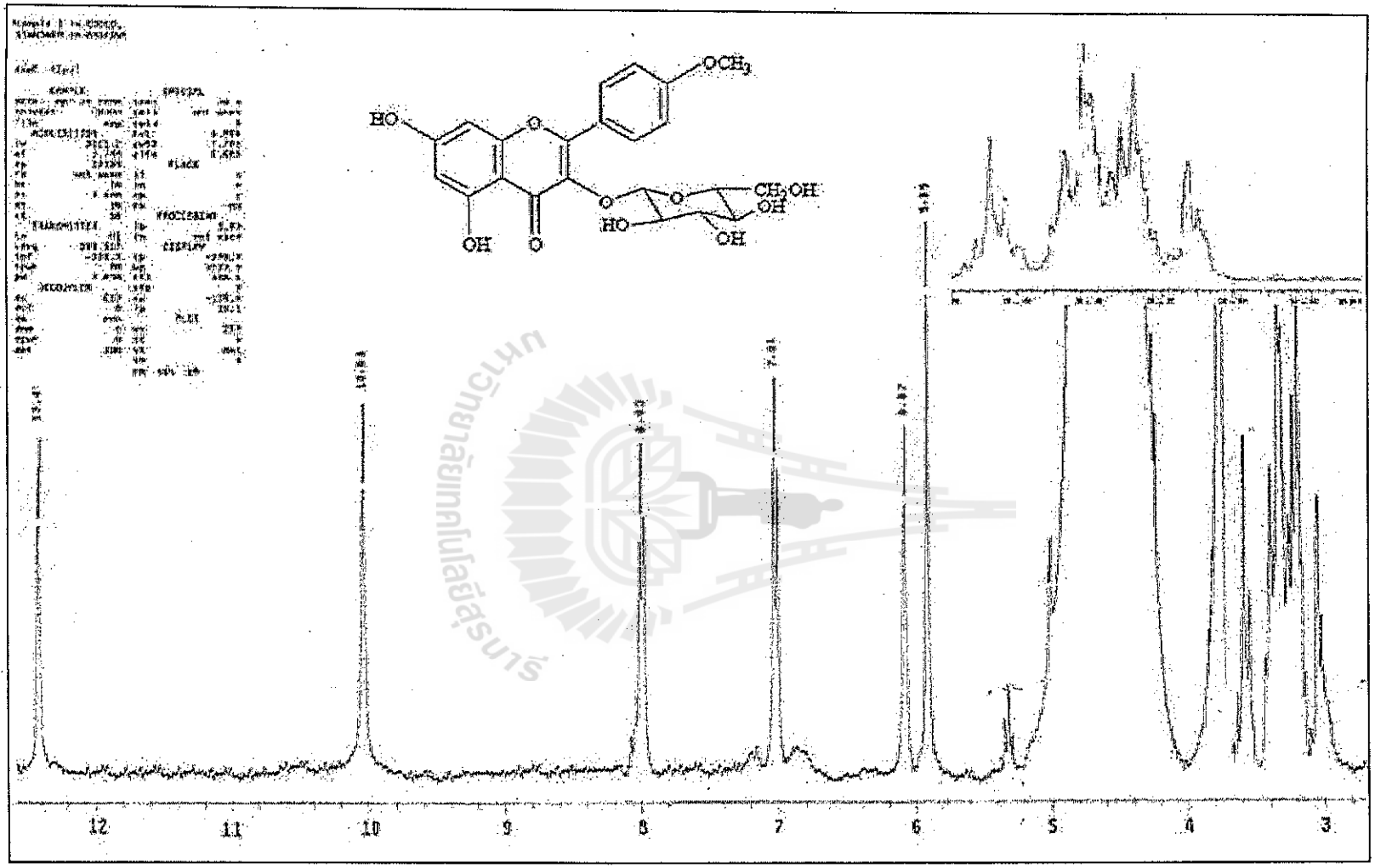
รูปที่ 13 แสดง ^{1}H-NMR spectrum ของสารตัวที่ 2



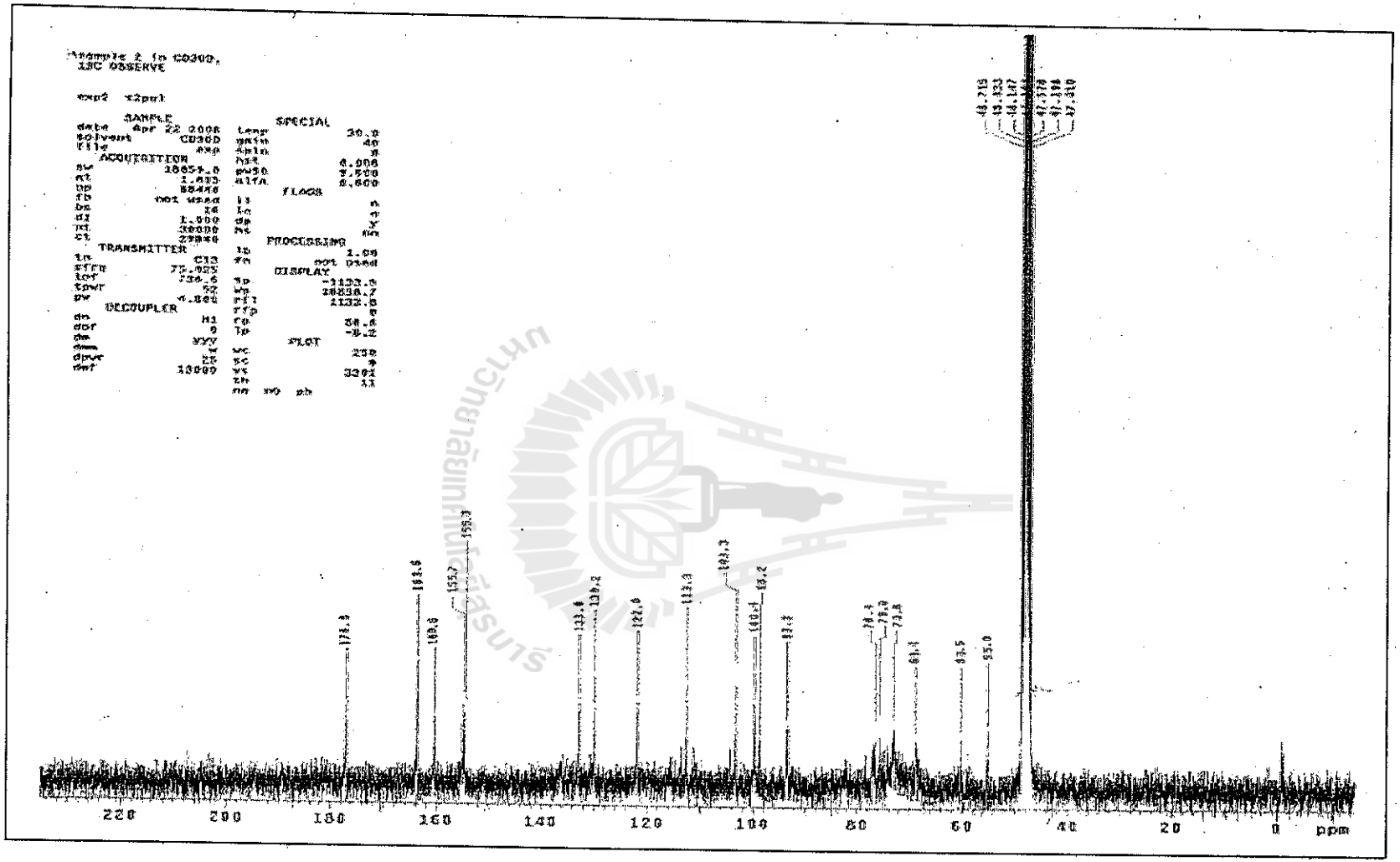
รูปที่ 14 แสดง ^{13}C-NMR spectrum ของสารตัวที่ 2



รูปที่ 15 แสดง IR spectrum ของสารตัวที่ 3



รูปที่ 16 แสดง ^{1}H-NMR spectrum ของสารตัวที่ 3



รูปที่ 17 แสดง ^{13}C-NMR spectrum ของสารตัวที่ 3

ประวัติบุคคล

1. ชื่อ – นามสกุล ภาษาไทย รองศาสตราจารย์ ดร.สันติ ศักดารัตน์

ภาษาอังกฤษ Assoc. Prof. Dr.Santi Sakdarat

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3110101782504

3. ระบุตำแหน่งบริหาร/วิชาการ ที่เป็นปัจจุบัน รศ.ดร.

4. ที่อยู่ (ที่ทำงาน) สาขาวิชาเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

111 ถนนมหาวิทยาลัย ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000

โทรศัพท์ 044 – 224302 โทรสาร 044 – 224185

โทรศัพท์เคลื่อนที่ 084 -0927697

E-mail santi@sut.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

B.Sc. Honors (Chemistry) 2517 Prince of Songkla University

M.Sc. (Organic Chemistry) 2519 Mahidol University

Ph.D. (Organic Synthesis) 2522 University of Glasgow. UK

6. สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ

1. Searching New Drugs from Thai Traditional Medicinal Plants and Natural Products by Extraction, Isolations, Structure. Elucidation and Biological Evaluation
2. Applications of LC-MS for analysis determination of natural products, drugs residues in environment food and toxicology

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 ผลงานวิจัย

1. Sakdart, S. and Robins, D.J. 1979. "Synthesis of the 8β-Pyrrolizidine Base, (+)-Isoretronecanol, (+) – Supinidine, and (+)-Laburnine" J.chem. Soc., Chem. Commun., 1181.
2. Sakdarat, S. and Robins, D.J.1980. "Synthesis of 13, 13-Dimethy1-1, 2-dihydrocrotalanine"., J. Chem. Soc., Chem. Commun., 282

3. Sakdarat, S. and Robins, D.J. 1981. "Synthesis of Optically Active Pyrrolizidine Bases". J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1., 909.
4. Sakdarat, S. Robins, D.J.and Devlin, J.A. 1982 ."Pyrrolizidine Alkaloid Analogues. Synthesis of Eleven-membered Macrocyclic Diester of Retronecine". J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1., 1117.
5. Sakdarat, S. and Williams, D.R. 1983. "Opportunities for Selective Removal of Methoxyethoxymethyl (MEM) Ethers". Tetrahedron Lett. 24, 3965.
6. Sakdarat, S. and Kowalski, C.J. "Ester Homologation via Ynolate Anions" J. Organic Synthesis, submitted.
7. Sakdarat, S. and Kowalski, C.J. "Silyl Ynol Ethers for Alkoxymethylene Introduction, Including the Synthesis of d, 1-Oudemansin". Journal of the American Chemical Society, submitted.
8. Sakdarat, S. and Kowalski, C.J. 1990. "Reaction of Silyl Ynol Ethers with Aldehyde and Acetals: An Alternative to the Horner-Wadsworth-Emmons Condensation". Journal of Organic Chem. 55, 1977-1979.
9. Sakdarat, S., Barrett, A.G.M., Cheng, M.C., Spilling, C.D. and Taylor, S.J. 1989. "Sterecontrolled Total Synthesis of the Penicillanate ester (25, 5R)-benzyl 3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo [3.2.0] heptane-2-carboxylate". Tetrahedron Lett. 30, 2349.
10. Sakdarat, S. and Barrett, A.G.M. 1990. "Total Synthesis of Penicillanic Acid S, S-Dioxide and 6-Aminopenicillanic Acid Using (Benzyloxy) nitromethane". Journal of Organic Chem, 55, 5110-5117.
11. Smitasiri, Y., and Sakdarat, S 1995. "The Means of Application of *Pueraria mirifica* for Pigeon *(Columba sp.)* Birth control". Suranaree J. Sci. Technol. 2, 89-96.
12. Sakdarat, S. and Robins, D.J. 1999. Chemical constituents from Bitter Cucumber, *Momordica charantia* Linn. Abstract of the 25th Congress on Science and Technology of Thailand, at Pissanulog, A-158, 404-5
13. Dechatiwongse Na Ayudhya T, Sakdarat S, Shuyprom A, Pattamadilok D, Bansiddhi J, Waterman PG and Karagianis G. 2001. Chemical Constituents from the Leaves of *Clinacanthus nutans* Lindau. 2001. Abstract of the 27th Congress on Science and Technology of Thailand, at Songkhla, 16-03p-05, 156

14. Dechatiwongse Na Ayudhya T, Sakdarat S, Shuyprom A, Pattamadilok D, Bansiddhi J, Waterman PG and Karagianis G. 2001. Chemical Constituents of the Leaves of *Clinacanthus nutans* Lindau. Thai Journal of Phytopharmacy. 8(1) , 1 – 8.

15. Chuankhayan P, Hua Y, Svasti J, Sakdarat S, Sullivan P.A., and Ketudat Cairns J.R. 2005. Purification of an isoflavonoid 7-O-B-apiosyl-glucoside B-glycosidase and its substrates from *Dalbergia nigrescens* Kurz. Phytochemistry. 66, 1880-1889.

16. Sakdarat S., Panyakom K., Shuyprom A., and Samart N.(2006). The constituents of the leaves of *clinacanthus nutans* landau part II. In *International Conference on Applied Science(ICAS-2006).* 5-7 November 2006, Laos.

17. Sakdarat S., Panyakom K., Shuyprom A., and Samart N.(2007). Chemical composition investigation of the clinacanthus nutans landau leaves. In *The 10th International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry(IKCOC-10)* 12-17 November 2006,Japan.

18. Sakdarat S., Robins D.,2008. Chemical Constitutens of the Thai Bitter Gourd *Momordica Charantia* Linn.(Marakheenok). The 2nd International Conference on Science and Technology for Sustainable Development of the Greater Mekong Sub-region, Hanoi, Vietnam, 2-3 October, 2008.

19. Sakdarat S., Samart N.,2008. Chemical Constituents from the rhizome of Smaller Galanga *(Alpinia officinarum* Hance). The 3rd Sino-Thai International Conference on Traditional Medicine and Natural Health Products,Nanning,Guangxi,P.R. China 29-31 October 2008.

20. Sakdarat S., Shuyprom A., Dechatiwongse Na Ayudhya T., Pientong C., Ekalaksananan T., Thongchai S., 2008. Bioactive Constituents from the Leaves of *Clinacanthus nutans* Lindau for anti-herpes simplex virus type 1 and type 2 activities. The 2nd International Conference on Natural Products for Health and Beauty(NATPRO). Naresuan University at Phayoa,Thailand 17-19 December 2008, Naresuan Phayoa Journal Volume 1,Supplement(1) page43,2008.

21. Sakdarat S., Shuyprom A., Dechatiwongse Na Ayudhya T., Waterman P.G. and Karagianis G., 2008, 'Chemical composition investigation of the

clinacanthus nutans landau leaves',Thai Journal of Phytopharmacy, 13(2) – 15(1) , 13-24

22. Sakdarat S., Shuyprom A., Pientong C., Ekalaksananan T., Thongchai S., 2009, 'Bioactive constituents frpm the leaves of Clinacanthus nutans Lindau', Bioorganic & Medicinal Chemistry 17 (2009) 1857-1860
23. Sakdarat S., Tanphonkrang S., Pientong C., Ekalaksananan T., 2010 "Bioactive Flavonoildsfrom the rhizome of Alpinia conchigera Griff", The 11th Tetrahedron Symposium on Frontiers of Organic Chemistry, 22-25 June, 2010,Beijing, China.
24. Sakdarat S., Shuyprom A., Pientong C., Ekalaksananan T., Thongchai S., 2010 "Chlorophyll A and B related compounds from Clinacanthus nutans Lindau leaves and theit antiviral activity" The 30th International Conference on Science and Technology[2010-(30th)-ICST], 5-6 August,2010, Budapest, Hungary

7.2 รางวัลที่เคยได้รับ

1. Graduate Fellowship, Glasgow University, U.K. Oct. 1976 – Sept. 1979
2. Graduate Fellowship, Mahidol University, THAILAND March 1974 – Feb. 1976
3. Studentship from Prime Mininster T. Kittikajon, THAILAND. 1971 – 1972

7.3 งานวิจัยหลังปริญญาเอก

1. 1979 – 1982 Postdoctorate Southampton University, England
2. 1982 – 1986 Postdoctorate Indiana University, USA.
3. 1986 – 1988 Postdoctorate Smith Kline Beecham, Pharmaceutical Company USA.
4. 1988 – 1990 Postdoctorate Northwestern University, USA.
5. 1990 – 1992 Postdoctorate Virginia Tech. and State University, USA.