



**สารต้านแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา และต้านอนุมูลอิสระ
จากเชื้อราและพืชที่คัดเลือก
(RTA5180007)**

**รายงานฉบับสมบูรณ์
(30 กรกฎาคม 2551 – 29 กรกฎาคม 2554)**

โดย

**ศาสตราจารย์ ดร. วชิรินทร์ รุกขไชยศิริกุล
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์**

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการค้นหาสารต้านจุลินทรีย์ ด้านเชื้อรา และต้านอนุมูลอิสระจากราเอนโดไฟท์จากพืชสกุลการ์ซีเนียและพืชป่าชายเลน ราทะเลจากกัลปิงหา ราดิน และพืชที่คัดเลือกตลอดจนทำการแยกและจำแนกราเอนโดไฟท์จากหญ้าทะเล ราทะเล และจุลินทรีย์เอนโดไฟท์จากพืชในวงศ์จิง

จากการศึกษาเชื้อราเอนโดไฟท์จำนวน 5 และ 4 ไอโซเลท ซึ่งแยกจากพืชสกุลการ์ซีเนียและพืชป่าชายเลน ตามลำดับ พบว่าสามารถแยกสารใหม่และสารที่มีการรายงานโครงสร้างแล้วจำนวน 26 และ 47 สาร ตามลำดับ โดยพบว่า (+)-sclerotiorin ที่แยกได้จาก *Penicillium sclerotiorum* PSU-A13 แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* ในระดับดีด้วยค่า MIC 32 $\mu\text{g/ml}$ นอกจากนี้ 1-(2,5-dihydroxyphenyl)-2-buten-1-one ที่ผลิตโดย *Microsphaeropsis arundinis* PSU-G18 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อ DPPH $\cdot$ ด้วยค่า IC₅₀ 0.018 mg/ml ในระดับเดียวกับสารมาตรฐาน butylated hydroxyanisole ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Microsporium gypseum* SH-MU-4 ในระดับดีมาก (MIC 8 $\mu\text{g/ml}$) และแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Candida albicans* และ *C. neoformans* ในระดับดีเท่ากัน (MIC 32 $\mu\text{g/ml}$)

เมื่อแยกสารสกัดหยาบที่ได้จากราทะเลจำนวน 10 ไอโซเลท ด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟีได้สารใหม่และสารที่มีการรายงานโครงสร้างแล้วจำนวน 31 และ 65 สาร ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อต่อยาเมธิซิลลิน (methicillin-resistant *S. aureus*) ของสารที่แยกได้ พบว่า coniothranthraquinone 1 และ emodin ที่แยกได้จาก *Trichoderma aureoviride* PSU-F95 แสดงฤทธิ์ในระดับดีมากด้วยค่า MIC 8 และ 4 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า *Fusarium* spp. PSU-F14 และ PSU-F135 ผลิตสารหลักประเภทแอนทราควิโนนและแนฟโทควิโนน ตามลำดับ ซึ่งสารประเภทเหล่านี้แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับที่น่าสนใจ เมื่อนำสารที่แยกได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก มะเร็งเต้านม และเซลล์ปกติ (Vero cells) พบว่า austrocortirubin แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมเท่านั้นด้วยค่า IC₅₀ 1.80 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งใกล้เคียงกับสารอ้างอิง doxorubicine (IC₅₀ 1.27 $\mu\text{g/ml}$) และไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ

การแยกสารต้านอนุมูลอิสระจากใบจุมพุด (*Garcinia prainiana*) รากมะกรูด (*Citrus hystrix*) และดอกกระดุมทองเลื้อย (*Wedelia trilobata*) ได้สารหลากหลายประเภทที่แสดงฤทธิ์ในระดับที่ดีกว่าสารมาตรฐาน ได้แก่ morelloflavone จากใบจุมพุด (+)-syringaresinol จากรากมะกรูด และ 4,2',4'-tetrahydroxychalcone และ luteolin 7-methyl ether จากดอกกระดุมทองเลื้อย ที่แสดงค่า IC₅₀ 72, 76, 62 และ 37 μM ตามลำดับ

ทำการแยกเชื้อราเอนโดไฟต์จากหญ้าทะเล 4 ชนิด ได้แก่ *Enhalus acoroides*, *Cymodocea rotundata*, *Halophila ovalis* และ *Thalassia hemprichii* ซึ่งเก็บจากบริเวณอ่าวมะขาม จังหวัดตรัง ได้ทั้งหมด 210 ไอโซเลต จัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวิถีทางชีวโมเลกุล จัดแบ่งได้ 8 Order 28 Genus เป็นราใน Genus *Cladosporium* มากที่สุด 20 ไอโซเลต รองลงมา คือ *Penicillium* (17 ไอโซเลต), *Fusarium* (11 ไอโซเลต), *Cochliobolus*, *Nigrospora* และ *Trichoderma* อย่างละ 9 ไอโซเลต นำเชื้อราทั้งหมดไปเพาะเลี้ยงในอาหาร potato dextrose broth (PDB) แล้วนำไปสกัดด้วยวิธีทางเคมีได้ส่วนสกัดหยาบ 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนสกัดหยาบ ethyl acetate จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา (BE), ส่วนสกัดหยาบ hexane จากส่วนเส้นใยรา (CH) และส่วนสกัดหยาบ ethyl acetate จากส่วนเส้นใยรา (CE) ได้สารสกัดทั้งหมด 602 สาร นำไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรค และหาค่า MIC และ minimal bactericidal concentration (MBC) หรือ minimal fungicidal concentration (MFC) ด้วยวิธี colorimetric microdilution พบว่าสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียดีที่สุด คือสารสกัด CE จาก *Fusarium* sp. ES73 สามารถยับยั้ง *S. aureus* ทั้งสองสายพันธุ์ (MIC 8 $\mu\text{g/ml}$) และสารสกัด BE และ CH จากเชื้อ *Stephanonectria keithii* ES172 ให้ค่า MIC ต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC25923 8 $\mu\text{g/ml}$ สารสกัด BE จาก *Aspergillus* sp. ES4 มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Escherichia coli* ATCC25922 ปานกลาง (MIC 32 $\mu\text{g/ml}$) ส่วนสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้าน *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 เป็นสารสกัดที่มีฤทธิ์ต่ำ (MIC 200 $\mu\text{g/ml}$) สำหรับฤทธิ์ต้านรา พบว่าสารสกัด CE จาก *Trichoderma* sp. ES38, *Trichoderma* sp. ES8 และ CH จาก *Hypocreales* sp. ES26 ยับยั้ง *C. albicans* ให้ค่า MIC 1, 2 และ 8 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ส่วน CE จาก *Fusarium* sp. ES73, CH จาก ES-190, *Penicillium citrinum* ES43 และ *Hypocreales* sp. ES26 ยับยั้ง *C. neoformans* ให้ค่า MIC 1-4, 4, 8 และ 8-16 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ และสารสกัด CH จาก *Hypocreales* sp. ES26 ยังสามารถยับยั้งเชื้อ *M. gypseum* ได้ดีมาก ให้ค่า MIC 2 $\mu\text{g/ml}$ และค่า MFC 16 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งใกล้เคียงกับยาต้านรามาตรฐาน miconazole นอกจากนี้สารสกัด CH และ BE จาก *Nigrospora* sp. ES5 ยับยั้ง *M. gypseum* ได้ดีรองลงมา (MIC/MFC 4/4 และ 8/8 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ) ส่วนสารสกัด CE จาก *Schizophyllum commune* ES49 มีฤทธิ์ปานกลางต่อเชื้อ *Penicillium marneffei* clinical isolate (MIC/MFC 16/64 $\mu\text{g/ml}$) นอกจากนี้ยังได้นำสารสกัด 115 สารสกัด จากเชื้อรา 86 ไอโซเลต มาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสารสกัด BE จาก ES109 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH ในระดับดี (IC_{50} 0.036 mg/ml) สารสกัด BE จาก ES109 และ *Pleiosporales* sp. ES187 ต้านอนุมูล $\text{OH}^{\bullet}$ ได้ในระดับดีมาก (IC_{50} 0.62 และ 0.69 mg/ml) ซึ่งใกล้เคียงกับค่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน tannin (0.5 mg/ml) และสารสกัด BE จาก *Pleiosporales* sp. ES187 และ ES200 ต้านอนุมูล superoxide anion ในระดับดีมาก (IC_{50} 0.22 และ 0.32 mg/ml) ใกล้เคียงกับค่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน trolox (0.3 mg/ml) ผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า ราเอนโดไฟต์จากหญ้าทะเลมีความหลากหลายและเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ

ในการคัดเลือกราหะเลที่ผลิตสารต้านจุลินทรีย์ ได้ทำการแยกเชื้อราทะเลจากสาหร่ายและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง จากจังหวัดชุมพร นครศรีธรรมราช และภูเก็ต ได้เชื้อราจำนวน 105 ไอโซเลต เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากราทั้งหมด มีน้ำเลี้ยงเชื้อรา 34 ไอโซเลต (32.4%) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้อย่างน้อย 1 ชนิด และจากจำนวนสารสกัดหยาบ 315 สารที่นำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ พบว่ามีสารสกัดจำนวน 100 (31.7%), 108 (34.3%), 8 (2.5%), 51 (16.2%), 130 (42.3%), 144(45.7%) และ 42 (13.3%) สารสกัด ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC25923, Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) SK1, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Escherichia coli* ATCC25922, *C. albicans* ATCC90028, *C. neoformans* ATCC90112 และ *M. gypseum* SH-MU4 ได้ โดยมีค่า MIC ต่ำสุดดังกล่าว อยู่ในช่วง 2-200, 8-200, 2-200, 128-200, 0.25-200, 0.25-200 และ 32-200 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ และมีสารสกัดจำนวน 2, 2 และ 1 สารที่สามารถฆ่าเชื้อ *S. aureus* (MBC 128 และ 128 $\mu\text{g/ml}$), *C. neoformans* (MFC 32 และ 128 $\mu\text{g/ml}$) และ *C. albicans* (MFC 128 $\mu\text{g/ml}$) ได้ตามลำดับ

จากการศึกษาความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ของแบคทีเรียและราเอนโดไฟท์ ที่แยกได้จากพืชวงศ์จิง 7 ชนิด คือ กระเจียวขาว กระเทียม กุ๊ก ข่า ข่าป่า ปุดคางคก และไพล ด้วยการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียจำนวน 11 ไอโซเลต และราเอนโดไฟท์จำนวน 133 ไอโซเลต ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (*Fusarium oxysporum*) และแบคทีเรียสาเหตุโรครเหี่ยว (*Ralstonia solanacearum*) โดยเลี้ยงราและแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในอาหารต่างๆ พบว่าสารสกัดหยาบของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ZB9 ที่เลี้ยงใน glucose yeast extract corn starch broth ยับยั้งการเจริญของ *F. oxysporum* ได้ดีที่สุด (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใส 15 มม.) ในขณะที่สารสกัดหยาบของราเอนโดไฟท์ PDB141 และ PDB152 ที่เลี้ยงใน potato dextrose galangal powder broth และ PDB148 ที่เลี้ยงใน potato dextrose broth ยับยั้งการเจริญของ *R. solanacearum* ได้ดีที่สุด (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใส 16 มม.) สำหรับการคัดกรองจุลินทรีย์เอนโดไฟท์ที่สร้างไซเดอโรฟออร์ หลังจากการเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์จำนวน 37 ไอโซเลต บนอาหารแข็ง chrome azurol S แต่เมื่อคัดเลือกราเอนโดไฟท์บางไอโซเลตที่ให้ผลบวกโดยเจริญบนอาหารชนิดนี้และสร้าง halo zone สีเหลืองหรือสีชมพูรอบๆ โคลนินี้ ไปเลี้ยงในอาหารเหลว MGs-1 และตรวจสอบหมู่ฟังก์ชันของไซเดอโรฟออร์โดยวิธี Arnou assay และ Ferric perchlorate assay พบว่าราเอนโดไฟท์ PDB141 ที่สร้าง halo zone ขนาดเล็กกว่าสร้างไฮดรอกซามาเทไซเดอโรฟออร์ 150.71 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งมากกว่าราเอนโดไฟท์ PDB136 ที่สร้าง halo zone ขนาดใหญ่แต่สร้างไฮดรอกซามาเทไซเดอโรฟออร์ได้เพียง 3.33 $\mu\text{g/ml}$

คำสำคัญ: ราเอนโดไฟท์ ราทะเล ราดิน แบคทีเรียเอนโดไฟท์ พืชสกุลการ์ซีเนีย พืชป่าชายเลน จมพุด มะกรูด กระดุมทองเลื้อย สารต้านแบคทีเรีย สารต้านเชื้อรา สารต้านอนุมูลอิสระ การแยกและจำแนกรา

Abstract

The research project involved the investigation of antibacterial, antifungal and antioxidant substances from selected fungi, including endophytic fungi isolated from *Garcinia* and mangrove plants, sea fan-derived fungi and soil fungi, as well as selected plants. In addition, the screening and identification of potential antimicrobial fungi or bacteria from seagrasses, algae, invertebrates and zingiberaceous plants were carried out.

26 New and 47 known metabolites were obtained from five *Garcinia*- and four mangrove-derived endophytic fungi. (+)-Sclerotiorin, isolated from *Penicillium sclerotiorum* PSU-A13, showed good antifungal activity against *Cryptococcus neoformans* with a minimum inhibitory concentration (MIC) value of 32 µg/ml. *Microsphaeropsis arundinis* PSU-G18 produced 1-(2,5-dihydroxyphenyl)-2-buten-1-one which displayed radical scavenging potency with an IC₅₀ value of 0.018 mg/ml as strong as the standard butylated hydroxyanisole and significant antifungal activity with the MIC values of 8, 32 and 32 µg/ml against *Microsporum gypseum* SH-MU-4, *C. albicans* and *C. neoformans*, respectively.

Investigation of 10 sea-fan derived fungi resulted in the isolation of 31 new and 65 known metabolites. Among them, *Trichoderma aureoviride* PSU-F95 gave coniothranthraquinone 1 and emodin which displayed strong antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with the MIC values of 8 and 4 µg/ml, respectively. Many anthraquinone and naphthoquinone derivatives were isolated as major constituents from *Fusarium* spp. PSU-F14 and PSU-F135. As compounds of these types displayed interesting cytotoxic activity, the isolated compounds from these fungi were tested for cytotoxic activity against Vero, human oral carcinoma and human breast cancer (MCF-7) cells. Austrocortirubin was selectively cytotoxic to MCF-7 cells with the IC₅₀ value 6.3 µM and noncytotoxic to Vero cells.

Six plants, including *Garcinia prainiana*, *G. nervosa*, *Wedelia trilobata*, *Citrus hystrix*, *Bouea oppositifolia* and *Mangifera foetida*, were chemically investigated. Morelloflavone from the leaves of *G. prainiana*, (+)-syringaresinol from the roots of *C. hystrix*, and, 4,2',4'-tetrahydroxychalcone and luteolin 7-methylether from the flowers of *W. trilobata* displayed higher radical scavenging potency than the standard butylated hydroxyanisole with the IC₅₀ values of 72, 76, 62 and 37 µM, respectively.

A total of 210 endophytic fungal isolates were isolated from four species of seagrasses including *Enhalus acoroides*, *Cymodocea rotundata*, *Halophila ovalis* and *Thalassia hemprichii* collected from Makham Bay, Trang province. Fungal identification based on morphological and molecular characteristics revealed that these endophytic fungi belonged to eight orders and 28 genera. The most prominent genus was *Cladosporium* (20 isolates) followed by *Penicillium* (17 isolates), *Fusarium* (11 isolates), *Cochiliobolus*, *Nigrospora* and *Trichoderma* (each of 9 isolates). All isolates were grown in potato dextrose broth (PDB) and extracted with organic solvents to obtain crude ethyl acetate extracts from the culture broth (BE), crude ethyl acetate extracts from the mycelia (CE) and crude hexane extracts from the mycelia (CH). Six hundred and two extracts were obtained and tested against pathogenic microorganisms. MIC and minimal bactericidal concentration (MBC) or minimal fungicidal concentration (MFC) were determined by colorimetric microdilution. CE from *Fusarium* sp. ES73 showed the best antibacterial activity against *S. aureus* ATCC25923 and methicillin-resistant *S. aureus* (MIC 8 $\mu\text{g/ml}$) while BE and CH from *Stephanonectria keithii* ES172 inhibited *S. aureus* ATCC25923 with the MIC value of 8 $\mu\text{g/ml}$. BE from *Aspergillus* sp. ES4 had moderate activity against *Escherichia coli* ATCC25922 (MIC 32 $\mu\text{g/ml}$). Extracts that had anti-*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 showed low activity with the MIC value of 200 $\mu\text{g/ml}$. For antifungal activity it was found that CE from *Trichoderma* sp. ES38, *Trichoderma* sp. ES8 and CH from *Hypocreales* sp. ES26 inhibited *C. albicans* with MIC values of 1, 2 and 8 $\mu\text{g/ml}$, respectively, followed by CE from *Fusarium* sp. ES73, CH from ES-190, *Penicillium citrinum* ES43 and *Hypocreales* sp. ES26 against *C. neoformans* (MIC 1-4, 4, 8 and 8-16 $\mu\text{g/ml}$, respectively). CH from *Hypocreales* sp. ES26 showed the best activity against *M. gypseum* with MIC 2 $\mu\text{g/ml}$ and MFC 16 $\mu\text{g/ml}$, which were comparable to antifungal drug miconazole. CH and BE from *Nigrospora* sp. ES5 were also active against *M. gypseum* (MIC/MFC 4/4 and 8/8 $\mu\text{g/ml}$, respectively). CE from *Schizophyllum commune* ES49 showed moderate activity against *Penicillium marneffeii* clinical isolate (MIC/MFC 16/64 $\mu\text{g/ml}$). In addition, 115 extracts from 86 endophytic fungal isolates were tested for their antioxidant activity. BE from ES109 showed good antioxidant activity in the DPPH test (IC_{50} 0.036 mg/ml) while BE from ES109 and *Pleiosporales* sp. ES187 showed very good activity against $\text{OH}^{\cdot}$ (IC_{50} 0.62 and 0.69 mg/ml) which were similar to the IC_{50} value of standard tannin (0.5 mg/ml) and BE from *Pleiosporales* sp. ES187 and ES200 against superoxide anion (IC_{50} 0.22 and 0.32 mg/ml) as compared to the IC_{50} value of standard trolox (0.3 mg/ml).

Results from this study indicated that endophytic fungi from seagrasses are diverse and could be a good source of bioactive natural products.

To screen for marine fungi with antimicrobial substances, 105 fungal isolates were isolated from algae and invertebrates from Chumphon, Nakhon Si Thammarat, and Phuket provinces. Fermentation broths were tested for antimicrobial activity by agar diffusion method. The results revealed that of the fermentation broths from a total of 105 isolates, 34 isolates (32.4%) showed antimicrobial activities against at least one test organism. From 315 crude extracts, 100 (31.7%), 108 (34.3%), 8 (2.5%), 51 (16.2%), 130 (42.3%), 144 (45.7%) and 42 (13.3%) extracts possessed inhibitory activities against *S. aureus* ATCC25923, Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) SK1, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Escherichia coli* ATCC25922, *C. albicans* ATCC90028, *C. neoformans* ATCC90112 and *M. gypseum* SH-MU4 with the MIC values in the range of 2-200, 8-200, 2-200, 128-200, 0.25-200, 0.25-200 and 32-200 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Two, two and one crude extracts from marine fungi inhibited the growth of *S. aureus* (MBC 128 and 128 $\mu\text{g/ml}$), *C. neoformans* (MFC 32 and 128 $\mu\text{g/ml}$) and *C. albicans* (MFC 128 $\mu\text{g/ml}$), respectively.

Bacterial and fungal endophytes were isolated from seven zingiberaceous species *Alpinia galanga*, *A. malaccensis*, *Amomum siamense*, *Curcuma parviflora*, *Etlingera litteralis*, *Zingiber cassumunar* and *Z. zerumbet*. The efficiency of 144 representative strains (11 bacteria and 133 fungi) in inhibiting the *in vitro* growth of *Fusarium oxysporum* and *Ralstonia solanacearum* was investigated. Endophytic fungi and bacteria were grown in five fermentation media. An agar well diffusion assay method was used to check the activity of resulting crude extracts. Growth of *F. oxysporum* was most strongly inhibited (15 mm inhibition zone diameter) by crude extract of ZB9 cultured in glucose yeast extract corn starch broth, while growth of *R. solanacearum* was most strongly inhibited (16 mm inhibition zone diameter) by crude extracts of PDB141 and PDB152 cultured in potato dextrose galangal powder broth and PDB148 cultured in potato dextrose broth. In screening of siderophore production, 37 fungal strains were grown on chrome azurol S (CAS agar). Twenty five strains grew on CAS agar with yellow or pink halo forming around the colonies. From this result some selected strains were then grown in MGs-1 broth to estimate catechol-type siderophores and hydroxamate siderophores by Arnou and Ferric perchlorate assays. A smaller halo zone producing strain PDB141 (150.71 $\mu\text{g/ml}$) produced higher hydroxamate siderophore than PDB136 (3.33 $\mu\text{g/ml}$).

Key words: endophytic fungi, marine-derived fungi, soil fungi, endophytic bacteria, *Garcinia* plant, mangrove plant, *Garcinia prainiana*, *Citrus hystrix*, *Wedelia trilobata*, antibacterial, antifungal, antioxidant, fungal screening and identification

Executive Summary

งานวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 3 ส่วน ดังนี้

ส่วนที่ 1 การค้นหาสารต้านจุลินทรีย์ ด้านเชื้อรา และต้านอนุมูลอิสระจากราเอนโดไฟท์จากพืชสกุลการ์ซีเนียและพืชป่าชายเลน ราชทะเลจากกัลปังกา และราดิน

คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาราเอนโดไฟท์จากพืชในสกุล *Garcinia* 5 ชนิด สามารถแยกราเอนโดไฟท์ที่มีศักยภาพในการต้านจุลินทรีย์ได้หลายชนิดและต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ได้แยกราที่มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันหลายไอโซเลทจากกัลปังกา (*Annella* sp.) และพบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อของราเหล่านี้จำนวนหนึ่งแสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (*Staphylococcus aureus*, SA หรือ methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA) ด้านเชื้อรา (*Microsporum gypseum*, MG) และต้านอนุมูลอิสระในระดับที่น่าสนใจ ดังนั้นจึงได้ทำการวิจัยเพื่อแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นสารใหม่หรือสารซึ่งมีการรายงานโครงสร้างแล้วจากราเอนโดไฟท์จากพืชสกุลการ์ซีเนียและพืชป่าชายเลน ราชทะเล และราดิน สรุปผลการศึกษาในตารางที่ 1

จากการศึกษาเชื้อราเอนโดไฟท์จำนวน 9 ไอโซเลท สามารถแยกสารใหม่และสารที่มีการรายงานโครงสร้างแล้วจำนวน 26 และ 47 สาร ตามลำดับ โดยพบว่า (+)-sclerotiorin ที่แยกได้จาก *Penicillium sclerotiorum* PSU-A13 แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* ในระดับดีด้วยค่า MIC 32 $\mu\text{g/ml}$ นอกจากนี้ 1-(2,5-dihydroxyphenyl)-2-buten-1-one ที่ผลิตโดย *Microsphaeropsis arundinis* PSU-G18 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อ DPPH[•] ด้วยค่า IC₅₀ 0.018 mg/ml ในระดับเดียวกับสารมาตรฐาน butylated hydroxyanisole ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Microsporum gypseum* SH-MU-4 ในระดับดีมาก (MIC 8 $\mu\text{g/ml}$) และแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อรา *C. albicans* และ *C. neoformans* ในระดับดีเท่ากัน (MIC 32 $\mu\text{g/ml}$)

เมื่อแยกสารสกัดหยาบที่ได้จากราทะเลจำนวน 10 ไอโซเลท ด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟีได้สารใหม่และสารที่มีการรายงานโครงสร้างแล้วจำนวน 31 และ 65 สาร ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อต่อยาเมธิซิลลิน (methicillin-resistant *S. aureus*) ของสารที่แยกได้ พบว่า coniothranthraquinone 1 และ emodin ที่แยกได้จาก *Trichoderma aureoviride* PSU-F95 แสดงฤทธิ์ในระดับดีมากด้วยค่า MIC 8 และ 4 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า *Fusarium* spp. PSU-F14 และ PSU-F135 ผลิตสารหลักประเภทแอนทราควิโนนและแนฟโทควิโนน ตามลำดับ ซึ่งสารประเภทเหล่านี้แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับที่น่าสนใจ เมื่อนำสารที่แยกได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก มะเร็งเต้านม และเซลล์ปกติ (Vero cells) พบว่า austrocortirubin แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมเท่านั้นด้วยค่า IC₅₀ 1.80 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งใกล้เคียงกับสารอ้างอิง doxorubicine (IC₅₀ 1.27 $\mu\text{g/ml}$) และไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ

Table 1 Metabolites from endophytic, sea fan-derived and soil fungi

Fungus	Number of isolated compounds		Biological activity	output
	new	known		
Garcinia-associated endophytic fungi				
Botryosphaeria rhodina PSU-M35	5	2	-Antibacterial activity against SA and MRSA	Tetrahedron, 2009, 65, 10590-10595
Botryosphaeria rhodina PSU-M114	2	10		
Diaporthaceous fungus PSU-H2 (PSU-G2)	1	6	-Cytotoxic activity against MCF-7 cells	Arch. Pharm. Res., 2009, 32 (9), 1227-1231
Microsphaeropsis arundinis PSU-G18	8	12	-Antimicrobial activity against SA, MRSA, CA and CN -Antioxidant activity -Antimalarial activity against Plasmodium falciparum	Submitted manuscript
Penicillium sclerotiorum PSU-A13	3	6	-Antimicrobial activity against SA, CA and CN -Anti-HIV 1 integrase and protease activity	Chem. Pharm. Bull., 2010, 58 (8), 1033-1036
Mangrove-derived fungi				
Pestalotiopsis sp. PSU-MA92	3	1	-Antimicrobial activity against SA, MRSA, CA, CN and MG	Phytochem. Lett., 2011, doi:10.1016/j.phytol.2011.08.008
Pestalotiopsis sp. PSU-MA119	2	1		
Sporothrix sp. PSU-STD57	*	3 (2)*	The study is being continued in phase 2	Report
Xylaria sp. PSU-STD70	2	6	-Antimicrobial activity against SA, MRSA and MG	Manuscript
Sea fan-derived fungi				
Aspergillus sydowii PSU-F154	5	10	-Antioxidant activity	J. Nat. Prod., 2011, 74, 1663-1667
Curvularia sp. PSU-F22	3	6	-Antimicrobial activity against SA, MRSA and MG	Arch. Pharm. Res., 2011, 34 (5), 709-714

Table 1 continued

Fungus	Number of isolated compounds		Biological activity	output
	new	known		
<i>Fusarium</i> sp. PSU-F14	1	9	-Antimicrobial activity against SA, MRSA, CN and MG	<i>J. Nat. Prod.</i> , 2010 , 73, 1507-1511
<i>Fusarium</i> sp. PSU-F135	4	9	-Antimalarial activity against <i>Plasmodium falciparum</i> -Antimycobacterial activity against <i>Mycobacterium tuberculosis</i> -Cytotoxic activity against Vero, MCF-7 and KB cells	
<i>Nigrospora</i> sp. PSU-F11	2	1	-Antibacterial activity against SA and MRSA	<i>Arch. Pharm. Res.</i> , 2010 , 33 (3), 375-
<i>Nigrospora</i> sp. PSU-F12	0	5	-Antioxidant activity	380
<i>Nigrospora</i> sp. PSU-F18	4	5	-Cytotoxic activity against Vero and MCF-7 cells	<i>Phytochemistry</i> , 2009 , 70, 554-557
<i>Penicillium</i> sp. PSU-F40	9	5	-Antibacterial activity against SA and MRSA	<i>Tetrahedron</i> , 2010 , 65, 4484-4489
<i>Trichoderma</i> sp. PSU-F95	2	11	-Antibacterial activity against SA and MRSA	<i>Arch. Pharm. Res.</i> , accepted
<i>Xylaria</i> sp. PSU-F100	1	6	-Antibacterial activity against SA and MRSA	<i>Chem. Pharm. Bull.</i> , 2009 , 57 (12), 1409-1411
Soil fungus				
<i>Aspergillus</i> sp. PSU-RSPG187	**	2 (2)**	The study is being continued in phase 2	report

SA = *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, MRSA = methicillin-resistant *S. aureus*, CA = *Candida albicans*, CN = *Cryptococcus neoformans*, MG = *Microsporium gypseum*

Vero = African green monkey kidney fibroblast, KB = human oral carcinoma, MCF-7 = human breast cancer

* Three known and two unidentified compounds, ** Two known and two unidentified compounds

ส่วนที่ 2 การค้นหาสารต้านจุลินทรีย์ ด้านเชื้อรา และต้านอนุมูลอิสระจากพืชที่คัดเลือก

คณะผู้วิจัยยังได้แยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากพืชที่คัดเลือกแล้วจำนวน 6 ชนิด รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 2

Table 2 Natural products from selected plants

Plant	Investigated part	Number of isolated compounds		Biological activity	output
		new	known		
<i>Garcinia prainiana</i>	Leaves	1	6	-Antioxidant activity	<i>Can. J. Chem.</i> , 2011 , 89, 461-464.
<i>Garcinia nervosa</i>	Twigs	0	10	*	Abstract
	Stem bark	0	9		
<i>Wedelia trilobata</i>	Flowers	1	7	-Antioxidant activity	Manuscript
<i>Citrus hystrix</i>	Roots	7	32	-Antioxidant activity -Anti-HIV activity -Antibacterial activity	Manuscript
<i>Bouea oppositifolia</i>	Leaves	0	2	*	Report
<i>Mangifera foetida</i>	Twigs	**	5 (3)**	*	Report

* not tested, ** 5 known and 3 unidentified compounds

สารที่แยกจากใบจุมพุด (*Garcinia prainiana*) รากมะกรูด (*Citrus hystrix*) และดอกกระดังงาทอง (*Wedelia trilobata*) เป็นสารหลากหลายประเภท ที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในระดับที่ดีกว่าสารมาตรฐาน ได้แก่ morelloflavone จากใบจุมพุด (+)-syringaresinol จากรากมะกรูด และ 3,4,2',4'-tetrahydroxychalcone และ luteolin 7-methyl ether จากดอกกระดังงาทองที่แสดงค่า IC₅₀ 72, 76, 62 และ 37 μ M ตามลำดับ

ส่วนที่ 3 การแยกและจำแนกราณโดไฟท์จากหญ้าทะเล ราชทะเล รวมทั้งจุลินทรีย์เอนโดไฟท์จากพืชในวงศ์ขิง

ทำการแยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากหญ้าทะเล 4 ชนิด ได้แก่ *Enhalus acoroides*, *Cymodocea rotundata*, *Halophila ovalis* และ *Thalassia hemprichii* เก็บจากบริเวณอ่าวมะขาม จังหวัดตรัง ได้

ทั้งหมด 210 ไอโซเลท จัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวิธีทางชีวโมเลกุล จัดแบ่งได้ 8 Order 28 Genus เป็นราใน Genus *Cladosporium* มากที่สุด 20 ไอโซเลท รองลงมา คือ *Penicillium* (17 ไอโซเลท), *Fusarium* (11 ไอโซเลท), *Cochliobolus*, *Nigrospora* และ *Trichoderma* อย่างละ 9 ไอโซเลท นำเชื้อราทั้งหมดไปเพาะเลี้ยงในอาหาร potato dextrose broth (PDB) แล้วนำไปสกัดด้วยวิธีทางเคมีได้ส่วนสกัดหยาบ 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนสกัดหยาบ ethyl acetate จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา (BE), ส่วนสกัดหยาบ hexane จากส่วนเส้นใยรา (CH) และส่วนสกัดหยาบ ethyl acetate จากส่วนเส้นใยรา (CE) ได้สารสกัดทั้งหมด 602 สาร นำไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรค และหาค่า MIC และ minimal bactericidal concentration (MBC) หรือ minimal fungicidal concentration (MFC) ด้วยวิธี colorimetric microdilution พบว่าสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียดีที่สุด คือสารสกัด CE จาก *Fusarium* sp. ES73 สามารถยับยั้ง *S. aureus* ทั้งสองสายพันธุ์ (MIC 8 $\mu\text{g/ml}$) และสารสกัด BE และ CH จากเชื้อ *Stephanonectria keithii* ES172 ให้ค่า MIC ต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC25923 8 $\mu\text{g/ml}$ สารสกัด BE จาก *Aspergillus* sp. ES4 มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Escherichia coli* ATCC25922 ปานกลาง (MIC 32 $\mu\text{g/ml}$) ส่วนสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้าน *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 เป็นสารสกัดที่มีฤทธิ์ต่ำ (MIC 200 $\mu\text{g/ml}$) สำหรับฤทธิ์ต้านรา พบว่าสารสกัด CE จาก *Trichoderma* sp. ES38, *Trichoderma* sp. ES8 และ CH จาก *Hypocreales* sp. ES26 ยับยั้ง *C. albicans* ให้ค่า MIC 1, 2 และ 8 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ส่วน CE จาก *Fusarium* sp. ES73, CH จาก ES-190, *Penicillium citrinum* ES43 และ *Hypocreales* sp. ES26 ยับยั้ง *C. neoformans* ให้ค่า MIC 1-4, 4, 8 และ 8-16 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ และสารสกัด CH จาก *Hypocreales* sp. ES26 ยังสามารถยับยั้งเชื้อ *M. gypseum* ได้ดีมาก ให้ค่า MIC 2 $\mu\text{g/ml}$ และค่า MFC 16 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งใกล้เคียงกับยาต้านรามาตรฐาน miconazole นอกจากนี้สารสกัด CH และ BE จาก *Nigrospora* sp. ES5 ยับยั้ง *M. gypseum* ได้ดีรองลงมา (MIC/MFC 4/4 และ 8/8 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ) ส่วนสารสกัด CE จาก *Schizophyllum commune* ES49 มีฤทธิ์ปานกลางต่อเชื้อ *Penicillium marneffei* clinical isolate (MIC/MFC 16/64 $\mu\text{g/ml}$) นอกจากนี้ยังได้นำสารสกัด 115 สารสกัดจากเชื้อรา 86 ไอโซเลท มาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสารสกัด BE จาก ES109 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH ในระดับดี (IC_{50} 0.036 mg/ml) สารสกัด BE จาก ES109 และ *Pleosporales* sp. ES187 ต้านอนุมูล $\text{OH}^{\cdot}$ ได้ในระดับดีมาก (IC_{50} 0.62 และ 0.69 mg/ml) ซึ่งใกล้เคียงกับค่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน tannin (0.5 mg/ml) และสารสกัด BE จาก *Pleosporales* sp. ES187 และ ES200 ต้านอนุมูล superoxide anion ในระดับดีมาก (IC_{50} 0.22 และ 0.32 mg/ml) ใกล้เคียงกับค่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน trolox (0.3 mg/ml)

ในการคัดเลือกราทะเลที่ผลิตสารต้านจุลินทรีย์ ได้ทำการแยกเชื้อราทะเลจากสาหร่ายและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง จากจังหวัดชุมพร นครศรีธรรมราช และภูเก็ต ในระหว่างเดือนมกราคม-กรกฎาคม 2553 ได้เชื้อราจำนวน 105 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของน้ำเลี้ยง

เชื่อกันด้วยวิธี agar diffusion พบว่าจากน้ำเลี้ยงเชื้อราจำนวน 105 ไอโซเลต มีน้ำเลี้ยงเชื้อรา 34 ไอโซเลต (32.4%) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้อย่างน้อย 1 ชนิด และจากจำนวนสารสกัดหยาบ 315 สารที่นำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ พบว่า มีสารสกัดจำนวน 100 (31.7%), 108 (34.3%), 8 (2.5%), 51 (16.2%), 130 (42.3%), 144 (45.7%) และ 42 (13.3%) สารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC25923, Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) SK1, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Escherichia coli* ATCC25922, *C. albicans* ATCC90028, *C. neoformans* ATCC90112 และ *M. gypseum* SH-MU4 ได้ โดยมีค่า MIC ต่ำสุดคือ 2-200, 8-200, 2-200, 128-200, 0.25-200, 0.25-200 และ 32-200 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ และมีสารสกัดจำนวน 2, 2 และ 1 สารที่สามารถฆ่าเชื้อ *S. aureus* (MBC 128 และ 128 $\mu\text{g/ml}$), *C. neoformans* (MFC 32 และ 128 $\mu\text{g/ml}$) และ *C. albicans* (MFC 128 $\mu\text{g/ml}$) ได้ตามลำดับ ผลการศึกษายังพบว่า เชื้อรา *Talaromyces trachyspermus* ที่แยกได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล *Sargassum* sp. นอกจากจะสร้างสารที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ 4 ชนิดแล้ว ยังให้รูปแบบ ^1H NMR สเปกตรัมที่น่าสนใจ ผู้วิจัยจึงจะทำการแยกสารให้บริสุทธิ์และศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของแต่ละสารต่อไปในอนาคต

ได้ศึกษาความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ของแบคทีเรียและราเอนโดไฟท์ ที่แยกได้จากพืชวงศ์ขิง 7 ชนิด คือ กระเจียวขาว กระเทียม กุ๊ก ข่า ข่าป่า ปุคคางคก และไพล ด้วยการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียจำนวน 11 ไอโซเลต และราเอนโดไฟท์จำนวน 133 ไอโซเลต ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (*Fusarium oxysporum*) และแบคทีเรียสาเหตุโรครเหี่ยว (*Ralstonia solanacearum*) โดยเลี้ยงราเอนโดไฟท์ในอาหาร 5 ชนิด และแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในอาหาร 3 ชนิด เมื่อทดสอบสารสกัดหยาบของจุลินทรีย์เอนโดไฟท์ดังกล่าวด้วยวิธี agar well diffusion assay พบว่า สารสกัดหยาบของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ZB9 ที่เลี้ยงใน glucose yeast extract corn starch broth ยับยั้งการเจริญของ *F. oxysporum* ได้ดีที่สุด (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใส 15 มม.) ในขณะที่สารสกัดหยาบของราเอนโดไฟท์ PDB141 และ PDB152 ที่เลี้ยงใน potato dextrose galangal powder broth และ PDB148 ที่เลี้ยงใน potato dextrose broth ยับยั้งการเจริญของ *R. solanacearum* ได้ดีที่สุด (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใส 16 มม.) สำหรับการคัดกรองจุลินทรีย์เอนโดไฟท์ที่สร้างไซโตโรฟอร์ หลังจากการเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์จำนวน 37 ไอโซเลต บนอาหารแข็ง chrome azurol S พบว่าราเอนโดไฟท์จำนวน 25 ไอโซเลต ที่ให้ผลบวกโดยเจริญบนอาหารชนิดนี้และสร้าง halo zone สีเหลืองหรือสีชมพูรอบๆ โคโลนี แต่เมื่อคัดเลือกว่าไอโซเลตไปเลี้ยงในอาหารเหลว MGs-1 และตรวจสอบหมู่งักชั้นของไซโตโรฟอร์โดยวิธี Arnow assay และ Ferric perchlorate assay พบว่าราเอนโดไฟท์ PDB141 ที่สร้าง halo zone ขนาดเล็กกว่า สร้างไฮดรอกซามาเทไซโตโรฟอร์ 150.71 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งมากกว่าราเอนโดไฟท์ PDB136 ที่สร้าง halo zone ขนาดใหญ่แต่สร้างไฮดรอกซามาเทไซโตโรฟอร์ได้เพียง 3.33 $\mu\text{g/ml}$

ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ราเอนโดไฟท์จากหญ้าทะเล เชื้อราทะเล และจุลินทรีย์เอนโดไฟท์มีความหลากหลายและเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ

เนื้อหางานวิจัย

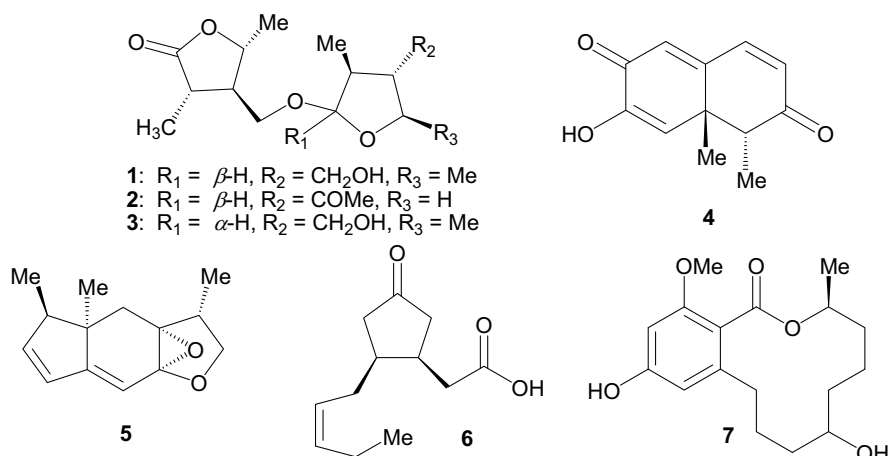
งานวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 3 ส่วน ดังนี้

ส่วนที่ 1 การค้นหาสารต้านจุลินทรีย์ ด้านเชื้อรา และต้านอนุมูลอิสระจากราเอนโดไฟท์จากพืชสกุลการ์ซีเนียและพืชป่าชายเลน รากทะเลจากกัลปังหา และราดิน

ได้ทำการศึกษาเชื้อราเอนโดไฟท์จำนวน 9 ไอโซเลท สามารถแยกสารใหม่และสารที่มีการรายงานโครงสร้างแล้วจำนวน 26 และ 47 สาร ตามลำดับ และได้สารใหม่และสารที่มีการรายงานโครงสร้างแล้วจำนวน 31 และ 65 สาร ตามลำดับ จากรากทะเลจำนวน 10 ไอโซเลท นอกจากนี้ได้เริ่มศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราดินอีกด้วย ผลการศึกษาโดยสังเขปดังนี้

เมทาบอลไลต์จากราเอนโดไฟท์ *Botryosphaeria rhodina* PSU-M35 และ PSU-M114

สามารถแยกสารใหม่จำนวน 7 สาร (1-7) และสารที่มีรายงานโครงสร้างจำนวน 12 สาร จากเชื้อรา *Botryosphaeria rhodina* PSU-M35 และ PSU-M114 นอกจากนี้ได้ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย SA และ MRSA ของเมทาบอลไลต์ที่แยก

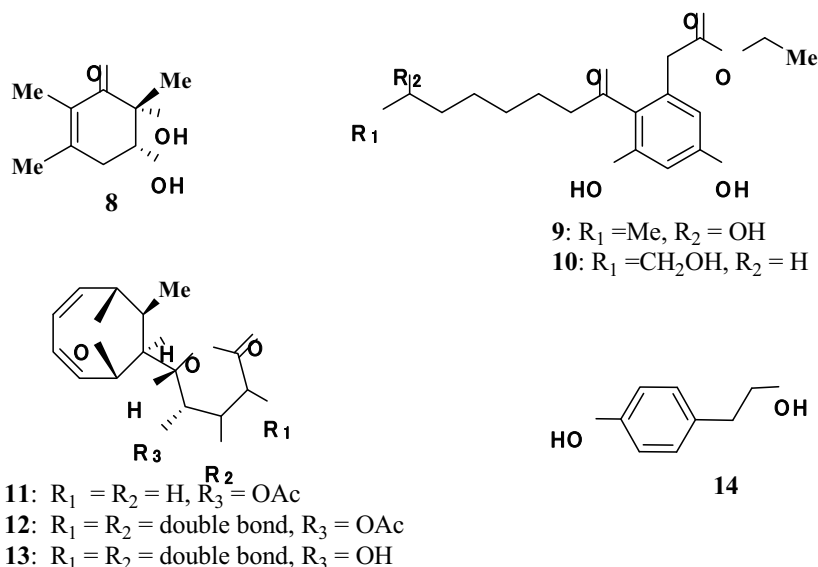


V. Rukachaisirikul*, J. Arunpanichlert, Y. Sukpondma, S. Phongpaichit, and J. Sakayaroj, 2009. Metabolites from the Endophytic Fungi *Botryosphaeria rhodina* PSU-M35 and PSU-M114, *Tetrahedron*, 65 (51), 10590-10595.

เมทาบอลไลต์จากราเอนโดไฟท์ Diaporthaceous fungus PSU-H2 (PSU-G2)

สามารถแยกสารใหม่ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ cyclohexenone จำนวน 1 สาร (8) และสารที่มีการรายงานโครงสร้างจำนวน 6 สาร ได้แก่ dothiorelone A (9), dothiorelone C (10), 2,3-dihydromyco-

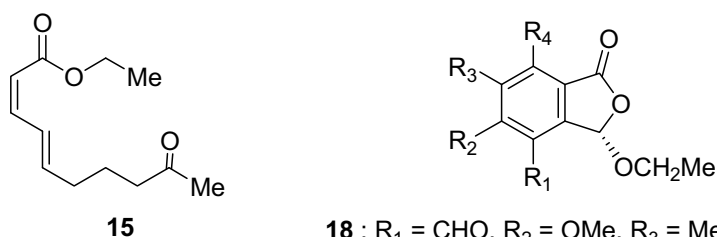
epoxydiene (11), (+)-mycoepoxydiene (12), deacetylmycoepoxydiene (13) และ tyrosol (14) นอกจากนี้ได้ทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของเมทาบอลิท์ที่แยก

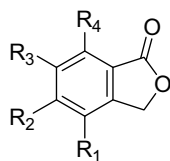


U. Sommart, V. Rukachaisirikul*, Y. Sukpondma, S. Phongpaichit, N. Hutadilok Towatana, P. Graidist, Z. Hajiwangoh, and J. Sakayaroj, 2009. A Cyclohexenone Derivative from Diaporthaceous Fungus PSU-H2, *Arch. Pharm. Res.*, 32 (9), 1227-1231.

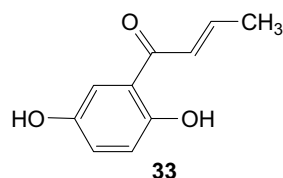
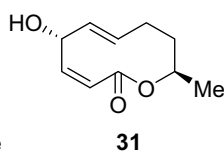
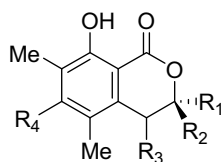
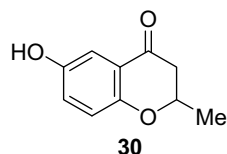
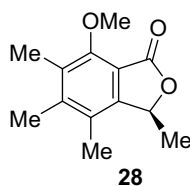
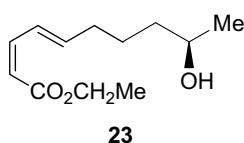
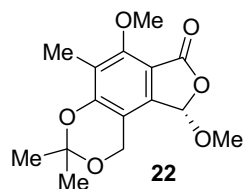
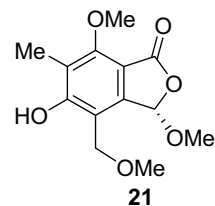
เมทาบอลิท์จากราเอนโดไฟท์ *Microsphaeropsis arundinis* PSU-G18

สามารถแยกสารใหม่จำนวน 8 สาร โดยจัดเป็นอนุพันธ์ modiolin และ phthalide อย่างละ 1 (15) และ 8 (16-22) สาร ตามลำดับ พร้อมสารที่มีการรายงานโครงสร้างแล้วจำนวน 12 สาร ได้แก่ 4-hydroxybenzoic acid, modiolin (23), deoxycyclopaldic acid (24), 5,7-dihydroxy-4,6-dimethyl-1(3H)-isobenzofuranone (25), 5-hydroxy-7-methoxy-4-(methoxymethyl)-6-methylisobenzofuran-1(3H)-one (26), 5-hydroxy-7-methoxy-4,6-dimethylphthalide (27), 7-methoxy-3,4,5,6-tetramethylphthalide (28), sclerin (29), 6-hydroxy-2-methyl-4-chromanone (30), modiolide B (31), sclerotinin A (32), and 1-(2,5-dihydroxyphenyl)-2-buten-1-one (33) และได้ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ





- 16 : $R_1 = \text{CH}_2\text{OCH}_2\text{Me}$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{Me}$, $R_4 = \text{OMe}$
 17 : $R_1 = \text{CHO}$, $R_2 = \text{OMe}$, $R_3 = \text{Me}$, $R_4 = \text{OH}$
 24 : $R_1 = \text{CHO}$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{Me}$, $R_4 = \text{OMe}$
 25 : $R_1 = R_3 = \text{Me}$, $R_2 = R_4 = \text{OH}$
 26 : $R_1 = \text{CH}_2\text{OMe}$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{Me}$, $R_4 = \text{OMe}$
 27 : $R_1 = R_3 = \text{Me}$, $R_2 = \text{OH}$, $R_4 = \text{OMe}$

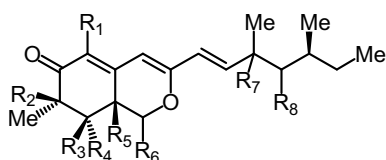


- 29 : $R_1 + R_2 = \text{O}$, $R_3 = R_4 = \text{Me}$
 32 : $R_1 = R_3 = \text{Me}$, $R_2 = R_4 = \text{OH}$

U. Sommart, **V. Rukachaisirikul**,* K. Tadpetch, Y. Sukpondma, S. Phongpaichit, N. Hutadilok-Towatana and J. Sakayaroj, Modiolin and Phthalide Derivatives from the Endophytic Fungus *Microspheeropsis arundinis* PSU-G18, submitted manuscript.

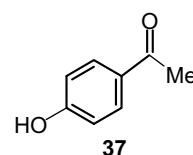
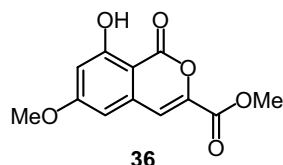
เมทาบอลไลต์จากราเอนโดไฟท์ *Penicillium sclerotiorum* PSU-A13

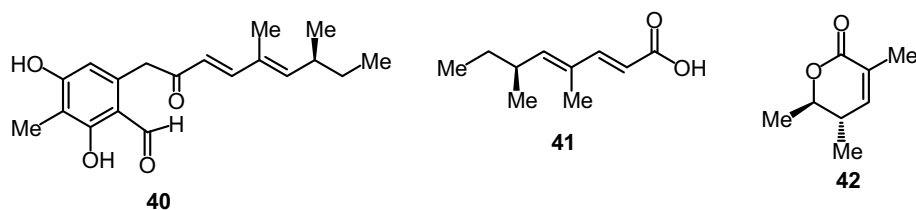
สามารถแยกสารใหม่ได้จำนวน 3 สารซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ azaphilone จำนวน 2 สาร (34-35) และอนุพันธ์ของ pyrone จำนวน 1 สาร (36) พร้อมสารที่มีรายงานโครงสร้างจำนวน 6 สาร ได้แก่ 4-hydroxyacetophenone (37), dechloroisochromophilone III (38), (+)-sclerotiorin (39), 2,4-dihydroxy-6-(5',7'-S-dimethyl-2'-oxo-trans-3'-trans-5'-nonadienyl)-3-methylbenzaldehyde (40), (+)-(2E,4E,-6S)-4,6-dimethylocta-2,4-dienoic acid (41) และ (5S,6R)-5,6-dihydro-3,5,6-trimethylpyran-2-one (42) และได้ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และต้านเชื้อ HIV 1



- 34: $R_1 = R_4 = R_5 = R_6 = \text{H}$, $R_2 = R_3 = \text{OH}$, $R_7 + R_8 =$

- 35: $R_1 = R_4 = R_5 = R_6 = \text{H}$, $R_2 = R_3 = R_7 = R_8 = \text{OH}$
 38: $R_1 = R_4 = R_5 = R_6 = \text{H}$, $R_2 = R_3 = \text{OH}$, $R_7 + R_8 = \text{double bond}$
 39: $R_1 = \text{Cl}$, $R_2 = \text{OAc}$, $R_3 + R_4 = \text{O}$, $R_5 + R_6 = R_7 + R_8 = \text{double bond}$

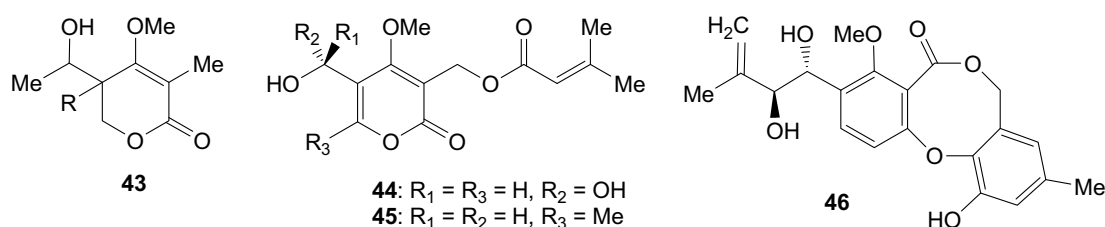




J. Arunpanichlert, V. **Rukachaisirikul***, Y. Sukpondma, S. Phongpaichit, S. Tewtrakul, N. Rungjindamai, and J. Sakayaroj, 2010. Azaphilone and Isocoumarin Derivatives from the Endophytic Fungus *Penicillium sclerotiorum* PSU-A13, *Chem. Pharm. Bulletin.*, 58 (8), 1033-1036.

เมทาบอลไลต์จากราเอนโดไฟท์ *Pestalotiopsis* sp. PSU-MA92

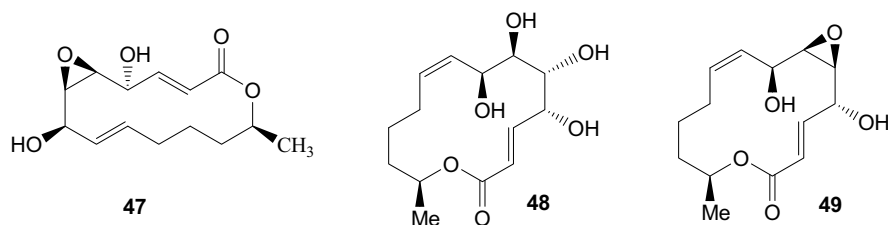
สามารถแยกสารใหม่ได้จำนวน 3 สารซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ pyrone (43-45) พร้อมสารที่มีรายงานโครงสร้างจำนวน 1 สาร ได้แก่ 2'-hydroxy-3',4'-didehydropenicillide (46) และได้ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์



V. **Rukachaisirikul***, A. Rodglin, S. Phongpaichit, J. Buatong, J. Sakayaroj, α -Pyrone and Seiricuprolide Derivatives from the Mangrove-derived Fungi *Pestalotiopsis* spp. PSU-MA92 and PSU-MA119, *Phytochem. Lett.* (2011), doi:10.1016/j.phytol.2011.08.008.

เมทาบอลไลต์จากราเอนโดไฟท์ *Pestalotiopsis* sp. PSU-MA119

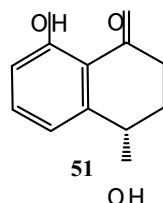
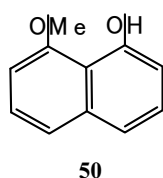
สามารถแยกสารใหม่ได้จำนวน 2 สาร (47-48) และสารที่มีการรายงานโครงสร้างแล้วจำนวน 1 สาร ได้แก่ seiricuprolide (49) สารใหม่ 47 แยกได้ในรูปอนุพันธ์อะซีเตต และได้ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์



V. **Rukachaisirikul***, A. Rodglin, S. Phongpaichit, J. Buatong, J. Sakayaroj, α -Pyrone and Seiricuprolide Derivatives from the Mangrove-derived Fungi *Pestalotiopsis* spp. PSU-MA92 and PSU-MA119, *Phytochem. Lett.* (2011), doi:10.1016/j.phytol.2011.08.008.

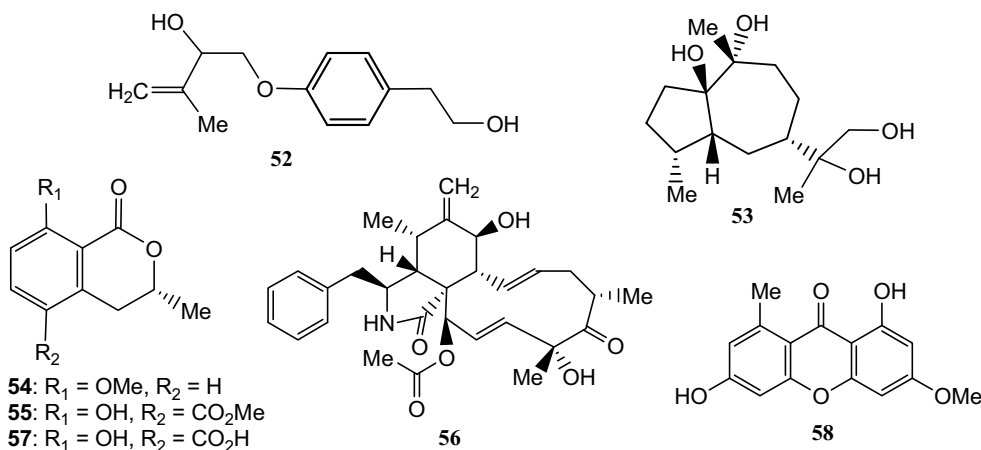
เมทาบอลิ์ที่จากราเอนโดไฟท์ *Sporothrix* sp. PSU-STD57

สามารถแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดหยาบน้ำเลี้ยงเชื้อได้ 5 สาร วิเคราะห์โครงสร้างแล้ว 3 สาร คือ 8-methoxy-1-naphthol (**50**), isosclerone (**51**) และ tyrosol (**14**) นอกจากนี้ยังอยู่ในระหว่างวิเคราะห์โครงสร้างสารจำนวน 2 สาร ศึกษาส่วนย่อยต่างๆ ที่เหลืออยู่ และจะดำเนินการศึกษาส่วนสกัดหยาบเซลล์เชื้อราต่อไปในโครงการวิจัยระยะที่ 2 (รายละเอียดในรายงานวิจัยหน้า 34)



เมทาบอลิ์ที่จากราเอนโดไฟท์ *Xylaria* sp. PSU-STD70

จากการศึกษาราเอนโดไฟท์นี้ สามารถแยกสารใหม่ได้ 2 สาร คือ อนุพันธ์ tyrosol (**52**) และ อนุพันธ์ sesquiterpene (**53**) จำนวนอย่างละ 1 สาร และสารที่มีการรายงานโครงสร้างแล้ว 6 สาร (*R*)-(-)-mellein methyl ether (**54**), 5-methoxycarbonylmellein (**55**), cytochalasin D (**56**), tyrosol (**14**), (*R*)-(-)-5-carboxymellein (**57**) และ 1,6-dihydroxy-3-methoxy-8-methylxanthone (**58**) และได้ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

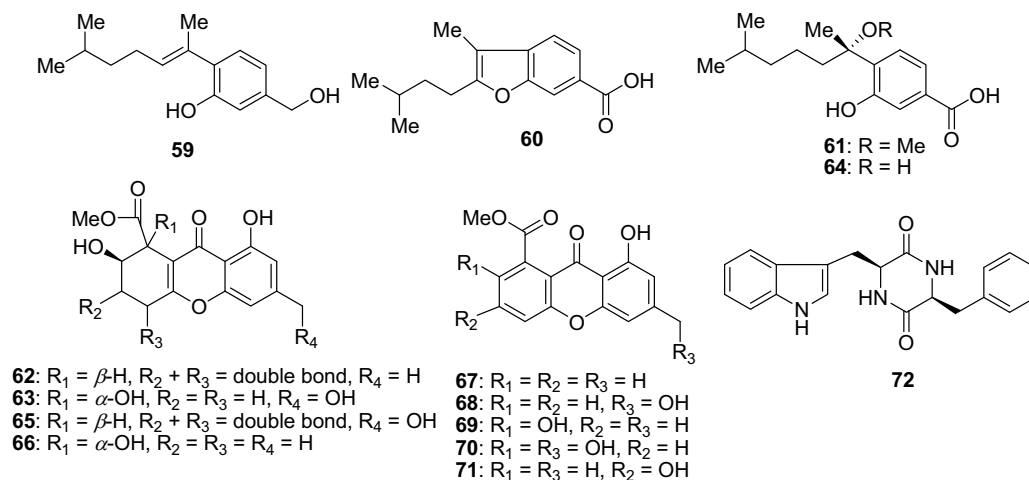


W. Pongcharoen,* V. Rukachaisirikul, S. Phongpaichit and J. Sakayaroj, Fungal Metabolites from the Endophytic Fungus *Xylaria* sp. PSU-STD70, manuscript.

เมทาบอลิ์ที่จากราทะเล *Aspergillus* sp. PSU-F154

สามารถแยกสารใหม่ได้จำนวน 5 สาร (**59-63**) และสารที่มีการรายงานโครงสร้างแล้วจำนวน 10 สารจากส่วนสกัดหยาบน้ำเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ (+)-(7*S*)-sydonic acid (**64**), (7*R*,8*R*)-AGI-B4 (**65**), (7*R*,8*S*)- β -diversonolic ester (**66**), methyl 8-hydroxy-6-methyl-9-oxo-9*H*-xanthene-1-

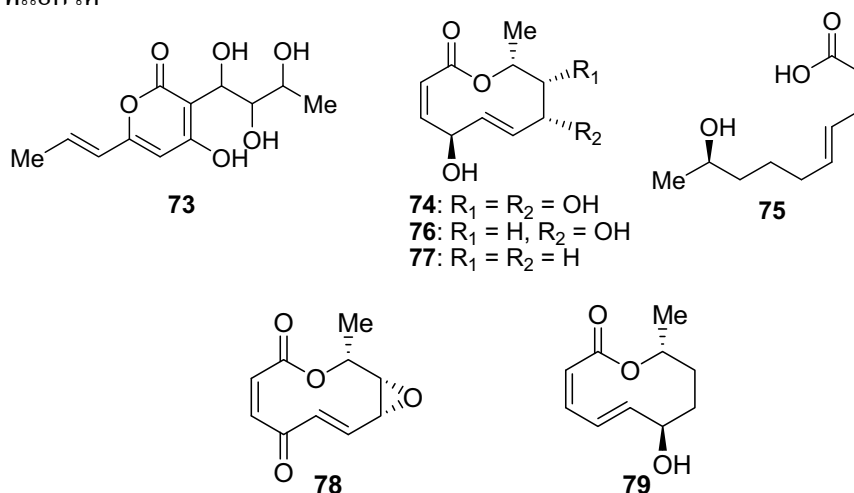
carboxylate (**67**), sydowinins A (**68**) และ B (**69**), pinselin (**70**), methyl 1,6-dihydroxy-3-methyl-9-oxo-9*H*-xanthene-1-carboxylate (**71**), (1*S*,14*S*)-cyclo-(*L*-try-*L*-phe) (**72**) และ orcinol นอกจากนี้ได้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารที่แยกได้



K. Trisuwan, V. Rukachaisirikul,* M. Keawpet, S. Phongpaichit, N. Hutadilok-Towatana, S. Preedanon and J. Sakayaroj, Sesquiterpene and Xanthone Derivatives from the Sea Fan-Derived Fungus *Aspergillus sydowii* PSU-F154, *J. Nat. Prod.*, 2011, 74, 1663-1667.

เมทาบอลิต์จากราทะเล *Curvularia* sp. PSU-F22

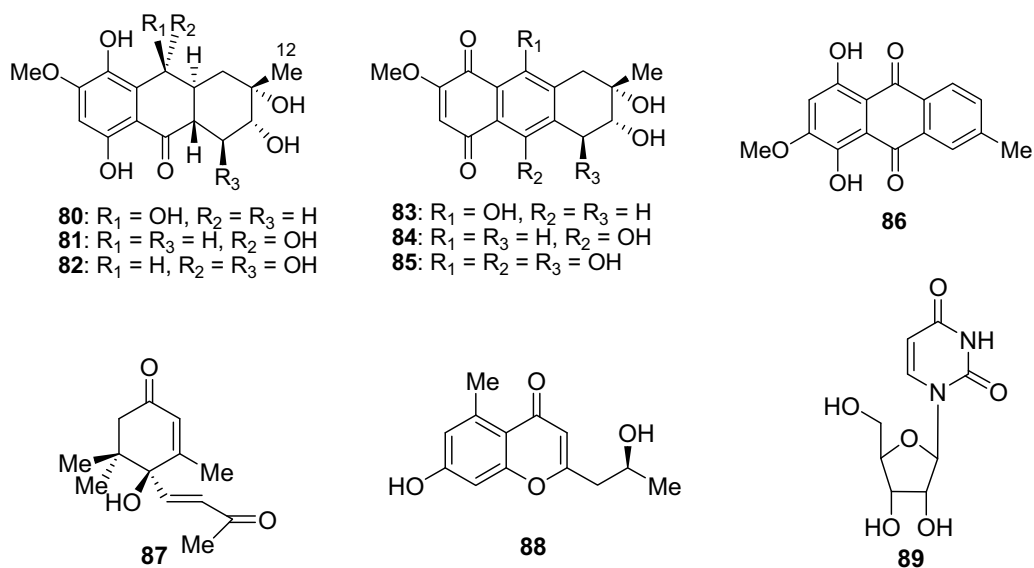
สามารถแยกสารใหม่จำนวน 3 สาร (**73-75**) และสารที่มีการรายงานโครงสร้างแล้วจำนวน 6 สาร ได้แก่ modiolide A (**76**) modiolide B (**77**), pyrenolide A (**78**), stagonolide E (**79**), mycoepoxydiene (**12**), และ deacetylmycoepoxydiene (**13**) นอกจากนี้ได้ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารที่แยกได้



K. Trisuwan, V. Rukachaisirikul*, S. Phongpaichit, S. Preedanon, and J. Sakayaroj, Modiolide and Pyrone Derivatives from the Sea Fan-Derived Fungus *Curvularia* sp. PSU-F22, *Arch. Pharm. Res.*, 2011, 34 (5), 709-714.

เมทาบอลไลต์จากรากทะเล *Fusarium* sp. PSU-F14

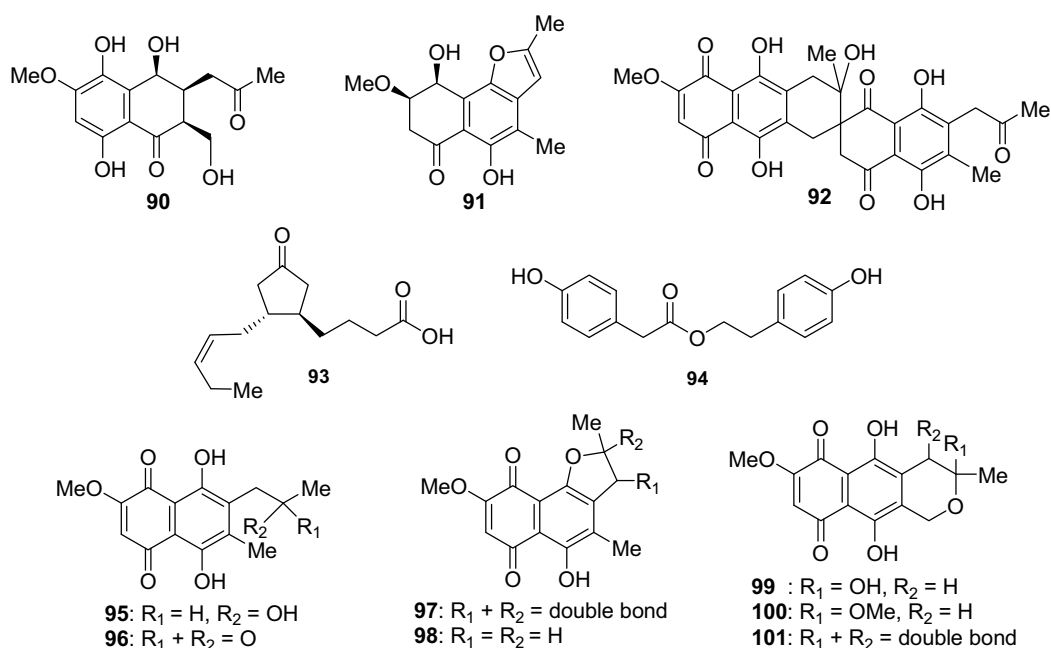
สามารถแยกสารใหม่จำนวน 1 สาร (80) และสารที่มีรายงานโครงสร้างจำนวน 7 สาร ได้แก่ (2*S*,3*R*,4*aS*,9*R*,9*aS*)-9-hydroxydihydrodesoxybostrycin (81), 9*α*-hydroxyhalorosellinia A (82), nigrosporin A (83), bostrycin (85), austrocortirubin (86), (+)-dehydrovomifoliol (87), 2-(2',*S*-hydroxypropyl)-5-methyl-7-hydroxychromone (88) จากส่วนสกัดหยาดน้ำเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium* sp. PSU-F14 นอกจากนี้ยังแยกสารที่มีรายงานโครงสร้างเพิ่มเติมอีกจำนวน 2 สาร คือ nigrosporin B (84) และ uridine (89) จากส่วนสกัดหยาดจากเซลล์ ตลอดจนได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ต้านมาลาเรีย ต้านวัณโรค และความเป็นพิษต่อเซลล์ของเมทาบอลไลต์ที่แยกได้



K. Trisuwan, N. Khamthong, V. Rukachaisirikul*, S. Phongpaichit, S. Preedanon, and J. Sakayaroj, 2010. Anthraquinone, Cyclopentanone and Naphthoquinone Derivatives from the Sea Fan-Derived Fungi *Fusarium* spp. PSU-F14 and PSU-F135, *J. Nat. Prod.*, 73 (9), 1507-1511.

เมทาบอลไลต์จากรากทะเล *Fusarium* sp. PSU-F135

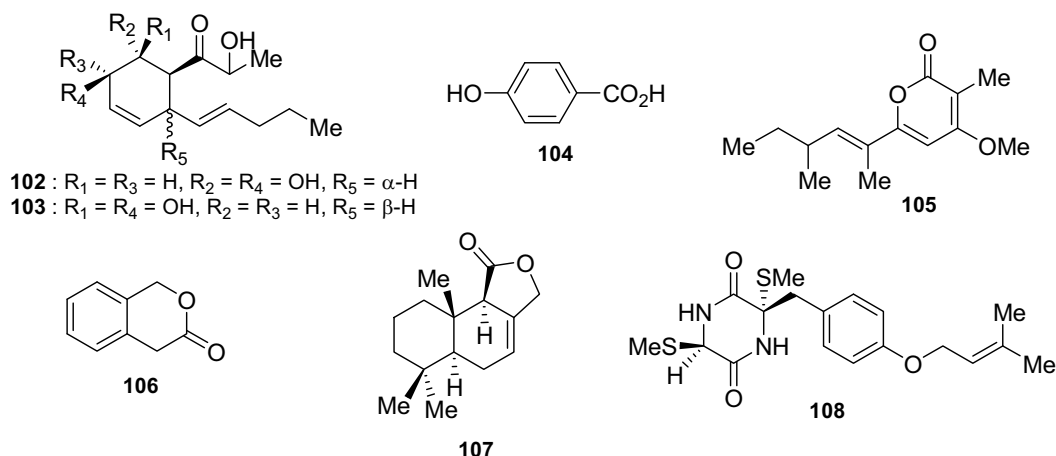
สามารถแยกสารใหม่จำนวน 4 สาร (90-93) และสารที่มีการรายงานโครงสร้างแล้วจำนวน 9 สาร ได้แก่ aspergillol B (94), (+)-solaninol (95), 2,3-dihydro-5-hydroxy-8-methoxy-2,4-dimethylnaphtho[1,2-*b*]furan-6,9-dione (96), 5-hydroxy-8-methoxy-2,4-dimethylnaphtho[1,2-*b*]furan-6,9-dione (97), javanicin (98), fusarubin (99), methyl ether fusarubin (100), anhydrofusarubin (101) และ tyrosol (14) และได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ต้านมาลาเรีย ต้านวัณโรค และความเป็นพิษต่อเซลล์ของเมทาบอลไลต์ที่แยกได้



K. Trisuwan, N. Khamthong, V. Rukachaisirikul*, S. Phongpaichit, S. Preedanon, and J. Sakayaroj, 2010. Anthraquinone, Cyclopentanone and Naphthoquinone Derivatives from the Sea Fan-Derived Fungi *Fusarium* spp. PSU-F14 and PSU-F135, *J. Nat. Prod.*, 73 (9), 1507-1511.

เมทาบอลิไทต์จากราทะเล *Nigrospora* sp. PSU-F11 และ PSU-F12

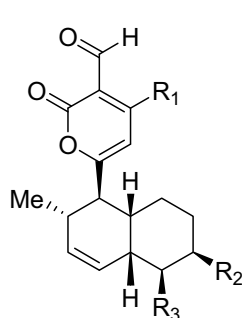
สามารถแยกสารใหม่ได้จำนวน 2 สาร (102-103) พร้อมด้วยสารที่มีการรายงานโครงสร้างมาแล้วจำนวน 6 สาร ได้แก่ tyrosol (14), 4-hydroxybenzoic acid (104), aplysiopsene D (105), 3-isochromanone (106), (-)-drimenein (107) และ diketopiperazine (108) และตรวจสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ต้านอนุมูลอิสระและความเป็นพิษต่อเซลล์



V. Rukachaisirikul*, N. Khamthong, Y. Sukpondma, S. Phongpaichit, N. Hutadilok-Towatana, P. Graidist, J. Sakayaroj, and K. Kirtikara, 2010. Cyclohexene, Diketopiperazine, Lactone and Phenol Derivatives from the Sea Fan-derived Fungi *Nigrospora* sp. PSU-F11 and PSU-F12, *Arch. Pharm. Res.*, 33 (3), 375-380.

เมทาบอลิ์ที่จากราหะเล *Nigrospora* sp. PSU-F18

สามารถแยกสารใหม่ประเภท pyrones ได้จำนวน 4 สาร (109-112) และสารที่มีการรายงานโครงสร้างแล้วจำนวน 5 สาร ได้แก่ solanapyrone A (113), (+)-phomalactone (114), 5-(S)-[1-(1(S)-hydroxybut-2-enyl)]-dihydrofuran-2-one (115), musacin F (116) และ tyrosol (14) และได้ตรวจสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารที่แยกได้

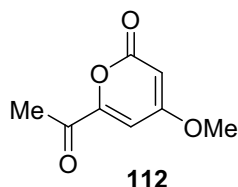


109: $R_1 = \text{OMe}, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{OH}$

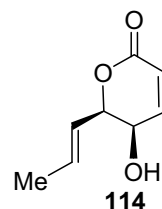
110: $R_1 = \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{OH}$

111: $R_1 = \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}, R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{H}$

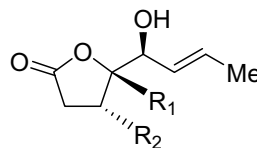
113: $R_1 = \text{OMe}, R_2 = R_3 = \text{H}$



112



114



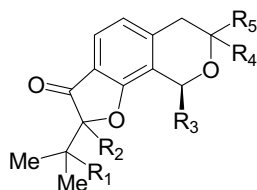
115: $R_1 = R_2 = \text{H}$

116: $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OH}$

K. Trisuwan, V. Rukachaisirikul*, Y. Sukpondma, S. Preedanon, S. Phongpaichit and J. Sakayaroj, 2009. Pyrone Derivatives from the Marine-derived Fungus *Nigrospora* sp. PSU-F18, *Phytochemistry*, 70 (3), 554-557.

เมทาบอลิ์ที่จากราหะเล *Penicillium* sp. PSU-F40

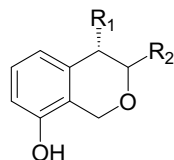
สามารถแยกสารใหม่จำนวน 9 สาร (117-125) และสารที่มีการรายงานโครงสร้างจำนวน 5 สาร ได้แก่ TMC-120B (126), TMC-120C (127), 1-(2,4-dihydroxy-6-methylphenyl)-3-methyl-1-butanone (128), 2-(2-methoxybenzyl)pyrrole (129) และ nicotinic acid (130) นอกจากนี้ได้ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของเมทาบอลิ์ที่แยกได้



117: $R_1 + R_2 = \text{double bond}, R_3 = \text{H}, R_4 = \text{OMe}, R_5 = \text{Me}$

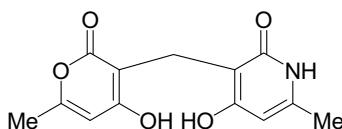
118: $R_1 = R_2 = R_4 = \text{H}, R_3 = \text{OMe}, R_5 = \alpha\text{-Me}$

119: $R_1 = R_2 = R_4 = \text{H}, R_3 = \text{OH}, R_5 = \alpha\text{-Me}$

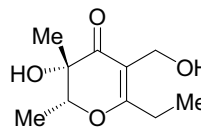


120: $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{Me}$

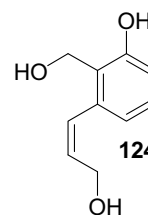
121: $R_1 = \text{OH}, R_2 = \alpha\text{-Me}$



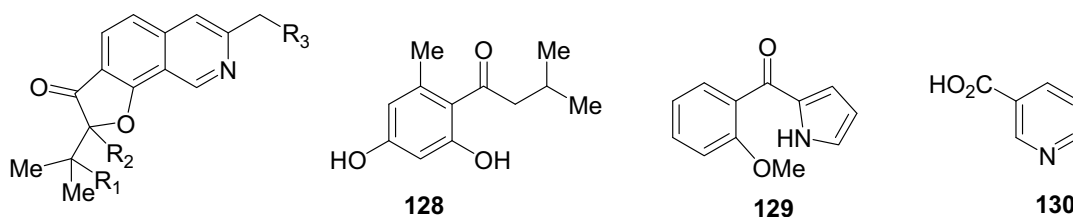
122



123



124

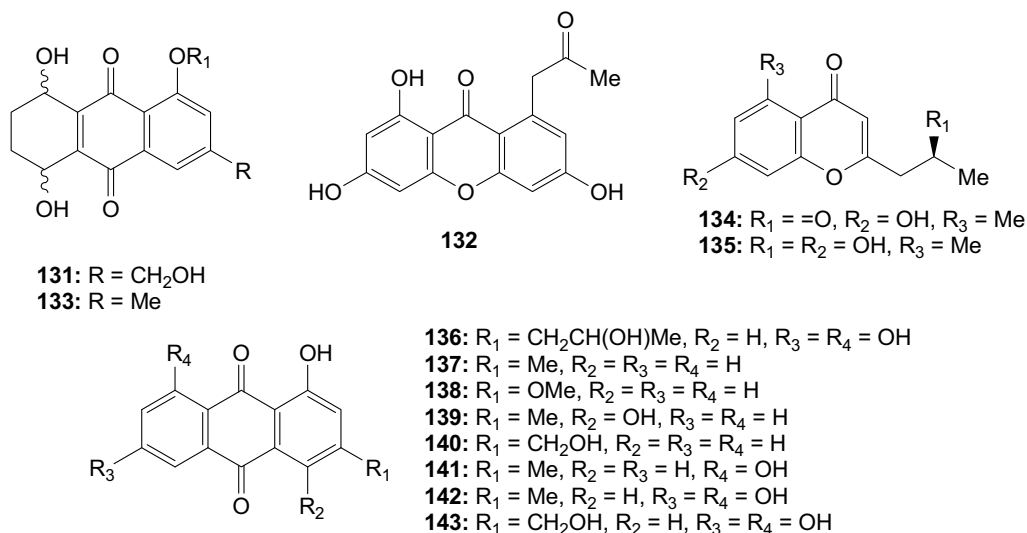


- 125: $R_1 = H, R_2 = R_3 = OH$
 126: $R_1 + R_2 = \text{double bond}, R_3 = H$
 127: $R_1 = R_3 = H, R_2 = OH$

K. Trisuwan, V. **Rukachaisirikul***, Y. Sukpondma, S. Phongpaichit, S. Preedanon, and J. Sakayaroj, 2010. Furo[3,2-h]isochroman, Furo[3,2-h]isoquinoline, Isochroman, Phenol, Pyranone and Pyrone Derivatives from the Sea Fan-derived Fungus *Penicillium* sp. PSU-F40, *Tetrahedron*, 66 (25), 4484-4489.

เมทาบอลิไทต์จากราหะเล *Trichoderma* sp. PSU-F95

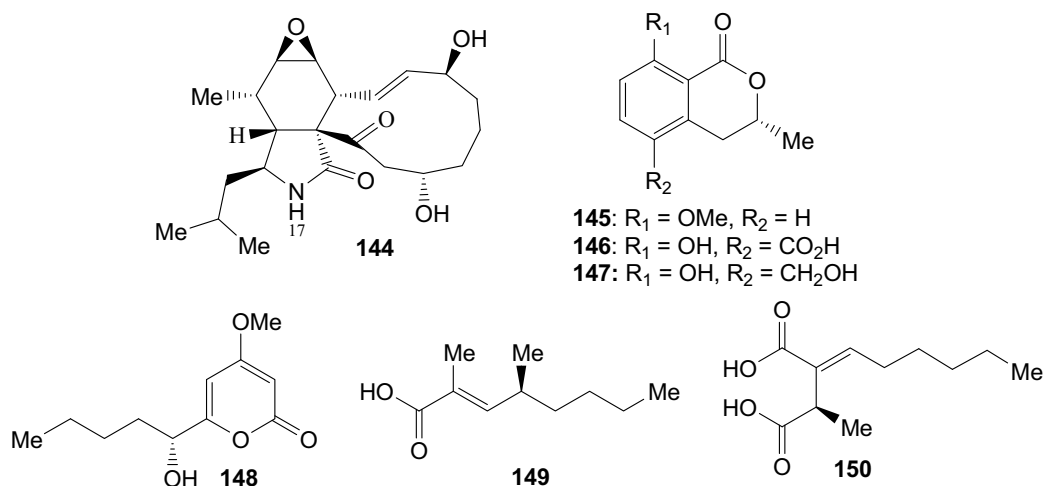
สามารถแยกสารใหม่ได้จำนวน 2 สาร (131-132) และสารที่มีการรายงานโครงสร้างแล้วจำนวน 7 สารจากส่วนสกัดหยาบน้ำเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ coniothranthraquinone (133), aloesone (134), 2-(2'-hydroxypropyl)-5-methyl-7-hydroxychromone (135), isorhodoptilometrins (136), pachybasin (137), 1-hydroxy-3-methoxyanthraquinone (138) และ 2-methylquinizarin (139) นอกจากนี้ยังสามารถแยกสารที่มีการรายงานโครงสร้างเพิ่มเติมอีกจำนวน 4 สารจากส่วนของเซลล์ ได้แก่ ω -hydroxypachybasin (140), chrysophanol (141), emodin (142) และ ω -hydroxyemodin (143) นอกจากนี้ได้ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของเมทาบอลิไทต์ที่แยกได้



N. Khamthong, V. **Rukachaisirikul***, K. Tadpetch, M. Kaewpet, S. Phongpaichit, S. Preedanon, and J. Sakayaroj, Tetrahydroanthraquinone and Xanthone Derivatives from the Marine-Derived Fungus *Trichoderma aureoviride* PSUF95, *Arch. Pharm. Res.*, accepted.

เมทาบอลไลต์จากราทะเล *Xylaria* sp. PSU-F100

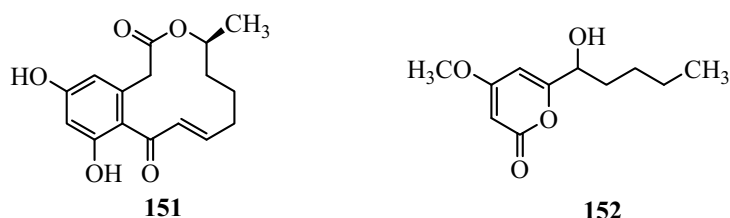
สามารถแยกสารใหม่ประเภท [11]cytochalasin จำนวน 1 สาร (**144**) และสารที่มีรายงานโครงสร้างจำนวน 6 สาร ได้แก่ (*R*)-(-)-mellein methyl ether (**145**), (*R*)-(-)-5-carboxymellein (**146**), (*R*)-(-)-5-hydroxymethylmellein (**147**), 6-[(1*R*)-1-hydroxypentyl]-4-methoxy-2*H*-pyran-2-one (**148**),³⁵ (2*E*,4*S*)-2,4-dimethyloct-2-enoic acid (**149**) และ piliformic acid (**150**) นอกจากนี้ได้ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของเมทาบอลไลต์ที่แยกได้



V. Rukachaisirikul*, N. Khamthong, Y. Sukpondma, C. Pakawatchai, S. Phongpaichit, J. Sakayaroj, and K. Kirtikara, 2009. An [11]Cytochalasin Derivative from the Marine-derived Fungus *Xylaria* sp. PSU-F100, *Chem. Pharm. Bull.*, 57 (12), 1409-1411.

เมทาบอลไลต์จากราดิน *Aspergillus terreus* PSU-RSPG187

สามารถแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อราดิน *A. terreus* PSU-RSPG187 ได้ทั้งหมด 4 สาร ขณะนี้ทราบโครงสร้างแล้ว 2 สาร คือ α,β -dehydrocurvularin (**151**) และ 5,6-dehydropestalotin (**152**) และอยู่ระหว่างการวิเคราะห์โครงสร้าง 2 สาร (รายละเอียดในรายงานวิจัย หน้า 42)

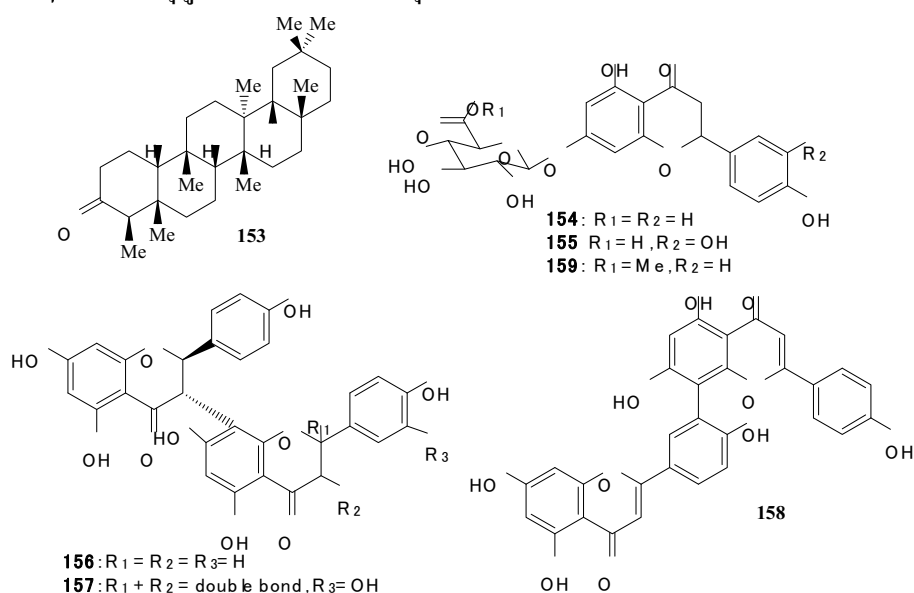


ส่วนที่ 2 การค้นหาสารต้านจุลินทรีย์ ด้านเชื้อรา และต้านอนุมูลอิสระจากพืชที่คัดเลือก

ได้ทำการศึกษาพืชที่คัดเลือกจำนวน 6 ชนิด สามารถแยกสารใหม่และสารที่มีการรายงานโครงสร้างแล้วจำนวน 9 และ 70 สาร ตามลำดับ ผลการศึกษาโดยสังเขปดังนี้

สารต้านอนุมูลอิสระจากจุมพุด (*Garcinia prainiana*)

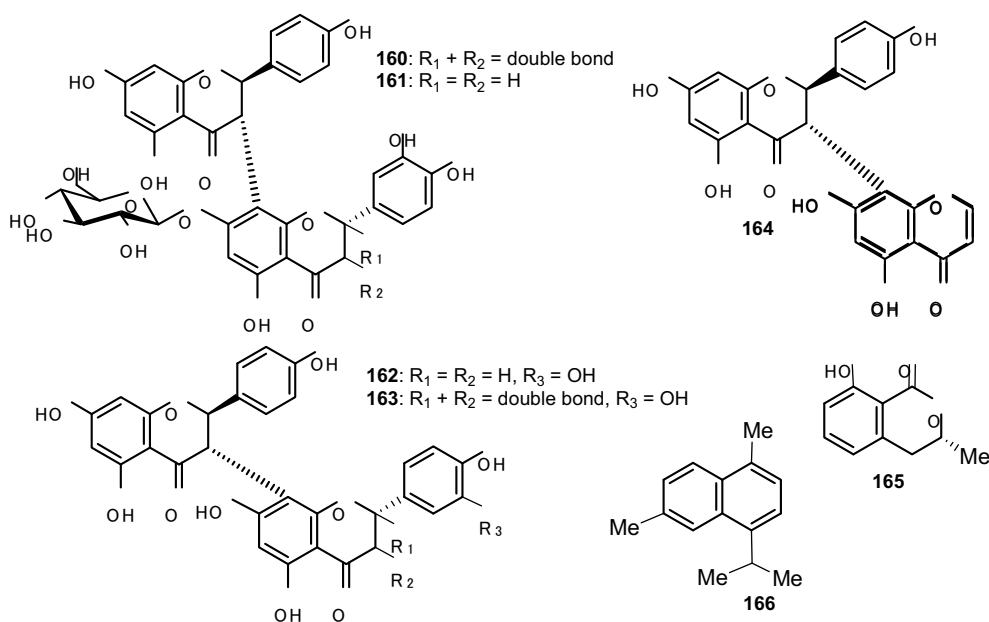
สามารถแยกสารบริสุทธิ์ที่มีการรายงานโครงสร้างแล้วจำนวน 6 สาร คือ friedelin (153), naringenin 7-O- β -D-glucuronide (154), eriodictyol 7-O- β -D-glucuronide (155), (-)-GB-1a (156), (+)-morelloflavone (157) และ amenthoflavone (158) ตลอดจนสารใหม่จำนวน 1 สาร (159) และได้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้



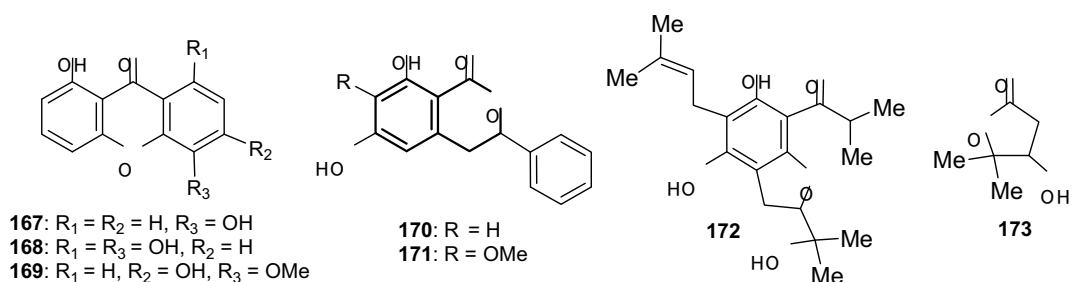
S. Klaiklay, Y. Sukpondma*, V. Rukachaisirikul, N. Hutadilok-Towatana and K. Chareonrat, Flavanone Glucuronides from the Leaves of *Garcinia prainiana*, *Can. J. Chem.*, 2011, 89, 461-464.

องค์ประกอบทางเคมีจากมะขวิดป่า (*Garcinia nervosa*)

แยกส่วนสกัดหยาบจากกิ่งมะขวิดป่าด้วยวิธีโครมาโทกราฟี สามารถแยกสารบริสุทธิ์ที่มีการรายงานโครงสร้างแล้วจำนวน 10 สาร ได้แก่ friedelin (153),¹ (-)-GB-1a (156),² (+)-morelloflavone (157),³ fukuside (160),⁴ xanthochymusside (161),⁵ (-)-GB-2a (162),² (+)-morelloflavone-7-sulfate (163),⁶ 4',5,5'',7,7''-pentahydroxyflavanone-3,8''-chromone (164),⁷ (R)-(-)-mellein (165)⁸ และ cadelene (166)⁹



แยกส่วนสกัดหยาบจากเปลือกมะพุดป่าด้วยวิธีโครมาโทกราฟี สามารถแยกสารบริสุทธิ์ที่มีการรายงานโครงสร้างแล้วจำนวน 9 สาร ได้แก่ (-)-GB-1a (**156**),² (+)-morelloflavone (**157**),³ 1,5-dihydroxyxanthone (**167**),¹⁰ 1,4,5-trihydroxyxanthone (**168**),¹¹ 2,5-dihydroxy-1-methoxyxanthone (**169**),¹² montroumarin (**170**),¹³ annulatamarin (**171**),¹⁴ benzofuran derivative (**172**)¹⁵ และ (+)-(3*R*)-3-hydroxy-4,4-dimethyl-4-butyrolactone (**173**)¹⁶ โดยสาร **173** แยกในรูปอนุพันธ์อะซีเตต



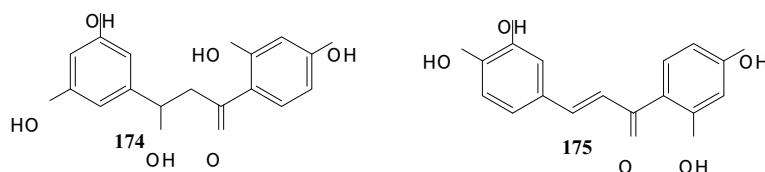
เอกสารอ้างอิง

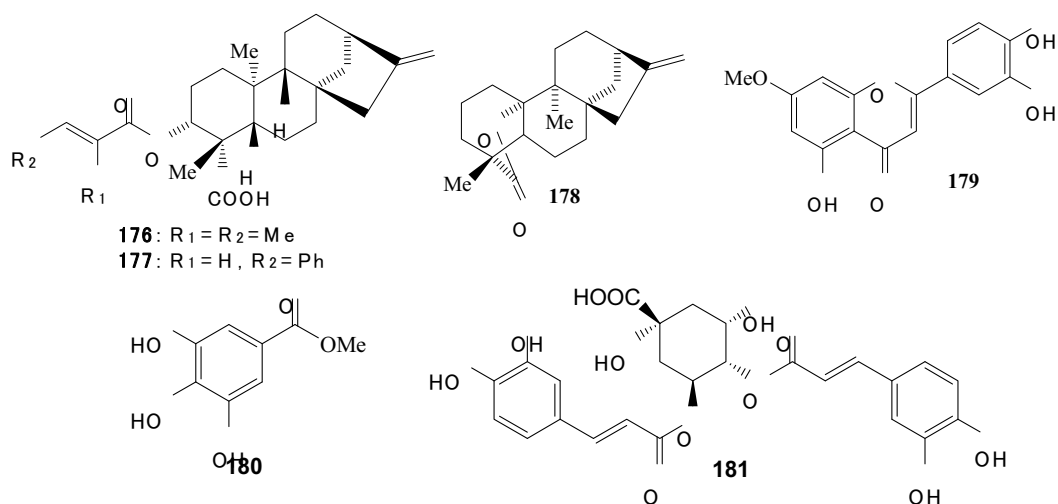
1. Sunisa Salae, T. 2006. Chemical Constituents from the Twigs, Seeds and Fruits of *Garcinia nervosa*. Master of Science Thesis in Organic Chemistry, Prince of Songkla University.
2. Terashima, K., Kondo, Y., Aqil, M., Waziri, M. and Niwa M. 1999. *Heterocycles* 50 (1), 283-290.
3. Sukpondma, Y., Rukachaisirikul, V. and Phongpaichit, S. 2005. *J. Nat. Prod.* 68 (7), 1010-1017.
4. Hussain, R. A., and Waterman, P. G. 1982. *Phytochemistry* 21 (6), 1393-1396.
5. Chen, F.-C., Lin, Y.-M. and Hung, J.-C. 1975. *Phytochemistry* 14 (3), 818-820.

6. Li, X.-C., Joshi, A. S., Tan, B., ElSohly, H. N., Walker, L. A., Zjawiony J. K. and Ferreira, D. 2002. *Tetrahedron* 58, 8709-8717.
7. Ansari, W. H., Rahman, W., Barraclough, D., Maynard, R. and Scheinmann, F. 1976. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 1458-1463.
8. Dimitriadis, C., Gill, M. and Harte, M. F. 1997. *Tetrahedron-Asym.* 8 (13), 2153-2158.
9. Watson, J. S., Pearson, V. K., Gilmour, I. and Sephton, M. A. 2003. *Org. Geochem.* 34, 37-47.
10. Francios, A.; Waffo, K.; Mulhohand, D.; Wansi, D. J.; Meva, L.; Powo, R.; Mpondo, N. T.; Fomum, T. Z.; Augustin, K.; Ephrem, W. 2005. *Chem. Pharm. Bull.* 54, 448-451.
11. Iinuma, M.; Tosa, H., Tanaka, T.; Asaif, F.; Shimano, R. 1994. *Phytochemistry* 38, 247-249.
12. Minami, H.; Emi, T.; Misuak, K.; Yoshiyasu, F. 1996. *Phytochemistry* 41, 623-629.
13. Ito, C.; Mishina, Y.; Litaudon, M.; Cosson, J. P.; Furukawa, H. 2000. *Phytochemistry* 53, 1043-1046.
14. Nedialkov, P. T.; Zheleva-Dimitrova, D.; Girreser, U.; Kitanov, G. M. 2007. *Nat. Prod. Res. Part A* 21, 1056-1060.
15. Byrne, E.; Cahill, D. M.; Shannon, P. V. R. 1970. *J. Chem. Soc. C* 12, 1637-1641.
16. Ahmed, A.; Taha, A. H.; Ahmed, A. M.; Mohamed, A. F.; Pare, P.; Malgorzata, W.; Karchesy, J.; Marby, J. T. 2004. *Phytochemistry* 65, 2539-2543.

สารต้านอนุมูลอิสระจากดอกกระดุมทองเลื้อย (*Wedelia trilobata*)

จากการศึกษาแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดหยาบเมทานอล จากดอกกระดุมทองเลื้อยด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีต่าง ๆ พบว่าแยกสารบริสุทธิ์ได้ 8 สาร ซึ่งจัดเป็นสารใหม่ที่ยังไม่มีการรายงานโครงสร้าง 1 สาร (**174**) และสารที่มีการรายงานโครงสร้างแล้ว 7 สาร คือ 3,4,2',4'-tetrahydroxychalcone (**175**), 3 α -tigloyloxykaur-16-en-19-oic acid (**176**), 3 α -cinnamoyloxykaur-16-en-19-oic acid (**177**), tetrachyrin (**178**), luteolin 7-methylether (**179**) gallic acid methyl ester (**180**) และ 3,4-di-O-caffeoyl quinic acid (**181**) ตลอดจนได้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารที่แยกได้

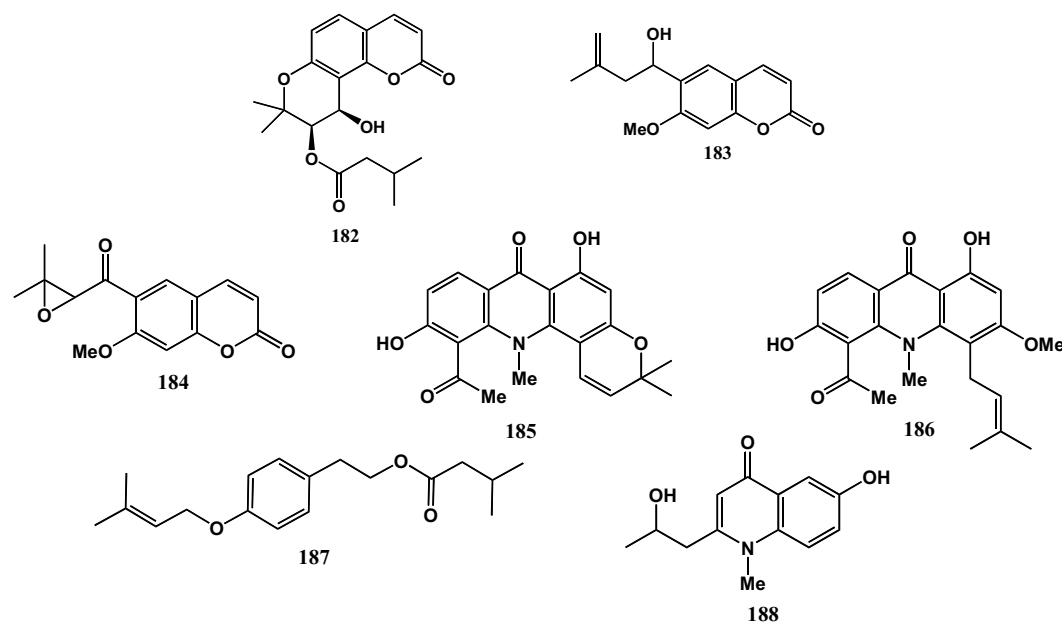




Y. Sukpondma,* V. Rukachaisirikul, K. Monprasart, N. Hutadilok-Towatana, A Dihydrochalcone Derivative from the Flowers of *Wedelia trilobata*, manuscript.

สารต้านอนุมูลอิสระจากรากมะกรูด (*Citrus hystrix*)

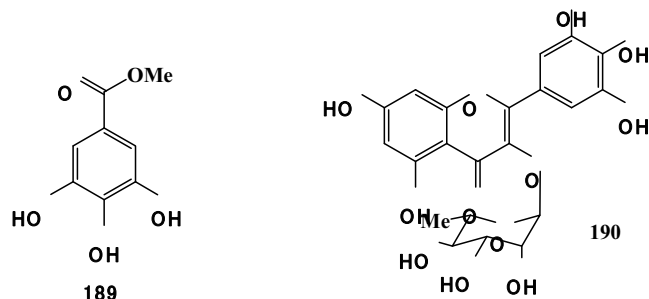
ส่วนสกัดหยาบอะซิโตนของรากมะกรูด เมื่อนำมาแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟี สามารถแยกสารใหม่ได้ จำนวน 7 สาร (182-188) และสารที่มีการรายงานโครงสร้างแล้ว จำนวน 32 สาร นอกจากนี้ได้มีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้านจุลินทรีย์และด้านเชื้อ HIV 1



K. Panthong,* Y. Srisud, V. Rukachaisirikul, N. Hutadilok-Towatana, S. Piyawan Voravuthikunchai, S. Tewtrakul, Acridone, Benzene, Coumarin and Quinolinone Derivatives from the Roots of *Citrus hystrix*, manuscript.

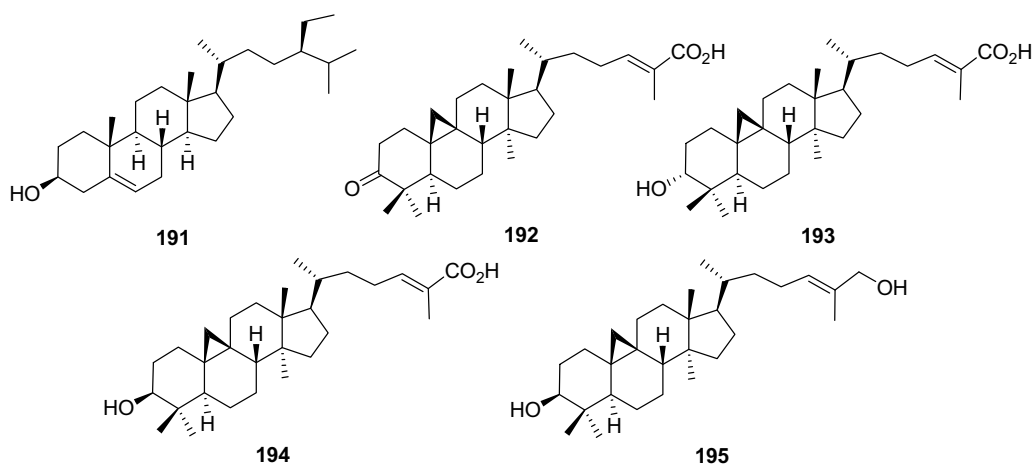
องค์ประกอบทางเคมีจากใบมะยม (*Bouea oppositifolia*)

สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้จำนวน 2 สารคือ gallic acid methyl ester (189) และ myricetin-3- α -rhamnoside (190) (รายละเอียดในรายงานวิจัยหน้า 56)



องค์ประกอบทางเคมีจากกิ่งมะมุด (*Mangifera foetida* Lour.)

การแยกองค์ประกอบทางเคมีให้บริสุทธิ์จากกิ่งมะมุด สามารถแยกสารได้ จำนวน 8 สาร และสามารถวิเคราะห์โครงสร้างได้แล้วจำนวน 5 สาร ดังแสดง β -sitosterol (191), mangiferonic acid (192), isomangiferolic acid (193), mangiferolic acid (194) และ mangiferadiol (195) ขณะนี้อยู่ในการแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนย่อยที่ได้จากสารสกัดหยาบด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟี (รายละเอียดในรายงานวิจัยหน้า 64)



ส่วนที่ 3 การแยกและจำแนกราเอ็นโดไฟต์จากหญ้าทะเล ราชทะเล รวมทั้งจุลินทรีย์เอนโดไฟต์จากพืชในวงศ์จิง

การแยกและจำแนกราเอ็นโดไฟต์จากหญ้าทะเล

ทำการแยกเชื้อราเอ็นโดไฟต์จากหญ้าทะเล 4 ชนิด ได้แก่ *Enhalus acoroides*, *Cymodocea rotundata*, *Halophila ovalis* และ *Thalassia hemprichii* บริเวณอ่าวมะขาม จังหวัดตรัง ได้ทั้งหมด 210 ไอโซเลท จัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวิธีทางชีวโมเลกุล จัดแบ่งได้ 8 Order 28 Genus เป็นราใน Genus *Cladosporium* มากที่สุด 20 ไอโซเลท รองลงมา คือ *Penicillium*

(17 ไอโซเลท), *Fusarium* (11 ไอโซเลท), *Cochliobolus*, *Nigrospora* และ *Trichoderma* อย่างละ 9 ไอโซเลท นำเชื้อราทั้งหมดไปเพาะเลี้ยงในอาหาร potato dextrose broth (PDB) แล้วนำไปสกัดด้วยวิธีทางเคมีได้ส่วนสกัดหยาบ 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนสกัดหยาบ ethyl acetate จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา (BE), ส่วนสกัดหยาบ hexane จากส่วนเส้นใยรา (CH) และส่วนสกัดหยาบ ethyl acetate จากส่วนเส้นใยรา (CE) ได้สารสกัดทั้งหมด 602 สาร และนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรค 10 ชนิด ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก (*Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) SK1) แบคทีเรียแกรมลบ (*Escherichia coli* ATCC25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853) ยีสต์ (*Candida albicans* ATCC90028, NCPF 3153, และ *Cryptococcus neoformans* ATCC90112, ATCC90113) และรา (*Microsporum gypseum* SH-MU4 clinical isolate และ *Penicillium marneffei* clinical isolate) และหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) และ minimal bactericidal concentration (MBC) หรือ minimal fungicidal concentration (MFC) ด้วยวิธี colorimetric microdilution พบว่าสารสกัดส่วนใหญ่มีฤทธิ์ต้านรา โดยสารสกัด 32.1% มีฤทธิ์ต้านยีสต์ และ 25.9% มีฤทธิ์ต้าน *M. gypseum* และ/หรือ *P. marneffei* รองลงมา คือ 22.9% มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวก และมีเพียง 3.5% ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียดีที่สุด คือสารสกัด CE จาก *Fusarium* sp. ES73 สามารถยับยั้ง *S. aureus* ทั้งสองสายพันธุ์ (MIC 8 $\mu\text{g/ml}$) และสารสกัด BE และ CH จากเชื้อ *Stephanonectria keithii* ES172 ให้ค่า MIC ต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC25923 8 $\mu\text{g/ml}$ สารสกัด BE จาก *Aspergillus* sp. ES4 มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *E. coli* ปานกลาง (MIC 32 $\mu\text{g/ml}$) ส่วนสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้าน *P. aeruginosa* เป็นสารสกัดที่มีฤทธิ์ต่ำ (MIC 200 $\mu\text{g/ml}$) สำหรับฤทธิ์ต้านรา พบว่าสารสกัด CE จาก *Trichoderma* sp. ES38, *Trichoderma* sp. ES8 และ CH จาก *Hypocreales* sp. ES26 ยับยั้ง *C. albicans* ให้ค่า MIC 1, 2 และ 8 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ส่วน CE จาก *Fusarium* sp. ES73, CH จาก ES-190, *Penicillium citrinum* ES43 และ *Hypocreales* sp. ES26 ยับยั้ง *C. neoformans* ให้ค่า MIC 1-4, 4, 8 และ 8-16 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ และสารสกัด CH จาก *Hypocreales* sp. ES26 ยังสามารถยับยั้งเชื้อ *M. gypseum* ได้ดีมาก ให้ค่า MIC 2 $\mu\text{g/ml}$ และค่า MFC 16 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งใกล้เคียงกับยาต้านรามาตรฐาน miconazole นอกจากนี้สารสกัด CH และ BE จาก *Nigrospora* sp. ES5 ยับยั้ง *M. gypseum* ได้ดีรองลงมา (MIC/MFC 4/4 และ 8/8 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ) ส่วนสารสกัด CE จาก *Schizophyllum commune* ES49 มีฤทธิ์ปานกลางต่อเชื้อ *P. marneffei* (MIC/MFC 16/64 $\mu\text{g/ml}$) นอกจากนี้ยังได้นำสารสกัด 115 สารสกัด จากเชื้อรา 86 ไอโซเลท มาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่ามีสารสกัด 14 สารที่ให้ผลบวกในการทดสอบ DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) เมื่อนำสารสกัดกลุ่มนี้ไปทดสอบต่อ พบว่ามีสารสกัด 11 และ 9 สารที่สามารถกำจัดอนุมูล $\text{OH}^\cdot$ (hydroxyl) และ superoxide ได้ โดยสารสกัด BE จาก ES109 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH ในระดับดี (IC_{50} 0.036 mg/ml) สารสกัด BE จาก ES109 และ *Pleiosporales* sp. ES187 ต้านอนุมูล $\text{OH}^\cdot$ ได้ในระดับดีมาก (IC_{50} 0.62 และ 0.69 mg/ml) ซึ่งใกล้เคียงกับค่า IC_{50}

ของสารมาตรฐาน tannin (0.5 mg/ml) และสารสกัด BE จาก Pleosporales sp. ES187 และ ES200 ด้านอนุมูล superoxide anion ในระดับดีมาก (IC_{50} 0.22 และ 0.32 mg/ml) ใกล้เคียงกับค่า IC_{50} ของ สารมาตรฐาน trolox (0.3 mg/ml) สารสกัดบางส่วนที่มี NMR profiles ที่น่าสนใจ และมีปริมาณ มากพอจึงนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค ฤทธิ์ต้านมาเลเรีย ความ เป็นพิษต่อเซลล์ และฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเต้านม MCF7 พบว่ามีสารสกัด 10 สาร คือ CE จาก *P. citrinum* ES43, BE จาก Polyporales sp. ES44, BE และ CE จาก *Fusarium* sp. ES73, BE และ CE จาก *Fusarium* sp. ES161, BE จาก *Annulohypoxylon* sp. ES163, BE, CH และ CE จาก *Pestalotiopsis* sp. ES180 ที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพเหล่านี้ได้อย่างใดอย่างหนึ่ง แต่สารสกัด 6 สารเป็น พิษต่อเซลล์ มีเพียง 4 สาร ได้แก่ ES161BE, ES161CE, ES163BE และ ES180CE ที่ไม่เป็นพิษต่อ Vero cell แต่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง KB และ MCF7 ได้ มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 20.25-49.76 และ 13.11-46.67 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ สารสกัดส่วนใหญ่มีสารหลักเป็น mellein, *p*-hydroxy benzoic acid และ tyrosol ผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าราเอนโดไฟท์จากหญ้าทะเลมีความ หลากหลายและเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ

O. Supaphon, S. **Phongpaichit**,* V. Rukachaisirikul and J. Sakayaroj, Diversity and Antimicrobial Activity of Endophytic Fungi Isolated from the Seagrass *Enhalus acoroides*, manuscript และรายละเอียดในรายงานวิจัยหน้า 74

การแยกและจำแนกราทะเล

ในการคัดเลือกราทะเลที่ผลิตสารต้านจุลินทรีย์จากสิ่งมีชีวิตในทะเล ได้ทำการแยกเชื้อรา ทะเลจากสาหร่ายและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง จากจังหวัดชุมพร นครศรีธรรมราช และภูเก็ต ใน ระหว่างเดือนมกราคม-กรกฎาคม 2553 ได้เชื้อราจำนวน 105 ไอโซเลต เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง จุลินทรีย์ของน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี agar diffusion และทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการ เจริญของจุลินทรีย์ (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าแบคทีเรีย (MBC) หรือความเข้มข้นต่ำสุดที่ ฆ่าเชื้อรา (MFC) ของสารสกัดด้วยวิธี colorimetric microdilution พบว่า จากน้ำเลี้ยงเชื้อราจำนวน 105 ไอโซเลต มีน้ำเลี้ยงเชื้อรา 34 ไอโซเลต (32.4%) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้อย่างน้อย 1 ชนิด และจากจำนวนสารสกัดหายา 315 สารที่นำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ พบว่า มีสารสกัด จำนวน 100 (31.7%), 108 (34.3%), 8 (2.5%), 51 (16.2%), 130 (42.3%), 144(45.7%) และ 42 (13.3%) สารสกัด ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC25923, Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) SK1, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Escherichia coli* ATCC25922, *Candida albicans* ATCC90028, *Cryptococcus neoformans* ATCC90112 และ *Microsporium gypseum* SH-MU4 ได้ โดยมีค่า MIC ต่อเชื้อดังกล่าว อยู่ในช่วง 2-200, 8-200, 2-200, 128-200, 0.25-200, 0.25-200 และ 32-200 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ และมีสารสกัดจำนวน 2, 2 และ 1 สารที่สามารถฆ่าเชื้อ *S.*

aureus (MBC 128 และ 128 $\mu\text{g/ml}$), *C. neoformans* (MFC 32 และ 128 $\mu\text{g/ml}$) และ *C. albicans* (MFC 128 $\mu\text{g/ml}$) ได้ตามลำดับ ผลการศึกษายังพบว่า เชื้อรา *Talaromyces trachyspermus* ที่แยกได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล *Sargassum* sp. นอกจากจะสร้างสารที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ 4 ชนิดแล้ว ยังให้รูปแบบ NMR ที่น่าสนใจ ผู้วิจัยจึงจะทำการแยกสารให้บริสุทธิ์และศึกษาฤทธิ์ด้านจุลินทรีย์ของแต่ละสารต่อไปอนาคต จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าเชื้อราทะเลที่แยกได้จากสิ่งมีชีวิตในทะเล มีศักยภาพในการผลิตสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค (รายละเอียดในรายงานวิจัยหน้า 86)

งานวิจัยนี้ ได้ศึกษาความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ของแบคทีเรียและราเอนโคไฟท์ที่แยกได้จากพืชวงศ์จิง 7 ชนิด คือ กระเจียวขาว กระเทียม กุ๊ก ข่า ข่าป่า ปุดคางคก และไพล ด้วยการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียจำนวน 11 ไอโซเลท และราเอนโคไฟท์จำนวน 133 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (*Fusarium oxysporum*) และแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยว (*Ralstonia solanacearum*) โดยเลี้ยงราเอนโคไฟท์ในอาหาร 5 ชนิด (F1: glucose soybean meal broth, F2: malt extract corn starch broth, F3: glucose soybean oil peptone broth, F4: potato dextrose galangal powder broth and F5: potato dextrose broth) และแบคทีเรียเอนโคไฟท์ในอาหาร 3 ชนิด (NB: nutrient broth, GPYM: glucose peptone yeast-malt extract broth and GYC: glucose yeast extract corn starch broth) และเมื่อทดสอบสารสกัดหยาบของจุลินทรีย์เอนโคไฟท์ ดังกล่าวด้วยวิธี agar well diffusion assay พบว่าสารสกัดหยาบของแบคทีเรียเอนโคไฟท์ ZB9 ที่เลี้ยงในอาหาร GYC ยับยั้งการเจริญของ *F. oxysporum* ได้ดีที่สุด (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส 15 มม.) ในขณะที่สารสกัดหยาบของราเอนโคไฟท์ PDB141 และ PDB152 ที่เลี้ยงในอาหาร F4 และ PDB148 ที่เลี้ยงในอาหาร F5 ยับยั้งการเจริญของ *R. solanacearum* ได้ดีที่สุด (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส 16 มม.) สำหรับการคัดกรองจุลินทรีย์เอนโคไฟท์ที่สร้างไซเดอโรฟอรั่ หลังจากการเพาะเลี้ยงราเอนโคไฟท์จำนวน 37 ไอโซเลท บนอาหารแข็ง chrome azurol S พบว่าราเอนโคไฟท์จำนวน 25 ไอโซเลท ที่ให้ผลบวกโดยเจริญบนอาหารชนิดนี้และสร้าง halo zone สีเหลืองหรือสีชมพูรอบๆ โคโลนี แต่เมื่อคัดเลือกบางไอโซเลทไปเลี้ยงในอาหารเหลว MGs-1 และตรวจสอบหมู่ฟังก์ชันของไซเดอโรฟอรั่ โดยวิธี Arnow assay และ Ferric perchlorate assay พบว่าราเอนโคไฟท์ PDB141 ที่สร้าง halo zone ขนาดเล็กกว่า สร้างไฮดรอกซามาเทไซเดอโรฟอรั่ 150.71 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งมากกว่าราเอนโคไฟท์ PDB136 ที่สร้าง halo zone ขนาดใหญ่แต่สร้างไฮดรอกซามาเทไซเดอโรฟอรั่ได้เพียง 3.33 $\mu\text{g/ml}$ (รายละเอียดในรายงานวิจัยหน้า 106)

รายงานวิจัย

องค์ประกอบทางเคมีจากเชื้อรา *Sporothrix* sp. PSU-STD57

ผู้วิจัยหลัก ดร. วิภาพรณ พงศ์เจริญ

บทนำ กลุ่มวิจัยของ ศ.ดร.วัชรินทร์ รุกขไชยศิริกุล ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ร่วมกับ รศ.ดร.เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ได้ศึกษาเกี่ยวกับเชื้อรา *Sporothrix* sp. PSU-STD57 ซึ่งแยกจากก้านใบ (petiole) ของพังกาหัวส้มดอกแดง (*Bruguiera gymnorrhiza* L. Soavigny) ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของส่วนสกัดหยาบน้ำเลี้ยงเชื้อ และเซลล์เชื้อรา พบว่า แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ด้วยค่า MIC ที่เท่ากันคือ $>200 \mu\text{g/mL}$ แต่ในส่วนสกัดหยาบเซลล์เชื้อราที่สกัดด้วยเฮกเซนจะแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Microsporum gypseum* ด้วยค่า MIC $64 \mu\text{g/mL}$ และจากลักษณะโครมาโทแกรมบนโครมาโทกราฟีแผ่นบาง ปรากฏการแยกของสารอย่างชัดเจน ประกอบกับสัญญาณ ^1H NMR ปรากฏลักษณะเฉพาะของสารประเภทอะโรมาติก ทำให้สนใจศึกษาสารที่ผลิตโดยเชื้อราชนิดนี้

วัตถุประสงค์ เพื่อแยกองค์ประกอบทางเคมีจากเชื้อรา *Sporothrix* sp. PSU-STD57 และศึกษาโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ โดยคาดว่าจะสามารถแยกสารใหม่ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจได้

วิธีการทดลอง

1. การสกัดเชื้อราและแผนการทดลอง

- นำเชื้อรา *Sporothrix* sp. PSU-STD57 มากรอง ได้เป็นส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อ (broth) และเซลล์เชื้อรา (mycelia)
- สกัดส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตจำนวน 3 ครั้ง ระเหยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตออกด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน จะได้ส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตจากน้ำเลี้ยงเชื้อ
- สกัดส่วนเซลล์เชื้อราที่เหลือจากการกรอง ดังนี้
 - นำเซลล์เชื้อราไปแช่ในตัวทำละลายเมทานอลเป็นเวลา 2 วัน
 - กรองเซลล์เชื้อราออก และนำสารละลายที่ได้มาระเหยตัวทำละลายออกบางส่วน เติมน้ำแล้วสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนจำนวน 2 ครั้ง จากนั้นระเหยตัวทำละลายเฮกเซนออกด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน ได้ส่วนสกัดหยาบเฮกเซนจากเซลล์

3.3 นำส่วนที่เหลือจากการสกัดด้วยเฮกเซน มาสกัดด้วยตัวทำละลายใช้เอทิลอะซิเตตจำนวน 3 ครั้ง

3.4 ระเหยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตออกด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน ทำให้ได้ส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตจากเซลล์

2. การแยกส่วนสกัดหยาบให้บริสุทธิ์

นำเชื้อราน้ำหนัก 550.2 มิลลิกรัม ละลายในเมทานอลแล้วมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยมีตัวอยู่กับที่เป็น Sephadex LH20 โดยชะด้วย 100% MeOH สามารถแยกได้ 316 หลอดนำสารละลายแต่ละส่วนไปตรวจสอบบนแผ่นโครมาโทกราฟีแผ่นบางพบว่า สามารถรวมส่วนที่มีลักษณะทางโครมาโทแกรมเหมือนกันได้ทั้งหมด 6 ส่วนดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ส่วนต่างๆ ที่ได้จากการแยกส่วนสกัดหยาบน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยมีตัวอยู่กับที่เป็น Sephadex Sephadex LH20

ส่วน	ตัวชะ	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ลักษณะสาร
Sp1	100% MeOH	40.0	ของหนืดสีน้ำตาลอมดำ
Sp2	100% MeOH	35.0	ของหนืดสีน้ำตาลอมดำ
Sp3	100% MeOH	212.6	ของหนืดสีน้ำตาลอมดำ
Sp4	100% MeOH	85.0	ของหนืดสีดำ
Sp5	100% MeOH	76.2	ของหนืดสีน้ำตาลอมดำ
Sp6	100% MeOH	91.4	ของแข็งสีน้ำตาลอมดำ

Sp1 และ Sp2

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตัวเคลื่อนที่ 2% MeOH / CH₂Cl₂ เห็นการเคลื่อนที่ของสารไม่ชัดเจน จึงไม่ได้ทำการศึกษา

Sp3

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตัวเคลื่อนที่ 2% MeOH/CH₂Cl₂ เห็น 1 spot ในUV-S ที่ R_f 0.5 อยู่ในระหว่างการศึกษา

Sp4

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตู้เคลื่อนที่ 2% MeOH/CH₂Cl₂ เห็น 5 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.1 0.23 0.44 0.52 และ 0.73 จากนั้นนำมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบธรรมดา โดยใช้ตัวชะเป็น 100% Hexane เพิ่มช้าด้วย ethyl acetate และเพิ่มช้าต่อด้วย MeOH จนถึง 100% MeOH นำสารละลายในแต่ละส่วนไปตรวจสอบบนแผ่นโครมาโทกราฟีแผ่นบางพบว่า สามารถรวมส่วนที่มีลักษณะทางโครมาโทแกรมเหมือนกันได้ทั้งหมด 7 ส่วน ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ส่วนต่างๆที่ได้จากการแยก Sp4 ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบธรรมดา

ส่วน	ตัวชะ	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ลักษณะสาร
Sp4-1	100% Hexane - 30% EtOAc/Hexane	38.5	ของแข็งสีน้ำตาล
Sp4-2	30-50% EtOAc/Hexane	13.0	ของแข็งสีน้ำตาล
Sp4-3	50-80% EtOAc/Hexane	1.5	ของแข็งสีเขียวเข้ม
Sp4-4	80-100% EtOAc/Hexane	3.1	ของแข็งสีน้ำตาลอ่อน
Sp4-5	2% MeOH/EtOAc- 30% MeOH/EtOAc	5.3	ของแข็งสีน้ำตาลอมดำ
Sp4-6	50% MeOH/EtOAc- 80% MeOH/EtOAc	5.7	ของแข็งสีน้ำตาลอ่อน
Sp4-7	100% MeOH	10.1	ของแข็งสีน้ำตาลอมดำ

Sp4-1

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตู้เคลื่อนที่ 20% EtOAc/Hexane (2 ครั้ง) เห็น 1 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.71 และเมื่อใช้ 50% CH₂Cl₂/Hexane (2 ครั้ง) เห็น 3 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.72 0.82 และ 0.90 อยู่ระหว่างการศึกษาศึกษา

Sp4-2

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตู้เคลื่อนที่ 20% EtOAc/Hexane (2 ครั้ง) เห็น 1 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.59 เมื่อนำไปบันทึกข้อมูล ¹H NMR พบว่ายังไม่บริสุทธิ์ อยู่ระหว่างการศึกษาศึกษา

Sp4-3

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตู้เคลื่อนที่ 20% EtOAc/Hexane (2 ครั้ง) เห็น 1 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.41 เนื่องจากสารมีปริมาณน้อย จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

Sp4-4

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตู้เคลื่อนที่ 20% EtOAc/Hexane (2 ครั้ง) เห็น 1 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.35 เนื่องจากสารมีปริมาณน้อย จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

Sp4-5

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตู้เคลื่อนที่ 20% EtOAc/Hexane (2 ครั้ง) เห็น 2 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.25 และ 0.35 จากนั้นนำมาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นหนาโดยใช้ตัวชะเป็น 50% CH_2Cl_2 /Petrol (2 ครั้ง) และ 70% CH_2Cl_2 /Petrol ได้ 2 แถบ ดังนี้

Sp4-5-1 (2.1 mg) มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตู้เคลื่อนที่ 50% CH_2Cl_2 /Hexane เห็น 1 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.38 เมื่อบันทึกข้อมูล ^1H NMR พบว่าเป็นสารบริสุทธิ์ ที่มีชื่อว่า **isosclerone**

Sp4-5-2 (2.7 mg) มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตู้เคลื่อนที่ 50% CH_2Cl_2 /Hexane เห็น 1 spot จางๆ ใน UV-S ที่ R_f 0.36 เมื่อบันทึกข้อมูล ^1H NMR พบว่าเป็นสารบริสุทธิ์และอยู่ในระหว่างบันทึกข้อมูล 2D NMR

Sp4-6

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตู้เคลื่อนที่ 20% EtOAc/Hexane (2 ครั้ง) เห็น 1 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.17 เมื่อบันทึกข้อมูล ^1H NMR พบว่าเป็นสารบริสุทธิ์ ที่มีชื่อว่า **tyrosol**

Sp4-7

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตู้เคลื่อนที่ 2% MeOH/ CH_2Cl_2 เป็นทางยาวใน UV-ไม่ได้ทำการศึกษา

Sp 5

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตู้เคลื่อนที่ 2% MeOH/ CH_2Cl_2 (2 ครั้ง) เห็นมากกว่า 7 spot ใน UV-S จากนั้นนำมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบธรรมดา โดยใช้ตัวชะเป็น 100% CH_2Cl_2 เพิ่มช้าด้วย MeOH จนถึง 100% MeOH นำสารละลายในแต่ละส่วนไปตรวจสอบบนแผ่นโครมาโทกราฟีแผ่นบางพบว่า

สามารถรวมส่วนที่มีลักษณะทางโครมาโทแกรมเหมือนกันได้ทั้งหมด 7 ส่วนดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ส่วนต่างๆที่ได้จากการแยก Sp5 ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบธรรมดา

ส่วน	ตัวชะ	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ลักษณะสาร
Sp5-1	100% CH ₂ Cl ₂	7.6	ของแข็งสีน้ำตาล
Sp5-2	100% CH ₂ Cl ₂	8.2	ของแข็งสีน้ำตาล
Sp5-3	100% CH ₂ Cl ₂	6.8	ของแข็งสีน้ำตาล
Sp5-4	2% MeOH/CH ₂ Cl ₂	8.6	ของแข็งสีน้ำตาล
Sp5-5	5-30% MeOH/CH ₂ Cl ₂	6.8	ของแข็งสีน้ำตาล
Sp5-6	50-80% MeOH/CH ₂ Cl ₂	7.7	ของแข็งสีน้ำตาล
Sp5-7	100% MeOH	20.3	ของแข็งสีน้ำตาล

Sp5-1

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตู้เคลื่อนที่ 50% CH₂Cl₂/Hexane เห็น 1 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.77 เมื่อบันทึกข้อมูล ¹H NMR พบว่าเป็นสารบริสุทธิ์ ที่มีชื่อว่า **8-methoxy-1-naphthol**

Sp5-2

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตู้เคลื่อนที่ 50% CH₂Cl₂/Hexane เห็น 2 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.62 และ 0.71 จากนั้นนำมาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นหนา โดยใช้ตัวชะเป็น 50% CH₂Cl₂/Petrol (2 ครั้ง) และ 80% CH₂Cl₂/Petrol ได้ 2 แถบ ดังนี้

Sp5-2-1 (4.7 mg) มีลักษณะเป็นของแข็งสีน้ำตาล จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตู้เคลื่อนที่ 40% CH₂Cl₂/Hexane เห็น 1 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.43 เมื่อบันทึกข้อมูล ¹H NMR พบว่าเป็นสารบริสุทธิ์ และอยู่ในระหว่างบันทึกข้อมูล 2D NMR

Sp5-2-2 (1.1 mg) มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตู้เคลื่อนที่ 50% CH₂Cl₂/Hexane ไม่เห็น spot ใน UV-S เนื่องจากสารมีปริมาณน้อย จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

Sp5-3 - Sp5-7

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตู้เคลื่อนที่ชนิดต่างๆ ส่วนใหญ่เห็นการแยกไม่ชัดเจน โดยจะมี

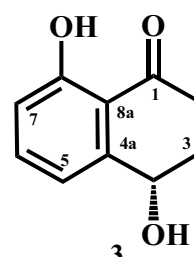
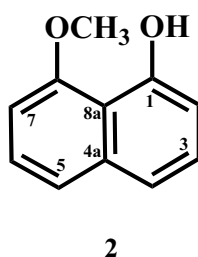
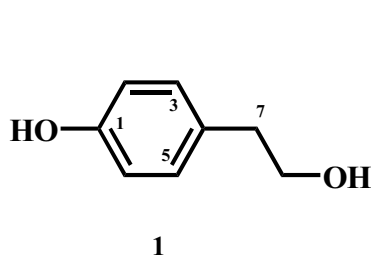
ลักษณะเป็นทางยาว หรือไม่เห็น spot แม้จะนำไปเคลือบด้วยสารละลาย Anisaldehyde แล้วให้ความร้อน ซึ่งจะดำเนินการศึกษาต่อไป

Sp6

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตู้เคลื่อนที่ 2% MeOH/CH₂Cl₂ (2 ครั้ง) ไม่เห็น spot แม้จะนำไปเคลือบด้วยสารละลาย Anisaldehyde แล้วให้ความร้อน ซึ่งจะดำเนินการศึกษาต่อไป

ผลการทดลอง

จากการศึกษาส่วนสกัดหยาดน้ำเลี้ยงเชื้อราพบว่า สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 5 สาร คือ tyrosol (1),¹ 8-methoxy-1-naphthol (2)² และ isosclerone (3)³ และอยู่ในระหว่างการบันทึกข้อมูล ¹³C NMR และ 2D NMR อีก 2 สาร วิเคราะห์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้โดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี เช่น UV, IR และ NMR



เมื่อนำสารบริสุทธิ์ที่ได้ไปบันทึกข้อมูล NMR ได้ผลดังตาราง

ตารางที่ 4 ข้อมูล ¹H และ ¹³C NMR ของ **1** และ tyrosol ในตัวทำละลาย CDCl₃

ตำแหน่ง	สาร 1		Tyrosol ^a	
	δ_{H} (mult., J_{Hz})	δ_{C} (C-type)	δ_{H} (mult., J_{Hz})	δ_{C} (C-type)
1	-	154.22 (C)	-	154.1 (C)
2, 6	6.79 (d, 9.0)	115.45 (CH)	6.77 (d, 8.0)	115.4 (CH)
3, 5	7.11 (d, 9.0)	130.15 (CH)	7.09 (d, 8.0)	130.0 (CH)
4	-	130.55 (C)	-	130.2 (C)
7	2.81 (t, 6.0)	38.27 (CH ₂)	2.82 (t, 6.4)	38.3 (CH ₂)
8	3.83 (t, 6.0)	63.80 (CH ₂)	3.83 (t, 6.4)	63.8 (CH ₂)

^a Guzmán-López *et al.*, 2007.

ตารางที่ 5 ข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR ของ **2** ในตัวทำละลาย CDCl_3

ตำแหน่ง	สาร 2	
	δ_{H} (mult., J_{Hz})	δ_{C} (C-type)
1-OH	9.32 (s)	154.51 (C)
2	6.87 (dd, 7.2, 1.5)	110.43 (CH)
3	7.32 (t, 7.2)	127.71 (CH)
4	7.29 (dd, 7.2, 1.5)	125.56 (CH)
4a	-	136.78 (C)
5	7.26 (d, 8.1)	118.84 (CH)
6	7.40 (t, 8.1)	121.88 (CH)
7	6.77 (d, 8.1)	103.94 (CH)
8-OMe	4.05 (s)	156.19 (C)
8a	-	118.84 (C)

Thines *et al.*, 1995.

ตารางที่ 6 ข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR ของ 3 และ isosclerone ในตัวทำละลาย CDCl_3

ตำแหน่ง	สาร 1		Tyrosol ^a	
	δ_{H} (mult., J_{Hz})	δ_{C} (C-type)	δ_{H} (mult., J_{Hz})	δ_{C} (C-type)
1	-	204.26 (C=O)	-	206.3 (C=O)
2	a: 3.01 (ddd, 17.7, 8.1, 4.8)	34.55 (CH ₂)	2.90 (ddd, 17.8, 7.6, 4.7)	36.1 (CH ₂)
	b: 2.65 (ddd, 17.7, 5.4, 4.8)		2.66 (ddd, 17.8, 9.1, 4.8)	
3	a: 2.35 (ddd, 13.2, 5.4, 4.5)	34.20 (CH ₂)	2.30 (m)	32.6 (CH ₂)
	b: 2.20 (ddd, 13.2, 8.1, 4.5)		2.10 (m)	
4	4.92 (dd, 7.5, 3.9)	67.70 (CH)	4.84 (dd, 8.0, 3.8)	68.3 (CH)
4a	-	145.84 (C)	-	148.6 (C)
5	7.02 (d, 7.5)	117.35 (CH)	7.07 (dm, 7.6)	118.8 (CH)
6	7.50 (t, 7.8)	136.98 (CH)	7.50 (dd, 8.3, 7.6)	137.9 (CH)
7	6.92 (d, 7.5)	117.78 (CH)	6.84 (dm, 8.3)	117.6 (CH)
8-OH	12.42 (s)	162.73 (C)	-	163.7 (C)
8a	-	115.00 (C)	-	116.5 (C)

^a Kokubun *et al.*, 2003.

เอกสารอ้างอิง

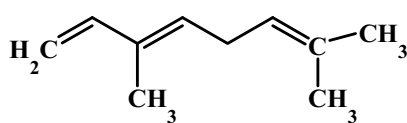
1. Guzman-Lopez O., Trigos A., Fernandez F. J., Yanez-Morales M., Saucedo-Castaneda G. *World J Microbiol Biotechnol.* **2007**. 23, 1473-1477.
2. Thines E., Daussmann T., Semar M., Sterner O., Anke H., *Z. Naturforsch.Sect. C, Biosci.* **1995**, 50, 813-819.
3. Kokubun T., Veitch N.C., Bridge, P.D., Simmonds M.S.J. *Phytochemistry.* **2003**. 62, 779-782.

สารต้านอนุมูลอิสระจากใบมะยม (*Bouea oppositifolia*)

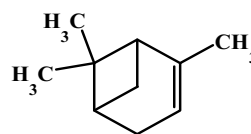
ผู้วิจัยหลัก : ดร.เยาวภา สุขพรมมา

บทนำ

มะยม (*Bouea oppositifolia*) อยู่ในวงศ์ Anacardiaceae¹ เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางสูง 8-20 เมตร พบในป่าดิบภาคตะวันออกเฉียงใต้และภาคใต้ของประเทศไทย จากการตรวจเอกสารพืชสกุล *Bouea* โดยใช้ฐานข้อมูล SciFinder พบว่าพืชสกุลนี้มีผู้ศึกษามาแล้ว 1 ชนิด คือ มะปราง (*Bouea macrophylla*) สามารถแยกสารได้ 2 สาร คือ 1,3,6-octatriene และ bicyclo[3.1.1]hept-2-ene²



1,3,6-Octatriene



Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene

แต่ยังไม่มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของมะยม นอกจากนี้ส่วนสกัดหยาบเมทานอลของใบมะยม ยังแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในระดับน่าสนใจ (IC₅₀ 0.017 mg/ml) ในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาองค์ประกอบเคมีของใบมะยม โดยคาดว่าสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะยม อาจเป็นสารใหม่และแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่น่าสนใจ

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาองค์ประกอบเคมีของใบมะยม ตลอดจนตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารบริสุทธิ์

การทดลองและผลการทดลอง

สกัดใบมะยมแห้งหนัก 1 กิโลกรัม ด้วยเมทานอลปริมาตร 10 ลิตร เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นกรองและระเหยให้แห้ง จะได้ส่วนสกัดหยาบเมทานอลของใบมะยมมีลักษณะเป็นของหนืดสีเขียวเข้มปนดำ หนัก 119 กรัม จากนั้นนำมาละลายด้วยเอทิลอะซิเตต จะได้ส่วนที่ไม่ละลายเอทิลอะซิเตต หนัก 35.4 กรัม แยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่มีตัวอยู่กับที่เป็น Sephadex LH-20 โดยชะด้วย 100% MeOH แยกสารได้ 4 ส่วน ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ส่วนต่างๆ ที่ได้จากการแยกส่วนสกัดหยาบส่วนสกัดหยาบเมทานอลของใบมะขังที่ไม่ละลายใน EtOAc ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ที่มีตัวอยู่กับที่เป็น Sephadex LH-20

ส่วน	น้ำหนัก (กรัม)	ลักษณะทางกายภาพ
B1	2.29	ของแข็งสีเขียวเข้มปนดำ
B2	15.18	ของแข็งสีเขียวเข้มปนดำ
B3	12.69	ของแข็งสีเขียวเข้มปนดำ
B4	0.77	ของแข็งสีเขียวเข้มปนดำ

B1 และ B2

โครมาโทกราฟีแผ่นบางแบบ reverse phase ในตัวเคลื่อนที่ 50% MeOH/H₂O ใน UV-S แสดงการแยกไม่ชัดเจน เมื่อนำไปบันทึกข้อมูล ¹H NMR spectrum พบว่าไม่ปรากฏสัญญาณของโอลิฟินิกและอะโรมาติกโปรตอน จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

B3

จากโครมาโทกราฟีแผ่นบางแบบ reverse phase ในตัวเคลื่อนที่ 50% MeOH/H₂O ใน UV-S เห็นสารหลัก 5 spot ที่ R_f 0.38, 0.52, 0.62, 0.78 และ 0.89 แบ่งมา 920 มิลลิกรัม นำไปแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่มีตัวอยู่กับที่เป็น reverse phase silica gel โดยใช้ตัวชะเป็น 40% MeOH/H₂O ลดชั่วลงเรื่อยๆ จนกระทั่งถึง 100% MeOH แยกสารได้ 4 ส่วน ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ส่วนต่างๆ ที่ได้จากการแยก B3 ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่มีตัวอยู่กับที่เป็น reverse phase silica gel

ส่วน	ตัวชะ	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ลักษณะทางกายภาพ
B301	40% MeOH/H ₂ O	429.0	ของหนืดสีเขียวเข้ม
B302	40% MeOH/H ₂ O	176.5	ของแข็งสีน้ำตาล
B303	40% MeOH/H ₂ O	198.5	ของแข็งสีน้ำตาล
B304	50% MeOH/H ₂ O – 100% MeOH	112.2	ของหนืดสีเขียวเข้ม

B301 และ B304

จากโครมาโทกราฟีแผ่นบางแบบ reverse phase ในตัวเคลื่อนที่ 40% MeOH/H₂O ใน UV-S ไม่เห็น spot สาร เมื่อนำไปบันทึกข้อมูล ¹H NMR spectrum พบว่าไม่ปรากฏสัญญาณของโอลิฟินิกและอะโรมาติกโปรตอน จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

B302

จากโครมาโทกราฟีแผ่นบางแบบ reverse phase ในตัวเคลื่อนที่ 40% MeOH/H₂O ใน UV-S เห็นสารหลัก 1 spot ที่ R_f 0.56 จึงแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่มีตัวอยู่กับที่เป็น reverse phase silica gel โดยใช้ตัวชะเป็น 30% MeOH/H₂O ลดช้าลงเรื่อยๆจนกระทั่งถึง 100% MeOH แยกสารได้ 3 ส่วนดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ส่วนต่างๆที่ได้จากการแยก B302 ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่มีตัวอยู่กับที่เป็น reverse phase silica gel

ส่วน	ตัวชะ	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ลักษณะทางกายภาพ
B302A	30% MeOH/H ₂ O – 100% MeOH	47.1	ของหนืดสีน้ำตาลเข้ม
B302B	30-40% MeOH/H ₂ O	97.5	ของแข็งสีน้ำตาล
B302C	50% MeOH/H ₂ O	22.6	ของหนืดสีเขียวเข้ม

B302A และ B302C

จากโครมาโทกราฟีแผ่นบางแบบ reverse phase ในตัวเคลื่อนที่ 30% MeOH/H₂O ใน UV-S เห็นเป็นทางยาว นำไปบันทึกข้อมูล ¹H NMR spectrum พบว่าไม่ปรากฏสัญญาณของโอลิฟินิก และอะโรมาติกโปรตอน จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

B302B

จากโครมาโทกราฟีแผ่นบางแบบ reverse phase ในตัวเคลื่อนที่ 30% MeOH/H₂O ใน UV-S เห็นสาร 1 spot ที่ R_f 0.40 นำไปบันทึกข้อมูล ¹H NMR spectrum พบว่าเป็นสารบริสุทธิ์ ให้รหัสเป็น

BO1

UV $\lambda_{\max}$ (nm) (MeOH) (log ϵ)	221 (4.46), 274 (4.12)
FTIR (neat): ν (cm ⁻¹)	3296 (O-H stretching) 1694 (C=O stretching) 1456 (C=C stretching)
¹ H NMR (CD ₃ OD) (δ ppm) (300 MHz):	7.15 (s, 2H), 3.85 (s, 3H)
¹³ C NMR (CD ₃ OD) (δ ppm) (75 MHz):	167.89, 144.97, 144.97, 138.34, 120.15, 109.21, 108.94, 51.24
DEPT 135°: CH;	109.21, 108.94
CH ₃ ;	51.24

B303

จากโครมาโทกราฟีแผ่นบางแบบ reverse phase ในตัวเคลื่อนที่ 40% MeOH/H₂O ใน UV-S เห็นสารหลัก 2 spot ที่ R_f 0.37 และ 0.54 นำไปแยกอีกครั้งด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่มีตัวอยู่กับที่เป็น reverse phase silica gel โดยใช้ตัวชะเป็น 40% MeOH/H₂O ลดช้าลงเรื่อยๆจนกระทั่งถึง 100% MeOH แยกสารได้ 2 ส่วนดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ส่วนต่างๆที่ได้จากการแยก **B303** ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่มีตัวอยู่กับที่เป็น reverse phase silica gel

ส่วน	ตัวชะ	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ลักษณะทางกายภาพ
B303A	40% MeOH/H ₂ O - 50% MeOH/H ₂ O	47.1	ของแข็งสีเหลืองเข้ม
B303B	50% MeOH/H ₂ O – 100% MeOH	23.7	ของแข็งสีเหลือง

B303A

จากโครมาโทกราฟีแผ่นบางแบบ reverse phase ในตัวเคลื่อนที่ 40% MeOH/H₂O ใน UV-S ไม่เห็นสารหลัก มีลักษณะเป็นทางยาว จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

B303B

จากโครมาโทกราฟีแผ่นบางแบบ reverse phase ในตัวเคลื่อนที่ 40% MeOH/H₂O ใน UV-S เห็นสาร 1 spot ที่ R_f 0.38 นำไปบันทึกข้อมูล ¹H NMR spectrum พบว่าเป็นสารบริสุทธิ์ให้รหัสเป็น

BO2

UV $\lambda_{\max}$ (nm) (MeOH) (log ϵ)	224 (4.58), 257 (4.38), 358 (4.31)
FTIR (neat): ν (cm ⁻¹)	3367 (O-H stretching) 1584 (C=O stretching) 1475 (C=C stretching)
¹ H NMR (CD ₃ OD) (δ ppm) (300 MHz):	6.97 (s, 1H), 5.33 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 4.24 (dd, J = 1.5, 3.3 Hz, 1H), 3.81 (dd, J = 3.3, 9.3 Hz, 1H), 3.37 (t, J = 9.6 Hz, 1H), 3.55 (dd, J = 9.6, 6.0 Hz, 1H), 0.98 (d, J = 6.0 Hz, 3H)
¹³ C NMR (CD ₃ OD) (δ ppm)(75 MHz) :	178.27, 164.42, 161.78, 158.04, 157.11, 145.44, 136.48, 134.93,

	120.59, 108.71, 108.25, 104.51,
	102.22, 98.42, 93.31, 71.99, 70.77,
	70.63, 70.49, 16.26
DEPT 135°: CH;	108.71, 108.25, 102.22, 98.42, 93.31,
	71.99, 70.77, 70.63, 70.49
CH ₃ ;	16.26

B304

จากโครมาโทกราฟีแผ่นบางแบบ Reverse phase ในตัวเคลื่อนที่ 40% MeOH/H₂O ใน UV-S ไม่เห็นสารหลัก มีลักษณะเป็นทางยาว เมื่อนำไปบันทึกข้อมูล ¹H NMR spectrum พบว่าไม่ปรากฏสัญญาณของโอลิฟินิกและอะโรมาติกโปรตอน จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

B4

จากโครมาโทกราฟีแผ่นบางแบบ Reverse phase ในตัวเคลื่อนที่ 50% MeOH/H₂O ใน UV-S เห็นสารหลัก 3 spot ที่ R_f 0.48, 0.67 และ 0.88 นำไปบันทึกข้อมูล ¹H NMR spectrum พบว่าปรากฏสัญญาณของสารหลักเหมือนกับ B3 จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

วิจารณ์และสรุปผล

การวิเคราะห์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ทั้ง 2 สาร ทำได้โดยอาศัยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี โดยเฉพาะข้อมูล 1D และ 2D NMR สเปกโทรสโกปี

BO1

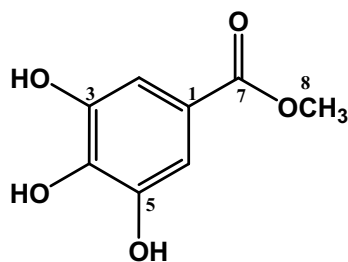
จากข้อมูล UV แสดงแถบดูดกลืนที่ λ_{max} 221 และ 274 nm แสดงว่ามีโครโมฟอร์ที่เป็นระบบคอนจูเกชัน จากข้อมูล IR แสดงแถบการยืดของหมู่ OH ที่ 3296 cm⁻¹ และ C=O ที่ 1694 cm⁻¹

จากข้อมูล ¹H NMR แสดงสัญญาณของ aromatic proton ที่เป็น chemically equivalent กัน 1 ชุด โดยปรากฏที่ δ 7.15 (*brs*, 2H) และปรากฏสัญญาณของ methoxy proton ที่ δ 3.85 (*s*, 3H)

จากข้อมูล ¹³C NMR แสดงสัญญาณของ carbonyl carbon จำนวน 1 carbon ที่ δ 167.89 และจากข้อมูล DEPT แสดงสัญญาณของ quaternary, methine และ methyl carbon จำนวน 4, 2 และ 1 carbon ตามลำดับ

จากข้อมูล HMBC แสดง correlation ของ aromatic H-2 และ H-4 (δ 7.15) กับ C-4 (δ 138.34), C-6 (δ 109.21) และ C-7 (δ 167.89) และ methoxy proton แสดง correlation กับ C-7 (δ 167.89)

จากข้อมูลข้างต้นสรุปได้ว่า **BO1** มีโครงสร้างดังแสดง และจากฐานข้อมูล SciFinder พบว่า **BO1** เป็นสารที่มีการรายงานโครงสร้างมาแล้ว และมีชื่อว่า gallic acid methyl ester³



ตารางที่ 5 ข้อมูล NMR ของ **BO1** ใน CD₃OD

BO1				Gallic acid methyl ester	
Position	δ_H (mult, J_{Hz})	δ_C (C-Type)	HMBC Correlation	δ_H (mult, J_{Hz})	δ_C
1		120.15 (C)			121.4 (C)
2	7.15 (<i>brs</i>)	108.94 (CH)	C-4, C-6, C-7	7.04 (<i>s</i>)	110.0 (CH)
3-OH		144.97 (C)			146.5 (C)
4-OH		138.34 (C)			139.7 (C)
5-OH		144.97 (C)			146.5 (C)
6	7.15 (<i>brs</i>)	109.21 (CH)	C-2, C-4, C-7	7.04 (<i>s</i>)	110.0 (CH)
7		167.89 (C)			167.5 (C)
8	3.85 (<i>s</i>)	51.24 (CH ₃)	C-7	3.80 (<i>s</i>)	52.3 (CH ₃)

BO2

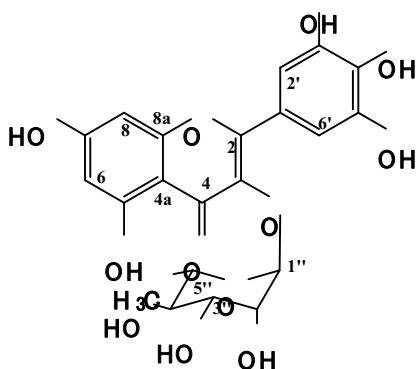
จากข้อมูล UV แสดงแถบดูดกลืนที่ λ_{max} 224, 257 และ 358 nm แสดงว่ามีโครโมฟอร์ที่เป็นระบบคอนจูเกชัน จากข้อมูล IR แสดงแถบการยืดของหมู่ OH ที่ 3367 cm⁻¹ และ C=O ที่ 1584 cm⁻¹ ซึ่งจากข้อมูลข้างต้นแสดงว่าเป็นสารประเภท flavone

จากข้อมูล ¹H NMR แสดงสัญญาณโปรตอนของ 1,3,4,5-tetrasubstituted benzene ring ที่ δ 6.97 (*brs*, H-2', 6') และสัญญาณ aromatic proton อีก 2 สัญญาณ ที่ δ 6.37 (*s*, H-8) และ δ 6.21 (*s*, H-6) ทำให้ทราบว่าโครงสร้างของ flavones เป็น 3',4',5',5,7- pentahydroxyflavone นอกจากนี้ ¹H NMR ยังแสดงสัญญาณของหมู่ methyl เป็น *doublet* ที่ δ 0.98 (*d*, J = 6.0 Hz, 3H, H-6'') และ methine proton อีก 5 สัญญาณ ที่ δ 5.33 (*d*, J = 1.5 Hz, H-1''), 4.24 (*dd*, J = 1.5, 3.3 Hz, H-2''), 3.81 (*dd*, J = 3.3, 9.3 Hz, H-3''), 3.37 (*t*, J = 9.6 Hz, H-4'') และ 3.55 (*dd*, J = 9.6, 6.0 Hz, H-5'') ซึ่ง

สัญญาณดังกล่าวเป็นสัญญาณโปรตอนของน้ำตาลแรมโนส ซึ่ง anomeric proton (H-1'') ปรากฏสัญญาณเป็น *doublet* ด้วยค่าคู่ควบเท่ากับ 1.5 Hz จึงทำให้ทราบว่า น้ำตาลแรมโนสอยู่ในรูปของ α -form

จากข้อมูล HMBC พบว่า H-1'' แสดง correlation กับ C-3 (δ 136.27) แสดงว่าน้ำตาลแรมโนสต่ออยู่กับหมู่ OH บน C-3 ของ 4-chromenone และ aromatic H-2' และ H-6' (δ 6.97) แสดง correlation กับ C-2 และ C-4' ทำให้ทราบว่า 1,3,4,5-tetrasubstituted benzene ring ต่ออยู่กับ C-2 ของวง 4-chromenone

จากข้อมูลข้างต้นสรุปได้ว่า **BO2** มีโครงสร้างดังแสดง และจากฐานข้อมูล SciFinder พบว่า **BO2** เป็นสารที่มีการรายงานโครงสร้างมาแล้วคือ myricetin-3- α -rhamnoside⁴



ตารางที่ 6 ข้อมูล NMR ของ **BO2** ใน CD₃OD

Position	BO2 (CD ₃ OD)		HMBC Correlation	Myricetin-3- α -rhamnoside	
	δ_H (mult, J_{Hz})	δ_C (C-Type)		δ_H (mult, J_{Hz})	δ_C (C-Type)
2		157.11 (C)			158.51 (C)
3		134.93 (C)			136.34 (C)
4		178.27 (C)			179.72 (C)
4a		104.51 (C)			105.92 (C)
5		161.78 (C)			163.21 (C)
6	6.21 (s)	98.42 (CH)	C-8, C-4a	6.33 (s)	99.84 (CH)
7		164.42 (C)			165.88 (C)
8	6.37 (s)	93.31 (CH)	C-6, C-4a	6.49 (s)	94.74 (CH)
8a		158.04 (C)			159.51 (C)

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Position	BO2 (CD ₃ OD)		HMBC Correlation	Myricetin-3- α -rhamnoside	
	δ_H (mult, J _{H_z})	δ_C (C-Type)		δ_H (mult, J _{H_z})	δ_C (C-Type)
1'		120.59 (C)			121.99 (C)
2'	6.97 (s)	108.25 (CH)	C-2, C-4', C-6'	7.07 (s)	109.64 (CH)
3'		145.44 (C)			146.86 (C)
4'		136.48 (C)			137.90 (C)
5'		145.44 (C)			146.86 (C)
6'	6.97 (s)	108.71 (CH)	C-2, C-2', C-4'	7.07 (s)	109.64 (CH)
1''	5.33 (d, 1.5)	102.22 (CH)	C-3, C-3'', C-5''	5.44 (d, 1.5)	103.64 (CH)
2''	4.24 (dd, 1.5, 3.3)	70.49 (CH)	C-4''	4.35 (dd, 1.5, 3.3)	71.90 (CH)
3''	3.81 (dd, 3.3, 9.3)	70.77 (CH)	C-1'', C-5''	3.92 (dd, 3.3, 9.5)	72.15 (CH)
4''	3.37 (t, 9.6)	71.99 (CH)	C-2'', C-6''	3.47 (t, 9.5)	73.37 (CH)
5''	3.55 (dd, 9.6, 6.0)	70.63 (CH)	C-1'', C-3''	3.64 (dd, 9.5, 6.2)	72.07 (CH)
6''	0.98 (d, 6.0)	16.26 (CH ₃)	C-4''	1.08 (d, 6.2)	17.67 (CH ₃)

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาแยกองค์ประกอบทางเคมีจากใบมะขง สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้จำนวน 2 สาร คือ gallic acid methyl ester และ myricetin-3- α -rhamnoside

เอกสารอ้างอิง

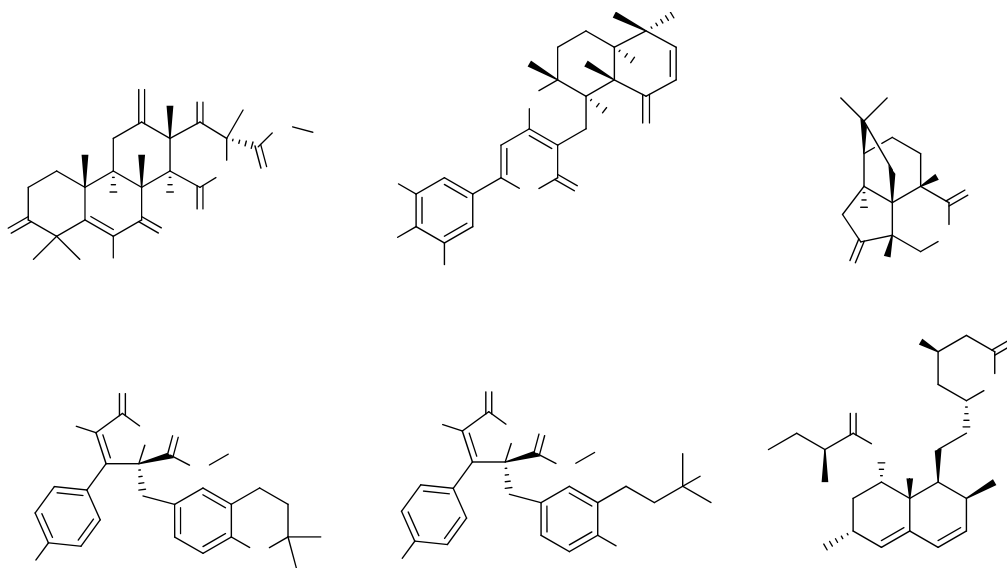
1. เต็ม สมิตินันท์. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม. กรุงเทพฯ: สำนักวิชาการ ป่าไม้ กรมป่าไม้. 2544.
2. Wong, K.C.; Loi, H.K. Volatile constituents of *Bouea macrophylla* Griff Fruit. *J. Essential oil Res.* **1996**, 8 (1), 99-100.
3. Wang, K. J., Yang, C. R., Zhang, Y. J. Phenolic antioxidants from Chinese toon (fresh young leaves and shoots of *Toona sinensis*. *Food chemistry.* **2007**, 101, 365-371.
4. Fossen, T., Larsen, Å., Kiremire, B. T., Andesen, Ø. M. Flavonoids from blue flowers of *Nymphaea caerulea*. *Phytochemistry.* **1999**, 51, 1133-1137.

เมตาบอไลต์จากเชื้อราดิน *Aspergillus terreus* PSU-RSPG187

ผู้วิจัยหลัก : ดร.มรกต แก้วเพชร

บทนำ

Aspergillus terreus เป็นเชื้อราในสกุล *Aspergillus* ที่กระจายอยู่ทั่วโลก พบมากในดินโดยเฉพาะในเขตร้อน ซึ่งเชื้อราสกุล *Aspergillus* เป็นแหล่งที่มาของสารเมตาบอไลต์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย และถึงแม้ว่าจะมีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเชื้อราสกุลนี้มากกว่าสามทศวรรษ ก็ยังสามารถค้นพบสารเมตาบอไลต์ที่มีโครงสร้างใหม่และฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเชื้อรา *Aspergillus terreus* สามารถแยกสารพิษจากเชื้อรา (mycotoxin) เช่น terretonin [1] และ territrem C [2] เป็นต้น และสารเมตาบอไลต์สารใหม่จากเชื้อราชนิดนี้ เช่น (-)-quadronone [3] aspernolide A และ B ซึ่งแสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ HMG-CoA reductase และยับยั้งการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในหนูทดลอง [4-5] และ lovastatin แสดงฤทธิ์ลดคอเลสเตอรอล [6] เป็นต้น



จากการตรวจเอกสารด้วยฐานข้อมูล SciFinder พบว่ามีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีของเชื้อรา *A. terreus* ที่เก็บตัวอย่างจากดินเป็นจำนวนไม่มากนัก [7, 8] นอกจากนี้ ส่วนสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อราดิน *A. terreus* PSU-RSPG187 ซึ่งเป็นเชื้อราที่พบในเขตปลูกพันธุ์กรรมพืช เชื้อนรัชชประภา จังหวัดสุราษฎร์ธานี แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ methicillin-resistant *S. aureus* ด้วยค่า MIC 128 และ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากเชื้อรา ดังกล่าว โดยคาดว่าจะสามารถแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติสารใหม่ ซึ่งมีประโยชน์ทางเภสัชวิทยาได้

วัตถุประสงค์

เพื่อแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อราดิน *A. terreus* PSU-RSPG187 พร้อมทั้งศึกษาโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ โดยคาดว่าสารบริสุทธิ์ที่แยกได้อาจเป็นสารใหม่และแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ

การทดลองและผลการทดลอง

นำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อราจากดิน *A. terreus* PSU-RSPG187 มาสกัดด้วยเอธิลอะซิเตท 3 ครั้งๆ ละ 300 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำชั้นเอธิลอะซิเตทมารวมกัน ดูดความชื้น แล้วระเหยเอาตัวทำละลายออก จะได้ส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตทของน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. terreus* PSU-RSPG187 ซึ่งมีลักษณะเป็นของหนืดสีน้ำตาลหนัก 0.8785 กรัม จากนั้นนำส่วนสกัดหยาบที่ได้มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่มี Sephadex LH-20 เป็นตัวอยู่กับที่และสารละลาย MeOH/CH₂Cl₂ (1:1) เป็นตัวเคลื่อนที่ แยกสารได้ 5 ส่วน ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ส่วนต่าง ๆ ที่ได้จากการแยกส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตทของของน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. terreus* PSU-RSPG187 ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่มีตัวอยู่กับที่เป็น Sephadex LH-20

ส่วน	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ลักษณะทางกายภาพ
A	177.5	ของหนืดสีน้ำตาล
B	361.6	ของหนืดสีน้ำตาล
C	91.5	ของแข็งสีเหลืองอ่อน
D	274.3	ของหนืดสีน้ำตาล
E	19.7	ของหนืดสีน้ำตาล

A

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตัวเคลื่อนที่ 70% EtOAc/Petrol เห็น 5 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.68 0.45 0.28 0.20 และ 0.15 จึงนำส่วน A มาแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบธรรมดา โดยใช้ตัวเคลื่อนที่ที่เป็น 50% EtOAc/Hexane เพิ่มซ้ำด้วย EtOAc จนถึง 100% EtOAc แล้วเพิ่มซ้ำด้วย MeOH จนถึง 100% MeOH สามารถแยกสารได้ 6 ส่วน ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ส่วนต่าง ๆ ที่ได้จากการแยกส่วน A ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบธรรมดา

ส่วน	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ลักษณะทางกายภาพ
A1	9.6	ของหนืดสีน้ำตาล
A2	10.7	ของหนืดสีน้ำตาลเหลือง
A3	2.1	ของหนืดสีเหลือง
A4	11.8	ของหนืดสีเหลือง
A5	32.7	ของหนืดสีเหลือง
A6	98.7	ของหนืดสีน้ำตาล

A1

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตัวเคลื่อนที่ 70% EtOAc/Hexane เห็น 2 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.80 และ 0.60 จึงนำส่วน A1 มาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นหนา โดยใช้ตัวเคลื่อนที่เป็น 2% MeOH/CH₂Cl₂ (6 รอบ) สามารถแยกสารได้ 1 ส่วน คือ A1A (1.4 มิลลิกรัม) จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตัวเคลื่อนที่ 70% EtOAc/Hexane เห็น 1 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.60 เมื่อนำไปบันทึกข้อมูล 300 MHz ¹H NMR พบว่าเป็นสารเดียวกับ AT2 ที่แยกได้จากส่วน B2A

A2

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตัวเคลื่อนที่ 70% EtOAc/Hexane เห็นเป็นทางยาวใน UV-S และสารมีปริมาณน้อย จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

A3

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตัวเคลื่อนที่ 70% EtOAc/Hexane เห็น 1 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.30 เมื่อนำไปบันทึกข้อมูล 300 MHz ¹H NMR ลักษณะสัญญาณแสดงว่าเป็นสารบริสุทธิ์ ให้รหัสเป็น AT1 ขณะนี้อยู่ระหว่างการวิเคราะห์โครงสร้างของสาร

A4

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตัวเคลื่อนที่ 70% EtOAc/Hexane เห็น 3 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.28 0.20 และ 0.16 จึงนำส่วน A4 มาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นหนา โดยใช้ตัวเคลื่อนที่เป็น 2% MeOH/CH₂Cl₂ (7 รอบ) สามารถแยกสารได้ 2 ส่วน ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ส่วนต่าง ๆ ที่ได้จากการแยกส่วน A4 ด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นหนา

ส่วน	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ลักษณะทางกายภาพ
A4A	1.0	ของแข็งสีขาว
A4B	2.4	ของหนืดสีเหลือง

A4A

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตู้เคลื่อนที่ 70% EtOAc/Hexane เห็นสารหลัก 1 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.20 เมื่อนำไปบันทึกข้อมูล 300 MHz ^1H NMR ลักษณะสัญญาณแสดงว่าสารไม่บริสุทธิ์ และสารมีปริมาณน้อย จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

A4B

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตู้เคลื่อนที่ 70% EtOAc/Hexane เห็นสารหลัก 1 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.16 เมื่อนำไปบันทึกข้อมูล 300 MHz ^1H NMR ลักษณะสัญญาณแสดงว่าสารไม่บริสุทธิ์ และเนื่องจากสารมีปริมาณน้อย จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

A5

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตู้เคลื่อนที่ 70% EtOAc/Hexane เห็น 3 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.25 0.18 และ 0.12 จึงนำส่วน A5 มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบธรรมดา โดยใช้ตู้เคลื่อนที่ที่เป็น 70% EtOAc/Hexane เพิ่มซ้ำด้วย EtOAc จนถึง 100% EtOAc แล้วเพิ่มซ้ำด้วย MeOH จนถึง 50% MeOH/EtOAc สามารถแยกสารได้ 5 ส่วน ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ส่วนต่าง ๆ ที่ได้จากการแยกส่วน A5 ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบธรรมดา

ส่วน	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ลักษณะทางกายภาพ
A5A	3.0	ของหนืดสีเหลือง
A5B	2.1	ของหนืดสีเหลือง
A5C	10.2	ของหนืดสีเหลือง
A5D	13.2	ของหนืดสีเหลือง
A5E	3.3	ของหนืดสีเหลือง

A5A

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตู้เคลื่อนที่ 70% EtOAc/Hexane (2 รอบ) ใน UV-S เห็นสารเป็นทางยาวโดยมีสารหลัก 2 spot ที่ R_f 0.85 และ 0.65 เนื่องจากสารมีปริมาณน้อย จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

A5B

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตัวเคลื่อนที่ 70% EtOAc/Hexane (2 รอบ) ใน UV-S เห็นสารเป็นทางยาวโดยมีสารหลัก 1 spot ที่ R_f 0.25 เนื่องจากสารมีปริมาณน้อย จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

A5C

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตัวเคลื่อนที่ 70% EtOAc/Hexane (2 รอบ) ใน UV-S เห็นสารเป็นทางยาวโดยมีสารหลัก 2 spot ที่ R_f 0.60 และ 0.25 เนื่องจากสารมีปริมาณน้อย จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

A5D

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตัวเคลื่อนที่ 70% EtOAc/Hexane (2 รอบ) ใน UV-S เห็นสารเป็นทางยาวโดยมีสารหลัก 3 spot ที่ R_f 0.85 0.60 และ 0.25 เนื่องจากสารมีปริมาณน้อย จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

A5E

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตัวเคลื่อนที่ 70% EtOAc/Hexane (2 รอบ) ใน UV-S เห็นสารเป็นทางยาว เนื่องจากสารมีปริมาณน้อย จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

A6

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตัวเคลื่อนที่ 70% EtOAc/Hexane ใน UV-S เห็นสารอยู่ที่ baseline เมื่อนำไปบันทึกข้อมูล 300 MHz ^1H NMR ลักษณะสัญญาณส่วนใหญ่ปรากฏที่สนามสูง จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

B

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตัวเคลื่อนที่ 70% EtOAc/Petrol เห็น 3 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.68 0.45 และ 0.20 จึงนำส่วน B มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบธรรมดา โดยใช้ตัวเคลื่อนที่เป็น 30% Acetone/Petrol เพิ่มซ้ำด้วย Acetone จนถึง 100% Acetone แล้วเพิ่มซ้ำด้วย MeOH จนถึง 50% MeOH/Acetone สามารถแยกสารได้ 6 ส่วน ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ส่วนต่าง ๆ ที่ได้จากการแยกส่วน B ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบธรรมดา

ส่วน	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ลักษณะทางกายภาพ
B1	4.0	ของหนืดสีน้ำตาล
B2	129.4	ของหนืดสีเหลืองผสมของแข็งสีขาว
B3	24.0	ของหนืดสีเหลือง
B4	21.2	ของหนืดสีเหลือง
B5	33.7	ของหนืดสีเหลือง
B6	124.6	ของหนืดสีน้ำตาล

B1

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตัวเคลื่อนที่ 50% EtOAc/Petrol เห็นสารหลัก 2 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.80 และ 0.71 เมื่อนำไปบันทึกข้อมูล 300 MHz ^1H NMR ลักษณะสัญญาณส่วนใหญ่ปรากฏที่สนามสูงและสารมีปริมาณน้อย จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

B2

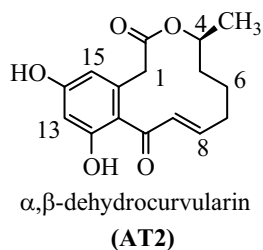
จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตัวเคลื่อนที่ 50% EtOAc/Petrol เห็นสารหลัก 1 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.52 จึงนำมาแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบธรรมดา โดยใช้ตัวเคลื่อนที่เป็น 20% EtOAc/Petrol เพิ่มซ้ำด้วย EtOAc จนถึง 100% EtOAc แล้วเพิ่มซ้ำด้วย MeOH จนถึง 100% MeOH สามารถแยกสารได้ 3 ส่วน ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ส่วนต่าง ๆ ที่ได้จากการแยกส่วน B2 ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบธรรมดา

ส่วน	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ลักษณะทางกายภาพ
B2A	75.1	ของแข็งสีขาว
B2B	26.2	ของแข็งสีเหลืองอ่อน
B2C	20.3	ของหนืดสีน้ำตาล

B2A

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตัวเคลื่อนที่ 50% EtOAc/Petrol เห็น 1 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.52 เมื่อนำไปบันทึกข้อมูล 300 MHz ^1H NMR ลักษณะสัญญาณแสดงว่าเป็นสารบริสุทธิ์ ให้รหัสเป็น AT2 จากการวิเคราะห์โครงสร้างของสารพบว่า AT2 คือ α,β -dehydrocurvularin [9] โดยมีข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR ดังแสดงในตารางที่ 7



ตารางที่ 7 ข้อมูล 300 MHz ^1H และ 75 MHz ^{13}C NMR ของ α,β-dehydrocurvularin (AT2) ใน CDCl_3

Position	^1H δ (multiplicity, J , Hz)	^{13}C δ (multiplicity)
1	4.09 (d, 17.7) 3.62 (d, 17.7)	42.8 (CH_2)
2	-	170.9 (C)
4	4.79-4.68 (m)	72.0 (CH)
5	1.93-1.81 (m) 1.70-1.56 (m)	33.8 (CH_2)
6	2.03-1.94 (m) 1.74-1.65 (m)	24.0 (CH_2)
7	2.50-2.28 (m)	32.2 (CH_2)
8	6.58 (ddd, 15.4, 8.6, 4.9)	148.7 (CH)
9	6.79 (d, 15.4)	131.6 (CH)
10	-	196.3 (C)
11	-	114.7 (C)
12-OH	12.35 (s)	165.1 (C)
13	6.32 (d, 2.4)	102.0 (CH)
14-OH	9.36 (s)	162.1 (C)
15	6.37 (d, 2.4)	112.8 (CH)
16	-	138.6 (C)
17	0.91 (t, 6.9)	13.9 (CH_3)

B2B

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตู้เคลื่อนที่ 50% EtOAc/Petrol เห็นสารหลัก 1 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.52 และเห็นสารรองอีก 2 spot ที่ R_f 0.45 และ 0.30 เนื่องจากสารหลักของ B2B คล้ายกับสารหลักของ B2A จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

B2C

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตู้เคลื่อนที่ 50% EtOAc/Petrol เห็นสาร 4 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.52 0.45 0.30 และ 0.10 เนื่องจากสารหลักของ B2C คล้ายกับสารหลักของ B2A จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

B3

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตัวเคลื่อนที่ 50% EtOAc/Petrol เห็น 3 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.52 0.45 และ 0.30 จึงนำส่วน B3 มาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นหนา โดยใช้ตัวเคลื่อนที่เป็น 40% EtOAc/Petrol (6 รอบ) สามารถแยกสารได้ 3 ส่วน ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ส่วนต่าง ๆ ที่ได้จากการแยกส่วน B3 ด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นหนา

ส่วน	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ลักษณะทางกายภาพ
B3A	5.5	ของหนืดใสไม่มีสี
B3B	1.3	ของหนืดใสไม่มีสี
B3C	3.6	ของหนืดใสไม่มีสี

B3A

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตัวเคลื่อนที่ 50% EtOAc/Petrol เห็นสาร 1 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.52 เมื่อนำไปบันทึกข้อมูล 300 MHz ^1H NMR พบว่าปรากฏสัญญาณของ **AT2** จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

B3B

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตัวเคลื่อนที่ 50% EtOAc/Petrol เห็นสาร 1 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.45 เมื่อนำไปบันทึกข้อมูล 300 MHz ^1H NMR พบว่าปรากฏสัญญาณที่น่าสนใจ แต่เนื่องจากสารมีปริมาณน้อย จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

B3C

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตัวเคลื่อนที่ 50% EtOAc/Petrol เห็นสาร 1 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.30 เมื่อนำไปบันทึกข้อมูล 300 MHz ^1H NMR พบว่าปรากฏสัญญาณที่น่าสนใจ แต่เนื่องจากสารมีปริมาณน้อย จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

B4

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตัวเคลื่อนที่ 50% EtOAc/Petrol เห็น 2 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.52 และ 0.18 จึงนำส่วน B4 มาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นหนา โดยใช้ตัวเคลื่อนที่เป็น 50% EtOAc/Petrol (7 รอบ) สามารถแยกสารได้ 2 ส่วน ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ส่วนต่าง ๆ ที่ได้จากการแยกส่วน B4 ด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นหนา

ส่วน	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ลักษณะทางกายภาพ
B4A	1.4	ของหนืดใสไม่มีสี
B4B	4.0	ของหนืดใสไม่มีสี

B4A

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตัวเคลื่อนที่ 50% EtOAc/Petrol เห็นสาร 1 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.52 เมื่อนำไปบันทึกข้อมูล 300 MHz ^1H NMR พบว่าปรากฏสัญญาณของ **AT2** จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

B4B

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตัวเคลื่อนที่ 50% EtOAc/Petrol เห็นสาร 1 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.18 เมื่อนำไปบันทึกข้อมูล 300 MHz ^1H NMR พบว่าปรากฏสัญญาณที่น่าสนใจ เป็นของผสมของสาร 2 ตัว เนื่องจากสารมีปริมาณน้อย จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

B5

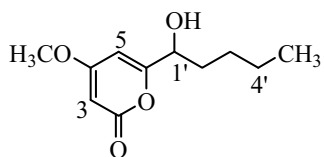
จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตัวเคลื่อนที่ 50% EtOAc/Petrol เห็น 1 spot และสารเป็นทางยาว ใน UV-S ที่ R_f 0.52 ซึ่งมีค่า R_f ตรงกับของ **AT2** จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

B6

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตัวเคลื่อนที่ 50% EtOAc/Petrol เห็นสารเป็นทางยาวจาก baseline ใน UV-S จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

C

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตัวเคลื่อนที่ 70% EtOAc/Petrol เห็น 1 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.68 จึงนำส่วน C มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกผลึก ในระบบตัวทำละลาย EtOAc-Petrol สามารถแยกของแข็งสีขาวได้ 80 มิลลิกรัม เมื่อนำไปบันทึกข้อมูล 300 MHz ^1H NMR ลักษณะสัญญาณแสดงว่าเป็นสารบริสุทธิ์ ให้รหัสเป็น **AT3** จากการวิเคราะห์โครงสร้างของสารพบว่า **AT3** คือ 5,6-dehydropestalotin [10] โดยมีข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR ดังแสดงในตารางที่ 10



5,6-dehydropestalotin
(AT3)

ตารางที่ 10 ข้อมูล 300 MHz ^1H และ 75 MHz ^{13}C NMR ของ 5,6-dehydropestalotin (AT3) ใน $\text{acetone-}d_6$

Position	^1H δ (multiplicity, J , Hz)	^{13}C δ (multiplicity)
2	-	171.2 (C)
3	5.43 (d, 2.1)	88.2 (CH)
4	-	164.3 (C)
5	6.08 (dd, 2.1, 0.7)	98.6 (CH ₂)
6	-	166.2 (C)
7	3.82 (t, 6.9)	55.9 (CH ₃)
1'	4.38 (dd, 7.8, 4.8)	70.8 (CH)
2'	1.91-1.64 (m)	34.9 (CH ₂)
3'	1.46-1.30 (m)	22.4 (CH ₂)
4'	1.46-1.30 (m)	27.2 (CH ₂)
5'	0.91 (t, 6.9)	13.88 (CH ₃)

D

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตัวเคลื่อนที่ 10% MeOH/CH₂Cl₂ เห็นสารหลัก 5 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.77 0.66 0.61 0.45 และ 0.35 จึงนำส่วน D มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบธรรมดา โดยใช้ตัวเคลื่อนที่เป็น 3% MeOH/CH₂Cl₂ เพิ่มช้าด้วย MeOH จนถึง 100% MeOH สามารถแยกสารได้ 6 ส่วน ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ส่วนต่าง ๆ ที่ได้จากการแยกส่วน D ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบธรรมดา

ส่วน	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ลักษณะทางกายภาพ
D1	160.0	ของแข็งสีขาวปนเหลือง
D2	23.8	ของหนืดสีน้ำตาล
D3	5.8	ของหนืดสีน้ำตาล
D4	13.9	ของหนืดสีน้ำตาล
D5	12.5	ของหนืดสีน้ำตาล
D6	38.1	ของหนืดสีน้ำตาล

D1

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตัวอย่างที่ 3% MeOH/CH₂Cl₂ (3 รอบ) เห็นสารหลัก 1 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.75 เมื่อนำไปบันทึกข้อมูล 300 MHz ¹H NMR พบว่าปรากฏสัญญาณของ AT2 จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

D2

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตัวอย่างที่ 3% MeOH/CH₂Cl₂ (3 รอบ) เห็นสารหลัก 4 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.75 0.60 0.50 และ 0.35 เมื่อนำส่วน D2 มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบธรรมดา โดยใช้ตัวเคลื่อนที่เป็น 3% MeOH/CH₂Cl₂ เพิ่มด้วย MeOH จนถึง 100% MeOH สามารถแยกสารได้ 4 ส่วน ดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ส่วนต่าง ๆ ที่ได้จากการแยกส่วน D2 ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบธรรมดา

ส่วน	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ลักษณะทางกายภาพ
D2A	7.2	ของแข็งสีขาว
D2B	3.8	ของหนืดสีน้ำตาลอ่อน
D2C	10.3	ของหนืดสีน้ำตาล
D2D	2.9	ของหนืดสีน้ำตาล

D2A

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตัวอย่างที่ 3% MeOH/CH₂Cl₂ (3 รอบ) เห็นสารหลัก 1 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.75 เมื่อนำไปบันทึกข้อมูล 300 MHz ¹H NMR พบว่าปรากฏสัญญาณของ AT2 จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

D2B

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตัวอย่างที่ 3% MeOH/CH₂Cl₂ (3 รอบ) เห็นสารหลัก 3 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.75 0.35 และ 0.28 เนื่องจากสารมีปริมาณน้อย จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

D2C

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตัวอย่างที่ 3% MeOH/CH₂Cl₂ (3 รอบ) เห็นสารหลัก 1 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.33 จึงนำส่วน D2C มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นหนา โดยใช้ตัวเคลื่อนที่เป็น 3% MeOH/CH₂Cl₂ (9 รอบ) สามารถแยกสารได้ 1 ส่วน คือ D2C1 (2.9 มิลลิกรัม) จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตัวอย่างที่ 3% MeOH/CH₂Cl₂ (3 รอบ) เห็น 1 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.33

เมื่อนำไปบันทึกข้อมูล 300 MHz ^1H NMR พบว่าสารไม่บริสุทธิ์ และเนื่องจากสารมีปริมาณน้อย จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

D2D

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตัวเคลื่อนที่ 3% MeOH/CH₂Cl₂ (3 รอบ) เห็นสารหลัก 2 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.28 และ 0.20 เนื่องจากสารมีปริมาณน้อย จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

D3

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตัวเคลื่อนที่ 3% MeOH/CH₂Cl₂ (3 รอบ) เห็นสารหลัก 3 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.72 0.40 และ 0.26 จึงนำส่วน D3 มาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นหนา โดยใช้ตัวเคลื่อนที่เป็น 3% MeOH/CH₂Cl₂ (9 รอบ) สามารถแยกสารได้ 2 ส่วน ดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ส่วนต่าง ๆ ที่ได้จากการแยกส่วน D3 ด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นหนา

ส่วน	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ลักษณะทางกายภาพ
D3A	1.2	ของหนืดใสไม่มีสี
D3B	0.5	ของหนืดใสสีเหลืองอ่อน

D3A

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตัวเคลื่อนที่ 3% MeOH/CH₂Cl₂ (5 รอบ) เห็นสาร 1 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.32 เมื่อนำไปบันทึกข้อมูล 300 MHz ^1H NMR เมื่อนำไปบันทึกข้อมูล 300 MHz ^1H NMR พบว่าสารไม่บริสุทธิ์ และเนื่องจากสารมีปริมาณน้อย จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

D3B

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตัวเคลื่อนที่ 3% MeOH/CH₂Cl₂ (5 รอบ) เห็นสาร 1 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.25 เมื่อนำไปบันทึกข้อมูล 300 MHz ^1H NMR เมื่อนำไปบันทึกข้อมูล 300 MHz ^1H NMR พบว่าสารไม่บริสุทธิ์ และเนื่องจากสารมีปริมาณน้อย จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

D4

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตัวเคลื่อนที่ 3% MeOH/CH₂Cl₂ (3 รอบ) เห็นสารหลัก 2 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.22 และ 0.17 เนื่องจากสารมีปริมาณน้อย จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

D5

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตัวเคลื่อนที่ 3% MeOH/CH₂Cl₂ (3 รอบ) เห็นสารหลัก 1 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.09 จึงนำมาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นหนา โดยใช้ตัวเคลื่อนที่เป็น 10% MeOH/CH₂Cl₂ สามารถแยกสารได้ 1 ส่วน คือ D5A (4.2 มิลลิกรัม) จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตัวเคลื่อนที่ 10% MeOH/CH₂Cl₂ เห็น 1 spot ใน UV-S ที่ R_f 0.75 เมื่อนำไปบันทึกข้อมูล 300 MHz ¹H NMR ลักษณะสัญญาณแสดงว่าเป็นสารบริสุทธิ์ ให้รหัสเป็น AT4 ขณะนี้อยู่ระหว่างการวิเคราะห์โครงสร้างของสาร

D6

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตัวเคลื่อนที่ 50% EtOAc/Petrol เห็นสารเป็นทางยาวจาก baseline ใน UV-S จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

E

จากข้อมูลโครมาโทกราฟีแผ่นบางในตัวเคลื่อนที่ 70% EtOAc/Petrol เห็นสารเป็นทางยาว ใน UV-S เนื่องจากสารมีปริมาณน้อย จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

สรุปผลการทดลอง

สามารถแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อราดิน *A. terreus* PSU-RSPG187 ได้ทั้งหมด 4 สาร ขณะนี้ทราบโครงสร้างแล้ว 2 สาร คือ α5,β-dehydrocurvularin (AT2) และ 5,6-dehydropestalotin และ (AT3) และอยู่ระหว่างการวิเคราะห์โครงสร้าง 2 สาร (AT1 และ AT4)

เอกสารอ้างอิง

1. Springer, J. P., Dorner, J. W., Cole, R. J. and Cox, R. H. Terretonin, a toxic compound from *Aspergillus terreus*. *J. Org. Chem.*, **1979**, 44, 4852-4854.
2. Ling, K. H., Liou, H. H., Yang, C. M. and Yang, C. K. Isolation, chemical structure, acute toxicity, and some physicochemical properties of territrem C from *Aspergillus terreus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **1984**, 47, 98-100.
3. Nomoto, K., Mizukawa, K., Kato, Y., Kubo, M., Kamiki, T. and Inamori, Y. (1984) Chemical structure of a new metabolite isolated from the mycelium of *Aspergillus terreus* var. *aureus*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **1984**, 32, 4213-4216.
4. Parvatkar, R. R., D'Souza, C., Tripathi, A. and Naik, C. G. Aspernolides A and B, butenolides from a marine-derived fungus *Aspergillus terreus*, *Phytochemistry*, **2009**, 70, 128-132.

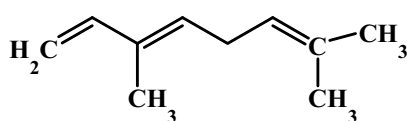
5. Albers-Schonberg, G., Joshua, H., Lopez, M. B., Hensens, O. D., Springer, J. P., Chen, J., Ostrove, S., Hoffman, C. H., Alberts, A. W. and Patchett, A. A. Dihydromevinolin, a potent hypocholesterolemic metabolite produced by *Aspergillus terreus*. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **1981**, 34, 507-512.
6. Manzoni, M., Bergomi, S., Rollini, M. and Cavazzoni, V. Production of statins by filamentous fungi. *Biotech. Lett.*, **1999**, 21, 253-257.
7. Zain, M. E., Awaad, A. S., Al-Jaber, N. A. and Maitland, D. J. New phenolic compounds with antifungal activity from *Aspergillus terreus* isolated from Desert soil. *J. Saudi Chem. Soc.*, **2008**, 12, 107-113.
8. Cazar, M., Schmeda-Hirschmann, G. and Astudillo, L. Antimicrobial butyrolactone I derivatives from the Ecuadorian soil fungus *Aspergillus terreus* Thorn. var *terreus*. *World J. Microbiol. Biotech.*, **2005**, 21, 1067-1075.
9. Vurro, M., Evidente, A., Andofi, A., Zonno, M. C., Giordano, F., Motta, A. Brefeldin A and α,β -dehydrocurvularin, two phytotoxins from *Alternaria zinniae*, a biocontrol agent of *Xanthium occidentale*. *Plant Science*, **1998**, 138, 67-79.
10. Ayer, W. A.; Trifonov, L. S.; Hutchison, L. J.; Chakravarty, P. Metabolites from a wood-inhabiting cup fungus, *Urnula craterium*. *Nat. Prod. Lett.*, **2000**, 14(6), 405-410.

สารต้านอนุมูลอิสระจากใบมะยม (*Bouea oppositifolia*)

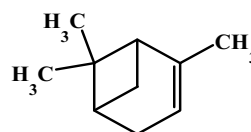
ผู้วิจัยหลัก : ดร.เยาวภา สุขพรมมา

บทนำ

มะยม (*Bouea oppositifolia*) อยู่ในวงศ์ Anacardiaceae¹ เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางสูง 8-20 เมตร พบในป่าดิบภาคตะวันออกเฉียงใต้และภาคใต้ของประเทศไทย จากการตรวจเอกสารพืชสกุล *Bouea* โดยใช้ฐานข้อมูล SciFinder พบว่าพืชสกุลนี้มีผู้ศึกษามาแล้ว 1 ชนิด คือ มะปราง (*Bouea macrophylla*) สามารถแยกสารได้ 2 สาร คือ 1,3,6-octatriene และ bicyclo[3.1.1]hept-2-ene²



1,3,6-Octatriene



Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene

แต่ยังไม่มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของมะยม นอกจากนี้ส่วนสกัดหยาบเมทานอลของใบมะยม ยังแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในระดับน่าสนใจ (IC_{50} 0.017 mg/ml) ในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาองค์ประกอบเคมีของใบมะยม โดยคาดว่าสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบมะยม อาจเป็นสารใหม่และแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่น่าสนใจ

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาองค์ประกอบเคมีของใบมะยม ตลอดจนตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารบริสุทธิ์

การทดลองและผลการทดลอง

สกัดใบมะยมแห้งหนัก 1 กิโลกรัม ด้วยเมทานอลปริมาตร 10 ลิตร เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นกรองและระเหยให้แห้ง จะได้ส่วนสกัดหยาบเมทานอลของใบมะยมมีลักษณะเป็นของหนืดสีเขียวเข้มปนดำ หนัก 119 กรัม จากนั้นนำมาละลายด้วยเอทิลอะซิเตต จะได้ส่วนที่ไม่ละลายเอทิลอะซิเตต หนัก 35.4 กรัม แยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่มีตัวอยู่กับที่เป็น Sephadex LH-20 โดยชะด้วย 100% MeOH แยกสารได้ 4 ส่วน ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ส่วนต่างๆ ที่ได้จากการแยกส่วนสกัดหยาบส่วนสกัดหยาบเมทานอลของใบมะขังที่ไม่ละลายใน EtOAc ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ที่มีตัวอยู่กับที่เป็น Sephadex LH-20

ส่วน	น้ำหนัก (กรัม)	ลักษณะทางกายภาพ
B1	2.29	ของแข็งสีเขียวเข้มปนดำ
B2	15.18	ของแข็งสีเขียวเข้มปนดำ
B3	12.69	ของแข็งสีเขียวเข้มปนดำ
B4	0.77	ของแข็งสีเขียวเข้มปนดำ

B1 และ B2

โครมาโทกราฟีแผ่นบางแบบ reverse phase ในตัวเคลื่อนที่ 50% MeOH/H₂O ใน UV-S แสดงการแยกไม่ชัดเจน เมื่อนำไปบันทึกข้อมูล ¹H NMR spectrum พบว่าไม่ปรากฏสัญญาณของโอลิฟินิกและอะโรมาติกโปรตอน จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

B3

จากโครมาโทกราฟีแผ่นบางแบบ reverse phase ในตัวเคลื่อนที่ 50% MeOH/H₂O ใน UV-S เห็นสารหลัก 5 spot ที่ R_f 0.38, 0.52, 0.62, 0.78 และ 0.89 แบ่งมา 920 มิลลิกรัม นำไปแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่มีตัวอยู่กับที่เป็น reverse phase silica gel โดยใช้ตัวชะเป็น 40% MeOH/H₂O ลดชั่วลงเรื่อยๆ จนกระทั่งถึง 100% MeOH แยกสารได้ 4 ส่วน ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ส่วนต่างๆ ที่ได้จากการแยก B3 ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่มีตัวอยู่กับที่เป็น reverse phase silica gel

ส่วน	ตัวชะ	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ลักษณะทางกายภาพ
B301	40% MeOH/H ₂ O	429.0	ของหนืดสีเขียวเข้ม
B302	40% MeOH/H ₂ O	176.5	ของแข็งสีน้ำตาล
B303	40% MeOH/H ₂ O	198.5	ของแข็งสีน้ำตาล
B304	50% MeOH/H ₂ O – 100% MeOH	112.2	ของหนืดสีเขียวเข้ม

B301 และ B304

จากโครมาโทกราฟีแผ่นบางแบบ reverse phase ในตัวเคลื่อนที่ 40% MeOH/H₂O ใน UV-S ไม่เห็น spot สาร เมื่อนำไปบันทึกข้อมูล ¹H NMR spectrum พบว่าไม่ปรากฏสัญญาณของโอลิฟินิกและอะโรมาติกโปรตอน จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

B302

จากโครมาโทกราฟีแผ่นบางแบบ reverse phase ในตัวเคลื่อนที่ 40% MeOH/H₂O ใน UV-S เห็นสารหลัก 1 spot ที่ R_f 0.56 จึงแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่มีตัวอยู่กับที่เป็น reverse phase silica gel โดยใช้ตัวชะเป็น 30% MeOH/H₂O ลดชั่วลงเรื่อยๆจนกระทั่งถึง 100% MeOH แยกสารได้ 3 ส่วนดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ส่วนต่างๆที่ได้จากการแยก B302 ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่มีตัวอยู่กับที่เป็น reverse phase silica gel

ส่วน	ตัวชะ	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ลักษณะทางกายภาพ
B302A	30% MeOH/H ₂ O – 100% MeOH	47.1	ของหนืดสีน้ำตาลเข้ม
B302B	30-40% MeOH/H ₂ O	97.5	ของแข็งสีน้ำตาล
B302C	50% MeOH/H ₂ O	22.6	ของหนืดสีเขียวเข้ม

B302A และ B302C

จากโครมาโทกราฟีแผ่นบางแบบ reverse phase ในตัวเคลื่อนที่ 30% MeOH/H₂O ใน UV-S เห็นเป็นทางยาว นำไปบันทึกข้อมูล ¹H NMR spectrum พบว่าไม่ปรากฏสัญญาณของโอลิฟินิก และอะโรมาติกโปรตอน จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

B302B

จากโครมาโทกราฟีแผ่นบางแบบ reverse phase ในตัวเคลื่อนที่ 30% MeOH/H₂O ใน UV-S เห็นสาร 1 spot ที่ R_f 0.40 นำไปบันทึกข้อมูล ¹H NMR spectrum พบว่าเป็นสารบริสุทธิ์ ให้รหัสเป็น

BO1

UV $\lambda_{\max}$ (nm) (MeOH) (log ϵ)	221 (4.46), 274 (4.12)
FTIR (neat): ν (cm ⁻¹)	3296 (O-H stretching) 1694 (C=O stretching) 1456 (C=C stretching)
¹ H NMR (CD ₃ OD) (δ ppm) (300 MHz):	7.15 (s, 2H), 3.85 (s, 3H)
¹³ C NMR (CD ₃ OD) (δ ppm) (75 MHz):	167.89, 144.97, 144.97, 138.34, 120.15, 109.21, 108.94, 51.24
DEPT 135°: CH;	109.21, 108.94
CH ₃ ;	51.24

B303

จากโครมาโทกราฟีแผ่นบางแบบ reverse phase ในตัวเคลื่อนที่ 40% MeOH/H₂O ใน UV-S เห็นสารหลัก 2 spot ที่ R_f 0.37 และ 0.54 นำไปแยกอีกครั้งด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่มีตัวอยู่กับที่เป็น reverse phase silica gel โดยใช้ตัวชะเป็น 40% MeOH/H₂O ลอดช้าลงเรื่อยๆจนกระทั่งถึง 100% MeOH แยกสารได้ 2 ส่วนดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ส่วนต่างๆที่ได้จากการแยก **B303** ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่มีตัวอยู่กับที่เป็น reverse phase silica gel

ส่วน	ตัวชะ	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ลักษณะทางกายภาพ
B303A	40% MeOH/H ₂ O - 50% MeOH/H ₂ O	47.1	ของแข็งสีเหลืองเข้ม
B303B	50% MeOH/H ₂ O – 100% MeOH	23.7	ของแข็งสีเหลือง

B303A

จากโครมาโทกราฟีแผ่นบางแบบ reverse phase ในตัวเคลื่อนที่ 40% MeOH/H₂O ใน UV-S ไม่เห็นสารหลัก มีลักษณะเป็นทางยาว จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

B303B

จากโครมาโทกราฟีแผ่นบางแบบ reverse phase ในตัวเคลื่อนที่ 40% MeOH/H₂O ใน UV-S เห็นสาร 1 spot ที่ R_f 0.38 นำไปบันทึกข้อมูล ¹H NMR spectrum พบว่าเป็นสารบริสุทธิ์ให้รหัสเป็น

BO2

UV $\lambda_{\max}$ (nm) (MeOH) (log ϵ)	224 (4.58), 257 (4.38), 358 (4.31)
FTIR (neat): ν (cm ⁻¹)	3367 (O-H stretching) 1584 (C=O stretching) 1475 (C=C stretching)
¹ H NMR (CD ₃ OD) (δ ppm) (300 MHz):	6.97 (s, 1H), 5.33 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 4.24 (dd, J = 1.5, 3.3 Hz, 1H), 3.81 (dd, J = 3.3, 9.3 Hz, 1H), 3.37 (t, J = 9.6 Hz, 1H), 3.55 (dd, J = 9.6, 6.0 Hz, 1H), 0.98 (d, J = 6.0 Hz, 3H)
¹³ C NMR (CD ₃ OD) (δ ppm)(75 MHz) :	178.27, 164.42, 161.78, 158.04, 157.11, 145.44, 136.48, 134.93,

	120.59, 108.71, 108.25, 104.51,
	102.22, 98.42, 93.31, 71.99, 70.77,
	70.63, 70.49, 16.26
DEPT 135°: CH;	108.71, 108.25, 102.22, 98.42, 93.31,
	71.99, 70.77, 70.63, 70.49
CH ₃ ;	16.26

B304

จากโครมาโทกราฟีแผ่นบางแบบ Reverse phase ในตัวเคลื่อนที่ 40% MeOH/H₂O ใน UV-S ไม่เห็นสารหลัก มีลักษณะเป็นทางยาว เมื่อนำไปบันทึกข้อมูล ¹H NMR spectrum พบว่าไม่ปรากฏสัญญาณของโอลิฟินิกและอะโรมาติกโปรตอน จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

B4

จากโครมาโทกราฟีแผ่นบางแบบ Reverse phase ในตัวเคลื่อนที่ 50% MeOH/H₂O ใน UV-S เห็นสารหลัก 3 spot ที่ R_f 0.48, 0.67 และ 0.88 นำไปบันทึกข้อมูล ¹H NMR spectrum พบว่าปรากฏสัญญาณของสารหลักเหมือนกับ B3 จึงไม่ทำการศึกษาต่อ

วิจารณ์และสรุปผล

การวิเคราะห์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ทั้ง 2 สาร ทำได้โดยอาศัยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี โดยเฉพาะข้อมูล 1D และ 2D NMR สเปกโทรสโกปี

BO1

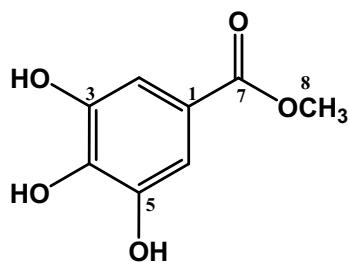
จากข้อมูล UV แสดงแถบดูดกลืนที่ λ_{max} 221 และ 274 nm แสดงว่ามีโครโมฟอร์ที่เป็นระบบคอนจูเกชัน จากข้อมูล IR แสดงแถบการยืดของหมู่ OH ที่ 3296 cm⁻¹ และ C=O ที่ 1694 cm⁻¹

จากข้อมูล ¹H NMR แสดงสัญญาณของ aromatic proton ที่เป็น chemically equivalent กัน 1 ชุด โดยปรากฏที่ δ 7.15 (*brs*, 2H) และปรากฏสัญญาณของ methoxy proton ที่ δ 3.85 (*s*, 3H)

จากข้อมูล ¹³C NMR แสดงสัญญาณของ carbonyl carbon จำนวน 1 carbon ที่ δ 167.89 และจากข้อมูล DEPT แสดงสัญญาณของ quaternary, methine และ methyl carbon จำนวน 4, 2 และ 1 carbon ตามลำดับ

จากข้อมูล HMBC แสดง correlation ของ aromatic H-2 และ H-4 (δ 7.15) กับ C-4 (δ 138.34), C-6 (δ 109.21) และ C-7 (δ 167.89) และ methoxy proton แสดง correlation กับ C-7 (δ 167.89)

จากข้อมูลข้างต้นสรุปได้ว่า **BO1** มีโครงสร้างดังแสดง และจากฐานข้อมูล SciFinder พบว่า **BO1** เป็นสารที่มีการรายงานโครงสร้างมาแล้ว และมีชื่อว่า gallic acid methyl ester³



ตารางที่ 5 ข้อมูล NMR ของ **BO1** ใน CD₃OD

BO1				Gallic acid methyl ester	
Position	δ_H (mult, J_{Hz})	δ_C (C-Type)	HMBC Correlation	δ_H (mult, J_{Hz})	δ_C
1		120.15 (C)			121.4 (C)
2	7.15 (<i>brs</i>)	108.94 (CH)	C-4, C-6, C-7	7.04 (<i>s</i>)	110.0 (CH)
3-OH		144.97 (C)			146.5 (C)
4-OH		138.34 (C)			139.7 (C)
5-OH		144.97 (C)			146.5 (C)
6	7.15 (<i>brs</i>)	109.21 (CH)	C-2, C-4, C-7	7.04 (<i>s</i>)	110.0 (CH)
7		167.89 (C)			167.5 (C)
8	3.85 (<i>s</i>)	51.24 (CH ₃)	C-7	3.80 (<i>s</i>)	52.3 (CH ₃)

BO2

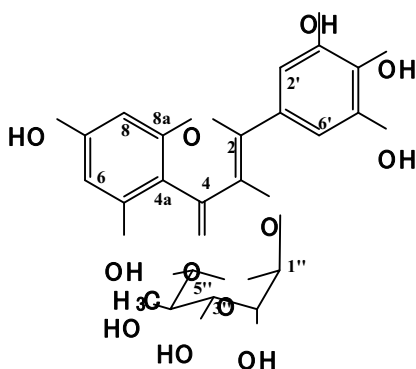
จากข้อมูล UV แสดงแถบดูดกลืนที่ λ_{max} 224, 257 และ 358 nm แสดงว่ามีโครโมฟอร์ที่เป็นระบบคอนจูเกชัน จากข้อมูล IR แสดงแถบการยืดของหมู่ OH ที่ 3367 cm⁻¹ และ C=O ที่ 1584 cm⁻¹ ซึ่งจากข้อมูลข้างต้นแสดงว่าเป็นสารประเภท flavone

จากข้อมูล ¹H NMR แสดงสัญญาณโปรตอนของ 1,3,4,5-tetrasubstituted benzene ring ที่ δ 6.97 (*brs*, H-2', 6') และสัญญาณ aromatic proton อีก 2 สัญญาณ ที่ δ 6.37 (*s*, H-8) และ δ 6.21 (*s*, H-6) ทำให้ทราบว่าโครงสร้างของ flavones เป็น 3',4',5',5,7- pentahydroxyflavone นอกจากนี้ ¹H NMR ยังแสดงสัญญาณของหมู่ methyl เป็น *doublet* ที่ δ 0.98 (*d*, J = 6.0 Hz, 3H, H-6'') และ methine proton อีก 5 สัญญาณ ที่ δ 5.33 (*d*, J = 1.5 Hz, H-1''), 4.24 (*dd*, J = 1.5, 3.3 Hz, H-2''), 3.81 (*dd*, J = 3.3, 9.3 Hz, H-3''), 3.37 (*t*, J = 9.6 Hz, H-4'') และ 3.55 (*dd*, J = 9.6, 6.0 Hz, H-5'') ซึ่ง

สัญญาณดังกล่าวเป็นสัญญาณโปรตอนของน้ำตาลแรมโนส ซึ่ง anomeric proton (H-1'') ปรากฏสัญญาณเป็น *doublet* ด้วยค่าคู่ควบเท่ากับ 1.5 Hz จึงทำให้ทราบว่า น้ำตาลแรมโนสอยู่ในรูปของ α -form

จากข้อมูล HMBC พบว่า H-1'' แสดง correlation กับ C-3 (δ 136.27) แสดงว่าน้ำตาลแรมโนสต่ออยู่กับหมู่ OH บน C-3 ของ 4-chromenone และ aromatic H-2' และ H-6' (δ 6.97) แสดง correlation กับ C-2 และ C-4' ทำให้ทราบว่า 1,3,4,5-tetrasubstituted benzene ring ต่ออยู่กับ C-2 ของวง 4-chromenone

จากข้อมูลข้างต้นสรุปได้ว่า **BO2** มีโครงสร้างดังแสดง และจากฐานข้อมูล SciFinder พบว่า **BO2** เป็นสารที่มีการรายงานโครงสร้างมาแล้วคือ myricetin-3- α -rhamnoside⁴



ตารางที่ 6 ข้อมูล NMR ของ **BO2** ใน CD₃OD

Position	BO2 (CD ₃ OD)		HMBC Correlation	Myricetin-3- α -rhamnoside	
	δ_H (mult, J_{Hz})	δ_C (C-Type)		δ_H (mult, J_{Hz})	δ_C (C-Type)
2		157.11 (C)			158.51 (C)
3		134.93 (C)			136.34 (C)
4		178.27 (C)			179.72 (C)
4a		104.51 (C)			105.92 (C)
5		161.78 (C)			163.21 (C)
6	6.21 (s)	98.42 (CH)	C-8, C-4a	6.33 (s)	99.84 (CH)
7		164.42 (C)			165.88 (C)
8	6.37 (s)	93.31 (CH)	C-6, C-4a	6.49 (s)	94.74 (CH)
8a		158.04 (C)			159.51 (C)

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Position	BO2 (CD ₃ OD)		HMBC Correlation	Myricetin-3- α -rhamnoside	
	δ_H (mult, J _{H_z})	δ_C (C-Type)		δ_H (mult, J _{H_z})	δ_C (C-Type)
1'		120.59 (C)			121.99 (C)
2'	6.97 (s)	108.25 (CH)	C-2, C-4', C-6'	7.07 (s)	109.64 (CH)
3'		145.44 (C)			146.86 (C)
4'		136.48 (C)			137.90 (C)
5'		145.44 (C)			146.86 (C)
6'	6.97 (s)	108.71 (CH)	C-2, C-2', C-4'	7.07 (s)	109.64 (CH)
1''	5.33 (d, 1.5)	102.22 (CH)	C-3, C-3'', C-5''	5.44 (d, 1.5)	103.64 (CH)
2''	4.24 (dd, 1.5, 3.3)	70.49 (CH)	C-4''	4.35 (dd, 1.5, 3.3)	71.90 (CH)
3''	3.81 (dd, 3.3, 9.3)	70.77 (CH)	C-1'', C-5''	3.92 (dd, 3.3, 9.5)	72.15 (CH)
4''	3.37 (t, 9.6)	71.99 (CH)	C-2'', C-6''	3.47 (t, 9.5)	73.37 (CH)
5''	3.55 (dd, 9.6, 6.0)	70.63 (CH)	C-1'', C-3''	3.64 (dd, 9.5, 6.2)	72.07 (CH)
6''	0.98 (d, 6.0)	16.26 (CH ₃)	C-4''	1.08 (d, 6.2)	17.67 (CH ₃)

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาแยกองค์ประกอบทางเคมีจากใบมะขง สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้จำนวน 2 สาร คือ gallic acid methyl ester และ myricetin-3- α -rhamnoside

เอกสารอ้างอิง

1. เต็ม สมิตินันท์. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม. กรุงเทพฯ: สำนักวิชาการ ป่าไม้ กรมป่าไม้. 2544.
2. Wong, K.C.; Loi, H.K. Volatile constituents of *Bouea macrophylla* Griff Fruit. *J. Essential oil Res.* **1996**, 8 (1), 99-100.
3. Wang, K. J., Yang, C. R., Zhang, Y. J. Phenolic antioxidants from Chinese toon (fresh young leaves and shoots of *Toona sinensis*. *Food chemistry.* **2007**, 101, 365-371.
4. Fossen, T., Larsen, Å., Kiremire, B. T., Andesen, Ø. M. Flavonoids from blue flowers of *Nymphaea caerulea*. *Phytochemistry.* **1999**, 51, 1133-1137.

องค์ประกอบทางเคมีจากกิ่งมะมุด

Chemical constituents from the twigs of *Mangifera foetida* Lour.

ผู้วิจัยหลัก : ผศ.ดร. กานดา ปานทอง

บทนำ

มะมุด (*Mangifera foetida* Lour.) เป็นไม้ยืนต้นที่อยู่ในวงศ์ Anacardiaceae มีชื่อสามัญ horse mango มีชื่ออื่น มะละมุดไทย ส้มมุด มุด มะม่วงป่า (ใต้) มะแจ มาจิง มาแจฮูแจ (มลายู-นราธิวาส) แหล่งที่พบ พบทางภาคใต้ ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ต้น ไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ สูงประมาณ 8-40 เมตร วัตรอบลำต้น 80-150 ซม. ลำต้นเปลาตรงเรือนยอดเป็นพุ่มกลมทึบ กิ่งอ่อนเกลี้ยงไม่มีต่อมระคายอากาศ เปลือกลำต้นแตกเป็นสะเก็ดสีน้ำตาลคล้ำ เปลือกชั้นในสีน้ำตาลแดง เมื่อมีบาดแผลจะมีน้ำยางสีขาวข้นซึมออกมาเป็นเม็ด ๆ เนื้อไม้ที่ติดกับเปลือกสีขาวไม่เรียบ ลักษณะเป็นคลื่นตามยาว ใบ ใบเดี่ยวออกเรียงเวียนสลับเป็นกลุ่มตามปลายกิ่ง แผ่นใบคล้ายแผ่นหนังเป็นคลื่นแข็งแรงรอบ ใบรูปรีแกมรูปขอบขนานหรือรูปหอก ขนาดใบกว้าง 4-11 ซม. ยาว 10-32 ซม. โคนใบสอบเบี้ยว ปลายใบเป็นติ่ง ๆ ใบพองตั้งชัน เนื้อใบหนามากเกลี้ยงเป็นมัน เส้นแขนงใบมี 12-26 คู่ เรียวโค้งและขนานกัน เส้นร่างแหเห็นไม่ชัด เส้นกลางใบขึ้นเป็นสันทางด้านหลังใบ ก้านใบอวบเป็นร่องทางด้านบน โคนก้านบวม ก้านใบยาว 2-5.5 ซม. ดอก มีขนาดเล็ก สีชมพูหรือสีส้มมีกลิ่นหอมเย็น ออกดอกเป็นช่อใหญ่ตามปลายกิ่ง คล้ายช่อมะม่วง ช่อหนึ่ง ๆ ยาว 7-21 ซม. เป็นดอกสมบูรณ์เพศ ก้านดอกสีแดงเข้มกลีบดอกและกลีบรองดอกมีอย่างละ 5 กลีบ กลีบรองกลีบดอกรูปไข่ ขนาด 2-4 มม. ส่วนกลีบดอกรูปหอก ขนาดกว้าง 2.5 มม. ยาว 7-10 มม. เกสรตัวผู้มี 5 อัน ในจำนวนนี้เป็นเกสรตัวผู้ปลอม 4 อัน เกสรตัวผู้แท้ที่เหลืออยู่อันเดียวจะยาวกว่าเกสรตัวผู้ปลอม รังไข่กลม ขนาดกว้าง 1.8 มม. ยาว 2 มม. ผล รูปไข่แกมรูปขอบขนาน ลักษณะเป็นป้อมเบี้ยว ๆ เนื้อหนา ขนาดกว้าง 7.5 ซม. ยาว 10.5 ซม. ผลสุก สีเหลืองแกมเขียว ภายในมีเมล็ด ประโยชน์ ผลใช้รับประทาน เนื้อไม้ใช้ก่อสร้างและทำเครื่องมือเครื่องใช้ได้ดี (เต็ม สมิตินันท์, 2523)

จากการสืบค้นจากฐานข้อมูล SciFinder Scholar พบว่ายังไม่มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของกิ่งมะมุด จากการนำส่วนสกัดหยาบอะซิโตนของกิ่งมะมุดไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบแสดงฤทธิ์ปานกลางด้วยค่า IC_{50} 0.16 mg/mL (ใช้ DPPH*) กิ่งมะมุดจึงมีความน่าสนใจในการนำมาศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อแยกองค์ประกอบทางเคมีจากกิ่งมะมุด (*Mangifera foetida* Lour.)
2. เพื่อศึกษาโครงสร้างของสารประกอบที่แยกได้จากกิ่งมะมุด (*Mangifera foetida* Lour.)
3. เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบที่แยกได้

ผลการทดลอง

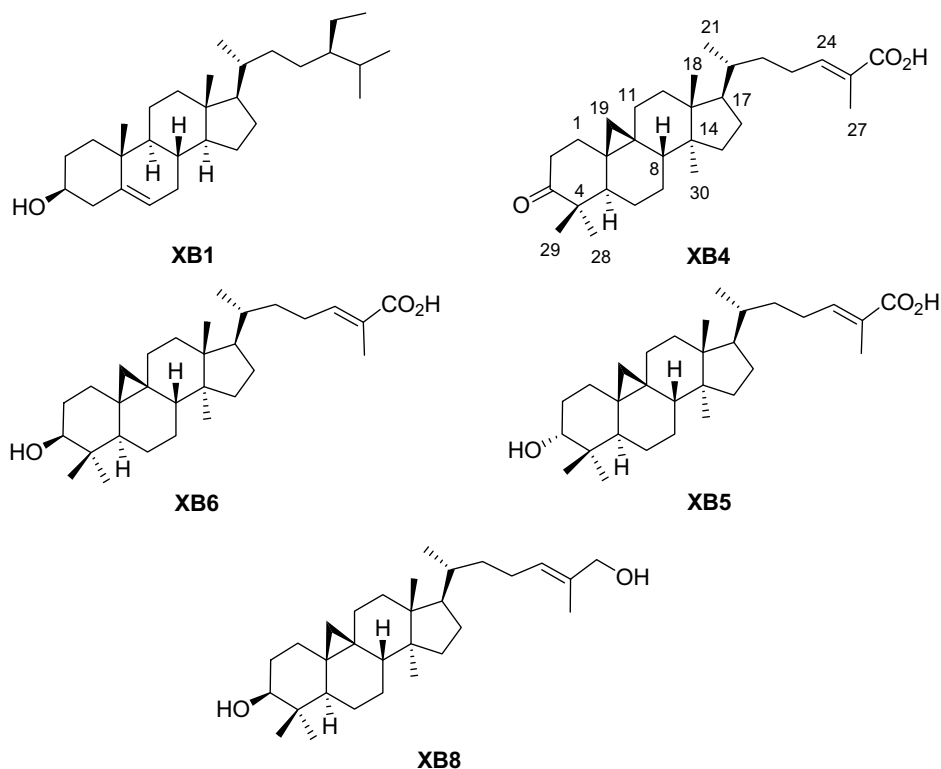
จากการนำกิ่งมะมุดมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ผึ่งลมให้แห้ง น้ำหนัก 3.4 กิโลกรัม มาทำการสกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตน จำนวน 17 ลิตร จำนวน 3 ครั้ง ได้ส่วนสกัดหยาบอะซิโตนมีลักษณะเป็นของหนืดสีน้ำตาล น้ำหนัก 53.16 กรัม และนำไปบันทึกข้อมูล ^1H NMR 300 MHz พบว่าสเปกตรัมที่ได้ปรากฏสัญญาณของอะโรเมติก และโอลิฟินิกโปรตอน และจากการตรวจสอบด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นบางจะปรากฏจุดสารหลายจุดที่สามารถมองเห็นภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต จึงมีความสนใจที่จะทำการศึกษา เนื่องจากยังไม่มีรายงานการศึกษาที่เกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีจากกิ่งมะมุด นำส่วนสกัดหยาบอะซิโตนของกิ่งมะมุดไปแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็วโดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวอยู่กับที่ เริ่มชะคอลัมน์ด้วย 100% เฮกเซน เพิ่มช้าด้วยอะซิโตน และ เมทานอล จนถึง 100% เมทานอล สามารถแยกได้ 9 ส่วน นำส่วนที่ 4 มาทำการแยกต่อด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบธรรมดา จำนวน 4 ครั้ง ตามด้วยการตกผลึก สามารถแยกสารได้ จำนวน 5 สาร คือ **XB1** มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวหนัก 13.3 มิลลิกรัม **XB2** มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวหนัก 3.4 มิลลิกรัม **XB3** มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวหนัก 8.2 มิลลิกรัม **XB4** มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวหนัก 45.3 มิลลิกรัม และ **XB5** มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวหนัก 6.2 มิลลิกรัม นำส่วนที่ 5 มาทำการตกผลึกด้วยตัวทำละลายอะซิโตนต่อเฮกเซน ได้ **XB6** มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวหนัก 374.1 มิลลิกรัม และส่วนที่เป็น mother liquor ของส่วนที่ 5 นำมารวมกันกับส่วนที่ 6 น้ำหนัก 4.89 กรัม ทำการแยกต่อด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบธรรมดา จำนวน 3 ครั้ง ตามด้วยการตกผลึก สามารถแยกสารได้ จำนวน 3 สาร คือ **XB6** มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวหนัก 117.2 มิลลิกรัม **XB7** มีลักษณะเป็นของหนืดใสไม่มีสีหนัก 1.2 มิลลิกรัม **XB8** มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวหนัก 31.7 มิลลิกรัม

วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย

การวิเคราะห์โครงสร้าง **XB1** **XB4** **XB5** **XB6** และ **XB8** โดยอาศัยข้อมูล 1D และ 2D NMR ซึ่ง **XB1** คือ β -sitosterol (Klass, J., *et al.*, 1992) **XB4** คือ mangiferonic acid (Singh, C., *et al.*, 1977) **XB5** คือ isomangiferolic acid (Anjaneyulu, V., *et al.*, 1989) **XB6** คือ mangiferolic acid (Sy, L.-K., *et al.*, 1997) และ **XB8** คือ mangiferadiol (Katano, T., *et al.*, 1975)

ในส่วนของการประกอบ **XB2** และ **XB7** กำลังรอผลของ 1D และ 2D NMR เพื่อใช้ในการวิเคราะห์โครงสร้างต่อไป **XB3** อยู่ในช่วงการวิเคราะห์โครงสร้าง

การแยกองค์ประกอบทางเคมีให้บริสุทธิ์จากกิ่งมะมุด อาศัยขบวนการแยกสารทางกายภาพ โดยเริ่มจากการระเหยอะซิโตนออกจากสารละลายที่ได้จากการนำกิ่งมะมุด มาสกัดด้วยตัวทำละลายอะซิโตนให้แห้งภายใต้เครื่องระเหยสารแบบลดความดัน จะได้ส่วนสกัดหยาบอะซิโตนเป็นของหนืดสีน้ำตาล นำไปแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวอยู่กับที่ เริ่มชะคอลัมน์ด้วย 100% เฮกเซน เพิ่มช้าด้วยอะซิโตน และ เมทานอล จนถึง 100% เมทานอล สามารถแยกได้ 9 ส่วน จากนั้นทำการแยกองค์ประกอบที่มีในส่วนที่ 4 ไปทำการแยกด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟี สามารถแยกสารได้ จำนวน 5 สาร คือ **XB1** (β -sitosterol) **XB2** **XB3** **XB4** (mangiferonic acid) และ **XB5** (isomangiferolic acid) ส่วนที่ 5 ทำการตกผลึก สามารถแยกสารได้จำนวน 1 สาร คือ **XB6** (mangiferolic acid) ส่วนของ mother liquor ของส่วนที่ 5 และส่วนที่ 6 ทำการแยกด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟี สามารถแยกสารได้ จำนวน 3 สาร คือ **XB6** (mangiferolic acid) **XB7** และ **XB8** (mangiferadiol)



ตารางที่ 1 ข้อมูล ^1H และ ^{13}C สเปกตรัมของ **XB4** ใน CDCl_3

ตำแหน่ง	δ_{H} (<i>mult</i> , J_{Hz})	δ_{C} (ppm)
1	1.86, <i>m</i> , 1H 1.57, <i>m</i> , 1H	33.45
2	2.71, <i>td</i> , 14.1, 6.6, 1H 2.31, <i>ddd</i> , 14.1, 4.2, 2.7, 1H	37.49
3		216.50
4		50.27
5	1.71, <i>dd</i> , 12.3, 4.5, 1H	48.48
6	1.55, <i>m</i> , 1H 0.95, <i>m</i> , 1H	21.54
7	1.42, <i>m</i> , 1H 1.14, <i>m</i> , 1H	25.89
8	1.59, <i>m</i> , 1H	47.90
9		21.12
10		26.04
11	2.05, <i>m</i> , 2H	26.77
12	1.67, <i>m</i> , 2H	32.86
13		45.45
14		48.81
15	1.31, <i>m</i> , 2H	35.59
16	1.88, <i>m</i> , 1H 1.32, <i>m</i> , 1H	28.18
17	1.65, <i>m</i> , 1H	52.27
18	1.00, <i>s</i> , 3H	18.15
19	0.79, <i>d</i> , 4.2, 1H 0.58, <i>d</i> , 4.2, 1H	29.57
20	1.32, <i>m</i> , 1H	36.00
21	0.92, <i>d</i> , 6.3, 3H	18.15
22	1.38, <i>m</i> , 2H	25.95

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ตำแหน่ง	δ_{H} (<i>mult</i> , J_{Hz})	δ_{C} (ppm)
23	1.52, <i>m</i> , 2H	34.83
24	6.91, <i>td</i> , 7.2, 1.2, 1H	145.71
25		126.63
26		172.67
27	1.85, <i>s</i> , 3H	12.01
28	1.04, <i>s</i> , 3H	22.23
29	1.10, <i>s</i> , 3H	20.80
30	0.91, <i>s</i> , 3H	19.34

ตารางที่ 2 ข้อมูล ^1H และ ^{13}C สเปกตรัมของ **XB5** ใน CDCl_3

ตำแหน่ง	δ_{H} (<i>mult</i> , J_{Hz})	δ_{C} (ppm)
1	1.99, <i>m</i> , 1H 1.02, <i>m</i> , 1H	27.47
2	1.89, <i>m</i> , 1H 1.29, <i>m</i> , 1H	28.12
3	3.48, <i>brt</i> , 3.0, 1H	77.18
4		39.55
5	1.82, <i>m</i> , 1H	41.08
6	1.49, <i>m</i> , 1H 1.10, <i>m</i> , 1H	21.07
7	1.64, <i>m</i> , 2H	28.58
8	1.53, <i>m</i> , 1H	47.99
9		19.84
10		26.51
11	2.06, <i>m</i> , 1H 1.03, <i>m</i> , 1H	26.29

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ตำแหน่ง	δ_{H} (<i>mult</i> , J_{Hz})	δ_{C} (ppm)
12	1.63, <i>m</i> , 2H	32.92
13		45.33
14		48.93
15	1.33, <i>m</i> , 2H	35.49
16	1.30, <i>m</i> , 1H 1.09, <i>m</i> , 1H	25.91
17	1.61, <i>m</i> , 1H	52.19
18	0.90, <i>s</i> , 3H	19.28
19	0.52, <i>d</i> , 3.9, 1H 0.35, <i>d</i> , 3.9, 1H	29.75
20	1.29, <i>m</i> , 1H	35.98
21	0.91, <i>d</i> , 5.4, 3H	17.99
22	1.51, <i>m</i> , 2H	34.82
23	1.35, <i>m</i> , 1H 1.15, <i>m</i> , 1H	25.64
24	6.91, <i>t</i> , 6.6, 1H	145.69
25		126.52
26		172.39
27	1.84, <i>s</i> , 3H	11.96
28	0.88, <i>s</i> , 3H	21.22
29	0.97, <i>s</i> , 3H	25.83
30	0.99, <i>s</i> , 3H	18.11

ตารางที่ 3 ข้อมูล ^1H และ ^{13}C สเปกตรัมของ **XB6** ใน pyridine- d_5

ตำแหน่ง	δ_{H} (<i>mult</i> , J_{Hz})	δ_{C} (ppm)
1	1.61, <i>m</i> , 1H 1.28, <i>m</i> , 1H	33.36
2	2.01, <i>m</i> , 1H 1.93, <i>m</i> , 1H	32.14
3	3.57, <i>dd</i> , 11.4, 4.8, 1H	78.92
4		41.99
5	1.37, <i>m</i> , 1H	48.36
6	1.62, <i>m</i> , 1H 0.83, <i>m</i> , 1H	22.36
7	1.91, <i>m</i> , 1H 1.33, <i>m</i> , 1H	29.29
8	1.52, <i>m</i> , 1H	49.01
9		27.46
10		30.60
11	2.01, <i>m</i> , 1H 1.10, <i>m</i> , 1H	27.56
12	1.65, <i>m</i> , 2H	34.11
13		46.47
14		49.96
15	1.34, <i>m</i> , 2H	36.69
16	2.02, <i>m</i> , 1H 1.65, <i>m</i> , 1H	27.22
17	1.67, <i>m</i> , 1H	53.41
18	1.02, <i>s</i> , 3H	19.21
19	0.56, <i>d</i> , 3.9, 1H 0.33, <i>d</i> , 3.9, 1H	30.84
20	1.48, <i>m</i> , 1H	37.15

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ตำแหน่ง	δ_{H} (<i>mult</i> , J_{Hz})	δ_{C} (ppm)
21	0.98, <i>d</i> , 6.6, 3H	19.24
22	1.20, <i>m</i> , 2H	36.33
23	2.32, <i>m</i> , 1H 2.22, <i>m</i> , 1H	26.86
24	7.23, <i>t</i> , 7.5, 1H	143.42
25		129.79
26		171.57
27	2.14, <i>s</i> , 3H	13.73
28	1.26, <i>s</i> , 3H	27.09
29	1.13, <i>s</i> , 3H	15.76
30	0.96, <i>s</i> , 3H	20.43

ตารางที่ 4 ข้อมูล ^1H และ ^{13}C สเปกตรัมของ **XB8** ใน CDCl_3

ตำแหน่ง	δ_{H} (<i>mult</i> , J_{Hz})	δ_{C} (ppm)
1	1.53, <i>m</i> , 2H	31.97
2	1.75, <i>m</i> , 2H	30.35
3	3.28, <i>dd</i> , 11.1, 4.5, 1H	78.84
4		40.48
5	1.30, <i>m</i> , 1H	47.10
6	1.59, <i>m</i> , 2H	21.12
7	2.00, <i>m</i> , 1H 1.63, <i>m</i> , 1H	26.46
8	1.51, <i>m</i> , 1H	47.98
9		19.98
10		26.07

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ตำแหน่ง	δ_{H} (<i>mult</i> , J_{Hz})	δ_{C} (ppm)
11	2.08, <i>m</i> , 1H 1.08, <i>m</i> , 1H	26.01
12	1.65, <i>m</i> , 2H	32.90
13		45.30
14		48.80
15	1.28, <i>m</i> , 2H	35.56
16	1.86, <i>m</i> , 1H 1.29, <i>m</i> , 1H	28.16
17	1.64, <i>m</i> , 1H	52.27
18	0.96, <i>s</i> , 3H	18.04
19	0.55, <i>d</i> , 3.9, 1H 0.33, <i>d</i> , 3.9, 1H	29.90
20	1.48, <i>m</i> , 1H	35.91
21	0.89, <i>d</i> , 6.3, 3H	19.32
22	1.12, <i>m</i> , 1H 1.06, <i>m</i> , 1H	35.98
23	2.13, <i>m</i> , 2H	24.54
24	5.40, <i>t</i> , 6.3, 1H	127.05
25		134.29
26	4.00, <i>s</i> , 2H	69.06
27	1.67, <i>s</i> , 3H	13.65
28	0.96, <i>s</i> , 3H	25.44
29	0.81, <i>s</i> , 3H	14.01
30	0.89, <i>s</i> , 3H	19.32

แผนงานที่จะดำเนินการในเฟสที่ 2

1. ทำการแยกองค์ประกอบที่มีในส่วนของ mother liquor ของส่วนที่ 5 และส่วนที่ 6 และในส่วนอื่น ๆ ที่เหลือให้บริสุทธิ์
2. วิเคราะห์โครงสร้างของสารที่แยกได้แล้ว คือ **XB3** ส่วน **XB2** และ **XB7** ซึ่งขณะนี้อยู่การบันทึกสัญญาณ 1D และ 2D NMR

เอกสารอ้างอิง

1. เต็ม สมิตินันท์, ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (ชื่อพฤกษศาสตร์-ชื่อพื้นเมือง), กรมป่าไม้, **2523**, 379.
2. Anjaneyulu, V.; Ravi, K.; Harischandra Prasad, K.; Connolly, J. D. Triterpenoids from *Mangifera indica*. *Phytochemistry* **1989**, 28, 1471-1477.
3. Kataro, T.; Masako, T. Studies on constituents of medicinal plants. XIV. Constituents of *Schizandra nigra* Max. (I). *Chem. Pharm Bull.* **1975**, 23, 538-842.
4. Klass, J.; Tinto, W. F.; McLean, S.; Reynolds, W. F. Frideland triterpenoids from *Peritassa compta*: complete ^1H and ^{13}C assignments by 2D nmr spectroscopy. *J. Nat. Prod.* **1992**, 55, 1626-1630.
5. Singh, C.; Dev, S. Higher isoprenoids-V. Partial syntheses from cycloartenol, cyclolaudenol part 1: mangiferolic acid, ambolic acid. *Tetrahedron*. **1977**, 33, 817-819.
6. Sy, L.-K.; Saunders, R. M. K.; Brown, G.D. Phytochemistry of *Illicium dunnianum* and the systematic position of the Illiciaceae. *Phytochemistry* **1997**, 44(6), 1099-1108.

การแยก จำแนกชนิด และฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟท์จากหญ้าทะเล

ผู้วิจัยหลัก รองศาสตราจารย์ ดร. เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร

บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีทรัพยากรทางทะเลที่อุดมสมบูรณ์โดยเฉพาะหญ้าทะเลซึ่งมีพื้นที่กว่า 60 ล้านไร่ แหล่งของหญ้าทะเลที่ใหญ่ที่สุด ได้แก่ จังหวัดตรัง มีพื้นที่หญ้าทะเล 17,500 ไร่ หญ้าทะเลเป็นแหล่งทรัพยากรที่สำคัญในระบบนิเวศชายฝั่งเพราะนอกจากจะเป็นแหล่งอาหารของสัตว์ทะเลเช่น พะยูน และเต่าทะเลแล้ว ยังเป็นแหล่งหลบภัยของสัตว์น้ำขนาดเล็กและช่วยป้องกันพื้นที่ชายฝั่งจากคลื่น และพายุ¹

ราเอนโดไฟท์เป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืชโดยไม่ก่อให้เกิดโรค² มีรายงานการศึกษาราเอนโดไฟท์ทั้งในแง่ของนิเวศวิทยาและการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ พบว่าราเอนโดไฟท์จากพืชสมุนไพรต่าง ๆ สามารถผลิตสารต้านจุลินทรีย์ที่น่าสนใจจำนวนมากและเป็นแหล่งของสารตัวใหม่ ๆ ด้วย^{4-5,2,6} แต่รายงานการศึกษาราเอนโดไฟท์จากหญ้าทะเลยังมีน้อยมาก^{3,7} และยังไม่มีรายงานการศึกษาหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟท์จากหญ้าทะเล เชื่อว่ากลุ่มนี้จึงมีความน่าสนใจ อาจนำไปสู่การคัดเลือกราเอนโดไฟท์ที่มีศักยภาพในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์และหรือที่มีองค์ประกอบทางเคมีใหม่ ๆ ได้

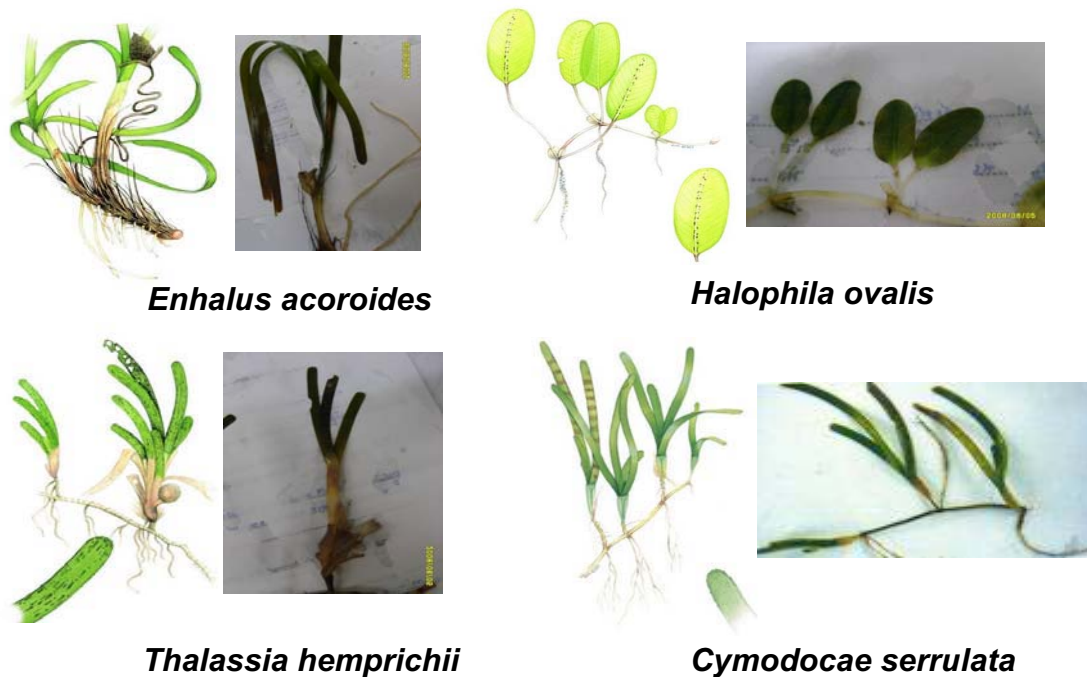
วัตถุประสงค์

1. เพื่อสำรวจและคัดแยกราเอนโดไฟท์จากหญ้าทะเลจากจังหวัดตรังให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และหรือฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเชื้อราเอนโดไฟท์
3. จำแนกชนิดราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

ผลการทดลอง

1.1 การเก็บตัวอย่างหญ้าทะเล และการแยกราเอนโดไฟท์

ทำการเก็บตัวอย่างหญ้าทะเล 4 ชนิด ได้แก่ *Enhalus acoroides*, *Cymodocea rotundata*, *Halodule ovalis* และ *Thalassia herpridii* (รูปที่ 1) บริเวณอ่าวมะขาม จังหวัดตรัง โดยเก็บตัวอย่างทุกเดือน จนครบ 1 ปี รวม 12 ครั้ง (เริ่มจากเดือนกรกฎาคม 2551 – เดือนมิถุนายน 2552) และแยกราเอนโดไฟท์จากส่วนต่าง ๆ ของหญ้าทะเล ได้แก่ ใบ ลำต้น ราก และ ส่วนเหง้า สามารถแยกราเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 210 ไอโซเลต ดังตารางที่ 1 โดยเชื้อราส่วนใหญ่แยกได้จากส่วนใบ



รูปที่ 1 ตัวอย่างหญ้าทะเลที่นำมาแยกราเอนโดไฟท์

ตารางที่ 1 ตัวอย่างหญ้าทะเลและจำนวนราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากส่วนต่าง ๆ ของพืช

Seagrass species	จำนวนราเอนโดไฟท์ที่แยกได้ (%)			
	ใบ	ราก	เหง้า	รวม
<i>Enhalus acoroides</i>	46	1	1	48 (22.9%)
<i>Thalassia hermpridii</i>	68	5	3	76 (36.2%)
<i>Halodule ovalis</i>	70	1	0	71 (33.8%)
<i>Cymodocea serrulata</i>	13	0	0	13 (6.2%)
Other seagrass	2	0	0	2(1.0%)
รวม	199 (94.8%)	7(3.3%)	4 (1.9%)	210

1.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

นำเชื้อราเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้มาเลี้ยงในอาหาร PDB ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 สัปดาห์ และนำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยไปสกัดโดยวิธีทางเคมี ได้ส่วนสกัดหยาบ 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนสกัดหยาบ ethyl acetate จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา (BE), ส่วนสกัดหยาบ hexane จากส่วนเส้นใยรา (CH) และส่วนสกัดหยาบ ethyl acetate จากส่วนเส้นใยรา (CE) นำสารสกัดหยาบที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ต้าน จุลินทรีย์เบื้องต้นที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/ml โดยวิธี microbroth dilution และนำสารสกัดที่ให้ผลการยับยั้งมาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้

(MIC = Minimal Inhibitory Concentration) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (MBC = Minimal Bactericidal Concentration) โดยวิธี microbroth dilution

ได้ทำการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบทั้งหมด 602 สาร จากราเอนโดไฟท์ 210 isolates ที่ความเข้มข้น 200 µg/ml กับเชื้อก่อโรค ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก (*Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ methicillin -resistant *S. aureus* (MRSA) SK1) แบคทีเรียแกรมลบ (*Escherichia coli* ATCC25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853) ยีสต์ (*Candida albicans* ATCC90028, NCPF 3153, และ *Cryptococcus neoformans* ATCC90112, ATCC90113) และรา (*Microsporum gypseum* SH-MU4 clinical isolate และ *Penicillium marneffei* clinical isolate) ผลดังตารางที่ 2 พบว่าสารสกัดส่วนใหญ่มีฤทธิ์ต้านรา คือ 32.1% มีฤทธิ์ต้านยีสต์ และ 25.9% มีฤทธิ์ต้าน *M. gypseum* และ/หรือ *P. marneffei* รองลงมา คือ 22.9% มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวก และมีเพียง 3.5% ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้

ตารางที่ 2 ส่วนสกัดจากราเอนโดไฟท์จากหญ้าทะเลที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

ส่วนสกัด	จำนวนสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (%)			
	แบคทีเรียแกรมบวก ^a	แบคทีเรียแกรมลบ ^b	ยีสต์ ^c	รา ^d
BE (207)	45(21.7)	15(7.2)	67(32.4)	65(31.4)
CE (197)	46(23.4)	4(2.0)	65(32.9)	47(23.8)
CH (198)	47(23.7)	2(1.0)	61(30.8)	44(22.2)
รวม (602)	138(22.9)	21(3.5)	193(32.1)	156(25.9)

BE= ส่วนสกัดหยาบ ethyl acetate จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา, CE= ส่วนสกัดหยาบ ethyl acetate จากส่วนเส้นใยรา, CH= ส่วนสกัดหยาบ hexane จากส่วนเส้นใยรา

^a*Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

^b*Escherichia coli* ATCC25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853

^c*Candida albicans* ATCC90028, NCPF 3153 และ *Cryptococcus neoformans* ATCC90112, ATCC90113

^d*Microsporum gypseum* SH-MU 4 clinical isolate และ *Penicillium marneffei* clinical isolate

จากผลการทดลอง สามารถคัดเลือกเชื้อราที่มีประสิทธิภาพดีมากในการต้านจุลินทรีย์ (MIC < 10 µg/ml) ผลดังแสดงในตารางที่ 3 โดยสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียดีที่สุดที่สุด คือสารสกัดหยาบ ethyl acetate จากส่วนเส้นใยรา ES-73 (ES-73CE) สามารถยับยั้ง *S. aureus* ทั้งสองสายพันธุ์ โดยให้ค่า MIC เท่ากับ 8 µg/ml และสารสกัดหยาบ ES-172BE และ ES-172CH ให้ค่า MIC ต่อเชื้อ

S. aureus ATCC25923 เท่ากับ 8 µg/ml สำหรับฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* พบว่าสารสกัด ES-4BE มีฤทธิ์ปานกลาง (MIC 32 µg/ml) ส่วนสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้าน *P. aeruginosa* เป็นสารสกัดที่มีฤทธิ์ต่ำ (MIC 200 µg/ml) จึงไม่ได้แสดงข้อมูลไว้ในตารางที่ 2

สำหรับฤทธิ์ต้านรา พบว่าสารสกัดหยาบ ES-38CE, ES-8CE และ ES-26CH ยับยั้ง *C. albicans* ให้ค่า MIC 1, 2 และ 8 µg/ml ตามลำดับ ส่วน ES-73CE, ES-190CH, ES-43CH และ ES-26CH ยับยั้ง *C. neoformans* ให้ค่า MIC 1-4, 4, 8 และ 8-16 µg/ml ตามลำดับ สำหรับฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *M. gypseum* นั้น พบว่า ES-26CH ให้ค่า MIC 2 µg/ml และค่า MFC 16 µg/ml ซึ่งใกล้เคียงกับยาต้านรามาตรฐาน miconazole นอกจากนี้สารสกัด CH และ BE จากรา ES-5 ยับยั้ง *M. gypseum* ได้ดีรองลงมา (MIC/MFC 4/4 และ 8/8 µg/ml ตามลำดับ) สำหรับเชื้อ *P. marneffei* พบสารสกัด ES-49CE มีฤทธิ์ปานกลาง (MIC/MFC 16/64 µg/ml)

1.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

เนื่องจากสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราสเกลเล็กในครั้งแรกมีปริมาณแตกต่างกัน บางชนิดให้สารสกัดน้อยมากไม่พอสำหรับการทดสอบทั้งหมด จึงได้แบ่งสารสกัดที่มีปริมาณมากพอ รวม 115 สารสกัด ประกอบด้วย BE 83 สาร CE 24 สาร และ CH 8 สาร จากเชื้อรา 86 isolates มาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยเริ่มจากการสอบฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH[•] (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ก่อน หากมีฤทธิ์จึงทำการทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูล OH[•] (hydroxyl) และ superoxide anion ผลการทดสอบ พบว่ามีสารสกัด 14 สารที่ให้ผลบวกในการทดสอบ DPPH เมื่อนำสารสกัดกลุ่มนี้ไปทดสอบต่อ พบว่ามีสารสกัด 11 และ 9 สารที่สามารถกำจัดอนุมูล OH[•] และ superoxide ได้ โดยสารสกัด ES109BE แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH[•] ดีที่สุดในระดับดี (IC₅₀ 0.036 mg/ml) ES109BE และ ES187BE ต้านอนุมูล OH[•] ได้ในระดับดีมาก (IC₅₀ 0.62 และ 0.69 mg/ml ซึ่งใกล้เคียงกับค่า IC₅₀ ของสารมาตรฐาน Tannin 0.5 mg/ml) และสารสกัด ES187BE และ ES200BE ต้านอนุมูล superoxide anion ในระดับดีมาก (IC₅₀ 0.22 และ 0.32 mg/ml ใกล้เคียงกับค่า IC₅₀ ของสารมาตรฐาน Trolox 0.3 mg/ml) (ตารางที่ 4)

1.4 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ

สารสกัดบางส่วนที่มี NMR profiles ที่น่าสนใจ และมีสารสกัดมากพอที่จะส่งไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค (anti-TB) ฤทธิ์ต้านมาเลเรีย (anti-Pf) ความเป็นพิษต่อเซลล์ และฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเต้านม MCF7 พบว่ามีสารสกัด 5 สาร คือ ES43CE, ES44BE, ES73BE, ES73CE และ ES163BE ที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพเหล่านี้ได้อย่างใดอย่างหนึ่ง ผลการทดลองดังตารางที่ 5 แต่สารสกัด 4 สารเป็นพิษต่อเซลล์ ยกเว้น ES163BE ที่ไม่เป็นพิษต่อ Vero cell แต่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง KB และ MCF7 ได้ มีค่า IC₅₀ 20.25 และ 46.67 µg/ml ตามลำดับ

ตารางที่ 3 ราเอนโดไฟท์ที่มีศักยภาพในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ที่ดีที่สุด

เชื้อรา เอนโด ไฟท์	สาร สกัด	MIC/MBC หรือ MFC (µg/ml)									
		SA	MRSA	EC	PA	CA1	CA2	CN1	CN2	MG	PM
ES-4	BE			32/>200							
ES-8	CE						2/>200				
ES-38	CE						1/>200				
ES-43	CH							8/16			
ES-73	CE	8/ >200	8/ >200					1/4	4/8		
ES-5	CH									4/4	
ES-5	BE									8/8	
ES-26	CH					8/128	8/128	16/>200	8/128	2/16	
ES-172	BE	8/ >200									
ES-172	CE	8/ >200									
ES-190	CH							4/>200			
ES-49	CE										16/64
ยามาตรฐาน Vancomycin		1/1	1/1								
Gentamicin				0.5/2	1/2						
Amphotericin B						0.06/ 0.25	0.06/ 0.25	0.13/2	0.13/2		ND
Miconazole										1/16	

BE= ส่วนสกัดหยาบ ethyl acetate จากน้ำเลี้ยงเชื้อรา, CE= ส่วนสกัดหยาบ ethyl acetate จากส่วนเส้นใยรา, CH= ส่วนสกัดหยาบ hexane จากส่วนเส้นใยรา

SA = *Staphylococcus aureus* ATCC25923 , MRSA = methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* , EC = *Escherichia coli* ATCC25922, PA = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 , CA1 = *Candida albicans* ATCC90028 , CA2=*Candida albicans* NCPF 3153, CN1 = *Cryptococcus neoformans* ATCC90112, , CN2= *Cryptococcus neoformans* ATCC90113, MG = *Microsporium gypseum* SH-MU 4 clinical isolate

ตารางที่ 4ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากราเอนโดไฟท์จากหญ้าทะเล

เชื้อราเอนโดไฟท์	สารสกัด	Antioxidant activity (IC ₅₀ mg/ml)		
		DPPH	Hydroxyl radical	Superoxide anion
ES97	BE	0.15 ⁻	3.53 ⁻	2.1 ⁻
ES104	BE	0.08 ⁺	2.74 ⁻	NA
ES109	CE	0.064 ⁺⁺	NA	0.93 ⁺⁺
ES109	BE	0.036⁺⁺⁺	0.62⁺⁺⁺⁺	1.51 ⁻
ES122	BE	0.18 ⁻	NA	1.54 ⁻
ES129	BE	0.19 ⁻	0.80 ⁺⁺⁺	NA
ES140	BE	0.17 ⁻	1.72 ⁺⁺	0.74 ⁺⁺⁺
ES141	BE	0.19 ⁻	NA	0.52 ⁺⁺⁺
ES150	BE	0.23 ⁻	4.02 ⁻	NA
ES156	BE	0.16 ⁻	4.15 ⁻	NA
ES163	BE	0.078 ⁺	0.95 ⁺⁺⁺	NA
ES187	BE	0.17 ⁻	0.69⁺⁺⁺⁺	0.22⁺⁺⁺⁺
ES197	BE	0.15 ⁻	1.56 ⁺⁺	0.65 ⁺⁺⁺
ES200	BE	0.11 ⁺	1.15 ⁺⁺⁺	0.32⁺⁺⁺⁺
Butylated hydroxyanisole (BHA)		0.02		
Tannin			0.5	
Trolox				0.3

++++ = very good activity, +++ = good, ++ fair, + = weak, - = very weak, NA = no activity

ตารางที่ 5 ฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ของสารสกัดจากราเอนโดไฟท์จากหญ้าทะเล

สารสกัด	Anti-TB	Anti-Pf	Cytotoxicity	Anti-cancer	
			Vero cell	KB	MCF7
	MIC*	IC ₅₀ *	IC ₅₀ *	IC ₅₀ *	IC ₅₀ *
ES43BE	inactive	inactive	inactive	ND	inactive
ES43CE	12.5	inactive	49.27	ND	27.27
ES43CH	inactive	inactive	inactive	ND	inactive
ES44BE	inactive	inactive	26.06	ND	47.82
ES44CE	inactive	inactive	inactive	ND	inactive
ES59BE	inactive	inactive	inactive	ND	inactive
ES64BE	inactive	inactive	inactive	ND	inactive
ES64CE	inactive	inactive	inactive	ND	สารหมด
ES64CH	inactive	inactive	inactive	ND	inactive
ES71BE	inactive	inactive	inactive	inactive	inactive
ES71CE	inactive	inactive	inactive	inactive	inactive
ES73BE	inactive	3.27	11.3	ND	11.4
ES73CE	inactive	inactive	17.86	ND	33.07
ES83BE	inactive	inactive	inactive	inactive	inactive
ES83CE	inactive	inactive	inactive	inactive	inactive
ES163BE	inactive	inactive	inactive	20.25	46.67
ES163CE	inactive	inactive	inactive	inactive	inactive
ES163CH	inactive	inactive	inactive	inactive	inactive

* µg/ml

1.5 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัด

จากการศึกษา TLC โครมาโตแกรม และ H¹ NMR สเปกตรัม ของสารสกัดจากราเอนโดไฟท์จากหญ้าทะเล จำนวน 143 isolates พบว่ามีเชื้อรา 49 isolates ที่มีความน่าสนใจ สามารถจัดกลุ่มได้ 3 กลุ่ม ดังตารางที่ 6 ซึ่งเชื้อเหล่านี้ได้ทำการเพาะเลี้ยงสเกลใหญ่ ในอาหารเลี้ยงเชื้อฟลาสก์ละ 300 ml เชื้อละ 50 ฟลาสก์ เพื่อการสกัดสารและศึกษาองค์ประกอบทางเคมีต่อไป ส่วนเชื้อที่เหลือจำนวน 94 isolates มี TLC โครมาโตแกรม และ H¹ NMR สเปกตรัมที่ไม่น่าสนใจ (ตารางที่ 7)

และยังพบว่าเชื้อบางกลุ่ม เช่น กลุ่ม 1, 2 และ 3 มีสารหลักเป็น mellein, *p*-hydroxy benzoic acid และ tyrosol ตามลำดับ

ตารางที่ 6 เชื้อราเอนโดไฟต์จากหญ้าทะเลที่มี TLC โครมาโตแกรม และ H^1 NMR สเปกตรัม น่าสนใจและได้ทำการเพาะเลี้ยงสเกลใหญ่เพื่อการสกัดสาร

กลุ่ม*	รหัสเชื้อรา (PSU-ES)	H^1 NMR สเปกตรัม	TLC โครมาโตแกรม	หมายเหตุ (เชื้อราที่มี H^1 NMR สเปกตรัม เหมือนกัน)
1	44, 45, 59, 64, 71, 83, 109, 113, 122, 123, 124, 161, 162, 163, 167, 180, 182, 187, 194	มีสัญญาณของ aromatic และ olefinic proton อย่างชัดเจน	มีหลาย spot ทั้งใน UV และ anisaldehyde และมีการแยกกันของสารอย่างชัดเจน	ES161=ES162
2	91, 111, 138, 139, 148, 151, 152, 156, 157, 159, 164, 165, 169, 174, 185, 191, 197, 199, 200, 208, 209, 210	มีสัญญาณของ aromatic และ olefinic proton อย่างชัดเจน	มีหลาย spot ทั้งใน UV และ anisaldehyde แต่ไม่ดีเท่าในกลุ่มที่ 1	ES152=ES156 ES157=ES164 ES199=ES210
3	97, 104, 106, 141, 150	มีสัญญาณของ aromatic และ olefinic proton ไม่ค่อยชัดเจน	มี 3-4 spots ใน UV แต่ไม่พบใน anisaldehyde	-

*เชื้อราในกลุ่มเดียวกัน มี H^1 NMR สเปกตรัม ไม่เหมือนกัน ยกเว้นบางตัวเท่านั้น

ตารางที่ 7 เชื้อราเอนโดไฟต์จากหญ้าทะเลที่มี TLC โครมาโตแกรม และ H^1 NMR สเปกตรัม
น่าสนใจน้อย

กลุ่ม*	รหัสเชื้อรา (PSU-ES)	H^1 NMR สเปกตรัม/ TLC โครมาโตแกรม/ สารหลัก
1	36, 65, 116, 153	มี mellein เป็นสารหลัก
2	79, 85, 99, 103, 125, 126, 132, 133, 134, 155, 172, 203	มีสารหลักเป็น <i>p</i> -hydroxy benzoic acid
3	57, 78, 82, 96, 98, 100, 105, 115, 117, 120, 136, 145, 149, 154, 170, 177, 179, 183, 188, 195	มี tyrosol เป็นสารหลัก
4	55, 76, 112, 119, 121, 129, 166, 176, 184, 190, 193, 196	สัญญาณส่วนใหญ่ปรากฏที่ สนามสูง มีสัญญาณของ aromatic และ olefinic proton บ้าง แต่ไม่ชัดเจน TLC โครมาโตแกรมมี 2-3 spots
5	3, 37, 81, 89, 92, 94, 102, 114, 128, 131, 135, 140, 147, 158, 160, 171, 173, 181, 186, 189, 202	สัญญาณส่วนใหญ่ปรากฏที่ สนามสูง TLC โครมาโตแกรมมี 2-3 spots
6	61, 86, 88, 90, 101, 108, 110, 117, 118, 130, 142, 143, 144, 146, 155, 168, 178, 192, 198, 201, 204, 205, 206, 207	ไม่มีสัญญาณของ aromatic และ olefinic proton

1.6 การจำแนกชนิดราเอนโดไฟท์จากหญ้าทะเล

จากเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากหญ้าทะเลทั้งหมด 210 isolates พบว่ามีเพียง 51 isolates ที่สร้างสปอร์ และสามารถจัดจำแนกได้ในระดับจีส (รวม 8 จีส (ตารางที่ 8) โดยเป็นเชื้อในจีส *Cladosporium* 14 isolates รองลงมา ได้แก่ *Penicillium* 12 isolates, *Curvularia* และ *Fusarium* อย่างละ 6 isolates, *Nigrospora* และ *Trichoderma* อย่างละ 5 isolates

สำหรับเชื้อที่ไม่สร้างสปอร์ ได้คัดเลือกมา 140 isolates เพื่อจำแนกชนิดโดยวิธีทางชีวโมเลกุล โดยศึกษาส่วน ITS (internal transcribed spacer) region ได้ทำการสกัด DNA เพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธีPCR และส่งไปหาลำดับเบส โดยทำไปได้ 135 isolates (อีก 5 isolates พบว่าเชื้อตาย) ขณะนี้อยู่ระหว่างการวิเคราะห์ข้อมูล

เชื้อราที่มีศักยภาพในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ในตารางที่ 3 มีเพียง 3 isolates ที่สร้างสปอร์ ได้แก่ ES4, ES5 และ ES8 ซึ่งจำแนกได้เป็น *Aspergillus*, *Nigrospora* และ *Trichoderma* ตามลำดับ สำหรับเชื้อที่เหลือซึ่งยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้ ต้องรอผลการศึกษาด้านชีวโมเลกุล

สำหรับเชื้อราที่มีศักยภาพในการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด ได้แก่ ES109, ES187 และ ES200 ไม่สร้างสปอร์ จึงยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้ ต้องรอผลการศึกษาด้านชีวโมเลกุล ตารางที่ 8 เชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากหญ้าทะเลจำแนกชนิดตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จีส	จำนวน	รหัสเชื้อรา (PSU-ES)
<i>Aspergillus</i>	1	4
<i>Pestalotiopsis</i>	2	19, 180
<i>Nigrospora</i>	5	5, 89, 114, 136, 154
<i>Trichoderma</i>	5	1, 8, 14, 18, 38
<i>Curvularia</i>	6	25, 45, 58, 59, 71, 72
<i>Fusarium</i>	6	48, 84, 85, 137, 177, 183
<i>Penicillium</i>	12	2, 3, 13, 16, 17, 36, 113, 118, 123, 126, 138, 153
<i>Cladosporium</i>	14	37, 40, 47, 53, 54, 65, 77, 80, 81, 82, 102, 125, 132, 134

วิจารณ์และสรุปผล

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านของสารสกัดหยาบทั้งหมด 602 สาร จากราเอนโดไฟท์ 210 isolates สามารถคัดเลือกกราฟที่มีศักยภาพในการต้านจุลินทรีย์ได้ดีมาก (MIC < 10 µg/ml) 8 isolates คือ ES-5 (*Nigrospora* sp.), ES-8 (*Trichoderma* sp.), ES-26, ES-38, ES-43, ES-73, ES-172 และ ES-190 isolates และราเอนโดไฟท์ที่มีศักยภาพในการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ 3 isolates ได้แก่ ES109, ES187 และ ES200 และยังมีสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ ES163 ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ แต่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ จะเห็นได้ว่าราเอนโดไฟท์จากหญ้าทะเลมีศักยภาพในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ สารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านมะเร็ง และฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ นอกจากนี้ยังพบว่า มีเชื้อราหลาย isolates ที่มี TLC โครมาโทแกรม และ H^1 NMR สเปกตรัม น่าสนใจ ซึ่งอาจเป็นแหล่งของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติชนิดใหม่ ๆ

เอกสารอ้างอิง

1. Jagtap, T., (1991). Distribution of seagrasses along the Indian coast. *Aquatic Botany*. 40, 379-386.
2. Gao, X., Zhou, H., Xu, D., Yu, C., Chen, Y. and Qu, L. (2005). High diversity of endophytic fungi from the pharmaceutical plant, *Heterosmilax japonica* Kunth revealed by cultivation-independent approach. *FEMS. Microbiol.* 249, 255-266.
3. Alva, P., McKenzie, E.H.C., Pointing, S.B., Pena-Muralla, R. and Hyde, K.D. (2002). Do sea grasses harbour endophytes. *Fungal Diversity Research Series* 7, 167-178.
4. Phongpaichit, S., Rungjindamai, N., Rukachaisirikul, V. and Sakayaroj, J. 2006. Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. *FEMS Immunol. Microbiol.* 48, 367-372.
5. Phongpaichit, S., Nikom, J., Rungjindamai, N., Sakayaroj, J., Hutadilok-Towatana, N., Rukachaisirikul, V. and Kirtikara, K. 2007. Biological activities of extracts from endophytic fungi isolated from *Garcinia* plants. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 51, 517-525.
6. Huang, Y.J., Wang, J.F., G.L., Zheng, Z.H. and Su, W.J. (2001) Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalaxus fortunei* and *Torreya grandis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 31, 163-167. Pongcharoen, W., Rukachaisirikul, V., Phongpaichit, S. and Sakayaroj, J. 2007. A new dihydrobenzofuran derivative from the endophytic fungus *Botryosphaeria mamane* PSU-M76. *Chem. Pharm. Bull.* 55, 1404-1405. Rukachaisirikul, V., Kaeobamrung, J., Panwiriyarat, W., Saitai, P., Sukpondma, Y., Phongpaichit, S. and Sakayaroj, J. 2007. A new pyrone derivative from the

- endophytic fungus *Penicillium paxilli* PSU-A71. *Chem. Pharm. Bull.* 55, 1383-1384.
- Rukachaisirikul; V., Sommart, U., Phongpaichit, S., Hutadilok-Towatana, N., Rungjindamai, N. and Sakayaroj, J. 2007. Metabolites from the xylariaceous fungus PSU-A80. *Chem. Pharm. Bull.* 55, 1316-1318.
- Rukachisirikul, V., Sommart, U., Phongpaichit, S., Sakayaroj, J. and Kirtikara, K. 2007. Metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. PSU-D15. *Phytochemistry* 69, 783-787.
7. Wilson, W. (1998). Isolation of endophytes from seagrasses from Bermuda. University of New Brunswick. pp. 4-69.

การคัดเลือกราทะเลที่ผลิตสารต้านจุลินทรีย์จากสิ่งมีชีวิตในทะเล

ผู้วิจัยหลัก ดร. สุมาลี เลี่ยมทอง

บทนำ

โรคติดเชื้อยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคที่เกิดจากเชื้อดื้อยาก่อให้เกิดปัญหาในการรักษาเป็นอย่างมาก จึงมีความจำเป็นที่จะต้องแสวงหาด้านจุลินทรีย์ชนิดใหม่ๆ มาใช้ทดแทนยาเดิมที่ใช้รักษาไม่ได้ผล แหล่งสำคัญของสารดังกล่าวแหล่งหนึ่งคือจากสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในทะเล โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากราทะเล

ราทะเลเป็นเชื้อราประเภทหนึ่งที่สามารถดำรงชีวิตอยู่ในสภาวะที่มีความเค็มสูงได้ นอกจากจะพบราทะเลได้ในระบบนิเวศป่าชายเลน ป่าชายหาด หรืออยู่ในทะเลโดยจะเกาะอยู่ตามหญ้าทะเล หรือสาหร่ายทะเลแล้ว ยังพบราทะเลที่อาศัยอยู่ในสิ่งมีชีวิตในทะเล เนื่องจากระบบนิเวศในทะเล เป็นระบบที่มีการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางกายภาพอยู่ตลอดเวลา สิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในทะเลจึงต้องมีการแข่งขันเพื่อความอยู่รอดในระบบนิเวศสูง โดยราทะเลสร้างมักจะสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพขึ้นเพื่อป้องกันตัวเอง สิ่งมีชีวิต อื่นๆ และเพื่อความอยู่รอด นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าราทะเลที่อาศัยอยู่ในสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในทะเลจะเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ และได้รับความสนใจจากนักเภสัชวิทยามากกว่าราที่ล่องลอยเป็นอิสระอยู่ในทะเล

การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อคัดเลือกราทะเลจากสิ่งมีชีวิตในทะเล ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในคน โดยผู้วิจัยคาดว่าจะสามารถตรวจพบเชื้อราทะเลจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ และสามารถนำเชื้อราที่ได้ไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ และพัฒนาให้เกิดคุณค่าทางเศรษฐกิจต่อไปได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อสำรวจและคัดแยกราทะเลจากสิ่งมีชีวิตในทะเล ให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จากเชื้อราทะเล
3. เพื่อจำแนกชนิดราทะเลที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างสิ่งมีชีวิตในทะเล

เก็บตัวอย่างสาหร่าย และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ในบริเวณจังหวัด ชุมพร นครศรีธรรมราช และภูเก็ต ระหว่างเดือนมกราคมและเดือนกรกฎาคม 2553 จำแนกชนิดของตัวอย่างสิ่งมีชีวิตในทะเล โดย ผศ. สมหมาย เจนกิจการ ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และ ผศ.สุริยะ จันทรแก้ว ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช

2. การแยกเชื้อราทะเล (ดัดแปลงจากวิธีการของ Zhang *et al.*, 2009)

นำตัวอย่างสิ่งมีชีวิตในทะเล มาตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ความยาวประมาณชิ้นละ 1 เซนติเมตร นำไปกำจัดเชื้อบริเวณผิว โดยล้างด้วยน้ำทะเลฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง เติมลูกแก้วที่ปราศจากเชื้อ นำไปแช่ที่ความเร็ว 60 rpm เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำทะเลฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นจึงนำไปแช่ใน 75% ethanol นาน 10 วินาที ล้างด้วยน้ำทะเลฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นจึงนำไปฝังบนกระดาษกรองปราศจากเชื้อ แล้วจึงนำตัวอย่างสิ่งมีชีวิตในทะเลไปวางบนอาหาร Potato Seawater Agar (PSA) ที่เติมยา tetracycline และ ampicillin ความเข้มข้น 50 mg/L โดยวางให้บริเวณที่เป็นผิวสัมผัสสัมผัสกับผิวอาหาร นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 3-7 วัน สังเกตผลทุกวัน เมื่อพบว่าการเจริญของเชื้อราออกมาจากชิ้นส่วนตัวอย่างพืช ทำการตัดส่วน hyphal tip ของเชื้อรา ภายใต้กล้อง stereo zoom นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร PSA ที่ไม่เติมยาปฏิชีวนะ โดยทำการเก็บตัวอย่างเชื้อราเป็นเวลา 7 วัน นับจากวันแรกที่พบการงอกของเชื้อราจากชิ้นส่วนตัวอย่าง เมื่อแยกเชื้อราได้บริสุทธิ์แล้ว ทำการเก็บเชื้อราใน 15% glycerol แล้วนำไปแช่ใน freezer ที่อุณหภูมิ -20 °C

3. การเพาะเลี้ยงเชื้อราทะเลในอาหารเหลวเพื่อใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

คัดเลือกเชื้อราทะเลที่แยกได้ ซึ่งมีลักษณะของโคโลนี ที่แตกต่างกัน มาเพาะเลี้ยงในอาหาร PSA ที่อุณหภูมิ 25 °C นาน 3-4 วัน หรือจนกว่าจะพบว่าการเจริญของโคโลนีของเชื้อรา ใช้ใบมิดฟัดจุ่ม 95% ethanol นำไปผ่านเปลวไฟ แล้วรอให้เย็น หลังจากนั้นนำไปตัดชิ้นส่วนบริเวณขอบโคโลนี ให้มีขนาดชิ้นละ 1x1 ตารางเซนติเมตร จำนวน 5 ชิ้น แล้วทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว Potato Dextrose Broth (PDB) ปริมาตร 300 ml ที่บรรจุในพลาสติกขนาด 500 ml นำไป incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 สัปดาห์ แล้วเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อราเพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้น

4. การสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อราและเส้นใยราด้วยตัวทำละลายทางเคมี

นำน้ำเลี้ยงเชื้อราทะเลที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้จากการทดสอบเบื้องต้น ไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เพื่อแยกส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยออกจากกัน จากนั้นจึงนำน้ำเลี้ยงเชื้อและ

เส้นใยเราไปสกัดด้วยตัวทำละลายทางเคมี
ดังนี้คือ

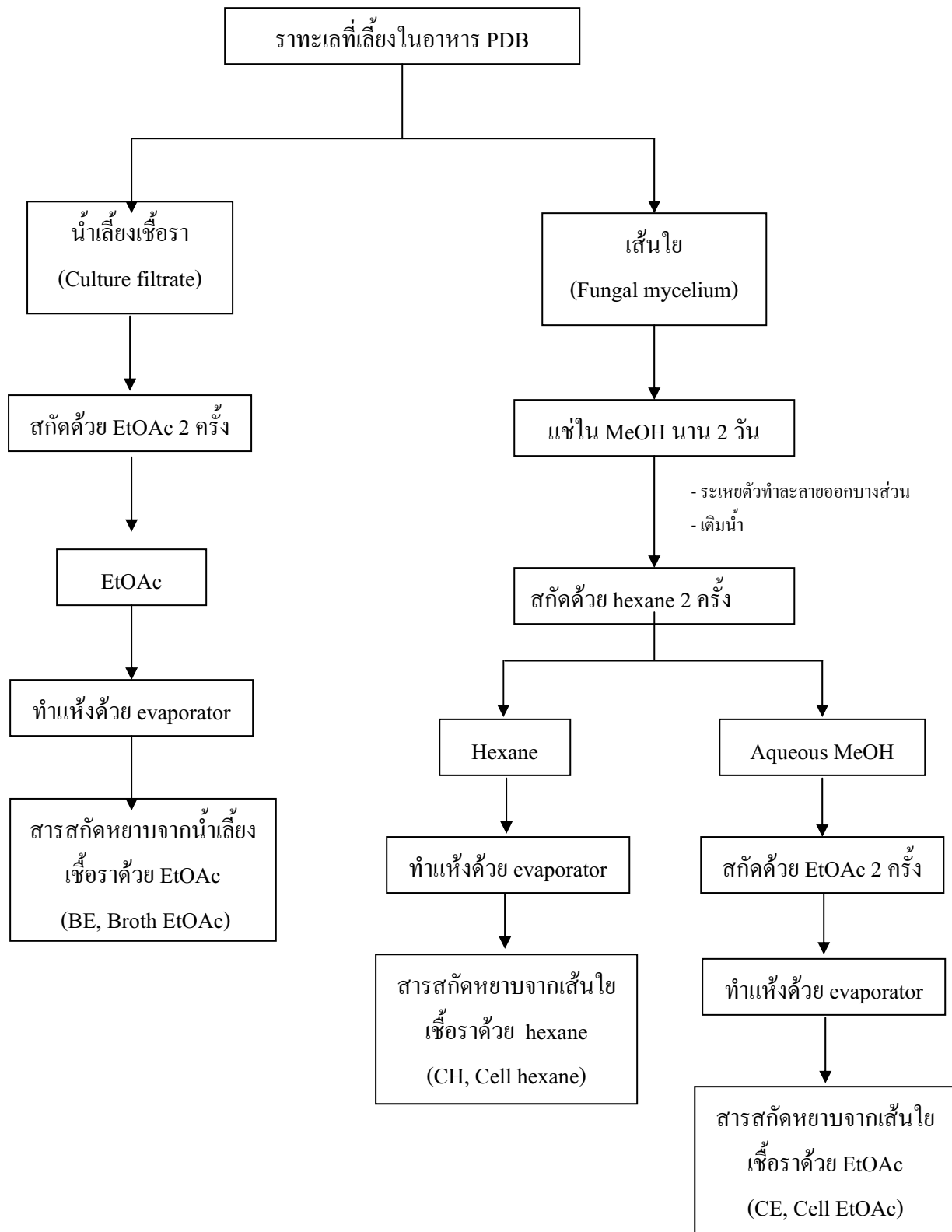
เพื่อหาสารต้านจุลินทรีย์ที่เชื้อราทะเลชนิดนั้น ๆ สร้างขึ้น

4.1 การสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อราทะเล

ทำการสกัดโดยใช้ ethyl acetate (EtOAc, AR grade) โดยใช้อัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อรา ต่อ EtOAc เท่ากับ 2:1 ทำการสกัดทั้งหมด 2 ครั้ง แล้วนำ EtOAc ที่ได้จากการสกัดทั้งสองครั้งมารวมกันแล้วใส่สารกำจัดน้ำ (dehydrating agent) คือ sodium sulphate anhydrous ลงไป หลังจากนั้นกรองแล้วนำสารละลายที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิประมาณ 40-45 °C ได้สารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อราทะเล (BE, Broth EtOAc) (ภาพที่ 1) แล้วจึงนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และตรวจองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นด้วย เทคนิค TLC และ ^1H NMR

4.2 การสกัดเส้นใยของเชื้อราทะเล

ทำการสกัดคล้ายกับการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อรา โดยนำเส้นใยของเชื้อราแช่ใน methanol (MeOH, commercial grade) เป็นเวลา 2 วัน นำสารละลาย MeOH ไปทำให้เข้มข้นโดยการระเหยตัวทำละลายบางส่วนออกไป จากนั้นเติมน้ำลงไป แล้วนำไปสกัดด้วย hexane (AR grade) ในอัตราส่วน 2:1 โดยทำการสกัดซ้ำ 2 ครั้ง แล้วนำ hexane ที่ได้จากการสกัดไปทำแห้ง หลังจากนั้นนำสารละลาย aqueous MeOH ที่ผ่านการสกัดด้วย hexane แล้ว นำไปสกัดต่อด้วย EtOAc ในอัตราส่วน 2:1 เช่นกัน โดยสกัดด้วย EtOAc 2 ครั้ง ซึ่งจากการสกัดดังกล่าวจะได้สารสกัด 2 ส่วน คือ CH (Cell hexane) และ CE (Cell EtOAc) ตามลำดับ (ภาพที่ 1) นำไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และตรวจองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นด้วย TLC และ ^1H NMR สเปกตรัม



ภาพที่ 1 แผนภาพการสกัดสารทางเคมีของราทะเล ด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

5 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

5.1 ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้น สำหรับน้ำเลี้ยงเชื้อรา ด้วยวิธี agar well diffusion (Lorian, 1996)

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและยีสต์

เตรียม inoculum ด้วยการ streak เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC29523, Methicillin-Resistant *S. aureus* (MRSA) SK1, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas. aeruginosa* ATCC27853 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) และเชื้อยีสต์ *Candida albicans* ATCC90028 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabourod dextrose agar (SDA) และบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ส่วนเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ATCC90012 จะ streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA เช่นเดียวกับ *C. albicans* แต่จะบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 48 ชั่วโมง เพาะเชื้อ 3-5 single colonies ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) สำหรับแบคทีเรีย และ Sabourod dextrose broth (SDB) สำหรับยีสต์ นำไป incubate ไว้ที่ 35 °C 3-5 ชั่วโมง ใน shaker incubator เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที หลังจากนั้นนำมาปรับให้ได้ความขุ่น 0.5 และ 2.0 Mcfarland standard สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ตามลำดับด้วย normal saline solution (NSS) ทำการลงเชื้อโดยใช้ sterile cotton swab จุ่มเชื้อ แล้วบิดให้หมาด ทำการ swab ให้ทั่วจานอาหารที่มีความหนา 4 mm โดยใช้แบคทีเรียใช้อาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) และยีสต์ใช้ Sabourod dextrose agar (SDA) ทำการเจาะรูในอาหาร ด้วยปลายที่จับของ Pasteur's pipette ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm โดยทำทั้งหมด 17 หลุมต่อจาน หลังจากนั้นหยดน้ำเลี้ยงเชื้อของราเอนโดไฟท์ที่เพาะเลี้ยงใน PDB ที่อายุ 3 สัปดาห์ ปริมาตร 80 µl ลงไปในหลุมที่เจาะไว้แล้ว โดยชุดควบคุมทดสอบด้วยแผ่นยาปฏิชีวนะ สำหรับแบคทีเรีย *S. aureus* และ MRSA ใช้ยา vancomycin 30 µg/แผ่น *E. coli* ATCC25922 และ *P. aeruginosa* ATCC27853 ใช้ยา gentamicin 10 µg/แผ่น ส่วนยีสต์ใช้ amphotericin B 10 µg/แผ่น นำไป incubate ที่ 35 °C 18-24 ชั่วโมง สำหรับ *C. neoformans* ATCC90012 นำไป incubate ที่อุณหภูมิห้อง นาน 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา ทำการอ่านผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone โดยใช้ vernier caliper หน่วยการวัดเป็นมิลลิเมตร

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา (ดัดแปลงจากวิธีการของ Huang *et al.*, 2000)

เตรียม inoculum ของเชื้อรา โดยเลี้ยง *M. gypseum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA นำไป incubate ที่ 25°C 3-4 วัน ให้ได้ colony ที่มีลักษณะกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 cm หลังจากนั้นใช้ pasteur's pipette เจาะอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่รอบ ๆ โคลนี ของเชื้อราที่กำลังเจริญเติบโต โดยเจาะห่างจากขอบของ colony ประมาณ 0.5 cm แล้วหยอดน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์ที่เพาะเลี้ยงใน PDB ที่อายุ 3 สัปดาห์ ปริมาตร 80 µl ลงไปในหลุมที่เจาะไว้แล้ว โดยชุดควบคุมทดสอบด้วยแผ่นยาปฏิชีวนะ miconazole nitrate 30 µg/แผ่น นำไป incubate ที่ 25 °C 3-4 วัน สังเกตผลการยับยั้งเชื้อทุกวัน หากมีการยับยั้งจะพบ inhibition zone เป็นรอยเว้าหรือพบว่าเชื้อจะไม่สามารถเจริญเลยหลุมไปได้

5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ สำหรับสารสกัดหยาบจากเชื้อราทะเล โดยวิธี broth microdilution

การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐาน

เตรียมเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐานโดยการ streak เชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC29523, MRSA SK1, *E. coli* ATCC25922 และ *P. aeruginosa* ATCC27853 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และเชื้อยีสต์ *C. albicans* ATCC90028 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA และบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ส่วนเชื้อ *C. neoformans* ATCC90012 จะ streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA เช่นเดียวกับ *C. albicans* แต่จะบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 48 ชั่วโมง หลังจากครบเวลาที่กำหนดเชื้เชื้อ 3-5 single colonies ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) สำหรับแบคทีเรีย และ อาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI-1640 สำหรับเชื้อยีสต์ เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาปรับให้ได้ความขุ่น 0.5 และ 2.0 Mcfarland standard สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ตามลำดับด้วย normal saline solution (NSS)

สำหรับเชื้อรา *M. gypseum* จะเตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 2-3 สัปดาห์ หรือจนกระทั่งเชื้อสร้างสปอร์ ทำการเก็บสปอร์โดยใช้ลูกแก้วที่ปราศจากเชื้อ กลิ้งบนผิวโคโลนีเชื้อราเพื่อให้สปอร์หลุดออกจากเส้นใย เติมน้ำ NSS แล้วปรับความขุ่นของ spore suspension ให้ได้ความเข้มข้น $4 \times 10^3 - 5 \times 10^4$ spore/ml โดยใช้ hemacytometer

การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเบื้องต้นของสารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 200 g/ml (ดัดแปลงจาก CLSI M7-A4, 2000)

นำสารสกัดหยาบจากเชื้อราแอนโดไฟท์มาละลายด้วย Dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้ได้ความเข้มข้น 100 mg/ml เก็บไว้เป็น stock solution ที่อุณหภูมิ -20 °C เมื่อจะใช้ทำการทดสอบ นำสารละลายที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าว มาละลายต่อด้วย DMSO ในอัตราส่วน 1:10 และละลายต่ออีกครั้งด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton broth (MHB) ในอัตราส่วน 1:25 ซึ่งจะทำได้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเท่ากับ 400 µg/ml ดูดสารสกัดหยาบ 50 µl ใส่ในแต่ละหลุมของ sterile 96-well microtiter plate ความเข้มข้นละ 2 หลุม จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน (0.5 MF) มาเจือจางด้วย NSS ในอัตราส่วน 1:200 ซึ่งจะทำได้ความเข้มข้นของแบคทีเรียมาตรฐานประมาณ 5×10^5 CFU/ml ดูดสารละลายแบคทีเรียมาตรฐาน 50 µl ใส่ในแต่ละหลุม ซึ่งจะทำได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดในแต่ละหลุมมีค่าเท่ากับ 200 µg/ml บ่ม plate ที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 15 ชั่วโมง จากนั้นจึงเติม 10 µl ของ 0.18% resazurin indicator ลงไปในแต่ละหลุม บ่มต่อที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ อ่านผลการทดสอบเมื่อครบเวลาที่กำหนด

ใช้ยา vancomycin และ gentamicin ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้าย 4 µg/ml เป็นชุดควบคุมที่ให้ผลบวก และใช้ในการเปรียบเทียบกับฤทธิ์ของสารสกัดสำหรับแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ตามลำดับ

การทดสอบฤทธิ์ต้านยีสต์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 200 g/ml

(ดัดแปลงจาก CLSI MA27-A2, 2002a)

ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อเชื้อยีสต์ เช่นเดียวกับแบคทีเรีย เพียงแต่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI-1640 และบ่ม microtiter plate ที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *C. albicans* และ 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง สำหรับเชื้อ *C. neoformans* เมื่อครบเวลาที่กำหนดจึงเติม 10 µl ของ 0.18% resazurin indicator ลงไปในแต่ละหลุม และทำการอ่านผลการทดสอบหลังจากที่บ่ม plate ไว้ที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ใช้ยา amphotericin B ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้าย 4 µg/ml เป็นชุดควบคุมที่ให้ผลบวกในการยับยั้งยีสต์และใช้ในการเปรียบเทียบกับฤทธิ์ของสารสกัด

การทดสอบฤทธิ์ต้านราเบื้องต้นของสารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 200 g/ml

(ดัดแปลงจาก CLSI MA27-A2, 2002a)

ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อเชื้อรา เช่นเดียวกับแบคทีเรีย เพียงแต่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI-1640 และบ่ม microtiter plate ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 6 วัน เมื่อครบเวลาที่กำหนดจึงเติม 10 µl ของ 0.18% resazurin indicator ลงไปในแต่ละหลุม และทำการอ่านผลการทดสอบหลังจากที่บ่ม plate ไว้ 1 วัน ที่อุณหภูมิ 25 °C

ใช้ยา miconazole ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้าย 4 µg/ml เป็นชุดควบคุมที่ให้ผลบวกในการยับยั้งรา และใช้ในการเปรียบเทียบกับฤทธิ์ของสารสกัด

ในการอ่านผลการทดสอบ อาศัยการเปลี่ยนสีของ resazurin ตามวิธีของ Drummond and Waigh (2000) ถ้าสารสกัดสามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อได้ (ผลบวก) resazurin จะมีสีน้ำเงินหรือสีม่วงเหมือนเดิม แต่ถ้าสารสกัดไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (ผลลบ) เชื้อจะสามารถเติบโตและเปลี่ยนสี resazurin ให้เป็นสีชมพู

นำสารสกัดซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/ml ไปทดสอบหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) และ minimal bactericidal concentration (MBC) หรือ minimal fungicidal concentration (MFC)

5.3 การหาค่า MIC, MBC และ MFC ของสารสกัดหยาบจากราทะเล

การหาค่า MIC ของสารสกัดหยาบใช้วิธี broth microdilution ที่ดัดแปลงจาก CLSI M7 - A4 (CLSI, 2000) สำหรับเชื้อแบคทีเรีย ดัดแปลงจาก CLSI MA27 - A2 (CLSI, 2002a) สำหรับเชื้อยีสต์ และดัดแปลงจาก CLSI MA34 - A (CLSI, 2002b) สำหรับเชื้อรา โดยทำการเจือจางสารสกัดหยาบด้วยวิธี serial dilution โดยเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 128 µg/mL และเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 64, 32, 8, 4, 2, 1, 0.5 และ 0.25 µg/mL ตามลำดับ

หลังจากบ่มภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อได้ซึ่งจะแสดงผลเป็นสีน้ำเงินหรือสีม่วง คือค่า MIC

สำหรับสารสกัดที่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่า 128 µg/mL จะรายงานว่ามีค่า MIC เท่ากับ 200 µg/mL

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียหรือรา (MBC หรือ MFC) ของสารสกัดหายากจากทะเลจะทำโดยนำสารละลายจากหลุม microtitier plate ที่มีค่าความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับค่า MIC ไป streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA สำหรับเชื้อแบคทีเรีย และบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA สำหรับเชื้อยีสต์และรา นำไปบ่มภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรียเจริญบนอาหาร คือค่า MBC และความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีเชื้อยีสต์หรือราเจริญบนอาหาร คือค่า MFC

ผลการทดลอง

การเก็บตัวอย่างสิ่งมีชีวิตในทะเล และการแยกราทะเล

จากการเก็บตัวอย่างสาหร่าย และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ในบริเวณจังหวัด ชุมพร นครศรีธรรมราช และภูเก็ต ระหว่างเดือนมกราคมและเดือนกรกฎาคม 2553 พบว่า สามารถแยกราทะเลได้จำนวน 105 ไอโซเลต เป็นเชื้อราที่แยกจากสิ่งมีชีวิตในทะเลจากจังหวัดชุมพรมากที่สุด จำนวน 65 ไอโซเลต รองลงมาจากจังหวัดภูเก็ต จำนวน 35 ไอโซเลต และจากจังหวัดนครศรีธรรมราชน้อยที่สุด จำนวน 5 ไอโซเลต เชื้อราที่แยกได้เป็นเชื้อราที่แยกได้สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังจำนวน 72 ไอโซเลต และเป็นเชื้อราที่แยกได้จากสาหร่ายจำนวน 33 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างสิ่งมีชีวิตในทะเล จำนวน และรหัสราทะเลที่แยกได้

สิ่งมีชีวิตในทะเล (จำนวนราทะเลที่แยกได้)			รหัสราทะเล ^a
กลุ่ม		ชนิด	
Seaweed (33)	Chlorophyta (6)	<i>Enteromorpha clathrata</i> (2)	MN A1, MP E1
		<i>Ulva reticulate</i> (4)	MN B1-B4
	Rhodophyta (5)	<i>Porphyra vietnamensis</i> (0)	
		<i>Bangia fucopurpurea</i> (0)	
		<i>Peyssonellia rubra</i> (5)	MP H1-H2, MP M1-M3
	Phaeophyta (22)	<i>Sargrassum</i> sp. (11)	MC K1-K5, MC F1-F4, MC G1, MC N1
		<i>Turbinaria</i> sp. (12)	MC B1-B2, MC C1-C2, MC D1-D3, MC H1-H3, MP I1-I2
Invertebrates (72)	Mollusca (8)	<i>Hemifusus ternatanus</i> (6)	MC I1-I3, MC V1-V2, MC W1
		<i>Murex trapa</i> (2)	MC Y1-Y2
	Coelenterata (51)	<i>Favia spicosa</i> (4)	MC A1, MP D1-D3
		<i>Pocillopora damicornis</i> (0)	
		<i>Turbinaria</i> sp. (8)	MP F1-F4, MP J1-J4
		<i>Acropora</i> sp. (16)	MP A1-A2, MP B1-B5, MP G1-G4, MP K1-K3, MP L1-L2
		<i>Pteroeides</i> sp. (3)	MC M1-M3
		<i>Fungia</i> sp. (1)	MP C1
		Gorgonian (11)	MC L1-L6, MC Q1-Q5
		Sea Wash (8)	MC J1-J8
	Porifera (11)	Sponge (11)	MC E1-E4, MC O1, MC P1, MC R1, MC S1, MC T1, MC U1-U2
	Crustacean (2)	<i>Odontodactylus scyllarus</i> (2)	MC X1-X2
รวม		105	

^a MC = เชื้อราทะเลที่แยกจากตัวอย่างจังหวัดชุมพร

MP = เชื้อราทะเลที่แยกจากตัวอย่างจังหวัดภูเก็ต

MN = เชื้อราทะเลที่แยกจากตัวอย่างจังหวัดนครศรีธรรมราช

การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำเลี้ยงเชื้อ

จากการนำราทะเลที่แยกได้จากสิ่งมีชีวิตในทะเล ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 สัปดาห์ และนำส่วนน้ำเลี้ยงไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรค โดยวิธี agar well diffusion พบว่าจากราทะเลทั้งหมด 105 ไอโซเลตที่แยกได้ มีราทะเลที่สามารถสร้างสารต้านจุลินทรีย์ก่อโรคได้ตั้งแต่ 1-4 ชนิด จำนวน 34 ไอโซเลต (32.4%) โดยแยกเป็นเชื้อราที่ได้จากสาหร่าย จำนวน 16 ไอโซเลต และจากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง จำนวน 18 ไอโซเลต (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 จำนวนชนิดของจุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้งด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อราทะเล

กลุ่มสิ่งมีชีวิตในทะเล	จำนวนน้ำเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรค (%)				
	1 ชนิด	2 ชนิด	3 ชนิด	4 ชนิด	รวม
สาหร่าย (33)	8 (24.2)	3 (9.1)	4 (12.1)	1 (3.0)	16 (48.4)
สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (72)	8 (11.1)	8 (11.1)	1 (1.4)	1 (1.4)	18 (25.0)
รวม (105)	16 (15.2)	11 (10.5)	5 (4.8)	2 (1.9)	34 (32.4)

เมื่อพิจารณาถึงชนิดเชื้อก่อโรคที่ถูกยับยั้งโดยน้ำเลี้ยงเชื้อราทะเล พบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีที่สุด โดยมีราทะเลจำนวน 18 (17.1%) และ 12 (11.4 %) ที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ได้ น้ำเลี้ยงเชื้อราทะเลมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ดีรองลงมา โดยมีราทะเลจำนวน 10 (9.5%) และ 7 (6.7%) ไอโซเลต ที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* และเชื้อ *Escherichia coli* ได้ตามลำดับ น้ำเลี้ยงเชื้อราทะเลยับยั้งการเจริญของยีสต์และราที่นำมาทดสอบได้น้อย โดยพบว่า มีเชื้อราจำนวนเท่ากัน คือ 5 (4.8%) ไอโซเลตที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ *Candida albicans* และเชื้อรา *Microsporium gypseum* ได้ และมีน้ำเลี้ยงเชื้อราจากราทะเลเพียง 4 (3.8%) ที่สามารถสร้างสารยับยั้ง *Cryptococcus neoformans* ได้ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้งด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อราทะเล

น้ำเลี้ยงเชื้อ	จำนวนน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรค ^a (%)						
	SA	MRSA	EC	PA	CA	CN	MG
สาหร่าย (33)	10 (30.3)	5 (15.2)	3 (9.1)	5 (15.2)	4 (12.1)	1 (3.0)	2 (6.0)
สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (72)	8 (11.1)	7 (9.8)	4 (5.6)	5 (6.9)	1 (1.4)	3 (4.2)	3 (4.2)
รวม (105)	18 (17.1)	12 (11.4)	7 (6.7)	10 (9.5)	5 (4.8)	4 (3.8)	5 (4.8)

^aSA = *Staphylococcus aureus* ATCC25923, MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SK1, EC = *Escherichia coli* ATCC25922, PA = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, CA = *Candida albicans* ATCC90028, CN = *Cryptococcus neoformans* ATCC90112, MG = *Microsporium gypseum*

เมื่อพิจารณาถึงขนาดของ inhibition zone ที่ได้จากการทดสอบน้ำเลี้ยงเชื้อเปรียบเทียบกับขนาด inhibition zone ที่ได้จากการทดสอบกับยาปฏิชีวนะมาตรฐาน พบว่า ขนาด inhibition zone ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบทั้งสองชนิด และเชื้อยีสต์ *C. albicans* ที่ได้จากการทดสอบกับน้ำเลี้ยงเชื้อมีค่าน้อยกว่าที่ได้จากการทดสอบกับยาปฏิชีวนะมาตรฐาน ในขณะที่มีน้ำเลี้ยงเชื้อราทะเลบางไอโซเลตที่ให้ขนาด inhibition zone ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและเชื้อยีสต์ *C. albicans* มากกว่ายาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบ

ตารางที่ 4 ขนาด inhibition zone ของเชื้อที่ได้จากการทดสอบกับน้ำเลี้ยงเชื้อราทะเลเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะมาตรฐาน

สารทดสอบ	ขนาด inhibition zone (mm)						
	SA	MRSA	EC	PA	CA	CN	MG ^a
น้ำเลี้ยงเชื้อ	7.4-24.8	7.1-25.5	8.2-14.8	7.7-9.2	10.1-21.4	8.7-12.1	+
Vancomycin	17.5	15.0					
Gentamicin			20.3	20.8			
Amphotericin B					14.5	15.2	
Miconazole							+

^a + มีฤทธิ์ยับยั้ง

จากผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ของน้ำเลี้ยงเชื้อ พบว่า มีน้ำเลี้ยงเชื้อของราทะเล 5 ไอโซเลต ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดี เชื้อราดังกล่าว ได้แก่ เชื้อรา MN B4 และ MN B3 ที่แยกได้จากสาหร่ายสีเขียว *Ulva reticulata* เชื้อรา MC K1 และ MC F2 ที่แยกได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล *Sargassum* sp. และ เชื้อรา MC J8 ที่แยกได้จากเตตนทะเล น้ำเลี้ยงเชื้อราทะเล MN B3 สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์แกรมบวกและแกรมลบที่ใช้ในการทดสอบทั้งหมดได้ และให้ค่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone ต่อเชื้อจุลินทรีย์แกรมบวกได้ใกล้เคียงกับยาปฏิชีวนะ อย่างไรก็ตามน้ำเลี้ยงเชื้อ MN B3 ให้ค่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone ต่อเชื้อจุลินทรีย์แกรมลบน้อยกว่ายาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบ เชื้อราทะเล MN B4 และ MC K1 สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus*, MRSA และ *C. albicans* ได้ โดยเชื้อราทะเล MN B4 ให้ค่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ต่อเชื้อทั้ง 3 ชนิด มากกว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อที่ได้จากการทดสอบด้วยยาปฏิชีวนะ ในขณะที่เชื้อ MC K1 ให้ค่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ต่อเชื้อทั้ง 3 ชนิด ใกล้เคียงกับยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบ น้ำเลี้ยงราทะเล MC F2 สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ 3 ชนิด เช่นเดียวกัน คือ สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus*, MRSA และ *E. coli* ได้ อย่างไรก็ตามมีเพียงเชื้อจุลินทรีย์ *S. aureus* เท่านั้นที่ค่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ของน้ำเลี้ยงเชื้อใกล้เคียงกับยาปฏิชีวนะ ในขณะที่ MRSA และ *E. coli* ให้ค่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone ของยาปฏิชีวนะมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบมากกว่าน้ำเลี้ยงเชื้อรา MC F2 ถึงแม้ว่าเชื้อราทะเล MC J8 จะยับยั้งเพียงเชื้อจุลินทรีย์แกรมบวก 2 ชนิดที่ใช้ในการทดสอบ แต่พบว่า นอกจากน้ำเลี้ยงเชื้อราทะเลดังกล่าวจะให้ค่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone ของ *S. aureus* ได้ใกล้เคียงกับยาปฏิชีวนะแล้วยังให้ค่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone ของ MRSA มากกว่ายาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบ

ตารางที่ 5 น้ำเลี้ยงราทะเลที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดี

Tested microorganisms	Inhibition Zone (mm)						Antibiotics (µg/ml)
	Broth					Antibiotics	
	MN B4	MN B3	MC K1	MC F2	MC J8		
<i>S. aureus</i>	24.8	17.8	16.1	17.0	18.7	17.5	Vancomycin (30)
MRSA	25.5	13.5	15.6	8.6	21.4	15.0	
<i>P. aeruginosa</i>		8.8				20.8	Gentamicin (10)
<i>E. coli</i>		14.8		8.9		20.3	
<i>C. albicans</i>	21.4		16.7			14.5	Amphotericin B (10)
<i>C. neoformans</i>						15.2	
<i>M. gypseum</i>						+	Miconazole nitrate (30)
Source of active fungi	<i>Ulva reticulate</i>		<i>Sargassum</i> sp.		Sea wasp		

การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบ

การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้นที่ระดับความเข้มข้น 200 g/mL

จากการนำน้ำเลี้ยงราทะเลและเส้นใยราไปสกัดด้วยวิธีทางเคมี จะได้สารสกัดทั้งสิ้น จำนวน 315 สารสกัด โดยแยกเป็นสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อด้วย EtOAc (BE) สารสกัดหยาบจากเส้นใยด้วย hexane (CH) และสารสกัดหยาบจากเส้นใยด้วย EtOAc (CE) จำนวนชนิดละ 105 สารสกัด

เมื่อนำสารสกัดหยาบดังกล่าวไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ พบว่า มีสารสกัดหยาบ 257 สาร (81.6%) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบได้อย่างน้อย 1 ชนิด โดยแยกเป็นสารสกัดหยาบ CE มากที่สุดจำนวน 102 สารสกัด รองลงมา คือ สารสกัดหยาบ BE และ CE ซึ่งสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจำนวน 79 และ 76 สาร ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

เมื่อพิจารณาถึงจำนวนชนิดของจุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้งด้วยสารสกัดหยาบ พบว่า สารสกัดหยาบสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ 1-5 ชนิด โดยยับยั้งจุลินทรีย์ได้ 2 ชนิดมากที่สุด จำนวน 81 สารสกัด รองลงมาคือ ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ 1, 3 และ 4 ชนิด โดยมีสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจำนวน 71, 60 และ 37 ชนิด ตามลำดับ และมีสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ถึง 5 ชนิด (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 จำนวนชนิดของจุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้งด้วยสารสกัดจากราทะเล

ส่วนสกัด	จำนวนชนิดของจุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้งด้วยสารสกัด (%)					
	1 ชนิด	2 ชนิด	3 ชนิด	4 ชนิด	5 ชนิด	รวม
BE	20 (19.0)	23 (21.9)	20 (19.0)	11 (10.4)	5 (4.7)	79 (75.2)
CH	21 (20.0)	25 (23.8)	17 (16.1)	12 (11.4)	1 (0.9)	76 (72.4)
CE	30 (28.5)	33 (31.4)	23 (21.9)	14 (13.3)	2 (1.9)	102 (97.0)
รวม	71 (22.5)	81 (25.7)	60 (19.0)	37 (11.7)	8 (2.5)	257 (81.6)

เมื่อพิจารณาถึงชนิดของจุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้งด้วยสารสกัด พบว่า สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ได้ดีที่สุด และยับยั้งยีสต์ที่ใช้ในการทดสอบทั้ง 2 ชนิด ได้ใกล้เคียงกัน โดยมีสารสกัดจำนวน 130 (42%) และ 144 (45.7%) สารสกัด ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ *C. albicans* และ *C. neoformans* ได้ตามลำดับ สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แกรมบวกได้คือรองลงมา และยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์แกรมบวกทั้ง 2 ชนิด ได้ใกล้เคียงกันเช่นเดียวกัน โดยมีสารสกัดจำนวน 100 (31.7%) และ 108 (34.3%) สารสกัด ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์แกรมบวก *S. aureus* และ MRSA ได้ตามลำดับ สารสกัดหยาบจากราทะเลสามารถยับยั้งการเจริญของราและแบคทีเรียแกรมลบได้น้อย โดยมีสารสกัดหยาบเพียง 42 (13.3%) และ 51 (16.2%) สารสกัด ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *M. gypseum* และแบคทีเรียแกรมลบ *P. aeruginosa* ได้ ตามลำดับ

และมีสารสกัดหยาบจากเชื้อราทะเลเพียง 8 (2.5%) สาร ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ได้ (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 จำนวนสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค

ชนิดของ สารสกัด	จำนวนสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ ^a (%)						
	SA	MRSA	EC	PA	CA	CN	MG
BE	25 (23.8)	39 (37.1)	3 (2.9)	23 (21.9)	38 (36.2)	51 (48.6)	15 (14.3)
CH	34 (32.4)	31 (29.5)	1 (0.9)	9 (8.6)	41 (39.0)	45 (42.9)	13 (12.4)
CE	41 (39.0)	38 (36.2)	4 (3.8)	19 (18.1)	51 (48.6)	48 (45.8)	14 (13.3)
รวม	100 (31.7)	108 (34.3)	8 (2.5)	51 (16.2)	130 (42.3)	144 (45.7)	42 (13.3)

^a SA = *Staphylococcus aureus* ATCC25923, MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SK1, EC = *Escherichia coli* ATCC25922, PA = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, CA = *Candida albicans* ATCC90028, CN = *Cryptococcus neoformans* ATCC90112, MG = *Microsporium gypseum*

การทดสอบหาค่า MIC และ MBC หรือ MFC

เมื่อนำสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์เบื้องต้นที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/mL มาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ยับยั้งเชื้อได้ (MIC) หรือความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ฆ่าเชื้อได้ (MBC หรือ MFC) ผลการทดสอบ พบว่า สารสกัดที่ใช้ในการทดสอบทั้งหมดให้ค่า MIC ต่อด้านเชื้อจุลินทรีย์แกรมบวกทั้งสองชนิด เชื้อ *E. coli* และเชื้อรา *M. gypseum* อยู่ในช่วงที่สูงกว่าค่า MIC ที่ได้จากการทดสอบกับยาปฏิชีวนะ โดยสารสกัดให้ค่า MIC ต่อด้านเชื้อ *S. aureus* และ MRSA ในช่วง 2-200 และ 8-200 µg/mL ในขณะที่ยาปฏิชีวนะ Vancomycin ให้ค่า MIC ต่อด้านเชื้อทั้งสอง เท่ากับ 1 µg/mL สารสกัดให้ค่า MIC ต่อด้านเชื้อ *E. coli* และ *M. gypseum* ในช่วง 128-200 และ 32-200 µg/mL ซึ่งสูงกว่าค่า MIC ที่ได้จากยาปฏิชีวนะ gentamicin ที่ให้ค่า MIC ต่อด้านเชื้อ *E. coli* และ ยาปฏิชีวนะ miconazole nitrate ที่ให้ค่า MIC ต่อด้านเชื้อ *M. gypseum* เท่ากับ 0.5 และ 1 µg/mL ตามลำดับ

ผลการทดสอบหาค่า MIC ของสารสกัดต่อด้านเชื้อ *P. aeruginosa* พบว่า สารสกัดให้ค่า MIC ต่อด้านเชื้อชนิดนี้อยู่ในช่วง 2-200 µg/mL เมื่อเปรียบเทียบกับค่า MIC ที่ได้จากการทดสอบกับยาปฏิชีวนะ gentamicin ที่มีค่า MIC เท่ากับ 4 µg/mL พบว่า มีสารสกัดบางสารที่ให้ค่า MIC ต่อด้านเชื้อชนิดนี้ต่ำกว่ายาปฏิชีวนะ

สำหรับผลการทดสอบหาค่า MIC ของสารสกัดต่อด้านเชื้อยีสต์ทั้ง 2 ชนิด นั้น พบว่า สารสกัดที่ทดสอบให้ค่า MIC ต่อด้านเชื้อยีสต์ *C. albicans* และ *C. neoformans* อยู่ในช่วงเดียวกัน คือ อยู่ในช่วง 0.25-200 µg/mL ซึ่งเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับค่า ค่า MIC ที่ได้จากการทดสอบกับยาปฏิชีวนะ amphotericin B มีค่า MIC ต่อด้านเชื้อ

เชื้อทั้งสอง เท่ากับ 2 µg/mL แล้ว พบว่า มีสารสกัดบางสารที่ให้ค่า MIC ต่ำเชื้อชนิดนี้ต่ำกว่ายาปฏิชีวนะ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ค่า MIC ของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์

Tested Microorganisms	MIC range (µg/mL)		Antibiotics
	Crude extracts	Antibiotics	
<i>S. aureus</i>	2-200	1	Vancomycin
MRSA	8-200	1	
<i>P. aeruginosa</i>	2-200	4	Gentamicin
<i>E. coli</i>	128-200	0.5	
<i>C. albicans</i>	0.25-200	2	Amphotericin B
<i>C. neoformans</i>	0.25-200	2	
<i>M. gypseum</i>	32-200	1	Miconazole nitrate

จากผลการทดสอบหาค่า MIC ต่ำเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก พบว่า สารสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด คือ MC X1 CE โดยมีค่า MIC เท่ากับ 2 µg/mL ในขณะที่สารสกัด MC K1 CE และ MN B4 BE ยับยั้งเชื้อ MRSA ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 8 µg/mL ส่วนผลการทดสอบหาค่า MIC ต่ำเชื้อแบคทีเรียแกรมลบนั้น พบว่า มีสารสกัดจำนวน 6 สารสกัด คือ MC K1 CE, MC K2 BE, MC K2 CE, MC O1 BE, MC O1 CE และ MC P1 CE ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *P. aeruginosa* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 2 µg/mL ในขณะที่มีสารสกัดเพียง 1 สาร คือ MP G1 CE มีฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 128 µg/mL เมื่อพิจารณาถึงฤทธิ์ของสารสกัดหยาบในการยับยั้งเชื้อยีสต์ พบว่า สารสกัดหยาบ MC B2 BE และ MP G4 CE ยับยั้ง *C. albicans* ได้ดีที่สุด และสารสกัดหยาบ MC E3 CE และ MP G1 CH ยับยั้ง *C. neoformans* ได้ดีที่สุด โดยสารสกัดทั้ง 4 สารให้ค่า MIC ต่ำเชื้อยีสต์ เท่ากัน คือ เท่ากับ 0.25 µg/mL นอกจากนี้ยังพบว่า มีสารสกัดจำนวน 4 สาร คือ MC B2 CE, MC I3 BE, MC I3 CH และ MC K2 BE ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *M. gypseum* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 32 µg/mL (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 สารสกัดหายาที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด

Tested Microorganisms	สารสกัดหายาที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด	
	Crude extract	MIC ($\mu\text{g/mL}$)
<i>S. aureus</i>	MC X1 CE	2
MRSA	MC K1 CE, MN B4 BE	8
<i>P. aeruginosa</i>	MC K1 CE, MC K2 BE, MC K2 CE, MC O1 BE, MC O1 CE, MC P1 CE	2
<i>E. coli</i>	MP G1 CE	128
<i>C. albicans</i>	MC B2 BE, MP G4 CE	0.25
<i>C. neoformans</i>	MC E3 CE, MP G1 CH	0.25
<i>M. gypseum</i>	MC B2 CE, MC I3 BE, MC I3 CH, MC K2 BE	32

ค่า MIC ของสารสกัด จำนวน 8 สาร คือ MC D1 CH, MC I3 BE, MC K2 BE, MC N1 BE, MC P1 CE, MC X1 CE, MN B4 BE และ MP I1 BE ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ 5 ชนิด แสดงดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ค่า MIC ของสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ 5 ชนิด

Tested microorganisms	MIC ($\mu\text{g/mL}$)							
	MCD1 CH	MC I3 BE	MC K2 BE	MC N1 BE	MC P1 CE	MC X1 CE	MN B4 BE	MP I1 BE
<i>S. aureus</i>	200			200		8	128	200
MRSA	200	128	32	128	200	200	128	200
<i>P. aeruginosa</i>	200	200	2		0.25	200	8	
<i>E. coli</i>						200		
<i>C. albicans</i>	128	64	200	200	200		200	200
<i>C. neoformans</i>	32	200	128	32	200		128	128
<i>M. gypseum</i>		32	32	64	200	200		200

จากผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์นั้น พบว่า มีสารสกัดเพียง 5 สาร ที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ โดยสารสกัดดังกล่าวให้ค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อที่ทำการทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ค่า MIC และ MBC หรือ MFC ของสารสกัดต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบ

Isolates	Type of crude extract	Tested microorganism	MIC/MBC (µg/mL)
MCJ3	CH	<i>C. albicans</i>	64/128
MCK4	BE	<i>C. neoformans</i>	2/32
	CH	<i>C. neoformans</i>	16/128
MCW1	CE	<i>S. aureus</i>	128/128
MPD3	BE	<i>S. aereus</i>	128/128

สารสกัดที่ 'HNMR profile ที่น่าสนใจ

จากการทดลองพบว่าได้เชื้อราทะเลที่มี ¹H-NMR profile ที่น่าสนใจ และให้สารสกัดหยาบ scale ใหญ่ปริมาณมาก และมี ¹H-NMR profile ใกล้เคียงกับสารสกัดจาก scale เล็ก จำนวน 1 ไอโซเลต คือ เชื้อรา MCK4

เชื้อรา MCK4 เป็นเชื้อราที่แยกได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล *Sargassum* sp. จากจังหวัดชุมพร จากการนำเชื้อราดังกล่าวไปจำแนกชนิดของเชื้อราโดยนำ ITS1-5.8S-ITS2 rDNA sequences ไปเปรียบเทียบกับ sequence ใน GeneBank พบว่า เชื้อราดังกล่าวมีความใกล้เคียงกับเชื้อราใน GeneBank ชนิด *Talaromyces trachyspermus* 99.6% เชื้อรา MCK4 มี GenBank accession number คือ JN107803 ขณะนี้กำลังรอข้อมูล BCC code

สำหรับข้อมูลค่า MIC และ MBC ของสารสกัดหยาบจากเชื้อ MCK4 แสดงผลดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดหยาบจากเชื้อ MCK4

Tested microorganisms	MIC/MBC ($\mu\text{g/mL}$)				Antibiotics
	BE	CH	CE	Antibiotics	
<i>S. aureus</i>		200		1	Vancomycin
MRSA	200	200	200	1	
<i>P. aeruginosa</i>	200		200	4	Gentamicin
<i>E. coli</i>				0.5	
<i>C. albicans</i>	200	128	200	2	Amphotericin B
<i>C. neoformans</i>	2/32	16/128	8	2	
<i>M. gypseum</i>				1	Miconazole nitrate

สรุปและวิจารณ์ผล

มีเชื้อราทะเลที่แยกจากสิ่งมีชีวิตในทะเลหลายไอโซเลตสามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดี ควรที่จะมีการแยกสารเพื่อศึกษาสูตรโครงสร้างและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่ได้จากเชื้อราเหล่านี้ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Munro M.H.G., Blunt J.W., Dumdei E.J., Hickford S.J.H. Lill R.E. Li S. Battershill C.N., and Duckworth A.R. 1999. The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. *J. Biotech.* 70, 15-25.
2. Mayer A.M.S., Rodriguez A.D., Berlinck R.G.S., and Hamann M.T. 2007. Marine pharmacology in 2003-4: Marine compound with anthelmintic antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 145, 553-558.
3. Mayer A.M.S. and Glaser K.B. 2009. A renaissance in marine pharmacology: From preclinical curiosity to clinical reality. *Biochem. Pharmacol.* 78, 440-448.
4. Bhadury, P. Mohammad B.T., and Wright, P.C. 2006. The current status of natural product from marine fungi and their potential as anti-infective agents. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33, 325-337.

5. Saleem, M.; Ali, M.S. Hussian, S.; Jabbar, A. ashraf M., Lee Y.S. 2007. Marine Natural products of fungal origin. *Nat. Prod. Rep.* 24, 1142-1152.
6. Zhang Y., Mu J., Feng Y., Kang Y., Zhang J., Gu P.J., Wang Y., Ma L.F., and Zhu Y.H. 2009. Broad-spectrum antimicrobial epiphytic and endophytic fungi from marine organisms; Isolation, bioassay and taxonomy. *Mar. Drugs.* 7, 97-112.

การคัดเลือกจุลินทรีย์เอนโดไฟท์ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพควบคุม เชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวของขิง

ผู้วิจัยหลัก : ดร. บุญสม บุญบรรณ

บทนำ

พืชขิงเป็นพืชสมุนไพรที่มีการใช้ในครัวเรือนของคนไทยมาแต่โบราณโดยใช้เป็นอาหารและสมุนไพร โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ขิง (*Zingiber officinale*) เกษตรกรให้ความสนใจพืชชนิดนี้มากเนื่องจากมีราคาดีและส่งไปจำหน่ายต่างประเทศ เช่น สิงคโปร์ ออสเตรเลีย ญี่ปุ่น ยุโรป และสหรัฐอเมริกา สามารถสร้างรายได้และทำเงินเข้าประเทศปีละหลายล้านบาท ซึ่งเกษตรกรสามารถขยายผลผลิตได้ทั้งในรูปแบบขิงอ่อนและขิงแก่โดยส่งตลาดสดและโรงงานแปรรูปขิงในประเทศไทยแบ่งขิงปลูกออกเป็น 2 ชนิด คือ ขิงหยวกซึ่งมีปริมาณมากกว่าร้อยละ 90 และขิงเผ็ดประมาณร้อยละ 10 โดยแหล่งผลิตขิงหยวกที่สำคัญอยู่ในภาคเหนือและภาคอีสาน ได้แก่ จังหวัดเชียงราย พะเยา พิจิตร โลก เพชรบูรณ์ และเลย ส่วนขิงเผ็ดพื้นที่ผลิตอยู่ในภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดเพชรบุรี และนครปฐม

พืชสกุลขมิ้น (*Curcuma*) เช่น ปทุมมา (*C. alismatifolia*) และ กระเจียว (*C. roscoena*) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอีกสกุลหนึ่งในวงศ์นี้ และมีพื้นที่เพาะปลูกมากในภาคเหนือเช่นกัน ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่และเชียงราย โดยผลิตเป็นไม้กระถาง ไม้ตัดดอก และหัวพันธุ์ ส่งต่างประเทศซึ่งมีมูลค่าส่งออกประมาณ 30 ล้านบาทต่อปี ตลาดต่างประเทศที่สำคัญ คือ เนเธอร์แลนด์ ญี่ปุ่น อเมริกาและกลุ่มประชาคมเศรษฐกิจยุโรป (กรมวิชาการ, 2521; โอพาร์ และคณะ, 2541)

อุปสรรคที่สำคัญของการปลูกขิงและพืชสกุลขมิ้นคือปัญหาเรื่องโรค โดยเฉพาะโรคเหี่ยวสาเหตุของโรคนั้นมีทั้งที่เกิดจากเชื้อราและแบคทีเรีย ซึ่งทำความเสียหายได้ทุกระยะการเจริญเติบโต สร้างความเสียหายอย่างมากต่อปริมาณผลผลิตและคุณภาพของหัวขิง โดยเฉพาะกรณีส่งออกเหง้าพันธุ์ปทุมมาไปประเทศเนเธอร์แลนด์ จะเข้มงวดมากในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยว (*Ralstonia solanacearum*) จึงต้องมีการใช้สารเคมีสังเคราะห์ในการควบคุมการระบาดของโรค (กรมวิชาการ, 2521)

การใช้สารเคมีในการควบคุมโรคแม้ว่าจะให้ผลดีแต่ทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น จึงขาดความสามารถในการแข่งขันกับประเทศคู่แข่งทางด้านราคา และยังมีพิษตกค้างจนก่อให้เกิดอันตรายต่อคุณภาพชีวิตและสิ่งแวดล้อม ซึ่งอาจเกิดจากการใช้สารเคมีในปริมาณที่มากเกินไปหรือใช้ผิดวิธี สารเคมีอาจไปทำลายจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์แก่พืชในดิน แมลงศัตรูธรรมชาติ หรืออาจทำให้เชื้อราสาเหตุเกิดความต้านทาน ประกอบกับปัจจุบันการส่งออกสินค้าเกษตรที่มุ่งเน้นความปลอดภัยทางด้านอาหารและการเกษตรแบบยั่งยืน เช่น เกษตรอินทรีย์ เกษตรธรรมชาติ เกษตรปลอดภัยจากสารพิษเป็นที่ต้องการมากขึ้น ดังนั้นการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีโดยการใช้จุลินทรีย์

กลุ่มต่างๆ เช่น แบคทีเรียเอนโดไฟต์และราเอนโดไฟท์ซึ่งจัดเป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่มีศักยภาพในการได้มาซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bills et al., 2002; Strobel and Daisey, 2003; Cassady et al., 2004; Ezra et al., 2004; Lumyong et al., 2004; Strobel et al., 2004; Du and Shen, 2006; Lacava et al., 2008) ซึ่งอาจเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มใหม่ๆ และเป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่สามารถใช้ในการส่งเสริมการเจริญของพืชหรือควบคุมโรคพืช ทดแทนการใช้สารเคมีที่ต้องนำเข้าได้ก็จะเป็นแนวทางในการลดต้นทุนการผลิต เพิ่มศักยภาพในการแข่งขันกับประเทศคู่แข่ง และจัดการความเสี่ยงจากสารพิษตกค้าง อันจะนำไปสู่การเกษตรแบบยั่งยืน การพัฒนาเศรษฐกิจการค้าที่ยั่งยืน และอาหารปลอดภัย

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดกรองหาจุลินทรีย์เอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชวงศ์ขิงในการสร้างสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวของขิง
2. เพื่อคัดกรองหาจุลินทรีย์เอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชวงศ์ขิงในการสร้างไซโตไคน์

การทดลองและผลการทดลอง

การคัดกรองราเอนโดไฟท์ที่สร้างสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวของขิง

เพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชวงศ์ขิง ได้แก่ กระเจียวขาว: *Curcuma parviflora*, กระเทียม: *Zingiber zerumbet*, กุ๊ก: *Amomum siamensis*, ข่า: *Alpinia galanga*, ข่าป่า: *Alpinia malaccensis*, ปุดคางคก: *Etlingera litteralis* และ ไพล: *Zingiber cassumunar* ซึ่งเก็บสะสมเชื้อที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จำนวน 133 ไอโซเลต บนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน จากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหารหมัก 5 ชนิด (F1: glucose soybean meal broth, F2: malt extract corn starch broth, F3: glucose soybean oil peptone broth, F4: potato dextrose galangal powder broth and F5: potato dextrose broth) โดยใช้เข็มเย็บเชื้อตัดบริเวณปลายเส้นใยให้มีขนาดประมาณ 0.3 cm × 0.3 cm นำไปใส่ในอาหารหมัก 5 ml ที่บรรจุในหลอดทดลอง ขนาด 18 mm × 180 mm หลอดละ 2 ชิ้น แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง (27–30 °C) นาน 7 วัน บนเครื่องเขย่าแบบซ้าย-ขวาที่อัตราเร็ว 120 รอบ/นาที จากนั้นกรองเอาน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปสกัดด้วย ethyl acetate ระเหยแห้งด้วย rotary evaporator จะได้สารสกัดหยาบ จากนั้นละลายสารสกัดหยาบของทุกไอโซเลตใน dimethyl sulfoxide (10% DMSO) 1 ml ก่อนนำไปเก็บที่ -20 °C เพื่อรอทดสอบหาสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* และเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยว ด้วยวิธี agar well diffusion assay โดยหยดสารสกัดหยาบที่ได้ 35 µl ลงในแต่ละ well ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 mm ซึ่งเจาะเตรียมไว้ในจานอาหาร NA และ PDA ที่ปลูกเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราแล้ว ตามลำดับ นำจาน

อาหารทดสอบทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 27–30 °C นาน 2 วัน สำหรับเชื้อแบคทีเรีย และนาน 5 วัน สำหรับเชื้อราสังเกตความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรครดงกล้วย โดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใส

จากการคัดกรองเชื้อราเอนโดไฟต์ 133 ไอโซเลท ในการสร้างสารออกฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวในพืชวงศ์ขิง พบว่าส่วนสกัดหยาบด้วย ethyl acetate ของน้ำเลี้ยงของราเอนโดไฟต์ 100 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวได้ (Table 1) โดยทำให้เกิดบริเวณใสขนาดมากกว่าหรือเท่ากับ 7 mm สารสกัดหยาบของ PDB136 ที่เลี้ยงในอาหาร F4 และ F5, PDB141 และ PDB152 ที่เลี้ยงในอาหาร F4 และ PDB148 ที่เลี้ยงในอาหาร F5 ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวได้ดีที่สุด (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใส 15–16 mm) ส่วนสารสกัดหยาบของ PDB28 ที่เลี้ยงในอาหาร F1 ยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใส 9 mm) ได้ดีที่สุด

การคัดกรองแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่สร้างสารออกฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวของขิง

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชวงศ์ขิง ได้แก่ กุ๊ก: *Amomum siamensis*, และข่าป่า: *Alpinia malaccensis* ซึ่งเก็บสะสมเชื้อที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จำนวน 11 ไอโซเลท บนอาหาร NA ด้วยวิธี streak plate บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (27–30 °C) 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้หัวหลอดถ่ายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์แต่ละไอโซเลทนั้นมาเพาะเลี้ยงในอาหาร NB บ่มบนเครื่องเขย่าแบบซ้าย-ขวาด้วยความเร็ว 120 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง 16 ชั่วโมง และนำไปเลี้ยงต่อในอาหารหมัก 3 ชนิด (NB: nutrient broth, F2:GPYM: glucose peptone yeast-malt extract broth and F3:GYC: glucose yeast extract corn starch broth) โดยใช้ปิเปตดูดเชื้อที่เตรียมได้ปริมาตร 5 ml นำไปใส่ในอาหารหมัก 70 ml ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml บ่มที่อุณหภูมิห้อง 7 วัน บนเครื่องเขย่าแบบซ้าย-ขวาที่อัตราเร็ว 120 รอบ/นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปสกัดด้วย ethyl acetate ระเหยแห้งด้วย rotary evaporator จะได้สารสกัดหยาบ จากนั้นละลายสารสกัดหยาบของทุกไอโซเลทใน dimethyl sulfoxide (10% DMSO) 1 ml ก่อนนำไปเก็บที่ -20 °C เพื่อรอทดสอบหาสารออกฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยว ด้วยวิธี agar well diffusion assay เช่นเดียวกับที่ทดสอบหาสารออกฤทธิ์ของราเอนโดไฟต์

จากการคัดกรองแบคทีเรียเอนโดไฟต์ 11 ไอโซเลท ในการสร้างสารออกฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวในพืชวงศ์ขิง พบว่าไม่มีสารสกัดหยาบของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลทใดที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ได้ อย่างไรก็ตามพบว่าสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียเอนโดไฟต์ไอโซเลท ZB9 ที่เลี้ยงในอาหาร F3 และ ZB7 ที่เลี้ยงในอาหาร

NB ยับยั้งการเจริญของรา *F. oxysporum* ได้ดีที่สุดเป็นสองลำดับแรก (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใส 15 และ 10 mm) (Table 2)

Table 1. Antimicrobial activity (inhibition zone ≥ 7 mm) of zingiberaceous endophytic fungi cultured in different media (F1-F5) against wilt pathogens.

Wilt pathogen	No. of active extract/ No. of extract tested	Inhibition zone (mm)	No. of hazy active extract
<i>Ralstonia solanacearum</i> BS322			
F1	48/108	8.0–15	20
F2	23/108	8.0–13	10
F3	35/108	8.0–13	12
F4	36/108	8.0–15	15
F5	44/108	8.0–15	21
<i>R. solanacearum</i> TNCC128			
F1	21/47	7.0–12	0
F2	32/47	7.5–15	3
F3	31/47	7.5–14	1
F4	30/47	7.5–16	1
F5	43/47	7.5–16	3
<i>R. solanacearum</i> TNCC1512			
F1	18/47	7.0–10	2
F2	24/47	7.0–13	1
F3	27/47	7.0–14	2
F4	27/47	7.0–13	3
F5	39/47	7.0–13	0
<i>Fusarium oxysporum</i> BS268			
F1	3/133	7.0–10	0
F2	0/133	0	0
F3	1/133	7	0
F4	3/133	7.0–7.5	0
F5	7/133	7.0–8	0

Table 1. Antimicrobial activity (inhibition zone ≥ 7 mm) of zingiberaceous endophytic fungi cultured in different media (F1-F5) against wilt pathogens.

Endophytic fungi	<i>Ralstonia solanacearum</i> BS322					<i>R. solanacearum</i> TNCC128					<i>R. solanacearum</i> TNCC1512					<i>Fusarium oxysporum</i> BS268				
	F1	F2	F3	F4	F5	F1	F2	F3	F4	F5	F1	F2	F3	F4	F5	F1	F2	F3	F4	F5
No. of active extract/No. of extract tested	48/ 108	23/ 108	35/ 108	36/ 108	44/ 108	21/ 47	32/ 47	31/ 47	30/ 47	43/ 47	18/ 47	24/ 47	27/ 47	27/ 47	39/ 47	3/ 133	0/ 133	1/ 133	3/ 133	7/ 133
Inhibition zone (mm)	8-15	8-13	8-13	8-15	8-15	7-12	7.5- 15	7.5- 14	7.5- 16	7.5- 16	7-10	7-13	7-14	7-13	7-13	7-10	0	7	7-7.5	7-8
No. of hazy active extract	20	10	12	15	21	0	3	1	1	3	2	1	2	3	0	0	0	0	0	0

Table 2. Antimicrobial activity (inhibition zone ≥ 7 mm) of zingiberaceous endophytic bacteria cultured in different media against wilt pathogens.

Endophytic bacteria	<i>Ralstonia solanacearum</i> BS322			<i>Fusarium oxysporum</i> BS268		
	NB	F2:GPYM	F3:GYC	NB	F2:GPYM	F3:GYC
ZB1	-	-	-	-	-	-
ZB2	-	-	-	-	-	-
ZB3	-	-	-	-	-	-
ZB4	-	-	-	-	-	-
ZB5	-	-	-	-	-	-
ZB6	-	-	-	-	-	-
ZB7	-	-	-	10	-	-
ZB8	-	-	-	-	-	-
ZB9	-	-	-	-	-	15
ZB13	-	-	-	-	-	-
ZB14	-	-	-	-	-	-

- = no activity

การคัดกรองหาจุลินทรีย์เอนโดไฟท์ที่สร้างไซเคอโรฟอรั

ทำการทดสอบและตรวจหาไซเคอโรฟอรัโดยเฉพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ จำนวน 37 ไอโซเลทบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน จากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง chrome azurol S (CAS agar) โดยใช้ Pasture pipette (เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 cm) ที่ฆ่าเชื้อแล้วตัดบริเวณขอบโคโลนีและใช้เข็มเย็บเขี่ยนำไปวางจานละ 3 ชิ้น บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง (27–30 °C) นาน 7 วัน สังเกตสีของอาหารบริเวณรอบโคโลนีจะเปลี่ยนจาก สีน้ำเงินเป็นสีเหลือง ส้ม หรือชมพู แสดงว่าเชื้อนั้นน่าจะสร้างสารไซเคอโรฟอรั วัดระยะห่างระหว่างขอบที่อาหารเปลี่ยนสีและขอบโคโลนีของเชื้อ (halo zone) จากนั้นตรวจสอบหมู่ฟังก์ชันของไซเคอโรฟอรัโดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว Modified Gaus No. 1 (MGs-1 broth, You et al., 2004) 5 ml ที่บรรจุในหลอดทดลองขนาด 18 mm × 180 mm หลอดละ 3 ชิ้น บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง (27–30 °C) นาน 7 วัน บนเครื่องเขย่าแบบซ้าย-ขวาที่อัตราเร็ว 120 รอบ/นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ทิ้งที่ 11,000 rpm นาน 15 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปตรวจว่าเป็นคาเทโคเลทหรือไฮดรอกซามาเทไซเคอโรฟอรัด้วยวิธี Arnou assay (Arnou, 1937) และ Ferric perchlorate assay (Atkin et al., 1970) วัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 500 nm และ 480 nm และวัดปริมาณของสารโดยประมาณเทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐาน 2,3-dihydroxybenzoic acid และ deferoxamine mesylate ตามลำดับ

จากการคัดกรองราเอนโดไฟท์ที่สร้างสารไซเคอโรฟอรับนอาหาร CAS agar พบว่าราเอนโดไฟท์จำนวนเกินครึ่งให้ผลบวก (Table 3) โดยราเอนโดไฟท์ไอโซเลท PDB37, PDB82 และ

PDB190 สร้าง halo zone มากกว่า 5, 8 และ 5 mm ตามลำดับ (Figure 1) อย่างไรก็ตามเมื่อเลือกบางไอโซเลทไปตรวจสอบหมู่ฟังก์ชันของไซเคอร์โรฟอร์ โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MGs-1 พบว่าปริมาณสารที่พบจากวิธีนี้ไม่สอดคล้องกับการคัดกรองบนอาหารแข็ง (Table 4) เช่น PDB136 สร้าง halo zone มากกว่า 2 mm ในขณะที่ PDB141 สร้าง halo zone น้อยกว่า 2 mm แต่เมื่อตรวจสอบโดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MGs-1 พบว่าเชื้อทั้งสองสร้างไฮดรอกซามาตไซเคอร์โรฟอร์ 3.33 และ 150.71 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ

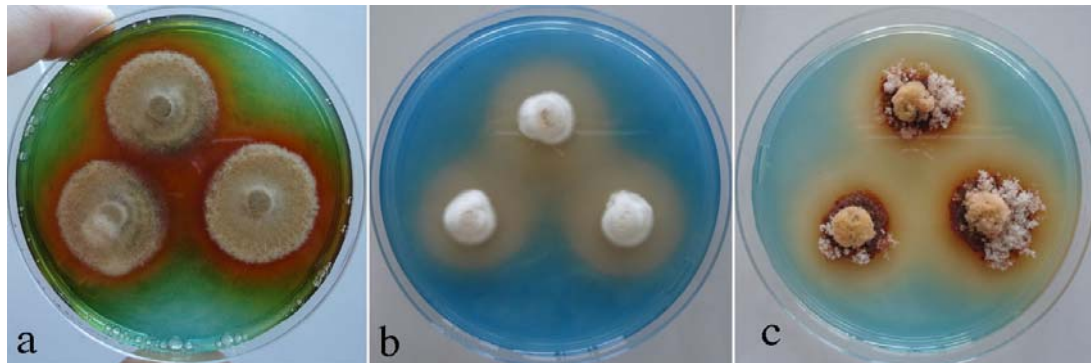


Figure 1. Halo zone on CAS agar, a. PDB37, b. PDB82, c. PDB190.

Table 3. Qualitative siderophore production by zingiberaceous endophytic fungi

Siderophore	
Halo diameter on CAS agar ^a	No. of isolate
+++	3
++	10
+	12
-	12

^a - = 0 mm; + < 2 mm; ++ = 2–5 mm; +++ > 5 mm

Table 4. Siderophore production by zingiberaceous endophytic fungi

Endophytic fungi	Siderophore	
	Halo diameter on CAS agar ^a	Hydroxamate ($\mu\text{g/ml}$) ^b
PDB119	-	4.65 $\pm$ 0.5
PDB136	++	3.33 $\pm$ 0.0
PDB141	+	150.71 $\pm$ 1.1
PDB151	+	33.13 $\pm$ 4.4

^a - = 0 mm; + < 2 mm; ++ = 2–5 mm

^b Average $\pm$ standard error from three replicates

นอกจากนี้อยู่ในระหว่างศึกษาผลการสร้างสารไซโคโรฟอรในอาหารเหลว MGs-1 จำนวน 22 ไอโซเลท แบ่งเป็น แบคทีเรียเอนโดไฟท์ 11 ไอโซเลท, ราเอนโดไฟท์ 11 ไอโซเลท

การคัดเลือกเอนโดไฟท์ที่มีผลบวกที่น่าสนใจเพื่อเลี้ยงเชื้อสเกลเล็กและสเกลใหญ่

เลี้ยงเชื้อสเกลเล็ก (150 ml) โดยเลือกเชื้อเอนโดไฟท์ที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวได้ จำนวน 20 ไอโซเลท (แบคทีเรียเอนโดไฟท์ 3 ไอโซเลท, ราเอนโดไฟท์ 17 ไอโซเลท) สกัดแยกสารด้วย ethyl acetate และส่งส่วนสกัดหยาบสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากราเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกลักษณะเพื่อบันทึก ^1H NMR สเปกตรัม จากนั้นคัดเลือกเอนโดไฟท์เลี้ยงเชื้อสเกลใหญ่โดยพิจารณาจากข้อมูล ^1H NMR สเปกตรัม ที่น่าสนใจ เพื่อส่งแยกสารบริสุทธิ์และวิเคราะห์สูตรโครงสร้าง จำนวน 4 ไอโซเลท (Table 5)

Table 5. Selected zingiberaceous endophytes having anti-wilt pathogens activity for small- and large-scale culture.

Endophytes	Sample code of extract	Small scale	Large scale
Bacteria			
ZB1	ZB1NB, ZB1F2, ZB1F3	/	
ZB7	ZB7NB	/	
ZB9	ZB9F3	/	
Fungi			
PDB7	7F3	/	/
PDB21	21F1	/	/
PDB25	25F1, 25F5	/	
PDB28 (<i>Fusarium</i> sp.)	28F1	/	
PDB37	37F5	/	
PDB82	82F5	/	
PDB141 (<i>Fusarium</i> sp.)	141F4	/	/
PDB154 (<i>Fusarium</i> sp.)	154F3, 154F5	/	
PDB161 (<i>Xylaria</i> sp.)	161F3	/	
PDB163 (<i>Xylaria</i> sp.)	163F5	/	
PDB166 (<i>Xylaria</i> sp.)	166F4	/	
PDB167 (<i>Xylaria</i> sp.)	167F1, 167F5	/	
PDB168 (<i>Phomopsis</i> sp.)	168F5	/	
PDB169 (<i>Phomopsis</i> sp.)	169F4, 169F5	/	
PDB178	178F2, 178F4	/	
PDB181	181F2	/	
PDB197 (<i>Pestalotiopsis</i> sp.)	197F2	/	/

เอกสารอ้างอิง

1. กรมวิชาการเกษตร. การปลูกขิงและขมิ้น. เอกสารทางวิชาการเล่มที่ 8 กรมวิชาการ-เกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2521.
2. ยุวดี พิรพรพิศาล และ นมาภรณ์ นิวาสะบุตร. คู่มือปฏิบัติการสาหร่ายวิทยา. เชียงใหม่: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 2546.
3. โอฬาร พิทักษ์ ภาวนา อัสวะประภา ทวีพงศ์ สุวรรณโร เศรษฐพงศ์ เลขาวัฒนะ และอภิชาติ สุวรรณ. ไม้ตัดดอกเขตร้อน การปลูกขมิ้นและกระเจียว. กรมส่งเสริม-การเกษตร กองส่งเสริมพืชสวน. 2541.
4. Arnow, L.E. Colorimetric estimation of the components of 3,4- dihydroxy phenylalanine tyrosine mixtures. *Journal of Biological Chemistry*. **1937**, 118, 531–535.
5. Atkin, C.L., Neilands, J.B., Phaff, J. Rhodotorulic acid from species of *Leucosporidium*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Sporodiobolus* and *Sporobolomyces* and new alanine-containing ferrichrome from *Cryptococcus melibiosum*. *Journal of Bacteriology*. **1970**, 103, 722–733.
6. Bills, G., Dombrowski, A., Pelaez, F., Polishook, J. and An, Z. Recent and future discoveries of pharmacologically active metabolites from tropical fungi. In *Tropical Mycology: Micromycetes, Vol 2*, eds. Watling, R. Frankland, J.C. Ainsworth, A.M. Issac, S. and Robinson, C.H. **2002**, pp. 165–194. New York: CABI Publishing.
7. Bussaban, B., Lumyong, S., Lumyong, P., McKenzie, E.H.C. and Hyde, K.D. Endophytic fungi from *Amomum siamense*. *Canadian Journal of Microbiology*. **2001**, 47, 943–948.
8. Cassady, J.M., Chan, K.K., Floss, H.G. and Leistner, E. Recent developments in the maytansinoid antitumor agents. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **2004**, 52, 1–26.
9. Clark, V.L. and Bavoil, P.M. *Methods in Enzymology*. **1994**, London: Academic Press.
10. Du, Z.-Z. and Shen, Y.-M. A rare new cleistanthane diterpene from the pericarp of *Trewia nudiflora*. *Helvetica Chimica Acta*. **2006**, 89, 2841–2845.
11. Ezra, D., Hess, W.M. and Strobel, G.A. New endophytic isolates of *Muscodora albus*, a volatile-antibiotic-producing fungus. *Microbiology*. **2004**, 150, 4023–4031.
12. Lacava, P.T., Silva-Stenico, M.E., Araújo, W.L., Simionato, A.V.C., Carrilho, E., Tsai, S.M. and Azevedo, J.L. Detection of siderophores in endophytic bacteria *Methylobacterium* spp. Associated with *Xylella fastidiosa* subsp. *paucis*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. **2008**, 43, 521–528.

13. Lumyong, S., Bussaban, B., Lumyong, P., Hyde, K.D., McKenzie, E.H.C., Asano K. and Tomita F. Evaluation of endophytic fungi from Zingiberaceae for antibiotic production. *Biotechnology for Sustainable Utilization of Biological Resources in the Tropics*. **2004**, 17, 472–476.
14. Pérez-Miranda, S., Cabirol, N., George-Téllez, R., Zamudio-Rivera, L.S. and Fernández, F.J. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *Journal of Microbiological Methods*. **2007**, 70, 127–131.
15. Sajid, I., Yao, C.B.F.F., Shaaban, K.A., Hasnain, S. and Laatsch, H. Antifungal and antibacterial activities of indigenous *Streptomyces* isolates from saline farmlands: prescreening, ribotyping and metabolic diversity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **2009**, 25, 601–610.
16. Strobel, G. and Daisy, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **2003**, 67, 491–502.
17. Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U. and Harper, J. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*. **2004**, 67, 257–268.
18. You, J.L., Cao, L.X., Liu, G.F., Zhou, S.N., Tan, H.M. and Lin, Y.C. Isolation and characterization of actinomycetes antagonistic to pathogenic *Vibrio* spp. from nearshore marine sediments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **2004**, 21, 679–682.

Output

1. ผลงานตีพิมพ์ระดับนานาชาติจำนวน 12 เรื่อง (ภาคผนวก-reprint)

1. K. Trisuwan, **V. Rukachaisirikul***, Y. Sukpondma, S. Preedanon, S. Phongpaichit and J. Sakayaroj, 2009. Pyrone Derivatives from the Marine-derived Fungus *Nigrospora* sp. PSU-F18, *Phytochemistry*, 70 (3), 554-557.
2. **V. Rukachaisirikul***, N. Khamthong, Y. Sukpondma, C. Pakawatchai, S. Phongpaichit, J. Sakayaroj, and K. Kirtikara, 2009. An [11]Cytochalasin Derivative from the Marine-derived Fungus *Xylaria* sp. PSU-F100, *Chem. Pharm. Bull.*, 57 (12), 1409-1411.
3. U. Sommart, **V. Rukachaisirikul***, Y. Sukpondma, S. Phongpaichit, N. Hutadilok Towatana, P. Graidist, Z. Hajiwangoh, and J. Sakayaroj, 2009. A Cyclohexenone Derivative from Diaporthaceous Fungus PSU-H2, *Arch. Pharm. Res.*, 32 (9), 1227-1231.
4. **V. Rukachaisirikul***, J. Arunpanichlert, Y. Sukpondma, S. Phongpaichit, and J. Sakayaroj, 2009. Metabolites from the Endophytic Fungi *Botryosphaeria rhodina* PSU-M35 and PSU-M114, *Tetrahedron*, 65 (51), 10590-10595.
5. **V. Rukachaisirikul***, N. Khamthong, Y. Sukpondma, S. Phongpaichit, N. Hutadilok Towatana, P. Graidist, J. Sakayaroj, and K. Kirtikara, 2010. Cyclohexene, Diketopiperazine, Lactone and Phenol Derivatives from the Sea Fan-derived Fungi *Nigrospora* sp. PSU-F11 and PSU-F12, *Arch. Pharm. Res.*, 33 (3), 375-380.
6. K. Trisuwan, **V. Rukachaisirikul***, Y. Sukpondma, S. Phongpaichit, S. Preedanon, and J. Sakayaroj, 2010. Furo[3,2-h]isochroman, Furo[3,2-h]isoquinoline, Isochroman, Phenol, Pyranone and Pyrone Derivatives from the Sea Fan-derived Fungus *Penicillium* sp. PSU-F40, *Tetrahedron*, 66 (25), 4484-4489.
7. J. Arunpanichlert, **V. Rukachaisirikul***, Y. Sukpondma, S. Phongpaichit, S. Tewtrakul, N. Rungjindamai, and J. Sakayaroj, 2010. Azaphilone and Isocoumarin Derivatives from the Endophytic Fungus *Penicillium sclerotiorum* PSU-A13, *Chem. Pharm. Bulletin.*, 58 (8), 1033-1036.
8. K. Trisuwan, N. Khamthong, **V. Rukachaisirikul***, S. Phongpaichit, S. Preedanon, and J. Sakayaroj, 2010. Anthraquinone, Cyclopentanone and Naphthoquinone Derivatives from the Sea Fan-Derived Fungi *Fusarium* spp. PSU-F14 and PSU-F135, *J. Nat. Prod.*, 73 (9), 1507-1511.

9. K. Trisuwan, **V. Rukachaisirikul***, S. Phongpaichit, S. Preedanon, and J. Sakayaroj, Modiolide and Pyrone Derivatives from the Sea Fan-Derived Fungus *Curvularia* sp. PSU-F22, *Arch. Pharm. Res.*, 2011, 34 (5), 709-714.
10. S. Klaiklay, **Y. Sukpondma***, V. Rukachaisirikul, N. Hutadilok-Towatana and K. Chareonrat, Flavanone Glucuronides from the Leaves of *Garcinia prainiana*, *Can. J. Chem.*, 2011, 89, 461-464.
11. K. Trisuwan, **V. Rukachaisirikul***, M. Keawpet, S. Phongpaichit, N. Hutadilok-Towatana, S. Preedanon and J. Sakayaroj, Sesquiterpene and Xanthone Derivatives from the Sea Fan-Derived Fungus *Aspergillus sydowii* PSU-F154, *J. Nat. Prod.*, 2011, 74, 1663-1667.
12. **V. Rukachaisirikul***, A. Rodglin, S. Phongpaichit, J. Buatong, J. Sakayaroj, α -Pyrone and Seiricuprolide Derivatives from the Mangrove-derived Fungi *Pestalotiopsis* spp. PSU-MA92 and PSU-MA119, *Phytochem. Lett.* (2011), doi:10.1016/j.phytol.2011.08.008.
2. ผลงานที่ได้รับการตอบรับตีพิมพ์แล้วจำนวน 1 เรื่อง (ภาคผนวก-accepted manuscript)
 - 2.1 N. Khamthong, **V. Rukachaisirikul***, K. Tadpetch, M. Kaewpet, S. Phongpaichit, S. Preedanon, and J. Sakayaroj, Tetrahydroanthraquinone and Xanthone Derivatives from the Marine-Derived Fungus *Trichoderma aureoviride* PSUF95, *Arch. Pharm. Res.*, accepted.
3. ต้นฉบับผลงานจำนวน 5 เรื่อง (ภาคผนวก-manuscript)
 - 3.1 U. Sommart, **V. Rukachaisirikul***, K. Tadpetch, Y. Sukpondma, S. Phongpaichit, N. Hutadilok-Towatana and J. Sakayaroj, Modiolin and Phthalide Derivatives from the Endophytic Fungus *Microsphaeropsis arundinis* PSU-G18.
 - 3.2 O. Supaphon, **S. Phongpaichit***, V. Rukachaisirikul and J. Sakayaroj, Diversity and Antimicrobial Activity of Endophytic Fungi Isolated from the Seagrass *Enhalus acoroides*.
 - 3.3 **W. Pongcharoen***, V. Rukachaisirikul, S. Phongpaichit and J. Sakayaroj, Fungal Metabolites from the Endophytic Fungus *Xylaria* sp. PSU-STD70.
 - 3.4 **K. Panthong***, Y. Srisud, V. Rukachaisirikul, N. Hutadilok-Towatana, S. Piyawan Voravuthikunchai, S. Tewtrakul, Acridone, Benzene, Coumarin and Quinolinone Derivatives from the Roots of *Citrus hystrix*.

- 3.5 **Y. Sukpondma,*** V. Rukachaisirikul, K. Monprasart, N. Hutadilok-Towatana, A. Dihydrochalcone Derivative from the Flowers of *Wedelia trilobata*.
4. ผลงานที่ได้นำเสนอในที่ประชุมวิชาการจำนวน 28 เรื่อง (ภาคผนวก- presentation)
- 4.1 **ระดับนานาชาติ** จำนวน 16 เรื่อง
- 4.1.1 **Kongkiat Trisuwan,** Vatcharin Rukachaisirikul, Souwalak Phongpaichit and Sita Preedanon เรื่อง Fungal Metabolites from the Marine-derived Fungus *Nigrospora* sp. PSU-F18 **แบบโปสเตอร์** ในการประชุม The 6TH Regional IMT-GT Conference 2008 ระหว่างวันที่ 28-30 สิงหาคม 2551 ณ รัฐปีนัง ประเทศมาเลเซีย
- 4.1.2 **Nanthaphong Khamthong,** Vatcharin Rukachaisirikul, Souwalak Phongpaichit, Sita Preedanon and Nongporn Hutadilok-Towatana เรื่อง Cyclohexene derivatives from the marine-derived fungus *Nigrospora* sp. PSU-F11 **แบบโปสเตอร์** ในการประชุม The 6TH Regional IMT-GT Conference 2008 ระหว่างวันที่ 28-30 สิงหาคม 2551 ณ รัฐปีนัง ประเทศมาเลเซีย
- 4.1.3 **Vatcharin Rukachaisirikul** เรื่อง Bioactive substances from *Garcinia* plants and their endophytic fungi ในการประชุม China-Thailand Joint Workshop for Natural Products and Drug Discovery **แบบบรรยาย** ระหว่างวันที่ 14-19 กันยายน 2551 ณ เมืองเจินตู สาธารณรัฐประชาชนจีน
- 4.1.4 **Vatcharin Rukachaisirikul,** Kongkiat Trisuwan, Nanthaphong Khamthong, Yaowapa Sukpondma, Sita Preedanon, Souwalak Phongpaichit and Jariya Sakayaroj เรื่อง Antibacterial Metabolites from the Marine-derived Fungi *Nigrospora* sp. PSU-F5, F11 and F12 **แบบโปสเตอร์** ในการประชุม 3rd International Conference on Cutting-Edge Organic Chemistry ระหว่างวันที่ 19-23 ตุลาคม 2551 ณ เมืองหางโจว สาธารณรัฐประชาชนจีน
- 4.1.5 **Vatcharin Rukachaisirikul,** Kongkiat Trisuwan, Nanthaphong Khamthong, Yaowapa Sukpondma, Jariya Sakayaroj and Souwalak Phongpaichit เรื่อง Metabolites from the Marine-derived Fungi **แบบบรรยาย** ในการประชุมวิชาการ 6th European Conference on Marine Natural Products ระหว่างวันที่ 19-23 กรกฎาคม 2552 ที่เมือง Porto ประเทศโปรตุเกส
- 4.1.6 Sita Preedanon, Jariya Sakayaroj, Sakanan Plathong, Vatcharin Rukachaisirikul, and **Souwalak Phongpaichit** เรื่อง Antimicrobial activity of sea fan-derived fungi **แบบโปสเตอร์** ในการประชุมวิชาการ 6th European Conference on Marine Natural Products ระหว่างวันที่ 19-23 กรกฎาคม 2552 ที่เมือง Porto ประเทศโปรตุเกส

- 4.1.7 **Orathai Supaphon**, Souwalak Phongpaichit, and Vatcharin Rukachaisirikul เรื่อง Isolation of Endophytic Fungi from Seagrass *Thalassia hermipridii* and their Antimicrobial Activity แบบโปสเตอร์ ในการประชุมวิชาการ 11th International Marine and Freshwater Mycology Symposium (IMFMS) ที่ National Museum of Natural Science, Taichung, Taiwan เมื่อวันที่ 16 พฤศจิกายน 2552
- 4.1.8 **Vatcharin Rukachaisirikul** เรื่อง Bioactive Metabolites from Sea Fan-derived Fungi แบบบรรยาย ในการประชุมวิชาการ The Second China-Thailand Workshop on Natural Products and Drug Discovery ระหว่างวันที่ 25-29 พฤศจิกายน 2552 ที่ภูเก็ต
- 4.1.9 **Vatcharin Rukachaisirikul**, Wipapan Pongcharoen, Jiraporn Arunpanichlert, Yaowapa Sukpondma, Souwalak Phongpaichit, and Jariya Sakayaroj เรื่อง Antibacterial Metabolites from the Endophytic Fungi of the Genus *Botryosphaeria* แบบโปสเตอร์ ในการประชุมวิชาการ The 4th International Conference on Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia (ICCEOCA-4) ระหว่างวันที่ 29 พฤศจิกายน-3 ธันวาคม 2552 ที่สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์
- 4.1.10 **Vatcharin Rukachaisirikul**, Kongkiat Trisuwan, Jiraporn Arunpanichlert, Wipapan Pongcharoen, Yaowapa Sukpondma, Souwalak Phongpaichit, and Jariya Sakayaroj เรื่อง Antibacterial Metabolites against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from *Garcinia* Plants and Fungi แบบบรรยาย ในการประชุมวิชาการ PACCON2010 ระหว่างวันที่ 21-23 มกราคม 2553 ที่อุบลราชธานี
- 4.1.11 **Kanda Panthong** and Yuranan Srisud เรื่อง Chemical Constituents from *Citrus hystrix* แบบโปสเตอร์ ในการประชุมวิชาการ PACCON2010 ระหว่างวันที่ 21-23 มกราคม 2553 ที่อุบลราชธานี
- 4.1.12 **ยูนันท์ ศรีสุต** และ กานดา ปานทอง Coumarins from the roots of *Citrus hystrix* แบบโปสเตอร์ ในงานประชุมวิชาการนานาชาติ the 1st Current Drug Development International Conference (1st CDD) วันที่ 6-8 พฤษภาคม 2553 ณ Woraburi Resort & Spa Hotel ภูเก็ต
- 4.1.13 Kongkiat Trisuwan, Nanthaphong Khamthong, Vatcharin Rukachaisirikul, **Souwalak Phongpaichit**, Sita Preedanon, and Jariya Sakayaroj, Anthraquinone, Cyclopentanone and Naphthoquinone Derivatives from the Sea Fan-Derived Fungi *Fusarium* spp. PSU-F14 and PSU-F135 แบบโปสเตอร์ ในการประชุม 9th International Mycological Congress (IMC9)- The Biology of Fungi วันที่ 1-6

สิงหาคม 2553 ณ Edinburgh International Conference Centre and Usher Hall, Edinburgh, Scotland

- 4.1.14 **อุบลทา สมมารต** วัชรินทร์ รุกขไชยศิริกุล เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร นงพร หุตะดิลก โตวัฒนะ และ จริยา สากยโรจน์ Pyrone, Macrolide and Acid Derivatives from the Unidentified Endophytic Fungus PSU-G3, *แบบโปสเตอร์* ใน RACI Natural Products Group Annual One Day Symposium, 1 October 2010, Macquarie University, NSW, Australia
- 4.1.15 **วัชรินทร์ รุกขไชยศิริกุล** Bioactive Metabolites from Endophytic Fungi Isolated from *Garcinia* Plants *แบบบรรยาย* ในการประชุม 7th IMT-GT UNINET and the 3rd Joint International PSU-UNS วันที่ 7-8 ตุลาคม 2553 ณ ศูนย์ประชุมนานาชาติฉลองสิริราชสมบัติครบ 60 ปี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- 4.1.16 **Supaphon, O.,** Phongpaichit, S., Sakayaroj, J. and Rukachaisirikul, V Antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from seagrass, *Enhalus acoroides* *แบบโปสเตอร์* การประชุมวิชาการ International Symposium on Fungal Biodiversity and Resources ที่มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ระหว่างวันที่ 11-13 พฤศจิกายน 2553

4.2 ระดับชาติ จำนวน 12 เรื่อง

- 4.2.1 **Jiraporn Arunpanichlert,** Vatcharin Rukachaisirikul, Souwalak Phongpaichit and Jariya Sakayaroj เรื่อง Metabolites from the Endophytic Fungus *Botryosphaeria rhodina* PSU-M114 ในการวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 34 (วทท. 34) ระหว่างวันที่ 31 ตุลาคม-2 พฤศจิกายน 2551 ณ ศูนย์ประชุมแห่งชาติสิริกิติ์ กรุงเทพมหานคร
- 4.2.2 **Nanthaphong Khamthong,** Vatcharin Rukachaisirikul, Souwalak Phongpaichit, Sita Preedanon, Nongporn Hutadilok-Towatana and Jariya Sakayaroj เรื่อง Metabolites from the Marine-derived Fungus *Nigrospora* sp. PSU-F12 ในการวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 34 (วทท. 34) ระหว่างวันที่ 31 ตุลาคม-2 พฤศจิกายน 2551 ณ ศูนย์ประชุมแห่งชาติสิริกิติ์ กรุงเทพมหานคร
- 4.2.3 **ก้องเกียรติ ไตรสุวรรณ** วัชรินทร์ รุกขไชยศิริกุล เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร ลิดา ปรีดานนท์ และ จริยา สากยโรจน์ Metabolites from the marine-derived fungus *Penicillium* sp. PSU-F40 *แบบโปสเตอร์* การประชุม PRECH-CIC Congress VI 3-6 พฤษภาคม 2552 โรงแรมจอมเทียน ปาล์มบีช ชลบุรี
- 4.2.4 **อุบลทา สมมารต** วัชรินทร์ รุกขไชยศิริกุล เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร และ ชูโบ๊ะตะ หะยิ วาเราะ Cyclohexenone, Mycoepoxydiene and Dothiorelone Derivatives from

- Diaporthaceous Fungus PSU-H2 *แบบโปสเตอร์* การประชุม PRECH-CIC Congress VI 3-6 พฤษภาคม 2552 โรงแรมจอมเทียน ปาล์มบีช ชลบุรี
- 4.2.5 **จิราพร อรุณพานิชเลิศ** วชรินทร์ รุกขไชยศิริกุล เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร และ จริยา สากยโรจน์ Metabolite from the endophytic fungi: *Botryosphaeria rhodina* PSU-M35 and PSU-M114 *แบบโปสเตอร์* การประชุม PRECH-CIC Congress VI 3-6 พฤษภาคม 2552 โรงแรมจอมเทียน ปาล์มบีช ชลบุรี
- 4.2.6 **ยรนนท์ ศรีสุด** กานดา ปานทอง และ ปัทมา พิทยขจรวุฒิ องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากรากมะกรูด (*Citrus hystrix*) *แบบปากเปล่า* การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเพื่อเยาวชน ครั้งที่ 3 22-23 มีนาคม 2009 ศูนย์ประชุมไบเทค บางนา กรุงเทพฯ
- 4.2.7 **Jiraporn Arunpanichlert**, Vatcharin Rukachaisirikul, Souwalak Phongpaichit, and Jariyu Buatong เรื่อง Metabolites from the Endophytic Fungus *Botryosphaeria rhodina* PSU-M35 *แบบโปสเตอร์* ในการวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 35 (วทท. 35) ระหว่างวันที่ 15-17 ตุลาคม 2552 ณ เดอะ ไทด์ รีสอร์ท ชลบุรี
- 4.2.8 **Nanthaphong Khamthong**, Vatcharin Rukachaisirikul, Souwalak Phongpaichit, Sita Preedanon, and Jariya Sakayaroj เรื่อง Metabolites from the Marine-derived Fungus *Fusarium* sp. PSU-F135 *แบบโปสเตอร์* ในการวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 35 (วทท. 35) ระหว่างวันที่ 15-17 ตุลาคม 2552 ณ เดอะ ไทด์ รีสอร์ท ชลบุรี
- 4.2.9 **Saranyoo Klaiklay**, yaowapa Sukpondma, Vatcharin Rukachaisirikul, Kanokphorn Chareonrat and Salinla Sriyapai เรื่อง Chemical Constituents from *Garcinia prainiana* *แบบโปสเตอร์* ในการวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 35 (วทท. 35) ระหว่างวันที่ 15-17 ตุลาคม 2552 ณ เดอะ ไทด์ รีสอร์ท ชลบุรี
- 4.2.10 **อุบลทา สมมาตร** วชรินทร์ รุกขไชยศิริกุล เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร และ จริยา สากยโรจน์ Metabolites from the Fungus *Microsphaeropsis arundinis* PSU-H18 *แบบโปสเตอร์* ในการประชุม RGJ-Ph.D. Congress XI 1-3 เมษายน 2553 โรงแรมจอมเทียน ปาล์มบีช ชลบุรี
- 4.2.11 **ก้องเกียรติ ไตรสุวรรณ** วชรินทร์ รุกขไชยศิริกุล เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร ลิดา ปรีดานนท์ และ จริยา สากยโรจน์ Fungal metabolites from the marine-derived fungi *Nigrospora* sp. *แบบบรรยาย* PSU-F5 and PSU-F18 การประชุม RGJ-Ph.D. Congress XI 1-3 เมษายน 2553 โรงแรมจอมเทียน ปาล์มบีช ชลบุรี

- 4.2.12 **นันทพงศ์ จำทอง** เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร ลีดา ปริดานนท์ จริยา สากยโรจน์ และ
 วัชรินทร์ รุกขไชยศิริกุล โครโมนและแซนโทนจากเชื้อราทะเล *Trichoderma* sp. PSU-
 F95 **แบบโปรสเตอร์** ในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
 ครั้งที่ 36 (วทท. 36) 26-28 ตุลาคม 2553 ศูนย์นิทรรศการและการประชุมไบเทค
 กรุงเทพมหานคร
5. นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาที่สำเร็จการศึกษาแล้ว
- 5.1 **ปริญญาเอก** จำนวน 2 คน ได้แก่
- 5.1.1 นายก่อเกียรติ ไตรสุวรรณ ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเคมีอินทรีย์
- 5.1.2 นางสาวอุบลทา สมมาตร ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเคมีอินทรีย์
- 5.2 **ปริญญาโท** จำนวน 9 คน ได้แก่
- 5.2.1 นางสาวจิราพร อรุณพานิชเลิศ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีอินทรีย์
- 5.2.2 นายศรัณยู ไคลคล้าย วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีอินทรีย์
- 5.2.3 นายนันทพงศ์ จำทอง วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีอินทรีย์
- 5.2.4 นายเอกชัย รอดกลิ่น วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีอินทรีย์
- 5.2.5 นายสาธิต บัวดำ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีอินทรีย์
- 5.2.6 นางสาวศิริกานต์ กันนัย วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา
- 5.2.7 น.ส. จิรายุ บัวทอง วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา
- 5.2.8 น.ส. ศิริสุข ด้วงสุข วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา
- 5.2.9 น.ส. ประไพพิศ เชาวลิต วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา
6. สมาชิกใหม่จำนวน 4 ท่าน คือ ดร. วิภาพรณ พงศ์เจริญ ดร. สุมาลี เลี่ยมทอง ดร. บุญสม
 บุญบรรณ และ ดร. มรกต แก้วเพชร จากราชภัฏสงขลา ราชภัฏนครศรีธรรมราช
 มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ตามลำดับ
7. ความร่วมมือในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพกับ Professor Dr. Xu Shen, Shanghai Institute of
 Materia Medica สาธารณรัฐประชาชนจีน

ภาคผนวก

Reprint จำนวน 12 เรื่อง



Metabolites from the endophytic fungi *Botryosphaeria rhodina* PSU-M35 and PSU-M114

Vatcharin Rukachaisirikul^{a,*}, Jiraporn Arunpanichlert^a, Yaowapa Sukpondma^a,
Souwalak Phongpaichit^b, Jariya Sakayaroj^c

^a Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla 90112, Thailand

^b Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla 90112, Thailand

^c National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Thailand Science Park, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 June 2009

Received in revised form 10 October 2009

Accepted 22 October 2009

Available online 25 October 2009

Keywords:

Botryosphaeria rhodina

Dimeric γ -lactone

Hexahydroindenofuran

Antibacterial activity

ABSTRACT

Three dimeric γ -lactones (**1–3**), one dihydronaphthalene-2,6-dione (**4**), one hexahydroindenofuran (**5**), one cyclopentanone (**6**), and one lasiodiplodin (**7**) were isolated from the endophytic fungi *Botryosphaeria rhodina* PSU-M35 and PSU-M114 along with twelve known metabolites. The structures and the proposed stereochemistry of the new metabolites were established by spectral data analysis. The isolated compounds were submitted for evaluation of the antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, both standard and methicillin-resistant strains.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Various types of compounds were isolated from the genus *Botryosphaeria*. Some of them showed interesting biological activities such as antibacterial primin,¹ antiseptic mellein,² phytotoxic 4-hydroxymellein,³ and antimicrobial lasiodiplodin.⁴ In our ongoing search on bioactive metabolites from endophytic fungi, the broth extracts of two endophytic fungi, *B. rhodina* PSU-M35 and PSU-M114, displayed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, both standard ATCC 25922 (SA) and methicillin-resistant (MRSA) strains. We describe herein the isolation of three new dimeric γ -lactones (**1–3**), one new dihydronaphthalene-2,6-dione (**4**), one new hexahydroindenofuran (**5**) together with two known compounds, dihydro-4-(hydroxymethyl)-3,5-dimethyl-2(3H)-furanone (**8**)⁵ and (3S,4S)-(-)-4-acetyl-3-methyl-2(3H)-dihydrofuranone (**9**)⁶ from *B. rhodina* PSU-M35. In addition, one new carboxylic acid derivative (**6**) and one new lasiodiplodin derivative (**7**) as well as ten known ones, (3S)-lasiodiplodin (**10**),⁷ (5R)-hydroxylasiodiplodin (**11**),⁸ (5S)-hydroxylasiodiplodin (**12**),⁸ (R)-(-)-mellein (**13**),⁹ cis-(3R,4R)-(-)-4-hydroxymellein (**14**),¹⁰ trans-(3R,4S)-(-)-4-hydroxymellein (**15**),¹⁰ (R)-(-)-5-hydroxymellein (**16**),¹¹ (R)-(-)-2-octeno- δ -lactone (**17**),¹² tetrahydro-4-hydroxy-6-propylpyran-2-one (**18**),¹³

and 6-methylsalicylic acid (**19**)¹⁴ were obtained from *B. rhodina* PSU-M114. Their antibacterial activity against SA and MRSA strains was examined.

2. Results and discussion

The endophytic fungi PSU-M35 and PSU-M114 were isolated from the leaves of *Garcinia mangostana*. As neither conidia nor spores were observed, these fungi were identified based on the analyses of the nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) regions. The ITS sequences of PSU-M35 (EF564146) and PSU-M114 (EF564147) are well placed in the *B. rhodina* subclade comprising nine sequences of *B. rhodina*. (DQ008312, DQ008311, DQ008310, DQ008309, DQ008308, DQ307677, AY568635, AY9412180 and AY745998) with 89% statistical support and sequence similarity between 99.2 and 100.0%. Moreover, sequence similarity between PSU-M35 and PSU-M114 was 98.7%. These fungi were then identified as *B. rhodina*.

The crude EtOAc extract from the culture broth of the fungus PSU-M35 was subjected to various chromatographic techniques, leading to the isolation of five new (**1–5**) and two known (**8–9**) compounds. All metabolites except for compound **4** were γ -lactone derivatives. One new compound (**6**) along with ten known ones (**10–19**) were obtained from the broth extract of the fungus PSU-M114. In addition, investigation of the mycelial extract afforded one new metabolite (**7**). Compounds **11** and **12** were isolated as their

* Corresponding author. Tel.: +66 74 288 435; fax: +66 74 212 918.

E-mail address: vatcharin.r@psu.ac.th (V. Rukachaisirikul).

acetate derivative. Their structures were elucidated by analysis of spectroscopic data, including IR, UV, NMR and MS. The relative configuration was assigned according to NOEDIFF results. In addition, the absolute configuration of compounds **1–3** and **8** was proposed on the basis of the known absolute configuration of **9**. It is worth to note that compounds **1–3** were not artifacts formed from the monomers **8** and **9** as their anomeric protons (H-10) were present in the ^1H NMR spectrum of the fraction obtained from the first chromatographic separation of the crude extract.

Botryosphaerilactone A (**1**) was obtained as a colorless gum with $[\alpha]_D^{27} -1.2$ (c 0.77, MeOH). The UV spectrum showed a maximum absorption band at λ_{max} 286 nm. Its IR spectrum exhibited absorption bands at 3438 and 1770 cm^{-1} for hydroxyl and γ -lactone carbonyl groups, respectively. The HREIMS showed the molecular formula $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{O}_5$, corresponding to three degrees of unsaturation. The ^1H NMR spectral data (Table 1) consisted of signals for the γ -lactone identical to those of **8**, three methine protons [δ_{H} 4.31 (dq, $J=9.0$ and 6.5 Hz , 1H), 2.54 (dq, $J=11.5$ and 7.2 Hz , 1H) and 1.92 (m, 1H)], two nonequivalent oxymethylene protons [δ_{H} 3.85 (dd, $J=10.2$ and 4.2 Hz , 1H) and 3.41 (dd, $J=10.2$ and 5.4 Hz , 1H)] and two methyl groups [δ_{H} 1.43 (d, $J=6.5\text{ Hz}$, 3H) and 1.27 (d, $J=7.2\text{ Hz}$, 3H)]. The ^1H – ^1H COSY and HMBC data as well as the ^{13}C NMR data supported the presence of this moiety.

Table 1
NMR data for botryosphaerilactones A (**1**), B (**2**) and C (**3**)

Position	1		2		3		HMBC
	δ_{H} , mult, J in Hz	δ_{C} , mult.	δ_{H} , mult, J in Hz	δ_{C} , mult.	δ_{H} , mult, J in Hz	δ_{C} , mult.	
2		178.7, qC		178.6, qC		178.8, qC	
3	2.54, dq, 11.5, 7.2	38.3, CH	2.52, m	38.1, CH	2.58, dq, 11.5, 7.0	38.2, CH	C-2, C-4, C-7, C-8
4	1.92, m	51.4, CH	1.86, m	51.4, CH	1.93, m	51.6, CH	C-3, C-5, C-6, C-7, C-8
5	4.31, dq, 9.0, 6.5	77.5, CH	4.26, dq, 9.5, 6.0	77.3, CH	4.33, dq, 9.0, 6.0	77.6, CH	C-8
6	1.43, d, 6.5	20.0, CH_3	1.41, d, 6.0	19.9, CH_3	1.45, d, 6.0	20.0, CH_3	C-4, C-5
7	1.27, d, 7.2	14.2, CH_3	1.24, d, 7.0	14.1, CH_3	1.27, d, 7.0	14.0, CH_3	C-2, C-3, C-4
8	a: 3.85, dd, 10.2, 4.2 b: 3.41, dd, 10.2, 5.4	65.4, CH_2	a: 3.78, dd, 10.0, 4.5 b: 3.36, dd, 10.0, 5.5	64.9, CH_2	a: 3.86, dd, 10.0, 5.5 b: 3.40, dd, 10.0, 4.0	64.5, CH_2	C-3, C-4, C-5, C-10
10	4.68, d, 1.5	109.9, CH	4.69, d, 2.0	109.5, CH	4.79, d, 4.5	105.0, CH	C-8, C-12, C-13, C-14
12	3.98, dq, 7.5, 6.0	77.5, CH	a: 4.20, dd, 9.0, 7.0 b: 4.06, t, 9.0	67.0, CH_2	4.06, dq, 8.5, 6.5	79.4, CH	C-10, C-13, C-16
13	1.54, m	55.7, CH	2.70, m	58.5, CH	1.74, m	52.9, CH	C-10, C-15, C-16, C-17
14	2.03, m	43.9, CH	2.52, m	43.3, CH	2.08, m	41.5, CH	C-10, C-15, C-16
15	1.14, d, 7.2	18.5, CH_3	1.18, d, 7.0	18.0, CH_3	1.03, d, 7.0	12.0, CH_3	C-10, C-13, C-14
16	a: 3.71, dd, 10.0, 5.0 b: 3.68, dd, 10.0, 5.0	63.5, CH_2		205.5, qC	a: 3.80, dd, 10.0, 4.5 b: 3.66, dd, 10.0, 6.0	62.6, CH_2	C-12, C-13, C-14
17	1.35, d, 6.0	20.9, CH_3	2.19, s	29.0, CH_3	1.32, d, 6.5	23.2, CH_3	C-12, C-13

The remaining proton signals belonged to a γ -lactol derivative of **8**. The following ^1H – ^1H COSY and HMBC correlations were in agreement with this conclusion. In the ^1H – ^1H COSY spectrum, the anomeric proton, H-10 (δ_{H} 4.68), was coupled with H-14 (δ_{H} 2.03), which was further coupled with H-13 (δ_{H} 1.54) and H₃-15 (δ_{H} 1.14). The same correlations of H-13/H-12 (δ_{H} 3.98), H-14 and H₂-16 (δ_{H} 3.71 and 3.68) and H-12/H₃-17 (δ_{H} 1.35) were also observed. A 3J HMBC correlation of H-10 with C-12 (δ_{C} 77.5) together with the chemical shift of C-10 (δ_{C} 109.9) established the lactol unit having the methyl groups at C-12 and C-14 and the hydroxymethyl group at C-13. The ether linkage between C-8 (δ_{C} 65.4) of the lactone unit with C-10 of the lactol ring was established according to a HMBC correlation of H₂-8 with C-10 as well as that of H-10 with C-8.

The relative configuration of the lactone ring was identical to that of **8** on the basis of signal enhancement of H₃-6 and H₃-7 upon irradiation of H-4 in the NOEDIFF experiment. In addition, the lactol unit displayed signal enhancement of H₃-15 and H₃-17 after irradiation H-13. These NOEDIFF results were identical to those of the lactone ring. Moreover, irradiation of H₃-15 affected the signal intensity of H-10, thus indicating their *cis*-orientation. As compounds **1** and **8** were co-metabolites, we proposed that **1** would be derived in nature from two molecules of **8**. The spatial arrangement of both

rings would be the same as that of **8**. Consequently, the absolute configuration in **1** was proposed to be 3*S*, 4*R*, 5*R*, 10*S*, 12*R*, 13*R* and 14*S* on the basis of known absolute configuration of its cometabolite **8**. Consequently, botryosphaerilactone A had the structure **1** (Fig. 1).

Botryosphaerilactone B (**2**) was obtained as a colorless gum with $[\alpha]_D^{26} +4.5$ (c 0.57, MeOH). The UV and IR spectra were similar to those of **1**. The HREIMS showed the molecular formula $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_5$, indicating that **2** contained one degree of unsaturation more than **1**. The ^1H NMR spectral data (Table 1) were similar to those of **1** except for proton signals of the lactol ring. The hydroxymethylene protons [δ_{H} 3.71 (dd, $J=10.0$ and 5.0 Hz , 1H) and 3.68 (dd, $J=10.0$ and 5.0 Hz , 1H)] in **1** were replaced, in **2**, by the methyl protons of an acetyl group (δ_{H} 2.19, s, 3H). The attachment of the acetyl group at C-13 (δ_{C} 58.5) of the lactol unit was supported by a HMBC correlation of H₃-17 with C-13. In addition, the oxymethylene proton (δ_{H} 3.98) and the coupled methyl protons (δ_{H} 1.35) in **1** were substituted by two nonequivalent oxymethylene protons [δ_{H} 4.20 (dd, $J=9.0$ and 7.0 Hz , 1H) and 4.06 (t, $J=9.0\text{ Hz}$, 1H)] in **2**. These results established the lactol with the acetyl and methyl groups at C-13 and C-14, respectively. Irradiation of H-14 (δ_{H} 2.52, m, 1H) in the NOEDIFF experiment enhanced signal intensity of H₃-15 (δ_{H} 1.18) and H₃-17 (δ_{H} 2.19), but not H-10, indicating *trans*-relationship between H-10

and H-14. These results indicated that the configuration of C-10, C-13 and C-14 was identical to that of **1**. Thus, botryosphaerilactone B (**2**) was assigned as a new dimeric γ -lactone, which would be derived from the condensation of **8** and a lactol derivative of **9**.

Botryosphaerilactone C (**3**) was obtained as a colorless gum with $[\alpha]_D^{26} +5.2$ (c 0.77, MeOH). The UV, IR, ^1H (Table 1) and ^{13}C NMR (Table 1) spectra were almost identical to those of **1**. Furthermore, the HREIMS of **1** and **3** displayed the same molecular formula. These results indicated that **3** might be an isomer of **1**. Irradiation of H-14 affected the signal intensity of H-10 (δ_{H} 4.79) and H_{ab}-16 (δ_{H} 3.80 and 3.66), indicating their *cis*-relationship. Thus, botryosphaerilactone C (**3**) was assigned as a C-10 epimer of **1**.

Botryosphaeridione (**4**) was obtained as a pale yellow gum with $[\alpha]_D^{27} -13.2$ (c 0.68, MeOH). The UV spectrum showed maximum absorption bands at λ_{max} 242 and 289 nm. Its IR spectrum displayed absorption bands at 3354 and 1673 cm^{-1} for hydroxyl and conjugated carbonyl groups, respectively. The HREIMS showed the molecular formula $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_3$, indicating that compound **4** consisted of seven degrees of unsaturation. The ^1H NMR spectral data (Table 2) exhibited signals of *cis*-olefinic protons of an α,β -unsaturated carbonyl unit (δ_{H} 7.22, d, $J=10.2\text{ Hz}$, 1H and 6.20, d, $J=10.2\text{ Hz}$, 1H), two olefinic protons of trisubstituted double bonds (δ_{H} 6.64, s, 1H and

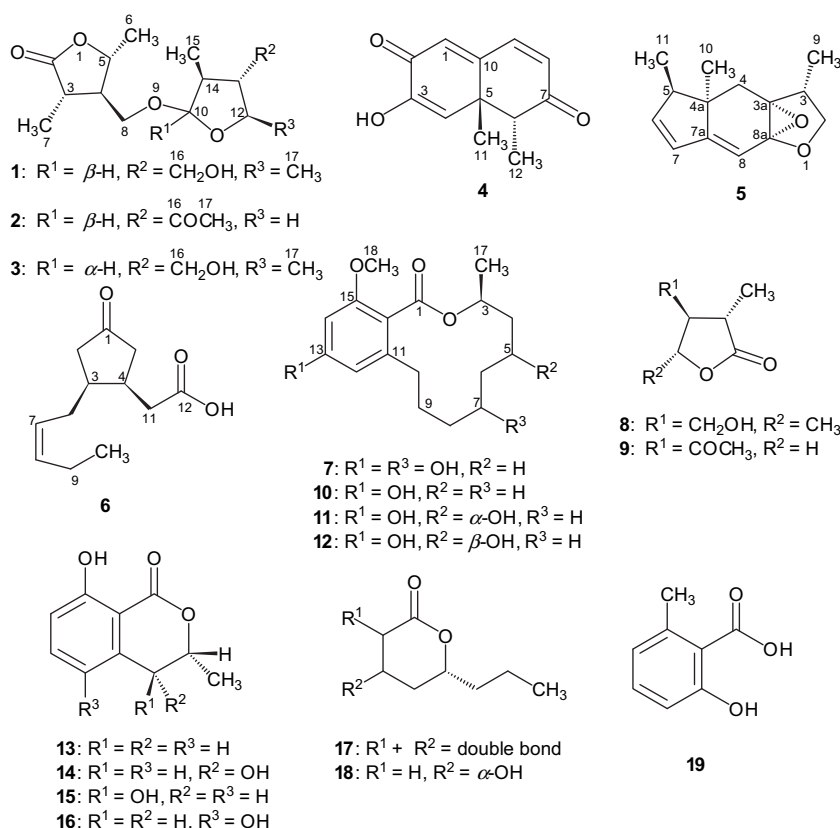


Figure 1. Metabolites isolated from the endophytic fungi *B. rhodina* PSU-M35 and PSU-M114.

6.06, s, 1H), one hydroxy proton (δ_{H} 6.41, s, 1H), one methine proton (δ_{H} 2.64, q, $J=7.2$ Hz, 1H) and two methyl groups (δ_{H} 1.39, s, 3H and 0.91, d, $J=7.2$ Hz, 3H). The ^{13}C NMR spectrum (Table 2) showed two ketone carbonyl (δ_{C} 201.0 and 181.4), three quaternary (δ_{C} 158.2, 148.2 and 45.7), five methine (δ_{C} 141.5, 129.7, 128.1, 123.7 and 53.4) and two methyl (δ_{C} 29.4 and 15.6) carbons. In the ^1H – ^1H COSY spectrum, the methyl protons, H₃–12 (δ_{H} 0.91), were correlated with H-6 (δ_{H} 2.64) while one of the *cis*-olefinic protons of the α,β -unsaturated carbonyl unit, H-8 (δ_{H} 6.20), gave a cross peak with the other one, H-9 (δ_{H} 7.22). The HMBC correlations of both H-6 and H-9 with C-5 (δ_{C} 45.7), C-7 (δ_{C} 201.0) and C-10 (δ_{C} 158.2) as well as the chemical shift of C-10 established a cyclohexenone unit with the methyl group and an exocyclic double bond at C-6 (δ_{C} 53.4) and C-10, respectively. The location of the methyl group was confirmed on the basis of the HMBC cross peaks of these methyl protons with C-5, C-6 and C-7. The 3J HMBC correlations of the olefinic proton, H-1 (δ_{H} 6.64), with C-5 and C-9 (δ_{C} 141.5) further implied that the exocyclic double bond was the trisubstituted one.

Table 2
NMR data for botryosphaeridione (4)

Position	δ_{H} , mult, J in Hz	δ_{C} , mult.	HMBC correlation
1	6.64, s	128.1, CH	C-3, C-5, C-9
2	181.4, qC		
3-OH	6.41, s	148.2, qC	C-2, C-3, C-4
4	6.06, s	123.7, CH	C-2, C-3, C-5, C-6, C-10, C-11
5		45.7, qC	
6	2.64, q, 7.2	53.4, CH	C-5, C-7, C-10, C-11, C-12
7		201.0, qC	
8	6.20, d, 10.2	129.7, CH	C-6, C-9, C-10
9	7.22, d, 10.2	141.5, CH	C-1, C-5, C-7, C-10
10		158.2, qC	
11	1.39, s	29.4, CH ₃	C-3, C-4, C-5, C-6, C-10
12	0.91, d, 7.2	15.6, CH ₃	C-5, C-6, C-7

The hydroxy proton, 3-OH (δ_{H} 6.41), showed HMBC cross peaks with C-2 (δ_{C} 181.4), C-3 (δ_{C} 148.2) and C-4 (δ_{C} 123.7) while the remaining olefinic proton, H-4 (δ_{H} 6.06), was correlated with C-2. Thus, a 2-hydroxypropenonyl unit was constructed. The HMBC correlations of H-4/C-6 and C-10 and that of H-1/C-3 established a naphthalenedione skeleton by connecting C-1 and C-5 of above cyclohexenone with C-2 and C-4 of the 2-hydroxypropenonyl unit, respectively. The remaining methyl protons, H₃–11 (δ_{H} 1.39), exhibited the HMBC correlations with C-4, C-5 and C-10 (δ_{C} 158.17), connecting the methyl group at C-5. The relative configuration of compound 4 was assigned by the NOEDIFF results. Irradiation of H-6 enhanced signal intensity of H₃–11, indicating their *cis*-relationship. Therefore, botryosphaeridione (4) was assigned as a new dihydronaphthalene-2,6-dione derivative.

Botryosphaerihydrofuran (5) was obtained as a colorless gum with $[\alpha]_{\text{D}}^{27} -23.8$ (c 0.14, MeOH). The UV spectrum displayed absorption bands at λ_{max} 220 and 280 nm. The IR spectrum showed an absorption band at 1664 cm^{-1} for a double bond functional group. The HREIMS displayed the molecular formula $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_2$, implying the presence of six degrees of unsaturation. The ^1H NMR data (Table 3) consisted of signals of *cis*-olefinic protons [δ_{H} 6.89 (d, $J=10.0$ Hz, 1H) and 5.90 (d, $J=10.0$ Hz, 1H)], one olefinic proton of a trisubstituted double bond (δ_{H} 6.01, s, 1H), two sets of nonequivalent methylene protons [δ_{H} 4.15 (t, $J=9.0$ Hz, 1H) and 3.40 (t, $J=9.0$ Hz, 1H); 1.76 (d, $J=14.5$ Hz, 1H) and 1.49 (d, $J=14.5$ Hz, 1H)], two methine protons [δ_{H} 2.52 (m, 1H) and 2.31 (m, 1H)] and three methyl groups [δ_{H} 1.41 (s, 3H), 1.05 (d, $J=7.0$ Hz, 3H) and 0.99 (d, $J=7.0$ Hz, 3H)]. The ^{13}C NMR spectrum (Table 3) showed four quaternary (δ_{C} 139.3, 99.4, 77.0 and 38.8), five methine (δ_{C} 143.6, 131.7, 126.4, 53.6 and 43.4), two methylene (δ_{C} 71.3 and 33.1) and three methyl (δ_{C} 27.8, 14.4 and 8.9) carbons. The ^1H – ^1H COSY spectrum showed cross peaks of H₃–11 (δ_{H} 0.99)/H-5 (δ_{H} 2.31) and H-6 (δ_{H} 5.90)/H-5 and H-7 (δ_{H} 6.89). The HMBC spectrum displayed correlations of H-5/C-4a (δ_{C} 38.8), C-7a

(δ_C 139.3), C-10 (δ_C 27.8) and C-11 (δ_C 14.4), H-7/C-4a, C-7a and C-8 (δ_C 131.7) and H₃-10 (δ_H 1.41)/C-4 (δ_C 33.1), C-4a, C-5 and C-7a. Furthermore, C-4 and C-8 gave HMQC cross peaks with H_{ab}-4 (δ_H 1.76 and 1.49) and H-8 (δ_H 6.01), respectively. These results together with HMBC correlations of H-8 with C-4a and C-7a and those of H_{ab}-4 with C-4a and C-5 established a cyclopentene having a *cis*-double bond at C-6 and C-7, two methyl groups at C-4a and C-5 as well as an exocyclic trisubstituted double bond and one methylene unit at C-7a and C-4a, respectively.

Table 3
NMR data for botryosphaerihydrofuran (**5**)

Position	δ_H , mult, <i>J</i> in Hz	δ_C , mult.	HMBC correlation
2	a: 4.15, t, 9.0 b: 3.40, t, 9.0	71.3, CH ₂	C-3, C-3a, C-8a, C-9
3	2.52, m	43.4, CH	C-3, C-9
3a		77.0, qC	C-3a, C-4
4	a: 1.76, d, 14.5 b: 1.49, d, 14.5	33.1, CH ₂	C-3a, C-4a, C-5, C-10 C-3a, C-4a, C-5, C-7a, C-8a, C-10
4a		38.8, qC	
5	2.31, m	53.6, CH	C-4a, C-7a, C-10, C-11
6	5.90, d, 10.0	126.4, CH	C-5, C-7a
7	6.89, d, 10.0	143.6, CH	C-4a, C-7a, C-8
7a		139.3, qC	
8	6.01, s	131.7, CH	C-3a, C-4a, C-7
8a		99.4, qC	
9	1.05, d, 7.0	8.9, CH ₃	C-2, C-3, C-3a
10	1.41, s	27.8, CH ₃	C-4, C-4a, C-5, C-7a
11	0.99, d, 7.0	14.4, CH ₃	C-4a, C-5

The methine proton, H-3 (δ_H 2.52), was coupled with H_{ab}-2 (δ_H 4.15 and 3.40) and H₃-9 (δ_H 1.05) in the 1H - 1H COSY spectrum. The HMBC correlations of H₃-9/C-2 (δ_C 71.3), C-3 (δ_C 43.4) and C-3a (δ_C 77.0) and H_{ab}-2/C-3a, C-8a (δ_C 99.4) and C-9 (δ_C 8.9) together with the chemical shift of C-2 established a tetrahydrofuran moiety with a methyl group at C-3. The chemical shifts at C-3a and C-8a established an epoxide unit at these carbons. The linkage between C-3a and C-4 and that between C-8a and C-8 (δ_C 131.7) were established according to the HMBC correlations of H-4 with C-3a and C-8a and that of H-8 with C-3a to form a tetracyclic skeleton. Irradiation of the methine proton, H-5 (δ_H 2.31), in the NOEDIFF experiment enhanced signal intensity of H₃-10, indicating their *cis*-relationship. In addition, signal intensity of H_a-4 was enhanced after irradiation of either H₃-9 or H₃-11. These results together with the molecular model (Fig. 2) established the relative configuration as shown. Therefore, botryosphaerihydrofuran was assigned to have the structure **5** (Fig. 1).

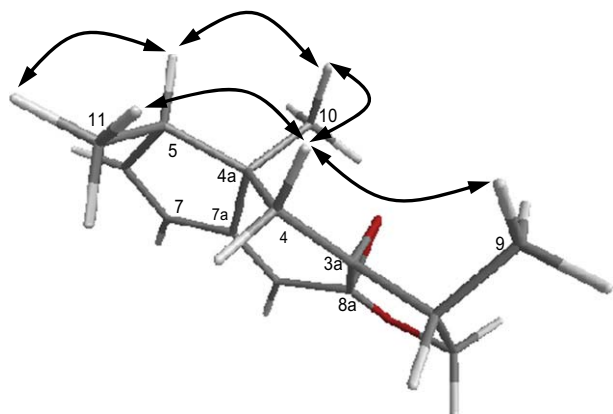


Figure 2. Selected NOEDIFF data of botryosphaerihydrofuran (**5**).

Botryosphaerinone (**6**) was obtained as a colorless gum with $[\alpha]_D^{25}$ -23.2 (*c* 0.14, MeOH). The IR spectrum exhibited absorption bands at 3441 and 1728 cm^{-1} for hydroxyl and carbonyl groups, respectively. The HREIMS showed the molecular formula $C_{12}H_{18}O_3$. The 1H NMR spectral data (Table 4) exhibited signals of *cis*-olefinic protons [δ_H 5.39 (dt, *J*=10.5, 7.2 and 1.2 Hz, 1H) and 5.19 (m, 1H)], two methine protons [δ_H 2.29 (m, 1H) and 1.85 (m, 1H)], five sets of methylene protons [δ_H 2.68 (dd, *J*=18.5 and 7.8 Hz, 1H) and 2.28 (m, 1H); 2.31 (m, 2H); 2.25 (m, 1H) and 1.45 (m, 1H); 2.22 (m, 1H) and 2.05 (m, 1H); 1.98 (m, 2H)] and one methyl group [δ_H 0.89 (t, *J*=7.5 Hz, 3H)]. The ^{13}C NMR spectrum (Table 4) showed one ketone carbonyl (δ_C 219.0), one carboxylic carbonyl (δ_C 177.5), four methine (δ_C 134.2, 124.8, 53.9 and 37.8), five methylene (δ_C 38.6, 37.7, 27.2, 25.5 and 20.6) and one methyl (δ_C 14.1) carbons. In the 1H - 1H COSY spectrum, the methyl protons, H₃-10 (δ_H 0.89), were coupled with H₂-9 (δ_H 1.98), which were further coupled with H-8 (δ_H 5.39). The same correlations of H-7 (δ_H 5.19)/H-8 and H₂-6 (δ_H 2.31) and those of H-3 (δ_H 1.85)/H_{ab}-2 (δ_H 2.22 and 2.05) and H₂-6 were also observed. These results indicated the presence of a $CH_3CH_2CH=CHCH_2CHCH_2$ unit. In addition, a CH_2CHCH_2COOH unit was established on the basis of the 1H - 1H COSY correlations of H-4/H_{ab}-5 (δ_H 2.25 and 1.45) and H_{ab}-11 (δ_H 2.68 and 2.28) as well as the HMBC correlations of both H-4 and H_{ab}-11 with the carboxylic carbon, C-12 (δ_C 177.5). The HMBC correlations of H_{ab}-2 and H-4 with C-1 (δ_C 219.0) and a 1H - 1H COSY cross peak between H-3 and H-4 established a cyclopentanone ring having a (2*Z*)-pentenyl unit at C-3 (δ_C 53.9) and a carboxymethyl substituent at C-4 (δ_C 37.8). In the NOEDIFF experiment, irradiation of H-3 affected signal intensity of H-4, indicating their *cis*-relationship. Therefore, botryosphaerinone (**6**) was assigned as a new cyclopentanone carboxylic acid.

Table 4
NMR data for botryosphaerinone (**6**)

Position	δ_H , mult, <i>J</i> in Hz	δ_C , mult.	HMBC correlation
1		219.0, qC	
2	a: 2.22, m b: 2.05, m	37.7, CH ₂	C-1, C-5
3	1.85, m	53.9, CH	C-2, C-4, C-6, C-11
4	2.29, m	37.8, CH	C-1, C-12
5	a: 2.25, m b: 1.45, m	27.2, CH ₂	C-2, C-4, C-11
6	2.31, m	25.5, CH ₂	C-2, C-3, C-7, C-8
7	5.19, m	124.8, CH	C-6, C-8, C-9
8	5.39, dt, 10.5, 7.2, 1.2	134.2, CH	C-6, C-7, C-9, C-10
9	1.98, m	20.6, CH ₂	C-7, C-8, C-10
10	0.89, t, 7.5	14.1, CH ₃	C-8, C-9
11	a: 2.68, dd, 18.5, 7.8 b: 2.28, m	38.6, CH ₂	C-3, C-4, C-5, C-12
12		177.5, qC	

Botryosphaeriodiplodin (**7**) was obtained as a colorless gum with $[\alpha]_D^{25}$ -9.8 (*c* 0.70, $CHCl_3$). The UV and IR spectra were similar to those of **10**. The HREIMS showed the molecular formula $C_{17}H_{24}O_5$, 16 mass units higher than that of **10**. The 1H NMR spectral data (Table 5) were similar to those of **10** except that proton signal of one methylene group in **10** was replaced, in **7**, by an oxymethine proton (δ_H 3.78, m). This was confirmed by the presence of two oxymethine (δ_C 72.2 and 68.0) and six methylene carbons in the ^{13}C NMR spectrum instead of one oxymethine and seven methylene carbons in **10**. This oxymethine proton was attributed to H-7 due to the 1H - 1H COSY correlations of H_{ab}-10 (δ_H 2.71 and 2.51)/H_{ab}-9 (δ_H 1.92 and 1.52), and H_{ab}-8 (δ_H 1.49 and 1.31)/H-7 and H_{ab}-9. In addition, H-7 displayed a HMBC correlation with C-9 (δ_C 26.6). A hydroxyl group was attached at C-7 (δ_C 68.0) on the basis of the chemical shift of C-7. Thus, botryosphaeriodiplodin (**7**) was assigned as a new lasiodiplodin derivative. The configuration at C-3 was purposed to be identical to that of **10**. However, the NOEDIFF data obtained were inadequate for the assignment of the relative

configuration at C-7. Analysis of the absolute configuration at C-7 was not performed as **7** was obtained in low quantity.

Table 5
NMR data for botryosphaerioidipodin (**7**)

Position	δ_{H} , mult, J in Hz	δ_{C} , mult.	HMBC correlation
1		168.5, qC	
3	5.22, m	72.2, CH	C-1, C-4, C-5, C-17
4	a: 1.96, m b: 1.66, m	32.8, CH ₂	C-3, C-5, C-6, C-7, C-17
5	a: 1.69, m b: 1.53, m	19.5, CH ₂	C-3, C-4, C-6, C-7, C-8
6	a: 1.64, m b: 1.49, m	36.1, CH ₂	C-4, C-7
7	3.78, m	68.0, CH	C-5, C-9
8	a: 1.49, m b: 1.31, m	33.5, CH ₂	C-6, C-7, C-9, C-10
9	a: 1.92, m b: 1.52, m	26.6, CH ₂	C-7, C-8, C-10, C-11
10	a: 2.71, ddd, 14.5, 9.0, 6.0 b: 2.51, dt, 14.5, 6.0	29.8, CH ₂	C-8, C-9, C-11, C-12, C-16
11		142.4, qC	
12	6.25, d, 2.0	108.0, CH	C-1, C-10, C-13, C-14, C-16
13		157.3, qC	
14	6.26, d, 2.0	97.1, CH	C-12, C-13, C-16
15		158.0, qC	
16		118.2, qC	
17	1.33, d, 6.5	19.3, CH ₃	C-3, C-4
18	3.77, s	55.9, CH ₃	C-15

The isolated compounds, except for compounds **2**, **4**, **5**, **7**, **11–12** and **19** which were obtained in low quantity, were tested for antibacterial activity against SA and MRSA strains. Among them, compound **10** exhibited the best activity against SA and MRSA with the respective MIC values of 64 and 128 $\mu\text{g/mL}$. Its antibacterial activity against SA ATCC 27154 with the MIC value of 25 $\mu\text{g/mL}$ ⁴ was previously reported. Compound **16** was as active as compounds **13–15** against both strains,¹ but displayed much weaker activity than compound **10** with the MIC value of >128 $\mu\text{g/mL}$. The remaining compounds showed no activity at the concentration of 200 $\mu\text{g/mL}$.

Mellein derivatives have been isolated from *B. mamane*¹ and *B. obtusa*¹¹ while *B. rhodina* has produced a lasiodiplodin derivative.⁷ This is the first report on the isolation of γ -lactone derivatives from the genus *Botryosphaeria*. Furthermore, compounds **8**, **11–12**, and **16–19**, were obtained from fungi of this genus for the first time while compound **9** was firstly isolated as a natural product.

3. Experimental

3.1. General experimental procedures

Infrared spectra (IR) were obtained on an FTS165 FTIR spectrometer or a Perkin Elmer Spectrum GX FTIR system and recorded on wavenumber (cm^{-1}). ¹H and ¹³C Nuclear magnetic resonance spectra were recorded on an FTNMR, Bruker Avance 300 MHz or 500 MHz spectrometers using tetramethylsilane (TMS) as an internal standard. Spectra were recorded as chemical shift parameter (δ) value in ppm down field from TMS. Ultraviolet spectra (UV) were measured with an UV-160A SHIMADSU spectrophotometer. Principle bands (λ_{max}) were recorded as wavelengths (nm) and log ϵ in MeOH solution. Optical rotations were measured in methanol solution or chloroform solution with sodium D line (590 nm) on an AUTOPOLR[®] Π automatic polarimeter. Solvents for extraction and chromatography were distilled at their boiling point range prior to use except for ethyl acetate, which was an analytical grade reagent. Thin-layer chromatography (TLC) and precoated TLC plate were performed on silica gel 60 GF₂₅₄ (Merck). Column chromatography was performed on silica gel (Merck) type 100 (70–230 mesh ASTM) with a gradient of MeOH–CH₂Cl₂, Sephadex LH-20 with MeOH,

reverse phase C₁₈ silica gel with a gradient of MeOH–H₂O or otherwise stated.

3.2. Fungal material

The endophytic fungi *B. rhodina* PSU-M35 (GenBank accession number EF564146) and PSU-M114 (GenBank accession number EF564147) were isolated from the leaves of *Garcinia mangostana*, collected in Suratthani Province, Thailand in the year 2005. These fungi were deposited as PSU-M35 and PSU-M114 at the Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University.

3.3. Fermentation, extraction and isolation

The endophytic fungi *B. rhodina* PSU-M35 and PSU-M114 were separately grown on potato dextrose agar (PDA) at 25 °C for five days. Three pieces (0.5×0.5 cm²) of mycelial agar plugs were inoculated into 500 mL Erlenmeyer flasks containing 300 mL potato dextrose broth (PDB) at room temperature for four weeks. Each culture (15 L) was filtered to give the filtrate and mycelia. The filtrate and the mycelial cakes were then extracted using the same procedure as described previously.¹⁵ The broth extracts were obtained as a dark brown gum in 2.48 g and 2.13 g from *B. rhodina* PSU-M35 and PSU-M114, respectively, while the mycelia extract of the fungus PSU-M114 was obtained as a brown gum in 796.6 mg.

The broth extract of *B. rhodina* PSU-M35 was separated by CC over Sephadex LH-20 to obtain five fractions (AA–AE). Fraction AB (417.5 mg) was purified by silica gel CC followed by CC over reverse phase silica gel to afford four fractions (AB1–AB4). Fraction AB2 (23.5 mg) was subjected to CC over silica gel, CC over Sephadex LH-20 and then PTLC with 7% acetone–CH₂Cl₂ to yield **5** (1.8 mg). Fraction AB3 (38.3 mg) was separated by CC over silica gel to afford four subfractions. Compound **2** (1.5 mg) was obtained from the first subfraction (12.5 mg) after purification by PTLC with 30% EtOAc–light petroleum. The third subfraction (19.7 mg) afforded **1** (4.3 mg) and **3** (3.8 mg) after separation by CC over silica gel with a gradient of EtOAc–light petroleum. Fraction AC (726.0 mg) was separated by CC over silica gel to give **4** (1.8 mg). Fraction AD was purified using the same procedure as fraction AC to afford five fractions. Compound **9** (13.6 mg) was contained in the second fraction. The fourth fraction (130.6 mg) was further purified by silica gel CC to afford **8** (7.8 mg).

The broth extract of *B. rhodina* PSU-M114 was fractionated by CC over Sephadex LH-20 to afford five fractions (BA–BE). Fraction BB (1.12 g) was then submitted to CC over silica gel to obtain five fractions (BB1–BB5). Fraction BB1 (25.9 mg) was further separated by flash CC over silica gel to afford **13** (4.3 mg). In addition, fraction BB2 contained **17** (138.4 mg). Fraction BB4 (393.3 mg) was purified by CC over silica gel to give six subfractions (BB41–BB46). Compound **10** (12.4 mg) was obtained from subfraction BB42 after purification by CC over silica gel followed by PTLC with 20% EtOAc–light petroleum. Subfraction BB43 (244.1 mg) was further purified by CC over silica gel to yield four subfractions. The second subfraction contained **18** (130.3 mg). The third subfraction (46.6 mg) was further separated using the same procedure as fraction BB43 to yield four subfractions. The third subfraction (9.7 mg) was further subjected to acetylation reaction, followed by purification on PTLC to afford **11** (1.6 mg) and **12** (1.8 mg). Subfraction BB45 contained **6** (4.8 mg). Fraction BC (400.5 mg) was further purified by CC over silica gel followed by PTLC with 20% EtOAc–light petroleum to afford three fractions (BC1–BC3). Fraction BC2 (21.3 mg) was separated by CC over Sephadex LH-20 to yield **14** (4.2 mg) and **15** (5.0 mg). Fraction BD (89.3 mg) was subjected to CC over silica gel with a gradient of EtOAc–CH₂Cl₂ to yield four fractions (BD1–BD4). Fraction BD2 (7.2 mg), on PTLC with 20% EtOAc–

light petroleum, and fraction BD3 (18.5 mg), on CC over Sephadex LH-20, gave **16** (3.9 mg) and **19** (2.1 mg), respectively. The mycelial extract was separated by CC over Sephadex LH-20 to afford three fractions. The second fraction (535.7 mg) was further purified by CC over silica gel, followed by PTLC with 40% EtOAc–light petroleum to afford **7** (1.9 mg).

3.3.1. Botryosphaerilactone A (1). Colorless gum; $[\alpha]_D^{27} -1.2$ (c 0.77, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 286 (1.30) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3438, 1770 cm^{-1} ; HREIMS m/z $[M-H]^+$ 271.1553 (calcd for $C_{14}H_{23}O_5$, 271.1545); ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz), see Table 1; ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz), see Table 1.

3.3.2. Botryosphaerilactone B (2). Colorless gum; $[\alpha]_D^{26} +4.5$ (c 0.57, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 280 (1.61) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3430, 1775 cm^{-1} ; HREIMS m/z $[M]^+$ 270.1479 (calcd for $C_{14}H_{22}O_5$, 270.1467); ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz), see Table 1; ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz), see Table 1.

3.3.3. Botryosphaerilactone C (3). Colorless gum; $[\alpha]_D^{26} +5.2$ (c 0.77, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 273 (2.21) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3438, 1770 cm^{-1} ; HREIMS m/z $[M-H]^+$ 271.1533 (calcd for $C_{14}H_{23}O_5$, 271.1545); ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz), see Table 1; ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz), see Table 1.

3.3.4. Botryosphaeridione (4). Pale yellow gum; $[\alpha]_D^{27} -13.2$ (c 0.68, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 242 (3.30), 289 (3.18) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3354, 1673 cm^{-1} ; HREIMS m/z $[M]^+$ 204.0793 (calcd for $C_{12}H_{12}O_3$, 204.0786); ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz), see Table 2; ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz), see Table 2.

3.3.5. Botryosphaerihydrofuran (5). Colorless gum; $[\alpha]_D^{27} -23.8$ (c 0.14, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 220 (4.81), 280 (4.91) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 1664 cm^{-1} ; HREIMS m/z $[M]^+$ 218.1314 (calcd for $C_{14}H_{18}O_2$, 218.1307); ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz), see Table 3; ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz), see Table 3.

3.3.6. Botryosphaerinone (6). Colorless gum; $[\alpha]_D^{28} -23.2$ (c 0.14, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 212 (2.73) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3441, 1728 cm^{-1} ; HREIMS m/z $[M]^+$ 210.1253 (calcd for $C_{12}H_{18}O_3$, 210.1256); ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz), see Table 4; ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz), see Table 4.

3.3.7. Botryosphaeriodiplodin (7). Colorless gum; $[\alpha]_D^{26} -9.8$ (c 0.70, CHCl_3); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 205 (3.20), 245 (2.44), 280 (2.19) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3440, 1684 cm^{-1} ; HREIMS m/z $[M]^+$ 308.1615 (calcd for $C_{17}H_{24}O_5$, 308.1624); ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz), see Table 5; ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz), see Table 5.

3.4. Antibacterial activity testing

MICs were determined by the agar microdilution method.¹⁶ The test substances were dissolved in DMSO (Merck, Germany). Serial 2-fold dilutions of the test substances were mixed with melted Mueller–Hinton agar (Difco) in the ratio of 1:100 in microtiter plates with flat-bottomed wells (Nunc, Germany). Final concentration of the test substances in agar ranged from 200 to 0.39 $\mu\text{g/mL}$. MRSA isolated from a clinical specimen, Songklanakarin Hospital, was used as test strain. Inoculum suspensions (10 μL) were spotted on agar-filled wells. The inoculated plates were incubated at 35 °C for 18 h. MICs were recorded by reading the lowest substance concentration that inhibited visible growth. Growth controls were performed on agar containing DMSO.

Acknowledgements

V. Rukachaisirikul thanks the Commission on Higher Education and the Thailand Research Fund for the TRF Senior Research Scholar (Grant No. RTA5180007). J. Arunpanichlert is grateful to the Development and Promotion of Science and Technology Talent Project for a scholarship and to the Center for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC) for a scholarship. Finally, the Graduate School, Prince of Songkla University, is gratefully acknowledged for partial support.

References and notes

- Pongcharoen, W.; Rukachaisirikul, V.; Phongpaichit, S.; Sakayaroj, J. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 1404–1405.
- Voegtli, H. L.; Jones, T. H.; Davidson, D. W.; Snelling, R. R. *J. Chem. Ecol.* **2008**, *34*, 215–219.
- Venkatasubbaiah, P.; Sutton, T. B.; Chilton, W. S. *Phytopathology* **1991**, *81*, 243–247.
- Yang, R.-Y.; Li, C.-Y.; Lin, Y.-C.; Peng, G.-T.; She, Z.-G.; Zhou, S.-N. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 4205–4208.
- Ravi, B. N.; Armstrong, R. W.; Faulkner, D. J. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 3109–3113.
- Forzato, C.; Furlan, G.; Nitti, P.; Pitacco, G.; Marchesan, D.; Coriani, S.; Valentin, E. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 3011–3023.
- Veiga, T. A. M.; Silva, S. C.; Francisco, A.-C.; Filho, E. R.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Silva, M. F. G. F.; Müller, M. W.; Lotina-Hennsen, B. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4217–4221.
- Matsuura, H.; Nakamori, K.; Omer, E. A.; Hatakeyama, C.; Yoshihara, T.; Ichihara, A. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 579–584.
- Dimitriadis, C.; Gill, M.; Harte, M. F. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 2153–2158.
- Asha, K. N.; Chowdhury, R.; Hasan, C. M.; Rashid, M. A. *Acta. Pharm.* **2004**, *54*, 57–63.
- Venkatasubbaiah, P.; Chilton, W. S. *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 1628–1630.
- Matsumoto, M.; Nago, H. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1994**, *58*, 1262–1266.
- Mink, D.; Wolberg, M.; Schuermann, M.; Hilker, I. WO2007068498 A1 20070621, 2007.
- Venkatasubbaiah, P.; Dyke, C. G. V.; Chilton, W. S. *Mycologia* **1992**, *84*, 715–723.
- Rukachaisirikul, V.; Sommart, U.; Phongpaichit, S.; Hutadilok-Tawatana, N.; Rungjindamai, N.; Sakayaroj, J. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 1316–1318.
- Lorian, V. *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 4th ed.; William and Wilkins: Baltimore, 1996; pp 28–32.



A Cyclohexenone Derivative from Diaporthaceous Fungus PSU-H2

Ubonta Sommart¹, Vatcharin Rukachaisirikul¹, Yaowapa Sukpondma¹, Souwalak Phongpaichit², Nongporn Hutadilok Towatana³, Potchanapond Graidist⁴, Zuboidah Hajiwangoh⁵, and Jariya Sakayaroj⁶

¹Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla 90112, Thailand, ²Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla 90112, Thailand, ³Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla 90112, Thailand, ⁴Department of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, Prince of Songkla University, Songkhla 90112, Thailand, ⁵Faculty of Science Technology and Agriculture, Yala Rajabhat University, Yala 95000, Thailand, and ⁶National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Thailand Science Park, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand

(Received January 26, 2009/Revised August 4, 2009/Accepted August 4, 2009)

One new cyclohexenone derivative (**1**) was isolated from Diaporthaceous fungus PSU-H2 together with six known compounds, dothiorelone A (**2**), dothiorelone C (**3**), 2,3-dihydromycoepoxydiene (**4**), (+)-mycoepoxydiene (**5**), deacetylmycoepoxydiene (**6**) and tyrosol (**7**). The structures were elucidated by spectroscopic methods. Their cytotoxic activity against human breast cancer cell line, MCF-7, was evaluated.

Key words: Diaporthaceae, Endophytic fungus, Cyclohexenone, Mycoepoxydiene, Dothiorelone, Cytotoxic activity

INTRODUCTION

In an ongoing search for biologically active substances from the endophytic fungi from the *Garcinia* plants, antibacterial primin (Pongcharoen et al., 2007), antifungal scoparasin B (Pongcharoen et al., 2006) and antimycobacterial phomoenamides (Rukachaisirikul et al., 2007) were identified. We describe herein the isolation and structural elucidation of one new cyclohexenone derivative (**1**) along with six known ones, dothiorelone A (**2**) (Xu et al., 2004) dothiorelone C (**3**) (Xu et al., 2004), 2,3-dihydromycoepoxydiene (**4**) (Prachya et al., 2007), (+)-mycoepoxydiene (**5**) (Cai et al., 1999), deacetylmycoepoxydiene (**6**) (Shen et al., 2007) and tyrosol (**7**) (Capasso et al., 1992) from the crude extract of Diaporthaceous fungus PSU-H2, isolated from *Garcinia hombroniana*. Their structures were assigned by spectroscopic methods and comparison of the ¹H- and ¹³C-NMR data with those reported in literatures. The isolated compounds were evaluated for cytotoxic

activity toward human breast cancer, MCF-7, cell line.

MATERIALS AND METHODS

General experimental procedures

Infrared spectra (IR) were recorded neat on a Perkin Elmer 783 FTS165 FT-IR spectrometer. Ultraviolet (UV) absorption spectra were measured on a SHIMADZU UV-160A spectrophotometer. ¹H and ¹³C-NMR spectra were recorded on a 300 MHz or a 500 MHz Bruker FTNMR Ultra Shield™ spectrometer. Mass spectra were obtained on a MAT 95 XL Mass Spectrometer (ThermoFinnigan). Optical rotations were measured in MeOH on a JASCO P-1020 polarimeter. Thin-layer chromatography (TLC) and precoated TLC were performed on silica gel GF254 (Merck). Column chromatography (CC) was carried out on Sephadex LH-20 or silica gel (Merck) type 100 (70-230 Mesh ASTM).

Fungal material

Diaporthaceous fungus PSU-H2 was isolated from the branch of *G. hombroniana*, collected in Songkhla Province, Thailand in 2005. This fungus was grown in potato dextrose agar (PDA) and an agar plug with mycelium was kept in 15% glycerol at -70°C at the Department of Microbiology, Prince of Songkla University,

Correspondence to: Vatcharin Rukachaisirikul, Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla 90112, Thailand
Tel: 66-74-288-435, Fax: 66-74-212-918
E-mail: vatcharin.r@psu.ac.th

Thailand.

Molecular identification of the fungal endophyte

The fungal endophyte PSU-H2 was inoculated in potato dextrose broth (PDB) for two weeks at 25°C, fresh mycelium was then harvested and ground into fine powder. Genomic DNA was extracted using CTAB method (O'Donnell et al., 1997). The ITS and LSU rDNA were amplified using gene specific primers: ITS1/ITS4 and LROR/LR5, respectively (Bunyard et al., 1994; White et al., 1990). PCR products were then sequenced by MacroGen Inc. using the same primer as for amplification. A BLAST search was employed to obtain the closest matched sequences from GenBank database. Sequence similarity and relatedness of the endophytic fungus PSU-H2 were calculated under sequence identity matrix using BioEdit 7.5.0.3 (Hall, 2006).

In vitro assay for cytotoxic activity

This was carried out according to that of Skehan. MCF-7 (human breast cancer cell line) was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD). Cells were grown in RPMI 1640 (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco BRL), 50 units/mL penicillin, and 50 µg/mL streptomycin and were maintained in a humidified 37°C incubator with 5% CO₂. The cytotoxicity assay was carried out using sulphorhodamine B (SRB) assay. Briefly, 1×10^4 of MCF-7 cells were seeded in 96-well plate and exposed with various concentrations of isolated compounds for 72 h. Then, cells were fixed with 100 µL of 40% trichloroacetic acid and incubated at 4°C for 1 h. After incubation, cells were washed five times with cold water and dried in air. Cells were stained with 50 µL of SRB stain (0.4% (w/v) in 1% acetic acid) for 30 min, after which the excess dye was removed by washing repeatedly with 1% (v/v) acetic acid. The protein-bound dye was dissolved in 100 µL of 10 mM Tris base solution (pH 10.5) for OD determination at 490 nm using a SLT 340 ATTC microplate reader (SLT Labinstrument, Australia). The IC₅₀ values were calculated by Prism program.

Extraction and isolation

The Diaporthaceous fungus PSU-H2 was grown on potato dextrose agar (PDA) at 25°C for 5 days. Three pieces (0.5 × 0.5 cm²) of mycelial agar plugs were inoculated into 500 mL Erlenmeyer flasks containing 300 mL potato dextrose broth (PDB) at room temperature for 3 weeks. The culture (15 L) was filtered to give the filtrate and mycelia. The filtrate was extracted

with EtOAc to afford a broth extract (500 mg) as a brown gum. The crude EtOAc extract was separated by CC over Sephadex LH-20 using MeOH to yield four fractions (A-C). Fraction B (300.0 mg) was further purified by silica gel CC using a gradient of MeOH-CH₂Cl₂ to give eight subfractions (B1-B8). Subfraction B3 contained **2** (1.5 mg) and **5** (13.0 mg). Subfraction B6 was subjected to precoated TLC with 30% EtOAc-light petroleum to give **1** (1.0 mg). Subfraction B7 was further purified by silica gel CC using a gradient of EtOAc-light petroleum followed by that of MeOH-EtOAc to give **6** (13.9 mg) and **7** (13.3 mg). Subfraction B8 was subjected to CC over reverse phase C₁₈ silica gel using a gradient system of MeOH-H₂O to yield four subfractions (B81-B83). Subfraction B82 was separated by CC over Sephadex LH-20 using 50% MeOH-CH₂Cl₂ to yield three subfractions. The second subfraction was subjected to precoated TLC with 30% EtOAc-light petroleum to give **4** (5.0 mg). Wet mycelia were extracted with MeOH (2 × 500 mL). After concentration of the MeOH solution to 200 mL, H₂O (100 mL) was added and the mixture washed with hexane (500 mL). The aqueous MeOH layer was extracted with EtOAc (3 × 400 mL) to yield a brown gum (310.0 mg). The crude mycelial extract was subjected to Sephadex LH-20 CC eluted with MeOH to afford three fractions. The second fraction (205.0 mg) was further purified by silica gel CC using a gradient of MeOH-CH₂Cl₂ to give **3** (4.5 mg).

5,6-Dihydroxy-2,3,6-trimethylcyclohex-2-enone (**1**)

Colorless gum; $[\alpha]_D^{26} +55.7^\circ$ (MeOH; c 0.08); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ nm (log ϵ): 213 (3.30); IR (neat) $\nu_{\max}$ cm⁻¹ 3127, 1734; HR-EI-MS m/z : 170.0935 (calcd for C₉H₁₄O₃: 170.0943); EIMS m/z : 170 (M⁺) (7), 152 (92), 109 (100), 96 (89), 74 (69); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 3.93 (1H, dd, J = 11.5 and 6.0 Hz, H-5), 2.63 (1H, dd, J = 18.5 and 6.0 Hz, Ha-4), 2.41 (1H, dd, J = 18.5 and 11.5 Hz, Hb-4), 1.97 (3H, s, H-9), 1.81 (3H, s, H-8), 1.22 (3H, s, H-7); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 201.7 (s, C-1), 152.9 (s, C-3), 128.2 (s, C-2), 77.0 (s, C-6), 72.6 (d, C-5), 38.2 (t, C-4), 21.3 (q, C-9), 17.7 (q, C-7), 11.4 (q, C-8).

Dothiorelone A (**2**)

Colorless gum; $[\alpha]_D^{26} -22.3^\circ$ (MeOH; c 0.13); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ nm (log ϵ): 225 (3.82), 269 (3.03), 295 (2.94); IR (neat) $\nu_{\max}$ cm⁻¹ 3283, 1716, 1610; HR-EI-MS m/z : 320.1622 (calcd for C₁₈H₂₄O₅: 320.1624); EIMS m/z : 320 (M⁺) (14), 248 (21), 205 (25), 196 (48), 167 (100); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃+CD₃OD) δ : 6.34 (1H, brs, H-6), 6.30 (1H, brd, J = 2.0 Hz, H-4), 4.21 (2H, q, J =

7.0 Hz, H-17), 3.86 (2H, s, H-2), 3.57 (1H, m, H-15), 2.89 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-10), 1.46 (2H, m, H-14), 1.45 (2H, m, H-11), 1.42 (4H, m, H-12, 13), 1.29 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, H-18), 0.96 (3H, d, $J = 7.5$ Hz, H-16); ^{13}C -NMR (125 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) δ : 207.4 (s, C-9), 171.2 (s, C-1), 164.5 (s, C-7), 161.0 (s, C-5), 137.8 (s, C-3), 117.5 (s, C-8), 113.3 (d, C-4), 104.1 (d, C-6), 74.0 (d, C-15), 62.4 (t, C-17), 44.1 (t, C-10), 42.7 (t, C-2), 37.5 (t, C-11), 31.2 (t, C-14), 26.2 (t, C-12), 25.8 (t, C-13), 15.1 (q, C-18), 10.8 (q, C-16).

Dothiorelone C (3)

Colorless gum; UV (MeOH) λ_{max} nm (log ϵ): 219 (3.50), 268 (3.01), 304 (2.95); IR (neat) ν_{max} cm^{-1} 3256, 1712, 1607; EIMS m/z : 338 (M^+) (14), 223 (100), 205 (37), 177 (42), 167 (85); ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 6.21 (1H, brs, H-6), 6.20 (1H, brs, H-4), 4.12 (2H, q, $J = 7.2$ Hz, H-17), 3.74 (2H, brs, H-2), 3.57 (2H, t, $J = 6.3$ Hz, H-16), 2.77 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-10), 1.63 (2H, m, H-11), 1.49 (2H, m, H-15), 1.26 (6H, m, H-12, 13, 14), 1.22 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, H-18); ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 205.7 (s, C-9), 170.1 (s, C-1), 163.2 (s, C-5), 159.3 (s, C-7), 135.7 (s, C-3), 115.8 (s, C-8), 111.5 (d, C-4), 102.5 (d, C-6), 62.0 (t, C-16), 60.5 (t, C-17), 42.2 (t, C-10), 40.7 (t, C-2), 31.6 (t, C-15), 28.0 (t, C-12, 14), 24.5 (t, C-13), 23.8 (t, C-11), 13.1 (q, C-18).

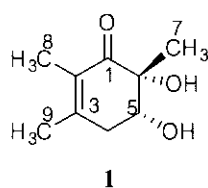
2,3-Dihydromycoepoxydiene (4)

Colorless gum; $[\alpha]_{\text{D}}^{26} +200.3^\circ$ (MeOH; c 0.10); UV (MeOH) λ_{max} nm (log ϵ): 215 (3.25), 265 (3.56); IR (neat) ν_{max} cm^{-1} 1777, 1739; HR-EI-MS m/z : 292.1314 (calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{O}_5$: 292.1311); EIMS m/z : 292 (M^+)

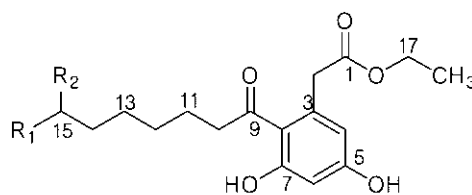
(23), 232 (75), 176 (72), 94 (93), 85 (100); ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 6.19 (1H, dd, $J = 10.0, 6.0$ Hz, H-8), 5.99 (1H, brdd, $J = 11.0, 4.5$ Hz, H-11), 5.89 (1H, m, H-9), 5.85 (1H, m, H-10), 5.10 (1H, dd, $J = 10.5, 2.4$ Hz, H-5), 4.52 (1H, ddm, $J = 6.3, 2.4$ Hz, H-4), 4.37 (1H, t, $J = 6.0$ Hz, H-7), 4.19 (1H, d, $J = 4.5$ Hz, H-12), 2.68 (1H, qn, $J = 7.2$ Hz, H-13), 2.93 (1H, m, H-6), 2.45 (1H, m, Ha-2), 2.39 (1H, m, Hb-2), 2.23 (1H, m, Ha-3), 2.06 (3H, s, H-16), 2.00 (1H, m, Hb-3), 0.92 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-14); ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 176.2 (s, C-1), 170.5 (s, C-15), 137.6 (d, C-8), 136.9 (d, C-11), 126.3 (d, C-9), 125.0 (d, C-10), 86.2 (d, C-12), 80.1 (d, C-4), 77.0 (d, C-7), 72.7 (d, C-5), 52.3 (d, C-13), 51.5 (d, C-6), 28.1 (t, C-2), 23.9 (t, C-3), 21.0 (q, C-16), 14.4 (q, C-14).

Mycoepoxydiene (5)

White solid; mp 143.0–144.0°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{26} +205.8^\circ$ (MeOH; c 0.11); UV (MeOH) λ_{max} nm (log ϵ): 210 (3.78), 265 (3.02); IR (neat) ν_{max} cm^{-1} 1735, 1726; ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 6.96 (1H, dd, $J = 9.6, 6.0$ Hz, H-3), 6.15 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-2), 6.02 (1H, ddd, $J = 9.9, 6.9, 4.5$ Hz, H-11), 5.97 (1H, m, H-8), 5.87 (1H, m, H-9), 5.84 (1H, m, H-10), 5.01 (1H, dd, $J = 6.0, 2.4$ Hz, H-4), 4.42 (1H, dd, $J = 11.1, 2.4$ Hz, H-5), 4.25 (1H, d, $J = 4.5$ Hz, H-12), 4.21 (1H, t, $J = 6.0$ Hz, H-7), 3.00 (1H, m, H-6), 2.95 (1H, m, H-13), 1.96 (1H, s, H-16), 1.07 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-14); ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 170.0 (s, C-15), 162.1 (s, C-1), 140.2 (d, C-3), 137.5 (d, C-11), 137.0 (d, C-8), 126.3 (d, C-9), 125.0 (d, C-2), 124.4 (d, C-10), 86.4 (d, C-12), 77.6 (d, C-5), 75.9 (d, C-7), 63.2 (d, C-4), 52.6 (d, C-13), 50.1 (d, C-6), 20.6 (q, C-16), 14.1 (q, C-14).

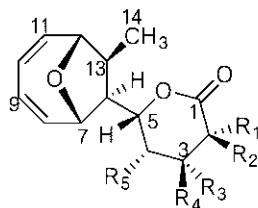


1



2: $\text{R}_1 = \text{CH}_3$, $\text{R}_2 = \text{OH}$

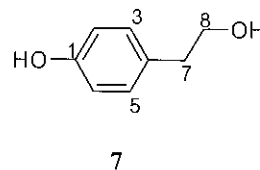
3: $\text{R}_1 = \text{CH}_2\text{OH}$, $\text{R}_2 = \text{H}$



4: $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{R}_4 = \text{H}$, $\text{R}_5 = \text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$

5: $\text{R}_1 = \text{R}_3 = \text{H}$, $\text{R}_2 = \text{R}_4 = \text{double bond}$, $\text{R}_5 = \text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$

6: $\text{R}_1 = \text{R}_3 = \text{H}$, $\text{R}_2 = \text{R}_4 = \text{double bond}$, $\text{R}_5 = \text{OH}$



7

Fig. 1. Chemical structures of compounds in this study

Deacetylmycoepoxydiene (6)

White solid; mp 157.0–159.0°C; $[\alpha]_D^{26} +195.3^\circ$ (MeOH; c 0.10); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ nm (log ϵ): 212 (3.81), 265 (3.03); IR (neat) $\nu_{\max}$ cm^{-1} 3383, 1718; ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 6.97 (1H, dd, $J = 9.6, 6.3$ Hz, H-3), 6.19 (1H, ddd, $J = 10.5, 5.4, 1.5$ Hz, H-8), 6.05 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-2), 6.02 (1H, m, H-11), 5.89 (1H, m, H-9), 5.85 (1H, m, H-10), 4.36 (1H, t, $J = 5.4$ Hz, H-7), 4.28 (1H, dd, $J = 10.5, 2.4$ Hz, H-5), 4.25 (1H, d, $J = 4.5$ Hz, H-12), 4.00 (1H, brt, $J = 5.4$ Hz, H-4), 2.95 (1H, m, H-6), 2.91 (1H, q, $J = 6.9$ Hz, H-13), 1.06 (1H, d, $J = 6.9$ Hz, H-14); ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 163.3 (s, C-1), 144.3 (d, C-3), 137.4 (d, C-8), 137.2 (d, C-11), 126.1 (d, C-9), 124.8 (d, C-10), 122.2 (d, C-2), 86.1 (d, C-12), 79.5 (d, C-5), 76.9 (d, C-7), 62.1 (d, C-4), 51.7 (d, C-6, 13), 14.3 (q, C-14).

Tyrosol (7)

Colorless gum; UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ nm (log ϵ): 222 (2.94), 279 (2.36); IR (neat) $\nu_{\max}$ cm^{-1} 3617; ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.11 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-3, 5), 6.79 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-2, 6), 3.83 (2H, t, $J = 6.0$ Hz, H-8), 2.81 (2H, t, $J = 6.0$ Hz, H-7); ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 154.2 (s, C-1), 130.6 (s, C-4), 130.2 (d, C-3, 5), 115.5 (d, C-2, 6), 63.8 (t, C-8), 38.3 (t, C-7).

RESULTS AND DISCUSSION

Fungal endophyte PSU-H2 was identified based on the rDNA sequence analysis. The nuclear large subunit (LSU) ribosomal DNA region was initially carried out for higher taxonomic levels. LSU sequence of the endophyte PSU-H2 (633 base pairs, GenBank accession number FJ386515) was closely related with *Phomopsis* sp. EU219393 (Diaporthales, Diaporthaceae). Sequence analysis between the fungus PSU-H2 and this isolate yielded 24 base pairs difference (100% similarity). The internal transcribed spacer (ITS) sequence analysis was further performed in order to identify at lower taxonomic levels. The results showed that this endophytic fungus (509 base pairs, GenBank accession number FJ386514) displayed the close relationship with two unidentified fungal endophytes sequences (DQ485947, DQ485954) isolated from *Magnolia liliifera* (Promputtha et al., 2005) with sequence similarity ranging from 95.4–97.0%. Moreover, within the same subclade, the fungus PSU-H2 had affinity with various strains of *Phomopsis* sp. and *Diaporthe* sp. (sequence similarity 93.5–94.3%). Because of inadequate sequences from GenBank for comparison, this fungus could only be placed in the Diaporthales (Subclass Sordariomycetidae, Class Sordariomycetes) and named as Diaportheaceous fungus PSU-H2.

Compounds **2–7** were identified by comparison of the ^1H - and ^{13}C -NMR data with those previously reported in the literature as dothiorelone A (**2**) (Xu et al., 2004) dothiorelone C (**3**) (Xu et al., 2004), 2,3-dihydromycoepoxydiene (**4**) (Prachya et al., 2007), (+)-mycoepoxydiene (**5**) (Cai et al., 1999), deacetylmycoepoxydiene (**6**) (Shen et al., 2007) and tyrosol (**7**) (Capasso et al., 1992). Compounds **3–7** were evaluated for cytotoxic activity toward human breast cancer cell line, MCF-7.

Compound **1** with the molecular formula $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}_3$ from HREIMS, was obtained as a colorless gum with $[\alpha]_D^{26} +55.7^\circ$ ($c = 0.08$, MeOH). It exhibited an UV absorption band at 213 nm while hydroxyl and carbonyl absorption bands were found at 3127 and 1734 cm^{-1} , respectively, in the IR spectrum. The ^1H NMR spectrum displayed signals for one oxymethine proton (δ 3.93, dd, $J = 11.5$ and 6.0 Hz), one set of nonequivalent methylene protons (δ 2.63, dd, $J = 18.5, 6.0$ Hz and δ 2.41, dd, $J = 18.5, 11.5$ Hz) and three methyl groups (δ 1.97, 1.81 and 1.22). The ^{13}C NMR spectrum consisted of one a,b-unsaturated carbonyl (δ 201.7), two olefinic quaternary (δ 152.9 and 128.2) of an unsaturated ketone, one oxyquaternary (δ 77.0), one oxymethine (δ 72.6), one methylene (δ 38.2) and three methyl (δ 21.3, 17.7 and 11.4) carbons. In the COSY spectrum, the oxymethine proton, H-5 (δ 3.93), was coupled with methylene protons, $\text{H}_{\text{ab}}\text{-4}$ (δ 2.63 and 2.41). In the HMBC spectrum, H-5 gave 3J cross peaks with C-1 (δ 201.7) and C-7 (δ 17.7) while $\text{H}_{\text{ab}}\text{-4}$ showed the same cross peaks with C-2 (δ 128.2), C-6 (δ 77.0) and C-9 (δ 21.3). In addition, the methyl protons, $\text{H}_3\text{-8}$ (δ 1.81), gave HMBC cross peaks with C-1, C-2 and C-3 (δ 152.9). These results together with HMQC correlations of $\text{H}_3\text{-7}$ (δ 1.22)/C-7 and $\text{H}_3\text{-9}$ (δ 1.97)/C-9 constructed a cyclohexenone ring having a double bond at C2–C3 and the methyl groups at C-2, C-3 and C-6. The chemical shifts of C-5 and C-6 revealed the presence of hydroxyl groups at both carbons. In the NOEDIFF experiment, irradiation of H-5 affected the intensity of the $\text{H}_3\text{-7}$ signal, thus indicating their *cis*-relationship. Consequently, compound **1** was identified as 5,6-Dihydroxy-2,3,6-trimethylcyclohex-2-enon, a new cyclohexenone derivative. No attempts were made to resolve the absolute configuration of **1** as it was obtained in low quantity.

Dothiorelone and mycoepoxydiene derivatives displayed interesting cytotoxic activity (Chen et al., 2006; Lin et al., 2005; Prachya et al., 2007; Xu et al., 2004). The cytotoxic activity of compounds **4–6** against various human cancer cell lines, except for MCF-7, was previously reported (Lin et al., 2005; Prachya et al., 2007). Compounds **3–7**, which were obtained in sufficient amount, were further tested for cytotoxic activity against

MCF-7. The results obtained in this investigation were in agreement with previous data which revealed that compound **5** exhibited more potent activity than compound **6**, and compound **4** was inactive. Compounds **5** and **6** gave the respective IC₅₀ values of 2.24 and 8.70 µg/mL against MCF-7. These data also supported the previous conclusion concerning an important role of the a,b-unsaturated lactone unit in the cytotoxic activity (Prachya et al., 2007). Compounds **3** and **7** showed no significant activity with the IC₅₀ value more than 50 µg/mL.

ACKNOWLEDGEMENTS

V. Rukachaisirikul thanks the Commission on Higher Education and the Thailand Research Fund for the TRF Senior Research Scholar (Grant No. RTA5180007). The Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC) and the Graduate School, Prince of Songkla University, are gratefully acknowledged for partial support. Finally, U. Sommart thanks the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program of the Thailand Research Fund (Grant No. PHD/0232/2549) for a scholarship.

REFERENCES

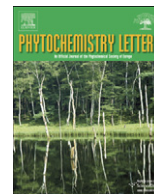
- Bunyard, B. A., Nicholson, M. S., and Royse, D. J., A systematic assessment of *Morchella* using RFLP analysis of the 28S ribosomal RNA gene. *Mycologia*, 86, 762-772 (1994).
- Cai, P., McPhail, A. T., Krainer, E., Katz, B., Pearce, C., Boros, C., Caceres, B., Smith, D., and Houck, D. R., Mycoepoxydiene represents a novel class of fungal metabolites. *Tetrahedron Lett.*, 40, 1479-1482 (1999).
- Capasso, R., Cristinzio, G., Evidente, A., and Scognamiglio, F., Isolation, spectroscopy and selective phytotoxic effects of polyphenols from vegetable waste waters. *Phytochemistry*, 31, 4125-4128 (1992).
- Chen, H., Lin, Y., Chen, G., Hu, G., Wang, L., and Vrijmoed, L. P., Catalytic transfer hydrogenation of mycoepoxydiene. *Chem. Nat. Compd.*, 42, 407-409 (2006).
- Hall, T., BioEdit 7.0.5.3 Department of Microbiology, North Carolina State University, (2006). (Online) Available: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/Bioedit.html> [accessed 1 October 2008].
- Lin, X., Huang, Y., Fang, M., Wang, J., Zheng, Z., and Su, W., Cytotoxic and antimicrobial metabolites from marine lignicolous fungus, *Diaporthe* sp. *FEMS Microbiology Letters*, 251, 53-58 (2005).
- O'Donnell, K., Cigelnik, E., Weber, N. S., and Trappe, J. M., Phylogenetic relationships among ascomycetous truffles and the true and false morels inferred from 18S and 28S ribosomal DNA sequence analysis. *Mycologia*, 89, 48-65 (1997).
- Pongcharoen, W., Rukachaisirikul, V., Phongpaichit, S., Rungjindamai, N., and Sakayaroj, J., Pimarane diterpene and cytochalasin derivatives from the endophytic fungus *Eutypella scoparia* PSU-D44. *J. Nat. Prod.*, 69, 856-857 (2006).
- Pongcharoen, W., Rukachaisirikul, V., Phongpaichit, S., and Sakayaroj, J., A new dihydrobenzopyran derivative from the endophytic fungus *Botryosphaeria mamane* PSU-M76. *Chem. Pharm. Bull.*, 55, 1404-1405 (2007).
- Prachya, S., Wiyakrutta, S., Sriubolmas, N., Ngamrojavanich, N., Mahidol, C., Ruchirawat, S., and Kittakoop, P., Cytotoxic mycoepoxydiene derivatives from an endophytic fungus *Phomopsis* sp. isolated from *Hydnocarpus anthelminticus*. *Planta Med.*, 73, 1418-1420 (2007).
- Promptuttha, I., Jeewon, R., Lumyong, S., McKenzie, E. H. C., and Hyde, K. D., Ribosomal DNA fingerprinting in the identification of nonsporulating endophytes from *Magnolia liliifera* (Magnoliaceae). *Fungal Divers.*, 20, 167-186 (2005).
- Rukachaisirikul, V., Sommart, U., Phongpaichit, S., Sakayaroj, J., and Kirtikara, K., Metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. PSU-D15. *Phytochemistry*, 69, 783-787 (2008).
- Shen, Y., Yang, L., Huang, Y., Zheng, Z., Song, S., and Su, W., Method for preparing deacetyl mycoepoxydiene from metabolite of *Phomopsis* A-1-2-3 and its application in antitumor drugs and other bioactive precursor. *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu*, (2007).
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S., and Boyd, M. R., New colorimetric cytotoxicity assay for anti-cancer-drug screening. *J. Natl. Cancer. Inst.*, 82, 1107-1112 (1990).
- White, T. F., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J., Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, In Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, F. S., White, T. T. (Eds.). *PCR Protocol: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego. pp. 315-322 (1990).
- Xu, Q., Wang, J., Huang, Y., Zheng, Z., Song, S., Zhang, Y., and Su, W., Metabolites from mangrove endophytic fungus *Dothiorella* sp., *Acta Oceanol. Sin.*, 23, 541-547 (2004).
- Yen G.-C. and Hsieh G.-L., Antioxidant effects of dopamine and related compounds. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 1646-1649 (1997).



Contents lists available at ScienceDirect

Phytochemistry Letters

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



α -Pyrone and seiricuprolide derivatives from the mangrove-derived fungi *Pestalotiopsis* spp. PSU-MA92 and PSU-MA119

Vatcharin Rukachaisirikul^{a,*}, Aekkachai Rodglin^a, Souwalak Phongpaichit^b, Jirayu Buatong^b, Jariya Sakayaroj^c

^a Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

^b Natural Products Research Center and Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

^c National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Thailand Science Park, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 May 2011

Received in revised form 5 August 2011

Accepted 23 August 2011

Available online xxx

Keywords:

Mangrove-derived fungi

Pestalotiopsis sp.

α -Pyrone

Seiricuprolide

Antibacterial

Antifungal

ABSTRACT

Investigation of the mangrove-derived fungi *Pestalotiopsis* spp. PSU-MA92 and PSU-MA119 resulted in the isolation of three new α -pyrones, pestalotiopyrones A–C (**1–3**), and two new seiricuprolides, pestalotioprolides A (**4**) and B (**5**), together with two known compounds. Their structures were identified by analysis of spectroscopic data. Compound **5** was isolated as its diacetate derivative (**6**). The antibacterial and antifungal activities of **2** were evaluated.

© 2011 Phytochemical Society of Europe. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The genus *Pestalotiopsis* produces a wide range of biologically active secondary metabolites including antibacterial ambuic acid (Ding et al., 2009), antifungal jesterone (Li and Strobel, 2001) and anti-HIV-1 pestaloficiols (Liu et al., 2008b). In the course of our ongoing search for bioactive substances from endophytic fungi obtained from mangrove plants, *Pestalotiopsis* spp. PSU-MA92 and PSU-MA119 were isolated from the twigs of two mangrove plants, *Rhizophora apiculata* and *Rhizophora mucronata*, respectively. Investigation of the broth extracts of both fungi led to the isolation and structural elucidation of three new α -pyrone derivatives, pestalotiopyrones A–C (**1–3**), two new seiricuprolides, pestalotioprolides A (**4**) and B (**5**), and two known compounds, seiricuprolide (Ballio et al., 1988; Bartolucci et al., 1992), and 2'-hydroxy-3',4'-didehydropenicillide (Kawamura et al., 2000). Compound **5** was isolated as its diacetate derivative (**6**). In addition, the isolated compound **2** was evaluated for its antibacterial and antifungal activities.

2. Results and discussion

All compounds were purified using various chromatographic techniques and their structures were elucidated by spectroscopic data, including IR, UV, NMR and MS. Compounds **1–3** and 2'-hydroxy-3',4'-didehydropenicillide (Fig. 1) were obtained from the fungus PSU-MA92 whereas the remaining metabolites (**4**, the diacetate derivative of **5** and seiricuprolide) were isolated from the fungus PSU-MA119. For the known compounds, the structures were confirmed by comparison of the ¹H and ¹³C NMR data with those previously reported. The relative configuration was assigned on the basis of NOEDIFF data whereas the absolute configuration was determined by comparison of their optical rotations with those previously reported in the literature.

Pestalotiopyrone A (**1**) with the molecular formula C₁₄H₁₈O₆ by HREIMS was obtained as a colorless gum. The UV spectrum exhibited maximum absorption bands at 210 and 287 nm. A hydroxyl absorption band was found at 3410 cm^{−1} while carbonyl ones were observed at 1722 and 1711 cm^{−1} in the IR spectrum. The ¹H NMR spectrum (Table 1) displayed signals for one olefinic proton (δ 7.64, d, *J* = 0.9 Hz), one 2-methyl-1-propenyl unit [δ 5.69, 1H, hept, *J* = 1.2 Hz), 2.16 (3H, d, *J* = 1.2 Hz) and 1.90 (3H, d, *J* = 1.2 Hz)], one set of oxymethylene protons (δ 5.05, 2H, s), one 1-hydroxyethyl group [δ 4.81 (1H, m), 4.42 (1H, d, *J* = 4.5 Hz) and 1.40 (3H, d, *J* = 6.3 Hz)] and

* Corresponding author. Tel.: +66 74 288 435; fax: +66 74 558 841.

E-mail address: vatcharin.r@psu.ac.th (V. Rukachaisirikul).

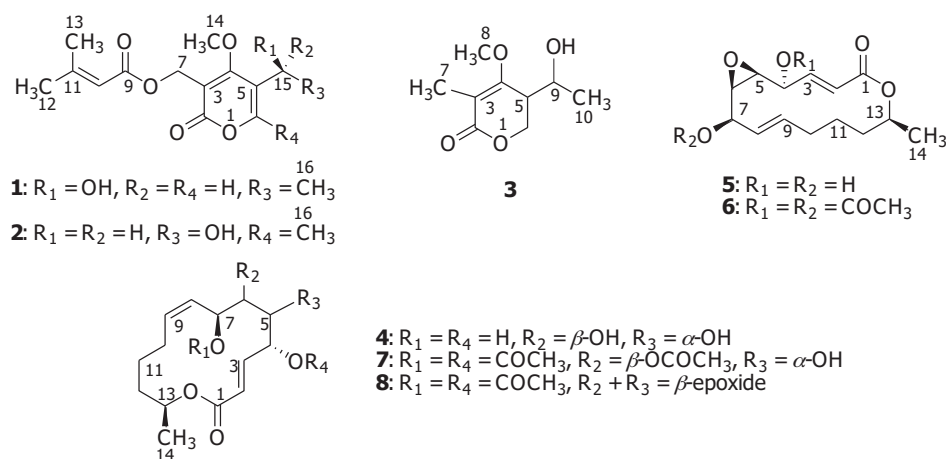


Fig. 1. Structures of metabolites isolated from *Pestalotiopsis* spp. PSU-MA92 and PSU-MA119.

one methoxyl group (δ 4.15, 3H, s). The ^{13}C NMR spectrum displayed one typical carbonyl carbon of an α -pyrone unit (δ 164.0), one ester carbonyl (δ 165.6), four quaternary (δ 169.2, 157.1, 122.4 and 106.1), three methine (δ 148.6, 115.3 and 62.3), one oxymethylene (δ 56.22), one methoxy (δ 61.3) and three methyl (δ 26.3, 23.2 and 19.2) carbons. The presence of the 2-methyl-1-propenyl unit was established by the ^1H - ^1H COSY cross peaks from H-10 (δ 5.69) to H₃-12 (δ 1.90) and H₃-13 (δ 2.16) as well as the ^3J HMBC correlations of H-10 with C-12 (δ 26.3) and C-13 (δ 19.2) (Table 1). The olefinic proton resonating at δ 7.64 was assigned as H-6 of the α -pyrone unit on the basis of its ^3J HMBC correlations with C-2 (δ 164.0) and C-4 (δ 169.2). The 1-hydroxyethyl unit was attached at C-5 (δ 122.4) of the α -pyrone moiety because the methine proton, H-15 (δ 4.81), displayed the ^3J HMBC correlations with C-4 and C-6 (δ 148.6). The small coupling constant ($J = 0.9$ Hz) between H-6 and H-15 supported the assigned location of the hydroxyethyl unit. In addition, the methoxyl group was located at C-4 on the basis of the ^3J HMBC correlation from H₃-14 (δ 4.15) to C-4. The oxymethylene protons (H₂-7, δ 5.05) displayed the ^3J HMBC correlations with C-2, C-4 and C-9 (δ 165.6) while the methyl protons, H₃-12 and H₃-13, of the 2-methyl-1-propenyl unit also exhibited the HMBC correlation with C-9. These data connected the oxymethylene group at C-3 (δ 106.1) of the α -pyrone moiety and further linked this group with the 2-methyl-1-propenyl unit through an ester linkage. Signal enhancement of H-15 (δ 4.81)

and H₂-7 upon irradiation of H₃-14 (δ 4.15) in the NOEDIFF experiment confirmed the assigned location of all substituents on the α -pyrone unit. The observed optical rotation of **1**, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -44.07$ (c 0.33, MeOH), was almost identical to that of taiwapyrone, $[\alpha]_{\text{D}}^{22} -48.50$ (c 0.33, MeOH) (Camarda et al., 1976). Consequently, the absolute configuration at C-15 in **1** would be *S*, identical to that of taiwapyrone. The new pyrone (**1**) was named as pestalotiopyrone A.

Pestalotiopyrone B (**2**), a colorless gum, possessed the same molecular formula as **1** from HREIMS. It exhibited UV and IR absorption bands similar to those of **1**. The ^1H and ^{13}C NMR data (Table 1) were almost identical to those of **1** except for the replacement of signals for the 1-hydroxyethyl unit and the α -pyrone proton (H-6) in **1** with those for one hydroxymethyl unit (δ 4.46, s, 2H) and one methyl group (δ 2.35, 3H, s), respectively. The HMBC correlations of H₃-16 (δ 2.35) to C-5 (δ 113.1) and C-6 (δ 161.9) confirmed the location of the methyl group at C-6 of the α -pyrone unit. Irradiation of these methyl protons enhanced signal intensity of H₂-15 (δ 4.46), thus supporting the attachment of the 1-hydroxymethyl unit at C-5. Therefore, pestalotiopyrone B had the structure **2**.

Pestalotiopyrone C (**3**) was obtained as a colorless gum with the molecular formula $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}_4$ from HREIMS. The UV spectrum displayed maximum absorption bands at 207 and 254 nm while the IR spectrum showed absorption bands for an hydroxyl (3407 cm^{-1}) and a conjugated ester carbonyl (1679 cm^{-1}) group.

Table 1
The NMR data for pestalotiopyrones A (**1**), B (**2**) and C (**3**) δ in ppm, J in Hz.

Position	1		2		HMBC of 1 and 2	3		HMBC
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}		δ_{H}	δ_{C}	
2		164.0 s		164.4 s			167.6 s	
3		106.1 s		105.0 s			105.2 s	
4		169.2 s		170.5 s			166.9 s	
5		122.4 s		113.1 s		2.69 ddd (6.9, 3.6, 1.5)	40.9 d	C-4, C-9
6	7.64 d (0.9)	148.6 d		161.9 s	C-2, C-4, C-5, C-15	a: 4.40 dd (12.0, 1.5) b: 4.28 dd (12.0, 3.6)	65.3 t	C-2, C-4, C-5, C-9
7	5.05 s	56.2 t	5.07 s	56.3 t	C-2, C-3, C-4, C-9	1.83 s	9.3 q	C-2, C-3, C-4
8						3.88 s	56.5 q	C-4
9		165.6 s		166.3 s		4.16 qn (6.9)	67.8 d	C-6
10	5.69 hept (1.2)	115.3 d	5.68 s	115.5 d	C-11, C-12, C-13	1.36 d (6.9)	21.0 q	C-5, C-9
11		157.1 s		157.7 s				
12	1.90 d (1.2)	26.3 q	1.88 s	27.4 q	C-9, C-10, C-11, C-13			
13	2.16 d (1.2)	19.2 q	2.17 s	20.3 q	C-9, C-10, C-11, C-12			
14	4.15 s	61.3 q	4.09 s	62.4 q	C-4			
15	4.81 m	62.3 d	4.46 s	56.0 t	C-4, C-5, C-6, C-16			
15-OH	4.42 d (4.5)							
16	1.40 d (6.3)	23.2 q	2.35 s	17.4 q	C-5, C-15			

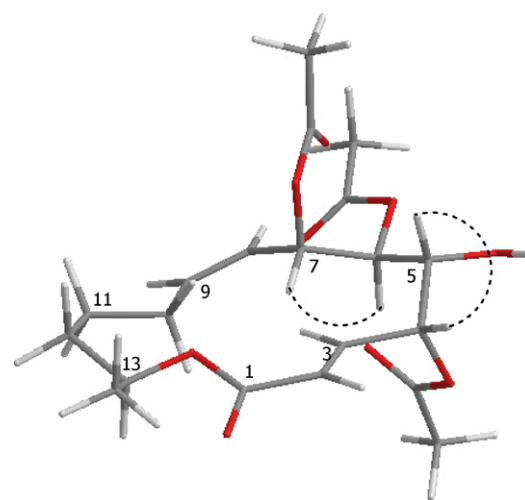
Table 2The NMR data for pestalotioprolide A (**4**), the diacetate of pestalotioprolide B (**6**), the triacetate of **4** (**7**) and the diacetate of seiricuprolide (**8**).

Position	4		6		7		8		HMBC of 4 , 6 , 7 and 8
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	
1		165.6 s		164.9 s		165.1 s		165.3 s	
2	6.26 d (15.6)	125.6 d	5.95 dd (15.5, 1.5)	122.4 d	6.46 d (15.9)	130.1 d	6.13 dd (15.6, 1.2)	126.1 d	C-1, C-3, C-4, C-5
3	6.86 dd (15.6, 7.0)	143.0 d	7.01 dd (15.5, 4.5)	140.9 d	6.93 dd (15.9, 9.0)	136.2 d	6.77 dd (15.6, 6.8)	138.5 d	C-1, C-2, C-4, C-5
4	4.73 m	71.9 d	5.34 ddd (6.5, 4.5, 1.5)	72.4 d	5.45 dd (9.0, 3.6)	71.5 d	5.33 m	73.1 d	C-2, C-3, C-5
5	4.42 m	68.2 d	3.25 dd (6.5, 4.5)	58.0 d	4.46 dd (8.7, 3.6)	60.8 d	3.26 dd (6.3, 4.2)	58.9 d	C-3, C-4, C-7
6	3.59 dd (7.2, 2.0)	73.8 d	3.22 dd (8.5, 4.5)	55.3 d	4.97 dd (8.7, 2.4)	74.0 d	3.02 dd (8.4, 4.2)	55.8 d	C-4, C-5, C-7, C-8
7	4.45 m	68.6 d	5.14 t (8.5)	73.0 d	5.96 dd (9.9, 2.4)	67.2 d	5.38 t (9.6)	66.0 d	C-5, C-8, C-9
8	5.57 m	129.0 d	5.47 dd (15.5, 8.5)	124.5 d	5.16 t (9.9)	122.9 d	5.28 m	123.7 d	C-6, C-7, C-10
9	5.47 m	133.0 d	6.16 ddd (15.5, 10.0, 5.5)	139.5 d	5.54 td (9.9, 5.1)	136.1 d	5.51 td (10.1, 3.0)	138.0 d	C-7, C-10, C-11
10	a: 2.20 m b: 1.95 m	29.8 t	a: 2.16 m b: 2.06 m	33.1 t	a: 2.55 m b: 1.87 m	30.4 t	a: 2.44 m b: 2.05 m	29.0 t	C-8, C-9
11	a: 1.57 m b: 1.11 m	26.0 t	a: 1.90 m b: 1.13 m	24.5 t	a: 1.69 m b: 1.13 m	25.8 t	a: 1.75 m b: 1.17 m	24.9 t	C-9, C-10, C-12, C13
12	a: 1.84 m b: 1.49 m	35.0 t	a: 1.80 m b: 1.56 m	34.4 t	a: 1.85 m b: 1.51 m	34.8 t	a: 1.81 m b: 1.43 m	33.3 t	C-10, C-11, C-13
13	5.02 m	73.2 d	4.78 dqd (10.0, 6.0, 2.0)	72.3 d	5.01 m	74.2 d	4.98 m	72.9 d	C-1, C-11, C-12, C-14
14	1.30 d (6.3)	20.6 q	1.27 d (6.0)	20.2 q	1.32 d (6.3)	20.7 q	1.21 d (6.3)	19.8 q	C-12, C-13
CH ₃ CO			2.20 s, 2.20 s	169.8 s 20.7 q 169.9 s 21.2 q	2.12 s, 2.14 s, 2.17 s	169.7 s 20.5 q 169.4 s 20.8 q 170.5 s 20.9 q	2.02 s, 2.07 s	169.3 s 20.8 q 169.8 21.0 s	

The ^1H NMR spectrum (Table 1) contained signals for one set of nonequivalent oxymethylene protons [δ 4.40 (dd, J = 12.0 and 1.5 Hz) and 4.28 (dd, J = 12.0 and 3.6 Hz), each 1H], one oxymethine proton (δ 4.16, qn, J = 6.9 Hz), one methoxyl group (δ 3.88, s), one methine proton (δ 2.69, ddd, J = 6.9, 3.6 and 1.5 Hz) and two methyl groups (δ 1.83, s and 1.36, d, J = 6.9 Hz, each 3H). The ^{13}C NMR spectrum displayed one typical carbonyl carbon of an α,β -unsaturated ester moiety (δ 167.6), two quaternary (δ 166.9 and 105.2), one oxymethine (δ 67.8), one oxymethylene (δ 65.3), one methoxy (δ 56.5), one methine (δ 40.9), and two methyl (δ 21.0 and 9.3) carbons. The methyl protons at δ_{H} 1.83 (H₃-7) gave the 3J HMBC correlations with C-2 (δ 167.6) and C-4 (δ 166.9) while the methoxy protons at δ 3.88 (H₃-8) showed the same correlation with C-4 (Table 1). These data indicated the attachment of the methyl and methoxyl groups at C-3 (δ 105.2) and C-4, respectively. The following ^1H - ^1H COSY correlations: H-5 (δ 2.69)/H_{ab}-6 (δ 4.40 and 4.28) and H-9 (δ 4.16) and H₃-10 (δ 1.36)/H-9, as well as the HMBC correlations of H-5/C-4 and H_{ab}-6/C-2, constructed a 5,6-dihydropyrone having a 1-hydroxyethyl unit at C-5 (δ 40.9). H-5 was located at the pseudoequatorial position according to its small coupling constants of 3.6 and 1.5 Hz with H_{ab}-6. Signal enhancement of H-9 and H₃-8 upon irradiation of H-5 in the NOEDIFF experiment indicated the close proximity of H-5 and H-9. The absolute configuration of **3** was not determined due to the insufficient amount. Consequently, pestalotiopyrone C (**3**) was identified as a new 5,6-dihydropyrone derivative.

Pestalotioprolide A (**4**) with the molecular formula C₁₄H₂₂O₆ by HREIMS was obtained as a colorless gum. It exhibited UV and IR absorption bands similar to those of seiricuprolide. The ^1H and ^{13}C NMR data (Table 2) were similar to those of seiricuprolide. The major differences were the replacement of signals for a *cis*-epoxymethine unit (δ 3.23 and 3.01, δ 62.6 and 58.9) in seiricuprolide (Ballio et al., 1988) with those of two hydroxymethine units (δ 4.42 and δ 3.59, δ 68.2 and 73.8) in **4**. The HMBC correlations of H-5 (δ 4.42)/C-3 (δ 143.0), C-4 (δ 71.9) and C-7 (δ 68.6) and those of H-6 (δ 3.59)/C-4, C-5 (δ 68.2), C-7 and C-8 (δ 129.0) (Table 2) supported the above conclusion. The appearance of hydroxymethine protons in **4** as multiplets and the NOEDIFF results provided inadequate data to establish their relative configurations. To overcome this problem, an acetate derivative

of **4** (**7**) was prepared. The ^1H NMR data of **7** (Table 2) were almost identical to those of **4** except for the appearance of signals for three oxymethine protons, H-4 (δ 5.45, dd, J = 9.0 and 3.6 Hz), H-6 (δ 4.97, dd, J = 8.7 and 2.4 Hz) and H-7 (δ 5.96, dd, J = 9.9 and 2.4 Hz), with well-defined multiplicities at a much lower field as well as three additional singlets for three acetoxyl groups, δ_{H} 2.12, 2.14 and 2.17. These results indicated that the 5-OH was intact. In addition, H-4, H-5, H-6 and H-7 were assigned at equatorial, axial, axial and equatorial, respectively, on the basis of the following coupling constants; $J_{4,5}$ = 3.6 Hz, $J_{5,6}$ = 8.7 Hz and $J_{6,7}$ = 2.4 Hz. Irradiation of H-5 (δ 4.46) in the NOEDIFF experiment of the triacetate **7** enhanced the signal intensity of H-4 (δ 5.45), while irradiation of H-7 (δ 5.96) affected the signal intensity of H-6 (δ 4.97) (Fig. 2). These results confirmed *cis*-relationship of H-4/H-5 and H-6/H-7 as well as *trans*-relationship of H-5/H-6. As **4** and seiricuprolide were co-metabolites, we proposed that the absolute configurations at C-4, C-7 and C-13 in **4** would have *R*, *S* and *S* configurations, respectively, identical to those of seiricuprolide. Thus, both C-5 and C-6 would possess *R*-configuration. Furthermore, the observed optical rotation of **4**, $[\alpha]_{\text{D}}^{27}$ -18.1 (*c* 0.15,

**Fig. 2.** NOEDIFF data of the triacetate of pestalotioprolide A (**7**).

CHCl₃), was similar to that of the 5R,6R-bromohydrin derivative of seiricuprolide, $[\alpha]_D^{25} -16.0$ (c 0.15, CHCl₃) (Ballio et al., 1988; Bartolucci et al., 1992), thus supporting the assigned absolute configurations. Therefore, pestalotioprolide A (**4**) was a new 5R,6R-dihydroxy derivative of seiricuprolide.

Pestalotioprolide B (**5**) was isolated as a diacetate derivative (**6**) due to difficulty in the separation of **5** from seiricuprolide. Compound **6** was assigned to have the molecular formula C₁₈H₂₄O₇ by HREIMS. It exhibited UV and IR absorption bands similar to those of the diacetate derivative of seiricuprolide (**8**). Their ¹H NMR data (Table 2) were almost identical except for the replacement of signals for two *cis*-olefinic protons (δ 5.51, td, *J* = 10.1 and 3.0 Hz, H-9 and 5.28, m, H-8) in **8** with those for two *trans*-olefinic protons (δ 6.16, ddd, *J* = 15.5, 10.0 and 5.5 Hz, H-9 and 5.47, dd, *J* = 15.5 and 8.5 Hz, H-8). This conclusion was confirmed by the ³J HMBC correlations of H-8/C-6 (δ 55.3) and C-10 (δ 33.1) and those of H-9/C-7 (δ 73.0) and C-11 (δ 24.5). The observed optical rotation of **6**, $[\alpha]_D^{25} +69.9$ (c 1.45, CHCl₃), was almost identical to that of seiricuprolide, $[\alpha]_D^{25} +67.2$ (c 1.45, CHCl₃) (Ballio et al., 1988) and **8**, $[\alpha]_D^{25} +65.8$ (c 1.45, CHCl₃), indicating that **6** possessed identical absolute configurations to seiricuprolide. Therefore, pestalotioprolide B (**5**), the precursor of **6**, differed from seiricuprolide in the configuration of the C8–C9 double bond.

Compound **2** was the only one obtained in amounts sufficient for antibacterial testing against *Staphylococcus aureus* ATCC25923 and a methicillin *S. aureus* clinical isolate as well as for antifungal activity against *Candida albicans* NCPF3153, *Cryptococcus neoformans* ATCC90113 and *Microsporum gypseum* clinical isolate. Unfortunately, it exhibited no activity against any of these human pathogens.

The fungi of the genus *Pestalotiopsis* have produced various bioactive metabolites of polyketide and terpenoid types (Deyrup et al., 2006; Ding et al., 2008; Lee et al., 1996; Li and Strobel, 2001; Liu et al., 2008a; Pulici et al., 1996a, 1996b; Strobel, 2003; Strobel et al., 1996, 2002, 2004). However, there have been only two reports on the isolation of chromones (Xu et al., 2009a), coumarins and cytosporones (Xu et al., 2009b) from two mangrove-derived *Pestalotiopsis* sp., isolated from the Chinese mangrove *R. mucronata*. This is the first report on 14-membered lactones and α -pyrones from *Pestalotiopsis* sp., isolated from the mangrove plants.

3. Experimental

3.1. General experimental procedures

Optical rotations were measured on a JASCO P-1020 polarimeter. Infrared spectra (IR) were recorded on a Perkin-Elmer 783 FTS 165 FT-IR spectrometer. Ultraviolet (UV) absorption spectra were measured in MeOH on a Shimadzu UV-160A spectrophotometer. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded in CDCl₃ on a 300 or a 500 MHz Bruker FTNMR Ultra Shield spectrometer. Mass spectra were obtained on a MAT 95 XL mass spectrometer (Thermo-finnigan). Thin-layer chromatography (TLC) and precoated TLC (PTLC) were performed on silica gel GF₂₅₆ (Merck). Column chromatography (CC) was carried out on silica gel (Merck) type 60 (230–400 mesh ASTM) or type 100 (70–230 mesh ASTM), or Sephadex LH-20 with MeOH or on reverse phase silica gel C-18 with a gradient system of MeOH–H₂O.

3.2. Fungal material

The mangrove-derived fungus *Pestalotiopsis* sp. PSU-MA92 (GenBank accession number GU592002) was isolated from a twig of *R. apiculata*, collected from Trang province, Thailand in 2006 while *Pestalotiopsis* sp. PSU-MA119 (GenBank accession number HQ187633) was obtained from a twig of *R. mucronata*, collected from Satun province, Thailand in 2007. These fungi were deposited

as PSU-MA92 and PSU-MA119 at the Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University and as BCC 35918 and BCC 42020 at the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) Culture Collection, Thailand.

3.3. Fermentation, extraction and isolation

The mangrove-derived fungus *Pestalotiopsis* sp. PSU-MA92 was grown on potato dextrose agar at 25 °C for 5 days. Three pieces (0.5 cm × 0.5 cm) of mycelial agar plugs were inoculated into 500 ml Erlenmeyer flasks containing 300 ml of potato dextrose broth at room temperature for 4 weeks. The culture (15 l) was filtered to give the filtrate and mycelia. The filtrate was divided into 30 portions. Each portion was extracted three times with EtOAc. The combined EtOAc extracts were dried over anhydrous Na₂SO₄ and evaporated to dryness under reduced pressure to afford a broth extract (278.8 mg) as a dark brown gum. The crude extract was fractionated by CC over Sephadex-LH 20 to give four fractions (A–D). Fraction B (87.9 mg) was purified by CC over reverse phase silica gel using 50% methanol in water as a mobile phase to yield five subfractions (B1–B5). Subfraction B2 (4.2 mg) was further purified by PTLC with 10% ethyl acetate in chloroform as a mobile phase (10 runs) to give **3** (1.4 mg). Subfraction B3 was further separated by CC over silica gel with 30% ethyl acetate in petroleum ether as a mobile phase to give **1** (1.2 mg) and **2** (11.7 mg). Fraction C (68.1 mg) was purified using the same procedure as fraction B to yield four subfractions (C1–C4). Subfraction C2 (9.2 mg) was further purified by CC over Sephadex LH-20 to afford four subfractions. The third subfraction was further purified by PTLC with 3% methanol in dichloromethane as a mobile phase (6 runs) to give 2'-hydroxy-3',4'-didehydropenicillide (2.2 mg). The crude extract of the fungus PSU-MA119 (976 mg) was prepared using the same procedure as that of the fungus PSU-MA92 to afford a dark brown gum (976 mg). It was fractionated by CC over Sephadex LH-20 to give five fractions (A–E). Fraction C (501.2 mg) was purified by CC over reverse phase silica gel using 50% methanol in water as a mobile phase to yield four subfractions (C1–C4). Subfraction C2 (79.3 mg) was further separated by flash CC over silica gel with 40% ethyl acetate in petroleum ether as a mobile phase to afford five subfractions (C21–C25). Seiricuprolide (2.1 mg) was obtained from subfraction C22. Subfraction C23 (14.0 mg) was further subjected to an acetylation reaction (Ac₂O in pyridine at room temperature, overnight). After work up, the reaction mixture was obtained as a yellow gum (24.9 mg). It was further purified by flash CC over silica gel with 10% acetone in petroleum ether as a mobile phase to yield three subfractions. Compounds **7** (3.9 mg) and **8** (3.3 mg) were obtained from the first and the second subfractions, respectively. The third subfraction (4.7 mg) was further purified by PTLC to give **6** (2.0 mg). Compound **4** (1.8 mg) was obtained from subfraction C24.

3.4. Pestalotiopyrone A (**1**)

Colorless gum. $[\alpha]_D^{25} -44.07$ (c 0.33, MeOH). UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 210 (3.96), 287 (3.40). FT-IR $\nu_{\max}^{\text{neat}}$ cm⁻¹: 3410, 1722, 1711. ¹H and ¹³C NMR (Acetone-*d*₆) data see Table 1. EIMS *m/z* (% relative intensity): 282 (1), 199 (100), 183 (28), 153 (9), 139 (10), 83 (54). HREIMS *m/z* 282.1104 [M]⁺ (calcd for C₁₄H₁₈O₆, 282.1103).

3.5. Pestalotiopyrone B (**2**)

Colorless gum. UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 212 (3.54), 273 (3.79). FT-IR $\nu_{\max}^{\text{neat}}$ cm⁻¹: 3414, 1720, 1712. ¹H and ¹³C NMR (CDCl₃) data see Table 1. EIMS *m/z* (% relative intensity): 282 (1), 199 (100), 183 (28), 153 (9), 139 (10), 83 (54). HREIMS *m/z* 282.1097 [M]⁺ (calcd for C₁₄H₁₈O₆, 282.1103).

3.6. Pestalotiopyrone C (3)

Colorless gum. $[\alpha]_D^{25} +38.2$ (c 1.0, CHCl₃). UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 207 (3.03), 254 (3.45). FT-IR $\nu_{\max}^{\text{neat}}$ cm⁻¹: 3407, 1679. ¹H and ¹³C NMR (CDCl₃) data see Table 1. EIMS m/z (% relative intensity): 186 (7), 142 (100), 124 (24), 109 (19), 97 (10). HREIMS m/z 186.0901 [M]⁺ (calcd for C₉H₁₄O₄ 186.0892).

3.7. Pestalotioprolide A (4)

Colorless gum. $[\alpha]_D^{27} -18.1$ (c 0.15, CHCl₃). UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 208 (3.66). FT-IR $\nu_{\max}^{\text{neat}}$ cm⁻¹: 3404, 1722. ¹H and ¹³C NMR (CDCl₃) data see Table 2. EIMS m/z (% relative intensity): 286 (1), 251 (7), 144 (23), 125 (61), 109 (67), 95 (66), 81 (100). HREIMS m/z 268.1302 [M-H₂O]⁺ (calcd for C₁₄H₂₀O₅, 268.1311).

3.8. The diacetate derivative of 5 (6)

Colorless gum. $[\alpha]_D^{25} +69.9$ (c 1.45, CHCl₃). UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 208 (3.60). FT-IR $\nu_{\max}^{\text{neat}}$ cm⁻¹: 1715. ¹H and ¹³C NMR (CDCl₃) data see Table 2. EIMS m/z (% relative intensity): 352 (1), 310 (7), 268 (6), 250 (28), 167 (54), 126 (53), 97 (83), 81 (100). HREIMS m/z 310.1417 [M-C₂H₂O]⁺ (calcd for C₁₆H₂₂O₆, 310.1416).

3.9. The triacetate derivative of 4 (7)

Colorless gum. $[\alpha]_D^{26} -11.9$ (c 1.0, CHCl₃). UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 208 (3.69). FT-IR $\nu_{\max}^{\text{neat}}$ cm⁻¹: 3372, 1738. ¹H and ¹³C NMR (CDCl₃) data see Table 2.

3.10. The diacetate derivative of seiricuprolide (8)

Colorless gum. $[\alpha]_D^{25} +65.8$ (c 1.45, CHCl₃). UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 208 (3.61). FT-IR $\nu_{\max}^{\text{neat}}$ cm⁻¹: 1734. ¹H and ¹³C NMR (CDCl₃) data see Table 2.

3.11. Antimicrobial assays using a colorimetric broth microdilution test (CLSI, 2002a,b,c; Drummond and Waigh, 2000)

The pure compound (200 µg/ml) was preliminarily tested against all the test microorganisms by a colorimetric broth microdilution test. A stock solution (10 mg/ml) was diluted with Mueller–Hinton broth (MHB) for bacteria and RPMI for fungi to 400 µg/ml and 50 µl of each test solution was pipetted into 3 wells of a 96 well plate. 50 µl of each inoculum was added to the test solution and incubated at 35 °C for 15 h (*S. aureus*, MRSA and *C. albicans*), 25 °C for 45 h (*C. neoformans*) and 25 °C for 6 days (*M. gypseum*). Then, 10 µl of 0.18% resazurin was added into each well and further incubated for another 2–3 h for *S. aureus*, MRSA, *C. albicans* and *C. neoformans* and 1 day for *M. gypseum*. Vancomycin, amphotericin B and miconazole were used as positive controls for *S. aureus* and MRSA, *C. albicans* and *C. neoformans*, and *M. gypseum*, respectively. The color change was then observed visually. A blue or purple color of the wells indicated inhibition of growth (positive result). Any color changes from purple to pink or colorless were recorded as negative result. Vancomycin, amphotericin B and miconazole exhibited the MIC values of 1, 0.25 and 1 µg/ml, respectively.

Acknowledgements

V. Rukachaisirikul thanks Office of the Higher Education Commission and the Thailand Research Fund for the TRF Senior

Research Scholar (Grant No. RTA5180007). A. Rodglin is grateful to the Center for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC) for a scholarship. Finally, the Graduate School, Prince of Songkla University is gratefully acknowledged for partial support. We also thank Dr. Brian Hodgson for checking the English.

References

- Ballio, A., Evidente, A., Graniti, A., Randazzo, G., Sparapano, L., 1988. Seiricuprolide, a new phytotoxic macrolide from a strain of *Seiridium cupressi* infecting cypress. *Phytochemistry* 27, 3117–3121.
- Bartolucci, C., Cerrini, S., Lamba, D., Evidente, A., Randazzo, G., 1992. Absolute configuration of seiricuprolide, a new phytotoxin from *Seiridium cupressi*. *Acta Crystallogr. C* 48, 83–86.
- Camarda, L., Merlini, L., Nasini, G., 1976. Metabolites of *Cercospora*. Taiwapyrone, an α -pyrone of unusual structure from *Cercospora taiwanensis*. *Phytochemistry* 15, 537–539.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2002a. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard M27-A2, 2nd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2002b. Reference Method for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard M7-A4. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2002c. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard. CLSI Documents M38-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Deyrup, S.T., Swenson, D.C., Gloer, J.B., Wicklow, D.T., 2006. Caryophyllene sesquiterpenoids from a fungicolous isolate of *Pestalotiopsis disseminata*. *J. Nat. Prod.* 69, 608–611.
- Ding, G., Li, Y., Fu, S., Liu, S., Wei, J., Che, Y., 2009. Ambuic acid and torreyanic acid derivatives from the endolichenic fungus *Pestalotiopsis* sp. *J. Nat. Prod.* 72, 182–186.
- Ding, G., Liu, S.C., Guo, L.D., Zhou, Y.G., Che, Y.S., 2008. Antifungal metabolites from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis foedan.* *J. Nat. Prod.* 71, 615–618.
- Drummond, A.J., Waigh, R.D., 2000. Recent research developments in phytochemistry, vol. 4. pp. 143–152.
- Kawamura, H., Kaneko, T., Koshino, H., Esumi, Y., Uzawa, J., Sugawara, F., 2000. Penicillides from *Penicillium* sp. isolated from *Taxus cuspidata*. *Nat. Prod. Lett.* 14, 477–484.
- Lee, J.C., Strobel, G.A., Lobkovsky, E., Clardy, J., 1996. Torreyanic acid: a selectively cytotoxic quinone dimer from the endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora*. *J. Org. Chem.* 61, 3232–3233.
- Li, J.Y., Strobel, G.A., 2001. Jesterone and hydroxy-jesterone antioomycete cyclohexenone epoxides from the endophytic fungus *Pestalotiopsis jesteri*. *Phytochemistry* 57, 261–265.
- Liu, L., Liu, S.C., Jiang, L.H., Chen, X.L., Guo, L.D., Che, Y.S., 2008a. Chloropupekeanin, the first chlorinated pupukeanane derivative, and its precursors from *Pestalotiopsis fici*. *Org. Lett.* 10, 1397–1400.
- Liu, L., Tian, R., Liu, S., Chen, X., Guo, L., Che, Y., 2008b. Pestaloficiols A–E, bioactive cyclopropane derivatives from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis fici*. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 6021–6026.
- Pulici, M., Sugawara, F., Koshino, H., Uzawa, J., Yoshida, S., 1996a. A new isodrimenol from *Pestalotiopsis* sp. *J. Nat. Prod.* 59, 47–48.
- Pulici, M., Sugawara, F., Koshino, H., Uzawa, J., Yoshida, S., Lobkovsky, E., Clardy, J., 1996b. Pestalotiopsins A and B: new caryophyllenes from an endophytic fungus of *Taxus brevifolia*. *J. Org. Chem.* 61, 2122–2124.
- Strobel, G.A., 2003. Endophytes as sources of bioactive products. *Microb. Infect.* 5, 535–544.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., Harper, J., 2004. Natural products from endophytic microorganisms. *J. Nat. Prod.* 67, 257–268.
- Strobel, G., Ford, E., Worapong, J., Harper, J.K., Arif, A.M., Grant, D.M., Fung, P.C.W., Wah Chau, R.M., 2002. Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. *Phytochemistry* 60, 179–183.
- Strobel, G.A., Yang, X., Sears, J., Kramer, R., Sidhu, R.S., Hess, W.M., 1996. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallichiana*. *Microbiology* 142, 435–440.
- Xu, J., Kjer, J., Sendker, J., Wray, V., Guan, H., Edrada, R., Lin, W., Wu, J., Proksch, P., 2009a. Chromones from the endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. isolated from the Chinese mangrove plant *Rhizophora mucronata*. *J. Nat. Prod.* 72, 662–665.
- Xu, J., Kjer, J., Sendker, J., Wray, V., Guan, H., Edrada, R., Mueller, W.E.G., Bayer, M., Lin, W., Wu, J., Proksch, P., 2009b. Cytosporones, coumarins, and an alkaloid from the endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. isolated from the Chinese mangrove plant *Rhizophora mucronata*. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 7362–7367.

Sesquiterpene and Xanthone Derivatives from the Sea Fan-Derived Fungus *Aspergillus sydowii* PSU-F154

Kongkiat Trisuwan,[†] Vatcharin Rukachaisirikul,^{*,†} Morakot Kaewpet,[†] Souwalak Phongpaichit,[‡] Nongporn Hutadilok-Towatana,[§] Sita Preedanon,[⊥] and Jariya Sakayaroj[⊥]

[†]Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

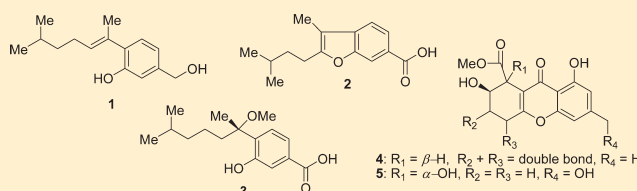
[‡]Natural Products Research Center and Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

[§]Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

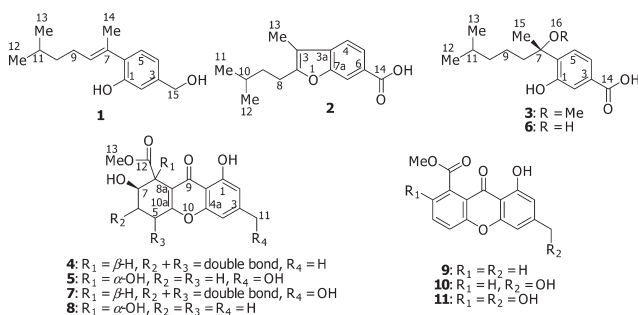
[⊥]National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Thailand Science Park, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand

S Supporting Information

ABSTRACT: Three new sesquiterpenes, named aspergillusenes A (1) and B (2) and (+)-(7*S*)-7-*O*-methylsydonic acid (3), and two new hydrogenated xanthone derivatives, named aspergillusones A (4) and B (5), were isolated from the sea fan-derived fungus *Aspergillus sydowii* PSU-F154 together with 10 known compounds. Their structures were identified on the basis of spectroscopic data. The isolated compounds were evaluated for their antioxidant activity.



Many biologically active secondary metabolites have been isolated from the genus *Aspergillus*.¹ During our ongoing search for biologically active metabolites from marine-derived fungi, the broth EtOAc extract of *Aspergillus sydowii* PSU-F154, isolated from a gorgonian sea fan of the genus *Annella*, exhibited antioxidant activity in the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH[•]) scavenging assay. Investigation of the EtOAc extract led to the isolation and structure determination of three new sesquiterpenes, aspergillusenes A (1) and B (2) and (+)-(7*S*)-7-*O*-methylsydonic acid (3), and two new hydrogenated xanthone derivatives, aspergillusones A (4) and B (5), along with 10 known compounds, including one sesquiterpene (6), two hydrogenated xanthones (7, 8), five xanthones (including 9–11), one diketopiperazine alkaloid, and one phenol. Their antioxidant activity was examined with the DPPH[•] assay.



All compounds were purified using various chromatographic techniques, and their structures were elucidated by interpretation of spectroscopic data, including IR, UV, NMR, and MS. For the 10 known compounds, the structures were confirmed by comparison of the ¹H and ¹³C NMR data with those previously reported. They were identified as (+)-(7*S*)-sydonic acid (6),² (7*R*,8*R*)-AGI-B4 (7),³ (7*R*,8*R*)-α-diversonolic ester (8),^{4,5} methyl 8-hydroxy-6-methyl-9-oxo-9*H*-xanthene-1-carboxylate (9),⁶ sydowinins A (10) and B (11),⁷ pinselin,⁸ methyl 1,6-dihydroxy-3-methyl-9-oxo-9*H*-xanthene-1-carboxylate,⁹ (11*S*,14*S*)-cyclo-(L-Trp-L-Phe),¹⁰ and orcinol.¹¹

Aspergillusene A (1) was isolated as a colorless gum with the molecular formula C₁₅H₂₂O₂ assigned from HREIMS data. The UV spectrum displayed absorption bands at 228 and 270 nm, characteristic of an aromatic chromophore. The IR spectrum exhibited absorption bands for hydroxy and double-bond functionalities at 3313 and 1635 cm⁻¹, respectively. The ¹H NMR spectrum (Table 1) showed characteristic signals for three aromatic protons of a 1,2,4-trisubstituted benzene [δ_{H} 7.07 (d, *J* = 7.8 Hz), 6.92 (d, *J* = 1.5 Hz), and 6.87 (dd, *J* = 7.8 and 1.5 Hz)], an isopentyl moiety [δ_{H} 2.32 (q, *J* = 7.2 Hz), 1.60 (m), 1.34 (m), and 0.93 (d, *J* = 6.6 Hz)], one hydroxy proton (δ_{H} 5.69, brs), one olefinic proton of a trisubstituted double bond (δ_{H} 5.55, tq, *J* = 7.2 and 1.2 Hz), one hydroxymethyl group (δ_{H} 4.62, s), and one methyl group (δ_{H} 1.98, d, *J* = 1.2 Hz). Three aromatic protons

Received: May 2, 2011

Published: June 30, 2011

Table 1. ^1H and ^{13}C NMR Data for Aspergillusenes A (1) and B (2) and (+)-(7S)-7-O-Methylsydonic Acid (3)

position	1		2		3	
	δ_{C}	δ_{H} m (J, Hz)	δ_{C}	δ_{H} m (J, Hz)	δ_{C}	δ_{H} m (J, Hz)
1-OH	152.1, C	5.69, brs			156.1, C	8.96, s
2	113.8, CH	6.92, d (1.5)	158.8, C		118.6, CH	7.49, s
3	141.1, C		110.0, C		129.9, C	
3a			135.6, C			
4	118.6, CH	6.87, dd (7.8, 1.5)	118.2, CH	7.37, d (8.1)	121.2, CH	7.49, d (8.5)
5	128.5, CH	7.07, d (7.8)	124.2, CH	7.89, d (8.1)	127.5, CH	7.03, d (8.5)
6	130.5, C		135.6, C		133.8, C	
7	131.6, C		112.7, CH	8.04, s	83.0, C	
7a			153.2, C			
8	132.1, CH	5.55, tq (7.2, 1.2)	24.5, CH_2	2.67, t (7.5)	39.8, CH_2	1.77, m
						1.75, m
9	26.4, CH_2	2.32, q (7.2)	36.9, CH_2	1.55, m	21.6, CH_2	1.27, m
						1.05, m
10	38.6, CH_2	1.34, m	27.7, CH	1.49, m	39.0, CH_2	1.05, m
11	27.8, CH	1.60, m	22.3, CH_3	0.86, d (6.0)	27.8, CH	1.42, m
12	22.5, CH_3	0.93, d (6.6)	22.3, CH_3	0.86, d (6.0)	22.5, CH_3	0.75, d (6.5)
13	22.5, CH_3	0.93, d (6.6)	7.8, CH_3	2.10, s	22.5, CH_3	0.75, d (6.5)
14	17.9, CH_3	1.98, d (1.2)	172.0, C		169.4, C	
15	65.1, CH_2	4.62, s			22.2, CH_3	1.55, s
16					50.6, CH_3	3.16, s

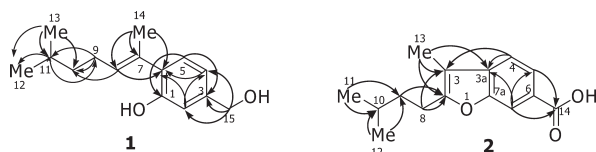


Figure 1. Selected HMBC correlations for compounds 1 and 2.

resonating at δ_{H} 7.07, 6.92, and 6.87 were assigned as H-5, H-2, and H-4, respectively, on the basis of their multiplicities, coupling constants, and 3J HMBC correlations: H-2/C-4 (δ_{C} 118.6) and C-6 (δ_{C} 130.5); H-4/C-2 (δ_{C} 113.8) and C-6; H-5/C-1 (δ_{C} 152.1) and C-3 (δ_{C} 141.1) (Figure 1). The substituent at C-1 of the 1,2,4-trisubstituted benzene ring was identified as a hydroxy group according to the chemical shift of C-1. The hydroxymethylene protons, H₂-15 (δ_{H} 4.62), showed HMBC correlations with C-2, C-3, and C-4, suggesting that the hydroxymethyl unit was located at C-3 of the benzene ring. Signal enhancement of H-2 and H-4 after irradiation of H₂-15 in the NOEDIFF experiment supported the assigned location. The isopentyl unit was established according to the following ^1H – ^1H COSY and HMBC correlations: H₂-10 (δ_{H} 1.34)/H₂-9 (δ_{H} 2.32) and H-11 (δ_{H} 1.60); H-11/H₃-12 (δ_{H} 0.93) and H₃-13 (δ_{H} 0.93); H₂-9/C-10 (δ_{C} 38.6) and C-11 (δ_{C} 27.8); H-11/C-9 (δ_{C} 26.4), C-12, and C-13; and H₃-13/C-10, C-11, and C-12. In the ^1H – ^1H COSY spectrum, the methylene protons, H₂-9, of the isopentyl unit showed a cross-peak with the olefinic proton, H-8 (δ_{H} 5.55), which was further coupled with the methyl protons, H₃-14 (δ_{H} 1.98), with a small coupling constant of 1.2 Hz. These data as well as the HMBC correlations of H₃-14 with C-7 (δ_{C} 131.6) and C-8 (δ_{C} 132.1) established a 2-substituted 6-methyl-2-heptenyl fragment. This fragment was attached at C-6 of the benzene ring on the basis of the HMBC

correlations of H-8 and H₃-14 with C-6. The configuration of the double bond in the heptenyl unit was assigned as *E* according to signal enhancement of H₂-9 upon irradiation of H₃-14 in the NOEDIFF experiment. Therefore, aspergillusene A had the structure 1.

Aspergillusene B (2), a colorless gum, had the molecular formula $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_3$, which was determined by HREIMS. The UV spectrum revealed the presence of a benzofuran chromophore at 219, 250, 266, 295, and 303 nm.¹² The IR spectrum was similar to that of 1 with an additional absorption band for a carbonyl group of a carboxylic acid at 1721 cm^{-1} . A carbonyl resonance at δ_{C} 172.0 in the ^{13}C NMR spectrum (Table 1) supported the IR data. The ^1H NMR spectrum (Table 1) was similar to that of 1. The differences were the downfield shift of all aromatic protons, H-4 (δ_{H} 7.37), H-5 (δ_{H} 7.89), and H-7 (δ_{H} 8.04), and the disappearance of signals for olefinic, hydroxy, and hydroxymethyl protons in 2. In the ^{13}C NMR spectrum, the replacement of the hydroxymethyl carbon in 1 with the carboxyl carbonyl carbon, C-14 (δ_{C} 172.0), in 2 revealed that the hydroxymethyl group in 1 was oxidized to the carboxylic acid in 2. The 3J HMBC correlations of H-5 and H-7 with C-14 (Figure 1) confirmed the assignment. In addition, the 2-substituted 6-methyl-2-heptenyl side chain and 1-OH in 1 formed an ether linkage between C-2 (δ_{C} 158.8) and C-7a (δ_{C} 153.2) in 2 to form a benzofuran moiety. The HMBC correlations of the methyl protons, H₃-13 (δ_{H} 2.10), with C-2, C-3 (δ_{C} 110.0) and C-3a (δ_{C} 135.6) and those of H₂-8 (δ_{H} 2.67) with C-2 and C-3 established the location of the methyl and isopentyl groups at C-3 and C-2 of the benzofuran unit, respectively. Consequently, aspergillusene B (2) was assigned as a cyclized benzofuran derivative of 1.

(+)-(7S)-7-O-Methylsydonic acid (3) was obtained as a colorless gum. The molecular formula was assigned as $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_4$ through analysis of its HREIMS spectrum. The UV (230 and

Table 2. ^1H and ^{13}C NMR Data for Aspergillusones A (4) and B (5)

position	4		5	
	δ_{C}	δ_{H} m (J, Hz)	δ_{C}	δ_{H} m (J, Hz)
1-OH	160.3, C	12.30, s	160.7, C	11.97, s
2	112.4, CH	6.63, brs	108.9, CH	6.76, s
3	147.2, C		151.0, C	
4	107.5, CH	6.71, brs	104.3, CH	6.94, s
4a	155.6, C		156.0, C	
5	123.0, CH	6.45, d (10.0)	26.0, CH ₂	2.96, m 2.87, m
6	137.8, CH	6.61, dd (10.0, 5.0)	24.2, CH ₂	2.31, m 2.21, m
7	65.2, CH	4.87, m	72.7, CH	4.09, dd (10.5, 4.0)
8	44.9, CH	4.29, d (3.5)	76.0, C	
8a	110.1, C		117.0, C	
9	181.0, C		180.0, C	
9a	108.9, C		116.8, C	
10a	158.5, C		167.2, C	
11	22.4, CH ₃	2.41, brs	64.4, CH ₂	4.76, brs
12	170.9, C		172.0, C	
13	52.8, CH ₃	3.73, s	53.3, CH ₃	3.85, s

283 nm) and IR (3400 and 1720 cm^{-1}) absorption bands revealed the presence of a benzoic acid.² Its ^1H NMR data (Table 1) were comparable with those of **6**² except for an additional signal for a methoxy group (δ_{H} 3.16, s). The presence of the methoxy group was supported by a resonance at δ_{C} 50.6 in the ^{13}C NMR and DEPT spectra. A HMBC correlation from the methoxy protons, H₃-16 (δ 3.16), to C-7 (δ_{C} 83.0) revealed the replacement of the hydroxy group in **6** with the methoxy group in **3**. The observed specific rotation of **3**, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +2$ (c 1.9, MeOH), which correlated well with that of **6**, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +2.7$ (c 2.3, MeOH), indicated that C-7 in **3** has the *S* configuration, identical to that of **6**. Therefore, **3** was identified as a methyl ether derivative of **6**.

Aspergillusone A (**4**) was obtained as a colorless gum with $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -1$ (c 0.4, MeOH). The UV and IR spectra were almost identical to those of **7**.³ The HREIMS data supported the molecular formula $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_6$, one oxygen atom less than that of **7**. The ^1H and ^{13}C NMR data (Table 2) of **4** were comparable to those of **7** except for the appearance of a signal for the aromatic methyl group (δ_{H} 2.41 and δ_{C} 22.4) in **4**, instead of the hydroxymethyl signal (δ_{H} 4.67 and δ_{C} 64.3) in **7**. The location of the methyl group at C-3 (δ_{C} 147.2) was confirmed by the HMBC correlations of the methyl protons, H₃-11, with C-2 (δ_{C} 112.4), C-3 and C-4 (δ_{C} 107.5) as well as signal enhancement of H-2 (δ_{H} 6.63) and H-4 (δ_{H} 6.71) upon irradiation of H₃-11 in the NOEDIFF experiment. The relative configuration of ring A in **4** was assigned as *trans*, identical to that of **7** according to their similar coupling constants (**4**: $J_{6,7} = 5.0$ Hz and $J_{7,8} = 3.5$ Hz; **7**: $J_{6,7} = 4.8$ Hz and $J_{7,8} = 3.6$ Hz). Irradiation of H-7 in the NOEDIFF experiment did not affect signal intensity of H-8, supporting their *trans* orientation. The observed specific rotation of **4** was almost identical to that of **7**, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -1.6$ (c 0.4, MeOH),³ indicating that they have the same absolute configuration at C-7 and C-8. Consequently, aspergillusone A (**4**) was the 11-deoxy derivative of **7**.

The molecular formula of aspergillusone B (**5**) was established by analysis of its HREIMS data as $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_8$. The UV and IR spectra were almost identical to those of **8**.⁴ Its ^1H NMR spectrum (Table 2) differs from that of **8**⁵ by the replacement of the aromatic methyl signal in **8** with a hydroxymethyl signal (δ_{H} 4.76, brs) in **5**. The HMBC correlations of the hydroxymethyl protons, H₂-11 (δ_{H} 4.76), with C-2 (δ_{C} 108.9), C-3 (δ_{C} 151.0), and C-4 (δ_{C} 104.3) as well as signal enhancement of both H-2 (δ_{H} 6.76) and H-4 (δ_{H} 6.94) upon irradiation of H₂-11 in the NOEDIFF experiment supported the attachment of the hydroxymethyl group at C-3. The coupling constants of 10.5 and 4.0 Hz between H-7 (δ_{H} 4.09) and H_{ab}-6 (δ_{H} 2.31 and 2.21) showed the pseudoaxial position of H-7, identical to that (H-7, δ_{H} 4.08, dd, $J = 10.5$ and 3.5 Hz) in **8**, thus suggesting the same relative configuration. The configurations of both C-7 and C-8 were proposed as *R*, identical to that of **8**, on the basis of above data and the same signs of their specific rotations: **5**, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -46.3$ (c 0.2, CHCl_3); **8**, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -22.6$ (c 0.23, CHCl_3).⁴ Accordingly, aspergillusone B (**5**) was determined as the 1-hydroxy derivative of **8**.

The isolated compounds **1**–**3**, **7**–**11**, and (1*S*,14*S*)-cyclo-(L-Trp-L-Phe) were subjected to a DPPH[•] assay. Among them, only the dihydroxanthone **7** showed antioxidant activity, with an IC₅₀ value of 17 μM , while the remaining compounds were inactive. This dihydroxanthone derivative (**7**), however, was much less effective than the standard butylated hydroxyanisole (IC₅₀ = 0.13 μM). The dihydroxanthone **7** and the xanthone **11** are structurally similar, with three hydroxy groups being at the same positions (C-1, C-7, and C-11). However, **7** differed from **11** in the absence of a double bond at the C7–C8 position, indicating that the planar structure in **11** might decrease the antioxidant activity.

Investigation of the sea fan-derived fungus *A. sydowii* PSU-F154 led to the isolation of 15 compounds, including three new sesquiterpenes (**1**–**3**) and two new dihydroxanthones (**4**, **5**). The xanthone derivatives have a right-hand ring structurally similar to the co-isolated orcinol. So far, there have been only two reports on compounds of this type isolated from marine-derived *Aspergillus* spp.^{13,14} Furthermore, only five phenolic bisabolane sesquiterpenes, for example, **6**, have been obtained from a marine-derived *Aspergillus* sp.¹⁵ Consequently, compounds **1**–**3** are new members of bisabolane-type sesquiterpenes and are derived via the same biosynthetic pathway as the co-occurring metabolite **6**.

EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Procedures. Optical rotations were measured on a JASCO P-1020 polarimeter. Ultraviolet spectra (UV) were measured in MeOH with an UV-160A Shimadzu spectrophotometer. Infrared spectra (IR) were recorded on a Perkin-Elmer 783 FTS 165 FT-IR spectrometer. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded in CDCl_3 on a 300 or 500 MHz Bruker FTNMR Ultra Shield spectrometer using tetramethylsilane (TMS) as an internal standard. Mass spectra were obtained on a MAT 95 XL mass spectrometer (Thermo Finnigan). Solvents for extraction and chromatography were distilled at their boiling point range prior to use except for EtOAc and light petroleum, which were analytical grade reagents. Thin-layer chromatography (TLC) and precoated TLC (PTLC) were performed on silica gel GF₂₅₄ (Merck). Column chromatography (CC) was carried out on silica gel (Merck) type 100 (70–230 Mesh ASTM) with a gradient system of MeOH– CH_2Cl_2 , on Sephadex LH-20 with MeOH, or on reversed-phase silica gel C-18 with a gradient system of MeOH– H_2O , or as otherwise stated.

Fungal Material and Identification. The marine-derived fungus *A. sydowii* PSU-F154 was isolated from a sea fan, *Annella* sp., collected from the coastal area in Suratthani Province, Thailand, in 2006. This fungus was deposited as PSU-F154 at the Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, and as BCC 28785 at the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) Culture Collection, Thailand.

The fungus PSU-F154 was identified on the basis of its morphological and molecular characteristics. Colonies on potato dextrose agar at 25 °C grew slowly, reaching 20–25 mm in diameter after 7 days, velvety to rather floccose. Colony color is blue-green and edge of colony is white. Conidiophores are upright, simple, terminating in a globose conidial head bearing phialides, which are the characteristics of the genus *Aspergillus*.¹⁶ The analysis of the DNA sequences of the internal transcribed spacer (ITS1-5.8S-ITS2) regions of its rRNA gene revealed that the PSU-F154 ITS sequence (GenBank accession no. JN123448) matched with three *A. sydowii* sequences from GenBank (HQ637369, FR733849, and FR733845) with sequence identity of 99.7%, respectively. This sea fan-derived fungus was then identified as *A. sydowii*.

Fermentation, Extraction, and Isolation. The EtOAc extract from the culture broth was prepared using the same procedure described previously.¹⁷ The broth EtOAc extract was obtained as a brown gum in 1.7 g. It was fractionated over Sephadex LH-20 to give five fractions (A–E). Separation of fraction B (573.6 mg) using Sephadex LH-20 CC afforded four fractions (B1–B4). Fraction B2 (501.3 mg) was further purified by CC over reversed-phase silica gel to give five fractions (B21–B25). Compound 5 (1.0 mg) was obtained from fraction B21 (23.5 mg) after purification by silica gel CC followed by PTLC with 40% EtOAc–light petroleum. Separation of fraction B22 (45.2 mg) using silica gel CC gave three fractions. The third fraction (4.7 mg) was further purified by PTLC using 1% MeOH–CH₂Cl₂ as a mobile phase to furnish 8 (3.1 mg). Fraction B24 (61.1 mg) was separated by CC over silica gel to give 1 (8.4 mg) and 2 (4.0 mg). Purification of fraction B25 (4.8 mg) by PTLC with 40% EtOAc–light petroleum yielded 3 (2.9 mg) and 6 (1.2 mg). Compound 4 (1.1 mg) was obtained from fraction B3 (57.3 mg) after purification by silica gel CC followed by PTLC with 10% EtOAc–CH₂Cl₂. Purification of fraction B4 (5.1 mg) by PTLC using 5% EtOAc–light petroleum afforded 10 (3.3 mg). Fraction C (630.1 mg) was separated using CC over reversed-phase silica gel to furnish six fractions (C1–C6). Fraction C1 (69.0 mg) was further purified by silica gel CC to give three fractions. The second fraction contained orcinol (3.0 mg). Purification of fraction C3 (26.3 mg) using CC over silica gel yielded (11S,14S)-cyclo-(L-Trp-L-Phe) (6.2 mg). Compound 9 (2.8 mg) was obtained from fraction C5 (35.6 mg) after purification with silica gel CC. Fraction D (269.6 mg) was subjected to CC over silica gel to afford six fractions (D1–D6). Fraction D2 (8.2 mg) was further purified by PTLC using 30% EtOAc–light petroleum to furnish pinselin (0.9 mg). Compound 7 (3.4 mg) was obtained from fraction D4 (7.3 mg) after purification by PTLC with 40% EtOAc–light petroleum. Fraction D6 contained 11 (20.0 mg). Fraction E (169.5 mg) was further purified by CC over silica gel using a gradient of EtOAc–light petroleum to afford three fractions (E1–E3). Fraction E2 (8.3 mg) after purification on PTLC with 10% EtOAc–CH₂Cl₂ yielded methyl 1,6-dihydroxy-3-methyl-9-oxo-9H-xanthene-1-carboxylate (1.2 mg).

Aspergillusene A (**1**): colorless gum; UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 228 (3.10), 270 (3.21) nm; FT-IR (neat) $\nu_{\max}$ 3313, 1635 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz) and ¹³C NMR (75 MHz) data, see Table 1; HREIMS m/z 234.1622 [M]⁺ (calcd for C₁₅H₂₂O₂, 234.1620).

Aspergillusene B (**2**): colorless gum; UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 219 (4.20), 250 (4.01), 266 (3.81), 295 (3.65), 303 (3.10) nm; FT-IR (neat) $\nu_{\max}$ 3312, 1721, 1623 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz) and ¹³C NMR (75 MHz) data, see Table 1; HREIMS m/z 246.1254 [M]⁺ (calcd for C₁₅H₁₈O₃, 246.1256).

(+)-(7S)-7-O-Methylsydonic acid (**3**): colorless gum; [α]_D²⁰ +2 (c 1.9, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 230 (3.73), 283 (3.15) nm; FT-IR (neat) $\nu_{\max}$ 3400, 1720, 1659 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz) and ¹³C NMR (125 MHz) data, see Table 1; HREIMS m/z 280.1675 [M]⁺ (calcd for C₁₆H₂₄O₄, 280.1675).

Aspergillusone A (**4**): colorless gum; [α]_D²⁵ -1 (c 0.4, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 220 (4.13), 263 (3.81), 292 (3.79), 304 (3.15) nm; FT-IR (neat) $\nu_{\max}$ 3380, 1745, 1681, 1653 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz) and ¹³C NMR (125 MHz) data, see Table 2; HREIMS m/z 284.0685 [M - H₂O]⁺ (calcd for C₁₆H₁₂O₅, 284.0681).

Aspergillusone B (**5**): colorless gum; [α]_D²⁰ -46.3 (c 0.2, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 230 (3.71), 280 (3.30), 320 (3.10) nm; FT-IR (neat) $\nu_{\max}$ 3400, 1725, 1697, 1649 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz) and ¹³C NMR (125 MHz) data, see Table 2; HREIMS m/z 336.0842 [M]⁺ (calcd for C₁₆H₁₆O₈, 336.0845).

(+)-(7S)-Sydonic acid (**6**): [α]_D²³ +2.0 (c 2.0, MeOH).

(7R,8R)-AGI-B4 (**7**): [α]_D²⁵ -1.0 (c 0.4, MeOH).

(7R,8R)- α -Diversonolic ester (**8**): [α]_D²³ -47.6 (c 0.2, CHCl₃).

Biological Activity. The DPPH radical scavenging assay was carried out according to Yen and Hsieh.¹⁸ The IC₅₀ value was recorded by reading the sample concentration that produced 50% scavenging of those radicals. Butylated hydroxyanisole displayed an IC₅₀ value of 0.13 μ M.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information. ¹H and ¹³C NMR spectra for new compounds (**1**–**5**). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tel: +66-74-288-435. Fax: +66-74-558-841. E-mail: vatcharin.r@psu.ac.th

■ ACKNOWLEDGMENT

V.R. thanks the Office of Higher Education Commission and the Thailand Research Fund for the TRF Senior Research Scholar (Grant No. RTA5180007). K.T. thanks the Thailand Research Fund through the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (Grant No. PHD/0109/2550) and the Center for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC) for a scholarship. The Graduate School and Faculty of Science, Prince of Songkla University, are acknowledged for partial support.

■ REFERENCES

- (1) Saleem, M.; Ali, M. S.; Hussain, S.; Jabbar, A.; Ashraf, M.; Lee, Y. S. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 1142–1152.
- (2) Kudo, S.; Murakami, T.; Miyanishi, J.; Tanaka, K.; Takada, N.; Hashimoto, M. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2009**, *73*, 203–204.
- (3) Kim, H. S.; Park, I. Y.; Park, Y. J.; Lee, J. H.; Hong, Y. S.; Lee, J. J. *J. Antibiot.* **2002**, *55*, 669–672.
- (4) Holker, J. S.; O'Brien, E.; Simpson, T. J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1983**, *7*, 1365–1368.
- (5) Nicolaou, K. C.; Li, A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 6579–6582.
- (6) Shao, C.; Wang, C.; Wei, M.; Gu, Y.; Xia, X.; She, Z.; Lin, Y. *Magn. Reson. Chem.* **2008**, *46*, 1066–1069.
- (7) Hamasaki, T.; Sato, Y.; Hatsuda, Y. *Agric. Biol. Chem.* **1975**, *39*, 2341–2345.
- (8) Yamazaki, M.; Okuyama, E. *Chem. Pharm. Bull.* **1980**, *28*, 3649–3655.

- (9) Hamasaki, T.; Kimura, Y. *Agric. Biol. Chem.* **1983**, *47*, 163–165.
- (10) Kimura, Y.; Tani, K.; Kojima, A.; Sotoma, G.; Okada, K.; Shimada, A. *Phytochemistry* **1996**, *41*, 665–669.
- (11) Monde, K.; Satoh, H.; Nakamura, M.; Tamura, M.; Takasugi, M. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 913–921.
- (12) Trofast, J. *Phytochemistry* **1978**, *17*, 1359–1361.
- (13) Wu, Z.-J.; Ouyang, M.-A.; Tan, Q.-W. *Pest Manag. Sci.* **2009**, *65*, 60–65.
- (14) Lee, Y. M.; Li, H.; Hong, J.; Cho, H. Y.; Bae, K. S.; Kim, M. A.; Kim, D.-K.; Jung, J. H. *Arch. Pharm. Res.* **2010**, *33*, 231–235.
- (15) Wei, M.-Y.; Wang, C.-Y.; Liu, Q.-A.; Shao, C.-L.; She, Z.-G.; Lin, Y.-C. *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 941–949.
- (16) Barnett, H. L.; Hunter, B. B. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*; Prentice-Hall, Inc.: The American Phytopathological Society, USA., 1998.
- (17) Trisuwan, K.; Rukachaisirikul, V.; Sukpondma, Y.; Preedanon, S.; Phongpaichit, S.; Sakayaroj, J. *Phytochemistry* **2009**, *70*, 554–557.
- (18) Yen, G.-C.; Hsieh, C.-L. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1997**, *61*, 1646–1649.



Modiolide and Pyrone Derivatives from the Sea Fan-derived Fungus *Curvularia* sp. PSU-F22

Kongkiat Trisuwan¹, Vatcharin Rukachaisirikul¹, Souwalak Phongpaichit², Sita Preedanon³, and Jariya Sakayaroj³

¹Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112, Thailand, ²Natural Products Research Center and Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112, Thailand, and ³National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Thailand Science Park, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand

(Received August 10, 2010/Accepted September 26, 2010)

Investigation of secondary metabolites from the sea fan-derived fungus *Curvularia* sp. PSU-F22 resulted in isolation of three new metabolites, curvulapyrone (1), curvulalide (2) and curvulalic acid (3) together with six known compounds, modiolides A (4) and B (5), pyrenolide A (6), stagonolide E (7), mycoepoxydiene (8), and deacetylmycoepoxydiene (9). Their antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, methicillin-resistant *S. aureus* and *Microsporum gypseum* SH-MU-4 were examined.

Key words: *Curvularia* sp., Sea fan-derived fungus, Modiolide, Pyrone, Mycoepoxydiene, Antibacterial activity, Antifungal activity

INTRODUCTION

Fungi belonging to the genus *Curvularia* are a rich source of chemically diverse metabolites with a wide range of pharmaceutical activities. These include phytotoxic pyrenocines (Kim et al., 2000), antibacterial lunatin (Jadulco et al., 2002), antifungal benzopyrans (Teles et al., 2005) and cytotoxic apralactone (Greve et al., 2008a). In our search of fungi for new secondary metabolites with antimicrobial activity, we investigated the marine-derived fungus *Curvularia* sp. PSU-F22, isolated from a sea fan of the genus *Annella*. One new pyrone derivative, curvulapyrone (1), and the known modiolide A (4) (Tsuda et al., 2003) were obtained from the mycelial extract of *Curvularia* sp. PSU-F22. In addition, two new metabolites, named curvulalide (2) and curvulalic acid (3), were isolated from the broth extract together with five known macrolides, modiolide B (5) (Tsuda et al., 2003), pyrenolide A (6) (Nukina et al., 1980), stagonolide E (7) (Evidente et

al., 2008), mycoepoxydiene (8) (Sommart et al., 2009) and deacetylmycoepoxydiene (9) (Sommart et al., 2009). The isolated compounds were examined for antimicrobial activities against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (SA), a clinical isolate of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) SK1 and a clinical isolate of *Microsporum gypseum* (MG) SH-MU-4.

MATERIALS AND METHODS

General experimental procedures

Infrared spectra (IR) were recorded on a Perkin Elmer 783 FTS 165 FT-IR spectrometer. Ultraviolet spectra (UV) were measured with an UV-160A SHIMADSU spectrophotometer. ¹H- and ¹³C-NMR spectra were recorded on a 300 MHz Bruker FTNMR Ultra Shield spectrometer using tetramethylsilane (TMS) as an internal standard. Optical rotations were measured on a JASCO P-1020 polarimeter. Solvents for extraction and chromatography were distilled at their boiling point range prior to use except for ethyl acetate and light petroleum, which were analytical grade reagents. Thin-layer chromatography (TLC) and precoated TLC (PTLC) were done on silica gel GF₂₅₄ (Merck). Column chromatography (CC) was

Correspondence to: Vatcharin Rukachaisirikul, Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

Tel: 66-74-288-435, Fax: 66-74-558-841
E-mail: vatcharin.r@psu.ac.th

performed on silica gel (Merck) type 100 (70–230 mesh ASTM) or on Sephadex LH-20 with MeOH.

Fungal material

The marine-derived fungus PSU-F22 was isolated from sea fan, *Annella* sp., collected near the Similan Islands, Phangnga Province, Thailand, in 2006. This fungus was deposited as *Curvularia* sp. PSU-F22 (GenBank accession number EU714387) at the Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University and the National Center for Generic Engineering and Biotechnology (BIOTECH) Culture Collection, Thailand (BCC number 28631).

Antibacterial and antifungal activities

Crude extracts (200 µg/mL) were preliminarily tested against all the test microorganisms by a colorimetric broth microdilution test (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2002a, 2002b, 2002c; Drummond and Waigh, 2000). Stock solutions of the crude extracts (10 mg/mL) were diluted with MHB to 400 µg/mL and 50 µL of each extract solution was pipetted into 3 wells of a 96 well plate. Fifty µL of each inoculum was added to the test solution and incubated at 35°C for 15 h (*S. aureus*, and MRSA) or at 25°C for 6 days (*M. gypseum*). Then, 10 µL of 0.18% resazurin was added to each well and incubated for another 2–3 h for bacteria and 1 day for fungi. Vancomycin and micronazole were used as positive controls for bacteria and fungi, respectively. The color change was then observed visually. Any color changes from purple to pink or colorless were recorded as positive. The crude extracts that showed antimicrobial activity at 200 µg/mL were further assessed for their minimum inhibitory concentrations (MICs). The MICs of extracts were tested over the concentration range of 0.25–128 µg/mL by the above colorimetric broth microdilution test. The lowest concentration at which color change occurred (2 to 3 wells) was taken as the MIC value.

Fermentation, extraction and isolation

The sea fan-derived fungus *Curvularia* sp. PSU-F22 was grown on potato dextrose agar (PDA) at 25°C for five days. Three pieces (0.5×0.5 cm²) of mycelial agar plugs were inoculated into 500 mL Erlenmeyer flasks containing 300 mL potato dextrose broth (PDB) at room temperature for four weeks. The culture (15 L) was filtered to give the filtrate and mycelia. The filtrate and the mycelial cakes were then extracted using the same procedure as described previously (Trisuwan et al., 2008). The broth and mycelia extracts were obtained as a brown gum in 1.3 g and

380.0 mg, respectively. The broth extract was separated by CC over Sephadex LH-20 to give five fractions (A–E). Fraction B (144.8 mg) was further purified by silica gel CC with a gradient of EtOAc–light petroleum to obtain **5** (3.2 mg) and **6** (1.0 mg). Separation of fraction C (1.1 g) using Sephadex LH-20 CC afforded five fractions (C1–C5). Fraction C3 (165.6 mg) was fractionated with the same procedure as fraction B to furnish four fractions. Compound **7** (3.3 mg) was obtained in the second fraction. The fourth fraction (35.7 mg) was further purified by CC over silica gel using a gradient of MeOH–CH₂Cl₂ as a mobile phase followed by PTLC with 2% MeOH–CH₂Cl₂ to yield **3** (1.0 mg). Fraction D (60.1 mg) was subjected by Sephadex LH-20 CC to give three fractions. The third fraction (12.4 mg) was purified by PTLC with 30% EtOAc–light petroleum to afford **2** (3.1 mg), **8** (2.2 mg) and **9** (2.4 mg). The mycelia extract was fractionated by Sephadex LH-20 CC to give three fractions (E1–E3). Fraction E2 (203.6 mg) was further purified with CC over silica gel to afford five fractions. Compound **4** (6.5 mg) was present in the second fraction. Purification of the fourth fraction by PTLC with 40% EtOAc–light petroleum obtained **1** (2.5 mg).

Curvulapyrone (1)

Colorless gum; [α]_D²⁵ –147° (c 0.38, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ nm (log ϵ) 231 (3.62), 226 (3.65), 251 (3.70), 320 (2.81); IR (neat) $\nu_{\max}$ cm^{–1} 3394, 1714; HR-EI-MS m/z : 238.0837 (calcd for C₁₂H₁₄O₅, 238.0841); EIMS m/z : 238 (M–H₂O⁺) (11), 181 (100), 152 (8), 111 (50), 69 (56); ¹H-NMR (300 MHz, acetone-*d*₆) and ¹³C-NMR (75 MHz, acetone-*d*₆): see Table I.

Curvulalide (2)

Colorless gum; [α]_D²⁵ –48° (c 0.10, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ nm (log ϵ) 208 (3.48); IR (neat) $\nu_{\max}$ cm^{–1} 3385, 1715; HR-EI-MS m/z : 197.0813 (calcd for C₁₀H₁₃O₄, 197.0814); EIMS m/z : 197 (M–OH⁺) (17), 141 (100), 123 (73), 95 (80); ¹H-NMR (300 MHz, acetone-*d*₆) and ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): see Table I.

Curvulalic acid (3)

Colorless gum; [α]_D²⁵ –8° (c 0.10, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ nm (log ϵ) 207 (2.90), 257 (2.27); IR (neat) $\nu_{\max}$ cm^{–1} 3422, 1704; HR-EI-MS m/z : 184.1090 (calcd for C₁₀H₁₆O₃, 184.1099); EIMS m/z : 184 (M⁺) (2), 151 (8), 124 (28), 79 (100), 67 (19); ¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) and ¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD): see Table I.

Modiolide A (4)

Colorless gum; [α]_D¹⁸ +40° (c 0.25, MeOH); UV (MeOH)

Table I. ^1H - and ^{13}C -NMR data for curvulapyrone (1), curvulalide (2) and curvulalic acid (3)

Position	1		2		3	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
	d (mult., J , Hz)	d (mult.)	d (mult., J , Hz)	d (mult.)	d (mult., J , Hz)	d (mult.)
1	-	-	-	167.8 (s)	-	173.0 (s)
2	-	163.1 (s)	5.84 (dd, 12.6, 1.5)	122.4 (d)	5.62 (d, 11.4)	121.7 (d)
3	-	100.9 (s)	5.88 (dd, 12.6, 3.0)	136.8 (d)	6.36 (t, 11.4)	139.3 (d)
4	-	164.0 (s)	5.01 (brd, 7.5)	71.2 (d)	7.28 (dd, 15.3, 11.4)	127.8 (d)
5	5.98 (s)	99.0 (d)	5.93 (ddd, 15.6, 7.5, 1.5)	131.5 (d)	5.94 (dt, 15.3, 6.9)	140.4 (d)
6	-	158.2 (s)	6.29 (dd, 15.6, 3.3)	128.0 (d)	2.18 (brd, 6.9)	32.4 (t)
7	6.16 (dq, 15.6, 1.5)	123.1 (d)	4.87 (brd, 5.3)	58.8 (d)	1.51 (m)	24.9 (t)
8	6.61 (dq, 15.6, 6.9)	133.9 (d)	3.87 (dd, 5.3, 2.5)	76.0 (d)	1.48 (m)	38.3 (t)
9	1.89 (dd, 6.9, 1.5)	17.4 (q)	5.64 (qd, 6.6, 2.5)	68.1 (d)	3.75 (sextet, 6.3)	67.0 (d)
10	4.49 (d, 5.4)	66.4 (d)	1.29 (d, 6.6)	17.2 (q)	1.16 (d, 6.3)	22.1 (q)
11	3.70 (dd, 6.6, 5.4)	71.9 (d)	-	-	-	-
12	4.29 (qn, 6.6)	77.0 (d)	-	-	-	-
13	1.46 (d, 6.6)	16.4 (q)	-	-	-	-

$\lambda_{\max}$ nm (log ε) 208 (3.48); IR (neat) $\nu_{\max}$ cm^{-1} 3224, 1714, 1638; ^1H -NMR (300 MHz, acetone- d_6): δ 5.87 (2H, d, J = 11.7 Hz, H-2, 3), 5.60 (1H, dd, J = 15.3, 6.9 Hz, H-5), 5.58 (1H, dd, J = 15.3, 6.9 Hz, H-6), 5.26 (1H, dqd, J = 10.5, 6.3, 1.8 Hz, H-9), 4.73 (1H, brs, H-4), 4.49 (1H, brs, 4-OH), 4.13 (1H, m, H-7), 1.94 (1H, ddd, J = 14.0, 3.0, 1.8 Hz, H_a-8), 1.73 (1H, dt, J = 14.0, 10.5 Hz, H_b-8), 1.24 (3H, d, J = 6.3 Hz, H-10); ^{13}C -NMR (75 MHz, acetone- d_6): δ 168.0 (s, C-1), 137.8 (d, C-6), 137.3 (d, C-3), 129.7 (d, C-5), 121.3 (d, C-2), 71.6 (d, C-7), 71.0 (d, C-4), 68.3 (d, C-9), 43.2 (t, C-8), 20.8 (q, C-10).

Modiolide B (5)

Colorless gum; $[\alpha]_{\text{D}}^{18}$ +40° (c 0.25, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ nm (log ε) 207 (3.22); IR (neat) $\nu_{\max}$ cm^{-1} 3416, 1698; ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 5.88 (1H, dd, J = 12.6, 2.4 Hz, H-3), 5.87 (1H, dd, J = 12.6, 1.2 Hz, H-2), 5.69 (1H, ddd, J = 15.6, 11.1, 3.6 Hz, H-6), 5.54 (1H, ddd, J = 15.6, 7.8, 1.5 Hz, H-5), 5.32 (1H, m, H-9), 4.75 (1H, brd, J = 6.9 Hz, H-4), 2.39 (1H, dm, J = 13.5 Hz, H_a-7), 2.20 (1H, m, H_b-7), 1.68 (2H, m, H-8), 1.22 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-10); ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 168.9 (s, C-1), 136.5 (d, C-3), 135.4 (d, C-6), 129.1 (d, C-5), 122.6 (d, C-2), 72.4 (d, C-9), 71.8 (d, C-4), 33.9 (t, C-8), 31.0 (t, C-7), 21.5 (q, C-10).

Pyrenolide A (6)

Colorless gum; $[\alpha]_{\text{D}}^{29}$ -257° (c 0.67, CHCl_3); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ nm (log ε) 204 (2.86), 221 (2.41), 262 (2.06); IR (neat) $\nu_{\max}$ cm^{-1} 1700, 1686, 1619; ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 6.75 (1H, dd, J = 17.0, 6.5 Hz, H-6), 6.63 (1H, d, J = 12.5 Hz, H-2), 6.20 (1H, dd, J = 17.0, 1.0 Hz, H-5), 6.14 (1H, d, J = 12.5 Hz, H-3), 5.58 (1H, qd, J = 7.0, 2.0 Hz, H-9), 3.82 (1H, ddd, J = 6.5, 4.5, 1.5 Hz, H-7), 3.25 (1H, dd, J = 4.5, 2.0 Hz, H-8), 1.52 (3H, d, J = 7.0 Hz, H-10); ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 192.9 (s, C-4), 166.6 (s, C-1), 145.7 (d, C-6), 134.6 (d, C-2), 133.5 (d, C-3), 128.7 (d, C-5), 66.2 (d, C-9), 60.9 (d, C-8), 54.8 (d, C-7), 16.8 (q, C-10).

Stagonolide E (7)

Colorless gum; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -180° (c 0.20, CHCl_3); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ nm (log ε) 207 (3.37), 253 (2.89); IR (neat) $\nu_{\max}$ cm^{-1} 3422, 1700; ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 6.62 (1H, ddd, J = 12.0, 3.0, 1.0 Hz, H-3), 6.12 (1H, dd, J = 15.0, 1.0 Hz, H-4), 5.85 (1H, dd, J = 12.0, 3.0 Hz, H-2), 5.74 (1H, ddd, J = 15.0, 9.0, 3.0 Hz, H-5), 4.98 (1H, qnd, J = 6.0, 3.0 Hz, H-9), 4.24 (1H, td, J = 9.0, 3.0 Hz, H-6), 2.09 (1H, ddd, J = 15.0, 9.0, 6.0 Hz, H_a-7), 1.84 (1H, ddd, J = 15.0, 9.0, 3.0 Hz, H_a-8), 1.75 (1H, m, H_b-7), 1.62 (1H, m, H_b-8), 1.12 (3H, d, J = 6.0 Hz, H-10); ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 168.3 (s, C-1), 140.2 (d, C-5), 139.6 (d, C-3), 126.6 (d, C-4), 125.6 (d, C-2), 73.7 (d, C-6), 73.3 (d, C-9), 37.8 (t, C-7), 30.4 (t, C-8), 21.4 (q, C-10).

Mycoepoxydiene (8)

Colorless gum; $[\alpha]_D^{29} +215^\circ$ (c 0.11, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ nm (log ϵ) 208 (3.78), 257 (3.50), 273 (3.27); IR (neat) $\nu_{\max}$ cm^{-1} 1739, 1720, 1655; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.03 (1H, dd, $J = 9.9, 6.0$ Hz, H-3), 6.23 (1H, d, $J = 9.9$ Hz, H-2), 6.10 (1H, ddd, $J = 10.5, 6.6, 4.5$ Hz, H-11), 6.05 (1H, m, H-8), 5.93 (1H, m, H-9), 5.90 (1H, m, H-10), 5.08 (1H, dd, $J = 6.0, 2.4$ Hz, H-4), 4.49 (1H, dd, $J = 11.1, 2.4$ Hz, H-5), 4.32 (1H, d, $J = 4.5$ Hz, H-12), 4.28 (1H, t, $J = 6.0$ Hz, H-7), 3.06 (1H, m, H-6), 3.02 (1H, m, H-13), 2.03 (3H, s, H-16), 1.14 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-14); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 170.0 (s, C-15), 162.1 (s, C-1), 140.2 (d, C-3), 137.5 (d, C-11), 136.9 (d, C-8), 126.3 (d, C-9), 125.1 (d, C-2), 124.4 (d, C-10), 86.4 (d, C-12), 77.7 (d, C-5), 75.9 (d, C-7), 63.2 (d, C-4), 52.6 (d, C-13), 50.1 (d, C-6), 20.7 (q, C-16), 14.3 (q, C-14).

Deacetylmicoepoxydiene (9)

Colorless gum; $[\alpha]_D^{29} +83^\circ$ (c 0.59, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ nm (log ϵ) 206 (3.08), 256 (2.56), 265 (2.46); IR (neat) $\nu_{\max}$ cm^{-1} 3418, 1721, 1655; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 6.97 (1H, dd, $J = 9.6, 6.3$ Hz, H-3), 6.19 (1H, m, H-8), 6.05 (1H, d, $J = 6.9$ Hz, H-2), 6.02 (1H, m, H-11), 5.89 (1H, m, H-9), 5.85 (1H, m, H-10), 4.36 (1H, t, $J = 5.4$ Hz, H-7), 4.28 (1H, dd, $J = 10.5, 2.4$ Hz, H-5), 4.25 (1H, d, $J = 4.5$ Hz, H-12), 4.00 (1H, brt, $J = 5.4$ Hz, H-4), 2.95 (1H, m, H-6), 2.91 (1H, q, $J = 6.9$ Hz, H-13), 1.06 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-14); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 163.3 (s, C-1), 144.3 (d, C-3), 137.4 (d, C-8), 137.2 (d, C-11), 126.1 (d, C-9), 124.8 (d, C-10), 122.9 (d, C-2), 86.1 (d, C-12), 79.5 (d, C-5), 76.9 (d, C-7), 62.1 (d, C-4), 51.7 (d, C-6, 13), 14.3 (q, C-14).

RESULTS AND DISCUSSION

The sea fan-derived fungus PSU-F22 is a dematiaceous fungus. Its colony is slow-growing, velvety and olivaceous grey in color with dark pigment under the colony. As neither conidia nor spores were observed, this fungus was identified based on the analysis of the ITS regions of its rDNA gene. Its ITS sequence (EU714387) is well placed in the major *Curvularia* clade comprising *Curvularia* sp. (DQ993652), *Curvularia affinis* (AF071335), *Curvularia* sp. (DQ993649), *Curvularia affinis* (EF187909) and *Curvularia* sp. (EF025971) with high statistical support (100%). Sequence similarity as compared to *Curvularia* sp. (EF025971) was 96.1%. PSU-F22 was then identified as *Curvularia* sp.

All compounds (Fig. 1) were isolated using chromatographic techniques. Their structures were elucidated by analysis of spectroscopic data, including UV,

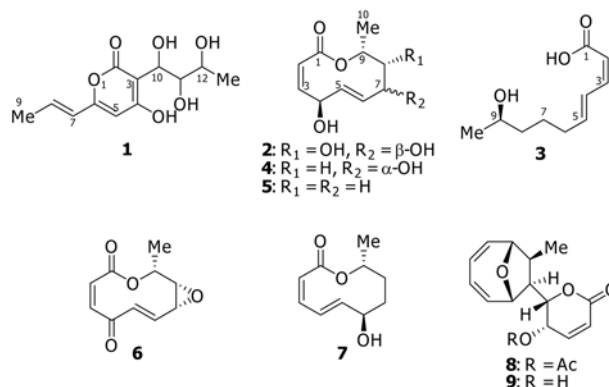


Fig. 1. Structures of compounds 1-9.

IR, NMR and MS. The absolute configuration of known compounds was assigned according to NOEDIFF results and by comparison of their optical rotations with those previously reported in the literature. In addition, the absolute configurations in **2** and **3** were proposed on the basis of known absolute configurations of co-metabolites **4-5** and (*R*)-9-hydroxydecanoic acid (Jones et al., 1997), respectively.

Curvulapyrone (**1**) with the molecular formula $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_6$ from a high resolution-electron ionization-mass spectrum (HR-EI-MS) was obtained as a colorless gum. Its UV spectrum with maximum absorption bands at $\lambda_{\max}$ 213, 226, 251 and 320 nm indicated that **1** had a conjugated pyrone chromophore (Lee et al., 1995). The IR spectrum showed absorption bands at 3394 and 1714 cm^{-1} for hydroxyl and conjugated carbonyl groups, respectively. The $^1\text{H-NMR}$ spectrum (Table I) displayed characteristic signals for a *trans*-propenyl unit [δ 6.61 (1H, dq, $J = 15.6, 6.9$ Hz), 6.16 (1H, dq, $J = 15.6, 1.5$ Hz) and 1.89 (3H, dd, $J = 6.9, 1.5$ Hz)], a 1,2,3-trihydroxybutyl unit [δ 4.49 (1H, d, $J = 5.4$ Hz), 4.29 (1H, qn, $J = 6.6$ Hz), 3.70 (1H, dd, $J = 6.6, 5.4$ Hz) and 1.46 (3H, d, $J = 6.6$ Hz)] and one olefinic proton (δ 5.98, 1H, s). The presence of the 1,2,3-trihydroxybutyl unit was established using $^1\text{H-NMR}$ correlation spectroscopy (COSY) and heteronuclear multiple bond correlations (HMBC). The $^{13}\text{C-NMR}$ and DEPT spectra showed four quaternary, six methine and two methyl carbons. The olefinic proton (δ 5.98) was attributed to H-5 on the basis of its HMBC correlations with C-3 (δ 100.9), C-4 (δ 164.0) and C-6 (δ 158.2). These results together with the chemical shift of C-4 established a hydroxyl group at C-4 of the pyrone unit. The *trans*-propenyl fragment was attached at C-6 of the pyrone ring based on the HMBC correlations of both H-7 (δ 6.16) and H-8 (δ 6.61) of the *trans*-propenyl unit with C-6. Thus, the remaining 1,2,3-trihydroxybutyl unit was located at

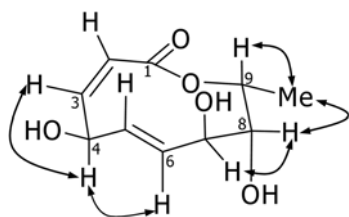


Fig. 2. Selected NOEDIFF data for curvulalide (2).

C-3. This assignment was confirmed by HMBC cross peaks of the hydroxymethine proton, H-10 (δ 4.49), with C-2 (δ 163.1), C-3 and C-4. Therefore, curvulapyrone (1) was identified as a new α -pyrone derivative. Because of insufficient material, no attempts were made to assign absolute configurations.

The molecular formula of curvulalide (2), isolated as a colorless gum, was determined as $C_{10}H_{14}O_5$ from HR-EI-MS. Its 1H -NMR spectrum (Table I) was similar to that of 4 except for the replacement of the resonances for the methylene protons (H_2 -8) in 4 with the signal of a hydroxymethine proton, δ 3.87 (1H, dd, $J = 5.3, 2.5$ Hz). Thus, this hydroxymethine proton was identified as H-8. This assignment was confirmed by the 1H - 1H COSY cross peaks from H-8 to H-7 (δ 4.87) and H-9 (δ 5.64) as well as its 3J HMBC correlations with C-6 (δ 128.0) and C-10 (δ 17.2). The location of all substituents in 2 was determined by comparison of the $J_{H,H}$ values observed with those of 4 and 5 (Tsuda et al., 2003). The location of 4-OH at the β -position, identical to those in 4 and 5, was deduced from the $J_{3/4}$ and $J_{4/5}$ values of 3.0 and 7.5 Hz, respectively. However, 7-OH was assigned at the β -position, not the α -position ($J_{6/7}$ 7.5 Hz) as found in 4, due to the smaller $J_{6/7}$ value of 3.3 Hz. Both 8-OH and H_3 -10 were α -oriented on the basis of the $J_{7/8}$ (5.3 Hz) and $J_{8/9}$ (2.5 Hz) values. The assigned relative configurations were in agreement with the nuclear Overhauser effect difference (NOEDIFF) data shown in Fig. 2. The absolute configurations of C-4, C-7, C-8 and C-9 in 2 were proposed to be *R*, *S*, *R* and *R*, respectively, on the basis of the known absolute configurations (4*R* and 9*R*) of its co-metabolites 4 and 5. Consequently, curvulalide (2) was identified as a new member of modiolide macrolides.

Curvulalic acid (3) with the molecular formula $C_{10}H_{16}O_3$ from HR-EI-MS was obtained as a colorless gum. The UV spectrum displayed absorption bands of a conjugated chromophore at 207 and 257 nm while hydroxyl (3422 cm^{-1}) and conjugated carboxylic carbonyl (1704 cm^{-1}) absorption bands were found in the IR spectrum. The 1H -NMR spectrum (Table I) displayed characteristic signals for *trans*-olefinic protons [δ 7.28

(1H, dd, $J = 15.3, 11.4$ Hz) and 5.94 (1H, dt, $J = 15.3, 6.9$ Hz)], *cis*-olefinic protons [δ 6.36 (1H, t, $J = 11.4$ Hz) and 5.62 (1H, d, $J = 11.4$ Hz)] and a 2-hydroxypentyl unit [δ 3.75 (1H, sextet, $J = 6.3$ Hz), 2.18 (2H, brd, $J = 6.9$ Hz), 1.51 (2H, m), 1.48 (2H, m) and 1.16 (3H, d, $J = 6.3$ Hz)]. The 1H - 1H COSY correlations supported the presence of the 2-hydroxypentyl moiety. One of the *trans*-olefinic protons, H-4 (δ 7.28), showed a 1H - 1H COSY cross peak with the *cis*-olefinic proton, H-3 (δ 6.36), while the other *trans*-olefinic proton, H-5 (δ 5.94), was correlated with H_2 -6 (δ 2.18) of the hydroxypentyl unit. In addition, the *cis*-olefinic proton, H-3, showed an HMBC correlation with a carboxylic carbonyl carbon, C-1 (δ 173.0). Irradiation of H-3 in the NOEDIFF experiment affected signal intensity of H-2 and H-5, indicating an *s-trans* configuration for a C3-C4 single bond. Thus, curvulalic acid (3) was identified as a new uncyclized metabolite of modiolide macrolides. The absolute configuration at C-9 was proposed to be *R*, identical to those of compounds 4-7, according to its optical rotation which was similar to that of (*R*)-9-hydroxydecanoic acid, $[\alpha]_D^{25} -7^\circ$ (Jones et al., 1997).

The isolated metabolites, except for 3 and 6 which were obtained in small amounts, were evaluated for antibacterial activity against SA and MRSA SK1 as well as for antifungal activity against MG SH-MU-4. They were inactive against all strains at the initial concentration of 200 $\mu\text{g/mL}$, which was identical to the activity of both broth and mycelial extracts. So far, there has been only one report on the isolation of ten-membered lactones from the marine-derived fungus *Curvularia* sp. (Greve et al., 2008b). Furthermore, this is the first isolation of an α -pyrone derivative from the genus *Curvularia*.

ACKNOWLEDGEMENTS

V. Rukachaisirikul thanks the Commission on Higher Education and the Thailand Research Fund for the TRF Senior Research Scholar (Grant No. RTA5180007). K. Trisuwan is grateful to the Thailand Research Fund through the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (Grant No. PHD/0109/2550) for a scholarship. Finally, the Center for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC) and Prince of Songkla University are gratefully acknowledged for partial support.

REFERENCES

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A4. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne,

- Pa, (2002a).
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard, 2nd ed, M27-A4. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa, (2002b).
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard. CLSI document M38-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa, (2002c).
- Drummond, A. J. and Waigh, R. D., The development of microbiological methods for phytochemical screening. Recent Research Developments in Phytochemistry, 4, pp. 143-152, (2000).
- Evidente, A., Cimmino, A., Berestetskiy, A., Mitina, G., Andolfi, A., and Motta, A., Stagonolides B-F, nonenolides produced by *Stagonospora cirsii*, a potential mycoherbicide of *Cirsium arvense*. *J. Nat. Prod.*, 71, 31-34 (2008).
- Greve, H., Schupp, P. J., Eguereva, E., Kehraus, S., Kelter, G., Maier, A., Fiebig, H. -H., and König, G. M., Apralactone A and a new stereochemical class of curvularins from the marine fungus *Curvularia* sp. *Eur. J. Org. Chem.*, 2008, 5085-5092 (2008a).
- Greve, H., Schupp, P. J., Eguereva, E., Kehraus, S., and König, G. M., Ten-membered lactones from the marine-derived fungus *Curvularia* sp. *J. Nat. Prod.*, 71, 1651-1653 (2008b).
- Jadulco, R., Brauers, G., Edrada, R. A., Ebel, R., Wray, V., Sudarsono, S., and Proksch, P., New metabolites from sponge-derived fungi *Curvularia lunata* and *Cladosporium herbarum*. *J. Nat. Prod.*, 65, 730-733 (2002).
- Jones, G. B., Huber, R. S., and Chapman, B. J., Catalytic enantioselective synthesis of macrolides via asymmetric alkylation. *Tetrahedron: Asymmetry*, 8, 1797-1809 (1997).
- Kim, J. -C., Choi, G. J., Kim, H. T., Kim, H. -J., and Cho, K. Y., Pathogenicity and pyrenocine production of *Curvularia inaequalis* isolated from zoysia grass. *Plant Disease*, 84, 684-688 (2000).
- Lee, J. C., Yang, X., Schwartz, M., Strobel, G., and Clardy, J., The relationship between an endangered North American tree and an endophytic fungus. *Chem. Biol.*, 2, 721-727 (1995).
- Nukina, M., Sassa, T., and Ikeda, M., A new fungal morphogenic substance, pyrenolide A from *Pyrenophora teres*. *Tetrahedron Lett.*, 21, 301-302 (1980).
- Sommart, U., Rukachaisirikul, V., Sukpondma, Y., Phongpaichit, S., Towatana, N. H., Graidist, P., Hajiwangoh, Z., and Sakayaroj, J., A cyclohexenone derivative from Diaporthaceous fungus PSU-H2. *Arch. Pharm. Res.*, 32, 1227-1231 (2009).
- Teles, H. L., Silva, G. H., Castro-Gamboa, I., Bolzani, V. S., Pereira, J. O., Costa-Neto, C. M., Haddad, R., Eberlin, M. N., Young, M. C. M., and Araújo, Â. R., Benzopyrans from *Curvularia* sp., an endophytic fungus associated with *Ocotea corymbosa* (Lauraceae). *Phytochemistry*, 66, 2363-2367 (2005).
- Trisuwan, K., Rukachaisirikul, V., Sukpondma, Y., Preedanon, S., Phongpaichit, S., Rungjindamai, N., and Sakayaroj, J., Epoxydons and a pyrone from the marine-derived fungus *Nigrospora* sp. PSU-F5. *J. Nat. Prod.*, 71, 1323-1326 (2008).
- Tsuda, M., Mugishima, T., Komatsu, K., Sone, T., Tanaka, M., Mikami, Y., and Kobayashi, J., Modiolides A and B, two new 10-membered macrolides from a marine-derived fungus. *J. Nat. Prod.*, 66, 412-415 (2003).

Anthraquinone, Cyclopentanone, and Naphthoquinone Derivatives from the Sea Fan-Derived Fungi *Fusarium* spp. PSU-F14 and PSU-F135

Kongkiat Trisuwan,[†] Nanthaphong Khamthong,[†] Vatcharin Rukachaisirikul,^{*,†} Souwalak Phongpaichit,[‡] Sita Preedanon,[§] and Jariya Sakayaroj[§]

Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand, Natural Products Research Center and Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand, and National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Thailand Science Park, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand

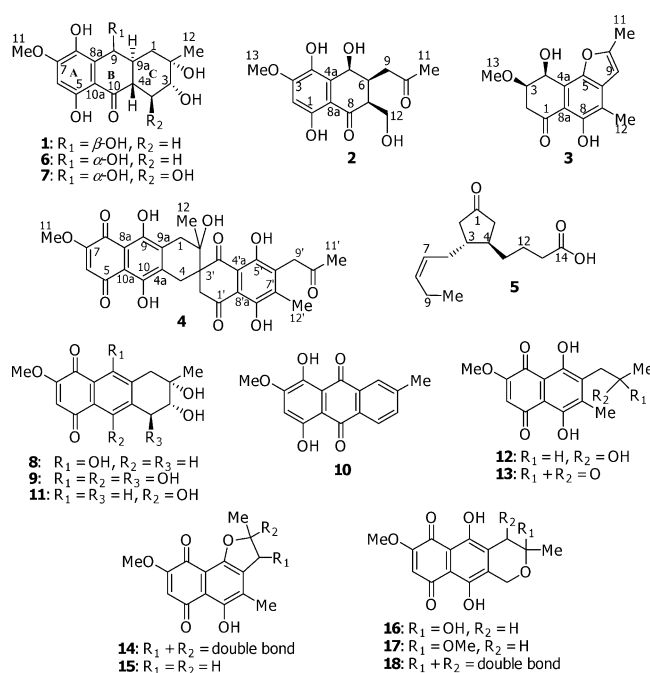
Received April 27, 2010

Five new metabolites, fusaranthraquinone (**1**), fusarnaphthoquinones A–C (**2–4**), and fusarone (**5**), were isolated from the sea fan-derived fungi *Fusarium* spp. PSU-F14 and PSU-F135 along with 18 known compounds. The structures were elucidated on the basis of spectroscopic evidence. Their antibacterial, antifungal, antimycobacterial, antimalarial, and cytotoxic activities were examined.

Fungi in the genus *Fusarium* with the capability of producing various bioactive metabolites have drawn attention from many chemists to investigate their metabolites. They have produced a broad range of secondary metabolites that show various biological activities. Some of them are the antifungal fuserin,¹ the antibacterial and cytotoxic neomangicols,² and the anti-*Helicobacter pylori* methylsulochrin.³ We have recently reported the investigation of sea fan-derived fungi that yielded the antibacterial nigrospoxydon A⁴ and nigrosporapyrone A.⁵ In this paper, we describe the isolation and structure determination of metabolites from two sea fan-derived fungi, *Fusarium* spp. PSU-F14 and PSU-F135. One new octahydroanthraquinone, fusaranthraquinone (**1**), and four new compounds, three hydronaphthoquinones, fusarnaphthoquinones A–C (**2–4**), and one cyclopentanone, fusarone (**5**), were obtained from the broth extracts of *Fusarium* spp. PSU-F14 and PSU-F135, respectively. Seven known compounds, 9 α -hydroxydihydrodesoxybostrycin (**6**),⁶ 9 α -hydroxyhalorosellinia A (**7**),⁶ nigrosporin A (**8**),⁷ bostrycin (**9**),⁸ austrocortirubin (**10**),⁹ (+)-dehydrovomifoliol,¹⁰ and 2-(2'-S-hydroxypropyl)-5-methyl-7-hydroxychromone,¹¹ were also obtained from the broth extract of the fungus PSU-F14, while its mycelial extract contained two additional known compounds, nigrosporin B (**11**)⁷ and uridine.¹² Compound **9** was isolated as its 11-acetoxy derivative. Moreover, nine known compounds, aspergillol B,¹³ (+)-solaninol (**12**),¹⁴ javanicin (**13**),¹⁵ 5-hydroxy-8-methoxy-2,4-dimethylnaphtho[1,2-*b*]furan-6,9-dione (**14**),¹⁴ 2,3-dihydro-5-hydroxy-8-methoxy-2,4-dimethylnaphtho[1,2-*b*]furan-6,9-dione (**15**),¹⁴ fusarubin (**16**),¹⁶ methyl ether fusarubin (**17**),¹⁷ anhydrofusarubin (**18**),¹⁶ and tyrosol,¹⁸ were obtained from the broth extract of *Fusarium* sp. PSU-F135. Their antibacterial, antifungal, antimalarial, antimycobacterial, and cytotoxic activities were evaluated.

Results and Discussion

The marine-derived fungi PSU-F14 and PSU-F135, isolated from a gorgonian sea fan (*Annella* sp.), were identified on the basis of their morphological and molecular characteristics as *Fusarium* spp. All compounds were isolated using chromatographic techniques, and their structures were elucidated by spectroscopic data (IR, UV, NMR, and MS). The relative configuration was assigned according to NOEDIFF results. The absolute configurations of the known



compounds were determined by comparison of their specific rotations with those previously reported in the literature (Supporting Information).

Fusaranthraquinone (**1**) was obtained as a colorless gum with the molecular formula C₁₆H₂₀O₇ from HREIMS. The UV absorption bands at 242, 280, and 353 nm revealed the presence of a conjugated carbonyl chromophore, while the IR spectrum showed absorption bands for hydroxy and conjugated ketone carbonyl groups at 3417 and 1667 cm⁻¹, respectively. The ¹H NMR and ¹³C NMR spectra (Table 1) were similar to those of 9 α -hydroxydihydrodesoxybostrycin (**6**)⁶ with significant differences in the chemical shifts of H₂-1 (1: δ _H 1.87, t, *J* = 11.5 Hz and 1.76, dd, *J* = 11.5 and 3.5 Hz; 6: δ _H 2.43, dd, *J* = 12.6 and 5.1 Hz and 1.34, dd, *J* = 12.6 and 11.7 Hz) and the coupling constants between H-9 and H-9a [1: *J* = 3.5 Hz, H-9 (δ _H 5.00, t, *J* = 3.5 Hz) and H-9a (δ _H 2.16, tt, *J* = 11.5 and 3.5 Hz); 6: *J* = 10.2 Hz, H-9 (δ _H 4.83, d, *J* = 10.2 Hz) and H-9a (δ _H 2.25, m)]. A small coupling constant of 3.5 Hz established the location of H-9 in a pseudoequatorial position, not at the pseudoaxial position as in **6**. Ring C existed in a chair conformation, identical to **6**, according to the large coupling constants (*J* = 11.5 Hz) between H-4a (δ _H 2.82, td, *J* = 11.5 and 4.5 Hz) and H-9a

* To whom correspondence should be addressed. Tel: +66-74-288-435. Fax: +66-74-558-841. E-mail: atcharin.r@psu.ac.th.

[†] Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry, Prince of Songkla University.

[‡] Natural Products Research Center, Prince of Songkla University.

[§] National Center for Genetic Engineering and Biotechnology.

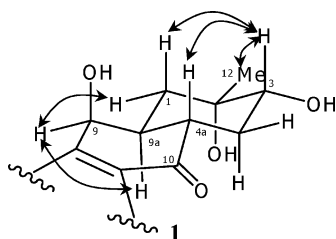
Table 1. ^{13}C (75 MHz) and ^1H (300 MHz) NMR and HMBC Data of Compound **1** in Acetone- d_6

position	δ_{C} , mult.	δ_{H} , mult. (J in Hz)	HMBC
1	40.2, CH_2	1.87, t (11.5) 1.76, dd (11.5, 3.5)	4a, 9, 9a 2, 3, 4a
2-OH	70.5, C	3.21, s	1, 2, 3
3	74.1, CH	3.47, ddd (11.5, 6.5, 4.5)	4
3-OH		3.81, d (6.5)	2, 3, 4
4	29.6, CH_2	2.38, dt (11.5, 4.5) 1.56, q (11.5)	2, 3, 4a, 9a 2, 3, 4a, 9a
4a	41.5, CH	2.82, td (11.5, 4.5)	1, 3, 4, 9, 9a
5-OH	158.7, C	12.76, s	5, 6, 10a
6	98.8, CH	6.44, s	5, 7, 8, 10a
7	155.0, C		
8	136.0, C		
8a	129.0, C		
9	62.4, CH	5.00, t (3.5) 4.15, d (3.5)	4a, 8, 8a, 10a 8a, 9, 9a
9-OH		2.16, tt (11.5, 3.5)	4
9a	38.5, CH		
10	203.0, C		
10a	107.8, C		
11	55.7, CH_3	3.93, s	7
12	26.7, CH_3	1.29, s	1, 2, 3

and H-4b (δ_{H} 1.56, q, $J = 11.5$ Hz) as well as the NOEDIFF data of H-4a (Figure 1). The NOEDIFF data in Figure 1 further revealed that the relative configurations of all asymmetric carbons in **1**, except C-9, were identical to that of **6**. Consequently, **1** was identified as the 9β epimer of **6**. However, the absolute configuration for **1** remains to be determined.

Fusarnaphthoquinone A (**2**) was obtained as a colorless gum with the molecular formula $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_7$ by HREIMS. The UV spectrum was similar to that of **1**. A hydroxy absorption band was found at 3330 cm^{-1} , while carbonyl bands were found at 1700 and 1682 cm^{-1} , in the IR spectrum. Compound **2** had a naphthalenone unit (AB ring) related to that of **1** according to similar ^1H and ^{13}C NMR data (Table 2) with significant differences in the chemical shifts of C-5, C-6, and C-7 compared to the corresponding carbons in **1** (C-9, C-9a, and C-4a, respectively). The presence of this naphthalenone unit was confirmed by the HMBC correlations depicted in Figure 2. The proton signals for ring C in **1** were replaced by signals for a 2-oxopropyl unit (δ_{H} 2.49, 1H, dd, $J = 17.7$ and 5.4 Hz, 2.76, 1H, dd, $J = 17.7$ and 8.1 Hz, and 2.20, 3H, s) and a hydroxymethyl group (δ_{H} 4.18, 1H, dd, $J = 9.0$ and 5.4 Hz and 3.77, 1H, d, $J = 9.0$ Hz) in **2**. The presence of the 2-oxopropyl unit was supported by the HMBC correlations from both H₂-9 (δ_{H} 2.76 and 2.49) and H₃-11 (δ_{H} 2.20) to C-10 (δ_{C} 205.8). A reduced 1,4-naphthoquinone unit having the 2-oxopropyl and hydroxymethyl substituents at C-6 (δ_{C} 44.0) and C-7 (δ_{C} 54.1), respectively, was established on the basis of the HMBC correlations of H₂-9 and H₂-12 (δ_{H} 4.18 and 3.77) (Figure 2). The substituents at C-5, C-6, and C-7 were located at the same side of the molecule on the basis of signal enhancement of H-5 (δ_{H} 5.39) and H-7 (δ_{H} 2.99) upon irradiation of H-6 (δ_{H} 2.87) as well as that of H₂-9 and H-7 after irradiation of H₂-12 in the NOEDIFF experiment (Figure 2). Therefore, fusarnaphthoquinone A has the structure **2**, with the relative configuration shown.

Fusarnaphthoquinone B (**3**) with the molecular formula $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_5$ by HREIMS was isolated as a red gum. The UV spectrum of **3**

**Figure 1.** Selected NOEDIFF data for **1**.**Table 2.** ^{13}C (75 MHz) and ^1H (300 MHz) NMR Data of Compounds **2** and **3** in CDCl_3

position	2		3	
	δ_{C} , mult.	δ_{H} , mult. (J in Hz)	δ_{C} , mult.	δ_{H} , mult. (J in Hz)
1	158.8, C		201.6, C	
1-OH		11.67, s		
2	99.0, CH	6.37, s	38.4, CH_2	3.16, dd (16.8, 11.1) 2.89, ddd (16.8, 4.8, 0.9)
3	154.2, C		76.9, CH	3.83, ddd (11.1, 4.8, 3.3)
4	134.5, C		62.3, CH	5.60, brs 2.70, d (1.8)
4-OH				
4a	127.6, C		119.6, C	
5	74.6, CH	5.39, s	145.9, C	
6	44.0, CH	2.87, dd (8.1, 5.4)	137.9, C	
7	54.1, CH	2.99, d (5.4)	116.6, C	
8	203.5, C		155.8, C	
8-OH				12.34, s
8a	107.3, C		111.1, C	
9	44.0, CH_2	2.76, dd (17.7, 8.1) 2.49, dd (17.7, 5.4)	102.6, CH	6.41, q (0.9)
10	205.8, C		161.4, C	
11	30.3, CH_3	2.20, s	14.6, CH_3	2.50, d (0.9)
12	66.4, CH_2	4.18, dd (9.0, 5.4) 3.77, d (9.0)	11.6, CH_3	2.33, s
13	56.4, CH_3	3.91, s	56.6, CH_3	3.55, s

exhibited absorption bands at 227, 312, and 360 nm. Hydroxy and ketone carbonyl functionalities were found at 3425 and 1629 cm^{-1} , respectively, in the IR spectrum. The ^1H NMR spectrum of **3** (Table 2) was similar to that of **14**, except for the disappearance of a typical signal for a quinone proton (δ_{H} 6.19, s) in **3** and the appearance of signals typical for two oxymethine protons (δ_{H} 3.83, ddd, $J = 11.1$, 4.8, and 3.3 Hz and 5.60, brs) and two nonequivalent methylene protons (δ_{H} 3.16, dd, $J = 16.8$ and 11.1 Hz and 2.89, ddd, $J = 16.8$, 4.8, and 0.9 Hz). In the ^1H - ^1H COSY spectrum, one of the oxymethine protons, H-3 (δ_{H} 3.83), gave cross-peaks with the nonequivalent methylene protons, H₂-2 (δ_{H} 3.16 and 2.89), and the other oxymethine proton, H-4 (δ_{H} 5.60). The HMBC correlations H₂-2/C-8a (δ_{C} 111.1), H-4/C-4a (δ_{C} 119.6), and H₃-13 (δ_{H} 3.55)/C-3 (δ_{C} 76.9) (Figure 3) together with the chemical shifts of C-3 and C-4 (δ_{C} 62.3) constructed a hydronaphthoquinone skeleton with the methoxy and hydroxy groups at C-3 and C-4, respectively. The signal intensity of H-3 was enhanced when H-4 was irradiated, suggesting their *cis*-relationship. H-3 and H-4 were assigned pseudoaxial and pseudoequatorial orientations, respectively, according to the large J (11.1 Hz) and small J (3.3 Hz) values of H-3 with H-2a (δ_{H} 3.16) and H-4, respectively. Thus, fusarnaphthoquinone B (**3**) was identified as a new tetrahydronaphthoquinone derivative of **14**. Only the relative configuration is indicated.

Fusarnaphthoquinone C (**4**) was obtained as a red gum. Its molecular formula, $\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{O}_{11}$, by HREIMS indicated that **4** had

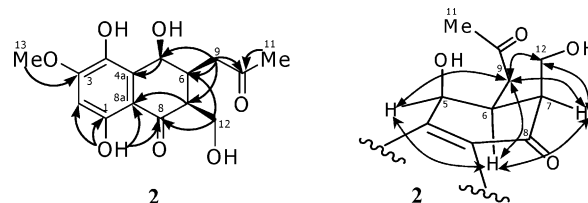
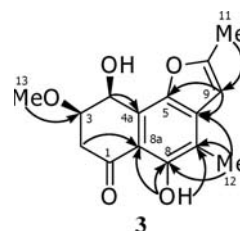
**Figure 2.** Selected HMBC and NOEDIFF data for **2**.**Figure 3.** Selected HMBC data for **3**.

Table 3. ^{13}C (75 MHz) and ^1H (300 MHz) NMR and HMBC Data of Compound **4** in CDCl_3

position	δ_{C} , mult.	δ_{H} , mult. (J in Hz)	HMBC
1	36.8, CH_2	3.12, d (19.8) 3.02, d (19.8)	2, 3, 4a, 9, 9a
2	72.3, C		
3, 3'	54.1, C		
4	32.2, CH_2	3.53, d (19.8) 2.92, d (19.8)	2, 3, 4a, 9a, 2', 4'
4a	137.6, C		
5	184.3, C		
6	109.7, CH	6.20, s	5, 8, 10a
7	160.7, C		
8	177.8, C		
8a	109.7, C		
9-OH	161.2, C	12.76, s	8a, 9, 9a
9a	134.7, C		
10a	107.9, C		
10-OH	159.6, C	13.17, s	4a, 10, 10a
11	56.8, CH_3	3.94, s	7
12	25.7, CH_3	1.30, s	1, 2, 3
1'	200.4, C		
2'	44.9, CH_2	3.20, d (17.4) 2.88, d (17.4)	2, 3, 4, 1', 4', 8'a
4'	203.6, C		
4'a	112.8, C		
5'-OH	154.5, C	12.73, s	4', 5', 6'
6'	132.9, C		
7'	139.4, C		
8'-OH	152.8, C	12.24, s	7', 8', 8'a
8'a	113.5, C		
9'	41.5, CH_2	3.93, s	5', 6', 7', 10'
10'	203.6, C		
11'	30.0, CH_3	2.30, s	9', 10'
12'	12.8, CH_3	2.24, s	6', 7', 8'

17 degrees of unsaturation. The presence of UV absorption bands at 227, 275, 296, 403, 473, 500, 535, and 571 nm indicated the existence of a 1,4-naphthoquinone chromophore.¹⁴ Furthermore, a hydroxy absorption band was found at 3470 cm^{-1} , while carbonyl ones were found at 1717 and 1644 cm^{-1} , in the IR spectrum. In the ^1H and ^{13}C NMR spectra (Table 3), signals for four chelated hydroxy protons [δ_{H} 12.24 (1H, s), 12.73 (1H, s), 12.76 (1H, s), and 13.17 (1H, s)] and four carbonyl carbons (δ_{C} 177.8, 184.3, 200.4, and 203.6) suggested the presence of two 1,4-naphthoquinone units. Analysis of the HMBC correlations (Table 3, Figure 4) for the left portion of **4** revealed that two chelated hydroxy protons resonating at δ_{H} 12.76 and 13.17 were attributed to 9-OH and 10-OH, respectively. The olefinic proton (δ_{H} 6.20) was assigned as H-6 on the basis of its 3J HMBC correlations with C-8 (δ_{C} 177.8) and C-10a (δ_{C} 107.9). Irradiation of H-6 enhanced the signal intensity of H₃-11 (δ_{H} 3.94), indicating the location of the methoxy group at C-7 (δ_{C} 160.7). The 3J HMBC correlations from H₂-1 (δ_{H} 3.12 and 3.02) to C-3 (δ_{C} 54.1) and C-4a (δ_{C} 137.6) and those from H₂-4 (δ_{H} 3.53 and 2.92) to C-2 (δ_{C} 72.3) and C-9a (δ_{C} 134.7) established a tetrahydroanthraquinone unit. Both methyl (H₃-12, δ_{H} 1.30) and hydroxy groups were attached to C-2, according to the 3J HMBC correlations of H₃-12 and the chemical shift of C-2. Two remaining chelated hydroxy protons resonating at δ_{H} 12.24 (8'-OH) and 12.73 (5'-OH) were sequentially placed at C-8' (δ_{C} 152.8) and C-5' (δ_{C} 154.5). The HMBC correlations from 8'-OH to C-7' (δ_{C} 139.4), C-8', and C-8'a (δ_{C} 113.5) together with those

from the methyl protons (H₃-12', δ_{H} 2.24) to C-6' (δ_{C} 132.9) and C-8' attached this methyl group at C-7'. A 2-oxopropyl unit was established and located at C-6' on the basis of the HMBC correlations of H₂-9' (δ_{H} 3.93) and H₃-11' (δ_{H} 2.30), as demonstrated in Figure 4. In the NOEDIFF experiment, signal enhancement of 8'-OH and H₂-9' upon irradiation of H₃-12' (δ_{H} 2.24) supported the assigned location of the methyl and 2-oxopropyl groups. In addition, two nonequivalent methylene protons (H₂-2', δ_{H} 3.20 and 2.88) displayed 3J HMBC correlations with C-8'a, connecting the methylene group at C-1' (δ_{C} 200.4). The HMBC correlations of H₂-2'/C-2, C-3 (C-3'), and C-4' and those of H₂-4/C-4' established a spiro skeleton by connecting the dihydronaphthoquinone and tetrahydroanthraquinone at C-3 (C-3'). Therefore, fusarnaphthoquinone **4** was identified as a new spiro dihydronaphthoquinone-tetrahydroanthraquinone derivative.

Fusarone (**5**) was isolated as a colorless gum with the molecular formula $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_3$ by HREIMS. It showed absorption bands at 3209 and 1731 cm^{-1} for hydroxy and carbonyl groups, respectively. A 3,4-disubstituted cyclopentanone was established using a series of ^1H - ^1H COSY cross-peaks (Supporting Information) from H₂-2 (δ_{H} 2.32 and 2.06) through H-3 (δ_{H} 1.82) to H-4 (δ_{H} 1.88) and then to H₂-5 (δ_{H} 2.16 and 1.42) as well as the HMBC correlations of both H₂-2 and H₂-5 with C-1 (δ_{C} 220.2). Another series of ^1H - ^1H COSY correlations from H₂-6 (δ_{H} 2.35) through an olefinic proton (H-7, δ_{H} 5.23) to the other olefinic proton (H-8, δ_{H} 5.43) and then to H₂-9 (δ_{H} 2.01) and H₃-10 (δ_{H} 0.95) constructed a 2-pentenyl unit. The configuration of the double bond was assigned as Z due to a coupling constant of 10.8 Hz between H-7 and H-8. The ^1H - ^1H COSY cross-peaks of H₂-12 (δ_{H} 1.75 and 1.63) and H₂-13 (δ_{H} 2.38) together with the HMBC correlations of both H₂-12 and H₂-13 to C-11 (δ_{C} 34.1) and C-14 (δ_{C} 177.8) established a 3-carboxypropyl unit. In the HMBC spectrum, H-3 of the cyclopentanone exhibited a 3J HMBC correlation with C-7 (δ_{C} 125.3) of the 2-pentenyl unit (Supporting Information), while H₂-12 of the carboxypropyl unit showed the same correlation with C-4 (δ_{C} 40.9). These data sequentially connected the 2-pentenyl and the carboxypropyl units at C-3 (δ_{C} 54.8) and C-4 of the cyclopentanone ring. In the NOEDIFF experiment, irradiation of H₂-11 enhanced the signal intensity of H-3, but not any protons of the 2Z-pentenyl unit, indicating that two substituents on the cyclopentanone ring were *trans*-oriented. Therefore, fusarone (**5**) was identified as a new cyclopentanone derivative.

The isolated compounds **1**–**3**, **5**–**11**, **13**–**16**, **18**, and 2-(2'S-hydroxypropyl)-5-methyl-7-hydroxychromone were tested for antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* (SA) and methicillin-resistant SA. Compounds **6**, **10**, **15**, **16**, and **18** exhibited very mild antibacterial activity against both strains (MIC values $>350\text{ }\mu\text{M}$). For antifungal activity, among the naphthoquinone derivatives **2**–**3**, **13**–**16**, and **18**, compounds **3** and **16** exhibited very weak antifungal activity against *Cryptococcus neoformans* and *Microsporium gypseum* (MIC values $>200\text{ }\mu\text{M}$).

The known octahydroanthraquinone **7** has been previously reported to exhibit antimalarial (against *Plasmodium falciparum* K1, IC_{50} $24.50\text{ }\mu\text{M}$)⁶ and antimycobacterial (against *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, MIC $38.57\text{ }\mu\text{M}$)⁶ activities. Thus, the anthraquinone (**6**, **7**, and **9**–**11**) and naphthoquinone (**2**, **13**, **15**, **16**, and **18**) derivatives were further evaluated for these activities (Table 4). Compounds **9**, **11**, **13**, and **18** displayed weak antimalarial activity, but better activity than **7**, with IC_{50} values in the range 9.8 – $14\text{ }\mu\text{M}$. Compounds **11** and **18** exhibited milder activity than **7** against *M. tuberculosis*. In addition, they were evaluated for cytotoxic activities against oral human carcinoma cells (KB), human breast cancer cells (MCF-7), and noncancerous Vero cells (African green monkey kidney fibroblasts). Compounds **2**, **10**, and **15** were noncytotoxic to Vero cell lines. Compound **10** was selectively cytotoxic to MCF-7 cells, whereas compound **9** exhibited strong activity to all tested cell lines. Furthermore, compound **18** showed

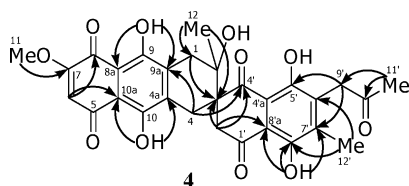
**Figure 4.** Selected HMBC data for **4**.

Table 4. Antimalarial, Antimycobacterial, and Cytotoxic Activities of Some Metabolites

compound	antimalarial (IC ₅₀ , μ M)	anti-TB (MIC μ M)	cytotoxicity (IC ₅₀ , μ M)		
	<i>P. falciparum</i> K1	<i>M. tuberculosis</i>	KB	MCF-7	Vero
2	<i>d</i>	<i>d</i>	130	22	<i>d</i>
6	<i>d</i>	<i>d</i>	19	15	57
7	25	39	49	6.2	54
9	9.8	<i>d</i>	0.9	2.7	4.2
10	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	6.3	<i>d</i>
11	13	41	88	5.4	29
13	12	<i>d</i>	5.7	13	170
15	<i>d</i>	<i>d</i>	120	101	<i>d</i>
16	<i>d</i>	<i>d</i>	14	9.8	79
18	14	87	2.0	0.9	58
dihydroartemisinin ^a	0.004				
isoniazid ^b		0.17–0.34			
doxorubicin ^c			0.33	2.18	
ellipticine ^c			1.10		4.47

^a Standard antimalarial drug. ^b Reference compounds for antimycobacterial activity. ^c Standard compounds for cytotoxicity assay. ^d Inactive.

significant selective cytotoxicity to both KB and MCF-7 cell lines. Interestingly, compounds **9** and **18** displayed cytotoxic activity as potent as the standard compounds against KB and MCF-7 cell lines, respectively. Because they share a common 1,4-naphthoquinone unit, this unit may play an important role in the activity. It is worth noting that the hydropyran unit in compound **18** might contribute to the selective cytotoxic activity.

Experimental Section

General Experimental Procedures. Optical rotations were measured on a JASCO P-1020 polarimeter. The ultraviolet (UV) absorption spectra were measured in MeOH on a Shimadzu UV-160A spectrophotometer. The infrared (IR) spectra were recorded neat using a Perkin-Elmer 783 FTS165 FT-IR spectrometer. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a 300 MHz Bruker FTNMR Ultra Shield spectrometer. Chemical shifts are expressed in δ (ppm) referring to the tetramethylsilane peak. Mass data were obtained on a MAT 95 XL mass spectrometer (ThermoFinnigan). Thin-layer chromatography (TLC) and preparative TLC were performed on silica gel 60 GF₂₅₄ (Merck). Column chromatography was carried out on Sephadex LH-20 with MeOH, silica gel (Merck) type 60 (230–400 mesh ASTM) or type 100 (70–230 mesh ASTM), or on reversed-phase silica gel C-18. Light petroleum had a bp of 40–60 °C.

Fungal Material. The marine-derived fungi *Fusarium* spp. PSU-F14 and PSU-F135 were isolated from a gorgonian sea fan (*Annella* sp.) collected near Koh Hin Ran Pet, Suratthani Province, on October 11, 2005, by Mr. Sakanan Plathong, the Department of Biology, Faculty of Science, Prince of Songkla University. They were deposited at the Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, as PSU-F14 and PSU-F135 (GenBank accession numbers EU714385 and EU714402, respectively) on October 20, 2005.

The fungus PSU-F135 was identified on the basis of its morphological and molecular characteristics. Its colony is rapid-growing, woolly to cottony, and white in color with some tinge of pink in the mycelium and pink to pale orange pigment in the agar medium. It produces two kinds of conidia: macroconidia with multiple cells, slightly curved at the pointed ends, and one-celled microconidia, which are the characteristics of the genus *Fusarium*.¹⁹ Its 550 base pair ITS sequence (EU714402) had 98.2% sequence identity to that for *Fusarium* sp. NRRL 43815 (EF453208). This confirmed the identity of PSU-F135 to be a *Fusarium* sp. Colonies of the fungus PSU-F14 are also rapid-growing, velvety, and pale orange in color. They release a bright orange pigment into the agar medium. As neither conidia nor spores were observed, this fungus was identified on the basis of the analysis of the ITS regions of its rDNA gene. Its 525 base pair ITS sequence (EU714385) had 99.8% and 100% sequence identity to those for *Fusarium* spp. AF158314 and AF158313, respectively. This confirmed the identity of PSU-F14 to be a *Fusarium* sp.

Fermentation, Extraction, and Isolation. The marine-derived fungi *Fusarium* spp. PSU-F14 and PSU-F135 were grown on potato dextrose

agar at 25 °C for 5 days. Three pieces (0.5 × 0.5 cm²) of mycelial agar plugs were inoculated into 500 mL Erlenmeyer flasks containing 300 mL of potato dextrose broth at room temperature for four weeks. The flask culture (15 L) was filtered to separate filtrate from wet mycelia. The filtrate was divided into three portions. Each portion was extracted three times with an equal volume of EtOAc (3 × 800 mL). The combined EtOAc layer was dried over anhydrous Na₂SO₄ and evaporated to dryness under reduced pressure to give a dark red solid (3.7 g) and a red-brown gum (839.0 mg) from *Fusarium* spp. PSU-F14 and PSU-F135, respectively. The mycelia cake from the fungus PSU-F14 was extracted with MeOH (500 mL). The MeOH layer was concentrated under reduced pressure. H₂O (100 mL) was added to the extract, and the mixture was washed with hexane (300 mL). The aqueous residue was extracted three times with an equal volume of EtOAc (3 × 300 mL). The EtOAc layer was then dried over anhydrous Na₂SO₄ and evaporated to dryness to obtain a brown solid (560.0 mg). The extracts from the fungi PSU-F14 and PSU-F135 were then subjected to a variety of chromatographic techniques to give compounds **1** (3.1 mg), **2** (4.0 mg), **3** (3.0 mg), **4** (1.5 mg), and **5** (3.1 mg) and 18 other compounds. Details are shown in flow diagrams in the Supporting Information.

Fusaranthraquinone (1): colorless gum; [α]_D²⁵ −18 (*c* 0.92, acetone); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 242 (3.91), 280 (3.61), 353 (3.42) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3417, 1667 cm^{−1}; ¹H NMR (acetone-*d*₆, 300 MHz), see Table 1; ¹³C NMR (acetone-*d*₆, 75 MHz), see Table 1; HREIMS *m/z* [M]⁺ 324.1195 (calcd for C₁₆H₂₀O₇, 324.1209).

Fusarnaphthoquinone A (2): colorless gum; [α]_D²⁵ −25 (*c* 0.45, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 244 (3.51), 282 (3.69), 352 (3.26) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3330, 1700, 1682 cm^{−1}; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz), see Table 2; ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz), see Table 2; HREIMS *m/z* [M − H₂O]⁺ 292.0948 (calcd for C₁₅H₁₆O₆, 292.0947).

Fusarnaphthoquinone B (3): red gum; [α]_D²⁵ −11 (*c* 0.12, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 227 (4.08), 312 (4.01), 360 (3.45) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3425, 1629 cm^{−1}; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz), see Table 2; ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz), see Table 2; HREIMS *m/z* [M]⁺ 276.1001 (calcd for C₁₅H₁₆O₅, 276.0988).

Fusarnaphthoquinone C (4): red gum; [α]_D²⁵ −125 (*c* 0.13, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 227 (4.23), 275 (3.70), 296 (3.69), 403 (3.61), 473 (3.47), 500 (3.53), 535 (3.44), 571 (3.12) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3470, 1717, 1644 cm^{−1}; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz), see Table 3; ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz), see Table 3; HREIMS *m/z* [M]⁺ 550.1478 (calcd for C₂₉H₂₆O₁₁, 550.1475).

Fusarone (5): colorless gum; [α]_D²³ −58 (*c* 0.20, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 213 (3.18) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3209, 1731 cm^{−1}; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 5.43 (1H, dt, *J* = 10.8, 7.2, 1.5 Hz, H-8), 5.23 (1H, dt, *J* = 10.8, 7.5, 1.5 Hz, H-7), 2.38 (2H, m, H-13), 2.35 (2H, m, H-6), 2.32 (1H, m, H-2a), 2.16 (1H, m, H-5a), 2.06 (1H, m, H-2b), 2.01 (2H, m, H-9), 1.88 (1H, m, H-4), 1.82 (1H, m, H-3), 1.77 (1H, m, H-11a), 1.75 (1H, m, H-12a), 1.63 (1H, m, H-12b), 1.42 (1H, m, H-5b), 1.31 (1H, m, H-11b), 0.95 (3H, t, *J* = 7.5 Hz, H-10); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 220.2 (C, C-1), 177.8 (C, C-14), 133.7 (CH, C-8), 125.3 (CH, C-7), 54.8 (CH, C-3), 40.9 (CH, C-4), 37.9 (CH₂, C-2), 34.1 (CH₂, C-11), 33.8 (CH₂, C-13), 26.9 (CH₂, C-5), 25.5 (CH₂, C-6), 22.3 (CH₂, C-12), 20.6 (CH₂, C-9), 14.1 (CH₃, C-10); HREIMS *m/z* [M]⁺ 238.1560 (calcd for C₁₄H₂₂O₃, 238.1569).

9*o*-Hydroxydihydrodesoxybostrycin (6): [α]_D²⁵ −8 (*c* 0.16, MeOH); [lit. [α]_D²⁵ −5.6 (*c* 0.16, MeOH)].⁶

Antimicrobial Assays Using a Colorimetric Broth Microdilution Test. Antimicrobial activity was determined as described by the Clinical and Laboratory Standards Institute^{20–22} and Drummond and Waigh.²³

Antimycobacterial Assay. Antimycobacterial activity was determined against *M. tuberculosis* H37Ra using green fluorescent protein (GFP)-based fluorescent detection.²⁴

Antimalarial Assay. The activity was evaluated against the parasite *P. falciparum* (K1, multi-drug-resistant strain), using the microculture radioisotope technique based on the method described.²⁵

Cytotoxicity Assays. The activity assay against African green monkey kidney fibroblast (Vero) cells was performed in triplicate employing the method described by Hunt and co-workers.²⁶ The activities against KB and MCF-7 cell lines were evaluated using the resazurin microplate assay.²⁷

Acknowledgment. V.R. thanks the Commission on Higher Education and the Thailand Research Fund for the TRF Senior Research Scholar (Grant No. RTA5180007). K.T. and N.K. thank the Thailand

Research Fund through the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (Grant No. PHD/0109/2550) and the Center for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC) for a scholarship. Finally, Prince of Songkla University is gratefully acknowledged for partial support.

Supporting Information Available: Flow diagrams for the isolation of all metabolites, structures of all isolated metabolites, ^1H and ^{13}C NMR spectra of compounds **1–5**, and their 2D NMR data. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References and Notes

- (1) Kato, Y.; Koshino, H.; Uzawa, J.; Anzai, K. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1996**, *60*, 2081–2083.
- (2) Renner, M. K.; Jensen, P. R.; Fenical, W. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 8346–8354.
- (3) Shu, R.-G.; Zhu, H.-L.; Tan, R.-X. *Acta Crystallogr., Sect. E: Struct. Rep. Online* **2005**, *E61*, o189–o191.
- (4) Trisuwan, K.; Rukachaisirikul, V.; Sukpondma, Y.; Preedanon, S.; Phongpaichit, S.; Rungjindamai, N.; Sakayaroj, J. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1323–1326.
- (5) Trisuwan, K.; Rukachaisirikul, V.; Sukpondma, Y.; Preedanon, S.; Phongpaichit, S.; Sakayaroj, J. *Phytochemistry* **2009**, *70*, 554–557.
- (6) Sommart, U.; Rukachaisirikul, V.; Sukpondma, Y.; Phongpaichit, S.; Sakayaroj, J.; Kirtikara, K. *Chem. Pharm. Bull.* **2008**, *56*, 1687–1690.
- (7) Tanaka, M.; Fukushima, T.; Tsujino, Y.; Fujimori, T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1997**, *61*, 1848–1852.
- (8) Noda, T.; Take, T.; Otani, M.; Miyauchi, K.; Watanabe, T.; Abe, J. *Tetrahedron Lett.* **1968**, *58*, 6087–6090.
- (9) Xia, X.-K.; Huang, H.-R.; She, Z.-G.; Shao, C.-L.; Liu, F.; Cai, X.-L.; Vrijmoed, L. L. P.; Lin, Y.-C. *Magn. Reson. Chem.* **2007**, *45*, 1006–1009.
- (10) Kai, H.; Baba, M.; Okuyama, T. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 133–136.
- (11) Kashiwada, Y.; Nonaka, G.; Nishioka, I. *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, *32*, 3493–3500.
- (12) Hisamoto, M.; Kikuzaki, H.; Ohigashi, H.; Nakatani, N. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5255–5261.
- (13) Pettit, G. R.; Du, J.; Pettit, R. K.; Knight, J. C.; Doubek, D. L. *Heterocycles* **2009**, *79*, 909–916.
- (14) Kimura, Y.; Shimada, A.; Nakajima, H.; Hamasaki, T. *Agric. Biol. Chem.* **1988**, *52*, 1253–1259.
- (15) Bergeron, D.; Caron, B.; Brassard, P. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 509–511.
- (16) Kurobane, I.; Vining, L. C.; McInnes, A. G.; Walter, J. A. *Can. J. Chem.* **1980**, *58*, 1380–1385.
- (17) Tatum, J. H.; Baker, R. A. *Phytochemistry* **1983**, *22*, 543–547.
- (18) Guzmán-López, O.; Trigos, A.; Fernández, F. J.; Yañez-Morales, M. de J.; Saucedo-Castañeda, G. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *23*, 1473–1477.
- (19) Barnett, H. L.; Hunter, B. B. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*; American Phytopathological Society: St. Paul, MN, 1998.
- (20) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M7-A4. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, 2002a.
- (21) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard, 2nd ed. M27-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, 2002b.
- (22) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: Approved Standard. CLSI documents M38-A. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, 2002c.
- (23) Drummond, A. J.; Waigh, R. D. *Recent Res. Dev. Phytochem.* **2000**, *4*, 143–152.
- (24) Changsen, C.; Franzblau, S. G.; Palittapongarnpim, P. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 3682–3687.
- (25) Desjardins, R. E.; Canfield, C. J.; Haynes, J. D.; Chulay, J. D. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1979**, *16*, 710–718.
- (26) Hunt, L.; Jordan, M.; De Jesus, M.; Wurm, F. M. *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, *65*, 201–205.
- (27) O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5421–5426.

NP100282K



Cyclohexene, Diketopiperazine, Lactone and Phenol Derivatives from the Sea Fan-derived Fungi *Nigrospora* sp. PSU-F11 and PSU-F12

Vatcharin Rukachaisirikul¹, Nanthaphong Khamthong¹, Yaowapa Sukpondma¹, Souwalak Phongpaichit², Nongporn Hutadilok-Towatana³, Potchanapond Graidist⁴, Jariya Sakayaroj⁵, and Kanyawim Kirtikara⁵

¹Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand, ²Natural Products Research Center and Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand, ³Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla 90112, Thailand, ⁴Department of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, Prince of Songkla University, Songkhla 90112, Thailand, and ⁵National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Thailand Science Park, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand

(Received November 5, 2009/Revised January 6, 2010/Accepted January 17, 2010)

Nigrosporane A (1) and B (2), two new cyclohexene derivatives, and tyrosol (3) were isolated from the sea fan-derived fungus *Nigrospora* sp. PSU-F11, whereas five known compounds: 4-hydroxybenzoic acid (4), aplysiopsene D (5), 3-isochromanone (6), (-)-drimenin (7) and diketopiperazine derivative (8), were obtained from the fungus *Nigrospora* sp. PSU-F12. Their structures were established by spectroscopic evidence. We also tested their cytotoxic (on African green monkey kidney fibroblast and breast cancer cells), antioxidant (in the DPPH assay), and antibacterial (against the standard *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and methicillin-resistant *S. aureus*) activities.

Key words: *Nigrospora* sp., Cyclohexenes, Lactones, Cytotoxic activity, Antioxidant activity, Antibacterial activity

INTRODUCTION

During our ongoing search for bioactive natural products from marine-derived fungi, a number of isolates in the genus *Nigrospora* with interesting biological activities were isolated from a gorgonian sea fan (*Annella* sp.) collected near the Similan Islands, Southern Thailand. Bioactive secondary metabolites isolated from *Nigrospora* sp. include phytotoxic and antibacterial nigrosporins from *Nigrospora oryzae* (Tanaka et al., 1997), herbicidal phomalactone from the culture broth of *Nigrospora sacchari* (Fukushima et al., 1998), and antiviral aphidicolin from *Nigrospora sphaerica* (Starratt et al., 1974; Michaelis et al., 2002). We have recently identified metabolites from two sea

fan-derived fungi, *Nigrospora* sp. PSU-F5 (Trisuwan et al., 2008), which contained epoxydon and pyrone analogues, and PSU-F18 (Trisuwan et al., 2009), which contained pyrone derivatives of the solanapyrone type. We report herein the isolation of two new cyclohexene metabolites (1 and 2) along with one known phenol, tyrosol (3) (Trisuwan et al., 2009), from the fungus *Nigrospora* sp. PSU-F11, and five known metabolites, 4-hydroxybenzoic acid (4) (Pyo et al., 2002), aplysiopsene D (5) (Ciavatta et al., 2009), 3-isochromanone (6) (Almena et al., 1995), (-)-drimenin (7) (Akita et al., 2000), and diketopiperazine derivative (8) (Chu et al., 1993), from the fungus *Nigrospora* sp. PSU-F12. We also report on their antibacterial activity against the standard *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (SA) and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), antioxidant activity in the DPPH assay, and cytotoxicity against both breast cancer (MCF-7) and African green monkey kidney fibroblast (Vero) cell lines.

Correspondence to: Vatcharin Rukachaisirikul, Department of Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla 90112, Thailand
Tel: 66-74-288-435, Fax: 66-74-212-918
E-mail: vatcharin.r@psu.ac.th

MATERIALS AND METHODS

General experimental procedures

The Infrared (IR) spectra were recorded using a Perkin-Elmer 783 FTS165 FT-IR spectrometer. The Ultraviolet (UV) absorption spectra were measured on a SHIMADZU UV-160A spectrophotometer. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a 300 MHz Bruker FTNMR Ultra Shield™ spectrometer in deuteriochloroform solution with tetramethylsilane (TMS) as an internal standard. The electron ionization (EI) and high resolution electron ionization (HREI) mass spectra were obtained on a MAT 95 XL Mass Spectrometer (ThermoFinnigan). Optical rotation was measured on a JASCO P-1020 polarimeter. Thin-layer chromatography (TLC) and preparative TLC were performed on silica gel 60 GF₂₅₄ (Merck). Column Chromatography (CC) was performed on Sephadex LH-20 with MeOH, silica gel (Merck) type 60 (230-400 mesh ASTM) or type 100 (70-230 mesh ASTM) with a MeOH-CH₂Cl₂ gradient, or reverse phase C-18 silica gel with a MeOH-H₂O gradient. Light petroleum had a bp of 40-60°C.

Fungal material

The fungi *Nigrospora* sp. PSU-F11 and PSU-F12 were isolated from the gorgonian sea fan (*Annella* sp.), which was collected near the Similan Islands, Thailand, in 2005. They were deposited as PSU-F11 and PSU-F12 at the Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University.

Fermentation and isolation

The broth extracts of both fungi were prepared using the same procedure as described for *Nigrospora* sp. PSU-F5 (Trisuwan et al., 2008). The crude extract of *Nigrospora* sp. PSU-F11 (497.7 mg) was subjected to CC over Sephadex LH-20 to obtain four fractions (1A-1D). Fraction 1B (287.9 mg) was further purified by CC over silica gel to afford three subfractions (1B1-1B3). Subfraction 1B2 (101.4 mg, eluted with 2-4% MeOH-CH₂Cl₂), was purified by reverse phase C-18 CC to give three subfractions. The second subfraction (48.1 mg, eluted with 40-60% MeOH-H₂O) was further purified by flash CC over silica gel to afford **1** (6.4 mg) and **2** (4.5 mg). Fraction 1C (64.9 mg) was purified by CC over silica gel with 30% EtOAc-light petroleum followed by preparative TLC using 20% acetone-light petroleum (6 runs) as a mobile phase to afford **3** (2.7 mg). Purification of the broth extract of the fungus PSU-F12 (519.3 mg) was performed by CC over Sephadex LH-20 to give four fractions (2A-2D). Fraction 2B (266.6 mg) was then subjected to CC over

silica gel to afford four subfractions (2B1-2B4). Subfraction 2B1 (17.9 mg, eluted with 1% MeOH-CH₂Cl₂) was purified by preparative TLC using 3% EtOAc-light petroleum (7 runs) as a mobile phase to give **6** (1.2 mg) and **7** (5.7 mg). **5** (1.5 mg) was obtained after subjecting subfraction 2B2 (4.4 mg, eluted with 1-2% MeOH-CH₂Cl₂) to preparative TLC using 4% EtOAc-light petroleum (9 runs) as a mobile phase. Subfraction 2B3 (58.3 mg, eluted with 2-8% MeOH-CH₂Cl₂) was subjected to CC over silica gel to afford **8** (1.2 mg). Fraction 2C (40.8 mg) was separated by reverse phase C-18 CC and then re-chromatographed by CC over Sephadex LH-20 to afford **4** (4.7 mg).

Nigrosporanene A (1)

Colorless gum; $[\alpha]_D^{25}$ -145.2 (MeOH; c 0.85); UV (MeOH) λ_{max} nm (log ϵ): 203 (4.05); IR (neat): 3392, 1705 cm⁻¹; HREIMS m/z 254.1524 [M]⁺ (calcd. for C₁₄H₂₂O₄, 254.1518); EIMS m/z 254 [M]⁺, 236, 163, 107, 91; ^1H NMR (300 MHz, CDCl₃) and ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl₃): see Table I.

Nigrosporanene B (2)

Colorless gum; $[\alpha]_D^{25}$ -40.5 (MeOH; c 0.54); UV (MeOH) λ_{max} nm (log ϵ): 206 (4.34); IR (neat): 3391, 1708 cm⁻¹; HREIMS m/z 236.1416 [M-H₂O]⁺ (calcd. for C₁₄H₂₀O₃, 236.1412); EIMS m/z 254 [M]⁺, 236, 163, 107, 91; ^1H NMR (300 MHz, CDCl₃) and ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl₃): see Table I.

Tyrosol (3)

Colorless gum; UV (MeOH) λ_{max} nm (log ϵ): 205 (3.47), 222 (3.50), 278 (3.05); IR (neat): 3354 cm⁻¹; ^1H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 7.11 (2H, d, J = 9.0 Hz, H-3, H-5), 6.79 (2H, d, J = 9.0 Hz, H-2, H-6), 3.83 (2H, t, J = 6.0 Hz, H-8), 2.81 (2H, t, J = 6.0 Hz, H-7); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 154.2 (s, C-1), 130.6 (s, C-4), 130.2 (d, C-3, C-5), 115.5 (d, C-2, C-6), 63.8 (t, C-8), 38.3 (t, C-7).

4-Hydroxybenzoic acid (4)

Colorless gum; UV (MeOH) λ_{max} nm (log ϵ): 253 (3.18), 273 (2.98); IR (neat): 3462, 1656 cm⁻¹; ^1H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 7.93 (2H, d, J = 8.7 Hz, H-3, H-7), 6.93 (2H, d, J = 8.7 Hz, H-4, H-6); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 166.9 (s, C-1), 161.8 (s, C-5), 131.8 (d, C-3, C-7), 121.7 (s, C-2), 115.1 (d, C-4, C-6)

Aplysiopsene D (5)

Colorless gum; $[\alpha]_D^{24}$ -109.4 (MeOH; c 0.08); UV (MeOH) λ_{max} nm (log ϵ): 204 (3.87); IR (neat): 1724 cm⁻¹; ^1H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 6.35 (1H, dd, J = 10.0, 0.5 Hz, H-8), 6.03 (1H, s, H-5), 3.84 (3H, s, H-15), 2.38

Table I. ^1H , ^{13}C NMR and HMBC data of nigrosporanenes A (1) and B (2) in CDCl_3

Position	1		2		1 and 2
	^1H δ (mult., J , Hz)	^{13}C δ (mult.)	δ_{H} (mult., J , Hz)	δ_{C} (mult.)	HMBC
1	4.20 (brd, 8.4)	72.0 (d)	4.06 (brd, 2.1)	67.4 (d)	C-2, C-3, C-6
2	5.67 (dd, 0.9, 10.8)	128.2 (d)	5.57 (d, 10.8)	125.1 (d)	C-4, C-6
3	5.54 (ddd, 2.1, 3.9, 10.8)	129.4 (d)	5.77 (d, 10.8)	133.3 (d)	C-1, C-4, C-5, C-10
4	3.19 (m)	42.4 (d)	3.28 (t, 7.8)	37.5 (d)	C-2, C-3, C-5, C-6, C-7, C-10, C-11
5	3.19 (m)	51.0 (d)	3.15 (dd, 2.1, 7.8)	48.9 (d)	C-3, C-4, C-6, C-8, C-10
6	4.08 (dd, 8.4, 10.2)	72.0 (d)	3.93 (t, 2.1)	70.4 (d)	C-1, C-4, C-5, C-7
7	-	213.0 (s)	-	214.5 (s)	-
8	4.36 (q, 7.2)	71.6 (d)	4.47 (q, 6.6)	72.5 (d)	C-7, C-9
9	1.40 (d, 7.2)	20.1 (q)	1.34 (d, 6.6)	19.4 (q)	C-7, C-8
10	5.11 (dd, 8.4, 15.3)	126.8 (d)	5.24 (dd, 7.8, 15.3)	129.8 (d)	C-3, C-4, C-5, C-7, C-11
11	5.47 (td, 7.2, 15.3)	134.8 (d)	5.50 (td, 7.8, 15.3)	133.5 (d)	C-4, C-10, C-12, C-13
12	1.94 (dq, 1.2, 7.2)	34.3 (t)	1.95 (q, 7.8)	34.5 (t)	C-10, C-11, C-13, C-14
13	1.32 (sext, 7.2)	22.2 (t)	1.36 (sext, 7.8)	22.3 (t)	C-11, C-12, C-14
14	0.84 (t, 7.2)	13.5 (q)	0.87 (t, 7.8)	13.7 (q)	C-12, C-13

(1H, m, H-9), 1.87 (3H, s, H-14), 1.83 (3H, d, $J = 1.5$ Hz, H-13), 1.37 (1H, m, Ha-10), 1.28 (1H, m, Hb-10), 0.95 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-12), 0.78 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, H-11); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 166.0 (s, C-4), 160.2 (s, C-2), 160.0 (s, C-6), 141.3 (d, C-8), 124.5 (s, C-7), 102.0 (s, C-3), 91.8 (d, C-5), 56.2 (q, C-15), 35.1 (d, C-9), 30.0 (t, C-10), 20.3 (q, C-12), 12.7 (q, C-13), 12.0 (q, C-11), 8.5 (q, C-14).

3-Isochromanone (6)

Colorless gum; UV (MeOH) λ_{max} nm (log ϵ): 208 (3.63), 246 (3.45); IR (neat): 1756 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.46 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-8), 7.40 (1H, t, $J = 7.0$ Hz, H-7), 7.27 (1H, t, $J = 7.0$ Hz, H-6), 7.08 (1H, brd, $J = 7.0$ Hz, H-5), 4.62 (2H, s, H-1), 3.89 (2H, s, H-4); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 173.3 (s, C-3), 136.1 (s, C-4a), 129.2 (d, C-6), 128.9 (d, C-8), 128.7 (d, C-7), 128.5 (d, C-5), 127.4 (s, C-8a), 71.1 (t, C-1), 34.0 (t, C-4).

(-)-Drimenin (7)

Colorless gum; $[\alpha]_{\text{D}}^{26} -57.4$ (benzene; c 0.85); UV (MeOH) λ_{max} nm (log ϵ): 208 (3.72); IR (neat): 1762 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 5.74 (1H, brs, H-7), 4.68 (1H, dt, $J = 12.0, 2.0$ Hz, Ha-13), 4.65 (1H, dt, $J = 12.0, 2.0$ Hz, Hb-13), 2.78 (1H, brs, H-9), 2.49 (1H, ddd, $J = 13.5, 5.0, 2.0$ Hz, Ha-1), 2.20 (1H, dm, $J = 14.0$ Hz, Ha-6), 1.99 (1H, dm, $J = 14.0$ Hz, Hb-6), 1.59 (1H, dm, $J = 13.5$ Hz, Ha-2), 1.49 (1H, dm, $J = 14.0$ Hz, Ha-3), 1.48 (1H, dm, $J = 13.5$ Hz, Hb-2), 1.36 (1H, dd, $J = 12.0, 5.0$ Hz, H-5), 1.26 (1H, dm, $J = 14.0$ Hz, Hb-3), 1.20 (1H, dd, $J = 13.5, 3.5$ Hz, Hb-1), 0.92 (3H, s, H-14), 0.90 (3H, s, H-15), 0.88 (3H, s, H-16); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 175.2 (s, C-11), 129.9 (s, C-

8), 121.2 (d, C-7), 69.8 (t, C-13), 53.7 (d, C-9), 49.7 (d, C-5), 42.4 (t, C-3), 38.5 (t, C-1), 34.4 (s, C-10), 33.1 (s, C-4), 33.0 (q, C-15), 23.4 (t, C-6), 21.4 (q, C-14), 18.3 (t, C-2), 13.9 (q, C-16).

Sch 54796 (8)

White solid; mp 202.0-204.0°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -50.9$ (MeOH; c 0.10); UV (MeOH) λ_{max} nm (log ϵ): 206 (3.47), 224 (2.44), 272 (2.52); IR (neat): 3177, 3066, 1672 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.10 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-9, H-9'), 6.78 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-10, H-10'), 6.05 (1H, brs, 4-NH), 5.97 (1H, brs, 1-NH), 5.39 (1H, tm, $J = 7.0$ Hz, H-13), 4.90 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-3), 4.41 (2H, d, $J = 6.5$ Hz, H-12), 3.50 (1H, d, $J = 14.0$ Hz, Ha-7), 2.95 (1H, d, $J = 14.0$ Hz, Hb-7), 2.16 (3H, s, H-18), 1.72 (3H, s, H-15), 1.67 (3H, s, H-16), 1.64 (3H, s, H-17); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 165.3 (s, C-5), 164.5 (s, C-2), 158.8 (s, C-11), 138.3 (s, C-14), 132.1 (d, C-9, C-9'), 125.1 (s, C-8), 119.6 (d, C-13), 115.0 (d, C-10, C-10'), 67.8 (s, C-6), 64.9 (t, C-12), 58.5 (d, C-3), 43.0 (t, C-7), 25.8 (q, C-15), 18.2 (q, C-16), 13.3 (q, C-18), 11.3 (q, C-17).

Biological assays

The antibacterial activity was evaluated against SA and MRSA using the agar microdilution method (Lorian, 1996). MICs were recorded by reading the lowest substance concentration that inhibited visible growth. Vancomycin, a positive control drug, exhibited an MIC value of 1 $\mu\text{g/mL}$. Growth controls were performed on the agar containing DMSO. Antioxidant activity was tested as previously described (Yen and Hsieh, 1997) and presented as IC_{50} (sample concentration that produced 50% scavenging of the DPPH

radical). 2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylphenol, the standard reagent, gave an IC_{50} value of 0.02 mg/mL. The cytotoxicity assay against African green monkey kidney fibroblasts (Vero) and MCF-7 (human breast cancer) cells was performed using the calorimetric method (Skehan et al., 1990). The standard compound, ellipticine, showed an IC_{50} value of 2.40 μ g/mL.

RESULTS AND DISCUSSION

The fungi PSU-F11 and PSU-F12 were identified as *Nigrospora* species on the basis of morphological characteristics (Barnett and Hunter, 1998). Their colonies were rapid-growing, woolly to cottony, and white to gray in color. The hyphae were septate. Conidiophores are simple, unbranched, and short, with inflated ends or vesicle. The conidium was black, spherical, and borne on the end of the vesicle. The fungal strain was cultivated on potato dextrose broth at room temperature for 4 weeks. The ethyl acetate extracts of the culture broth of PSU-F11 and PSU-F12 were subjected to chromatographic purification. The former afforded two new cyclohexene analogues (**1** and **2**) and the known tyrosol (**3**), whereas the latter yielded five known metabolites: 4-hydroxybenzoic acid (**4**), aplysiopene D (**5**), 3-isochromanone (**6**), (-)-drimenin (**7**) and a diketopiperazine derivative (**8**). Their structures were established on the basis of spectroscopic analyses, including 2D NMR spectroscopic techniques. For the known compounds, their 1H and ^{13}C NMR data were also compared with previous reports. The relative configuration of **1** and **2** was established on the basis of NOEDIFF data. The absolute configuration at C-1 and C-6 of **1** and **2** could be resolved using the Harada-Nakanishi dibenzoate rule (Ayer et al., 1992; Hashimoto et al., 2008), but we did not have sufficient material. The absolute configuration of the known metabolites was assigned by NOEDIFF data and by comparison of their optical rotation with the literature.

Nigrosporanene A (**1**), with the molecular formula $C_{14}H_{22}O_4$ from HREIMS, was obtained as a colorless gum with $[\alpha]_D^{25}$ -145.2 (MeOH; *c* 0.85). It exhibited hydroxyl and carbonyl absorption bands at 3392 and 1705 cm^{-1} , respectively, in the IR spectrum. The olefinic proton signals at δ 5.67 and 5.54 (Table I) were assigned as *cis*-olefinic protons, H-2 and H-3, respectively, according to the coupling constant of 10.8 Hz. The 1H - 1H COSY spectrum showed correlations of H-2 with H-1 (δ 4.20) and H-3; H-4 (δ 3.19) with H-3 and H-5 (δ 3.19); and H-6 (δ 4.08) with H-1 and H-5. These results together with the chemical shifts of H-1 and H-6 established a cyclohexene skeleton with a

double bond at C-2 and C-3 and hydroxyl groups at C-1 and C-6. The chemical shifts of C-1 (δ 72.0) and C-6 (δ 72.0) supported the above assignment. Two remaining olefinic protons were attributed to H-10 (δ 5.11) and H-11 (δ 5.47), which had *trans* orientation according to their coupling constant of 15.3 Hz. In the 1H - 1H COSY spectrum, H-11 showed cross peaks with H-10 and H₂-12 (δ 1.94), whereas H₂-13 (δ 1.32) gave the same correlations with H₂-12 and H₃-14 (δ 0.84) to show a 1-pentenyl subunit. Furthermore, the following 1H - 1H COSY and HMBC data (Table I) indicated the presence of a -(CO)CH(OH)CH₃ subunit. The hydroxymethine proton, H-8 (δ 4.36), exhibited a 1H - 1H COSY cross peak with H₃-9 (δ 1.40) and gave HMBC correlations with C-7 (δ 213.0) and C-9 (δ 20.1). The connectivity of the three assigned subunits was deduced by the HMBC correlations of H-10 with C-3 (δ 129.4), C-4 (δ 42.4), and C-5 (δ 51.0); H-4 with C-7; and H-5 with C-8 (δ 71.6). These results showed the attachment of the 1-pentenyl and α -hydroxy ketone units at C-4 and C-5 of the cyclohexene ring, respectively. The relative stereochemistry of **1** was determined by the NOEDIFF data and *J* values. H-6 was coupled with H-1 and H-5 with coupling constants of 8.4 and 10.2 Hz, respectively, indicating that these protons were at pseudoaxial positions (Fig. 2). The signal intensity of H-6 was enhanced when H-10 of the 1-pentenyl subunit was irradiated in the NOEDIFF experiment, and was assigned to the pseudoaxial position. Thus, the substituents of the cyclohexene ring, except for the 1-pentenyl subunit, were pseudoequatorially oriented. The difference in the *J* value of the pseudoaxial H-1 and H-2 versus that of H-3 and the pseudoequatorial H-4 (Jolad et al., 1981) supported this conclusion. Therefore, **1** was identified as a new cyclohexene derivative (Fig. 1).

Nigrosporanene B (**2**) was obtained as a colorless gum with $[\alpha]_D^{25}$ -40.5 (MeOH; *c* 0.54), and possessed the same molecular formula as **1** from HREIMS. The UV and IR absorption bands of **2** were similar to those of **1**. Comparison of their 1H , ^{13}C NMR and HMBC data (Table I) indicated that their structures were alike. In the half-chair conformation, H-4 (δ 3.28) was coupled with H-5 (δ 3.15) with a large coupling constant of 7.8 Hz, indicating a *trans* diaxial relationship (Fig. 2). In addition, H-5 was coupled with H-6 (δ 3.93) with a small coupling constant of 2.1 Hz, suggesting a pseudoequatorial location, not pseudoaxial as in **1**. H-1 (δ 4.06) was located either pseudoaxially or pseudoequatorially with a small *J* value of 2.1 Hz between H-1 and H-6. H-1 was assigned the pseudoaxial position, identical to **1**, on the basis of the similar *J* values of H-1 and H-2 in both compounds. This assignment was

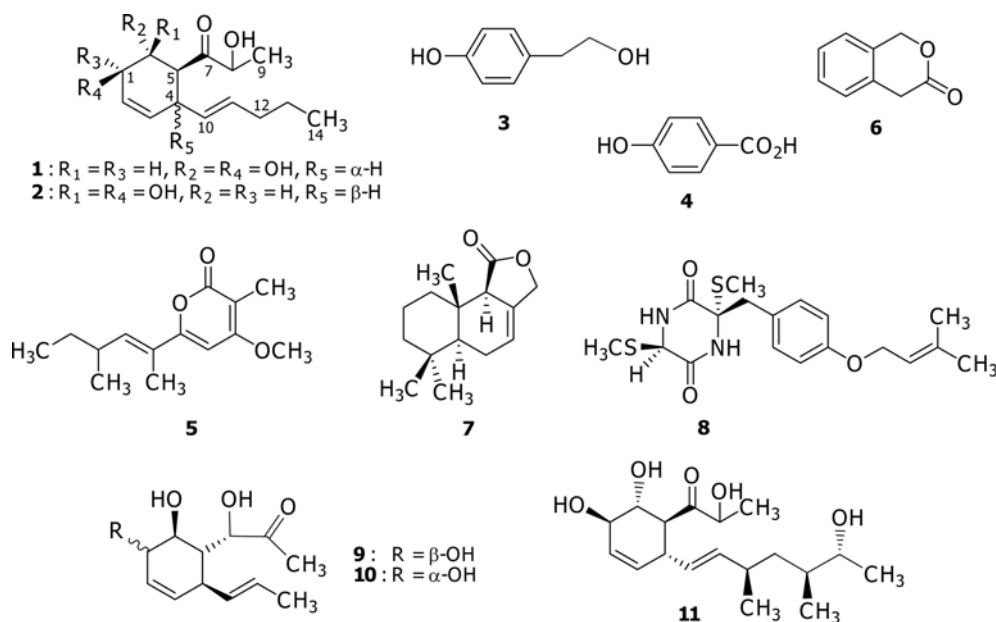


Fig. 1. Structures of compounds 1-11

supported by the signal enhancement of H-1 upon irradiation of H-5 in the NOEDIFF experiment. Therefore, **2** differed from **1** in the spatial arrangement of the substituents at C-4 (δ 37.5) and C-6 (δ 70.4) (Fig. 1).

Several fungal metabolites related to compounds **1** and **2**, arthropatriols A (**9**) and B (**10**) (Ayer et al., 1992), and norleptosol C (**11**) (Murakami et al. 2009), have been isolated from *Arthropsis truncata* and *Leptosphaeria doliolum*, respectively. Although all of them have different relative stereochemistry, they share common structural features: C-1 and C-6 hydroxyl groups, a C-5 three-carbon chain, and a C-4 *trans*-1-alkenyl substituent with various numbers of carbons. Thus, compounds **1**, **2**, and **11** may have a biosynthetic pathway similar to that proposed for **9** and **10** (Ayer and Craw, 1992).

Compounds **1**, **2**, and **7** were evaluated for cytotoxic activity against MCF-7 and Vero cell lines, antioxidant activity with the DPPH assay, and antibacterial

activity against SA and MRSA. Compound **1** exhibited cytotoxic activity against MCF-7 and Vero cells with respective IC_{50} values of 9.37 and 5.42 $\mu g/mL$, whereas **2** and **7** were inactive at 50 $\mu g/mL$. Compound **7** was inactive against KB (mouth epidermoid carcinoma), HL60 (promyelocytic leukemia), and HCT116 (colon) cancer cell lines (Allouche et al., 2009). No compound showed antibacterial activity against SA and MRSA at the concentration of 200 $\mu g/mL$. Finally, **1** and **2** showed weak radical scavenging activity with IC_{50} values of 0.34 and 0.24 mg/mL, respectively, whereas **7** was inactive.

ACKNOWLEDGEMENTS

V. Rukachaisirikul thanks the Commission on Higher Education and the Thailand Research Fund for the TRF Senior Research Scholar (Grant No. RTA5180007). N. Khamthong is grateful to the Center for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC) for a scholarship and Prince of Songkla University for partial support.

REFERENCES

- Akita, H., Nozawa, M., Mitsuda, A., and Ohsawa, H., A convenient synthesis of (+)-albicanol based on enzymatic function: total syntheses of (+)-albicanyl acetate, (-)-albicanyl 3,4-dihydroxycinnamate, (-)-drimenol, (-)-drimenin and (-)-ambrox. *Tetrahedron: Asymmetry*, 11, 1375-1388 (2000).
 Allouche, N., Apel, C., Martin, M.-T., Dumontet, V., Guéritte,

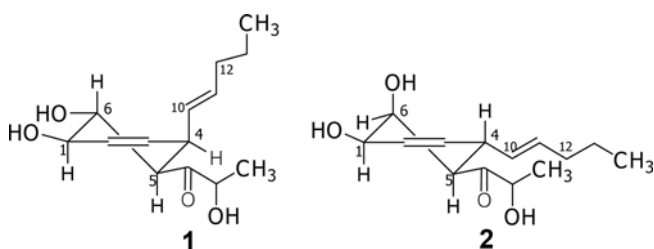
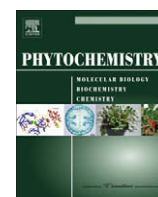


Fig. 2. The half-chair conformation of nigrosporane A (**1**) and B (**2**)

- Fr., and Litaudon, M., Cytotoxic sesquiterpenoids from Winteraceae of Caledonian rainforest. *Phytochemistry*, 70, 546-553 (2009).
- Almena, J., Foubelo, F., and Yus, M., 1,2-Di(lithiomethyl) benzene from phthalan: sequential introduction of two different electrophiles. *Tetrahedron*, 51, 3351-3364 (1995).
- Ayer, W. A. and Craw, P. A., Biosynthesis and biogenetic interrelationships of metabolites of the fungus *Arthropsis truncata*. *Can. J. Chem.*, 70, 1348-1355 (1992).
- Ayer, W. A., Craw, P. A., and Neary, J., Metabolites of the fungus *Arthropsis truncata*. *Can. J. Chem.*, 70, 1338-1347 (1992).
- Barnett, H. L. and Hunter B. B., Illustrated genera of imperfect fungi. Prentice-Hall Inc., The American Phytopathological Society, USA, (1998).
- Chu, M., Mierzwa, R., Truumees, I., Gentile, F., Patel, M., Gullo, V., Chan, T.-M., and Puar, M. S., Two novel diketopiperazines isolated from the fungus *Tolypocladium* sp. *Tetrahedron Lett.*, 34, 7537-7540 (1993).
- Ciavatta, M. L., Manzo, E., Nuzzo, G., Villani, G., Cimino, G., Cervera, J. L., Malaquias, M. A. E., and Gavagnin, M., Aplysiopsenes: an additional example of marine polyketides with a mixed acetate/propionate pathway. *Tetrahedron Lett.*, 50, 527-529 (2009).
- Fukushima, T., Tanaka, M., Gohbara, M., and Fujimori, T., Phytotoxicity of three lactones from *Nigrospora sacchari*. *Phytochemistry*, 48, 625-630 (1998).
- Hashimoto, M., Tsushima, T., Murakami, T., Nomiya, M., Takada, N., and Tanaka, K., Spiroleptoshol isolated from *Leptosphaeria doliolum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18, 4228-4231 (2008).
- Jolad, S. D., Hoffmann, J. J., Schram, K. H., Cole, J. R., Tempesta, M. S., and Bates, R. B., Structures of zeylenol and zeylena, constituents of *Uvaria zeylanica* (Annonaceae). *J. Org. Chem.*, 46, 4267-4272 (1981).
- Lorian, V., Antibiotics in Laboratory Medicine. William and Wilkins, Baltimore, pp. 28-32, (1996).
- Michaelis, M., Langer, K., Vogel, J.-U., Kreuter, J., Rabenau, H., Doerr, H.-W., and Cinatl, J., In vitro antiviral activity of aphidicolin and its derivatives: synergistic effects of aphidicolin with other antiviral drugs. *Arzneimittelforschung*, 52, 393-399 (2002).
- Murakami, T., Tsushima, T., Takada, N., Tanaka, K., Nihei, K., Miura, T., and Hashimoto, M., Four analogues of spiroleptoshol isolated from *Leptosphaeria doliolum*. *Bioorg. Med. Chem.*, 17, 492-495 (2009).
- Pyo, M. K., Koo, Y. K., and Yun-Choi, H. S., Anti-platelet effect of the phenolic constituents isolated from the leaves of *Magnolia obovata*. *Nat. Prod. Sci.*, 8, 147-151 (2002).
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S., and Boyd, M. R., New colorimetric cytotoxicity assay for anti-cancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.*, 82, 1107-1112 (1990).
- Starratt, A. N. and Loschiavo, S. R., Production of aphidicolin by *Nigrospora sphaerica*. *Can. J. Microbiol.*, 20, 416-417 (1974).
- Tanaka, M., Fukushima, T., Tsujino, Y., and Fujimori, T., Nigrosporins A and B, new phytotoxic and antibacterial metabolites produced by a fungus *Nigrospora oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 61, 1848-1852 (1997).
- Trisuwan, K., Rukachaisirikul, V., Sukpondma, Y., Preedanon, S., Phongpaichit, S., Rungjindamai, N., and Sakayaroj, J., Epoxydons and a pyrone from the marine-derived fungus *Nigrospora* sp. PSU-F5. *J. Nat. Prod.*, 71, 1323-1326 (2008).
- Trisuwan, K., Rukachaisirikul, V., Sukpondma, Y., Preedanon, S., Phongpaichit, S., and Sakayaroj, J., Pyrone derivatives from the marine-derived fungus *Nigrospora* sp. PSU-F18. *Phytochemistry*, 70, 554-557 (2009).
- Yen, G.-C. and Hsieh, G.-L., Antioxidant effects of dopamine and related compounds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 61, 1646-1649 (1997).



Pyrone derivatives from the marine-derived fungus *Nigrospora* sp. PSU-F18

Kongkiat Trisuwan^a, Vatcharin Rukachaisirikul^{a,*}, Yaowapa Sukpondma^a, Sita Preedanon^b, Souwalak Phongpaichit^b, Jariya Sakayaroj^c

^a Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

^b Natural Products Research Center and Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

^c National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Thailand Science Park, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 September 2008

Received in revised form 29 November 2008

Available online 23 February 2009

Keywords:

Nigrospora sp.

Marine-derived fungus

Pyrone

Antibacterial activity

ABSTRACT

Pyrone, named nigrosporapyrones A–D (**1–4**), and five known compounds were isolated from the marine-derived fungus *Nigrospora* PSU-F18. Their structures were elucidated on the basis of spectroscopic evidence. The antibacterial activity against the standard *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and methicillin-resistant *S. aureus* was evaluated.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The genus *Nigrospora* has been recognized as plant endophyte and also as a rich source of biologically active secondary metabolites, including herbicidal lactones (Fukushima et al., 1998), antibacterial nigrosporins (Tanaka et al., 1997), phytoxin epoxyxerohilone (Cutler et al., 1991) and antibiotic griseofulvin (Furuya et al., 1967). We recently reported the isolation and the antibacterial activity of metabolites isolated from the first marine-derived fungus *Nigrospora* sp. (Trisuwan et al., 2008). We described herein investigation of the second marine-derived fungus *Nigrospora* sp. PSU-F18 of which the ethyl acetate extract from the culture broth exhibited interesting antibacterial activity against standard *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (SA) and a clinical isolate of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). Investigation of the broth extract led to isolation and structural elucidation of four new pyrones, nigrosporapyrones A–D (**1–4**) together with five known compounds, solanapyrone A (**5**) (Alam et al., 1989), (+)-phomalactone (**6**) (Yang et al., 1997), 5-(*S*)-[1-(1(*S*)-hydroxybut-2-enyl)]-dihydrofuran-2-one (**7**) (Fukushima et al., 1998), musacin F (**8**) (Grabley et al., 1994) and tyrosol (**9**) (Rasser et al., 2000).

2. Results and discussion

The marine-derived fungus *Nigrospora* sp. PSU-F18 was isolated from the sea fan (*Annella* sp.). As neither conidia nor spores were

observed, this fungus was identified based on the analyses of the partial large subunit (LSU) and the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) regions of their rDNA gene. Its LSU sequence (EU852533) matched with the closely related sequence of *Nigrospora* sp. AY234934 with 100% bootstrap support. Moreover, its ITS sequence (EU714386) was well placed in the major *Nigrospora* clade comprising *Nigrospora* sp. (AM262341, EU714382, EF589888, AM921707, EF564154) and *Nigrospora oryzae* (EU427044, EU529995, EU529994, EU529993, DQ219433, EU196745) with high statistical support (98%) and sequence similarity between 94.7% and 95.8%. The fungus PSU-F18 was then identified as *Nigrospora* sp.

The culture broth of this fungus grown in potato dextrose broth at room temperature for 4 weeks was extracted with EtOAc. The crude extract obtained was subjected to chemical investigation, leading to the isolation of compounds **1–9**. Six of them were pyrone derivatives (**1–6**), including four solanapyrone derivatives (**1–3** and **5**). Their antibacterial activity against SA and MRSA was evaluated.

Nigrosporapyrone A (**1**) was obtained as a colorless gum with the molecular formula C₁₈H₂₂O₅ from HREIMS. The UV spectrum displayed maximum absorption bands at λ_{max} 228, 273 and 320 nm while the IR spectrum showed absorption bands for hydroxyl (3390 cm^{−1}), conjugated ester carbonyl (1719 cm^{−1}) and conjugated aldehyde carbonyl (1698 cm^{−1}) groups. The ¹H and ¹³C NMR spectra (Table 1) displayed characteristic signals for a decalin skeleton with a C3–C4 double bond, a hydroxyl group at C-6 (δ 73.6) and a methyl group attached at C-2 (δ 35.1). The ¹H–¹H COSY correlations supported the presence of the decalin moiety. The following HMBC correlations (Table 2), H₃-16 (δ 0.98, d,

* Corresponding author. Tel.: +66 74 288 435; fax: +66 74 212 918.

E-mail address: vatcharin@psu.ac.th (V. Rukachaisirikul).

Table 1
¹H and ¹³C NMR data of **1–3**.

Position	1		2		3	
	δ_{H} , mult. (J in Hz)	δ_{C} , mult.	δ_{H} , mult. (J in Hz)	δ_{C} , mult.	δ_{H} , mult. (J in Hz)	δ_{C} , mult.
1	2.33, m	49.0, CH	2.24, dd (12.0, 9.9)	48.5, CH	2.29, m	46.8, CH
2	2.65, m	35.1, CH	2.63, m	34.6, CH	2.59, m	34.7, CH
3	5.63, d (9.9)	132.1, CH	5.62, d (10.2)	132.5, CH	5.49, dt (10.0, 1.5)	131.0, CH
4	6.06, ddd (9.9, 5.1, 2.4)	128.5, CH	6.04, ddd (10.2, 4.8, 2.4)	128.3, CH	5.64, m	131.2, CH
5	2.06, m	44.1, CH	2.02, m	44.2, CH	2.59, m	30.4, CH
6	3.50, td (10.2, 4.5)	73.6, CH	3.46, m	73.8, CH	a: 1.81, dm (14.0) b: 1.36, td (14.0, 2.5)	36.1, CH ₂
7	a: 2.00, m b: 1.28, m	35.4, CH ₂	a: 1.96, m b: 1.30, m	35.4, CH ₂	4.10, m	65.6, CH
8	1.40, m	27.9, CH ₂	1.46, m	27.9, CH ₂	1.55, m	27.7, CH ₂
9	a: 1.63, m b: 1.40, m	20.1, CH ₂	a: 1.46, m b: 1.32, m	20.1, CH ₂	a: 1.93, tm (13.0) b: 1.28, m	21.5, CH ₂
10	2.37, m	36.8, CH	2.41, m	36.3, CH	2.29, m	35.3, CH
11		175.5, qC		175.0, qC		175.0, qC
12	6.14, s	95.9, CH	5.97, s	96.1, CH	5.98, s	95.6, CH
13		173.5, qC		171.5, qC		172.5, qC
14		102.0, qC		94.9, qC		94.9, qC
15		162.2, qC		160.5, qC		160.6, qC
16	0.98, d (7.2)	20.2, CH ₃	0.98, d (6.9)	20.2, CH ₃	0.97, d (7.0)	20.3, CH ₃
17	10.15, s	186.6, CH	9.98, s	191.3, CH	10.00, s	191.4, CH
18	4.08, s	57.8, CH ₃	3.54, q (5.4)	44.9, CH ₂	3.52, q (5.5)	44.8, CH ₂
18-NH			10.85, brs		10.87, brt (1.5)	
19			3.89, t (5.4)	61.1, CH ₂	3.90, t (5.5)	61.2, CH ₂

Table 2
Selected HMBC correlations of **1–3**.

Position	1	2	3
H-1	C-5, C-11, C-12, C-16	C-2, C-5, C-10, C-11, C-12, C-16	C-10, C-11, C-16
H-2	C-3, C-16		C-1
H-3	C-1, C-2, C-5, C-16	C-1, C-2, C-5, C-16	C-1, C-2, C-5, C-16
H-4	C-2, C-5, C-10	C-2, C-5, C-10	C-3
H-5	C-1, C-3, C-4, C-6, C-10	C-1, C-3, C-4, C-6, C-10	C-1
H-6	C-4, C-8		C-5
H-7	C-5, C-6, C-8, C-9	C-6, C-8, C-9	
H-8	C-6, C-10	C-7, C-9	
H-9	C-5, C-8, C-10	C-7, C-8	C-1
H-10	C-2, C-5, C-8	C-1, C-5	C-1
H-12	C-1, C-11, C-13, C-14, C-17	C-1, C-11, C-13, C-14, C-17	C-1, C-13, C-14
H-16	C-1, C-2, C-3	C-1, C-2, C-3	C-1, C-2, C-3
H-17	C-13, C-14, C-15	C-12, C-14, C-15	C-13, C-14, C-15
H-18	C-13	C-13, C-19	C-19
H-19		C-18	C-18

$J = 7.2$ Hz)/C-1 (δ 49.0), C-2 and C-3 (δ 132.1); H-6 (δ 3.50, td, $J = 10.2$ and 4.5 Hz)/C-4 (δ 128.5), supported the assigned location of the double bond, hydroxyl and methyl groups. In addition, the ¹H and ¹³C NMR spectra of **1** established the presence of a pyrone ring with methoxyl and the formyl groups at C-13 (δ 173.5) and C-14 (δ 102.0), respectively. The presence of this unit was confirmed by the chemical shifts and following HMBC correlations: H-12 (δ 6.14, s)/C-11 (δ 175.5), C-13 and C-14; H-17 (δ 10.15, s)/C-13, C-14 and C-15 (δ 162.2); H₃-18 (δ 4.08, s)/C-13. The linkage between C-1 of the decalin unit and C-11 of the pyrone ring was established according to the HMBC correlations of H-1 (δ 2.33, m) of the decalin unit with C-11 and C-12 (δ 95.9) of the pyrone ring. Consequently, nigrosporapyrone A had the structure **1** (Fig. 1) that differed from **5** in the presence of a hydroxyl group attached at C-6. The relative configuration was established by the following NOEDIFF results (Fig. 2). Irradiation of H-2 (δ 2.65, m) affected H-10 (δ 2.37, m) and H-12, indicating their location at the same side of the molecule and pseudoaxial orientations for H-2 and H-10. When H-5 was irradiated, the signal intensity of H-10 was enhanced, thus suggesting a *cis* ring fusion of the decalin moiety. The large coupling constant (10.2 Hz) observed between H-5 and

H-6 established axial orientations for both protons. These data permitted assignment of the relative configuration for **1** at all chiral centers except for C-6 identical to that of **5**.

Nigrosporapyrone B (**2**) with the molecular formula C₁₉H₂₅NO₅ from HREIMS was obtained as a colorless gum. The UV and IR spectra were almost identical to those of **1**. Its ¹H NMR spectrum (Table 1) was similar to that of **1** except for the replacement of the methoxyl group in **1** with signals for an aminohydroxyethyl moiety [δ 10.85 (br s, 18-NH), 3.89 (t, $J = 5.4$ Hz, H₂-19) and 3.54 (q, $J = 5.4$ Hz, H₂-18)]. The attachment of this unit at C-13 (δ 171.5) was confirmed by a HMBC correlation of H₂-18 with C-13 (Table 2). Consequently, nigrosporapyrone B (**2**) was identified as an aminoalcohol derivative of **1**.

Nigrosporapyrone C (**3**) was obtained as a colorless gum with the molecular formula identical to that of **2**. Its UV, IR and ¹H NMR spectra were almost identical to those of **2**. Furthermore, compounds **2** and **3** consisted of the same number and types of carbons. The differences were found in the ¹H–¹H COSY spectrum. A hydroxymethine proton (δ 4.10, m, H-7) was correlated with H₂-6 [δ 1.81 (dm, $J = 14.0$ Hz, H_a-6) and 1.36 (td, $J = 14.0$ and 2.5 Hz, H_b-6)] and H₂-8 (δ 1.55, m), but not with H-5 as found in **2**. These

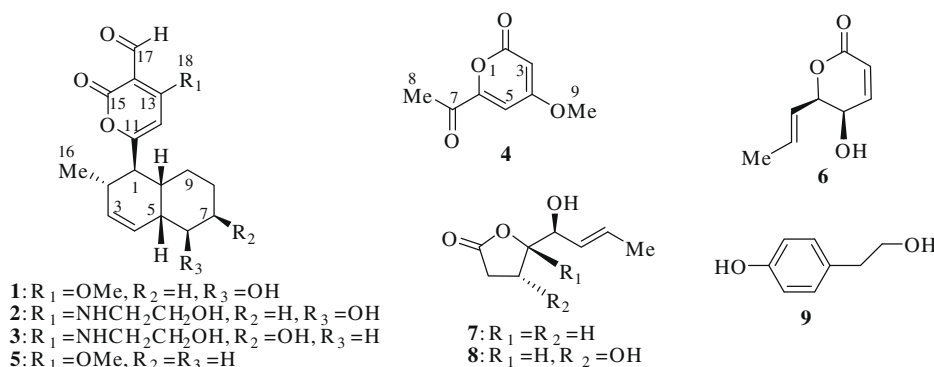


Fig. 1. Structures of compounds 1–9.

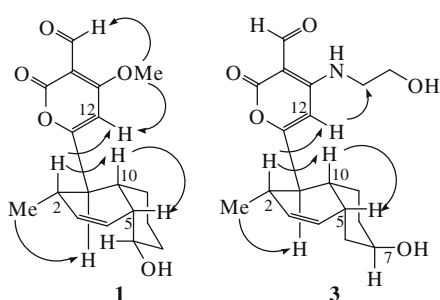


Fig. 2. Selected NOEDIFF results of compounds 1 and 3.

data established the attachment of the hydroxymethine proton at C-7 (δ 65.6), not at C-6. Irradiation of H-5 (δ 2.59, m) affected signal intensity of H-10 (δ 2.29, m), but not H-7, in the NOEDIFF experiment (Fig. 2), established a *cis* ring fusion of the decalin skeleton and the presence of 7-OH at an axial orientation. The appearance of H-5 at much lower field and that of C-5 at much higher field than those observed in compounds 1 and 2 due to Van der Waals repulsion (a 1,3-diaxial interaction) supported the assigned location of 7-OH. Thus, nigrosporapyrone C (3) differed from 2 in the location of the hydroxyl group in the decalin skeleton.

Nigrosporapyrone D (4) with the molecular formula $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$ from HREIMS was obtained as a colorless gum. Its UV spectrum with maximum absorption bands at λ_{max} 229, 254 and 304 nm indicated that 4 had a conjugated pyrone chromophore (Lee et al., 1995). The IR spectrum showed absorption bands for a conjugated ester carbonyl (1706 cm^{-1}) and a conjugated ketone carbonyl (1698 cm^{-1}) groups. Its ^1H NMR spectrum was similar to that of pestalopyrone (Lee et al., 1995) except that signals for a 1-methyl-1-propenyl unit of pestalopyrone were replaced with a methyl signal of an acetyl group (δ 2.53, s, H_3 -8). The presence of the acetyl substituent was supported by signals of ketone carbonyl and methyl carbons at δ 192.0 and 26.1, respectively, in the ^{13}C NMR spectrum. The attachment of this unit at C-6 (δ 154.5) was confirmed by a HMBC correlation of H_3 -8 with C-6. Consequently, nigrosporapyrone D (4) was assigned as a new pyrone derivative.

All isolated compounds, except for compounds 2, 3 and 9 which were not obtained in sufficient amount, were tested for antibacterial activity against SA and MRSA. Among them, 1 exhibited the best activity with a MIC value of $128\text{ }\mu\text{g/mL}$, while the others were inactive with MIC values of $>128\text{ }\mu\text{g/mL}$ against both strains. This is the second report on the antibacterial activity against SA of solanapyrone analogues as solanapyrones J and K isolated from an unidentified fungus have recently been found to show this activity (Schmidt et al., 2007).

3. Concluding remarks

Analogues of the solanapyrones have been previously isolated from the fungus *Alternaria solani* (Ichihara et al., 1983 and Oikawa et al., 1998), *Ascochyta rabiei* (Alam et al., 1989) and two unidentified fungi (Jenkins et al., 1998 and Schmidt et al., 2007). Thus, this is the first report on the isolation of solanapyrone derivatives from the fungus *Nigrospora* sp. Biosynthetic investigations previously established that the carbon skeleton was constructed via a polyketide pathway (Oikawa et al. 1989). In addition, the formation of the decalin skeleton involved an intramolecular Diels-Alder reaction of a polyketide-derived pyrone (Oikawa et al., 1994 and 1995). The replacement of the methoxyl group with the 2-aminohydroxyethyl group would then occur at the later stage (Oikawa et al., 1998).

4. Experimental

4.1. General

Optical rotations were measured on a JASCO P-1020 polarimeter. Infrared spectra (IR) were recorded on a Perkin-Elmer 783 FTS 165 FT-IR spectrometer. Ultraviolet (UV) absorption spectra were measured in MeOH on a Shimadzu UV-160A spectrophotometer. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded in CDCl_3 on a 300 MHz Bruker FTNMR Ultra Shield spectrometer. Mass spectra were obtained on a MAT 95 XL mass spectrometer (ThermoFinnigan). Thin-layer chromatography (TLC) and precoated TLC (PTLC) were performed on silica gel GF₂₅₆ (Merck). Column chromatography (CC) was carried out on silica gel (Merck) type 100 (70–230 Mesh ASTM) with a gradient system of EtOAc-light petroleum, on Sephadex LH-20 with MeOH or on reversed phase silica gel C-18 with a gradient system of MeOH- H_2O .

4.2. Fungal material

The marine-derived fungus PSU-F18 was isolated from sea fan (*Annella* sp.) collected near Similan Islands, Thailand, in 2006. This fungus was deposited as *Nigrospora* sp. PSU-F18 (GenBank accession numbers EU852533 and EU714386) at the Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University and the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) Culture Collection, Thailand (BCC number 28630).

4.3. Fermentation and isolation

The marine-derived fungus *Nigrospora* sp. PSU-F18 was grown on potato dextrose agar at $25\text{ }^\circ\text{C}$ for 5 days. Three pieces ($0.5 \times 0.5\text{ cm}^2$) of mycelial agar plugs were inoculated into 500 mL Erlenmeyer flasks containing 300 mL of potato dextrose

broth at room temperature for 4 weeks. The culture (15 L) was filtered to give the filtrate and mycelia. The filtrate (5×3 L) was extracted three times with EtOAc (3×1 L) to afford a broth extract (4.4 g) as a brown gum after evaporation to dryness under reduced pressure. The crude extract was fractionated by CC over Sephadex LH-20 to give three fractions (A–C). Fraction B (4.0 g) was purified by silica gel CC to give eight fractions (B1–B8). Fraction B2 (13.0 mg) contained **4** (2.5 mg). Fraction B4 (420.9 mg) was separated by CC over silica gel to afford four fractions. The second and third fractions contained **5** (10.7 mg) and **7** (240.9 mg), respectively. Fraction B5 (32.0 mg) was further separated by CC over Sephadex LH-20 to give **1** (8.0 mg) and **6** (8.3 mg). Fraction B6 (53.4 mg) was subjected to CC over reversed phase silica gel to yield three fractions. The second fraction (35.2 mg) upon purification on CC over reversed phase silica gel gave **2** (1.8 mg), **8** (2.8 mg) and **9** (1.3 mg). Fraction B7 (43.0 mg) was purified by CC over reverse phase silica gel to give **3** (1.8 mg).

4.4. Nigrosporapyrone A (**1**)

Colorless gum; $[\alpha]_D^{29} -254$ (c 0.10, CHCl_3); UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 228 (3.75), 273 (3.84), 320 (2.65); FT-IR $\nu_{\text{max}}^{\text{neat}}$ cm^{-1} : 3390, 1719, 1698; For ^1H NMR and ^{13}C NMR (CDCl_3) spectra, see Table 1; EIMS m/z (% relative intensity): 318 (9), 290 (100), 153 (97), 71 (62); HREIMS m/z 318.1463 $[\text{M}]^+$ (calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_5$ 318.1467).

4.5. Nigrosporapyrone B (**2**)

Colorless gum; $[\alpha]_D^{29} -232$ (c 0.10, CHCl_3); UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 237 (4.43), 280 (4.10), 316 (4.02); FT-IR $\nu_{\text{max}}^{\text{neat}}$ cm^{-1} : 3390, 1719, 1692; For ^1H NMR and ^{13}C NMR (CDCl_3) spectra, see Table 1; EIMS m/z (% relative intensity): 347 (59), 257 (37), 110 (100), 105 (11); HREIMS m/z 347.1731 $[\text{M}]^+$ (calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{NO}_5$, 347.1733).

4.6. Nigrosporapyrone C (**3**)

Colorless gum; $[\alpha]_D^{29} -202$ (c 0.10, CHCl_3); UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 235 (3.85), 281 (3.41), 314 (3.42); FT-IR $\nu_{\text{max}}^{\text{neat}}$ cm^{-1} : 3395, 1706, 1689; For ^1H NMR and ^{13}C NMR (CDCl_3) spectra, see Table 1; EIMS m/z (% relative intensity): 347 (24), 257 (35), 110 (100), 105 (31); HREIMS m/z 347.1735 $[\text{M}]^+$ (calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{NO}_5$, 347.1733).

4.7. Nigrosporapyrone D (**4**)

Colorless gum; UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 229 (3.19), 254 (2.32), 304 (2.63); FT-IR $\nu_{\text{max}}^{\text{neat}}$ cm^{-1} : 1706, 1698; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz); δ 6.67 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-5), 5.72 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-3), 3.87 (3H, s, H-9), 2.53 (3H, s, H-8), ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz); δ 192.0 (C, C-7), 169.8 (C, C-4), 161.5 (C, C-2), 154.5 (C, C-6), 103.9 (CH, C-5), 93.2 (CH, C-2), 56.0 (CH_3 , C-9), 26.1 (CH_3 , C-8); EIMS m/z (% relative intensity): 168 (77), 125 (100), 69 (90); HREIMS m/z 168.0421 $[\text{M}]^+$ (calcd for $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$, 168.0423).

4.8. Antibacterial activity testing

MICs were determined by the agar microdilution method (Lorian, 1996). The test substances were dissolved in DMSO (Merck,

Germany). Serial 2-fold dilutions of the test substances were mixed with melted Mueller-Hinton agar (Difco) in the ratio of 1:100 in microtiter plates with flat-bottomed wells (Nunc, Germany). Final concentration of the test substances in agar ranged from 0.03 to 128 $\mu\text{g/mL}$. SA and MRSA were used as test strain. Inoculum suspensions (10 μL) were spotted on agar-filled wells. The inoculated plates were incubated at 35 $^\circ\text{C}$ for 18 h. MICs were recorded by reading the lowest substance concentration that inhibited visible growth. Vancomycin, a positive control drug, exhibited a MIC value of 1 $\mu\text{g/mL}$. Growth controls were performed on the agar containing DMSO.

Acknowledgments

V. Rukachaisirikul thanks the Commission on Higher Education and the Thailand Research Fund for the TRF Senior Research Scholar (Grant No. RTA5180007). The Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC) and Prince of Songkla University, are gratefully acknowledged for partial support. Finally, K. Trisuwan thanks the Royal Golden Jubilee Ph. D. Program (Grant No. PHD/0109/2550) of the Thailand Research Fund for a scholarship.

References

- Alam, S.S., Bilton, J.N., Slawin, A.M.Z., Williams, D.J., Sheppard, R.N., Strange, R.N., 1989. Chickpea blight: production of the phytotoxins solanapyrones A and C by *Ascochyta rabiei*. *Phytochemistry* 28, 2627–2630.
- Cutler, H.G., Hoogsteen, K., Littrell, R.H., Arison, B.H., 1991. Epoxyxerohilone, a novel metabolite from *Nigrospora sphaerica*. *Agric. Biol. Chem.* 55, 2037–2042.
- Fukushima, T., Tanaka, M., Gohbara, M., Fujimori, T., 1998. Phytotoxicity of three lactones from *Nigrospora sacchari*. *Phytochemistry* 48, 625–630.
- Furuya, K., Enokita, R., Shirasaka, M., 1967. Antibiotics from fungi. II: new griseofulvin producer, *Nigrospora oryzae*. *Ann. Sankyo Res. Lab.* 19, 91–95.
- Grabley, S., Thiericke, R., Wink, J., Helsberg, M., Schmidt, K., Burkhardt, K., Zeeck, A., Schneider, A., Fiedler, H.-P., 1994. DE Patent 43 03 684 A1.
- Ichihara, A., Tazaki, H., Sakamura, S., 1983. Solanapyrones A, B and C, phytotoxic metabolites from the fungus *Alternaria solani*. *Tetrahedron Lett.* 24, 5373–5376.
- Jenkins, K.M., Toske, S.G., Jensen, P.R., Fenical, W., 1998. Solanapyrones E–G, antialgal metabolites produced by a marine fungus. *Phytochemistry* 49, 2299–2304.
- Lee, J.C., Yang, X., Schwartz, M., Strobel, G., Clardy, J., 1995. The relationship between an endangered North American tree and an endophytic fungus. *Chem. Biol.* 2, 721–727.
- Lorian, V., 1996. *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 4th ed. William and Wilkins, Baltimore, pp. 28–32.
- Oikawa, H., Yokota, T., Abe, T., Ichihara, A., Sakamura, S., Yoshizawa, Y., Vederas, J.C., 1989. Biosynthesis of solanapyrone A, a phytotoxin of *Alternaria solani*. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1282–1284.
- Oikawa, H., Suzuki, Y., Naya, A., Katayama, K., Ichihara, A., 1994. First direct evidence in biological Diels–Alder reaction of incorporation of diene–dienophile precursors in biosynthesis of solanapyrones. *J. Am. Chem. Soc.* 116, 3605–3606.
- Oikawa, H., Katayama, K., Suzuki, Y., Ichihara, A., 1995. Enzymatic activity catalyzing *exo*-selective Diels–Alder reaction in solanapyrone biosynthesis. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1321–1322.
- Oikawa, H., Yokota, T., Sakano, C., Suzuki, Y., Naya, A., Ichihara, A., 1998. Solanapyrones, phytotoxins produced by *Alternaria solani*: biosynthesis and isolation of minor components. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 2016–2022.
- Rasser, F., Anke, T., Sterner, O., 2000. Secondary metabolites from a *Gloeophyllum* sp. *Phytochemistry* 54, 511–516.
- Schmidt, L.E., Gloer, J.B., Wicklow, D.T., 2007. Solanapyrone analogues from a Hawaiian fungicolous fungus. *J. Nat. Prod.* 70, 1317–1320.
- Tanaka, M., Fukushima, T., Tsujino, Y., Fujimori, T., 1997. Nigrosporins A and B, new phytotoxic and antibacterial metabolites produced by a fungus *Nigrospora oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61, 1848–1852.
- Trisuwan, K., Rukachaisirikul, V., Sukpondma, Y., Preedanon, S., Phongpaichit, S., Rungjindamai, N., Sakayaroj, J., 2008. Epoxydones and a pyrone from the marine-derived fungus *Nigrospora* sp. PSU-F5. *J. Nat. Prod.* 71, 1323–1326.
- Yang, Z.-C., Jiang, X.-B., Wang, Z.-M., Zhou, W.-S., 1997. Total synthesis of (+)-asperlin, (+)-acetylphomalactone and (5S,6S,7R,8S)-asperlin based on the kinetic resolution of 2-furylmethanols. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 317–321.



Furo[3,2-*h*]isochroman, furo[3,2-*h*]isoquinoline, isochroman, phenol, pyranone, and pyrone derivatives from the sea fan-derived fungus *Penicillium* sp. PSU-F40

Kongkiat Trisuwan^a, Vatcharin Rukachaisirikul^{a,*}, Yaowapa Sukpondma^a, Souwalak Phongpaichit^b, Sita Preedanon^c, Jariya Sakayaroj^c

^a Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

^b Natural Products Research Center and Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

^c National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Thailand Science Park, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 January 2010

Received in revised form 30 March 2010

Accepted 19 April 2010

Available online 24 April 2010

Keywords:

Sea fan-derived fungus

Penicillium sp.

Furo[3,2-*h*]isochroman

Furo[3,2-*h*]isoquinoline

ABSTRACT

Nine new fungal metabolites, penicisochromans A–E, penicipyrone, penicipyranone, peniciphenol, and penicisoquinoline, were isolated from the sea fan-derived fungus *Penicillium* sp. PSU-F40 together with five known compounds. Their structures were determined by spectroscopic analysis. Their antibacterial activity against the standard *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and methicillin-resistant *S. aureus* was evaluated.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

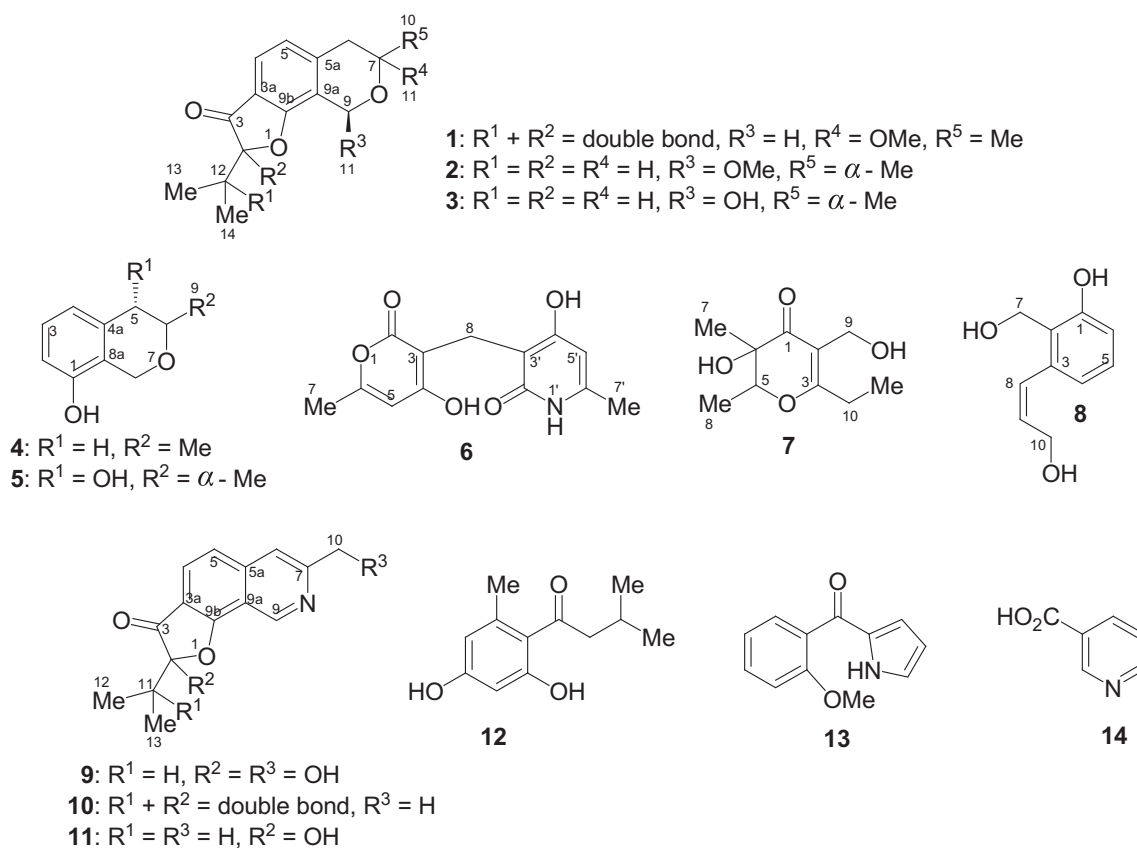
The fungi in the genus *Penicillium* have produced various bioactive compounds, such as cytotoxic leptosphaerone,¹ antioxidant terrestrols,² antifungal citrinin,³ antibacterial rugulotrosins,⁴ and insecticidal decaturin.⁵ In our ongoing search for antibacterial metabolites against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (SA) and a clinical isolate of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) from the marine-derived fungi, the fungus *Penicillium* PSU-F40 was isolated from a gorgonian sea fan of the genus *Annella*. Investigation of its culture broth led to the isolation of three new furo[3,2-*h*]isochromans, penicisochromans A–C (**1**–**3**), two isochromans, penicisochromans D and E (**4** and **5**), one new pyrone, penicipyrone (**6**), one new pyranone, penicipyranone (**7**), one new phenol, peniciphenol (**8**), and one new furo[3,2-*h*]isoquinoline, penicisoquinoline (**9**), along with two known furo[3,2-*h*]isoquinolines, TMC-120B (**10**)⁶ and TMC-120C (**11**)⁶ and one known ketophenol, 1-(2,4-dihydroxy-6-methylphenyl)-3-methyl-1-butanone (**12**).⁷ Furthermore, two known metabolites, 2-(2-methoxybenzoyl)pyrrole (**13**)⁸ and nicotinic acid (**14**)⁹ were isolated from the mycelia extract. Their antibacterial activity against SA and MRSA were examined.

2. Results and discussion

All compounds (**1**–**14**) (Fig. 1) were purified using chromatographic techniques and their structures were elucidated by spectroscopic data (IR, UV, NMR, and MS). For known compounds, the structures were confirmed by comparison of the ¹H and ¹³C NMR data with those previously reported. The relative configuration was assigned on the basis of NOEDIFF data. No attempts were made to identify the absolute configuration of the new metabolites due to the minute amounts.

Penicisochroman A (**1**) was obtained as a colorless gum. The molecular formula C₁₆H₁₈O₄ was assigned by HREIMS of M⁺–CH₃OH and the presence of 16 carbon resonances for 16 carbons in the ¹³C NMR spectrum. The UV spectrum displayed absorption bands for an aromatic chromophore at λ_{max} 213, 253, 269, and 324 nm. The IR spectrum showed absorption bands for conjugated ketone carbonyl and double bond functional groups at 1695 and 1647 cm^{–1}, respectively. The ¹H NMR spectrum (Table 1) consisted of signals for two *ortho*-coupled aromatic protons [δ 7.46 (1H, d, *J*=7.8 Hz) and 6.77 (1H, d, *J*=7.8 Hz)], two sets of nonequivalent methylene protons [δ 4.86/4.66 (each 1H, d, *J*=16.2 Hz) and 2.94/2.85 (each 1H, d, *J*=16.2 Hz)], one methoxyl group (δ 3.27, 3H, s) and three methyl groups [δ 2.29 (3H, s), 2.02 (3H, s), and 1.46 (3H, s)]. The ¹³C NMR and DEPT 135 spectra (Table 1) showed one conjugated ketone carbonyl (δ 183.4), six aromatic quaternary (δ 160.4, 145.3, 140.7, 131.5, 121.2, and 118.3), two aromatic methine (δ

* Corresponding author. Tel.: +66 74 288 435; fax: +66 74 212 918; e-mail address: vatcharin.r@psu.ac.th (V. Rukachaisirikul).

Figure 1. Metabolites isolated from the sea fan-derived fungus *Penicillium* PSU-F40.

123.0 and 121.9), one dioxygenated quaternary (δ 97.4), two methylene (δ 57.8 and 39.3), one methoxy (δ 49.0), and three methyl (δ 23.0, 20.2, and 17.4) carbons. The HMBC correlations of the methyl protons, H₃-13 (δ 2.29) and H₃-14 (δ 2.02), with C-2 (δ 145.3), C-3 (δ 183.4), and C-12 (δ 131.5) as well as the chemical shifts of these carbons established a 2-oxy-3-methyl-2-butenoyl moiety. One of the *ortho*-coupled aromatic protons resonating at δ 7.46 was assigned as H-4 on the basis of its 3J HMBC correlation with C-3 of the butenoyl unit. This conclusion was supported by its downfield appearance due to an anisotropic effect of the adjacent ketone carbonyl group. The other *ortho*-coupled proton (δ 6.77) was then

attributed to H-5. The nonequivalent methylene protons, H_{ab}-6 (δ 2.94 and 2.85), gave HMBC cross peaks with C-5 (δ 123.0), C-5a (δ 140.7), C-7 (δ 97.4), and C-9a (δ 118.3) while the methoxy (δ 3.27) and the methyl (δ 1.46) protons showed cross peaks with the dioxygenated carbon, C-7. These results attached a 2-methoxy-2-oxypropyl unit at C-5a of the aromatic ring. In addition, the oxymethylene protons, H_{ab}-9 (δ 4.86 and 4.66), displayed the same correlations with C-5a, C-9a, and C-9b (δ 160.4), thus linking the oxymethylene unit at C-9a. An isochroman unit having the methoxyl and methyl groups at C-7 was established on the basis of the 3J HMBC correlations of H_{ab}-9 with C-7. An ether linkage

Table 1

^1H and ^{13}C NMR data of penicisochromans A (1), B (2), and C (3)

Position	1	2	3
	δ_{H} , mult, J in Hz	δ_{H} , mult, J in Hz	δ_{H} , mult, J in Hz
	δ_{C} , mult.	δ_{C} , mult.	δ_{C} , mult.
2		4.35, d, 4.0	4.46, d, 3.5
3			91.0, CH
3a			202.0, qC
4	7.46, d, 7.8	7.43, d, 8.0	120.1, qC
5	6.77, d, 7.8	6.72, d, 8.0	123.4, CH
5a			122.0, CH
6	a: 2.94, d, 16.2 b: 2.85, d, 16.2	a: 2.68, dd, 17.0, 3.5 b: 2.62, dd, 17.0, 11.0	145.4, qC
7		4.25, m	35.9, CH ₂
9	a: 4.86, d, 16.2 b: 4.66, d, 16.2	5.61, s	a: 2.72, dd, 16.5, 2.5 b: 2.62, dd, 16.5, 10.0
9a			4.40, m
9b			6.18, s
10	1.46, s	1.32, d, 6.5	
11	3.27, s	3.45, s	120.0, qC
12		2.28, m	171.0, qC
13	2.29, s	0.80, d, 7.0	1.33, d, 6.0
14	2.02, s	1.11, d, 7.0	2.29, m

between C-2 and C-9b was formed to construct a 3-oxobenzofuran unit according to the chemical shifts of C-2 and C-9b as well as the mass data. Therefore, the structure of penicisochroman A was established as depicted in **1**.

Penicisochroman B (**2**) was obtained as a colorless gum. The molecular formula $C_{16}H_{20}O_4$ from HREIMS suggested that **2** was a dihydro analogue of **1**. This conclusion was supported by the replacement of signals for two olefinic carbons, C-2 (δ 145.3) and C-12 (δ 131.5), in **1**, with those for two methine carbons (δ 90.2 and 31.1) in **2** (Table 1). The presence of the saturated ketone carbonyl functionality was further confirmed by the appearance of the ketone carbonyl carbon in **2** at δ 202.0, which resonated at much lower field than that observed in **1**. Furthermore, the dioxyquaternary carbon, C-7, and the oxymethylene carbon, C-9, in **1** were replaced by one oxymethine carbon (δ 62.6) and one dioxymethine carbon (δ 94.7) in **2**. These data were in agreement with the 1H NMR data of which signals for the nonequivalent oxymethylene protons (H_{ab} -9) in **1** were replaced by those for one dioxymethine proton (δ 5.61, 1H, s, H-9) and one oxymethine proton (δ 4.25, 1H, m, H-7). In the 1H - 1H COSY spectrum, H-7 showed cross peaks with H_{ab} -6 and the methyl protons, H_3 -10 (δ 1.32, d, $J=6.5$ Hz), indicating the presence of a $[-CH_2CH(O-CH_3)]$ unit. The methoxy protons, H_3 -11 (δ 3.45), gave a 3J HMBC cross peak with C-9 (δ 94.7) while H-9 (δ 5.61) displayed the same correlation with C-7 (δ 62.6). Consequently, an isochroman moiety having the methyl and the methoxyl groups at C-7 and C-9, respectively, was established. As H_b -6 was coupled with H-7 with a large coupling constant of 11.0 Hz, both of them were located at pseudoaxial position. Irradiation of H_3 -11 (9-OMe) in the NOEDIFF experiment enhanced signal intensity of H-7, indicating *trans* relationship between pseudoequatorial H_3 -10 (7-Me) and pseudoaxial 9-OMe. However, the NOEDIFF data were inadequate to identify the relative configuration at C-2. Therefore, penicisochroman B had the structure **2**.

Penicisochroman C (**3**) with the molecular formula $C_{15}H_{18}O_4$ from HREIMS was obtained as a colorless gum. Its UV spectrum was similar to that of **2** while the IR spectrum displayed an additional absorption band for a hydroxyl group at 3409 cm^{-1} . The 1H NMR spectrum of **3** (Table 1) was similar to that of **2** except for the absence of the methoxyl signal. These data together with mass information revealed the replacement of the methoxyl group in **2** with a hydroxyl group in **3**. The DEPT spectrum showed one dioxygenated carbon (δ 88.8) and three methyl carbons (δ 21.9, 19.5, and 16.7), supporting the above conclusion. The location of 7-Me was at pseudoequatorial, identical to that in **2**, on the basis of a large coupling constant of 10.0 Hz between H_b -6 and H-7. Furthermore, compounds **2** and **3** gave almost identical optical rotation, indicating they would have the same absolute configuration. These data revealed that 9-OMe in **2** was replaced by a hydroxyl group in **3**. Therefore, penicisochroman C (**3**) was assigned as a 9-hydroxy derivative of **2**.

Penicisochroman D (**4**), a colorless gum, has the molecular formula $C_{10}H_{12}O_2$ established by HREIMS. The UV spectrum exhibited absorption bands at $\lambda_{\max}$ 251, 277, and 284 nm for a benzene chromophore. The IR spectrum showed an absorption band at 3351 cm^{-1} for a hydroxyl group. The 1H NMR (Table 2) and 1H - 1H COSY spectra displayed signals for three aromatic protons of a 1,2,3-trisubstituted benzene [δ 7.11 (1H, t, $J=7.8$ Hz), 6.74 (1H, d, $J=7.8$ Hz), and 6.71 (1H, d, $J=7.8$ Hz)], the 1-substituted 2-oxypropyl unit [δ 3.92 (1H, d br q, $J=10.0$ and 6.0 Hz), 2.75 (1H, dd, $J=12.5$ and 2.4 Hz), 2.74 (1H, dd, $J=12.5$ and 10.0 Hz), and 1.24 (3H, d, $J=6.0$ Hz)] and one set of nonequivalent oxymethylene protons [δ 4.85 and 4.79 (each 1H, d, $J=13.2$ Hz)]. The aromatic protons resonating at δ 6.74, 7.11, and 6.71 were attributed to H-2, H-3, and H-4, respectively. The nonequivalent methylene protons, H_{ab} -5 (δ 2.75 and 2.74), of the oxypropyl unit showed the HMBC correlations with C-4 (δ 122.5), C-4a (δ 137.7), and C-8a (δ 124.9), linking above unit at C-4a of the

Table 2 1H and ^{13}C NMR data of penicisochromans D (**4**) and E (**5**)

Position	4		5	
	δ_H , mult, J in Hz	δ_C , mult.	δ_H , mult, J in Hz	δ_C , mult.
1		156.2, qC		150.4, qC
2	6.74, d, 7.8	115.0, CH	6.60, d, 8.0	114.6, CH
3	7.11, t, 7.8	129.0, CH	7.07, t, 8.0	129.3, CH
4	6.71, d, 7.8	122.5, CH	6.73, d, 8.0	114.0, CH
4a		137.7, qC		140.9, qC
5	a: 2.75, dd, 12.5, 2.4 b: 2.74, dd, 12.5, 10.0	41.8, CH ₂	4.95, d, 2.0	88.5, CH
6	3.92, d br q, 10.0, 6.0	69.1, CH	3.85, qd, 6.5, 2.0	70.0, CH
8	a: 4.85, d, 13.2 b: 4.79, d, 13.2	58.5, CH ₂	a: 5.06, d, 12.0 b: 5.01, d, 12.0	71.1, CH ₂
8a		124.9, qC		126.1, qC
9	1.24, d, 6.0	23.4, CH ₃	1.26, d, 6.5	18.6, CH ₃

aromatic ring. Irradiation of H_{ab} -5 enhanced signal intensity of H-4, supporting the assignment. The remaining oxymethylene group was attached at C-8a as H_{ab} -8 (δ 4.85 and 4.79) were correlated with C-1 (δ 156.2), C-4a, and C-8a in the HMBC spectrum. These results together with the HMBC correlations of H_{ab} -8 with C-6 (δ 69.1) established an isochroman skeleton. The substituent at C-1 was a hydroxyl group due to the chemical shift of C-1. Therefore, penicisochroman D was determined as **4**. It is worth to note that the oxymethine proton, H-6 (δ 3.92, d br q, $J=10.0$ and 6.0 Hz), was located at pseudoaxial position due to a coupling constant of 10.0 Hz between H_b -5 and H-6.

Penicisochroman E (**5**) was isolated as a colorless gum whose molecular formula was determined by HREIMS as $C_{10}H_{12}O_3$, with 16 mass unit higher than **4**. Its UV and IR spectra were almost identical to those of **4**. Its 1H NMR spectrum (Table 2) was similar to that of **4** except for the replacement of signals for H_{ab} -5 in **4** with signal of a hydroxymethine proton (δ 4.95, 1H, d, $J=2.0$ Hz) in **5**. This was consistent with the molecular formula and the presence of two oxymethine carbons (δ 88.5 and 70.0) in the ^{13}C NMR and DEPT spectra. These data implied that **5** was a 5-hydroxy derivative of **4**. A small coupling constant between H-5 and H-6 in **5** indicated the replacement of H_b -5 in **4** with a hydroxyl group in **5**. Therefore, penicisochroman E (**5**) was determined as a 5-hydroxy derivative of **4**.

The molecular formula of penicypyrone (**6**) was established by analysis of its HREIMS as $C_{13}H_{13}NO_5$. The UV spectrum displayed characteristic absorption bands for a pyrone chromophore¹⁰ at $\lambda_{\max}$ 224, 247, and 361 nm. The IR spectrum showed absorption bands at 3399 and 1683 cm^{-1} for hydroxyl and conjugated carbonyl groups, respectively. The 1H NMR spectrum showed two olefinic protons of trisubstituted double bonds [δ 6.02 and 5.94 (each 1H, s)], one set of nonequivalent methylene protons [δ 3.64 and 3.54 (each 1H, d, $J=9.6$ Hz)], and two methyl groups [δ 2.30 (3H, s) and 2.22 (3H, s)]. The ^{13}C NMR and DEPT spectra exhibited one pyridinone carbonyl (δ 169.9),¹¹ one pyrone carbonyl (δ 166.5),¹⁰ six quaternary (δ 169.1, 166.9, 160.7, 143.1, 108.2, and 102.4), two methine (δ 103.1 and 102.8), one methylene (δ 18.3), and two methyl (δ 19.7 and 19.0) carbons. The olefinic proton at δ 5.94 was attributed to H-5 of the pyrone moiety on the basis of its chemical shift as well as its HMBC cross peaks with C-3 (δ 102.4), C-4 (δ 169.1), and C-6 (δ 160.7). The methyl protons, H_3 -7 (δ 2.22), gave the same correlations with C-5 (δ 102.8) and C-6. In addition, the methylene protons, H_{ab} -8 (δ 3.64 and 3.54), gave the HMBC cross peaks with C-2 (δ 166.5) and C-3. These results together with the chemical shift of C-4 indicated the attachment of the methylene group, a hydroxyl group and the methyl group at C-3, C-4, and C-6 of the pyrone ring, respectively. The chemical shifts of the remaining carbons indicated the presence of a pyridinone unit.¹¹ The olefinic proton at δ 6.02 was assigned as H-5' due to its HMBC correlations with C-3' (δ 108.2),

C-4' (δ 166.9), and C-6' (δ 143.1). The methyl protons, H₃-7' (δ 2.30), gave the HMBC correlations with C-5' and C-6'. These data revealed that the pyridinone unit carried hydroxyl and methyl groups at C-4' and C-6', respectively. The HMBC correlations from H_{ab}-8 of the pyrone moiety to C-2' and C-3' of the pyridinone established the methylene linkage between C-3 of the pyrone and C-3' of the pyridinone. Consequently, penicypyrone was assigned as **6**. The appearance of the methylene protons (H_{ab}-8) as nonequivalent protons in the ¹H NMR spectrum might be due to the formation of H-bond between either the amino nitrogen or carbonyl oxygen of the pyridinone moiety and the hydroxy hydrogen of the pyrone unit, which would prevent bond rotation.

Penicypyrone (**7**) with the molecular formula C₁₀H₁₆O₄ from HREIMS was obtained as a colorless gum. The UV spectrum showed an absorption band at λ_{max} 269 nm. The IR spectrum displayed absorption bands at 3409 and 1687 cm⁻¹ for hydroxyl and conjugated carbonyl functional groups, respectively. The ¹H NMR and ¹H–¹H COSY spectra revealed the presence of signals for one ethyl group [δ 2.45 (1H, dq, *J*=15.3 and 7.5 Hz), 2.40 (1H, dq, *J*=15.3 and 7.5 Hz) and 1.18 (3H, t, *J*=7.5 Hz)], one 1-oxyethyl group [δ 4.52 (1H, q, *J*=6.6 Hz) and 1.31 (3H, d, *J*=6.6 Hz)], one hydroxymethyl group [δ 4.38 and 4.32 (each 1H, d, *J*=12.6 Hz)], and one methyl group (δ 1.40, 3H, s). The ¹³C NMR and DEPT spectra displayed ten carbon resonances for one ketone carbonyl (δ 196.2), three quaternary (δ 175.6, 110.1, and 71.3), one methine (δ 82.0), two methylene (δ 56.3 and 25.6), and three methyl (δ 24.1, 12.3 and 11.4) carbons. The oxymethine proton of the 1-oxyethyl unit, H-5 (δ 4.52), gave the HMBC correlations with C-1 (δ 196.2), C-3 (δ 175.6), and C-6 (δ 71.3) while H₃-7 (δ 1.40) gave the same correlations with C-1, C-5 (δ 82.0), and C-6. In addition, the hydroxymethyl protons, H_{ab}-9 (δ 4.38 and 4.32), gave the HMBC cross peaks with C-1, C-2 (δ 110.1), and C-3. These results together with the chemical shifts of C-3, C-5, and C-6 established a dihydropyran-4-one unit with two methyl groups at C-5 and C-6, a hydroxyl group at C-6 and the hydroxymethyl substituent at C-2. Consequently, the remaining ethyl group was located at C-3. The HMBC correlations of the methylene protons, H_{ab}-10 (δ 2.45 and 2.40), of the ethyl group with C-2 and C-3 confirmed this assignment. The relative configuration between H-5 and H₃-7 was not assigned as either *cis* or *trans* relationship gave signal enhancement of H-5 upon irradiation of H₃-7. Therefore, penicypyrone (**7**) was determined as a new dihydropyran-4-one derivative.

Penicphenol (**8**) with the molecular formula C₁₀H₁₂O₃ from HREIMS was obtained as a colorless gum. The UV spectrum displayed absorption bands at λ_{max} 250 and 289 nm for a benzene chromophore. The IR spectrum showed absorption bands at 3328 and 1638 cm⁻¹ for hydroxyl and double bond functional groups, respectively. The ¹H NMR and ¹H–¹H COSY spectra showed characteristic signals for three aromatic protons of a 1,2,3-trisubstituted aromatic protons [δ 7.14 (1H, t, *J*=7.8 Hz), 6.81, and 6.59 (each 1H, d, *J*=7.8 Hz)], a (Z)-3-hydroxyl-1-propenyl unit [δ 6.64 (1H, d, *J*=11.4 Hz), 5.97 (1H, dt, *J*=11.4 and 6.9 Hz) and 4.07 (2H, dd, *J*=6.9 and 0.6 Hz)], and one hydroxymethyl group (δ 4.78, 2H, s). The aromatic protons resonating at δ 6.59, 7.14, and 6.81 were assigned as H-4, H-5, and H-6, respectively. The (Z)-3-hydroxyl-1-propenyl unit was located at C-3 (δ 136.3) based on the HMBC correlations of the olefinic proton, H-8 (δ 6.64), with C-3, and C-4 (δ 120.9). The hydroxymethyl protons, H₂-7 (δ 4.78), showed HMBC cross peaks with C-1 (δ 156.3), C-2 (δ 123.6), and C-3, thus connecting the hydroxymethyl group at C-2. The substituent at C-1 of the benzene ring was a hydroxyl group on the basis of its chemical shift. Signal enhancement of H₂-7 and H-4 upon irradiation of H-8 in the NOEDIFF spectrum supported the assigned location of these substituents. Therefore, penicphenol had the structure **8**.

Penicisoquinoline (**9**) with the molecular formula C₁₅H₁₅NO₄ from HREIMS was obtained as a yellow gum. Its UV and IR spectra

were almost identical to those of **11**. The ¹H NMR spectrum was similar to that of **11** except for the replacement of the downfield methyl signal in **11** with the signal of a hydroxymethyl group (δ 4.89, 2H, s). The presence of two methyl (δ 16.0 and 15.5) and one oxymethylene (δ 64.5) carbons in the ¹³C NMR and DEPT spectra supported the ¹H NMR data. The HMBC correlations of the hydroxymethyl protons, H₂-10 (δ 4.89), with C-6 (δ 117.4), and C-7 (δ 159.3) together with signal enhancement of H₂-10 upon irradiation of H-6 (δ 7.79, 1H, s) established the linkage of the hydroxymethyl group at C-7. Consequently, penicisoquinoline (**9**) was identified as a 10-hydroxy derivative of **11**.

The isolated metabolites **1**, **4**, **6**–**12**, and **14** were tested for antibacterial activities against SA and MRSA. None of them were active at the concentration of 200 μ g/mL. The remaining compounds were not evaluated for the antibacterial activity due to sample limitation.

The furo[3,2-*h*]isoquinolines (**10**, **11**) have been isolated from the fungus *Aspergillus ustus* TC 1118⁶ while this is the first report on the isolation of the corresponding isochromans (**1**–**3**). We proposed that all of the isolated isochromans (**1**–**5**) and furo[3,2-*h*]isoquinolines (**9**–**11**) would have a similar biosynthetic pathway. Penicisochromans A–E (**1**–**5**) would be derived from the same biosynthetic precursor, penicphenol (**8**). Acid-catalysed intramolecular cyclization of the (Z)-3-hydroxyl-1-propenyl side chain of **8** would generate an isochroman ring as shown in Scheme 1. Dehydration and subsequent hydrogenation would produce **4** via an isochroman intermediate (**4a**). Penicisochromans B (**2**) and C (**3**) would be transformed from **4** via a 3-oxo-2-isopropylbenzofuran (**4b**) by acylation with a 3-methyl-2-butenoyl unit and subsequent cyclization. Oxidation of the isochroman unit of **4b** would yield compound **3**, which would be further methylated to the corresponding methyl ether **2**. Compound **1** would be obtained from **4a** by hydration and methylation to yield a ketal intermediate (**4c**), which would further undergo acylation, cyclization, and oxidation. Finally, penicisochroman E (**5**) would be derived from **8** via a different biosynthetic route, which would involve epoxidation, cyclization followed by dehydration and subsequent hydrogenation. In addition, the furo[3,2-*h*]isoquinolines (**9**–**11**) would be biosynthesized via the similar pathway as that for the furo[3,2-*h*]isochromans (**1**–**3**) using a 7-amino derivative of **8** as a biosynthetic precursor.

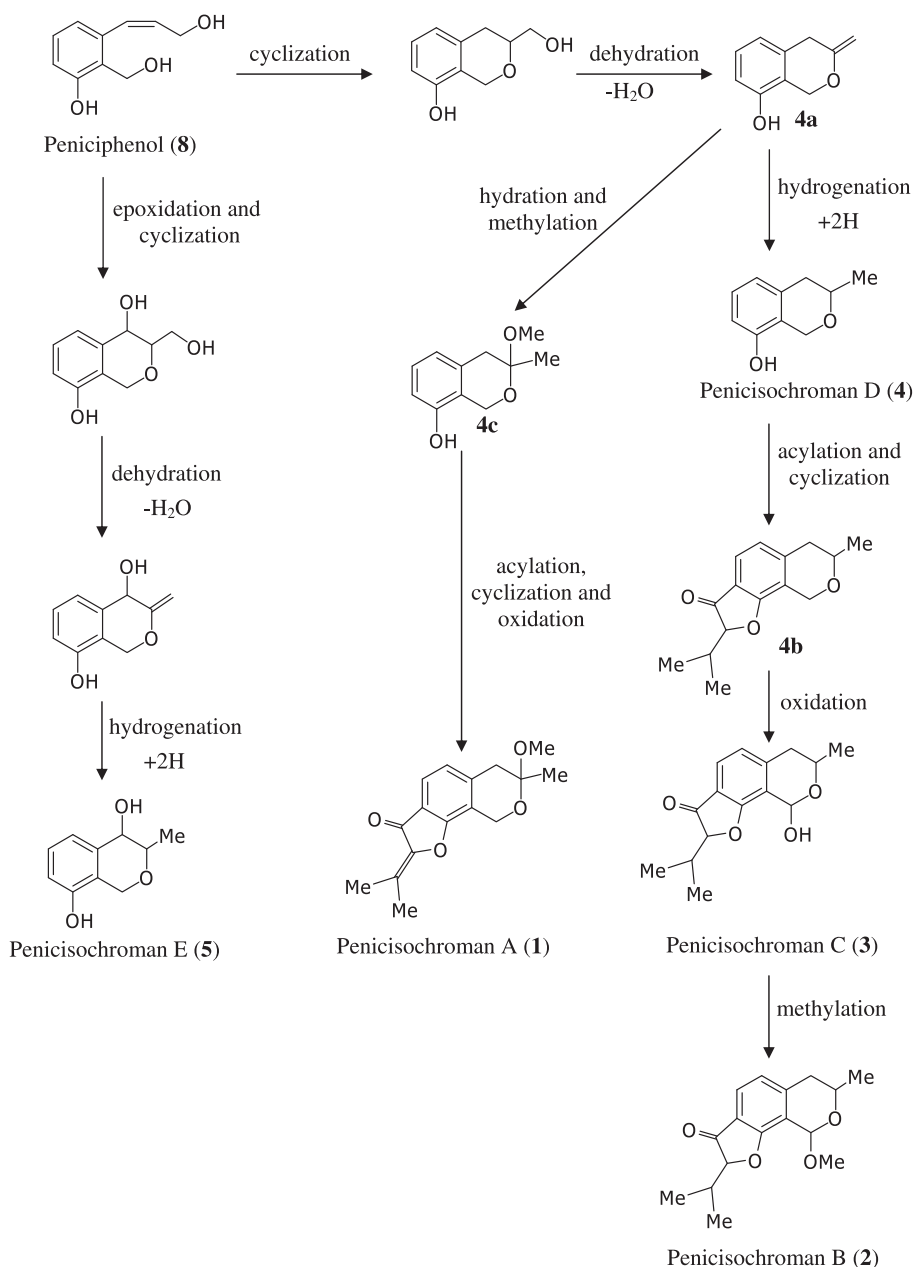
3. Experimental

3.1. General experimental procedures

Infrared spectra (IR) were recorded on a Perkin–Elmer 783 FTS 165 FT-IR spectrometer. Ultraviolet (UV) absorption spectra were measured in MeOH on a Shimadzu UV-160A spectrophotometer. Optical rotations were measured on a JASCO P-1020 polarimeter. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on 300 and 500 MHz Bruker FTNMR Ultra Shield spectrometer. Chemical shifts are expressed in δ (ppm) referring to the TMS peak. Mass spectra were measured on a MAT 95 XL mass spectrometer (ThermoFinnigan). Thin-layer Chromatography (TLC) and precoated TLC (PTLC) were performed on silica gel GF₂₅₆ (Merck). Column chromatography (CC) was carried out on silica gel (Merck) type 100 (70–230 Mesh ASTM) with a gradient system of MeOH–CH₂Cl₂, on Sephadex LH-20 with MeOH or on reverse phase silica gel C-18 with a gradient system of MeOH–H₂O, or otherwise stated.

3.2. Fungal material

The marine-derived fungus *Penicillium* sp. PSU-F40 was isolated from the sea fan, collected near the Similan Islands, Phangnga Province, Thailand, in 2006. The sea fan was identified as *Annella* sp.



Scheme 1. Possible biosynthetic pathway of compounds **1**–**5** from compound **8**.

by C. Benzie and S. Plathong from the Coral Reef and Benthos Research Unit, Center for Biodiversity of Peninsular Thailand (CBIPT), Department of Biology, Prince of Songkla University, Thailand. The sample (voucher no. sea fan-Similan 1.4) was deposited at CBIPT while the fungus was deposited as PSU-F40 at the Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University.

3.3. Fermentation, extraction, and isolation

The crude EtOAc extracts from the culture broth and mycelia were prepared using the same procedure as described earlier.¹⁰ The crude extract from the broth (1.3 g, a dark brown gum) was fractionated by CC over Sephadex-LH 20 to give five fractions (A–E). Fraction B (325 mg) was purified by silica gel CC to afford three fractions (B1–B3). Fraction B3 (59.2 mg) was then separated by CC

over reverse phase silica gel to afford four fractions. The second fraction (7.5 mg) contained **7** (2.3 mg) after separation by PTLC with 20% EtOAc–light petroleum. Compound **12** (2.4 mg) was obtained from the third fraction (5.8 mg) after purification by PTLC with 1% MeOH–CH₂Cl₂. Fraction C (396 mg) was separated by CC over silica gel to yield four fractions (C1–C4). Fraction C2 (8.2 mg) was further purified by PTLC using 50% CH₂Cl₂–light petroleum as a mobile phase to furnish **2** (1.6 mg) and **3** (1.0 mg). Fraction C4 (22.8 mg) was then separated by CC over reverse phase silica gel to afford **4** (3.5 mg). Fraction D (314 mg) was separated by silica gel CC to afford five fractions (D1–D5). Fraction D2 (106 mg) was then purified by CC over silica gel to give **1** (3.1 mg), **10** (9.7 mg), and **11** (3.4 mg). Compound **5** (2.0 mg) was obtained from the fraction D3 (33.5 mg) after purification by silica gel CC with a gradient of EtOAc–light petroleum followed by PTLC with 20% EtOAc–light petroleum. Fraction D4 (40.5 mg), upon CC over silica gel, afforded **8** (7.7 mg).

and **9** (3.5 mg). Fraction E (43.5 mg) was separated by silica gel CC to give three fractions. Compound **6** (3.4 mg) was obtained from the third fraction. The mycelial extract (540.0 mg, a brown gum) was separated by CC over Sepadex LH-20 to afford three fractions. The second fraction (92.6 mg) was further purified by silica gel CC followed by CC over reverse phase silica gel to furnish **13** (1.3 mg) and **14** (3.2 mg).

3.3.1. Penicisochroman A (1). Colorless gum; $[\alpha]_D^{25} +12$ (c 0.16, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 213 (3.68), 253 (3.28), 269 (3.15), 324 (2.92) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 1695, 1647 cm⁻¹; HREIMS m/z [M–CH₃OH]⁺ 242.0941 (calcd for C₁₅H₁₄O₃, 242.0943); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz), see Table 1; ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz), see Table 1.

3.3.2. Penicisochroman B (2). Colorless gum; $[\alpha]_D^{25} -57$ (c 0.08, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 240 (3.01), 256 (2.97), 307 (2.70) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 1700, 1650 cm⁻¹; HREIMS m/z [M]⁺ 276.1374 (calcd for C₁₆H₂₀O₄, 276.1362); ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz), see Table 1; ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz), see Table 1.

3.3.3. Penicisochroman C (3). Colorless gum; $[\alpha]_D^{25} -55$ (c 0.08, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 241 (3.04), 256 (2.99), 307 (2.73) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3409, 1683, 1647 cm⁻¹; HREIMS m/z [M]⁺ 262.1196 (calcd for C₁₅H₁₈O₄, 262.1205); ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz), see Table 1; ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz), see Table 1.

3.3.4. Penicisochroman D (4). Colorless gum; $[\alpha]_D^{25} -26$ (c 0.21, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 251 (3.04), 277 (3.01), 284 (2.97) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3351, 1657 cm⁻¹; HREIMS m/z [M]⁺ 164.0836 (calcd for C₁₀H₁₂O₂, 164.0837); ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz), see Table 2; ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz), see Table 2.

3.3.5. Penicisochroman E (5). Colorless gum; $[\alpha]_D^{25} -12$ (c 0.13, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 215 (3.35), 268 (2.63), 275 (2.61) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3402, 1653 cm⁻¹; HREIMS m/z [M]⁺ 180.0793 (calcd for C₁₀H₁₂O₃, 180.0786); ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz), see Table 2; ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz), see Table 2.

3.3.6. Penicipyrone (6). Colorless gum; UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 224 (3.64), 247 (3.43), 361 (3.31) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3399, 1683 cm⁻¹; HREIMS m/z [M]⁺ 263.0795 (calcd for C₁₃H₁₃NO₅, 263.0794); ¹H NMR (CDCl₃+CD₃OD, 300 MHz) δ_H 6.02 (1H, s, H-5'), 5.94 (1H, s, H-5), 3.64 (1H, d, $J=9.6$ Hz, H_a-8), 3.54 (1H, d, $J=9.6$ Hz, H_b-8), 2.30 (3H, s, H-7'), 2.22 (3H, s, H-7); ¹³C NMR (CDCl₃+CD₃OD, 75 MHz) δ_C 169.9 (C-2'), 169.1 (C-4), 166.9 (C-4'), 166.5 (C-2), 160.7 (C-6), 143.1 (C-6'), 108.2 (C-3'), 103.1 (C-5'), 102.8 (C-5), 102.4 (C-3), 18.3 (C-8), 19.7 (C-7), 19.0 (C-7').

3.3.7. Penicipyrone (7). Colorless gum; $[\alpha]_D^{25} -135$ (c 0.16, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 269 (3.67) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3409, 1687 cm⁻¹; HREIMS m/z [M]⁺ 200.1057 (calcd for C₁₀H₁₆O₄, 200.1049); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ_H 4.52 (1H, q, $J=6.6$ Hz, H-5), 4.38 (1H, d, $J=12.6$ Hz, H_a-9), 4.32 (1H, d, $J=12.6$ Hz, H_b-9), 2.45 (1H, dq, $J=15.3, 7.5$ Hz, H_a-10), 2.40 (1H, dq, $J=15.3, 7.5$ Hz, H_b-10), 1.40 (3H, s, H-7), 1.31 (3H, d, $J=6.6$ Hz, H-8), 1.18 (3H, t, $J=7.5$ Hz, H-11); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ_C 196.2 (C-1), 175.6 (C-3), 110.1 (C-2), 82.0 (C-5), 71.3 (C-6), 56.3 (C-9), 25.6 (C-10), 24.1 (C-7), 12.3 (C-8), 11.4 (C-11).

3.3.8. Peniciphenol (8). Colorless gum; UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 250 (2.49), 289 (2.19) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3328, 1638 cm⁻¹; HREIMS m/z

[M]⁺ 180.0788 (calcd for C₁₀H₁₂O₃, 180.0786); ¹H NMR (CDCl₃+CD₃OD, 300 MHz) δ_H 7.14 (1H, t, $J=7.8$ Hz, H-5), 6.81 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-6), 6.64 (1H, d, $J=11.4$ Hz, H-8), 6.59 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-4), 5.97 (1H, dt, $J=11.4, 6.9$ Hz, H-9), 4.78 (2H, s, H-7), 4.07 (2H, dd, $J=6.9, 0.6$ Hz, H-10); ¹³C NMR (CDCl₃+CD₃OD, 75 MHz) δ_C 156.3 (C-1), 136.3 (C-3), 131.9 (C-9), 130.0 (C-8), 128.5 (C-5), 123.6 (C-2), 120.9 (C-4), 115.3 (C-6), 59.1 (C-7), 58.6 (C-10).

3.3.9. Penicisoquinoline (9). Yellow gum; $[\alpha]_D^{25} -21$ (c 0.50, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 252 (3.69), 353 (3.19) nm; IR (neat) $\nu_{\max}$ 3245, 1692, 1641 cm⁻¹; HREIMS m/z [M]⁺ 273.1009 (calcd for C₁₅H₁₅NO₄, 273.1001); ¹H NMR (CDCl₃+CD₃OD, 300 MHz) δ_H 9.48 (1H, s, H-9), 7.79 (1H, s, H-6), 7.72 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-4), 7.36 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5), 4.89 (2H, s, H-10), 2.36 (1H, m, H-11), 1.19 (3H, br s, H-13), 0.97 (3H, br s, H-12); ¹³C NMR (CDCl₃+CD₃OD, 75 MHz) δ_C 199.0 (C-3), 171.9 (C-9b), 159.3 (C-7), 146.6 (C-9), 142.7 (C-5a), 124.5 (C-4), 120.3 (C-5), 117.4 (C-6), 115.9 (C-3a, C-9a), 110.1 (C-2), 64.5 (C-10), 34.2 (C-11), 16.0 (C-12), 15.5 (C-13).

3.4. Antibacterial activity testing

MICs were determined by the agar microdilution method.¹² The test substances were dissolved in DMSO (Merck, Germany). Serial twofold dilutions of the test substances were mixed with melted Mueller–Hinton agar (Difco) in the ratio of 1:100 in microtiter plates with flat-bottomed wells (Nunc, Germany). Final concentration of the test substances in agar ranged from 0.03 to 128 µg/mL. SA and MRSA were used as test strains. Inoculum suspensions (10 µL) were spotted on agar-filled wells. The inoculated plates were incubated at 35 °C for 18 h. MICs were recorded by reading the lowest substance concentration that inhibited visible growth. Vancomycin, a positive control drug, exhibited the MIC value of 1 µg/mL. Growth controls were performed on the agar containing DMSO.

Acknowledgements

V.R. thanks the Commission on Higher Education and the Thailand Research Fund for the TRF Senior Research Scholar (Grant No. RTA5180007). K.T. thanks the Thailand Research Fund through the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (Grant No. PHD/0109/2550) for a scholarship. Finally, the Center for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC) and Prince of Songkla University are gratefully acknowledged for partial support.

References and notes

- Lin, Z.; Zhu, T.; Fang, Y.; Gu, Q.; Zhu, W. *Phytochemistry* **2008**, 69, 1273–1278.
- Chen, L.; Fang, Y.; Zhu, T.; Gu, Q.; Zhu, W. *J. Nat. Prod.* **2008**, 71, 66–70.
- Wakana, D.; Hosoe, T.; Itabashi, T.; Okada, K.; de Campos Takaki, G. M.; Yaguchi, T.; Fukushima, K.; Kawai, K.-I. *J. Nat. Med.* **2006**, 60, 279–284.
- Stewart, M.; Capon, R. J.; White, J. M.; Lacey, E.; Tennant, S.; Gill, J. H.; Shaddock, M. P. *J. Nat. Prod.* **2004**, 67, 728–730.
- Li, C.; Gloer, J. B.; Wicklow, D. T.; Dowd, P. F. *J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 319–322.
- Kohno, J.; Hiramatsu, H.; Nishio, M.; Sakurai, M.; Okuda, T.; Komatsubara, S. *Tetrahedron* **1999**, 55, 11247–11252.
- Sakai, K.; Satoh, Y.; Doi, K.; Kitamura, K. JP Patent 97-150098 19970522, 1998.
- Ghigo, G.; Ciofalo, M.; Gagliardi, L.; La Manna, G.; Cramer, C. J. *J. Phys. Org. Chem.* **2005**, 18, 1099–1106.
- Soman, A. G.; Gloer, J. B.; Wicklow, D. T. *J. Nat. Prod.* **1999**, 62, 386–388.
- Trisuwan, K.; Rukachaisirikul, V.; Sukpondma, Y.; Preedanon, S.; Phongpaichit, S.; Sakayaroj, J. *Phytochemistry* **2009**, 70, 554–557.
- Yang, J.-G.; Pan, F.-Y. *Lett. Org. Chem.* **2007**, 4, 137–141.
- Lorian, V. *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 4th ed.; William and Wilkins: Baltimore, 1996; pp 28–32.

Flavanone glucuronides from the leaves of *Garcinia prainiana*

Saranyoo Klaiklay, Yaowapa Sukpondma, Vatcharin Rukachaisirikul, Nongporn Hutadilok-Towatana, and Kanokphorn Chareonrat

Abstract: Phytochemical investigation of *Garcinia prainiana*'s leaves led to the isolation of prainianonide (**1**), a new flavanone glucuronide, together with six known compounds: (2*S*)-eriodictyol 7-*O*- β -D-glucuronide (**2**), naringenin 7-*O*- β -D-glucuronide (**3**), (–)-GB-1a (**4**), (+)-morelloflavone (**5**), amenthoflavone (**6**), and friedelin (**7**). Their structures were elucidated by spectroscopic methods. The absolute configuration of **1** was determined by circular dichroism spectroscopy. Compounds **4** and **5** showed significant antioxidant activity.

Key words: *Garcinia prainiana*, Guttiferae, flavanone glucuronide, biflavonoid, antioxidant.

Résumé : Une étude phytochimique des feuilles de *Garcinia prainiana* a permis d'isoler le prainianonide (**1**), un nouveau glucuronide de flavanone ainsi que six nouveaux composés : le 7-*O*- β -D-glucuronide du (2*S*)-ériodictyol (**2**), le 7-*O*- β -D-glucuronide du de la naringénine (**3**), le (–)-GB-1a (**4**), la (+)-morelloflavone (**5**), l'amenthoflavone (**6**) et la friedéline (**7**). Leurs structures ont été élucidées par des méthodes spectroscopiques. La configuration absolue du composé **1** a été déterminée par spectroscopie de dichroïsme circulaire. Les composés **4** et **5** présentent une activité antioxydante significative.

Mots-clés : *Garcinia prainiana*, Guttiferae, glucuronide de flavanone, biflavonoïde, antioxydant.

[Traduit par la Rédaction]

Introduction

Plants in the genus *Garcinia* are known to be a rich source of bioactive compounds such as xanthenes,^{1–3} biflavonoids,^{4,5} benzophenones,⁵ benzoquinones,⁶ and triterpenes.^{7,8} Some of them have shown a wide range of biological activities including antibacterial,^{1,6} antifungal,⁹ antioxidant,^{3,10} and cytotoxic^{5,11} effects. In our ongoing effort to search for biologically active substances from *Garcinia* plants, we found that the crude methanol extract from the leaves of *G. prainiana* showed significant antioxidant activity. *Garcinia prainiana*, locally named Chu-pu, is distributed in the southern part of Thailand. This plant is a small tree with a berrylike fruit. Its ripe fruits are edible and used for lowering blood pressure.¹² In this paper, we describe the isolation and structural elucidation of one new flavanone glucuronide together with six known compounds and their antioxidant activity.

Results and discussion

The crude methanol extract from the leaves of *G. prainiana* was subjected to chromatographic techniques to yield one new flavanone glucuronide, prainianonide (**1**), as well as two known flavanone glucuronides, (2*S*)-eriodictyol 7-*O*- β -D-glucuronide (**2**)¹³ and naringenin 7-*O*- β -D-glucuronide

(**3**),¹⁴ three biflavonoids, (–)-GB-1a (**4**),¹⁵ (+)-morelloflavone (**5**),¹⁶ and amenthoflavone (**6**),¹⁷ and friedelin (**7**) (Chart 1).¹⁸ The structure of **1** was determined by analysis of one- and two-dimensional NMR spectroscopic data, while the known compounds were identified by comparison of the NMR data, especially ¹H and ¹³C NMR data, with previously reported data (see Supplementary data). The absolute configurations of **1** and **2** were assigned by circular dichroism (CD) spectroscopy. This is the first report on the isolation of a flavanone glucuronide from the genus *Garcinia*.

Prainianonide (**1**) was isolated as a pale yellow gum. Its molecular formula, C₂₂H₂₂O₁₁, was deduced by high-resolution electron impact mass spectrometry (HR-EI-MS) (*m/z* 462.1144 [M]⁺ (calcd. 462.1162)). The UV spectrum showed characteristic absorption bands of a flavanone chromophore at 283 and 337 nm.¹⁹ The IR spectrum showed absorption bands for a hydroxyl group (3422 cm^{–1}), an ester carbonyl group (1716 cm^{–1}), and a flavanone carbonyl group (1644 cm^{–1}). The ¹H NMR spectrum (Table 1) displayed AA'BB' signals at δ 7.33 and 6.82 (2H each, d, *J* = 8.4 Hz), two meta-coupled signals at δ 6.16 and 6.17 (1H each, brs), an oxymethine proton signal at δ 5.39 (1H, dd, *J* = 13.2, 2.7 Hz), and methylene proton signals at δ 3.18 (1H, dd, *J* = 17.1, 13.2 Hz) and 2.75 (1H, dd, *J* = 17.1, 2.4 Hz). These data indicated that **1** had a 4',5,7-trihydroxyflavanone

Received 6 August 2010. Accepted 22 November 2010. Published on the NRC Research Press Web site at canjchem.nrc.ca on 11 March 2011.

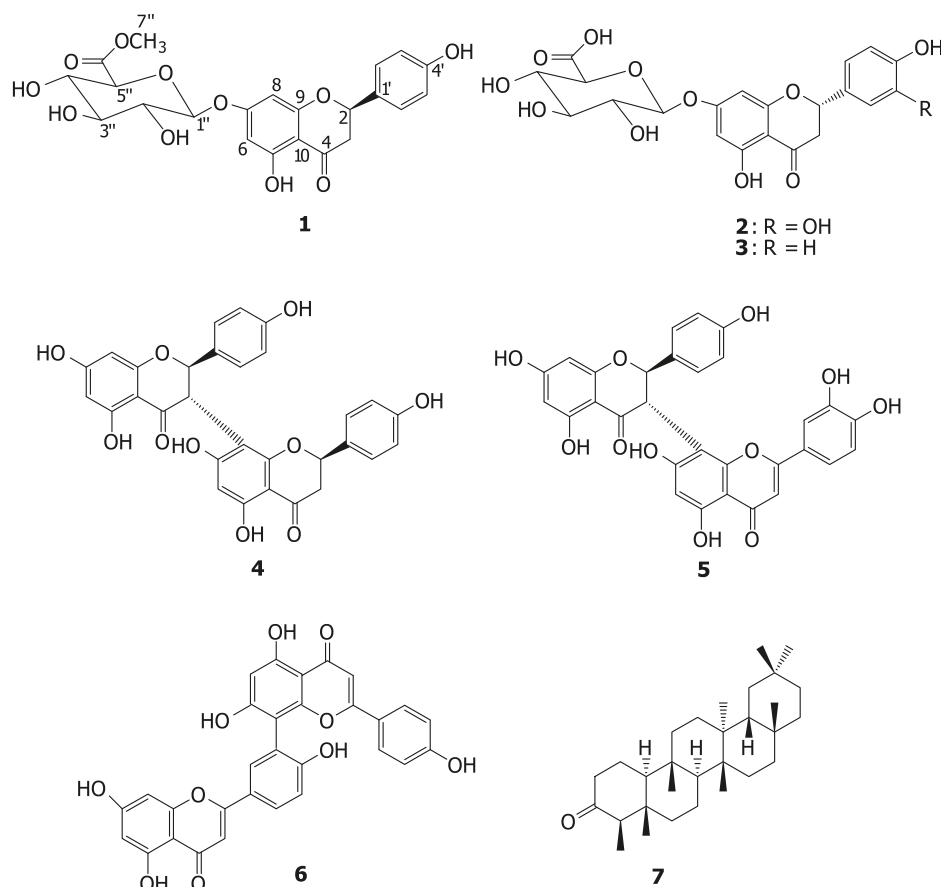
S. Klaiklay, Y. Sukpondma,¹ and V. Rukachaisirikul. Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai 90112, Thailand.

N. Hutadilok-Towatana. Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai 90112, Thailand.

K. Chareonrat. Srinagarindra The Princess Mother School Phuket, Phuket 83000, Thailand.

¹Corresponding author (e-mail: yaowapa.suk@psu.ac.th).

Chart 1.



skeleton.²⁰ In addition, the ^1H NMR data (Table 1) showed signals of a sugar unit (δ 5.07 (1H, d, J = 7.2 Hz), 4.09 (1H, d, J = 9.6 Hz), 3.60 (1H, t, J = 9.6 Hz), 3.49 (1H, dd, J = 9.6, 7.2 Hz), 3.47 (1H, t, J = 9.6 Hz)) and a methoxyl signal at δ 3.76 (3H, s). The ^{13}C NMR spectrum (Table 1) showed the presence of one ester carbonyl carbon (δ 169.4). A heteronuclear multiple bond correlation (HMBC) between the methoxy protons (δ 3.76) and the ester carbonyl carbon (δ 169.4) indicated the presence of a methyl ester group. This methyl ester group was connected to C-5'' (δ 75.2) of a sugar moiety, which was determined by HMBC of H-5'' (δ 4.09) / C-6'' (δ 169.4). From these results, the sugar moiety was identified as a methyl ester of glucuronic acid.¹³ The anomeric proton of the glucuronic acid at δ 5.07 with a large coupling constant of 7.2 Hz implied that this unit must have a β -glucuronide form.¹³ Irradiation of H-5'' affected signal intensities of both H-1'' (δ 5.07) and H-3'' (δ 3.47), supporting the assigned stereochemistry of the glucuronide unit. A cross peak in the HMBC spectrum between H-1'' of the glucuronide unit and C-7 (δ 165.1) of the flavanone skeleton indicated the attachment of the glucuronide unit to the 7-hydroxyl group of the flavanone moiety. The absolute configuration of **1** was assigned by CD spectroscopy. Its CD spectrum showed positive Cotton effects (249 ($\Delta\epsilon$ -5.84), 290 ($\Delta\epsilon$ +2.35) nm), indicating that the absolute configuration of the 2-position is an *R* orientation, which was supported by comparison with positive (252 ($\Delta\epsilon$ -1.00), 292 ($\Delta\epsilon$ +3.66) nm) and negative Cotton effects (250

Table 1. ^1H and ^{13}C NMR spectral data of **1** in CD_3OD and major correlations.

Position	δ_{H} , mult, J (in Hz)	δ_{C}	HMBC
2	5.39, dd, 13.2, 2.7	79.3	C-4, C-9, C-2', 6'
3	3.18, dd, 17.1, 13.2 2.75, dd, 17.1, 2.4	42.8	C-10, C-1'
4		197.2	
5		163.6	
6	6.17, brs	96.5	C-8, C-10
7		165.1	
8	6.16, brs	95.4	C-6, C-10
9		163.2	
10		103.7	
1'		129.4	
2', 6'	7.33, d, 8.4	127.7	C-2, C-4'
3', 5'	6.82, d, 8.4	114.9	C-1', C-4'
4'		157.7	
1''	5.07, d, 7.2	99.6	C-7
2''	3.49, dd, 9.6, 7.2	75.6	C-3'', C-4''
3''	3.47, t, 9.6	72.9	C-1'', C-2'', C-4''
4''	3.60, t, 9.6	71.4	C-2''
5''	4.09, d, 9.6	75.2	C-1'', C-4'', C-6''
6''		169.4	
7''	3.76, s	51.5	C-6''

($\Delta\epsilon$ +1.43), 293 ($\Delta\epsilon$ -3.48) nm) of (2*R*)-eriodictyol 7-*O*- β -D-glucuronide and (2*S*)-eriodictyol 7-*O*- β -D-glucuronide (**2**), respectively.¹³ Therefore, **1** was characterized as (2*R*)-4,5-dihydroxyflavanone 7-*O*- β -glucuronide methyl ester, a new flavanone glucuronide.

Compounds **1–6** were examined for their antioxidant activity against DPPH (diphenylpicrylhydrazyl) radicals, while compound **7** was not tested owing to the lack of phenolic moiety. Compounds **4** and **5** showed higher radical scavenging potency than the standard (butylated hydroxyanisole), with IC₅₀ values (concentration required to reduce DPPH radicals by 50%) of 148 and 72 μ mol/L, respectively (Table 2). Compound **2** was much less active, with an IC₅₀ value of 841 μ mol/L. The radical trapping potency of moreloflavone (**5**), which was twofold higher than that of GB-1a (**4**), was mainly due to the presence of *ortho*-dihydroxy groups in its B ring, a structural feature required for effective radical scavenging.²¹ Compound **5**, however, has been shown to be a potent antioxidant in various studies.^{22,23} In comparison with the biflavonoids (**4** and **5**), the flavanone glucuronide (**2**) seemed to be a poor scavenger. As the 5,7-dihydroxy moiety in the A ring is known to have a strong influence on the total antioxidant activity of flavonoids,²¹ thus blocking the 7-position by glycosylation and containing only a single hydroxyl substituent at position 5 in the A ring, compound **2** became an ineffective hydrogen donor in this chemical arrangement.

Experimental

General

The infrared (IR) spectra were recorded neat using a PerkinElmer 783 FTS165 FTIR spectrometer. The ultraviolet (UV) absorption spectra were measured on a SHIMADZU UV-160A spectrophotometer. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a 300 MHz Bruker FTNMR Ultra Shield spectrometer in deuteriochloroform solution with tetramethylsilane as an internal standard. The EI and HR-EI mass spectra were obtained on a MAT 95 XL mass spectrometer (ThermoFinnigan). Optical rotation was measured on a JASCO P-1020 polarimeter. CD spectra were recorded on a JASCO J-810 spectropolarimeter. Thin-layer chromatography was performed on silica gel 60 GF₂₅₄ (Merck). Column chromatography (CC) was carried out on Sephadex LH-20, silica gel (Merck) type 60 (230–400 mesh ASTM) or type 100 (70–230 mesh ASTM), or reverse phase C-18 silica gel. Light petroleum had a bp of 40–60 °C.

Plant material

The leaves of *G. prainiana* were collected in Narathiwat Province, Thailand. The voucher specimens (K.Maneenoon2010-001-003) were deposited in the Herbarium at the Department of Biology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand.

Extraction and isolation

The leaves of *G. prainiana* (0.80 kg), cut into small segments, were extracted with MeOH three times over a period of 7 days at room temperature. After filtration, the filtrate was evaporated to dryness under reduced pressure to give a crude methanol extract as a dark brown gum (56.2 g). The

Table 2. Antioxidant activity of compounds **1–6**.

Compound	DPPH ^a
	IC ₅₀ (μ mol/L)
1	— ^a
2	841
3	— ^a
4	148
5	72
6	— ^a
BHA ^b	167

^aInactive.

^bButylated hydroxyanisole.

resulting residue was subjected to CC over Sephadex LH-20 with MeOH to afford four fractions (G1–G4). Fraction G3 (1.01 g) was dissolved with CH₂Cl₂ to provide soluble (G3D) and insoluble (G3N) fractions. Fraction G3D (399.6 mg) was subjected to CC over silica gel with a gradient of CH₂Cl₂/petroleum ether (1:1) to provide **7** (73.4 mg). Fraction G4 (2.7 g) was subjected to CC over reverse phase silica gel with a gradient of MeOH/H₂O (1:1) to provide five subfractions (G4A–G4E). Subfraction G4A (260.2 mg) was chromatographed using CC over reverse phase silica gel with a gradient of MeOH/H₂O (1:4) to produce **2** (14.1 mg). Subfraction G4B (31.2 mg) was separated by CC over reverse phase silica gel with a gradient of MeOH/H₂O (2:3) to provide four subfractions (G4B1–G4B4). Subfraction G4B1 (15.6 mg) was further subjected to CC over reverse phase silica gel with a gradient of MeOH/H₂O (1:4) to provide **3** (4.3 mg). Subfractions G4B3 (25.9 mg) and G4B4 (34.7 mg) were chromatographed using CC over Sephadex LH-20 with MeOH/CH₂Cl₂ to produce **1** (3.9 mg) and **4** (8.7 mg), respectively. Subfraction G4D (69.5 mg) was purified by CC over reverse phase silica gel with a gradient of MeOH/H₂O (6:4) to afford **5** (25.3 mg). Subfraction G4E (67.1 mg) was subjected to CC over reverse phase silica gel with a gradient of MeOH/H₂O (6:4) followed by CC over Sephadex LH-20 using MeOH/CH₂Cl₂ to produce **6** (4.0 mg).

Prainianonide (**1**)

Pale yellow gum. [α]_D²⁶ -26.0° (*c* 0.20, MeOH). UV (MeOH) (nm, log ϵ): 337 (2.14), 283 (3.63), 224 (3.81). FTIR (neat, cm⁻¹): 3422, 1716, 1644. CD (MeOH) (nm, $\Delta\epsilon$): 249 (-5.84), 290 (+2.35). ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) and ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) data: see Table 1. EI-MS *m/z*: 462 [M]⁺ (3), 272 (100), 254 (7), 179 (27), 166 (36), 153 (86), 120 (57), 107 (23). HR-EI-MS *m/z*: 462.1144 [M]⁺ (calcd. for C₂₂H₂₂O₁₁: 462.1162).

Determination of antioxidant activity

DPPH radical scavenging assay

The DPPH radical scavenging assay was carried out in triplicate, based on the method used by Hutadilok-Tawatana et al.²⁴ BHA (butylated hydroxyanisole), a positive control, gave an IC₅₀ value of 167 μ mol/L. The DPPH radical scav-

enging ability was calculated based on the concentration of sample required to reduce DPPH radicals by 50% (IC₅₀).

Supplementary data

Supplementary data are available with the article through the journal Web site (www.nrcresearchpress.com/cjc).

Acknowledgements

V.R. thanks the Commission on Higher Education and the Thailand Research Fund (TRF) for the TRF Research-Team Promotion Grant (No. RTA5180007). S.K. thanks the Center for Innovation in Chemistry and K.C. thanks the Science, Mathematics and Technology Excellence Development Project; the Teacher Professional Development Project for scholarships. Finally, Y.S. is grateful to Dr. Katesarin Maneenoon for collecting the plant, Assistant Professor Dr. Tiengthong Thongpanchang for recording CD spectra, and the Graduate School, Prince of Songkla University, for partial support.

References

- (1) Rukachaisirikul, V.; Kaewnok, W.; Koysomboon, S.; Phongpaichit, S.; Taylor, W. C. *Tetrahedron* **2000**, *56* (43), 8539. doi:10.1016/S0040-4020(00)00778-X.
- (2) Rukachaisirikul, V.; Painuphong, P.; Sukpondma, Y.; Koysomboon, S.; Sawangchote, P.; Taylor, W. C. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66* (7), 933. doi:10.1021/np030080v.
- (3) Rukachaisirikul, V.; Naklue, W.; Phongpaichit, S.; Towatana, N. H.; Maneenoon, K. *Tetrahedron* **2006**, *62* (36), 8578. doi:10.1016/j.tet.2006.06.059.
- (4) Parveen, M.; Ilyas, M.; Mushfiq, M.; Busudan, O. A.; Muhaisen, H. M. H. *Nat. Prod. Res.* **2004**, *18* (3), 269. doi:10.1080/14786410310001620574.
- (5) Yang, H.; Figueroa, M.; To, S.; Baggett, S.; Jiang, B.; Basile, M. J.; Weinstein, I. B.; Kennelly, E. J. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58* (8), 4749. doi:10.1021/jf9046094.
- (6) Rukachaisirikul, V.; Trisuwan, K.; Sukpondma, Y.; Phongpaichit, S. *Arch. Pharm. Res.* **2008**, *31* (1), 17. doi:10.1007/s12272-008-1114-9.
- (7) Rukachaisirikul, V.; Pailee, P.; Hiranrat, A.; Tuchinda, P.; Yoosook, C.; Kasisit, J.; Taylor, W. C.; Reutrakul, V. *Planta Med.* **2003**, *69* (12), 1141. doi:10.1055/s-2003-818006.
- (8) Rukachaisirikul, V.; Saelim, S.; Karnsomchoke, P.; Phongpaichit, S. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68* (8), 1222. doi:10.1021/np050131j.
- (9) Mackeen, M. M.; Ali, A. M.; Lajis, N. H.; Kawazu, K.; Kikuzaki, H.; Nakatani, N. Z. *Naturforsch.* **2002**, *57c* (3/4), 291.
- (10) Panthong, K.; Hutadilok-Towatana, N.; Panthong, A. *Can. J. Chem.* **2009**, *87* (11), 1636. doi:10.1139/V09-123.
- (11) Suksamrarn, S.; Komutiban, O.; Ratananukul, P.; Chimnoi, N.; Lartpornmatulee, N.; Suksamrarn, A. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **2006**, *54* (3), 301. doi:10.1248/cpb.54.301.
- (12) Whitmore, T. C. *Tree Flora of Malaya*; Wing Tai Cheung Printing Co. Ltd.: Hong Kong, 1972; Vol. 2, pp 220.
- (13) Matsuda, H.; Morikawa, T.; Toguchida, I.; Harima, S.; Yoshikawa, M. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **2002**, *50* (7), 972. doi:10.1248/cpb.50.972.
- (14) Yoshimura, M.; Sano, A.; Kamei, J.-I.; Obata, A. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57* (14), 6432. doi:10.1021/jf901137x.
- (15) Terashima, K.; Kondo, Y.; Aqil, M.; Waziri, M.; Niwa, M. *Heterocycles* **1999**, *50* (1), 283. doi:10.3987/COM-98-S(H) 40.
- (16) Li, X.-C.; Joshi, A. S.; Tan, B.; Elsohly, H. N.; Walker, L. A.; Zjawiony, J. K.; Ferreira, D. *Tetrahedron* **2002**, *58* (43), 8709. doi:10.1016/S0040-4020(02)01096-7.
- (17) Gonzalez, E.; Felicio, J. D.; Pinto, M. M. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2001**, *34* (11), 1453. doi:10.1590/S0100-879X2001001100013.
- (18) LeFevre, J.; McNeill, K. I.; Moore, J. L. *J. Chem. Educ.* **2001**, *78* (4), 535. doi:10.1021/ed078p535.
- (19) Cui, C.-B.; Tezuka, Y.; Kikuchi, T.; Nakano, H.; Tamaoki, T.; Park, J.-H. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1990**, *38* (12), 3218.
- (20) Jeon, S. H.; Chun, W.; Choi, Y. J.; Kwon, Y. S. *Arch. Pharm. Res.* **2008**, *31* (8), 978. doi:10.1007/s12272-001-1255-9.
- (21) Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, *20* (7), 933. doi:10.1016/0891-5849(95) 02227-9.
- (22) Sanz, M. J.; Ferrandiz, M. L.; Cejudo, M.; Terencio, M. C.; Gil, B.; Bustos, G.; Ubeda, A.; Gunasegaran, R.; Alcaraz, M. J. *Xenobiotica* **1994**, *24* (7), 689. doi:10.3109/00498259409043270.
- (23) Hutadilok-Towatana, N.; Kongkachuay, S.; Mahabusarakam, W. *Nat. Prod. Res.* **2007**, *21* (7), 655. doi:10.1080/14786410701371256.
- (24) Hutadilok-Towatana, N.; Chaiyamutti, P.; Panthong, K.; Mahabusarakam, W.; Rukachaisirikul, V. *Pharm. Biol.* **2006**, *44* (3), 221. doi:10.1080/13880200600685592.

Accepted manuscript

จำนวน 1 เรื่อง

Research Article

**Tetrahydroanthraquinone and Xanthone Derivatives from
the Marine-Derived Fungus *Trichoderma aureoviride* PSU-
F95**

Nanthaphong Khamthong¹, Vatcharin Rukachaisirikul¹, Kwanruthai Tadpetch¹,
Morakot Kaewpet¹, Souwalak Phongpaichit², Sita Preedanon³, and Jariya Sakayaroj³

¹*Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand,* ²*Natural Products Research Center and Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand,* and ³*National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Thailand Science Park, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand*

Correspondence to: Vatcharin Rukachaisirikul, Department of Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla 90112, Thailand
Tel: +66-74-288-435, Fax: +66-74-558-841
E-mail: vatcharin.r@psu.ac.th

ABSTRACT

Trichodermaquinone (**1**) and trichodermaxanthone (**2**) were isolated from the marine-derived fungus *Trichoderma aureoviride* PSU-F95 together with eleven known compounds. The structures were interpreted by spectroscopic methods. Known coniothranthraquinone **1** and emodin displayed strong antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with the MIC values of 8 and 4 µg/mL, respectively.

Key words: *Trichoderma aureoviride*, Marine-derived fungus, Tetrahydroanthraquinone, Xanthone, Antibacterial activity

INTRODUCTION

Marine-derived fungi belonging to the genus *Trichoderma* produce many types of bioactive metabolites such as the antimycobacterial aminolipopeptide trichoderins (Pruksakorn et al., 2010), the antifungal trichodermaiketone A (Song et al., 2010) and the cytotoxic dipeptide trichodermaamide B (Garro et al., 2003). As part of an effort to search for biologically active compounds from our marine-derived fungi collection, we screened the isolated fungi for antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* (SA) ATCC 25923 and methicillin-resistant *S. aureus* SK1 (MRSA). Results indicated that the broth and mycelial extracts from the marine-derived fungus *T. aureoviride* PSU-F95, isolated from a gorgonian sea fan of the genus *Annella*, showed interesting activity against both strains. Based on SciFinder Scholar Database searches, there has been only one report on the chemical investigation of *T. aureoviride* leading to the isolation of growth-inhibiting koniginin G (Cutler et al., 1999). We report herein the isolation of two new metabolites from the broth extract of the fungus *T. aureoviride* PSU-F95: one tetrahydroanthraquinone, trichodermaquinone (**1**), and one xanthone, trichodermaxanthone (**2**) (Fig. 1), along with seven known compounds, coniothranthraquinone 1 (**3**) (Yi et al., 2010), aloesone (**4**) (Che et al., 1991), 2-(2'-S-hydroxypropyl)-5-methyl-7-hydroxychromone (**5**) (Kashiwada et al., 1984), isorhodoptilometrin (**6**) (Ren et al., 2006), pachybasin (**7**) (Liu et al., 2007), 1-hydroxy-3-methoxyanthraquinone (**8**) (Wu et al., 2003) and 2-methylquinizarin (**9**) (Kuo et al., 1995). In addition, the mycelial extracts afforded four additional known compounds, ω -hydroxypachybasin (**10**) (Kuo et al., 1995), chrysophanol (**11**) (Ngoc et al., 2008), emodin (**12**) (Cohen and Towers, 1995) and ω -hydroxyemodin (**13**) (Fujimoto et al., 2004). Their structures were determined based on spectroscopic data. Antibacterial activity against SA and MRSA of some isolated compounds was evaluated.

MATERIALS AND METHODS

General procedures

Infrared spectra (IR) were recorded on a Perkin-Elmer 783 FTS 165 FT-IR spectrometer. Ultraviolet (UV) absorption spectra were measured in MeOH on a Shimadzu UV-160A spectrophotometer. Optical rotations were measured on a JASCO P-1020 polarimeter. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on 300 and 500 MHz Bruker FTNMR Ultra Shield spectrometer. Chemical shifts are expressed in δ (ppm) referring to the TMS peak. Mass spectra were measured on a MAT 95 XL mass spectrometer (Thermo Finnigan) or on a Micromass model VQ-TOF2 spectrometer. Thin-layer Chromatography (TLC) and precoated TLC (PTLC) were performed on silica gel GF₂₅₆ (Merck). Column chromatography (CC) was carried out on silica gel (Merck) type 100 (70-230 Mesh ASTM) with a gradient system of MeOH-CH₂Cl₂, on Sephadex LH-20 with MeOH or on reverse phase silica gel C-18 with a gradient system of MeOH-H₂O, or otherwise stated.

Fungal strain

The marine-derived fungus *T. aureoviride* PSU-F95 was isolated from the gorgonian sea fan (*Annella* sp.). The sea fan was collected and identified according to previously reported methods (Trisuwan et al., 2010). The fungus was deposited as PSU-F95 (GenBank accession number EU714396) at the Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Thailand.

Tissue Samples were treated with 95% ethanol for 1 minute and rinsed with sterile distilled water. The surface-sterilized samples were placed on cornmeal agar (supplemented with tetracycline and ampicillin to suppress bacterial growth) and

incubated at 25 °C until the outgrowth of sea fan-derived fungi was discerned. Hyphal tips originating from sea fan samples were transferred to potato dextrose agar (PDA) without antibiotics. The fungal isolate was transferred to the new medium by the hyphal tip method.

Identification of the fungus PSU-F95

The fungus PSU-F95 was identified based on its morphological and molecular characteristics. Its colony is fast growing on potato dextrose agar at 25 °C. It produces a scattered blue-green mass of conidia with secreted yellow pigment after five days of incubation. Conidiophores are hyaline and extensively branched with hyaline, 1-celled, ovoid conidia borne in small terminal clusters which are the characteristics of the genus *Trichoderma* (Barnett and Hunter, 1998). Its ITS sequence (EU714396) matched closely with sequences of *Trichoderma aureoviride* AF359266, AF359400 and EF359265 with a very short tree branch length, 99.8 % sequence identity and highly similar by bootstrap value. These data confirmed the identity of PSU-F95 to be *Trichoderma aureoviride*.

Fermentation and isolation

The sea fan-derived fungus PSU-F95 was grown on potato dextrose agar (PDA) at 25 °C for five days. Three pieces (0.5 x 0.5 cm²) of mycelial agar plugs were inoculated into 500 mL Erlenmeyer flasks containing 300 mL potato dextrose broth (PDB) at room temperature for four weeks. The crude extracts from the fungus PSU-F95 were prepared using the same procedure as described previously (Arunpanichlert et al., 2010) to give broth EtOAc (BE, 639.8 mg), mycelial EtOAc (CE, 462.8 mg) and mycelial hexane (CH, 127.9 mg) extracts, respectively. The BE extract was subjected to column chromatography (CC) over Sephadex LH-20 to obtain five fractions (A-E). Fraction B (82.9 mg) was further purified by CC over reverse phase C-18 silica gel to afford four subfractions (B1-B4). Subfraction B2 (19.5 mg, eluted with 70% MeOH-H₂O) was rechromatographed over reverse phase C-18 silica gel and then purified by preparative thin-layer chromatography (PTLC) using 3% MeOH-CH₂Cl₂ (4 runs) to give **4** (3.6 mg) and **5** (3.9 mg). Fraction C (101.6 mg) was further investigated using the same procedure as fraction B to yield five subfractions (C1-C5). Both subfractions C1 (54.8 mg, eluted with 60% MeOH-H₂O) and C2 (17.9 mg, eluted with 60% MeOH-H₂O) were further purified over reverse phase C-18 silica gel to give **1** (3.5 mg) and **3** (10.1 mg), respectively. Subfraction C4 (4.9 mg, eluted with 80% MeOH-H₂O) contained **7** (4.9 mg). Fraction D (106.4 mg) was subjected to the same procedure as fraction B to yield five subfractions (D1-D5). Subfractions D2 (1.1 mg, eluted with 70% MeOH-H₂O) and D5 (2.4 mg, eluted with 90% MeOH-H₂O) contained compounds **2** (1.1 mg) and **9** (2.4 mg), respectively. Subfraction D3 (10.6 mg, eluted with 70% MeOH-H₂O) was further purified by PTLC using 2% MeOH-CH₂Cl₂ as a mobile phase to give **6** (5.7 mg) and **8** (1.0 mg). The CH extract was chromatographed using CC over silica gel to give three fractions (CH1-CH3). Fraction CH2 (29.3 mg, eluted with 1-3% MeOH-CH₂Cl₂) was rechromatographed over silica gel with a gradient of EtOAc-light petroleum to give **10** (2.0 mg) and **12** (5.4 mg). The CE extract was purified by CC over Sephadex LH-20 to give four fractions (CE1-CE4). Both fractions CE2 (52.6 mg) and CE4 (31.3 mg) were subjected to CC over reverse phase C-18 silica gel to give **13** (3.5 mg). Fraction CE3 (101.9 mg) was further purified using the same method as fraction CE2 and then repurified by PTLC using 1% EtOAc-light petroleum (10 runs) as a mobile phase to yield **11** (1.5 mg).

Trichodermaquinone (1)

Yellow gum; $[\alpha]_D^{24} -45.9$ (*c* 0.20, MeOH); UV $\lambda_{\max}$ (MeOH) nm (log ϵ): 243 (3.35), 273 (3.23); IR $\nu_{\max}$ (neat) cm^{-1} : 3263, 1662, 1627; ^1H NMR (300 MHz, acetone- d_6) and ^{13}C NMR (75 MHz, acetone- d_6), see Table I; EIMS m/z (% relative intensity): 290 (100), 231 (88), 135 (74), 115 (55), 77 (61); HREIMS m/z : $[\text{M}]^+$ 290.0790 (calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$, 290.0790).

Trichodermaxanthone (2)

Pale yellow gum; UV $\lambda_{\max}$ (MeOH) nm (log ϵ): 241 (3.51), 255 (3.48), 273 (3.42), 313 (3.26) and 341 (2.86); IR $\nu_{\max}$ (neat) cm^{-1} : 3315, 1698, 1650; ^1H NMR (300 MHz, acetone- d_6) and ^{13}C NMR (75 MHz, acetone- d_6), see Table II; EI-MS m/z (% relative intensity) 300 (21), 258 (100), 229 (10); HR-TOF-MS (APCI positive) m/z : $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 323.0543 (calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6\text{Na}$, 323.0532).

Coniothranthraquinone 1 (3)

Yellow gum; $[\alpha]_D^{25} -32.0$ (*c* 0.20, MeOH); UV $\lambda_{\max}$ (MeOH) nm (log ϵ): 249 (3.67), 277 (3.64), 419 (3.25); IR $\nu_{\max}$ (neat) cm^{-1} : 3343, 1662, 1628; ^1H NMR (300 MHz, acetone- d_6): δ 12.04 (1H, *s*, 1-OH), 7.37 (1H, *d*, $J = 0.9$ Hz, H-4), 7.07 (1H, *q*, $J = 0.6$ Hz, H-2), 4.05 (2H, *m*, H-6, H-7), 2.80 (1H, *m*, H_a-5), 2.75 (2H, *m*, H_b-5, H_a-8), 2.69 (1H, *m*, H_b-8), 2.43 (3H, *s*, H₃-11); ^{13}C NMR (75 MHz, acetone- d_6): δ 189.6 (C-9), 183.5 (C-10), 161.4 (C-1), 148.0 (C-3), 143.0 (C-8a), 141.7 (C-10a), 132.1 (C-4a), 123.1 (C-2), 119.6 (C-4), 112.8 (C-9a), 67.4 (C-6, C-7), 29.1 (C-8), 28.4 (C-5), 21.1 (C-11).

Aloesone (4)

Colorless gum; UV $\lambda_{\max}$ (MeOH) nm (log ϵ): 210 (2.89), 242 (3.71), 249 (3.54), 292 (3.44); IR $\nu_{\max}$ (neat) cm^{-1} : 3360, 1717, 1649; ^1H NMR (300 MHz, acetone- d_6): δ 9.60 (1H, *brs*, 7-OH), 6.68 (1H, *d*, $J = 2.4$ Hz, H-6), 6.67 (1H, *d*, $J = 2.4$ Hz, H-8), 6.04 (1H, *s*, H-3), 3.82 (1H, *s*, H₂-9), 2.27 (3H, *s*, H₃-11), 2.71 (3H, *s*, H₃-12); ^{13}C NMR (75 MHz, acetone- d_6): δ 201.3 (C-10), 178.3 (C-4), 160.9 (C-7), 160.4 (C-2), 159.7 (C-8a), 142.3 (C-5), 116.5 (C-6), 115.0 (C-4a), 113.1 (C-3), 100.7 (C-8), 47.5 (C-9), 28.9 (C-11), 21.9 (C-11).

2-(2'*S*-Hydroxypropyl)-5-methyl-7-hydroxychromone (5)

Colorless gum; $[\alpha]_D^{27} +32.7$ (*c* 0.55, MeOH); UV $\lambda_{\max}$ (MeOH) nm (log ϵ): 210 (3.02), 242 (2.92), 249 (2.92), 290 (2.76); IR $\nu_{\max}$ (neat) cm^{-1} : 3400, 1643; ^1H NMR (300 MHz, acetone- d_6): δ 9.52 (1H, *brs*, 7-OH), 6.69 (1H, *d*, $J = 2.4$ Hz, H-8), 6.66 (1H, *brs*, H-6), 5.97 (1H, *s*, H-3), 4.21 (1H, *m*, H-10), 2.70 (3H, *s*, H₃-12), 2.65 (1H, *m*, H₂-9), 1.25 (3H, *d*, $J = 6.8$ Hz, H₃-11); ^{13}C NMR (75 MHz, acetone- d_6): δ 178.5 (C-4), 164.6 (C-2), 160.7 (C-7), 159.7 (C-8a), 142.2 (C-5), 116.3 (C-6), 115.3 (C-4a), 111.9 (C-3), 100.7 (C-8), 64.8 (C-10), 43.3 (C-9), 22.9 (C-11), 21.9 (C-12).

Isorhodoptilometrin (6)

Yellow gum; $[\alpha]_D^{25} -33.6$ (*c* 0.20, MeOH); UV $\lambda_{\max}$ (MeOH) nm (log ϵ): 220 (3.67), 252 (3.43), 290 (3.38), 437 (3.14); IR $\nu_{\max}$ (neat) cm^{-1} : 3373, 1693, 1664; ^1H NMR (300 MHz, acetone- d_6): δ 12.20 (1H, *s*, 8-OH), 12.08 (1H, *s*, 1-OH), 7.66 (1H, *d*, $J = 1.8$ Hz, H-4), 7.26 (1H, *d*, $J = 2.7$ Hz, H-5), 7.21 (1H, *d*, $J = 1.8$ Hz, H-2), 6.66 (1H, *d*, $J = 2.7$ Hz, H-7), 4.09 (1H, *sext*, $J = 6.0, 0.9$ Hz, H-12), 2.82 (2H, *m*, H₂-11), 1.22 (3H *d*, $J = 6.0$ Hz, H₃-13); ^{13}C NMR (75 MHz, acetone- d_6): δ 190.9 (C-9), 182.0 (C-10), 165.8 (C-8), 165.4 (C-1, C-6), 150.4 (C-3), 135.8 (C-4a), 133.1 (C-10a), 124.8 (C-2), 121.2 (C-4), 113.9 (C-9a), 109.5 (C-8a), 108.9 (C-5), 108.0 (C-7), 67.4 (C-12), 45.6 (C-11), 22.9 (C-13).

Pachybasin (7)

Yellow gum; UV $\lambda_{\max}$ (MeOH) nm (log ϵ): 223 (3.37), 253 (3.44), 329 (2.52), 405 (2.85); IR $\nu_{\max}$ (neat) cm^{-1} : 3516, 1712, 1677; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 12.58 (1H, *s*, 1-OH), 8.31 (1H, *m*, H-5), 8.28 (1H, *m*, H-8), 7.82 (1H, *m*, H-6), 7.78 (1H, *m*, H-7), 7.65 (1H, *d*, $J = 1.2$ Hz, H-4), 7.11 (1H, *dq*, $J = 1.2, 0.6$ Hz, H-2), 2.45 (3H, *s*, H_3 -11); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 188.1 (C-9), 182.8 (C-10), 162.8 (C-1), 148.6 (C-3), 134.4 (C-7), 134.1 (C-6), 133.7 (C-8a), 133.4 (C-10a), 133.2 (C-4a), 127.4 (C-8), 126.8 (C-5), 124.1 (C-2), 120.8 (C-4), 114.1 (C-9a), 22.3 (C-11).

1-Hydroxy-3-methoxyanthraquinone (8)

Yellow gum; UV $\lambda_{\max}$ (MeOH) nm (log ϵ): 204 (3.76), 221 (3.71), 252 (3.65), 280 (3.29), 326 (3.62); IR $\nu_{\max}$ (neat) cm^{-1} : 3243, 1688, 1664; ^1H NMR (300 MHz, acetone- d_6): δ 12.60 (1H, *s*, 1-OH), 8.33 (1H, *m*, H-8), 8.28 (1H, *m*, H-5), 7.81 (1H, *s*, H-4), 7.97 (2H, *m*, H-6, H-7), 7.37 (1H, *s*, H-2), 4.80 (3H, *s*, H_3 -11); ^{13}C NMR (75 MHz, acetone- d_6): δ 188.4 (C-9), 182.0 (C-10), 162.9 (C-1), 153.4 (C-3), 134.8 (C-6), 134.4 (C-7), 133.6 (C-8a), 133.7 (C-4a), 133.3 (C-10a), 127.0 (C-5), 126.6 (C-8), 120.3 (C-2), 116.9 (C-4), 114.8 (C-9a), 62.9 (C-11).

2-Methylquinizarin (9)

Yellow gum; UV $\lambda_{\max}$ (MeOH) nm (log ϵ): 202 (2.99), 222 (2.91), 249 (2.83), 282 (2.29); IR $\nu_{\max}$ (neat) cm^{-1} : 3247, 1690, 1660; ^1H NMR (300 MHz, acetone- d_6): δ 13.40 (1H, *s*, 4-OH), 12.95 (1H, *s*, 1-OH), 8.37 (2H, *m*, H-5, H-8), 8.00 (2H, *m*, H-6, H-7), 7.32 (1H, *q*, $J = 1.0$ Hz, H-2), 2.38 (1H, *d*, $J = 1.0$, H_3 -11); ^{13}C NMR (75 MHz, acetone- d_6): δ 188.3 (C-10), 187.5 (C-9), 158.6 (C-1), 158.0 (C-4), 141.9 (C-3), 135.8 (C-7)^a, 135.6 (C-6)^a, 134.6 (C-10a), 134.4 (C-8a), 129.7 (C-2), 127.7 (C-8)^b, 127.6 (C-5)^b, 112.8 (C-4a), 112.0 (C-9a), 16.4 (C-11); ^{a, b} may be interchangeable.

ω -Hydroxypachybasin (10)

Yellow gum; UV $\lambda_{\max}$ (MeOH) nm (log ϵ): 224 (3.96), 246 (4.06), 255 (4.07), 281 (3.72), 328 (3.10), 401 (3.41); IR $\nu_{\max}$ (neat) cm^{-1} : 3192, 1673, 1668; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 12.63 (1H, *s*, 1-OH), 8.32 (1H, *m*, H-5), 8.30 (1H, *m*, H-8), 7.83 (1H, *m*, H-7), 7.82 (1H, *m*, H-6), 7.81 (1H, *m*, H-4), 7.35 (1H, *m*, H-2), 4.83 (2H, *s*, H_2 -11); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 188.3 (C-9), 182.4 (C-10), 163.1 (C-1), 150.9 (C-3), 134.6 (C-6), 134.2 (C-7), 133.7 (C-4a), 133.6 (C-8a), 133.3 (C-10a), 127.5 (C-8), 126.9 (C-5), 121.2 (C-2), 117.3 (C-4), 115.3 (C-9a), 64.2 (C-11).

Chrysophanol (11)

Yellow gum; UV $\lambda_{\max}$ (MeOH) nm (log ϵ): 224 (3.58), 255 (3.33), 277 (3.01), 287 (3.02), 429 (3.07); IR $\nu_{\max}$ (neat) cm^{-1} : 3337, 1688, 1675; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 12.13 (1H, *s*, 8-OH), 12.02 (1H, *s*, 1-OH), 7.82 (1H, *dd*, $J = 8.4, 1.2$ Hz, H-5), 7.68 (1H, *t*, $J = 8.4$ Hz, H-6), 7.65 (1H, *d*, $J = 1.5$ Hz, H-4), 7.29 (1H, *dd*, $J = 8.4, 1.2$ Hz, H-7), 7.10 (1H, *brs*, H-2), 2.47 (3H, *s*, H_3 -11); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 192.6 (C-9), 182.0 (C-10), 162.8 (C-1), 162.5 (C-8), 149.3 (C-3), 136.9 (C-6), 133.7 (C-4a), 133.3 (C-10a), 124.6 (C-7), 124.4 (C-2), 121.4 (C-4), 119.9 (C-5), 115.9 (C-8a), 113.8 (C-9a), 22.2 (C-11).

Emodin (12)

Yellow gum; UV $\lambda_{\max}$ (MeOH) nm (log ϵ): 218 (3.84), 254 (3.60), 264 (3.60), 287 (3.55), 431 (3.19); IR $\nu_{\max}$ (neat) cm^{-1} : 3373, 1689, 1662; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 12.17 (1H, *s*, 8-OH), 12.05 (1H, *s*, 1-OH), 7.54 (1H, *s*, H-4), 7.23 (1H, *d*, $J = 2.4$ Hz, H-5), 7.11 (1H, *s*, H-2), 6.64 (1H, *d*, $J = 2.4$ Hz, H-7), 2.45 (3H, *s*, H_3 -11); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 190.7 (C-9), 181.3 (C-10), 165.7 (C-6), 165.4 (C-8), 162.4 (C-1), 148.6

(C-3), 135.7 (C-10a), 133.3 (C-4a), 124.0 (C-2), 120.6 (C-4), 113.6 (C-9a), 109.4 (C-8a), 108.9 (C-5), 108.0 (C-7), 21.1 (C-11).

ω -Hydroxyemodin (13)

Yellow gum; UV $\lambda_{\max}$ (MeOH) nm (log ϵ): 221 (3.21), 272 (3.10), 289 (2.93), 393 (3.47); IR $\nu_{\max}$ (neat) cm^{-1} : 3372, 1689, 1660; ^1H NMR (300 MHz, acetone- d_6): δ 12.21 (1H, *s*, 8-OH), 7.75 (1H, *s*, H-4), 7.31 (1H, *s*, H-2), 7.26 (1H, *d*, $J = 1.5$ Hz, H-5), 6.65 (1H, *d*, $J = 1.5$, H-7), 4.78 (2H, *s*, H₂-11); ^{13}C NMR (75 MHz, acetone- d_6): δ 191.5 (C-9), 182.5 (C-10), 167.8 (C-6), 166.5 (C-8), 163.4 (C-1), 153.7 (C-3), 136.7 (C-10a), 134.5 (C-4a), 121.7 (C-2), 118.1 (C-4), 115.4 (C-9a), 110.5 (C-5), 110.0 (C-8a), 108.9 (C-7), 63.7 (C-11).

Acetonide formation of 3

p-Toluenesulfonic acid (1.0 mg) was added to a solution of the diol **3** (1.2 mg) in 2,2-dimethoxypropane (0.6 mL). The solution was stirred at room temperature for 4 hours. Saturated aqueous NaHCO_3 (3 mL) was then added, and the mixture was extracted with CH_2Cl_2 (3 x 2 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure to obtain the acetonide **14** (1.7 mg).

Acetonide of coniothranthraquinone 1 (14)

Yellow gum; $[\alpha]_D^{26} -13.7$ (*c* 0.64, CHCl_3); UV $\lambda_{\max}$ (MeOH) nm (log ϵ): 250 (3.75), 277 (3.77), 426 (3.47); IR $\nu_{\max}$ (neat) cm^{-1} : 3232, 1662, 1635; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 11.97 (1H, *s*, 1-OH), 7.40 (1H, *d*, $J = 1.0$ Hz, H-4), 6.97 (1H, *q*, $J = 0.5$ Hz, H-2), 4.59 (2H, *m*, H-6, H-7), 3.22 (2H, *dm*, $J = 16.5$ Hz, H_a-5, H_a-8), 2.35 (3H, *s*, H₃-11), 2.24 (2H, *dm*, $J = 16.5$ Hz, H_b-5, H_b-8), 1.25 (3H, *s*, H₃-13), 1.17 (3H, *s*, H₃-14); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 187.9 (C-9), 182.8 (C-10), 161.7 (C-1), 147.8 (C-3), 143.9 (C-8a),^a 142.4 (C-10a),^a 131.9 (C-4a), 120.6 (C-2), 123.8 (C-4), 112.8 (C-9a), 108.3 (C-12), 72.8 (C-6, C-7), 26.5 (C-8),^b 26.2 (C-14), 25.3 (C-5),^b 24.3 (C-13), 22.1 (C-11); EIMS m/z (% relative intensity): 314 (24), 299 (100), 256 (59), 239 (100), 227 (48); HREIMS m/z : $[\text{M}]^+$ 314.1143 (calcd for 314.1149, $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_5$). ^{a,b} may be interchangeable.

Antibacterial activity testing

Antibacterial activity was evaluated against SA and MRSA, using the procedure demonstrated by the Clinical and Laboratory Standards Institute (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2002) and Drummond and Waigh (Drummond and Waigh, 2000).

RESULTS AND DISCUSSION

Trichodermaquinone (**1**) was isolated as a yellow gum and displayed the molecular formula $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$ as determined by high resolution electron impact ionization mass spectrometry (HREIMS). Its (ultraviolet) UV and (infrared) IR spectra exhibited absorption bands indicative of a naphthoquinone moiety (Higa et al., 1998). The ^1H NMR data (Table I) contained signals for one chelated hydroxyl proton (δ_{H} 12.12, *s*) two *meta*-coupled aromatic protons (δ_{H} 7.58 and 7.26, each *d*, $J = 1.2$ Hz, 1H), two oxymethine protons (δ_{H} 4.05, *m*, 2H) and two methylene groups (δ_{H} 2.80 and 2.77, each *m*, 2H) along with one hydroxymethylene signal (δ_{H} 4.74, *s*, 2H). The ^{13}C NMR spectrum (Table I) displayed resonances for two carbonyls (δ_{C} 189.7 and 183.4), six quaternarys (δ_{C} 161.5, 152.4, 143.4, 141.8, 132.3 and 113.6), two aromatic methines (δ_{C} 120.0 and 116.3), one resonance for two oxymethines (δ_{C} 67.4), two methylenes (δ_{C} 28.4 and 29.1) and one oxymethylene (δ_{C} 62.9). The chelated hydroxy proton was placed at C-1 (δ_{C} 161.5), *peri*-position to the carbonyl carbon (C-9, δ_{C} 189.7), and gave the 3J HMBC cross peaks with C-2 (δ_{C} 120.0) and C-9a (δ_{C} 113.6). One of two *meta*-aromatic protons resonated at δ_{H} 7.26 was attributed to H-2 on the basis of its HMQC

correlation with C-2. The remaining aromatic proton (δ_{H} 7.58) was then assigned as H-4 which displayed the 3J HMBC correlations with C-2, C-9a and C-10 (δ_{C} 183.4). These data and the chemical shift of H-4 attached the other ketone carbonyl group at C-4a (δ_{C} 132.3). The hydroxymethyl group, H₂-11 (δ_{H} 4.74), was connected to C-3 (δ_{C} 152.4) due to its 3J HMBC correlations with C-2 and C-4 (δ_{C} 116.3). On the basis of the following ^1H - ^1H COSY data: H_{ab}-5 and H_{ab}-8 (δ_{H} 2.80 and 2.77)/H-6 and H-7 (δ_{H} 4.05) as well as their chemical shifts, a 2,3-dihydroxybutyl unit was established. As H-6 and H-7 of the 2,3-dihydroxybutyl unit displayed the HMBC correlations with C-10a (δ_{C} 141.8) and C-8a (δ_{C} 143.4), a cyclohex-4-ene-1,2-diol unit was established. C-8a and C-10a of the cyclohex-4-ene-1,2-diol unit were connected to the carbonyl carbons C-9 and C10 to form a tetrahydroanthraquinone according to the molecular formula and the chemical shifts of two carbonyl carbons (δ_{C} 189.7 and 183.4), typical carbon resonances of a naphthoquinone moiety (Higa et al., 1998). Finally, **1** was characterized as an 11-hydroxymethyl derivative of **3**. Because **1** and **3** possessed similar specific rotations, they would have the same absolute configurations at C-6 and C-7. The relative configuration of the 1,2-diol in **1** and **3** was determined by converting **3** which was obtained in sufficient amount to its acetonide derivative **14**. In accordance with literature precedents (McCulloch et al., 2009; Isaka et al., 2010; Shao et al., 2011), the relatively dissimilar ^{13}C chemical shifts of the acetonide methyl groups (δ_{C} 24.3 and 26.2) suggested the *syn* configuration of the 1,2-diol. An attempt to determine the absolute configurations of chiral centers C-6 and C-7 was pursued using the Mosher's method (Ohtani et al., 1991). Compound **3** was converted to its (*R*)- and (*S*)-MTPA ester derivatives. Because of overlapping signals of H-6 and H-7 and those of H_{ab}-5 and H_{ab}-8 in both esters, the absolute configurations at C-6 and C-7 remained unidentified. Attempts to determine the absolute configurations of **3** by the exciton chirality method (Harada and Nakanishi, 1972) were unsuccessful since conversions of **3** to its dibenzoate ester led to the undesired aromatized product, pachybasin **7**. However, comparison of the specific rotation of **14**, $[\alpha]_{\text{D}}^{26} -13.7$ (*c* 0.64, CHCl_3), with that of (–)-(6*R*,7*S*)-6,7-(isopropylidenedioxy)-5,6,7,8-tetrahydro-1-naphthol, $[\alpha]_{\text{D}} -22.8$ (*c* 0.64, CHCl_3) (Back et al., 2004), indicated that they should have the same absolute configurations. Consequently, the absolute configurations at C-6 and C-7 in **1** and **3**, corresponding to C-7 and C-6 in **14**, were proposed to be *S* and *R*, respectively.

Trichodermaxanthone (**2**) was isolated as a pale yellow gum. Its molecular formula was determined as $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$ by HRTOFMS measurement calculated for $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6\text{Na}$. The UV absorption bands of the xanthone chromophore were found at 241, 255, 273, 313 and 341 nm (dos Santos et al., 2000) while the IR spectrum exhibited absorption bands for a hydroxyl group at 3315 cm^{-1} and for two carbonyl groups at 1698 and 1650 cm^{-1} . One chelated hydroxy proton resonating at δ_{H} 13.17 (8-OH) exhibited HMBC correlations to C-7 (δ_{C} 98.0), C-8 (δ_{C} 163.9) and C-8a (δ_{C} 102.7) (Table II). One of *meta*-coupled aromatic protons (δ_{H} 6.19, *d*, $J = 2.1\text{ Hz}$) was thus assigned as H-7 because it showed an HMQC correlation with C-7. The other *meta*-coupled aromatic proton (δ_{H} 6.34, *d*, $J = 2.1\text{ Hz}$) was then identified as H-5. This was confirmed by its 3J HMBC correlations with C-7 and C-8a. Two remaining *meta*-coupled aromatic protons at δ_{H} 6.80 (*d*, $J = 2.4\text{ Hz}$) and 6.69 (*d*, $J = 2.4\text{ Hz}$) were assigned as H-4 and H-2, respectively, on the basis of their HMBC correlations: H-2/C-4 (δ_{C} 101.6) and C-9a (δ_{C} 111.5) and H-4/C-2 (δ_{C} 117.7) and C-9a. The presence of a 2-propanoyl unit was established based on the HMBC correlations from both methylene (H₂-11, δ_{H} 4.28) and methyl (H₃-13, δ_{H} 2.27) protons to a ketone carbonyl carbon at δ_{C} 203.4 (C-12). This

unit was connected to the xanthone skeleton at C-1 (δ_C 140.1) on the basis of the HMBC correlations from H₂-11 to C-1 and C-2 as well as the appearance of H₂-11 at lower field due to an anisotropic effect of the xanthone carbonyl group. Based on the carbon chemical shifts of C-3 (δ_C 162.9) and C-6 (δ_C 165.0), the substituents at these carbons must be hydroxyl groups. Consequently, **2** was identified as a new xanthone.

The crude ethyl acetate extracts from the culture broth and mycelia and the crude hexane extract from the mycelia were screened for their antibacterial activity. The mycelial ethyl acetate extract (CE) exhibited better antibacterial activity against SA than the broth ethyl acetate (BE) and mycelial hexane (CH) extracts (Table III). For MRSA, CE and CH displayed equal activity while BE exhibited much weaker activity. The isolated compounds **1**, **3-7**, **12** and **13** with enough quantity were subjected to the antibacterial activity testing against SA and MRSA (Table III). Most of the tested compounds exhibited better antibacterial activity against MRSA than SA while compounds **5** and **7** were inactive against both strains. Among them, compounds **3** and **12** displayed the best activity with moderate and strong effect against SA and MRSA, respectively. Compound **12** was twofold more active than **3** against MRSA.

Our results demonstrated that emodin (**12**) exhibited the antibacterial activity against SA and MRSA similar to those previously reported in the literature (Beattie et al., 2010). Among three anthraquinones (**7**, **12** and **13**), **12** displayed strongest antibacterial activity against both strains. These antibacterial results suggested that both C-3 methyl and C-6 hydroxyl groups in the anthraquinone skeleton is necessary for the antibacterial activity against MRSA. Furthermore, the same pattern was observed between the tetrahydroanthraquinones **1** and **3** wherein **3**, with the C-3 methyl group, was more active than **1** that possesses the hydroxymethyl group.

ACKNOWLEDGEMENTS

N.K. is grateful to the Thailand Research Fund (TRF) through the Royal Golden Jubilee Ph.D. program (Grant No. PHD/0231/2551) for a scholarship. The Center for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), the Office of Higher Education Commission and Prince of Songkla University are acknowledged for partial support. Finally, V.R. thanks the Office of Higher Education Commission and TRF for the Thailand Research Fund (TRF) Senior Research Scholar (Grant No. RTA5180007).

REFERENCES

- Arunpanichlert, J., Rukachaisirikul, V., Sukpondma, Y., Phongpaichit, S., Tewtrakul, S., Rungjindamai, N., and Sakayaroj, J., Azaphilone and isocoumarin derivatives from the endophytic fungus *Penicillium sclerotiorum* PSU-A13. *Chem. Pharm. Bull.*, 58, 1033-1036 (2010).
- Back, T. G., Bey, M. A., Parvez, M., and Pharis, R. P., Enantioselective synthesis of the individual stereoisomers of a brassinolide mimetic. *Tetrahedron: Asymmetry*, 15, 873-880 (2004).
- Barnett, H. L., and Hunter, B. B., Illustrated genera of imperfect fungi. Prentice-Hall Inc., The American Phytopathological Society, USA, 1998.
- Beattie, K. D., Rouf, R., Gander, L., May, T. W., Ratkowsky, D., Donner, C. D., Gill, M., Grice, I. D., and Tiralongo, E., Antibacterial metabolites from Australian macrofungi from the genus *Cortinarius*. *Phytochemistry*, 71, 948-955 (2010).
- Che, Q.-M., Akao, T., Hattori, M., Kobashi, K., and Namba, T., Metabolism of aloesin and related compounds by human intestinal bacteria: a bacterial cleavage of the C-

- glucosyl bound and the subsequent reduction of the acetyl side chain. *Chem. Pharm. Bull.*, 39, 704-708 (1991).
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M7-A4. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, (2002).
- Cohen, P. A., and Towers, G. H. N., Anthraquinones and phenanthroperylenequinones from *Nephroma laevigatum*. *J. Nat. Prod.*, 58, 520-526 (1995).
- Cutler, H. G., Cutler, S. J., Ross, S. A., Sayed, K. E., Dugan, F. M., Bartlett, M. G., Hill, A. A., Hill, R. A., and Parker, S. R., Koniginin G, a new metabolite from *Trichoderma aureoviride*. *J. Nat. Prod.*, 62, 137-139 (1999).
- dos Santos, M. H., Nagem, T. J., da Silva, M. C., and e Silva, L. G. F., Xanthonones from *Vismia latifolia*. *J. Braz. Chem. Soc.* 11, 537-539 (2000).
- Drummond, A. J., and Waigh, R. D., The development of microbiological methods for phytochemical screening. *Recent Res. Devel. Phytochem.*, 4, 143-152 (2000).
- Fujimoto, H., Nakamura, E., Okuyama, E., and Ishibashi, M., Six immunosuppressive features from an ascomycete, *Zopfiella longicaudata*, found in a screening study monitored by immunomodulatory activity. *Chem. Pharm. Bull.*, 52, 1005-1008 (2004).
- Garo, E., Starks, C. M., Jensen, P. R., Fenical, W., Lobkovsky, E., and Clardy, J., Trichodermamides A and B, cytotoxic modified dipeptides from the marine-derived fungus *Trichoderma virens*. *J. Nat. Prod.*, 66, 423-426 (2003).
- Harada, N., and Nakanishi, K., Exciton chirality method and its application to configurational and conformational studies of natural products. *Acc. Chem. Res.*, 5, 257-263 (1972).
- Higa, M., Ogihara K., and Yogi, S., Bioactive naphthoquinone derivatives from *Diospyros maritima* Blume. *Chem. Pharm. Bull.*, 46, 1189-1193 (1998).
- Isaka, M., Chinthanom, P., Kongthong, S., Supothina, S., and Ittiworapong, P., Hamigeromycins C-G, 14-membered macrolides from the fungus *Hamigera avellanea* BCC 17816. *Tetrahedron*, 66, 955-961 (2010).
- Kashiwada, Y., Nonaka, G.-I., and Nishioka, I., Studies on rhubarb (*Rhei Rhizoma*). V. Isolation and characterization of chromone and chromanone derivatives. *Chem. Pharm. Bull.*, 32, 3493-3500 (1984).
- Kuo, S.-C., Chen, P.-R., Lee, S.-W., and Chen, Z.-T., Constituents of roots of *Rubia lanceolata* Hayata. *J. Chin. Chem. Soc.-Taip.*, 42, 869-871 (1995).
- Liu, S.-Y., Lo, C.-T., Chen, C., Liu, M.-Y., Chen, J.-H., and Peng, K.-C., Efficient isolation of anthraquinone-derivatives from *Trichoderma harzianum* ETS 323. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 70, 391-395 (2007).
- McCulloch, M. W. B., Bugni, T. S., Concepcion, G. P., Coombs, G. S., Harper, M. K., Kaur, S., Mangalindan, G. C., Mutizwa, M. M., Veltri, C. A., Virshup, D. M., and Ireland, C. M., Carteriosulfonic acids A-C, GSK-3 β inhibitors from a *Carteriospongia* sp. *J. Nat. Prod.*, 72, 1651-1656 (2009).
- Ngoc, T. M., Minh, P. T. H., Hung, T. M., Thuong, P. T., Lee, I.-S., Min, B.-S., and Bae K.-H., Lipoxygenase inhibitory constituents from rhubarb. *Arch. Pharm. Res.*, 31, 598-605 (2008).
- Ohtani, I., Kusumi, T., Kashman, Y., and Kakisawa, H., High-field FT NMR application of Mosher's method. The absolute configurations of marine terpenoids. *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 4092-4096 (1991).

- Pruksakorn, P., Arai, M., Kotoku, N., Vilchèze, C., Baughn, A. D., Moodley, P., Jacobs, W. R. Jr., and Kobayashi, M., Trichoderins, novel aminolipopeptides from a marine sponge-derived *Trichoderma* sp., are active against dormant mycobacteria. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 20, 3658-3663 (2010).
- Ren, H., Tian, L., Gu, Q., and Zhu, W., Secalonic acid D; A cytotoxic constituent from marine lichen-derived fungus *Gliocladium* sp. T31. *Arch. Pharm. Res.*, 29, 59-63 (2006).
- Shao, C.-L., Wu, H.-X., Wang, C.-Y., Liu, Q.-A., Xu, Y., Wei, M.-Y., Qian, P.-Y., Gu, Y.-C., Zheng, C.-J., She, Z.-G., and Lin, Y.-C., Potent antifouling resorcylic acid lactones from the gorgonian-derived fungus *Cochliobolus lunatus*. *J. Nat. Prod.*, 74, 629-633 (2011).
- Song, F., Dai, H., Tong, Y., Ren, B., Chen, C., Sun, N., Liu, X., Bian, J., Liu, M., Gao, H., Liu, H., Chen, X., and Zhang, L., Trichodermaketones A-D and 7-O-methylkoninginin D from the marine fungus *Trichoderma koningii*. *J. Nat. Prod.*, 73, 806-810 (2010).
- Wu, T.-S., Lin, D.-M., Shi, L.-S., Damu, A. G, Kuo, P.-C., and Kuo, Y.-H., Cytotoxic anthraquinones from the stems of *Rubia wallichiana* Decne. *Chem. Pharm. Bull.*, 51, 948-950 (2003).
- Yi, Y., Huo, J., Zhang, W., Li, L., Sun, P., Liu, B., and Tang, H., Reducing anthraquinone-like compounds with antimicrobial activity. *Faming Zhuanli Shenqing*, CN 101885676 (2010).

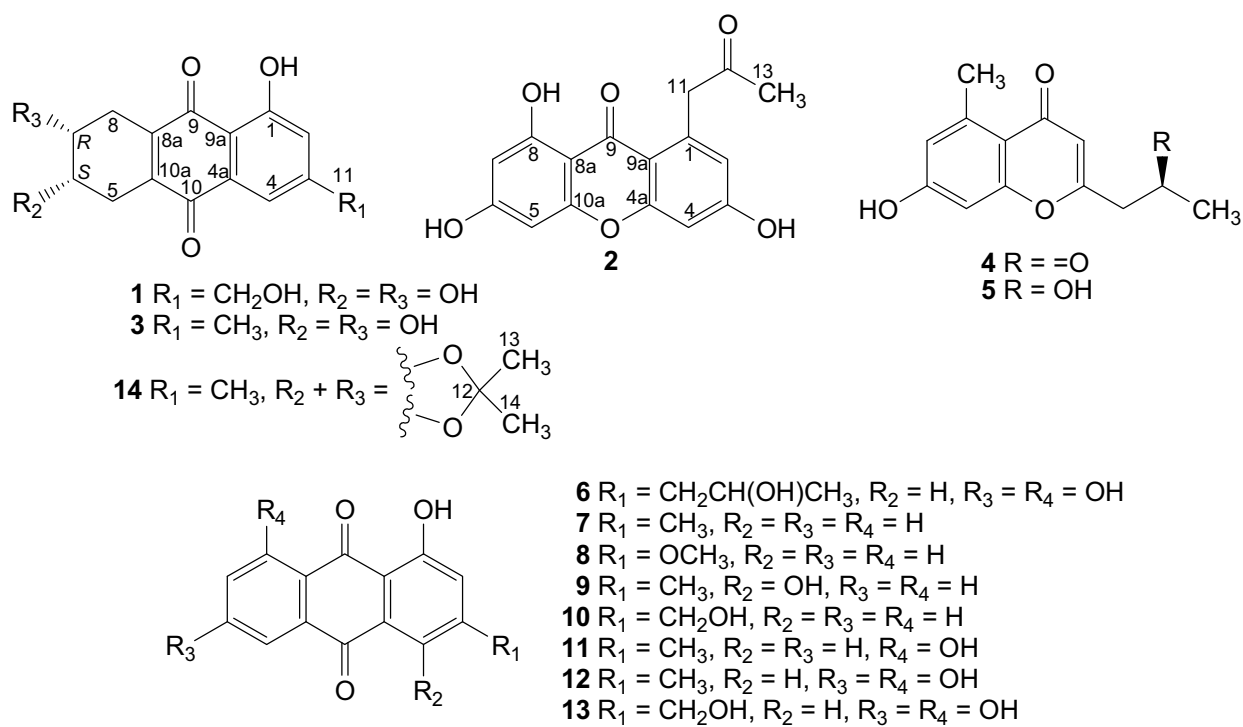


Fig. 1. Structures of compounds 1-14

Table I. ^1H (300 MHz) and ^{13}C (75 MHz) NMR data for trichodermaquinone (**1**) in acetone- d_6

Position	1		
	^1H δ (mult., J , Hz)	^{13}C δ (mult.)	HMBC
1	-	161.5 (C)	-
1-OH	12.12 (s)	-	C-1, C-2, C-9a
2	7.26 (d, 1.2)	120.0 (CH)	C-1, C-4, C-9a, C-11
3	-	152.4 (C)	-
4	7.58 (d, 1.2)	116.3 (CH)	C-2, C-9a, C-10, C-11
4a	-	132.3 (C)	-
5	2.80 (m) 2.77 (m)	28.4 ^a (CH ₂)	C-8a, C-10a
6	4.05 (m)	67.4 (CH)	C-8a ^c
7	4.05 (m)	67.4 (CH)	C-10a ^c
8	2.80 (m) 2.77 (m)	29.1 ^a (CH ₂)	C-8a, C-10a
8a	-	143.4 ^b (C)	-
9	-	189.7 (C)	-
9a	-	113.6 (C)	-
10	-	183.4 (C)	-
10a	-	141.8 ^b (C)	-
11	4.74 (s)	62.9 (CH ₂)	C-2, C-3, C-4

^{a, b, c} Interchangeable

Table II. ^1H (300 MHz) and ^{13}C (75 MHz) NMR data for trichodermaxanthone (**2**) in acetone- d_6

Position	2		
	^1H δ (mult., J , Hz)	^{13}C δ (mult.)	HMBC
1	-	140.1 (C)	-
2	6.69 (d, 2.4)	117.7 (CH)	C-4, C-9a, C-11
3	-	162.9 (C)	-
4	6.80 (d, 2.4)	101.6 (CH)	C-2, C-3, C-4a, C-9a
4a	-	159.3 (C)	-
5	6.34 (d, 2.1)	93.3 (CH)	C-6, C-7, C-8a, C-10a
6	-	165.0 (C)	-
7	6.19 (d, 2.1)	98.0 (CH)	C-5, C-6, C-8, C-8a
8	-	163.9 (C)	-
8-OH	13.17 (s)	-	C-7, C-8, C-9a
8a	-	102.7 (C)	-
9	-	181.4 (C)	-
9a	-	111.5 (C)	-
10a	-	157.3 (C)	-
11	4.28 (s)	49.5 (CH_2)	C-1, C-2, C-9a, C-12
12	-	203.4 (C)	-
13	2.27 (s)	29.2 (CH_3)	C-12

Table III. Antibacterial activity against SA and MRSA of compounds **1**, **3**, **5-7**, **12** and **13**

Extract/ Compound	Antibacterial (MIC, $\mu\text{g/mL}$)	
	SA	MRSA
BE ^a	160	320
CE ^b	80	80
CH ^c	160	80
1	- ^e	200
3	16	8
4	- ^e	200
5	- ^e	- ^e
6	- ^e	16
7	- ^e	- ^e
12	16	4
13	200	32
Vancomycin ^d	1	1

^aBE = ethyl acetate extract from culture broth

^bCE = ethyl acetate extract from mycelia

^cCH = hexane extract from mycelia

^dStandard control drug for antibacterial activity

^eInactive at the initial concentration of 200 $\mu\text{g/mL}$

Manuscript จำนวน 5 เรื่อง

Modiolin and Phthalide Derivatives from the Endophytic Fungus *Microsphaeropsis arundinis*

PSU-G18

Ubonta Sommart,[†] Vatcharin Rukachaisirikul,^{*,†} Kwanruthai Tadpetch,[†] Yaowapa Sukpondma,[†]

Souwalak Phongpaichit,[‡] Nongporn Hutadilok-Towatana[§] and Jariya Sakayaroj[⊥]

[†]*Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Prince of
Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand*

[‡]*Natural Products Research Center and Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of
Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand*

[§]*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla
90112, Thailand*

[⊥]*National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand Science Park, Klong Luang,
Pathumthani 12120, Thailand*

* To whom correspondence should be addressed. Tel: +66-74-288-435.

Fax: +66-74-558-841. E-mail: vatcharin.r@psu.ac.th.

ABSTRACT One new modiolin, microsphaerodiolin (**1**), and seven new phthalides, microsphaerophthalides A-G (**2-8**), together with 12 known compounds were isolated from the endophytic fungus *Microsphaeropsis arundinis* PSU-G18. Their structures were elucidated by spectroscopic methods. Known 1-(2,5-dihydroxyphenyl)-2-buten-1-one displayed significant antifungal activity against *Microsporum gypseum* SH-MU-4 with a MIC value of 8 $\mu\text{g/mL}$ and moderate activity against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* with the equal MIC value of 32 $\mu\text{g/mL}$. In addition, it displayed moderate antimalarial activity against *Plasmodium falciparum* with an IC_{50} value of 9.63 $\mu\text{g/mL}$, and strong antioxidant activity with the IC_{50} value of 0.018 mg/mL.

The *Microsphaeropsis* genus is a rich source of bioactive compounds, such as the antibacterial microsphaerin D,¹ the cytotoxic preussomerins E-I and 3'-*O*-demethylpreussomerin I² and the antibiotic TAN-1496s A, C and E.³ During our ongoing search for bioactive compounds from *Garcinia*-associated endophytic fungi, the ethyl acetate extracts from the culture broth and mycelia of the endophytic fungus *Microsphaeropsis arundinis* PSU-G18 isolated from the leaves of *G. hombroniana* exhibited antioxidant (in the DPPH assay) and antifungal (against *Microsporum gypseum* SH-MU-4) activities. We describe herein the isolation and structural elucidation of one new modiolin, microsphaerodioliol (1), and seven new phthalides, microsphaerophthalides A-G (2-8), along with 12 known compounds: 4-hydroxybenzoic acid,⁴ modiolin (9),⁵ deoxycyclopaldic acid (10),⁶ 5,7-dihydroxy-4,6-dimethyl-1(3*H*)-isobenzofuranone (11),⁷ 5-hydroxy-7-methoxy-4-(methoxymethyl)-6-methylisobenzofuran-1(3*H*)-one (12),⁷ 5-hydroxy-7-methoxy-4,6-dimethylphthalide (13),⁸ 7-methoxy-3,4,5,6-tetramethylphthalide (14),⁹ sclerin (15),¹⁰ 6-hydroxy-2-methyl-4-chromanone (16),¹¹ modioliol B (17),⁵ sclerotinin A (18),¹² and 1-(2,5-dihydroxyphenyl)-2-buten-1-one (19).¹³ In addition, the biological activities, including antioxidant, antifungal, antibacterial and antimalarial activities, of the isolated metabolites are described in this paper.

RESULTS AND DISCUSSION

The EtOAc extracts from the culture broth and mycelia of the fungus *M. arundinis* PSU-G18 was purified upon chromatographic techniques to yield eight new compounds, one modioliol derivative (1) and seven phthalides (2-8), along with twelve known compounds including five phthalides (10-14), two phenols (4-hydroxybenzoic acid and 19), two modioliol derivatives (9 and 17), two 3,4-dihydroisocoumarins (15 and 18) and one chromanone (16). The new phthalide derivatives can be divided into four groups based on a substituent at C-3 of the γ -lactone ring: a nonsubstituted (2 and 3), 3-ethoxy (4, 5 and 6) and 3-methoxy (7 and 8) lactone rings. This is the first report on the isolation of phthalide derivatives from the *Microsphaeropsis* genus.

Microsphaerodioliol (1) obtained as a colorless gum had the molecular formula C₁₂H₁₈O₃ by HREIMS. It exhibited UV absorption bands at 211 and 288 nm while conjugated ester and ketone carbonyl absorption bands were found at 1723 and 1668 cm⁻¹, respectively, in the IR spectrum. The ¹H NMR spectrum contained signals for one ethoxyl group (δ_{H} 4.09, 2H, q, *J* = 7.2 Hz and 1.20, 3H, t, *J* = 7.2 Hz), two *trans*-olefinic protons (δ_{H} 7.28, dd, *J* = 15.0, 11.4 Hz and 5.91, dt, *J* = 15.0, 7.2 Hz, each 1H), two *cis*-olefinic protons (δ_{H} 6.44, t and 5.49, d, each 1H, *J* = 11.4 Hz), three sets of equivalent methylene protons (δ_{H} 2.35, t, *J* = 7.2 Hz, 2.12, m and 1.64, qn, *J* = 7.2 Hz, each 2H) and methyl protons of an acetyl group (δ_{H} 2.04, 3H, s). The ¹³C NMR spectrum showed one ketone carbonyl (δ_{C} 209.5), one ester carbonyl (δ_{C} 166.5), four olefinic methine (δ_{C} 144.8, 144.0, 127.7 and 116.1), four methylene carbons (δ_{C} 59.9, 42.8, 32.2 and 22.7) and two methyl (δ_{C} 30.0 and 14.3) carbons. In the ¹H-¹H COSY spectrum, H₂-7 (δ_{H} 1.64) were coupled with H₂-8 (δ_{H} 2.35) and H₂-6 (δ_{H} 2.12) which were further coupled with one of the *trans*-olefinic protons (H-5, δ_{H} 5.91) (Figure 1). In addition, the remaining *trans*-olefinic proton (H-4, δ_{H} 7.28) was coupled with one of *cis*-olefinic protons (H-3, δ_{H} 6.44). These data revealed the presence of a *cis,trans*-1,3-heptadiene unit. Irradiation of H-5 in the NOEDIFF experiment affected the intensity of H-3 and H₂-6 signals (Figure 1), indicating *s-trans* configuration of a C-3–C-4 bond. The *cis*-olefinic moiety of the diene unit and the ethoxyl group were linked together with the ester carbonyl carbon, C-1 (δ_{C} 166.5), according to the ³*J* HMBC cross peaks of H-3 and H₂-12 (δ_{H} 4.09) with C-1 (Figure 1). The other end of the heptadiene unit was linked with the acetyl group on the basis of the HMBC cross peaks of H₂-7 and H₃-10 (δ_{H} 2.04) with C-9 (δ_{C} 209.5). Consequently, 1 was identified as a *s-trans*-9-oxomodiolin derivative.

Microsphaerophthalide A (2) was isolated as a colorless gum with the molecular formula C₁₃H₁₆O₅ by HREIMS, requiring six degrees of unsaturation. It exhibited UV absorption bands at 261 and 294 nm while the IR spectrum displayed absorption bands for a hydroxyl group and a γ -lactone ring at 3365 and 1756 cm⁻¹, respectively. The ¹H NMR spectrum (Table 1) contained signals for one hydroxy proton (δ_{H} 8.65, 1H, s), two equivalent oxymethylene protons (δ_{H} 5.09, 2H, s), one ethoxymethyl group (δ_{H} 4.63, s,

2H, 3.67, 2H, q, $J = 7.2$ Hz and 1.32, 3H, t, $J = 7.2$ Hz), one methoxyl group (δ_{H} 4.04, 3H, s) and one methyl group (δ_{H} 2.17, 3H, s). The ^{13}C NMR spectrum (Table 1) showed one ester carbonyl (δ_{C} 168.8), six quaternary aromatic (δ_{C} 161.3, 158.2, 144.3, 119.9, 110.5 and 108.4), three methylene (δ_{C} 67.7, 67.3 and 67.2), one methoxy (δ_{C} 62.2) and two methyl (δ_{C} 15.0 and 8.4) carbons. The ethoxymethyl group was established according to the HMBC correlations of H₂-8 (δ_{H} 4.63) with C-10 (δ_{C} 67.2) of an ethoxyl group (Figure 2). These oxymethylene protons also gave cross peaks with C-3a (δ_{C} 144.3), C-4 (δ_{C} 110.5) and C-5 (δ_{C} 161.3) while 6-Me (δ_{H} 2.17) showed cross peaks with C-5, C-6 (δ_{C} 119.9) and C-7 (δ_{C} 158.2). These data together with a HMBC correlation of 7-OMe (δ_{H} 4.04) with C-7 (Figure 2) and the chemical shift of C-5 constructed an aromatic ring bearing the ethoxymethyl, hydroxyl, methyl and methoxyl groups at C-4, C-5, C-6 and C-7, respectively. Accordingly, the hydroxyl signal resonating at δ_{H} 8.65 belonged to 5-OH. This assignment was confirmed by the HMBC correlations from 5-OH to C-4, C-5 and C-6. Signal enhancement of 6-Me and 5-OH upon irradiation of 7-OMe and H₂-8, respectively, in the NOEDIFF experiments (Figure 2) supported the assigned locations of all substituents on the aromatic ring. In addition, a phthalide skeleton with the attachment of the γ -lactone carbonyl group at C-7a (δ_{C} 108.4) was established on the basis of the HMBC cross peaks from H₂-3 (δ_{H} 5.09) to C-1 (δ_{C} 168.8), C-3a, C-4 and C-7a, the IR absorption band at 1756 cm^{-1} and the requirement of six degrees of unsaturation for **2**. Consequently, microsphaerophthalide A had the structure **2**.

Microsphaerophthalide B (**3**) with a molecular formula of $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_5$ assigned by HREIMS, was obtained as a colorless gum. The UV spectrum was similar to that of **2** with an additional absorption band at 361 nm. The IR spectrum showed an additional absorption band for an aldehyde functional group at 1725 cm^{-1} . The ^1H NMR data (Table 1) were similar to those of **2** except for the replacement of the 5-OH and the ethoxymethyl signals in **2** with signals for a chelated hydroxy proton (δ_{H} 12.20, s) and an aldehyde proton (δ_{H} 9.85, s) in **3**. The chelated hydroxyl group was placed at C-7 (δ_{C} 166.9), peri position to the carbonyl group, while the aldehyde moiety was located at C-4 (δ_{C} 110.5) according to the 3J HMBC correlations of the aldehyde proton with C-3a (δ_{C} 152.3) and C-5 (δ_{C} 164.0). The attachment of the methoxyl group at C-5 was established on the basis of the 3J HMBC correlation from 5-OMe (δ_{H} 4.15) to C-5. Consequently, the structure **3** was assigned for microsphaerophthalide B.

Microsphaerophthalide C (**4**) obtained as a colorless gum had the molecular formula $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_6$ by HREIMS. The UV and IR spectra were similar to those of **3**. The ^1H NMR data of **3** and **4** (Tables 2 and 3) were also similar except that the signal for the oxymethylene protons (H₂-3) in **3** was replaced by that of a dioxymethine proton (H-3, δ_{H} 6.52) in **4**. In addition, **4** displayed additional proton signals for one ethoxyl group (δ_{H} 4.06, dq, $J = 10.0$ and 7.5 Hz and 3.92, dq, $J = 10.0$ and 7.5 Hz, each 1H, and δ_{H} 1.36, 3H, t, $J = 7.5$ Hz). The disappearance of the oxymethylene carbon as well as the presence of a dioxymethine carbon (δ_{C} 99.0) and ethoxyl carbons (δ_{C} 65.9 and 15.1) in the ^{13}C NMR spectrum supported the ^1H NMR data. Thus, the dioxymethine proton was attributed to H-3. The 3J HMBC correlations from H-3 and H₂-9 (δ_{H} 4.06 and 3.92) to C-9 (δ_{C} 65.9) and C-3 (δ_{C} 99.0), respectively, linked the ethoxyl group at C-3 of the phthalide unit. This assignment was supported by signal enhancement of H-3 after irradiation of either H₂-9 or H-11 in the NOEDIFF experiment. Therefore, **4** was elucidated as a 3-ethoxyl derivative of **3**.

Microsphaerophthalide D (**5**) was obtained as a colorless gum and its molecular formula was determined as $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_6$ by HREIMS. The ^1H NMR data (Table 2) were similar to those of **4** except for the replacement of the signal for the aldehyde proton in **4** with signals for a methoxymethyl group (H₂-11, δ_{H} 4.81 and 4.66, each 1H, d, $J = 12.9$ Hz and H₃-13, δ_{H} 3.50, 3H, s). The 3J HMBC cross peaks of H₂-11 with C-3a (δ_{C} 142.6) and C-5 (δ_{C} 161.9) confirmed this conclusion. The appearance of a hydroxy proton at δ_{H} 8.70, typical signal for 5-OH in the phthalide, indicated the locations of hydroxyl and methoxyl groups at C-5 and C-7 (δ_{C} 158.0), respectively, identical to those in **1**. The 3J HMBC cross

peaks of 5-OH with C-4 (δ_C 112.4) and C-6 (δ_C 121.6) and that of 7-OMe (δ_H 4.04, s) with C-7 supported this assignment. Consequently, microsphaerophthalide D had the structure **5**.

Microsphaerophthalide E (**6**) had a molecular formula of $C_{15}H_{20}O_6$ by HREIMS. The 1H NMR data (Table 2) indicated that the signals for the methoxymethyl protons in **5** was replaced by signals of an ethoxymethyl group (H_2 -10, δ_H 4.85 and 4.70, each 1H, d, J = 13.2 Hz, H_2 -13, δ_H 3.67, q, J = 7.2 Hz and H_3 -14, δ_H 1.30, t, J = 7.2 Hz) in **6**. The 3J HMBC cross peaks of H_2 -11 with C-3a (δ_C 143.3) and C-5 (δ_C 162.9) linked this ethoxymethyl group at C-4 (δ_C 113.6) of the phthalide unit. Therefore, **6** was identified as a new phthalide derivative.

Microsphaerophthalide F (**7**) had the molecular formula $C_{13}H_{16}O_6$, assigned by HREIMS. The 1H NMR data (Table 3) were similar to those of **5** except that signals of the ethoxyl group at C-3 (δ_C 100.4) in **5** were replaced by signal for a methoxyl group (H_3 -9, δ_H 3.55) in **7**. The 3J HMBC cross peaks of H_3 -9 with C-3 and signal enhancement of these methyl protons after irradiation of H-3 (δ_H 6.11) in the NOEDIFF experiment confirmed the location of the methoxyl group at C-3. Therefore, **7** was a 3-methoxyl derivative of **5**.

Microsphaerophthalide G (**8**) was obtained as a colorless gum. Its molecular formula was determined as $C_{15}H_{18}O_6$ by HREIMS. The 1H NMR data of **8** (Table 3) differed from those of **7** in the presence of two methoxyl signals (δ_H 4.03 and 3.60), instead of three methoxyl signals in **7**, and two additional methyl signals (H_3 -13, δ_H 1.59 and H_3 -14, δ_H 1.57) in **8**. The 3J HMBC cross peaks from H_2 -10 (δ_H 4.95 and 4.75, each 1H, d, J = 15.5 Hz), H_3 -13 and H_3 -14 to C-12 (δ_C 101.0) together with the absence of the 5-OH signal established a fused six membered ring at C-4 (δ_C 110.2) and C-5 (δ_C 155.7) of the phthalide skeleton. Consequently, the structure **8** was assigned for microsphaerophthalide G.

The absolute configurations at C-3 of all isolated phthalides were assigned by comparison of their specific rotations with those of previously reported phthalides. In general, the 3*S*- and 3*R*-phthalides showed negative and positive specific rotations, respectively.¹⁴⁻¹⁵ Due to the negative signs of the specific rotation of all isolated phthalides, all new and known phthalides would have *S* configurations at C-3.

The broth and mycelial extracts of *M. arundinis* PSU-G18 displayed antifungal activity against *M. gypseum* with equal MIC values of 128 μ g/mL. For antioxidant activity with DPPH assay, the latter extract showed an IC_{50} value of 0.73 mg/mL, stronger than that of the broth extract (IC_{50} value of 2.0 mg/mL). Compounds **10**, **12-16**, **18** and **19**, obtained in sufficient amount, were evaluated for antioxidant, antibacterial (against *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus*), antifungal (against *M. gypseum* SH-MU-4, *Candida albicans* NCPF 3153 and *Cryptococcus neoformans* ATCC 90113) and antimalarial (against *Plasmodium falciparum*) activities. All of them were inactive against both bacterial strains at the concentration of 200 μ g/mL. Compounds **2**, **5**, **6** and **11** were tested for only antifungal activity due to the paucity of materials. Compound **19** exhibited significant antifungal activity with the MIC values of 8 μ g/mL, 32 μ g/mL and 32 μ g/mL against *M. gypseum* SH-MU-4, *C. albicans* and *C. neoformans*, respectively, as well as moderate antimalarial activity with an IC_{50} value of 9.63 μ g/mL. It also displayed strong radical scavenging potency with the IC_{50} value of 0.018 mg/mL. Compounds **2** and **15** were moderately active against *M. gypseum* SH-MU-4 with equal MIC values of 64.0 μ g/mL whereas **6** exhibited moderate antifungal activity against *C. neoformans* with the MIC value of 64 μ g/mL. In addition, **6** showed mild activity against *M. gypseum* with the MIC value of 200 μ g/mL. The remaining compounds were inactive for all tests.

EXPERIMENTAL SECTION

General Experiment Procedure. Optical rotations were measured using a JASCO P-1020 polarimeter. Infrared spectra (IR) were recorded on a Perkin Elmer 783 FTS165 FT-IR spectrometer.

Ultraviolet (UV) spectra were measured in MeOH on a SHIMADZU UV-160A spectrophotometer. ^1H - and ^{13}C NMR, along with 2D NMR spectra, were recorded on 300 or 500 MHz Bruker FT-NMR Ultra Shield spectrometer. Mass spectra were obtained on a MAT 95 XL Mass Spectrometer (Thermo Finnigan). Column chromatography (CC) was carried out on Sephadex LH-20 or silica gel (Merck) type 100 (70-230 Mesh ASTM).

Fungal Material and Identification. The endophytic fungus *M. arundinis* PSU-G18 was isolated from the leaves of *G. hombroniana*, collected in Songkhla Province, Thailand, in 2006. This fungus was deposited as PSU-G18 at the Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, and as BCC 35875 in the BIOTEC Culture Collection, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand.

The fungus did not produce any conidia or spores. Consequently, it was identified based on the analysis of the DNA sequences of the internal transcribed spacer (ITS1-5.8S-ITS2) regions of its ribosomal RNA gene. Its ITS sequence (GenBank accession no. HM049172) matched with *Microsphaeropsis arundinis* EF094551 sequence from GenBank with sequence identity of 99.1%. This endophytic fungus was then identified as *M. arundinis*.

Fermentation, Extraction and Isolation. The broth ethyl acetate (5.50 g) and mycelial (0.50 g) extracts were prepared using the same procedure as previously described¹⁶ and were combined because of their similar ^1H NMR signals. The combined extracts were purified by various chromatographic techniques to give compounds **1** (1.7 mg), **2** (2.5 mg), **3** (1.5 mg), **4** (1.4 mg), **5** (2.3 mg), **6** (3.9 mg), **7** (1.5 mg), **8** (1.3 mg) and 12 other known compounds. Details of isolation are described in the Supporting Information.

Microsphaerodiolin (1): colorless gum; UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 211 (4.11), 288 (3.47) nm; FT-IR (neat) ν_{max} 1723, 1668 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ_{H} 7.28 (1H, dd, $J = 15.0$ and 11.4 Hz, H-4), 6.44 (1H, t, $J = 11.4$ Hz, H-3), 5.91 (1H, dt, $J = 15.0$ and 7.2 Hz, H-5), 5.49 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, H-2), 4.09 (2H, q, $J = 7.2$ Hz, H-12), 2.12 (2H, m, H-6), 2.35 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-8), 2.04 (3H, s, Me-10), 1.64 (2H, qn, $J = 7.2$ Hz, H-7), 1.20 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, Me-13); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ_{C} 209.5 (C-9), 166.5 (C-1), 144.8 (C-3), 144.0 (C-5), 127.7 (C-4), 116.1 (C-2), 59.9 (C-12), 42.8 (C-8), 32.2 (C-6), 30.0 (C-10), 22.7 (C-7), 14.3 (C-13); HREIMS m/z $[\text{M}]^+$ 210.1257 (calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_3$, 210.1256).

Microsphaerophthalide A (2): colorless gum; UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 261 (3.75), 294 (3.16) nm; FT-IR (neat) ν_{max} 3365, 1756 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) and ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) spectra, see Table 1; HREIMS m/z $[\text{M}]^+$ 252.0999 (calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_5$, 252.0998).

Microsphaerophthalide B (3): colorless gum; UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 260 (3.98), 291 (3.89), 361 (2.30) nm; FT-IR (neat) ν_{max} 3371, 1765, 1725 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) and ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) spectra, see Table 1; HREIMS m/z $[\text{M}]^+$ 222.0528 (calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_5$, 222.0528).

Microsphaerophthalide C (4): colorless gum; $[\alpha]_{\text{D}}^{28}$ -17.6 (c 0.11, CHCl_3); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 261 (3.01), 289 (2.75), 368 (2.01) nm; FT-IR (neat) ν_{max} 3413, 1759, 1738 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) and ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) spectra, see Table 2; HREIMS m/z $[\text{M}]^+$ 266.0797 (calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_6$, 266.0790).

Microsphaerophthalide D (5): colorless gum; $[\alpha]_{\text{D}}^{28}$ -13.4 (c 0.11, CHCl_3); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 263 (3.27), 297 (2.12) nm; FT-IR (neat) ν_{max} 3317, 1760 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) and ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) spectra, see Table 2; HREIMS m/z $[\text{M}]^+$ 282.1107 (calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_6$, 282.1103).

Microsphaerophthalide E (6): colorless gum; $[\alpha]_{\text{D}}^{28}$ -22.4 (c 0.11, CHCl_3); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 259 (3.36), 297 (2.12) nm; FT-IR (neat) ν_{max} 3281, 1762 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) and ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) spectra, see Table 2; HREIMS m/z $[\text{M}]^+$ 296.1262 (calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_6$, 296.1260).

Microsphaerophthalide F (7): colorless gum; $[\alpha]_{\text{D}}^{28}$ -17.8 (c 0.11, CHCl_3); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 263 (2.85), 305 (2.35) nm; FT-IR (neat) ν_{max} 3300, 1764 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) and ^{13}C

NMR (CDCl₃, 125 MHz) spectra, see Table 3; HREIMS m/z [M]⁺ 268.0938 (calcd for C₁₃H₁₆O₆, 268.0947).

Microsphaerophthalides G (8): colorless gum; [α]_D²⁸ -40.9 (c 0.16, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 264 (3.18), 290 (2.25) nm; FT-IR (neat) $\nu_{\max}$ 3394, 1768 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) and ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) spectra, see Table 3; HREIMS m/z [M]⁺ 294.1105 (calcd for C₁₅H₁₈O₆, 294.1103).

Free Radical Scavenging Activity. Free radical scavenging activity in the DPPH assay was carried out according to the procedure described by Yen and Hsieh.¹⁷ The standard compound used was 2,6-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluene (BHT) (IC₅₀ 0.02 mg/mL).

Antimicrobial Assays Using a Colorimetric Broth Microdilution Test. Antimicrobial activity was evaluated as described by the Clinical and Laboratory Standards Institute¹⁸⁻²⁰ and Drummond and Waigh.²¹ Vancomycin, amphotericin B and miconazole were used as positive controls for *S. aureus* and MRSA, *C. albicans* and *C. neoformans*, and *M. gypseum*, respectively. Vancomycin, amphotericin B and miconazole exhibited the MIC values of 1, 0.25 and 1 μ g/mL, respectively.

Antimalarial Assay. The activity was determined against the parasite *P. falciparum* (K1, multidrug-resistant strain), using the microculture radioisotope technique based on the method described.²² The standard compound was dihydroartemisinin (IC₅₀ 0.0012 μ g/mL).

ACKNOWLEDGMENT

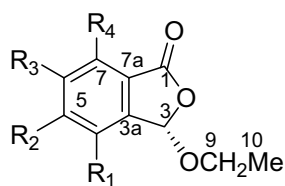
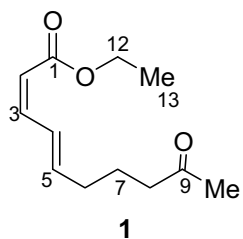
V. Rukachaisirikul thanks the Commission on Higher Education and the Thailand Research Fund for the TRF Senior Research Scholar (Grant No. RTA5180007). U. Sommart thanks the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program of the Thailand Research Fund (Grant No. PHD/0232/2549) and the Center for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC) for a scholarship. Finally, the Graduate School, Prince of Songkla University, is gratefully acknowledged for partial support.

Supporting Information Available. Isolation diagram, ¹H and ¹³C NMR spectra of compounds **1-8** as well as their HMBC correlations are available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

REFERENCES

- (1) Yoganathan, K.; Cao, S.; Crasta, S. C.; Aitipamula, S.; Whitton, S. R.; Ng, S.; Buss, A. D.; Butler, M. S. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 10181-10187.
- (2) Seephonkai, P.; Isaka, M.; Kittakoo, P.; Palittapongarnpim, P.; Kamchonwongpaisan, S.; Tanticharoen, M.; Thebtaranonth, Y. *Planta Med.* **2002**, *68*, 45-48.
- (3) Funabashi, Y.; Horiguchi, T.; Iinuma, S.; Tanida, S.; Harada, S. *J. Antibiot.* **1994**, *47*, 1202-1218.
- (4) Cho, J.-Y.; Moon, J.-H.; Seong, K.-Y.; Park, K.-H. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1998**, *62*, 2273-2276.
- (5) Tsuda, M.; Mugishima, T.; Komatsu, K.; Sone, T.; Tanaka, M.; Mikami, Y.; Kobayashi, J. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 412-415.
- (6) Shimada, A.; Nakaya, K.; Takeuchi, S.; Kimura, Y. *Z. Naturforsch. B: Chem. Sci.* **2001**, *56*, 449-451.
- (7) Achenbach, H.; Muehlenfeld, A.; Brillinger, G. U. *Liebigs Ann. Chem.* **1985**, *8*, 1596-1628.
- (8) Yu, Z.; Wang, G.; Bianba, C.; Lin, R. *Zhongguo Zhongyao Zazhishe* **2006**, *31*, 656-658.
- (9) Kubota, T.; Tokoroyama, T.; Kamikawa, T.; Satomura, Y. *Tetrahedron Lett.* **1966**, *42*, 5205-5210.
- (10) Natsume, M.; Takahashi, Y.; Marumo, S. *Agric. Biol. Chem.* **1988**, *52*, 307-312.
- (11) Bhilabutra, W.; Techowisan, T.; Peberdy, J. F.; Lumyong, S. *Res. J. Microbiol.* **2007**, *2*, 749-755.

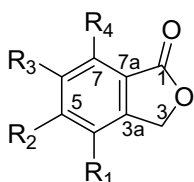
- (12) Sassa. T.; Aoki, H.; Namiki, M.; Munakata, K. *Agric. Biol. Chem.* **1968**, *32*, 1432-1439.
- (13) Kraus, G. A.; Kirihaara, M. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 3256-3257.
- (14) Tianpanich, K.; Prachya, S.; Wiyakrutta, S.; Mahidol, C.; Ruchirawat, S.; Kittakoop, P. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 79-81.
- (15) Sakamoto, M.; Takahashi, M.; Moriizumi, S.; Yamaguchi, K.; Fujita, T.; Watanabe, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8138-8139.
- (16) Sommart, U.; Rukachaisirikul, V.; Sukpondma, Y.; Phongpaichit, S.; Sakayaroj, J.; Kirtikara, K. *Chem. Pharm. Bull.* **2008**, *56*, 1687-1690.
- (17) Yen G.-C.; Hsieh G.-L. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1997**, *61*, 1646-1649.
- (18) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M7-A4. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, 2002a.
- (19) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard, 2nd ed. M27-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, 2002b.
- (20) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: Approved Standard. CLSI documents M38-A. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, 2002c.
- (21) Drummond, A. J.; Waigh, R. D. *Recent Res. Dev. Phytochem.* **2000**, *4*, 143-152.
- (22) Desjardins, R. E.; Canfield, C. J.; Haynes, J. D.; Chulay, J. D. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1979**, *16*, 710-718.



4 : $R_1 = \text{CHO}$, $R_2 = \text{OMe}$, $R_3 = \text{Me}$, $R_4 = \text{OH}$

5 : $R_1 = \text{CH}_2\text{OMe}$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{Me}$, $R_4 = \text{OMe}$

6 : $R_1 = \text{CH}_2\text{OCH}_2\text{Me}$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{Me}$, $R_4 = \text{OMe}$



2 : $R_1 = \text{CH}_2\text{OCH}_2\text{Me}$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{Me}$, $R_4 = \text{OMe}$

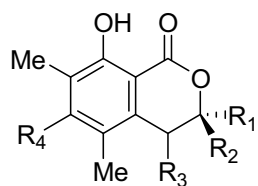
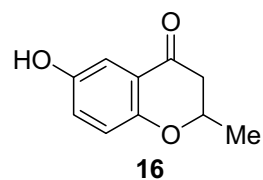
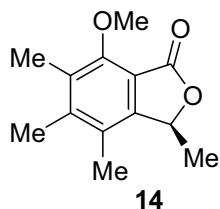
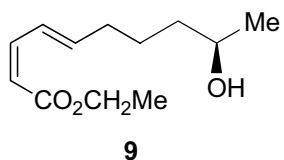
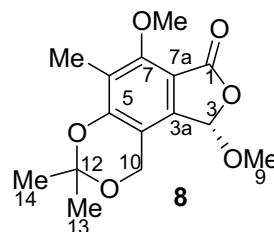
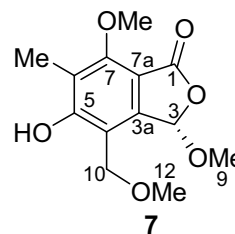
3 : $R_1 = \text{CHO}$, $R_2 = \text{OMe}$, $R_3 = \text{Me}$, $R_4 = \text{OH}$

10 : $R_1 = \text{CHO}$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{Me}$, $R_4 = \text{OMe}$

11 : $R_1 = R_3 = \text{Me}$, $R_2 = R_4 = \text{OH}$

12 : $R_1 = \text{CH}_2\text{OMe}$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{Me}$, $R_4 = \text{OMe}$

13 : $R_1 = R_3 = \text{Me}$, $R_2 = \text{OH}$, $R_4 = \text{OMe}$



15 : $R_1 + R_2 = \text{O}$, $R_3 = R_4 = \text{Me}$

18 : $R_1 = R_3 = \text{Me}$, $R_2 = R_4 = \text{OH}$

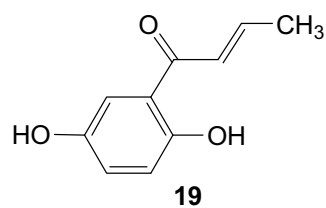
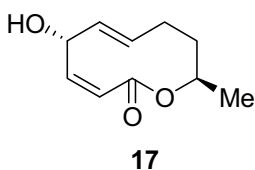


Table 1. ^1H and ^{13}C NMR Data for Microsphaerophthalides A (**2**) and B (**3**)

2			3	
Position	δ_{C}	δ_{H} m (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}	δ_{H} m (<i>J</i> in Hz)
1	168.8, C		166.9, C	
3	67.3, CH ₂	5.09, s	66.7, CH ₂	5.45, s
3a	144.3, C		152.3, C	
4	110.5, C		109.0, C	
5	161.3, C		164.0, C	
5-OH		8.65, s		
5-OMe			62.9, CH ₃	4.15, s
6	119.9, C		120.0, C	
6-Me	8.4, CH ₃	2.17, s	8.0, CH ₃	2.10, s
7	158.2, C		166.9, C	
7-OH				12.20, s
7-OMe	62.2, CH ₃	4.04, s		
7a	108.4, C		110.3, C	
8	67.7, CH ₂	4.63, s	189.9, CH	9.85, s
10	67.2, CH ₂	3.67, q (7.2)		
11	15.0, CH ₃	1.32, t (7.2)		

Table 2. ^1H and ^{13}C NMR Data for Microsphaerophthalides C (**4**), D (**5**) and E (**6**)

4			5		6	
Position	δ_{C}	δ_{H} m (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}	δ_{H} m (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}	δ_{H} m (<i>J</i> in Hz)
1	165.0, C		167.0, C		167.3, C	
3	99.0, CH	6.52, s	99.6, CH	6.17, s	100.5, CH	6.16 (s)
3a	157.3, C		142.6, C		143.3, C	
4	111.4, C		112.4, C		113.6, C	
5	162.9, C		161.9, C		162.9, C	
5-OH				8.70, s		8.96 (s)
5-OMe	63.0, CH ₃	4.23, s				
6	121.8, C		121.6, C		122.5, C	
6-Me	8.1, CH ₃	2.19, s	8.5, CH ₃	2.16, s		
7	167.0, C		158.0, C		158.8, C	
7-OH		12.25, s				
7-OMe			62.2, CH ₃	4.04, s	63.0, CH ₃	4.03, s
7a	111.4, C		109.2, C		110.0, C	
9	65.9, CH ₂	4.06, dq (10.0, 7.5)	64.9, CH ₂	3.91, dq (9.3, 7.2)	65.8, CH ₂	3.90, dq (9.3, 7.2)
		3.92, dq (10.0, 7.5)		3.79, dq (9.3, 7.2)		3.78, dq (9.3, 7.2)
10	15.1, CH ₃	1.36, t (7.5)	15.1, CH ₃	1.30, t (7.2)	16.0, CH ₃	1.30, t (7.2)
11	191.8, CH	10.12, s	69.2, CH ₂	4.81, d (12.9)	68.2, CH ₂	4.85, d (13.2)
				4.66, d (12.9)		4.70, d (13.2)
13			58.72, CH ₃	3.50, s	67.8, CH ₂	3.67, q (7.2)
14					15.8, CH ₃	1.30, t (7.2)

Table 3. ^1H and ^{13}C NMR Data for Microsphaerophthalides F (**7**) and G (**8**)

Position	7		8	
	δ_{C}	δ_{H} m (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}	δ_{H} m (<i>J</i> in Hz)
1	165.0, C		166.5, C	
3	100.4, CH	6.11, s	100.4, CH	6.08, s
3a	142.0, C		140.0, C	
4	112.0, C		110.2, C	
5	162.0, C		155.7, C	
5-OH		8.74, s		
6	122.0, C		122.1, C	
6-Me	8.5, CH ₃	2.16, s	8.3, CH ₃	2.11, s
7	158.0, C		156.4, C	
7-OMe	62.2, CH ₃	4.04, s	62.2, CH ₃	4.03, s
7a	109.0, C		109.9, C	
8				
9	55.8, CH ₃	3.55, s	55.9, CH ₃	3.60, s
10	69.4, CH ₂	4.79, d (13.0)	57.9, CH ₂	4.95, d (15.5)
		4.65, d (13.0)		4.75, d (15.5)
11				
12	58.8, CH ₃	3.51, s	101.0, C	
13			25.5, CH ₃	1.59, s
14			24.3, CH ₃	1.57, s

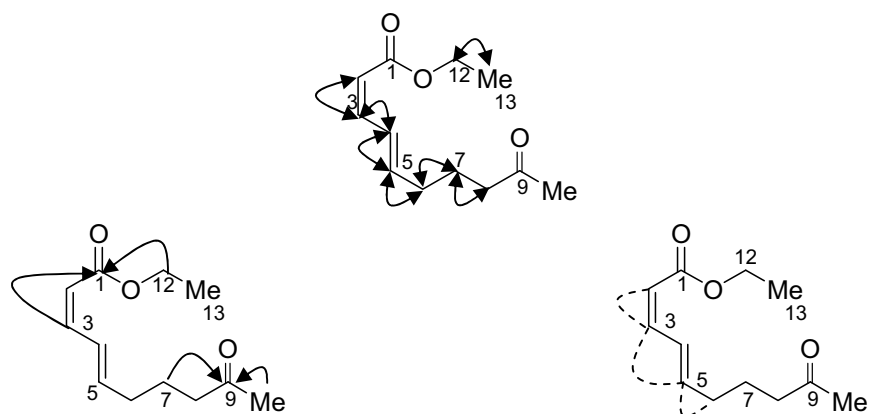


Figure 1. selected ^1H - ^1H COSY (↔), HMBC (↗) and NOEDIFF (---) data of **1**.

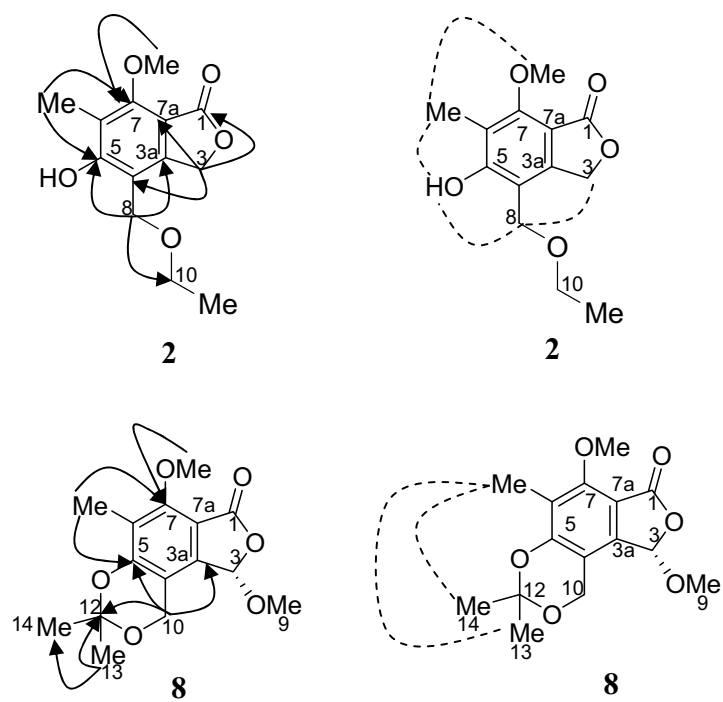
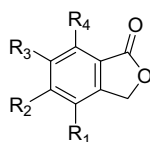
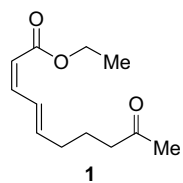
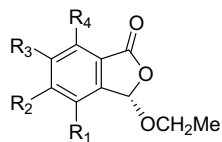


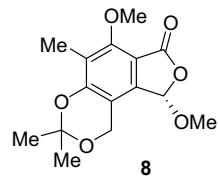
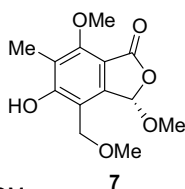
Figure 2. Selected HMBC (—) and NOEDIFF (---) data of **2** and **8**.



- 2 : $R_1 = \text{CH}_2\text{OCH}_2\text{Me}$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{Me}$, $R_4 = \text{OMe}$
 3 : $R_1 = \text{CHO}$, $R_2 = \text{OMe}$, $R_3 = \text{Me}$, $R_4 = \text{OH}$



- 4 : $R_1 = \text{CHO}$, $R_2 = \text{OMe}$, $R_3 = \text{Me}$, $R_4 = \text{OH}$
 5 : $R_1 = \text{CH}_2\text{OMe}$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{Me}$, $R_4 = \text{OMe}$
 6 : $R_1 = \text{CH}_2\text{OCH}_2\text{Me}$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{Me}$, $R_4 = \text{OMe}$



Fungal Metabolites from the Endophytic Fungus

Xylaria sp. PSU-STD70

Wipapan Pongcharoen,^{a,*} Vatcharin Rukachaisirikul,^b Souwalak Phongpaichit,^c

Jariya Sakayaroj^d

^a*Programe of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Songkhla Rajabhut University, Songkhla
90000, Thailand*

^b*Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla
University, Songkhla 90112, Thailand*

^c*Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla 90112,
Thailand*

^d*National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Thailand Science Park, Klong
Luang, Pathumthani 12120, Thailand.*

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +66-74-288-435.

Fax: +66-74-212-918. E-mail: vatcharin.r@psu.ac.th

Abstract

One new tyrosol derivative, xylarosol (**1**), and one new sesquiterpene, xylariterpenes (**2**), were isolated from the broth extract of the endophytic fungus *Xylaria* sp. PSU-STD70 along with six known compounds, cytochalasin D (**3**), 5-methoxycarbonylmellein (**4**), (*R*)-(-)-mellein methyl ether (**5**), tyrosol (**6**), 1,6-dihydroxy-3-methoxy-8-methylxanthone (**7**) and 5-carboxymellein (**8**). The structures were assigned by spectroscopic methods. All compounds were tested for antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *S. aureus* and *Microsporum gypseum*.

Keywords: *Xylaria* sp.; tyrosol; mellein; antimicrobial activity

1. Introduction

Fungi belonging to the genus *Xylaria* are a source of bioactive metabolites. These include the cytotoxic hydroxycamptothecins¹, the antibacterial cytochalasins² and the cytotoxic tetralones³. The ethyl acetate extracts from the culture broth and mycelia of *Xylaria* sp. PSU-STD70 isolated from midrib of a mangrove *Avicennia alba* Bl. exhibited very mild antimicrobial activities against *Staphylococcus aureus* (SA), methicillin-resistant SA and *Microsporum gypseum*. We describe herein the isolation and structural elucidation of one new tyrosol derivative, xylarosol (**1**) and one new sesquiterpene, xylariterpene (**2**), along with six known compounds, cytochalasin D (**3**),⁴ 5-methoxycarbonylmellein (**4**),⁵ (*R*)-(-)-mellein methyl ether (**5**),⁶ tyrosol (**6**),⁷ 1,6-dihydroxy-3-methoxy-8-methylxanthone (**7**)⁸ and 5-carboxymellein (**8**)⁵. All isolated compounds were tested for antimicrobial activity against SA, MRSA and *Microsporum gypseum*.

2. Results and Discussion

The crude extracts from the culture broth and mycelia of the fungus PSU-STD70 were purified using various chromatographic techniques. Compounds **1-7** were obtained from the broth extract while the mycelial extract provided compounds **4-5** and **8**. Their structures were assigned by spectroscopic methods. For known compounds, their NMR data as well as specific rotations were compared with those previously reported.

Xylarosol (**1**) was obtained as a yellow gum with $[\alpha]_D^{28} -0.72$ (*c* 0.90, MeOH). The UV spectrum showed absorption bands at 224, 277 and 284 nm, indicating the presence of a benzene chromophore. Its IR spectrum showed an absorption band at 3370 cm^{-1} for a hydroxyl group. The HREI-MS showed the molecular formula $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_3$. The ^1H NMR spectrum (Table 1) showed signals for four aromatic protons of a *para*-disubstituted benzene [δ_{H} 7.15 (*d*, $J = 8.7$ Hz, 2H) and 6.88 (*d*, $J = 8.7$ Hz, 2H)], one oxymethine proton (δ_{H} 4.47, *dd*, $J = 8.1$ and 3.3 Hz, 1H), two oxymethylene groups [δ_{H} 4.04 (*dd*, $J = 9.6$ and 3.3 Hz, 1H), 3.91 (*dd*, $J = 9.6$ and 3.3 Hz, 1H) and 3.83 (*t*, $J = 6.6$ Hz, 2H)], two gem olefinic protons (δ_{H} 5.15, *brs* and 5.01, *brd*, $J = 0.6$ Hz, each 1H), one methylene group (δ_{H} 2.82, *t*, $J = 6.6$ Hz, 2H), and one methyl group (δ_{H} 1.82, *s*). The ^{13}C NMR spectrum showed 11 signals for 13 carbons supporting the presence of *para*-disubstituted benzene in the ^1H NMR data. In the ^1H - ^1H COSY spectrum, the methylene protons, H₂-1'' (δ_{H} 2.82), were coupled with the oxymethylene protons, H₂-2'' (δ_{H} 3.83), indicating the presence of a hydroxyethyl unit. This unit was attached at C-4' (δ_{C} 131.1) on the basis of HMBC correlations from H₂-1'' to C-3' (δ_{C} 130.1), C-4' and C-5' (δ_{C} 130.1). In addition, the ^1H - ^1H COSY spectrum revealed that the oxymethylene protons, H_{ab}-1 (δ_{H} 4.04 and 3.91), were coupled with the oxymethine proton, H-2 (δ_{H}

4.47). The methyl protons, H₃-5 (δ_{H} 1.82), and gem-olefinic protons, H_{ab}-4 (δ_{H} 5.15 and 5.01), showed cross peaks in the HMBC spectrum with C-2 (δ_{C} 73.6) and C-3 (δ_{C} 143.4), thus constructing a 1,2-dioxy-3-methyl-3-butenyl side chain. The attachment of this side chain at C-1' (δ_{C} 157.3) of the 1,4-disubstituted benzene through an ether linkage was established according to the 3J HMBC correlation from H_{ab}-1 to C-1'. The substituent at C-2 (δ_{C} 73.6) must be a hydroxyl group according to its ^{13}C chemical shift. Therefore, xylarosol (**1**) was determined as a new naturally occurring tyrosol derivative.

Xylariterpene (**2**) was obtained as a colorless gum with $[\alpha]_{\text{D}}^{28}$ 0.76 (*c* 2.5, MeOH). The UV spectrum showed absorption bands at λ_{max} 201 and 223 nm. The IR spectrum exhibited an absorption band at 3402 cm^{-1} for a hydroxyl group. The ^1H NMR spectrum (Table 2) displayed typical signals for one set of nonequivalent oxymethylene protons [δ_{H} 3.50 (*d*, J = 11.0 Hz, 1H) and 3.35 (*d*, J = 11.0 Hz, 1H)], five sets of nonequivalent methylene protons [δ_{H} 2.33 (*dd*, J = 14.0, 6.5 Hz, 1H)/1.28 (*m*, 1H), 2.08 (*dd*, J = 13.5, 5.0 Hz, 1H)/1.60 (*m*, 1H), 1.88 (*m*, 1H)/1.65 (*m*, 1H), 1.85 (*m*, 1H)/1.29 (*m*, 1H) and 1.45 (*m*, 1H)/1.37 (*m*, 1H)], three methine protons [δ_{H} 2.53 (*m*, 1H), 1.82 (*m*, 1H) and 1.77 (*m*, 1H)] and three methyl groups [δ_{H} 1.26 (*s*, 3H), 1.04 (*s*, 3H) and 0.87 (*d*, J = 7.0 Hz, 3H)]. The ^{13}C NMR spectrum (Table 2) showed three oxyquaternary (δ_{C} 90.4, 75.8 and 75.3), three methine (δ_{C} 47.9, 35.5 and 32.9), one oxymethylene (δ_{C} 69.3), five methylene (δ_{C} 32.5, 29.6, 26.8, 24.1 and 18.9) and three methyl (δ_{C} 26.6, 24.3 and 15.0). In the ^1H - ^1H COSY correlations, H_{ab}-3 (δ_{H} 1.85 and 1.29) were coupled with the methylene protons (H_{ab}-2, δ_{H} 2.33 and 1.28) and methine proton (H-4, δ_{H} 2.53) which was further coupled with methine proton (H-5, δ_{H} 1.77) and H₃-15 (δ_{H} 0.87). These results established a butyl unit with a methyl group at C-4 (δ_{C} 35.5). The HMBC correlations from H_b-3 to C-1 (δ_{C} 90.4) and H-5 to C-1 and C-2 (δ_{C} 32.5) and H_b-6 (δ_{H} 1.37) to C-1 and C-5 (δ_{C} 47.9) (Table 2) constructed a cyclopentyl unit with the methyl and methylene groups at C-4 and C-5, respectively. The methylene protons, H_{ab}-9 (δ_{H} 2.08 and 1.60), and methyl protons, H₃-14 (δ_{H} 1.04), were attached at C-10 (δ_{C} 75.8) according to their HMBC correlations. The connectivity of this group at C-1 was established on the basis of the 3J HMBC correlation of H₃-14 with C-1. In addition, the chemical shifts of C-1 and C-10 attached the hydroxyl groups at these carbons. The ^1H - ^1H COSY correlations of H_{ab}-6 (δ_{H} 1.45)/H-7 (δ_{H} 1.82), H-7/H_{ab}-8 (δ_{H} 1.88, 1.65) and H_{ab}-8/H_{ab}-9 as well as the HMBC correlations from both H_b-6 to C-8 (δ_{C} 18.9) and H_a-9 to C-7 and C-10 established a fused cycloheptyl ring having the methyl and hydroxyl groups at C-10. A 2-substituted 1,2-dihydroxypropyl unit was formed on the basis of the HMBC correlations from H₃-13 (δ_{H} 1.26) to C-11 (δ_{C} 75.3) and C-12 (δ_{C} 69.3). This unit was attached at C-7 of the cycloheptyl ring according to HMBC cross peaks of H_{ab}-12 (δ_{H} 3.50 and 3.35) and H₃-13 with C-7. The relative configuration was assigned on the basis of NOEDIFF data (Fig. 1). Irradiation of H_a-2 affected signal intensity of H_b-3 and H₃-14 while signal intensity of H_b-3 and H-5 was enhanced upon irradiation of H-4. In addition, irradiation of H₃-15 and H_{ab}-12 enhanced signal intensity of H_a-6. These results indicated β -*cis* relationship of H_a-2, H_b-3, H-4, H-5 and H₃-14 and α -*cis* relationship of H_a-6, H_{ab}-12 and H₃-15, thus constructing a cis-fused bicyclic skeleton. Therefore, compound **2** was determined as a new naturally occurring guaiane-type sesquiterpene.

3. Conclusion

Cytochalasin D (**3**), (*R*)-(-)-mellein methyl ether (**5**) and 5-carboxymellein (**8**) were isolated from *Xylaria* sp. BCC 9653⁹ while tyrosol (**6**) was produced by *X. longipes*.¹¹ In addition, 5-methoxycarbonylmellein (**4**) was obtained from the family xylariaceae¹⁰. Only 1,6-Dihydroxy-3-methoxy-8-methylxanthone (**7**) was isolated from the genus *Xylaria* for the first time. Compounds **1**, **3** and **5-8** were weakly active against both bacterial strains (SA and MRSA) with a minimum inhibitory concentration (MIC) value of 200 µg/mL, while compound **4** was inactive. However, compound **45** exhibited better activity against *Microsporum gypseum* with the MIC value of 128 µg/mL. Compound **2** was inactive against all tested human pathogens.

4. Experimental

4.1 General Experimental Procedures

Infrared spectra (IR) were recorded as neat on a Perkin Elmer 783 FTS165 FT-IR spectrometer. Ultraviolet (UV) absorption spectra were measured in methanol solution on a SHIMADZU UV-160A spectrophotometer. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a 500 MHz Bruker FTNMR Ultra Shield™ spectrometer, with tetramethylsilane (TMS) as internal standard. Mass spectra were obtained on a MAT 95 XL mass spectrometer (Thermo Finnigan). Optical rotations were measured in methanol solution on a JASCO P-1020 polarimeter. Thin-layer chromatography (TLC) and precoated TLC were performed on silica gel 60 GF₂₅₄ (Merck). Column chromatography (CC) was carried out on silica gel (Merck) type 100 (70-230 Mesh ASTM) or on Sephadex LH20 with MeOH, or as otherwise stated.

4.2 Fungal Material

The endophytic fungus *Xylaria* sp. PSU-STD70 was isolated from midrib of *A. alba* Bl., collected in Suratthani Province, Thailand, in 2006. This fungus was deposited as PSU-STD70 at the Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University.

4.3 Fermentation and Isolation

The endophytic fungus *Xylaria* sp. PSU-STD70 was grown on potato dextrose agar (PDA) and incubated at 25 °C for 5 days. Six agar plugs (1 x 1 cm²) from the edge of the mycelium from an actively growing culture were inoculated into 500 ml Erlenmeyer flasks containing 300 ml potato dextrose broth (PDB) and incubated for 3 weeks at room temperature for production of antimicrobials.¹² The culture broth (15.6 L) was filtered through Whatman #1 to separate the filtrate and mycelia. The filtrate (300x5 mL) was extracted three times with an equal volume of EtOAc (300 mL). The combined EtOAc layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, and evaporated to dryness under reduced pressure to obtain a brown gum (3.02 g). The crude extract was fractionated by CC over Sephadex LH20 to afford seven fractions (A-G). Fraction B (259.8 mg) was subjected to CC over Sephadex LH20 to give three fractions (B1-B3). Fraction B2 (195.1 mg) was separated by CC over Sephadex LH20 to give three subfractions (B21-B23). Subfraction B22 (139.4 mg) was further separated by CC over silica gel with a gradient system of MeOH-CH₂Cl₂ to give **3** (60.6 mg). Fraction C (475.7 mg) upon CC over silica gel yielded five fractions (C1-C5). Fraction C2 (6.0 mg) was subjected to precoated TLC using 40% EtOAc-light petroleum as a mobile phase (2 runs) to give **4** (3.0 mg). Fraction C3 (118.1 mg) was subjected to CC over Sephadex

LH20 to give four subfractions (C31-C34). Subfraction C32 (93.2 mg) upon CC over silica gel with gradient systems of EtOAc-light petroleum and MeOH-EtOAc afforded **1** (6.2 mg), **2** (3.1 mg) and **5** (8.5 mg). Fraction D (267.6 mg) upon CC over silica gel with a gradient system of MeOH-CH₂Cl₂ yielded three fractions (D1-D3). Fraction D5 (38.1 mg) was separated by CC over silica gel with a gradient system of MeOH-CH₂Cl₂ to yield **6** (6.6 mg). Fraction F (35.4 mg) was further subjected to CC over silica gel with gradient systems of EtOAc-light petroleum and MeOH-EtOAc to afford **7** (1.6 mg). The wet mycelia were extracted twice with 500 ml of MeOH for 2 days. The aqueous MeOH layer was concentrated under reduced pressure. To the extract was added H₂O (50 ml), and the mixture was washed with hexane (700 ml). The aqueous layer was extracted three times with an equal volume of EtOAc (300 ml). The combined EtOAc extracts were dried over anhydrous NaSO₄ and then evaporated to dryness under reduced pressure to give a dark brown gum (485.0 mg). The mycelial extract was fractionated by CC over Sephadex LH20 to afford three fractions. The second fraction (70.8 mg) was separated by CC over Sephadex LH20 to afford five subfractions. The third subfraction (22.7 mg) was purified using precoated TLC with 40% EtOAc-light petroleum as a mobile phase (2 runs) to give **4** (4.6 mg) and **5** (4.0 mg). The fourth subfraction (18.0 mg) was further separated using the same procedure as the third subfraction with 50% EtOAc-light petroleum as a mobile phase (2 runs) to give **4** (3.5 mg) and **8** (14.0 mg).

Xylarosol (1)

Yellow gum; $[\alpha]_D^{28}$ -0.72 (*c* 0.90, MeOH); UV (MeOH) nm (log ϵ): 224 (4.36), 277 (3.62) and 284 (3.55); FT-IR (neat, cm⁻¹) 3370; ¹H and ¹³C NMR data see Table 1; EIMS *m/z* (% relative intensity): 222 (13), 138 (23), 107 (100), 77 (8); HR-EIMS *m/z* 222.1253 [M]⁺ (calcd for C₁₃H₁₈O₃: 222.1256).

Xylariterpene A (2)

Colorless gum; $[\alpha]_D^{28}$ +0.76 (*c* 2.5, MeOH); UV (MeOH) nm (log ϵ): 201 (0.49) and 223 (0.04); FT-IR (neat, cm⁻¹) 3402; ¹H and ¹³C NMR data see Table 2.

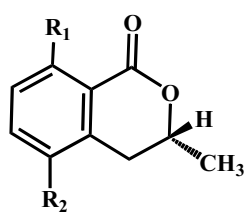
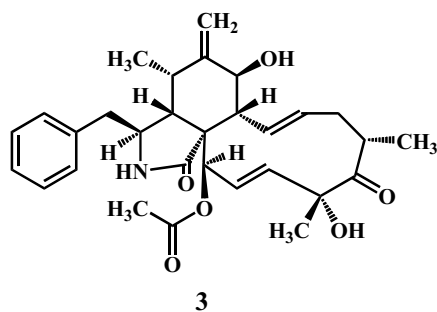
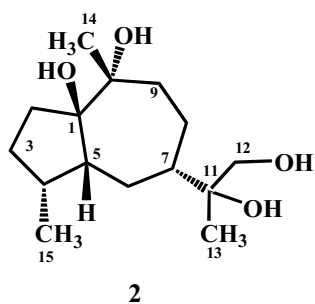
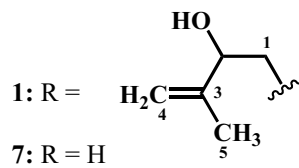
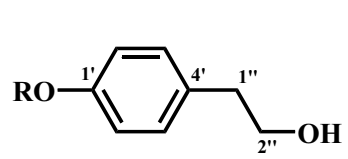
Antimicrobial Activity Testing.

Antibacterial activity was evaluated against SA and MRSA, using the agar microdilution method.¹³ MICs were recorded by reading the lowest substance concentration that inhibited visible growth. Vancomycin, a positive control drug, exhibited the MIC value of 1 µg/mL. Growth controls were performed on the agar containing DMSO. Antifungal activity was evaluated against *M. gypseum* SH-MU-4 using the hyphal extension-inhibition assay.¹⁴ A modification of the NCCLS M38-A broth microdilution test¹⁵ was performed against. Equal volumes of a suspension of conidia (approximately 4x10³ conidia/mL) were added to each test dilution to make final concentrations of 1-128 µg/mL in triplicate. Plates were incubated at 25 °C for 72 h. Miconazole, a standard antifungal agent, gave an MIC value of 9.6 µM. The MICs were recorded for the lowest concentration that resulted in a reduction of approximately 50% of the fungal growth.

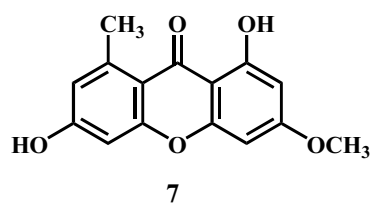
References

1. Liu K., Ding X., Deng B., Chen W. *Biotechnol. Lett.* **2010**, 32, 689–693.
2. Rukachaisirikul V., Khamthong N., Sukpondma Y., Pakawatchai C., Phongpaichit S., Sakayaroj J., Kirtikara K. **2009**, *Chem. Pharm. Bull.*, 57(12), 1409-1411.

3. Gu W., Ding H. *Chin. Chem. Lett.*, **2008**, 19, 1323-1326.
4. Merifield E., Thomas E. J., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1999**, 3269-3283.
5. Anderson J. R., Edwards R. L., Whalley A. J. S. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*. **1983**, 2185-2192.
6. Dimitriadis C., Gill M., Harte M. F. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1997**, 8(13), 2153-2158 (1997).
7. Guzman-Lopez O., Trigos A., Fernandez F. J., Yanez-Morales M., Saucedo-Castaneda G. *World J Microbiol Biotechnol.* **2007**. 23, 1473-1477.
8. Mutanyatta J., Matapa B. G., Shushu D. D., Abegaz B. M. *Phytochemistry*. **2003**, 62, 797-804.
9. Pongcharoen W., Rukachaisikul V., Isaka M., Sriklung K. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**. 55(11) 1647-1648.
10. Anderson J. R., Edwards R. L., Whalley A. J. S. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1983**. 2185-2192.
11. Schneider G., Anke H., Sterner O. *Z. Naturforsch., C: Biosci.* **1996**. 51(11/12), 802-806.
12. Phongpaichit S., Rungjindamai N., Rukachaisirikul V., Sakayaroj J., *Microbiol.* **2006**. 48, 367-372.
13. Lorian V. *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 4th ed.; William and Wilkins: Baltimore, **1996**; 28-32.
14. Huang X. Xie W. Gong Z. *FEBS Lett.* **2000**, 478, 123-126.
15. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard. NCCLS documents M38-A; National Committee for Clinical Laboratory Standards: Wayne, PA, **2002**.



4: R₁ = OH, R₂ = COOCH₃
 5: R₁ = OCH₃, R₂ = H
 8: R₁ = OH, R₂ = COOH



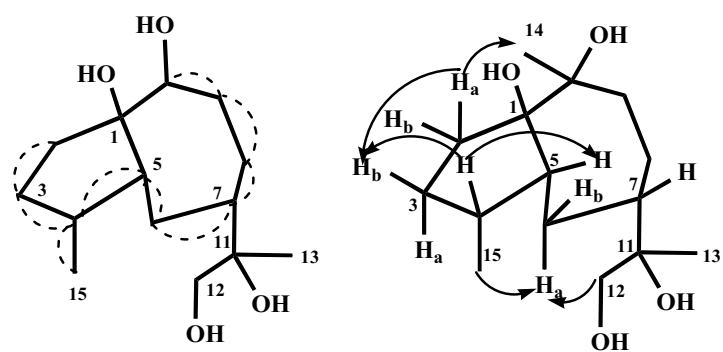


Figure 1. Selected ^1H - ^1H COSY (---) and NOEDIFF (—) data for xylariterpene (**2**)

Table 1 ^1H , ^{13}C NMR and HMBC data of xylarosol (**1**) in CDCl_3

Position	δ_{H} (<i>mult.</i> , J_{Hz})	δ_{C} (C-Type)	HMBC	COSY
1	a: 4.04 (<i>dd</i> , 9.6, 3.3) b: 3.91 (<i>dd</i> , 9.6, 3.3)	71.3 (CH_2)	C-1' , C-2, C-3	H _b -1, H-2 H _a -1, H-2
2	4.47 (<i>dd</i> , 8.1, 3.3)	73.6 (CH)	C-1, C-3, C-5	H _{ab} -1
3	-	143.4 (C)	-	-
4	a: 5.15 (<i>brs</i>) b: 5.01 (<i>brd</i> , 0.6)	112.7 (CH_2)	a: C-2, C-3, C-5 b: C-2, C-5	- H _a -4
5	1.82 (<i>s</i>)	18.9 (CH_3)	C-2, C-3, C-4	-
1'	-	157.3 (C)	-	-
2', 6'	6.88 (<i>d</i> , 8.7)	114.9 (CH)	C-1', C-2', C-3', C-4', C-5', C-6'	H-2', H-3', H-5', H-6'
3', 5'	7.15 (<i>d</i> , 8.7)	130.1 (CH)	C-1', C-2', C-3', C-5', C-6', C-1''	H-2', H-3', H-5', H-6'
4'	-	131.1 (C)	-	-
1''	2.82 (<i>t</i> , 6.6)	38.3 (CH_2)	C-3', C-4', C-5', C-2''	H-2''
2''	3.83 (<i>t</i> , 6.6)	63.8 (CH_2)	C-4', C-1''	H-1''

Table 2 ^1H , ^{13}C NMR and HMBC data of xylariterpene (**2**) in CDCl_3

Position	δ_{H} (<i>mult.</i> , J_{Hz})	δ_{C} (C-Type)	HMBC	NOEDIFF
1	-	90.4 (C)	-	-
2	a: 2.33 (<i>dd</i> , 14.0, 6.5) b: 1.28 (<i>m</i>)	32.5 (CH_2)	C-1, C-3, C-10	H_b -3, H_3 -14
3	a: 1.85 (<i>m</i>) b: 1.29 (<i>m</i>)	29.6 (CH_2)	C-2 C-1, C-2, C-15	-
4	2.53 (<i>m</i>)	35.5 (CH)	C-3, C-6, C-15	H_b -3, H-5, H_3 -15
5	1.77 (<i>m</i>)	47.9 (CH)	C-1, C-2, C-3, C-6	-
6	a: 1.45 (<i>m</i>) b: 1.37 (<i>m</i>)	24.1 (CH_2)	C-1, C-11 C-1, C-5, C-8	-
7	1.82 (<i>m</i>)	32.9 (CH)	C-5, C-8	-
8	a: 1.88 (<i>m</i>) b: 1.65 (<i>m</i>)	18.9 (CH_2)	C-6, C-9, C-10, C-11 C-1, C-6, C-7, C-9, C-11	-
9	a: 2.08 (<i>dd</i> , 13.0, 5.0) b: 1.60 (<i>m</i>)	26.8 (CH_2)	C-1, C-7, C-8, C-10	H_b -9, H_3 -14
10	-	75.8 (C)	-	-
11	-	75.3 (C)	-	-
12	a: 3.50 (<i>d</i> , 11.0) b: 3.35 (<i>d</i> , 11.0)	69.3 (CH_2)	C-7, C-11, C-13	H_a -6, H_3 -13 H_a -6, H_3 -13
13	1.26 (<i>s</i>)	24.3 (CH_3)	C-7, C-11, C-12	-
14	1.04 (<i>s</i>)	26.6 (CH_3)	C-1, C-9, C-10	-
15	0.87 (<i>d</i> , 7.0)	15.0 (CH_3)	C-3, C-4, C-5	H_a -6

A Dihydrochalcone Derivative from the Flowers of *Wedelia trilobata*

Yaowapa Sukpondma, Vatcharin Rukachaisirikul, Khrongkwan Monprasart
Nongporn Hutadilok-Towatana

Y. Sukpondma,¹ V. Rukachaisirikul and K. Monprasart *Department of Chemistry and
Center for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University,
Hat Yai, 90112, Thailand,*

N. Hutadilok-Towatana *Department of Biochemistry, Faculty of Science,
Prince of Songkla University, Hat Yai, 90112, Thailand*

.

Corresponding author. Tel.: +66-74-288449; Fax: +66-74-558-841.

E-mail address: yaowapa.suk@psu.ac.th (Y.Sukpondma)

One new dihydrochalcone derivative (**1**) was isolated from the flowers of *Wedelia trilobata* together with seven known compounds; 3,4,2',4'-tetrahydroxychalcone (**2**), luteolin 7-methylether (**3**), tetrachyrin (**4**), 3 α -tigloyloxykaur-16-en-19-oic acid (**5**), 3 α -cinnamoyloxykaur-16-en-19-oic acid (**6**), gallic acid methyl ester (**7**) and 3,4-di-*O*-caffeoyl quinic acid (**8**). Their structures were assigned on the basis of spectroscopic data. Compounds **1-3** showed significant antioxidant activity.

Key words : *Wedelia trilobata*, Compositae, dihydrochalcone, kaurane diterpene, antioxidant

Introduction

Wedelia trilobata (Compositae), locally named “Kra dum thong lueai”,¹ is a creeping evergreen perennial herb and a yellow daisy-like flowers. It is widely found in South America. This plant was used as an ornamental groundcover in many areas of tropics and subtropics and used in traditional medicine for the treatment of fever and combination with other herbs to clear placenta after birth.² Previous chemical investigation of its leaves and aerial part afforded kaurane diterpenes,^{3,4} steroids,³ flavonoids,³ and sesquiterpenoids.⁵ In our search for biologically active substances from the flowers of this plant, we found that the crude methanol extract from the flowers of *W. trilobata* showed significant antioxidant activity. In this paper, we describe the isolation of one new dihydrochalcone together with seven known compounds and their antioxidant activity.

Result and discussion

The crude methanol extract from the flowers of *W. trilobata* was subjected to chromatographic techniques to yield one new dihydrochalcone (**1**), and seven known compounds; 3,4,2',4'-tetrahydroxychalcone (**2**),⁶ luteolin 7-methylether (**3**),⁷ tetrachyrin (**4**),⁸ 3 α -tigloyloxykaur-16-en-19-oic acid (**5**),⁸ 3 α -cimnamoxyloxykaur-16-en-19-oic acid (**6**),⁸ gallic acid methyl ester (**7**)⁹ and 3,4-di-*O*-caffeoyl quinic acid (**8**).¹⁰ Their structures were elucidated by analysis of 1D and 2D NMR spectroscopic data. For the known compounds, the structural identification was supported by comparison of the NMR data, especially ¹H and ¹³C NMR data, with those previously reported.

Compound (**1**) was isolated as a yellow gum. Its molecular formula C₁₅H₁₂O₅ was deduced by HREIMS [*m/z* 272.0679 [M-H₂O]⁺ (calcd. 272.0679)]. The IR spectrum exhibited the presence of a hydroxyl group (3422 cm⁻¹), a carbonyl group (1716 cm⁻¹) and an aromatic group (1644 cm⁻¹). The UV spectrum with absorption bands at 232, 277, and 312 nm suggested a dihydrochalcone derivative.¹¹ The ¹H NMR spectrum (Table 1) displayed signals of nonequivalent methylene protons at δ 3.01 (1H, dd, *J* = 16.8 and 12.6 Hz), and δ 2.67 (1H, dd, *J* = 16.8 and 3.0 Hz), one oxymethine proton at δ 5.39 (1H, dd, *J* = 12.6 and 3.0 Hz), three aromatic protons of a 1,3,5-trisubstituted benzene ring at δ 6.87, δ 6.88 and δ 7.04 (1H each, d, *J* = 1.5 Hz) and three aromatic protons of a 1,2,4-trisubstituted benzene ring at δ 6.42 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), δ 6.57 (1H, dd, *J* = 8.7 and 2.4 Hz), and δ 7.72 (1H, d, *J* = 8.7 Hz). The ¹³C NMR data (Table 1) showed the presence of one carbonyl carbon (δ 189.7). The NMR signals were all assigned using COSY, HMQC and HMBC spectra. The nonequivalent methylene protons (δ 3.01 and δ 2.67) were coupled with the oxymethine proton (δ 5.39) and these methylene protons showed a HMBC correlation with the carbonyl carbon. These results constructed a -CH(OH)CH₂CO- unit. In addition, the aromatic protons at δ 6.88 (H-2) and δ 7.04 (H-6) of the 1,3,5-trisubstituted benzene ring showed cross peaks with the methylene carbon (δ 79.7, C- β) indicated that this subunit was connected to C-1 (δ 131.1) of the 1,3,5-trisubstituted benzene ring. The 1,2,4-trisubstituted benzene ring was linked with the carbonyl carbon by the HMBC correlation of the aromatic proton (δ 7.72, H-6') with the carbonyl carbon (δ 189.7). Therefore, **1** was characterized as β ,3,5,2',4'-pentahydroxydihydrochalcone, a new dihydrochalcone derivative.

Compounds (**1-6**) were evaluated for their antioxidant activity against DPPH (diphenylpicrylhydrazyl) radical. Compounds **1-3** displayed higher radical scavenging potency than the standard butylated hydroxyanisole with the IC₅₀ values of 141, 62 and 37 μ M, respectively, while compounds **4-6** were inactive due to the lack of phenolic moiety.¹²

Experimental

General

The Infrared (IR) spectrum was recorded neat using a Perkin-Elmer 783 FTS165 FT-IR spectrometer. The Ultraviolet (UV) absorption spectrum was measured on a SHIMADZU UV-160A spectrophotometer. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a 300 MHz Bruker FTNMR Ultra Shield™ spectrometer in deuteriochloroform solution with tetramethylsilane (TMS) as an internal standard. The electron ionization (EI) and high resolution electron ionization (HREI) mass spectra were obtained on a MAT 95 XL Mass Spectrometer (Thermo Finnigan). Optical rotation was measured on a JASCO P-1020 polarimeter. Thin-layer chromatography (TLC) was performed on silica gel 60 GF₂₅₄ (Merck). Column Chromatography (CC) was carried out on Sephadex LH-20, silica gel (Merck) type 60 (230-400 mesh ASTM) or type 100 (70-230 mesh ASTM) or reverse phase C-18 silica gel. Light petroleum had bp 40-60 °C.

Plant Material

The flowers of *W. trilobata* were collected at Prince of Songkla University, Songkhla Province, Thailand. The voucher specimen was deposited in the Herbarium of the Department of Biology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand.

Extraction and Isolation

The flowers of *W. trilobata* (370 g), cut into small segments, were extracted with MeOH for three times over the period of 7 days at room temperature. After filtration, the filtrate was evaporated to dryness under reduced pressure to give a crude methanol extract as a yellowish brown gum (44.1 g). It was separated into two parts by dissolving with EtOAc. The EtOAc-soluble part was evaporated to dryness under reduced pressure to give a yellowish brown gum (13.2 g) which was further fractionated by CC over silica gel using a gradient system of MeOH-CH₂Cl₂ to yield nine fractions. Fraction 3 (3.9 g) was subjected to CC over silica gel with solvent mixture of increasing polarity (2% EtOAc-hexane to 100% acetone) to provide eight subfractions (3A-3H). Subfraction 3B (0.4 g) was purified by CC over silica gel using 15% EtOAc-hexane to afford **3** (10.6 mg). Subfraction 3E (0.1 g) was separated by CC over Sephadex LH-20 using 50%MeOH/CH₂Cl₂ to afford **1** (17.0 mg). Subfraction 3G (0.1 g) was further purified by CC over reverse phase silica gel with a gradient of MeOH-H₂O (7:3) to give **2** (12.2 mg). Fraction 7 (0.44 g) was further purified with CC over Sephadex LH-20 using 50%MeOH/CH₂Cl₂ to provide seven subfractions (7A-7G). Subfraction 7D (9.9 mg) was further purified by CC over reverse phase silica gel with a gradient of MeOH-H₂O (7:3) to give **6** (2.0 mg). Fraction 8 (0.5 g) was subjected to CC over silica gel with solvent mixture of increasing polarity (5% MeOH/CH₂Cl₂ to 100% MeOH) to provide seven subfractions (8A-8G). Subfraction 8C (181.9 mg) was further purified by CC over Sephadex LH-20 using 100%MeOH to give **4** (5.7 mg) and **5** (9.1 mg). The EtOAc-insoluble part was evaporated to dryness under reduced pressure to give a brown gum (18.0 g) which was further fractionated by CC over Sephadex LH-20 using 100%MeOH to yield three fractions. The third fraction (3.8 g) was purified with two successive CC over reverse silica gel with a gradient of MeOH-H₂O (1:4) to afford **7** (20.8 mg) and **8** (14.2 mg).

Compound (1)

Yellow gum. $[\alpha]_D^{26}$ -33.5° (c 0.05, CHCl₃). UV (MeOH) nm (log ε): 232 (4.10), 277 (4.03), 312 (3.71). FTIR (neat, cm⁻¹): 3430, 1732. ^1H NMR (300 MHz, CDCl₃) and ^{13}C

NMR (75 MHz, CDCl₃) data: see Table 1. EI-MS *m/z*: 272 [M-H₂O]⁺ (100), 255 (11), 163 (15), 137 (45), 136 (27). HR-EI-MS *m/z*: 272.0679 [M-H₂O]⁺ (calcd. for C₁₅H₁₂O₅: 272.0679).

Determination of Antioxidant Activity

DPPH radical scavenging assay

The DPPH radical scavenging assay was carried out in triplicate, based on the method used by Hutadilok-Towatana *et al.*¹³ BHA (butylated hydroxyanisole), a positive control, gave an IC₅₀ value of 167 μM. DPPH radical scavenging ability was calculated based on a concentration of sample required to reduce DPPH radicals by 50% (IC₅₀).

Acknowledgements

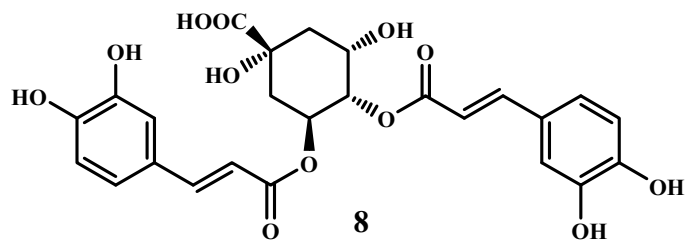
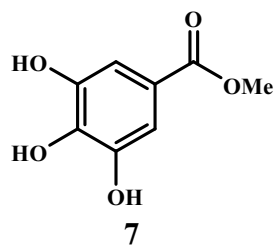
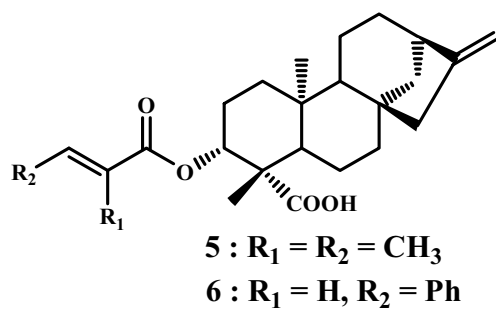
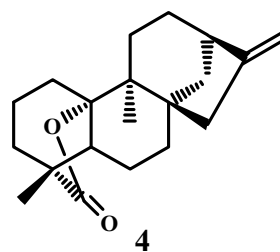
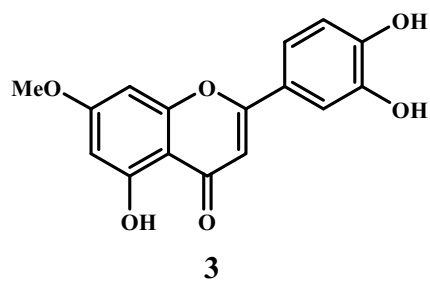
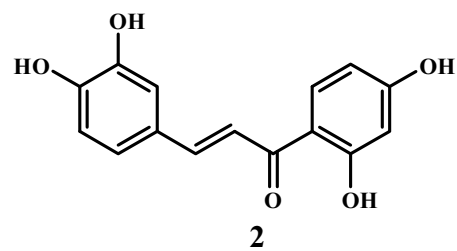
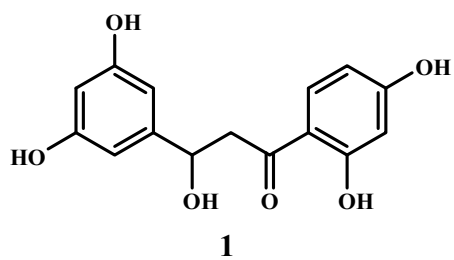
V.R. thanks the Commission on Higher Education and the Thailand Research Fund for the TRF Senior Research Scholar (Grant No.RTA5180007). Y.S. thanks the Center for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC) for partial support.

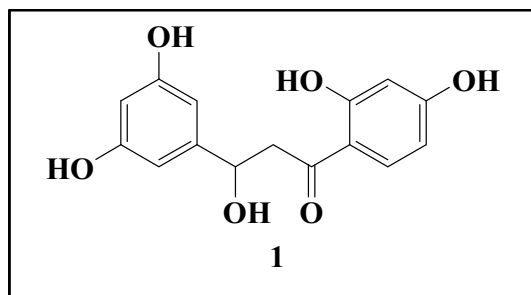
References

- (1) Smitinand, T. Thai Plant Names. Prachachon publisher: Bangkok, **2001**, 555.
- (2) Floridata. *Wedelia trilobata*. <http://www.floridata.com/ref/w/wedelia.cfm>. (accessed August 22, 2011)
- (3) Qiang, Y.; Du, D.-L.; Chen, Y.-J.; Gao, K. *Helv. Chim. Acta.* **2011**, 94 (5), 817-823.
- (4) Bohlmann, F.; Ziesche, J.; King, R. M.; Robinson, H. *Phytochemistry* **1981**, 20 (4), 751-756.
- (5) That, Q.T.; Jossang, J.; Jossang, A.; Kim, P.P.N.; Jaureguiberry, G. *J. Org. Chem.* **2007**, 72 (19), 7102-7105.
- (6) Li, Y.-L.; Li, J.; Wang, N.-L.; Yao, X.-S. *Molecules* **2008**, 13, 1931-1941.
- (7) Ameddah, S.; Dendougui, H.; Menad, A.; Mekkiou, R.; Meraihi, Z.; Benayache, S.; Benayache, F. *Chem. Nat. Compd.* **2007**, 43 (2), 210-211.
- (8) Vieira, H. S.; Takahashi, J. A.; Boaventura, M. A.D. *Fitoterapia* **2001**, 72 (7), 854-856.
- (9) Wang, K.; Yang, C. *Food Chem.* **2007**, 101, 365-371.
- (10) Basnet, P.; Matsushige, K.; Hasen, K.; Kadota, S.; Namba, T. *Biol. Pharm. Bull.* **1996**, 19 (11), 1479-1484.
- (11) Trani, M.; Carbonetti, A.; Delle Monache, G.; Delle Monache, F. *Fitoterapia* **2004**, 75, 99-102.
- (12) Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. *Free Radical Bio. Med.* **1996**, 20, 933-956.
- (13) Hutadilok-Towatana, N.; Chaiyamutti, P.; Panthong, K.; Mahabusarakam, W.; Rukachaisirikul, V. *Pharm. Biol.* **2006**, 44 (3), 221-228.

Table 1 ^1H , ^{13}C NMR and selected HMBC data for **1** in CDCl_3

Position	δ_{H} (mult, J in Hz)	δ_{C}	HMBC
C=O		189.7	
α	3.01, dd, 12.6, 16.8	43.8	C-1
	2.67, dd, 16.8, 3.0		C-1, C-1'
β	5.39, dd, 12.6, 3.0	79.7	C=O, C-2, C-6
1		131.1	
2	6.88, d, 1.5	118.3	C- β , C-6
3		145.1	
4	6.87, d, 1.5	115.1	C-2, C-6
5		145.4	
6	7.04, d, 1.5	113.8	C- β , C-2
1'		114.0	
2'		163.6	
3'	6.42, d, 2.4	102.8	C-1', C-5'
4'		164.4	
5'	6.57, dd, 8.7, 2.4	110.3	C-1', C-3'
6'	7.72, d, 8.7	128.6	C=O, C-2', C-4'





**Acridone, benzene, coumarin and quinolinone derivatives from
the roots of *Citrus hystrix***

Kanda Panthong^a, Yuranan Srisud^b, Vatcharin Rukachaisirikul^b,

Nongporn Hutadilok-Towatana^c, Supayang Piyawan

Voravuthikunchai^d, Supinya Tewtrakul^e

^a *Department of Chemistry, Center for Innovation in Chemistry, and Natural Products
Research Center, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla 90112,
Thailand*

^b *Department of Chemistry, and Center for Innovation in Chemistry, Faculty of Science,
Prince of Songkla University, Songkhla 90112, Thailand*

^c *Department of Biochemistry, and Natural Products Research Center, Faculty of Science,
Prince of Songkla University, Songkhla 90112, Thailand*

^d *Department of Microbiology, and Natural Products Research Center, Faculty of Science,
Prince of Songkla University, Songkhla 90112, Thailand*

^e *Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, and Center for Innovation in
Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University, Songkhla
90112, Thailand*

Corresponding author. Tel.: +66 74 288 433; fax: +66 74 558 841.

E-mail address: kanda.p@psu.ac.th (K. Panthong).

ABSTRACT

Three coumarins, hystrixarins A-B (**1-2**) and (+)-hopeyhopin (**3**); two acridone alkaloids, hystracridones A-B (**4-5**), one benzene derivative, hystroxene-I (**6**), and one quinolinone alkaloid, hystrolinone (**7**), along with 32 known compounds were isolated from the crude acetone extract of the roots of *Citrus hystrix*. Their structures were determined by 1D and 2D NMR spectroscopic data. The antioxidant, anti-HIV and antibacterial activities of the isolated compounds were evaluated.

Keywords: *Citrus hystrix*, Rutaceae, Coumarins, Acridone alkaloids, Antibacterial activity

1. Introduction

Citrus hystrix or kaffir lime, locally known as “magrood”, is a plant belonging to the Rutaceae family. It is commonly cultivated in Southeast Asia. It is a small tree, about 3-5 m tall with very distinctive leaves. The leaves and fruits of *C. hystrix* have a pleasant lemon smell and are referred to as medicinal lime (Yaacob et al., 1995). The leaves are widely used as flavor for cooking in Thailand. The fruit is not eaten fresh, but can be made into preserves or used as a spice for cooking, a hair shampoo or a medicine (Allen et al., 1967). *C. hystrix* is rich of essential oils in the several parts, leaves, twigs, fruit peels and fruit juices (Akiyoshi et al., 1990). Because of this reason, it was used as an insect repellent and treated for the insect bites (Koh et al., 1999). Previous investigation of the leaves of *C. hystrix* revealed that the crude extracts from the leaves showed antitumor promoter (Murakami et al., 1995 and Tiwawech et al., 2000), cytotoxic (Ong et al., 2009), antibacterial (Wannissorn et al., 2005), and antioxidant (Hutadilok - Towatana et al., 2006 and Wong et al., 2006) activities. The extract from the fruit peels showed antifertility activity (Piyachaturawat et al., 1985). Three coumarins, isolated from the fruits of *C. hystrix* DC., were inhibitors of both lipopolysaccharide (LPS) and interferon- γ (IFN- γ) induced nitric oxide (NO) generation in RAW 264.7 cells (Murakami et al., 1999). Recently, four new coumarins, citrusosides B-D, were isolated from the fruit peels of *Citrus hystrix* and showed cholinesterase inhibitory activity (Youkwan et al., 2010). However, phytochemical examination and biological activity of the roots from *C. hystrix* have not yet been reported. From our investigation, the crude acetone extract from the roots of *C. hystrix* exhibited antioxidant activity with the IC₅₀ values of 0.21 and 3.7 mg/ml in DPPH $\cdot$ and hydroxyl $\cdot$ assays, respectively, anti-HIV activity with the IC₅₀ value of 19.8 μ g/ml and antibacterial activity against *Acinetobacter baumannii* and *Escherichia coli* with the MIC values < 3.125 and 3.125 μ g/ml, respectively. These prompts us to investigate its chemical constituents in order to isolate bioactive constituents from this plant. In this paper, we describe the isolation and structural elucidation of seven new compounds (**Fig. 1**): hystrixarins A-B (**1-2**), (+)-hopeyhopin (**3**), hystracidones A-B (**4-5**), hystroxene-I (**6**) and hystrolinone (**7**), as well as 32 other known compounds (**Fig. 2**). Antioxidant, anti-HIV and antibacterial activities of the isolated compounds were also evaluated.

2. Results and discussion

The crude acetone extract (24.19 g) from the roots of *Citrus hystrix* was further investigated by chemical method and chromatographic techniques to yield seven new compounds: three new coumarins; hystrixarins A-B (**1-2**) and (+)-hopeyhopin (**3**), two new acridone alkaloids; hystracidones A-B (**4-5**), one new benzene derivative; hystroxene-I (**6**), and one new quinolinone alkaloid; hystrolinone (**7**), together with 32 known compounds: xanthoxylin (**8**) (Valenciennes et al., 1999), dipetalolactone (**9**) (Melliou et al., 2005), seselin (**10**) (Cazal et al., 2009), xanthyletin (**11**) (Cazal et al., 2009), crenulatin (**12**) (Basa S. C., 1975 and Basa et al., 1982), suberosin (**13**) (Cazal et al., 2009), baiyumine-A (**14**) (Wu T. -S., 1987), tamarin (**15**) (Burke et al., 1979 and Ito et al., 1991), 5-hydroxynor-acronycine (**16**) (Wu et al., 1983), scoparone (**17**) (Razdan et al., 1987), valencic acid (**18**) (Ito et al., 1988), osthonol (**19**) (Sasaki et al., 1980), citracridone-I (**20**) (Wu et al., 1983), citpressine-I (**21**) (Wu et al., 1983 and Furukawa et al., 1983), scopoletin (**22**) (Razdan et al., 1987), 5-hydroxyseselin (**23**) (Ito et al., 1988 and Melliou et al., 2005), umbelliferone (**24**) (Kong et al., 1996), yukovanol (**25**) (Ito et al., 1989), isoimperatorin (**26**) (Harkar et al., 1984), (-)-*cis*-khellactone (**27**) (Duh et al., 1991), limonin (**28**) (Breksa et al., 2008), citramine (**29**) (Ju-ichi et al., 1988), (+)-syringaresinol (**30**) (Kuo et al., 2007), oxypeucedanin hydrate (**31**) (Harkar et al., 1984), 2',3'-dihydroxydihydrosuberin (**32**) (Dreyer et al., 1972), (-)-*cis*-decursidinol

(**33**) (Sano et al., 1975), limonexin (**34**) (Kondo et al., 1985 and Nui et al., 2001), limonexic acid (**35**) (Ng et al., 1987), vanillic acid (**36**) (Wang et al., 2011), *p*-hydroxybenzaldehyde (Xu et al., 2009), tyrosol (Capasso et al., 1992) and *p*-hydroxybenzoic acid (Cho et al., 1998). Their structures were elucidated by spectroscopic data, especially 1D and 2D NMR. ¹H and (or) ¹³C spectroscopic data of known compounds were also compared with those reported in the literatures.

Hystrixarin A (**1**) was obtained as a colourless viscous oil. Its molecular formula was determined as C₁₉H₂₂O₆ by HRESIMS measurement for C₁₉H₂₂O₆Na at *m/z* 369.1308. The IR spectrum showed the absorption bands at 3452, 1738 and 1606 cm⁻¹, indicating the presence of a hydroxyl group, a carbonyl group and an aromatic ring system, respectively. The UV spectrum displayed the absorption bands at 218, 245, 256 and 325 nm, indicating the presence of a 7-oxygenated coumarin moiety (Smith et al., 1957). The ¹H NMR spectrum (Table 1) showed signals similar to those of (+)-*cis*-**27** (González et al., 1979) with additional signal for an isobutyl group [δ_{H} 2.23 (2H, *d*, *J* = 7.5 Hz, H-2''), 2.12 (1H, *m*, H-3'') and 0.96 (6H, *d*, *J* = 6.6 Hz, 4''-Me and 5''-Me)]. The HMBC correlations (Table 3) of an oxymethine proton (δ_{H} 5.23, *d*, *J* = 3.9 Hz, H-3') and H-2'' with a carbonyl carbon (δ_{C} 172.0, C-1'') established a 3-methyl-1-butanoyl unit and further linked this unit with the coumarin moiety through an ester bond. A small coupling constant of 3.9 Hz between H-3' and H-4' (δ_{H} 5.02) and their NOESY correlation suggested that these protons had *cis* relationship. Comparison of its optical rotation ($[\alpha]^{25.7}_{\text{D}} + 37.43^{\circ}$, *c* = 2.0, CHCl₃) with that of (+)-*cis*-(**27**) ($[\alpha]^{20}_{\text{D}} + 81.2^{\circ}$, *c* = 2.0, CHCl₃) (Ganbaatar et al., 2008), indicated that the absolute configurations at C-3' and C-4' of **1** were both *R*, identical to those of (+)-*cis*-**27**. Therefore, hystrixarin A was identified as (+)-(3'*R*,4'*R*)-*cis*-3'-(3''-methylbutanoy)-4'-hydroxydihydro-6',6'-dimethylpyrano(2',3':7,8)coumarin (**1**).

Hystrixarin B (**2**) was obtained as a white solid, melting at 114.3-115.8 °C. The molecular formula was established as C₁₅H₁₇O₄ by HRAPCIMS, which displayed a molecular ion peak at *m/z* 261.1077 [*M*⁺ + *H*]. The optical rotation was -21.58° (*c* = 0.53, CHCl₃). The UV and IR absorption bands were similar to those of **1**. These results suggested the presence of a 7-oxygenated coumarin moiety in **2**. The ¹H NMR spectrum (Table 1) showed signals similar to those of **15** (Ito et al., 1991) except for the difference in the chemical shifts of nonequivalent methylene protons and an oxymethine of the C-6 substituent. From the ¹³C NMR spectrum (Table 3), an oxymethine carbon (δ_{C} 88.2) in **2** resonated at lower field than that in **15** (δ_{C} 74.9, C-2'), indicating the attachment of a hydroxyl group at C-1', instead of C-2' in **15**. Thus, the 2-hydroxy-3-methyl-3-butenyl unit in **15** was replaced by the 1-hydroxy-3-methyl-3-butenyl moiety in **2**. In addition, the HMBC correlations between the nonequivalent methylene protons [δ_{H} 2.86 (1H, H-2'a) and 2.93 (1H, H-2'b)] and C-6 (δ_{C} 123.7) supported the attachment of this unit at C-6. Thus, hystrixarin B was assigned as (-)-6-(1'-hydroxy-3'-methyl-3'-butenyl)-7-methoxycoumarin (**2**).

Hopeyhopin (**3**) was isolated as a colourless solid, melting at 155.3 °C (decomposed). The HRESIMS showed the molecular formula C₁₅H₁₄O₅ (*m/z* 297.0733 [*M*⁺ + *H*]). The optical rotation was +12.32° (*c* = 0.75, CHCl₃). The IR spectrum showed the absorption bands at 1739 and 1684 cm⁻¹, indicating the presence of carbonyl groups. The UV absorption bands were similar to those of **32** (Dreyer et al., 1972). The ¹H NMR spectrum (Table 1) displayed signals similar to those of **32** except for the disappearance of signals for the methylene protons [δ_{H} 2.55 (1H, *dd*, *J* = 13.8, 10.5 Hz, H-1'a) and 3.01 (1H, *dd*, *J* = 13.8, 2.1 Hz, H-1'b)] in **32**. The HMBC correlations of H-2' (δ_{H} 4.05) and C-1' (δ_{C} 193.5), C-3' (δ_{C} 61.9) and C-4' (δ_{C} 24.7) and those between the methyl protons [δ_{H} 1.27 (5'-Me) and 1.57 (4'-Me)] and C-2' (δ_{C} 67.9) and C-3' (δ_{C} 61.9) (Table 3) together with the chemical shift values

of C-2' and C-3' suggested that the 2',3'-dihydroxy-3'-methylbutyl side chain of **32** was replaced by the 2',3'-epoxy-3'-methylbutanoyl side chain. This substituent was attached at C-6 (δ_C 123.4) on the basis of the HMBC correlation from H-5 (δ_H 8.06) to C-1' (δ_C 193.5) as well as the appearance of H-5 at a much lower field than that in **32**. From these results, hopehopin was assigned as 6-(2',3'-epoxy-3'-methylbutanoyl)-7-methoxycoumarin (**3**).

Hystracidone A (**4**) was isolated as an orange solid, melting at 242.9-243.1 °C. The HRAPCIMS showed the molecular formula $C_{21}H_{20}NO_5$ (m/z 313.1486 [$M^+ + H$]). The UV spectrum displayed the absorption bands at 262, 277 and 332 nm indicating the presence of a 9-acridone skeleton (Takemura et al., 1996). The IR spectrum exhibited absorption bands at 3426, 1732 and 1633 cm^{-1} for a hydroxyl group, a carbonyl group and an aromatic ring system, respectively. The 1H NMR spectrum (Table 2) showed signals similar to those of **20** except that a methoxyl signal (δ_H 3.92, 3H, *s*, 5-OMe) of **20** was replaced by signals for an ethanoyl group [δ_H 2.56 (3H, *s*, 2''-Me) and δ_C 203.5 (C-1'')]. The HMBC correlations between methyl protons (δ_H 2.56, 2''-Me) and C-5 (δ_C 117.4) and C-1'' (δ_C 203.5) (Table 4) confirmed the attachment of this unit at C-5 (δ_C 117.4). In addition, the appearance of a hydroxy proton (6-OH) at δ_H 16.58 and the HMBC correlations between 6-OH and C-5 (δ_C 117.4), C-6 (δ_C 176.7) and C-7 (δ_C 124.0) supported this conclusion. Thus, hystracidone A was assigned as 5-ethanoyl-1,6-dihydroxy-6',6'-dimethylpyrano(2',3':3,4)acridone (**4**).

Hystracidone B (**5**) was isolated as an orange solid, melting at 156.5-157.3 °C. The HRAPCIMS showed the molecular formula $C_{22}H_{24}NO_5$ (m/z 382.1559 [$M^+ + H$]). The UV and IR spectrum exhibited the similar absorption bands to those found in **4**, indicating that **5** was a 9-acridone derivative. Its 1H NMR spectrum (Table 2) showed signals similar to those of **4** except for the signals of a *gem*-dimethylchromene ring [δ_H 1.51 (6H, *s*, 5'-Me and 6'-Me), 5.57 (1H, *d*, $J = 9.6$ Hz, H-3') and 6.62 (1H, *d*, $J = 9.6$ Hz, H-4')] of **4** were replaced by signals for a methoxyl group (δ_H 3.93, 3H, *s*, 3-OMe) and an isoprenyl group [(δ_H 1.75, 6H, *s*, 4'-Me and 5'-Me), 3.45 (2H, *d*, $J = 5.5$ Hz, H-1') and 5.25 (1H, *tm*, $J = 5.5$ Hz, H-2')]. The additional signals of an oxymethyl carbon at δ_C 56.5 (3-OMe), a quarternary carbon at δ_C 132.8 (C-3'), a methine carbon at δ_C 123.6 (C-2'), a methylene carbon at δ_C 26.9 (C-1') and two methyl carbons at δ_C 18.32 (4'-Me) and δ_C 25.82 (5'-Me) in the ^{13}C NMR spectrum (Table 2) supported this conclusion. The methoxyl group (δ_H 3.93, 3-OMe) was assigned at C-3 (δ_C 165.8) due to the HMBC correlation between the methoxy protons and C-3 (δ_C 165.8). The isoprenyl group was located at C-4 (δ_C 108.6) by the HMBC correlations between the methylene protons of an isoprenyl group (δ_H 3.45, H-1') and C-3 (δ_C 165.8) and C-4a (δ_C 146.5) (Table 4). Furthermore, the HMBC and NOESY correlations established the attachment of the remaining substituents identical to those of **4**. Therefore, hystracidone B was assigned as a new acridone alkaloid: 5-ethanoyl-1,6-dihydroxy-3-methoxy-4-(3'-methyl-2'-butenyl)acridone (**5**).

Hystroxene-I (**6**) was isolated as a colourless viscous oil. The HRESIMS showed the molecular formula $C_{18}H_{26}O_3Na$ (m/z 313.1774 [$M^+ + Na$]). Comparison of the UV and IR spectra with those of etrogol (**6a**, **Fig. 1**) (Ito et al., 1988) indicated the presence of *p*-oxygenated benzene derivative. However, the lack of the absorption bands for a hydroxyl group at 3600 and 3450 cm^{-1} in **6** suggested the absence of the hydroxyl group in **6a**. The 1H NMR spectrum (Table 2) showed signals similar to those of **6a** with additional signals for an isobutyl group [δ_H 2.16 (2H, *d*, $J = 6.6$ Hz, H-2''), 2.08 (1H, *m*, H-3'') and 0.92 (6H, *d*, $J = 6.3$ Hz, 4''-Me and 5''-Me)]. The HMBC correlation between H-2'' (δ_H 2.16) and C-1'' (δ_C 173.0) (Table 4) established a 3-methyl-1-butanoyl unit which formed an ester linkage with C-2' (δ_C 64.8) according to the HMBC correlation from H-2' (δ_H 4.24) and C-1''. Accordingly,

hystroxene-I was identified as a new benzene derivative: 4-(3'''-methyl-2'''-butenyloxy)-2'-(3''-methylbutanoxy)ethylbenzene (**6**).

Hystrolinone (**7**) was isolated as a light yellow viscous oil. The HRESIMS showed the molecular formula $C_{13}H_{16}O_3N$ (m/z 233.1125 [$M^+ + H$]). The optical rotation was -17.97° ($c = 0.36$, MeOH). The UV spectrum displayed the absorption bands at 215, 244, 289, 301, 340 and 353 nm indicating the presence of a 4(*1H*)-quinolinone (Ashan et al., 1993). The IR spectrum exhibited absorption bands at 3672 and 1735 cm^{-1} for a hydroxyl group and a carbonyl group, respectively. The 1H NMR spectrum (Table 5) showed signals similar to those of 1-methyl-2-*n*-nonyl-4-quinolinone (**7a**, Fig. 1) (Grundon et al., 1979) except that the signals for *ortho*-disubstituted aromatic protons of **7a** was replaced by the signals of 1,2,4-trisubstituted aromatic protons [δ_H 7.62 (1H, *d*, $J = 3.0$ Hz, H-5), 7.31 (1H, *dd*, $J = 9.5, 3.0$ Hz, H-7) and 7.77 (1H, *d*, $J = 9.5$ Hz, H-8)]. The HMBC correlation between H-5 and C-4 (δ_C 177.1) confirmed this conclusion. The 1,2,4-trisubstituted aromatic protons (H-5, H-7 and H-8) showed the HMBC correlation with C-6 (δ_C 154.4) indicated the attachment of a hydroxyl group at this position. Furthermore, a *n*-nonyl side chain of **7a** was replaced by a 2'-hydroxypropyl unit [δ_H 2.98 (1H, *dd*, $J = 14.5, 5.5$ Hz, H-1'a), 3.02 (1H, *dd*, $J = 14.5, 7.5$ Hz, H-1'b), 4.14 (1H, *m*, H-2') and 1.31 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, 3'-Me)]. The HMBC correlations between H-1'a, H-1'b and H-2' and C-2 (δ_C 153.5) supported the attachment of this unit at C-2. Thus, hystrolinone was assigned as (-)-2-(2'-hydroxypropyl)-6-hydroxyquinolinone (**7**).

This is the first report on the chemical constituents from the roots of this plant. The major constituents are coumarins (xanthyletin) that are usually isolated from *Citrus* species. Furthermore, other types of compounds: acridone alkaloids, flavanones, lignins, limonoids, quinolinone alkaloid and benzene derivatives were isolated from this species. Compounds **1-2**, **4-6**, **9**, **10-20**, **21-22** and **24-30** were evaluated for anti-HIV-1 protease and integrase activities. Only 5-hydroxynoracronycine (**16**) showed anti-HIV-1 protease activity with the IC_{50} value of 93.1 μM . Selected compounds; **1-6**, **8**, **14-16**, **18-20**, **22-25**, **27-28**, **30-36**, *p*-hydroxybenzoic acid, tyrosol and *p*-hydroxybenzaldehyde were tested for antioxidant activity using DPPH $\cdot$, hydroxyl $\cdot$ and superoxide anion assays. Compound **16** and (+)-syringaresinol (**30**) exhibited DPPH $\cdot$ scavenging activity with the IC_{50} values of 0.19 and 0.032 mg/ml, respectively. The latter compound was also a superoxide scavenger with the IC_{50} value of 1.52 mg/ml. In addition, 24 compounds (**1-2**, **6**, **8-16**, **18-20**, **24-28**, **30** and **34-35**) were evaluated for antibacterial activity (MDR *Acinetobacter baumannii* JVC 1053 and *Escherichia coli* ATCC 25922). Compounds **8**, **15**, **25** and **30** were active against MDR *Acinetobacter baumannii* JVC 1053 with the same MIC values of 100 $\mu g/ml$ while limonin (**28**) showed better activity with the MIC value of 50 $\mu g/ml$.

3. Experimental

3.1 General experimental procedures

Melting points were recorded on an Electrothermal 9100 melting point apparatus are uncorrected. IR spectra were recorded using a FTS 165 FT-IR spectrometer (Perkin-Elmer 783). UV spectra on a SPECORD S 100 (Analytikjena), and optical rotations on a JASCO P-1020 polarimeter. 1H NMR and ^{13}C were recorded on a Bruker FT-NMR Ultra ShieldTM 300 MHz and 500 MHz spectrometer using $CDCl_3$ solution unless otherwise stated with TMS as the internal standard. HRESIMS and HRAPCIMS were recorded on a Bruker micrOTOF Mass spectrometer. Quick CC and CC were carried out on silica gel (Merck) types 60 and 100 (70-230 mesh ASTM) or on reversed phase silica gel C-18 or on sephadex LH-20 (GE Healthcare). TLC and precoated TLC were performed on silica gel 60 F₂₅₄ (Merck).

3.2 Plants materials

The roots of *Citrus hystrix* were collected in October 2007 from Moo. 3, Koh-Hong, Hat-Yai, Songkhla in the Southern part of Thailand. A voucher specimen (Yuranan 01) has been deposited at the Herbarium of the Department of Biology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand.

3.3 Extraction and isolation

The dried and chopped roots of *C. hystrix* (2.59 kg) were extracted with acetone (15 L) for 7 days at room temperature three times. Filtration and subsequent evaporation of combined acetone extracts to dryness in vacuo gave a dark brown gum (24.19 g) which was subjected to quick CC, eluting with hexane, acetone and methanol in a polarity gradient to give ten fractions (1-10). Fraction 2 (2.04 g) was repeatedly separated by CC over silica gel, CC over sephadex LH-20 and precoated TLC using 100% benzene (3 runs) to provide **6** (7.4 mg), **8** (25.0 mg) and **9** (2.9 mg). Fraction 3 (464.1 mg) was further purified by recrystallization from acetone - hexane to afford **10** (305.8 mg). Fraction 4 (4.07 g) was purified using the same method as fraction 3 to give **11** (1.61 g). The mother liquor of fraction 4 (3.18 g) was repeatedly separated by CC over silica gel and finally with precoated TLC using 25% ethyl acetate in hexane (4 runs) to yield **2** (3.8 mg), **12** (16.2 mg), **13** (24.5 mg), **14** (10.2 mg) and **15** (13.4 mg). Fraction 7 (547.4 mg) was repeatedly separated by CC over silica gel, CC over sephadex LH-20, flash CC over silica gel and finally with precoated TLC to give **1** (6.9 mg), **16** (7.3 mg), **17** (1.4 mg) and **18** (2.6 mg). Fraction 8 (2.32 g) was further purified by washing with hexane to give **4** (9.2 mg). The mother liquor of fraction 8 (2.31 g) was further purified by recrystallization from acetone - hexane, CC over silica gel, CC over sephadex LH-20 and precoated TLC to yield **1** (4.8 mg), **3** (1.5 mg), **4** (2.3 mg), **5** (2.2 mg), **15** (17.4 mg), **16** (38.3 mg), **17** (10.4 mg), **18** (13.7 mg), **19** (3.1 mg), **20** (29.7 mg), **21** (3.2 mg), **22** (2.6 mg), **23** (1.8 mg), **24** (5.9 mg), **25** (5.7 mg), **26** (2.7 mg), **27** (9.9 mg) and *p*-hydroxybenzaldehyde (2.1 mg). Fraction 9 (3.79 g) was separated by CC over silica and subsequent precoated TLC to afford **18** (1.1 mg), **26** (3.5 mg), **27** (6.5 mg), **28** (10.4 mg), **29** (1.0 mg), **30** (11.0 mg), **31** (2.4 mg), **32** (6.8 mg), **33** (12.0 mg), **34** (5.1 mg), **35** (8.0 mg), **36** (2.1 mg), tyrosol (1.0 mg) and *p*-hydroxybenzoic acid (2.8 mg). Fraction 10 (8.73 g) was separated by dissolving in acetone and then methanol. The methanol fraction (6.50 g) was separated by CC over sephadex LH-20, CC over silica gel and precoated TLC to afford **7** (1.8 mg) and **18** (1.6 mg).

3.4 Hystrixarin A (**1**)

Colourless viscous oil; $[\alpha]^{25.7}_D + 37.43^\circ$ (*c* 2.0, CHCl₃); UV (EtOH) $\lambda_{\max}$ nm (log ϵ): 218 (4.39), 245 (3.82), 256 (3.75), 325 (4.40); IR (neat) $\nu_{\max}$ cm⁻¹: 3452, 1738, 1606; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) and ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) data see Table 1; HRESIMS: *m/z* 369.1308 [*M*⁺ + Na] (calcd. for C₁₉H₂₂O₆Na, 369.1314).

3.5 Hystrixarin B (**2**)

White solid; mp. 114.3-115.8 °C; $[\alpha]^{22.7}_D - 21.58^\circ$ (*c* 0.53, CHCl₃); UV (EtOH) $\lambda_{\max}$ nm (log ϵ): 223 (4.12), 243 (3.67), 253 (3.60), 293 (3.70), 329 (3.98); IR (neat) $\nu_{\max}$ cm⁻¹: 3406, 1731, 1621; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) and ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) data see Table 1; HRAPCIMS: *m/z* 261.1077 [*M*⁺ + H] (calcd. for C₁₅H₁₇O₄, 261.1127).

3.6 (+)-Hopeyhopin (**3**)

Colourless solid; mp. 155.3 °C (decomposed); $[\alpha]^{27.7}_D + 12.32^\circ$ (*c* 0.75, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ nm (log ϵ): 212 (4.12), 219 (4.08), 257 (4.18), 302 (3.87), 328 (3.94); IR (neat)

$\nu_{\max}$ cm^{-1} : 1739, 1684; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) and ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) data see Table 1; HRESIMS: m/z 297.0733 [$\text{M}^+ + \text{H}$] (calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_5$, 297.0730).

3.7 Hystracridone A (4)

Orange solid; mp. 242.9-243.1 $^{\circ}\text{C}$; UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ nm (log ϵ): 262 (4.29), 277 (4.28), 332 (4.13); IR (neat) $\nu_{\max}$ cm^{-1} : 3426, 1732, 1633; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) and ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) data see Table 2; HRAPCIMS: m/z [$\text{M}^+ + \text{H}$] (calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{12}\text{NO}_5$,).

3.8 Hystracridone B (5)

Orange solid; mp. 156.5-157.3 $^{\circ}\text{C}$; UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ nm (log ϵ): 227 (4.09), 263 (4.05), 306 (4.05), 329 (3.95), 404 (3.62); IR (neat) $\nu_{\max}$ cm^{-1} : 3429, 1625, 1588; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) and ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) data see Table 2; HRAPCIMS: m/z 382.1559 [$\text{M}^+ + \text{H}$] (calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{NO}_5$, 382.1654).

3.9 Hystroxene-I (6)

Colourless viscous oil; UV (EtOH) $\lambda_{\max}$ nm (log ϵ): 226 (4.17), 277 (3.36), 284 (3.28); IR (neat) $\nu_{\max}$ cm^{-1} : 2960, 1731, 1613; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) and ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) data see Table 2; HRESIMS: m/z 313.1774 [$\text{M}^+ + \text{Na}$] (calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_3\text{Na}$, 313.1780).

3.10 Hystrolinone (7)

Light yellow viscous oil; UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ nm (log ϵ): 215 (4.14), 244 (4.24), 289 (3.43), 301 (3.43), 340 (3.76), 353 (3.73); IR (neat) $\nu_{\max}$ cm^{-1} : 3672, 1735; ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) and ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) data see Table 5; HRESIMS: m/z 233.1125 [$\text{M}^+ + \text{H}$] (calcd. for $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_3\text{N}$, 233.1130).

3.11 Free radical scavenging activity

In this study, three assays were carried out, according to those previously described (Hutadilok - Towatana et al., 2006).

3.12 Antibacterial activity

A modified broth microdilution method (CLSI, [remove hyperlink 2009](#)) was used to obtain the MICs of the tested materials. Twenty microlitres of a 3-5 h culture of each bacterial strain (multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* JVC 1053 and *Escherichia coli* ATCC 25922), containing approximately 5×10^4 CFU/ml, were applied into MHB supplemented with the medicinal plant extracts at concentrations ranging from 0.05-100 $\mu\text{g/ml}$. The microtiter plates were incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 18 h. Minimum inhibitory concentrations were observed at least in duplicate as the lowest concentration of the plant extracts that produced a complete suppression of the bacterial growth.

3.13 Anti-HIV assay

Anti-HIV assay was evaluated according to the method previously described by Tewtrakul (Tewtrakul et al., 2006).

Acknowledgements

K. P. thanks the Thailand Research Fund for the research grant (grant No. RTA5180007) to Professor Dr. Vatcharin Rukachaisirikul. Y. S. thanks the Center for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), the Graduate School and the Department of

Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University and Young Scientist and Technologist Programme (YSTP), National Science and Technology Development Agency for partial support.

References

- Akiyoshi, A., Kenichi, A., Toshiya, S., 1990. The chemical composition of *Citrus hystrix* DC. (Swingi). J. Essential Oil Res. 2, 179-183.
- Allen, B. M., 1967. Malayan fruits an introduction to the cultivated species. Singapore, Donald Moore Press Ltd. pp. 154-155.
- Ashan, M., Gray, A. I., Waterman, P. G., 1994. 4-Quinolinone, 2-quinolinone, 9-acridone, and furoquinoline alkaloids from the aerial parts of *Boronia bowmanii*. J. Nat. Prod. 57, 670-672.
- Basa, S. C., 1975. Crenulatin, a formyl coumarins from *Hesperathusa crenulata* (Rutaceae). Aust. J. Chem. 28, 1159-1160.
- Basa, S. C., Tripathy, R. N., 1982. Constituents of *Hesperathusa crenulata*. J. Nat. Prod. 45, 503-504.
- Brekas, A. P., Dragull, K., Wong, R. Y., 2008. Isolation and identification of the first C-17 limonin epimer, epilimonin. J. Agric. Food Chem. 56, 5595-5598.
- Burke, B. A., Parkins, H., 1979. Coumarins from *Amyris balsamifera*. Phytochemistry 18, 1073-1075.
- Capasso, R., Cristinzio, G., Evident, A., Scognamiglio, F., 1992. Polyphenols from vegetable waste water. Phytochemistry 31, 4125-4128.
- Cazal, C. de M., Domingues, V. de C., Batalhão, J. R., Bueno, O. C., Filho, E. R., Silva, M. F. G. F. da., Vieira, P. C., Fernandes, J. B., 2009. Isolation of xanthyletin, an inhibitor of ants' symbiotic fungus, by high-speed counter-current chromatography. J. Chromatogr. A. 1216, 4307-4312.
- Cho, J.-Y., Moon, J.-H., Seona, K.-Y., Park, K.-H., 1998. Antimicrobial activity of 4-hydroxybenzoic acid and *trans*-4-hydroxycinnamic acid isolation and identified from Rich Hull. Biosci. Biotechnol. Biochem., 62, 2273-2276.
- Dominguez, X. A., Cano, G., Luna, I., Dieck, A., 1977. Two coumarins from the aerial parts of *Amyris madrensis*. Phytochemistry 16, 1096.
- Dreyer, D. L., Pickering, M. V., Cohan, P., 1972. Distribution of limonoids in the rutaceae. Phytochemistry 11, 705-713.
- Duh, C.-Y., Wang, S.-K., Wu, Y.-C., 1991. Cytotoxic pyranocoumarins from the aerial parts of *Peucedanum japonicum*. Phytochemistry 30, 2812-2814.
- Furukawa, H., Yogo, M., Wu, T.-S., 1983. Acridone alkaloids. X. ¹³C-Nuclear Magnetic Resonance spectra of acridone alkaloids. Chem. Pharm. Bull. 31, 3084-3090.
- Ganbaatar, Zh., Gantumur, B., Osadchii, S. A., 2008. Plants coumarins. 3. (+)-pteryxin from *Peucedanum terebinthaceum*. Chem. Nat. Compd. 44, 578-581.

- González, A. G., Barroso, J. T., López-Dorta, H. L., Luis, J. R., Rodríguez-Luis, F., 1979. Pyranocoumarin derivatives from *Seseli tortuosum*. *Phytochemistry* 18, 1021-1023.
- Grundon, M. F., Okely, H. M., 1979. A new quinoline alkaloid from *Ruta graveolens*. *Phytochemistry* 18, 1768-1769.
- Harkar, S., Razdan, T. K., Waight, E. S., 1984. Steroids, chromone and coumarins from *Angelica officinalis*. *Phytochemistry* 23, 419-426.
- Hutadilok-Towatana, N., Chaiyamutti, P., Panthong, K., Mahabusarakam, W., Rukachaisirikul, V., 2006. Antioxidant and free radical scavenging activities of some plants used in Thai folk medicine. *Pharm. Biol.* 44, 221-228.
- Ito, C., Fujiwara, K., Kajita, M., Ju-ichi, M., Takemura, Y., Suzuki, Y., Tanaka, K., Omura, M., Furukawa, H., 1991. New coumarins from *Citrus* plants. *Chem. Pharm. Bull.* 39, 2509-2513.
- Ito, C., Mizuno, T., Matsuoka, M., Kimura, Y., Sato, K., Kajiura, I., Omura, M., Ju-ichi, M., Furukawa, H., 1988. A new flavonoid and other new components from *Citrus* plants. *Chem. Pharm. Bull.* 36, 3292-3295.
- Ito, C., Sato, K., Oka, T., Inoue, M., Ju-ichi, M., Omura, M., Furukawa, H., 1989. Two flavanones from *Citrus* species. *Phytochemistry* 28, 3562-3564.
- Ju-ichi, M., Kaga, H., Muraguchi, M., Inoue, M., Kajiura, I., Omura, M., Furukawa, H., 1988. Constituents of domestic *Citrus* plants. Part X. New acridone alkaloid and coumarin from *Citrus* plants. *Heterocycles* 27, 2197-200.
- Koh, D., Ong, C.-N., 1999. Phytophotodermatitis due to the application of *Citrus hystrix* as a folk remedy. *J. Dermatol.* 140, 737-738.
- Kondo, Y., Suzuki, H., Nozoe, S., 1985. Two g-hydroxybutenolides from the bark of *Phellodendron amurense* and photooxidation of limonoids. *Yakugaku Zasshi* 105, 742-746.
- Kong, L.-Y., Li, Y., Min, Z.-D., Li, X., Zhu, T.-R., 1996. Coumarins from *Peucedanum praeruptorum*. *Phytochemistry* 41, 1423-1426.
- Kuo, W.-L., Huang, Y.-L., Wang, S.-T., Ni, C.-L., Shien, B.-J., Chen, C.-C., 2007. Chemical constituents of *Trema orientalis*. *J. Chin. Med.* 18, 27-36.
- Melliou, E., Magiatis, P., Mitaku, S., Skaltsounis, A.-L., Chinou, E., Chinou, I., 2005. Natural and synthetic 2,2-dimethylpyranocoumarins with antibacterial. *J. Nat. Prod.* 68, 78-82.
- Murakami, A., Nakamura, Y., Koshimizu, K., Ohigashi, H., 1995. Glyceroglycolipids from *Citrus hystrix*, a traditional herb in Thailand, potentially inhibit the tumor-promoting activity of 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate in mouse skin. *J. Agric. Food Chem.* 43, 2779-2783.
- Murakami, A., Gao, G., Kim, O. K., Omura, M., Yano, M., Ito, C., Furukawa, H., Jiwajinda, S., Koshimizu, K., Ohigashi, H., 1999. Identification of coumarins from the fruit of *Citrus hystrix* DC as inhibitors of nitric oxide generation in mouse macrophage RAW 264.7 cells. *J. Agric. Food Chem.* 47, 333-339.

- Ng, K. M., Gray, A. I., Waterman, P. G., But, P. P. H., Kong, Y.-C., 1987. Limonoids, alkaloids, and a coumarin from the root and stem barks of *Tetradium glabrifolium*. J. Nat. Prod. 50, 1160-1163.
- Nui, X.-M., Li, S.-H., Peng, L.-Y., Lin, Z.-W., Rao, G.-X., Sun, H.-D., 2001. Constituents from *Limonia crenulata*. J. Asian Nat. Prod. Res., 3, 299-311.
- Ong, C. Y., Ling, S. K., Ali, R. M., Chee, C. F., Samah, Z. A., Ho, A. S. H., Teo, S. H., Lee, H. B., 2009. Systematic analysis of *in vitro* photo-cytotoxic activity in extracts from terrestrial plants in Peninsula Malaysia for photodynamic therapy. J. Photochem. Photobiol. B. 96, 216-222.
- Piyachaturawat, P., Glinsukon, T., Chanjarunee, A., 1985. Antifertility effect of *Citrus hystrix* DC. J. Ethnopharmacol. 13, 105-110.
- Razdan, T. K., Qadri, B., Harkar, S., Waight, E. S., 1987. Chromones and coumarins from *Skimmia laureola*. Phytochemistry 26, 2063-2069.
- Sano, K., Yosioka, I., Kitakama, I., 1975. Studies on coumarin from the root of *Angelica decursiva* Fr. Et Sav. II. Stereostructures of decursin, decursidin and other new pyranocoumarin derivatives. Chem. Pharm. Bull. 23, 20-28.
- Sasaki, H., Taguchi, H., Endo, T., Yosioka, I., 1980. The constituents of *Glehnia littoralis* Fr. Schmidt et Miq. Structure of a new coumarin glycoside, osthenol-7-*O*- β -gentiobioside. Chem. Pharm. Bull. 28, 1847-1852.
- Smith, E., Hosanaky, N., Bywater, W. G., E. van Tamelen, E., 1957. Constitution of samidin, dihydrosamidin and visnadin. J. Am. Chem. Soc. 79, 3534-3540.
- Takemura, Y., Kawaguchi, H., Maki, S., Ju-ichi, M., Omura, M., Ito, C., Furukawa, H., 1996. Studies on the constituents of *Yahala*. Structures of a new acridone alkaloid and two new coumarins. Chem. Pharm. Bull. 44, 804-809.
- Tiwawech, D., Hirose, M., Futakuchi, M., Lin, C., Thamavit, W., Ito, N., Shirai, T., 2000. Enhancing effects of Thai edible plants on 2-amino-3,8-dimethylimidazo(4,5-*f*)quinoxalinehepatocarcinogenesis in a rat medium-term bioassay. Cancer Lett. 158, 195-201.
- Tewtrakul, S., Itharat, A., Rattanasuwan, P., 2006. Anti-HIV-1 protease- and HIV-1 integrase activities of Thai medicinal plants known as HUA-KHao-Yen. J. Ethnopharmacol. 105, 312-315.
- Valenciennes, E., Smadja, J., Conan, J. Y., 1999. Screening for biological activity and chemical composition of *Euodia borbonica* var. *borbonica* (Rutaceae), a medicinal plant in Reunion Island. J. Ethnopharmacol. 64, 283-288.
- Wang, H.-M., Chou, Y.-T., Hong, Z.-L., Chen, H.-A., Chang, Y.-C., Yang, W.-L., Chang, H.-C., Mai, C.-T., Chen, C.-Y., 2011. Bioconstituents from stems of *Synsepalum dulcificum* Daniell (Sapotaceae) inhibit human melanoma proliferation, reduce mushroom tyrosinase activity and have antioxidant properties. J. Taiwan. Inst. Chem. Engrs., 42, 204-211.
- Wannissorn, B., Jarikasem, S., Siriwangchai, T., Thubthimthed, S., 2005. Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. Fitoterapia 76, 233-236.

- Wong, S. P., Leong, L. P., Koh, J. H. W., 2006. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chem.* 99, 775-783.
- Wu, T.-S., Kuoh, C.-S., Furukawa, H., 1983. Acridone alkaloids. VI. The constituents of *Citrus depressa*. Isolation and structure elucidation of new acridone alkaloids from *Citrus* genus. *Chem. Pharm. Bull.* 31, 895-900.
- Wu, T.-S., 1987. Baiyumine-A and -B, two acridone alkaloids from *Citrus grandis*. *Phytochemistry* 26, 871-872.
- Xu, M. L., Wang, L., Hu, J. H., Wang, M.-H., 2009. Antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities of extract from *Sparganium stoloniferum* Buch.-Ham. Root and its constituent compounds. *J. Food. Sci. Nutr.* 14, 354-357.
- Yaacob, O., Subhadrabandhu, S., 1995. The production of economic fruits in South East Asia. Kuala Lumpur, Oxford University Press. pp. 156.
- Youkwan, J., Sutthivaiyakit, S., Sutthivaiyakit, P., 2010. Citrusosides A-D and furanocoumarins with cholinesterase inhibitory activity from the fruit peels of *Citrus hystrix*. *J. Nat. Prod.*, 73, 1879-1883.

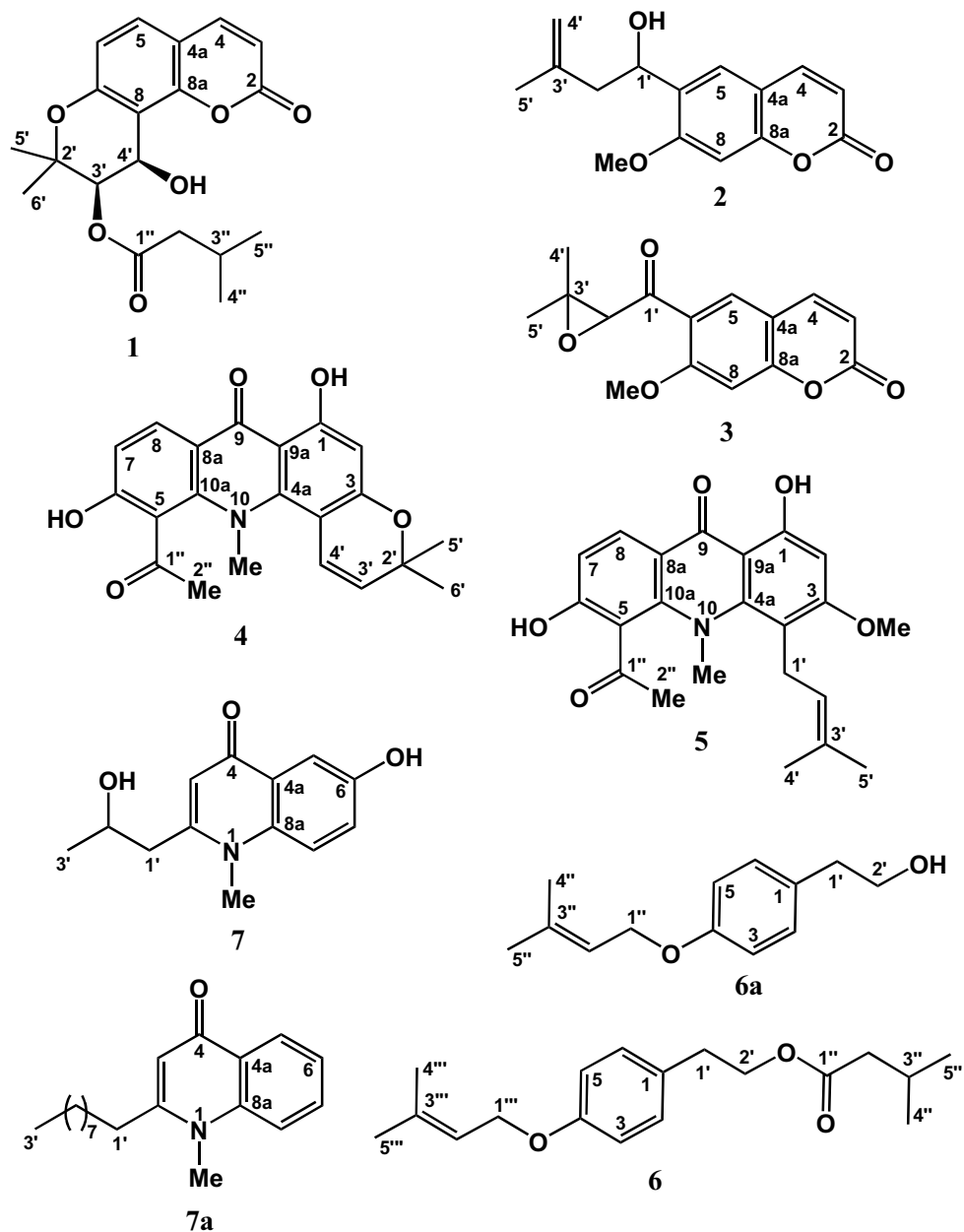


Figure 1 Structures of compounds 1-7 from the roots of *C. hystrix*, etrogol (**6a**) and

1-methyl-2-*n*-nonyl-4-quinolinone **7a**

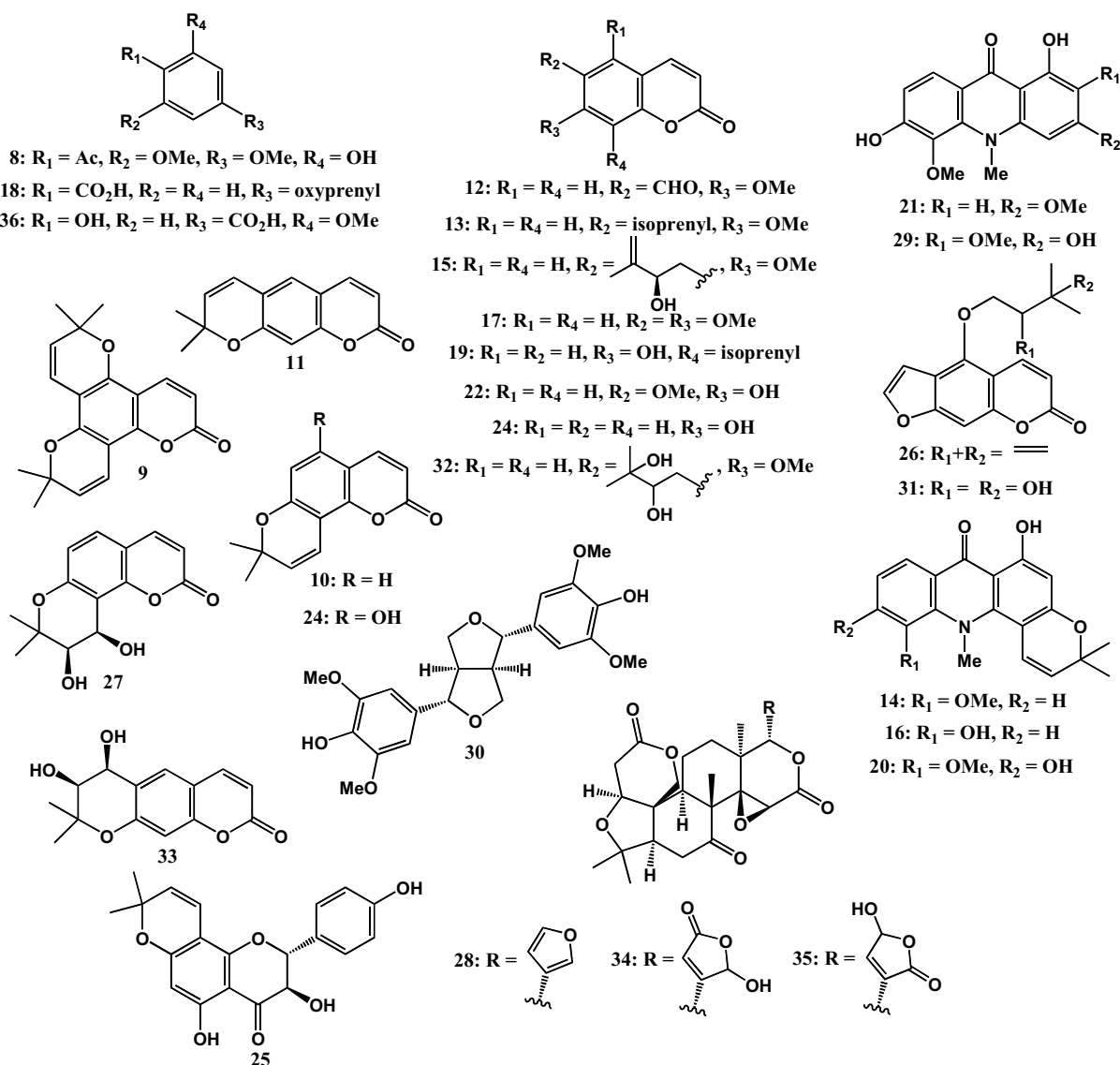


Figure 2 Structures of known isolated compounds from the roots of *C. hystrix*

Table 1 ^1H and ^{13}C NMR spectroscopic data of hystrixarins A-B (**1-2**) and hopeyhopin (**3**)

position	1		2		3	
	δ_{H} (<i>mult</i> , J_{Hz})	δ_{C}	δ_{H} (<i>mult</i> , J_{Hz})	δ_{C}	δ_{H} (<i>mult</i> , J_{Hz})	δ_{C}
2	-	160.7	-	161.4	-	159.9
3	6.28 (<i>d</i> , 9.6)	112.6	6.25 (<i>d</i> , 9.6)	113.2	6.34 (<i>d</i> , 10.0)	114.7
4	7.68 (<i>d</i> , 9.6)	144.0	7.62 (<i>d</i> , 9.6)	143.3	7.70 (<i>d</i> , 10.0)	143.2
4a	-	112.4	-	112.2	-	112.8
5	7.37 (<i>d</i> , 8.7)	128.6	7.24 (<i>s</i>)	129.7	8.06 (<i>s</i>)	131.4
6	6.84 (<i>d</i> , 8.7)	114.8	-	123.7	-	123.4
7	-	155.9	-	160.8	-	162.1
7-OMe	-	-	3.91 (<i>s</i>)	55.9	4.04 (<i>s</i>)	56.7
8	-	110.5	6.80 (<i>s</i>)	98.8	6.91 (<i>s</i>)	99.9
8a	-	154.5	-	155.0	-	158.8
1'	-	-	4.58 (<i>dd</i> , 7.8, 5.4)	88.2	-	193.5
2'	-	77.2	a: 2.86 (<i>dd</i> , 14.7, 7.8) b: 2.93 (<i>dd</i> , 14.7, 5.4)	31.7	4.05 (<i>s</i>)	67.9
3'	5.23 (<i>d</i> , 3.9)	73.8	-	143.3	-	61.9
4'	5.02 (<i>d</i> , 3.9)	63.2	a: 4.96 (<i>s</i>) b: 5.01 (<i>s</i>)	113.9	1.57 (<i>s</i>)	18.3
5'	1.40 (<i>s</i>)	23.5	1.82 (<i>s</i>)	18.1	1.27 (<i>s</i>)	24.7
6'	1.50 (<i>s</i>)	23.9	-	-	-	-
1''	-	172.0	-	-	-	-
2''	2.23 (<i>d</i> , 7.5)	43.3	-	-	-	-
3''	2.12 (<i>m</i>)	25.6	-	-	-	-
4'', 5''	0.96 (<i>d</i> , 6.6)	22.3	-	-	-	-

Table 2 ^1H and ^{13}C NMR spectroscopic data of hystracridones A-B (**4-5**) andhystroxene-I (**6**)

position	4		5		6	
	δ_{H} (<i>mult</i> , J_{Hz})	δ_{C}	δ_{H} (<i>mult</i> , J_{Hz})	δ_{C}	δ_{H} (<i>mult</i> , J_{Hz})	δ_{C}
1	-	164.2	-	163.3	-	131.0
1-OH	14.12 (<i>s</i>)	-	14.20 (<i>s</i>)	-	-	-
2	6.34 (<i>s</i>)	100.3	6.47 (<i>s</i>)	95.8	7.12 (<i>d</i> , 8.4)	129.8
3	-	161.9	-	165.8	6.84 (<i>d</i> , 8.4)	114.7
3-OMe	-	-	3.93 (<i>s</i>)	56.5	-	-
4	-	101.9	-	108.6	-	157.6
4a	-	143.9	-	146.5	-	-
5	-	117.4	-	117.6	6.84 (<i>d</i> , 8.4)	114.7
6	-	176.7	-	176.8	7.12 (<i>d</i> , 8.4)	129.8
6-OH	16.58 (<i>s</i>)	-	16.58 (<i>s</i>)	-	-	-
7	6.68 (<i>d</i> , 12.9)	124.0	6.63 (<i>d</i> , 12.5)	123.7	-	-
8	7.96 (<i>d</i> , 12.9)	133.4	7.95 (<i>d</i> , 12.5)	133.8	-	-
8a	-	117.4	-	116.7	-	-
9	-	180.0	-	181.0	-	-
9a	-	108.6	-	108.4	-	-
10-NMe	3.76 (<i>s</i>)	47.0	3.68 (<i>s</i>)	46.9	-	-
10a	-	153.8	-	155.2	-	-
1'	-	-	3.45 (<i>d</i> , 5.5)	26.9	2.86 (<i>t</i> , 7.2)	34.3
2'	-	76.7	5.25 (<i>tm</i> , 5.5)	123.6	4.24 (<i>t</i> , 7.2)	64.8
3'	5.57 (<i>d</i> , 9.6)	124.7	-	132.8	-	-
4'	6.62 (<i>d</i> , 9.6)	120.3	1.75 (<i>s</i>)	18.3	-	-
5'	1.51 (<i>s</i>)	26.9	1.75 (<i>s</i>)	25.8	-	-
6'	1.51 (<i>s</i>)	26.9	-	-	-	-
1''	-	203.5	-	203.8	-	173.0
2''	2.56 (<i>s</i>)	28.4	2.56 (<i>s</i>)	28.6	2.16 (<i>d</i> , 6.6)	43.4
3''	-	-	-	-	2.08 (<i>m</i>)	25.7
4'', 5''	-	-	-	-	0.92 (<i>d</i> , 6.3)	22.4
1'''	-	-	-	-	4.48 (<i>d</i> , 6.6)	64.8
2'''	-	-	-	-	5.49 (<i>tm</i> , 6.6)	119.8
3'''	-	-	-	-	-	138.0
4'''	-	-	-	-	1.79 (<i>s</i>)	25.8
5'''	-	-	-	-	1.74 (<i>s</i>)	18.1

Table 3 HMBC correlations of hystrixarins A-B (**1-2**) and hopeyhopin (**3**)

position	HMBC correlations		
	1	2	3
3	C-2, C-4a	C-2, C-4a	C-2, C-4a
4	C-2, C-4a, C-5, C-8a	C-2, C-4a, C-5, C-8a	C-2, C-4a, C-5
5	C-4, C-4a, C-7, C-8a	C-4, C-4a, C-7, C-8a	C-4, C-4a, C-7, C-8a, C-1'
6	C-4a, C-7, C-8	-	-
7-OMe	-	C-7	C-7
8	-	C-4a, C-6, C-7, C-8a	C-4a, C-6, C-7, C-8a
1'	-	C-6, C-2'	-
2'	-	C-6, C-1', C-3'	C-1', C-3', C-4'
3'	C-8, C-1''	-	-
4'	C-7, C-8a, C-3'	C-3', C-5'	C-2', C-3', C-5'
5'	C-2', C-3', C-6'	C-3', C-4'	C-2', C-3', C-4'
6'	C-2', C-3', C-5'	-	-
2''	C-1'', C-3'', C-4'', C-5''	-	-
3''	C-1'', C-2'', C-4'', C-5''	-	-
4''	C-2'', C-3'', C-5''	-	-
5''	C-2'', C-3'', C-4''	-	-

Table 4 HMBC correlations of hystracridones A-B (**4-5**) and hystroxene-I (**6**)

position	HMBC correlations		
	4	5	6
1-OH	-	C-1, C-2, C-9a	-
2	C-1, C-3, C-4, C-9a	C-1, C-3, C-4, C-9a	C-1, C-3, C-4, C-6
3	-	-	C-1, C-2, C-4, C-5
3-OMe	-	C-3	-
5	-	-	C-1, C-3, C-4, C-6
6	-	-	C-1, C-2, C-4, C-5
6-OH	C-5, C-6, C-7	C-5, C-7	-
7	C-5, C-6, C-8a	C-6, C-8a	-
8	C-6, C-9, C-10a	C-6, C-9, C-10a	-
10-NMe	C-4a, C-10a	C-4a, C-10a	-
1'	-	C-3, C-4, C-4a, C-2', C-3'	C-2, C-6, C-2'
2'	-	C-1', C-4', C-5'	C-1, C-1', C-1''
3'	C-4, C-5', C-6'	-	-
4'	C-3, C-4, C-4a, C-2'	C-2', C-3', C-5'	-
5'	C-2', C-3', C-6'	C-2', C-3', C-4'	-
6'	C-2', C-3', C-5'	-	-
2''	C-5, C-1''	C-5, C-1''	C-1'', C-3'', C-4'', C-5''
3''	-	-	C-1'', C-2'', C-4'', C-5''
4''	-	-	C-2'', C-3'', C-5''
5''	-	-	C-2'', C-3'', C-4''
1'''	-	-	C-4, C-2''', C-3'''
2'''	-	-	C-4''', C-5'''
4'''	-	-	C-2''', C-3''', C-5'''
5'''	-	-	C-2''', C-3''', C-4'''

Table 5 ^1H , ^{13}C NMR spectroscopic data and HMBC correlations of hystrolinone (**7**)

position	7		
	δ_{H} (<i>mult</i> , J_{Hz})	δ_{C}	HMBC correlation
1-NMe	3.90 (<i>s</i>)	35.0	C-2, C-8, C-8a
2	-	153.5	-
3	6.29 (<i>s</i>)	110.2	C-2, C-4, C-4a, C-1'
4	-	177.1	-
4a	-	127.2	-
5	7.62 (<i>d</i> , 3.0)	107.6	C-4, C-6, C-7, C-8a
6	-	154.4	-
7	7.31 (<i>dd</i> , 9.5, 3.0)	122.4	C-5, C-6, C-8a
8	7.77 (<i>d</i> , 9.5)	118.3	C-6, C-4a
8a	-	136.0	-
1'	a: 2.98 (<i>dd</i> , 14.5, 5.5) b: 3.02 (<i>dd</i> , 14.5, 7.5)	43.2	C-2, C-3, C-2', C-3'
2'	4.14 (<i>m</i>)	66.6	C-2, C-3'
3'	1.31 (<i>d</i> , 6.0)	22.3	C-1', C-2'

Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from the seagrass

Enhalus acoroides

O. Supaphon¹, S. Phongpaichit^{1,*} V. Rukachaisirikul² and J. Sakayaroj³

¹Department of Microbiology and Natural Products Research Center, Faculty of Science,
Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand

²Department of Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai,
Songkhla, Thailand

³National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), 113 Thailand Science
Park, Phaholyothin Road, Klong 1, Klong Luang, Pathumthani, 12120 Thailand.

*Corresponding author. Mailing addresses: Department of Microbiology and Natural Products
Research Center, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla,
Thailand, 90112. Phone (66)074288323. Fax: (66) 074446661. E-mail: souwalak.p@psu.ac.th

Abstract

Endophytic fungi were isolated from healthy leaves, roots and rhizomes of seagrass, *Enhalus acoroides*, Trang province, southern Thailand. A total of 48 isolates of endophytic fungi were identified based on morphological characteristics: *Aspergillus* sp. 1 isolate, *Curvularia* spp. 2 isolates, *Cladosporium* spp. 2 isolates, *Fusarium* spp. 2 isolates, *Penicillium* spp. 5 isolates, and *Nigrospora* spp. 3 isolates. Thirty-three isolates did not produce reproductive structures in cultures. Twenty-eight non-sporulating strains were selected for molecular identification based on rDNA sequence analyses. Endophytic fungi from *E. acoroides* are more abundance in medium age leaves than young and old leaves, respectively. Percentage of occurrence showed the highest value in medium age leaves (0.556%). All of the isolates were cultured in PDB and extracted by ethyl acetate and hexane. Crude extracts were screened for their antimicrobial activity using a colorimetric broth microdilution method against ten pathogenic microorganisms. The endophytic fungus *Nigrospora* PSU-ES5 produced the best active extracts. Its CH and BE extracts had the strongest activity against *M. gypseum* (MIC 4 and 8 µg/ml, MBC 8 and 8 µg/ml, respectively). This result showed the potential of fungal endophyte that could produce antimicrobial substances.

Keywords: Antimicrobial activity, Endophytic fungi, Seagrasses, Isolation, *Enhalus acoroides*

1 Introduction

2 It is well documented that endophytic fungi are a good source of bioactive natural
3 products (Strobel et al., 2004; Gunatilaka, 2006; Verma et al., 2009; Aly et al., 2010). Most of
4 the studied endophytic fungi were isolated from terrestrial plants (Naik *et al.*, 2008,
5 Gurulingappa *et al.*, 2010, Chafre *et al.*, 2010; Linares *et al.*, 2010). Bioactive natural products
6 from marine endophytic fungi in particular from seagrasses have been rarely studied (Rowley
7 *et al.*, 2003 and Rodrigues, 2008).

8 Seagrasses are marine flowering plants and important for marine ecology systems,
9 reduce wave energy, stabilize the sand and provide a large variety of marine animals
10 (Horinouchi *et al.*, 2009 and Hori *et al.*, 2009). They have been used in traditional medicine in
11 India such as the roots of *Enhalus acoroides* as a remedy against sting by different kinds of
12 rays and scorpion; *Cymodocea* spp. as a tranquillizer for babies, as soothing help during
13 pregnancy and against cough and malaria; and *Halophila* spp. as a strong medicine against
14 malaria, skin diseases and in the early stages of leprosy (Kumar et al., 2008). Previous reports
15 on seagrass endophytes have been rarely studied and most of them have been focused on
16 diversity and distribution (Wilson, 1998; Alva et al., 2002; Devarajan *et al.* 2002; Alva, 2005;
17 Rodrigues, 2008 and Sakayaroj et al., 2010).

18 Thailand is a rich source of biodiversity. The coastal areas of southern Thailand have
19 many rich seagrass beds (Adulyanukosol and Poovachiranon, 2006). Twelve species
20 representing 7 genera were reported through the coastal lines of the Andaman Sea and the Gulf
21 of Thailand. Recently, Sakayaroj et al. (2010) reported the diversity of endophytic fungi
22 isolated from seagrass *Enhalus acoroides* from Hat Khanom-Mu Ko Thale Tai National Park,
23 southern Thailand. Therefore, this study aimed to isolate endophytic fungi from *E. acoroides*
24 from Trang Province and screen for their ability to produce antimicrobial active metabolites
25 against human pathogens.

26 Materials and methods

27 Source and isolation of endophytic fungi.

28 Five *E. acoroides* plant samples were randomly collected from Trang Province,
29 Thailand every month for a period of one year from June 2008 – May 2009. Seagrass samples
30 including leaves, roots, and rhizomes were surface-sterilized with 10% ethanol (3min), 3%
31 sodium hypochlorite (10sec), 10% ethanol (3min), rinsed two times in sterile distilled water
32 and dried on a sterile paper towel, respectively. Leaves were divided into 3 age groups from
33 the outermost leaves (oldest) to the innermost leaves (youngest) as old medium and young
34 leaves. Each leaf age group was divided into 3 equal parts (upper, middle, and lower). Each of
35 leaf part, root and rhizome was then cut into 6 fragments. Samples were placed onto potato
36 dextrose-sea water agar (PDA-SW) supplemented with antibiotics (50 mg/L penicillin plus
37 streptomycin). The plates were incubated at RT for up to 2 weeks until the outgrowth of
38 endophytic fungi was observed. Endophytic fungi were subcultured into PDA without
39 antibiotics. Each pure fungal isolate was maintained on PDA at 4°C and in 20% glycerol at -
40 80°C.

41 The isolation rate was calculated according to Jordaan et al. (2006) as follows:

42 Isolation rate = Total number of isolates yielded/Total number of sample segments

43 Fermentations and extractions

44 Endophytic fungal cultures were grown on PDA and incubated at 25°C for 3-5 days.
45 Six agar plugs (1 x 1 cm²) from the edge of the mycelium from an actively growing culture
46 were inoculated into 500 mL Erlenmeyer flasks containing 300 mL potato dextrose broth
47 (PDB) and incubated for 3 weeks at 25°C under stationary condition for production of
48 antimicrobial metabolites (Phongpaichit *et al.*, 2006). The culture broth was filtered to separate
49 the filtrate and mycelia. The filtrate was extracted three times with an equal volume of ethyl
50 acetate (EtOAc) in a separating funnel. The combined EtOAc extracts were dried over

1 anhydrous sodium sulphate (Na_2SO_4) and evaporated to dryness under reduced pressure at
2 45°C using a rotary vacuum evaporator to give the BE extract. The fungal mycelia were
3 extracted with 500 mL of methanol (MeOH) for 2 days. The aqueous MeOH layer was
4 concentrated under reduced pressure. Distilled water (50 mL) was added to the extract and the
5 mixture was then mixed with hexane (100 mL). The aqueous layer was then extracted three
6 times with an equal volume of EtOAc. The hexane extract and the combined EtOAc extracts
7 were dried over Na_2SO_4 and evaporated to dryness under reduced pressure at 45°C using a
8 rotary vacuum evaporator to give CH and CE extracts respectively. All crude extracts were
9 first subjected to thin-layer chromatography (TLC) and their H^1 nuclear magnetic resonance
10 (NMR) spectra were recorded. At least two batches of each isolate were extracted and checked
11 for their identical TLC and MNR spectra.

13 Identification of endophytic fungi

14 All endophytic fungi were identified based on their morphology and the analyses of the
15 Internal Transcribed Spacers (ITS) of rDNA. Genomic DNA was extracted using the protocols
16 described by Wang *et al.* (2005). The ITS regions were amplified by the polymerase chain
17 reaction (PCR) with the universal and fungal specific primer pairs ITS5/ITS4 and ITS1F/ITS4.
18 Purification of the DNA fragment was performed utilizing the NucleoSpin® Extract DNA
19 purification kit Cat. No. 740 609.50 (Macherey-Nagel, Germany), as described by the
20 manufacture's protocol. DNA sequencing was performed using the primers mentioned above,
21 at Macrogen, Korea. A BLAST Search was used to search for the closest matched sequences in
22 the GenBank database (Altschul *et al.*, 1990). The fungal sequences in this study and other
23 related sequences were multiple aligned using BioEdit 7.0.9 (Hall, 2007) and the alignments
24 were adjusted manually where necessary to maximize alignment. Phylogenetic relationships
25 were estimated using PAUP* v4.0b10 (Swofford, 2003). The ITS sequences of endophytic
26 fungi were submitted to GenBank for retrieving their accession numbers.

28 Antibacterial assay

29 The dried endophytic fungal extracts were dissolved in dimethyl sulfoxide
30 (DMSO) to prepare stock solutions and stored at -4°C until used. All extracts at
31 concentrations of $200\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ were screened for antibacterial activity against
32 *Staphylococcus aureus* ATCC25923, a clinical isolate of methicillin-resistant *S. aureus*
33 (MRSA) clinical isolate, *Escherichia coli* ATCC25922, and *Pseudomonas aeruginosa*
34 ATCC27853 by the colorimetric microdilution method according to a modification of
35 CLSI M7-A4 (CLSI, 2000). Plates were incubated at 35°C for 15 hours, then $10\text{ }\mu\text{L}$ of
36 resazurin indicator (0.18%) was added to each well and examined after incubation for 2-3
37 hours at 35°C for the completed reaction (Drummond and Waigh, 2000). After incubation,
38 a blue or purple color of the wells indicated inhibition of growth (positive result) and a
39 pink color meant growth had occurred (negative result). The MICs of active crude extracts
40 were determined by the same method. The lowest concentration of extract that inhibited
41 growth (blue or purple colour) was recorded as the MIC. Concentrations of crude extract
42 less dilute than the MIC and the MIC were streaked onto nutrient agar (NA) plate and
43 incubated under appropriate conditions. The lowest concentration of extract that showed
44 no growth was recorded as the MBC. Vancomycin and gentamicin were used as standard
45 antibacterial agents for positive inhibitory controls.

46 Antifungal assay

47 The endophytic fungal extracts were screened for their antifungal activity at a
48 concentration of $200\text{ }\mu\text{g/ml}$ by a modification of the microbroth dilution CLSI M27-A2 (CLSI,
49 2002a) against yeasts (*Candida albicans* ATCC90028 and NCPF3153, *Cryptococcus*
50 *neoformans* ATCC90112 and ATCC90113) and a modification of the microbroth dilution

CLSI M38-A (CLSI, 2002b) against clinical isolates of *Microsporum gypseum* and *Penicillium marneffei*. Microtiter plates were incubated at 35°C for 24 hours for *C. albicans*, 48 hours at room temperature for *C. neoformans*, and 6 days at room temperature for *M. gypseum* and *P. marneffei*, then 10 µL resazurin indicator (0.18%) was added to each well and examined after incubation for 5 hours at 35°C for yeasts and one day for *M. gypseum* and *P. marneffei* as adapted from Drummond and Waigh (2000). The MFCs of the active extracts were determined by the streaking method on Sabouraud's dextrose agar (SDA). Amphotericin B was used as a positive inhibitory control for yeasts and *P. marneffei* and miconazole for *M. gypseum*.

Results

Endophytic fungal isolation and identification

Forty-eight endophytic fungi were isolated from 3,300 fragments from *E. acoroides*, 45 isolates from leaves, one from root and one from rhizome (Table 1). The percentage of occurrence in middle segment of young and medium leaves gave the highest values of 0.185% and 0.556%, respectively. In old leaf, the highest isolation rate was from the lower segment (0.296%) (Fig. 1).

Only 14 isolates produced conidia and were identified by morphological characteristics as: *Aspergillus* sp. (1 isolate), *Curvularia* sp. (2 isolates), *Cladosporium* sp. (2 isolates), *Fusarium* sp. (2 isolates), *Penicillium* sp. (4 isolates), and *Nigrospora* sp. (3 isolates). Thirty-three isolates did not produce any reproductive structure and were classified as mycelia sterilia (Table 1). Twenty-eight different morphotypes were selected for molecular identification based on ITS sequence analyses (Table 3).

Phylogenetic analysis indicated that three fungal isolates were associated with Phylum Basidiomycota (Figure 2). Two isolates (PSU-ES25 and PSU-ES49) showed high nucleotide identity with *Schizophyllum commune* (84.3-99.3%). Endophytic fungus PSU-ES174 had an affinity with various species of *Phanerochaete*, with *P. sordida* as the most closely related taxon (71.4-99.8% sequence similarities).

Within the most parsimonious tree of Phylum Ascomycota (Figure 3), three different fungal groups were classified to the Sordariomycetes (17 isolates), Eurotiomycetes (2 isolates) and Dothideomycetes (6 isolates). Fungal endophytes belonging to the Sordariomycetes had affinities within 3 orders including the Hypocreales, Xylariales and Trichosphaeriales.

Twelve isolates had affinities with the Order Hypocreales. They were identified as *Hypocrea lixii* (PSU-ES22, PSU-ES207 and PSU-ES160), *Trichoderma* sp. (PSU-ES103), *Simplicillium lanosoniveum* (PSU-ES104), *Simplicillium lamellicola* (PSU-ES108), *Fusarium* sp. (PSU-ES123), *Fusarium oxysporum* (PSU-ES157), Hypocreales sp. (PSU-ES23, PSU-ES203 and PSU-ES147) and *Cordyceps memorabilis* (PSU-ES197).

Within the Xylariales, the endophytic fungus PSU-ES148 showed highest similarity with species of *Pestalotiopsis*. This fungus should be identified as *Pestalotiopsis* sp. Another two strains, PSU-ES106 and PSU-ES116, did not have any closely related species. Therefore, they could be tentatively identified as member of the Xylariaceae.

Two isolates of endophyte assemblages (PSU-ES117 and PSU-ES151) were placed in the Trichosphaeriales. They were closely related and could be identified as *Nigrospora* sp. Due to high sequence identity with several *Nigrospora* species.

The molecular identification confirmed that two isolates of PSU-ES159 and PSU-ES194 should be classified in Class Eurotiomycetes, Order Eurotiales. PSU-ES159 could belong to *Eupenicillium erubescens*, while PSU-ES194 was identified as *Penicillium verruculosum*.

Class Dothideomycetes comprised six isolates of endophytes: PSU-ES70 could be identified as *Bipolaris spicifera*, while PSU-ES56 was identified as *Bipolaris* sp. Endophytic

fungus PSU-ES24 gave closest relationships with the genus *Phaeosphariopsis*, therefore it should be identified as *Phaeosphariopsis* sp. The remaining isolates (PSU-ES127, PSU-ES146 and PSU-ES210) did not have any closest taxa. Thus they could be tentatively identified as Pleosporales sp. A summary of endophytic identification in the current study is shown in Table 3.

Antimicrobial assay

A total of 135 extracts were screened for their antimicrobial activity. The BE extracts gave the highest potential against filamentous fungi (37.25%) followed by CE against yeasts (34.88%) and filamentous fungi (27.91%) and CH against yeasts (21.95%), respectively (Table 2). The MIC values of the active extracts were in the range of 4-200 µg/ml (Table 4). Most of the extracts had high MBC or MFC values of 200 to >200 µg/ml. The endophytic fungus *Nigrospora* PSU-ES5 produced the best active extracts with MIC values less than 10 µg/ml. Its CH and BE extracts had the strongest activity against *M. gypseum* (MIC 4 and 8 µg/ml and MFC 8 and 8 µg/ml, respectively). Both extracts also showed antibacterial activity against both strains of *S. aureus* (MIC 64 µg/ml).

Discussion

Seagrasses are natural resource and provide nursery habitats for juvenile fish for aquatic animal (Horinouchi *et al.*, 2009). The association of endophytic fungi and their host plant tissue is believed to be complex (Owen and Hundley, 2004). Many secondary metabolites are produced from seagrasses. Methanolic extracts from three estuarine seagrass species, *Potamogeton pectinatus* L. (sagopond weed), *Potamogeton perfoliatus* L. (redhead grass) and *Ruppia maritima* L. (widgeon grass) showed antibacterial activity using a disk diffusion assay. All extracts inhibited Gram-positive and a few Gram-negative bacteria (Bushmann and Ailstock 2006). Extract from the common seagrasses, *Ruppia maritima*, showed higher potential for growth inhibition of *Lindera thalassiae* and *Fusarium* spp. (Ross *et al.*, 2008).

There are only a few reports on the studies of the endophytic fungi from seagrasses (Wilson, 1998; Alva *et al.*, 2002; Sakayaroj *et al.* 2010), while many reports showed the potential of endophytic fungi isolated from terrestrial plants (Wiyakrutta *et al.*, 2004, Kharwar *et al.*, 2008 and Gu, 2009). The endophytic fungi isolated from plants have been shown to have antifungal and antibacterial activities (Ina'cio *et al.*, 2006, Yang *et al.*, 2006, Li *et al.*, 2005 and Li *et al.*, 2008).

Forty-eight endophytic fungi obtained from this study belonged to Phyla Ascomycota (93.62%) and Basidiomycota (6.38%). Molecular identification showed that 33 non-sporulating fungi were in association with three major classes: Sordariomycetes, Eurotiomycetes and Dothideomycetes. They were reported to be the most abundant endophytic groups isolated from various plant families (Arnold, 2007). In this study, we also found basidiomycetes occurred as the endophytes in *E. acoroides*. Normally, the basidiomycetous endophytes are rarely isolated from halo and mangrove plants, most of them were frequently reported from terrestrial plants (Wang *et al.* 2005; Rungjindamai *et al.* 2008). Our result was in concordance with a study by Sakayaroj *et al.* (2010) which documented an endophytic basidiomycete (*Peniophora* sp.) from *E. acoroides*.

Most of the endophytes found from our study were also commonly reported from other plants such as *Aspergillus*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis* and *Fusarium* (Devarajan and Suryanarayanan 2002, Rungjindamai *et al.* 2008, Deshmukh *et al.* 2010, Pinruan *et al.* 2010, Sakayaroj *et al.* 2010; Buatong *et al.* 2011). Moreover, the frequent endophytes isolated from *E. acoroides* include the genera *Bipolaris*, *Nigrospora*, unidentified Hypocreales and unidentified Pleosporales (Sakayaroj *et al.* 2010).

1 In 2008, JianQiu et al. studied on diversity and ecological distribution of fungal
2 endophyte from medicinal plants. It has been shown that the number of isolation rate and
3 colonization rate were higher in twig than in leaves. The colonization and isolation rates of
4 endophytic fungi in twigs increased with the age. Gond et al. (2007) found that the endophytic
5 fungi isolated from plant gave the highest colonization frequency in bark and leaves, while it is
6 least in root. However, Sakayaroj et al. (2010) studied on seagrass *Enhalus acoroides* and
7 found the highest number of isolates in upper sections, which is different from this study. We
8 found the highest number of isolates in middle, lower and upper sections, respectively. The
9 distribution of fungal endophyte in plant tissue may association with many factors, age,
10 seasonal, nutrient and collecting site (Wilson, 1998 and Abreu *et al.*, 2010).

11 In this study we could select the most potential isolate, *Nigrospora* sp. PSU-ES5 which
12 produced the best active antifungal extracts with very low MIC comparable to the standard
13 antifungal drugs. Therefore, endophytic fungi isolated from seagrasses were a good source of
14 antimicrobial substance.

15 **Acknowledgements**

16 V. Rukachaisirikul and S. Phongpaichit thank the Commission on Higher Education and the
17 Thailand Research Fund for the TRF Senior Research Scholar (Grant No.RTA5180007). O.
18 Supaphon is gratsful to the Thailand Research Fund throgh the Royal Golden Jubilee Ph.D.
19 Program (Grant No. PHD/0052/2550) for a scholarship. Finally, Graduate School, Prince of
20 Songkla University, and The Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC)
21 are gratefully acknowledged for partial support.
22
23

References

- Abreu, L.M.D., Almeida, A.R., Salgado, M. And Pfenning, L.H. 2010. Fungal endophytes associated with the mistletoe *Phoradendron perrottettii* and its host tree *Tapirira guianensis*. Mycol Progress. 9:559–566.
- Adulyanukosol, K. and Poovachiranon, S. 2006. Dugong (*Dugong dugon*) and seagrass in Thailand: present status and future challenges. Proc.3rd International Symposium on Seastar2000 and Asian Biologging Science. December 13-14, 2006, Bangkok, Thailand.
- Altschul, S.F., Gish, W., Myers, W.M.E.W. and Lipman, D.J. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. J. Mol. Biol. 215: 403-410.
- Alva, P.P. 2005. Fungal endophytes of seleted seagrass species in Hong Kong and Philippines. Thesis, Master of Science in Biology.
- Alva, P., McKenzie, E.H.C., Pointing, S.B., Pena-Muralla, R. and Hyde, K.D. 2002. Do sea grasses harbour endophytes. Fungal Diversity Research Series 7: 167-178.
- Aly, A.H., Debbab, A., Kier, J. and Proksch, P. 2010. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. Fungal Divers. 41: 1-16.
- Arnold, A.E. 2007. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. Fungal Biology Reviews 21: 51-66.
- Buatong, J., Phongpaichit, S., Rukachaisirikul, V. and Sakayaroj, J. 2011. Antimicrobial activity of crude extracts from mangrove fungal endophytes. World J Microbiol Biotechnol DOI 10.1007/s11274-011-0765-8.
- Bushmann, P.J. and Ailstock, M.S. 2006. Antibacterial compounds in estuarine submersed aquatic plants. J. Exp. Marine Biol. Ecol. 331: 41-50.
- Chafre, G.S., Ordu ~Na, F.N.R., Hidalgo-Lara, M.E., Rodriguez, C.H., Rodolfo, M and Flores-Cotera, L.B. 2010. Molecular phylogeny and paclitaxel screening of fungal endophytes from *Taxus globosa*. MexicoFungal Biology. xxx: 1-14.
- Clinical and Laboratory Standards Institue (CLSI) (2000) Reference method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A4. CLSI, Wayne, PA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2002a. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard-second edition. CLSI documents M27–A2. CLSI, Wayne, PA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2002b. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: approved standard. CLSI documents M38-A. CLSI, Wayne, PA.
- Devarajan, P.T., Suryanarayanan, T.S. and Geetha, V. 2002. Endophytic fungi associated with the tropical seagrass *Halophila ovalis* (Hydrocharitaceae). Ind. J. Marine Sci. 31: 73-74.
- Deshmukh, S.K., Kolet, M. J. and Verekar, S. A. 2010. Distribution of endophytic fungi in lemon grass (*Cymbopogon citrates* (DC.) stap.). 10: 2263-2267.
- Drummond, A.J. and Waigh, R.D. 2000. The development of microbiological methods for phytochemical screening. Recent Research Developmental in Phytochemistry. 4: 143-152.
- Jordaan, A., Taylor, J.E. and Rossenkhan, R. 2006. Occurrence and possible role of endophytic fungi associated with seed pods of *Colophospermum mopane* (Fabaceae) in Botswana. South Afr. J. Bot. 72: 245–255.

- 1 Hall, T.A. 2007. BioEdit V.7.0.9: a user-friendly biological sequence alignment editor and
2 analysis program for Windows 95/98/NT. (online). Available at
3 <http://www.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1> (Accessed 4/8/2009)
- 4 Horinouchi, M., Tongnunui, P., Nanjyo, K., Nakamura, Y., Sano, M. and Ogawa, H. 2009.
5 Differences in fish assemblage structures between fragmented and continuous seagrass
6 beds in Trang, southern Thailand. *Fish Sci.* 75:1409–1416.
- 7 Ina'cio, M.L., Silva, G.H., Teles, H.L., Trevisan, H.C., Cavaleiro, A.J., Bolzani, V.S. and
8 Young, M.C.M., Pfenning, L.H. and Araujo, A.R. 2006. Antifungal metabolites from
9 *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Cryptocarya mandioccana*
10 Nees (Lauraceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 34: 822-824.
- 11 Gu, W. 2009. Bioactive metabolites from *Alternaria brassicicola* ML-P08, an endophytic
12 fungus residing in *Malus halliana*. *World J Microbiol Biotechnol* 25:1677–1683.
- 13 Gurulingappa, P., McGee, P.A. and Sword, G. 2010. Endophytic *Lecanicillium lecanii* and
14 *Beauveria bassiana* reduce the survival and fecundity of *Aphis gossypii* following
15 contact with conidia and secondary metabolites. *Australia Crop Protection*. xxx: 1-5.
- 16 Gond, S.K., Verma, V.C., Kumar, A., Kumar, V. Kharwar, R.N. 2007. Study of endophytic
17 fungal community from different parts of *Aegle marmelos* Correae (Rutaceae) from
18 Varanasi (India). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23:1371–1375.
- 19 Gunatilaka AAL. 2006. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution,
20 structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *J Nat Prod* 69:
21 509-526.
- 22 JianQiu, S., LiangDong, G., Wei, Z., WenXiang, P. and Defu, C. 2008. Diversity and
23 ecological distribution of endophytic fungi associated with medicinal plants. *Sci. China*
24 *C: Life Sci.* 51: 751-759.
- 25 Kharwar, R.N., Verma, V.C., Kumar, A., Gond, S.K., Harper, J.K. and Hess, W.M. 2008.
26 Javanicin, an Antibacterial Naphthaquinone from an Endophytic Fungus of Neem,
27 *Chloridium* sp. *Curr. Microbiol.* 58:233–238.
- 28 Kumar, C.S., Sarada, D.V.L., Gideon, T.P. and Rengasamy, R. 2008. Antibacterial activity of
29 three South Indian seagrasses, *Cymodocea serrulata*, *Halophila ovalis* and *Zostera*
30 *capensis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 1989-1992.
- 31 Li, Y., Song, Y.C., Liu, J.Y., Ma, Y.M. and Tan, R.X. 2005. Anti-*Helicobacter pylori*
32 substances from endophytic fungal cultures. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21:553–
33 558.
- 34 Li, E., Jiang, L., Guo, L., Zhang, H and Che, Y. 2008. Pestalachlorides A–C, antifungal
35 metabolites from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis adusta*. *Bioorg. Med.*
36 *Chem.* 16: 7894–7899.
- 37 Linares, D.R.A., Grosch, R., Restrepo, S., Krumbein, A. and Franken, P. 2010. Effects of dark
38 septate endophytes on tomato plant performance. *Mycorrhiza*. 21 :413-22.
- 39 Owen, N.L. and Hundley, N. 2004. Endophytes-the chemical synthesizers inside plants. *Sci.*
40 *Progress.* 87: 79-99.
- 41 Pinruan, U., Rungjindamai, N., Choeyklin, R., Lumyong, S., Hyde, K.D. and Jones, E.B.G.
42 2010. Occurrence and diversity of basidiomycetous endophytes from the oil palm,
43 *Elaeis guineensis* in Thailand. *Fungal Divers.* 41: 71-88.
- 44 Naik, B.S., Shashikala, J. and Krishnamurthy, Y.L. 2008. Diversity of fungal endophytes in
45 shrubby medicinal plants of Malnad region, Western Ghats, Southern India . *Fungal*
46 *Ecol.* 1: 89-93.
- 47 Phongpaichit, S., Rungjindamai, N., Rukachaisirikul, V. and Sakayaroj, J. 2006. Antimicrobial
48 activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. *FEMS*
49 *Immunol. Med. Microbiol.* 48: 367-372.

- 1 Rodrigues, G.M. 2008. Potential of fungal endophytes from *Thalassia testudinum* bank ex
2 K.D. Koenig as producers of bioactive compounds. Thesis, University of Puerto Rico,
3 Mayaguez Campus.
- 4 Ross, C., Puglisi, M.P. and Paul V.J. 2008. Antifungal defenses of seagrasses from the Indian
5 River Lagoon, Florida. *Aqua. Bot.* 88: 134-141.
- 6 Rowly, D.C., Kelly, S., Kauffman, C.A., Jensen, P.R. and Fencial, W. 2003. Halovirs A-E,
7 new anti-viral agents from a marine-derived fungus of the genus *Scytalidium*. *Bioorg.*
8 *Med. Chem.* 11: 4263-4274.
- 9 Rungjindamai, N., Prinruan, U., Choeyklin, R., Hattori, T. and Jone, EBG. 2008. Molecular
10 characterization of basidiomycetous endophytes isolated from leaves, rachis and
11 petioles of the oil palm, *Elaeis guineensis*, in Thailand. *Fungal Divers.* 33: 139-161.
- 12 Sakayaroj, J., Preedanon, S., Supaphon, O., Jones, E.B.G. and Phongpaichit, S. Phylogenetic
13 diversity of endophyte assemblages associated with the tropical seagrass *Enhalus*
14 *acoroides* in Thailand. 2010. *Fungal Divers.* 42:27-45.
- 15 Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U. and Harper, J. 2004. Natural products from endophytic
16 microorganisms. *J. Nat. Prod.*, 67: 257-268.
- 17 Swofford, D. 2003. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (* and Other Methods).
18 Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- 19 Verma VC, Kharmar RN, Strobel GA. 2009. Chemical and functional diversity of natural
20 products from plant associated endophytic fungi. *Nat. Prod. Comm.* 4: 1511-1532.
- 21 Wang, Y., Guo, L.D., Hyde, K.D. 2005. Taxonomic placement of sterile morphotypes of
22 endophytic fungi from *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae) in notheast China based on
23 rDNA sequences. *Fungal Divers* 20:235-260.
- 24 Wilson, W. 1998. Isolation of endophytes from seagrasses from Bermuda. University of New
25 Brunswick. pp. 4-69.
- 26 Wiyakrutta, S., Sriubolmas, N., , Panphut, W., Thongon, N., Danwisetkanjana, K.,
27 Ruangrunsi, N. and Meevootisom, V. 2004. Endophytic fungi with anti-microbial,
28 anti- cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. *World J.*
29 *Microbiol. Biotechnol.* 20: 265-272.
- 30 Yang, R.Y., Li, C.Y., Lin, Y.C., Peng, G.T., She, Z.G. and Zhou, S.N. 2006. Lactones from
31 brown alga endophytic fungus (No.ZZF36) from the South China Sea and their
32 antimicrobial activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16: 4205-4208.
- 33

Table 1 Number of endophytic fungi isolated from *Enhalus acoroides*

Fungi	Number of isolates (%)		
	Leaves	Roots	Rhizomes
<i>Aspergillus</i> sp.			1
<i>Nigrospora</i> sp.	3		
<i>Penicillium</i> sp.	4		
<i>Curvularia</i> sp.	2		
<i>Cladosporium</i> sp.	2		
<i>Fusarium</i> sp.	2		
Unidentified fungi	33	1	
Total (48 isolates)	46	1	1

Table 2 Percentages of active fungal crude extracts against at least one microorganism

Extracts	Active extracts (%)			
	Gram-positive	Gram-negative	Yeasts	Filamentous fungi
CH (41)	8(19.51)	0(0)	9(21.95)	14(34.15)
CE (43)	7(16.28)	2(4.65)	15(34.88)	12(27.91)
BE (51)	10(19.61)	6(11.75)	13(25.49)	19(37.25)
Total (135)	25(18.52)	8(5.93)	37(27.41)	45(33.33)

Table 3. The identification of endophytic fungi isolated from *Enhalus acoroides* based on morphological characteristic and molecular data.

Strain	Plant organ	Morphology	Molecular	Accession
		identification	identification	number
PSU-ES2	Leaf	<i>Penicillium</i> sp.	—	—
PSU-ES3	Leaf	<i>Penicillium</i> sp.	—	—
PSU-ES4	Rhizome	<i>Aspergillus</i> sp.	—	—
PSU-ES5	Leaf	<i>Nigrospora</i> sp.	—	—
PSU-ES21	Leaf	<i>Penicillium</i> sp.	—	—
PSU-ES22	Leaf	Non-sporulating	<i>Hypocrea lixii</i>	JN116598
PSU-ES23	Leaf	Non-sporulating	<i>Hypocreales</i> sp.	JN116599
PSU-ES24	Leaf	Non-sporulating	<i>Phaeosphaeriopsis</i> sp	JN116600
PSU-ES25	Leaf	Non-sporulating	<i>Schizophyllum commune</i>	JN116601
PSU-ES45	Leaf	<i>Curvularia</i> sp.	—	—
PSU-ES49	Leaf	Non-sporulating	<i>Schizophyllum commune</i>	JN116615
PSU-ES56	Leaf	Non-sporulating	<i>Bipolaris</i> sp.	JN116619
PSU-ES69	Leaf	Non-sporulating	<i>Psilocybe</i> sp.	—
PSU-ES70	Leaf	Non-sporulating	<i>Bipolaris specifera</i>	JN116627
PSU-ES71	Leaf	<i>Curvularia</i> sp.	—	—
PSU-ES103	Leaf	Non-sporulating	<i>Trichoderma</i> sp.	JN116645
PSU-ES104	Leaf	Non-sporulating	<i>Simplicillium lanosoniveum</i>	JN116646
PSU-ES106	Leaf	Non-sporulating	<i>Xylariaceae</i> sp.	JN116648
PSU-ES107	Leaf	Non-sporulating	<i>Cochliobolus</i> sp.	—
PSU-ES108	Leaf	Non-sporulating	<i>Simplicillium lamellicola</i>	JN116649
PSU-ES111	Leaf	Non-sporulating	<i>Cochliobolus</i> sp.	—
PSU-ES114	Leaf	<i>Nigrospora</i> sp.	—	—
PSU-ES116	Leaf	Non-sporulating	<i>Xylariaceae</i> sp.	JN116652

1	PSU-ES117	Leaf	Non-sporulating	<i>Nigrospora</i> sp.	JN116653
2	PSU-ES123	Leaf	Non-sporulating	<i>Fusarium</i> sp.	JN116657
3	PSU-ES124	Leaf	Non-sporulating	<i>Psilocybe</i> sp.	–
4	PSU-ES125	Leaf	<i>Cladosporium</i> sp.	–	–
5	PSU-ES127	Leaf	Non-sporulating	<i>Pleosporales</i> sp.	JN116658
6	PSU-ES130	Leaf	Non-sporulating	<i>Capnodiales</i> sp.	–
7	PSU-ES134	Leaf	<i>Cladosporium</i> sp.	–	–
8	PSU-ES136	Leaf	<i>Nigrospora</i> sp.	–	–
9	PSU-ES137	Leaf	<i>Fusarium</i> sp.	–	–
10	PSU-ES139	Leaf	<i>Penicillium</i> sp.	–	–
11	PSU-ES146	Leaf	Non-sporulating	<i>Pleosporales</i> sp.	JN116669
12	PSU-ES147	Leaf	Non-sporulating	<i>Hypocreales</i> sp.	JN116670
13	PSU-ES148	Leaf	Non-sporulating	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	JN116671
14	PSU-ES151	Leaf	Non-sporulating	<i>Nigrospora</i> sp.	JN116674
15	PSU-ES157	Leaf	Non-sporulating	<i>Fusarium oxysporum</i>	JN116678
16	PSU-ES158	Leaf	<i>Fusarium</i> sp.	–	–
17	PSU-ES159	Leaf	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Eupenicillium erubescens</i>	JN116679
18	PSU-ES160	Leaf	Non-sporulating	<i>Hypocrea lixii</i>	JN116680
19	PSU-ES174	Root	Non-sporulating	<i>Phanerochaete sordida</i>	JN116691
20	PSU-ES194	Leaf	Non-sporulating	<i>Penicillium verruculosum</i>	JN116703
21	PSU-ES197	Leaf	Non-sporulating	<i>Cordyceps memorabilis</i>	JN116706
22	PSU-ES203	Leaf	Non-sporulating	<i>Hypocreales</i> sp.	JN116711
23	PSU-ES207	Leaf	Non-sporulating	<i>Hypocrea lixii</i>	JN116715
24	PSU-ES210	Leaf	Non-sporulating	<i>Pleosporales</i> sp.	JN116717

25

26

27

Table 4 Endophytic fungi showing potential antimicrobial activity (MIC < 100 µg/ml)

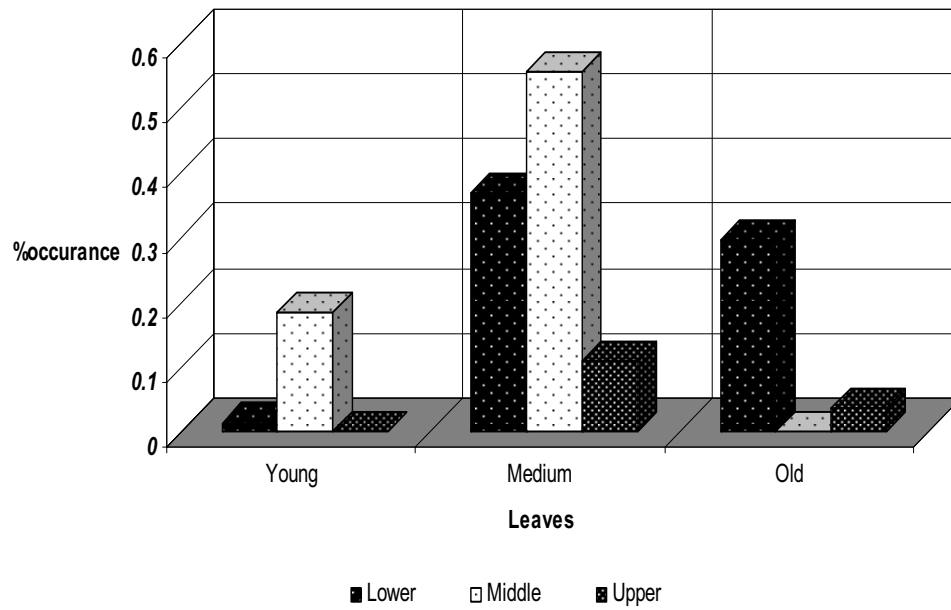
		MIC (µg/ml)									
PSU											
code	Extract	SA	MRSA	EC	PA	CA1	CA2	CN1	CN2	MG	PM
ES4	CH							128	32		
ES4	BE	64	64	32				128		64	
ES5	BE	64	64					200	200	8	
ES5	CE	64	64					200	200	16	
ES5	CH									4	
ES6	CH							128	64		
ES6	BE					64		64	128	200	
ES22	BE		128			128	200	32	64	64	
ES23	CH	128	128			200		64	200	128	
ES23	BE	200	200		200	200				64	
ES45	CE	200				128	64				
ES49	CE					64	200	128	64		32
ES69	CE	64	32					128	200		
ES111	BE	128	128							16	128
ES114	BE	16	32	128		32	64	200	200		
ES123	CH	64						16	64		200
ES123	BE	64				200		128	64		200
ES123	CE	64				128		16	200		
ES136	BE	128	128			64	128	64	64		
ES137	CH	64	64								

ES139	BE	64	200			128	128	
ES158	CE					64	128	200
ES160	BE							64
ES197	BE	200	64		200	200	200	128 64
Vancomycin		0.5	1					
Gentamicin				1	1			
Amphotericin B					0.25	0.125	0.5	0.5 2
Miconazole								2

1

2 SA, *Staphylococcus aureus* ATCC25923; MRSA, methicillin-resistant *S. aureus* clinical isolate; EC, *Escherichia*
3 *coli* ATCC25923 ; PA, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853; CA1, *Candida albicans* ATCC90028; CA2, *C.*
4 *albicans* NCPF3153; CN1, *Cryptococcus neoformans* ATCC90012; CN1, *C. neoformans* ATCC90013; MG,
5 *Microsporium gypseum* clinical isolate, PM, *Penicillium marneffeii* clinical isolate
6 BE, crude ethyl acetate extract from culture broth; CE, crude ethyl acetate extract from the fungal mycelia, CH,
7 crude hexane extract from the fungal mycelia

1



2

3 Figure 1 The percentage of occurrence of endophytic fungi isolated from difference
4 segments from leaves, old, medium and young.

5

6

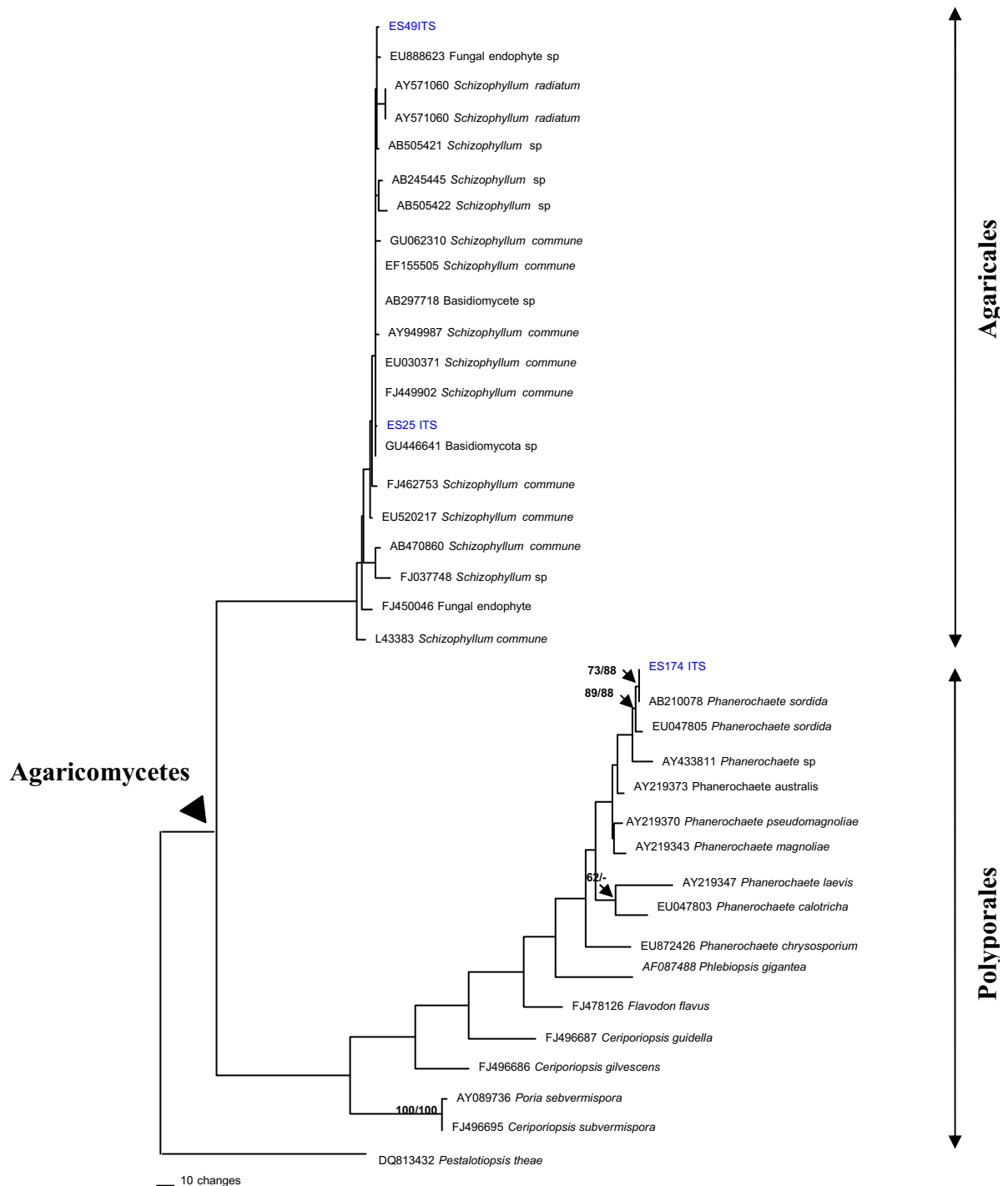
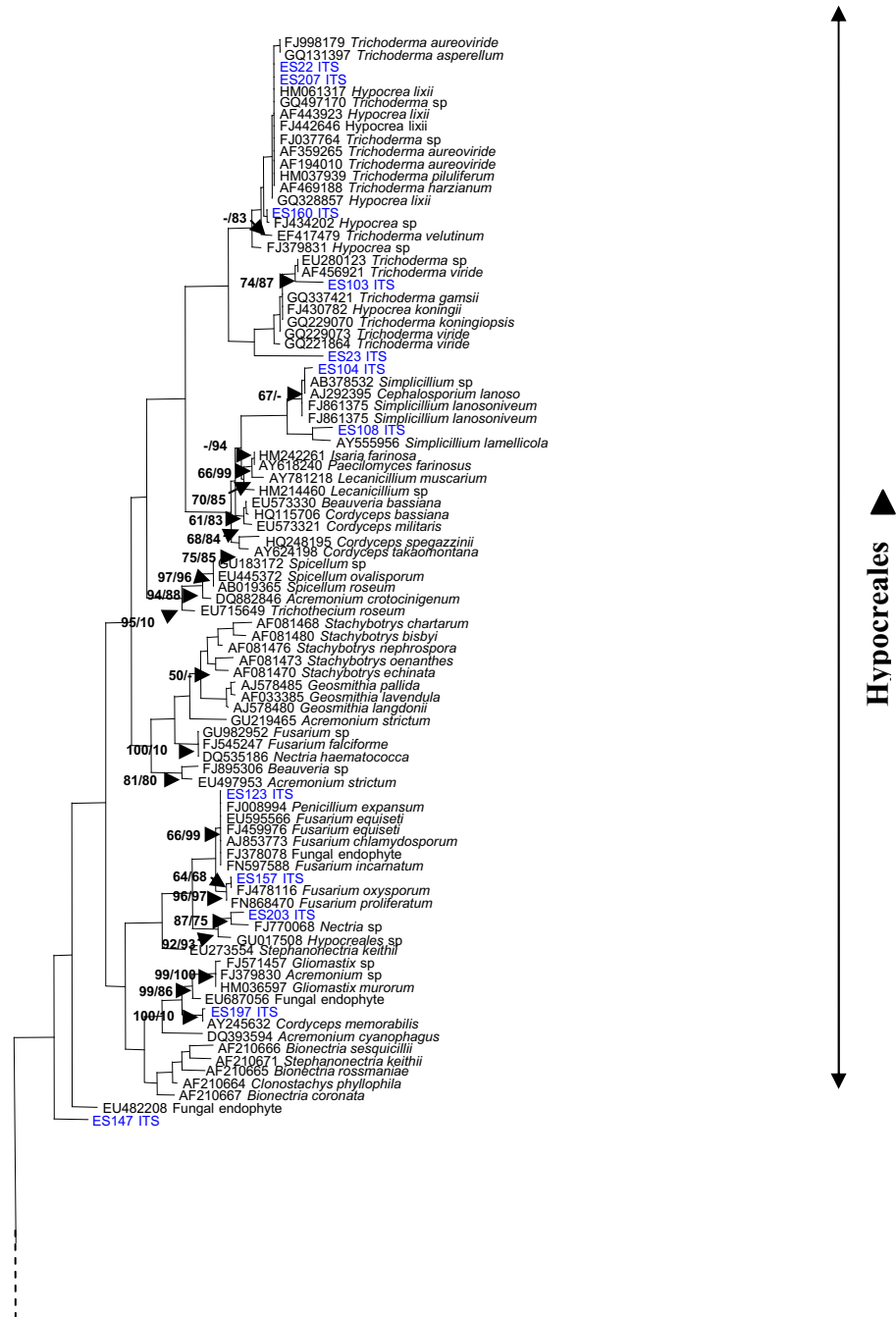
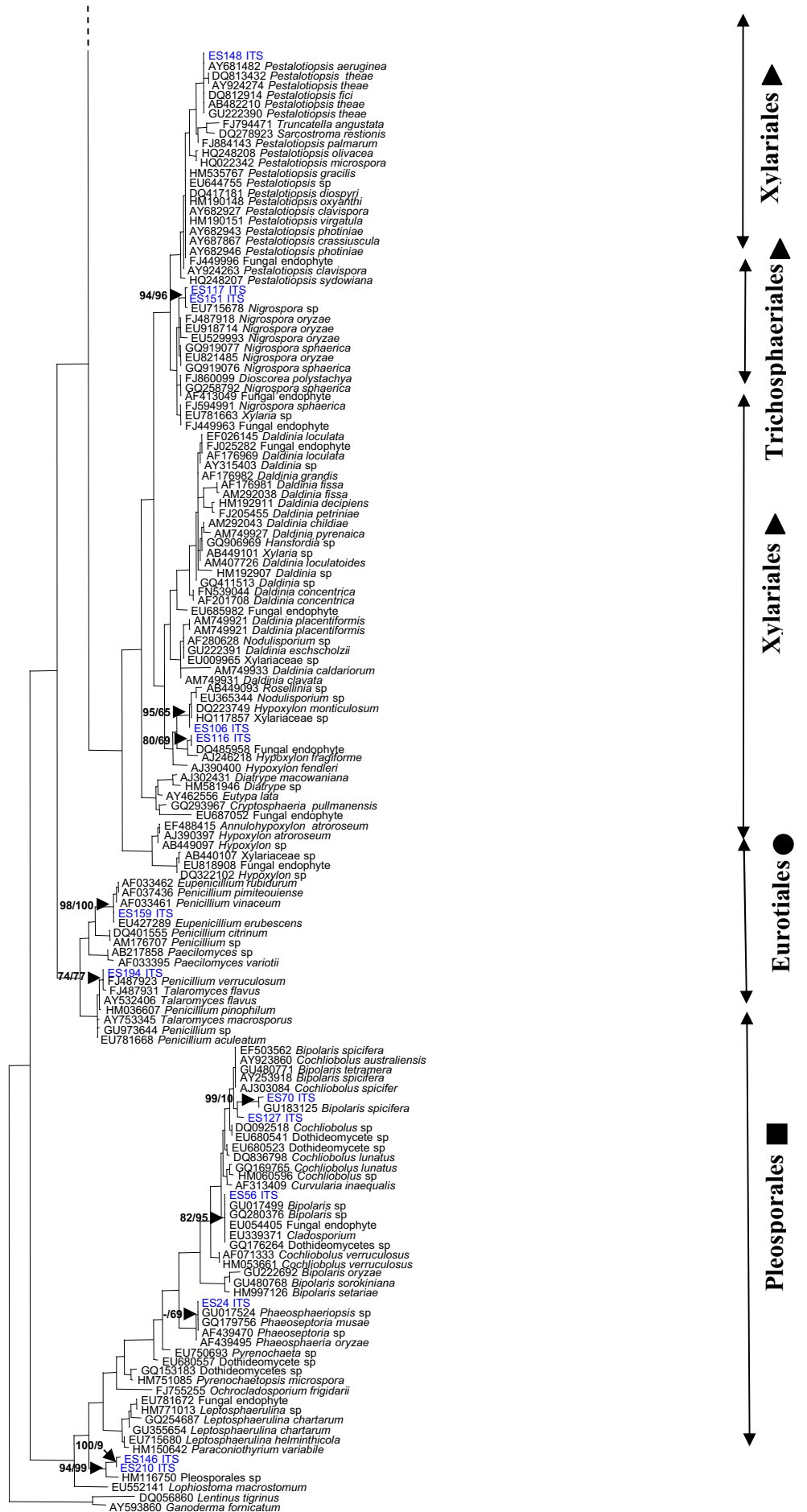


Figure 2. Phylogenetic tree of fungal endophytes belong to Basidiomycota based on Maximum Parsimony analysis of ITS rDNA sequences. Length= 921; consistency index (CI)=0.696; retention index (RI)=0.897; homoplasy index (HI)=0.304; rescaled consistency index (RC)=0.624. Bootstrap values from Maximum Parsimony (MP BS) and Neighbour Joining (NJ BS) with 500 replications are shown on the branch. MP BS values $\geq 50\%$ are shown before the slash; NJ BS values $\geq 50\%$ are shown after the slash.

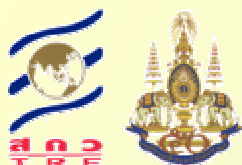




— 5 changes

Figure3. Most parsimonious tree of ITS rDNA sequences of Ascomycota. Length= 1401; consistency index (CI)=0.279; retention index (RI)=0.871; homoplasy index (HI)=0.721; rescaled consistency index (RC)=0.243. Bootstrap values from Maximum Parsimony (MP BS) and Neighbour Joining (NJ BS) with 500 replications are shown on the branch. MP BS values ≥ 50 % are shown before the slash; NJ BS values ≥ 50 % are shown after the slash. Symbols represent in the different classes; ▲ Sordariomycetes, ● Eurotiomycetes and ■ Dothideomycetes.

Presentation จำนวน 28 เรื่อง



FUNGAL METABOLITES FROM THE MARINE-DERIVED FUNGUS *NIGROSPORA* SP. PSU-F18



Kongkiat Trisuwan,^a Vatcharin Rukachaisirikul,^a Souwalak Pongpaichit,^b and Sita Preedanon^b

^aDepartment of Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University,

^bDepartment of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University,
Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand.

Introduction:

Investigation of bioactive compounds from fungi is of interest. The ethyl acetate extract from the culture broth of *Nigrospora* sp. PSU-F18 isolated from a sea fan *Annella* sp. exhibited antibacterial activity against standard *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (SA) and a clinical isolate of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) with equal MIC values of 128 $\mu\text{g/mL}$. Thus, we are interested in the isolation and structural elucidation of antibacterial metabolites.

Materials and methods:

The flask culture of the marine-derived fungus *Nigrospora* sp. PSU-F18 was filtered to give two parts, the filtrate and mycelia. The filtrate was extracted three times with an equal volume of ethyl acetate (300 mL). The ethyl acetate layer was dried over anhydrous Na_2SO_4 and evaporated to dryness under reduced pressure to obtain a brown gum (4.2 g). The crude extract from the culture broth was separated by column chromatography over Sephadex LH-20 to afford five fractions (A-E). Fraction B was purified by column chromatography over silica gel with a gradient system of methanol-dichloromethane to obtain two new compounds (1 and 2). Fraction D was further separated by column chromatography over silica gel using a gradient system of ethyl acetate-light petroleum to give three known ones (3-5).

Results and Conclusions:

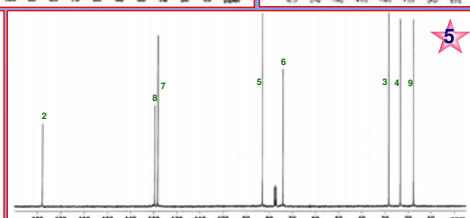
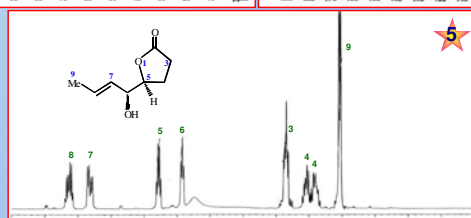
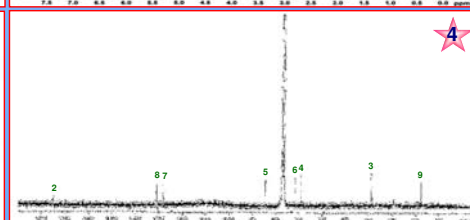
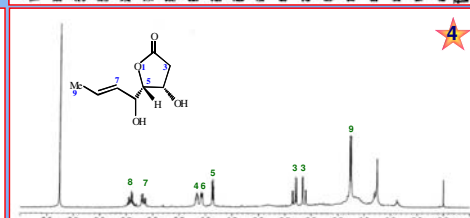
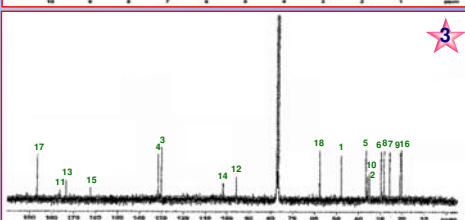
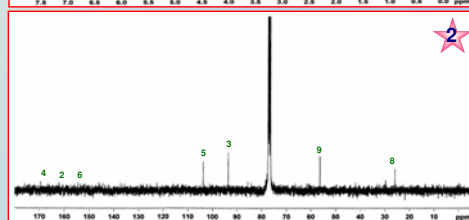
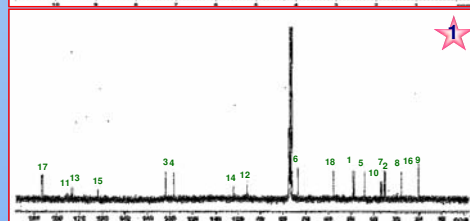
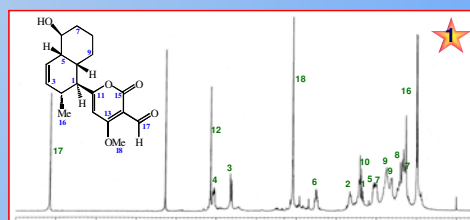
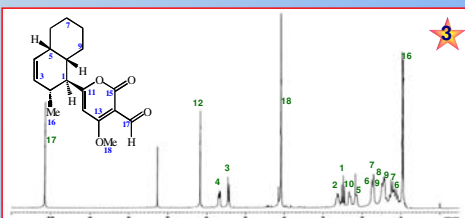
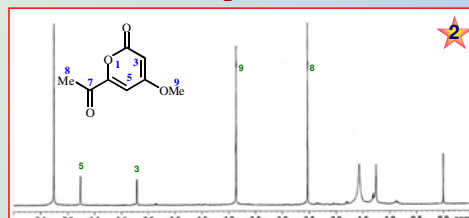
The investigation of the ethyl acetate extract from the culture broth of the marine-derived fungus *Nigrospora* sp. PSU-F18 led to the isolation of one new solanapyrone derivative (1), one new pyrone derivative (2) and three known compounds, solanapyrone A (3), musacin F (4) and 5-(S)-[1-(S)-hydroxybut-2-enyl]dihydrofuran-2-one (5). Their structures were assigned by spectroscopic methods.

References:

1. Alam, S. S., Bilton, J. N., Slawin, A. M. Z., Williams, D. J., Sheppard, R., Strange, R. N., *Phytochemistry*, 1989, 28, 2627-2630.
2. Fukushima, T., Tanaka, M., Gohbara, M., Fujimori, T., *Phytochemistry*, 1998, 48, 625-630.

Acknowledgements:

1. The Commission on Higher Education and The Thailand Research Fund for Research Grant No. RTA5180007
2. The Royal Golden Jubilee Ph.D. Program of the Thailand Research Fund and the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC) for a scholarship.





CYCLOHEXENE DERIVATIVES FROM THE MARINE-DERIVED FUNGUS *NIGROSPORA* SP. PSU-F11

Nanthaphong Khamthong^a, Vatcharin Rukachaisirikul^a, Souwalak Phongpaichit^b,
Sita Preedanon^b and Nongporn Hutadilok-Towatana^c



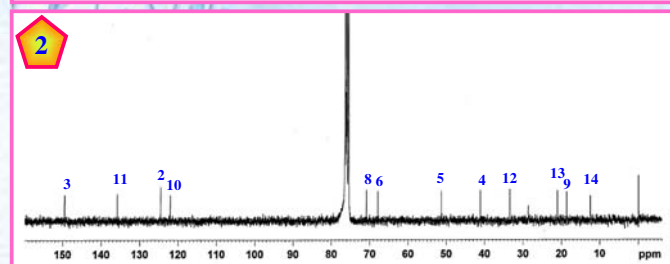
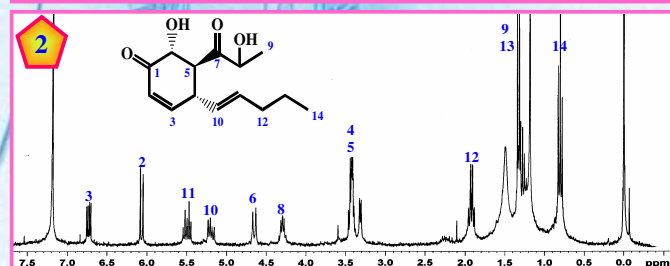
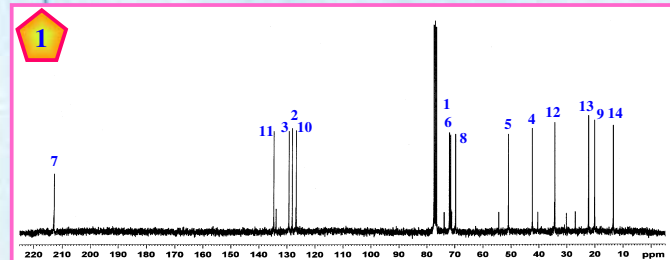
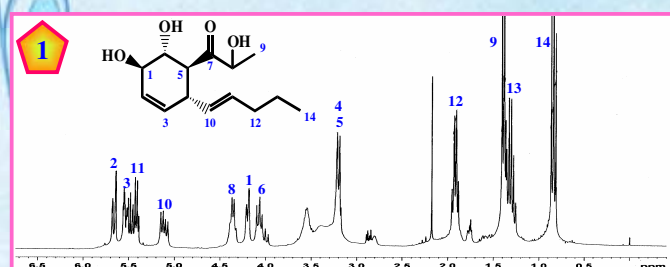
^aDepartment of Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand.

^bDepartment of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand.

^cDepartment of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand.

Abstract The ethyl acetate extract from the marine-derived fungus *Nigrospora* sp. PSU-F11, upon chromatographic separation, afforded one new cyclohexene derivative (1), one new cyclohexenone derivative (2) and one known phenol derivative, tyrosol (3). Their structures were elucidated by analysis of spectroscopic data and comparison of the ¹H and ¹³C NMR data with those previously reported.

Introduction The secondary metabolites, for example, antifungal phomalactone, phytotoxic metabolite nigrosporins A and B, were isolated from the genus *Nigrospora*. The fungus *Nigrospora* sp. PSU-F11 was sampled from the gorgonian sea fan (*Annella* sp.) which was destroyed after Tsunami disaster in the region of Similan islands in the Southern Thailand. Its ethyl acetate extract exhibited antifungal activity against *Microsporum gypseum* with a MIC value of 640 mg/mL and antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, both standard and methicillin-resistant strains with equal MIC values of 1,280 µg/mL. In addition, it displayed antioxidant activity against DPPH[•], hydroxyl[•] and superoxide[•] with IC₅₀ values of 0.14, 0.50 and 3.83 mg/mL, respectively. Thus, we are interested in the isolation and structural elucidation of bioactive metabolites from this fungus.



Methodology The flask culture of the marine-derived fungus *Nigrospora* sp. PSU-F11 (15 L) was filtered to separate into the filtrate and wet mycelia. The filtrate was extracted three times with an equal volume of EtOAc (300 mL). The combined EtOAc extracts were dried over anhydrous Na₂SO₄ and evaporated to dryness under reduced pressure to obtain a dark brown gum (497.4 mg). The EtOAc extract from the culture broth was separated by column chromatography (CC) over Sephadex LH-20 with MeOH to yield five fractions. Fraction 2 (287.9 mg) was further purified by CC over silica gel with a gradient system of MeOH-CH₂Cl₂ to afford four subfractions. The second subfraction (45.5 mg, eluted with 2% MeOH-CH₂Cl₂) was rechromatographed by CC over silica gel with a gradient system of EtOAc-light petroleum, followed by purification on preparative TLC with 1% MeOH-CH₂Cl₂ (8 runs) to gain 2 (2.4 mg). The third subfraction (101.4 mg, eluted with 2-4% MeOH-CH₂Cl₂) was subjected to reverse phase CC with a gradient system of MeOH-H₂O and subsequently purified by flash CC with a gradient system of MeOH-CH₂Cl₂ to give 1 (17.4 mg). 3 (2.7 mg) was obtained after subjecting fraction 3 (64.9 mg) to CC over silica gel with a gradient system of EtOAc-light petroleum.

Results, Discussion and Conclusion

The investigation of the ethyl acetate extract from the culture broth of the marine-derived fungus *Nigrospora* sp. PSU-F11 led to the isolation of one new cyclohexene derivative (1), one new cyclohexenone derivative (2) and tyrosol (3). Their structures were elucidated by analysis of spectroscopic data. As a result of the presence of those isolated compounds in the ¹H NMR spectrum, the mycelial extract was not further investigated.

References

1. Feng, S., Wang, X., Diao, Y., *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu* 2007, 9.
2. Kim, J.-C., Choi, G. J., Park, J.-H., Kim, H. T., Cho, K. Y., *Pest Manage. Sci.* 2001, 57, 554-559.
3. Tanaka, M., Fukushima, T., Tsujino, Y., Fujimori, T., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1997, 61, 1848-1852.

Acknowledgements

1. The Commission on Higher Education and The Thailand Research Fund for Research Grant No. RTA518007
2. The Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC) for a scholarship.
3. The Graduate School and Department of Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University for partial support.

Bioactive Substances from *Garcinia* Species and their Endophytic Fungi

Vatcharin Rukachaisirikul

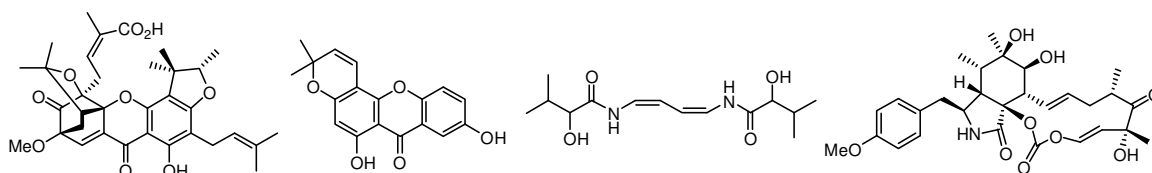
Department of Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University,

Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

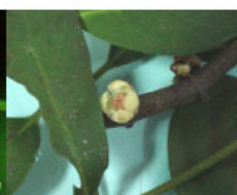
vatcharin.r@psu.ac.th

Plants of the genus *Garcinia* are encountered mainly in tropical rainforests and have been used in traditional medicines for wound healing, anti-inflammatory, anti-diarrhea and cytotoxic activities. They have produced an abundance of biologically active and structurally interesting natural products. Our research work on the discovery of bioactive substances from *Garcinia* plants grown in the southern part of Thailand led to the isolation of various types of compounds, including biphenyls, biflavones, benzophenones, benzopyrans, depsidones, isocoumarins, phloroglucinols, quinones, terpenes and xanthenes. Some of them exhibited potent antibacterial,¹⁻³ anti-HIV 1 and antioxidant⁴ activities.

The discovery of taxol, an anticancer drug from the endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora* isolated from the Himalayan yew tree *Taxus wallichiana*, draws our interest to search for bioactive compounds produced by fungal endophytes in *Garcinia* plants. Investigation of ten endophytic fungi resulted in the isolation of significant antifungal,⁵ antibacterial⁶ and antimycobacterial⁷ metabolites. This presentation will highlight our work on antibacterial xanthenes from *G. nigrolineata* and *G. scortechnikii*. The isolation of bioactive compounds from the endophytic fungi will also be presented.



G. hanburyi



G. scortechnikii



G. nigrolineata



Fungal endophytes
from *Garcinia* species

1. Rukachaisirikul, V.; Kaewnok, W.; Koysomboon, S.; Phongpaichit, S.; Taylor, W. C. *Tetrahedron* **2000**, 56, 8539-8543.
2. Rukachaisirikul, V.; Kamkaew, M.; Sukavisit, D.; Phongpaichit, S.; Sawangchote, P.; Taylor, W. C. *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 1531-1535.
3. Rukachaisirikul, V.; Phainuphong, P.; Sukpondma, Y.; Phongpaichit, S.; Taylor, W. C. *Planta Medica* **2005**, 71, 165-170.
4. Rukachaisirikul, V.; Naklue, W.; Phongpaichit, S.; Hutadilok-Tawatana, N.; Maneenoon, K. *Tetrahedron* **2006**, 62, 8578-8585.
5. Pongcharoen, W.; Rukachaisirikul, V.; Phongpaichit, S.; Rungjindamai, N.; Sakayaroj, J. *J. Nat. Prod.* **2006**, 69, 856-858.
6. Pongchareon, W.; Rukachaisirikul, V.; Phongpaichit, S.; Sakayaroj, J. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, 55 (9), 1404-1405.
7. Rukachaisirikul, V.; Sommart, U.; Phongpaichit, S.; Sakayaroj, J.; Kirtikara, K. *Phytochemistry* **2008**, 69, 783-787.



Vatcharin Rukachaisirikul, Prince of Songkla Univ. (B.Sc. 1979), Mahidol Univ. (M.Sc., 1981), Australian National Univ. (Ph.D. 1987, Prof. R. W. Rickards), Research Fellow, Philipps Univ. (Prof. R. W. Hoffmann, 1990-1991), Visiting Fellow, Nagoya Univ. (Prof. M. Isobe, 1997, 1998). Prof., Prince of Songkla University (2006-present). Research field: Bioactive natural products from medicinal plants and fungi.



Antibacterial Metabolites from Marine-Derived Fungi *Nigrospora* sp., PSU-F5, F11 and F12



Vatcharin Rukachaisirikul,^a Kongkiat Trisuwan,^a Nanthaphong Khamthong,^a
Yaowapa Sukpondma,^a Sita Preedanon,^b Souwalak Phongpaichit^b and Jariya Sakayaroj^c

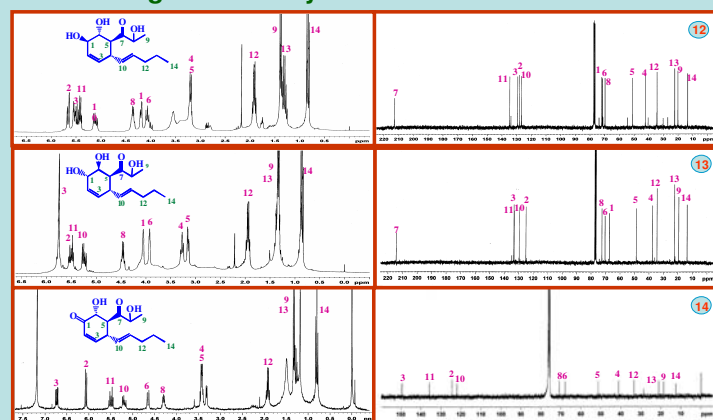
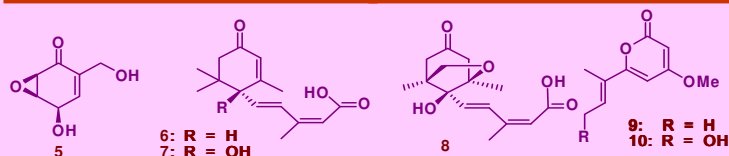
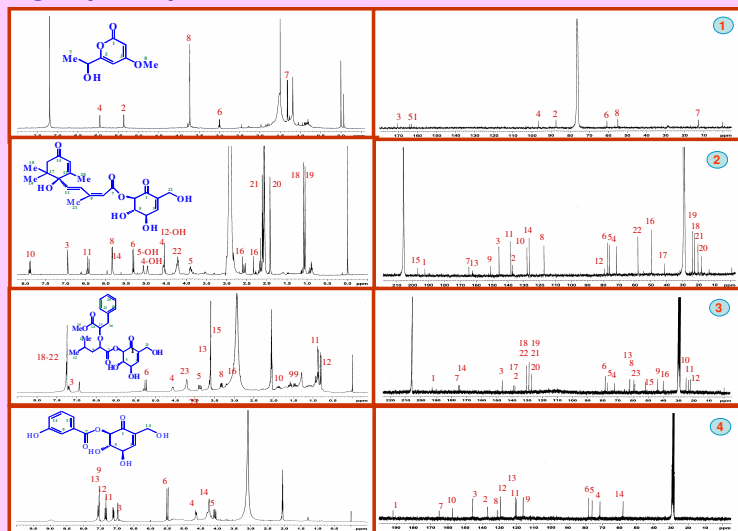
^a Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), ^b Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand, ^c National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Thailand Science Park, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand.

Introduction: Fungi belonging to the genus *Nigrospora* have been an important source of bioactive secondary metabolites, such as plant growth-inhibiting nigrosporolide and phomalactone, phytotoxic and antibacterial nigrosporins, and phytotoxic lactones. In an ongoing search for bioactive metabolites from marine-derived fungi, the crude extracts from culture broth of *Nigrospora* sp. PSU-F5, F11 and F12 exhibited antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (SA) and a clinical isolate of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). These fungi were isolated from a gorgonian sea fan (*Annella* sp.) near Similan Islands and identified on the basis of sequence analyses of the ribosomal internal transcribed spacer and partial large subunit rDNA. Eight new compounds including one cyclohexenone, two cyclohexenes, two pyrones and three epoxydons were isolated from these fungi together with 13 known metabolites. The structures were elucidated on the basis of spectroscopic data, especially 1D and 2D NMR. Their antibacterial activity against SA and MRSA was evaluated.

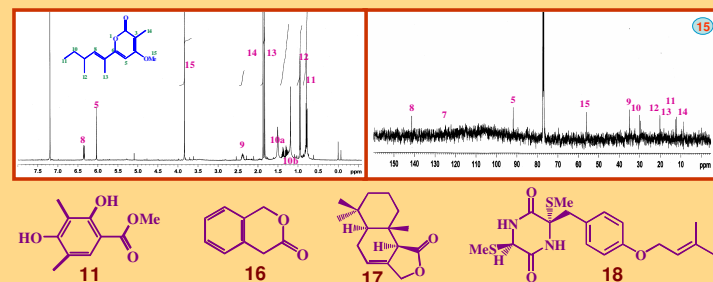
Fermentation and Isolation: Each fungus was grown on potato dextrose agar at 25°C for 5 days. Three pieces (0.5x0.5 cm²) of mycelial agar plugs were inoculated into 500 ml Erlenmeyer flasks containing 300 ml of potato dextrose broth and incubated at room temperature for 4 weeks. The culture of each isolated fungus (10 l) was filtered to separate into the filtrate and wet mycelia. The filtrate was extracted with EtOAc (3x300 ml). The combined EtOAc extracts were dried over anhydrous Na₂SO₄ and evaporated to dryness under reduced pressure to obtain a dark brown gum. The crude EtOAc extract was separated by CC over Sephadex LH-20 eluted with MeOH to give fractions. Selected fractions were further purified by CC or precoated TLC to obtain pure compounds.

Results: one new pyrone (1), three new epoxydons (2-4), and nine known compounds, (+)-epoxydon (5), (+)-deoxyabscisic acid (6), abscisic acid (7), (+)-phaseic acid (8), pestalopyrone (9), hydroxypestalopyrone (10), clavatul (11), 3-hydroxymethylphenol and 3,4-dihydro-3,4,8-trihydroxy-1[2H]-naphthalenone were produced from *Nigrospora* sp. PSU-F5.

Two new cyclohexenes (12-13) and one new cyclohexenone (14) were obtained from *Nigrospora* sp. PSU-F11 together with tyrosol.



One new pyrone (15) and three known compounds, 3-isochromanone (16), (-)-drimenien (17) and diketo-piperazine (18), were isolated from *Nigrospora* sp. PSU-F12.



Antibacterial Activity: The isolated metabolites, except for 1, 9, 11, 15 and naphthalenone derivative for which insufficient material was available, were tested for antibacterial activity against SA and MRSA. Only compounds isolated from *Nigrospora* sp. PSU-F5 displayed interesting results while the remaining compounds exhibited very weak activity. Compound 2 was more active than 5 against SA (MIC 64 µg/ml), but less active against MRSA (MIC > 128 µg/ml). Compound 5 gave the MIC value of 128 µg/ml against both strains.

Metabolites from Marine-derived Fungi

Vatcharin Rukachaisirikul,^a Kongkiat Trisuwan,^a Nanthaphong Khamthong,^a

Yaowapa Sukpondma,^a Jariya Sakayaroj^b and Souwalak Phongoaichit^c

^a Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC),
Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

^b National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand Science Park,
Klong Luang, Pathumthani, 12120, Thailand

^c Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University,
Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

Marine-derived fungi are a rich source of structurally unique and biologically active secondary metabolites and a promising source of pharmaceutical leads. During our ongoing search for bioactive natural products from marine-derived fungi, many fungal isolates have been isolated from a gorgonian sea fan (*Annella* sp.), collected near the Similan Islands, Southern Thailand. They were screened for their potential to produce antimicrobial and antioxidation substances. The fungi were selected on the basis of their biological data and ¹H NMR profiles for further study on bioactive metabolites and new compounds. Structural elucidation of secondary metabolites, isolated from the marine-derived fungi in the genera *Nigrospora*, *Penicillium*, *Xylaria* and *Fusarium*, and their biological activities will be presented.

Isolation of endophytic fungi from seagrass *Thalassia hemprichii* and their antimicrobial activity

O. Supaphon¹, S. Phongpaichit¹ and V. Rukachaisirikul²

¹Department of Microbiology and Natural Products Research Center, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand

²Department of Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand

Introduction

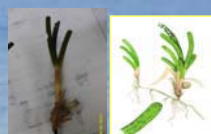
Drug resistant problem has increased worldwide. There is a need to find novel sources of antimicrobial agents. Endophytes are microbes that live asymptotically within various plant tissues (Gao *et al.*, 2005). It was reported that 51% of biologically active substances were isolated from endophytic fungi (Schulze *et al.*, 2002). Most of endophytic fungi studied were from terrestrial plants.

Seagrasses are marine plants with the same basic structures as the terrestrial plants. However, endophytic fungi from seagrasses have been rarely studied, with few reports (Wilson, 1998; Alva *et al.*, 2002). The coastal areas of Trang Province have many rich seagrass beds (Adulyanukosol *et al.*, 2007). Therefore, this study aimed to isolate endophytic fungi from seagrass *Thalassia hemprichii* from Trang Province and screen for their ability to produce antimicrobial active metabolites against human pathogens.

Materials and Methods

Seagrass sample collection

Seagrass samples were randomly collected from Trang Province every month for a period of 1 year. The samples were identified as *Thalassia hemprichii* according to their morphology.

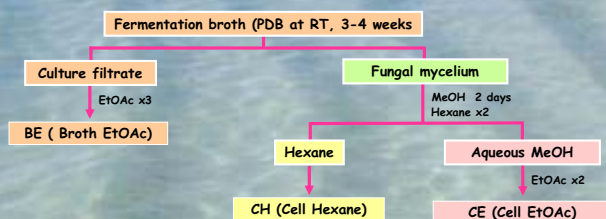


Thalassia hemprichii

Fungal isolation

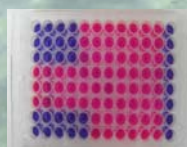
Endophytic fungi were isolated from surface-sterilized leaves, roots and rhizomes of *T. hemprichii* into axenic culture. All isolates were grown on PDA and kept at RT until use.

Extract preparation



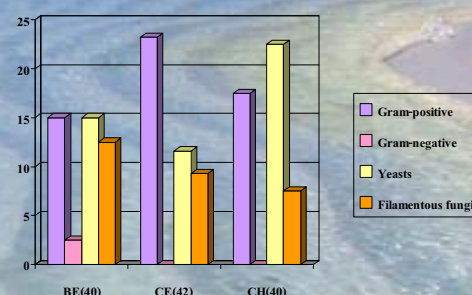
Antimicrobial assays

- Test microorganisms: Gram-positive bacteria (*S. aureus* and methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA), Gram-negative bacteria (*E. coli* and *P. aeruginosa*), yeasts (*C. albicans* and *C. neoformans*) and fungi (*M. gypseum* and *P. marneffeii*).
- Screening test at 200 µg/ml by colorimetric broth microdilution test.
- Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) and Minimum Bactericidal Concentrations (MBCs) or Minimum Fungicidal Concentrations (MFCs) by the same colorimetric broth microdilution.



Plates after testing for antimicrobial activity in modified resazurin assay. Pink colour indicates growth and blue means inhibition of growth.

2. Percentages of active fungal crude extracts against at least one microorganism



3. The most potential of endophytic fungi

Fungal code	Extracts	MIC/MBC or MFC (µg/ml)			
		<i>S. aureus</i>	MRSA	<i>C. neoformans</i> 1	<i>C. neoformans</i> 2
ES-43	CH			8/16	
ES-73	CE	8/>200	8/>200	1/4	4/8
Vancomycin		0.5/1	1/2		
Amphotericin B				1/4	1/4

Conclusions

- Endophytic fungi isolated from seagrass *T. hemprichii* showed the great ability to produce antimicrobial metabolites against Gram-positive bacteria and fungi, but not against Gram-negative bacteria.
- An unidentified endophytic fungus ES-73 was most active against MRSA and *C. neoformans* followed by ES-43 against *C. neoformans*.

References

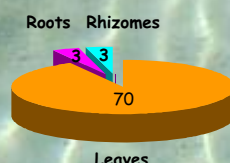
- Adulyanukosol K, Thongsukdee S, Hara T, Arai N and Tsuchiya M. 2007. Mar Biol. 151: 1887-1891.
- Alva P, McKenzie EHC, Pointing SB, Pena-Muralla R and Hyde KD. 2002. Fungal Diversity Research Series 7: 167-178.
- Gao X, Zhou H, Xu D, Yu C, Chen Y and Qu L. 2005. FEMS Microbiol Lett. 249: 255-266.
- Schulz B, Boyle AM, Draeger S, Rommert AM and Krohn K. 2002. The British Mycological Society. 106: 996-1004.
- Wilson W. 1998. Isolation of endophytes from seagrasses from Bermuda. University of New Brunswick. pp.4-69.

Acknowledgments

- The Royal Golden Jubilee Ph.D. Program
- Graduate School, Prince of Songkla University
- Thailand Research Fund for the TRF Senior Research Scholar (Grant No.RTA5180007)
- The Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC)

1. Number of isolates of endophytic fungi from *T. hemprichii*

Seventy-six endophytic fungi were isolated, mostly from leaves of *T. hemprichii*. Only 12 isolates (22.4%) could be identified into six genera based on morphological characteristics: *Cladosporium* sp. (2), *Curvularia* sp. (3), *Fusarium* sp. (3), *Nigrospora* sp. (1), *Penicillium* sp. (2), and *Trichoderma* sp. (1).



Bioactive Metabolites from Sea Fan-derived Fungi

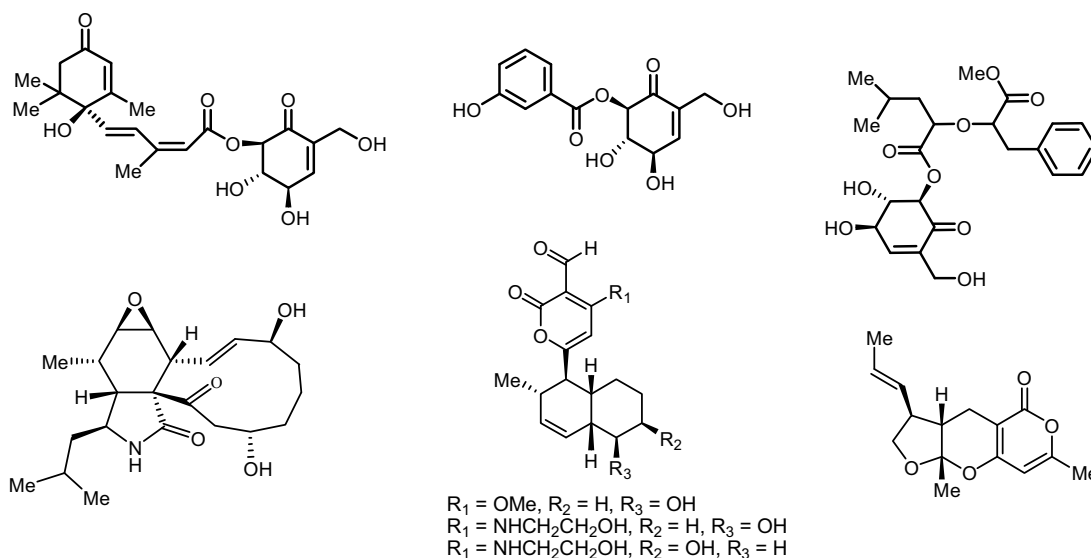
Vatcharin Rukachaisirikul

Department of Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University,
Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

vatcharin.r@psu.ac.th

Marine-derived fungi have become an important source of structurally unique and pharmacologically active secondary metabolites. As part of our continuing search for bioactive metabolites from marine-associated fungi, many fungal strains were isolated from a gorgonian sea fan of the genus *Annella*. Their broth extracts were

screened for potential to produce antimicrobial and antioxidation substances. The fungi were selected for further study on the basis of the biological and ^1H NMR data of the crude extracts. This presentation will focus on metabolites isolated from nine sea fan-derived fungi and their biological activity.



1. Trisuwan, K.; Rukachaisirikul, V.; Sukpondma, Y.; Preedanon, S.; Phongpaichit, S.; Rungjindamai, N.; Sakayaroj, J. *J. Nat. Prod.* **2008**, 71(8), 1323-1326.
2. Trisuwan, K.; Rukachaisirikul, V.; Sukpondma, Y.; Preedanon, S.; Phongpaichit, S.; Sakayaroj, J. *Phytochemistry* **2009**, 70(3), 554-557.
3. Trisuwan, K.; Rukachaisirikul, V.; Sukpondma, Y.; Preedanon, S.; Phongpaichit, S.; Sakayaroj, J. *Chem. Pharm. Bull.* **2009**, 57 (10), 1100-1102.
4. Rukachaisirikul, V.; Khamthong, N.; Sukpondma, Y.; Pakawatchai, C.; Phongpaichit, S.; Sakayaroj, J.; Kirtikara, K. *Chem. Pharm. Bull.* **2009**, 57 (12), *in press*.



Vatcharin Rukachaisirikul, Prince of Songkla Univ. (B.Sc. 1979), Mahidol Univ. (M.Sc., 1981), Australian National Univ. (Ph.D. 1987, Prof. R. W. Rickards), Research Fellow, Philipps Univ. (Prof. R. W. Hoffmann, 1990-1991), Visiting Fellow, Nagoya Univ. (Prof. M. Isobe, 1997, 1998). TRF Senior Research Scholar (2008-present). Prof., Prince of Songkla University (2006-present). Research field: Bioactive natural products from medicinal plants and fungi.



METABOLITES FROM THE ENDOPHYTIC FUNGUS *BOTRYOSPHERA RHO*DINA PSU-M114

Jiraporn Arunpanichlert,¹ Vatcharin Rukachaisirikul,¹ Souwalak Pongpaichit² and Jariya Sakayaroj³

¹ Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112.

² Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112.

³ National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Thailand Science Park, Klong Luang, Pathumthani 12120.

ABSTRACT: Chromatographic separation of the ethyl acetate extract from the broth of endophytic fungus *Botryosphaeria rhodina* PSU-M114 afforded a new carboxylic acid derivative (1) together with six known compounds, (*R*)-(-)-mellein (2), *cis*-4-hydroxymellein (3), *trans*-4-hydroxymellein (4), (*R*)-(-)-5-hydroxymellein (5), 5,6-dihydro-6-propylpyran-2-one (6) and (4*R*, 6*S*)-tetrahydro-4-hydroxy-6-propylpyran-2-one (7). Their structures were elucidated by analysis of spectroscopic data, especially 1D and 2D NMR data.

INTRODUCTION: *Botryosphaeria rhodina* is one of the most widely distributed endophytic fungi. This microorganism produces an array of bioactive natural products, such as lasiodiplodin, inosin, *p*-hydroxyphenylethanol and ergosterol. In an ongoing search for bioactive fungal metabolites, we discovered antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* in the broth extract of *B. rhodina* PSU-M114, isolated from the leaves of *Garcinia mangostana*. We described herein the isolation and characterization of seven metabolites isolated from the broth extract.

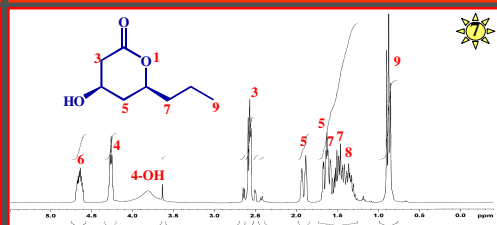
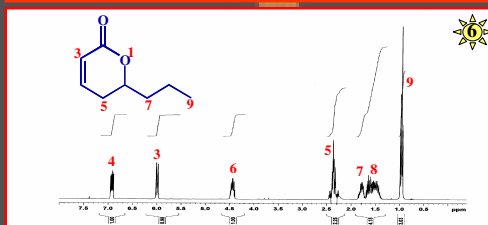
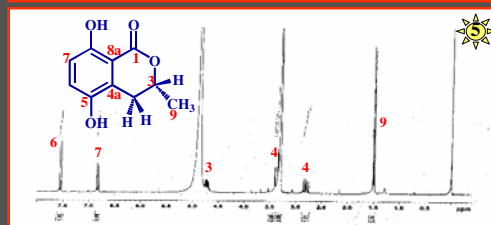
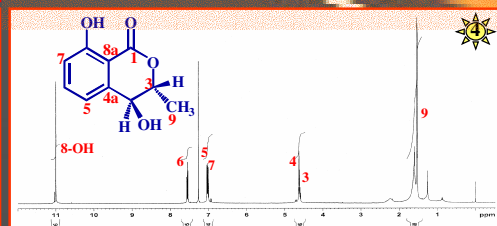
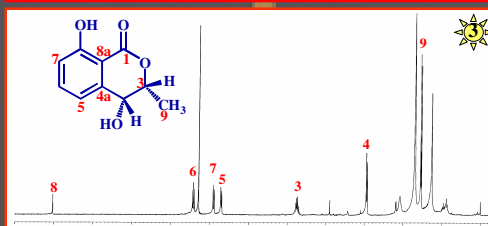
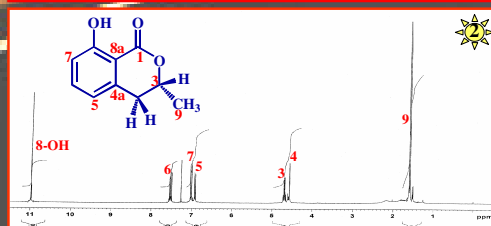
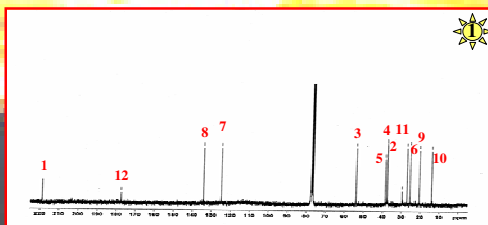
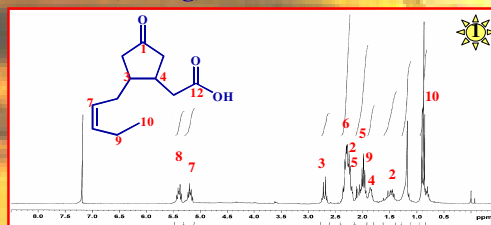
MATERIALS AND METHODS: The culture of the endophytic fungus *B. rhodina* PSU-M114 was filtered to give two parts; the filtrate and wet mycelia. The filtrate was extracted three times with an equal volume of EtOAc (300 mL). The EtOAc extract was dried over anhydrous Na₂SO₄ and then evaporated to dryness under reduced pressure to give a brown gum (2.12 g). The EtOAc extract was separated by CC over Sephadex LH-20 to afford five fractions. Fraction 2 (1.12 g) was separated by CC over silica gel to afford five subfractions. The second subfraction yielded 2 (3.3 mg) and 6 (124.2 mg). The fourth subfraction (393.3 mg) was separated by CC over silica gel to afford four subfractions. The second subfraction afforded 7 (130.3 mg). The third subfraction was separated by preparative TLC with 3% MeOH-CH₂Cl₂ (4 runs) as a mobile phase to afford 1 (9.3 mg). Fraction 3 (400.5 mg) was purified by CC over silica gel to afford 3 (1.7 mg) and 4 (1.2 mg). Fraction 4 (63.3 mg) was separated by CC over Sephadex LH-20 to afford 5 (2.6 mg).

RESULTS DISCUSSION AND CONCLUSIONS:

The investigation of the ethyl acetate extract from the broth of the endophytic fungus *B. rhodina* PSU M114 led to the isolation of a new carboxylic acid derivative (1) together with six known compounds, (*R*)-(-)-mellein (2), *cis*-4-hydroxymellein (3), *trans*-4-hydroxymellein (4), (*R*)-(-)-5-hydroxymellein (5), 5,6-dihydro-6-propylpyran-2-one (6) and (4*R*, 6*S*)-tetrahydro-4-hydroxy-6-propylpyran-2-one (7). Their structures were elucidated on the basis of spectroscopic data.

KEYWORDS:

B. rhodina, Carboxylic acid derivative, Mellein



REFERENCES:

1. Devys, M., Barbier, M., Bousquet, J-F., Kollmann, A. *Phytochemistry*. 1994, 35(3), 825-826.
2. Dimitriadis, C., Gill, M., Harte, M. F. *Tetrahedron: Asymmetry*. 1997, 8(13), 2153-2158.
3. Izawa, Y., Hirose, T., Shimizu, T., Koyama, K., Natori, S. *Tetrahedron*. 1989, 45(8), 2323-2335.

ACKNOWLEDGEMENTS:

1. The Commission on Higher Education and The Thailand Research Fund for Research Grant No. RTA5180007
2. The Development and Promotion of Science and Technology Talents Project (DPST) for a scholarship.
3. Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Faculty of Science and Graduate School, Prince of Songkla University for partial support.



METABOLITES FROM THE MARINE-DERIVED FUNGUS *NIGROSPORA* SP. PSU-F12



Nanthaphong Khamthong¹, Vatcharin Rukachaisirikul¹, Souwalak Phongpaichit², Sita Preedanon²,
PERCH-CIC Nongporn Hutadilok-Towatana³ and Jariya Sakayaroj⁴

- ¹ Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, E-mail: nant.ph@gmail.com
² Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112.
³ Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112.
⁴ National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Thailand Science Park, Klong Luang, Pathumthani 12120.

Abstract The ethyl acetate extract from the marine-derived fungus *Nigrospora* sp. PSU-F12, upon chromatographic separation, afforded one new α -pyrone derivative (1) together with three known compounds, 3-isochromanone (2), (-)-drimenin (3) and diketopiperazine derivative (4). Their structures were elucidated by analysis of spectroscopic data and comparison of the ¹H and ¹³C NMR data with those previously reported.

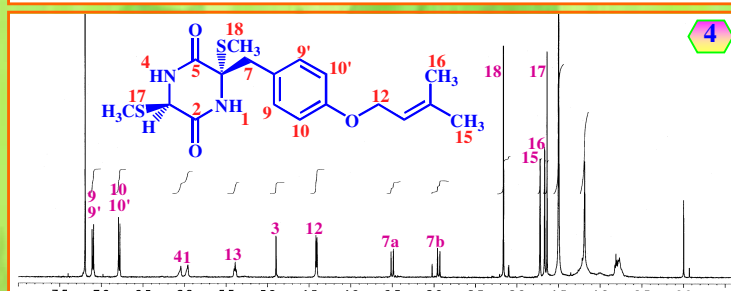
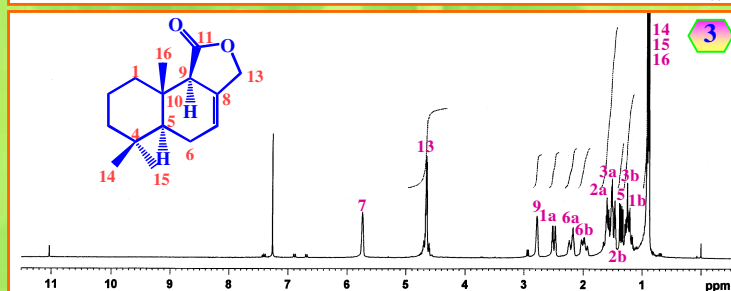
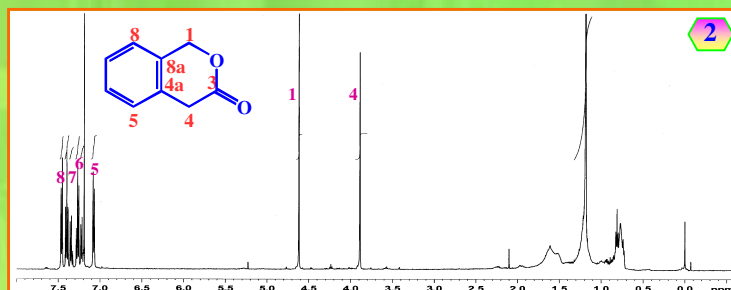
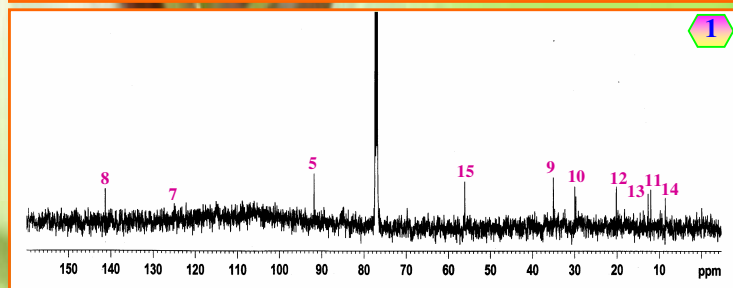
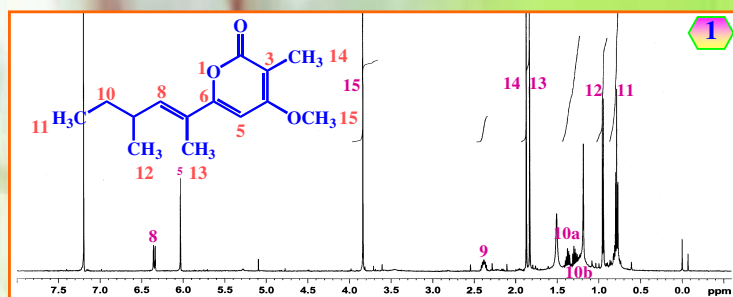
Introduction The secondary metabolites, for example, antifungal phomalactone, phytotoxic metabolite nigrosporins A and B were isolated from the genus *Nigrospora*. The fungus *Nigrospora* sp. PSU-F12 was sampled from the gorgonian sea fan (*Annella* sp.) which was destroyed after Tsunami disaster in the region of Similan islands in Southern Thailand. Its ethyl acetate extract exhibited antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* with a MIC value of 1,280 μ g/mL and antioxidant activity in DPPH[•] assay with a IC₅₀ value of 1.53 mg/mL. Thus, we are interested in the isolation and structural elucidation of bioactive metabolites from this fungus.

Methodology The flask culture of the marine-derived The investigation of the ethyl acetate extract from the broth of fungus *Nigrospora* sp. PSU-F12 (10.8 L) was filtered to separate the fungus *Nigrospora* sp. PSU-F12 led to the isolation of one new into the filtrate and wet mycelia. The filtrate was extracted three α -pyrone derivative (1), together with 3-isochromanone (2), (-)-times with an equal volume of EtOAc (300 mL). The EtOAc layer drimenin (3) and diketopiperazine derivative (4). Their structures were elucidated by analysis of spectroscopic data.

Results, Discussion and Conclusion

Acknowledgements

1. The Commission on Higher Education and The Thailand Research Fund for Research Grant No. RTA5180007
2. Department of Chemistry, Faculty of Science and Graduate School, Prince of Songkla for partial support.
3. The Center for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC)



References

1. J. Almena, F. Foubelo and M. Yus, *Tetrahedron*, 1995, 51, 3351-3364.
2. H. Akita, M. Nozawa, A. Mitsuda and H. Ohsawa, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2000, 11, 1375-1388.
3. M. Chu, R. Mierzwa, I. Truumees, F. Gentile, M. Patel, V. Gullo, T. M. Chan and M. S. Puar, *Tetrahedron Lett.*, 1993, 34, 7537-7540.
4. J.-C. Kim, G. J. Choi, J.-H. Park, H. T. Kim and K. Y. Cho, *Pest Manage. Sci.*, 2001, 57, 554-559.
5. M. Tanaka, T. Fukushima, Y. Tsujino and T. Fujimori, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1997, 61, 1848-1852.



Metabolites from the Marine-Derived Fungus *Penicillium* sp. PSU-F40

Kongkiat Trisuwan,^a Vatcharin Rukachaisirikul,^a Souwalak Pongpaichit,^b
Sita Preedanon^c and Jariya Sakayaroj^c



^a Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry, ^b Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand
^c National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Thailand Science Park, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand

Introduction: Fungi in the genus *Penicillium* are well known to be rich in a variety of compounds, polyketide-terpenoid, alkaloid and quinone derivatives. Some of these exhibited a wide range of biological and pharmacological activities, e.g., anticancer, antifungal and antibacterial. Thus, investigation of bioactive compounds from the genus *Penicillium* is of interest. We described herein the isolation and characterization of six metabolites isolated from the broth extract of the marine-derived fungus *Penicillium* sp. PSU-F40.

Methods: The culture of the fungus *Penicillium* sp. PSU-F40 was filtered to give two parts; the filtrate and mycelia. The filtrate was extracted with ethyl acetate. The crude extract was separated by column chromatography over Sephadex LH-20 to afford five fractions (A-E). Fraction B was purified by column chromatography over silica gel with a gradient system of MeOH-CH₂Cl₂ to obtain compounds 5 and 6. Fraction C was further separated using the same procedure as fraction B to give compounds 1 and 2. Fraction D was purified by CC with a gradient system of EtOAc-light petroleum to give three fractions Compounds 3 and 4 were obtained from the second fraction after purification by silica gel CC with a gradient system of MeOH-CH₂Cl₂ followed by PTLC with EtOAc-light petroleum.

Results: The investigation of the ethyl acetate extract from the culture broth of the marine-derived fungus *Penicillium* sp. PSU-F40 led to the isolation of two new compounds, one isoquinoline derivative (1) and one isochroman derivative (4), together with four known compounds, 2-hydroxy-7-methyl-2-(1-methylethyl)furo[3,2-*h*]isoquinoline-3-one (2), 7-methyl-2-(1-methylethylidene)furo[3,2-*h*]isoquinoline-3-one (3), nicotinic acid (5) and 1-(2,4-dihydroxy-6-methylphenyl)-3-methyl-1-butanone (6). Their structures were assigned by spectroscopic methods.

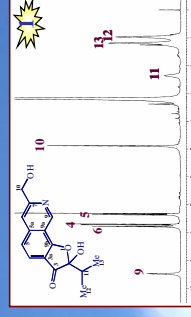
Conclusion: Two new metabolites (1 and 4) and four known compounds (2-3 and 5-6) were isolated from the broth extract of *Penicillium* sp. PSU-F40.

Acknowledgements: 1. The Commission on Higher Education and the Thailand Research Fund for Research Grant No. RTA5180007.
2. The Royal Golden Jubilee Ph.D. Program of the Thailand Research Fund (Grant No. PHD/0109/2550) and the Center for Innovation in Chemistry for a scholarship.

3. The Graduate School and Department of Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University for partial support.

Selected References: 1. Kohn, J.; Hiramatsu, H.; Nishio, M.; Sakurai, M.; Okuda, T.; Komatsubara, S. *Tetrahedron* 1999, 55, 11247-11252.
2. Soman, A. G.; Gloer, J. B.; Wicklow, D. T. *J. Nat. Prod.* 1999, 62(2), 386-388.
3. Sakai, K.; Satoh, Y.; Doi, K.; Kitamura, K. *PCT/JP1998/002266*, 1998.

Keywords: Marine-derived fungus, nicotinic acid, *Penicillium* sp., isoquinoline, isochroman,





Cyclohexenone, Mycoepoxydiene and Dothiorelone Derivatives from Diaporthaceous Fungus PSU-H2

Ubontia Sommart,^a Vatcharin Rukachaisirikul,^a Souwalak Phongpaichit,^b

Jariya Sakayaroj,^c Zuboidah Hajjwangoh^d

^aDepartment of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand.

^bDepartment of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand.

^cNational Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Thailand Science Park, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand.

^dFaculty of Science Technology and Agriculture, Yala Rajabhat University, Yala 95000, Thailand.

Abstract: Diaporthaceous fungus PSU-H2, an endophytic fungus isolated from the leaves of *Garcinia hombroniana*, produced one new cyclohexenone derivative (1) together with six known ones, 2,3-dihydromycoepoxydiene (2), (+)-mycoepoxydiene (3), deacetyl mycoepoxydiene (4), tyrosol (5), dothiorelone A (6), and dothiorelone C (7). Their structures were elucidated by spectroscopic methods. Compounds 3 and 4 exhibited interesting cytotoxic activity against MCF-7, human breast cancer cell lines, with the IC₅₀ values of 2.24 and 8.70 µg/ml, respectively.

Introduction: In an ongoing search for biological active substances from the endophytic fungi, the broth and mycelial extracts of Diaporthaceous fungus PSU-H2, isolated from *Garcinia hombroniana*, showed interesting antioxidant activity in 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical assay. We described herein the isolation and structural elucidation of one new compound (1) together with six known ones (2-7). Their structures were assigned by spectroscopic methods and comparison of the ¹H- and ¹³C-NMR data with those reported in literatures. The isolated compounds were evaluated for antioxidant activity and cytotoxicity toward human breast cancer cell lines.

Materials and Methods: The ethyl acetate extracts from the culture broth and mycelia of Diaporthaceous fungus PSU-H2 were separated by Sephadex LH-20 column chromatography. Selected fractions were further purified by column chromatography and/or precoated TLC to obtain seven compounds. The structures were determined by analysis of spectroscopic data, especially 1D and 2D NMR spectroscopic data. Their antioxidant and cytotoxic activities were evaluated.

Results, Discussion and Conclusion: The investigation of the ethyl acetate extracts from the culture broth and mycelia of Diaporthaceous fungus PSU-H2 led to the isolation of one new compound (1) together with five known ones (2-6) from the broth extract as well as one known compound (7) from the mycelial one. Although the crude ethyl acetate extracts of the broth and mycelia showed strong antioxidant activity, compound 5 which exhibited the best activity among the isolated compounds, showed low radical scavenging potency (IC₅₀ value of 0.84 mg/ml). Dothiorelone and mycoepoxydiene derivatives previously displayed interesting cytotoxic activity. Compounds 2-4 and 7, which were obtained in sufficient amount, were further tested for cytotoxic activity against MCF-7 (human breast cancer cell lines). Compound 3 exhibited potent activity with the IC₅₀ value of 2.24 µg/ml while compound 4 was less active with the IC₅₀ value of 8.70 µg/ml. The remaining metabolites have no significant activity with the IC₅₀ value more than 50 µg/ml.

Acknowledgements:

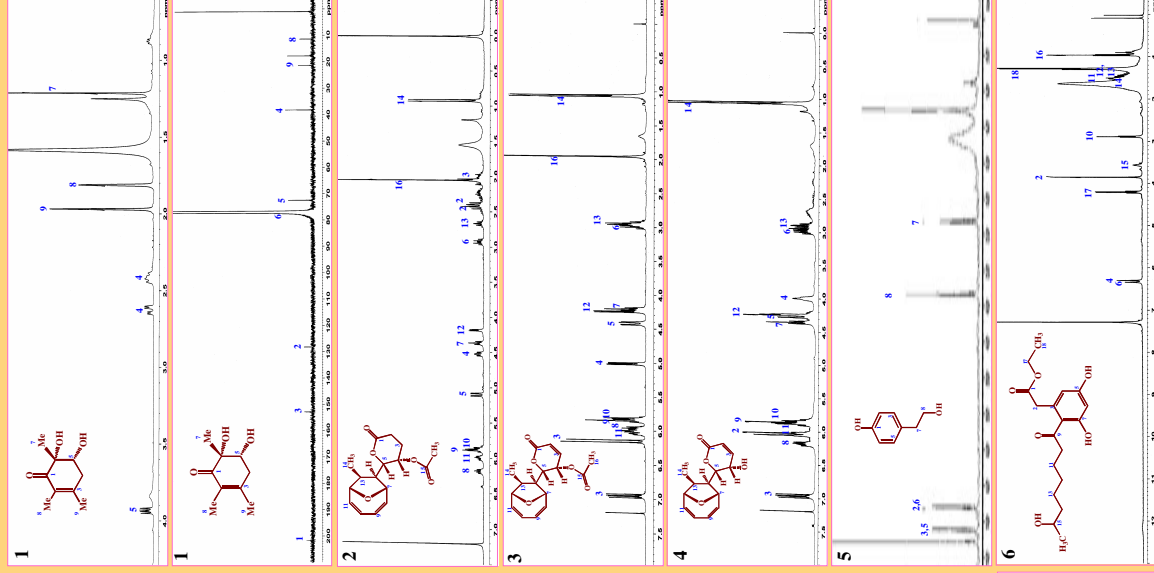
1. The Royal Golden Jubilee Ph.D. Program of the Thailand Research Fund (Grant No. PHD/0232/2549) and the Center for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC) for a scholarship.
2. The Commission on Higher Education and the Thailand Research Fund for Research Grant No. RTA5180007.
3. Graduate School and Department of Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, for partial support.

References:

1. Capasso, R.; Cristinzio, G.; Evidente, A.; Scognamiglio, F. *Phytochemistry* 1992, 31, 4125-4128.
2. Prachya, S.; Wiyakrutta, S.; Sriubolmas, N.; Ngamrojanavanich, N.; Mahidol, C.; Ruchirawat, S.; Kittakoop, P. *Planta Med.* 2007, 73, 1418-1420.
3. Xu, Q.; Huang, J.; Huang, Y.; Zheng, Z.; Song, S.; Zhang, Y.; Su, W. *Acta Oceanol. Sin.* 2004, 23, 541-547.

Keywords:

Diaporthaceae
Cyclohexenones
Mycoepoxydienes
Dothiorelones
Antioxidant activity
Cytotoxic activity



Metabolites From The Endophytic Fungi *Botryosphaeria Rhodina* PSU-M35 And PSU-M114

Jiraporn Arunpanichlert,^a Vatcharin Rukachaisirikul,^a Souwalak Phongpaichit^b and Jariya Sakayaroj^c

^aDepartment of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

^bDepartment of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

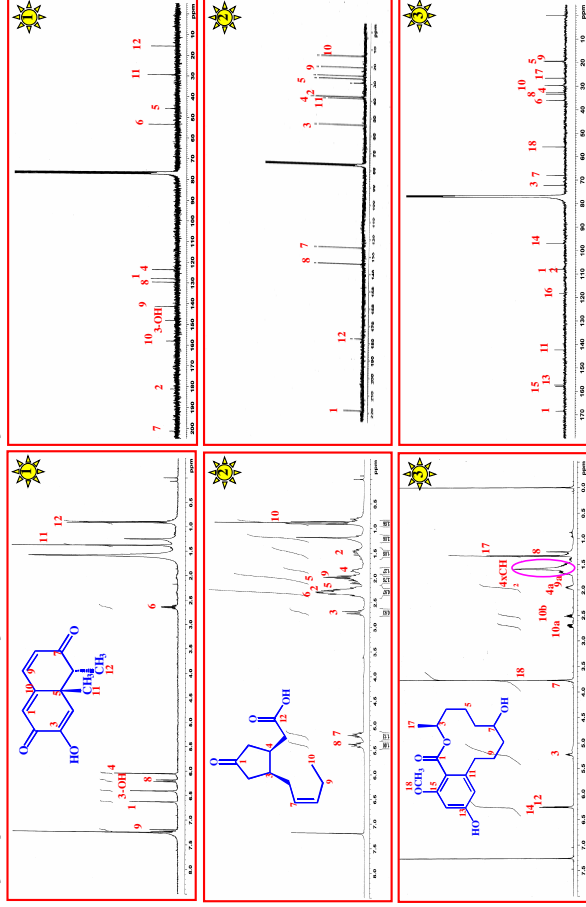
^cNational Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Thailand Science Park, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand

Introduction: The endophytic fungi *B. rhodina* PSU-M35 and PSU-M114 were isolated from the leaves of *Garcinia mangostana*, collected in Suratthani Province, Thailand. The ethyl acetate extracts from the culture broth of these fungi displayed interesting antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* with equal MIC values of 6.25 µg/mL.

Objective: To investigate chemical constituents from the endophytic fungi *B. rhodina* PSU-M35 and PSU-M114.

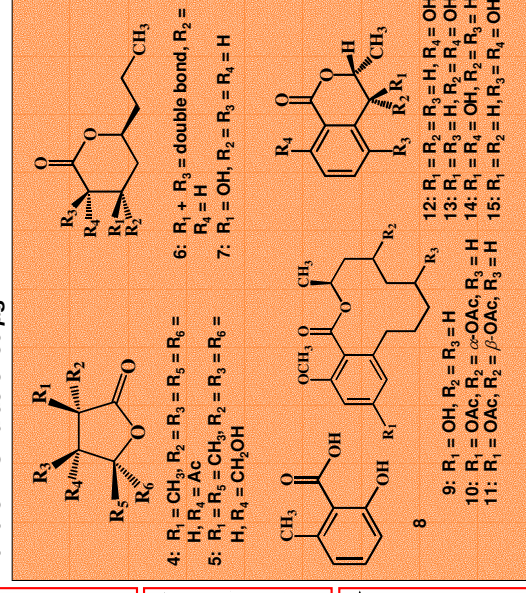
Methods: The ethyl acetate extracts from the culture broth and mycelia of *B. rhodina* PSU-M35 and PSU-M114 were separated by Sephadex LH-20 column chromatography. Selected fractions were further purified by column chromatography and/or pre-coated TLC to obtain three new compounds (1-3) and twelve known ones (4-15). The structures were determined by analysis of spectroscopic data, especially 1D and 2D NMR data.

Keywords: *Botryosphaeria rhodina*, lasiodiplodins, hydronaphthalenones, cyclopentanones, antimycobacterial activity



Results: The investigation of the ethyl acetate extracts from the culture broth and mycelia of *B. rhodina* PSU-M35 and PSU-M114 led to the isolation of three new compounds, hydronaphthalenone (1), carboxylic acid (2) and lasiodiplodin (3) derivatives, together with twelve known ones, (3*S*,4*S*)-levulinic acid (4), dihydro-4-(hydroxymethyl)-3,5-dimethyl-2-(3*H*)-furanone (5), (*R*)-2-octeno- δ -lactone (6), tetrahydro-4-hydroxy-6-propylpyran-2-one (7), 6-methylsalicylic acid (8), (3*S*)-lasiodiplodin (9), (5*R*)-hydroxy lasiodiplodin (10), (5*S*)-hydroxy lasiodiplodin (11), (*R*)-(-)-mellein (12), *cis*-4-hydroxymellein (13), *trans*-4-hydroxymellein (14) and (*R*)-(-)-5-hydroxymellein (15).

Conclusion: Three new compounds (1-3) and twelve known ones were isolated from the culture broth and mycelial extracts of *B. rhodina* PSU-M35 and PSU-M114. Compound 9 showed weak antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* with the MIC value of 50 µg/mL.



ACKNOWLEDGEMENTS: 1. The Commission on Higher Education and The Thailand Research Fund for Research Grant No. RTA5780007.

2. The Development and Promotion of Science and Technology Talents Project (DPST) for a scholarship.

3. The Center for Innovation in Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science and Graduate School, Prince of Songkla University for partial support.

Selected References: 1.Devys, M.; Barbier, M.; Bousquet, J.-F.; Kollmann, A. *Phytochemistry* 1994, 35(3), 825-826.

2.Dimitriadis, C.; Gill, M.; Harfe, M. F. *Tetrahedron: Asymmetry* 1997, 8(13), 2153-2158.

3.Venkatasubbaiah, P. and Chilton, W. S. J. *Nat. Prod.* 1990, 53(c), 1628-1630.



Chemical constituents from the roots of *Citrus hystrix*



Kanda Panthong* Yuranan Srisud

Department of Chemistry and Center for innovation in Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand, 90112

*E-mail: kanda.p@psu.ac.th

Introduction

Citrus hystrix (family: Rutaceae), locally called "magrood" is commonly cultivated in Southeast Asia. The preliminary test of the crude acetone extract of its root has displayed moderate antioxidant activity with IC_{50} 0.21 mg/mL (using DPPH) and anti-HIV activity with IC_{50} 19.8 μ g/mL. Therefore, this study aims to investigate the chemical constituents from the acetone extract.

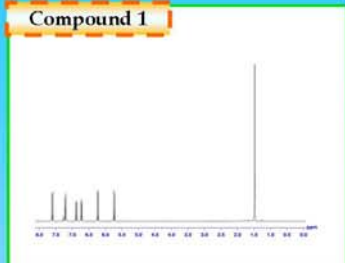


Results

The acetone extract of the roots of *C. hystrix* was subjected to chromatographic purification to yield six known compounds as two coumarins: xanthyletin (1) and seselin (2), two acridone alkaloids: 5-hydroxynoracronycine (3) and baiyumine A (4), and two benzene derivatives: xanthoxylin (5) and valencic acid (6). All structures were elucidated using 1D and 2D NMR spectroscopic data and comparison with those reported in the literatures.

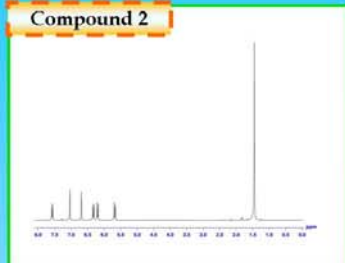


Compound 1



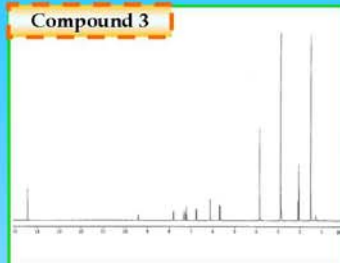
^1H NMR in CDCl_3 300 MHz.

Compound 2



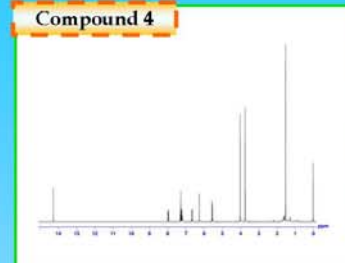
^1H NMR in CDCl_3 300 MHz.

Compound 3



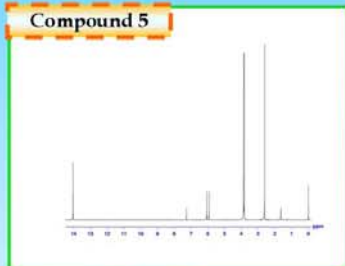
^1H NMR in acetone- d_6 500 MHz.

Compound 4



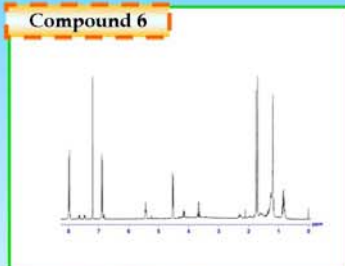
^1H NMR in CDCl_3 300 MHz.

Compound 5



^1H NMR in CDCl_3 300 MHz.

Compound 6



^1H NMR in CDCl_3 300 MHz.

Conclusion

Two coumarins, two acridone alkaloids and two benzene derivatives were isolated from the roots of *C. hystrix*. All pure compounds will be further evaluated for antioxidant and anti-HIV activity.

References

1. The Commission on Higher Education and the Thailand Research Fund for the research grant No. RTA5180007 to Professor Dr. Vatcharin Rukachaisirikul.
2. The Center for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC) for a scholarship.
3. The Graduate School and the Department of Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University for partial support.

- Ito, C.; Mizuno, T.; Matsuoka, M.; Kimura, Y.; Sato, K.; Kajiura, I.; Omura, M.; Ichi, M. J.; Furukawa, H. *Chem. Pharm. Bull.*, **1988**, 36, 3292-3295.
- Murray, R. D. H.; Zeghdi, S. *Phytochem.*, **1989**, 28, 227-230.
- Valenciennes, E.; Smadja, J.; Conan, J. Y. J. *J. Ethnopharm.*, **1999**, 64, 283-288.
- Wu, T.-S.; Kuoh, C.-S.; Furukawa, H. *Chem. Pharm. Bull.*, **1983**, 31, 895-900.
- Wu, T.-S. *Phytochem.*, **1987**, 26, 871-872.

CHEMICAL CONSTITUENTS FROM THE LEAVES OF *GARCINIA PRAINIANA*

Saranyoo Klaiklay, Yaowapa Sukpondma, Vatcharin Rukachaisirikul,

PERCH-CIC Kanokphorn Chareonrat and Salinla Sriyapai

Department of Chemistry and Center for Innovation of Chemistry (PERCH-CIC), Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkla 90112, Thailand.



Abstract: The investigation of the leaves of *Garcinia prainiana* using various chromatography techniques afforded six known compounds: two flavanone glucuronides, naringenin 7-*O*- β -glucuronide (1) and eriodictyol 7-*O*- β -glucuronide (2), three biflavonoids, GB-1a (3), morelloflavone (4) and amenthoflavone (5), and one triterpene, friedelin (6). Their structures were elucidated by spectroscopic methods and comparison with the previously reported data.



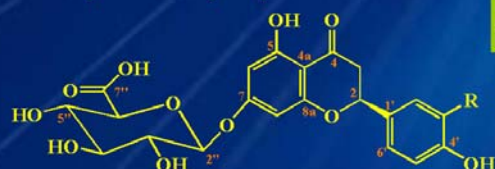
Introduction: *Garcinia prainiana* belongs to Guttiferae family. It is distributed throughout the South of Thailand. Its fruits are traditionally used for lowering blood pressure. Based on SciFinder database, the investigation of *G. prainiana* has not been reported. Therefore, we are interested in the isolation, purification and structure elucidation of compounds isolated from the leaves of *G. prainiana* which was collected from Narathiwat Province.

Methodology: The crude methanol extract from the leaves of *G. prainiana* was fractionated by column chromatography over Sephadex LH-20 to afford four fractions. The second fraction was subjected to column chromatography using silica gel as a stationary phase to obtain compound 6. The fourth fraction was purified by column chromatography over reverse phase silica gel to afford compounds 1-5.

Results, Discussion and Conclusion:

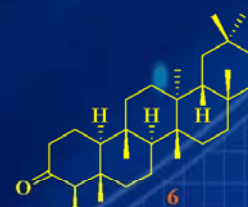
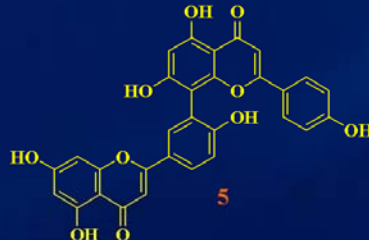
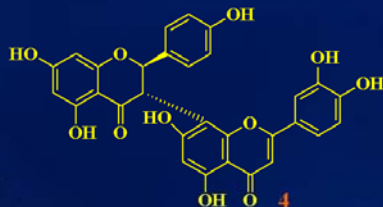
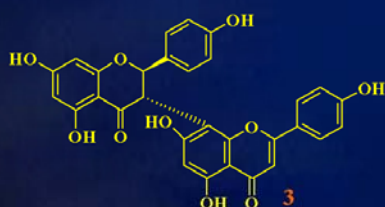
Investigation of the leaves of *G. prainiana* led to the isolation of naringenin 7-*O*- β -glucuronide (1), eriodictyol 7-*O*- β -glucuronide (2), GB-1a (3), morelloflavone (4), amenthoflavone (5) and friedelin (6). Their structures were determined by analysis of spectroscopic data and comparison of the NMR data with those reported in the literature.

Keywords: *Garcinia prainiana*, Biflavonoids, Flavanone glucuronides, Triterpenes



1 : R = H
2 : R = OH

Position	1		2	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{mult}}, J \text{ Hz}$	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}^{\text{mult}}, J \text{ Hz}$	δ_{C}
2	5.39 (dd, 12.6, 2.7)	79.25	5.33 (dd, 12.9, 3.3)	79.25
3	a: 3.17 (dd, 17.1, 12.6) b: 2.74 (dd, 17.1, 2.7)	42.75	a: 3.11 (dd, 17.4, 12.9) b: 2.75 (dd, 17.4, 3.3)	42.76
4	-	197.18	-	197.17
4a	-	103.58	-	103.60
5	-	163.80	-	165.65
6	6.23 (brs)	95.60	6.19 (d, 2.4)	96.75
7	-	165.73	-	165.71
8	6.19 (brs)	96.78	6.23 (d, 2.4)	95.65
8a	-	163.24	-	163.14
1'	-	129.51	-	130.19
2'	7.32 (d, 8.4)	127.68	6.93 (brs)	113.42
3'	6.81 (d, 8.4)	114.95	-	145.10
4'	-	157.64	-	145.52
5'	6.81 (d, 8.4)	114.95	6.79 (d, 8.4)	114.91
6'	7.32 (d, 8.4)	127.68	6.78 (dd, 8.4, 1.8)	117.91
2''	5.00 (d, 7.2)	99.77	5.00 (m)	99.75
3''	3.80 (m)	76.23	3.50 (m)	76.22
4''	3.50 (m)	73.07	3.50 (m)	73.06
5''	3.80 (m)	72.04	3.50 (m)	72.04
6''	3.78 (d, 9.0)	75.28	3.78 (m)	75.26
7''	-	182.00	-	182.00



Acknowledgements:

1. The Commission on Higher Education and the Thailand Research Fund for Research Grant No. RTA5180007 to Professor Dr. Vatcharin Rukachaisirikul.
2. The Center of Innovation for Chemistry (PERCH-CIC) for a scholarship.
3. Department of Chemistry, Faculty of Science and Graduate School, Prince of Songkla University for partial support.

References:

1. M. Silberberg, A. Gil-Izquierdo, L. Combaret, C. Remesy, and C. Morand, *Biomed. Pharmacother.*, 2006, 60, 529-535.
2. C.-B. Cui, Y. Tezuka, T. Kikuchi, H. Nakano, T. Tamaoki, and J.-H. Park, *Chem. Pharm. Bull.*, 1990, 38, 3218-3225.
3. W. Keywo, H. Pei-Lin, Z. Yu-Lin, D. Chen-Wei, G. Amooru, and T.-S. Wu, *J. Nat. Prod.*, 2005, 68, 1180-1184.
4. Y. Sukpondma, V. Rukachaisirikul, and S. Phongpaichit, *J. Nat. Prod.*, 2005, 68, 1010-1017.