



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การสกัดแยกและพิสูจน์ทราบสารต้นแบบที่มีฤทธิ์ทางยาสำหรับ การรักษามะเร็งจากราที่ได้จากพืชป่าชายเลนไทย

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนิษฐา พุดหอม

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เดือนกรกฎาคม 2558

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การสกัดแยกและพิสูจน์ทราบสารต้นแบบที่มีฤทธิ์ทางยาสำหรับ การรักษามะเร็งจากราที่ได้จากพืชป่าชายเลนไทย

ผศ. ดร.ชนิษฐา พุดหอม

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัยสกว. และจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นอย่างสูงที่ให้เงินสนับสนุนโครงการวิจัยนี้จนงานสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี อีกทั้งขอขอบคุณ Professor Kiminori Matsubara, Hiroshima University ประเทศญี่ปุ่นที่ให้ความอนุเคราะห์ในด้านการทดสอบฤทธิ์ด้านการสร้างหลอดเลือดใหม่และคำแนะนำต่าง ๆ ในการวิเคราะห์ผลการทดลองในส่วนนี้ ขอขอบคุณ นางสาวสุพิชชา โชคไพบุลย์และนางสาวสุจิตรา หาญทะนง หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ช่วยในส่วนการเพาะเลี้ยงและคัดกรองเชื้อรา

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ความอนุเคราะห์ทั้งด้านสถานที่ เครื่องมือการทำวิจัย และการอำนวยความสะดวกต่าง ๆ ในการทำงานวิจัยนี้ จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ผศ.ดร.ชนิษฐา พุดหอม
ผู้วิจัย

บทคัดย่อ

อัตราการเกิดโรคมะเร็งทั่วโลกได้เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเนื่องจากจำนวนประชากรสูงอายุที่เพิ่มขึ้นและการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการใช้ชีวิตในโลกที่กำลังพัฒนาขึ้นอย่างต่อเนื่องจนทำให้มะเร็งเป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิตของประชากรในศตวรรษที่ 21 นี้ ซึ่งมีผู้เสียชีวิตมากกว่า 7 ล้านคนต่อปี ด้วยเหตุนี้จึงทำให้การทำวิจัยในแง่การค้นหายารักษามะเร็งเพิ่มขึ้นอย่างทวีคูณ ในการศึกษานี้ได้ทำการแยกสารเซคันดารีเมทาบอลไลต์จากราที่ไดจากพืชป่าชายเลนที่เลือกได้จำนวน 5 สายพันธุ์ จากนั้นพิสูจน์ทราบโครงสร้างและนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเพื่อให้ได้สารต้นแบบสำหรับการรักษามะเร็งต่อไป การแยกสารจากราสายพันธุ์แรกซึ่งเป็นรา *Alternaria* sp. (HK-5) ทำให้ได้สารเมทาบอลไลต์ที่มีการรายงานมาก่อน 9 ชนิด (1-9) เป็นสารกลุ่มแอโรมาติก 6 ชนิดและสารกลุ่ม anthranoid 3 ชนิด สำหรับราสายพันธุ์ที่สองเป็นรา *Rhytidhysterion* sp. จากการศึกษาพบว่าการผลิตเมทาบอลไลต์ของราชชนิดนี้ขึ้นกับสภาวะของการเพาะเลี้ยง เนื่องจากเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร MEB ทำให้ได้สารกลุ่ม spirobisanaphthalene 8 ชนิดซึ่งเป็นสารใหม่ 3 ชนิดคือ rhytidone A-C (10-12) และอนุพันธ์ที่มีการรายงานมาก่อนอีก 5 ชนิด ขณะที่เมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนข้าว สามารถแยกได้สารกลุ่ม spirobisanaphthalene เพิ่มอีก 7 ชนิด (18-24) โดยมีสารที่ซ้ำกับเมื่อเพาะเลี้ยงใน MEB เพียงชนิดเดียวเท่านั้นคือสาร 14 สำหรับสารที่แยกได้เพิ่มพบว่าเป็นสารใหม่ 6 ชนิดคือ rhytidenone A-F (18-23) และอนุพันธ์ที่มีการรายงานมาก่อน 1 ชนิด นอกจากนี้การศึกษารูปแบบทางเคมีของราสายพันธุ์ที่สาม 8D ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร SDB ทำให้สามารถแยกและพิสูจน์ทราบโครงสร้างของสารประเภท sesquiterpene กลุ่ม chamigrane ได้ 10 ชนิด ได้แก่ merulinol A-J (25-34) สำหรับราสายพันธุ์ที่ 4 ซึ่งเป็นรา *Rhytidhysterion rufulum* (KP1) ให้สารกลุ่ม highly oxygenated chromone ชนิดใหม่ 3 ชนิดคือ rhytidchromone A-E (35-39) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร SDB ขณะที่ราสายพันธุ์ที่ 5 KP2 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร YEB ให้สารกลุ่ม isocoumarin ชนิดใหม่ 3 ชนิด (40-42) จากนั้นได้นำสารที่แยกได้ทั้งหมดมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพตามที่กล่าวไว้ข้างต้น ทั้งสามฤทธิ์ พบว่าสาร altersolanol (3) ซึ่งเป็นสารกลุ่ม anthranoid ที่แยกได้จากรา *Alternaria* sp. มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ที่ดีมากทั้งในระดับ in vitro และ in vivo นอกจากนี้ยังพบว่าสารกลุ่ม spirobisanaphthalene ชนิดใหม่ 2 ชนิดจากรา *Rhytidhysterion* sp. คือ rhytidenone C (20) และ D (21) มีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ดีมากโดยให้ค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.31 และ 3.06 μ M ตามลำดับ สำหรับฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง พบว่าไม่มีสารใดที่มีฤทธิ์อยู่ในระดับดีมาก ดังนั้นงานวิจัยสามารถได้สารที่ศักยภาพในการเป็นสารต้นแบบซึ่งอาจนำไปพัฒนาเพื่อใช้สำหรับการรักษามะเร็งได้ 3 ชนิด

Abstract

Global cancer rates have been increasing primarily due to an aging population and lifestyle changes in the developing world. The fact that cancer is the major cause of death in the twenty-first century, killing more than seven million people annually, has led to the exponential increase in research effort in the area of anticancer drug discovery. In the present study, the secondary metabolites from the five selected strains of mangroved-derived fungi were isolated, elucidated, and evaluated for their anti-angiogenetic, anti-inflammatory, and anti-cancer activities to provide cancer therapeutic leads. The chromatographic separation of the first strains, *Alternaria* sp. (HK-5) fungus, led to the isolation of nine known metabolites (**1-9**), including six aromatic and three anthranoid compounds. For the second strains, *Rhytidhysterion* sp. (21B) fungus, it was found that the production of secondary metabolites was highly dependent on the fermentation conditions. When cultured in MEB the fungus yielded eight spirobisanaphthalenes, including three new derivatives, namely rhytidones A-C (**10-12**), and five known derivatives (**13-17**), while grown on solid rice medium seven additional spirobisanaphthalenes (**18-24**) were obtained with only one same compound (**14**). The additional metabolites included six new, namely rhytidenones A-F and one known derivatives. Further, chemical investigation of the third strains 8D cultured in SDB led to the isolation and characterization of ten new chamigrane-type sesquiterpenes, merulinols A-J (**25-34**), whereas the fourth strains, *Rhytidhysterion rufulum* (KP1), gave five new highly oxygenated chromones, namely rhytidchromones A-E (**35-39**), when cultured in SDB. The fifth strains KP2, which was cultured in YEB, yielded three new isocoumarin (**40-42**). When isolated compounds were subjected to the aforementioned three assays, altersolanol (**3**), an anthranoid from *Alternaria* sp., exhibited potent anti-angiogenic activity in both in vitro and in vivo levels. Two new spirobisanaphthalenes, rhytidenones C and D (**20-21**), from *Rhytidhysterion* fungus showed potent anti-inflammatory activity with IC₅₀ values of 0.31 and 3.60 μ M, respectively. No any metabolites showed potent cytotoxicity against tested human cancer cell lines. In conclusion, three therapeutic leads, which might be developed to use for cancer treatment, were obtained from this study.

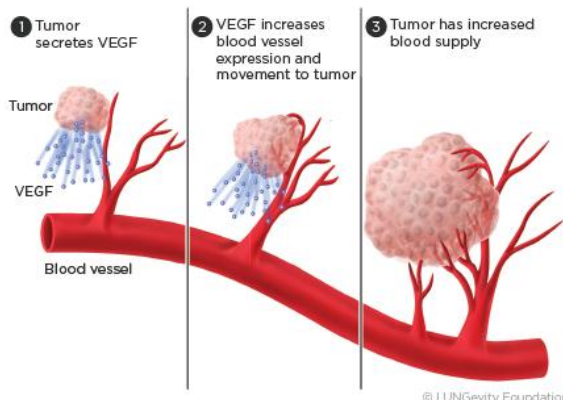
โครงการ: การสกัดแยกและพิสูจน์ทราบสารต้นแบบที่มีฤทธิ์ทางยาสำหรับการรักษามะเร็งจาก ราที่ได้จากพืชป่าชายเลนไทย

บทนำ

มะเร็งซึ่งเป็นหนึ่งในปัญหาสุขภาพที่สำคัญทั่วโลกยังคงเป็นสาเหตุที่ทำให้คนตายอย่างต่อเนื่อง และจำนวนประชากรที่เป็นโรคนี้นี้กำลังเพิ่มขึ้นอย่างน่ากลัว¹ แม้ว่าจะมีการค้นพบและพัฒนาการรักษา มะเร็งจำนวนมากเพื่อใช้ในทางคลินิกในช่วงสิบปีที่ผ่านมาแต่ยาส่วนใหญ่ยังเป็นสารที่มีความเป็นพิษ แบบไม่จำเพาะเจาะจงซึ่งทำให้เกิดผลข้างเคียงอย่างรุนแรงต่อผู้ป่วย นอกจากนี้ยังพบปัญหาการดื้อยา อีกด้วย ดังนั้นการค้นหาและพัฒนาสารเพื่อใช้ในทางเคมีบำบัดอย่างได้ผลยังคงเป็นที่ต้องการสำหรับการรักษามะเร็ง

เมื่อไม่นานมานี้ การรักษามะเร็งด้วยสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ (anti-angiogenic agent) เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจอย่างมากจากนักวิจัยเพราะการเกิดเป็น ก้อนมะเร็งจะขึ้นกับขั้นตอนการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) เป็นหลัก²⁻³ กระบวนการแองจิโอ เจเนซิสเป็นการสร้างหลอดเลือดใหม่จากระบบหลอดเลือดที่มีอยู่เดิมของร่างกายคนซึ่งไม่เพียงจำเป็น ต่อการเจริญเติบโตของมะเร็งแต่ยังจำเป็นสำหรับกระบวนการเมทาสเตซิส (metastasis) ของมะเร็งอีกด้วย โดยหลอดเลือดใหม่ที่สร้างขึ้นนี้จะทำหน้าที่ส่งผ่านออกซิเจนและสารอาหารให้กับก้อนมะเร็งได้อย่าง เพียงพอ และในทางกลับกันก็ทำหน้าที่กำจัดของเสียออกจากก้อนมะเร็งอีกด้วยซึ่งจะทำให้มะเร็งเติบโต ได้อย่างรวดเร็ว (รูปที่ 1)⁴⁻⁵ ดังนั้นการยับยั้งกระบวนการแองจิโอเจเนซิสของมะเร็งจึงเป็นอีกวิธีหนึ่ง ที่น่าสนใจสำหรับแนวทางการป้องกันและรักษามะเร็ง⁶ นอกจากนี้การรักษาโดยเลือกเป้าหมายที่ กระบวนการแองจิโอเจเนซิสยังสามารถใช้ได้กับมะเร็งทุกชนิดเพราะกระบวนการนี้เป็นกระบวนการ พื้นฐานที่สำคัญของมะเร็งทุกชนิด

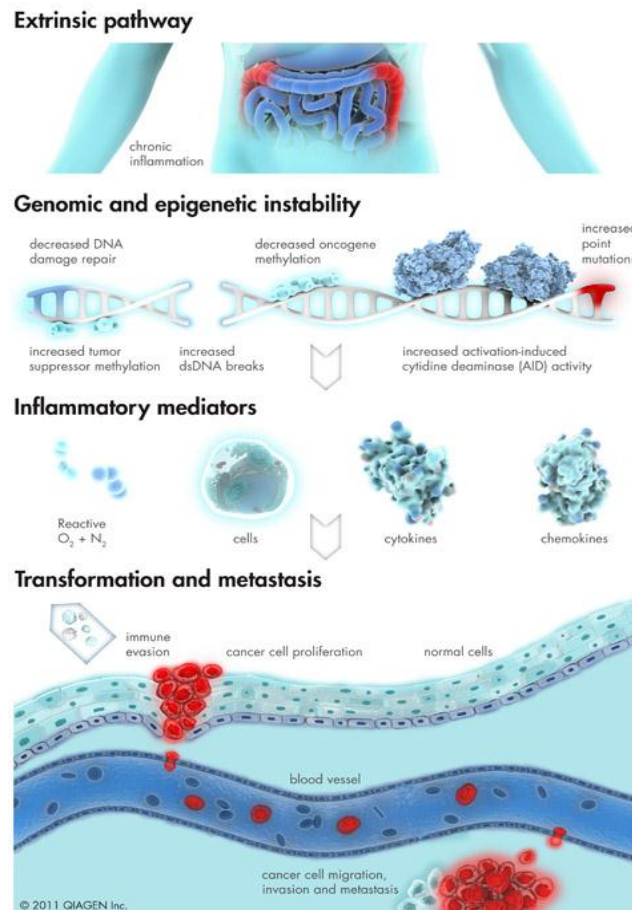
Blood Vessel Overgrowth on Cell



รูปที่ 1 กระบวนการแองจิโอเจเนซิสช่วยเร่งการเจริญเติบโตของมะเร็ง

(<http://www.lungevity.org/about-lung-cancer/lung-cancer-101/treatment-options/angiogenesis-inhibitors>)

นอกจากนั้นปัจจุบันได้เป็นที่ทราบกันอย่างชัดเจนว่าการเจริญเติบโตของเซลล์เพียงอย่างเดียวไม่ได้เป็นสาเหตุที่ทำให้เซลล์กลายเป็นเซลล์มะเร็ง แต่การที่เซลล์ต้องอยู่ภายใต้สภาวะที่เกิดการอักเสบอย่างเรื้อรังจะช่วยส่งเสริมการกลายพันธุ์ของเซลล์⁷ ดังนั้นสารที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบจึงเป็นสารอีกกลุ่มหนึ่งที่มีประโยชน์ในการรักษามะเร็ง



รูปที่ 2 การพัฒนาของเซลล์มะเร็งภายใต้สภาวะอักเสบเรื้อรังของเซลล์ปกติ

(<http://www.sabiosciences.com/pathwaymagazine/minireview/cancerinflammation.php>)

สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติยังคงเป็นแหล่งสำคัญที่สุดของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสำหรับการนำไปพัฒนาเป็นยาชนิดใหม่ๆ ซึ่งเมื่อไม่นานมานี้สิ่งมีชีวิตทางทะเลและพืชป่าชายเลนได้มีบทบาทสำคัญในการค้นหาต่างๆ เนื่องจากความผันแปรทางชีวภาพที่สูงของพวกมัน⁸ จนถึงปัจจุบันได้มีการค้นพบสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากแหล่งทางทะเลมากกว่า 22,000 ชนิดและชนิดของสารที่ได้ก็มีความหลากหลายซึ่งมีทั้งสารกลุ่มเทอร์ปีน อัลคาลอยด์ โพลีคีโตนด์ กลัยโคไซด์ ไฮโดรคาร์บอน และอื่นๆ และประมาณ 20% ของสารเหล่านี้มีฤทธิ์ยับยั้งมะเร็ง ไวรัส ต้านการอักเสบ และฤทธิ์อื่นๆ ตัวอย่างที่โดดเด่น คือ ecteinascidin 743 เป็นอัลคาลอยด์ที่ได้จากเพรียงหัวหอมซึ่งปัจจุบันได้ใช้สำหรับการรักษา

มะเร็งชนิด advanced soft tissue sarcoma ในประเทศแถบยุโรป⁹⁻¹⁰ สำหรับแหล่งผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเลอีกแหล่งหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจอย่างมากคือราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชป่าชายเลน ซึ่งราเอนโดไฟต์เป็นราที่เจริญอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืชและเป็นที่ทราบกันดีว่าเป็นแหล่งผลิตภัณฑ์สารธรรมชาติที่มีโครงสร้างและฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ และราเหล่านี้ยังอาจผลิตสารชนิดเดียวกันกับที่ต้นไม้ซึ่งมันอิงอาศัยอยู่ได้¹¹⁻¹² เช่น ในกรณีของ taxol¹³ และ camptothecin¹⁴ ซึ่งเป็นยารักษามะเร็งที่ใช้ได้ดีในปัจจุบัน ในบรรดาราเอนโดไฟต์ทั้งหลาย ราที่แยกได้จากพืชป่าชายเลนจะได้รับความสนใจจากนักวิจัยด้านผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมากที่สุดเพราะระบบนิเวศที่มีลักษณะเฉพาะ¹⁵⁻¹⁹ นอกจากนี้ประเทศไทยยังพบว่าเป็นประเทศที่มีพื้นที่ป่าชายเลนใหญ่เป็นอันดับหนึ่งในห้าของโลก จึงทำให้ผู้วิจัยสนใจศึกษาสารเมตาบอไลต์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากราที่แยกได้จากพืชป่าชายเลนไทย

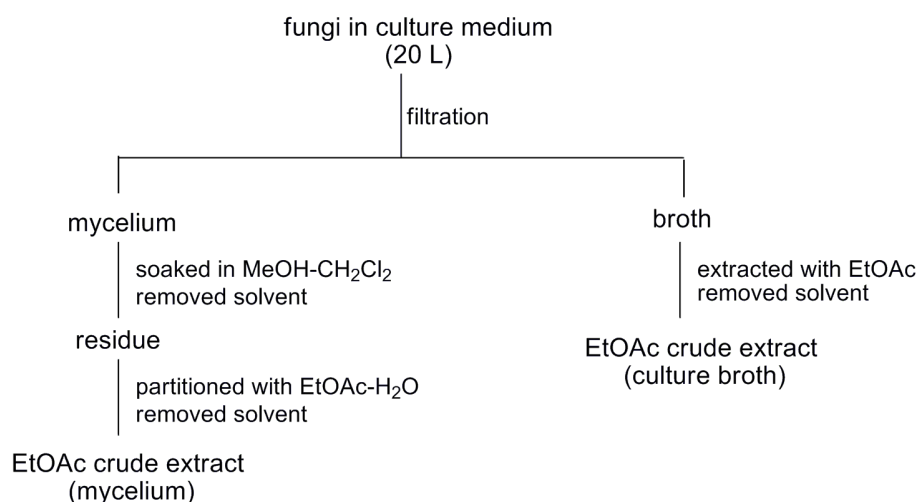
จากงานวิจัยส่วนหนึ่งของผู้วิจัยในการค้นหาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่แยกได้จากแหล่งในไทยที่มีศักยภาพที่จะเป็นสารต้นแบบสำหรับการพัฒนาเป็นยารักษามะเร็ง งานวิจัยนี้จึงได้ทำการแยกสารพิษจากราโครงสร้างของสารเซคันดารีเมตาบอไลต์จากราเอนโดไฟต์ที่ได้จากพืชป่าชายเลนไทย 5 สายพันธุ์ซึ่งคัดกรองด้วยเทคนิค ¹H NMR จากนั้นได้นำสารที่แยกได้ทั้งหมดมาทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT การยับยั้งกระบวนการแอ่งจีโอเจเนซิสซึ่งใช้ทั้งโมเดล ex vivo, in vitro และ in vivo และฤทธิ์ด้านการอักเสบด้วยวิธียับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์มาโครฟาจที่ถูกกระตุ้น และจากนั้นศึกษากลไกการออกฤทธิ์นั้นๆ ของสารที่มีฤทธิ์ดี

วิธีการทดลอง

ส่วนที่ 1: การแยกสารเซคันดารีเมตาบอไลต์จากราเอนโดไฟต์ที่เลือก

1.1. การเตรียมส่วนสกัดเอธิลแอซีเททของราเอนโดไฟต์แต่ละชนิด

เมื่อเพาะเลี้ยงราครบ 21 วัน ทำการกรองแยกเส้นใยรากับอาหารเพาะเลี้ยง จากนั้นนำส่วนอาหารเพาะเลี้ยงมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอธิลแอซีเทท และระเหยตัวทำละลายออก ได้ส่วนสกัดหยาบเอธิลแอซีเทท (EtOAc crude extract) สำหรับส่วนเส้นใยราจะนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายผสมเมทานอลและไดคลอโรมีเทน ระเหยตัวทำละลายออก แล้วนำมาสกัดด้วยเอธิลแอซีเททอีกครั้งหนึ่งจะได้ส่วนสกัดหยาบเอธิลแอซีเททของเส้นใย ขั้นตอนการสกัดได้แสดงไว้ในแผนภาพที่ 1 และตารางที่ 1 แสดงชนิดของรา อาหารที่เพาะเลี้ยง และน้ำหนักของส่วนสกัดหยาบที่ได้



แผนภาพที่ 1 การเตรียมส่วนสกัดหยาบเอธิลแอซีเททของราที่เพาะเลี้ยง

ตารางที่ 1 ราที่เลือก อาหารที่เพาะเลี้ยงและน้ำหนักส่วนสกัดที่ได้

ราสายพันธุ์	อาหารเพาะเลี้ยง (L)	น้ำหนักส่วนสกัดหยาบเอธิลแอซีเทท (g)
HK-5	MEB (20 L)	12.20
21B	MEB (20 L)	7.00
	Solid rice medium (10 L)	2.92
8D	SDB (20 L)	15.00
KP1	SDB (10 L)	4.62
KP2	YEB (10 L)	18.18

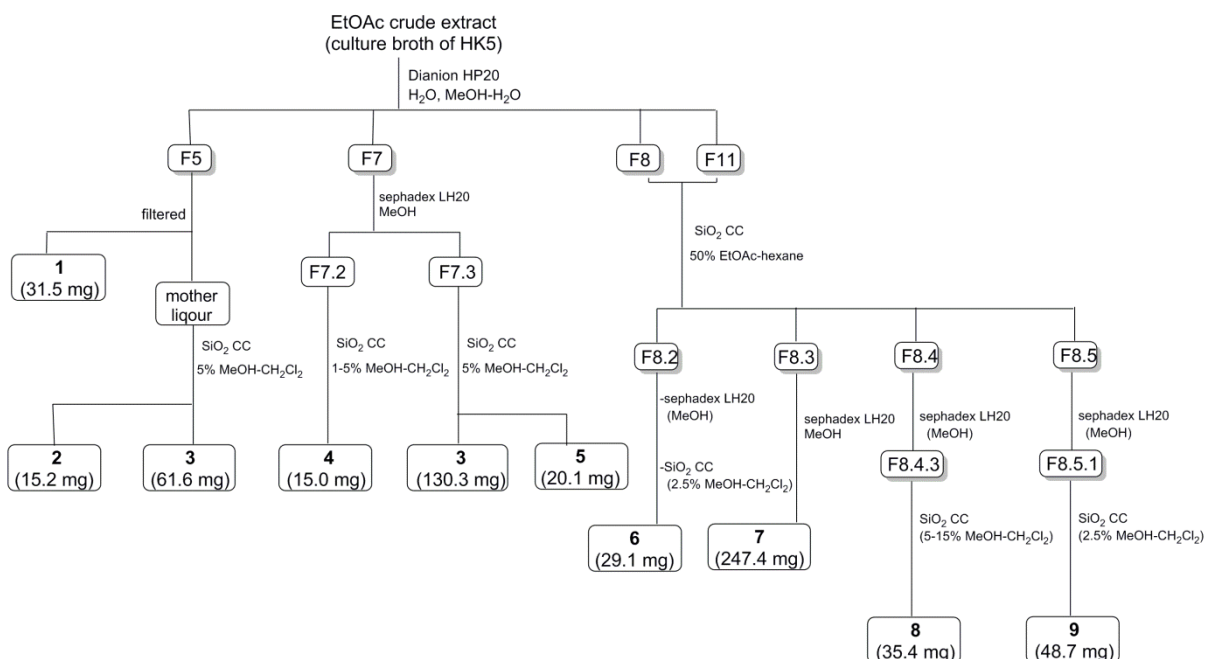
1.2. การแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดหยาบเอธิลแอซีเทท

1.2.1. การแยกบริสุทธิ์จากส่วนสกัดหยาบเอธิลแอซีเททของราสายพันธุ์ HK-5

นำส่วนสกัดหยาบเอธิลแอซีเททของน้ำเพาะเลี้ยงของรา HK5 มาผ่านคอลัมน์ Dianion HP-20 โดยใช้ น้ำและของผสมระหว่างน้ำ-เมทานอลเป็นตัวชะ ได้ 11 ส่วน (F1-F11) พบว่าส่วน F5 มีผลึกตกออกมา เมื่อกรองพบว่าได้สาร 1 (31.5 mg) จากนั้นนำส่วนที่เหลือจากการกรองมาทำคอลัมน์ sephadex LH20 ชะด้วยเมทานอล แล้วนำส่วนที่ F5.1 มาแยกด้วยซิลิกาเจลที่ชะด้วยของผสมเมทานอล-ไดคลอโรมีเทน (1:19) ได้สาร 2 (15.2 mg) และ 3 (61.6 mg)

นำส่วน F7 มาผ่านคอลัมน์ sephadex LH20 โดยใช้เมทานอลเป็นตัวชะ ได้เป็น 5 ส่วน คือ F7.1 ถึง F7.5 จากนั้นนำส่วน F7.2 มาแยกต่อด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์ ชะด้วย 1-5% เมทานอลในไดคลอโรมีเทน ได้สาร **4** (15.0 mg) และเมื่อนำส่วน F7.3 มาแยกต่อด้วยเทคนิคเดียวกันโดยใช้ 5% เมทานอลในไดคลอโรมีเทนเป็นตัวชะ ได้สาร **3** (130.3 mg) และสาร **5** (20.1 mg)

นำส่วน F8 และ F11 มารวมกันเนื่องจากมีองค์ประกอบทางเคมีใกล้เคียงกัน จากนั้นนำมาแยกต่อด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์ซึ่งชะด้วยเอธิลแอซีเทท-เฮกเซน (1:1) จนถึง 100% เอธิลแอซีเทท ได้เป็น 5 ส่วนใหญ่ๆ คือ F8.1 ถึง F8.5 เมื่อนำส่วน F8.2 มาผ่านคอลัมน์ sephadex LH20 ชะด้วยเมทานอลและแยกอีกครั้งด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์ซึ่งชะด้วย 2.5% เมทานอลในไดคลอโรมีเทน ได้สาร **6** (29.1 mg) สำหรับสาร **7** (247.4 mg) ได้จากการนำส่วน F8.3 มาผ่านคอลัมน์ sephadex LH20 ที่ชะด้วยเมทานอล จากนั้นนำส่วน F8.4 มาผ่านคอลัมน์ sephadex LH20 แล้วนำส่วน F8.4.3 มาแยกต่อด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์ซึ่งชะด้วย 5-15% เมทานอลในไดคลอโรมีเทน ได้สาร **8** (35.4 mg) สำหรับสาร **9** (48.7 mg) ได้จากการนำส่วน F8.5 มาผ่านคอลัมน์ sephadex LH20 และนำส่วนย่อย F8.5.1 มาแยกต่อด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โดยชะด้วย 2.5% เมทานอลในไดคลอโรมีเทน ซึ่งการแยกสารจากรา HK5 อย่างย่อได้สรุปไว้ในแผนภาพที่ 2



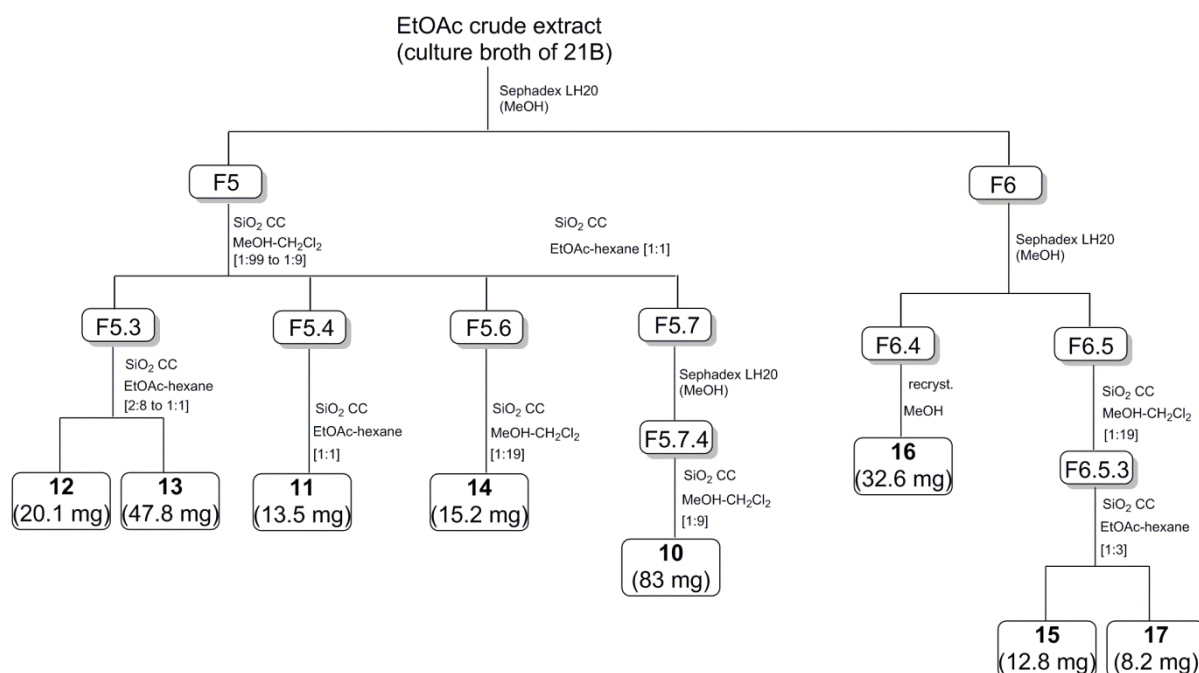
แผนภาพที่ 2 การแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดหยาบเอธิลแอซีเททของรา HK5

1.2.2. การแยกบริสุทธิ์จากส่วนสกัดหยาบเอธิลแอซีเททของราสายพันธุ์ 21B ที่เพาะเลี้ยงใน MEB

นำส่วนสกัดหยาบเอธิลแอซีเททที่เพาะเลี้ยงใน MEB ของน้ำเพาะเลี้ยงของรา 21B (ประมาณ 7 g) มาผ่านคอลัมน์ Sephadex LH20 โดยใช้เมทานอลเป็นตัวชะ ได้ 6 ส่วน (F1-F6) จากนั้นนำส่วน F5 มาแยกต่อด้วยซิลิกาเจลที่ชะแบบเกรเดียนต์ด้วยของผสมระหว่างเมทานอลและไดคลอโรมีเทนตั้งแต่ 1:99 ถึง 1:9 ได้เป็น 9 ส่วนย่อย (F5.1-F5.9) เมื่อนำส่วนย่อย F5.3 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟีซึ่งชะแบบเกรเดียนต์ด้วยของผสมระหว่างเอธิลแอซีเททและเฮกเซน (จาก 2:8 ถึง 1:1) ได้สาร **12** (20.1 mg) และ **13** (47.8 mg) จากนั้นได้นำส่วนย่อย F5.4 มาแยกต่อด้วยเทคนิคเดียวกันและชะด้วยของผสมระหว่างเอธิลแอซีเททและเฮกเซนในอัตราส่วน 1:1 ได้สาร **11** (13.5 mg)

นำส่วนย่อย F5.6 มาแยกต่อด้วยซิลิกาเจลที่ชะด้วยของผสมระหว่างเมทานอลและไดคลอโรมีเทน (1:19) ได้สาร **14** (15.2 mg) จากนั้นนำส่วนย่อย F5.7 มาผ่านคอลัมน์ Sephadex LH20 ด้วยเมทานอลอีกครั้งหนึ่งแล้วนำส่วนย่อยที่ F5.7.4 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่ชะด้วยของผสมระหว่างเมทานอลและไดคลอโรมีเทน (1:9) ได้สาร **10** (83.0 mg)

นำส่วน F6 มาผ่านคอลัมน์ Sephadex LH20 โดยใช้เมทานอลเป็นตัวชะ ได้เป็น 5 ส่วนย่อย (F6.1-F6.5) จากนั้นนำส่วนย่อย F6.4 มาตกผลึกด้วยเมทานอล ได้สาร **16** (32.6 mg) และเมื่อนำส่วนย่อย F6.5 มาแยกต่อด้วยซิลิกาเจลที่ชะด้วยของผสมระหว่างเมทานอลและไดคลอโรมีเทน (1:19) ได้เป็น 3 ส่วน ซึ่งส่วน F6.5.3 ได้นำมาทำให้บริสุทธิ์ต่อยด้วยเทคนิคเดียวกันโดยใช้ของผสมระหว่างเอธิลแอซีเททและเฮกเซนในอัตราส่วน 1:3 เป็นตัวชะ ได้สาร **15** (12.8 mg) และสาร **17** (8.2 mg) ซึ่งการแยกสารจากรา 21B ที่เพาะเลี้ยงใน MEB อย่างย่อได้สรุปไว้ในแผนภาพที่ 3



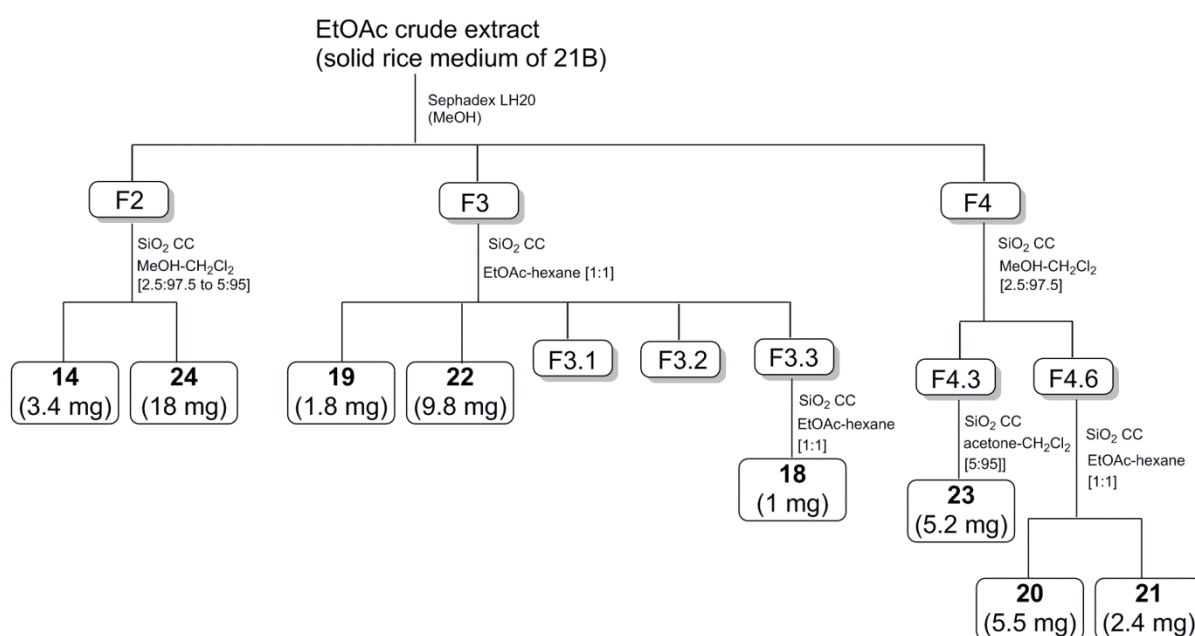
แผนภาพที่ 3 การแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดหยาบเอธิลแอซีเททของรา 21B ใน MEB

1.2.3. การแยกบริสุทธิ์จากส่วนสกัดหยาบเอธิลแอลกอฮอล์ของสายพันธุ์ 21B ที่เพาะเลี้ยงในข้าว

นำส่วนสกัดหยาบเอธิลแอลกอฮอล์ที่เพาะเลี้ยงบนข้าวของรา 21B มาผ่านคอลัมน์ Sephadex LH20 โดยใช้เมทานอลเป็นตัวชะ จากนั้นนำส่วนหลักที่ได้ (520 mg) มาผ่านคอลัมน์ Sephadex LH20 ซ้ำอีกครั้งหนึ่ง ได้เป็น 6 ส่วน (F1-F6)

นำส่วน F2 มาแยกด้วยซิลิกาเจลที่ชะแบบเกรเดียนท์ด้วยของผสมระหว่างเมทานอลและไดคลอโรมีเทนตั้งแต่ 2.5:97.5 ถึง 5:95 ได้สาร **24** (18.0 mg) และสาร **14** (3.4 mg) และเมื่อนำส่วน F3 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟีซึ่งชะด้วยของผสมระหว่างเอธิลแอลกอฮอล์และเฮกเซน (1:1) ได้สาร **19** (1.8 mg), **22** (9.8 mg) และอีก 3 ส่วนย่อย (F3.1-F3.3) จากนั้นนำส่วนย่อย F3.3 มาแยกด้วยเทคนิคและตัวชะเดียวกันคือของผสมระหว่างเอธิลแอลกอฮอล์และเฮกเซน (1:1) ได้สาร **18** (1.0 mg)

นำส่วน F4 มาแยกด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่ชะด้วยของผสมระหว่างเมทานอลและไดคลอโรมีเทน (2.5:97.5) ได้ 6 ส่วนย่อย และเมื่อนำส่วนย่อย F4.3 มาทำให้บริสุทธิ์ต่อไปด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟีซึ่งชะด้วยของผสมระหว่างเอซีโตนและไดคลอโรมีเทน (5:95) ได้สาร **23** (5.2 mg) จากนั้นได้นำส่วนย่อย F4.6 มาแยกด้วยเทคนิคเดียวกันและชะด้วยของผสมระหว่างเอธิลแอลกอฮอล์และเฮกเซนในอัตราส่วน 1:1 ได้สาร **20** (5.5 mg) และสาร **21** (2.4 mg) ซึ่งการแยกสารจากรา 21B ที่เพาะเลี้ยงบนข้าวอย่างย่อได้สรุปไว้ในแผนภาพที่ 4



แผนภาพที่ 4 การแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดหยาบเอธิลแอลกอฮอล์ของรา 21B ที่เพาะเลี้ยงบนข้าว

1.2.4. การแยกบริสุทธิ์จากส่วนสกัดหยาบเอธิลแอซีเททของร่ายพันธุ์ 8D

นำส่วนสกัดหยาบเอธิลแอซีเททที่เพาะเลี้ยงใน SDB ของน้ำเพาะเลี้ยงของรา 8D (ประมาณ 15 g) มาผ่านคอลัมน์ Sephadex LH20 โดยใช้เมทานอลเป็นตัวชะ ได้ 5 ส่วน (F1-F5) จากนั้นนำส่วน F5 มาแยกต่อ Sephadex LH20 อีกครั้งหนึ่งได้เป็น 4 ส่วนย่อย (F5.1-F5.4) นำส่วน F5.4 มาแยกต่อด้วยซิลิกาเจลที่ชะแบบเกรเดียนท์ด้วยของผสมระหว่างเอธิลแอซีเททและเฮกเซน (จาก 1:2 ถึง 1:0) และระหว่างเอธิลแอซีเททและเมทานอล (จาก 9:1 ถึง 8:2) ซึ่งแยกได้เป็น 11 ส่วน (F5.4.1-F5.4.11)

นำส่วน F5.4.4 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟีซึ่งชะด้วยของผสมระหว่างเมทานอลและไดคลอโรมีเทน (1:19) ได้สาร **27** (3.2 mg) จากนั้นนำส่วน F5.4.5 มาแยกต่อด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่ชะด้วยของผสมระหว่างเอธิลแอซีเททและไดคลอโรมีเทน (3:2) และตามด้วยการแยกด้วย Sephadex LH20 (MeOH) ได้สาร **31** (3.7 mg)

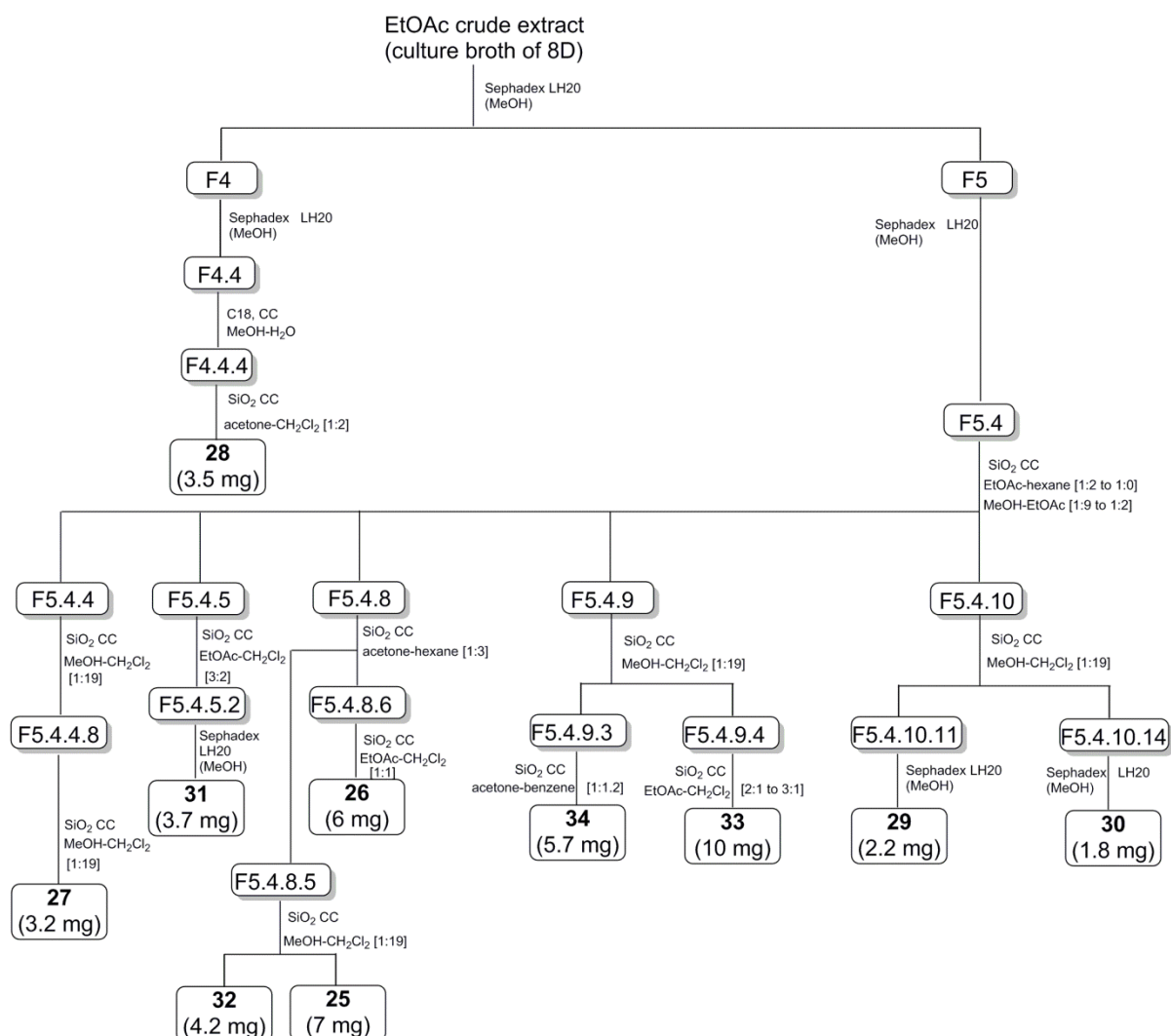
นำส่วน F5.4.8 มาแยกต่อด้วยซิลิกาเจลซึ่งชะด้วยของผสมระหว่างแอซีโตนและเฮกเซน (1:3) ได้เป็น 6 ส่วน (F5.4.8.1-F5.4.8.6) และได้ส่วน F5.4.8.6 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟีซึ่งชะด้วยของผสมระหว่างเอธิลแอซีเททและไดคลอโรมีเทน (1:1) ได้สาร **26** (6 mg) จากนั้นนำส่วน F5.4.8.5 มาแยกต่อด้วยซิลิกาเจลและชะด้วยของผสมระหว่างเมทานอลและไดคลอโรมีเทน (1:19) ได้สาร **32** (7 mg) และอีก 4 ส่วนย่อย (F5.4.8.5.1-F5.4.8.5.4) และเมื่อส่วนย่อย F5.4.8.5.4 มาตกผลึกด้วยเมทานอลได้สาร **25** (4.2 mg)

นำส่วน F5.4.9 มาแยกต่อด้วยซิลิกาเจลซึ่งชะด้วยของผสมระหว่างเมทานอลและไดคลอโรมีเทน (1:19) ได้เป็น 10 ส่วนย่อย จากนั้นนำส่วนย่อย F5.4.9.4 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟีซึ่งชะด้วยของผสมระหว่างเอธิลแอซีเททและไดคลอโรมีเทน (2:1 และ 3:1) ได้สาร **33** (10 mg) และได้ส่วนย่อย F5.4.9.3 มาแยกต่อด้วยซิลิกาเจลซึ่งชะด้วยของผสมระหว่างแอซีโตนและเบนซีน (1:1.2) ได้สาร **34** (5.7 mg)

นำส่วน F5.4.10 มาแยกต่อด้วยซิลิกาเจลที่ชะด้วยของผสมระหว่างเมทานอลและไดคลอโรมีเทน (1:19) ซึ่งแยกได้เป็น 14 ส่วนย่อย จากนั้นได้ส่วนย่อย F5.4.10.11 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย Sephadex LH20 ที่ชะด้วยเมทานอล ได้สาร **29** (2.2 mg) และเมื่อส่วนย่อย F5.4.10.14 มาแยกต่อด้วยเทคนิคเดียวกัน ได้สาร **30** (1.8 mg)

จากนั้นนำส่วน F4 มาแยกต่อ Sephadex LH20 อีกครั้งหนึ่งได้เป็น 4 ส่วนย่อย (F4.1-F4.4) นำส่วน F4.4 มาแยกต่อด้วยคอลัมน์ reverse phase C18 ที่ชะด้วยของผสมระหว่างเมทานอลและน้ำ (1:1) ซึ่งแยกได้เป็น 4 ส่วนย่อย และจากนั้นรวมส่วนย่อยที่ 3 และ 4 เข้าด้วยกันและแยกต่อให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจลที่ชะด้วยของผสมระหว่างอะซีโตนและไดคลอโรมีเทน (1:2) จึงได้สาร **28** (3.5 mg)

การแยกสารจากรา 8D ที่เพาะเลี้ยงใน SDB อย่างย่อได้สรุปไว้ในแผนภาพที่ 5



แผนภาพที่ 5 การแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดหยาบเอธิลแอซีเททของรา 8D

1.2.5. การแยกบริสุทธิ์จากส่วนสกัดหยาบเอธิลแอซีเททของราสายพันธุ์ KP1

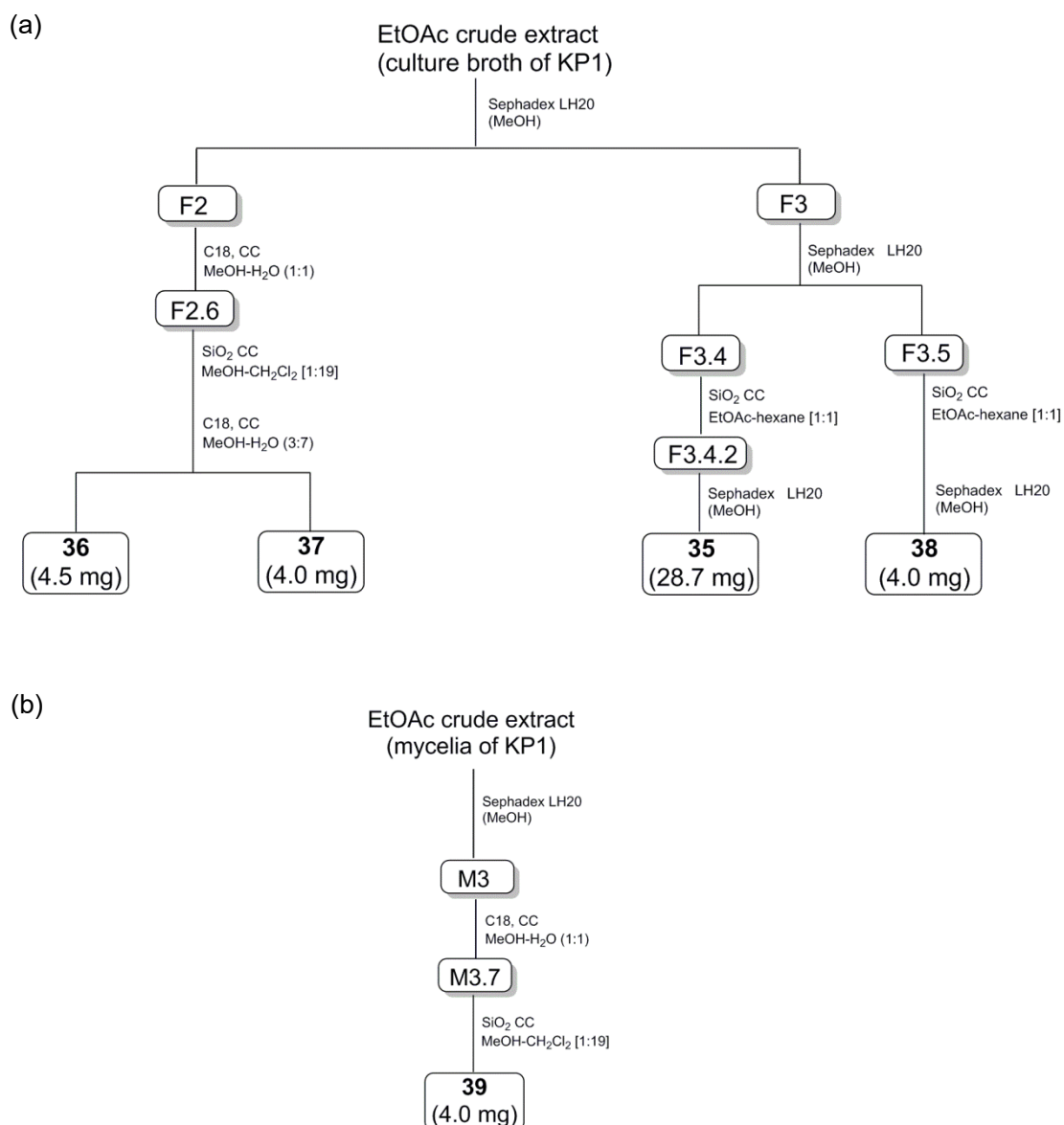
นำส่วนสกัดหยาบเอธิลแอซีเททที่เพาะเลี้ยงใน SDB ของน้ำเพาะเลี้ยงของรา KP1 (4.62 g) มาผ่านคอลัมน์ Sephadex LH20 โดยใช้เมทานอลเป็นตัวชะ ได้ 5 ส่วน (F1-F5) จากนั้นนำส่วน F3 มาแยกต่อ Sephadex LH20 อีกครั้งหนึ่งได้เป็น 6 ส่วนย่อย (F3.1-F3.6) นำส่วน F3.4 มาแยกต่อด้วยซิลิกาเจลที่ชะด้วยของผสมระหว่างเอธิลแอซีเททและเฮกเซน (1:1) ซึ่งแยกได้เป็น 9 ส่วน (F3.4.1-F3.4.9) จากนั้นนำส่วน F3.4.2 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยการผ่านคอลัมน์ Sephadex LH20 ที่ชะเมทานอลจึงได้สาร **35** (28.7 mg)

นำส่วน F-2 มาแยกต่อด้วยคอลัมน์ reverse phase C18 ชะด้วยของผสมระหว่างเมทานอลและน้ำ (1:1) ซึ่งแยกได้เป็น 7 ส่วนย่อย (F2.1-F2.7) จากนั้นนำส่วน F2.6 มาแยกต่อด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์ที่ชะด้วยของผสมระหว่างเมทานอลและไดคลอโรมีเทน (1:19) และตามด้วยการต่อด้วยคอลัมน์ reverse phase C18 ชะด้วยของผสมระหว่างเมทานอลและน้ำ (3:7) จึงได้สาร **36** (4.5 mg) และสาร **37** (4.0

mg) เมื่อนำส่วน F3.5 มาแยกด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์ชะด้วยของผสมระหว่างเอทิลแอซีเททและเฮกเซน (2:3) และจากนั้นนำมาแยกต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex LH20 ชะด้วยเมทานอล ได้สาร **38** (4.0 mg)

นอกจากนี้ยังได้นำส่วนสกัดหยาบเอทิลแอซีเทท (0.87 g) ของเส้นใยที่ได้จากการสกัดเส้นใยของรา KP1 ด้วยเอทิลแอซีเททมาผ่านคอลัมน์ Sephadex LH20 ชะด้วยเมทานอล แยกได้ออกเป็น 6 ส่วนย่อย (M1-M6) จากนั้นนำส่วน M3 มาแยกต่อด้วยคอลัมน์ reverse phase C18 ชะด้วยของผสมระหว่างเมทานอลและน้ำ (1:1) แล้วนำส่วนย่อย M3.7 มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจลชะด้วยของผสมระหว่างเมทานอลและไดคลอโรมีเทน (1:19) จึงได้สาร **39** (4.0 mg)

การแยกสารจากรา KP1 ที่เพาะเลี้ยงใน SDB อย่างย่อได้สรุปไว้ในแผนภาพที่ 6



แผนภาพที่ 6 (a) การแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดหยาบเอทิลแอซีเททของน้ำเพาะเลี้ยงรา KP1

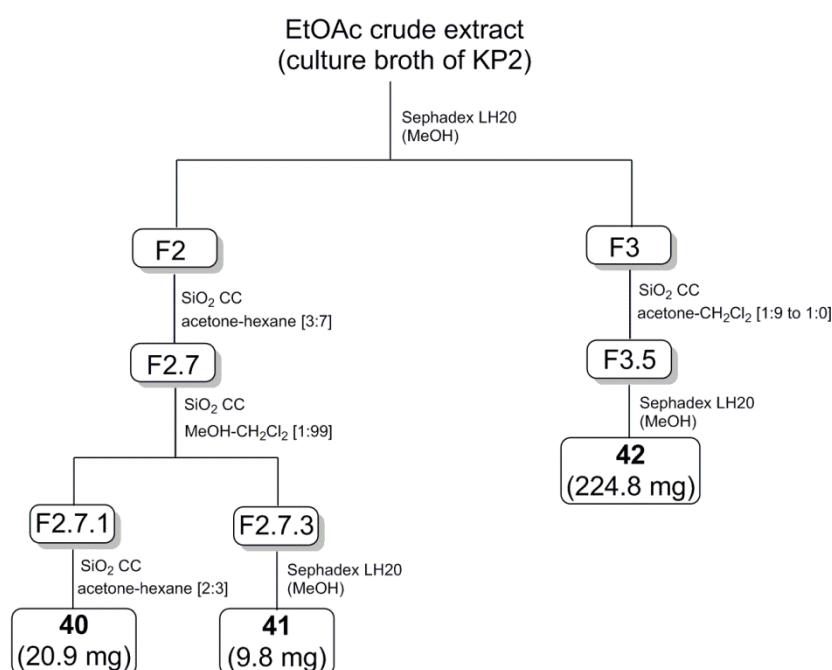
(b) การแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดหยาบเอทิลแอซีเททของเส้นใยรา KP1

1.2.6. การแยกบริสุทธิ์จากส่วนสกัดหยาบเอธิลแอซีเททของราสายพันธุ์ KP2

นำส่วนสกัดหยาบเอธิลแอซีเททที่เพาะเลี้ยงใน YEB ของน้ำเพาะเลี้ยงของรา KP2 (18.18 g) มาผ่านซิลิกาเจลคอลัมน์ซึ่งชะด้วยของผสมระหว่างอะซีโทนและไดคลอโรมีเทน (1:9 ถึง 1:1) และตามด้วยของผสมระหว่างเมทานอลและไดคลอโรมีเทน (1:5 ถึง 2:3) ซึ่งแยกได้ออกเป็น 7 ส่วน (F1-F7) จากนั้นนำ F2 มาทำการแยกต่อด้วยเทคนิคเดียวกันโดยใช้ของผสมระหว่างอะซีโทนและเฮกเซน (3:7) เป็นตัวชะซึ่งแยกออกได้เป็น 8 ส่วนย่อย (F2.1-F2.8) นำส่วนย่อย F2.7 มาแยกต่อด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์ที่ชะด้วยของผสมระหว่างเมทานอลและไดคลอโรมีเทน (1:99) ได้เป็น 4 ส่วนย่อย จากนั้นนำส่วนย่อย F2.7.1 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคเดียวกันโดยใช้ตัวชะเป็นของผสมระหว่างอะซีโทนและเฮกเซน (2:3) และทำซ้ำอีกครั้งจึงได้สาร **40** (20.9 mg) จากนั้นนำส่วนย่อย F2.7.3 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Sephadex LH20 ชะด้วยเมทานอลจึงได้สาร **41** (9.8 mg)

นำส่วน F3 มาแยกด้วยซิลิกาคอลัมน์ชะด้วยของผสมระหว่างอะซีโทนและไดคลอโรมีเทน (1:9 ถึง 1:0) ซึ่งแยกออกได้เป็น 6 ส่วน (F3.1-F3.6) จากนั้นนำส่วน F3.5 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Sephadex LH20 ชะด้วยเมทานอลจึงได้สาร **42** (224.8 mg)

การแยกสารจากรา KP2 ที่เพาะเลี้ยงใน YEB อย่างย่อได้สรุปไว้ในแผนภาพที่ 7



แผนภาพที่ 7 การแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดหยาบเอธิลแอซีเททของรา KP2

1.3. การพิสูจน์ทราบโครงสร้างของสารที่แยกได้

นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์หาโครงสร้างด้วยเทคนิค NMR ทั้ง 1D และ 2D NMR ซึ่งประกอบด้วย ^1H - ^1H COSY, HSQC, HMBC และ NOESY ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Varian Mercury-400 Plus NMR spectrometer สำหรับสารชนิดใหม่จะทำการวัด HRESIMS ด้วยเครื่อง micrOTOF-Q II ESI mass spectrometer, วัด optical rotation ด้วยเครื่อง PerkinElmer 341 polarimeter, วัด UV สเปกตรัมด้วยเครื่อง Shimadzu UV-160 UV-visible spectrometer และในกรณีที่สารชนิดใหม่เป็นผลึก จะทำการยืนยันโครงสร้างและสเตอริโอเคมีด้วยเทคนิค single-crystal X-ray diffraction analysis ด้วยเครื่อง Bruker APEX II diffractometer

1.4. การสังเคราะห์อนุพันธ์แอซิติลของสาร rhytidone A (10)

นำสาร **10** (10 mg) มาละลายในไดคลอโรมีเทน (2 mL) จากนั้นเติม acetic anhydride (0.1 mL) และ DMAP เล็กน้อย แล้วคนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมน้ำ (5 mL) และสกัดด้วยเอทิลเอซีเทท 3 ครั้ง นำส่วนที่ละลายในเอทิลเอซีเททมาล้างด้วย brine และกำจัดน้ำด้วย MgSO_4 แล้วระเหยตัวทำละลายออก จากนั้นนำส่วนสกัดที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์ ะด้วยของผสมระหว่างเมทานอลและไดคลอโรมีเทน (1:19) ได้สาร 5-O-acetyl-rhytidone A (**10a**) (7.2 mg, 64% yield)

ส่วนที่ 2: การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้

สารที่แยกได้ทั้งหมดจะถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งเกี่ยวข้องกับมะเร็ง 3 ระบบ ประกอบด้วย การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ และการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ (anti-angiogenic activity) ดังนี้

2.1. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

ในงานวิจัยนี้ได้นำสารที่แยกได้มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งคนจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) เซลล์มะเร็งปากมดลูก (CaSki) เซลล์มะเร็งตับ (Hep-G2) ด้วยวิธี MTT

นำเซลล์มะเร็งแต่ละชนิดใส่ลงในแต่ละหลุมของ 96-well plate จำนวน 1×10^4 เซลล์ บ่มที่ 37 °C ภายใต้บรรยากาศ 5% CO_2 เป็นเวลาหนึ่งคืน จากนั้นทรานส์เฟอเซลล์ด้วยสารแต่ละชนิดตามความเข้มข้นที่กำหนดและ DMSO สำหรับชุดควบคุม หลังจากบ่มที่ 37 °C ภายใต้บรรยากาศ 5% CO_2 เป็นเวลานาน 72 ชั่วโมง เติมน้ำละลาย MTT (5 mg/PBS 1 mL) 10 μL ลงในแต่ละหลุม บ่มต่ออีก 4 ชั่วโมง จากนั้นดูด supernatant ออก แล้วเติม DMSO 100 μL ลงในแต่ละหลุมเพื่อละลายผลึก formazan ที่เกิดขึ้น แล้วนำไปวัด O.D. ที่ 540 nm การทดลองนี้ทำสามซ้ำและใช้ doxorubicin เป็น positive control

2.2. การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ

ในงานวิจัยนี้ใช้ได้นำสารที่แยกได้มาทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธีตรวจวัดการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ (NO) ในเซลล์มาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย LPS (lipopolysaccharide)

2.2.1. การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบเบื้องต้น

นำเซลล์มาโครฟาจ J774.A1 มาใส่ลงในแต่ละหลุมของ 96-well plate จำนวน 5×10^4 เซลล์ บ่มที่ 37 °C ภายใต้บรรยากาศ 5% CO₂ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทรานส์เฟกต์เซลล์ด้วยสารที่ต้องการทดสอบตามความเข้มข้นที่กำหนดและ DMSO สำหรับชุดควบคุม แล้วบ่มต่ออีก 2 ชั่วโมง แล้วจึงกระตุ้นด้วย LPS (10 µg/mL) หลังจากบ่มที่ 37 °C ภายใต้บรรยากาศ 5% CO₂ เป็นเวลานาน 18-20 ชั่วโมง ดูด supernatant หลุมละ 50 µL ใส่ลงใน 96-well plate อีกอันหนึ่ง จากนั้นเติมสารละลาย 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid หลุมละ 50 µL บ่มในที่มืด 10 นาที แล้วเติมสารละลาย 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride 50 µL บ่มในที่มืด 10 นาที จากนั้นนำไปวัด O.D. ที่ 540 nm การทดลองนี้ทำสามซ้ำและใช้ indomethacin เป็น positive control

เพื่อตรวจสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์มาโครฟาจ เติมสารละลาย MTT (5 mg/PBS 1 mL) 10 µL ลงในแต่ละหลุมของเซลล์ที่ทดสอบ (หลังจากดูด supernatant 50 µL) บ่มต่ออีก 4 ชั่วโมง แล้วนำไปวัด O.D. ที่ 540 nm คำนวณเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์

2.2.2. Western Blot analysis

สารที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ดีมากจะนำมาศึกษาผลของสารต่อการแสดงออกของโปรตีน iNOS (inducible nitric oxide synthase) ที่เหนี่ยวนำด้วย LPS

ทำการทรานส์เฟกต์ J774.A1 ด้วยสารที่เลือกในแบบเดียวกับการทดสอบฤทธิ์ตามเวลาที่กำหนด จากนั้นดูดมีเดียออกและล้างเซลล์ด้วย PBS เย็น ทำการไลซิสเซลล์ด้วย mammalian protein extraction reagent แล้วนำเซลล์ไลเซตที่ได้มาทำการเซนทริฟิวส์ที่ 5000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเก็บเฉพาะส่วน supernatant แล้วนำมาหาปริมาณโปรตีน นำโปรตีน 30 µg มาทำการแยกบน 10% แล้วย้อมด้วย 3% skim milk ใน PBS ที่มี 0.05% Tween-20 จากนั้นทำการโพรบด้วย iNOS antibody เป็นเวลาหนึ่งคืน แล้วนำมาทำการตรวจวัดสัญญาณด้วยวิธี chemiluminescent แล้วทำในลักษณะเดียวกันโดยเปลี่ยนเป็นโพรบด้วย β-actin antibody ซึ่งใช้เป็น internal control

2.3. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่

ทำการทดสอบใน 3 ระดับ โดยเริ่มจากการคัดกรองด้วย ex vivo model และเมื่อพบสารที่มีฤทธิ์ดีจะทำการหาว่าสารก่อกำเนิดการทำงานของเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือด (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) ในกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ด้วย in vitro model และในกรณีที่สารมีฤทธิ์ดีและมีสารปริมาณมากพอจะนำสารนั้นมาทำการทดสอบใน in vivo model ต่อไปด้วย

2.3.1. การคัดกรองด้วย Ex vivo model (microvessel sprouting assay)

ตัดหลอดเลือดแดงของหนู Wistar ให้มีขนาด 1 mm แล้ววางใน 6-well plate จากนั้นหยอดทับด้วยคอลลาเจน หลุมๆ ละ ประมาณ 0.5 mL นำไปบ่มที่ 37 °C (5% CO₂) นาน 30 นาทีจนคอลลาเจนแข็งตัว แล้วเติม RPMI หลุมละ 2 mL จากนั้นทรีทด้วยสารที่แยกได้โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 25 µM และ DMSO สำหรับชุดควบคุม แล้วนำไปบ่มที่ 37 °C (5% CO₂) นาน 7 วัน แล้วนำมาถ่ายรูปภายใต้กล้องจุลทรรศน์ดูการเกิดขึ้นของ microvessel เทียบกับชุดควบคุม

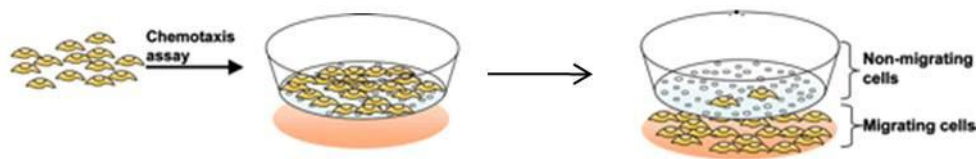
2.3.2. การศึกษาผลของสารต่อฟังก์ชันการทำงานของ HUVEC

ทำการทดสอบโดยใช้ HUVEC โดยการทดลองจะแบ่งออกเป็น 3 ส่วนด้วยกัน ได้แก่ proliferation, tube formation และ migration ซึ่งถ้าการทำงานส่วนใดส่วนหนึ่งถูกยับยั้ง การเกิดของหลอดเลือดใหม่จะมีขึ้นไม่ได้

(1) *Proliferation*: เตรียม HUVEC ในอาหารเพาะเลี้ยง HuMedia EG2 ใส่ลง 96-well plate หลุมละ 1.5×10^3 เซลล์ บ่มที่ 37 °C (5% CO₂) นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นทรีทด้วยสารที่ความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม), 0.1, 0.5, 1, และ 2.5 µM จากนั้นบ่มต่ออีก 72 ชั่วโมง ทำการตรวจวัดการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วยรีเอเจนต์ WST-8 โดยเติมลงในแต่ละหลุมๆ ละ 10 µL และนำไปวัด O.D. ที่ 450 nm ด้วยเครื่อง microplate reader ทุกๆ 1 ชั่วโมงจนค่าคงที่ แล้วคำนวณค่า IC₅₀ ของการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ของสารที่ทดสอบ

(2) *Tube formation*: ใส่ Matrigel ลงใน 96-well plate หลุมละ 50 µL บ่มที่ 37 °C (5% CO₂) นาน 30 นาทีจนเจลแข็งตัว เติม HUVEC ในอาหารเพาะเลี้ยง HuMedia EG2 ที่มีสารที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2.5, 5 และ 10 µM หลุมละ 1×10^4 เซลล์ บ่มที่ 37 °C (5% CO₂) นาน 12-18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตรวจดูการสร้าง tube formation ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (0 µM) และคำนวณค่า IC₅₀ ในการยับยั้ง tube formation ของสารที่ทดสอบ

(3) *Migration*: วาง cell culture insert ที่มี microporous membrane ขนาด 8 µm ลงใน 24-well plate แต่ละหลุม แล้วเติมสารละลาย 0.1% เจลาตินลงบน membrane ทั้งไว้ประมาณ 10 นาทีจนเจลแข็งตัว จากนั้นใส่ HUVEC ในอาหารเพาะเลี้ยง Medium199 ที่มี 0.1% BSA ลงบนเจลาติน insert ละ 2.5×10^4 เซลล์ และเติมอาหารเพาะเลี้ยง Medium199 ที่มี 0.1% BSA และ recombinant human VEGF (10 ng/mL) และสารที่ความเข้มข้น 0, 2.5, 5 และ 10 µM ลงในแต่ละหลุมด้านล่างของ insert หลุมละ 400 µL จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 °C (5% CO₂) นาน 6 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 3 จากนั้นตัด membrane ออกมาแล้ว fix ด้วยเมทานอล และย้อมด้วยสี Diff Quick จากนั้นนับจำนวนเซลล์ที่ไม่เกิดการ migrate ผ่านเมมเบรนออกไปเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (0 µM) และคำนวณ ค่า IC₅₀ ในการยับยั้งการ migration ของสารที่ทดสอบ



รูปที่ 3 การทดสอบ migration assay ของ HUVEC

2.3.3. การทดสอบด้วย in vivo model (Matrigel plug assay)

ทำการทดสอบด้วยวิธี Matrigel plug assay โดยฉีด Matrigel 0.5 mL ที่มีสารที่ความเข้มข้นที่กำหนดหรือ DMSO สำหรับชุดควบคุม, VEGF (30 ng/mL) และ heparin (10 U/ μ L) เข้าใต้ผิวหนังบริเวณสองข้างของลำตัวหนูสายพันธุ์ C57BL/6 หลังจาก 7 วัน ฆ่าหนูแล้วตัดเอาก้อน Matrigel ออกมาและถ่ายรูป จากนั้นหาปริมาณฮีโมโกลบินในก้อน Matrigel ด้วย Quantichromhemoglobin assay kit และนำมาคำนวณหาความเข้มข้นของฮีโมโกลบินจากฮีโมโกลบินมาตรฐานเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ส่วนที่ 3: การพิสูจน์เอกลักษณ์ของราที่เลือก

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของราจะทำงานร่วมกันสองวิธีคือ conventional method และ molecular method

(1) *conventional method* : นำราแต่ละชนิดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นที่มีชิ้นใบตองแห้งวางอยู่เป็นเวลา 14 วัน สังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเกิดสปอร์ พร้อมบันทึกภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์

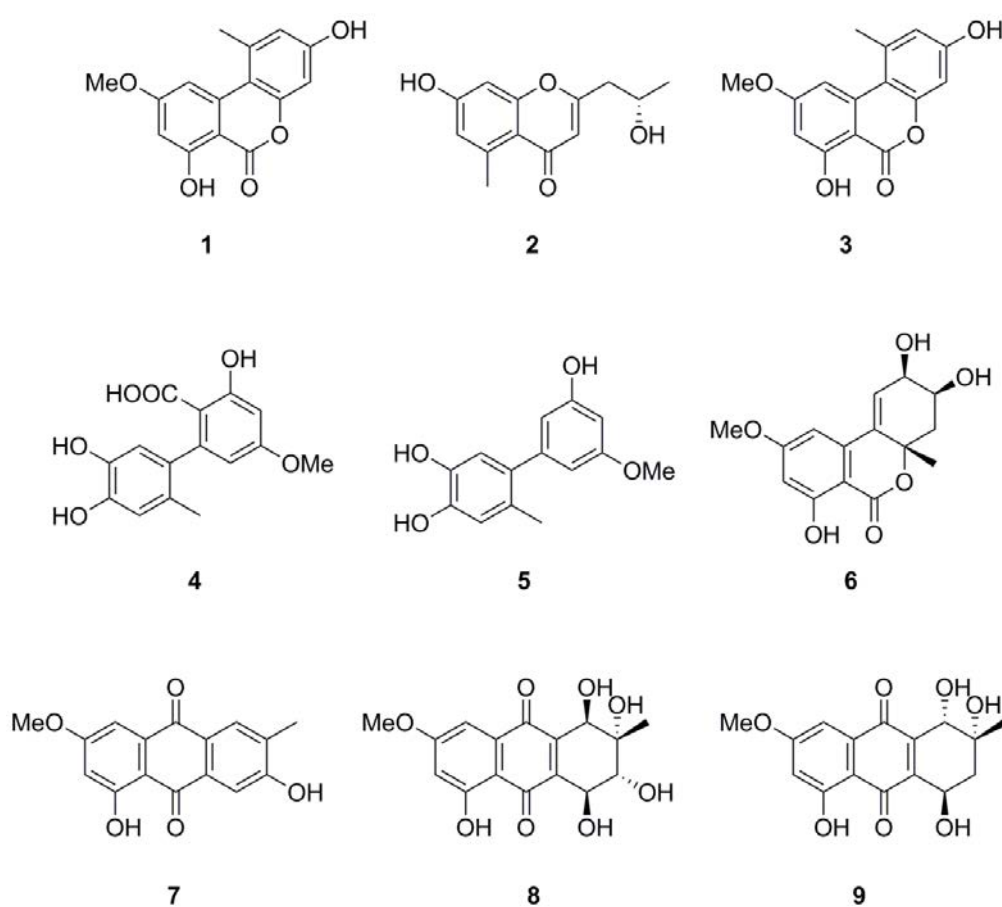
(2) *molecular method* : นำราที่เพาะเลี้ยงมาทำ DNA sequence ซึ่งได้ใช้ ITS1-5.8S-ITS2 sequence เป็นซีควেনซ์ที่ไปเทียบจากข้อมูลใน GenBank เพื่อระบุสกุลหรือสปีชีส์ของราและทำการขอ accession no.

ผลการทดลองและบทวิจารณ์

ตอนที่ 1. การสกัดแยกและพิสูจน์โครงสร้างของสารที่แยกได้

1.1. การสกัดแยกและพิสูจน์โครงสร้างของสารที่แยกได้จากราสายพันธุ์ HK-5

จากการนำส่วนสกัดหยาบแอซิลแอซิเททของส่วนน้ำเพาะเลี้ยงของรา HK-5 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MEB ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้จำนวน 9 ชนิด (1-9) และได้ทำการพิสูจน์โครงสร้างของสารที่แยกได้โดยอาศัยการวิเคราะห์ข้อมูล 1D (^1H , ^{13}C) และ 2D (^1H - ^1H COSY, HMQC, HMBC) NMR และการเปรียบเทียบกับข้อมูล NMR ของสารที่มีการรายงานมาก่อน ซึ่งจากการวิเคราะห์ข้อมูล NMR พบว่าสาร 1-9 ที่แยกได้เป็นสารกลุ่ม aromatic และ anthranoid ที่มีการรายงานมาก่อนซึ่งตรงกับข้อมูลที่ปรากฏในวารสารวิจัยที่รายงานมาก่อน ซึ่งเป็นสารต่อไปนี้ alternariol monomethyl ether (1), 5-carbomethoxymethyl-2-heptyl-7-hydroxychromone (2), alternariol (3), altenusin (4), 3'-methoxy-2-methylbiphenyl-4,5,5'-triol (5), 5'-epialtenuene (6), macrosporin (7), altersolanol (8), และ 1,2,4,5-tetrahydroxy-7-methoxy-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroanthracene-9,10-dione (9)²¹⁻³¹ และมีโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 4



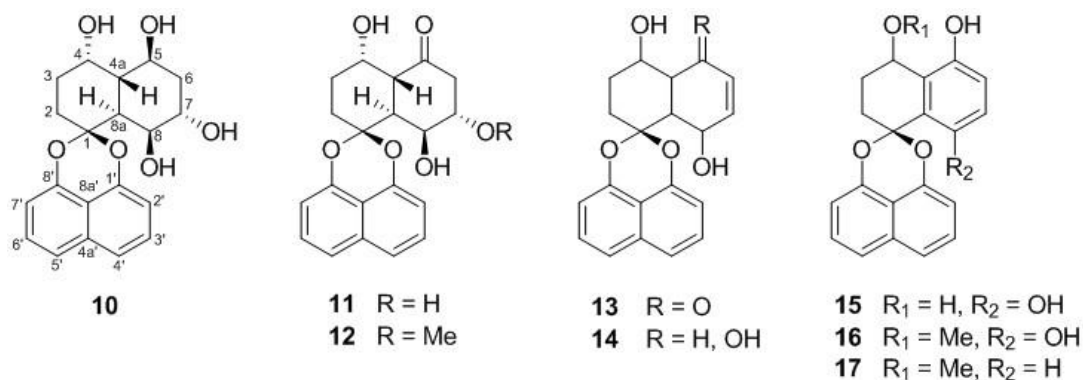
รูปที่ 4 โครงสร้างของสาร 1-9 ที่แยกได้จากรา HK-5

1.2. การสกัดแยกและพิสูจน์โครงสร้างของสารที่แยกได้จากราสายพันธุ์ 21B

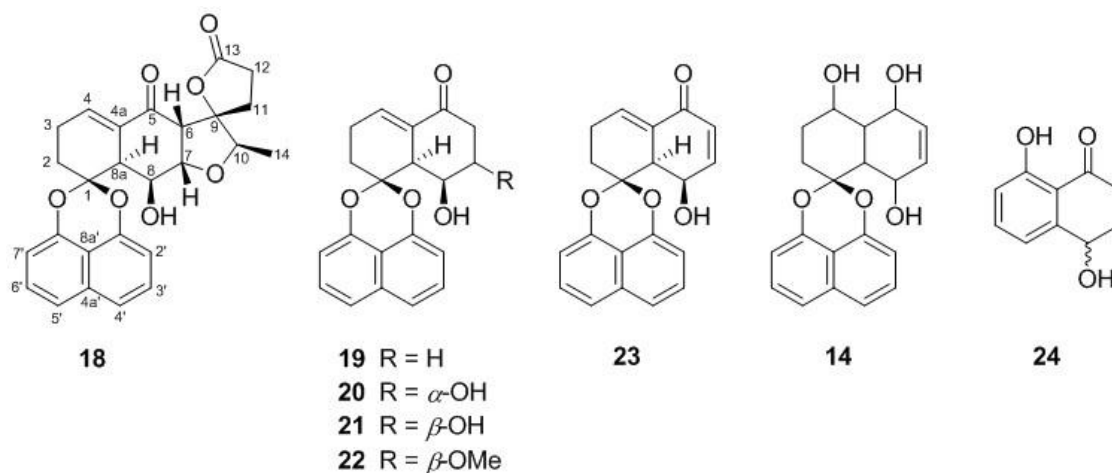
จากการคัดกรององค์ประกอบทางเคมีของรา 21B ที่เพาะเลี้ยงในอาหารต่างชนิดกัน พบว่าชนิดของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงมีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีของรา 21B อย่างมากโดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงในอาหาร MEB และ solid rice medium ซึ่งพบว่ายังให้สารเมทาบอลิต์กลุ่มเดียวกันแต่มีโครงสร้างแตกต่างกัน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้สกัดแยกสารจากส่วนสกัดหยาบแอซิลแอซิเททของรา 21B ที่เพาะเลี้ยงทั้งใน MEB และ solid rice medium

จากการพิสูจน์ทราบโครงสร้างของสารที่แยกได้โดยอาศัยการวิเคราะห์ข้อมูล 1D และ 2D NMR พบว่า ได้สารกลุ่ม spirobisanaphthalene 8 ชนิดจากส่วนสกัดหยาบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใน MEB โดยเป็นสารชนิดใหม่ 3 ชนิดซึ่งให้ชื่อว่า rhytidone A, B และ C (10-12) และสารกลุ่มเดียวกันที่มีการรายงานมาก่อนอีก 5 ชนิด คือ MK3018 (13), palmarumycin CR1 (14), CJ-12,372 (15), 4-O-methyl-CJ-12,372 (16) และ 4-O-methyl-CJ-12,371 (17)³²⁻³⁵ ซึ่งมีโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 5a สำหรับโครงสร้างของสาร 13-17 ยังได้ยืนยันโดยการเปรียบเทียบข้อมูล NMR ในวารสารวิจัยต่างๆ

(a) MEB



(b) solid rice medium



รูปที่ 5 โครงสร้างของสารที่แยกได้จากรา 21B ที่เพาะเลี้ยงใน MEB (a) และข้าว (b)

สำหรับการสกัดแยกสารจากส่วนสกัดหยาบเอธิลแอซิเททที่เพาะเลี้ยงบนข้าว สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 8 ชนิดเช่นกัน และเมื่อพิสูจน์ทราบโครงสร้างของสารที่แยกได้โดยการวิเคราะห์ข้อมูล 1D และ 2D NMR พบว่า ได้สารกลุ่ม spirobisanaphthalene 7 ชนิด ซึ่งซ้ำกับที่พบใน MEB เพียงชนิดเดียวคือสาร palmarumycin CR1 (14) และสารกลุ่ม decalin ซึ่งเป็นโครงสร้างส่วนหนึ่งของ spirobisanaphthalene ที่แยกได้อีก 1 ชนิด³⁶ ซึ่งมีโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 5b และจากการสืบค้นข้อมูลพบว่าได้สารชนิดใหม่ 6 ชนิดคือสาร 18-23 ซึ่งให้ชื่อว่า rhytidenone A-F เนื่องจากสารใหม่ทุกตัวมีโครงสร้างส่วนที่เป็นหมู่ฟังก์ชัน enone ($-\text{CH}_4=\text{C}_4\text{a}-\text{C}=\text{O}$) ร่วมกัน สารที่น่าสนใจที่สุดคือสาร rhytidenone A (18) เนื่องจากมีโครงสร้างที่มีลักษณะเฉพาะอย่างมากคือส่วน tetrahydrofuran ring เชื่อมต่อกับ γ -lactone ring ผ่าน spiro carbon ที่ตำแหน่ง C9 ซึ่งไม่เคยมีการพบมาก่อน

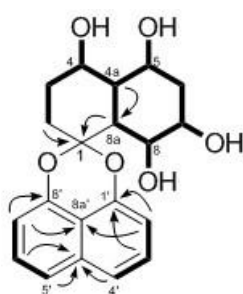
การพิสูจน์ทราบโครงสร้างของสาร spirobisanaphthalene ชนิดใหม่ 10-12

จากข้อมูล HRESIMS ที่ m/z 381.1319 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd 381.1314) ของสาร 10 สามารถระบุสูตรโมเลกุลได้เป็น $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_6$ ซึ่งแสดงว่ามี degree of unsaturation (DBE) เท่ากับ 10 และจากการวิเคราะห์ข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR (ตารางที่ 2) ร่วมกับข้อมูล HSQC พบว่าโครงสร้างของสาร 10 ประกอบด้วยคาร์บอนชนิด methine 6 คาร์บอนซึ่ง 4 คาร์บอนมี O ต่ออยู่, คาร์บอนชนิด methylene 3 คาร์บอน, คาร์บอนชนิด quaternary ที่มี O ต่ออยู่สองแขน 1 คาร์บอน (δ_{C} 104.4) และแอโรมาติก 10 คาร์บอน จากการพิจารณาข้อมูล ^1H - ^1H COSY พบ correlation ของ H-2'/H-3', H-3'/H-4', H-5'/H-6' และ H-6'/H-7' ซึ่งชี้ให้เห็นว่ามีสอง three-spin system แยกกันอยู่คือ C-2'-C-4' และ C-5'-C-7' (รูปที่ 6) นอกจากนี้ยังสามารถยืนยันโครงสร้างส่วนนี้ได้จากค่า J ที่เท่ากับ 7.2, 7.6 และ 8.0 Hz ซึ่งเป็น *ortho* coupling constant ของโปรตอนเหล่านี้

จาก HMBC สเปกตรัม พบ correlation ระหว่าง H-2'/C-1', H-2'/C-8a', H-3'/C-4a', H-6'/C-4a', H-7'/C-8' และ H-7'/C-8a' ซึ่งสามารถต่อโครงสร้างทั้งสองส่วนเข้าด้วยกันโดยผ่าน C-4a' และ C-8a' จึงยืนยันการมีโครงสร้างส่วน naphthalene unit ดังแสดงในรูปที่ 6 และจากค่า chemical shift ของ C-1' และ C-8' ที่ δ_{C} 147.4 และ 145.9 ยังบ่งบอกถึงการมีหมู่ 1,8-dioxynaphthalene ซึ่งจากข้อมูลเหล่านี้ทำให้บอกได้ว่าสาร 10 เป็นอนุพันธ์ของ spirobisanaphthalene ซึ่งสารกลุ่มนี้มีลักษณะเฉพาะคือมีส่วน 1,8-dioxynaphthalene ต่อกับโครงสร้างอีกส่วนหนึ่งโดยผ่าน spiroketal carbon สำหรับโครงสร้างส่วนที่สอง เมื่อพิจารณาจาก ^1H - ^1H COSY พบ extended spin system อีกอันหนึ่งจาก C-2-C-8 ดังแสดงในรูปที่ 6 และใน HMBC สเปกตรัมพบ correlation ระหว่าง H-2 และ H-8a กับ C-1 ซึ่งเป็นการต่อ spiroketal carbon (C-1) เข้ากับโครงสร้างส่วนที่สองที่ตำแหน่ง C-2 และ C-8a นอกจากนี้ใน ^1H NMR สเปกตรัมยังพบสัญญาณของหมู่ไฮดรอกซิล 4 หมู่ที่ δ_{H} 4.41, 4.81, 3.85, และ 4.22 ซึ่งได้กำหนดเป็น OH-4, OH-5, OH-7 และ OH-8 ตามลำดับ จาก COSY correlation ของโปรตอนเหล่านี้กับโปรตอนบนคาร์บอนที่อยู่ติดกัน ดังแสดงในรูปที่ 6

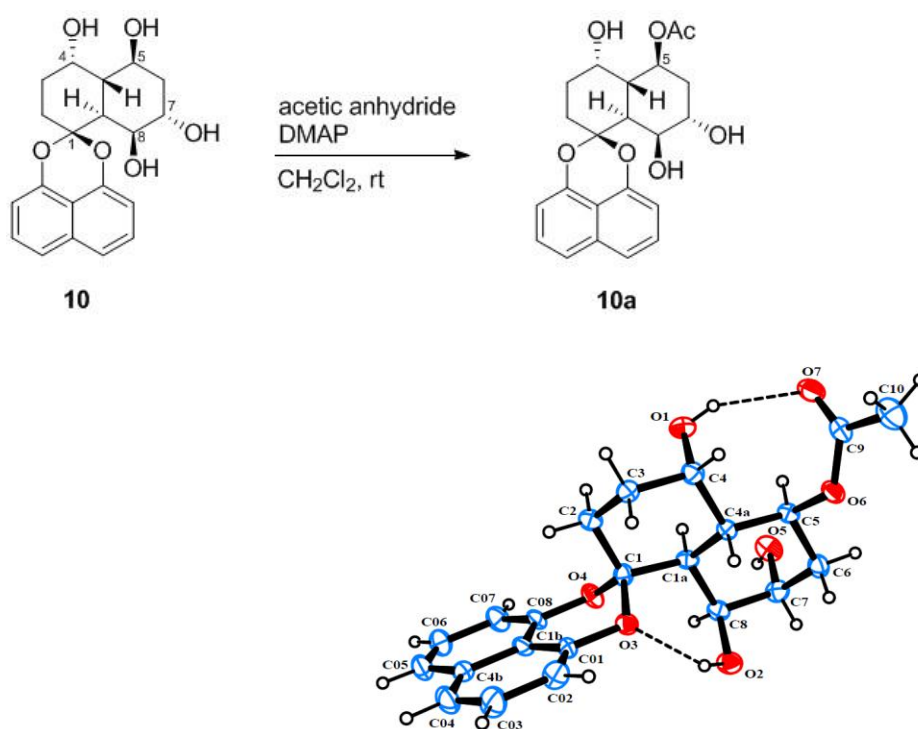
ตารางที่ 2 ข้อมูล NMR ของสาร 10-12

No.	10 (DMSO-d ₆)		11 (CDCl ₃)		12 (CDCl ₃)	
	δ_c , type	δ_H (J in Hz)	δ_c , type	δ_H (J in Hz)	δ_c , type	δ_H (J in Hz)
1	104.4, qC		104.4, qC		104.4, qC	
2	25.6, CH ₂	1.73, m	25.6, CH ₂	1.95, m	25.6, CH ₂	1.94, m
3	28.2, CH ₂	1.53, m	26.5, CH ₂	1.66, m	26.6, CH ₂	1.62, m
				1.75, m		1.72, m
4	61.2, CH	4.16, brs	62.9, CH	4.54, brs	62.9, CH	4.52, brs
4a	42.9, CH	1.97, ddd (12.8, 10, 2.4)	49.0, CH	3.31, d (13.6)	48.9, CH	3.27, dd (13.6, 1.6)
5	68.8, CH	3.70, brs	212.2, qC		211.8, qC	
6	35.7, CH ₂	1.75, m	44.2, CH ₂	2.47, dd (14.4, 2.8)	41.2, CH ₂	2.60, dd (14.4, 2)
				3.13, brs		3.05, m
7	66.9, CH	4.21, brs	71.3, CH	4.43, t (3.2)	80.1, CH	3.89, m
8	63.3, CH	3.93, m	67.4, CH	4.77, d (3.2)	65.1, CH	4.88, brd (3.6)
8a	38.6, CH	2.44, dd (12.8, 1.6)	41.5, CH	3.17, brs	41.9, CH	3.03, m
1'	146.5, qC		147.3, qC		147.3, qC	
2'	109.4, CH	6.96, d (7.2)	109.8, CH	6.94, d (7.2)	109.8, CH	6.96, d (7.6)
3'	127.6, CH	7.45, t (7.6)	127.8, CH	7.43, t (8.0)	127.7, CH	7.44, t (7.6)
4'	119.7, CH	7.50, d (8.0)	121.5, CH	7.53, d (8.4)	120.5, CH	7.48, d (8.4)
4a'	133.6, qC		134.2, qC		134.2, qC	
5'	120.1, CH	7.52, d (8.0)	120.5, CH	7.49, d (8.4)	121.4, CH	7.53, d (8.4)
6'	127.5, CH	7.45, t (7.6)	127.1, CH	7.43, t (8.0)	127.1, CH	7.42, t (7.6)
7'	108.8, CH	6.94, d (7.2)	109.6, CH	6.95, d (7.2)	109.6, CH	6.93, d (7.6)
8'	147.6, qC		145.9, qC		145.9, qC	
8a'	113.3, qC		113.8, qC		113.9, qC	
4-OH		3.70, brs				
5-OH		4.81, d (2.8)				
7-OH		3.85, d (2.4)				
8-OH		4.21, brs		3.77, s		3.71, s
7-OMe					56.9, CH ₃	3.43, s



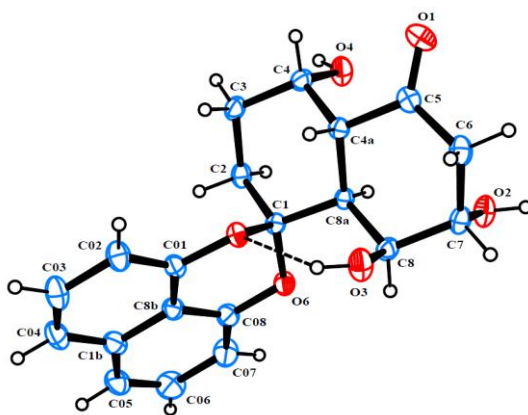
รูปที่ 6 ^1H - ^1H COSY และ HMBC correlation ที่สำคัญของสาร 10

จากนั้นทำการศึกษาหา relative configuration ของสาร **10** ซึ่งสารนี้มี chiral carbon ทั้งหมด 7 ตำแหน่ง จึงเลือกใช้เทคนิค single-crystal X-ray diffraction analysis แต่อย่างไรก็ตามแม้สารนี้จะเป็นของแข็งแต่มีลักษณะเป็นผงที่ไม่ใช่ผลึก จึงทำการเปลี่ยนสาร **10** เป็นอนุพันธ์ acetyl เนื่องจากปฏิกิริยา acetylation จะไม่มีผลกระทบต่อ configuration ของสารตั้งต้น ดังนั้นจึงนำสาร **10** มาทำปฏิกิริยากับ acetic anhydride ในไดคลอโรมีเทนโดยใช้ DMAP เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (แผนภาพที่ 7) ซึ่งหลังจากการทำปฏิกิริยาด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์ ได้ผลิตภัณฑ์หลักเพียงหนึ่งชนิดคือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการ acetylate ที่ OH-5 (**10a**) ซึ่งสารนี้มีลักษณะเป็นของแข็งที่ตกเป็นผลึกได้ จึงทำให้สามารถระบุ configuration ของสาร **10** ได้อย่างสมบูรณ์ และมีรูป ORTEP ดังแสดงในรูปที่ 7 ดังนั้นสาร **10** จึงมีโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 5 ซึ่งได้ให้ชื่อเป็น rhytidone A



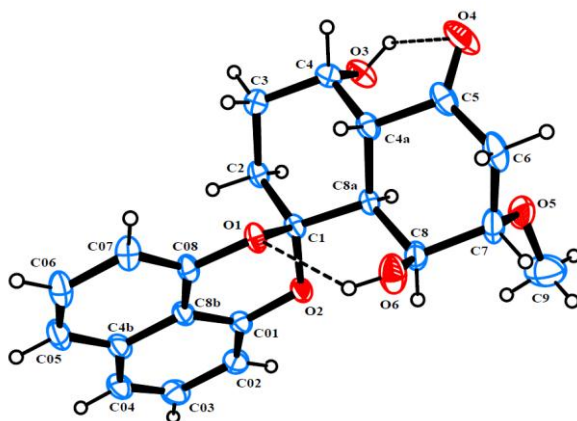
รูปที่ 7 ปฏิกิริยา acetylation ของ rhytidone A (**10**) และ ORTEP diagram ของอนุพันธ์ **10a**

สำหรับสาร **11** จากข้อมูล HRESIMS (m/z 379.1153 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, calcd 379.1158) ทำให้ทราบว่าสาร **11** มีสูตรโมเลกุลเป็น $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_6$ และพบว่า ^1H และ ^{13}C NMR สเปกตรัมของสาร **11** (ตารางที่ 2) คล้ายกับสาร **10** มาก ยกเว้นพบว่าสัญญาณโปรตอนและคาร์บอนของหมู่ methine ในตำแหน่งที่ 5 ได้หายไปและมีสัญญาณของหมู่คีโตนที่ δ_{C} 212.2 ขึ้นมาแทนที่ จึงสรุปได้ว่าสาร **11** เป็นอนุพันธ์คีโตนที่ตำแหน่งที่ 5 ของสาร **10** นอกจากนี้ยังได้ทำการยืนยันโครงสร้างและระบุ relative configuration ของสารด้วยเทคนิค single-crystal X-ray diffraction analysis ด้วยเช่นกัน ซึ่ง ORTEP diagram ของสารนี้ได้แสดงไว้ในรูปที่ 8 และได้ให้ชื่อสาร **11** เป็น rhytidone B



รูปที่ 8 ORTEP diagram ของ rhytidone B (11)

ในส่วนของสาร **12** จากข้อมูล HRESIMS (m/z 393.1315 $[M + Na]^+$, calcd 393.1314) ทำให้ทราบว่าสาร **12** มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{21}H_{22}O_6$ และพบว่า 1H และ ^{13}C NMR สเปกตรัมของสาร **12** (ตารางที่ 2) คล้ายกับสาร **11** มาก ยกเว้นเพียงมีสัญญาณของหมู่ methoxy เพิ่มขึ้นมาที่ δ_H 3.43 (s) และ δ_C 56.9 และใน HMBC สเปกตรัม พบ correlation จากโปรตอนของหมู่ methoxy ไปยัง C-7 ที่ δ_C 80.1 จึงทำให้สรุปได้ว่าสาร **12** เป็นอนุพันธ์ 7-OMe ของสาร **11** และได้ทำการยืนยันโครงสร้างพร้อมระบุ relative configuration ด้วยเทคนิค single-crystal X-ray diffraction analysis ด้วยเช่นกัน ซึ่ง ORTEP diagram ของสารนี้ได้แสดงไว้ในรูปที่ 9 และได้ให้ชื่อสาร **12** เป็น rhytidone C



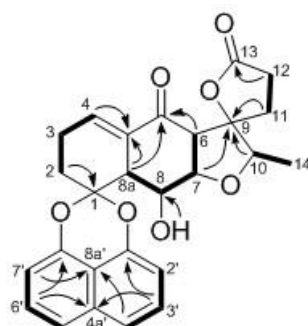
รูปที่ 9 ORTEP diagram ของ rhytidone C (12)

การพิสูจน์ทราบโครงสร้างของสาร *spirobisanaphthalene* ชนิดใหม่ 18-23

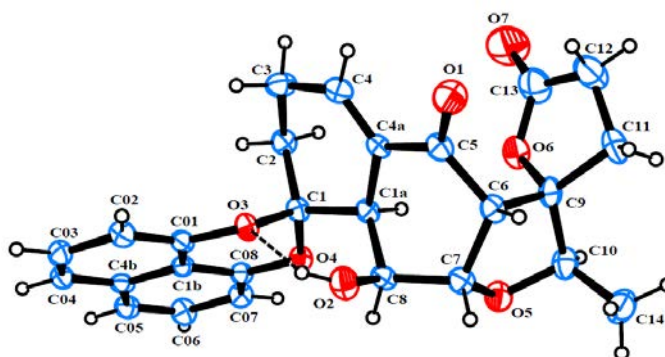
สาร **18** มีลักษณะเป็นผลึกใสไม่มีสี จากข้อมูล HRESIMS ที่ m/z 471.1416 $[M + Na]^+$ (calcd. 471.1420) พบว่าสาร **18** มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{26}H_{24}O_7$ ซึ่งมี DBE เท่ากับ 15 อย่างไรก็ตาม ข้อมูล NMR ของสาร **18** ยังคงมีสัญญาณที่เป็นลักษณะเฉพาะของ *spirobisanaphthalene* โดยเฉพาะในส่วน ของ 1,8-dioxynaphthalene unit และจากการวิเคราะห์ข้อมูล 1H , ^{13}C (ตารางที่ 3) และ HSQC พบว่า โครงสร้างของสาร **18** ประกอบด้วยคาร์บอนชนิด methylene 4 คาร์บอน, คาร์บอนชนิด methine 5 คาร์บอนซึ่ง 3 คาร์บอนมี O ต่ออยู่, คาร์บอนชนิด secondary methyl 1 คาร์บอน, คาร์บอนชนิด quaternary carbon 2 คาร์บอนซึ่งมี O ต่ออยู่, หมู่คีโตนและเอสเทอร์อย่างละ 1 หมู่ และคาร์บอนชนิด olefinic/aromatic อีก 12 คาร์บอน จากข้อมูลข้างต้นโครงสร้างของสาร **18** จึงประกอบด้วย 7 วง (heptacyclic) ซึ่งแสดงว่ามีวงเพิ่มขึ้นมาอีก 2 วงจาก *spirobisanaphthalene* ทั่วไป

สำหรับโครงสร้างส่วน 1,8-dioxynaphthalene ยืนยันได้จาก correlation ที่พบใน 1H - 1H COSY และ HMBC สเปกตรัม ดังแสดงในรูปที่ 10a นอกจากนี้ยังพบ extended spin system ที่แยกกันอีก 4 ส่วนใน 1H - 1H COSY สเปกตรัม คือ C-2-C-4, C-6-C-8a, C-11-C-12 และ C-10-C-14 (รูปที่ 10a) และเมื่อพิจารณา HMBC สเปกตรัม พบ correlation ระหว่าง H-2 กับ C-1 ซึ่งเป็นการบ่งบอกถึงการต่อส่วนที่สองของโมเลกุลเข้ากับหมู่ naphthalene ผ่าน spiroketal C-1 นอกจากนี้ยังพบ correlation ระหว่าง H-8a/C-4a, H-8a/C-5 และ H-6/C-5 ซึ่งยืนยันการมีของหมู่ α,β -unsaturated ketone ที่ C-5 และ correlation ระหว่าง H-7, H-10 และ H-11 กับ C-9, และระหว่าง H-12 กับ C-13 แสดงถึงการมีวง tetrahydrofuran และวง lactone เชื่อมต่อกันผ่าน spirocenter ที่ C-5 อย่างไรก็ตามยังมีข้อมูลหลายจุดที่ไม่ชัดเจน จึงทำการยืนยันโครงสร้างและระบุ relative configuration ของสาร **18** ด้วยเทคนิค single-crystal X-ray diffraction analysis ซึ่ง ORTEP diagram ของสารนี้ได้แสดงไว้ในรูปที่ 10b และได้ให้ชื่อสาร **18** เป็น rhytidenone A

(a)



(b)

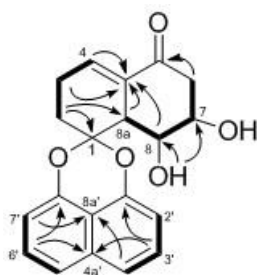


รูปที่ 10 1H - 1H COSY และ HMBC correlation ที่สำคัญของสาร **18** (a) ORTEP ของสาร **18** (b)

ตารางที่ 3 ข้อมูล NMR ของสาร 18-20

No.	18 (CDCl ₃)		19 (CDCl ₃)		20 (CDCl ₃)	
	δ_c , type	δ_H (J in Hz)	δ_c , type	δ_H (J in Hz)	δ_c , type	δ_H (J in Hz)
1	103.3, qC		103.0, qC		103.6, qC	
2	27.4, CH ₂	1.85, m 1.53, m	27.6, CH ₂	1.67, ddd (14, 8, 1.6) 2.23, m	27.7, CH ₂	1.72, m 2.24, m
3	23.1, CH ₂	2.34, m	22.9, CH ₂	2.28, m 2.37, m	23.0, CH ₂	2.28, m 2.38, m
4	137.2, CH	7.17, brm	136.8, CH	7.11, brs	136.6, CH	7.08, brm
4a	132.0, qC		132.9, qC		132.8, qC	
5	194.1, qC		198.5, qC		197.3, qC	
6	44.0, CH	3.76, brd (2.8)	33.3, CH ₂	2.52, ddd (18.4, 6.8, 1.6) 2.90, ddd (18.4, 12.4, 8)	42.6, CH ₂	2.58, dd (18, 1.6) 3.07, dd (18, 4.8)
7	65.4, CH	4.80, brd (2.8)	28.5, CH ₂	1.95, m 2.30, m	68.0, CH	4.44, brs
8	77.4, CH	4.54, dd (2.8, 8.4)	63.4, CH	4.90, brs	67.4, CH	4.77, brd (3.6)
8a	55.9, CH	3.33, d (8.4)	49.3, CH	3.14, brs	43.6, CH	3.63, brd (1.6)
9	77.2, qC					
10	82.2, CH	4.39, q (6.8)				
11	28.3, CH ₂	2.32, m 2.58, m				
12	28.6, CH ₂	2.46, m 2.74, m				
13	175.1, qC					
14	15.0, CH ₃	1.26, d (6.8)				
1'	147.3, qC		147.2, qC		147.2, qC	
2'	110.0, CH	6.88, d (7.6)	109.8, CH	6.94, d (7.6)	109.8, CH	6.97, d (7.2)
3'	127.8, CH	7.45, t (7.6)	127.7, CH	7.46, t (7.6)	127.7, CH	7.45, t (7.6)
4'	120.5, CH	7.53, d (8.2)	120.6, CH	7.50, d (8.4)	120.6, CH	7.51, d (8.4)
4a'	134.2, qC		134.2, qC		134.2, qC	
5'	121.4, CH	7.51, d (8.2)	121.5, CH	7.54, d (8.4)	121.5, CH	7.54, d (8.4)
6'	127.1, CH	7.40, t (7.6)	127.3, CH	7.43, t (7.6)	127.2, CH	7.42, t (7.6)
7'	109.5, CH	6.99, d (7.6)	109.7, CH	6.95, d (7.6)	109.7, CH	6.94, d (7.2)
8'	147.6, qC		145.9, qC		145.9, qC	
8a'	113.6, qC		113.6, qC		113.6, qC	
7-OH		3.70, brs				2.06, brs
8-OH		3.43, s		3.56, d (2.4)		3.77, s

สำหรับสาร **19** จากข้อมูล HRESIMS (m/z 323.1280 $[M + Na]^+$, calcd 323.1278) ทำให้ทราบว่สาร **19** มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{20}H_{18}O_4$ ซึ่งมี DBE เท่ากับ 12 และเมื่อพิจารณาจากหมู่ฟังก์ชันที่พบ (จากข้อมูล 1H และ ^{13}C NMR และ HSQC) พบว่า 7 DBE มาจากหมู่คีโตน 1 หมู่ และพันธะคู่ 6 พันธะ ดังนั้นสาร **19** จึงมีโครงสร้างแบบ pentacyclic นอกจากนี้ข้อมูล NMR (ตารางที่ 2) ยังแสดงสัญญาณซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ spirobisanaphthalene ใน 1H - 1H COSY สเปกตรัมพบ correlation ของ H-2/H-3, H-3/H-4, H-6/H-7, H-7/H-8 และ H-8/H-8a จึงทำให้ได้ spin system ที่แยกกันสองส่วน คือ C-2-C-4 และ C-6-C-8a ดังแสดงในรูปที่ 11a นอกจากนี้ใน HMBC สเปกตรัมพบ correlation ระหว่าง H-2 กับ C-1 และ C-8 ซึ่งยืนยันการเชื่อมต่อของส่วนที่สองของโมเลกุลเข้ากับ naphthalene ผ่าน spiroketal C-1 และในโครงสร้างนี้ก็พบว่ามีหมู่ α,β -unsaturated ketone ที่ C-5 เช่นเดียวกับในสาร **18** ซึ่งยืนยันได้จาก HMBC correlation ของ H-3/C-4a, H-8a/C-4a, H-8/C-4a และ H-6/C-5 นอกจากนี้โปรตอนของหมู่ไฮดรอกซิลที่ δ_H 3.56 ยังแสดง correlation กับ C-7 และ C-8 ซึ่งทำให้ต่อหมู่ไฮดรอกซิลนี้ไว้บนตำแหน่ง C-8 สำหรับ relative configuration ของสาร **19** ได้จากการศึกษา NOESY correlation ซึ่งพบ H-8 แสดง correlation กับ H-8a ซึ่งสรุปได้ว่า H-8 และ H-8a อยู่ด้านเดียวกัน ดังนั้นสาร**19** จึงมีโครงสร้างดังแสดงและให้ชื่อว่า rhytidenone B



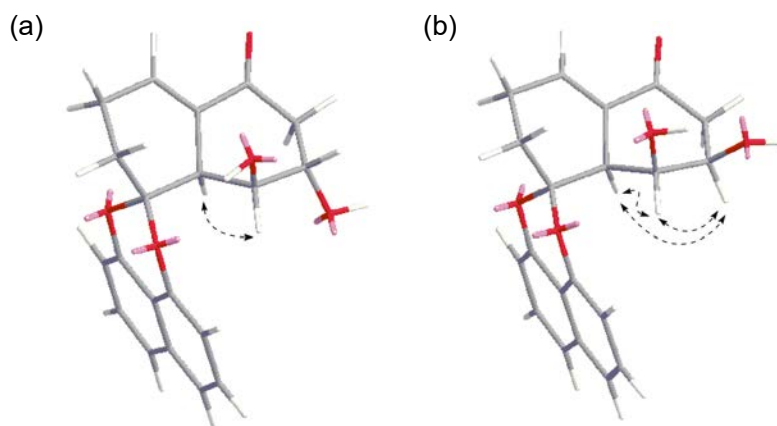
รูปที่ 11 1H - 1H COSY และ HMBC correlation ที่สำคัญของสาร **19**

สำหรับสาร **20** สามารถระบุสูตรโมเลกุลได้เป็น $C_{20}H_{18}O_5$ จากข้อมูล HRESIMS (m/z 339.1236 $[M + Na]^+$, calcd. 339.1232) และพบว่าสาร **20** มีข้อมูล NMR (ตารางที่ 3) คล้ายกับสาร **19** แตกต่างกันเพียงสัญญาณ NMR ของหมู่ methylene ในตำแหน่งที่ 7 ได้หายไปและถูกแทนที่ด้วยสัญญาณของหมู่ methane ที่มี O ต่ออยู่ (δ_H 4.44 s, δ_C 68.0) ซึ่งยืนยันได้จาก correlation ที่พบทั้งในสเปกตรัม 1H - 1H COSY และ HMBC สำหรับ relative configuration ของสาร **20** สามารถระบุได้จากข้อมูล NOESY correlation ซึ่งพบ H-8 แสดง correlation กับ H-8a ขณะที่ทั้งสองโปรตอนนี้ไม่แสดง correlation กับ H-7 ดังแสดงในรูปที่ 12a ซึ่งสรุปได้ว่า H-8 และ H-8a อยู่ด้านเดียวกันและอยู่คนละด้านกับ H-7 ดังนั้นสาร **20** จึงมีโครงสร้างดังแสดงและให้ชื่อว่า rhytidenone C

ตารางที่ 3 ข้อมูล NMR ของสาร 21-23

No.	21 (CDCl ₃)		22 (CDCl ₃)		23 (CDCl ₃)	
	δ_c , type	δ_H (J in Hz)	δ_c , type	δ_H (J in Hz)	δ_c , type	δ_H (J in Hz)
1	102.8, qC		103.5, qC		102.8, qC	
2	27.8, CH ₂	1.71, m 2.28, m	27.7, CH ₂	1.70, ddd (13.6, 8, 1.6) 2.23, m	28.4, CH ₂	1.92, dt (13.6, 6.8) 2.26, dt (13.6, 6)
3	23.0, CH ₂	2.29, m 2.40, m	22.9, CH ₂	2.25, m 2.38, m	22.7, CH ₂	2.43, m
4	137.9, CH	7.13, brm	136.4, CH	7.06, brm	137.1, CH	7.18, brm
4a	131.0, qC		132.8, qC		131.2, qC	
5	196.9, qC		197.2, qC		187.1, qC	
6	43.7, CH	2.78, dd (17, 10) 2.93, dd (18, 6.8)	39.3, CH ₂	2.69, dd (18, 4.8) 2.95, dd (18, 1.6)	131.8, CH	6.24, d (10)
7	69.2, CH	4.09, brm	76.9, CH	3.89, ddd (6.4, 4.4, 2)	146.1, CH	7.07, dd (10, 6)
8	67.5, CH	4.90, s	65.1, CH	4.89, d (3.2)	62.2, CH	4.94, m
8a	43.6, CH	3.03, brs	43.9, CH	3.50, brm	47.3, CH	3.27, brm
1'	147.1, qC		147.3, qC		146.8, qC	
2'	109.8, CH	6.97, d (7.6)	109.9, CH	6.98, d (7.6)	109.7, CH	6.92, d (7.6)
3'	127.7, CH	7.46, t (8.0)	127.7, CH	7.45, t (7.6)	127.6, CH	7.43, t (7.6)
4'	120.7, CH	7.52, d (8.4)	120.6, CH	7.50, d (8.4)	120.7, CH	7.52, d (8.8)
4a'	134.2, qC		134.2, qC		134.2, qC	
5'	121.6, CH	7.55, d (8.4)	121.4, CH	7.55, d (8.4)	121.2, CH	7.50, d (8.8)
6'	127.3, CH	7.43, t (8.0)	127.2, CH	7.42, t (7.6)	127.4, CH	7.43, t (7.6)
7'	109.7, CH	6.94, d (7.6)	109.2, CH	6.92, d (7.6)	109.5, CH	6.97, d (7.6)
8'	145.8, qC		146.0, qC		146.3, qC	
8a'	113.5, qC		113.6, qC		113.5, qC	
7-OMe				3.46, s		
8-OH		3.50, s		3.68, s		3.25, d (3.6)

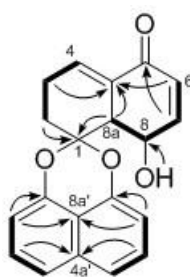
ในส่วนของสาร **21** จากการวิเคราะห์ข้อมูล HRESIMS, 1D และ 2D NMR (ตารางที่ 4) พบว่า สาร **21** มีโครงสร้างเหมือนกับสาร **20** ซึ่งชี้ให้เห็นว่าสารทั้งสองนี้ต้องมี relative configuration บางตำแหน่งแตกต่างกัน เมื่อพิจารณาข้อมูล NOESY correlation ของสาร **21** พบว่า มี correlation ระหว่าง H-8/H-8a, H-7/H-8 และ H-7/H-8a ดังแสดงในรูปที่ 12b ซึ่งแสดงว่าโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่ง 7, 8, และ 8a อยู่ด้านเดียวกันหมด ดังนั้นสาร **21** จึงเป็น C-7 epimer ของสาร **20** และมีโครงสร้างดังแสดง ซึ่งได้ให้ชื่อว่า rhytidenone D



รูปที่ 12 NOESY correlation ที่สำคัญของสาร **20** (a) และ **21** (b)

สาร **22** มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{21}H_{20}O_5$ จากข้อมูล HRESIMS (m/z 375.1204 $[M + Na]^+$, calcd. 375.1208) และพบว่าข้อมูล NMR (ตารางที่ 4) ของสาร **22** คล้ายกับสาร **20** และ **21** มากแตกต่างกันตรงที่มีสัญญาณของหมู่ methoxy เพิ่มขึ้นมาโดยแทนที่หมู่ไฮดรอกซิลในตำแหน่งที่ 7 ซึ่งยืนยันได้จาก HMBC correlation ของโปรตอนของหมู่ methoxy (δ_H 3.46 s) กับ C-7 และพบว่า relative configuration เหมือนกับในกรณีของสาร **21** เพราะพบ correlation ระหว่าง H-8/H-8a, H-7/H-8 และ H-7/H-8a ดังนั้นสาร **22** จึงเป็นอนุพันธ์ 7-OMe ของสาร **21** และมีโครงสร้างดังแสดงและให้ชื่อว่า rhytidenone D

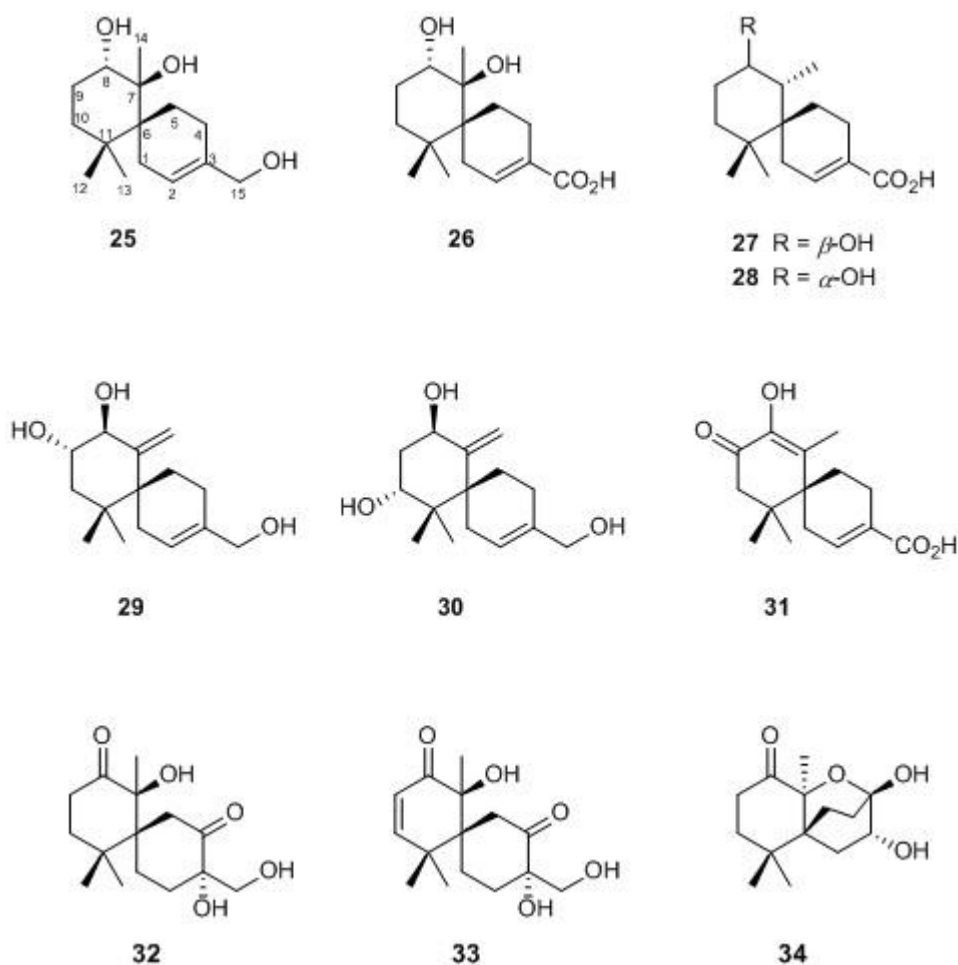
สำหรับสาร **23** จากข้อมูล HRESIMS ที่ m/z 321.1123 $[M + H]^+$ (calcd. 321.1127) พบว่ามีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{20}H_{16}O_4$ ซึ่งมี mass unit น้อยกว่าสาร **21** ซึ่งแสดงว่ามีพันธะคู่เพิ่มอีกหนึ่งพันธะจากการวิเคราะห์ข้อมูล NMR พบว่าโครงสร้างของสาร **21** มีหมู่ α,β -unsaturated ketone 2 หมู่เชื่อมต่อกันด้วยหมู่คีโตนเดียวกัน ดังนั้นด้วยผลของ extended conjugation นี้จึงทำให้หมู่คีโตนมีค่า chemical shift downfield ลงไปถึง δ_C 187.1 ซึ่งโครงสร้างส่วนนี้ยืนยันได้จาก HMBC correlation ระหว่าง H-3/C-4a, H-8a/C-4a, H-6/C-8a และ H-7/C-5 ดังแสดงในรูปที่ 13 และข้อมูล NOESY correlation ซึ่งให้เห็นว่าสาร **23** มี relative configuration เหมือนกับสาร **19-21** ดังนั้นสาร **23** จึงมีโครงสร้างดังแสดงและให้ชื่อว่า rhytidenone E



รูปที่ 13 1H - 1H COSY และ HMBC correlation ที่สำคัญของสาร **23**

1.3. การสกัดแยกและพิสูจน์โครงสร้างของสารที่แยกได้จากกราสายพันธุ์ 8D

จากการนำส่วนสกัดหยาบแอธิลแอซิเททของส่วนน้ำเพาะเลี้ยงของรา 8D ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร SDB ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้จำนวน 10 ชนิด (25-34) และเมื่อพิสูจน์ทราบโครงสร้างของสารที่แยกได้โดยการวิเคราะห์ข้อมูล 1D และ 2D NMR พบว่าสารทั้ง 10 ชนิดเป็นสารชนิดใหม่ที่จัดอยู่ในกลุ่ม sesquiterpene ประเภท chamigrane และมีโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 14



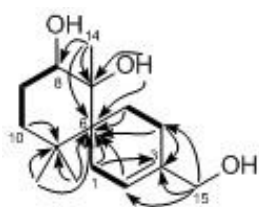
รูปที่ 14 โครงสร้างของสารที่แยกได้จากรา 8D

การพิสูจน์ทราบโครงสร้างของสาร sesquiterpene ประเภท chamigrane ชนิดใหม่ 25-34

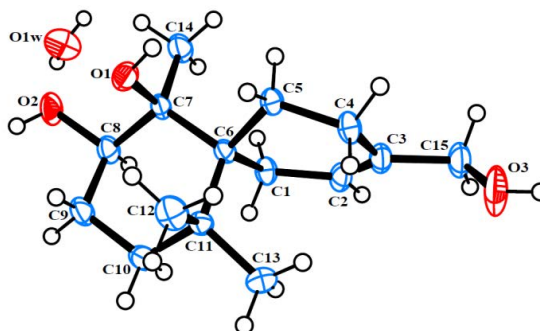
สูตรโมเลกุลของสาร 25 พบว่าเป็น $C_{15}H_{26}O_3$ ซึ่งได้จากข้อมูล HRESIMS ที่ m/z 277.1771 $[M + Na]^+$ ซึ่งชี้ให้เห็นว่ามี DBE เท่ากับ 3 จากการวิเคราะห์ข้อมูล 1H , ^{13}C NMR และ HSQC พบว่ามีหมู่ methylene 6 หมู่ซึ่งหนึ่งหมู่มี O ต่ออยู่, หมู่ methine 1 หมู่ซึ่งมี O ต่ออยู่, มีหมู่ methyl ชนิด quaternary 3 หมู่, มีคาร์บอนชนิด quaternary 3 คาร์บอนซึ่งหนึ่งคาร์บอนมี O ต่ออยู่, พันธะคู่ 1 พันธะ ดังนั้นโครงสร้างจึงเป็นแบบ bicyclic และจากการวิเคราะห์สเปกตรัม 1H - 1H COSY พบว่ามี 3 spin

system ที่แยกกัน คือ C-1—C-2, C-4—C-5 และ C-8—C-10 (รูป 15a) เมื่อพิจารณาข้อมูล HMBC correlation พบว่าหมู่ methyl 2 หมู่ (Me-12 และ Me-13) ต่ออยู่บนคาร์บอนเดียวกัน (C-11) และ C-11 นี้เชื่อมอยู่ระหว่าง C-10 และ C-6 ซึ่งยืนยันได้จาก HMBC correlation ของ H-10, H₃-12 และ H₃-13 กับ C-11 และของ H₃-12 และ H₃-13 กับ C-6 ดังแสดงในรูปที่ 15a นอกจากนี้ยังพบ correlation ของหมู่ methyl ที่เหลืออีกหมู่หนึ่ง (δ_H 1.33) กับ C-8 ซึ่งเป็นหมู่ oxymethine และ C-7 ซึ่งเป็น oxygenated quaternary carbon ซึ่งทำให้สามารถต่อหมู่ methyl นี้ไว้กับ C-7 และเชื่อม C-6 และ C-8 ต่อเข้ากับ C-8 และ HMBC correlation ระหว่าง H₂-1, H-2, H₂-4, H₂-5 กับ C-6 และระหว่าง H₂-1 กับ C-3 ทำให้สามารถกำหนดส่วน C-1—C-2 และ C-4—C-5 ให้อยู่ระหว่าง C-6 และ C-3 ซึ่งเป็นคาร์บอนของพันธะคู่ จึงทำให้โครงสร้างที่เป็น 6,6-bicyclic ring โดยเชื่อมผ่าน C-6 ซึ่งเป็น spiro carbon ส่วนหมู่ oxymethylene ได้ถูกกำหนดให้เป็น C-15 ซึ่งต่ออยู่กับ C-3 เนื่องจากพบ HMBC correlation ระหว่างโปรตอนของหมู่ oxymethylene (δ_H 3.89) กับคาร์บอนของพันธะคู่ทั้ง C-2 และ C-3 สำหรับ relative configuration ของสาร **25** ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูล NOESY ซึ่งพบ correlation ของ H₃-13/H₃-14, H₃-13/H₂-1, และ H₃-14/H₂-1 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโปรตอนเหล่านี้อยู่ด้านเดียวกัน และยังพบ correlation ระหว่าง H₃-12/H₂-5 และ H-8/7-OH ซึ่งโปรตอนเหล่านี้จะอยู่ด้านเดียวกันแต่ตรงข้ามกับโปรตอนในตำแหน่ง 1, 13 และ 14 นอกจากนี้ยังได้ทำการยืนยันโครงสร้างและ relative configuration ของสาร **25** ด้วยเทคนิค single-crystal X-ray diffraction analysis ซึ่ง ORTEP ได้แสดงไว้ในรูปที่ 15b ดังนั้นสาร **25** จึงมีโครงสร้างดังแสดงและให้ชื่อว่า merulinol A

(a)



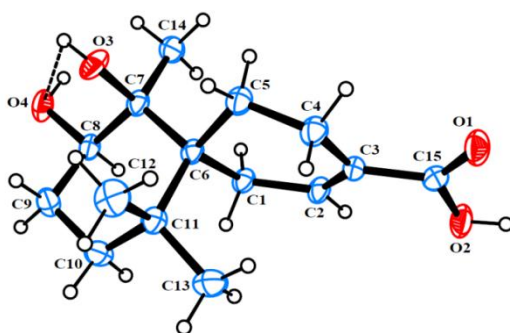
(b)



รูปที่ 15 ^1H - ^1H COSY และ HMBC correlation ที่สำคัญของสาร **25** (a) ORTEP ของสาร **25** (b)

สำหรับสาร **26** พบว่ามีสูตรโมเลกุลเป็น $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_4$ จากข้อมูล HRESIMS (m/z 291.1564 [$\text{M} + \text{Na}$]⁺ ซึ่งแสดงว่ามี DBE เท่ากับ 4 เมื่อพิจารณาข้อมูล NMR (ตารางที่ 4) พบว่าสาร **26** มี ^1H NMR สเปกตรัมคล้ายกับสาร **25** ซึ่งชี้ให้เห็นว่าสารทั้งสองมีลักษณะโครงสร้างใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตาม ได้พบว่าสิ่งที่แตกต่างคือ สัญญาณของหมู่ oxymethylene ในตำแหน่ง C-15 ของสาร **25** ได้หายไป และพบคาร์บอนิลคาร์บอนที่ δ_C 169.3 ขึ้นมาแทนในสาร **26** นอกจากนี้ยังพบว่าสัญญาณโปรตอนของพันธะ

คู่ shift ไปทาง low field ค่อนข้างมากจนถึง δ_H 7.00 ซึ่งในสาร 25 ขึ้นเพียงที่ δ_H 5.61 ซึ่งข้อมูลนี้จึงชี้ว่ามีหมู่คาร์บอกซิลิก conjugate อยู่กับพันธะคู่ในตำแหน่งที่ 3 เกิดเป็นหมู่ α,β -unsaturated carboxylic acid ขึ้นในโครงสร้างของสาร 26 ซึ่งโครงสร้างส่วนนี้สามารถยืนยันได้จาก HMBC correlation ระหว่าง H-2 และ H₂-4 กับ C-15 ส่วน relative configuration ของสาร 26 พบว่าเหมือนกับของสาร 25 นอกจากนี้โครงสร้างและ relative configuration ของสาร 26 ยังได้ยืนยันด้วยเทคนิค single-crystal X-ray diffraction analysis ซึ่ง ORTEP ได้แสดงไว้ในรูปที่ 16 ดังนั้นสาร 26 จึงมีโครงสร้างดังแสดงและให้ชื่อว่า merulinol B

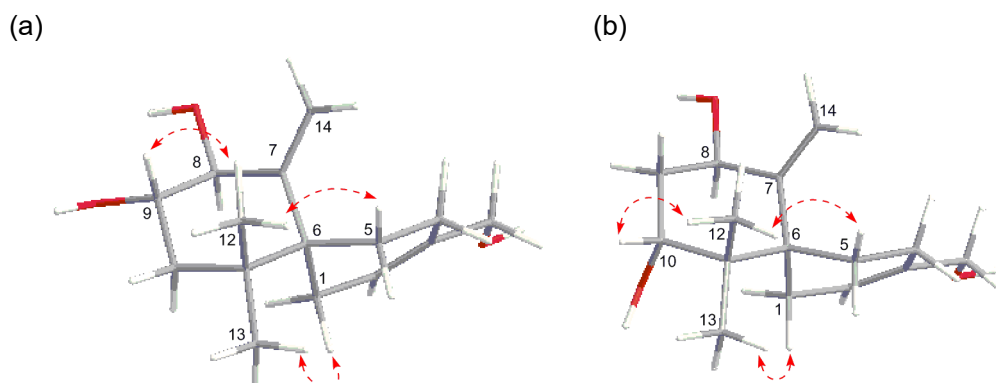


รูปที่ 16 ORTEP ของสาร 26

สาร 27 พบว่ามีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{15}H_{24}O_3$ ซึ่งพิจารณาจากข้อมูล HRESIMS (m/z 275.1612 $[M + Na]^+$) ข้อมูล 1H และ ^{13}C NMR ของสาร 27 (ตารางที่ 4) คล้ายกันกับของสาร 26 สิ่งที่มีความแตกต่างชัดเจนใน 1H NMR สเปกตรัม คือมีสัญญาณหมู่ methyl ที่มีลักษณะเป็น doublet ที่ δ_H 1.01 แทนที่หมู่ methyl ชนิด quaternary หนึ่งตำแหน่ง ซึ่งแสดงว่าหมู่ methyl ต้องต่ออยู่กับคาร์บอนชนิด methine จากการวิเคราะห์ข้อมูล 1H - 1H COSY และ HMBC สามารถระบุได้ว่าหมู่ methyl นี้เป็น C-14 ที่ต่ออยู่กับ C-7 ซึ่งเป็นหมู่ methine ในกรณีของสาร 27 นี้ เนื่องจากพบ correlation ระหว่าง H₃-14 กับ H-7 และพบ HMBC correlation ระหว่าง H₃-14 กับ C-6, C-7 และ C-8 จากการวิเคราะห์ข้อมูล NOESY พบว่าสาร 27 มี relative configuration เหมือนกับสาร 25-26 และการมี correlation ระหว่าง H₃-14 กับ H-8 แต่ไม่พบ correlation ระหว่าง H-7 กับ H-8 ทำให้ระบุได้ว่า 8-OH มี orientation แบบ β ดังแสดงในรูปที่ 17a ดังนั้นสาร 27 จึงมีโครงสร้างดังแสดงและให้ชื่อว่า merulinol C

สำหรับสาร 28 พบว่ามีสูตรโมเลกุลเดียวกันกับสาร 27 และยังมีข้อมูล NMR ที่คล้ายกันมาก และเมื่อวิเคราะห์ข้อมูล 1D และ 2D NMR พบว่าสาร 27 และ 28 มีโครงสร้างแบบเดียวกัน ดังนั้นสารสองชนิดนี้จะแตกต่างกันที่ configuration ของคาร์บอนบางตำแหน่ง จาก NOESY สเปกตรัม พบว่าสารทั้งสองมี relative configuration เหมือนกันทุกตำแหน่ง ยกเว้นในตำแหน่งที่ 8 ซึ่งพบ correlation ระหว่าง H-7 และ H-8 จึงระบุได้ว่า 8-OH มี orientation แบบ α (รูปที่ 17b) ซึ่งตรงข้ามกับในสาร 27 นอกจากนี้ยังสามารถดูได้จากเครื่องหมายของค่า specific rotation ที่ตรงข้ามกันของสารทั้งสองเพราะ

สาร **27** มีค่า $[\alpha]_D^{20}$ เป็น +6.4 ขณะที่ค่าของสาร **28** เป็น -47.2 ดังนั้นสาร **28** จึงมีโครงสร้างดังแสดง และให้ชื่อว่า merulinol D



รูปที่ 17 NOESY correlation ของสาร **27** (a) และสาร **28** (b)

ตารางที่ 4 ข้อมูล NMR ของสาร **25-27**

No.	25 (acetone-d ₆)		26 (acetone-d ₆)		27 (CDCl ₃)	
	δ_C , type	δ_H (J in Hz)	δ_C , type	δ_H (J in Hz)	δ_C , type	δ_H (J in Hz)
1	29.2, CH ₂	2.19, brd (20) 2.34, brd (20)	28.0, CH ₂	2.13, m 2.33, m	26.9, CH ₂	2.17, m 2.40, m
2	124.0, CH	5.16, brs	141.7, CH	7.00, brs	142.7, CH	7.12, brs
3	137.7, qC		130.8, qC		129.1, qC	
4	25.1, CH ₂	1.89, m	24.1, CH ₂	2.32, m	22.6, CH ₂	2.27, m 2.35, m
5	25.8, CH ₂	2.05, m	24.2, CH ₂	1.83, m 2.02, m	27.5, CH ₂	1.50, m 1.82, m
6	44.3, qC		44.7, qC		39.5, qC	
7	78.3, qC		79.3, qC		36.8, CH	1.95, m
8	76.9, CH	3.56, brs	73.1, CH	3.47, dd (12, 4)	70.8, CH	3.91, dd (12, 6.8)
9	26.9, CH ₂	1.38, dq (12, 4) 2.10, m	28.0, CH ₂	1.52, dq (12, 3.2) 1.79, m	27.7, CH ₂	1.63, m
10	34.7, CH ₂	1.00, m 1.86, m	37.6, CH ₂	1.13, dt (14, 3.2) 1.63, td (14, 3.6)	35.6, CH ₂	1.48, m
11	38.3, qC		38.2, qC		36.6, qC	
12	30.5, CH ₃	0.85, s	30.4, CH ₃	0.76, s	25.7, CH ₃	0.84, s
13	26.3, CH ₃	1.17, s	25.1, CH ₃	1.22, s	26.3, CH ₃	0.95, s
14	25.2, CH ₃	1.33, s	23.9, CH ₃	1.26, s	11.4, CH ₃	0.98, s
15	66.9, CH ₂	3.89, brs	168.3, qC		171.4, qC	
7-OH		3.08, s				

สาร **29** มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{15}H_{24}O_3$ จากข้อมูล HRESIMS ที่ m/z 275.1622 $[M + Na]^+$ ซึ่งข้อมูล NMR ยังแสดงสัญญาณที่เป็นลักษณะเฉพาะของ chamigrane จากการวิเคราะห์ข้อมูล NMR พบว่าคล้ายกับสาร **25** โดยแตกต่างกันที่สัญญาณของหมู่ methyl หายไปหนึ่งหมู่ แต่มีสัญญาณของหมู่ exomethylene ขึ้นมาแทนที่ที่ δ_H 4.78 และ 5.39 และหมู่ methine ที่ δ_H 3.45 HMBC correlation แสดงให้เห็นว่ามีหมู่ exomethylene อยู่ในตำแหน่ง C-14 แทนหมู่ methyl จาก correlation ระหว่าง H_2 -14 กับ C-6, C-7 และ C-8 ขณะที่หมู่ methane ที่เพิ่มขึ้นถูกกำหนดให้อยู่ในตำแหน่ง C-9 เนื่องจาก correlation ใน 1H - 1H COSY สเปกตรัมกับ H-8 และ H-10 นอกจากนี้ NOESY correlation ยังแสดงให้เห็นว่าสาร **29** มี relative configuration เหมือนกับสาร **25** สำหรับ configuration ของตำแหน่ง C-9 พบว่าเป็นแบบ 9 β -OH เพราะ H-8 และ H-9 ให้ค่า coupling constant สูงถึง 9.6 ซึ่งแสดงว่าเป็น *trans* diaxial ซึ่งกันและกัน ดังนั้นสาร **29** จึงมีโครงสร้างดังแสดงและให้ชื่อว่า merulinol E

ตารางที่ 5 ข้อมูล NMR ของสาร **28-30**

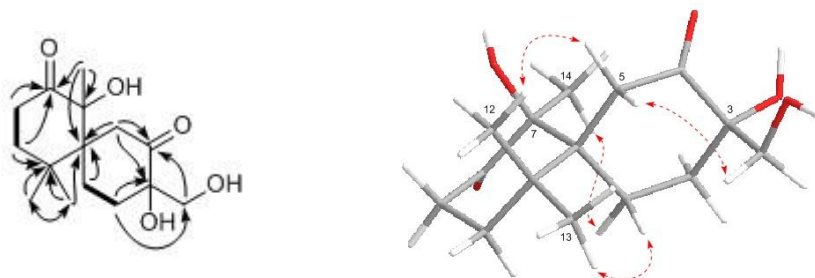
No.	28 (CDCl ₃)		29 (CDCl ₃)		30 (acetone-d ₆)	
	δ_C , type	δ_H (J in Hz)	δ_C , type	δ_H (J in Hz)	δ_C , type	δ_H (J in Hz)
1	29.9, CH ₂	2.17, m 2.40, m	29.5, CH ₂	2.05, m 2.15, m	30.7, CH ₂	1.93, m 2.20, d (16.8)
2	142.7, CH	7.12, brs	121.9, CH	5.63, brs	120.5, CH	5.58, brs
3	129.1, qC		136.7, qC		139.4, qC	
4	22.6, CH ₂	2.27, m 2.35, m	23.6, CH ₂	1.72, m 1.97, m	24.7, CH ₂	1.44, td (12, 6.8) 1.87, m
5	27.5, CH ₂	1.50, m 1.82, m	26.8, CH ₂	1.52, td (12.8, 4.4) 1.90, m	27.7, CH ₂	2.39, dq (12, 2.8)
6	39.5, qC		45.7, qC		46.2, qC	
7	36.8, CH	1.95, m	147.1, qC		150.4, qC	
8	70.8, CH	3.91, dd (12, 6.8)	74.5, CH	4.08, d (9.6)	75.3, CH	1.64, td (12.4, 4)
9	27.7, CH ₂	1.63, m	73.3, CH	3.45, m	39.7, CH ₂	1.90, m
10	35.6, CH ₂	1.48, m	43.2, CH ₂	1.57, dd (13.2, 5.2) 1.80, m	68.9, CH	4.16, dd (12, 4)
11	36.6, qC		37.5, qC		42.8, qC	
12	25.7, CH ₃	0.84, s	24.1, CH ₃	0.83, s	15.3, CH ₃	0.67, s
13	26.3, CH ₃	0.95, s	24.7, CH ₃	0.92, s	20.8, CH ₃	1.00, s
14	11.4, CH ₃	0.98, d (6.8)	109.7, CH ₂	4.78, s 5.39, s	115.4, CH ₂	4.36, dd (1.6) 4.79, dd (1.6)
15	171.4, qC		67.2, CH ₂	3.93, brs	66.5, CH ₂	3.82, brs

สำหรับสาร **30** จากข้อมูล HRESIMS พบว่ามีสูตรโมเลกุลเดียวกับสาร **29** คือ $C_{15}H_{24}O_3$ และข้อมูล 1H , ^{13}C และ HSQC ยังแสดงให้เห็นว่าโครงสร้างประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันที่เหมือนกันทั้งหมด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารทั้งสองน่าจะเป็น diastereomer กัน ซึ่งสามารถบอกความแตกต่างของโครงสร้างได้

จากการพิจารณา ^1H - ^1H COSY สเปกตรัม พบว่าหมู่ oxymethine ซึ่งเดิมเคยอยู่ในตำแหน่ง C-9 จะอยู่ในตำแหน่ง C-10 สำหรับในกรณีของสาร **30** ซึ่งสามารถยืนยันได้จาก HMBC correlation ระหว่าง H_3 -12 และ H_3 -13 กับ C-10 และ configuration ของ 10-OH ได้ถูกระบุว่าเป็นแบบ α จาก NOE cross-peak ระหว่าง H-10 กับ H_2 -5 ดังนั้นสาร **30** จึงมีโครงสร้างดังแสดงและให้ชื่อว่า merulinol F

ในกรณีของสาร **31** พบว่ามีสูตรโมเลกุลเป็น $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4$ จากข้อมูล HRESIMS จากการวิเคราะห์ข้อมูล 1D และ 2D พบว่าวงด้านขวายังคงมีโครงสร้างเหมือนกับสาร **26** ดังนั้นจึงมีความแตกต่างกันตรงโครงสร้างของวงด้านซ้ายซึ่งจากข้อมูล NMR พบว่ามีหมู่คีโตน (δ_{C} 198.3) และพันธะคู่ชนิด tetrasubstituted 1 พันธะซึ่งพันธะคู่นี้ได้ถูกหนดให้เป็นตำแหน่ง C-7 และ C-8 จาก HMBC correlation ระหว่าง H_3 -14 กับคาร์บอนทั้งสองของพันธะคู่และจากค่า chemical shift ที่ δ_{C} 135.9 ของ C-8 ซึ่งแสดงว่ามีหมู่ไฮดรอกซิลติดอยู่บน C-8 ขณะที่หมู่คีโตนได้กำหนดให้เป็น C-9 เนื่องจากมี HMBC correlation กับ H_2 -11 และจากค่า chemical shift ของหมู่คีโตนที่ δ_{C} 198.3 จึงยืนยันได้ว่าหมู่คีโตนติดอยู่กับพันธะคู่และได้โครงสร้างส่วนนี้เป็น α,β -unsaturated ketone และจากการวิเคราะห์ข้อมูล NOESY พบว่าสาร **31** มี relative configuration ของ C-6 เหมือนกับสารก่อนหน้านี้ ดังนั้นสาร **31** จึงมีโครงสร้างดังแสดงและให้ชื่อว่า merulinol G

สาร **32** จากข้อมูล HRESIMS พบว่ามีสูตรโมเลกุลเป็น $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_5$ และจากข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR (ตารางที่ 6) พบว่ายังเป็นสารกลุ่ม sesquiterpene ประเภท chamigrane แต่มีความแตกต่างจากสารก่อนหน้านี้ค่อนข้างมาก ซึ่งจากข้อมูล NMR พบว่ามีหมู่คีโตน 2 หมู่, หมู่ quaternary methyl 3 หมู่, หมู่ methylene 5 หมู่, หมู่ oxymethylene 1 หมู่, quaternary carbon 4 คาร์บอนซึ่งเป็นชนิดที่ติดกับ O 2 คาร์บอน และจากข้อมูล ^1H - ^1H COSY พบ spin system ที่แยกกัน 2 ส่วนคือ C-9—C-10 และ C-1—C-2 นอกจากนี้ จาก HMBC correlation (รูปที่ 18) พบว่าสาร **32** มีโครงสร้างหลักเหมือนกับสาร **25** โดยยังมีหมู่ oxymethylene ในตำแหน่ง C-15 แต่ไม่มีพันธะคู่ในโครงสร้าง หมู่คีโตนที่ δ_{C} 215.8 ถูกระบุเป็น C-4 จาก HMBC cross-peak ของ H_2 -5 และ H_2 -15 กับหมู่คาร์บอนนี้ และหมู่คีโตนอีกหนึ่งหมู่ที่ δ_{C} 213.8 ได้ถูกกำหนดเป็น C-8 จาก correlation ระหว่างคาร์บอนิลของหมู่คีโตนกับ H_3 -14, H_2 -9 และ H_2 -8 และกำหนดให้ oxygenated carbon ที่ δ_{C} 75.9 อยู่ที่ตำแหน่ง C-3 จาก HMBC correlation ระหว่าง H_2 -2 และ H_2 -5 กับ C-3 สำหรับ relative configuration ที่ตำแหน่ง C-8, C-6 และ C-3 สามารถกำหนดได้จาก NOESY correlation ระหว่าง H_3 -14/ H_2 -1, H_3 -13/ H_2 -1, H_3 -12/ H_2 -5 และ H_2 -5/ H_2 -15 ดังนั้นสาร **32** จึงมีโครงสร้างและ relative configuration ดังแสดงและให้ชื่อว่า merulinol F



รูปที่ 18 ^1H - ^1H COSY และ HMBC correlation (a) และ NOESY correlation (b) ของสาร **32**

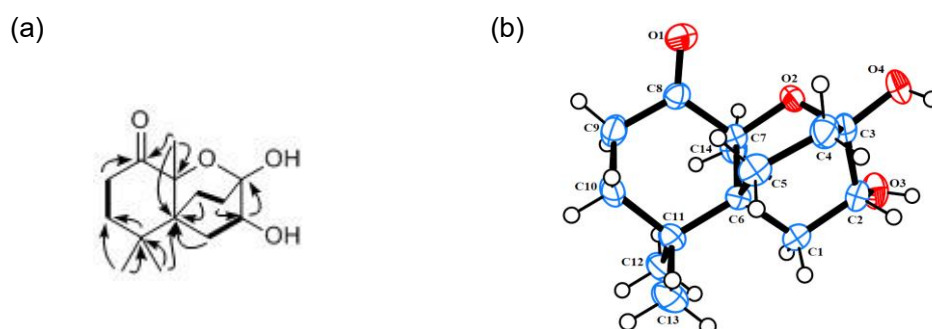
ตารางที่ 6 ข้อมูล NMR ของสาร 31-33

No.	31 (CDCl ₃)		32 (CDCl ₃)		33 (CDCl ₃)	
	δ_C , type	δ_H (J in Hz)	δ_C , type	δ_H (J in Hz)	δ_C , type	δ_H (J in Hz)
1	30.1, CH ₂	2.43, dd (20) 2.27, dd (20)	23.5, CH ₂	1.54, m 1.08, m	23.9, CH ₂	1.67, m 2.04, m
2	142.4, CH	7.26, brs	33.3, CH ₂	1.76, m 2.24, m	34.5, CH ₂	1.80, m 2.15, m
3	130.6, qC	2.10, m	75.9, qC		77.5, qC	
4	22.3, CH ₂	2.58, d (18) 1.88, m	215.8, qC		213.7, qC	
5	30.7, CH ₂		38.9, CH ₂	2.70, d (14.4) 2.79, d (14.4)	37.8, CH ₂	2.83, d (14.4) 2.95, d (14.4)
6	43.0, qC		55.2, qC		53.1, qC	
7	143.8, qC		81.8, qC		79.1, qC	
8	135.9, qC		213.8, qC		202.2, qC	
9	192.3, qC		33.7, CH ₂	2.41, m 2.74, m	122.1, CH	5.99, d (10)
10	47.1, CH ₂	2.22, d (18) 2.78, d (18)	36.5, CH ₂	1.61, m 1.91, m	157.9, CH	6.93, d (10)
11	40.8, qC		39.0, qC		42.9, qC	
12	23.8, CH ₃	1.01, s	28.6, CH ₃	1.00, s	29.3, CH ₃	1.16, s
13	24.8, CH ₃	1.05, s	25.0, CH ₃	1.28, s	24.4, CH ₃	1.34, s
14	15.1, CH ₃	1.85, s	25.4, CH ₃	1.42, s	26.5, CH ₃	1.38, s
15	170.9, qC		67.1, CH ₂	3.48, d (11.6) 3.85, d (11.6)	67.0, CH ₂	3.60, d (11.6) 4.10, d (11.6)
7-OH				4.15, brs		3.86, brs

สาร 33 จากข้อมูล HRESIMS พบว่ามีสูตรโมเลกุลเป็น C₁₅H₂₂O₅ และมี ¹H และ ¹³C NMR สเปกตรัมคล้ายกับสาร 32 (ตารางที่ 6) ต่างกันตรงที่ในสเปกตรัมของสาร 33 พบสัญญาณโปรตอนของพันธะคู่ชนิด disubstituted ซึ่งมีลักษณะเป็น doublet ที่ δ_H 5.99 และ 6.93 ($J = 10$ Hz) ซึ่งเมื่อพิจารณาข้อมูล ¹³C NMR และ HSQC พบว่าสาร 33 ประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันต่างๆ เหมือนกับของสาร 33 ยกเว้นมีพันธะคู่ 1 คู่ขึ้นมาแทนที่หมู่ methylene 2 หมู่ที่เคยอยู่ในตำแหน่ง C-9 และ C-10 ซึ่งโครงสร้างส่วนนี้ยืนยันได้จาก HMBC correlation ของ H-9/C-8 และ H-10/C-8 และจากข้อมูล NOESY ยังพบว่าสาร 32 และ 33 มี configuration ที่เหมือนกันอีกด้วย

สาร 34 จากข้อมูล HRESIMS พบว่ามีสูตรโมเลกุลเป็น C₁₄H₂₂O₄ ข้อมูล ¹H, ¹³C NMR และ HSQC ชี้ให้เห็นว่าโครงสร้างของสาร 34 ประกอบด้วยหมู่ quaternary methyl 3 หมู่, หมู่ methylene 5 หมู่, หมู่ oxymethine 1 หมู่, quaternary carbon 3 หมู่ซึ่งหมู่หนึ่งมี O ต่ออยู่, หมู่คีโตน 1 หมู่ และที่แตกต่างจากสารอื่นอย่างชัดเจนคือการมี hemiacetal carbon ที่ δ_C 95.4 และจากสูตรโมเลกุลข้างต้นซึ่ง

ชี้ให้เห็นว่าสาร **34** มี DBE เท่ากับ 4 ดังนั้นการมีคีโตนเพียง 1 หมู่ ทำให้ทราบว่าโครงสร้างของสาร **34** เป็นแบบ tricyclic ซึ่งจากข้อมูล ^1H - ^1H COSY พบ spin system ที่แยกกัน 3 ส่วนคือ C-1—C-2, C-4—C-5 และ C-9—C-10 ซึ่งจาก HMBC correlation พบว่ามีโครงสร้างของวงด้านซ้ายเหมือนกับสาร **32** คือมีหมู่คีโตนในตำแหน่งที่ 8 ขณะที่ correlation ของ H-2/C-6, H₂-1/C-6, H₂-4/C-6, H₂-4/C-2 และ H₂-4/C-3 ทำให้สามารถสร้างวงด้านซ้ายดังแสดงได้ และการสร้าง O bridge ระหว่าง C-3 และ C-7 มาจากการพิจารณาค่า chemical shift ที่ δ_{C} 95.4 ของ C-3 และความสอดคล้องกับสูตรโมเลกุลที่ได้ นอกจากนี้โครงสร้างของสาร **34** ยังได้ทำการยืนยันได้โดยอาศัยเทคนิค single-crystal X-ray diffraction analysis รวมทั้ง relative configuration ด้วย ซึ่ง ORTEP ได้แสดงดังในรูปที่ 19



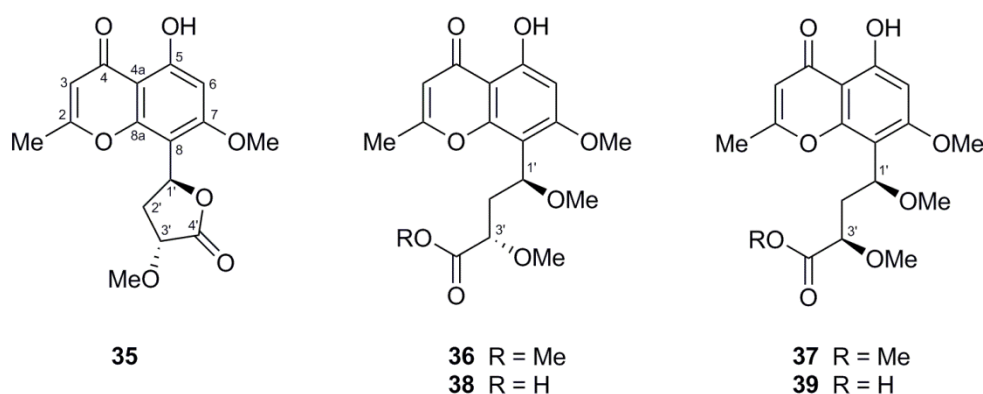
รูปที่ 19 ^1H - ^1H COSY และ HMBC correlation (a) และ ORTEP diagram (b) ของสาร **32**

ตารางที่ 7 ข้อมูล NMR ของสาร **34**

No.	34 (CDCl_3)	
	δ_{C} , type	δ_{H} (J in Hz)
1	32.4, CH_2	1.99, m 2.11, dt (10, 6.2)
2	69.4, CH	3.85, dd (10, 4.8)
3	95.4, qC	
4	29.5, CH_2	1.66, m 1.94, m
5	25.7, CH_2	1.64, m 1.70, m
6	43.5, qC	
7	86.0, qC	
8	212.0, qC	
9	35.1, CH_2	2.31, m 2.75, m
10	37.3, CH_2	1.61, m 1.92, m
11	37.1, qC	
12	27.3, CH_3	0.94, s
13	25.1, CH_3	1.24, s
14	25.8, CH_3	1.68, s

1.4. การสกัดแยกและพิสูจน์โครงสร้างของสารที่แยกได้จากราสายพันธุ์ KP1

จากการนำส่วนสกัดหยาบแอซิลแอซิเททของส่วนน้ำเพาะเลี้ยงของรา KP1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร SDB ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้จำนวน 5 ชนิด (**35-39**) และเมื่อพิสูจน์ทราบโครงสร้างของสารที่แยกได้โดยการวิเคราะห์ข้อมูล 1D และ 2D NMR พบว่าสารทั้ง 5 ชนิดเป็นสารชนิดใหม่ที่จัดอยู่ในกลุ่ม chromone ที่หายากเนื่องจากประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันที่มี O อยู่เกือบทั้งโครงสร้างจึงจัดเป็นประเภท highly oxygenated chromone และมีโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 20

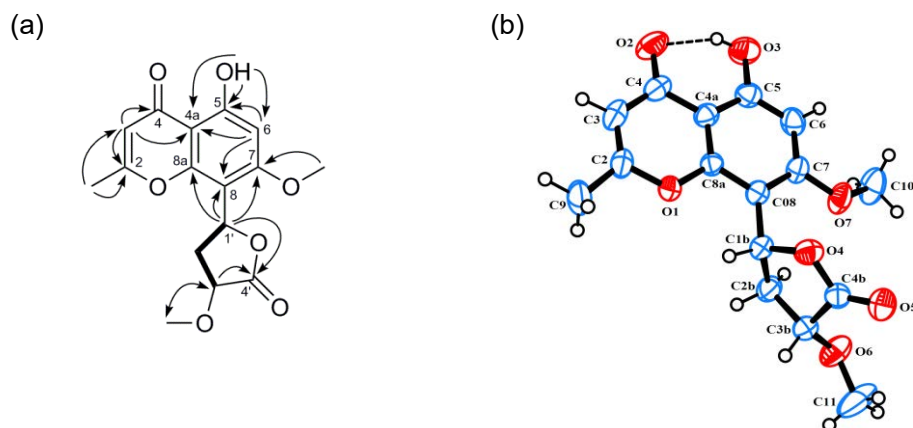


รูปที่ 20 โครงสร้างของสาร **35-39** ที่แยกได้จากรา KP1

การพิสูจน์ทราบโครงสร้างของสาร highly oxygenated chromone ชนิดใหม่ **35-39**

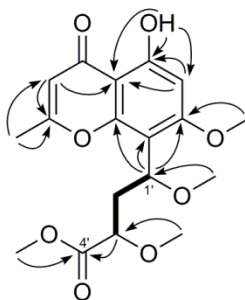
สาร **35** จากข้อมูล HRESIMS พบว่ามีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{16}H_{16}O_7$ จึงมี DBE เท่ากับ 9 จากข้อมูล 1H NMR (ตารางที่ 8) พบการปรากฏของสัญญาณของ phenolic proton ที่เกิด H-bonding กับหมู่คาร์บอนิล (δ_H 13.04), aromatic proton 1 โปรตอนซึ่งชี้ให้เห็นว่าเป็น pentasubstituted aromatic ring, olefinic proton 1 โปรตอนซึ่งแสดงว่าเป็นพันธะคู่แบบ trisubstituted, โปรตอนของหมู่ methoxy 2 หมู่, โปรตอนของหมู่ quaternary methyl 1 หมู่ และจากข้อมูล ^{13}C NMR และ HSQC พบว่าโครงสร้างประกอบด้วยหมู่ conjugated ketone (δ_C 182.5), ester carbonyl 1 คาร์บอน (δ_C 174.9), quaternary carbon 6 คาร์บอน, หมู่ methine 4 หมู่, หมู่ methoxy 2 หมู่, หมู่ methylene 1 หมู่ และหมู่ methyl 1 หมู่ นอกจากนี้พบการดูดกลืนแสง UV ที่ 237, 255, 290 และ 319 ซึ่งจากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสาร **35** เป็นอนุพันธ์ chromone และจากข้อมูล DBE และหมู่ฟังก์ชันที่พบ โครงสร้างของ **35** ยังต้องมีอีกหนึ่งวงนอกเหนือจาก chromone nucleus ซึ่งจาก 1H - 1H COSY พบ spin system เพียงหน่วยเดียวในส่วนที่ไม่ใช่ chromone คือ $CH-1'-CH_2-2'-CH-3'$ และจาก HMBC พบ correlation ระหว่าง $H-1'$ และ $H-1'$ กับ ester carbonyl δ_C 174.9 จึงสรุปได้ว่ามีโครงสร้างส่วนที่เป็น γ -lactone ring ซึ่งวง lactone นี้ได้ถูกต่อเข้ากับ C-8 ของ chromone nucleus จาก HMBC correlation ของ $H-1'$ กับ C-7, C-8 และ C-8a ดังแสดงในรูปที่ 21 สำหรับการมีหมู่ methyl ต่อกับ C-2 และหมู่ methoxy ต่อกับ C-7

และ C-3' นั้นยืนยันได้จาก HMBC correlation เช่นกัน นอกจากนี้ยังได้ทำการยืนยันโครงสร้างและระบุ relative configuration ของสาร **35** ด้วยเทคนิค single-crystal X-ray diffraction analysis ซึ่ง ORTEP ได้แสดงไว้ในรูปที่ 21b ดังนั้นสาร **35** จึงมีโครงสร้างดังแสดงและให้ชื่อว่า rhytidchromone A



รูปที่ 21 ^1H - ^1H COSY และ HMBC correlation (a) และ ORTEP diagram (b) ของสาร **35**

สาร **36** จากข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR (ตารางที่ 8) พบว่าเป็นอนุพันธ์ของสาร **35** เนื่องจากมีความใกล้เคียงกัน และจากข้อมูล HRESIMS พบว่ามีสูตรโมเลกุลเป็น $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_8$ ซึ่ง DBE เท่ากับ 8 ซึ่งสอดคล้องกับโครงสร้างของ chromone และการมีหมู่ ester 1 หมู่ ดังนั้นสาร **36** จึงเป็นอนุพันธ์ที่ไม่ได้มี side chain เป็นแบบปิดวงเหมือนในสาร **35** นอกจากนี้ข้อมูล NMR ยังได้แสดงให้เห็นว่าสาร **36** มีหมู่ methoxy เพิ่มขึ้นอีก 2 หมู่ ซึ่งได้ต่อเข้ากับ C-1' หนึ่งหมู่เนื่องจากพบ correlation ระหว่างโปรตอนของหมู่ methoxy นี้กับ C-1' ใน HMBC สเปกตรัม นอกจากนี้ยังพบของหมู่ methoxy อีกหนึ่งหมู่กับ ester carbon ที่ δ_{C} 172.8 จึงสรุปได้ว่าเป็นหมู่ methyl ester ที่ตำแหน่ง C-4' (รูปที่ 22) สำหรับ relative configuration ของ C-1' และ C-3' พบว่าหมู่ methoxy ทั้งสองอยู่คนละด้านกัน เนื่องจากไม่พบ NOE correlation ของกันและกัน ดังนั้นสาร **36** จึงมีโครงสร้างดังแสดงและให้ชื่อว่า rhytidchromone B



รูปที่ 22 ^1H - ^1H COSY และ HMBC correlation ของสาร **36**

ตารางที่ 8 ข้อมูล NMR ของสาร 35-37

No.	35 (CDCl ₃)		36 (CDCl ₃)		37 (CDCl ₃)	
	δ_c , type	δ_H (J in Hz)	δ_c , type	δ_H (J in Hz)	δ_c , type	δ_H (J in Hz)
2	167.1, qC		166.9, qC		166.9, qC	
3	108.7, qC	6.04, s	108.4, qC	6.05, s	108.4, qC	6.04, s
4	182.5, qC		182.9, qC		182.9, qC	
4a	104.9, qC		105.3, qC		105.8, qC	
5	163.4, qC		162.5, qC		162.3, qC	
6	95.2, CH	6.36, s	95.3, CH	6.40, s	95.3, CH	6.38, s
7	162.9, qC		164.1, qC		164.0, qC	
8	103.4, qC		104.8, qC		104.7, qC	
8a	155.7, qC		156.1, qC		155.9, qC	
1'	69.2, CH	6.00, dd (7.2, 9.6)	70.6, CH	5.10, t (7.2)	70.2, CH	5.09, dd (3.9, 9.9)
2'	33.6, CH ₂	2.55, ddd (7.2, 10, 12.8)	36.9, CH ₂	2.30, m	37.4, CH ₂	1.97, ddd (3.9, 9.7, 14)
		2.86, ddd (7.2, 9.6, 12.8)		2.60, dt (7.2, 14)		2.70, ddd (3.7, 9.9, 14)
3'	76.1, CH	4.29, t (10)	78.2, CH	3.63, dd (4.8, 12.8)	77.9, CH	4.06, dd (3.7, 9.7)
4'	174.9, qC		172.8, qC		173.3, qC	
2-Me	20.4, CH ₃	2.35, s	20.5, CH ₃	2.38, s	20.5, CH ₃	2.38, s
5-OH		13.04, brs		13.01, brs		13.03, brs
7-OMe	56.3, CH ₃	3.89, s	56.2, CH ₃	3.90, s	56.2, CH ₃	3.89, s
1'-OMe			56.7, CH ₃	3.17, s	56.6, CH ₃	3.19, s
3'-OMe	58.6, CH ₃	3.64, s	58.1, CH ₃	3.29, s	58.4, CH ₃	3.43, s
4'-OMe			51.8, CH ₃	3.73, s	51.8, CH ₃	3.71, s

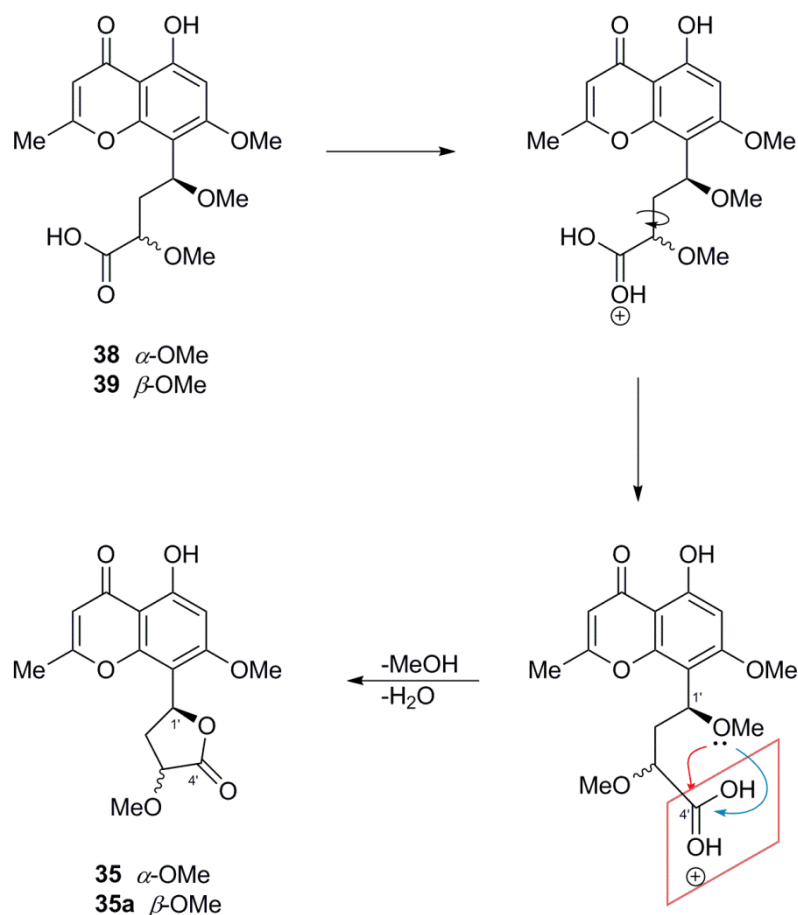
ในกรณีของสาร **37** จากข้อมูล HRESIMS และการวิเคราะห์ข้อมูล 1D และ 2D NMR (ตารางที่ 8) พบว่ามีโครงสร้างแบบ planar เป็นแบบเดียวกันกับสาร **36** ดังนั้นสารทั้งสองจึงต่างกันที่ configuration บางตำแหน่ง และเมื่อพิจารณาข้อมูล NOESY พบว่ามี configuration ของ 3'-OMe อยู่ตรงกันข้ามกัน เพราะในกรณีนี้พบ correlation ระหว่าง 3'-OMe กับ 1'-OMe ซึ่งไม่พบในกรณีของสาร **36** ดังนั้นสาร **37** จึงมีโครงสร้างดังแสดงและให้ชื่อว่า rhytidchromone C

นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ข้อมูล HRESIMS และ NMR (ตารางที่ 9) ทั้ง 1D และ 2D พบว่าสาร **38** และ **39** มีโครงสร้างแบบ planar เหมือนกัน และสารทั้งสองเป็นอนุพันธ์ carboxylic acid ของสาร **36** และ **37** ตามลำดับ สารทั้งสองจึงมีโครงสร้างและ relative configuration ดังแสดงและให้ชื่อว่า rhytidchromone D และ E ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ได้มีการพบว่าเมื่อทั้งสองนี้ไว้ในตัวทำละลาย CDCl₃ เป็นเวลา 2-3 วันสารทั้งสองจะเปลี่ยนเป็นของผสมระหว่างสาร **35** และ C-3' epimer ของมัน จึงได้มีการเสนอกลไกของการเปลี่ยนแปลงนี้ว่ามาจากความเป็นกรดของตัวทำละลาย CDCl₃ ที่ไป activate หมู่คาร์บอนิลของ carboxylic acid แล้วตามด้วยการเกิด nucleophilic attack จากหมู่ 3'-

OMe จากทั้งด้าน re- และ si- ของหมู่คาร์บอนิลจึงเกิดเป็นของผสมระหว่าง **35** และ **35a** ดังแสดงในแผนภาพที่ 8

ตารางที่ 9 ข้อมูล NMR ของสาร **38-39**

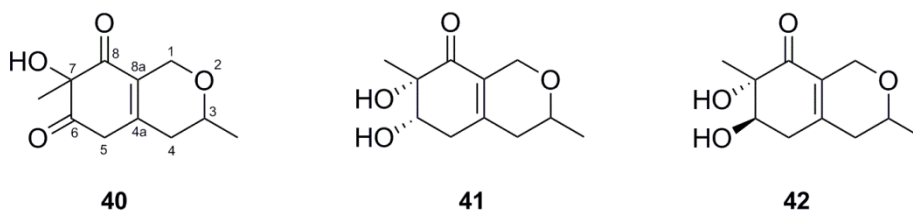
No.	38 (CDCl ₃)		39 (CDCl ₃)	
	δ_C , type	δ_H (J in Hz)	δ_C , type	δ_H (J in Hz)
2	167.1, qC		167.0, qC	
3	108.4, qC	6.05, s	108.4, qC	6.05, s
4	182.8, qC		182.8, qC	
4a	105.1, qC		105.2, qC	
5	162.5, qC		162.5, qC	
6	95.3, CH	6.39, s	95.3, CH	6.37, s
7	164.0, qC		163.9, qC	
8	104.8, qC		104.8, qC	
8a	156.1, qC		156.0, qC	
1'	70.6, CH	5.16, t (6.8)	70.6, CH	5.10, dd (4, 10)
2'	36.0, CH ₂	2.30, m	37.0, CH ₂	2.00, ddd (4, 8.4, 14)
		2.64, brm		2.78, ddd (4, 10, 14)
3'	78.2, CH	3.68, brs	77.8, CH	4.05, dd (4, 8.4)
4'	175.0, qC		175.0, qC	
2-Me	20.5, CH ₃	2.38, s	20.5, CH ₃	2.38, s
5-OH		13.05, brs		13.04, brs
7-OMe	56.2, CH ₃	3.89, s	56.2, CH ₃	3.88, s
1'-OMe	56.6, CH ₃	3.18, s	56.5, CH ₃	3.20, s
3'-OMe	58.1, CH ₃	3.34, s	58.7, CH ₃	3.48, s



แผนภาพที่ 8 กลไกการเกิดปฏิกิริยาในการเปลี่ยนสาร 38 และ 39 ไปเป็นของผสมของสาร 35 และ 35a

1.5. การสกัดแยกและพิสูจน์โครงสร้างของสารที่แยกได้จากสายพันธุ์ KP2

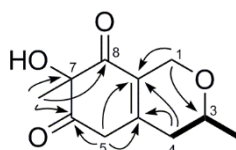
จากการนำส่วนสกัดหยาบแอซิลแอซิเททของส่วนน้ำเพาะเลี้ยงของรา KP2 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร YEB ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้จำนวน 3 ชนิด (40-42) และเมื่อพิสูจน์ทราบโครงสร้างของสารที่แยกได้โดยการวิเคราะห์ข้อมูล 1D และ 2D NMR พบว่าสารทั้ง 3 ชนิดเป็นสารชนิดใหม่ที่จัดอยู่ในกลุ่ม isochromene และมีโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 23



รูปที่ 23 โครงสร้างของสาร 40-42 ที่แยกได้จากรา KP2

การพิสูจน์ทราบโครงสร้างของสาร isocoumarin ชนิดใหม่ 40-42

สาร **40** พบว่ามีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{11}H_{14}O_4$ จากข้อมูล HRESIMS ซึ่งแสดงให้เห็นว่า DBE เท่ากับ 5 และจากข้อมูล 1H และ ^{13}C NMR (ตารางที่ 10) พบว่ามีหมู่คีโตน 2 หมู่และพันธะคู่ 1 พันธะ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าสาร **40** ต้องมีโครงสร้างแบบ bicyclic เมื่อนำข้อมูล HSQC มาประกอบการพิจารณา พบว่าสารนี้ยังประกอบด้วยหมู่ methyl ชนิด tertiary 1 หมู่, หมู่ methyl ชนิด secondary 1 หมู่, หมู่ methylene 3 หมู่ซึ่งหนึ่งหมู่มี O ต่ออยู่, หมู่ methine ซึ่งมี O ต่ออยู่ 1 หมู่ และคาร์บอนชนิด quaternary ที่มี O ต่ออยู่ 1 คาร์บอนซึ่งพิจารณาจากค่า chemical shift ที่ δ_H 84.1 จากข้อมูล 1H - 1H COSY ทำให้ทราบโครงสร้างส่วนย่อย 1 ส่วน คือ C-4—C-3—CH₃ ดังแสดงในรูปที่ 24 และจากข้อมูล HMBC พบความสัมพันธ์ระหว่าง H-4/C-4a, H-3/C-1 และ H-1/C-8a จึงระบุได้ว่าพันธะคู่อยู่ในตำแหน่ง 4a กับ 8a นอกจากนี้ใน HMBC สเปกตรัมยังพบความสัมพันธ์ระหว่าง H-5 กับ C-4a และหมู่คีโตนที่ ตำแหน่ง C-6 จึงสามารถยืนยันโครงสร้างส่วนย่อยนี้ได้ และเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์จากหมู่ tertiary methyl พบว่าหมู่นี้มีความสัมพันธ์กับหมู่คีโตนทั้งสองหมู่ จึงทำให้ได้โครงสร้างที่สมบูรณ์ของสาร **40** ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ isochromene และมีโครงสร้างดังแสดงในส่วน of configuration ในตำแหน่งที่ 3 และ 7 ยังไม่สามารถกำหนดได้เนื่องจากยังไม่มีข้อมูลในที่เพียงพอ

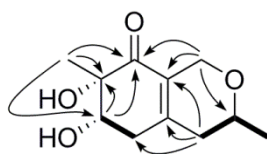


รูปที่ 24 1H - 1H COSY และ HMBC correlation ของสาร **40**

ตารางที่ 10 ข้อมูล NMR ของสาร 40-42

No.	40 (CDCl ₃)		41 (CDCl ₃)		42 (CDCl ₃)	
	δ_C , type	δ_H (J in Hz)	δ_C , type	δ_H (J in Hz)	δ_C , type	δ_H (J in Hz)
1	63.6, CH ₂	4.22, d (7.6) 4.67, d (7.6)	63.7, CH ₂	4.36, m	63.4, CH ₂	4.09, dd (2.8, 16) 4.57, d (16)
3	69.4, CH	3.72, m	69.1, CH	3.70, m	69.2, CH	3.58, m
4	37.2, CH	2.24, m	37.8, CH	2.16, d (8)	37.6, CH	2.14, d (5.2)
4a	148.9, qC		150.6, qC		152.9, qC	
5	43.1, CH ₂	3.21, d (19.2) 3.54, dd (2.8, 19.2)	35.6, CH ₂	2.52, d (19.2) 2.75, d (19.2)	36.2, CH ₂	2.32, m 2.56, dd (5.2, 18.4)
6	202.2, qC		73.3, CH	4.14, t (3.6)	72.0, CH	3.97, t (4.4)
7	84.1, qC		76.0, qC		77.5, qC	
8	195.0, qC		199.3, qC		199.2, qC	
8a	129.7, qC		127.4, qC		128.2, qC	

สารประกอบ **41** จากข้อมูล HRESIMS พบว่ามีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{11}H_{16}O_4$ และจากข้อมูล 1H และ ^{13}C -NMR และ HSQC พบหมู่คีโตน 1 หมู่ และพันธะคู่ 1 พันธะ นอกจากนี้ยังพบว่าสาร **41** มีข้อมูล NMR (ตารางที่ 10) และ correlation ใน 2D NMR คล้ายกับสาร **40** ซึ่งแตกต่างกันเพียงสาร **41** มีหมู่ oxygenated methine เพิ่มขึ้นมา 1 หมู่ ขณะที่หมู่คีโตนซึ่งเคยพบในสาร **40** ได้หายไป 1 หมู่ ดังนั้นสารนี้จึงน่าจะเป็นอนุพันธ์ของสาร **40** ที่เกิดจากการที่หมู่คีโตน 1 ตำแหน่งถูกรีดิวซ์ เมื่อพิจารณาข้อมูล 2D NMR โดยเฉพาะ 1H - 1H COSY และ HMBC ดังแสดงในรูปที่ 25 ทำให้สามารถยืนยันได้ว่าสาร **41** มีหมู่ oxygenated methine อยู่ในตำแหน่งที่ 6 ซึ่งแทนที่หมู่คีโตนของสาร **40** สำหรับ configuration ของไครัลคาร์บอนในตำแหน่งที่ 6 และ 7 จากการศึกษาข้อมูล NOESY พบว่า H_3-6 มีความสัมพันธ์กับ $H-7$ ซึ่งแสดงว่าหมู่ไฮดรอกซิลทั้งสองอยู่ด้านเดียวกันของวง ดังนั้นโครงสร้างของสาร **41** จึงเป็นดังแสดง



รูปที่ 25 1H - 1H COSY และ HMBC correlation ของสาร **41**

สาร **42** จากข้อมูล HRESIMS และ NMR พบว่าสาร **42** มีโครงสร้างเหมือนกับสารประกอบ **41** ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารทั้งสองจะมีความแตกต่างกันที่ configuration บางตำแหน่ง เมื่อพิจารณาข้อมูล NOESY พบว่าโปรตอนของหมู่ methyl ในตำแหน่งที่ 6 ไม่แสดง correlation กับ $H-5$ ซึ่งแตกต่างจากในสาร **41** จึงยืนยันได้ว่าได้ว่าหมู่ hydroxyl ทั้งสองอยู่คนละด้านกันของวง ดังนั้นโครงสร้างของสาร **42** จึงเป็นดังแสดง

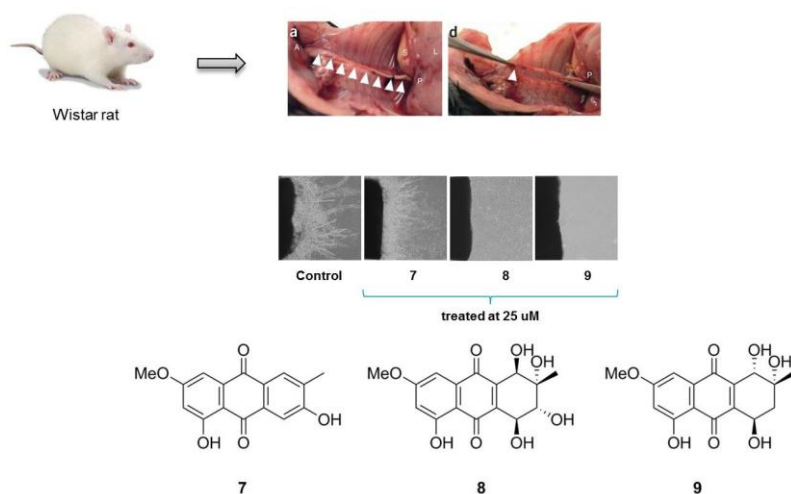
ตอนที่ 2. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้

ในงานวิจัยนี้ ได้นำสารที่แยกได้มาทดสอบฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับโรคมะเร็ง 3 การทดสอบ ซึ่งประกอบด้วย การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

2.1. ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ (anti-angiogenic activity)

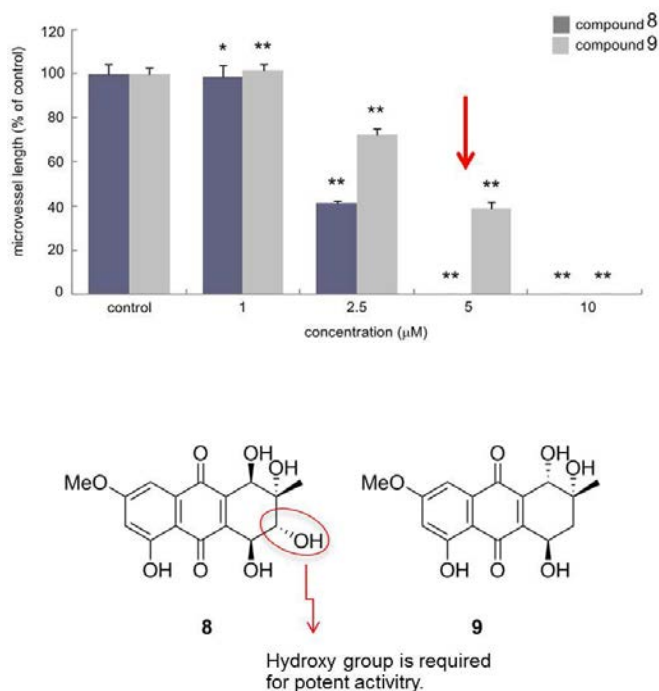
เนื่องจากกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่จะประกอบด้วย 3 กระบวนการย่อยๆ ที่จำเป็น ได้แก่ การ proliferation ของเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด (HUVEC), การ migration ของเซลล์ และการก่อตัวเป็นหลอดเลือดใหม่ (tube formation) ซึ่งถ้ากระบวนการใดกระบวนการหนึ่งถูกยับยั้งจะส่งผลให้ไม่มีการสร้างหลอดเลือดใหม่เกิดขึ้น ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกการคัดกรองสารที่มีฤทธิ์โดยเริ่มจากการทดสอบด้วย ex vivo model โดยใช้หลอดเลือดแดงใหญ่ของหนู Wistar เป็นตัวทดสอบ เพราะถ้าสารมีฤทธิ์ยับยั้งการทดสอบในขั้นตอนนี้ได้ แสดงว่าสารนั้นต้องสามารถยับยั้งกระบวนการใดกระบวนการหนึ่งหรือทั้งสามกระบวนการเหล่านี้ได้ โดยจะทำการคัดกรองที่ความเข้มข้น 25 μM จากนั้นจะนำสารที่ทำให้การยับยั้งมากกว่า 50% มาทำการทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อเลือกสารที่มีฤทธิ์โดดเด่นที่สุดมาทำการศึกษาในระดับกลไกการออกฤทธิ์ต่อไป ขั้นตอนถัดมาจะนำสารที่มีฤทธิ์ดีที่สุดมาทำการทดสอบในระดับ in vitro กับ HUVEC เพื่อดูว่าสารนั้นยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ที่ฟังก์ชันใดของ HUVEC และถ้าสารมีฤทธิ์ที่ดีมากในระดับที่ยอมรับได้ จะนำไปศึกษาการออกฤทธิ์ในระดับ in vivo ต่อไป

การคัดกรองด้วย ex vivo model: เมื่อนำสารที่แยกได้ทั้งหมด 42 ชนิดมาทรีกับหลอดเลือดแดงของหนู Wistar ที่ตัดเป็นวงที่มีความหนาขนาด 1-2 mm ที่ความเข้มข้น 25 μM พบว่ามีสารเพียงสองชนิดที่ให้ผลการยับยั้งการเกิดหลอดเลือดใหม่ได้อย่างสมบูรณ์ (100%) คือสาร 8 และ 9 ซึ่งเป็นสารกลุ่ม anthranoid ที่แยกได้จากราสายพันธุ์ HK-5 ขณะที่อีกอนุพันธ์หนึ่งคือสาร 7 แทบไม่แสดงการยับยั้ง ดังแสดงในรูปที่ 26 ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการที่วงขวามือมีความเป็น hydrophobic มากขึ้นทำให้ฤทธิ์ของสารลดลง



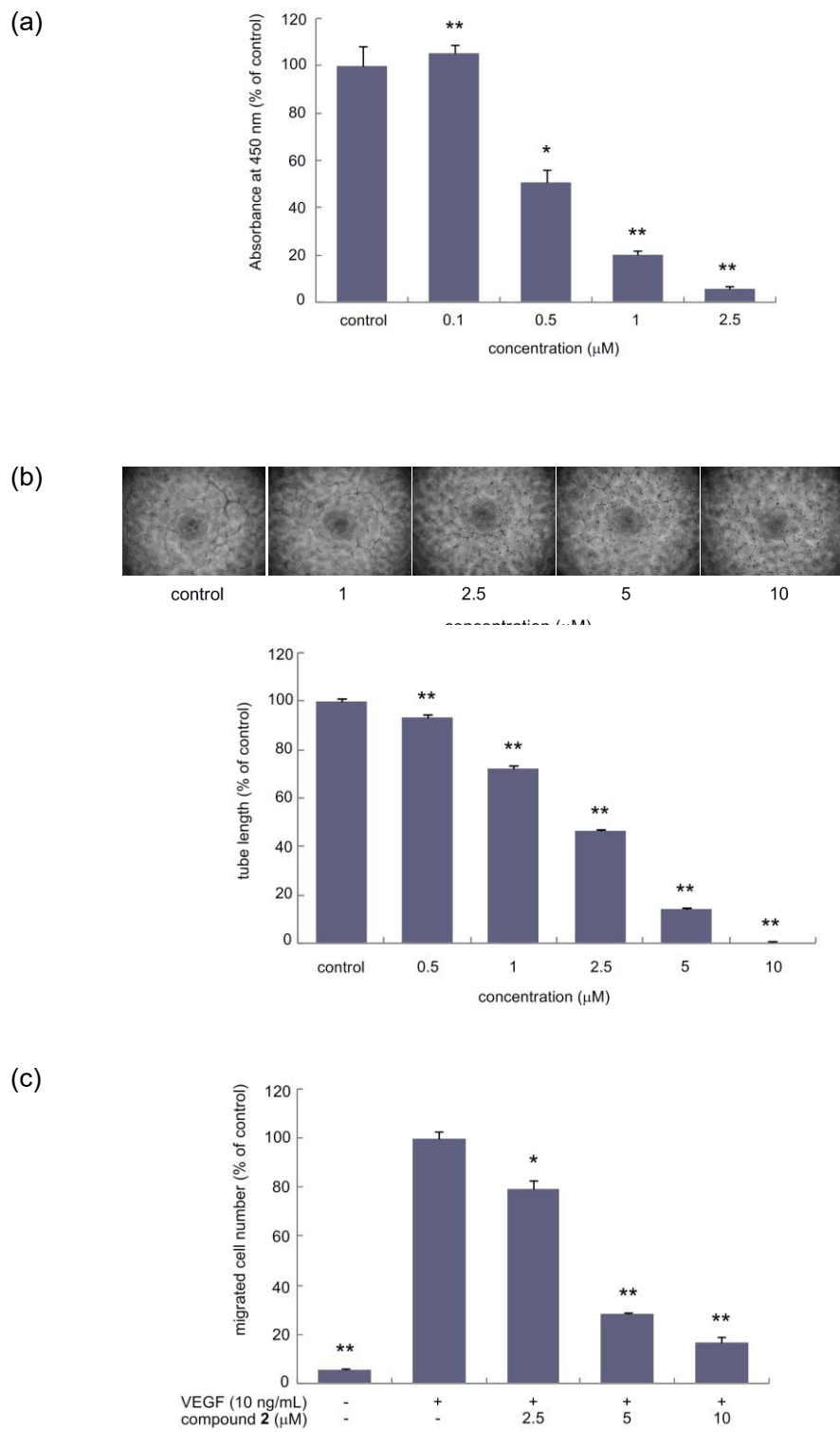
รูปที่ 26 ผลการยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ของสาร 7-9

ต่อมาจึงได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของโครงสร้างของสารกลุ่มนี้ต่อการออกฤทธิ์โดยนำสาร 8 และ 9 มาทำการทดลองซ้ำที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 μM ซึ่งพบว่าที่ความเข้มข้น 10.0 μM สารทั้งสองยังให้การยับยั้งที่ 100% แต่ที่ความเข้มข้น 5.0 μM พบว่ามีเพียงสาร 8 ที่ให้ผลการยับยั้ง 100% ขณะที่สาร 9 ให้การยับยั้งที่ประมาณ 40% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการมีหมู่ไฮดรอกซิลบนคาร์บอนทุกตำแหน่งของวงควาสุดมีผลส่งเสริมให้ฤทธิ์ดีขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 27 ดังนั้นสาร 8 จึงถูกนำไปศึกษาในขั้นต่อไป



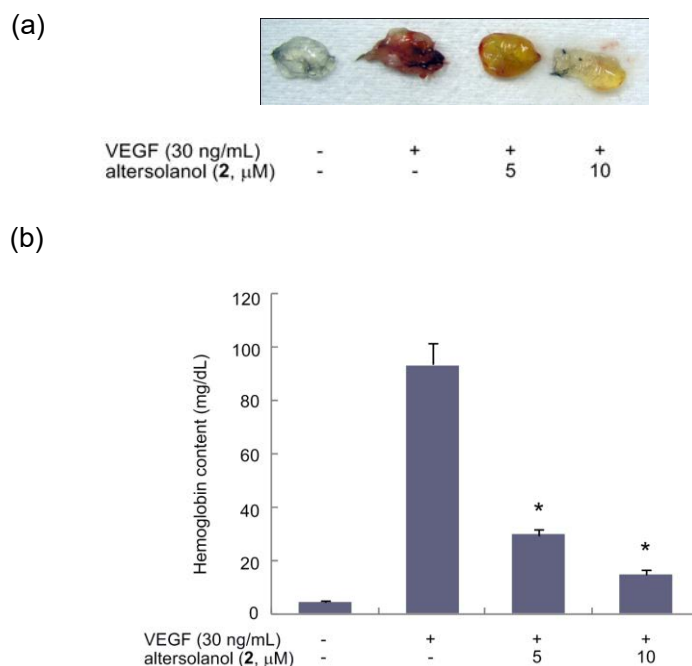
รูปที่ 27 ผลของโครงสร้างต่อการออกฤทธิ์ของสารกลุ่ม anthranoid (8 และ 9)

การศึกษาผลของสาร 8 ต่อฟังก์ชันของ HUVEC (in vitro model): จากผลการทดลองทั้ง 3 ส่วนคือ proliferation, migration และ tube formation พบว่าสาร 8 สามารถยับยั้งฟังก์ชันของ HUVEC ได้ทั้งสามกระบวนการ โดยเฉพาะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ HUVEC ได้ดีมากด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 0.51 μM ขณะที่การยับยั้ง tube formation และ migration ก็อยู่ในระดับดีด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 2.38 และ 4.00 μM ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 28 จึงทำให้สรุปได้ว่า สาร altersolanol (8) สามารถยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ได้โดยยับยั้งการทำงานของเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดทั้งสามฟังก์ชันได้เป็นอย่างดี



รูปที่ 28ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ HUVEC ของสาร 8; (a) proliferation (b) tube formation
(c) migration

ผลการยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ของสาร **8** ใน *in vivo* model: การทดสอบด้วยวิธี Matrigel plug assay โดยฉีด Matrigel 0.5 mL ที่มีสาร altersolanol (**3**) ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 μM หรือ DMSO สำหรับชุดควบคุม, VEGF (30 ng/mL) และ heparin (10 U/ μL) เข้าใต้ผิวหนังบริเวณสองข้างของลำตัวหนูสายพันธุ์ C57BL/6 หลังจาก 7 วัน ฆ่าหนูแล้วตัดเอาก้อน Matrigel ออกมาและถ่ายรูป จากนั้นหาปริมาณฮีโมโกลบินในก้อน Matrigel ด้วย Quantichromhemoglobin assay kit และนำมาคำนวณหาความเข้มข้นของฮีโมโกลบินจากฮีโมโกลบินมาตรฐาน



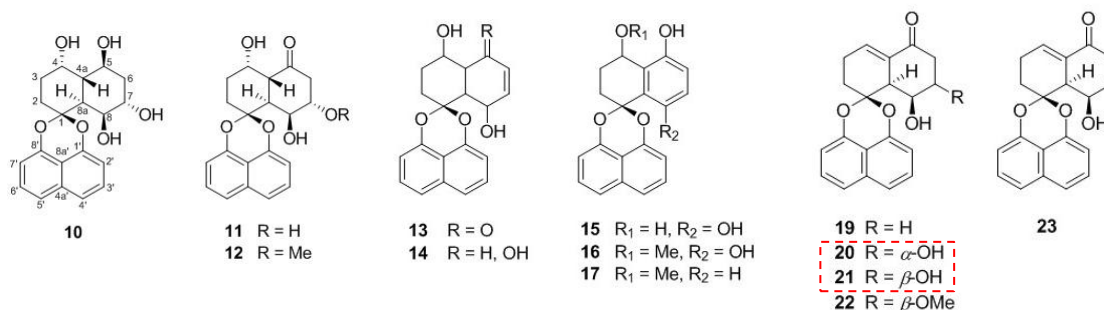
รูปที่ 29ฤทธิ์การยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ของสาร **8** ใน *in vivo* model

(a) Matrigel plug ที่ตัดออกมาจากหนู (b) ปริมาณฮีโมโกลบินในก้อน Matrigel

จากผลการทดลองพบว่าสาร **8** สามารถยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ในระดับหนูทดลองด้วยการยับยั้งขึ้นกับความเข้มข้นของสารที่ใช้ (dose-dependent manner) จะเห็นว่าแทบจะไม่มีหลอดเลือดใหม่งอกเข้าไปในก้อน Matrigel เมื่อทดสอบด้วยสาร **3** ที่ความเข้มข้น 10 μM ดังแสดงในรูปที่ 29a และผลการหาปริมาณฮีโมโกลบินก็สอดคล้องกัน จะเห็นได้ว่าเมื่อที่ความเข้มข้น 5 และ 10 μM จะมีปริมาณฮีโมโกลบินลดลง 10 และ 90% ตามลำดับเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 29b

2.2.ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory activity)

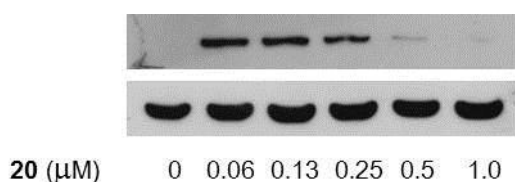
ในการวิจัยนี้ได้นำสารที่แยกได้ทั้งหมดมาทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธีดูการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (NO) ที่เกิดขึ้นในเซลล์มาโครฟาจที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วย lipopolysaccharide (LPS) ซึ่งมาจากสมมติฐานที่ว่าเซลล์ที่เกิดการอักเสบอย่างเรื้อรังจะมีส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์เป็นเซลล์มะเร็งได้ โดยในการทดลองได้เริ่มทำการคัดกรองสารที่ความเข้มข้น 50 μM และถ้าสารนั้นให้ค่าการยับยั้งการผลิต NO มากกว่า 50% จะนำมาหาค่า IC_{50} ซึ่งจากการทดลองพบว่า สารกลุ่ม aromatic ที่แยกได้จากกรา HK-5 ไม่มีฤทธิ์หรือมีฤทธิ์ที่อ่อนมากขณะที่สารกลุ่ม anthranoid มีความเป็นพิษต่อเซลล์สูงเกินไป ในทำนองเดียวกันพบว่าสารกลุ่ม chamigrane sesquiterpene จากกรา 8D สารกลุ่ม chromone จากกรา KP1 และสารกลุ่ม isochromene จากกรา KP2 ก็ไม่มีฤทธิ์นี้เช่นกัน แต่มีเพียงสารกลุ่ม spirobisanaphthalene จากกรา 21B ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการผลิต NO และมีค่า IC_{50} โดยเฉพาะสาร rhytidenone C (20) และ D (21) ซึ่งให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.31 และ 3.60 μM ขณะที่สาร rhytidenone E (22) และ F (23) แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้นที่ทดสอบ นอกจากนี้ยังพบว่าสารกลุ่ม spirobisanaphthalene ชนิดอื่นๆ มีฤทธิ์อย่างอ่อนหรือไม่แสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบ ดังแสดงในตารางที่ 11 ดังนั้นจากการพิจารณาในด้านความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบจึงสรุปได้ว่าหมู่ α, β -unsaturated ketone ในตำแหน่ง C-4=C4a-C=O จึงเป็นหมู่ที่มีความสำคัญต่อการอักเสบของสารกลุ่มนี้ อย่างไรก็ตามในกรณีสาร 18 ไม่ได้ทำการทดสอบเนื่องจากมีสารในปริมาณไม่เพียงพอ



ตารางที่ 11 ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารกลุ่ม spirobisanaphthalene

สาร	IC_{50} (μM)	สาร	IC_{50} (μM)
10	> 25	17	>25
11	>25	19	9.84
12	>25	20	0.31
13	22.15	21	3.60
14	>25	22	1.25 (toxic)
15	>25	23	3.20 (toxic)
16	19.20		

ผลของสาร rhytideone C (20) ต่อการแสดงออกของโปรตีน iNOS: ต่อมาได้นำสาร rhytideone C (20) มาศึกษาผลต่อการแสดงออกของโปรตีน iNOS เพื่อยืนยันว่าสารกีดการผลิต NO ได้ตั้งแต่ระดับ DNA และไม่ใช่เป็นเพียงการที่สารเข้าไปทำปฏิกิริยาโดยตรงกับ NO ที่ผลิตขึ้น จากผลการทดลองพบว่าสาร 20 สามารถกีดการแสดงออกของโปรตีน iNOS ได้อย่างดีและเป็นแบบ dose-dependent manner ดังแสดงในรูปที่ 30



รูปที่ 30 ผลของสาร 20 ต่อการแสดงออกของโปรตีน iNOS

2.3. ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (cytotoxic activity)

ฤทธิ์สุดท้ายที่ได้ทำการทดสอบในงานวิจัยนี้คือความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 3 ชนิดคือ เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) เซลล์มะเร็งปากมดลูก (CaSki) เซลล์มะเร็งตับ (Hep-G2) อย่างไรก็ตามสารทั้งหมดที่แยกได้ไม่สามารถแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้งสามที่ทดสอบในระดับที่ดีจนสามารถนำไปศึกษาในเชิงกลไกได้เนื่องจากสารทุกตัวให้ค่า IC_{50} มากกว่า $10 \mu M$ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ใช้ในการคัดกรอง

3. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของราที่เลือก

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของราทั้ง 5 สายพันธุ์ด้วยวิธี conventional และ molecular พบว่าได้ผลดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 สรุปชนิดสายพันธุ์ของราที่เลือก

รา	สายพันธุ์
HK-5	<i>Alternaria</i> sp.
8D	<i>Basidiomycetes</i>
21B	<i>Rhytidhysterium</i> sp.
KP1	<i>Rhytidhysterium rufulum</i>
KP2	<i>Phomopsis</i> sp.

เอกสารอ้างอิง

1. <https://en.wikipedia.org/wiki/Cancer>
2. Folkmann, J.; Shing Y. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 10931-10934
3. Folkmann, J. *Nat. Med.* **1995**, *1*, 27-31
4. Carmeliet, P.; Jain, R. K. *Nature* **2000**, *407*, 2249-257
5. Bergers, G.; Benjamin, L. E. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 401-410
6. Herbst, R. S. *Expert Opin. Emerging Drugs* **2006**, *11*, 635-650
7. Coussens, L. M.; Werb, Z. *Nature* **2009**, *420*, 860-867
8. Sashidhara, K. V.; White, K. N.; Crews, P. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 588-603
9. Rinehart, K. L.; Holt, T. G.; Fregeau, N. L.; Srroh, J. G.; Keifer, P. A.; Sun, F.; Li, L. H.; Martin, D. G. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4512-4515
10. Blay, J. Y.; von Mehren, M.; Samuels, B. L.; Fanucchi, M. p.; Ray-Coquard, I.; Buckley, B; Gilles, L.; Lebedinsk, C.; ElSatedm Y. A.; Le Cesne, A. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 6656-6662
11. Strobel, G. A. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2002**, *22*, 315-333
12. Zhang, H. W.; Song, Y. C.; Tan, R. X. *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, 753-711
13. Stierle, A.; Strobel, G. A.; Stierle, D. *Science* **1993**, *260*, 214-216
14. Kusari, S.; Zühkle, S.; Spiteller, M. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 2-7
15. Guan, S.; Sattler, I.; Lin, W.; Guo, D.; Grabley, S. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1198-1200
16. Xu, F.; Zhang, Y.; Wang, J.; Pang, J.; Huang, C.; Wu, X.; She, Z; Vrijmoed, L. L. P.; Jones, G. E. B.; Lin, Y. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1251-1253
17. Kjer, J.; Wray, V.; Edrada-Ebel, R.; Ebel, R.; Pretsch, A.; Lin, W.; Proksch, P. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 2053-2057
18. Liu, D.-Z.; Dong, Z.-J.; Wang, F.; Liu, J.-K. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 3152-3153
19. Ananda, K.; Sridhar, K. R. *Can. J. Microbiol.* **2002**, *48*, 871-878
20. Jones, G.; Stanley, S. J.; Pinruan, U. *Bot. Mar.* **2008**, *51*, 163-170
21. Lu, Z.; Zhu, H.; Fu, P.; Wang, Y.; Zhang, Z.; Lin, H.; Liu, P.; Zhuang, Y.; Hong, K.; Zhu, W. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 911-914
22. Wen, G. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *25*, 1677-1683
23. Kashiwada, Y.; Nonaka, G. I.; Nishioka, I. *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, *32*, 3493-3500

24. Okamura, N.; Kimura, K.; Haraguchi, H.; Shingu, K.; Miyahara, K.; Yagi, A. *Phytochemistry* **1996**, *42*, 77-80
25. Suemitsu, R.; Ohnishi, K.; Yanagawase, S.; Yamamoto, K.; Yamada, Y. *Phytochemistry* **1989**, *27*, 3251-3254
26. Burns, C. J.; Gill, M.; Giménez, A. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 7269-7272
27. Tan, N.; Tao, Y.; Pan, J.; Wang, S.; Xu, F.; She, Z.; Lin, Y.; Jones, E. B. G. *Chem. Nat. Comp.* **2008**, *44*, 296-300
28. Freeman, G. G. *Phytochemistry* **1965**, *5*, 719-725
29. Nakanishi, S.; Toki, S.; Saitoh, Y.; Tsukuda, E.; Kawahara, K.; Ando, K.; Matsuda, Y. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1995**, *59*, 1333-1335.
30. Kameda, K.; Aoki, H.; Namiki, M. *Tetrahedron Lett.* **1974**, *15*, 103-106
31. Bradburn, N.; Coker, R. D.; Blunden, G.; Turner, C. H.; Crabb, T. A. *Phytochemistry* **1994**, *35*, 665-669
32. Sakemi, S.; Inagaki, T.; Kaneda, K.; Hirai, H.; Iwata, E.; Sakakibara, T.; Yamauchi, Y.; Norcia, M.; Wondrack, L. M.; Sutcliffe, J. A.; Kojima, N. *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 134-132.
33. Wifp, P.; Lynch, S. M.; Birmingham, A.; Tamayo, G.; Jiménez, A.; Campos, N.; Powis, G. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *2*, 1651-1658.
34. Ragot, J. P.; Steeneck, C.; Alcaraz, M. L.; Taylor, R. J. K. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1999**, 1073-1082.
35. Ohishi, H.; Chiba, N.; Mikawa, T.; Sakaki, T.; Miyaji, S.; Sezaki, M. Jnp. Pat. 01294686, 28 November 1989.
36. Dong, J. Y.; Song, H. C.; Li, J. H.; Tang, Y. S.; Sun, R.; Wang, L.; Zhou, Y. P.; Wang, L. M.; Shen, K. Z.; Wang, C. R.; Zhang, K. Q. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 952-956.

ภาคผนวก



Short communication

Antiangiogenic effects of anthranoids from *Alternaria* sp., an endophytic fungus in a Thai medicinal plant *Erythrina variegata*Phunlap Pompeng^a, Damrong Sommit^b, Nongluksna Sriubolmas^b, Nattaya Ngamrojanavanich^{c,**}, Kiminori Matsubara^d, Khanitha Pudhom^{c,*}^a Program in Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand^b Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand^c Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand^d Department of Human Life Science Education, Graduate School of Education, Hiroshima University, Hiroshima 739-8524, Japan

ARTICLE INFO

Keywords:

Anthranoid

Antiangiogenesis

Endophytic fungus

Alternaria species*Erythrina variegata*

ABSTRACT

Endophytic fungi are known as a prolific source for the discovery of structurally interesting and biologically active secondary metabolites, some of which are promising candidates for drug development. In the present study, three anthranoids were isolated from an *Alternaria* sp. endophytic fungus and evaluated for their antiangiogenic activity in a rat aortic sprouting assay, an *ex vivo* model of angiogenesis. Of these three compounds, altersolanol (**2**) was further characterized and found to show a promising activity in *ex vivo*, *in vitro* and *in vivo* angiogenesis assays. Using human umbilical vein endothelial cells as an *in vitro* model, the angiogenic effect of **2** was found to occur via suppression of all three main functions of endothelial cells, namely proliferation, tube formation and migration.

© 2013 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Angiogenesis, the formation of new blood vessels from the pre-existing vasculature, is essential for many physiological processes including embryonic development, tissue regeneration, and wound repair. However, pathological angiogenesis is involved in various diseases, such as ischemic heart disease, diabetic retinopathy, rheumatoid arthritis, and cancer (Carmeliet 2003; Folkman 1995). Angiogenesis is not only required for the growth, but also for the transplantation and metastasis of a tumor (Folkman 1996). Therefore, inhibition of angiogenesis is an important target for cancer therapy and the treatment of other angiogenesis-associated diseases.

Endophytic fungi are microorganisms that live within their host plants without causing any noticeable disease symptoms. These fungi are known as a potential source of a wide variety of biologically active secondary metabolites, some of which are promising candidates for drug development (Gunatilaka 2006; Zhang et al. 2006; Schulz et al. 2002; Strobel et al. 2004). Among them, endophytic *Alternaria* strains have been found to produce diverse

aromatic constituents with pharmaceutical potential including anthranoid components (Aly et al. 2008; Kjer et al. 2009; Okaumura et al. 1996). Indeed, various anthraquinones isolated from plants, such as rhein, aloe-emodin and emodin, have been reported to possess antiangiogenic activity in both *in vitro* and *in vivo* assays (Cardenas et al. 2006; He et al. 2009, 2011; Kwak et al. 2006). This prompted us to investigate the effect of anthranoids isolated from endophytic fungi on angiogenesis. In this study, an anthraquinone, macrosporin (**1**), and two hydroxylated tetrahydroanthraquinones, altersolanol (**2**) and 1,2,4,5-tetrahydroxy-7-methoxy-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroanthracene-9,10-dione (**3**), were isolated from an *Alternaria* sp., an endophytic fungus isolated from the Thai medicinal plant, *Erythrina variegata*, and evaluated for their potential to be angiogenic inhibitors using a rat aortic sprouting (*ex vivo* model), *in vitro* proliferation, migration and tube formation assays with human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and the Matrigel plug *in vivo* assay on mice.

Materials and methods

General experimental procedures

Optical rotations were measured on a JASCO DPI-370 digital polarimeter at a wavelength of 589 nm. NMR spectra were recorded with a Varian Mercury-400 plus (¹H, 400 MHz; ¹³C, 100 MHz) spectrometer using tetramethylsilane as an internal standard. Mass spectra were obtained from a Bruker micrOTOF mass spectrometer.

* Corresponding author at: Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand. Tel.: +662 2187639; fax: +662 2541309.

** Corresponding author. Tel.: +662 2187639; fax: +662 2541309.

E-mail addresses: Nattaya.N@chula.ac.th (N. Ngamrojanavanich), Khanitha.P@chula.ac.th (K. Pudhom).

Silica gel 60 (Merck, 40–63 μm), Sephadex LH-20 (GE Healthcare Life Sciences, 18–111 μm) and Diaion HP-20 resin (Mitsubishi chemical corporation) were used for column chromatography.

Fungal material

The endophytic fungus *Alternaria* sp. was isolated from a fresh healthy leaf of *Erythrina variegata* collected in Samutsakorn Province, Thailand, in July 2008, according to the previously reported procedure (Sappapan et al. 2008). It was identified on the basis of both the morphology of fungi grown on potato dextrose agar (PDA) at 25 °C and the phylogenetic analysis of the DNA sequences of the internal transcribed spacer (ITS) region of the rRNA gene and large subunit ribosomal (LSU). The fungus has been deposited at Research Center of Bioorganic Chemistry (RCBC 1003), Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University.

Fermentation and isolation

The fungus *Alternaria* sp. was grown on PDA at room temperature for 10 days, and then the agar was cut into small plugs and inoculated into 1000 ml Erlenmeyer flasks ($\times 25$) each containing 200 ml of malt extract broth (MEB; malt extract 20.0 g/l, peptone 1.0 g/l). The fermentation was carried out at room temperature for 21 days under static conditions. The fungal mycelia were then separated from the broth by filtration, and the culture broth was then subjected to aromatic absorbent resin column chromatography using Dianion HP-20 and eluted with a step gradient of H_2O and MeOH as the mobile phase to afford 11 pooled fractions (1–11). Fraction 5 was further fractionated firstly by gel filtration using Sephadex LH-20 column chromatography with MeOH as the mobile phase eluent, and then by silica gel column chromatography with elution by a 1:19 ration of $\text{MeOH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$ to yield altersolanol A (**2**, 61.6 mg). Fraction 7 was also subjected to Sephadex LH-20 column chromatography as above to obtain five subfractions (7.1–7.5). Subfraction 7.2 was further purified by silica gel column chromatography and eluted with a continuous gradient from 99:1 to 5:95 of $\text{MeOH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$ to yield macrosporin (**1**, 15.0 mg). Finally, 1,2,4,5-tetrahydroxy-7-methoxy-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroanthracene-9,10-dione (**3**, 20.1 mg) was obtained from subfraction 7.3 by purification over a silica gel column and eluted with a 1:19 ratio of MeOH and CH_2Cl_2 .

Identification of pure compounds

The isolated compounds were identified by analysis of 1D- and 2D-NMR spectroscopic and mass spectrometry data as well as comparison of their data with those reported in the literature (Burns et al. 1989, 1991; Okaumura et al. 1996).

Animals

Six-week-old specific pathogen free male Wistar rats and C57BL/6 mice (Charles River Laboratory) were housed in controlled temperature (25 °C) room with a 12-h light/dark cycle (light on 8.00 a.m.–8.00 p.m.). The animals were given free access to diet and deionized water. The rats and mice were maintained according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals established by Hiroshima University. All experiments using animals were approved by Hiroshima University Animal Research Committee.

Ex vivo angiogenesis assay

A male Wistar rat was sacrificed by bleeding from the right femoral artery under diethyl ether anesthesia. The thoracic aorta was removed, washed with RPMI 1640 medium (Gibco, New York, USA), turned inside out, and cut into 1-mm lengths to form aortic rings. The aortic rings were then placed at three per well of a 6-well culture plate and covered with 0.5 ml of gel matrix solution [8 volume of porcine tendon collagen solution (Cellmatrix Ia, Nitta Gelatin Co., Osaka, Japan), 1 volume of 10 $\times$ Eagle's MEM (Gibco, New York, USA), and 1 volume of reconstitution buffer (0.08 M NaOH and 200 mM HEPES)], and allowed to gel at 37 °C for 30 min. Two milliliters of RPMI 1640 medium containing 1% (v/v) of TIS+ (Beckon, Dickinson and Company, Tokyo, Japan) with the designated doses of the test compounds or vehicle (DMSO) were added to each well. After incubation for 7 days at 37 °C in 5% CO_2 , the capillary length was estimated by measuring the distance from the cut end of the aortic segment to the approximate mid-point of the capillary under phase-contrast microscopy.

Cell culture

HUVECs were purchased from Kurabo Industries (Osaka, Japan), and the cells were grown in HuMedia EG2 medium (Kurabo Industries, Osaka, Japan) containing 2% fetal bovine serum (FBS), 10 ng/ml of recombinant human epidermal growth factor, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of hydrocortisone, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of gentamycin, 50 ng/ml of amphotericin B, 5 ng/ml of recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF), and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of heparin, at 37 °C in 5% CO_2 . Subcultures were obtained by treating the HUVEC cultures with Hanks'-based enzyme-free cell dissociation buffer solution (Gibco, New York, USA). HUVECs at passages three to seven were used for the experiment. HUVECs were cultured in all the below assays at 37 °C in 5% CO_2 .

Proliferation assay

A HUVEC suspension in HuMedia EG2 (1.5×10^4 cells/ml) was seeded (100 μl) into each well of 96-well plate and incubated for 24 h. The medium was then removed and replaced with fresh HuMedia EG2 containing the designated doses of the test compound (0, 0.1, 0.5, 1 and 2.5 μM) and incubated for 72 h. Cell proliferation was detected using the WST-8 reagent (Dojindo Molecular Technologies, Inc., USA) as per the manufacturer's instructions, and the inhibition of proliferation was measured in terms of the absorbance at 450 nm using a microplate reader.

Tube formation assay

The HUVEC tube formation assay was performed using BD Matrigel (Becton, Dickinson and Company, Tokyo, Japan) according to the method of Kayashima et al. (2009) (Chokpaiboon et al. 2011). The solid gel was prepared in a 96-well tissue culture plate according to the manufacture's instruction. A 100 μl suspension of HUVECs (1×10^5 cells/ml) in HuMedia EG2 medium containing the designated doses of the test compound (0, 0.5, 1, 2.5, 5 and 10 μM) were seeded onto the surface of the solid BD Matrigel. After incubation for 12 h, tube formation was observed under an inverted light microscope at 40 $\times$ magnification. Microscopic fields were photographed with a digital camera (OLYMPUS DSE330-A system).

Chemotactic migration assay

The HUVEC migration assay was performed using a modified Boyden chamber (Kayashima et al. 2009; Chokpaiboon et al. 2011). A microporous membrane (8 μm) of 24-well cell culture inserts

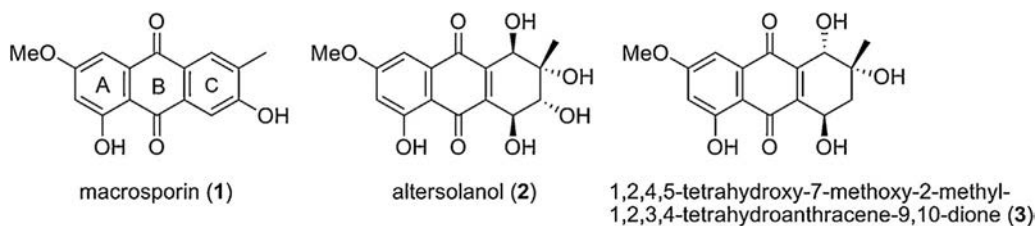


Fig. 1. Structures of isolated anthranoids.

was coated with a 0.1% (w/v) gelatin solution. Then 400 μ l of the HUVEC suspension (2.5×10^5 cells/ml) in Medium 199 with 0.1% (w/v) bovine serum albumin (BSA) was seeded in each chamber, followed by 400 μ l of Medium 199 containing 0.1% (w/v) BSA and 10 ng/ml of recombinant human VEGF with or without the test compound (0, 2.5, 5 and 10 μ M). The assembled chamber was incubated for 6 h, whereupon non-migrated cells on the surface of the membrane were removed by scrubbing with a cotton swab. The migrated cells were fixed with methanol, stained with Diff-Quik stain (Sysmex, Kobe, Japan), and then counted in three fields of view for membrane under a light microscope at 200 $\times$ magnification.

In vivo mouse Matrigel plug assay

For the Matrigel plug assay, 0.5 ml of Matrigel (BD Biosciences) containing 0 (DMSO vehicle only), 5 or 10 μ M altersolanol, VEGF (30 ng/ml) and heparin (10 U/ μ l) was injected subcutaneously into C57BL/6 mice. After 7 days, the mice were sacrificed and the skin of each mouse was carefully pulled back to expose the Matrigel plug. The plugs were dissected out and photographed. The amount of hemoglobin in the plugs was measured using a QuantiChrom hemoglobin assay kit (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA) as per the manufacturer's instructions. The concentration of hemoglobin was calculated from a known amount of hemoglobin assayed in parallel.

Statistical analysis

Values are presented as the means $\pm$ SD. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Dunnett test. Differences with $p < 0.05$ were considered as significant.

Results and discussion

Effect of isolated anthranoids on ex vivo angiogenesis

All of isolated anthranoids (Fig. 1) were assessed for their antiangiogenic activity by monitoring the suppression of microvessel sprouting from a rat aortic ring (an *ex vivo* model). Their effect on angiogenesis at a single dose of 25 μ M was first examined to look at their structure-activity relationship. Results showed that compounds **2** and **3**, hydroxylated tetrahydroanthranoids, exhibited the complete inhibition of microvessel sprouting, whereas there was only a slight inhibition of angiogenesis by anthraquinone **1**, as compared to control (Fig. 2a). This indicated that the fully aromatized anthranoid dramatically reduced angiogenic inhibitory activity. Further, the hydroxylated tetrahydroanthraquinones **2** and **3** were subjected to the same assay in a concentration-dependent manner. As shown in Fig. 2b, the inhibitory effect of both compounds was in a dose-dependent manner. However, altersolanol (**2**) displayed two-fold more potent antiangiogenic activity than **3** with an IC_{50} value of 2.30 μ M and the complete suppression of the microvessel sprouting at 5 μ M, while compound **3** afforded the whole suppression at 10 μ M. This suggested the hydroxyl groups at ring C might be required for the potent angiogenesis inhibition,

the absence of a hydroxyl group at this ring of tetrahydroquinone **3** thus caused a significant loss of activity. Based on these results, only compound **2** was therefore selected for further study.

Effect of altersolanol (2) on HUVEC functions

Endothelial cells, a specialized type of epithelial cell forming the inner layer of blood vessels, play a key role in angiogenesis, the development of new blood vessels from the pre-existing vasculature. Indeed, during this biological process, they are activated and express matrix metalloproteinases (MMPs) leading to the degradation of the basal membrane of the parent vessel and of the extra-cellular surrounding matrix. In response to environmental cues, they secrete MMPs and then invade through the basement membrane to form new capillary networks (Shinkaruk et al. 2003). In order to investigate how altersolanol (**2**) could exert the antiangiogenic effect, its *in vitro* inhibitory activity toward the functions of HUVECs, in terms of the cell proliferation, tube formation and migration, were evaluated. The effect of **2** on the proliferation of HUVECs was first evaluated by using the WST-8 assay. Altersolanol (**2**) inhibited the proliferation of the endothelial cells in a dose-dependent manner and 50% inhibition could be seen with as little as 0.51 μ M (Fig. 3). Further, the effect of **2** on the HUVECs tube formation was examined by inoculating HUVECs onto reconstituted basement membranes (Matrigel) and then allowing them to migrate, attach to each other and then form capillary-like structures (Kayashima et al. 2009; Chokpaiboon et al. 2011). The results (Fig. 4) indicated that altersolanol (**2**) suppressed tube formation in the endothelial cells in a dose dependent manner with a significant inhibition being observed at 1 μ M, an IC_{50} of 2.38 μ M and the complete inhibition at 10 μ M. Finally, whether altersolanol (**2**) could affect the VEGF-induced migration of HUVECs was investigated using a modified Boyden chamber assay (Kayashima et al. 2009; Chokpaiboon et al. 2011). VEGF is known as a specific and pivotal

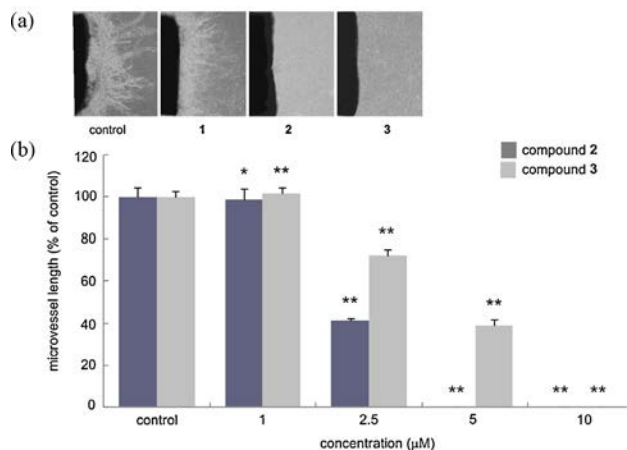


Fig. 2. Effect of isolated anthranoids on *ex vivo* angiogenesis. (a) Effect of anthranoids 1–3 at a dose of 25 μ M. (b) Inhibitory effect of 1 and 2 at various concentrations. Significantly different from the control: ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$.

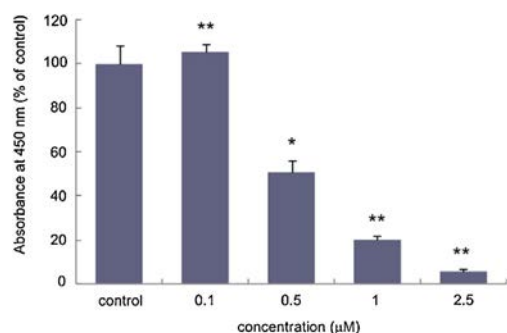


Fig. 3. Effect of altersolanol (**2**) on the HUVECs proliferation. Values are the mean $\pm$ SD ($n=5$). Significantly different from the control: ** $p<0.01$ and * $p<0.05$.

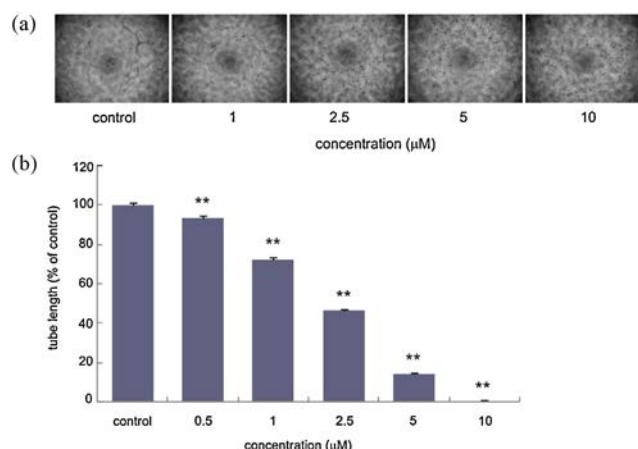


Fig. 4. Effect of altersolanol (**2**) on the HUVECs tube formation. (a) Microscopic photograph of tube formation on the reconstituted gel after incubation for 12 h. (b) The average capillary length. Values are the mean $\pm$ SD ($n=5$). Significantly different from the control: ** $p<0.01$ and * $p<0.05$.

growth factor involved in endothelial cell proliferation, migration and survival during blood vessel formation (Ferrara 1999). As seen in Fig. 5, VEGF strongly stimulated the cell migration, whereas altersolanol displayed the significant suppression of HUVECs induced by VEGF in a dose dependent manner with an IC_{50} value of $4.00 \mu M$. Based on the results from the above *in vitro* assays, altersolanol (**2**) would appear to be a potent angiogenic inhibitor, and that it could suppress all functions of endothelial cells including proliferation, tube formation and migration.

Effect of altersolanol (**2**) on *in vivo* VEGF-induced angiogenesis

To determine whether altersolanol (**2**) can suppress blood vessel formation *in vivo*, a Matrigel plug assay was carried out

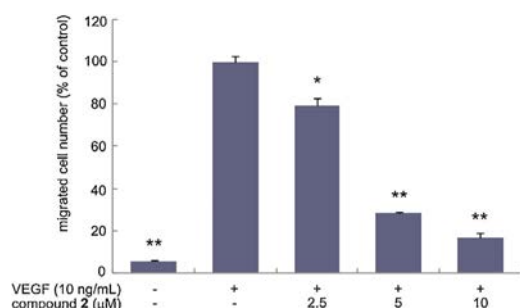


Fig. 5. Effect of altersolanol (**2**) on the HUVECs migration. Values are the mean $\pm$ SD ($n=5$). Significantly different from the control: ** $p<0.01$ and * $p<0.05$.

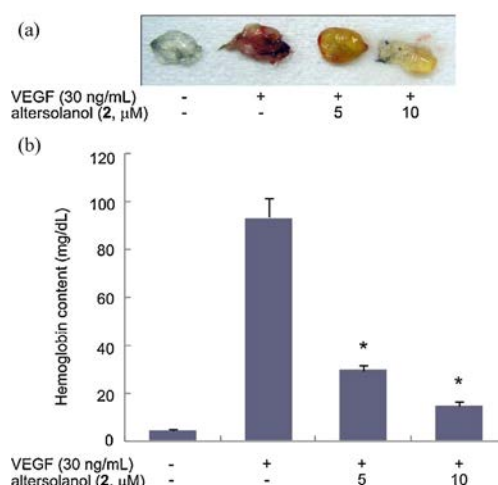


Fig. 6. Effect of altersolanol (**2**) on *in vivo* angiogenesis. (a) Effect of altersolanol (**2**) on VEGF-induced vessel formation in the Matrigel plug assay. (b) Measure hemoglobin content in the Matrigel plug. Values are the mean $\pm$ SD ($n=5$). Significantly different from the control: ** $p<0.01$.

(Chokpaiboon et al. 2011). VEGF containing Matrigel, with 5 and $10 \mu M$ altersolanol or vehicle (DMSO), was subcutaneously implanted into male C57BL/6 mice for seven days. As shown in Fig. 6a, suppression of neovascularization in mice implanted with Matrigel containing altersolanol was clearly observed and in dose dependent manner. In contrast, the Matrigel plug of control mice obviously indicated an angiogenic response. Furthermore the degree of function in these blood vessels was quantified by measuring the level of hemoglobin in the Matrigel plugs by a QuantiChrom hemoglobin assay kit. The results (Fig. 6b) were in agreement with the above. The hemoglobin content in the Matrigel plugs containing VEGF plus altersolanol (**2**) was considerably lower than that in the plugs with only VEGF alone, being about one-third and one-sixth of the control one at 5 and $10 \mu M$, respectively.

Conclusions

The present results indicate that altersolanol (**2**), a hydroxylated tetrahydroanthraquinone from an *Alternaria* endohytic fungus, possesses potent antiangiogenic activity by suppressing all functions of endothelial cells, proliferation, tube formation and migration. Most importantly, altersolanol even at low concentration inhibits blood vessel formation in both *ex vivo* and *in vivo* assays. Taking the results together, altersolanol (**2**) might be a promising candidate for cancer therapy, and for prevention of cancer and other pro-angiogenesis related diseases.

Acknowledgments

This work was supported by the Thailand Research Fund (RSA5580023) 90th Anniversary of Chulalongkorn University Fund (Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund) and the Hitachi Scholarship Foundation. The authors are also grateful for the Thai Government Stimulus Package (TKK2555) under the Project for Establishment of Comprehensive Center for Innovative Food, Health Products and Agriculture. The authors wish to thank Dr. Robert Butcher, the Publication Councillant Unit, Faculty of Science, Chulalongkorn University for language proving.

References

- Aly, A.H., Edrada-Ebel, R., Indriani, I.D., Wray, V., Müller, W.E.G., Totzke, F., Zirrgebel, U., Schächtele, C., Kubbutat, M.H.G., Lin, W.H., Proksch, P., Ebel, R., 2008. Cytotoxic metabolites from the fungal endophyte *Alternaria* sp. and their subsequent

- detection in its host plant *Polygonum senegalense*. *Journal of Natural Products* 71, 972–980.
- Burns, C.J., Gill, M., Giménez, A., 1989. New trihydroxylated tetrahydroanthraquinones from fungi of the genus *Dermocybe*. *Tetrahedron Letters* 30, 7269–7272.
- Burns, C.J., Gill, M., Giménez, A., 1991. Pigments of fungi XXIV new trihydroxylated tetrahydroanthraquinones from an Australian fungus belonging to the genus *Dermocybe*. *Australian Journal of Chemistry* 44, 1729–1736.
- Cardenas, C., Quesada, A.R., Medina, M.A., 2006. Evaluation of the anti-angiogenic effect of aloe-emodin. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63, 3083–3089.
- Carmeliet, P., 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nature Medicine* 9, 653–660.
- Chokpaiboon, S., Sommit, D., Bunyapaiboonsri, T., Matsubara, K., Pudhom, K., 2011. Antiangiogenic effect of chamigrane endoperoxides from a Thai mangrove-derived fungus. *Journal of Natural Products* 74, 2290–2294.
- Ferrara, N., 1999. Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 237, 1–30.
- Folkmann, J., 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other diseases. *Nature Medicine* 1, 27–31.
- Folkmann, J., 1996. Tumor Angiogenesis and tissue factor. *Nature Medicine* 2, 167–168.
- Gunatilaka, A.A.L., 2006. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *Journal of Natural Products* 69, 509–526.
- He, Z.H., He, M.F., Ma, S.C., But, P.P.H., 2009. Anti-angiogenic effect of rhubarb and its anthraquinone derivatives. *Journal of Ethnopharmacology* 121, 313–317.
- He, Z.H., Zhou, R., He, M.F., Lau, C.B.S., Yue, G.G.L., Ge, W., But, P.P.H., 2011. Anti-angiogenic effect and mechanism of rhein from *Rhizoma Rhei*. *Phytomedicine* 18, 470–478.
- Kayashima, T., Mori, M., Yoshida, H., Mizushima, Y., Matsubara, K., 2009. 1,4-Naphthoquinone is a potent inhibitor of human cancer cell growth and angiogenesis. *Cancer Letters* 278, 34–40.
- Kjer, J., Wray, V., Edrada-Ebel, R., Ebel, R., Pretsch, A., Lin, W., Proksch, P., 2009. Xanalteric acids I and II and related phenolic compounds from an endophytic *Alternaria* sp. isolated from the mangrove plant *Sonneratia alba*. *Journal of Natural Products* 72, 2053–2057.
- Kwak, H.J., Park, M.J., Park, C.M., Moon, S.I., Yoo, D.H., Lee, H.C., Lee, S.H., Kim, M.S., Lee, H.W., Shin, W.S., Park, I.C., Rhee, C.H., Hong, S.I., 2006. Emodin inhibits vascular endothelial growth factor-A-induced angiogenesis by blocking receptor-2 (KDR/Flk-1) phosphorylation. *International Journal of Cancer* 118, 2711–2720.
- Okaumura, N., Mimura, K., Haraguchi, H., Shingu, K., Miyahara, K., Yagi, A., 1996. Altersolanol-related compounds from the culture liquid of *Alternaria solani*. *Phytochemistry* 42, 77–80.
- Sappapan, R., Sommit, D., Ngamrojanavanich, N., Pengpreecha, S., Wiyakrutta, S., Sriubolmas, N., Pudhom, K., 2008. 11-Hydroxymonocerin from the plant endophytic fungus *Exserohilum rostratum*. *Journal of Natural Products* 71, 1657–1659.
- Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Römmert, A.-K., Krohn, K., 2002. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research* 106, 996–1004.
- Shinkaruk, S., Bayle, M., Laín, G., Délérís, G., 2003. Vascular endothelial cell growth factor (VEGF), and emerging target for cancer chemotherapy. *Current Medicinal Chemistry – Anti-Cancer Agents* 3, 95–117.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., Harper, J., 2004. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products* 67, 257–268.
- Zhang, H.W., Song, Y.C., Tan, R.X., 2006. Biology and chemistry of endophytes. *Natural Products Reports* 23, 753–771.

Communication

Spirobisnaphthalenes from the Mangrove-Derived Fungus *Rhytidhysterion* sp. AS21B

Khanitha Pudhom ^{1,*}, Thapong Teerawatananond ¹ and Supichar Chookpaiboon ²

¹ Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand; E-Mail: thapong_sthc@hotmail.com

² Program in Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand; E-Mail: bubu_keaw@hotmail.com

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: khanitha.p@chula.ac.th; Tel.: +66-2218-7641; Fax: +66-2254-1309.

Received: 6 January 2014; in revised form: 8 February 2014 / Accepted: 18 February 2014 /

Published: 6 March 2014

Abstract: Three new spirobisnaphthalenes (**1–3**) were isolated from the mangrove-derived fungus *Rhytidhysterion* sp., together with five known derivatives (**4–8**). The structures of the compounds were established on the basis of extensive spectroscopic data, and the relative configurations of their stereogenic carbons were determined by a single-crystal X-ray crystallographic analysis. Compounds **3–5** displayed cytotoxicity against both cancer cell lines, MCF-7 and CaSki, while **2** was active only on CaSki cells.

Keywords: endophytic fungus; *Rhytidhysterion* sp.; spirobisnaphthalene; cytotoxicity

1. Introduction

Spirobisnaphthalenes, a series of compounds consisting of two naphthalene-derived C₁₀ units bridged through a spiroketal linkage, have been mainly isolated from fungi [1–5]. This class of compounds is of great interest as potential leads for medicinal chemistry, since they have interesting structures and a variety of biological activities such as antibacterial, antifungal, anticancer, and antileishmanial activities [4–7].

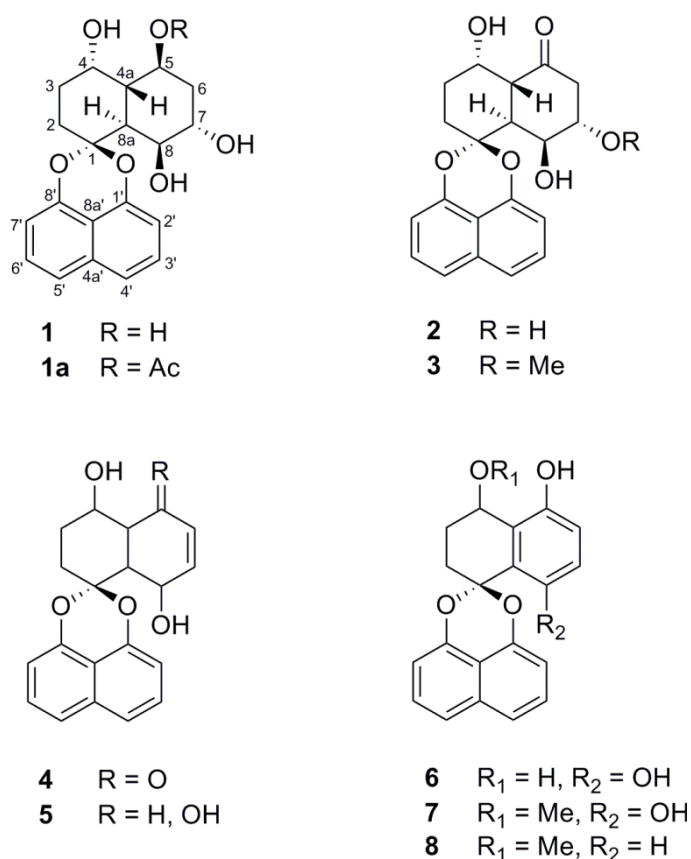
Endophytic fungi are known as a prolific source for the discovery of structurally interesting and biologically active metabolites [8–11]. Among plant-derived fungi, those associated with the trees growing up in mangrove areas have received much attention from medicinal chemists owing to the

unique ecosystem [12]. In our continued investigation into new bioactive compounds from Thai mangrove-derived fungi, we describe the isolation and structure elucidation of three new spirobisnaphthalenes, rhytidones A–C (**1–3**), together with five known derivatives from an endophytic *Rhytidhysterion* sp. fungus. In addition, all isolated compounds were evaluated for their cytotoxic activities against human cancer cell lines.

2. Results and Discussion

The *Rhytidhysterion* sp. fungus was cultured in malt extract broth (MEB) under static conditions for 21 days. The EtOAc crude extract of the culture broth was successively subjected to Sephadex LH-20 and silica gel column chromatography to afford three new spironaphthalenes, rhytidones A–C (**1–3**), and five known analogues including MK3018 (**4**), palmarumycin CR1 (**5**), CJ-12,372 (**6**), 4-*O*-methyl-CJ-12,372 (**7**) and 4-*O*-methyl-CJ-12,371 (**8**) as shown in Figure 1. The structures of the known compounds were determined by comparison of their NMR spectroscopic data with those in the literature [13–16].

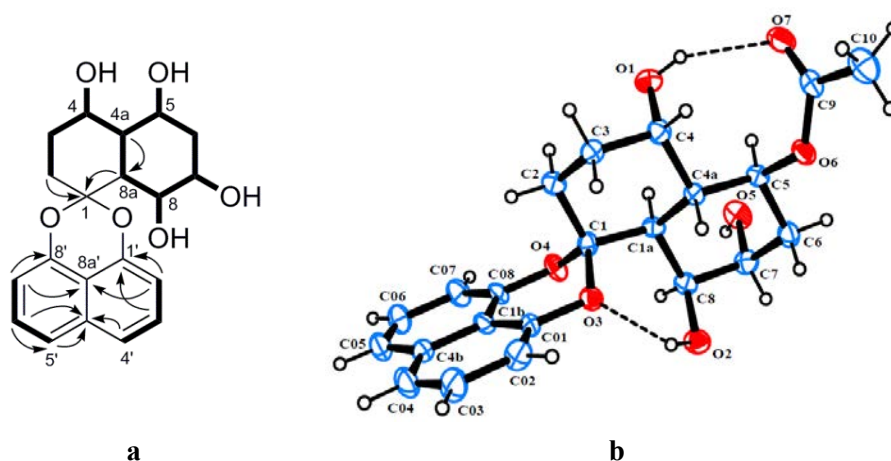
Figure 1. Structures of compounds **1–8** isolated from fungus *Rhytidhysterion* sp.



Rhytidone A (**1**) was obtained as a light brown powder and its molecular formula was established as C₂₀H₂₂O₆ from HRESIMS at m/z 381.1319 [M + Na]⁺ (calcd 381.1314), implying 10 degrees of unsaturation. Detailed analysis of the ¹H, ¹³C and HSQC NMR data revealed the presence of six methine carbons (four oxygenated), three methylene carbons, one doubly oxygenated quaternary carbon (δ_C 104.4) and 10 aromatic carbons. In the ¹H-¹H COSY spectrum, homonuclear coupling

correlations of H-2'/H-3' and H-3'/H-4', as well as correlations of H-5'/H-6' and H-6'/H-7' indicated the presence of two isolated three-proton spin systems corresponding to the C-2'–C-4' and C-5'–C-7' subunits of **1**, which displayed the *ortho* coupling constant with *J* values of 7.2, 7.6 and 8.0 Hz. The HMBC correlations of H-2'/C-1', H-2'/C-8a', H-3'/C-4a', H-6'/C-4a', H-7'/C-8' and H-7'/C-8a' led to the attachment of both subunits at C-4a' and C-8a', suggesting the presence of a naphthalene moiety. In addition, the chemical shifts of the nonprotonated carbons C-1' and C-8' at δ_C 147.4 and 145.9, respectively, were indicative of a 1,8-dioxynaphthalene moiety. Based on the above evidence, compound **1** was recognized as a member of the spirobisanaphthalene, characteristic of a 1,8-dioxynaphthalene linked with the second half of the molecule via a spiroketal carbon. The remaining part of the molecule was mainly elucidated by analysis of ^1H - ^1H COSY and HMBC data. The COSY correlations confirmed the presence of the new extended spin system corresponding to the C-2–C-8 subunit (including C-4a and C-8a) (Figure 2a). HMBC correlations of H-2 and H-8a with C-1 led to the attachment of the spiroketal bridge carbon to the last subunit at C-2 and C-8a. Moreover, four exchangeable protons, observed at δ_H 4.41, 4.81, 3.85, 4.22, were assigned to OH-4, OH-5, OH-7 and OH-8, respectively, by their COSY correlations with their vicinal protons (Figure 2a). The relative configuration of **1** was determined through single-crystal X-ray diffraction analysis of its 5-acetate derivative (**1a**), obtained from acetylation of **1** with acetic anhydride in the presence of a catalytic amount of DMAP. The perspective ORTEP plot of **1a** is shown in Figure 2b.

Figure 2. (a) Key HMBC and ^1H - ^1H COSY correlations of rhytidone A (**1**); (b) ORTEP diagram of the 5-acetate derivative of **1** (**1a**).



Rhytidone B (**2**) was isolated as colorless crystals. Its HRESIMS spectrum exhibited a pseudo-molecular ion at m/z 379.1153 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, calcd 379.1158), consistent with the molecular formula $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_6$. The NMR data of **2** also displayed characteristic signals associated with a spirobisanaphthalene, including a 1,8-dioxynaphthalene moiety and a spiroketal bridge carbon. Moreover, its NMR data (Table 1) were similar to those of **1**, except for the replacement of one oxygenated methine carbon in **1** by a new ketone carbon (δ_C 212.2). The $-\text{CH}_2(2)-\text{CH}_2(3)-\text{CH}(4)\text{OH}-\text{CH}(4a)-\text{CH}(8a)-\text{CH}(8)\text{OH}-\text{CH}(7)-\text{OH}-\text{CH}_2(6)-$ subunit was established by analysis of ^1H - ^1H COSY. HMBC correlations from H-4a and H₂-6 to the ketone carbon clearly indicated the location of

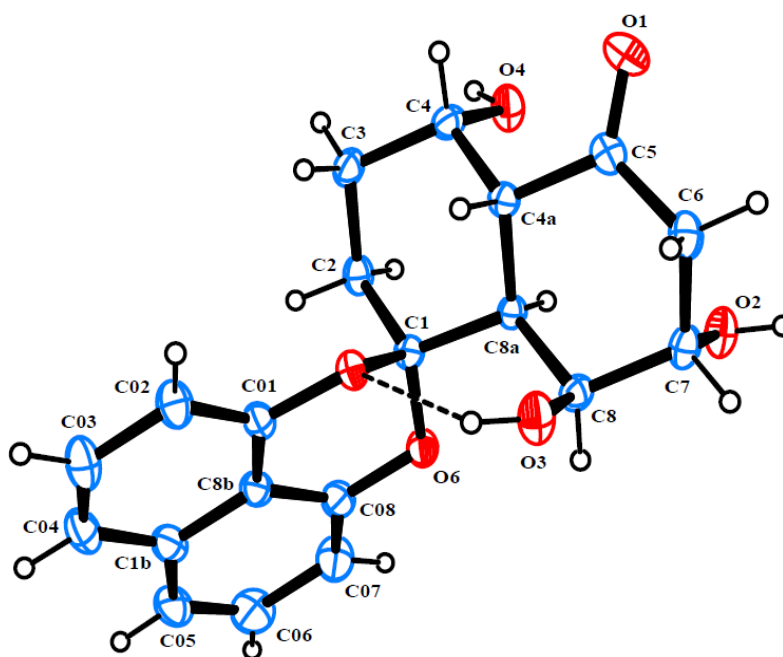
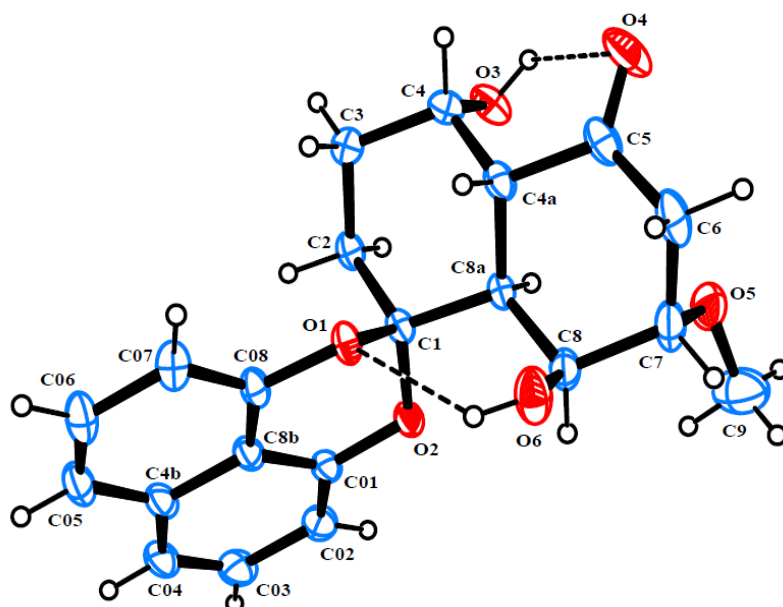
the ketone carbonyl at C-5. Ultimately, the structure and relative configuration of **2** was clarified by single-crystal X-ray diffraction analysis (Figure 3).

Table 1. NMR spectroscopic data of compounds **1–3**.

No.	1 ^a		2 ^b		3 ^b	
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
1	-	104.4	-	104.4	-	104.4
2	1.73, m	25.6	1.95, m	25.6	1.94, m	25.6
3	1.53, m	28.2	1.75, m 1.66, m	26.5	1.72, m 1.62, m	26.6
4	4.16, br s	61.2	4.54, br s	62.9	4.52, br s	62.9
4a	1.97, ddd (12.8, 10.0, 2.4)	42.9	3.31, d (13.6)	49.0	3.27, dd (13.2, 1.6)	48.9
5	3.70, br s	68.8	-	212.2	-	211.8
6	1.75, m	35.7	3.13, br s 2.47, dd (14.4, 2.8)	44.2	3.05, m 2.60, dd (14.4, 2.0)	41.2
7	4.21, br s	66.9	4.43, t (3.2)	71.3	3.89, m	80.1
8	3.93, m	63.3	4.77, d (3.2)	67.4	4.88, br d (3.6)	65.1
8a	2.44, dd (12.8, 1.6)	38.6	3.17, br s	41.5	3.03, m	41.9
1'	-	146.5	-	147.3	-	-
2'	6.96, d (7.2)	109.4	6.94, d (7.2)	109.8	6.96, d (7.6)	109.8
3'	7.45, t (7.6)	127.6	7.43, t (8.0)	127.8	7.44, t (7.6)	127.7
4'	7.50, d (8.0)	119.7	7.53, d (8.4)	121.5	7.48, d (8.4)	120.5
4a'	-	133.6	-	134.2	-	134.2
5'	7.52, d (8.0)	120.1	7.49, d (8.4)	120.5	7.53, d (8.4)	121.4
6'	7.45, t (7.6)	127.5	7.43, t (8.0)	127.1	7.42, t (7.6)	127.1
7'	6.94, d (7.2)	108.8	6.95, d (7.2)	109.6	6.93, d (7.6)	109.6
8'	-	147.6	-	145.9	-	145.9
8a'	-	113.3	-	113.8	-	113.9
4-OH	3.70, br s	-	-	-	-	-
5-OH	4.81, d (2.8)	-	-	-	-	-
7-OH	3.85, d (2.4)	-	-	-	-	-
8-OH	4.21, br s	-	3.77, s	-	3.71, s	-
7-OMe	-	-	-	-	3.43, s	56.9

^a Measured in DMSO- d_6 ; ^b measured in CDCl_3 .

Rhytidone C (**3**), obtained as colorless crystals, gave the molecular formula $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_6$, as established by HRESIMS (m/z 393.1315 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, calcd. 393.1314). The NMR data of **3** (Table 1) were very similar to those of **2**, except for the presence of an additional methoxy group (δ_{H} 3.43 s, δ_{C} 56.9). Strong HMBC correlation from methoxyl protons to C-7 at δ_{C} 80.1 indicated the attachment of the methoxyl group at C-7. Compound **3** was found to have the same configuration as in **2**, which was also determined by single-crystal X-ray diffraction analysis (Figure 4).

Figure 3. ORTEP diagram of rhytidone B (2).**Figure 4.** ORTEP diagram of rhytidone C (3).

Cytotoxic activity of isolated compounds against human breast cancer (MCF-7) and cervical carcinoma (CaSki) cell lines was evaluated by the MTT method (Table 2) [17]. Compounds **3–5** showed moderate activity against both cell lines with IC_{50} values between 14.47 and 25.59 μ M, while compound **2** was active only for CaSki with IC_{50} value of 22.81 μ M. It should be noted that compounds **6–8**, possessing an additional aromatic ring in the structure, did not exhibit any significant activity against the cell lines tested ($IC_{50} > 10 \mu$ g/mL).

More details are available at the Supplementary Information.

Table 2. Cytotoxicity of compounds **2–5** against human breast and cervical cancer cell lines.

Compound	IC ₅₀ (μM)	
	MCF-7	CaSki
2	— ^a	22.81 ± 1.33
3	17.30 ± 2.11	24.44 ± 0.22
4	20.10 ± 1.52	25.59 ± 1.70
5	14.47 ± 0.51	21.95 ± 2.56
Doxorubicin	0.06 ± 0.01	0.20 ± 0.02

^a IC₅₀ > 10 μg/mL.

3. Experimental Section

3.1. General Experimental Procedures

Optical rotations were measured on a Perkin-Elmer 341 polarimeter. UV spectra were recorded on a Shimadzu UV-160 UV-visible spectrometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). NMR spectra were acquired on a Varian Mercury-400 Plus NMR spectrometer (Varian, CA, USA) with TMS as internal standard. HRESIMS was carried out on a micrOTOF-Q II ESI mass spectrometer (Bruker, Bremen, Germany). Single-crystal X-ray diffraction analysis was performed on a Bruker APEX II diffractometer (Bruker, Bremen, Germany).

3.2. Fungal Material and Fermentation

The fungus AS21B used in the present study was isolated from leaves of *Azima sarmentosa*, collected from the mangrove forest in Samutsakhon province, Thailand in July 2008. The fungus was identified as a *Rhytidhysterion* sp. based on the ITS sequences, and was deposited at Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University. The strain AS21B was grown on potato dextrose agar (PDA) plate at room temperature for 7 days. Five pieces (5 × 5 mm²) of mycelial agar plugs were inoculated into 1 L Erlenmeyer flasks (×50) containing 200 mL of malt extract broth (MEB). The cultivation was kept at room temperature for 21 days under static conditions.

3.3. Extraction and Isolation

The mycelia were separated off from the broth by filtration. The filtrate was extracted with an equal amount of EtOAc for 3 times. The EtOAc solution was evaporated under reduced pressure to afford a crude extract (7.0 g). The extract was subjected to a Sephadex LH20 column and eluted with MeOH to give six fractions (F1–F6). Subsequently, fraction 5 was fractionated by silica gel (SiO₂) column chromatography eluted by a gradient of MeOH/CH₂Cl₂ from 1:99 to 1:9 to yield nine subfractions. The fraction F5.3 was purified by SiO₂ column chromatography (a gradient of EtOAc/hexane from 2:8 to 1:1) to give **3** (20.1 mg) and **4** (47.8 mg). Subfraction F5.4 was rechromatographed on SiO₂ with a 1:1 mixture of EtOAc/hexane to obtain **2** (13.5 mg). Fraction F5.6 was applied to SiO₂ column chromatography eluted with MeOH/CH₂Cl₂ (1:19) to afford **5** (15.2 mg). Fraction F5.7 was divided into four fractions by column chromatography on Sephadex LH20 (MeOH), then F5.7.4 was further purified by SiO₂ column chromatography with MeOH/CH₂Cl₂ (1:9) to give **1** (83 mg). Fraction F6 was

subjected to a Sephadex LH20 column eluted with MeOH to yield five subfractions. F6.4 was recrystallized with MeOH to provide **7** (32.6 mg). Subfraction F6.5 was rechromatographed over a SiO₂ column to give three fractions. The fraction F6.5.3 was further purified by SiO₂ column chromatography eluted with EtOAc/hexane (1:3) to yield **6** (12.8 mg) and **8** (8.2 mg).

Rhytidone A (**1**): light brown powder; $[\alpha]_D^{25} +21$ (*c* 0.10, MeOH); ¹H and ¹³C NMR, see Table 1; HRESIMS *m/z* 381.1319 [M + Na]⁺ (calcd for C₂₀H₂₂O₆Na, 381.1314).

Rhytidone B (**2**): colorless crystals; $[\alpha]_D^{25} +15$ (*c* 0.10, MeOH); ¹H and ¹³C NMR, see Table 1; HRESIMS *m/z* 379.1153 [M + Na]⁺ (calcd for C₂₀H₂₀O₆Na, 379.1158).

Rhytidone C (**3**): colorless crystals; $[\alpha]_D^{25} +18$ (*c* 0.10, MeOH); ¹H and ¹³C NMR, see Table 1; HRESIMS *m/z* 393.1315 [M + Na]⁺ (calcd for C₂₁H₂₂O₆Na, 393.1314).

Preparation of 5-*O*-Acetyl-rhytidone A (**1a**). A mixture of compound **1** (10 mg), acetic anhydride (0.1 mL) and a catalytic amount of DMAP in CH₂Cl₂ (2 mL) was stirred at room temperature for 30 min. Then, water (5 mL) was added to the reaction mixture, and extracted with EtOAc (3 × 5 mL). The combined organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄, and evaporated after filtration. The residue was purified by SiO₂ column chromatography (MeOH/CH₂Cl₂, 2:98) to yield **1a** (7.2 mg, 64%) as colorless crystals: ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.51 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5'), 7.47 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-4'), 7.44 (1H, t, *J* = 7.2 Hz, H-6'), 7.39 (1H, t, *J* = 7.2 Hz, H-3'), 6.93 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-2'), 6.90 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-7'), 5.34 (1H, ddd, *J* = 5.2, 10.0, 16.8 Hz, H-5), 4.56 (1H, br s, H-8), 4.13 (1H, br m, H-7), 3.88 (1H, br s, 4-OH), 3.70 (1H, s, 8-OH), 3.58 (1H, br s, H-4), 2.76 (1H, dd, *J* = 1.6, 12.8 Hz, H-8a), 2.43 (1H, ddd, *J* = 2.0, 12.8, 16.8 Hz, H-4a), 2.27 (1H, ddd, *J* = 2.4, 12.8, 14.4 Hz, H-6a), 2.15 (3H, s, 5-OAc), 2.00 (1H, m, H-6b), 1.97 (2H, m, H-2), 1.73 (2H, m, H-2); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 172.7 (5-OCOCH₃), 147.5 (C-8'), 146.0 (C-1'), 134.2 (C-4a'), 127.7 (C-6'), 127.0 (C-3'), 121.3 (C-5'), 120.3 (C-4'), 113.9 (C-8a'), 109.8 (C-2'), 109.5 (C-7'), 104.7 (C-1), 69.4 (C-5), 69.2 (C-7), 67.6 (C-8), 62.6 (C-4), 41.3 (C-4a), 39.0 (C-8a), 32.3 (C-6), 27.2 (C-3), 25.6 (C-2), 21.2 (5-OCOCH₃).

X-ray Crystallographic Analysis of compounds **1a**, **2** and **3**. All single crystal X-ray diffraction data were collected at 296 K on a Bruker APEX II diffractometer with Mo K α radiation (λ = 0.71073 Å). The structures were solved by direct methods using SHELXS-97 and refined full-matrix least squares on all *F*² data using SHELXL97 to final *R* values [18,19]. All hydrogen atoms were added at calculated positions and refined using a rigid model. Crystallographic data for **1a**, **2** and **3** have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre (Cambridge, UK) [20].

Crystal data of **1a**: colorless crystal; C₂₂H₂₄O₇, *M_r* = 400.41, monoclinic, *a* = 12.220(2) Å, *b* = 5.7498(9) Å, *c* = 13.925(3) Å, space group *P*2₁, *Z* = 2 and *V* = 956.2(3) Å³, μ (Mo K α) = 0.10 mm^{−1}, and *F*(000) = 424. Crystal dimensions: 0.42 × 0.27 × 0.25 mm. Independent reflections: 1492 (*R*_{int} = 0.063). The final *R*₁ values were 0.039, *wR*₂ = 0.113 (*I* > 2 σ (*I*)). CCDC number: 977804.

Crystal data of **2**: colorless crystal; C₂₀H₂₀O₆, *M_r* = 356.36, orthorhombic, *a* = 7.6970(6) Å, *b* = 8.4012(8) Å, *c* = 25.845(2) Å, space group *P*2₁2₁2₁, *Z* = 4 and *V* = 1617.3(2) Å³, μ (Mo K α) = 0.11 mm^{−1}, and *F*(000) = 752. Crystal dimensions: 0.40 × 0.22 × 0.20 mm. Independent

reflections: 3200 ($R_{\text{int}} = 0.025$). The final R_1 values were 0.037, $wR_2 = 0.110$ ($I > 2\sigma(I)$). CCDC number: 977805.

Crystal data of **3**: colorless crystal; $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_6$, $M_r = 370.39$, monoclinic, $a = 23.9484(6)$ Å, $b = 5.6338(1)$ Å, $c = 15.5486(4)$ Å, space group $P2_12_12_1$, $Z = 4$ and $V = 1783.37(7)$ Å³, $\mu(\text{Mo K}\alpha) = 0.10$ mm⁻¹, and $F(000) = 784$. Crystal dimensions: $0.36 \times 0.34 \times 0.24$ mm. Independent reflections: 3133 ($R_{\text{int}} = 0.016$). The final R_1 values were 0.037, $wR_2 = 0.119$ ($I > 2\sigma(I)$). CCDC number: 898711.

3.4. Cytotoxicity Assay

Cytotoxicity of all compounds was assayed with a modification of the MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium] bromide) colorimetric method. Cytotoxicity assays were performed according to previously described procedures [16]. The following human cancer cell lines were used in the assay: human breast cancer (MCF-7) and cervical carcinoma (CaSki) cell lines. Doxorubicin was used as the reference compound.

4. Conclusions

The chemical investigation of the EtOAc extract of the endophytic fungus *Rhytidhysterion* sp. has led to the isolation and characterization of three spirobisanaphthalenes, along with five known derivatives. All isolated compounds (**1–8**) were evaluated for their cytotoxicity against breast and cervical cancer cells. Compounds **3–5** exhibited cytotoxicity against both cell lines, whereas compound **2** was active only for cervical carcinoma cells.

Acknowledgments

This work was supported by the Thailand Research Fund (RSA5580023), and the Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund of Chulalongkorn University (RES560530208-AS). The authors also gratefully thank Miss Sujitra Hantanong, Program in Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, for fungal cultivation.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Jiao, P.; Swenson, D.C.; Gloer, J.B.; Campbell, J.; Shearer, C.A. Decaspirones A–E, bioactive spirodioxynaphthalenes from the freshwater aquatic fungus *Decaisnella thyridioides*. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 1667–1671.
2. Hu, H.; Guo, H.; Li, E.; Zhou, Y.; Che, Y. Decaspirones F–I, bioactive secondary metabolites from the saprophytic fungus *Helicoma viridis*. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 1672–1675.

3. Macías-Rubalcava, M.L.; Hernández-Bautista, B.E.; Jiménez-Estrada, M.; González, M.C.; Glenn, A.E.; Hanlin, R.T.; Hernández-Ortega, S.; Saucedo-García, A.; Muria-González, J.M.; Anaya, A.L. Naphthaquinone spiroketal with allelochemical activity from the newly discovered endophytic fungus *Edenia gomezpompae*. *Phytochemistry* **2008**, *69*, 1185–1196.
4. Matínez-Luis, S.; Della-Togna, G.; Coley, P.D.; Kursar, T.A.; Gerwick, W.H.; Cubilla-Rios, L. Antileishmanial constituents of the Panamanian endophytic fungus *Edenia* sp. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 2011–2014.
5. Van der Sar, S.A.; Blunt, J.W.; Munro, M.H.G. Spiro-Mamakone A, a unique relative of the spironaphthalene class of compounds. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 2059–2061.
6. Chen, X.; Shi, Q.; Lin, G.; Guo, S.; Yang, J. Spirobisnaphthalene analogues from the endophytic fungus *Preussia* sp. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 1712–1715.
7. Cai, Y.-S.; Guo, Y.-W.; Krohn, K. Structure, bioactivities, biosynthetic relationships and chemical synthesis of the spirodioxynaphthalenes. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 1840–1870.
8. Zhang, H.W.; Song, Y.C.; Tan, R.X. Biology and chemistry of endophytes. *Nat. Prod. Res.* **2006**, *23*, 753–771.
9. Gunatilaka, A.A.L. Natural products from plant-associated microorganisms: Distribution, structural diversity, bioactivity and implications of their occurrence. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 509–526.
10. Strobel, G.; Diasy, B.; Castillo, U.; Harper, J. Natural products from endophytic microorganisms. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 257–268.
11. Strobel, G.A. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes Infect.* **2003**, *5*, 535–544.
12. Debbab, A.; Aly, A.H.; Proksch, P. Mangrove derived fungal endophytes—A chemical and biological perception. *Fungal Divers.* **2013**, *61*, 1–27.
13. Sakemi, S.; Inagaki, T.; Kaneda, K.; Hirai, H.; Iwata, E.; Sakakibara, T.; Yamauchi, Y.; Norcia, M.; Wondrack, L.M.; Sutcliffe, J.A.; Kojima, N. CJ-12,371 and CJ-12,372, two novel DNA gyrase inhibitors, fermentation, isolation, structural elucidation and biological activities. *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 134–142.
14. Wipf, P.; Lynch, S.M.; Birmingham, A.; Tamayo, G.; Jiménez, A.; Campos, N.; Powis, G. Natural product based inhibitors of the thioredoxin-thioredoxin reductase system. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 1651–1658.
15. Ragot, J.P.; Steeneck, C.; Alcaraz, M.-L.; Taylor, R.J.K. The synthesis of 1,8-dihydroxynaphthalene-derived natural products: Palmarymycin CP₁, Palmarymycin CP₂, Palmarymycin CP₁₁, CJ-12,371, deoxypreussomerin A and novel analogues. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1999**, 1073–1082; doi:10.1039/A901076I.
16. Ohishi, H.; Chiba, N.; Mikawa, T.; Sakaki, T.; Miyaji, S.; Sezaki, M. Novel Antibiotic MK3018 substance—Useful as antimicrobial agent. Jpn. Pat. 01294686, 28 November 1989.
17. Chokpaiboon, S.; Sommit, D.; Teerawatananond, T.; Muangsin, N.; Bunyapaiboonsri, T.; Pudhom, K. Cytotoxic nor-chamigrane and chamigrane endoperoxides from a basidiomycetous fungus. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 1005–1007.
18. Sheldrick, G.M. *SHELXS-97, Program for Crystal Structure Solution*; University of Göttingen: Göttingen, Germany, 1997.

19. Sheldrick, G.M. *SHELXS-97, Program for Crystal Structure Refinement*; University of Göttingen: Göttingen, Germany, 1997.
20. Cambridge Crystallographic Data Centre. Available online: http://www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif (accessed on 24 February 2014).

© 2014 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Rhytidenones A–F, Spirobisnaphthalenes from *Rhytidhysterion* sp. AS21B, an Endophytic Fungus

Khanitha Pudhom* and Thapong Teerawatananond

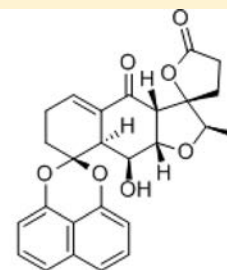
Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330 Thailand

Supporting Information

ABSTRACT: Rhytidenone A (1), a unique spirobisnaphthalene with a 1,7-dioxaspiro[4,4]nonan-2-one motif, and five new spirobisnaphthalenes, rhytidenones B–F (2–6), were isolated from the extract of a cultured fungal endophyte, *Rhytidhysterion* sp. AS21B. Their structures were elucidated mainly by analysis of NMR spectroscopic data. The structure and configuration of 1 were further confirmed by single-crystal X-ray diffraction analysis. Compounds 3 and 4 exhibited significant inhibitory activity against nitric oxide production from activated macrophages with IC₅₀ values of 0.31 and 3.60 μ M, respectively.



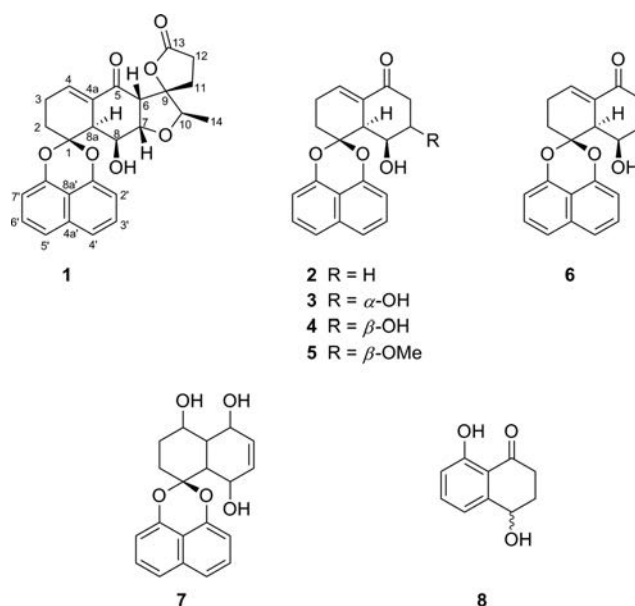
Rhytidhysterion sp. AS21B



Rhytidenone A (1)

Endophytic fungi are known as a potential source for the discovery of structurally interesting and biologically active secondary metabolites, some of which are promising candidates for drug development or agrochemical applications.^{1–3} Endophytic fungi have also been found to produce molecules previously obtained from their host plants, for example, paclitaxel⁴ and camptothecin.⁵ Among plant-derived fungi, those associated with plants growing in mangrove forests have received much attention from natural product and medicinal chemistry researchers due to the unique ecosystem.^{6–9} In addition to growing in tropical regions, which provide great biodiversity, these plants have to deal with broad ranges of salinity, temperature, moisture, and a number of other environmental factors.^{10,11} It is reasonable to expect they must be home to a great variety of specific microorganisms including fungi. In our ongoing search for new bioactive metabolites from mangrove-derived fungi, a chemical investigation of the *Rhytidhysterion* sp. fungus isolated from *Azima sarmentosa*, which was collected from a mangrove area in Samutsakhon Province, Thailand, afforded six new compounds, namely, rhytidenones A–F (1–6), containing a dioxynaphthalene moiety, together with two known analogues. These compounds belong to a rare family of fungal metabolites referred to as spirobisnaphthalenes, a series of compounds comprising two naphthalene-derived C₁₀ units bridged through a spiroketal linkage.^{12–17} This class of compounds are potential leads for medicinal chemistry, since they have interesting structures and a variety of biological activities such as antibacterial, antifungal, anticancer, and antileishmanial activities.^{15–19} In the current study, details of isolation, structural elucidation, and anti-inflammatory activity of rhytidenones A–F (1–6) are reported.

The EtOAc extract of the *Rhytidhysterion* sp. fungus grown on solid rice medium was successively subjected to Sephadex LH-



20 and silica gel column chromatography to give six new spirobisnaphthalenes, rhytidenones A–F (1–6), along with two known derivatives, palmarumycin CR₁ (7) and 4,8-dihydroxy-3,4-dihydronaphthalen-1(2H)-one (8). The structures of the known compounds were determined by comparison of their NMR spectroscopic data with those in the literature.^{20,21}

Rhytidenone A (1) was isolated as colorless crystals, and its molecular formula was established as C₂₆H₂₄O₇ from HRESIMS, indicating 15 degrees of unsaturation. Combined analysis of ¹H, ¹³C, and HSQC data of 1 (Table 1) revealed the

Received: January 24, 2014

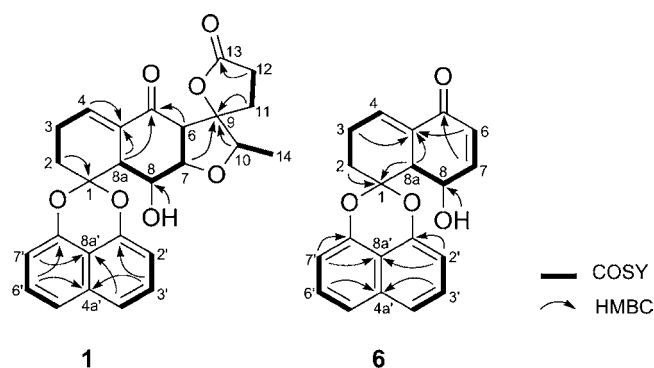
Published: August 1, 2014

Table 1. ^1H (400 MHz) and ^{13}C (100 MHz) NMR Data of Compounds 1–3 in CDCl_3

position	1			2			3		
	δ_{C}	type	δ_{H} , mult. (J in Hz)	δ_{C}	type	δ_{H} , mult. (J in Hz)	δ_{C}	type	δ_{H} , mult. (J in Hz)
1	103.3,	qC		103.0,	qC		103.6,	qC	
2	27.4,	CH_2	2.23, m 1.85, m	27.6,	CH_2	2.23, m 1.67, ddd (14.0, 8.0, 1.6)	27.7,	CH_2	2.24, m 1.72, m
3	23.1,	CH_2	2.34, m	22.9,	CH_2	2.37, m 2.28, m	23.0,	CH_2	2.38, m 2.28, m
4	137.2,	CH	7.17, br m	136.8,	CH	7.11, br s	136.6,	CH	7.08, br m
4a	132.0,	qC		132.9,	qC		132.8,	qC	
5	194.1,	qC		198.5,	qC		197.3,	qC	
6	44.0,	CH	3.76, br d (2.8)	33.3,	CH_2	2.90, ddd (18.4, 12.4, 8.0) 2.52, ddd (18.4, 6.8, 1.6)	42.6,	CH_2	3.07, dd (18.0, 4.8) 2.58, dd (18.0, 1.6)
7	65.4,	CH	4.80, br d (2.8)	28.5,	CH_2	2.30, m 1.95, m	68.0,	CH	4.44, br s
8	77.4,	CH	4.54, dd (2.8, 8.4)	63.4,	CH	4.90, br s	67.4,	CH	4.77, br d (3.6)
8a	55.9,	CH	3.33, d (8.4)	49.3,	CH	3.14, br s	43.6,	CH	3.63, br d (1.6)
9	77.2,	qC							
10	82.2,	CH	4.39, q (6.8)						
11	28.3,	CH_2	2.58, m 2.32, m						
12	28.6,	CH_2	2.74, m 2.46, m						
13	175.1,	qC							
14	15.0,	CH_3	1.26, d (6.8)						
1'	147.3,	qC		147.2,	qC		147.2,	qC	
2'	110.0,	CH	6.88, d (7.6)	109.8,	CH	6.94, d (7.6)	109.8,	CH	6.97, d (7.2)
3'	127.8,	CH	7.45, t (7.6)	127.7,	CH	7.46, t (7.6)	127.7,	CH	7.45, t (7.6)
4'	120.5,	CH	7.53, d (8.2)	120.6,	CH	7.50, d (8.4)	120.6,	CH	7.51, d (8.4)
4a'	134.2,	qC		134.2,	qC		134.2,	qC	
5'	121.4,	CH	7.51, d (8.2)	121.5,	CH	7.54, d (8.4)	121.5,	CH	7.54, d (8.4)
6'	127.1,	CH	7.40, t (7.6)	127.3,	CH	7.43, t (7.6)	127.2,	CH	7.42, t (7.6)
7'	109.5,	CH	6.99, d (7.6)	109.7,	CH	6.95, d (7.6)	109.7,	CH	6.94, d (7.2)
8'	146.0,	qC		145.9,	qC		145.9,	qC	
8a'	113.6,	qC		113.6,	qC		113.6,	qC	
7-OH ^a									2.06, br s
8-OH ^a			3.43, s			3.56, d (2.4)			3.77, s

^aExchangeable with D_2O .

presence of four methylenes, five methines (three oxygenated), one secondary methyl, one oxygenated and one doubly oxygenated quaternary carbon, two carbonyl carbons (one ketone and one ester), and 12 olefinic/aromatic carbons. On the basis of the above data, eight degrees of unsaturation were due to six double bonds and two carbonyl groups, and the molecule should be heptacyclic. The existence of a naphthalene moiety was indicated by ^1H – ^1H COSY correlations of H-2'/H-3', H-3'/H-4', H-5'/H-6', and H-6'/H-7', as well as by HMBC correlations of H-3'/C-1', H-3'/C-4a', H-4'/C-8a', H-6'/C-4a', H-6'/C-8', and H-7'/C-8a' (Figure 1). In addition, the chemical shifts of the nonprotonated carbons C-1' and C-8' at 147.3 and 146.0, respectively, were suggestive of a 1,8-dioxynaphthalene moiety. According to these correlations, compound **1** was recognized as a member of the spirobisnaphthalene class of compounds, characterized by a spiroketal-linked 1,8-dioxynaphthalene unit. Furthermore, the ^1H – ^1H COSY correlations of **1** clarified the existence of four extended spin systems corresponding to the C-2–C-4, C-6–C-8a, C-11–C-12, and C-10–C-14 subunits (Figure 1). The observed HMBC correlation of H-2 with C-1 led to the conclusion that this unit was attached to the second part of the molecule via a spiroketal bridge. The presence of an α,β -

Figure 1. Key ^1H – ^1H COSY and HMBC correlations of **1** and **6**.

unsaturated ketone at C-5 was established by HMBC correlations of H-8a/C-4a, H-8a/C-5, and H-6/C-5. In addition, HMBC correlations from H-7, H-10, and H-11 to C-9, as well as from H-12 to C-13, led to the corroboration of an additional tetrahydrofuran and lactone joining together via a spirocenter at C-5. However, the stereoconfigurational arrangement of these two rings remained ambiguous due to the paucity of correlations. The structure and relative configuration of

rhytidenone A (**1**) was further confirmed by single-crystal X-ray diffraction analysis, and its perspective ORTEP plot is shown in Figure 2. Therefore, compound **1** was identified as a novel

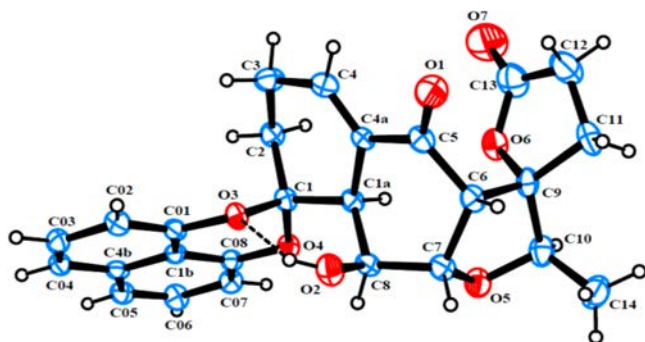


Figure 2. ORTEP drawing of **1**.

spirobisnaphthalene containing a 1,7-dioxaspiro[4.4]nonan-2-one motif, which seems to be an unprecedented addition product between the bisnaphthalene moiety and a hexenyl carboxylic unit.

Rhytidenone B (**2**), obtained as a pale yellow gum, had the molecular formula $C_{20}H_{18}O_4$ as established by HRESIMS (m/z 323.1280, calcd for $[M + H]^+$ 323.1278). From this formula, compound **2** was determined to contain 12 degrees of unsaturation, seven of which were due to a carbonyl group and six carbon–carbon double bonds, according to the 1H and ^{13}C NMR data (Table 1); accordingly the molecule should be pentacyclic. The NMR spectra of **2** displayed the typical signals associated with a spirobisnaphthalene, including signals for a 1,8-disubstituted naphthalene [δ_H 6.94 (d, $J = 7.6$ Hz), 6.95 (d, $J = 7.6$ Hz), 7.43 (t, $J = 7.6$ Hz), 7.46 (t, $J = 7.6$ Hz), 7.50 (d, $J = 8.4$ Hz), 7.54 (d, $J = 8.4$ Hz); δ_C 109.7 CH, 109.8 CH, 113.6 qC, 120.6 CH, 121.5 CH, 127.3 CH ($\times 2$), 134.2 qC, 145.9 qC, 147.2 qC], and a spiroketal quaternary carbon (δ_C 103.0). Indeed, the NMR data of **2** were similar to those of **1**, except for the disappearance of signals for tetrahydrofuran and lactone subunits in **1**. According to the 1H – 1H COSY data, observed correlations of H-2/H-3, H-3/H-4, H-6/H-7, H-7/H-8, and H-8/H-8a led to the establishment of two isolated spin systems, the C-2–C-4 and C-6–C-8a units. In the HMBC spectrum, H-2 displayed cross-peaks to the quaternary carbon at δ_C 103.0 (C-1) and also to C-8a, indicating the vicinity of C-2 and C-8a to the spiroketal bridge C-1. The existence of the $\Delta^{4,4a}$ conjugated with a carbonyl carbon at C-5 was confirmed by HMBC correlations of H-3/C-4a, H-8a/C-4a, H-8/C-4a, and H-6/C-5, in addition to the upfield chemical shift of C-5 (δ_C 198.5). Moreover, an exchangeable proton at δ_H 3.56 was assigned to 8-OH by its correlations to C-7 and C-8. The relative configuration of **2** was determined by NOESY correlation of H-8 with H-8a.

Rhytidenone C (**3**) was obtained as a colorless gum. HRESIMS analysis of the molecular ion (m/z 339.1236 $[M + H]^+$) suggested the molecular formula of $C_{20}H_{18}O_5$, which was indicative of 12 degrees of unsaturation. The NMR data of **3** (Table 1) were similar to those of **2**, except for the replacement of the methylene carbon at C-7 in **2** by an oxygenated methine carbon (δ_C 68.0). In addition, one exchangeable proton at δ_H 2.06 was assigned as 7-OH by its 1H – 1H COSY correlation with H-7, while the other exchangeable proton at δ_H 3.77 was assigned as 8-OH by its HMBC correlations with C-7 and C-8a.

The relative configuration of **3** was established by analysis of NOESY data. An NOE between H-8a and H-8 indicated a *cis*-orientation of these substituents (Figure 3), whereas the lack of

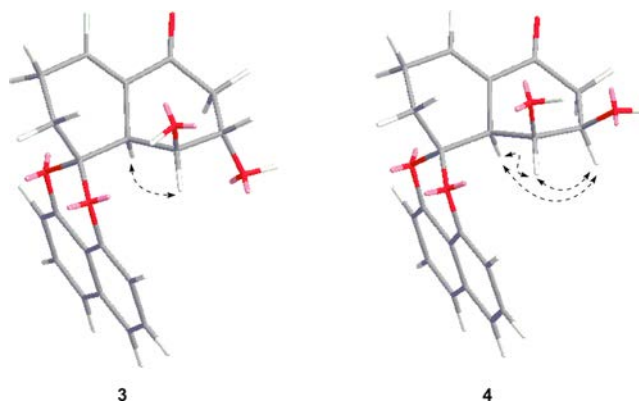


Figure 3. Key NOESY correlations of **3** and **4**.

NOEs between H-8 and H-7, as well as between H-8a and H-7, suggested that the orientation of H-7 was opposite of H-8. Thus, the structure of rhytidenone C (**3**) was determined as shown.

Rhytidenone D (**4**), a pale yellow gum, had a molecular formula of $C_{20}H_{18}O_5$, established by HRESIMS (m/z 339.1234, calcd for $[M + H]^+$ 339.1232), being the same as that of rhytidenone C (**3**). Comparison of the NMR data of **4** with those of **3** indicated a different orientation of 7-OH, implying a different C-7 configuration. Significant NOE correlations of H-8/H-8a, H-7/H-8, and H-7/H-8a (Figure 3) indicated that they were in the same orientation.

Rhytidenone E (**5**) was isolated as a colorless gum, and the molecular formula was assigned as $C_{21}H_{20}O_5$ by HRESIMS at m/z 375.1204 $[M + Na]^+$ (calcd 375.1208). The NMR data of **5** were closely related to those of **4**, except for the presence of a methoxy group at C-7. This was confirmed by the HMBC correlation of the singlet methoxy protons at δ_H 3.46 to C-7. The relative configuration of **5** was established to be the same as **4** on the basis of NOE correlations of H-8/H-8a, H-7/H-8, and H-7/H-8a.

Rhytidenone F (**6**), a yellow gum, had the molecular formula $C_{20}H_{16}O_4$ by HRESIMS (m/z 321.1123 $[M + H]^+$, calcd 321.1127), two mass units less than that of rhytidenone B (**3**). Two conjugated enone units were present in **6**. With the extended conjugative effect in **6**, the ketone carbonyl at C-5 was significantly shifted downfield to δ_C 187.1. This finding was confirmed by HMBC correlations of H-6/C-4a and H-7/C-5 (Figure 1). The relative configuration of **6** was assigned to be the same as **1** on the basis of NOE correlation of H-8 and H-8a.

The anti-inflammatory activity of compounds **3**–**7** was evaluated by monitoring their inhibitory effects on nitric oxide (NO) production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated J774.A1 macrophage cells. Among the compounds tested, compound **3** displayed the most promising anti-inflammatory activity with an IC_{50} value of 0.31 μM , while activity of its C-7 epimer (**4**) was 10-fold lower ($IC_{50} = 3.60 \mu M$), indicating that the α -orientation of 7-OH is most likely associated with the anti-inflammatory activity of **3**. According to the MTT results, inhibition of NO production in stimulated cells of compounds **5** and **6** was caused by their cytotoxicity. Moreover, compound **7** did not show any significant anti-inflammatory activity at a dose of 10 μM . This suggested that the absence of the carbonyl

Table 2. ^1H (400 MHz) and ^{13}C (100 MHz) NMR Data of Compounds 4–6 in CDCl_3

position	4			5			6		
	δ_{C}	type	δ_{H} , mult. (J in Hz)	δ_{C}	type	δ_{H} , mult. (J in Hz)	δ_{C}	type	δ_{H} , mult. (J in Hz)
1	102.8,	qC		103.5,	qC		102.8,	qC	
2	27.8,	CH_2	2.28, m 1.71, m	27.7,	CH_2	2.23, m 1.70, ddd (13.6, 8.0, 1.6)	28.4,	CH_2	2.26, dt (13.6, 6.0) 1.92, dt (13.6, 6.8)
3	23.0,	CH_2	2.40, m 2.29, m	22.9,	CH_2	2.38, m 2.25, m	22.7,	CH_2	2.43, m
4	137.9,	CH	7.13, br m	136.4,	CH	7.06, br m	137.1,	CH	7.18, br m
4a	131.0,	qC		132.8,	qC		131.2,	qC	
5	196.9,	qC		197.2,	qC		187.1,	qC	
6	43.7,	CH_2	2.93, dd (18.0, 6.8) 2.78, dd (18.0, 10.0)	39.3,	CH_2	2.95, dd (18.0, 4.8) 2.69, dd (18.0, 1.6)	131.8,	CH	6.24, d (10.0)
7	69.2,	CH	4.09, br m	76.9,	CH	3.89, ddd (6.4, 4.4, 2.0)	146.1,	CH	7.07, dd (10.0, 6.0)
8	67.5,	CH	4.90, s	65.1,	CH	4.89, d (3.2)	62.2,	CH	4.94, m
8a	43.6,	CH	3.03, br s	43.9,	CH	3.50, br m	47.3,	CH	3.27, br m
1'	147.1,	qC		147.3,	qC		146.8,	qC	
2'	109.8,	CH	6.97, d (7.6)	109.9,	CH	6.98, d (7.6)	109.7,	CH	6.92, d (7.6)
3'	127.7,	CH	7.46, t (8.0)	127.7,	CH	7.45, t (7.6)	127.6,	CH	7.43, t (7.6)
4'	120.7,	CH	7.52, d (8.4)	120.6,	CH	7.50, d (8.4)	120.7,	CH	7.52, d (8.8)
4a'	134.2,	qC		134.2,	qC		134.2,	qC	
5'	121.6,	CH	7.55, d (8.4)	121.4,	CH	7.55, d (8.4)	121.2,	CH	7.50, d (8.8)
6'	127.3,	CH	7.43, t (8.0)	127.2,	CH	7.42, t (7.6)	127.4,	CH	7.43, t (7.6)
7'	109.7,	CH	6.94, d (7.6)	109.2,	CH	6.92, d (7.6)	109.5,	CH	6.97, d (7.6)
8'	145.8,	qC		146.0,	qC		146.3,	qC	
8a'	113.5,	qC		113.6,	qC		113.5,	qC	
7-OMe						3.46, s			
8-OH ^a			3.50, s			3.68, s			3.25, d (3.6)

^aExchangeable with D_2O .

group at C-5 is responsible for the lack of activity of this compound type. Rhytidenones C and D (3 and 4) may offer a promising entry point for the development of new anti-inflammatory agents, primarily due to their low IC_{50} values and relative lack of toxicity.

The various reported activities of the spironaphthalenes can be mainly attributed to the presence of an α,β -unsaturated keto-functionality (as in the structure of 6) due to its chemical reactivity. Thus, it has been shown that these compounds can undergo Michael reactions with elected solvents and generate compounds that added, for example, a hydroxy or methoxy group nonstereospecifically.²² As a result of the reaction, these compounds lost the activity of the reactive parent compound. Therefore, it is highly likely that compounds 3, 4, and 5 are artifacts of 6 formed during the isolation and purification procedures. This would readily explain the differences in the observed stereconfiguration at C-7.

EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Procedures. Optical rotations were measured on a PerkinElmer 341 polarimeter. UV spectra were recorded on a Shimadzu UV-160 UV–visible spectrometer. NMR spectra were acquired on a Varian Mercury-400 Plus NMR spectrometer with TMS as internal standard. HRESIMS was carried out on a microTOF-Q II ESI mass spectrometer. Single-crystal X-ray diffraction analysis was performed on a Bruker APEX II diffractometer.

Fungal Material. The fungus AS21B used in the present study was isolated from leaves of *Azima sarmentosa*, collected from the mangrove forest in Samutsakhon Province, Thailand, in July 2008. The fungus was identified as a *Rhytidhysterion* sp. based on the ITS sequences (deposited in GenBank, accession no. KJ865411), and was deposited in the Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University.

Fermentation and Isolation. The strain AS21B was grown on a potato dextrose agar (PDA) plate at room temperature for 7 days. Mass growth of the fungus was performed in 1 L Erlenmeyer flasks ($\times 20$). Five pieces ($5 \times 5 \text{ mm}^2$) of mycelial agar plugs were inoculated on solid rice medium, and the cultivation was kept at room temperature for 28 days under static conditions. The medium was prepared by adding 100 mL of H_2O to 100 g of jasmine brown rice and kept overnight prior to autoclaving.

Extraction and Isolation. The culture was extracted with EtOAc. The extract was fractionated by Sephadex LH-20 column chromatography. The main fraction (520 mg) was rechromatographed on Sephadex LH-20 with MeOH to give seven fractions (F1–F6). Fraction F2 was applied to silica gel (SiO_2) column chromatography with a gradient of MeOH/ CH_2Cl_2 from 2.5:97.5 to 5:95 to yield 7 (18.0 mg). Fraction 3 was subjected to a SiO_2 column eluted by a 1:1 mixture of EtOAc and hexane to give 2 (1.8 mg), 5 (9.8 mg), and three subfractions (F3.1–F3.3). Fraction 3.1 was further purified by SiO_2 column chromatography (EtOAc/hexane, 1:1) to afford 1 (1.0 mg). Fraction F4 was chromatographed over SiO_2 eluted with MeOH/ CH_2Cl_2 (2.5:97.5) to yield six subfractions. Subfraction F4.3 was purified by SiO_2 column chromatography eluted with acetone/ CH_2Cl_2 (5:95) to provide 6 (5.2 mg). Fraction F4.6 was rechromatographed on SiO_2 (EtOAc/hexane, 1:1) to yield 3 (5.5 mg) and 4 (2.4 mg).

Rhytidenone A (1): colorless crystals; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +5.4$ (c 0.04, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 226 (4.2), 298 (3.6) nm; ^1H and ^{13}C NMR, see Table 1; HRESIMS m/z 471.1416 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{O}_7\text{Na}$, 471.1420).

Rhytidenone B (2): pale yellow gum; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -5.5$ (c 0.05, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 222 (4.8), 297 (3.7) nm; ^1H and ^{13}C NMR, see Table 1; HRESIMS m/z 323.1280 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{O}_4$, 323.1278).

Rhytidenone C (3): colorless gum; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -16.2$ (c 0.25, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 224 (4.3), 297 (3.5) nm; ^1H and ^{13}C NMR, see Table 1; HRESIMS m/z 339.1236 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{O}_5$, 339.1232).

Rhytidene D (4): pale yellow gum; $[\alpha]_D^{25} +119.1$ (c 0.20, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 221 (5.0), 296 (3.8) nm; ^1H and ^{13}C NMR, see Table 2; HRESIMS m/z 339.1234 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{O}_5$, 339.1232).

Rhytidene E (5): colorless gum; $[\alpha]_D^{25} -18.3$ (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 222 (4.4), 296 (3.4) nm; ^1H and ^{13}C NMR, see Table 2; HRESIMS m/z 375.1204 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_5\text{Na}$, 375.1208).

Rhytidene F (6): yellow gum; $[\alpha]_D^{25} -20.3$ (c 0.25, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 230 (4.6), 303 (3.6) nm; ^1H and ^{13}C NMR, see Table 2; HRESIMS m/z 311.1123 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{O}_4$, 311.1127).

X-ray Crystallographic Analysis of Rhytidene A (1). All crystallographic data were collected at 293 K on a Bruker APEX II diffractometer with Mo $K\alpha$ radiation ($\lambda = 0.71073$ Å). The structures were solved by direct methods using SHELXS-97 and refined by full-matrix least-squares on all F^2 data using SHELXL97 to final R values.^{23,24} All hydrogen atoms were added at calculated positions and refined using a rigid model. Crystallographic data for **1** have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre. Copies of the data can be obtained, free of charge, via www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif, by e-mailing data_request@ccdc.cam.ac.uk, or by contacting the Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: +44 1223 336033.

Crystal data for compound 1: colorless crystal, $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{O}_7$, $M_r = 448.45$, monoclinic, $a = 7.7279(12)$ Å, $b = 7.7892(9)$ Å, $c = 17.775(3)$ Å, space group $P2_1$, $Z = 2$, $D_x = 1.393$ Mg/m³, and $V = 1069.1(3)$ Å³, $\mu(\text{Mo } K\alpha) = 0.10$ mm⁻¹, and $F(000) = 472$. Crystal dimensions: $0.52 \times 0.14 \times 0.25$ mm. Independent reflections: 2603 ($R_{\text{int}} = 0.025$). The final R_1 values were 0.040, $wR_2 = 0.120$ ($I > 2\sigma(I)$). CCDC number: 980911.

Anti-inflammatory Assay. The murine macrophage J774.A1 cell line was maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, 100 mM sodium pyruvate, Hepes free acid, penicillin G, and streptomycin. In brief, 5×10^4 J774.A1 cells were plated in 96-well plates, incubated for 1 h, pretreated with designated concentrations of compounds or vehicle (DMSO) for another 2 h, and challenged with LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for an additional 18 h. Equal volumes of cultured medium and Griess reagent (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid and 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride in distilled water) were mixed for 10 min, and the absorbance at 540 nm was determined with a microplate reader. Indomethacin was used as a positive control with an IC_{50} value of 28.5 μM .

Cytotoxicity Assay. Cytotoxicity of isolated compounds was assessed with a modification of the MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium] bromide) assay against unstimulated J774.A1 cells according to previously described procedures.²⁵

■ ASSOCIATED CONTENT

● Supporting Information

NMR spectra of compounds **1**–**6** and CIF file for compound **1**. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tel/Fax: +66-2-2187641/+66-2-2541309. E-mail: Khanitha.P@chula.ac.th.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Thailand Research Fund (RSA5580023) and the Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund of Chulalongkorn University (RESS60530208-AS). The authors also gratefully thank Miss S. Chokpaiboon, Program in

Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, for fungal cultivation.

■ REFERENCES

- (1) Zhang, H. W.; Song, Y. C.; Tan, R. X. *Nat. Prod. Res.* **2006**, *23*, 753–771.
- (2) Strobel, G.; Diasy, B.; Castillo, U.; Harper, J. J. *Nat. Prod.* **2004**, *67*, 257–258.
- (3) Gunatilaka, A. A. L. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 509–526.
- (4) Stierle, A.; Stroble, G. A.; Srierle, D. *Science* **1993**, *260*, 214–216.
- (5) Kusari, S.; Zühkle, S.; Spittler, M. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 2–7.
- (6) Guan, S.; Sattler, I.; Lin, W.; Guo, D.; Grabley, S. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1198–1200.
- (7) Xu, F.; Zhang, Y.; Wang, J.; Pang, J.; Huang, C.; Xu, X.; She, Z.; Vrijmoed, L. L. P.; Jones, G. E. B.; Lin, Y. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1251–1253.
- (8) Kjer, J.; Wray, V.; Edrada-Ebel, R.; Ebel, R.; Pretsch, A.; Lin, W.; Proksch, P. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 2053–2057.
- (9) Liu, D.-Z.; Dong, Z.-J.; Wang, F.; Liu, J.-K. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 3152–3153.
- (10) Ananda, K.; Sridhar, K. R. *Can. J. Microbiol.* **2001**, *48*, 871–878.
- (11) Jones, G.; Stanley, S. J.; Pinruan, U. *Bot. Mar.* **2008**, *51*, 163–170.
- (12) Jiao, P.; Swenson, D. C.; Gloer, J. B.; Campbell, J.; Shearer, C. A. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 1667–1671.
- (13) Hu, H.; Guo, H.; Li, E.; Zhou, Y.; Che, Y. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 1672–1675.
- (14) Macías-Rubalcava, M. L.; Hernández-Bautista, B. E.; Jiménez-Estrada, M.; González, M. C.; Glenn, A. E.; Hanlin, R. T.; Hernández-Ortega, S.; Saucedo-García, A.; Muria-González, J. M.; Anaya, A. L. *Phytochemistry* **2008**, *69*, 1185–1196.
- (15) Matínez-Luis, S.; Della-Togna, G.; Coley, P. D.; Kursar, T. A.; Gerwick, W. H.; Cubilla-Rios, L. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 2011–2014.
- (16) van der Sar, S. A.; Blunt, J. W.; Munro, M. H. G. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 2059–2061.
- (17) Schlingmann, G.; West, R. R.; Milne, L.; Pearce, C. J.; Carter, G. T. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7225–7228.
- (18) Chen, X.; Shi, Q.; Lin, G.; Guo, S.; Yang, J. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 1712–1715.
- (19) Cai, Y.-S.; Guo, Y.-W.; Krohn, K. *Nat. Prod. Res.* **2010**, *27*, 1840–1870.
- (20) Wipf, P.; Lynch, S. M.; Birmingham, A.; Tamayo, G.; Jiménez, A.; Campos, N.; Powis, G. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 1651–1658.
- (21) Dong, J. Y.; Song, H. C.; Li, J. H.; Tang, Y. S.; Sun, R.; Wang, L.; Zhou, Y. P.; Wang, L. M.; Shen, K. Z.; Wang, C. R.; Zhang, K.-Q. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 952–956.
- (22) Schlingmann, G.; Matile, S.; Berova, N.; Nakanishi, K.; Carter, G. T. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 435–446.
- (23) Sheldrick, G. M. *SHELXS-97, Program for Crystal Structure Solution*; University of Göttingen: Germany, 1997.
- (24) Sheldrick, G. M. *SHELXL-97, Program for Crystal Structure Refinement*; University of Göttingen: Germany, 1997.
- (25) Khan, S.; Shin, E. M.; Jung, Y. H.; Kim, J.; Tosun, A.; Kim, Y. C. *J. Cell. Biochem.* **2011**, *112*, 2179–2188.