# สารที่มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวจากราเอนโดไฟต์ *Phomopsis* sp. ที่แยกได้จากชิงเฮา

นางสาวปุญญิศา งานกรณาธิการ



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชเวท ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2556

# ANTILEUKEMIC COMPOUNDS FROM AN ENDOPHYTIC FUNGUS *PHOMOPSIS* SP. ISOLATED FROM *ARTEMISIA ANNUA* L.

Miss Punyisa Ngankaranatikarn



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy Program in Pharmacognosy
Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2013

| | |
|---|---|
| Thesis Title | ANTILEUKEMIC COMPOUNDS FROM AN ENDOPHYTIC FUNGUS *PHOMOPSIS* SP. ISOLATED FROM *ARTEMISIA ANNUA* L. |
| By | Miss Punyisa Ngankaranatikarn |
| Field of Study | Pharmacognosy |
| Thesis Advisor | Khanit Suwanborirux, Ph.D. |
| Thesis Co-Advisor | Assistant Professor Taksina Chuanasa, Ph.D. |

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

.....Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences
(Assistant Professor Rungpetch Sakulbumrungsil, Ph.D.)



THESIS COMMITTEE

.....Chairman
(Professor Kittisak Likhitwitayawuid, Ph.D.)

.....Thesis Advisor
(Khanit Suwanborirux, Ph.D.)

.....Thesis Co-Advisor
(Assistant Professor Taksina Chuanasa, Ph.D.)

.....Examiner
(Supakarn Chamni, Ph.D.)

.....External Examiner
(Associate Professor Nongluksna Sriubolmas, Ph.D.)

ปุญญิศา งานกรณาธิการ : สารที่มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวจากราเอนโดไฟต์ *Phomopsis* sp. ที่แยกได้จากชิงเฮา. (ANTILEUKEMIC COMPOUNDS FROM AN ENDOPHYTIC FUNGUS *PHOMOPSIS* SP. ISOLATED FROM *ARTEMISIA ANNUA* L.) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ. ภก. ดร.คณิต สุวรรณบริรักษ์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ภญ. ดร.ทักษิณา ชวนอาษา, 72 หน้า.

ได้ทำการสกัดแยกสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิจากสารสกัดเอทิลอะซิเตทของน้ำหมักจากราเอนโดไฟต์ *Phomopsis* sp. AANN8 ที่แยกได้จากกิ่งของชิงเฮา (*Artemisia annua* L., family Asteraceae) โดยอาศัยฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ได้ทั้งหมด ๓ ชนิด ประกอบด้วยสารผสม ๒ diastereomers ของ *O*-1-(2-hydroperoxy-1,2-dimethylethyl)-*O*-1′-(mercaptoethyl-*S*-oxide)-peroxocarbonate ร่วมกับสารพวกฟีนอล ชื่อ tyrosol และสารที่พบในวัฏจักรเครบส์ ชื่อ succinic acid โครงสร้างทางเคมีของสารทั้งหมดที่แยกได้ถูกพิสูจน์โดยการวิเคราะห์ข้อมูลจาก อัลตราไวโอเลตสเปกโทรสโกปี อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี แมสสเปกโทรเมทรี และนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี ร่วมกับการเปรียบเทียบข้อมูลของสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว นอกจากนี้สารที่แยกได้ยังถูกนำไปทดสอบฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว THP-1 ในหลอดทดลองด้วยวิธีการทดสอบด้วยสาร sulforhodamine B โดยใช้สาร ellipticine เป็นสารควบคุมผลบวก มีค่า $EC_{50}$ เท่ากับ ๗๙ ไมโครโมลาร์ ผลการทดสอบพบว่าสาร tyrosol และ succinic acid ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ในขณะที่สารผสม *O*-1-(2-hydroperoxy-1,2-dimethylethyl)-*O*-1′-(mercaptoethyl-*S*-oxide)-peroxocarbonate แสดงฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวอย่างอ่อน มีค่า $EC_{50}$ เท่ากับ ๑๓๑ ไมโครโมลาร์



ภาควิชา เภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต ปุญญิศา งานกรณาธิการ

สาขาวิชา เภสัชเวท ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ปีการศึกษา 2556 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ทักษิณา ชวนอาษา

# # 5476238433 : MAJOR PHARMACOGNOSY
KEYWORDS: PHOMOPSIS SP. AANN8 / ARTEMISIA ANNUA L. / ENDOPHYTIC FUNGUS / ANTILEUKEMIC ACTIVITY

PUNYISA NGANKARANATIKARN: ANTILEUKEMIC COMPOUNDS FROM AN ENDOPHYTIC FUNGUS *PHOMOPSIS* SP. ISOLATED FROM *ARTEMISIA ANNUA* L.. ADVISOR: KHANIT SUWANBORIRUX, Ph.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF. TAKSINA CHUANASA, Ph.D., 72 pp.

Three secondary metabolites named a mixture of two diasterromers *O*-1-(2-hydroperoxy-1,2-dimethylethyl)-*O*-1′-(mercaptoethyl-*S*-oxide)-peroxocarbonate, together with a phenolic metabolite, tyrosol, and a Kreb's cycle metabolite, succinic acid, were isolated from the ethyl acetate extract of the fermentation broth of an endophytic fungus, *Phomopsis* sp. AANN8 by antileukemic-guided fractionation. The endophytic fungus was obtained from the twigs of a Thai medicinal plant, *Artemisia annua* L. (family Asteraceae). The identification and structure determination of the isolated compounds were elucidated by analyses of UV, IR, MS and NMR spectroscopic data along with comparison with previous publications. The isolated compounds were evaluated for *in vitro* antileukemic activity against THP-1 cell line by a sulforhodamine B colorimetric bioassay using ellipticine as a positive control with $EC_{50}$ 79 μM. The results showed that tyrosol and succinic acid had no antileukemic activity while the mixture of *O*-1-(2-hydroperoxy-1,2-dimethylethyl)-*O*-1′-(mercaptoethyl-*S*-oxide)-peroxocarbonate exhibited weak antileukemic activity with $EC_{50}$ 131 μM.



Department: Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany
Field of Study: Pharmacognosy
Academic Year: 2013

Student's Signature Punyisa Ngankaranatikarn
Advisor's Signature Khanit Suwanborirux
Co-Advisor's Signature T. Chuanasa

# ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude and sincere thanks to my thesis advisor, Dr.Khanit Suwanborirux and my thesis co-advisor, Assistant Professor Dr.Taksina Chuanasa of the Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University. I greatly appreciate their valuable advice, useful guidance, kindness, constant encouragement, patience, and endless support throughout my research study.

I wish to express my thanks to the members of my thesis committee, including Professor Dr.Kittasak Likhitwitayawuid, Associate Professor Dr.Nongluksna Sriubolmas and Dr.Supakarn Chamni, for their critical review and constructive suggestions for this thesis.

I would also like to thank Assistant Professor Dr.Suthep Wiyakrutta and Mrs.Jitra Limthongkul of the Department of Microbiology, Faculty of Science, Mahidol University, and Associate Professor Dr.Nongluksna Sriubolmas of the School of Pharmacy, Eastern Asia University, for fungal material and antileukemic activity assay.

I would like to thank Professor Naoki Saito of the Meiji Pharmaceutical University, Japan, for mass measurement and the Pharmaceutical Research Instrument Center, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for supporting scientific equipment.

I am thankful to all staff members of the Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for supplying chemicals and facilities.

I am grateful to all graduate students of the Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for unforgettable friendship and kindness.

Finally, I would like to express my deepest appreciation to my family for their love, understanding and encouragement.

CONTENTS

Page

Page

# LIST OF TABLES

PAGE

# LIST OF FIGURES

PAGE

# LIST OF SCHEMES

PAGE

# ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

| | |
|---|---|
| % | = Percentage |
| µg | = Microgram |
| µl | = Microliter |
| µM | = Micromolar |
| $^{13}$C-NMR | = Carbon-13 nuclear magnetic resonance |
| $^{1}$H-NMR | = Proton nuclear magnetic resonance |
| $^{1}$H-$^{1}$H COSY | = Homonuclear (Proton-Proton) correlation spectroscopy |
| A549 | = Human lung adenocarcinoma epithelial cell line |
| Acetone-$d_6$ | = Deuterated acetone |
| BC | = Human lymphoma cell line |
| BT220 | = Human breast cancer cell line |
| br | = Broad (for NMR spectra) |
| Calc | = Calculated |
| CC | = Column chromatography |
| $CD_3OD$ | = Deuterated methanol |
| $CDCl_3$ | = Deuterated chloroform |
| $CH_2Cl_2$ | = Dichloromethane |
| $CHCl_3$ | = Chloroform |
| cm | = Centimeter |

$cm^{-1}$ = Reciprocal centimeter (unit of wave number)

$cm^{2}$ = Square centrimeter

$CO_2$ = Carbon dioxide

d = Doublet (for NMR spectra)

DEPT = Distortionless enhancement by polarization transfer

DMSO = Dimethyl sulfoxide

dq = Double quartets (for NMR spectra), doublet of quartets

$\varepsilon$ = Molar absorptivity

$EC_{50}$ = Half maximal effective concentration

EIMS = Electron impact mass spectrometry

ELISA = Enzyme-linked immunosorbent assay

EtOAc = Ethyl acetate

eV = Electron volt

FABMS = Fast atom bombardment mass spectrometry

g = Gram

$H_2O$ = Water

HCT-116 = Human colorectal carcinoma cell line

HeLa = Human cervical adenocarcinoma cell line

HepG2 = Human liver hepatocellular carcinoma cell line

HL251 = Human lung cancer cell line

HL-60 = Human promyelocytic leukemia cell line

HMBC = $^{1}$H-detected heteronuclear multiple bond correlation

HPLC = High pressure liquid chromatography

HR = High resolution

HSQC = Heteronuclear single quantum coherence

HT-29 = Human colorectal adenocarcinoma cell line

Hz = Hertz

IR = Infrared

ITS = Internal transcribed spacer

*J* = Coupling constant

K562 = Human erythromyeloblastoid leukemia cell line

KB = Human epidermoid carcinoma cell line

KBr = Potassium bromide

l = Liter

*m/z* = Mass to charge ratio

MDA-MB-231 = Human breast adenocarcinoma cell line

MeOH = Methanol

mg = Milligram

MHz = Mega Hertz

ml = Milliliter

mm = Millimeter

mM = Millimolar

MS = Mass spectrum

NCI-H187 = Human small-cell lung cancer cell line

nm = Nanometer

NMR = Nuclear magnetic resonance

NOESY = Nuclear overhauser enhancement spectroscopy

nt = Not tested

°C = Degree Celsius

OD = Optical density

P388 = Murine leukemia cell line

PC-3 = Human prostate adenocarcinoma cell line

PDA = Potato dextrose agar

PDB = Potato dextrose broth

ppm = Part per million

psi = Pound per square inch

s = Singlet (for NMR spectra)

sp. = Species

SRB = Sulforhodamine B

t = Triplet (for NMR spectra)

TCA = Trichloroacetic acid

THP-1 = Human acute monocytic leukemia cell line

TLC = Thin layer chromatography

UV = Ultraviolet-visible

YSB = Yeast extract sucrose broth

$\beta$ = Beta

$\delta$ = Chemical shift

$\lambda_{max}$ = Wavelength at maximal absorption

$\nu_{max}$ = Wave number at maximal absorption