

제 2 차 년도
년차 보고서

BSPN 00179-603-1

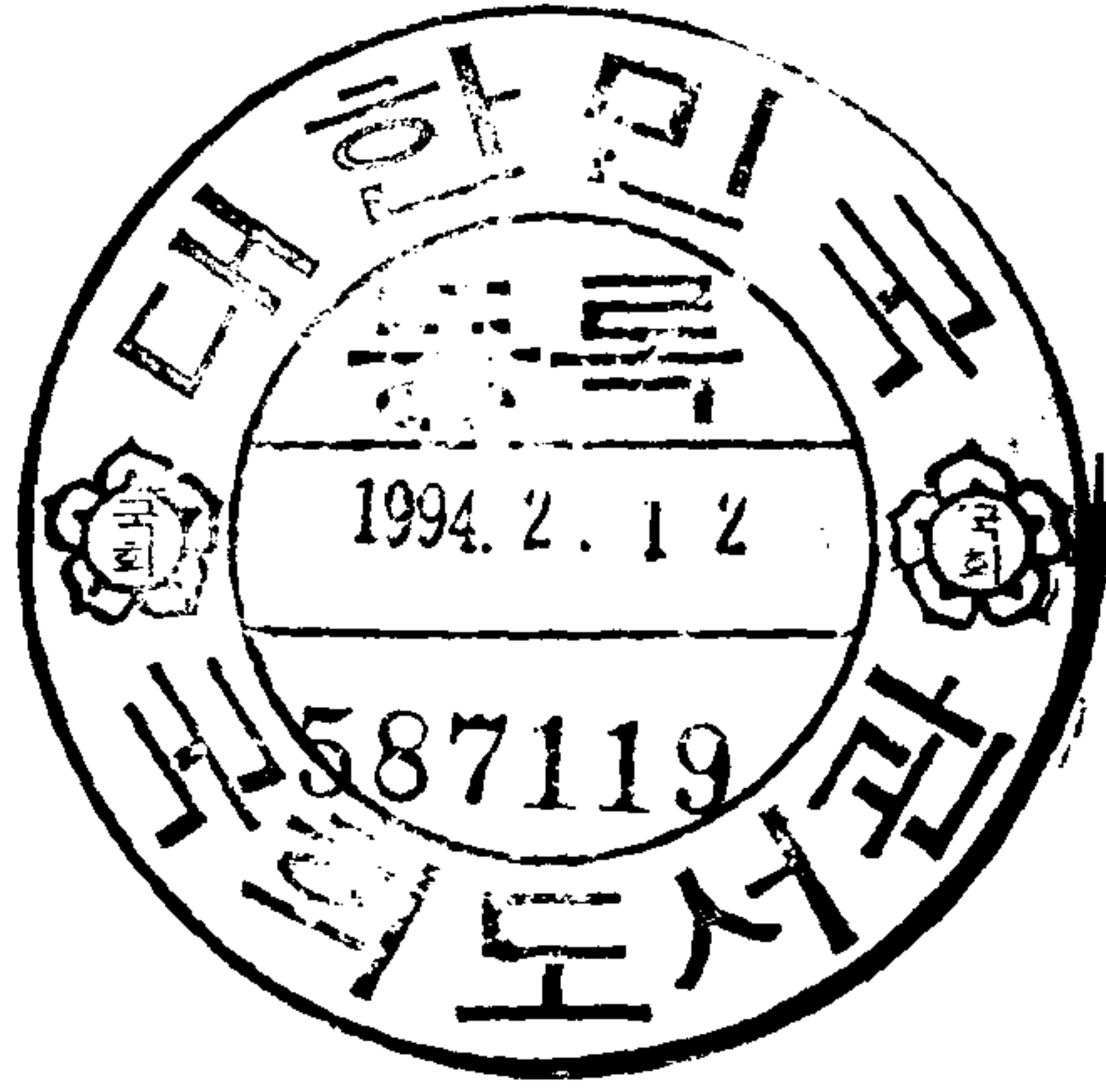
한국 근해 저서 군체생물로부터 신물질 추출 연구
(제 2 차 년 도)

A Study on the Isolation of Novel Natural Products from the
Benthic Colonial Organisms of the Korean Waters

1993. 8

연 구 기 관
한 국 해 양 연 구 소

과 학 기 술 처



제 출 문

과학기술처 장관 귀하

본 보고서를 “한국근해 저서 군체생물로부터 신물질 추출연구”의 보고서로 제출합니다.

1993년 8월

연구기관:	한국해양연구소	
연구책임자	신종현	
연구원	정지형	서영완
	정호성	백은주
	문두현	김형돈
	노정래	홍기훈
	정창수	강동진

여 백

요 약 문

I. 제 목

한국근해 저서 군체생물로부터 신물질 추출 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

해양 천연물 화학은 그 역사는 짧으나 급속히 성장하는 분야이다. 이미 4000 이상의 신물질의 구조가 결정되었으며, 의·약학, 화학, 생물학등 여러 관련분야의 연구에 필수적인 정보와 연구수단을 제공하여 이들의 발전에 크게 기여하였다.

해양 천연물의 중요성을 인식한 외국에서는 집중적인 연구노력을 기울인 결과 무수한 생리활성 신물질을 발견하였고 이미 40여 물질특허를 획득하였다. 수종의 선도물질은 수년내에 시판될 것으로 예정되고 있다. 그러나 국내에서는 이 분야에 관한 본격적인 연구가 전혀 이루어 지지 않았다. 해양 천연물이 보유하고 있는 막대한 학문적 산업적 중요성을 고려할 때 이 분야의 연구는 대단히 시급한 과제이다.

우리나라 근해에 서식하는 해양생물의 대사물질에 대한 체계적인 첫 연구로서 본 과제의 최종목표는 저서군체 동물로부터 천연물의 분리, 구조결정 및 생리활성도의 측정이다. 지난 해에 수행되었던 기존자료에 대한 분석, 연구대상생물의 채집 및 중점연구대상 시료의 선정 등의 연구결과를 바탕으로 하여 본 2차 년도에는 다양한 크로마토그래피, NMR 분석 및 화학적인 기법을 이용하여 천연물을 분리하고 구조를 결정하는 것을 연구목표로 하였다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. 천연물 연구를 위한 다양한 시료를 확보하기 위하여 저서군체 동물을 채집하였으며 채집된 시료들에 대하여 전문가들과 공동으로 생물학적 분류를 수행하였다. 또한 문헌조사와 유기조추출물에 대한 생리활성도와 화학적 분석의 결과를 종합하여 중점연구대상 생물을 선정하였다.

2. 다양한 크로마토그래피 방법을 이용하여 선정된 강장동물과 해면동물 시료로부터 천연물을 분리 정제하였다.

3. 여러 가지 NMR과 유기화학적 실험방법을 이용하여 분리된 천연물의 구조를 결정하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 관한 건의

1. 서귀포 해역에서 110 kg 이상의 저서군체 동물 시료를 채집하였다. 이로서 지난 연도에 수행한 세 차례의 채집과 합하여 93종 260 kg의 강장동물과 해면동물 시료를 확보하였다. 이들중 22종의 강장동물과 38종의 해면은 분류가 완료되었으며 수종의 새로운 종을 포함한 나머지 시료에 대한 분류가 전문가들에 의하여 진행중이다. 조추출물에 대한 brine shrimp 독성과 P388 항암 및 항바이러스 효과 등의 생리활성도와 TLC, 수소 NMR등의 측정결과를 종합하여 4종의 강장동물과 2종의 해면동물을 1차적인 연구대상으로 선정하였다.

2. Gorgonian *Acalycigorgia inermis*로부터 2개의 xenicane계 diterpenoids를 분리하였다. 이들의 구조는 NMR 분석과 문헌조사에 의하여 acalycixeniolide B 및 그 유도체임이 확인되었다. Gorgonian *Acabaria undulata*로부터 4개의 sphingosine계 유도물질이 분리되었으며 이들의 구조는 2-D NMR 실험과 화학적 구조변환에 의하여 결정되었다. 또한 동일한 시료로부터 2개의 새로운 polyhydroxy steroids가 분리되었다.

3. Soft coral *Alcyonium gracillimum*으로부터 7개의 물질이 분리되었으며 이들의 구조는 C₂₁ pregnanes, C₂₇ steroids계 ketals, hemiketals 및 enol ethers로 결정되었다. 또한 hydroid *Solanderia secunda*로부터 3개의 cyclopropane기를 가진 C₂₂ fatty acid lactones이 분리되었다.

4. 강력한 독성을 가진 macrolide계 물질이 해면 *Pachastrella* sp.로부터 분리되었다. 이 물질의 구조는 DQFCOSY, TOCSY, HETCOR, HMBC 및 HMQC등 다양한 2-D NMR기법을 이용하여 현재 구조결정중이다.

5. 이상의 연구결과를 종합하여 6가지 다른 종류에 속하는 19개의 물질이 5종의 저서군체 동물로부터 분리되었다. 이들중 해면의 대사물질을 제외한 다른 천연물에 대해서는 NMR과 화학적 방법에 의하여 2차원적 구조가 모두 결정되었으며 현재 비대칭 탄소에 대한 입체화학적 배열을 규명중에 있다. 문헌조사 결과 대부분의 천연물이 해양생물로부터는 보고된 바 없음을 확인하였으며 현재 육상식물과 미생물들을 대상으로 하여 신물질 여부를 조사중이다. 아울러 정밀 생리활성도가 조사될 예정이다.

해양 천연물 연구는 학문적, 산업적 중요성이 매우 큰 분야이다. 그러나 우리나라 근해의 해양생물에 대해서는 화학적 연구가 체계적으로 이루어진 바가 없다. 당해 년도의 연구결과는 이들이 강력한 생리활성도를 가진 신물질의 중요한 원천이 될 가능성이 큰 것을 입증하였다.

여 백

Summary

I. Title

A Study on the Isolation of Novel Natural Products from the Benthic Colonial Organisms of the Korean Waters

I. Objectives and Significance

Marine natural products chemistry is among the fastest developing fields of sciences. Despite its relatively short history, structures of over 4000 novel secondary metabolites have been determined, and marine natural products chemistry has greatly contributed to the progress of many related fields including medicinal sciences, chemistry and biology by providing essential informations and research means.

Acknowledging the great potential in this field, leading countries have put tremendous efforts and have found numerous biologically active and structurally unique compounds culminating in more than 40 patents. Some lead compounds are expected to appear in the market in near future. However, chemical investigation of marine organisms has never been seriously pursued by domestic scientists. Considering the tremendous academic and industrial potentials of marine natural products, research in this field should be started immediately.

As the first systematic approach to natural products from Korean Waters marine organisms, the ultimate objectives of this research is the isolation, structure determination and bioactivity testing of novel secondary metabolites from benthic colonial invertebrates. Based upon the last year's work on

literature analysis, selection and collection of target organisms, the research objectives of this second year is the isolation and structure determination of secondary metabolites by utilizing various chromatographic, chemical and NMR techniques.

III. Contents and Scope

1. As a continuous effort to ensure sufficient quantities of samples for chemical investigation more invertebrate samples were collected from domestic waters. In addition, based upon the results of literature analysis, bioactivity test and chemical analysis of crude organic extracts, prime target organisms were selected. Taxonomical classification of invertebrate samples was pursued by domestic specialists.

2. Secondary metabolites were isolated from selected coelenterate and sponge samples by utilizing chromatographic techniques.

3. Structures of isolated compounds were determined by using chemical methods and NMR experiments especially by utilizing various modern 2-dimensional experiments.

IV. Results and Suggestions

1. More than 110 kg of benthic invertebrates were collected from Seoguipo area. Combined with the results of three expeditions in the last year, total 93 species 260 kg of coelenterate and sponge samples are stored. Classification of 22 coelenterates and 38 sponges has been done by taxonomists. Classification of the remainder including several new species are currently being pursued. Based

on the results of brine shrimp toxicity, P388 antileukemic, and antiviral activity tests, TLC and proton NMR measurements of the crude extracts, 4 species of coelenterates and 2 species of sponges were selected for chemical investigation.

2. Two diterpenoids of the xenicane skeleton were isolated from the gorgonian *Acalycigorgia inermis*. Structures of these compounds were determined as acalycixeniolide B and a derivative by NMR analysis and literature survey. Four sphingosine derivatives were isolated from the gorgonian *Acabaria undulata*. Structures of three new derivatives were determined by 2-D NMR experiments and chemical conversion. In addition, two novel polyhydroxy steroids were isolated from the same organism.

3. Seven compounds were isolated from the soft coral *Alcyonium gracillimum*. The structures of these compounds were determined as C₂₁ pregnanes, C₂₇ steroidal ketals, hemiketal and cyclic enol ethers. Also, three cyclopropane-containing C₂₂ fatty acid lactones were isolated from the hydroid *Solanderia secunda*.

4. A highly toxic macrolide was isolated from the sponge *Pachastrelia* sp. The structure of this metabolite is currently being investigated by combination of 2-D NMR techniques including phase-sensitive DQFCOSY, TOCSY, HETCOR, HMBC and HMQC.

5. In total, nineteen compounds of six different skeletal classes were isolated from five benthic invertebrate samples. Two-dimensional structures of all but one sponge metabolite were unambiguously determined by NMR and chemical methods. Stereochemistry of asymmetric carbon centers of these compounds is being currently investigated.

Literature survey has found that most of compounds have never been reported

from marine organisms. To ensure these compounds as novel secondary metabolites, database on metabolites of other organisms mainly terrestrial plants and microorganisms is currently investigated. Full structural determination and literature survey will be followed by advanced bioactivity tests.

Marine natural products chemistry is among the fields of sciences with great academic and industrial potentials. However, chemistry of Korean Waters marine organisms has never been systematically investigated. This second year's study clearly demonstrated domestic marine organisms having the potential to be prolific sources for biologically active and structurally unique compounds.

목 차

요약문.....	3
그림목차.....	15
표목차.....	19
제 1 장. 서론.....	21
제 2 장. 시료의 채집, 분류 및 생리활성도 측정.....	25
2.1. 채집.....	26
2.2. 분류.....	27
2.3. 생리활성도 측정.....	32
2.4. 연구대상 생물의 선정.....	36
제 3 장. Gorgonians의 천연물.....	37
3.1. 연구의 배경.....	37
3.2. <i>Acalycigorgia inermis</i> 의 대사물질.....	40
3.3. <i>Acabaria undulata</i> 의 대사물질.....	51
3.4. 실험방법.....	63
제 4 장. Soft corals의 천연물.....	93
4.1. 연구의 배경.....	93
4.2. <i>Alcyonium gracillimum</i> 의 대사물질.....	94
4.3. 실험방법.....	104
제 5 장. Hydroids의 천연물.....	135
5.1. 연구의 배경.....	135
5.2. <i>Solanderia secunda</i> 의 대사물질.....	138
5.3. 실험방법.....	149

제 6 장. Sponges의 천연물	167
6.1. 연구의 배경.....	167
6.2. <i>Pachastrella</i> sp.의 대사물질.....	172
6.3. 실험방법.....	180
제 7 장. 결론.....	187
참고문헌.....	189

Contents

Summary.....	7
List of Figures.....	15
List of Tables.....	19
Chapter 1. Introduction.....	21
Chapter 2. Collection, classification and bioactivity test.....	25
2.1. Collection of samples.....	26
2.2. Classification.....	27
2.3. Bioactivity test.....	32
2.4. Selection of prime target organisms.....	36
Chapter 3. Natural products of gorgonians.....	37
3.1. Background.....	37
3.2. Metabolites of <i>Acalycigorgia inermis</i>	40
3.3. Metabolites of <i>Acabaria undulata</i>	51
3.4. Experimental.....	63
Chapter 4. Natural products of soft corals.....	93
4.1. Background.....	93
4.2. Metabolites of <i>Alcyonium gracillimum</i>	94
4.3. Experimental.....	104
Chapter 5. Natural products of hydroids.....	135
5.1. Background.....	135
5.2. Metabolites of <i>Solanderia secunda</i>	138
5.3. Experimental.....	149

Chapter 6. Natural products of sponges	167
6.1. Background.....	167
6.2. Metabolites of <i>Pachastrella</i> sp.....	172
6.3. Experimental.....	180
Chapter 7. Conclusion.....	187
References.....	189

List of Figures

Fig. 3-1. Potential drugs isolated from gorgonians.....	38
Fig. 3-2. Structures of diterpenoids isolated from the gorgonian <i>Acalycigorgia inermis</i>	41
Fig. 3-3. The xenicane group of diterpenoids from marine organisms.....	45
Fig. 3-4. Carbon NMR spectrum of compound 91K-4-1.....	46
Fig. 3-5. Proton NMR spectrum of compound 91K-4-1.....	47
Fig. 3-6. Proton COSY NMR spectrum of compound 91K-4-1.....	48
Fig. 3-7. Carbon NMR spectrum of compound 91K-4-2.....	49
Fig. 3-8. Proton NMR spectrum of compound 91K-4-2.....	50
Fig. 3-9. Sphingosines isolated from the gorgonian <i>Acabaria undulata</i>	52
Fig. 3-10. Partial structures and proton NMR assignments for compounds 91K-2-1 ~ -4.....	54
Fig. 3-11. Sphingosines and related metabolites from marine organisms.....	57
Fig. 3-12. Polyhydroxy steroids isolated from the gorgonian <i>Acabaria undulata</i>	59
Fig. 3-13. Carbon NMR spectrum of compound 91K-2-1.....	72
Fig. 3-14. Proton NMR spectrum of compound 91K-2-1.....	73
Fig. 3-15. Proton COSY spectrum of compound 91K-2-1.....	74
Fig. 3-16. Proton NMR spectrum of compound 91K-2-5.....	75
Fig. 3-17. Carbon NMR spectrum of compound 91K-2-2.....	76
Fig. 3-18. Proton NMR spectrum of compound 91K-2-2.....	77
Fig. 3-19. Carbon NMR spectrum of compound 91K-2-3.....	78
Fig. 3-20. Proton NMR spectrum of compound 91K-2-3.....	79
Fig. 3-21. Carbon NMR spectrum of compound 91K-2-4.....	80

Fig. 3-22. Proton NMR spectrum of compound 91K-2-4.....	81
Fig. 3-23. Proton NMR spectrum of mixture of polyhydroxy steroids isolated from the gorgonian <i>Acabaria undulata</i>	82
Fig. 3-24. Carbon NMR spectrum of mixture of polyhydroxy steroids isolated from the gorgonian <i>Acabaria undulata</i>	83
Fig. 3-25. Carbon NMR spectrum of compound 91K-2-6.....	84
Fig. 3-26. Proton NMR spectrum of compound 91K-2-6.....	85
Fig. 3-27. Proton coupled carbon NMR spectrum of polyhydroxy steroids.....	86
Fig. 3-28. Proton COSY NMR spectrum of compound 91K-2-6.....	87
Fig. 3-29. HMQC spectrum of compound 91K-2-6.....	88
Fig. 3-30. HMBC spectrum of compound 91K-2-6.....	89
Fig. 3-31. Carbon NMR spectrum of compound 91K-2-7.....	90
Fig. 3-32. Proton NMR spectrum of compound 91K-2-7.....	91
Fig. 4-1. Metabolites isolated from the soft coral <i>Alcyonium gracillimum</i>	95
Fig. 4-2. Carbon NMR spectrum of compound 91-18-1.....	111
Fig. 4-3. Proton NMR spectrum of compound 91-18-1.....	112
Fig. 4-4. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-18-1.....	113
Fig. 4-5. HMQC spectrum of compound 91-18-1.....	114
Fig. 4-6. HMBC spectrum of compound 91-18-1.....	115
Fig. 4-7. Carbon NMR spectrum of compound 91-18-2.....	116
Fig. 4-8. Proton NMR spectrum of compound 91-18-2.....	117
Fig. 4-9. Carbon NMR spectrum of compound 91-18-3.....	118
Fig. 4-10. Proton NMR spectrum of compound 91-18-3.....	119
Fig. 4-11. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-18-3.....	120
Fig. 4-12. Carbon NMR spectrum of compound 91-18-4.....	121

Fig. 4-13. Proton NMR spectrum of compound 91-18-4.....	122
Fig. 4-14. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-18-4.....	123
Fig. 4-15. HMQC spectrum of compound 91-18-4.....	124
Fig. 4-16. HMBC spectrum of compound 91-18-4.....	125
Fig. 4-17. Carbon NMR spectrum of compound 91-18-5.....	126
Fig. 4-18. Proton NMR spectrum of compound 91-18-5.....	127
Fig. 4-19. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-18-5.....	128
Fig. 4-20. Carbon NMR spectrum of compound 91-18-6.....	129
Fig. 4-21. Proton NMR spectrum of compound 91-18-6.....	130
Fig. 4-22. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-18-6.....	131
Fig. 4-23. Carbon NMR spectrum of compound 91-18-7.....	132
Fig. 4-24. Proton NMR spectrum of compound 91-18-7.....	133
Fig. 4-25. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-18-7.....	134
Fig. 5-1. Metabolites of hydroids.....	136
Fig. 5-2. Cyclopropane-containing C ₂₂ fatty acid lactones isolated from the hydroid <i>Solanderia secunda</i>	139
Fig. 5-3. Partial structures and connectivity of compound 91-10-1.....	143
Fig. 5-4. Cyclopropane-containing fatty acid lactones from marine organisms.....	148
Fig. 5-5. Carbon NMR spectrum of compound 91-10-1.....	153
Fig. 5-6. Proton NMR spectrum of compound 91-10-1.....	154
Fig. 5-7. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-10-1.....	155
Fig. 5-8. Carbon NMR spectrum of compound 91-10-2.....	156
Fig. 5-9. Proton NMR spectrum of compound 91-10-2.....	157
Fig. 5-10. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-10-2.....	158
Fig. 5-11. Carbon NMR spectrum of compound 91-10-3.....	159

Fig. 5-12. Proton NMR spectrum of compound 91-10-3.....	160
Fig. 5-13. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-10-3.....	161
Fig. 5-14. Proton NMR spectrum of compound 91-10-4.....	162
Fig. 5-15. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-10-4.....	163
Fig. 5-16. Proton NMR spectrum of compound 91-10-5.....	164
Fig. 5-17. Proton NMR spectrum of compound 91-10-6.....	165
Fig. 5-18. Proton NMR spectrum of compound 91-10-7.....	166
Fig. 6-1. Examples of potential drugs and lead compounds from sponges.....	169
Fig. 6-2. Partial structures of compound 91K-19-1.....	176
Fig. 6-3. Results of DNA-cleavage assay for compound 91K-19-1.....	178
Fig. 6-4. Results of plasma membrane reductase assay for compound 91K-19-1.....	179
Fig. 6-5. Carbon NMR spectrum of compound 91K-19-1.....	182
Fig. 6-6. Proton NMR spectrum of compound 91K-19-1.....	183
Fig. 6-7. HETCOR spectrum of compound 91K-19-1.....	184
Fig. 6-8. Proton COSY NMR spectrum of compound 91K-19-1.....	185
Fig. 6-9. TOCSY spectrum of compound 91K-19-1.....	186

List of Tables

Table 2-1. List of coelenterates collected from Korean Waters.....	29
Table 2-2. List of sponges collected from Korean Waters.....	30
Table 2-3. Brine shrimp toxicity of selected commercial drugs.....	33
Table 3-1. Carbon and proton NMR assignments for compounds 91K-4-1 and -2.....	43
Table 4-1. Carbon and proton NMR assignments for compounds 91-18-1 and -2.....	96
Table 4-2. Carbon NMR assignments for compounds 91-18-3 and -4.....	
Table 4-3. Carbon NMR assignments for compounds 91-18-5, -6, and -7.....	103
Table 5-1. Proton NMR assignments for compounds 91-10-1 ~ 3.....	140
Table 5-2. Carbon NMR assignments for compounds 91-10-1 ~ 3.....	141
Table 6-1. Results of brine shrimp assay for solvent-partitioned layers.....	173
Table 6-2. Results of brine shrimp assay for vacuum flash chromatographic fractions.....	173

여 백

제1장 서론

해양 천연물 즉 해양 생물의 대사물질에 관한 연구는 그 역사가 비교적 짧으나 급속도로 성장하는 분야이다. 이 분야는 60년대말에 본격적으로 시작되었으나 이미 4000 이상의 신물질이 추출되었으며 발표된 논문도 2500을 상회하는 등 실로 폭발적으로 성장하고 있다(Faulkner, 1992).

해양 천연물 연구의 학문적, 산업적 중요성은 실로 막대하며 이는 유사분야인 육상 천연물 연구의 발전상에서 여실이 증명되고 있다. 이러한 천연물 연구의 중요성은 이 분야가 여타의 여러분야와 맺고 있는 밀접한 연관관계와 구조가 결정된 천연물의 막대한 응용성에 대부분 기인한다. 천연물을 매개로 하여 해양 천연물 연구가 관련을 맺고 있는 분야는 크게 3분야 즉 유기화학, 생물 및 생태학 그리고 의.약학으로 구분된다. 유기화학적 측면에서 특이한 구조를 가진 천연물의 규명은 합성 및 생합성에 필수적인 정보 즉, 합성과 생체내 반응기작 연구를 위한 목표를 제공한다. 이러한 천연물의 합성은 오랜기간 진화를 거친 생물이 합성한 물질을 인간의 힘으로 재현한다는 의의를 가질 뿐만 아니라 이 과정에서 개발되는 유기합성의 많은 새로운 방법은 유기화학의 발전에 크게 기여한다.

해양 천연물 연구는 또한 생물학의 제 분야중 화학 생태학(chemical ecology)과 화학 분류학(chemosystematics - chemical taxonomy)등과 불가분의 관계를 맺고 있다. 먼저 화학 생태학은 생물이 생성 혹은 획득하여 보유하고 있는 2차 대사물질을 probe로 이용하여 생태학적 계 현상의 해석을 도모하는 분야이므로, 천연물 화학에서 얻어지는 정보가 필수적이다. 그러므로 근래에 이루어진 천연물 화학의 성장은 해양 생물에 대한 화학 생태학적 연구를 크게 촉진시키고 있다. 또 해양 천연물 연구는 생물의 화학적 성분에 관한 자료를 공급하여 해양 생물의 분류학적 연구에 크게 기여한다(Bergquist & Wells, 1987).

해양 천연물 연구의 대표적인 응용분야는 의.약학으로서 많은 천연물이 강력한 생

리활성도를 보유하고 있으므로 이러한 생리활성물질의 구조결정은 생체내 효소 및 신경계의 연구, 항암, 항바이러스 연구등 무수한 분야의 연구에 필수적일 뿐만 아니라 생리학, 병리학, 면역학등 생체내에서 일어나는 제 현상의 규명에 관여하는 분야들에 도 크게 기여한다. 이는 많은 천연물질 특히 독성물질들이 생체내의 필수적인 효소나 신경세포에 매우 선택적으로 결합하거나, 이온들의 통로를 봉쇄하기 때문이다(Fautin, 1988).

산업적인 측면에서 천연물의 주된 이용이 신 의약품과 농약 및 동물약품등의 개발 임은 주지의 사실이다. 그런데 다년 간의 연구개발로 인하여 육상 천연물 연구는 점차로 정체하는 경향을 보임에 따라 미국, 일본등의 선진국에서는 관심을 해양생물로 상 당부분 이전하여 집중적인 노력을 기울인 결과 짧은 기간에도 불구하고 4000 이상의 신물질을 추출하였으며 그 중 상당수가 강력한 생리활성 효과를 보유하고 있음이 밝혀 져 50여 물질은 물질특허를 획득하여 신 의약품으로서의 개발중에 있다. 특히 최근에는 일본과 구미 각국의 많은 제약회사들이 학·연과 공동 혹은 단독으로 해양생물로부터 천연 생리활성물질을 개발하는데 직접 참여하고 있으며 가까운 시일에 해양 천연물 이나 합성 유도체가 시판될 예정이다.

그러나 국내에서는 다양한 생물이 근해에 서식함에도 불구하고 해양 천연물에 대 한 본격적인 연구가 아직 시작되지 않은 실정이다. 해양 천연물이 갖고 있는 막대한 학문적, 산업적 중요성을 고려할 때 근년에 대두한 물질특허의 개념과 함께 국내에서 이 분야의 연구는 대단히 시급하다.

본 연구에서는 우리나라 근해에 서식하는 해양생물중 신물질의 추출 가능성이 매우 높다고 생각되는 해면동물, 강장동물, 원색동물등의 저서군체동물을 연구대상으로 선택하여 이들의 천연물을 추출, 구조를 결정하고 신물질의 생리활성도를 측정하는 것 을 연구목표로 하였다.

이들 생물을 연구대상으로 선정한 이유는 다음과 같다. 육상 천연물과는 달리 해 양 천연물에서는 동물이 차지하는 비중이 매우 높아서 알려진 천연물의 약 60%가 해양 동물로부터 분리되었으며 동물 천연물의 거의 대부분이 저서군체동물로부터 추출되었

다. 연체동물이나 어류등 군체를 이루지 않는 동물로부터 얻어진 천연물도 실제로는 군체동물이 생성한 물질이 먹이사슬을 통하여 이들 포식자의 체내에 축적된 경우가 대부분이다.

저서군체동물중 해면과 강장동물은 천연물 연구가 가장 활발한 생물문이어서 현재 까지 구조가 밝혀진 해양 천연물의 각각 30%와 25%가 이들로부터 분리되었으며 이는 단일 생물문으로서는 전체 해양 동식물중 각각 1위와 2위를 차지하는 것이다. 뿐만 아니라 이들의 천연물은 생리활성효과를 갖고 있는 경우가 많아 신 의약품 개발의 중요한 선도물질이며 화학생태학적 측면에서도 큰 관심을 불러 일으키고 있다(Ireland et al, 1987).

원색동물은 양적인 면에서 전체 해양 천연물중 대단히 미미한 위치를 차지하나 생리활성물질의 추출빈도가 믿기 어려울 정도로 높아(50% 이상의 대사물질이 생리활성도를 나타냄) 신 의약품 개발을 위한 후보물질의 다수가 원색동물로부터 추출되었고 천연물 구조 또한 매우 다양하여 추정 가능한 거의 모든 생합성적 전구물질로부터 기인한 물질들을 망라하고 있다. 그리하여 외국의 관련분야 연구진에서는 원색동물을 가까운 장래에 해양 천연물 연구를 주도할 가능성이 가장 높은 생물로 인식하고 있다.

전기한 바와 같이 국내의 해양 천연물 연구는 대단히 미미하여 관련 산·학계의 인정을 받을만큼 우수한 연구결과가 전무한 실정이다. 이는 해양 천연물에 대한 인식의 부족과 연구의 어려움에도 그 이유가 있으나 체계적인 연구를 수행하지 않은데서 대부분 기인한 것으로 해석된다. 따라서 본 연구에서는 확고한 연구기반의 조성이 본격적인 연구에 선행되어야 한다는 것을 인식하고 먼저 1차년도에는 연구체계의 확립에 수력하였다. 지난 년도에 수행한 주요 내용으로는 외국의 거의 모든 기존 연구결과를 정리, 분석하였고, FT-NMR을 비롯한 다수의 천연물 분리 및 분광기와 기초 생리활성도 측정장비를 설치하였다. 또한 우리 나라 근해에 서식하는 다수의 저서군체 동물을 채집하여 유기 조추출물에 대한 생리활성도와 화학적 분석을 기초로 하여 중점연구대상 시료를 선정하였다.

1차 년도에 수행한 연구결과를 바탕으로 본 2차 년도에는 본격적인 해양 천연물

연구 즉 채집된 시료로부터 천연물을 분리하고 그 구조를 결정하는데에 주력하였다. 주요 연구내용으로는 먼저 1차 년도의 시험분석 결과가 우수한 시료를 추가로 확보하였으며 현재 보유중인 모든 저서군체 동물 시료를 분류학자들과 함께 분류를 하였다. 또한 일차적으로 선정된 수 종의 강장 및 해면동물로부터 20 여 천연물을 분리하였다.

FT-NMR을 비롯한 분광자료 해석과 문헌자료 검색에 의하여 이들중 다수는 신물질임이 확인되었으며 구조결정 및 확인작업에 있다. 현재까지 밝혀진 바로는 이들의 구조는 terpenoids, sphingosines, steroidal ketals, hemiketals, polyhydroxy steroids, modified fatty acids, macrolides 등으로 매우 다양하였다. 이와 같이 우리나라 근해의 저서군체 동물로부터 다수의 천연물이 발견되었고 그들의 구조 또한 다양한 것은 국내에서도 해양 천연물의 연구가치가 매우 높은 것으로 생각된다.

제 2 장 시료의 채집, 분류 및 생리활성도 측정

효과적인 천연물 연구를 위해서는 다양한 종류의 시료를 충분히 확보하는 것이 대단히 중요하다. 천연물의 함량은 해양생물의 종류와 물질에 따라 편차가 매우 심하나 일반적으로 저서군체동물의 경우는 1 - 2 kg의 시료가 안정적인 천연물 연구를 위한 하한인 것으로 알려져 있다. 또한 채집한 시료의 정확한 동정이 매우 중요한데 그것은 동일한 종류의 천연물은 화학적으로 동질의 시료로부터만이 얻을 수 있기 때문이다. 아울러 채집한 시료를 정확히 분류하게 되면 해당 생물에 대한 기존 연구자료의 분석을 통하여 천연물의 존재가능성과 함께 존재하는 물질의 종류를 예측할 수 있어서 천연물의 분리와 구조결정을 용이하게 할 수 있다. 본 연구를 위하여 여러차례에 걸쳐 생물을 채집하였으며, 그 결과 80여종 260 kg 이상의 저서군체 동물의 시료가 확보되었다.

다양한 종류의 시료를 충분히 확보한 다음, 실제적인 천연물의 분리과정에 들어가기 전에 필수적으로 수행되어야 할 과정은 특이한 구조를 가진 생리활성물질이 함유되어 있을 가능성이 높은 시료의 선정이다. 육상생물을 연구대상으로 할 때는 오랜 기간 민간에서 전래한 한방요법과 다년 간의 연구결과로 비교적 잘 알려진 해당생물의 생태학적 특성등을 종합하므로 시료의 선정에 큰 어려움이 없으나 해양생물의 경우에는 이러한 사전정보가 적으므로 시료의 선정이 매우 어렵다.

해양생물중 연구대상 시료를 선정하는데 이용하는 방법은 크게 두 가지 즉 유기추출물에 대한 화학적 분석과 생리활성도 측정이 있다. 이 두 가지 방법은 모두 장단점이 있는데 먼저 조추출물에 대한 TLC와 proton NMR 측정등의 화학적 분석은 천연물의 존재를 직접 확인할 수 있다는 장점이 있는 반면에 천연물이 미량으로 존재하는 경우에는 발견하기가 어렵고 생리활성도가 전혀 없는 천연물을 분리할 가능성이 매우 높다는 등의 단점이 있다.

한편 생리활성도의 측정은 신의약품의 개발연구에 흔히 이용되는 방법으로서 특정

생리활성효과를 가진 천연물에 대한 집중적인 연구를 유도하는 장점이 있는 반면에 기존의 알려진 생리활성 물질을 분리하거나, 특정 screening에 드러나지 않는 다른 우수한 생리활성 효과를 가진 물질들을 사장시키는 단점이 있다. 그러므로 최상의 천연물 연구를 위해서는 화학적 분석과 생리활성도 측정을 종합하는 것이 바람직하나 이는 너무나도 어려워서 실제로 대부분의 천연물 연구진에서는 두 방법중 한 가지에 주력하는 것이 일반적인 현상이다.

본 연구진에서는 현재의 기기 및 인력에 대한 상황을 고려하여 화학적 분석방법에 주력하면서 생리활성도에 대해서는 비교적 효과가 광범위 하면서 운용이 쉬운 수종의 기초 생리활성도는 직접 측정하고 특정 생리활성도에 대한 정밀한 측정은 외부의 전문 연구진에 의뢰하는 방법을 택하였다. 저서군체 동물의 채집, 분류, 생리활성도 측정, 중점연구대상 생물의 선정등 실제적인 천연물 분리 및 구조결정작업 이전에 선행된 모든 과정에 대한 상세한 연구결과는 다음과 같다.

2.1. 시료의 채집

저서군체동물의 채집은 제주도 서귀포 근해에서 3회('91년 1월, 7월 및 '92년 11월)와 남해안의 거문도 연안에서 1회('91년 11월)등 4회에 걸쳐 이루어졌다. 이들중 서귀포 근해에서 91년 상반기에 시행한 2회의 채집은 소량 다수의 시험분석용 시료 채집이 주목적이었고 나머지 2회의 채집은 본격적인 천연물 분리를 위한 선택적 채집이었다.

채집은 암석해안 부근의 수심 10 - 30 m의 조하대에 서식하는 생물을 SCUBA다이빙을 하여 손으로 채집하는 방법을 이용하였으며 때로는 연안에서 상당히 떨어진 해상에서의 boat다이빙도 겸하였다. 채집한 시료는 현장에서 형태적인 특성에 따라 분류한 후 표본을 고정하고 나머지 시료는 냉동운송하였다. 채집된 시료량은 '91년 1월과 7월에 약 30 kg, '91년 11월에 120 kg, '92년 11월에 110 kg등으로 합계 260여 kg의 시료가 확보되었다.

2.2. 분류

해양군체동물은 지구상에 현존하는 육상과 해양의 모든 동·식물중 가장 분류가 어려운 종류의 생물로 알려져 있다. 이것은 이들 생물의 분류의 지표로 이용되는 군체의 모양, 색깔, 골편의 모양, 조직의 구성등 형태학적 특성들이 서식환경에 따라 대단히 다양하게 변하기 때문이다(Bayer, 1961). 이러한 형태적 특성의 변화의 정도는 매우 커서 동일한 종에 있어서 물리적 특성이 다른 지역에 서식하는 군체간의 형태적 차이가 같은 지역에 서식하는 다른 종들 간의 형태적 차이보다 더욱 큰 예도 드물지 않다. 특히 강장동물의 경우는 현재까지 종에 대한 개념조차도 확실하지 않다(Bayer, 1961; 1981).

그런데 천연물 화학적 연구를 위해서는 무엇보다도 화학적 조성이 동일한 시료를 채집해야 하므로 저서군체 동물의 동정 및 분류의 어려움이 이들에 대한 천연물 화학적 연구를 방해하는 큰 장애물로 인식되고 있다(Gerhart, 1981). 잘 알려진 예로서 Caribbean Sea의 대표적 강장동물인 gorgonian *Eunicea*속의 경우는 일찌기 60년대초부터 천연물이 보고되어 해양천연물 연구의 초기부터 큰 주목을 끌어왔으나 분류 및 동정의 어려움으로 인하여 70년대 중반부터는 연구가 거의 중단되어 왔다. 최근 Shin과 Fenical에 의하여 thin layer chromatographic method로 gorgonian의 시료를 화학적으로 동일한 그룹(chemotype)을 분류하는 방법이 개발되었으며. 이에 따라 *Enicea*의 천연물에 대한 연구가 다시 활발하여 졌으며 그 결과 전혀 새로운 탄소골격을 가진 신물질이 다수 발견된 것은 유명한 사실이다(Shin, 1989; Shin et al, 1993).

Shin과 Fenical에 의하여 개발된 방법은 강장동물 특히 다수의 gorgonians과 soft corals이 각각의 종에 따라 특이한 2차 대사물질을 다량 함유하고 있고 fats, fatty acids등 1차 대사물질의 조성도 종에 따라 다른 경우가 많으므로 개개의 군체로부터 작은 조직을 절단하여 유기물질을 추출한 뒤 thin layer chromatography의 결과를 서로 비교하는 방법이다(Shin, 1989). 이 방법은 시간이 오래 걸린다는 단점이 있으나 한꺼번에 수십 개의 군체를 비교할 수 있다는 장점이 있다.

이와 같은 방법으로 본 연구기간에 채집된 700여개의 강장동물의 시료를 23개의 화학적으로 동일한 chemotypes으로 나누어 각각의 그룹으로부터 1-3개의 군체표본을 만들었다. 그러나 해면의 경우는 군체의 크기가 일정하지 않고 다량의 부착생물(epiphytes)이 표면에 서식하는 경우도 많아서 부득이 조직의 형태, 군체표면과 단면의 모양 및 색깔, chimney의 발달정도에 따라 64 종류로 분류하였다.

이상과 같이 분류된 저서군체동물의 시료는 국내의 분류학자들에게 정확한 학명에 대한 연구를 의뢰하였다. 그 결과 현재까지 학명이 밝혀진 시료의 list는 table 2-1 및 2-2와 같다.

Table 2-1에 나타난 것과 같이 23종의 강장동물중 21종에 대한 학명이 밝혀졌으며 이들은 각각 14종(2종은 중복)의 gorgonians와 3종의 soft corals, 1종의 black coral 및 1종의 hydroid로 알려졌다. 나머지 2종의 시료(92J-16 및 -17)는 그 형태적 특성이 기존의 국내에서 보고된 gorgonians와 다른것으로 알려졌다으며 현재 정확한 학명을 연구중에 있다.

외국의 해양천연물 연구자료와 비교하여 본 결과 *Acalycigorgia*, *Alcyonium*, *Anthoplexaura*, *Plexauroides*, *Solanderia* 등 다섯 속의 생물은 천연물이 보고된 바 있음이 확인되었으며 본 연구진에서 채집한 시료로부터도 유사한 물질이 발견될 가능성이 높은 것으로 생각되었다(신 등, 1993).

해면의 경우는 64종의 시료중 39종(6종은 중복)의 시료에 대해서만 분류가 완료되었고 나머지 시료에 대해서는 현재 계속 연구중이다. 분류학자들의 의견으로서는 이들 중 상당수는 국내에서 미분류된 종이거나 신종이어서 생물학적 연구가치가 높은 것으로 추측된다.

기존 외국의 연구자료의 분석에 의하면 강장동물과 마찬가지로 본 연구에서 채집된 해면들도 천연물을 포함하고 있는 종이 다수 포함되어 있다. *Axinella*, *Discodermia*, *Halichondria*, *Hymeniacidon*, *Jaspis*, *Pachastrella* 속 등은 강력한 생리활성물질이 다수 발견된 속이어서 본 연구에서 채집된 우리나라 근해의 시료들에서도 생리활성 신물질이 발견될 가능성이 높은 것으로 추측된다.

해면과 강장동물 이외에도 수 종의 저서동물이 함께 채집되었는데 이들은 각각 1종의 원색동물과 이끼벌레, 6종의 연체동물등 이었다. 이들은 시료의 양이 적거나 본 연구의 중점연구 방향에서 벗어난 생물들이어서 본 연구에서는 다루지 않았다.

Table 2-1. List of coelentrates collected from Korean Waters

#	animal	collection site	collection date	name
91-12	gorgonian	Seoguipo	91/1	<i>Calicogorgia granulosa</i>
(=92J-15)	gorgonian	Seoguipo	92/11	
91-14	gorgonian	Seoguipo	91/1	<i>Anthoplexaura dimorpha</i>
91-15	gorgonian	Seoguipo	91/1	<i>Plexauroides rigida</i>
(=92J-27)	gorgonian	Seoguipo	92/11	
91-21	gorgonian	Seoguipo	91/1	<i>Euplexaura erecta</i>
91K-1	gorgonian	Geomundo	91/11	<i>Euplexaura anastomosans</i>
91K-2	gorgonian	Geomundo	91/11	<i>Acabaria undulata</i>
91K-3	gorgonian	Geomundo	91/11	<i>Acabaria bicolor</i>
91K-4	gorgonian	Geomundo	91/11	<i>Acalycigorgia inermis</i>
91K-6	gorgonian	Geomundo	91/11	<i>Euplexaura recta</i>
91K-7	gorgonian	Geomundo	91/11	<i>Acanthogorgia japonica</i>
92J-14	gorgonian	Seoguipo	92/11	<i>Eupleaura crassa</i>
92J-16	gorgonian	Seoguipo	92/11	
92J-17	gorgonian	Seoguipo	92/11	
92J-19	gorgonian	Seoguipo	92/11	<i>Bebryce thomsoni</i>
92J-20	gorgonian	Seoguipo	92/11	<i>Acalycigorgia irregularis</i>
92J-33	gorgonian	Seoguipo	92/11	<i>Acalycigorgia radians</i>
92J-43	gorgonian	Seoguipo	92/11	<i>Verrucella stellata</i>
92J-1	soft coral	Seoguipo	92/11	<i>Dendronephthya palaoensis</i>
92J-30	soft coral	Seoguipo	92/11	<i>Alcyonium gracillimum</i>
92J-33	soft coral	Seoguipo	92/11	<i>Dendronephthya suenisoni</i>
91-16	black coral (=horny coral)	Seoguipo	91/1	<i>Antipathes japonica</i>
91-10	hydrozoan	Seoguipo	91/1	<i>Solanderia secunda</i>

Table 2-2. List of sponges collected from Korean Waters

#	collection site	collection date	name
91-4	Seoguipo	91/1	
91-5	Seoguipo	91/1	
91-6	Seoguipo	91/1	<i>Cliona sp.</i>
91-9	Seoguipo	91/1	<i>Axinella sp.</i>
91-17	Seoguipo	91/1	
917-1	Seoguipo	91/7	<i>Strongglyophora corticata</i>
917-2	Seoguipo	91/7	<i>Spirastella insignis</i>
(=91K-21)	Geomundo	91/11	
917-3	Seoguipo	91/7	
917-4	Seoguipo	91/7	<i>Callyspongia conforderata</i>
917-5	Seoguipo	91/7	<i>Saberites sp.</i>
917-6	Seoguipo	91/7	
917-7	Seoguipo	91/7	<i>Halichondria panicea</i>
(=92J-28)	Seoguipo	92/11	
917-8	Seoguipo	91/7	
917-9	Seoguipo	91/7	
917-10	Seoguipo	91/7	<i>Penares incristans</i>
(=91K-28)	Geomundo	91/11	
91K-10	Geomundo	91/11	<i>Reniera sp.</i>
91K-11	Geomundo	91/11	
91K-12	Geomundo	91/11	
91K-13	Geomundo	91/11	
91K-14	Geomundo	91/11	<i>Myxilla productius</i>
91K-15	Geomundo	91/11	<i>Myxilla setoensis</i>
(=91K-34)	Geomundo	91/11	
91K-16	Geomundo	91/11	<i>Raspailia hirsuta</i>
91K-17	Geomundo	91/11	<i>Pachastella cribruna</i>
91K-19	Geomundo	91/11	<i>Pachastella sp.</i>
91K-20	Geomundo	91/11	<i>Spirastella abata</i>
91K-22	Geomundo	91/11	<i>Asteropus simplex</i>

(=92J-24)	Seoguipo	92/11	
91K-24	Geomundo	91/11	<i>Cliona celata</i>
91K-25	Geomundo	91/11	
91K-26	Geomundo	91/11	<i>Stelletta sp.</i>
91K-27	Geomundo	91/11	
91K-29	Geomundo	91/11	
91K-31	Geomundo	91/11	<i>Jaspis sp.</i>
91K-33	Geomundo	91/11	<i>Phakellia sp.</i>
91K-35	Geomundo	91/11	<i>Callyspongia sp.</i>
91K-36	Geomundo	91/11	<i>Raspailia trachystyla</i>
91K-37	Geomundo	91/11	<i>Erylus sp.</i>
92J-2	Seoguipo	92/11	
92J-3	Seoguipo	92/11	<i>Discodermia calyx</i>
92J-4	Seoguipo	92/11	<i>Discodermia sp.</i>
92J-5	Seoguipo	92/11	<i>Pachastella sp.</i>
92J-7	Seoguipo	92/11	<i>Hymeniacidon sinapium</i>
92J-8	Seoguipo	92/11	<i>Suberites sp.</i>
92J-10	Seoguipo	92/11	
92J-11	Seoguipo	92/11	<i>Chondrilla australe</i>
(=92J-55)	Seoguipo	92/11	
92J-13	Seoguipo	92/11	
92J-25	Seoguipo	92/11	
92J-32	Seoguipo	92/11	
92J-34	Seoguipo	92/11	
92J-35	Seoguipo	92/11	<i>Discodermia sp.</i>
92J-36	Seoguipo	92/11	
92J-38	Seoguipo	92/11	<i>Esperiopsis sp.</i>
92J-40	Seoguipo	92/11	
92J-46	Seoguipo	92/11	<i>Erylus nobilus</i>
92J-47	Seoguipo	92/11	
92J-52	Seoguipo	92/11	
92J-53	Seoguipo	92/11	
92J-54	Seoguipo	92/11	<i>Phakellia elegans</i>
92J-57	Seoguipo	92/11	

2.3 생리활성도 측정

현재 천연물 연구진이나 관련 산학계에서 주목하는 생리활성도는 매우 다양하여서 실제로 운용되는 종류만도 100여 가지 이상이고 매 년 여러 종류의 새로운 생리활성 측정방법이 보고되는 실정이다. 본 연구진에서는 현재의 인력 및 기기상황등을 종합하여 brine shrimp toxicity, DNA-cleavage, plasma membrane enzyme assay 등 세 종류의 생리활성도의 측정에 주력하고 정밀 생리활성도는 외부의 전문 연구진에 의뢰하는 것으로 연구추진전략을 세웠다. 이들 생리활성도중 brine shrimp와 DNA-cleavage assay는 현재 일상적으로 운용되고 있으며 plasma membrane enzyme assay는 현재 기술 도입중이다.

본 연구에서 채집된 저서군체 동물 시료의 조추출물에 대한 상기의 생리활성도와 P388, DNA-binding, antiviral등 외부 연구진에 의하여 측정된 생리활성도 연구결과는 제 1차 년도에 상세히 언급하였으므로 본 보고서에서는 전기한 3가지 생리활성도의 원리, 운용방법 및 장단점에 대해서만 아래와 같이 요약하였다.

먼저 brine shrimp assay는 바다새우의 일종인 brine shrimp(*Artemia salina*)를 사용하여 천연물의 전반적인 독성을 손쉽게 검색할 수 있는 일종의 *in vivo* 실험법이다(Meyer et al, 1982). 이 검색법은 누구나 쉽게 시행할 수 있으며 재현성이 높아 현재 본 실험실에서 1차 생리활성 검색방법으로 채용되고 있다. 모든 약물은 과량 투여하면 그것이 바로 독이 되며 반대로 독성물질을 적절히 농도를 낮추어 사용하면 약리 효과를 얻을 수 있다는 개념에서 이 방법을 활용하고 있다.

Brine shrimp는 실제로 살충효과검색(Michael et al, 1956; Tarpley 1958; Areekul and Harwood 1960; Grosch 1967), mycotoxin의 독성측정(Brown et al, 1968; Brown, 1969; Harwig et al, 1971; Eppley, 1974; Korpinen, 1974; Eng-Wilmot and Martin, 1979), 하천 오염물질측정(Hood et al, 1960), 수면·진정제의 효과측정(Robinson et al, 1965), 쌍편모조류 독소의 독성측정(Granade et al, 1976), 모르핀류 약품의 약효측정(Richter & Goldstein, 1970), phorbol ester의 cocarcinogenicity 측정(Kinghorn, 1967), 해양의 독성물질의 효과측정(Vanhaecke, 1981)등에 사용된 예가 있다.

이후 McLaughlin group에 의해 고등식물의 생리활성 성분연구에 있어서 활성성분을 추적하는데 1차 검색법으로 상용되기 시작하여 실용성이 인정되었으며 항암효과를 측정하는 *in vitro* cell culture assay로 흔히 이용되는 9KB, 9PS cytotoxicity와도 우수한 상관성을 보이는 것으로 나타났다(Meyer et al, 1982). 뿐만 아니라 항히스타민제와 히스타민을 함께 투여했을때 receptor에 대한 길항작용이 관찰되는 것으로 보아 brine shrimp 자체가 최소한의 인체와 유사한 receptor를 가지고 있는 축소형 *in vivo* system으로 볼 수도 있을 것이다(personal communication).

Brine shrimp assay를 상용되는 수종의 의약품들에 대해 실험한 결과 대개 1000 ppm 이하의 농도에서 brine shrimp에 대해 독성을 나타내었다(Table 2-3)(Meyer et al, 1982).

Table 2-3. Brine shrimp toxicity of selected commercial drugs

compound	LC ₅₀ in ppm(μ g/ml)
podophyllotoxin	2.4
berberine chloride	22.5
strychnine sulfate	77.2
digitalin	151
quinidine sulfate	215
ephedrine sulfate	215
strophanthin	215
arbutin	275
caffeine	306
thymol	514
atropine sulfate	686
santonin	> 1000

이 방법으로 천연물의 어떤 특정한 약리작용을 밝힐 수는 없지만 일반독성 여부를 쉽게 판별할 수 있으며 mechanism-based bioassay의 단점을 보완할 수 있다. 실제적으로 천연물 화학연구에 있어서 채집하여 검색할 수 있는 시료의 종류에는 한계가 있으며 특정 mechanism-based bioassay만으로 1차 검색을 실시할 경우 여타의 다른 약물 작용기전에 의한 활성물질들을 모두 놓칠 염려가 있는 것이다. 이에 비해 brine shrimp assay는 작은 *in vivo* system에서 전반적인 독성여부를 측정하므로 어떤 작용기전으로 활성을 나타내든 모두 검출할 수가 있다.

이 검색방법은 냉동건조된 brine shrimp의 알을 부화시켜 48시간후의 유충(nauplii)을 3단계의 각기 다른 농도(eg. 10, 100, 1000 ppm)의 시료에 투입하여 24시간후의 생존여부를 통해 독성을 파악한다. 통계처리를 위해 각각의 농도에 10마리씩의 유충을 사용하며 이를 3번 반복하여 실험한다. 결과는 LC₅₀(50 % lethal concentration at which 50 % of brine shrimp die)로 나타내며 crude extract에서 LC₅₀가 1000 ppm 이하이면 유의성이 있는것으로 간주한다. Brine shrimp의 알은 쉽게 구할 수 있으며 건조된 상태에서 냉장 또는 냉동보관하면 수 년 동안 보존할 수 있고 알을 부화시켜 결과를 보기까지는 24시간밖에 걸리지 않는다.

Brine shrimp assay와 9KB, 9PS cytotoxicity간에는 우수한 상관성이 있는것으로 나타나므로(Fisher-Irwin test $p=0.036$ $\kappa=0.56$) 항암효과 측정의 전단계 검색법으로 이용할 수도 있을 것이다. Brine shrimp에 대한 독성을 추적하여 최종적으로 순수한 물질을 획득하면 좀더 정밀하고 특정 약리작용을 볼 수 있는 mechanism-based bioassay를 진행시켜야 한다.

본 연구진에 의하여 운용되는 mechanism-based bioassay는 DNA-cleavage assay가 있다. 현재까지 알려진 많은 항암제들의 작용기전은 DNA와의 반응에 의한 것이다. 예를 들면 alkylating agent인 chlorambucil, cyclophosphamide, melphalan, streptozotocin 그리고 항종양 항균제인 bleomycin, adriamycin, mithramycin 등이며 그외에 cisplatin등이 있다. 이들 항암제들은 DNA와 반응하여 이를 무력화시켜 DNA복제를 차단하며 이는 곧 암세포 증식차단으로 이어진다.

물리 화학적인 방법으로 DNA의 1차 배열을 변형시키면 그것이 곧 암을 일으키는 요인이 되는데 이러한 DNA의 변형작용에 근거한 항암제를 개발한다는 것이 일견 모순인 것처럼 보일지도 모른다. 하지만 이러한 항암작용의 총체적인 현상이 약물의 투여량의 증감으로 조절할 수 있는 것 인지도 모르며 분자단위에서 여러가지 변수들이 이

러한 선별적인 작용기전에 영향을 미치는지도 모른다. 아무튼 발암물질이 될 가능성이 있는 물질을 항암제로 개발한다는 위험한 발상에도 불구하고 실제로 훌륭하게 임상 치료에 사용되고 있는 전례가 많기 때문에 이러한 DNA와 반응하는 물질들을 찾으려는 시도가 꾸준히 계속되고 있는 것이다.

Mechanism-based bioassay의 일종인 DNA-cleavage assay는 암세포의 DNA를 손상시켜 DNA합성을 억제함으로써 궁극적으로 암세포의 증식을 차단하는 물질을 찾아내는 방법이다. 현재 항암제로 사용되고 있는 bleomycin이 이러한 작용기전을 가진 대표적인 물질이며 epicatechin, procyanidin B₂, 5-alk(en)yl resorcinols등이 이 검색법으로 발견된 물질들이다. 이 검색법에서는 supercoiled DNA(ϕ X 174 form I DNA)와 검색시료를 함께 섞어 일정시간 배양후 supercoiled DNA의 꼬여진 원형구조가 깨어져 form II (또는 form III)로 변한 정도를 측정하여 약효를 판단한다. form I과 form II는 agarose 전기영동법에 의해 분리가 되므로 쉽게 결과를 판독할 수 있다. 이 검색법은 결과를 보기까지 8 ~ 10시간 밖에 걸리지 않으며 시료의 요구량은 1 mg이하 이므로 천연물의 생리활성 검색에 아주 적합하다고 할 수 있을 것이다.

Brine shrimp와 DNA-cleavage assay 이외에 현재 본 연구진에 의하여 도입 설치중인 생리활성도는 최근에 개발중인 *in vitro* 항암효과 검색법의 하나로서 plasma membrane에 존재하는 산화·환원 효소계를 이용하는 방법이 있다. 이 효소계를 차단하면 세포의 성장이 억제되며(Brightman et al, 1992) 실제로 sulfonyl urea계통, adriamycin adduct등이 이 system을 억제하여 항암효과를 나타내는 것으로 알려져있다 (personal communication). 이 검색법은 다른 방법과는 달리 세포막(cell membrane)에 있는 표적에 작용하는 약물을 찾게 되므로 약물이 세포내로 흡수되는 과정 없이도 세포 바깥에서 세포막에 존재하는 효소계와 반응하여 세포증식을 억제한다. 따라서 약물이 세포내로 흡수 될 필요가 없으므로 상대적으로 낮은 혈중농도에서 약효를 발휘할 수 있으며 그 결과 기존 항암제의 문제점인 부작용이 대폭 경감된 물질을 발견할 수 있으리라 기대한다.

이 검색법에서는 plasma membrane에 존재하는 reductase와 oxidase의 활성을 각각 측정하여 시료의 생리활성을 볼 수 있다. 검색방법은 우선 쥐(rat)의 간에서 plasma membrane을 분리하여 redox enzyme fraction을 얻는다. plasma membrane(reductase)과 NADH, Coenzyme Q₀와 검사물질을 함께 Tris HCl buffer에 녹여 37 C에서 반응시킨다. plasma membrane에 있는 reductase의 활성변화를 각각 5분, 10분후에 측정한다.

reductase의 활성변화는 Coenzyme Q₀의 감소정도를 관찰하여 알 수 있다. Coenzyme Q₀의 감소정도는 UV 410 nm를 이용하여 측정할 수 있다.

2.4. 중점연구대상 시료의 선정

채집된 저서군체 동물 시료의 양, 유기조추출물에 대한 thin layer chromatographic analysis, 생리활성도 측정 등의 결과를 종합하여 일차적으로 2 종의 gorgonians, 1종의 soft coral, 1종의 hydrozoan과 2종의 sponges를 중점연구대상 생물로 선정하였다. 먼저 gorgonian *Acalycigorgia inermis*(시료번호 91K-4)는 채집된 시료의 양이 5 kg이상이고 P388 cell-line에 대한 세포독성도(EC₅₀ 10.9 µg/ml)와 brine shrimp에 대한 독성(LC₅₀ 127ppm)이 우수하였다. 또한 gorgonian *Acabaria undulata*(시료번호 91K-2) 또한 우수한 생리활성도(P388 25.7 µg/ml, brine shrimp LC₅₀ 296 ppm)를 나타내었다. 제주도 해역에 널리 분포하는 soft coral *Alcyonium gracillimum* 역시 P388 세포독성도(EC₅₀ 22.4 µg/ml)가 우수하고 문헌조사 결과 수종의 생리활성 물질이 보고된 예가 있어서 우선연구 대상으로 선정하였다.

서귀포 근해에서 다량으로 채집된(5 kg 이상) hydrozoan *Solanderia secunda*(시료번호 91-10)은 생리활성도는 뛰어나지 않으나 외국에서 hydrozoan에 대한 연구가 대단히 미약하므로 상대적으로 신물질을 발견할 가능성이 클 것으로 예상되어 일차적인 연구대상에 포함되었다. 해변의 시료중에서는 거문도에서 채집된 *Reniera* sp.(91K-10)과 *Pachastrella* sp.(91K-19)이 일차적으로 선정되었는데 그 이유는 확보된 시료의 양이 5 kg이상이며 brine shrimp에 대한 toxicity 분석결과가 탁월하였기 때문이다(각각 Lc₅₀ 12와 61 ppm).

상기의 다섯 종의 시료에 대한 천연물의 분리와 구조결정작업이 현재 진행중이며 그 결과는 제 3 - 6장에 요약되었다.

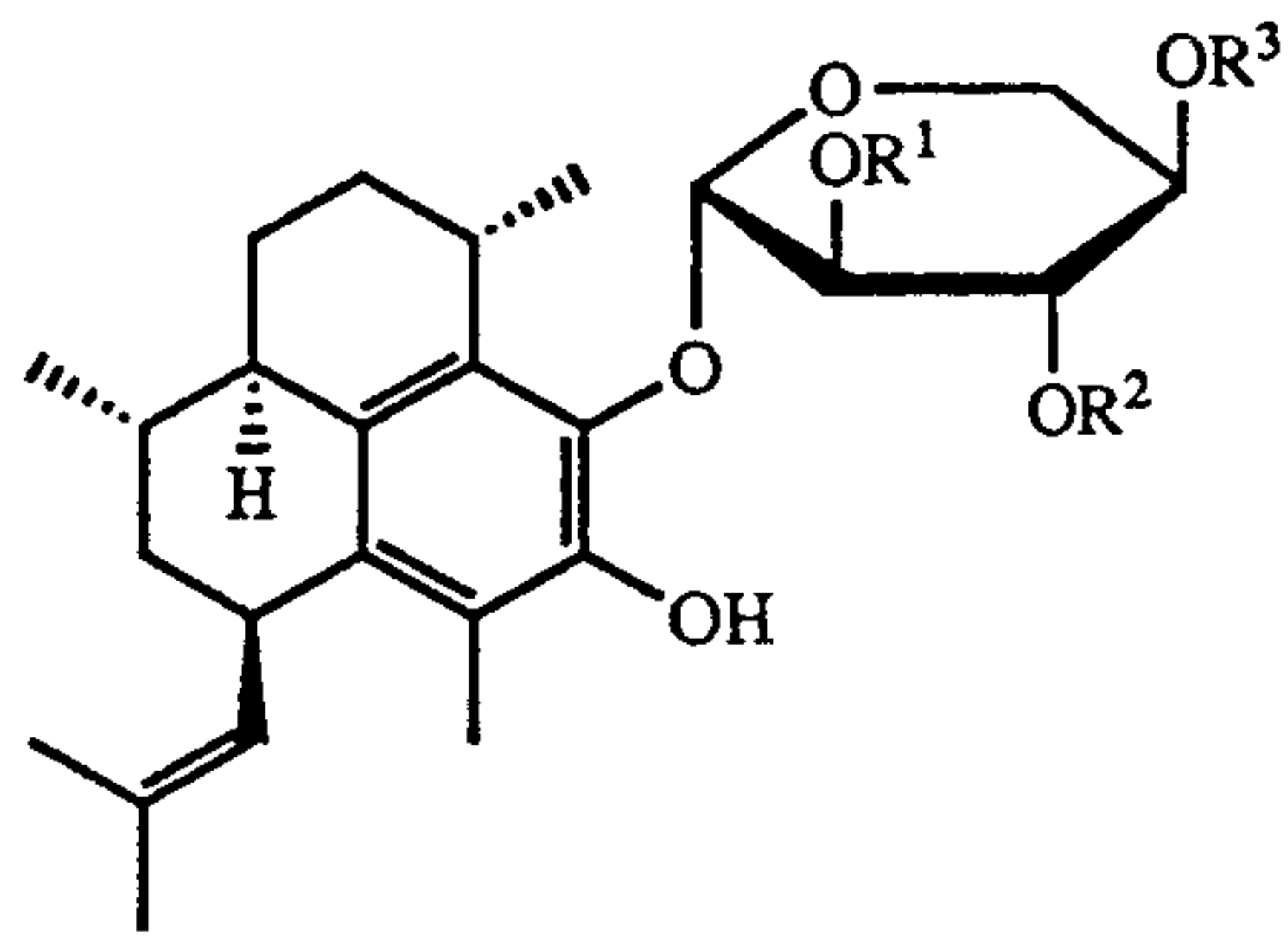
제 3 장 Gorgonians(order Gorgonacea)의 천연물

3.1. 연구의 배경

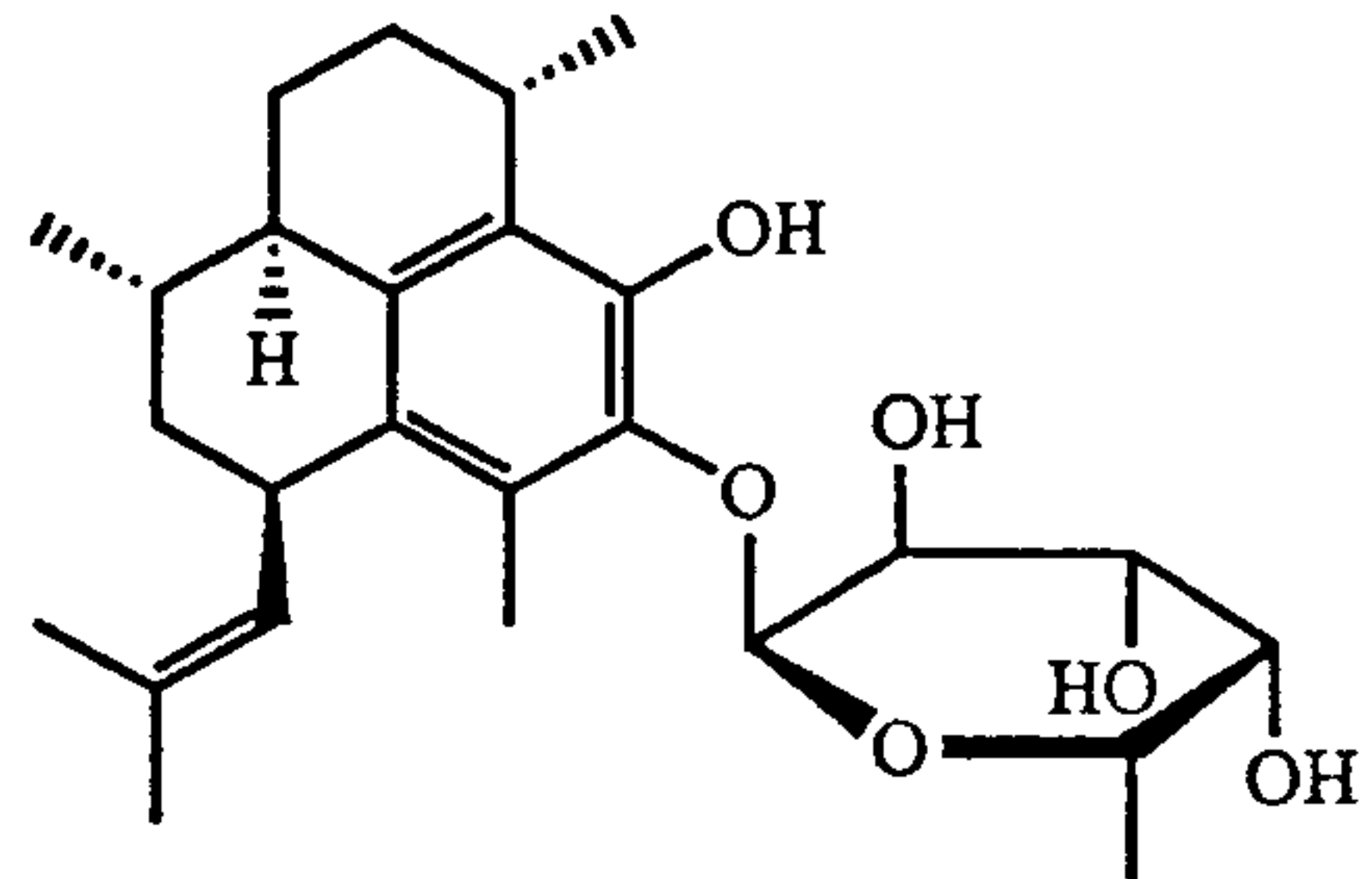
강장동물은 해양천연물 연구에 있어서 대단히 중요한 위치를 차지하고 있다. 현재 까지 알려진 천연물의 약 25%가 강장동물로부터 추출되었으며 이는 동·식물을 망라한 전체 해양천연물중 해면동물(약 35%)에 버금가는 추출빈도이다(Ireland et al, 1987). 또한 이들 물질중 많은 수가 강력한 생리활성도를 갖고 있어서 관련 산·학계의 큰 주목을 끌고 있다. 잘 알려진 예로서 Caribbean sea에 서식하는 gorgonian *Pseudoterogorgia elisabethae*로부터 추출된 강력한 소염, 진통효과를 가진 diterpene glycosides인 pseudoteropsins는 현재 물질특허를 획득하여 신의약품으로 개발중이며 *Enuicea fusca*의 소염물질인 fuscocides 역시 임상실험중이다(Look et al, 1986; Fautin, 1988; Shin and Fenical, 1991). 또한 Pacific gorgonian *Lophogorgia* spp.에서 추출된 cembrane계 diterpene인 lophotoxin등은 신경세포의 acetylcholine receptor의 구조연구와 Alzheimer병의 연구를 위한 연구용 시약으로 이용되고 있다 (Fig. 3-1).

강장동물의 천연물은 그 수는 매우 많으나 분포가 편중되어 있으며 대사물질의 생합성적 기원 또한 제한되어있다. 강장동물의 천연물은 90%이상이 gorgonians와 soft corals등 Anthozoa강의 Alcyonaria아강(넓은 의미의 soft corals에 속하는 생물)로부터 발견되었으며 hard corals, sea anemones, zoanthids등 Zoantharia아강이나 Hydrozoa강(히드라), Scyphozoa강(해파리)등의 생물로부터 발견된 예는 별로 많지 않다.

이 원인에 대해서는 여러가지 설이 있으나 현재 가장 널리 인정받고 있는것은 생물의 화학적 방어와 물리적 방어의 상호보완 기작이다. 즉, gorgonians와 soft corals 등은 일생의 거의 대부분을 부착하여 생활하며 단단한 조직이나 외피, 가시(spine)등

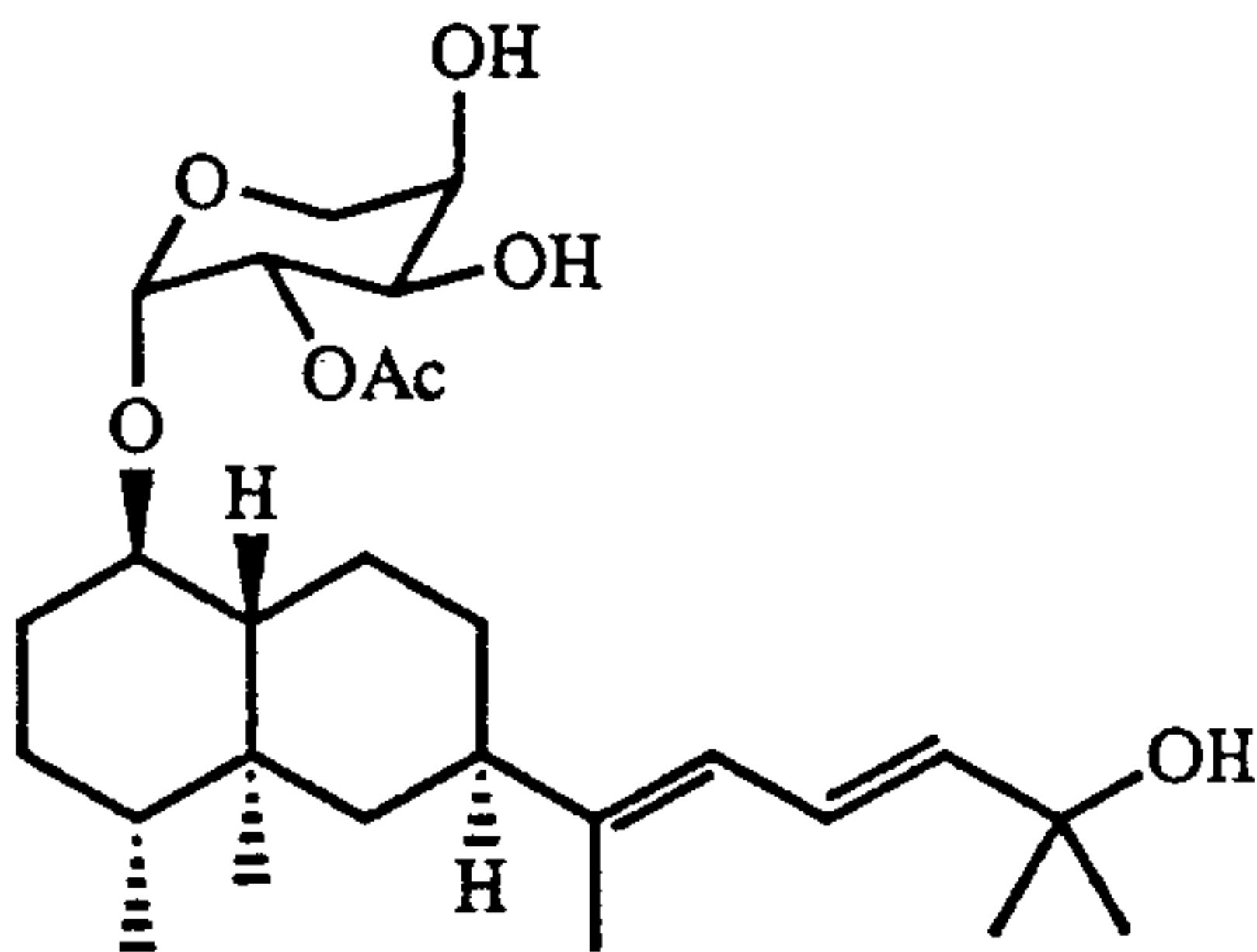


pseudopterosin A : $R^1 = R^2 = R^3 = H$
 B : $R^1 = Ac, R^2 = R^3 = H$
 C : $R^1 = R^3 = H, R^2 = Ac$
 D : $R^1 = R^2 = H, R^3 = Ac$

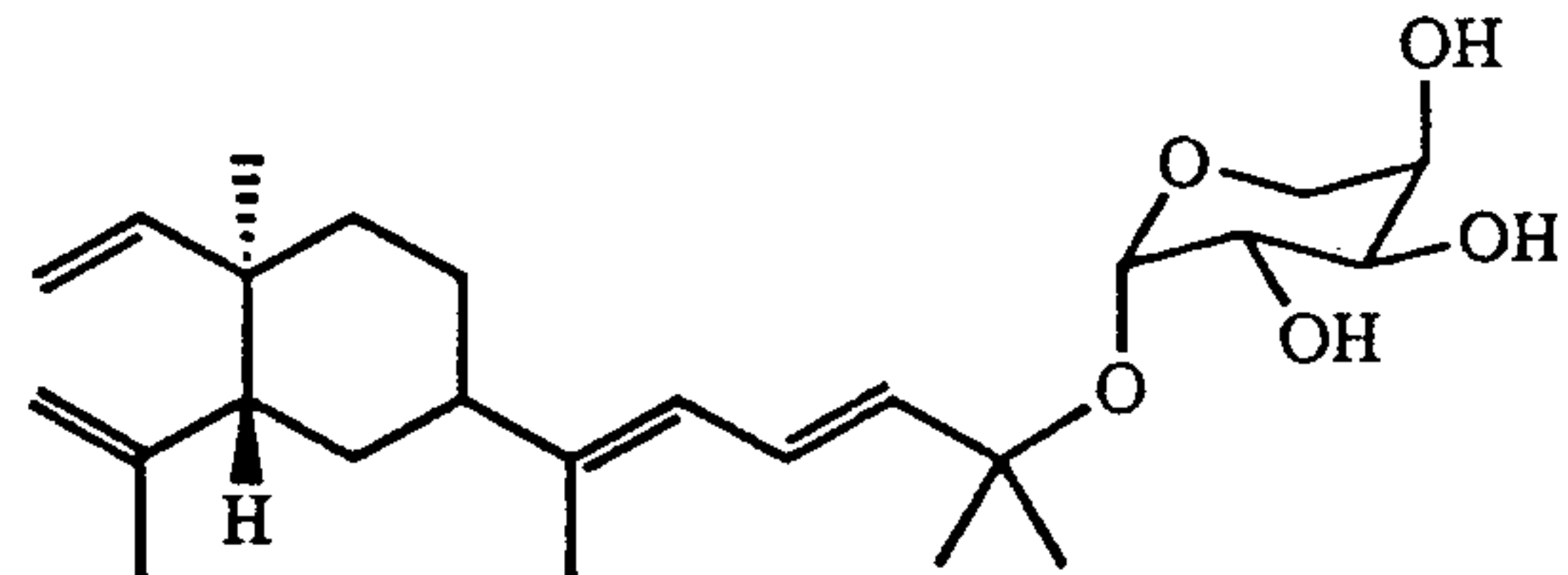


pseudopterosin E

pseudopterosins - antiinflammatory, analgesic. Phase II Clinical Trial
 (*Pseudopteroorgia elisabethae*)

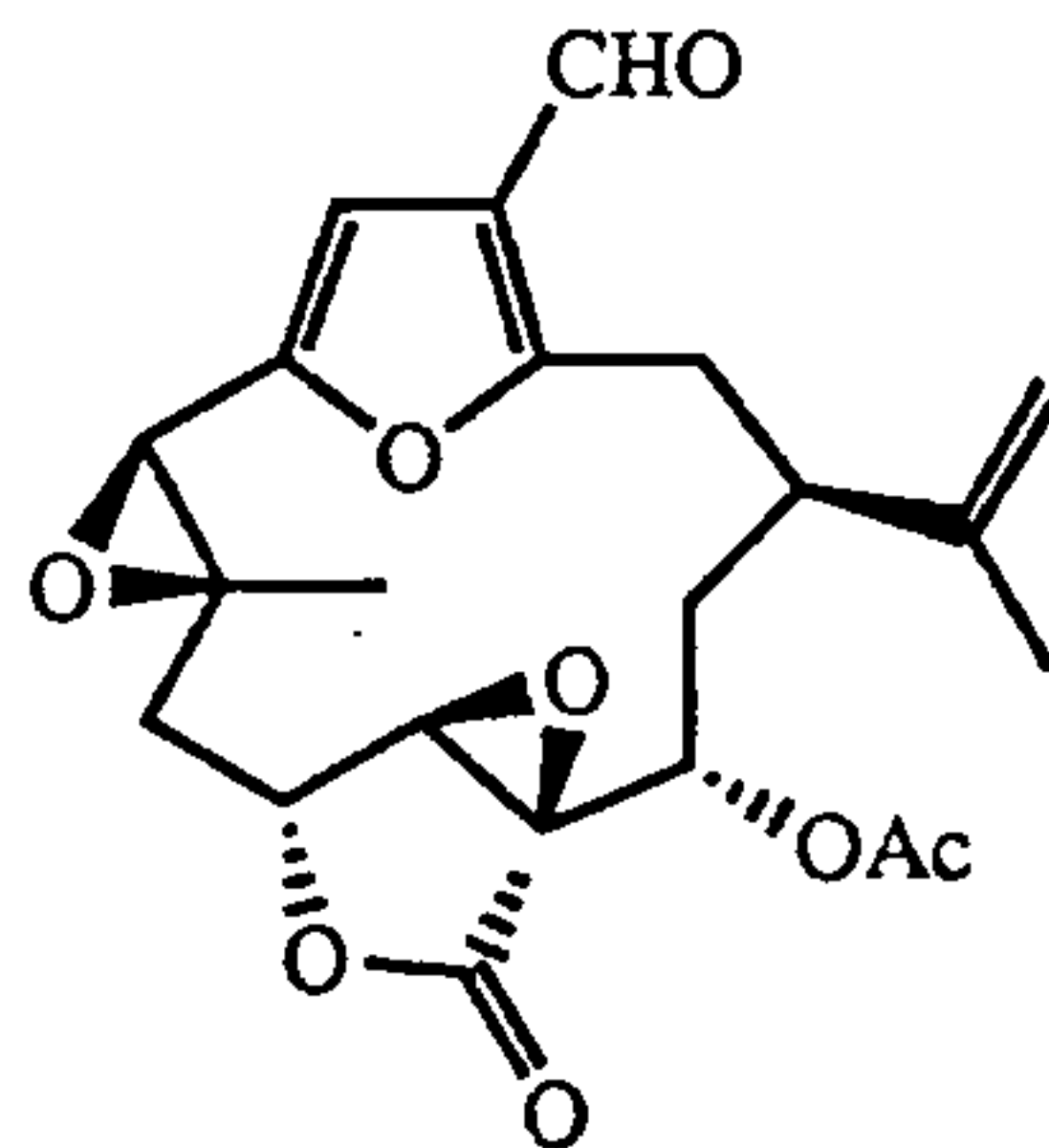


fuscoidin A



fuscoidin B

fuscoidins - antiinflammatory, selective inhibitor of 5-lipoxygenase
 (*Eunicea fusca*)



lophotoxin - selective binder of acetylcholine receptor
 (*Lophogorgia* spp.)

Fig. 3-1. Potential drugs isolated from gorgonians.

물리적 방어수단을 전혀 갖고 있지 못하다. 그러므로 부득이 이들은 자신을 보호하기 위한 수단으로서 포식자에 대한 피식 효과를 갖거나 다른 부착생물의 성장을 억제하는 천연물을 생산한다. 반면에 Zoantharia는 단단한 calcium carbonate의 조직으로 이루어져 있고 Scyphozoa는 유영을 하는 등 물리적 방어수단을 갖고 있어서 상대적으로 화학적 방어수단의 필요성이 적다.

Soft corals과 gorgonians의 대사물질은 거의 대부분(>90%)이 terpenoids나 terpene part를 갖고 있는 mixed biosynthetic products이다. 이들의 terpenoids 특히 diterpenoids는 그 수와 탄소골격의 다양함으로 유명하다(Ireland et al, 1987; Faulkner, 1992). Terpenoids를 제외한 alcyonarians의 대사물질은 거의 전부가 polyketides나 fatty acids등 lipid 대사에서 기원한 물질들이며 amino acids, shikimic acids, bases에서 기원한 물질들은 매우 드물다.

본 연구에서 천연물 화학적 분석이 시도된 gorgonians는 거문도 근해에서 채집된 *Acalycigorgia inermis*(시료번호 91K-4)와 *Acabaria undulata*(시료번호 91K-2)의 두 종이었다. 이들은 채집된 시료의 양과 유기조추출물에 대한 TLC분석, P388, antiviral, DNA-binding, brine shrimp toxicity등의 생리활성도 측정결과가 다른 시료에 비하여 탁월하였다.

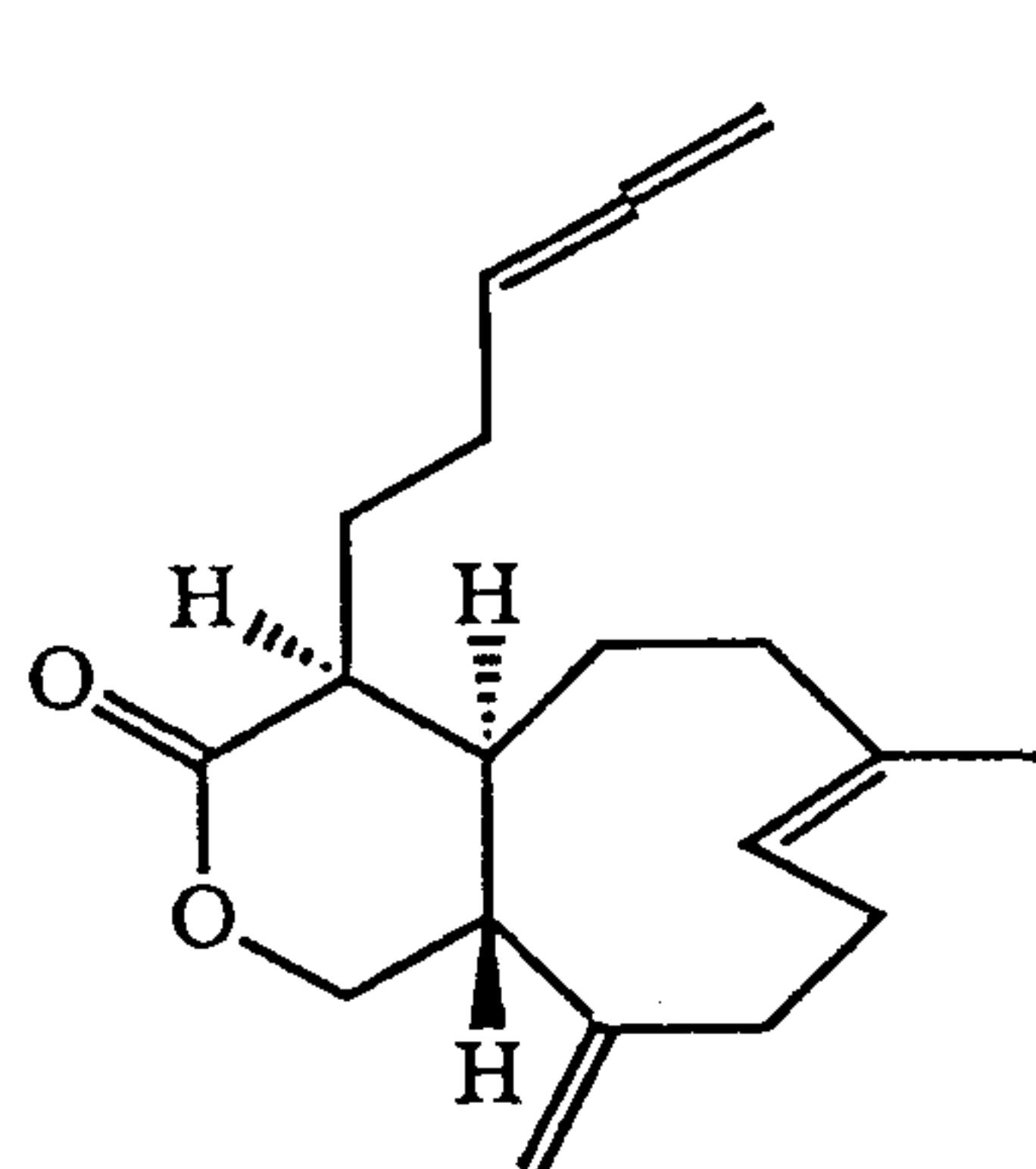
3.2. *Acalycigorgia inermis*의 대사물질

Gorgonian *Acalycigorgia inermis*(91K-4)는 91년 11월에 남해안의 거문도 부근의 대삼부도와 서도근해에서 boat diving으로 채집되었다. 군체의 색깔은 연한 갈색이었으며 크기가 15 cm 미만으로서 gorgonian중에서는 매우 작은 종류에 속하였다. Main body의 굵기도 3 mm 이하여서 매우 fragile하였으며 가지의 수도 1 - 3개로 branching pattern 또한 단조로웠다. 그 밖의 형태적인 특징으로서는 3 mm 이상의 대단히 발달한 calyses를 갖고 있는 점이였다.

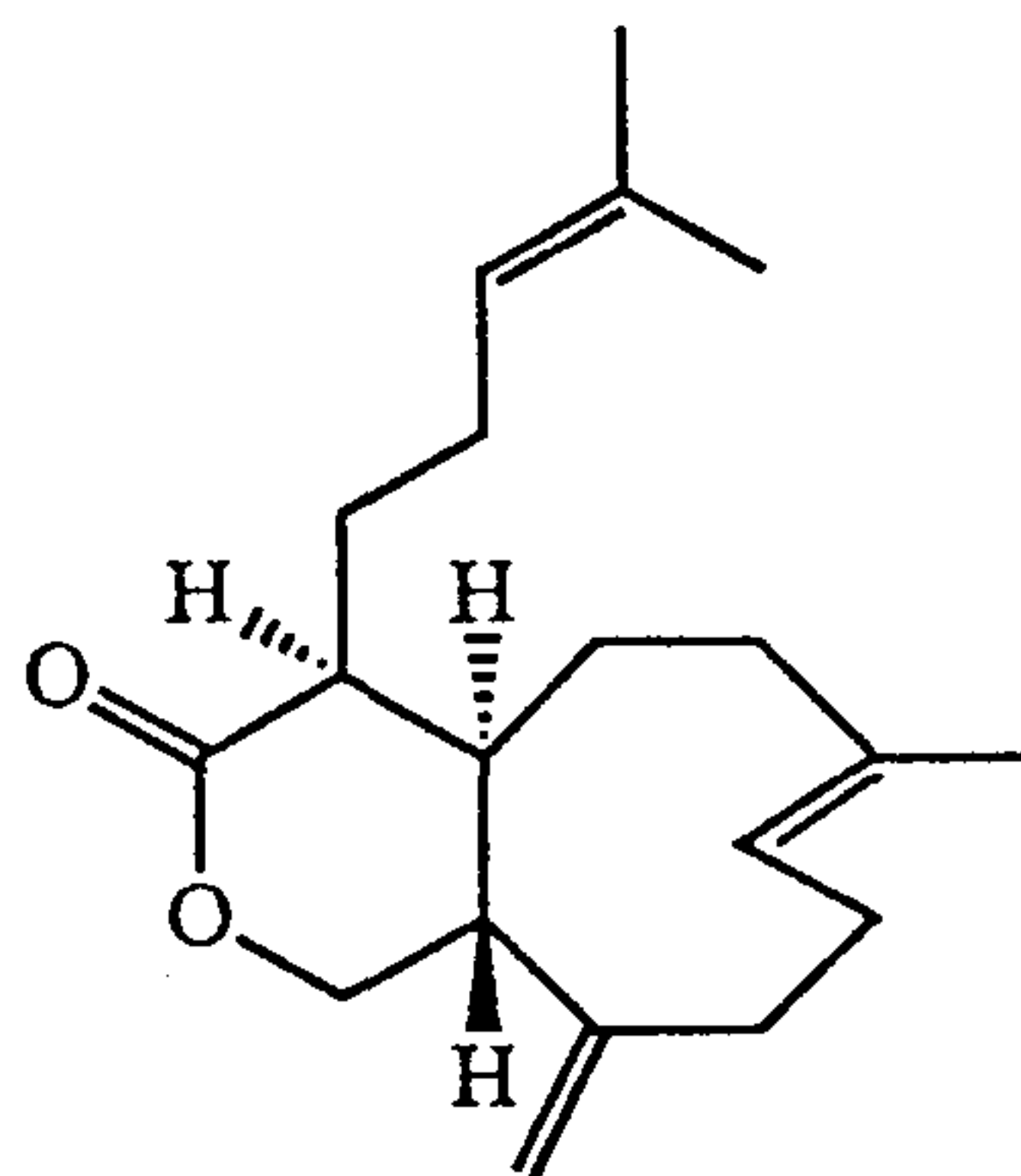
그늘에서 말린후 냉동보관한 시료 5 kg으로부터 dichloromethane으로 추출한후 silica vacuum flash chromatography에 의하여 polarity에 따른 분리를 하였다. Proton NMR분석결과 비교적 non-polar한 fractions(n-Hex:EtOAc = 8:2와 7:3)에서 특이한 물질들의 존재가 드러났다. 이 fractions을 합한뒤 여러 번에 걸친 HPLC(n-Hex:EtOAc = 7:93 - 10:90)분리결과 두 개의 천연물이 분리되었다.

주 대사물질인 91K-4-1은 흰색의 분말상의 고체로 얻어졌으며 ^{13}C NMR spectrum상에서 19개의 탄소가 존재함이 드러났다(Fig. 3-2, -4). DEPT 실험결과 이들은 각각 4개의 quaternary, 5개의 methine, 9개의 methylene 및 1개의 methyl로 구성되어 있음이 밝혀졌다. 이 물질의 downfield signals중 175.4(C)는 carbonyl, 153.0(C), 135.9(C), 123.9(CH) 및 112.1(CH₂)등 4개의 signals은 2개의 double bonds로 해석되었다. 또한 208.5(C), 89.1(CH), 75.4(CH₂), 70.6(CH₂)등 4개의 carbons은 1개의 ketone과 3개의 oxygen이 결합된 carbons이거나 1개의 terminal allene과 1개의 oxygen이 결합된 methylene으로 해석되었다. ^1H NMR spectrum에서도 carbon NMR에 상응하는 signals들이 나타났다(Fig. 3-5). 즉 70 ppm이하의 carbons에 접합된 8개의 protons이 모두 3.8 ppm이하에서 나타났으며 이 물질의 유일한 methyl signal이 1.69 ppm에서 나타나서 vinyl methyl group의 존재가 드러났다.

각 proton간의 상관관계는 COSY NMR과 proton decoupling에 의하여 명확하여 졌다(Fig. 3-6). 먼저 δ 4.98과 4.97에 위치한 2개의 broad singlet protons는 다른



91K-4-1
(acalcixeniolide B)



91K-4-2

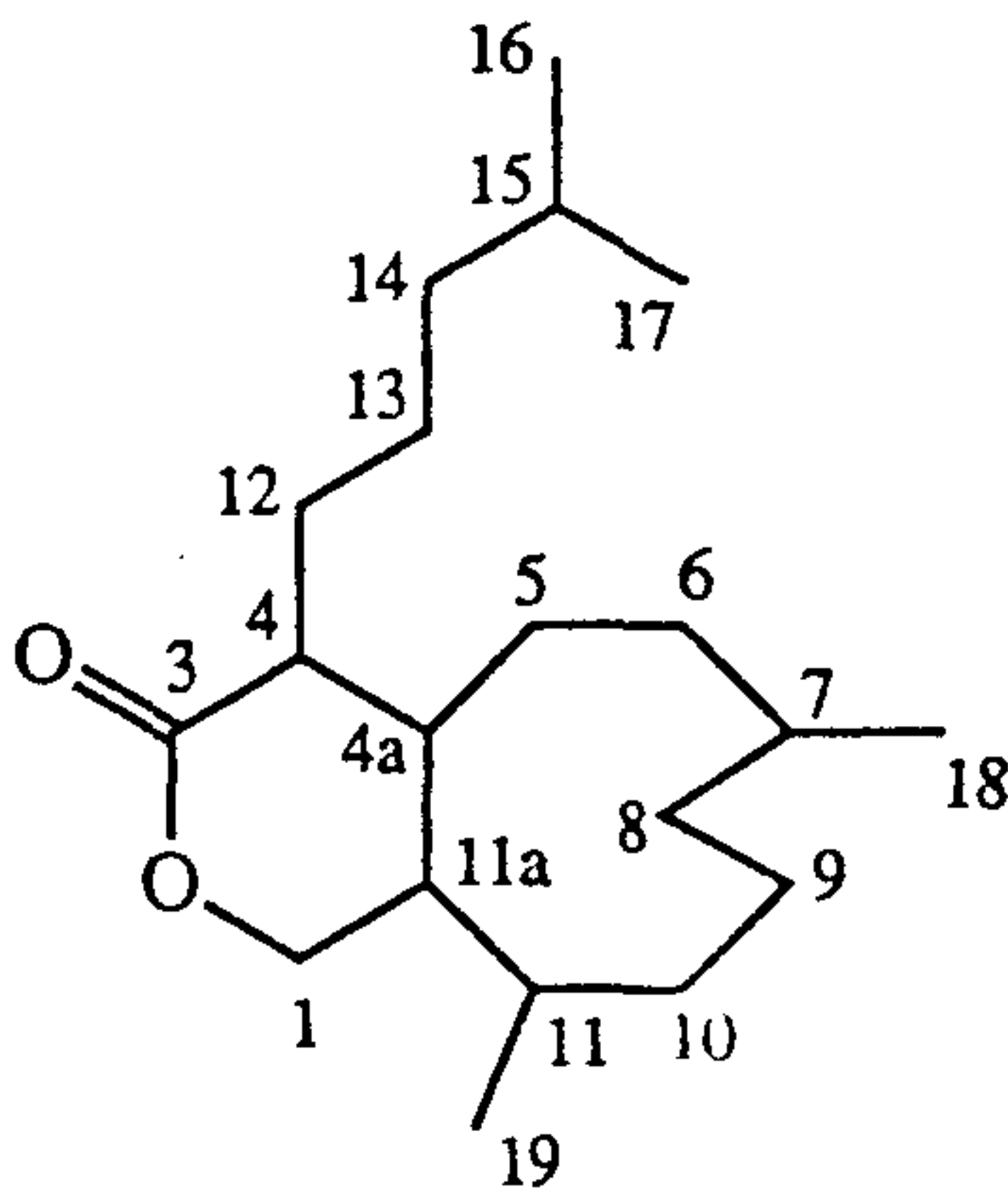


Fig. 3-2. Structures of diterpenoids isolated from the gorgonian *Acalycigorgia inermis* (sample number 91K-4).

protons과의 coupling이 전혀 없으므로 exocyclic methylene임이 명확하였다. δ 5.35에 위치한 olefinic proton(1H, brt, $J=7.8$ Hz)은 이 물질의 유일한 methyl protons와 long range coupling을 이루며 또한 upfield methylene과도 coupling을 하였다. δ 5.12(1H, m)와 4.96(2H, m)에 위치한 protons는 서로 coupling을 할 뿐만 아니라 공통된 upfield protons(δ 2.15 - 2.10)과도 coupling을 이룬다는 것이 발견되었다. 이들 세 protons의 chemical shifts, coupling patterns과 carbon signals(δ 208.5, 89.1, 75.4)는 terminal allene의 전형적인 pattern으로 해석되었으며 COSY NMR과 decoupling에 의하여 이 allene기가 두개의 methylene과 연결되어 있음을 알 수 있었다.

서로 coupling을 이루는 두개의 protons(δ 4.16, dd, $J=11.9, 6.9$ Hz: 3.92, dd, $J=12.5, 11.9$ Hz)은 upfield에 위치한 methine proton(δ 1.59, m)과 coupling을 이루었으며 이 proton은 다시 2.10 - 2.15에 위치한 proton과 coupling을 하였다. 또한 α -carbonyl methine proton(δ 2.91, brq, $J=7.0$ Hz)은 upfield proton과 coupling을 하였다. 마지막으로 upfield proton(δ 1.08, 1H, dddd, 14.0, 11.0, 3.9 Hz)의 coupling pattern으로부터 이 proton이 $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}$ spin system의 일원인 것을 밝혀내었다(Fig. 3-4).

이상의 NMR자료해석의 결과를 토대로 gorgonians와 soft corals에 대하여 현재까지 보고된 모든 천연물의 구조와 비교한 결과 최근 일본에서 *Acalycigorgia inermis*의 대사물질로 보고된 acalycixeniolide B와 동일한 물질임이 확인되었다(Fusetani et al, 1987). Norxenicane계의 norditerpene인 acalycixeniolide B의 구조와 carbon 및 proton assignments는 Fig. 3-2 및 Table 3-1과 같다.

Acalycixeniolide B(91K-4-1)와 함께 부대사물질인 91K-4-2가 HPLC를 이용하여 흰색의 고체형태로 분리되었다. 이 물질의 ^1H 와 ^{13}C NMR spectra는 91K-4-1과 매우 유사하였다(Fig 3-7, -8). NMR상에 있어서의 중요한 차이점은 먼저 ^{13}C NMR에서 20개의 signal이 발견된 점으로서 따라서 이 물질이 norditerpene인 91K-4-1과는 달리 완전한 diterpene임을 나타내었다. 91K-4-1의 allene에 해당하는 3개의 signals(δ 208.5,

Table 3-1. Proton and carbon NMR assignments for 91K-4-1(=acalycixeniolide B) and 91K-4-2^{a, b}

*	91K-4-1		91K-4-2	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
1	4.16(1H, dd, 12, 6.9) 3.91(1H, dd, 12, 12)	70.57 t	4.15(1H, dd, 11.8, 6.8) 3.89(1H, dd, 11.8, 11.8)	70.57 t
3		175.43 s		175.72 s
4	2.91(1H, brq, 6.2)	44.91 d	2.82(1H, brq, 6.5)	44.64 d
4a	2.08(1H, m)	41.13 d	2.08(1H, m)	41.13 d
5	1.65(1H, m), 1.09(1H, m)	30.18 t	1.58(1H, m), 1.07(1H, m)	30.08 t
6	2.20(1H, dt, 12.7, 3.6) 1.95(1H, m)	39.84 t	2.19(1H, m) 1.96(1H, m)	39.88 t
7		135.85 s		135.97 s
8	5.34(1H, brt, 7.7)	123.88 d	5.34(1H, brt, 7.8)	123.84 d
9	2.48(1H, m), 2.08(1H, m)	24.99 t	2.48(1H, m), 2.08(1H, m)	24.98 t
10	2.34(1H, m) 2.20(1H, dt, 12.7, 3.6)	35.55 t	2.33(1H, m) 2.20(1H, dt, 12.2, 3.4)	35.54 t
11		152.93 s		153.05 s
11a	1.99(1H, ddd, 11.5, 7.0, 2.9)	49.80 d	1.96(1H, m)	49.76 d
12	2.02(1H, m), 1.59(1H, m)	26.25 t ^c	2.02(1H, m), 1.54(1H, m)	26.91 t ^c
13	2.10(2H, m)	25.86 t ^c	2.12(2H, m)	25.33 t ^c
14	5.12(1H, quint, 6.6)	89.09 d	5.11(1H, tt, 7.1, 1.5)	123.41 d
15		208.45 s	1.01(3H, s)	132.82 s
16	4.70(2H, m)	75.40 t	1.71(3H, brs)	25.75 q
17	1.68(3H, brs)	16.46 q	1.69(3H, brs)	16.43 q
18	4.98(1H, brs) 4.97(1H, brs)	112.14 t	4.98(1H, brs) 4.97(1H, brs)	112.02 t
19			1.62(3H, brs)	17.87 q

^a ¹H NMR spectra were recorded in CDCl₃ solution at 500 MHz. Chemical shifts are reported in δ values(ppm downfield from Me₄Si). J values are reported in Hz. Assignments are aided by COSY experiments. ^b ¹³C NMR spectra were obtained in CDCl₃ solution at 125 MHz. Carbon multiplicities were determined by DEPT experiments. ^c Assignments may be interchanged.

89.1, 75.4)이 4개의 signals(δ 132.8, 123.4, 25.7, 17.9)로 대체되었으며 더우기 이들중 upfield에 위치한 δ 25.7과 17.9의 signals은 DEPT실험결과 methyl carbon임이 밝혀졌다.

이에 상응하는 변화가 ^1H NMR에서도 발견되었다. Allene에 해당하는 protons이 사라진 대신에 새로운 olefinic proton이 δ 5.11(1H, brt, $J=7.8$ Hz)에 나타났으며 두 개의 vinyl methyl기가 δ 1.71과 1.69에서 발견되었다(Fig 3-8). 그 외의 proton signals의 chemical shifts와 coupling pattern은 acalycixeniolide B와 매우 유사하였다. NMR상에서 나타난 이와같은 모든 변화는 acalycixeniolide B의 terminal allene group이 dimethyl vinyl group으로 치환됨으로서 가능하였다.

이와같이 91K-4-2는 xenicane계의 diterpene lactone으로 구조가 결정되었으며 이 물질의 구조와 carbon 및 proton assignments는 Fig. 3-2 및 Table 3-1과 같다. 문헌 조사결과 동일한 구조를 가진 것으로 여겨지는 물질이 Kuril Islands에서 채집한 *Paragorgia arborea*로부터 최근에 보고된 것을 발견하였으나 분광자료를 입수하지 못하여 동일한 물질인지는 아직까지 확인하지 못하였다(Stonik et al, 1990).

91K-4-1과 -2는 모두 nine-membered ring을 가진 xenicane계열의 물질들이다. Geranyl geraniol의 1번과 3번 isoprene units가 cyclization을 하여 형성된 xenicane 골격은 해양 diterpenoids의 대표적 탄소 골격중의 하나이다(Fig. 3-3). 이 계열의 물질들은 주로 soft corals, gorgonians와 brown algae로부터 발견되며 특히 brown algae에 있어서는 dolabellane, extended sesquiterpene과 더불어 3대 골격중의 하나로 불리운다(Faulkner, 1988).

Acalycixeniolide B는 구조결정과 함께 fertilized starfish egg의 세포분열을 억제하는 생리활성 효과가 보고된 바 있다(Fusetani et al, 1987). 이 생리활성도는 항암도와 관계가 밀접한 것으로서 본 연구에서도 시 1의 조추출물에 대한 생리활성도 측정결과 P388과 brine shrimp test에서 우수한 생리활성효과를 나타내었으며 이들은 acalycixeniolide B(91K-4-1)와 91K-4-2에 기인한 것으로 추측된다. 현재 이들 두 물질에 대한 정밀한 항암도를 측정중에 있다.

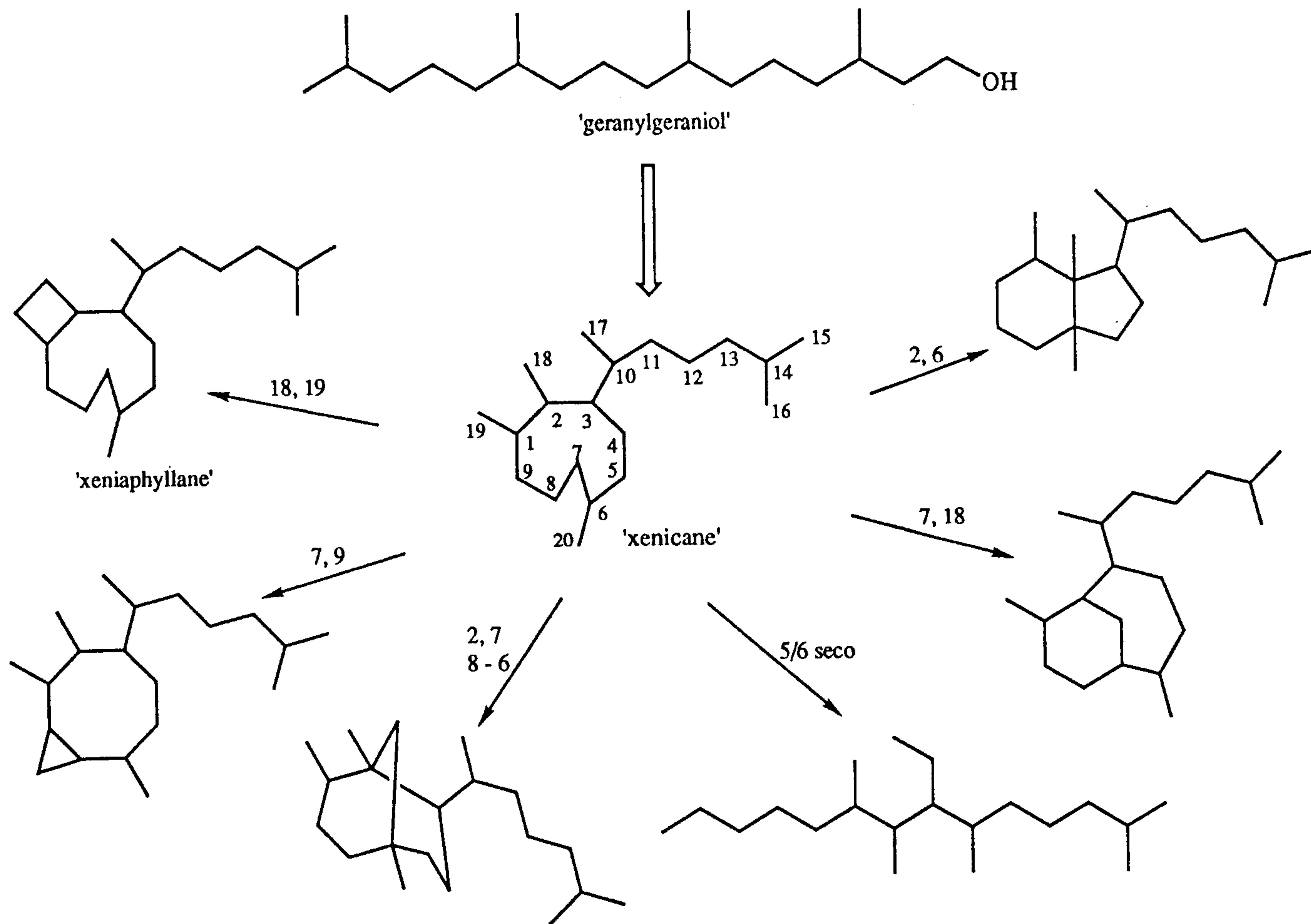


Fig 3-3 The xenicane group of diterpenoids from marine organisms

Fig 3-4 Carbon NMR spectrum of compound 91K-4-1

91k-4-5-hplc-9-c
OBSERVE C13
FREQUENCY 125.697 MHz
SPECTRAL WIDTH 30007.5 Hz
ACQUISITION TIME 1.301 sec
RELAXATION DELAY 4.000 sec
PULSE WIDTH 8.0 usec
AMBIENT TEMPERATURE
NO. REPETITIONS 500
DECOUPLE M1
H100 - PWR 42
DECOUPLE CONTINUOUSLY ON
WALTZ-16 MODULATED
DOUBLE PRECISION ACQUISITION
DATA PROCESSING
LINE BROADENING 0.5 Hz
FT SIZE 131072
TOTAL ACQUISITION TIME 51 minutes

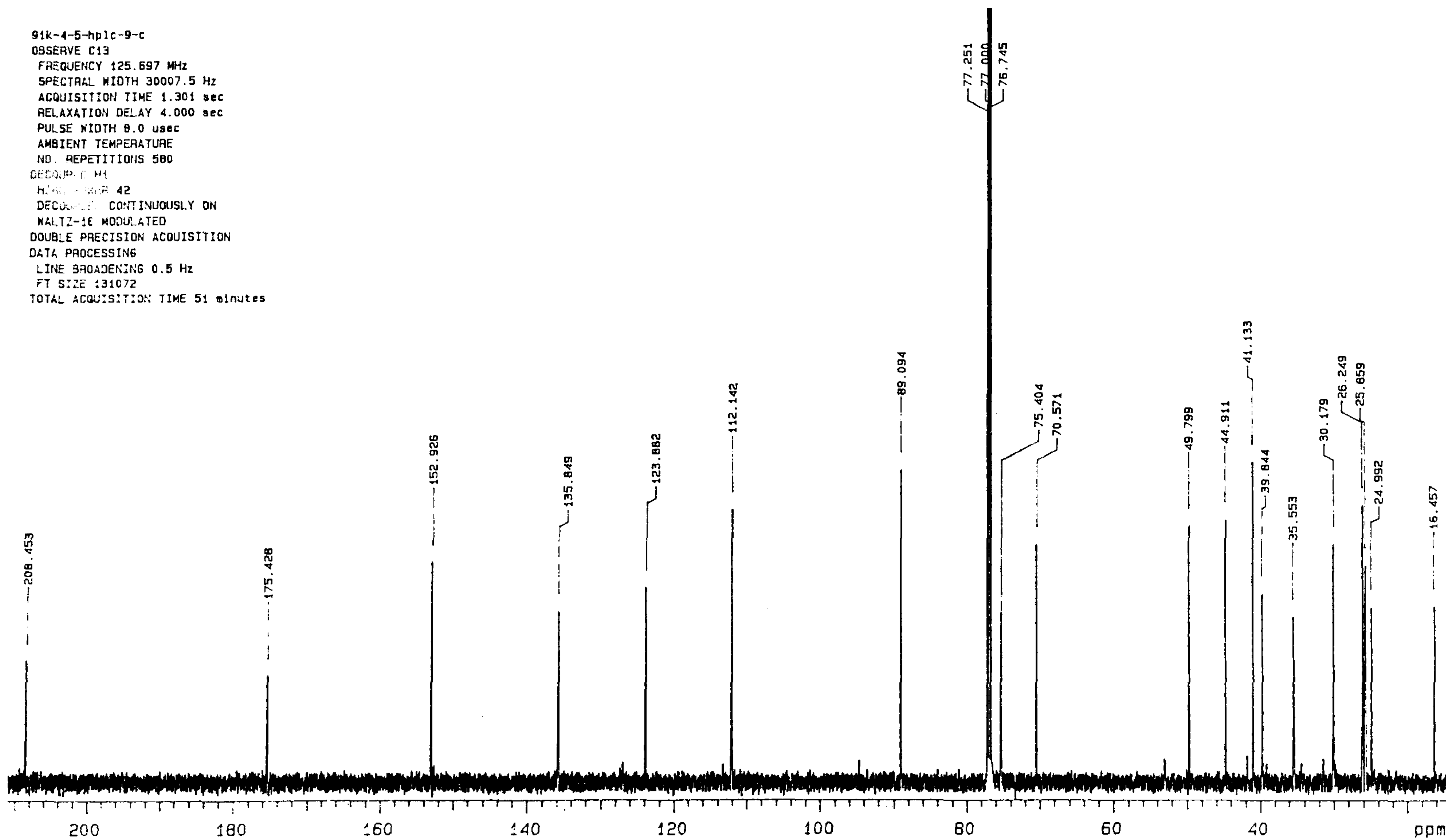


Fig 3-5 Proton NMR spectrum of compound 91K-4-1

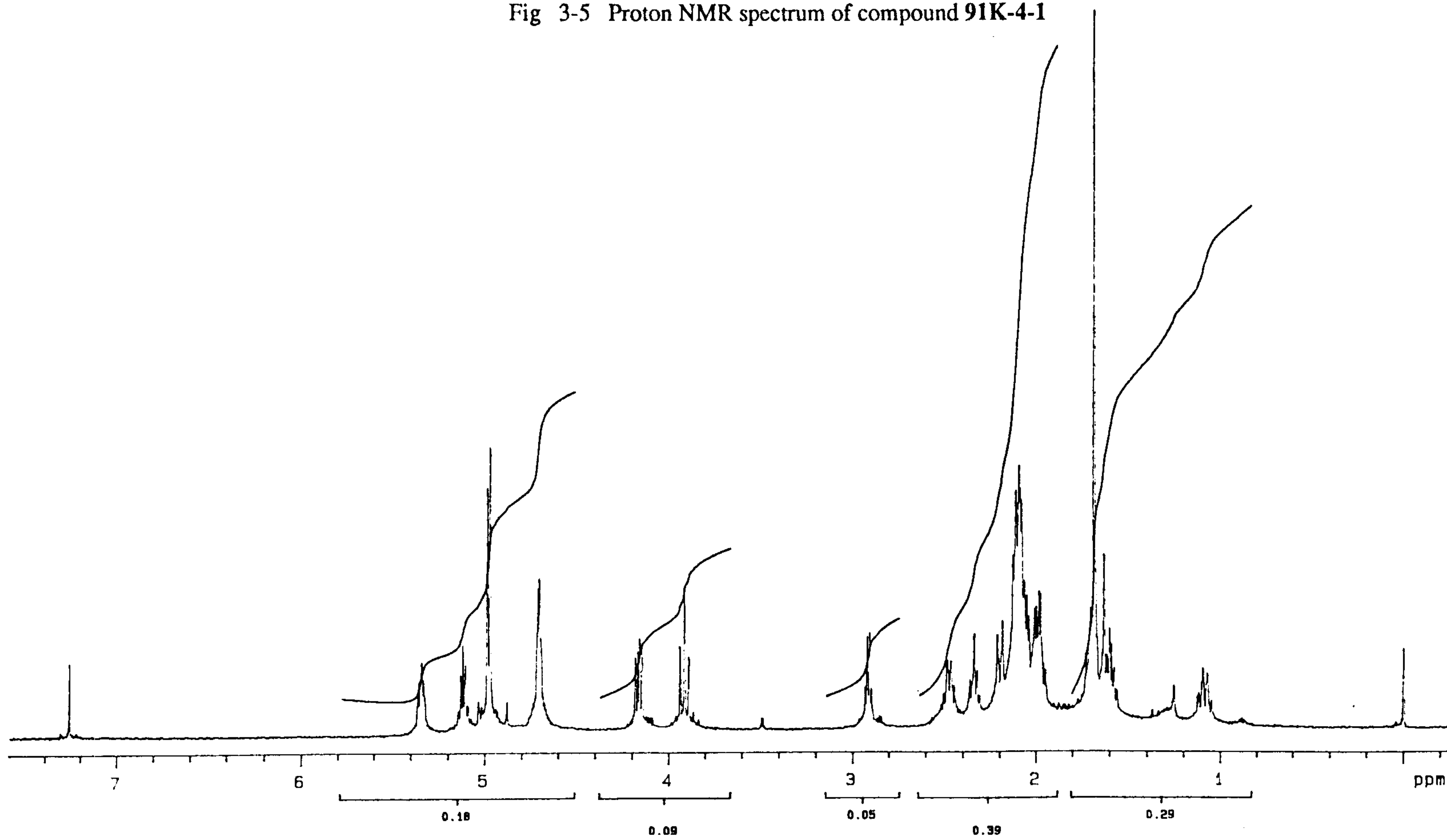


Fig 3-6 Proton COSY NMR spectrum of compound 91K-4-1.

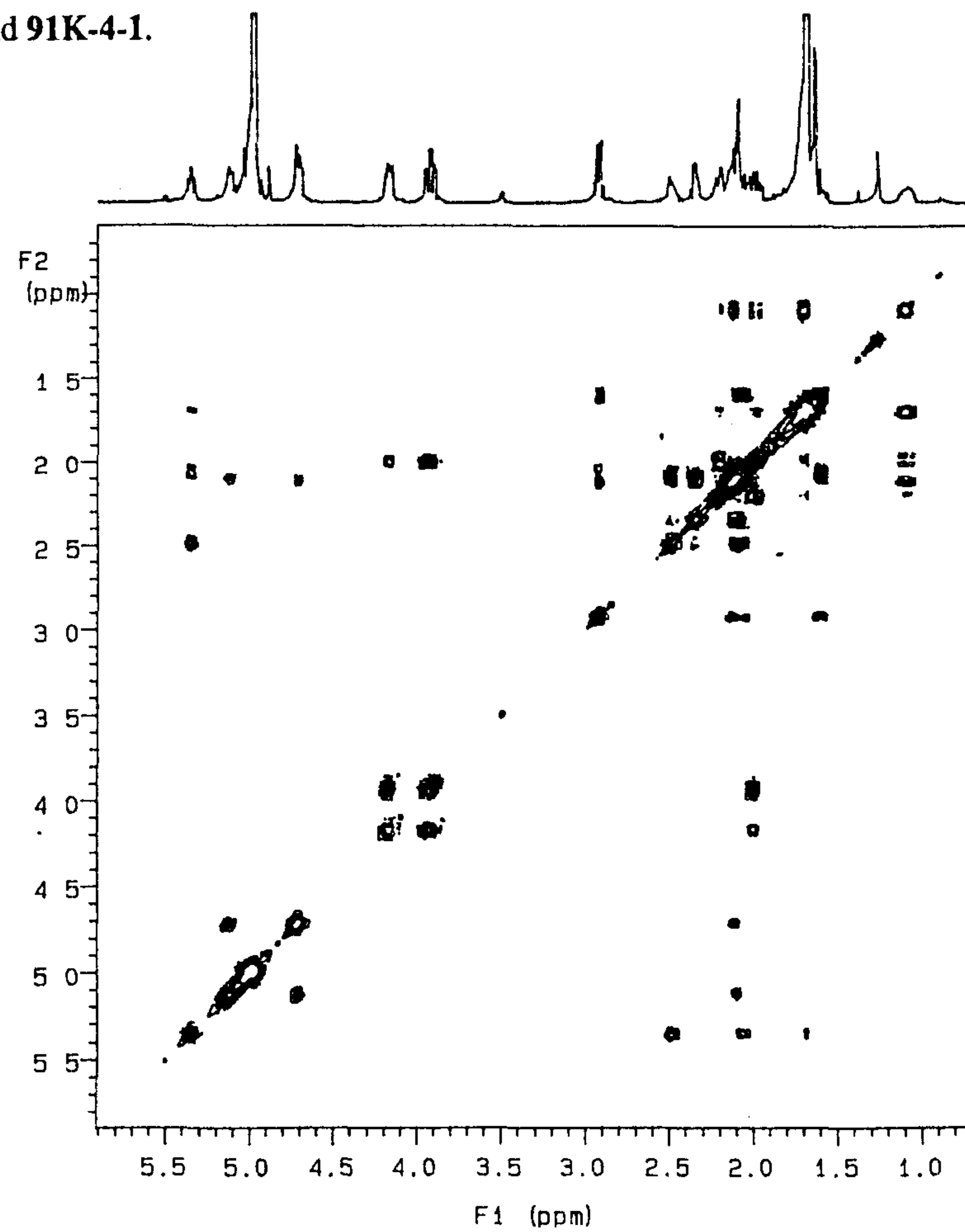


Fig 3-7 Carbon NMR spectrum of compound 91K-4-2

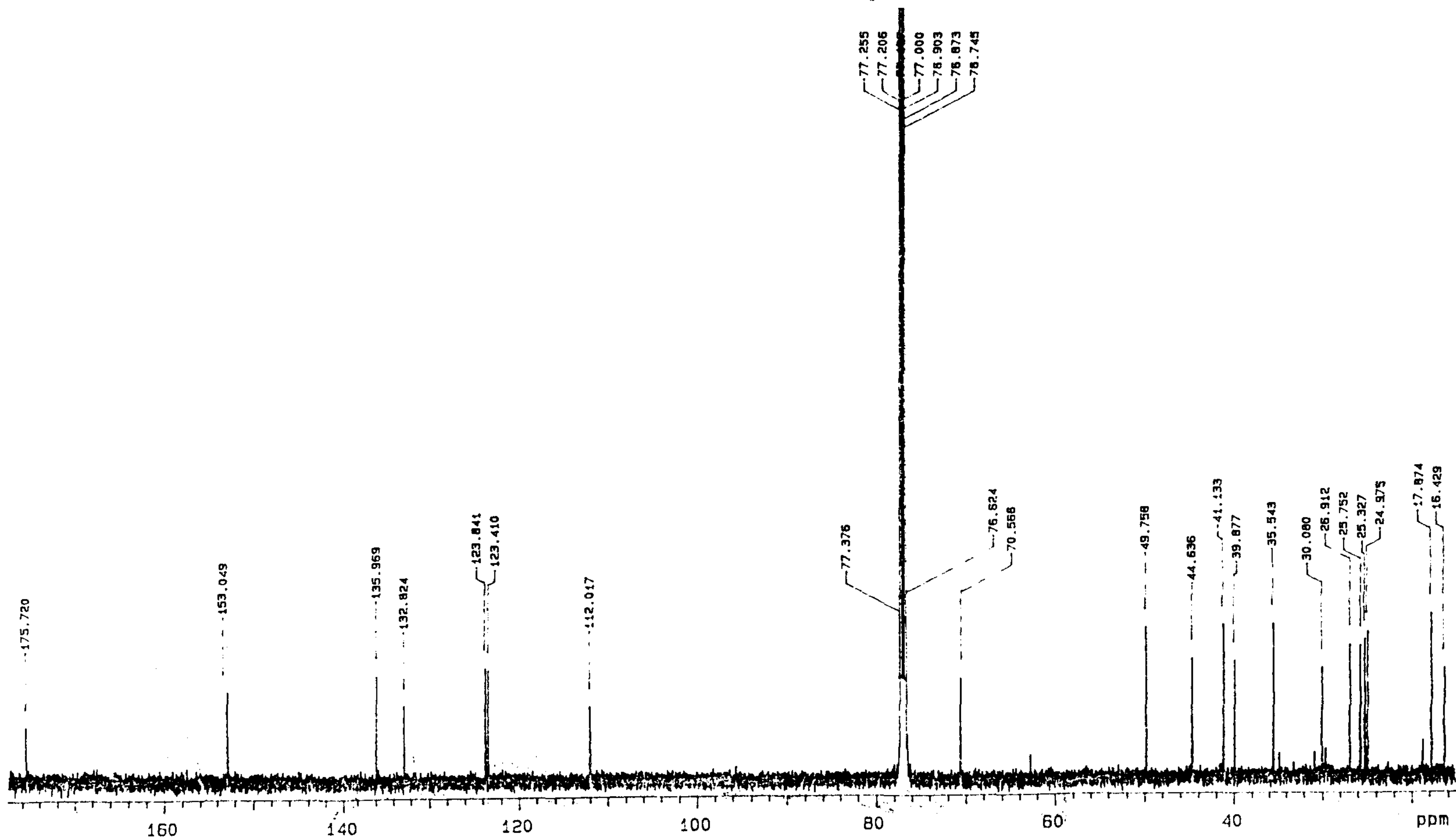
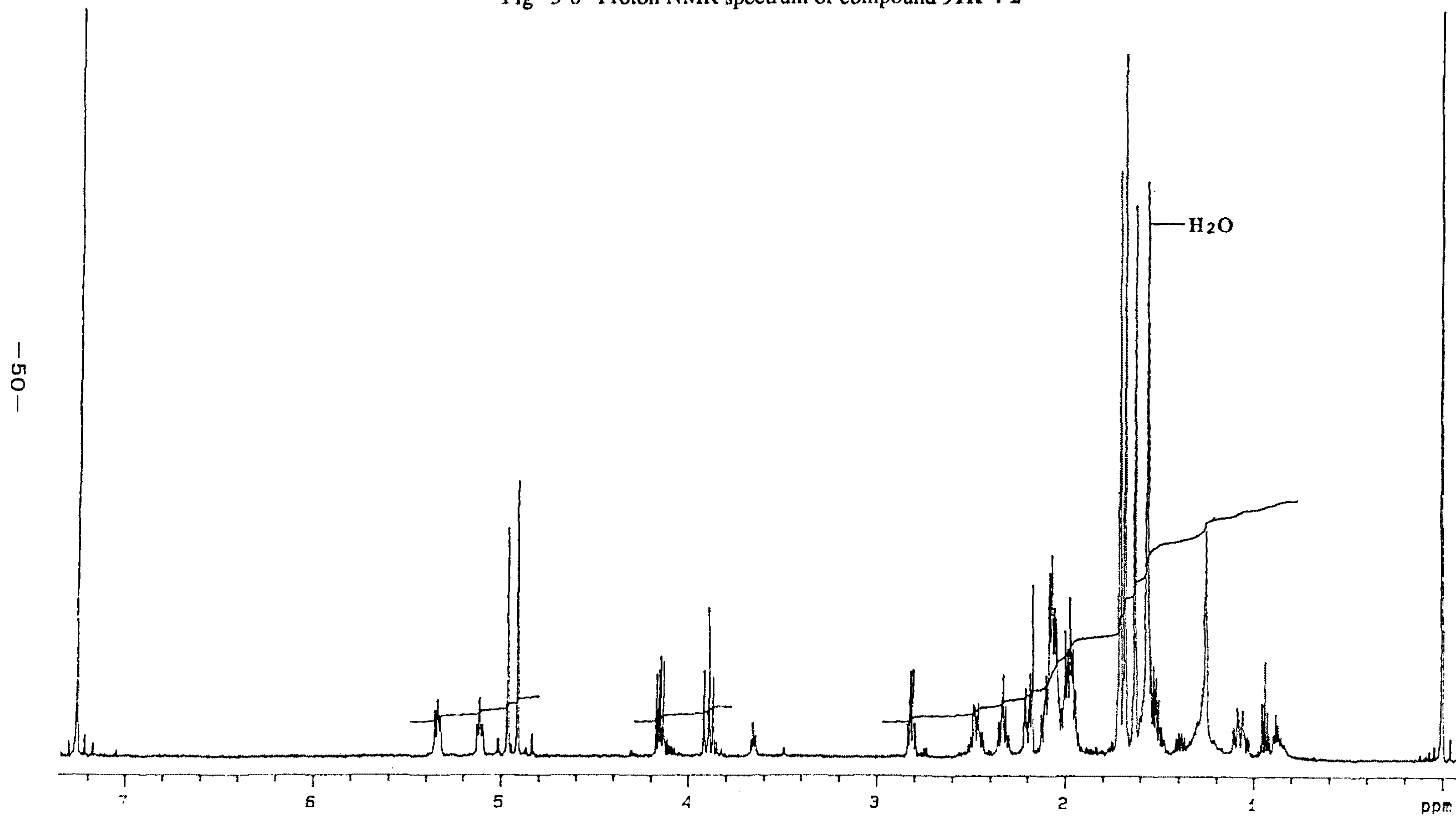


Fig 3-8 Proton NMR spectrum of compound 91K-4-2



3.3. *Acabaria undulata*의 대사물질

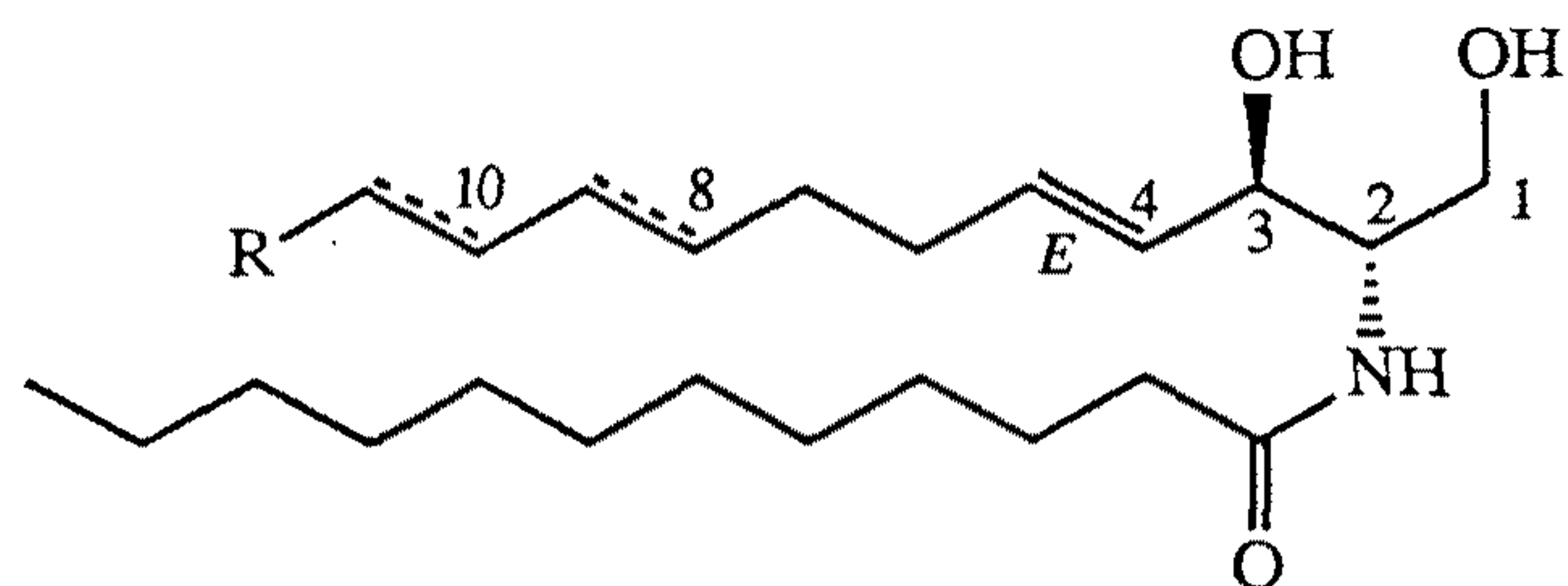
Gorgonian Acabaria undulata(91K-2)는 '91년 11월에 남해안의 거문도 부근의 대삼부도와 서도 근처에서 SCUBA 다이빙에 의하여 채집되었다. 군체의 색깔은 선명한 주홍색이었으며 main body의 굵기가 3 mm이하, 군체의 크기가 20 cm미만으로서 gorgonians에서는 소형에 속하였다. 그 밖의 형태적 특징으로서는 선명한 노란색의 calyses를 갖고 있는 점이였다.

그늘에서 말린후 냉동보관한 시료 3 kg으로부터 dichloromethane으로 추출한 후 silica vacuum flash chromatography를 이용하여 polarity에 의한 분리를 하였다. 각 fraction에 대한 ^1H NMR측정결과 중간정도의 극성(*n*-hexane/EtOAc = 5:5 - 2:8)을 갖는 fractions에서 특이한 물질들이 포함되어 있는 것을 발견하였다. 여러번에 걸친 C_{18} reversed phase HPLC결과 4개의 물질(91K-2-1 ~ -4)가 분리되었다. 이들의 구조는 아래에서 설명한 바와 같이 NMR 자료해석과 화학반응에 의하여 sphingosine유도체로 결정되었다(Fig. 3-9).

주 대사물질인 91K-2-1은 흰 무정형 고체로 얻어졌다. 이 물질의 ^{13}C NMR측정결과 27개의 peaks가 나타났다(Fig. 3-13). 그러나 upfield peaks간의 intensity 차가 매우 커서 여러 개의 carbon signals이 overlap되어 있음이 명백하였다. 탄소의 수를 보다 정확히 파악하기 위하여 ^{13}C NMR 실험에서 delay time을 10 sec이상으로 하여(T_1 value의 차에 의한 carbon간의 intensity의 차이를 없애기 위하여) 측정한 결과 7개의 carbon signals이 overlap되어 있음을 발견하였다. 또한 ^1H NMR에서도 upfield protons간에 overlapping이 매우 심하였다(Fig. 3-14).

NMR상에서 upfield signals의 overlapping이 매우 심한 것으로 보아 이 물질은 long chain fatty acid에서 기원한 것으로 추측되었으며 두개의 methyl signals이 역시 overlap되어 있으며 동일한 methylenes($\delta \sim 1.2$ ppm)과 coupling을 하는 것으로 보아 91K-2-1은 2개의 fatty acids가 결합한 물질임을 알 수 있었다.

Proton COSY NMR(Fig. 3-15)과 proton decoupling에 의하여 downfield protons간



- 91K-2-1** : 8,9-didehydro (*E*), R = (CH₂)₁₂CH₃
-2 : 8,9,10,11-tetradidehydro (*E,E*), R = (CH₂)₁₂CH₃
-3 : 8,9-didehydro (*E*), R = (CH₂)₁₁CH(CH₃)₂
-4 : R = (CH₂)₁₂CH₃

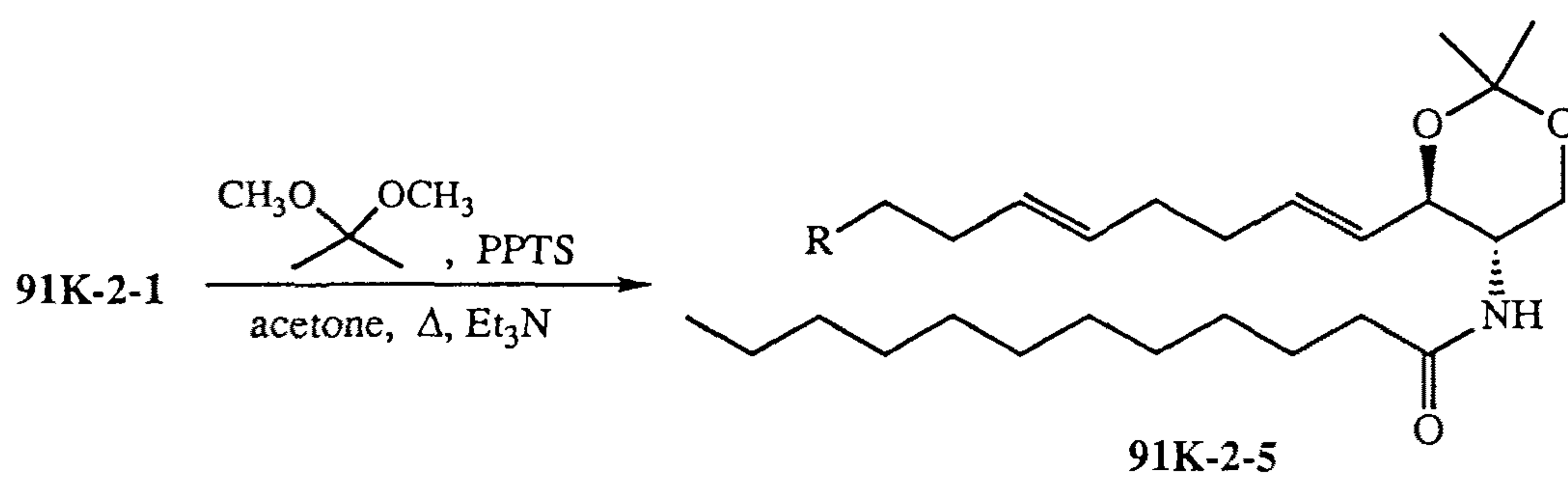


Fig. 3-9. Sphingosines isolated from the gorgonian *Acabaria undulata* (sample number 91K-2).

의 상호관계가 드러났다. 먼저 δ 6.29의 proton(1H, brd, $J=7.3$ Hz)은 D_2O exchange 실험에서 사라졌는데 이 proton의 chemical shift와 ^{13}C NMR에서의 δ 174.11에서 나타난 signal은 함께 secondary amide로 해석되었다. Amide proton은 δ 3.90의 methine proton(1H, m)과 couple을 하였으며 이 methine proton은 다시 δ 4.32, 3.95, 3.69의 세 protons과 couple을 하였다. ^{13}C NMR DEPT 실험의 결과와 이들 세 protons의 coupling constants의 측정에 의하여 이들은 각각 secondary alcohol과 primary alcohol로 해석되었다.

δ 4.32에 나타난 secondary alcoholic proton은 δ 5.53의 olefinic proton과 직접 연결되어 있으며 이 olefinic proton과 직접 연결되어 있는 δ 5.77에 위치한 proton은 2개의 methylene을 경유하여 또 다른 double bond(δ 5.43, 5.36)와 결합되어 있었다. Olefinic protons간의 vicinal coupling constants의 측정결과($J=15.4$, 15.4 Hz) 이들 두 double bonds는 모두 E-configuration을 이루고 있음이 밝혀졌다. 마지막으로 δ 2.22(2H, t, $J=7.6$ Hz)에 나타난 α -carbonyl methylene protons은 δ 1.61(2H, quint, $J=7.2$ Hz)를 경유하여 upfield methylene(δ ~1.2)와 연결되어 있었다. 이로서 91K-2-1의 모든 downfield protons은 완벽히 해석되었으며 이 부분에 대한 구조와 proton assignments는 Fig. 3-10과 같다.

문헌조사결과 91K-2-1은 수 년전 북부 Africa에서 채집한 sea anemone *Anemonia sulcata*로부터 분리된 sphingosine계열의 물질인 docosasphinga-4,8-dienine과 동일한 물질로 추측되었다(Chebaane & Guyot, 1986). Docosasphinga-4,8-dienine에는 C-2와 C-3 두 위치가 asymmetric carbon centers를 이루고 있다. 이 centers의 stereochemistry에 대하여 original paper에서는 C-2와 C-3 proton간의 coupling constant(7 Hz)로부터 erythro라고 보고하였으며 최근 이 물질의 전합성에 의하여 확인되었다(Nakagawa et al., 1990). 그런데 91k-2-1의 경우는 동일한 protons과의 coupling constant가 4.4 Hz 정도로서 보고된 값보다는 상당히 적었다. 이 문제점을 해결하고 asymmetric centers의 stereochemistry를 결정하기 위하여 유기반응을 하였다.

91K-2-1의 두 hydroxy groups을 결합시켜 고정된 6-membered ring을 형성하기 위

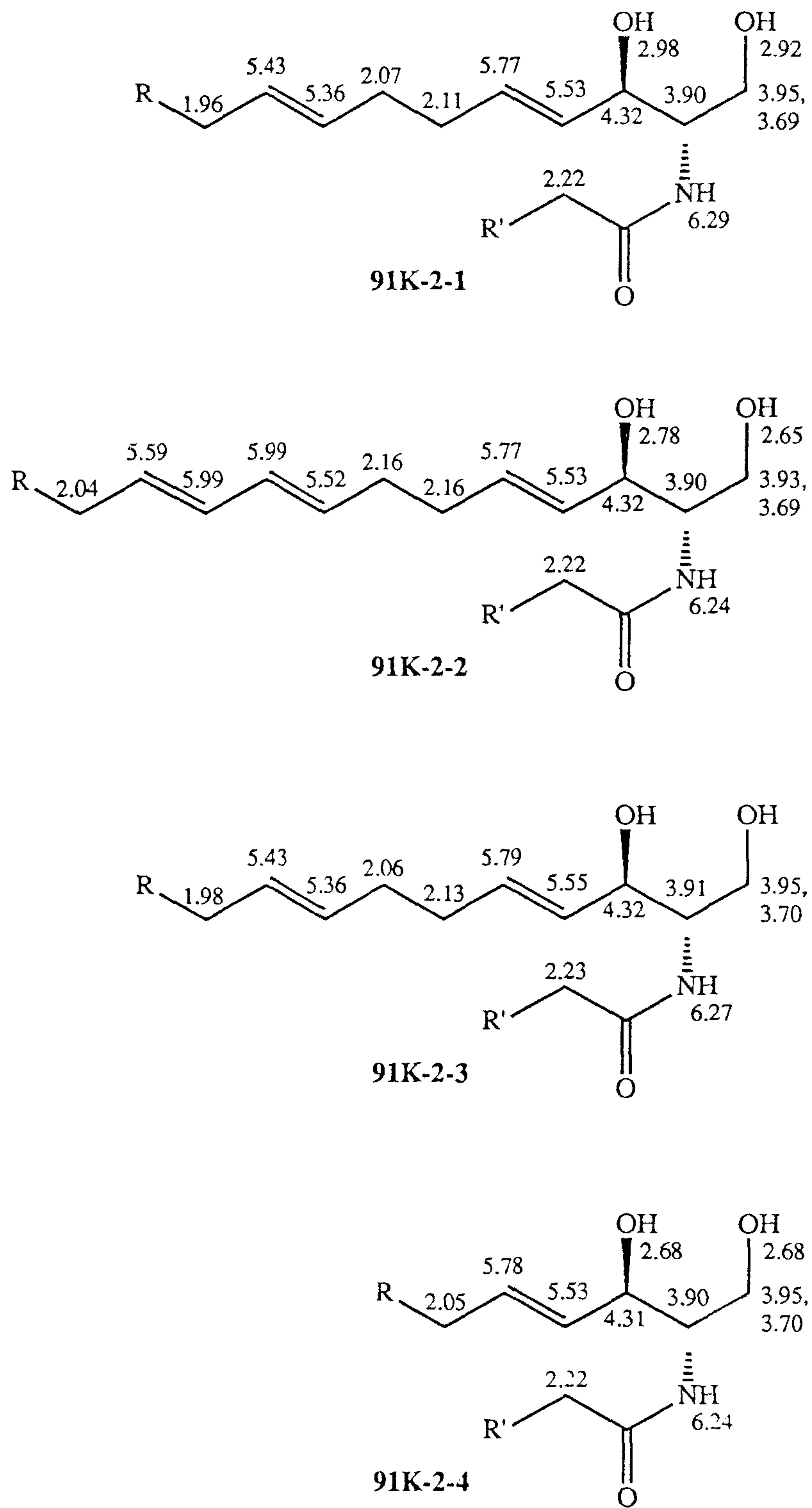


Fig. 3-10. Partial structures and ^1H NMR assignments for compounds 91K-2-1 ~ -4

하여 PPTS(pyridinium p-toluenesulfonate)를 촉매로 이용하여 2,2-dimethoxy acetone과 반응을 시켰다. 이 결과 생성된 cyclic ketal 91K-2-5의 ^1H NMR에서 C-1 ~ C-3의 4 protons간의 coupling constants를 측정하였다(Fig. 3-9, 3-16). 이에 따라 C-2 protons은 ketal ring에서 axial position에 위치하며 (C-1 ~ C-2 = 9.3, 4.9 Hz) C-3 역시 axial orientation을 이루는 것이 명확하였다(C-2 ~ C-3 = 9.5 Hz). 그러므로 91K-2-1의 stereochemistry는 $2S^*3R^*$ 으로서 비록 coupling constant는 다르나 처음으로 보고된 docosasphinga -4,8-dienine과 동일한 것을 증명하였다.

91K-2-1의 구조결정에 있어서 남은 문제는 이 물질에 존재하는 두개의 long chain fatty acid와 amide parts 길이의 결정이다. 이 물질이 보고된 바와 같이 docosadiene과 lauroyl acid amide로 구성되어 있는지 아니면 다른 chain length를 가진 부분으로 구성되어 있는가의 여부는 mass spectrum으로 측정이 가능할 것이다.

유사한 물질인 91K-2-2가 동일한 조건에서 분리되었다. 이 물질의 ^1H 와 ^{13}C NMR은 91K-2-1과 매우 유사하였다(Fig. 3-17, 3-18). NMR data상에 있어서 두 물질의 차이점은 먼저 ^{13}C NMR에서 91K-2-1의 두개의 upfield methylene carbons이 사라진 대신에 downfield의 olefinic region에 두개의 새로운 carbons이 나타난 점이며 이에 상응하는 변화가 ^1H NMR에서도 발견되었다. 그러므로 91K-2-2는 세개의 double bonds를 가진 sphingatriene임이 명백하였다.

새로이 나타난 double bond의 위치를 결정하기 위하여 proton decoupling 실험을 한 결과 4개의 olefinic protons(δ 5.99, 2H; 5.59, 1H; 5.52, 1H) 이 서로 coupling을 하는 즉, conjugated double bond의 존재가 발견되었다. 그러므로 91K-2-2의 구조는 docosasphinga-4,8,10-trienine으로 결정되었다(Fig. 3-9, 3-10). Conjugated double bond의 configuration을 결정하기 위하여 C-7 methylene protons(δ 2.16)과 C-12 methylene protons(δ 2.04)을 각각 irradiation한 결과 C-8 proton(δ 5.52)과 C-11 proton(δ 5.59)이 doublet로 변화하였으며 coupling constants는 각각 14.7 Hz와 14.2 Hz이었다. 이 결과에 의하여 두 개의 conjugated double bond는 E configuration을 하고 있는 것으로 밝혀 졌다. 91K-2-1과 동일한 위치에 있는 두개의 asymmetric

carbon centers의 stereochemistry는 α -hydroxy protons간의 coupling constants의 측정에 의하여 91K-2-1과 같은 erythro-임이 증명되었다.

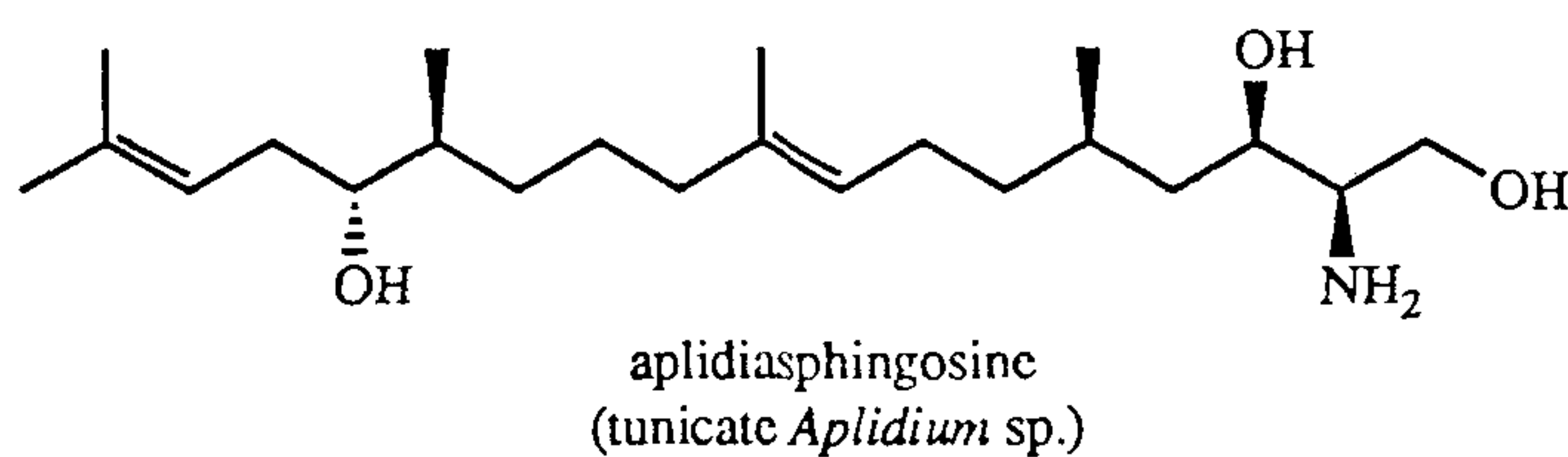
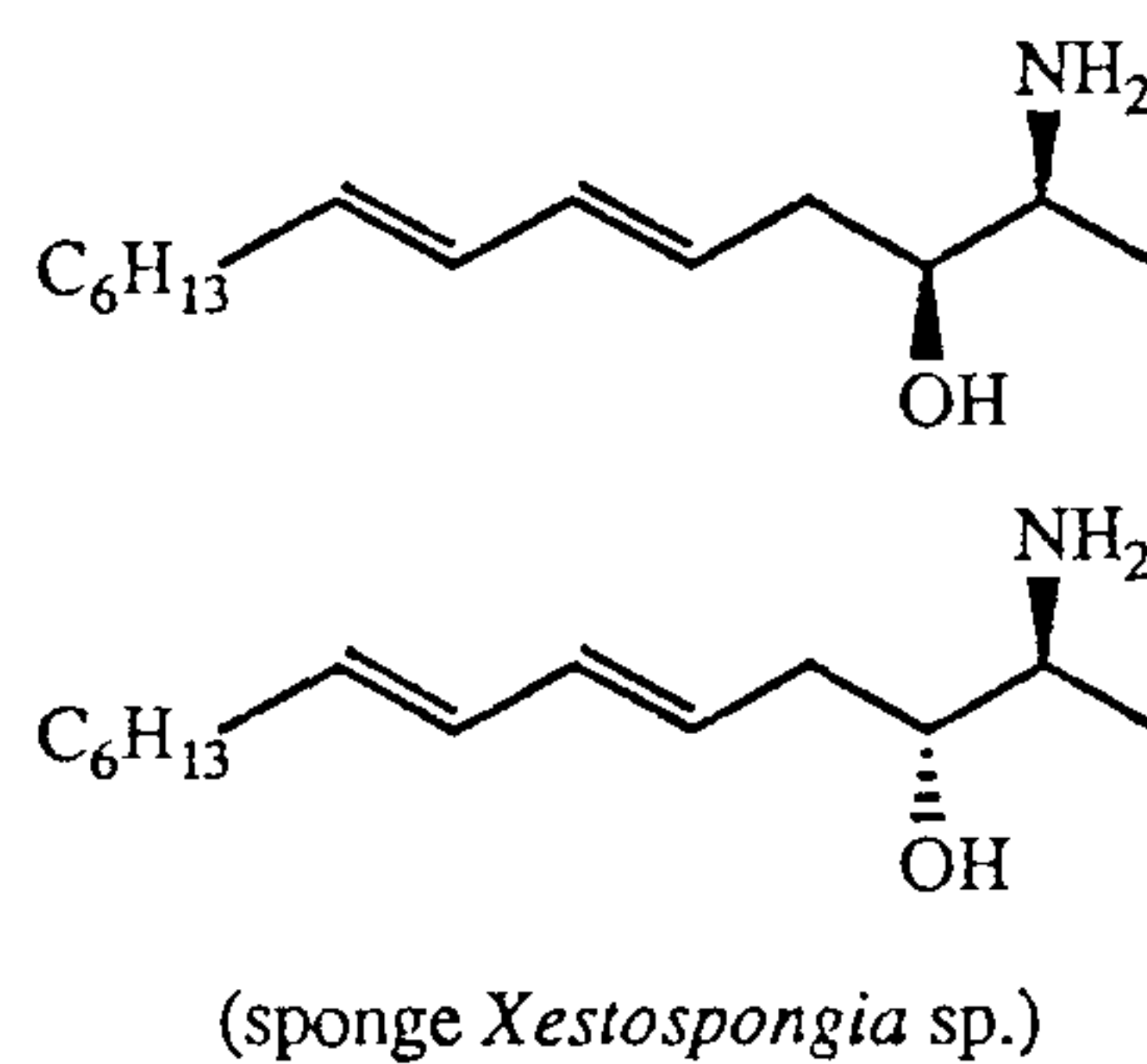
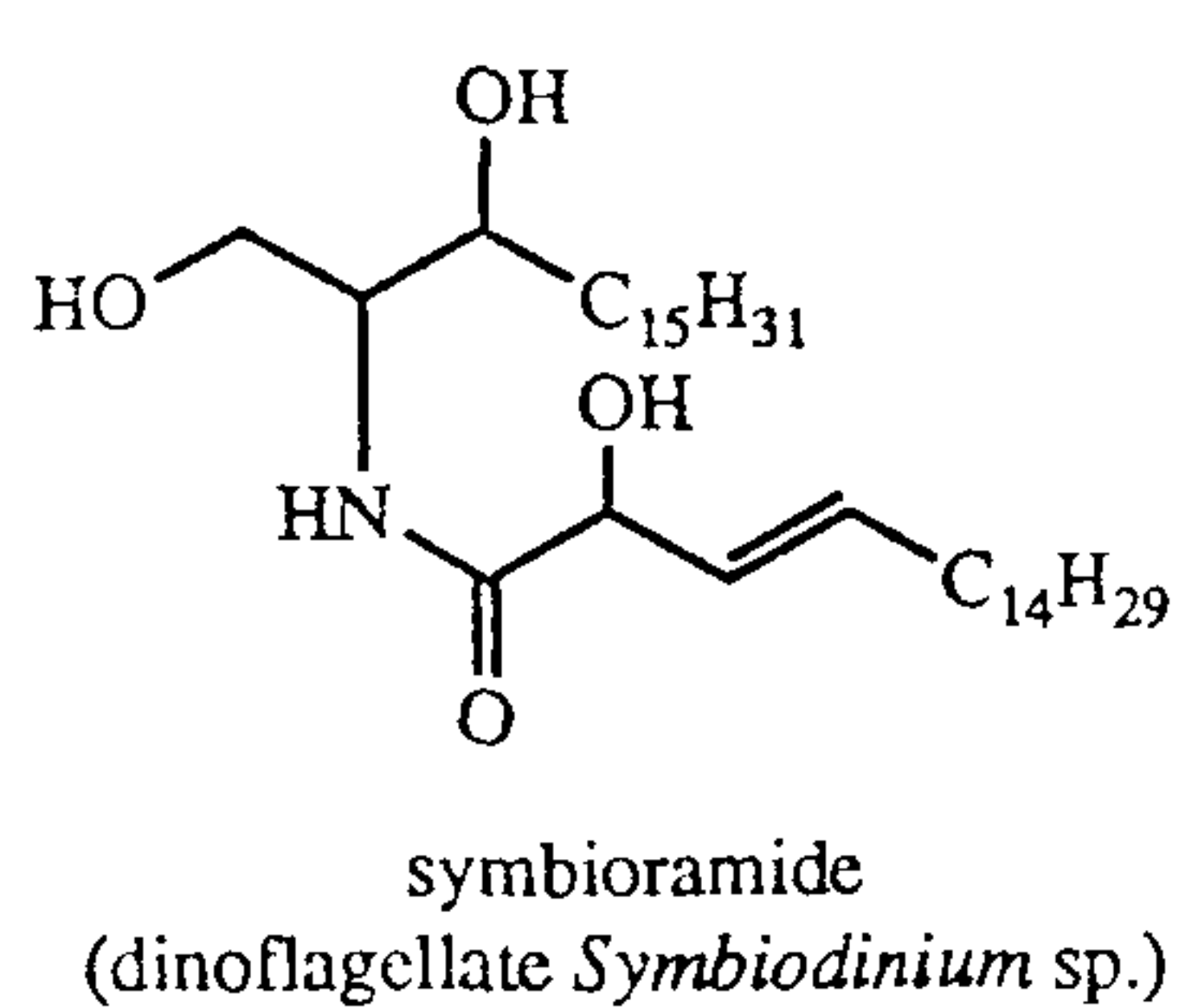
또 다른 유사물질인 91K-2-3 이 동일한 HPLC조건에서 분리되었다. 91K-2-2와 마찬가지로 이 물질의 ^1H 와 ^{13}C NMR은 91K-2-1과 매우 유사하였다(Fig. 3-19, 3-20). 차이점은 91K-2-1에 존재하는 두 개의 methyl groups (^{13}C NMR - δ 14.09 x 2; ^1H NMR - δ 0.87, 6H)이 이 물질에서는 세개의 methyl groups(^{13}C NMR - δ 22.70, 22.67, 14.14; ^1H NMR - δ 0.88, 3H, 0.86, 6H)으로 치환된 점이다. 수소가 methyl group으로 치환되면서 생기는 새로운 methine에 해당하는 peak 또한 예상된 위치에서 발견되었다(^{13}C NMR - δ 27.97; ^1H NMR - δ 1.51).

새로이 생겨난 branch의 위치는 NMR해석에 의하여 결정되었다. Steroids의 경우에 흔히 볼 수 있는 것처럼 두 methyl group의 ^{13}C NMR chemical shifts가 매우 유사한 것은 branching point가 long chain의 terminal인 것을 나타내는 것이며 ^1H NMR에서도 δ 0.86(6H, d, $J=6.8$ Hz)에 나타난 두 methyl groups이 동일한 methine과 coupling을 하였다.

그러므로 91K-2-3은 91K-2-1의 hydrocarbon terminal에 methyl기가 접합된 유도체인 것이 명백하였으며 additional methyl group은 생합성적 mechanism으로부터 두개의 long chains중 docosasphingosine에 접합된 것으로 추측되었다(Fig. 3-9, 3-10). 이 문제는 mass spectrum에서의 fragmentation pattern에 대한 해석에 의하여 완벽하게 결정될 것이다.

또 다른 유도체인 91K-2-4가 동일한 HPLC 조건에서 분리되었다. 이 물질의 ^1H NMR과 ^{13}C NMR data 역시 91K-2-1과 매우 유사하였다(Fig. 3-21, 3-22). NMR상에 있어서의 유일한 차이점은 91K-2-1의 C-8의 olefinic carbons과 protons에 해당하는 signals이 upfield signals로 대체되었다는 점이다. 그러므로 91K-2-4는 의심할 바 없이 erythro-docosasphinga-4-enine으로 결정되었다(Fig. 3-9, 3-10).

Sphingolipids는 그 종류가 매우 다양하고 고등동물의 brain과 nerve tissue에 다량으로 존재하나 91K-2-1 ~ -3과 같은 sphingadienine의 형태로 발견된 예는 매우 드



acanthacerebroside A : $R^1 = C_{12}H_{25}$, $R^2 = C_{22}H_{45}$
 B : $R^1 = C_{18}H_{37}$, $R^2 = C_{14}H_{29}$
 C : $R^1 = -(CH_2)_8CH=CHC_8H_{17}$,
 $R^2 = C_{14}H_{29}$
 (starfish *Acanthaster planci*)

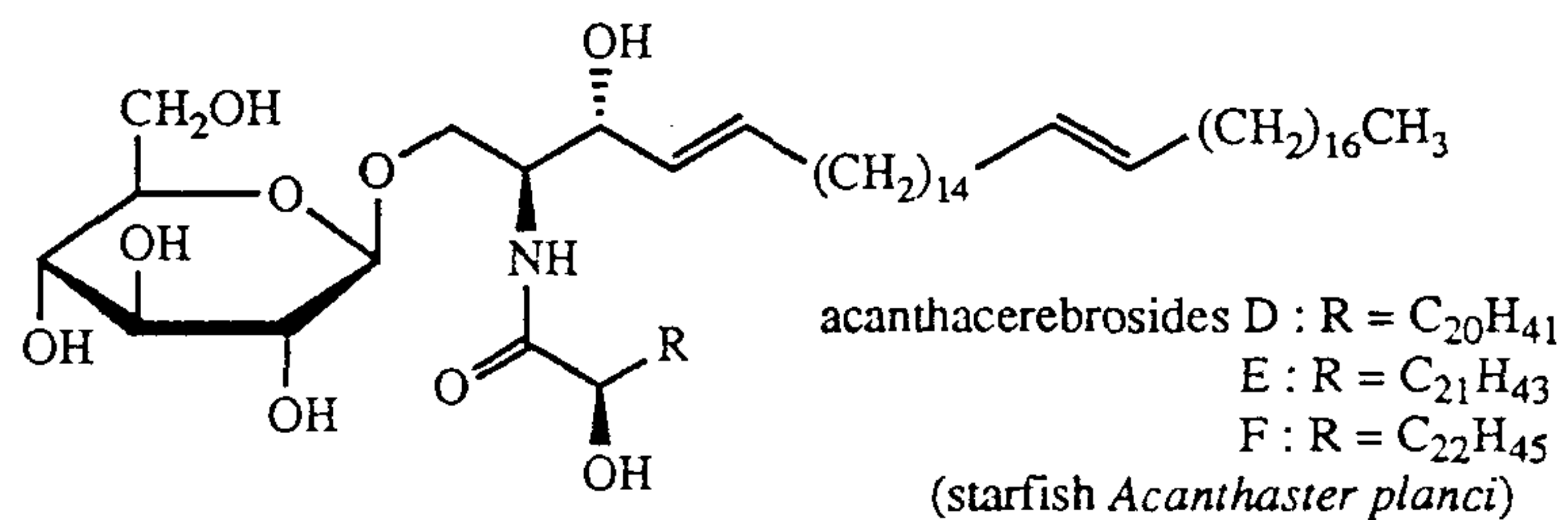


Fig. 3-11. Sphingosines and related metabolites from marine organisms.

물어서 해양 생물에서는 sea anemone *Anemonia sulcata*에서 발견된 91K-2-1이 유일한 예이다(Chebaane & Guyot, 1986). 91K-2-1 ~ -4와 같은 sphingosine 유도체나 이로부터 파생한 새로운 구조의 cerebrosides, ceramides, gangliosides 등은 생물체의 1차 대사 물질과 구조가 매우 유사하여 근래에 이르기까지 큰 관심을 끌지 못하였다. 그러나 최근에는 dinoflagellate, tunicate, sponge, echinoderm 등 여러 해양생물로부터 새로운 구조의 물질들이 계속 발견되고 이에 따라 항미생물, 항암 등 생리활성도도 보고되어 주목을 끌고 있으며 수종의 물질은 전합성이 된 바 있다(Fig. 3-11) (Kawaro et al, 1990; Kobayashi et al, 1988; Gulavita & Scheuer, 1989; Faulkner, 1991; 1992).

위에서 언급한 4 개의 sphingosine 유도체 이외에도 여러 개의 전혀 다른 물질이 포함되어 있음이 polar fractions에 대한 ^1H NMR 측정에 의하여 드러 났다. 다양한 HPLC 조건을 이용하여 물질의 분리를 시도한 결과 천연물이 포함된 4개의 peak를 얻었다. NMR 분석결과 이들은 모두 polyhydroxy steroids로 추측되었으며 구조적인 면에서 A - D ring은 동일하며 side chain에서의 double bond 및 methylation의 유무에서만 차이가 나는 서로 유사한 물질들로 생각되었다(Fig 3-23, 3-24). 그러나 polyhydroxy steroids의 mixture에서 흔히 볼 수 있는 바와 같이 이들 상호간의 polarity의 차이가 거의 없어 순수한 상태로의 분리가 불가능하였다. 이에 대한 해결방법으로 부득이 이들 mixture를 acetic anhydride와 반응시켜 polyacetates를 합성한 뒤 분리를 시도하였으며 그 결과 두 개의 물질(91k-2-6, -7)의 분리에 성공하였다(Fig. 3-12).

물질 91k-2-6의 ^{13}C NMR에서는 모두 32개의 peaks가 발견되었다(Fig. 3-25). 따라서 91k-2-6은 C_{28} steroid에 두 units의 acetyl기가 결합된 물질로 생각되었다. δ 130 - 140에서 발견된 두 개의 methine carbons는 하나의 이중결합의 존재를 나타내었고 upfield region에 나타난 8개의 methyl carbons는 이 물질이 전형적인 C_{28} steroid이며 cholestane의 C-24 위치에 methylation이 일어난 ergostane 계열의 물질일 가능성을 제시하였다.

δ 80 - 60에 나타난 5개의 signals는 91k-2-6의 5위치가 산화되었음을 의미하였다. 그러나 원래의 mixture의 ^1H NMR과 비교하여 볼때 acetylation 반응에서 5개의 산

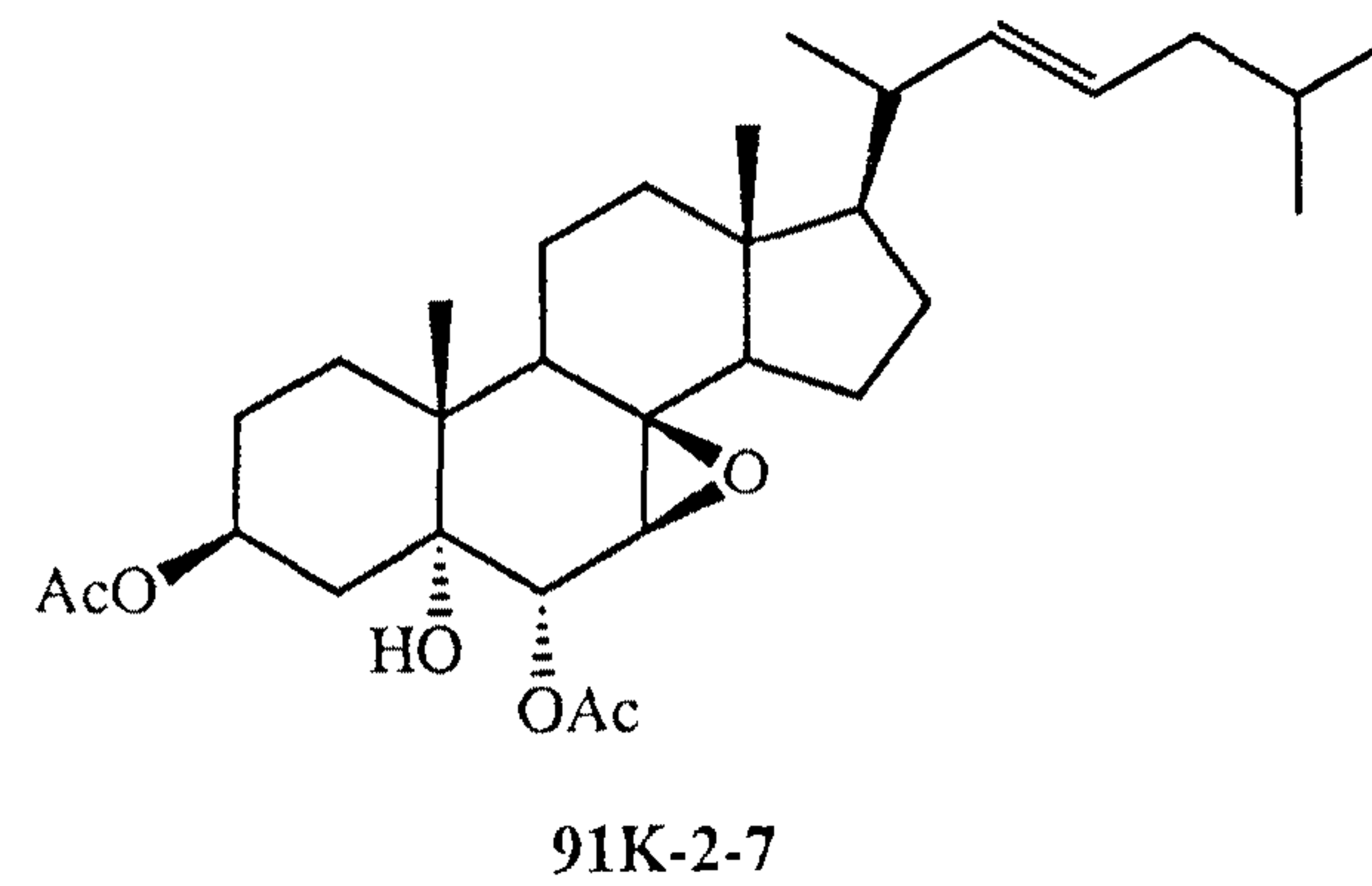
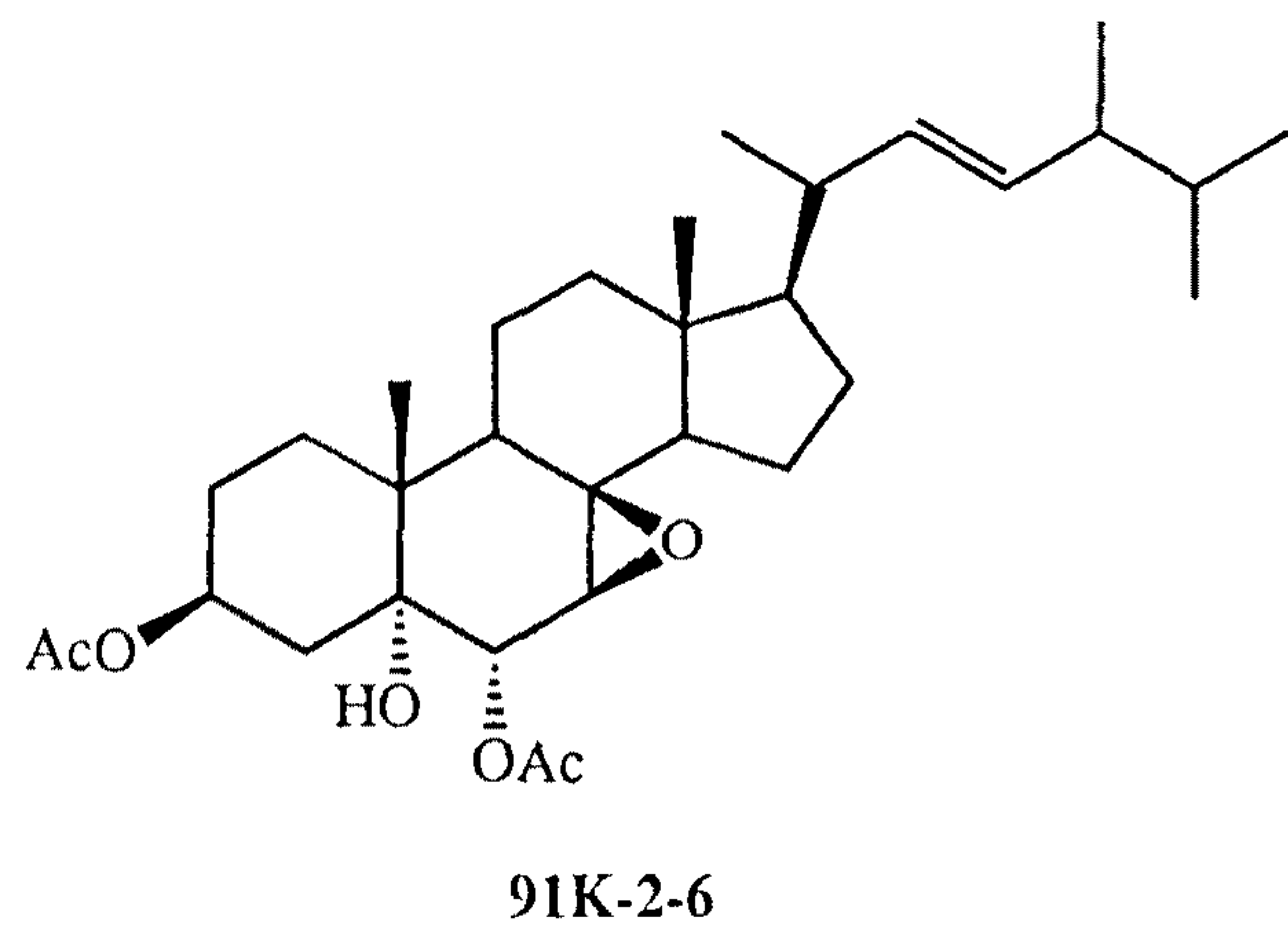


Fig 3-12 Structures of polyhydroxy steroids isolated from the gorgonian *Acabaria undulata* (sample number 91K-2)

화된 carbons 중 2개만 acetoxy carbons로 변화한 것이 명백하였다(Fig. 3-26). δ 66.20(s)와 62.44(d)에서 발견된 두 개의 carbons의 chemical shifts는 일반적인 polyhydroxy steroid에서 존재하는 산화된 carbons의 chemical shifts와는 상당한 차이(5-10 ppm)를 나타내었다. 따라서 이들 2개의 carbon은 hydroxy기 대신 ether나 epoxide 등 free hydrogen을 갖지 않은 oxygen이 결합된 것이 분명하였으며 carbon의 chemical shifts의 해석으로는 epoxide일 가능성이 매우 높음을 의미하였다.

Epoxide의 존재는 proton coupled ^{13}C NMR에서의 $^1J_{\text{CH}}$ 의 측정으로 증명되었다(Fig. 3-27). 일반적으로 one bond carbon-proton coupling constant는 해당 carbon의 s-p character의 상대적인 비, 작용기의 종류 및 ring size에 의하여 결정된다는 것이 잘 알려져 있다. 전형적인 hydrocarbon에서의 $^1J_{\text{CH}}$ 는 125 Hz 정도이며 oxygen이 결합된 경우에는 140 - 143 Hz 정도이다. 또한 ring size도 coupling constant에 큰 영향을 미쳐 6-membered 이상이면 acyclic system과 차이가 없으나 ring size가 줄어들수록 점차로 커져서 cyclopropane에서는 161 Hz에 이른다(Wehrli & Wirthlin, 1978; Kalinowski et al. 1984).

Polyhydroxy steroid mixture의 proton coupled ^{13}C NMR에서 δ 70 - 60 region을 살펴 보면 δ 70.22와 69.95에서 나타난 두 개의 carbons(CDCl_3 에서는 각각 δ 67.80과 66.54)는 모두 methine의 전형적인 coupling constant인 143 Hz 정도를 나타낸데 비하여 δ 62.44(CDCl_3 에서는 δ 65.50)의 methine carbon은 176.2 Hz의 one bond coupling constant를 갖고 있음이 드러났다(Fig. 3-27). 이 값은 epoxide의 전형적인 coupling constant인 175.7과 거의 일치하는 것이다. 따라서 91k-2-6에는 전기한 2개의 secondary acetoxy기와 1개의 tertiary hydroxy기와 함께 1개의 epoxide기가 존재함이 밝혀 졌다.

위에서 언급한 carbon NMR에 대한 해석은 모두 proton NMR spectrum으로 입증되었다(Fig. 3-26). 먼저 8개의 methyl protons가 확연히 드러났으며 이들중 4개의 methyl기가 doublet로 나타난 것은 additional methyl이 C-24 methine에 결합되었음을 의미하였다. δ 5.0이하의 지역에서 2개의 double bonds와 2개의 α -acetoxy methine에 해

당하는 peaks가 발견되었으며 epoxide proton은 δ 3.55에서 broad singlet의 형태로 나타났다. δ 4.76에 나타난 proton은 D₂O exchange 실험에서 사라졌으므로 tertiary hydroxy proton이 분명하였다.

91k-2-6의 대체적인 구조는 proton COSY와 decoupling 실험에 의하여 결정되었으며 구조의 확인은 HMQC와 HMBC등 2-dimensional hetero NMR실험에 의하여 이루어 졌다 (Fig. 2-28 ~ 3-30). 먼저 δ 5.54에 나타난 proton은 chemical shift와 coupling pattern으로 보아 acetoxy bearing C-3 methine이 분명하였으며 이 proton을 기준으로 하여 C-1, -2 및 -4에 위치한 6 protons가 모두 decoupling과 COSY실험에 의하여 결정되었다. 따라서 이 steroid의 A ring에는 C-3 acetoxy기를 제외한 다른 작용기는 없는 것이 밝혀 졌다. A-ring의 protons중 H-4 β (δ 1.66)과 tert-hydroxy proton(δ 4.76)사이에는 long-range coupling이 존재하는 것이 발견되었는데 이는 4-bond W coupling으로 해석되었으며 따라서 hydroxy group은 C-5 carbon에 접합되어있음이 분명하였다.

C-5 carbon의 낮은 chemical shift(δ 76.91)는 C-6에 또 다른 oxygen이 접합되어 있음을 의미하였다. 문헌조사에서도 C-5와 C-6이 함께 산화된 경우에는 C-5의 chemical shift가 δ 75 - 80인 반면에 C-6위치가 산화되지 않았을 때에는 C-5 carbon은 δ 70 부근에서 발견되었다(Faulkner, 1988; 1992). 따라서 C-3과 마찬가지로 C-6도 acetoxy group이 접합되어 있으며 δ 5.29에 위치한 C-6 proton과 δ 3.55에 있는 epoxide proton과의 coupling에 의하여 epoxide의 위치가 C-7, -8임이 결정되었다. 이 두 protons간의 coupling constant(<1.5 Hz)가 cyclohexane ring에 있어서의 전형적인 vicinal coupling(12 ~ 4 Hz)보다 매우 적은 것은 새로운 epoxide ring의 존재로 인하여 C-6, -7 protons간의 dihedral angle이 변하였기 때문으로 생각되었다.

Side chain 부분 역시 proton decoupling과 COSY실험에 의하여 C-20 ~ C-28에 위치한 모든 protons의 상관관계가 명백히 밝혀짐으로서 C-22위치가 double bond로, 그리고 C-24위치가 methylation되어 있음이 결정되었다. 이 해석은 ergostane 골격을 가진 여러 steroids와의 carbon NMR 비교에 의하여도 입증되었다(Faulkner, 1992).

위에서 언급하지 않은 부분 즉 91k-2-6의 C와 D rings는 해당 protons와 carbons의 chemical shifts와 coupling patterns에 아무런 변화를 찾아 볼 수 없었으므로 가장 일반적인 6/5 bicyclic을 이루고 있는 것으로 생각되었다. 따라서 91k-2-6은 A와 B rings가 산화된 ergostane 계열의 물질임이 분명하였다(Fig. 3-12).

Proton, carbon 및 COSY NMR에 의하여 제시된 구조는 HMQC 및 HMBC실험에 의하여 증명되었다(Fig. 3-29, 3-30). 먼저 이 물질에 존재하는 거의 모든 protonated carbons와 protons간의 상관관계가 HMQC실험에 의하여 밝혀 졌다. 또한 HMBC 실험에 의하여 key protons와 carbons간의 2-bond와 3-bond correlation이 다수 밝혀 졌다. 특히 C-4a, -5OH, -7, -19등에 접합된 4개의 protons와 A/B ring에 위치한 여러 개의 carbons간의 long-range coupling이 다수 발견됨으로서 가장 문제가 되었던 A, B rings의 구조가 완벽히 입증되었다. 따라서 91k-2-6의 구조는 의심할 바 없이 3,6-diacetoxy-7,8-epoxy-5-hydroxyergosta-22-ene으로 밝혀 졌으며 따라서 해당하는 천연물의 구조는 3,5,6-trihydroxy-7,8-epoxyergosta-22-ene임이 분명하였다(Fig. 3-12).

91k-2-6과 함께 분리된 91k-2-7의 proton과 carbon data는 91k-2-6과 매우 유사하였다(Fig. 3-31, 3-32). A, B rings의 산화 pattern은 완전히 동일하였으며 C, D rings에 해당하는 signals도 거의 일치하였다. NMR 상에 있어서의 차이점은 91k-2-6의 C-22에 위치한 double bond와 C-28 methyl기가 사라진 점이었다. 따라서 91k-2-7은 3,6-diacetoxy-7,8-epoxy-5-hydroxy-cholestane이며 천연물은 3,5,6-trihydroxy-7,8-epoxycholestane임이 분명하였다(Fig. 3-12).

문헌조사 결과 91k-2-6, -7 및 해당하는 천연물은 모두 해양생물로부터는 발견된 바가 없다는 것을 확인하였으며 현재 육상생물과 미생물의 천연물을 대상으로 신물질 여부를 조사중이다. 해양 천연물중 polyhydroxy steroids는 여러 생물에 걸쳐 폭 넓게 분포하고 있으며 특히 해양동물로부터는 상당히 빈번하게 발견되고 있다. 이들은 극피동물에서 흔히 발견되는 바와 같이 saponin의 형태로 존재하기도 하나 free hydroxy기나 sulfate기의 형태로 발견되는 예가 많다(Faulkner, 1992).

해양동물에서 분리된 polyhydroxy steroids의 다수는 항암, 항바이러스, 항미생물 등 다양한 생리활성효과를 나타내어 큰 주목을 끌고 있다. 본 연구에서도 조추출물에서 나타난 P388 cell-line에 대한 생리활성 효과가 이들 polyhydroxy steroids에 기인한 것으로 생각되며 신물질 여부의 확인이 이루어진 후에 보다 정밀한 생리활성도를 측정할 예정이다.

결론적으로 본 연구에서는 우리나라의 남해안에 서식하는 *Acalycigorgia inermis*와 *Acabaria undulata* 등 두 종의 gorgonians로부터 2개의 diterpenoids와 4개의 sphingosines를 분리하였고 또한 2개의 polyhydroxy steroids를 acetylated form으로 분리하였으며 다양한 NMR 실험과 유기화학적 반응에 의하여 모든 물질의 구조를 결정하였다. 이들 물질은 현재 신물질 여부를 조사중이며 생리활성효과를 측정할 예정이다.

3.4. 실험 방법

3.4.1. 기기 및 시약

NMR측정은 500 MHz Varian Unity-500을 이용하였다. Proton NMR은 500MHz에서 carbon NMR은 125MHz에서 측정하였다. Chemical shifts는 internal standards인 TMS(tetramethyl silane)나 $CDCl_3$ 를 이용하여 측정하였다. 모든 NMR실험은 Varian사에서 공급한 Vnmr software를 이용하였으며 각각의 실험에 이용된 pulse width, transmitter power, delay 및 evolution time들은 기 측정된 값을 이용하였다. HPLC는 spectra-physics제의 Isochrom isocratic pump를 모체로하여 본 실험실에서 조립한 제품을 사용하였다. 중요부품은 injector(Rheodyne 7825)와 detector(Shodex RI) Spectra-physics UV detector 및 Linear 2-pen recorder로 구성되었다. 물질분리에 사용한 HPLC column은 YMC silica semiprep column(1cm x 25cm), YMC C_{18} reversed phase semiprep column(1 x 25 cm)와 각각의 guard column cartridge(Aldrich)이었다.

Rotavapor는 Buchi RE-101과 121를 사용하였다. 유기물질의 추출 및 분리에 이용한 모든 용매와 시약은 GR등급을 사용하거나 EP급을 재증류하여 사용하였다.

3.4.2. 91K-4로부터 천연물 추출 및 분리

3.4.2.1. 시료의 채집 및 유기물질의 추출과 고속감압크로마토그래피

산호 *Acalycigorgia inermis*(시료번호: 91K-4)의 채집은 1991년 10월 거문도 연안 서도와 대삼부도 근해 수심 25-30 m에서 SCUBA 다이빙에 의해서 이루어 졌으며 이 시료는 채집해 오는 즉시 용달에서 완전히 말려 냉동고에 보관되었다. 냉동보관중인 시료(건조무게량: 5 kg)를 잘게 잘라 methylene chloride 2 L를 가하여 실온에서 48시간 방치한 후에 그 용액을 걸러내었으며 이 과정을 다시 반복한 후에 얻어진 전체 유기추출물의 양은 15.14 g이 얻어 졌다.

이 추출물을 진공 flash chromatography로 분리하기 위해 n-hexane과 ethylacetate의 혼합액(100% n-hexane으로부터 100% ethylacetate까지), acetone, methanol을 순서대로 용출시켰다. 이렇게 얻어진 18개의 분획(fraction, fx)을 각각 용매를 제거한 후 ¹H NMR을 측정한 결과 흥미 있는 2차 대사물질이 fx-4(15% ethylacetate/n-hexane: 485 mg)과 fx-5(20% ethylacetate/ n-hexane: 410 mg)에 포함되어 있음이 밝혀 졌다. 기타의 fx에는 여러 해양생물에 흔히 존재하는 포화 및 불포화 지방, 지방산 및 steroids가 포함되었다.

3.4.2.2. 91K-4-1(=acalycixeniolide B)와 91K-4-2의 분리

91K-4-1은 고속감압 크로마토그래피(20%와 30% ethylacetate/hexane fx)에 의해서 대략적으로 분리한 후에 HPLC(high performance liquid chromatography)에 의해서 순수하게 분리하였다(YMC silica column, RI detector, 2 ml/min). Acalycixeniolide

B는 7% ethylacetate/hexane에서 retention time 27 분, 10% ethylacetate/hexane에서 18.2 분이였다. 분리된 양은 53 mg 이며 다음과 같은 분광 데이터를 주었다. ^1H NMR(CDCl_3 , 500 MHz) δ 5.34(1H, brt, 7.7, H-8), 5.12(1H, quint, 6.6, H-14), 4.98(1H, brs, H-18), 4.97(1H, brs, H-18), 4.70(2H, m, H-16), 4.16(1H, dd, 12, 6.9, H-1), 3.91(1H, dd, 12, 12, H-1), 2.91(1H, brq, 6.2, H-4), 2.48(1H, m, H-9), 2.34(1H, m, H-10), 2.20(1H, dt, 12.7, 3.6, H-10), 2.17-1.94(8H, m, H-4a, -6, -9, -11a, -12, -13), 1.65-1.56(2H, m, H-5, -12), 1.68(3H, brs, H-17), 1.09(1H, m, H-5); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125 MHz) δ 208.45(C, C-15), 175.43(C, C-3), 152.93(C, C-11), 135.85(C, C-7), 123.88(CH, C-8), 112.14(CH_2 , C-18), 89.09(CH, C-14), 75.40(CH_2 , C-16), 70.57(CH_2 , C-1), 49.80(CH, C-11a), 44.91(CH, C-4), 41.13(CH, C-4a), 39.84(CH_2 , C-6), 35.55(CH_2 , C-10), 30.18(CH_2 , C-5), 26.25(CH_2 , C-12), 25.86(CH_2 , C-13), 24.99(CH_2 , C-9), 16.46(CH_3 , C-17).

91K-4-2도 acalycixeniolide B와 동일한 조건하에서 15 mg이 분리되었으며 HPLC 의 peak retention time은 7% ethylacetate/ hexane에서 21.5분, 10% ethylacetate/hexane에서 16분에서 분리되었다. 이 물질의 분광 데이터는 다음과 같다. ^1H NMR(CDCl_3 , 500 MHz) δ 5.34(1H, brt, 7.8, H-8), 5.11(1H, tt, 7.1, 1.5, H-14), 4.98(1H, brs, H-18), 4.97(1H, brs, H-18), 4.15(1H, dd, 11.8, 6.8, H-1), 3.89(1H, dd, 11.8, 11.8, H-1), 2.82(1H, brq, 6.5, H-4), 2.48(1H, m, H-9), 2.33(1H, m, H-10), 2.20(1H, dt, 12.2, 3.4, H-10), 2.13-2.04(8H, H-4a, -6, -9, -11a, -12, -13), 2.02-1.93(m), 1.71(3H, s, H-16), 1.69(3H, s, H-17), 1.62(3H, s, H-19), 1.60-1.49(2H, m, H-5, -12), 1.07(1H, m, H-5); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125 MHz) δ 175.72(C, C-3), 153.05(C, C-11), 135.57(C, C-7), 132.82(C, C-15), 123.41(CH, C-14), 123.84(CH, C-8), 112.02(CH_2 , C-18), 70.57(CH_2 , C-1), 49.76(CH, C-11a), 44.64(CH, C-4), 41.13(CH, C-4a), 39.88(CH_2 , C-6), 35.54(CH_2 , C-10), 30.08(CH_2 , C-5), 26.91(CH_2 , C-12), 25.75(CH_3 , C-16), 25.33(CH_2 , C-13), 24.98(CH_2 , C-9), 17.87(CH_3 , C-19), 16.3(CH_3 , C-17).

3.4.3. 91K-2로부터 천연물의 추출 및 분리

3.4.3.1. 시료의 채집 및 유기물질의 추출과 고속감압크로마토그래피

산호 *Acabaria undulata*의 채집은 1991년 10월 거문도 연안 서도와 대삼부도 근해 수심 25-30 m에서 SCUBA 다이빙에 의해서 이루어 졌으며 이 시료는 채집해 오는 즉시 응달에서 완전히 말려 냉동고에 보관되었다. 냉동보관중인 시료(건조무게량: 3 kg)를 잘게 잘라 methylene chloride 1.5 L를 가하여 실온에서 48시간 방치한 후에 그 용액을 걸러내었으며 이 과정을 다시 반복한 후에 얻어진 전체 유기추출물의 양은 6.66 g이 얻어 졌다.

이 추출물을 진공 flash chromatography로 분리하기 위해 n-hexane과 ethylacetate의 혼합액(10% ethylacetate/n-hexane으로부터 100% ethylacetate까지), methanol을 순서대로 용출시켰다. 이렇게 얻어진 11개의 분획(fraction, fx)을 각각 용매를 제거한 후 ¹H NMR을 측정한 결과 흥미 있는 2차 대사물질이 fx-6(60% ethylacetate/n-hexane: 240 mg), fx-7(70% ethylacetate/n-hexane: 70 mg), fx-8(80% ethylacetate/n-hexane: 20 mg), fx-9(90% ethylacetate/n-hexane: 120 mg) 및 fx-10(100% ethylacetate: 240 mg)에 포함되어 있음이 밝혀 졌다. 기타의 fx에는 여러 해양생물에 흔히 존재하는 포화 및 불포화 지방, 지방산 및 steroids가 포함되었다.

3.4.3.2. Sphingosine 유도체들의 분리

고속감압 크로마토그래피로 분리한 fx 6 - 9를 methanol에 녹이고 녹지 않는 물질은 spartan filter(Aldrich)로 여과한 후에 이 용액을 HPLC를 이용하여 분리한 결과 순수한 sphingosine 유도체들을 얻었다(YMC C₁₈ reversed phase column, RI detector, 2 ml/min). 용출용매는 methanol을 사용하였으며 erythro-docosasphinga-

4,8,10-trienine(=91K-2-2), erythro-docosasphinga-4,8-dienine(=91K-2-1), branched erythro-docosasphinga-4,8-dienine(=91K-2-3), erythro-docosasphinga-4-enine(=91K-2-4)이 retention time 27.2, 30.1, 33.4, 35.8 분에서 각각 7.7 mg, 54.6 mg, 12.3 mg, 11.4 mg으로 분리되었다.

erythro-Docosasphinga-4,8,10-trienine(=91K-2-2): ^1H NMR(CDCl_3 , 500 MHz) δ 6.24(1H, brd, 7.3, NH), 5.99(2H, m, H-9, -10), 5.77(1H, dt, 15.4, 6.1, H-5), 5.59(1H, m, H-11), 5.53(1H, dd, 15.4, 6.1, H-4), 5.52(1H, m, H-8), 4.32(1H, brdd, 6.8, 4.4, H-3), 3.93(1H, brdd, 11.2, 3.4, H-1), 3.90(1H, m, H-2), 3.69(1H, brdd, 11.2, 3.2, H-1), 2.78(1H, brs, OH), 2.65(1H, brs, OH), 2.22(2H, t, 7.6, H-2'), 2.16(4H, m, H-6, -7), 2.04(2H, brq, 7.2, H-12), 1.63(2H, quint, 7.2, H-3'), 1.25(34H, m), 0.87(6H, t, 6.8, H-22, -12'); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125 MHz) δ 173.92(C), 133.26(CH), 133.10(CH), 131.16(CH), 130.74(CH), 129.96(CH), 129.50(CH), 74.58(CH), 62.50(CH_2), 54.38(CH), 36.80(CH_2), 32.61(CH_2), 32.05(CH_2), 32.01(CH_2), 31.92(CH_2), 31.82(CH_2), 29.70(CH_2) x 3, 29.66(CH_2) x 2, 29.63(CH_2), 29.50(CH_2), 29.39(CH_2), 29.36(CH_2) x 2, 29.29(CH_2), 29.19(CH_2), 29.18(CH_2), 25.75(CH_2), 22.69(CH_2), 22.66(CH_2), 14.12(CH_3), 14.10(CH_3).

erythro-Docosasphinga-4,8-dienine(=91K-2-2): ^1H NMR(CDCl_3 , 500 MHz) δ 6.29(1H, brd, 7.3, NH), 5.77(1H, dt, 15.4, 6.1, H-5), 5.53(1H, dd, 15.4, 6.8, H-4), 5.43(1H, dt, 15.4, 6.4, H-9), 5.36(1H, dt, 15.4, 6.4, H-8), 4.32(1H, brdd, 6.8, 4.4, H-3), 3.95(1H, brdd, 11.2, 3.4, H-1), 3.90(1H, m, H-2), 3.69(1H, brdd, 11.2, 3.2, H-1), 2.98(1H, brs, OH), 2.92(1H, brs, OH), 2.22(2H, t, 7.6, H-2'), 2.11(2H, m, H-6), 2.07(2H, m, H-7), 1.96(2H, brq, 6.8, H-10), 1.61(2H, quint, 7.2, H-3'), 1.24(38H, m), 0.87(6H, t, 6.6, H-22, H-12'); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125 MHz) δ 174.11(C), 133.38(CH), 131.26(CH), 129.09(CH), 128.95(CH), 74.26(CH), 62.29(CH_2), 54.54(CH), 36.80(CH_2), 32.58(CH_2), 32.34(CH_2), 32.14(CH_2), 31.90(CH_2), 31.88(CH_2), 29.68(CH_2) x 3, 29.66(CH_2), 29.64(CH_2) x 2, 29.58(CH_2) x

2, 29.51(CH₂) x 2, 29.37(CH₂), 29.34(CH₂), 29.32(CH₂), 29.29(CH₂), 29.20(CH₂), 25.75(CH₂), 22.66(CH₂) x 2, 14.09(CH₃) x 2.

Branched *erythro*-docosasphinga-4,8-dienine(=91K-2-3): ¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 6.27(1H, brd, 7.3, NH), 5.79(1H, dt, 15.1, 6.6, H-5), 5.55(1H, dd, 15.4, 6.6, H-4), 5.43(1H, dt, 15.6, 6.0, H-9), 5.36(1H, dt, 15.4, 5.4, H-8), 4.32(1H, brdd, 6.8, 4.4, H-3), 3.95(1H, brdd, 11.2, 3.4, H-1), 3.91(1H, m, H-2), 3.70(1H, brdd, 11.2, 3.2, H-1), 2.23(2H, t, 7.6, H-2'), 2.13(2H, m, H-6), 2.06(2H, m, H-7), 1.98(2H, brq, 6.8, H-10), 1.64(2H, quint, 7.3, H-3'), 1.51(1H, m, H-21), 1.25(36H, m), 0.88(3H, t, 7.3, H-12'), 0.86(6H, d, 6.8, H-22); ¹³C NMR(CDCl₃, 125 MHz) δ 173.94(C), 133.49(CH), 131.31(CH), 129.11(CH), 128.93(CH), 74.61(CH), 62.44(CH₂), 54.41(CH), 39.04(CH₂), 36.84(CH₂), 32.60(CH₂), 32.33(CH₂), 32.13(CH₂), 31.93(CH₂), 29.90(CH₂), 29.70(CH₂)x3, 29.67(CH₂)x2, 29.65(CH₂)x2, 29.60(CH₂), 29.57(CH₂), 29.52(CH₂), 29.37(CH₂)x2, 29.29(CH₂), 29.22(CH₂), 27.97(CH), 27.41(CH₂), 25.77(CH₂), 22.70(CH₃), 22.67(CH₃), 14.14(CH₃).

erythro-Docosasphinga-4-enine(=91K-2-4): ¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 6.24(1H, brd, 7.3, NH), 5.78(1H, dt, 15.5, 6.6, H-5), 5.53(1H, dd, 15.5, 6.8, H-4), 4.31(1H, brdd, 6.8, 4.4, H-3), 3.95(1H, brdd, 11.2, 3.9, H-1), 3.90(1H, m, H-2), 3.70(1H, brdd, 11.2, 3.2, H-1), 2.68(2H, brs, OH), 2.22(2H, t, 7.8, H-2'), 2.05(2H, brq, 7.3, H-6), 1.63(2H, quint, 7.2, H-3'), 1.25(46H, m), 0.87(6H, t, 6.6, H-22, -12'); ¹³C NMR(CDCl₃, 125 MHz) δ 173.91(C), 134.30(CH), 128.77(CH), 74.68(CH), 62.51(CH₂), 54.46(CH), 36.84(CH₂), 32.28(CH₂), 32.14(CH₂), 31.92(CH₂) x 2, 29.70(CH₂) x 3, 29.69(CH₂) x 3, 29.66(CH₂) x 2, 29.65(CH₂), 29.64(CH₂) x 2, 29.51(CH₂), 29.49(CH₂), 29.36(CH₂) x 2, 29.29(CH₂), 29.22(CH₂), 29.12(CH₂), 25.76(CH₂) x 2, 22.69(CH₂) x 2, 14.12(CH₃) x 2.

3.4.3.3. 91K-2-5(=erythro-Docosasphinga-4,8-dienine acetone ketal)의 합성

erythro-Docosasphinga-4,8-dienine(3.4 mg), PPTS(3.2 mg), 2,2-dimethoxypropane(0.5 ml)를 아세톤 20 ml에 녹이고 8시간 동안 환류시킨 후에 트라이에틸아민 0.3 ml를 넣고 1시간 동안 다시 환류하였다. 용매를 진공증발기와 진공라인을 이용해서 제거한 후에 30% ethylacetate/hexane를 용출용매로 사용하여 HPLC(YMC silica column, RI detector, 3 ml/min)로 분리한 결과 retention time 13분에서 순수하게 분리되었다.

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3, 500 \text{ MHz}) \delta$ 5.76(1H, dt, 15.5, 6.4, H-5), 5.45(1H, dd, 15.5, 6.6, H-4), 5.40(1H, m, H-9), 5.37(1H, m, H-8), 5.13(1H, brd, 8.3, NH), 4.08(1H, dd, 9.4, 7.3, H-3), 4.00(1H, dd, 11.2, 4.9, H-1), 3.83(1H, m, H-2), 3.65(1H, dd, 11.2, 9.4, H-1), 2.12(2H, t, 7.8, H-2'), 2.11(2H, m, H-6), 2.06(2H, m, H-7), 1.96(2H, brq, 6.5, H-10), 1.56(2H, quint, m, H-3'), 1.49(3H, s), 1.42(3H, s), 1.26(38H, m), 0.88(6H, t, 6.8, H-22, -12').

3.4.3.4. Polyhydroxylated steroids의 분리

고속감압 크로마토그래피로 분리한 fx-10을 methanol에 녹이고 spartan filter(Aldrich)로 여과한 후에 이 용액을 HPLC를 이용하여 분리한 결과(YMC C₁₈ reversed phase column, RI detector, 2 ml/min) retention time 16.2 분에서 13.6 mg의 polyhydroxylated steroids의 혼합물이 얻어 졌다. 이 상태에서는 더 이상 순수한 물질을 분리하는 것이 불가능하였기 때문에 acetylation 반응을 시킨 후에 HPLC로 분리를 시도하였다. 10 ml round-bottomed flask에 이 혼합물 6 mg, acetic anhydride 0.3 ml, pyridine 0.5 ml를 넣고 4시간 동안 실온(25 °C)에서 교반시켰다. 반응의 유무를 확인하기 위하여 TLC를 이용하여 측정된 결과 출발물질의 spot은 보이지 않고 새

로운 생성물의 spot이 강하게 나타 났다.

Rotavapor와 vacuum pump를 이용하여 acetic anhydride와 pyridine를 제거하고 acetonitrile을 용출용매로 사용하여 HPLC(YMC C₁₈ reversed phase column, RI detector, 2.5 ml/min)로 분리한 결과 retention time 25.5분에서 미량의 3,6-diacetoxy-7,8-epoxy-5-hydroxyergosta-22-ene(=91k-2-6)와 27.2분에서 소량의 3,6-diacetoxy-7,8-epoxy-5-hydroxycholestane(=91k-2-7)이 얻어 졌다.

3,6-Diacetoxy-7,8-epoxy-5-hydroxyergosta-22-ene(=91k-2-6): ¹H NMR(C₆D₆, 500 MHz) δ 5.54(1H, m, H-3), 5.29(1H, brd, 1.0, H-6), 5.24(1H, dd, 15.6, 7.8, H-23), 5.15(1H, dd, 15.6, 8.3, H-22), 4.76(1H, d, 2.4, OH), 3.55(1H, s, H-7), 2.41(1H, ddd, 12.7, 5.1, 1.7, H-4α), 1.99(1H, m, H-2α), 1.87-1.96(3H, m, H-9, -20, -24), 1.70-1.77(3H, m, H-1α, -12, -14), 1.72(3H, s, OAc), 1.69(3H, s, OAc), 1.66(1H, m, H-4β), 1.59(1H, m, H-16), 1.48(1H, m, H-25), 1.26-1.39(5H, m, H-2β, -11, -15), 1.12-1.19(2H, m, H-1β, -16), 1.03(3H, d, 6.8, H-21), 1.00(3H, d, 6.8, H-28), 1.00(1H, m, H-17), 0.89(6H, d, 6.8, H-26, -27), 0.86(1H, m, H-12), 0.74(3H, s, H-19), 0.48(3H, s, H-18); ¹³C NMR(C₆D₆, 125 MHz) δ 170.89(C, OAc), 169.49(C, OAc), 135.80(CH, C-22), 132.72(CH, C-23), 76.91(C, C-5), 70.22(CH, C-6), 69.95(CH, C-3), 66.20(C, C-8), 62.44(CH, C-7), 55.76(CH, C-17), 53.84(CH, C-14), 43.46(CH, C-24), 42.40(C, C-13), 41.77(C, C-10), 40.66(CH, C-20), 40.09(CH, C-9), 38.14(CH₂, C-12), 36.19(CH₂, C-4), 33.55(CH, C-25), 32.18(CH₂, C-1), 27.96(CH₂, C-16), 27.41(CH₂, C-2), 22.09(CH₂, C-15), 21.32(CH₃, C-21), 21.29(CH₂, C-11), 20.98(CH₃, OAc), 20.37(CH₃, OAc), 20.36(CH₃, C-26/-27), 19.88(CH₃, C-26/-27), 18.90(CH₃, C-19), 18.20(CH₃, C-28), 12.61(CH₃, C-18); ¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 5.35(1H, dd, 15.1, 7.6, H-22), 5.12(1H, dd, 15.1, 8.3, H-23), 5.11(1H, d, 1.0, H-6), 4.52(1H, d, 2.4, OH), 3.55(1H, s, H-7), 2.20(3H, s), 2.10(1H, dd, 11.2, 8.2), 1.95-2.06(2H, m), 1.99(3H, s), 1.86-1.92(2H, m), 1.82(1H, m, H-24), 1.64-1.81(3H, m), 1.37-1.60(3H, m), 1.23-1.36(7H, m),

1.12(1H, m), 1.09(3H, s, H-19), 1.01(3H, d, 6.3, H-21), 0.90(3H, d, 6.8, H-24), 0.86(1H, m), 0.82(6H, d, 6.8, H-26, H-27), 0.74(3H, s, H-18); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125 MHz) δ 171.44(C, OAc), 170.24(C, OAc), 135.17(CH, C-22), 132.58(CH, C-23), 76.52(C, C-5), 70.09(CH, C-3*), 69.64(CH, C-6*), 66.64(C, C-8), 62.32(CH, C-7), 55.53(CH), 53.75(CH), 43.01(CH), 42.39(C), 41.53(C), 40.30(CH), 39.93(CH), 37.95(CH_2), 35.33(CH_2), 33.14(CH), 31.82(CH_2), 29.70(CH_2), 27.59(CH_2), 26.81(CH_2), 21.98(CH_2), 21.36(CH_3), 21.21(CH_2), 21.13(CH_3) x 2, 21.10(CH_3), 20.11(CH_3), 19.64(CH_3), 12.67(CH_3).

3,6-Diacetoxy-7,8-epoxy-5-hydroxycholestane(=91k-2-7): ^1H NMR(C_6D_6 , 500 MHz) δ 5.55(1H, m, H-3), 5.29(1H, brd, 1.0, H-6), 4.77(1H, d, 2.4, OH), 3.55(1H, s, H-7), 2.42(1H, ddd, 12.5, 5.1, 1.7, H-4 α), 1.99(1H, m, H-2 α), 1.89(1H, dd, 11.5, 8.1, H-9), 1.79(1H, dt, 12.7, 3.7, H-12), 1.72(3H, s, OAc), 1.71(3H, s, OAc), 1.65(1H, m, H-4 β), 1.76-1.62(4H, m, H-1 α , -14, -16), 1.40-1.25(9H, m, H-2 β , -11, -15), 1.24-1.17(3H, m, H-16), 1.13(1H, dt, 13.5, 3.5, H-1 β), 1.07-0.96(4H, m), 0.94(3H, d, 2.4, H-21), 0.93(6H, d, 2.4, H-26, -27), 0.93-0.89(2H, m, H-12), 0.74(3H, s, H-19), 0.47(3H, s, H-18); ^{13}C NMR (C_6D_6 , 125 MHz) δ 170.91(C, OAc), 169.52(C, OAc), 76.91(C, C-5), 70.25(CH, C-6), 69.97 (CH, C-3), 66.25(C, C-8), 62.45(CH, C-7), 56.04(CH, C-17), 53.75(CH, C-14), 42.53(C, C-13), 41.75(C, C-10), 40.08(CH, C-9), 39.88(CH_2 , C-24), 38.24(CH_2 , C-12), 36.32(CH_2 , C-22), 36.29(CH, C-20), 36.16(CH_2 , C-4), 32.17(CH_2 , C-1), 28.38(CH, C-25), 27.46(CH_2 , C-16), 27.40(CH_2 , C-2), 24.28(CH_2 , C-23), 23.00(CH_3 , C-26/-27), 22.74(CH_3 , C-27/-26), 22.08(CH_2 , C-15), 21.28(CH_2 , C-11), 20.98(OAc), 20.37(OAc), 19.00(CH_3 , C-21), 18.89(CH_3 , C-19), 12.43(CH_3 , C-18).

Fig 3-13 Carbon NMR spectrum of compound 91K-2-1

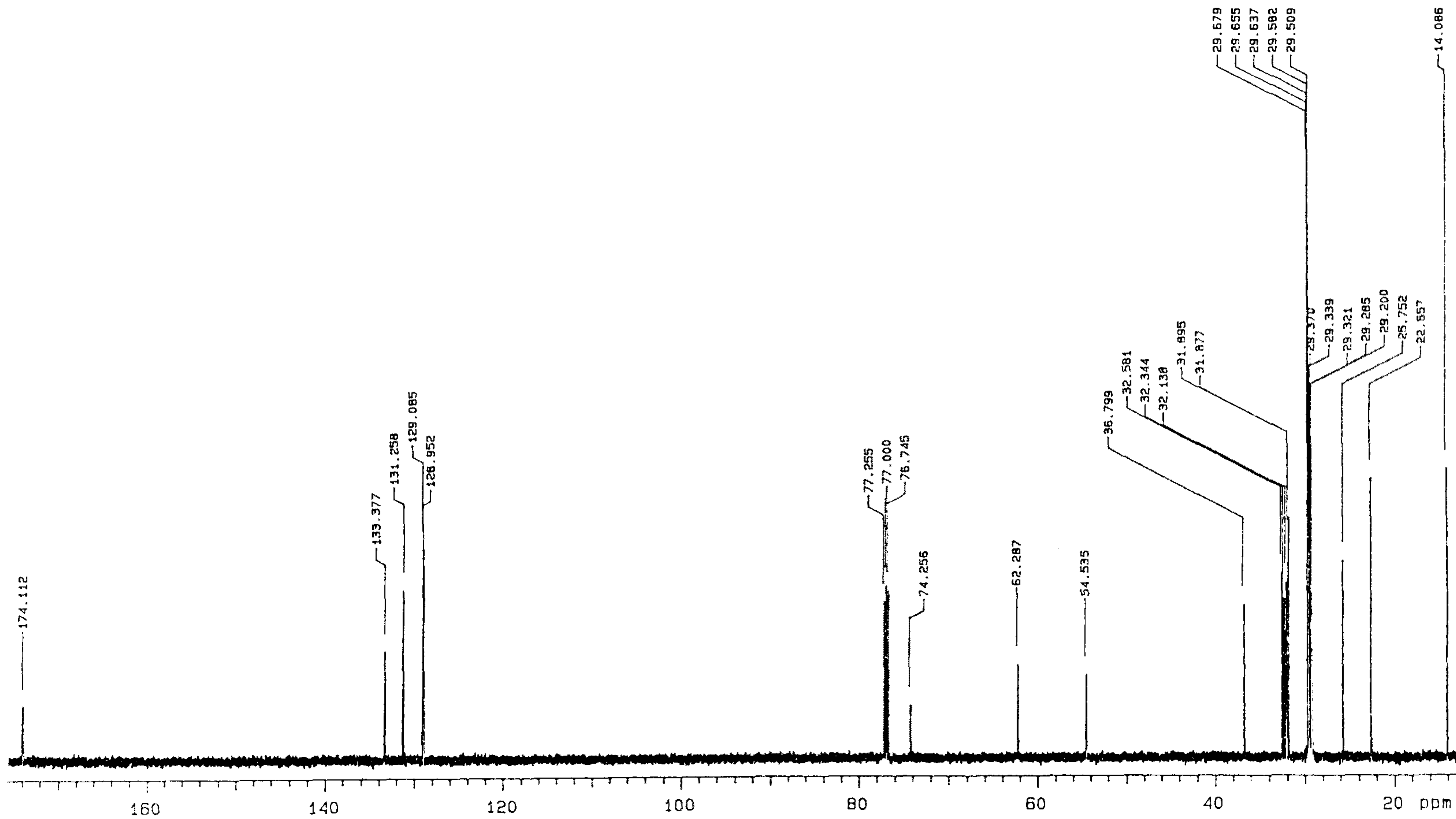


Fig 3-14 Proton NMR spectrum of compound 91K-2-1.

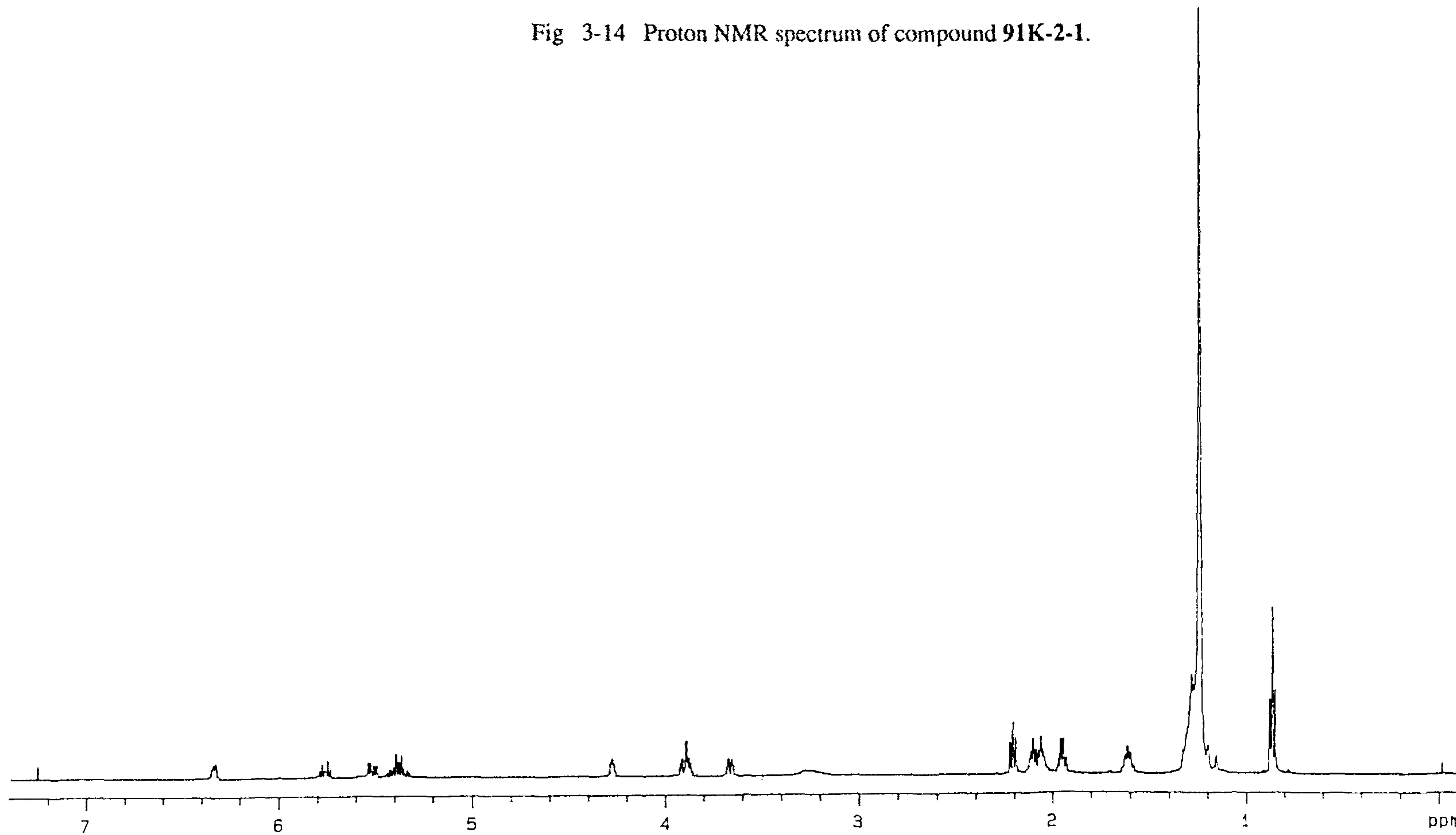


Fig 3-15 Proton COSY NMR spectrum of compound 91K-2-1

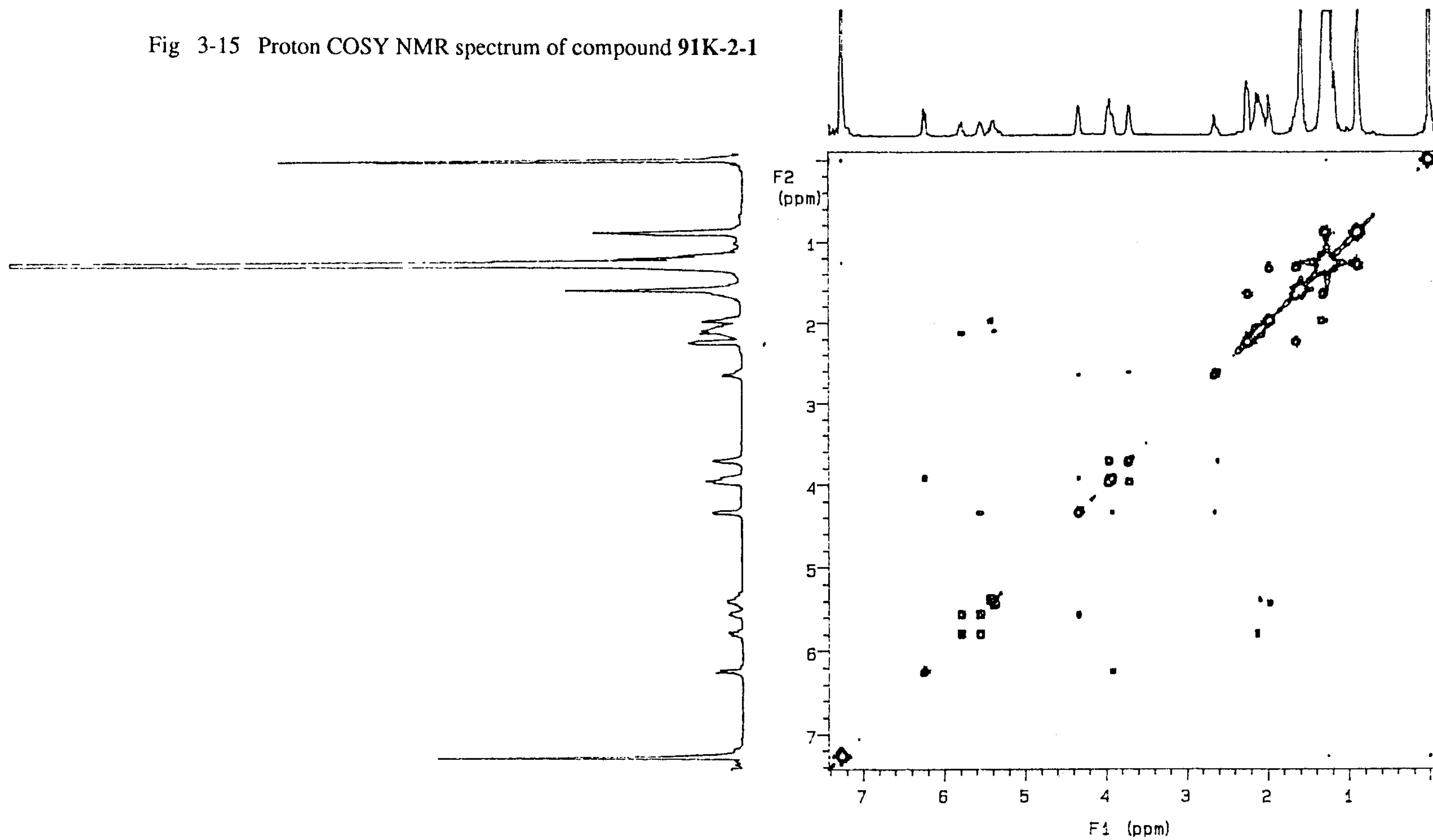


Fig 3-16 Proton NMR spectrum of compound 91K-2-5

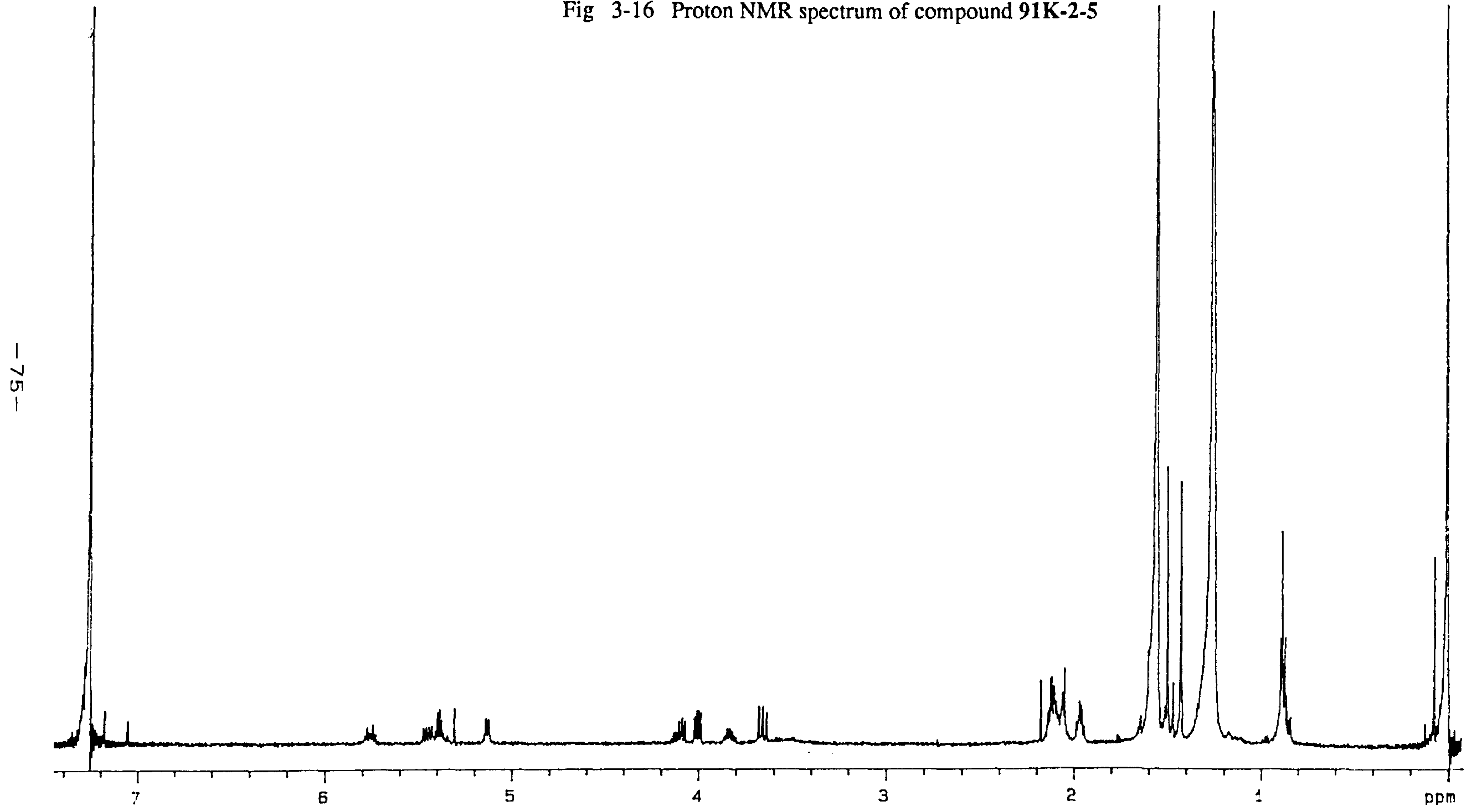


Fig 3-17 Carbon NMR spectrum of compound 91K-2-2

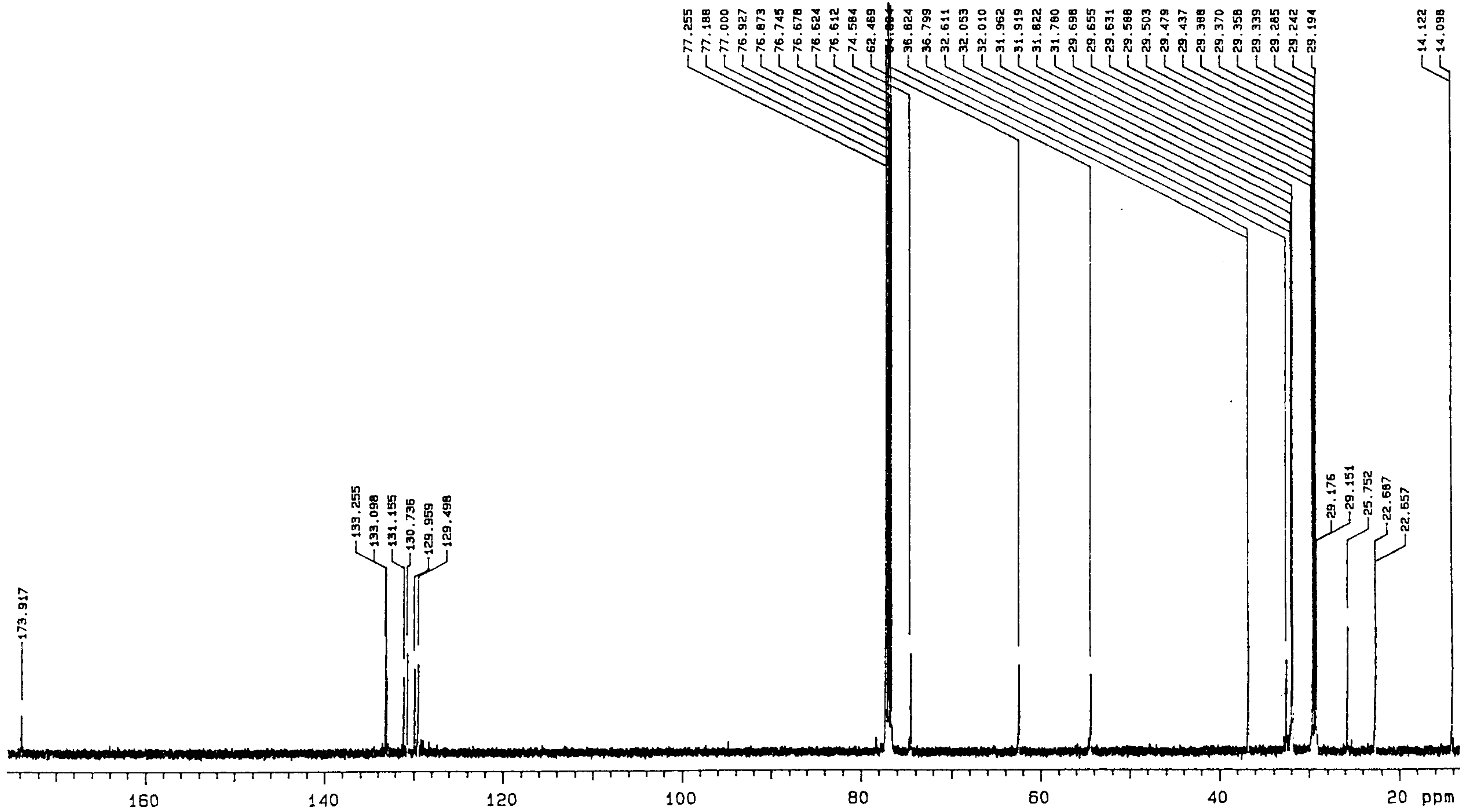


Fig. 3-18. Proton NMR spectrum of compound 91K-2-2.

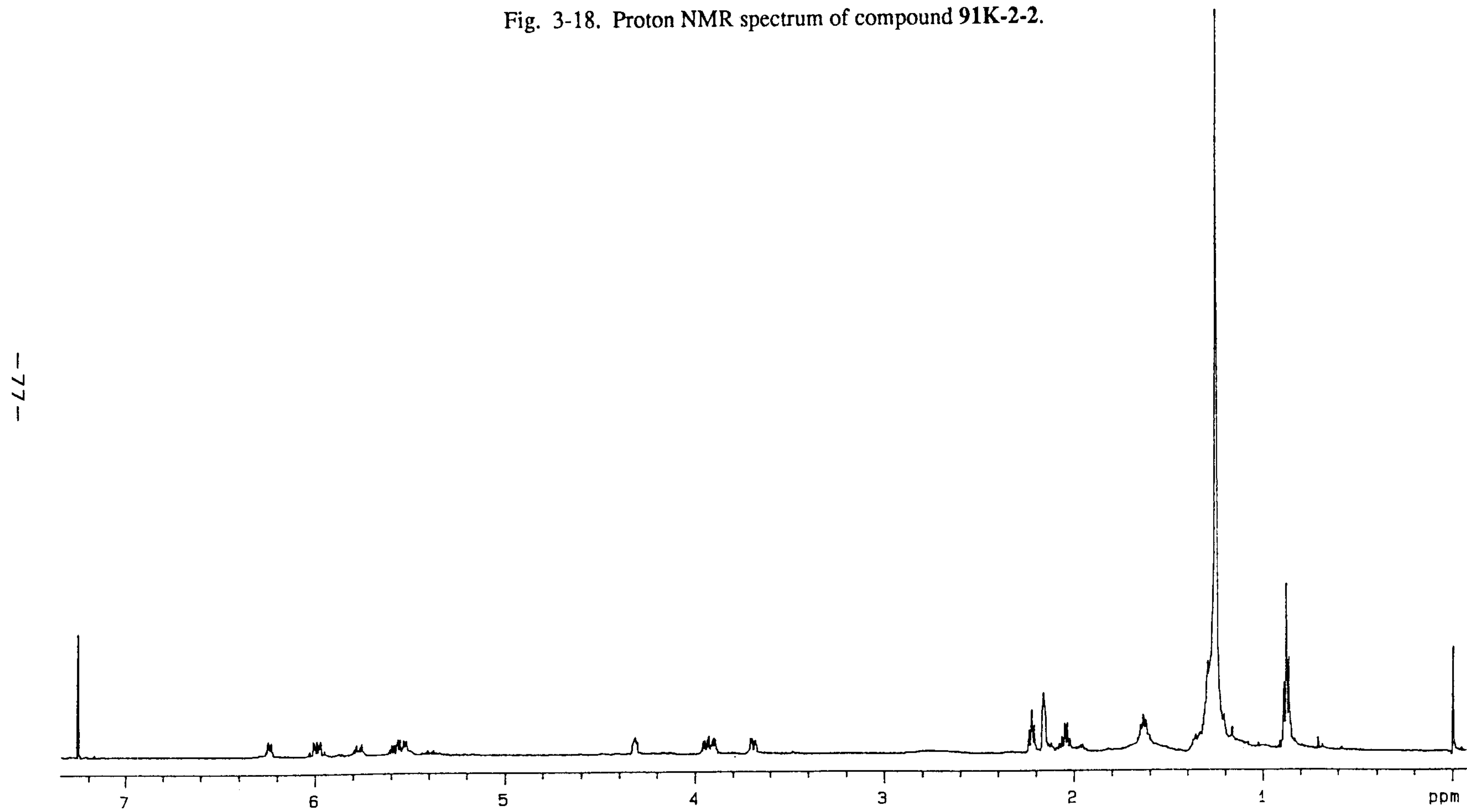


Fig 3-19 Carbon NMR spectrum of compound 91K-2-3

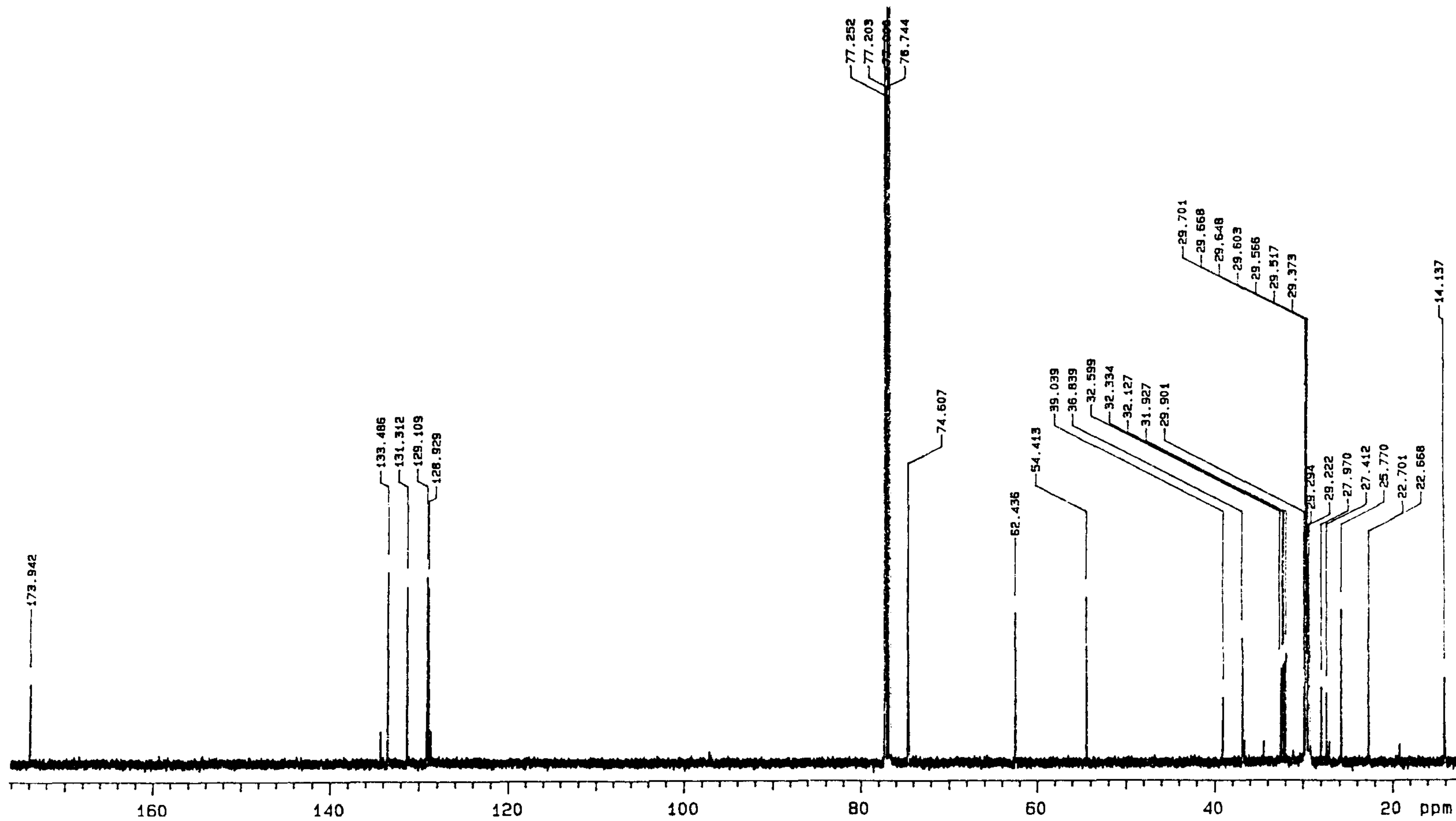


Fig 3-20 Proton NMR spectrum of compound 91K-2-3.

-79-

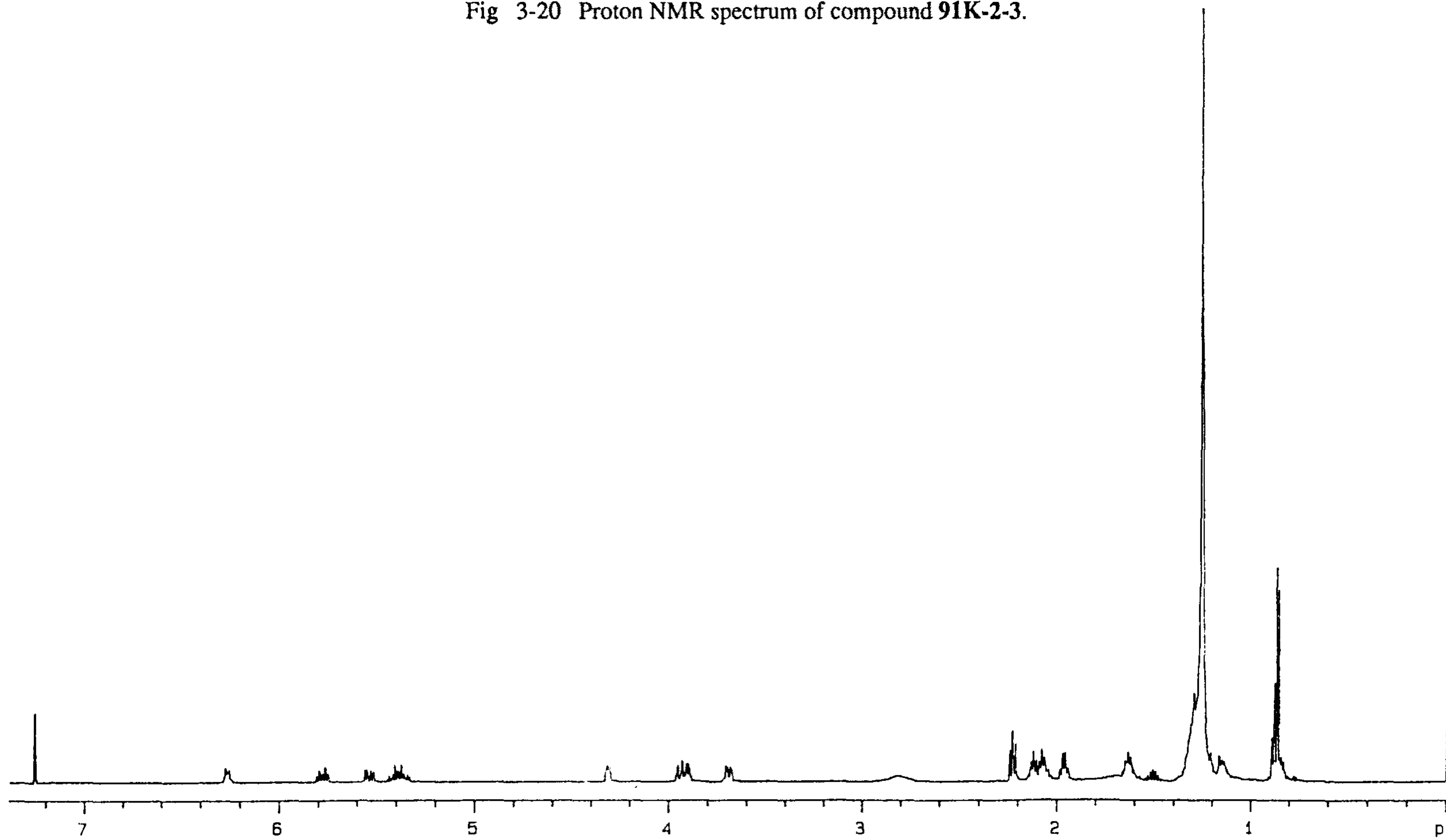


Fig 3-21 Carbon NMR spectrum of compound 91K-2-4

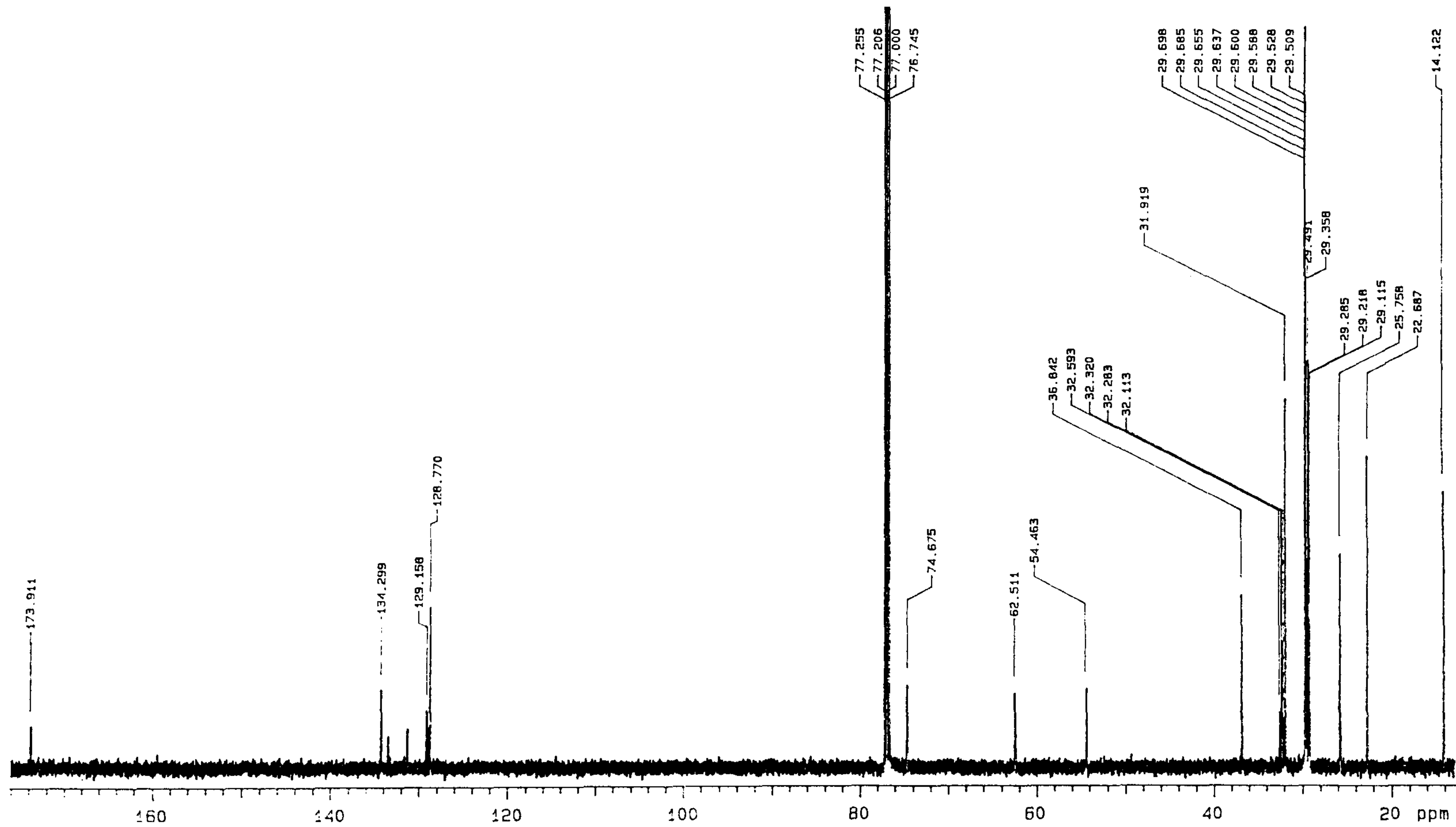


Fig 3-22 Proton NMR spectrum of compound 91K-2-4

-81-

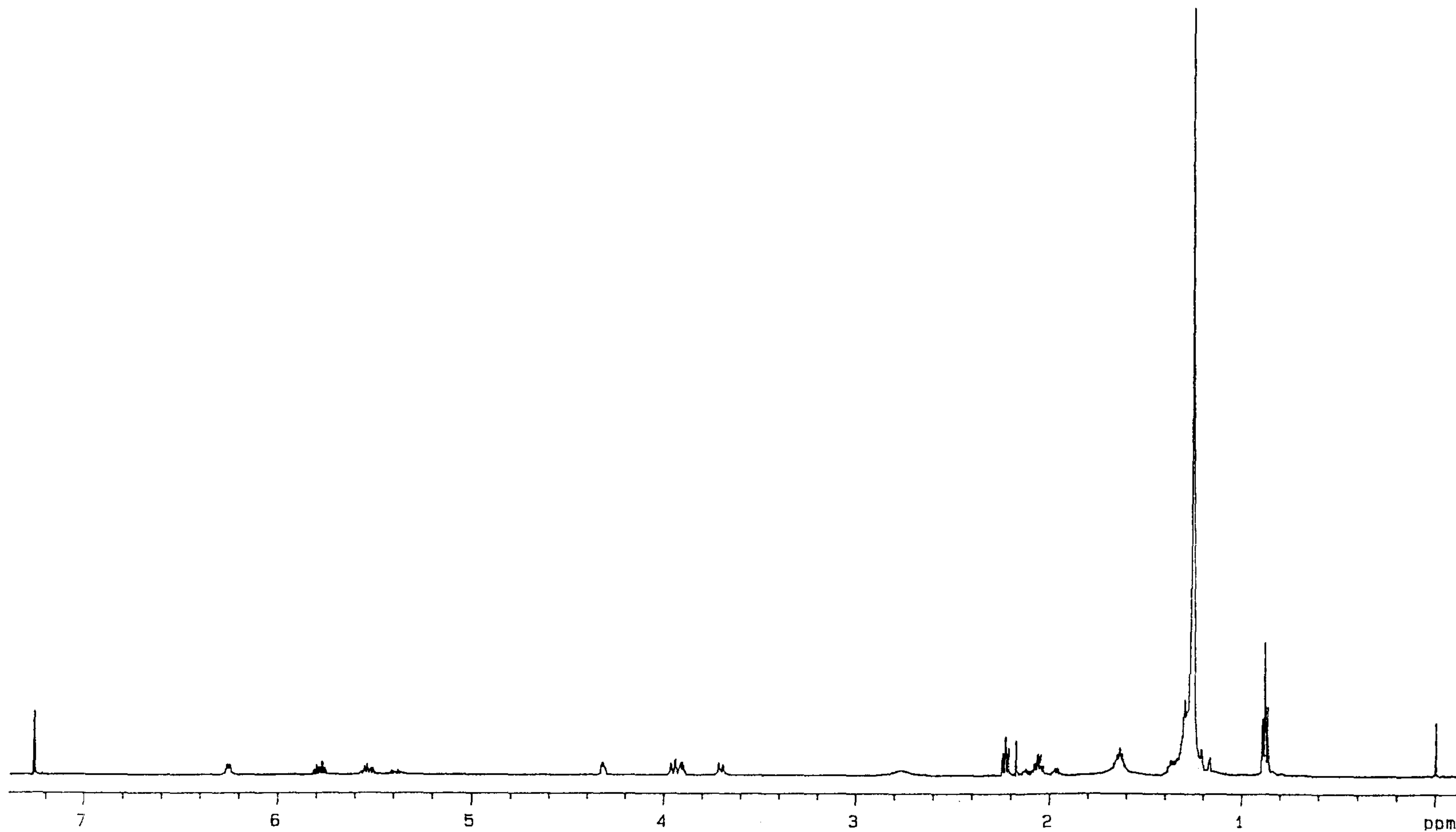


Fig 3-23 Proton NMR spectrum of mixture of polyhydroxy steroids isolated from the gorgonian *Acabaria undulata*

--82--

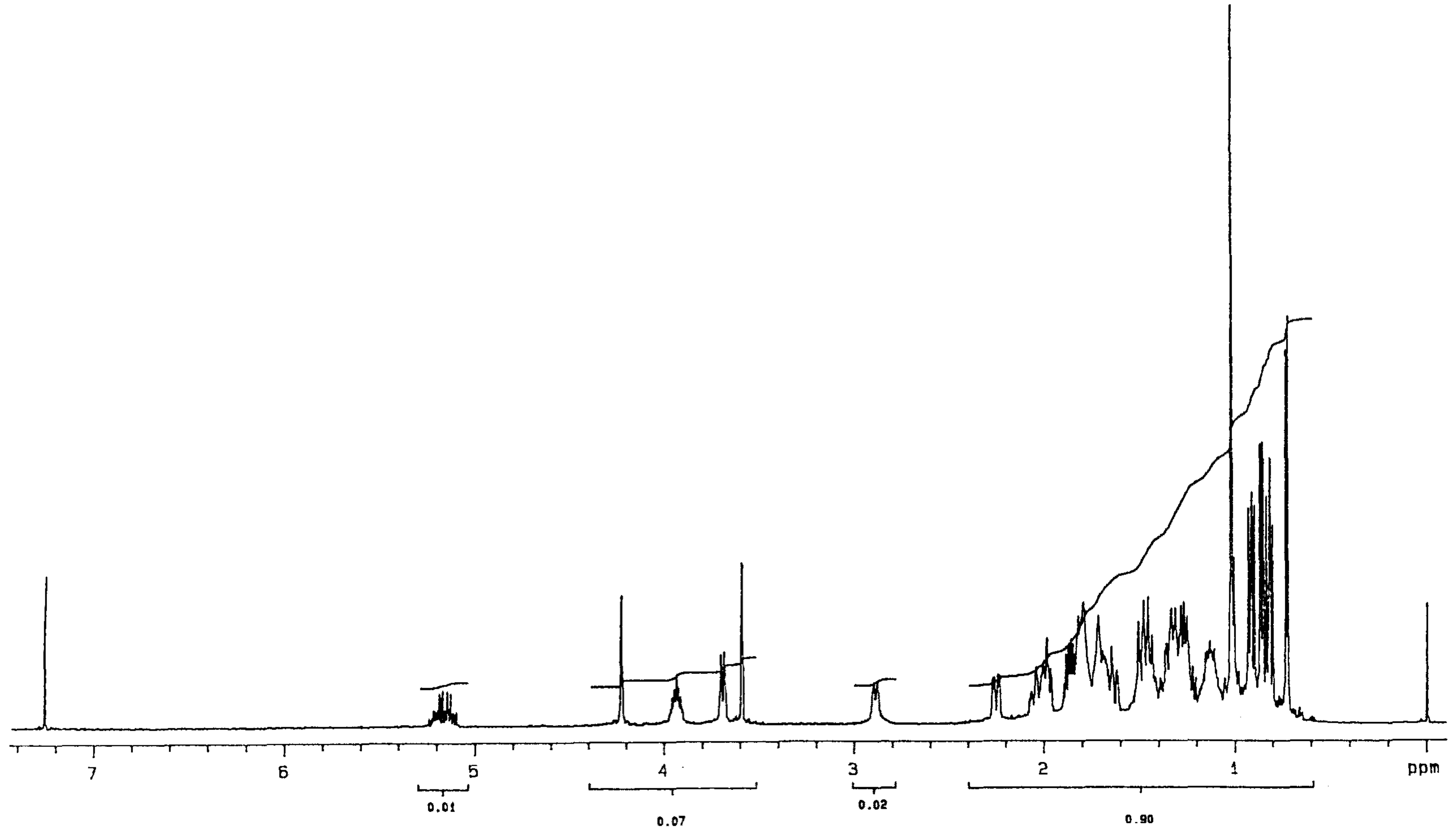


Fig 3-24 Carbon NMR spectrum of mixture of polyhydroxy steroids isolated from the gorgonian *Acabaria undulata*

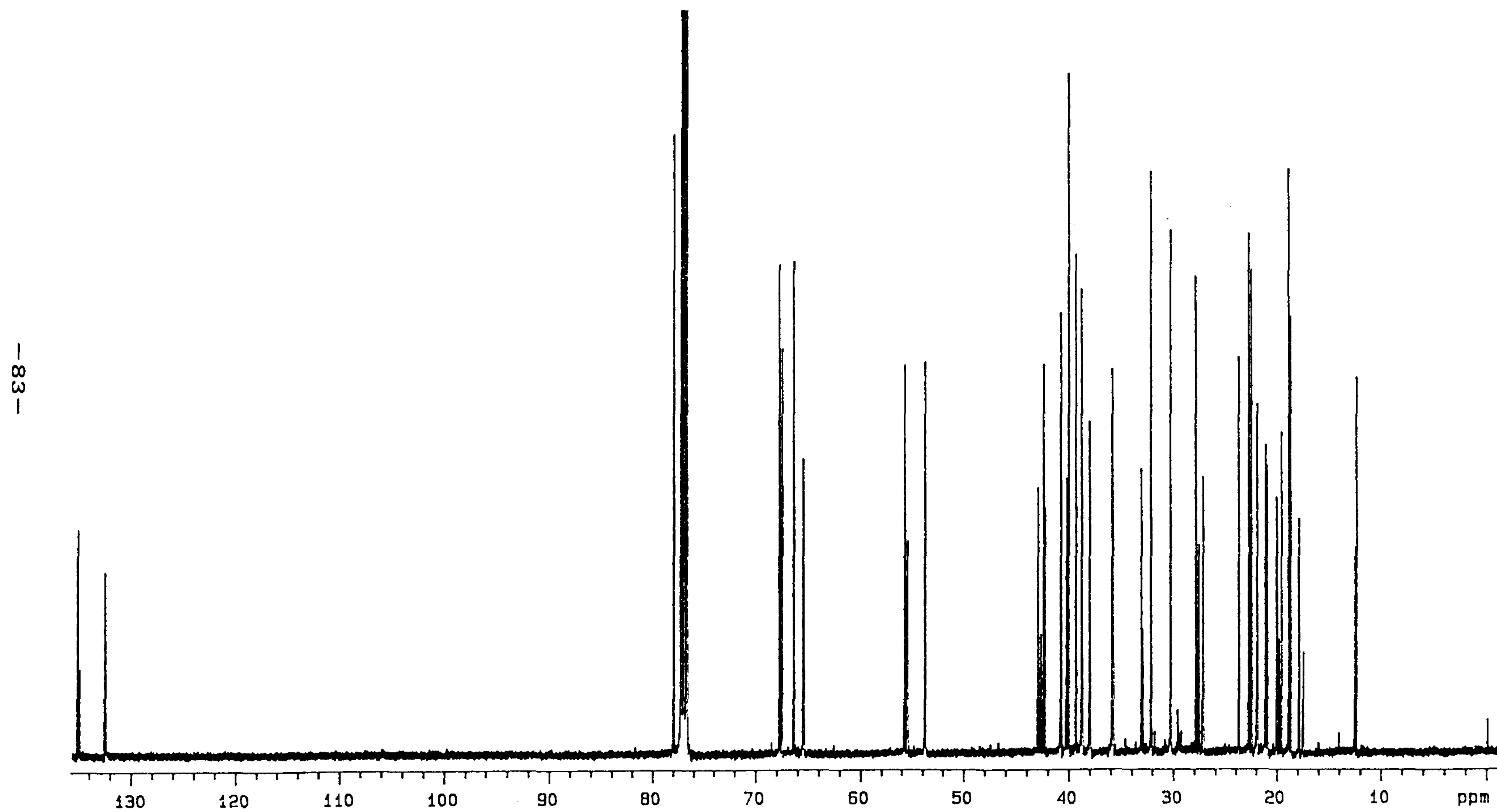


Fig 3-25 Carbon NMR spectrum of compound 91K-2-6

91K-2-10-1012 5-3 2 2-0 0 00 F-42
 OBSERVE C13
 FREQUENCY 125.697 MHz
 SPECTRAL WIDTH 27991.6 Hz
 ACQUISITION TIME 1.301 sec
 RELAXATION DELAY 2.000 sec
 PULSE WIDTH 16.0 usec
 AMBIENT TEMPERATURE
 NO. REPETITIONS 5440
 DECOUPLE H1
 HIGH POWER 45
 DECOUPLER CONTINUOUS ON
 WALTZ-16 MODULATED
 DOUBLE PRECISION ACQUISITION
 DATA PROCESSING
 LINE BROADENING 0.5 Hz
 FT 9 25 181078
 TOTAL ACQUISITION TIME 1.301

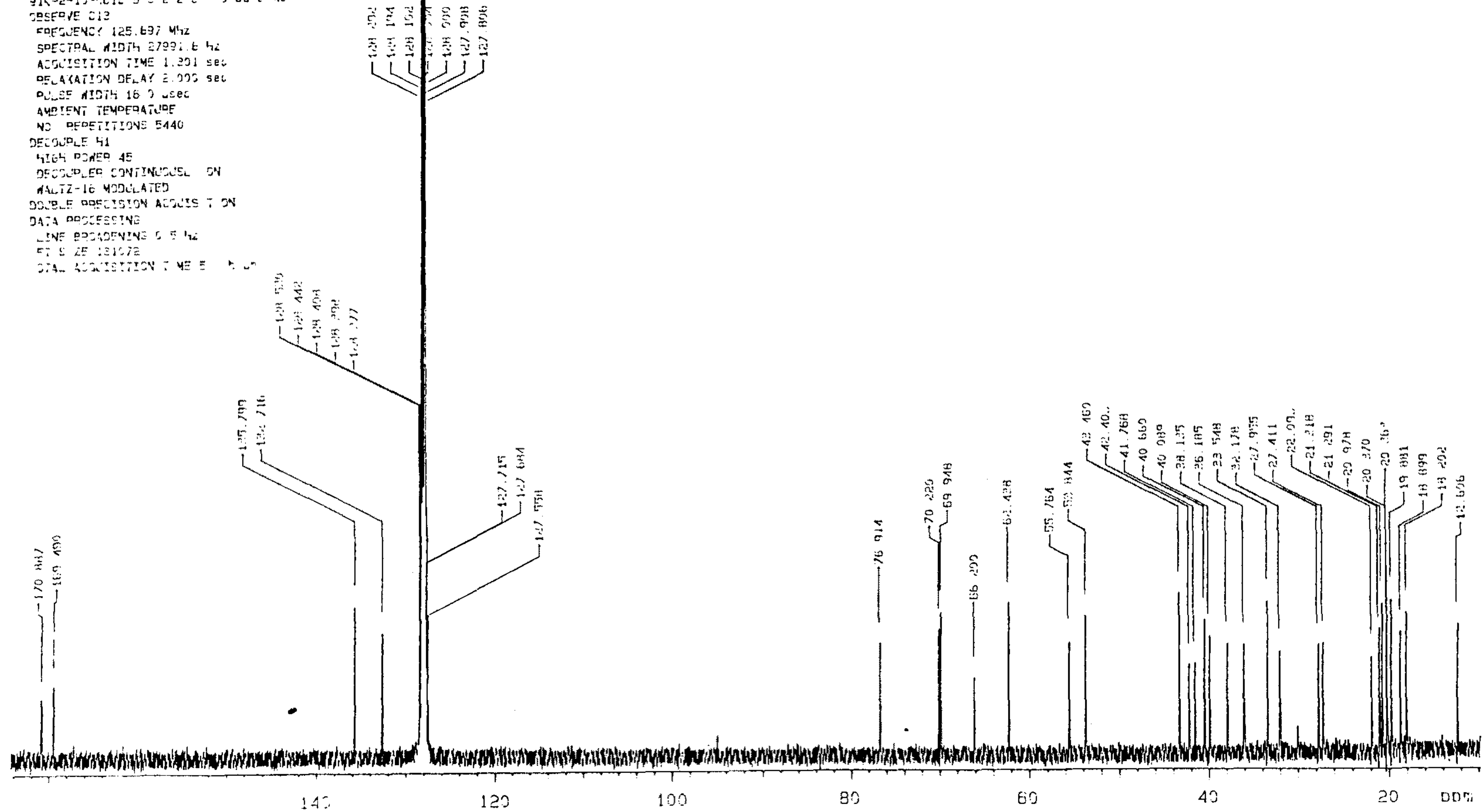
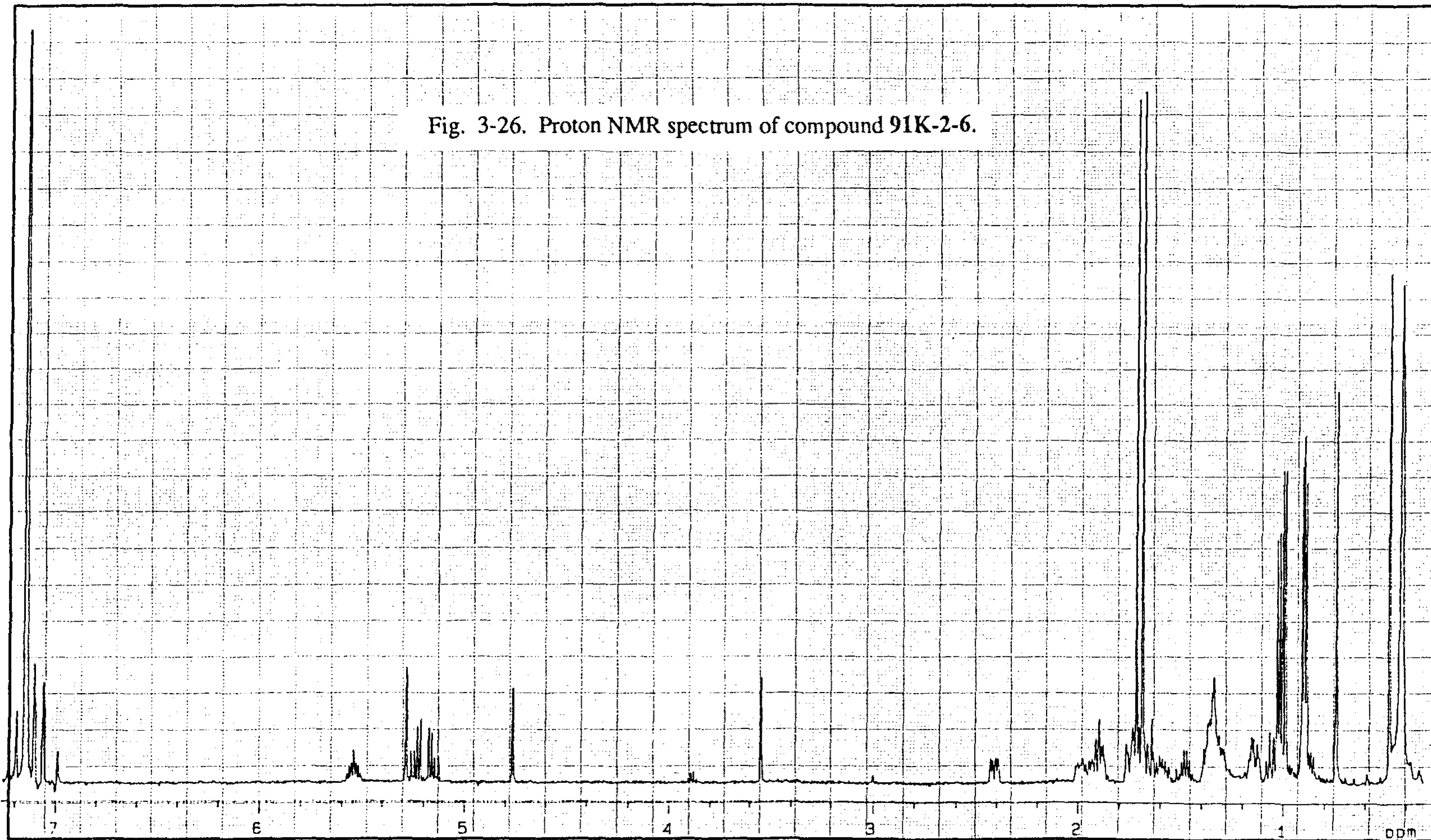


Fig. 3-26. Proton NMR spectrum of compound 91K-2-6.



OBSERVE

Nucleus	H1	Freq	499.84	MHz
Spec. Width	8000.00	Hz		
Acq. Time	1.88	sec		
Pulse Width	6.00	μsec		
Offset	0	Hz		
Delay	0	sec		
Transmits	0			
			32.00	

DECUPLE

Nucleus	H1	Offset	0	Hz
Mode	hnn	Power	200.00	dB
Modulation Mode	c	Freq	not used	Hz
Pulse Width	not used	Power Mode	not used	

PLOT/PROCESSING

FN	not used	K	RE	sec	CD	sec
LB	not used	Hz	AF	sec	OOD	
Width	not used	Hz/ppm	Start	Hz/ppm		
Reference	3473.85		156.19			

EXPERIMENT

Pulse Sequence	SAMPLE	
Tube	0.0 s2pu1	mm
Temp		°C
Solvent	not used	

Number _____


File _____

Date _____

XL _____

Jun 29 93

500



varian

Fig 3-27 Proton coupled carbon NMR spectrum of polyhydroxy steroids (60 - 80 ppm region)

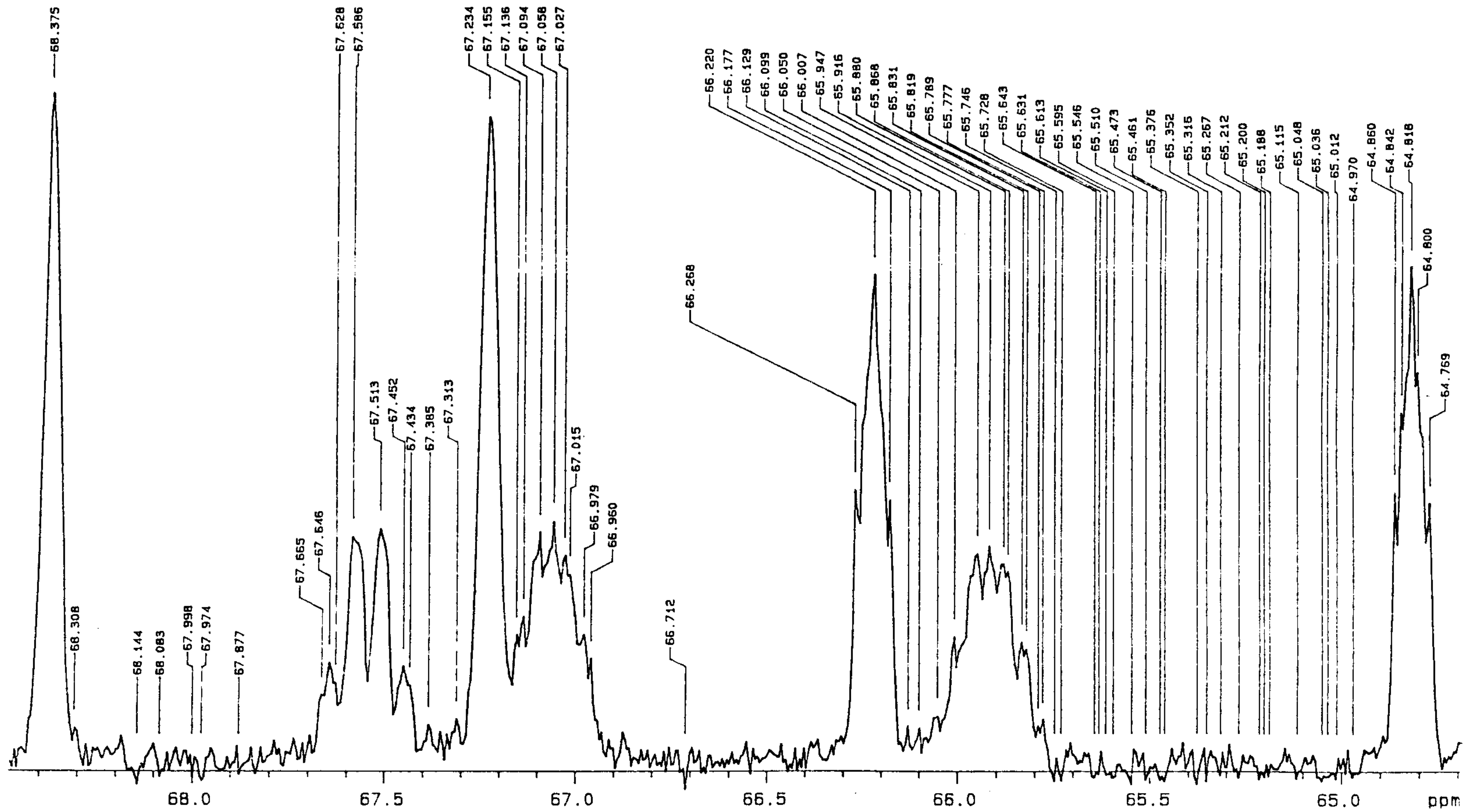


Fig 3-29 HMQC spectrum of compound 91K-2-6

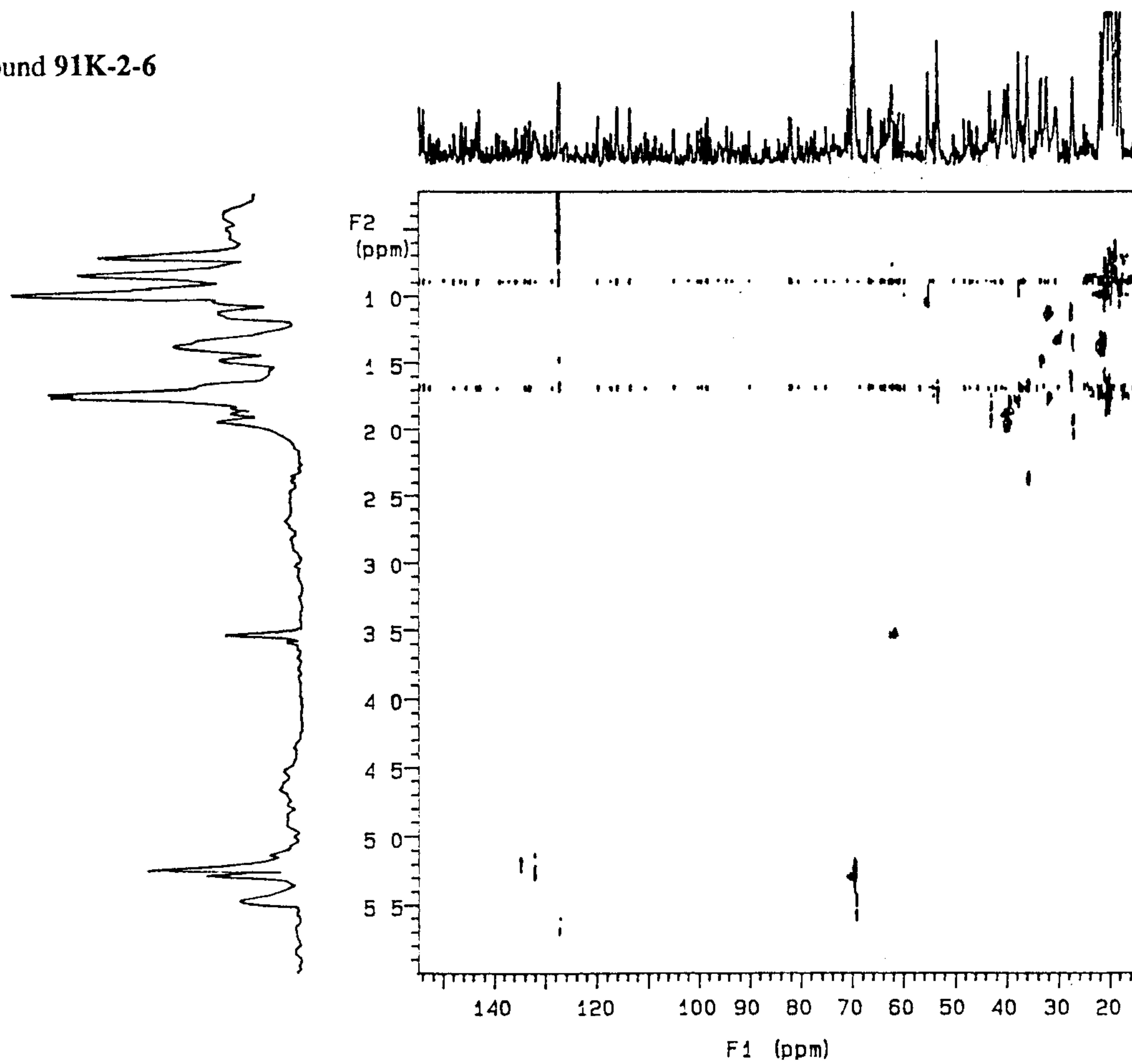


Fig 3-30 HMBC spectrum of compound 91K-2-6

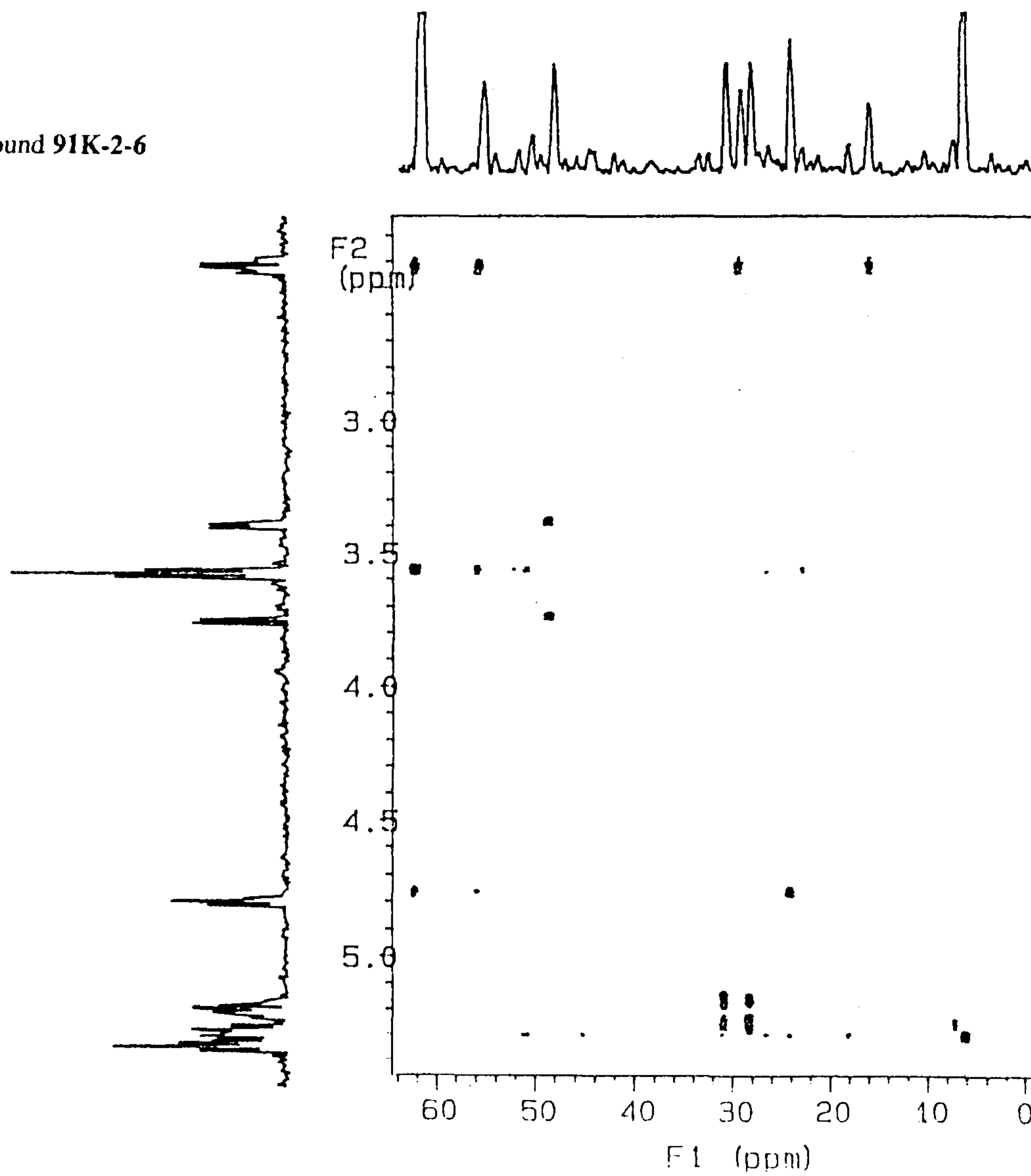


Fig 3-31 Carbon NMR spectrum of compound 91K-2-7

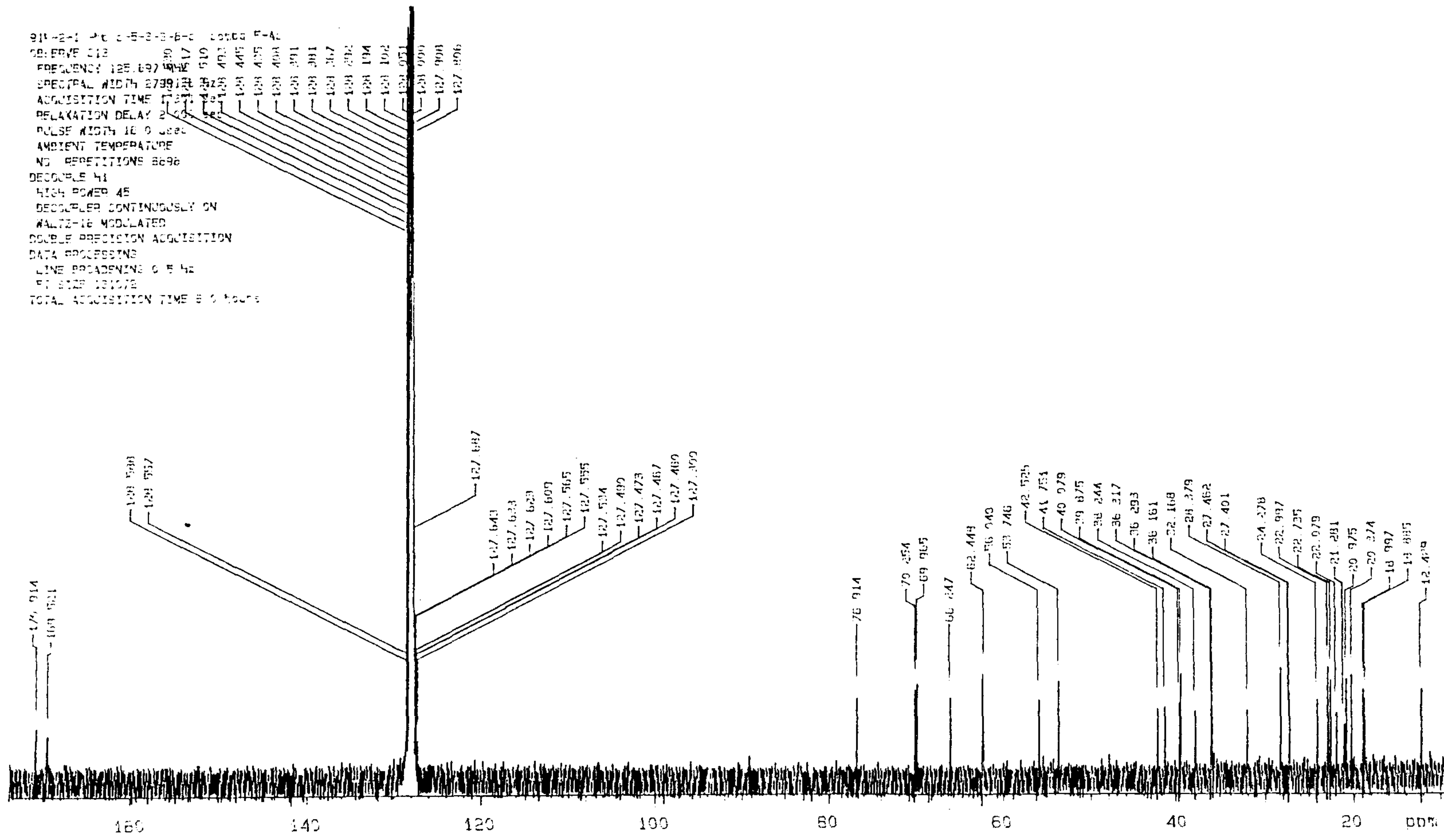
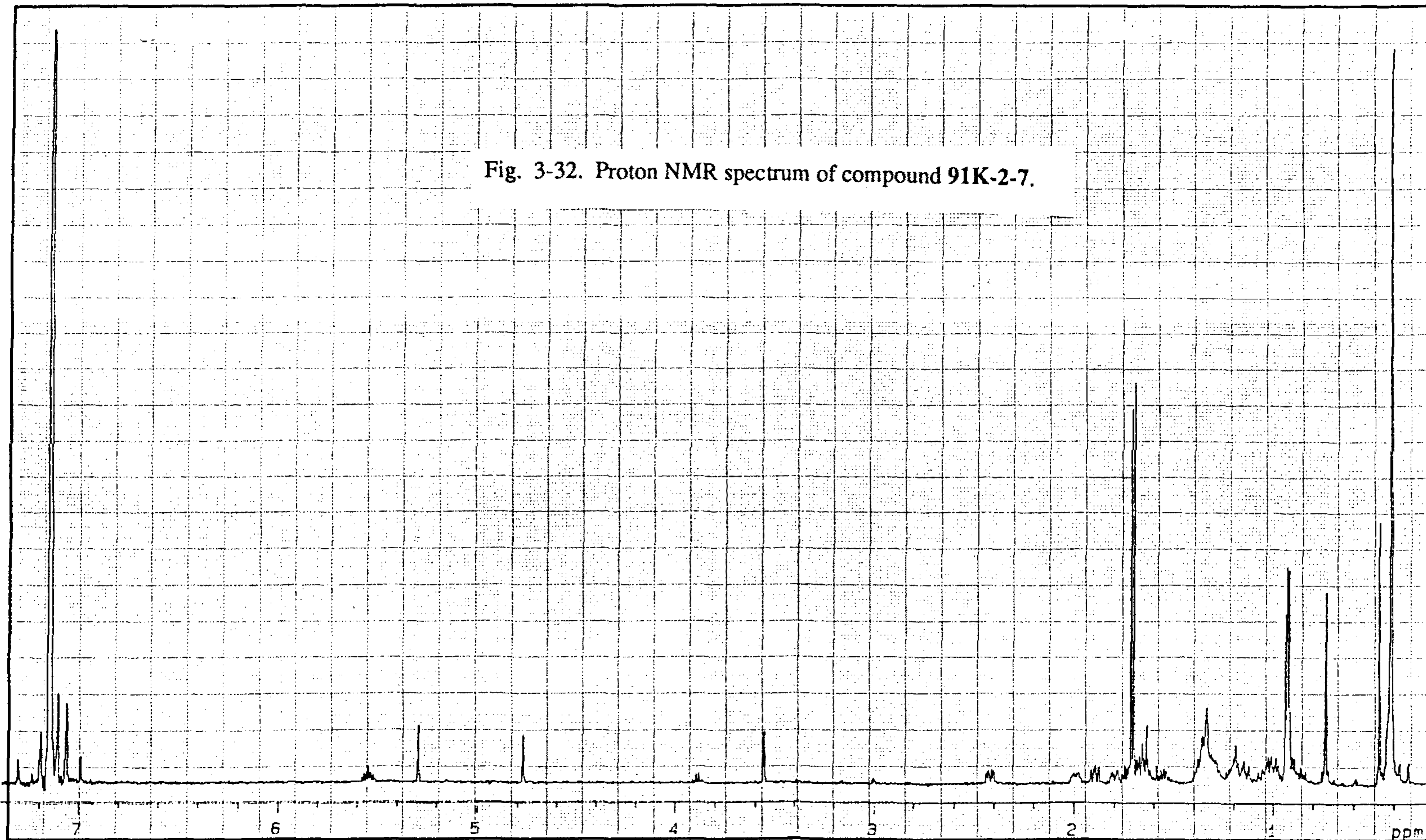


Fig. 3-32. Proton NMR spectrum of compound 91K-2-7.



OBSERVE

Nucleus	H1	Freq	499.84	MHz
Spec. Width	8000.00	Hz		
Acq. Time	1.89	sec		
Pulse Width	6.00	μsec		
Offset	0	sec		
Delay	32.00	sec		
Transmits	0			

DECOUPLE

Nucleus	H1	Offset	0	Hz
Mode	not used	Power	200.00	db
Modulation Mode	not used	Freq	not used	Hz
Pulse Width	not used	Power Mode	not used	

PLOT/PROCESSING

FN	not used	K	RE	sec	CD	sec
LB	not used	Hz	AF	sec	CCD	
Width	3586.16	Hz/ppm	Start	108.82	Hz/ppm	
Reference						

EXPERIMENT

Pulse Sequence	SAMPLE	
Tube O.D.	2pul	mm
Temp	not used	°C
Solvent	CDC13	

Number

File

Date

xl Jun 29 93 V:

500

여 백

제 4 장 Soft corals의 대사물질

4.1. 연구의 배경

강장동물의 천연물에 대한 전반적인 특징에 대하여는 3.1 연구의 배경에서 간략히 언급하였다. 본 장에서 다루어진 soft corals(order Alcyonacea)은 gorgonians(order Gorgonacea)와 더불어 강장동물의 천연물을 양분하고 있다. 이들 두 종류의 생물은 분류학적으로 대단히 가까운만큼 천연물에 있어서도 뚜렷한 차이를 발견하기 어렵다. 초기에는 서로 다른 탄소골격을 가진 물질들이 많이 발견되었기 때문에 soft corals과 gorgonians의 대사물질을 다른 category에 포함시켰으나 연구가 진행됨에 따라 동일한 골격의 물질이 두 종류의 생물에서 함께 발견되고 심지어는 같은 물질이 발견된 예도 적지 않아 최근에는 soft corals과 gorgonians의 대사물질을 함께 다루는 것이 일반적인 경향이다(Faulkner, 1988; Shin, 1989).

특이한 점은 동일한 탄소골격을 가진 물질들이 soft corals와 gorgonians에서 함께 발견될 때 동일한 asymmetric carbon centers의 absolute stereochemistry가 정반대인 경우가 많다는 점이다. 잘 알려진 예로서 강장동물의 대표적인 diterpenes인 cembranes의 경우에는 C-1 chiral centers의 absolute stereochemistry가 soft corals에서 추출된 물질은 모두 R configuration인데 비하여 gorgonians로부터 분리된 물질들은 모두 S configuration을 이루고 있다(Shin, 1989).

이와같이 soft corals와 gorgonians 사이에는 천연물에 있어서 어느 정도의 경계가 있는 것도 사실이며 이 문제에 대한 확실한 결론을 얻기 위해서는 더욱 많은 천연물 화학 및 생화학적 연구결과가 필요할 것이다.

4.2. *Alcyonium gracillimum*의 대사물질

Soft coral *Alcyonium gracillimum*은 제주도 남부 해역에서 흔히 볼 수 있는 저서 생물이다. 본 연구에서도 세 차례에 걸친 서귀포 채집에서 동일한 생물을 매번 발견하였다. 냉동보관한 약 4 kg의 시료로부터 dichloromethane으로 추출한 후 유기추출액에 대한 여러 번의 silica vacuum flash chromatography와 silica 및 C₁₈ reversed phase HPLC에 의하여 7개의 천연물이 분리되었다. 이들의 구조는 아래에 설명한 바와 같이 분광학적 방법에 의하여 C₂₁ pregnanes와 C₂₇ steroids로 결정되었다(Fig. 4-1).

주 대사물질인 91-18-1은 ¹³C NMR에서 21개의 signals를 나타내었다(Fig. 4-2). δ 200 ~ 110에 나타나는 5개의 signals은 chemical shifts로부터 α,β-unsaturated ketone과 terminal vinyl group으로 해석되었으며 ¹H NMR spectrum과 COSY data에서도 이에 상응하는 peak들이 발견되었다(Fig. 4-3, 4-4). 91-18-1에 존재하는 두개의 methyl중 하나의 proton chemical shifts는 매우 upfield(δ 0.63, singlet)에 위치하여 대단히 crowd된 quaternary carbon에 접합된 것을 알 수 있었다. 이와같이 하나의 methyl singlet가 upfield shift되는 현상은 steroid에서 흔히 볼 수 있는 것으로서 이 물질이 C₂₁ steroid 즉 pregnane계열의 물질임을 의미하였다.

COSY NMR과 proton decoupling 그리고 HMQC 및 HMBC의 결과를 종합하여 이 물질의 구조에 대한 보다 명확한 접근이 가능하였다(Fig. 4-4 ~ 4-6). δ 2.22 proton과의 coupling, δ 2.22, 2.37, 1.92등에 위치한 세 protons간의 coupling 및 이에 상응하는 carbon들의 δ 1.02 methyl protons와의 long-range coupling등은 모두 steroidal-1-ene-3-one의 전형적인 현상으로 해석되었다. 같은 방법으로 vinyl protons와 δ 1.98에 위치한 allylic methine proton간의 coupling 및 이 carbon의 carbon(δ 55.19)과 δ 0.63에 위치한 upfield methyl protons와의 coupling으로부터 terminal vinyl group이 steroid의 D-ring에 결합되어 있음을 밝혀내었다. B-C ring에 해당하는 나머지의 protons과 carbons도 알려진 물질들과의 비교에 의하여 모두 정확히 assign 되었다.

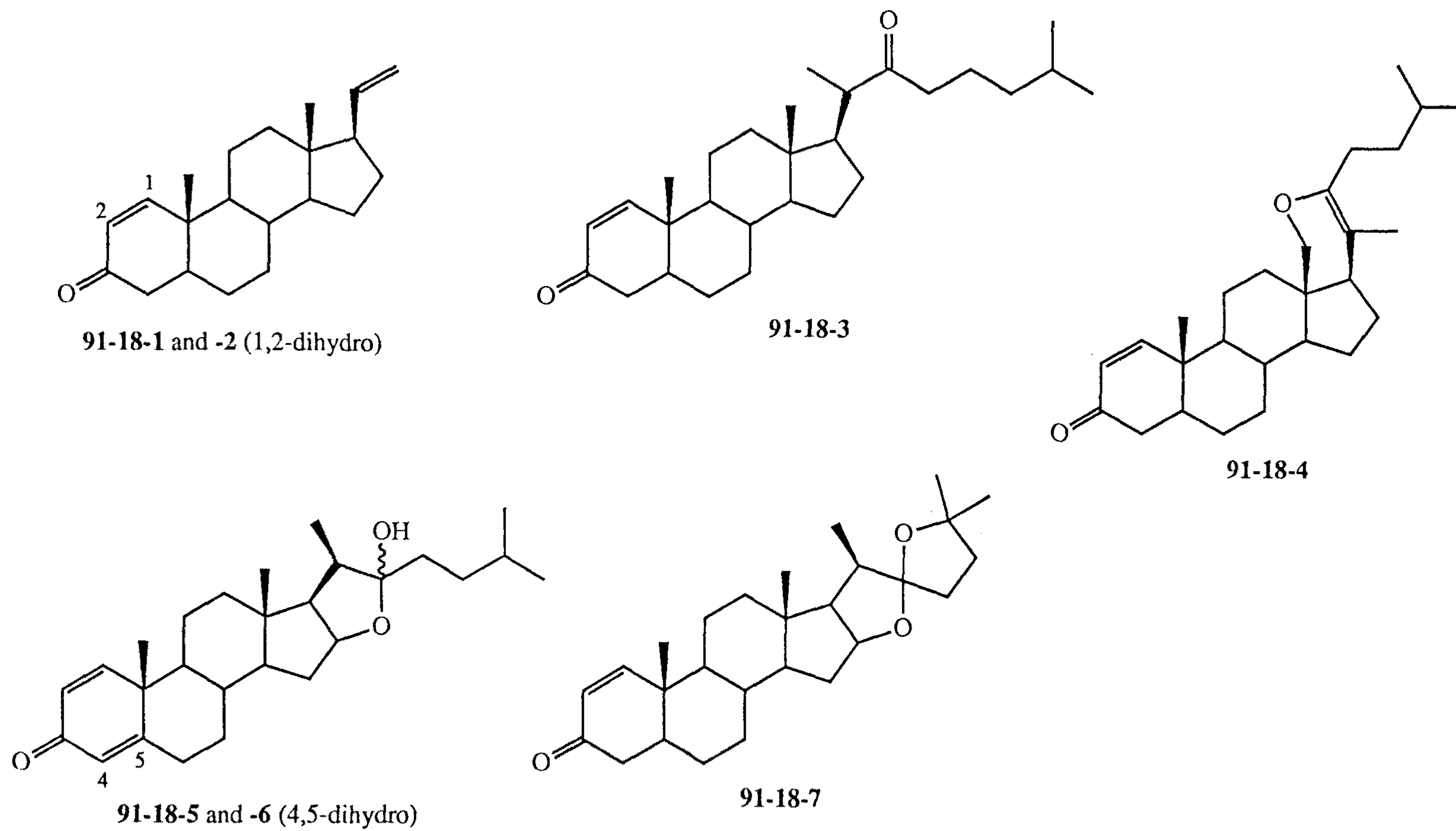


Fig 4-1 Metabolites isolated from the soft coral *Alcyonium gracillimum* (sample number 91-18)

결론적으로 91-18-1은 degraded steroids인 pregnanes에 속하는 물질이며 정확한 구조는 pregna-1,20-diene-3-one으로 결정되었다(Fig. 4-1). 이 물질의 carbons과 protons에 대한 assignments는 Table 4-1과 같다. 문헌자료에 의하면 91-18-1은 California 근해에서 채집된 분류되지 않은 soft coral의 대사물질로 보고된 바 있다 (Higgs & Faulkner, 1977).

Table 4-1. Proton and carbon NMR assignments for pregna-1,20-diene-3-one(91-18-1) and pregna-20-ene-3-one(91-18-2)^{a, b}

*	91-18-1		91-18-2	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
1	7.15(1H, d, 10.3)	158.45 d	2.02(1H, ddd, 15.1, 6.4, 2.0)	38.62 t
2	5.85(1H, d, 10.3)	127.26 d	2.38(1H, ddd, 15.6, 13.7, 6.4) 2.29(1H, brddd, 15.6, 5.4, 2.9)	38.19 t
3		200.09 s		212.15 s
4	2.37(1H, dd, 17.6, 14.2) 2.22(1H, dd, 17.6, 3.9)	40.91 t	2.27(1H, dd, 14.9, 14.7) 2.08(1H, ddd, 14.9, 3.9, 2.2)	44.73 t
5	1.92(1H, m)	44.28 d		46.78 d
6		27.55 t		28.95 t
7	0.93 - 1.05(1H, m)	31.33 t		31.82 t
8		35.70 d		35.52 d
9	0.93 - 1.05(1H, m)	50.17 d	0.94(1H, m)	54.09 d
10		39.00 s		35.77 s
11	1.49(1H, m)	20.75 t	1.42(1H, m)	21.05 t
12	1.13 - 1.06(1H, m)	37.26 t	1.10 - 0.98(1H, m)	37.44 t
13		43.61 s		43.61 s
14	1.13 - 1.06(1H, m)	55.45 d	1.10 - 0.98(1H, m)	55.44 d
15	1.20(1H, m)	24.59 t	1.19(1H, m)	24.79 t
16	1.58(1H, m)	27.11 t	1.79(1H, m)	27.20 t
17	1.98(1H, m)	55.19 d	1.96(1H, m)	55.38 d
18	0.63(3H, s)	12.97 q	0.61(3H, s)	12.94 q
19	1.02(3H, s)	12.99 q	1.01(3H, s)	11.50 q
20	5.76(1H, ddd, 17.1, 10.3, 7.3)	139.46 d	5.25(1H, ddd, 16.9, 10.7, 7.6)	139.74 d
21	4.99(1H, dd, 10.3, 1.0)	114.64 t	4.97(1H, dd, 10.7, 2.2)	114.55 t

^a ¹H NMR spectra were recorded in CDCl₃ solution at 500 MHz. Chemical shifts are reported in δ values(ppm downfield from Me₄Si). J values are reported in Hz. Assignments are aided by decoupling and COSY experiments. ^b ¹³C NMR spectra were obtained in CDCl₃ solution at 125 MHz. Carbon multiplicities were determined by DEPT experiments. Assignments for 91-18-1 are based upon HMQC and HMBC. Assignments for 91-18-2 are made by comparison with 91-18-1.

유사한 물질인 91-18-2가 동일한 HPLC조건에서 분리되었다. 이 물질의 NMR data는 주 대사물질인 91-18-1과 매우 유사하였다(Fig. 4-7, 4-8). 두 물질의 NMR data에 있어서의 중요한 차이점은 먼저 ^{13}C NMR에서 91-18-1의 C-1, -2 olefin에 해당하는 signals(δ 158.45, 127.26)이 upfield methylenes(δ 38.19, 37.44)로 치환이 되었으며 C-3 carbonyl carbon(δ 200.09)이 downfield shift(δ 212.15) 되었다는 점이다.

이에 상응하는 변화가 ^1H NMR에서도 발견되었다. C-1, -2 olefinic protons이 사라진 대신에 δ 2.0 ~ 2.4 region이 더욱 복잡하여졌다. 이와같이 모든 변화는 91-18-1의 C-1, -2 double bond가 91-18-2에서 hydration됨으로서 수용이 가능하였다. 그러므로 91-18-2는 의심할 바 없이 pregna-20-ene-3-one으로 결론지워졌다(Fig. 4-1). 이 물질의 상세한 proton 및 carbon assignments는 Table 4-1과 같다.

문헌조사 결과 91-18-2는 해양생물로부터는 현재까지 발견된 바 없음을 확인하였으며 현재 육상생물과 미생물을 포함한 보다 광범위한 천연물을 대상으로 신물질의 여부를 조사중이다.

다른 천연물인 91-18-3이 유사한 HPLC조건에서 분리되었다. 91-18-1 ~ -2와는 달리 이 물질의 ^{13}C NMR에서는 27개의 peaks가 발견되었다(Fig. 4-9). DEPT실험결과 5개의 methyl carbon signals이 발견되었는데 이들의 ^1H NMR에서의 chemical shifts와 splitting patterns은 91-18-3이 전형적인 C_{27} steroid임을 나타내었다(Fig. 4-10). 이 물질의 ^{13}C NMR과 ^1H NMR 및 COSY NMR data는 91-18-1과 유사한 점이 많았으며 특히 A-C rings에 해당하는 signals들은 거의 일치하였으며 나머지 많은 signals들도 steroids의 전형적인 모습을 보여주었다(Table 4-2). 그러므로 91-18-3은 C_{27} steroidal-1-ene-3-one임이 명확하였다.

구조결정에 있어서의 남은 문제는 이 물질에 존재하는 새로운 ketone(δ 214.83)의 위치를 결정하는 것이었다. 이 문제는 proton chemical shifts, decoupling과 COSY NMR 자료의 해석에 의하여 해결되었다(Fig. 4-11). ^1H NMR에 있어서 δ 2.6 ~ 2.0 region에 위치한 5개의 protons들은 모두 α -carbonyl protons들로 해석되었다. 그러므로 C-4 methylene을 제외한 나머지 3개의 protons들이 carbonyl group의 주위에

-CHC(=O)CH₂-의 형태로 배열되어 있는것이 분명하였다.

COSY NMR에서 C-21 methyl protons(δ 1.10, d, J=6.8 Hz)과 C-20 methine proton(δ 2.52, dq, J=10.3, 6.8 Hz)과의 coupling이 명확히 드러났으며 이 proton의 downfield chemical shift로 미루어 새로운 carbonyl group의 위치는 C-22임이 분명하였다. 이와같이 91-18-3은 C₂₇ steroidal framework에 C-1 double bond와 C-3, C-22 carbonyl groups을 가진 물질로 구조가 결정되었다(Fig. 4-1). 문헌조사결과 이 물질 역시 해양생물로부터는 보고된 바 없음을 확인하였으며 현재 육상생물과 미생물로부터 보고된 바의 여부를 조사중이다.

다른 C₂₇ steroid계의 새로운 물질인 91-18-4가 유사한 HPLC조건에서 분리되었다. 이 물질의 ¹H NMR과 ¹³C NMR 및 COSY data는 91-18-1 ~ -3과 유사한 점이 매우 많았으나 몇가지 중요한 차이점이 발견되었다(Fig. 4-12 ~ 4-14). 먼저 ¹³C NMR에서 steroid의 A ~ D rings과 side chain의 terminal에 해당하는 signals들의 chemical shifts는 거의 변화가 없었으나 C-18과 C-21에 해당하는 두개의 methyl signals중의 하나가 사라졌으며 C-20과 C-22에 해당하는 signals 또한 일반적인 위치에서 찾을 수 없었다. 그 대신에 이들 3개의 carbon이 변화된 것으로 해석되는 signals들이 δ 146.15(C), 106.04(C), 63.80(CH₂)에서 발견되었다. ¹H NMR에서도 C-18과 C-21의 두개의 methyl groups중 하나는 δ 1.59(brs)에 나타났으며 다른 하나는 isolated methylene의 형태로 δ 3.91(1H, dd, J=10.6, 1.7 Hz)과 3.31(1H, d, J=10.6 Hz)로 나타났다.

이와같은 NMR상에 있어서의 변화를 충족시킬수 있는 유일한 구조는 C-20과 -22가 double bond를 이루고 C-18 methyl기가 oxygen에 의하여 산화되며 이 oxygen atom이 C-22에 결합된, 즉 steroid의 D ring과 side chain이 결합된 6-membered cyclic enol ether로 해석되었다(Fig. 4-1). 이 구조로서만이 tetra-substituted enol ether의 특징적 ¹³C NMR chemical shifts인 δ 146.15(C)와 106.04(C) 및 isolated oxymethylene인 63.80(CH₂), 그리고 ¹H NMR상에서의 vinyl methyl의 존재등 모든 변화를 만족시킬 수 있다.

이 해석에 대한 검증은 hetero 2-dimensional NMR 실험인 HMQC와 HMBC에 나타난

C-18 methylene, C-21 vinyl methyl protons 및 vicinal carbons간의 long-range CH correlation에 의하여 확인되었다(Fig. 4-15, 4-16). 91-18-4에 대한 ^{13}C NMR assignment는 Table 4-2와 같다. 문헌조사결과 91-18-4 역시 해양생물로부터 보고된 바 없음을 확인하였으며 현재 옥상 생물과 미생물을 대상으로 신물질 여부를 조사중이다.

Table 4-2. Carbon NMR assignments for pregna-1,20-diene-3-one(91-18-1), 91-18-3, and 91-18-4^a

#	91-18-1	91-18-3	91-18-4
1	158.45 d	158.19 d	158.33 d
2	127.26 d	127.40 d	127.41 d
3	200.09 s	200.19 s	200.13 s
4	40.91 t	40.96 t	40.96 t
5	44.28 d	44.22 d	44.31 d
6	27.55 t	27.58 ^c t	27.49 t
7	31.33 t	31.23 t	31.54 t
8	35.70 d	35.63 d	35.58 d
9	50.17 d	49.88 d	50.15 d
10	39.00 s	38.94 s	39.11 s
11	20.75 t	21.28 t	20.83 t
12	37.26 t	39.58 ^b t	36.81 t
13	43.61 s	42.84 s	41.18 s
14	55.45 d	55.69 d	54.34 d
15	24.59 t	24.31 t	24.20 t
16	27.11 t	27.51 ^c t	27.90 t
17	55.19 d	52.05 d	47.70 d
18	12.97 q	12.42 q	63.80 t
19	12.99 q	12.99 q	12.99 q
20	139.46 d	49.40 d	106.04 s
21	114.64 t	16.55 q	16.79 q
22		214.83 s	146.15 s
23		39.72 ^b t	31.66 t
24		32.39 t	30.59 t
25		27.70 d	27.90 t
26		22.41 ^d q	22.58 ^e q
27		22.37 ^d q	22.57 ^e q

^a ^{13}C NMR spectra were obtained in CDCl_3 solution at 125 MHz. Carbon multiplicities were determined by DEPT experiments. Assignments for 91-18-1 and 91-18-4 are based upon HMQC and HMBC. Assignments for 91-18-3 are aided by comparison with 91-18-1 and 91-18-4. ^{b-e} Assignments may be interchanged.

상기의 91-18-1 ~ -4 이외에도 서로 구조적으로 관련있는 세개의 천연물이 silica 와 C₁₈ reversed phase HPLC에 의하여 분리되었다. 먼저 91-18-5의 ¹H NMR, ¹³C NMR 및 proton COSY NMR data는 이 물질이 91-18-1 ~ -4와 유사한 C₂₇ steroid임을 나타내었다(Fig. 4-17 ~ 4-19). A ~ C rings와 terminal shifts와 coupling patterns 및 coupling constants 그리고 carbons의 chemical shifts와 multiplicities등에서 거의 모든 값이 일치하였다.

NMR상에 있어서의 중요한 차이점은 일반적인 steroid에서 나타나는 upfield methylenes중의 두 signals이 downfield shift되어 δ 110.49(C)와 81.10 (CH)에서 발견되었으며 이에 상응하는 downfield methine proton이 δ 4.58(ddd, J=8.5, 7.3, 6.3 Hz)에서 나타난 것이다. 이것은 91-18-4와 마찬가지로 side chain의 일부와 D ring이 산화되면서 여러가지 변화가 일어나 cyclic hemiketal이 형성된 것으로 해석되었다.

산화된 carbon의 위치는 proton decoupling과 COSY 실험으로 결정되었다. δ 1.02에서 나타난 C-21 methyl group과 coupling을 이루는 유일한 methine proton 즉 C-20 proton이 δ 2.04에서 발견되었다. 이 proton의 낮은 chemical shift는 C-20의 vicinal carbon 즉 C-22가 oxygenate되어 있음을 의미하였다. 한편 ¹H NMR상에 있어서 δ 4.58에 나타난 downfield methine proton은 δ 1.97, 1.78, 1.28등 3개의 protons과 direct coupling(J > 5 Hz)을 이루고 있으며 이들중 δ 1.97과 1.28 protons이 동일한 carbon에 결합된 methylene protons(J=12.2 Hz)임이 COSY NMR실험에 의하여 발견되었다. 더우기 이들 두 protons은 δ 1.14에 위치한 proton과도 coupling을 하였다. 이로서 -CHCH₂CH(O)CH-의 부분 구조가 얻어졌다.

이 부분구조의 위치 역시 COSY NMR 자료의 해석에 의하여 결정되었다. δ 2.04에 위치한 C-20 proton은 C-21 methyl 이외에 δ 1.78의 proton과 direct coupling을 하고 있었으며 위에서 언급한 바와 같이 δ 1.78의 proton은 δ 4.58 proton과 직접 연결되어 있었다. 이 δ 1.78 proton은 또 다른 proton과 어느정도 overlap되어 있었으나 proton decoupling에 의하여 2.04, 4.58의 protons과의 coupling이 증명되었다.

즉, C-21 methyl protons을 irradiation 하였을 때 C-20 methine(δ 2.04)는 sharp doublet($J=6.4$ Hz, $J_{17,20}$)로 나타났으며 이 proton을 irradiation한 결과 C-17(δ 1.78) proton으로 예상되는 doublet($J=8.8$ Hz, $J_{16,17}$)이 나타났다.

또한 C-16(δ 4.58) proton을 irradiation 하였을때 동일한 proton이 doublet($J=6.8$ Hz, $J_{17,20}$)으로 나타났다. 이들 coupling constants가 모두 6 Hz이상인 것으로 보아 vicinal coupling들이 분명하였다. 또한 peak overlapping에도 불구하고 각각 다른 decoupling 실험에서 $J_{17,20}$ 이 거의 같은 값을 가지는 것으로보아 C-16과 C-20이 동일한 methine proton으로 연결되어있는 것이 입증되었다.

이로서 91-18-5의 C-14로부터 C-17을 거쳐 C-21 methyl에 이르는 일련의 상관관계가 명확히 드러났다. 따라서 C-16과 C-21이 oxygen bridge에 의하여 연결된 tetrahydrofuran ring이 존재하며 C-21은 또 다른 hydroxy group이 연결된 hemiketal carbon이었다. 결론적으로 91-18-5는 5개의 ring을 가진 C_{27} steroidal hemiketal로 구조가 결정되었다(Fig. 4-1). 이 물질의 carbon assignments는 Table 4-3과 같다. 91-18-5 역시 해양생물에서는 최초로 발견되었으며 신물질 여부를 조사중이다.

91-18-5와 매우 유사한 C_{27} steroid인 91-18-6이 동일한 HPLC조건에서 분리되었다. 이 물질의 NMR data 역시 다른 steroid와 유사한 점이 많았으며 특히 91-18-5와는 C,D,E(furan)rings와 side chain에 해당되는 protons, carbons의 chemical shifts와 protons의 coupling patterns이 거의 일치하였다(Fig. 4-20 ~ 4-22).

NMR data상에 있어서의 중요한 차이점은 91-18-5의 C-4와 -5의 hydrocarbon에 해당하는 ^{13}C NMR resonance들이 사라지는 대신에 olefinic region에 두개의 signals(δ 168.90-C, 123.90-CH)이 새로이 나타난 점이며 이에 상응하는 변화로서 1H NMR에서 δ 6.07(1H, brs)에 새로운 olefinic proton resonance가 발견되었다. 또한 91-18-5의 C-4 methylene이 사라졌으며 유사한 위치에 coupling pattern이 전혀 다른 두개의 protons(δ 2.48, 2.36)이 새로이 나타났다.

이와같은 NMR상에 있어서의 변화는 91-18-6의 A ring이 91-18-5의 α, β -unsaturated ketone에서 $\alpha, \alpha', \beta, \beta'$ -diunsaturated ketone으로 바뀜으로서 설명이 가

능하였다(Fig. 4-1). 문헌조사를 한 결과 이 물질의 A ring에 해당하는 carbon들의 NMR data는 최근에 보고된 동일한 부분구조를 가진 물질들과 거의 일치하였다(Ksebati & Schmitz, 1988). 이 물질의 ^{13}C NMR assignments는 Table 4-3과 같다.

마지막으로 또 다른 C_{27} steroid 유도체인 91-18-7이 HPLC에 의하여 분리되었다. 이 물질의 NMR data 역시 steroid의 특징적인 peak들을 보여주었으며 특히 91-18-5와는 놀랄정도로 일치하는 점이 많았다(Fig. 4-23 ~ 4-25). 중요한 차이점은 91-18-5의 hemiketal center인 C-22의 chemical shift가 약 10 ppm정도 downfield로 이동하였으며 upfield에서 나타나던 C-25 methine carbon이 downfield(δ 82.04)에서 quaternary carbon의 형태로 발견되었다.

^1H NMR에서도 C-25 methine proton이 사라졌으며 δ 1.0 ~ 0.8에서 doublet의 형태로 나타나던 C-26, -27 methyl proton들이 δ 1.34와 1.17에서 두개의 singlet으로 나타났다. 이와같은 NMR상의 변화는 91-18-5의 C-22 hemiketal이 C-25 위치를 공격하여 새로운 tetrahydrofuran ring을 형성한 것으로서 설명이 가능하였다(Fig. 4-1). 이로서 91-18-7 역시 C_{27} steroidal ketal로 구조가 결정되었으며 carbon assignments는 Table 4-3과 같다

Steroids의 side chain이 산화되어 spiralsterone 골격을 이룬 물질은 드물지 않게 발견되나 이들은 대부분 C-26 methyl이 산화된 5/6 cyclic ketals이며 91-18-7과 같이 C-25 methine이 산화된 5/5 ketals은 그 예가 많지 않다.

Alcyonium속의 soft corals은 태평양과 지중해의 온대와 아열대 해역에 걸쳐 광범위하게 서식하는 저서군체동물이다. 따라서 천연물 연구가 상당히 이루어져 있으며 알려진 물질의 수도 20여에 이른다. 이들은 구조적으로 크게 두 부류 즉, steroids와 diterpenes에 포함된다(Faulkner, 1992; 신 등, 1992). 우리나라에 서식하는 *A. gracillimum*으로부터는 최근에 본 연구와 관련된 연구에서 5개의 알려진 sterols을 보고한 바 있다(김 등, 1993).

Table 4-3. Carbon NMR assignments for 91-18-5, 91-18-6, and 91-18-7^a

#	91-18-1	91-18-5	91-18-6	91-18-7
1	158.45 d	158.21 d	155.68 d	158.15 d
2	127.26 d	127.37 d	127.53 d	127.39 d
3	200.09 s	200.10 s	186.30 s	200.15 s
4	40.91 t	40.89 t	123.90 d	40.96 t
5	44.28 d	44.19 d	168.90 s	44.22 d
6	27.55 t	27.46 t	32.77 t	27.51 t
7	31.33 t	31.60 ^b t	33.71 t	31.70 t
8	35.70 d	35.26 d	35.16 d	35.26 d
9	50.17 d	49.91 d	50.15 d	49.93 d
10	39.00 s	38.99 s	43.55 s	39.03 s
11	20.75 t	20.94 t	22.66 t	21.02 t
12	37.26 t	36.87 t	36.92 t	37.05 t
13	43.61 s	40.99 s	40.01 s	40.74 s
14	55.45 d	56.01 d	55.15 d	55.99 d
15	24.59 t	31.40 ^b t	31.91 t	31.42 t
16	27.11 t	81.10 d	80.99 d	80.36 d
17	55.19 d	62.67 d	62.59 d	61.79 d
18	12.97 q	16.51 q	16.40 t	16.47 q
19	12.99 q	13.03 q	18.75 q	13.06 q
20	139.46 d	39.60 d	39.90 d	38.37 d
21	114.64 t	15.48 q	15.48 q	14.66 q
22		110.49 s	110.54 s	119.87 s
23		39.78 t	39.37 t	39.79 t
24		32.51 t	32.53 t	33.66 t
25		28.28 d	28.33 d	82.04 s
26		22.55 ^c q	22.60 ^d q	30.22 ^e q
27		22.43 ^c q	22.47 ^d q	28.45 ^e q

^a ¹³C NMR spectra were obtained in CDCl₃ solution at 125 MHz. Carbon multiplicities were determined by DEPT experiments. Assignments for 91-18-1 are based upon HMQC and HMBC. Assignments for 91-18-5 ~ -7 are aided by comparison with 91-18-1. ^{b-e} Assignments may be interchanged.

결론적으로 본 연구에서는 서귀포 근해에서 채집한 *Alcyonium gracillimum*으로부터 7개의 steroids를 분리, 구조를 결정하였으며 현재 구조확인 작업과 함께 비대칭 탄소의 입체화학적 배열을 규명중이다. 문헌조사결과 이들중 6개의 물질은 해양생물로부터 보고된 바가 없는 물질임을 확인하였으며 육상식물과 미생물의 대사물질을 대상으로 하여 신물질여부를 탐색중이다. 또한 이들 천연물의 구조결정작업의 완료 및 신물질여부의 판정과 더불어 생리활성도도 조사될 예정이다.

4.3. 실험방법

4.3.1. 시료의 채집 및 유기물질의 추출과 고속감압크로마토그래피

Soft coral *Alcyonium gracillimum*의 채집은 서귀포 근해 수심 25-30 m에서 3회 ('91년 1월, 7월 및 '92년 11월)에 걸쳐 SCUBA 다이빙에 의해서 이루어 졌으며 이 시료는 채집해 오는 즉시 냉동고에 보관되었다. 냉동보관중인 시료(약 4 kg)를 실온에 방치하여 얼음을 녹인 뒤 잘게 잘라 methylene chloride 2 L를 가하여 실온에서 48시간 방치한 후에 그 용액을 걸러내었으며 이 과정을 다시 반복한 후에 얻어진 전체 유기추출물의 양은 9.22 g이 얻어 졌다.

이 추출물을 진공 flash chromatography로 분리하기 위해 n-hexane과 ethylacetate의 혼합액(100% n-hexane으로부터 100% ethylacetate까지), acetone, methanol을 순서대로 용출시켰다. 이렇게 얻어진 13개의 분액(fraction, fx)을 각각 용매를 제거한 후 ¹H NMR을 측정한 결과 흥미 있는 2차 대사물질이 fx-2(10% ethylacetate/n-hexane: 0.030 g), fx-3(15% ethylacetate/n-hexane: 1.56 g), fx-5(40% ethylacetate/n-hexane: 1.02 g) 및 fx-6 (50% ethylacetate/n-hexane: 0.91 g)에 포함되어 있음이 밝혀 졌다. 기타의 fx에는 여러 해양생물에 흔히 존재하는 포화 및 불포화 지방, 지방산 및 steroids가 주요 대사물질 이었다.

고속진공 크로마토그래피에 의해 분리한 fx-2와 3은 다시 gravity column

chromatography(3 x 15 cm)로 분리하기 위하여 10%(500 ml), 15%(250 ml씩 5개의 분액), 20%(500 ml) 및 25%(500 ml) ethylacetate/hexane, 100% ethylacetate(500 ml), 그리고 methanol(500 ml)로 차례대로 용출시켜 모두 10개의 분액으로 나누어 졌으며 이들은 다시 HPLC로 분리되었다.

4.3.2. 91-18-1과 91-18-2의 분리

Gravity column chromatography로 분리한 fx-2(170 mg)를 7% ethylacetate/hexane에 녹이고 spartan filter(Aldrich)로 여과한 후에 이 용액을 같은 용매를 용출액으로 사용하여 HPLC로 분리한 결과(YMC C₁₈ silica column, RI detector, 2 ml/min) retention time 20.5 분에서 약간의 불순물을 포함한 pregna-20-ene-3-one (=91-18-2)이 2 mg 얻어 졌으며 23 분에서 순수한 pregna-1,20-diene-3-one(=91-18-1)이 80 mg 얻어 졌다. 불순물을 함유하고 있는 pregna-20-ene-3-one(=91-18-2)은 reversed phase C₁₈ column을 이용한 HPLC로 다시 분리한 결과 1 mg이 순수하게 얻어 졌다 (acetonitrile, 3 ml/min, retention time 21 분).

Pregna-1,20-diene-3-one: ¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 7.15(1H, d, 10.3, H-1), 5.85(1H, d, 10.3, H-2), 5.76(1H, ddd, 17.1, 10.3, 7.3, H-20), 4.99(1H, dd, 10.3, 1.0, H-21), 4.96(1H, ddd, 17.1, 1.0, 1.0, H-21), 2.37(1H, dd, 17.6, 14.2, H-4β), 2.22(1H, dd, 17.6, 3.9, H-4α), 1.98(1H, m, H-17), 1.92(1H, m, H-5), 1.65-1.84(5H, m), 1.58(1H, m, H-16), 1.49(1H, m, H-16), 1.37-1.45(3H, m), 1.20(1H, m, H-15), 1.06-1.13(2H, m, H-12, -14), 1.02(3H, s, H-19), 0.93-1.05(2H, m, H-7, -9), 0.63(3H, s, H-18); ¹³C NMR(CDCl₃, 125 MHz) δ 200.09(C, C-3), 158.45(CH, C-1), 139.46(CH, C-20), 127.26(CH, C-2), 114.64(CH₂, C-21), 55.45(CH, C-14), 55.19(CH, C-17), 50.17(CH, C-9), 44.28(CH, C-5), 43.61(C, C-13), 40.91(CH₂, C-4), 39.00(C, C-10), 37.26(CH₂, C-12), 35.70(CH, C-8), 31.33(CH₂, C-7), 27.55(CH₂, C-6), 27.11(CH₂, C-16), 24.59(CH₂, C-15), 20.75(CH₂, C-11).

12.99(CH₃, C-19), 12.97(CH₃, C-18)

Pregna-20-ene-3-one: ¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 5.25(1H, ddd, 16.9, 10.7, 7.6, H-20), 4.97(1H, dd, 10.7, 2.2, H-21), 4.96(1H, ddd, 16.9, 1.0, 1.0, H-21), 2.38(1H, ddd, 15.6, 13.7, 6.4, H-2β), 2.29(1H, brddd, 15.6, 5.4, 2.9, H-2α), 2.27(1H, dd, 14.9, 14.7, H-4β), 2.08(1H, ddd, 14.9, 3.9, 2.2, H-4α), 2.02(1H, ddd, 15.1, 6.4, 2.0, H-1α), 1.96(1H, m, H-17), 1.79(1H, m, H-16), 1.64-1.75(3H, m), 1.47-1.60(3H, m), 1.42(1H, m, H-11), 1.25-1.31(4H, m), 1.19(1H, m, H-15), 1.01(3H, s, H-19), 0.98-1.10(2H, m, H-12, -14), 0.94(1H, m, H-9), 0.76(1H, ddd, 12.7, 10.3, 4.4), 0.61(3H, s, H-18); ¹³C NMR(CDCl₃, 125 MHz) δ 212.15(C, C-3), 139.74(CH, C-20), 114.55(CH₂, C-21), 55.44(CH, C-14), 55.38(CH, C-17), 54.09(CH, C-9), 46.78(CH, C-5), 44.73(CH₂, C-4), 43.61(C, C-13), 38.62(CH₂, C-1), 38.19(CH₂, C-2), 37.44(CH₂, C-12), 35.77(C, C-10), 35.52(CH, C-8), 31.82(CH₂, C-7), 28.95(CH₂, C-6), 27.20(CH₂, C-16), 24.79(CH₂, C-15), 21.05(CH₂, C-11), 12.94(CH₃, C-18), 11.50(CH₃, C-19)

4.3.3. 91-18-3의 분리

Gravity column chromatography로 분리한 fx-4(110 mg)를 9% ethylacetate/hexane에 녹이고 spartan filter(Aldrich)로 여과한 후에 이 용액을 같은 용매를 용출액으로 사용하여 YMC silica column을 이용한 HPLC(RI detector, 2.5 ml/min)에서 retention time 20 분에 나오는 peak를 모으고 이것을 다시 reversed phase C₁₈ column을 사용하여 다시 HPLC하여 91-18-3이 순수하게 10 mg 얻어졌다(acetonitrile, 2 ml/min, retention time 26.4 분).

¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 7.13(1H, d, 10.3, H-1), 5.85(1H, d, 10.3, H-2), 2.52(1H, dq, 10.3, 6.8, H-20), 2.45(1H, ddd, 17.1, 9.3, 6.4, H-23), 2.36(1H, dd, 17.6, 14.2, H-4β), 2.35(1H, ddd, 17.1, 9.3, 6.3, H-23), 2.21(1H, dd, 17.6, 3.9,

H-4 α), 1.98(1H, ddd, 12.6, 3.4, 3.4, H-12 β), 1.92(1H, m, H-5), 1.57-1.77(5H, m), 1.53(1H, m, H-25), 1.38-1.49(6H, m), 1.30(1H, ddd, 12.6, 12.6, 3.4, H-12 α), 1.10(3H, d, 6.8, H-21), 1.09-1.17(3H, m), 0.92-1.07(2H, m), 1.01(3H, s, H-19), 0.89(6H, d, 6.8, H-26, 27), 0.72(3H, s, H-18): ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125 MHz) δ 214.83(C, C-22), 200.19(C, C-3), 158.19(CH, C-1), 127.40(CH, C-2), 55.69(CH, C-14), 52.05(CH, C-17), 49.88(CH, C-9), 49.40(CH, C-20), 44.22(CH, C-5), 42.84(C, C-13), 40.96(CH_2 , C-4), 39.72(CH_2 , C-23/-12), 39.58(CH_2 , C-12/-23), 38.94(C, C-10), 35.63(CH, C-8), 32.39(CH_2 , C-24), 31.23(CH_2 , C-7), 27.70(CH, C-25), 27.58(CH_2 , C-6/-16), 27.51(CH_2 , C-16/-6), 24.31(CH_2 , C-15), 22.41(CH_3 , C-26), 22.37(CH_3 , C-27), 21.18(CH_2 , C-11), 16.55(CH_3 , C-21), 12.99(CH_3 , C-19), 12.42(CH_3 , C-18)

4.3.4. 91-18-4의 분리

Gravity column chromatography로 분리한 fx-3(130 mg)을 8% ethylacetate/hexane에 녹이고 spartan filter(Aldrich)로 여과한 후에 이 용액을 같은 용매를 용출액으로 사용하여 HPLC로 분리한 결과(YMC silica column, RI detector, 2.5 ml/min) retention time 19.8 분에서 약간의 불순물을 포함한 91-18-4가 얻어 졌으며 이것을 reversed phase C_{18} column을 이용하여 다시 HPLC한 결과 순수한 물질이 6 mg 얻어졌다(acetonitrile, 3 ml/min, retention time 28.6 분).

^1H NMR(CDCl_3 , 500 MHz) δ 7.16(1H, d, 10.0, H-1), 5.86(1H, brd, 10.0, H-2), 3.91(1H, dd, 10.6, 1.7, H-18), 3.31(1H, d, 10.6, H-18), 2.37(1H, dd, 17.6, 14.2, H-4 β), 2.22(1H, dd, 17.6, 3.9, H-4 α), 2.00-2.15(4H, m), 1.93(1H, m, H-5), 1.83(1H, m), 1.67-1.75(2H, m), 1.59(3H, s, H-21), 1.54-1.63(2H, m), 1.52(1H, m, H-25), 1.41-1.50(2H, m), 1.28-1.40(6H, m), 1.07(1H, m), 1.00(3H, s, H-19), 0.98(1H, m), 0.95(1H, m), 0.89(6H, d, 6.4, H-26, -27): ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125 MHz)

δ 200.13(C, C-3), 158.33(CH, C-1), 146.15(C, C-22), 127.41(CH, C-2), 106.04(C, C-20), 63.80(CH₂, C-18), 54.34(CH, C-14), 50.15(CH, C-9), 47.70(CH, C-17), 44.31(CH, C-5), 41.18(C, C-13), 40.96(CH₂, C-4), 39.11(C, C-10), 36.81(CH₂, C-12), 35.58(CH, C-8), 31.66(CH₂, C-23), 31.54(CH₂, C-7), 30.59(CH₂, C-24), 27.90(CH₂, C-25/-16), 27.90(CH, C-16/-25), 27.49(CH₂, C-6), 24.20(CH₂, C-15), 22.58(CH₃, C-26/-27), 22.57(CH₃, C-27/-26), 20.83(CH₂, C-11), 16.79(CH₃, C-21), 12.99(CH₃, C-19)

4.3.5. 91-18-5의 분리

고속감압 크로마토그래피로 분리한 fx-5(501 mg)를 35% ethylacetate/hexane에 녹이고 spartan filter(Aldrich)로 여과한 후에 이 용액을 HPLC(YMC silica column, RI detector, 2.5 ml/min)로 분리하여 retention time 11.6 분에 나오는 peak를 모으고 이것을 reversed phase C₁₈ column을 사용하여 다시 HPLC로 분리하여 91-18-5가 순수하게 30 mg 얻어졌다(acetonitrile, 2 ml/min, retention time 20.4 분).

¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 7.11(1H, d, 10.3, H-1), 5.84(1H, brd, 10.3, H-2), 4.58(1H, ddd, 8.5, 7.3, 6.3, H-16), 2.34(1H, dd, 17.6, 14.3, H-4 β), 2.20(1H, dd, 17.6, 3.9 H-4 α), 2.04(1H, m, H-20), 1.97(1H, ddd, 12.2, 7.3, 5.1, H-15), 1.89(1H, m, H-5), 1.75-1.82(2H, m), 1.74-1.60(5H, m), 1.52(1H, m, H-25), 1.38-1.48(3H, m), 1.36-1.29(2H, m), 1.26(1H, m, H-15), 1.11-1.21(2H, m), 1.02(3H, d, 7.3, H-21), 1.00(3H, s, H-19), 0.93-1.02(2H, m), 0.88(3H, d, 6.4, H-26/27), 0.87(3H, d, 6.4, H-26/27), 0.81 (3H, s, H-18) . ¹³C NMR(CDCl₃, 125 MHz) δ 200.10(C, C-3), 158.21(CH, C-1), 127.37(CH, C-2), 110.49(C, C-22), 81.10(CH, C-16), 62.67(CH, C-17), 56.01(CH, C-14), 49.91(CH, C-9), 44.19(CH, C-5), 40.99(C, C-13), 40.89(CH₂, C-4), 39.78(CH₂, C-23), 39.60(CH, C-20), 38.99(C, C-10), 36.87(CH₂, C-12), 35.26(CH, C-8), 32.51(CH₂, C-24), 31.60(CH₂,

C-7), 31.40(CH₂, C-15), 28.28(CH, C-25), 27.46(CH₂, C-6), 22.55(CH₃, C-26),
22.43(CH₃, C-27), 20.94(CH₂, C-11), 16.51(CH₃, C-18), 15.48(CH₃, C-21),
13.03(CH₃, C-19)

4.3.6. 91-18-6의 분리

고속감압 크로마토그래피로 분리한 fx-6(455 mg)을 45% ethylacetate/hexane에 녹이고 spartan filter(Aldrich)로 여과한 후에 이 용액을 HPLC(YMC silica column, RI detector, 2.5 ml/min)로 분리하여 retention time 19.2 분에 나오는 peak를 모우고 이것을 reversed phase C₁₈ column을 사용하여 다시 HPLC로 분리하여 91-18-6이 순수하게 34 mg 얻어졌다(acetonitrile, 2 ml/min, retention time 18.2 분).

¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 7.04(1H, d, 10.0, H-1), 6.02(1H, dd, 10.0, 1.7, H-2), 6.07(1H, brs, H-4), 4.59(1H, q, 7.3, H-16), 2.48(1H, ddd, 12.9, 12.9, 4.9, H-6β), 2.36(1H, ddd, 12.9, 3.3, 3.3, H-6α), 2.06(1H, m, H-20), 1.94-2.03(2H, m), 1.76-1.85(3H), 1.62-1.72(4H, m), 1.54(1H, septet, 6.7, H-25), 1.28-1.38(3H, m), 1.24(3H, s, H-19), 0.98-1.21(4H, m), 1.03(3H, d, 7.5, H-21), 0.90(6H, d, 6.5, H-26, 27), 0.87(3H, s, H-18); ¹³C NMR(CDCl₃, 125 MHz) δ 186.30(C, C-3), 168.90(C, C-5), 155.68(CH, C-1), 127.53(CH, C-2), 123.90(CH, C-4), 110.54(C, C-22), 80.99(CH, C-16), 62.59(CH, C-17), 55.15(CH, C-14), 52.34(CH, C-9), 43.55(C, C-10), 41.01(C, C-13), 39.90(CH, C-20), 39.37(CH₂, C-23), 36.92(CH₂, C-12), 35.16(CH, C-8), 33.71(CH₂, C-7), 32.77(CH₂, C-6), 32.53(CH₂, C-24), 31.91(CH₂, C-15), 28.33(CH, C-25), 22.60(CH₃, C-26), 22.47(CH₃, C-27), 22.66(CH₂, C-11), 18.75(CH₃, C-19), 15.48(CH₃, C-21), 16.40(CH₃, C-18)

4.3.7. 91-18-7의 분리

Gravity column chromatography로 분리한 fx-5(80 mg), 6(50 mg) 및 7(40 mg)을 모아서 12% ethylacetate/ hexane에 녹이고 spartan filter(Aldrich)로 여과한 후에 이 용액을 같은 용매를 용출액으로 사용하여 YMC silica column을 이용한 HPLC(RI detector, 2.5 ml/min)에서 retention time 21.6 분에 나오는 peak를 모우고 이것을 다시 reversed phase C₁₈ column을 사용하여 다시 HPLC하여 91-18-7이 순수하게 30 mg 얻어졌다(acetonitrile, 2.5 ml/min, retention time 25.5 분).

¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 7.12(1H, d, 10.3, H-1), 5.84(1H, d, 10.3, H-2), 4.45(1H, ddd, 7.5, 7.4, 7.2, H-16), 2.36(1H, dd, 17.6, 14.2, H-4 β), 2.21(1H, dd, 17.6, 3.9 H-4 α), 2.08(1H, m, H-20), 1.87-2.01(5H, m), 1.60-1.81(6H, m), 1.39-1.50(3H, m), 1.34(3H, s, H-26/27), 1.12-1.26(3H, m), 1.17(3H, s, H-27/26), 1.01(3H, s, H-19), 0.96(3H, d, 7.3, H-21), 0.93-1.03(2H, m), 0.80(3H, s, H-18);
¹³C NMR(CDCl₃, 125 MHz) δ 200.15(C, C-3), 158.15(CH, C-1), 127.39(CH, C-2), 119.87(C, C-22), 82.04(C, C-25), 80.36(CH, C-16), 61.79(CH, C-17), 55.99(CH, C-14), 49.93(CH, C-9), 44.22(CH, C-5), 40.96(CH₂, C-4), 40.74(C, C-13), 39.79(CH₂, C-23), 39.03(C, C-10), 38.37(CH, C-20), 37.05(CH₂, C-12), 35.26(CH, C-8), 33.66(CH₂, C-24), 31.70(CH₂, C-7), 31.42(CH₂, C-15), 30.22(CH₃, C-26), 28.45(CH₃, C-27), 27.51(CH₂, C-6), 21.02(CH₂, C-11), 16.47(CH₃, C-18), 14.66(CH₃, C-21), 13.06(CH₃, C-19).

Fig 4-2 Carbon NMR spectrum of compound 91-18-1

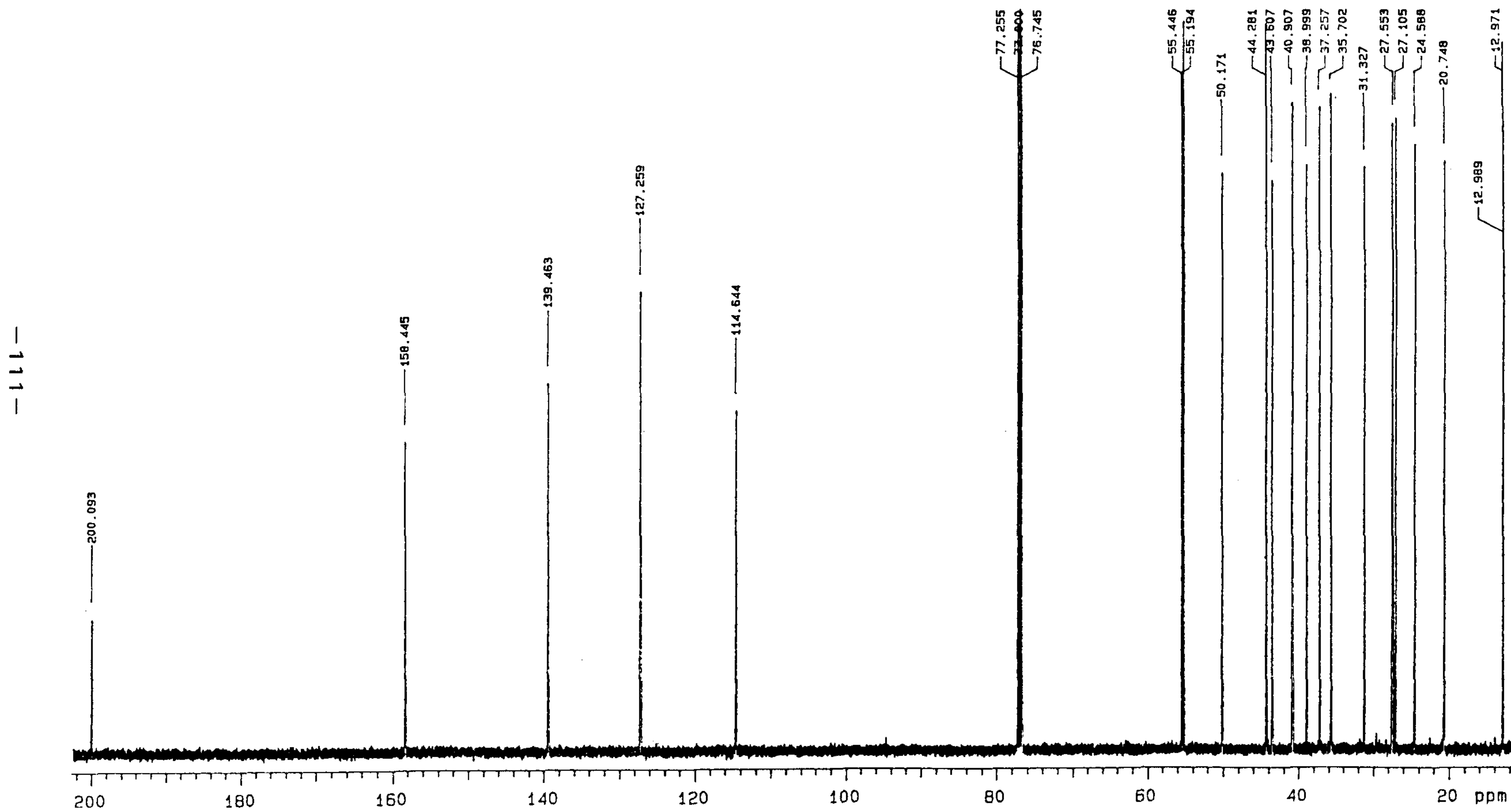


Fig 4-3 Proton NMR spectrum of compound 91-18-1

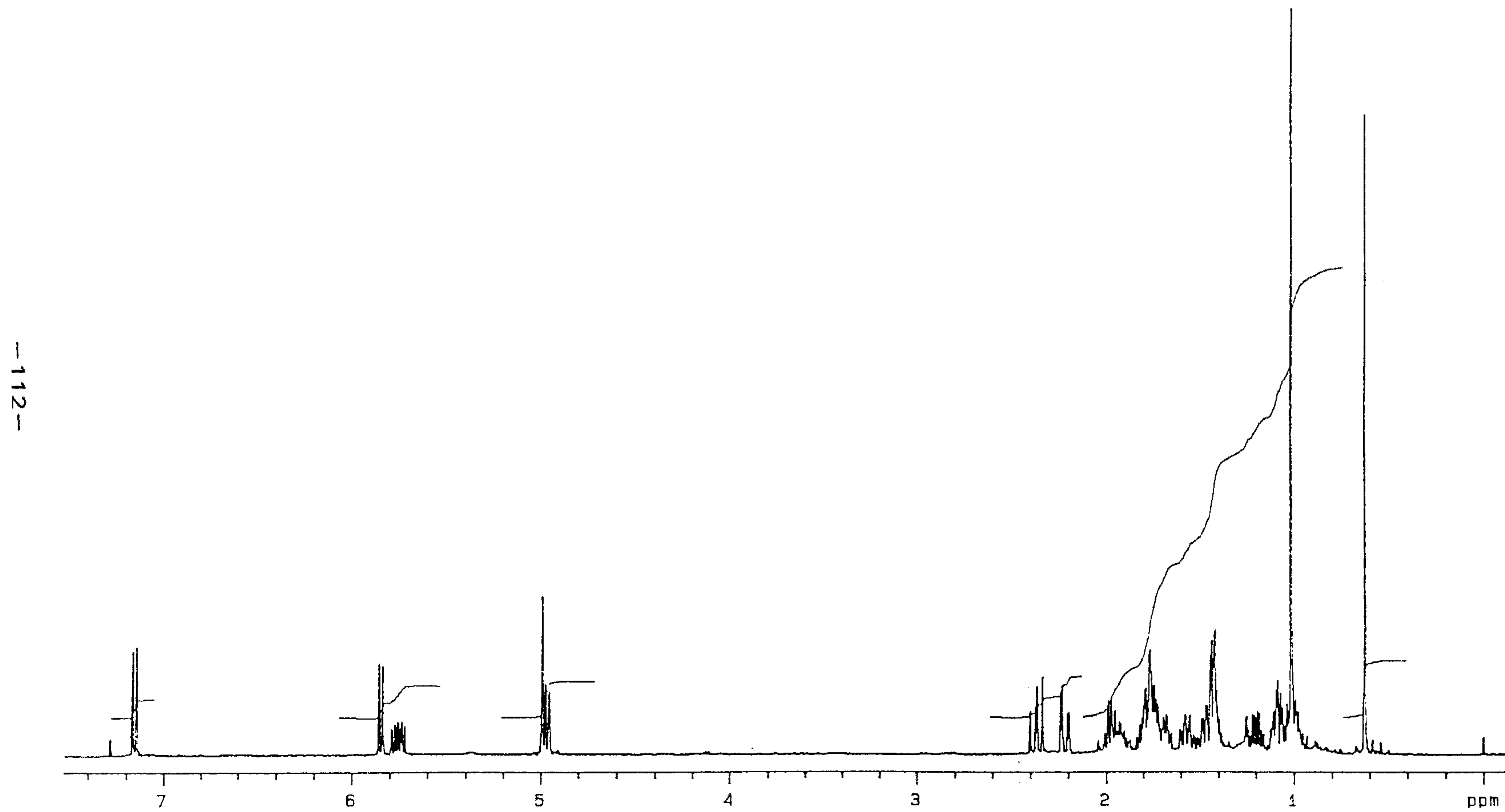


Fig 4-4 Proton COSY NMR spectrum of compound 91-18-1 (upfield region)

AUTOMATIC COSY ANALYSIS
91-18-2, 3-2-mpic-B-cosy45

	M	L	K	J	I	H	G	F	E	D	C	B	A	(ppm)
M														0.61
L														1.02
K														1.10
J														1.40
I														1.42
H														1.47
G														1.57
F														1.71
E														1.75
D														1.92
C														1.93
B														1.99
A														2.36

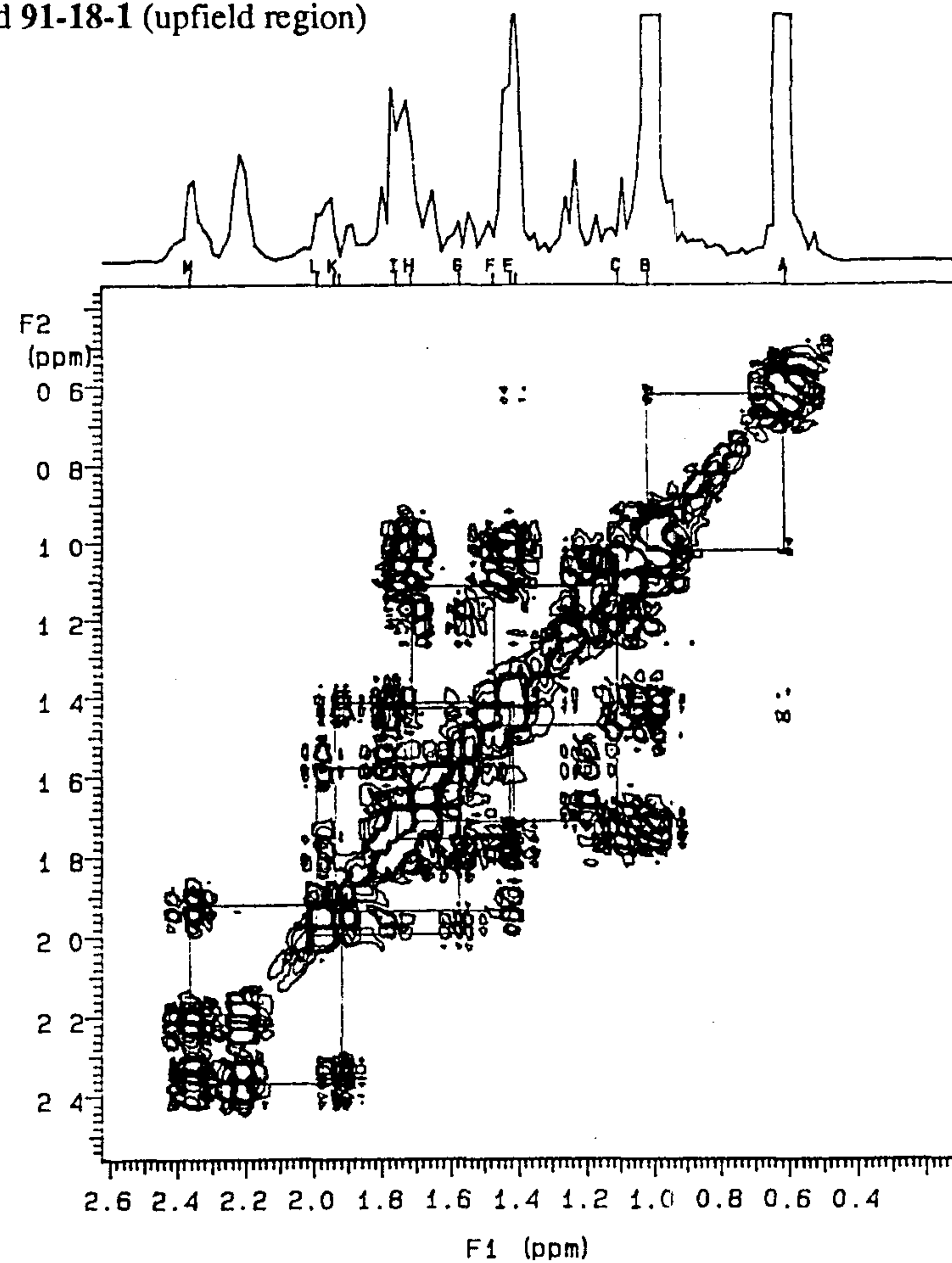
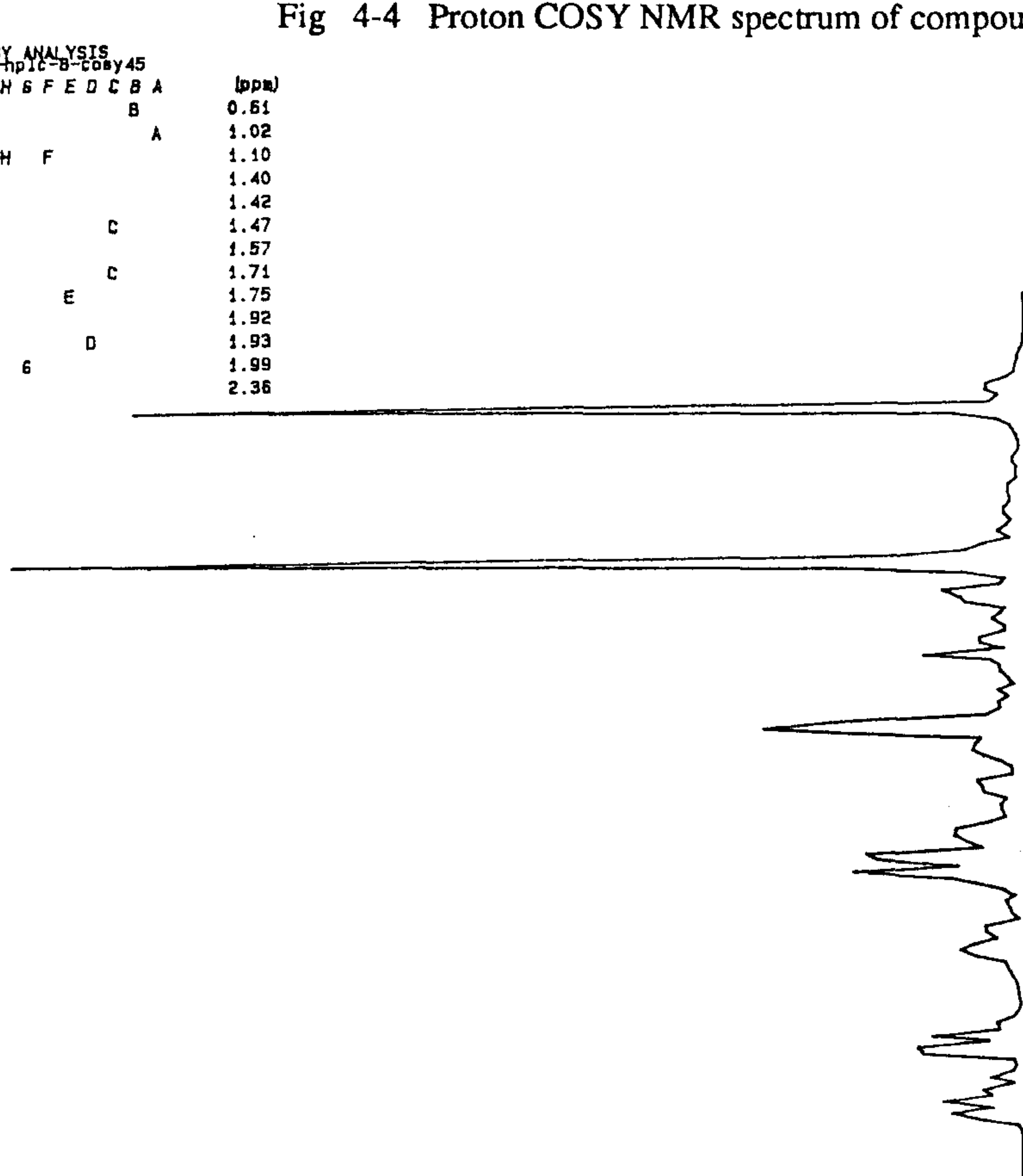


Fig 4-5 HMQC spectrum of compound 91-18-1

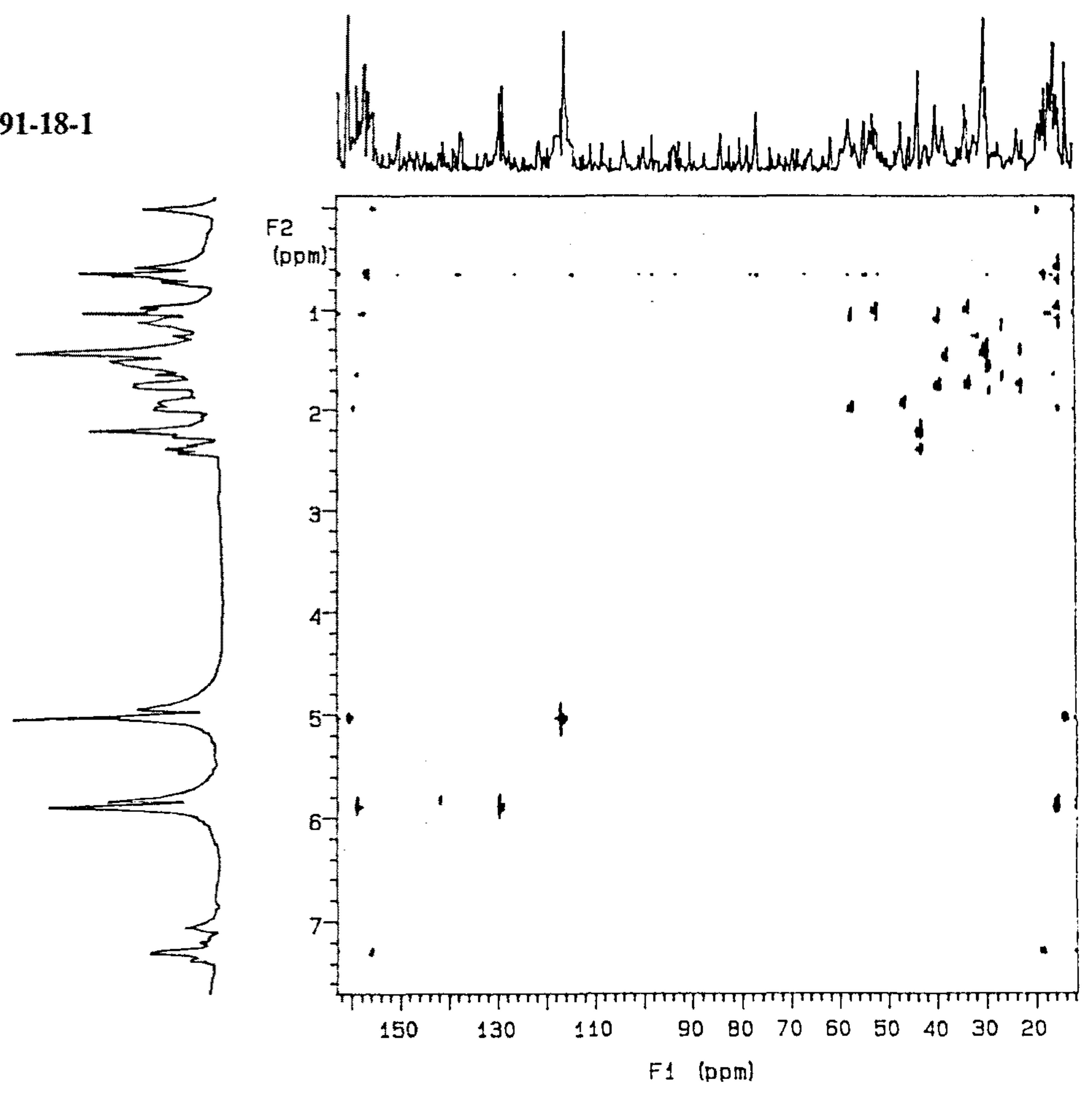


Fig 4-6 HMBC spectrum of compound 91-18-1

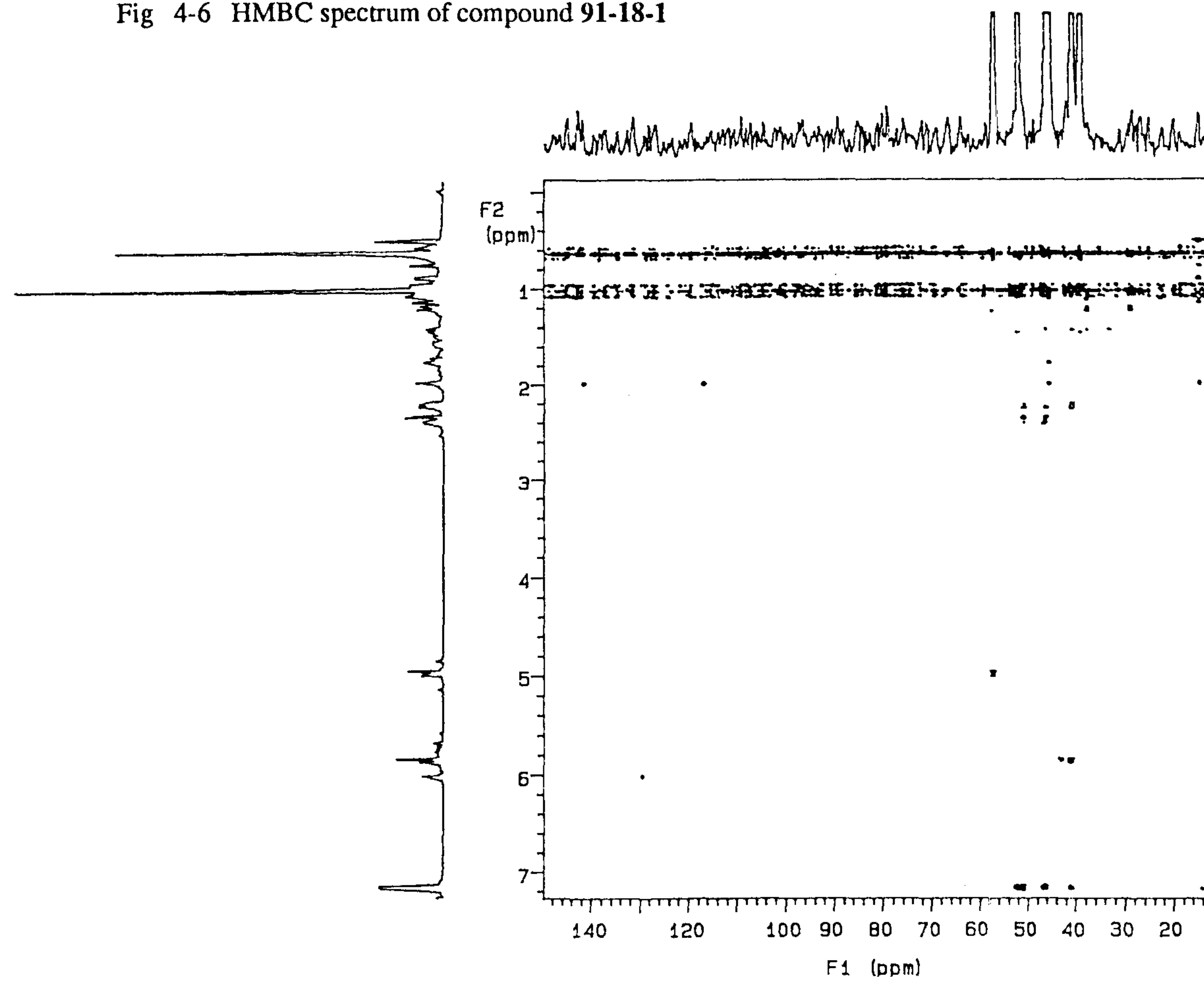


Fig 4-7 Carbon NMR spectrum of compound 91-18-2

91-18-2, 3-2-hplc-6, 13-rh-1-c
OBSERVE C13
FREQUENCY 125.697 MHz
SPECTRAL WIDTH 30067.5 Hz
ACQUISITION TIME 1.301 sec
RELAXATION DELAY 2.000 sec
PULSE WIDTH 17.0 usec
AMBIENT TEMPERATURE
NO. REPETITIONS 1664
DECOUPLE H1
HIGH POWER 43
DECOUPLER CONTINUOUSLY ON
WALTZ-16 MODULATED
DOUBLE PRECISION ACQUISITION
DATA PROCESSING
LINE BROADENING 0.5 Hz
FT SIZE 131072
TOTAL ACQUISITION TIME 9: minutes

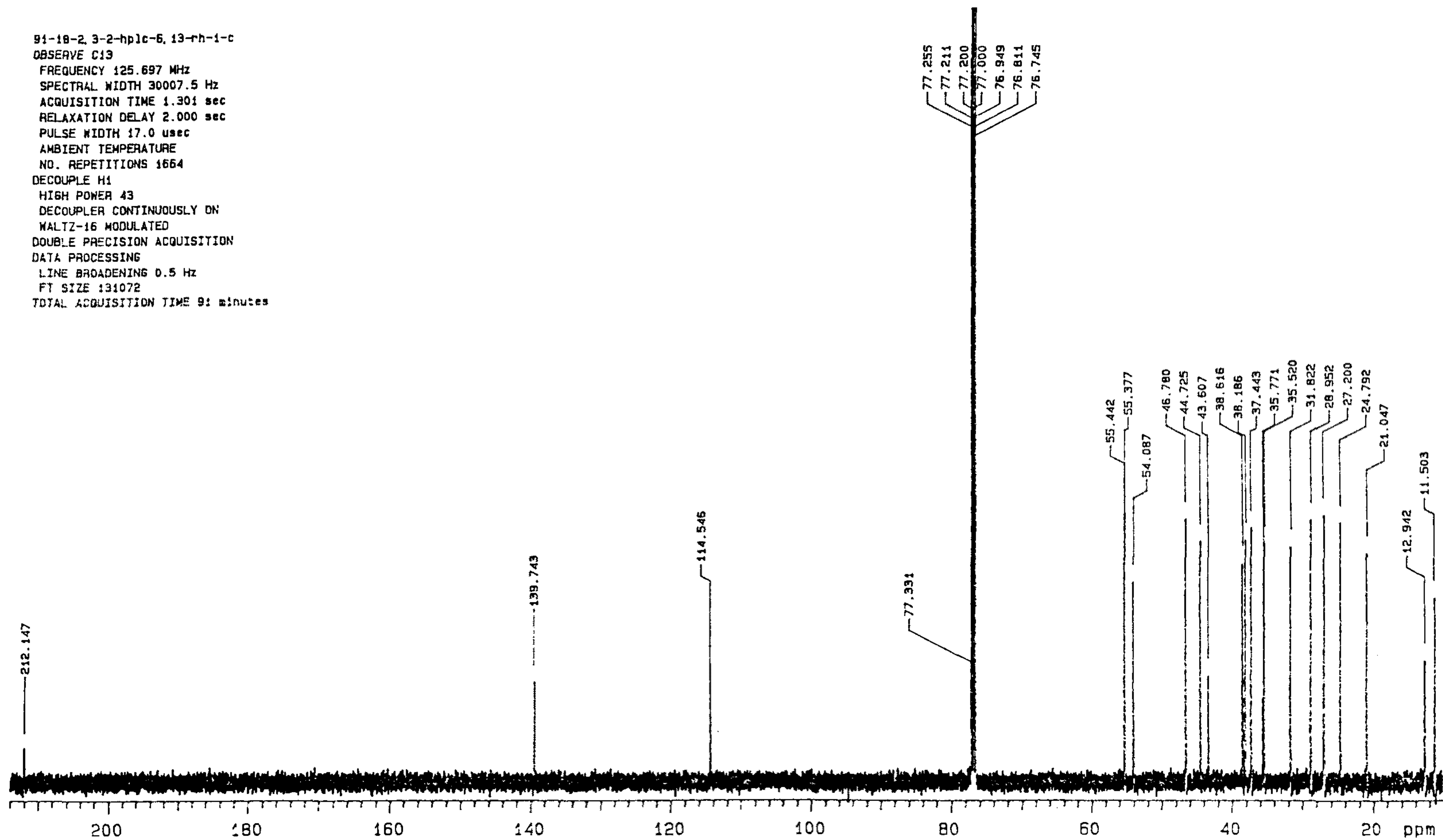


Fig 4-8 Proton NMR spectrum of compound 91-18-2

91-18-2 3-2-hpic-6 13-rh-1-p-1
OBSERVE H1
FREQUENCY 499 843 MHz
SPECTRAL WIDTH 8000.0 Hz
ACQUISITION TIME 1.892 sec
RELAXATION DELAY 0.000 sec
PULSE WIDTH 7.0 usec
AMBIENT TEMPERATURE
NO. REPETITIONS 32
DOUBLE PRECISION ACQUISITION
DATA PROCESSING
FT SIZE 32768
TOTAL ACQUISITION TIME 1 minutes

-117-

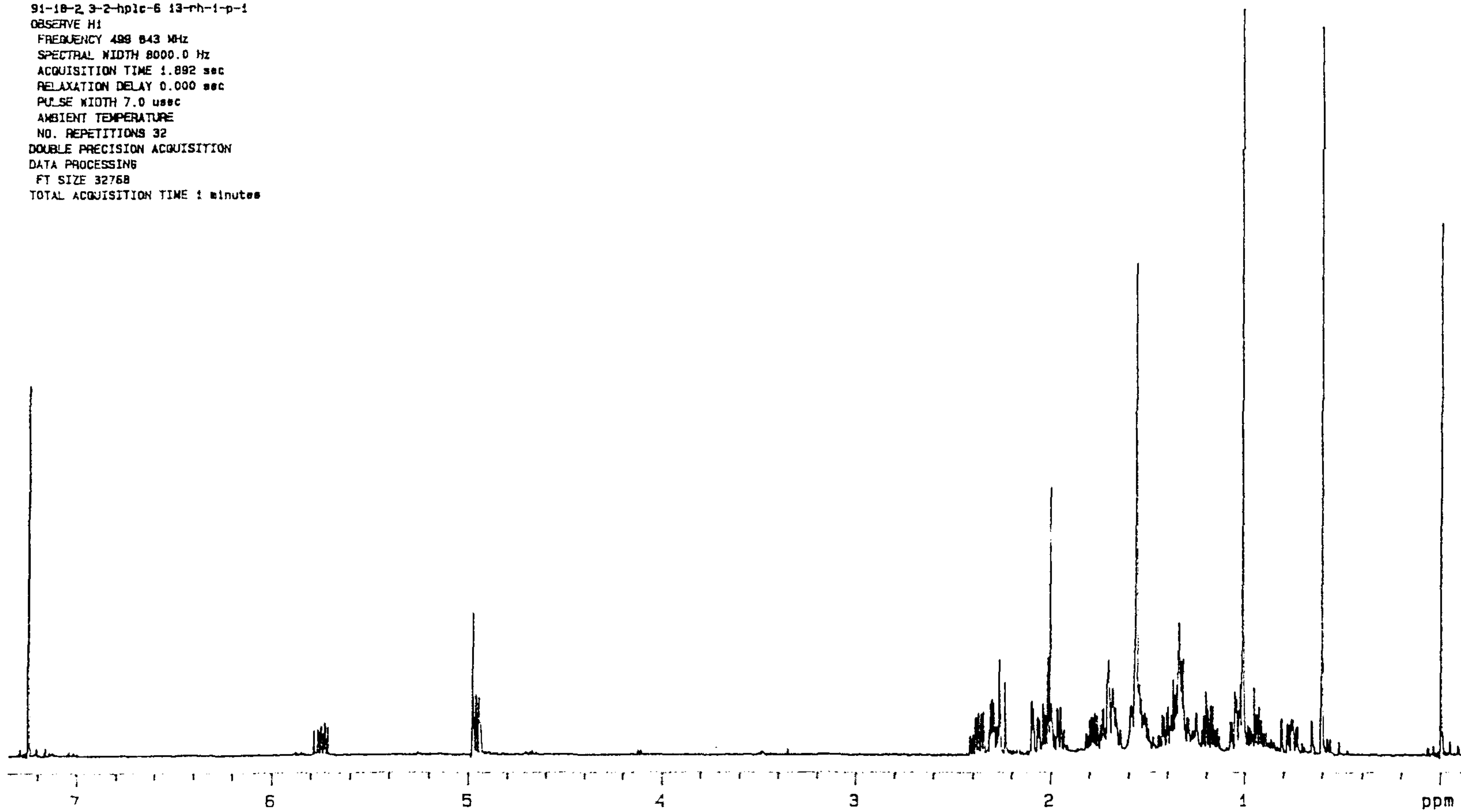


Fig 4-9 Carbon NMR spectrum of compound 91-18-3

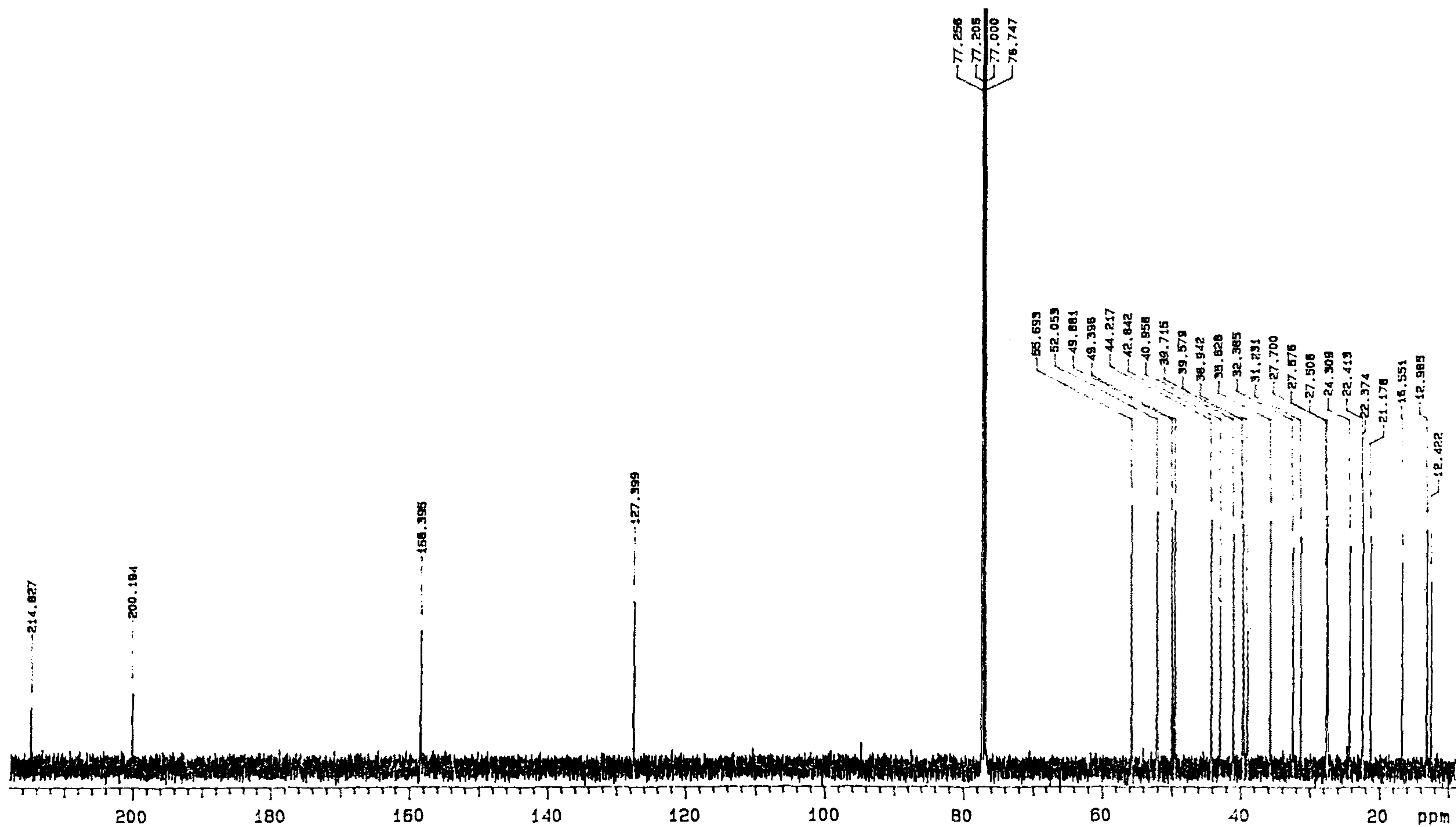


Fig 4-10 Proton NMR spectrum of compound 91-18-3

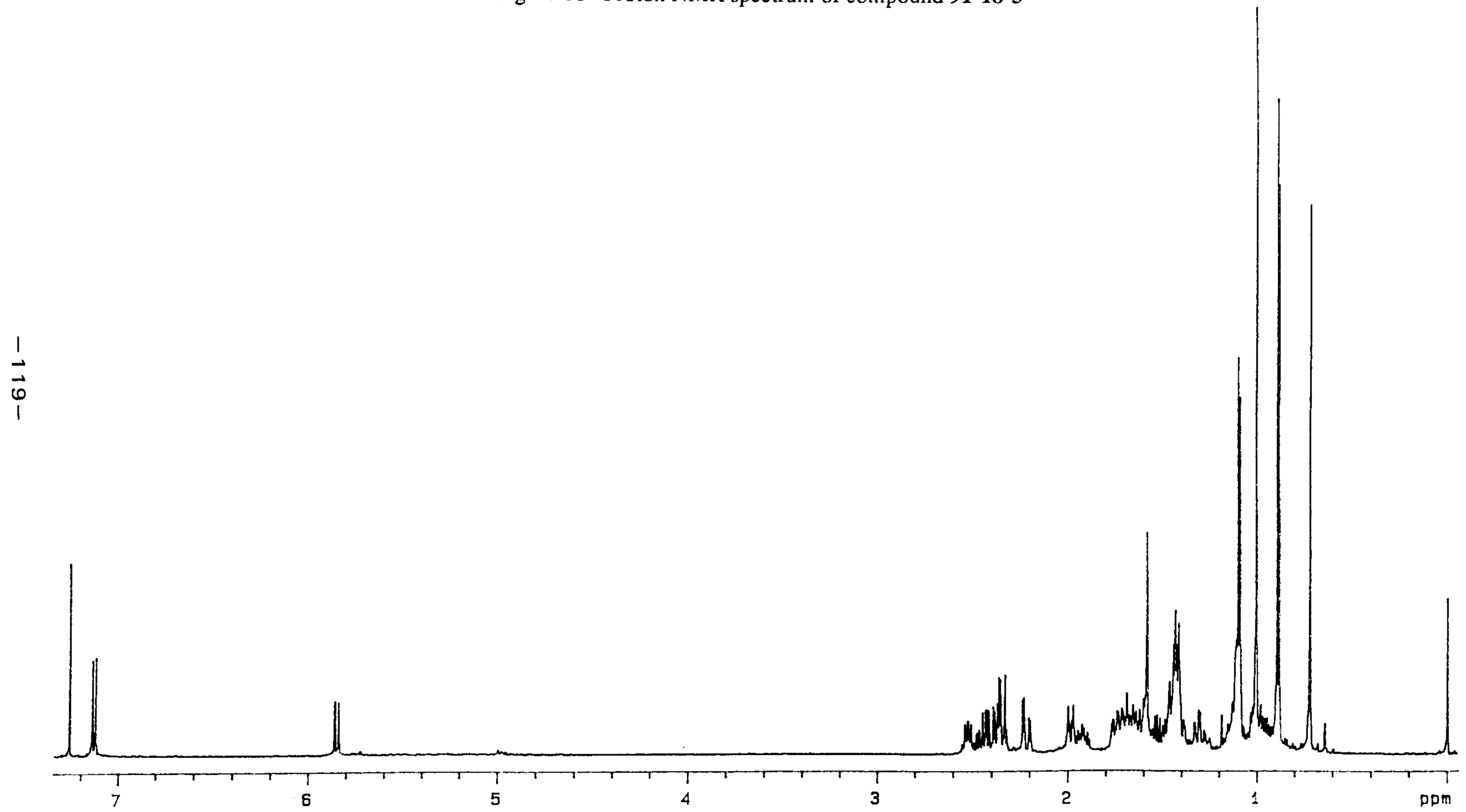


Fig 4-11 Proton COSY NMR spectrum of compound 91-18-3 (upfield region).

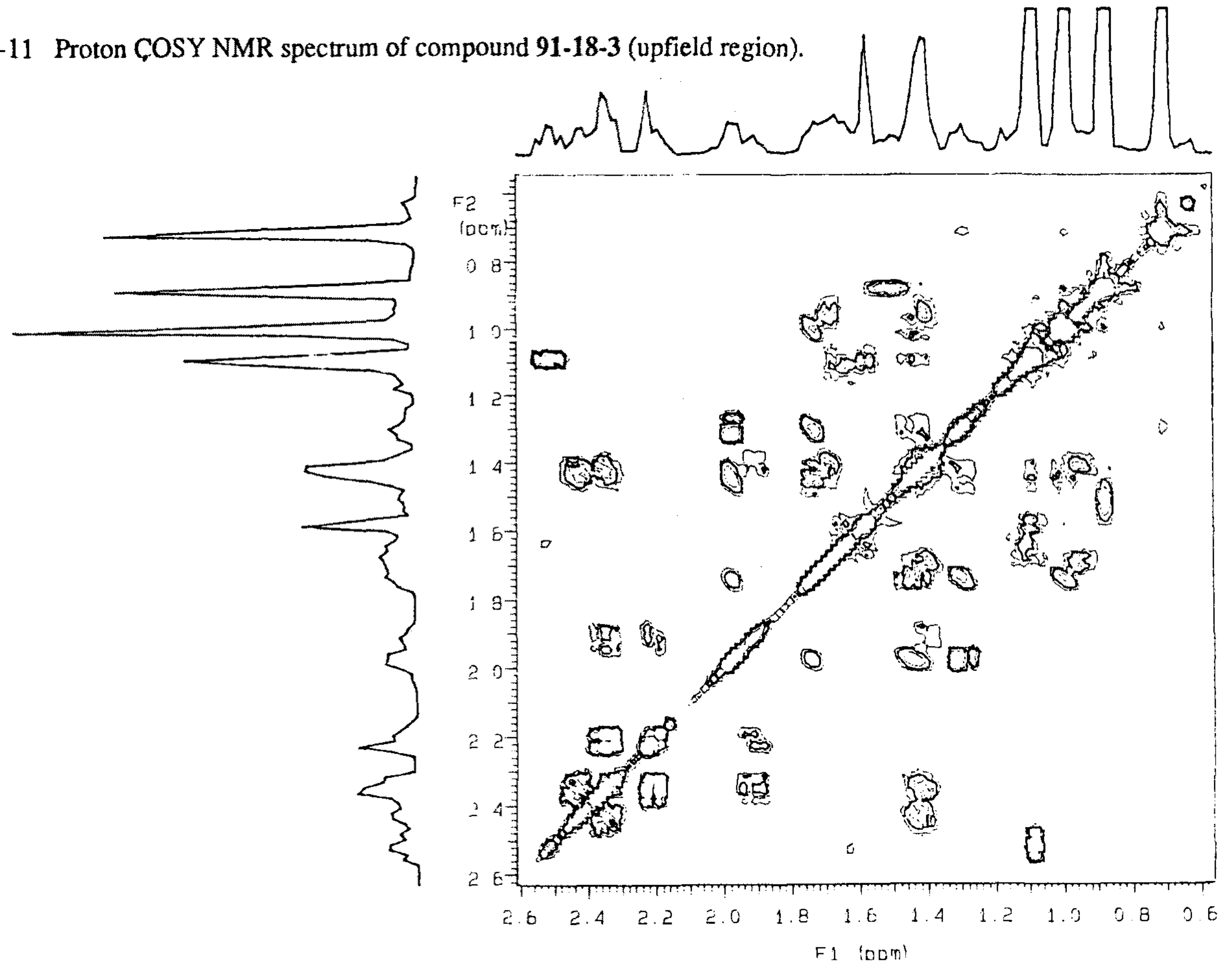


Fig 4-12 Carbon NMR spectrum of compound 91-18-4

91-18-2 3-3-hplc-7-rh-5-c
OBSERVE C13
FREQUENCY 125.697 MHz
SPECTRAL WIDTH 25000.0 Hz
ACQUISITION TIME 1.300 sec
RELAXATION DELAY 2.000 sec
PULSE WIDTH 17.0 usec
AMBIENT TEMPERATURE
NO. REPETITIONS 2176
DECOUPLE H1
HIGH POWER 43
DECOUPLER CONTINUOUSLY ON
WALTZ-16 MODULATED
DOUBLE PRECISION ACQUISITION
DATA PROCESSING
LINE BROADENING 0.5 Hz
FT SIZE 65536
TOTAL ACQUISITION TIME 9 minutes

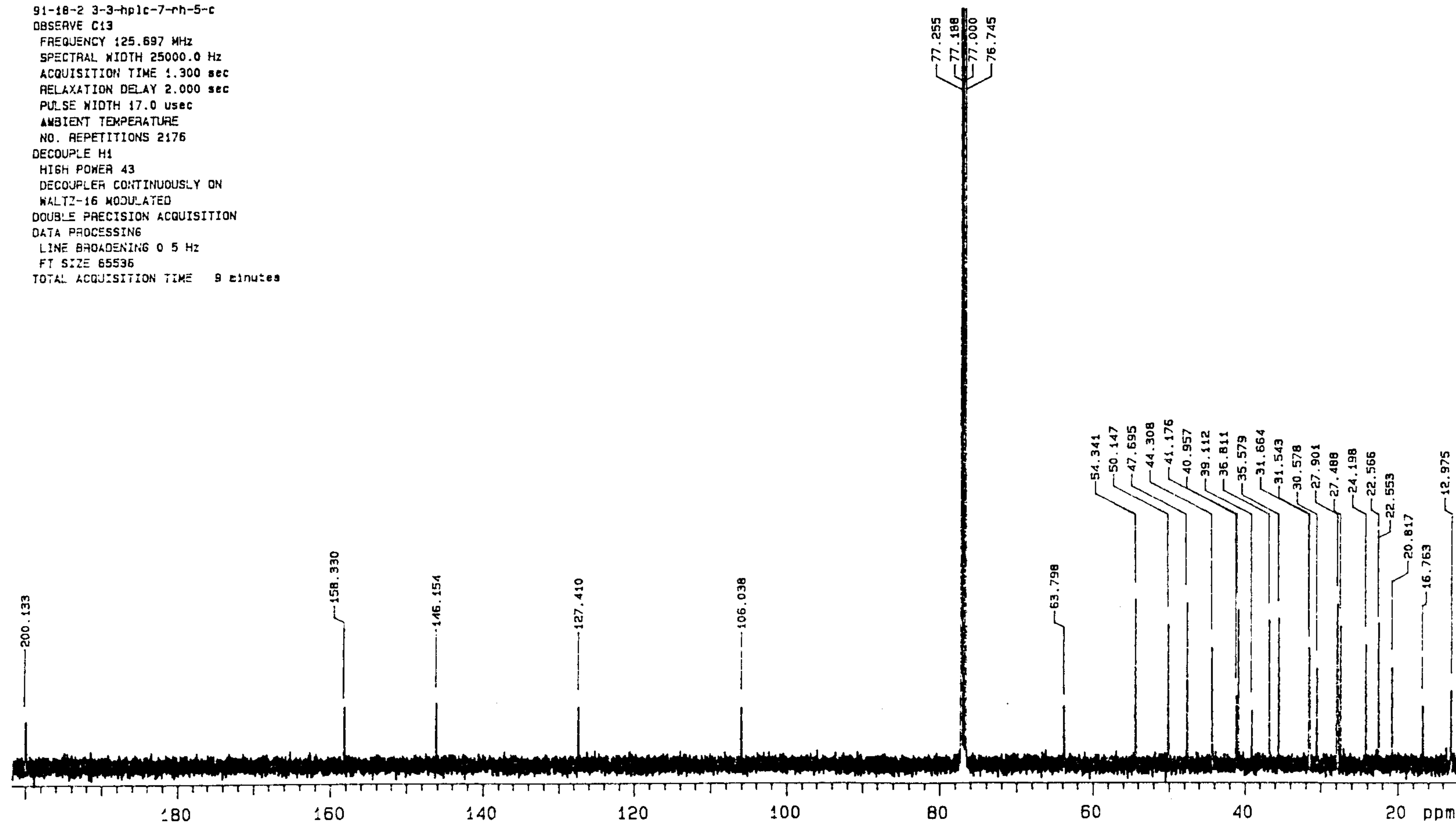


Fig 4-13 Proton NMR spectrum of compound 91-18-4

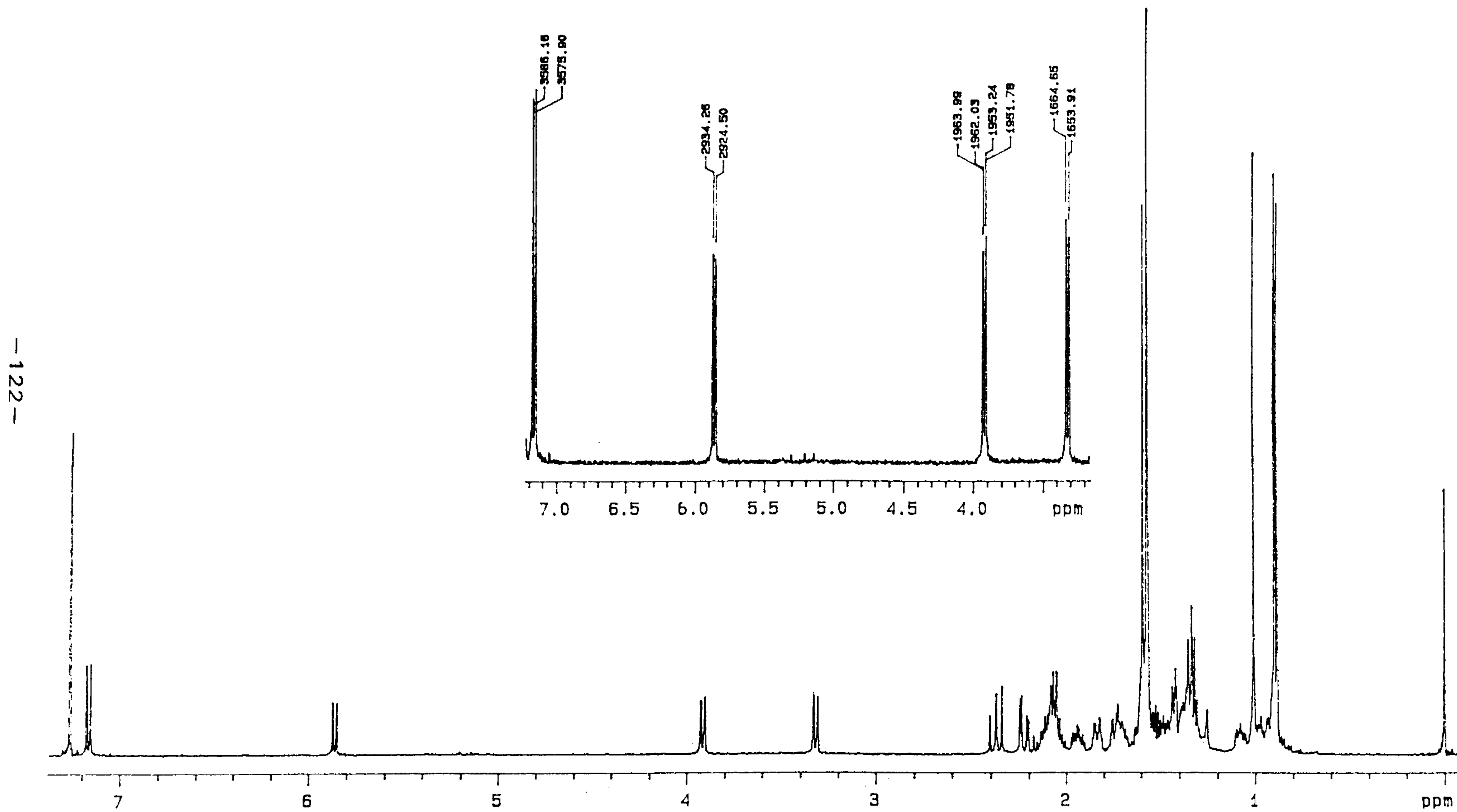


Fig 4-14 Proton COSY NMR spectrum of compound 91-18-4 (upfield region)

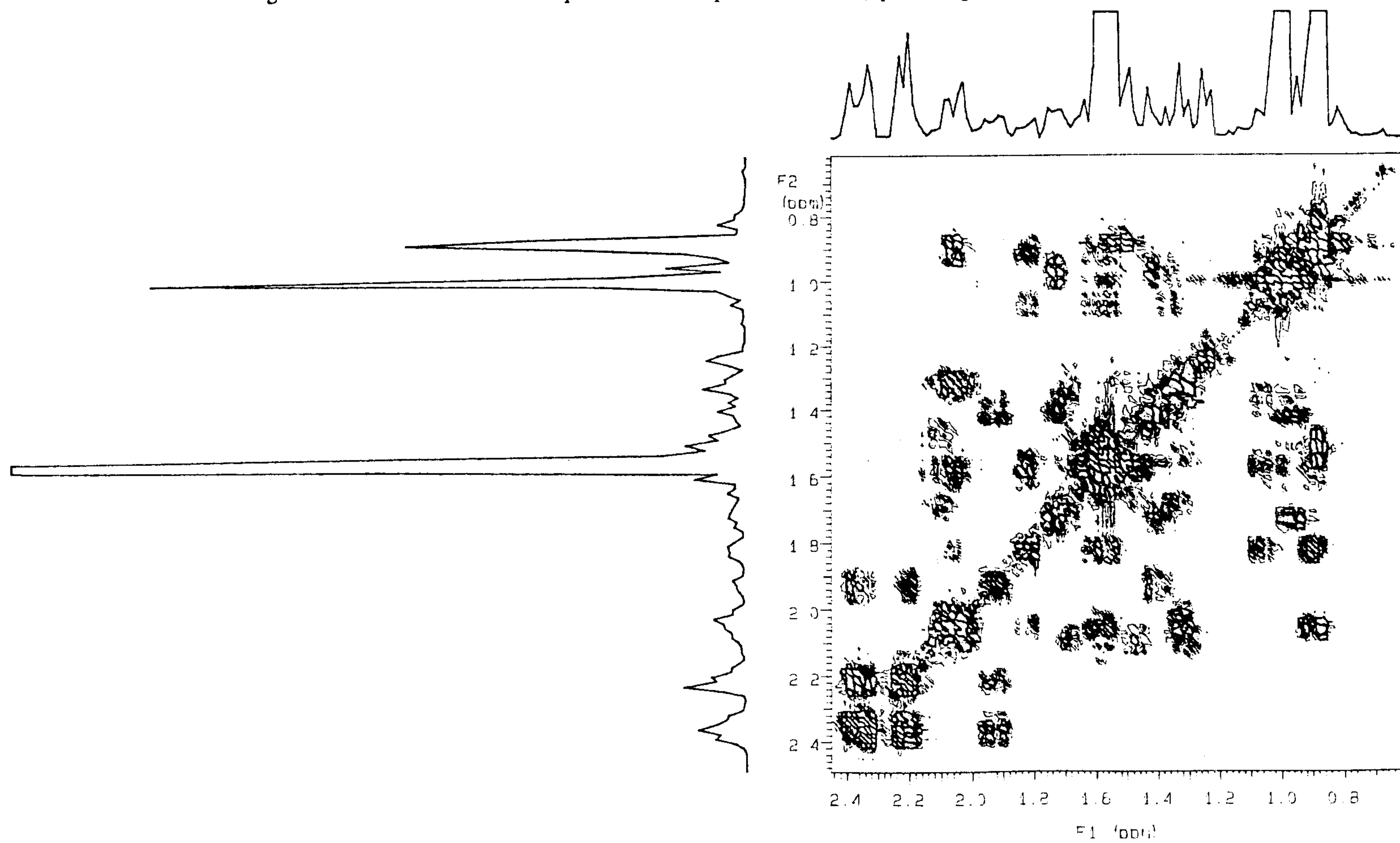


Fig 4-15 HMQC spectrum of compound 91-18-4 (upfield region)

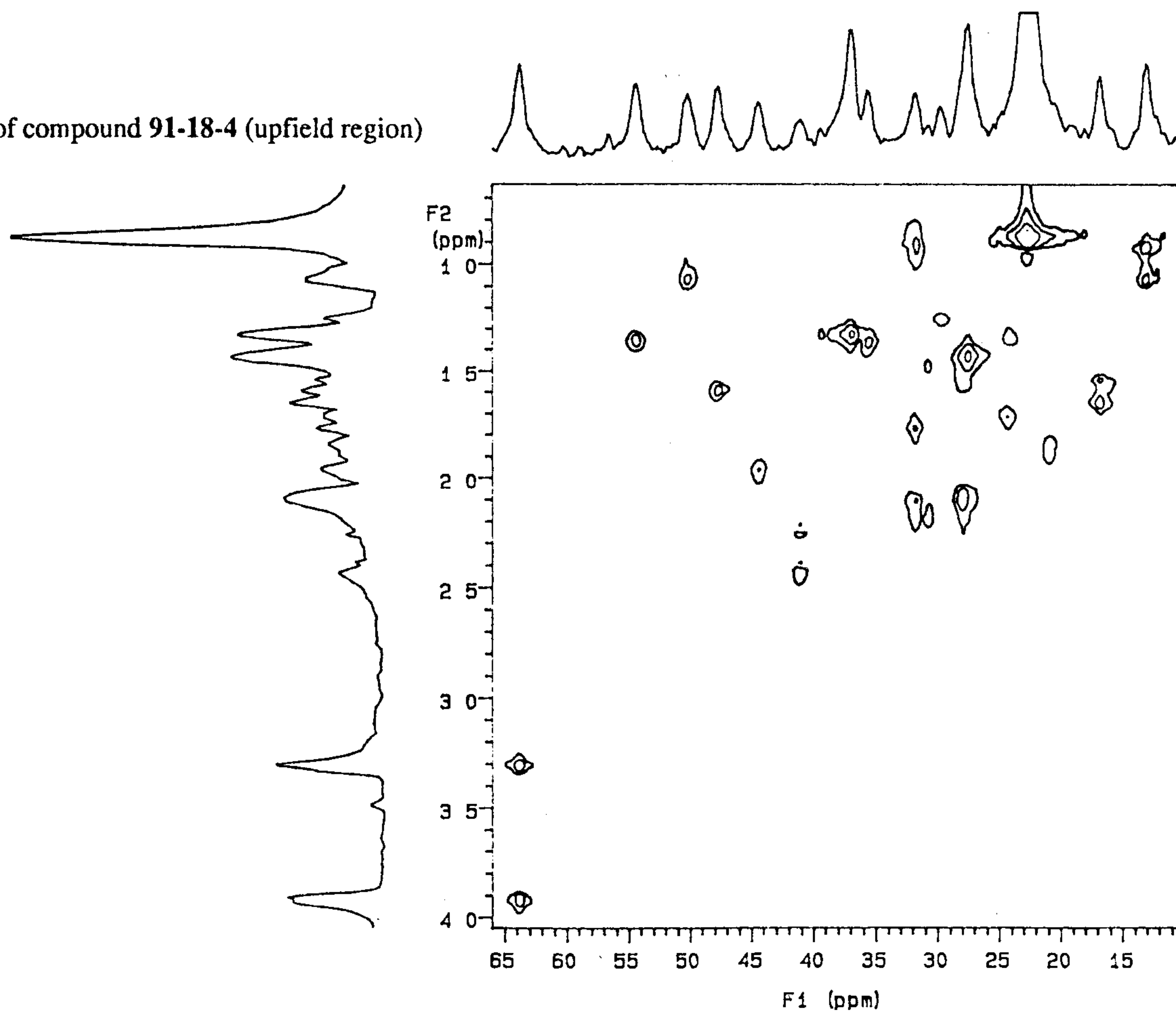


Fig 4-16 HMBC spectrum of compound 91-18-4

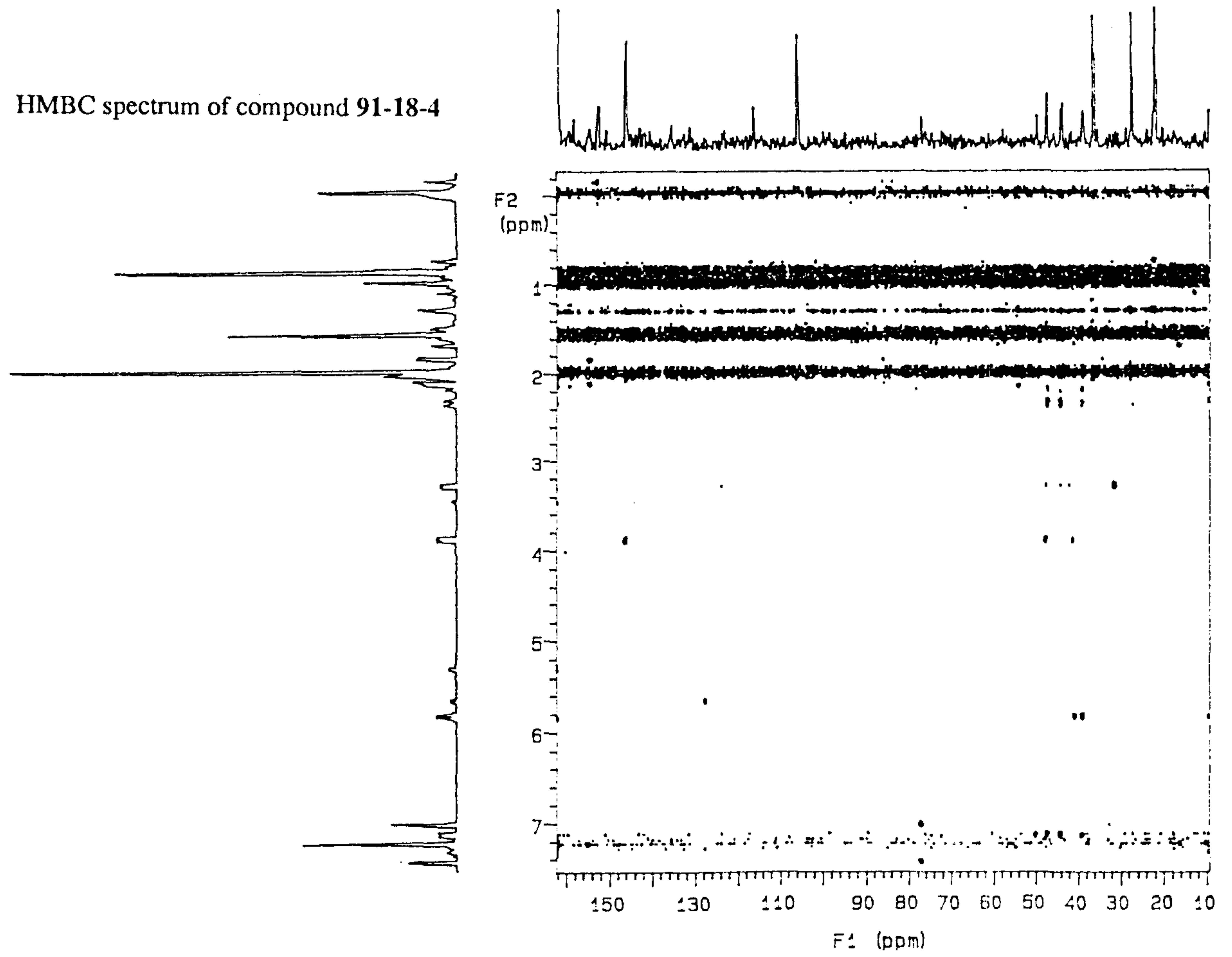


Fig 4-17 Carbon NMR spectrum of compound 91-18-5

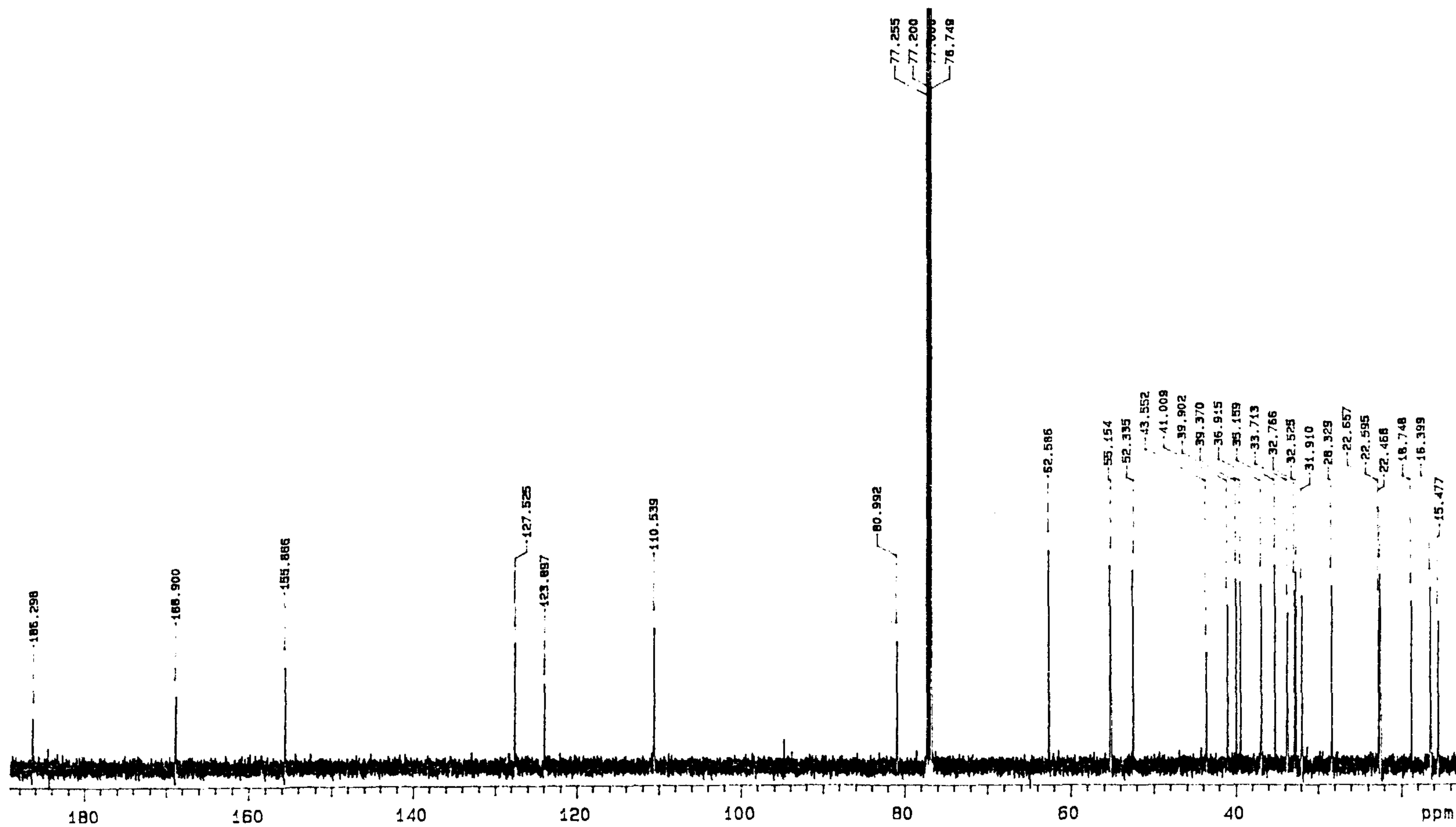


Fig 4-18 Proton NMR spectrum of compound 91-18-5

91-18-6-hplc-2-rh-1-p
OBSERVE H1
FREQUENCY 499.843 MHz
SPECTRAL WIDTH 8000.0 Hz
ACQUISITION TIME 1.892 sec
RELAXATION DELAY 0.000 sec
PULSE WIDTH 9.0 usec
AMBIENT TEMPERATURE
NO. REPETITIONS 32
DOUBLE PRECISION ACQUISITION
DATA PROCESSING
F1 SIZE 32768
TOTAL ACQUISITION TIME 1 minutes

-127-

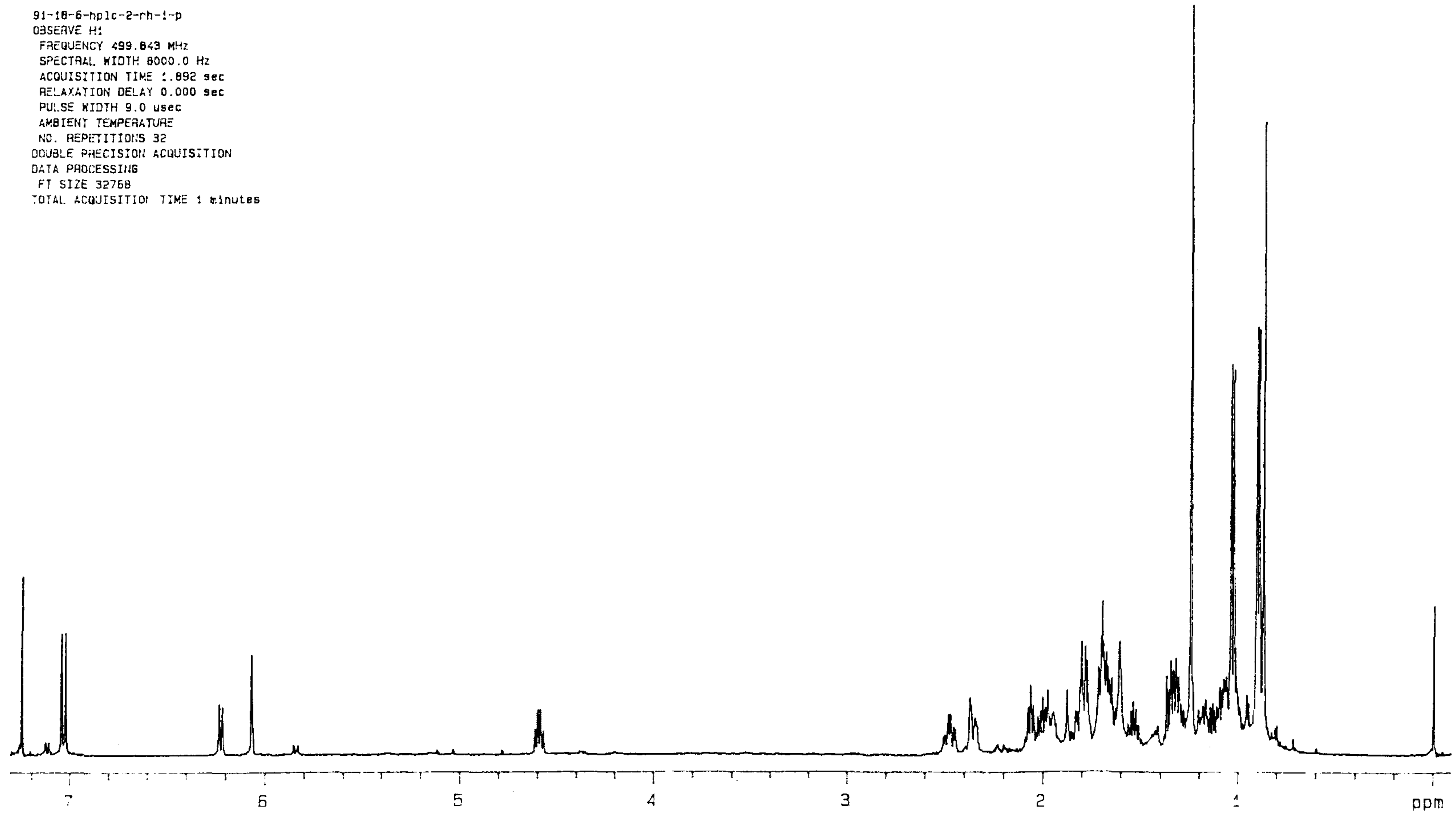
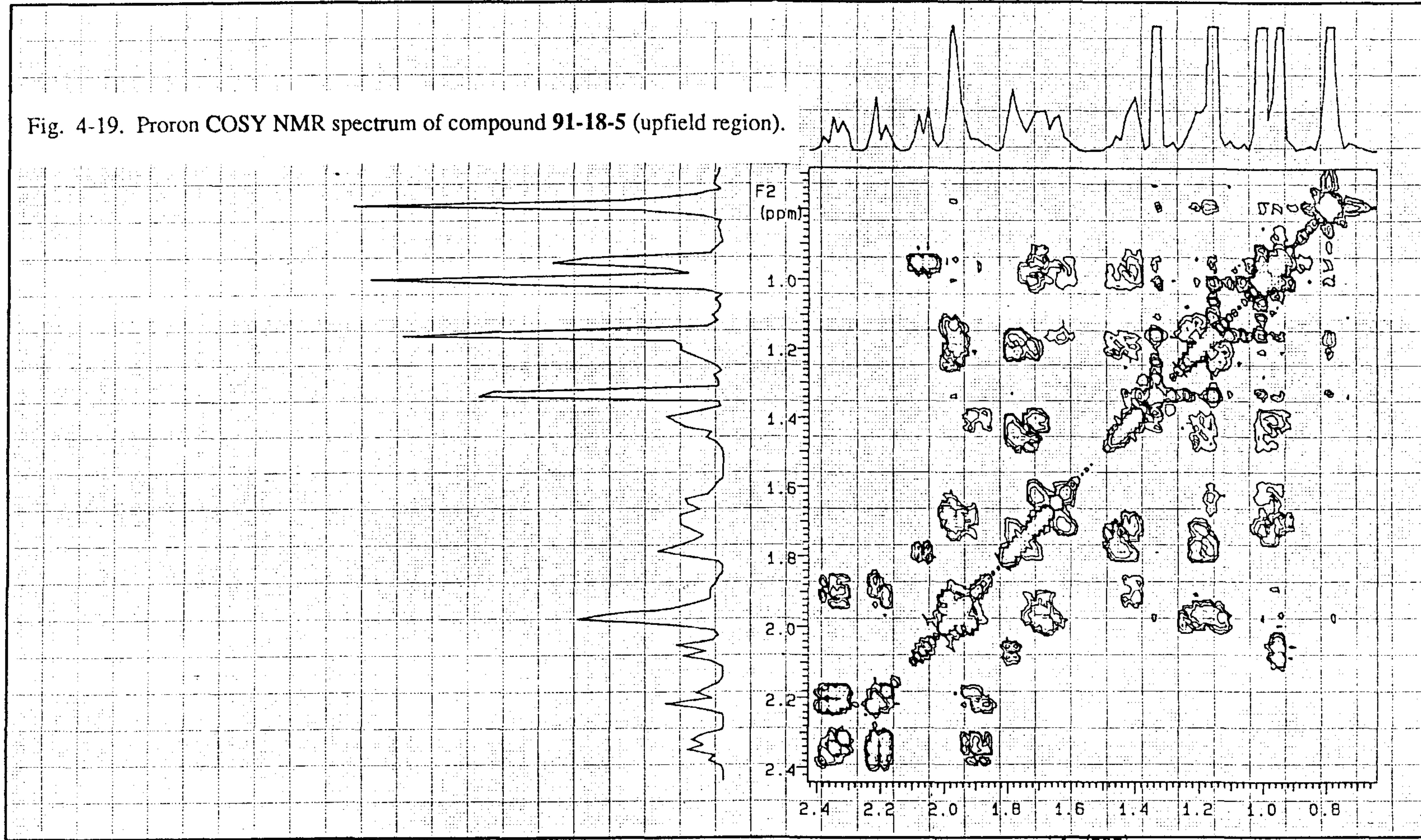


Fig. 4-19. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-18-5 (upfield region).



OBSERVE
Nucleus H1 Freq 499.84 MHz
Spec. Wdm 3796.51 Hz Offset -670.30 Hz
Acq. Time 0.20 sec Delay 2.00 sec
Pulse Width 9.00 μ sec Transients 2.00

DECOUPLE
Nucleus H1 Offset 0 Hz
Mode rrr Power not used dB
Modulation Mode c Freq 200.00 Hz
Pulse Width not used μ sec Power Mode not used

PLOT/PROCESSING
FN 1024.00 K RE 342.30 sec CD 876.69 sec
LB not used Hz AF not used sec CCD not used
Width not used Hz/ppm Start not used Hz/ppm
Reference not used 342.30

EXPERIMENT
Pulse Sequence SAMPLE
Tube O.D. relayh mm
Temp not used °C
Solvent CDC13

Number 91-18-2, 3-5, 7-hplc-2-rh-cosy4
File not used
Date May 1 93
XL not used varian
500

Fig 4-20 Carbon NMR spectrum of compound 91-18-6

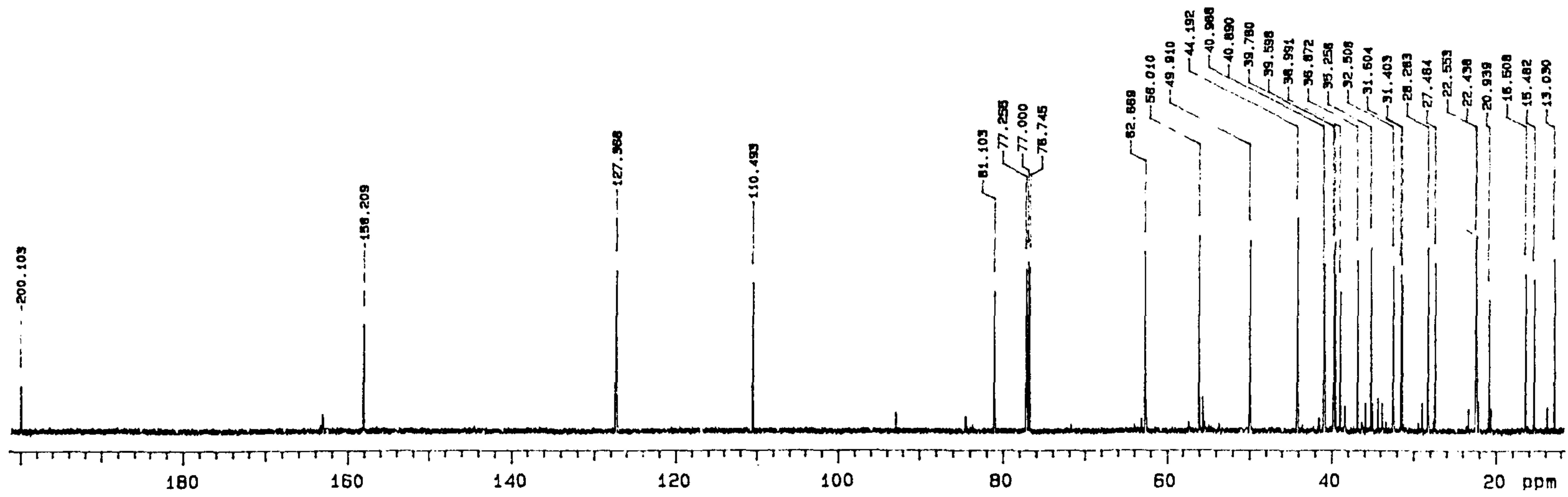


Fig 4-21 Proton NMR spectrum of compound 91-18-6

--130--

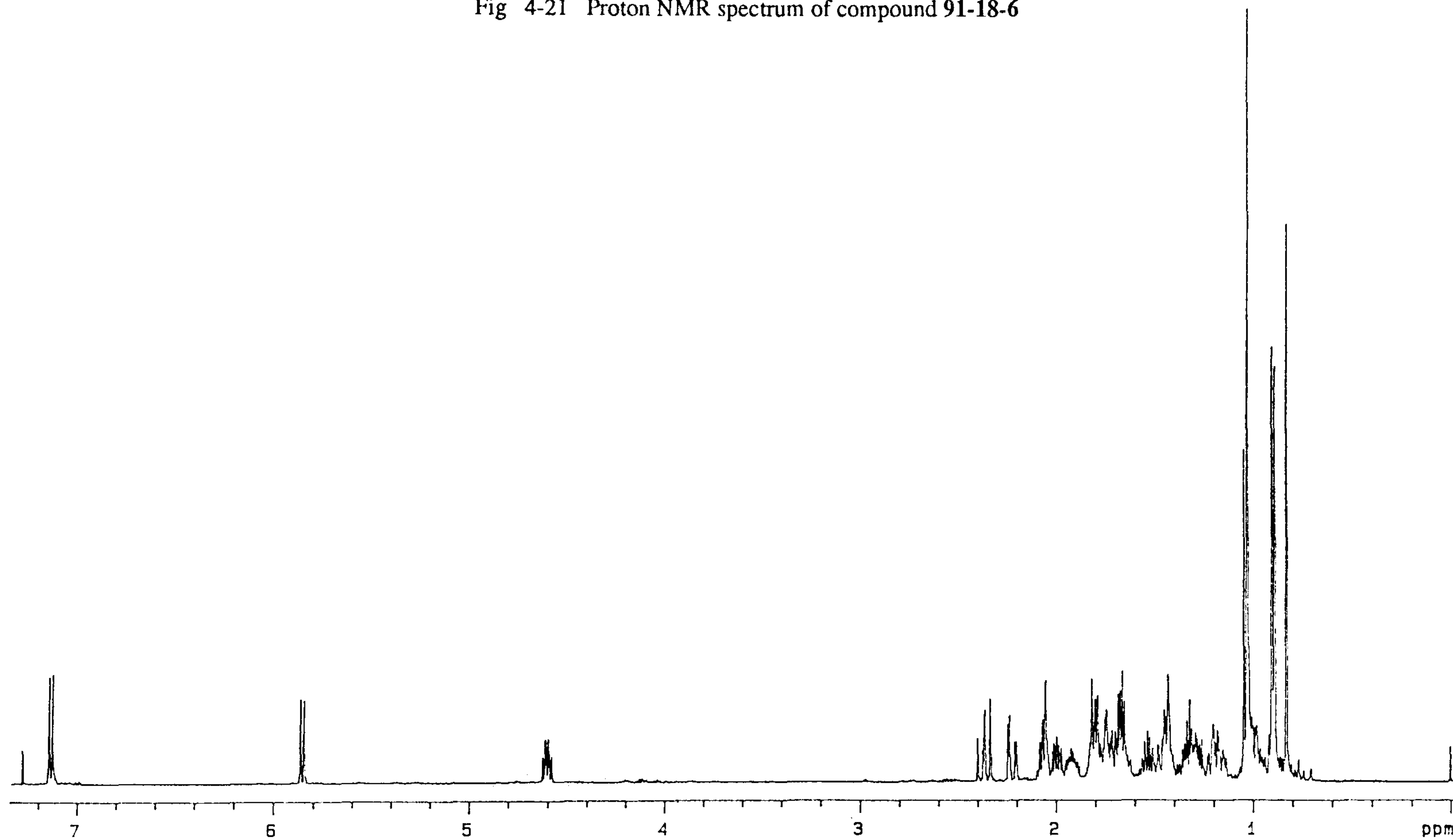
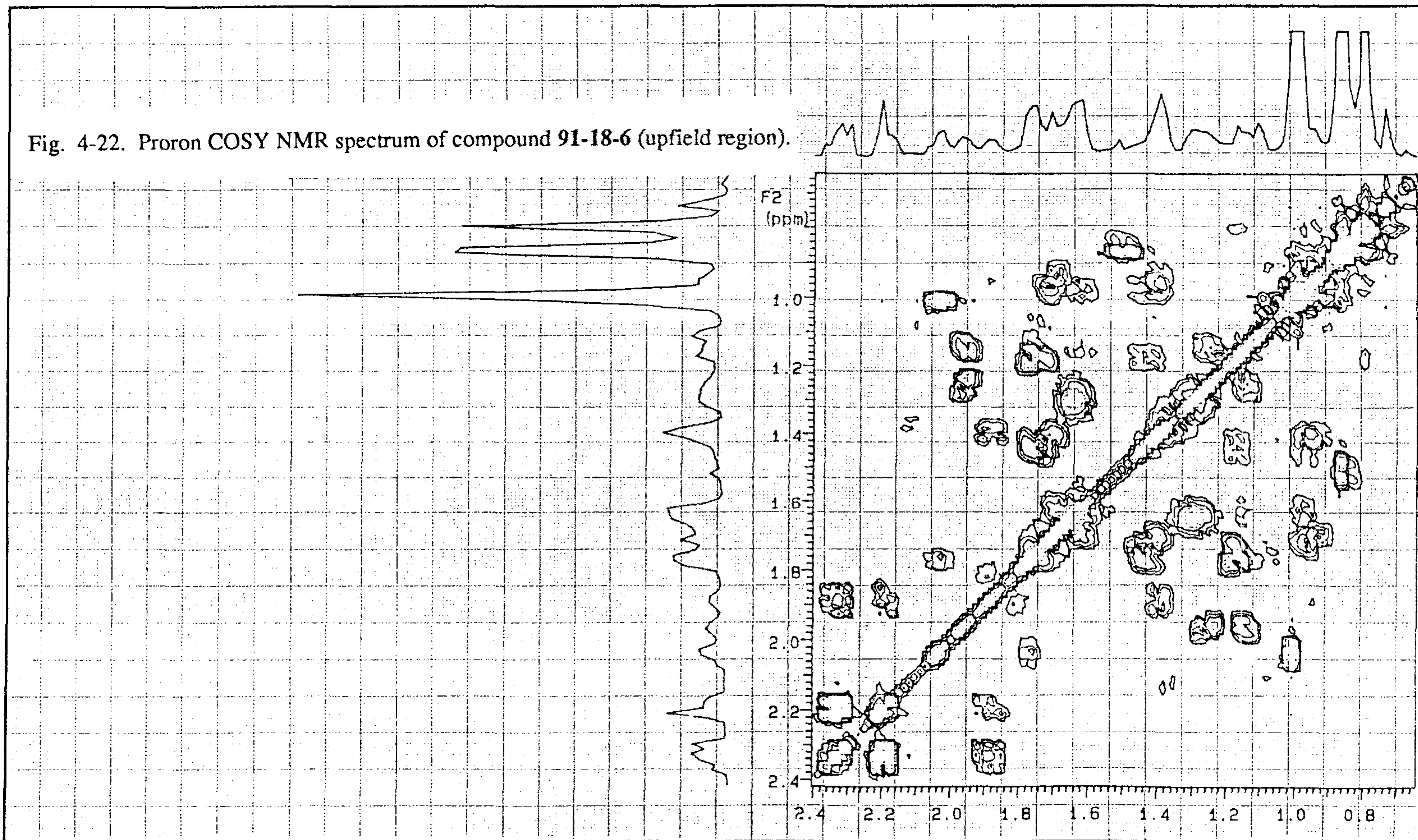


Fig. 4-22. Proron COSY NMR spectrum of compound 91-18-6 (upfield region).



OBSERVE

Nucleus	H1	Freq	499.84	MHz	
Spec Width	3835.83	Hz	Offset	-680.00	Hz
Acq Time	0.20	sec	Delay	2.00	sec
Pulse Width	9.00	μsec	Transients	2.00	

DECOUPLE

Nucleus	H1	Offset	0	Hz
Mode	hnn	Power	not used	dB
Modulation Mode	c	Freq	200.00	Hz
Pulse Width	---	Power Mode	not used	

PLOT/PROCESSING

FN	1024.00	K	RE	sec	CD	sec
LB	not used	Hz	AF	sec	CCD	
Width	885.77	Hz/ppm	Start	322.26	Hz/ppm	
Reference						

EXPERIMENT

Pulse Sequence	relayh	
Tube OD	not used	mm
Temp		°C
Solvent	CDCl3	

F1 (ppm)

SAMPLE

Number _____
 File _____
 91-18-5-hplc-7-rh-4-cosy45
 Date _____
 May 3 1993
 500



Varian

Fig 4-23 Carbon NMR spectrum of compound 91-18-7

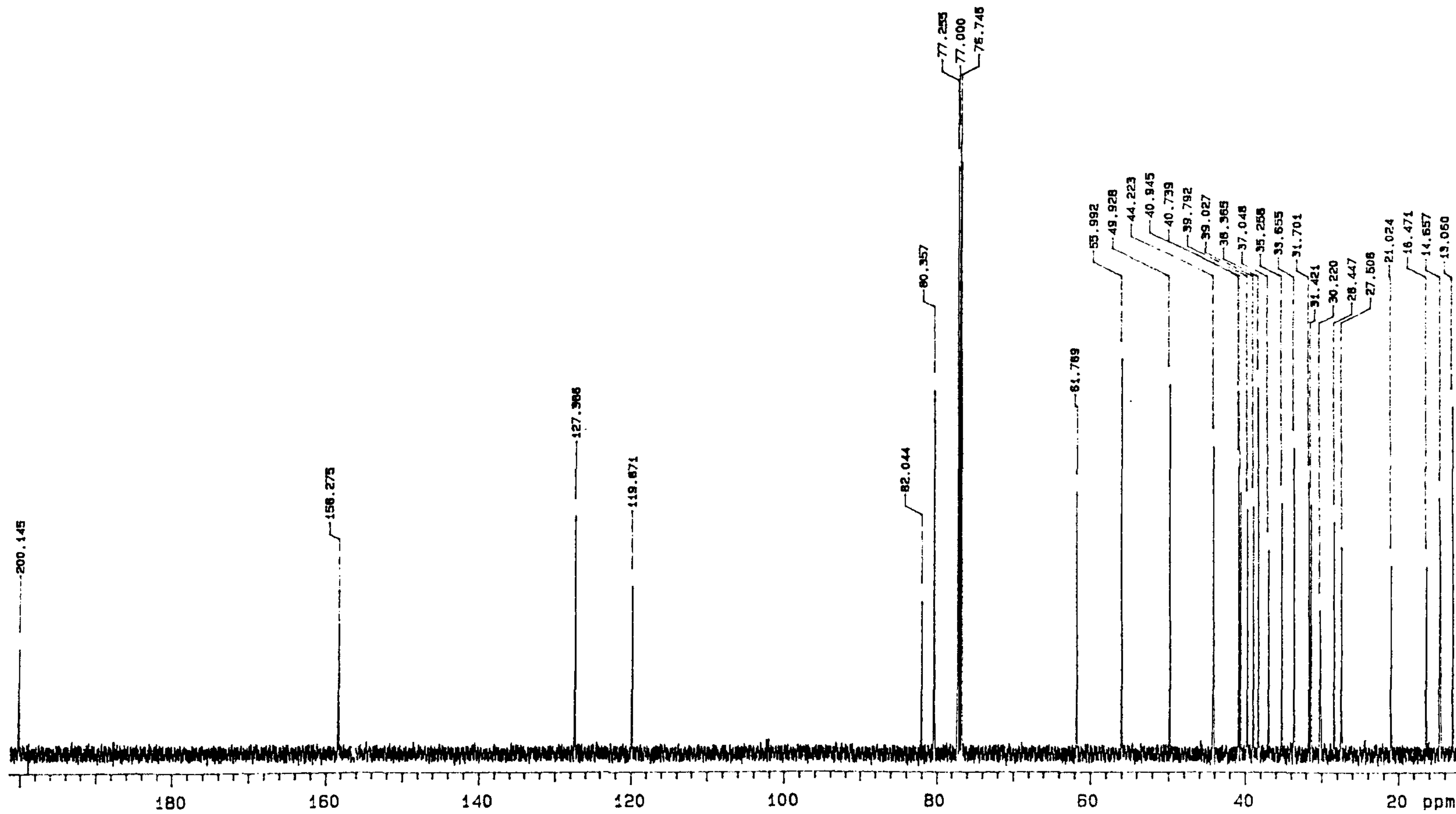


Fig 4-24 Proton NMR spectrum of compound 91-18-7

-133-

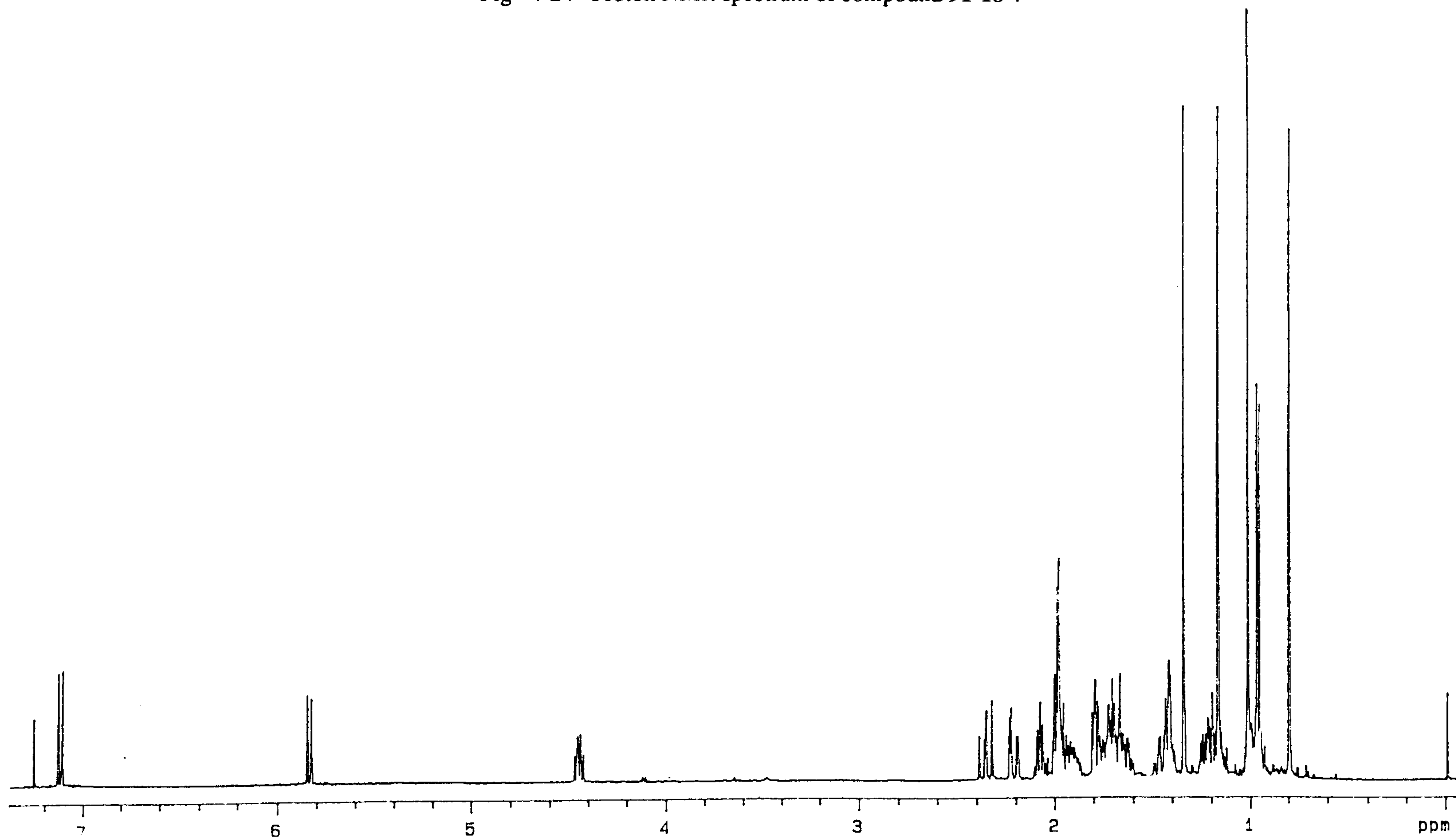
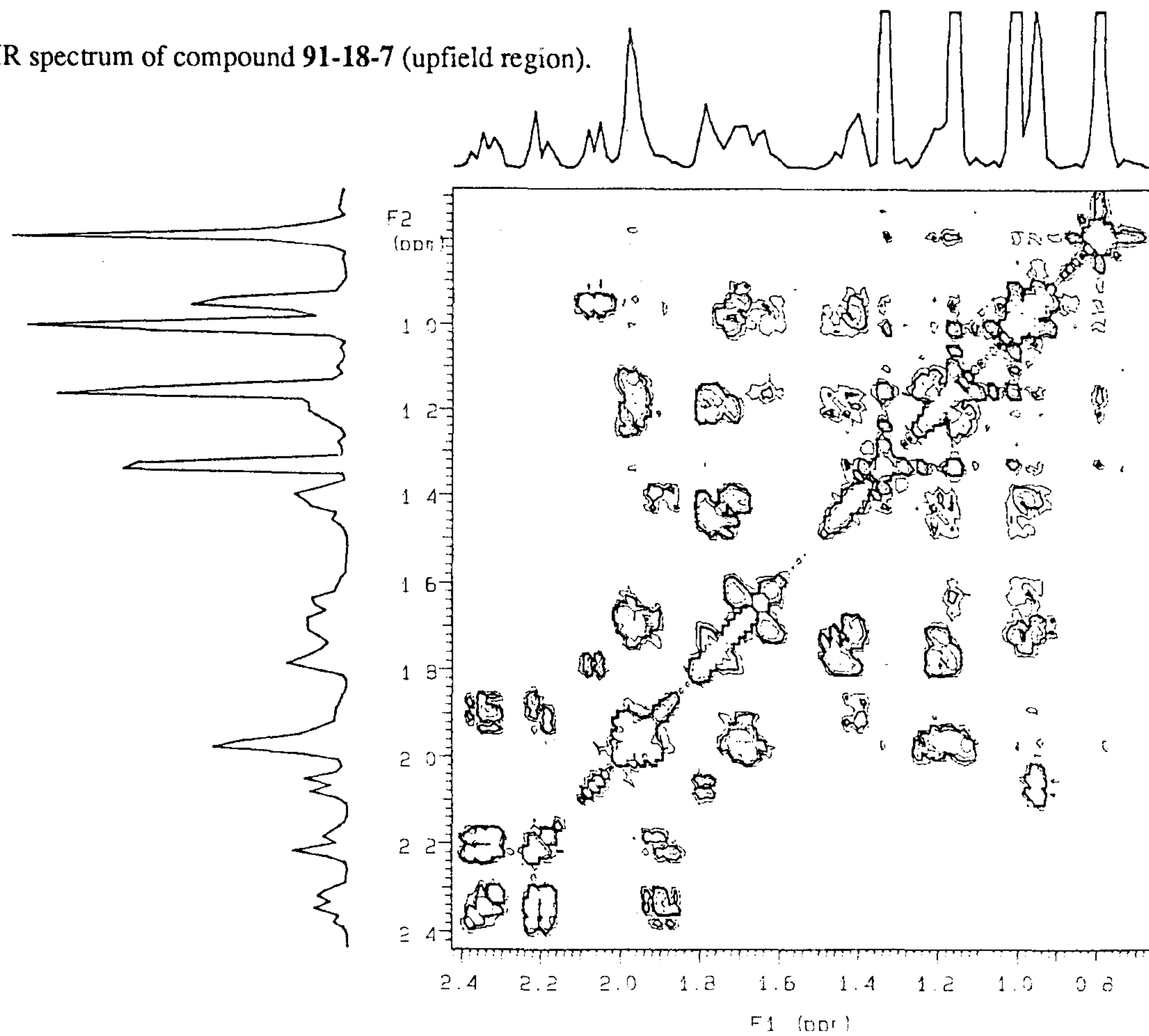


Fig 4-25 Proton COSY NMR spectrum of compound 91-18-7 (upfield region).



제 5 장 Hydroids의 대사물질

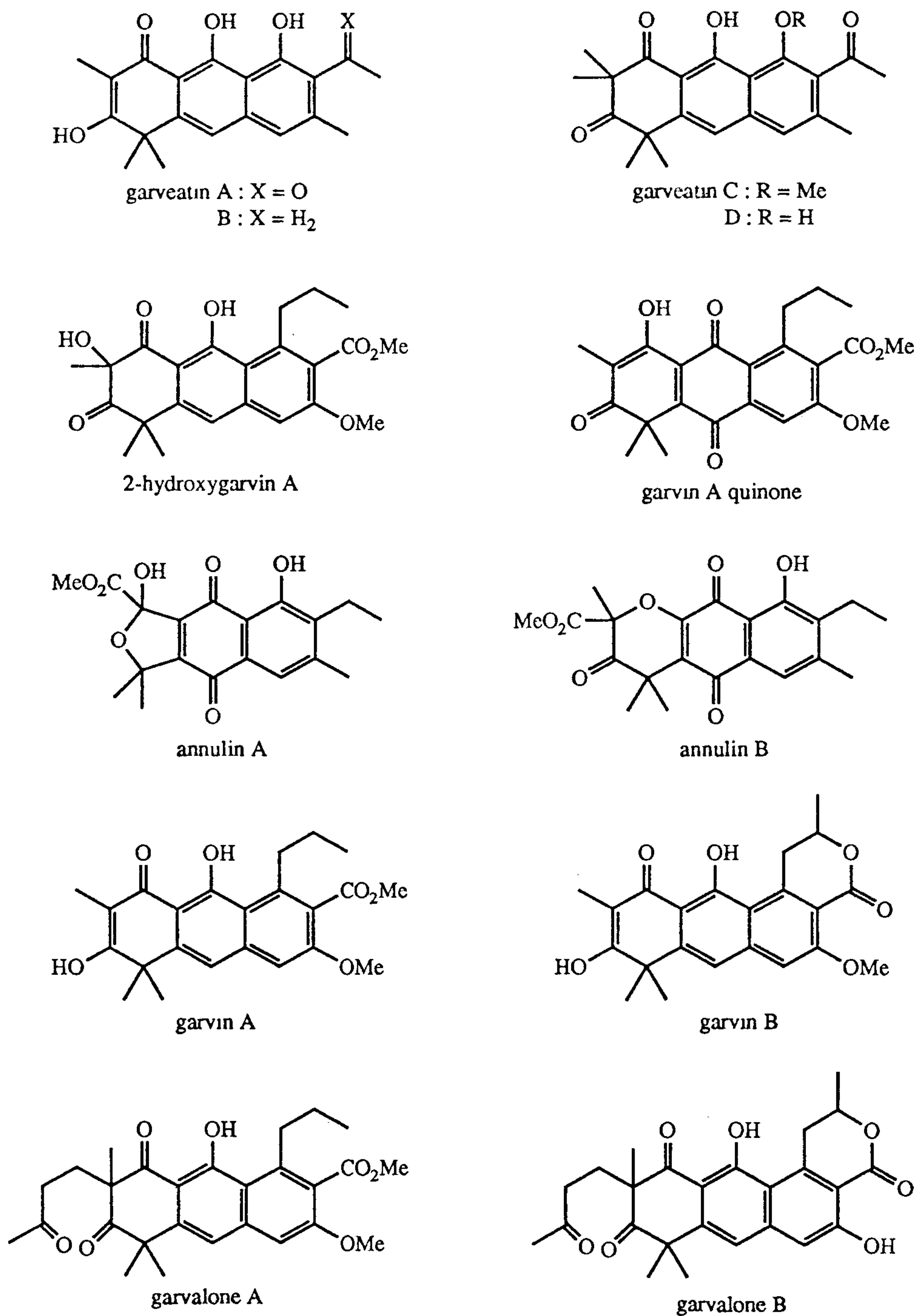
5.1. 연구의 배경

Hydroids(히드라, class Hydrozoa)는 산호, 해파리등과 더불어 강장동물문(phylum)을 구성하는 중요한 분류군이다. 그러나 천연물 화학적인 면에서는 강장동물 전체로는 해면과 더불어 모든 해양생물중 가장 연구가 많이 되고 있으나 이들의 대부분은 산호 특히 soft corals, gorgonians등 Alcyonaria아강(=subclass Octocorallia)의 생물에 집중되어있다(제3장 3.1. 연구의 배경).

Alcyonarians를 제외한 다른 강장동물로부터 분리된 천연물은 100에 미달하며 이들도 대부분은 Alcyonaria아강과 분류학적으로 가까운 Zoantharia아강(=Hexacorallia)으로부터 분리되었고 hydroids의 천연물은 20여 물질에 불과하다(Faulkner, 1992; 신 등, 1993). 연구가 이루어진 종의 수도 본 연구에서 조사한 바에 따르면 4종에 불과하여 hydroids의 천연물에 대한 일반적인 경향조차 파악이 되지 않은 실정이다. 알려진 물질들은 aromatic polyketides, β -carbonline계의 alkaloids, unusual phospholipids, polyhydroxy steroids등이나 이들중 polyketides를 제외한 다른 천연물은 여러 해양생물로부터 흔히 발견되는 물질들이어서 hydroids의 고유한 대사물질로 보기에는 곤란하다(Fig. 5-1).

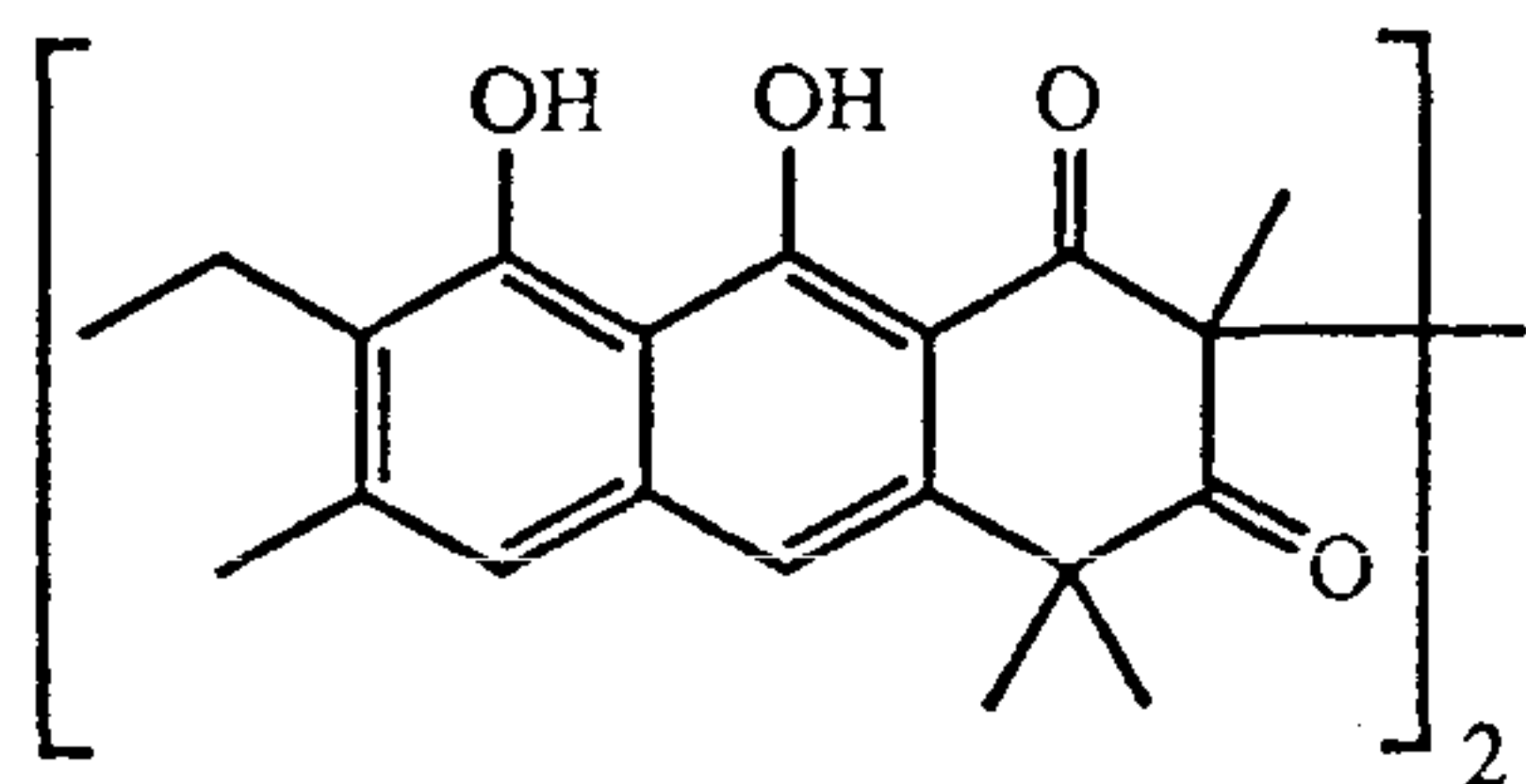
Hydroids의 대사물질중 독특한 것은 anthraquinone계의 polyketides들로서 이들은 다른 해양 생물로부터는 보기 드문 생합성적 기원과 탄소골격을 갖추고 있다. 이들은 그 수도 비교적 많고 구조적으로도 다양하나 British Columbia에 서식하는 단 한종의 시료로부터 분리되었으므로 hydroids의 대표적인 대사물질로 보기에는 어려움이 많다.

Hydroids의 천연물이 잘알려지지 않은 것은 이들의 2차 대사 효소체계가 발달하지 않아서 천연물을 만드는 예가 적은것이 가장 중요한 이유이겠으나 또 한가지의 원인은 시료의 다량 채집의 어려움이다. Hydroids는 일반적으로 군체가 매우 연약하고 크기

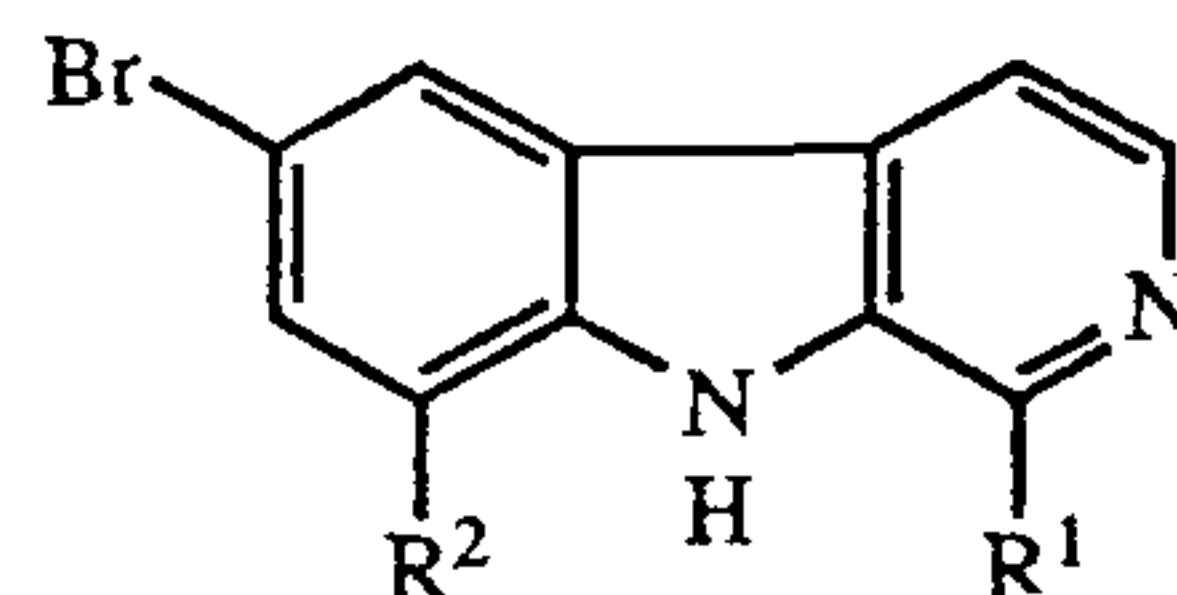


aromatic polyketides isolated from *Garveia annulata*

Fig. 5-1. Metabolites of hydroids.

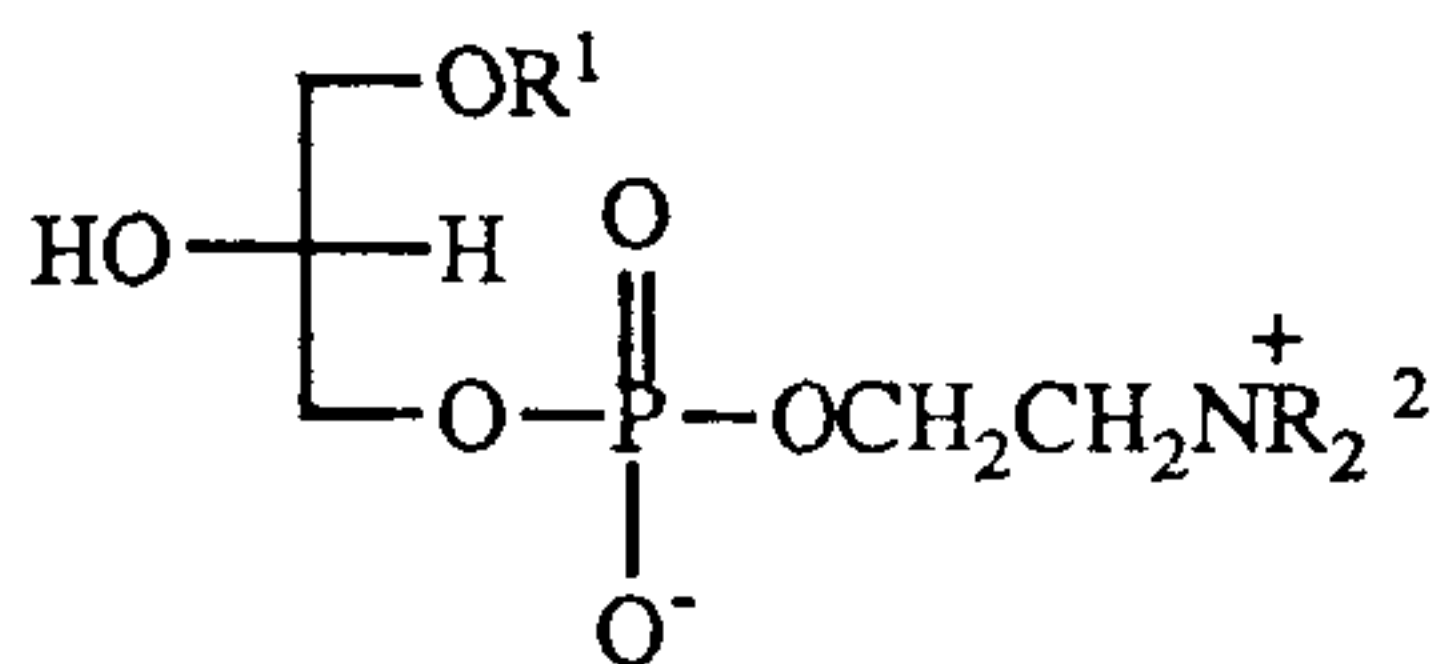


(*Garveia annulata*)



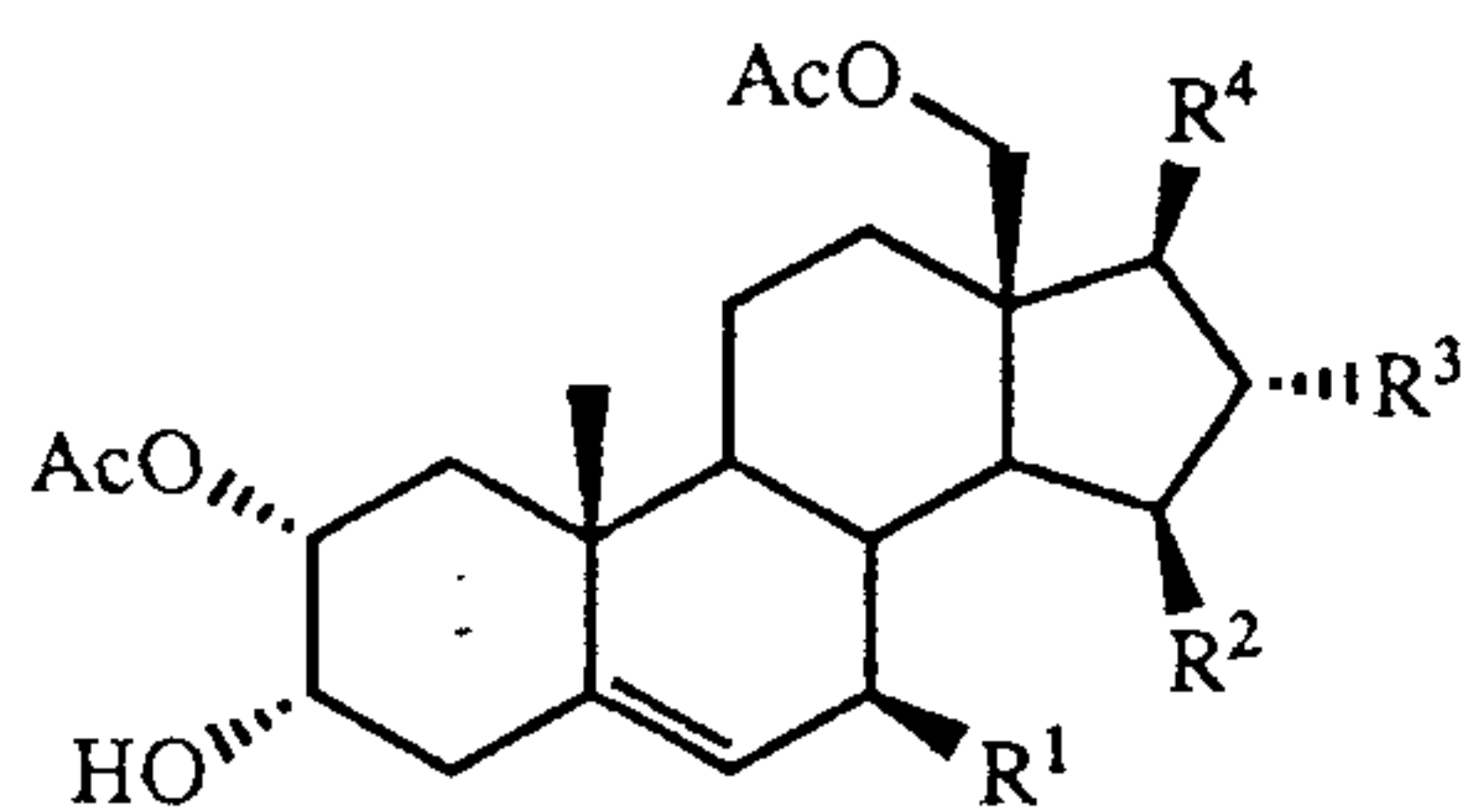
$R^1 = \text{Et}, R^2 = \text{H},$
 $R^1 = \text{Me}, R^2 = \text{H},$ and
 $R^1 = \text{Et}, R^2 = \text{Br}$

(*Agalophenia pluma*)



$R^1 = \text{C}_{16}\text{H}_{33}, R^2 = \text{Me},$
 $R^1 = \text{C}_{14}\text{H}_{29}, R^2 = \text{Me},$ and
 $R^1 = \text{CH=CHC}_{14}\text{H}_{29}, R^2 = \text{H}$

(*Solanderia secunda*)

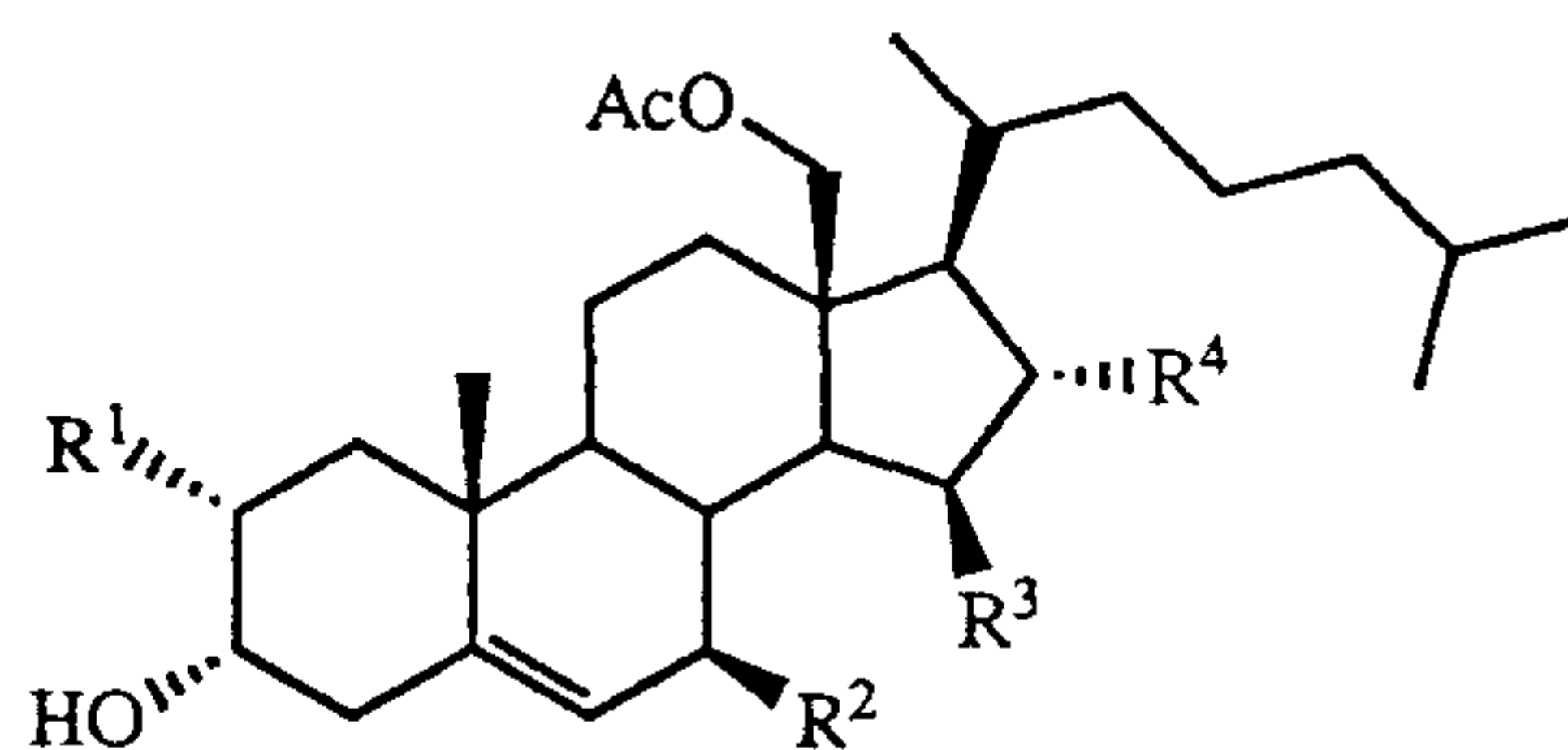
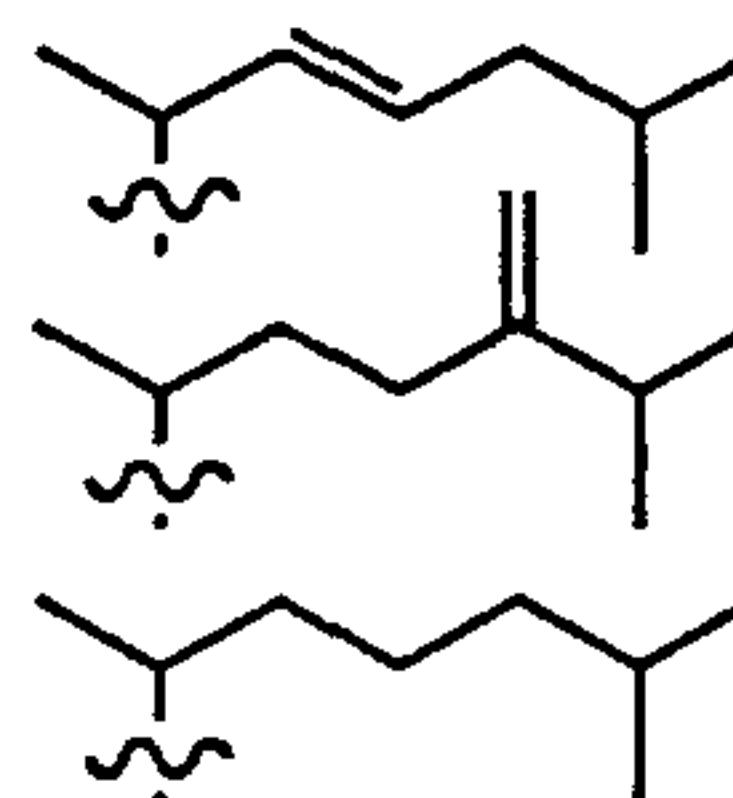


$R^1 = R^2 = \text{H}, R^3 = \text{OAc}, R^4 =$

$R^1 = R^3 = \text{H}, R^2 = \text{OAc}, R^4 =$

$R^1 = R^2 = \text{OAc}, R^3 = \text{H}, R^4 =$

(*Eudendrium glomeratum*)



$R^1 = R^4 = \text{OAc}, R^2 = R^3 = \text{H}$ and

$R^1 = R^4 = \text{H}, R^2 = R^3 = \text{OAc}$

(*E. glomeratum*)

Fig. 5-1. continued.

또한 작아서 천연물 연구에 충분한 양의 시료를 확보하기에 어려움이 많다. 또한 비록 다량의 시료를 확보하더라도 유기용매를 이용한 추출물의 양은 다른 생물의 경우보다 훨씬 적은 것이 일반적이다(Fenical, personal comm.).

본 연구에서는 제주도와 거문도 근해에서 hydroid *Solanderia secunda*를 다량 채집하였으며 유기조추출물에 대한 생리활성도 여부와 무관하게 이 시료를 일차적인 연구대상에 포함시켰다. 그 이유는 위에서 언급한 바와 같이 hydroids의 천연물에 대한 지식이 매우 빈약하므로 생리활성도를 막론하고 신물질의 추출 및 구조결정은 해양천연물 연구에 있어서 중요한 기여로 판단되었기 때문이다. 채집된 *S. secunda*로부터 6개의 물질을 분리하였으며 이들중 3개의 물질은 구조결정작업이 거의 완료되었으며 현재까지의 연구결과는 다음과 같다.

5.2. *Solanderia secunda*의 대사물질

Hydroid *Solanderia secunda*는 우리나라의 남해안 일대에서 흔히 발견되는 강장동물이다. 본 연구에서도 제주도와 거문도 해역에 대한 4차례의 채집에서 이 생물을 항상 발견하였다. 짙은 갈색을 띤 군체의 길이는 20 ~ 40 cm정도이며 부채살(fan) 모양의 branching pattern등 외관상 gorgonians과 대단히 흡사하여 현지 주민들도 목산호라고 부른다. 그러나 군체의 내부중심에 gorgonin이라고 불리는 chitin질의 골격이 없는 점에서 gorgonians와 구분이 된다.

냉동보관한 시료로부터 methanol과 dichloromethane을 이용하여 유기물질을 추출한 뒤 silica와 C₁₈ reversed phase flash chromatography, HPLC등 여러가지 분리기술을 이용하여 몇개의 천연물을 분리하였으며 이들중 3개의 천연물은 현재 2차원적인 구조결정작업이 완료되었으며 입체배열을 연구중이다(Fig. 5-2).

먼저 중간정도의 극성(moderate polarity)을 띤 주대사물질인 91-10-1이 viscous liquid의 형태로 분리되었다. 이 물질의 ¹³C NMR에서는 모두 22개의 signals이 발견되었다(Fig. 5-5). 이들중 δ 176.84에 나타난 quaternary carbon은 esteric carbonyl

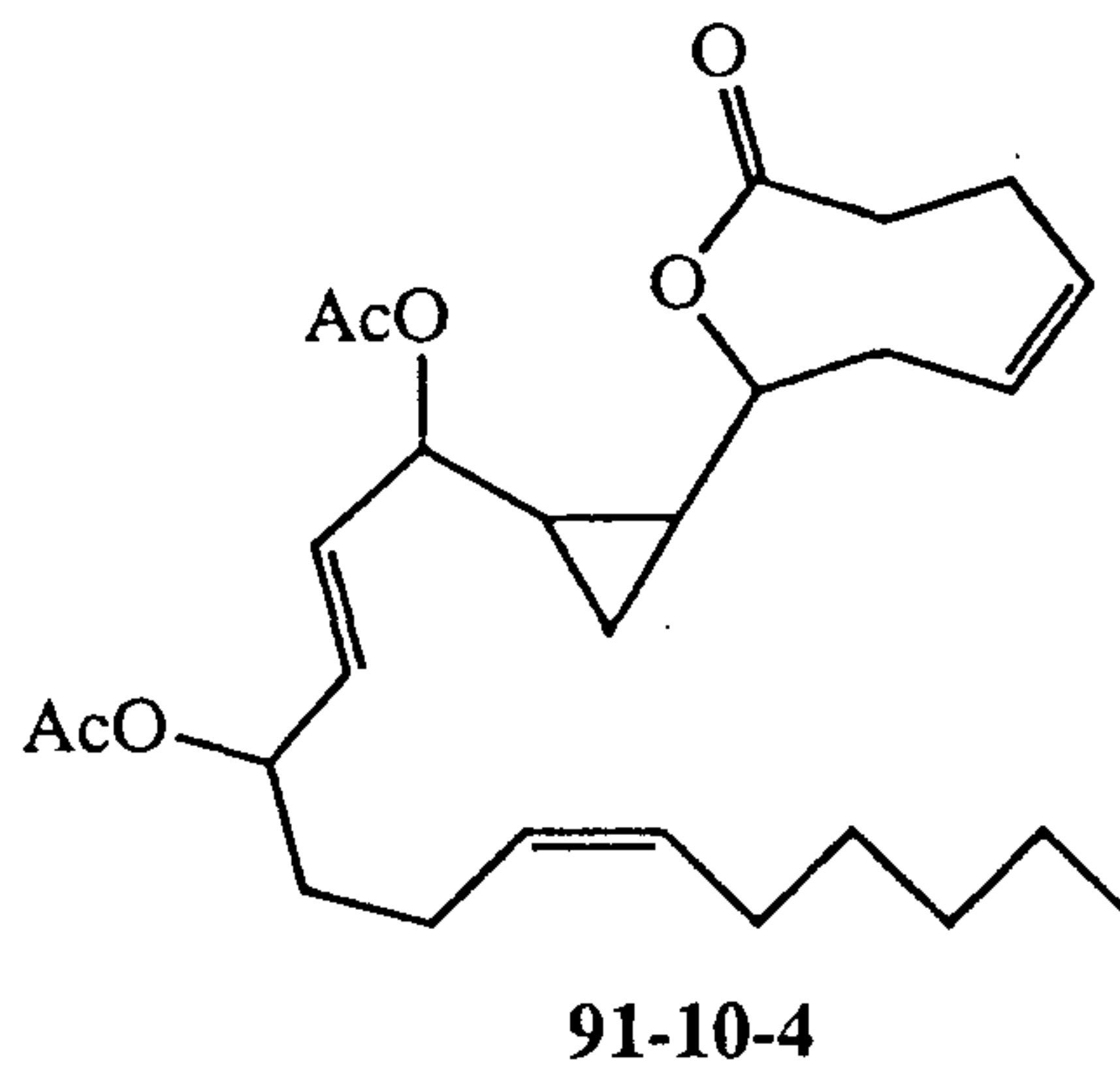
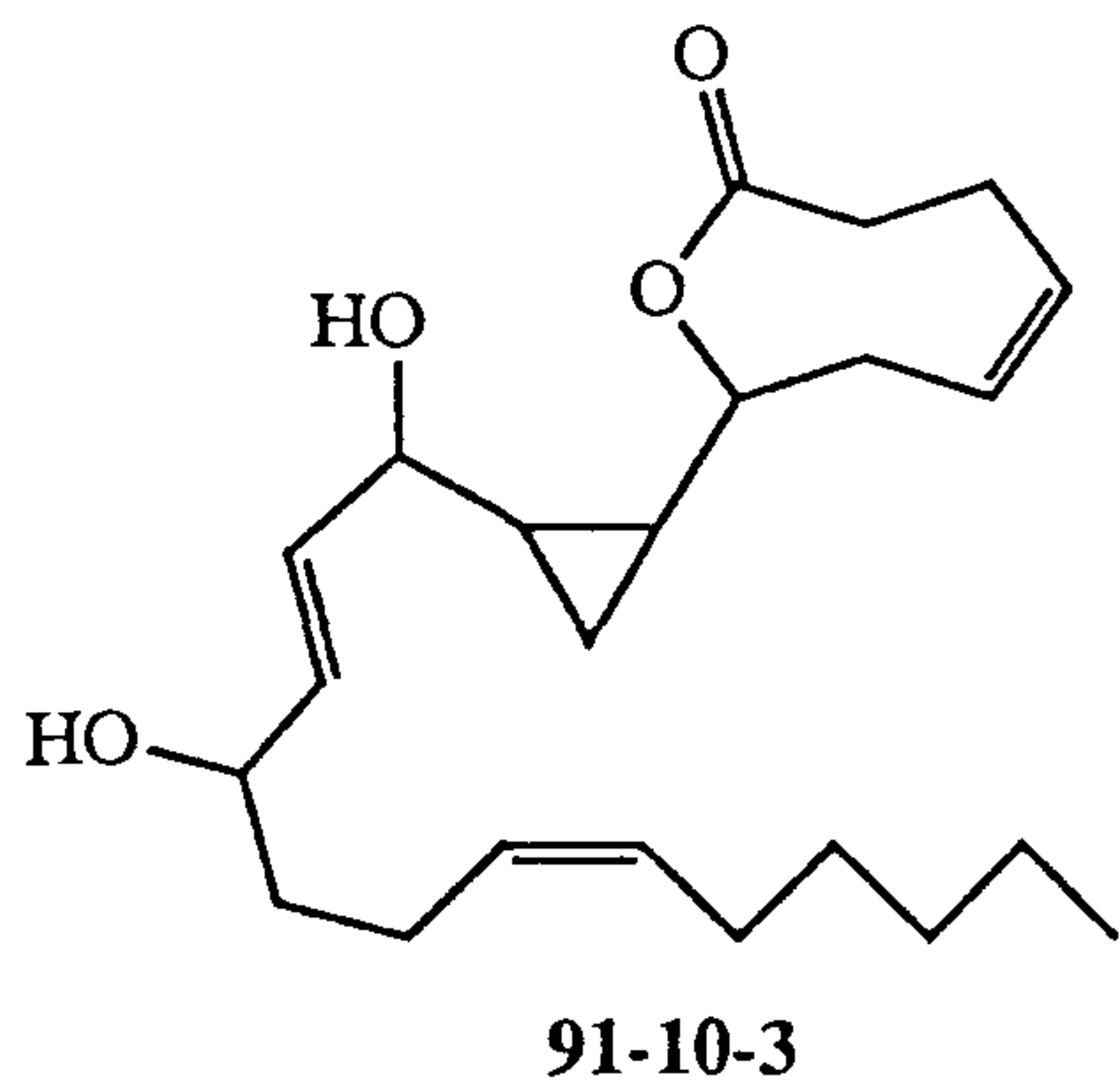
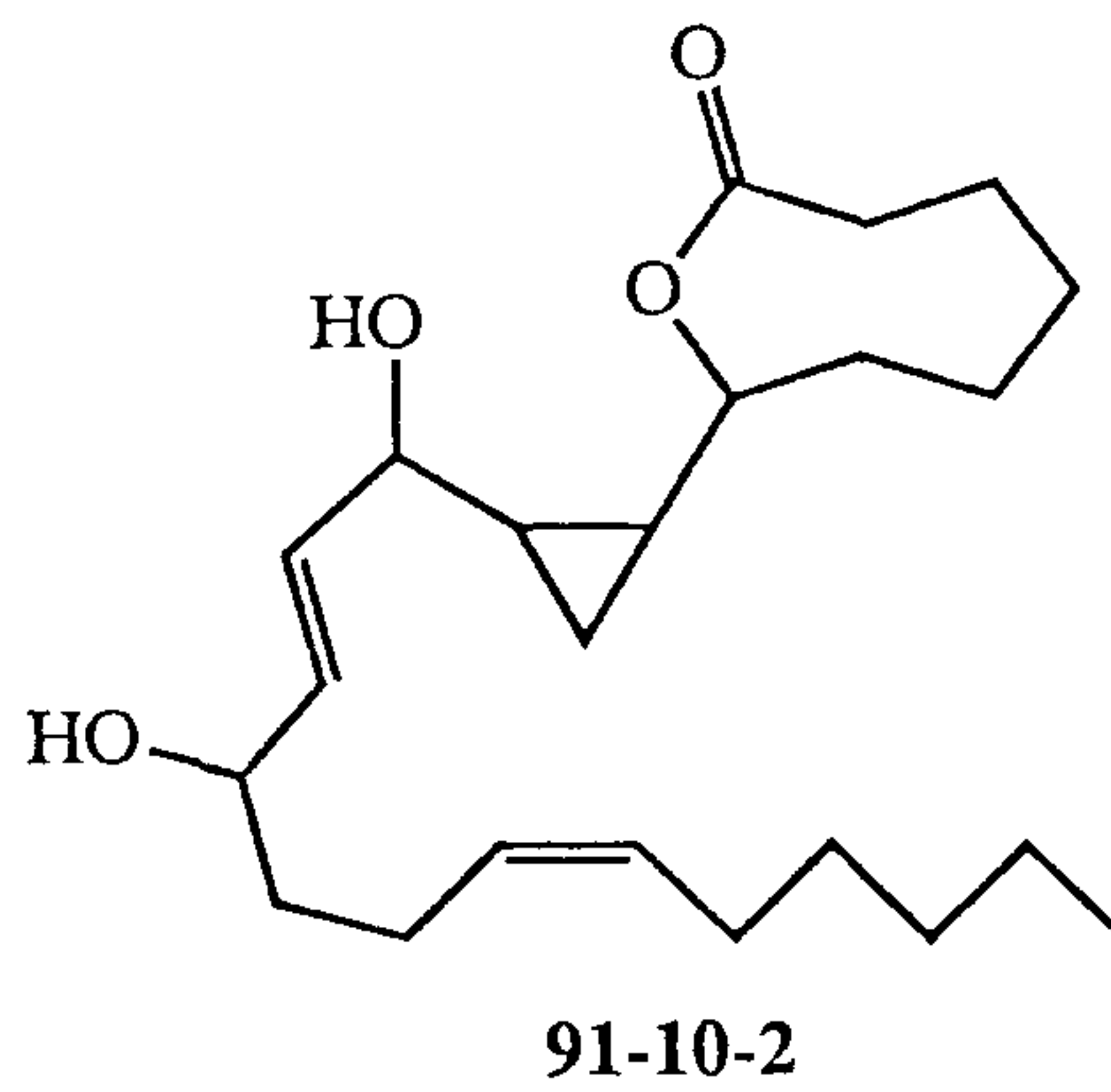
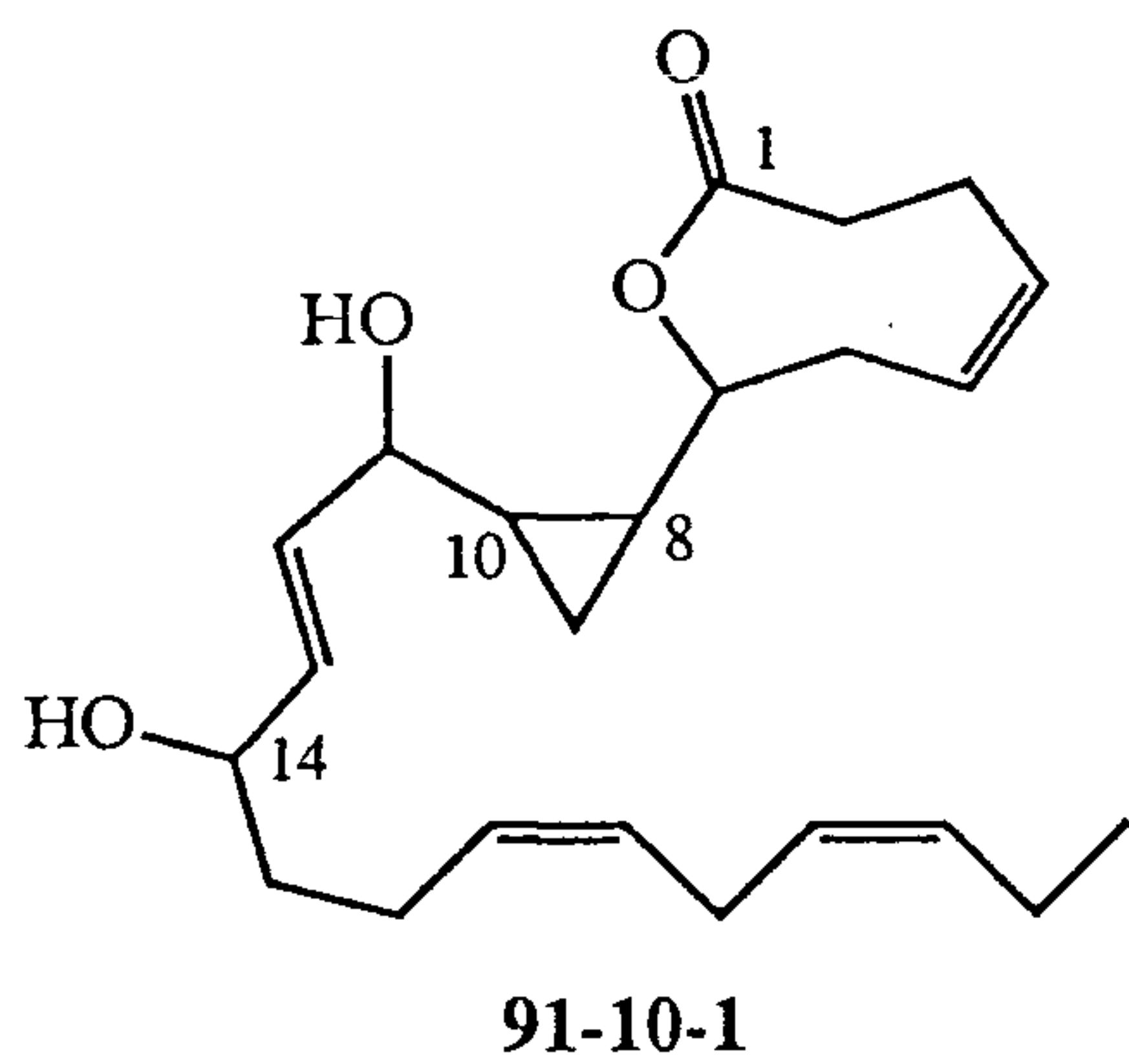


Fig. 5-2. Cyclopropane-containing C_{22} fatty acid lactones isolated from the hydrozoan *Solanderia secunda* (sample number 91-10).

Table 5-1. Proton NMR assignments for compounds 91-10-1 ~ -3^a

#	91-10-1	91-10-2	91-10-3
2	2.73(1H, ddd, 13.2, 5.9, 2.9) 2.30(1H, ddd, 13.2, 11.7, 4.9)	2.44(2H, m)	2.73(1H, ddd, 13.2, 5.9, 2.9) 2.40 - 2.25(1H, m)
3	2.85(1H, m) 2.12(1H, m)	1.85(2H, m)	2.84(1H, m) 2.12(1H, m)
4	5.79(1H, m)	1.68(2H, m) ^b	5.79(1H, m)
5	5.74(1H, m)	1.53(2H, m) ^b	5.73(1H, m)
6	2.58(1H, dddd, 14.0, 10.2, 6.8, 1.3) 2.19(1H, ddd, 14.0, 8.0, 1.9)	1.85(2H, m)	2.57(1H, ddd, 14.0, 10.3, 6.4) 2.19(1H, ddd, 14.0, 8.1, 1.7)
7	4.01(1H, ddd, 10.2, 7.8, 1.9)	4.09(1H, dt, 7.3, 6.8)	4.01(1H, ddd, 10.3, 8.1, 1.7)
8	1.03(1H, m)	1.15(1H, m)	1.02(1H, m)
9	0.78(1H, ddd, 8.1, 5.4, 5.3) 0.70(1H, ddd, 8.1, 5.4, 5.3)	0.68(1H, ddd, 8.8, 5.4, 5.4) 0.60(1H, ddd, 8.3, 5.4, 5.4)	0.78(1H, ddd, 8.3, 5.4, 5.4) 0.70(1H, ddd, 8.4, 5.4, 5.4)
10	1.03(1H, m)	0.98(1H, m)	1.02(1H, m)
11	3.67(1H, dd, 6.8, 4.9)	3.64(1H, dd, 7.8, 4.4)	3.67(1H, dd, 6.3, 4.9)
12	5.79(1H, m)	5.78(1H, m)	5.79(1H, m)
13	5.79 (1H, m)	5.78(1H, m)	5.79(1H, m)
14	4.19(1H, dt, 6.8, 5.1)	4.18(1H, dt, 4.4, 6.4)	4.17(1H, dt, 6.8, 5.3)
15	2.41 - 2.31(2H, m)	2.32(2H, m)	2.40 - 2.25(2H, m)
16	5.41(1H, m)	5.37(1H, dtt, 10.8, 7.3, 1.5)	5.37(1H, brdt, 11.0, 7.1)
17	5.29(1H, dtt, 10.8, 7.3, 1.5)	5.59(1H, dtt, 10.8, 7.3, 1.5)	5.58(1H, brdt, 11.0, 7.3)
18	2.81(2H, dd, 7.3, 7.3)	2.05(2H, dd, 6.8, 6.8)	2.04(2H, dd, 7.3, 7.3)
19	5.57(1H, dtt, 10.7, 7.3, 1.5)	1.34(2H, m)	1.35(2H, m)
20	5.41(1H, m)	1.28(2H, m)	1.29(2H, m)
21	2.07(2H, brdq, 7.3, 7.6)	1.28(2H, m)	1.29(2H, m)
22	0.98(3H, t, 7.6)	0.88(3H, t, 7.1)	0.89(3H, t, 7.1)

^a ¹H NMR spectra were recorded in CDCl₃ solution at 500 MHz. Chemical shifts are reported in δ values(ppm downfield from Me₄Si). J values are reported in Hz. Assignments are aided by decoupling and COSY experiments. ^b Assignments may be interchanged.

Table 5-2. Carbon NMR assignments for 91-10-1 ~ -3^a

#	91-10-1	91-10-2	91-10-3
1	176.84 s	176.57 s	176.88 s
2	35.29 t	32.66 t	35.29 t
3	37.70 t	37.05 t	37.69 t
4	132.83 d	24.14 t ^b	132.80 d
5	127.99 d	26.44 t ^b	127.99 d
6	34.31 t	29.02 t	34.30 t
7	80.70 d	81.47 d	80.76 d
8	19.76 d	21.43 d	19.73 d
9	8.99 t	7.88 t	9.02 t
10	23.49 d	23.04 d	23.49 d
11	74.69 d	74.60 d	74.74 d
12	133.50 d	133.16 d	133.91 d
13	131.76 d	131.67 d	131.70 d
14	71.48 d	71.42 d	71.57 d
15	24.42 t	35.30 t	24.41 t
16	124.39 d	124.03 d	124.02 d
17	132.30 d	134.01 d	133.62 d
18	25.73 t	27.43 t	27.82 t
19	126.60 d	29.27 t	29.26 t
20	131.93 d	31.49 t	31.50 t
21	20.59 t	22.54 t	22.53 t
22	14.24 q	14.05 q	14.04 q

^a ¹³C NMR spectra were obtained in CDCl₃ solution at 125 MHz. Carbon multiplicities were determined by DEPT experiments. Assignments for 91-10-2 and 91-10-3 are based upon HMQC. Assignments for 91-10-1 are by comparison with 91-10-2 and 91-10-3. ^b Assignments may be interchanged.

carbon으로 해석되었으며 olefinic region에 나타난 8개의 methine carbons은 4개의 double bonds의 존재를 드러내었다. 또한 3개의 oxygen-bearing methine carbons과 하나의 methyl carbon이 발견되었다.

91-10-1의 ^{13}C NMR상에서 특이한 점은 carbonyl carbon을 제외하고는 quaternary carbon이 없다는 점인데 이것은 91-10-1이 long-chain fatty acid계열의 물질임을 의미한 것으로 해석되었다. 또한 대단히 upfield region에 3개의 methylene 및 methine resonances(δ 23.49, 19.76, 8.99)가 발견되었는데 이는 cyclopropane ring의 존재를 나타내는 것이다. ^1H NMR 또한 ^{13}C NMR에 상응하는 여러 signal들을 나타내었다(Fig. 5-6). 즉 olefinic region과 oxygen-bearing proton region에 각각 8개와 3개의 proton resonances가 발견되었다. Upfield region에는 terminal methyl protons(δ 0.98)과 cyclopropane protons으로 생각되는 4개의 proton peaks 이외에 다른 protons은 발견되지 않았다. 많은 protons이 δ 2.0 ~ 3.0 region에 밀집되어 있는데 이는 대부분의 methylene들이 double bond의 allylic position에 존재하는 것으로 해석되었다.

91-10-1의 구조는 ^1H COSY와 proton decoupling에 의하여 대부분 결정되었다(Fig. 5-7). 먼저 terminal methyl로부터 시작하여 2개의 double bonds와 3개의 allylic methylenes을 거쳐 oxygen-bearing methine(δ 4.19)에 이르는 9개의 carbons으로 이루어진 long chain이 결정되었다(Fig. 5-3-1). 그러나 δ 5.82 ~ 5.77에 olefinic proton들이 밀집되어 있어서 더 이상의 connectivity는 알 수 없었다. 두개의 oxygen-bearing methines과 cyclopropane을 포함하는 C_7 unit의 존재가 COSY와 proton decoupling에 의하여 결정되었다 (Fig. 5-3-2). 그러나 olefinic protons간의 overlapping때문에 더 이상의 해석은 불가능 하였다. 마지막으로 carbonyl group을 포함하는 C_3 unit의 존재가 드러났다(Fig 5-3-3).

이상 3개의 units(1,2,3)을 결합시키는 방법은 부분구조 1과 3이 2의 methine과 methylene중 어느곳에 결합하는가에 따라 두가지 구조(4와 5)가 가능하였다(Fig. 5-3-4, -5). 전기한 olefinic protons간의 overlapping때문에 91-10-1의 구조가 4와 5

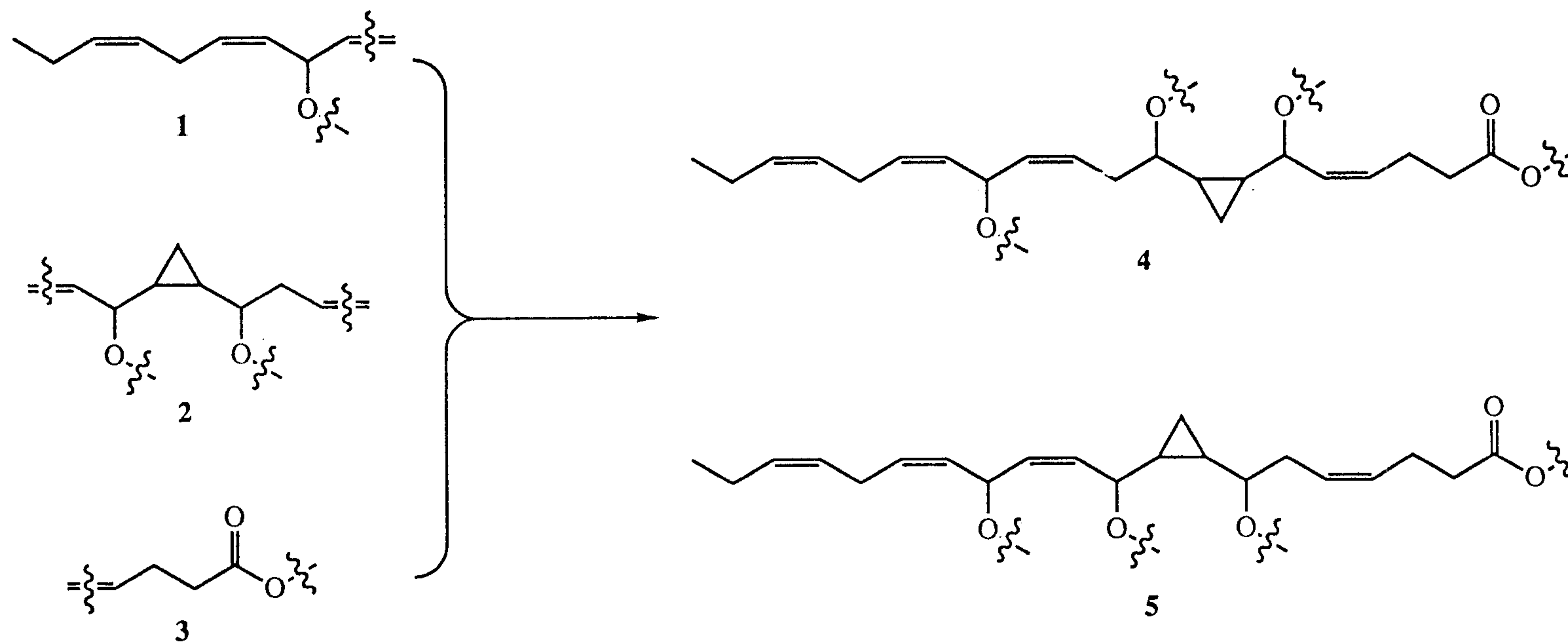


Fig 5-3 Partial structures and connectivity of compound 91-10-1.

중 어느것인가 하는 문제는 부득이 다른 물질(91-10-2)의 구조해석에 따른 유추로서만이 가능하였으며 결론을 먼저 언급하면 5가 정확한 connectivity이었다.

91-10-1에는 C-7, -11, -14등 세 위치에 oxygen이 결합되어 있으며 C-1은 carbonyl group을 형성하고 있다. 이들이 상호 결합된 lactone이나 ether의 형태를 이루고 있는지 혹은 free hydroxy group과 carboxylic acid로 존재하는지의 여부는 함께 분리된 91-10-3의 구조로서 결정되었다. 이의 상세한 내용은 뒤에 언급하였으며 결론만 요약하면 91-10-1은 C-1과 C-7이 oxygen-bridge로 연결된 8-membered lactone이었다.

91-10-1에는 4개의 double bonds가 존재한다. 이들중 C-16과 -19에 위치한 double bond는 C-17(δ 5.30)과 C-19(δ 5.57)의 vicinal coupling constants(각각 10.7과 10.8 Hz)로부터 Z configuration을 형성함이 밝혀졌다. 그러나 proton signals간의 overlapping이 심한 C-4와 -12의 geometry는 coupling constant로 유추할 수 없었다. 이 문제를 해결하기 위하여 C-6 methylene proton(δ 2.58)을 irradiation한 결과 C-5 proton(δ 5.74)의 pattern이 double - doublet($J=11.2, 7.3$ Hz)으로 변화하였으며 이로서 C-4 bond의 geometry 역시 Z configuration임이 밝혀졌다. 그러나 C-12 bond의 geometry는 decoupling에 의하여도 알 수 없었으며 부득이 동일한 위치에 double bond를 갖고 있는 유도체인 91-10-2와의 NMR data비교에 의하여 E로 결론내었다.

Cyclopropane ring에 존재하는 두 asymmetric carbon centers(C-8, -10)의 stereochemistry는 asymmetric centers에 접합된 protons coupling pattern이 너무 복잡하였으므로 C-9 methylene protons의 coupling constants로부터 접근되었다. Cyclopropane ring에서의 proton간의 coupling constants는 $J_{gem} \sim J_{trans} \sim 5$ Hz, $J_{cis} \sim 8$ Hz이다. 그러므로 C-8과 C-10의 상대적인 배열이 cis이면 C-9의 두 protons의 전체적인 coupling constants는 각각 15 Hz(5, 5, 5)와 21 Hz(8, 8, 5)를 나타내어야 하며 반대로 상대적인 배열이 trans이면 coupling constants는 모두 18 Hz(8, 5, 5)로 나타내어야 한다.

그런데 91-10-1의 1H NMR상의 δ 0.78과 0.70에 위치한 C-9 protons들의 coupling

constants는 각각 18.8 Hz(8.1, 5.4, 5.3 Hz)와 18.9 Hz(8.1, 5.4, 5.4 Hz)로서 전체적인 coupling constants의 합이나 개개의 coupling constants의 크기 모두 C-8과 C-10의 상대적인 배열이 trans임을 명백히 드러내었다. 이로서 91-10-1의 구조는 C₂₂ fatty acid에 기원한 8-membered lactone으로 구조가 결정되었다(Fig. 5-2). 이 물질의 NMR assignments는 table 5-1 및 5-2와 같다.

유사한 물질인 91-10-2가 동일한 HPLC조건에서 분리되었다. 이 물질의 ¹H NMR 및 ¹³C NMR data는 91-10-1과 매우 유사하였다(Fig 5-8, 5-9). 중요한 차이점은 91-10-1에 존재하던 4개의 double bonds중 2개가 saturated signals bonds로 바뀐 점이었으며 그외의 key protons과 carbons의 chemical shifts와 coupling patterns은 거의 변화가 없었다. 그러므로 91-10-2 또한 C₂₂ fatty acid lactone임이 명백하였다.

91-10-1과 마찬가지로 이물질 또한 proton decoupling과 COSY NMR 실험에 의하여 구조가 결정되었다(Fig. 5-10). C-2 methylene으로부터 시작하여 C-22 terminal methyl에 이르는 모든 coupling이 명확히 드러났다. C-16에 위치한 double bond의 geometry는 double bond protons간의 coupling constant(J=10.8 Hz)로부터 Z configuration임이 결정되었다. 또한 서로 overlap되어 있는 C-12 double bond의 geometry는 C-11과 C-14 methine proton을 각각 decoupling 한 후의 C-12와 C-13의 residual coupling constant의 측정에 의하여 결정되었다. 즉 C-11 proton을 irradiation 하였을 때 C-13 proton이 double-doublet(J=15.4, 4.4 Hz)로 형태가 바뀌었으며 C-14 proton을 irradiation 하였을 때 C-12 proton에 역시 double-doublet(J=15.6, 4.4 Hz)로 바뀌었다.

이로서 C-12/-13간의 vicinal coupling constants는 15 Hz이상이며 따라서 C-12 double bond의 geometry는 E configuration임이 밝혀졌다. 아울러 91-10-1에 있는 동일한 double bond의 geometry도 해당 혹은 인접한 carbon이나 proton의 chemical shifts에 아무런 차이가 없으므로 91-10-2와 마찬가지로 E configuration을 이루고 있는것으로 결론지워졌다(Fig. 5-2). 이 물질의 NMR assignments는 Table 5-1 및 5-2와 같다.

유사한 물질인 91-10-3이 동일한 HPLC조건에서 분리되었다. 이 물질의 ^1H NMR과 ^{13}C NMR자료 역시 다른 C_{22} fatty acid lactones와 매우 유사하였다(Fig. 5-11, 5-12). NMR상에 있어서의 뚜렷한 차이점은 91-10-1이 4개, 91-10-2가 2개의 double bonds를 갖고 있는데 비하여 91-10-3은 3개의 double bonds를 포함한다는 점이었다. 전체적인 구조는 다른 물질과 마찬가지로 proton decoupling과 COSY NMR에 의하여 결정되었다(Fig. 5-13). 그 결과 91-10-3은 91-10-1의 C-19가 double bond로 바뀐 유도체임이 밝혀졌다(Fig. 5-2). 이 물질의 NMR assignments는 table 5-1 및 5-2와 같다.

91-10-1 ~ -3의 세 물질은 double bonds를 제외한 다른 작용기의 위치가 동일하다. 이들의 구조결정에 있어서 남은 문제는 3개의 oxygen-bearing methines(C-7, -11, 14)와 carboxylic group(C-1)과의 연결여부이다. 이 문제를 해결하기 위하여 91-10-3을 pyridine용매에서 acetic anhydride와 반응시킨 결과 diacetate인 91-10-4가 주반응물질로 얻어졌다(Fig. 5-2).

91-10-4의 ^1H NMR과 COSY실험결과 이 물질은 91-10-3의 C-11과 C-14 hydroxy기가 acetylation되어 형성된 것이며 C-7 methine proton은 chemical shift, coupling pattern coupling constants등에서 아무런 변화가 없었다(Fig. 5-14, 5-15). 이 실험 결과는 91-10-1 ~ -3에 있어서 C-1과 C-7이 oxygen bridge에 의하여 서로 연결되어 있다는 것을 의미하였다. 이와같이 91-10-1 ~ -3은 모두 8-membered ring을 가진 C_{22} fatty acid lactones으로 구조가 명확히 결정되었다(Fig. 5-2).

이들 *Solanderia secunda*의 대사물질들은 모두 C-7, -8, -10, -11, -14등 다섯개의 asymmetric centers를 공통적으로 갖고 있다. 이들중 C-8, -10등 cyclopropane에 속한 centers의 상대배열은 C-9 methylene protons의 coupling constants로부터 trans로 결정되었으나 나머지 세 asymmetric centers의 입체적 배열은 명확하지 않다. 다른 macrolides나 long-chain fatty acids에서 흔히 볼 수 있는 것 같이 현재의 천연물 화학적 연구수준으로는 이들 long-chain asymmetric centers의 입체화학적 배열의 결정은 불가능 할 것으로 생각된다. 91-10-1 ~ -3 이외에도 3개의 유사한 물질(91-10-4 ~ -6)이 동일한 시료로부터 분리되었으며 현재 구조결정중에 있다. ^1H NMR해석으로는 이

들은 모두 전기한 세 물질의 입체 이성질체(diastereomers)로 생각되나 epimeric centers의 위치는 확실하지 않다(Fig. 5-16 ~ 5-18).

91-10-1 ~ -3은 모두 cyclopropane을 가진 C₂₂ fatty acid lactones이다. 문헌조사결과 이들은 모두 신물질이며 hydroids를 비롯한 강장동물의 대사물질로는 매우 특이한 천연물임을 확인하였다. 그러나 구조적으로 매우 유사한 cyclopropanyl fatty acid lactones이 수 종의 red algae, sponge, mollusk등으로부터 발견된 바 있다(Fig. 5-4) (Higgs & Mulheirn, 1981; Niwa et al. 1989; Nagle & Gerwick, 1990; Ojika et al, 1990).

이들중 홍조 *Laurencia hybrida*로부터 추출된 tricyclic compound인 hybridalactone을 제외한 나머지 물질들은 작용기의 종류나 배열에 있어서 서로 거의 동일하다. 이들은 모두 phospholipids를 이루는 C₂₀ arachidonic acid로부터 기원하여 prostaglandins, leucotrienes등 prostanoids를 생합성 하는 과정에서 변화된 물질들이며 따라서 phospholipase A₂, 5-lipoxygenase등 arachidonic acid cascade에 관여하는 여러 효소에 대한 활성도와 그에 따른 소염효과를 나타내었다. 이들 arachidonic acid에서 기원한 물질들이 arachidonic acid cascade에 관여하는 효소에 대한 생리활성도를 나타내는 것은 매우 합당한 결과이다.

본 연구에서 구조가 결정된 91-10-1 ~ -3은 모두 arachidonic acid에서 기원하지 않았음에도 불구하고(chain length가 C₂₂), 유사한 위치에 동일한 작용기를 갖고 있다. 그러므로 이들 *Solanderia secunda*의 대사물질들이 다른 C₂₀ fatty acid lactones과 같은 생리활성도를 나타낼지의 여부는 상당히 주목된다. 또한 산업적인 면에서도 prostanoids의 합성에 관여하는 효소에 대한 선택적 저해작용을 하는 새로운 소염제의 개발은 외국에서 연구투자가 집중되고 있는 분야이다(Fenical & Faulkner, personal comm.). 따라서 구조결정 작업이 완료되는 대로 이들 물질에 대한 소염작용과 효소저해등 생리활성도가 측정될 예정이다.

결론적으로 본 연구에서 hydroid *Solanderia secunda*로부터 3개의 새로운 cyclopropane-containing C₂₂ fatty acid lactones을 분리하고 구조를 결정하였다.

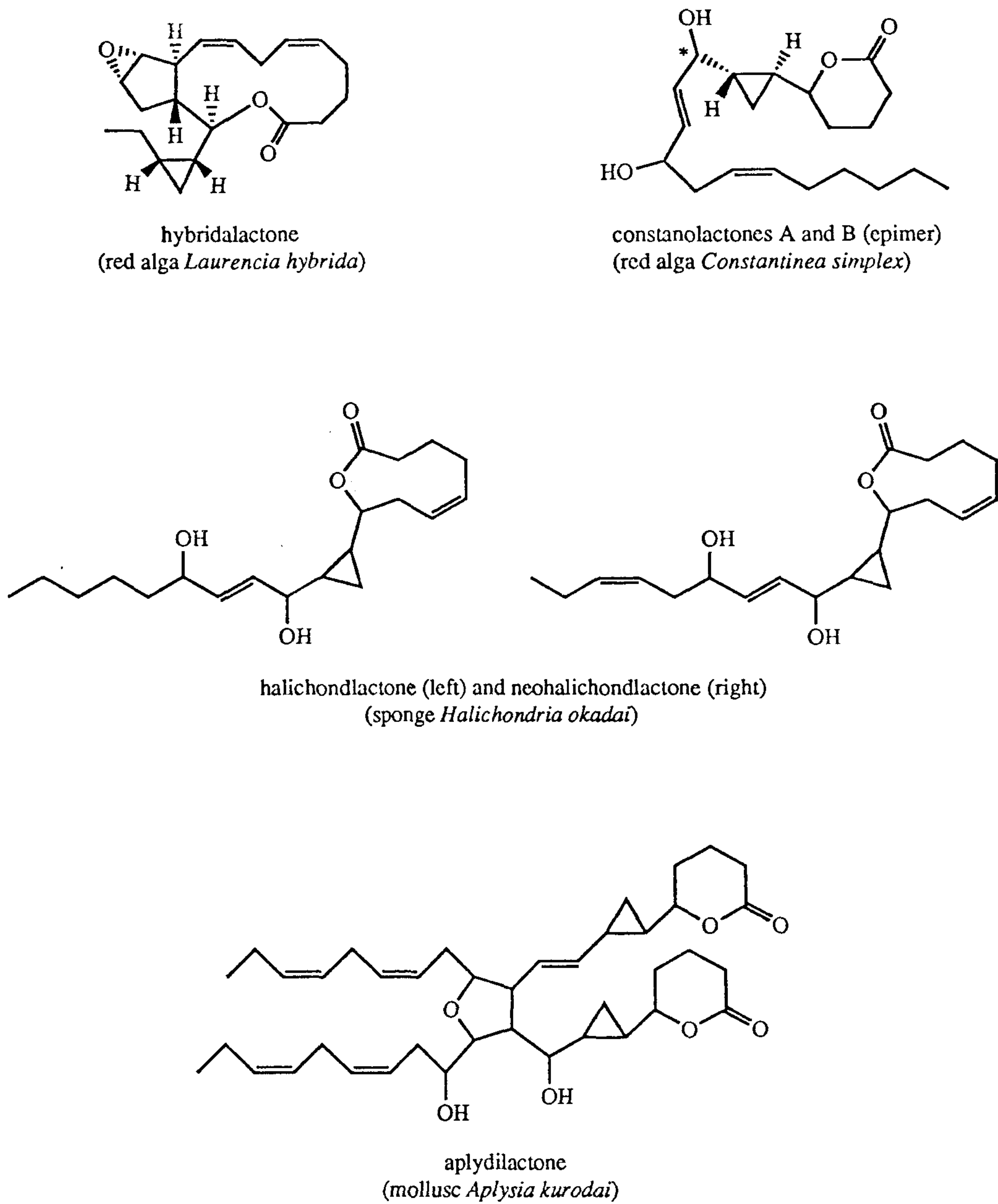


Fig. 5-4. Cyclopropane-containing fatty acid lactones from marine organisms.

5.3. 실험방법

5.3.1. 시료의 채집 및 유기물질의 추출과 고속크로마토그래피

Hydroid *Solanderia secunda*의 채집은 서귀포 근해 수심 25-30 m에서 2회('91년 1월, 7월) 및 거문도 연안 서도와 대삼부도 근해 수심 25-30 m에서 1회('91년 10월) SCUBA 다이빙에 의해서 이루어 졌으며 이 시료는 채집해 오는 즉시 응달에서 완전히 말려 냉동고에 보관되었다. 냉동보관중인 시료(건조무게량: 5 kg)를 잘게 잘라 methylene chloride 2 L를 가하여 실온에서 48시간 방치한 후에 그 용액을 걸러내었으며 이 과정을 다시 반복한 후에 얻어진 전체 유기추출물의 양은 10.7 g이 얻어 졌다.

이 추출물을 진공 flash chromatography로 분리하기 위해 n-hexane과 ethylacetate의 혼합액(5% ethylacetate/n-hexane으로부터 100% ethylacetate까지), acetone, methanol을 순서대로 용출시켰다. 이렇게 얻어진 18개의 분액(fraction, fx)을 각각 용매를 제거한 후 ¹H NMR을 측정한 결과 흥미 있는 2차 대사물질이 fx-12(55% ethylacetate/n-hexane: 100 mg), fx-13(60% ethylacetate/ n-hexane: 70 mg), fx-14(65% ethylacetate/n-hexane: 170 mg), fx-15(70% ethylacetate/n-hexane: 140 mg) 및 fx-16(100% ethylacetate: 130 mg)에 포함되어 있음이 밝혀 졌다. 기타의 fx에는 여러 해양생물에 흔히 존재하는 포화 및 불포화 지방, 지방산 및 steroids가 포함되었다.

5.3.2. 91-10-1의 분리

고속감압 크로마토그래피로 분리한 fx-12(100 mg), -13(70 mg) 및 -14(170 mg)를 각각 42% water/acetonitrile에 녹이고 Maxi-clean C₁₈ filter(Alltech)로 여과한 후에 같은 혼합액을 용출용매로 사용하여 HPLC(YMC reversed phase C₁₈ column, RI

detector, 2 ml/min)로 분리하면 retention time 19.8 분에 91-10-1의 peak가 나타났으며 각 시료에서 분리한 전체량은 16 mg이었다.

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3, 500 \text{ MHz}) \delta$ 5.76-5.81(3H, m, H-4, -12, -13), 5.74(1H, m, H-5), 5.57(1H, dtt, 10.7, 7.3, 1.5, H-19), 5.38-5.44(2H, m, H-16, -20), 5.29(1H, dtt, 10.8, 7.3, 1.5, H-17), 4.19(1H, dd, 6.8, 5.1, H-14), 4.01(1H, ddd, 10.2, 7.8, 1.9, H-7), 3.67(1H, dd, 6.8, 4.9, H-11), 2.85(1H, m, H-3), 2.81(2H, dd, 7.3, 7.3, H-18), 2.73(1H, ddd, 13.2, 5.9, 2.9, H-2), 2.58(1H, dddd, 14.0, 10.2, 6.8, 1.3, H-3), 2.31-2.41(2H, m, H-15), 2.30(1H, ddd, 13.2, 11.7, 4.9, H-2), 2.19(1H, ddd, 14.0, 8.0, 1.9, H-6), 2.12(1H, m, H-3), 2.07(2H, brdq, 7.3, 7.6, H-21), 1.03(2H, m, H-8, -10), 0.98(3H, t, 7.6, H-22), 0.78(1H, ddd, 8.1, 5.4, 5.3, H-9), 0.70 (1H, ddd, 8.1, 5.4, 5.4, H-9); $^{13}\text{C NMR}(\text{CDCl}_3, 125 \text{ MHz}) \delta$ 176.84(C), 133.50(CH), 132.83(CH), 132.30(CH), 131.93(CH), 131.76(CH), 127.99(CH), 126.60(CH), 124.39(CH), 80.70(CH), 74.69(CH), 71.48(CH), 37.70(CH₂), 35.29(CH₂), 34.31(CH₂), 25.73(CH₂), 24.42(CH₂), 23.49(CH), 20.59(CH₂), 19.76(CH), 14.24(CH₃), 8.99(CH₂).

5.3.3. 91-10-2의 분리

고속감압 크로마토그래피로 분리한 fx-13(70 mg), -14(170 mg), -15(150 mg) 및 -16(130 mg)을 각각 42%나 50% water/acetonitrile에 녹이고 Maxi-clean C₁₈ filter (Alltech)로 여과한 후에 같은 혼합액을 용출용매로 사용하여 HPLC(YMC reversed phase C₁₈ column, RI detector)로 분리하면 retention time 26.5 분 (2 ml/min)과 33.6 분(2.5 ml/min)에 91-10-2의 peak가 나타났으며 각 시료에서 분리한 전체량은 22.4 mg이었다.

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3, 500 \text{ MHz}) \delta$ 5.78(2H, m, H-12, -13), 5.59(1H, dtt, 10.8, 7.3, 1.5, H-17), 5.37(1H, dtt, 10.8, 7.3, 1.5, H-16), 4.18(1H, dt, 4.4, 6.4, H-14),

4.09(1H, dt, 6.4, 7.8, H-7), 3.64(1H, dd, 7.8, 3.4, H-11), 2.44(2H, m, H-2), 2.32(2H, m, H-15), 2.05(2H, brdt, 6.8, 6.8, H-18), 1.85(4H, m, H-3, -6), 1.68(1H, m, H-5), 1.53(3H, m, H-4, -5), 1.34(2H, m, H-19), 1.28(4H, m, H-20, -21), 1.15(1H, m, H-8), 0.98(1H, m, H-10), 0.88(3H, t, 7.1, H-22), 0.68(1H, ddd, 8.8, 5.4, 5.4, H-9), 0.60(1H, ddd, 8.3, 5.4, 5.4, H-9); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125 MHz) δ 176.57(C), 134.01(CH), 133.16(CH), 131.67(CH), 124.03(CH), 81.47(CH), 74.60(CH), 71.42(CH), 37.05(CH_2), 35.30(CH_2), 32.66(CH_2), 31.49(CH_2), 29.27(CH_2), 29.02(CH_2), 27.43(CH_2), 26.44(CH_2), 24.14(CH_2), 23.04(CH), 22.54(CH_2), 21.43(CH), 14.05(CH_3), 7.88(CH_2).

5.3.4. 91-10-3의 분리

고속감압 크로마토그래피로 분리한 fx-12(100 mg), -13(70 mg) 및 -14(170 mg)를 각각 42% water/acetonitrile에 녹이고 Maxi-clean C_{18} filter (Alltech)로 여과한 후에 같은 혼합액을 용출용매로 사용하여 HPLC(YMC reversed phase C_{18} column, RI detector, 2 ml/min)로 분리하면 retention time 28.8 분에 91-10-3의 peak가 나타났으며 각 시료에서 분리한 전체량은 42 mg이었다.

^1H NMR(CDCl_3 , 500 MHz) δ 5.82-5.75(3H, m, H-4, -12, -13), 5.73(1H, m, H-5), 5.58(1H, brdt, 11.0, 7.3, H-17), 5.37(1H, brdt, 11.0, 7.1, H-16), 4.17(1H, dt, 6.8, 5.3, H-14), 4.01(1H, ddd, 10.3, 8.1, 1.7, H-7), 3.67(1H, brdd, 6.3, 4.9, H-11), 2.84(1H, m, H-3), 2.73(1H, ddd, 13.2, 5.9, 2.9, H-2), 2.57(1H, ddd, 14.0, 10.3, 6.4, H-6), 2.40-2.25(3H, m, H-2, -15), 2.19(1H, ddd, 14.0, 8.1, 1.7, H-6), 2.12(1H, m, H-3), 2.04(2H, dt, 7.3, 7.3, H-18), 1.35(2H, m, H-19), 1.29 (4H, m, H-20, -21), 1.02(2H, m, H-8, -10), 0.89(3H, t, 7.1, H-22), 0.78(1H, ddd, 8.3, 5.4, 5.4, H-9), 0.70(1H, ddd, 8.4, 5.4, 5.4, H-9); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125 MHz) δ 176.88(C, C-1), 133.91(CH, C-12), 133.62(CH, C-17), 132.80(CH, C-4), 131.70(CH,

C-13), 127.99(CH, C-5), 124.02(CH, C-16), 80.76(CH, C-7), 74.74(CH, C-11), 71.57(CH, C-14), 37.69(CH₂, C-3), 35.29(CH₂, C-2), 34.30(CH₂, C-6), 31.50(CH₂, C-19), 29.26(CH₂, C-20), 27.42(CH₂, C-18), 24.41(CH₂, C-15), 23.49(CH, C-8), 22.53(CH₂, C-21), 19.73(CH, C-10), 14.04(CH₃, C-22), 9.02(CH₂, 9.02).

5.3.5. 91-10-4의 합성

10 ml round-bottomed flask에 91-10-3 7.7 mg, acetic anhydride 0.3 ml, pyridine 0.5 ml를 넣고 2시간 동안 실온(25 °C)에서 교반시켰다. 반응의 유무를 확인하기 위하여 TLC를 이용하여 측정된 결과 출발물질의 spot은 보이지 않고 새로운 생성물의 spot이 강하게 나타 났다. Rotavapor와 vacuum pump를 이용하여 acetic anhydride와 pyridine를 제거하고 acetonitrile을 용출용매로 사용하여 HPLC(YMC C₁₈ reversed phase column, RI detector, 2.5 ml/min)로 분리한 결과 retention time 25.4분에서 91-10-4가 4.5 mg 얻어 졌다.

¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 5.82-5.72(2H, m, H-4, -5), 5.68(2H, m, H-12, -13), 5.51(1H, brdt, 10.7, 7.3, H-17), 5.28(2H, m, H-14, -16), 4.87(1H, dd, 7.8, 5.4, H-11), 3.99(1H, dt, 9.3, 1.5, H-7), 2.84(1H, dddd, 12.9, 11.7, 9.3, 6.9, H-3), 2.72(1H, ddd, 13.0, 6.9, 3.2, H-2), 2.56(1H, m, H-6), 2.33(1H, m, H-15), 2.29(1H, ddd, 13.0, 11.7, 2.4, H-2), 2.17(1H, ddd, 14.2, 8.1, 1.5, H-6), 2.11(1H, m, H-3), 2.07(3H, s, OAc), 2.05(3H, s, OAc), 2.01(2H, dt, 7.3, 6.4, H-18), 1.33(2H, m, H-19), 1.28(4H, m, H-20, -21), 1.07(1H, m, H-10), 1.01(1H, m, H-8), 0.89(3H, t, 6.3, H-22), 0.75(2H, m, H-9); ¹³C NMR(CDCl₃, 125 MHz) δ 176.74(C, C-1), 170.12(C, OAc), 170.08(C, OAc), 133.36(CH), 132.87(CH), 131.01(CH), 129.40(CH), 127.91(CH), 123.16(CH), 80.42(CH), 75.55(CH), 73.07(CH), 37.70(CH₂), 34.17(CH₂), 32.26(CH₂), 31.50(CH₂), 29.19(CH₂), 27.39(CH₂), 24.43(CH₂), 22.56(CH₂), 21.25(CH₃), 21.21(CH₃), 20.87(CH), 19.97(CH), 14.06(CH₃), 9.57(CH₂).

Fig 5-5 Carbon NMR spectrum of compound 91-10-1

91-10-13-hplc-2-rh-2-c compd A
OBSERVE C13
FREQUENCY 125 697 MHz
SPECTRAL WIDTH 25000.0 Hz
ACQUISITION TIME 1.300 sec
RELAXATION DELAY 2.000 sec
PULSE WIDTH 17.0 usec
AMBIENT TEMPERATURE
NO. REPETITIONS 1024
DECOUPLE H1
HIGH POWER 43
DECOUPLER CONTINUOUSLY ON
WALTZ-16 MODULATED
DOUBLE PRECISION ACQUISITION
DATA PROCESSING
LINE BROADENING 0.5 Hz
FT SIZE 65536
TOTAL ACQUISITION TIME 56 minutes

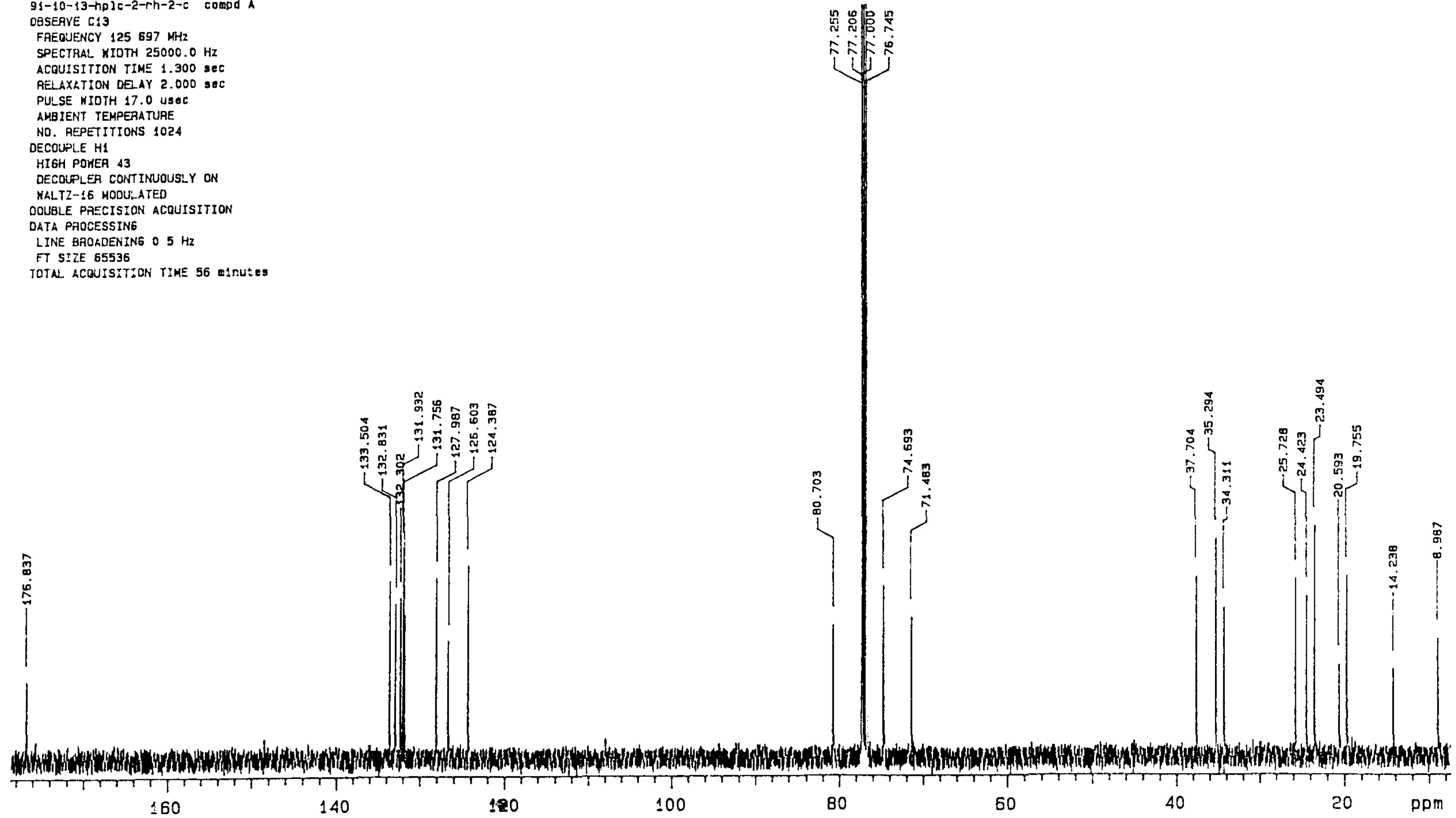


Fig. 5-6 Proton NMR spectrum of compound 91-10-1

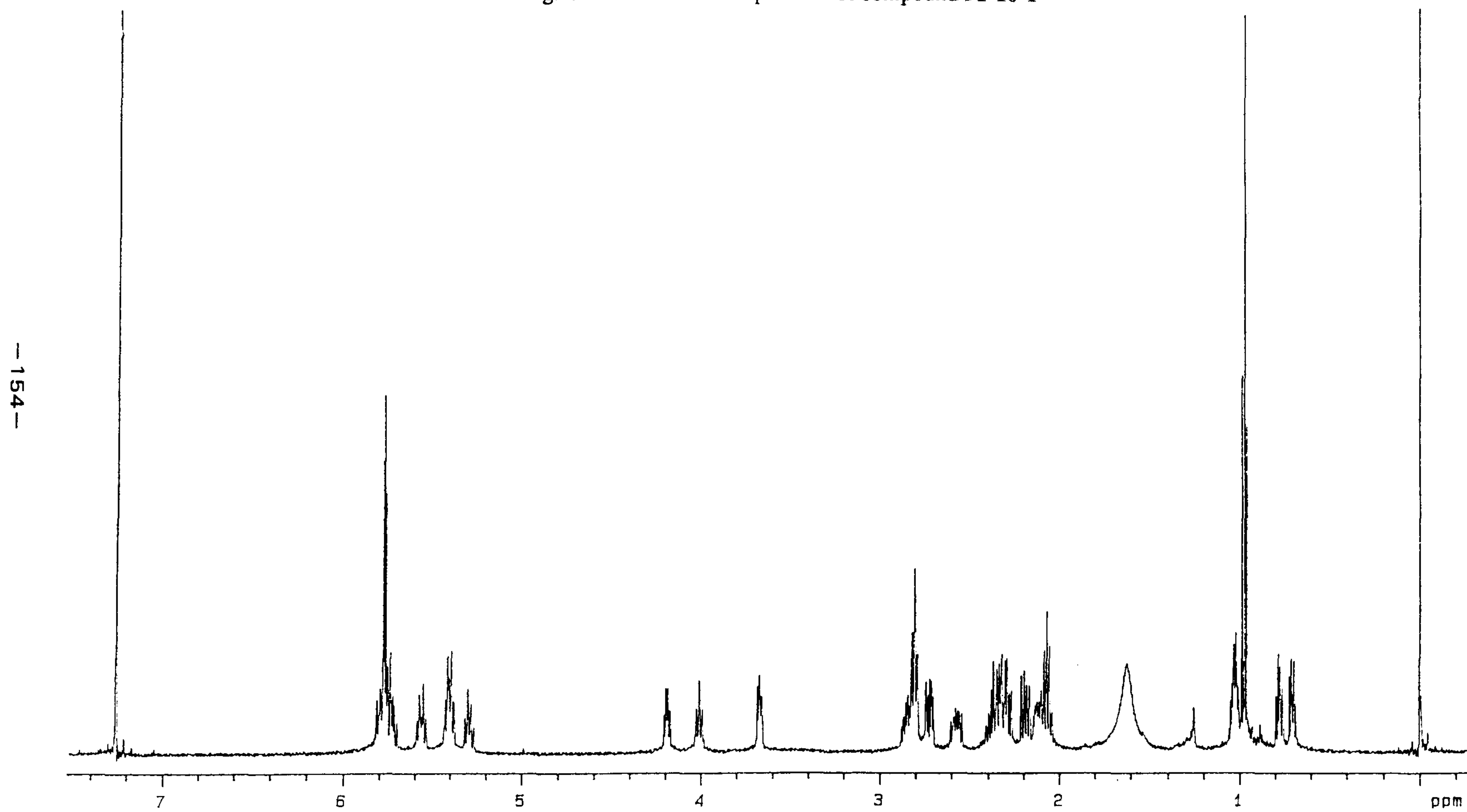


Fig 5-7 Proton COSY NMR spectrum of compound 91-10-1

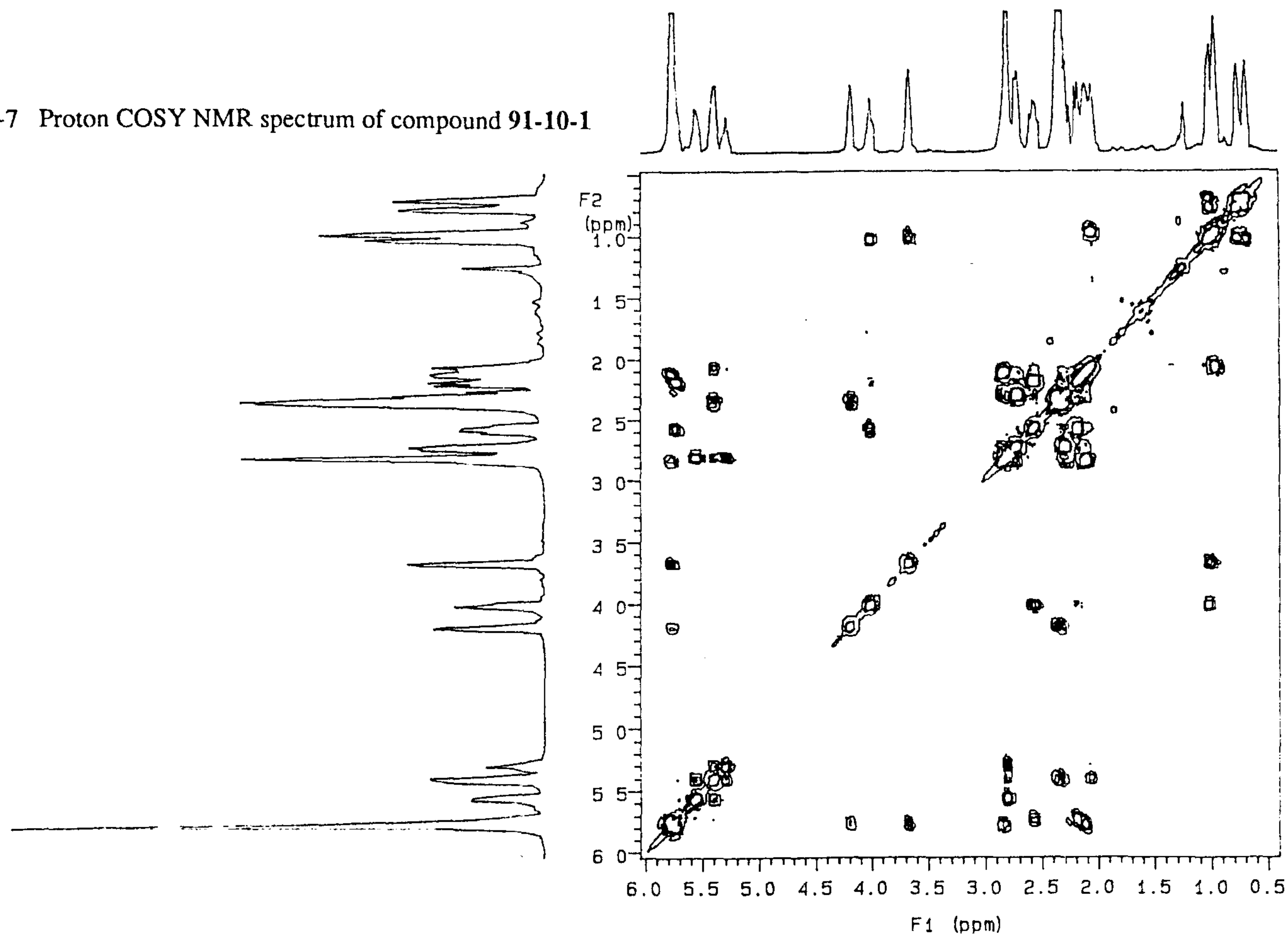


Fig 5-8 Carbon NMR spectrum of compound 91-10-2

91-10-13-hplc-2-rh-3-c compd B
OBSERVE C13
FREQUENCY 125 697 MHz
SPECTRAL WIDTH 25000.0 Hz
ACQUISITION TIME 1.300 sec
RELAXATION DELAY 2.000 sec
PULSE WIDTH 17.0 usec
AMBIENT TEMPERATURE
NO. REPETITIONS 1024
DECOUPLE H1
HIGH POWER 43
DECOUPLER CONTINUOUSLY ON
WALTZ-16 MODULATED
DOUBLE PRECISION ACQUISITION
DATA PROCESSING
LINE BROADENING 0.5 Hz
FT SIZE 65536
TOTAL ACQUISITION TIME 56 minutes

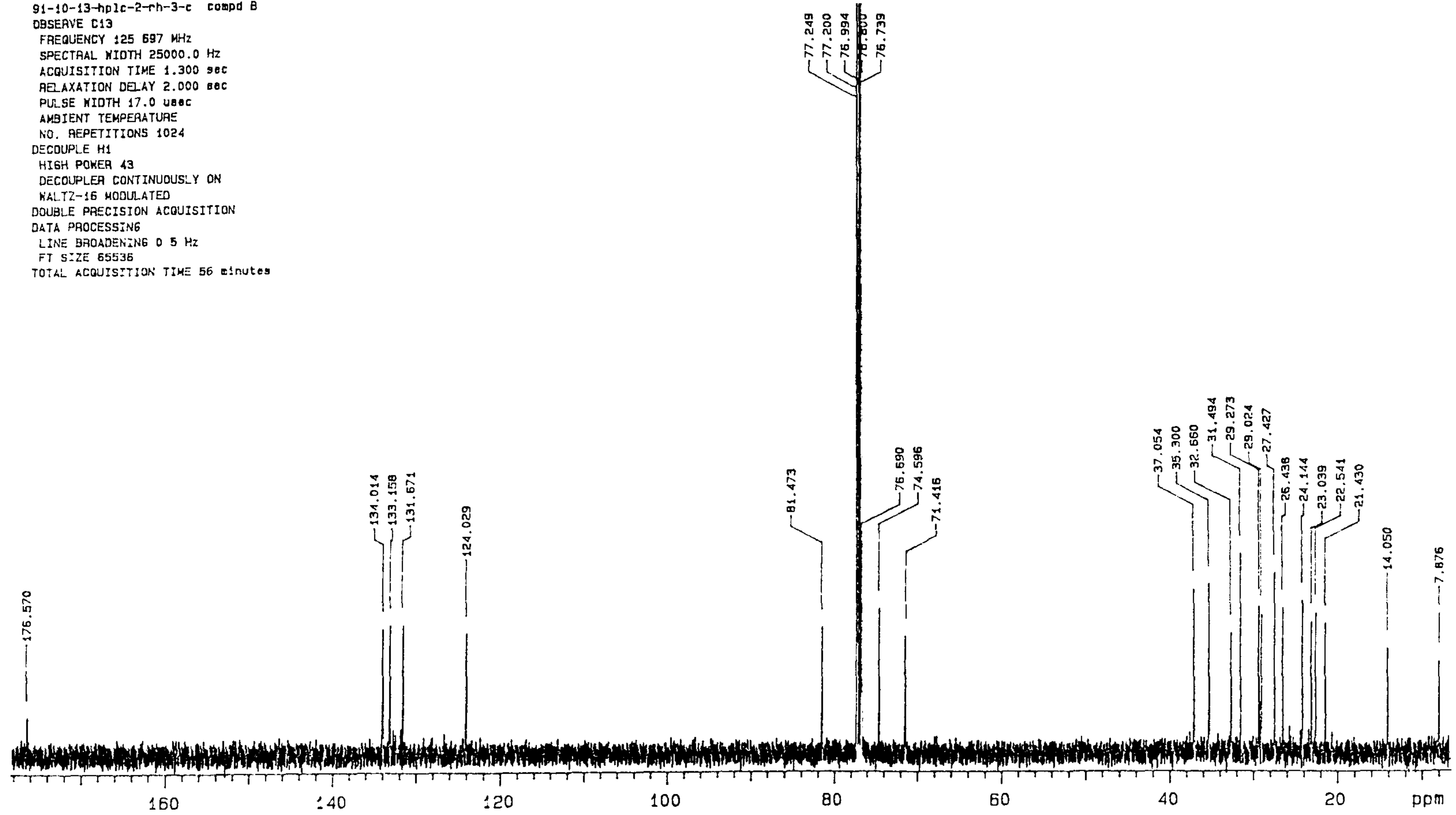


Fig 5-9 Proton NMR spectrum of compound 91-10-2

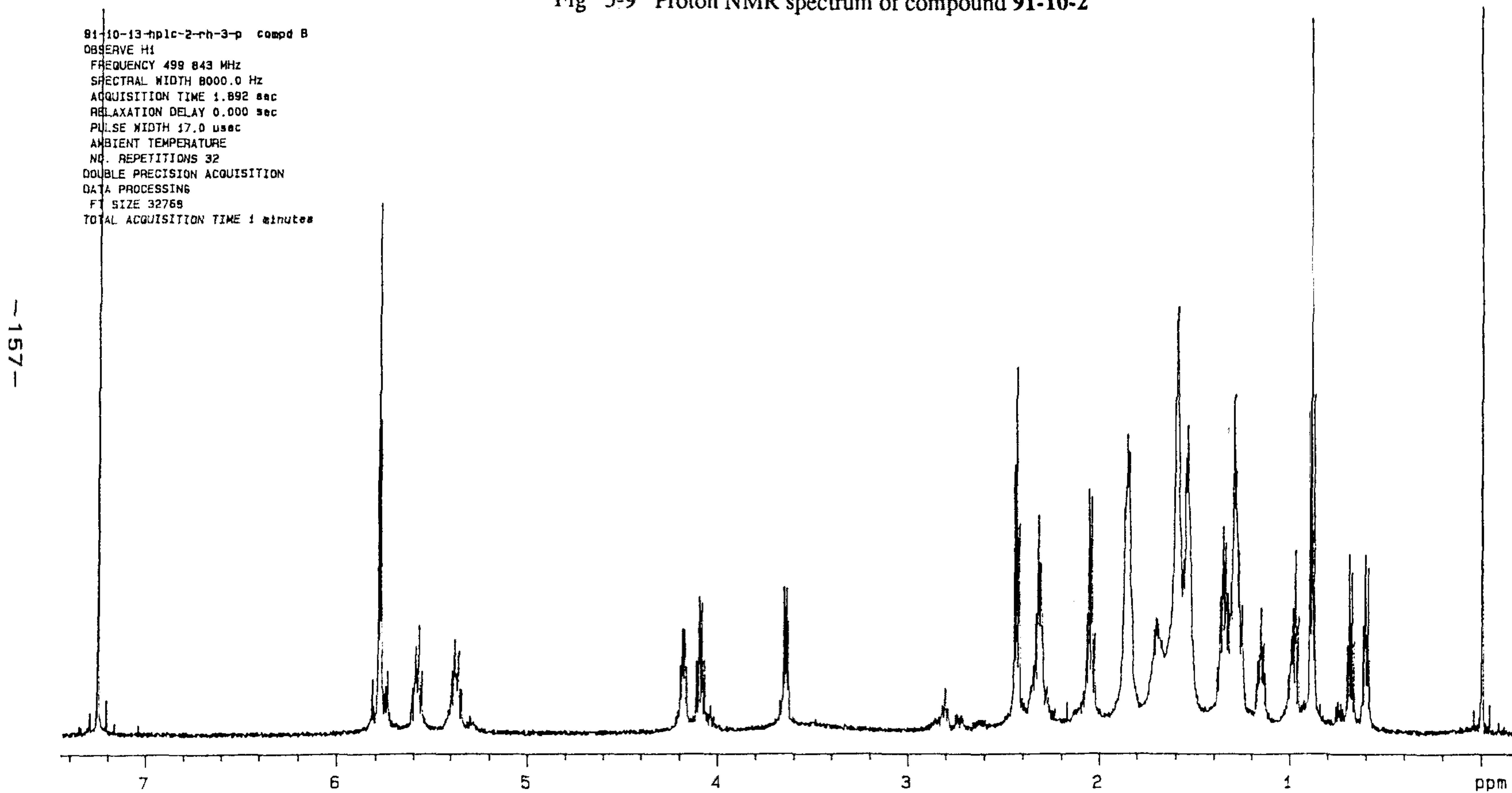


Fig 5-10 Proton COSY NMR spectrum of compound 91-10-2

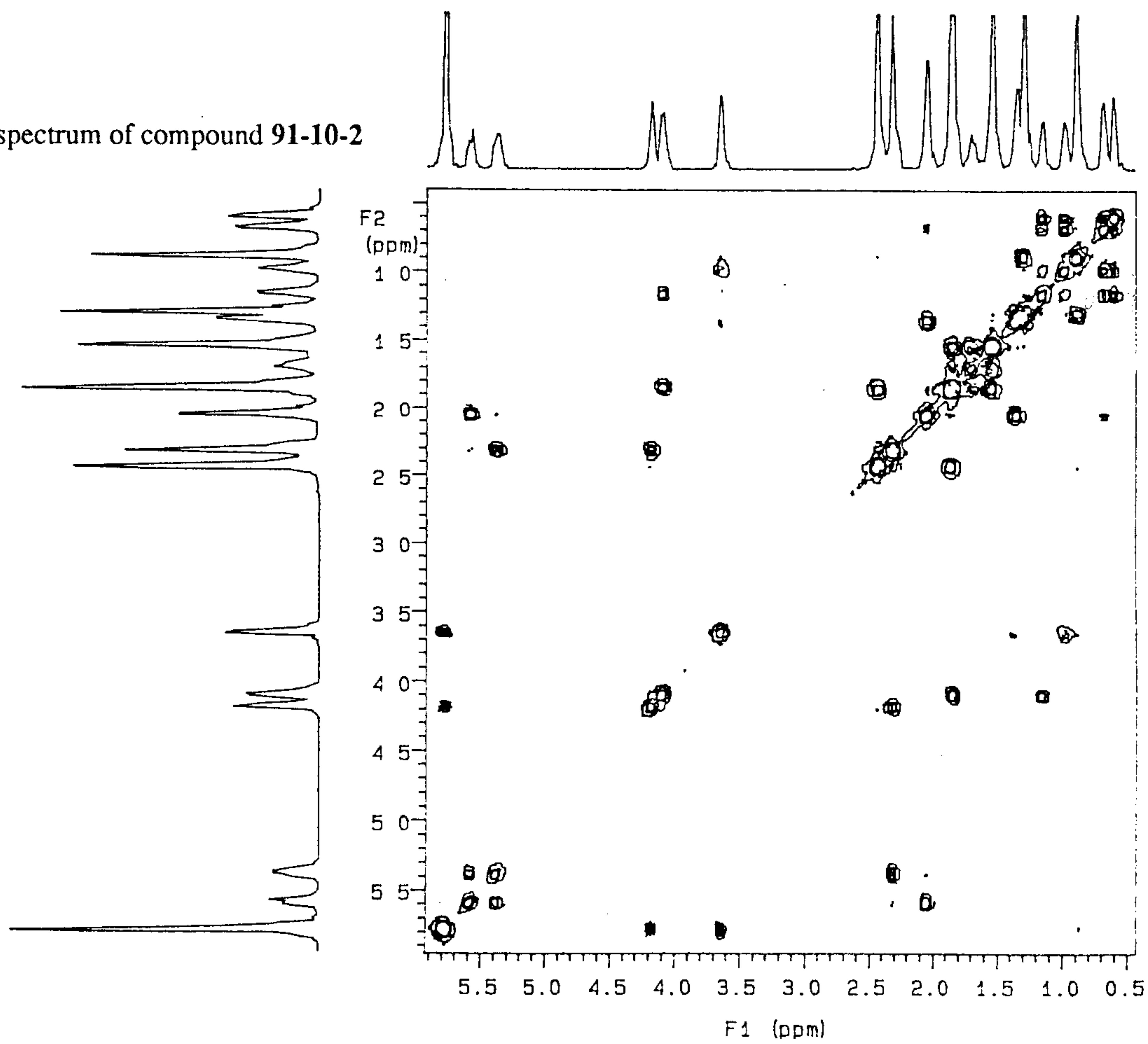


Fig 5-11 Carbon NMR spectrum of compound 91-10-3

91-10-13-hp e-3-c
 OBSERVE C13
 FREQUENCY 125 697 MHz
 SPECTRAL WIDTH 25000.0 Hz
 ACQUISITION TIME 1.300 sec
 RELAXATION DELAY 2.000 sec
 PULSE WIDTH 17.0 usec
 AMBIENT TEMPERATURE
 NO. REPEATITIONS 896
 DECOUPLE H1
 HIGH POWER 13
 DECOUPLER CONTINUOUSLY ON
 WALTZ-16 MODULATED
 DOUBLE PRECISION ACQUISITION
 DATA PROCESSING
 LINE BROADENING 0.5 Hz
 FT SIZE 65536
 TOTAL ACQUISITION TIME 9 4 25.65

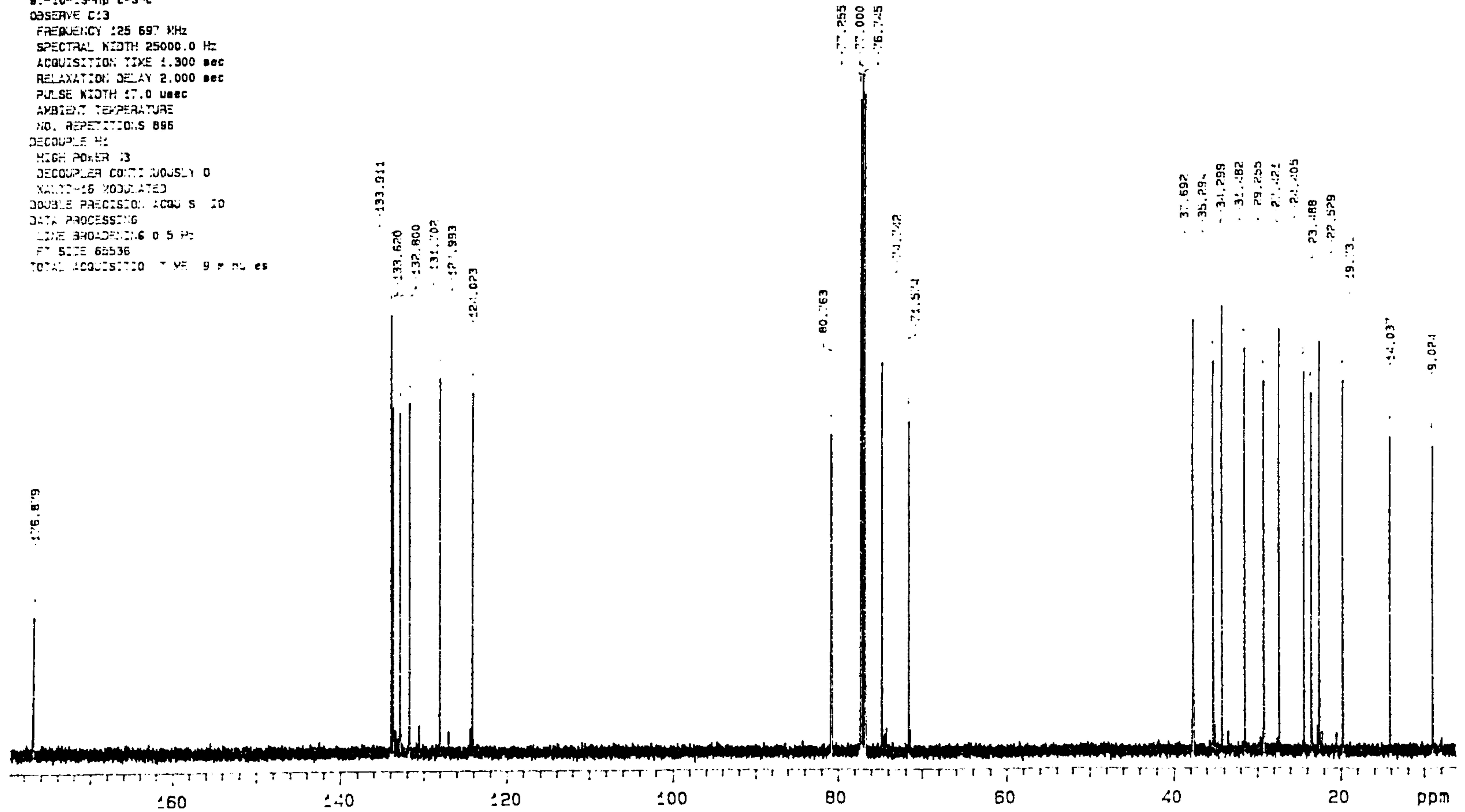


Fig 5-12 Proton NMR spectrum of compound 91-10-3

91-10-13-hplc-3-p
OBSERVE H:
FREQUENCY 499 843 MHz
SPECTRAL WIDTH 8000.0 Hz
ACQUISITION TIME 1.892 sec
RELAXATION DELAY 0.000 sec
PULSE WIDTH 5.5 usec
AMBIENT TEMPERATURE
NO. REPETITIONS 32
DOUBLE PRECISION ACQUISITION
DATA PROCESSING
FT SIZE 32768
TOTAL ACQUISITION TIME 1 minutes

—160—

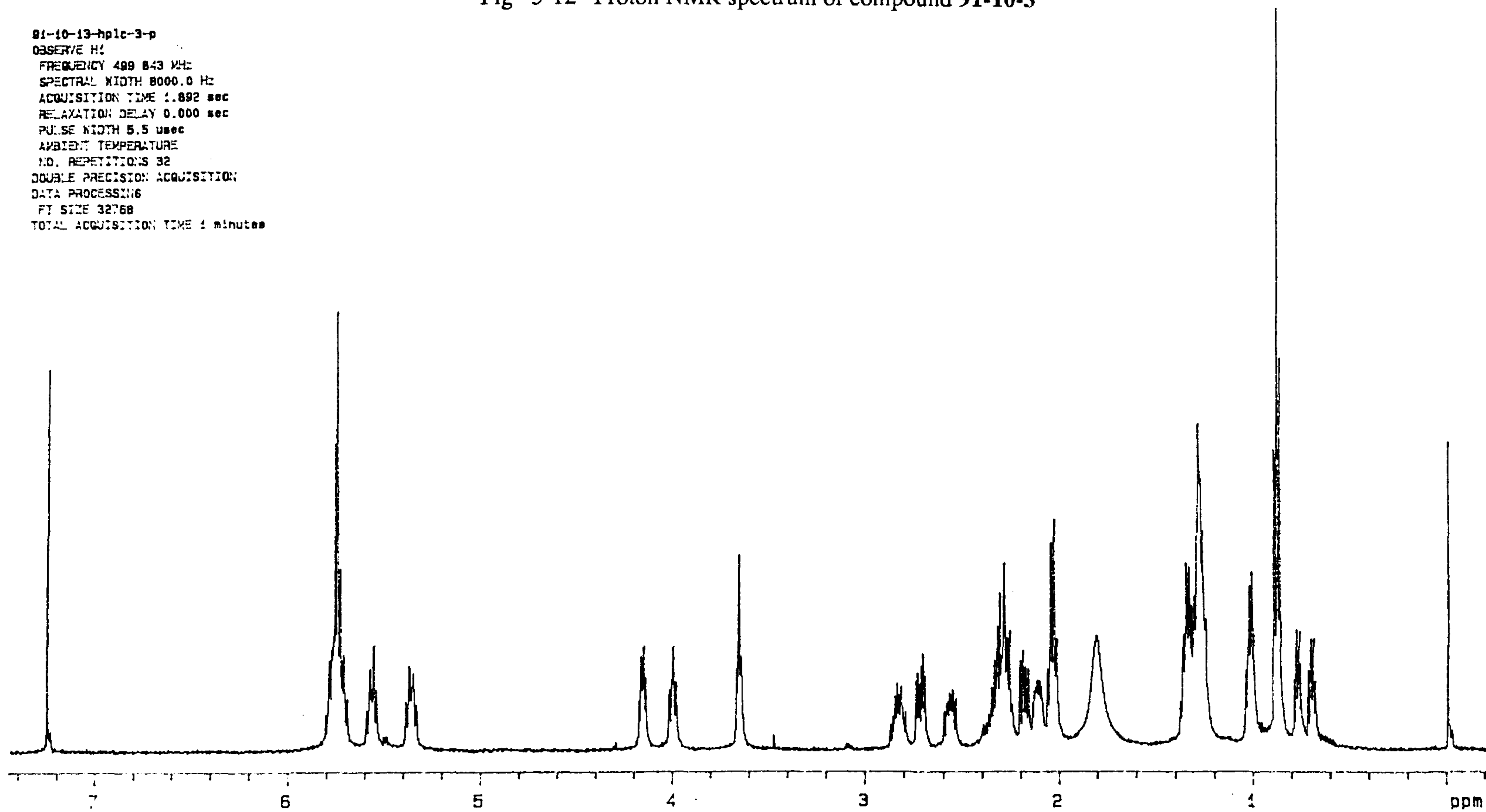


Fig 5-13 Proton COSY NMR spectrum of compound 91-10-3

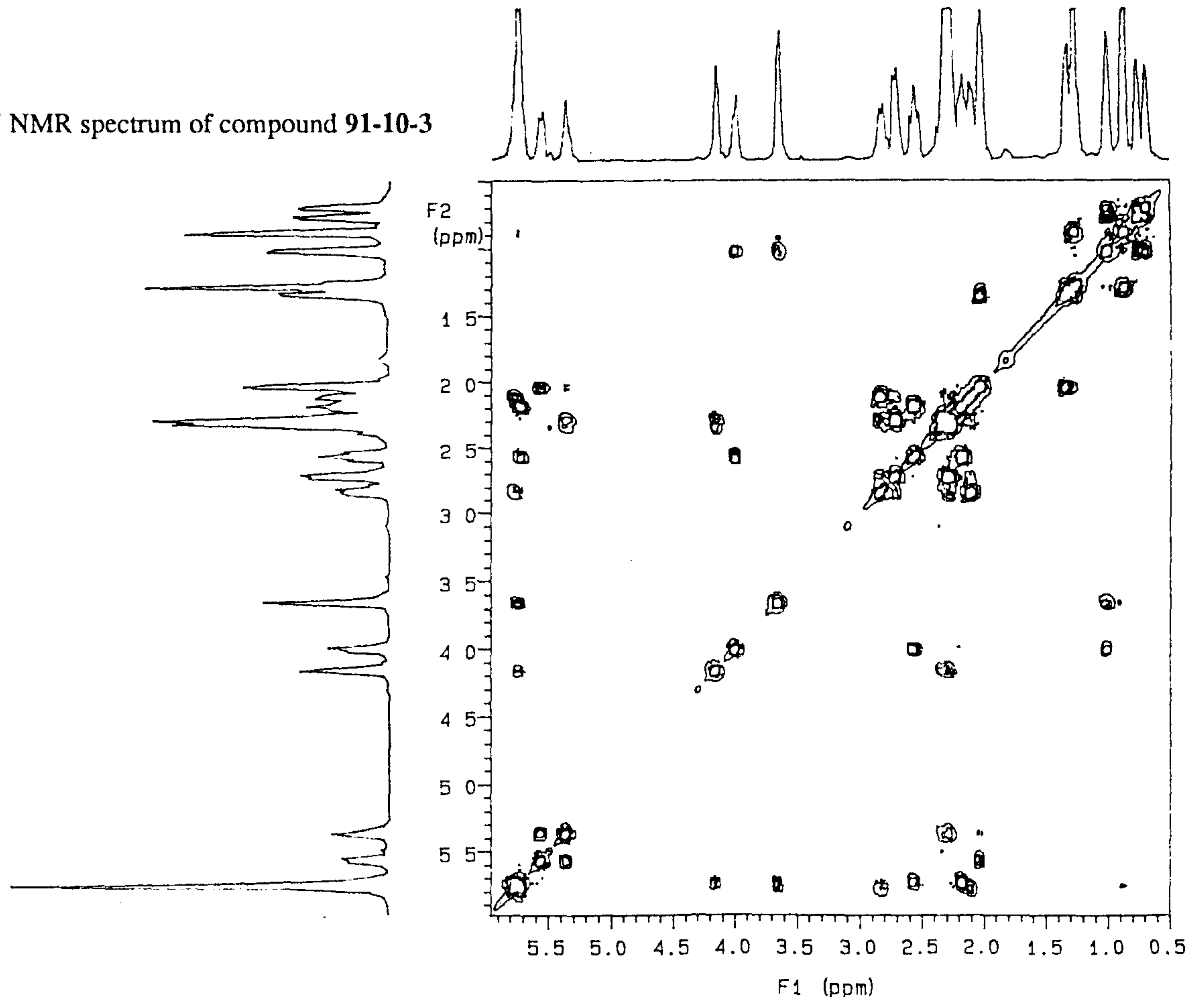


Fig 5-14 Proton NMR spectrum of compound 91-10-4

91-10-C-ac
OBSERVE H1
FREQUENCY 499 843 MHz
SPECTRAL WIDTH 8000.0 Hz
ACQUISITION TIME 1.892 sec
RELAXATION DELAY 0.000 sec
PULSE WIDTH 6.0 usec
AMBIENT TEMPERATURE
NO. REPETITIONS 16
DOUBLE PRECISION ACQUISITION
DATA PROCESSING
FT SIZE 32768
TOTAL ACQUISITION TIME 1 minutes

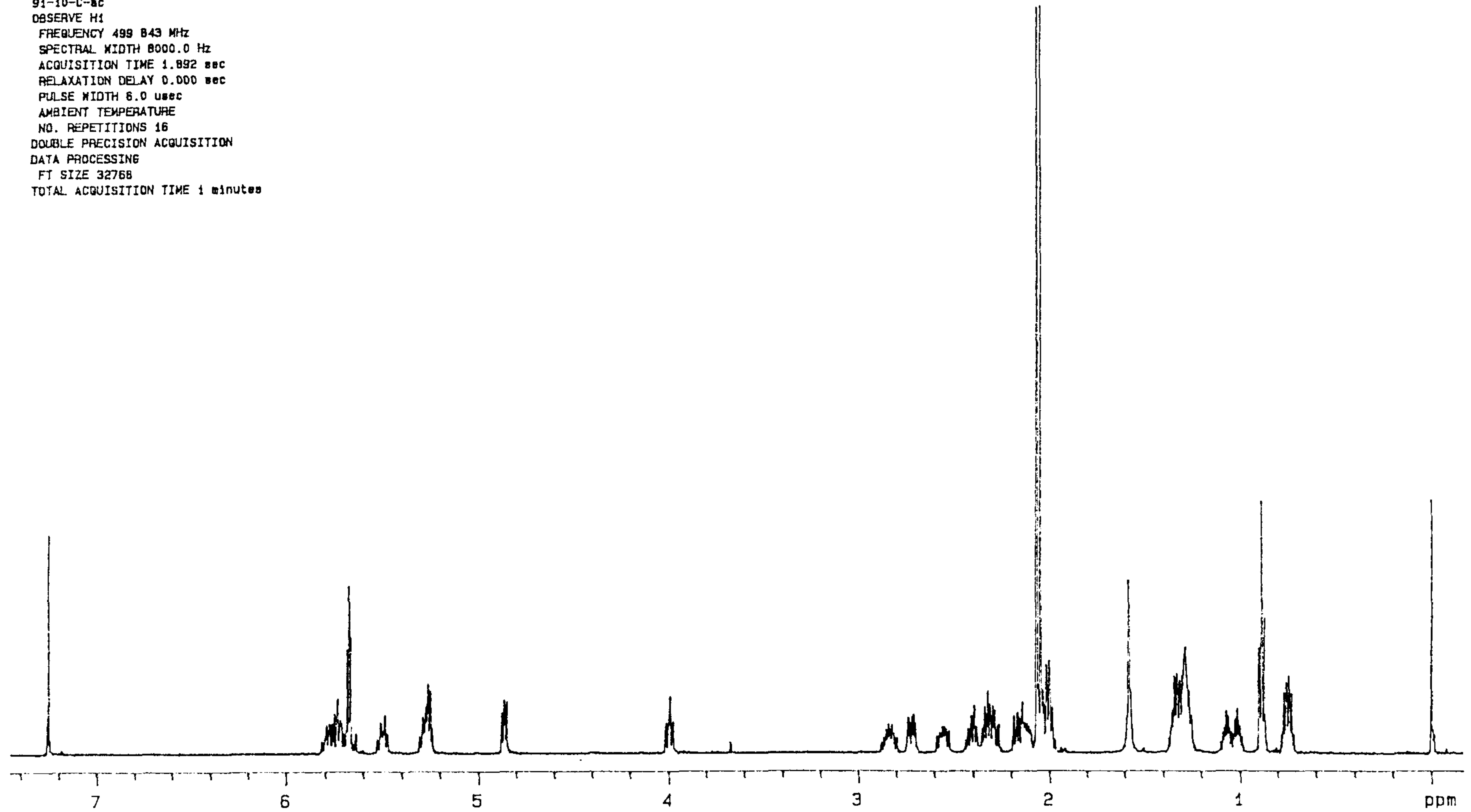


Fig 5-15 Proton COSY NMR spectrum of compound 91-10-4

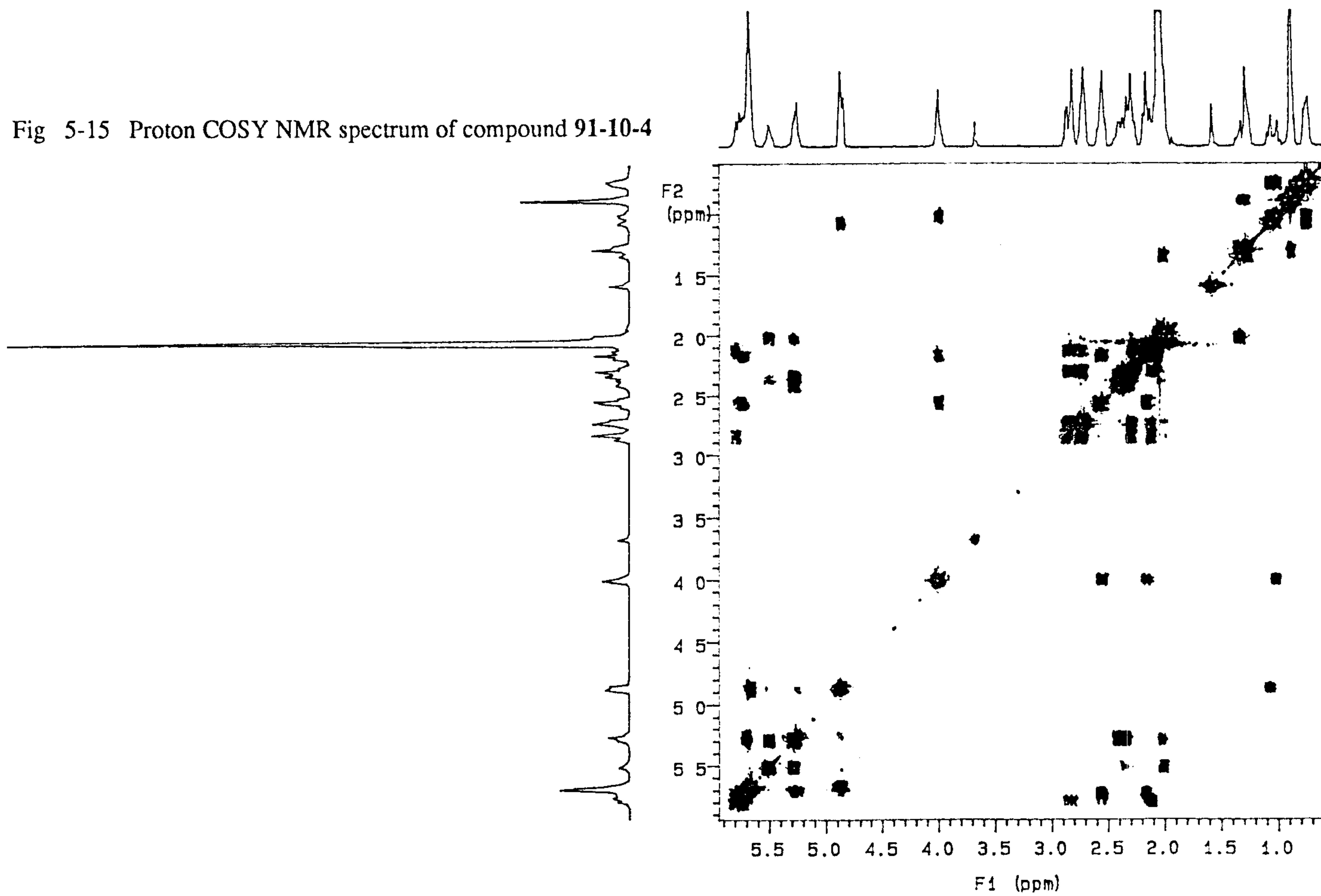


Fig 5-16 Proton NMR spectrum of compound 91-10-5

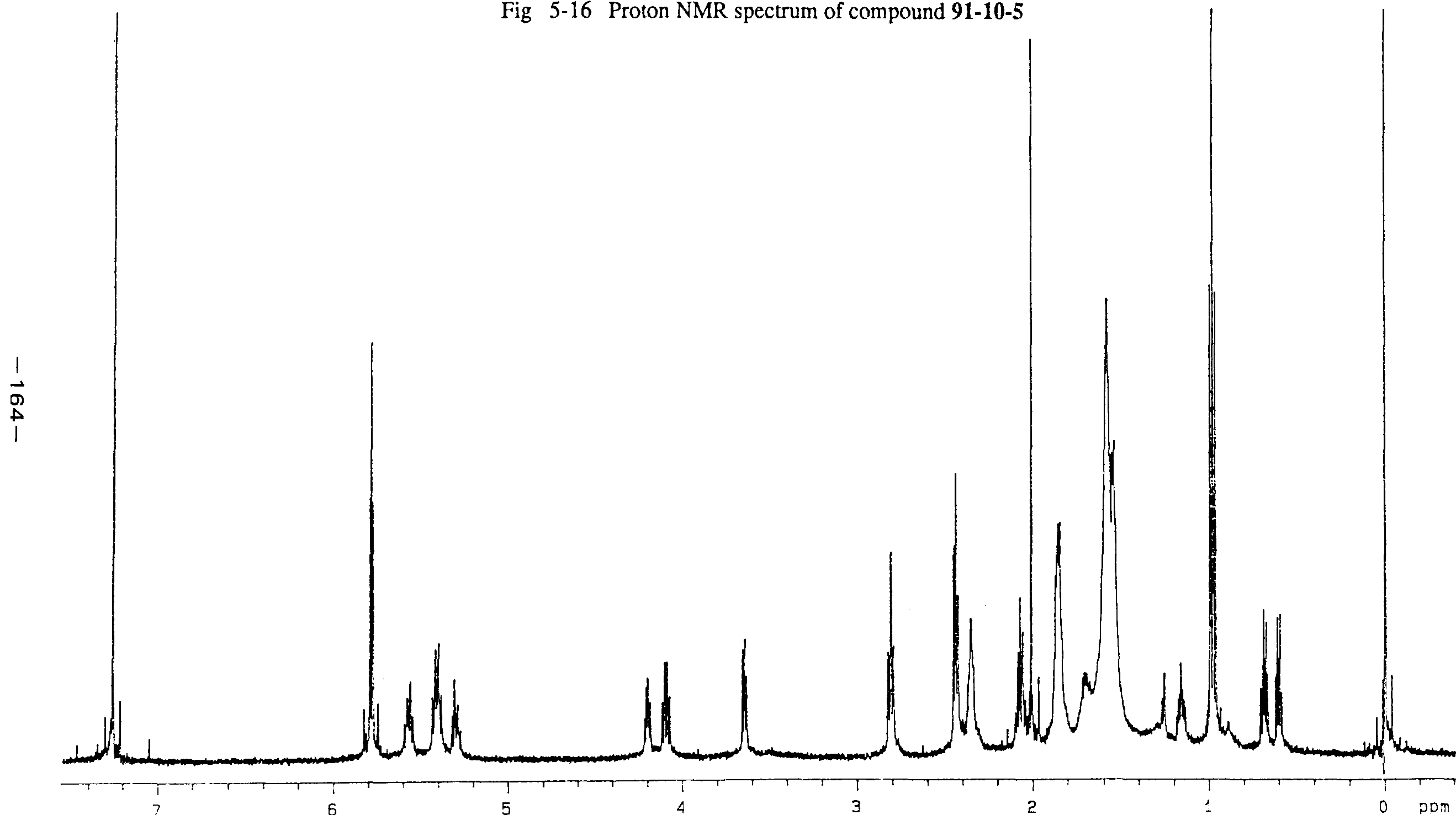


Fig 5-17 Proton NMR spectrum of compound 91-10-6

91-10-15-hplc-3-p compd E
OBSERVE H1
FREQUENCY 499.843 MHz
SPECTRAL WIDTH 8000.0 Hz
ACQUISITION TIME 1.892 sec
RELAXATION DELAY 0.000 sec
PULSE WIDTH 20.0 usec
AMBIENT TEMPERATURE
NO. REPETITIONS 16
DOUBLE PRECISION ACQUISITION
DATA PROCESSING
FT SIZE 32768
TOTAL ACQUISITION TIME 1 minutes

--165--

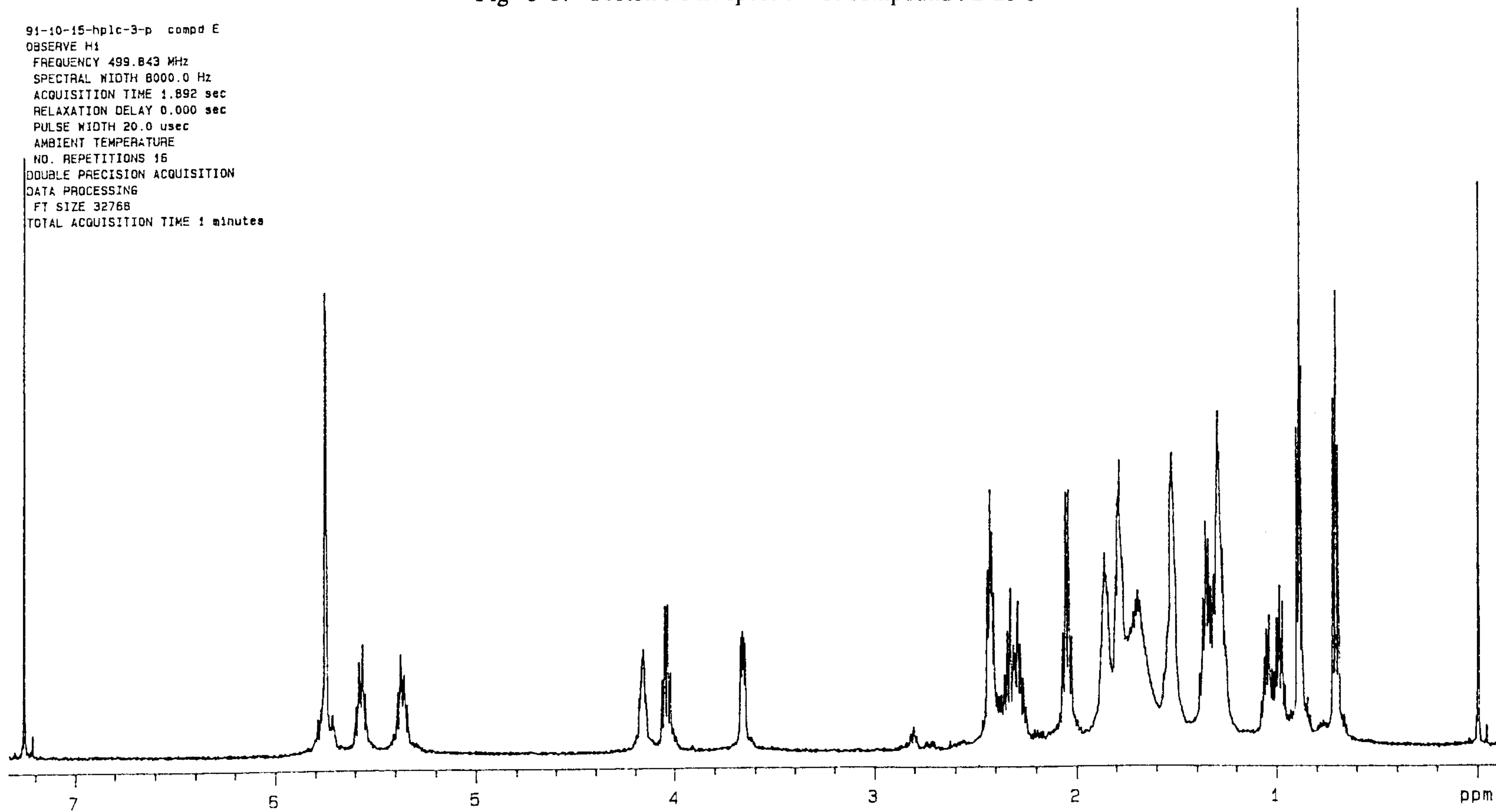
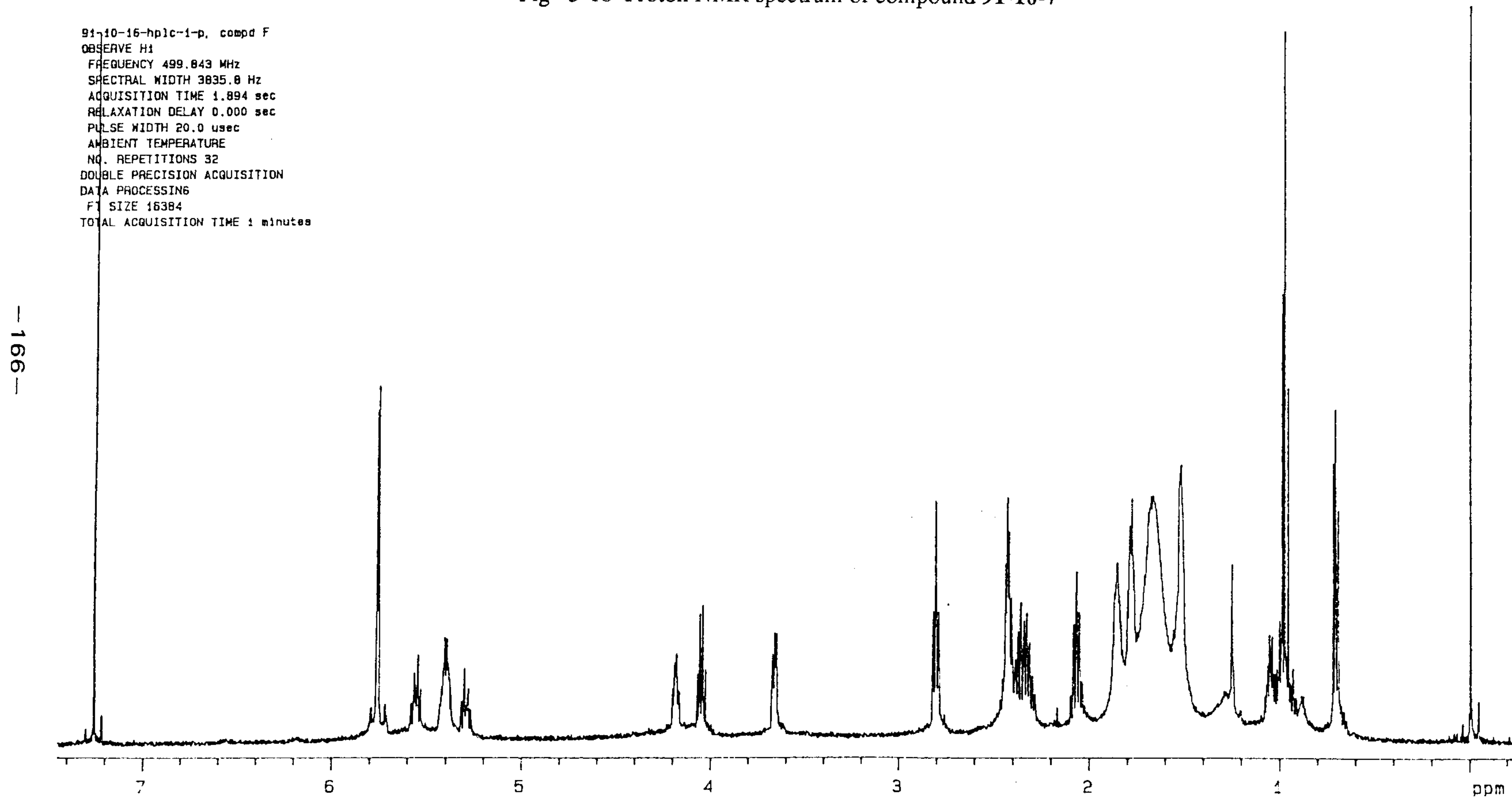


Fig 5-18 Proton NMR spectrum of compound 91-10-7



제 6 장 Sponges의 대사물질

6.1. 연구의 배경

Sponges 즉 해면동물은 천연물 화학적 측면에서 전 해양생물중 가장 중요한 위치를 차지하고 있다. '85년 까지의 통계에 의하면 해양 천연물중 약 35%가 해면으로부터 추출되었으며 이는 단일 생물문(phylum)으로서는 해양생물중 최대의 추출빈도이다 (Ireland et al, 1987). 더우기 최근에는 새로이 보고되는 천연물중 절반이상이 해면의 대사물질이어서 해면의 천연물 화학적 중요성은 더욱 증가하고 있다(신 등, 1993). 이러한 경향은 미래에도 상당기간 지속되리라는 것이 관련학계의 공통된 의견이다.

해면의 천연물 화학적 중요성은 천연물의 수 이외에도 분리된 물질의 구조적 다양성과 생리활성도에 기인하는 바가 크다. 먼저 해면으로부터 보고된 천연물은 그 구조적 다양성에 있어서 다른 해양 천연물의 추종을 불허할 정도로 뛰어나다. 이들은 생합성적 기원에 있어서 polyketides, mevalonates, shikimic acids, amino acids, bases 등 거의 모든 생합성적 전구물질에서 파생한 물질들을 망라할 뿐 아니라 상당수는 생합성적 기원과 합성경로를 추측할 수 없을 정도로 독특한 구조를 갖고있다.

생합성적 기원 뿐만 아니라 해면의 천연물의 탄소골격과 작용기 또한 너무나 다양하여 종전의 천연물의 구조에 대한 일반적인 개념을 뛰어 넘는 전혀 새로운 형태의 물질들이 끊임 없이 발견되고 있다. 해면의 천연물의 이러한 구조적 다양성은 육상과 해양생물을 망라한 지구상의 다른 대형생물(macroorganisms)에서는 찾아 볼 수 없는 것으로 미생물에서만 볼 수 있는 현상이다. Bacteria나 fungi등 미생물은 각각 최고의 분류군인 kingdom을 의미하기 때문에 일 개의 문(phylum)인 해면동물의 천연물이 kingdom에 비견할 만한 구조적 다양성을 갖는다는 것은 대단히 특이한 사실이다. 또한 동일한 시료로부터 생합성적 기원이 판이한 여러 종류의 천연물이 함께 추출되는 예도 적지 않은데 생물의 에너지 대사와 효소체계의 효율성에 위배되는 이런 현상의 원인에

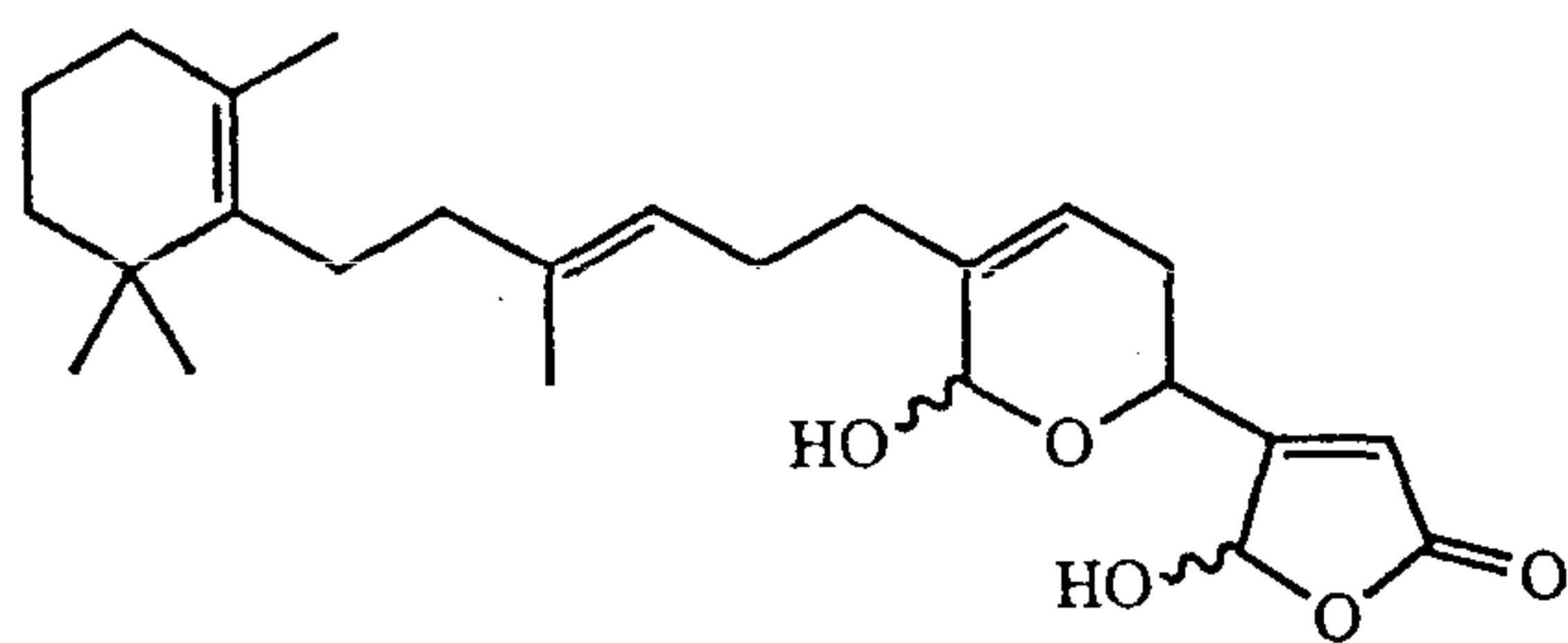
대해서 많은 의문을 낳고 있다(Bergquist & Wells, 1987).

해면의 천연물의 생합성적 기원과 구조적 다양성의 원인에 대해서는 여러 가지 이론이 있으나 현재 가장 설득력이 있는 것은 해면에 공생하는 미생물이나 착생생물(epiphyte)의 존재이다. 해면은 다량의 unicellular algae, cyanobacteria, fungi등을 체내에 함유하는 경우가 많으며 때로는 이들 공생미생물이 전체조직의 수십 %를 차지한다(Bergquist & Wells, 1987). 또한 부착생물에서 흔히 볼 수 있는 바와 같이 algae나 다른 동물이 해면의 표면에 착생하여 서식하는 경우도 많다. 그러므로 해면에서 분리된 천연물의 다수는 해면의 대사물질이 아니고 공생하는 미생물이나 착생생물의 대사물질일 가능성이 매우 높다. 실제로 해면의 천연물의 일부는 미생물의 대사물질과 동일하거나 구조적으로 매우 유사한 물질들이다(Faulkner, 1992). 또한 전기한 바와 같이 동일한 시료로부터 여러 종류의 천연물이 함께 분리되는 경우에 있어서도 이들중 최소한 일부의 물질은 그 생합성적 생산주체가 공생 미생물일 것으로 추측되고 있다.

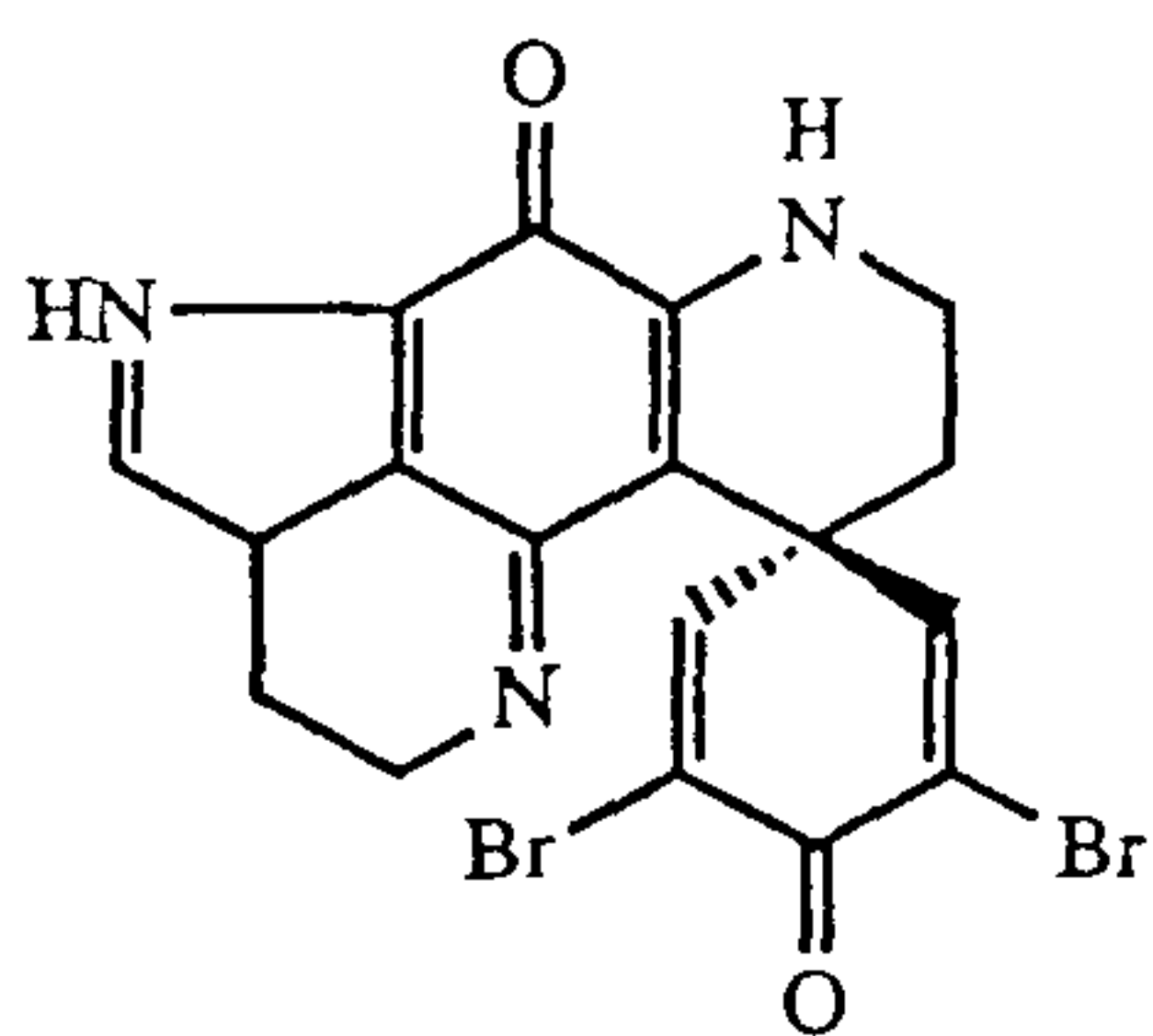
상기의 이유 이외에도 해면의 천연물이 주목을 받고 있는 또 다른 이유는 생리활성도 때문이다. 산업적인 면에서 천연물의 주된 이용분야는 신의약품의 개발인 것은 주지의 사실이며 이것이 천연물 연구를 촉진시키는 중요한 원동력임은 부인할 수 없다. 해면은 강장동물과 더불어 모든 해양생물중 생리활성효과를 가진 천연물의 추출빈도가 가장 높은 종류의 생물이다. 현재까지 보고된 해면의 천연물중 20% 이상이 한 가지 이상의 생리활성효과를 가진 것으로 알려져 있으며, 해양 천연물 연구의 초기에 보고되었던 많은 물질이 생리활성도에 대한 검색이 없이 구조만 보고된 점을 감안하면 실제로 해면의 천연물중 생리활성물질의 수는 훨씬 더 증가할 것이다(Fenical, 1987).

현재 물질특허를 획득하여 현재 외국의 연구기관에서 신의약품으로의 개발중에 있거나, 개발 가능성을 타진 받고 있는 물질들에는 해면의 천연물이 다수 포함되어 있다. 이들중 잘 알려진 몇 가지 예를 들면 소염, 진통 효과를 가진 manoalide, 항진균성 물질인 jaspamide, 항암효과를 가진 discorhabdins, 항바이러스 효과를 가진 avarols와 topsentins등이다(Fig. 6-1).

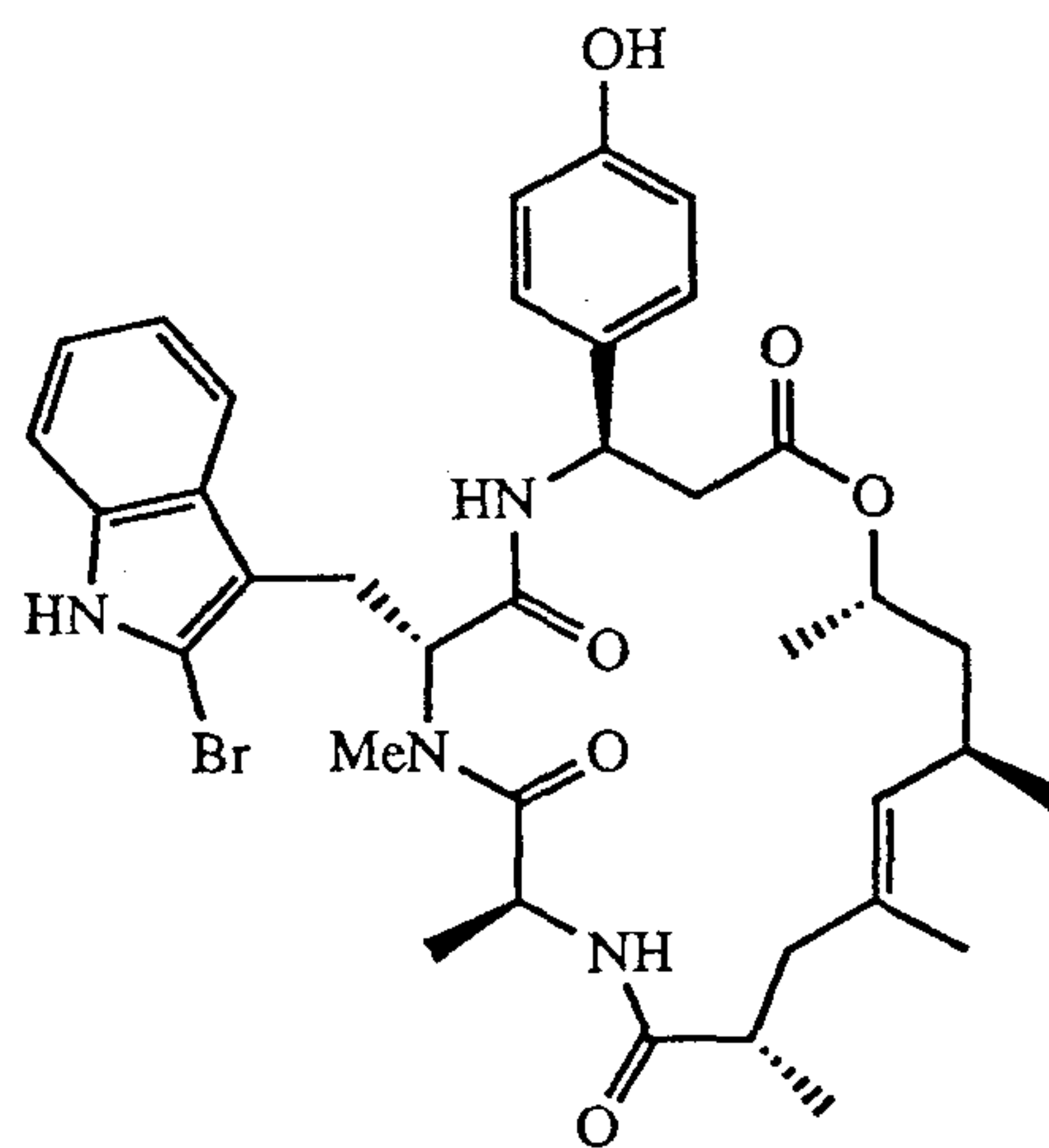
해면의 천연물은 그 자체로서 의약품으로 개발될 뿐만 아니라 신의약품의 개발을



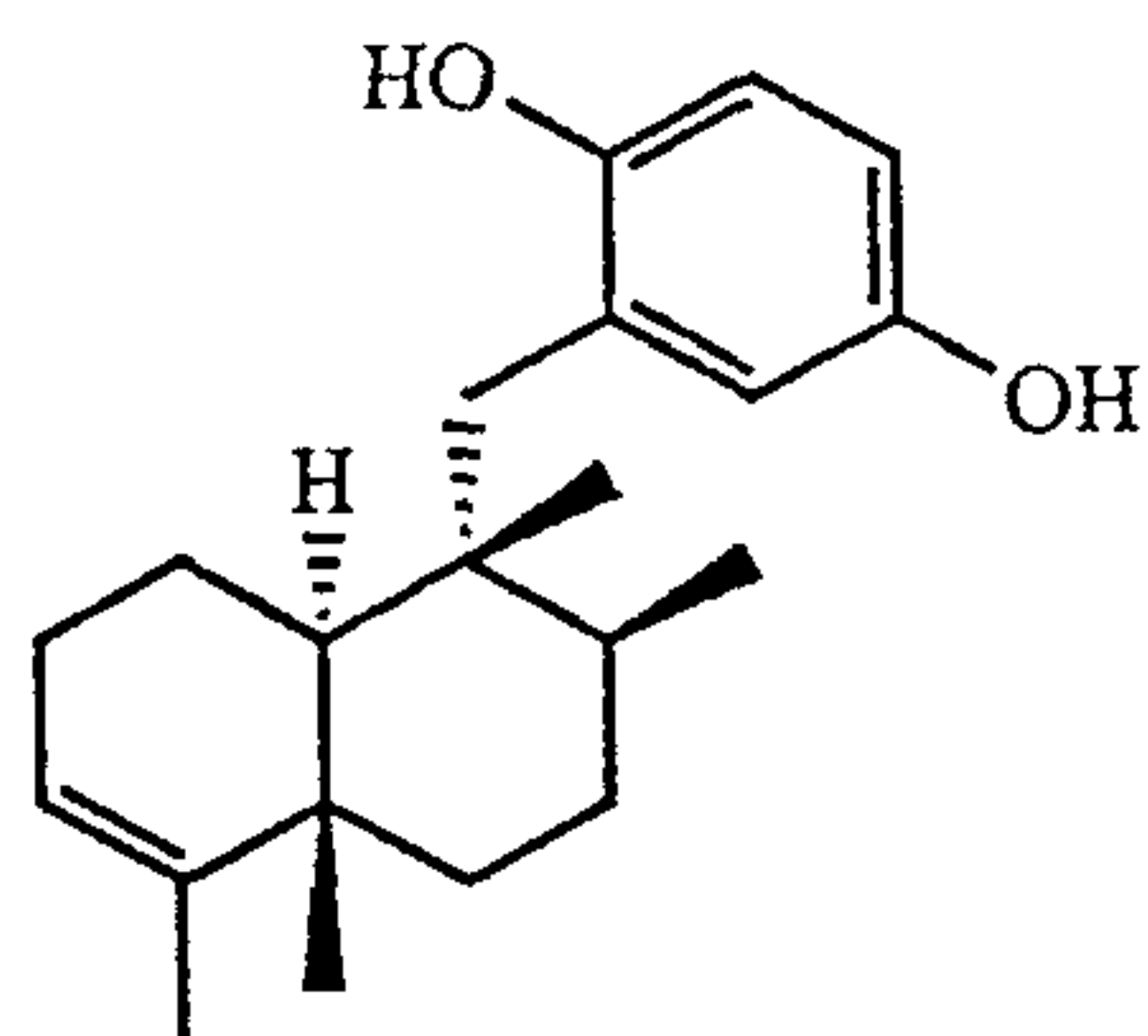
manoalide
(*Luffariella variabilis*)



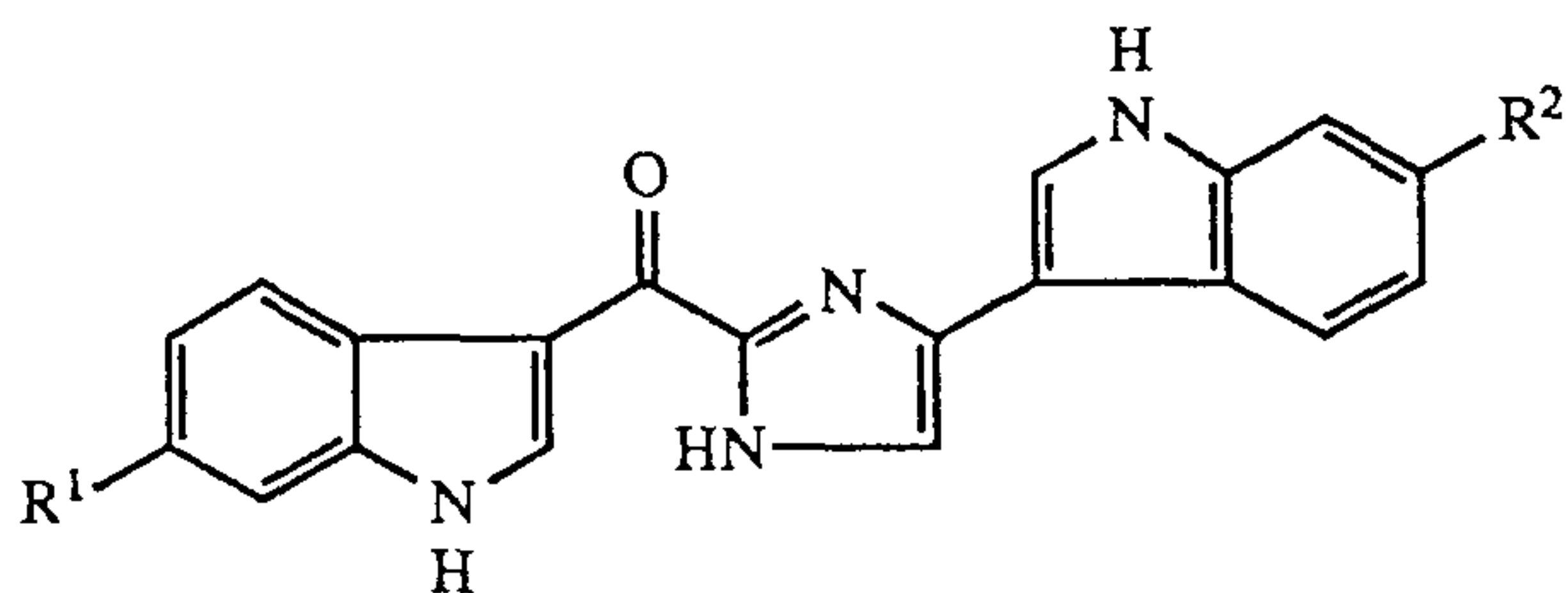
discorhabdin C
(*Latrunculia* sp.)



jaspamide (=jaspakinolide)
(*Jaspis* sp.)

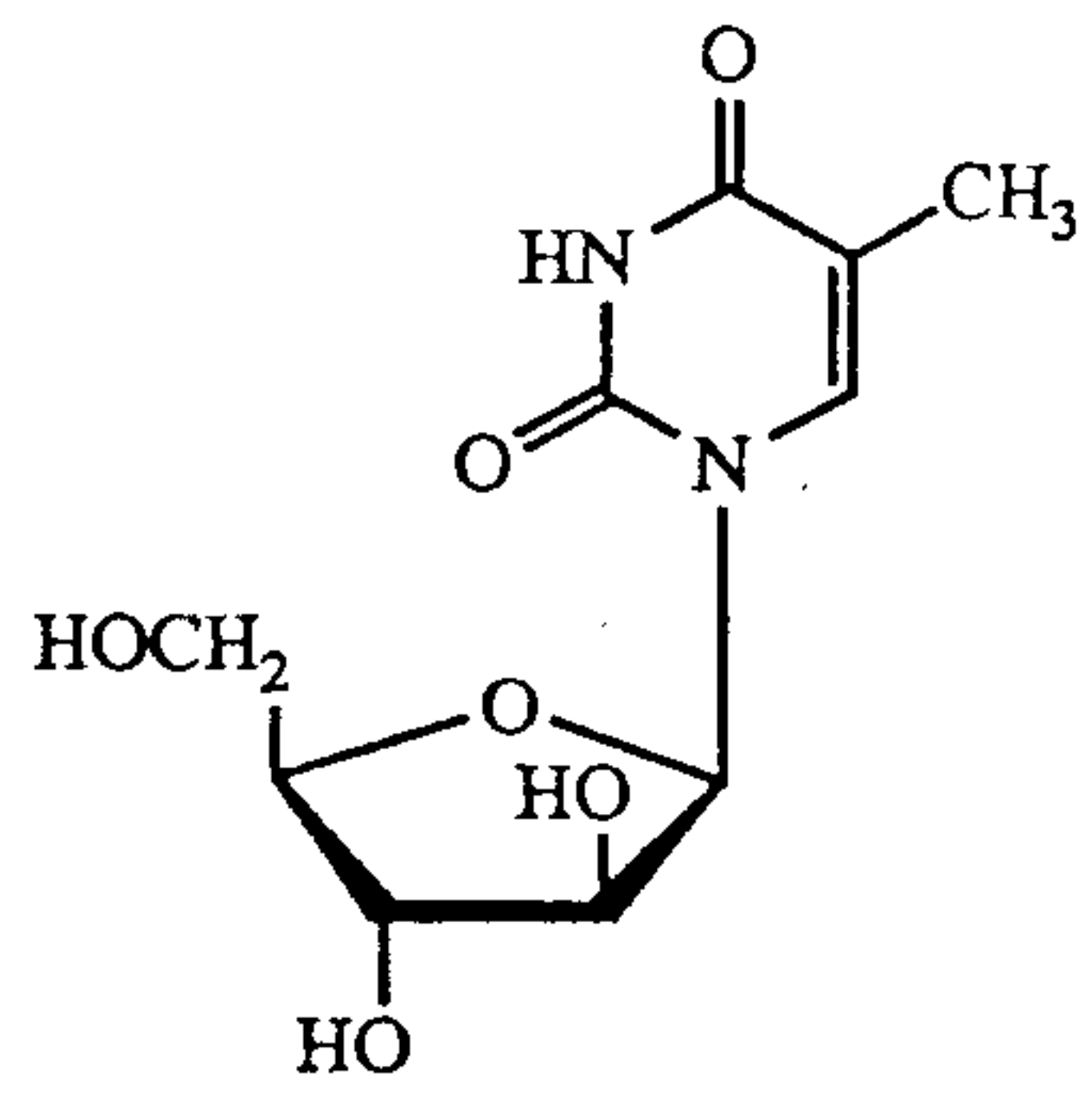


avarol
(*Dysidea avara*)

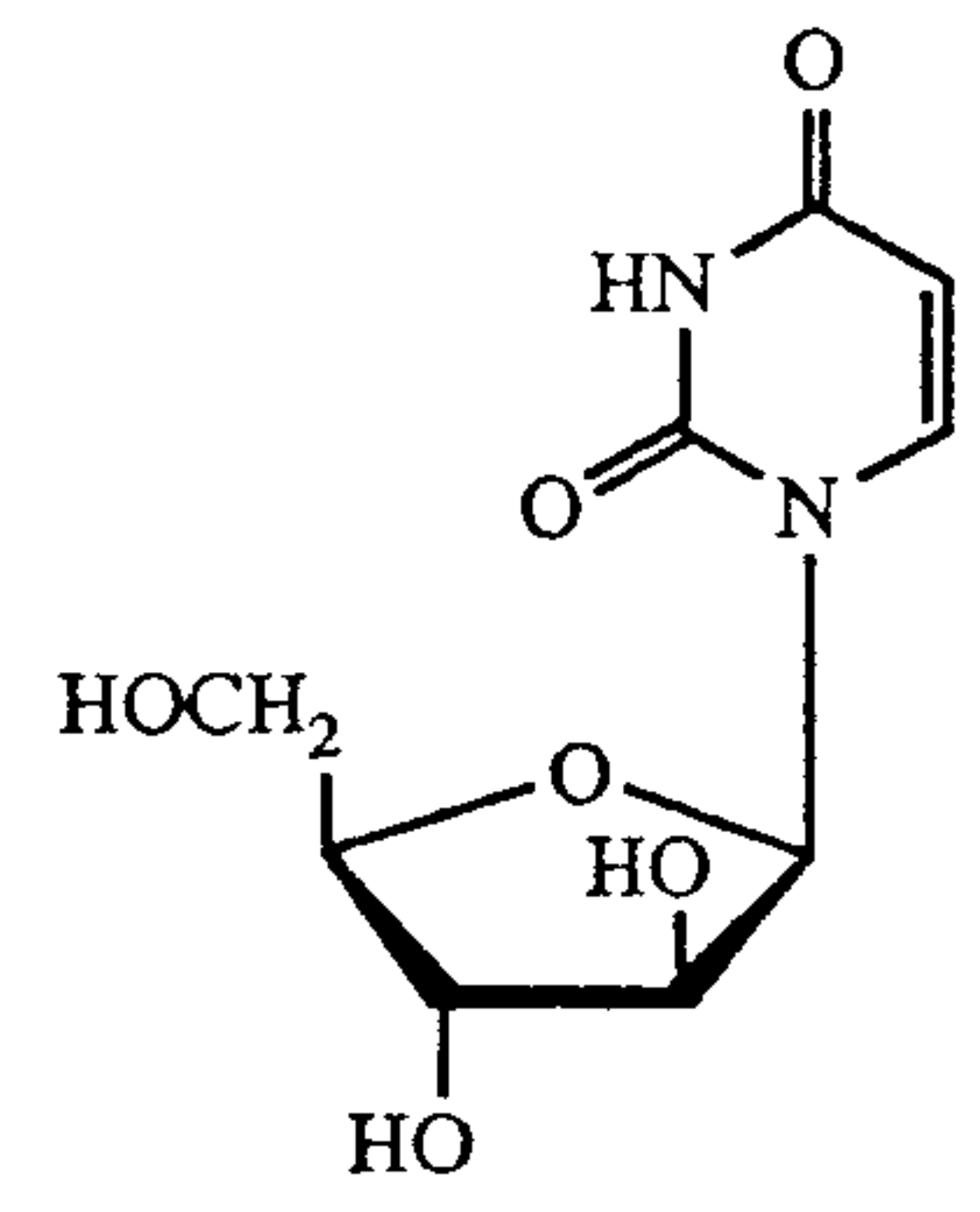


topsentin-A : $R^1 = R^2 = H$
 -B1 : $R^1 = OH, R^2 = H$
 -B2 : $R^1 = OH, R^2 = Br$
 (*Topsentia genitrix*)

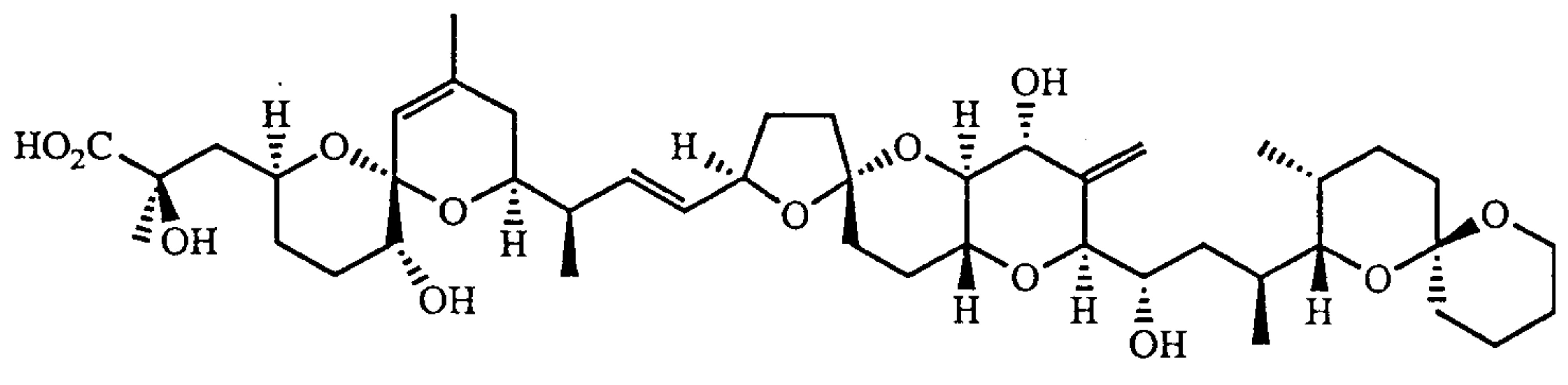
Fig. 6-1. Examples of potential drugs and lead compounds isolated from sponges.



ara-T (spongothymidine)
(various sponges)



ara-U (spongouridine)
(various sponges)



okadaic acid
(*Halichondria okadai* and *H. melanodocia*)

Fig. 6-1. continued.

위한 선도물질(lead compound)로 이용된 예도 많은데, 항바이러스제와 항암제로 개발된 AZT, acyclovir 등 modified bases와 nucleosides계의 합성시약이 ara-T, ara-U 등 해면의 항암, 항바이러스성 물질을 모태로 하여 개발된 제 3세대 물질인 것은 유명한 사실이다(Rinehart, 1987). 또한 해면의 천연물의 생체내에서의 특수한 반응기작을 이용하여 생리학, 병리학등의 연구용 시약으로 이용되는 예가 많은데 전기한 manoalide 나 okadaic acid 등은 잘 알려져 있다(Fig. 6-1)(Fautin, 1987).

해양 천연물을 신의약품으로 개발하는데 있어서 최대의 장애는 시료의 다량확보이다. 이 문제의 해결에 있어서도 해면은 다른 해양생물보다 훨씬 유리하다. 그것은 위에서 언급한 바와 같이 해면의 천연물중 다수는 공생하는 미생물의 대사물질로 추측되므로 생리활성물질을 함유하는 해면으로부터 미생물을 분리, 배양하여 해당물질을 대량으로 추출하려는 시도가 활발히 이루어 지고 있다(Faulkner, 1991; Stierle & Stierle, 1992).

위에서 언급한 여러 가지 이유로 본 연구에서도 우리 나라 근해에 서식하는 해면을 주요 연구대상으로 선정하였다. 거문도와 서귀포 근해에서 이루어진 4 차례의 현장 채집에서 60 여종 이상의 해면을 채집하였으며(제 2 장 참조), 이들의 조추출물에 대한 생리활성도 측정 결과 다수의 해면이 생리활성 천연물을 함유하고 있을 가능성이 높은 것으로 판단되었다. 그러나 채집된 시료에 대한 생물학적 분류를 국내의 연구진에 의뢰하였으나 다수의 시료에 대한 분류의 어려움으로 인하여 해면의 천연물에 대한 연구는 강장동물 보다는 진척도가 미흡하다.

일차적으로 분류가 완료된 38종의 시료중 조추출물에 대한 brine shrimp toxicity test와 proton NMR 분석결과, 채집된 시료의 양 및 기존 연구결과에 대한 문헌조사등을 종합하여 *Pachastrella* sp.와 *Reniera* sp.를 일차적인 연구대상으로 선정하였다. 현재 *Pachastrella* sp.의 시료로부터 대단히 구조가 복잡한 macrolide계의 물질을 분리, 정제하여 그 구조를 결정중인 바 자세한 내용은 아래와 같다.

6.2. *Pachastrella* sp.의 대사물질

'92년 11월에 남해안의 거문도에 속한 대삼부도와 서도 근해에서 SCUBA 다이빙에 의하여 해면 *Pachastrella* sp.(시료번호 91K-19; Order Choristida, Family Pachastrellidae)가 다량(5 kg) 채집되었다. 보통 해면강(Demospongiae)에 속하는 이 해면의 외견상 특징으로는 군체의 크기가 10 - 15 cm로 비교적 크고 납작하며 chimney가 발달하지 않은 점이였다. 외형은 노란색에서 회갈색을 띠었으며 단면은 흰색에 가까운 베이지 색이였다. 이 해면을 중점연구대상으로 선정된 이유는 시료의 양이 많고 brine shrimp toxicity(LC₅₀ 61 ppm)가 우수하였기 때문이다.

Methanol과 dichloromethane의 1:1 혼합액으로 추출한 유기 조추출물에 대하여 다양한 분리방법을 이용하여 천연물을 분리하였다. 이 시료에 대한 분리과정에 있어서 강장동물(제 3 - 5 장)과 다른 점은 먼저 조추출물에 대한 용매분획을 하였다는 점인데 그 이유는 해면은 체내에 다량의 해수를 함유하고 있고 그 결과 조추출물에 과량의 salt가 섞여 있기 때문에 이 salt를 효과적으로 제거하지 않고서는 천연물의 분리가 곤란하기 때문이였다. 또한 용매분획에서 flash chromatography를 거쳐 HPLC에 이르는 분리과정의 모든 단계에서 각 fraction에 대한 brine shrimp toxicity를 측정하여 생리활성물질에 대하여 연구의 초점을 맞추는 bioactivity-guided fractionation을 하였다. 이와 같은 방법으로 brine shrimp에 대한 강력한 독성을 나타내는 원인물질을 분리, 구조결정을 한 후 그 밖의 천연물에 대한 연구를 수행하기로 하였다.

상세한 분리과정은 6.3. 실험방법에 기술하였거니와 개략적인 분리과정과 각 분액의 brine shrimp toxicity는 다음과 같다. Methanol/dichloromethane(1:1)로 상온에서 추출하여 감압농축한 조추출물에 대하여 1차적으로 물층과 dichloromethane층으로 극성에 따라 용매분획한 후 물층은 다시 물층과 n-butanol층으로 그리 dichloromethane층은 90% aqueous methanol과 n-hexane층으로 각각 분획하였다. 각각의 용매분획층에 대한 brine shrimp assay 결과 90 % aq. MeOH 층에서 강한독성이 관찰되었으며 다른 용매층은 1000 ppm이하에서는 활성을 나타내지 않았다(Table 6-1).

Table 6-1. Results of brine shrimp assay for solvent-partitioned layers

	water	n-BuOH	90 % aq. MeOH	hexane
brine shrimp toxicity(LC ₅₀) ^a	> 1000	> 1000	7	> 1000
dry weight(g)	139.7	12.2	5.3	25.7

^a LC₅₀ values were measured by ppm($\mu\text{g}/\text{ml}$)

Brine shrimp assay에서 가장 높은 독성을 보이는 90 % aq. MeOH층 (5.3 g)에 대해 그 원인물질을 찾고자 C₁₈ reversed phase vacuum flash column chromatography를 3차례에 나누어 실시하였다. Eluting solvent system은 H₂O:MeOH(1:3) → H₂O:MeOH(1:5) → H₂O:MeOH(1:9) → MeOH의 순서로 하였으며 마지막으로 EtOAc와 CH₂Cl₂로 column을 washing하였다. 총 8개의 fraction을 모았으며 역시 모든 fraction에 대해 brine shrimp assay를 실시하였다. 그 결과 비교적 극성이 높은 fraction 1~4에서 독성이 검출되었으며 그 중에서도 fraction 2에서 가장높은 독성이 검출되었다 (Table 6-2).

Table 6-2. Results of brine shrimp assay for vacuum flash chromatographic fractions

fractions	fr.1	fr.2	fr.3	fr.4	fr.5	fr.6	fr.7	fr.8
brine shrimp 독성 toxicity(LC ₅₀)	0.4	0.1	0.2	13	*n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
dry weight(mg)	2000	360	170	890	560	330	1740	310

* n.a. not active (LC₅₀ > 1000 ppm)

가장 독성이 높은 fraction 2(360 mg)에 대해 C₁₈ reversed phase HPLC를 반복 실시하여(6.3. 실험방법 참조) 침상형 결정물질(91K-19-1) 40 mg을 얻었다.

91K-19-1의 brine shrimp에 대한 생리활성을 확인하기 위하여 순수한 물질에 대해 정밀한 brine shrimp assay를 실시하였다. Mixture상태인 fraction 2의 LC₅₀가 0.1 ppm이므로 우선 10 ppm, 1 ppm, 0.1 ppm의 3가지 농도에서 독성측정을 하였는데 0.1 ppm에서도 강한 독성을 나타어 3 group의 실험군(30마리)에서 brine shrimp가 24시간 이내에 모두 사망하였다.

91K-19-1의 brine shrimp 독성 확인으로 이 물질이 생리활성 효과를 가진 것을 확인하였으므로 이에 대해 화학구조 규명을 시작하였다. 91K-19-1은 acetone에 높은 용해도를 나타내었으며 실온에서 상당히 안정한 물질이었다. 동일한 물질을 chloroform-d, acetone-d₆, methanol-d₄ 등의 용매에서 차례로 ¹³C NMR을 찍어본 결과 각각의 용매에서 43, 47, 44개의 carbon이 확인되어 일단 상당한 분자량이 되는 물질로 추정되었으며 NMR 분석을 위한 용매로는 acetone-d₆가 가장 적합한 것을 알 수 있었다.

¹³C NMR spectrum에서는 213.5 ppm에서 ketone carbonyl signal이 관측되었으며 172.6 ppm에서 esteric carbonyl로 생각되는 signal이 나타났다. 네 개의 olefinic carbon이 140.8, 135.3, 130.9, 122.2 ppm에서 나타났다(Fig. 6-5). 특기할 만한 것은 109.7, 107.8, 97.8 ppm에서 3개의 quaternary carbon들이 관측된 것이다. 83.2 ~ 60.9 ppm부근의 10개의 oxygenated carbon signal들과 연관지어 생각해 볼때 91K-19-1은 polycyclic ether type의 macrolide계 물질임을 짐작할 수 있었고 단지 3개의 OH group(4.34, 3.50, 3.32 ppm)만이 ¹H NMR에서 나타난것도 이 추측을 뒷받침하였다(Fig. 6-6).

91K-19-1의 ¹H NMR spectrum에서는 signal들이 6.5 ~ 1.0 ppm에 걸쳐 고르게 분포되어 있어 많은 functional group들이 분자내에 존재함을 알 수 있었다. Olefinic region(6.46, 5.43, 5.38, 5.30 ppm)에 4개의 proton signal들이 나타났으나 ¹³C NMR spectrum에서는 olefinic region에 3개의 protoned carbon(140.8, 135.3, 122.2 ppm)

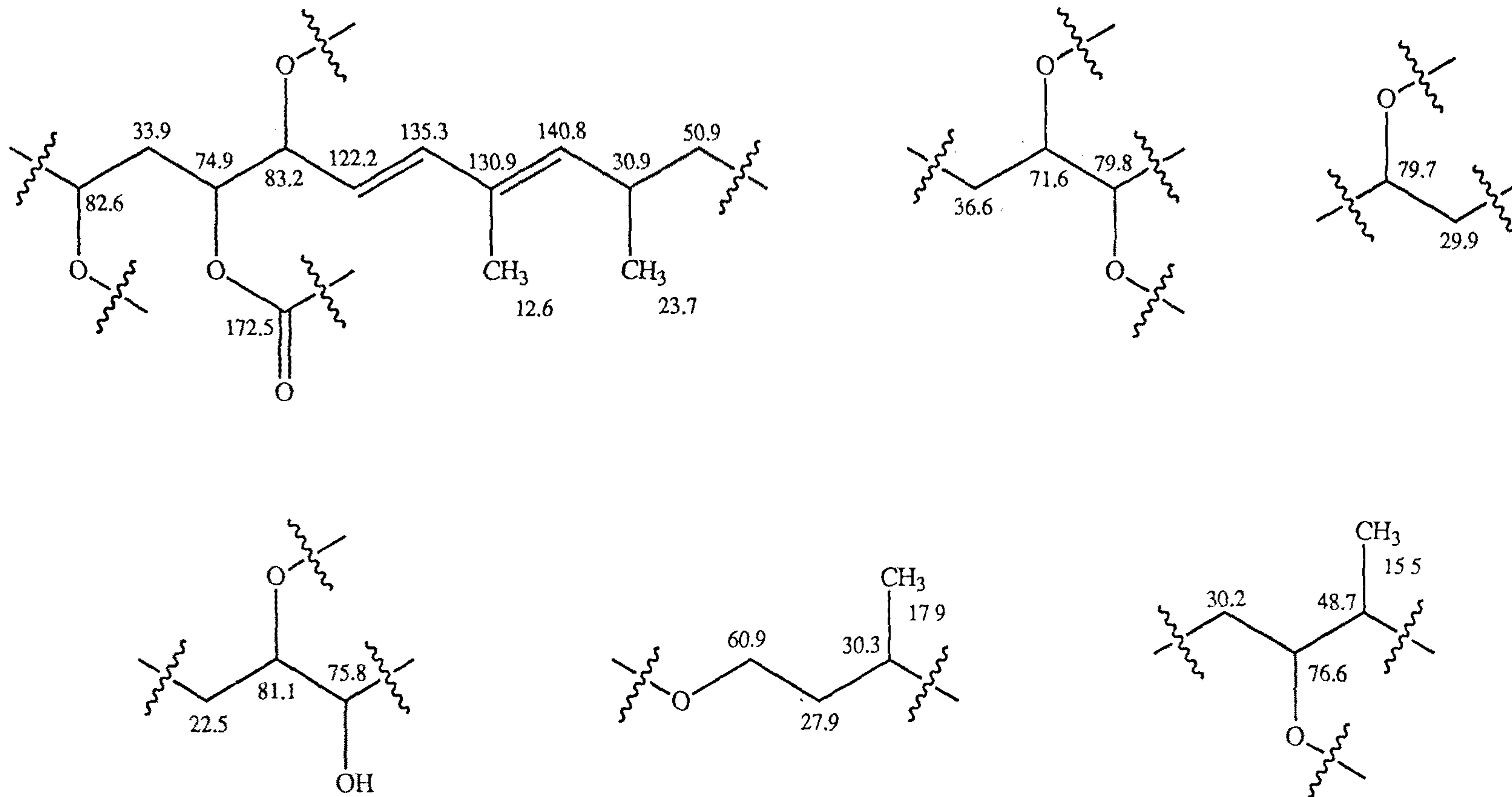
만이 보였으며 HETCOR 실험결과 5.43 ppm의 proton signal은 74.9 ppm의 carbon과 correlation을 보이므로 oxygenated carbon에 붙은 proton으로 추측되었다(Fig. 6-7). 4.69 ppm ~ 3.31 ppm에 나타나는 proton signal중에서 11개의 signal이 83.2 ppm ~ 60.9 ppm의 10개의 oxygenated carbon과 correlation을 보였다(CH x 9, CH₂ x 1).

2.26 ppm ~ 1.48 ppm 부근의 proton signal들은 상당히 겹쳐 있어 해석이 까다로웠다. 모두 7개의 methyl signal이 확인되었으며 이중 4개는 quaternary carbon에 붙은 methyl group(1.70, 1.26, 1.17, 1.16 ppm, singlet)이었으며 나머지 3개는 CH에 붙은 methyl group(1.08, 0.96, 0.93 ppm, doublet)이었다. COSY와 TOCSY실험 결과 모두 6개의 부분구조를 확인할 수 있었다(Fig. 6-2, 6-8, 6-9).

91K-19-1의 화학구조에 대한 분석은 HMQC, HMBC등의 실험으로 계속 진행중이며 이와 병행하여 이 물질의 생리활성에 대한 연구를 진행하였다. 91K-19-1은 brine shrimp assay에서 상당한 독성을 나타내었으므로 cancer cell에 독성을 나타낼 가능성이 농후하여 우선 인체 암세포를 이용한 항암효과 측정에 중점을 두었다.

현재 사용되고 있는 항암제들의 작용기전을 보면 주로 세포내의 RNA합성 억제, DNA합성 억제, 단백질합성 억제, 세포분열 억제 등을 통하여 궁극적으로 암세포의 증식을 억제하는 것이다. 따라서 신약개발 과정에서 흔히 채용되는 *in vitro*검색방법도 이러한 세포내 생합성 과정에 관여하는 효소를 억제하거나 생화학적 진행과정을 차단 또는 억제하는 물질을 찾아내는데 주안점을 두고 있다. 이러한 항암효과 검색법중에 하나인 human tumor cell culture assay는 현재 1차 검색법으로서 가장 널리 인정받아 사용되는 방법이다. 미국 국립 암연구소(NCI)에서도 50여종 이상의 인체 암세포를 이용하여 신약개발을 위한 천연물 및 합성물질의 약효검색에 활용하고 있으며 이 과정을 통과한 물질에 대해서는 2차적으로 특정 암세포를 이식한 nude mouse에 투여하여 *in vivo* 실험을 실시한다. Taxol을 비롯한 많은 천연물 유래의 항암제들이 이 검색법을 통해 발견되었다.

Cell culture assay에서는 MTT검색법(Metrazolium-based colorimetric assay)을 가장 흔히 사용한다. 이 MTT검색법에서는 배양된 암세포에 검사물질과



~ 176 ~

Fig 6-2 Partial structures of compound 91K-19-1. Numbers denote chemical shifts of carbons in ppm. Chemical shifts of attached protons are omitted for clarity.

MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 함께 첨가하여 일정시간 배양후 MTT가 formazan으로 대사된 양을 측정하여 항암효과를 관찰한다. 살아있는 암세포만이 MTT를 formazan으로 대사 할 수 있으므로 생물 세포수와 대사량은 비례관계에 있다. formazan의 생성량은 ELISA(multiwell microplate reader) counter를 사용하여 흡광도를 측정하면 단시간에 많은 수의 시료를 자동으로 처리할 수 있다.

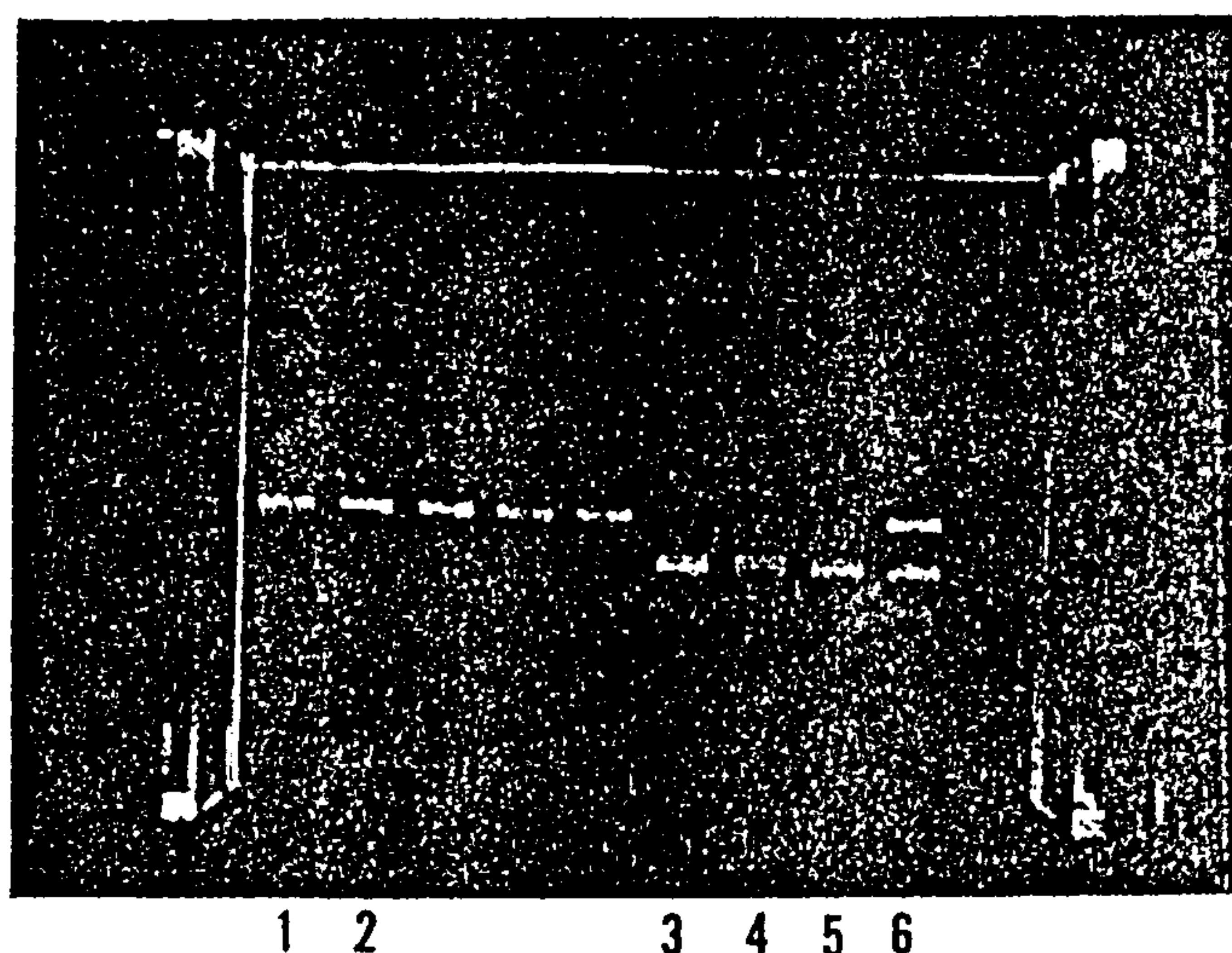
MTT법을 이용한 cell culture assay의 장점은 미량의 시료(1 mg이하)를 단시간에 자동적으로 여러개를 처리할 수 있으며 재현성과 객관성이 우수하다는 것이다. 반면에 검색법의 유지비용이 많이 들고 전문인력이 필요하다는 단점이 있다. 이 검색법으로는 수십 가지의 암세포에 대한 억제효과를 동시에 측정할 수 있기 때문에 검사물질의 특정 암세포에 대한 선택적 약효를 파악할 수 있다. NCI에서는 검사물질의 50가지 이상의 암세포에 대한 선택적 약효를 측정한 뒤 그 다음 단계에서는 선택성이 있는 암세포를 athymic nude mouse(면역반응을 일으키지 않는 쥐)에 이식하여 이 mouse에 대한 *in vivo* assay를 실시하고 있다.

91K-19-1의 cell culture assay는 Purdue 대학 Cancer Center에 인체 결장암(HT-29), 폐암(A-549) 및 유방암(MCF-7) 세포등에 대한 항암효과를 측정 의뢰 하였는데 시판되는 항암제인 adriamycin을 positive control로 사용한 약효비교의 결과가 밝혀질 예정이다.

91K-19-1의 암세포에 대한 cytotoxicity의 작용기전에 대한 정보를 얻기 위해서는 mechanism-based bioassay의 활용이 필요하다. 따라서 mechanism-based bioassay로서 본 연구의 2.4. 생리활성도 측정에서 설명된 DNA-cleavage와 plasma membrane enzyme assay를 시도하였다. 91K-19-1을 DNA-cleavage assay로 분석해 본 결과 1000 ppm의 농도에서는 효과가 나타나지 않는 것으로 나타났다. Bleomycin을 positive control로 사용하여 효과를 비교한 결과는 아래와 같다(Fig. 6-3).

이 실험결과 일단 91K-19-1은 DNA에 직접적인 영향은 미치지 않으면서 다른 경로로 세포독성을 나타내는 것으로 추정되었다.

Fig. 6-3. Results of DNA-cleavage assay for compound 91K-19-1.

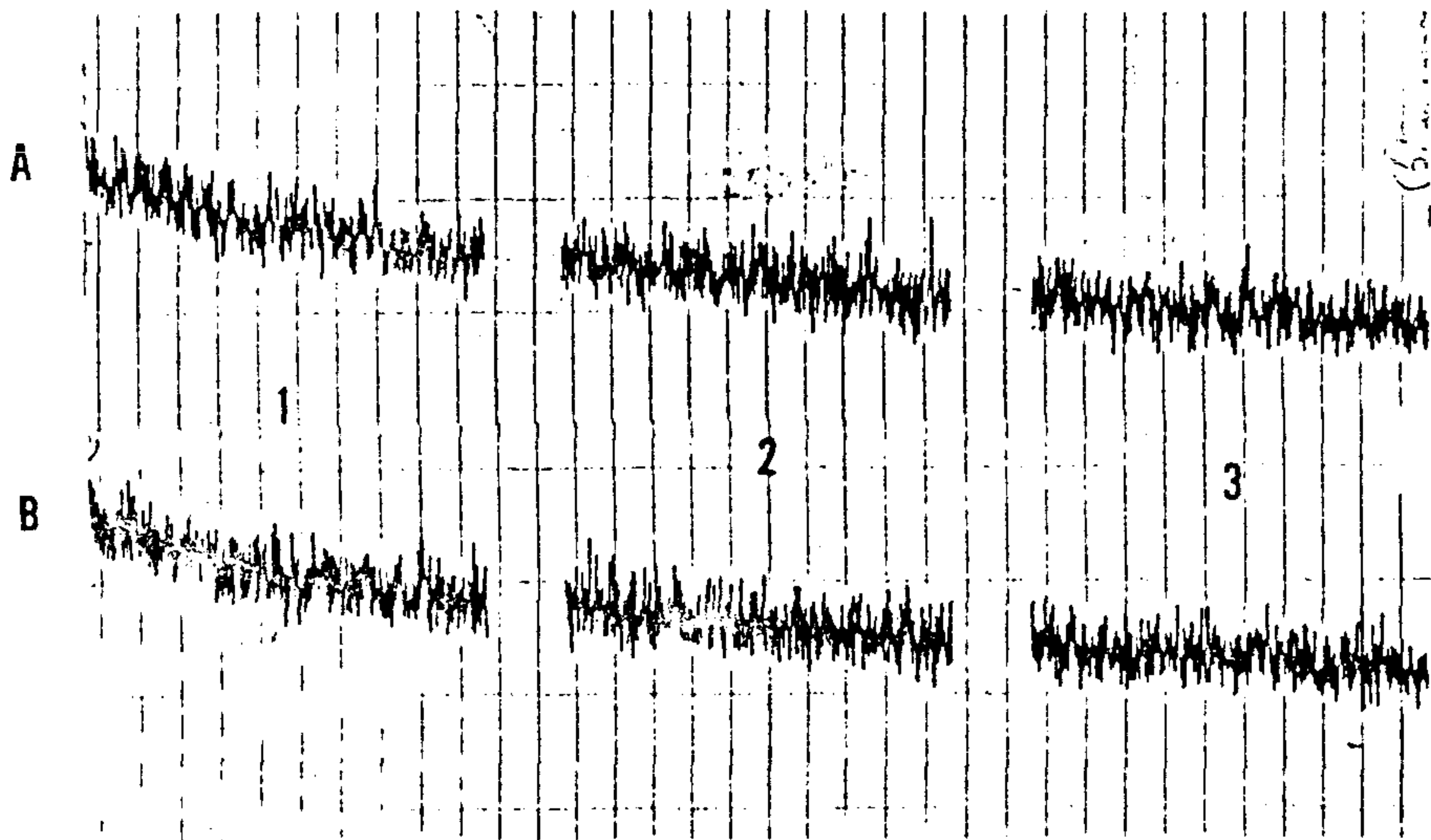


- 1 Compound A(1000 $\mu\text{g/ml}$) + $\phi\text{x 174 DNA}$
- 2 Compound A (100 $\mu\text{g/ml}$) + $\phi\text{x 174 DNA}$
- 3 : Bleomycin (1 mM) + $\phi\text{x 174 DNA}$
- 4 " (0.1 mM) + "
- 5 : " (0.01 mM) + "
- 6 : " (0.001 mM) + "

또다른 mechanism-based bioassay 방법인 plasma membrane에 존재하는 산화·환원 효소체계를 이용한 assay(2.3. 생리활성도 측정 참조)는 reductase와 oxidase의 활성을 각각 측정하여 시료의 생리활성을 볼 수 있으나 91K-19-1에 대해서는 reductase에 대한 활성만을 측정하였으며 실험은 이 방법의 창안자인 Purdue 대학 Dr. Morré의 연구실에서 행해졌다.

실험 결과 91K-19-1은 28.8 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 reductase의 활성에는 영향을 미치지 않았으므로 이 물질의 cytotoxicity는 세포막의 산화·환원 효소계와는 무관하며 다른 경로에 의한 것임을 알 수 있다(Fig. 6-4).

Fig. 6-4. Results of plasma membrane reductase assay for compound 91K-19-1
by measurement of decreasing rate of coenzyme Q_o.



A : control (enzyme + substrate)

B (enzyme + substrate) + Compound A 20 μ l (28.8 μ g/ml)

1 5 min. after reaction

2 : 5 - 10 min. after reaction

3 : 10 - 15 min. after reaction

이상의 생리활성도 측정결과를 종합하면 91K-19-1은 강력한 cytotoxicity를 갖고 있으나 그 작용경로가 DNA나 세포막의 산화환원 효소계와는 무관한 경로에 의한 것으로 추측된다. 향후 이 물질에 대해서는 구조결정 작업과 병행하여 보다 다양한 생리활성도를 측정할 예정이다. 91K-19-1이외에도 본 *Pachastrella* sp.의 시료에서는 brine shrimp에 독성을 가진 물질이 계속 분리되고 있으며 이들에 대한 연구도 진행중이다.

요약하여 본 연구에서는 거문도 근해에서 채집한 해면 *Pachastrella* sp.로부터 polycyclic ether를 가진 macrolide계 세포독성 물질을 분리하였으며 NMR을 이용한 구조결정과 생리활성도 측정연구가 진행중이다.

6.3. 실험방법

6.3.1. 시료의 채집 및 유기물질의 추출

*Sponge Pachastrella sp.*의 채집은 거문도 연안 서도와 대삼부도 근해 수심 25-30 m에서 1회('91년 10월) SCUBA 다이빙에 의해서 이루어 졌으며 이 시료는 채집해 오는 즉시 냉동고에 보관되었다. 냉동보관중인 시료(무게량: 약 5 kg)를 실온에 방치하여 얼음을 제거한 후에 잘게 잘라 methanol과 methylene chloride 1:1 혼합액 2 L를 가하여 실온에서 48시간 방치한 후에 그 용액을 걸러내었으며 이 과정을 다시 수 차례 반복한 후에 얻어진 전체 유기조추출물의 양은 191.3 g이 얻어 졌다.

조추출물을 약 95 g씩 두 번에 나누어 용매분획을 실시하였다. 1차로 물층과 methylene chloride층으로 극성에 따라 용매분획한 후 다시 물층은 물층(건조중량: 139.7 g)과 n-butanol(12.2 g)층으로 분획하였다. 그리고 methylene chloride층은 90% aqueous methanol층(건조중량: 5.3 g)과 hexane층(25.7 g)으로 분획하였다. 추출 성분의 극성에 따라 극성이 가장 높은 성분들은 물층, 그리고 가장 낮은 것은 hexane층으로 모아 4 가지의 각각 다른 용매분획을 얻었다.

6.3.2. 91K-19-1의 분리

위에서 얻은 4 가지의 용매분획층에 대한 brine shrimp assay결과 90% aq. methanol층에서 가장 강한 독성이 관찰되었으며 이 원인물질을 찾기 위하여 90% aq. methanol층에 대해서 C₁₈ reversed phased vacuum flash column chromatography를 세 차례 나누어 실시하였다. Eluting solvent system은 H₂O:MeOH(1:3) → H₂O:MeOH(1:5) → H₂O:MeOH(1:9) → MeOH의 순서로 하였으며 마지막으로 ethylacetate와 methylene chloride로 column을 washing하였다. 총 8개의 fraction을 모았으며 역시 모든 fx에 대한 brine shrimp assay를 실시하였다. 그 결과 비교적 극성이 높은 fx 1-4(건조중량

은 각각 2000, 360, 170, 890 mg)에서 독성이 검출되었으며 그 중에서도 fx 2에서 가장 높은 독성이 검출되었다.

고속감압 크로마토그래피로 분리한 fx-2를 H₂O:MeCN:MeOH(10:3:40)의 혼합액을 용출용매로 사용하여 HPLC(Alltech reversed phase semipreparative C₁₈ column, UV 254 nm, 2.5 ml/min)로 분리하면 retention time 42 분에 major band를 얻었다(80 mg). 이를 다시 MeOH:H₂O(7:3)으로 flow rate 1.5 ml/min의 조건에서 동일 column으로 정제하여 침상형 결정물질 91K-19-1을 40 mg 얻었다.

¹H NMR(acetone-d₆) δ 6.46(1H), 5.43(1H), 5.38(1H), 5.30(1H), 4.69(1H), 4.46(1H), 4.34(1H), 4.26(1H), 4.19(1H), 3.96(1H), 3.90(1H), 3.80(1H), 3.74(1H), 3.56(1H), 3.50(1H), 3.45(1H), 3.32(1H), 3.31(1H), 2.89(1H), 2.60(1H), 2.46(1H), 2.26 - 2.00(8H), 1.92(1H), 1.88(1H), 1.78(1H), 1.70(3H), 1.66 - 1.48(10H), 1.39(1H), 1.28(1H), 1.26(3H), 1.20(1H), 1.17(3H), 1.16(3H), 1.12(1H), 1.08(3H), 0.96(3H), 0.93(3H); ¹³C NMR(acetone-d₆) δ 213.5(C), 172.6(C), 140.8(CH), 135.3(CH), 130.9(C), 122.2 (CH), 109.7(C), 107.8(C), 97.8(C), 84.5(C), 83.2(CH), 82.6(CH), 81.9(C), 81.3(CH), 80.4(C), 79.8(CH), 79.7(CH), 76.6(CH), 75.7(CH), 74.9(CH), 71.6(CH), 71.4(CH), 60.9(CH₂), 50.9(CH₂), 48.7(CH), 44.4(CH₂), 37.9(CH₂), 36.6(CH₂), 34.7(CH₂), 34.2(CH₂), 33.9(CH₂), 33.1(CH₂), 30.9(CH), 30.3(CH), 30.2(CH₂), 29.9(CH₂), 28.8(CH₂), 27.9(CH₂), 26.8(CH₃), 26.3(CH₃), 23.7(CH₃), 23.3(CH₃), 22.5(CH₂), 22.3(CH₂), 17.9(CH₃), 15.5(CH₃), 12.6(CH₃).

Fig. 6-5. Carbon NMR spectrum of compound 91K-19-1.

-182-

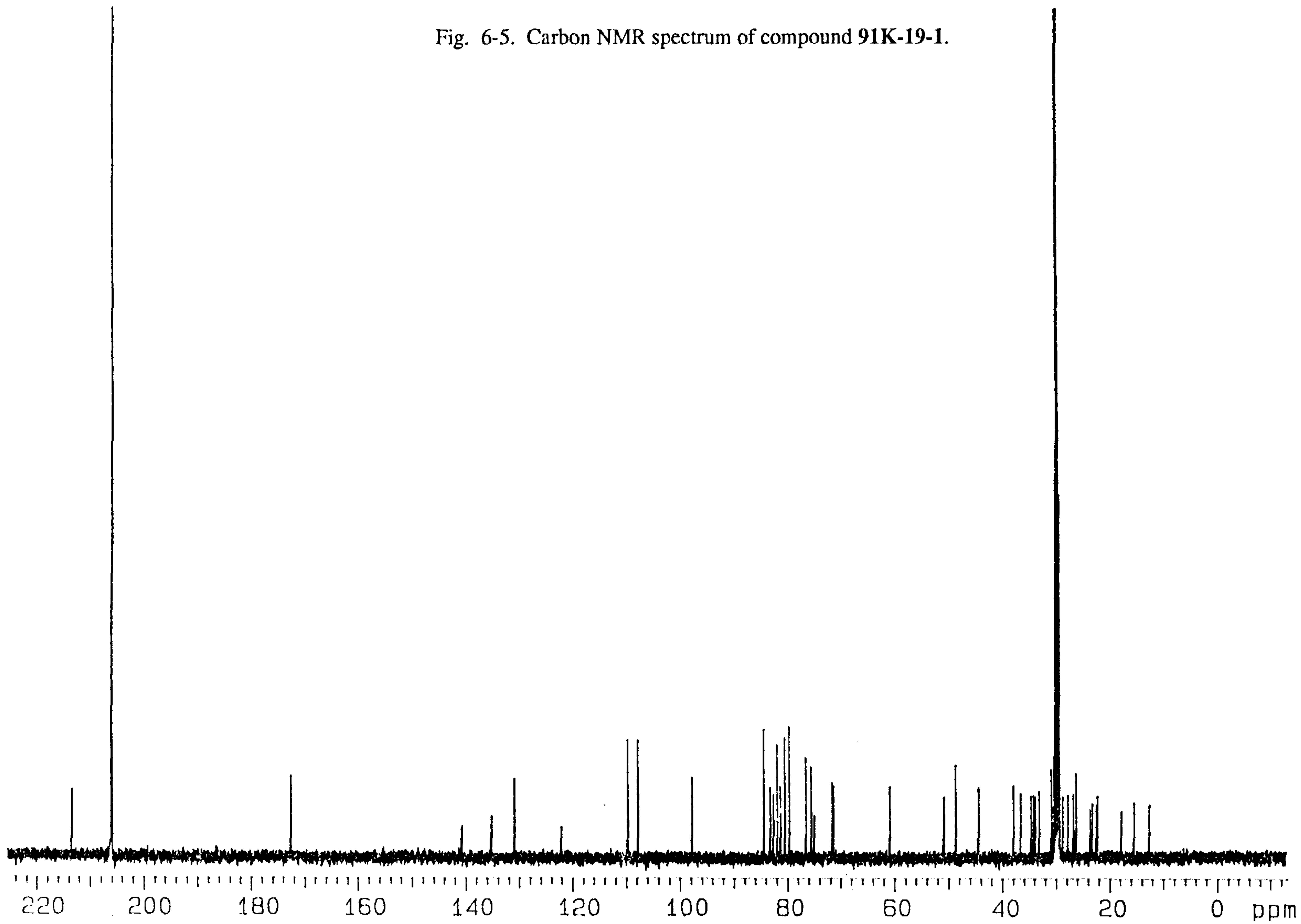


Fig 6-6 Proton NMR spectrum of compound 91K-19-1

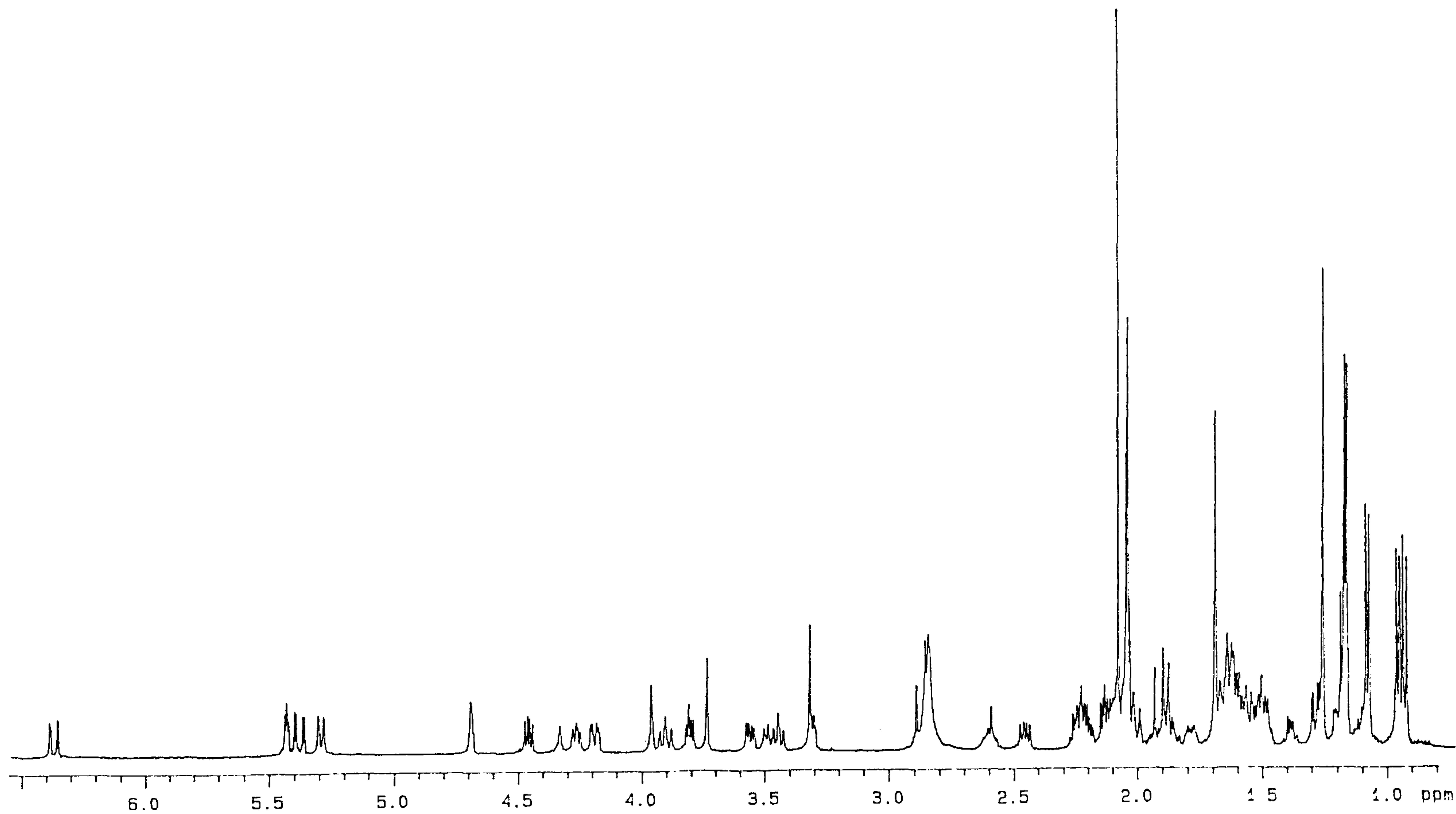
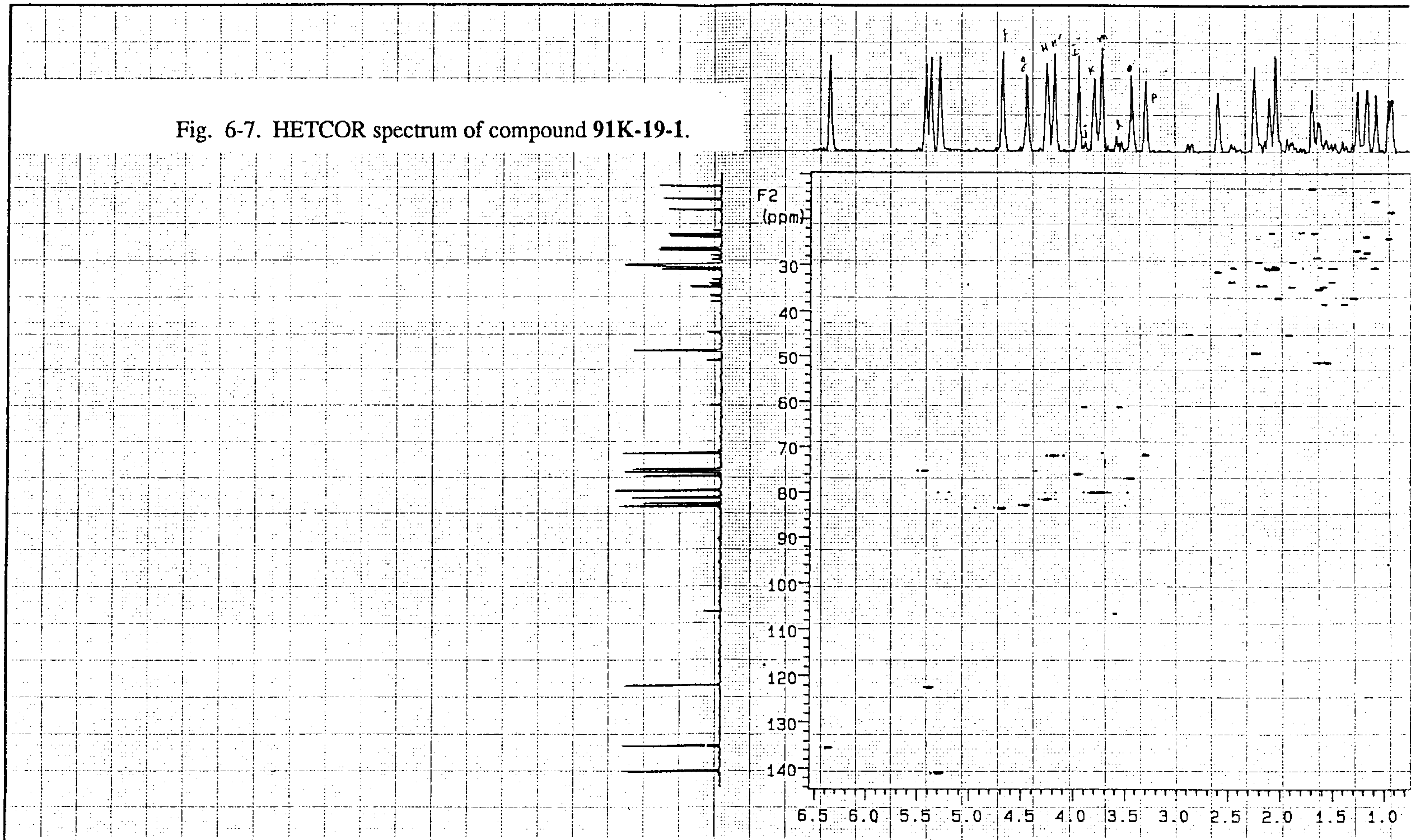


Fig. 6-7. HETCOR spectrum of compound 91K-19-1.



OBSERVE	Nucleus _____ Freq. _____ MHz	DECOUPLE	Nucleus _____ Offset _____ Hz	PLOT/PROCESSING	FN _____ K RE _____ sec CD _____ sec	EXPERIMENT	Pulse Sequence _____	Number _____
	Spec. Width _____ Hz Offset _____ Hz		Mode _____ Power _____ db		LB _____ Hz AF _____ sec CCD _____		Tube O.D. _____ mm	File _____
	Acq. Time _____ sec Delay _____ sec		Modulation: Mode _____ Freq. _____ Hz		Width _____ Hz/ppm Start _____ Hz/ppm		Temp. _____ °C	Date _____
	Pulse Width _____ μsec Transients _____		Pulse Width _____ μsec Power Mode _____		Reference _____		Solvent _____	XL _____ Var

Fig 6-8 Proton COSY spectrum of compound 91K-19-1

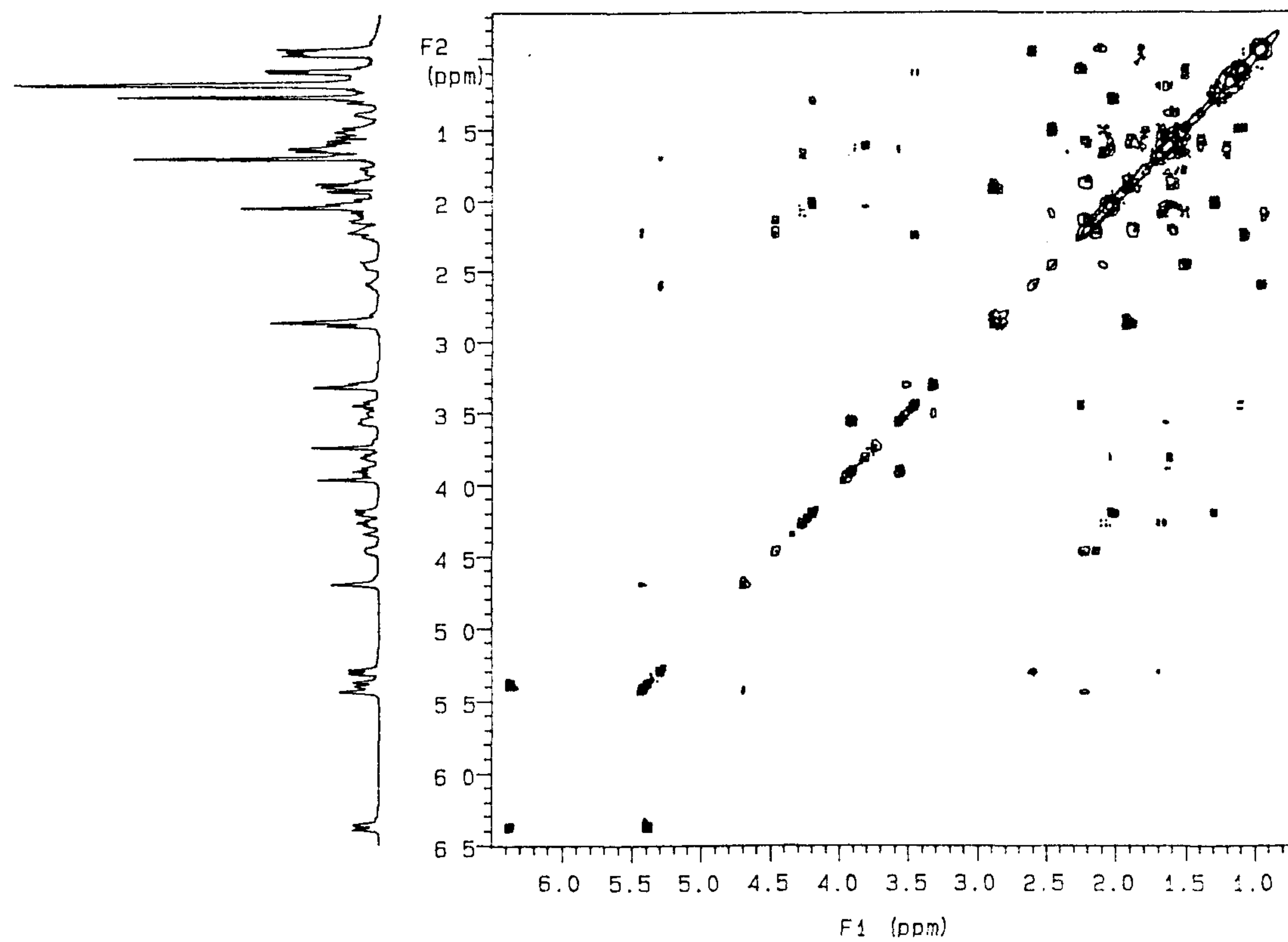
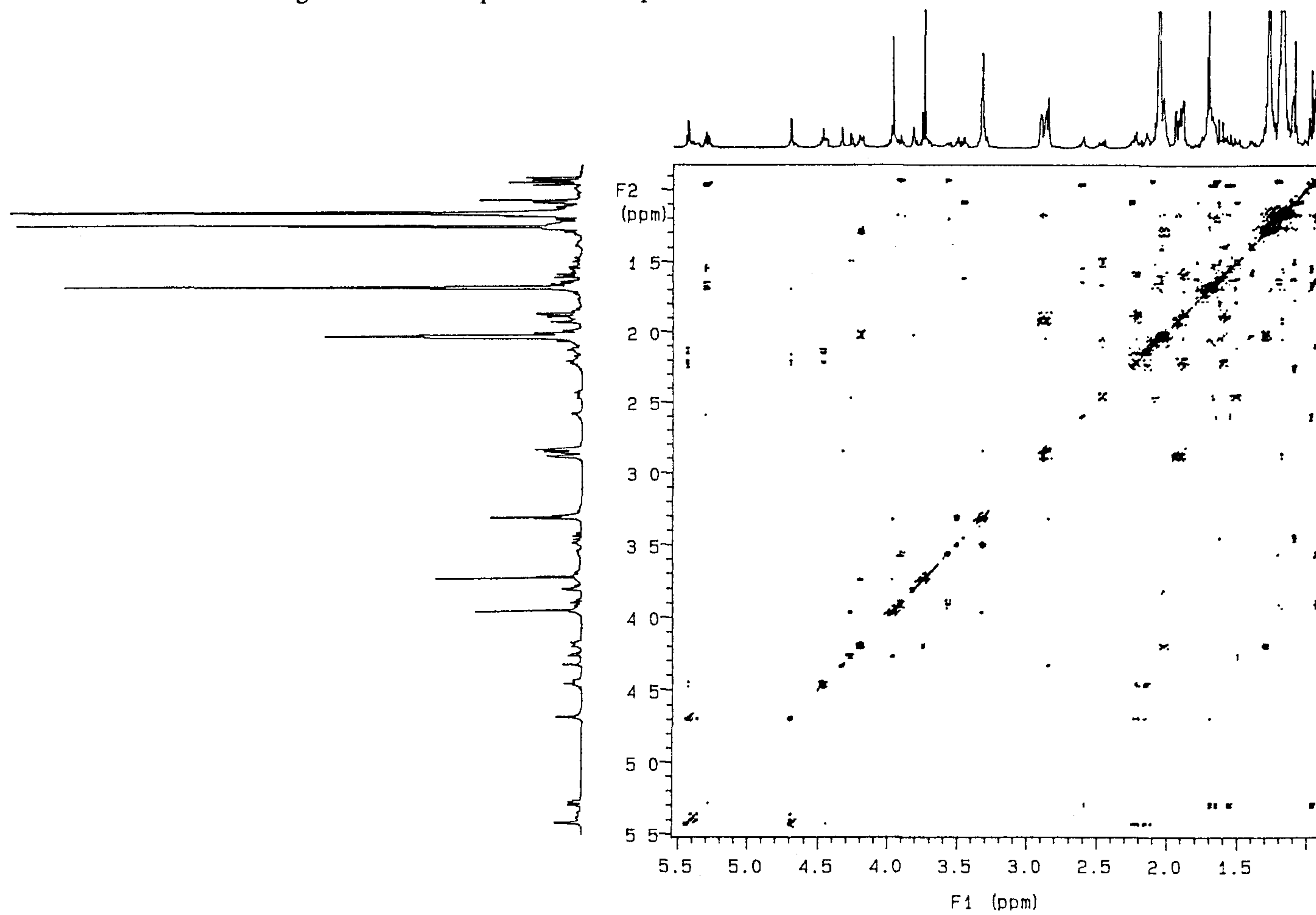


Fig 6-9 TOCSY spectrum of compound 91K-19-1



제 7 장 결 론

본 연구는 국내에서 해양 천연물에 대한 본격적인 첫 시도로서 우리 나라 근해에서 서식하는 강장동물과 해면동물등 저서군체 생물로부터 천연물을 추출하고 구조를 결정한 후 생리활성도를 측정하여 응용가능성을 타진하는 것을 연구목표로 하였다. 전년도인 제 1차 년도에는 향후의 장기적인 연구를 위한 기반을 조성하기 위하여 연구체계의 확립과 중점연구대상 생물의 선정에 대한 연구를 수행한 바 그 주요 연구내용은 외국에서의 기존 연구결과에 대한 체계적 분석, 연구기기의 설치, 저서군체 동물의 채집과 동정 및 생리활성도 측정에 의한 중점연구대상 시료의 선정등이었다.

전년도의 연구결과를 바탕으로 하여 당해년도인 제 2차 년도에는 천연물의 분리 및 구조결정을 주요 연구목표로 하였다. 현재까지 남해안에서 채집한 5종의 시료로부터 19개의 천연물을 분리하였으며 다양한 NMR 실험과 유기화학적 실험방법을 이용하여 구조를 결정 및 확인작업중이다.

세부적인 연구내용을 요약하면 다음과 같다.

1. 제주도 서귀포 근해에서 SCUBA 다이빙을 통하여 40 여종 110 kg이상의 저서군체 동물시료를 채집하였다. 이로서 전년도에 채집한 60여종, 150 kg의 시료와 함께 87종 260 kg의 시료를 확보하였다. 채집한 시료는 형태적인 특성에 따라 분류한 뒤에 국내의 전문가들에게 의뢰하여 정확한 학명과 분류학적 위치를 조사하였다. 현재까지 21종의 강장동물과 38종의 해면동물에 대한 분류를 완료하였으며 나머지 28종에 대해서는 분류작업이 진행중이다.

2. 유기조추출물에 대한 TLC, 수소 NMR등의 화학적 분석과 brine shrimp toxicity, P388 anti-leukemia, DNA-binding등의 생리활성도를 토대로 4종의 강장동물과 6종의 해면동물을 1차적인 연구대상으로 선정하였다.

3. Gorgonian *Acalycigorgia inermis*로부터 acalycixeniolide B등 2개의 xenicane계 diterpenoids를 분리하였다. 또한 gorgonian *Acabaria undulata*로부터 4개의

sphingosine계 물질을 분리, 구조를 결정하였으며, 동일한 시료로부터 2개의 polyhydroxy steroids를 분리하여 구조를 결정하였다.

4. Soft coral *Alcyonium gracillimum*으로부터 2개의 pregnanes와 5개의 steroidal ketal, hemiketal, enol ether를 분리하여 구조를 결정하였다.

5. Hydroid *Solanderia secunda*로부터 3개의 cyclopropane-containing C₂₂ fatty acid lactones를 분리하여 구조를 결정하였다.

6. Sponge *Pachastrella* sp.로부터 하나의 macrolide계 물질을 분리하여 현재 구조결정중이다.

7. 요약하여 본 2차년도에는 시료의 추가확보 및 분류와 함께 선정된 시료로부터 천연물을 분리하여 구조를 결정하는데 주력한 바 현재까지 19개의 천연물에 대한 구조를 결정하였거나 결정중에 있다. 문헌조사 결과 이들중 다수가 해양생물로부터 발견된 바 없음을 확인하였고 육상생물과 미생물의 천연물을 대상으로 식물질 여부를 조사중이다. 이와 같은 연구결과를 바탕으로 제 3차 년도에는 상기물질들에 대한 구조결정의 완료와 신물질 여부의 검색 및 정밀 생리활성도의 측정에 주력할 계획이다.

본 연구의 서론에서 언급한 바와 같이 해양 천연물 연구는 학문적, 산업적 중요성이 막대한 분야로서 선진국에서는 이미 상당기간에 걸쳐 집중적인 연구를 하여 왔으며 그 결과 많은 연구성과를 얻고 있다. 본 연구의 성공적인 수행은 향후 국내에서도 동일 혹은 유사한 연구를 다수 유발시키는 계기가 되어 천연물 연구에 크게 이바지 할 것으로 사료된다.

참고 문헌

1. 신종헌, 정지형, 서영완, 정호성, 백은주, 한국근해 저서군체 생물로부터 신물질 추출 연구(I), BSPG 00157-467-4, 1992, 256pp.
2. 신종헌, 정지형, 서영완, 백은주, 해양동물로부터 추출된 천연물에 관한 연구(문헌 중심), BSPE 00308-512-4, 1993, 417pp.
3. S. Areekul, R.F. Harwood, J. Agric. Food Chem., 1960, 8, 32.
4. F. M. Bayer, The Shallow Water Octocorallia of the West Indian Region, Nijhoff, The Hague, 1961, 373pp.
5. F. M. Bayer, Proc. Biol. Soc. Wash., 1981, 94, 902.
6. P. R. Bergquist, R. J. Wells, In P. J. Scheuer, ed. Marine Natural Products: Chemical and Biological Perspectives, Academic Press, New York, Vol. V, 1983, pl.
7. A. O. Brightman, J. Wang, R. K.-n. Miu, I. L. Sun, R. Barr, F. L. Crane, D. J. Morre, Biochem. Biophys. Acta, 1992, 1.
8. R. F. Brown, J. D. Wildman, R. M. Eppley, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1968, 51, 905.
9. R. F. Brown, J. Am. Oil Chem. Soc., 1969, 46, 119.
10. K. Chebaane, M. Guyot, Tetrahedron Lett., 1986, 27, 1495.
11. D. Eng-Wilmot, D. F. Martin, J. Pharm. Sci., 1979, 68, 963.
12. R. M. Eppley, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1974, 57, 618.
13. R. M. Eppley, W. J. Bailey, Science, 1973, 181, 758.
14. D. J. Faulkner, Nat. Prod. Rep., 1988, 5, 613.
15. D. J. Faulkner, Nat. Prod. Rep., 1991, 8, 97.
16. D. J. Faulkner, Nat. Prod. Rep., 1992, 9, 323.
17. D. G. Fautin, ed. Biomedical Importance of Marine Organisms, California Academy of Sciences, 1988, 159 pp.

18. N. Fusetani, M. Asano, S. Matsunaga, K. Hashimoto, *Tetrahedron Lett.*, 1987, 28, 5837.
19. N. Fusetani, M. Asano, S. Matsunaga, K. Hashimoto, *Tetrahedron*, 1989, 45, 1647.
20. D. J. Gerhart, *Biol. Bull.*, 1981, 164, 71.
21. H. R. Granade, P. C. Cheng, N. J. Doorenbos, *J. Pharm. Sci.*, 1976, 65, 1414
22. D. S. Grosch, *Science*, 1967, 155, 592.
23. N. K. Gulavita, P. J. Scheuer, *J. Org. Chem.*, 1989, 54, 366.
24. J. Harwig, P. M. Scott, *Applied Microbiol.*, 1971, 21, 1011.
25. M. D. Higgs, D. J. Faulkner, *Steroids*, 1977, 30, 379.
26. M. D. Higgs, L. J. Mulherin, *Tetrahedron*, 1981, 37, 4259.
27. D. W. Hood, T. W. Duke, B. Stevenson, *J. Water Pollut. Control Fed.*, 1960, 32, 984.
28. A. D. Kinghorn, K. K. Harjes, N. J. Doorenbos, *J. Pharm. Sci.*, 1967, 66, 1363.
29. E. L. Korpinen, *Acta Path. Microbiol. Scand., Sect. B*, 1974, 82, 465.
30. C. M. Ireland, D. M. Roll, T. F. Molinski, T. C. Mckee, T. M. Zabriskie, J. C. Swersey. In D. G. Fautin ed. *Biomedical Importance of Marine Organisms*, California Academy of Sciences, 1988, 41pp.
31. H.-O. Kalinowski, S. Berger, S. Braun, *Carbon-13 NMR Spectroscopy*, John Wiley & Sons. 1988, 776pp.
32. Y. Kawano, R. Higuchi, T. Komori, *Liebigs Ann. Chem.*, 1990, 43.
33. J. Kobayashi, M. Ishibashi, H. Nakamura, Y. Hirata, T. Yamasu, T. Sasaki, Y. Ohizumi, *Experientia*, 1988, 44, 800.
34. M. B. Ksebati, F. J. Schmitz, *J. Org. Chem.*, 1988, 53, 3926.
35. S. A. Look, W. Fenical, R. S. Jacobs, J. Clardy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1986, 83, 6238.

36. B. N. Meyer, N. R. Ferrigni, J. E. Putnam, L. B. Jacobsen, D. E. Nichols, J. L. McLaughlin, *Planta medica*, 1982, 45, 31.
37. A. S. Michael, C. G. Thompson, M. Abramovitz, *Science*, 1956, 123, 464.
38. D. G. Nagle, W. H. Gerwick. *Tetrahedron Lett.*, 1990, 31, 2995.
39. M. Nakagawa, A. Tsuruoka, J. Yoshida, T. Hino, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1990, 603.
40. H. Niwa, K. Wakamatsu, K. Yamada, *Tetrahedron Lett.*, 1989, 30, 4543.
41. M. Ojika, Y. Yoshida, Y. Nakayama, K. Yamada, *Tetrahedron Lett.*, 1990, 31, 4907.
42. J. A. Richter, A. Goldstein, *Psychopharmacologia*, 1970, 17, 327.
43. A. B. Robinson, K. F. Manly, M. P. Anthony, J. F. Catchpool, L. Pauling, *Science*, 1965, 149, 1255.
44. J. Shin, Ph. Dissertation, University of California, San Diego, La Jolla, 1988, 222pp.
45. J. Shin, W. Fenical, *J. Org. Chem.*, 1991, 56, 3153.
46. J. Shin, W. Fenical, T. J. Stout, J. Clardy, *Tetrahedron*, 1993, 49, 515.
47. W. A. Tarpley, *J. Econ. Entomol.*, 1958, 51, 781.
48. V. A. Stonik, T. N. Makar'eva, A. S. Dmitrenok, *Chem. Nat. Comp.*, 1990, 26, 103.
49. P. Vanhaecke, G. Persone, C. Claus, P. Sorgeloos, *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 1981, 5, 382.
50. F. W. Wehrli, T. Wirthlin, *Interpretation of Carbon-13 NMR Spectra*, Heyden, 1978, 310pp.
51. E. J. Zillioux, H. R. Fouk, J. C. Prager, J. A. Cardin, *J. Pharm. Sci.* 1967, 66, 1363.