

한국근해 저서 군체생물로부터 신물질 추출 연구

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

1994. 9.

연구 기관
한국해양연구소

과학기술처



제 출 문

과학기술처장관 귀하

본 보고서를 "한국근해 저서군체 생물로부터 신물질 추출연구"의
최종년도 보고서로 제출합니다.

1994년 9월

연구 기관: 한국해양연구소

연구 책임자: 신 종 현

연구 원: 정지형, 서영완

노정래, 정호성

홍기훈, 이동섭

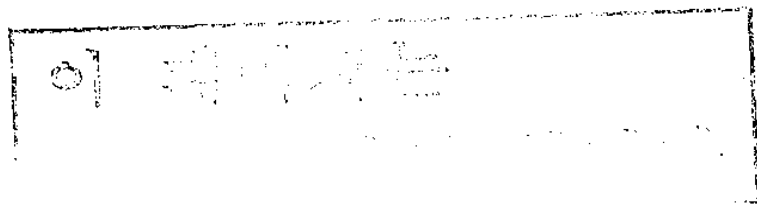
김석현, 정창수

강동진, 이홍금

백은주, 윤종배

도은미, 문두현

연구 조 원: 김보연



요 약 문

I. 계 목

한국근해 저서 군체생물로부터 신물질 추출 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

해양 천연물 화학은 그 역사는 짧으나 급속히 성장하는 분야이다. 이미 5500 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. 수 종의 선도물질은 수 년내에 시판될 것으로 예정되고 있다. 그러나 국내에서는 이 분야에 관한 본격적인 연구가 전혀 이루어지지 않았다. 해양 천연물이 보유하고 있는 막대한 학문적 산업적 중요성을 고려할 때 이 분야의 연구는 대단히 시급한 과제이다.

우리 나라 근해에 서식하는 해양생물의 대사물질에 대한 체계적인 첫 연구로서 본 과제 의 최종목표는 저서군체 동물로부터 천연물의 분리, 구조결정 및 생리활성도의 측정이다. 또한 본 연구를 수행하는 과정에서 연구추진전략, 실험방법, 분광데이터 해석기술 등을 선진국 수준에 도달시켜 향후의 더욱 포괄적이고 종합적인 해양 천연물 연구의 기초를 수립하는데 그 목적이 있다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. 저서군체 동물의 천연물에 대한 기존의 연구결과를 수집하여 체계적으로 분석하였다.
2. 다양한 지역으로부터 저서군체 동물을 채집하여 분류하였다. 문헌조사, 조추출물에 대한 생리활성도와 화학적 분석의 결과를 종합하여 중점연구대상 생물을 선정하고 집중적으로 채집하였다.
3. 유기용매를 이용하여 유기물질을 추출한 후 다양한 크로마토그래피 방법을 이용하여 천연물을 분리, 정제하였다.
4. 화학적 방법과 분광자료의 해석 특히 다양한 2-D NMR 실험의 결과를 종합하여 천연물의 구조를 결정하였다.
5. 구조가 결정된 천연물은 brine shrimp 독성, 세포독성, 항바이러스, 소염 등 생리활성도를 측정하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 관한 건의

1. 해면, 강장 및 원색 동물로부터 분리된 1800여 천연물에 관한 자료를 수집, 정리하였다. 이는 '90년 이전에 이루어진 거의 모든 연구결과를 망라한 것이다. 이들 자료를 활용하여 생물학적 기원과 생리활성도에 따른 데이터 베이스를 만들었다. 천연물의 추

출빈도, 구조적 특징, 생리활성도 등의 기준에 따라 선택된 600 여 대표물질에 관한 분리방법, 구조적 특징, 생리활성도, 전합성 및 생합성, 산업적 이용방안 등이 분석되었다. 또한 해당 생물별로 천연물 연구가 이루어진 속과 종의 분류학적 위치가 조사되었다. 이는 해당 생물에 대한 신물질의 구조적 특징과 생합성적 기원의 추론을 가능하게 하여 신물질의 구조결정에 도움이 될 것이다.

2. 남해안 일원에서 이루어진 4차례의 채집에 의하여 260 kg 이상의 저서군체 동물시료를 확보하였으며 이들중 21종의 강장동물과 43종의 해면에 대한 분류가 전문가에 의하여 수행되었다. 유기 조추출물에 대한 brine shrimp 독성, P388 항암, 항바이러스 효과 등의 생리활성도와 TLC, 수소 NMR 등의 측정결과를 종합하여 4종의 강장동물과 2종의 해면동물을 중점연구대상으로 선정하였다.

3. Gorgonian *Acalycigorgia inermis*로부터 2개의 xenicane계 diterpenoids가 분리되었다. 문헌자료 검색과 NMR 분석에 의하여 이들은 세포독성을 가진 acalycixeniolide B 및 그 유도체임이 확인되었다. Gorgonian *Acabaria undulata*로부터 4개의 새로운 ceramides가 분리되었다. 이들 새로운 sphingolipids의 구조는 분광자료의 해석과 합성에 의하여 결정되었다. 또한 동일한 시료로부터 2개의 새로운 polyhydroxy steroids가 분리되었다.

4. 5개의 신물질을 포함한 7개의 steroids가 Soft coral *Alcyonium gracillimum*으로부터 분리되었다. 이들의 구조는 furospirostan계의 ketals, furostan계의 hemiketals, enol-ether, pregnanes 등으로 결정되었다. Hemiketals는 세포독성과 항바이러스 효과를 나타내었다. 또한 hydroid *Solanderia secunda*로부터 9개의 cyclopropane기를 가진 새로운 C₂₂ fatty acid lactones이 분리되었다.

5. 강력한 세포독성을 가진 macrolide계 물질이 해면 *Pachastrella* sp.와 *Jaspis* sp.의 혼합체로부터 분리되었다. NMR 분석에 의하여 이 물질은 쌍편모조류에 기원한 강력한 항리성 패독인 pectenotoxin II로 확인되었다. 생리활성도 측정결과 이 물질은 대단히 강력한 항암 및 항바이러스 효과가 있음이 밝혀졌으며 현재 생체내(*in vivo*)에서의 활성에 대한 연구가 진행중이다. Bromotyrosine계 물질인 pasarmaplin A가 동일한 시료로부터 분리되었으며 brine shrimp 독성과 세포독성을 나타내었다. 동일한 시료로부터 unusual base인 2',3'-didehydro-2',3'- dideoxy- uridine이 함께 분리되었다.

6. 종합하여 우리 나라 근해에 서식하는 6종의 저서군체 동물로부터 구조적으로 서로 다른 7개의 그룹에 속하는 27개의 천연물을 분리하였으며 문헌자료 검색, 분광자료 해석 및 적 방법을 종합하여 그 구조를 결정하였다. 문헌자료에 의하여 이들중 다수가 신물질임이 확인되었고 상당수가 brine shrimp 독성, 세포독성, 항바이러스 등의 생리활성도를 나타내었다.

해양 천연물 화학은 학문적, 산업적 중요성이 매우 큰 분야이다. 그러나 우리 나라 근해의 해양생물에 대해서는 지금까지 화학적 연구가 체계적으로 이루어진 바가 없다. 본 연구의 결과는 이들이 생리활성 신물질의 중요한 원천이 될 가능성이 매우 높음을 입증하였다. 결론적으로 본 연구결과는 향후의 포괄적인 해양천연물 연구를 위한 중요한 기초자료로 이용될 수 있을 것이다.

SUMMARY

I . Title

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

II . Objectives and Significance

Marine natural products chemistry is among the fastest developing fields of sciences. Despite its relatively short history, structures of more than 5500 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

scientists. Considering the tremendous academic and industrial potentials of marine natural products and international competition for valuable substances, research in this field is a matter of urgency.

As the first systematic approach to natural products of Korean water marine organisms, the ultimate objectives of this research are the isolation, structure determination, and bioactivity testing of novel secondary metabolites from benthic colonial organisms. To achieve these goals, research strategy, experimental techniques, and data interpretation skills will be developed to the level of leading research groups in this field. This will serve as foundation for comprehensive long-term researches.

III. Contents and Scope

1. Previous results on natural products of benthic colonial animals were collected and systematically analyzed.

2. Benthic animals were collected from various sites of domestic waters and were taxonomically classified. Target organisms were selected by combination of literature survey, bioactivity tests and chemical analysis of organic crude extracts. Selected animals were collected in large scale.

3. Organic materials were extracted with various solvents. Secondary metabolites were isolated by utilizing various chromatographic techniques guided by bioactivity tests and chemical analysis.

4. Structures of secondary metabolites were determined by combined chemical and spectroscopic methods including modern 2-D NMR experiments.

5. Structurally determined natural products were tested for bioactivities such as brine shrimp toxicity, cytotoxicity, antiviral and antiinflammatory activities.

IV. Results and Suggestions

1. Data of over 1800 metabolites of sponges, coelenterates, and tunicates were collected and organized. These might cover, if not all, most of compounds identified prior to '90. Database was made on the basis of biological classification and bioactivity. Based upon frequency of isolation, structural uniqueness and bioactivity, over 600 representative metabolites were selected and analyzed for isolation methods, structural characteristics, bioactivities, total synthetic methods, biosyntheses, and biomedical potentials. In addition, chemically investigated genera and species were biologically classified. This would be useful in predicting the structural types and biogenetic origins of new natural products.

would be useful in predicting the structural types and biogenetic origins of new natural products.

2. More than 260 Kg of benthic colonial animals were collected from four expeditions to the South Sea. Classification of 21 coelenterates and 43 sponges has been performed by taxonomists. Based on the results of brine shrimp toxicity, P388 antileukemic, and antiviral activity tests, TLC and proton NMR measurements of the crude organic extracts, 4 species of coelenterates and 2 species of sponges were selected for chemical investigation .

3. Two diterpenoids of the xenicane class were isolated from the gorgonian *Acalycigorgia inermis*. Structures of these compounds were determined as acalycixeniolide B and its derivative by NMR analysis and literature survey. Four novel ceramides were isolated from the gorgonian *Acabaria undulata*. Structures of these new sphingolipids were determined by combination of spectral analysis and chemical synthesis. In addition, two novel polyhydroxy steroids were isolated from the same animal.

4. Seven steroids including five novel compounds were isolated from the soft coral *Alcyonium gracillimum*. Structures of these compound were determined as a steroidal ketal of the furospirostan class, two hemiketals of the related furostan class, a steroidal enol-ether, a steroidal ketone, and two pregnanes. The hemiketals exhibited both cytotoxicity and antiviral activity. In

addition, nine novel metabolites were isolated from the hydroid *Solanderia secunda*. Structures of these compounds were determined as cyclopropane-containing C₂₂ fatty acid latones.

5. A highly cytotoxic macrolide was isolated from the sponges *Pachastrella* sp. and *Jaspis* sp. The structure of this compound was determined by NMR analysis as pectenotoxin II, a potent DSP(diarrhetic shellfish poisoning) toxin of dinoflagellate origin. Bioactivity tests revealed that this compound possesses unusually potent cytotoxicity and antiviral activity. To evaluate the pharmaceutical potential of this compound, *in vivo* bioactivity is currently under investigation. Psammaphin A, a dimeric alkaloids of the bromotyrosine class was isolated from the same sponges. This compound exhibited brine shrimp toxicity and cytotoxicity. In addition, an unusual base was isolated from the same sponge mixture. The structure of this compound was determined as 2',3'-didehydro-2'3'-dideoxyuridine by spectroscopic methods.

6. In total, 27 compounds of 7 structural types were isolated from 6 benthic colonial animals of the Korean waters. Structures of these compounds were determined by combination of database analysis, spectroscopic techniques and chemical methods. Literature survey revealed that many of these metabolites have been never reported from marine organisms. Bioactivity test showed that several of these compound possess brine shrimp toxicity, cytotoxicity and

Marine natural products chemistry is among the fields of sciences with great academic and industrial potentials. However, chemistry of Korean water marine organisms has never been systematically investigated. The results of this study clearly demonstrated domestic marine organisms possessing the potential to be prolific sources of both biologically active and structurally unique compounds. In conclusion, this study will serve as a basis of further comprehensive investigation of marine natural products.

목 차

요약문	3
그림목차.....	17
표목차.....	27
제 1 장. 서론.....	29
제 2 장. 시료의 채집, 분류 및 생리활성도 측정.....	35
2.1. 시료의 채집.....	36
2.2. 분류.....	37
2.3. 생리활성도 측정.....	42
2.4. 중점연구대상 시료의 선정.....	45
2.5. 실험방법.....	46
제 3 장. <i>Gorgonians</i> 의 천연물.....	49
3.1. 연구의 배경.....	49
3.2. <i>Acalycigorgia inermis</i> 의 대사물질.....	52
3.3. <i>Acabaria undulata</i> 의 대사물질.....	72
3.4. 실험방법.....	78
제 4 장. <i>Soft corals</i> 의 천연물.....	125
4.1. 연구의 배경.....	125
4.2. <i>Alcyonium gracillimum</i> 의 대사물질	126

4.3. 실험방법.....	148
제 5 장. Hydroids의 천연물	209
5.1. 연구의 배경.....	209
5.2. <i>Solanderia secunda</i> 의 대사물질.....	212
5.3. 실험방법.....	228
제 6 장. Sponges의 천연물	283
6.1. 연구의 배경.....	283
6.2. 해면동물의 항바이러스 및 항암성분.....	285
6.3. <i>Pachastrella sp.</i> 와 <i>Jaspis sp.</i> 의 천연물.....	298
6.4. 생리활성검색.....	307
6.5. 실험방법.....	312
제 7 장. 결론	329
참고문헌	333

Contents

Summary	7
List of Figures	17
List of Tables	27
Chapter 1. Introduction	29
Chapter 2. Collection, classification and bioactivity test	35
2.1. Collection of samples.....	36
2.2. Classification.....	37
2.3. Bioactivity test.....	42
2.4. Selection of prime target organisms.....	45
2.5. General experimental.....	46
Chapter 3. Natural products of gorgonians	49
3.1. Background.....	49
3.2. Metabolites of <i>Acalycigorgia inermis</i>	52
3.3. Metabolites of <i>Acabaria undulata</i>	72
3.4. Experimental.....	78
Chapter 4. Natural products of soft corals	125
4.1. Background.....	125
4.2. Metabolites of <i>Alcyonium gracillimum</i>	126

4.3. Experimental.....	148
Chapter 5. Natural products of hydroids.....	209
5.1. Background.....	209
5.2. Metabolites of <i>Solanderia secunda</i>	212
5.3. Experimental.....	228
Chapter 6. Natural products of sponges.....	283
6.1. Background.....	285
6.2. Antiviral and cytotoxic substances from sponges.....	285
6.3. Natural products of the sponges <i>Pachastrella</i> sp. and <i>Jaspis</i> sp.....	298
6.4. Bioactivity tests.....	307
6.5. Experimental.....	312
Chapter 7. Conclusion.....	329
References.....	333

List of Figures

Fig. 3-1. Potential drugs isolated from gorgonians.....	51
Fig. 3-2. Sphingosines isolated from the gorgonian <i>Acabaria undulata</i>	54
Fig. 3-3. Partial structures and proton NMR assignments for compounds 91K-2-1 ~ 4	56
Fig. 3-4. Nomenclature for cleavage of precursor ions of sphingolipids.....	59
Fig. 3-5. Biosynthesis of sphingolipids.....	64
Fig. 3-6. Sphingosines and related metabolites from marine organisms.....	66
Fig. 3-7. Polyhydroxy steroids isolated from the gorgonian <i>Acabaria undulata</i>	68
Fig. 3-8. Structures of diterpenoids isolated from the gorgonian <i>Acalycigorgia inermis</i>	74
Fig. 3-9. Proton NMR spectrum of compound 91K-2-1	89
Fig. 3-10. Carbon NMR spectrum of compound 91K-2-1	90
Fig. 3-11. Proton COSY spectrum of compound 91K-2-1	91
Fig. 3-12. IR spectrum of compound 91K-2-1	92
Fig. 3-13. Low-resolution EIMS spectrum of compound 91K-2-1	93
Fig. 3-14. Proton NMR spectrum of compound 91K-2-5	94
Fig. 3-15. Proton NMR spectrum of compound 91K-2-2	95

Fig. 3-16. Carbon NMR spectrum of compound 91K-2-2	96
Fig. 3-17. IR spectrum of compound 91K-2-2	97
Fig. 3-18. Proton NMR spectrum of compound 91K-2-3	98
Fig. 3-19. Carbon NMR spectrum of compound 91K-2-3	99
Fig. 3-20. IR spectrum of compound 91K-2-3	100
Fig. 3-21. Proton NMR spectrum of compound 91K-2-4	101
Fig. 3-22. Carbon NMR spectrum of compound 91K-2-4	102
Fig. 3-23. IR spectrum of compound 91K-2-4	103
Fig. 3-24. Proton NMR spectrum of mixture of polyhydroxy steroids isolated from the gorgonian <i>Acabaria undulata</i>	104
Fig. 3-25. Carbon NMR spectrum of mixture of polyhydroxy steroids isolated from the gorgonian <i>Acabaria undulata</i>	105
Fig. 3-26. Proton NMR spectrum of compound 91K-2-6	106
Fig. 3-27. Carbon NMR spectrum of compound 91K-2-6	107
Fig. 3-28. Proton coupled carbon NMR spectrum of polyhydroxy steroids....	108
Fig. 3-29. Proton COSY NMR spectrum of compound 91K-2-6	109
Fig. 3-30. TOCSY spectrum of compound 91K-2-6	111
Fig. 3-31. HMQC spectrum of compound 91K-2-6	112
Fig. 3-32. HMBC spectrum of compound 91K-2-6	113
Fig. 3-33. Proton NMR spectrum of compound 91K-2-7	115

Fig. 3-34. Carbon NMR spectrum of compound 91K-2-7	116
Fig. 3-35. Proton COSY NMR spectrum of compound 91K-2-7	117
Fig. 3-36. Proton NMR spectrum of compound 91K-4-1	119
Fig. 3-37. Carbon NMR spectrum of compound 91K-4-1	120
Fig. 3-38. Proton COSY NMR spectrum of compound 91K-4-1	121
Fig. 3-39. Proton NMR spectrum of compound 91K-4-2	122
Fig. 3-40. Carbon NMR spectrum of compound 91K-4-2	123
Fig. 4-1. Metabolites isolated from the soft coral <i>Alcyonium gracillimum</i>	127
Fig. 4-2. Furanospirostan steroids isolated from the soft coral <i>Isis hippuris</i>	131
Fig. 4-3. Reduction of the furospirostan and spirostan steroids for determination of stereochemistry of the C-22 asymmetric center.....	132
Fig. 4-4. Furospirostan steroids isolated from terrestrial plants.....	135
Fig. 4-5. Pregnane steroids isolated from marine organisms.....	145
Fig. 4-6. Proton NMR spectrum of compound 91-18-1	157
Fig. 4-7. Carbon NMR spectrum of compound 91-18-1	158
Fig. 4-8. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-18-1	159
Fig. 4-9. HMQC spectrum of compound 91-18-1	160
Fig. 4-10. HMBC spectrum of compound 91-18-1	161
Fig. 4-11. IR spectrum of compound 91-18-1	164

Fig. 4-12. UV spectrum of compound 91-18-1	165
Fig. 4-13. High-resolution CIMS spectrum of compound 91-18-1	166
Fig. 4-14. Proton NMR spectrum of compound 91-18-2	167
Fig. 4-15. Carbon NMR spectrum of compound 91-18-2	168
Fig. 4-16. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-18-2	169
Fig. 4-17. IR spectrum of compound 91-18-2	170
Fig. 4-18. UV spectrum of compound 91-18-2	171
Fig. 4-19. High-resolution CIMS spectrum of compound 91-18-2	172
Fig. 4-20. Proton NMR spectrum of compound 91-18-3	173
Fig. 4-21. Carbon NMR spectrum of compound 91-18-3	174
Fig. 4-22. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-18-3	175
Fig. 4-23. IR spectrum of compound 91-18-3	176
Fig. 4-24. UV spectrum of compound 91-18-3	177
Fig. 4-25. High-resolution CIMS spectrum of compound 91-18-3	178
Fig. 4-26. Proton NMR spectrum of compound 91-18-4	179
Fig. 4-27. Carbon NMR spectrum of compound 91-18-4	180
Fig. 4-28. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-18-4	181
Fig. 4-29. HMQC spectrum of compound 91-18-4	182
Fig. 4-30. HMBC spectrum of compound 91-18-4	183
Fig. 4-31. IR spectrum of compound 91-18-4	184

Fig. 4-32. UV spectrum of compound 91-18-4	185
Fig. 4-33. High-resolution EIMS spectrum of compound 91-18-4	186
Fig. 4-34. Proton NMR spectrum of compound 91-18-5	187
Fig. 4-35. Carbon NMR spectrum of compound 91-18-5	188
Fig. 4-36. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-18-5	189
Fig. 4-37. IR spectrum of compound 91-18-5	190
Fig. 4-38. UV spectrum of compound 91-18-5	191
Fig. 4-39. High-resolution EIMS spectrum of compound 91-18-5	192
Fig. 4-40. Proton NMR spectrum of compound 91-18-6	193
Fig. 4-41. Carbon NMR spectrum of compound 91-18-6	194
Fig. 4-42. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-18-6	195
Fig. 4-43. HMQC spectrum of compound 91-18-6	196
Fig. 4-44. HMBC spectrum of compound 91-18-6	197
Fig. 4-45. IR spectrum of compound 91-18-6	200
Fig. 4-46. UV spectrum of compound 91-18-6	201
Fig. 4-47. High-resolution EIMS spectrum of compound 91-18-6	202
Fig. 4-48. Proton NMR spectrum of compound 91-18-7	203
Fig. 4-49. Carbon NMR spectrum of compound 91-18-7	204
Fig. 4-50. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-18-7	205
Fig. 4-51. HMQC spectrum of compound 91-18-7	206

Fig. 4-52. IR spectrum of compound 91-18-7	207
Fig. 4-53. Low-resolution EIMS spectrum of compound 91-18-7	208
Fig. 5-1. Metabolites of hydroids.....	210
Fig. 5-2. Cyclopropane-containing C22 fatty acid lactones isolated from the hydroid <i>Solanderia secunda</i>	213
Fig. 5-3. Cyclopropane-containing fatty acid lactones from marine organisms..	227
Fig. 5-4. Proton NMR spectrum of compound 91-10-1	238
Fig. 5-5. Carbon NMR spectrum of compound 91-10-1	239
Fig. 5-6. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-10-1	240
Fig. 5-7. TOCSY spectrum of compound 91-10-1	241
Fig. 5-8. HMQC spectrum of compound 91-10-1	242
Fig. 5-9. HMBC spectrum of compound 91-10-1	243
Fig. 5-10. Proton NMR spectrum of compound 91-10-2	244
Fig. 5-11. Carbon NMR spectrum of compound 91-10-2	245
Fig. 5-12. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-10-2	246
Fig. 5-13. TOCSY spectrum of compound 91-10-2	247
Fig. 5-14. HMQC spectrum of compound 91-10-2	248
Fig. 5-15. HMBC spectrum of compound 91-10-2	249
Fig. 5-16. Proton NMR spectrum of compound 91-10-3	250
Fig. 5-17. Carbon NMR spectrum of compound 91-10-3	251

Fig. 5-18. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-10-3	252
Fig. 5-19. Proton NMR spectrum of compound 91-10-4	253
Fig. 5-20. Carbon NMR spectrum of compound 91-10-4	254
Fig. 5-21. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-10-4	255
Fig. 5-22. Proton NMR spectrum of compound 91-10-5	256
Fig. 5-23. Carbon NMR spectrum of compound 91-10-5	257
Fig. 5-24. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-10-5	258
Fig. 5-25. HMQC spectrum of compound 91-10-5	259
Fig. 5-26. Proton NMR spectrum of compound 91-10-6	260
Fig. 5-27. Carbon NMR spectrum of compound 91-10-6	261
Fig. 5-28. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-10-6	262
Fig. 5-29. HMQC spectrum of compound 91-10-6	263
Fig. 5-30. Proton NMR spectrum of compound 91-10-7	264
Fig. 5-31. Carbon NMR spectrum of compound 91-10-7	265
Fig. 5-32. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-10-7	266
Fig. 5-33. Proton NMR spectrum of compound 91-10-8	267
Fig. 5-34. Carbon NMR spectrum of compound 91-10-8	268
Fig. 5-35. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-10-8	269
Fig. 5-36. HMQC spectrum of compound 91-10-8	270
Fig. 5-37. Proton NMR spectrum of compound 91-10-9	271

Fig. 5-38. Carbon NMR spectrum of compound 91-10-9	272
Fig. 5-39. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-10-9	273
Fig. 5-40. HMQC spectrum of compound 91-10-9	274
Fig. 5-41. Proton NMR spectrum of compound 91-10-10	275
Fig. 5-42. Carbon NMR spectrum of compound 91-10-10	276
Fig. 5-43. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-10-10	277
Fig. 5-44. Proton NMR spectrum of compound 91-10-11	278
Fig. 5-45. Carbon NMR spectrum of compound 91-10-11	279
Fig. 5-46. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-10-11	280
Fig. 5-47. HMQC spectrum of compound 91-10-11	281
Fig. 6-1. Natural and synthetic bases with antiviral activity.....	286
Fig. 6-2. Cytotoxic and antiviral compounds isolated from sponges.....	293
Fig. 6-3. Natural products isolated from sponges of the genera <i>Jaspis</i> and <i>Pachastrella</i>	300
Fig. 6-4. Structures of natural products isolated from the sponge sample 91K-19.....	302
Fig. 6-5. Partial structures of compound 91K-19-2	308
Fig. 6-6. Proton NMR spectrum of compound 91K-19-1	315
Fig. 6-7. Carbon NMR spectrum of compound 91K-19-1	316
Fig. 6-8. FABMS spectrum of compound 91K-19-1	317

Fig. 6-9. Proton COSY and TOCSY spectra of compound 91K-19-1	318
Fig. 6-10. HETCOR spectrum of compound 91K-19-1	319
Fig. 6-11. Long-range HETCOR spectrum of compound 91K-19-1	320
Fig. 6-12. Homonuclear J-resolved 2D spectrum of compound 91K-19-1	321
Fig. 6-13. Proton and carbon NMR spectrum of compound 91K-19-2	322
Fig. 6-14. TOCSY spectrum of compound 91K-19-2	323
Fig. 6-15. HETCOR and long-range HETCOR spectra of compound 91K-19-2	324
Fig. 6-16. EIMS spectrum of compound 91K-19-2	325
Fig. 6-17. Proton and carbon NMR spectra of compound 91K-19-3	326
Fig. 6-18. Proton COSY and HETCOR spectra of compound 91K-19-3	327

이 장에서는

List of Tables

Table 2-1. List of coelenterates collected from Korean Waters.....	40
Table 2-2. List of sponges collected from Korean Waters.....	40
Table 3-1. Proton NMR assignments for compounds 91K-2-1 ~ -4	63
Table 3-2. Proton and carbon NMR assignments for compounds 91K-4-1 and -2	76
Table 4-1. Proton and carbon NMR assignments for compound 91-18-1	133
Table 4-2. Proton NMR data for strictagenin, rubragenin, wallogenin, and 91-18-1	136
Table 4-3. Carbon NMR assignments for strictagenin, rubragenin, wallogenin, and 91-18-1	137
Table 4-4. Carbon NMR assignments for compounds 91-18-1 ~ -3	140
Table 4-5. Proton and carbon NMR assignments for compound 91-18-4	142
Table 4-6. Carbon NMR assignments for compounds 91-18-1 and -5	143
Table 4-7. Proton and carbon NMR assignments for compounds 91-18-6 and -7	146
Table 4-8. Results of HMBC experiments with compounds 91-18-1,-4 and -6 ..	147
Table 4-9. Antiviral activity of compounds 91-18-1 ~ -3	149
Table 4-10. Antiviral activity of compounds 91-18-1 ~ -3	149

Table 4-11. P388 activity of compounds 91-18-1 ~ -3	149
Table 5-1. Proton and carbon NMR assignments for compounds 91-10-1 and -2	217
Table 5-2. Proton and carbon NMR assignments for compounds 91-10-3 and -4	219
Table 5-3. Proton and carbon NMR assignments for compounds 91-10-5 and -6	221
Table 5-4. Proton and carbon NMR assignments for compounds 91-10-7 and -8	222
Table 5-5. Proton and carbon NMR assignments for compound 91-10-9	224
Table 5-6. Proton and carbon NMR assignments for compounds 91-10-10 and -11	225
Table 6-1. Brine shrimp lethality of the crude extracts of various sponges collected from the South Sea of Korea.....	299
Table 6-2. Proton and carbon NMR assignments for pectenotoxin II	305
Table 6-3. Cytotoxicity of pectenotoxin II against human cancer cell-lines...	309
Table 6-4. Cytotoxicity of psammaplin A against human cancer cell-lines.....	311
Table 6-5. Antiviral activity of psammaplin A.....	311

제 1 장 서 론

해양 천연물 즉 해양 생물의 대사물질에 관한 연구는 그 역사가 비교적 짧으나 급속도로 성장하는 분야이다. 이 분야는 60년대에 본격적으로 시작되었으나 이미 5500 이상의 신물질이 추출되었으며 발표된 논문도 2500을 상회하는 등 실로 폭발적으로 성장하고 있다(Faulkner, 1993).

해양 천연물 연구의 학문적, 산업적 중요성은 실로 막대하며 이는 유사분야인 육상 천연물 연구의 발전상에서 여실히 증명되고 있다. 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 의약학으로 구분된다. 유기화학적 측면에서 특이한 구조를 가진 천연물의 규명은 합성 및 생합성에 필수적인 정보 즉, 합성과 생체내 반응기작 연구를 위한 목표를 제공한다. 복잡하고 독특한 구조를 가진 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)등과 불가분의 관계를 맺고 있다. 먼저 화학 생태학은 생물이 생성 혹은 획득하여 보유하고 있는 2차 대사물질을 probe로 이용하여 생태학적 제 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 의약학으로서 많은 천연물이 강력한 생리활성도를 보유하고 있으므로 이러한 생리활성물질의 추출 및 구조결정은 생체 내 효소 및 신경계의 연구, 항암, 항바이러스 연구등 무수한 분야의 연구에 필수적일 뿐만 아니라 생리학, 병리학, 면역학등 생체내에서 일어나는 제 현상의 규명에 관여하는 분야들에게도 크게 기여한다. 이는 많은 천연물질 특히 독성물질들이 생체 내의 필수적인 효소나 신경세포에 매우 선택적으로 결합하거나, 이온들의 통로를 봉쇄하기 때문이다(Fautin, 1988).

산업적인 측면에서 천연물의 주된 이용이 신 의약품과 농약 및 동물약품등의 개발임은 주지의 사실이다. 그런데 다년 간의 연구개발로 인하여 육상 천연물 연구는 점차로 정체하는 경향을 보임에 따라 미국, 일본등의 선진국에서는 관심을 해양생물로 상당부분 이전하여 집중적인 노력을 기울인 결과 짧은 기간에도 불구하고 5500 이상의 신물질을 추출하였으며 그 중 상당수가 강력한 생리활성 효과를 보유하고 있음이 밝혀져 50여 물질은 물질특허를 획득하여 신 의약품으로서의 개발중에 있다. 특히 최근에는 일본과 구미 각국의 많은 정부기관과 민간 제약회사들이 학연과 공동 혹은 단독으로 해양생물로부터 천연 생리활성물질을 개발하는데 직접 참여하고 있으며 가까운 시일에 해양 천연물이나 합성 유도체가 시판될 예정이다.

그러나 국내에서는 다양한 생물이 근해에 서식함에도 불구하고 해양 천연물에 대한 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 것을 연구목표로 하였다.

이들 생물을 연구대상으로 선정한 이유는 다음과 같다. 육상과는 달리 해양 천

연물에서는 동물이 차지하는 비중이 매우 높아서 알려진 천연물의 약 60%가 해양 동물로부터 분리되었으며 동물 천연물의 거의 대부분이 저서균체동물로부터 추출되었다. 연체동물이나 어류등 균체를 이루지 않는 동물로부터 얻어진 천연물도 실제로는 균체동물이 생성한 물질이 먹이사슬을 통하여 이들 포식자의 체내에 축적된 경우가 대부분이다.

저서균체동물중 해면과 강장동물은 천연물 연구가 가장 활발한 생물문이어서 현재까지 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 있으며 미래에도 상당기간 해양천연물 연구의 주요 대상의 위치를 지속할 것으로 예상되기 때문이다(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 않은 데서 대부분 기인한 것으로 해석된다. 따라서 본 연구에서는 확고한 연구기반의 조성이 본격적인 연구에 선행되어야 한다는 것을 인식하고 먼저 1차년도에는 연구체계의 확립에 주력하였다. 제 1차년도에 수행한 주요 내용으로는 외국에서 '90년까

지 저서군체 생물에 대하여 이루어진 거의 모든 연구결과를 정리하여 종합적인 분석을 하였고, 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 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 분리하였으며 NMR 데이터의 해석과 문헌자료 검색에 의하여 이들중 다수가 신물질임을 확인하였고 개략적인 구조를 제시하였다. 이들의 구조는 terpenoids, sphingosines, steroidal ketals, hemiketals, polyhydroxy steroids, modified fatty acids, macrolides peptides, modified bases 등으로 매우 다양하였다.

최종년도인 본 3차년도에는 다양한 2-D NMR실험과 IR, UV, MS등 분광자료의 종합과 유기 반응을 통하여 전년도에 분리된 천연물에 대한 완벽한 구조결정에 주력하였다. 아울러 이들에 대한 생리활성도 측정에 의하여 천연물의 상당수가 항암, 항바이러스등의 생리활성 효과를 갖고 있음을 규명하였다. 특히 강력한 하리성 패독인 pectenotoxin II는 대단히 강력한 항암효과를 갖고 있음을 밝혀 현재 의약품으로의 개발 가능성을 타진하기 위하여 정밀 생리활성도를 측정중이다. 이외에도 본 3차년도중에 10여종의 천연물을 분리하였으나 구조결정이 완결되지 않았으므로 본 보고서에는 생략하였다. 이들의 구조와 생리활성도는 향후 진행될 연구과제에서 집중적으로 연구될 예정이다.

본 연구에 의하여 우리나라 근해의 저서군체동물로부터 다수의 천연물 특히 새로운 구조를 가진 물질들이 발견되었고 이들중 상당수가 생리활성 효과를 나타낸

것은 국내에서의 해양천연물의 연구가능성을 입증한 것이며 향후의 지속적인 연구 노력에 의하여 국내에서도 외국의 수준과 동등내지는 더욱 우수한 연구결과가 양산 될 수 있을 것으로 생각된다.

○ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100

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 저서균체동물의 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 저서균체 동물의 시료가 확보되었다.

다양한 종류의 시료를 충분히 확보한 다음, 실제적인 천연물의 분리과정에 들어 가기 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 유기 추출물에 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 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 측정 결과를 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 아래와 같다.

또한 본 연구에서 이용된 분석 및 분광기와 천연물 추출 및 분리방법등 3 - 6장에서 공통적으로 해당되는 실험방법도 본 장에서 함께 다루었다.

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. 이들 중 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 SCUBA 다이빙을 하여 손으로 채집하는 방법을 이용하였으며 때로는 연안에서 상당히 떨어

진 해상에서의 boat다이빙도 겸하였다. 채집한 시료는 현장에서 형태적인 특성에 따라 분류를 한 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 군체 표본을 만들었다. 그러나 해면의 경우는 군체의 크기가 일정하지 않고 다량의 부착 생물(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 해당분야의 저명 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 알려졌으며 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 연구전에서 채집한 시료로부터도 유사한 물질이 발견될 가능성이 높은 것으로 생각되었다(신 등, 1993).

해면의 경우는 64종의 시료중 43종(7종은 중복)의 시료에 대해서만 분류가 완

료되었고 나머지 시료에 대해서는 현재 계속 연구중이다. 분류학자들의 의견으로서는 이들중 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*, *Phakellia* *Reniera*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 erecta</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

(=92J-24)	Seoguipo	92/11	
91K-25	Geomundo	91/11	<i>Ircinia sp.</i>
91K-26	Geomundo	91/11	<i>Stelleeta 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>Pachastrella sp.</i>
92J-7	Seoguipo	92/11	<i>Hymeniacion 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 다양하여 실제로 운용되는 종류만도 100여 가지 이상이고 매 년 여러 종류의 새로운 생리활성 측정방법이 보고되는 실정이다. 본 연구진에서는 현재의 인력 및 기기상황 등을 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 기술도입중이다.

본 연구에서 채집된 저서군체 동물 시료의 조추출물에 대한 상기의 생리활성도와 P388, DNA-binding, antiviral등 외부 연구진에 의하여 측정된 생리활성도 연구 결과는 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 약리효과를 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), 수면진정제의 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 활성 성분을 추적하는데 1차 검색법으로 상용되기 시작하여 실용성이 인정되었으며 항암 효과를 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 투여했을 때 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).

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 있는 것으로 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 있는 것으로 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. 이 방법은 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 세포증식

을 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 2종의 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 μ g/ml)와 brine shrimp에 대한 독성(LC₅₀ 127ppm)이 우수하였다. Gorgonian *Acabaria undulata*(시료번호 91K-2) 또한 우수한 생리활성도(P388 25.7 μ g/ml, brine shrimp LC₅₀ 296 ppm)를 나타내었다. 제주도 해역에 널리 분포하는 soft coral *Alcyonium gracillimum* 역시 P388 세포독성도(EC₅₀ 22.4 μ g/ml)가 우수하고 문헌조사 결과 수 종의 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. 해면의 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 Lc_{50} 12와 61 ppm).

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

2. 5. 실험방법

2. 5. 1. 기기 및 시약

NMR측정은 Varian Unity-500을 이용하였다. Proton NMR은 500MHz에서 carbon NMR은 125MHz에서 측정하였다. Chemical shifts는 internal standards인 TMS(tetramethyl silane)나 $CDCl_3$, $MeOH-d_4$, $benzene-d_6$, $acetone-d_6$ 등을 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 pump와 ternary gradient pump를 모체로하여 본 실험실에서 조립한 제품을 사용하였다. 중요부품은 injector(Rheodyne 7825)와 detector(Shodex RI, Spectra-physics UV) 및 Linear 2-pen recorder로 구성되었다. 물질분리에 사용한 HPLC column은 YMC silica semiprep column(1 x 25cm), YMC C_{18} reversed phase semiprep column(1 x 25 cm), Altech econosil semiprep column(1 x 25cm)

와 각각의 guard column cartridge(Aldrich)이었다. FT-IR과 UV 분광자료는 Mattson Galaxy와 Milton-Roy 분광기를 이용하여 얻어졌다. Low-resolution EI mass 데이터는 서울대학교와 대림화학 분석실에서 그리고 High-resolution EI, CI 및 FAB mass 데이터는 University of California Riverside 분석실에서 얻어졌다. 편광도(optical rotation)은 JASCO digital polarimeter를 이용하여 얻어졌다. 천연물의 용점(melting point)은 Fisher-Johns사의 기기를 이용하여 측정되었다. 유기물질의 추출 및 분리에 이용한 모든 용매와 시약은 GR등급을 사용하거나 EP급을 재증류하여 사용하였다.

2. 5. 2. 천연물의 추출 및 분리

SCUBA 다이빙으로 채집된 시료는 현장에서 dry ice로 냉동시킨 뒤 화학분석을 하기 직전까지 냉동보관(-25℃)하였다. 꺼낸 시료는 실온에서 수시간 방치하여 얼음과 대부분의 수분을 제거한 뒤 유기용매로 추출하였다. 추출방법은 천연물의 특성에 따라 강장동물은 dichloromethane으로 2회, methanol로 2회 그리고 해면동물은 그 역순으로 추출하였다. 추출하기 위하여 유기용매에 시료를 담가놓는 시간은 각각 2 - 3일 정도이었다. Rotavapor와 vacuum pump를 이용하여 유기용매를 제거한 조추출물은 함께 추출된 salt를 제거하기 위하여 물과 n-butanol로 분획하였다. Butanol층은 용매를 제거한 뒤 TLC측정 결과에 의하여 silica나 C₁₈ reversed-phase vacuum flash chromatography를 하였다. Flash chromatography에 사용된 용매는 silica의 경우는 n-hexane과 EtOAc의 혼합액을, 그리고 reversed-phase의 경우는 water와 MeOH의 혼합액을 주로 이용하였다. 조추출물의 양이 많고 TLC상에 여러개의 spots이 나타난 경우에는 flash chromatography를 하기전에 n-hexane과 10% aqueous MeOH를 이용하여 분획하였다. Flash chromatography에 의하여 극성에 따라 분리된 각각의 fractions은 ¹H NMR

spectrum과 brine shrimp toxicity test 결과를 종합하여 생리활성 천연물의 존재 여부를 확인하였다. 천연물의 존재가 확인된 fraction은 극성에 따라 silica나 C₁₈ reversed-phase HPLC를 이용하여 함유된 천연물을 순수하게 분리, 정제하였다.

HPLC에 이용된 solvent system은 silica의 경우에는 n-hexane과 EtOAc의 혼합액, reversed-phase의 경우에는 MeOH나 CH₃CN과 water의 혼합액을 주로 이용하였다.

제 3 장. Gorgonians의 대사물질

3. 1. 연구의 배경

강장동물은 해양 천연물 연구에 있어서 해면동물과 함께 가장 중요한 생물로 불리운다. 현재까지 구조가 결정된 해양 천연물중 약 25%가 이들로부터 추출되었는데 이는 동식물을 망라한 전체 해양 천연물중 해면동물(약 30%)에 버금가는 추출빈도이다. 그러나 현재까지의 연구결과는 강장동물에 있어서의 2차 대사물질의 분포나 종류가 지극히 편중되어 있음을 보여 준다. 먼저 천연물의 분포에 대해서 살펴 보면 강장동물문에 속하는 3개의 아문(subphyla)중 Hydrozoa(hydroids)와 Scyphozoa(jelly fishes)에서는 2차 대사물질이 대단히 드물게 발견되고 Anthozoa아문의 Alcyonaria강(class)에 속하는 동물에서만 집중적으로 발견되고 있다.

Alcyonaria강은 Octacorallia강이라고도 하며 모두 6개의 목(order)으로 구성되어 있다. 이중에서 Alcyonacea(soft corals)와 Stolonifera목은 인도 대서양에서 많이 발견되며 Gorgonacea(gorgonians, sea whips and sea fans)와 Pennatulacea목은 카리브해에서 많이 발견된다. 천연물은 Alcyonaria강 에서도 Alcyonacea와 Gorgonacea등 두개의 목에 속하는 동물로부터 집중적으로 추출되었고(90% 이상) Zoanthida (zoanthid)목에서 일부의 천연물이 발견되었을 뿐, 이들을 제외한 나머지 목, 특히 sea anamones나 hard corals등으로부터는 단지 몇 개의 속에서만 천연물이 극히 드물게 추출되었을 뿐이다(Faulkner, 1984b).

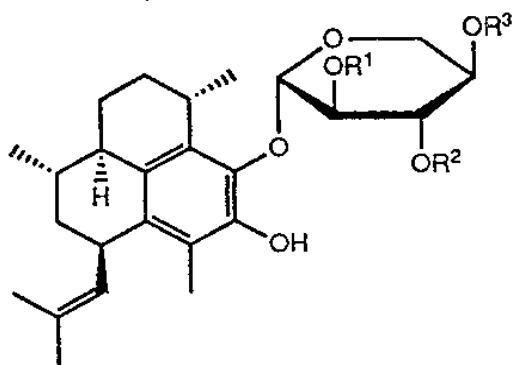
많은 강장동물이 그러하듯이 Alcyonaria강의 생물은 탄산칼슘을 다량함유하기 때문에(조직의 75%에 달하는 경우도 있음) 오랫동안 화학자들의 관심을 끌지 못했으나 이후에 gorgonians에서 풍기는 독특한 향기의 성분에 대한 관심으로부터 천연물 화학적 연구가 시작되어 지금까지 새로운 탄소골격과 작용기를 가진 무수한 대

사물질들이 분리되었으며 이들 물질중 많은 수가 강력한 생리활성도를 나타내었다 (Coll, 1992).

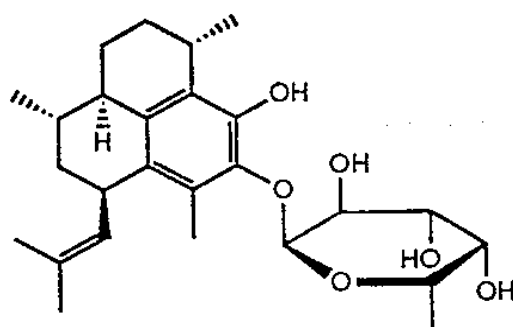
강장동물의 천연물은 위에서 언급한 바와 같이 그 생물학적 분포가 편중되어 있을 뿐만 아니라 생물의 종류에 따른 대사물질의 종류도 매우 편중되어 있다. Soft corals, gorgonians, sea pens(Pennatulacea목)의 천연물은 거의 대부분이 terpenoids 혹은 polyprenyl part를 가진 mixed biosynthetic products이다. 이들의 terpenoids, 특히 diterpenoids는 그 탄소골격이 지극히 다양하여 종래에 알려져 있던 terpenoid chemistry의 개념을 바꿀 정도에 이르렀다. Terpenoids 중에서는 diterpenoids가 압도적인 다수를 차지하며 diterpenoids에서는 cembrane 골격을 갖고 있는 물질이 다수(>65%)를 차지하고 있다(Ireland et al, 1988; Faulkner, 1984b).

반면에 zoanthids와 stony corals에서 추출된 천연물은 거의 대부분이 alkaloids이며 이들중 zoanthid *Palythoa* spp.에서 추출된 palytoxins는 그 구조의 복잡함과 유례를 찾기 어려운 강력한 독성으로 유명하다(Faulkner, 1984b). 또한 hydroids에서는 polyketides가 그리고 stolonifer에서는 terpenoids와 함께 여러 prostaglandins가 추출되었다. Sea anemones에서도 최근 amino acids나 bases에서 기원한 물질들이 추출되고 있다.

전기한 바와 같이 gorgonians의 천연물은 독특한 구조와 강력한 생리활성도로 유명한 물질이 많으나 특히 잘 알려진 예를 들면 다음과 같다. 1969년에 Caribbean gorgonian *Plexaura homomalla*로부터 생체내에서 다양한 활성을 가진 prostaglandin A₂와 유도체를 발견한 것이 해양천연물의 중요성을 널리 인식시킨 계기가 된 것은 너무나 유명하다. 다른 Caribbean gorgonian *Pseudopterogorgia elisabethae*에서 추출된 diterpene glycosides, pseudopterosins는 물질특허를 획득하여 소염제로의 개발중에 있다(Look et al, 1986; Fautin, 1988). 대서양 gorgonian인 *Lophogorgia* spp.에서 추출된 cembrane diterpenoid, lophotoxin 역시 신경세포의 acetylcholine receptor의 구조연구와 Alzheimer병의 연구용 시약으로 이용되고 있

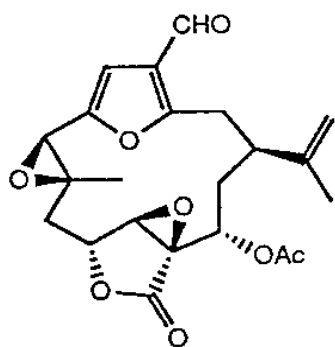


pseudopterosin A : $R^1 = R^2 = R^3 = H$
 B : $R^1 = Ac, R^2 = R^3 = H$
 C : $R^1 = R^3 = H, R^2 = Ac$
 D : $R^1 = R^2 = H, R^3 = Ac$

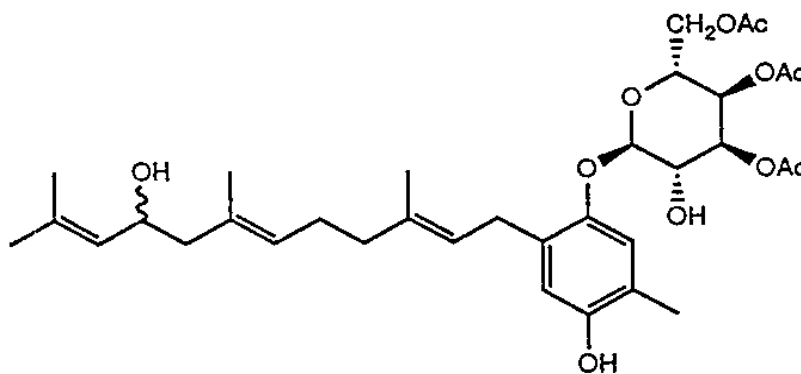


pseudopterosin E

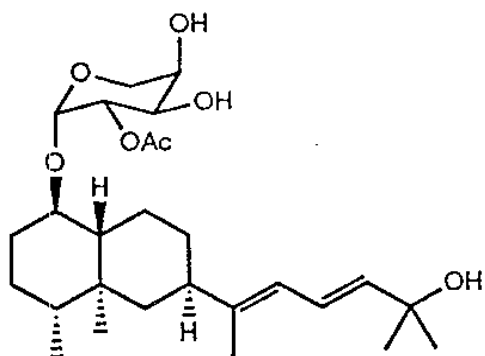
pseudopterosins - antiinflammatory, analgesic.
 (*Pseudoptero-gorgia elisabethae*)



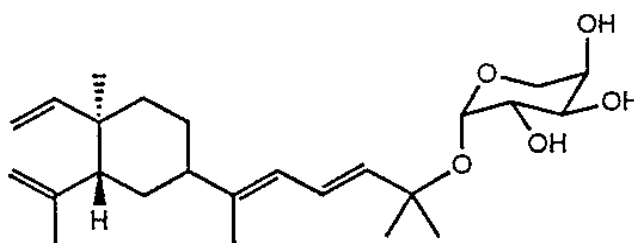
lophotoxin - acetylcholine receptor binder
 (*Lophogorgia* spp.)



moritoside - cytotoxic
 (*Euplexaura* sp.)



fuscoidin A



fuscoidin B

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

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

acetylcholine receptor의 구조연구와 Alzheimer병의 연구용 시약으로 이용되고 있다(Culver et al, 1985).이들 이외에도 *Euplexaura* sp.로부터 분리된 강력한 항암물질 moritoside, *Eunicea fusca*로부터 얻어진 강력한 소염물질 fuscocide등이 유명하다(Fusetani et al, 1985; Shin & Fenical, 1991)(Fig. 3-1). 또한 순수한 천연물은 아니나 *Pseudopterogorgia elisabethae*의 조추출물은 화장품의 원료로 이용되고 있다.

3. 2. *Acabaria undulata*의 대사물질

Gorgonians은 horny soft corals라고도 부르며 학명으로는 海楊目(Gorgonacea)에 속한다. 우리 나라에서는 부산, 울릉도, 제주도등지에 많이 서식하며 회초리 모양, 깃모양, 부채모양, 나무모양등의 형태를 이룬다. 해양류(gorgonians)는 골축이 있고 또 각질인 점에서 유사한 생물인 바다팬드라미류(soft corals)와 구별된다. 본 연구에서 천연물 화학적 분석이 시도된 gorgonians는 거문도 근해에서 채집된 *Acabaria undulata*(시료번호 91K-2)와 *Acalycigorgia inermis*(시료번호 91K-4)이다. 이 들은 채집된 시료의 양과 유기조추출물에 대한 TLC분석, P388, antiviral, DNA-binding, brine shrimp toxicity등의 생리활성도 측정결과가 다른 시료에 비하여 탁월하였다.

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.

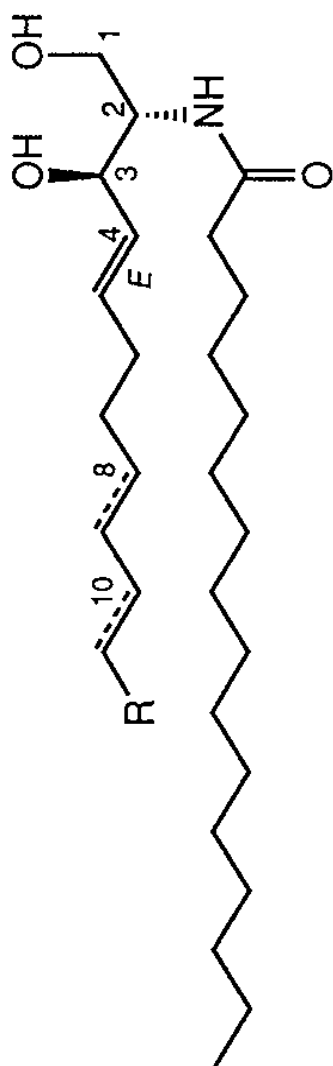
그들에서 말린후 냉동보관한 3 kg의 시료를 dichloromethane으로 추출한 후 silica vacuum flash chromatography를 이용하여 polarity에 의한 분리를 하였다.

각각의 fraction에 대한 ^1H NMR 측정결과 중간정도의 극성($n\text{-hexane/EtOAc} = 5:5 - 2:8$)을 갖는 fractions에서 특이한 물질들이 포함되어 있는 것을 발견하였다. 여러 번에 걸친 C_{18} reversed phase HPLC결과 4개의 물질(91K-2-1 ~ -4)가 분리되었다. 이들의 구조는 아래에서 설명한 바와 같이 NMR 자료해석과 화학반응에 의하여 sphingosine 유도체로 결정되었다(Fig. 3-2).

주 대사물질인 91K-2-1은 흰 무정형 고체로 얻어졌다. 이 물질의 ^{13}C NMR 측정결과 27개의 peaks가 나타났다(Fig. 3-10). 그러나 upfield peaks간의 intensity 차이가 매우 커서 여러 개의 carbon signals이 overlap되어 있음이 명백하였다. 탄소의 수를 보다 정확히 파악하기 위하여 ^{13}C NMR 실험에서 delay time을 10 sec 이상으로 하여(T_1 value의 차에 의한 carbon간의 intensity의 차이를 없애기 위하여) 재측정한 결과 7개의 carbon signals이 overlap되어 있음을 발견하였다. 또한 ^1H NMR에서도 upfield protons간에 overlapping이 매우 심하였다(Fig. 3-9).

Proton NMR상에서 upfield signals의 overlapping이 매우 심한 것으로 보아 이 물질은 long chain fatty acid에서 기원한 것으로 추측되었다. 특히 두개의 upfield methyl signals도 서로 overlap되어 있으며 동일한 methylenes(δ -1.2 ppm)과 coupling을 하는 것으로 보아 91K-2-1은 2개의 fatty acids가 결합한 물질임을 알 수 있었다.

Proton COSY NMR과 proton decoupling에 의하여 downfield protons간의 상호관계가 드러났다(Fig. 3-11). 먼저 δ 6.29에 나타난 proton(1H, brd, $J=7.3$ Hz)은 D_2O exchange 실험에서 사라졌는데 이 proton의 downfield chemical shift와 ^{13}C NMR에서의 δ 174.11에서 나타난 quaternary carbon signal은 secondary amide의 존재를 의미하였다. IR spectrum에서 3300 cm^{-1} 과 1626 cm^{-1} 에 나타난 강한 absorption bands도 이 해석을 지지하였다(Fig. 3-12). Amide proton은 δ 3.90의 methine proton(1H, m)과 couple을 하였으며 이 methine proton은 다시 δ 4.32(1H brdd, $J=6.8, 4.4$), 3.95(1H, brdd, $J=11.2, 3.4$), 3.69(1H, brdd, 11.2, 3.2)의 세 protons



- 91K-2-1** : 8,9-didehydro (*E*), R = (CH₂)₆CH₃
-2 : 8,9,10,11-tetradidehydro (*E,E*), R = (CH₂)₆CH₃
-3 : 8,9-didehydro (*E*), R = (CH₂)₅CH(CH₃)₂
-4 : R = (CH₂)₆CH₃

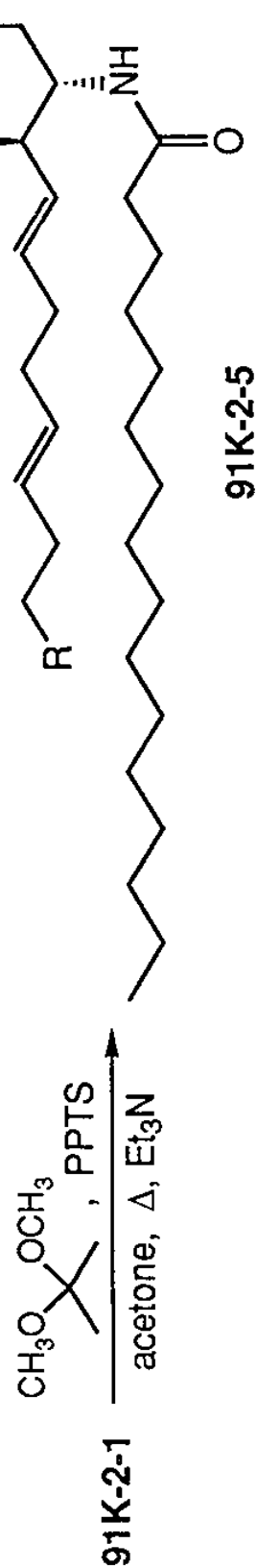


Fig. 3-2. Sphingosines isolated from the gorgonian *Acabaria undulata*.

과 couple을 하였다. ^{13}C NMR data(δ 74.26s, 62.29d) 및 DEPT 실험의 결과에 의하여 이들은 각각 secondary alcohol과 primary alcohol에 해당하는 methine과 methylene protons로 해석되었다. Proton NMR의 D_2O exchange 실험에서 δ 4.32, 3.95, 3.69의 broad한 peak가 sharp한 double doublet로 변한 사실과 IR spectrum에서 나타난 3400 cm^{-1} signal도 이 사실을 확인시켜 준다.

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 methylene protons를 경유하여 또 다른 double bond(δ 5.43, 5.36)와 결합되어 있었다. Olefinic protons간의 vicinal coupling constants의 측정결과 ($J=15.4, 15.4\text{ Hz}$) 이들 두 double bonds는 모두 E-configuration을 이루고 있음이 밝혀졌다. 이 사실은 IR spectrum상에 970 cm^{-1} 에 나타난 absorption band의해서도 지지를 받는다. 마지막으로 δ 2.22(2H, t, $J=7.6\text{ Hz}$)에 나타난 α -carbonyl methylene protons은 δ 1.61(2H, quint, $J=7.2\text{ Hz}$)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. 3-3과 같다.

문헌조사결과 91K-2-1은 최근 인도양 연안에서 채집한 sea anemone *Paracondylactis indicus*로부터 분리된 sphingosine계열의 물질인 N-palmityl-octadecasphinga-4(E),8(E)-dienine과 동일하거나 유사한 물질로 추측되었다 (Chakrabarty et al, 1994). Octadecasphinga-4(E),8(E)-dienine에는 C-2와 C-3 두 위치가 asymmetric carbon centers를 이루고 있다. 이 centers의 stereochemistry에 대하여 original paper에서는 자연계에 존재하는 모든 sphingosine-type amine alcohols가 D-erythro-configuration이라는 것과 이 물질의 C-2(δ 54.7)와 C-3(δ 74.3)의 ^{13}C NMR data가 합성된 N-octadecanoyl- D-erythrosphingosine의 ^{13}C NMR data(δ 54.7과 73.1)와 잘 일치한다는 사실에 의해서 (2S*,3R*) 즉 D-erythro라고 보고되었다. 하지만 그러나 천연물 특히 open-chain 구조의 stereoisomer에서

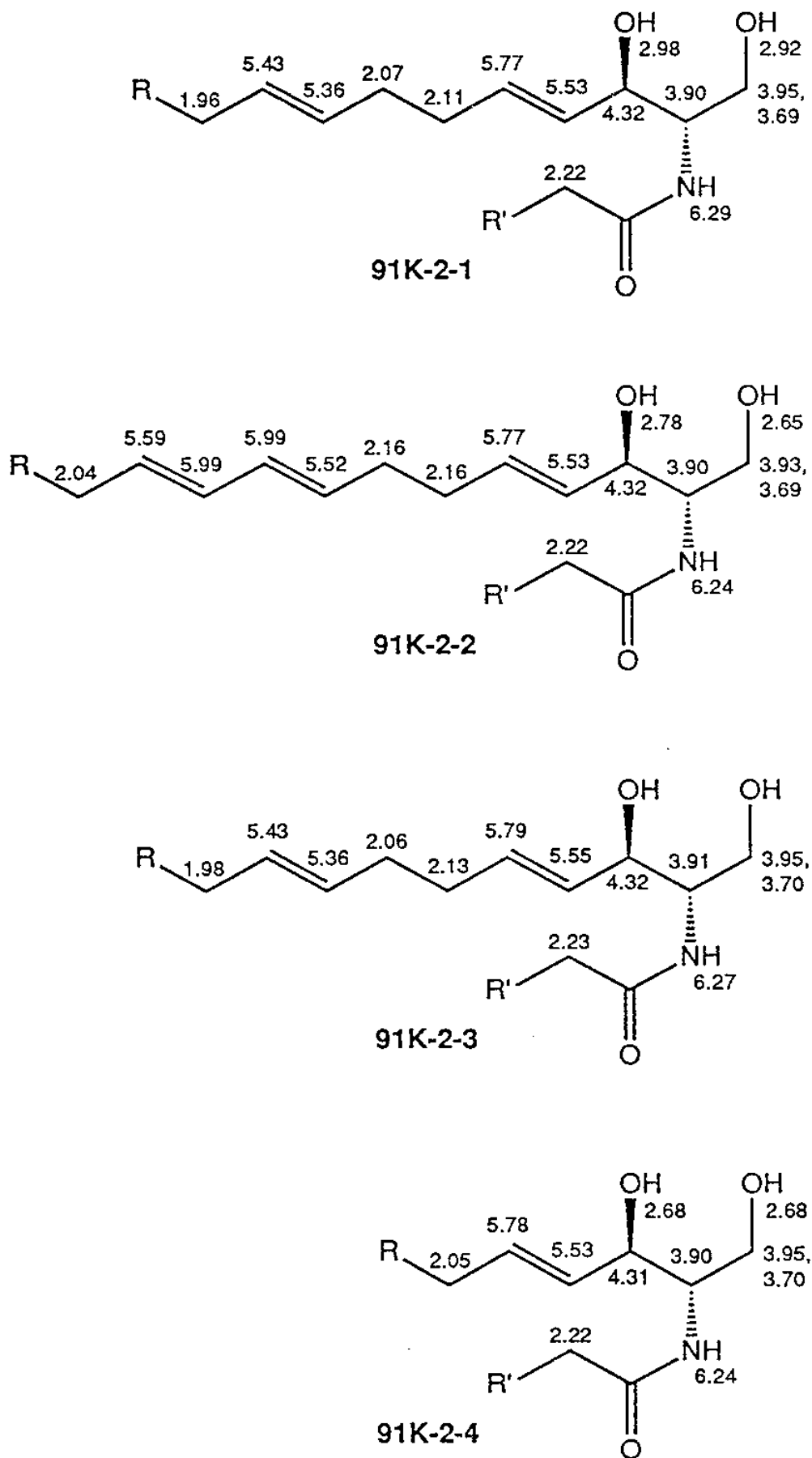


Fig. 3-3. Partial structures and ^1H NMR assignments for compounds 91K-2-1 ~ -4.

^{13}C NMR data가 거의 동일하게 나오는 경우가 빈번하기 때문에 이 asymmetric centers의 stereochemistry를 좀 더 명확하게 결정할 필요성을 느껴 유기반응을 시도 하였다.

91K-2-1의 두 hydroxy groups을 결합시켜 고정된 6-membered ring을 형성하기 위하여 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. 3-2, -14). 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 $2\text{S}^*3\text{R}^*$ 인 것이 분명하게 결정되었다. 그러나 optical rotation 값을 측정한 결과 알려진 물질의 경우에는 $[\alpha]_{\text{D}} +10.6^\circ$ 로 보고된 반면에 우리가 분리한 91K-2-1의 경우에는 $[\alpha]_{\text{D}}$ 값이 -8.0° 로 얻어 졌다. 그런데 이 테이타를 만족시키기 위해서는 우리가 분리한 물질의 absolute stereochemistry가 알려진 물질과 서로 반대되는 것으로 해석될 수 밖에 없다. 하지만 그렇게 할 경우에 original paper에서 제시한 자연계에 존재하는 모든 sphingosine-type amine alcohols가 D-erythro-configuration라는 전제조건에 어긋난다. 이 사실을 분명히 하기 위하여 지금까지 이루어진 sphingosine에 대한 연구결과를 조사하였더니 실제로 L-erythro-sphingosine이 천연물로 분리되어 absolute stereochemistry 역시 합성에 의하여 결정된 사실을 확인할 수 있었다(K. Chebaane & M. Guyot, 1986; M. Nakagawa et al, 1990). 그러므로 자연계에 존재하는 모든 sphingosine derivatives가 D-erythro-configuration이라는 가정은 잘못된 결론임을 알 수 있다. 우리가 분리한 ceramide(91K-2-1)의 absolute stereochemistry를 좀 더 분명하게 밝히기 위해서는 absolute stereochemistry가 알려진 sphingosine으로부터 이 ceramide를 합성하면 확실하겠지만 상업적으로 이용할 수 있는 sphingosine이 제한되어 있어 유사한 유도체인 91K-2-4를 합성하여 확인할 예정

이다.

91K-2-1의 구조결정에 있어서 남은 문제는 이 물질에 존재하는 두개의 long chain fatty acid와 amide parts 길이의 결정이다. 이 물질이 보고된 바와 같이 octadecadiene과 palmitic acid amide로 구성되어 있는지 아니면 다른 chain length를 가진 부분으로 구성되어 있는가의 여부를 확인하기 위하여 mass spectrum을 측정하였다.

Sphingolipids의 mass spectrum pattern에 대한 연구는 잘 이루어져 있으며 심지어 각 fragmentation pattern에 대한 nomenclature까지도 결정되어 있다. 91K-2-1에 대한 mass spectrum data에서는 m/z 517에서 molecular ion으로 여겨지는 peak가 발견되었으며 base peak가 m/z 281에서 발견되었고 또 다른 major ion이 m/z 298(relative abundance 40%)에서 나타났다(Fig. 3-13). Ceramides의 fragmentation ion pattern 명명법을 따르면 이들은 각각 G와 T pattern에 해당된다(Adams & Ann, 1993)(Fig. 3-4). 또 이런 mass spectrum 분석 데이터 결과에 의하여 ceramide part인 N-acyl group은 palmitic acid에서 유래한 것으로 생각되었으며 다른 또 하나의 long-chain 골격은 octadeca-4,8-diene으로 여겨 졌다. 이것을 좀 더 명확하게 하기 위하여 enzyme을 이용하여 이 물질을 가수분해하였다.

91K-2-1, cholesterol esterase, 50 mM tris-buffer(pH 7.5)를 methanol에 녹이고 37 °C에서 하룻밤 동안 방치한 후에 hexane으로 추출하였다. 용매를 진공증발기로 제거한 후에 남은 잔류물에 5 % methanolic HCl 용액을 가하여 1시간 정도 저어 주면 가수분해된 지방산의 ester가 형성된다. 이 반응물을 헥산으로 추출하여 용매를 제거한 후에 남은 물질을 GC(Gas chromatography)로 분석하였다. 여러 가지 fatty acid methyl ester를 standard로 이용하여 retention time을 비교한 결과 methyl palmitate와 동일한 peak가 major peak로 GC spectrum상에서 확인되었다. 이상의 결과에 의하여 91K-2-1은 N-palmityl-octadecasphinga- 4(E),8(E)-dienine이라는 것이 명확하게 밝혀 졌다(Fig. 3-2).

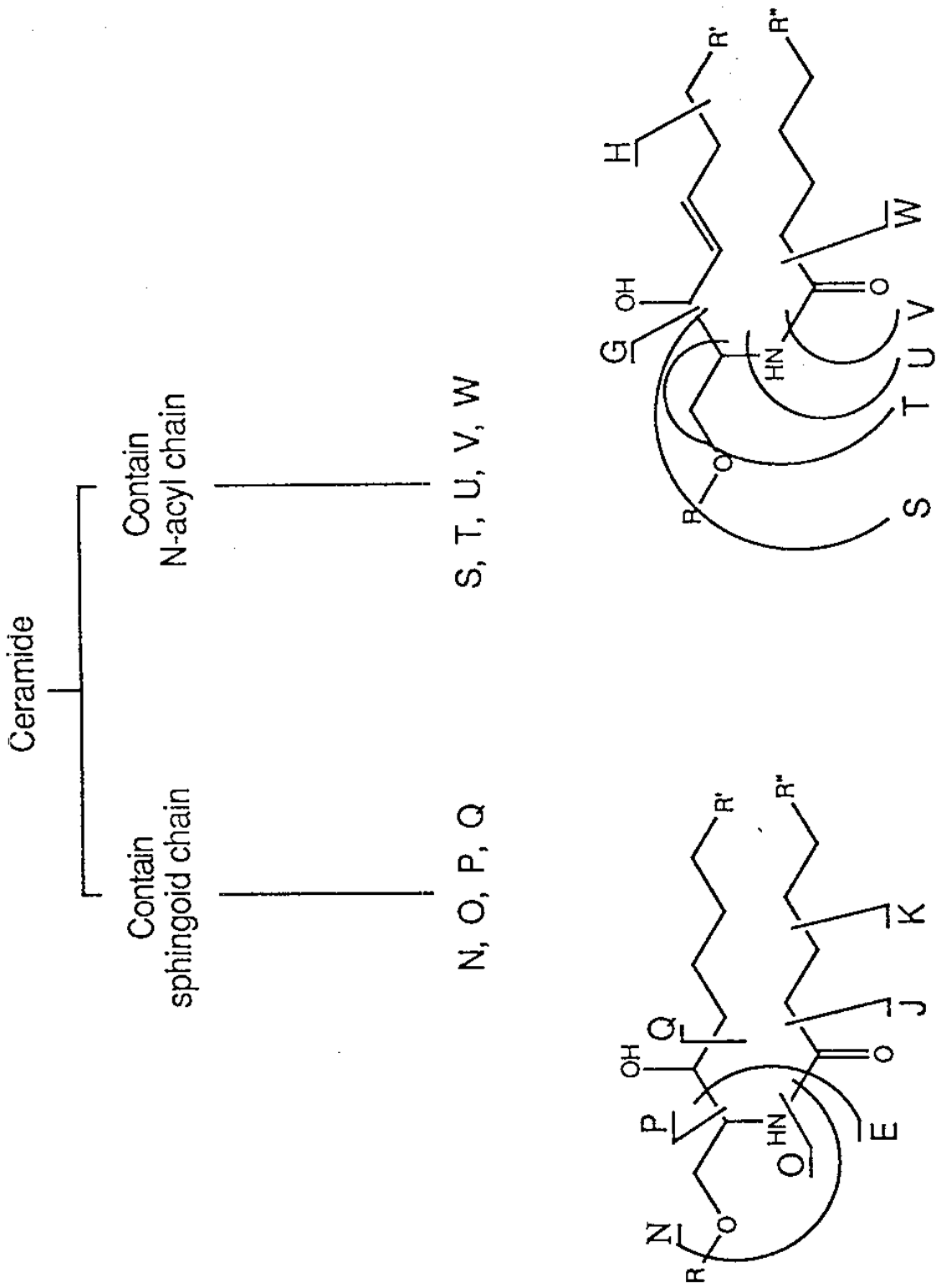


Fig. 3-4. Nomenclature for cleavages of precursor ions of sphingolipids.

유사한 물질인 91K-2-2가 동일한 조건에서 분리되었다. 이 물질의 ^1H 와 ^{13}C NMR 및 IR spectrum은 91K-2-1과 매우 유사하였다(Fig. 3-15 ~ -17). 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. 이 사실은 UV spectrum의 226 nm에서 나타난 $\lambda_{\text{max}}(\epsilon=7500)$ 에 의해서도 증명되었다. Mass spectrum pattern은 91K-2-1과 유사하였으며 m/z 533에서 molecular ion peak가 발견되었다. 그러므로 91K-2-2의 구조는 octadecasphinga-4,8,10-trienine으로 결정되었다(Fig. 3-2, 3-3). 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-2-3이 동일한 HPLC조건에서 분리되었다. 91K-2-2와 마찬가지로 이 물질의 ^1H 와 ^{13}C NMR 및 IR spectrum은 91K-2-1과 매우 유사하였다(Fig. 3-18 ~ -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 유도체임이 명백하였으며 additional methyl group은 생합성적 mechanism으로부터 이 물질을 이루는 두개의 long chains중 octadecasphingosine에 접합된 것으로 추측되었다(Fig. 3-2, 3-3).

이 문제를 해결하기 위하여 산가수분해 반응을 실시하였다. 91K-2-3(2 mg)을 methanol 8 ml에 녹이고 2M 황산 2 ml를 가한 후에 6시간 동안 환류하였다. 이 반응혼합물을 실온으로 식히고 포화된 NaCl 용액을 넣고 hexane으로 추출하였다. 추출용액을 anhydrous magnesium sulfate로 건조시키고 magnesium sulfate를 여과하였으며 용매를 제거한 후에 normal phased HPLC로 major peak를 분리하여 methyl palmitate 1 mg을 얻었다. 이 물질의 동정은 GC에 의하여 이루어 졌다. 또 이 물질의 mass spectrum을 측정한 결과 역시 methyl palmitate에 해당하는 molecular ion peak(m/z 270)가 얻어 졌다. 그러므로 두 개의 long chain중에 terminal methyl branch가 존재하는 chain은 octadecasphingadiene으로 밝혀 졌다.

또 다른 유도체인 91K-2-4가 동일한 HPLC 조건에서 분리되었다. 이 물질의 ^1H NMR과 ^{13}C NMR 및 IR data 역시 91K-2-1과 매우 유사하였다(Fig. 3-21 ~ -23). 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*-octadecasphinga-4-enine으로 결정되었다 (Fig. 3-2, 3-3). Ceramides 91K-2-1 ~ -4의 key protons에 대한 assignments는 Table 3-1과 같다.

Sphingolipids는 그 종류가 매우 다양하고 고등동물의 brain과 nerve tissue에 다량으로 존재한다. Long-chain acyl CoA와 아미노산 serine의 축합물 dihydrosphingosines이 flavoprotein에 의해서 산화되어 생성된 물질을 sphingosines이라 부르며 이 sphingosines에 존재하는 amino group이 또 다른 acyl CoA와 반응하여 형성된 N-acyl sphingosines을 ceramides라 칭한다. Ceramides는 역시 여기에 존재하는 hydroxyl group과 또 다른 물질들이 반응하여 phosphosphingolipids(PSL)와 glycosphingolipid(GSL) 유도체들을 형성한다.

Phosphosphingolipids로서는 CDP-choline과 반응하여 형성된 sphingomyelin, ceramide aminoethylphosphonate인 phosphosphingolipids(PnSL), ceramide phosphoethanolamine(CPEA)등이 있으며 glycosphingolipids에 속하는 것들로는 cerebrosides와 gangliosides가 있다(Fig. 3-5). Cerebrosides는 한 개의 sugar unit(glucose나 galactose)가 결합된 것이며 gangliosides는 2개 이상의 sugar unit가 결합한 것이다. 척추동물에 주로 존재하는 PSL은 sphingomyelin이며 해양 무척추동물의 경우에는 극피동물을 제외하고는 PnSL이 해면, 강장, 연체, 절지동물(새우, 게)등에서 발견되며 CPEA는 해양 무척추 동물에서 발견되지 않았다. GSL은 해면, 강장, 척색, 극피, 연체, 절지, 환형동물 및 해양식물에서 발견되었다(Hori & Sugita, 1993).

Sphingosine derivatives는 쌍편모조류, 원색동물 및 강장동물등에서 발견되었으나 91K-2-1 ~ -4와 같은 sphingadienine의 형태로 발견된 예는 매우 드물어 Sea anemone *Paracondylactis indicus*에서 분리된 N-palmityl-*erythro*-octadecasphinga-4(E),8(E)-dienine(91K-2-1)과 역시 sea anemone에 속하는 *anemonia sulcata*에서 발견된 N-lauryl-*erythro*-docosaspinga-4(E),8(E)-dienine

Table 3-1. Proton and carbon NMR assignments for compounds 91K-2-1 ~ 4^a

#	91K-2-1	91K-2-2	91K-2-3	91K-2-4
1	3.69(1H, brdd, 11.2, 3.2)	3.69(1H, brdd, 11.2, 3.2)	3.70(1H, brdd, 11.2, 3.2)	3.70(1H, brdd, 11.2, 3.2)
	3.95(1H, brdd, 11.2, 3.4)	3.93(1H, brdd, 11.2, 3.4)	3.95(1H, brdd, 11.2, 3.4)	3.95(1H, brdd, 11.2, 3.9)
2	3.90(1H, m)	3.90(1H, m)	3.91(1H, m)	3.90(1H, m)
3	4.32(1H, brdd, 6.8, 4.4)	4.32(1H, brdd, 6.8, 4.4)	4.32(1H, brdd, 6.8, 4.4)	4.31(1H, brdd, 6.8, 4.4)
4	5.53(1H, dd, 15.4, 6.8)	5.53(1H, dd, 15.4, 6.1)	5.55(1H, dd, 15.4, 6.6)	5.53(1H, dd, 15.5, 6.8)
5	5.77(1H, dt, 15.4, 6.1)	5.77(1H, dt, 15.4, 6.1)	5.79(1H, dt, 15.1, 6.6)	5.78(1H, dt, 15.5, 6.6)
6	2.11(2H, m)	2.16(2H, m)	2.13(2H, m)	2.05(2H, brq, 7.3)
7	2.07(2H, m)	2.16(2H, m)	2.06(2H, m)	
8	5.36(1H, dt, 15.4, 6.4)	5.52(1H, m)	5.36(1H, dt, 15.4, 5.4)	
9	5.43(1H, dt, 15.4, 6.4)	5.99(1H, m)	5.43(1H, dt, 15.6, 6.0)	
10	1.96(2H, brq, 6.8)	5.99(1H, m)	1.98(2H, brq, 6.8)	
11		5.59(1H, m)		
12		2.04(2H, brq, 7.2)		
18	0.87(3H, t, 6.6)	0.87(3H, t, 6.8)	0.86(6H, d, 6.8)	0.87(3H, t, 6.6)
2'	2.22(2H, t, 7.6)	2.22(2H, t, 7.6)	2.23(2H, t, 7.6)	2.22(2H, t, 7.8)
3'	1.61(2H, quint, 7.2)	1.63(2H, quint, 7.2)	1.64(2H, quint, 7.3)	1.63(2H, quint, 7.2)
16'	0.87(3H, t, 6.6)	0.87(3H, t, 6.8)	0.88(3H, t, 7.3)	0.87(3H, t, 6.6)

^a Proton NMR spectra were obtained in CDCl₃ solution at 500 MHz. Chemical shifts are reported in δ values (ppm downfield from Me₄Si). J values are reported in Hz.

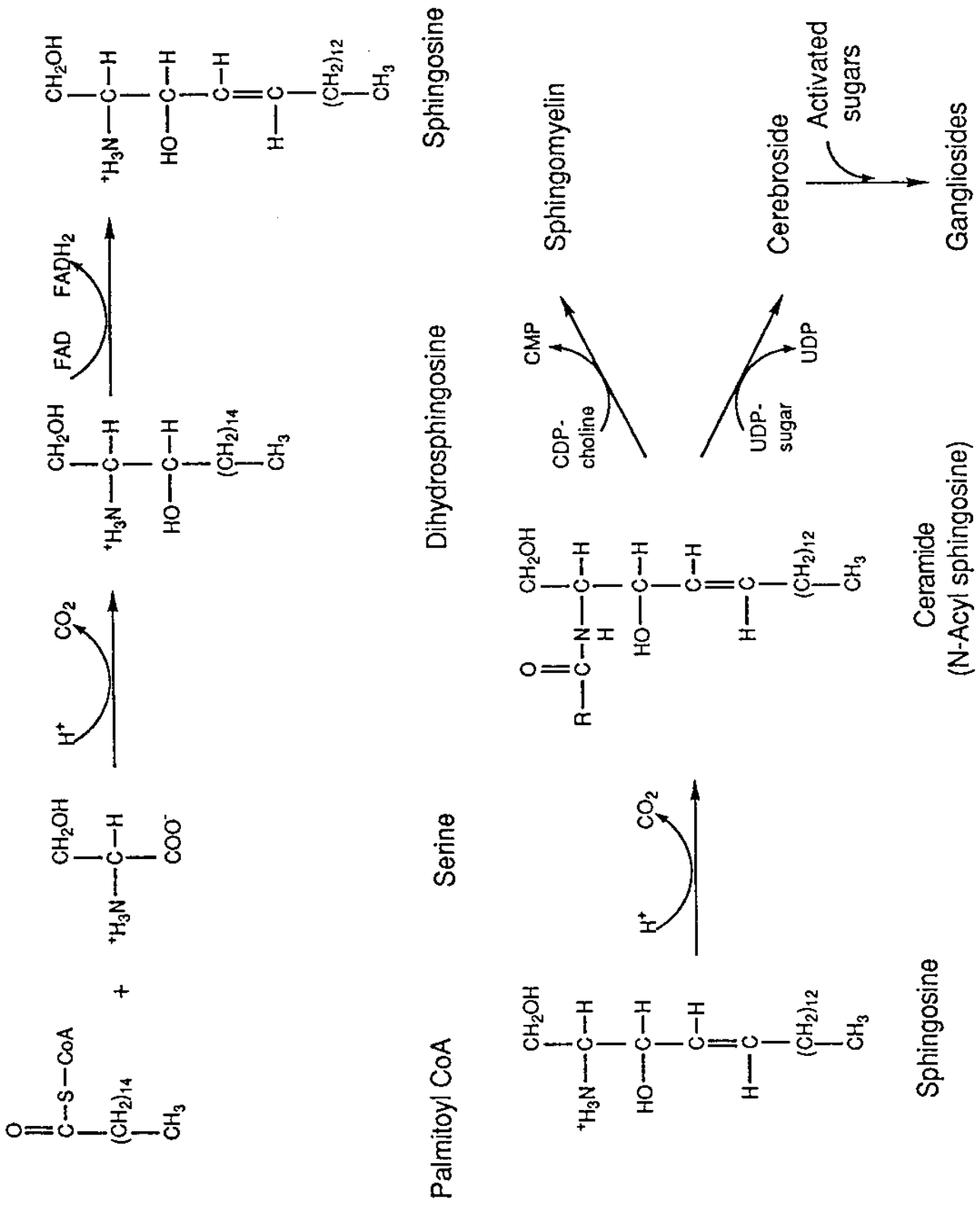


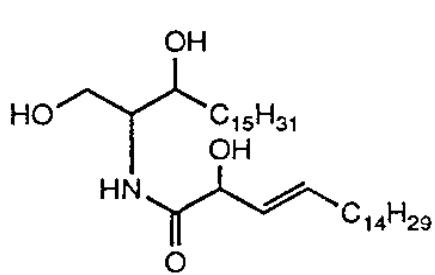
Fig. 3-5. Biosynthesis of sphingolipids.

이 분리된 것이 유일한 예이다(Chakrabarty et al, 1994; Chebaane & Guyot, 1986).

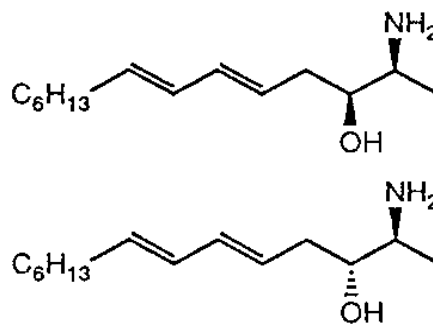
91K-2-1 ~ -4와 같은 sphingosine 유도체나 이로부터 파생한 새로운 구조의 cerebrosides, ceramides, gangliosides 등은 생물체의 1차 대사물질과 구조가 매우 유사하여 근래에 이르기까지 큰 관심을 끌지 못하였다. 그러나 최근에는 dinoflagellate, tunicate, sponge, echinoderm 등 여러 해양생물로부터 새로운 구조의 물질들이 계속 발견되고 이에 따라 항미생물, 항바이러스, 항암 등 생리활성도도 보고되어 주목을 끌고 있으며 수종의 물질은 전합성이 된 바 있다(Kawano et al, 1990; Kobayashi et al, 1988; Gulavita & Scheuer, 1989; Faulkner, 1991; 1992; Natori et al, 1993; 1994; Jin et al, 1994)(Fig. 3-6).

위에서 언급한 4 개의 sphingosine 유도체 이외에도 여러 개의 전혀 다른 물질이 포함되어 있음이 polar fractions에 대한 ^1H NMR 측정에 의하여 드러났다. 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. 3-24, -25). 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. 3-7).

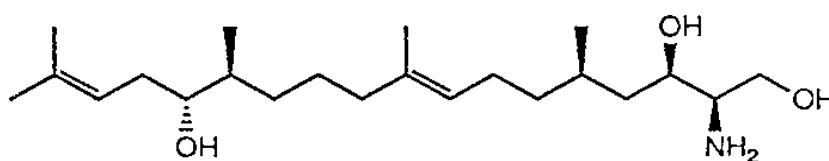
물질 91k-2-6의 ^{13}C NMR에서는 모두 32개의 peaks가 발견되었다(Fig. 3-27). 따라서 91K-2-6은 C_{28} steroid에 두 units의 acetyl기가 결합된 물질로 생각되었다. δ 130 ~ 140에서 발견된 두 개의 methine carbons는 하나의 이중결합의 존재를 나타내었고 upfield region에 나타난 8개의 methyl carbons는 이 물질이 전형적인 C_{28} steroid이며 cholestane의 C-24 위치에 methylation이 일어난 ergostane 계열의



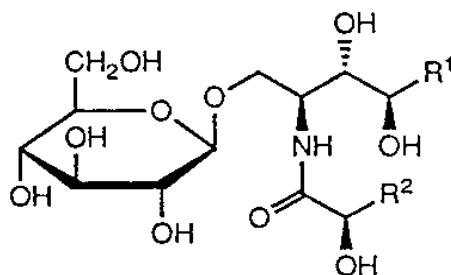
symbioramide
(dinoflagellate *Symbiodinium* sp.)



(sponge *Xestospongia* sp.)

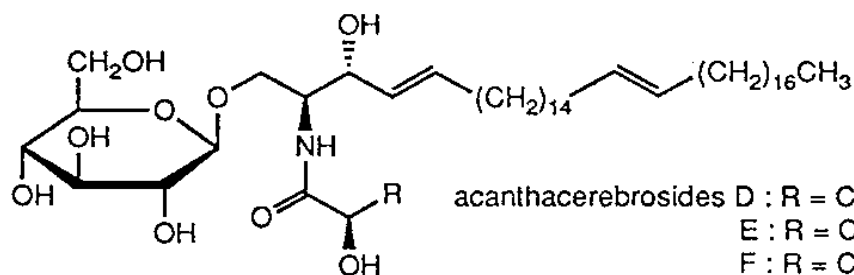


aplidiasphingosine
(tunicate *Aplidium* sp.)



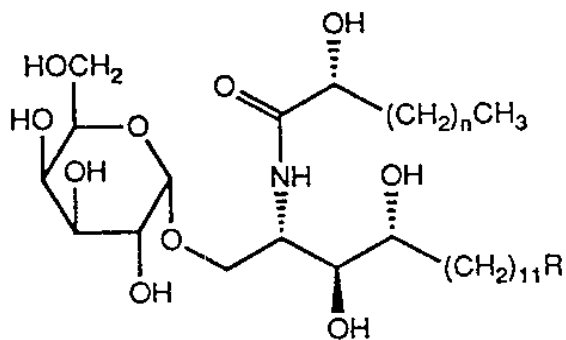
acanthocerebroside A : $R^1 = C_{12}H_{25}$, $R^2 = C_{22}H_{45}$
 B : $R^1 = C_{18}H_{37}$, $R^2 = C_{14}H_{29}$
 C : $R^1 = -(CH_2)_8CH=CHC_8H_{17}$,
 $R^2 = C_{14}H_{29}$

(starfish *Acanthaster planci*)

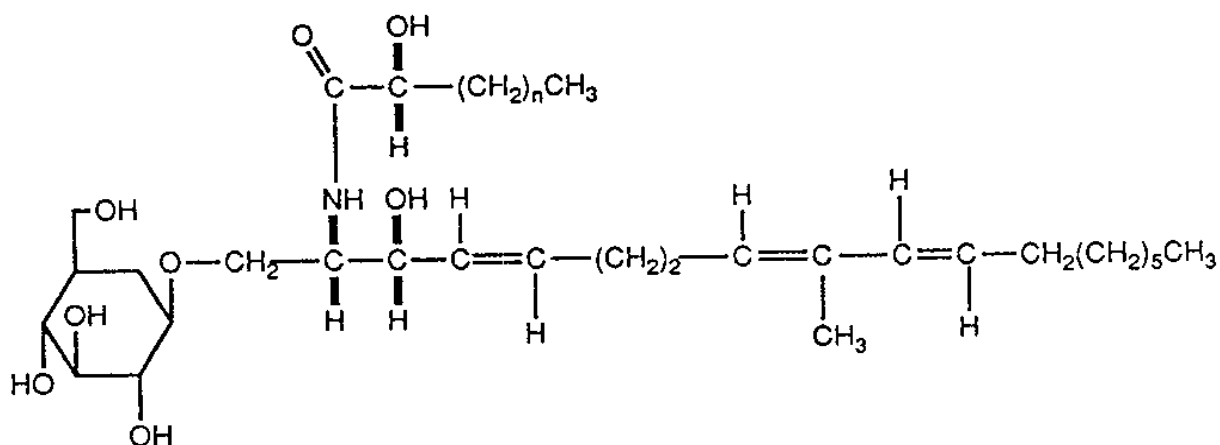


acanthocerebroside D : $R = C_{20}H_{41}$
 E : $R = C_{21}H_{43}$
 F : $R = C_{22}H_{45}$
 (starfish *Acanthaster planci*)

Fig. 3-6. Sphingosines and related metabolites from marine organisms.

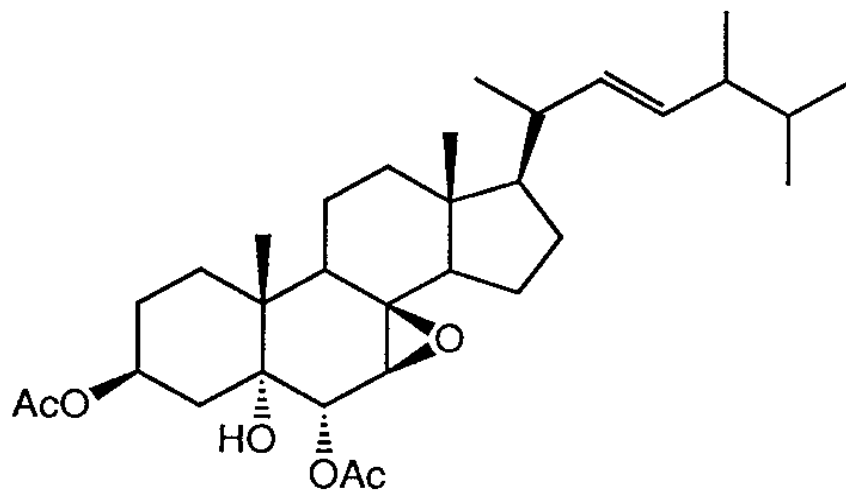


agelasphins 4 ($n = 20$ or 21 , $R = \text{CHMe}_2$ or CHMeEt)
 7a ($n = 21$, $R = \text{Me}$)
 9a ($n = 21$, $R = \text{Et}$)
 9b ($n = 21$, $R = \text{CHMe}_2$)
 11 ($n = 21$, $R = \text{CHMeEt}$)
 13 ($n = 22$, $R = \text{CHMeEt}$)
 (sponge *Agelas mauritianus*)

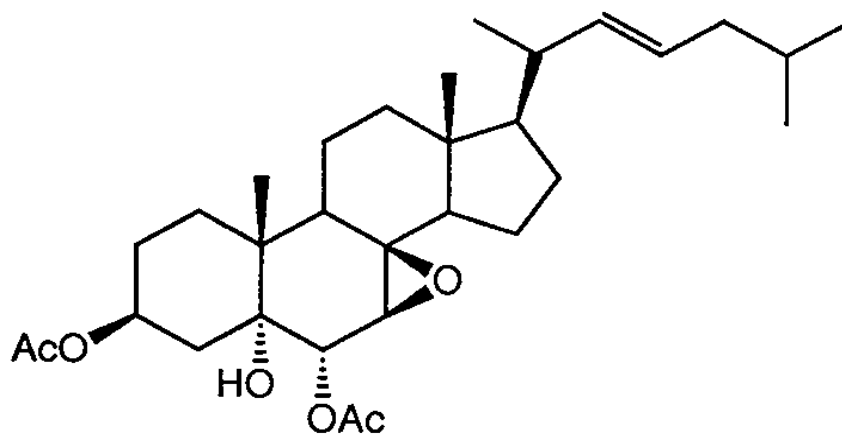


Ophidiacerebroside A : $n = 17$
 B : $n = 18$
 C : $n = 19$
 D : $n = 20$
 E : $n = 21$
 (starfish *Ophidiaster ophidiamus*)

Fig. 3-6. continued.



91K-2-6



91K-2-7

Fig. 3-7. Polyhydroxy steroids isolated from the gorgonian *Acabaria undulata*.

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 산화된 carbons중 2개만 acetoxyl carbons로 변화한 것이 명백하였다. 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 epoxide등 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. 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 Hz정도이며 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 나타내는데 비하여 δ 62.44(CDCl_3 에서는 δ 65.50)의 methine carbon은 176.2 Hz의 one bond coupling constant를 갖고 있음이 드러났다(Fig. 3-28). 이 값은 epoxide의 전형적인 coupling constant인 175.7과 거의 일치하는 것이다. 따라서 91k-2-6에는 전기한 2개의 secondary acetoxyl기와 1개의 tertiary hydroxy기와 함

계 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 해당하는 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. 3-29 ~ -32). 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. 3-7).

Proton, carbon 및 COSY NMR에 의하여 제시된 구조는 HMQC 및 HMBC실험에 의하여 증명되었다. 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-4 α , -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. 3-7).

91k-2-6과 함께 분리된 91k-2-7의 proton과 carbon 및 COSY data는 91k-2-6과 매우 유사하였다(Fig. 3-33 ~ -35). A, B rings의 산화 pattern은 완전

히 동일하였으며 C, D rings에 해당하는 signals도 거의 일치하였다. NMR 상에 있어서의 차이점은 91k-2-6의 C-22에 위치한 double bond와 C-28 methyl기가 사라진 점이였다. 따라서 91k-2-7은 3,6-diacetoxy-7,8-epoxy-5-hydroxy-cholestane이며 천연물은 3,5,6-trihydroxy-7,8-epoxycholestane임이 분명하였다(Fig. 3-7).

문헌조사 결과 91k-2-6, -7 및 해당하는 천연물은 모두 육상 및 해양생물로부터는 발견된 바가 없다는 것을 확인하였다. 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 생각된다.

3. 3. *Acalycigorgia inermis*의 대사물질

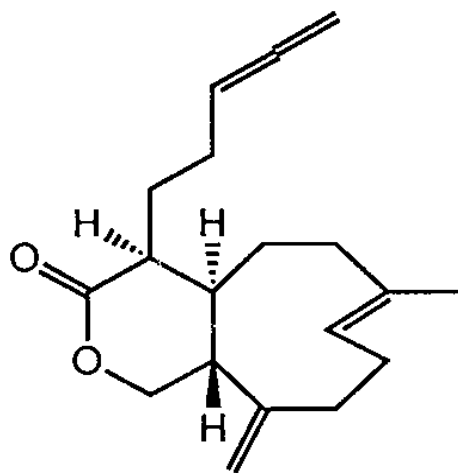
Gorgonian *Acalycigorgia inermis*(91K-4)는 91년 11월에 남해안의 거문도 부근의 대삼부도와 서도근해에서 boat diving으로 채집되었다. 군체의 색깔은 연한 갈색이었으며 크기가 15 cm 미만으로서 gorgonian중에서는 매우 작은 종류에 속하였다. Main body의 굵기도 3 mm 이하여서 매우 fragile하였으며 가지의 수도 1 ~ 3개로 branching pattern 또한 단조로웠다. 그 밖의 형태적인 특징으로서는 3 mm 이상의 대단히 발달한 calyses를 갖고 있는 점이였다.

그들에서 말린후 냉동보관한 시료 5 kg으로부터 dichloromethane으로 추출한후 silica vacuum flash chromatography에 의하여 polarity에 따른 분리를 하였다.

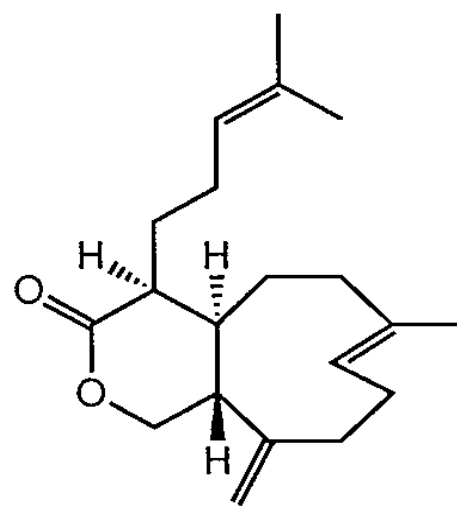
Proton NMR분석결과 비교적 non-polar한 fractions(n-Hex:EtOAc = 8:2와 7:3)에서 특이한 물질들의 존재가 드러났다. 이 fractions을 합한뒤 여러 번에 걸친 HPLC(n-Hex:EtOAc = 7:93 - 10:90) 분리결과 두 개의 천연물이 분리되었다(Fig. 3-8).

주대사물질인 91K-4-1은 흰색의 분말상의 고체로 얻어졌으며 ^{13}C NMR spectrum상에서 19개의 탄소가 존재함이 드러났다(Fig. 3-37). 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. 3-36). 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. 3-38). 먼저 δ 4.98과 4.97에 위치한 2개의 broad singlet protons는 다른 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 연결되



91K-4-1
(acalcixeniolide B)



91K-4-2

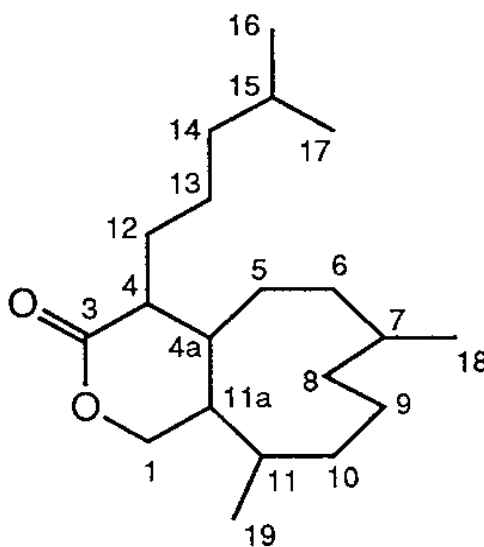


Fig. 3-8. Structures of diterpenoids isolated from the gorgonian *Acalycigorgia inermis*.

어 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.

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 B(91K-4-1)의 구조와 carbon 및 proton assignments는 Table 3-2와 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. 3-39, -40). NMR상에 있어서의 중요한 차이점은 먼저 ^{13}C NMR에서 20개의 signal이 발견된 점으로서 따라서 이 물질이 norditerpene인 91K-4-1 과는 달리 완전한 diterpene임을 나타내었다. 91K-4-1의 allene에 해당하는 3개의 signals(δ 208.5, 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 두개의 vinyl methyl기가 δ 1.71과 1.69에서 발견되었다. 그 외의 proton signals의 chemical shifts와 coupling pattern은 acalycixeniolide B와 매우 유사하였

Table 3-2. Proton and carbon NMR assignments for compounds 91K-4-1 and -2^a

*	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 ^b	2.02(1H, m), 1.54(1H, m)	26.91 t ^c
13	2.10(2H, m)	25.86 t ^b	2.12(2H, m)	25.75 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)	25.33 q
17	1.68(3H, brs)	16.46 q	1.69(3H, brs)	16.43 q
18	4.97(1H, brs) 4.70(1H, brs)	112.14 t	4.98(1H, brs) 4.97(1H, brs)	112.02 t
19			1.69(3H, brs)	17.87 q

* Proton and carbon NMR spectra were recorded in CDCl₃ solution at 500 and 125 MHz respectively. 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. Carbon multiplicities were determined by DEPT experiments. ^{b-c} Assignments may be interchanged.

다. NMR상에서 나타난 이와같은 모든 변화는 acalycixeniolide B의 terminal allene group이 dimethyl vinyl group으로 치환됨으로서 가능하였다.

이와같이 91K-4-2는 xenicane계의 diterpene lactone으로 구조가 결정되었으며 문헌조사결과 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). Norxenicane계의 norditerpene인 acalycixeniolide B(91K-4-1)와 91K-4-2의 구조 및 carbon과 proton assignments는 Fig. 3-9 및 Table 3-2와 같다.

91K-4-1과 -2는 모두 nine-membered ring을 가진 xenicane계열의 물질들이다. Geranyl geraniol의 1번과 3번 isoprene units가 cyclization을 하여 형성된 xenicane골격은 해양 diterpenoids의 대표적 탄소 골격중의 하나이다. 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 시료의 조추출물에 대한 생리활성도 측정결과 P388과 brine shrimp test에서 우수한 생리활성효과를 나타내었으며 이들은 acalycixeniolide B(91K-4-1)와 91K-4-2에 기인한 것으로 추측된다.

결론적으로 본 연구에서는 우리 나라의 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.

3. 4. 실험 방법

3. 4. 1. 기기 및 시약

NMR측정은 500 MHz Varian Unity-500을 이용하였다. Proton NMR은 500MHz에서 carbon NMR은 125 MHz에서 측정하였다. Chemical shifts는 internal standards인 TMS(tetramethyl silane)나 $CDCl_3$ 를 이용하여 측정하였다. 모든 NMR 실험은 Varian사에서 공급한 Vnmr software를 이용하였으며 각각의 실험에 이용된 pulse width, transmitter power, delay 및 evolution time들은 기 측정된 값을 이용하였다. HPLC는 spectra-physics계의 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(1 cm x 25 cm), YMC C_{18} reversed phase semiprep column(1 x 25 cm)와 각각의 guard column cartridge(Aldrich)이었다. GC는 Hewlett Packard사의 HP 5890 model을 사용하였으며 GC column은 SP380을 사용하였다. Rotavapor는 Buchi RE-101과 121를 사용하였다. 유기물질의추출 및 분리에 이용한 모든 용매와 시약은 GR등급을 사용하거나 EP급을 재증류하여 사용하였다.

3. 4. 2. 91K-2로부터 천연물 추출 및 분리

3. 4. 2. 1 시료의 채집 및 유기물질의 추출과 flash chromatography

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 용달에서 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 유기조추출물의 양은 6.66 g이 얻어 졌다.

이 조추출물을 진공 flash chromatography로 분리하기 위해 n-hexane과 ethylacetate의 혼합액(10% ethylacetate/n-hexane으로부터 100% ethylacetate까지), methanol을 순서대로 용출시켰다. 이렇게 얻어진 11개의 분액(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/ -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. 2. 2. Sphingosine 유도체들의 분리

고속감압 크로마토그래피로 분리한 fx 6 - 9(n-hexane/EtOAc = 4:6 ~ 1:9)를 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 100% methanol을 사용하였으며 N-palmitoyl *erythro*-octadecasphinga-4(E),8(E), 10(E)-trienine (=91K-2-2), N-palmitoyl *erythro*-octadecasphinga-4(E),8(E)-dienine (=91K-2-1), N-palmitoyl 18-methyl-*erythro*-octadecasphinga-4(E), 8(E)-dienine (=91K-2-3), N-palmitoyl *erythro*-octadecasphinga-4(E)-enine (=91K-2-4)이 동일한 조건에서 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.

N-Palmityl *erythro*-Octadecasphinga-4(E),8(E)-dienine(=91K-2-1): mp. 82-83; $[\alpha]_D -8.0^{\circ}$ (c 0.5 CHCl₃); UV(CH₃CN) λ_{max} 203 nm(ϵ 7000); LREIMS: m/z(relative intensity) 250(14), 281(100), 298(40), 320(5), 352(4), 366(3), 486(3), 504(3), 517(5), 535(1); IR(KBr), 3400(-OH), 3300(-NH), 2960, 2920, 2854, 1627(C=O), 1470, 1053, 970, 725 cm⁻¹; ¹H NMR(CDCl₃, 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, 3.4, 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-18, H-16'); ¹³C NMR(CDCl₃, 125 MHz) δ 174.11(C), 133.38(CH), 131.26(CH), 129.09(CH), 128.95(CH), 74.26(CH), 62.29(CH₂), 54.54(CH), 36.80(CH₂), 32.58(CH₂), 32.34(CH₂), 32.14(CH₂), 31.90(CH₂), 31.88(CH₂), 29.68(CH₂) x 3, 29.66(CH₂), 29.64(CH₂) x 2, 29.58(CH₂) 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.

N-Palmityl *erythro*-Octadecasphinga-4(E),8(E),10(E)-trienine(=91K-2-2) : mp. 65-66; $[\alpha]_D -4.0^{\circ}$ (c 0.5 CHCl₃); UV(CH₃CN) λ_{max} 223 nm(ϵ 7500); LREIMS: m/z(relative intensity) 164(22), 179(32), 248(100), 281(31), 298(13), 320(6), 352(23), 515(19), 533(3); IR(KBr), 3390(-OH), 3290(-NH), 2920, 2852, 1625(C=O), 1570, 1470, 1380, 1260, 1110, 1080, 1050, 988, 728 cm⁻¹; ¹H NMR(CDCl₃, 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-18, -16'); ^{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).

N-Palmityl *erythro*-octadecasphinga-4(E),8(E)-dienine(=91K-2-3): mp. 76-77; $[\alpha]_D -6.0^\circ$ (c 0.5 CHCl_3); LREIMS: m/z(relative intensity) 250(38), 281(100), 298(38), 320(13), 332(8), 352(5), 500(4), 516(3), 531(4), 549(0.3); IR(KBr), 3402(-OH), 3302(-NH), 2922, 2854, 1628(C=O), 1576, 1468, 1054, 975, 730 cm^{-1} ; ^1H NMR(CDCl_3 , 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, 15.4, 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), 2.82(2H, brs, OH), 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-16'), 0.86(6H, d, 6.8, H-18); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125 MHz) δ 173.94(C), 133.49(CH), 131.31(CH), 129.11(CH), 128.93(CH), 74.61(CH), 62.44(CH_2), 54.41(CH), 39.04(CH_2), 36.84(CH_2), 32.60(CH_2), 32.33(CH_2), 32.13(CH_2), 31.93(CH_2), 29.90(CH_2), 29.70(CH_2)x3, 29.67(CH_2)x2, 29.65(CH_2)x2, 29.60(CH_2), 29.57(CH_2), 29.52(CH_2), 29.37(CH_2)x2, 29.29(CH_2), 29.22(CH_2), 27.97(CH), 27.41(CH_2), 25.77(CH_2), 22.70(CH_3), 22.67(CH_3), 14.14(CH_3).

N-Palmityl *erythro*-octadecasphinga-4(E)-enine(=91K-2-4): mp. 88-89; $[\alpha]_D$

-6.0^o(c 0.5 CHCl₃); LREIMS: m/z(relative intensity) 250(25), 281(100), 298(35), 312(5), 488(4), 500(2), 506(4), 519(2), 537(0.2); IR(KBr), 3360(-OH), 3300(-NH), 2920, 2853, 1640(C=O), 1550, 1470, 1094, 1075, 1043, 972, 730 cm⁻¹; 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), 31.92(CH₂) x 2, 29.70(CH₂) x 3, 29.69(CH₂) x 3, 29.66(CH₂) x 3, 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. 2. 3. 91K-2-5(=N-Palmityl *erythro*-octadecasphinga-4(E),8(E)-dienine acetone ketal)의 합성

N-Palmityl *erythro*-octadecasphinga-4(E),8(E)-dienine(91K-2-1,3,4 mg), PPTS (3.2 mg), 2,2-dimethoxypropane(0.5 ml)를 아세톤 20 ml에 녹이고 8시간 동안 환류시킨 후에 Et₃N 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.

¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 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. 2. 4. Sphingosine 유도체들의 가수분해

3. 4. 2. 4. 1. Enzyme에 의한 91K-2-1의 가수분해

91K-2-1(1 mg), cholesterol esterase(1 unit), 50 mM pH 7.5의 tris-buffer (0.5 ml)를 methanol 0.1 ml에 녹이고 37 °C에서 하루밤 동안 방치한 후에 hexane 으로 추출하였다. 용매를 진공증발기로 제거한 후에 남은 잔류물에 5% methanolic HCl 용액을 가하여 1시간 정도 저어 주면 가수분해된 지방산의 ester가 형성된다. 이 반응물을 hexane으로 추출하여 용매를 제거한 후에 남은 물질을 GC로 분석하였다. 여러 가지 fatty acid methyl ester를 standard로 이용하였으며 그 결과 methyl palmitate와 동일한 peak가 major peak로 GC spectrum상에서 확인이 되었다.

3. 4. 2. 4. 2. 황산에 의한 91K-2-3의 가수분해

91K-2-3(2 mg)을 methanol 8 ml에 녹이고 2M 황산 2 ml를 가한 후에 6시간 동안 환류하였다. 이 반응혼합물을 실온으로 식히고 포화된 NaCl 용액을 넣고 hexane으로 추출하였다. 추출용액을 anhydrous magnesium sulfate로 건조시키고 magnesium sulfate를 여과하였으며 용매를 제거한 후에 silica HPLC(15% EtOAc/hexane, retention time 8 min, 2 ml/min)로 major peak를 분리하여 methyl palmitate 1 mg을 얻었다. 이 물질의 동정은 역시 GC(SP 380 column, flow rate

50 ml/min, injector temp. 250, oven temp. 195, Fid detector temp. 260, carrier gas N₂)에 의하여 이루어 졌으며 peak retention time은 3.5 min이었다. 또 위 반응의 잔류물을 normal phased silica HPLC로 분리하여 methyl palmitate로 생각되는 물질 1 mg을 얻었으며. 이 물질의 ¹H NMR spectrum을 측정한 결과 authentic methyl palmitate와 동일하였으며 mass spectrum의 결과도 methyl palmitate의 molecular ion에 해당하는 m/z 270 peak가 얻어 졌다.

3. 4. 2. 5. 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 측정한 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 25.5분에서 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-4 α), 1.99(1H, m, H-2 α), 1.87-1.96(3H, m, H-9, -20, -24), 1.70-1.77(3H, m, H-1 α , -12, -14), 1.72(3H, s, OAc), 1.69(3H, s, OAc), 1.66(1H, m, H-4 β), 1.59(1H, m, H-16), 1.48(1H, m, H-25), 1.26-1.39(5H, m, H-2 β , -11, -15), 1.12-1.19(2H, m, H-1 β , -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); ^{13}C NMR(C_6D_6 , 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(CH_2 , C-12), 36.19(CH_2 , C-4), 33.55(CH, C-25), 32.18(CH_2 , C-1), 27.96(CH_2 , C-16), 27.41(CH_2 , C-2), 22.09(CH_2 , C-15), 21.32(CH_3 , C-21), 21.29(CH_2 , C-11), 20.98(CH_3 , OAc), 20.37(CH_3 , OAc), 20.36(CH_3 , C-26/-27), 19.88(CH_3 , C-26/-27), 18.90(CH_3 , C-19), 18.20(CH_3 , C-28), 12.61(CH_3 , C-18); ^1H NMR(CDCl_3 , 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(CH₃).

3,6-Diacetoxy-7,8-epoxy-5-hydroxycholestane(=91k-2-7): ¹H NMR(C₆D₆, 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); ¹³C NMR (C₆D₆, 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(CH₂, C-24), 38.24(CH₂, C-12), 36.32(CH₂, C-22), 36.29(CH, C-20), 36.16(CH₂, C-4), 32.17(CH₂, C-1), 28.38(CH, C-25), 27.46(CH₂, C-16), 27.40(CH₂, C-2), 24.28(CH₂, C-23), 23.00(CH₃, C-26/-27), 22.74(CH₃, C-27/-26), 22.08(CH₂, C-15), 21.28(CH₂, C-11), 20.98(OAc), 20.37(OAc), 19.00(CH₃, C-21), 18.89(CH₃, C-19), 12.43(CH₃, C-18).

3. 4. 3. 91K-4로부터 천연물 추출 및 분리

3. 4. 3. 1. 시료의 채집 및 유기물질의 추출과 flash chromatography

산호 *Acalycigorgia inermis*(시료번호: 91K-4)의 채집은 1991년 10월 거문도 연안 서도와 대삼부도 근해 수심 25-30 m에서 SCUBA 다이빙에 의해서 이루어 졌 으며 이 시료는 채집해 오는 즉시 웅달에서 완전히 말려 냉동고에 보관되었다. 냉 동보관중인 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 유기조추출물의 양은 15.14 g이 얻어 졌다.

이 조추출물을 진공 flash chromatography로 분리하기 위해 n-hexane과 ethylacetate의 혼합액(100% 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-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. 3. 2. 91K-4-1(=acalcixeniolide 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). Acalcixeniolide 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(CH₂, C-6), 35.55(CH₂, C-10), 30.18(CH₂, C-5), 26.25(CH₂, C-12), 25.86(CH₂, C-13), 24.99(CH₂, C-9), 16.46(CH₃, C-17).

91K-4-2도 acalycixeniolide B와 동일한 조건하에서 15 mg이 분리되었으며 HPLC의 peak retention time은 7% ethylacetate/ hexane에서 21.5분, 10% ethylacetate/hexane에서 16분에서 분리되었다. 이 물질의 분광 데이터는 다음과 같다. ¹H NMR(CDCl₃, 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); ¹³C NMR(CDCl₃, 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(CH₂, C-18), 70.57(CH₂, C-1), 49.76(CH, C-11a), 44.64(CH, C-4), 41.13(CH, C-4a), 39.88(CH₂, C-6), 35.54(CH₂, C-10), 30.08(CH₂, C-5), 26.91(CH₂, C-12), 25.75(CH₃, C-16), 25.33(CH₂, C-13), 24.98(CH₂, C-9), 17.87(CH₃, C-19), 16.3(CH₃, C-17).

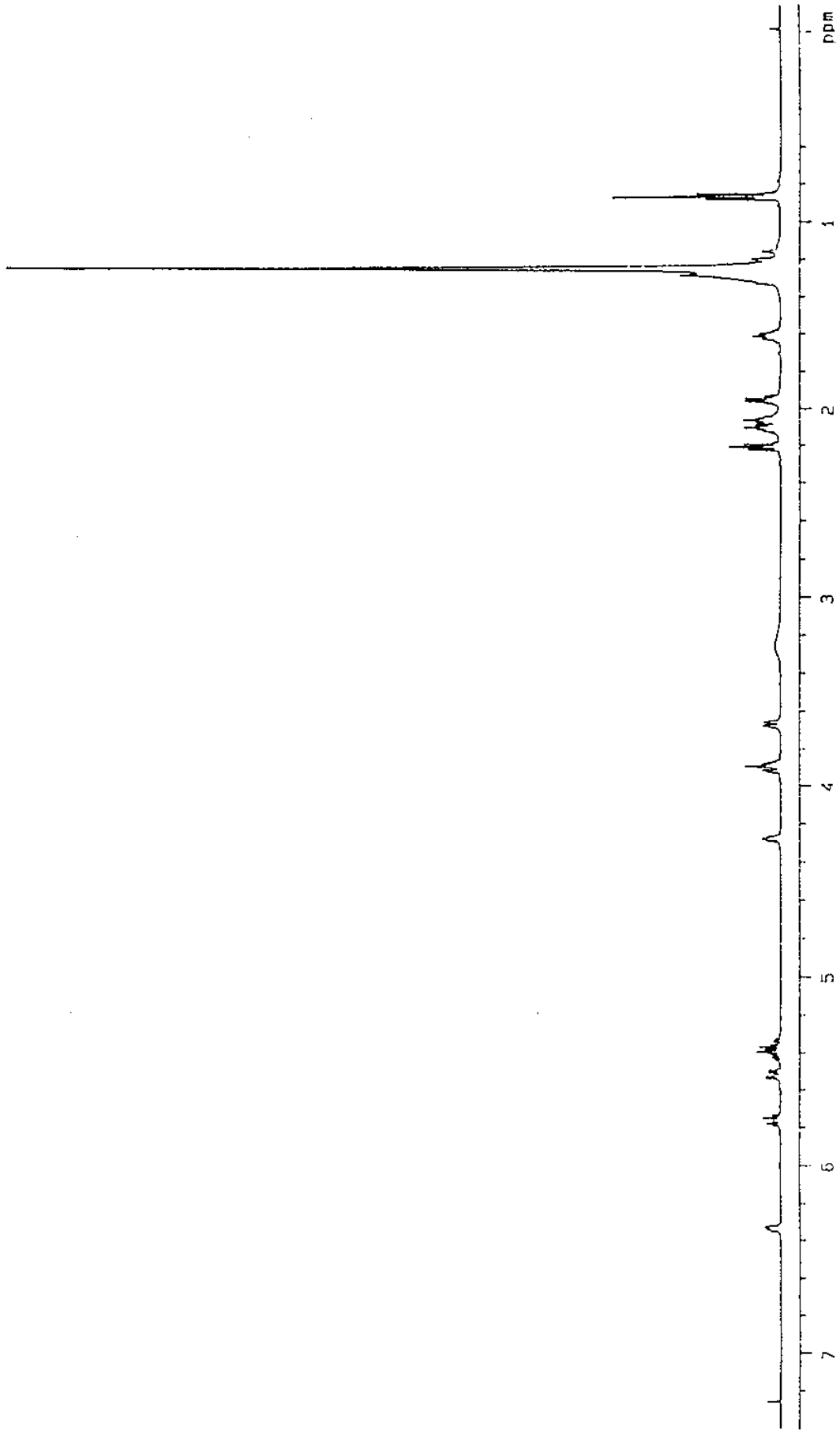


Fig. 3-9. Proton NMR spectrum of compound 91K-2-1.

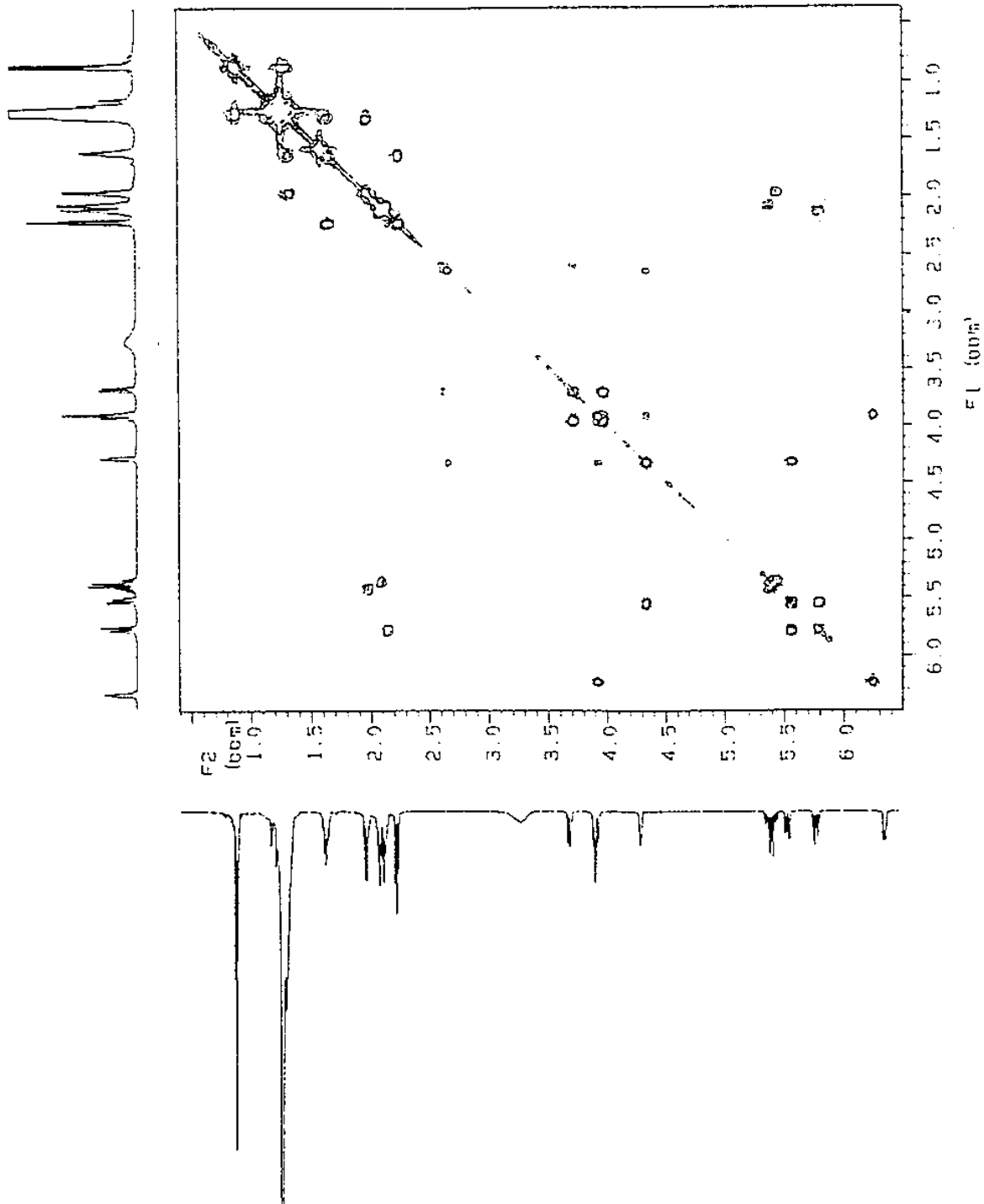


Fig. 3-11. Proton COSY spectrum of compound 91K-2-1.

Mattson Instruments FTIR

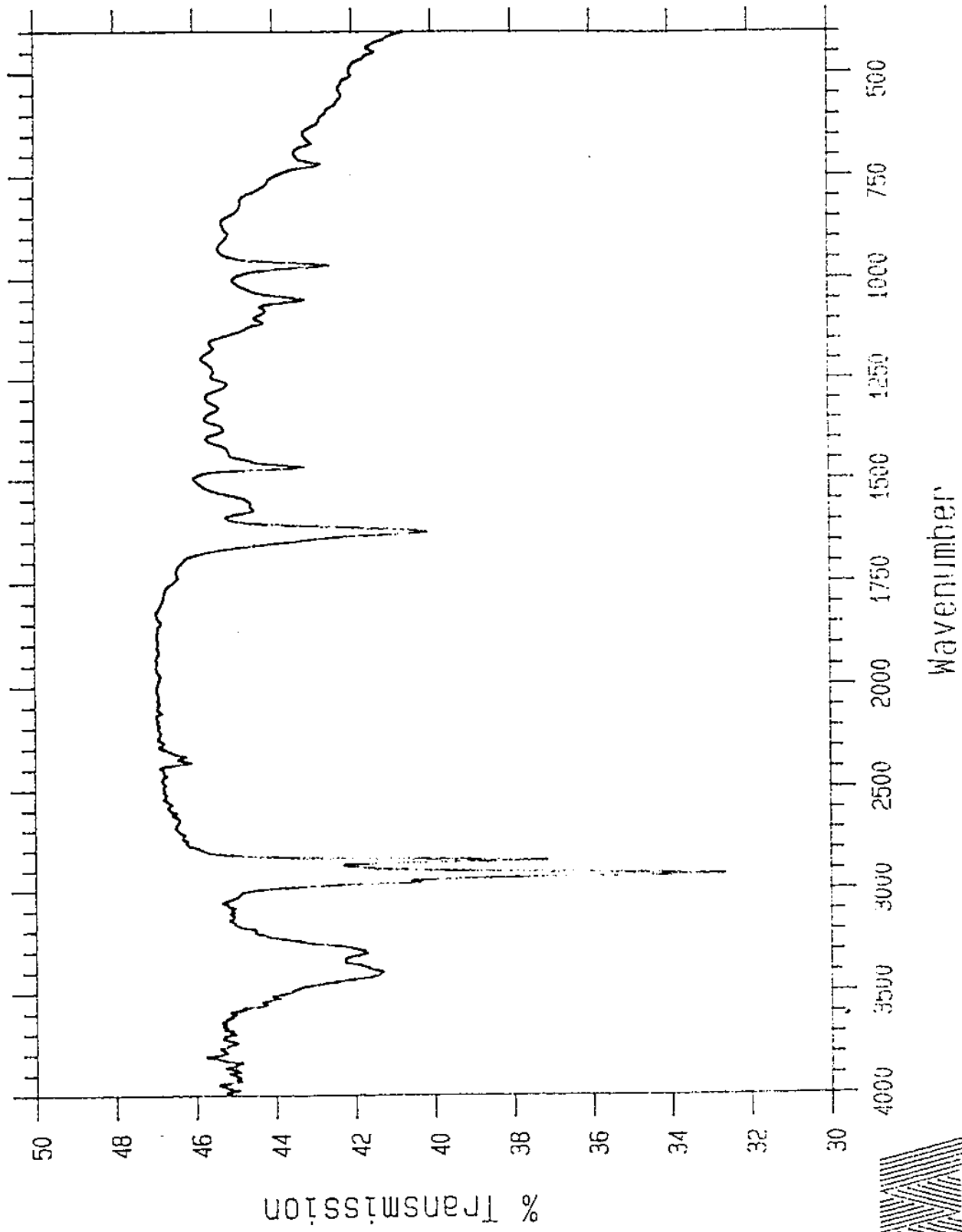


Fig. 3-12. IR spectrum of compound 91K-2-1.

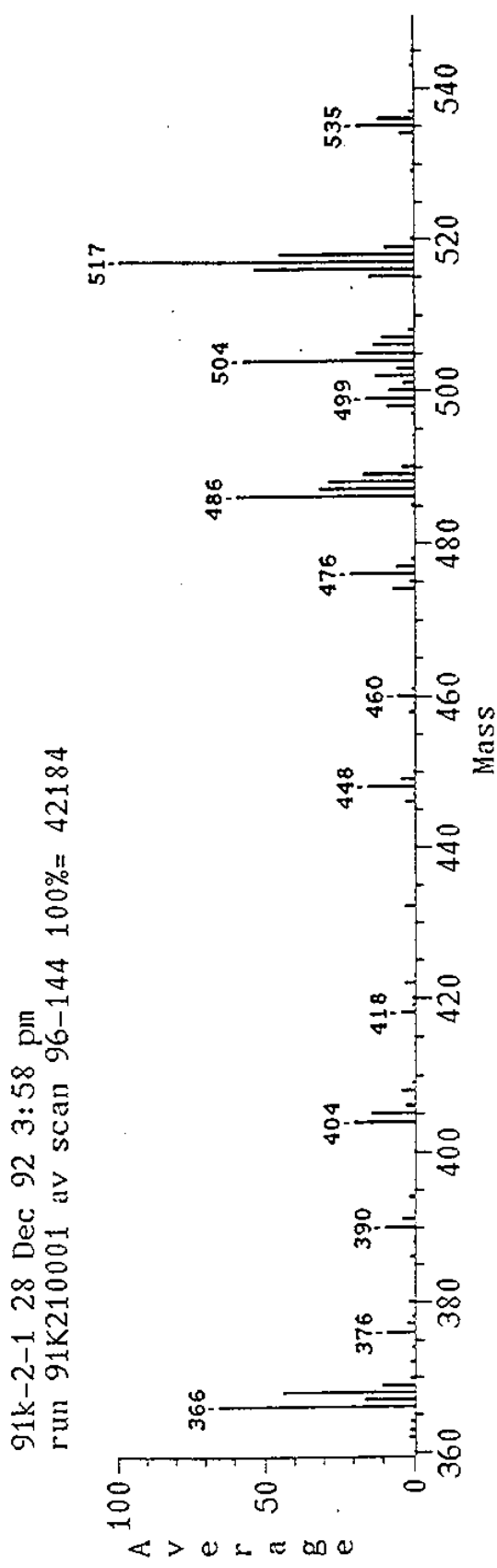
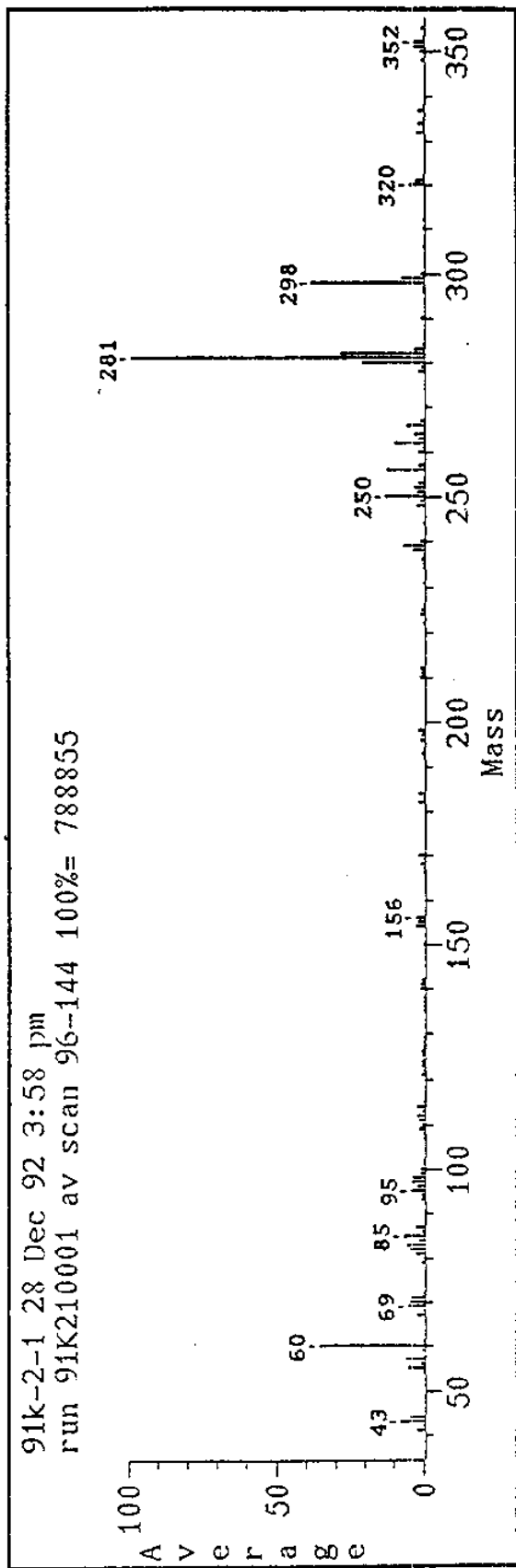


Fig. 3-13. Low-resolution EIMS spectrum of compound 91K-2-1.

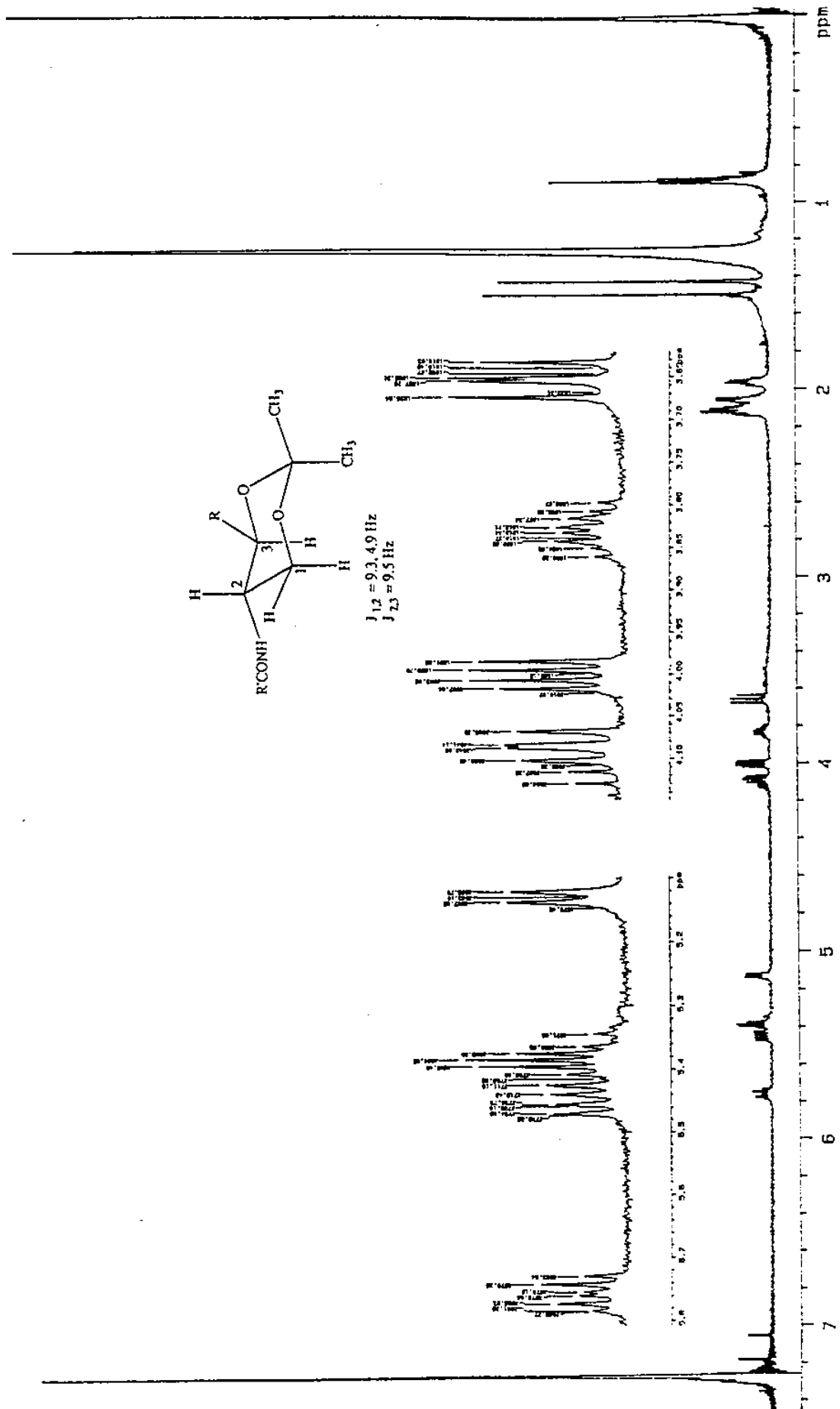


Fig. 3-14. Proton NMR spectrum of compound 91K-2-5.

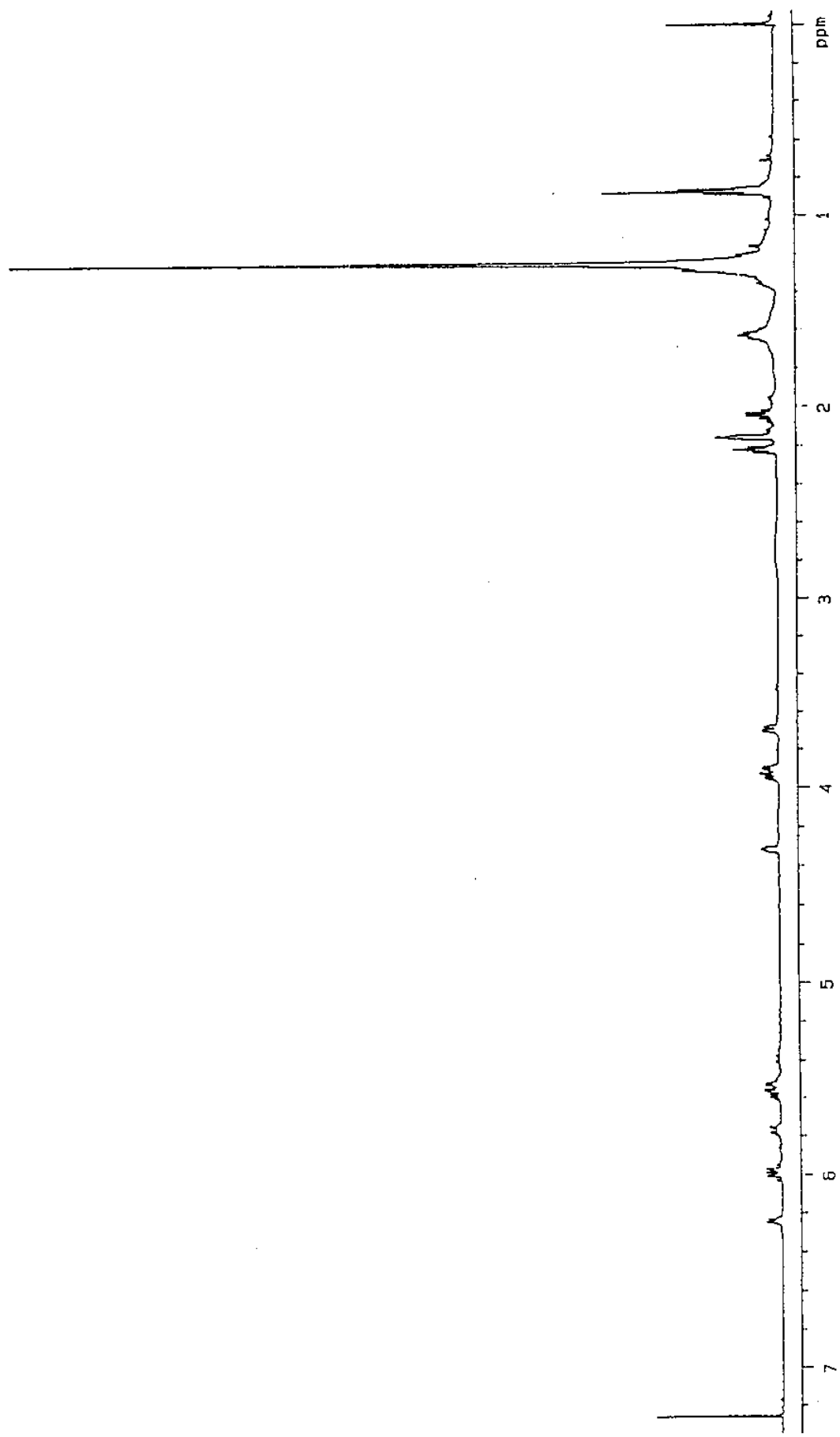


Fig. 3-15. Proton NMR spectrum of compound 91K-2-2.

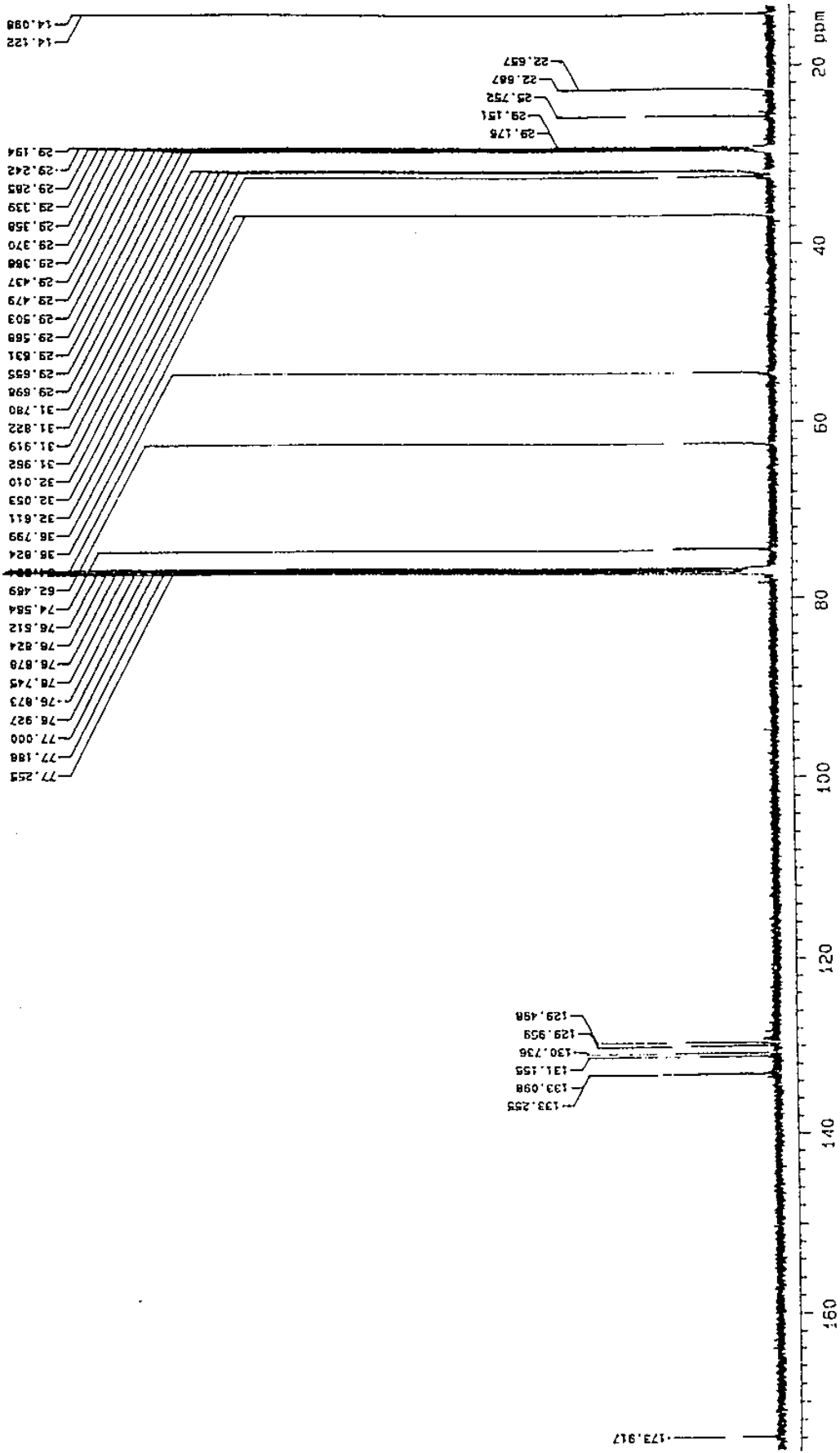


Fig. 3-16. Carbon NMR spectrum of compound 91K-2-2.

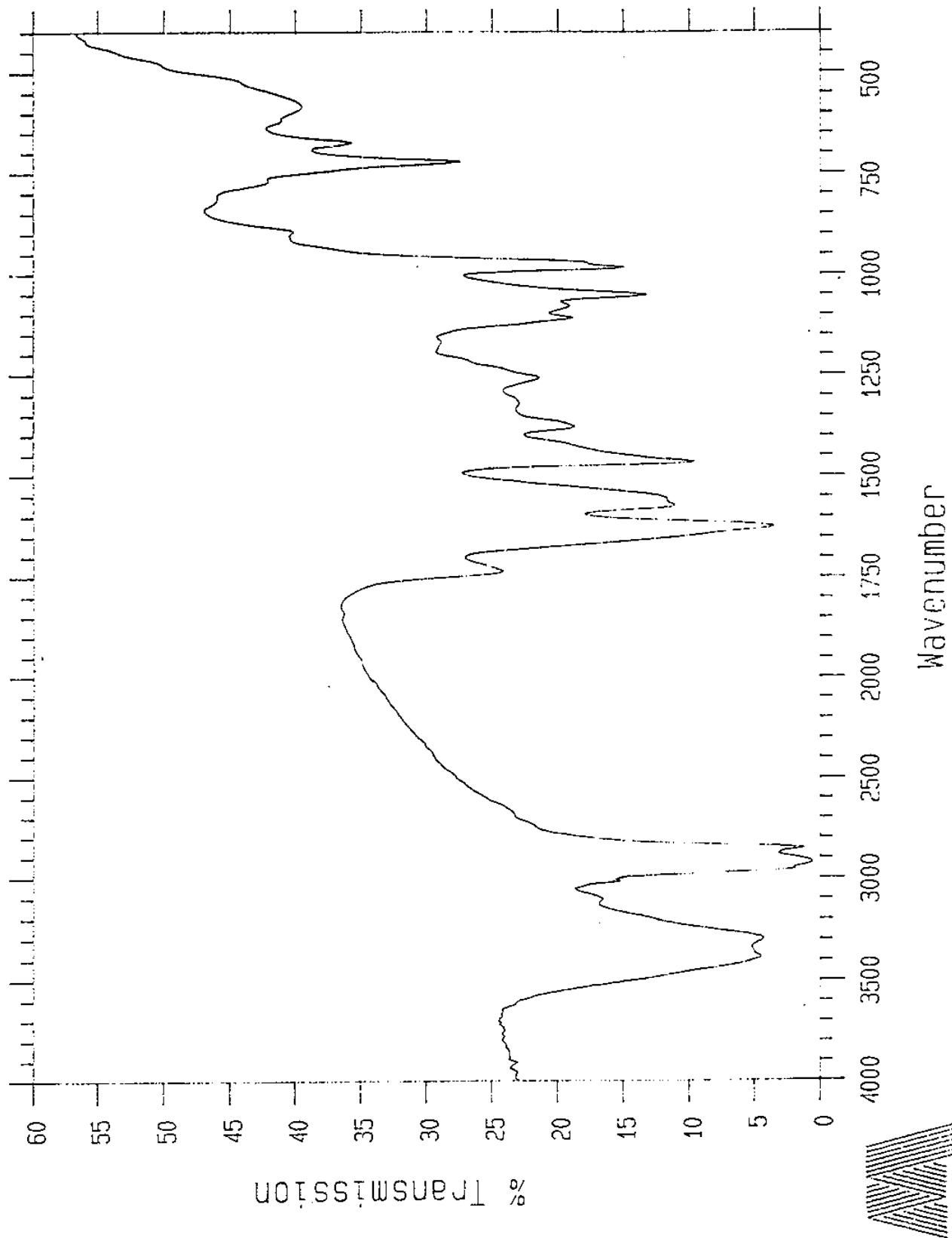


Fig. 3-17. IR spectrum of compound 91K-2-2.

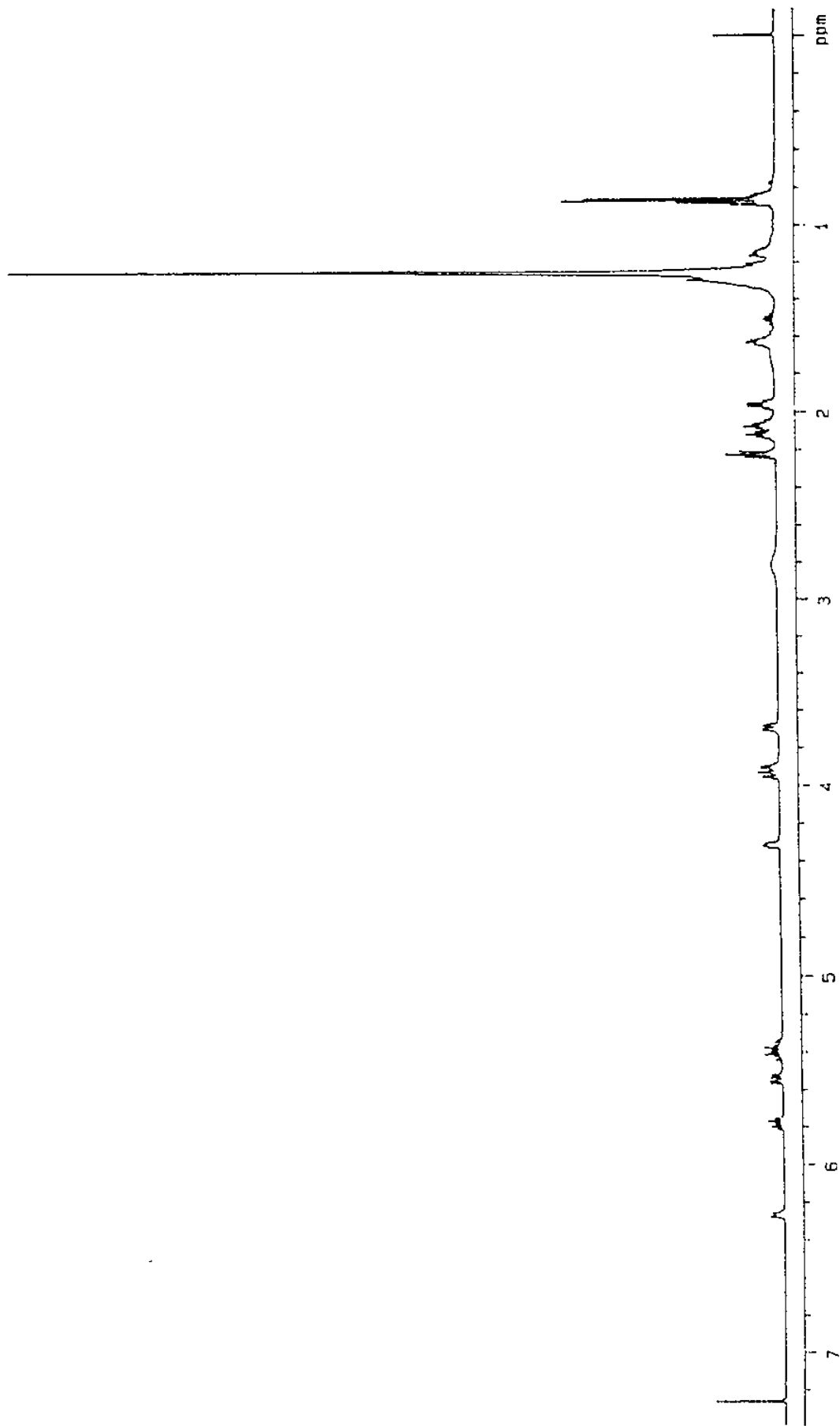


Fig. 3-18. Proton NMR spectrum of compound 91K-2-3.

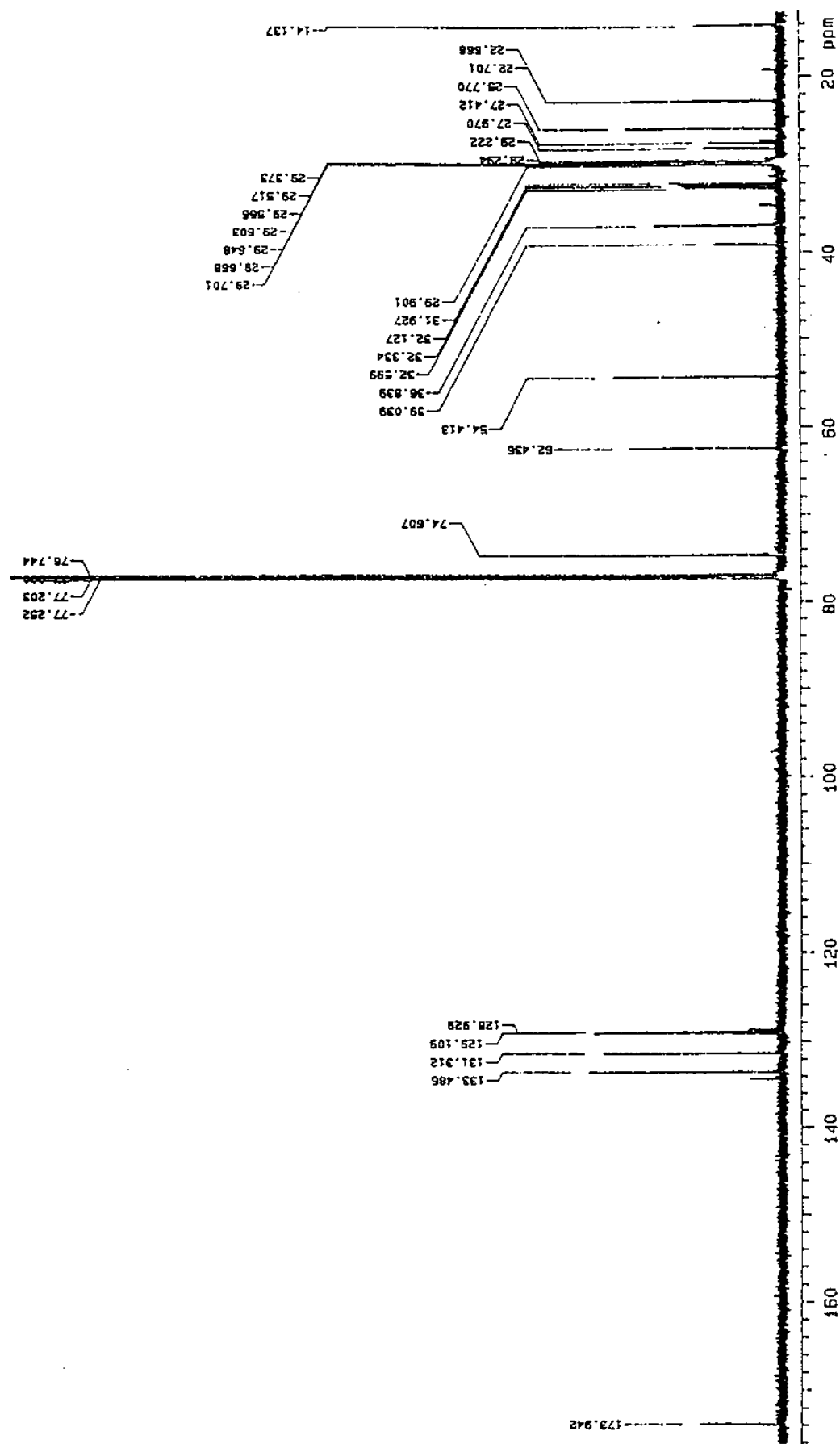


Fig. 3-19. Carbon NMR spectrum of compound 91K-2-3.

Mattson Instruments FTIR

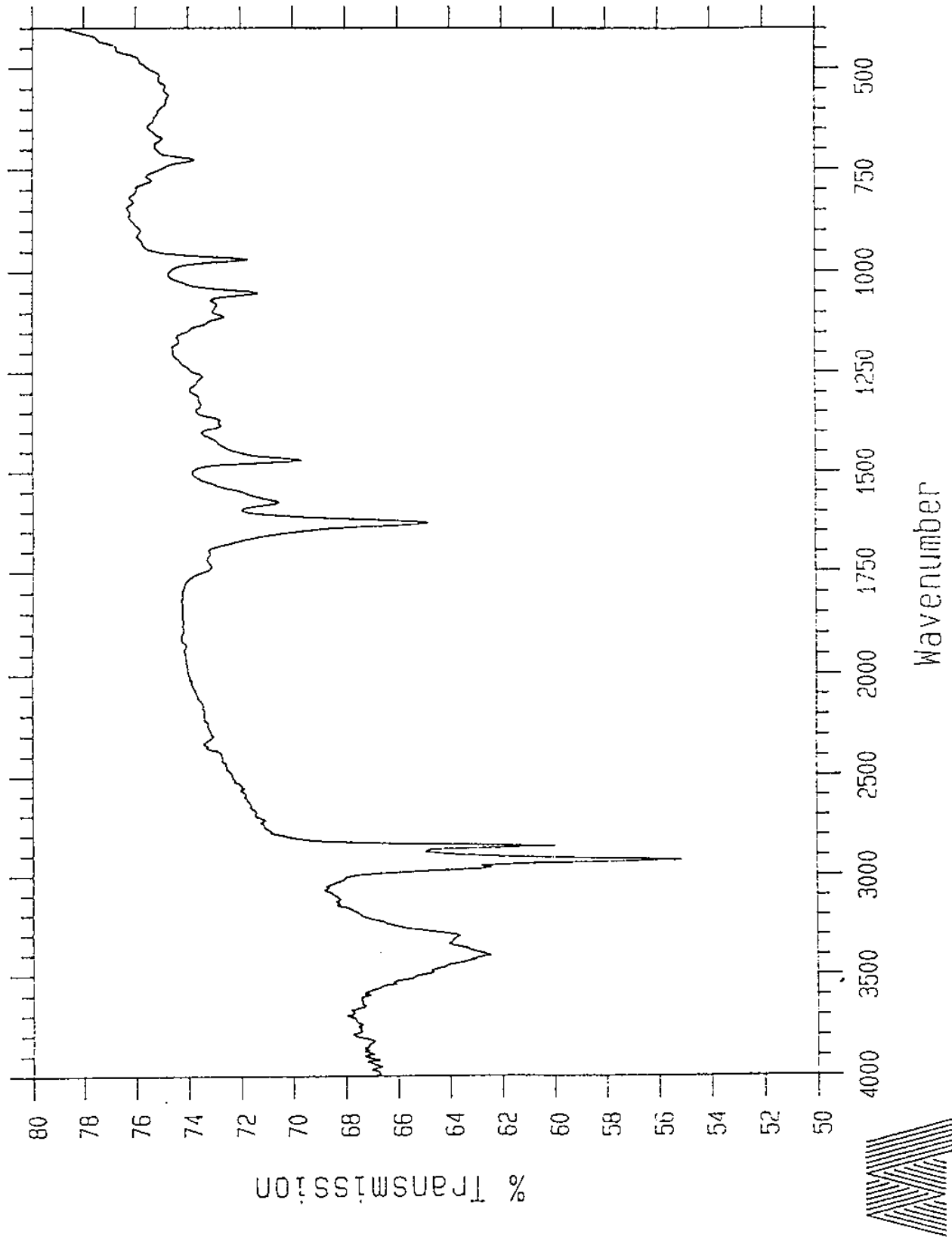


Fig. 3-20. IR spectrum of compound 91K-2-3.

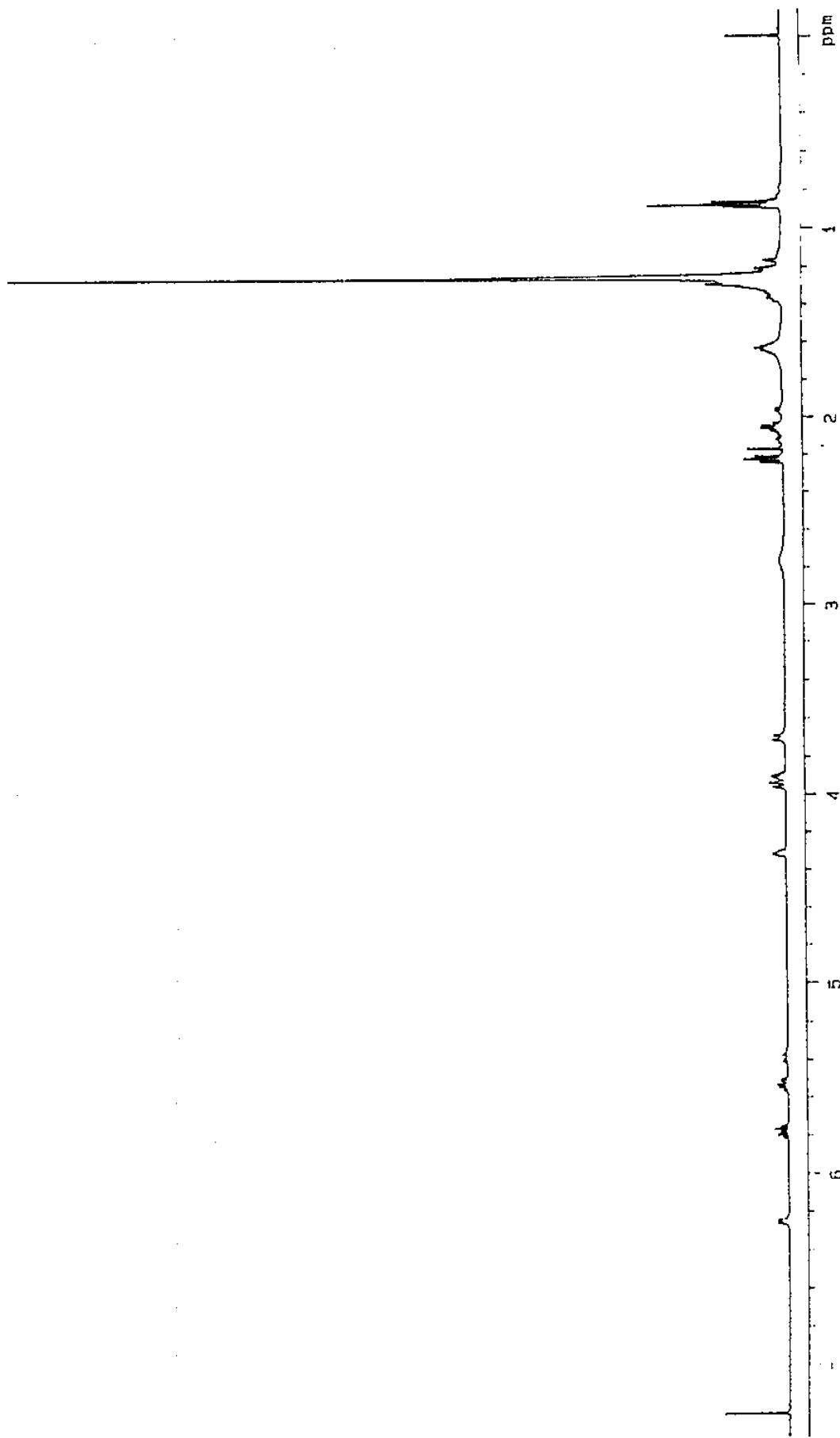


Fig. 3-21. Proton NMR spectrum of compound 91K-2-4.

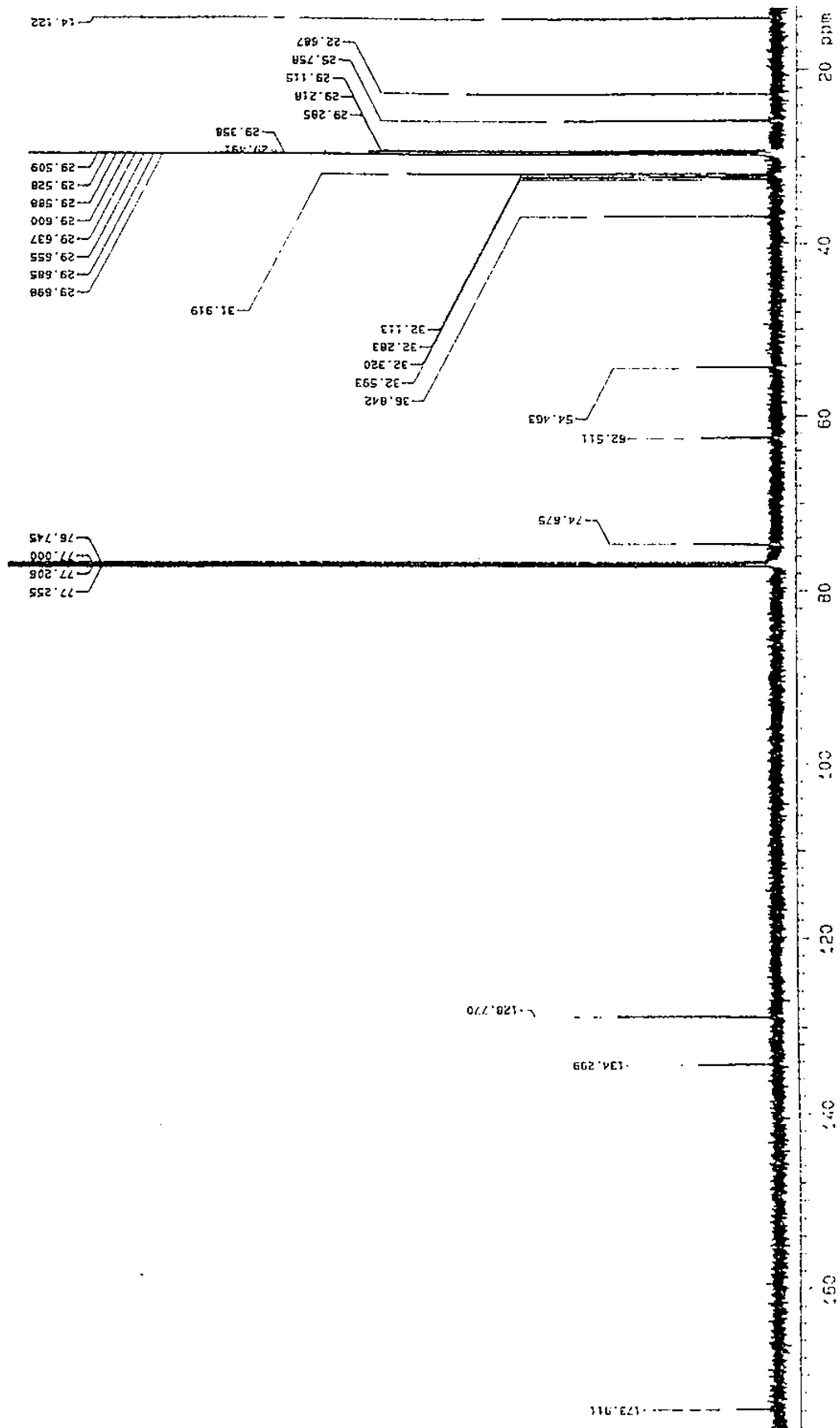


Fig. 3-22. Carbon NMR spectrum of compound 91K-2-4.

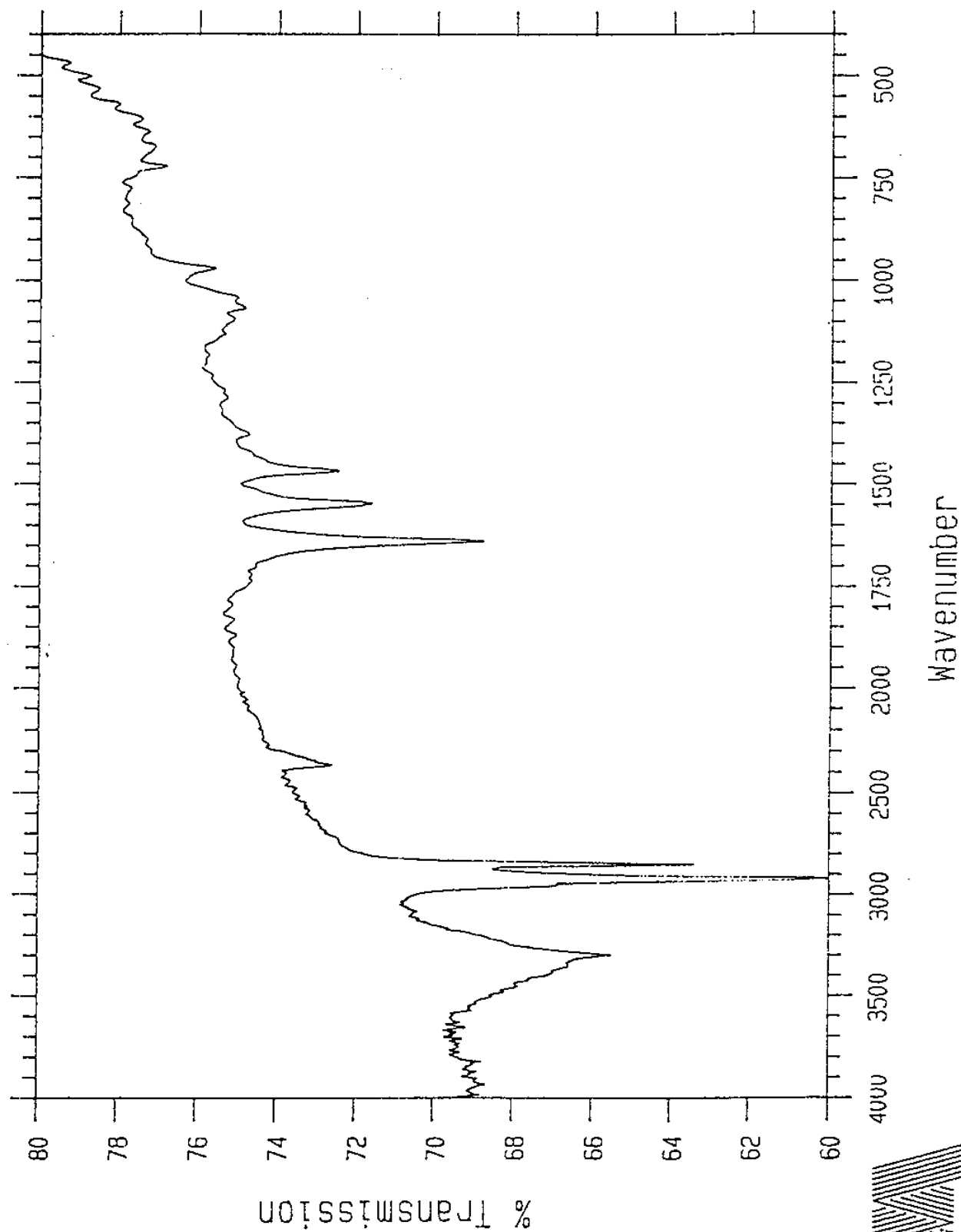


Fig. 3-23. IR spectrum of compound 91K-2-4.

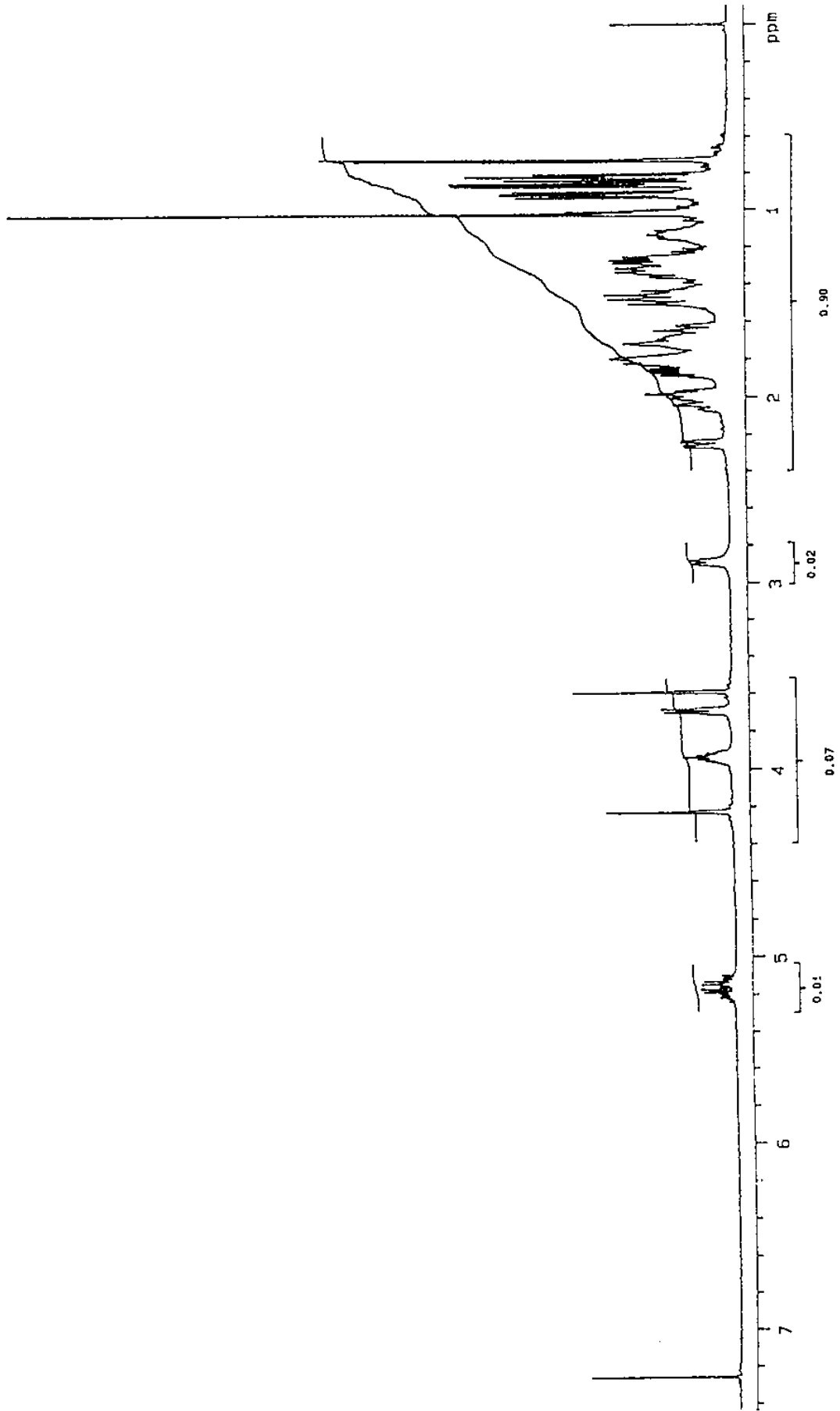


Fig. 3-24. Proton NMR spectrum of mixture of polyhydroxy steroids isolated from the gorgonian *Acabaria undulata*.

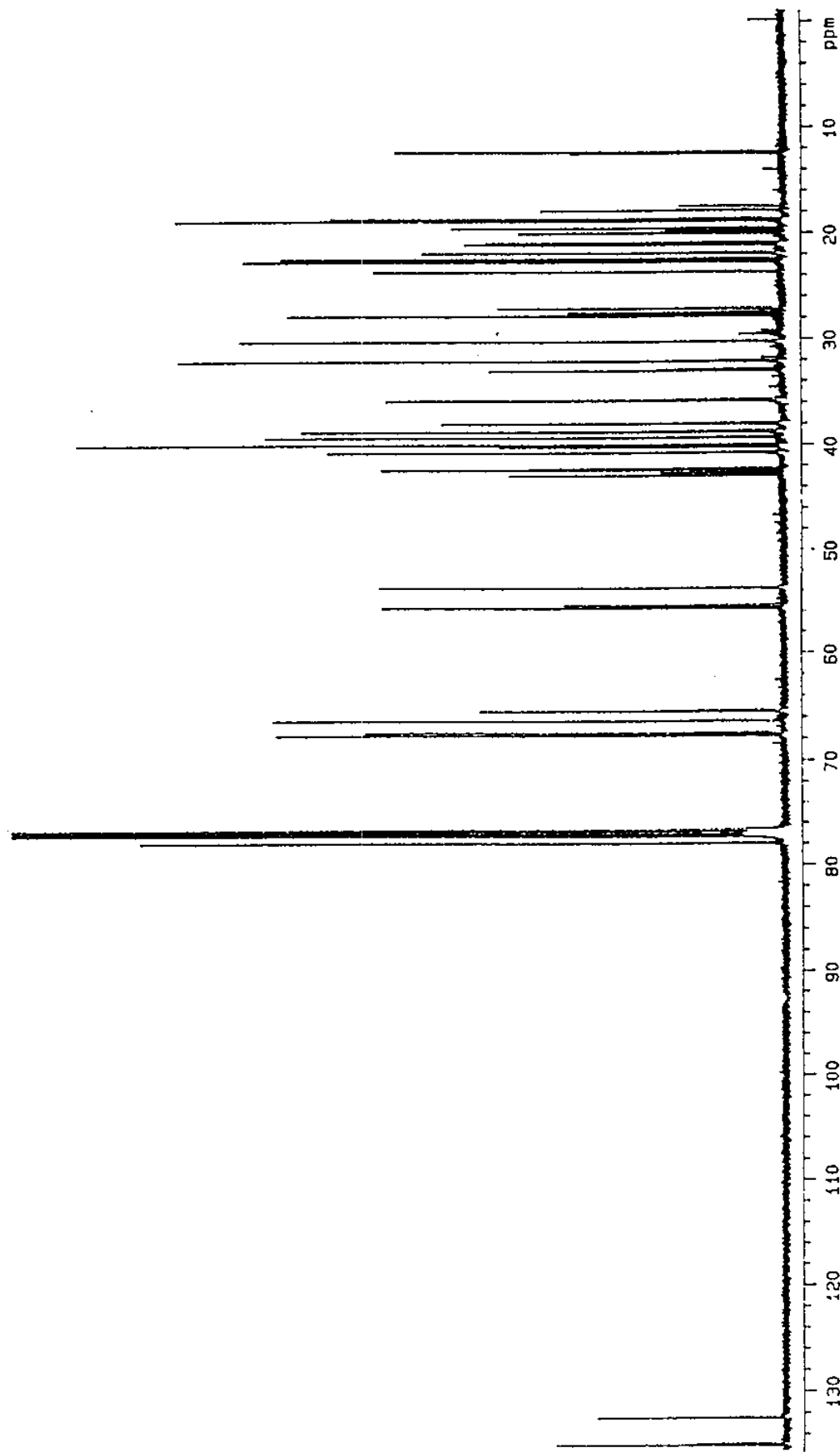


Fig. 3-25. Carbon NMR spectrum of mixture of polyhydroxy steroids isolated from the gorgonian *Acabaria undulata*.

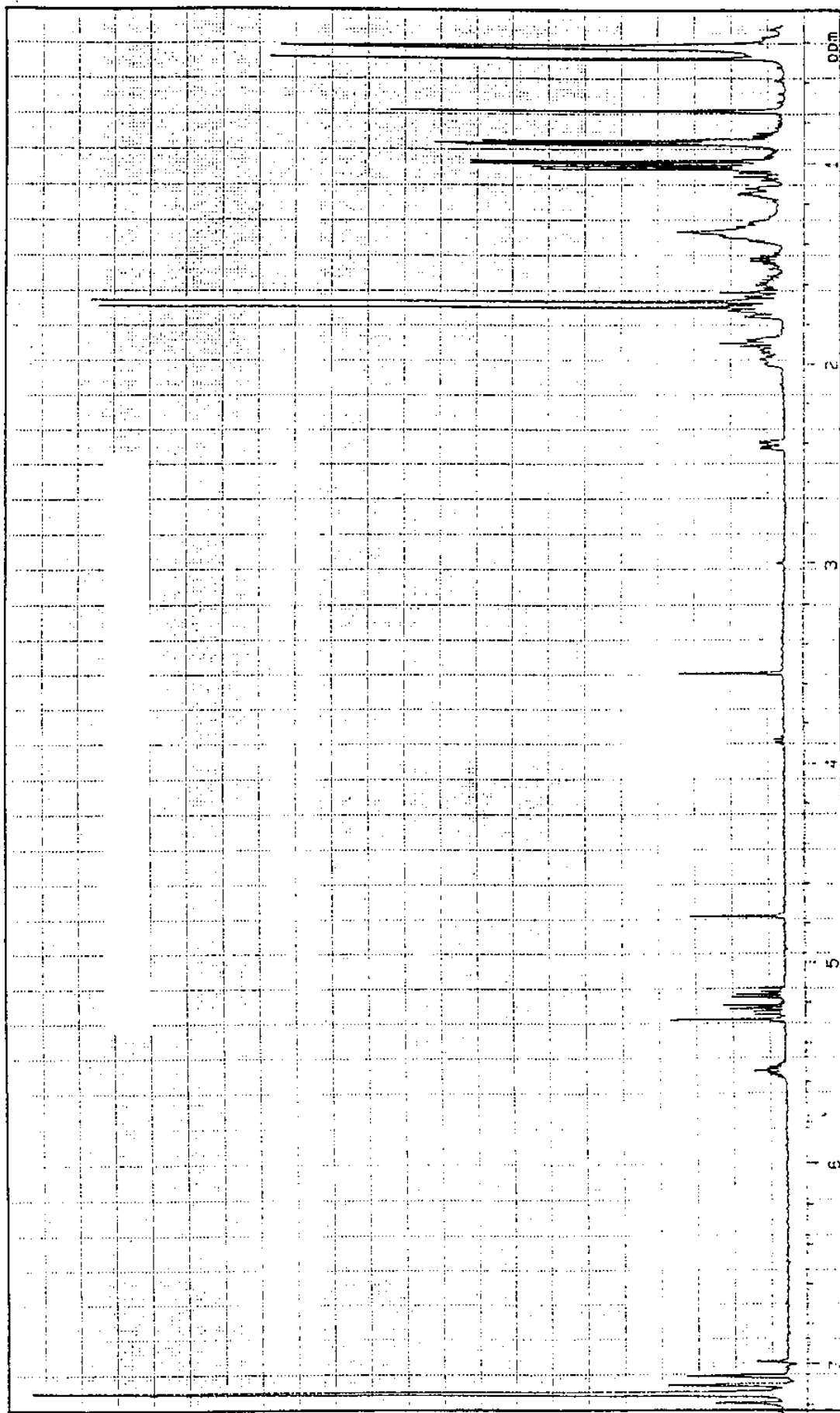
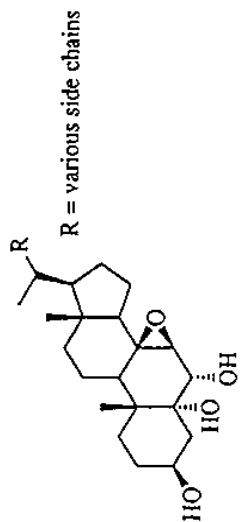


Fig. 3-26. Proton NMR spectrum of compound 91K-2-6.

$^1J_{CH}$ measurement for mixture of polyhydroxysteroids



secondary alcohol
($^1J_{CH} = 143.44$ Hz)

epoxide
($^1J_{CH} = 176.25$ Hz)

secondary alcohol
($^1J_{CH} = 143.44$ Hz)

tertiary alcohol
($^1J_{CH} = 0$ Hz)

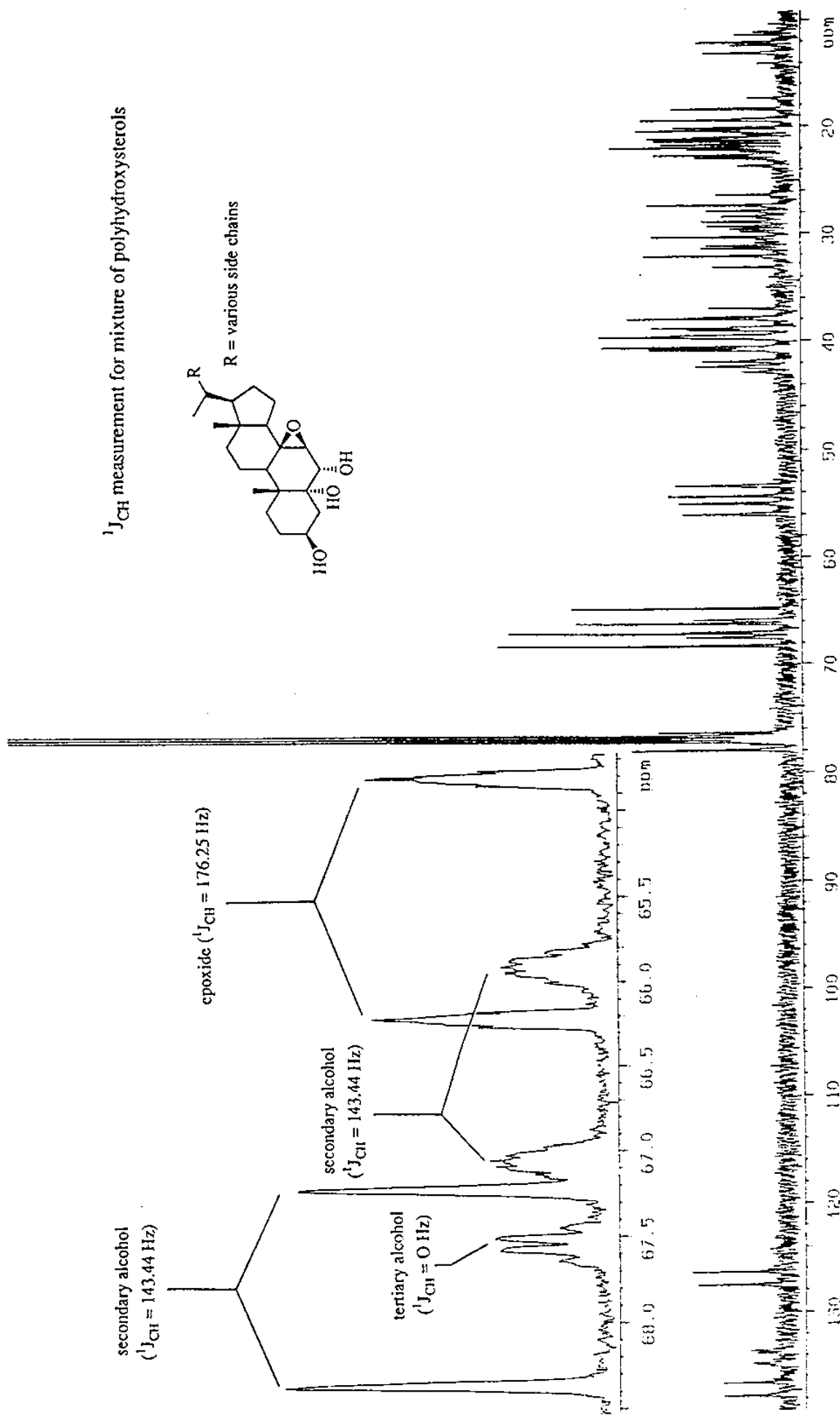


Fig. 3-28. Proton coupled carbon NMR spectrum of polyhydroxy steroids.

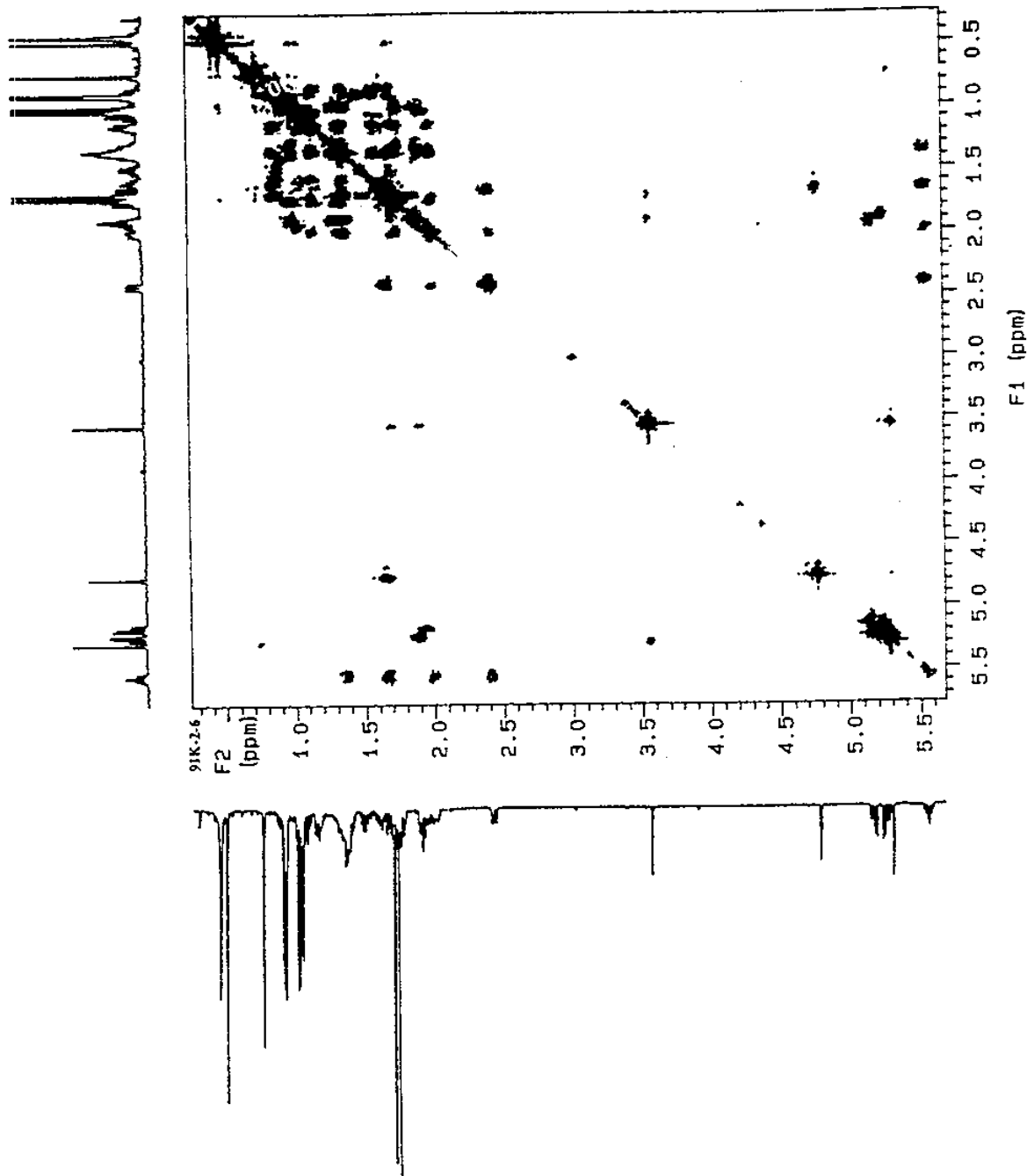


Fig. 3-29. Proton COSY NMR spectrum of compound 91K-2-6.

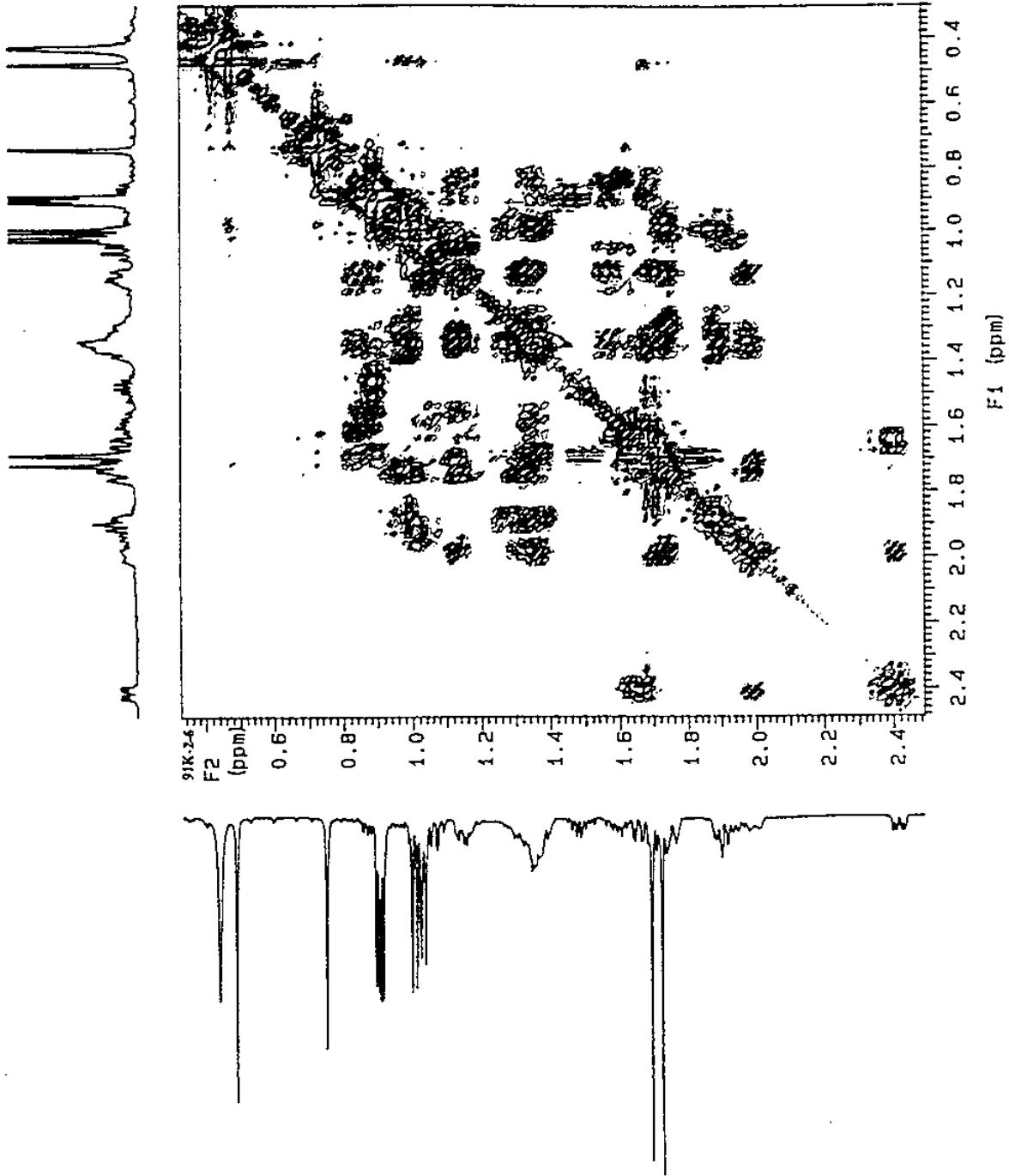


Fig. 3-29. continued.

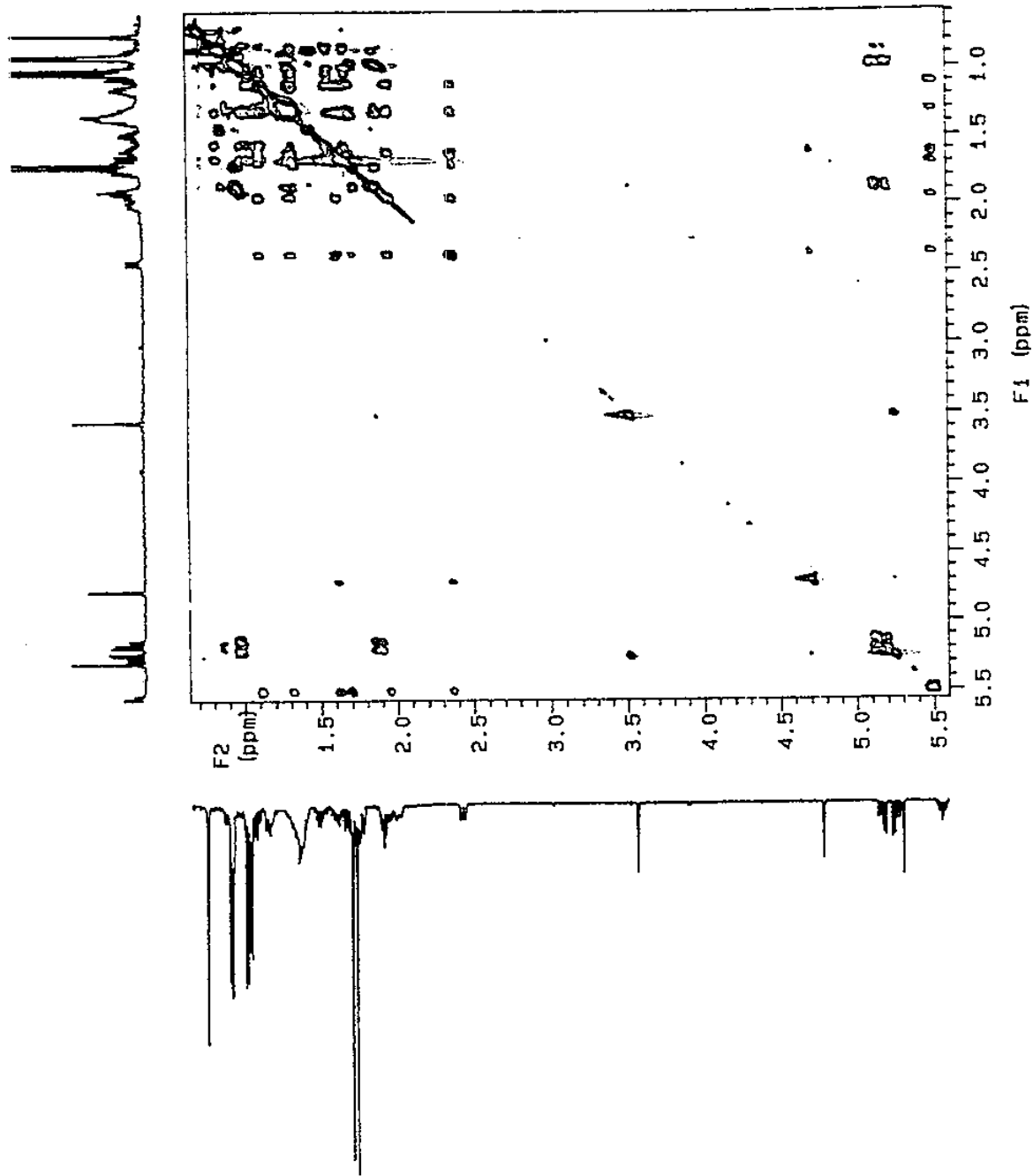


Fig. 3-30. TOCSY spectrum of compound 91K-2-6.

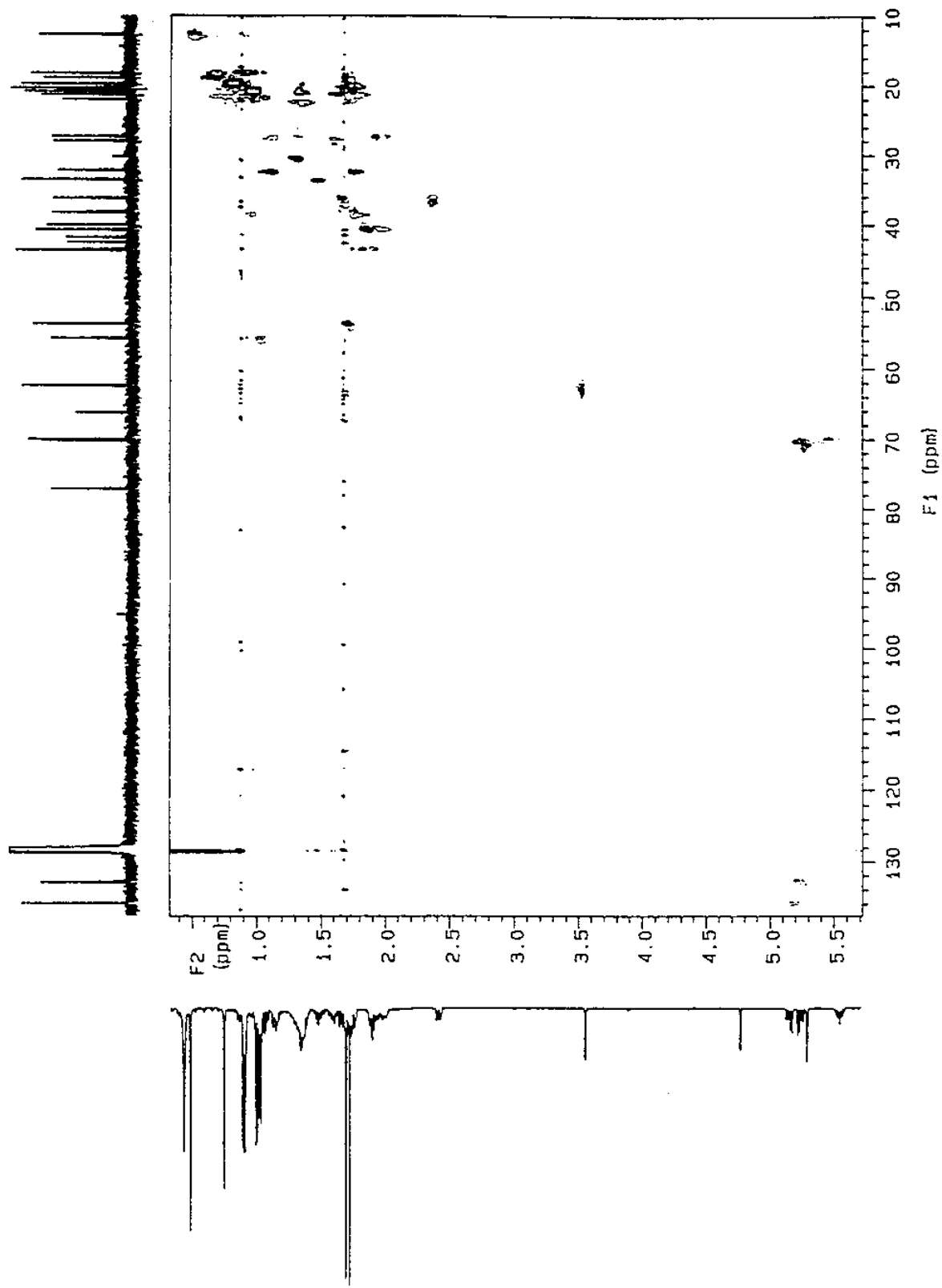


Fig. 3-31. HMQC spectrum of compound 9IK-2-6.

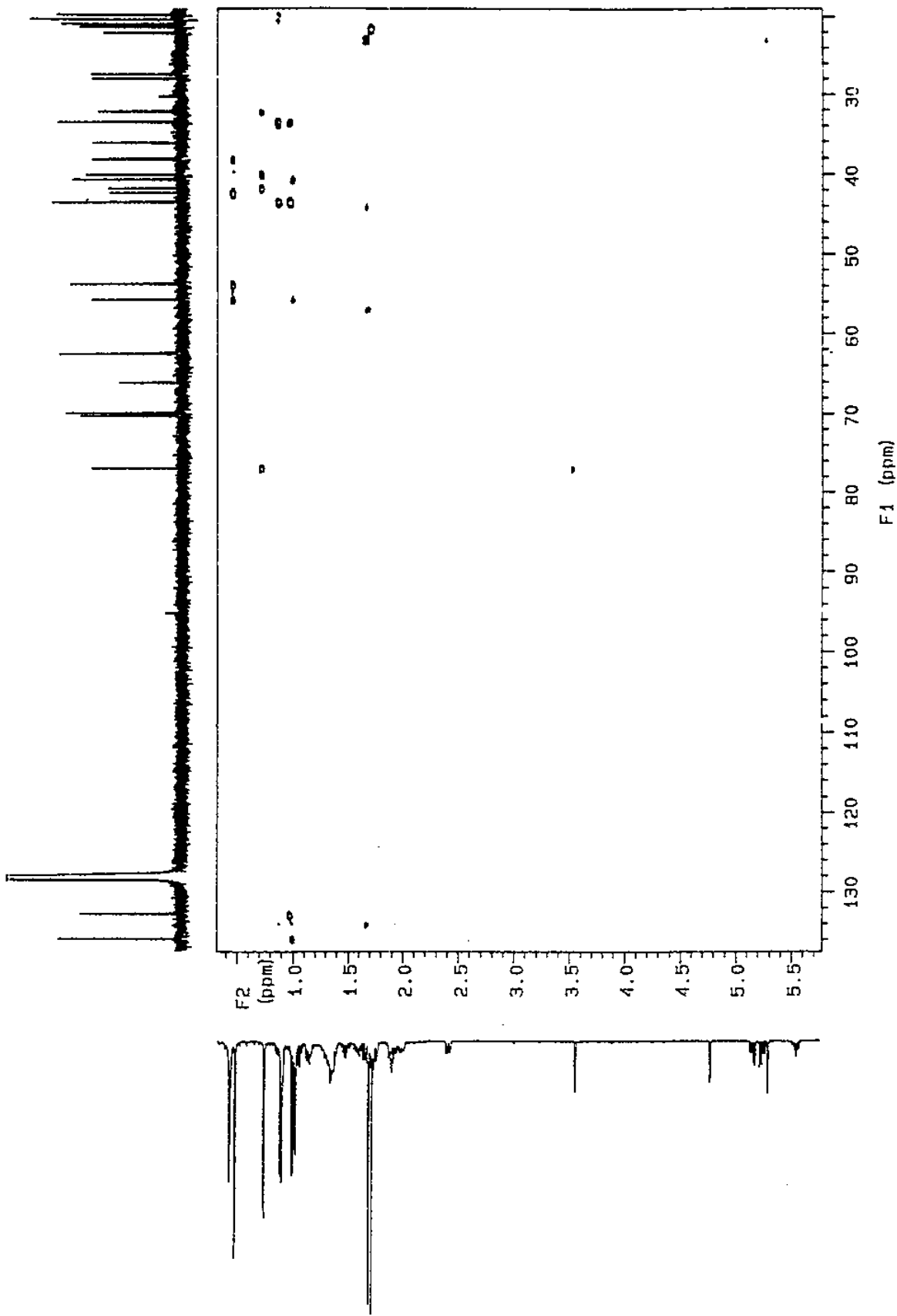


Fig. 3-32. HMBC spectrum of compound 91K-2-6.

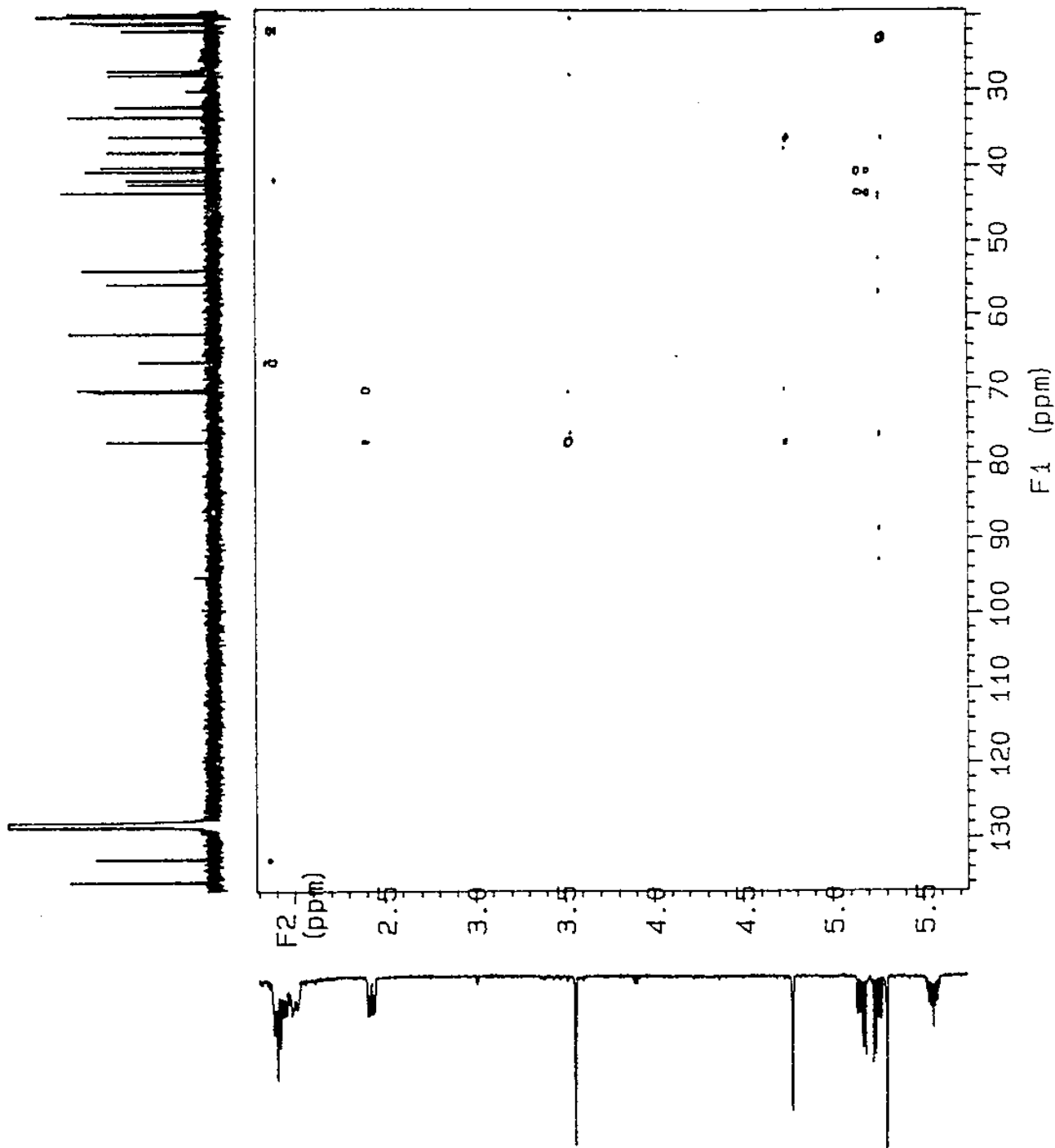


Fig. 3-32. continued.

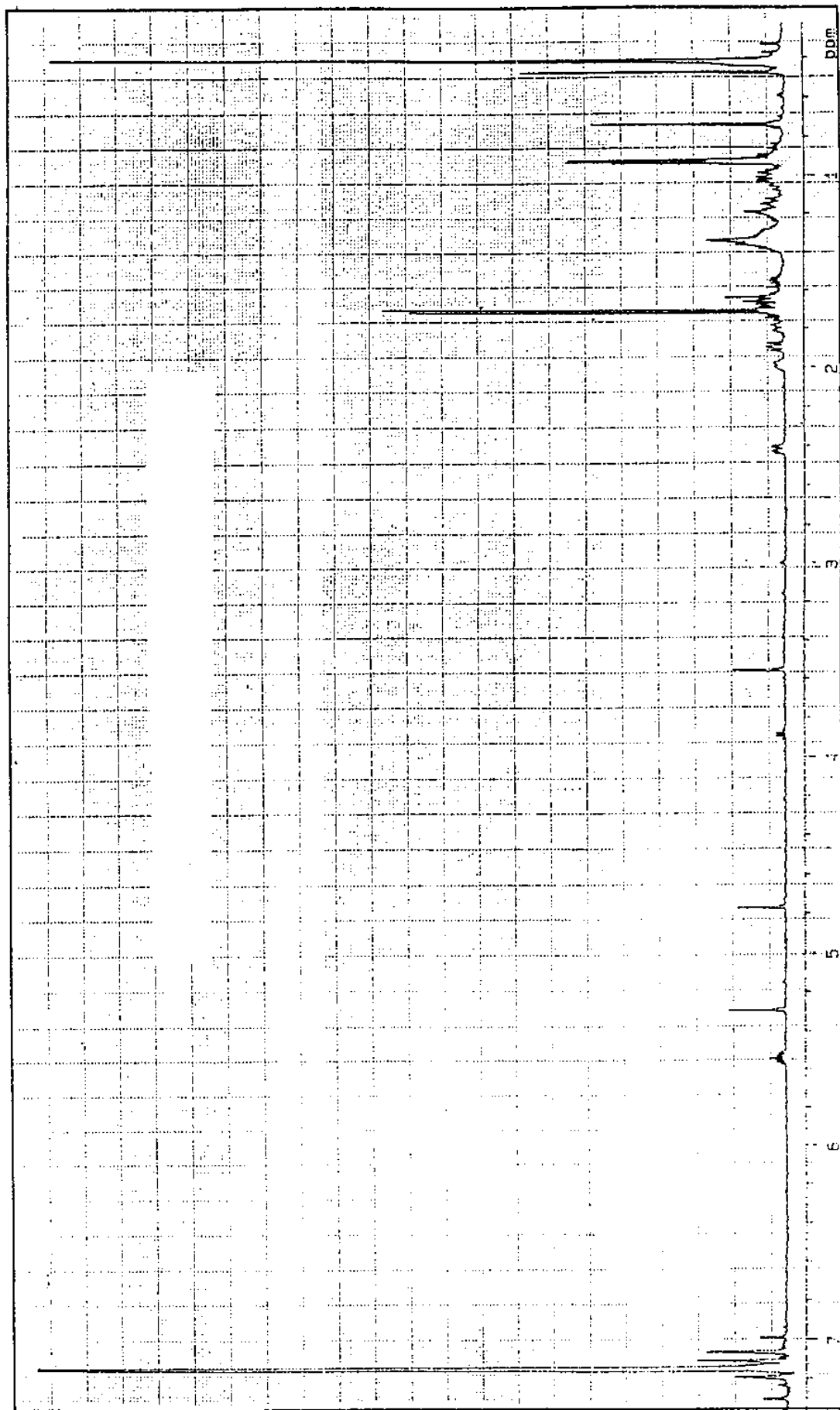


Fig. 3-33. Proton NMR spectrum of compound 91K-2-7.

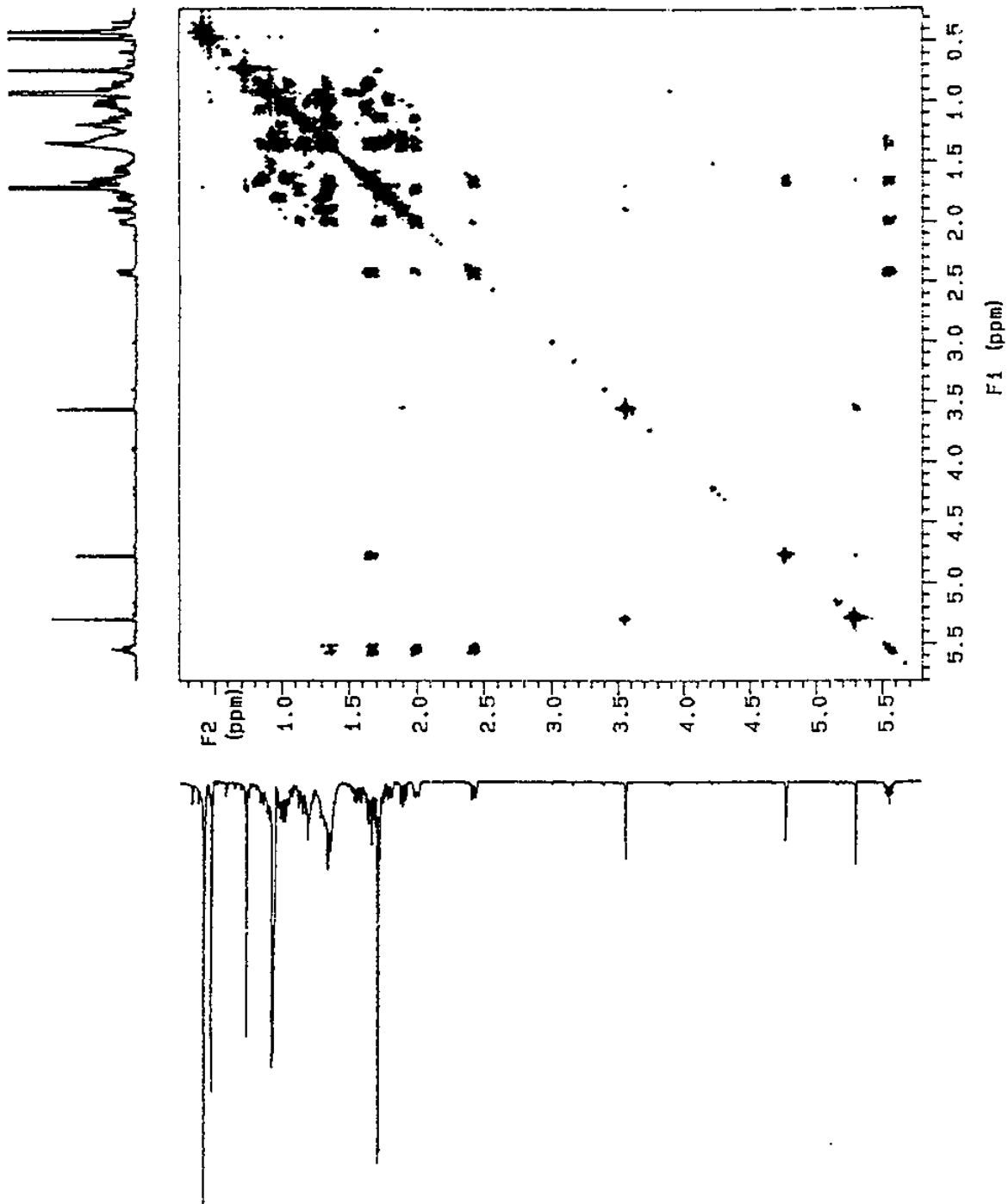


Fig. 3-35. Proton COSY NMR spectrum of compound 91K-2-7.

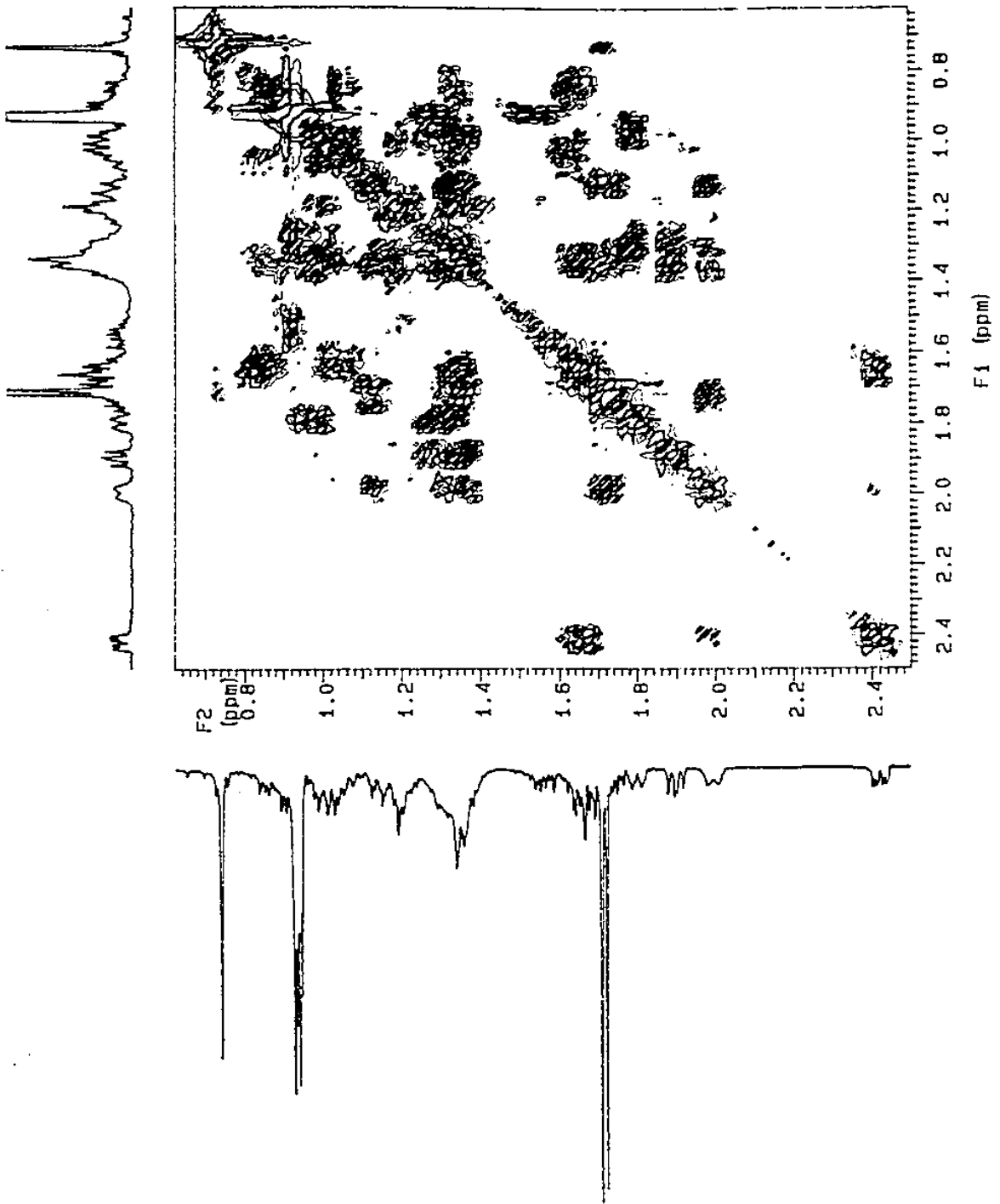


Fig. 3-35. continued.

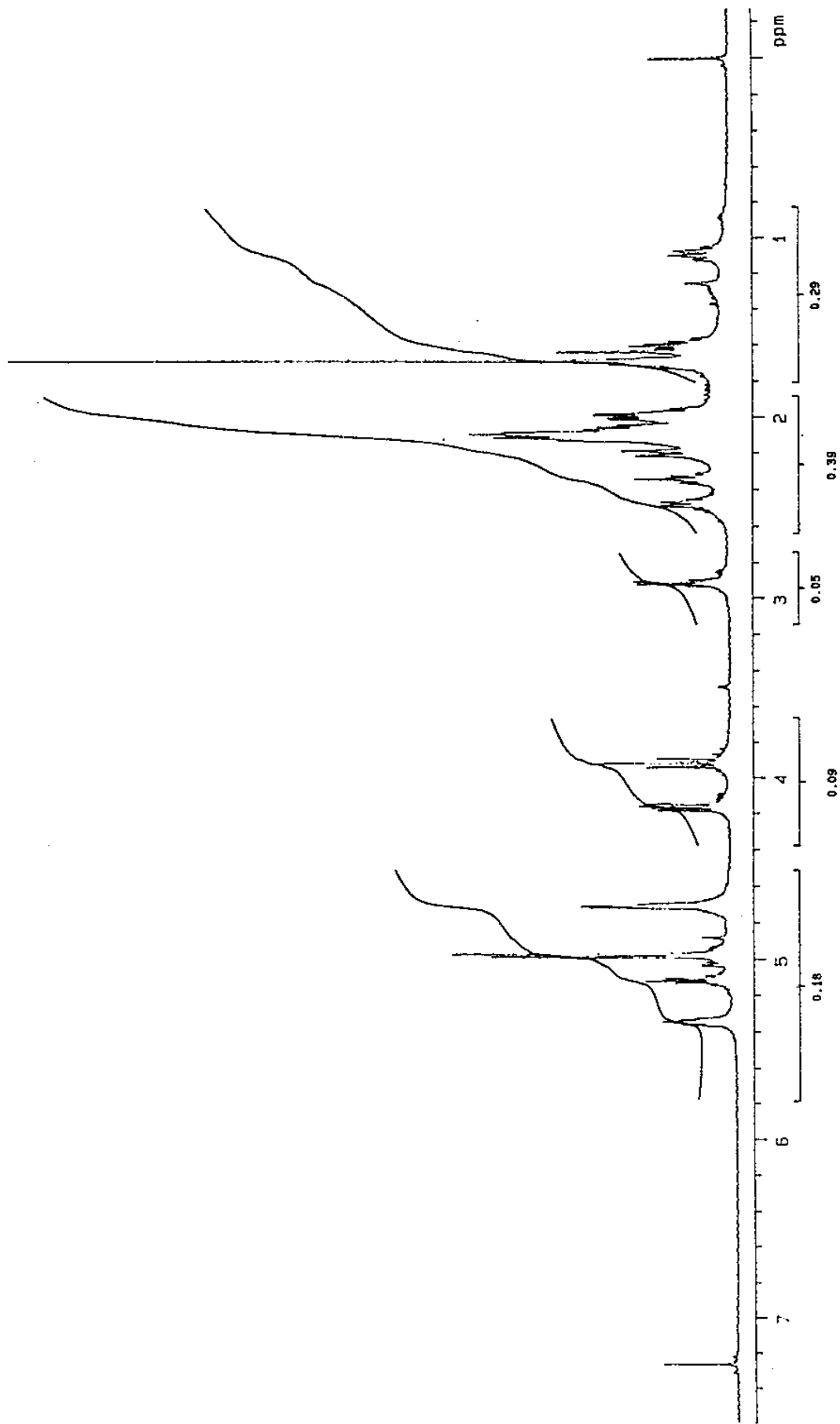


Fig. 3-36. Proton NMR spectrum of compound 9IK-4-1.

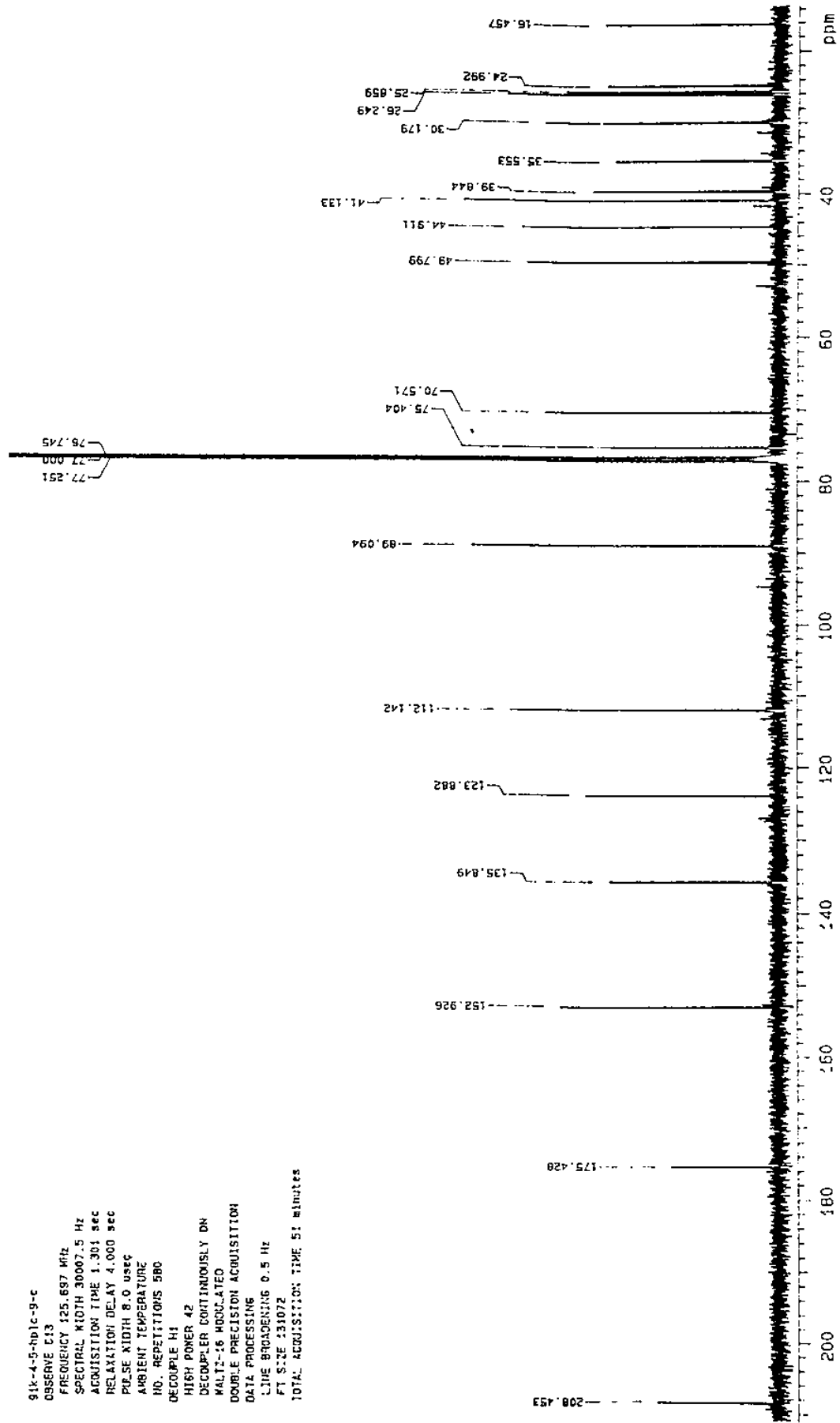


Fig. 3-37. Carbon NMR spectrum of compound 91K-4-I.

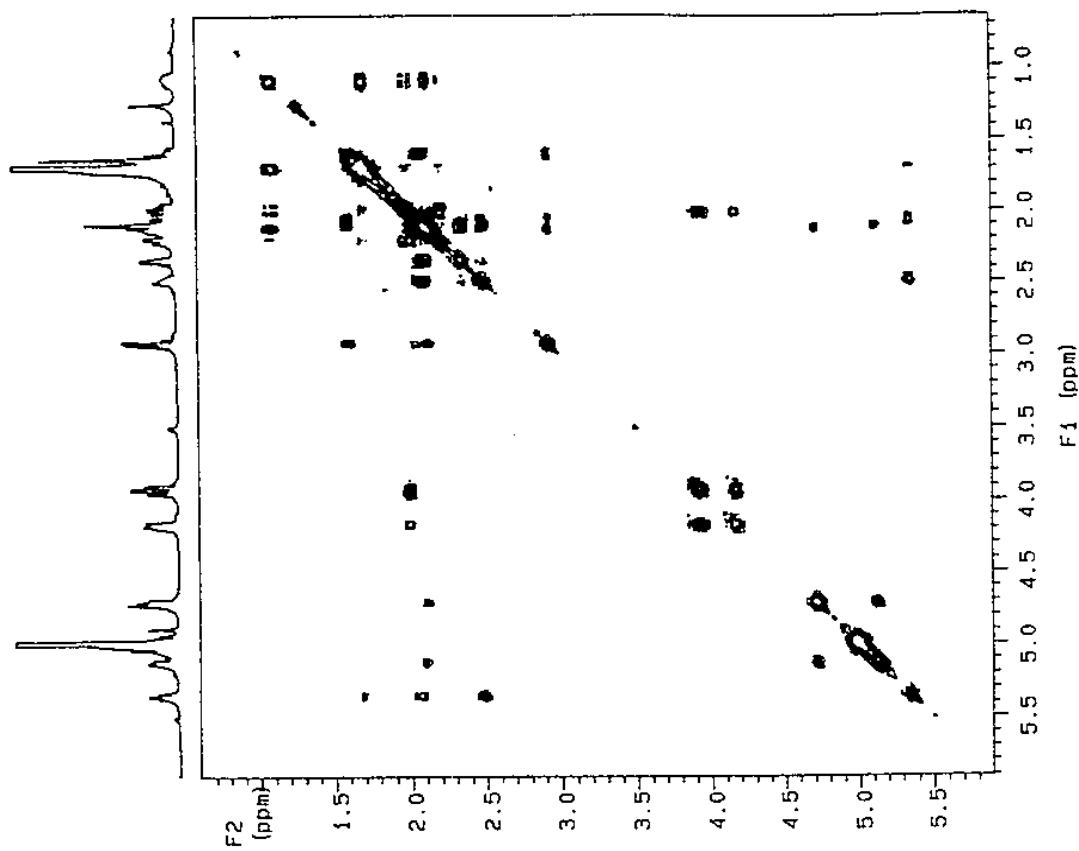


Fig. 3-38. Proton COSY NMR spectrum of compound 91K-4-1.

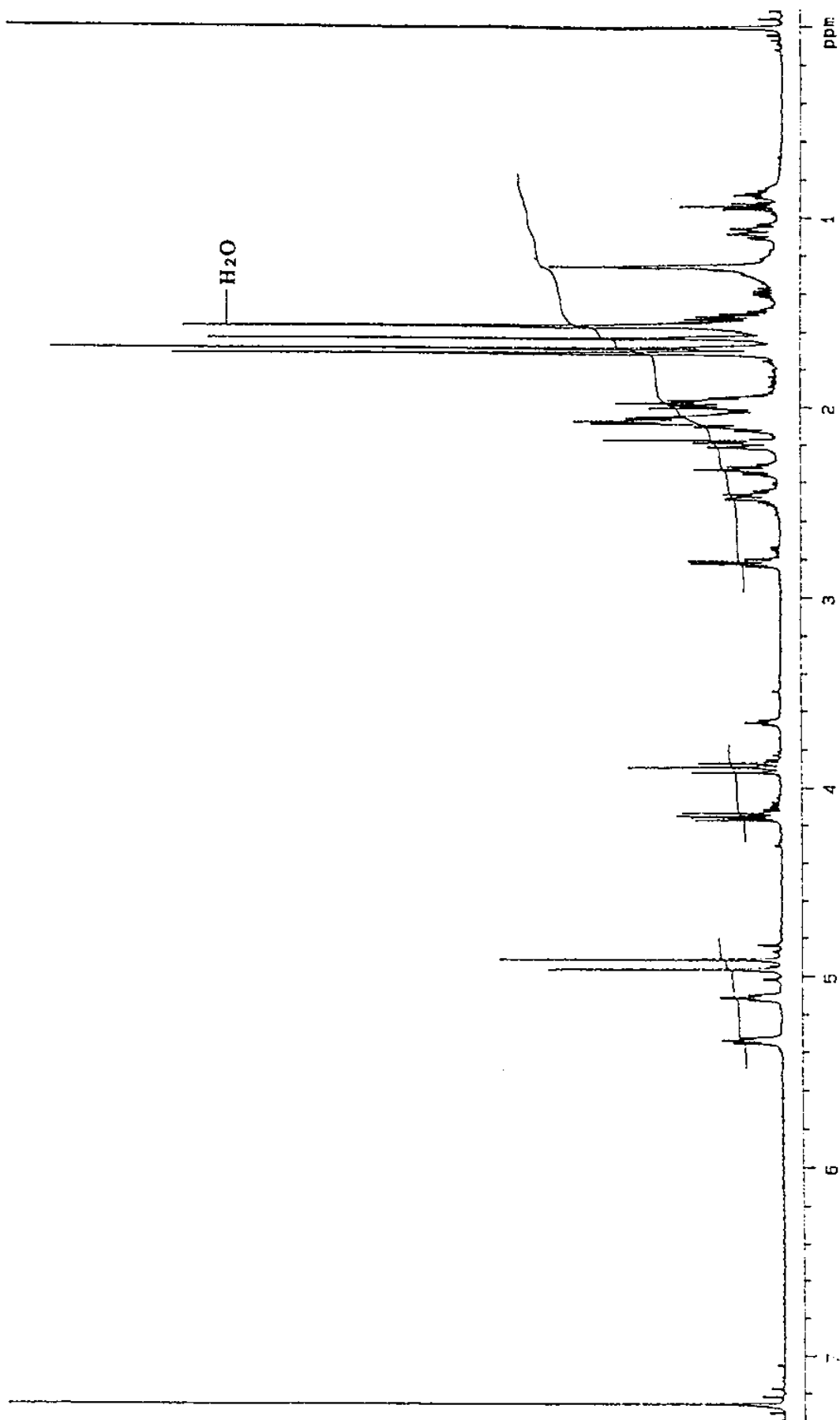


Fig. 3-39. Proton NMR spectrum of compound 91K-4-2.

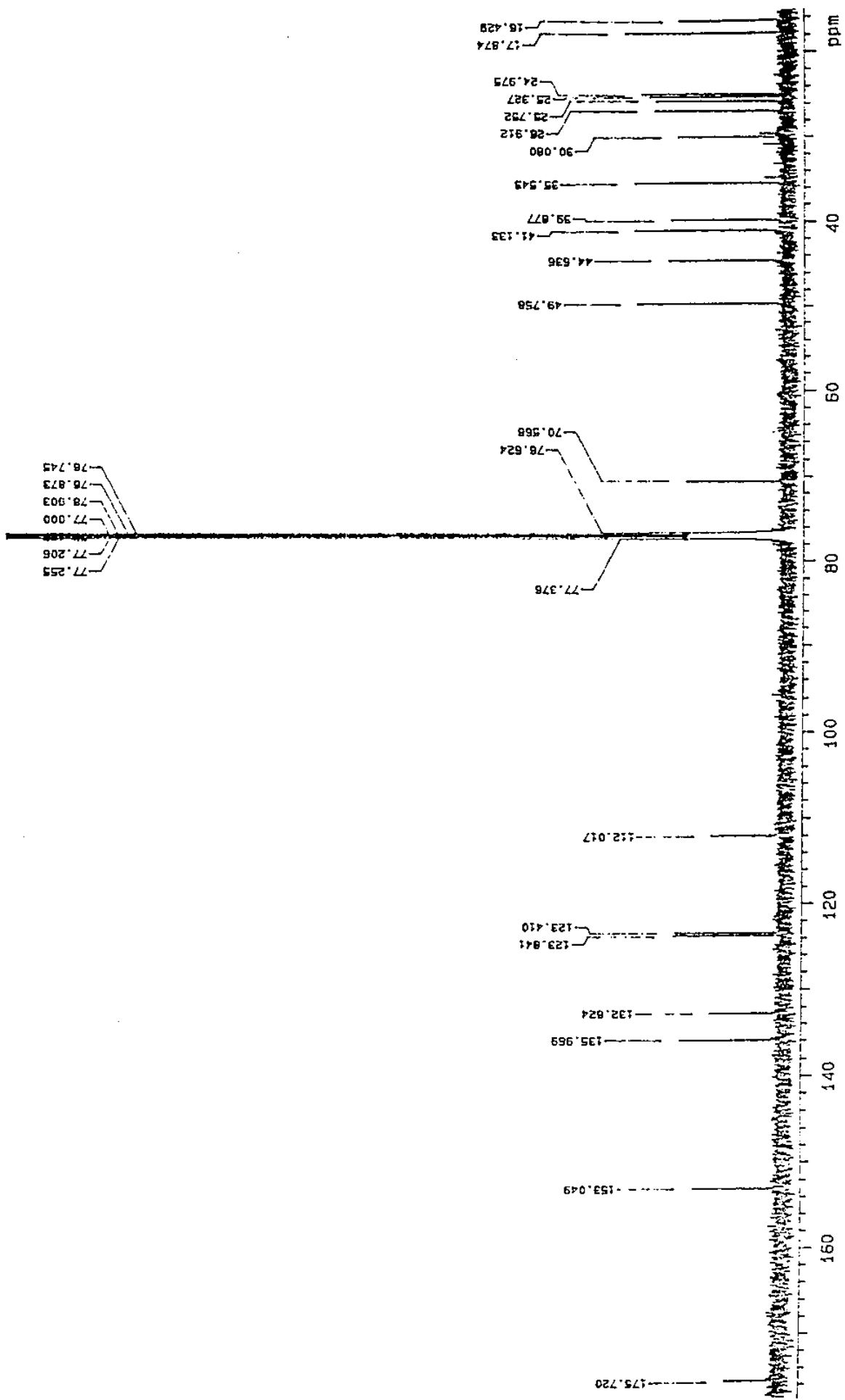


Fig. 3-40. Carbon NMR spectrum of compound 91K-4-2.

이 표의 차는
1000 10000

제 4 장. Soft corals의 대사물질

4. 1. 연구의 배경

일반적으로 soft corals이라고 불리우는 강장동물은 학명으로는 바다맨드라미목(海鷄頭目, Alcyonacea)에 속하며 일명 연산호라고도 부른다. 전체적인 모양은 폴립(polyp)이 공육(coenecyme)속에 파묻혀 있고 화두(anthocodia)는 노출되어 있다. 군체는 덩어리 혹은 버섯 모양이며 육상의 맨드라미와 비슷하다.

강장동물은 해양천연물에 있어서 해면동물에 버금가는 중요한 위치를 차지하고 있으며 soft corals는 gorgonians와 함께 강장동물을 양분하고있다. 천연물의 구조와 추출빈도에 있어서 soft corals와 gorgonians간에는 뚜렷한 구분이 없다. 보고된 천연물 중 terpenoids가 80% 이상을 차지하며 diterpenoids가 가장 빈번하게 추출되고 그중에서도 cembranoids 유도체가 가장 흔하다는 점은 gorgonians와 완전히 일치하고 있다. 또한 거의 모든 terpenoids의 탄소 골격이나 작용기의 종류 및 위치에 있어서도 양분류군이 거의 일치하고 있다. 한 종류의 생물에서만 발견되는 특이한 골격을 가진 terpenoids도 소수있으나 이는 양분류군 간의 전체적인 차이보다는 해당 속(genus)이나 종(species)에 국한된 현상으로 이해된다. Terpenoids이외에는 특이한 작용기를 가진 steroids가 상당수 발견되었으며 prostnoids등 unusual polyketides나 lipid part를 가진 mixed biosynthetic products도 드물지않게 얻어 진다.

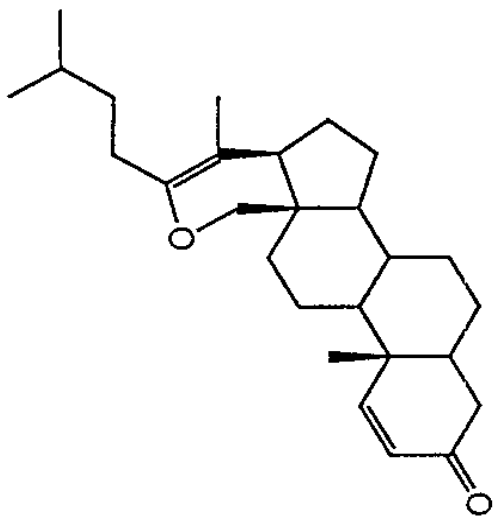
Soft corals는 이들로부터 분리된 천연물중 상당수가 세포독성, 항암, 소염, 항미생물, 포식억제, 부착억제(antifouling)등 다양한 생리활성도를 보유하고 있어 의학이나 화학생태학적인 측면에서 중요한 위치를 차지하고 있다. 최근에 해양 천연물에 대한 연구가 해면(sponges)이나 척색동물(tunicates)에 집중되는 경향을 일부

나타내고는 있으나 이는 soft corals이 천연물화학과 생약학적인 측면에서 차지하던 중요성이 감소한 것을 의미하지는 않는다. 최근 말라리아에 강력한 효과를 보이는 artemether라는 물질이 개발된 바 있다. 이 물질은 육상식물 *Artemisia annua* L에서 얻어지는 sesquiterpenoid artemisinin의 endoperoxide의 유도체이다(Qinghaosu Research Group, 1980; Schmidt & Hofheinz, 1983; Avery et al, 1992). 이 물질이 비록 육상식물에서 얻어지기는 하였으나 terpenoids의 일종이라는 것을 고려할 때 해양 terpenoids의 보고인 강장동물의 천연물화학적 중요성은 자명하다. 더우기 강장동물의 천연물은 일반적으로 생체내의 농도가 다른 해양천연물에 비하여 월등히 높으므로 생리활성 신물질의 산업적이용에 있어서도 전망이 매우 밝다. 따라서 soft corals를 비롯한 강장동물의 중요성은 미래에도 줄어들지 않을 것으로 보여진다.

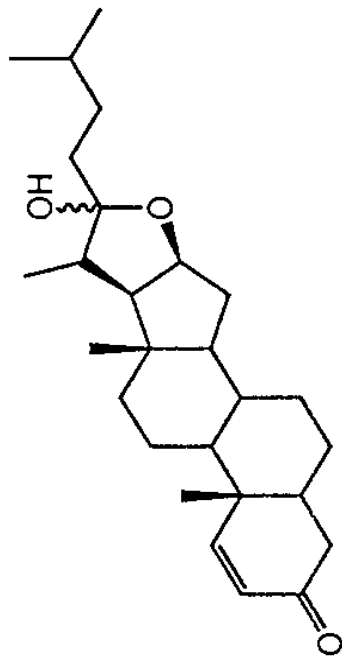
4. 2. *Alcyonium gracillimum*의 대사물질

90년 1월, 7월 및 92년 11월에 제주도 서귀포 연안에 위치한 섯섬, 문섬 및 범섬의 조하대(-20 m)에서 SCUBA다이빙을 이용하여 약 8kg의 시료를 채집하였다. 이 생물의 크기는 20 cm 정도이며 물속에서 마치 맨드라미꽃과 유사한 모양으로 선명한 분홍색깔을 띄고 있다. 이 생물의 조추출물은 항바이러스와 P388에 대한 세포독성 tests에서 중정도의 생리활성(LC50 7.0 $\mu\text{g/ml}$ 와 22.7 $\mu\text{g/ml}$)을 나타내었다.

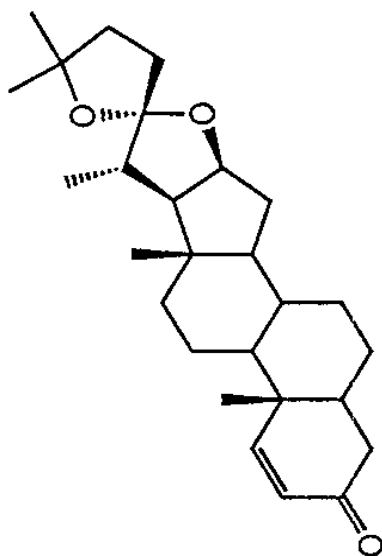
냉동보관했던 시료 약 5 kg을 실온에서 그늘에서 건조하여 수분의 대부분을 제거한 후 dichloromethane으로 추출하고 용매는 진공증발기로 제거하였다. 용매를 제거한 후에 남은 잔류물을 silica vacuum flash chromatography로 극성에 따라 수 개의 분획으로 나누었으며 silica 및 reversed-phase HPLC에 의해서 이 분획들로부터 7개의 천연물을 분리하였다(Fig. 4-1). 이 물질들의 구조는 아래에 설명한 바와 같이 분광학적 방법에 의하여 C_{27} steroids와 C_{21} pregnanes로 결정되었다. 문헌자료 조사결과 이들중 91-18-1 ~ -5등 다섯 물질은 신물질로 판명되었으며 생리활성



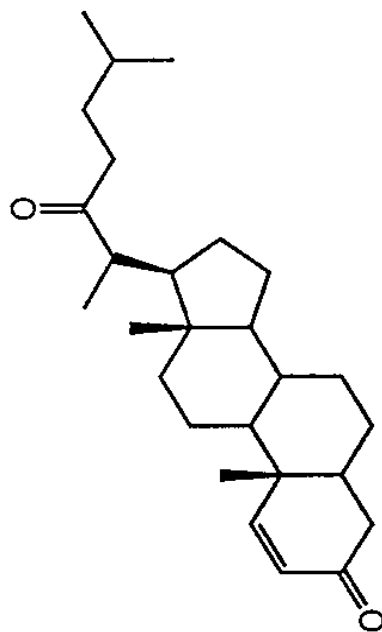
91-18-4



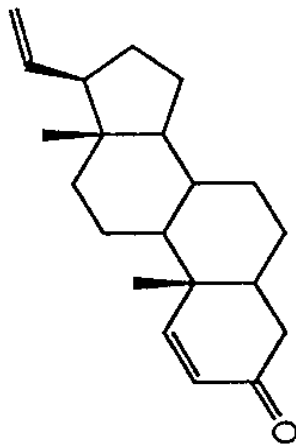
91-18-2 and -3 (4,5-didehydro)



91-18-1



91-18-5



91-18-6 and -7 (1,2-dihydro)

Fig. 4-1. Metabolites isolated from the soft coral *Alcyonium gracillimum*.

도 측정결과 91-18-2와 -3등은 세포독성과 항바이러스효과를 갖고 있음이 밝혀졌다.

91-18-1은 흰색고체로 분리되었으며 분자식 $C_{27}H_{40}O_4$ 가 high-resolution mass와 carbon NMR data에 의해서 결정되었다(Fig. 4-7, -13). α,β -Unsaturated ketone은 δ 200.15(s), 158.15(d) 및 127.39(d)의 carbon signal, IR spectrum상의 1690 cm^{-1} 에 나타난 강한 흡광 band 및 UV spectrum에서 나타난 λ_{max} 228 nm에 의해서 쉽게 확인할 수 있었다(Fig. 4-11,12). 이에 상응하는 ^1H NMR signal들이 δ 7.12(1H, d, $J=10.3\text{ Hz}$)와 5.84(1H, d, $J=10.3\text{ Hz}$)에서 발견되었다(Fig. 4-6). ^{13}C NMR spectrum에서 downfield에 나타나는 δ 119.87(s), 82.04(s) 및 80.36(d)의 signal들은 이 물질에 ketal group이 존재한다는 것을 보여 준다. IR spectrum의 $3000\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ 지역에 OH기에 의한 absorption band가 나타나지 않았는데 이는 ketal이 hemiketal이 아니고 완전한 ketal이라는 사실을 증명한 것으로 해석되었다. 또 ketal center carbon의 chemical shift 값이 δ 119.87(s)으로 일반적인 ketal carbon(δ 105-110)에 비하여 10 ppm정도 낮았는데 이것은 ketal이 두 개의 tetrahydrofuran rings에 의한 spiro-ring type으로 존재한다는 것을 의미하였다 (Shin & Fenical, 1988; Agrawal et al, 1985).

이 물질의 전체적인 구조는 ^1H 및 ^{13}C NMR을 비롯한 여러 가지 NMR 실험과 알려진 물질과의 ^{13}C NMR 데이터의 비교에 의해서 확인할 수 있었다. High-resolution mass data는 이 물질이 다섯 개의 rings로 이루어진 것을 나타내었는데 proton 및 carbon NMR data에 기초한 문헌조사 결과 A-C rings은 soft coral *Minabea* sp에서 분리된 withanolides계열의 minabeolides와 아주 유사하였다 (Ksebati & Schmitz, 1988). 따라서 cyclic ketal의 위치를 결정하는 것이 전체적인 구조 결정의 핵심이었다. 이것은 HMQC와 proton COSY NMR실험의 결과를 종합하여 이루어졌다(Fig. 4-8, -9). 먼저 HMQC에 의하여 91-18-1에 존재하는 모든 proton-bearing carbons와 protons간의 상관관계가 명확히 드러났다. δ 0.96(d,

$J=7.3$ Hz)에 나타난 C-21 methyl group과 coupling을 이루는 유일한 methine proton 즉 C-20 proton이 δ 2.08에서 발견되었다. 이 proton의 낮은 chemical shift는 C-20의 vicinal carbon 즉 C-22가 oxygenated되어 있음을 의미하였다. 또 ^1H NMR spectrum상에서 δ 4.45(ddd, $J=7.5, 7.4, 7.2$)에 나타난 downfield methine proton은 δ 1.98, 1.80, 1.23등 3개의 proton과 direct coupling을 이루고 있으며 이들 중 δ 1.98과 1.23 protons은 동일한 carbon에 결합된 methylene carbon임이 HMQC NMR 실험에 의하여 발견되었다. 더우기 이들 두 protons은 δ 1.18에 위치한 proton과도 coupling을 하였으며 δ 1.80과 1.18의 protons은 모두 methine carbon에 해당하는 것이 역시 HMQC 실험에 의하여 확인되었다. 이와 같이 하여 $-\text{CHCH}_2\text{CH}(\text{O})\text{CH}-$ 의 부분 구조가 얻어 졌다.

이 부분구조의 위치는 proton decoupling과 COSY NMR 데이터 자료의 해석에 의하여 결정되었다. C-21 methyl protons을 irradiation하였을 때 C-20 methine (δ 2.08)이 broad quintet($J=7.0$ Hz)으로부터 sharp doublet($J= 6.1$ Hz)로 나타났다. 또 COSY 데이터 분석에서 이 proton은 C-21 methyl 이외에 δ 1.80의 proton과 direct coupling을 하고 있었으며 위에서 언급한 바와 같이 δ 1.80의 proton은 δ 4.45 proton과 직접 연결되어 있다. 이는 C-16과 C-20이 동일한 methine proton으로 연결되어 있음을 의미하며 이에따라 C-14로부터 C-17을 거쳐 C-21에 이르는 일련의 상관관계가 명확하게 드러났다. 마지막으로 δ 1.34(s), 1.17(s)에 나타나는 두 개의 methyl peaks의 chemical shift 값과 splitting pattern은 인접한 위치인 C-25가 산화되어 있는 것을 의미하였다.

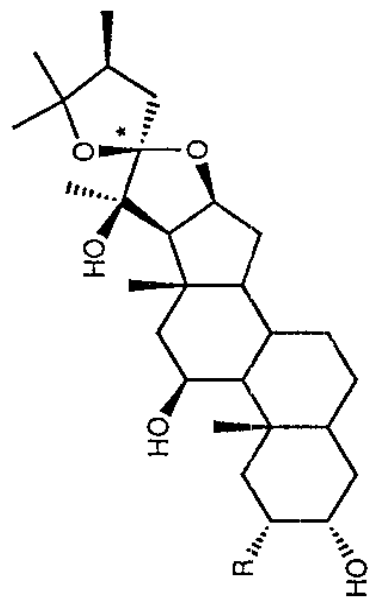
위의 결과를 종합해 볼 때 이 대사물질은 산소와 결합하고 있는 carbon 위치가 C-16, -22, -25이며 C-22가 ketal center를 이루는 C_{27} steroidal ketal로 생각되었다. 이 해석은 HMBC 실험에 의하여 입증되었다(Fig. 4-10)(Table 4-8). 즉 key protons인 18, 21, 26, 27의 methyl protons와 C-22 ketal carbon을 포함해서 인접하고 있는 탄소들 사이의 long-range correlations에 의해서 [5,5]-bicyclic ketal의 준

제가 확인되었으며 또한 19 methyl protons의 long-range correlations에 의해 A ring의 α,β -unsaturated carbonyl의 존재도 함께 입증되었다(Table 4-8). 결론적으로 물질 91-18-1은 furospirostan계 steroid에 속하는 신물질로 구조가 결정되었다. 91-18-1의 proton 및 carbon의 assignments는 Table 4-1과 같다.

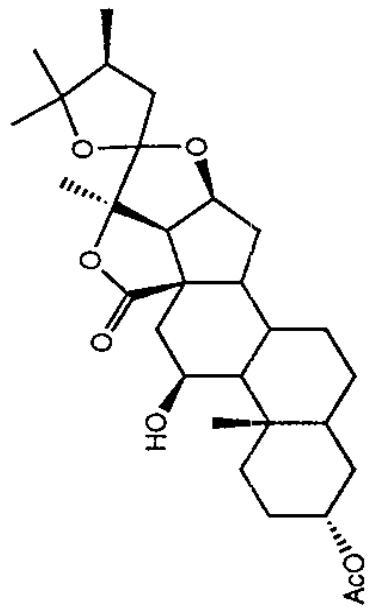
Steroid의 side chain이 [5,5]bicyclic ketal로 이루어진 furospirostan steroids는 대부분 육상식물에서 분리되었으며 해양에서는 soft coral *Isis hippuris*로부터 분리된 몇 개의 물질만 알려져 있다(Kazlauskas et al, 1977; Higa et al, 1981; Rao et al, 1988)(Fig. 4-2). 그러나 육상식물에서 얻어진 furospirostan steroids는 모두가 그 자체로 분리된 것이 아니라 saponin의 aglycone 형태로 얻어져 가수분해후에야 이러한 골격의 steroids를 순수하게 얻을 수 있다. Furospirostan saponins중에 일부는 cytotoxic⁹, antifungal¹⁰ 및 mulluscicidal¹¹ activity를 보여 주며 식물의 쓴 맛의 주성분인 것들도 있다(Reddy et al, 1984; Harborne & Baxter, 1993; Chen & Snyder, 1987; Sato & Sakamura, 1973).

Furospirostan steroids의 구조결정에 있어서 가장 어려운 점은 C-22에 존재하는 ketal center의 stereochemistry를 결정하는 점이다. 문헌조사에 의하면 먼저 유사한 bicyclic ketal인 spirostan steroids의 C-22 configuration을 물질의 상대적 안정성에 대한 비교에 의하여 S*(α -orientation)로 결정하였으며 furospirostan steroids에 대한 촉매수소화 반응(PtO₂) 생성물질인 furostan derivative와 spirostan steroids에 촉매수소화 반응에 의하여 생성된 물질이 동일하다는 것으로 부터 furospirostan steroids의 C-22 configuration도 S*로 결론을 내렸다(Callow & Massy-Beresford, 1957; Thompson et al, 1959)(Fig. 4-3).

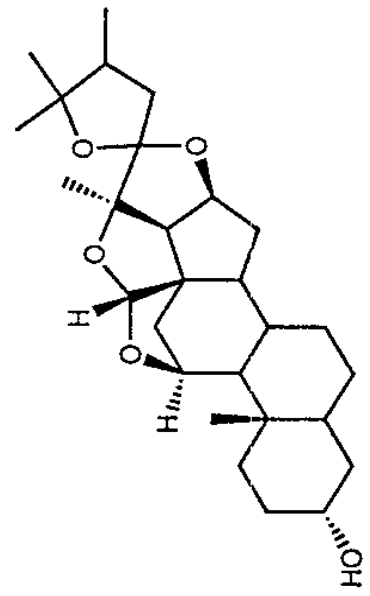
Soft coral *Alcyonium gracillimum*로부터 분리된 대사물질 91-18-1은 여러개의 비대칭 탄소(asymmetric carbon center)들을 갖고 있다. 이들의 대부분은 일반적인 steroids와 공통된 것이나 C-16과 C-22의 위치에 존재하는 비대칭 탄소들은 새로운 것이다. 이들의 configuration은 NOEDS 실험과 알려진 물질과의 NMR자료의



R = OAc, hippurin-1 (22R)



R = H, hippuristonol (22R)



R = H, 22-epihippuristonol (22S)

Fig. 4-2. Furanospirostan steroids isolated from the soft coral *Isis hippuris*.

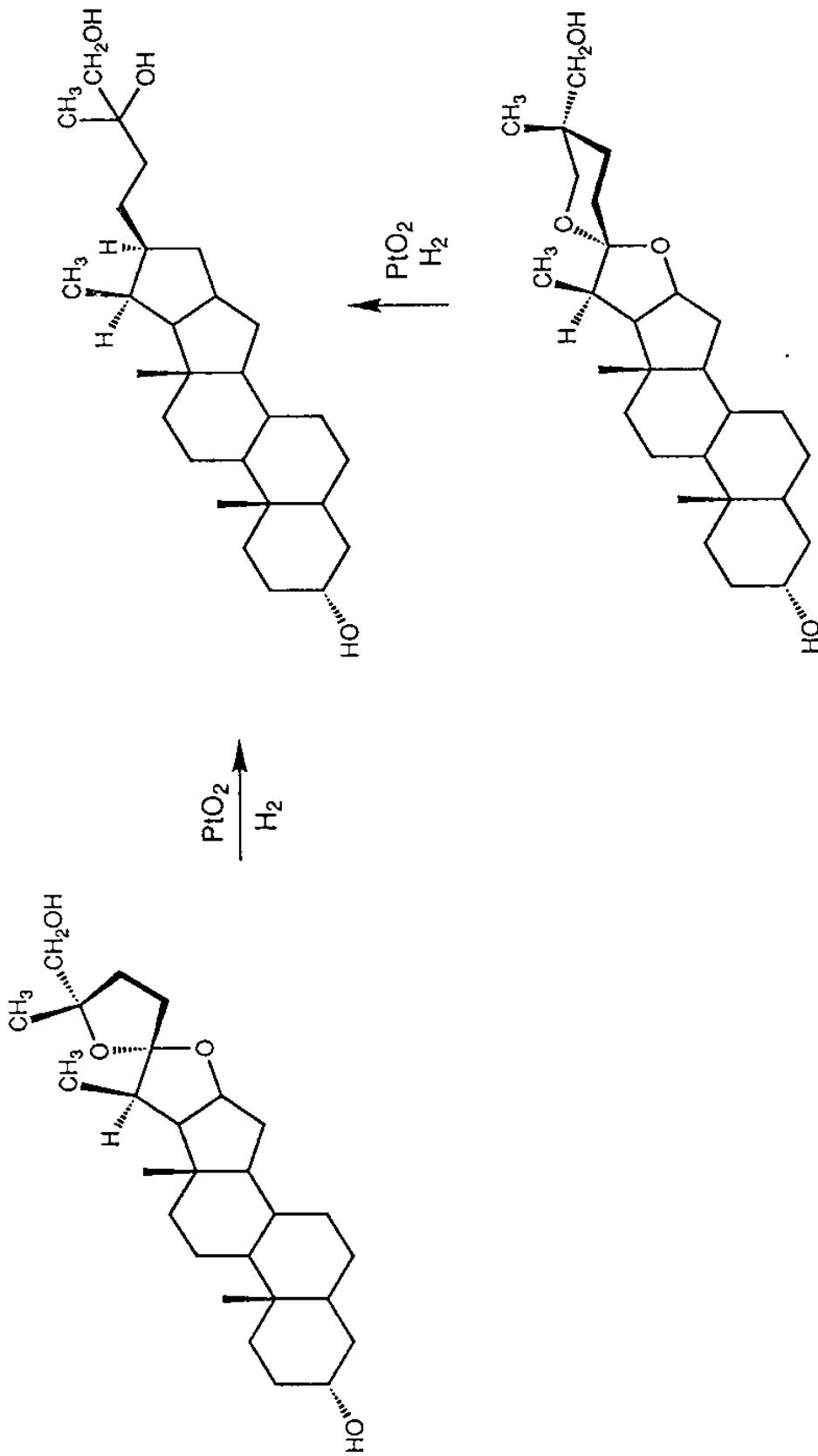


Fig. 4-3. Reduction of the furospirostan and spirostan steroids for determination of stereochemistry of the C-22 asymmetric center.

Table 4-1. Proton and carbon NMR assignments for compound 91-18-1^a

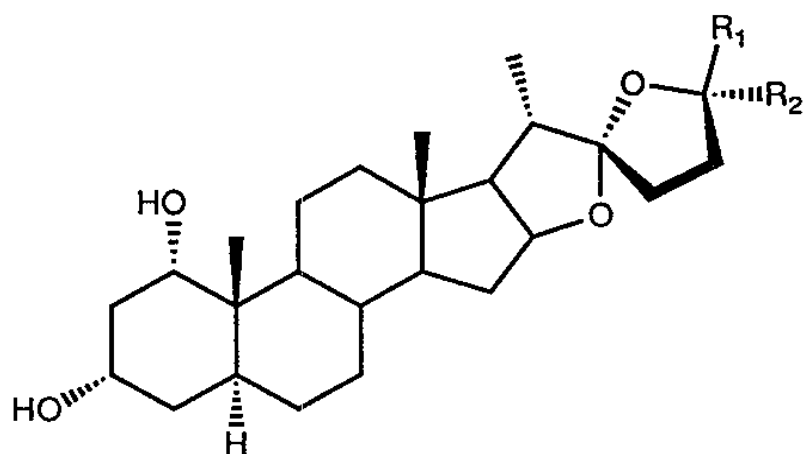
#	¹ H	¹³ C
1	7.12(1H, d, 10.3)	158.15 d
2	5.84(1H, d, 10.3)	127.39 d
3		200.15 s
4	2.37(1H, dd, 17.6, 14.2) 2.22(1H, dd, 17.6, 3.9)	40.96 t
5	1.91(1H, m)	44.22 d
6	1.44(2H, m)	27.51 t
7	1.72(1H, m), 0.96(1H, m)	31.70 t
8	1.63(1H, m)	35.26 d
9	1.01(1H, m)	49.93 d
10		39.03 s
11	1.73(1H, m), 1.45(1H, m)	21.02 t
12	1.77(1H, m), 1.20(1H, m)	39.79 t
13		40.74 s
14	1.18(1H, m)	55.99 d
15	1.23(1H, m), 1.98(1H, m)	31.42 t
16	4.45(1H, ddd, 7.5, 7.4, 7.2)	80.36 d
17	1.80(1H, m)	61.79 d
18	0.80(3H, s)	16.47 q
19	1.01(3H, s)	13.06 q
20	2.08(1H, m)	38.37 d
21	0.96(3H, d, 7.3)	14.66 q
22		119.87 s
23	1.98(2H, m)	33.66 t
24	1.98(1H, m), 1.70(1H, m)	37.05 t
25		82.04 s
26	1.17(3H, s)	30.22 q ^b
27	1.34(3H, s)	28.45 q ^b

^a Proton and carbon NMR spectra were recorded in CDCl₃ solution at 500 and 125 MHz, respectively. Chemical shifts are reported in δ values. J values are reported in Hz. Carbon multiplicities were determined by DEPT experiments. Assignments were aided by proton decoupling, COSY, HMQC, and HMBC experiments. ^b Assignments may be interchanged.

비교에 의하여 결정되었다. C-16과 C-21에 있는 protons를 irradiation하면 C-17 proton peak의 강도가 각각 5.1%와 2.2%씩 증가되었으며 C-20 proton을 irradiation하면 C-18 methyl protons이 6.7% 증가되었다. 그러나 C-16과 C-20 protons 사이의 nOe는 관측되지 않았다. 따라서 C-16의 configuration은 S*로 결정되었다.

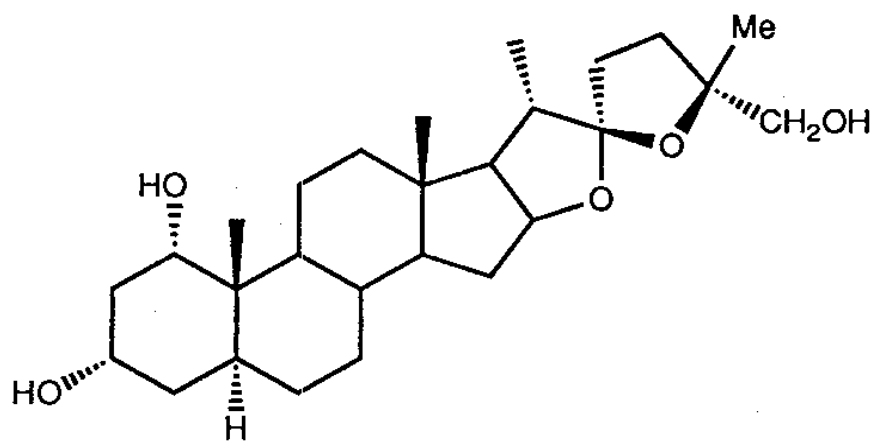
그러나 C-22의 configuration은 C-21과 C-20 protons를 irradiation해도 C-23 protons의 nOe는 관찰되지 않았기 때문에 이 carbon의 configuration은 알려진 물질과의 NMR data 비교분석에 의하여 결정되었다(Table 4-2, -3). Configuration이 22R인 wallogenin과 22S-epimers(Fig. 4-4)의 ¹H NMR spectrum 데이터를 비교해 보면 wallogenin의 C-16 proton chemical shift가 4.15 ppm이나 22S-epimers의 chemical shift는 4.45 ppm이며 또 ¹³C NMR spectrum 데이터에서 wallogenin의 C-20, 21, 22, 23이 각각 37.5, 16.7, 120.4, 30.0인 반면에 22S-epimer인 strictagenin은 38.3, 14.7, 120.2, 32.2이었다(M.-H. Yang et al, 1989). 한편 91-18-1은 C-16 proton의 chemical shift 값이 δ 4.45이며 C-20, 21, 22, 23의 chemical shift 값은 δ 38.4, 14.7, 119.9, 33.7이었다. 이 값들은 22R-configuration을 가진 wallogenin과 다르며 22S-epimer와 아주 유사하므로 91-18-1의 C-22의 configuration은 S*로 밝혀졌다. 이상과 같이 하여 이 물질의 구조는 (16S,20S,22S)-5α-furostan-22,25-epoxy-1-en-3-one으로 결정되었다.

91-18-2는 흰색고체로 분리되었으며 이물질의 분자식은 high resolution mass와 ¹³C NMR data에 의해서 C₂₇H₄₂O₃로 결정되었다(Fig. 4-19, -15). 91-18-2의 분광 데이터는 91-18-1과 아주 유사하였다(Fig. 4-14 ~ -19). ¹H NMR과 ¹³C NMR 데이터를 자세히 비교한 결과 91-18-2는 91-18-1과 동일한 A-E rings를 갖고있는 것이 발견되었다(Fig. 4-14, -15). 그러나 ¹³C NMR에서 중요한 차이점이 발견되었다. 91-18-1에서 δ 82.04에 나타났던 quaternary carbon(C-25)이 91-18-2에서는 δ 28.28에 나타나는 methine carbon signal로 바뀌었다. 뿐만 아니



Strictagenin $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = \text{CH}_2\text{OH}$

Rubragenin $R_1 = \text{CH}_2\text{OH}$, $R_2 = \text{Me}$



Wallogenin

Fig. 4-4. Furospirostan steroids isolated from terrestrial plants.

Table 4-2. Proton NMR data for strictagenin, rubragenin, wallogenin^a, and 91-18-1^b

#	strictagenin	rubragenin	wallogenin	91-18-1
16	4.45(1H, q, 7.5)	4.45(1H, q, 7.5)	4.15(1H, q, 7.5)	4.45(1H, ddd, 7.5, 7.4, 7.2)
18	0.78(3H, s)	0.77(3H, s)	0.88(3H, s)	0.80(3H, s)
19	0.84(3H, s)	0.83(3H, s)	0.82(3H, s)	1.01(3H, s)
21	0.78(3H, d, 7)	0.99(3H, d, 7)	1.00(3H, d, 7)	1.00(3H, d, 7.3)
26	3.35(2H, d, 11)	3.35(2H, d, 11)	3.35(2H, d, 11)	1.17(3H, s)
	3.50(3H, d, 11)	3.44(2H, d, 11)	3.57(2H, d, 11)	
27	1.16(3H, s)	1.36(3H, s)	1.14(3H, s)	1.34(3H, s) s

^{a, b} Carbon NMR spectra of strictagenin, rubragenin, and wallogenin and 91-18-1 were obtained in CDCl₃ solution at 270 and 500 MHz respectively. Chemical shifts are reported in δ values (ppm downfield from Me₄Si). J values are reported in Hz.

Table 4-3. Carbon NMR assignments for strictagenin, rubragenin, wallogenin^a, and 91-18-1^b

#	strictagenin	rubragenin	wallogenin	91-18-1
1	73.9 d	74.0 d	74.0 d	158.15 d
2	40.4 d	40.3 d	40.4 d	127.39 d
3	66.2 d	66.7 d	66.7 d	200.15 s
4	36.1 t	35.8 t	35.8 t	40.96 t
5	37.4 d	38.2 d	38.2 d	44.22 d
6	28.3 t	28.1 t	28.1 t	27.51 t
7	32.0 t	32.1 t	32.1 t	31.70 t
8	35.6 d	35.5 d	35.4 d	35.26 d
9	55.0 d	54.6 d	54.7 d	49.93 d
10	42.6 s	42.5 s	42.5 s	39.03 s
11	24.4 t	24.4 t	24.4 t	21.02 t
12	40.4 t	39.8 t	39.8 t	39.79 t
13	40.3 s	40.1 s	40.7 s	40.74 s
14	56.3 d	56.2 d	55.6 d	55.99 d
15	30.7 t	31.9 t	29.7 t ^c	31.42 t
16	81.1 d	80.6 d	79.2 d	80.36 d
17	62.1 d	62.0 d	62.1 d	61.79 d
18	16.2 q	16.3 q	16.6 q	16.47 q
19	5.9 q	5.6 q	5.6 q	13.06 q
20	38.3 d	38.5 d	37.5 d	38.37 d
21	14.7 q	14.8 q	16.7 q	14.66 q
22	120.2 s	120.1 s	120.4 s	119.87 s
23	32.2 t	32.8 t	30.0 t ^c	37.05 t
24	33.8 t	34.1 t	32.8 t	33.66 t
25	85.8 s	84.1 s	84.7 s	82.04 s
26	68.9 t	69.5 t	68.0 t	30.22 q ^d
27	23.9 q	25.3 q	24.0 q	28.45 q ^d

^{a, b} Carbon NMR spectra of strictagenin, rubragenin, and wallogenin and 91-18-1 were obtained in CDCl₃ solution at 68 and 125 MHz, respectively. Carbon multiplicities of 91-18-1 were determined by DEPT experiments. Assignments for 91-18-1 are based upon HMQC and HMBC. ^{c, d} Assignments may be interchanged.

라 δ 119.87의 ketal carbon(C-22)의 signal이 upfield로 shift되어 δ 110.49에 나타났다. 상응하는 차이점이 ^1H NMR에서도 나타났다. δ 1.34와 1.17에 나타났던 singlet methyl signal도 δ 0.88($J=6.4$ Hz)과 0.87($J=6.4$ Hz)로 바뀌었다. 또 IR 분광 데이터에서 강한 -OH peak가 3450 cm^{-1} 에 나타났다(Fig. 4-17). 이 모든 변화는 91-18-1 즉 furospirostan 골격의 tetrahydrofuran F ring이 열려 hemiketal로 바뀐 것을 의미하였다. 이와 같이 91-18-2의 구조는 steroidal hemiketal(furostanol)인 (16S,20S)-5 α -furostan-1-en-22-ol-3-one으로 결정되었다.

91-18-2 역시 91-18-1과 동일한 비대칭 탄소(asymmetric carbon centers)를 가지고 있다. 이 물질의 key proton들의 chemical shifts와 coupling constants는 91-18-1과 거의 동일하였으므로 C-16의 configuration 또한 91-18-1과 동일한 것으로 해석되었다. 하지만 ketal과 hemiketal로 작용기가 서로 다른 C-22의 configuration은 NMR자료에 의한 configuration의 추측이 불가능하였다. 문헌조사에 의하면 동일한 hemiketal기를 가진 furostanols의 경우에도 ketal기를 가진 furospirostans와 동일한 configuration으로 표시되어 있으나 여기에 대한 구체적인 증거를 제시한 것은 발견되지 않았다.

91-18-2와 매우 유사한 91-18-3이 동일한 HPLC 조건에서 흰색고체로 분리되었다. 이 물질의 분자식은 high resolution mass spectrum과 ^{13}C NMR spectrum 데이터에 의해서 $\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{O}_3$ 로 결정되었다(Fig. 4-25, -21). 이 물질은 91-18-2와 대단히 유사하며 유일한 차이점은 ^{13}C NMR에서 91-18-2의 δ 40.89(CH_2)와 44.19(CH) signals이 δ 168.90(C)와 123.90(CH)의 olefinic carbon signals로 바뀌었다는 것이다(Fig. 4-20 ~ -25). ^1H NMR spectrum에서도 대응하는 olefinic proton peak가 δ 6.07(brs)에서 나타났다(Fig. 4-20). 또 91-18-2의 IR spectrum에서 나타났던 1680 cm^{-1} peak가 91-18-3에서 1665 cm^{-1} 로 shift되었다(Fig. 4-23). 이러한 차이점을 종합한 결과 91-18-3은 91-18-2의 α,β -unsaturated carbonyl group이 $\alpha,\beta-\alpha',\beta'$ -unsaturated carbonyl group으로 바뀐 물질로 해석되었다. 알려진 물질과의

비교에서도 이러한 functional group이 존재한다는 것을 명백히 확인할 수 있었다. 그러므로 이 물질의 구조는 (16S,20S)-5 α -furostan-1,4-dien-22-ol-3-one으로 결정되었다(Table 4-4). 문헌자료 조사결과 91-18-2와 -3은 모두 신물질로 판명되었다.

새로운 물질인 91-18-4가 HPLC에 의해서 흰색고체로 얻어 졌다. 이 물질의 분자식 C₂₇H₄₀O₂ 은 high resolution mass와 ¹³C NMR spectroscopic data에 의해서 결정되었다(Fig. 4-33, -27). 91-18-4의 spectral data는 91-18-2와 유사하며 A-C ring과 side chain의 terminal isopropyl group은 동일한 것으로 생각되었다(Fig. 4-26 ~ -33). 하지만 ¹³C NMR spectrum에서 중요한 차이점들이 발견되었다. δ 16.51(C-18)과 15.48(C-21)에서 나타났던 methyl signals중에 하나가 oxygen이 결합된 methylene carbon으로 바뀌어 δ 63.80에서 나타났으며 91-18-2에 존재하지 않는 또 하나의 이중결합을 나타내는 carbon signals이 δ 146.15(s)와 106.04(s)에서 나타났다. 마지막으로 91-18-2의 C-17 methine carbon peak가 δ 62.67에서 upfield로 shift되어 δ 47.70에서 나타났다. ¹H NMR spectrum에서도 일반적인 steroids의 C-18과 C-21에 해당하는 두 개의 singlet methyl groups중 하나는 δ 1.59(s)에 나타났으며 다른 하나는 isolated methylene의 형태로 δ 3.91(dd, J=10.6, 1.7 Hz)과 δ 3.31(d, J=10.6)에 나타났다(Fig. 4-26). 이와 같은 NMR 상에 변화를 충족시킬 수 있는 유일한 구조는 C-20과 C-22가 이중결합을 이루고 C-18과 C-22가 oxygen에 의해서 결합된 즉 C₂₇ steroid의 D ring과 side chain이 결합되어 형성된 새로운 6-membered cyclic enoether로 해석되었다.

이러한 해석은 2-D NMR 실험에 의해서 확증되었다. 모든 protons와 carbons의 signals는 ¹H COSY와 HMQC 실험에 의하여 정확하게 assign되었다(Fig. 4-28, -29). D ring과 side chain사이에 형성된 dihydropyran ring의 존재는 HMBC 실험에 의하여 결정되었다(Fig. 4-30)(Table 4-8). Vinyl methyl proton과 olefinic carbons사이의 long-range correlations는 C-20과 C-22사이의 이중결합의 존재를

Table 4-4. Carbon NMR assignments for compounds 91-18-1 ~ -3^a

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

^a Carbon 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 and 91-18-3 are aided by comparison with 91-18-1. ^{b-e} Assignments may be interchanged.

확인시켜 주었으며 δ 3.91과 3.31의 protons과 C-12, C-13 및 C-17사이의 correlation은 C-18의 산화되어 있다는 것을 확인시켜 주었다. 또 이 protons와 C-22의 correlation에 의해서 C-22와 C-18사이가 oxygen으로 연결되어 있다는 것이 밝혀졌다. 이와 같이 해서 91-18-4는 6-membered cyclic enoether ring을 가진 C_{27} steroid라는 사실이 명백하게 확인되었다(Table 4-5).

91-18-5가 유사한 HPLC 조건에 의해서 흰색고체로 얻어 졌으며 이 대사물질의 분자식은 high resolution mass 및 ^{13}C NMR 분광 데이터에 의해서 $C_{27}H_{42}O_2$ 로 결정되었다(Fig. 4-39, -35). 91-18-5의 분광 데이터는 91-18-2와 상당히 유사하였으며 특히 A-C rings에 해당하는 signals는 거의 일치하였다(Fig. 4-34 ~ -39). 하지만 ^{13}C NMR spectrum에서 δ 214.83의 carbonyl peak가 중요한 차이점으로 나타났으며 IR spectrum에서도 새로운 carbonyl absorption band가 1710 cm^{-1} 에서 강하게 나타 났다(Fig. 4-35, -37). 따라서 91-18-5는 새로운 carbonyl group을 가진 steroid 유도체임이 분명하였다.

이 새로운 ketone group의 위치는 proton chemical shift, proton decoupling 및 1H COSY 데이터 분석에 의하여 해결되었다(Fig. 4-34, -36). 1H NMR에 있어서 δ 2.6 - 2.0 region에 위치한 5개의 protons은 모두 α -carbonyl protons로 해석되었다(Fig. 4-34). 그러므로 C-4 methylene을 제외한 나머지 3개의 protons이 carbonyl group의 주위에 $-CH(=O)CH_2-$ 의 형태로 배열되어 있는 것이 분명하였다. 1H COSY NMR에서 C-21 methyl protons(δ 1.10, d, $J=6.8\text{ Hz}$)과 C-20 methine proton(δ 2.52, dq, $J=10.3, 6.8\text{ Hz}$)과의 correlation이 명확하게 드러 났으며 C-21 methyl protons를 decoupling 했을 때도 C-20의 splitting pattern이 뚜렷한 doublet로 변하였다(Fig. 4-36). 또 C-20 proton의 chemical shift가 상당히 downfield로 shift되어 있어 인접한 C-22가 산화되어 있음을 나타 내 준다. 이상과 같은 데이터 분석에 의하여 carbonyl carbon의 위치는 C-22로 확인되어 이 물질의 구조가 결정 되었다(Table 4-6).

Table 4-5. Proton and carbon NMR assignments for 91-18-4^a

#	¹ H	¹³ C
1	7.16(1H, d, 10.0)	158.33 d
2	5.86(1H, d, 10.0)	127.41 d
3		200.13 s
4	2.37(1H, dd, 17.6, 14.2) 2.22(1H, dd, 17.6, 3.9)	40.96 t
5	1.93(1H, m)	44.31 d
6	2.08(1H, m), 1.42(1H, m)	27.49 t
7	1.73(1H, m), 0.98(1H, m)	31.54 t
8	1.38(1H, m)	35.58 d
9	1.07(1H, m)	50.15 d
10		39.11 s
11	1.83(1H, m), 0.90(1H, m)	20.83 t
12	2.10(1H, m), 0.92(1H, m)	31.66 t
13		41.18 s
14	1.35(1H, m)	54.34 d
15	1.69(1H, m), 1.35(1H, m)	24.20 t
16	2.08(1H, m), 1.42(1H, m)	27.90 t
17	1.58(1H, m)	47.70 d
18	3.91(1H, dd, 10.6, 1.7) 3.31(1H, d, 10.6)	63.80 t
19	1.00(3H, s)	12.99 q
20		106.04 s
21	1.59(3H, s)	16.79 q
22		146.15 s
23	2.09(1H, m), 1.48(1H, m)	30.59 t
24	1.33(2H, m)	36.81 t
25	1.52(1H, m)	27.90 t
26	0.89(3H, d, 6.4)	22.58 ^b q
27	0.89(3H, d, 6.4)	22.57 ^b q

^a Proton and carbon NMR spectra were recorded in CDCl₃ solution at 500 and 125 MHz, respectively. Chemical shifts are reported in δ values. J values are reported in Hz. Carbon multiplicities were determined by DEPT experiments. Assignments were aided by proton decoupling, COSY, HMQC, and HMBC experiments. ^b Assignments may be interchanged.

Table 4-6. Carbon NMR assignments for compounds 91-18-1 and -5^a

#	91-18-1	91-18-5
1	158.15 d	158.19 d
2	127.39 d	127.40 d
3	200.15 s	200.19 s
4	40.96 t	40.96 t
5	44.22 d	44.22 d
6	27.51 t	27.58 ^d t
7	31.70 t	31.23 t
8	35.26 d	35.63 d
9	49.93 d	49.88 d
10	39.03 s	38.94 s
11	21.02 t	21.28 t
12	39.79 t	39.58 ^c t
13	40.74 s	42.84 s
14	55.99 d	55.69 d
15	31.42 t	24.31 t
16	80.36 d	27.51 ^d t
17	61.79 d	52.05 d
18	16.47 q	12.42 q
19	13.06 q	12.99 q
20	38.37 d	49.40 d
21	14.66 q	16.55 q
22	119.87 s	214.83 s
23	37.05 t	32.39 t
24	33.66 t	39.72 ^c t
25	82.04 s	27.70 d
26	30.22 ^b q	22.41 ^e q
27	28.45 ^b q	22.37 ^e q

^a Carbon 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 are by comparison with 91-18-1. ^{b-e} Assignments may be interchanged.

환색의 고체로 얻어진 91-18-6은 91-18-1 ~ -5와는 대조적으로 ^{13}C NMR에서 단지 21개의 signals만 나타났다. High resolution mass 데이터와 carbon NMR 자료를 분석하여 이 물질의 분자식은 $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}$ 로 결정되었다(Fig. 4-47, -41). ^1H NMR, ^{13}C NMR, IR, UV spectrum 데이터 분석에 의하면 이 물질은 91-18-1, -2 및 -5등과 동일한 A-D ring을 가지고 있다는 것을 보여 주었으며 ^1H COSY, HMQC, HMBC 실험에 의하여 이 물질의 정확한 구조는 pregna-1,20-dien-3-one으로 결정되었다(Fig. 4-40 ~ -46)(Table 4-7, -8). 문헌조사에 의하면 이 물질은 이전에 동정되지 않은 Pacific soft coral에서 분리되었던 물질과 분광데이터가 잘 일치하여 알려진 물질인 것으로 확인되었다(Higgs & Faulkner, 1977).

91-18-7 역시 환색의 고체로 얻어 졌으며 ^{13}C NMR과 high resolution mass spectrum에 의하여 이 물질의 분자식은 $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}$ 로 결정되었다(Fig. 4-49, -53). 이 물질의 분광 데이터는 91-18-6과 유사하나 δ 158.45(d)과 127.26(d)에 나타났던 olefinic carbons이 δ 38.92(t)과 38.19(t)로 upfield shift되었으며 δ 200.09(s)의 carbonyl carbon은 downfield로 shift되어 δ 212.15(s)에 나타났다(Fig. 4-48 ~ -53). 이러한 차이점들은 ^1H NMR spectrum에서도 나타나 91-18-6의 δ 7.15와 5.85의 olefinic signals이 upfield signals로 치환되었다(Fig. 4-48). 뿐만 아니라 IR spectrum에서 1685 cm^{-1} 에 보였던 α,β -unsaturated carbonyl group의 흡광 band가 1715 cm^{-1} 로 이동되었다(Fig. 4-52). 그러므로 91-18-7은 91-18-6의 A ring이 hydrogenate된 pregna-2-en-3-one로 결정되었다(Table 4-7). 문헌조사 결과에 의하면 이 물질은 천연물질로 분리되지는 않았으나 91-18-6을 합성하는 과정에서 key intermediate로 합성되었다는 사실이 확인되었다(Schow & McMorris, 1977). 91-18-6과 -7은 C_{21} degraded steroid인 pregnane계의 물질들이다. 문헌조사에 의하면 지금까지 pregnane 계열의 물질은 해양생물에서는 드물게 발견되어 수 개의 물질만이 알려져 있다(Kingston et al, 1977; 1979; 1982; Higgs & Faulkner, 1977; Cimino et al, 1979; Black et al, 1985; Wasyluk et al, 1989)(Fig. 4-5).

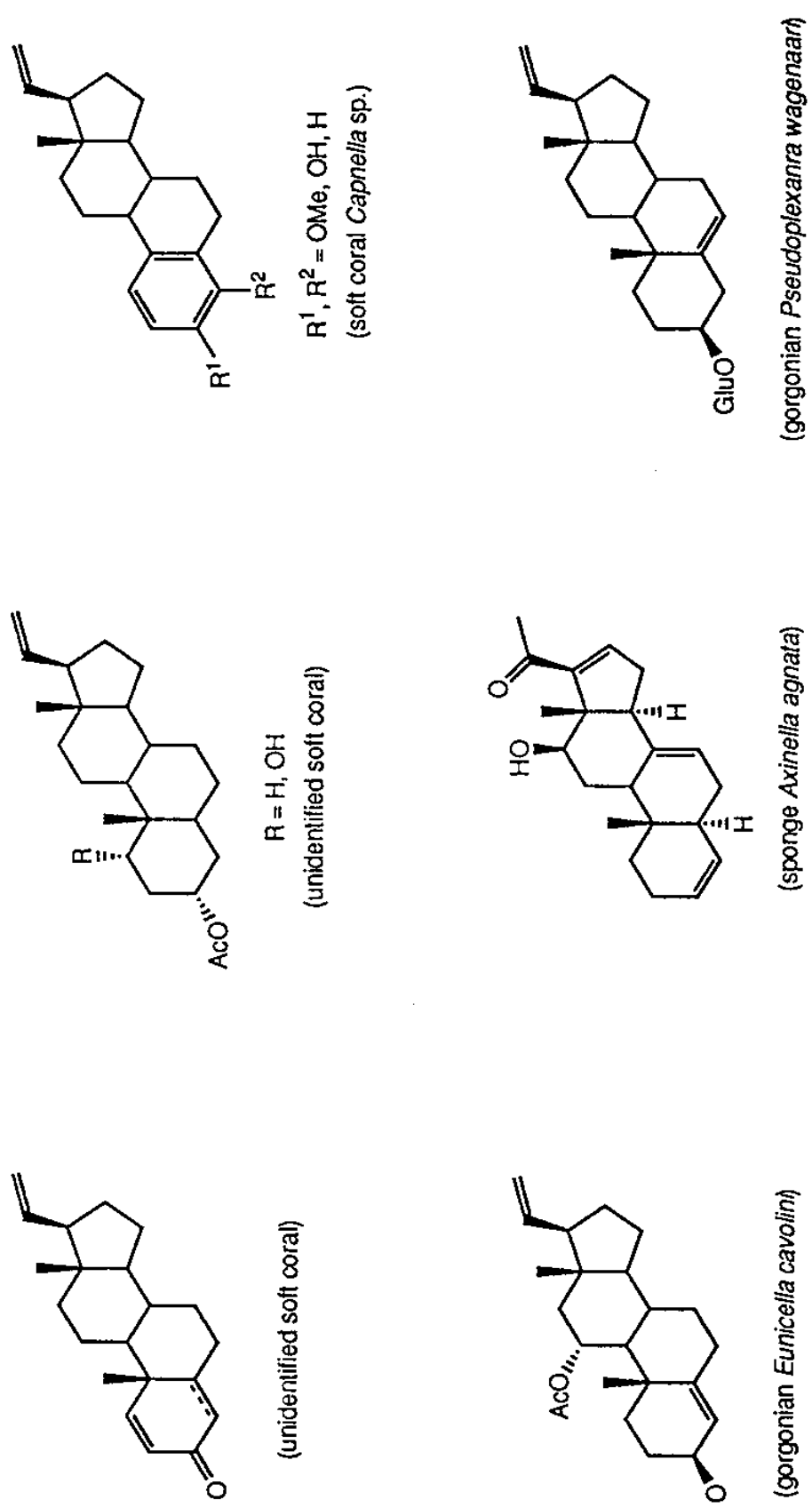


Fig. 4-5. Pregnane steroids isolated from marine organisms.

Table 4-7. Proton and carbon assignments for compounds 91-18-6 and -7^a

*	91-18-6		91-18-7	
	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) 1.36(1H, m)	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	1.53(1H, m)	46.78 d
6	1.42(2H, m)	27.55 t	1.33(2H, m)	28.95 t
7	1.75(1H, m), 0.99(1H, m)	31.33 t	1.73(1H, m), 0.94(1H, m)	31.82 t
8	1.46(1H, m)	35.70 d	1.41(1H, m)	35.52 d
9	0.99(1H, m)	50.17 d	0.76(1H, ddd, 12.7, 10.3, 4.4)	54.09 d
10		39.00 s		35.77 s
11	1.79(1H, m), 1.40(1H, m)	20.75 t	1.54(1H, m), 1.31(1H, m)	21.05 t
12	1.77(1H, m), 1.10(1H, m)	37.26 t	1.69(1H, m), 1.04(1H, m)	37.44 t
13		43.61 s		43.61 s
14	1.10(1H, m)	55.45 d	1.04(1H, m)	55.44 d
15	1.69(1H, m), 1.20(1H, m)	24.59 t	1.67(1H, m), 1.19(1H, m)	24.79 t
16	1.79(1H, m), 1.58(1H, m)	27.11 t	1.79(1H, m), 1.56(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 ^b	0.61(3H, s)	12.94 q
19	1.02(3H, s)	12.99 q ^b	1.01(3H, s)	11.50 q
20	5.76(1H, ddd, 17.1, 10.3, 7.3)	139.46 d	5.75(1H, ddd, 16.9, 10.7, 7.6)	139.74 d
21	4.99(1H, dd, 10.3, 1.0) 4.96(1H, ddd, 17.1, 1.0, 1.0)	114.64 t	4.97(1H, dd, 10.7, 2.2) 4.96(1H, ddd, 16.9, 1.0, 1.0)	114.55 t

Proton and carbon NMR spectra were recorded in CDCl₃ solution at 500 and 125 MHz, respectively. 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. Carbon multiplicities were determined by DEPT experiments. Assignments for 91-18-6 and -7 are based upon HMQC and HMBC. ^b Assignment may be interchanged.

Table 4-8. Results of HMBC Experiments with compounds 91-18-1, -4, and -6^a

H ^b	C		
	91-18-1	91-18-2	91-18-3
1	3, 5, 9, 10	5, 9, 10	3, 5, 9, 10
2	4, 10		4, 10
4	3, 5, 10	5, 6, 10	3, 5
15			8, 16
16	13		
17			13, 18, 20, 21
18	13, 14, 17	12, 13, 17	12, 13, 14
19	1, 5, 9, 10	5, 9, 10	1, 5, 9, 10
20	13, 17, 21		
21	17, 22	17, 20, 22	17
26	24, 25, 27	24, 25, 27	
27	24, 25, 26	24, 25, 26	

^a Experiments were performed at 125 MHz in CDCl₃ solutions. Parameters were optimized for couplings of 8 Hz. ^b Numbers are protons which exhibited H-C correlations. Other protons are omitted for clarity.

*Alcyonium gracillimum*의 조추출물은 P388과 HSV-II에 대해서 각각 상당한 세포독성(IC₅₀ 22.4 µg/ml)과 항바이러스 효과(IC₅₀ 7 µg/ml)를 나타내었다. 순수하게 분리한 대사물질들의 생리활성도를 측정한 결과 hemiketal 91-18-2는 P388 cell line에 대해서 중간정도의 세포독성(IC₅₀ 7.8 µg/ml)을 보였으며 91-18-2와 91-18-3은 human cytomegalovirus에 대해서 각각 IC₅₀ 3.7 과 7.2 µg/ml를 나타내었다(Table 4-9, -10, -11). 그러나 91-18-4등 나머지 물질은 항암이나 항바이러스 효과가 없는 것으로 생각된다.

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 유기조추출물의 양은 9.22 g이 얻어 졌다.

이 조추출물을 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

Table 4-9. Antiviral activity of compounds 91-18-1 ~ -3

단위: $\mu\text{g/ml}$

Sample	Toxicity	Antiviral activity(EC50)		Selectivity index		비 고
	CC50	HSV-1	HSV-2	HSV-1	HSV-2	
91-18-1	39.87	>39.87	>39.87	<1	<1	
91-18-2	7.58	>7.58	>7.58	<1	<1	
91-18-3	7.59	>7.59	>7.59	<1	<1	
Acyclovir	>250	1.5	3.89	>166.67	>64.27	기준약물
Ara-C	7.7	0.7	0.81	11.00	9.51	기준약물

Table 4-10. Antiviral activity of compounds 91-18-1 ~ -3

단위: $\mu\text{g/ml}$

Sample	Antiviral activity(EC50)		비 고
	AD-169	Davis	
91-18-1	>3.7	<3.7	
91-18-2	3.7	3.7	
91-18-3	7.2	7.7	
Ganciclovir	0.37	0.37	기준약물
PFA	19.3	57.7	기준약물

AD-169 and Davis are strains of human cytomegalovirus

Table 4-11. P388 activity of compounds 91-18-1 ~ -3

단위: $\mu\text{g/ml}$

sample	P388(EC50)	비 고
91-18-1	>100	
91-18-2	8.11	
91-18-3	79.4	

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. 91-18-1의 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 91-18-1이 순수하게 30 mg 얻어졌다(acetonitrile, 2.5 ml/min, retention time 25.5 분). mp. 181-183°.

[α]_D -20.7°(c 0.5, CHCl₃); UV(CH₃CN) λ_{max} 228 nm(ϵ 11500); HRCIMS: M⁺+H obsd 413.3048, calcd 413.3056(C₂₇H₄₁O₃); LREIMS:m/z(relative intensity) 412(4), 397(9), 354(6), 343(8), 298(45), 283(15), 269(27), 177(8), 139(100), 122(9); IR(KBr) 2930, 2870, 1690, 1450, 1380, 1260, 1170, 1135, 990, cm⁻¹; 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-12), 39.03(C, C-10), 38.37(CH, C-20), 37.05(CH₂, C-23), 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).

4. 3. 3. 91-18-2의 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 91-18-2가 순수하게 30 mg 얻어졌다(acetonitrile, 2 ml/min, retention time 20.4 분). mp. 43-45°.

$[\alpha]_D$ -3.8°(c 0.5, CHCl₃); UV(CH₃CN) λ_{max} 225 nm(ϵ 11100); HRCIMS: M⁺+NH₄⁺- H₂O obsd 414.3357, calcd 414.3372(C₂₇H₄₄NO₂); LREIMS:m/z(relative intensity) 414(1), 396(18), 353(100), 298(6), 283(45), 269(83), 149(5), 121(6); IR(KBr) 3450, 2950, 2930, 2870, 1680, 1450, 1380, 1260, 1170, 990 cm⁻¹; 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) ; ^{13}C NMR(CDCl_3 , 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(CH_2 , C-4), 39.78(CH_2 , C-12), 39.60(CH, C-20), 38.99(C, C-10), 36.87(CH_2 , C-23), 35.26(CH, C-8), 32.51(CH_2 , C-24), 31.60(CH_2 , C-7), 31.40(CH_2 , C-15), 28.28(CH, C-25), 27.46(CH_2 , C-6), 22.55(CH_3 , C-26), 22.43(CH_3 , C-27), 20.94(CH_2 , C-11), 16.51(CH_3 , C-18), 15.48(CH_3 , C-21), 13.03(CH_3 , C-19)

4. 3. 4. 91-18-3의 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 C_{18} column을 사용하여 다시 HPLC로 분리하여 91-18-3이 순수하게 34 mg 얻어졌다(acetonitrile, 2 ml/min, retention time 18.2 분). mp. 123-125°.

$[\alpha]_D -10.2^\circ$ (c 0.5, CHCl_3); UV(CH_3CN) λ_{max} 236 nm(ϵ 13000); HRCIMS: $\text{M}^+ + \text{H}$ obsd 413.3054, calcd 413.3056($\text{C}_{27}\text{H}_{41}\text{O}_3$); LREIMS:m/z(relative intensity) 412(0.2), 410(2), 394(48), 351(42), 267(26), 248(100), 171(10), 165(48), 121(11), 115(8); IR(KBr) 3450, 2950, 2870, 1665, 1625, 1450, 1380, 1250, 1070, 890 cm^{-1} ; ^1H NMR(CDCl_3 , 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-6 β), 2.36(1H, ddd, 12.9, 3.3, 3.3, H-6 α), 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); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 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(CH_2 , C-12), 36.92(CH_2 , C-23), 35.16(CH, C-8), 33.71(CH_2 , C-7), 32.77(CH_2 , C-6), 32.53(CH_2 , C-24), 31.91(CH_2 , C-15), 28.33(CH, C-25), 22.60(CH_3 , C-26), 22.47(CH_3 , C-27), 22.66(CH_2 , C-11), 18.75(CH_3 , C-19), 15.48(CH_3 , C-21), 16.40(CH_3 , C-18)

4. 3. 5. 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 얻어졌으며 이것을 reversed phase C_{18} column을 이용하여 다시 HPLC한 결과 순수한 물질이 6 mg 얻어졌다(acetonitrile, 3 ml/min, retention time 28.6 분). mp. 52-53.

$[\alpha]_D^{25} +34.0^\circ$ (c 0.5, CHCl_3); UV(CH_3CN) λ_{max} 224 nm(ϵ 10600); HREIMS: M^+ obsd 396.3034, calcd 396.3028($\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{O}_2$); LREIMS:m/z(relative intensity) 396(100), 340(10), 292(7), 268(8), 191(7), 149(7), 110(9); IR(KBr) 2930, 2870, 1680, 1630, 1445, 1260, 1170, 785 cm^{-1} ; ^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. 6. 91-18-5의 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 91-18-5가 순수하게 10 mg 얻어졌다 (acetonitrile, 2 ml/min, retention time 26.4 분). mp. 55-57°

$[\alpha]_D^{25} +22.4^\circ$ (c 0.5, CHCl₃); UV(CH₃CN) λ_{max} 229 nm(ϵ 10600); HREIMS: M⁺ obsd 398.3161, calcd 398.3185(C₂₇H₄₂O₂); LREIMS:m/z(relative intensity) 398(100), 383(7), 342(11), 327(23), 299(31), 271(61), 245(8), 229(8), 161(9), 122(25) 99(23), 81(17); IR(KBr) 2930, 2870, 1710, 1690, 1450, 1370, 1265, 780 cm⁻¹; 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-4 β), 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. 7. 91-18-6과 91-18-7의 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 C_{18} silica column, RI detector, 2 ml/min) retention time 20.5 분에서 약간의 불순물을 포함한 pregna-20-ene-3-one(=91-18-7)이 2 mg 얻어 졌으며 23 분에서 순수한 pregna-1,20-diene-3-one(=91-18-6)이 80 mg 얻어 졌다. 불순물을 함유하고 있는 pregna-20-ene-3-one(=91-18-7)은 reversed phase C_{18} column을 이용한 HPLC로 다시 분리한 결과 1 mg이 순수하게 얻어졌다(acetonitrile, 3 ml/min, retention time 21 분).

Pregna-1,20-diene-3-one: mp. 126-127.; $[\alpha]_D^{25} +35.4^\circ$ (c 0.5, CHCl_3); UV (CH_3CN) λ_{max} 228 nm(ϵ 12000); LREIMS:m/z(relative intensity) 298(74), 283(100), 270(12), 229(31), 177(20), 163(19), 134(24), 122(60), 107(22); IR(KBr) 2920, 2850, 1685, 1630, 1440, 1380, 1270, 1010, 930 cm^{-1} ; ^1H NMR(CDCl_3 , 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-4 β), 2.22(1H, dd, 17.6, 3.9, H-4 α), 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); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 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(CH_2 , 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(CH_2 , C-4), 39.00(C, C-10), 37.26(CH_2 , C-12), 35.70(CH, C-8), 31.33(CH_2 , C-7), 27.55(CH_2 , C-6), 27.11(CH_2 , C-16), 24.59(CH_2 , C-15), 20.75(CH_2 , C-11), 12.99(CH_3 , C-19), 12.97(CH_3 , C-18)

Pregna-20-ene-3-one: mp. 113-115°. $[\alpha]_D^{25} +12.5^\circ$ (c 0.2, CHCl_3); UV(CH_3CN) no λ_{max} ; LREIMS:m/z(relative intensity) 300(100), 285(36), 272(16), 231(51), 217(10), 163(10), 121(12); IR(KBr) 2940, 2850, 1715, 1640, 1440, 1250, 910, 685 cm^{-1} ; ^1H NMR(CDCl_3 , 500 MHz) δ 5.75(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-2 β), 2.29(1H, brddd, 15.6, 5.4, 2.9, H-2 α), 2.27(1H, dd, 14.9, 14.7, H-4 β), 2.08(1H, ddd, 14.9, 3.9, 2.2, H-4 α), 2.02(1H, ddd, 15.1, 6.4, 2.0, H-1 α), 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); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125 MHz) δ 212.15(C, C-3), 139.74(CH, C-20), 114.55(CH_2 , C-21), 55.44(CH, C-14), 55.38(CH, C-17), 54.09(CH, C-9), 46.78(CH, C-5), 44.73(CH_2 , C-4), 43.61(C, C-13), 38.62(CH_2 , C-1), 38.19(CH_2 , C-2), 37.44(CH_2 , C-12), 35.77(C, C-10), 35.52(CH, C-8), 31.82(CH_2 , C-7), 28.95(CH_2 , C-6), 27.20(CH_2 , C-16), 24.79(CH_2 , C-15), 21.05(CH_2 , C-11), 12.94(CH_3 , C-18), 11.50(CH_3 , C-19)

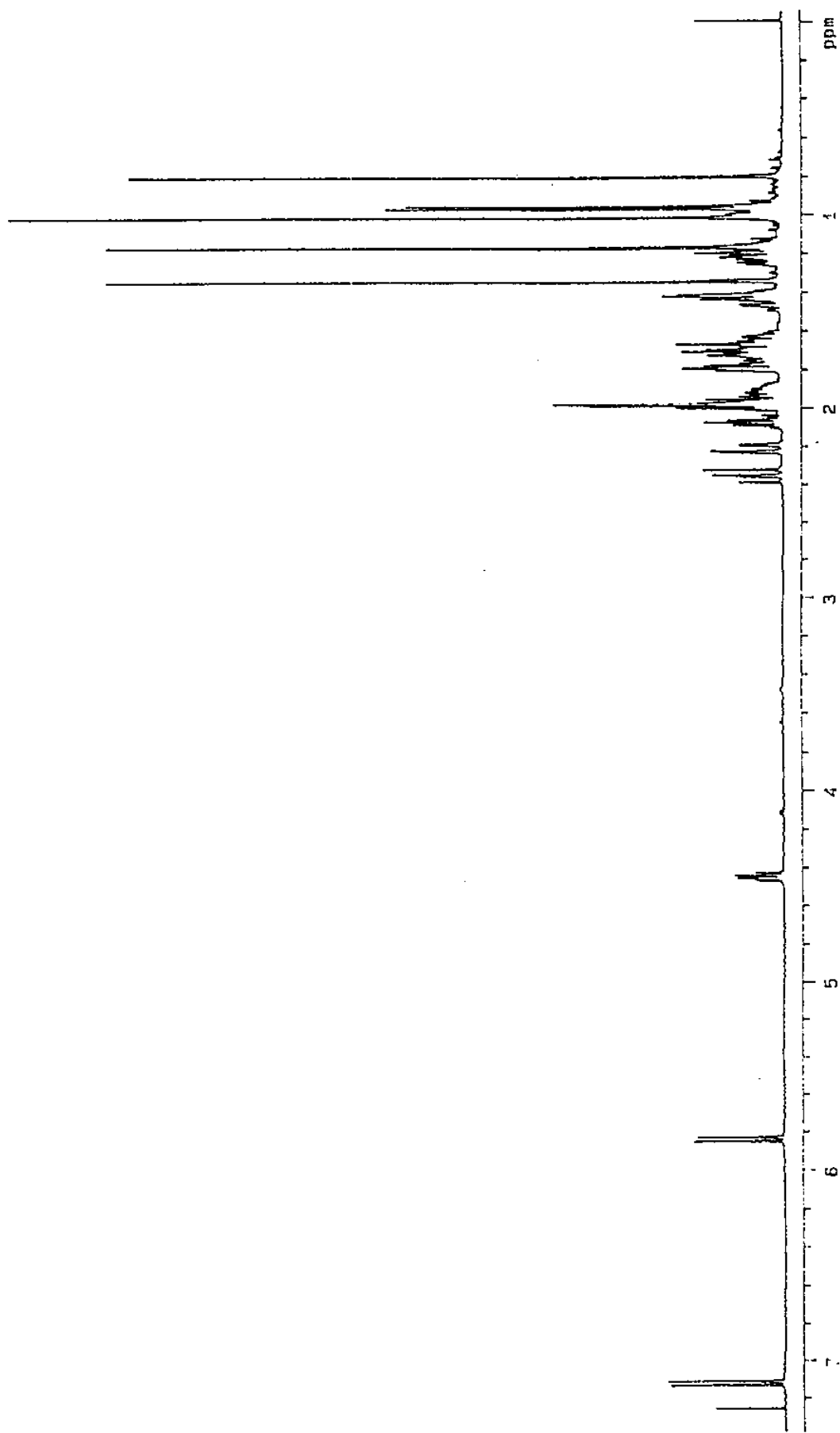


Fig. 4-6. Proton NMR spectrum of compound 91-18-1.

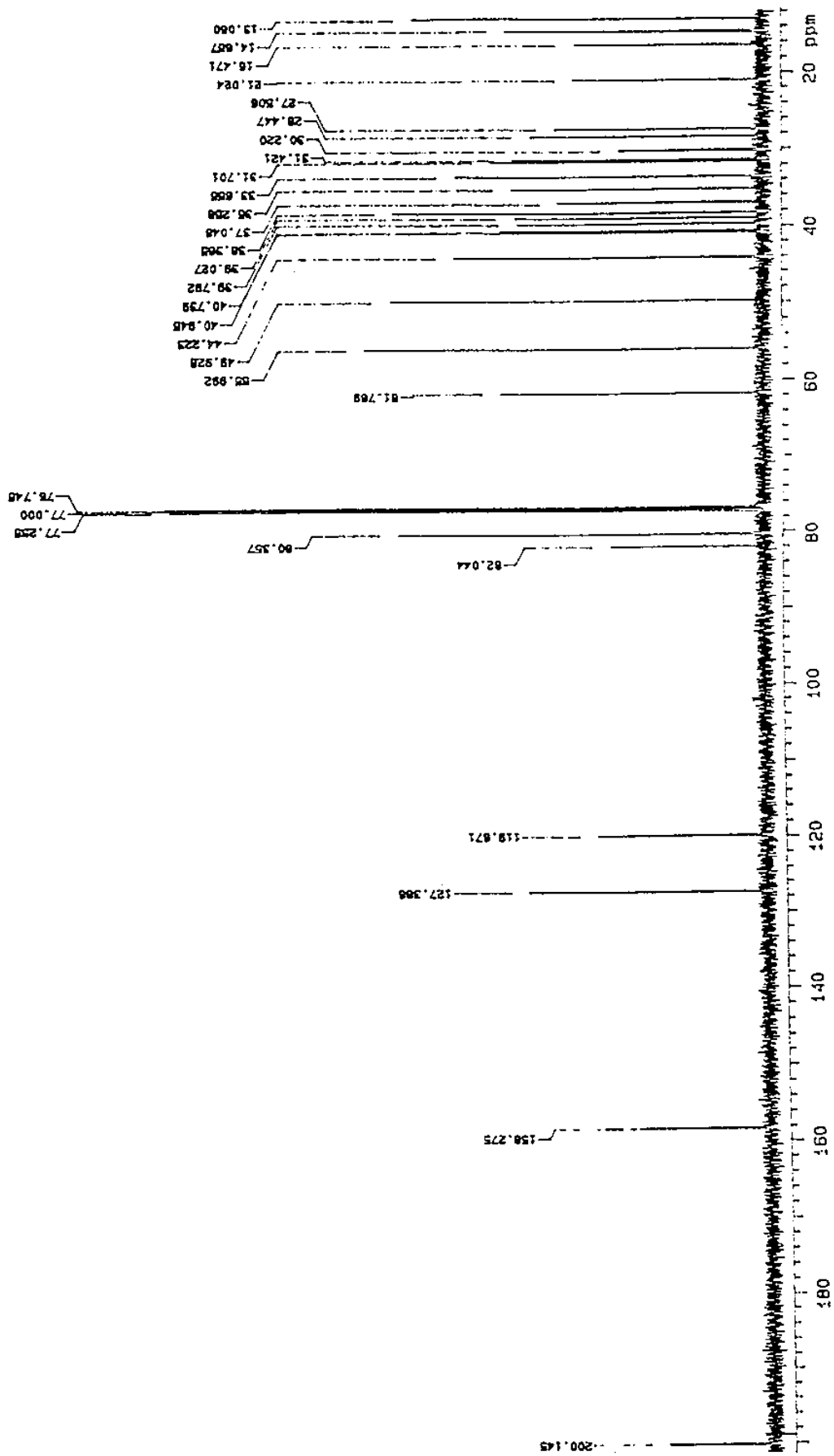


Fig. 4-7. Carbon NMR spectrum of compound 91-18-1.

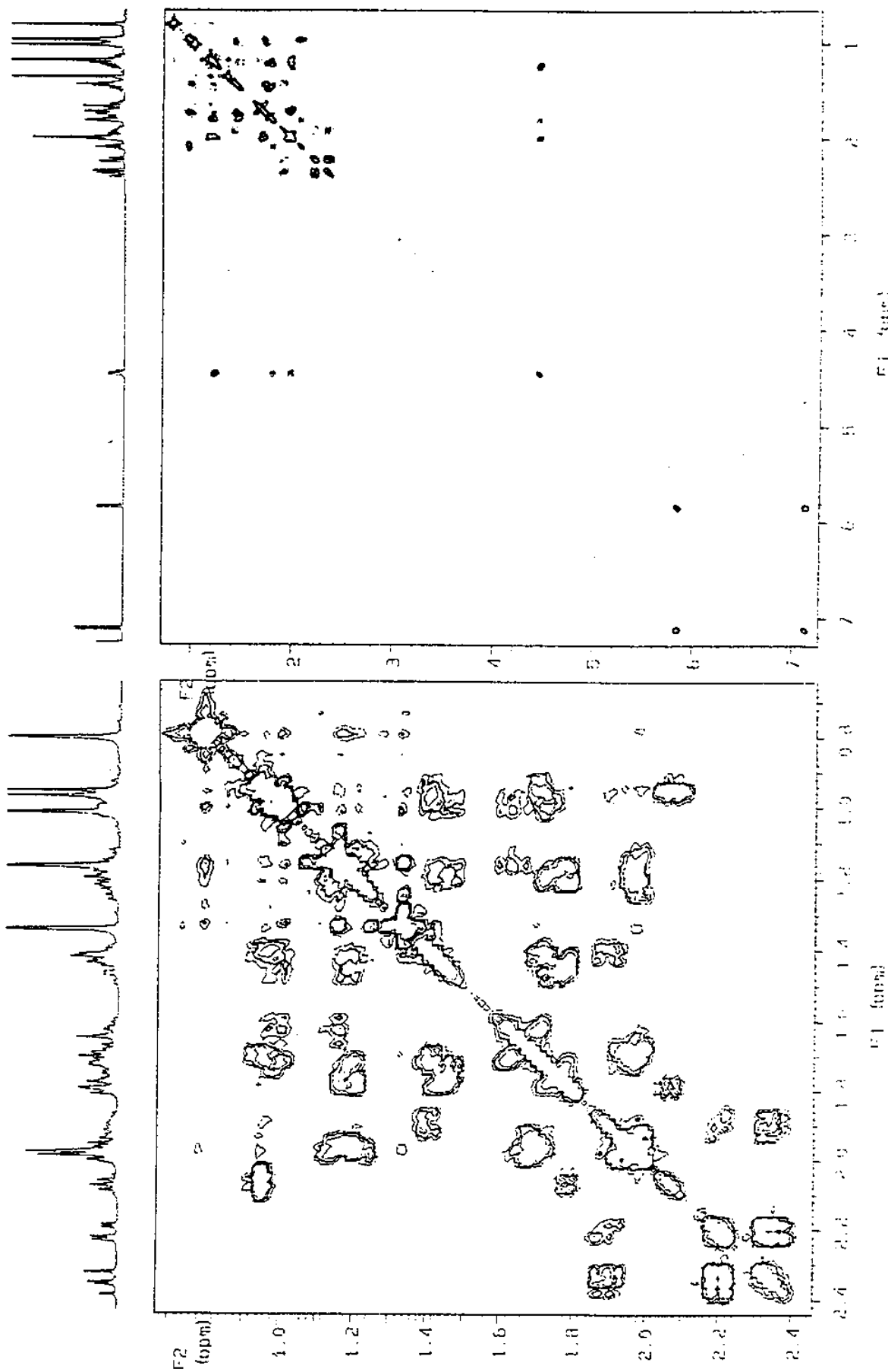


Fig. 4-8. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-18-1.

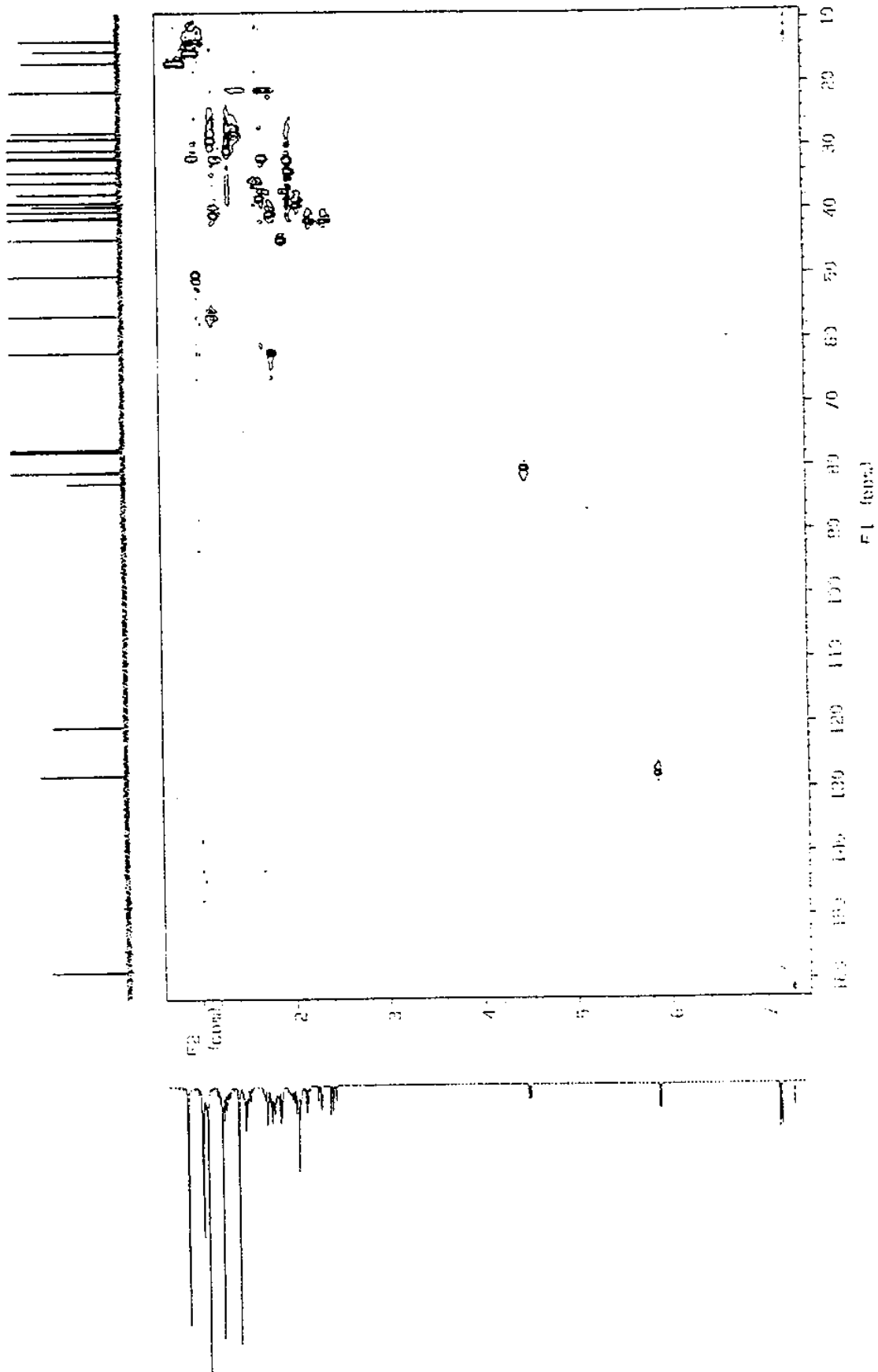


Fig. 4-9. HMQC spectrum of compound 91-18-1.

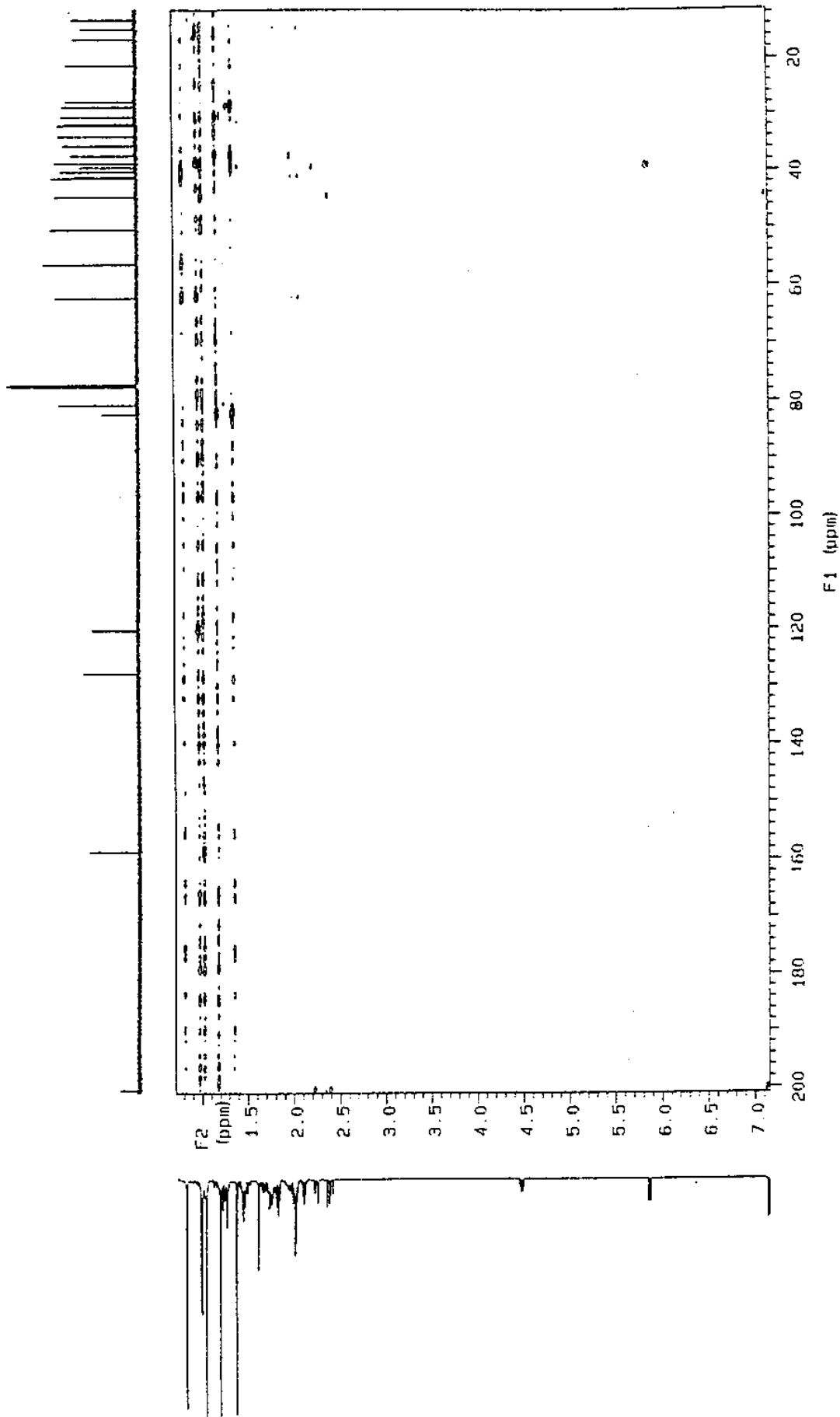


Fig. 4-10. HMBC spectrum of compound 91-18-1.

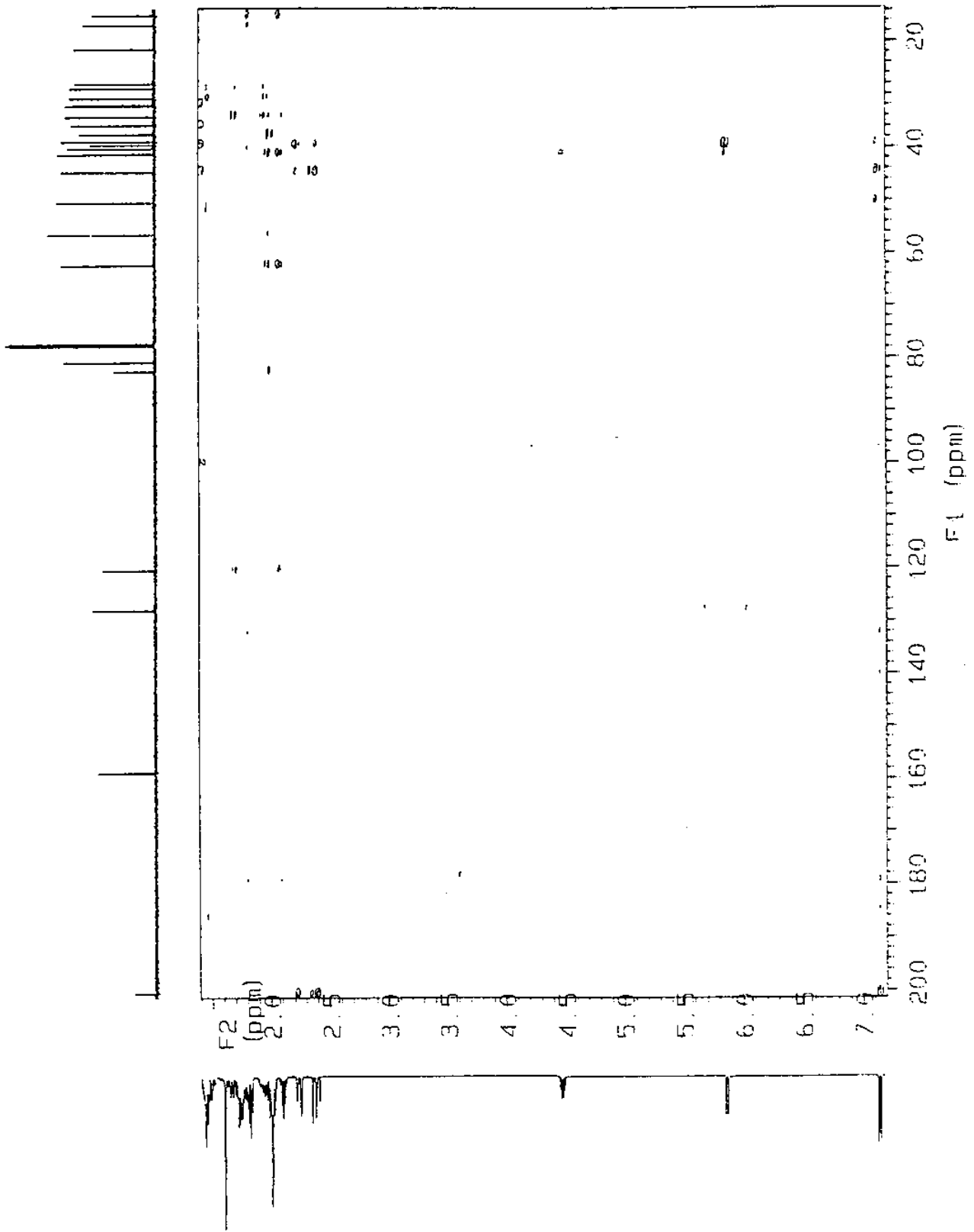


Fig. 4-10. continued.

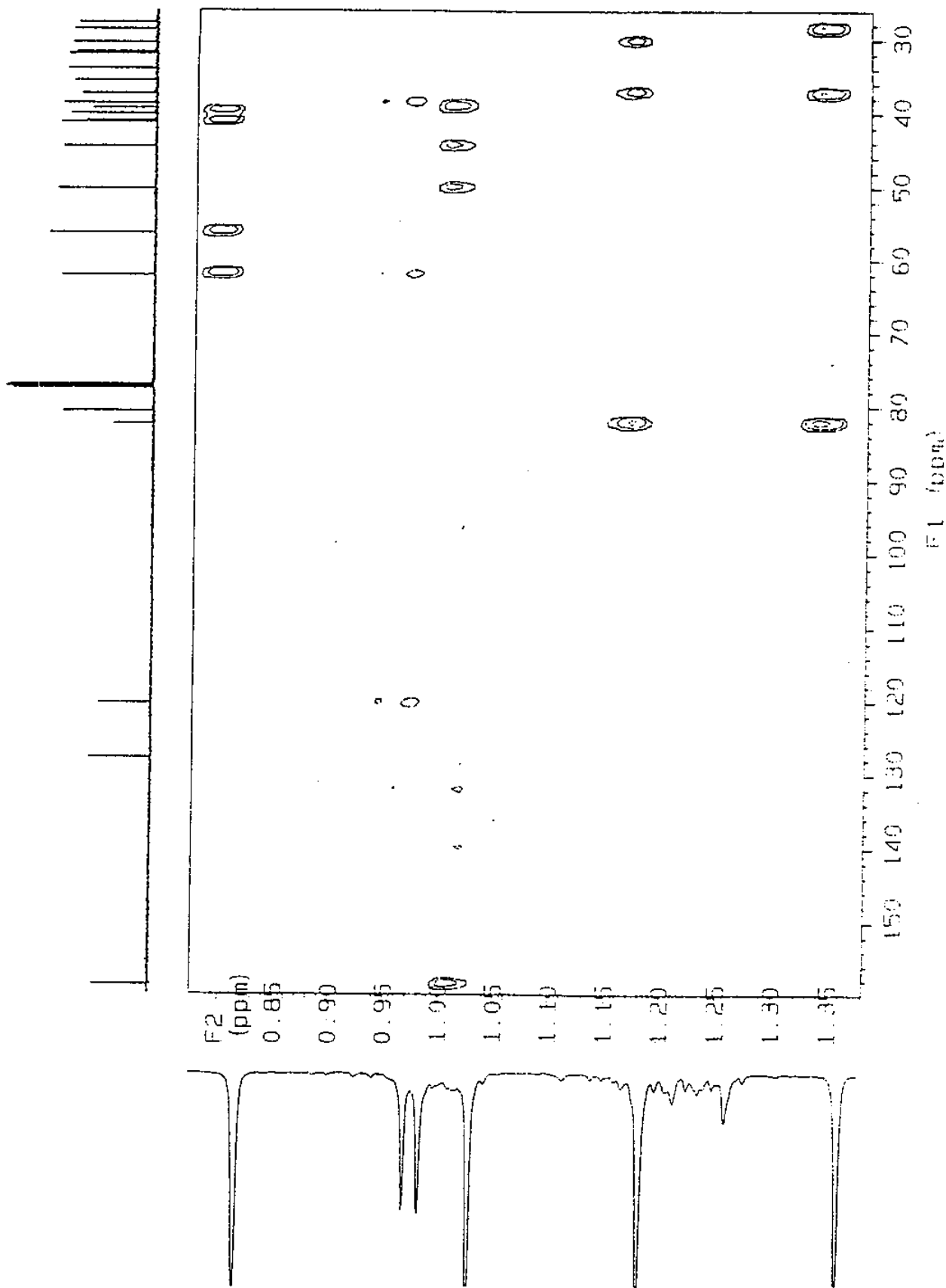


Fig. 4-10. continued.

Mattson Instruments FTIR

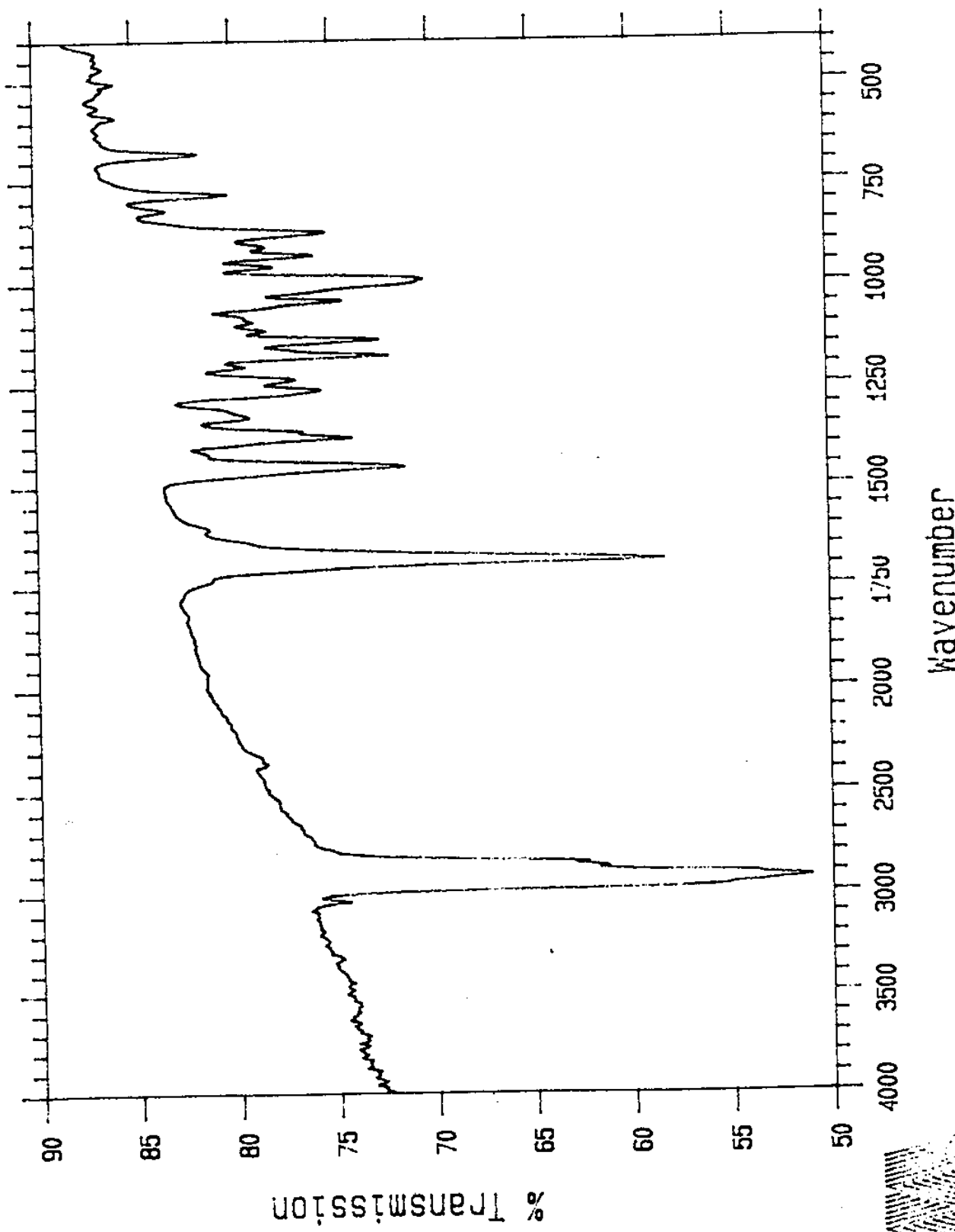


Fig. 4-11. IR spectrum of compound 91-18-1.

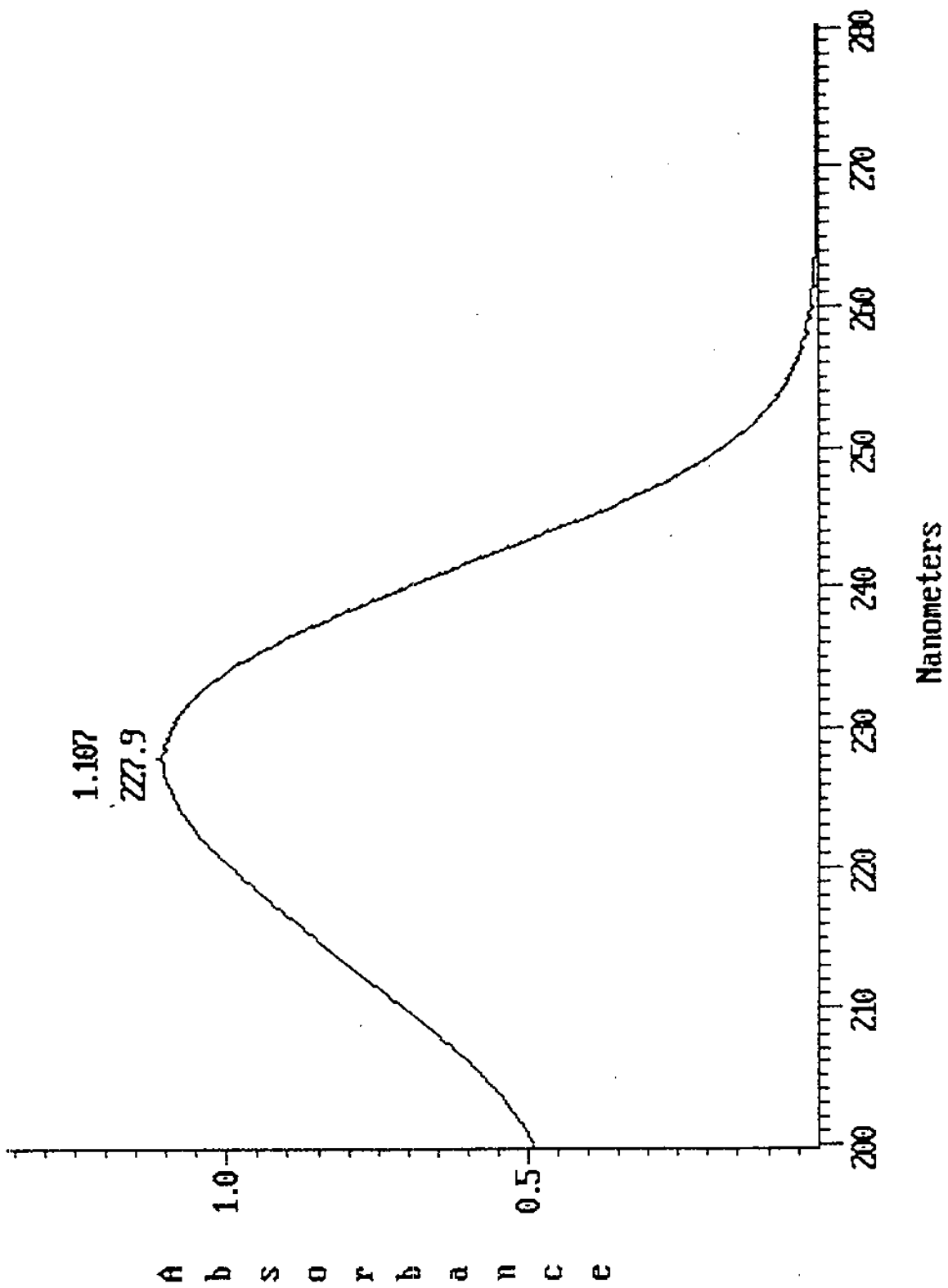


Fig. 4-12. UV spectrum of compound 91-18-1.

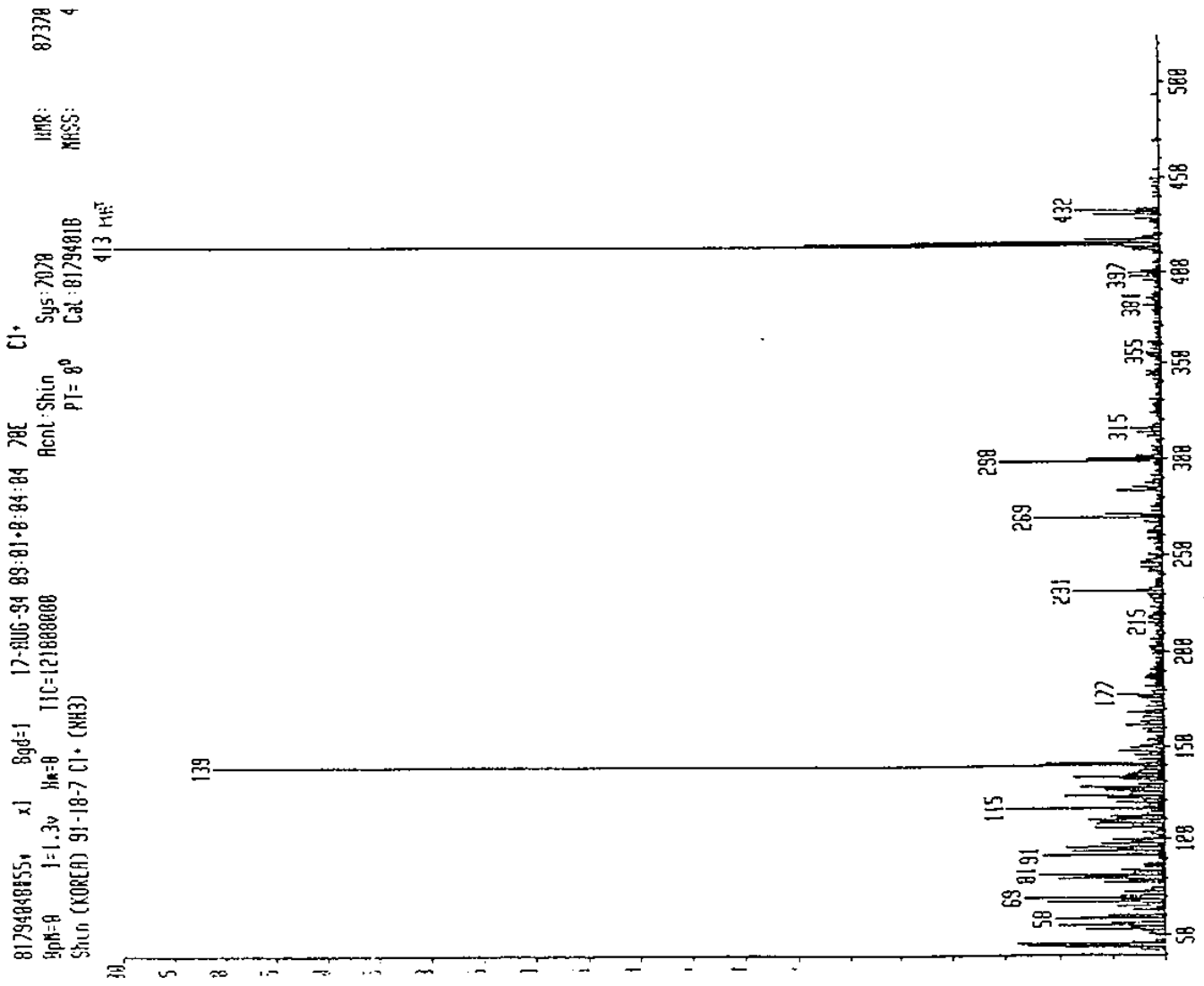


Fig. 4-13. High-resolution CIMS spectrum of compound 91-18-1.

91-18-6-hp1c-2-rh-1-p
OBSERVE H1
FREQUENCY 498.843 MHz
SPECTRAL WIDTH 8000.0 Hz
ACQUISITION TIME 2.892 sec
RELAXATION DELAY 0.000 sec
PULSE WIDTH 9.0 usec
AMBIENT TEMPERATURE
NO. REPEATITIONS 32
DOUBLE PRECISION ACQUISITION
DATA PROCESSING
F1 SIZE 32768
TOTAL ACQUISITION TIME : 21minutes

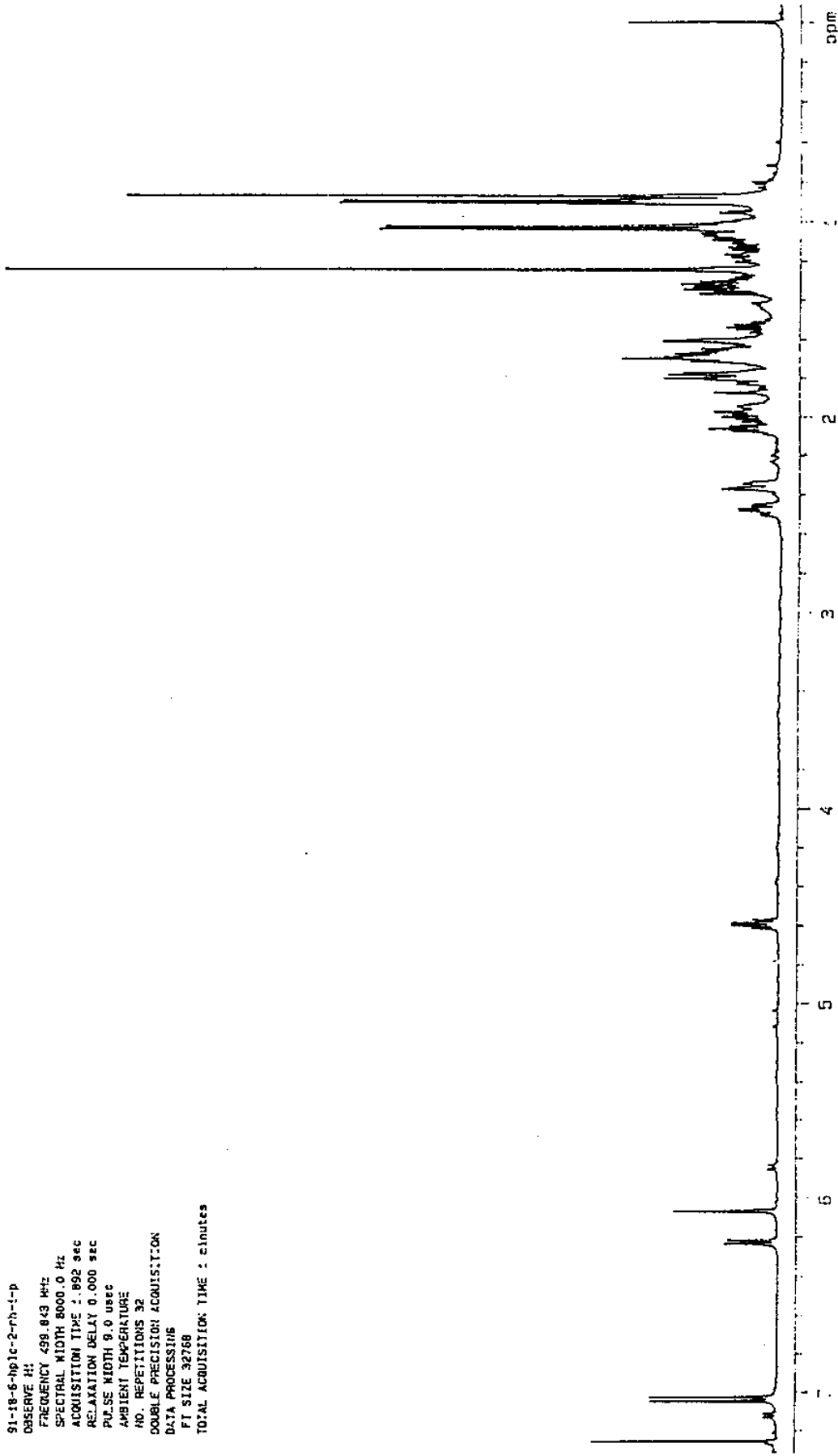


Fig. 4-14. Proton NMR spectrum of compound 91-18-2.

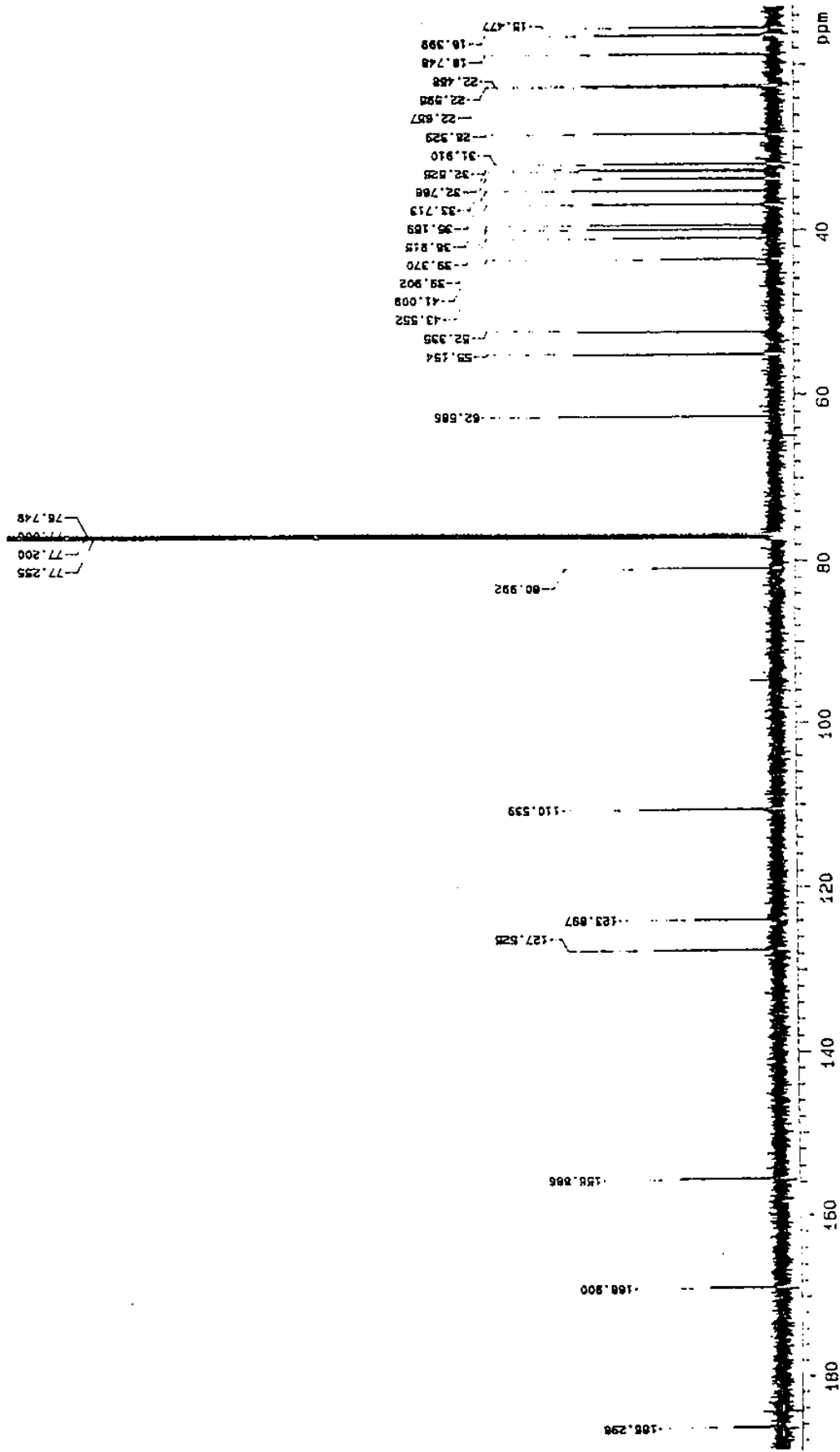


Fig. 4-15. Carbon NMR spectrum of compound 91-18-2.

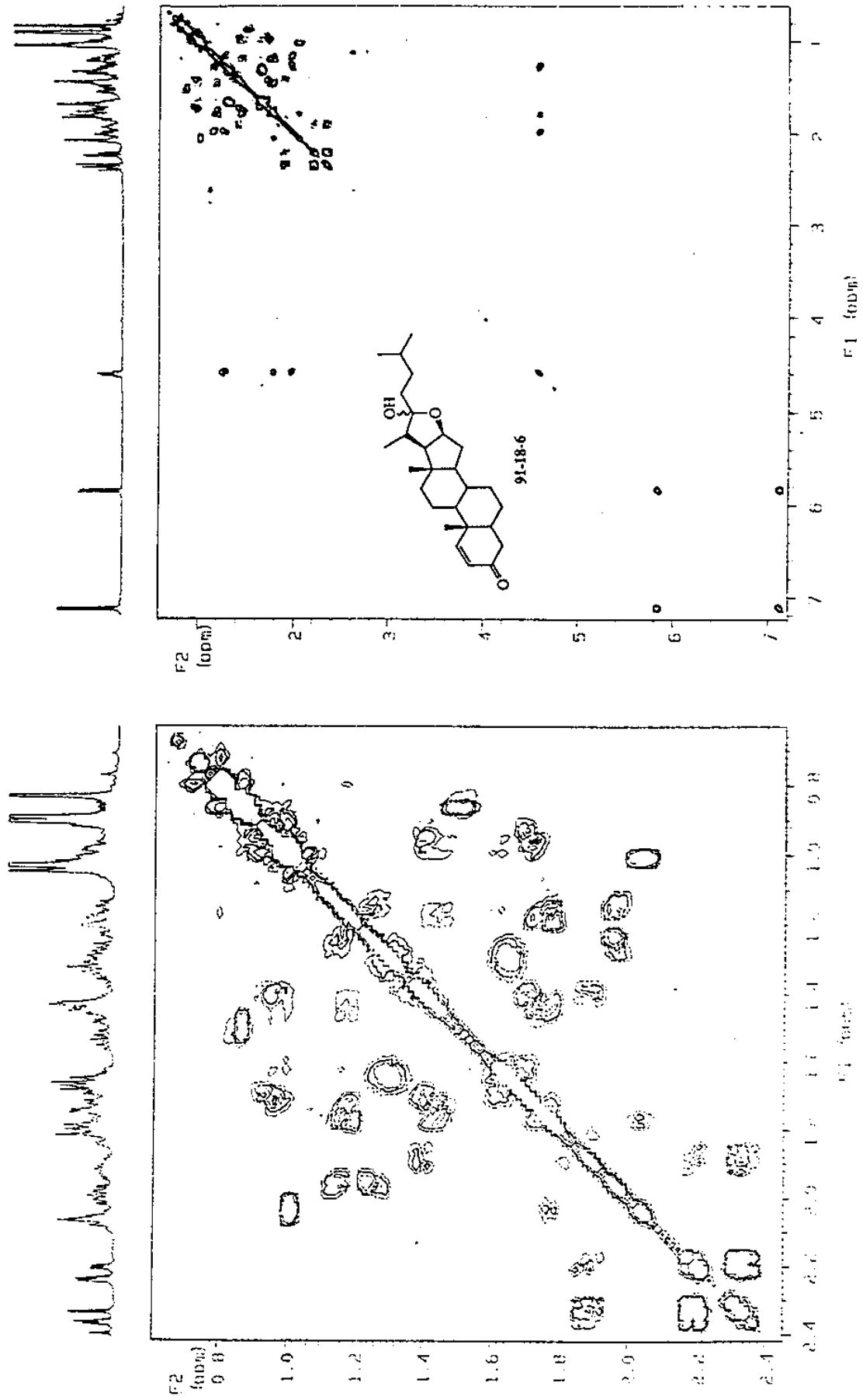


Fig. 4-16. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-18-2.

Mattson Instruments FTIR

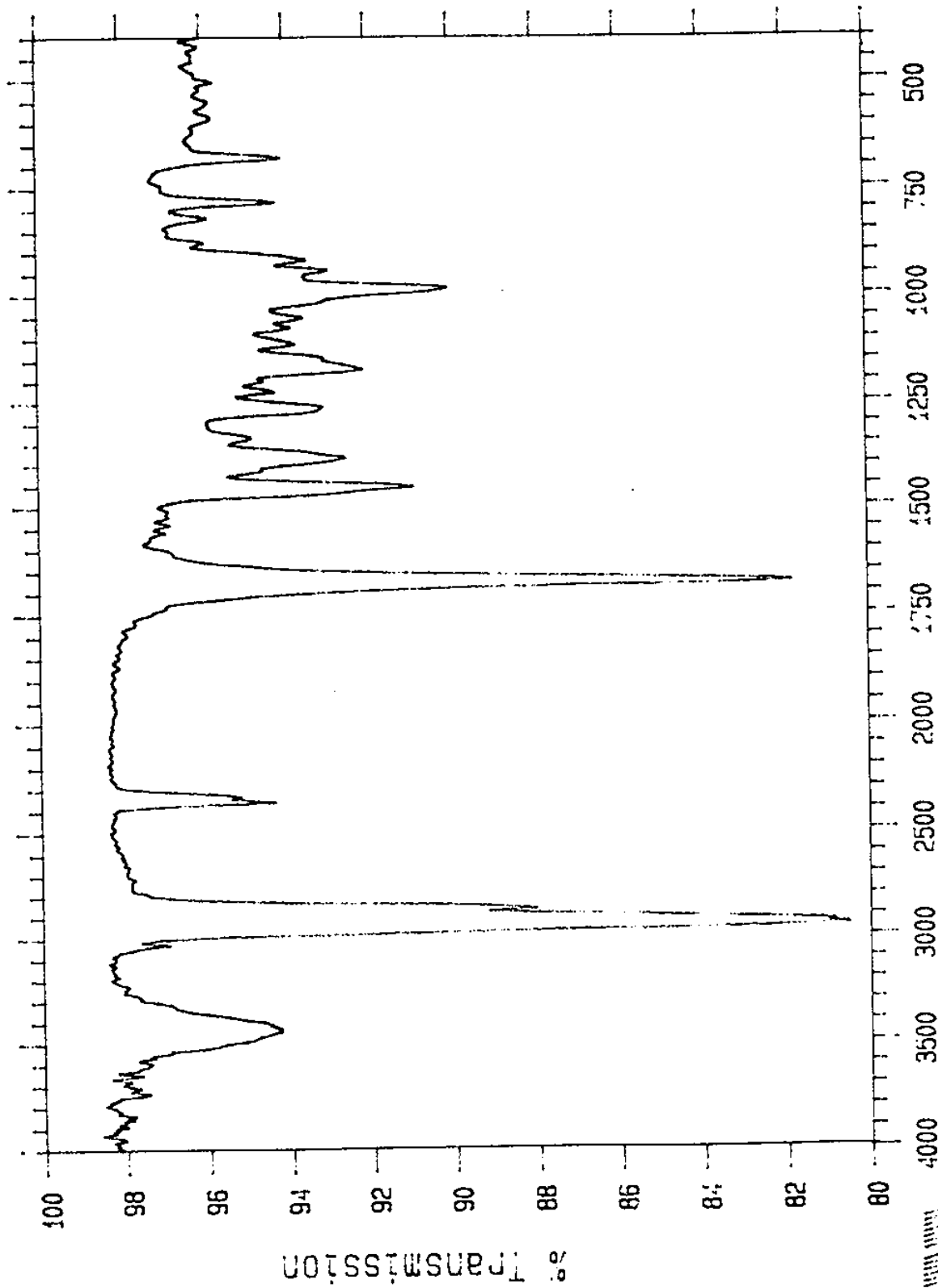


Fig. 4-17. IR spectrum of compound 91-18-2.

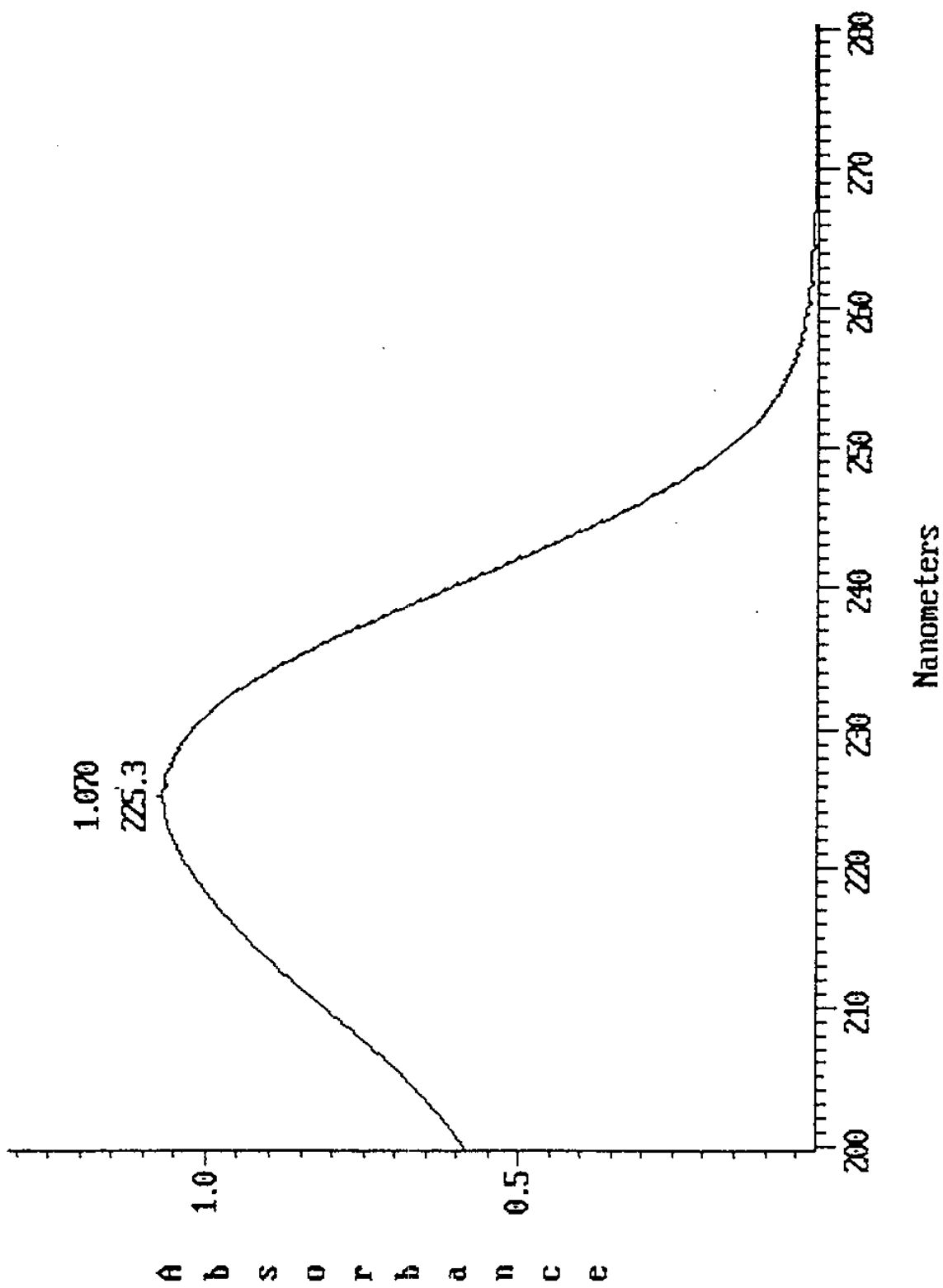


Fig. 4-18. UV spectrum of compound 91-18-2.

Scan 1297 (30.242 min) of 81689404h.d SUBTRACTED SCALED

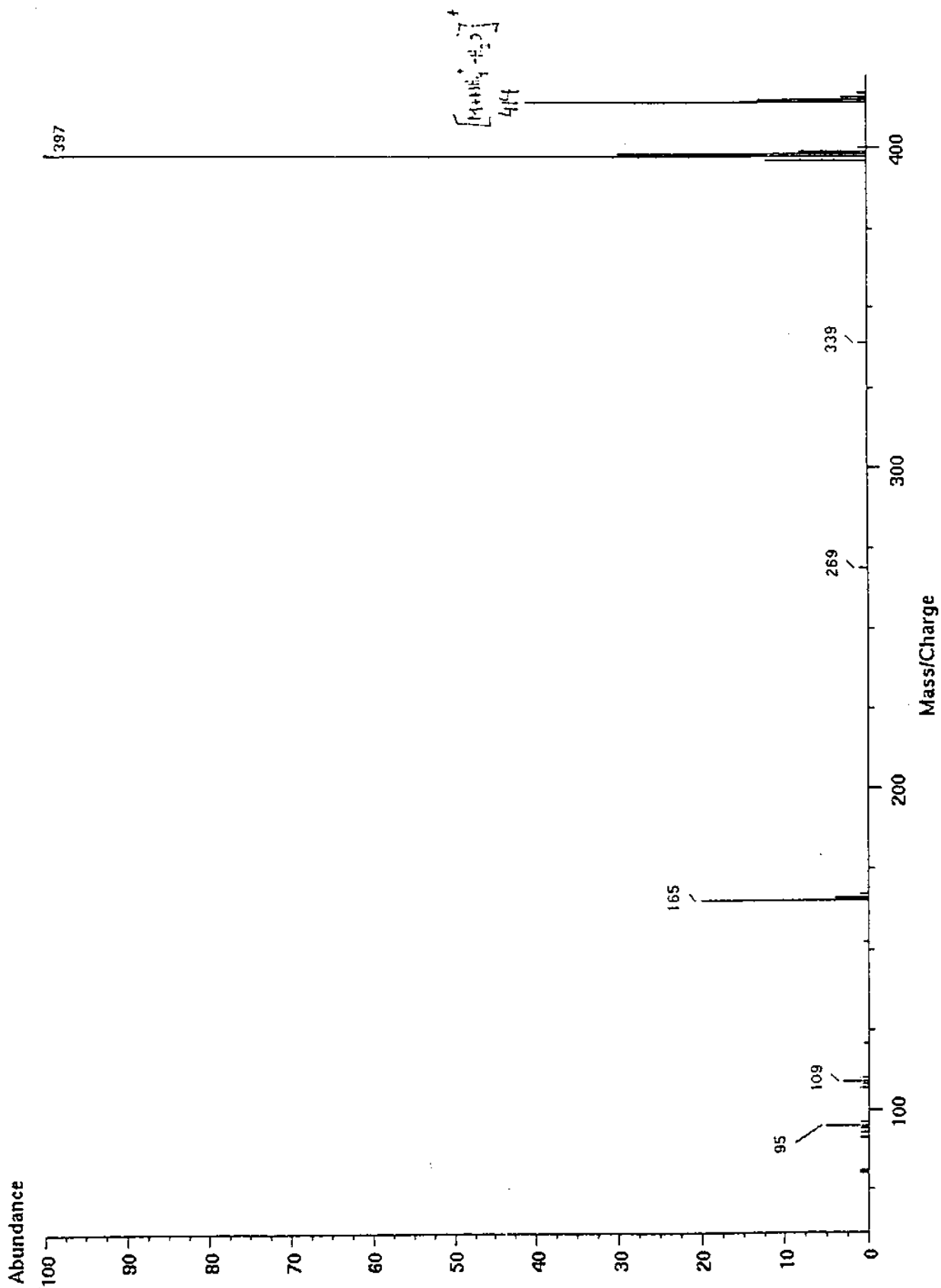


Fig. 4-19. High-resolution CIMS spectrum of compound 91-18-2.

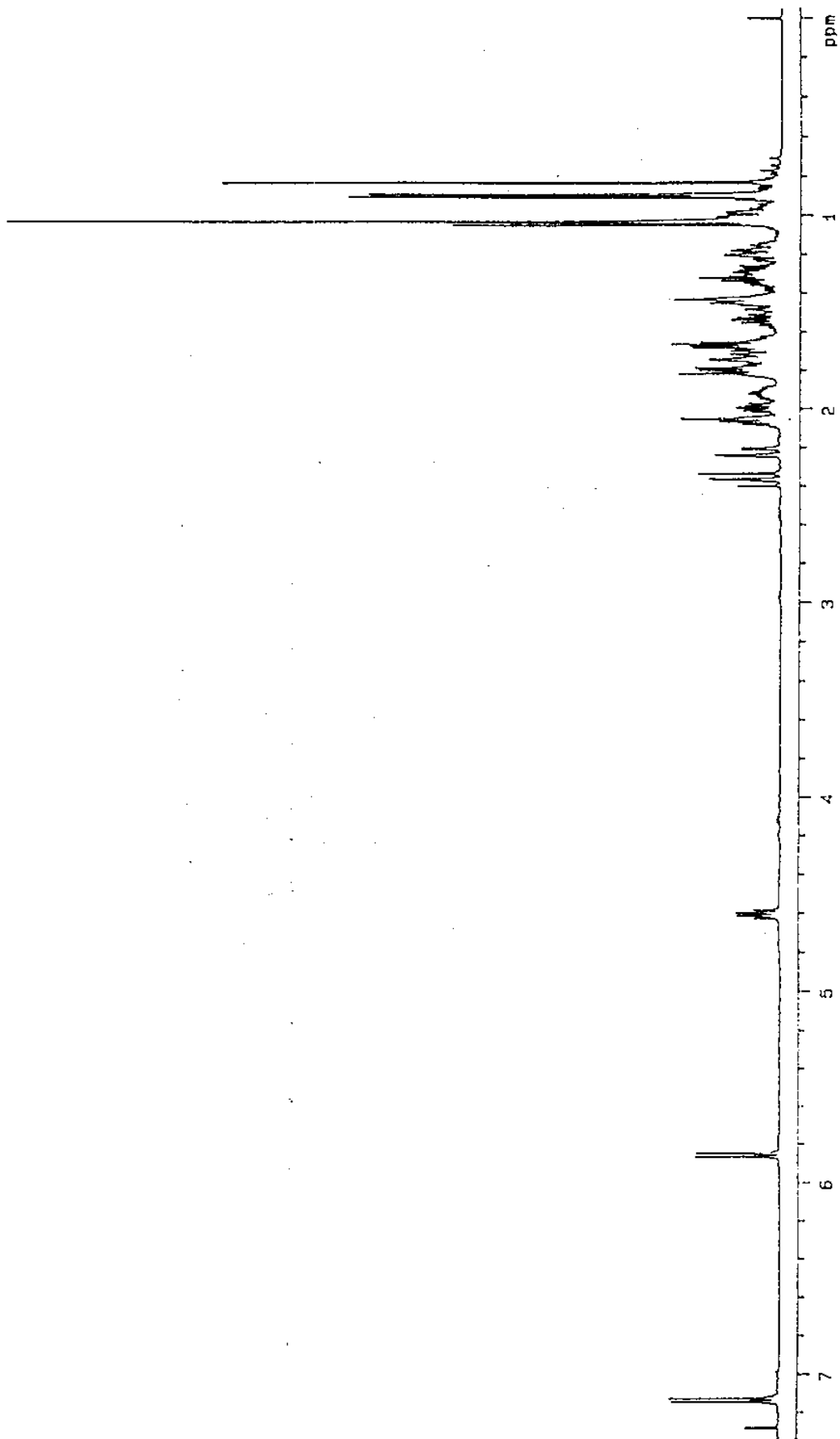


Fig. 4-20. Proton NMR spectrum of compound 91-18-3.

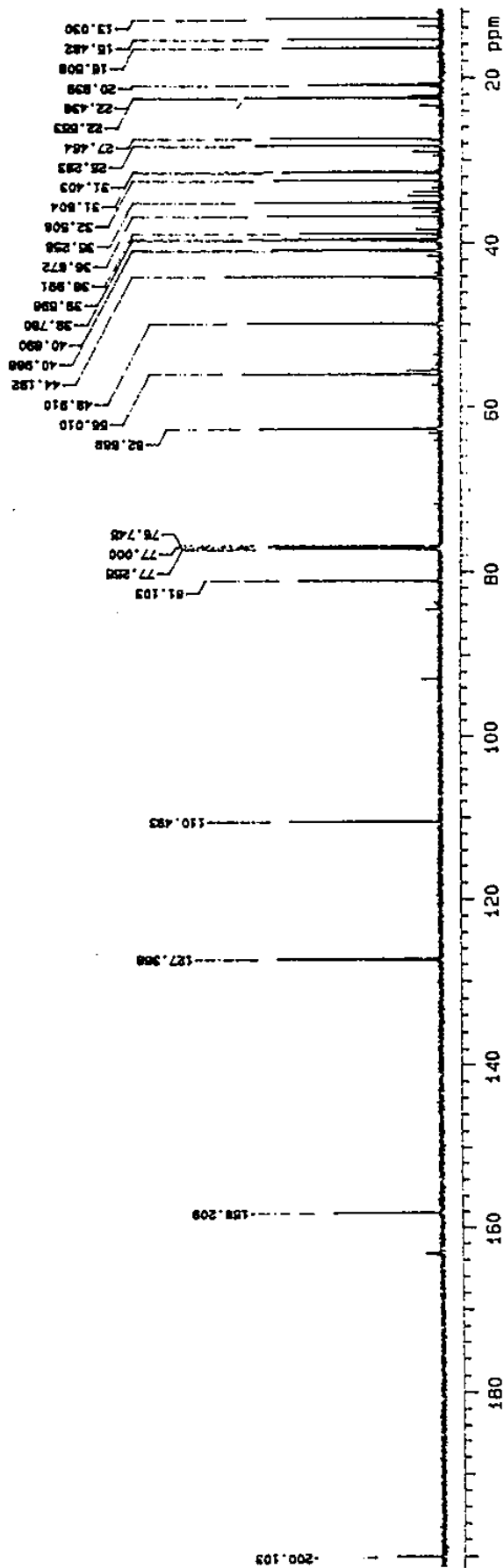


Fig. 4-21. Carbon NMR spectrum of compound 91-18-3.

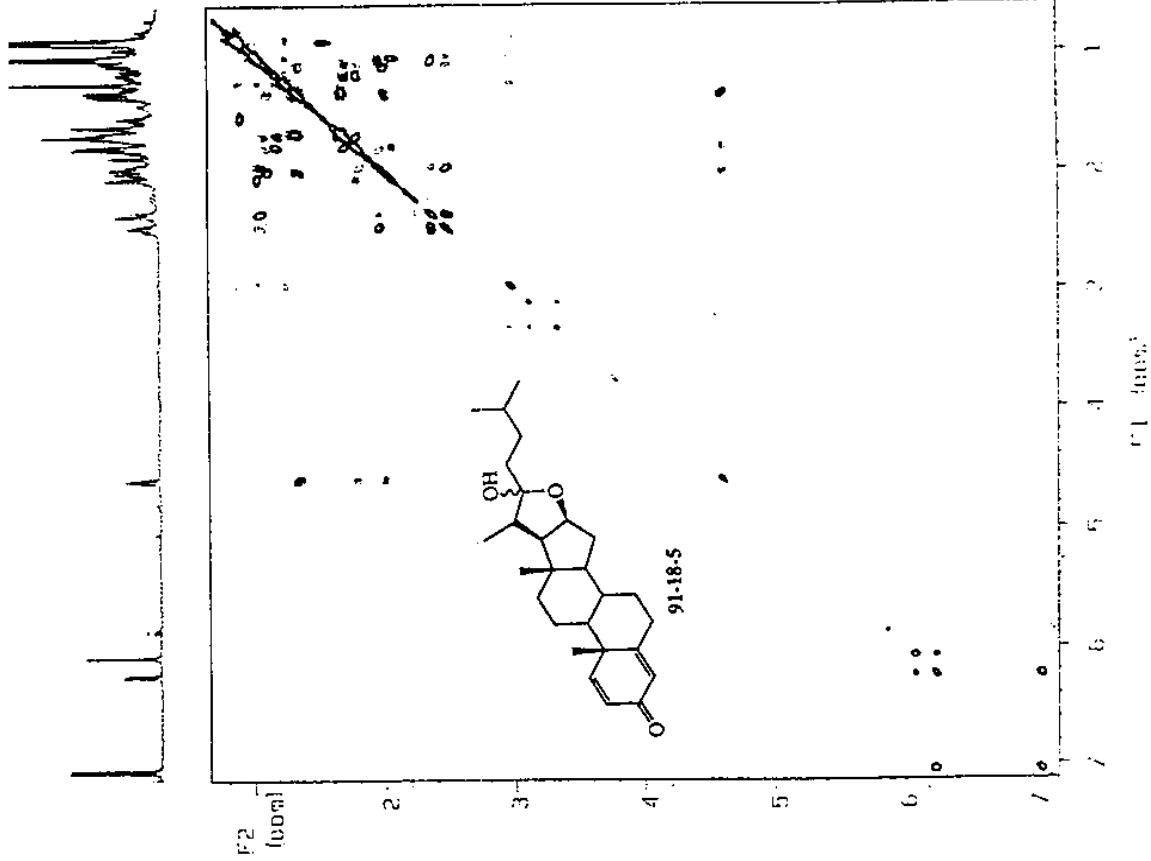


Fig. 4-22. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-18-3.

Mattson Instruments FTIR

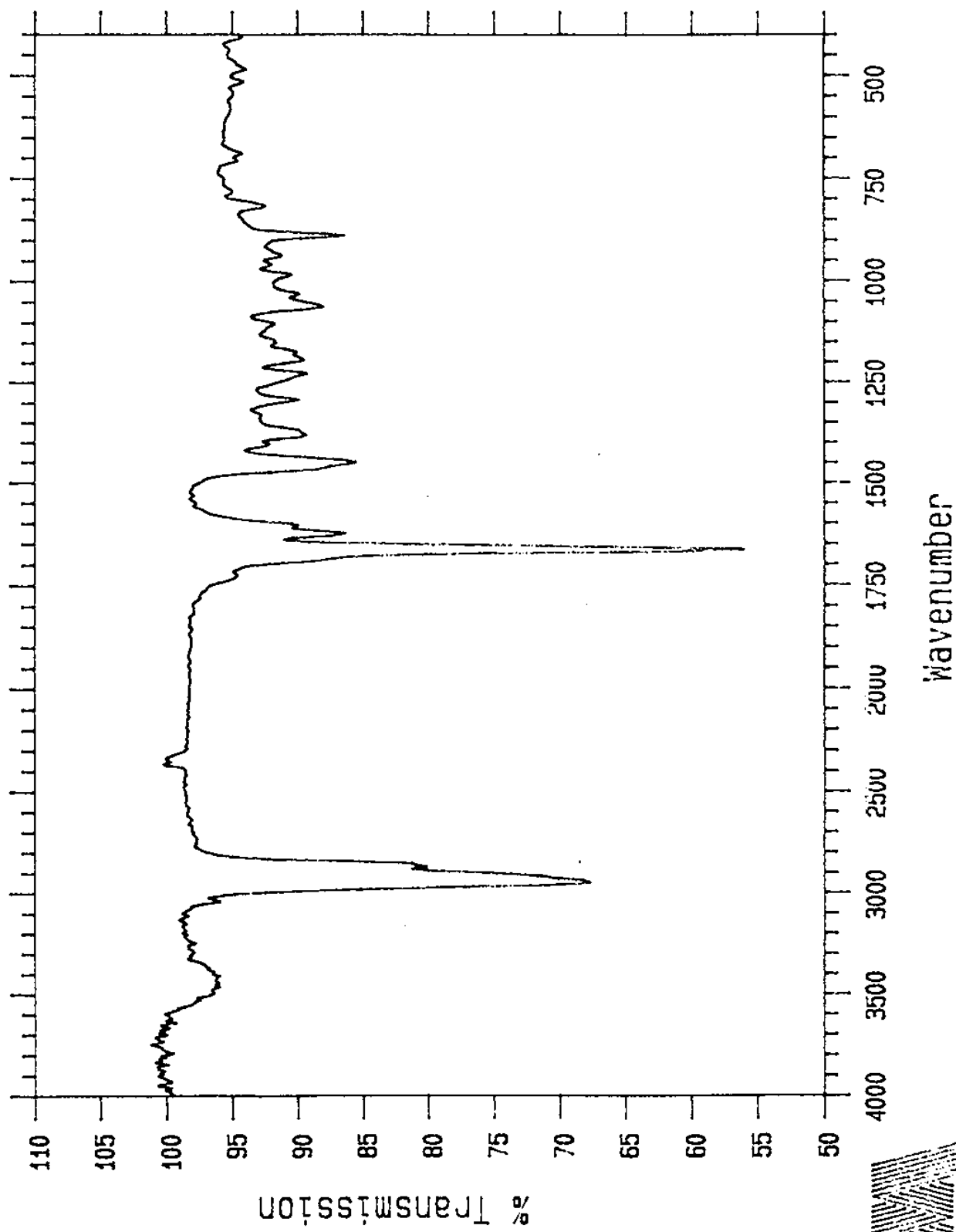


Fig. 4-23. IR spectrum of compound 91-18-3.

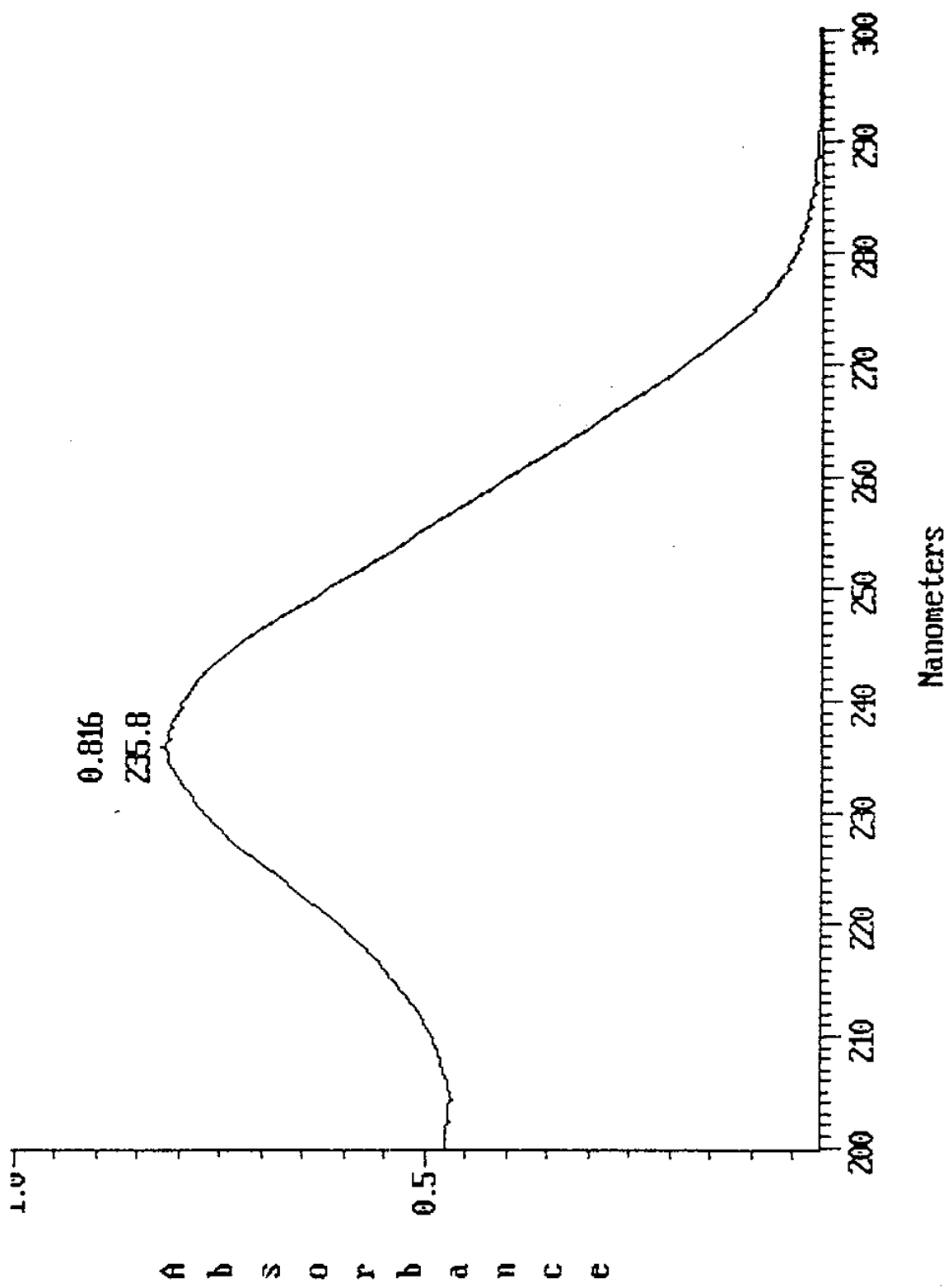


Fig. 4-24. UV spectrum of compound 91-18-3.

7940284964 xl 0gd-1 17-HUG-94 08:04:08:06 70E C1*
 #=0 1=1.lv #=0 TIC=161706000 Rent:Shin Sys:7070 HMR: 7043000
 in (Korea) 91-18-6 C1* (M3) PT= 00 Cal:-8179481B MASS: 413

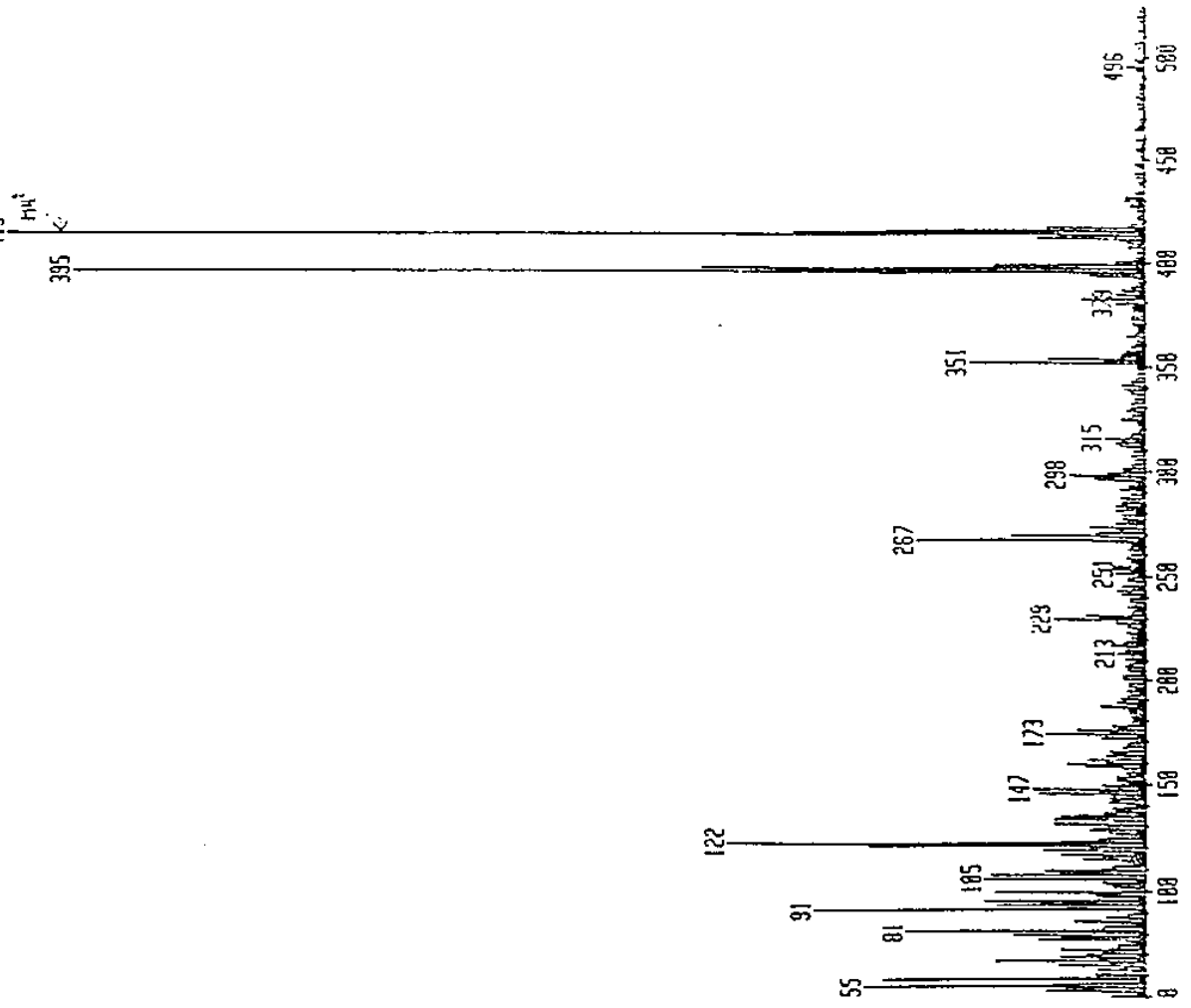


Fig. 4-25. High-resolution CIMS spectrum of compound 91-18-3.

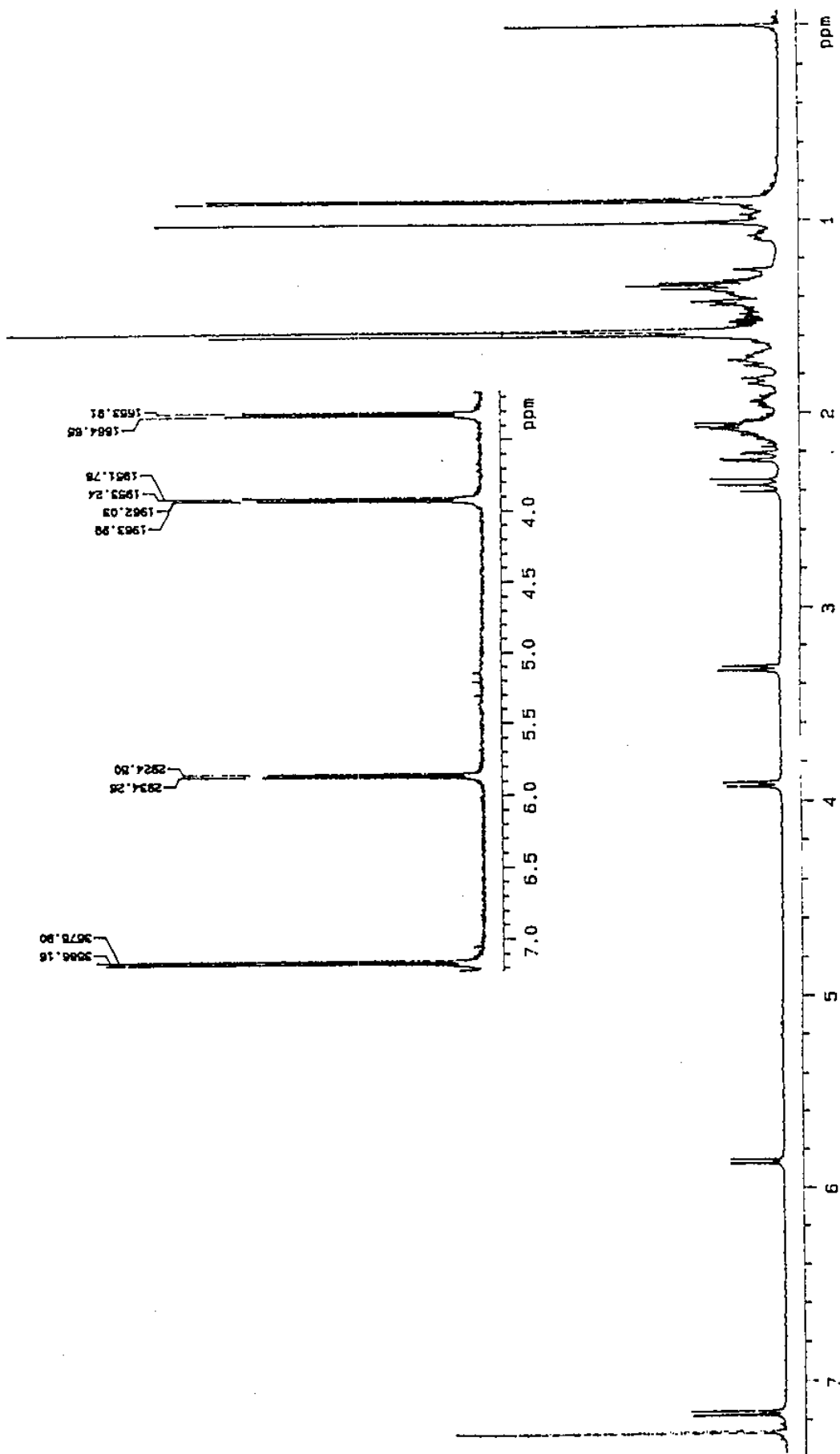


Fig. 4-26. Proton NMR spectrum of compound 91-18-4.

91-18-2, 3-3-1016-7-10-5-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
 MULTI-16 MODULATED
 DOUBLE PRECISION ACQUISITION
 DATA PROCESSING
 LINE BROADENING 0.5 Hz
 FT SIZE 65536
 TOTAL ACQUISITION TIME 115 minutes

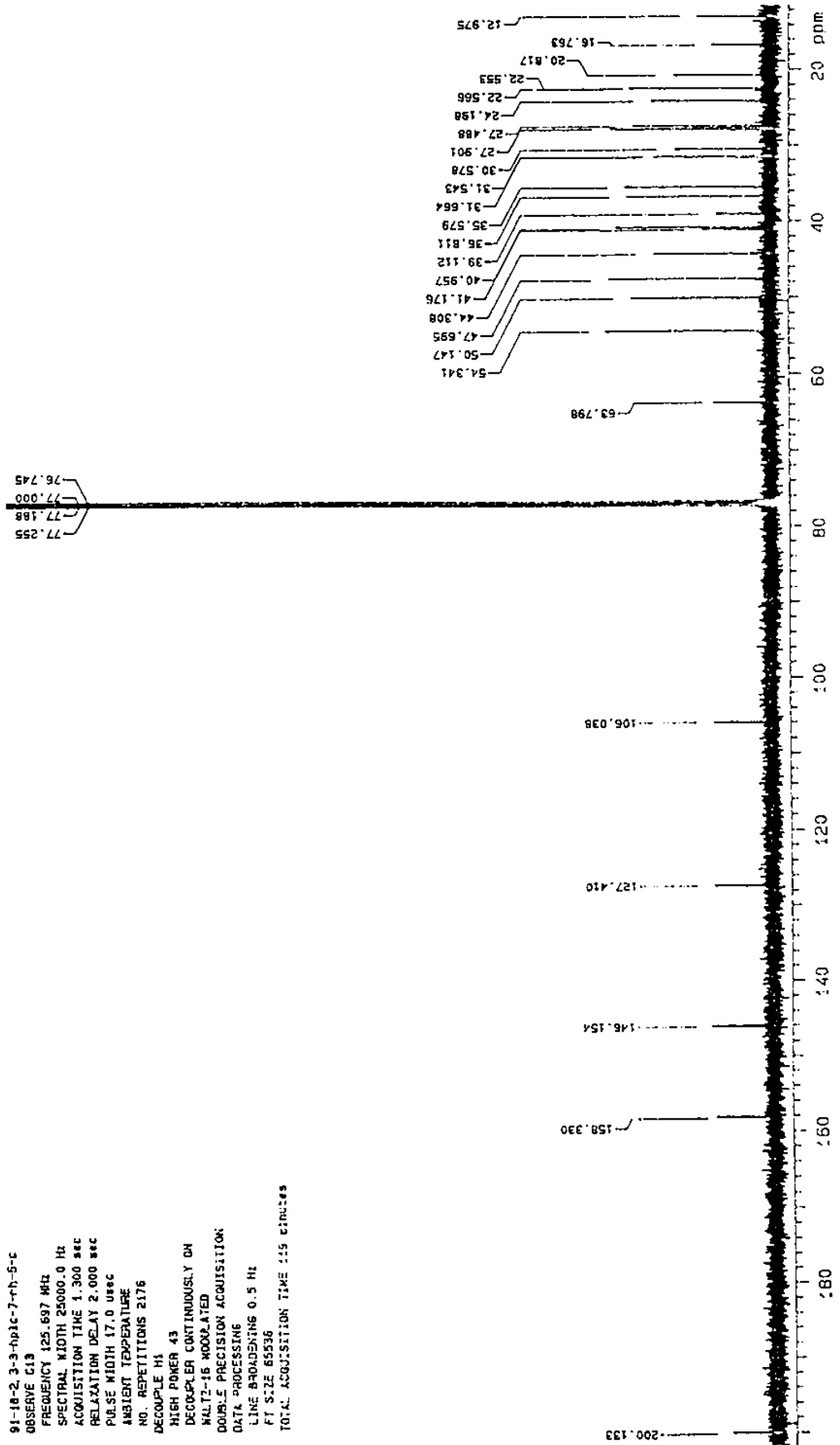


Fig. 4-27. Carbon NMR spectrum of compound 91-18-4.

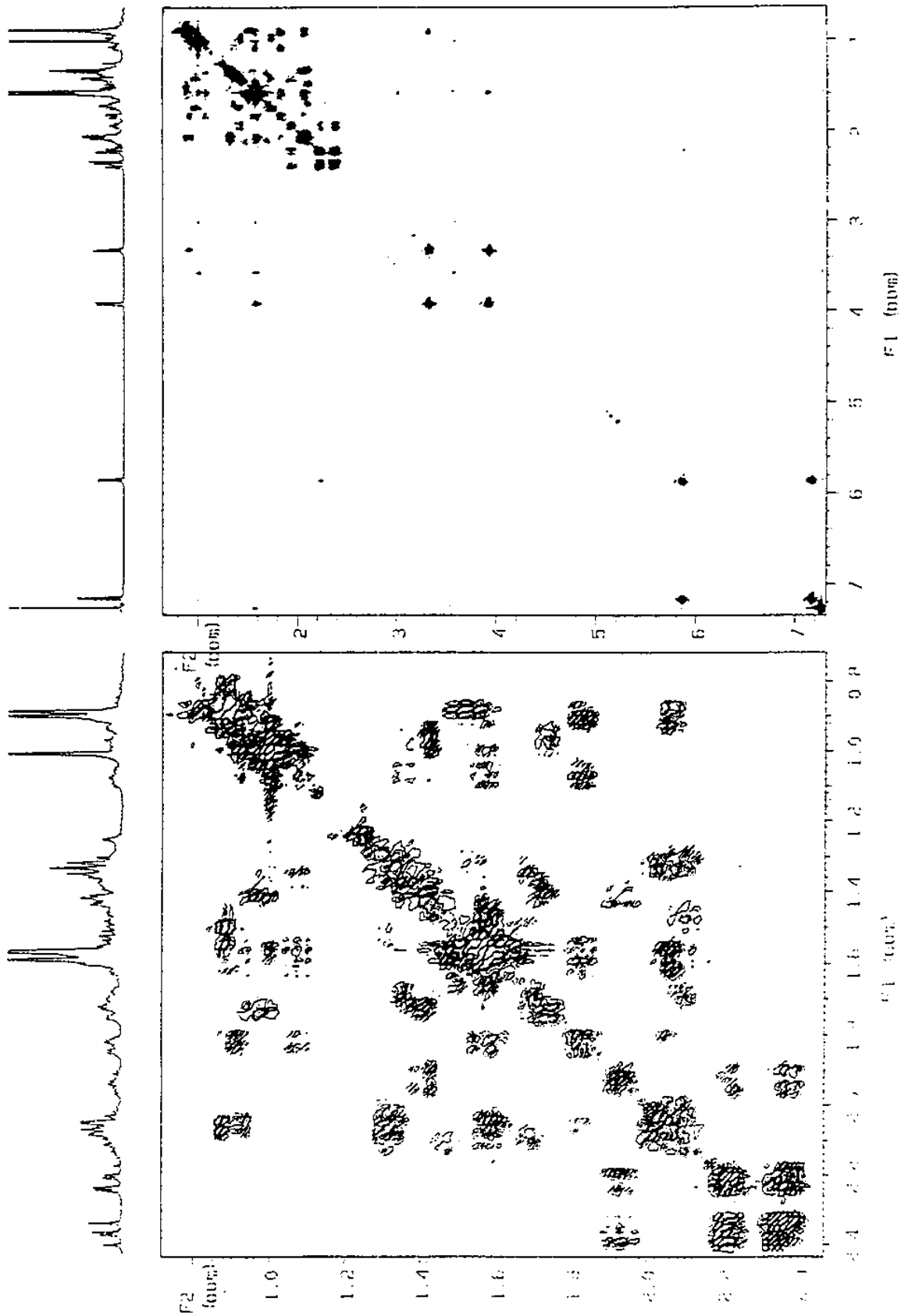


Fig. 4-28. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-18-4.

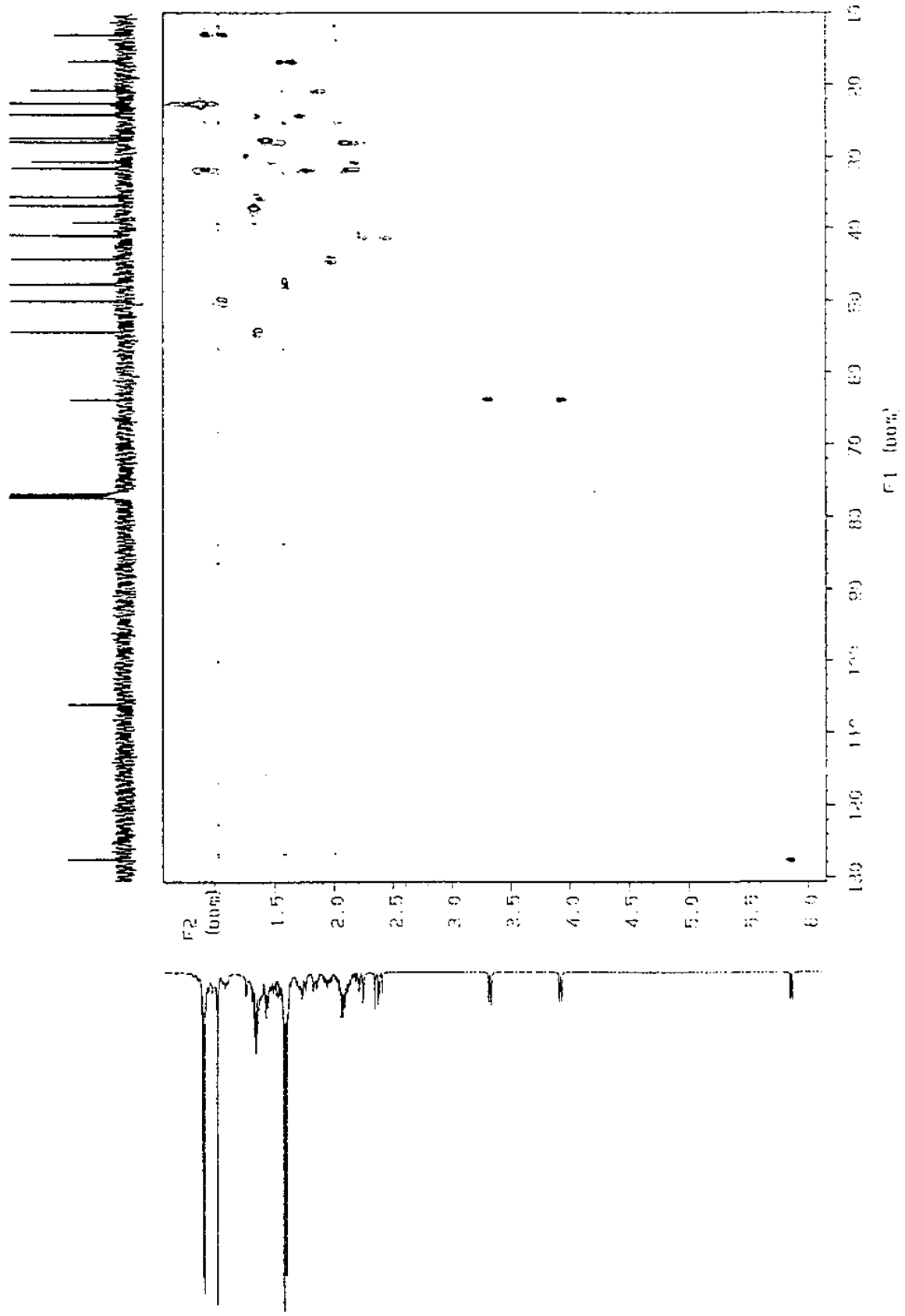


Fig. 4-29. HMQC spectrum of compound 91-18-4.

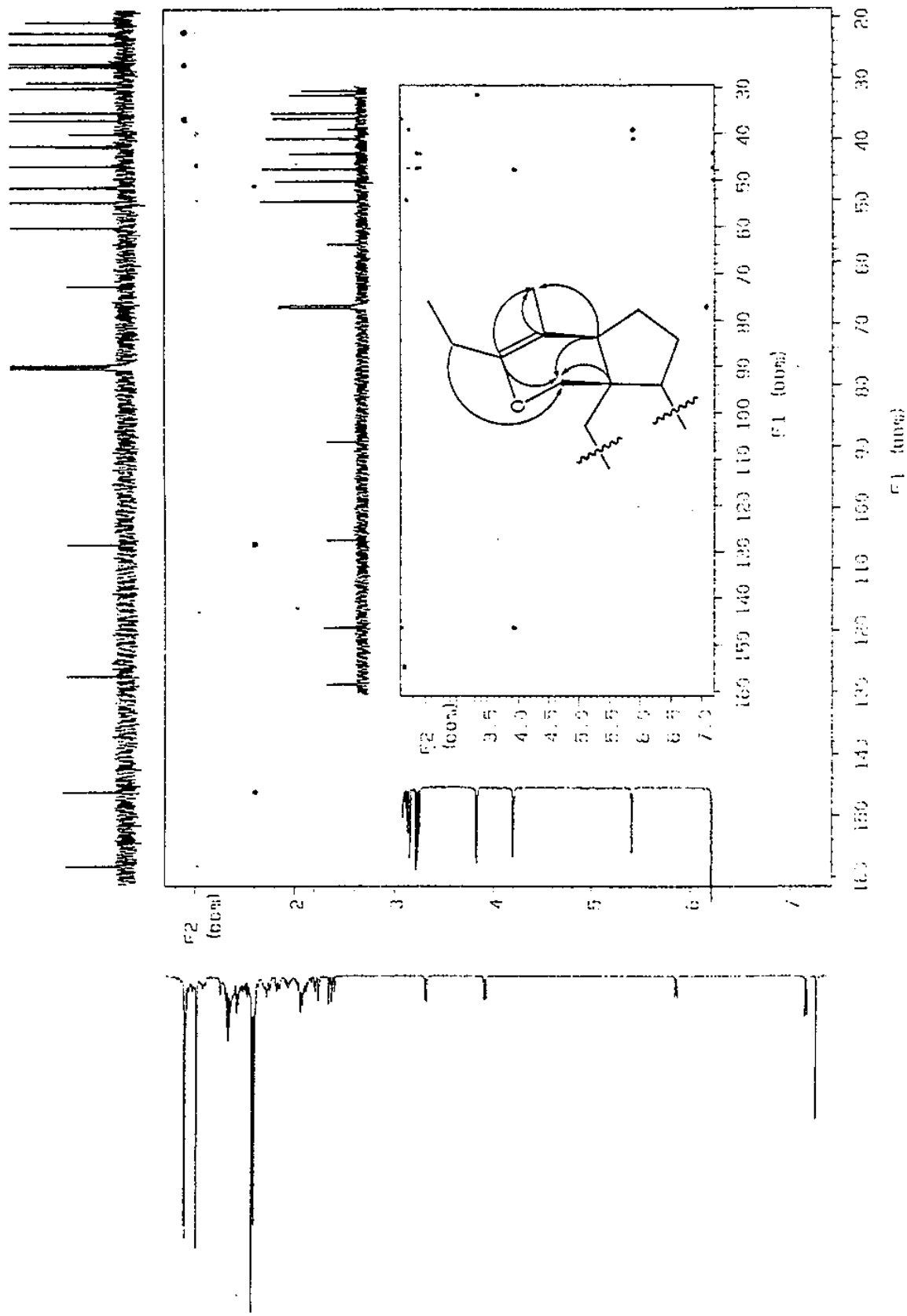


Fig. 4-30. HMBC spectrum of compound 91-18-4.

Mattson Instruments FTIR

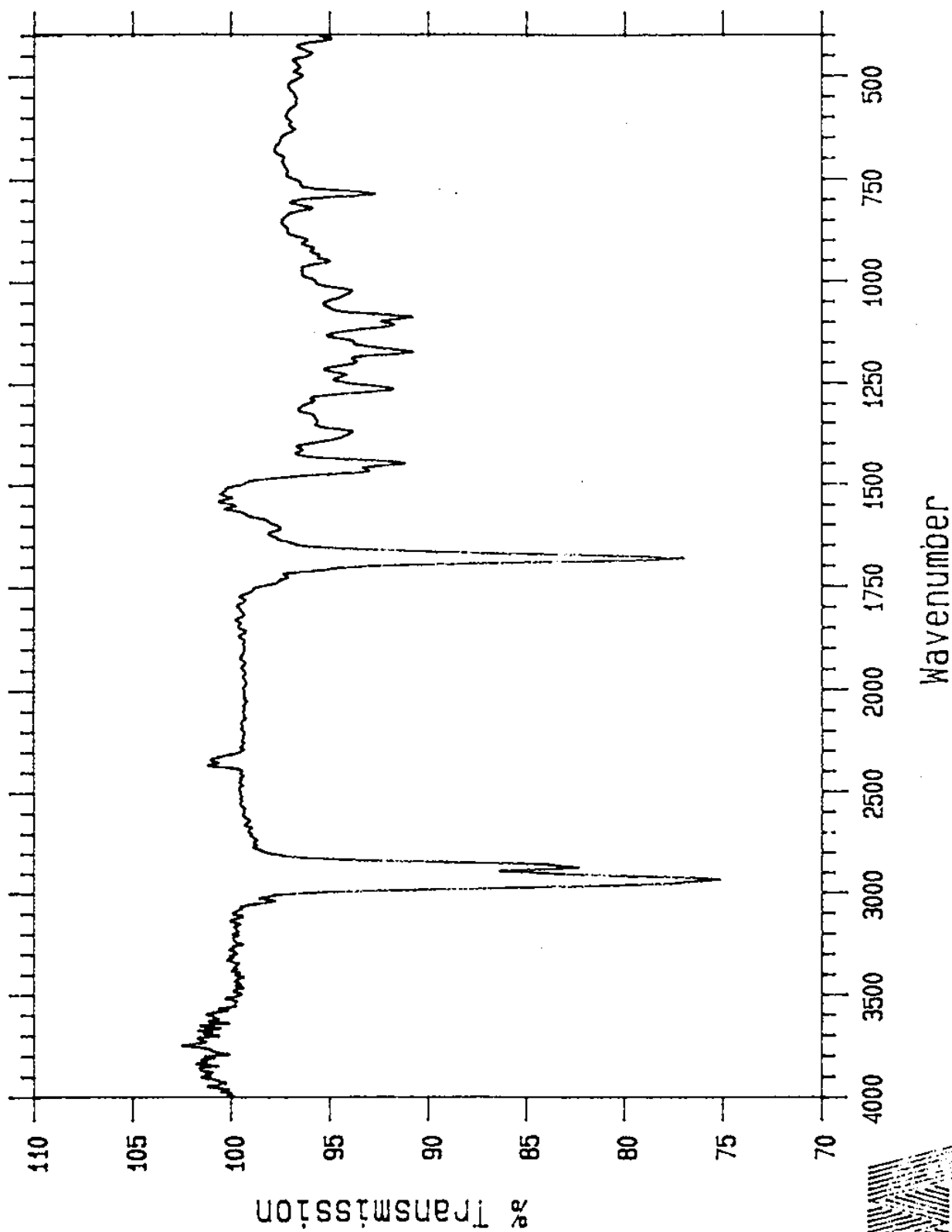


Fig. 4-31. IR spectrum of compound 91-18-4.

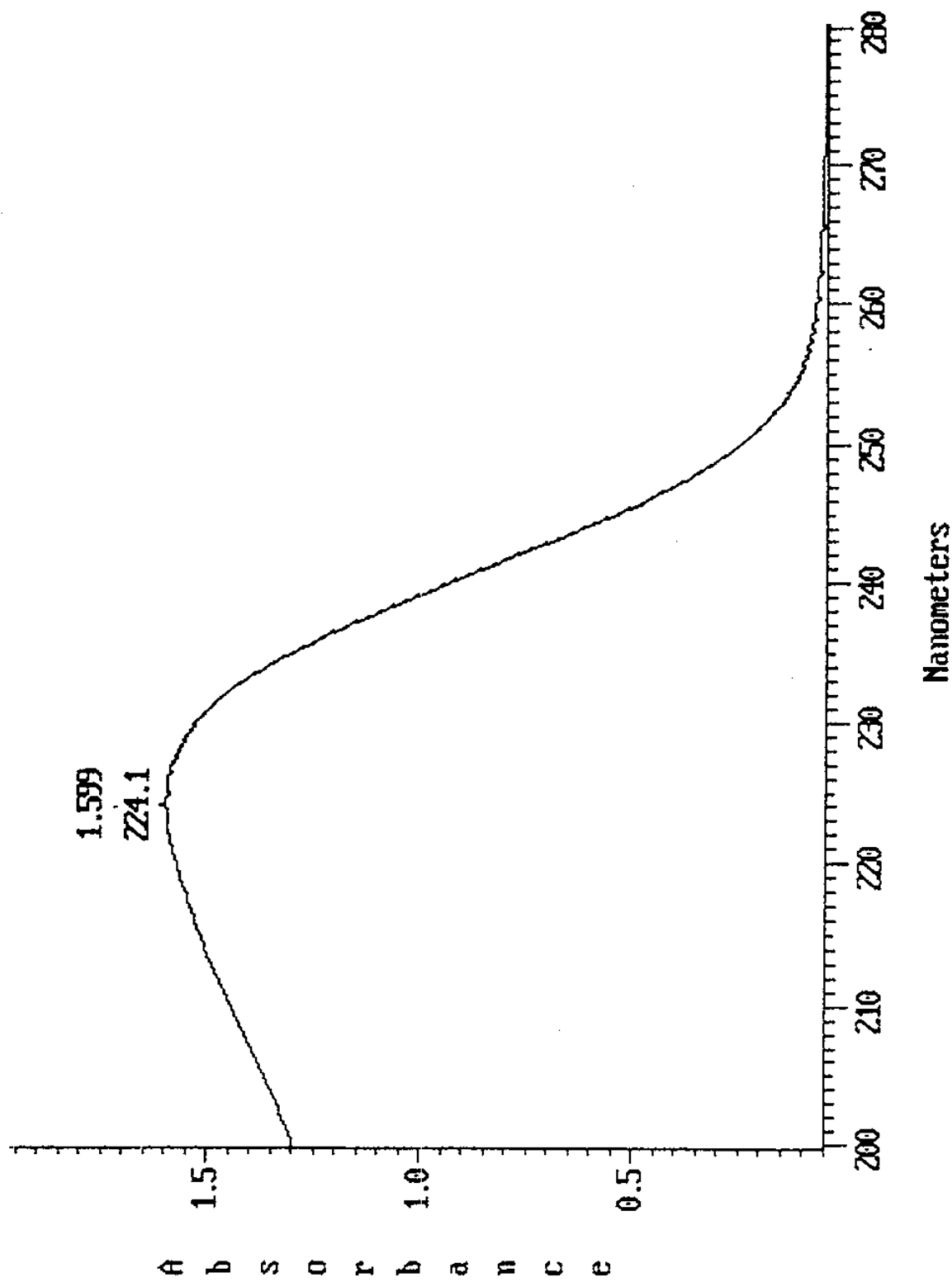


Fig. 4-32. UV spectrum of compound 91-18-4.

Scan 1570 (30.776 min) of 8159402h.d SCALED

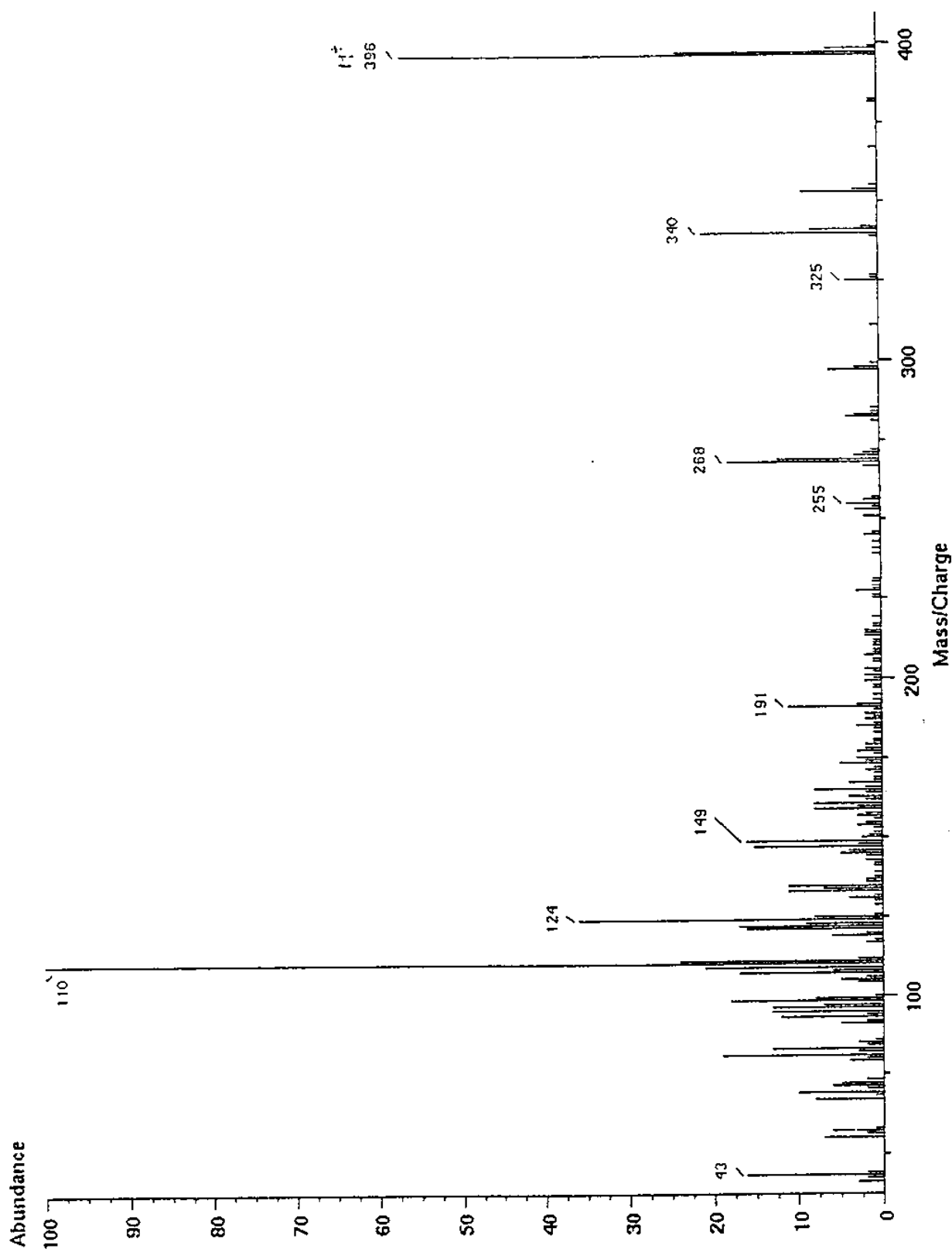


Fig. 4-33. High-resolution EIMS spectrum of compound 91-18-4.

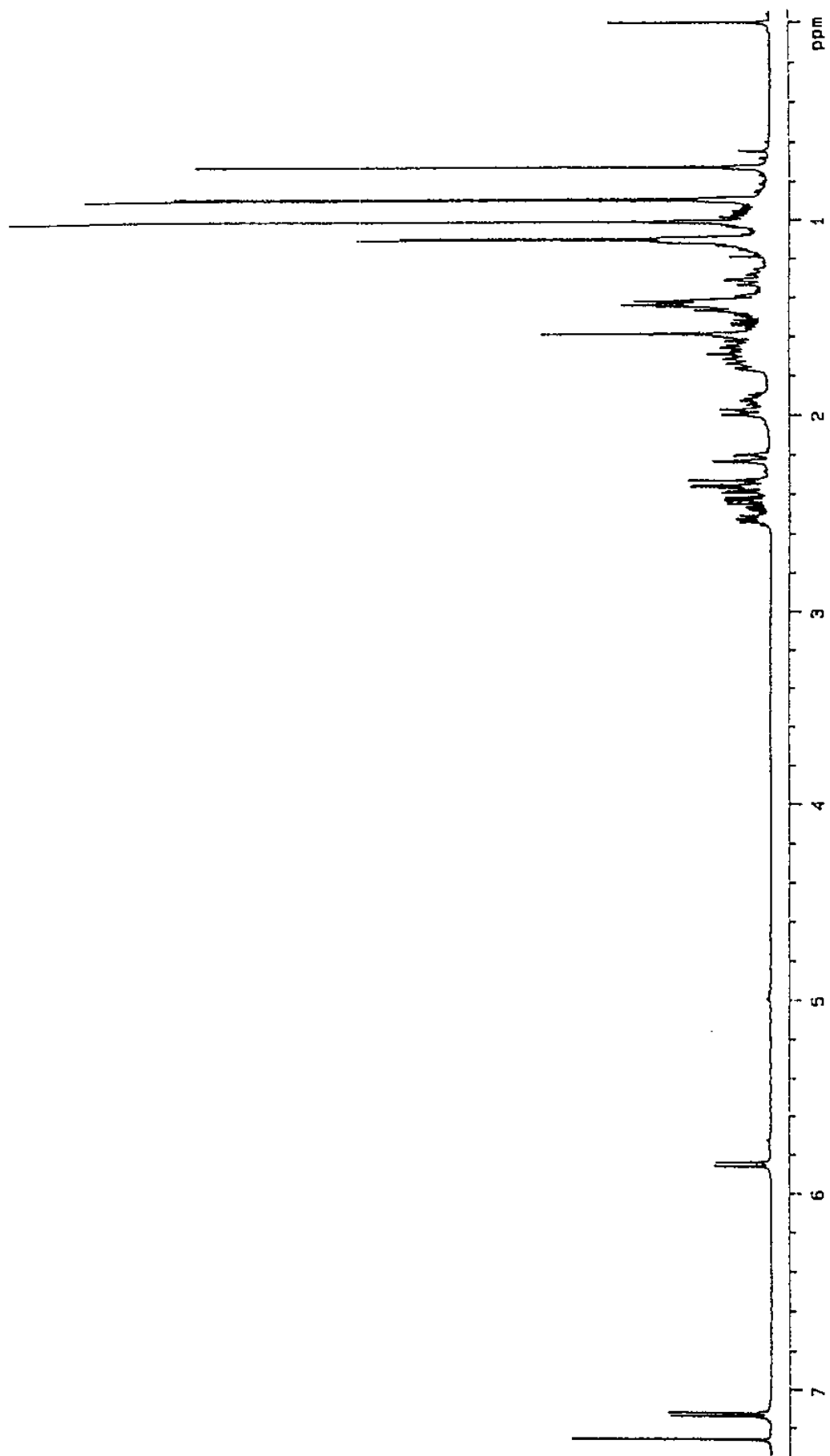


Fig. 4-34. Proton NMR spectrum of compound 91-18-5.

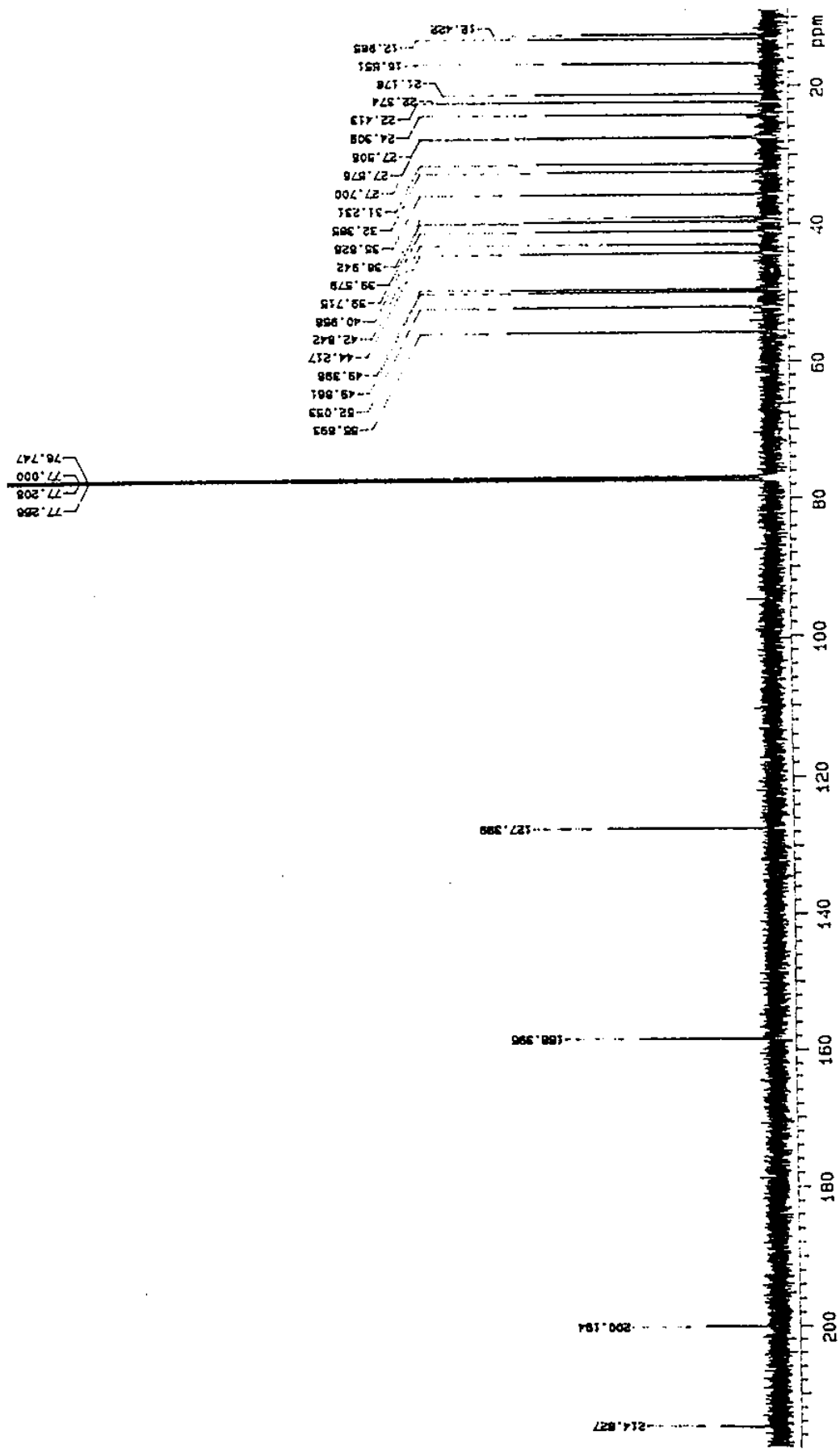


Fig. 4-35. Carbon NMR spectrum of compound 91-18-5.

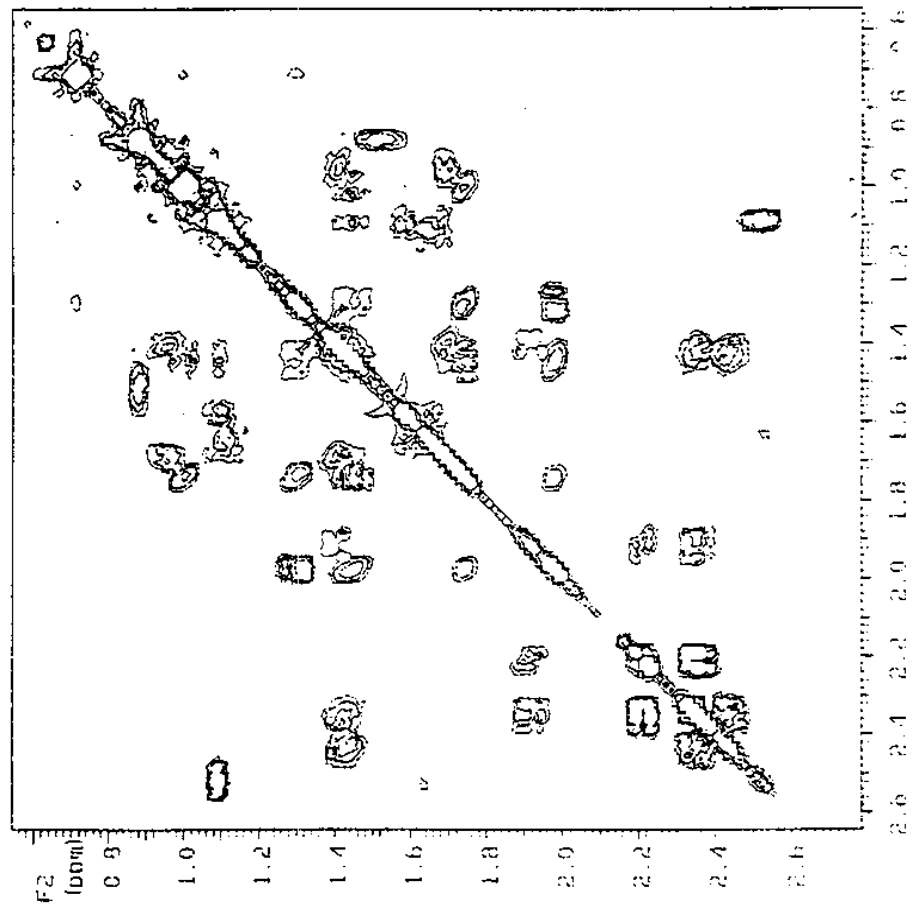
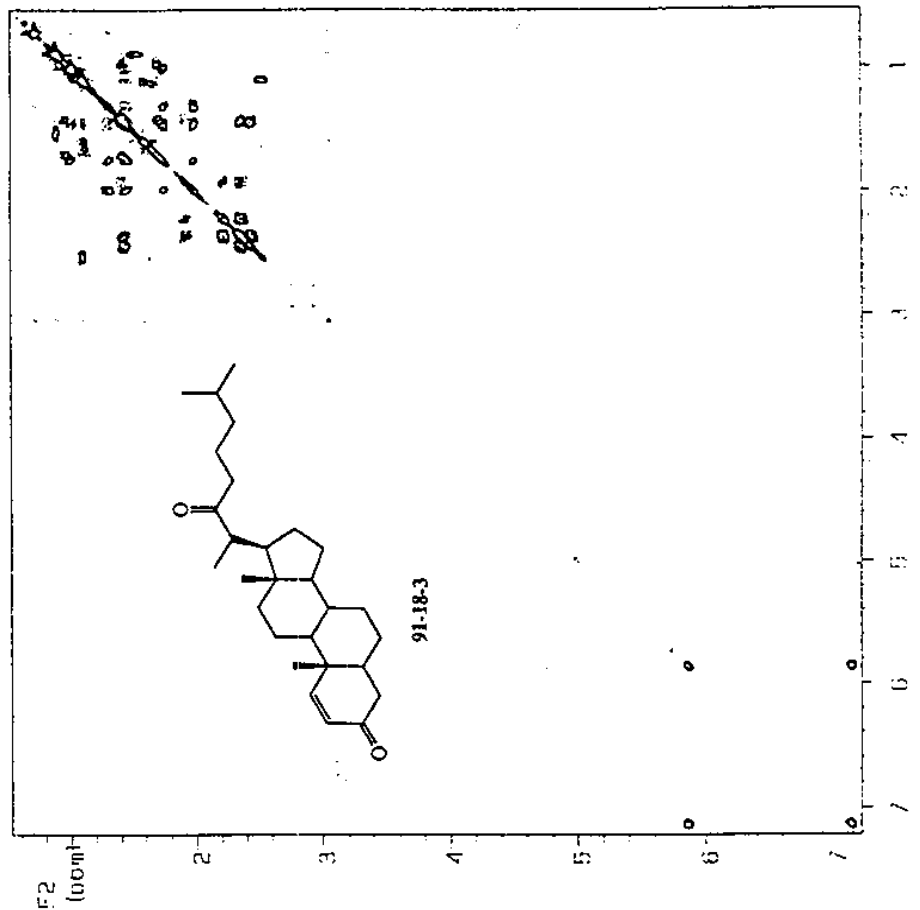


Fig. 4-36. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-18-5.

Mattson Instruments FTIR

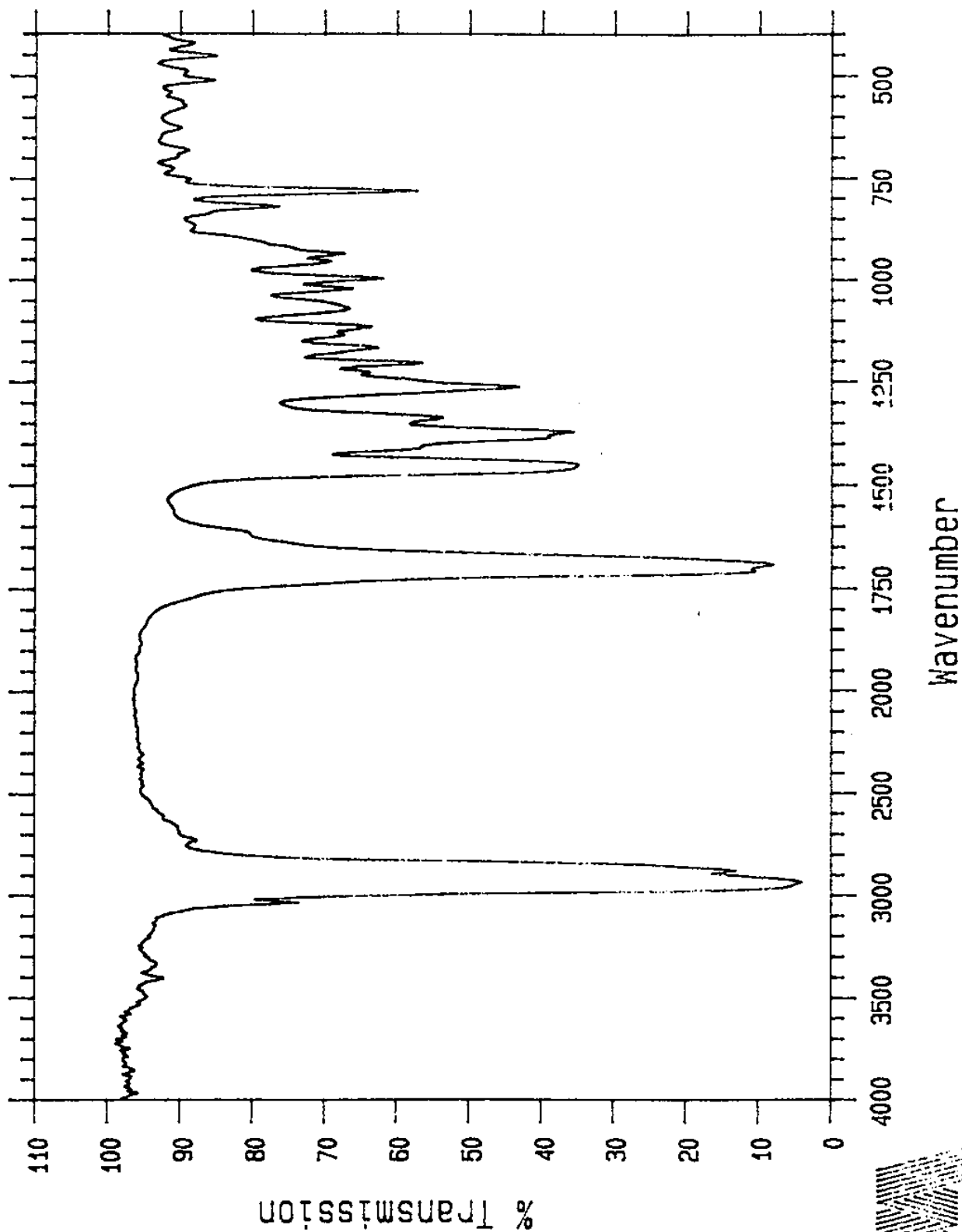


Fig. 4-37. IR spectrum of compound 91-18-5.

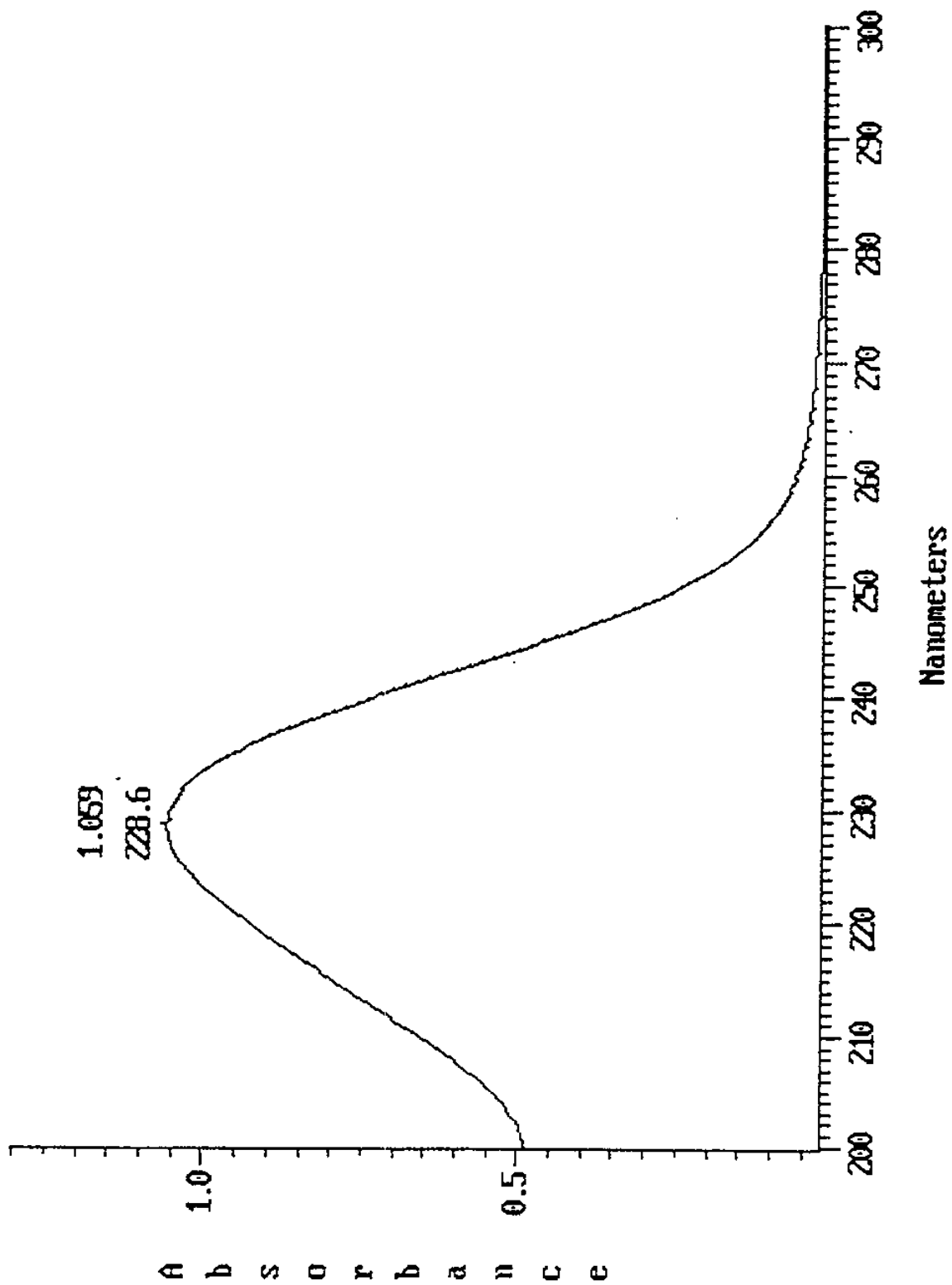


Fig. 4-38. UV spectrum of compound 91-18-5.

Scan 1728 (33.644 min) of 8159401h.d SCALED

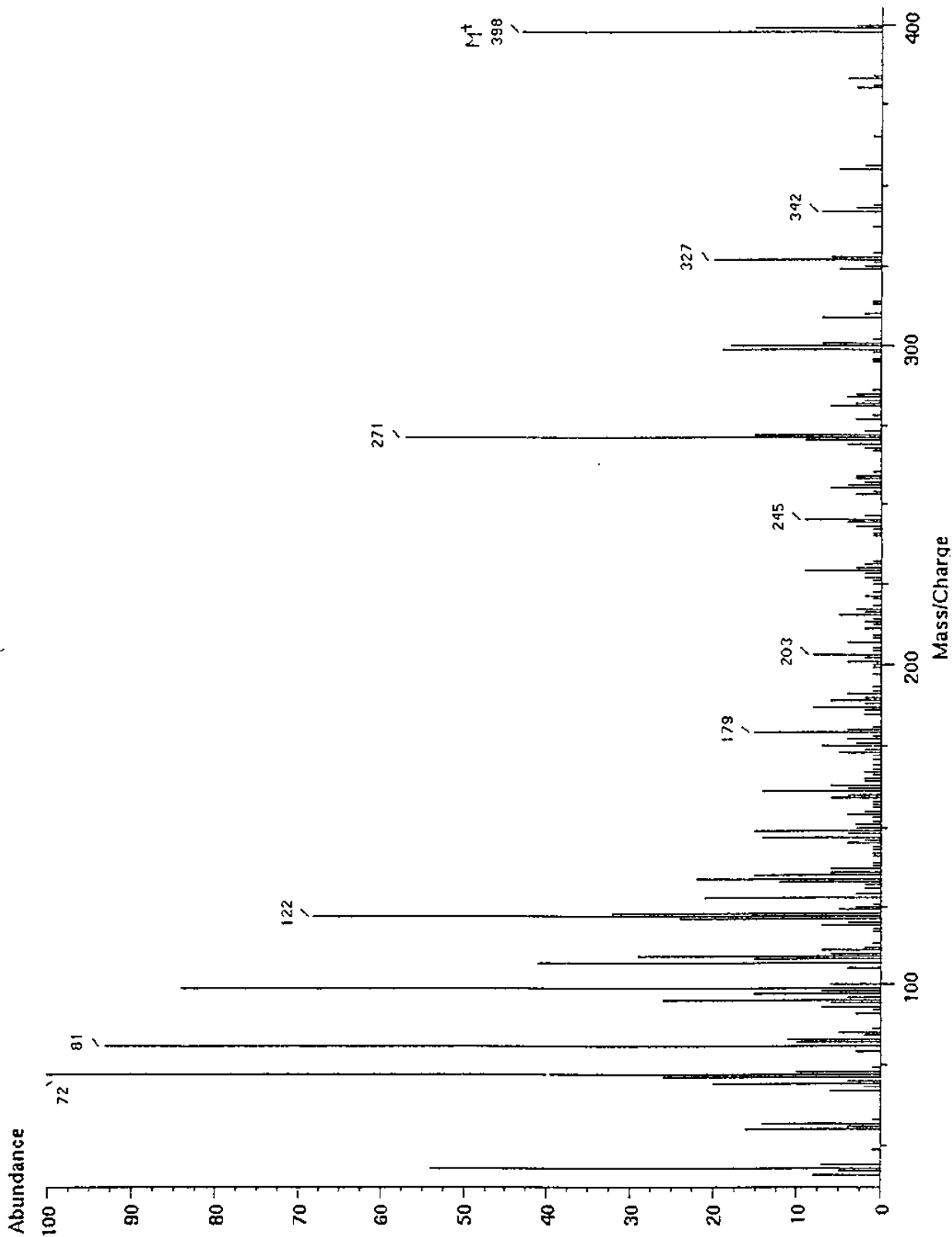


Fig. 4-39. High-resolution EIMS spectrum of compound 91-18-5.

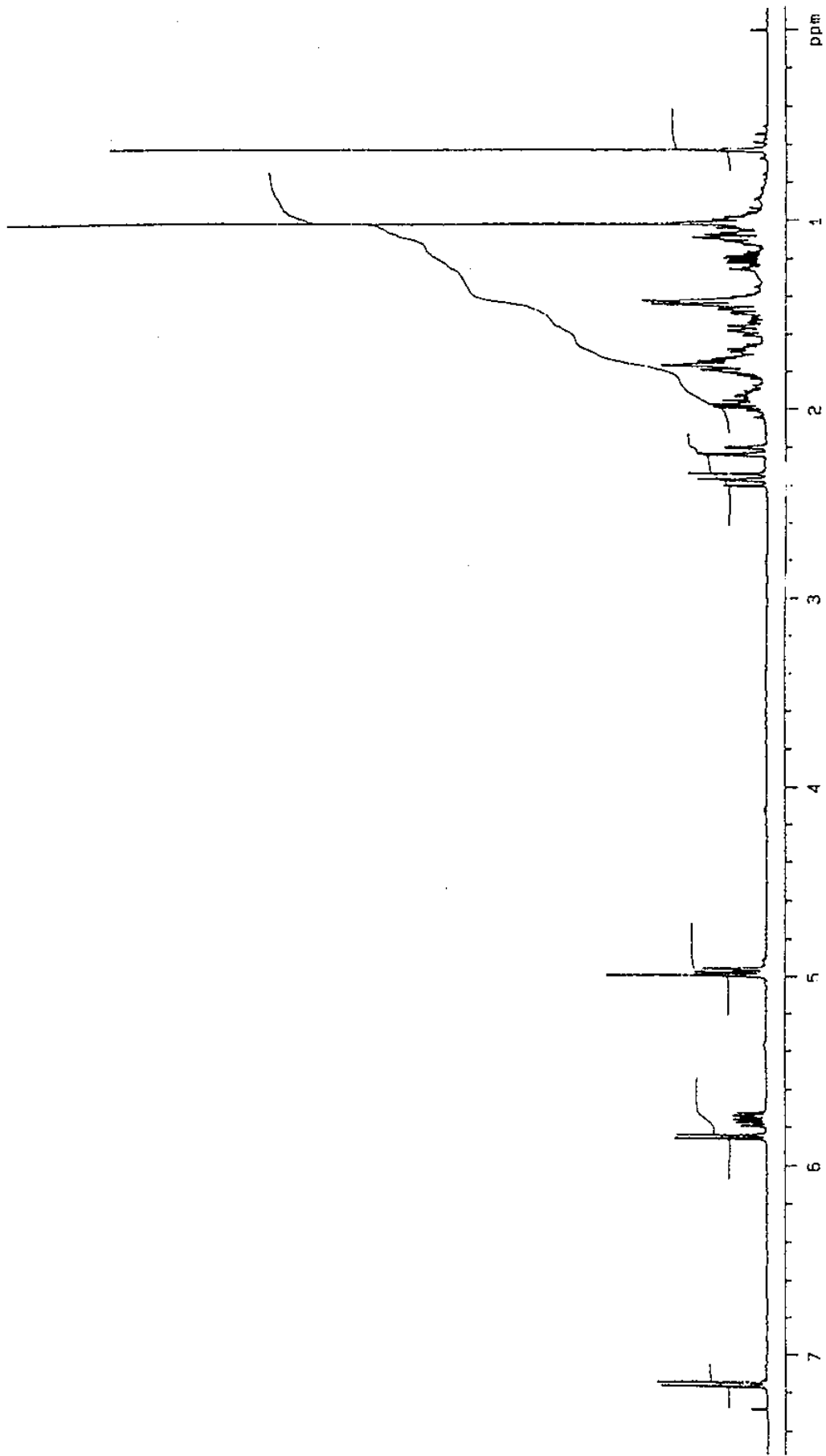


Fig. 4-40. Proton NMR spectrum of compound 91-18-6.

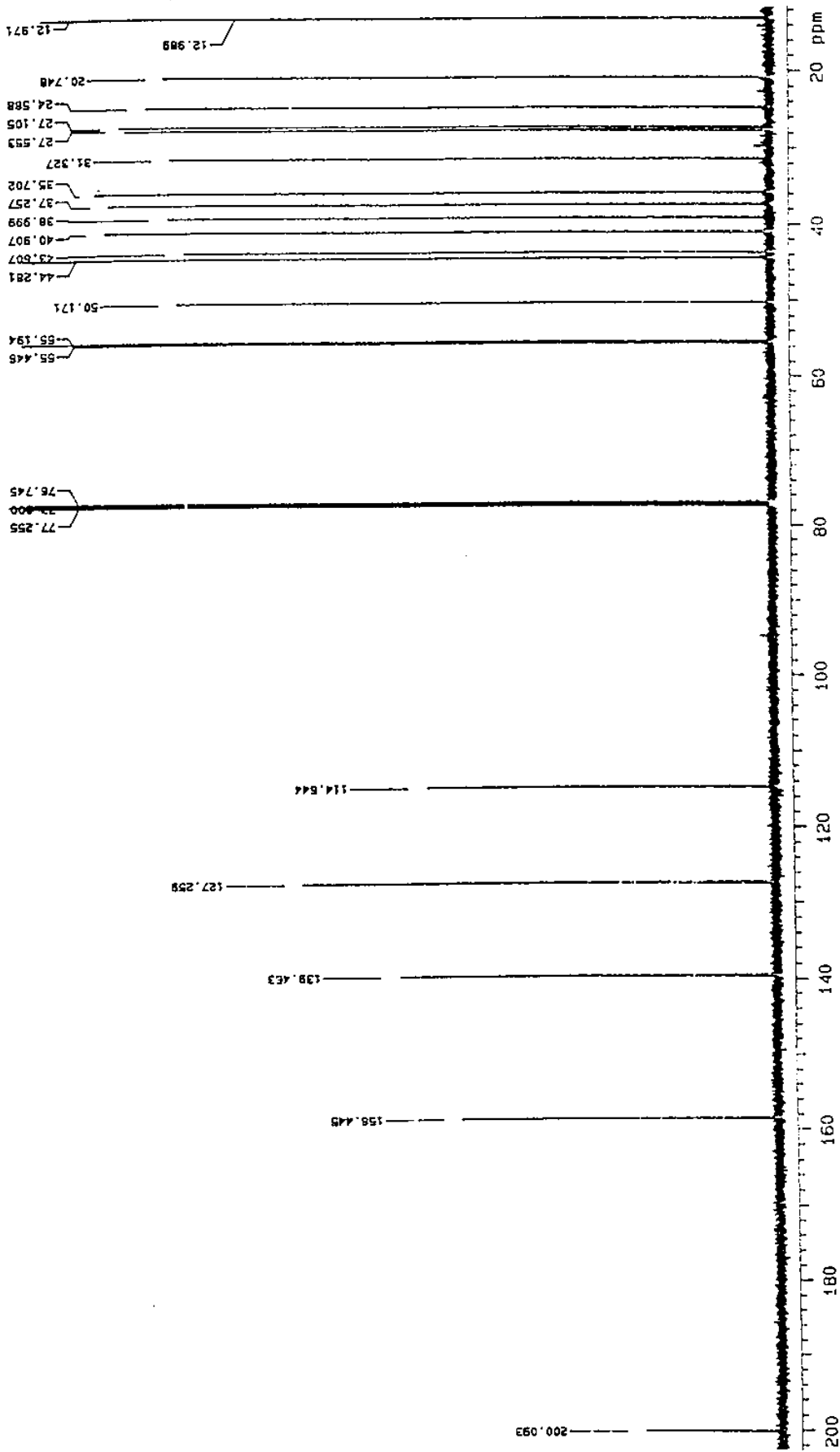


Fig. 4-41. Carbon NMR spectrum of compound 91-18-6.

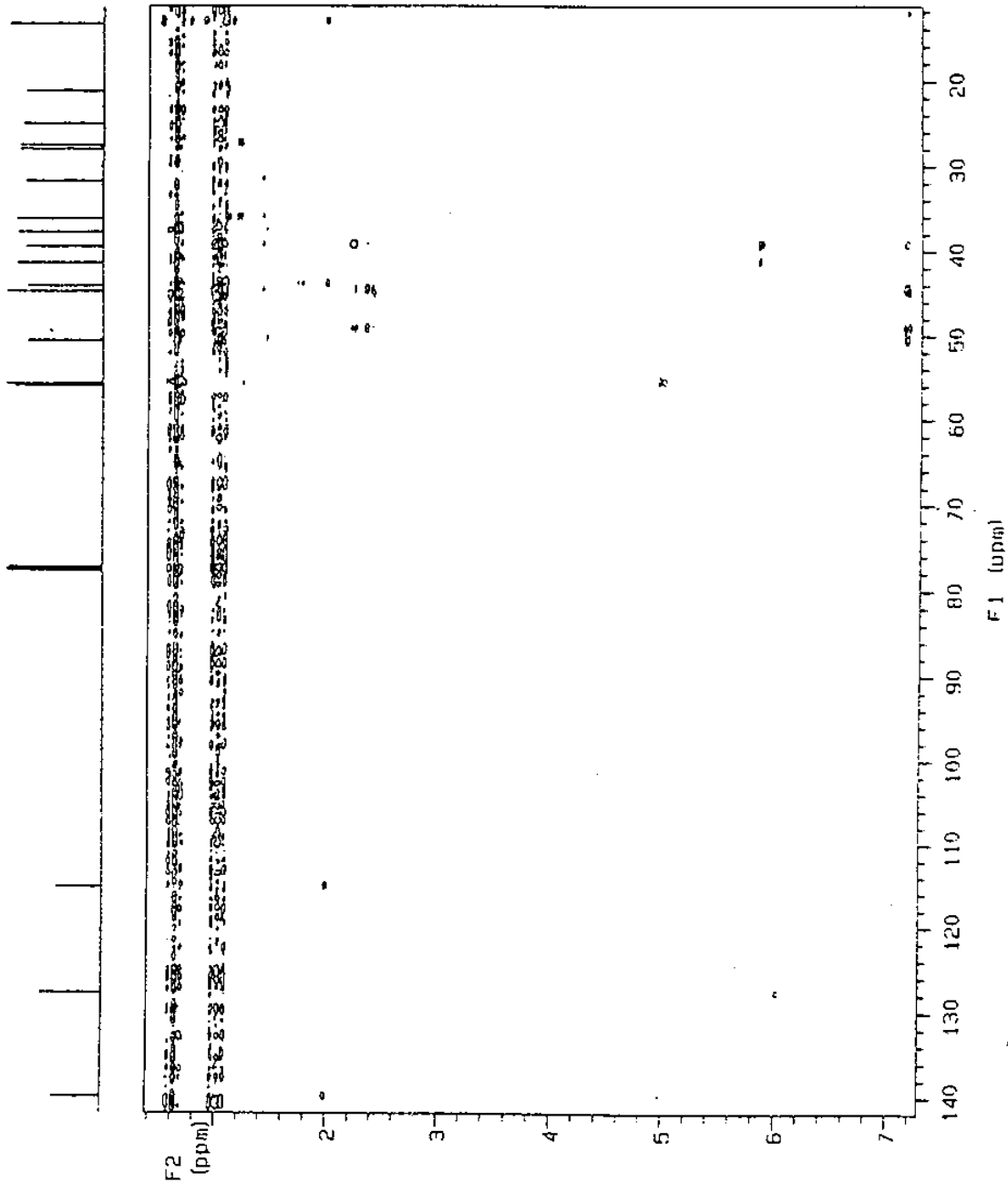


Fig. 4-44. HMBC spectrum of compound 91-18-6.

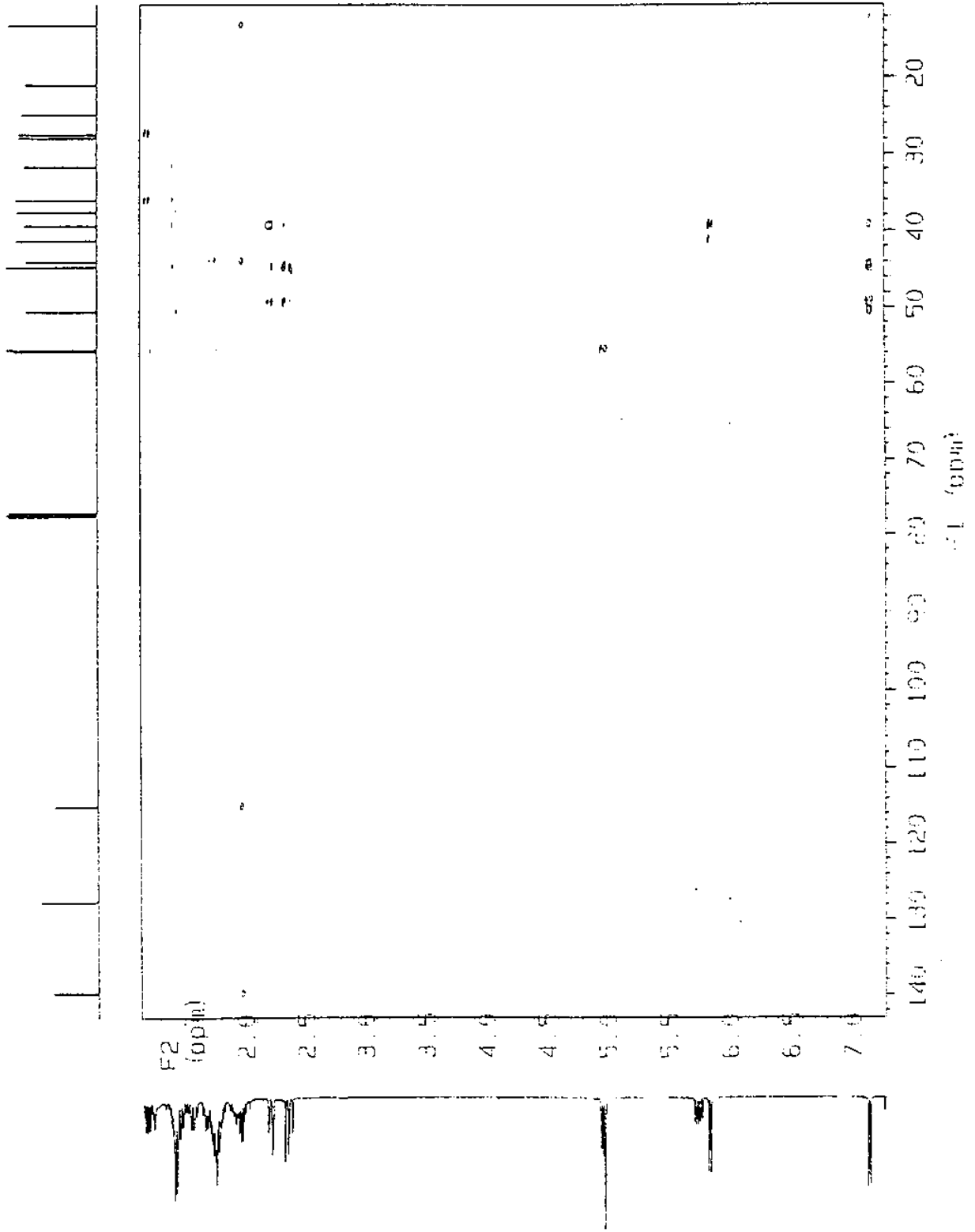


Fig. 4-44. continued.

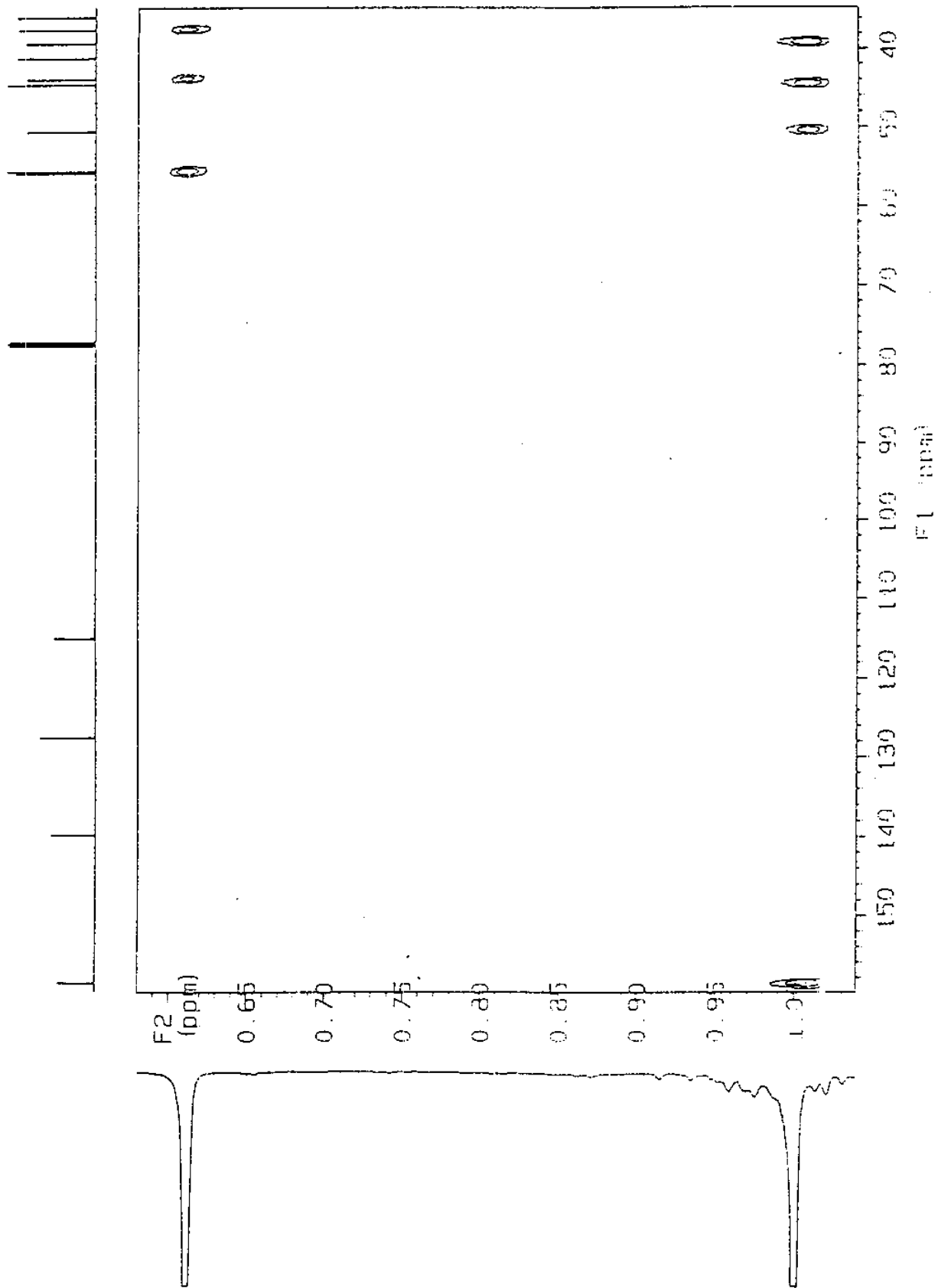


Fig. 4-44. continued.

Mattson Instruments FTIR

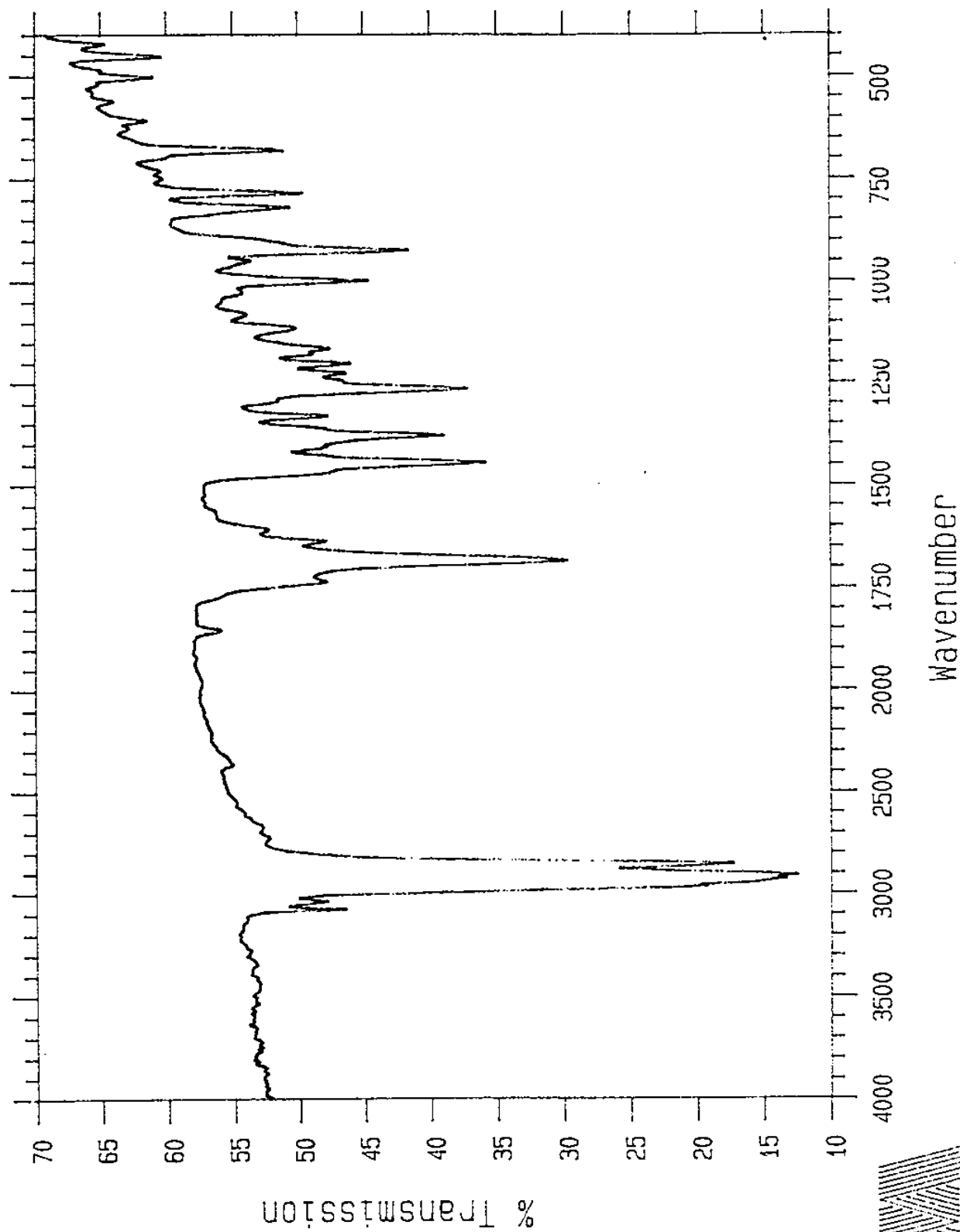


Fig. 4-45. IR spectrum of compound 91-18-6.

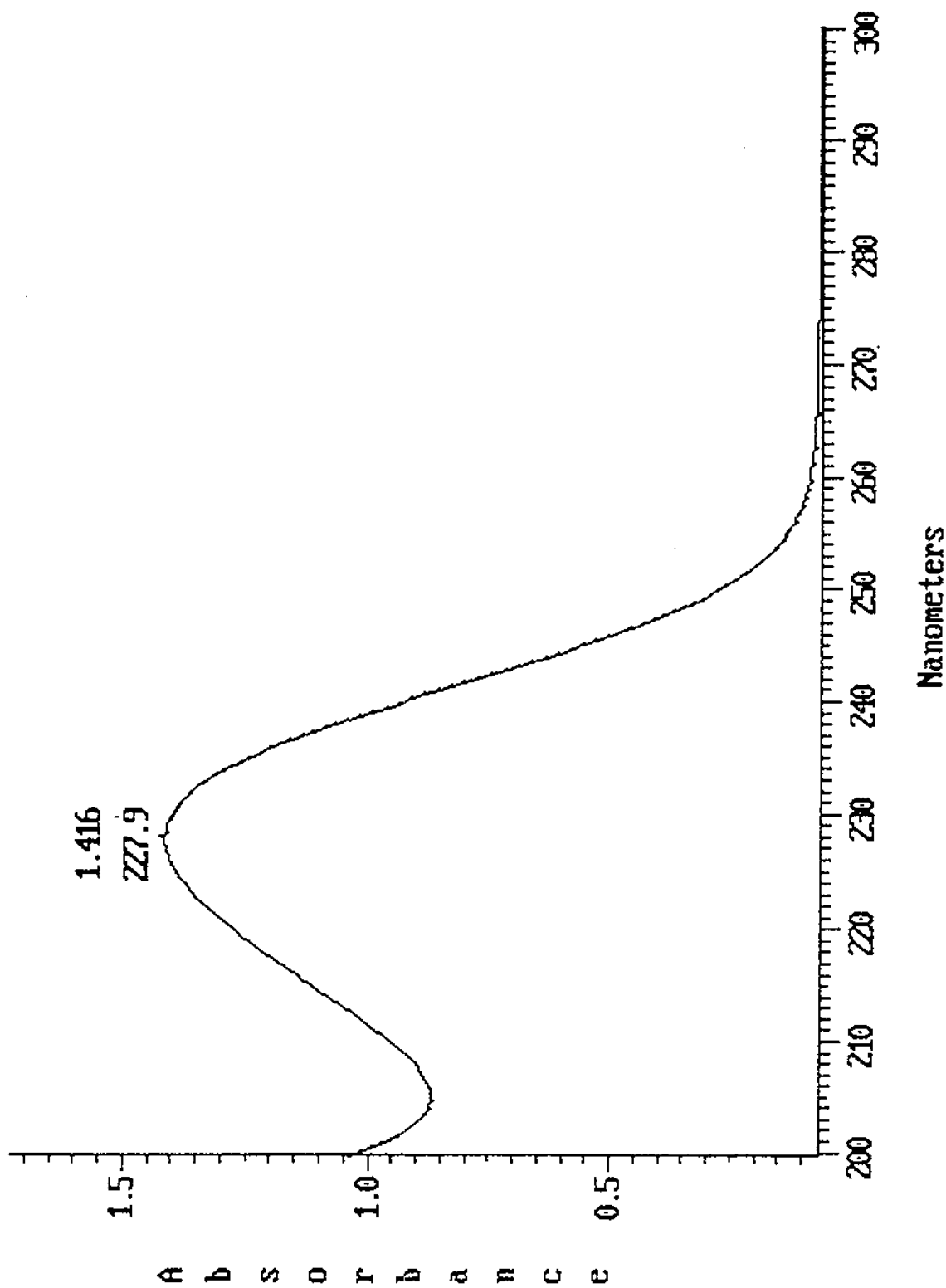


Fig. 4-46. UV spectrum of compound 91-18-6.

91-18-1 25 Nov 93 8:54 am
run 911810001 av scan 4-78 100%= 251039

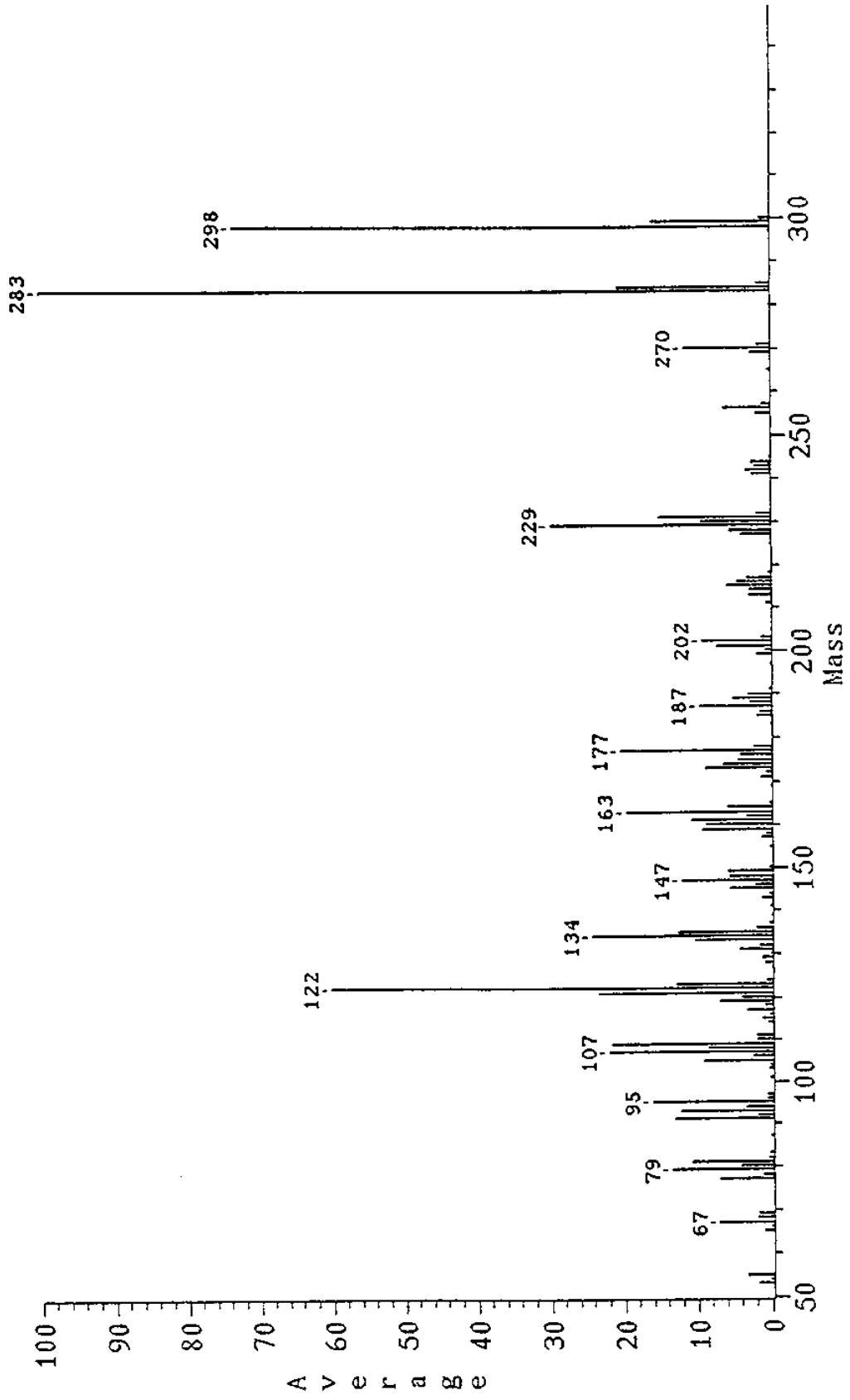


Fig. 4-47. High-resolution EIMS spectrum of compound 91-18-6.

01-18-2 3-2-nplc-6.13-11-1-p-1
OBSERVE H1
FREQUENCY 489.843 MHz
SPECTRAL WIDTH 8000.0 Hz
ACQUISITION TIME 1.882 sec
RELAXATION DELAY 0.000 sec
PULSE WIDTH 7.0 usec
AMBIENT TEMPERATURE
NO. REPEATITIONS 32
DOUBLE PRECISION ACQUISITION
DATA PROCESSING
F1 SIZE 32768
TOTAL ACQUISITION TIME 1.81min**

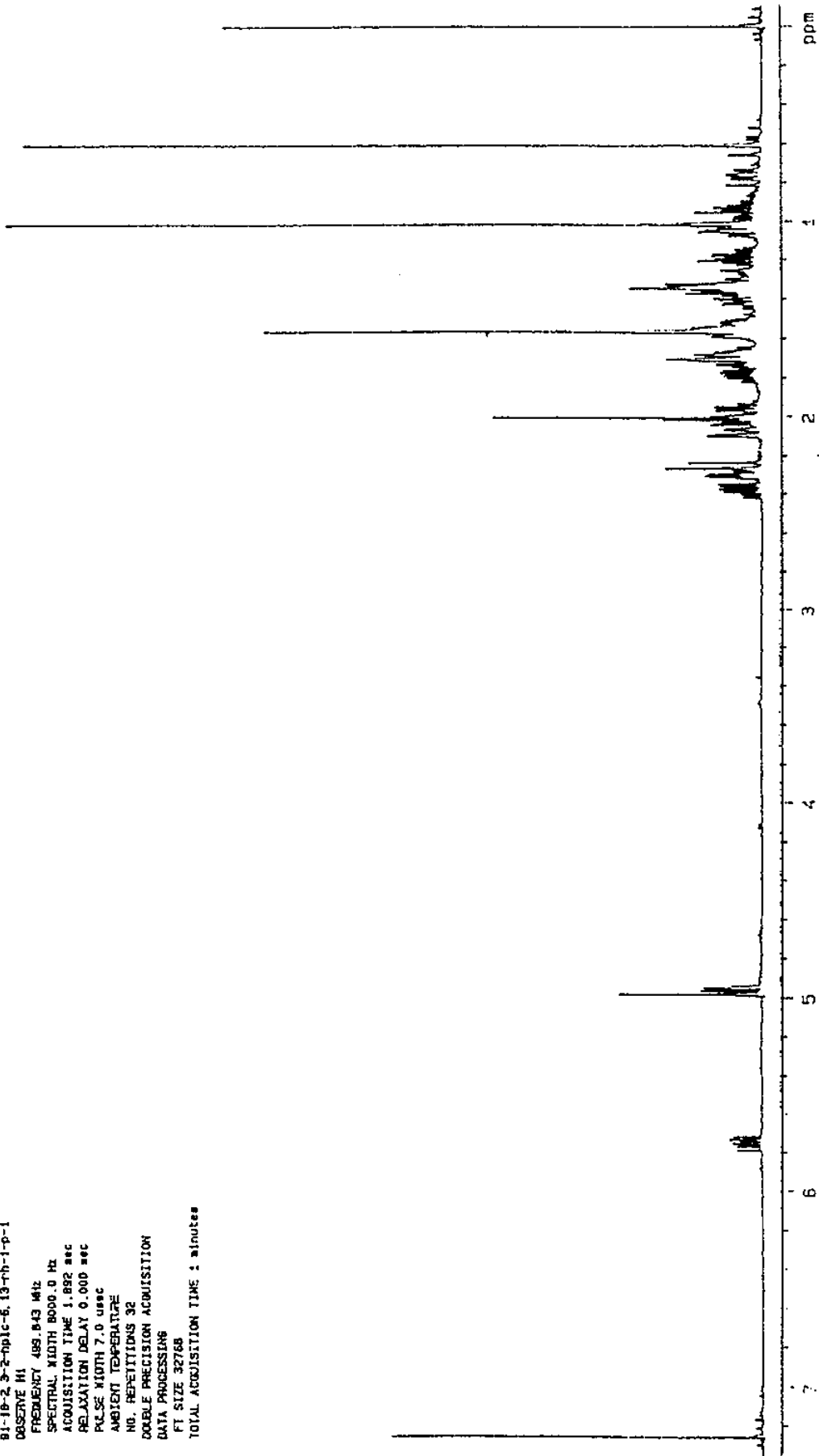


Fig. 4-48. Proton NMR spectrum of compound 91-18-7.

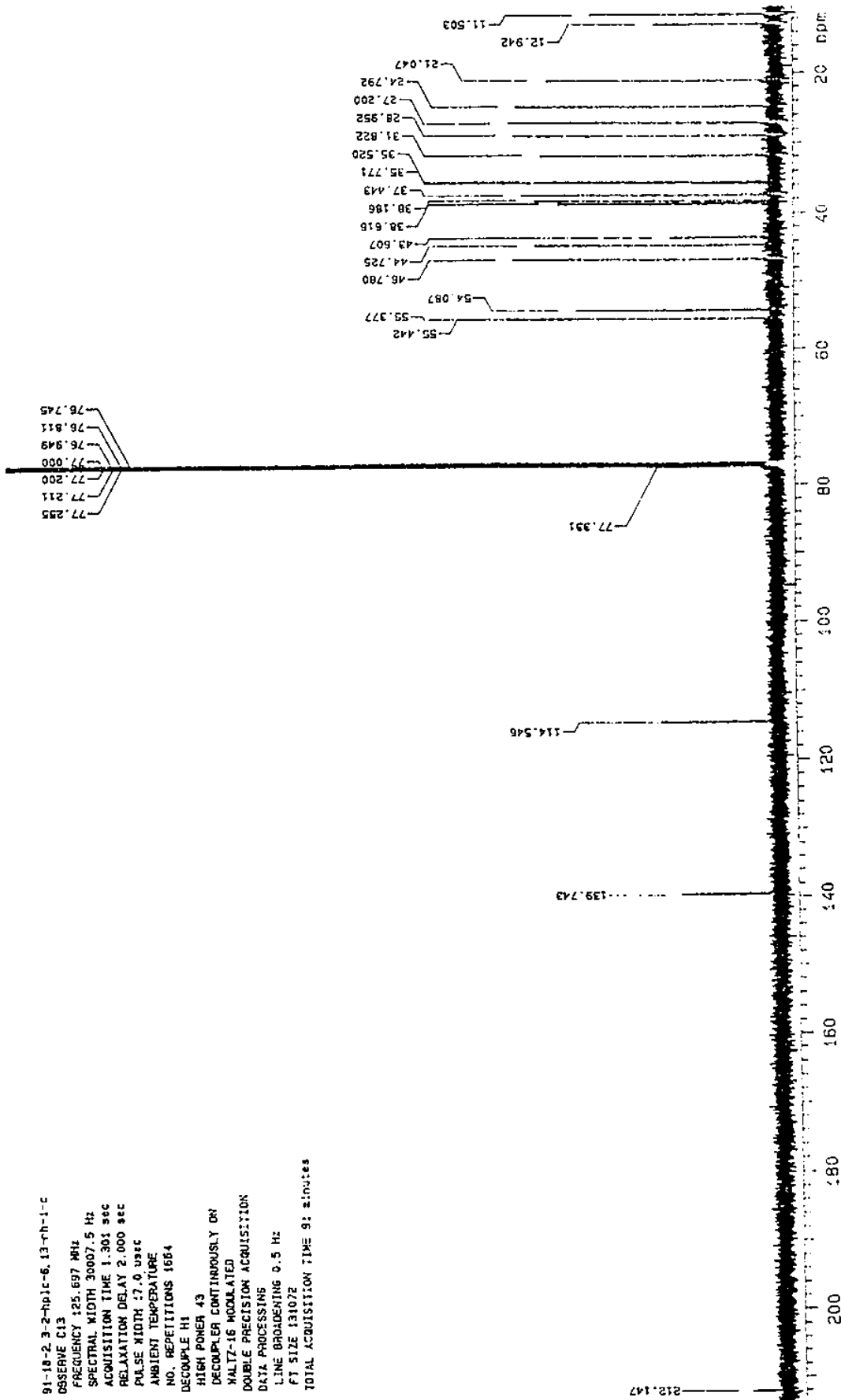


Fig. 4-49. Carbon NMR spectrum of compound 91-18-7.

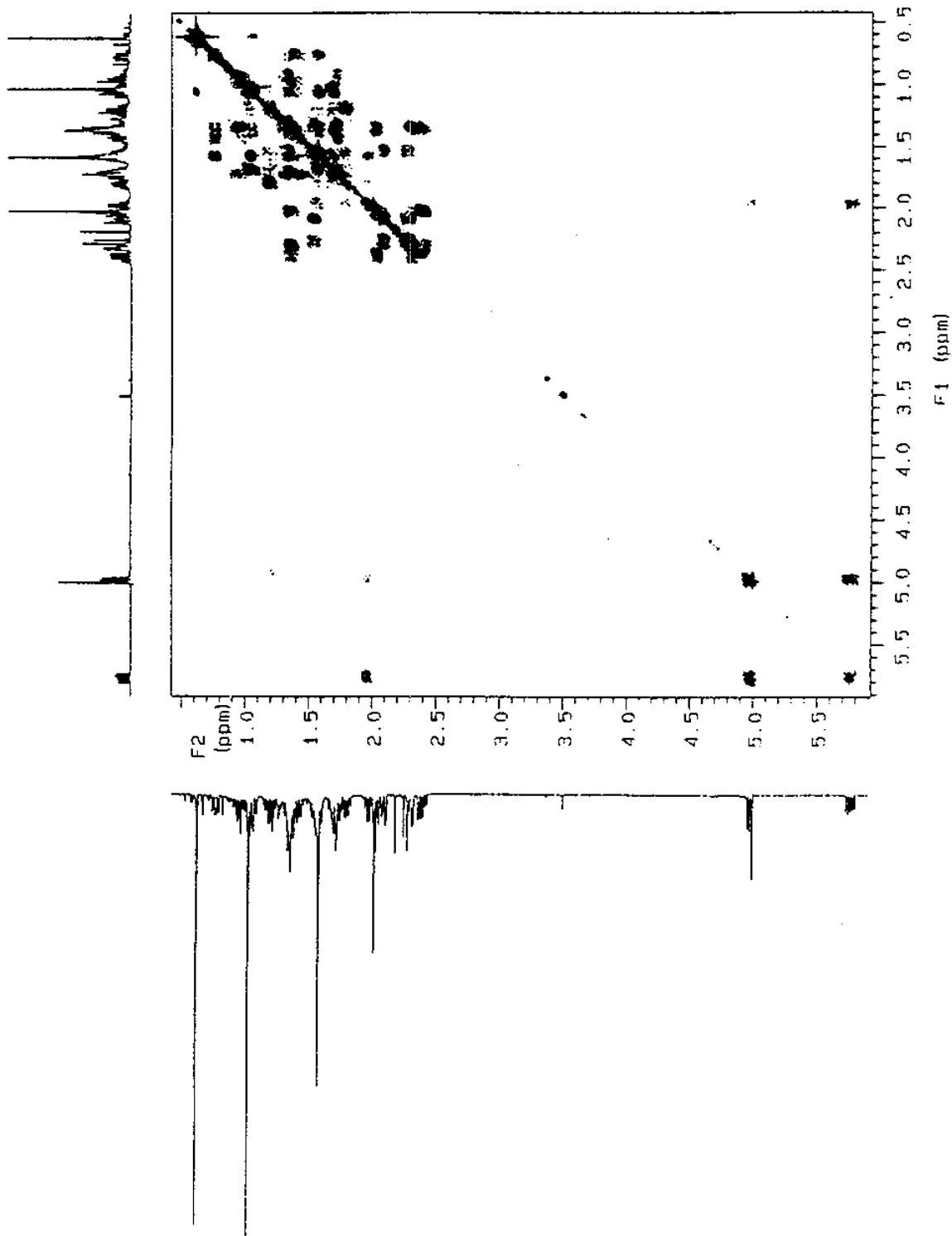


Fig. 4-50. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-18-7.

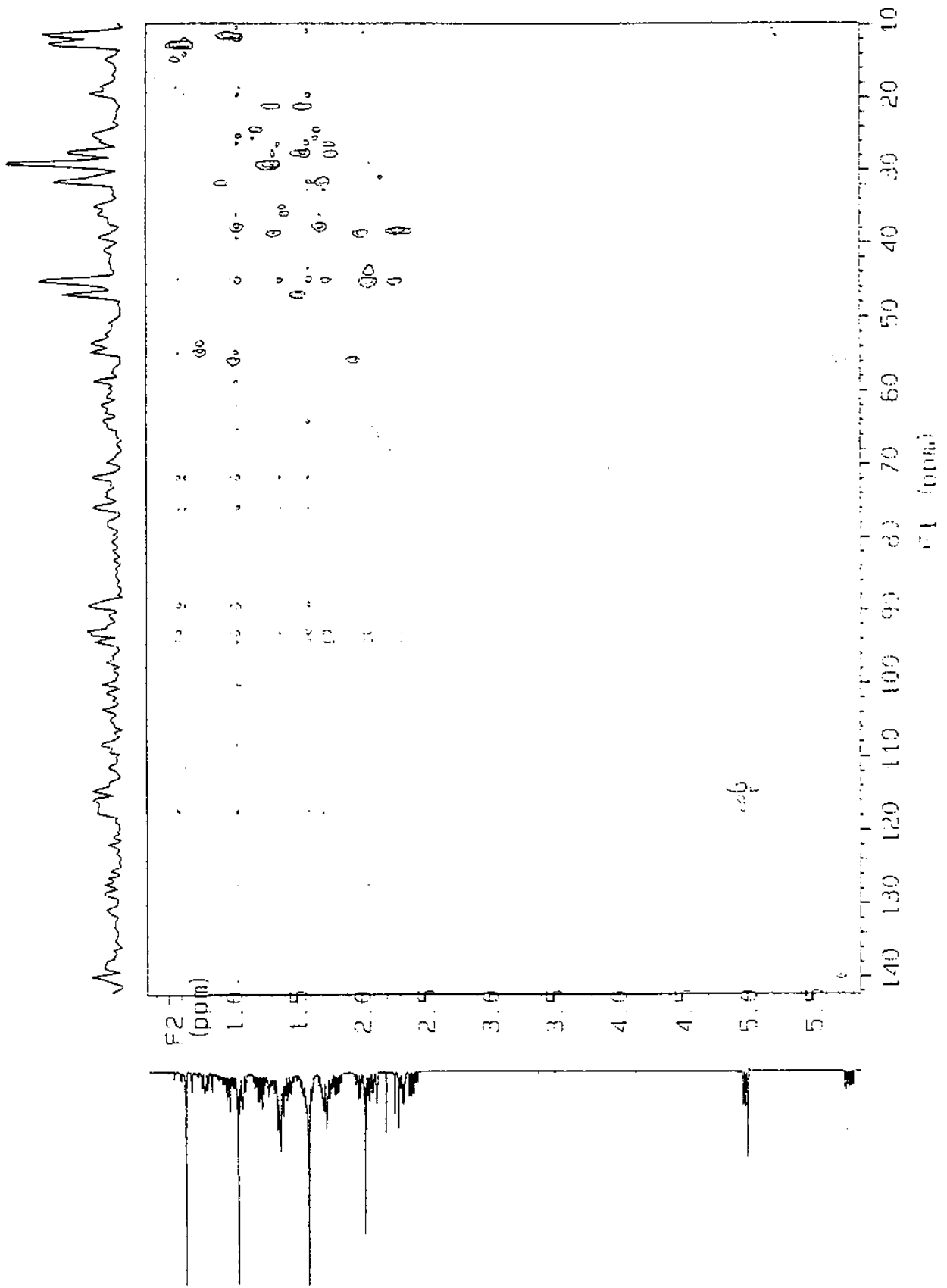


Fig. 4-51. HMQC spectrum of compound 91-18-7.

MATLSON INSTRUMENTS FILM

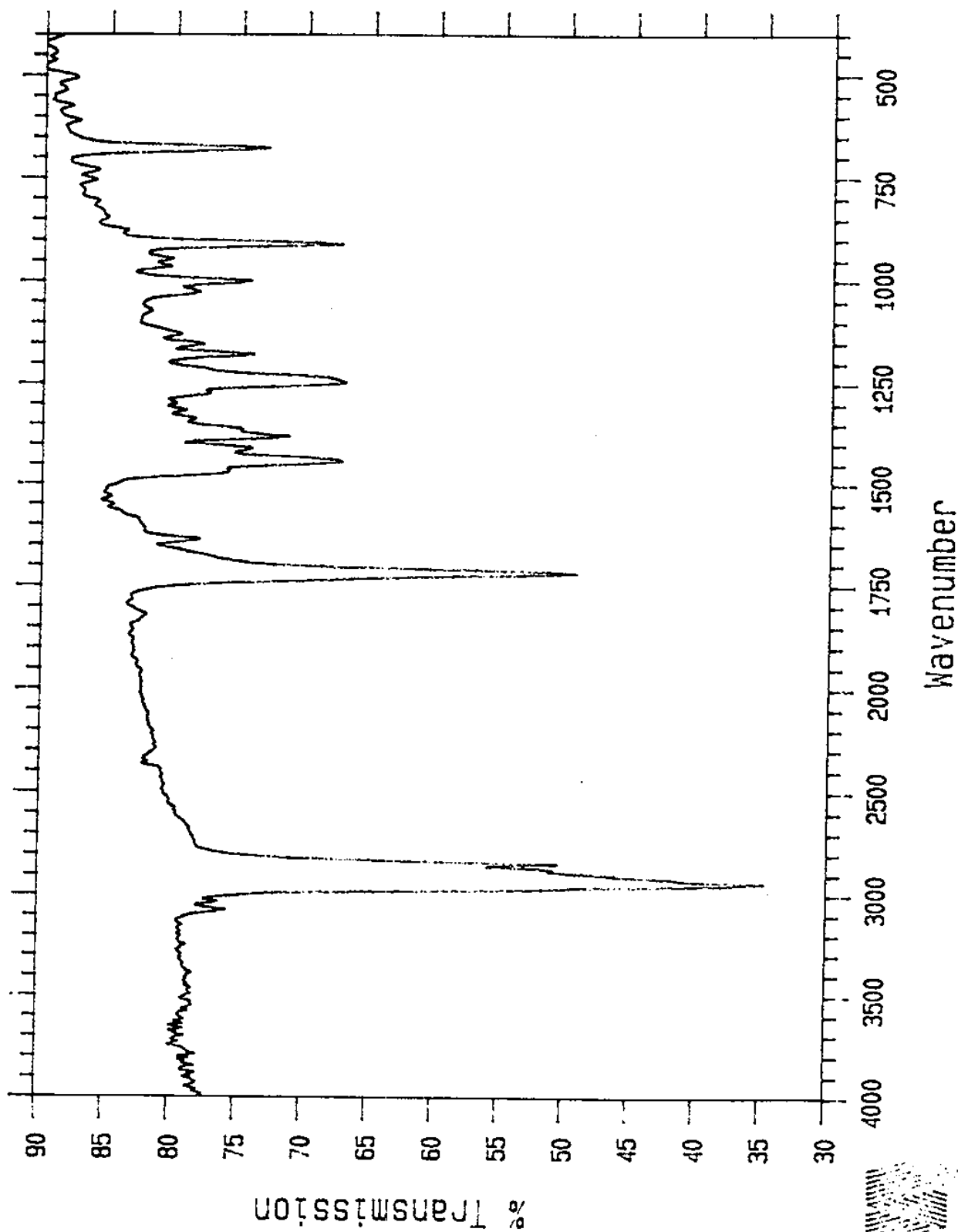


Fig. 4-52. IR spectrum of compound 91-18-7.

91-18-2 25 Nov 93 9:13 am
run 911820001 av scan 3-111 100%= 1107643

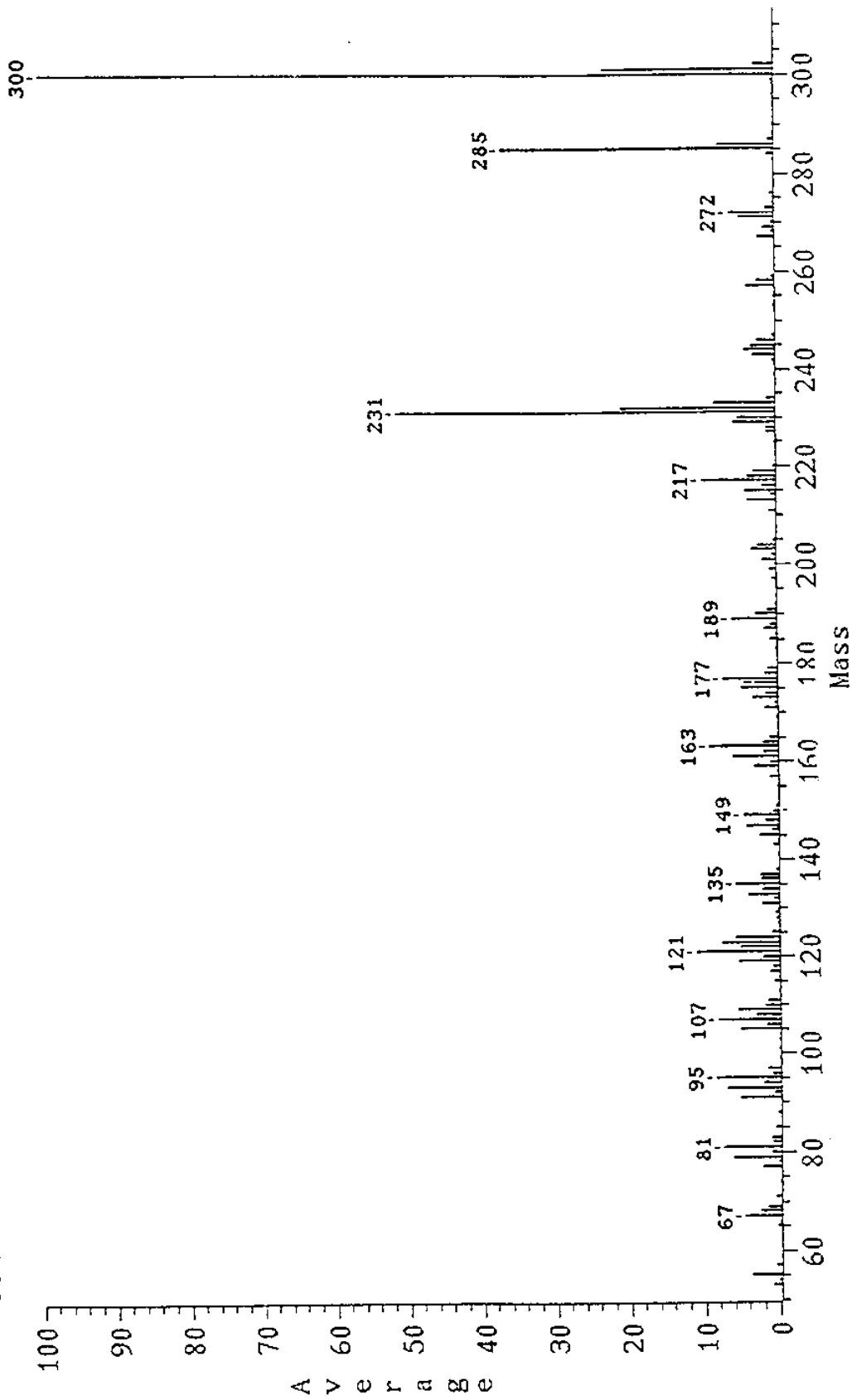


Fig. 4-53. High-resolution EIMS spectrum of compound 91-18-7.

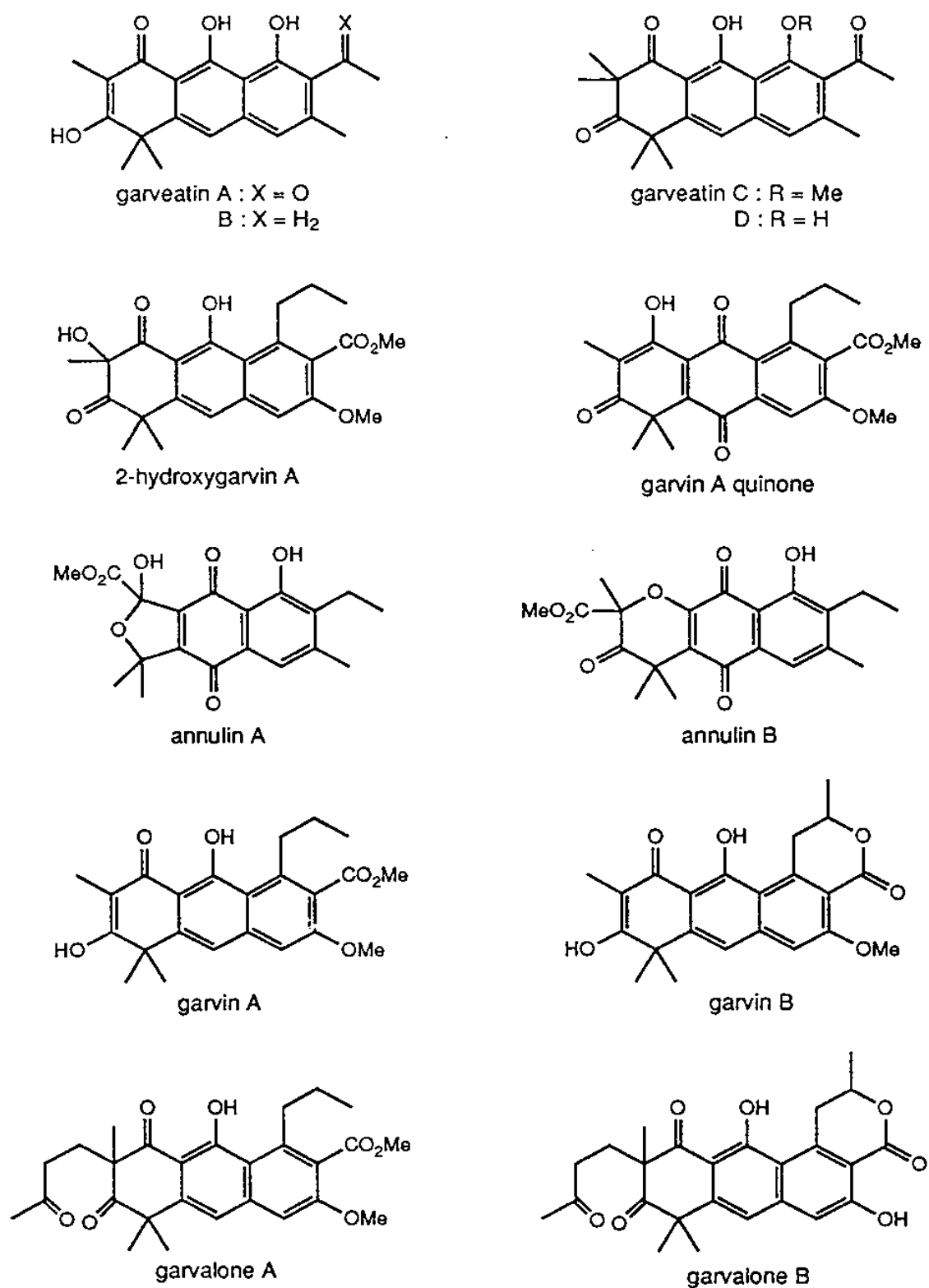
제 5 장 Hydroids의 대사물질

5. 1. 연구의 배경

Hydroids(히드라, class Hydrozoa)는 폴립형과 해파리형이 있으며 산호, 해파리 등과 더불어 강장동물문(phylum)을 구성하는 중요한 분류군이다. 하지만 천연물 화학적인 연구는 대단히 미미하며 연구가 이루어진 종의 수도 4 종에 불과하여 hydroids의 천연물에 대한 일반적인 경향조차 파악이 되지 않은 실정이다. 물론 강장동물 전체로는 해면과 더불어 천연물 화학적인 연구가 모든 해양생물중 가장 많이 이루어 졌으나 이들의 대부분은 산호 특히 soft corals, gorgonians등 Anthozoa 강의 생물에 집중되어있다.

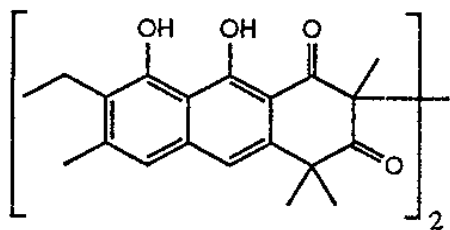
해양 천연물 화학에서 이들 생물이 도외시 되었던 이유로는 효소체계가 판이하여 다량의 대사물질을 생성하지 않는다는 것도 충분한 설득력을 가질 수 있겠으나 가장 큰 이유는 이들의 대부분이 유영생활을 하고, 체내의 수분함유량이 너무 커서 대사물질의 연구를 하기에 충분한 양의 고형조직을 얻기가 대단히 어렵다는 점이다. 그리하여 이들의 화학성분에 대한 연구는 엄밀히 말하여 천연물 화학의 범위를 벗어나는, protein계 독성물질에만 집중되었다. 그러나 최근 몇 종의 부착 hydroids에 대한 연구결과 anthozoans와 마찬가지로 이들 생물 역시 독특한 대사물질을 함유하고 있을 가능성이 높다는 것이 밝혀져 Hydrozoa에 한하여서는 천연물 연구의 가치가 재인식되고 있다.

현재까지 밝혀진 20 여종의 대사물질을 살펴 보면 aromatic polyketides, β -carbonline계의 alkaloids, unusual phospholipids, polyhydroxy steroids등이나 이들 중 polyketides를 제외한 다른 천연물은 여러 해양생물로부터 흔히 발견되는 물질들이어서 hydroids의 고유한 대사물질로 보기에는 곤란하다(Fig. 5-1)

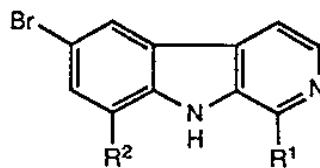


aromatic polyketides isolated from *Garveia annulata*

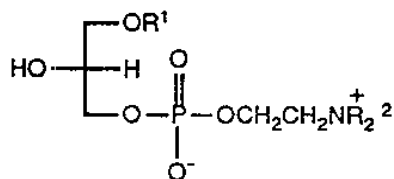
Fig. 5-1. Metabolites of hydroids.



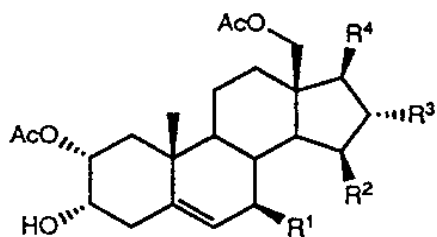
(*Garveia annulata*)

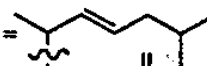
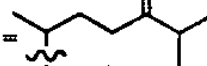
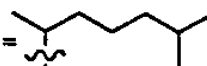


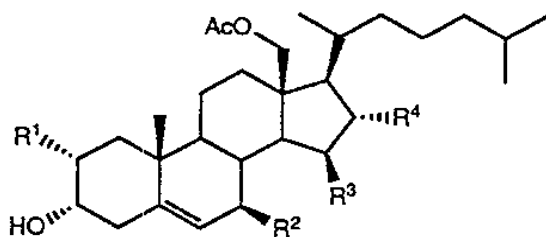
$R^1 = \text{Et}, R^2 = \text{H},$
 $R^1 = \text{Me}, R^2 = \text{H},$ and
 $R^1 = \text{Et}, R^2 = \text{Br}$
 (*Agalophenia pluma*)



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

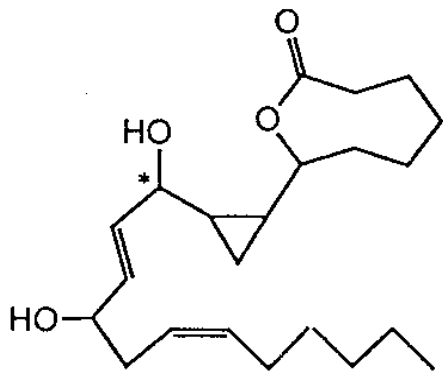
Hydroids의 대사물질중 독특한 것은 anthraquinone계의 polyketides들로서 이들은 다른 해양 생물로부터는 보기 드문 생합성적 기원과 탄소골격을 갖추고 있다. 이들은 그 수도 비교적 많고 구조적으로도 다양하나 British Columbia에 서식하는 단 한종의 시료로부터 분리되었으므로 hydroids의 대표적인 대사물질로 보기에는 어려움이 많다.

본 연구에서는 제주도과 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.

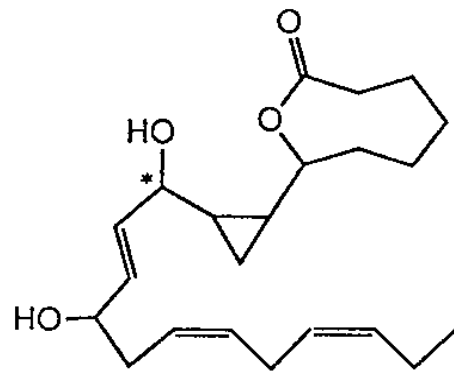
5. 2. *Solanderia secunda*의 대사물질

우리 나라의 거문도에 속하는 서도와 대삼부도 및 서귀포시 연안해역에서 hydroid *Solanderia secunda* 약 10 kg을 채집하였다. *S. secunda*는 우리 나라 남해안 일대에서 가장 흔히 발견되는 강장동물들중의 하나이다. 외관상으로 gorgonians와 아주 흡사하여 현지 주민들은 목산호라고 부른다. 이 생물은 군체의 길이가 20 - 40 cm정도로서 부채살(fan) 모양을 하고 있으며 진한 갈색을 띄고 있다. 그러나 군체의 내부중심에 gorgonin이라고 불리는 chitin질의 골격이 없는 점에서 gorgonians와 구별 된다.

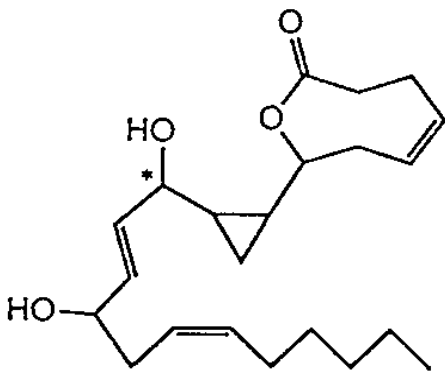
냉동보관했던 시료를 그늘에서 건조시켜 수분을 제거한 후에 dichloromethane을 이용하여 유기물질을 추출하고 용매는 진공증발기로 제거하였다. 용매를 제거한 후에 남은 잔류물을 silica flash chromatography를 하여 몇 개의 분획으로 나눈 후에 HPLC(silica normal phase와 C₁₈ reversed phase)를 이용하여 모두 9개의 물질을 분리하였다(Fig. 5-2).



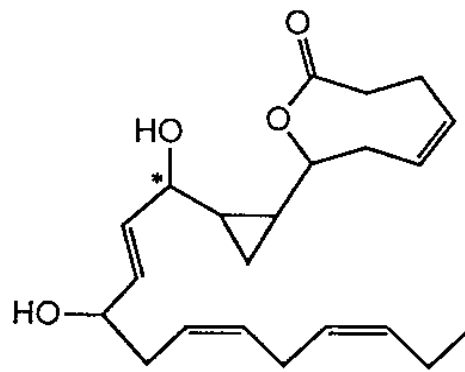
91-10-1 and -2 (epimer)



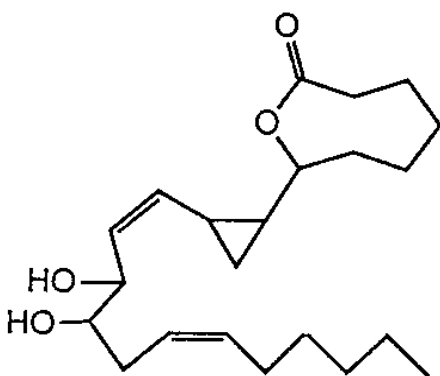
91-10-3 and -4 (epimer)



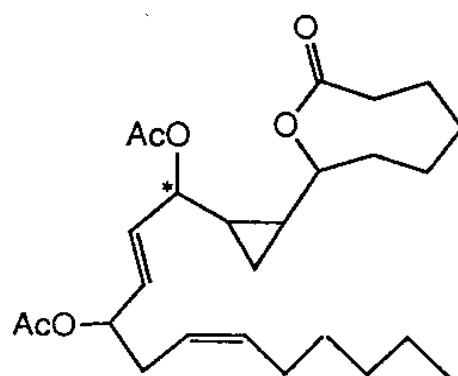
91-10-5 and -6 (epimer)



91-10-7 and -8 (epimer)



91-10-9



91-10-10 and -11 (epimer)

Fig. 5-2. Cyclopropane-containing C_{22} fatty acid lactones isolated from the hydroid *Solanderia secunda*.

먼저 중간정도의 극성(moderate polarity)을 띤 주대사물질인 91-10-1이 viscous liquid의 형태로 분리되었다. 이 물질의 ^{13}C NMR에서는 모두 22개의 signals이 발견되었다(Fig. 5-5). 이들중 δ 176.57에 나타난 quaternary carbon은 esteric carbonyl carbon으로 해석되었으며 olefinic region인 δ 123.03, 131.67, 133.16, 134.01에 나타난 4개의 methine carbons은 2개의 double bonds의 존재를 드러내었다. 또한 3개의 oxygen-bearing methine carbons(δ 71.42, 74.60, 81.47), 하나의 methyl carbon(δ 14.05) 및 11개의 methylene carbons가 DEPT 실험에 의하여 확인되었다.

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 23.04, 21.43, 7.88)가 발견되었는데 이는 cyclopropane ring의 존재를 나타내는 것이다. ^1H NMR 또한 ^{13}C NMR에 상응하는 여러 signal들을 나타내었다(Fig. 5-4). 즉 olefinic region과 oxygen-bearing proton region에 각각 4개와 3개의 proton resonances가 발견되었다. Upfield region에는 terminal methyl protons(δ 0.88)과 cyclopropane protons으로 생각되는 4개의 proton peaks 이외에 다른 protons은 발견되지 않았다. δ 2.0 ~ 3.0 region에 6개의 protons이 발견되었는데 이는 carbonyl group의 α -protons와 double bond의 allylic position에 존재하는 것들로 해석되었다.

91-10-1의 구조는 ^1H COSY와 proton decoupling에 의하여 대부분 결정되었다(Fig. 5-6). 먼저 terminal methyl로부터 시작하여 2개의 double bond, 3개의 oxygen-bearing methines(δ 4.18, 3.64, 4.09), 1개의 cyclopropane ring 및 1개의 carbonyl group을 포함하는 22개의 carbons으로 이루어진 long chain이 결정되었다.

91-10-1에는 2개의 double bonds가 존재한다. 이들중 C-16에 위치한 double

bond는 C-17(δ 5.30)의 vicinal coupling constants(10.7 Hz)로부터 Z configuration을 형성함이 밝혀졌다. 그러나 proton signals간의 overlapping이 심한 C-12 double bond의 geometry는 coupling constant로 유추할 수 없었다. 이 문제를 해결하기 위하여 C-11, -14의 protons를 irradiation한 결과 C-12와 C-13 protons의 coupling pattern이 각각 doublet로 바뀌었으며 coupling constant는 15.6 Hz로 동일하였다. 따라서 C-12의 double bond geochemistry는 E configuration임을 알 수 있다.

Cyclopropane ring에 존재하는 두 asymmetric carbon centers(C-8, -10)의 stereochemistry는 asymmetric centers에 접합된 protons간의 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 constants은 각각 15 Hz(5, 5, 5)와 21 Hz(8, 8, 5)를 나타내어야하며 반대로 상대적인 배열이 trans이면 coupling constants는 모두 18 Hz(8, 5, 5)로 나타내어야 한다.

그런데 91-10-1의 ^1H NMR상의 δ 0.60과 0.68에 위치한 C-9 protons들의 coupling constants는 각각 19.6 Hz(8.8, 5.4, 5.4 Hz)와 19.6 Hz(8.8, 5.4, 5.4 Hz)로서 전체적인 coupling constants의 합이나 개개의 coupling constants의 크기 모두 C-8과 C-10의 상대적인 배열이 trans임을 명백히 드러내었다.

이 물질의 구조결정에 있어서 남은 문제는 3개의 oxygen-bearing methines(C-7, -11, 14)와 carboxylic group(C-1)과의 연결여부이다. 이들이 상호 결합된 lactone이나 ether의 형태를 이루고 있는지 혹은 free hydroxy group과 carboxylic acid로 존재하는지의 여부를 해결하기 위하여 91-10-1을 pyridine용매에서 acetic anhydride와 반응시킨 결과 diacetate인 91-10-10이 주반응물질로 얻어졌다(Fig. 5-2).

91-10-10의 ^1H NMR과 COSY실험결과 이 물질은 91-10-1의 C-11과 C-14

hydroxy기가 acetylation되어 형성된 것이며 C-7 methine proton은 chemical shift, coupling pattern coupling constants등에서 아무런 변화가 없었다(Fig. 5-41, -43). 이 실험결과는 91-10-1에 있어서 C-1과 C-7이 oxygen bridge에 의하여 서로 연결되어 있다는 것을 의미하였다. 이와같이 91-10-1은 8-membered ring을 가진 C₂₂ fatty acid lactones으로 구조가 명확히 결정되었다(Fig. 5-2). 91-10-1과 91-10-10의 물질의 NMR assignments는 Table 5-1 및 5-6과 같다(Fig. 5-4 ~ -9, -41 ~ -43).

유사한 물질인 91-10-2가 동일한 HPLC조건에서 분리되었다. 이 물질의 ¹H NMR 및 ¹³C NMR data는 91-10-1과 매우 유사하였다(Fig 5-10, 5-11). ¹H COSY에 의해 이루어진 구조분석의 결과도 91-10-1과 동일한 위치에 functional group이 위치한다는 것을 보여 주었다(Fig. 5-12). 다만 C-8 ~ C-11의 carbons 및 protons의 분광 데이터에 약간의 차이점을 나타냈다(Table 5-2). 그런데 C-9 protons의 coupling pattern이 multiplet로 나타나서 C-8과 -9의 configuration을 확인할 수 없었기 때문에 이 문제를 해결하기 위하여 91-10-2를 pyridine 용매에서 acetic anhydride와 반응시킨 결과 diacetate 유도체인 91-10-11이 얻어 졌으며 결과적으로 C-9 protons이 각각 다른 chemical shift에서 나타났기 때문에 coupling constants를 정확하게 알 수 있었고 C-8과 -9의 configuration의 역시 91-10-1과 동일한 cis-configuration임을 알 수 있었다(Fig. 5-45). 이 물질과 91-10-1의 diacetate 유도체인 91-10-10에 대한 NMR assignments는 Table 5-6과 같다. 이 물질들의 분광 데이터를 잘 분석해 보면 몇 가지 중요한 차이점을 발견할 수 있다. 첫째는 C-11 proton의 coupling constants(91-10-10, J₁₀₋₁₁= 3.2, J₁₁₋₁₂= 8.3, J₁₁₋₁₃= 1.5; 91-10-11, J₁₀₋₁₁= 7.3, J₁₁₋₁₂= 5.4)가 다르다는 점이며 둘째는 C-8과 -9의 ¹³C NMR chemical shifts 값이 달랐으며 그리고 마지막으로 C-8 ~ -13에 이르는 protons의 ¹H NMR chemical shifts 값이 변화되었다는 것을 알 수 있었다(Table 5-6). 그러므로 이미 언급한 대로 평면상으로는 동일한 위치에 functional group을

Table 5-1. Proton and carbon NMR assignments for compounds 91-10-1 and -2^a

*	91-10-1		91-10-2	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
1		176.57 s		176.55 s
2	2.44(2H, m)	32.66 t	2.43(2H, m)	32.74 t
3	1.85(2H, m)	29.02 t	1.86(2H, m)	29.07 t
4	1.68(2H, m)	24.14 t	1.70(2H, m)	24.16 t
5	1.53(2H, m)	26.44 t	1.53(2H, m)	26.49 t
6	1.85(2H, m)	37.05 t	1.79(2H, m)	37.11 t
7	4.09(1H, dt, 6.4, 7.8)	81.47 d	4.05(1H, dt, 6.4, 6.8)	81.58 d
8	1.15(1H, m)	21.43 d	1.05(1H, m)	20.46 d
9	0.68(1H, ddd, 8.8, 5.4, 5.4) 0.60(1H, ddd, 8.3, 5.4, 5.4)	7.88 t	0.71(2H, m)	8.96 t
10	0.98(1H, m)	23.04 d	0.99(1H, m)	23.22 d
11	3.64(1H, dd, 7.8, 3.4)	74.60 d	3.66(1H, dd, 7.8, 4.9)	74.74 d
12	5.78(1H, m)	133.16 d	5.75(1H, m)	133.58 d
13	5.78(1H, m)	131.67 d	5.75(1H, m)	131.64 d
14	4.18(1H, dt, 4.4, 6.4)	71.42 d	4.16(1H, dt, 3.9, 6.3)	71.56 d
15	2.32(2H, m)	35.30 t	2.34(1H, ddd, 14.6, 7.8, 6.3) 2.28(1H, ddd, 14.6, 7.1, 6.3)	35.32 t
16	5.37(1H, dtt, 10.8, 7.3, 1.5)	124.03 d	5.37(1H, dtt, 10.7, 7.1, 1.5)	124.04 d
17	5.59(1H, dtt, 10.8, 7.3, 1.5)	134.01 d	5.57(1H, dtt, 10.7, 7.1, 1.5)	133.92 d
18	2.05(2H, brdt, 6.8, 6.8)	27.43 t	2.05(2H, brdt, 7.3, 7.3)	27.43 t
19	1.34(2H, m)	29.27 t	1.36(2H, m)	29.26 t
20	1.28(2H, m)	31.49 t	1.29(2H, m)	31.49 t
21	1.28(2H, m)	22.54 t	1.29(2H, m)	22.54 t
22	0.88(3H, t, 7.1)	14.05 q	0.89(3H, t, 7.1)	14.04 q

^a Proton and carbon 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. Carbon NMR spectra were obtained in CDCl₃ solution at 125 MHz. Assignments are aided by decoupling and COSY, and HMQC experiments.

가지면서 이와 같은 분광 데이터상의 변화를 만족시킬 수 있기 위하여는 91-10-2가 91-10-1의 C-11 epimer라고 결론 지을 수 있다(Fig. 5-2).

유사한 물질인 91-10-3과 91-10-4가 분리되었다. 이 물질들 역시 91-10-1이나 91-10-2와 유사한 fatty acid lactones로 생각되었으며 중요한 차이점은 C-19에 새로운 double bond가 나타났다는 점이었다(Fig. 5-16 ~ -21). 이 물질들의 구조 역시 proton decoupling과 ^1H COSY NMR 실험에 의하여 구조가 결정되었다(Fig. 5-16, -18, -19, -21). C-2 methylene으로부터 시작하여 C-22 terminal methyl에 이르는 모든 correlation이 명확히 드러났다. C-16과 -19 double bond의 geometry는 각각 coupling constant(C-16, 91-10-3, $J=10.7$ Hz, 91-10-4, $J=12.2$ Hz; C-19, 91-10-3, 11.2 Hz, 91-10-4, 12.2 Hz)에 의해서 Z-configuration으로 결정되었다. 또 C-12에 위치한 double bond의 geometry는 91-10-3의 경우에는 위와 마찬가지로 double bond protons간의 coupling constant($J=15.6$ Hz)로부터 E configuration임이 밝혀 졌으나 91-10-4의 경우에는 이 부분의 protons가 겹쳐져 있어 proton decoupling 실험에 의하여 결정되었다. 대사물질 91-10-4의 δ 3.66(C-11)이나 4.19(C-14)의 protons를 irradiation하였을 때 C-13과 C-12의 protons가 각각 double doublet인 것을 볼 수 있었으며 coupling constants는 15.5 Hz였다. 그러므로 C-12 geometry는 E-configuration으로 확인되었다(Fig. 5-2)(Table 5-2). 91-10-3과 91-10-4는 91-10-1과 91-10-2의 경우와 마찬가지로 C-11의 epimer로 여겨지며 91-10-1과 91-10-3, 그리고 91-10-2과 91-10-4는 동일한 stereochemistry를 갖는 것으로 판단된다.

또 다른 유사물질인 91-10-5와 91-10-6이 유사한 조건에서 분리되었으며 이 물질들의 ^1H NMR과 ^{13}C NMR data 역시 91-10-1이나 91-10-2와 아주 유사하였다(Fig. 5-22, -23, -26, -27). 유일한 차이점은 ^1H NMR spectrum상의 δ 5.79와 5.73에서 vinyl protons로 생각되는 peak가 추가적으로 나타났으며 이에 상응하는 변화가 ^{13}C NMR 상에서도 발견되어(δ 132.80d, 127.99d) 이 물질들은 이중결합이

Table 5-2. Proton and carbon NMR assignments for compounds 91-10-3 and -4^a

*	91-10-3		91-10-4	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
1		176.55 s		176.56 s
2	2.44(2H, m)	32.70 t	2.43(2H, m)	32.75 t
3	1.85(2H, m)	29.05 t	1.86(2H, m)	29.07 t
4	1.69(2H, m)	24.17 t	1.69(2H, m)	24.16 t
5	1.55(2H, m)	26.47 t	1.53(2H, m)	26.49 t
6	1.85(2H, m)	37.07 t	1.79(2H, m)	37.10 t
7	4.09(1H, dt, 6.4, 7.6)	81.46 d	4.05(1H, dt, 6.6, 7.5)	81.54 d
8	1.16(1H, m)	21.44 d	1.06(1H, m)	20.47 d
9	0.68(1H, ddd, 8.8, 5.4, 5.4) 0.60(1H, ddd, 8.8, 5.4, 5.4)	7.87 t	0.71(2H, m)	8.94 t
10	0.99(1H, m)	23.04 d	0.99(1H, m)	23.21 d
11	3.65(1H, dd, 7.6, 4.4)	74.57 d	3.66(1H, dd, 8.0, 4.5)	74.71 d
12	5.77(1H, dd, 15.6, 4.4)	133.07 d	5.76(1H, m)	133.47 d
13	5.81(1H, dd, 15.6, 5.0)	131.80 d	5.76(1H, m)	131.73 d
14	4.20(1H, dt, 3.9, 6.6)	71.37 d	4.19(1H, dt, 4.2, 6.0)	71.50 d
15	2.36(2H, m)	35.30 t	2.35(2H, m)	35.30 t
16	5.41(1H, m)	124.44 d	5.41(1H, m)	124.41 d
17	5.30(1H, dtt, 10.7, 7.3, 1.5)	126.66 d	5.30(1H, dtt, 12.2, 7.5, 1.4)	126.60 d
18	2.81(2H, dd, 7.3, 7.3)	25.73 t	2.81(2H, dd, 7.3, 7.3)	25.73 t
19	5.57(1H, dtt, 11.2, 7.3, 1.5)	131.92 d	5.56(1H, dtt, 12.2, 7.5, 1.4)	131.90 d
20	5.41(1H, m)	132.29 d	5.41(1H, m)	132.32 d
21	2.07(2H, brdq, 7.6, 7.6)	20.60 t	2.07(2H, brdq, 7.0, 7.0)	20.60 t
22	0.98(3H, t, 7.6)	14.23 q	0.98(3H, t, 7.5)	14.24 q

^a Proton and carbon 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. Carbon NMR spectra were obtained in CDCl₃ solution at 125 MHz. Assignments for 91-10-3 and -4 are aided by comparison with 91-10-1 and -8 and COSY experiment.

하나 더 늘어난 즉 모두 3개의 이중결합을 가진 fatty acid lactones라는 사실을 알 수 있었다. 정확한 전체적인 구조는 proton decoupling과 ^1H COSY 실험에 의하여 결정되었으며 그 결과 91-10-5와 91-10-6은 C-4, -12, -16이 이중결합인 fatty acid 유도체들이 확인되었다(Fig. 5-22 ~ -24, -26 ~ -28). 91-10-5에 하나 더 존재하는 C-4의 이중결합의 geometry를 결정하기 위하여 C-6 methylene protons (δ 2.57)을 irradiation한 결과 C-5 proton(δ 5.73)의 pattern이 double doublet($J=11.3, 7.2$ Hz)로 변화하였으며 이로서 C-4 bond의 geometry는 Z configuration임이 밝혀 졌다. 91-10-5와 91-10-6의 분광데이터를 자세히 분석해 보면 91-10-5와 91-10-6 역시 서로 11-epimer관계이며 91-10-5는 91-10-1과 그리고 91-10-6은 91-10-2와 각각 동일한 stereochemistry를 갖는다(Fig. 5-2)(Table 5-3).

유사한 조건에서 또 다른 유도체인 91-10-7과 91-10-8이 분리되었다. 이 물질들 역시 분광 데이터는 91-10-1 ~ -6과 아주 유사하였으며 유일한 차이점은 이중결합의 수가 모두 4개가 존재한다는 점이었다(Fig. 5-30 ~ -36). 91-10-7에 대한 이중결합의 configurations이 결정되었다. 각 이중결합의 geometry는 C-16과 C-19의 경우에 vicinal coupling constant(10.7과 10.8 Hz)에 의해서 Z configuration임이 확인되었으며 또 C-4의 경우에는 C-6 methylene protons를 irradiation하면 C-5 methine proton(δ 5.74)이 double doublet($J=11.2, 7.3$ Hz)로 변화되는 것으로부터 역시 Z configuration으로 결정되었다. 그러나 C-12 double bond의 경우에는 C-12, -13 protons이 나타나는 위치에 C-4와 -5의 protons이 겹쳐 있어 decoupling에 의해서도 정확한 geometry를 알기 어려웠기 때문에 91-10-1과 NMR data를 비교하여 E configuration으로 결정하였다. 91-10-8은 91-10-7의 11-epimer로서 91-10-2와 동일한 stereochemistry를 가지며 그 epimer인 91-10-7은 91-10-1과 동일한 stereochemistry를 갖는다(Fig. 5-2)(Table 5-4).

유사한 대사물질인 91-10-9가 분리되었다. ^{13}C NMR 실험에서 한 개의 esteric carbonyl group(δ 176.62), 2개의 double bonds(δ 135.82, 133.55, 127.60, 124.42) 그

Table 5-3. Proton and carbon NMR assignments for compounds 91-10-5 and -6^a

*	91-10-5		91-10-6	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
1		176.88 s		176.99 s
2	2.73(1H, ddd, 13.2, 5.9, 2.9) 2.30(1H, m)	37.69 t	2.73(1H, ddd, 13.2, 5.9, 2.9) 2.30(1H, m)	37.69 t
3	2.84(1H, m) 2.12(1H, m)	24.41 t	2.86(1H, m) 2.12(1H, m)	24.38 t
4	5.79(1H, m)	131.70 d	5.78(1H, m)	131.73 d
5	5.73(1H, m)	127.99 d	5.76(1H, m)	128.11 d
6	2.57(1H, ddd, 14.0, 10.3, 6.4) 2.19(1H, ddd, 14.0, 8.1, 1.7)	34.30 t	2.63(1H, ddd, 14.2, 10.5, 6.4) 2.26(1H, ddd, 14.2, 7.8, 1.5)	34.21 t
7	4.01(1H, ddd, 10.3, 8.1, 1.7)	80.76 d	4.05(1H, ddd, 10.3, 7.3, 1.0)	80.87 d
8	1.02(1H, m)	19.73 d	1.14(1H, m)	20.56 d
9	0.78(1H, ddd, 8.3, 5.4, 5.4) 0.70(1H, ddd, 8.4, 5.4, 5.4)	9.02 t	0.74(1H, ddd, 8.8, 5.4, 4.9) 0.60(1H, ddd, 8.3, 5.4, 5.3)	7.96 t
10	1.02(1H, m)	23.02 d	1.01(1H, m)	23.31 d
11	3.67(1H, dd, 6.3, 4.9)	74.74 d	3.66(1H, dd, 7.3, 4.4)	74.36 d
12	5.79(1H, m)	133.91 d	5.78(1H, m)	133.09 d
13	5.79(1H, m)	132.80 d	5.78(1H, m)	132.72 d
14	4.17(1H, dt, 5.3, 6.8)	71.57 d	4.18(1H, dt, 5.5, 6.8)	71.42 d
15	2.33(2H, m)	35.29 t	2.32(2H, m)	35.26 t
16	5.37(1H, brdt, 11.0, 7.1)	124.02 d	5.38(1H, brdt, 11.1, 6.8)	124.08 d
17	5.58(1H, brdt, 11.0, 7.3)	133.62 d	5.58(1H, brdt, 11.1, 7.3)	133.85 d
18	2.04(2H, dt, 7.3, 7.3)	27.82 t	2.05(2H, dt, 7.3, 7.3)	27.40 t
19	1.35(2H, m)	29.26 t	1.36(2H, m)	29.24 t
20	1.29(2H, m)	31.50 t	1.28(2H, m)	31.47 d
21	1.29(2H, m)	22.53 t	1.28(2H, m)	22.51 t
22	0.89(3H, t, 7.1)	14.04 q	0.89(3H, t, 6.8)	14.02 q

^a Proton and carbon 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. Carbon NMR spectra were obtained in CDCl₃ solution at 125 MHz. Assignments are aided by decoupling and COSY, and HMQC experiments.

Table 5-4. Proton and carbon NMR assignments for compounds 91-10-7 and -8^a

*	91-10-7		91-10-8	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
1		176.84 s		176.90 s
2	2.73(1H, ddd, 13.2, 5.9, 2.9) 2.30(1H, ddd, 13.2, 11.7, 4.9)	37.70 t	2.74(1H, ddd, 13.7, 5.9, 2.9) 2.33(1H, ddd, 13.7, 4.9, 1.5)	37.71 t
3	2.85(1H, m) 2.12(1H, m)	24.42 t	2.85(1H, m) 2.12(1H, m)	24.42 t
4	5.79(1H, m)	131.76 d	5.79(1H, m)	131.82 d
5	5.74(1H, m)	127.99 d	5.74(1H, m)	128.10 d
6	2.58(1H, ddd, 14.0, 10.2, 6.8, 1.3) 2.19(1H, ddd, 14.0, 8.0, 1.9)	34.31 t	2.57(1H, ddd, 14.0, 10.3, 6.4) 2.26(1H, ddd, 14.0, 7.8, 1.5)	34.23 t
7	4.01(1H, ddd, 10.2, 8.0, 1.9)	80.70 d	4.01(1H, ddd, 10.0, 8.3, 1.9)	80.79 d
8	1.03(1H, m)	19.76 d	1.14(1H, m)	20.60 d
9	0.78(1H, ddd, 8.1, 5.4, 5.3) 0.70(1H, ddd, 8.1, 5.4, 5.3)	8.99 t	0.74(1H, ddd, 8.8, 5.1, 5.1) 0.60(1H, ddd, 8.8, 5.1, 5.1)	7.97 t
10	1.03(1H, m)	23.49 d	1.01(1H, m)	23.32 d
11	3.67(1H, dd, 6.8, 4.9)	74.69 d	3.67(1H, dd, 7.8, 4.9)	74.37 d
12	5.79(1H, m)	133.50 d	5.79(1H, m)	133.03 d
13	5.79(1H, m)	132.83 d	5.79(1H, m)	132.71 d
14	4.19(1H, dt, 6.8, 5.1)	71.48 d	4.20(1H, dt, 5.9, 4.9)	71.40 d
15	2.36(2H, m)	35.29 t	2.33(2H, m)	35.30 t
16	5.41(1H, m)	124.39 d	5.41(1H, m)	124.47 d
17	5.29(1H, dtt, 10.8, 7.3, 1.5)	126.60 d	5.30(1H, dtt, 10.7, 6.8, 1.5)	126.66 d
18	2.81(2H, dd, 7.3, 7.3)	25.73 t	2.81(2H, dd, 7.1, 7.1)	25.74 t
19	5.57(1H, dtt, 10.7, 7.3, 1.5)	131.93 d	5.57(1H, dtt, 10.7, 7.3, 1.5)	131.82 d
20	5.41(1H, m)	132.30 d	5.41(1H, m)	132.24 d
21	2.07(2H, brdq, 7.3, 7.6)	20.59 t	2.07(2H, brdq, 7.3, 7.3)	20.60 t
22	0.98(3H, t, 7.6)	14.24 q	0.98(3H, t, 7.6)	14.23 q

^a Proton and carbon 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. Carbon NMR spectra were obtained in CDCl₃ solution at 125 MHz. Assignments are aided by decoupling and COSY, and HMQC experiments.

리고 3 개의 oxygen-bearing carbons(δ 81.29, 75.10, 74.29)를 포함해서 모두 22개의 carbon signals이 발견되었으며 또 HMQC 실험에 의하여 proton-carbon간의 정확한 correlation이 assign됨에 따라 δ 12.16의 carbon signal과 대응하는 δ 0.71과 0.89의 proton signals는 91-10-9 역시 다른 유도체들과 마찬가지로 한 개의 cyclopropane ring을 가지고 있음을 알 수 있었다(Fig. 5-2, -37, -38, -40). 91-10-9의 전체적인 평면구조는 ^1H COSY 실험에 의하여 결정 되었다(Fig. 5-39). Fig. 5-2에 제시된 것처럼 이 물질은 C-7과 -13의 alcoholic bond, C-14의 esteric bond 및 C-11과 C-16에 이중결합을 가진 fatty acid lactone이라는 것을 알 수 있다. 이 대사물질은 91-10-1이나 91-10-2에 allylic rearrangement가 일어나 형성된 것으로 여겨진다. 이 물질의 NMR assignments는 Table 5-5와 같다.

이들 *Solanderia secunda*의 대사물질들은 91-10-9를 제외하고는 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. 이 물질들의 stereochemistry를 밝히기 위하여 nOe 및 NOESY 실험을 시도하였으나 configuration을 결정할 수 있는 데이터를 얻기 어려웠다. 다른 macrolides나 long-chain fatty acids에서 흔히 볼 수 있는 것 같이 현재의 천연물 화학적 연구수준으로는 NMR 실험에 의해서 이들 long-chain asymmetric centers의 입체화학적 배열의 결정은 불가능 할 것으로 생각된다. 따라서 p-biphenylcarboxylic acid ester 유도체를 만들어 X선 결정구조분석을 시도할 예정이다. 하지만 NMR data를 자세히 분석해 보면 동일한 stereochemistry를 갖는 두 개의 그룹 즉 91-10-1, -3, -5, -7과 91-10-2, -4, -6, -8로 나눌 수 있으며 이 그룹들간에는 서로 11-epimer 관계에 있음을 알 수 있다. 지금까지 이런 계통의 fatty acid lactones의 stereochemistry는 아직 결정된 바 없다.

91-10-1 ~ -9은 모두 cyclopropane을 가진 C_{22} fatty acid lactones이다. 문헌

Table 5-5. Proton and carbon NMR assignments for compounds 91-10-9^a

*	91-10-9	
	¹ H	¹³ C
1		176.62 s
2	2.44(2H, m)	32.69 t
3	1.87(2H, m)	29.24 t
4	1.70(1H, m), 1.56(1H, m)	26.46 t
5	1.54(2H, m)	24.15 t
6	1.82(2H, m)	37.13 t
7	4.12(1H, dt, 6.3, 7.6)	81.29 d
8	1.14(1H, m)	24.86 d
9	0.89(1H, ddd, 8.3, 5.4, 5.4) 0.71(1H, ddd, 8.3, 5.4, 5.4)	12.16 t
10	1.41(1H, m)	19.24 d
11	5.37(1H, dd, 15.1, 8.3)	135.62 d
12	5.56(1H, dd, 15.1, 8.3)	127.60 d
13	3.92(1H, dd, 6.3, 6.3)	75.10 d
14	3.49(1H, ddd, 7.8, 6.0, 4.8)	74.29 d
15	2.25(2H, m)	31.07 t
16	5.42(1H, dtt, 9.8, 7.8, 1.5)	124.42 d
17	5.57(1H, dtt, 9.8, 7.3, 1.5)	133.55 d
18	2.04(2H, dt, 6.8, 7.1)	27.36 t
19	1.35(2H, m)	29.06 t
20	1.30(2H, m)	31.50 t
21	1.27(2H, m)	22.62 t
22	0.89(3H, t, 6.8)	14.03 q

^a Proton and carbon 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. Carbon NMR spectra were obtained in CDCl₃ solution at 125 MHz. Assignments are aided by decoupling and COSY, and HMQC experiments.

Table 5-6. Proton and carbon NMR assignments for compounds 91-10-10 and -11^a

*	91-10-10		91-10-11	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
1		176.56 s		176.51 s
2	2.43(2H, m)	32.89 t	2.42(2H, m)	32.86 t
3	1.86(2H, m)	29.14 t	1.86(2H, brq, 6.0)	29.17 t
4	1.70(1H, m), 1.56(1H, m)	24.19 t	1.69(1H, m), 1.55(1H, m)	24.21 t
5	1.53(2H, m)	26.57 t	1.52(2H, m)	26.58 t
6	1.79(2H, m)	36.97 t	1.78(2H, brdt, 5.9, 6.1)	37.17 t
7	4.05(1H, dt, 5.4, 8.1)	81.16 d	4.06(1H, dt, 6.8, 7.1)	81.22 d
8	1.21(1H, m)	21.69 d	1.04(1H, m)	20.57 d ^f
9	0.74(1H, ddd, 8.3, 5.4, 5.4) 0.60(1H, ddd, 8.3, 5.4, 5.4)	8.39 t	0.74(1H, ddd, 8.3, 5.4, 5.4) 0.70(1H, ddd, 8.3, 5.4, 5.4)	9.36 t
10	1.04(1H, m)	20.52 d	1.04(1H, m)	20.62 d ^f
11	4.83(1H, ddd, 8.3, 3.2, 1.5)	75.73 d	4.88(1H, dd, 7.3, 5.4)	75.46 d
12	5.69(1H, m)	130.57 d	5.64(1H, dd, 15.6, 5.4)	130.92 d
13	5.71(1H, m)	129.50 d	5.68(1H, dd, 15.6, 5.4)	129.35 d
14	5.27(1H, m)	73.09 d	5.25(1H, m)	73.11 d
15	2.43(1H, m), 2.34(1H, m)	32.28 t	2.41(1H, m), 2.32(1H, m)	32.28 t
16	5.28(1H, dtt, 11.2, 7.3, 1.5)	123.17 d	5.28(1H, dtt, 10.7, 7.3, 1.5)	123.18 d
17	5.51(1H, dtt, 11.2, 7.3, 1.5)	133.33 d	5.50(1H, dtt, 10.7, 7.3, 1.5)	133.35 d
18	2.01(2H, brdt, 6.4, 7.8)	27.39 t	2.01(2H, brdt, 6.8, 7.3)	27.39 t
19	1.34(2H, m)	29.21 t	1.34(2H, m)	29.19 t
20	1.29(2H, m)	31.51 t	1.29(2H, m)	31.50 t
21	1.29(2H, m)	22.57 t	1.29(2H, m)	22.56 t
22	0.89(3H, t, 7.1)	14.07 q	0.89(3H, t, 6.8)	14.07 q
OAC		170.12 s ^c		170.11 s ^g
	2.07(3H, s) ^b	21.25 q ^d	2.06(3H, s) ^e	21.25 q ^h
		170.12 s ^c		170.09 s ^g
	2.05(3H, s) ^b	21.21 q ^d	2.05(3H, s) ^e	21.23 q ^h

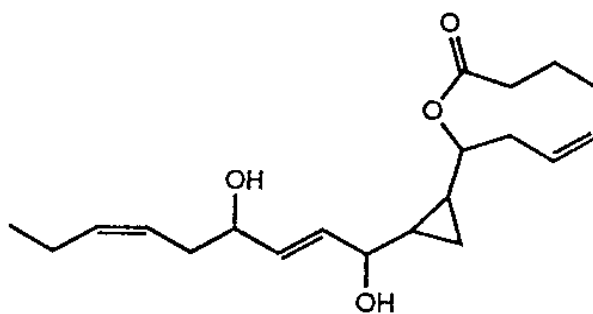
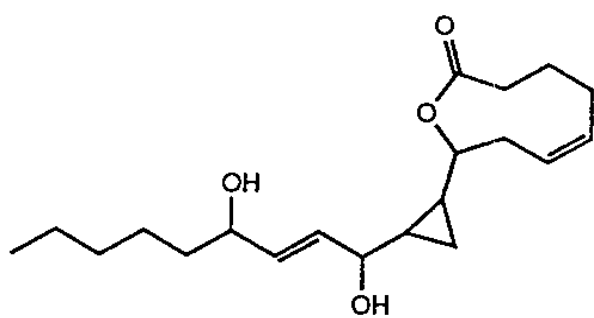
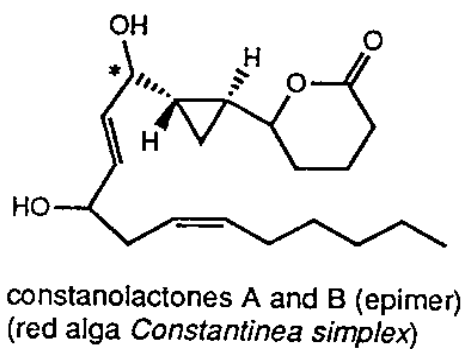
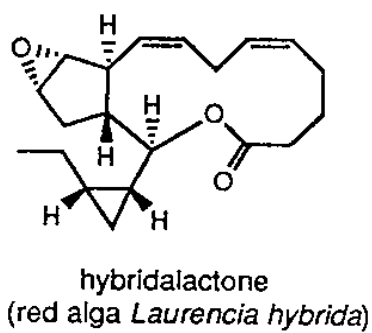
^a Proton and carbon NMR spectra were recorded in CDCl₃ solution at 500 MHz. Chemical shifts are reported in δ values (ppm downfield from Me₄Si). J values are reported in Hz. Carbon NMR spectra were obtained in CDCl₃ solution at 125 MHz. Assignments are aided by COSY and HMQC experiments. ^{c-i} Assignments may be interchanged.

조사결과 이들은 모두 신물질이며 hydroids를 비롯한 강장동물의 대사물질로는 매우 특이한 천연물임을 확인하였다. 그러나 구조적으로 유사한 cyclopropanyl fatty acid lactones이 수 종의 red algae, sponges, mollusks등으로부터 발견된 바 있다 (Fig. 5-3)(Higgs & Mulheim, 1981; Niwa et al. 1989; Nagle & Gerwick, 1990; Ojika et al, 1990).

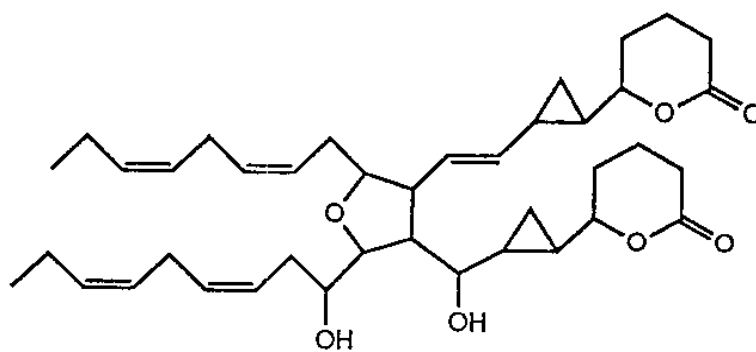
이들중 홍조 *Laurencia hybrida*로부터 추출된 tricyclic compound인 hybridalactone을 제외한 나머지 물질들은 작용기의 종류나 배열에 있어서 서로 거의 동일하다. 이들은 모두 phospholipids를 이루는 C₂₀ arachidonic acid로부터 기원하여 prostaglandins, leucotrienes등 prostanoids를 생합성 하는 과정에서 변화된 물질들이며 따라서 phospholipase A₂, 5-lipoxygenase등 arachidonic acid cascade에 관여하는 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 ~ 9는 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 모두 9개의 새로운 cyclopropane-containing C₂₂ fatty acid lactones을 분리하고 구조를 결정하였다.



halichondlactone (left) and neohalichondlactone (right)
(sponge *Halichondria okadae*)



aplydilactone
(mollusc *Aplysia kuroda*)

Fig. 5-3. 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 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 유기조추출물의 양은 10.7 g 이 얻어 졌다.

이 조추출물을 진공 silica 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-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 91-10-1의 peak가 나타났으며 각 시료에서 분리한 전체량은 22.4 mg이었다.

¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 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-4), 1.53(3H, m, H-5, -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); ¹³C NMR(CDCl₃, 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(CH₂), 35.30(CH₂), 32.66(CH₂), 31.49(CH₂), 29.27(CH₂), 29.02(CH₂), 27.43(CH₂), 26.44(CH₂), 24.14(CH₂), 23.04(CH), 22.54(CH₂), 21.43(CH), 14.05(CH₃), 7.88(CH₂).

5. 3. 3. 91-10-2의 분리

고속감압 크로마토그래피로 분리한 fx-14(170 mg), fx-15(140 mg), 및 fx-16(130 mg)을 각각 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 29.0 분(2.5 ml/min)에 91-10-2의 peak가 나타났으며 각 시료에서 분리한 전체량은 19.5 mg이었다.

¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 5.75(2H, m, H-12, -13), 5.57(1H, dtt, 10.7, 7.1, 1.5, H-17), 5.37(1H, dtt, 10.7, 7.1, 1.5, H-16), 4.16(1H, dt, 3.9, 6.3, H-14), 4.05(1H,

dt, 6.4, 6.8, H-7), 3.66(1H, dd, 7.8, 4.9, H-11), 2.43(2H, m, H-2), 2.34(1H, ddd, 14.6, 7.8, 6.3, H-15), 2.28(1H, ddd, 14.6, 7.1, 6.3, H-15), 2.05(2H, brdt, 7.3, 7.3, H-18), 1.86(2H, m, H-3), 1.79(2H, m, H-6), 1.70(2H, m, H-4), 1.53(2H, m, H-5), 1.36(2H, m, H-19), 1.29(4H, m, H-20, -21), 1.05(1H, m, H-8), 0.99(1H, m, H-10), 0.89(3H, t, 7.1, H-22), 0.71(2H, m, H-9); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125 MHz) δ 176.55(C), 133.92(CH), 133.58(CH), 131.64(CH), 124.04(CH), 81.58(CH), 74.74(CH), 71.56(CH), 37.11(CH_2), 35.32(CH_2), 32.74(CH_2), 31.49(CH_2), 29.26(CH_2), 29.07(CH_2), 27.43(CH_2), 26.49(CH_2), 24.16(CH_2), 23.22(CH), 22.54(CH_2), 20.46(CH), 14.04(CH_3), 8.96(CH_2).

5. 3. 4. 91-10-3의 분리

고속감압 크로마토그래피로 분리한 fx-14(170 mg), fx-15(140 mg), 및 fx-16(130 mg)을 각각 50% 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)로 분리하면 retention time 18.5 분(2.5 ml/min)에 91-10-2의 peak가 나타났으며 각 시료에서 분리한 전체량은 4.1 mg이었다.

^1H NMR(CDCl_3 , 500 MHz) δ 5.81(1H, dd, 15.6, 5.0, H-13), 5.77(1H, dd, 15.6, 4.4, H-12), 5.57(1H, dtt, 11.2, 7.3, 1.5, H-19), 5.41(2H, m, H-16, -20), 5.30(1H, dtt, 10.7, 7.3, 1.5, H-17), 4.20(1H, dt, 3.9, 6.6, H-14), 4.09(1H, dt, 6.4, 7.6, H-7), 3.65(1H, dd, 7.6, 4.4, H-11), 2.81(2H, dd, 7.3, 7.3, H-18), 2.44(2H, m, H-2), 2.36(2H, m, H-15), 2.07(2H, brdq, 7.6, 7.6, H-21), 1.85(4H, m, H-3, -6), 1.69(2H, m, H-4), 1.55(2H, m, H-5), 1.16(1H, m, H-8), 0.99(1H, m, H-10), 0.98(3H, t, 7.6, H-22), 0.68(1H, ddd, 8.8, 5.4, 5.4, H-9), 0.60(1H, ddd, 8.8, 5.4, 5.4, H-9); ^{13}C

NMR(CDCl₃, 125 MHz) δ 176.55(C), 133.07(CH), 132.29(CH), 131.92(CH), 131.80(CH), 126.66(CH), 124.44(CH), 81.46(CH), 74.57(CH), 71.37(CH), 37.07(CH₂), 35.30(CH₂), 32.70(CH₂), 29.05(CH₂), 26.47(CH₂), 25.73(CH₂), 24.17(CH₂), 23.03(CH), 21.44(CH), 20.60(CH₂), 14.23(CH₃), 7.87(CH₂).

5. 3. 5. 91-10-4의 분리

고속감압 크로마토그래피로 분리한 fx-15(140 mg), 및 fx-16(130 mg)을 각각 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 20 분(2.5 ml/min)에 91-10-2의 peak가 나타났으며 각 시료에서 분리한 전체량은 4.1 mg이었다.

¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 5.76(1H, m, H-13), 5.76(1H, m, H-12), 5.56(1H, dtt, 12.2, 7.5, 1.4, H-19), 5.41(2H, m, H-16, -20), 5.30(1H, dtt, 12.2, 7.5, 1.4, H-17), 4.19(1H, dt, 4.2, 6.0, H-14), 4.05(1H, dt, 6.6, 7.5, H-7), 3.66(1H, dd, 8.0, 4.5, H-11), 2.81(2H, dd, 7.3, 7.3, H-18), 2.43(2H, m, H-2), 2.35(2H, m, H-15), 2.07(2H, brdq, 7.0, 7.0, H-21), 1.86(2H, m, H-3), 1.79(2H, m, H-6), 1.69(2H, m, H-4), 1.53(2H, m, H-5), 1.06(1H, m, H-8), 0.99(1H, m, H-10), 0.98(3H, t, 7.5, H-22), 0.71(2H, m, H-9); ¹³C NMR(CDCl₃, 125 MHz) δ 176.56(C), 133.47(CH), 132.32(CH), 131.90(CH), 131.73(CH), 126.60(CH), 124.41(CH), 81.54(CH), 74.71(CH), 71.50(CH), 37.10(CH₂), 35.30(CH₂), 32.75(CH₂), 29.07(CH₂), 26.49(CH₂), 25.73(CH₂), 24.16(CH₂), 23.21(CH), 21.44(CH), 20.47(CH₂), 14.24(CH₃), 8.94(CH₂).

5. 3. 6. 91-10-5의 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 28.8 분에 91-10-5의 peak가 나타났으며 각 시료에서 분리한 전체량은 42 mg이었다.

¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 5.79(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, 5.3, 6.8, 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), 2.30(1H, m, H-2), 2.33(2H, m, -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); ¹³C NMR(CDCl₃, 125 MHz) δ 176.88(C, C-1), 133.91(CH, C-12), 133.62(CH, C-17), 132.80(CH, C-13), 131.70(CH, C-4), 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-2), 35.29(CH₂, C-15), 34.30(CH₂, C-6), 31.50(CH₂, C-19), 29.26(CH₂, C-20), 27.42(CH₂, C-18), 24.41(CH₂, C-3), 23.49(CH, C-8), 22.53(CH₂, C-21), 19.73(CH, C-10), 14.04(CH₃, C-22), 9.02(CH₂, C-9).

5. 3. 7. 91-10-6의 분리

고속감압 크로마토그래피로 분리한 fx-10(130 mg)과 -11(110 mg)을 각각 43% water/acetonitrile에 녹이고 Maxi-clean C₁₈ filter (Alltech)로 여과한 후에 같은 혼

합액을 용출용매로 사용하여 HPLC(YMC reversed phase C₁₈ column, RI detector, 3 ml/min)로 분리하면 retention time 47.0 분에 91-10-6의 peak가 나타났으며 각 시료에서 분리한 전체량은 35 mg이었다.

¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 5.78(3H, m, H-4, -12, -13), 5.76(1H, m, H-5), 5.58(1H, brdt, 11.1, 7.3, H-17), 5.38(1H, brdt, 11.1, 6.8, H-16), 4.18(1H, dt, 5.5, 6.8, H-14), 4.05(1H, ddd, 10.3, 7.3, 1.0, H-7), 3.66(1H, brdd, 7.3, 4.4, H-11), 2.86(1H, m, H-3), 2.73(1H, ddd, 13.2, 5.9, 2.9, H-2), 2.63(1H, ddd, 14.2, 10.5, 6.4, H-6), 2.30(1H, m, H-2), 2.32(2H, m, -15), 2.26(1H, ddd, 14.2, 7.8, 1.5, H-6), 2.12(1H, m, H-3), 2.05(2H, dt, 7.3, 7.3, H-18), 1.36(2H, m, H-19), 1.28(4H, m, H-20, -21), 1.14(1H, m, H-8), 1.01(2H, m, H-10), 0.89(3H, t, 6.8, H-22), 0.74(1H, ddd, 8.8, 5.4, 4.9, H-9), 0.60(1H, ddd, 8.3, 5.4, 5.3, H-9); ¹³C NMR(CDCl₃, 125 MHz) δ 176.99(C, C-1), 133.09(CH, C-12), 133.85(CH, C-17), 132.72(CH, C-13), 131.73(CH, C-4), 128.11(CH, C-5), 124.08(CH, C-16), 80.87(CH, C-7), 74.36(CH, C-11), 71.42(CH, C-14), 37.69(CH₂, C-2), 35.26(CH₂, C-3), 34.21(CH₂, C-6), 31.47(CH₂, C-20), 29.24(CH₂, C-19), 27.40(CH₂, C-18), 24.38(CH₂, C-3), 23.31(CH, C-10), 22.51(CH₂, C-21), 20.56(CH, C-8), 14.02(CH₃, C-22), 7.96(CH₂, C-9).

5. 3. 8. 91-10-7의 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 91-10-7의 peak가 나타났으며 각 시료에서 분리한 전체량은 16 mg이었다.

¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 5.79(3H, m, H-4, -12, -13), 5.74(1H, m, H-5),

5.57(1H, dtt, 10.7, 7.3, 1.5, H-19), 5.41(2H, m, H-16, -20), 5.29(1H, dtt, 10.8, 7.3, 1.5, H-17), 4.19(1H, dt, 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-6), 2.36(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}C NMR(CDCl_3 , 125 MHz) δ 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(CH_2), 35.29(CH_2), 34.31(CH_2), 25.73(CH_2), 24.42(CH_2), 23.49(CH), 20.59(CH_2), 19.76(CH), 14.24(CH_3), 8.99(CH_2).

5. 3. 9. 91-10-8의 분리

고속압 크로마토그래피로 분리한 fx-10(130 mg)과 -11(110 mg)을 각각 43% 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, 3 ml/min)로 분리하면 retention time 32.5 분에 91-10-8의 peak가 나타났으며 각 시료에서 분리한 전체량은 20 mg이었다.

^1H NMR(CDCl_3 , 500 MHz) δ 5.79(3H, m, H-4, -12, -13), 5.74(1H, m, H-5), 5.57(1H, dtt, 10.7, 6.8, 1.5, H-17), 5.41(2H, m, H-16, -20), 5.30(1H, dtt, 10.7, 6.8, 1.5, H-17), 4.20(1H, dt, 5.9, 4.9, H-14), 4.01(1H, ddd, 10.0, 8.3, 1.9, H-7), 3.67(1H, dd, 7.8, 4.9, H-11), 2.85(1H, m, H-3), 2.81(2H, dd, 7.1, 7.1, H-18), 2.74(1H, ddd, 13.7, 5.9, 2.9, H-2), 2.57(1H, dddd, 14.0, 10.3, 6.4, H-6), 2.33(2H, m, H-15), 2.33(1H, ddd, 13.7, 4.9, 1.5, H-2), 2.26(1H, ddd, 14.0, 7.8, 1.5, H-6), 2.12(1H, m,

H-3), 2.07(2H, brdq, 7.3, 7.3, H-21), 1.14(1H, m, H-8), 1.01(1H, m), 0.98(3H, t, 7.6, H-22), 0.74(1H, ddd, 8.8, 5.1, 5.1, H-9), 0.60 (1H, ddd, 8.8, 5.1, 5.1, H-9); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125 MHz) δ 176.90(C), 133.03(CH), 132.71(CH), 132.24(CH), 131.82(CH x 2), 128.10(CH), 126.66(CH), 124.47(CH), 80.79(CH), 74.37(CH), 71.40(CH), 37.71(CH_2), 35.30(CH_2), 34.23(CH_2), 25.74(CH_2), 24.42(CH_2), 23.32(CH), 20.60(CH, CH_2), 14.23(CH_3), 7.97(CH_2).

5. 3. 10. 91-10-9의 분리

고속감압 크로마토그래피로 분리한 fx-10(130 mg)과 -11(110 mg)을 각각 43% 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, 3 ml/min)로 분리하면 retention time 44.6 분에 91-10-9의 peak가 나타났으며 각 시료에서 분리한 전체량은 10 mg이었다.

^1H NMR(CDCl_3 , 500 MHz) δ 5.57(1H, dtt, 9.8, 7.3, 1.5, H-17), 5.56(1H, dd, 15.1, 8.3, H-12), 5.42(1H, dtt, 9.8, 7.8, 1.5, H-16), 5.37(1H, dd, 15.1, 8.3, H-11), 4.12(1H, dt, 6.3, 7.6, H-7), 3.92(1H, dd, 6.3, 6.3, H-13), 3.49(1H, ddd, 7.8, 6.0, 4.8, H-14), 2.44(2H, m, H-2), 2.25(2H, m, H-15), 2.04(2H, dt, 6.8, 7.1, H-18), 1.87(2H, m, H-3), 1.82(2H, m, H-6), 1.70(1H, m, H-4), 1.56(1H, m, H-4), 1.54(2H, m, H-5), 1.41(1H, m, H-10), 1.35(2H, m, H-19), 1.30(2H, m, H-20), 1.27(2H, m, H-21), 1.14(1H, m, H-8), 1.01(1H, m), 0.89(1H, ddd, 8.3, 5.4, 5.4, H-9), 0.89(3H, t, 6.8, H-22), 0.71(1H, ddd, 8.3, 5.4, 5.4, H-9); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125 MHz) δ 176.62(C), 133.62(CH), 133.55(CH), 127.60(CH), 124.42(CH), 81.29(CH), 75.10(CH), 74.29(CH), 37.13(CH_2), 32.69(CH_2), 31.50(CH_2), 31.07(CH_2), 29.24(CH_2), 29.06(CH_2), 27.36(CH_2), 26.46(CH_2), 24.86(CH), 24.15(CH_2), 22.62(CH_2), 19.24(CH), 14.03(CH_3),

12.16(CH₂).

5. 3. 11. 91-10-10의 합성

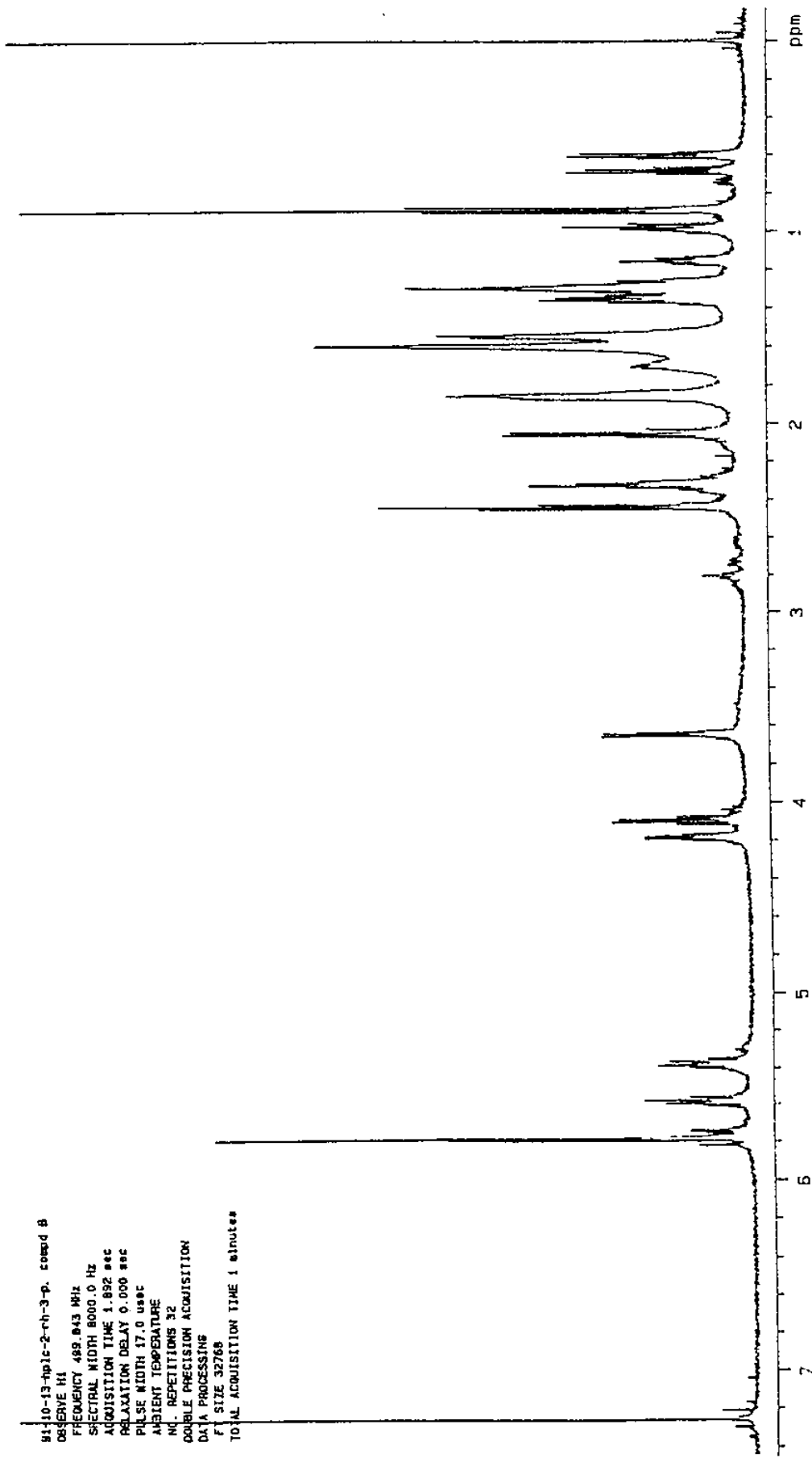
10 ml round-bottomed flask에 91-10-1 1.5 mg, acetic anhydride 0.3 ml, pyridine 0.5 ml를 넣고 1시간 동안 실온(25 °C)에서 교반시켰다. 반응의 유무를 확인하기 위하여 TLC를 이용하여 측정한 결과 출발물질의 spot은 보이지 않고 새로운 생성물의 spot이 강하게 나타 났다. Rotavapor와 vacuum pump를 이용하여 acetic anhydride와 pyridine를 제거하고 acetonitrile을 용출용매로 사용하여 HPLC(YMC C₁₈ reversed phase column, RI detector, 2.5 ml/min)로 분리한 결과 retention time 25.4분에서 91-10-10이 1.3 mg 얻어 졌다.

¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 5.71(1H, m, H-13), 5.69(1H, m, H-12), 5.51(1H, dtt, 11.2, 7.3, 1.5, H-17), 5.28(1H, dtt, 11.2, 7.3, 1.5, H-16), 5.27(1H, m, H-14), 4.83(1H, ddd, 8.3, 3.2, 1.5, H-11), 4.05(1H, dt, 5.4, 8.1, H-7), 2.43(3H, m, H-2, -15), 2.34(1H, m, H-15), 2.07(3H, s, OAc), 2.05(3H, s, OAc), 2.01(2H, brdt, 6.4, 7.8, H-18), 1.86(2H, m, H-3), 1.79(2H, m, H-6), 1.70(1H, m, H-4), 1.56(1H, m, H-4), 1.53(2H, m, H-5), 1.34(2H, m, H-19), 1.29(4H, m, H-20, -21), 1.21(1H, m, H-10), 1.04(1H, m, H-8), 0.89(3H, t, 7.1, H-22), 0.74(1H, ddd, 8.3, 5.4, 5.4, H-9), 0.60(1H, ddd, 8.3, 5.4, 5.4, H-9); ¹³C NMR(CDCl₃, 125 MHz) δ 176.56(C), 170.12(C), 170.12(C), 133.33(CH), 130.57(CH), 129.50(CH), 123.17(CH), 81.16(CH), 75.73(CH), 73.09(CH), 36.97(CH₂), 32.89(CH₂), 32.28(CH₂), 31.51(CH₂), 29.21(CH₂), 29.14(CH₂), 27.39(CH₂), 26.57(CH₂), 24.19(CH₂), 22.57(CH₂), 21.69(CH), 21.25(OCH₃), 21.21(OCH₃), 20.52(CH), 14.07(CH₃), 8.39(CH₂).

5. 3. 12. 91-10-11의 합성

10 ml round-bottomed flask에 91-10-2 2.0 mg, acetic anhydride 0.3 ml, pyridine 0.5 ml를 넣고 1시간 동안 실온(25 °C)에서 교반시켰다. 반응의 유무를 확인하기 위하여 TLC를 이용하여 측정한 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 24.0분에서 91-10-11이 1.6 mg 얻어 졌다.

¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 5.68(1H, dd, 15.6, 5.4, H-13), 5.64(1H, dd, 15.6, 5.4, H-12), 5.50(1H, dtt, 10.7, 7.3, 1.5, H-17), 5.28(1H, dtt, 10.7, 7.3, 1.5, H-16), 5.25(1H, m, H-14), 4.88(1H, dd, 7.3, 5.4, H-11), 4.06(1H, dt, 6.8, 7.1, H-7), 2.42(2H, m, H-2, -15), 2.41(1H, m, H-15), 2.32(1H, m, H-15), 2.06(3H, s, OAc), 2.05(3H, s, OAc), 2.01(2H, brdt, 6.8, 7.3, H-18), 1.78(2H, brdt, 5.9, 6.1, H-6), 1.69(1H, m, H-4), 1.55(1H, m, H-4), 1.52(2H, m, H-5), 1.34(2H, m, H-19), 1.29(4H, m, H-20, -21), 1.04(2H, m, H-8, -10), 0.89(3H, t, 6.8, H-22), 0.74(1H, ddd, 8.3, 5.4, 5.4, H-9), 0.70(1H, ddd, 8.3, 5.4, 5.4, H-9); ¹³C NMR(CDCl₃, 125 MHz) δ 176.51(C), 170.11(C), 170.09(C), 133.35(CH), 130.92(CH), 129.35(CH), 123.18(CH), 81.22(CH), 75.46(CH), 73.11(CH), 37.17(CH₂), 32.86(CH₂), 32.28(CH₂), 31.50(CH₂), 29.19(CH₂), 29.17(CH₂), 27.39(CH₂), 26.58(CH₂), 24.21(CH₂), 22.56(CH₂), 21.25(OCH₃), 21.23(OCH₃), 20.62(CH), 20.57(CH), 14.07(CH₃), 9.36(CH₂).



91-10-13-hplc-2-rh-3-p. compd B
 OBSERVE HI
 FREQUENCY 499.843 MHz
 SPECTRAL WIDTH 8000.0 Hz
 ACQUISITION TIME 1.892 sec
 RELAXATION DELAY 0.000 sec
 PULSE WIDTH 17.0 usec
 AMBIENT TEMPERATURE
 NO. REPEATITIONS 32
 DOUBLE PRECISION ACQUISITION
 DATA PROCESSING
 F1 SIZE 32768
 TOTAL ACQUISITION TIME 1 minutes

Fig. 5-4. Proton NMR spectrum of compound 91-10-1.

91-10-13-dpic-2-4-3-c, compound 8
 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
 XALTZ-15 MODULATED
 DOUBLE PRECISION ACQUISITION
 DATA PROCESSING
 LINE SPOADENING 0.5 Hz
 FT SIZE 65536
 TOTAL ACQUISITION TIME 56 minutes

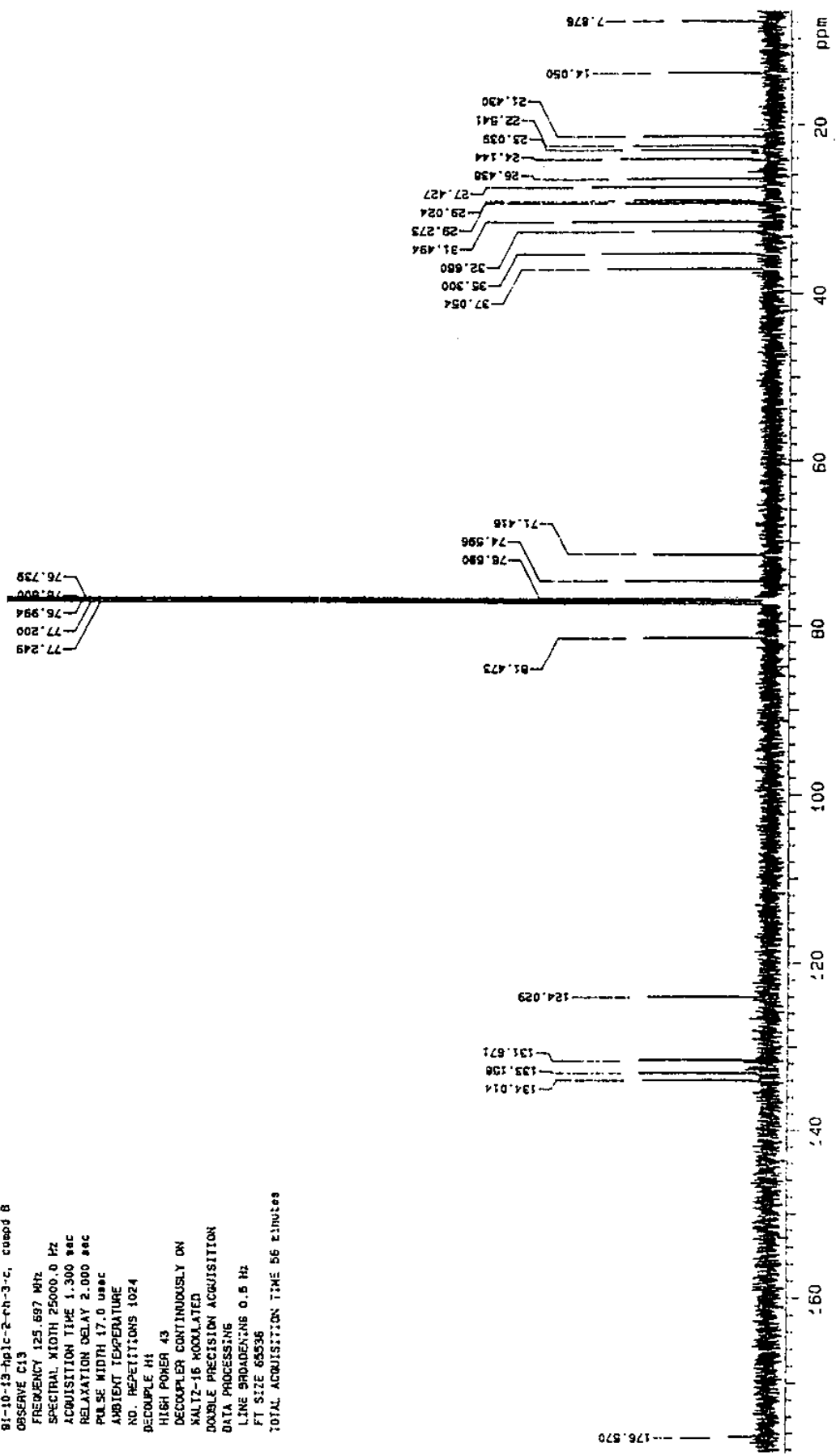


Fig. 5-5. Carbon NMR spectrum of compound 91-10-1.

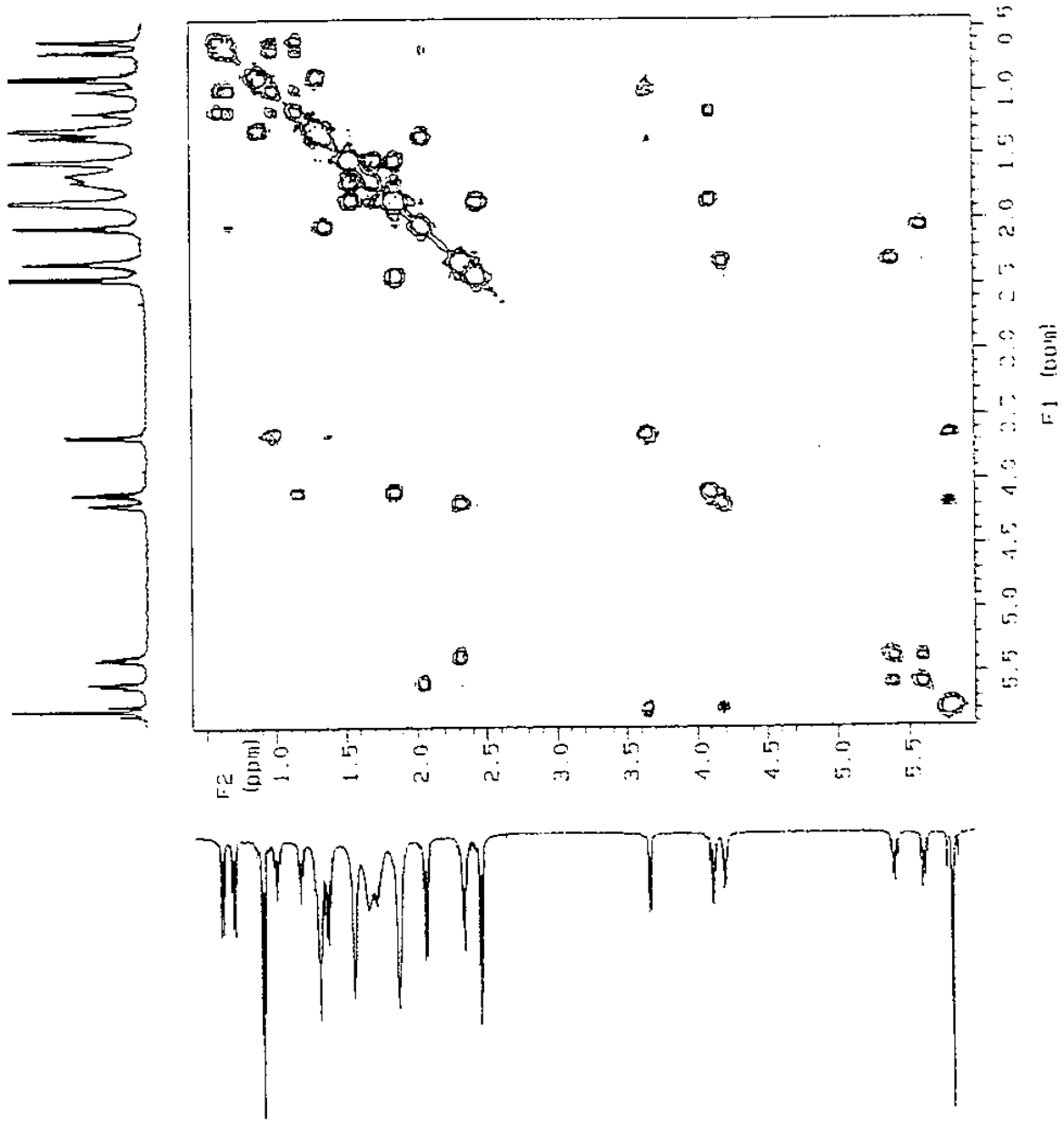


Fig. 5-6. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-10-1.

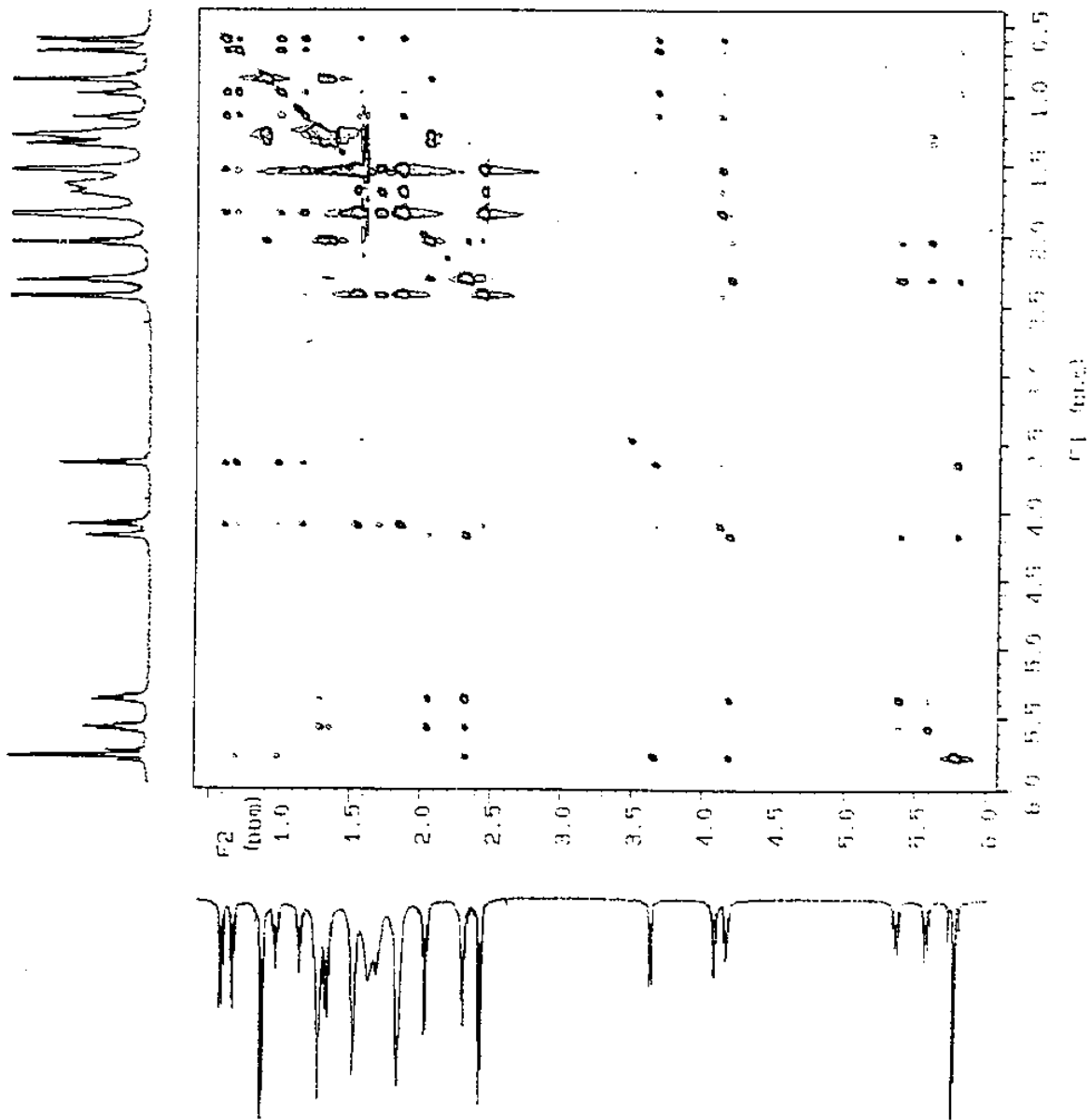


Fig. 5-7. TOCSY spectrum of compound 91-10-1.

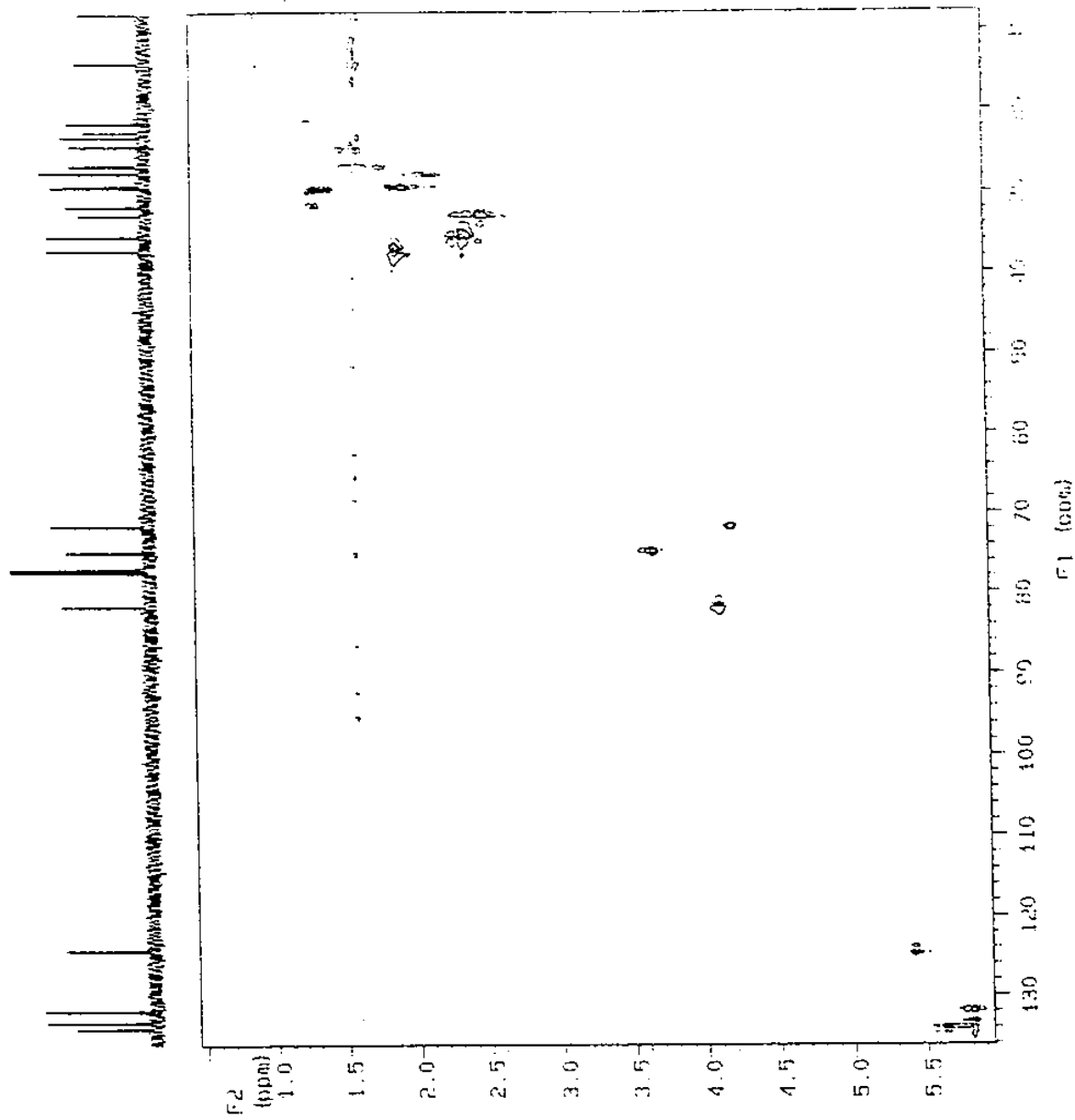


Fig. 5-8. HMQC spectrum of compound 91-10-1.

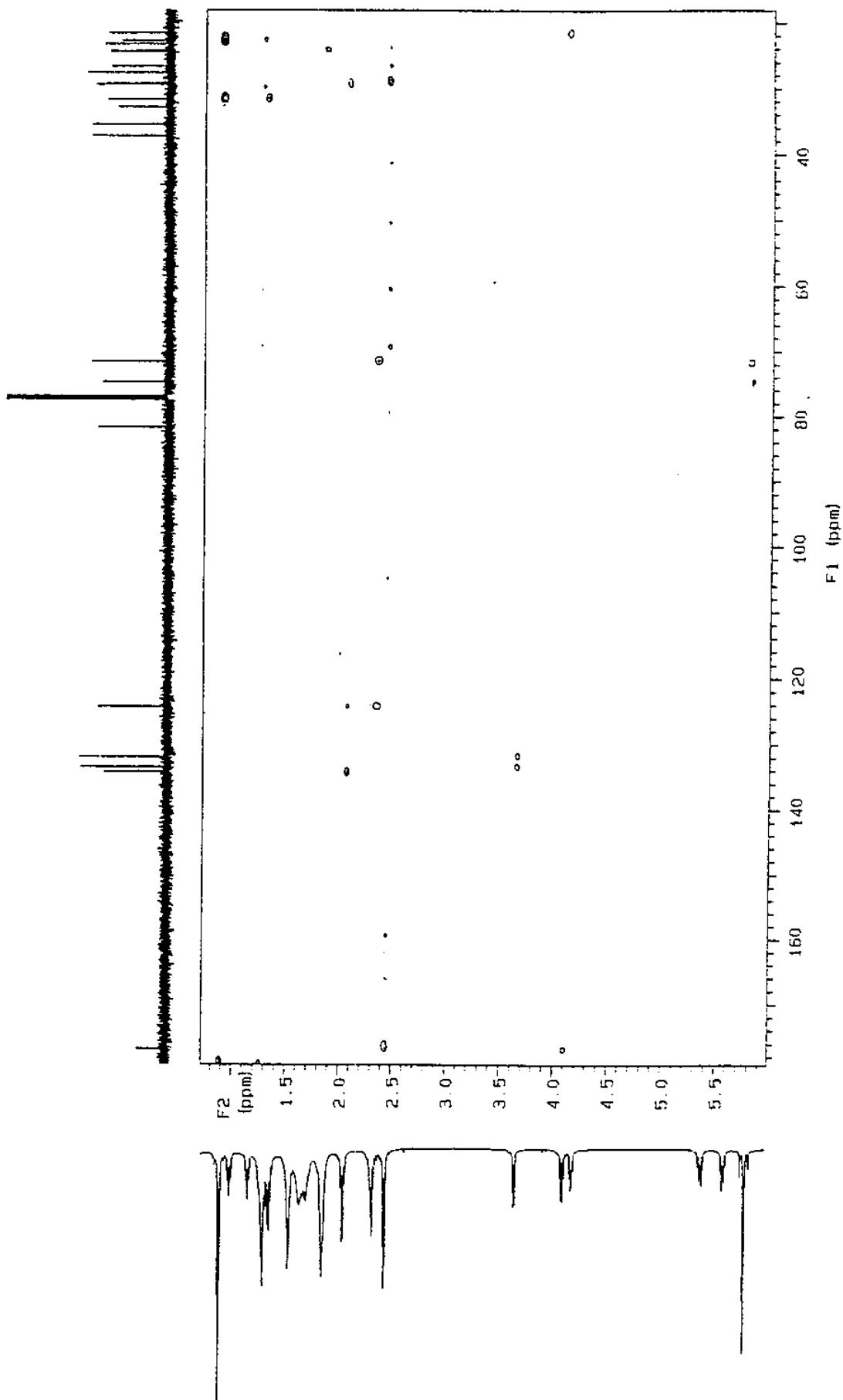


Fig. 5-9. HMBC spectrum of compound 91-10-1.

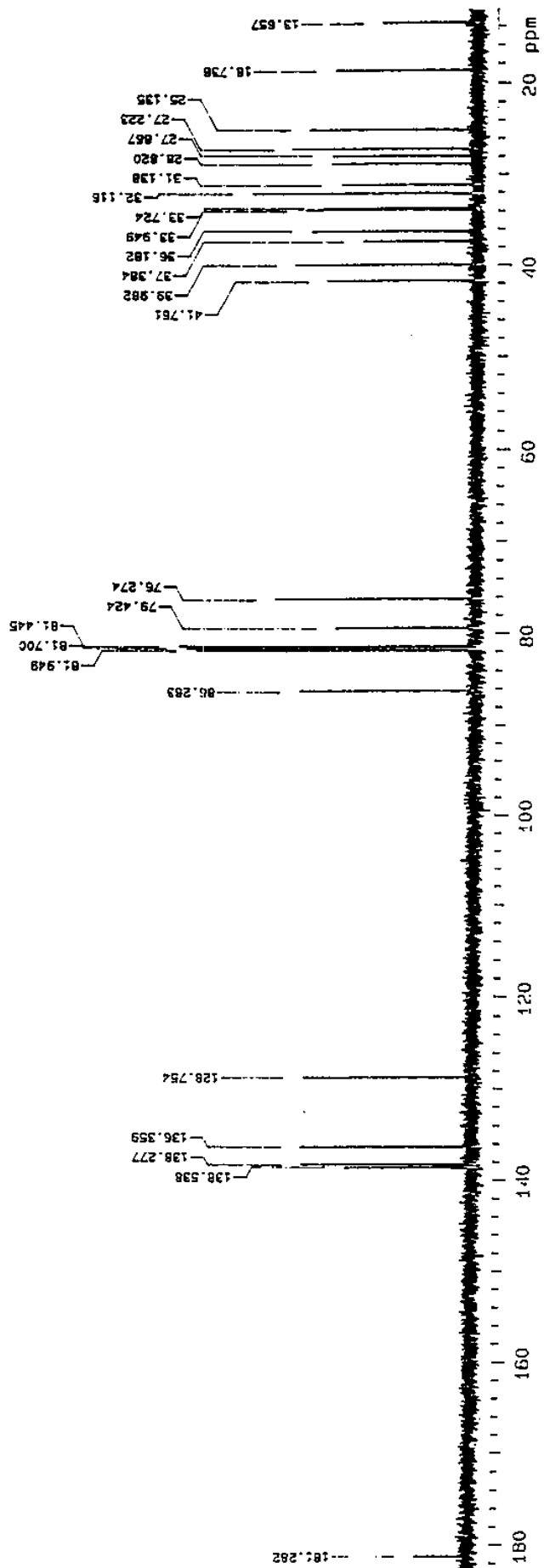


Fig. 5-11. Carbon NMR spectrum of compound 91-10-2.

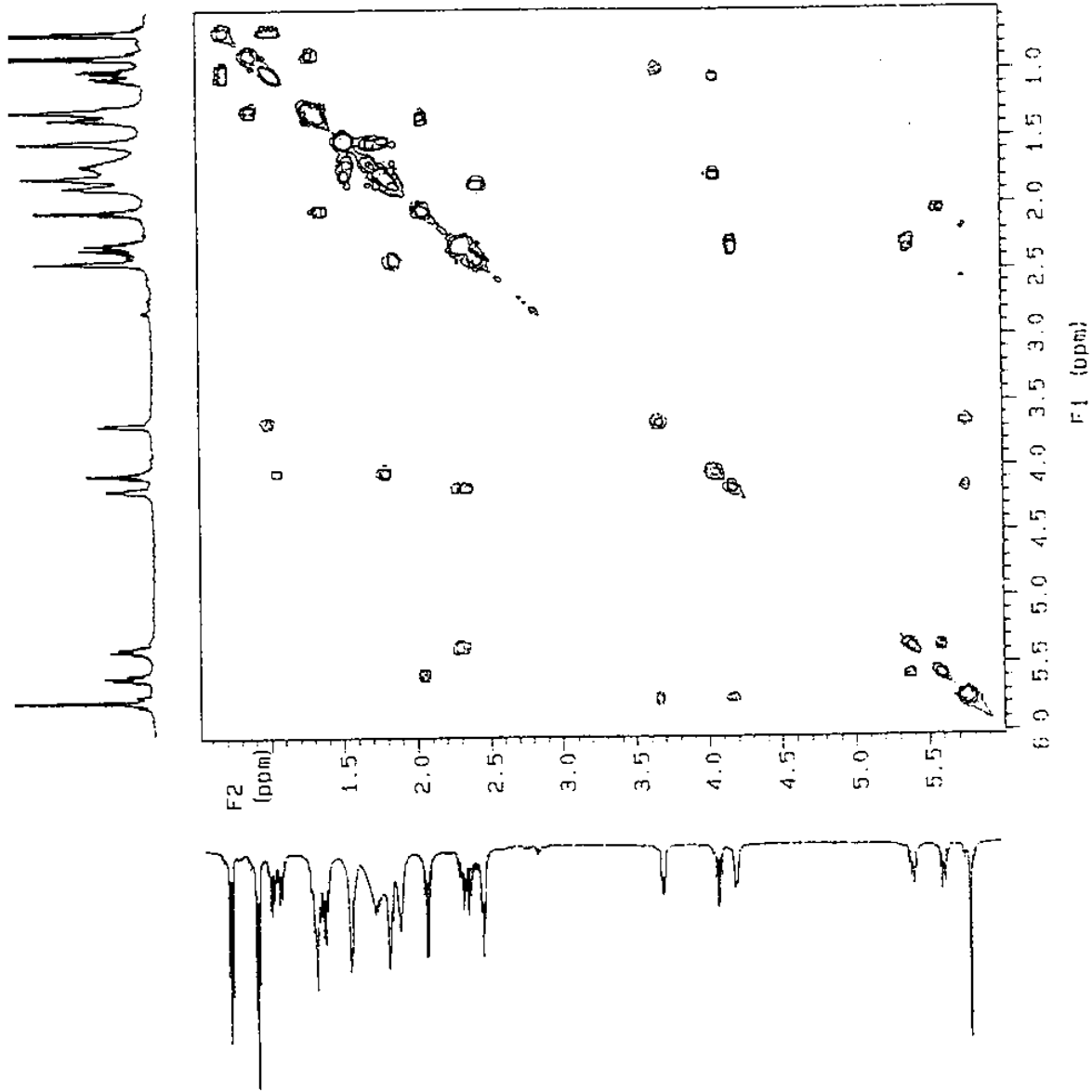


Fig. 5-12. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-10-2.

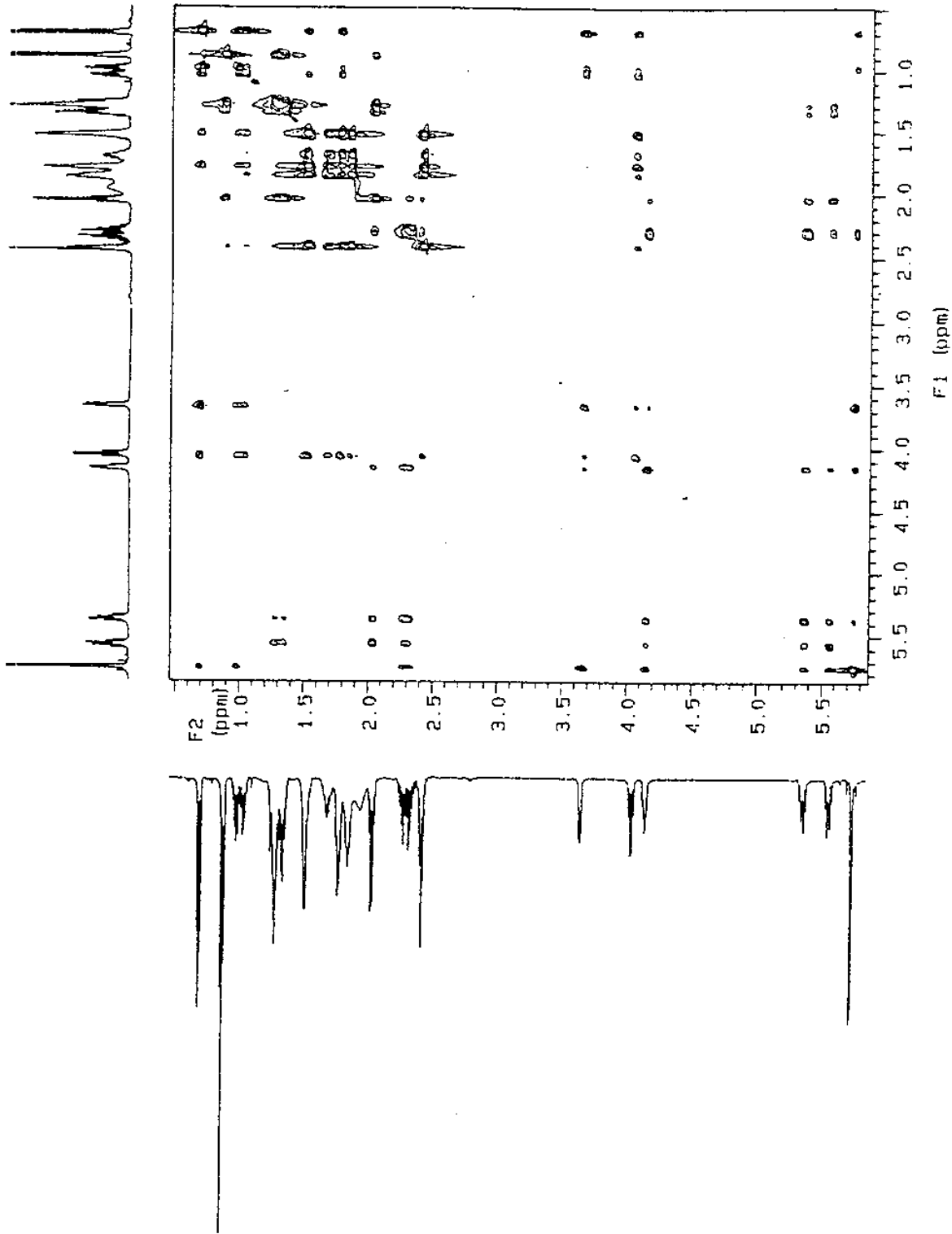


Fig. 5-13. TOCSY spectrum of compound 91-10-2.

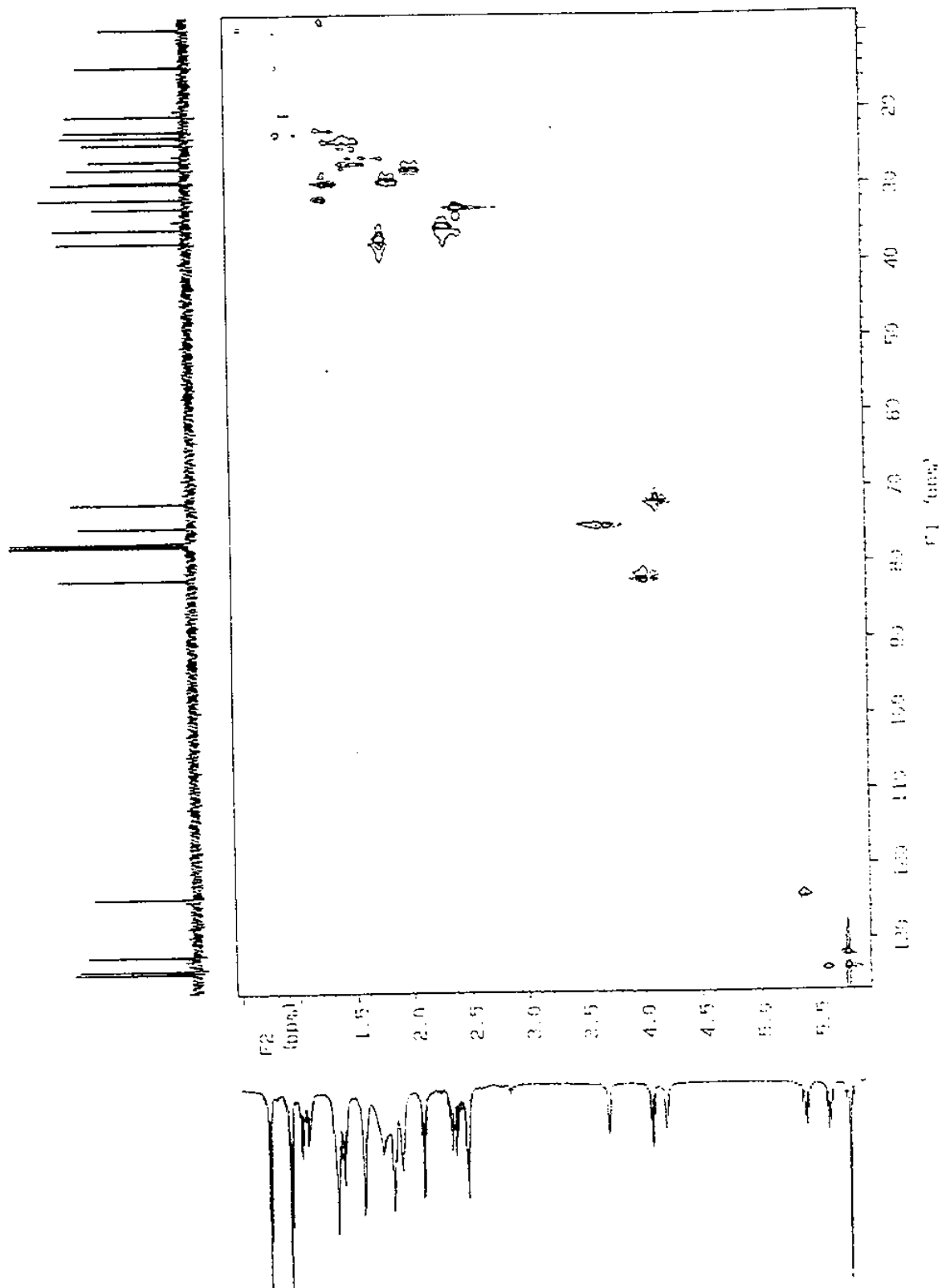


Fig. 5-14. HMQC spectrum of compound 91-10-2.

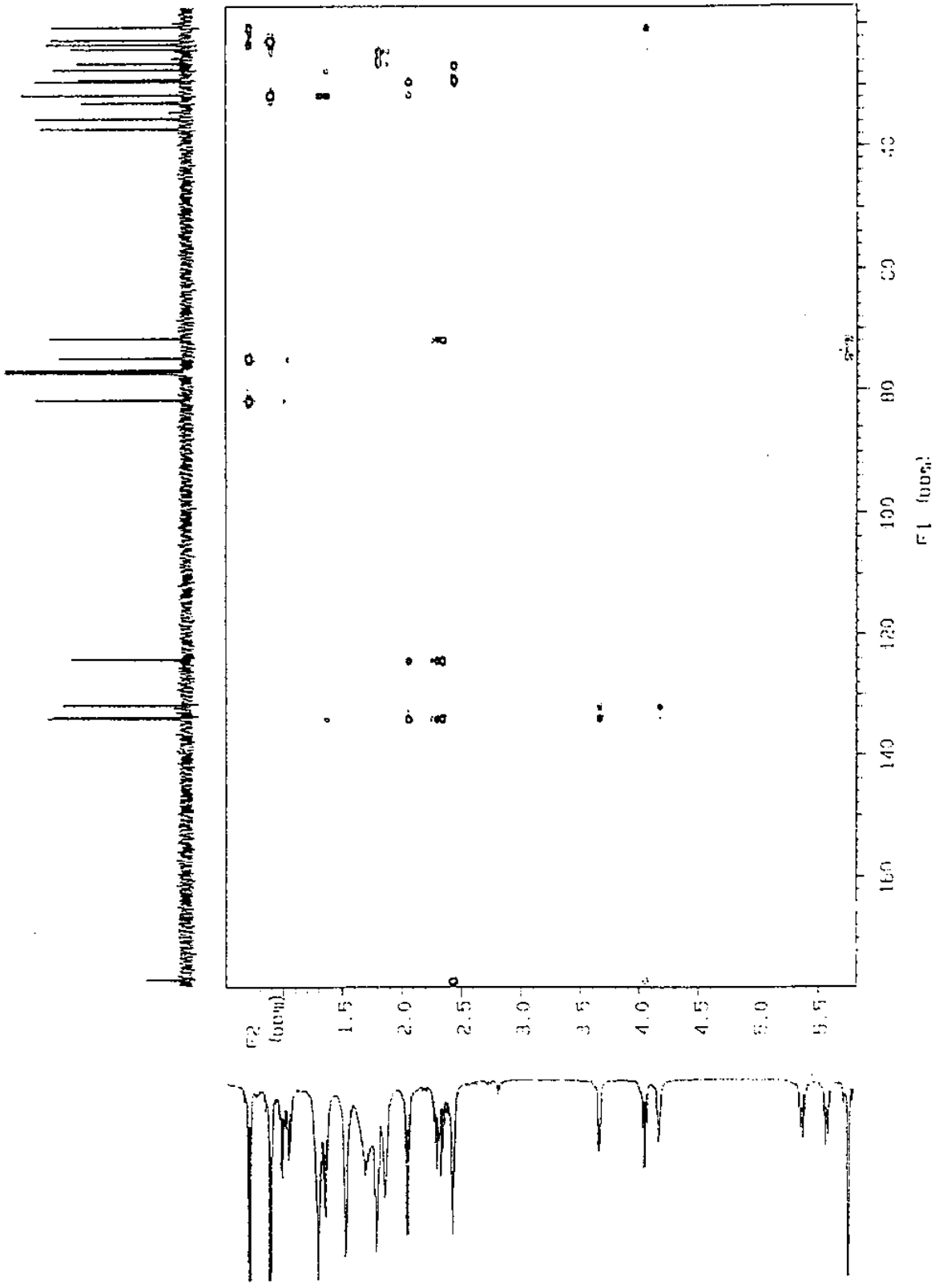


Fig. 5-15. HMBC spectrum of compound 91-10-2.

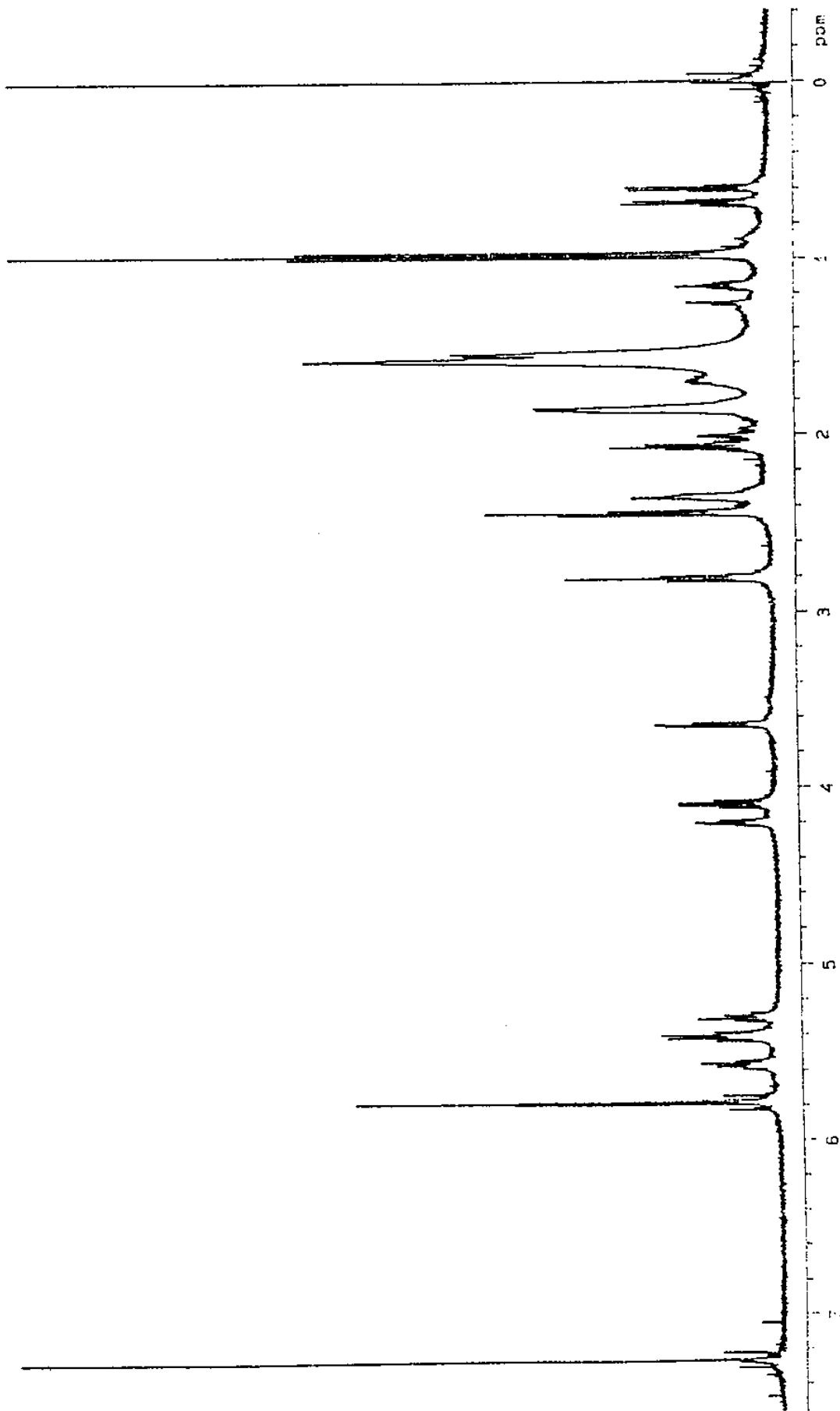


Fig. 5-16. Proton NMR spectrum of compound 91-10-3.

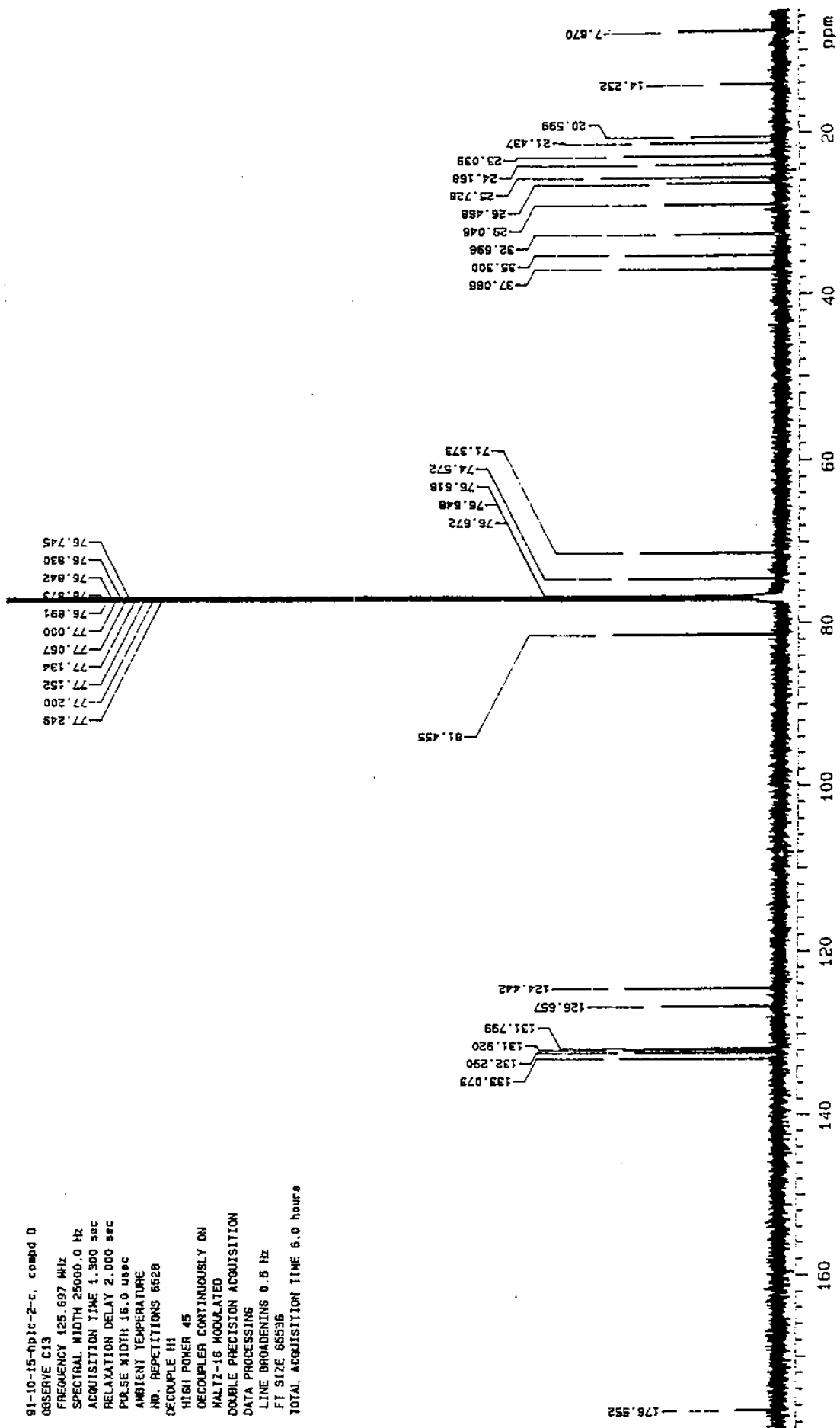


Fig. 5-17. Carbon NMR spectrum of compound 91-10-3.

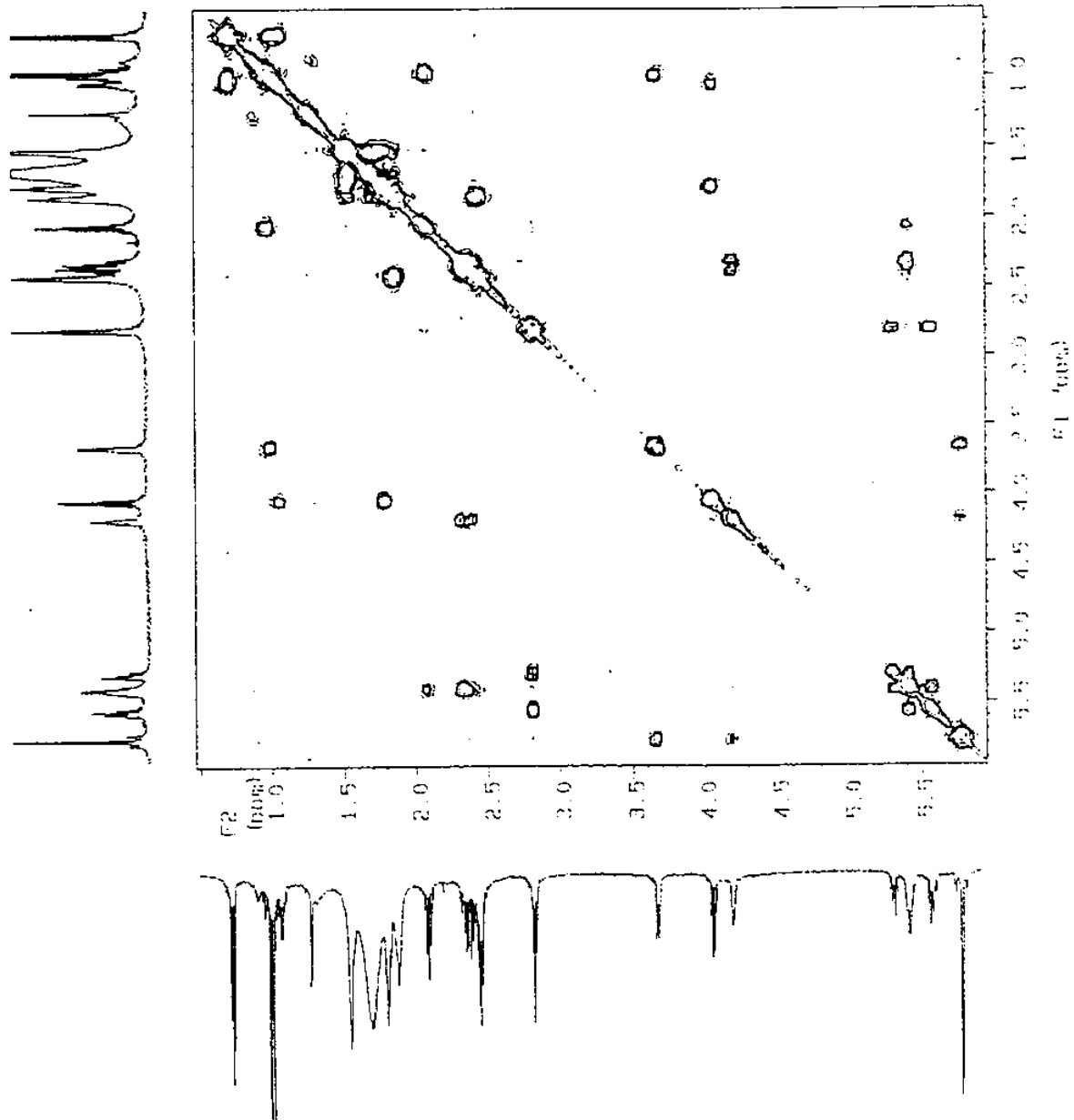


Fig. 5-18. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-10-3.

91-10-18-rpic-1-p, comad F
OBSERVE H1
FREQUENCY 499.843 MHz
SPECTRAL WIDTH 3835.8 Hz
ACQUISITION TIME 1.894 sec
RELAXATION DELAY 0.000 sec
PULSE WIDTH 20.0 usec
AMBIENT TEMPERATURE
IN. REPEATITIONS 32
DOUBLE PRECISION ACQUISITION
DATA PROCESSING
F1 SIZE 16384
TOTAL ACQUISITION TIME 1 minutes

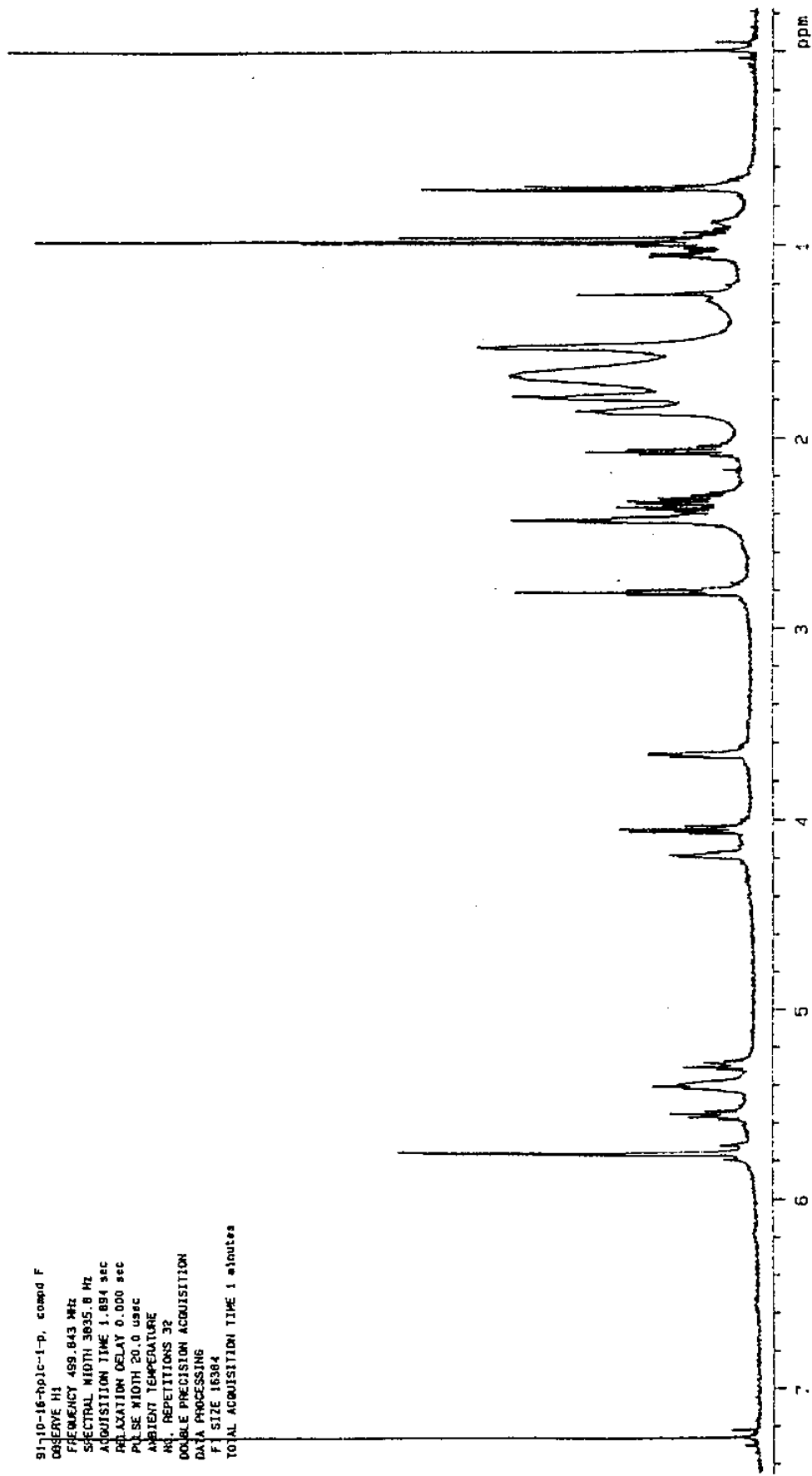


Fig. 5-19. Proton NMR spectrum of compound 91-10-4.

91-10-16-hp)c-1-c, compd F
 OBSERVE C13
 FREQUENCY 125.697 MHz
 SPECTRAL WIDTH 25000.0 Hz
 ACQUISITION TIME 1.300 sec
 RELAXATION DELAY 2.000 sec
 PULSE WIDTH 16.0 usec
 AMBIENT TEMPERATURE
 NO. REPETITIONS 1088
 DECOUPLE H1
 HIGH POWER 45
 DECOUPLER CONTINUOUSLY ON
 NALYZ-16 MODULATED
 DOUBLE PRECISION ACQUISITION
 DATA PROCESSING
 LINE BROADENING 0.5 Hz
 FT SIZE 65536
 TOTAL ACQUISITION TIME 59 minutes

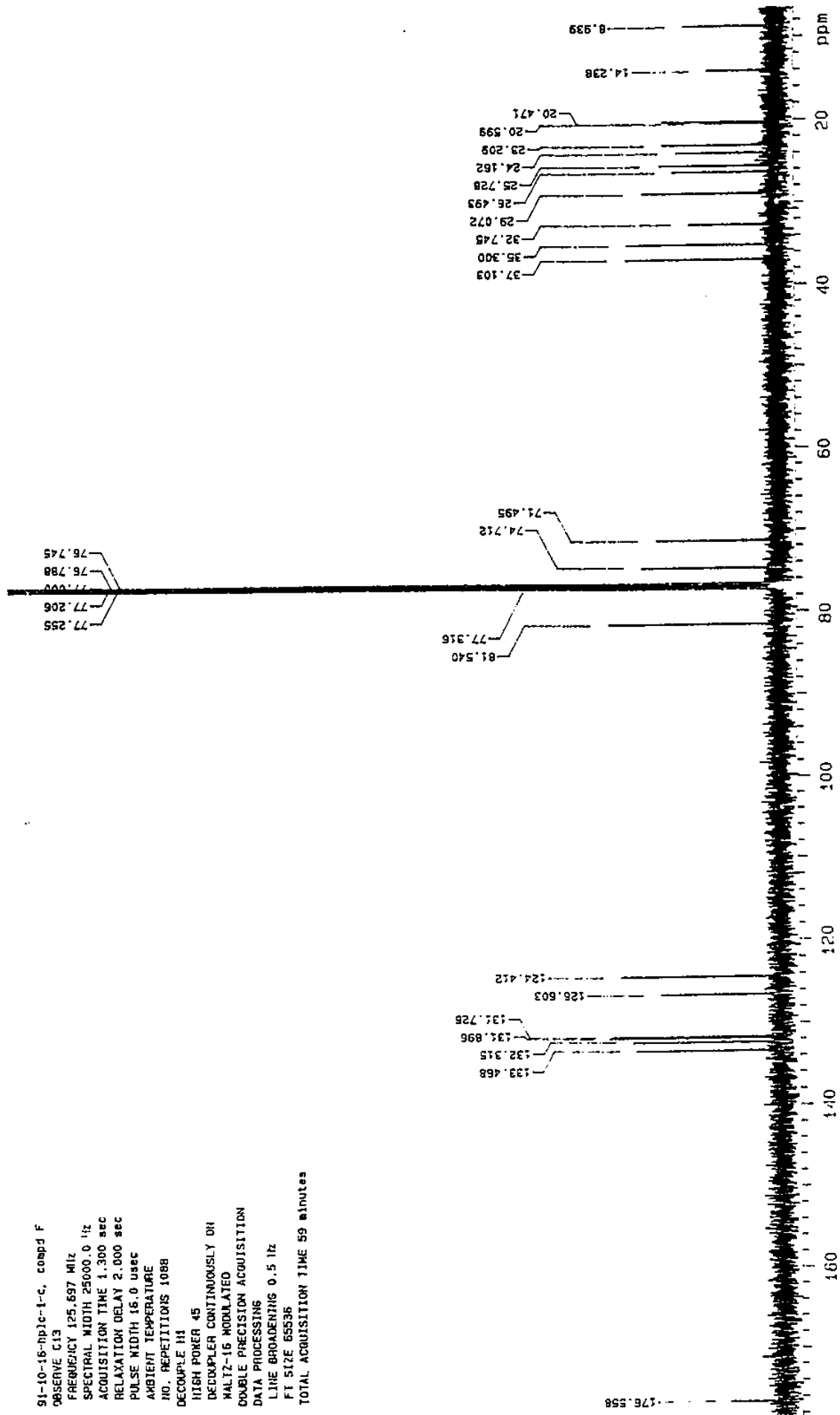


Fig. 5-20. Carbon NMR spectrum of compound 91-10-4.

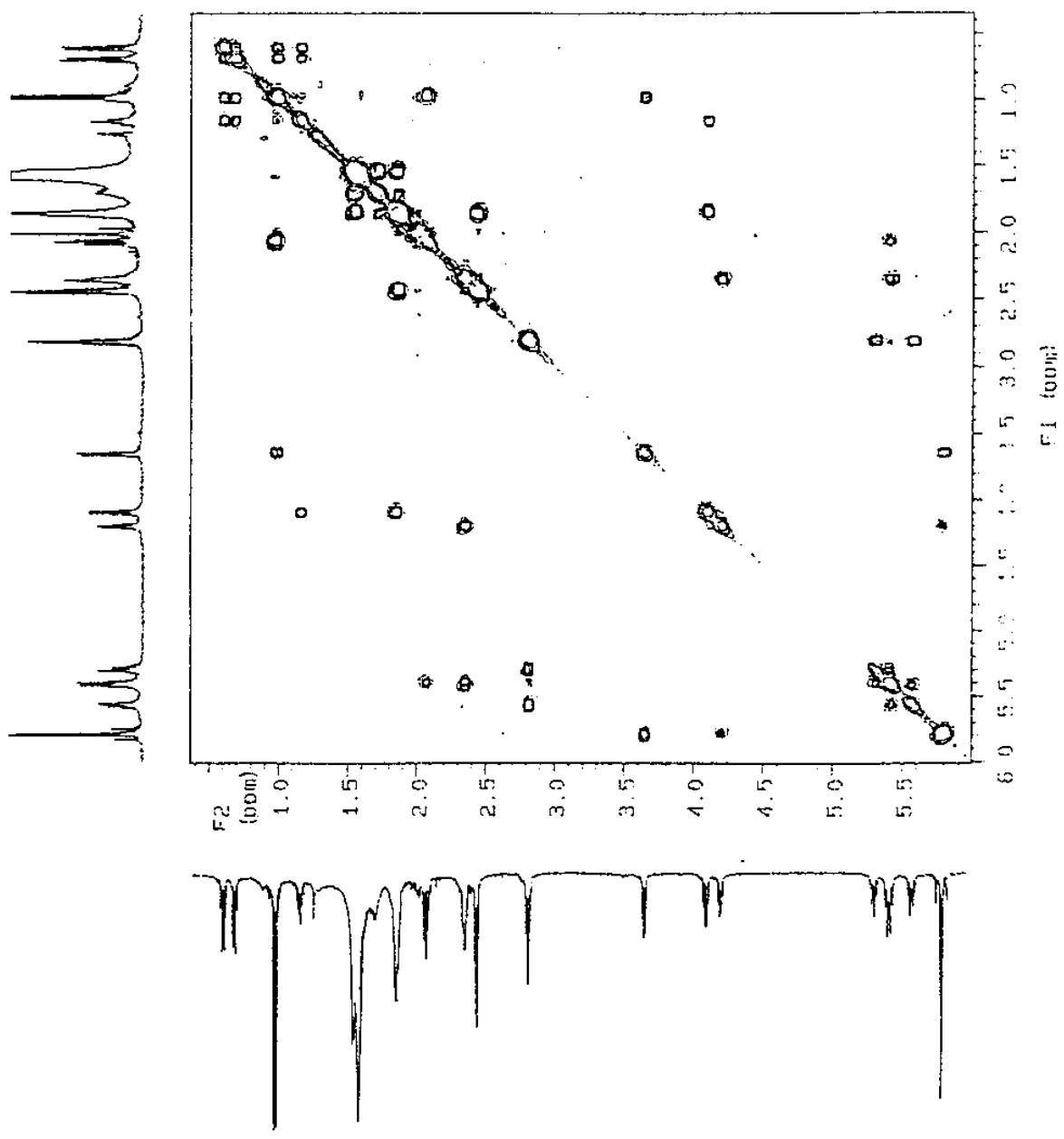
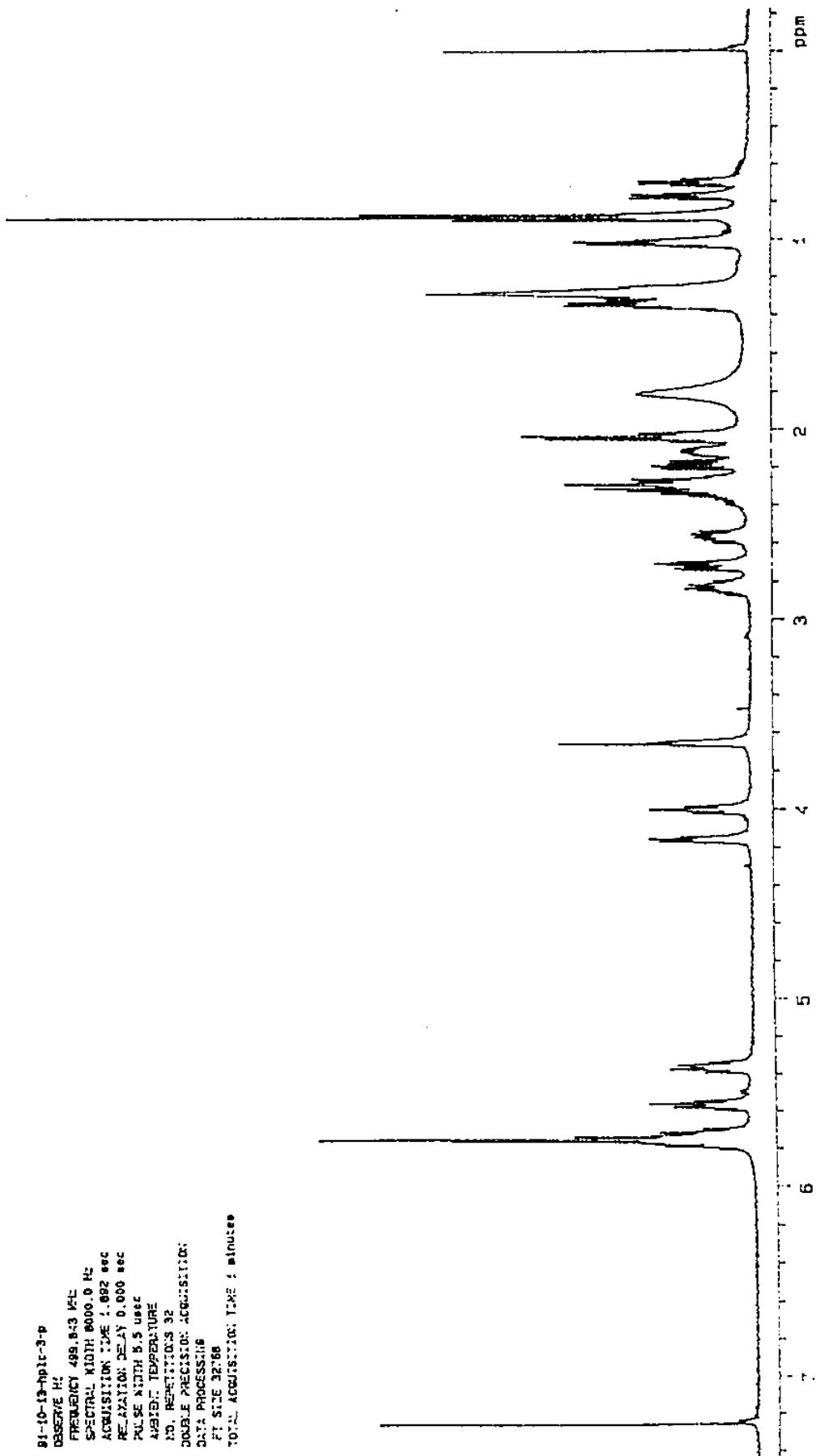


Fig. 5-21. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-10-4.



91-10-13-hpl-3-p
 OBSERVE H:
 FREQUENCY 499.843 MHz
 SPECTRAL WIDTH 8000.0 Hz
 ACQUISITION TIME 1.092 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

Fig. 5-22. Proton NMR spectrum of compound 91-10-5.

91-10-13-101c-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 47.0 usec
 AMBIENT TEMPERATURE
 NO. REPEATS 856
 DECOUPLE H1
 HIGH POWER 43
 DECOUPLE CONTINUOUSLY ON
 NMR-16 MODIFIED
 DOUBLE PRECISION ACQUISITION
 DATA PROCESSING
 LINE AROUNDING 0.5 Hz
 F1 SIZE 6536
 TOTAL ACQUISITION TIME 49 minutes

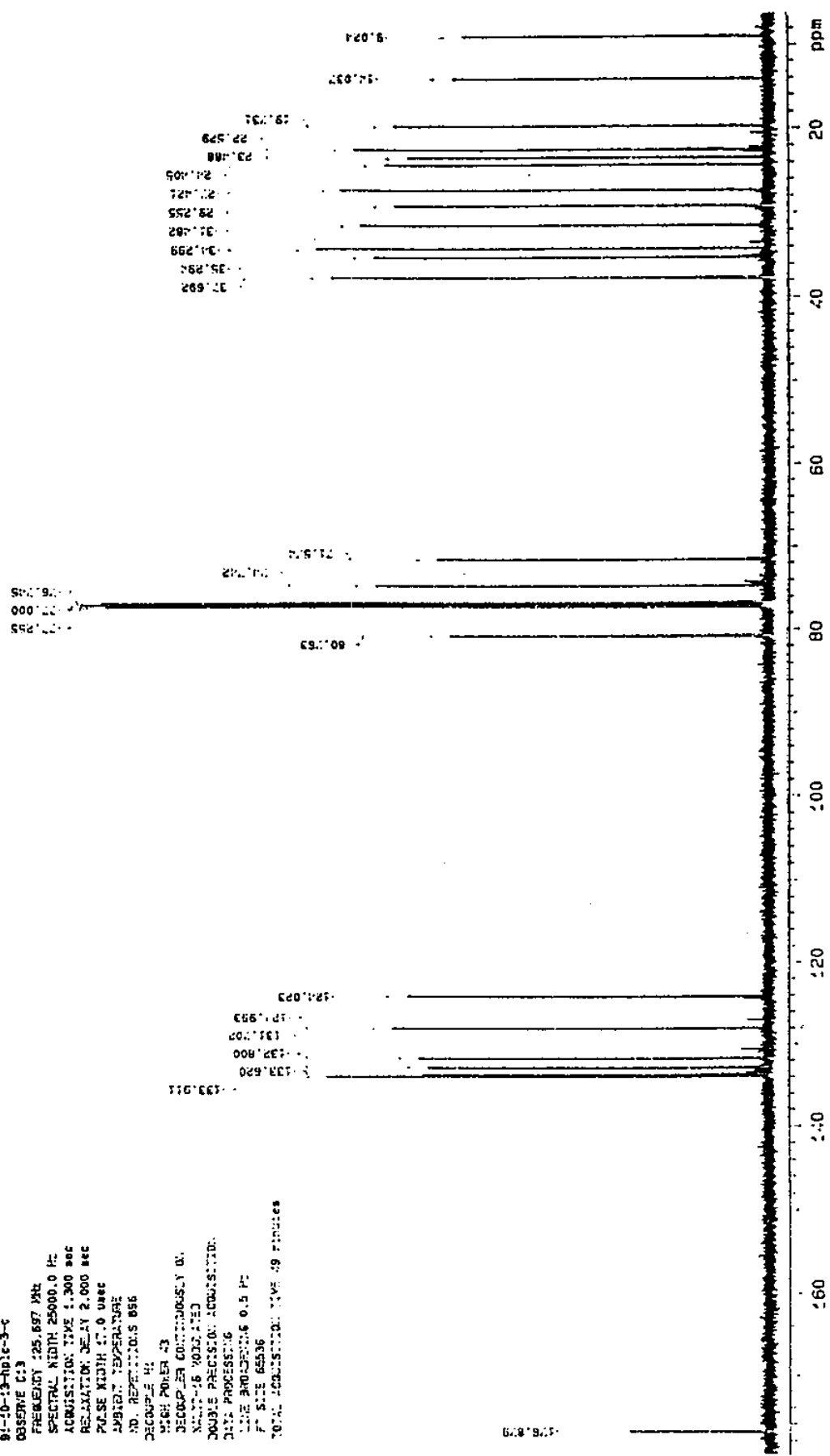


Fig. 5-23. Carbon NMR spectrum of compound 91-10-5.

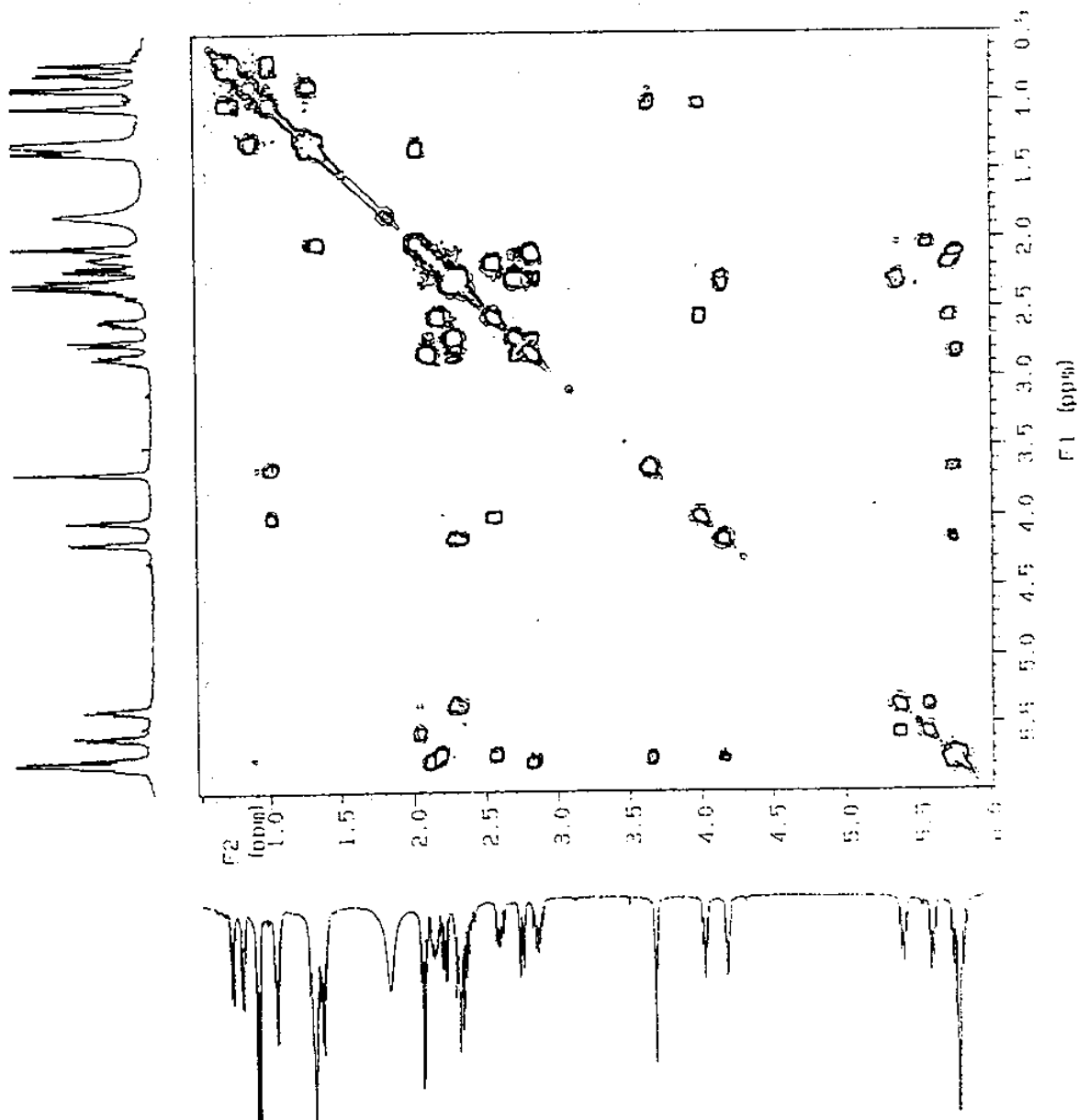


Fig. 5-24. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-10-5.

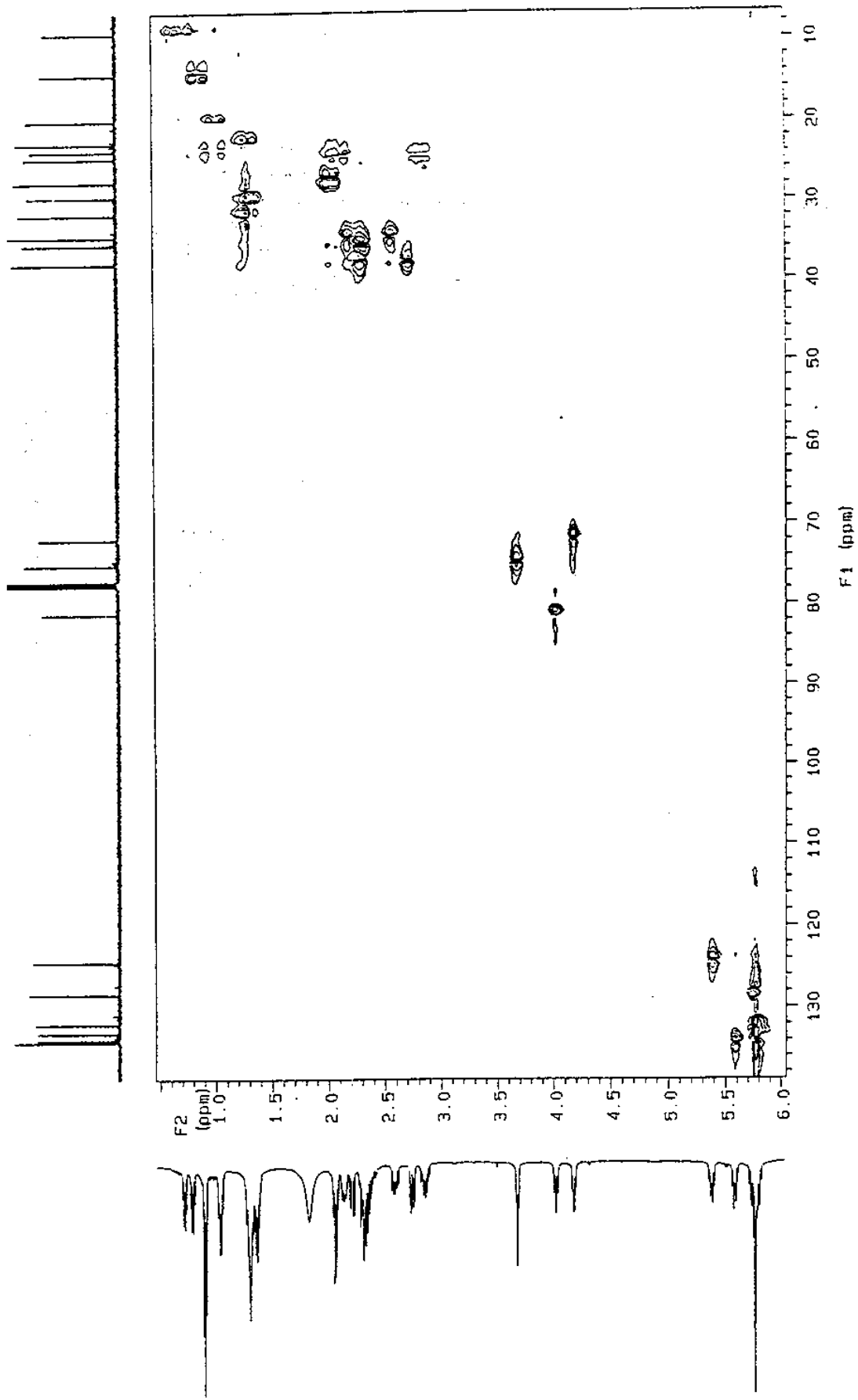


Fig. 5-25. HMQC spectrum of compound 91-10-5.

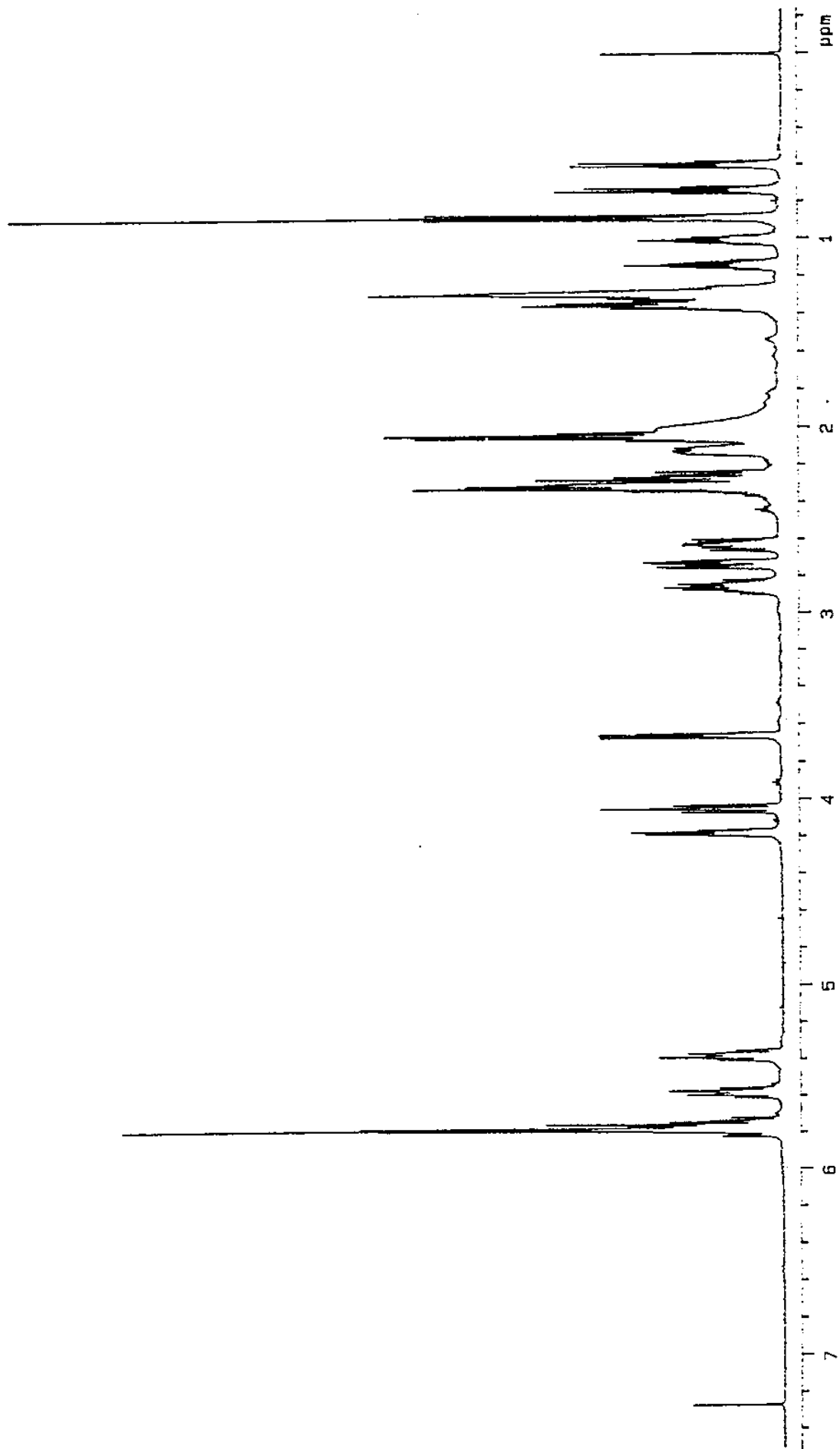


Fig. 5-26. Proton NMR spectrum of compound 91-10-6.

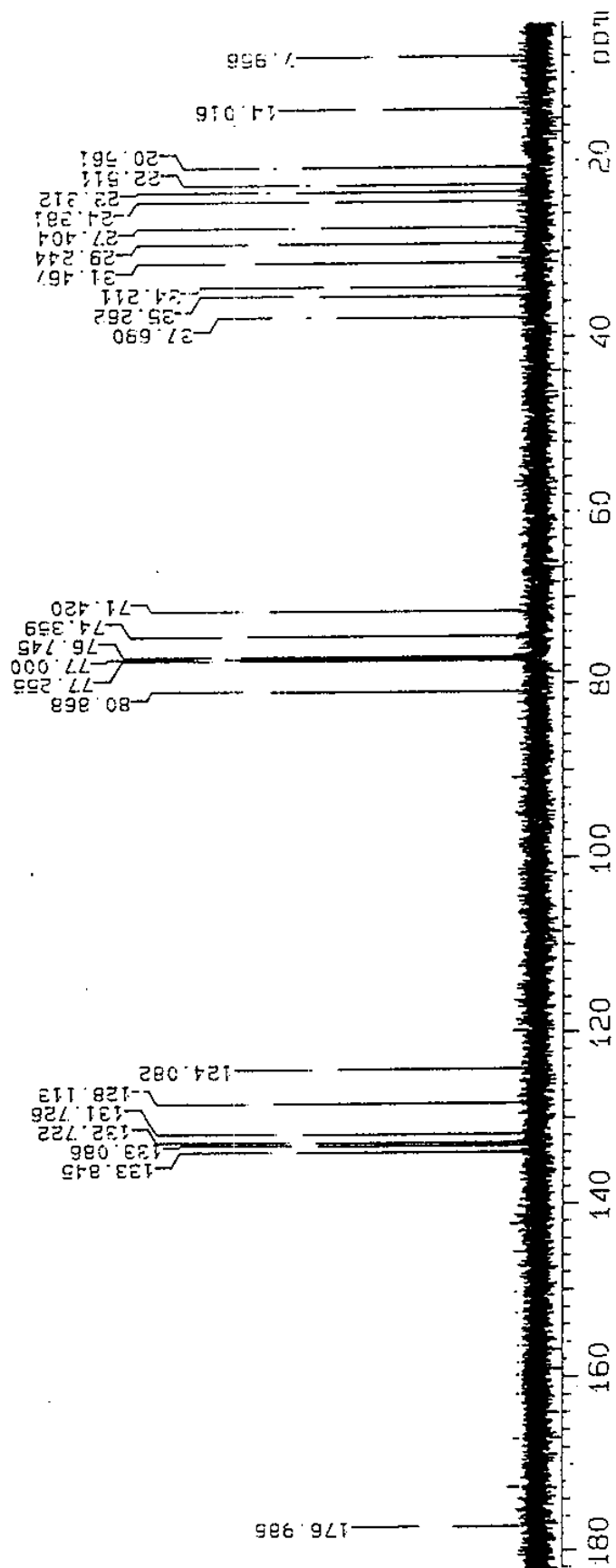


Fig. 5-27. Carbon NMR spectrum of compound 91-10-6.

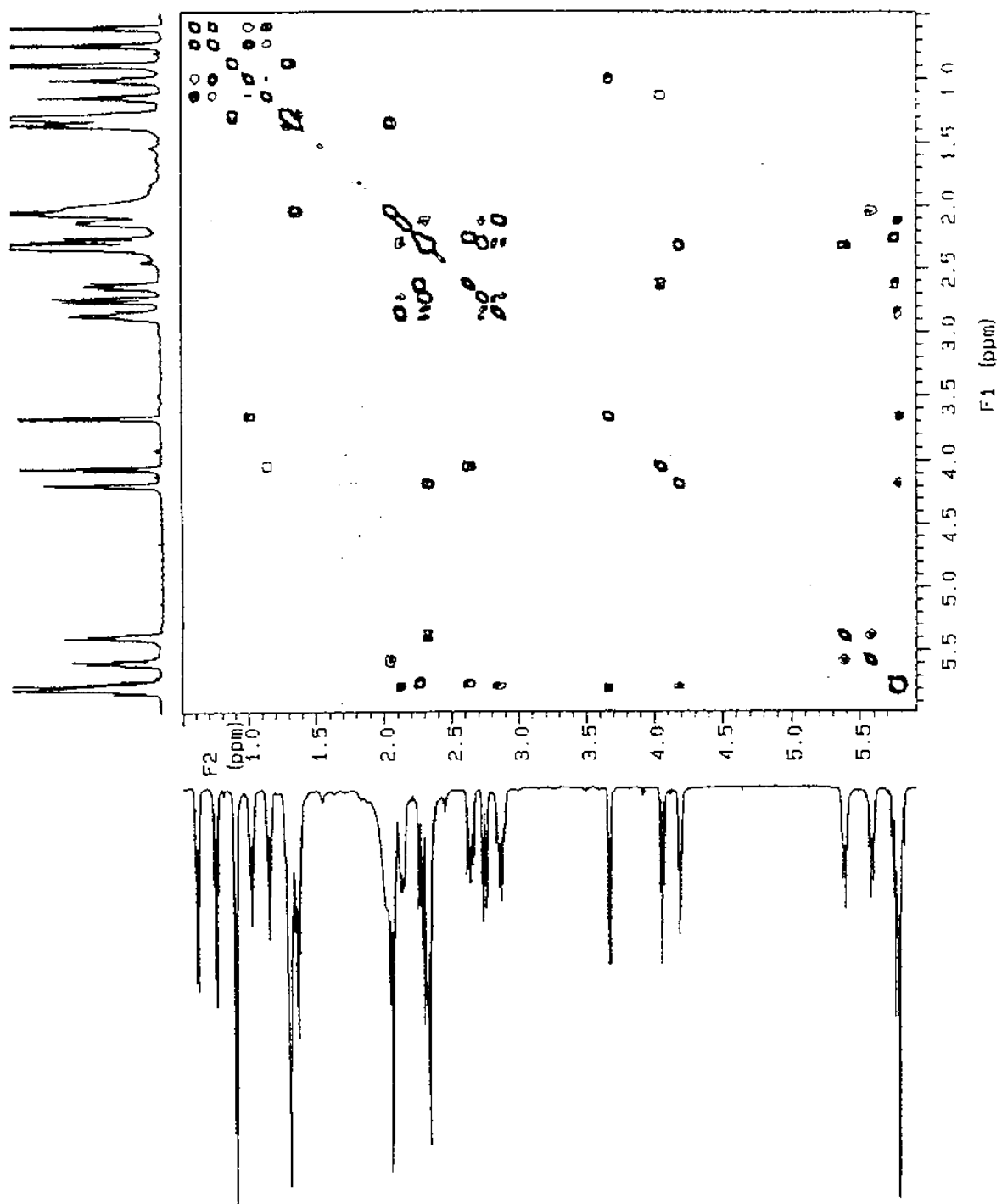


Fig. 5-28. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-10-6.

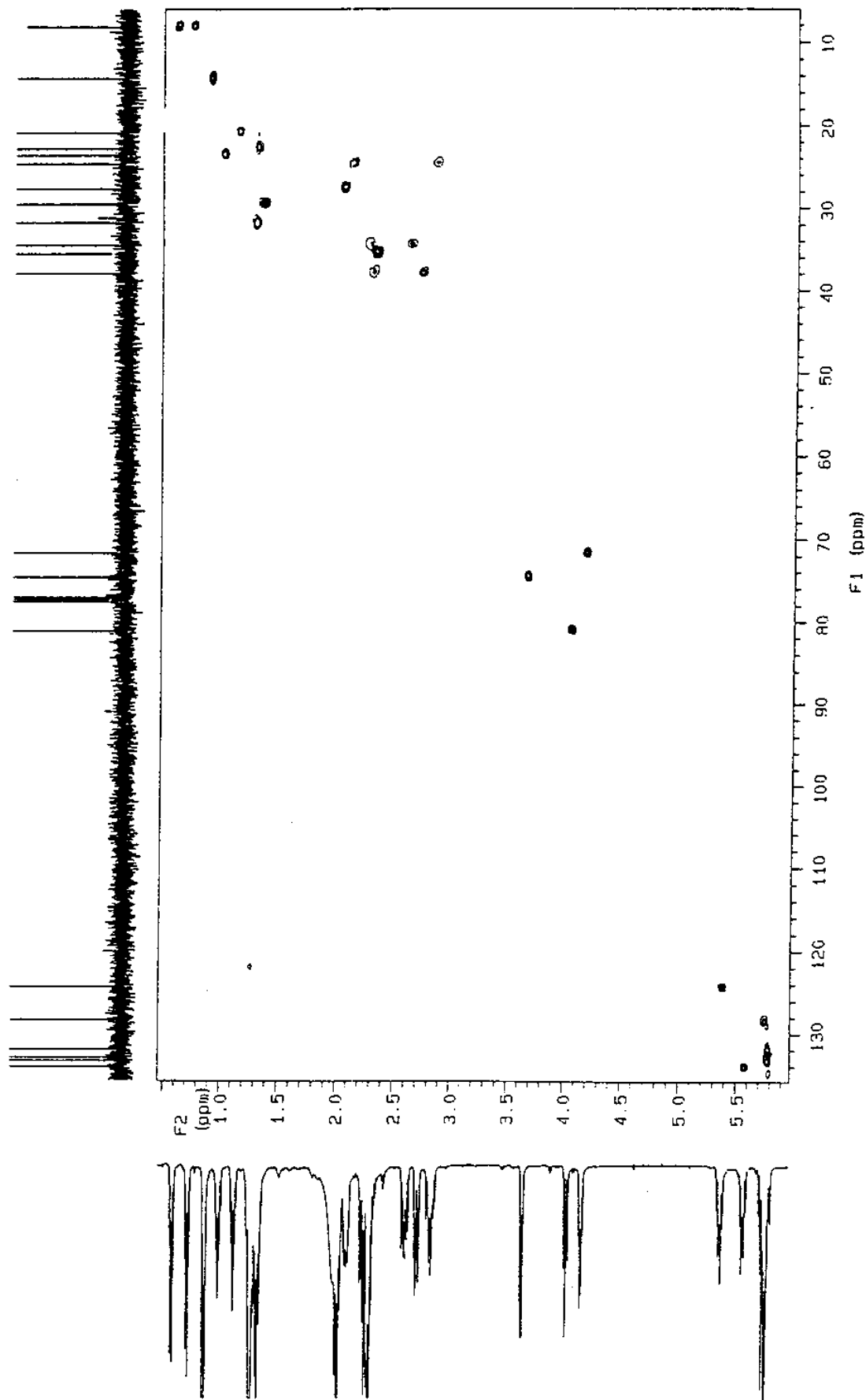


Fig. 5-29. HMQC spectrum of compound 91-10-6.

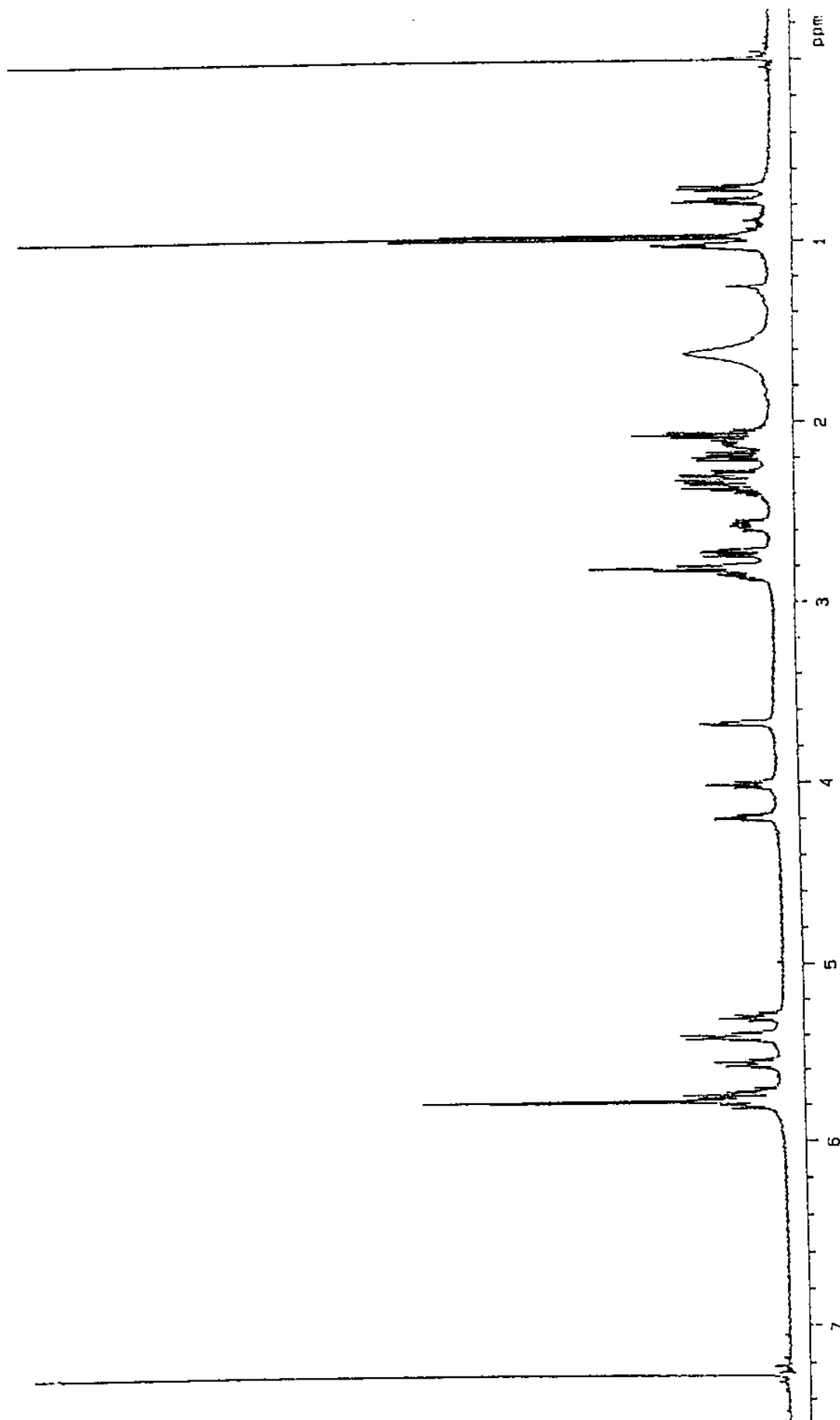


Fig. 5-30. Proton NMR spectrum of compound 91-10-7.

91-10-13-hplc-2-h-2-E, 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. REPEATITIONS 1024
 DECOUPLE H1
 HIGH POWER 43
 DECOUPLER CONTINUOUSLY ON
 HALTZ-16 MODULATED
 DOUBLE PRECISION ACQUISITION
 DATA PROCESSING
 LINE BROADENING 0.5 Hz
 FT SIZE 65536
 TOTAL ACQUISITION TIME 56 minutes

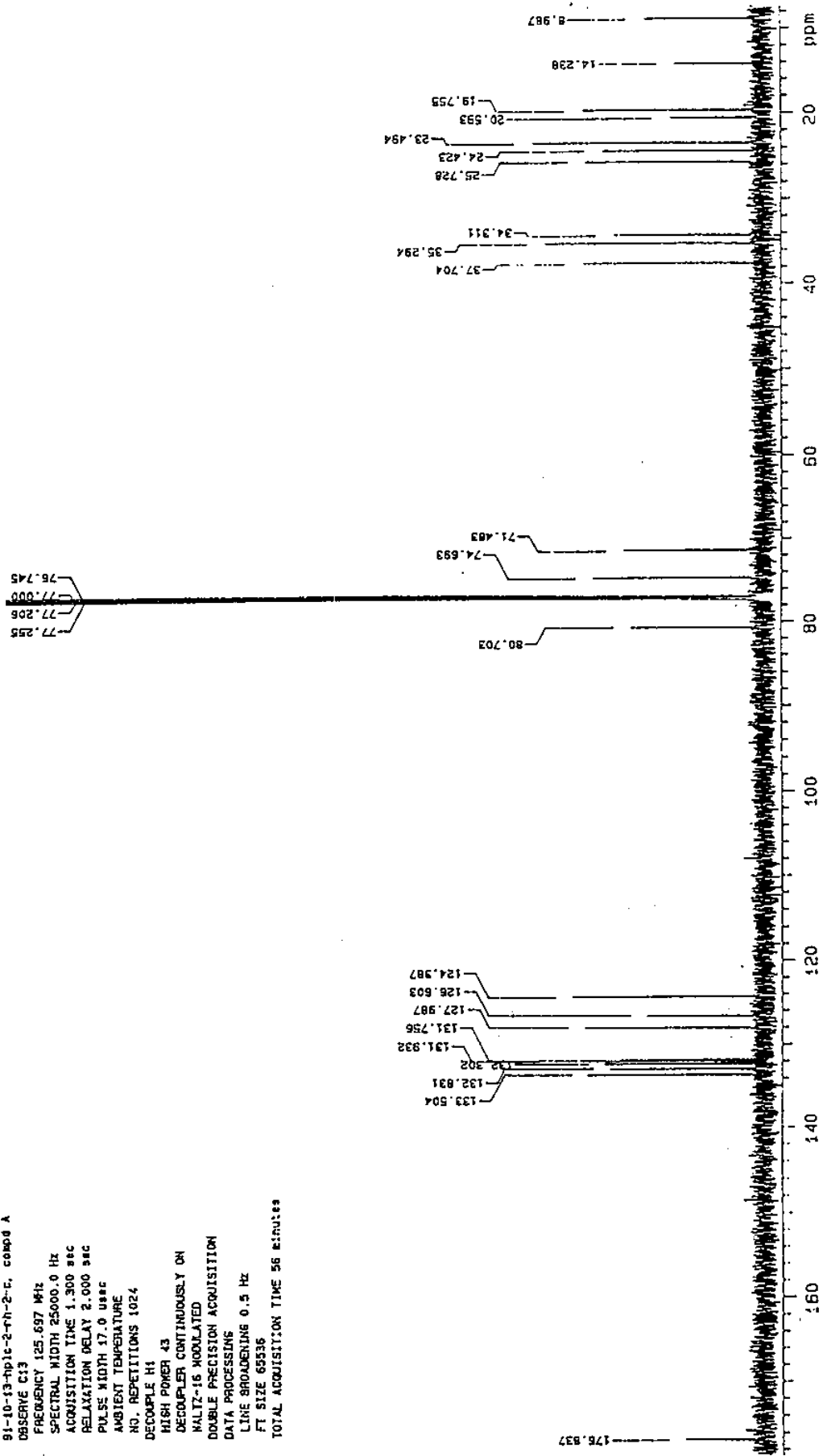


Fig. 5-31. Carbon NMR spectrum of compound 91-10-7.

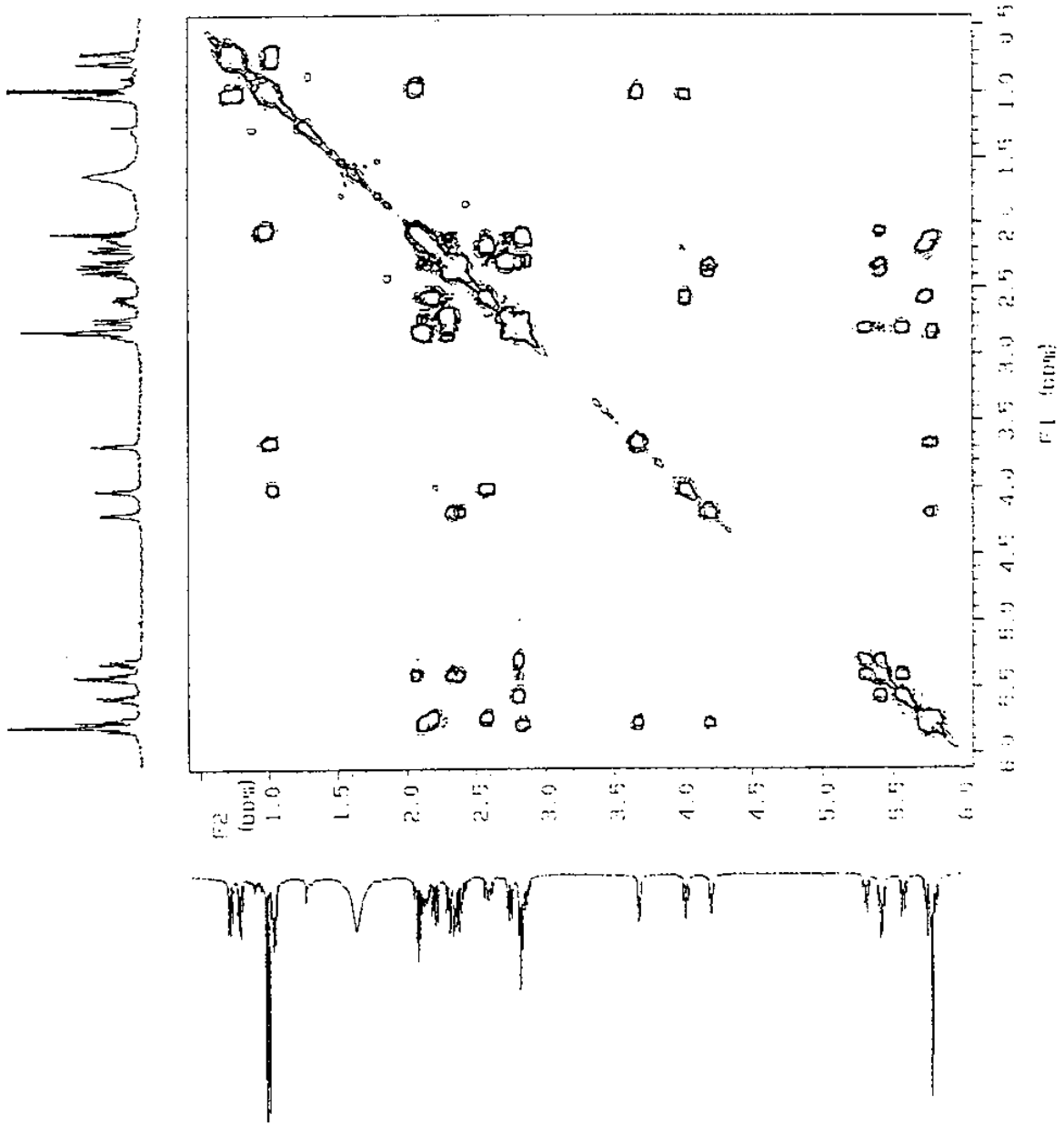


Fig. 5-32. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-10-7.

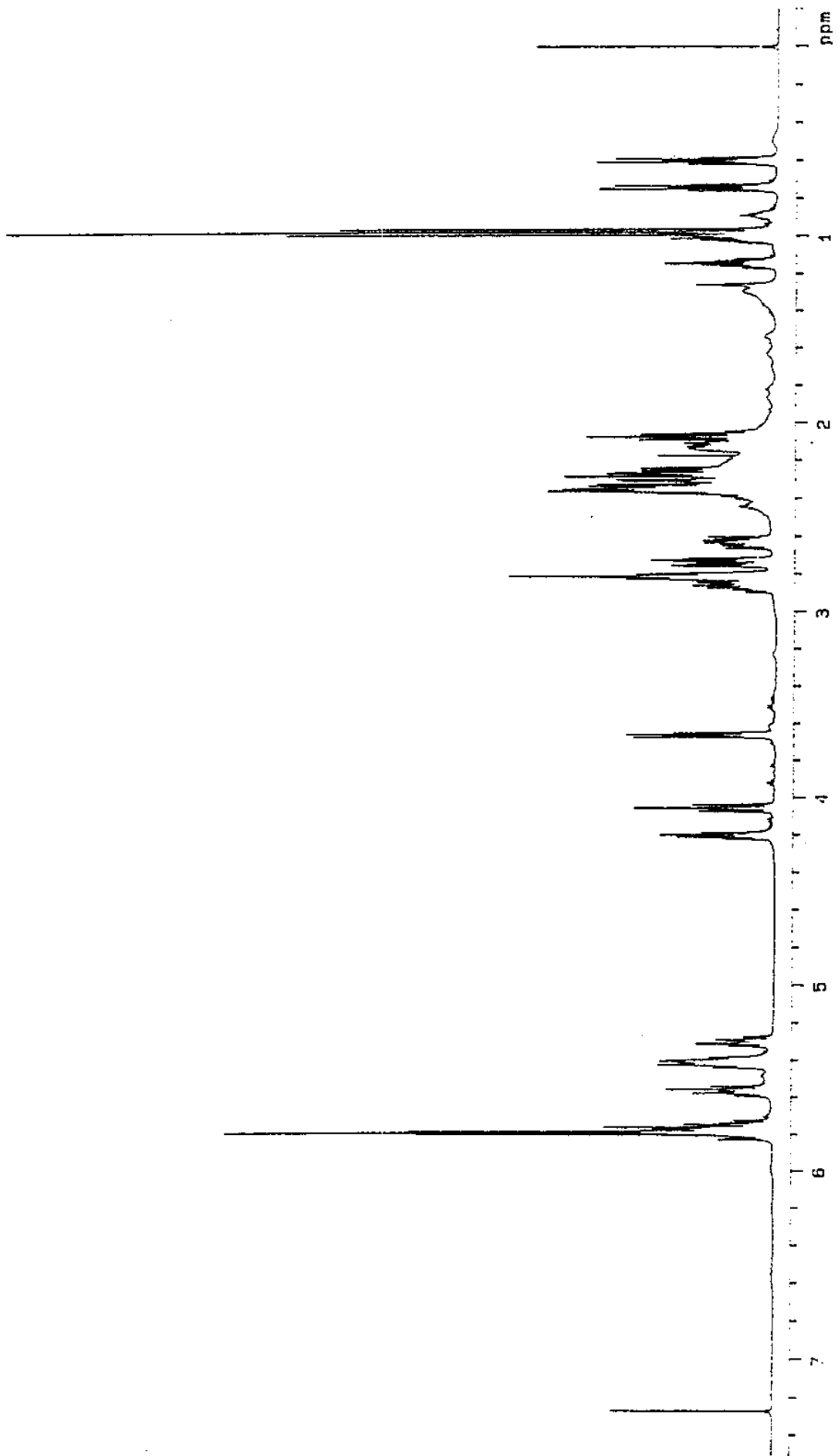


Fig. 5-33. Proton NMR spectrum of compound 91-10-8.

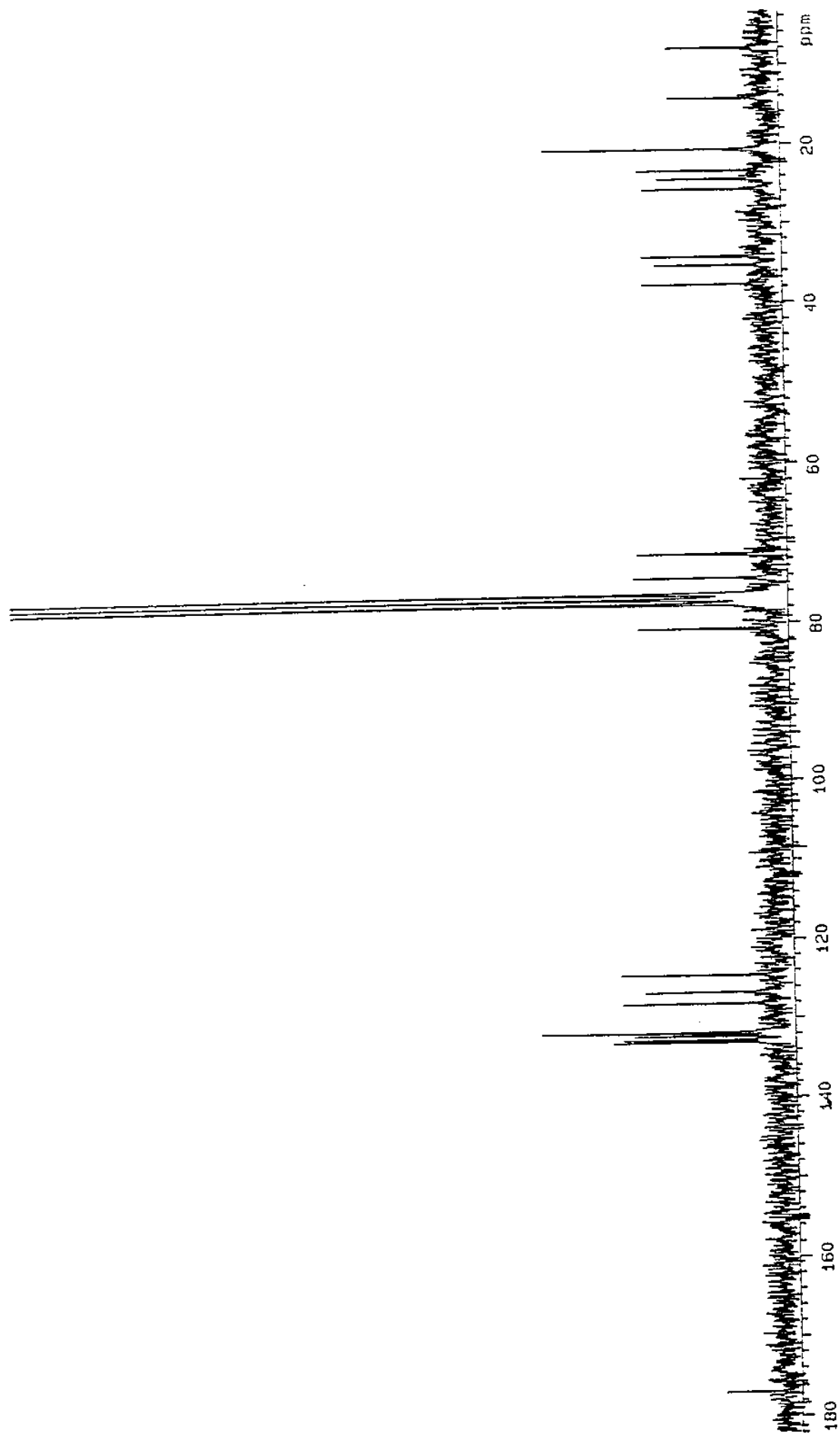


Fig. 5-34. Carbon NMR spectrum of compound 91-10-8.

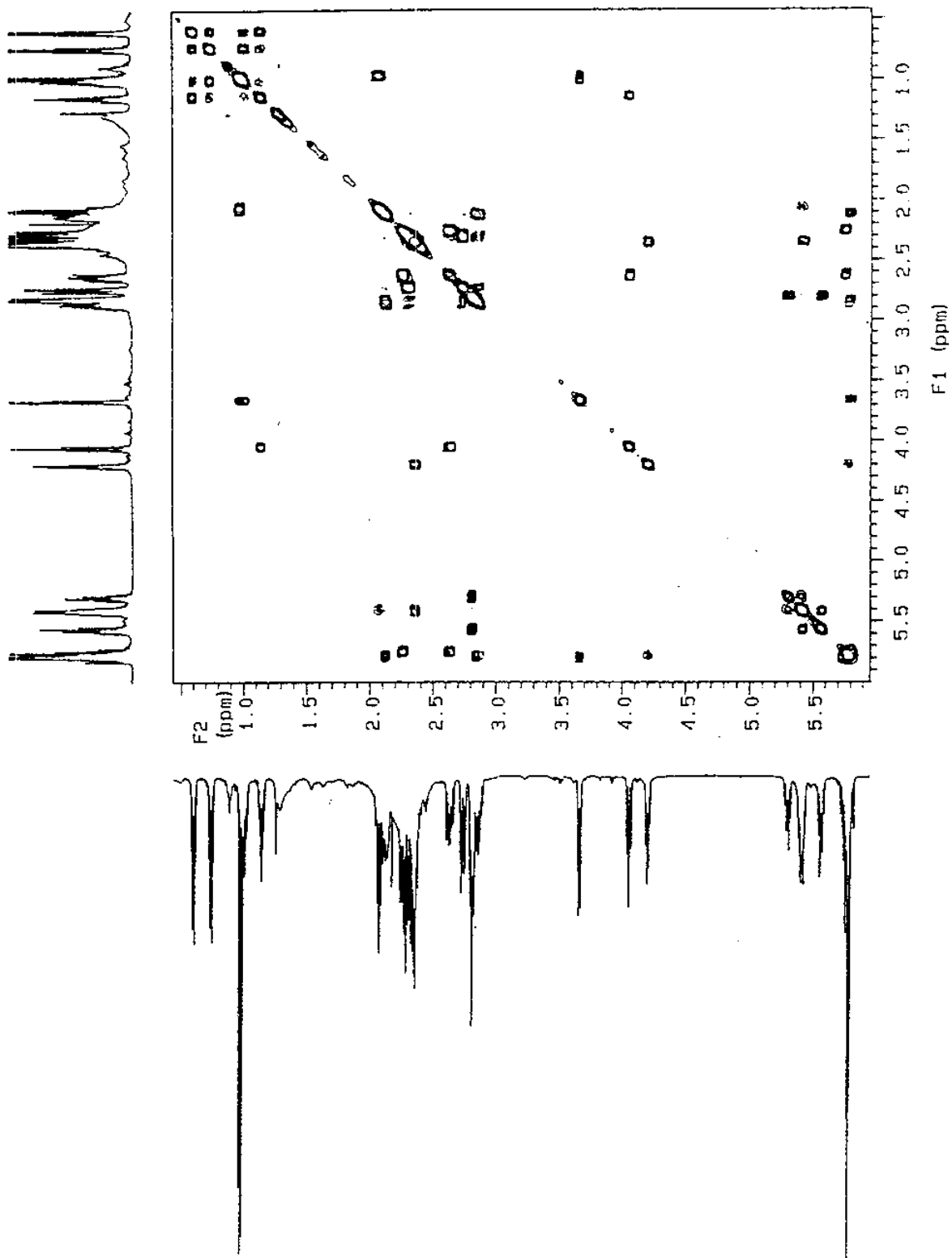


Fig. 5-35. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-10-8.

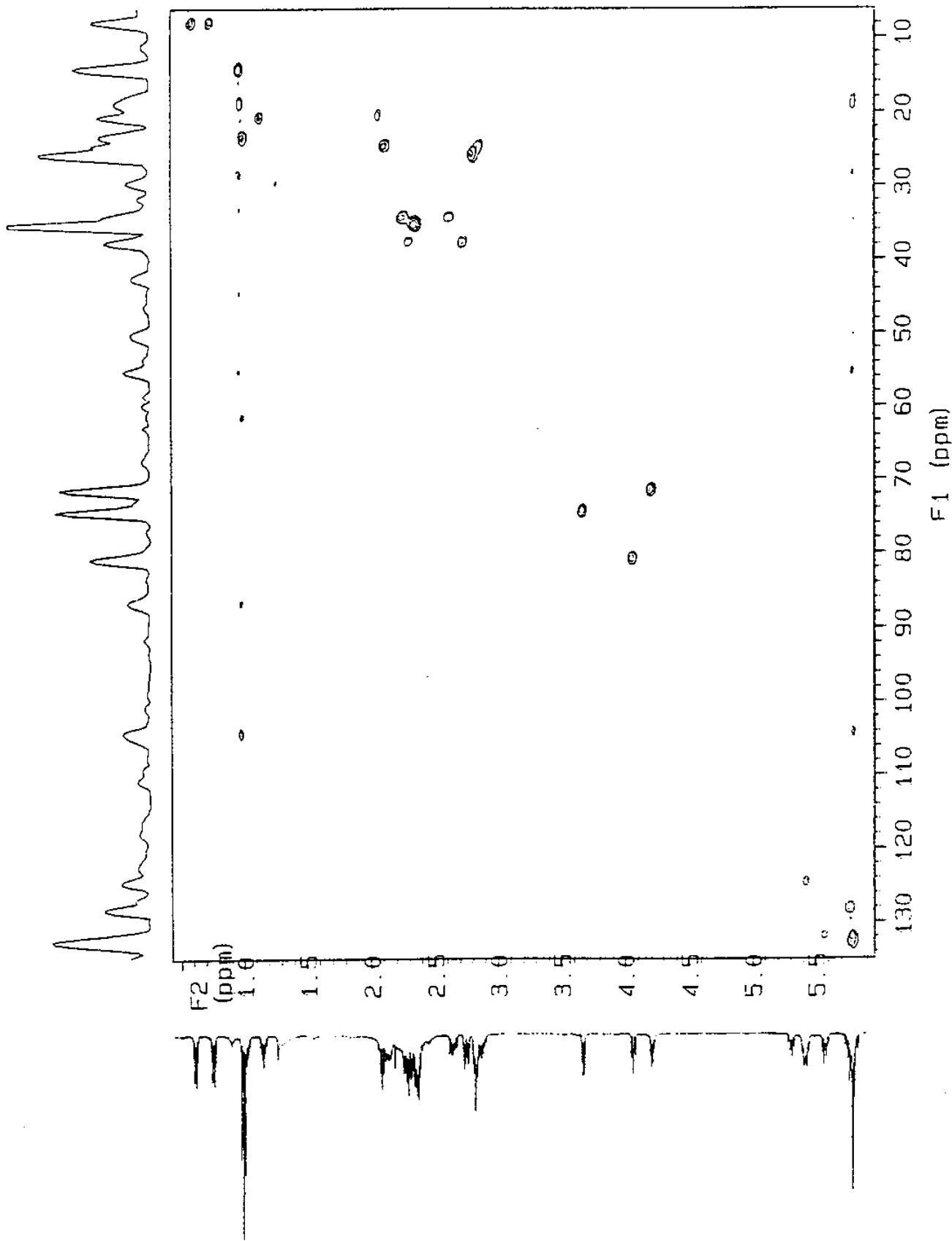


Fig. 5-36. HMQC spectrum of compound 91-10-8.

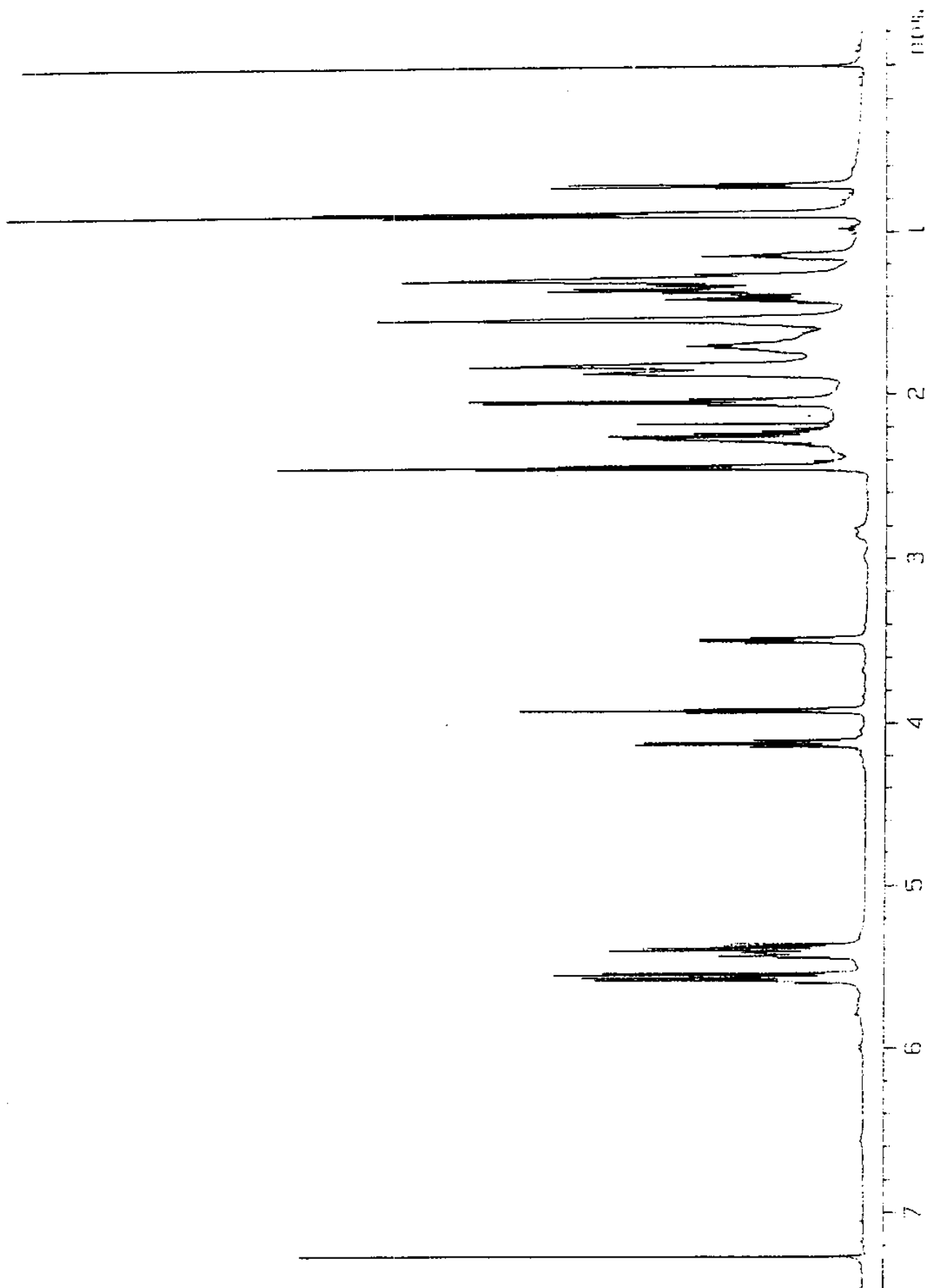


Fig. 5-37. Proton NMR spectrum of compound 91-10-9.

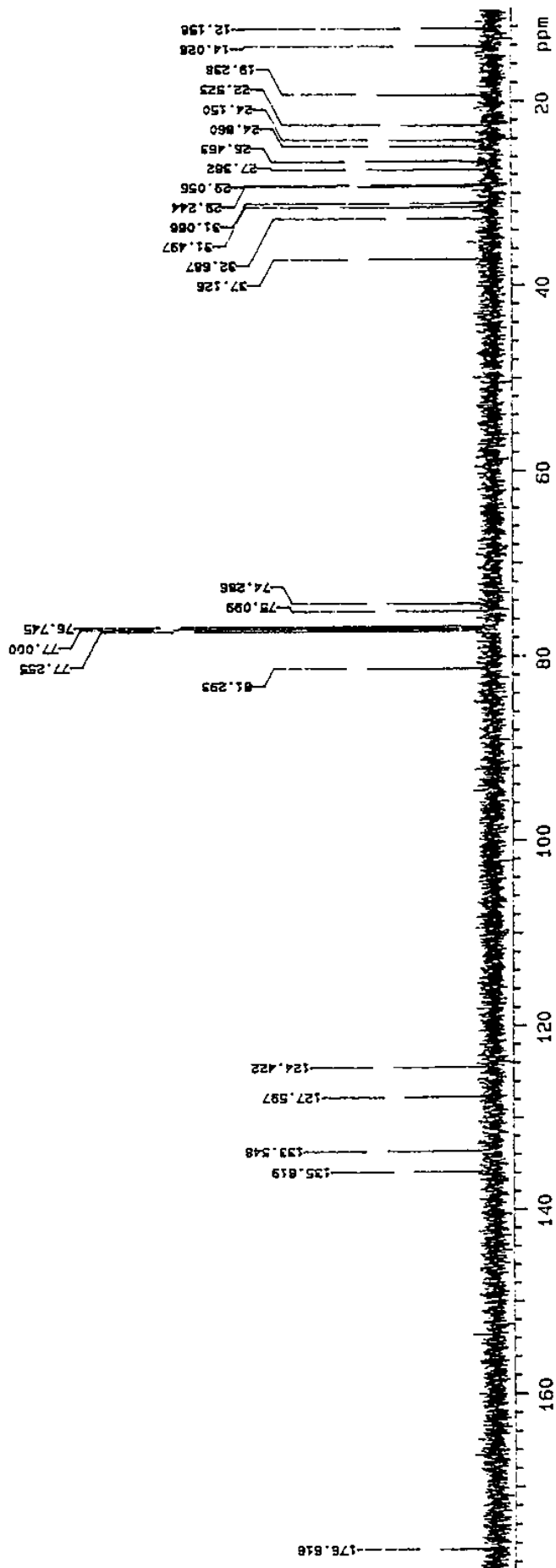


Fig. 5-38. Carbon NMR spectrum of compound 91-10-9.

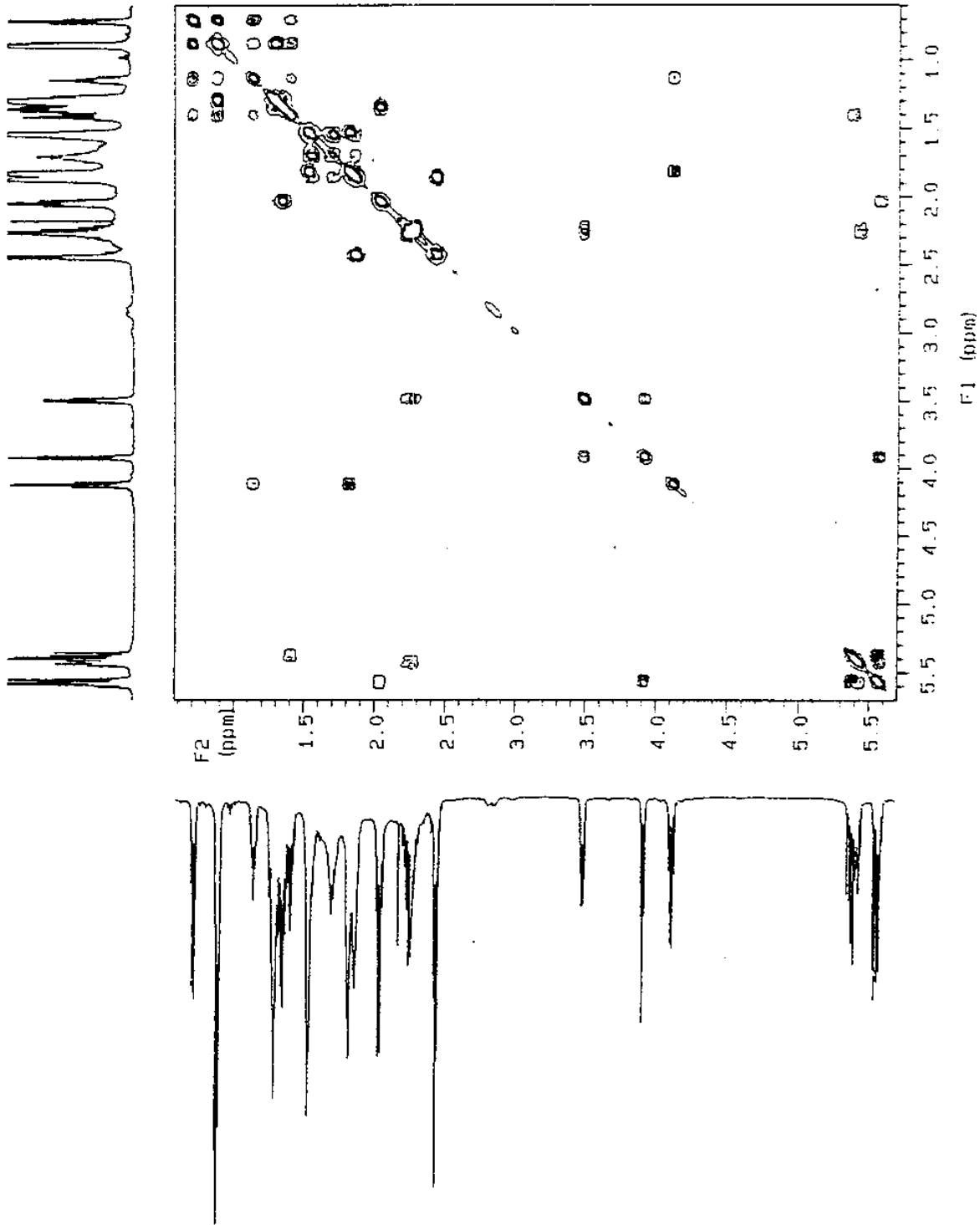


Fig. 5-39. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-10-9.

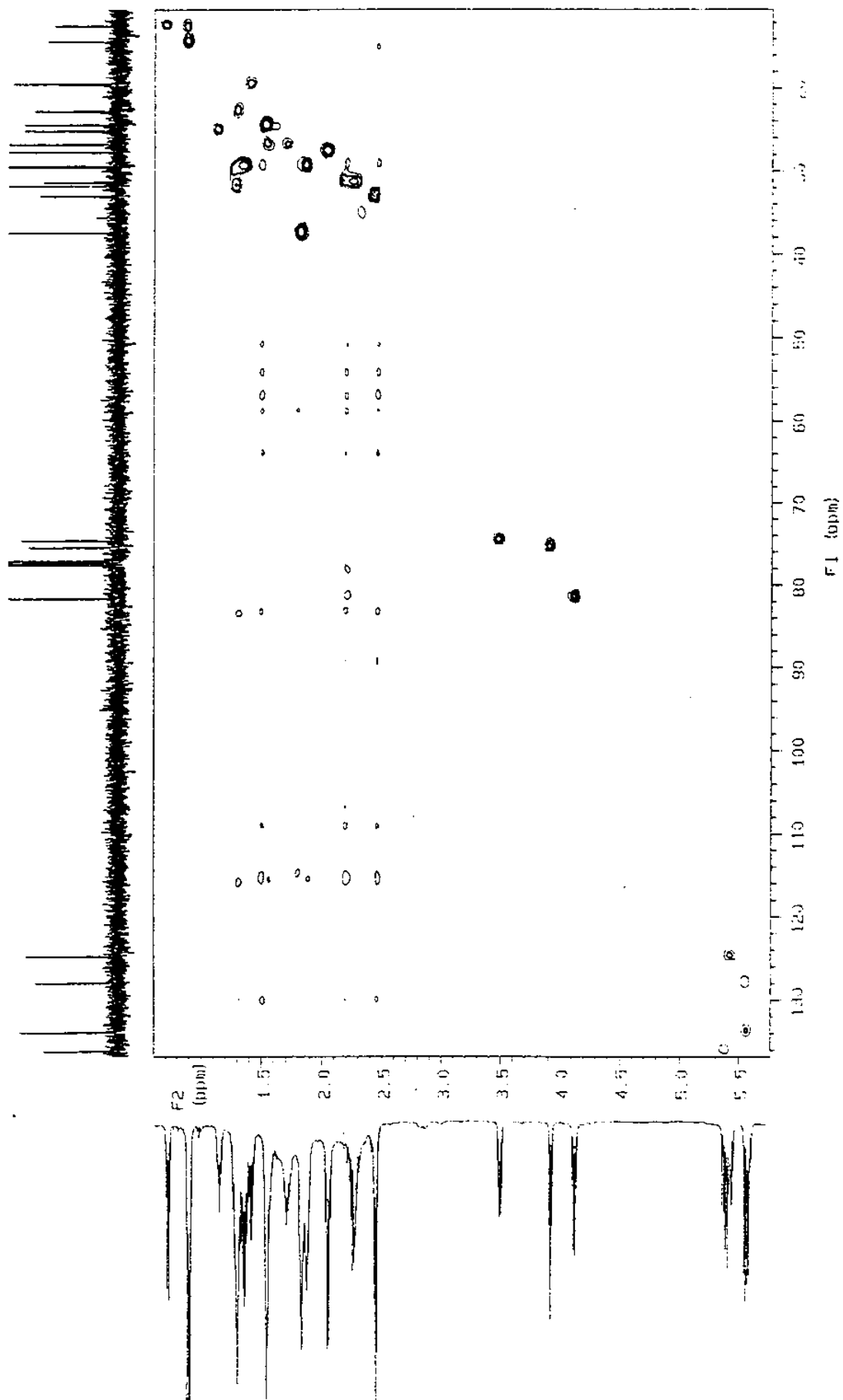


Fig. 5-40. HMQC spectrum of compound 91-10-9.

exp1 pulse sequence s2bu1

```
SAMPLE          DEC. & YI
name Sep 25 93  an  H1
solvent CDCl3  ac/  0
file exp  ac/  ppp
ACQUISITION
vprq 499 843 087  200
tr  30
ac  1.200  temp  25.0
DE  19200
PRCESSING
s4  8000 0  atfile
tr  4400  proc  ft
b1  32  fn  not used
b1fr 58  each  f
b2  8 1
a1  0 4err
t1  0 4exp
m1  64 xhc
c1  64 xnt  wft
a1lock n  DISPLAY
g1un not used su  -125.5
i  3062.1
l  305
t1  n vs
ac  n sc  0
ap  y xc  400
r1  n h2a  9 66
r2  2454.33
r3  1594.5
r4  n p  0
r5  th  24
r6  ins  1.000
r7a luc ph
```

Acquisition: Sep 25 1993 15:00:00
Processing: Sep 25 1993 15:00:00
F2: 500.131 MHz, 100% CHLOROFORM-D

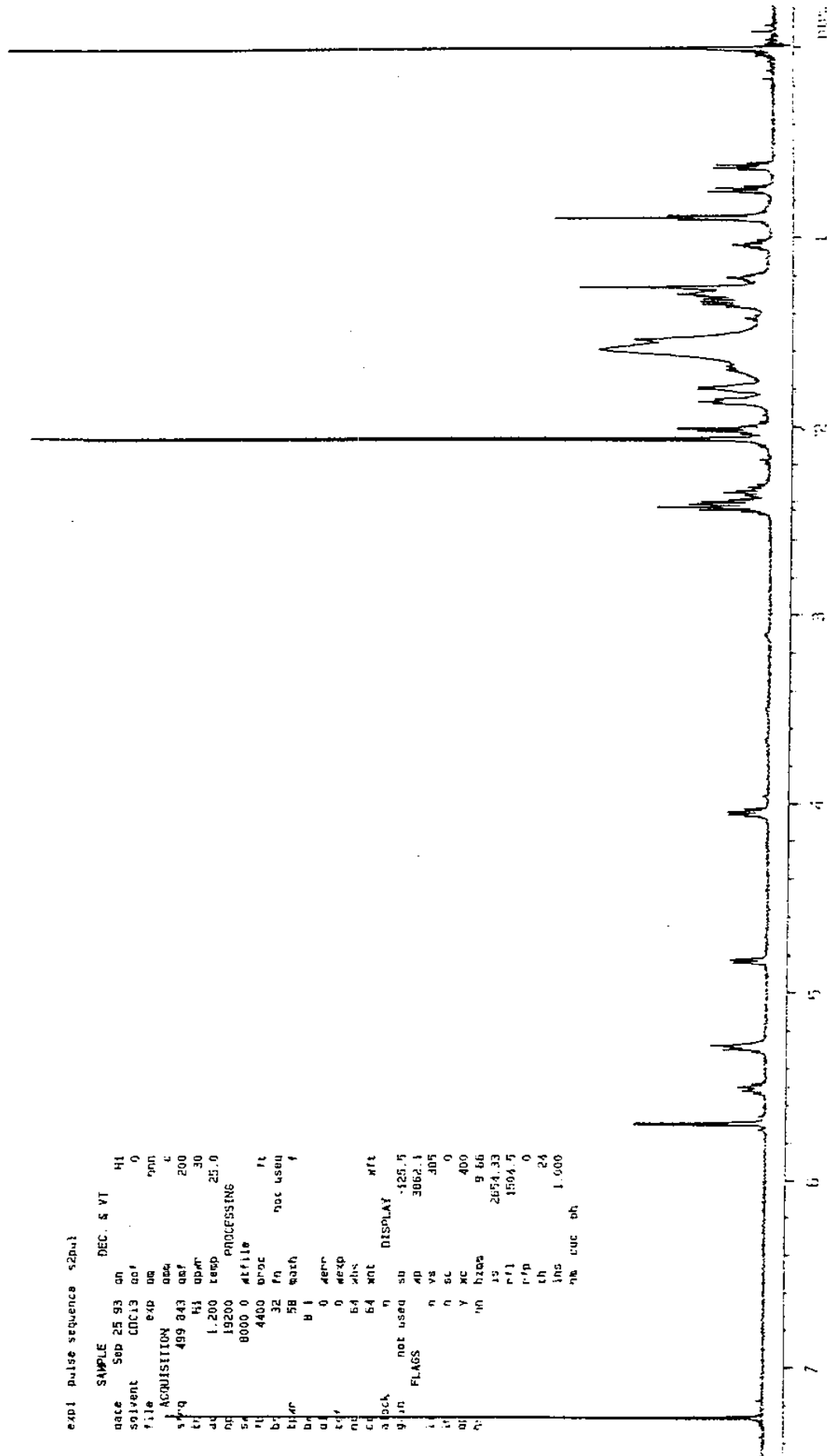


Fig. 5-41. Proton NMR spectrum of compound 91-10-10.

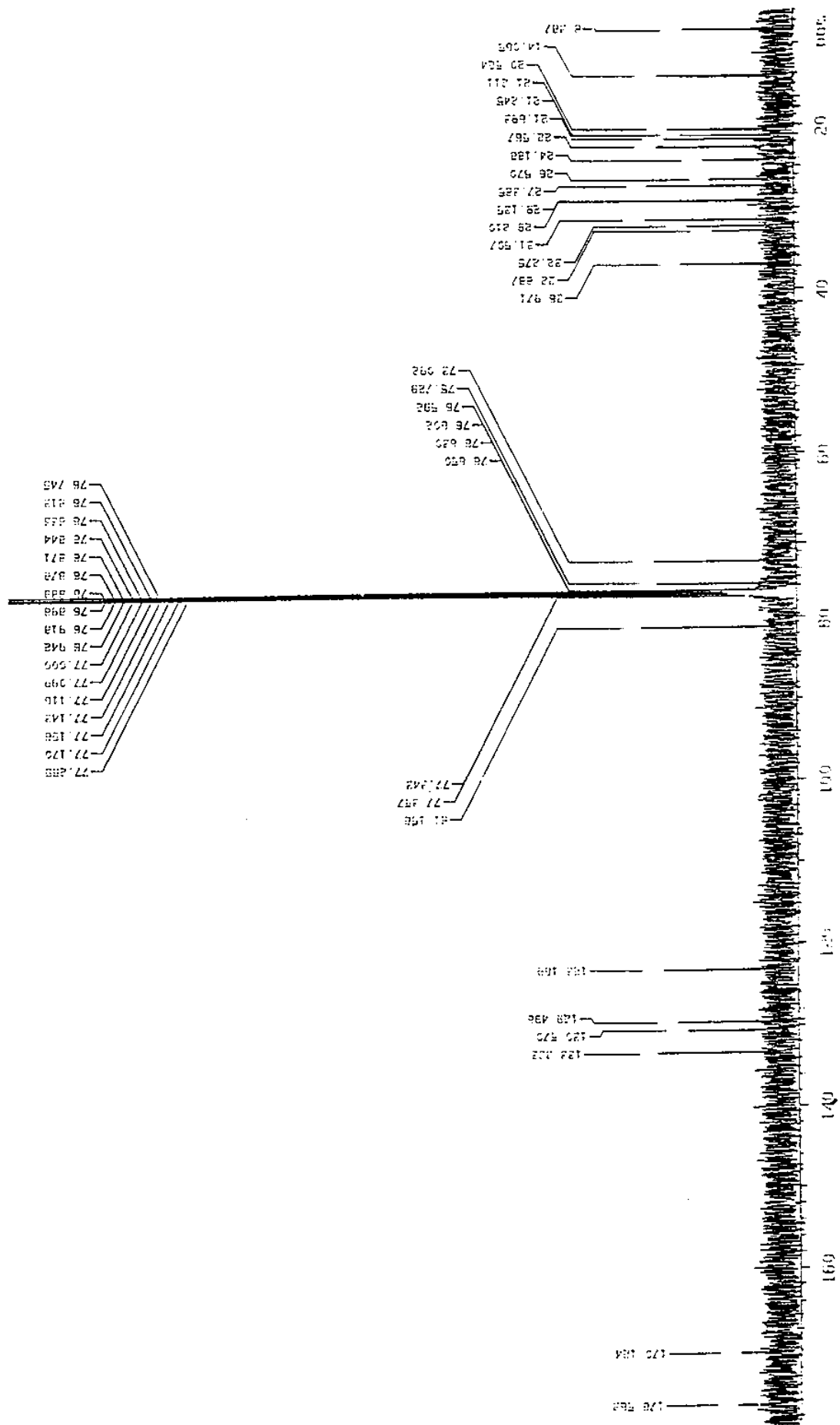


Fig. 5-42. Carbon NMR spectrum of compound 91-10-10.

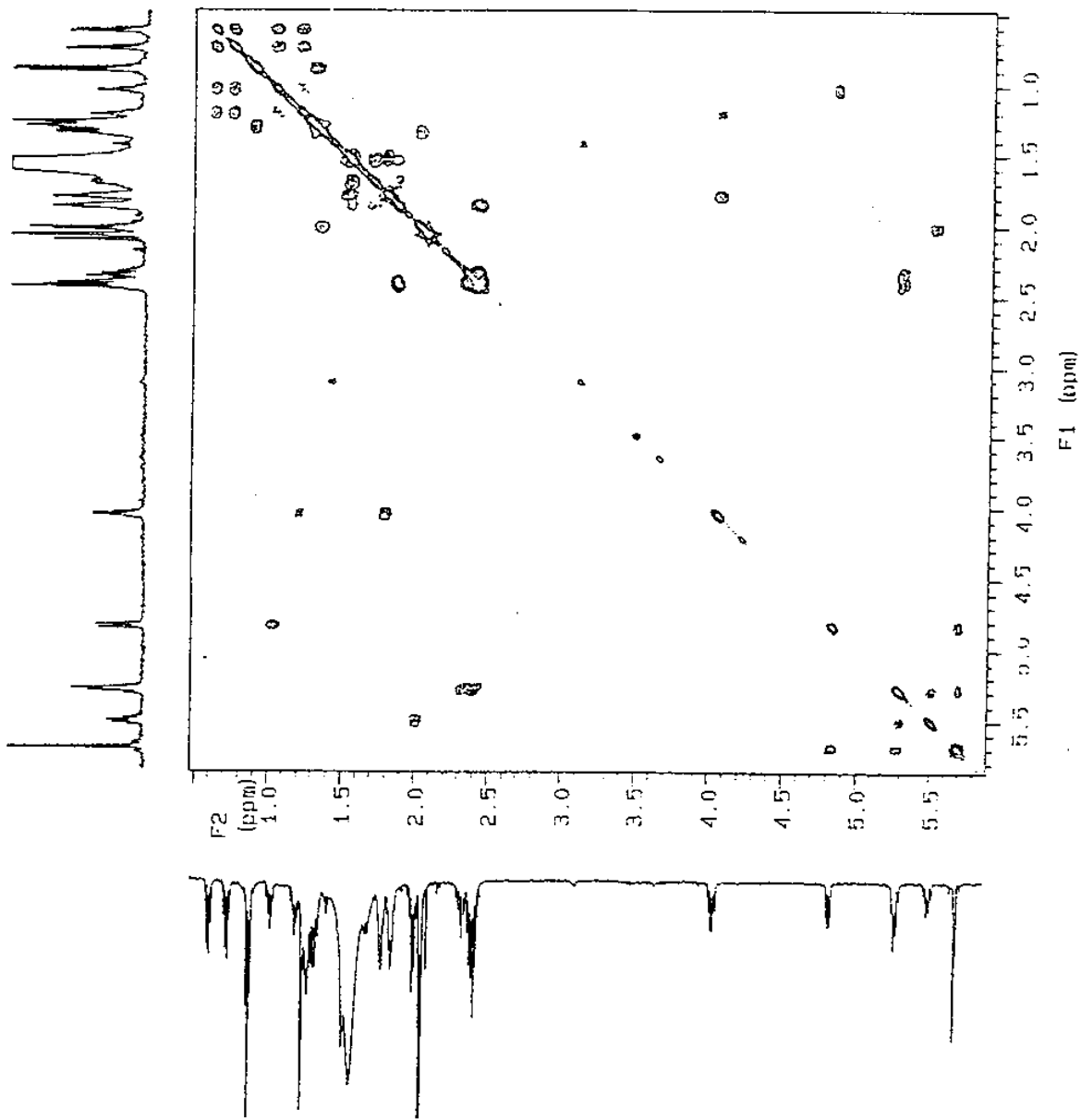
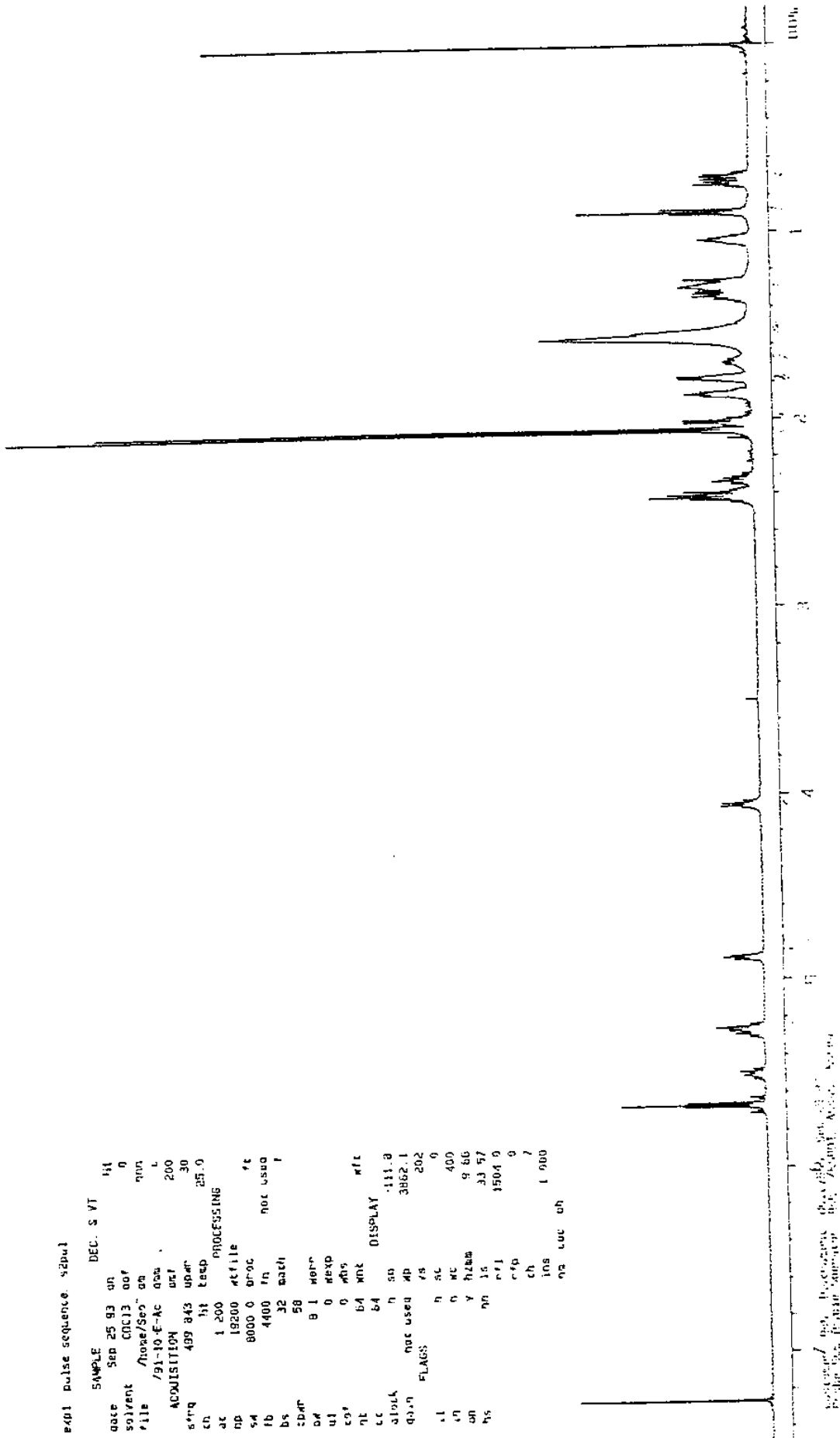


Fig. 5-43. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-10-10.



```

EXP1 pulse sequence. szbul
SAMPLE          DEC. S VT
date    Sep 25 93  on      HI
solvent  CDCl3  007      0
file     /home/Sec  on    non
        /91-10-E-Ac  data  L
ACQUISITION  acf      200
ch         499 843  u04r    30
        hi temp    25.0
ac         1 200  PROCESSING
mp         19200  atfile
s4         8000 0  orpc    ft
fb         4400  in    not used
bs         32  mach    f
cparm     58
bf         8  l  m0rr
ul         0  rEXP
cp         0  rbs
nl         64  MKT  MFC
lc         64
alpk      h  sn    .111.8
q0,n      not used  4p    3862.1
        FLAGS      fs    202
l1         h  ac    0
l7         n  WC    400
un         y  h2ba   9 86
hs         nn  ls   33 57
        rfb      0
        ch       7
        ins     1 000
        na     luc  oh
  
```

Fig. 5-44. Proton NMR spectrum of compound 91-10-11.

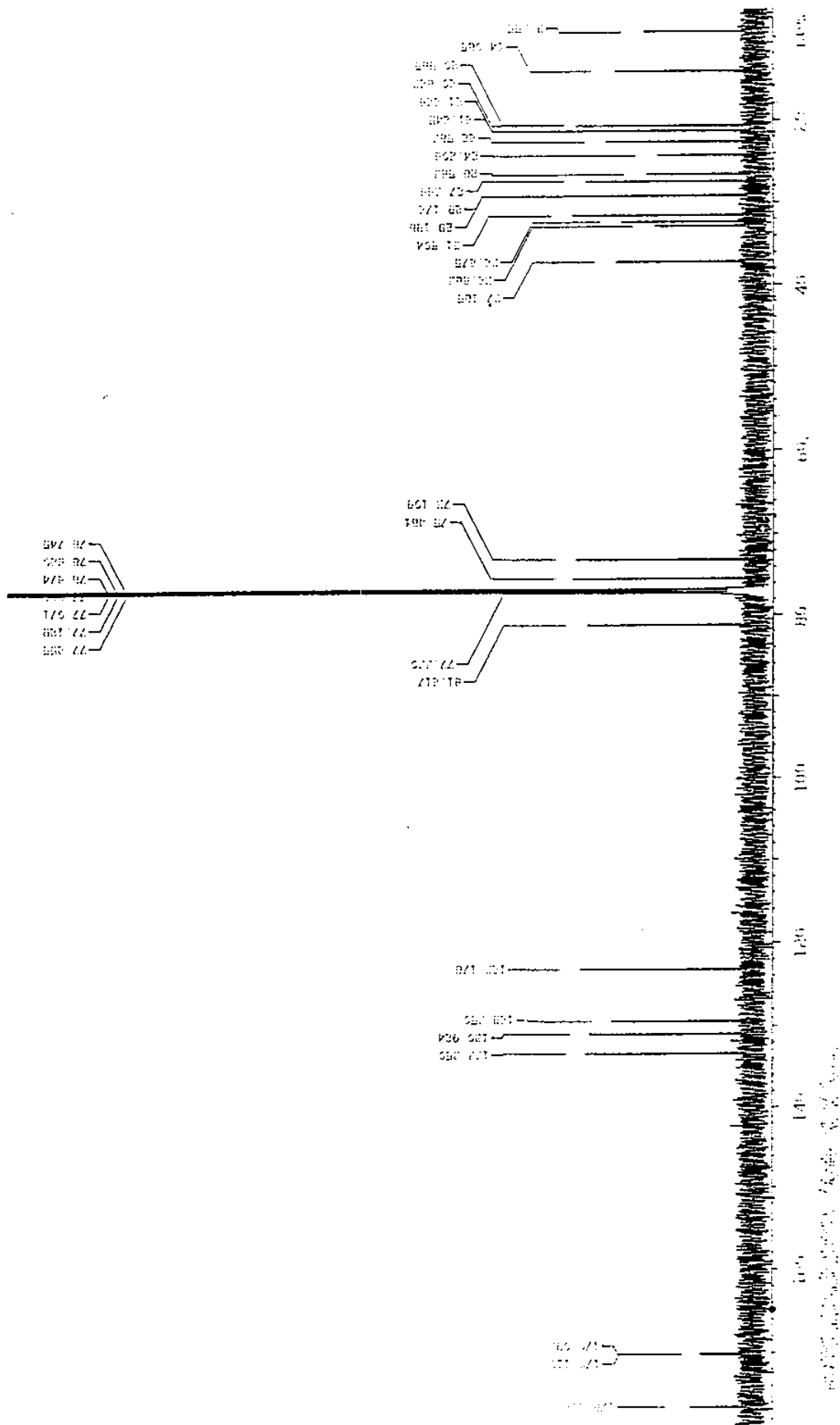


Fig. 5-45. Carbon NMR spectrum of compound 91-10-11.

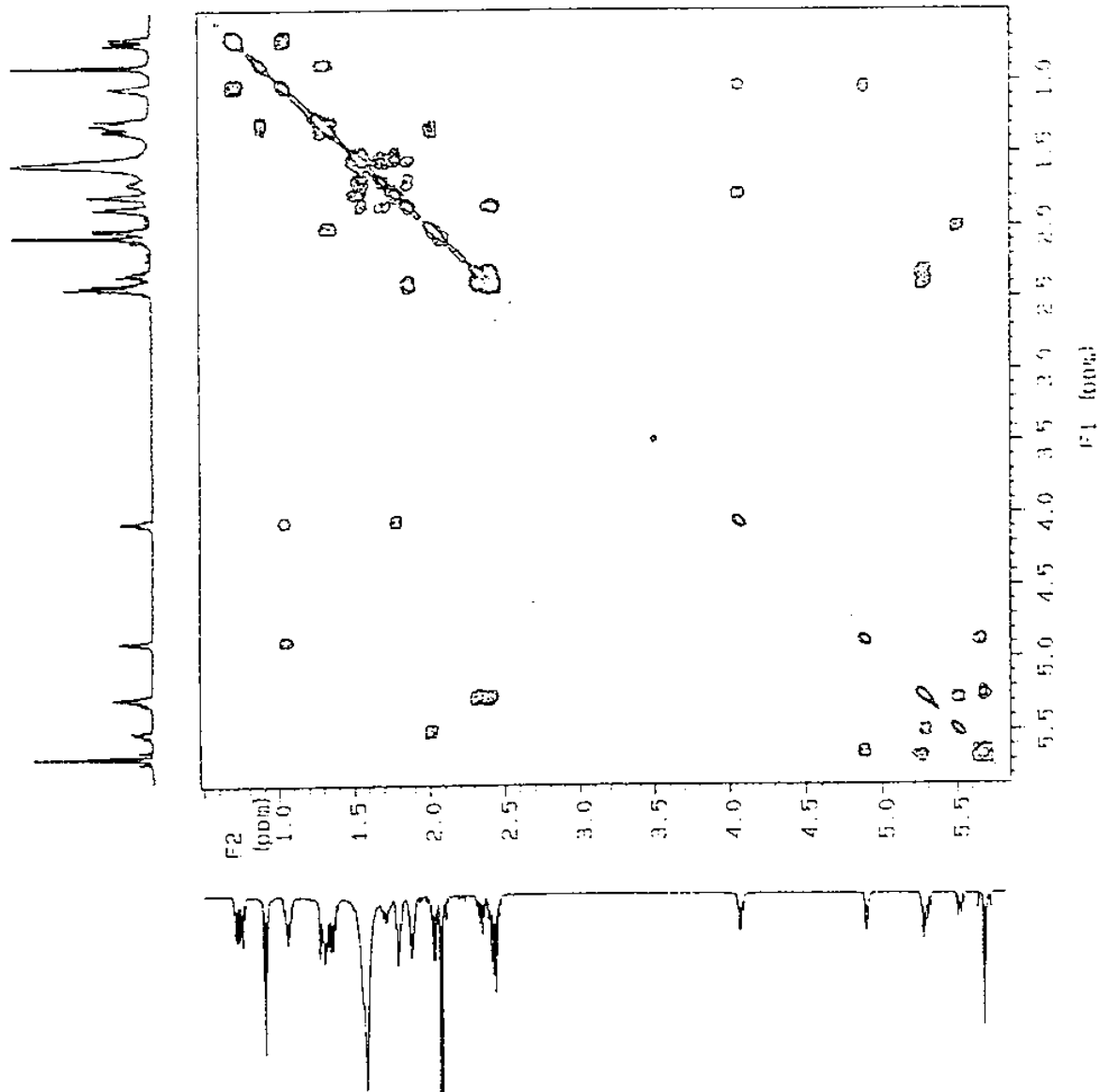


Fig. 5-46. Proton COSY NMR spectrum of compound 91-10-11.

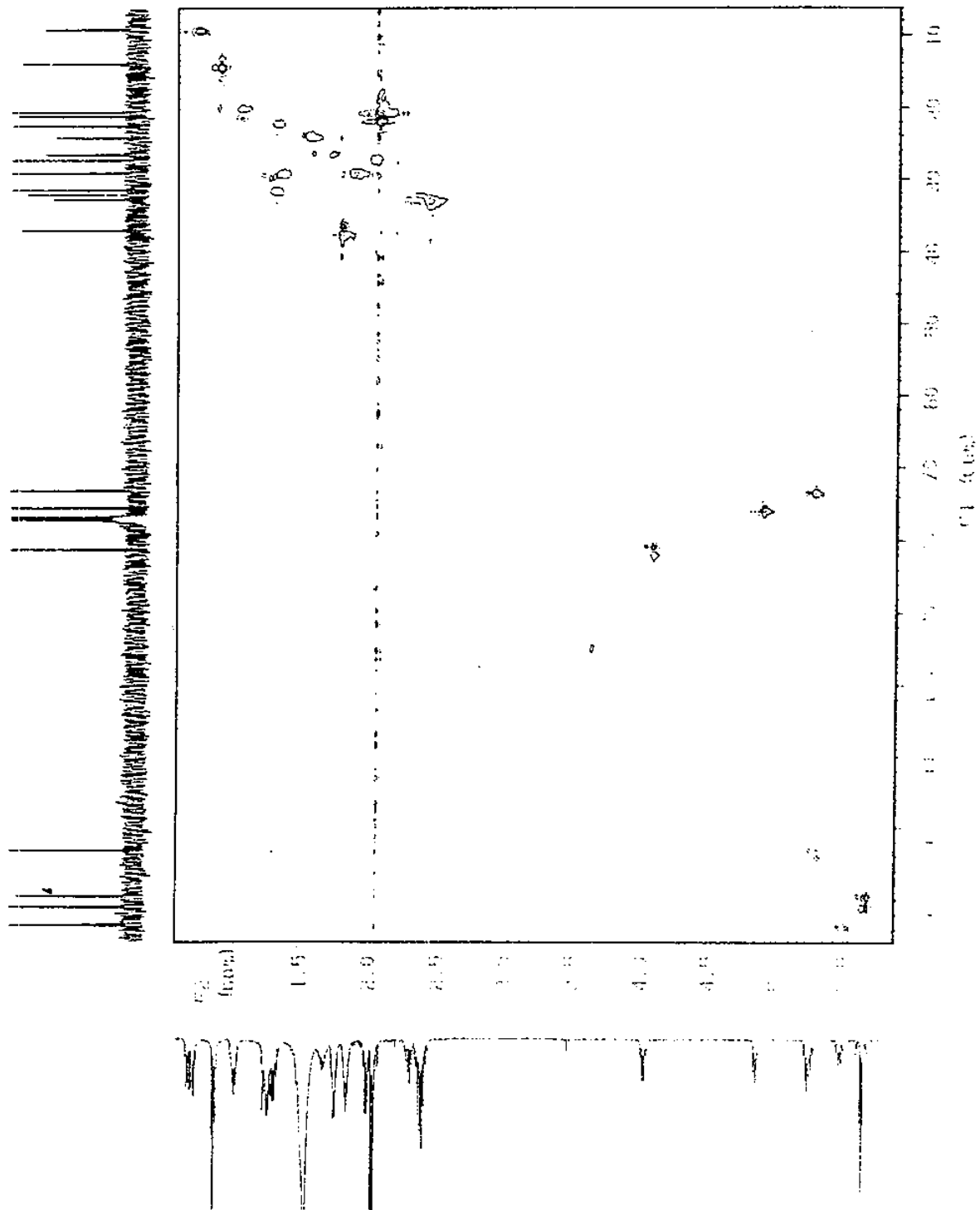


Fig. 5-47. HMQC spectrum of compound 91-10-11.

이 책이 주는
행복을
가르쳐 준다

제 6 장. 해면동물(sponges)의 천연물

6. 1. 연구의 배경 - 해면동물로부터의 생리활성물질 개발

일반적으로 의약품이 개발되는 과정은 크게 두가지로 볼 수 있는데 우선, 천연물로부터 유래되어 개발되거나 순수하게 화학적 합성으로 개발되는 것이다. 실제로는 많은 의약품이 시초에는 천연물로부터 유래되었으나 화학적인 방법에 의해 변형되고 개선되어 약효는 증대되고 부작용은 감소된 제품으로 개발된 것이 대부분이다.

천연물에서 발견되었거나 혹은 화학적으로 합성된 생리활성 선도물질이 제품으로 개발되기까지에는 수많은 단계를 통과해야 하는데 수만개의 후보물질 중에서 오직 몇 가지만이 최종 개발단계에까지 진입할 수 있게 된다. 육상천연물과는 달리 해양천연물의 경우에는 원료자원 확보의 어려움이라는 장애물이 하나 더 추가된다. 어떠한 제약회사이든 간에 제품개발을 검토할 때는 전임상 및 임상실험에 필요한 충분한 물량 뿐만아니라 그것이 의약품으로 개발되었을 경우에 제품생산을 위해 공급할 수 있는 원료자원이 100 % 확보되어야 한다. 이러한 원료자원 확보측면에서 볼 때 해양에서 유래되는 생리활성 선도물질은 크게 2가지로 분류할 수 있다. 기원생물을 배양내지는 재배할 수 있는 것과 그렇지 못한 것이다.

해양미생물에 의해 선도물질이 생산되는 경우에는 생산균주만 확보하면 문제가 쉽게 해결된다. 실제적으로는 여러가지 난관이 있을 수 있지만 이론적으로는 대량 배양에 의해 원료물질을 다량 얻을 수 있기 때문이다. 해양미생물의 배양에는 여러가지 어려움이 따르는데 예를 들면 균주가 낮은 cell density에서만 성장을 한다는 것, 고염도 상태에서 배양해야하므로 생산시설이 쉽게 부식되는 문제, 또는 저온에서만 적정생장을 유지하기 때문에 배양시간이 길어지고 따라서 생산기간이 길어지

며 다른 미생물에 의한 오염의 위험성도 높아지는 문제등이 있다. 무엇보다도 근본적인 문제는 해양미생물의 배양조건에 대한 지식이 아직도 충분히 축적되어 있지 않다는 것이다. 현재 많은 제약기업들이 해양미생물 발효의 문제점을 해결하기 위해 계속 연구를 하고 있으므로 조만간에 해결방법이 나오리라 기대된다.

해양 macroorganism의 경우에는 자원확보 문제가 미생물과는 전혀 다른 각도에서 해결되어야 한다. 우선 손쉽게 구할 수 있는 전구체로부터 전합성 또는 반합성에 의해 제품판매에 필요한 충분한 물량공급이 가능한지를 검토해야 한다. 그러나 asymmetric center가 많고 복잡한 구조의 생리활성물질의 경우에는 화학적합성이 불가능하거나 경제성이 떨어지므로 대량채집하거나 대량재배 (cultivation)에 의존하는 수밖에 없는데 해양 macroorganism을 대량채집하여 의약품을 생산하는 것은 환경보존의 측면이나 경제성의 측면에서 실현 가능성이 희박하다. 육상식물로부터 의약품을 개발하는 경우에는 대개 자원식물을 대량 재배하여 생산한다. Quinine, vincristine, colchicine, morphine 등이 그 대표적인 예이다. 그러나 해양천연물 중에서도 해면동물, 강장동물, 균체명게류, 이끼벌레류 등에서 특히 산업적 가치가 높은 생리활성 물질들이 많이 발견되고 있는데 이러한 해양생물은 대량 양식이 아직까지는 미해결의 문제이다.

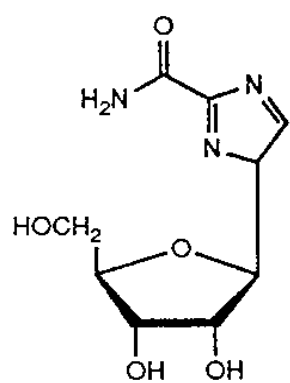
이러한 점들을 고려할때 해양 macroorganism이 의약품 개발의 직접적인 자원으로 크게 각광받지 못했던 것은 어쩌면 당연한지도 모른다. 그러나 최근들어 다시금 해양동물로부터 생리활성 선도물질 개발에 관심이 증대되고 있는데 이러한 연구결과의 유용성에 대해서는 천연물 연구분야 종사자들 사이에서도 제대로 인식이 되어있지 않다. 오늘날 많은 산업체와 학계의 연구진들이 해양미생물의 천연물연구에 몰려들게 하는데 기폭제 역할을 한 것이 바로 해양미생물의 대사물질인 saxitoxin, okadaic acid, tetrodotoxin 등의 생리활성 물질들인데 이들은 모두 해양 macroorganism에서 처음 발견되었던 것이다. 특히 해면동물의 경우에는 이 생물체에서 발견되는 생리활성물질이 대부분의 경우 공생하는 박테리아나, fungi

cyanobacteria 또는 먹이로 흡수된 dinoflagellate 등에서 기원한다는 것이 이미 밝혀졌다. 그러므로 해면동물의 생리활성물질 연구는 그 결과로써 새로운 생리활성물질 개발 뿐만아니라 해양미생물 연구의 새로운 방향을 제시할 수도 있는 것이다.

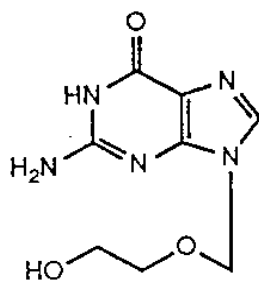
6. 2. 해면동물의 항바이러스 및 항암성분

항바이러스제, 항암제는 모두 숙주 (인체)에는 해를 주지않고 세포 (바이러스, 암세포)의 성장을 억제하여 치료효과를 나타내는 공통점이 있다 (이상적인 치료제의 경우).

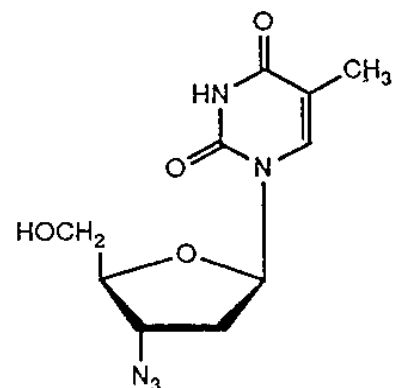
기존의 많은 항바이러스, 항암제가 개발되어 있기는 하지만 기존 치료제에 대한 내성이 계속적으로 생겨나므로 항상 새로운 치료제가 요구되고있다. 이러한 신약의 일부는 분명히 천연물에서 발견된 선도물질 그 자체나 혹은 그의 화학적인 변형 또는 유도체 개발을 통하여 개발될 것이다. 자원확보의 문제점이 있기는 하지만 확률적으로 해양천연물에서 이러한 분야의 신약들이 개발될 가능성이 가장 높다고 할 수 있다. 1970년대 이전부터 해양천연물의 항바이러스 효과에 대해서 보고는 되어 왔지만 이에 대한 체계적인 연구는 미비한 상태였다. 1978년에 Rinehart가 카리브해의 생물을 대상으로 연구한 결과 항바이러스 성분을 발견할 확률이 Cyanobacteria, Phaeophyta, Chordata (Ascidacea)에서 가장 높으며 Porifera (해면동물), Cnidaria, Echinodermata에서도 높다고 하였다 (Rinehart *et al.*, 1981). 최근의 연구에서는 카리브해의 해면동물에서 9 % (Sea Pharm Inc.) 뉴질랜드 근해의 해면동물, bryozoans, ascidian에서 8 %가 되는 것으로 나타났다 (Blunt *et al.*, 1985). 이와 같은 연구결과를 종합해 볼 때 항암 성분 발견빈도가 높은 생물종에서 항바이러스 성분이 발견될 확률도 함께 높다는 것을 알 수 있다. 항바이러스 성분을 검색하는 *in vitro* 실험방법에서 세포독성도 동시에 검출 할 수 있다는 사실을 함께 고려할 때 항바이러스 성분과 항암성분을 동시에 추적하는 것이 생리활성 성



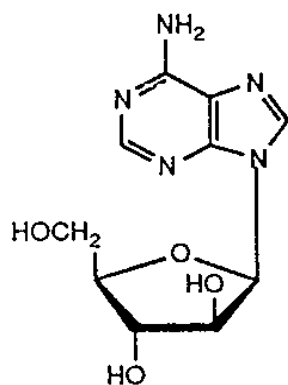
ribivarin



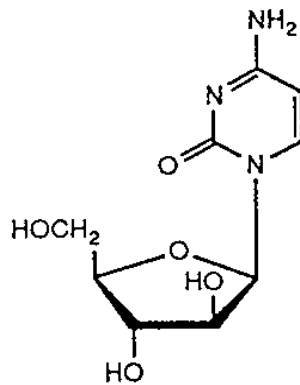
acyclovir



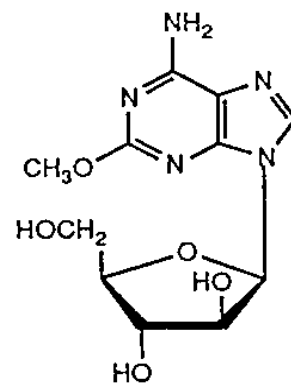
AZT



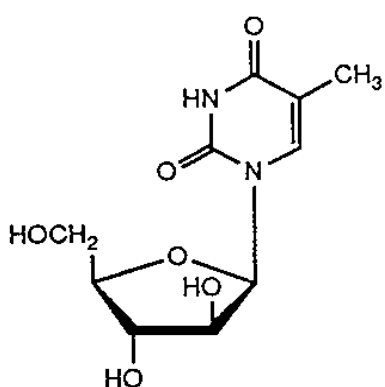
ara-A



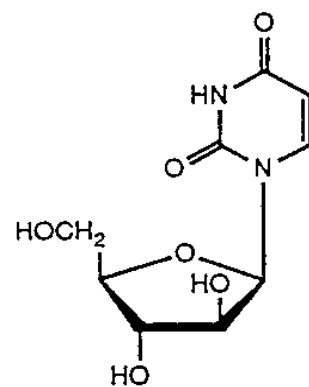
ara-C



spongosine



ara-T (spongothymidine)



ara-U (spongouridine)

Fig. 6-1. Natural and synthetic bases with antiviral activity.

분연구의 합리적인 접근방법이 될 수도 있을 것이다.

현재까지 항바이러스제로 개발된 것은 의외로 많지 않은데 그 중에서도 가장 성공적인 것은 ribivarin과 acyclovir이다. 최초의 항바이러스제의 개발과정과 해양 천연물 특히 해면동물의 천연물의 연구 역사는 서로 상당히 밀접한 관계가 있다. Bergmann에 의한 해면으로부터 arabinoside bases 발견을 기화로 천연에서 발견되는 unnatural nucleoside의 생물학적 작용에 대한 관심이 집중되기 시작했다 (Bergmann *et al.*, 1957). 이것은 결국 ara-A와 ara-C의 개발로 이어졌다. Bergmann에 의해 spongothymidine, spongosine, spongouridine이 해면동물 *Cryptotethya crypta*로부터 발견된 이래 다른 해양생물에서도 nucleoside가 분리되기 시작하였다. Ara-A (9- β -D-arabinofuranosyladenine)는 지중해의 gorgonian *Eunicella cavolini*에서 3'-O-acetyl 유도체 및 spongouridine과 함께 발견되었다 (Cimino *et al.*, 1984). Ara-A는 그 이전에 화학적으로 합성되어 알려져 있었던 물질인데 1964년에 항바이러스 효과가 최초로 발견되고 그후 1970년대 후반에는 실제적으로 *Herpes encephalitis*의 치료에 사용되었다. 천연에서 발견된 이러한 항바이러스 nucleoside를 모델로 하여 새로운 유도체의 개발 노력 결과 AZT, ribivarin, acyclovir과 같은 보다 나은 약효의 항바이러스제가 개발되었다(Fig. 6-1.).

위에서 언급한 unusual bases 이외에도 해면동물로부터 무수한 항암, 항바이러스, 항진균, 소염, 면역억제, 효소억제 물질들이 발견되고 있다. 이들중 본 연구의 주된 목표인 항암, 항바이러스 효과가 높아 주목을 끌고 있는 물질들을 요약하면 아래와 같다(Fig. 6-2).

서로 유사한 화학구조를 가진 항종양성분 acanthifolicin과 okadaic acid는 각기 다른 연구팀에서 거의 동시에 보고되었다 (Schmitz *et al.*, 1981, Tachibana *et al.*, 1981). Acanthifolicin은 카리브해의 해면동물 *Pandaros acanthifolium*에서 미량성분으로 분리된 물질이다. Acanthifolicin은 이전에 bacteria에서 발견된 polyether antibiotics와 구조적으로 매우 유사하였으나 episulfide기를 함유한 것이 특징적이었

다. Acanthifolicin의 세포독성은 *in vitro* P388, KB, 그리고 L1210에 대하여 ED₅₀가 각각 0.000208 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.0021 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.0039 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에 달했으며 포유류에 대한 독성은 *in vivo*에서 0.14 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다. 아깝게도 acanthifolicin은 *in vivo*에서 독성농도 이하에서는 뚜렷한 항암효과가 관찰되지 않았다. Okadaic acid는 일본해역에서 채집된 해면동물 *Halichondria okadai*와 카리브해에서 채집된 *H. melandocia*에서 분리되었다. Schmitz와 Gopichand는 암세포에 대한 세포독성을 추적한 결과 okadaic acid를 분리하였고 Tsukitani와 Kikuchi는 mice에 대한 독성을 추적한 결과 okadaic acid를 분리하였다. Okadaic acid는 P388과 L1210에 대하여 ED₅₀가 각각 0.0017 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.017 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에 달했고 KB cell은 okadaic acid에 의하여 0.0025 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 30 % 이상 억제되었으며 0.005 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 80 % 이상 억제되었다. Mice에 대해서는 0.12 mg/kg 이상의 농도에서 독성이 나타났으며 (LD₅₀ 0.192 mg/kg) 독성농도 이하에서는 *in vivo* P388 억제효과가 나타나지 않았다. Okadaic acid는 그후 해양에서 흔히 발견되는 dinoflagellate *Prorocentrum lima*의 독성성분임이 밝혀졌으며 scallop, mussel 등에 의한 diarrhetic shellfish poisoning의 원인물질로 밝혀졌다. Diarrhetic shellfish poisoning을 야기시키는 조개류에서의 okadaic acid의 출처는 dinoflagellate의 일종인 *Dinopysis acuminata*로 추정된다.

일본해역에서 채집된 해면동물 *Halichondria okadai*의 조추출물에서 강력한 *in vivo* B16 melanoma 억제효과가 관찰되어 Hirata 등은 600 kg의 시료를 채집하여 활성성분을 추적하였다. 그 결과 8종의 halichondrins를 분리하였다 (Hirata and Uemura, 1986). 이 중에서 halichondrin B는 B16 melanoma에서 IC₅₀가 0.093 ng/ml라는 경이적인 효과를 나타내었다. Halichondrin B를 *in vivo* B16 melanoma 및 P388 leukemia에 대하여 검색한 결과 T/C 가 각각 244 % (5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 및 323 % (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$)의 놀라운 효과를 나타내었다. 그리고 *in vivo* L1210 leukemia 에서는 T/C가 375 % (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$)에 달했다.

*H. okadai*에서 발견된 halichondrin의 진정한 생산주체는 무엇인지에 대해서는

아직도 궁금한 점이 많다. *H. okadai*의 채집장소에 따라 halichondrin의 함량에 변화가 많고 용매를 사용하여 시료를 추출할 때에도 분쇄된 시료로부터 halinchondrin이 아주 서서히 추출되는 점으로 미루어보아 해면동물에 들어있는 미생물이 생산주체가 아닌가 의심된다. 수종의 박테리아를 *H. okadai*로부터 분리 배양하였으나 아직 진정한 생산주체는 규명되지 않았다.

최근에는 Kishi group에 의하여 halichondrin B와 norhalichondrin B가 화학적으로 완전히 합성되어 (Aicher *et al.*, 1992) 앞으로 halichondrins의 연구 및 개발에 많은 진전이 있을 것으로 기대된다.

서인도제도에서 채집된 해면동물 *Phakellia carteri*의 조추출물에서 상당한 *in vitro* P388 암세포독성이 검출되었다 (ED_{50} 0.74 $\mu\text{g}/\text{ml}$). *In vitro* P388 검색에 의하여 활성성분을 추적한 결과 halichondrins와 유사한 구조를 가진 halistatin I이 분리되었다. Halistatin I은 *in vitro* P388에서 ED_{50} 가 4×10^{-4} $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에 달했으며 NCI에서의 60 cell line antitumor screening panel에서 평균 GI_{50} 가 7×10^{-10} M에 달하는 강력한 세포독성을 보였다. Halistatin I은 *in vivo* P388에서도 상당한 항종양 효과를 보여 T/C 330 % (40 $\mu\text{g}/\text{kg}$)을 나타내었다 (Pettit *et al.*, 1993).

Tedanolidide는 카리브해의 해면동물 *Tedania ignis*로부터 분리된 macrolide인데 보통의 macrolide와 다른점은 lactone ring이 탄소골격의 끝에서 이루어지지않고 중간에서 ring을 형성하고 있는것이다 (Schmitz *et al.*, 1984). Tedanolidide는 암세포독성이 매우 강력하여 ED_{50} 가 *in vitro* KB에서 0.00025 $\mu\text{g}/\text{ml}$, P388에서 0.000016 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에 달했다. 하지만 *in vivo*에서의 항종양검사 결과는 다소 실망적이었다. Tedanolidide의 쥐에 대한 독성은 12~14 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이었으며 *in vivo* P388에서 T/C가 1.56 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 에서 123 %이었다. Tedanolidide는 M5 (난소암)에 대해서는 전혀 효과가 없었다.

일본에서 채집된 *Theonella* sp.의 해면동물의 추출물이 starfish egg assay 및 세포독성 검색에서 상당한 활성이 검출되었다. 생리활성 추적결과 misakinolide A

가 분리되었는데 (Sakai *et al.*, 1986, Kato *et al.*, 1987) *in vitro* P388, HCT-8, A549, MDA-MB-231 (human breast adenocarcinoma)에 대해서 IC₅₀가 각각 10, 4, 4, 0.5 ng/ml의 강력한 수준이었다. 그리고 *Candida albicans*에 대하여 항진균 효과가 있어 MIC 가 5 µg/ml였다. *In vivo* P388 에서는 T/C가 145 % (0.5 mg/kg) 에 달했다.

인도양에서 채집된 해면동물 *Spongia* sp.를 *in vitro* P388 leukemia로 생리활성을 추적한 결과 spongistatins를 분리하였다 (Pettit *et al.*, 1993). Spongistatins의 시료내 함량은 매우 낮아서 400 kg의 *Spongia* sp.로부터 4.34 mg 의 spongistatin 2를 얻었다. Spongistatins는 새로운 형태의 macrolide 로서 매우 강력한 *in vitro* 항암효과를 나타내었다. NCI의 60 human tumor cell line 에서 수종의 암세포에서 GI₅₀가 2.5~3.5 x 10⁻¹¹ M 에 달하는 강력한 항암효과를 나타내었다. Spongistatin I 에 대해서는 인체암세포를 athymic mouse에 이식하여 *in vivo* 항암효과를 NCI에서 실험중에 있다.

해면에서 quinones 혹은 hydroquinones, sesquiterpenes가 결합된 mixed biosynthetic products를 발견하는 것은 그리 흔하지 않으나 이 물질들은 다양한 약리작용을 하기 때문에 아주 중요하다. *Dysidea avara*로부터 추출된 avarol은 이제 열에 속하는 물질로서는 최초로 발견된 것이다. *Trans*-fused decalin type의 ring junction을 포함하는 drimane골격을 가진 이 물질은 대응하는 quinone유도체인 avarone과 함께 분리되었다. Avarol은 섬계의 수정란에 대한 활성을 나타내며 mouse L5178y lymphoma cell line에 대한 세포독성을 보여주었다. 이들은 또한 HIV등 바이러스에 대한 강한활성을 나타내어 많은 주목을 받았다.

Avarol 및 avarone과 유사한 sesquiterpene hydroquinone 및 quinone인 arenarol과 arenarone이 태평양에서 채집된 *Dysidea arenaria*로부터 분리되었다. Arenarol의 구조는 대응하는 diacetate 유도체의 X선 결정구조 분석에 의하여 결정되었다. 이들은 모두 세포독성을 나타내었는데 quinone인 arenarone이 대응하는

hydroquinone, arenarol보다 10배 정도 세포독성이 강하였다. 유사한 물질인 isospongiaquinone이 Australia에서 채집된 *Fasciospongia rimosa*로부터 분리되었다. 이 물질은 polyoma virus에 감염된 PV₄ cultured cells에 세포독성을 보였으며 이 물질과 dihydro 유도체는 알려진 해양천연물중 산화적 인산화 과정(oxidative phosphorylation)에 대한 가장 강력한 저해 효과를 가진 것으로 보고되었다.

*Hippospongia metachromia*로부터 분리된 ilimaquinone의 구조는 X선 결정구조 분석에 의하여 결정되었으나 이 물질이 화학반응에 의하여 다른 물질로 변환되었기 때문에 이것의 절대배열은 수정되었다. 이 물질을 산화시킬 경우에 생성된 물질에 관해 발표된 연구결과는 틀린 것으로 밝혀 졌다. 최근에 ilimaquinone은 HIV 바이러스에 대한 억제효과가 매우 크며 작용기작도 다른 항HIV제와는 다르다는 사실이 밝혀졌다.

Okinawa에서 채집한 *Hippospongia cf. metachromia*의 시료로부터 2개의 새로운 prenylated quinone들인 metachromins A와 B가 분리되었다. 이 물질들의 구조는 분광 데이터에 의해서 결정되었다. 또 이 물질들은 L1210 백혈병 세포(leukaemia cell)에 대해서 활성도를 보일 뿐만 아니라 강력한 혈관이완 작용(coronary vasodilating activity)을 한다.

Aerophysinin-I은 *Aplysina aerophoba*, *A. cavernicola*, *A. archeri*, *Pseudoceratina crassa*, *Verongula rigida*, *Psammaphysilla purpurea* 등에서 분리된 bromotyrosine 유도체이다. Bromotyrosine 유도체는 *Aplysinidae*와 *Aplysinellidea*과의 (Verongida목) 거의 모든 해면동물에서 발견된다. 브라질의 *Aplysina sp.* 에서만이 bromotyrosine 유도체가 발견되지 않은 유일한 예이다. Aerophysinin-I은 KB, HL-5, HS-5 cell에 대하여 세포독성을 나타내었으며 *in vivo* L1210 에서 항암효과를 나타내었으나 그 유효농도는 보고되지 않았다 (Minale *et al.*, 1976).

Aplysinopsin은 해면동물 *Aplysinopsis sp.*와 *Smenospongia echina*에서 처음

분리된 tryptophan 유도체이다 (Hollenbeak and Schmitz, 1977). 이들 해면동물의 추출물에서 상당한 *in vivo* P388 항암효과가 검출되어 (T/C 135 % at 0.2 mg/kg) 그 활성성분을 추적한 결과 aplysinopsin이 분리되었다. Aplysinopsin은 *in vitro* KB, P388, 그리고 L1210에 대해서는 활성이 있었으나 (ED₅₀ 0.87 µg/ml, 3.8 µg/ml, 3.7 µg/ml) *in vivo* P388이나 *in vivo* B16 melanoma에서는 별효과가 나타나지 않았다.

해면동물 *Aplysina archeri*로부터 bromotyrosine 계열의 fistularin 3와 11-ketofistularin 3가 분리되었다. 이들은 feline leukemia virus에 대하여 각각 ED₅₀ 22 µM, 42 µM를 나타내었다. 이들의 항바이러스 효과는 AZT (3' -azido-3' -deoxythymidine) 보다는 못하고 2' ,3' -dideoxy cytidine (ddCyd)와 유사한 정도이나 세포독성이 낮아 전망이 있는 물질이다.

New Zealand에서 채집된 해면동물 *Latrunculia sp.*에서 강력한 세포독성을 나타내어 구조적으로도 흥미가 있는 dibromotyrosine 유도체 discorhabdin이 분리되었다 (Perry *et al.*, 1986). Discorhabdin은 *in vitro* P388에서 ED₅₀가 0.03 µg/ml였다. 종래에 bromotyrosine 유도체는 Verongida목에 속하는 해면동물에서만 발견되었다. Discorhabdin은 일반적인 bromotyrosine 유도체와 달리 좀 복잡한 bromotyrosine 유도체 이기는하나 여태까지 Verongida 이외의 해면동물에서 bromotyrosine 유도체가 발견된 유일한 예이다.

지중해에 서식하는 해면 *Topsentia genitrix*로부터 3개의 bisindole계 alkaloids인 Tosentin-A, -B1과 -B2가 분리되었다. 이들은 모두 항암, 항바이러스 효과를 나타내었다. 최근 topsentins이 decarbonylation되어 형성한 것으로 추측되는 nortopsentins가 카리브해의 해면 *Spongosorites*와 *Halichondria*로부터 분리되었다. 이들은 비록 항바이러스 효과는 없으나 강력한 항암효과로 인하여 물질특허를 획득하였다(Sun, *et al.* 1991).

지중해에서 채집된 해면동물 *Crambe crambe*로부터 HSV-1과 L1210 murine

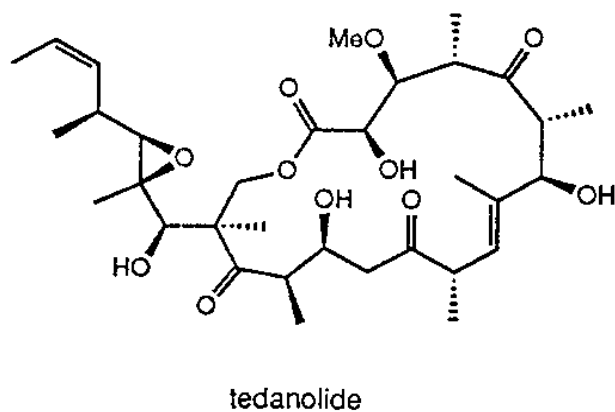
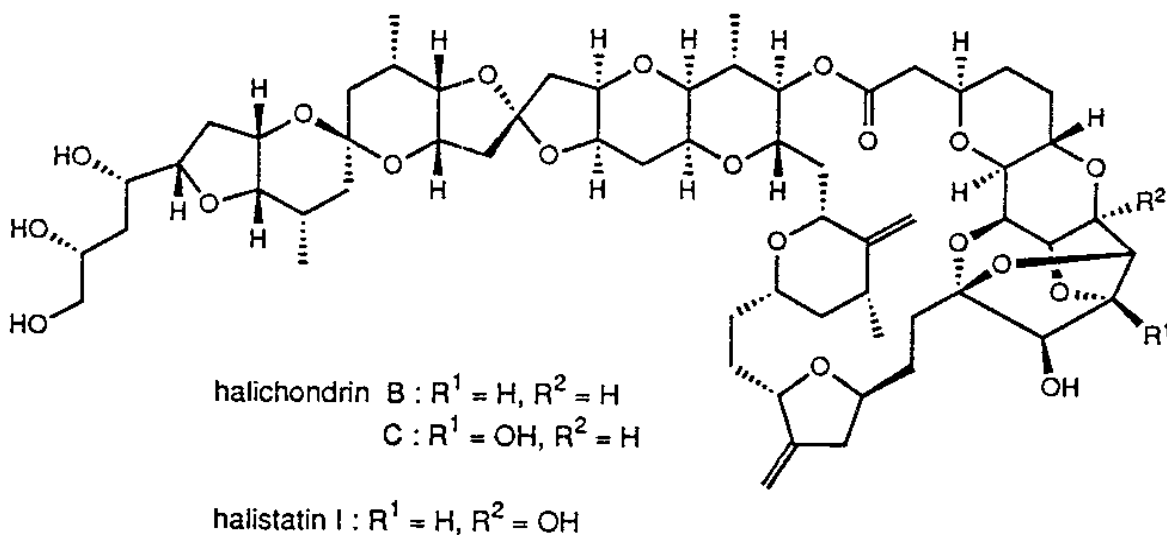
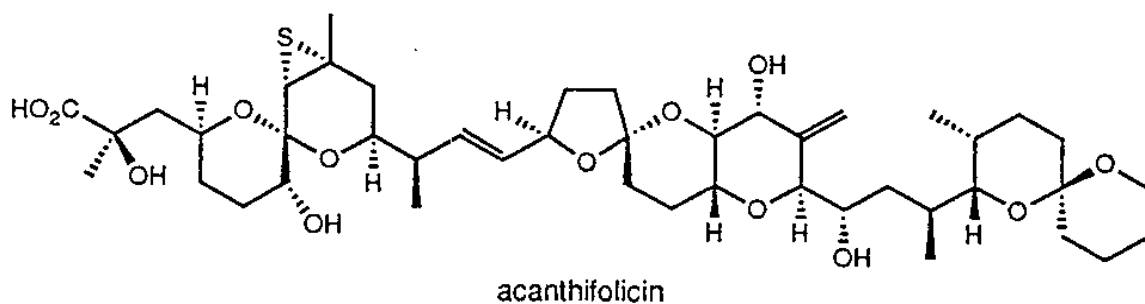
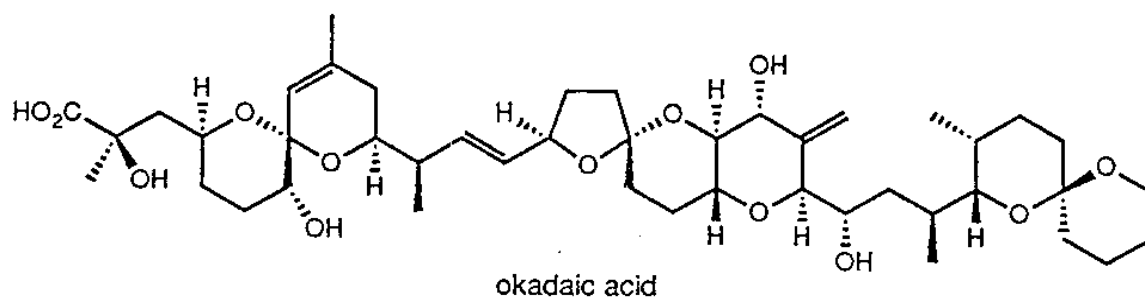
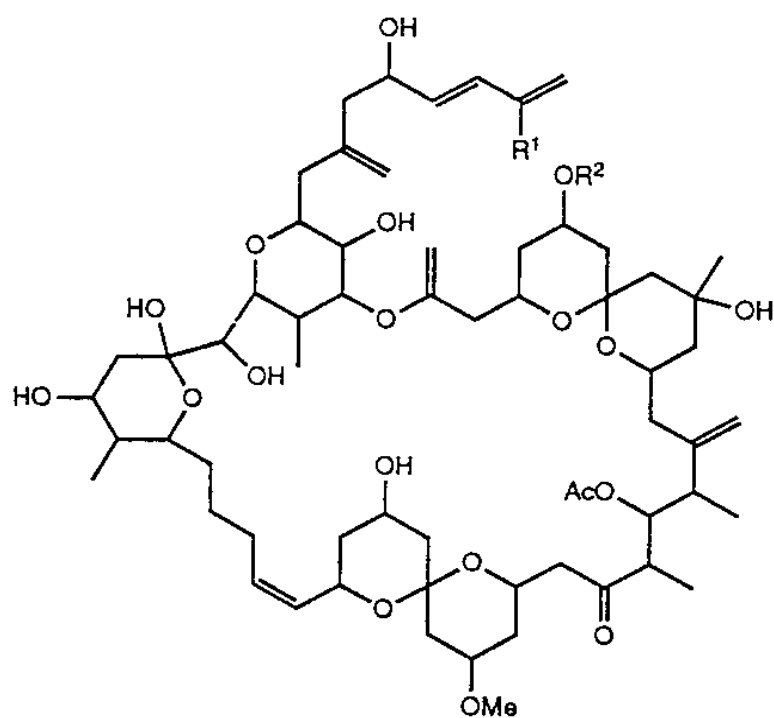
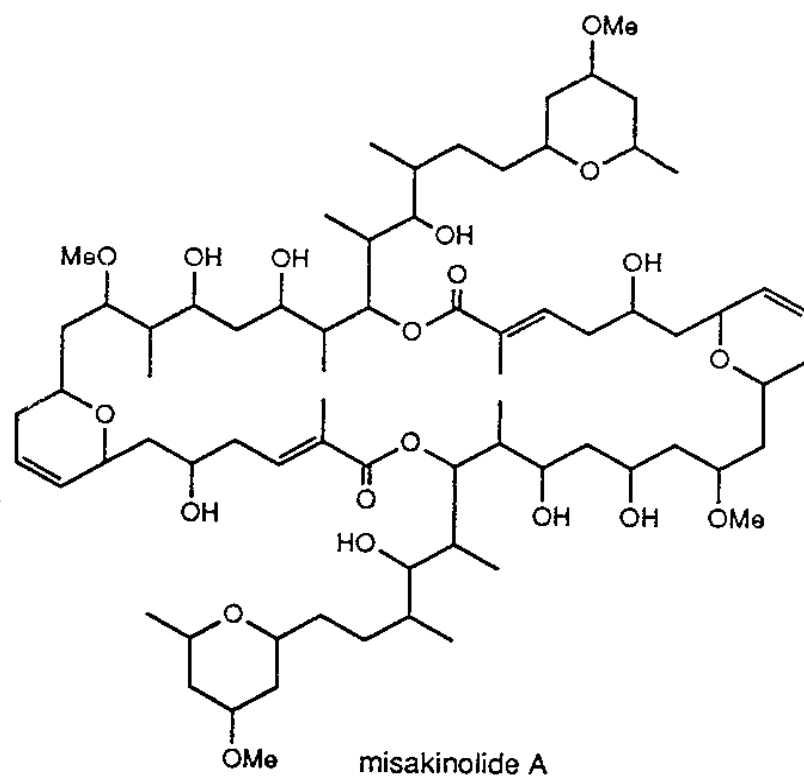
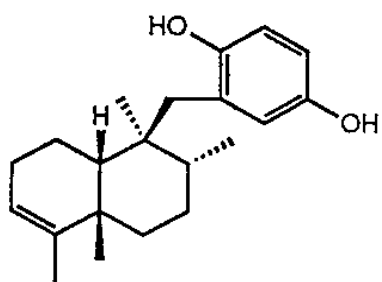


Fig. 6-2. Cytotoxic and antiviral compounds isolated from sponges.

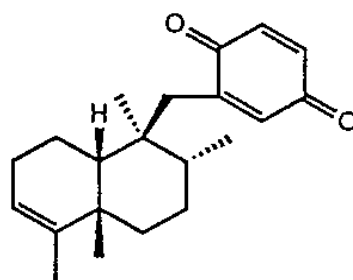


spongistatin 1 : $R^1 = Cl, R^2 = Ac$
 2 : $R^1 = H, R^2 = Ac$
 3 : $R^1 = Cl, R^2 = H$

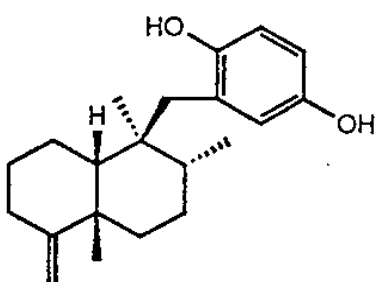
Fig. 6-2. continued.



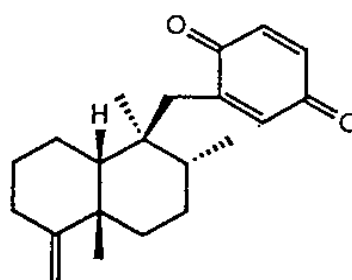
avarol



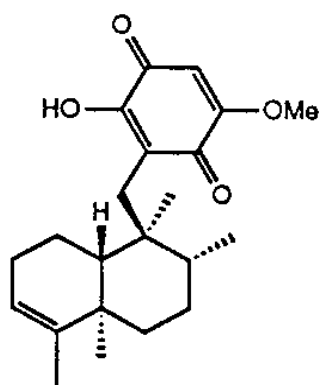
avarone



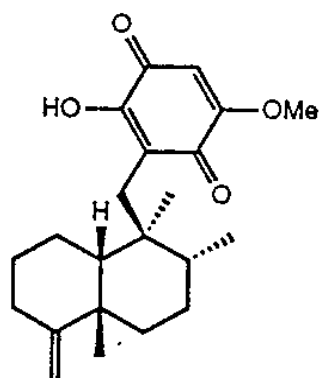
arenarol



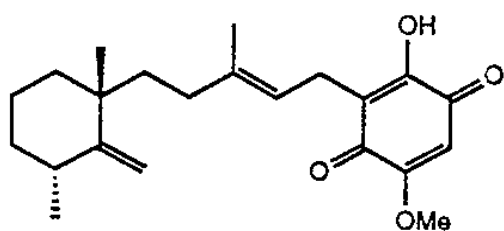
arenarone



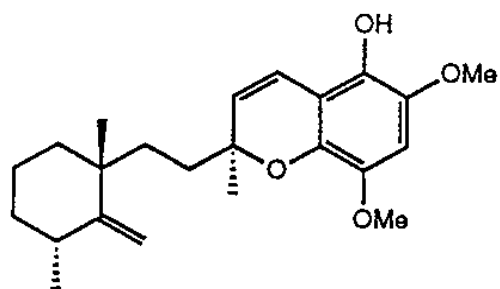
isospongiaquinone



ilimaquinone

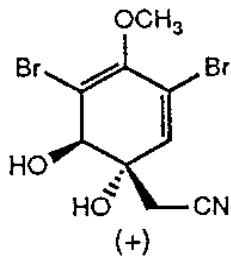


metachromin A

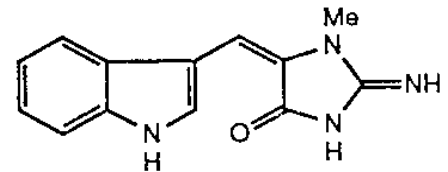
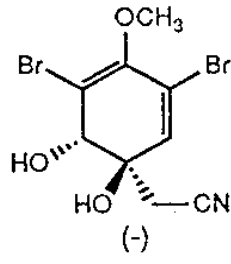


metachromin B

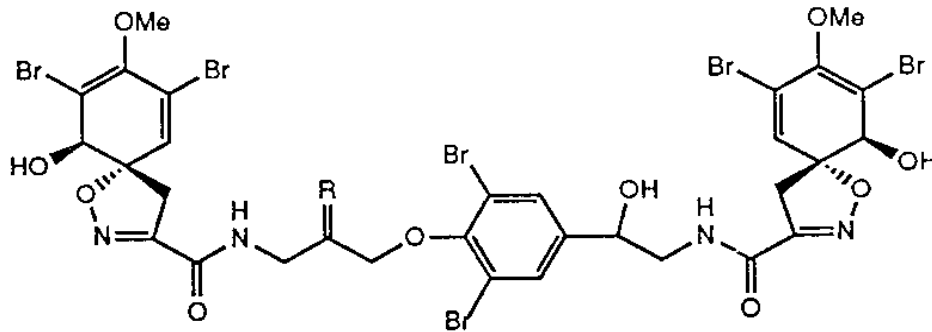
Fig. 6-2. continued.



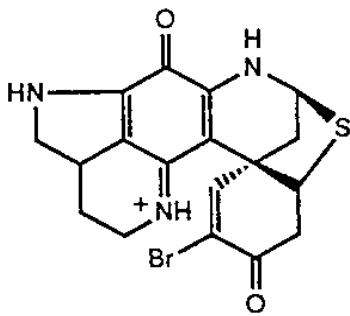
aeropylsinin-1



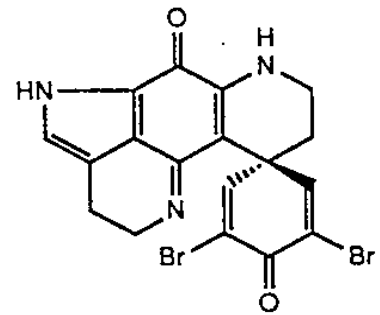
aplysinopsin



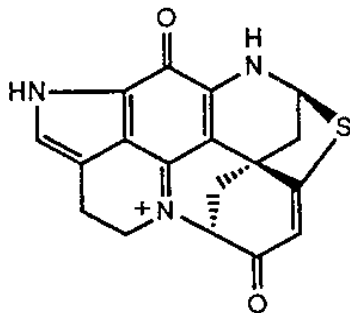
fistularin 3 (R = H, OH) and 11-ketofistularin 3 (R = O)



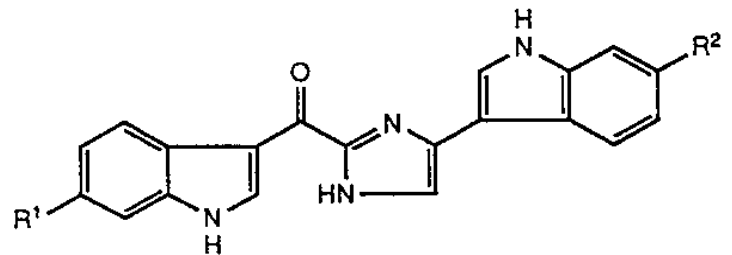
discorhabdin A



discorhabdin C

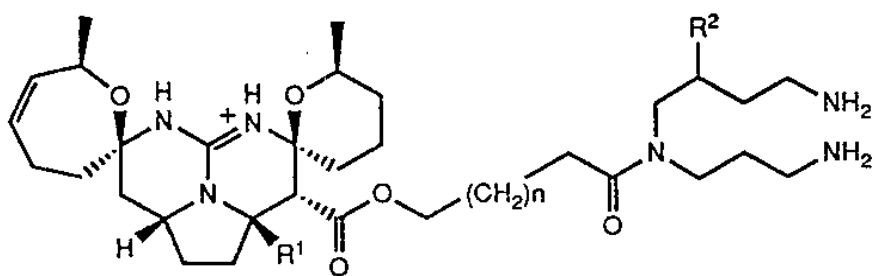


discorhabdin D



topsentin-A : R¹ = R² = H
 -B1 : R¹ = OH, R² = H
 -B2 : R¹ = OH, R² = Br

Fig. 6-2. continued.

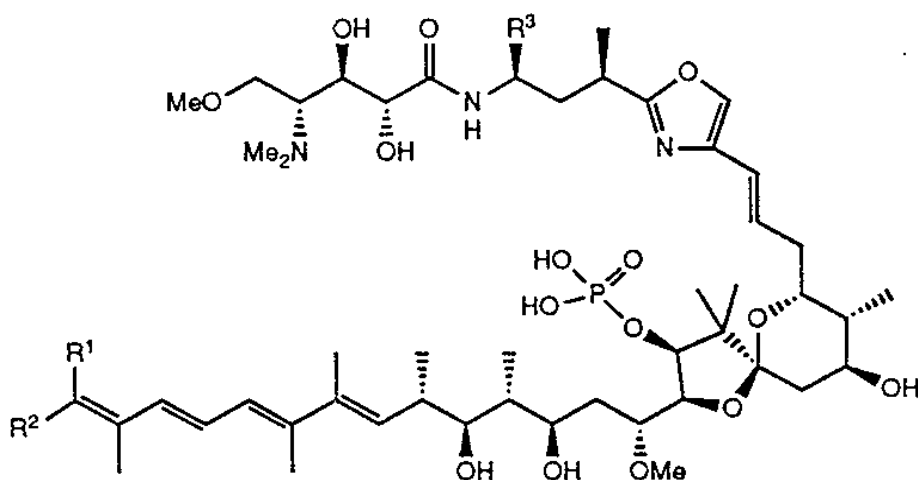


crambescidin 816 : $R^1 = R^2 = \text{OH}$, $n = 13$

830 : $R^1 = R^2 = \text{OH}$, $n = 14$

844 : $R^1 = R^2 = \text{OH}$, $n = 15$

800 : $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{OH}$, $n = 13$

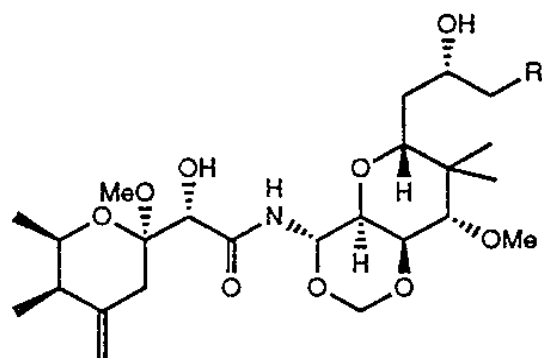


calyculin A : $R^1 = \text{CN}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{H}$

B : $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{CN}$, $R^3 = \text{H}$

C : $R^1 = \text{CN}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{Me}$

D : $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{CN}$, $R^3 = \text{Me}$



mycalamide A : $R = \text{OH}$

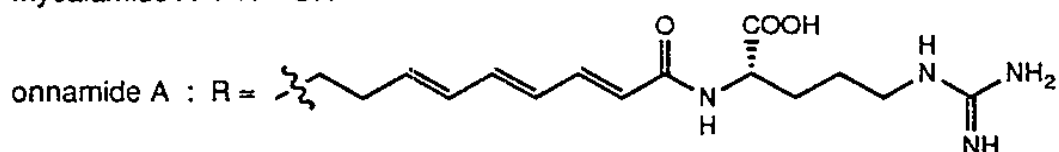


Fig. 6-2. continued.

leukemia에 대한 억제효과가 관찰되어 활성물질을 분리한 결과 crambescidins 816, 830, 844, 800이 얻어졌다. Crambescidins 816, 844, 800은 1.25 $\mu\text{g}/\text{well}$ 의 농도에서 HSV-1을 완전히 억제하였다 (Jares-Erijman *et al.*, 1991).

일본해역의 해면동물 *Discodermia calyx* 에서 분리된 calyculin A는 starfish egg assay에 의해 발견되었다 (Kato *et al.*, 1986). *In vitro* L1210 에 대해서는 LD₅₀가 1.75 ng/ml 로 강력한 효과를 나타내었다. *In vivo* 에서는 Ehrlich ascite와 P388 leukemia 에서 T/C가 각각 245.8 %와 144.4% (15 $\mu\text{g}/\text{kg}$)을 나타내었다. Calyculin A는 [³H] thymidine, -uridine, -leucine의 L1210 세포내 흡수를 억제하는 것으로 밝혀졌다. Calyculins B-D도 L1210에서 calyculin A와 비슷한 정도의 세포독성을 나타내었다

일본해역에서 채집된 해면동물 *Theonella* sp. 에서 VSV (Vesicular Stomatitis Virus), HSV-1, A-59에 대하여 강한 항바이러스 효과가 검출되어 활성물질을 추적한 결과 onnamide A를 분리하였다 (Sakemi *et al.*, 1988). New Zealand에서 채집된 해면동물 *Mycale* sp.에서 분리된 mycalamide A는 Onnamide A와 유사한 구조를 보유하고 있었으며 *in vitro*에서 항바이러스 효과를 나타내었다 (Perry *et al.*, 1986)

6. 3. *Pachastrella* sp. 와 *Jaspis* sp.의 천연물

본 실험실에서는 1차적으로 우리나라 근해 (제주도 및 거문도 해역)에서 20여 종의 해면동물들을 채집하여 조추출물 상태에서 brine shrimp에 대한 독성을 검사하였다. 본 실험실에서는 암세포독성 (항암효과의 지표)의 지표로서 brine shrimp에 대한 독성을 관찰한다. Brine shrimp에 대한 독성과 암세포 독성과의 밀접한 상관관계는 이미 보고된 바가 있다 (Meyer *et al.*, 1982). Brine shrimp 독성검색 결과는 Table 6-1에 정리하였다.

Table 6.1. Brine shrimp lethality of various sponges collected from the South Sea of Korea.

classification	code number	LC ₅₀ (µg/ml)
<i>Stronglyphora corticata</i>	917-1	956
<i>Spirastrella insignis</i>	917-2	>1000
<i>Spirastrella abata</i>	917-3	589
<i>Callyspongia conforderata</i>	917-4	>1000
<i>Suberites sp.</i>	917-5	>1000
<i>Cliona celata</i>	917-6	521
<i>Reniera sp.</i>	91K-10	12
unidentified	91K-13	632
<i>Paspailia hirsuta</i>	91K-16	>1000
<i>Pachastrella cribruna</i>	91K-17	1748
<i>Pachastrella sp. & Jaspissp.</i>	91K-19	61
<i>Asteropus simplex</i>	91K-22	>1000
<i>Myxilla productius</i>	91K-14	>1000
<i>Myxilla setoensis</i>	91K-15	>1000
<i>Ircinia sp.</i>	91K-25	125
<i>Stelletta sp.</i>	91K-26	>1000
unidentified	91K-27	297
unidentified	91K-29	>1000
<i>Jaspis sp.</i>	91K-31	>1000
<i>Phakellia sp.</i>	91K-33	>1000
unidentified	91K-34	637

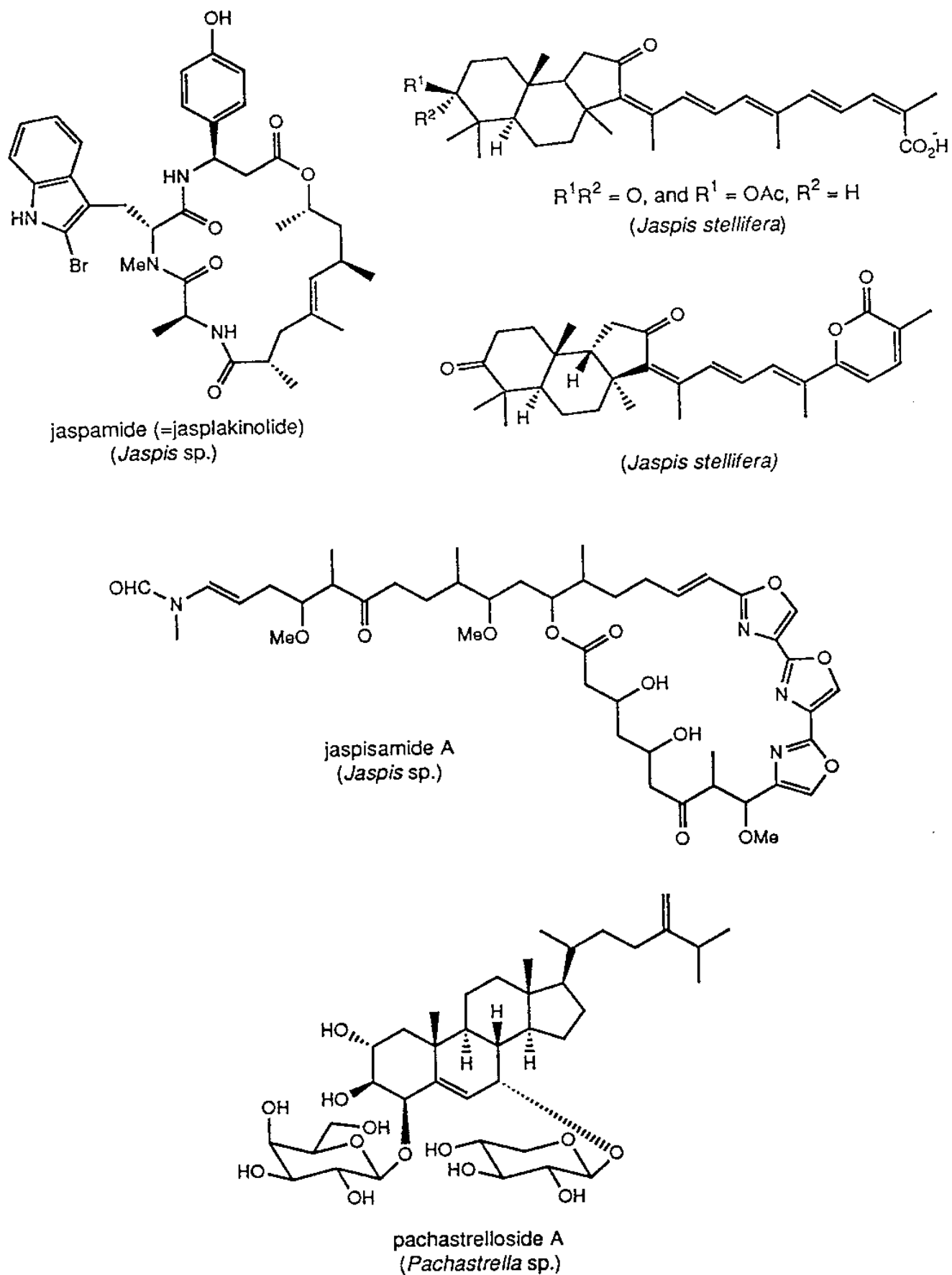


Fig. 6-3. Natural products isolated from sponges of the genera *Jaspis* and *Pachastrella*.

검색된 시료중 거문도 해역에서 채집된 시료 91K-19에서 상당한 독성이 관찰되어 (LC_{50} 61 $\mu\text{g/ml}$) 이 시료에 대하여 활성성분 분리작업에 착수하였다. 91K-19는 처음에 *Pachastrella* sp.로 분류되었으나 그 후에 다시 정밀 검사한 결과 *Pachastrella* sp.와 *Jaspis* sp.의 공생 혼합체임이 밝혀졌다. 91K-19의 절단단면을 관찰하면 2개의 서로 다른 층을 확연히 볼 수 있는데 바깥쪽의 엷은 회갈색내지는 노란색을 띄는 엷은 층의 *Pachastrella* sp.와 안쪽의 엷은 베이지색의 *Jaspis* sp.로 이루어져 있었다.

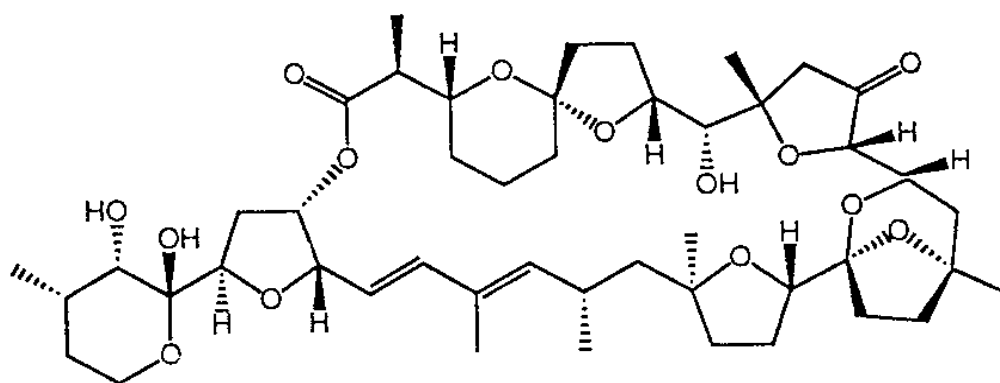
Jaspis sp.에 대한 성분연구는 비교적 많이 되어있어 항진균 성분 depsipeptide인 jasplakinolide (jaspamides) (Zabriskie *et al.*, 1986, Crews *et al.*, 1986), 항암성분 (iso)malabricane triterpenes (Tsuda *et al.*, 1991, Ravi *et al.*, 1981), 세포독성성분 macrolide계 jaspisamides (Kobayashi *et al.*, 1993) 등과 그외 sterols (stelliferasterol, jaspisterols, codisterol, crinosterol) 등이 보고 되어 있다(Fig. 6-3).

반면에 *Pachastrella* sp.에 대한 성분연구는 별로 되어 있지 않아서 saponin계 열의 pachastrelloside A (Hirota, 1990), 그리고 항바이러스성 sesquiterpene류 (Rinehart, 1990)가 보고되어 있을뿐이다.

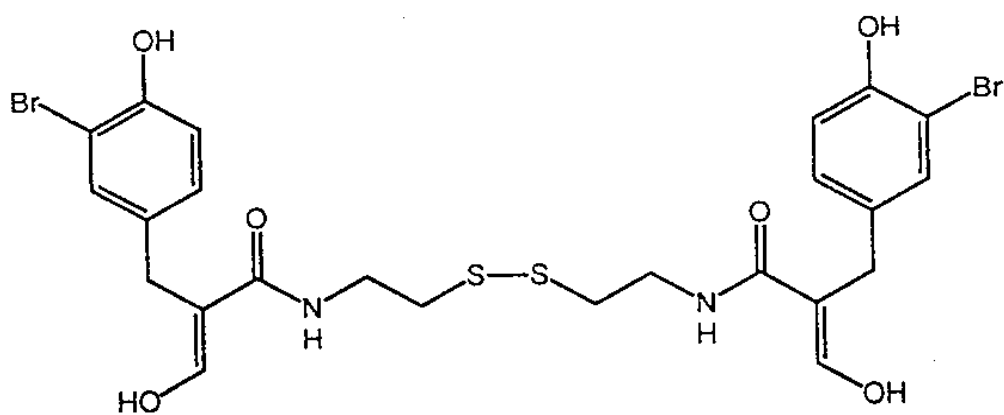
91K-19로부터 순수한 생리활성 성분을 분리하는 전과정에서 brine shrimp assay를 채용하여 각 단계마다 brine shrimp에 대한 독성정도를 측정하여 생리활성 성분을 추적하였다. 자세한 분리과정은 6.5.실험방법에 요약하였으며 91K-19-1 ~ -3등 3개의 천연물을 분리하였다(Fig. 6-4).

6. 3. 1. 91K-19-1(pectenotoxin II)의 동정

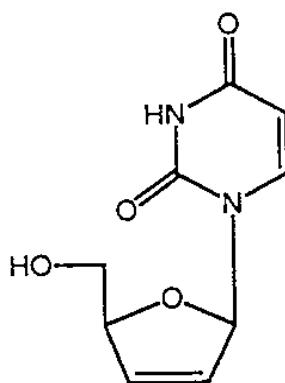
물질 91K-19-1은 유기용매에 상당히 잘 녹으며 실온에서도 대체적으로 안정한 편이었다. 물질의 NMR spectrum을 분석하기 위하여 chloroform-d, acetone-d₆, methanol-d₄ 등의 용매에서 각각 NMR을 찍어본 결과 acetone-d₆에서 peaks의 분



91K-19-1 (pectenotoxin II)



91K-19-2 (psammaplin A)



91K-19-3 (2',3'-didehydro-2',3'-dideoxyuridine)

Fig. 6-4. Structures of natural products isolated from the sponge sample 91K-19.

리가 가장 좋았다.

우선 ^1H NMR spectrum을 보면 6.5 ppm에서 1.0 ppm에 걸쳐 signal들이 고르게 분포되어 많은 functional group 들이 분자내에 존재함을 알 수 있었으며 흡사 macrolide의 ^1H NMR spectral pattern을 연상시키게 하였다(Fig. 6-6). ^{13}C NMR spectrum에서는 총 47개의 carbon signal이 확인되어 일단 상당한 분자량이 되는 물질로 추정되었다(Fig. 6-7).

91K-19-1의 ^{13}C NMR spectrum에서 특징적인 것은 109.7, 107.8, 97.8 ppm에서 3개의 quaternary carbon 들이 관측된 것이다. 83.2 ppm ~ 60.9 ppm 부근의 10개의 oxygenated carbon signal들과 연관지어 생각해 볼때 compound 1은 polycyclic ether type의 macrolide계 물질임을 짐작할 수 있었고 단지 3개의 Hydroxy signal 만이 ^1H NMR에서 나타난 것도 이 추측을 뒷받침하였다. 4.69 ppm ~ 3.31 ppm에 나타나는 proton signal 중에서 11개의 signal이 83.2 ppm ~ 60.9 ppm의 10개의 oxygenated carbon과 correlatin을 보였다 ($\text{CH} \times 9, \text{CH}_2 \times 1$). 2.26 ppm ~ 1.48 ppm 부근의 proton signal 들은 상당히 겹쳐있어 해석이 까다로웠다. 모두 7개의 methyl signal이 확인되었으며 이 중 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. 이상의 data와 COSY, TOCSY 실험에 근거하여 모두 6개의 부분구조를 확인할 수 있었다.

이러한 부분구조에 근거하여 문헌조사를 해본 결과 이미 알려진 물질 petenotoxin II의 구조와 상당히 일치함을 알 수 있었다. 원래 petenotoxin II는 조개독 중독현상 (Diarrhetic Shellfish Poisoning)의 원인물질로 규명되어 X-ray crystallography에 의해 그 구조가 밝혀진 바 있다 (Yasumoto *et al.*, 1985, Murata *et al.*, 1986).

보고된 pectenotoxin II의 ^{13}C NMR data와 91K-19-1의 ^{13}C NMR data를 비교한 결과 거의 일치함을 볼 수 있었다. 91K-19-1의 FABMS를 측정된 결과 m/z

881.8에서 $[MNa^+]$ 이온과 m/z 859.0에서 $[MH^+]$ 이온이 확인되어 pectenotoxin II와 동일물질임을 확인하였다(Fig. 6-8).

보고된 논문에 의하면 pectenotoxin II의 1H 및 ^{13}C NMR data가 완전히 assign 되어있지 않으므로 이를 시도하였다. Pectenotoxin II의 1H 및 ^{13}C NMR spectra는 매우 복잡하여 완전한 assignment가 쉽지 않았다. TOCSY, HETCOR, Long-range HETCOR, Homonuclear J-resolved 2D experiments 등을 이용하여 완전한 assignment를 시도하였다. Tetrahydrofuran ring과 tetrahydropyran ring을 제외한 pectenotoxin II 분자의 대부분의 탄소골격은 1H COSY, HETCOR, 그리고 TOCSY data에 근거하여 쉽게 assign 되었다(Fig. 6-9, 6-10). 문제는 tetrahydrofuran ring과 tetrahydropyran ring의 methylene proton 들이 좁은 영역에 밀집하여 중첩되어 있는데 있었다. 중첩된 각각의 methylene proton의 splitting pattern과 coupling constants 및 chemical shift는 Homonuclear J-resolved 2D experiment에 의존하여 분석했다.

Quaternary carbon에 부착된 4개의 methyl group (C-42, C-43, C-44, 및 C-46)은 각각의 methyl protons의 H-13, H-17, H-26, H-28 과의 long-range coupling을 long-range HETCOR 실험에서 관찰하여 assign 하였다(Fig. 6-11). Ketal과 hemiketal을 이루고 있는 quaternary carbons C-21과 C-36은 H-20/H-22 및 H-40과의 long-range coupling에 의하여 assign 되었다. 3개의 oxygenated quaternary carbons C-12, C-18, C-25도 같은 방법으로 assign 되었다. C-12는 H-42, H-11 및 11-OH와 correlation을 나타내었으며 C-18은 H-43, H-17, H-17' 와 correlation을 보였다. C-25는 H-44, H-28과 correlation을 보였다. H-2, H-4, H-5, H-8, H-9, H-19, H-20, H-23, H-24, H-26 및 H-34 등의 중첩되는 proton signal은 Homonuclear J-resolved 2D experiment에 의해 chemical shift와 coupling constant를 측정하였다(Fig. 6-12). 11-OH와 37-OH는 H-11, 11-37과 correlation을 보였다. Methyl carbon C-42와 C-44는 $CDCl_3$ 에서 더 잘 분리되어 assign이 되었

Table 6.2. ^1H - and ^{13}C -nmr assignments of pectenotoxin II

position	^{13}C (125 Hz) ^a	^1H (500 MHz) ^a	long-range ^{13}C - ^1H correlation	^{13}C (125 MHz) ^b	^1H (500MHz) ^b
1	172.6 <i>s</i>		H-41	172.5	
2	48.7 <i>d</i>	2.24 dd (9.2, 7.0)		47.7	
3	76.6 <i>d</i>	3.45 ddd (11.0, 9.2, 2.2)		75.7	3.39
4	30.2 <i>t</i>	1.12 dd (3.9, 11.0); 1.49 dd (10.9, 2.2)		29.2	
5	22.3 <i>t</i>	1.79 dd (10.9, 3.9); 1.51 dd (13.0, 9.7)		21.8	
6	34.7 <i>t</i>	1.61 m		34.0	
7	107.8 <i>s</i>			107.0	
8	33.1 <i>t</i>	2.46 dd (12.7, 7.0); 1.50 dd (12.7, 5.1)		32.4	
9	22.5 <i>t</i>	2.05 m; 1.66 m		21.9	
10	81.3 <i>d</i>	4.27 ddd (8.3, 6.0, 1.3)		80.1	4.22
11	75.7 <i>d</i>	3.96 d (1.3)		74.4	4.20
12	81.9 <i>s</i>		H-42; H-11; 11-OH	81.6	
13	44.4 <i>t</i>	2.88 d (16.2); 1.92 d (16.2)		43.6	2.95, 1.91
14	213.5 <i>s</i>			212.6	
15	79.8 <i>d</i>	3.74 d (1.8)		78.8	3.72
16	71.6 <i>d</i>	4.19 ddd (12.5, 3.5, 1.8)		70.8	4.22
17	36.6 <i>t</i>	2.01 dd (3.9, 3.5); 1.28 dd (12.5, 3.9)		35.8	
18	80.4 <i>s</i>		H-17; H-17'; H-43	80.1	
19	28.8 <i>t</i>	2.21 dd (13.0, 8.2); 1.86 m		28.0	
20	34.2 <i>t</i>	1.88 m; 1.58 dd (10.0, 1.4)		33.5	
21	109.7 <i>s</i>		H-20; H-22	109.2	
22	79.7 <i>d</i>	3.81 dd (9.6, 5.2)		78.5	
23	29.9 <i>t</i>	2.02 ^c ; 1.61 t (11.0)		29.2	
24	37.9 <i>t</i>	1.39 dd (5.3, 2.5); 1.57 dd (11.0, 5.3)		37.1	
25	84.5 <i>s</i>		H-26; H-44	84.3	
26	50.9 <i>t</i>	1.64 dd (13.5, 4.9); 1.55 dd (12.3, 11.0)		50.0	
27	30.9 <i>d</i>	2.60 m		30.3	2.49
28	140.8 <i>d</i>	5.30 d (10.0)		141.1	5.29
29	130.9 <i>s</i>		H-46	129.7	
30	135.3 <i>d</i>	6.38 dt (15.7, 1.8)		135.5	6.46
31	122.2 <i>d</i>	5.38 dd (15.7, 3.0)		119.5	5.35
32	83.2 <i>d</i>	4.69 q (3.0)		83.2	4.76
33	74.9 <i>d</i>	5.43 t (3.0)		73.6	5.50
34	33.9 <i>t</i>	2.23 ddd (13.0, 10.5, 3.0); 2.13 ddd (13.0, 6.0, 1.5)		33.3	
35	82.6 <i>d</i>	4.46 dd (10.5, 6.0)		81.6	4.50
36	97.8 <i>s</i>		H-40	96.9	
37	71.4 <i>d</i>	3.30 dd (8.0, 1.7)		71.1	3.40
38	30.3 <i>d</i>	2.07 m		29.2	
39	27.9 <i>t</i>	1.20 m; 1.63 m		26.9	
40	60.9 <i>t</i>	3.96 ddd (13.1, 10.9, 2.5); 3.56 dd (10.9, 4.4)		60.8	4.00, 3.76
41	15.5 <i>q</i>	1.08 d (7.0)		14.8	1.07
42	23.3 <i>q</i>	1.17 s		23.3	1.20
43	26.3 <i>q</i>	1.26 s		25.9	1.40
44	26.8 <i>q</i>	1.16 s		26.3	1.16
45	23.7 <i>q</i>	0.96 d (6.6)		23.4	0.92
46	12.6 <i>q</i>	1.70 s		12.4	1.68
47	17.9 <i>q</i>	0.93 d (7.0)		17.3	1.01
11-OH		3.32 s			
36-OH		4.33 brs			
37-OH		3.49 d (8.0)			

a: Chemical shifts were reported relative to the residual solvent peaks in acetone- d_6 (2.04 ppm, 29.8 ppm)

b: Chemical shifts were reported relative to the residual solvent peaks in CDCl_3 (7.26 ppm, 77 ppm)

c: Coupling constants for this signal were not measured due to overlapping with solvent peak.

다. 이상의 pectenotoxin II의 assignment는 Table 6-2에 정리하였다.

6. 3. 2. 91K-19-2(psammaphin A)의 동정

91K-19-2의 ^1H NMR spectrum은 매우 간단하였다(Fig. 6-13). 3개의 aromatic proton signal이 7.45, 7.13, 6.87 ppm에 각각 나타났으며 7.64 ppm에 나타나는 signal은 peak intensity가 시간이 지남에 따라 감소하였다. 이로 미루어 이 proton은 exchangeable proton으로 추정되었다.

이 물질의 ^{13}C NMR spectrum에서는 총 11개의 carbon signal이 관찰되었다(Fig. 6-13). Coupling constant 8.5 Hz의 (ortho coupling) 2개의 proton과 coupling constant 2.0 Hz의 (meta coupling) 1개의 proton이 관찰되므로 trisubstituted aromatic ring의 존재를 ^1H NMR에서 짐작할 수 있었다.

3.82 ppm에 singlet으로 나타나는 2개의 protons이 TOCSY spectrum에서 3개의 aromatic proton과 모두 correlation을 보였다(Fig. 6-14). 그러므로 3.82 ppm의 proton은 aromatic ring에 연결된 methylene group이 확실했다. 3.55 ppm (quartet, 7.0 Hz)과 2.87 (triplet, 7.0 Hz)에 나타나는 각각 2개씩의 proton은 서로 couple 되어 있었으며 각각은 다시 TOCSY spectrum에서 7.64 ppm의 proton과 correlation을 나타내었다. 7.64 ppm의 proton은 OH나 NH와 같은 exchangeable proton인데 이와 correlation을 나타내는 3.55 ppm의 proton이 HETCOR에서 39.1 ppm의 carbon과 correlation을 나타내었다. 그러므로 39.1 ppm의 carbon은 oxygen이 아닌 nitrogen에 연결된 것으로 보아야했다. 2.87 ppm의 proton은 HETCOR experiment에서 38.4 ppm의 carbon에 correlation을 보였으므로 38.4 ppm의 carbon 역시 oxygen이 아닌 heteroatom에 연결된 것을 알 수 있었다(Fig. 6-15).

Long-range HETCOR experiment에서 3.82 ppm의 proton과 carbonyl carbon (164.0 ppm) 및 153.3 ppm의 carbon과 correlation을 보였다(Fig. 6-15). 그러므로

이상의 결과를 종합하면 Fig. 6-5와 같은 부분구조를 추정할 수 있다. 이상과 같은 부분구조로 문헌조사를 한 결과 예전에 해면동물 *Psammaplysilla* sp.에서 발견된 psammaplin A의 구조와 거의 유사함을 알 수 있었다 (Quinoa and Crews, 1987). 보고된 NMR data가 compound 91K-19-2의 data와 일치하였으며 EIMS에서도 psammaplin A의 분자식과 일치하는 molecular ion cluster를 보여주었다(Fig. 6-16).

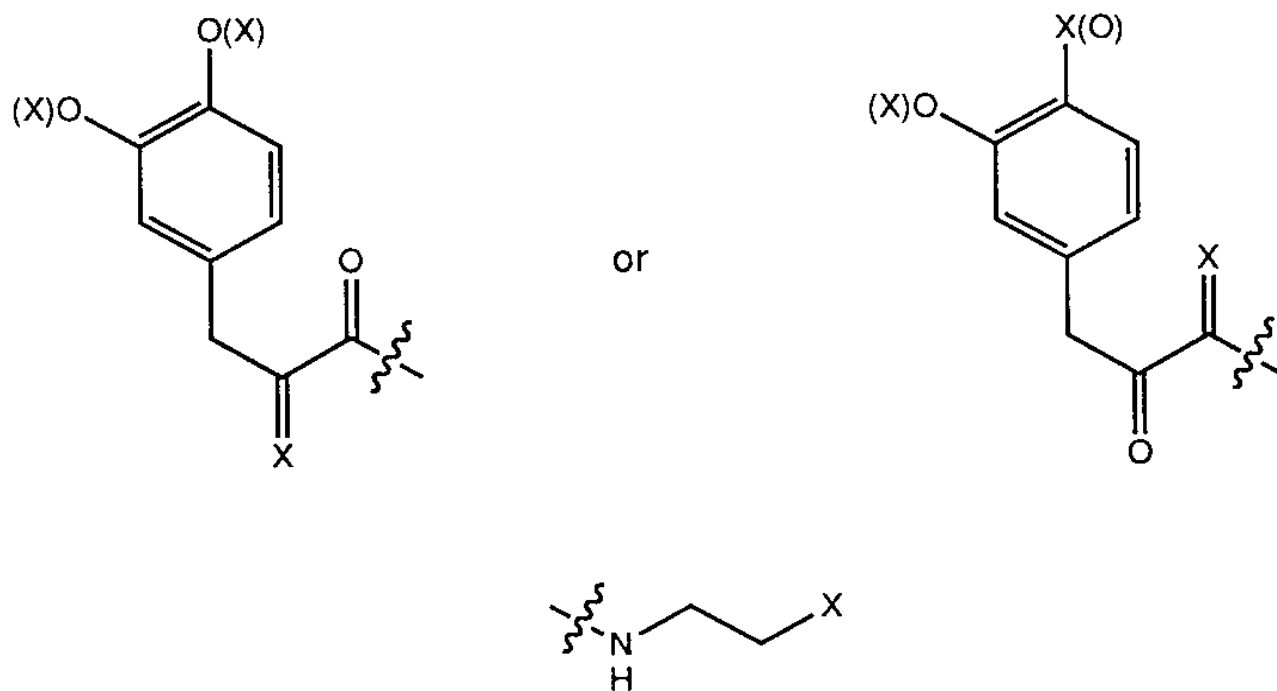
6. 3. 3. 91K-19-3(2',3'-didhydro-2',3'-dideoxyuridine)의 동정

물질 91K-19-3은 ^1H NMR spectrum에서 모든 proton들이 7.87~3.75 ppm 영역에서 나타나는 것이 특징적이었다(Fig. 6-17). 7.87 ppm (doublet, 8.3 Hz)과 5.52 ppm (doublet, 8.3 Hz)의 2개 proton이 couple하고 있었으며 6.92, 6.43, 5.94, 4.85, 3.78/3.75 ppm의 proton들이 순차적으로 coupling을 보였다.

^{13}C NMR spectrum에서는 총 9개의 carbon을 볼 수 있었으며 2개의 carbonyl carbons (166.3 ppm, 152.7 ppm)가 나타났다(Fig. 6-17). ^1H NMR, ^{13}C NMR, ^1H COSY, HETCOR spectra 의 전체적인 pattern이 nucleoside 류의 pattern과 흡사하였는데 다만 ribose ring의 2', -3' -proton과 carbon으로 추정되는 signal 들이 예외적으로 downfield (136.1 ppm, 127.1 ppm)에 나타나 unsaturation 된 형태임을 짐작할 수 있었다(Fig. 6-18). Nucleoside에 관한 문헌조사 결과 91K-19-3은 예전에 해면 *Aplysina* sp.에서 발견된 2', 3' -didehydro-2', 3' -dideoxyuridine과 동일 물질임을 알 수 있었다 (Kondo *et al.*, 1992).

6. 4. 생리활성 검색

본 시료의 성분분리는 brine shrimp assay에 근거하여 추적하였으므로 분리된



X = N, S or other heteroatom

Fig. 6-5. Partial structures of compound **91K-19-2**.

물질들에 대해서는 일단 암세포독성 (cytotoxicity)에 대하여 중점적으로 검색하였다. Brine shrimp toxicity와 세포독성과의 밀접한 상관관계는 이미 보고가 되어 있으며 본 보고서의 2.3.에서도 상세히 다루었다. 또한 세포독성을 나타내는 물질들은 항바이러스 작용을 수반하는 경우가 많으므로 항바이러스 작용에 대해서도 검색을 실시했다.

Pectenotoxin II와 부분적으로 구조가 유사한 halichondrins, okadaic acid 등의 암세포독성은 잘 알려진 사실이고 psammoplin A와 같은 bromotyrosine 계열물질인 fistularin 3, 11-ketofistularin 3에 대해서는 항바이러스 효과가 보고되어 있다. 그리고 2',3'-didehydro-2',3'-deoxyuridine과 같은 계열의 nucleoside인 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxycytidine (ddeCyd), 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidine (ddeThd)에 대해서는 항바이러스 효과가 많이 보고되어 있는 바이다.

6. 4. 1. Pectenotoxin II(91K-19-1)의 생리활성

Pectenotoxin II에 대해서는 1차적으로 3종류의 인체고형암에 대하여 *in vitro* 항암효과를 검색하였다. *In vitro* 항암효과 검색은 Purdue 대학 암센터에서 시행하였으며 인체결장암 (HT-29), 폐암 (A-549), 유방암 (MCF-7)과 같은 난치성 고형암세포에 대하여 억제효과를 측정하였다. 측정결과 이 3가지 암세포에 대하여 pectenotoxin II가 LC₅₀ 약 10⁻¹²~10⁻¹³ µg/ml의 매우 강력한 억제효과를 나타내었다 (Table 6-3).

Table 6-3. Cytotoxicity of pectenotoxin II against human cancer cell-lines*

cancer cell-lines	pectenotoxin II	adriamycin
HT-29 (colon)	1.0 x 10 ⁻¹³	5.6 x 10 ⁻⁴
A -549(lung)	2.4 x 10 ⁻¹³	3.1 x 10 ⁻⁴
MCF-7 (breast)	2.3 x 10 ⁻¹²	2.0 x 10 ⁻²

* LC₅₀ (50 % lethal concentration) µg/ml

이는 positive control로 사용된 adriamycin (doxorubicin)에 비하여 약 $10^9 \sim 10^{10}$ 배나 강력한 효과였다. 암세포 독성이 너무나 강력하여 pectenotoxin II의 효과가 단순히 비선택적인 독작용에 의한 것일 가능성이 높아보였다. Yasumoto *et al.*에 의해 보고된 바에 의하면 쥐에 대한 독성실험에서는 adriamycin에 비해 독성이 50배 정도로 강하게 나타났다. *In vitro* 항암효과와 *in vivo* 독성을 동등하게 비교할 수는 없지만 *in vitro*에서의 pectenotoxin II의 암세포 억제효과는 adriamycin에 비하여 $10^9 \sim 10^{10}$ 배가 강력하므로 안전성은 (Therapeutic index) 오히려 adriamycin보다 월등할 수가 있다 (쥐에 대한 adriamycin의 LD₅₀는 복강내 주사시 13~14 mg/kg, pectenotoxin II의 LD₅₀는 0.26 mg/kg 이었다).

Pectenotoxin II는 좀더 정밀한 항암효과 검색을 위하여 미국국립암연구소 (NCI)에 보내져 60여 가지의 인체암세포에 대하여 검색이 되었다. 인체 leukemia, 폐암, 결장암, 중추신경계암, 피부암, 난소암, 신장암, 전립선암, 유방암 등의 60여 가지 암세포에 대한 검색에서 특히 폐암, 결장암, 중추신경계암, 피부암, 난소암, 신장암, 유방암 등의 몇 가지 암세포에 대하여 선택적인 억제효과를 나타내었다. 감수성 암세포에 대한 평균적인 GI₅₀가 $10^{-9} \sim 10^{-8}$ M 정도의 강력한 활성을 나타내었으며 감수성 세포와 내성 세포간의 LC₅₀ 차이는 약 100 배 정도이므로 선택성도 양호하다고 볼 수 있다. 미국국립암연구소에서도 pectenotoxin II에 대하여 상당히 흥미를 가지고 현재 인체암세포를 이식한 쥐에 대한 *in vivo* 항암효과 검색을 계획하고 있다.

Pectenotoxin II는 DNA-cleavage assay나 rat plasma membrane assay에서 모두 눈에 띄는 효과가 나타나지 않았다. 그러므로 pectenotoxin II는 DNA 합성이나 세포막에서의 산화-환원 반응계에는 작용하지 않는 것으로 생각된다. Pectenotoxin II는 그와 유사한 유형의 육상미생물에서 발견되는 polycyclic ether 물질과 마찬가지로 ionophore 역할을 하는 것이 아닌가 추정되고 있다. Pectenotoxin II에 대해서는 특허가 출원되어 있으며 앞으로 물질이 확보되는 대로 *in vivo* 이후

단계의 생리활성 검색을 추진할 계획이다. Pectenotoxin II에 대해서 항바이러스 효과도 측정하였으나 독성농도 이하에서는 항바이러스 효과가 관찰되지 않았다.

6. 4. 2. Psammaplin A(91K-19-2)의 생리활성

Psammaplin A는 *in vitro* murine leukemia (P388)와 인체 폐암 (A-549) 세포에 대하여 검색을 하였다. Psammaplin A에 대한 항암효과 검색에서 중등도의 암세포 억제 효과가 나타났다 (Table 6-4).

Table 6-4. Cytotoxicity of psammaplin A against human cancer cell-lines*

cancer cell-lines	psammaplin A	5-fluorouracil
P388 (murine leukemia)	0.64	0.2
A-549 (lung cancer)	6.43	

* LC₅₀ µg/ml

Psammaplin A와 같은 bromotyrosine 계열의 화합물인 fistularin 3 등에서 항바이러스 효과가 발견되고 있으므로 이 물질에 대해서도 항바이러스 효과를 측정하였다. HSV-1과 HSV-2에 대해 검색하였는데 2가지의 virus 모두에서 눈에 띄는 항바이러스 효과가 관찰되지 않았다 (Table 6-5).

Table 6-5. Antiviral activity of psammaplin A*

	Psammaplin A	ACVa	Ara-C
HSV-1	> 6.5	1.3	1.49
HSV-2	> 6.5	4.5	9.79

* LC₅₀ µg/ml

6. 4. 3. 2' -3' -didehydro-2' -3' -dideoxyuridine(91K-19-3)의 생리활성

Unusual nucleoside 류의 항바이러스 효과에 대해서는 많은 연구가 되어 있으며 사실상 항바이러스제 연구의 대부분은 unusual nucleoside 류에 관한 것이다. 현재까지 상품화된 acyclovir, AZT, Ara-A 등이 모두 unusual nucleoside 연구의 산물이다.

Unusual nucleoside 류의 일종인 ddeThd (2' -3' -didehydro-2' -3' -dideoxythymidine), ddeCyd (2' -3' -didehydro-2' -3' -dideoxycytidine)은 leukemia virus, sarcoma virus, HIV 등에 항바이러스 효과가 있는 것으로 알려져 있는데 본 실험실에서 분리된 2' -3' -didehydro-2' -3' -dideoxyuridine도 이들 물질과 구조가 매우 유사하므로 기대를 가지고 항바이러스 검색을 실시하였다. 그러나 기대에 어긋나게도 2' -3' -didehydro-2' -3' -dideoxyuridine은 항바이러스 효과를 나타내지 않았다. HSV-1과 HSV-2에 대해 항바이러스 효과를 검색하였는데 LC₅₀가 모두 33 µg/ml 이상이였다.

6. 5. 실험방법

6. 5. 1. 시료의 채집, 유기물질의 추출 및 flash chromatography

해면 시료 91K-19의 채집은 1991년 10월 거문도 해역의 서도와 대삼부도 근해 수심 25-30 mm 에서 SCUBA 다이빙에 의하여 이루어졌다. 채집된 시료는 dry ice 를 이용하여 즉시 냉동되었으며 그 상태에서 운반되어 -20℃ 에서 보관되었다. 냉동하였던 91K-19를 (5 kg, wet weight) 잘게 썰어 상온에서 MeOH : CH₂Cl₂ (1:1) 로 추출하였다. 이를 감압하에서 농축하여 물층과 CH₂Cl₂층으로 분획하였다. 그리고

CH₂Cl₂층을 감압농축하여 90 % aq. MeOH층과 n-hexane층으로 다시 분획하였다. 물층은 동량의 n-BuOH층으로 추출하였다. 이렇게하여 극성정도별로 얻어진 4종류의 분획을 brine shrimp에 대하여 독성검색을 하였다. 그 결과 90 % aq. MeOH층에 가장 독성이 농축되어 있는 것으로 나타났는데 brine shrimp에 대한 LC₅₀ (50 % lethal concentration) value는 7 µg/ml였다. 통상적으로 조추출물의 경우 LC₅₀값이 1000 µg/ml 이하이면 유의성이 있는 것으로 간주하는데 그 기준으로 볼때 LC₅₀ 7 µg/ml은 상당히 강한 독성을 의미한다.

90 % aq. MeOH층을 C-18 reversed phase flash column으로 3번에 나누어 분리하였다. 용출용매는 H₂O : MeOH (1:3) → H₂O : MeOH (1:5) → H₂O : MeOH (1:9) → MeOH 순으로 하였으며 마지막으로 EtoAC와 CH₂Cl₂로 column을 washing 하였다. 모두 8개의 분획이 얻어졌는데 그 중에서 fraction 2 (F-2)에서 가장 강력한 brine shrimp 독성이 검출되었다 (LC₅₀ 0.1 µg/ml). Fraction 1, 3에서도 각각 LC₅₀가 0.4 µg/ml, 0.2 µg/ml로 나타났다.

6. 5. 2. 천연물의 분리

Brine shrimp에 대하여 가장 활성이 높은 fraction 2 (F-2)를 다시 C18 reversed phase preparative HPLC column을 통과하여 8개의 분획을 얻었다. 용출용매는 H₂O : acetonitrile : MeOH (10:3:4)으로 하였다. Fractions 3~6에서 brine shrimp toxicity가 검출되었으며 major band는 fraction 5로써 retention time은 42 min이었다. Fraction 5 (P-5)는 다시 C18 reversed phase semi-preparative HPLC column을 통과하여 compound 91K-19-1(pectenotoxin II)을 침상형 결정으로 얻었다. Flash column chromatography에 의해 얻어졌던 fraction 1 (F-1)을 C-18 reversed phase vacuum flash HPLC column을 통과한후 다시 C-18 reversed phase HPLC column을 통과하여 compound 91K-19-3(2',3'-didhydro-2',3'-

dideoxyuridine)을 무정형 분말형태로 얻었다. Fraction 2 (F-2)를 C-18 reversed phase preparative HPLC column을 통과하여 얻었던 fraction 3 (P-3)를 C-18 reversed phase HPLC column을 다시 통과하여 compound 91K-19-2(psammaplin A)를 얻었다.

Pectenotoxin II: FABMS m/z 881.8(MNa⁺), 859.0(MH⁺), ¹H and ¹³C NMR;

Table 6-2.

Psammaplin A : low resolution EIMS (220eV) m/z 668/667/66/664/663 (MH⁺), 334/332 (5), 318/316 (2), 301/299 (1.5), 283/281 (2), 218/216 (19), 213/211 (99), 201/199 (14), 138/136 (9), 133 (12), 132 (100) ; ¹H-NMR (500 MHz, acetone-d₆) 7.64 (NH, t, 5.5 Hz), 7.45 (H-2, d, 2.0 Hz), 7.13 (H-6, dd, 8.5 Hz, 2.0 Hz), 6.87 (H-5, d, 8.5 Hz), 3.82 (H-7, s), 3.55 (H-10, q, 7.0 Hz), 2.87 (H-11, t, 7.0 Hz) ; ¹³C-nmr (125 MHz, acetone-d₆) 164.0 (C-9), 153.3 (C-8), 153.1 (C-4), 134.3 (C-2), 130.5 (C-1), 130.4 (C-6), 117.0 (C-5), 110.0 (C-3), 39.1 (C-10), 38.4 (C-11), 28.4 (C-7).

2',3' -didehydro-2',3' -dideoxyuridine : ¹H-nmr (500 MHz, acetone d₆) 7.87 (H-6, d, 8.3 Hz), 6.92 (H-1' , m), 6.43 (H-2' , ddd, 5.7 Hz, 2.2 Hz, 2.1 Hz), 5.94 (H-3' , ddd, 5.7 Hz, 2.6 Hz, 1.6 Hz), 5.52 (H-5, d, 8.3 Hz), 4.85 (H-4' , m), 3.78 (H-5' , dd, 12.8 Hz, 3.1 Hz), 3.75 (H-5' , dd, 12.8 Hz, 3.0 Hz) ; ¹³C-nmr (125 MHz, methanol-d₄) 166.3 (C-4), 152.7 (C-2), 143.1 (C-6), 136.1 (C-2'), 127.1 (C-3'), 102.5 (C-5), 91.3 (C-1'), 89.1 (C-4'), 63.9 (C-5').

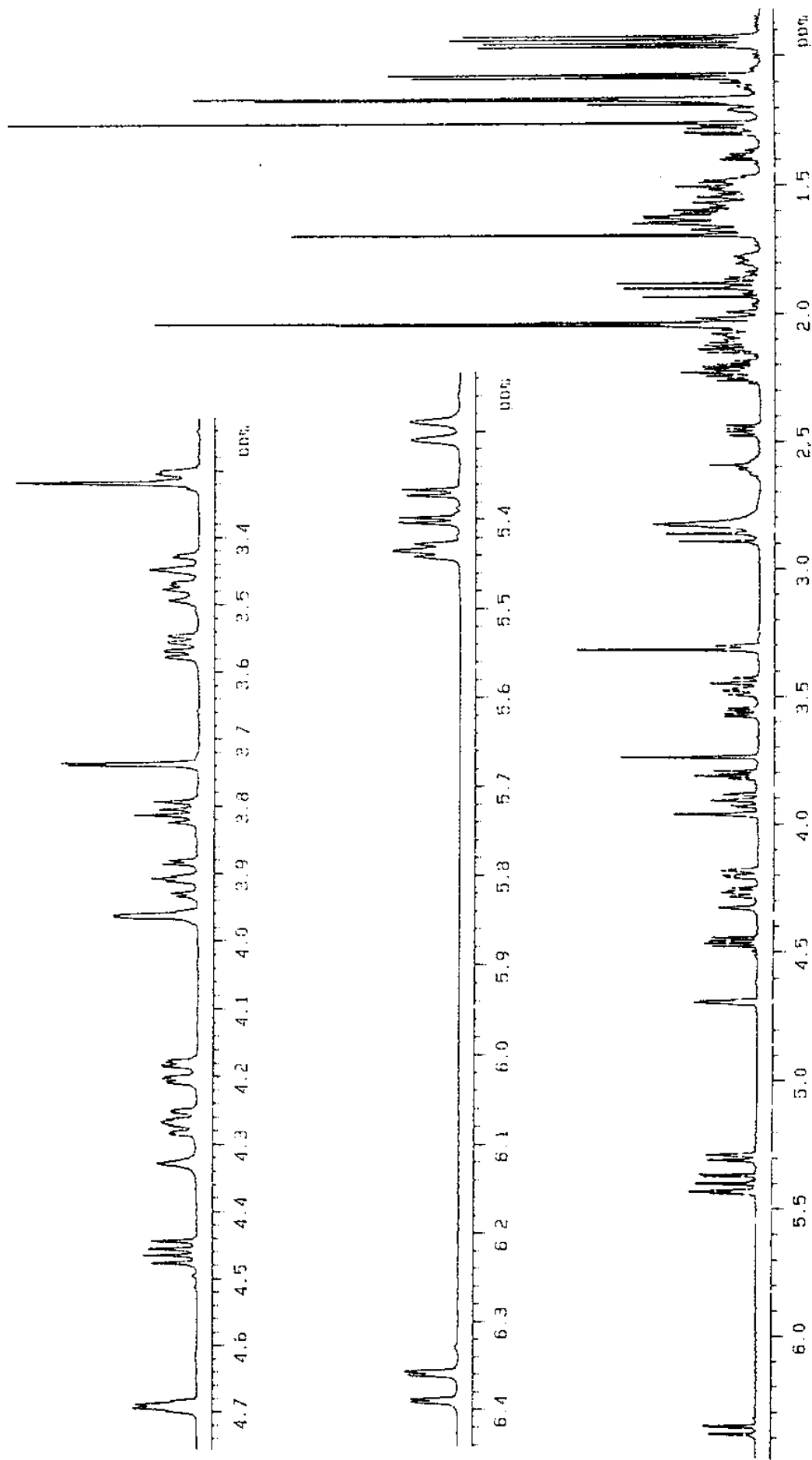


Fig. 6-6. Proton NMR spectrum of compound 91K-19-1.

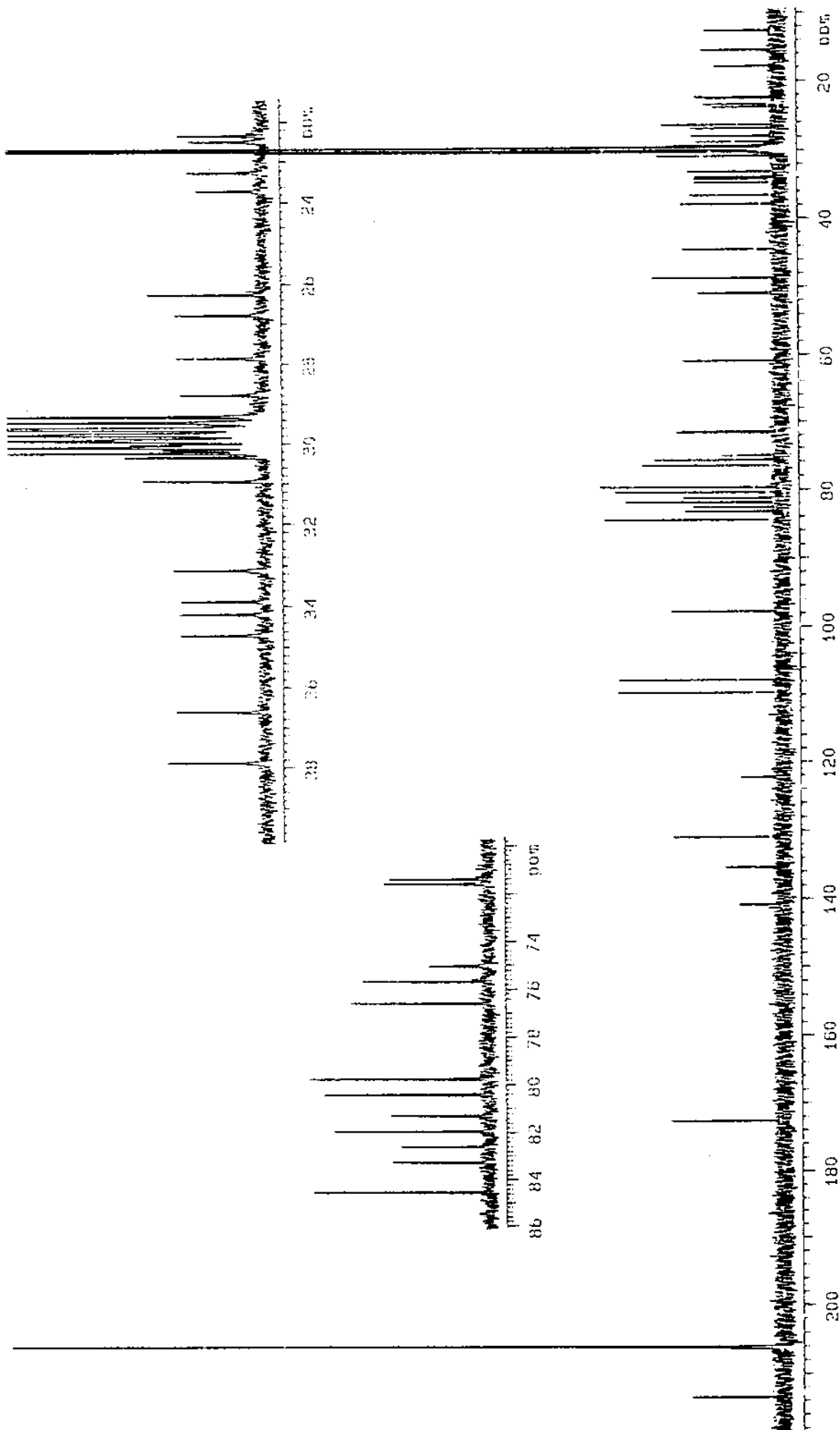
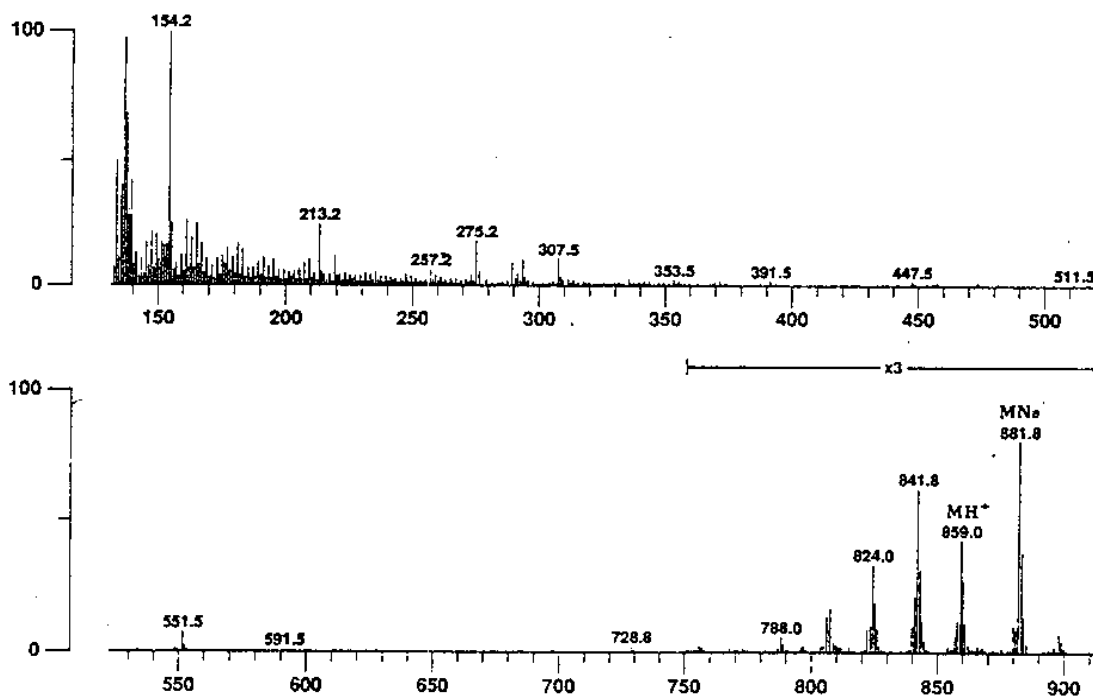


Fig. 6-7. Carbon NMR spectrum of compound 91K-19-1.

JS07140048 Scan 2 RT=0:31 100%=37344 mv 15 Jul 93 8:13
Compacted SLRP +EI PATINE-YESS (NBA)



JS07140048 Scan 2 RT=0:31 100%=10078 mv 15 Jul 93 8:13
Compacted SLRP +EI PATINE-YESS (NBA)

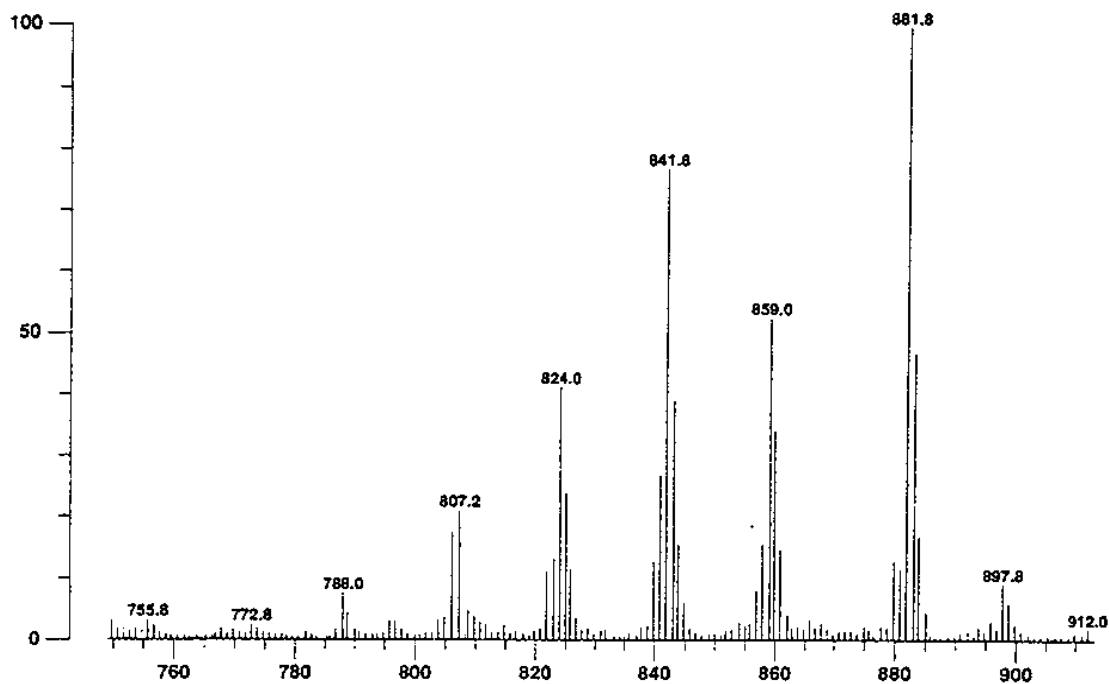


Fig. 6-8. FABMS spectrum of compound 91K-19-1.

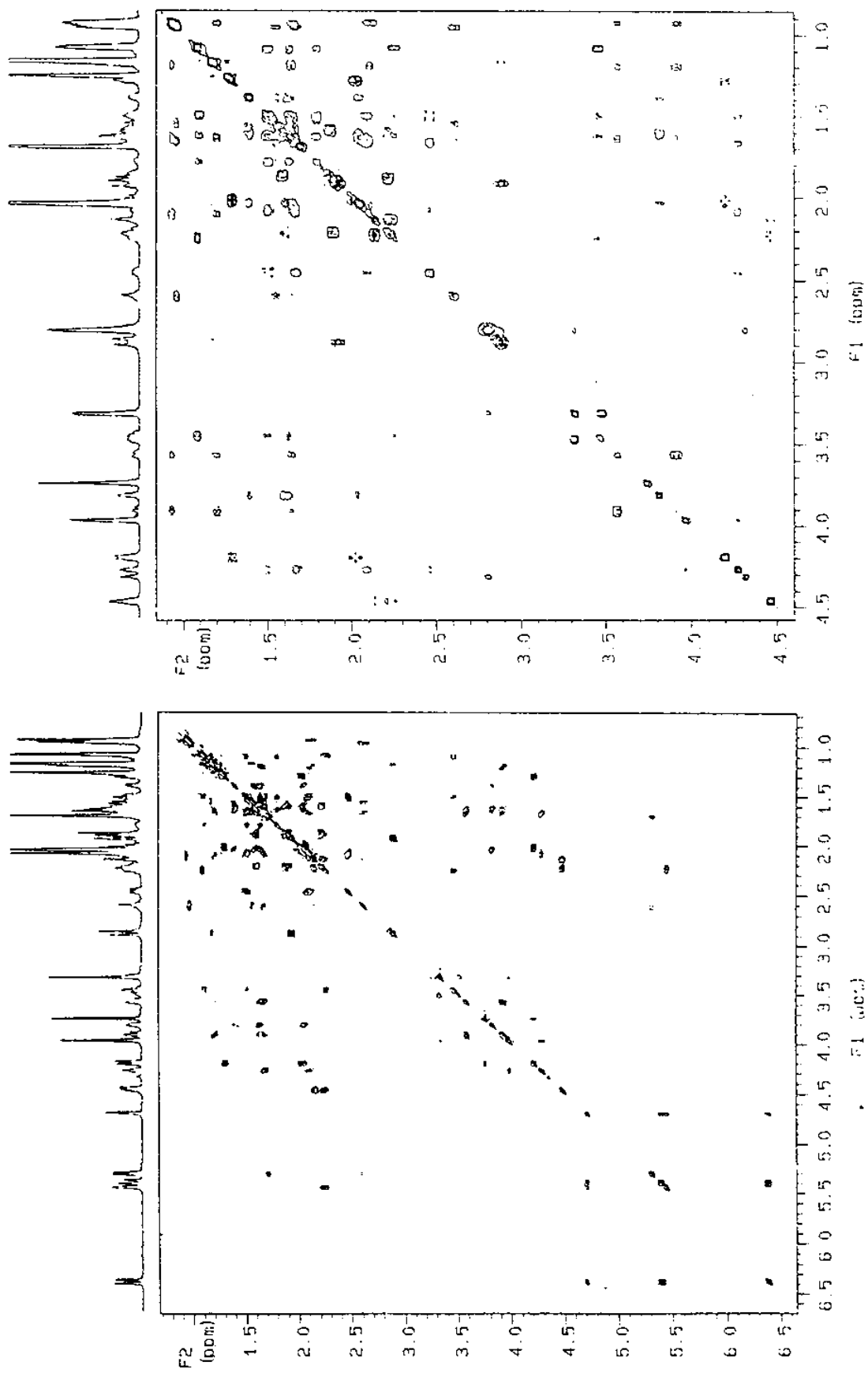


Fig. 6-9. Proton COSY and TOCSY spectra of compound 91K-19-1.

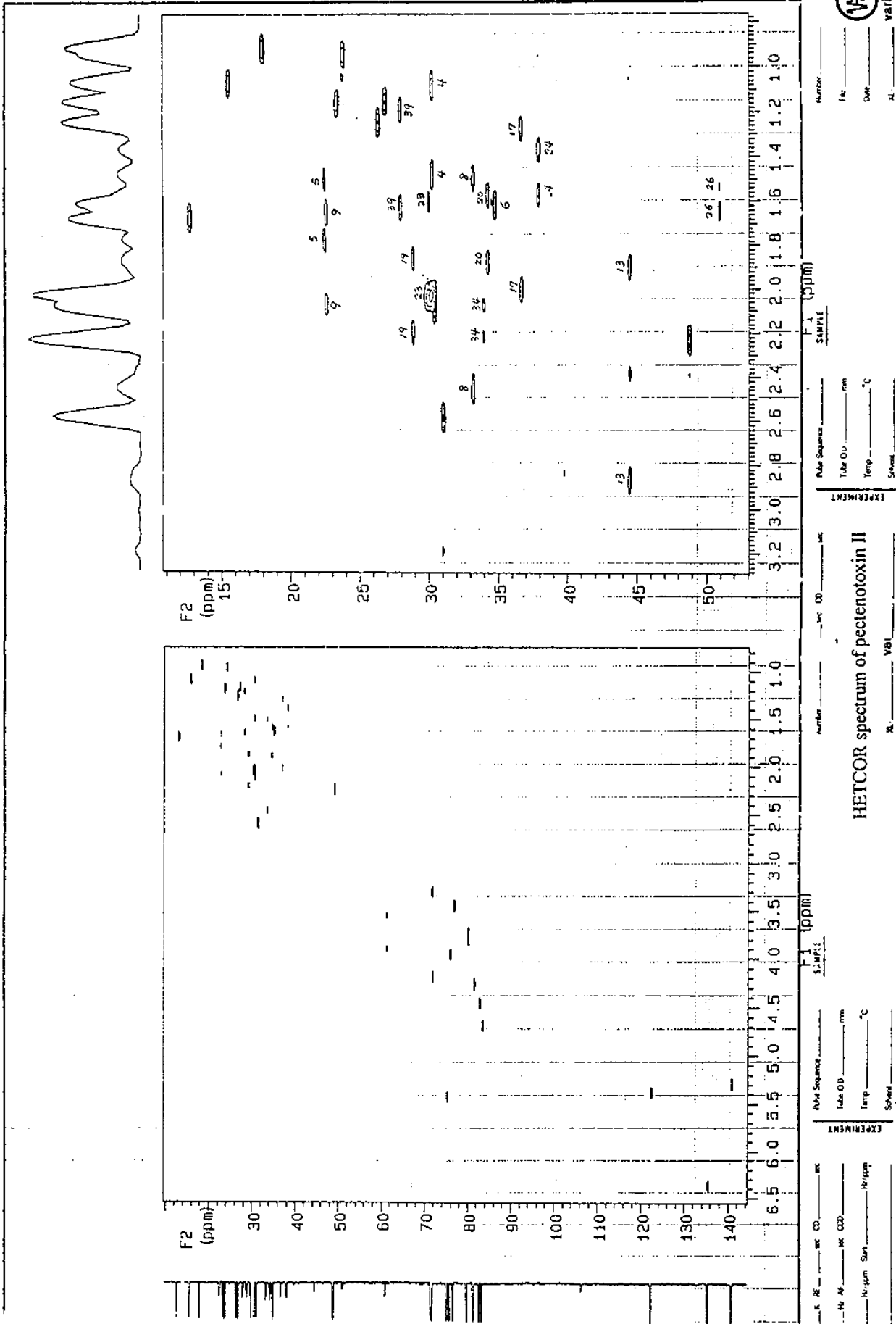


Fig. 6-10. HETCOR spectrum of compound 91K-19-1.

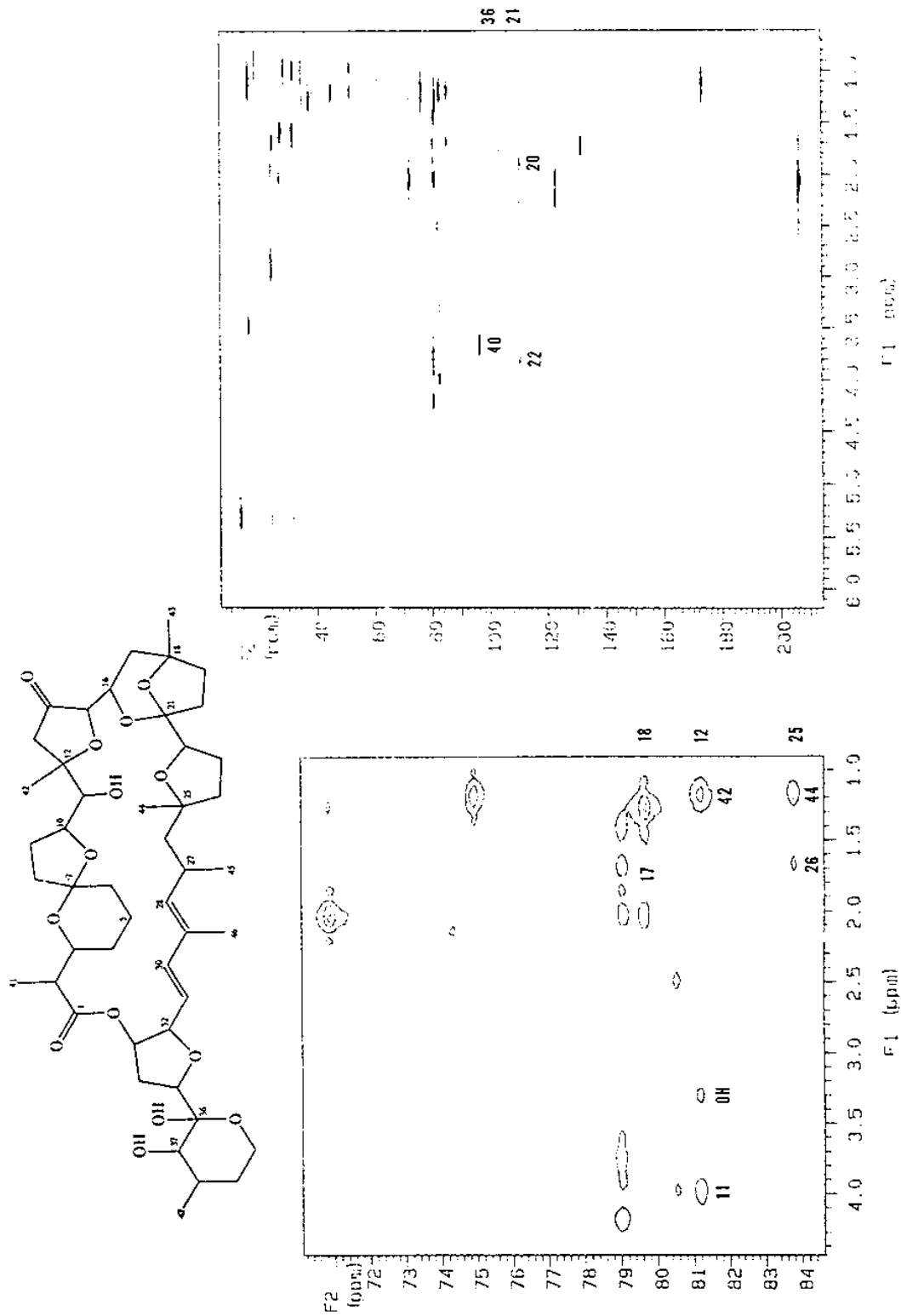


Fig. 6-11. Long-range HETCOR spectrum of compound 91K-19-1.

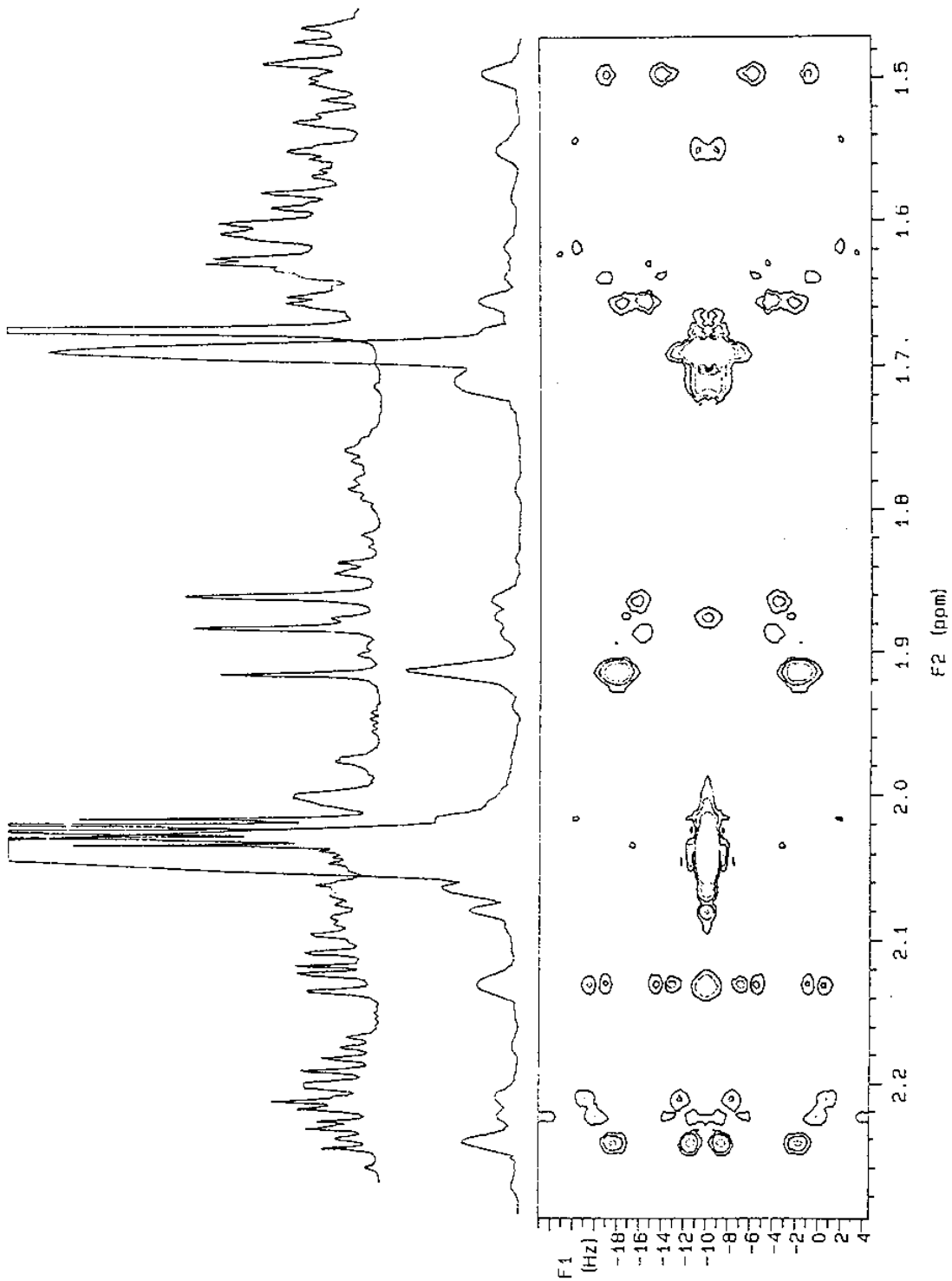


Fig. 6-12. Homonuclear J-resolved 2D spectrum of compound 91K-19-1.

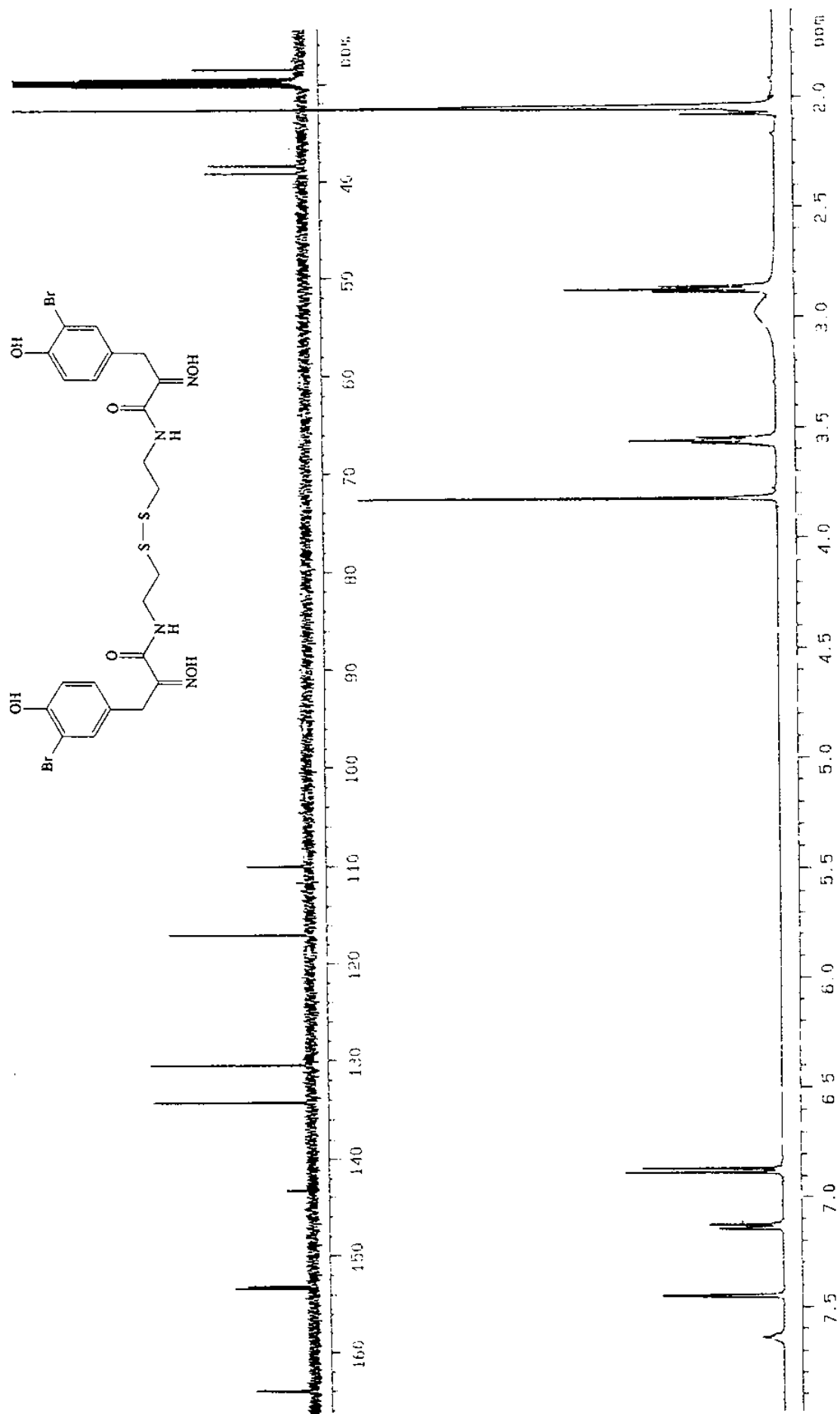


Fig. 6-13. Proton and Carbon NMR spectra of compound 91K-19-2.

exp1 pulse sequence: tocsy

date	Aug 4 93	dn	array	Highpass
solvent	acetone	dof	arraydim	0 200
file		dm	nnn	
ACQUISITION				
sfrq	499.843	dmm	1	cphase
tn		dmf	1	200
at	0.150	dpwr	2	30
np	1024	homo		n
sw	3406.0	gf	0.069	
fb	1900	gfa	not used	
bs	32	wtfile		
ss	8	proc	ft	
tpwr	49	fn	1024	f
pw	22.2	math		
p1v1	55			
p1	11.1	werr		
p2	undefined	wexp		
d1	2.000	wbs		
presat	0	wnt		
mix	0.060	2D PROCESSING		
trim	0.0020	gf1	0.019	
tof	-36.9	gfa1	not used	
nt	8	wtfile1		
ct	8	proc1	ft	
alock	s	fn1	1024	
gain	18	DISPLAY		
FLASS				
l1	n	sp	1362.1	
in	n	vp	2732.8	
dp	y	vc	3375	
ha	yn	ac	0	
sepu1	yn	wc	170	
2D ACQUISITION	y	hzmm	20.04	
sw1	3406.0	ls	3000.00	
n1	100	rfl	270.7	
phase	arrayed	rfp	1019.7	
2D DISPLAY	th	ins	4	
sp1	1375.5	al	1.000	ph
wp1	2719.5			
sc2	0			
wc2	170			
rfl1	270.7			
rflp1	1019.7			

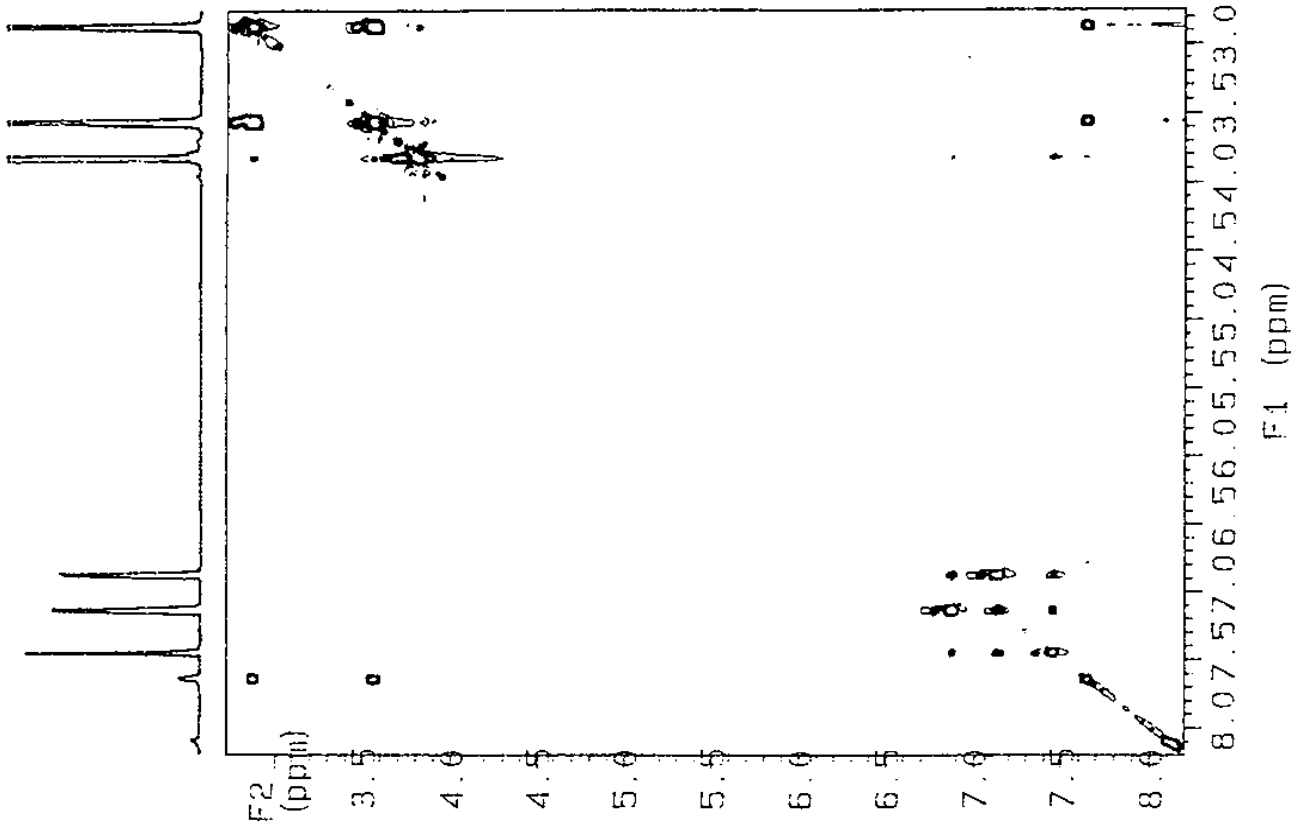


Fig. 6-14. TOCSY spectrum of compound 91K-19-2.

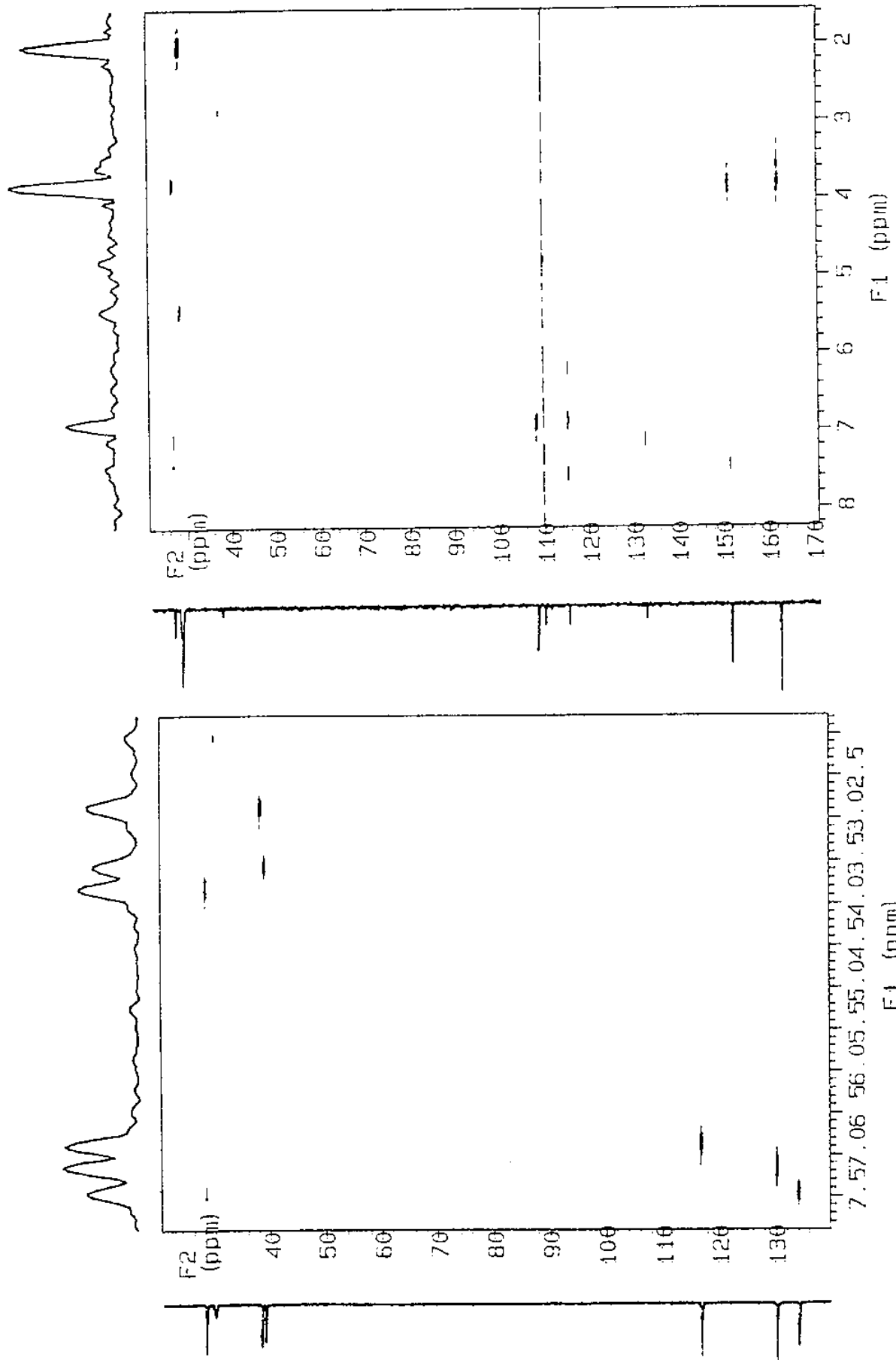


Fig. 6-15. HETCOR and long-range HETCOR spectra of compound 91K-19-2.

File:687

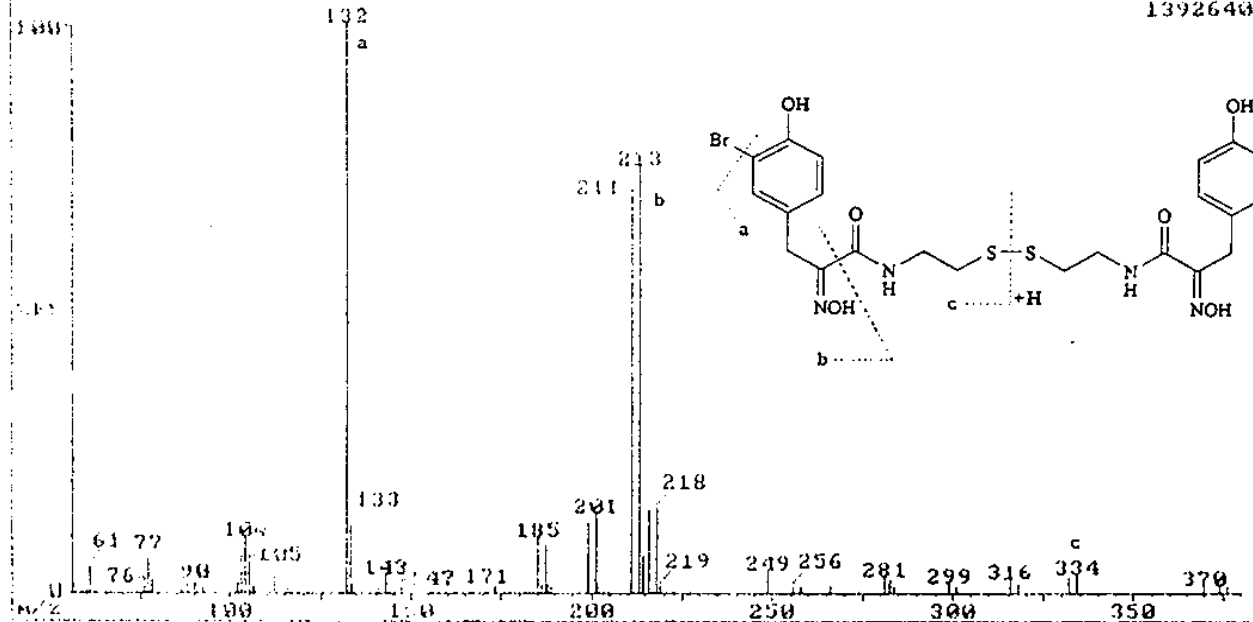
LAB-BASE - The MS Data System

11/88/1993 14:25

Sample:EI+(22eV): PACH B

687 188 (3.134) COMBINE:(151 to 218)-(((133 to 136)+(225 to 238))*1.089)

1392648



File:672

LAB-BASE - The MS Data System

26/88/1993 14:58

Sample:EI+(22eV): PACH B

672 178 (2.969) COMBINE:(153 to 205)-(((123 to 137)+(228 to 236))*1.080)

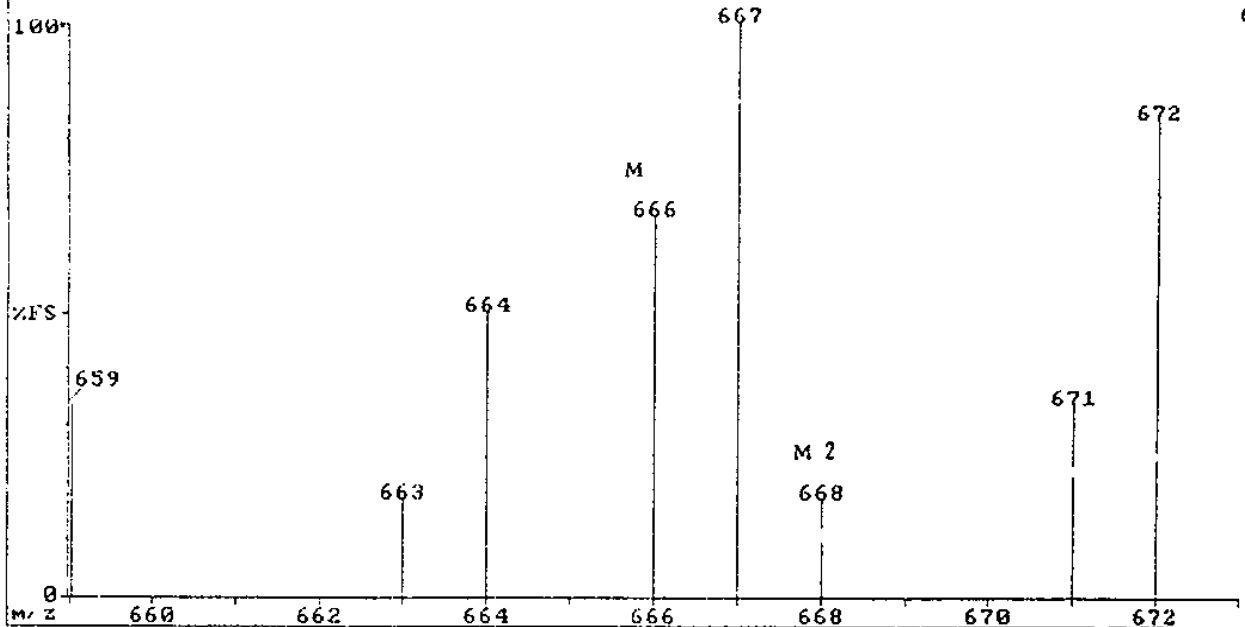


Fig. 6-16. EIMS spectrum of compound 91K-19-2.

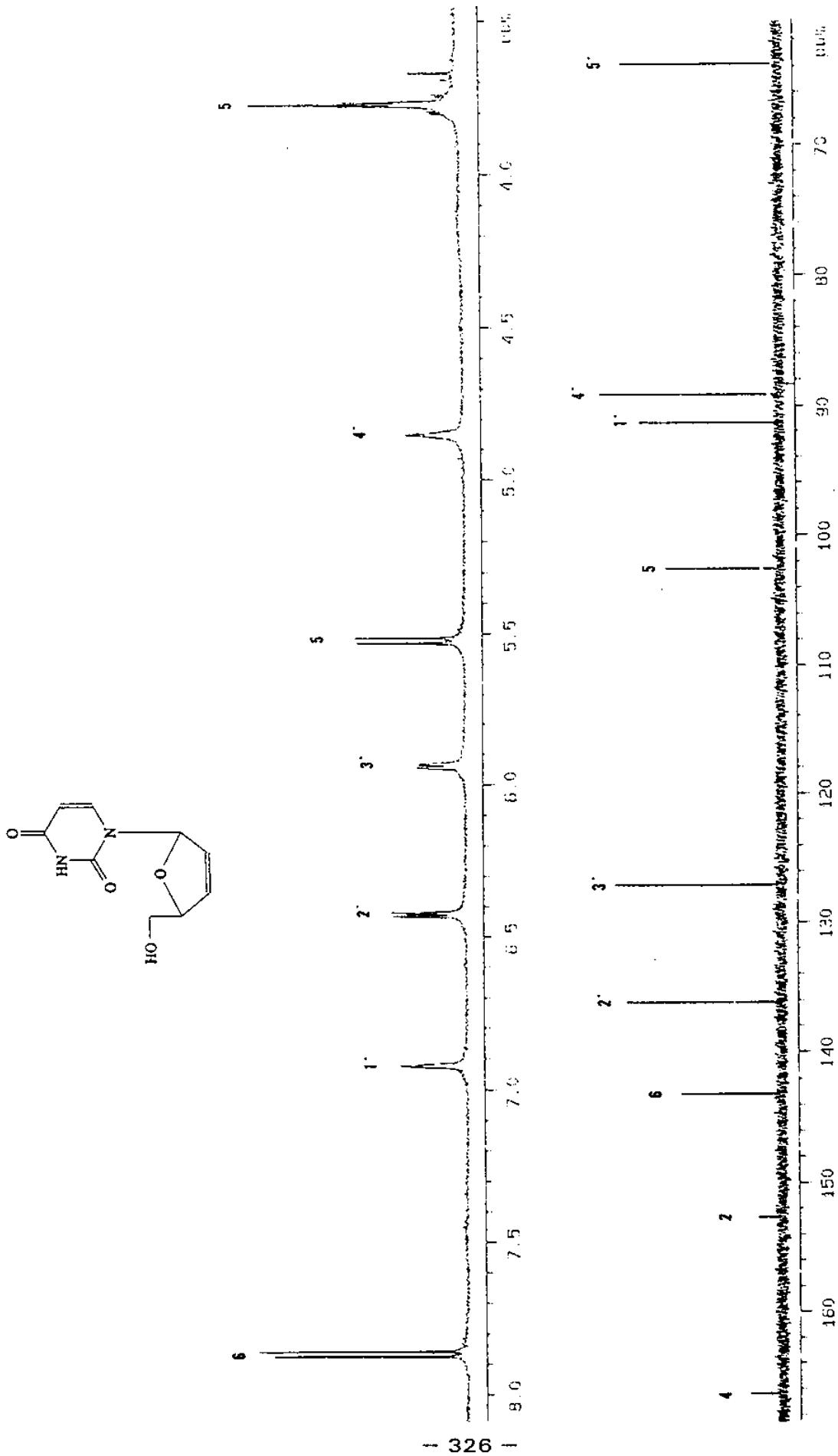


Fig. 6-17. Proton and Carbon NMR spectra of compound 91K-19-3.

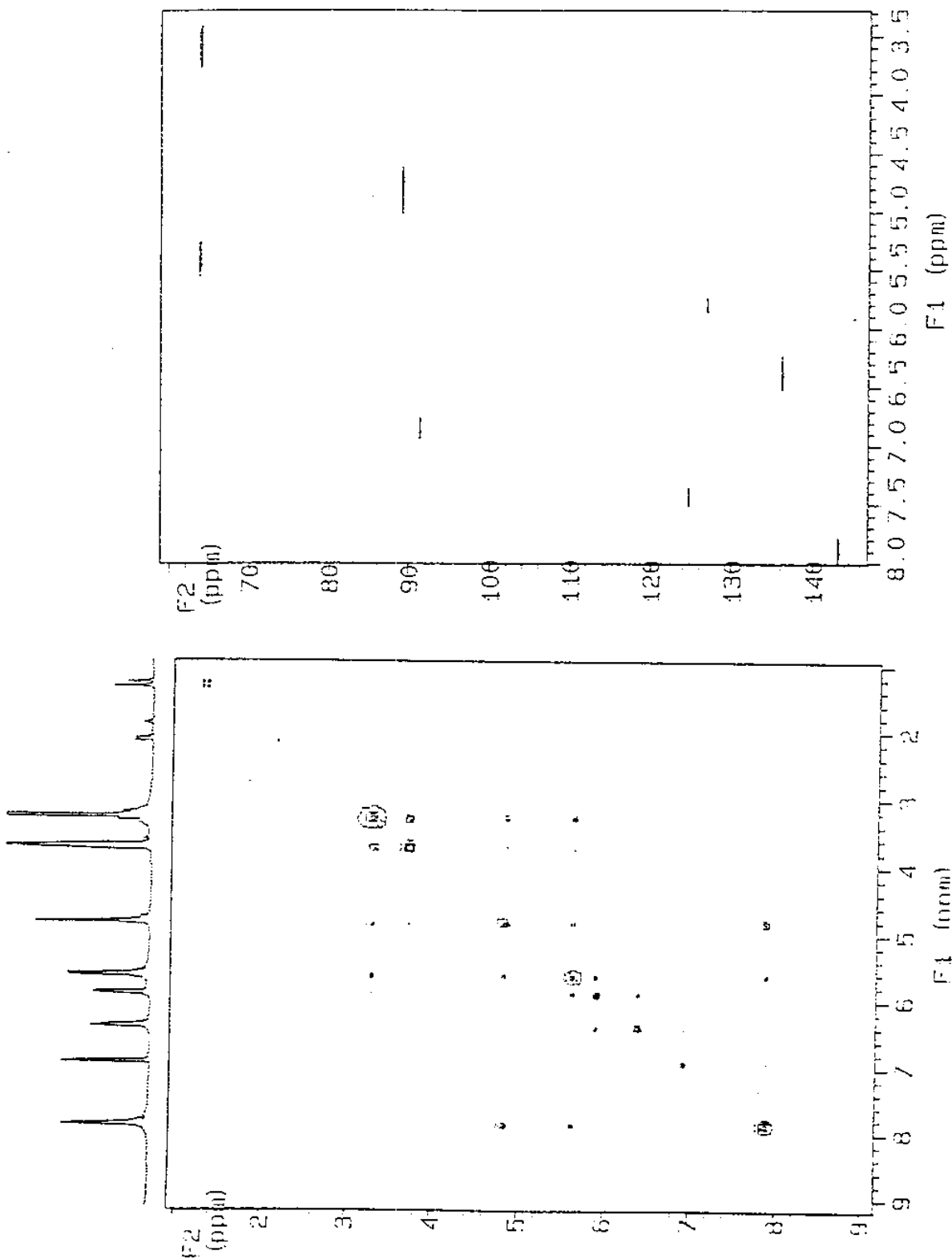


Fig. 6-18. Proton COSY and HETCOR spectra of compound 91K-19-3.

○ 1944年12月1日
1944年12月1日

제 7 장 결 론

본 연구는 국내에서 해양 천연물에 대한 본격적인 첫 시도로서 우리 나라 근해에 서식하는 강장동물과 해면동물등 저서군체 생물로부터 천연물을 추출하고 구조를 결정한 후 생리활성도를 측정하여 응용가능성을 타진하는 것을 연구목표로 하였다. 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.

전년도 연구결과를 바탕으로 하여 제 2차 년도에는 천연물의 분리 및 구조결정을 주요 연구목표로 하여 남해안 일원에서 채집한 6종의 시료로부터 20여 천연물을 분리하여 개략적인 구조를 제시하였다. 최종년도인 본 3차 년도에는 전년도에 분리한 천연물에 대한 포괄적인 분광자료의 해석과 유기반응의 결과를 종합하여 구조를 완벽히 결정하여 신물질 여부를 확인하고 아울러 생리활성도를 측정하는 것을 목표로 하였다.

본 연구의 중요 연구결과를 요약하면 다음과 같다.

1 해양 저서군체 생물에 대하여 '90년 이전에 보고된 거의 전부의 물질을 조사하여 이를 기초로하여 생물명과 물질명 및 생리활성도에 따른 database를 만들었다. 또한 1800에 달하는 이들 천연물 중 추출빈도, 구조적 특성, 생리활성도 여부 등에 의하여 600여 대표물질을 선택하여 구조적 특징에 따라 분류하고 분리 및 구조결정방법, 작동기의 특징, 생리활성도, 전합성 및 생합성적 연구결과 및 산업적인 생물별로 현재까지 천연물 연구가 이루어진 속과 종에 대한 분류학적 위치를 고찰하여 국내에서 채집된 시료에 대한 천연물의 함유 가능성과 천연물의 종류에 대한 예측을 가능하게 하였다.

2. 남해안 일원에 대한 여러 차례의 채집여행을 통하여 97종 260 kg 이상의 저서군체 동물이 채집되었다. 이들중 21종의 강장동물과 43종의 해면동물이 국내의 전문가들에 의하여 분류되었다. 시료의 유기조추출물에 대한 brine shrimp 독성, 항바이러스, P388 항백혈병, DNA-binding 등 생리활성도와 TLC, 수소 NMR등의 화학적 특성을 종합하여 4종의 강장동물과 선정된 시료에 대하여 유기용매를 이용하여 유기물질을 추출한 뒤 극성에 따른 분획, silica나 역상 vacuum flash chromatography, silica 및 역상 HPLC, Shphadex LH-20 등 다양한 분리방법을 이용하여 천연물을 분리하였다. 이 과정에서 매 분액에 대한 생리활성도와 NMR 측정을 통하여 천연물을 추적하였다. 정제된 천연물은 2-D NMR 화학실험의 결과를 종합하여 구조를 결정하였으며 구조가 결정된 천연물의 생리활성도를 측정하였다.

3. Gorgonian *Acalycigorgia inermis*로부터 acalycixeniolide B등 brine shrimp 에 강한 독성을 갖는 2개의 xenicane계 diterpenoids를 분리하였다. 또한 gorgonian *Acabaria undulata*로부터 4개의 새로운 ceramide계 sphingolipids가 분리되었다. 이들의 구조는 분광자료 해석과 함께 합성에 의하여 결정되었다. 또한 2개의 새로운 polyhydroxy steroids가 동일한 시료로부터 분리되었다.

4. Soft coral *Alcyonium gracillimum*으로부터 5개의 신물질을 포함한 7개의 steroids가 분리되었다. 분광자료 해석에 의하여 이들은 furospirostan 계의 ketals, furostan계의 hemiketals, enol-ether, pregnanes 등으로 구조가 결정되었다. 또한 hydroid *Solanderia secunda*로부터 9개의 신물질이 분리되었으며 모두 cyclopropane기를 가진 C₂₂ fatty acid lactones으로 구조가 결정되었다.

5. 해면 *Pachastrella* sp.와 *Jaspis* sp.의 혼합체로부터 강력한 세포독성을 갖는 macrolide계 물질이 분리되었다. NMR등 분광자료 해석에 의하여 이 물질은 강력한 하리성 패독인 pectenotoxin II임이 밝혀졌다. 기초 생리활성도 측정결과 이 물질은 대단히 강한 세포독성과 항바이러스 효과를 갖고 있음이 밝혀졌으며 용도 및 제법 특허를 출원하였고 현재 *in vivo* 활성을 측정중이다.

동일한 시료로부터 bromotyrosine에서 유래한 dimeric alkaloid인 psammaphin A가 분리되었으며 brine shrimp에 대한 세포독성을 나타내었다. 또한 동일한 시료로부터 unusual base인 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxycytidine이 분리되었으며 문헌 자료 검색과 분광자료 해석에 의하여 구조가 결정되었다.

6. 종합하여 남해안 일원에 서식하는 6종의 저서군체 동물로부터 27개의 천연물이 분리되었다. 이들의 구조는 매우 다양하여 terpenoids, steroids, ceramides, fatty acids, macrolide, alkaloids, modified base 등 여러그룹을 망라하였다. 문헌조사 결과 이들중 다수는 신물질임이 밝혀졌으며 일부는 brine shrimp 독성, 세포독성 및 항바이러스 등 생리활성도를 갖고 있음이 밝혀졌다.

본 연구의 서론에서 언급한 바와 같이 해양 천연물 연구는 학문적 가치와 산업적 이용 가능성이 높은 분야로서 선진국에서는 이미 상당기간에 걸쳐 집중적인 연구를 하고 있으며 많은 연구성과를 얻고 있다. 그러나 국내의 천연물 연구는 육상 생물과 미생물에 편중되었 있어서 해양 생물은 전혀 주목을 받지 못하고 있다. 그러나, 본 연구의 결과는 우리나라 근해에 서식하는 해양 생물도 천연물 연구대상 특히, 생리활성 신물질의 원천으로서의 가치가 매우 높음을 입증하였다. 아울러 본 연구결과는 향후의 보다 체계적이고 종합적인 해양 천연물 연구를 위한 중요한 기초자료로 활용될 것으로 생각된다.

이 시의 주제는
자연의 아름다움

참고문헌

1. 한국해양연구소, 한국근해 저서군체 생물로부터 신물질 추출 연구(I), BSPG 00157-467-4, 1992, 256pp.
2. 한국해양연구소, 한국근해 저서군체 생물로부터 신물질 추출 연구(II), BSPN 00179-603-1, 1993, 191pp.
3. 한국해양연구소, 해양동물로부터 추출된 천연물에 관한 연구(문헌 중심), BSPE 00308-512-4, 1992, 417pp.
4. Adams, J., Q., *Ann., Mass. Spect. Rev.*, 1993, 12, 51.
5. Agrawal, P. K., Jain, D. C., Gupta, R. K., Thakur, R. S., *Phytochemistry*, 1985, 24, 2479.
6. Aicher, T. D., Buszek, K. R., Fang, F. G., Forsyth, C. J., Jung, S. H., Kishi, Y., Matelich, M. C., Scola, P. M., Spero, D. M., Yoon, S. K., *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, 114, 3162.
7. Areekul, S., Harwood, R. F., *J. Agric. Food Chem.*, 1960, 8, 32.
8. Avery, M. A., Chong, W. K. M., Jennings-White, C., *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, 114, 974.
9. Bayer, F. M., *The Shallow Water Octocorallia of the West Indian Region*, Nijhoff, The Hague, 1961, 373pp.
10. Bergmann, W., Watkins, J. C., Stenpien, Jr. M. F., *J. Org. Chem.*, 1957, 22, 1308.
11. Bergquist, P. R., Wells, R. J., In Scheuer, P. J. ed. *Marine Natural Products: Chemical and Biological Perspectives*, Academic Press, New York, Vol. V, 1983, pl.
12. Blackman, A. J., Heaton, A., Skelton, B. W., White, A. H., *Aust. J. Chem.*,

1985, 38, 565.

13. Blunt, J. W., Munro, M. H. G., Barrow, C. J., Calder, V. L., Fenwick, G. D., Ingham, D. M., Jennings, L. C., Lake, R. J., Lewis, S. J., McCombs, J. D., Perry, N. B., FECS 3rd International Conference on Chemistry of Biologically Active Natural Products, Sophia, Bulgaria, Sept. 16-21. 1985.
14. Brightman, A. O., Wang, J., Miu, R. K.-n., Sun, I. L., Barr, R., Crane, F. L., Morre, D. J., *Biochem. Biophys. Acta*, 1992, 1.
15. Brown, R. F., Wildman, J. D., Eppley, R. M., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1968, 51, 905.
16. Brown, R. F., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1969, 46, 119.
17. Burch, P. M., Porenza, C., Wasserman, L., Fenical, W., Taylor, P., *Mol. Pharmacol.*, 1985, 28, 436.
18. Callow, R. K., Massy-Beresford, P. N., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1957, 4482.
19. Chakrabarty, M., Batabyal, A., Barua, A. K., *J. Nat. Prod.*, 1994, 57, 393.
20. Chebaane, K., Guyot, M., *Tetrahedron Lett.*, 1986, 27, 1495.
21. Chen, S., Snyder, J. K., *Tetrahedron Lett.*, 1987, 28, 5603.
22. Cimino, G., Desiderio, B., De Stefano, S., Sodano, G., 1979, *Experientia*, 35, 298.
23. Cimino, G., De Rasa, S., De Stefano, S., *Experientia*, 1984, 40, 339.
24. Coll, J. C., *Chem. Rev.*, 1982, 92, 613.
25. Crew, P., Manes, L. V., and Boehler, M., *Tetrahedron Lett.*, 1986, 27, 2797.
26. Eng-Wilmot, D., Martin, D. F., *J. Pharm. Sci.*, 1979, 68, 963.

27. Eppley, R. M., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **1974**, *57*, 618.
28. Eppley, R. M., Bailey, W. J., *Science*, **1973**, *181*, 758.
29. Faulkner, D. J., *Nat. Prod. Rep.*, **1984**, *1*, 551.
30. Faulkner, D. J., *Nat. Prod. Rep.*, **1988**, *5*, 613.
31. Faulkner, D. J., *Nat. Prod. Rep.*, **1991**, *8*, 97.
32. Faulkner, D. J., *Nat. Prod. Rep.*, **1992**, *9*, 323.
33. Fautin, D. G., ed. *Biomedical Importance of Marine Organisms*. California of Sciences, **1988**, 159pp.
34. Fusetani, N., Yasukawa, K., Matsunaga, S., Hashimoto, K., *Tetrahedron Lett.*, **1985**, *26*, 6449.
35. Fusetani, N., Asano, M., Matsunaga, S., Hashimoto, K., *Tetrahedron Lett.*, **1987**, *28*, 5837.
36. Gerhart, D. J., *Biol. Bull.*, **1981**, *164*, 71.
37. Granade, H. R., Cheng, P. C., Doorenbos, N. J., *J. Pharm. Sci.*, **1976**, *65*, 1414.
38. Grosch, D. S., *Science*, **1967**, *155*, 592.
39. Guella, G., Pietra, F., *Helv. Chim. Acta.*, **1988**, *71*, 62.
40. Harwig, J., Scott, P. M., *Applied Microbiol.*, **1971**, *21*, 1011.
41. Harborne, J. B., Baxter, H., ed., *Phytochemical Dictionary*, Taylor & Francis, **1993**, 690pp.
42. Higa, T., Tanaka, J., Tachibana, K., *Tetrahedron Lett.*, **1981**, 2777.
43. Higa, T., Tanaka, J., Tsukitani, Y., Kikuchi, H., *Chem. Lett.*, **1981**, 1647.

44. Higgs, M. D., Faulkner, D. J., *Steroids*, 1977, 30, 379.
45. Higgs, M. D., Mulherin, L. J., *Tetrahedron*, 1981, 37, 4259.
46. Hirata, Y., and Uemura, D., *Pure & Appl. Chem.*, 1986, 58, 701.
47. Hirota, H., Takayama, S., Miyashiro, S., Ozaki, Y., and Ikegami, S., *Tetrahedron Lett.*, 1990, 31, 3321.
48. Hollenbeak, K. H., and Schmitz, F. J., *Lloydia*, 1977, 40, 479.
49. Hood, D. W., Duke, T. W., Stevenson, B., *J. Water Pollut. Control Fed.*, 1960, 32, 984.
50. Hori, T., Sugita, M., *Prod. Lipid Res.*, 1993, 32, 25.
51. Ireland, C. M., Roll, D. M., Molinski, T. F., Mckee, T. C., Zabriskie, T. M., Swersey, J. C., in '*Biomedical Importance of Marine Organisms*', ed. Fautin, D. G., California Academy of Science, 1988, pp41.
52. Jares-Erijman, E. A., Sakai, R., Rinehart, K. L., *J. Org. Chem.*, 1991, 56, 5712.
53. Kalinowski, H. O., Berger, S., Braun, S., *Carbon-13 NMR Spectroscopy*, John Wiley & Sons. 1988, 776p
54. Kato, Y., Fusetani, N., Matsunaga, S., and Hashimoto, K., *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, 108, 2780.
55. Kato, Y., Fusetani, N., Matsunaga, S., Hashimoto, K., Sakai, R., Higa, T., Kashman, Y., *Tetrahedron Lett.*, 1987, 28, 6225.
56. Kawano, Y., Higuchi, R., Komori, T., *Liebigs Ann. Chem.*, 1990, 43.
57. Kazlauskas, R., Murphy, P. T., Quinn, R. J., Wells, R. J., Scho'nholder, P., *Tetrahedron Lett.*, 1977, 4439.
58. Kingston, J. F., Gregory, B., Fallis, A. G., *Tetrahedron Lett.*, 1977, 4261.

59. Kingston, J. F., Gregory, B., Fallis, A. G., *Can. J. Chem.*, **1982**, *60*, 820.
60. Kingston, J. F., Gregory, B., Fallis, A. G., *J. Chem. Soc., Perkin Trans I*, **1979**, 2064.
61. Kobayashi, J., Murata, O., Shigemori, H., and Sasaki, T., *J. Nat. Prod.*, **1993**, *56*, 787.
62. Kobayashi, J., Ishibashi, M., Nakamura, H., Hirata, Y., Yamasu, T., Sakaki, T., Ohizumi, Y., *Experientia*, **1988**, *44*, 800.
63. Kondo, K., Shigemori, H., Ishibashi, M., Kobayashi, J., *Tetrahedron*, **1992**, *48*, 7145.
64. Korpinen, E. L., *Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B.*, **1974**, *82*, 465.
65. Ksebati, M. B., Schmitz, F. J., *J. Org. Chem.*, **1988**, *53*, 3926.
66. Look, S. A., Fenical, W., Jacobs, R. S., Clardy, J., *Proc. Acad. Sci. U.S.A.*, **1986**, *83*, 6238.
67. Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols D. E., McLaughlin, J. L., *Planta Med.*, **1982**, *45*, 31.
68. Michael, A. S., Thompson, C. G., Abramovitz, M., *Science*, **1956**, *123*, 464.
69. Minale, L., Cinimo, G., De Stefano, S., Sodano, G., *Fortschritte der. Chem. Org. Naturst.*, **1976**, *33*, 1.
70. Murata, M., Sano, M., Iwashita, T., Naoki, H., and Yasumoto, T., *Agric. Biol. Chem.*, **1986**, *50*, 2693.
71. Nagle, D. G., Gerwick, W. H., *Tetrahedron Lett.*, **1990**, *31*, 2995.
72. Nakagawa, M., Tsuruoka, A., Yoshida, J., Hino, T., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1990**, 603.
73. Natori, T., Morita, M., Akimoto, K., Koezuka, Y., *Tetrahedron*, **1994**, *50*,

2771.

74. Natori, T., Koezuka, Y., Higa, T., *Tetrahedron Lett.*, **1993**, 34, 5591.
75. Niwa, H., Wakamatsu, K., Yamada, K., *Tetrahedron Lett.*, **1989**, 30, 4543.
76. Ojika, M., Yoshida, Y., Nakayama, Y., Yamada, K., *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 4907.
77. Perry, N. B., Blunt, J. W., McCombs, J. D., Munro, M. H. G., *J. Org. Chem.*, **1986**, 51, 5476.
78. Pettit, G. R., Cichacz, Z. A., Gao, F., Herald, C. L., boyd, M. R., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1993**, 1166.
79. Pettit, G. R., Tan, R., Gao, F., Williams, M. D., Doubek, D. L., Boyd, M. R., Schmidt, J. M., Chapuis, J. C., Hamel, E., Bai, Ruoli, Hooper, J. N. A., Tackett, L. P., *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 2538.
80. Qinghaosu Research Group, *Sci. Sin.*, **1980**, 23, 380.
81. Quinoa, E., Crews, P., *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28, 3229.
82. Rao, C. B., Ramana, K. V., Rao, D. V., Fahy, E., Faulkner, D. J., *J. Nat. Prod.*, **1988**, 51, 954.
83. Ravi, B. N., Wells, R. J., and Croft, K. D., *J. Org. Chem.*, **1981**, 46, 1998.
84. Reddy, K. S., Shekhani, M. S., Berry, D. E., Lynn, D. G., Hecht, S. M., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1984**, 987.
85. Richter, J. A., Goldstein, A., *Psychopharmacologia*, **1970**, 17, 327.
86. Rinehart, Jr. K. L., Gloer, J. B., Hughes, Jr. R. G., Renis, H. E., McGovren, J. P., Swynenberg, E. B., Stringfellow, D. A., Kuentzel, S. L., Li, L. H., *Science*, **1981**, 212, 933.
87. Rinehart, K.L., Patil, A. D., U. S. Patent #4,908,445A900313. **1990**,

88. Robinson, A. B., Manly, K. F., Anthony, M. P., Catchpool, J. F., Pauling, L., *Science*, 1965, 149, 1255.
89. Sakai, R., Higa, T., Kashman, Y., *Chem. Lett.*, 1986, 1499.
90. Sakemi, S., Ichiba, T., Kohmoto, S., Saucy, G., and Higa, T., *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, 110, 4851.
91. Sato, H., Sakamura, S., *Agr. Biol. Chem.*, 1973, 37, 225.
92. Schmitz, G., Hofheinz, W., *J. Am. Chem. Soc.*, 1983, 105, 624.
93. Schmitz, F. J., Gunasekera, S. P., Yalamanchili, G., Hossain, M. B., Van der Helm, D., *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, 106, 7251.
94. Schmitz, F. J., Prasad, R. S., Gopichand, Y., Hossain, M. B., Van der Helm, O., *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, 103, 2467.
95. Schow, S. R., McMorris, T. C., *Steroids*, 1977, 30, 389.
96. Shin, J., Ph. D. Dissertation, University of California, San Diego, La Jolla, 1989, 222pp.
97. Shin, J., Fenical, W., *J. Org. Chem.*, 1988, 53, 3271.
98. Shin, J., Fenical, W., *J. Org. Chem.*, 1991, 56, 3153.
99. Shin, J., Fenical, W., Stout, T. J., Clardy, J., *Tetrahedron*, 1993, 49, 515.
100. Stonik, V. A., Makar'eva, T. N., Dmitrenok, A. S., *Chem. Nat. Comp.*, 1990, 26, 103.
101. Tachibana, K., Scheuer, P. J., Tsukitani, Y., Kikuchi, H., Van Engen, D., Clardy, J., Gopichand, Y., Schmitz, F. J., *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, 103, 2469.
102. Tarpley, W. A., *J. Econ. Entomol.*, 1958, 51, 781.

103. Thompson, M. J., Scheer, I., Mosettig, E., *J. Am. Chem. Soc.*, **1959**, *81*, 5222.
104. Tsuda, M., Ishibashi, M., Agemi, K., Sakai, T., and Kobayashi, J., *Tetrahedron*, **1991**, *47*, 2181.
105. Vanhaecke, P., Persone, G., Claus, C., Sorgeloos, *Ecotoxicol. Environ. Safety*, **1981**, *5*, 382.
106. Wasyluk, J. M., Martin, G. E., Weinheimer, A. J., Alam, M., *J. Nat. Prod.*, **1989**, *52*, 391.
107. Wehrli, F. W., Wirthlin, T., *Interpretation of Carbon-13 NMR spectra*, Hyden, **1978**, 310pp.
108. Yang, M. H., Blunden, G., Patel, A., Crabb, T. A., Griffin, W. J., *Phytochemistry*, **1989**, *28*, 3171.
109. Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., sano, M., Matsumoto, G. K., and Clardy, J., *Tetrahedron*, **1985**, *41*, 1019.
110. Zabriskie, T. M., Klocke, J. A., Ireln, C. M., Marcus, A. H., Molinski, T. F., Faulkner, D. J., Xu, C., and Clardy, J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, *108*, 3123.