CHEMICAL CONSTITUENTS AND BIOACTIVE SUBSTANCES FROM FUNGI *CHAETOMIUM* SPP.

MISS PRIMMALA KHUMKOMKHET

A THESIS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
KHON KAEN UNIVERSITY
2010

CHEMICAL CONSTITUENTS AND BIOACTIVE SUBSTANCES FROM FUNGI *CHAETOMIUM* SPP.

MISS PRIMMALA KHUMKOMKHET

A THESIS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY

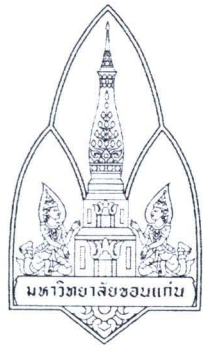
KHON KAEN UNIVERSITY

2010

CHEMICAL CONSTITUENTS AND BIOACTIVE SUBSTANCES FROM FUNGI *CHAETOMIUM* SPP.

MISS PRIMMALA KHUMKOMKHET

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE
REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN ORGANIC CHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL KHON KAEN UNIVERSITY
2010



THESIS APPROVAL

KHON KAEN UNIVERSITY

FOR

DOCTOR OF PHILOSOPHY

IN ORGANIC CHEMISTRY

Thesis Title: Chemical Constituents and Bioactive Substances from Fungi *Chaetomium* spp.

Author: Miss Primmala Khumkomkhet

Thesis Examination Committee

Assoc. Prof. Dr. Chavi Yenjai	Chairperson
Assoc. Prof. Dr. Somdej Kanokmedhakul	Member
Assoc. Prof. Dr. Kwanjai Kanokmedhakul	Member
Assoc. Prof. Dr. Kasem Soytong	Member

Thesis Advisors:

.....Advisor

(Assoc. Prof. Dr. Kwanjai Kanokmedhakul)

.....Co-Advisor

(Assoc. Prof. Dr. Somdej Kanokmedhakul)

(Asst. Prof. Dr. Lampang Manmart)
Dean, Graduate School

(Asst. Prof. Dr. Kiat Sangaroon)
Dean, Faculty of Science

ปริ่มมาลา ขำคมเขตต์. 2553. **การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราสกุลคีโตเมียม** วิทยานิพนธ์ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเคมีอินทรีย์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: รศ.ดร. ขวัญใจ กนกเมธากุล, รศ.ดร. สมเดช กนกเมธากุล

บทคัดย่อ

จากการสกัดเส้นใยแห้งของรา *Chaetomium brasiliense* (300 กรัม) *Chaetomium bostrychodes* (119 กรัม) และ *Chaetomium siamense* (135 กรัม) ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล ได้ส่วนสกัดหยาบ 9 ส่วน คือส่วนสกัดหยาบเฮกเซน 6.8 กรัม ส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต 17.8 กรัม และส่วนสกัดหยาบเมทานอล 20.6 กรัม จาก *C. brasiliense* ส่วนสกัดหยาบเฮกเซน 1.5 กรัม ส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต 2.1 กรัม และส่วนสกัดหยาบเมทานอล 4.5 กรัม จาก *C. bostrychodes* และส่วนสกัดหยาบเฮกเซน 3.6 กรัม ส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต 4.9 กรัม และส่วนสกัดหยาบเมทานอล 7.6 กรัม จาก *C. siamense*

จากการแยกส่วนสกัดหยาบของ *C. brasiliense* ด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟีได้สาร 12 สาร เป็นสารใหม่ 4 สาร ได้แก่ mollicellin K (**1.5**), mollicellin L (**1.6**), mollicellin M (**1.7**)และ mollicellin N (**1.11**) และสารที่ทราบโครงสร้างแล้ว 8 สาร ได้แก่ ergosterol (**1.1**), 24(*R*)-5α,8α-epidioxyergosta-6-22-diene-3*β*-ol (**1.2**), mollicellin H (**1.3**), mollicellin J (**1.4**), mollicellin B (**1.8**), mollicellin C (**1.9**), mollicellin E (**1.10**) และ mollicellin F (**1.12**) การแยกส่วนสกัดหยาบของ *C. bostrychodes* ด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟีได้สารที่ทราบโครงสร้างแล้ว 7 สาร ได้แก่ ergosterol (**2.1**), 24(*R*)-5α,8α-epidioxyergosta-6-22-diene-3*β*-ol (**2.2**), ergosterylplamitate (**2.3**), chaetoviridin A (**2.4**), chaetoviridin F (**2.5**), chrysophanol (**2.6**) และ emodin (**2.7**) และจากการแยกส่วนสกัดหยาบของ *C. siamense* ด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟีได้สารที่ทราบโครงสร้างแล้ว 8 สาร ได้แก่ ergosterol (**3.1**), 24(*R*)-5α,8α-epidioxyergosta-6-22-diene-3*β*-ol (**3.2**), ergosterylplamitate (**3.3**), cochliodone D (**3.4**), chaetoviridin A (**3.5**), chaetoviridin F (**3.6**), chaetoviridin G (**3.7**) และ chrysophanol (**3.8**) การพิสูจน์โครงสร้างของสารเหล่านี้อาศัยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี (UV, IR, MS, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, DEPT และ 2D NMR) จากการแยกครั้งนี้ยังพบว่าราทั้งสามผลิตสารเหมือนกัน 2 สาร ได้แก่สาร ergosterol (**1.1**, **2.1** หรือ **3.1**) และ 24(*R*)-5α,8α-epidioxyergosta-6-22-diene-3*β*-ol (**1.2, 2.2** หรือ **3.2**)

จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสาร **1.4-1.10** มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Plasmodium falciparum* สาเหตุของไข้มาลาเรีย โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.9, 1.2, 3.4, 2.9, 4.7, 9.1 และ 3.2 μg/mL ตามลำดับ มีเพียงสาร **1.5** ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* สาเหตุของวัณโรค โดยมีค่า MIC เท่ากับ 12.5 μg/mL พบว่า สาร 1.5, 1.9 และ

1.10 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* ซึ่งเป็นสาเหตุของเชื้อราโรคผิวหนัง IC_{50} เท่ากับ 1.2, 49.9 และ 39.7 µg/mL ตามลำดับ นอกจากนี้ สาร **1.3-1.6, 1.9** และ**1.10** มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 16.6, 29.1, 1.9, 33.9, 37.1, 46.3, 25.9 และ 37.9 µg/mL ตามลำดับ มีเพียงสาร **1.5** ที่มีพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด BC1 ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 6.8 µg/mL นอกจากนี้ยังพบว่า สารทุกตัวมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง NCI-H187 และมะเร็งท่อน้ำดี 5 เซลล์ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.5 ถึง 15.7 µg/mL โดยพบว่าความเป็นพิษสำหรับเซลล์ KKU-100 ค่า IC_{50} เท่ากับ 4.5 ถึง 6.5 µg/mL และพบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่ายา ellipticine

Primmala Khumkomkhet. 2010. **Chemical Constituents and Bioactive Substances from Fungi *Chaetomium* spp.** Doctor of Philosophy Thesis in Organic Chemistry, Graduate School, Khon Kaen University.

Thesis Advisors: Assoc. Prof. Dr. Kwanjai Kanokmedhakul,
Assoc. Prof. Dr. Somdej Kanokmedhakul

ABSTRACT

Extraction of air-dried mycelial mats of Chaetomium brasiliense (300 g), C. bostrychodes (119 g) and C. siamense (135 g) were successively extracted with hexane, EtOAc and MeOH gave nine crude extracts. C. brasiliense gave crude hexane 6.8 g, crude EtOAc 17.8 g, and crude MeOH 20.6 g. C. bostrychodes gave crude hexane 1.5 g, crude EtOAc 2.1 g, and crude MeOH 4.5 g. C. siamense gave crude hexane 3.6 g, crude EtOAc 4.9 g, and crude MeOH 7.6 g.

The chromatographic separation of crude extracts from C. brasiliense led to the isolation of twelve compounds. They were four new compounds: mollicellin K **(1.5)**, mollicellin L **(1.6)**, mollicellin M **(1.7)** and mollicellin N **(1.11)** together with eight known compounds: ergosterol **(1.1)**, 24*(R)*-5α,8α-epidioxyergosta-6-22-diene-3β-ol **(1.2)**, mollicellin H **(1.3)**, mollicellin J **(1.4)**, mollicellin B **(1.8)**, mollicellin C **(1.9)**, mollicellin E **(1.10)** and mollicellin F **(1.12)**. The chromatographic isolation of crude extracts from C. bostrychodes yielded seven compounds. They were known compounds: ergosterol **(2.1)**, 24*(R)*-5α,8α-epidioxyergosta-6-22-diene-3β-ol **(2.2)**, ergosterylplamitate **(2.3)**, chaetoviridin A **(2.4)**, chaetoviridin F **(2.5)**, chrysophanol **(2.6)** and emodin **(2.7)**. While, the chromatographic isolation of crude extracts from C. siamense yielded eight compounds. They were known compounds ergosterol **(3.1)**, 24*(R)*-5α,8α-epidioxyergosta-6-22-diene-3β-ol **(3.2)**, ergosterylplamitate **(3.3)**, cochliodone D **(3.4)**, chaetoviridin A **(3.5)**, chaetoviridin F **(3.6)**, chaetoviridin G **(3.7)** and chrysophanol **(3.8)**. These structures were elucidated on the basis of spectroscopic analysis (UV, IR, MS, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, DEPT, and 2D NMR). Among isolated compounds, ergosterol **(1.1, 2.1** or **3.1)** and 24*(R)*-5α,8α-epidioxyergosta-6-22-diene-3β-ol **(1.2, 2.2** or **3.2)** were produced from all three fungi.

The bioactivity assays revealed that compounds **1.4-1.10** showed antimalarial activity against *Plasmodium falciparum* with IC_{50} values of 4.9, 1.2, 3.4, 2.9, 4.7, 9.1 and 3.2 μg/mL, respectively. Only **1.5** exhibited antimycobacterial activity against Mycobacterium tuberculosis with MIC values of 12.5 μg/mL. Compounds **1.5, 1.9** and **1.10** showed antifungal activity against *Candida albicans* with IC_{50} values of 1.2, 49.9 and 49.7 μg/mL, respectively. Compounds **1.3-1.6, 1.9,** and **1.10** showed cytotoxicity against KB cancer cell line with IC_{50} values of 16.6, 29.1, 1.9, 33.9, 37.1, 46.3, 25.9 and 37.9 μg/mL, respectively. Only **1.5** showed cytotoxicity against BC1 cancer cell lines with IC_{50} values of 6.8 μg/mL. In addition, all of them displayed cytotoxicity against NCI-H187, and five cholangiocarcinoma cell lines with IC_{50} values ranging from 2.5 to 15.7 μg/mL. It should be noted that all compounds exhibited IC_{50} values against KKU-100 ranging from 4.5 to 6.5 μg/mL and were more cytotoxic than the control drug ellipticine.

The good aspects of the present thesis are dedicated to my parents and the entire teaching staff.

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest and sincere gratitude to my advisors, Assoc. Prof. Dr. Kwanjai Kanokmedhakul and Assoc. Prof. Dr. Somdej Kanokmedhakul, for their expert supervision of this project. They have always been engaged with the project, giving direction and help with problem solving.

I would like to sincerely thank Prof. Dr. Ibrahim Jantan for his wisdom and kindness. I am so thankful for the opportunity that he offered me to carry out the bioassay and have a fun life in Kuala Lumpur, Malaysia.

I am grateful to Assoc. Prof. Dr. Kasem Soytong for providing fungi cultures and identification of the fungi *Chaetomium brasilliense*, *C. bostrychodes* and *C. siamense*.

I am indebted to Assoc. Prof. Dr. Chavi Yenjai, and Assoc. Prof. Dr. Kasem Soytong for their valuable discussions and comments on this thesis.

I would like to gratefully acknowledge the Commission on Higher Education, Thailand, for support by funding under the program Strategic Scholarships for Frontier Research for Networks for the Ph.D. Program Thai Doctoral Degree (CHE) and the Center for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC) for financial support of this work. Bioassay Research Facility of BIOTEC and Asst. Prof. Dr. Chariya Hahnvajanawong are gratefully acknowledged for testing against cholangiocarcinoma cell lines. I am thankful to the Department of Chemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, for providing instrumental support and all other facilities.

My appreciation is extended to all the staff of the Department of Chemistry. Furthermore, I feel thankful to my friends, sisters and brothers here in this Department for their help and encouragement during my research work.

Last and most of all, I wish to show my heartfelt gratitude here to my family, especially, my beloved parents, brother and sister, for their tender love, care, encouragement, and constant support throughout my studies. Without them I can not image how I could complete my PhD study.

Primmala Khumkomkhet

TABLE OF CONTENTS

TABLE OF CONTENTS (Cont.)

LIST OF TABLES

LIST OF TABLES (Cont.)

LIST OF TABLES (Cont.)

LIST OF FIGURES

LIST OF FIGURES (Cont.)

LIST OF FIGURES (Cont.)

LIST OF FIGURES (Cont.)

LIST OF FIGURES (Cont.)

LIST OF FIGURES (Cont.)

LIST OF FIGURES (Cont.)

LIST OF ABBREVIATIONS

%	percent
δ	chemical shift
λ	wavelength
ν	wavenumber
°C	degree Celsius
μg	microgram
$[\alpha]_D$	specific optical rotation
^{13}C NMR	Carbon Nuclear Magnetic Resonance
^{1}H NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance
2D NMR	two-dimensional Nuclear Magnetic Resonance
antiTB	antituberculosis
aq.	aqueous
BC1	Human breast cancer cells
Br	broad
Br	broad (IR spectra)
Brd	broad doublet
Brs	broad singlet
BuOH	butanol
C	concentration (%v/v)
Calcd	calculated
CC	Column Chromatography
CD_3OD	methanol-d_4
$CDCl_3$	chloroform-*d*
CH_2Cl_2	dichloromethane
$CHCl_3$	chloroform
cm^{-1}	per centimeter
COSY	Homonuclear Correlation Spectroscopy

LIST OF ABBREVIATIONS (Cont.)

D	doublet
D_2O	deuterium oxide
Dd	doublet of doublet
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO-d_6	dimethylsulfoxide-d_6
EtOAc	ethyl acetate
FCC	Flash Column Chromatography
G	gram
H	hours
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HRESITOFMS	High Resolution Electrospray Ionization-Time Of Flight Mass Spectroscopy
HSQC	Heteronuclear Single Quamtum Coherence
Hz	Hertz
IC_{50}	Half Maximal Inhibitory Concentration
IR	Infrared Spectrum
J	coupling constant
KB	Human epidermoid carcinoma in the mouth
KBr	Potassium Bromide
lit.	literature
M	multiplet (^{1}H NMR spectra)
M	medium (IR spectra)
MeOH	methanol
Mg	milligram
MHz	Megahertz
MIC	Minimum Inhibitory Concentration

LIST OF ABBREVIATIONS (Cont.)

Min	minute
mL	milliliter
Mp	melting point
MS	Mass Spectrum
NCI-H187	Human small lung cancer cells
Nm	nanometre
NOESY	Nuclear Overhauser Enhanced Spectroscopy
PDB	Potato Dextrose Broth
PLC	preparative Thin Layer Chromatography
Ppm	parts per million
Recryst.	recrystallization
R_f	Retardation factor
S	singlet (^{1}H NMR spectra)
S	strong (IR spectra)
T	triplet
Sext	sextet
Sept	septet
Quint	quintet
TLC	Thin Layer Chromatography
TMS	tetramethylsilane
UV	Ultraviolet
W	Weak