


สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากไชยาโนแบคทีเรีย *Lyngbya majuscula*



นางสาวสุธาทิพย์ บุญญเจตน์พงษ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-1803-9

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

BIOACTIVE COMPOUNDS FROM CYANOBACTERIUM *Lyngbya majuscula*



Miss Sutaporn Bunyajetpong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Chemistry

Department of Chemistry

Faculty of Science


Chulalongkorn University

Academic Year 2002

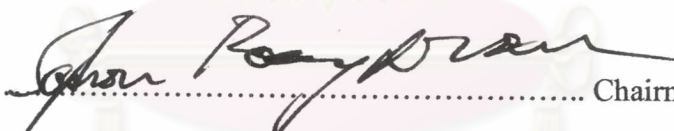
ISBN 974-17-1803-9


Thesis Title BIOACTIVE COMPOUNDS FROM CYANOBACTERIUM
Lyngbya majuscula
By Miss Sutaporn Bunyajetpong
Field of Study Chemistry
Thesis Advisor Namthip Sitachitta, Ph.D.

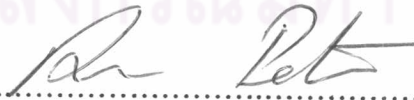
Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree


.....Dean of Faculty of Science
(Associate Professor Wanchai Phothiphichitr, Ph.D.)

Thesis Committee:


..... Chairman
(Associate Professor Sophon Roengsumran, Ph.D.)


..... Thesis Advisor
(Namthip Sitachitta, Ph.D.)


..... Member
(Associate Professor Amorn Petsom, Ph.D.)


..... Member
(Assistant Professor Thawatchai Tuntulani, Ph.D.)

สุชาพร บุญญเจตน์พงษ์ : สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากไซยาโนแบคทีเรีย

Lyngbya majuscula (BIOACTIVE COMPOUNDS FROM

CYANOBACTERIUM *Lyngbya majuscula*)

อ. ที่ปรึกษา : อ. ดร. นำทิพย์ ตีตะจิตต์, 56 หน้า

ISBN 974-974-17-1803-9

ไซยาโนแบคทีเรีย *Lyngbya majuscula* เป็นแหล่งให้สารทุติยภูมิที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และมีสูตรโครงสร้างทางเคมีที่หลากหลาย งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจาก *L. majuscula* ซึ่งเก็บจากหาดราชมงกล จังหวัดตรัง โดยใช้ความเป็นพิษต่อไรทะเลและต่อปลาทอง เป็นแนวทางในการหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จากส่วนสกัดของตัวอย่างดังกล่าวสามารถแยกเปปไทด์ใหม่ได้ 3 ชนิด คือ trungapeptins A, B และ C โดยการหาโครงสร้างของสารทั้งสามชนิดนี้ได้ โดยอาศัยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี และการหาสเตอริโอเคมี ณ ตำแหน่งแอลฟาอะมิโนแอซิดด้วยวิธี Marfey's method สารทั้งสามชนิดดังกล่าว มี 3-hydroxy-2-methyl-7-octynoic acid (Hmoya), 3-hydroxy-2-methyl-7-octenoic acid (Hmoea) และ 3-hydroxy-2-methyl-7-octanoic acid (Hmoaa) เป็นส่วนประกอบตามลำดับ โดย trungapeptin A พบว่ามีความเป็นพิษสูงต่อไรทะเลที่ 10 ppm และมีความเป็นพิษสูงต่อปลาทองที่ 6.25 ppm ในระยะเวลา 20 นาที แต่ไม่ออกฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็ง KB และ LoVo

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....เคมี.....

สาขาวิชา.....เคมีอินทรีย์.....

ปีการศึกษา.....2545.....

ลายมือชื่อนิสิต.....สุชาพร บุญญเจตน์พงษ์.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....นำทิพย์ ตีตะจิตต์.....

4472457523 : MAJOR CHEMISTRY

KEY WORD : Marine Natural Product, Cytotoxic Compound, Ichthyotoxicity,
Cyanobacterium, *Lyngbya majuscula*

**SUTAPORN BUNYAJETPONG : BIOACTIVE COMPOUNDS FROM
CYANOBACTERIUM *Lyngbya majuscula***

THESIS ADVISOR : NAMTHIP SITACITTA, Ph.D., 56 pp.

ISBN 974-17-1803-9

The marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula* has proven to be a rich source of chemically diverse classes of bioactive secondary metabolites. This research describes the chemistry of *L. majuscula* collected from Ratchamonkol Beach, Trung Province. After using brine shrimp toxicity and ichthyotoxic assays to guide the fractionations, the lipophilic extract of this collection provided three new bioactive depsipeptides, trungapeptins A, B and C. The structures were determined using spectroscopic methods and the absolute configuration of α -amino acids were determined using Marfey's method. Trungapeptins A, B and C contain the unique 3-hydroxy-2-methyl-7-octynoic acid (Hmoya), the 3-hydroxy-2-methyl-7-octenoic acid (Hmoea), and 3-hydroxy-2-methyl-7-octanoic acid (Hmoaa) residues, respectively. Trungapeptin A showed brine shrimp toxicity at 10 ppm and ichthyotoxicity at 6.25 ppm (20 min). However, trungapeptin A exhibited no cytotoxicity against KB and LoVo cells.

ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department.....Chemistry.....

Student's signature.....Sutaporn Bunyajetpong

Field of study...Organic Chemistry...

Advisor's signature...Namthip Sitacitta

Academic year...2002.....

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express gratitude to my advisor, Dr. Namthip Sitachitta, for her invaluable suggestion and assistance throughout my studies and research at Chulalongkorn University. I wish to thank my graduate committee members, Associate Professor Dr. Sophon Roengsumran, Associate Professor Dr. Amorn Petsom and Assistant Professor Dr. Thawatchai Tuntulani for their advices and comments.

I would like to acknowledge for the staunch supporter, Wesley Y. Yoshida (Department of Chemistry, University of Hawaii), for his guidance and assistance with NMR experiments. I am grateful to Dr. Aparat Mahakhant (Thailand Institute of Scientific and Technology Research) for taxonomic identification of *Lyngbya majuscula*, Dr. Kunimitsu Kaya (National Institute for Environmental Studies, Japan) for operating HR-FABMS data and Dr. Chutiwan Dechsakulwatana (Institute of Marine Science, Burapha University) for classifying the marine sponge, *Xestospongia exigua*. I thank Associate Professor Dr. Supason Pattanaargson and Dr. Yongsak Srithanaanant for their advice during the group meetings. I wished to express sincere thanks to the faculty of science, graduate school and Ratchadapiseksompoj Research fund, Chulalongkorn University for financial support. Moreover, thank was also extended to Natural Products Research Unit, Department of Chemistry, Chulalongkorn University for the laboratory facilities. My special thankfulness is to Miss Jirapatch Polchai (Thailand Institute of Scientific and Technology Research) for her kindness in teaching me the method of bioassays and the using of laboratory-equipments. I thank all of my friends for their friendship and helps during my graduate studies. Finally, I would like to appreciate my parents for their great support, encouragement and guidance throughout my education.

CONTENTS

	<u>Page</u>
Abstract in Thai.....	iv
Abstract in English.....	v
Acknowledgement.....	vi
Contents.....	vii
List of Figures.....	ix
List of Schemes.....	x
List of Tables.....	xi
List of Abbreviations.....	xii
CHAPTER	
1. THE INSPIRATION OF THIS RESEARCH.....	1
2. GENERAL INTRODUCTION.....	3
2.1 Marine Natural Products.....	3
2.2 Natural Products Studied of the Marine Microorganisms.....	6
2.3 Natural Products from the Marine Cyanobacterium <i>Lyngbya majuscula</i>	10
3. EXPERIMENT.....	14
3.1 Biological Material.....	14
3.2 Equipments.....	14
3.3 Chemicals.....	14
3.4 Marfey's Analysis.....	15
3.5 Bioassay Procedures.....	15
3.5.1 Brine Shrimp Toxicity Assay.....	15
3.5.2 Ichthyotoxicity Assay.....	16
3.6 Extraction.....	16
3.7 Isolation and Purification.....	17

	<u>Page</u>
4. RESULTS AND DISCUSSION	18
4.1 Physical Properties of Isolated Compounds.....	18
4.1.1 Compound A.....	18
4.1.2 Compound B.....	18
4.1.3 Compound C.....	18
4.2 Structure Elucidation of Isolated Compounds.....	19
4.2.1 Compound A.....	19
4.2.2 Compounds B and C.....	23
4.3 Biological Activities of Compound A.....	27
4.4 Structural Related Compounds of Trungapeptins A, B and C.....	27
5. CONCLUSION	30
Proposal for the Future Work.....	31
REFERENCES.....	32
APPENDICES.....	38
VITA.....	56

ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of Figures

<u>Figure</u>	<u>Page</u>
1.1 A biosynthetic sequence illustrating the contrast between hydrogen ion and bromonium ion-induced cyclizations of a geraniol-derived precursor in the terrestrial and marine environments.....	2
4.1 Partial Structures of Compound A (26).....	20
A.1 ^1H and ^{13}C NMR Spectra of Compound A (26).....	39
A.2 DEPT Spectrum of Compound A (26).....	40
A.3 ^1H - ^1H COSY Spectrum of Compound A (26).....	41
A.4 HSQC of Compound A (26).....	42
A.5 HMBC of Compound A (26).....	43
A.6 ^1H -TOCSY of L-Valine in Compound A (26).....	44
A.7 ^1H -TOCSY of L-N-Methyl Valine in Compound A (26).....	45
A.8 ^1H -TOCSY of 3-Phenyllactic acid in Compound A (26).....	46
A.9 ^1H -TOCSY of L-Proline in Compound A (26).....	47
A.10 ^1H -TOCSY of L-allo-Isoleucine in Compound A (26).....	48
A.11 ^1H -TOCSY of 2-Methyl-3-Hydroxy-Octynoic acid in Compound A (26).....	49
A.12 ^1H and ^{13}C NMR Spectra of Compound B (27).....	50
A.13 HSQC of Compound B (27).....	51
A.14 HMBC of Compound B (27).....	52
A.15 ^1H and ^{13}C NMR Spectra of Compound C (28).....	53
A.16 HRFABMS Spectra of Compounds A (26), B (27) and C (28).....	54
A.17 IR Spectra of Compounds A (26), B (27) and C (28).....	55

List of Schemes

<u>Scheme</u>	<u>Page</u>
3.1 Extraction Procedure of <i>Lyngbya majuscula</i>	16
3.2 Isolation Procedure of Organic Extract.....	17



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of Tables

<u>Table</u>		<u>Page</u>
2.1	Selected Marine Natural Products Currently in Clinical Trials.....	5
4.1	Correlated ^1H and ^{13}C NMR Data for Compound A (26) in CDCl_3	21
4.2	^1H and ^{13}C NMR Data for Compounds B (27) and C (28) in CDCl_3	25



ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of Abbreviations

br	Broad
°C	degree celsius
CDCl ₃	Deuterated chloroform
COSY	1H-1H chemical shift correlation spectroscopy
δ	Chemical shift
d	Doublet
dd	Doublet of doublet
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
DMSO	Dimethylsulfoxide
EtOAc	Ethyl acetate
FABMS	Fast atom bombardment mass spectrometry
FDA	1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-alaninamide
g	gram
HETLOC	Heteronuclear long range coupling spectroscopy
HMBC	Heteronuclear multiple-bond coherence spectroscopy
Hmoya	3-Hydroxy-2-methyl-7-octynoic acid
Hmoea	3-Hydroxy-2-methyl-7-octenoic acid
Hmoaa	3-Hydroxy-2-methyl-7-octanoic acid
HPLC	High performance liquid chromatography
HR-FABMS	High resolution fast atom bombardment mass spectrometry
HMQC	Heteronuclear single quantum coherence
Hz	Hertz
Ileu	Isoleucine
IPP	Isopentenyl diphosphate
IR	Infrared spectroscopy
<i>J</i>	Coupling constant
m	Multiplet

MeCN	Acetonitrile
MeOH	Methanol
mg	Milligram
min	Minute
ml	Milliliter
m/z	Mass per charge
MS	Mass spectrometry
MW	Molecular weight
<i>N</i> -MeVal	<i>N</i> -Methylvaline
NMR	Nuclear magnetic resonance
Pla	Phenylactic acid
ppm	Part per million (or mg/g)
Pro	Proline
RP-HPLC	Reversed phase high performance liquid chromatography
q	Quartet
s	Singlet
t	Triplet
t_R	Retention time
TFA	Trifluoroacetic acid
TLC	Thin layer chromatography
TOCSY	Total correlated spectroscopy
UV	Ultraviolet spectroscopy
Val	Valine