รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากดอกฝ้ายน้ำ และเห็ด *Sanghuangporus* sp.1

นางสาวเอื้ออาทร ราชจันทร์ และคณะ

เมษายน 2563

สัญญาเลขที่ MRG6180081

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากดอกฝ้ายน้ำ และเห็ด *Sanghuangporus* sp.1

1. นางสาวเอื้ออาทร ราชจันทร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

2. ศาสตราจารย์สมเดช กนกเมธากุล มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG6180081

ชื่อโครงการ: องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากดอกฝ้ายน้ำและเห็ด *Sanghuangporus* sp.1

ชื่อนักวิจัย: นางสาวเอื้ออาทร ราชจันทร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
ศาสตราจารย์สมเดช กนกเมธากุล มหาวิทยาลัยขอนแก่น

E-mail Address: oueartorn.r@msu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี (2 พฤษภาคม 2561 - 1 พฤษภาคม 2563)

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากรา *Sanghuangporus* sp. และดอกฝ้ายน้ำซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย พบว่าแยกสารใหม่สองสารคือ (4*S*,6*S*)-4-hydroxy-γ-ionylideneacetic acid (**S1**) และ (4*R*,5*R*,6*S*)-5,14-dihydro-4-hydroxy-γ-ionylideneacetic acid (**S2**) และสารที่ทราบโครงสร้างแล้วสามสารคือ γ-ionylideneacetic acid (**S3**) 1*S*-(2*E*)-5-[(1*R*)-2,2-dimethyl-6-methylidene cyclohexyl]-3-methylpent-2-enoic acid (**S4**) และ D-mannitol (**S5**) จากรา *Sanghuangporus* sp. ในส่วนของดอกฝ้ายน้ำแยกสารได้ทั้งหมดเจ็ดสาร เป็นสารที่ทราบโครงสร้างแล้วสี่สารคือ isocrotocaudin (**C1**) isoteucvin (**C2**) stigmasterol (**C3**) และ stigmasterol-3-*O*-β-D-glucoside (**C4**) และอีกสามสาร (**C5**-**C7**) ที่อยู่ในกระบวนการวิเคราะห์โครงสร้าง วิเคราะห์โครงสร้างของสารที่แยกได้ด้วยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี (IR 1D และ 2D NMR) และแมสสเปกโทรเมทรี ระบุโครงสร้างสัมบูรณ์ของสาร **S1** และ **S2** ด้วยข้อมูล NOESY และการเปรียบเทียบข้อมูล ECD จากการทดลองและการคำนวณ ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้ต่อฤทธิ์ต้านแบคทีเรียห้าชนิด (*Staphylococcus aureus* MSSA 2933 *S. aureus* MRSA 20651 *Bacillus cereus* ATCC 11778 *Escherichia coli* 25922 และ *Shigella dysenteriae* 15110) ฤทธิ์ต้านเบาหวาน และความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (KB MCF-7 และ NCI-H187)

คำหลัก: *Sanghuangporus* sp.; ต้นฝ้ายน้ำ; cyclofarnesane sesquiterpenoid; clerodane diterpenoid; ฤทธิ์ทางชีวภาพ

Abstract

Project Code: MRG6180081

Project Title: Chemical Constituents and Biological Activities from the Flowers of *Croton krabas* and the Cultures of Mushroom *Sanghuangporus* sp.1

Investigator: Dr. Oue-artorn Rajachan Mahasarakham University

Prof. Dr. Somdej Kanokmedhakul Khon Kaen University

E-mail Address: oueartorn.r@msu.ac.th

Project Period: 2 years (2 May 2018 - 1 May 2020)

The chemical constituents from the fungus *Sanghuangporus* sp. and the flowers of *Croton krabas* were investigated based on their antibacterial activity. Two new cyclofarnesane sesquiterpenoids, (4*S*,6*S*)-4-hydroxy-γ-ionylideneacetic acid (**S1**) and (4*R*,5*R*,6*S*)-5,14-dihydro-4-hydroxy-γ-ionylideneacetic acid (**S2**), together with three known compounds γ-ionylideneacetic acid (**S3**), 1*S*-(2*E*)-5-[(1*R*)-2,2-dimethyl-6-methylidene cyclohexyl]-3-methylpent-2-enoic acid (**S4**) and D-mannitol (**S5**) were isolated from the fungus *Sanghuangporus* sp. Whereas, four known compounds, isocrotocaudin (**C1**), isoteucvin (**C2**), stigmasterol (**C3**) and stigmasterol-3-*O*-β-D-glucoside (**C4**), along with three compounds (**C5**-**C7**) were separated from the flowers of *C. Krabas*. Their structures were elucidated using extensive spectroscopic data (IR, 1D and 2D NMR) and MS. The absolute configurations of compounds **S1** and **S2** were identified by NOESY and a comparison of their experimental and calculated ECD spectral data. The isolated compounds were evaluated for antibacterial activity against five bacterial strains (*Staphylococcus aureus* MSSA 2933, *S. aureus* MRSA 20651, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* 25922, and *Shigella dysenteriae* 15110), anti-diabetes, and cytotoxicity against three cancer cells (KB, MCF-7, and NCI-H187).

Keywords: *Sanghuangporus* sp.; *Croton krabas*; cyclofarnesane sesquiterpenoid; clerodane diterpenoid; biological activity

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
Abstract	ข
สารบัญ	ค
Executive Summary	1
บทนำ	2
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
วัตถุประสงค์	10
วิธีการทดลอง	10
สรุปผลการดำเนินการ	17
ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต	18
เอกสารอ้างอิง	18
Output ที่ได้จากโครงการ	21
ภาคผนวก	22

Executive Summary

รหัสโครงการ : MRG6180081

ชื่อโครงการ : องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากดอกฝ้ายน้ำและเห็ด *Sanghuangporus* sp.1

ชื่อนักวิจัย: นางสาวเอื้ออาทร ราชจันทร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ศาสตราจารย์สมเดช กนกเมธากุล มหาวิทยาลัยขอนแก่น

E-mail Address: oueartorn.r@msu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี (2 พฤษภาคม 2561 - 1 พฤษภาคม 2563)

รายละเอียดผลการดำเนินงานของโครงการ

โครงการวิจัยนี้มุ่งเน้นการแยกสาร การพิสูจน์โครงสร้างสารบริสุทธิ์และการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากรา *Sanghuangporus* sp. และจากดอกฝ้ายน้ำ ซึ่งสามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 12 สาร เป็นสารที่แยกได้จากรา *Sanghuangporus* sp. 5 สาร เป็นสารใหม่กลุ่ม cyclofarnesane sesquiterpenoids 2 สาร คือ (4*S*,6*S*)-4-hydroxy-γ-ionylideneacetic acid (**S1**) และ (4*R*,5*R*,6*S*)-5,14-dihydro-4-hydroxy-γ-ionylideneacetic acid (**S2**) และสารที่เคยรายงานโครงสร้างแล้ว 3 สารคือ γ-ionylideneacetic acid (**S3**) 1*S*-(2*E*)-5-[(1*R*)-2,2-dimethyl-6-methylidenecyclohexyl]-3-methylpent-2-enoic acid (**S4**) และ D-mannitol (**S5**) และสารจากดอกฝ้ายน้ำ 7 สาร คาดว่าน่าจะเป็นสารใหม่ 3 สาร (**C5**-**C7**) เป็นสารกลุ่ม clerodane diterpenoids ซึ่งยังอยู่ในกระบวนการยืนยันโครงสร้างจากแมสสเปกโทรเมทรี และสารที่ทราบโครงสร้างแล้วอีก 4 สาร คือ isocrotocaudin (**C1**) isoteucvin (**C2**) stigmasterol (**C3**) และ stigmasterol-3-*O*-β-D-glucoside (**C4**) วิเคราะห์โครงสร้างของสารที่แยกได้ด้วยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี (IR 1D และ 2D NMR) และแมสสเปกโทรเมทรี ระบุโครงสร้างแบบสัมบูรณ์ของสารใหม่ที่แยกได้ด้วยข้อมูล NOESY และการเปรียบเทียบข้อมูล ECD จากการทดลองและการคำนวณ เมื่อนำสารบริสุทธิ์ที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าสารดังกล่าวมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายเช่น ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (*Staphylococcus aureus* MSSA 2933 *S. aureus* MRSA 20651 *Bacillus cereus* ATCC 11778 *Escherichia coli* 25922 และ *Shigella dysenteriae* 15110) และความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) มะเร็งเต้านม (MCF-7) มะเร็งปอด (NCI-H187) และยังศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (Vero cells) ด้วย

คำหลัก : *Sanghuangporus* sp.; *Croton krabas*; cyclofarnesane sesquiterpenoid; clerodane diterpenoid; biological activity

รายละเอียดผลการดำเนินการของโครงการ

1. บทนำ

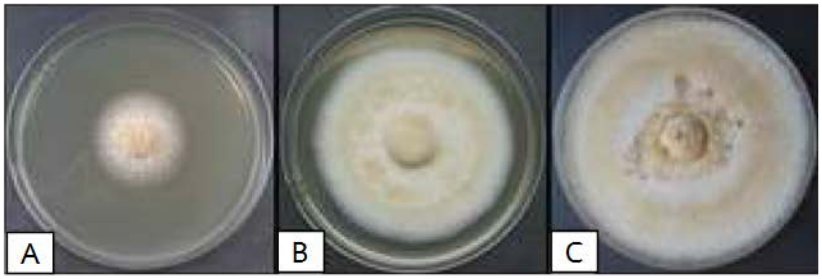
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

เป็นที่ทราบกันดีว่าปัจจุบันการดื้อยาต้านจุลชีพ (Antimicrobial resistance) ของเชื้อแบคทีเรียได้ทวีความรุนแรงมากขึ้นและมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทำให้ยาต้านจุลชีพที่ในอดีตเคยใช้ได้ผลกลับใช้ไม่ได้ผลแล้ว โดยจะเห็นได้จากข่าวที่ทั่วโลกมีการเสียชีวิตจากเชื้อดื้อยาประมาณปีละ 700,000 คน และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในขณะเดียวกันอุตสาหกรรมยาทั่วโลกได้มีการวิจัยและพัฒนาหรือค้นคิดยาต้านจุลชีพชนิดใหม่เพื่อต่อสู้กับเชื้อแบคทีเรียดื้อยาซึ่งการศึกษานี้มีค่าใช้จ่ายสูง นอกจากนี้ยังพบว่าประเทศไทยเรามีผู้ป่วยเบาหวานเพิ่มมากขึ้น เป็นผลเนื่องมาจากสังคมไทยกำลังก้าวสู่สังคมผู้สูงอายุ จากข้อมูลงานวิจัยพบว่าในปี พ.ศ. 2558 มีผู้ป่วยเบาหวานทั่วโลก 348 ล้านคน และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น 53% ในระยะเวลา 20 ปี ยาที่ใช้ในการรักษาเบาหวานนี้ส่วนใหญ่มีผลข้างเคียงต่อสุขภาพ ดังนั้นการค้นหาตัวยาใหม่ๆ โดยใช้สมุนไพรไทยเพื่อเป็นทางเลือกในการใช้ควบคู่หรือทดแทนตัวยาเดิมที่ดื้อต่อเชื้อแบคทีเรียหรือลดผลข้างเคียงของยาต่อปัญหาสุขภาพ จึงมีความจำเป็นอย่างมาก เพื่อเป็นการลดต้นทุนและนำสมุนไพรที่มีอยู่มาใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อไปในอนาคต

เนื่องด้วยภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพของพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ และภูมิปัญญาชาวบ้านยังคงใช้ประโยชน์จากพืชสมุนไพรในการรักษาและบรรเทาอาการเจ็บป่วยเบื้องต้น ดังนั้นในงานวิจัยนี้สนใจศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากเส้นใยรา *Sanghuangporus* sp. และดอกฝ้ายน้ำ (*Croton krabas*) ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณทางยาและพบในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนใต้ มาสกัดแยกหาสารประกอบทางเคมีและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ต้านเบาหวาน และความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่างๆ ต่อไป

***Sanghuangporus* sp.**

Sanghuangporus จัดอยู่ในวงศ์ (family) Hymenochaetaceae หรือรู้จักกันในชื่อของเห็ดซางฮวง เห็ดชนิดนี้มีสรรพคุณทางยามากมาย โดยที่จีน ญี่ปุ่น เกาหลี และไต้หวัน ใช้เป็นอาหารและยาแผนโบราณมาเป็นเวลาหลายร้อยปี รา *Sanghuangporus* sp. ที่ใช้ในการศึกษานี้ สกัดมาจากเห็ดซางฮวง ซึ่งเก็บตัวอย่างมาจากจังหวัดมุกดาหาร เลี้ยงตัวอย่างเห็ด *Sanghuangporus* sp. ด้วยอาหาร potato dextrose agar (PDA) เป็นเวลา 22 วัน (รูปที่ 1) และจากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น พบว่าส่วนสกัดหยาบเอทานอลของเชื้อรา *Sanghuangporus sp.* มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus* ATCC 11778 *Staphylococcus aureus* MSSA 2933 และ *Vibrio cholerae* [O1] DMST 9700 (MIC 2.5-10.0 mg/mL)[1]



รูปที่ 1 *Sanghuangporus* sp. บนอาหาร PDA ในช่วงเวลา 7 14 และ 22 วัน (A B และ C)

ฝ้ายน้ำ (*Croton krabas*)

ต้นฝ้ายน้ำจัดอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae มีลักษณะเป็นไม้พุ่มสูง 1-3 เมตร (รูปที่ 2) มีสรรพคุณทางยาคือ เปลือกและดอกนำมาทำเป็นยาต้มเพื่อลดแก๊สในกระเพาะอาหาร และรักษาโรคเกี่ยวกับกระเพาะอาหาร จากการสืบค้นข้อมูล (Scifinder, October 2019) พบว่ายังไม่มีรายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากดอกฝ้ายน้ำ และจากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นพบว่าส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซีเตทและเมทานอลของดอกฝ้ายน้ำมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cereus* และ *Salmonella aureus* ดังตารางที่ 1

จากสรรพคุณทางยาและฤทธิ์ทางชีวภาพของรา *Sanghuangporus* sp. และดอกฝ้ายน้ำ ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชทั้งสองชนิดนี้ ซึ่งเป็นการวิจัยพืชสมุนไพรท้องถิ่นโดยเป็นการศึกษาและพัฒนาการใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ต่อไป

รูปที่ 2 ลักษณะต้นฝ้ายน้ำ

ตารางที่ 1 แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนสกัดหยาบจากดอกฝ้ายน้ำ

Test bacterium	Zone of inhibition (mm)	
	EtOAc extract	MeOH extract
Bacillus cereus ATCC 11778	12x12	14X14
Salmonella aureus (MSSA) DMST 2933	16x16	inactive
Salmonella aureus (MRSA) DMST 20651	17x17	inactive
Salmonella aureus (MRSA) DMST 20654	18x18	inactive

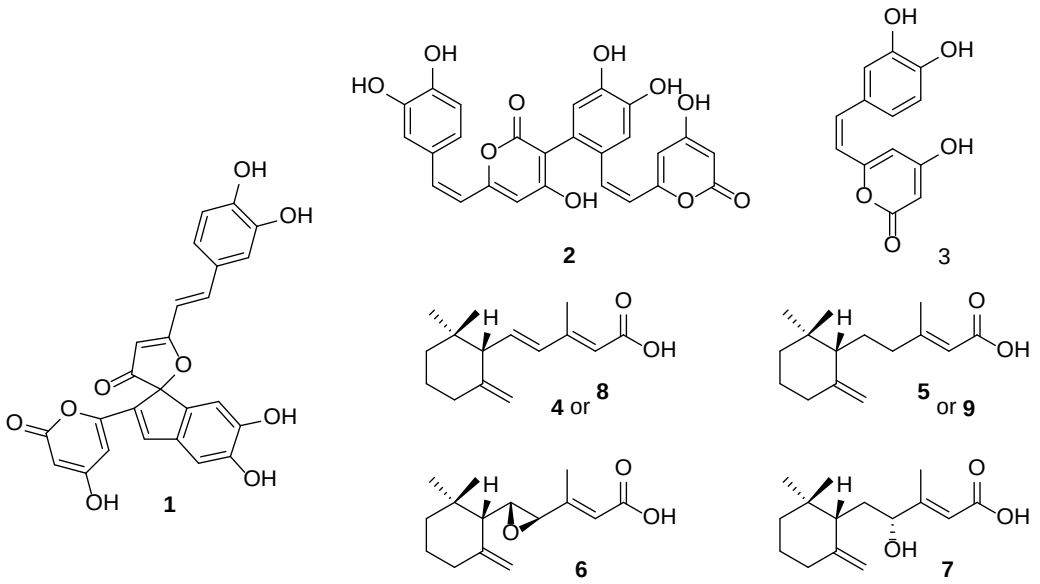
2. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Sanghuangporus sp.

เห็ด *Sanghuangporus* พบได้ทั่วไปในแถบเอเชีย โดยเฉพาะที่จีน ญี่ปุ่น ไต้หวัน และเกาหลี ประเทศเหล่านี้นำเห็ดซางฮวงมาใช้ประโยชน์ทางยากันอย่างแพร่หลายเช่นเดียวกับเห็ดหลินจือ[2-3] จากรายงานการวิจัยพบว่า สารสกัดหยาบของเห็ดชนิดนี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญมากมาย เช่น เพิ่มการไหลเวียนของเลือดให้ดียิ่งขึ้น ช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกัน เพิ่มการขับถ่ายของเสียออกจากร่ายกาย ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและเนื้องอก[4-6] จากฐานข้อมูล Scifinder (March 2020) มีการรายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากรา สกุล *Sanghuangporus* 2 รายงานวิจัย ดังสรุปต่อไปนี้ (รูปที่ 3)

ในปี 2561 กลุ่มผู้วิจัยของ Chepkirui C.[7] รายงานสารใหม่ 1 สาร ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม spiro [furan-2,1'-indine]-3-one คือ phelligridin L (**1**) และสารที่ทราบโครงสร้างแล้วอีก 6 สาร ได้แก่ 3,14'-bihispidinyl (**2**) hispidin (**3**) ionylideneacetic acid (**4**) 1*S*-(2*E*)-5-[(1*R*)-2,2-dimethyl-6-methylidenecyclohexyl]-3-methylpent-2-enoic acid (**5**) phellidine E (**6**) และ phellidine D (**7**) สกัดมาจากรา *Sanghuangporus* sp. นอกจากนี้สาร **1**–**5** ยังมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ดีอีกด้วย

ในปี 2562 กลุ่มผู้วิจัยของ Der Wu[8] รายงานการแยกสาร 2 สารจากรา *Sanghuangporus sanghuang* ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม Cyclofarnesane sesquiterpenoids คือ sanghuanglin (**8**) และ (+)-(2*E*,4*E*)-5-((*S*)-2,2-dimethyl-6-methylenecyclohexyl)-3-methylpenta-2,4-dienoic acid (**9**) และรายงานโครงสร้างสัมบูรณ์ของสาร **8** และ **9** โดยการวัดและเปรียบเทียบค่าการหมุนจำเพาะ ($[\alpha]_D$)



รูปที่ 3 โครงสร้างของสารที่แยกได้จากราสกุล *Sanghuangporus*

Croton krabas

พืชสกุล *Croton* มีมากกว่า 1300 ชนิดกระจายอยู่ในเขตร้อนชื้นของโลก ซึ่งในแถบแอฟริกา เอเชีย และอเมริกาใต้มีการใช้ประโยชน์เป็นยาสมุนไพรมาเป็นเวลาช้านาน[9] เนื่องจากพืชสกุลนี้มีสรรพคุณทางยาและการใช้ประโยชน์มาเป็นเวลานาน จึงมีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชสกุล *Croton* กันอย่างแพร่หลาย ซึ่งพบสารในกลุ่ม alkaloids, diterpenoids, clerodane diterpenoids, phorbol esters, tigliane diterpenoids, และอนุพันธ์ของ pyran-2-one[2-4] นอกจากนี้สารที่แยกได้เหล่านี้ยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านเชื้อรา ต้านแบคทีเรีย ต้านอัลไซเมอร์ ต้านเบาหวาน และมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง เป็นต้น[10-15] อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากลำต้นฝ้ายน้ำ ผู้วิจัยจึงค้นคว้าข้อมูลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชสกุล *Croton* ดังตัวอย่างต่อไปนี้ (รูปที่ 4)

ในปี 2556 กลุ่มผู้วิจัยของ Yue J-M.[16] รายงานการพบสารใหม่ 2 สาร ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม ent-clerodane diterpenoids คือ laevinoid A (**10**) และ leavinoid B (**11**) จากพืช *C. laevigatus* ซึ่งยืนยันโครงสร้างของสารที่แยกได้ด้วยเทคนิค X-ray diffraction และ CD spectra ในปีเดียวกัน คณะผู้วิจัยของ Wu T-S.[17] ศึกษาองค์ประกอบที่เคมีของส่วนสกัดหยาบเมทานอล จาก *C. tonkinensis* ได้สารใหม่ 8 สาร คือ crotonkinins C–J (**12**–**19**) และพบสารที่มีการรายงานแล้ว 2 สาร คือ crotonkinins A และ B (**20** และ **21**) คณะผู้วิจัยของWang M-K.[15] ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเมล็ด *C. tiglium* พบสารใหม่ซึ่งอยู่ในกลุ่มของ phorbol diesters 8 สาร คือ 12-*O*-(2-methyl)butyrylphorbol-13-tiglate (**22**) 12-*O*-tiglylphorbol-13-propionate (**23**) 13-*O*-acetylphorbol-20-oleate (**24**) 3-O-acetyl-4-deoxy-4α-phorbol-20-linoleate (**25**) 13-*O*-acetyl-4-

deoxy-4α-phorbol-20-oleate (**26**) 12-*O*-tiglyl-4-deoxy-4α-phorbol-13-decanoate (**27**) 12-*O*-tiglyl-4-deoxy-4α-phorbol-13-phenyl acetate (**28**) และ 12-*O*-tiglyl-4-deoxy-4α-phorbol-13-(2-methyl)butyrate (**29**) พร้อมกับสารที่ทราบโครงสร้างแล้วอีก 11 สาร คือ 12-*O*-tiglylphorbol-13-isobutyrate (**30**) 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (**31**) 12-*O*-hexadecanoylphorbol-13-acetate (**32**) 12-*O*-tiglylphorbol-13-(2-methyl)butyrate (**33**) 12-*O*-acetylphorbol-13-decanoate (**34**) 12-*O*-(2-methyl)butyrylphorbol-13-isobutyrate (**35**) 12-*O*-acetylphorbol-13-dodecanoate (**36**) 13-*O*-acetylphorbol-20-linoleate (**37**) 12-*O*-(2-methyl)-butyrylphorbol-13-dodecanoate (**38**) 12-*O*-tiglyl-4-deoxy-4α-phorbol-13-acetate (**39**) และ 12-*O*-tiglyl-4-deoxy-4α-phorbol-13-isobutyrate (**40**) ซึ่งสาร **24** และ **37** มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง SNU387 hepatic tumor cell line ที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 1.2 และ 3.4 μM ตามลำดับ

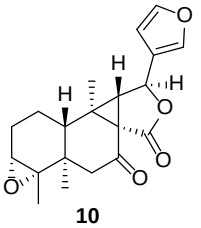
ในปี 2557 คณะผู้วิจัยของ Wolfender J.L.[18] รายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเอทานอล จากลำต้นและรากของ *C. heliotropiifolius* ได้สารทั้งหมด 9 สาร คือ 6-hydroxy-1-methyl-2-dimethyl-3,4-tetrahydro-β-carboline (**41**) (*S*)-magnoflorine (**42**) (+)-menisperine (**43**) taspine (**44**) moschamine (**45**) *n*-propylparaben (**46**) velamolone acetate (**47**) spruceanol (**48**) และ velamone (**49**) ในขณะที่ Fei D-Q.[19] และคณะศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของราก *C. crassifolius* ได้สารใหม่ 2 สาร จัดอยู่ในกลุ่มของ pyran-2-one คือ crotonpyrones A และ B (**50** และ **51**) ในปีเดียวกัน Yue J-M.[20] และคณะ พบสารใหม่ 14 สาร คือ crotonolides A (**52**) และ B (**53**) isocrotonolides B (**54**) และ C (**56**) crotonolides C (**55**) และ D (**57**) isocrotonolide D (**58**) crotonolides E-H (**59-62**) 12-deoxycrotonolide H (**63**) crotonolides I (**64**) และ J (**65**) จากส่วนยอดของ *C. laui* คณะผู้วิจัยของ Guo Y.[21] ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากกิ่งของ *C. yanhuii* ได้สารใหม่ 2 สาร คือ crotonpenes A (**66**) และ B (**67**) นอกจากนี้ Litaudon M. และคณะ[13] พบสาร 12-*O*-decanoylphorbol-13-acetate (**68**) และ 12-*O*-decanoyl-7-hydroperoxy-phorbol-5-ene-13-acetate (**69**) จากส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซิเตทของใบ *C. mauritianus*

ปี พ.ศ.2558 กลุ่มวิจัยของ Wang X-N[12] ได้แยกสารใหม่ 6 สาร ซึ่งเป็นสารในกลุ่มของ diterpenoids คือ crotontomentosins A-F (**70-75**) และสารที่มีรายงานแล้วอีก 6 สารคือ *ent*-15,16-epoxyhalim-5 (10) 13(16),14-trien-18-carboxylic acid (**76**) margocin (**77**) pomiferin D (**78**) pomiferin E (**79**) 15-hydroxy-7-oxoabieta-8,11,13-triene (**80**) และ 5-eumeudesm-4 (15)-ene-1β,6β-diol (**81**) จากกิ่งและใบของ *C. caudatus* var. *tomentosus* พบว่าสาร **70-73** และ **79** มีฤทธิ์ยับยั้งปานกลางต่อการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) และมะเร็งปอด (A549)

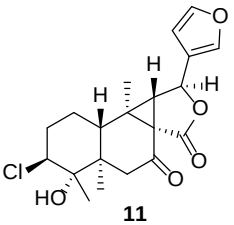
ปี พ. ศ. 2560 กลุ่มวิจัยของ Xuan L-J[22] ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนสกัดหยาบ 70% อะซิโตนจากราก *C. crassifolius* พบสารใหม่ 8 สาร ซึ่งเป็นสารในกลุ่มของ diterpenoids คือ

crassins A-H (**82-89**) นอกจากนี้สาร **89** มีความเป็นพิษต่อมะเร็งปอด (A549) ที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 5.2 ± 0.4 μM ซึ่งมีความเป็นพิษต่ำกว่ายามาตรฐาน cisplatin

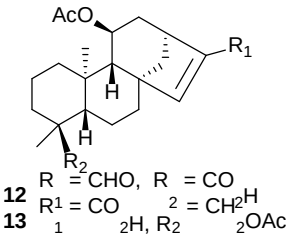
ปี พ. ศ. 2561 กลุ่มวิจัยของ González-Montiela S[23] ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนสกัดหยาบเฮกเซนจากส่วนเหนือพื้นดินของ *C. hypoleucus* พบสารใหม่ 3 สาร ซึ่งเป็นสารในกลุ่มของ epoxy-clerodanes คือ hypoleins A–C (**90-92**). และกลุ่มวิจัยของ Gao K[24] รายงานสารใหม่ 2 สารในกลุ่มของ macrocyclic diterpenoid คือ mangelonoid A และ B (**93** และ **94**) จากกิ่งและใบของ *C. mangelong* นอกจากนี้สาร **93** ยังมีฤทธิ์ยับยั้งอาการอักเสบ (NF-KB) ที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 7.27 ± 1.30 μM.



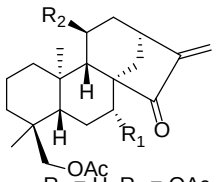
10



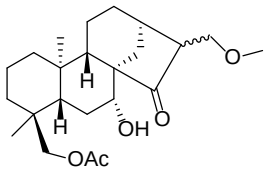
11



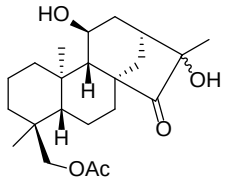
12 R = CHO, R = CO
13 R^1 = CO$_2$H, R_2 = CH$_2$OAc



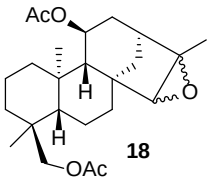
14 R = H, R = OAc
15 R^1 = OAc, R = H



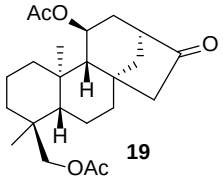
16



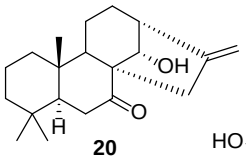
17



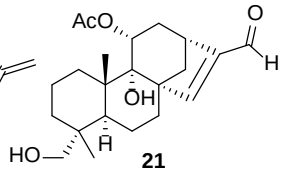
18



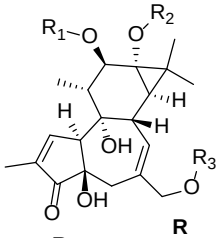
19



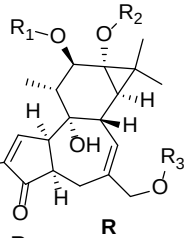
20



21

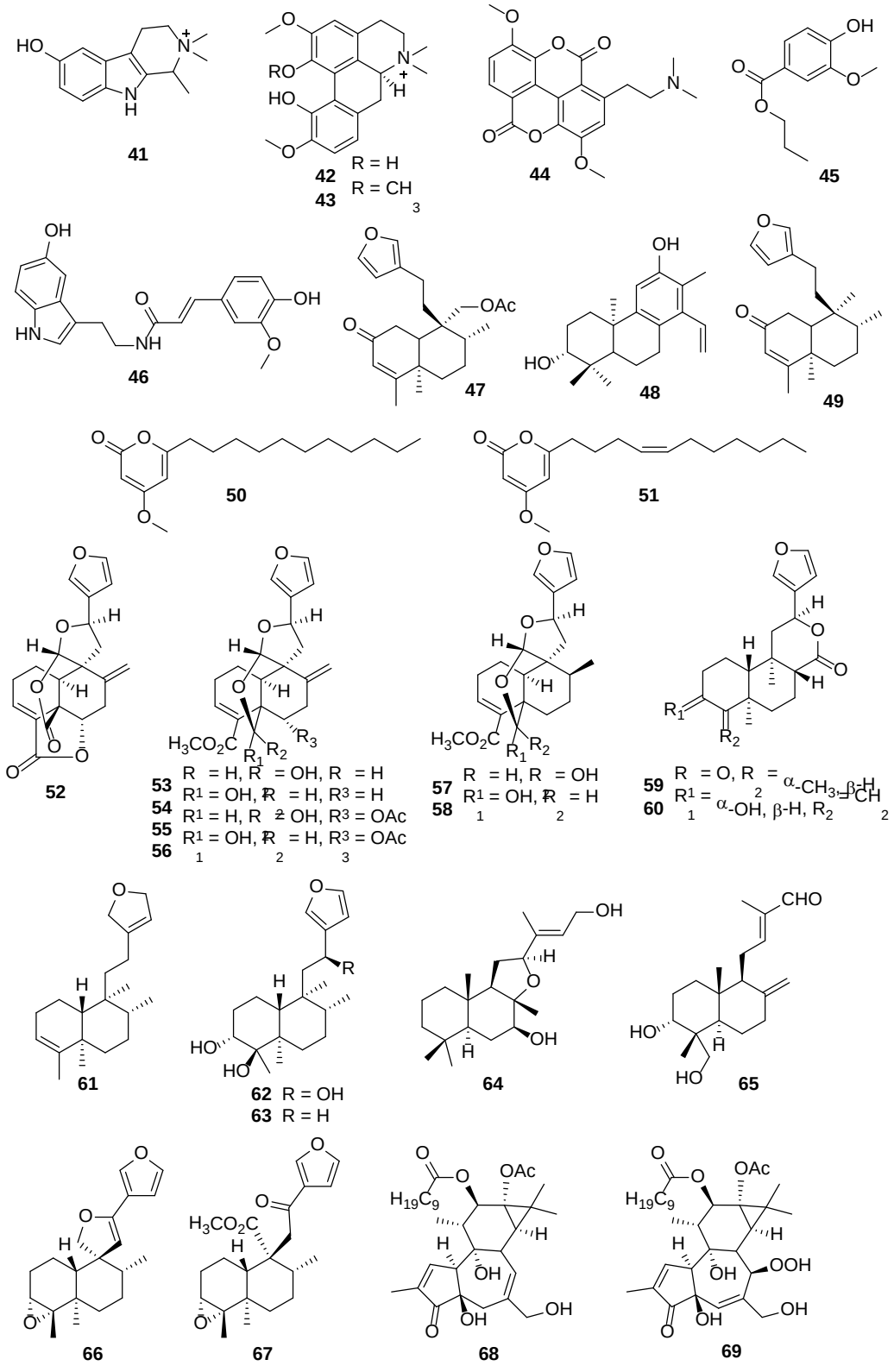


compound	R_1	R_2	R_3
22	(2-methyl)butyryl	tiglyl	H
23	tiglyl	propionyl	H
24	H	acetyl	oleoyl
25	tiglyl	isobutyryl	H
26	tetradecanoyl	acetyl	H
27	hexadecanoyl	acetyl	H
28	tiglyl	(2-methyl)butyryl	H
29	acetyl	decanoyl	H
30	(2-methyl)butyryl	isobutyryl	H
31	acetyl	dodecanoyl	H
32	H	acetyl	H
33	(2-methyl)butyryl	dodecanoyl	H

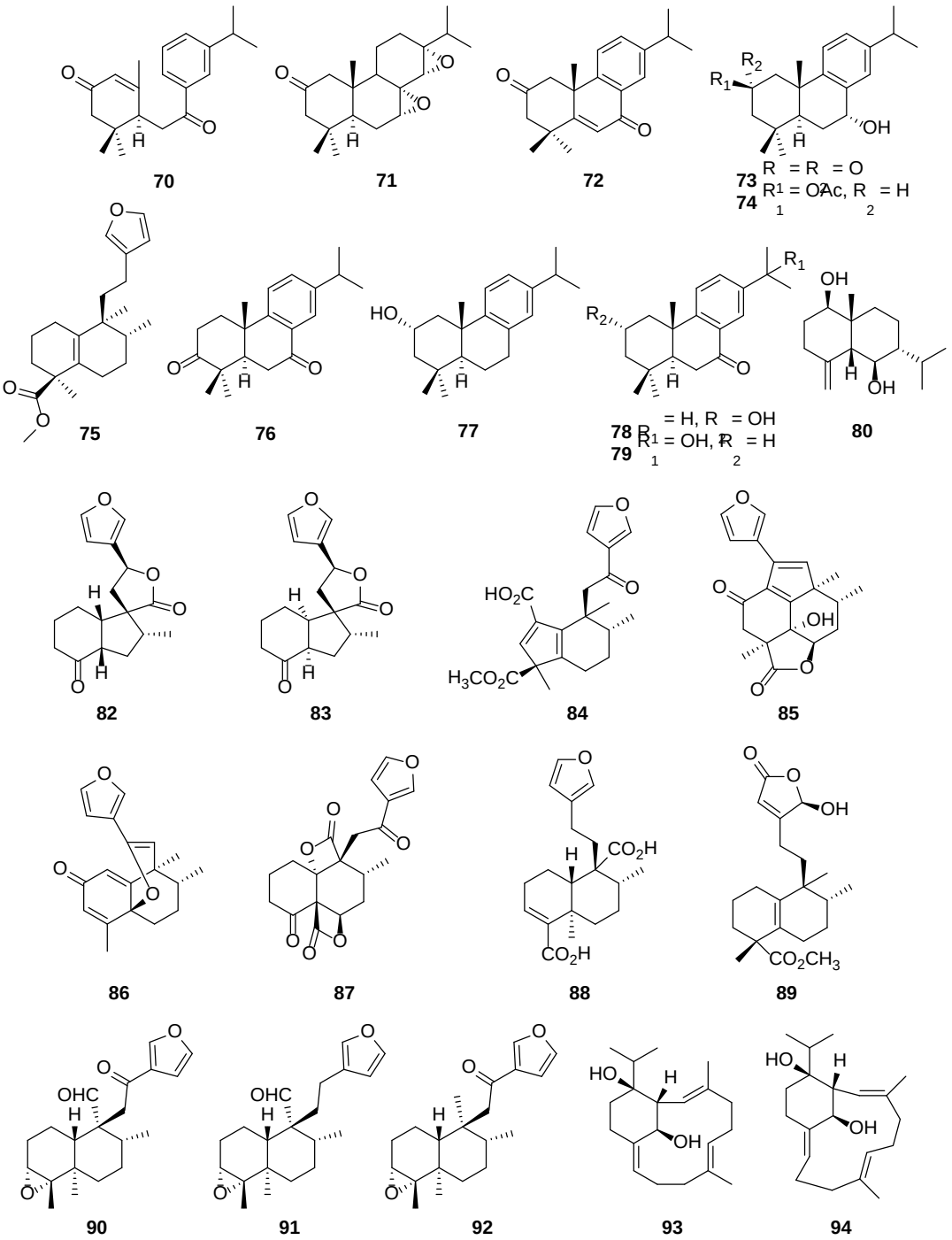


compound	R_1	R_2	R_3
34	H	acetyl	linoleyl
35	H	acetyl	oleyl
36	tiglyl	decanoyl	H
37	tiglyl	phenylacetyl	H
38	tiglyl	(2-methyl)butyryl	H
39	tiglyl	acetyl	H
40	tiglyl	isobutyryl	H

รูปที่ 4 โครงสร้างของสารที่แยกได้จากพืชสกุล *Croton*



รูปที่ 4 โครงสร้างของสารที่แยกได้จากพืชสกุล *Croton* (ต่อ)



รูปที่ 4 โครงสร้างของสารที่แยกได้จากพืชสกุล *Croton* (ต่อ)

3. วัตถุประสงค์

1) เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากรา *Sanghuangporus* sp. และดอกฝ้ายน้ำ โดยคาดหวังว่าจะพบสารใหม่ซึ่งใช้เป็นฐานข้อมูลสำหรับนักวิจัยทางด้านเคมีอินทรีย์และเภสัชวิทยา

2) เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพขององค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้ต่อฤทธิ์ต้านแบคทีเรียชนิดต่างๆ และศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ เพื่อนำไปพัฒนาใช้ประโยชน์ด้านการแพทย์ต่อไป

3) เพื่อผลิตผลงานวิจัยที่ได้ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติที่มี impact factor

4. วิธีการทดลอง

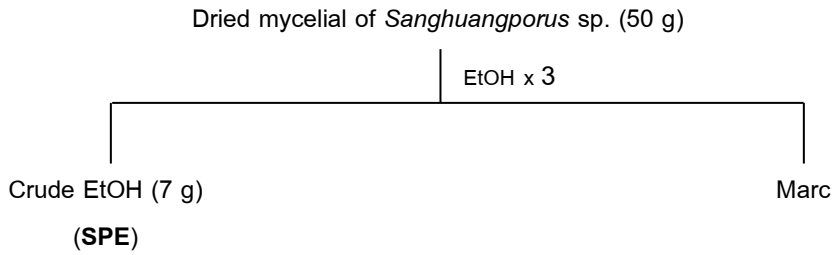
4.1 *Sanghuangporus* sp.

4.1.1 เก็บตัวอย่าง

เลี้ยงตัวอย่างรา *Sanghuangporus* sp. ด้วยอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 22 วัน จากนั้นเก็บตัวอย่างราและนำไปอบให้แห้งด้วยเตาอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (ได้รับตัวอย่างราจากรองศาสตารจารย์อภิเดช แสงดี)

4.1.2 การสกัดด้วยตัวทำละลาย

นำตัวอย่างแห้งของรา *Sanghuangporus* sp. 50 กรัม มาบดให้ละเอียด สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (3 x 200 mL) ระเหยตัวทำละลายออก ได้ส่วนสกัดหยาบเอทานอล 7 กรัมดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 แผนผังการสกัดรา *Sanghuangporus* sp.

4.1.3 การแยกและทำให้บริสุทธิ์

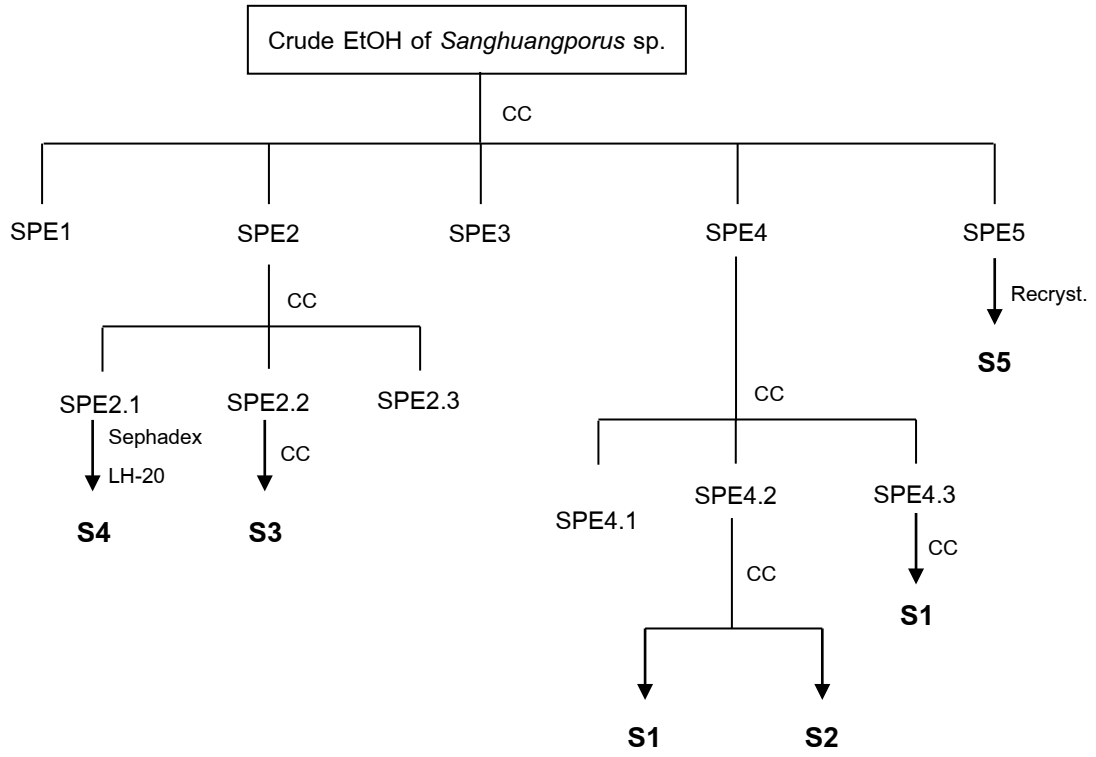
นำส่วนสกัดหยาบเอทานอลของรา *Sanghuangporus* sp. น้ำหนัก 7 กรัม มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ชะด้วยตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วต่ำไปสูง เริ่มจากการใช้ตัวทำละลาย hexane, EtOAc:hexane, EtOAc, MeOH:EtOAc และ MeOH ตามลำดับ ได้ fraction ย่อย 60 fractions รวม fractions ที่มีลักษณะ TLC เหมือนกัน ได้ 6 กลุ่ม (SPE1-SPE6) ดังรูปที่ 6

นำ SPE2 มาแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ชะด้วยตัวทำละลาย 5% acetone:hexane ได้ fraction ย่อย 25 fractions รวม fractions ที่มีลักษณะ TLC

เหมือนกัน ได้ 3 กลุ่ม (SPE2.1-SPE2.3) นำ fraction SPE2.1 มาแยกด้วย Sephadex LH-20 คอลัมน์โครมาโทกราฟี ชะด้วยตัวทำละลาย 100% MeOH ได้สาร **S4** มีลักษณะเป็นน้ำมันใสไม่มีสี และนำ fraction SPE2.2 มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ชะด้วยตัวทำละลาย 90:10:1 CH_2Cl_2:hexane:MeOH ได้สาร **S3** มีลักษณะเป็นน้ำมันใสไม่มีสี

นำ SPE4 มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ใช้ตัวทำละลาย 15% acetone:hexane เป็นตัวชะ รวม fractions ที่มีลักษณะ TLC เหมือนกัน ได้ 3 กลุ่ม (SPE4.1-SPE4.3) นำ fraction SPE4.2 มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ชะด้วยตัวทำละลาย 90:10:2 CH_2Cl_2:hexane:MeOH ได้สาร **S1** และ **S2** มีลักษณะเป็นน้ำมันใสไม่มีสี นำ fraction SPE4.3 มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ชะด้วยตัวทำละลาย 90:10:1 CH_2Cl_2:hexane:MeOH ได้สาร **S1** มีลักษณะเป็นน้ำมันใสไม่มีสี

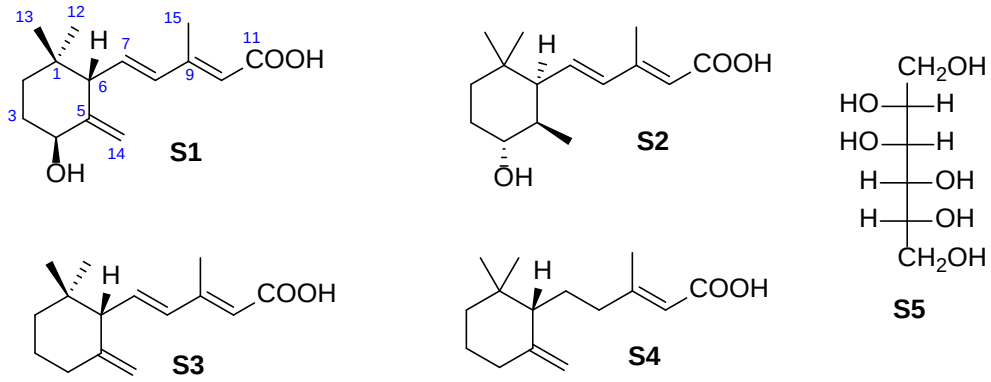
นำ SPE5 มาตกผลึกซ้ำด้วย CH_2Cl_2:MeOH ได้สาร **S5** ซึ่งมีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน



รูปที่ 6 แผนผังการแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดหยาบเอทานอลของรา *Sanghuangporus* sp.

พิสูจน์โครงสร้างของสารที่แยกได้ด้วยวิธีทางสเปกโทรสโคปี ได้แก่ IR 1D และ 2D NMR พบว่าสาร **S1** คือ (4*S*,6*S*)-4-hydroxy-γ-ionylideneacetic acid สาร **S2** คือ (4*R*,5*R*,6*S*)-5,14-dihydro-4-hydroxy-γ-ionylidene acetic acid สาร **S3** คือ γ-ionylideneacetic acid สาร **S4** คือ

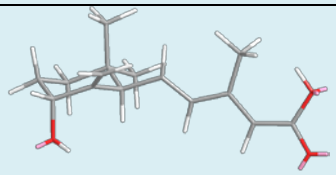
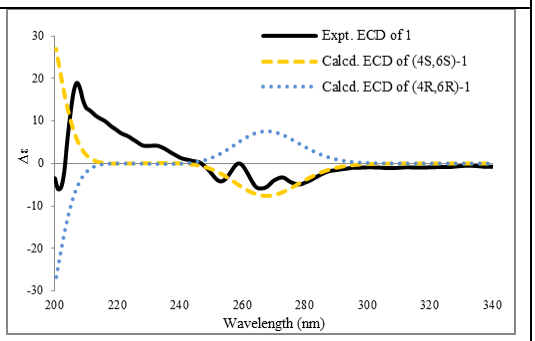
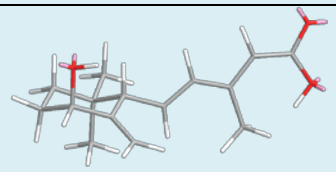
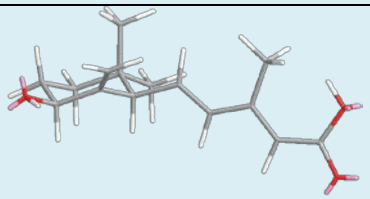
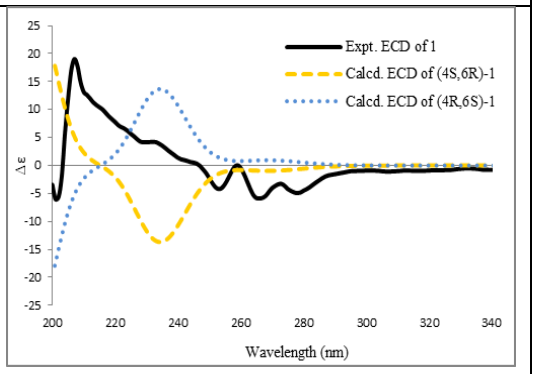
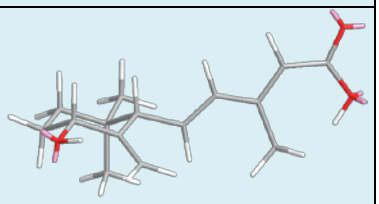
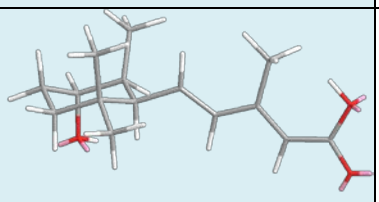
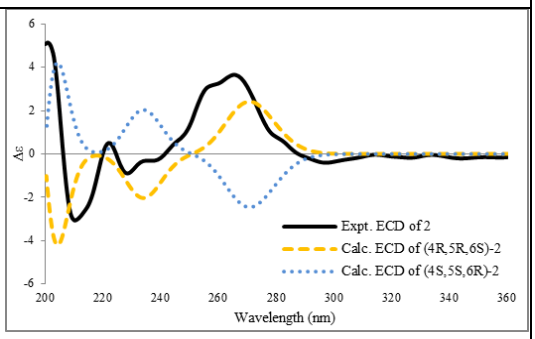
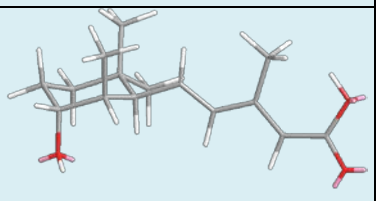
1*S*-(2*E*)-5-[(1*R*)-2,2-dimethyl-6-methylidene cyclohexyl]-3-methylpent-2-enoic acid และสาร **S5** D-manitol (รูปที่ 7)

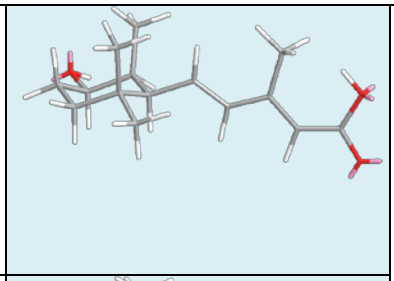
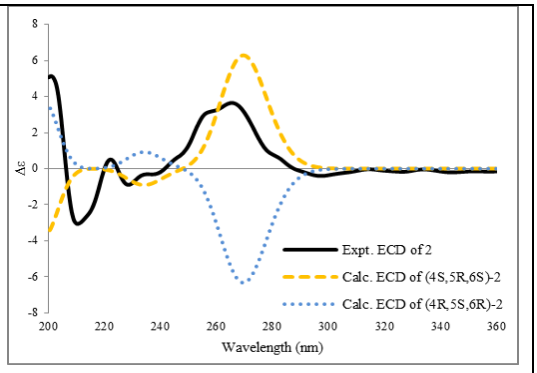
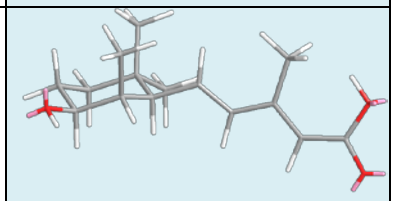
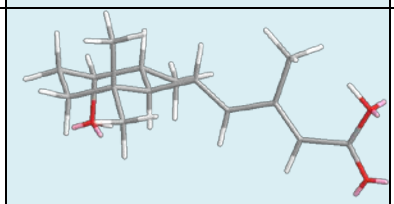
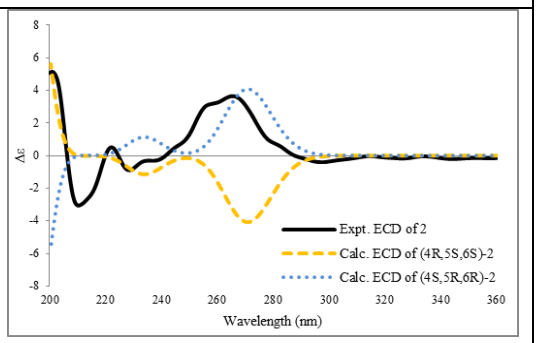
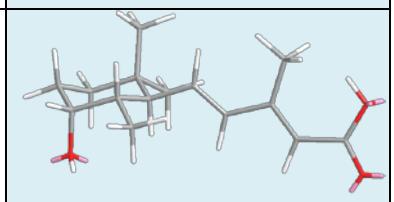
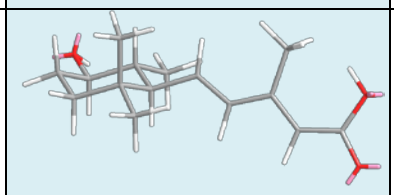
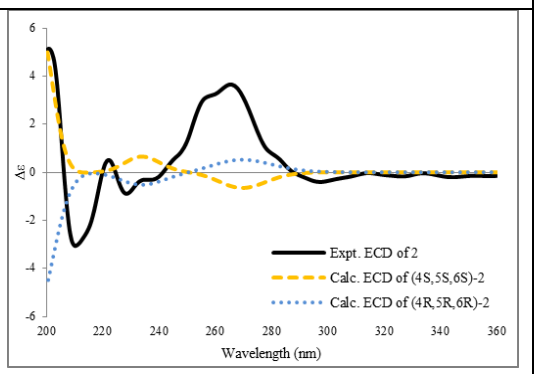
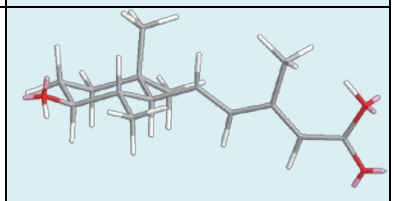


รูปที่ 7 โครงสร้างของสารที่แยกได้จากรา *Sanghuangporus* sp.

จากข้อมูล Scifinder database พบว่าสาร **S1** และ **S2** เป็นสารใหม่ ระบุโครงสร้างสัมบูรณ์ (absolute configuration) ของสารใหม่ **S1** และ **S2** ด้วยวิธีการเปรียบเทียบสเปกตรัม ECD จากการคำนวณและการทดลองดังแสดงในตารางที่ 2 ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้ต่อฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 5 ชนิด (*Staphylococcus aureus* MSSA 2933, *S. aureus* MRSA 20651, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* 25922, and *Shigella dysenteriae* 15110) พบว่าสารที่แยกได้ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิดนี้ งานวิจัยชิ้นนี้ตีพิมพ์ในวารสาร Phytochemistry Letters, **2020**, *37*, 17–20.

ตารางที่ 2 สเปกตรัม ECD จากการคำนวณและการทดลองของสาร **S1** และ **S2**

entry	compound	structure	ECD spectra
1	(4*R*,6*R*)-**S1**		
	(4*S*,6*S*)-**S1**		
2	(4*R*,6*S*)-**S1**		
	(4*S*,6*R*)-**S1**		
3	(4*S*,5*S*,6*R*)-**S2**		
	(4*R*,5*R*,6S)-**S2**		

4	(4*R*,5*S*,6*R*)-**S2**		
	(4*S*,5*R*,6*S*)-**S2**		
5	(4*S*,5*R*,6*R*)-**S2**		
	(4*R*,5*S*,6*S*)-**2**		
6	(4*R*,5*R*,6*R*)-**S2**		
	(4*S*,5*S*,6*S*)-**S2**		

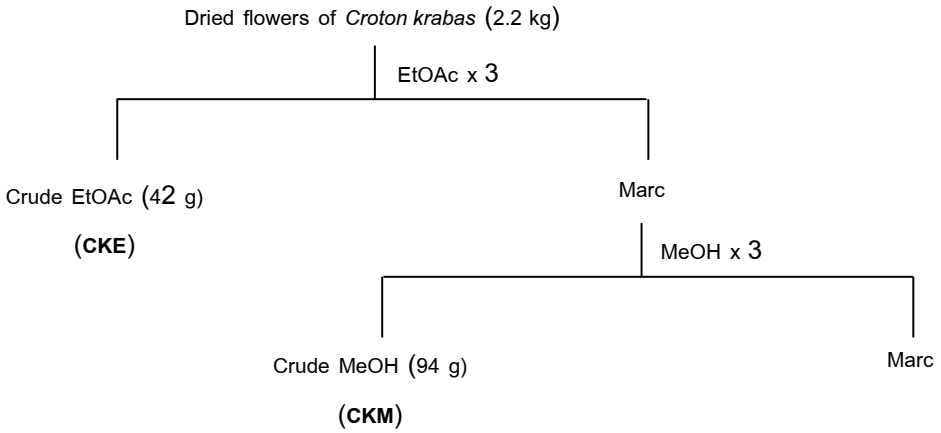
4.2 *Croton krabas*

4.2.1 เก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างดอกฝ้ายน้ำ (*Croton krabas*) ในช่วงเดือนมกราคม พ.ศ. 2561 จากตำบลสะแก อำเภอสตึก จังหวัดบุรีรัมย์ ระบุเอกลักษณ์ของพืชโดย ศาสตราจารย์ประนอม จันทรโณทัย

4.2.2 การสกัดด้วยตัวทำละลาย

นำตัวอย่างดอกฝ้ายน้ำมาผึ่งลมให้แห้งและบดให้ละเอียดได้น้ำหนักแห้ง 2.2 กิโลกรัม สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตท (3 x 3 ลิตร) และเมทานอล (3 x 3 ลิตร) ระเหยตัวทำละลายออก ได้ส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซีเตท 42 กรัม และส่วนสกัดหยาบเมทานอล 94 กรัม ตามลำดับ (รูปที่ 8)



รูปที่ 8 แผนผังการสกัดดอกฝ้ายน้ำ

4.2.3 การแยกและทำให้บริสุทธิ์

นำส่วนสกัดหยาบเมทานอลของดอกฝ้ายน้ำ 80 กรัม มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ชะด้วยตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วต่ำไปสูง เริ่มจากการใช้ตัวทำละลาย hexane, EtOAc:hexane, EtOAc, MeOH:EtOAc และ MeOH ตามลำดับ ได้ fraction ย่อย 70 fractions รวม fractions ที่มีลักษณะ TLC เหมือนกัน ได้ 6 กลุ่ม (FCM1-FCM6) นำ fractions ย่อยทั้ง 6 มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ แต่ไม่พบองค์ประกอบทางเคมี

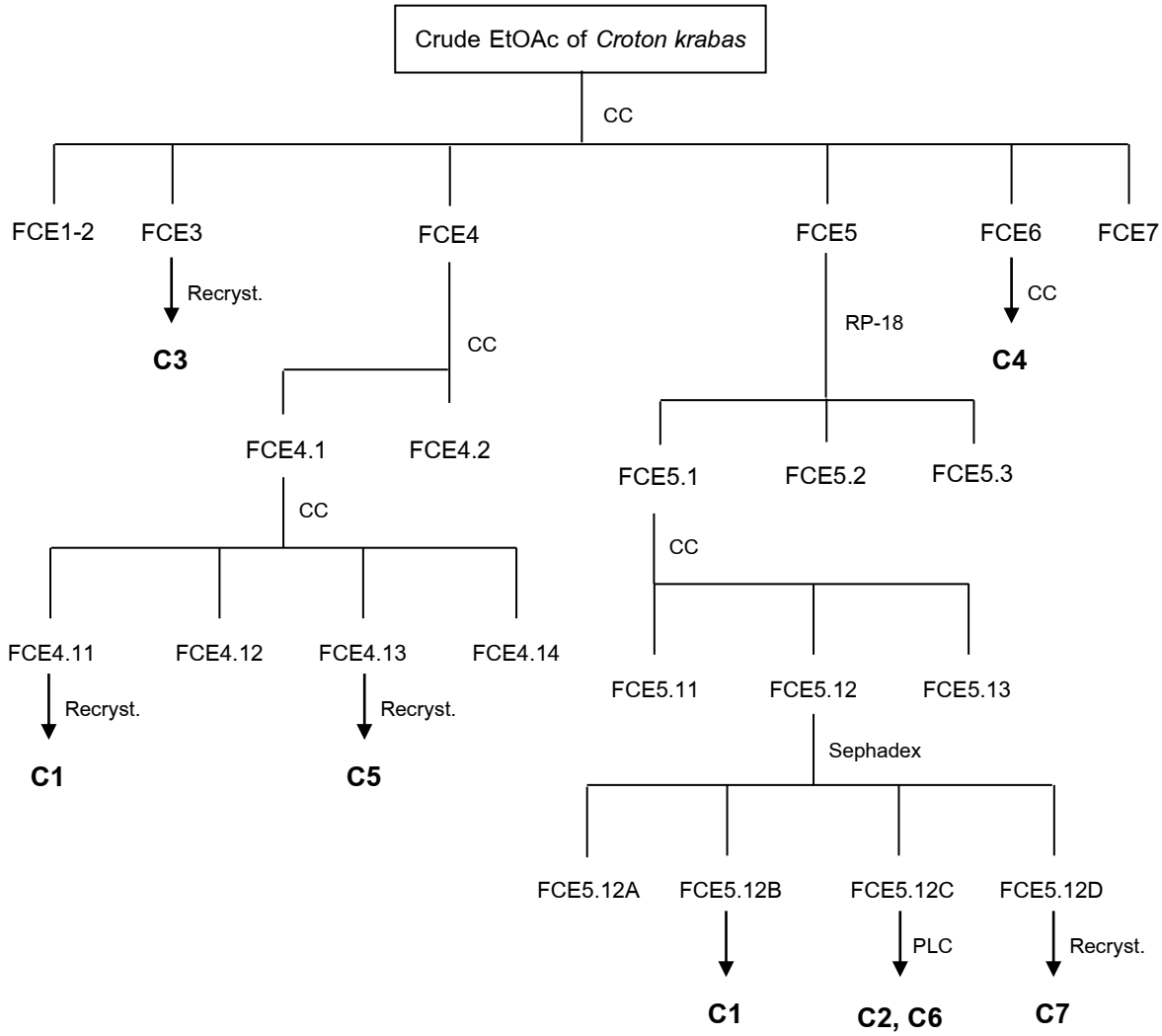
นำส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซีเตทของดอกฝ้ายน้ำ 42 กรัม มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ชะด้วยตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วต่ำไปสูง เริ่มจากการใช้ตัวทำละลาย hexane, EtOAc:hexane, EtOAc, MeOH:EtOAc และ MeOH ตามลำดับ ได้ 99 fractions รวม fractions ที่มีลักษณะ TLC เหมือนกัน ได้ 7 กลุ่ม (FCE1-FCE7) ดังรูปที่ 9

นำ FCE3 มาตกผลึกซ้ำด้วย EtOAc:hexane ได้สาร **C3** ซึ่งมีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มใสไม่มีสี

นำ FCE4 มาแยกด้วยคอลัมน์ reverse phase (RP-18) ใช้ตัวทำละลาย 20% H_2O:MeOH เป็นตัวชะ รวม fractions ที่มีลักษณะ TLC เหมือนกัน ได้ 2 กลุ่ม (FCE4.1-FCE4.2) นำ FCE4.1 มาแยก

ต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ใช้ตัวทำละลาย 0.5% MeOH:CH_2Cl_2 รวม fractions ที่มีลักษณะ TLC เหมือนกัน ได้ 4 กลุ่ม (FCE4.11-FCE4.14) นำ FCE4.11 มาตกผลึกซ้ำด้วย EtOAc:hexane ได้สาร **C1** ซึ่งมีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว นำ FCE4.13 มาตกผลึกซ้ำด้วย MeOH ได้สาร **C5** ซึ่งมีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว

นำ FCE5 มาแยกต่อด้วยคอลัมน์ reverse phase (RP-18) ใช้ตัวทำละลาย 20% H_2O:MeOH เป็นตัวชะ รวม fractions ที่มีลักษณะ TLC เหมือนกัน ได้ 3 กลุ่ม (FCE5.1-FCE5.3) นำ FCE5.1 มาแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยมีซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ใช้ตัวทำละลาย 20% EtOAc:hexane เป็นตัวชะ รวม fractions ที่มีลักษณะ TLC เหมือนกัน ได้ 3 กลุ่ม (FCE5.11-FCE5.13)



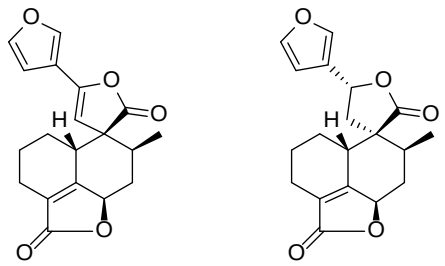
รูปที่ 9 แผนผังการแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซีเตทของดอกฝ้ายน้ำ

นำ FCE5.12 มาแยกต่อด้วย Sephadex LH-20 ชะด้วยตัวทำละลาย 100% MeOH รวม fractions ที่มีลักษณะ TLC เหมือนกัน ได้ 4 กลุ่ม (FCE5.12A-FCE5.12D) fraction FCE5.12B ได้สาร **C1** นำ FCE5.12C มาแยกต่อด้วย preparative TLC โดยใช้ตัวทำละลาย 0.5 MeOH:CH_2Cl_2

เป็นตัวชะ ได้สาร **C2** และ **C6** ซึ่งมีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว และนำ FCE5.12D มาตกผลึกซ้ำด้วย MeOH ได้สาร **C7** มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว

นำ FCE6 มาตกผลึกซ้ำด้วย MeOH:CH_2Cl_2 ได้สาร **C4** ซึ่งมีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว

พิสูจน์โครงสร้างของสารที่แยกได้ด้วยวิธีทางสเปกโทรสโคปี ได้แก่ IR 1D และ 2D NMR พบว่าสาร **C1** คือ isocrotocaudin สาร **C2** คือ isoteucvin สาร **C3** คือ stigmasterol และสาร **C4** คือ stigmasterol-3-*O*-β-D-glucoside (รูปที่ 10) ส่วนโครงสร้างสาร **C5**-**C7** อยู่ในกระบวนการยืนยันโครงสร้างและระบุโครงสร้างสัมบูรณ์ สาร **C1 C2** และ **C5**-**C7** อยู่ระหว่างการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านเบาหวานและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง หลังจากรวบรวมข้อมูลแล้ว จะสรุปและวิเคราะห์ผล เขียนงานวิจัยเพื่อตีพิมพ์ในวารสาร Natural Product Research ภายในเดือนตุลาคม 2563



C1 **C2**

รูปที่ 10 โครงสร้างของสารที่แยกได้จากดอกฝ้ายน้ำ

5. สรุปผลการดำเนินการ

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากรา *Sanghuangporus* sp. และจากดอกฝ้ายน้ำ ซึ่งแยกสารบริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 12 สาร เป็นสารที่แยกได้จากรา *Sanghuangporus* sp. 5 สาร เป็นสารใหม่ 2 สารและสารที่เคยรายงานโครงสร้างแล้ว 3 สาร และสารที่แยกได้จากดอกฝ้ายน้ำ 7 สาร คาดว่าน่าจะเป็นสารใหม่ 3 สาร ซึ่งยังอยู่ในกระบวนการยืนยันโครงสร้างด้วยแมสสเปกโทรเมทรี และสารที่ทราบโครงสร้างแล้วอีก 4 สาร ระบุโครงสร้างสัมบูรณ์ของสารใหม่ที่แยกได้โดยการเปรียบเทียบข้อมูล ECD จากการทดลองและการคำนวณ จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่า สารที่แยกได้มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (*Staphylococcus aureus* MSSA 2933 *S. aureus* MRSA 20651 *Bacillus cereus* ATCC 11778 *Escherichia coli* 25922 และ *Shigella dysenteriae* 15110) ต้านเบาหวานและมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (KB MCF-7 และ NCI-H187)

6. ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

สารบริสุทธิ์บางสารที่แยกได้จากดอกฝ้ายน้ำมีฤทธิ์ที่ดีในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย จึงน่าสนใจสำหรับนักวิจัยในสาขาที่เกี่ยวข้องเช่น เภสัชวิทยา วิทยาศาสตร์ทางการแพทย์เพื่อนำไปศึกษากลไกการออกฤทธิ์ หรือพัฒนาไปเป็นยาต้านเชื้อแบคทีเรียในอนาคต

7. เอกสารอ้างอิง

1. Sangdee, K., Buranrat, B., Naksuwankul, K., Jaihan, P., Sangdee, A. Antibacterial and anti-breast cancer cell line activities of *Sanghuangporus* sp.1 extracts. *Trop. J. Pharm. Res.* **2017**, 16, 613–620.
2. Han, J.G., Hyun, M.W., Kim, C.S., Jo, J.W., Cho, J.H., Lee, K.H., Kong, W.S., Han, S.K., Oh, J., Sung, G.H. Species identity of *Phellinus linteus* (sanghuang) extensively used as a medicinal mushroom in Korea. *J. Microbiol.* **2016**, 54, 290–295.
3. Lin, W.C., Deng, J.S., Huang, S.S., Lin, W.R., Wu, S.H., Lin, H.Y., Huang, G.J. Anti-inflammatory activity of *Sanghuangporus sanghuang* by suppressing the TLR4-mediated PI3K/AKT/mTOR/IKKβ signaling pathway. *RSC Adv.* **2017**, 7, 21234–21251.
4. Chen, W., Tan, H., Liu, Q., Zheng, X., Zhang, H., Liu, Y., Xu, L., 2019. A review: The bioactivities and pharmacological applications of *Phellinus linteus*. Molecules. https://doi.org/10.3390/molecules24101888
5. Hsieh, P.W., Wu, J. Bin, Wu, Y.C. Chemistry and biology of *Phellinus linteus*. *Biomed*. **2013**, 3, 106–113.
6. Lin, W.C., Deng, J.S., Huang, S.S., Wu, S.H., Chen, C.C., Lin, W.R., Lin, H.Y., Huang, G.J. Anti-inflammatory activity of *Sanghuangporus sanghuang* mycelium. *Int. J. Mol. Sci*. **2017**, 18, 347. https://doi.org/10.3390/ijms18020347
7. Chepkirui, C., Cheng, T., Matasyoh, J., Decock, C., Stadler, M. An unprecedented spiro [furan-2,1'-indene]-3-one derivative and other nematicidal and antimicrobial metabolites from *Sanghuangporus* sp. (Hymenochaetaceae, Basidiomycota) collected in Kenya. *Phytochem. Lett*. **2018**, 25, 141–146.
8. Wu, M. Der, Cheng, M.J., Chen, Y.L., Chan, H.Y., Hsieh, S.Y., Chen, I.C., Wu, P.H., Wu, S.H. Secondary metabolites from the fermented whole broth of fungal strain *Sanghuangporus sanghuang*. *Chem. Nat. Compd*. **2019**, 55, 36–40.

9. Salatino, A.; Salatino, M.L.F.; Negri, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, 18(1), 11–33.
10. Santos, H.S.; Barros, F.W.A.; Albuquerque, M.R.J.R.; Bandeira, P.N.; Pessoa, C.; Braz-Filho, R. Monte, F.J.Q.; Leal-Cardoso, J.H.; Lemos, T.L.G.. Cytotoxic diterpenoids from *Croton argyrophylloides*. *J. Nat. Prod.* **2009**, 72(10), 1884–1887.
11. Wang, J-J.; Chung, H.Y.; Zhang, Y-B.; Li, G-Q.; Li, Y-L.; Huang, W-H.; Wang, G-C. Diterpenoids from the roots of *Croton crassifolius* and their anti-angiogenic activity. *Phytochemistry*. **2016**, 122, 270–275.
12. Song, J-T.; Han, Y.; Wang, X-L.; Shen, T.; Lou, H-X.; Wang, X-N. Diterpenoids from the twigs and leaves of *Croton caudatus* var. tomentosus. *Fitoterapia*. **2015**, 107, 54–59.
13. Corlay, N.; Delang, L.; Girard-Valenciennes, E.; Neyts, J.; Clerc, P.; Smadja, J.; Guéritte, F.; Leyssen, P.; Litaudon, M. Tigliane diterpenes from *Croton mauritianus* as inhibitors of chikungunya virus replication. *Fitoterapia*. **2014**, 97, 87–91.
14. Qiu, M.; Cao, D.; Gao, Y.; Li, S.; Zhu, J.; Yang, B.; Zhou, L.; Zhou, Y.; Jin, J.; Zhao, Z. New clerodane diterpenoids from *Croton crassifolius*. *Fitoterapia.* **2016**, 108, 81–86.
15. Zhang, X-L.; Wang, L.; Li, F.; Yu, K.; Wang, M-K. Cytotoxic Phorbol Esters of *Croton tiglium*. *J. Nat. Prod.* **2013**, 76(5), 858–864.
16. Wang, G-C.; Zhang, H.; Liu, H-B.; Yue, J-M. Laevinoids A and B: two diterpenoids with an unprecedented backbone from *Croton laevigatus*. *Org Lett.* **2013**, 15(18), 4880–4883.
17. Kuo, P-C.; Yang, M-L.; Hwang, T-L.; Lai, Y-Y.; Li, Y-C.; Thang, T.D. et al. Anti-inflammatory diterpenoids from *Croton tonkinensis*. *J. Nat. Prod.* **2013**, 76(2), 230–236.
18. Queiroz, M.M.F.; Queiroz, E.F.; Zeraik, M.L.; Marti, G.; Favre-Godal, Q.; Simões-Pires, C.; Marcourt, L.; Carrupt, P.A.; Cuendet, M.; Paulo, M.Q.; Bolzani, V.S.; Wolfender, J.L. Antifungals and acetylcholinesterase inhibitors from the stem bark of *Croton heliotropiifolius*. *Phytochem. Lett.* **2014**, 10, lxxxviii–xciii.

19. Li, H-H.; Qi, F-M.; Dong, L-L.; Fan, G-X.; Che, J-M.; Guo, D-D.; Zhang, Z-X.; Fei, D-Q. Cytotoxic and antibacterial pyran-2-one derivatives from *Croton crassifolius. Phytochem. Lett.* **2014**, 10, 304–308.

20. Liu, C-P.; Xu, J-B.; Zhao, J-X.; Xu, C-H.; Dong, L.; Ding, J.; Yue, J-M. Diterpenoids from *Croton laui* and their cytotoxic and antimicrobial activities. *J. Nat. Prod.* **2014**, 77(4), 1013–1020.

21. Sun, Y.; Wang, M.; Ren, Q.; Li, S.; Xu, J.; Ohizumi, Y.; Xie, C.; Jin, D-Q.; Guo, Y. Two novel clerodane diterpenenes with NGF-potentiating activities from the twigs of *Croton yanhuii*. *Fitoterapia.* **2014**, 95, 229–233.

22. Yuan, Q-Q.; Tang, S. Song, W-B. Wang, W-Q.; Huang, M.; Xuan, L-J. Crassins A–H, Diterpenoids from the roots of *Croton crassifolius*. *J. Nat. Prod.* **2017**, 80(2), 254–260.

23. Velázquez-Jiménez, R.; Vargas-Mendoza, D.; Gayosso-de-Lucio, JA.; González-Montiel, S.; Villagómez-Ibarra, JR. Three novel epoxy-clerodanes bearing a furan ring from *Croton hypoleucus*. *Phytochem. Lett.* **2018**, 24, 21–26.

24. Zhang, W-Y.; Zhao, J-X.; Sheng, L.; Fan, Y-Y.; Li, J-Y.; Gao, K.; Yue, J-M. Mangelonoids A and B, two pairs of macrocyclic diterpenoid enantiomers from *Croton mangelong*. *Org. Lett.* **2018**, 20, 4040–4043.

เอกสารแนบหมายเลข 3

Output ที่ได้จากโครงการ

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

1.1 ผลงานวิจัยจากรา Sanghuangporus sp. ได้ตีพิมพ์ในวารสาร Phytochemistry Letters ดังนี้ (รายละเอียดอยู่ในภาคผนวก)

Rajachan, O-a., Sangdee, A., Kanokmedhakul, K., Tontapha, S., Amornkitbamrung, V., Kanokmedhakul, S. Cyclofarnesane sesquiterpenoids from the fungus *Sanghuangporus* sp.. *Phytochemistry Lett.* **2020**, 37, 17–20.

1.2 งานวิจัยจากดอกฝ้ายน้ำยังอยู่ในกระบวนการสรุป วิเคราะห์ผลการทดลอง และการยืนยันโครงสร้างของสารใหม่ คาดว่าจะเตรียม manuscript และส่งตีพิมพ์ในวารสาร Natural Product Research ในเดือนตุลาคม 2563

ภาคผนวก

Phytochemistry Letters 37 (2020) 17–20

Contents lists available at ScienceDirect

Phytochemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/phytol

Cyclofarnesane sesquiterpenoids from the fungus *Sanghuangporus* sp.

Oue-artorn Rajachan[a,*], Aphidech Sangdee[b], Kwanjai Kanokmedhakul[c], Sarawut Tontapha[d], Vittaya Amornkitbamrung[d], Somdej Kanokmedhakul[c]

[a] Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Mahasarakham University, Mahasarakham, 44150, Thailand
[b] Microbiology and Applied Microbiology Research Unit, Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Mahasarakham, 44150, Thailand
[c] Natural Products Research Unit, Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand
[d] Integrated Nanotechnology Research Center, Department of Physics, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

ARTICLE INFO

Keywords:
Sanghuangporus sp.
Hymenochaetaceae
Cyclofarnesane sesquiterpenoids
Antibacterial

ABSTRACT

An antibacterial activity-guided phytochemical investigation of the fungus *Sanghuangporus* sp. resulted in the isolation of two new cyclofarnesane sesquiterpenoids, (4*S*,6*S*)-4-hydroxy-γ-ionylideneacetic acid (**1**) and (4*R*,5*R*,6*S*)-5,14-dihydro-4-hydroxy-γ-ionylideneacetic acid (**2**), together with three known compounds, γ-ionylideneacetic acid (**3**), 1*S*-(2*E*)-5-[(1*R*)-2,2-dimethyl-6-methylidenecyclohexyl]-3-methylpent-2-enoic acid (**4**), and D-mannitol (**5**). Their structures were elucidated using extensive spectroscopic data (IR, 1D and 2D NMR) and mass spectrometry. The absolute configurations of compounds **1** and **2** were identified by NOESY and comparisons of their experimental and calculated electronic circular dichroism spectral data. Compounds **1**, **3**, and **4** were evaluated for antibacterial activity against five bacterial strains (*Staphylococcus aureus* MSSA 2933, *S. aureus* MRSA 20651, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* 25922, and *Shigella dysenteriae* 15110).

1. Introduction

Sanghuangporus, a medicinal mushroom, belongs to the family Hymenochaetaceae which is widely distributed in China, Japan, Korea, and Taiwan (Han et al., 2016; Lin et al., 2017a). *Sanghuangporus* has been traditionally used as food and medicine for many decades (Lin et al., 2017c). Several bioactivity studies of its crude extracts confirmed their medicinal benefits, including improved blood circulation, enhanced immunity, antitumor, anti-inflammatory, and antioxidant effects, enhanced detoxification and hepatoprotection (Chen et al., 2019; Hsieh et al., 2013; Lin et al., 2017b). Two previous phytochemical investigations of *Sanghuangporus* revealed the presence of hispidins and cyclofarnesane sesquiterpenoids (Chepkirui et al., 2018; Der Wu et al., 2019). Additionally, most isolated compounds showed moderate antimicrobacterial activity (Chepkirui et al., 2018). Cyclofarnesane sesquiterpenoids, the major secondary metabolites from *Sanghuangporus*, have also been reported to have significant bioactivities, such as antioxidant (Kikuzaki et al., 2004), antibacterial (Chepkirui et al., 2018; Shirahata et al., 2017), and phytotoxicity in reducing cheatgrass coleoptile elongation (Masi et al., 2014a, 2014b). As part of our continuing research on Thai fungi, we found that an ethanolic extract of *Sanghuangporus* sp. exhibited antibacterial activity against three bacterial strains, including *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* MSSA 2933, and *Vibrio cholerae* [O1] DMST 9700, with MIC values ranging from 2.5 to 10.0 mg/mL (Sangdee et al., 2017). This work further describes the isolation of two new cyclofarnesane sesquiterpenoids and three known compounds from the mycelium of *Sanghuangporus* sp. and reports on their bioactivity.

2. Results and discussion

An EtOH extract of *Sanghuangporus* sp. was investigated for active secondary metabolites with antibacterial activity against *B. cereus* ATCC 11778, *S. aureus* MSSA 2933, and *V. cholerae* [O1] DMST 9700 (Sangdee et al., 2017). The secondary metabolites from the EtOH extract of *Sanghuangporus* sp. were isolated by column chromatography (CC), resulting in five isolated compounds (**1**–**5**). Their structures were established by using their physical and spectroscopic data (IR, 1D and 2D NMR), along with mass spectrometry (MS). By comparing these data with those of similar compounds previously reported in the literature, three known compounds were identified: γ-ionylideneacetic acid (**3**) (Zheng et al., 2012; Der Wu et al., 2019), 1*S*-(2*E*)-5-[(1*R*)-2,2-dimethyl-6-methylidenecyclohexyl]-3-methylpent-2-enoic acid (**4**) (Chepkirui et al., 2018; Der Wu et al., 2019), and D-mannitol (**5**) (Yim et al., 2014).

* Corresponding author.
E-mail address: oueartorn.r@msu.ac.th (O.-a. Rajachan).

https://doi.org/10.1016/j.phytol.2020.03.007
Received 24 November 2019; Received in revised form 19 March 2020; Accepted 23 March 2020
1874-3900/ © 2020 Phytochemical Society of Europe. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

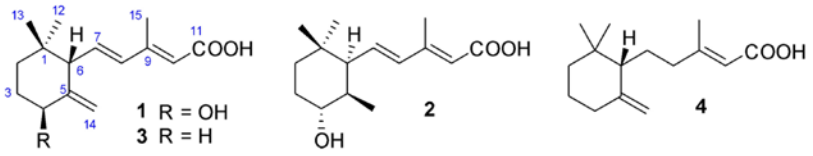


Fig. 1. Structures of the isolated compounds (**1**–**4**).

Table 1
^{1}H and ^{13}C NMR spectral data of compounds **1** and **2** measured in $CDCl_3$.

No	**1**		**2**	
	δ_H (J in Hz)	δ_C	δ_H (J in Hz)	δ_C
1		35.5		34.0
2	1.69, m 1.42, ddd (11.6, 4.8, 2.0)	34.5	1.69, m 1.25, m	34.4
3	1.84, dd (11.6, 4.8) 1.67, m	30.6	1.72, m	29.4
4	4.31, t (4.8)	71.7	3.85, q (2.8)	70.8
5		150.9	1.66, m	35.7
6	2.95, d (8.8)	54.8	2.00, br d (10.4)	51.4
7	6.25, dd (15.6, 8.8)	136.3	5.89, dd (15.6, 10.4)	139.3
8	6.17, d (15.6)	135.9	6.12, d (15.6)	135.9
9		154.6		154.9
10	5.75, s	117.6	5.74, s	116.8
11		171.7		171.1
12	0.84, s	23.3	0.88, s	20.1
13	0.93, s	29.1	0.84, s	31.0
14	5.03, s	110.1	0.85, d (6.8)	17.6
14'	4.71, s			
15	2.31, s	14.2	2.29, s	14.4

Their structures are shown in Fig. 1.

Compound **1** was obtained as a colorless oil. Its molecular formula, $C_{15}H_{22}O_3$, determined from the ^{13}C NMR and HRESITOFMS (observed m/z 249.1482 $[M–H]^-$) data, indicated five degrees of unsaturation. The UV spectrum showed an absorption maximum of an extended α,β-unsaturated carboxylic acid at 265 nm. The IR spectrum displayed broad absorption bands of hydroxyl (3400 cm^{-1}) and conjugated acid carbonyl (1688 cm^{-1}) groups. The ^{13}C NMR and DEPT spectra indicated that its structure contained three methyl, three methylene (one sp^2 methylene), five methine (three sp^2 methine and one oxymethine), one carbonyl, and three quaternary carbons. The ^{1}H NMR spectroscopic data of **1** (Table 1) showed a set of resonance signals of a cyclohexane ring at δ 1.69 (m, H-2), 1.42 (ddd, J = 11.6, 4.8, 2.0 Hz, H-2), 1.84 (dd, J = 11.6, 4.8 Hz, H-3), 1.67 (m, H-3), 2.95 (d, J =8.8 Hz, H-6) and an oxymethine proton at δ 4.31 (t, J =4.8 Hz, H-4). The COSY correlations of H-2/H-3/H-4 supported the connectivity of the ring, and HMBC correlations of H-2 to C-1, C-3, C-4, C-6, and C-13; H-3 to C-1, C-2, C-4, and C-5; H_3-12 (δ_H 0.84) to C-1, C-2, C-6, and C-13; H_3-13 (δ_H 0.93) to C-1, C-2, C-6, and C-12; H_2-14 (δ_H 4.71 and 5.03) to C-4, C-5, and C-6 (Fig. 2) indicated two methyl groups, one oxymethine group and one exomethylene group. The ^{1}H NMR spectroscopic data showed

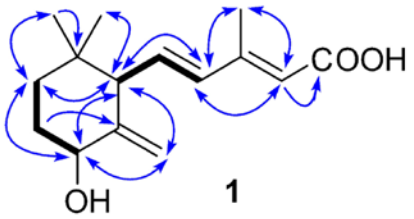


Fig. 2. COSY (bold line) and key HMBC (arrows) correlations of **1**.

resonances of three olefinic methine signals at δ 6.25 (dd, J = 15.6, 8.8 Hz, H-7), 6.17 (d, J =15.6 Hz, H-8), and 5.75 (s, H-10), as well as one methyl signal at δ 2.31 (s, H-15) of the penta-7,9-dienoic acid side chain. This result was confirmed by COSY and HMBC data. The COSY spectrum exhibited a correlation between H-7 and H-8, and the HMBC spectrum showed correlations of H-7 to C-8 and C-9; H-8 to C-7, C-9, C-10, and C-15; H-10 to C-8, C-11, and C-15; and H-15 to C-8, C-9, C-10, and C-11. The COSY correlations between H-6 and H-7, as well as the HMBC correlations of H-2, H-4, H-7, H-8, H-12, H-13, and H-14 to a methine carbon C-6, indicated the connectivity of the two moieties at C-6.

The relative configuration of **1** was characterized through extensive analyses of the coupling constants of cyclohexane protons, NOESY, and NOE correlations. The NOESY spectrum (Fig. 3) showed correlations of H-8 with H-6 and H-10, and H-7 with H_3-15, supporting the 7*E*, 9*E* geometry of the penta-7,9-dienoic acid. A set of correlations between H-6 with H_{ax}-2 and H-8 revealed axial orientations of both H_{ax}-2 and H-6, and the correlations of H_3-13 with H_{ax}-2 and H-6 indicated the coplanarity of these protons. The equatorial orientation of H-4 was established from the coupling constant of H-4 (J =4.8 Hz) with H_{ax}-3 and H_{eq}-3 and the NOESY correlations of H_{ax}-3 with H_3-12, H_{ax}-3 with H_{eq}-2, H-4 with H-14, and H-14' with H_3-12. The NOE correlations also confirmed the anti-relation of H-4 and H-6 by showing no enhancement of H-4 (irradiation of H-6).

The absolute configuration of **1** was further assigned by the comparison of its experimental and calculated electronic circular dichroism (ECD) spectra. The ECD calculations were performed for four possible stereoisomers using Gaussian 09 software (Frisch et al., 2010) and optimized by the B3LYP/6-31 G(d) method (Parr and Yang, 1989). Their ECD spectra were calculated using the time-dependent density functional theory (TD-DFT) method with the CAM-B3LYP functional (Yanai et al., 2004) and 6–311++G(d,p) basis set. The polarizable continuum model (PCM) solvation model using MeOH was included in the calculations (Cossi et al., 2003). All calculated ECD spectra are shown in the supplementary data (Table S1). The calculated ECD spectrum of (4*S*,6*S*)-**1** showed a Cotton effect at λ_{max} 271 nm ($\Delta\varepsilon$ -7.2) in agreement with the experimental ECD spectrum of **1** (Fig. 4). Therefore, compound **1** was elucidated as a new cyclofarnesane sesquiterpenoid with 4*S*, 6*S* configuration and was named (4*S*,6*S*)-4-hydroxy-γ-ionylideneacetic acid.

Compound **2** was isolated as a colorless oil. Its molecular formula was assigned as $C_{15}H_{24}O_3$ based on the ^{13}C NMR and HRESITOFMS (observed m/z 251.1633 $[M–H]^-$) data, indicating four degrees of unsaturation. The UV and IR spectra were similar to those of compound **1**. The ^{1}H and ^{13}C NMR spectroscopic data (Table 1) of **2** were also similar to those of **1**, except that the exomethylene group of **1** was replaced by a methyl group of C-14 [$\delta_{H/C}$ 0.85 (d, J =6.8 Hz)/17.6] in **2**. This result was confirmed by the COSY correlations of H-4/H-5 and H-6/H-5/H_3-14, as well as the HMBC correlations of H-6 to C-1, C-5, C-7, C-8, C-12, and C-13; H-5 to C-1 and C-3; and H_3-14 to C-4, C-5, and C-6.

The relative configuration of **2** was established on the basis of the coupling constant of cyclohexane protons, NOESY, and NOE correlations. The penta-7*E*,9*E*-dienoic acid side chain was determined to be the same as in **1**. The NOESY correlation between H-6 and H_3-12 revealed α-axial and α-equatorial orientations of H-6 and H_3-12, respectively. An equatorial orientation of H-4 (δ_H 3.85, q, J =2.8 Hz) was determined from the small coupling constants of H-4 with H-3 and H-5. The NOESY correlations of H_3-14 with H-4 and H-7 confirmed the β-equatorial and

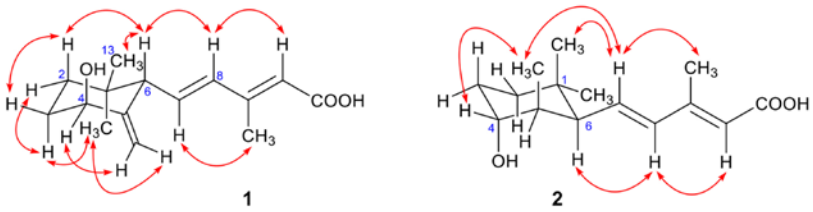


Fig. 3. Key NOESY correlations of **1** and **2**.

β-axial orientations of H-4 and H_3-14, respectively (Fig. 3). Moreover, the high field methyl protons of H-14 (δ_H 0.85) also supported its orientation (Masi et al., 2014b, 2014a). As in compound **1**, the NOE correlation between H-4 and H-6 was not observed. Finally, the absolute configuration of **2** was assigned by the comparison of its experimental and calculated ECD spectra (eight possible stereoisomers for three chiral carbons at C-4, C-5, and C-6) (Table S2). The calculated ECD spectrum of (4*R*,5*R*,6*S*)-**2** exhibited Cotton effects at λ_{max} 271 nm ($\Delta\varepsilon$ +2.4), 234 nm ($\Delta\varepsilon$ -2.0), 217 nm ($\Delta\varepsilon$ -0.1) and 204 nm ($\Delta\varepsilon$ -4.2), consistent with the experimental ECD spectrum of **2** (Fig. 4). Thus, the absolute configuration of **2** was identified as 4*R*, 5*R*, 6*S*, and **2** was named (4*R*,5*R*,6*S*)-5,14-dihydro-4-hydroxy-γ-ionylideneacetic acid.

Compounds **1**, **3** and **4** were evaluated for their antibacterial activities against five bacterial strains: *Staphylococcus aureus* MSSA 2933, *S. aureus* MRSA 20651, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* 25922, and *Shigella dysenteriae* 15110. All tested compounds were inactive in these antibacterial evaluations (MIC > 128 μg/mL). Compound **3** has been previously reported to have moderate antibacterial activities against *Bacillus subtilis* DSM 10, *Micrococcus luteus* DSM 1790, *Candida tenuis* MUCL 29982, *Mucor plumbeus* MUCL 49355 and *Porphyromonas gingivalis* (Chepkirui et al., 2018; Shirahata et al., 2017). However, compound **3** has been reported to exhibit no cytotoxicity against three cancer cell lines (NCI-H187, MCF-7, and KB), and **3** also exhibited no antimalarial activity against *Plasmodium falciparum* K1 (Isaka et al., 2015). Compound **4** has also been reported to possess weak antimicrobial activity against *M. plumbeus* MUCL 49355 (Chepkirui et al., 2018).

3. Experimental

3.1. General experimental procedures

Optical rotations were recorded on a JASCO P-1020 polarimeter (JASCO, Inc., MD, USA). ECD and UV spectra were determined on a JASCO J-810 spectropolarimeter (JASCO, Inc., Japan). IR spectra were obtained using a Bruker Tensor 27 spectrophotometer (Agilent Technologies, USA). NMR spectra were recorded using the Varian Mercury Plus 400 MHz (Varian, Inc., USA) and Bruker Avance 400 MHz (Bruker Daltonics, Inc., MA, USA) spectrometers; the internal standards $CDCl_3$ and CD_3OD were referenced from the residues of those solvents. HRESITOFMS spectra were recorded on a Micromass Q-TOF-2 mass spectrometer (Micromass, Manchester, UK). Column chromatography was applied via silica gel (40–63 μm; SiliCycle, Inc., Canada) and Sephadex LH-20 (40–70 μm; GE Healthcare, Uppsala, Sweden). TLC was performed with precoated Merck silica gel 60 PF_{254} aluminum sheets (Merck, Darmstadt, Germany).

3.2. Fungal materials

The fungus was isolated from a wild mushroom fruiting body which was collected from the deciduous dipterocarp forest of Mukdahan province, Thailand, in 2016. The specimen was deposited in the Natural Medicinal Mushroom Museum of Mahasarakham University, Thailand, with the specimen code of J. Naksuwankul 720 (MSUT). The fungus was identified using ITS sequence analysis and was assigned as *Sanghuangporus* isolate sp.1 (GenBank accession number MT041771). This fungus was cultured on potato dextrose broth (PDB) and incubated at 25 – 28 °C for 20 days. The mycelium was collected and then dried at 50 °C for 2–3 days as described in a previous paper (Sangdee et al., 2017).

3.3. Extraction and isolation

Dried mycelium of *Sanghuangporus* sp. (50 g) was ground and extracted successively with ethanol (200 mL × 3) to produce the crude ethanol extract (7 g). The crude ethanol extract was separated by silica gel column chromatography (CC) (6 × 12 cm) and then eluted with a gradient system of *n*-hexane-EtOAc and EtOAc-MeOH to yield six

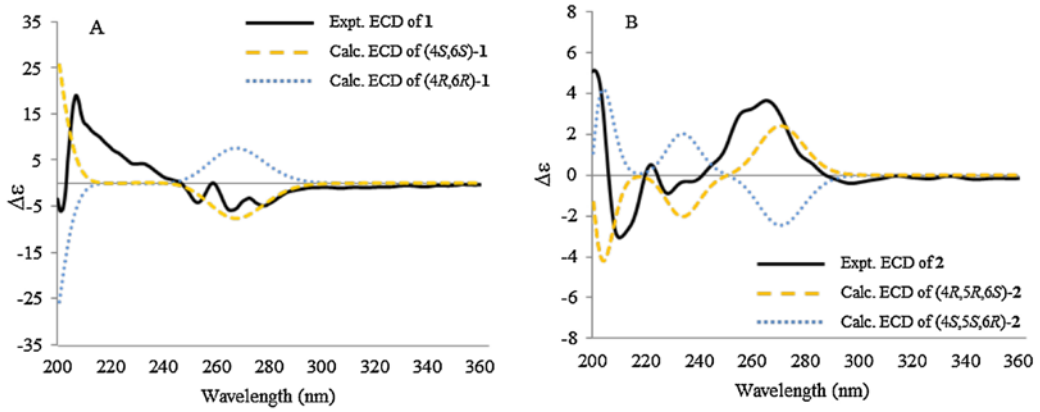


Fig. 4. Experimental and calculated ECD spectra of **1** (A) and **2** (B) measured in MeOH.

fractions, S1-S6. Fraction S2 (330 mg) was separated by silica gel CC (3 × 15 cm) and eluted by an isocratic system of acetone:*n*-hexane (5:95) to yield three subfractions, S2.1-S2.3. Subfraction S2.1 was separated by Sephadex LH-20 CC and eluted with MeOH to yield **4** as a colorless oil (15 mg). Subfraction S2.2 (87 mg) was further isolated by silica gel CC (2 × 20 cm) using an isocratic system of CH_2Cl_2:*n*-hexane:MeOH (90:10:1) as eluent to yield **3** as a colorless oil (16 mg). Fraction S4 (76 mg) was subjected to silica gel CC (2 × 20 cm) and eluted with an isocratic system of acetone:*n*-hexane (15:85) to produce three subfractions, S4.1-S4.3. Subfraction S4.2 (28 mg) was applied to silica gel CC (2 × 20 cm) and eluted with an isocratic system of CH_2Cl_2:*n*-hexane:MeOH (90:10:2) to afford **1** (2 mg) and **2** (1.8 mg) as colorless oils. Subfraction S4.3 (20 mg) was further purified by silica gel CC (2 × 20 cm), using an isocratic system of CH_2Cl_2:*n*-hexane:MeOH (90:10:1) as eluent, to provide an additional amount of **1** (3 mg). Recrystallization of the solid in fraction S5 (214 mg) with CH_2Cl_2:MeOH yielded pale yellow solid **5** (70 mg).

(4*S*,6*S*)-4-hydroxy-γ-ionylideneacetic acid (**1**): colorless oil; $[\alpha]^{22}_D$ -38.6 (*c* 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 265 (4.22) nm; ECD (*c* 80.0 μM, MeOH) λ_{max} ($\Delta\varepsilon$) 208 (17.83), 267 (-5.78); IR (Neat) ν_{max} 3100, 2957, 2872, 1688, 1651, 1610, 1453, 1251 cm^{-1}; for ^1H and ^{13}C NMR spectroscopic data ($CDCl_3$, 400 MHz), see Table 1; HRESITOFMS *m/z* 249.1482 $[M-H]^-$ (calcd for $C_{15}H_{21}O_3$, 249.1491).

(4*R*,5*R*,6*S*)-5,14-dihydro-4-hydroxy-γ-ionylideneacetic acid (**2**): colorless oil; $[\alpha]^{22}_D$ -45.0 (*c* 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 266 (4.44) nm; ECD (*c* 79.2 μM, MeOH) λ_{max} ($\Delta\varepsilon$) 212 (-2.91), 222 (0.51), 227 (-0.75), 266 (3.65); IR (Neat) ν_{max} 3175, 2958, 2858, 1720, 1691, 1612, 1455, 1245 cm^{-1}; for ^1H and ^{13}C NMR spectroscopic data ($CDCl_3$, 400 MHz), see Table 1; HRESITOFMS *m/z* 251.1633 $[M-H]^-$ (calcd for $C_{15}H_{23}O_3$ 251.1647).

3.4. Antibacterial assay

Antibacterial assay was performed on five reference strains of bacteria (*Staphylococcus aureus* MSSA 2933, *S. aureus* MRSA 20651, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* 25922, and *Shigella dysenteriae* 15110) using the agar well diffusion method described by Sangdee et al. (2017).

4. Conclusion

Two new cyclofarnesane sesquiterpenoids, (4*S*,6*S*)-4-hydroxy-γ-ionylideneacetic acid (**1**) and (4*R*,5*R*,6*S*)-5,14-dihydro-4-hydroxy-γ-ionylideneacetic acid (**2**), together with three known compounds were isolated from *Sanghuangporus* sp. The absolute configurations of **1** and **2** were elucidated by NMR data and by comparing experimental and calculated ECD spectral data. Compounds **1**, **3**, and **4** were tested for antibacterial activity against those five bacterial strains; however, all the tested compounds were inactive.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We acknowledge the financial support of the Thailand Research Fund (grant number MRG6180081). We thank the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC) and Natural Products Research Unit, Khon Kaen University for partial support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:https://doi.org/10.1016/j.phytol.2020.03.007.

References

Chen, W., Tan, H., Liu, Q., Zheng, X., Zhang, H., Liu, Y., Xu, L., 2019. A review: the bioactivities and pharmacological applications of *Phellinus linteus*. Molecules. https://doi.org/10.3390/molecules24101888.

Chepkirui, C., Cheng, T., Matasyoh, J., Decock, C., Stadler, M., 2018. An unprecedented spiro [furan-2,1'-indene]-3-one derivative and other nematicidal and antimicrobial metabolites from *Sanghuangporus* sp. (Hymenochaetaceae, Basidiomycota) collected in Kenya. Phytochem. Lett. 25, 141–146.

Cossi, M., Rega, N., Scalmani, G., Barone, V., 2003. Energies, structures, and electronic properties of molecules in solution with the C-PCM solvation model. J. Comput. Chem. 24, 669–681.

Der Wu, M., Cheng, M.J., Chen, Y.L., Chan, H.Y., Hsieh, S.Y., Chen, I.C., Wu, P.H., Wu, S.H., 2019. Secondary metabolites from the fermented whole broth of fungal strain *Sanghuangporus sanghuang*. Chem. Nat. Compd. 55, 36–40.

Frisch, M.J., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G.E., Robb, M.A., Cheeseman, J.R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G.A., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X., Hratchian, H.P., Izmaylov, A.F., Bloino, J., Zheng, G., Sonnenberg, J.L., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Montgomery Jr., J.A., Peralta, J.E., Ogliaro, F., Bearpark, M., Heyd, J.J., Brothers, E., Kudin, K.N., Staroverov, V.N., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A., Burant, J.C., Iyengar, S.S., Tomasi, J., Cossi, M., Rega, N., Millam, J.M., Klene, M., Knox, J.E., Cross, J.B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R.E., Yazyev, O., Austin, A.J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J.W., Martin, R.L., Morokuma, K., Zakrzewski, V.G., Voth, G.A., Salvador, P., Dannenberg, J.J., Dapprich, S., Daniels, A.D., Farkas, Ö., Foresman, J.B., Ortiz, J.V., Cioslowski, J., Fox, D.J., 2010. Gaussian09, Revision B. 01 Gaussian Inc, Wallingford CT.

Han, J.G., Hyun, M.W., Kim, C.S., Jo, J.W., Cho, J.H., Lee, K.H., Kong, W.S., Han, S.K., Oh, J., Sung, G.H., 2016. Species identity of *Phellinus linteus* (sanghuang) extensively used as a medicinal mushroom in Korea. J. Microbiol. 54, 290–295.

Hsieh, P.W., Wu, J.Bin, Wu, Y.C., 2013. Chemistry and biology of *Phellinus linteus*. BioMedicine 3, 106–113.

Isaka, M., Yangchum, A., Supothina, S., Boonpratuang, T., Choeyklin, R., Kongsaeree, P., Prabpai, S., 2015. Aromadendrane and cyclofarnesane sesquiterpenoids from cultures of the basidiomycete *Inonotus* sp. BCC 23706. Phytochemistry 118, 94–101.

Kikuzaki, H., Kayano, S.I., Fukutsuka, N., Aoki, A., Kasamatsu, K., Yamasaki, Y., Mitani, T., Nakatani, N., 2004. Abscisic acid related compounds and lignans in Prunes (*Prunus domestica* L.) and their oxygen radical absorbance capacity (ORAC). J. Agric. Food Chem. 52, 344–349.

Lin, W.C., Deng, J.S., Huang, S.S., Lin, W.R., Wu, S.H., Lin, H.Y., Huang, G.J., 2017a. Anti-inflammatory activity of *Sanghuangporus sanghuang* by suppressing the TLR4-mediated PI3K/AKT/mTOR/IKKβ signaling pathway. RSC Adv. 7, 21234–21251.

Lin, W.C., Deng, J.S., Huang, S.S., Wu, S.H., Chen, C.C., Lin, W.R., Lin, H.Y., Huang, G.J., 2017b. Anti-inflammatory activity of *Sanghuangporus sanghuang* mycelium. Int. J. Mol. Sci. 18, 347. https://doi.org/10.3390/ijms18020347.

Lin, W.C., Deng, J.S., Huang, S.S., Wu, S.H., Lin, H.Y., Huang, G.J., 2017c. Evaluation of antioxidant, anti-inflammatory and anti-proliferative activities of ethanol extracts from different varieties of Sanghuang species. RSC Adv. 7, 7780–7788.

Masi, M., Meyer, S., Cimmino, A., Andolfi, A., Evidente, A., 2014a. Pyrenophoric acid, a phytotoxic sesquiterpenoid penta-2,4-dienoic acid produced by a potential mycoherbicide, *Pyrenophora semeniperda*. J. Nat. Prod. 77, 925–930.

Masi, M., Meyer, S., Cimmino, A., Clement, S., Black, B., Evidente, A., 2014b. Pyrenophoric acids B and C, two new phytotoxic sesquiterpenoids produced by *Pyrenophora semeniperda*. J. Agric. Food Chem. 62, 10304–10311.

Parr, R.G., Yang, W., 1989. Density-functional Theory of Atoms and Molecules. Oxford University Press Inc, New York.

Sangdee, K., Buranrat, B., Naksuwankul, K., Jaihan, P., Sangdee, A., 2017. Antibacterial and anti-breast cancer cell line activities of *Sanghuangporus* sp.1 extracts. Trop. J. Pharm. Res. 16, 613–620.

Shirahata, T., Ino, C., Mizuno, F., Asada, Y., Hirotani, M., Petersson, G.A., Omura, S., Yoshikawa, T., Kobayashi, Y., 2017. γ-Ionylidene-type sesquiterpenoids possessing antimicrobial activity against *Porphyromonas gingivalis* from *Phellinus linteus* and their absolute structure determination. J. Antibiot. (Tokyo) 70, 695–698.

Yanai, T., Tew, D.P., Handy, N.C., 2004. A new hybrid exchange-correlation functional using the Coulomb-attenuating method (CAM-B3LYP). Chem. Phys. Lett. 393, 51–57.

Yim, T., Kanokmedhakul, K., Kanokmedhakul, S., Sanmanoch, W., Boonlue, S., 2014. A new meroterpenoid tatenoic acid from the fungus *Neosartorya tatenoi* KKU-2NK23. Nat. Prod. Res. 28, 1847–1852.

Zheng, Y.B., Lu, C.H., Shen, Y.M., 2012. New abscisic acid-related metabolites from *Phellinus vaninii*. J. Asian Nat. Prod. Res. 14, 613–617.

Supplementary data

Cyclofarnesane sesquiterpenoids from the fungus *Sanghuangporus* sp.

Oue-artorn Rajachan,[a*] Aphidech Sangdee,[b] Kwanjai Kanokmedhakul,[c] Sarawut Tontapha,[d] Vittaya Amornkitbamrung[d] and Somdej Kanokmedhakul[c]

[a]Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Mahasarakham University, Mahasarakham 44150, Thailand

[b]Microbiology and Applied Microbiology Research Unit, Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Mahasarakham 44150, Thailand

[c]Natural Products Research Unit, Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

[d]Integrated Nanotechnology Research Center, Department of Physics, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

* Corresponding author: E-mail: oueartorn.r@msu.ac.th

*Tel.: +6643-754246. Fax: +6643-754246.

Contents

Fig. S1. MS spectrum of compound **1**

Fig. S2. IR spectrum of compound **1**

Fig. S3. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) spectrum of compound **1**

Fig. S4. ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) spectrum of compound **1**

Fig. S5. HMQC ($CDCl_3$) spectrum of compound **1**

Fig. S6. COSY ($CDCl_3$) spectrum of compound **1**

Fig. S7. HMBC ($CDCl_3$) spectrum of compound **1**

Fig. S8. NOESY ($CDCl_3$) spectrum of compound **1**

Fig. S9. NOE ($CDCl_3$) spectrum of compound **1**

Table S1. Experimental and calculated ECD spectra of **1**

Fig. S10. MS spectrum of compound **2**

Fig. S11. IR spectrum of compound **2**

Fig. S12. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) spectrum of compound **2**

Fig. S13. ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) spectrum of compound **2**

Fig. S14. Extended ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) spectrum of compound **2**

Fig. S15. DEPT (CDCl3) spectrum of compound **2**

Fig. S16. HMQC ($CDCl_3$) spectrum of compound **2**

Fig. S17. Extended HMQC ($CDCl_3$) spectrum of compound **2**

Fig. S18. COSY ($CDCl_3$) spectrum of compound **2**

Fig. S19. HMBC ($CDCl_3$) spectrum of compound **2**

Fig. S20. Extended HMBC ($CDCl_3$) spectrum of compound **2**

Fig. S21. NOESY ($CDCl_3$) spectrum of compound **2**

Fig. S22. NOE ($CDCl_3$) spectrum of compound **2**

Table S2. Experimental and calculated ECD spectra of **2**

Mass Spectrum List Report

Analysis Info

Analysis Name	OSAR30042019001.d	Acquisition Date	4/30/2019 11:43:13 AM
Method	Tune_M_Neg_PIN012018.m	Operator	Administrator
Sample Name	OAR1 30042019	Instrument	micrOTOF 72

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Set Corrector Fill	75 V
Scan Range	n/a	Capillary Exit	-130.0 V	Set Pulsar Pull	372 V
Scan Begin	50 m/z	Hexapole RF	150.0 V	Set Pulsar Push	372 V
Scan End	3000 m/z	Skimmer 1	-50.0 V	Set Reflector	1300 V
		Hexapole 1	-25.0 V	Set Flight Tube	9000 V
				Set Detector TOF	2295 V

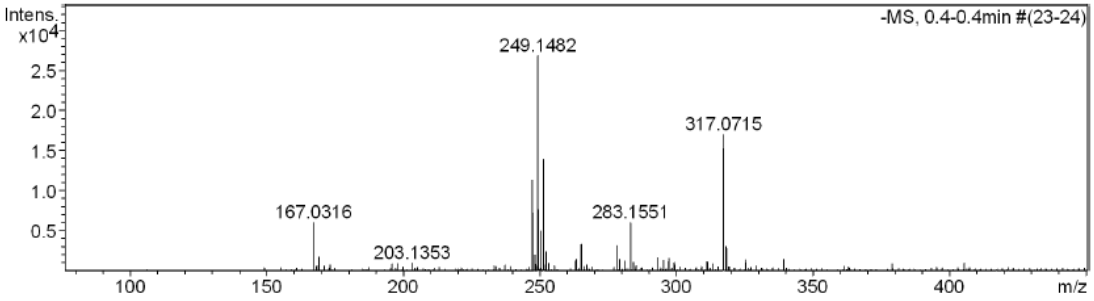


Fig. S1. MS spectrum of compound **1**

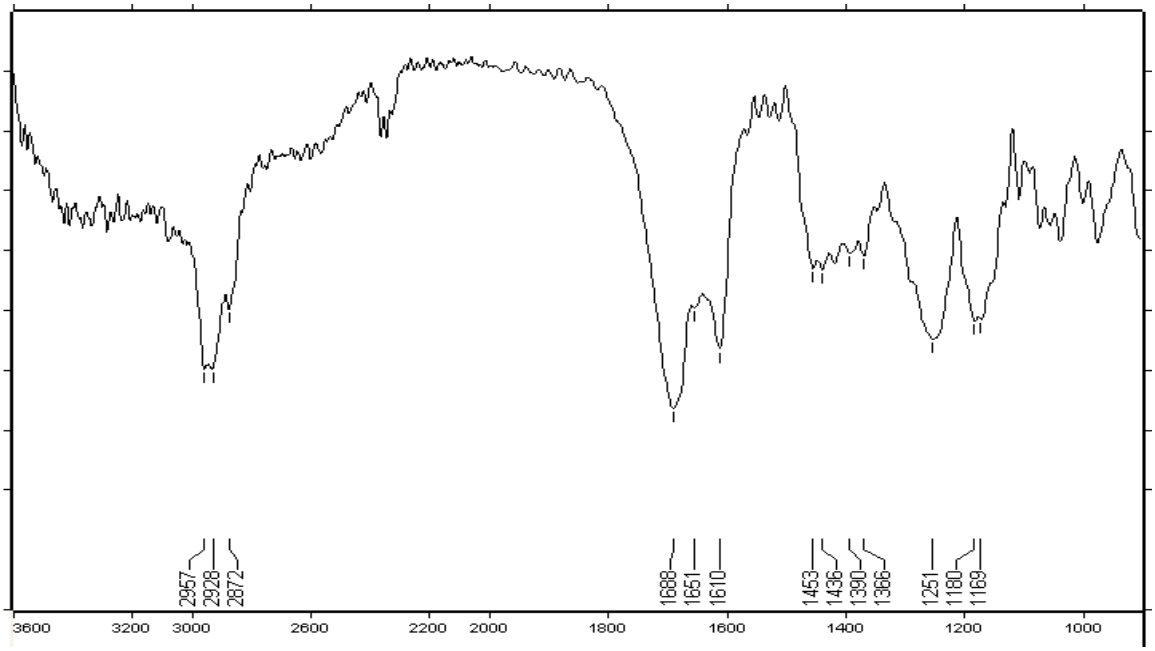


Fig. S2. IR spectrum of compound **1**

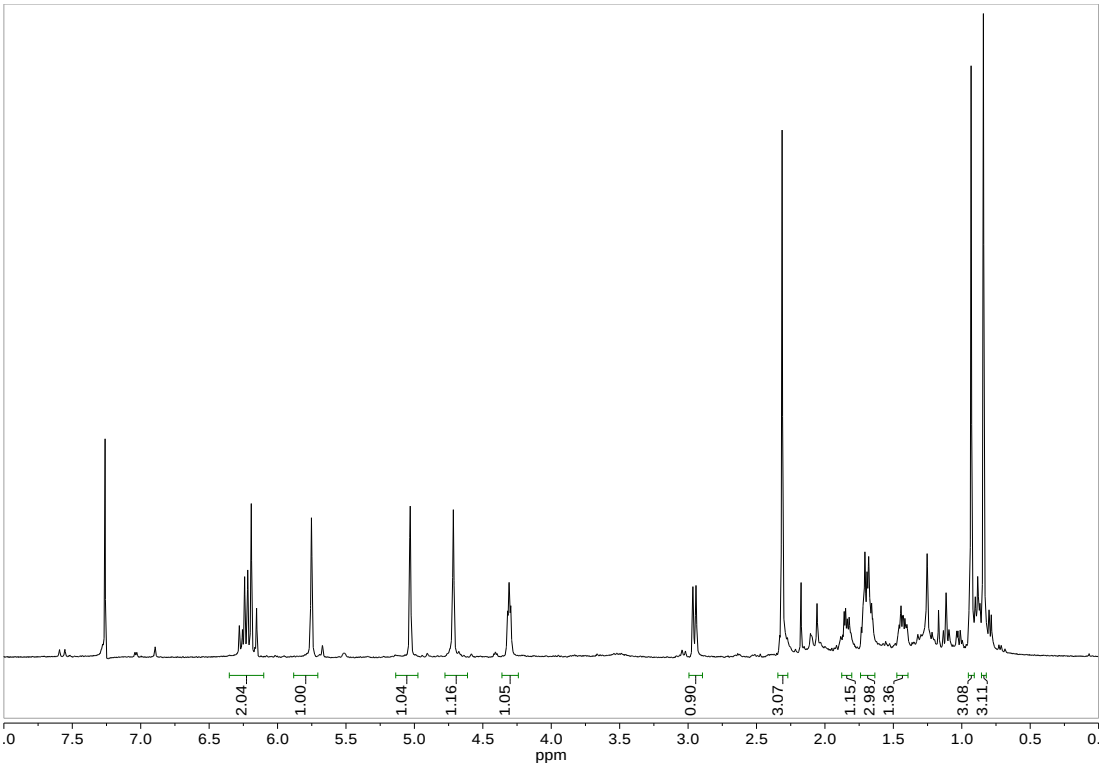


Fig. S3. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) spectrum of compound **1**

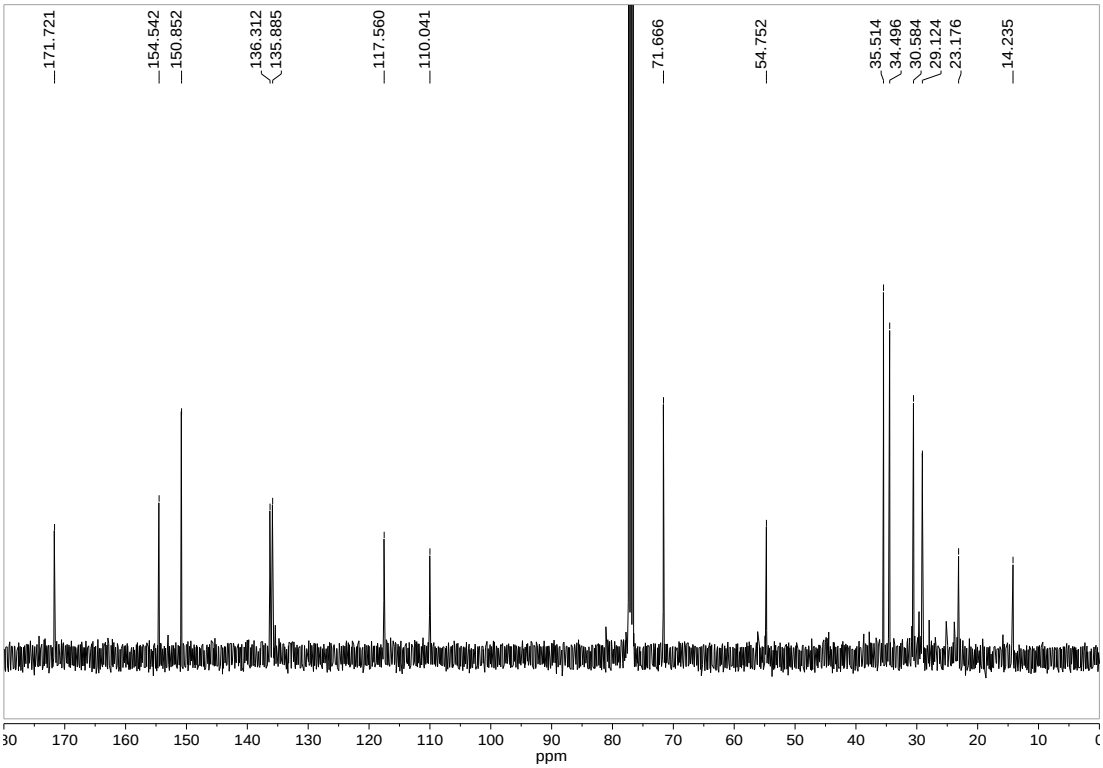


Fig. S4. ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) spectrum of compound **1**

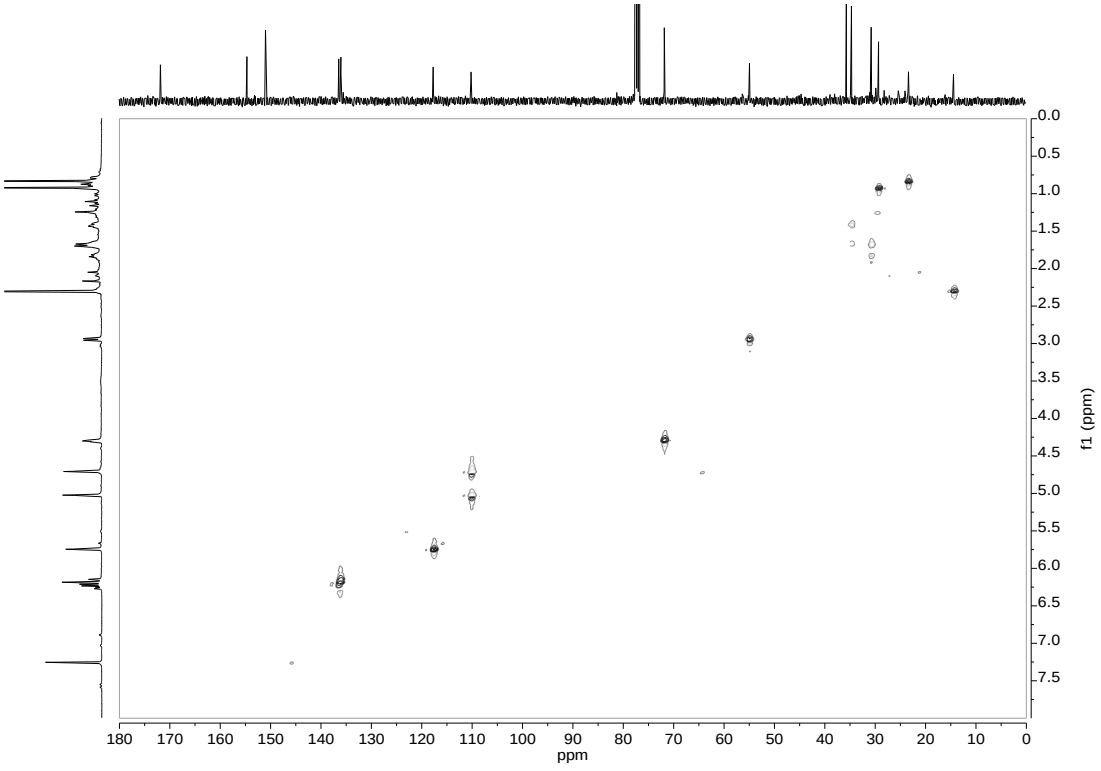


Fig. S5. HMQC ($CDCl_3$) spectrum of compound **1**

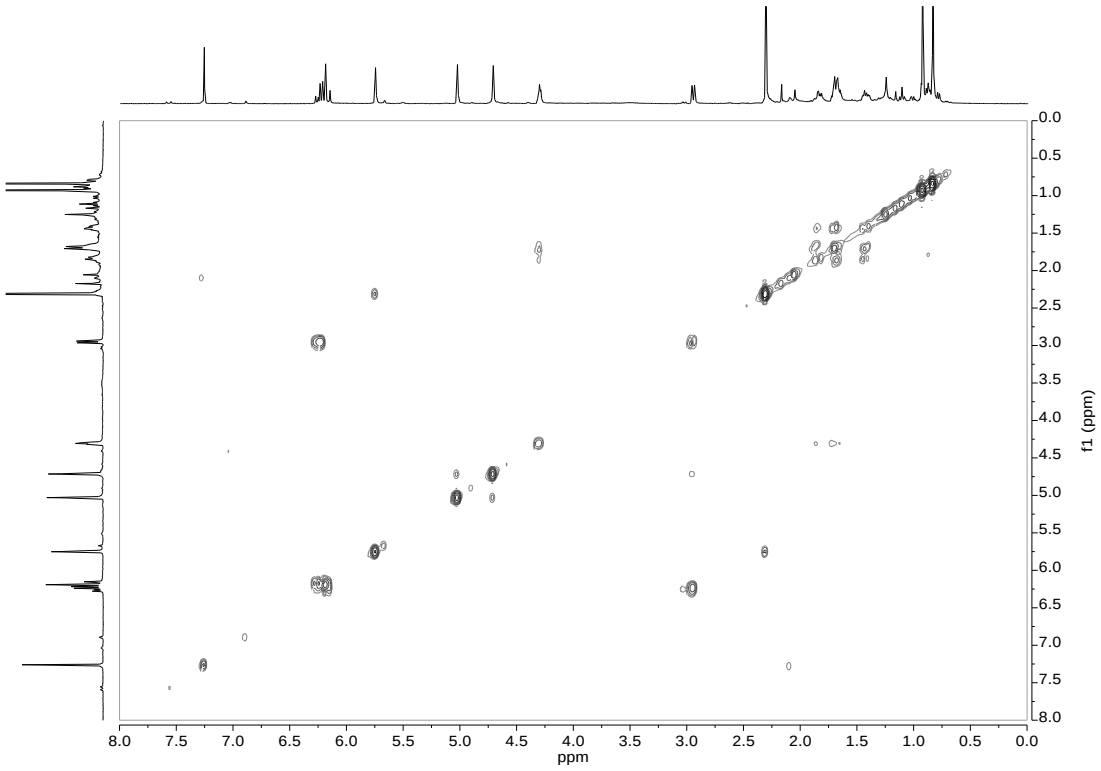


Fig. S6. COSY ($CDCl_3$) spectrum of compound **1**

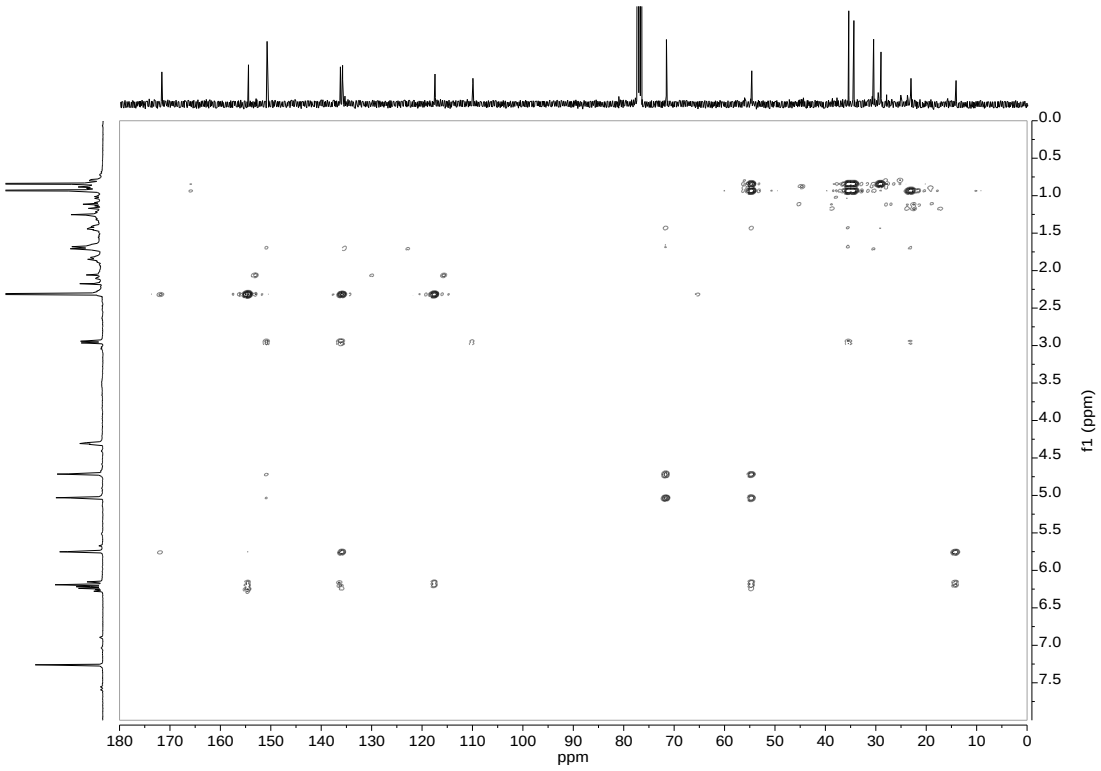


Fig. S7. HMBC ($CDCl_3$) spectrum of compound **1**

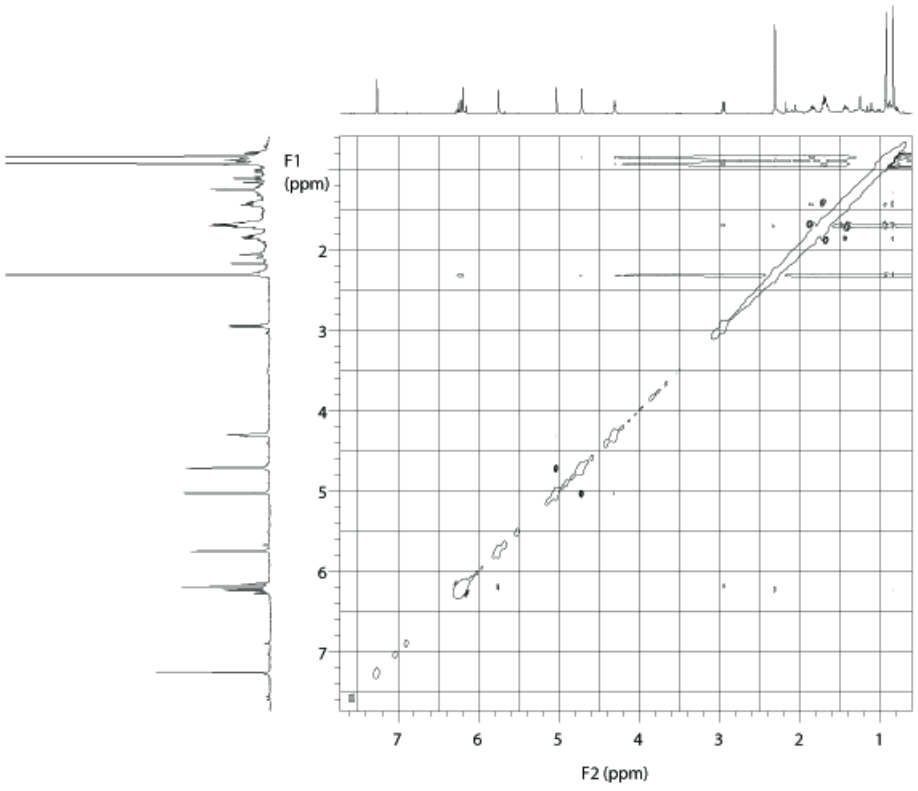


Fig. S8. NOESY ($CDCl_3$) spectrum of compound **1**

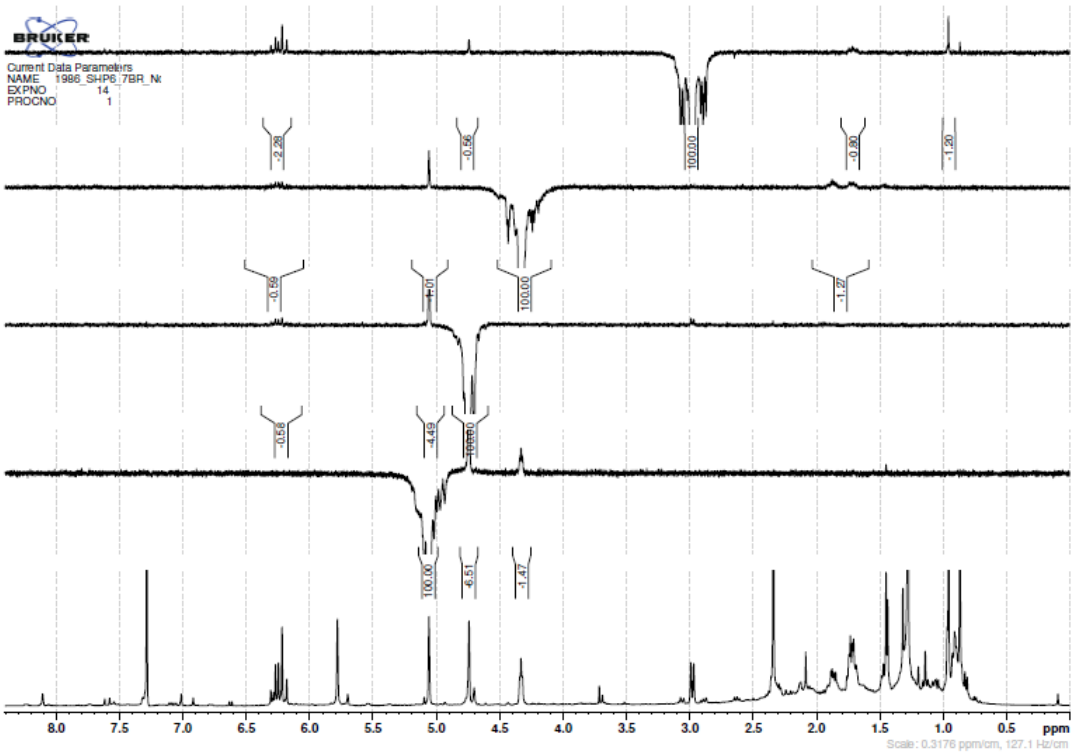
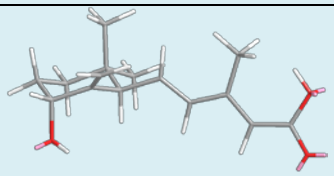
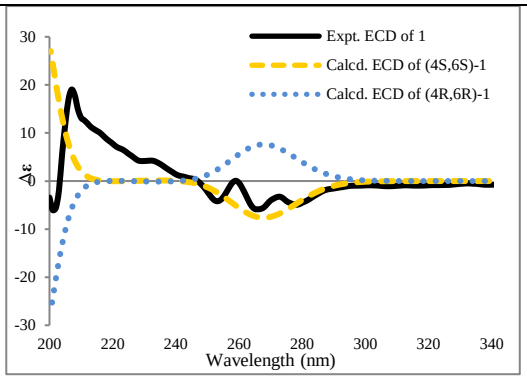
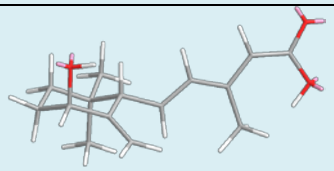
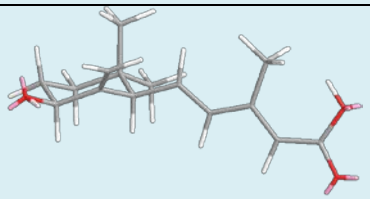
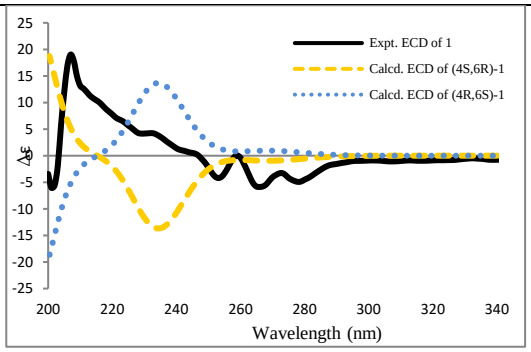
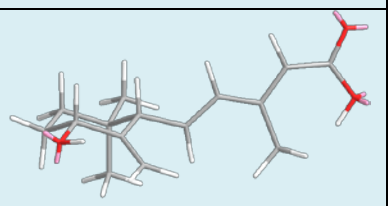


Fig. S9. NOE ($CDCl_3$) spectrum of compound **1**

Table S1. Experimental and calculated ECD spectra of **1**

entry	compound	structure	ECD spectra
1	(4*R*,6*R*)-**1**		
	(4*S*,6*S*)-**1**		
2	(4*R*,6*S*)-**1**		
	(4*S*,6*R*)-**1**		

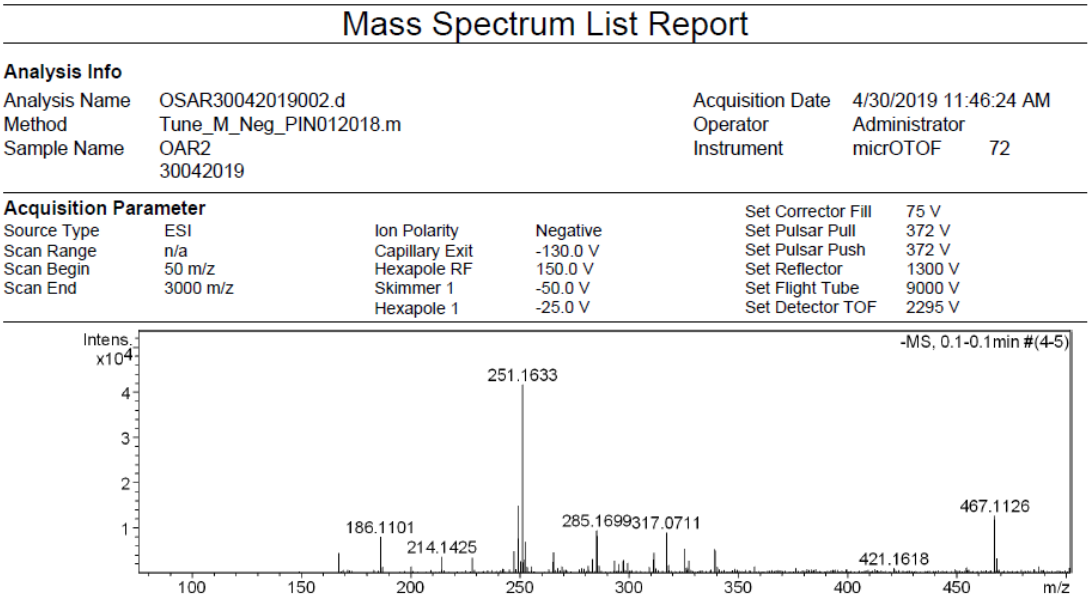


Fig. S10. MS spectrum of compound **2**

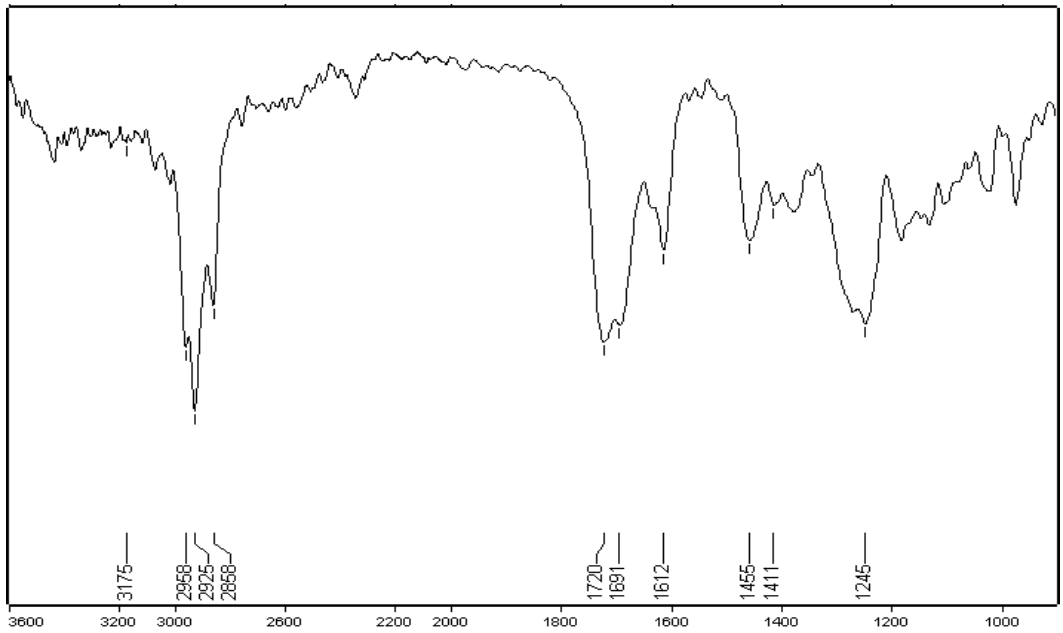


Fig. S11. IR spectrum of compound **2**

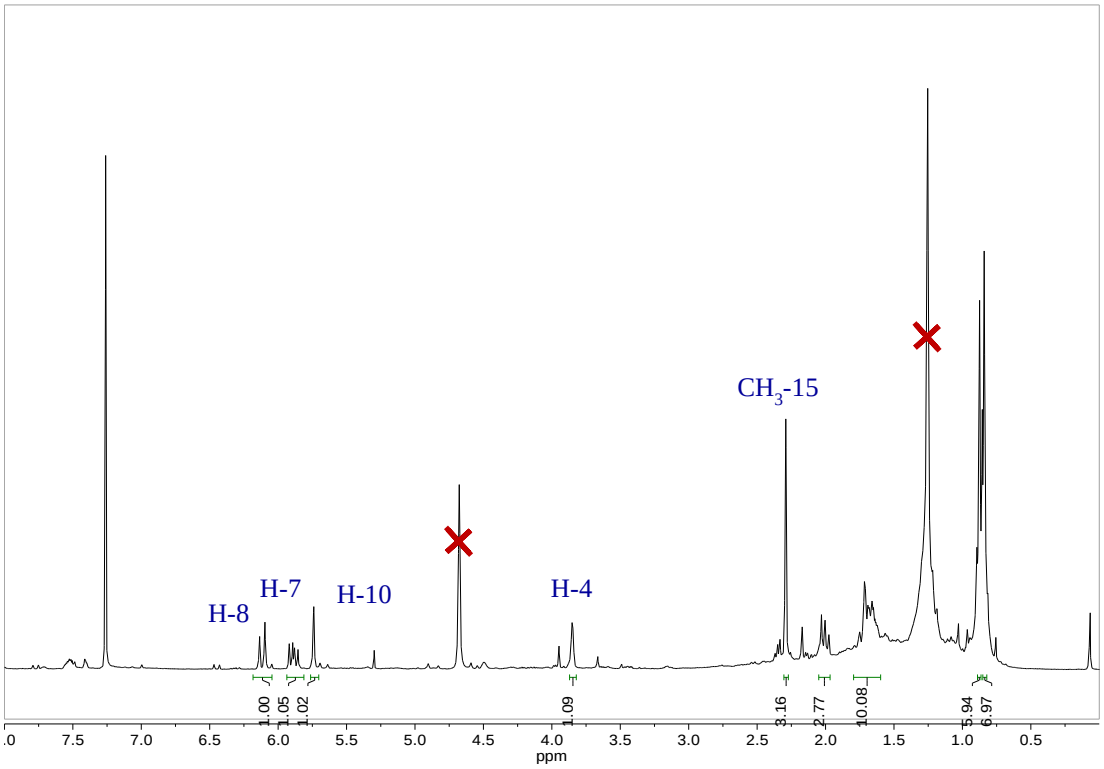


Fig. S12. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) spectrum of compound **2**

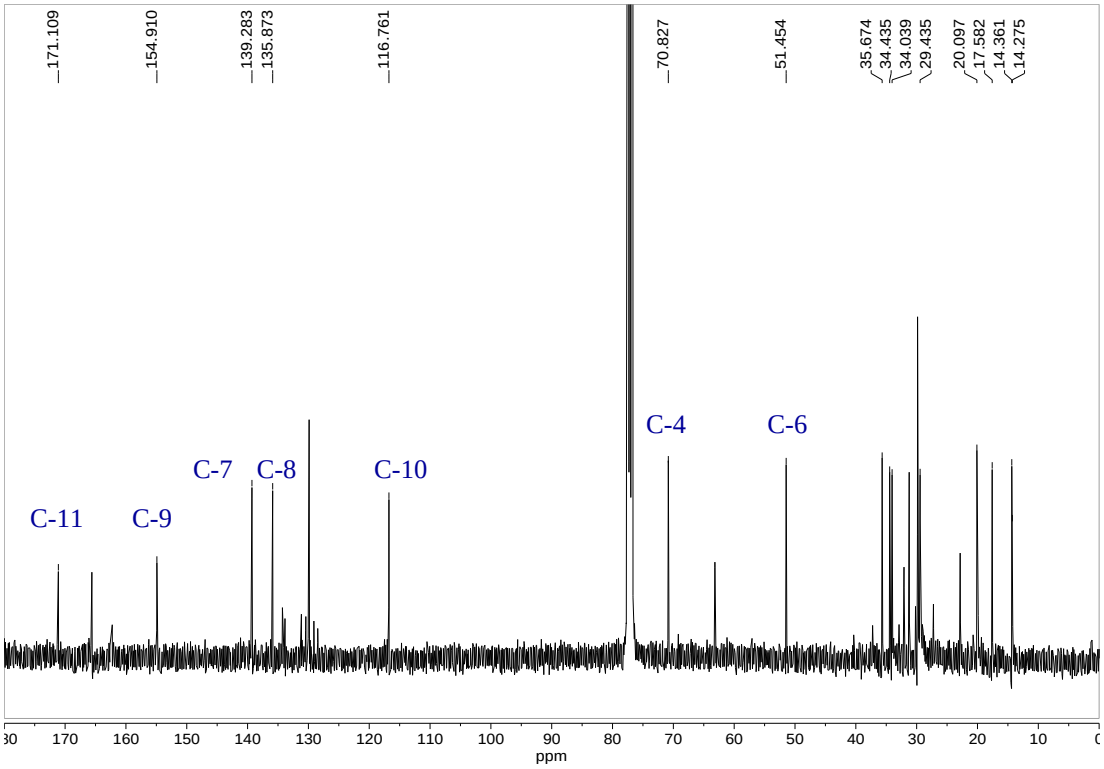


Fig. S13. ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) spectrum of compound **2**

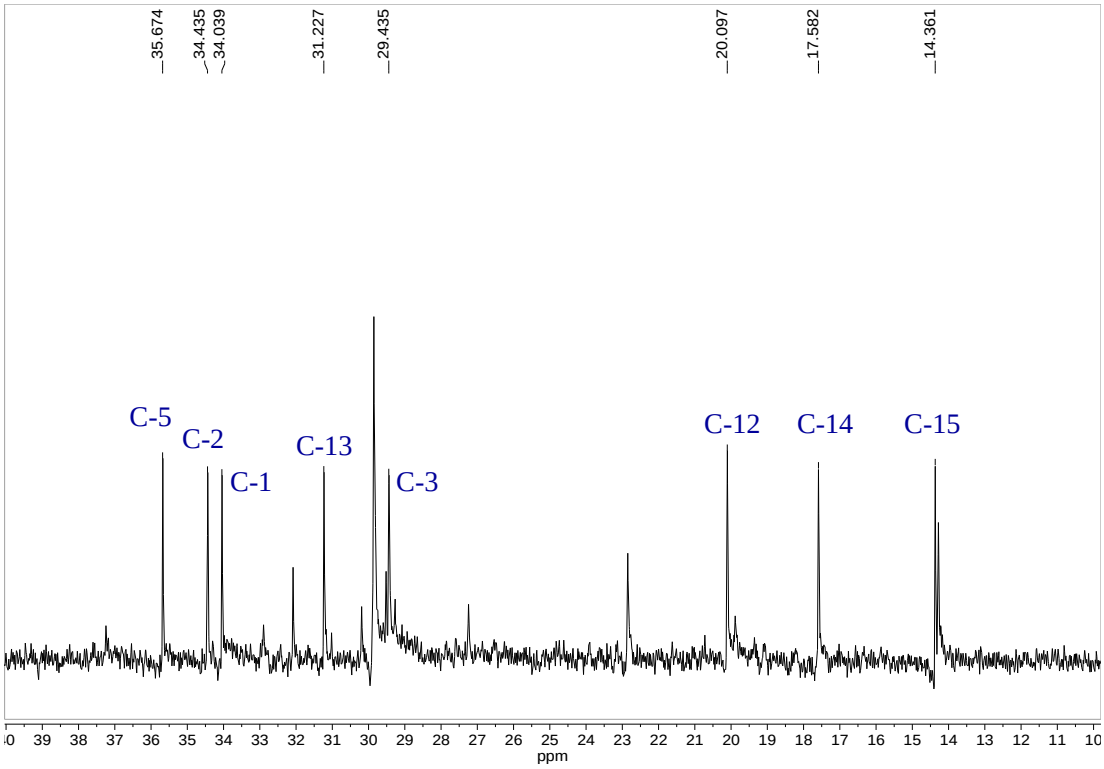


Fig. S14. Extended ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) spectrum of compound **2**

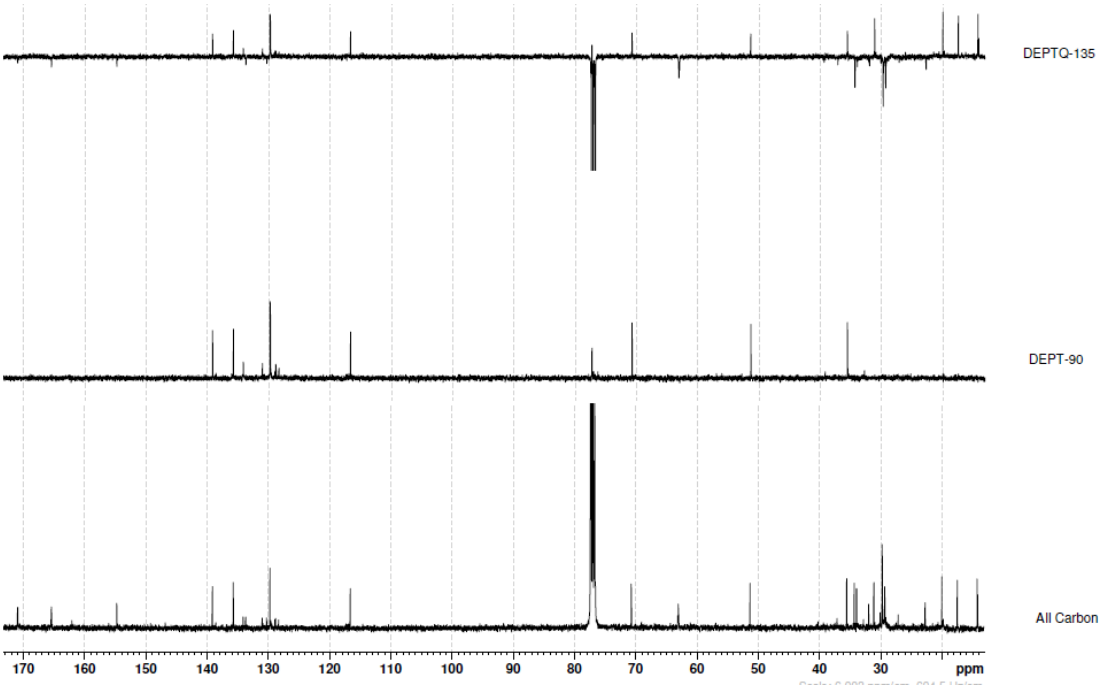


Fig. S15. DEPT (CDCl3) spectrum of compound **2**

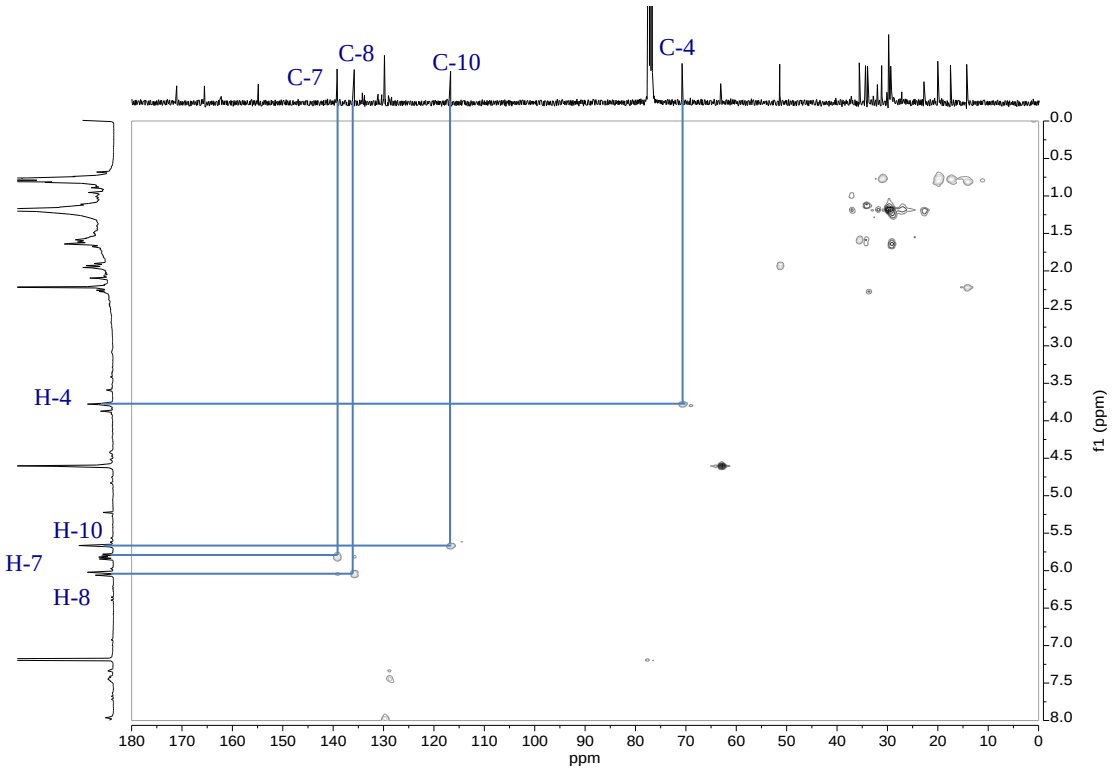


Fig. S16. HMQC ($CDCl_3$) spectrum of compound **2**

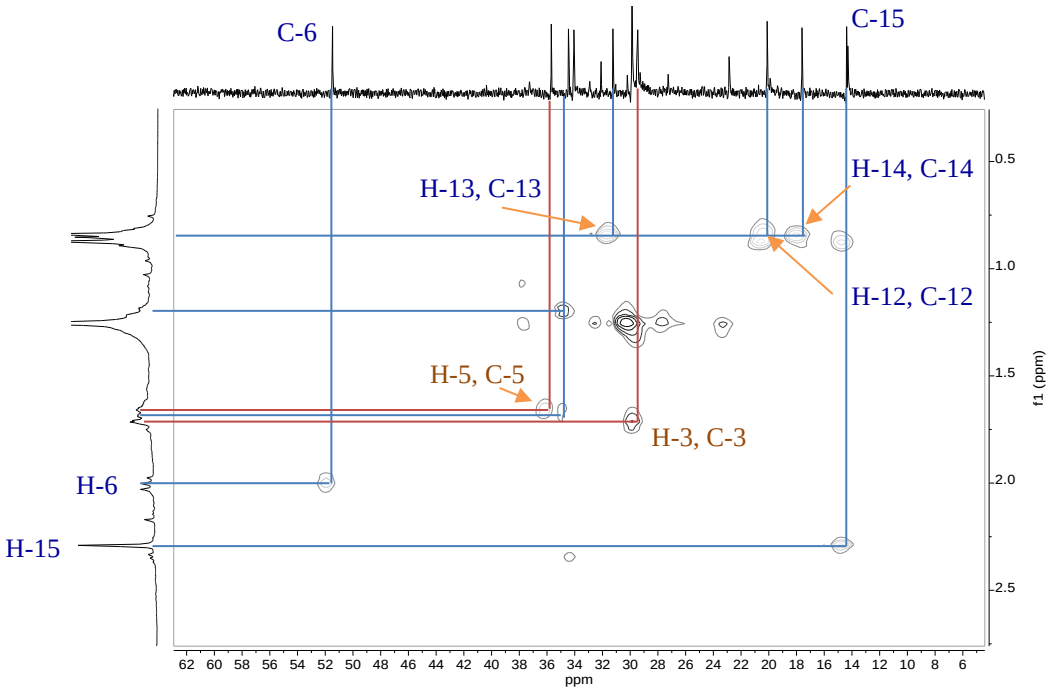


Fig. S17. Extended HMQC ($CDCl_3$) spectrum of compound **2**

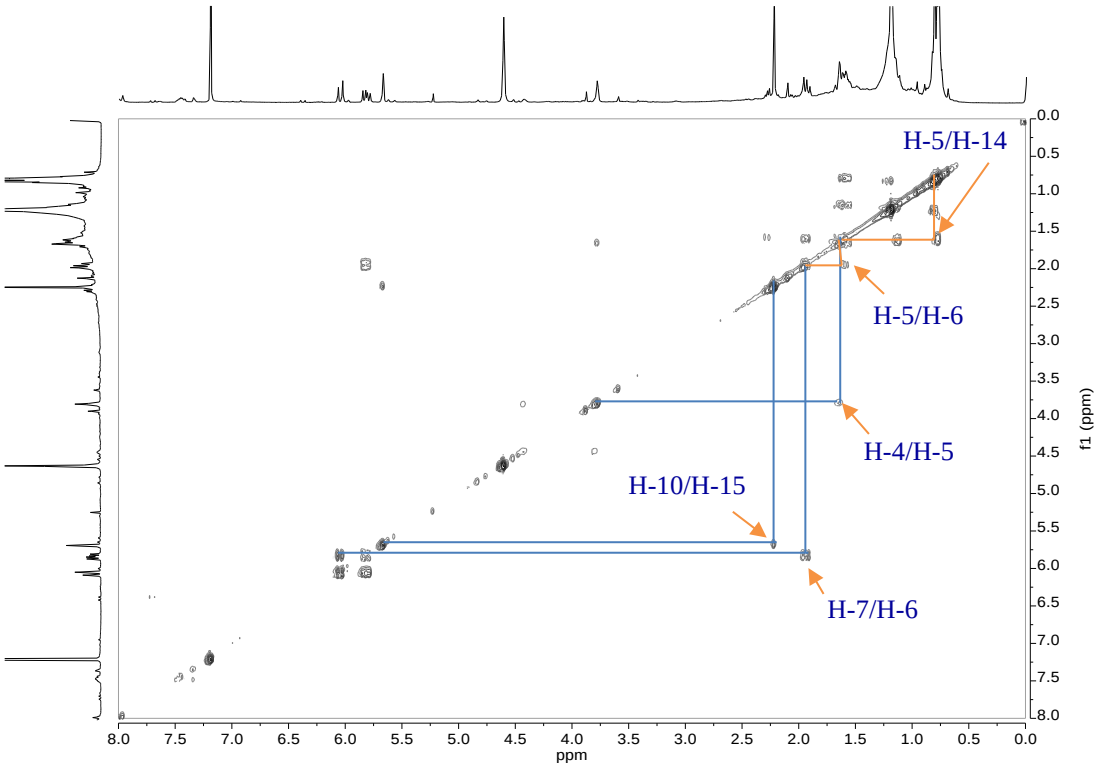


Fig. S18. COSY ($CDCl_3$) spectrum of compound **2**

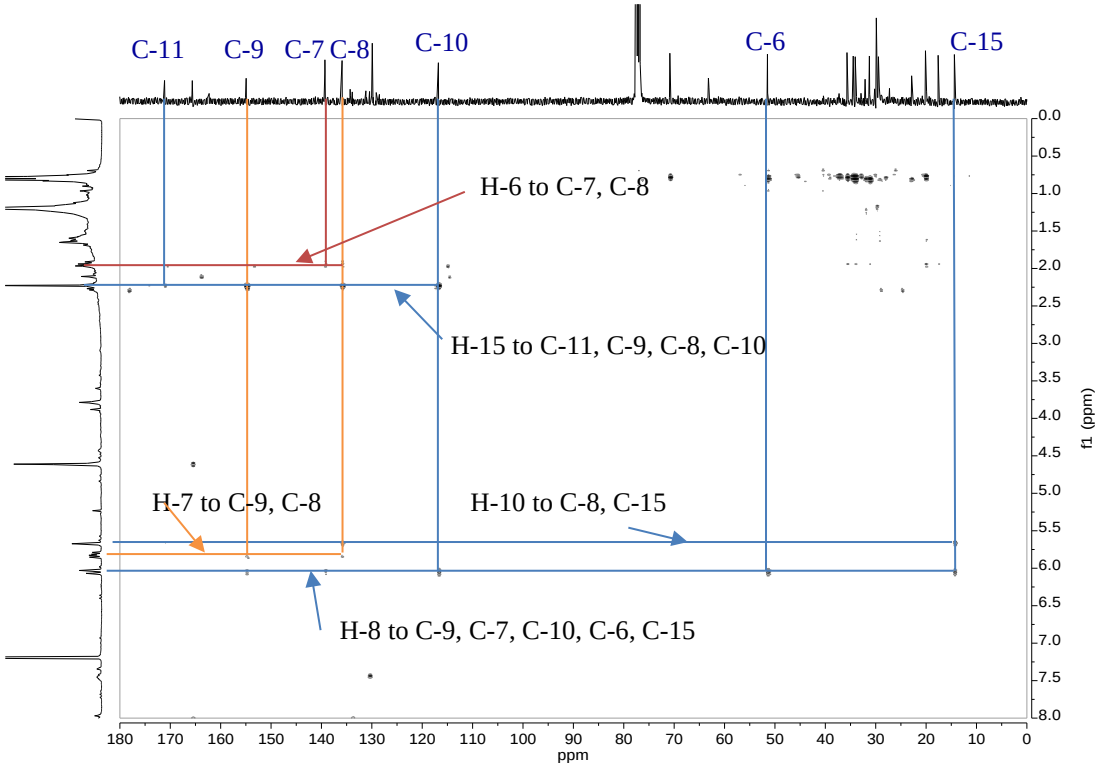


Fig. S19. HMBC ($CDCl_3$) spectrum of compound **2**

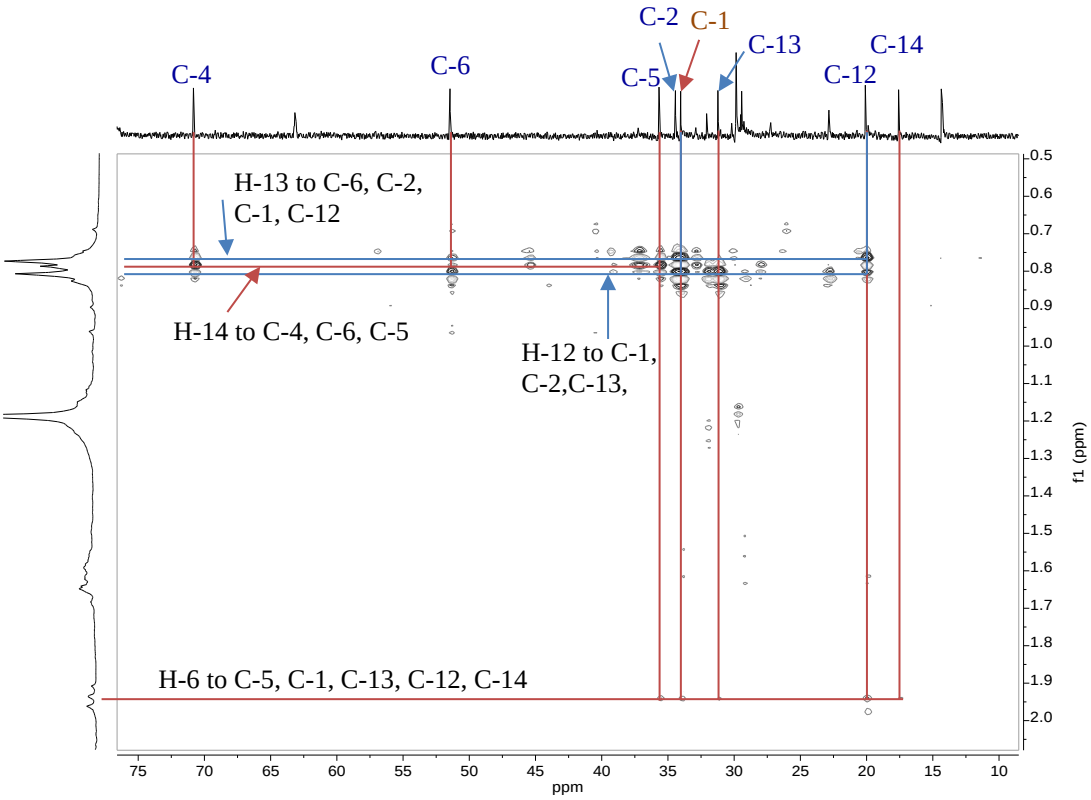


Fig. S20. Extended HMBC ($CDCl_3$) spectrum of compound **2**

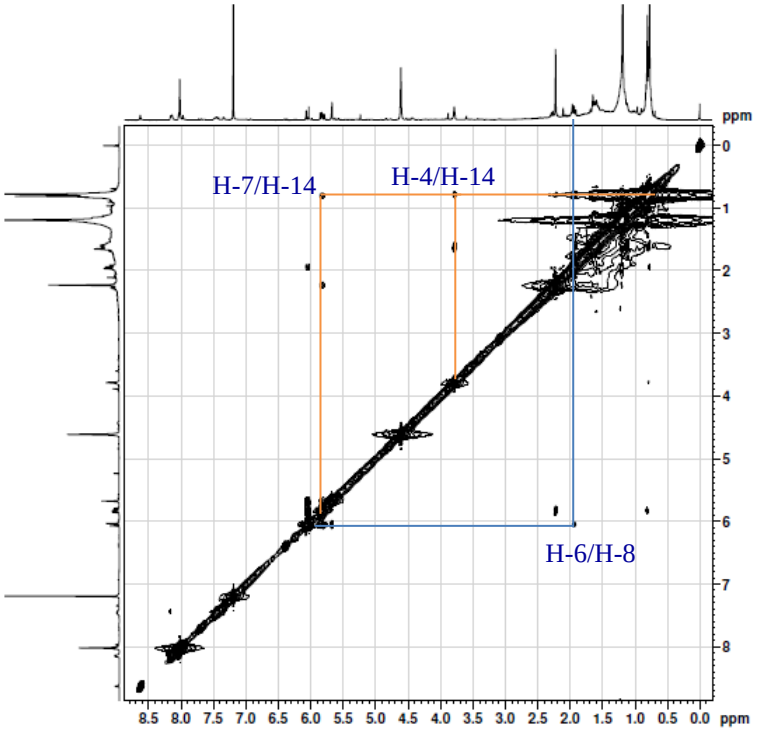


Fig. S21. NOESY ($CDCl_3$) spectrum of compound **2**

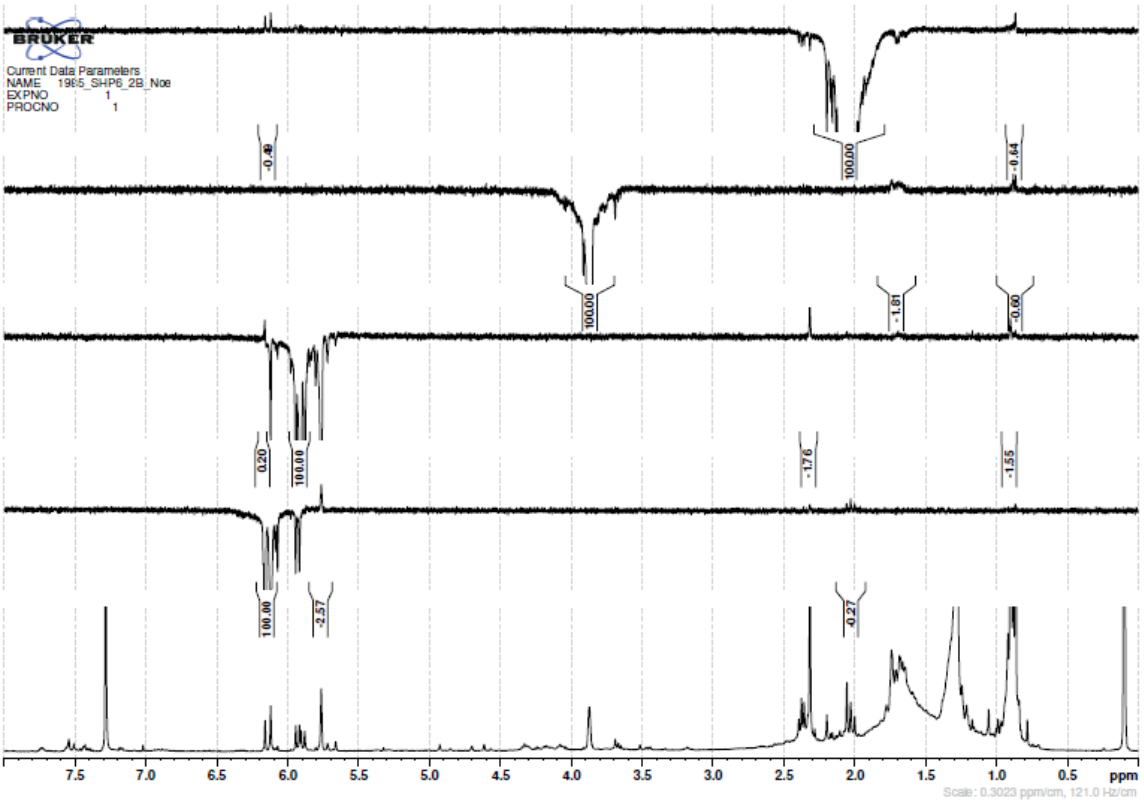
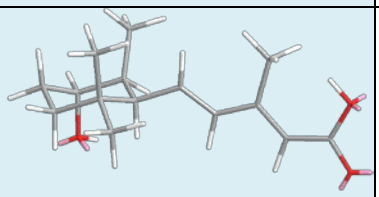
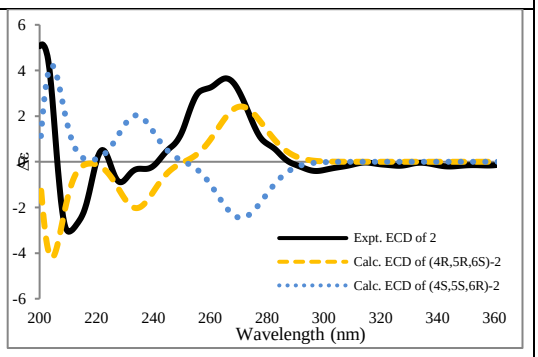
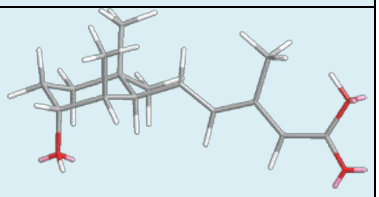
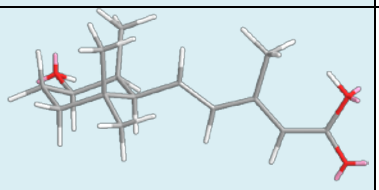
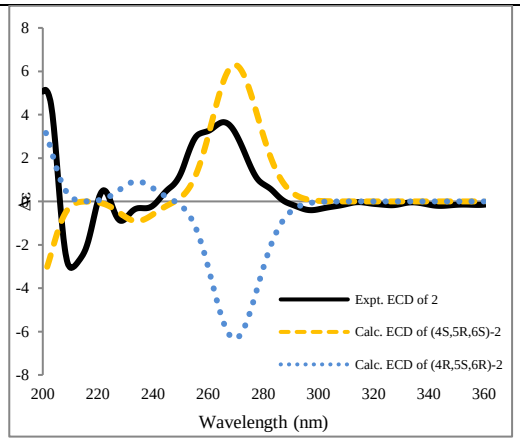
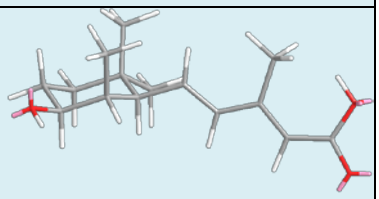
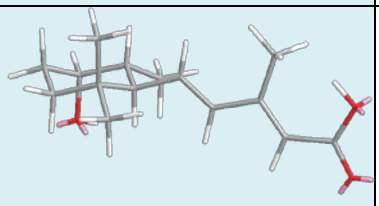
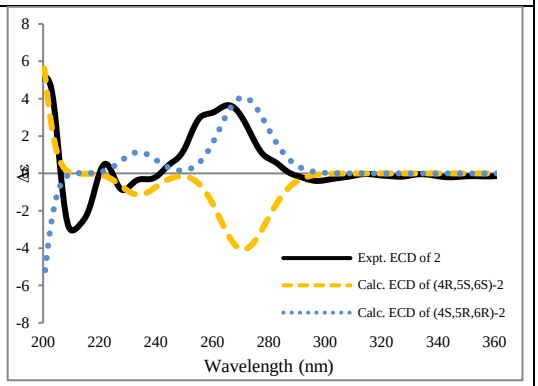
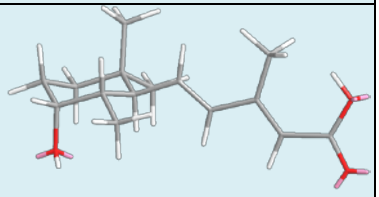
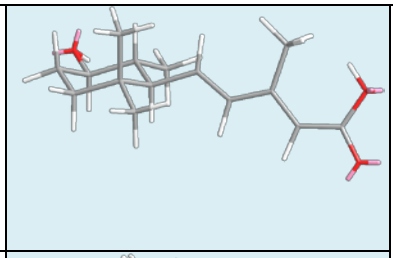
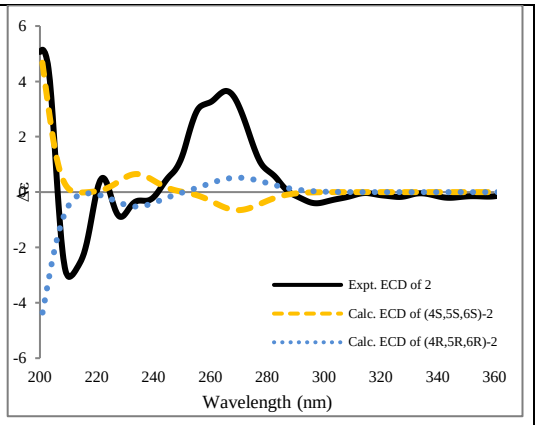
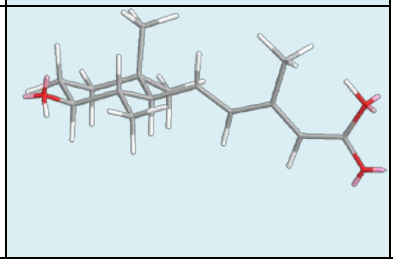


Fig. S22. NOE ($CDCl_3$) spectrum of compound **2**

Table S2. Experimental and calculated ECD spectra of **2**

entry	compound	structure	ECD spectra
1	(4*S*,5*S*,6*R*)-**2**		
	(4*R*,5*R*,6*S*)-**2**		
2	(4*R*,5*S*,6*R*)-**2**		
	(4*S*,5*R*,6*S*)-**2**		
3	(4*S*,5*R*,6*R*)-**2**		
	(4*R*,5*S*,6*S*)-**2**		

<table>
<tr><td rowspan="2">4</td><td>(4R,5R,6R)-2</td><td>  </td><td rowspan="2"> 
</td></tr>
<tr><td>(4S,5S,6S)-2</td><td>  </td></tr>
</table>

สัญญาเลขที่ MRG6180081

โครงการ: องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากดอกฝ้ายน้ำและเห็ด *Sanghuangporus* sp.1

รายงานสรุปการเงินในรอบ 6 เดือน

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน นางสาวเอื้ออาทร ราชจันทร์

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ **2-พ.ย.-62** **ถึงวันที่** **2-พ.ค.-63**

รายจ่าย

หมวด (ตามสัญญา)	รายจ่ายสะสมจากรายงานครั้งก่อน	ค่าใช้จ่ายงวดปัจจุบัน	รวมรายจ่ายสะสมจนถึงงวดปัจจุบัน	งบประมาณรวมทั้งโครงการ	คงเหลือ (หรือเกิน)
1. ค่าตอบแทน	234,000.00		234,000.00	312,000.00	78,000.00
2. ค่าจ้าง	0.00		0.00		0.00
3. ค่าวัสดุ	173,454.00	14,546.00	188,000.00	188,000.00	0.00
4. ค่าใช้สอย	40559.00	60,453.00	101,012.00	100,000.00	-1,012.00
5. ค่าครุภัณฑ์	0.00		0.00		0.00
6.	0.00		0.00		0.00
รวม	**448,013.00**	**74,999.00**	**523,012.00**	**600,000.00**	**76,988.00**

จำนวนเงินที่ได้รับและจำนวนเงินคงเหลือ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1	300,000.00 บาท	เมื่อ วันที่	13/06/2561
งวดที่ 2	221,980.00 บาท	เมื่อ วันที่	10/04/2562
ดอกเบี้ย ครั้งที่ 1	68.11 บาท	เมื่อ วันที่	30/06/2561
ดอกเบี้ย ครั้งที่ 2	439.70 บาท	เมื่อ วันที่	31/12/2561
ดอกเบี้ย ครั้งที่ 3	258.96 บาท	เมื่อ วันที่	30/06/2562
ดอกเบี้ย ครั้งที่ 4	272.57 บาท	เมื่อ วันที่	31/12/2562
รวม	**523,019.34** บาท (A)		

ค่าใช้จ่าย

งวดที่ 1	147,661.00 บาท
งวดที่ 2	152,355.00 บาท
งวดที่ 3	147,997.00 บาท
งวดที่ 4	74,999.00 บาท
รวม	**523,012.00** บาท (B)

จำนวนเงินคงเหลือ (A)-(B) **7.34 บาท**

เอื้ออาทร ราชจันทร์ .....

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

เอื้ออาทร ราชจันทร์ .....

ลงนามเจ้าหน้าที่การเงิน

หมายเหตุ

1. ตัวเลขใน cell สีฟ้า (ยอดรวมรายจ่ายสะสมจนถึงงวดปัจจุบันและยอดรวมค่าใช้จ่าย) **ต้องเท่ากัน**

2. ยอดจำนวนเงินคงเหลือ (A-B) ควรเท่ากับหรือใกล้เคียงกับยอดคงเหลือในสำเนาสมุดบัญชี

Phytochemistry Letters 37 (2020) 17–20

Contents lists available at ScienceDirect

Phytochemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/phytol

Cyclofarnesane sesquiterpenoids from the fungus *Sanghuangporus* sp.

Oue-artorn Rajachan[a,*], Aphidech Sangdee[b], Kwanjai Kanokmedhakul[c], Sarawut Tontapha[d], Vittaya Amornkitbamrung[d], Somdej Kanokmedhakul[c]

[a] Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Mahasarakham University, Mahasarakham, 44150, Thailand
[b] Microbiology and Applied Microbiology Research Unit, Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Mahasarakham, 44150, Thailand
[c] Natural Products Research Unit, Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand
[d] Integrated Nanotechnology Research Center, Department of Physics, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

ARTICLE INFO

Keywords:
Sanghuangporus sp.
Hymenochaetaceae
Cyclofarnesane sesquiterpenoids
Antibacterial

ABSTRACT

An antibacterial activity-guided phytochemical investigation of the fungus *Sanghuangporus* sp. resulted in the isolation of two new cyclofarnesane sesquiterpenoids, (4*S*,6*S*)-4-hydroxy-γ-ionylideneacetic acid (**1**) and (4*R*,5*R*,6*S*)-5,14-dihydro-4-hydroxy-γ-ionylideneacetic acid (**2**), together with three known compounds, γ-ionylideneacetic acid (**3**), 1*S*-(2*E*)-5-[(1*R*)-2,2-dimethyl-6-methylidenecyclohexyl]-3-methylpent-2-enoic acid (**4**), and D-mannitol (**5**). Their structures were elucidated using extensive spectroscopic data (IR, 1D and 2D NMR) and mass spectrometry. The absolute configurations of compounds **1** and **2** were identified by NOESY and comparisons of their experimental and calculated electronic circular dichroism spectral data. Compounds **1**, **3**, and **4** were evaluated for antibacterial activity against five bacterial strains (*Staphylococcus aureus* MSSA 2933, *S. aureus* MRSA 20651, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* 25922, and *Shigella dysenteriae* 15110).

1. Introduction

Sanghuangporus, a medicinal mushroom, belongs to the family Hymenochaetaceae which is widely distributed in China, Japan, Korea, and Taiwan (Han et al., 2016; Lin et al., 2017a). *Sanghuangporus* has been traditionally used as food and medicine for many decades (Lin et al., 2017c). Several bioactivity studies of its crude extracts confirmed their medicinal benefits, including improved blood circulation, enhanced immunity, antitumor, anti-inflammatory, and antioxidant effects, enhanced detoxification and hepatoprotection (Chen et al., 2019; Hsieh et al., 2013; Lin et al., 2017b). Two previous phytochemical investigations of *Sanghuangporus* revealed the presence of hispidins and cyclofarnesane sesquiterpenoids (Chepkirui et al., 2018; Der Wu et al., 2019). Additionally, most isolated compounds showed moderate antimicrobacterial activity (Chepkirui et al., 2018). Cyclofarnesane sesquiterpenoids, the major secondary metabolites from *Sanghuangporus*, have also been reported to have significant bioactivities, such as antioxidant (Kikuzaki et al., 2004), antibacterial (Chepkirui et al., 2018; Shirahata et al., 2017), and phytotoxicity in reducing cheatgrass coleoptile elongation (Masi et al., 2014a, 2014b). As part of our continuing research on Thai fungi, we found that an ethanolic extract of *Sanghuangporus* sp. exhibited antibacterial activity against three bacterial strains, including *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* MSSA 2933, and *Vibrio cholerae* [O1] DMST 9700, with MIC values ranging from 2.5 to 10.0 mg/mL (Sangdee et al., 2017). This work further describes the isolation of two new cyclofarnesane sesquiterpenoids and three known compounds from the mycelium of *Sanghuangporus* sp. and reports on their bioactivity.

2. Results and discussion

An EtOH extract of *Sanghuangporus* sp. was investigated for active secondary metabolites with antibacterial activity against *B. cereus* ATCC 11778, *S. aureus* MSSA 2933, and *V. cholerae* [O1] DMST 9700 (Sangdee et al., 2017). The secondary metabolites from the EtOH extract of *Sanghuangporus* sp. were isolated by column chromatography (CC), resulting in five isolated compounds (**1–5**). Their structures were established by using their physical and spectroscopic data (IR, 1D and 2D NMR), along with mass spectrometry (MS). By comparing these data with those of similar compounds previously reported in the literature, three known compounds were identified: γ-ionylideneacetic acid (**3**) (Zheng et al., 2012; Der Wu et al., 2019), 1*S*-(2*E*)-5-[(1*R*)-2,2-dimethyl-6-methylidenecyclohexyl]-3-methylpent-2-enoic acid (**4**) (Chepkirui et al., 2018; Der Wu et al., 2019), and D-mannitol (**5**) (Yim et al., 2014).

* Corresponding author.
E-mail address: oueartorn.r@msu.ac.th (O.-a. Rajachan).

https://doi.org/10.1016/j.phytol.2020.03.007
Received 24 November 2019; Received in revised form 19 March 2020; Accepted 23 March 2020
1874-3900/ © 2020 Phytochemical Society of Europe. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

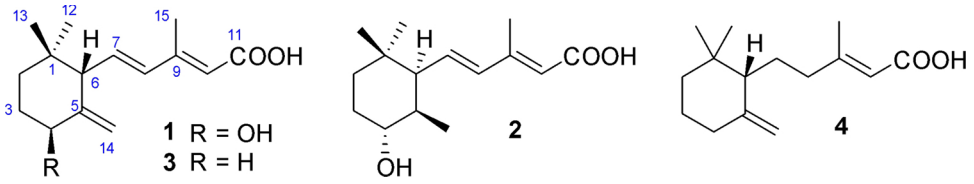


Fig. 1. Structures of the isolated compounds (**1**–**4**).

Table 1
^{1}H and ^{13}C NMR spectral data of compounds **1** and **2** measured in $CDCl_3$.

No	1		2	
	δ_H (*J* in Hz)	δ_C	δ_H (*J* in Hz)	δ_C
1		35.5		34.0
2	1.69, m 1.42, ddd (11.6, 4.8, 2.0)	34.5	1.69, m 1.25, m	34.4
3	1.84, dd (11.6, 4.8) 1.67, m	30.6	1.72, m	29.4
4	4.31, t (4.8)	71.7	3.85, q (2.8)	70.8
5		150.9	1.66, m	35.7
6	2.95, d (8.8)	54.8	2.00, br d (10.4)	51.4
7	6.25, dd (15.6, 8.8)	136.3	5.89, dd (15.6, 10.4)	139.3
8	6.17, d (15.6)	135.9	6.12, d (15.6)	135.9
9		154.6		154.9
10	5.75, s	117.6	5.74, s	116.8
11		171.7		171.1
12	0.84, s	23.3	0.88, s	20.1
13	0.93, s	29.1	0.84, s	31.0
14	5.03, s	110.1	0.85, d (6.8)	17.6
14'	4.71, s			
15	2.31, s	14.2	2.29, s	14.4

Their structures are shown in Fig. 1.

Compound **1** was obtained as a colorless oil. Its molecular formula, $C_{15}H_{22}O_3$, determined from the ^{13}C NMR and HRESITOFMS (observed *m/z* 249.1482 $[M–H]^-$) data, indicated five degrees of unsaturation. The UV spectrum showed an absorption maximum of an extended *α,β*-unsaturated carboxylic acid at 265 nm. The IR spectrum displayed broad absorption bands of hydroxyl (3400 cm^{-1}) and conjugated acid carbonyl (1688 cm^{-1}) groups. The ^{13}C NMR and DEPT spectra indicated that its structure contained three methyl, three methylene (one sp^2 methylene), five methine (three sp^2 methine and one oxymethine), one carbonyl, and three quaternary carbons. The ^{1}H NMR spectroscopic data of **1** (Table 1) showed a set of resonance signals of a cyclohexane ring at *δ* 1.69 (m, H-2), 1.42 (ddd, *J* = 11.6, 4.8, 2.0 Hz, H-2), 1.84 (dd, *J* = 11.6, 4.8 Hz, H-3), 1.67 (m, H-3), 2.95 (d, *J* = 8.8 Hz, H-6) and an oxymethine proton at *δ* 4.31 (t, *J* = 4.8 Hz, H-4). The COSY correlations of H-2/H-3/H-4 supported the connectivity of the ring, and HMBC correlations of H-2 to C-1, C-3, C-4, C-6, and C-13; H-3 to C-1, C-2, C-4, and C-5; H_3-12 (δ_H 0.84) to C-1, C-2, C-6, and C-13; H_3-13 (δ_H 0.93) to C-1, C-2, C-6, and C-12; H_2-14 (δ_H 4.71 and 5.03) to C-4, C-5, and C-6 (Fig. 2) indicated two methyl groups, one oxymethine group and one exomethylene group. The ^{1}H NMR spectroscopic data showed

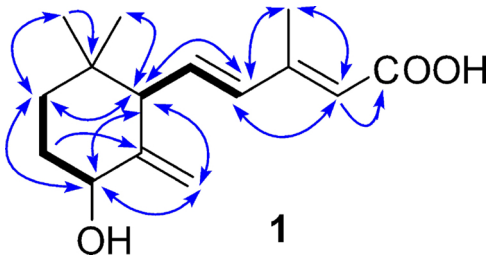


Fig. 2. COSY (bold line) and key HMBC (arrows) correlations of **1**.

resonances of three olefinic methine signals at *δ* 6.25 (dd, *J* = 15.6, 8.8 Hz, H-7), 6.17 (d, *J* = 15.6 Hz, H-8), and 5.75 (s, H-10), as well as one methyl signal at *δ* 2.31 (s, H-15) of the penta-7,9-dienoic acid side chain. This result was confirmed by COSY and HMBC data. The COSY spectrum exhibited a correlation between H-7 and H-8, and the HMBC spectrum showed correlations of H-7 to C-8 and C-9; H-8 to C-7, C-9, C-10, and C-15; H-10 to C-8, C-11, and C-15; and H-15 to C-8, C-9, C-10, and C-11. The COSY correlations between H-6 and H-7, as well as the HMBC correlations of H-2, H-4, H-7, H-8, H-12, H-13, and H-14 to a methine carbon C-6, indicated the connectivity of the two moieties at C-6.

The relative configuration of **1** was characterized through extensive analyses of the coupling constants of cyclohexane protons, NOESY, and NOE correlations. The NOESY spectrum (Fig. 3) showed correlations of H-8 with H-6 and H-10, and H-7 with H_3-15, supporting the 7*E*, 9*E* geometry of the penta-7,9-dienoic acid. A set of correlations between H-6 with H_{ax}-2 and H-8 revealed axial orientations of both H_{ax}-2 and H-6, and the correlations of H_3-13 with H_{ax}-2 and H-6 indicated the coplanarity of these protons. The equatorial orientation of H-4 was established from the coupling constant of H-4 (*J* = 4.8 Hz) with H_{ax}-3 and H_{eq}-3 and the NOESY correlations of H_{ax}-3 with H_3-12, H_{ax}-3 with H_{eq}-2, H-4 with H-14, and H-14' with H_3-12. The NOE correlations also confirmed the anti-relation of H-4 and H-6 by showing no enhancement of H-4 (irradiation of H-6).

The absolute configuration of **1** was further assigned by the comparison of its experimental and calculated electronic circular dichroism (ECD) spectra. The ECD calculations were performed for four possible stereoisomers using Gaussian 09 software (Frisch et al., 2010) and optimized by the B3LYP/6-31 G(d) method (Parr and Yang, 1989). Their ECD spectra were calculated using the time-dependent density functional theory (TD-DFT) method with the CAM-B3LYP functional (Yanai et al., 2004) and 6–311 + + G(d,p) basis set. The polarizable continuum model (PCM) solvation model using MeOH was included in the calculations (Cossi et al., 2003). All calculated ECD spectra are shown in the supplementary data (Table S1). The calculated ECD spectrum of (4*S*,6*S*)-**1** showed a Cotton effect at λ_{max} 271 nm (Δε -7.2) in agreement with the experimental ECD spectrum of **1** (Fig. 4). Therefore, compound **1** was elucidated as a new cyclofarnesane sesquiterpenoid with 4*S*, 6*S* configuration and was named (4*S*,6*S*)-4-hydroxy-γ-ionylideneacetic acid.

Compound **2** was isolated as a colorless oil. Its molecular formula was assigned as $C_{15}H_{24}O_3$ based on the ^{13}C NMR and HRESITOFMS (observed *m/z* 251.1633 $[M–H]^-$) data, indicating four degrees of unsaturation. The UV and IR spectra were similar to those of compound **1**. The ^{1}H and ^{13}C NMR spectroscopic data (Table 1) of **2** were also similar to those of **1**, except that the exomethylene group of **1** was replaced by a methyl group of C-14 [$\delta_{H/C}$ 0.85 (d, *J* = 6.8 Hz)/17.6] in **2**. This result was confirmed by the COSY correlations of H-4/H-5 and H-6/H-5/H_3-14, as well as the HMBC correlations of H-6 to C-1, C-5, C-7, C-8, C-12, and C-13; H-5 to C-1 and C-3; and H_3-14 to C-4, C-5, and C-6.

The relative configuration of **2** was established on the basis of the coupling constant of cyclohexane protons, NOESY, and NOE correlations. The penta-7*E*,9*E*-dienoic acid side chain was determined to be the same as in **1**. The NOESY correlation between H-6 and H_3-12 revealed *α*-axial and *α*-equatorial orientations of H-6 and H_3-12, respectively. An equatorial orientation of H-4 (δ_H 3.85, q, *J* = 2.8 Hz) was determined from the small coupling constants of H-4 with H-3 and H-5. The NOESY correlations of H_3-14 with H-4 and H-7 confirmed the *β*-equatorial and

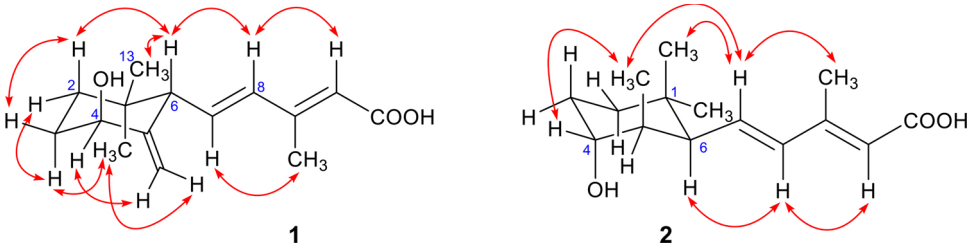


Fig. 3. Key NOESY correlations of **1** and **2**.

β-axial orientations of H-4 and H_3-14, respectively (Fig. 3). Moreover, the high field methyl protons of H-14 (δ_H 0.85) also supported its orientation (Masi et al., 2014b, 2014a). As in compound **1**, the NOE correlation between H-4 and H-6 was not observed. Finally, the absolute configuration of **2** was assigned by the comparison of its experimental and calculated ECD spectra (eight possible stereoisomers for three chiral carbons at C-4, C-5, and C-6) (Table S2). The calculated ECD spectrum of (4*R*,5*R*,6*S*)-**2** exhibited Cotton effects at λ_{max} 271 nm (Δε +2.4), 234 nm (Δε -2.0), 217 nm (Δε -0.1) and 204 nm (Δε -4.2), consistent with the experimental ECD spectrum of **2** (Fig. 4). Thus, the absolute configuration of **2** was identified as 4*R*, 5*R*, 6*S*, and **2** was named (4*R*,5*R*,6*S*)-5,14-dihydro-4-hydroxy-γ-ionylideneacetic acid.

Compounds **1**, **3** and **4** were evaluated for their antibacterial activities against five bacterial strains: *Staphylococcus aureus* MSSA 2933, *S. aureus* MRSA 20651, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* 25922, and *Shigella dysenteriae* 15110. All tested compounds were inactive in these antibacterial evaluations (MIC > 128 μg/mL). Compound **3** has been previously reported to have moderate antibacterial activities against *Bacillus subtilis* DSM 10, *Micrococcus luteus* DSM 1790, *Candida tenuis* MUCL 29982, *Mucor plumbeus* MUCL 49355 and *Porphyromonas gingivalis* (Chepkirui et al., 2018; Shirahata et al., 2017). However, compound **3** has been reported to exhibit no cytotoxicity against three cancer cell lines (NCI-H187, MCF-7, and KB), and **3** also exhibited no antimalarial activity against *Plasmodium falciparum* K1 (Isaka et al., 2015). Compound **4** has also been reported to possess weak antimicrobial activity against *M. plumbeus* MUCL 49355 (Chepkirui et al., 2018).

3. Experimental

3.1. General experimental procedures

Optical rotations were recorded on a JASCO P-1020 polarimeter (JASCO, Inc., MD, USA). ECD and UV spectra were determined on a JASCO J-810 spectropolarimeter (JASCO, Inc., Japan). IR spectra were obtained using a Bruker Tensor 27 spectrophotometer (Agilent Technologies, USA). NMR spectra were recorded using the Varian Mercury Plus 400 MHz (Varian, Inc., USA) and Bruker Avance 400 MHz (Bruker Daltonics, Inc., MA, USA) spectrometers; the internal standards $CDCl_3$ and CD_3OD were referenced from the residues of those solvents. HRESITOFMS spectra were recorded on a Micromass Q-TOF-2 mass spectrometer (Micromass, Manchester, UK). Column chromatography was applied via silica gel (40–63 μm; SiliCycle, Inc., Canada) and Sephadex LH-20 (40–70 μm; GE Healthcare, Uppsala, Sweden). TLC was performed with precoated Merck silica gel 60 PF_{254} aluminum sheets (Merck, Darmstadt, Germany).

3.2. Fungal materials

The fungus was isolated from a wild mushroom fruiting body which was collected from the deciduous dipterocarp forest of Mukdahan province, Thailand, in 2016. The specimen was deposited in the Natural Medicinal Mushroom Museum of Mahasarakham University, Thailand, with the specimen code of J. Naksuwankul 720 (MSUT). The fungus was identified using ITS sequence analysis and was assigned as *Sanghuangporus* isolate sp.1 (GenBank accession number MT041771). This fungus was cultured on potato dextrose broth (PDB) and incubated at 25 – 28 °C for 20 days. The mycelium was collected and then dried at 50 °C for 2–3 days as described in a previous paper (Sangdee et al., 2017).

3.3. Extraction and isolation

Dried mycelium of *Sanghuangporus* sp. (50 g) was ground and extracted successively with ethanol (200 mL × 3) to produce the crude ethanol extract (7 g). The crude ethanol extract was separated by silica gel column chromatography (CC) (6 × 12 cm) and then eluted with a gradient system of *n*-hexane-EtOAc and EtOAc-MeOH to yield six

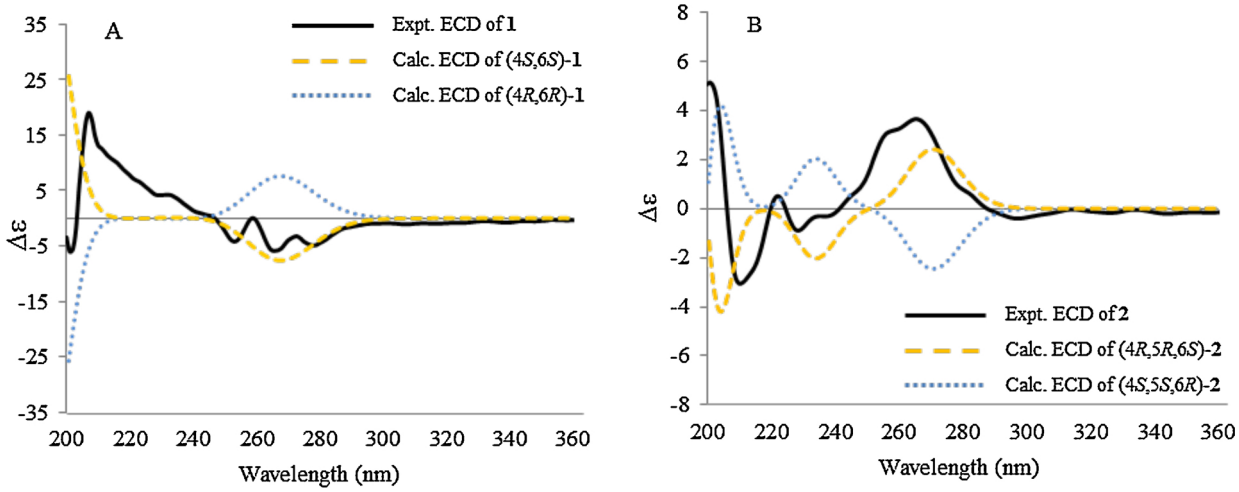


Fig. 4. Experimental and calculated ECD spectra of **1** (A) and **2** (B) measured in MeOH.

fractions, S1-S6. Fraction S2 (330 mg) was separated by silica gel CC (3 × 15 cm) and eluted by an isocratic system of acetone:*n*-hexane (5:95) to yield three subfractions, S2.1-S2.3. Subfraction S2.1 was separated by Sephadex LH-20 CC and eluted with MeOH to yield **4** as a colorless oil (15 mg). Subfraction S2.2 (87 mg) was further isolated by silica gel CC (2 × 20 cm) using an isocratic system of CH_2Cl_2:*n*-hexane:MeOH (90:10:1) as eluent to yield **3** as a colorless oil (16 mg). Fraction S4 (76 mg) was subjected to silica gel CC (2 × 20 cm) and eluted with an isocratic system of acetone:*n*-hexane (15:85) to produce three subfractions, S4.1-S4.3. Subfraction S4.2 (28 mg) was applied to silica gel CC (2 × 20 cm) and eluted with an isocratic system of CH_2Cl_2:*n*-hexane:MeOH (90:10:2) to afford **1** (2 mg) and **2** (1.8 mg) as colorless oils. Subfraction S4.3 (20 mg) was further purified by silica gel CC (2 × 20 cm), using an isocratic system of CH_2Cl_2:*n*-hexane:MeOH (90:10:1) as eluent, to provide an additional amount of **1** (3 mg). Recrystallization of the solid in fraction S5 (214 mg) with CH_2Cl_2:MeOH yielded pale yellow solid **5** (70 mg).

(4*S*,6*S*)-4-hydroxy-γ-ionylideneacetic acid (**1**): colorless oil; $[\alpha]^{22}_{D}$ -38.6 (*c* 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 265 (4.22) nm; ECD (*c* 80.0 μM, MeOH) λ_{max} ($\Delta\varepsilon$) 208 (17.83), 267 (-5.78); IR (Neat) ν_{max} 3100, 2957, 2872, 1688, 1651, 1610, 1453, 1251 cm^{-1}; for ^{1}H and ^{13}C NMR spectroscopic data ($CDCl_3$, 400 MHz), see Table 1; HRESITOFMS *m/z* 249.1482 $[M-H]^-$ (calcd for $C_{15}H_{21}O_3$, 249.1491).

(4*R*,5*R*,6*S*)-5,14-dihydro-4-hydroxy-γ-ionylideneacetic acid (**2**): colorless oil; $[\alpha]^{22}_{D}$ -45.0 (*c* 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 266 (4.44) nm; ECD (*c* 79.2 μM, MeOH) λ_{max} ($\Delta\varepsilon$) 212 (-2.91), 222 (0.51), 227 (-0.75), 266 (3.65); IR (Neat) ν_{max} 3175, 2958, 2858, 1720, 1691, 1612, 1455, 1245 cm^{-1}; for ^{1}H and ^{13}C NMR spectroscopic data ($CDCl_3$, 400 MHz), see Table 1; HRESITOFMS *m/z* 251.1633 $[M-H]^-$ (calcd for $C_{15}H_{23}O_3$ 251.1647).

3.4. Antibacterial assay

Antibacterial assay was performed on five reference strains of bacteria (*Staphylococcus aureus* MSSA 2933, *S. aureus* MRSA 20651, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* 25922, and *Shigella dysenteriae* 15110) using the agar well diffusion method described by Sangdee et al. (2017).

4. Conclusion

Two new cyclofarnesane sesquiterpenoids, (4*S*,6*S*)-4-hydroxy-γ-ionylideneacetic acid (**1**) and (4*R*,5*R*,6*S*)-5,14-dihydro-4-hydroxy-γ-ionylideneacetic acid (**2**), together with three known compounds were isolated from *Sanghuangporus* sp. The absolute configurations of **1** and **2** were elucidated by NMR data and by comparing experimental and calculated ECD spectral data. Compounds **1**, **3**, and **4** were tested for antibacterial activity against those five bacterial strains; however, all the tested compounds were inactive.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We acknowledge the financial support of the Thailand Research Fund (grant number MRG6180081). We thank the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC) and Natural Products Research Unit, Khon Kaen University for partial support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:https://doi.org/10.1016/j.phytol.2020.03.007.

References

Chen, W., Tan, H., Liu, Q., Zheng, X., Zhang, H., Liu, Y., Xu, L., 2019. A review: the bioactivities and pharmacological applications of *Phellinus linteus*. Molecules. https://doi.org/10.3390/molecules24101888.

Chepkirui, C., Cheng, T., Matasyoh, J., Decock, C., Stadler, M., 2018. An unprecedented spiro [furan-2,1'-indene]-3-one derivative and other nematicidal and antimicrobial metabolites from *Sanghuangporus* sp. (Hymenochaetaceae, Basidiomycota) collected in Kenya. Phytochem. Lett. 25, 141–146.

Cossi, M., Rega, N., Scalmani, G., Barone, V., 2003. Energies, structures, and electronic properties of molecules in solution with the C-PCM solvation model. J. Comput. Chem. 24, 669–681.

Der Wu, M., Cheng, M.J., Chen, Y.L., Chan, H.Y., Hsieh, S.Y., Chen, I.C., Wu, P.H., Wu, S.H., 2019. Secondary metabolites from the fermented whole broth of fungal strain *Sanghuangporus sanghuang*. Chem. Nat. Compd. 55, 36–40.

Frisch, M.J., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G.E., Robb, M.A., Cheeseman, J.R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G.A., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X., Hratchian, H.P., Izmaylov, A.F., Bloino, J., Zheng, G., Sonnenberg, J.L., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Montgomery Jr., J.A., Peralta, J.E., Ogliaro, F., Bearpark, M., Heyd, J.J., Brothers, E., Kudin, K.N., Staroverov, V.N., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A., Burant, J.C., Iyengar, S.S., Tomasi, J., Cossi, M., Rega, N., Millam, J.M., Klene, M., Knox, J.E., Cross, J.B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R.E., Yazyev, O., Austin, A.J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J.W., Martin, R.L., Morokuma, K., Zakrzewski, V.G., Voth, G.A., Salvador, P., Dannenberg, J.J., Dapprich, S., Daniels, A.D., Farkas, Ö., Foresman, J.B., Ortiz, J.V., Cioslowski, J., Fox, D.J., 2010. Gaussian09, Revision B. 01 Gaussian Inc, Wallingford CT.

Han, J.G., Hyun, M.W., Kim, C.S., Jo, J.W., Cho, J.H., Lee, K.H., Kong, W.S., Han, S.K., Oh, J., Sung, G.H., 2016. Species identity of *Phellinus linteus* (sanghuang) extensively used as a medicinal mushroom in Korea. J. Microbiol. 54, 290–295.

Hsieh, P.W., Wu, J.Bin, Wu, Y.C., 2013. Chemistry and biology of *Phellinus linteus*. BioMedicine 3, 106–113.

Isaka, M., Yangchum, A., Supothina, S., Boonpratuang, T., Choeyklin, R., Kongsaeree, P., Prabpai, S., 2015. Aromadendrane and cyclofarnesane sesquiterpenoids from cultures of the basidiomycete *Inonotus* sp. BCC 23706. Phytochemistry 118, 94–101.

Kikuzaki, H., Kayano, S.I., Fukutsuka, N., Aoki, A., Kasamatsu, K., Yamasaki, Y., Mitani, T., Nakatani, N., 2004. Abscisic acid related compounds and lignans in Prunes (*Prunus domestica* L.) and their oxygen radical absorbance capacity (ORAC). J. Agric. Food Chem. 52, 344–349.

Lin, W.C., Deng, J.S., Huang, S.S., Lin, W.R., Wu, S.H., Lin, H.Y., Huang, G.J., 2017a. Anti-inflammatory activity of *Sanghuangporus sanghuang* by suppressing the TLR4-mediated PI3K/AKT/mTOR/IKKβ signaling pathway. RSC Adv. 7, 21234–21251.

Lin, W.C., Deng, J.S., Huang, S.S., Wu, S.H., Chen, C.C., Lin, W.R., Lin, H.Y., Huang, G.J., 2017b. Anti-inflammatory activity of *Sanghuangporus sanghuang* mycelium. Int. J. Mol. Sci. 18, 347. https://doi.org/10.3390/ijms18020347.

Lin, W.C., Deng, J.S., Huang, S.S., Wu, S.H., Lin, H.Y., Huang, G.J., 2017c. Evaluation of antioxidant, anti-inflammatory and anti-proliferative activities of ethanol extracts from different varieties of Sanghuang species. RSC Adv. 7, 7780–7788.

Masi, M., Meyer, S., Cimmino, A., Andolfi, A., Evidente, A., 2014a. Pyrenophoric acid, a phytotoxic sesquiterpenoid penta-2,4-dienoic acid produced by a potential mycoherbicide, *Pyrenophora semeniperda*. J. Nat. Prod. 77, 925–930.

Masi, M., Meyer, S., Cimmino, A., Clement, S., Black, B., Evidente, A., 2014b. Pyrenophoric acids B and C, two new phytotoxic sesquiterpenoids produced by *Pyrenophora semeniperda*. J. Agric. Food Chem. 62, 10304–10311.

Parr, R.G., Yang, W., 1989. Density-functional Theory of Atoms and Molecules. Oxford University Press Inc, New York.

Sangdee, K., Buranrat, B., Naksuwankul, K., Jaihan, P., Sangdee, A., 2017. Antibacterial and anti-breast cancer cell line activities of *Sanghuangporus* sp.1 extracts. Trop. J. Pharm. Res. 16, 613–620.

Shirahata, T., Ino, C., Mizuno, F., Asada, Y., Hirotani, M., Petersson, G.A., Omura, S., Yoshikawa, T., Kobayashi, Y., 2017. γ-Ionylidene-type sesquiterpenoids possessing antimicrobial activity against *Porphyromonas gingivalis* from *Phellinus linteus* and their absolute structure determination. J. Antibiot. (Tokyo) 70, 695–698.

Yanai, T., Tew, D.P., Handy, N.C., 2004. A new hybrid exchange-correlation functional using the Coulomb-attenuating method (CAM-B3LYP). Chem. Phys. Lett. 393, 51–57.

Yim, T., Kanokmedhakul, K., Kanokmedhakul, S., Sanmanoch, W., Boonlue, S., 2014. A new meroterpenoid tatenoic acid from the fungus *Neosartorya tatenoi* KKU-2NK23. Nat. Prod. Res. 28, 1847–1852.

Zheng, Y.B., Lu, C.H., Shen, Y.M., 2012. New abscisic acid-related metabolites from *Phellinus vaninii*. J. Asian Nat. Prod. Res. 14, 613–617.