DAEHAN HWAHAK HWOEJEE
(Journal of the Korean Chemical Society)
Vol. 33, No. 3, 1989
Printed in the Republic of Korea

청각 *Codium fragile*의 성분 연구

金寅圭[1]·姜善英
성균관대학교 이과대학 화학과
(1988. 8. 31 접수)

The Chemical Constituents of the Marine Green Alga *codium fragile*

In Kuy Kim[†] and Seon-Yong Kang
(Received August 31, 1988)

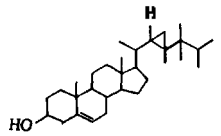
요 약. 해양 생물에는 육지 생물에 비해 훨씬 다양하고 특이한 구조의 sterol이 나타나고 있으며 이런 특징들은 화학자들에게 여러가지 흥미있는 생화학적 혹은 유기화학적인 관심을 불러 일으켜 왔다. 본 연구에서는 한국산 청각(*Codium fragile*)으로부터 3개의 sterol 성분을 분리 확인하였다. 주 sterol 성분은 탄소가 29인 clerosterol 였으며 codisterol과 cholesterol도 소량 발견되었다.

ABSTRACT. There has been a continuing interest in the sterols and sterodis of marine organisms. The most exciting results of recent studies have been the characterization of a host of novel sterols, many with unique alkylation patterns in the side chain, but some with modified ring structures. The isolation and characterization of three sterols from the Korean alga *codium fragile* are presented. The major sterol was (24S)-24-ethylcholesta-5,25-dien-3β-ol (clerosterol) and two minors are codisterol and cholesterol.

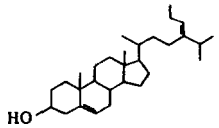
서 론

지구 전체 생물의 80%를 차지하고 있으면서도 아직 깊은 연구가 이루어지지 않아 미지의 요소가 많은 해양 생물의 성분 연구가 근래에 와서 활발히 진행되고 있다. 그 중 sterol에서 관한 관심과 연구는 이들의 약학적 가치와 구조적 특징으로 인해 1960년도 이후 활발히 전개되고 있다[1].

최근의 연구에서 얻어진 가장 현저한 성과는 특이한 알킬화 양상을 나타내는 곁사슬 및 변형된 고리구조를 갖는 수많은 해양 sterol의 특성을 밝혀낸 점이다. 육상 식물의 것과 공통적인 sterol을 분리했던 초기의 연구와는 달리 1970년대에 들어서면서 해양 생물에서만 발견되는 특이한 sterol이 밝혀지기 시작했다[2]. 그 예로서 곁사슬에 시클로프로필 고리를 갖는 gorgosterol(1), C-24에 프로필리덴기가 위치하는 24-propylidenecholesterol(2) 등이 대표적인 예다.



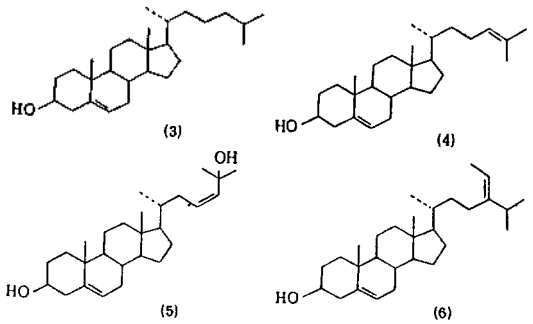
(1)



(2)

또 하나의 중요한 성과는 해조 sterol과 그 생합성에 관한 계속적인 연구에 의해 생합성 중간체의 구조를 규명함으로써 해양 무척추 동물 sterol이 해조 sterol에 그 기원을 두고 있으며, 따라서 해조 sterol이 해양 생물에서 발견되는 수 많은 sterol의 근원적 출처임을 밝혀낸 데 있다[1,2].

대부분의 홍조류(Rhodophyta)는 콜레스테롤(3)을 주 sterol 성분으로 함유하고 있으며 desmosterol(4), liagosterol(5) 등 C_{27} sterols이 우세하게 나타난다. 갈조류(Phaeophyta)에서 fucosterol(6)과 같은 C_{29} sterols이 주 sterol 성분으로 밝혀졌다[1,3].



그러나 이에 반해 녹조류(Chlorophyta)에 관한 연구는 활발히 진행되지 못해 sterol 분포의 계통 발생학적 양식이 명확히 밝혀지지 않고 있다[4].

본 연구에서는 옛날부터 민간에서 식용, 구충제로 이용되어 오던 한국의 녹조류 청각 *Codium fragile* (Chlorophyceae 강 : Siphonales 목)의 유기용매 추출물로부터 제 2차 대사물질을 분리해 그 화학적 구조를 밝히고자 했으며 특히 sterol 성분에 관심을 가지고 분리와 구조 규명에 실험의 중점을 두었다.

이미 보고된 청각의 화학적 성분 연구에 의하면 찬물 추출물에 박테리아의 성장을 방해하는 항균성 물질이 함유돼 있으며[5] 저급지방산 부분에서 발견된 acrylic acid 역시 항균성 성분으로 밝혀졌다[6]. 또한 메탄올 추출물에선 indole 화합물인 트립토판, indoleacetonitrile 등이 발견됐으며[7] 여러 형태의 다당류가 찬물 추출에서 발견됐다[8].

청각의 sterol 성분 연구에 의하면 영국의 Kimmeridge 만에서 채집된 청각에 대한 Rubistein 과 Goad 의 연구에 의해 주 sterol 인 clerosterol(7)과 소량의 codisterol(22a)이 분리됐다[10]. 일본의 내해에서 채집된 청각에서도 (7)이 발견됐고 계절에 따른 분포는 여름에는 최소였다가 겨울에 이르러 최대의 함량을 나타냈다[11].

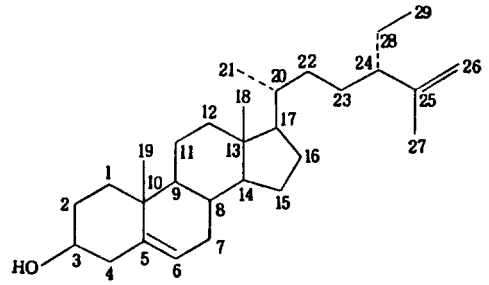
해양 생물은 같은 종이라 할지라도 지역, 계절에 따라 제 2차 대사물질의 성분이 다를 수 있으며 이는 화학성분과 종과의 관계를 나타내는 chemotaxonomy 로서 분류의 기준이 될 수 있다.

따라서 한국산 녹조류 청각의 화학적 성분 연구는 타지역의 청각으로 연구된 결과들과 비교해 볼 가치가 있으며 특히 sterols 의 계통 발생학적 기원을 예측할 수 있다는 데 본 실험의 의의가 있다.

결과 및 고찰

한국의 동해산 청각을 시료로 사용했다. 젖은(fresh) 청각을 에탄올, pet·ether, 및 CH_2Cl_2의 순서로 계속적으로 추출하였고, 마른(dried) 청각은 pet·ether CH_2Cl_2 및 EtOAc 의 순서로 추출하였다.

각각의 추출물을 용매의 극성을 높여가며 shorty funnel chromatography 로 분리했고 6개 추출물 모두 methylene chloride 의 20% EtOAc 부분에서 sterol 혼합물이 얻어졌다. 이들은 preparative TLC 및 역상(reversephase) HPLC 로 분리 정제하여 3개의 sterol 성분을 얻었다. 이 중 주성분은 clerosterol(7)였고 이것의 구조를 ^{1}H-nmr 및 ^{13}C-nmr 스펙트럼에 의해 밝혔다.



Clerosterol (7)

^{13}C-NMR 스펙트럼으로부터 탄소가 29개임을 알았고, 이 중 21개의 흡수 peak 는 C_{27} sterol 의 콜레스테롤과 거의 일치하여 이 물질의 골격이 콜레스테롤(3)임을 쉽게 알 수 있었다. A, B 고리를 이루는 메틸렌 탄소인 C-1, C-2, C-4, C-7, C-8, C-9, C-10(δ37.3, 31.7, 42.4, 32.0, 31.7, 50.3, 36.6), C, D 고리를 이루는 메틸렌 탄소인 C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17(δ21.2, 28.2, 42.4, 56.9, 24.3, 40.0, 56.2), OH 기로 치환된 탄소 C-3(δ71.9), 고리 안 이중결합의 두 탄소 C-5, C-6(δ35.6, 18.7)를 나타내는 흡수 peak 가 얻어졌다. 이상의 peak assignment 는 콜레스테롤(3) 골격의 chemical shifts 와 거의 일치한다 [12].

나머지 8개의 탄소의 값은 콜레스테롤의 곁사슬의 변형된 구조를 나타냈다. 147.6 및 111.4δ 값으로부터 C-25 및 C-26의 말단 메틸렌기를 알 수 있고 나머지 탄소들은 치환체에 따른 δ 값의 공식으로부터 예측할 수 있다[13,14]. 5 ppm 범위내에서, 계산된 값과 관측된 값은 일치를 보였다. 이들 값은 곁사슬의 탄소 C-22, C-23, C-24(δ33.8, 29.5, 49.6), C-24에 치환된 에틸기의 두 탄소 C-28, C-29(δ29.7, 17.9), 말단 이중결합 탄소 C-25에 붙어있는 메틸기 탄소 C-27(δ26.6)의 흡수 peak를 나타낸다.

^{1}H-NMR 스펙트럼은 C-18 메틸 양성자(δ0.66, s, 3H), C-19 메틸 양성자(δ1.01, s, 3H), C-21 메틸 양성자(δ0.899, J=6.5Hz, d), OH기가 β면으로 붙어있는 C-3의 양성자(δ3.54, m, 1H), Δ^5 위치의 고리안 이중결합 탄소 C-6의 양성자(δ5.36, m, 1H)의 흡수 peak를 나타낸다. 또 C-26 메틸렌 양성자(δ4.64와 4.72, 2H), 말단 이중결합 탄소에 붙은 C-27 메틸 양성자(δ1.56, s, 3H)를 나타내는 흡수 peak에 의해 메틸렌기는 C-26에 위치함을 알 수 있다. 이상의 peak assignment는 문헌에 나타난 값과 일치한다[10].

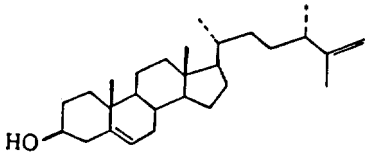
그러나 이 80 MHz 스펙트럼에서는 분해능이 낮아 C-29 메틸기의 세 양성자에 의한 흡수 peak가 triplet(δ0.71, 0.79와 0.86, 3H)으로 나타나지 않고 δ0.798에서 C-21 메틸 양성자의 doublet와 겹쳐서, 뚜렷하게 triplet으로 구별되지 않는다.

구조 규명에서 높은 자기장(high-field) 영역의 ^{1}H-NMR 스펙트럼은 C-24 알킬화된 sterols의 각 에피머에 대한 특이한 메틸 양성자 흡수 peak를 나타낸다[15]. 이는 sterol의 C-24 에피머끼리 비교할 때 C-24 비대칭 중심으로 생기는 자기적 환경의 차이로 인해 C-26, C-27 양성자의 chemical shift 값에 차이가 나타나며 두 에피머의 C-20, C-24 비대칭 중심사이의 부분입체 이성질체 관계는 C-21, C-28 혹은 C-29 양성자의 chemical shift 값에 차이를 가져오기 때문이다.

300 MHz ^{1}H-NMR 스펙트럼에 나타난 메틸 양성자영역(C-18, C-19, C-21, C-26, C-27, C-29)의 chemical shift 값을 문헌에 보고된 해면(*Strongylophora durissima* sp.)[17]의 clerosterol과 합성 이성질체들의 값과 비교해 보면 *Table* 1과 같다.

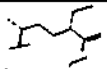
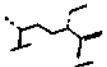
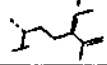
^{1}H-NMR 값을 비교한 결과, C-24 배열(configuration)이 (24S)-즉 24β임을 밝혀냈다. 스펙트럼은 C-29 메틸 양성자의 흡수 peak를 0.771, 0.795와 0.820δ(3H)에서 뚜렷하게 triplet으로 나타내며, C-21 메틸 양성자의 흡수 peak(δ0.899, J=6.5Hz, d, 3H)와 구별되고 있다. 나머지 2개 탄소(C-3, C-5)의 양성자의 흡수 peak는 80 MHz ^{1}H-NMR 스펙트럼에 나타난 값과 일치한다.

이상의 결과를 종합할 때 청각의 주 sterol 성분은 clerosterol(7), 즉 (24S)-혹은 (24β)-24-ethylcholesta-5, 25-dien-3β-ol임을 알 수 있었다. 지금까지 자연계에선 오직 clerosterol(7)만이 발견됐으며 에피머인(24R)-혹은 24α-24-ethylcholesta-5, 25-dien-3β-ol(epiclerosterol)은 발견되지 않았다[17]. 이외에 소량성분으로 codisterol(8) 및 cholesterol을 얻었다. 이들의 구조는 ^{1}H- 및 ^{13}C-nmr으로 확인하였으며 문헌[4]에 알려진 ^{1}H-nmr 값과 완전히 일치하였다.



Codisterol (8)

Table 1. Selected H-NMR data of natural clerosterol (a) from C. fragile and their synthetic isomers (b) and (c)

Sterol(Side chain)		C18-H	C19-H	C21-H	C26-H	C27-H	C29-H
	Natural(a)	0.666(s)	1.001(s)	0.899(d)	4.679(d)	1.560(s)	0.795(t)
	Synth[17](b)	0.665(s)	1.001(s)	0.899(d)	4.679(d)	1.559(s)	0.794(t)
	Synth[17](c)	0.662(s)	1.002(s)	0.908(d)	4.674(d)	1.564(s)	0.789(t)

결 론

일반적으로 해양 생물에는 육지 생물에 비해 훨씬 다양하고 특이한 구조의 sterols이 나타나고 있으며 이런 특징들은 화학자들에게 여러가지 흥미있는 생화학적 혹은 유기화학적인 관심을 불러일으켜 왔다.

본 연구에서는 한국 해안에서 채집된 청각을 유기용매로 추출한 다음, shorty funnel chromatography, preparative TLC 및 역상 HPLC로 분리, 정제하였다. 주 sterol 성분으로 탄소가 29개인 clerosterol(7)을 얻었으며 이외 codisterol(8)과 cholesterol(3)이 소량 발견되었다. 이들의 구조와 입체적인 배열은 ^{13}C- 및 ^{1}H-NMR 스펙트럼으로부터 밝혀냈다.

Clerosterol(7)은 콜레스테롤(3)의 골격을 가지며 C-25에 이중결합, C-24에 에틸기가 β면(혹은 24S)으로 위치한 것이 특징이다.

한편 본 연구실에서는 항생물질 등 생리활성물질과 흥미있는 구조의 화합물이 계속적으로 발견되고 있고 해조류를 먹이로 하는 해면(sponge)에 관심을 두고 한국산 해면의 제2차 대사물질의 화학적 구조규명과 생리활성 실험을 진행중에 있다.

실 험

^{1}H-NMR 스펙트럼은 Bruker WP80 SY80 MHzFT-NMR Spectrometer와 Nicolet NT 300WB 300MHz Spectrometer를 사용했으며 ^{13}C-NMR 스펙트럼은 Bruker WP80 SY80 MHz FT-NMR Spectrometer를 사용했다. 모든 NMR 스펙트럼은 표준물질로 TMS를 사용했고 δ(ppm)으로 chemical shift를 나타냈으며 용매로 $CDCl_3$(δ7.259)를 사용했다.

HPLC는[17] Waters HPLC(M600A와 M45 pumps, U6K injector, R401 differential refractometers)를 이용했다. 정제와 분리에 사용한 column은 Altex Ultrasphere ODS column이며 retention time은 콜레스테롤의 retention time을 기준으로 계산한 PRT로 측정됐다.

Shorty funnel chromatography는 silicagel 60H(Merck 7736)를 사용했으며 preparative TLC는 silicagel 60 GF_{254}(Merck 7730)을 사용했다. TLC에 나타난 spot는 UV Lamp와 진한 황산 spray로 확인했다. 모든 용매는 증류하여 사용했으며 시약은 GR급을 사용했다.

채집과 추출. 시료는 1986년 겨울 한국 동해안에서 채집된 젖은 청각(2.45 kg)과 냉동고에 보관돼 있던 마른 청각(600 g)을 사용했다.

깨끗한 병에 젖은 청각을 넣고 에탄올에 3일간 담가 놓는다. 3일 후, 시료로부터 에탄올 추출액을 조용히 따라내고 남아있는 시료에 pet. ether를 붓는다. 다시 3일 후, pet. ether 추출액을 따라내고 동일한 방법으로 CH_2Cl_2 추출액을 얻는다.

각 유기용매 추출액에 대해 CH_2Cl_2를 이용한 solvent partitioning을 실시하며 분액 깔때기로 유기층을 분리하고 물층은 버린다.

유기층은 무수 황산나트륨으로 건조시키고 rotary evaporator로 용매를 제거한 결과, 진한 녹색의 에탄올(0.6 g), pet. ether(0.25 g) 및 CH_2Cl_2 추출물(0.4 g)이 얻어졌다.

위와 동일한 방법으로 마른 청각에 대해 pet. ether, CH_2Cl_2 및 EtOAc 순서로 유기용매 추출을 했으며 각 추출액으로부터 진한 녹색의 pet. ether(0.3 g), CH_2Cl_2(0.9 g) 및 EtOAc 추출물(0.5 g)을 얻었다.

크로마토그래피를 이용한 sterol(crude)의 분리. 젖은 청각과 마른 청각의 에탄올, pet. ether, CH_2Cl_2 및 EtOAc 추출물에 대해 각각 shorty funnel chromatography 분리를 했고 여러 혼합용매의 극성을 높여가며 분리한 결과 각 추출물로부터 9개 부분이 얻어졌다.

6개 추출물 모두에서 methylene chloride의 20% EtOAc 부분으로부터 sterol 혼합물이 얻어졌다. 이들을 각각 TLC(20% EtOAc in benzene)로 전개시킨 결과 황산 spray 확인에 의해 주 sterol 성분으로 여겨지는 진한 청색의 spot가 R_f 0.43에서 나타났다.

Preparative TLC로 재분리해 R_f 0.43의 band로부터 주 sterol 성분인 clerosterol(7 crude) 2 mg(dry weight)을 얻었다. 이것을 다

시 absolute methanol(이동상)을 이용한 역상 HPLC로 분리 정제하여(Altex ultrasphere ODS column) clerosterol(7) 이외에 미량의 codisterol(8) 및 cholesterol(3)을 분리하였다.

Clerosterol(7). ^{13}C-NMR(80MHz, $CDCl_3$) δ37.3(C-1), 31.7(C-2), 71.9(C-3), 42.4(C-4), 140.8(C-5), 121.7(C-6), 32.0 (C-7), 31.7(C-8), 50.3(C-9), 36.6(C-10), 21.2(C-11), 28.2(C-12), 42.4(C-14), 24.3 (C-15), 40.0(C-16), 56.2(C-17), 12.0 (C-18), 19.4(C-19), 35.6(C-20), 18.7 (C-21), 33.8(C-21), 33.8(C-22), 29.5 (C-23), 49.6(C-24), 147.6(C-25), 111.4 (C-26), 26.6(C-27), 29.7(C-28), 17.9 (C-29) ; ^{1}H-NMR(80MHz, $CDCl_3$) δ0.66(s, 3H, C-18), 0.79(3H, C-29), 0.86과 0.93(d, C-21), 1.01(m, 1H, C-19), 1.56(s, 3H, C-27), 3.54(m, 1H, C-3), 4.64와 4.72(2H, C-26), 5.36(m, 1H, C-6).

^{1}H-NMR(300MHz, $CDCl_3$) δ0.66(s, 3H, C-18), 0.795(t, J=2.5Hz, 3H, C-29), 0.899 (d, J=6.5Hz, 3H, C-21), 1.001(s, 3H, C-19), 1.56(s, 3H, C-27), 3.54(m, 1H, C-3), 4.679(d, 2H, C-26), 5.36(m, 1H, C-6).

인 용 문 헌

1. L. J. Goad, In Marine Natural Products, ed. P. J. Scheuer, Academic Press, New York, Vol. 2, chapter 2 (1978).
2. Francis J. Schmitz, In Marine Natural Products, ed. P. J. Scheuer, Academic Press, New York, Vol. 1, chapter 5 (1978).
3. G. W. Patterson, *Lipids*, **6**, 120 (1971).
4. G. F. Gibbson, L. J. Goad and T. W. Goodwin, *Phytochemistry*, **7**, 983 (1968).
5. Kazuhiko Kamimoto, *Nippon Salikingaku Zasshi*, **11**, 307 (1956).
6. Glombitza, Kral W., *Planta Med*, **18**(3), 201 (1970).
7. Augier, Henri: *Tethys*, **2**(4), 763 (1970).
8. Yamamoto, Massako; Mita Kjyo; *Hiroshime Joshi Digaku Kasegakubu Kiyo*, **9**, 37 (1974).
9. Teruhisa Katayama, *Hiroshima Daigaku Suichikusan Gakubu Kiyo*, **2**, 67 (1958).
10. I. Rubinstein, L. J. Goad, *Phytochemistry*, **13**, 481 (1974a).
11. Aratani, Takaaki; Okano, Massyoshi; Funkai, Yumiko; Mizui, Fumie; *Nippon Suisan Gakkaishi*, **47**(3), 391 (1981)
12. Le Roy E. Johnson, William C. Jankowski, In Carbon-13 NMR Spectra, Wiley-Interscience Publication, 494 (1972).
13. Silverstein, Basser and Morrilli, In Spectrometric identification of organic compounds, 4th edition, pp. 258-264 (1981).
14. Pretsch, Clerc, Seibl, Simon, In Tables Spectral Data for Structure Determination of Organic Compounds, Springer-Verlag, C5-C105 (1983).
15. I. Rubinstein, L. J. Goad, A. D. H. Glauge and L. J. Mulhern, *Phytochemistry*, **15**, 195 (1976).
16. C. A. N. Catalan, J. E. Thomson, W. C. M. C. Kokke and C. Djerassi, *Tetrahedron*, **41**, 1073 (1985).
17. I. L. Stoilov, J. E. Thompson, Jin-Ho Cho and C. Djerassi, *N. Am. Chem. Soc.*, **108**, 8235 (1986).