

해면의 화학적 성분 연구

朴善求 · Paul J. Scheuer*

한국과학기술연구원 응용과학부

*하와이대학교 화학과

(1993. 8. 10 접수)

The Chemical Constituents from Unidentified Sponge

Sun Ku Park and Paul J. Scheuer*

Organic Chemistry Laboratory (I), Korea Institute of Science and
Technology, P.O. Box 131 Cheongryang, Seoul 130-650

*Department of Chemistry, University of Hawaii at Manoa, 2545

The Mall, Honolulu, HI, 96822

(Received August 10, 1993)

요 약. 인도네시아 Manado만의 Sulawesi에서 채집한 미동정된 해면으로부터 KB cancer cell line에 대해 활성을 갖는 xestoquinone, halenaquinol sulfate 및 halenaquinol이 검출되었다. 이들을 ^1H -, ^{13}C -NMR, ^1H - ^{13}C (1 bond) Heteronuclear Multiple Quantum Coherence Spectroscopy(HMQC)¹, ^1H - ^{13}C (2 and 3 bond) Heteronuclear multiple Bond Correlation Spectroscopy(HMBC)², Electron Impact Mass Spectroscopy(EI ms), UV 및 IR에 의해 밝혔다.

ABSTRACT. The previously reported cytotoxic metabolites, against the KB cell line, xestoquinone, halenaquinol sulfate and halenaquinol^{5,6} were isolated from the unidentified sponge collected in October 1992, Manado Bay, Sulawesi in Indonesia. Their structure were elucidated by ^1H -, ^{13}C -NMR, ^1H - ^{13}C (1 bond) Heteronuclear Multiple Quantum Coherence Spectroscopy(HMQC)¹, ^1H - ^{13}C (2 and 3 bond) Heteronuclear multiple Bond Correlation Spectroscopy(HMBC)², Electron Impact Mass Spectroscopy(EI ms), Ultraviolet Spectroscopy(UV), and Infrared Spectroscopy(IR)

서 론

종래에는 천연물·의약품자원에 대한 연구가 주로 육상생물에 치우쳐 왔지만 근래에는 해양자원으로부터 새로운 의약품자원의 발견이 절실히 요구되고 있다. 또한 최근래에 와서 해양생물로부터 항박테리아, 항바이러스, 항암효과를 갖는 화합물들이 발견되고 있어 해양생물에 대한 관심이 크게 고조되고 있다. 그 중 해면에는 생리활성이 큰 화합물들이 다양하게 포함되어 있어 큰 관심에 대상이 되고 있다. 한 예로서 caroline 섬으로부터 채집한 *Luffariella Variabilis* 해면에는 2차 대사물질 중의 하나인 manolide가 들어있는데, 이는 통증과 염증의 원인이

되는 효소를 저해시키는 약효성분이 들어 있다³.

한편, Jaspamide은 해면 Jaspis 종에서 발견된 성분으로 살균, 항생, 항암등 매우 특이한 생리작용이 있어 최근래에 주목을 받고 있는 depsipeptide의 하나이다⁴.

본 연구에서는 SCUBA Diver에 의해 Indonesia의 Manado만 Sulawesi에서 채집한 미동정된 해면의 CH_2Cl_2 -isopropyl alcohol(IPA)(1:1) 추출물로부터 생리활성이 있는 물질을 분리해 그 화학적 구조를 밝히고자 하였다. 이 미동정된 해면의 추출물을 vitro로 KB cancer cell line에 대해 시험한 결과 활성을 갖게 되어 실험을 수행하게 되었다.

실 험

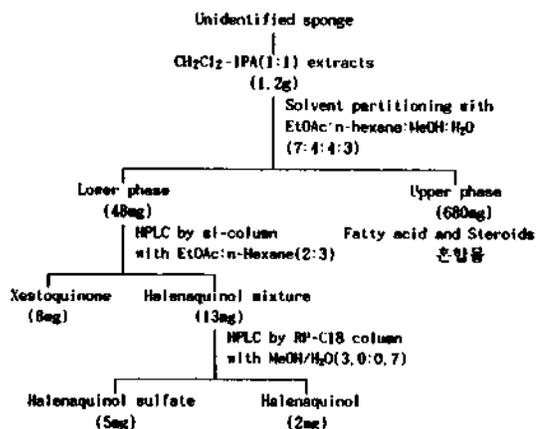
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz) 및 $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz) 스펙트럼은 General Electric GN 500을 사용했으며, 용매로는 CDCl_3 (δ 7.2), DMSO-d_6 (δ 2.6), MeOH-d_4 (δ 3.3)를 사용했다.

Xestoquinone(1)에 대한 HMBC 조건: Sample 농도 = 8 mg/ CDCl_3 0.6 ml, 256 of blocks x 2048 data matrix with 48 of scan per t_1 increment, 5.0 delay period for long-range couplings, 100° shifted sine bell squared filtering for t_1 and 4700 Hz line broadening for it.

Halenaquinol sulfate(2)에 대한 HMBC 조건: Sample 농도 = 5 mg/ DMSO-d_6 0.5 ml, 256 of blocks x 2048 data matrix with 112 of scan per t_1 increment, 3.0 delay period for long-range couplings, 100° shifted sine bell squared filtering for t_1 and 5300 Hz line broadening for it.

IR spectrometer는 Perkin-Elmer社의 Model 1420을 사용했으며, UV는 Hewlett-Packard社의 Model 8452A를 사용했다. Mass spectra는 VG-70SE magnetic sector mass spectrometer로부터 얻었으며, 분리를 위한 HPLC로는 Waters社 Model 441를 사용했으며, column은 YMC-guardpack ODS-A, 30×10 mm ID., S-5 μm , 120 Å과 microsorb Si, 80-199-C5, G9 10041를 사용했다. HPLC 사용전 정제를 위한 Bond Elut로는 Varian C18 1210-2028, SI 1210-2037을 사용했으며, TLC는 Merk RP-C18 F₂₅₄ S와 Sigma T-6270 Lot 21H0126을 사용하였고, UV lamp, vanillin 용액 및 진한 황산 spray 등으로 확인했다. 모든 유기용매와 초자는 증류, 건조하여 사용했으며, 시약은 GR급을 사용했다.

채집과 추출. 시료는 1992년 10월 인도네시아의 Manado만 Sulawesi에서 채집된 젖은(fresh) 해면(미동정된) 200 g을 사용했다. 깨끗한 플라스틱 자루에 젖은 해면을 넣고, 2일 동안 냉동시킨 후, 이들을 성글게 자르고 4일 동안 냉동 건조시켰다. 건조된 해면을 잘게 부순 후 깨끗한 유리병에 담고, CH_2Cl_2 -isopropyl alcohol(IPA)(1:1)에 2일간 담가 놓았다. 2일 후 시료로부터 CH_2Cl_2 -isopropyl alcohol(IPA)(1:1) 추출액을 Bücher funnel을 이용하여 여



Scheme 1.

과한 다음, rotary evaporator로 용매를 제거하였다. 건조된 추출물에 대해 EtOAc : n-hexane : MeOH : H_2O = 7 : 4 : 4 : 3을 이용한 solvent partitioning을 실시하였으며, 분액깔때기로 유기층과 물층을 분리하였다. 물층을 vacuum 감압하에서 rotary evaporator로 용매를 제거하여 48 mg의 추출물을 얻었다.

HPLC를 이용한 xestoquinone, halenaquinol sulfate 및 halenaquinol의 분리. 앞에서 얻은 물층 추출물(48 mg)을 EtOAc : n-hexane = 2 : 3 용매로 Si column을 사용하여 HPLC를 수행하였다; RI 검출기의 감쇠기, 16x, UV 감도와 파장길이, 2.0, 254 nm, 용매 흐름속도, 2.0 ml/min, chart 속도, 12 cm/hr, 머무른 시간 t_{R1} : 9 min에서 화합물(1)(8 mg)과 t_{R2} : 12 min에서 혼합물(13 mg)이 얻어졌다. 이 혼합물(13 mg)을 $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ = 3.0 : 0.7 용매와 함께 silica gel 역상-C18 column을 사용하여 반복해서 HPLC를 수행하였다; RI 검출기의 감쇠기, 32x, UV 감도와 파장길이, 2.0, 254 nm, 용매 흐름속도, 2.0 ml/min, chart 속도는 12CM/HR, 머무른 시간 t_{R1} : 8.5 min에서 화합물(2)(5 mg)과 t_{R2} : 11 min에서 화합물(3)(2 mg)을 얻었다. 각 화합물(1), (2), (3)은 하얀 분말로 얻었다(Scheme 1).

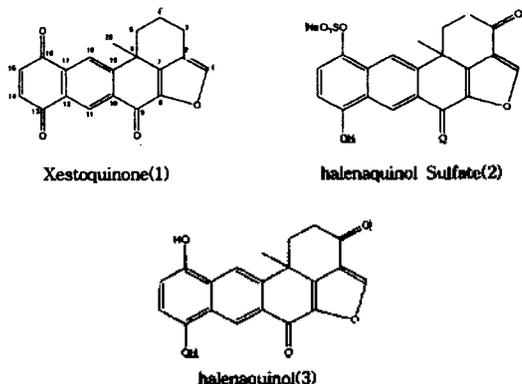
이를 ^1H -, $^{13}\text{C-NMR}$, HMQC, HMBC, EI ms, IR 및 UV 스펙트럼으로부터 확인하였다. Xestoquinone 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, halenaquinol sulfate 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 halenaquinol 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 은 KB cancer cell⁷(하와이대학교 R. E. Moore group에 의뢰한 것임)에 대해 각각 2^+ (25

%, 3⁺(75%), 2⁺(25%) 활성을 갖고 있었다.

결과 및 고찰

인도네시아의 Manado 만 Sulawesi에서 채집한 해면(미동정된)을 시료로 사용하였다. 젖은 해면을 냉동 건조한 다음 용매 EtOAc : *n*-hexane : MeOH : H₂O = 7 : 4 : 4 : 3를 사용하여 solvent partitioning을 하였다. 유기층과 물층을 분리하여, 물층 추출물은 Si column을 사용하여 HPLC로 분리한 결과 KB cancer cell line에 대해 활성을 갖는 화합물(1)과 혼합물(13 mg)이 얻어졌다. 이 혼합물을 역상 C-18 column을 이용한 반복적인 HPLC로 분리 정제하여, 화합물(2)와 화합물(3)을 얻었다. 이렇게 얻어진 화합물(1), (2), (3)은 ¹H-, ¹³C-NMR, HMQC, HMBC, EI ms, UV, IR로 분석하여 각각의 화합물이 Xestoquinone(1), Halenaquinol sulfact(2), Halenaquinol(3)임을 확인하였다.

1985년 H. Nakamura, Kobayashi⁵⁶ 등은 Okinawa 해안에서 채집한 *Xestospongia sapra* 해면으로부터 xestoquinone, halenaquinol sulfate와 halenaquinol을 분리하였으며, 이러한 종류의 해면에는 강력한 cardiotonic 활성을 지니고 있다. 특히 xestoquinone은 돼지의 뇌피질로부터 분리된 Na, K-ATPase에 대해 농도-의존적효과를 갖고 있으며, 두드러진 inotropic 작용을 나타내고 있다. 또한 이것은 cardiotonic glycosides 뿐만 아니라 inotropic 작용과 Na,K-ATPase 억제 사이에 유사성을 가짐이 해양 천연물의 처음 예가 알려져 있다⁸.



3개의 화합물 1, 2, 3 중 xestoquinone(1)이 주성

분으로 얻어졌으며, halenaquinol sulfate(2)와 halenaquinol(3)은 소량으로 발견되었다. 이들의 구조를 ¹H-, ¹³C-NMR, Heteronuclear Multiple Quantum Coherence(HMQC), Heteronuclear Multiple Bond Correlation(HMBC), IR, UV, EI ms 스펙트럼에 의해 밝혔다. 1과 2 구조는 ¹H-, ¹³C-NMR, HMQC, HMBC, IR, EI ms에 의해 확실히 밝혔기 때문에 3을 ¹H-NMR 스펙트럼으로부터 쉽게 추정할 수 있었다.

Xestoquinone(1)의 ¹H-NMR 스펙트럼: Aromatic C-11 양성자(δ 9.05, 1 H, singlet), C-18 양성자(δ 8.24, 1 H, singlet), C-14 양성자(δ 7.05, 1 H, singlet), C-15 양성자(δ 7.03, 1 H, singlet), C-3 양성자와 long range coupling한 furan ring의 C-1 양성자(δ 7.54, 1 H, triplet, *J*=1.4 Hz), C-3 methylene 양성자(δ 2.91~2.85, 2 H, multiplet), C-4 methylene 양성자(δ 2.33~2.14, 2 H, multiplet), C-5 methylene 양성자(δ 2.68~2.56, 1 H, multiplet, 1.78~1.72, 1 H, multiplet), methyl C-20 methyl 양성자(δ 1.54; 3 H, singlet); ¹³C-NMR 스펙트럼, carbonyl기의 탄소(δ 170.28, 183.82, 184.75), furan ring의 탄소(δ 144.93, 147.22, 144.06, 121.47), aromatic ring의 탄소(δ 138.01, 127.01, 130.38, 139.38, 138.65, 133.26, 123.18, 156.20), methylene 탄소(δ 16.89, 18.40, 31.23, 37.33), methyl기의 탄소(δ 32.56)이다(Table 1). 이상의 값은 문헌치⁵와 일치하였다.

각각의 탄소 위치와 탄소-탄소 연결을 통한 xestoquinone(1)의 구조를 HMBC spectra로 확인하였는데, 이것을 살펴보면 furan ring의 C-1 양성자는 탄소-2 및 7과 상관관계를 갖고 있었으며, methylene C-3과 C-5 양성자는 각각 탄소-2, 4, 5와 탄소-4, 6, 20, aromatic C-11과 C-18의 양성자는 탄소-9, 13, 17, 19와 탄소-6, 10, 12, 16, conjugated한 이중결합의 C-14와 C-15의 양성자는 각각 탄소-12, 16, 탄소-13, 17과 상관관계를 나타냈고, 그 구체적인 nmr data는 Table 1에 나타냈다.

Electron Impact mass spectra로부터 molecular ion이 318이었음을 알 수 있었고, 이를 IR로 확인하였는데 여기에 대한 data는 다음과 같다: Aromatic C-H stretching 진동수 3000~3100 cm⁻¹, aliphatic C-H stretching 진동수 2945 cm⁻¹, carbo-

Table 1. NMR data for xestoquinone at 500 MHz in CDCl₃

Position	¹ H-NMR	¹³ C-NMR	HMBC
1	7.54(1 H, t, <i>J</i> =1.4 Hz)	144.93	2, 7
2		121.47	
3	2.91~2.85(2 H, m)	16.89	2, 4, 5
	2.33~2.23(1 H, m)	18.40	
4	2.20~2.14(1 H, m)		
	2.68~2.56(1 H, m)	31.23	4, 6, 20
5	1.78~1.72(1 H, m)		
6		37.33	
7		147.22	
8		144.06	
9		170.28	
10		138.01	
11	9.05(1 H, s)	127.10	9, 13, 17, 19
12		130.38	
13		183.82	
14	7.05(1 H, s)	139.38	12, 16
15	7.03(1 H, s)	138.65	13, 17
16		184.75	
17		133.26	
18	8.24(1 H, s)	123.18	6, 10, 12, 16
19		156.20	
20	1.54(3 H, s)	32.56	5, 6, 7, 19

s: singlet, t: triplet, m: multiplet, *J*: coupling constant.

nyl의 C=O은 1676 cm⁻¹, aromatic C=C 진동수 1614 cm⁻¹, 그리고 1454, 1327 cm⁻¹에서 나타났다. 이상의 값은 문헌치⁵와 일치했다.

CH₂Cl₂-isopropyl alcohol(IPA)(1:1) 추출물을 solvent partitioning한 다음 2차에 걸쳐 HPLC한 결과 halenaquinol sulfate(2)가 얻어졌다. ¹H-NMR 스펙트럼: C-13의 hydroxyl 양성자(δ 10.34, 1 H, singlet), aromatic C-11 양성자(δ 9.01, 1 H, singlet), C-18 양성자(δ 9.01, 1 H, singlet), C-18 양성자(δ 8.30, 1 H, singlet), C-14 양성자(δ 6.84, 1 H, doublet, *J*=8.4 Hz), C-15 양성자(δ 7.35, d, *J*=8.4 Hz), furan ring의 C-1 양성자(δ 8.80, 1 H, singlet), C-5 methylene 양성자(δ 2.74~2.73, 1 H, multiplet, 2.30~2.25, 1 H, multiplet), C-4 methylene 양성자(δ 3.15~3.06, 1 H, multiplet, 2.71~2.66, 1 H, multiplet), C-20 methyl기의 양성자(δ 1.60, 3 H, singlet)의 peak를 나타낸다. ¹³C-NMR 스펙트럼의 peak를 살펴보면 carbonyl 탄소(δ 192.03, 171.87), sulfate기가 치환된

Table 2. NMR data for halenaquinol sulfate at 500 MHz in DMSO-d₆

Position	¹ H-NMR	¹³ C-NMR	HMBC
1	8.80(1 H, s)	150.04	2, 3, 7
2		122.39	
3		192.03	
4	3.15~3.06(1 H, m)	36.49	2, 3, 5, 6
	2.71~2.66(1 H, m)		
5	2.74~2.73(1 H, m)	33.56	3, 4, 6, 7,
	2.30~2.25(1 H, m)		19, 20
6		35.40	
7		144.06	
8		144.66	
9		171.87	
10		129.16	
11	9.01(1 H, s)	123.58	9, 17
12		123.05	
13(OH)	10.34(1 H, s)	150.90	12, 13
14	6.84(1 H, d, <i>J</i> =8.4 Hz)	108.04	12, 13, 16
15	7.35(1 H, d, <i>J</i> =8.4 Hz)	121.23	13, 16, 17
16		141.11	
17		129.84	
18	8.30(1 H, s)	120.04	6, 10, 12, 16
19		147.57	
20	1.60(3 H, s)	31.50	5, 6, 7, 19

탄소-16(δ 141.11), hydroxyl의 탄소-13(δ 150.90), 탄소-13, 16을 제외한 aromatic 탄소들(δ 129.16, 123.56, 123.05, 108.04, 121.23, 129.84, 120.04, 147.57), furan ring의 탄소들(δ 150.04, 122.39, 144.06, 144.66)이다(Table 2). 이 구조는 HMBC spectra를 통해 확인하였는데, 이것으로부터 탄소-13의 hydroxy기의 양성자는 탄소-12, 13과 상관관계가 있어 탄소-13에 hydroxy이 치환되었음을 알 수 있었고, 탄소-14와 15의 양성자는 각각 탄소-12, 13, 16, 탄소-13, 16, 17, 탄소-18과 11의 양성자는 각각 탄소-6, 10, 12, 16, 탄소-9, 17과 상관관계를 나타냄으로서 aromatic 부분을 결정할 수 있었다. 이 구조의 구체적인 NMR data는 Table 2에 나타냈다.

Electron impact mass spectra로부터 molecular ion이 436임을 알 수 있었고, IR과 UV⁹로부터 이를 확인하였다. 이상의 값은 문헌치⁶와 일치하였다.

CH₂Cl₂-isopropyl alcohol(IPA)(1:1) 추출물을 solvent partitioning한 다음 Si와 RP-C18 column을 사용하여 반복적으로 HPLC한 결과 halenaquinol(3)

을 얻었다. 이것의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼은 aromatic 양성자들로 해석되는 3개의 singlets(δ 9.03, 11-H, 8.85, 1-H, 8.28, 18-H), 서로 이웃하고 있어 coupling하는 2개의 aromatic 양성자[δ 6.88(14-H, doublet, $J=8.09$ Hz), 6.76(15-H, doublet, $J=8.09$ Hz)], methylene 양성자[δ 3.15~3.04(4-H, multiplet), 2.83~2.74(4-H, multiplet), 2.98~2.90(5-H, multiplet), 2.38~2.25(5-H, multiplet)], methyl기의 양성자(δ 1.65, 20-H, singlet)이다. 이것은 halenaquinol sulfate의 nmr data와 비교하였고, 문헌치⁶와 일치하였기에 이 화합물이라 추정하였다.

결 론

종래에는 천연물 의약품자원 개발에 대한 연구가 주로 육지생물에 치우쳐 왔지만 최근래에 와서 해양생물로부터 생리활성을 갖는 화합물들이 발견되고 있어 해양생물에 대한 관심이 크게 고조되고 있다. 본 연구에서는 인도네시아 Manado만 Sulawesi에서 채집한 미동정된 해면을 CH_2Cl_2 -isopropyl alcohol (IPA)(1:1) 용매로 추출한 다음 solvent partitioning을 하였고, HPLC로 분리, 정제한 결과 KB cancer cell line에 대해 활성을 가진 pentacyclic hydroquinones계의 xestoquione(1)을 얻었으며, halenaquinol sulfate(2) 및 이와 유사한 류의 화합물인 ha-

lenaquinol(3)을 분리, 확인하였다. 이들을 ^1H -, ^{13}C -NMR, HMQC, HMBC, EI ms, UV 및 IR 스펙트럼으로부터 확인하였다.

인 용 문 헌

- Ottig, G.; Wuthrich, K. *J. Magn. Reson.* **1988**, *76*, 569.
- Bax, A.; Summers, M. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2093.
- Desilva, E. B.; Scheuer, P. J. *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 1611-1614.
- (a) Scheuer, P. J. *Bioorganic Marine Chemistry*; Springer-Verlag Berlin Heidelberg: New York, 1989, Vol. 3, p 10; (b) Zabriskie, T. M.; Klocke, J. A.; Ireland, C. M.; Molinski, T. F.; Faulkner, D. J.; Xu, C.; Clardy, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 3123.
- Nakamura, H.; Kobayashi, J.; Kobayashi, M.; Ohizumi, Y.; Hirata, Y. *Chemistry Letters* **1985**, 713-716.
- Kobayashi, M.; Shimizu, N.; Kyogoku, Y.; Kitagawa, I. *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, *33*, 1305-1308.
- Cook, K. M.; Friedberg, E. C. *Biochemistry* **1978**, *17*, 850.
- Akera, T. *Science* **1977**, *198*, 569.
- IR(Nujol) ν_{max} 3400~3100, 1660, 1624, 1430, 1320, 1200 cm^{-1} ; UV(MeOH) $\lambda_{\text{max}}(\epsilon)$ 238(40000), 290(21000), 382(6200).