# การเปลี่ยนแปลงในรอบปี และชนิดเซลล์ที่พบสารกลุ่มเรเนียรามัยซิน จากฟองน้ำสีน้ำเงิน *Xestospongia* sp.

นางสาวสุภาพร บุญศิริลักษณ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา เภสัชเวท ภาควิชา เภสัชเวท
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ANNUAL VARIATION AND CELLULAR SOURCE OF RENIERAMYCINS FROM THE BLUE SPONGE *XESTOSPONGIA* SP.

Miss Supaporn Bunsiriluck

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy Program in Pharmacognosy
Department of Pharmacognosy
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2006

491225

| | |
|---|---|
| Thesis Title | ANNUAL VARIATION AND CELLULAR SOURCE OF RENIERAMYCINS IN THE BLUE SPONGE *XESTOSPONGIA* SP. |
| By | Miss Supaporn Bunsiriluck |
| Field of study | Pharmacognosy |
| Thesis Advisor | Khanit Suwanborirux, Ph.D. |

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

Pornpen Pramyothin .....Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences

(Associate Professor Pornpen Pramyothin, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

K. Likhit .....Chairman

(Associate Professor Kittisak Likhitwitayawuid, Ph.D.)

Khanit Suwanb .....Thesis Advisor

(Khanit Suwanborirux, Ph.D.)

S. Amnuoypol .....Member

(Associate Professor Surattana Amnuoypol, Ph.D.)

Suchana Chav .....Member

(Assistant Professor Suchana Chavanich, Ph.D.)

สุภาพร บุญศิริลักษณ์ : การเปลี่ยนแปลงในรอบปี และชนิดเซลล์ที่พบสารกลุ่มเรเนียรามัยซินจากฟองน้ำสีน้ำเงิน *Xestospongia* sp. (ANNUAL VARIATION AND CELLULAR SOURCE OF RENIERAMYCINS IN THE BLUE SPONGE *XESTOSPONGIA* SP.) อ.ที่ปรึกษา: ดร. คณิต สุวรรณบริรักษ์, 86 หน้า.

สารกลุ่มเรเนียรามัยซิน เป็นสารอัลคาลอยด์ที่มีโครงสร้างหลักเป็นบิสเตตระไฮโดรไอโซควิโนลีน ซึ่งมีฤทธิ์เป็นพิษสูงต่อเซลล์ พบในฟองน้ำทะเลสีน้ำเงิน *Xestospongia* sp. ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารกลุ่มเรเนียรามัยซินในหนึ่งรอบปีในฟองน้ำทะเล *Xestospongia* sp. บริเวณเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี โดยการเติมสารโพแทสเซียมไซยาไนด์ในขั้นตอนของการสกัดสาร เพื่อเปลี่ยนสารกลุ่มเรเนียรามัยซินเป็นอนุพันธ์ไซยาโนที่มีความเสถียร และทำการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารกลุ่มเรเนียรามัยซินโดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (เอชพีแอลซี) โดยระบบประกอบด้วยรีเวอร์สเฟสอาร์พี-๑๘อี เป็นเฟสคงที่ (ขนาดคอลัมน์ ๑๒๕×๔ มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค ๕ ไมโครเมตร) และส่วนผสมของเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยเมทานอลและน้ำในอัตราส่วน ๗:๓ ด้วยอัตราการไหล ๑.๐ มิลลิลิตรต่อนาที ผ่านเครื่องตรวจวัดชนิดโฟโตไดโอดแอร์เรย์ที่ความยาวคลื่น ๒๗๐ นาโนเมตร และมีอะซีแนฟทีนเป็นสารมาตรฐานภายใน จากการทดสอบความน่าเชื่อถือของวิธีเอชพีแอลซีที่ใช้วิเคราะห์พบว่ามีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงที่ $R^2$=๐.๙๙๙๙ มีความถูกต้องของการคืนกลับของสารอยู่ในช่วงร้อยละ ๑๐๓.๑๐–๑๐๗.๑๔ และมีความเที่ยงตรงที่มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ในช่วงร้อยละ ๐.๓๙–๐.๙๕ งานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างฟองน้ำทะเล *Xestospongia* sp. ทุกเดือน ตั้งแต่เดือนสิงหาคม พ.ศ. ๒๕๔๘ ถึงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. ๒๕๔๙ การวิเคราะห์พบสารเรเนียรามัยซินเอ็มเป็นสารหลัก แสดงพีคในเอชพีแอลซีโครมาโตแกรมที่เวลา ๘.๙ นาที โดยในแต่ละเดือนปริมาณสารเรเนียรามัยซินเอ็มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ ๙๕ โดยมีปริมาณเฉลี่ยร้อยละ ๐.๑๓ โดยน้ำหนัก อย่างไรก็ตามผลการวิเคราะห์พบปริมาณสารเรเนียรามัยซินเอ็มสูงสุดร้อยละ ๐.๒๐ โดยน้ำหนักในเดือนเมษายนและเดือนตุลาคม และต่ำสุดร้อยละ ๐.๐๘ โดยน้ำหนักในเดือนมกราคม และร้อยละ ๐.๐๙ ในเดือนกรกฎาคม และพบว่ามีความสัมพันธ์โดยตรงกับปัจจัยสิ่งแวดล้อม คือ ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ และปริมาณคลอโรฟิลด์เอ นอกจากนี้เมื่อทำการแยกชนิดเซลล์ของฟองน้ำด้วยเทคนิคการหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว และการหมุนเหวี่ยงด้วยความหนาแน่นเกรเดียนต์ของสารละลายฟิคอลล์ พบว่าชนิดของเซลล์ฟองน้ำที่พบมาก คือ โคแอนโนไซท์ และอาร์คีโอไซท์ และสารเรเนียรามัยซินเอ็มมีความสัมพันธ์กับเซลล์ทั้งสองชนิดของฟองน้ำทะเล โดยไม่มีความสัมพันธ์ชัดเจนกับเซลล์ในชั้นของแบคทีเรีย

ภาควิชา เภสัชเวท
สาขาวิชา เภสัชเวท ลายมือชื่อนิสิต.....สุภาพร บุญศิริลักษณ์.....
ปีการศึกษา ๒๕๔๙ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

## 4776612433 : MAJOR PHARMACOGNOSY
KEY WORDS: *XESTOSPONGIA* SP. / RENIERAMYCINS / ANNUAL VARIATION / CELLULAR SOURCE

SUPAPORN BUNSIRILUCK: ANNUAL VARIATION AND CELLULAR SOURCE OF RENIERAMYCINS IN THE BLUE SPONGE *XESTOSPONGIA* SP. THESIS ADVISOR: KHANIT SUWANBORIRUX, Ph. D., 86 pp.

The Thai blue sponge *Xestospongia* sp. was found to produce large amount of the highly potent cytotoxic bistetrahydroisoquinolines, named renieramycins. Pretreatment of the sponge with potassium cyanide before extraction yielded a mixture of stabilized renieramycins, of which renieramycin M was predominant. The purpose of this study was to determine the annual variation in quantity and to localize the cellular source of renieramycin M within the sponge. The sponge *Xestospongia* sp. samples were monthly collected from Sichang Island, Cholburi Province, in the Gulf of Thailand during August 2005 to July 2006. A high performance liquid chromatography (HPLC) method, which was developed to analyze renieramycins, consisted of a RP-18e column (125×4 mm, 5 μm), the isocratic solution of methanol/water (7:3) as the mobile phase at flow rate 1.0 mL/min, a photodiode array detector at wavelength 270 nm and acenaphthene as the internal standard. The HPLC method was reliable in terms of linearity ($R^2$ = 0.9999), accuracy (%recovery of 103.10-107.14%), and precision (%RSD of 0.39-0.95%). The HPLC analyses showed that renieramycin M was normally detected as the major component at retention time 8.9 min and the annual variation of renieramycin M quantity (%w/w, semi-dried weight sponge) was significantly different (ANOVA, $p < 0.05$) with the average of 0.13%. However, the sponge produced the highest amount of renieramycin M at 0.20% w/w in April and October and the lowest at 0.08% w/w in January and at 0.09% w/w in July. Following the Pearson correlation coefficient ($r$), the relationships between renieramycin M annual content and other environment factors were found to have the positive correlations with total dissolved solids and chlorophyll-a. Fractionation of the sponge cells was performed by differential centrifugation and Ficoll density gradient centrifugation. The result showed that choanocytes and archaeocytes were the major cell types of the sponge. The HPLC analyses of cell fractions demonstrated that renieramycin M was associated with both sponge cells but not with the bacterial fraction.

| | | |
|---|---|---|
| Department | Pharmacognosy | |
| Field of study | Pharmacognosy | Student's signature S. Bunsiriluck. |
| Academic year | 2006 | Advisor's signature Khanit Suwanborirux |

# ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my sincere indebtedness to my thesis advisor, Dr. Khanit Suwanborirux, head Center for Bioactive Natural Products from Marine Organisms and Endophytic Fungi (BNPME), Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for his valuable advice, continual guidance, kindness, encouragement, and understanding throughout my graduate study period.

My great appreciation is extended to the thesis committee for their suggestions and critical review of my thesis; all the teachers, staff, and graduate students in the Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for their kind and friendship assistance.

I am sincerely grateful to Mr. Udomsak Darumas, School of Biology, Institute of Science, Walailak University, for his guidance on my field experiments.

I would like to thank Dr. Chutima Petchprayoon for her valuable suggestions, advice, and kindness and Ms. Kornvika Charupan for providing four renieramycins references.

I would like to thank Dr. Jittrakul Leartsakulpanitch and Ms. Karunrat Tewthanom for statistical analysis of this experimental data.

I would like to thank the Pharmaceutical Research Instrument Center, Department of Biochemistry, and Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences and Department of Marine Science, Faculty of Sciences, Chulalongkorn University for providing research facilities.

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

# CONTENTS

Page

ABSTRACT (Thai).....iv

ABSTRACT (English).....v

ACKNOWLEDGEMENTS.....vi

CONTENTS.....vii

LIST OF SCHEME.....x

LIST OF TABLES.....xi

LIST OF FIGURE.....xiii

ABBREVIATIONS.....xv

CHAPTER

I INTRODUCTION.....1

II LITERATURE REVIEW.....3

1. Sponge biology.....3
2. Taxonomical characteristic of the blue sponge *Xestospongia* sp.....10
3. Chemistry of renieramycins.....12
4. Biological activity.....18
5. Cellular origin study of bioactive compounds in the sponge.....21

III MATERIALS AND METHODS.....27

Materials.....27

1. Chemicals and reagents.....27
2. Instruments.....28
3. Sources of the blue sponge *Xestospongia* sp.....29

Method.....31

1. Quantitative determination of the blue sponge *Xestospongia* sp.....31
   - 1.1. Collection of the sponge *Xestospongia* sp.....31
   - 1.2. Preparation of 10 mM potassium cyanide in 0.05 M phosphate buffer solution, pH 7.....31
   - 1.3. Extraction of the sponge *Xestospongia* sp.....31
2. Cell separation of the blue sponge *Xestospongia* sp.....33
   - 2.1. Preparation of the sponge *Xestospongia* sp. for cell dissociation and fractionation.....33
   - 2.2. Extraction of the sponge *Xestospongia* sp. cell fractions.....34
   - 2.3. Scanning electron microscopic (SEM) study.....37

CHAPTER Page

3. High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....37
3.1. Preparation of internal standard acenaphthene solution.....37
3.2. Preparation of renieramycin M reference solution.....37
3.3. Sample preparation.....38
3.4. HPLC condition.....38
4. Validation of HPLC method.....39
4.1. Linearity.....39
4.2. Accuracy.....39
4.3. Precision.....39
5. Determination of environmental parameters.....40
5.1. Chlorophyll-a.....40
5.2. Total suspended solids (TSS).....41
5.3. Total dissolved solids (TSS).....41
6. Statistical analysis.....42
IV RESULTS AND DISCUSSION.....43
Results.....43
1. High-performance liquid chromatography method (HPLC) analysis of renieramycins.....43
1.1. The suitable HPLC condition for renieramycins.....43
1.2. Qualitative determination of renieramycins references.....43
1.3. Validation of the HPLC method for renieramycins analyses.....45
1.4. Calibration curve of renieramycin M.....51
2. Annual variation of renieramycins contents in the blue sponge *Xestospongia* sp. during August 2005 to July 2006.....52
3. Environmental factors measurement.....56
3.1. Seasonal variation of environmental parameters.....56
3.2. Relationship between environmental parameters and renieramycin M.....58
4. Cellular source of renieramycin M in the blue sponge *Xestospongia* sp.....61
4.1. Scanning electron microscopic (SEM) observation in whole-sponge tissue.....61
4.2. Cell separation and identification.....64

CHAPTER Page

4.3. Distribution and cellular location of renieramycin M in the cell fractions....66
Discussion....67
V CONCULSION....72
REFERENCES....73
APPENDICES....79
VITA....86

# LIST OF SCHEMES


| Scheme | | Page |
|---|---|---|
| 3.1. | Preparation of the crude ethyl acetate extract from the sponge *Xestospongia* sp | 32 |
| 3.2. | Scheme of sponge cell fractionation | 35 |
| 3.3. | Preparation of the ethyl acetate extracts of cell fractions Fa, Fb, and Fc for HPLC analysis | 36 |

# LIST OF TABLES


| Table | | Page |
|---|---|---|
| 2.1. | Larval type in the major taxonomic categories of Porifera | 9 |
| 2.2. | Sources of bis-tetrahydroisoquinoline alkaloids | 13 |
| 2.3. | Cytotoxicity of renieramycins | 19 |
| 2.4. | The bioactivities of the renieramycin G and analogue, 3-*epi*-renieramycin G | 20 |
| 2.5. | Cellular origins of bioactive compounds in the marine sponges | 26 |
| 4.1. | Peak area ratios of renieramycin M and acenaphthene of linearity test of the HPLC method | 45 |
| 4.2. | Percent recovery of renieramycin M for accuracy test | 47 |
| 4.3. | Percent RSD of peak area ratios between renieramycin M and acenaphthene for precision test | 49 |
| 4.4. | Percent RSD of retention times ($t_R$) of renieramycin M for precision test | 50 |
| 4.5. | Peak area ratios of renieramycin M and acenaphthene for calibration curve of renieramycin M | 51 |
| 4.6. | The percentage of seawater weight loss from the sponge *Xestospongia* sp. | 53 |
| 4.7. | Renieramycin M contents in the sponge *Xestospongia* sp. during August 2005 to July 2006 at Sichang Island | 54 |
| 4.8. | Means of environmental factors variation during August 2005 to July 2006 | 55 |

**Table** **Page**

4.9. Annual variation between renieramycin M contents (%w/w) and environmental parameters during August 2005 to July 2006.....58

4.10. Correlation coefficients (n=36) between renieramycin M of the sponge *Xestospongia* sp. and environmental parameters during August 2005 to July 2006.....66

4.11. Fractionation of the sponge *Xetospongia* sp. cell types by SEM.....64

4.12. Distribution of renieramycin M in cell fractions Fa, Fb, and Fc.....66

1A Collection of Xetospongia sp. in semi-dried weight (mg) during August 2005 to July 2006.....80

2A Environment parameters and renieramycin M (RM) quantity during August 2005 to July 2006.....81

3A Statistical analysis of renieramycin M annual content (from August 2005 to July 2006) using one-way ANOVA and multiple comparison (Tukey).....83

# LIST OF FIGURES


| Figure | | Page |
|---|---|---|
| 2.1. | Diagrammatic representation of a simple (asconoid) sponge | 5 |
| 2.2. | The production of a sponge spicule by a binucleate sclerocyte | 5 |
| 2.3. | Spicule skeletons and spicules from sponges | 6 |
| 2.4. | Sponge body forms, asconoid, synconoid, and leuconoid | 7 |
| 2.5. | Schematic of asexual and sexual reproduction of sponges | 8 |
| 2.6. | Porifera sexual reproduction: larval development and metamorphosis | 10 |
| 2.7. | Pictures of the blue sponge *Xestospongia* sp | 11 |
| 2.8. | The chemical stuctures of renieramycins from marine sponges | 14 |
| 2.9. | The chemical structures of bistetrahydroisoquinolines from other natural sources | 16 |
| 2.10. | The chemical structures of monomeric isoquinolinequinones | 17 |
| 2.11. | The chemical structures of renieramycin G and 3-*epi* analogue | 20 |
| 2.12. | Scanning electron micrographs of *Haliclona vansoesti* | 22 |
| 2.13. | Microscopy of *Agelas conifera* | 24 |
| 3.1. | The blue sponge *Xestospongia* sp. | 29 |
| 3.2. | The initial sponge *Xestospongia* sp. from Ran-Dok-Mai Island and in-sea cultured sponge collection sites at Sichang Island | 30 |
| 4.1. | The overlaid HPLC chromatograms of renieramycin references | 44 |
| 4.2. | The typical UV spectrum of renieramycins | 44 |
| 4.3. | Linearity of the HPLC method for renieramycin M analysis | 46 |
| 4.4. | The calibration curve of renieramycin M | 51 |
| 4.5. | A representative HPLC chromatogram of the sponge *Xestospongia* sp. ethyl acetate extract | 55 |

**Figure** **Page**

4.6. Renieramycin M contents in the blue sponge *Xestospongia* sp. in August 2005 to July 2006.....55

4.7. Graphs showing annual variation (from August 2005 to July 2006) of environmental parameters.....57

4.8. Annual variation between renieramycin M contents ($\times 10^{-2}$ %w/w) and environmental factors .....59

4.9. Annual variation between renieramycin M contents ($\times 10^{-2}$ %w/w) and both environmental factors as total dissolved solids, TDS (mg/L) and chlorophyll-a ($mg/m^3$).....60

4.10. Representative SEM images from cross section of the sponge *Xestospongia* sp.....62

4.11. Representative SEM images of bacteria in the sponge *Xestospongia* sp .....63

4.12. Representative SEM images of sponge cell fractions obtained from centrifugation.....65

4.13. Parenchymella larva of the blue sponge *Xestospongia* sp. .....69

4.14. HPLC chromatograms of the ethyl acetate extracts in November 2005.....70

# ABBREVIATIONS

| | | |
|---|---|---|
| % | = | percent or part per hundred |
| ‰ | = | part per thousand |
| %R | = | percent recovery |
| %RSD | = | percent of relative standard deviation |
| %CV | = | percent of coefficient of variation |
| °C | = | degree Celsius |
| µg | = | microgram |
| µL | = | microliter |
| µm | = | micrometer |
| µM | = | micromolar |
| cm | = | centimeter |
| g | = | gram or earth's gravitational field |
| $GI_{50}$ | = | 50 percent growth inhibitory concentration |
| HPLC | = | high performance liquid chromatography |
| $IC_{50}$ | = | 50 percent inhibitory concentration |
| Kg | = | kilogram |
| L | = | liter |
| M | = | molar |
| mg | = | milligram |
| MIC | = | minimum inhibition concentration |
| min | = | minute |
| mL | = | milliliter |
| mm | = | millimeter |
| mM | = | millimolar |
| MW | = | molecular weight |
| ng | = | nanogram |
| nM | = | nanomolar |
| nm | = | nanometer |
| ppm | = | part per million |
| ppt | = | part per thousand |
| SD | = | standard deviation |

| | | |
|---|---|---|
| sp. | = | species |
| $R^2$ | = | correlation coefficient |
| rpm | = | round per minute |
| RSD | = | relative standard deviation |
| TLC | = | thin layer chromatography |
| $t_R$ | = | retention time |
| UV | = | ultraviolet |
| w or wt. | = | weight |