

한국산 해양 의충동물 개불에서 Anthraquinone 및 Sterol 성분연구

張聖根* · 朴永茲[†] · 蔡 碩 · 金寅圭^{††} · 徐泳完^{†††} · 趙基雄^{†††} · 申宗憲^{†††}

순천향대학교 화학과

[†]순천향대학교 식품영양학과

^{††}성균관대학교 화학과

^{†††}한국해양연구소

(1997. 5. 31 접수)

Anthraquinones and Sterols from the Korean Marine Echiura *Urechis unicinctus*

Sungkeun Chang*, Yonghyun Park[†], Seuk Chai, Inkyu Kim^{††}, Youngwan Seo^{†††}
Kiwoong Cho^{†††}, and Jongheon Shin^{†††}

Department of Chemistry, Sunchunhyang University, Asan 336-745, Korea

[†]Department of Food Science & Nutrition, Sunchunhyang University, Asan 336-745, Korea

^{††}Department of Chemistry, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

^{†††}Korea Ocean Research & Development Institute, Ansan 425-600, Korea

(Received May 31, 1997)

요 약. 한국 연해에 서식하고 있는 의충동물 개불(*Urechis unicinctus*)로부터 강심작용과 관련된 Na^+ , K^+ -ATPase 저해 작용 및 cyclic AMP phosphodiesterase 저해 작용이 높은 anthraquinone 화합물인 chrysophanol, physcion 및 1-*o*-methyl-2-methoxychrysophanol을 분리하였다. 주로 HMQC, HMBC 및 NOE 등의 분광학적 방법으로 이들의 구조를 밝혔다.

ABSTRACT. Three anthraquinones, chrysophanol, physcion and 1-*o*-methyl-2-methoxychrysophanol which have Na^+ , K^+ -ATPase and cyclic AMP phosphodiesterase lowering activities related to cardiotoxic action were isolated from the Korean marine echiura, *Urechis unicinctus*. Spectroscopic methods, including HMQC, HMBC and NOE studies, were used to establish the structures.

서 론

해양 생물의 제 2대사물질에 대한 연구의 급속한 성장으로 많은 수의 새롭고 다양한 구조의 화합물이 발견되었다. 이들 화합물의 대부분은 지상 생물로부터 얻어진 화합물의 구조에서 찾을 수 없던 새로운 약물 또는 독성 작용을 가지고 있다.

해양 생물에서 생리 활성 물질을 탐색하려는 계속된 연구의 일환으로 우리 나라에서 서식하며 발생학적으로 독특한 개불의 2차 대사 물질의 화학적 구조와 그 약리 활성에 대한 연구를 수행하였다.

개불(*Urechis unicinctus*)은 의충동물문(Phylum Echiura)에 속하며 우리 나라 서남 해안에 서식하고 식용으로 이용되고 있다. 개불에 관한 연구는 발생학적

특성 때문에 주로 형태학적 연구가 진행되고 있으며 인체 혈액과 유사한 체강액(coelomic fluid)내에서 산소와 친화력이 높은 적혈구의 구성 성분인 hemoglobin 단백질에 대한 구조와 기능에 대하여 최근 활발히 연구되고 있다.¹ 그 밖의 생리 활성 성분에 대하여는 methanol로 추출한 수용성 물질을 가지고 사람 및 흰쥐의 적혈구에 대한 용혈 작용을 비교 연구한 보고가 있다.² 그러나 대사 물질에 대한 화학적 연구는 아직 보고된 바 없다.

실 험

기기 및 시약

NMR측정은 500 MHz Varian Unity-500을 이용하

였다. Proton NMR은 500 MHz에서 carbon NMR은 125 MHz에서 측정하였다. Chemical shifts는 internal standards인 TMS(tetramethyl silane)나 $CDCl_3$, benzene- d_6 , CD_3OD 를 이용하여 측정하였다. 모든 NMR실험은 Varian사에서 공급한 Vnmr software를 이용하였으며 각각의 실험에 이용된 pulse width, transmitter power, delay 및 evolution time들은 기측정된 값을 이용하였다. 물질분리에 사용한 HPLC column은 YMC silica semiprep column(1 cm×25 cm), YMC 및 Sheido C_{18} reversed phase semiprep column(1 cm×25 cm)와 각각의 guard column cartridge(Aldrich)이었다. Rotavapor는 Buchi RE-101과 121를 사용하였다. 녹는점 측정에는 Fisher-Jones Apparatus를 보정없이 사용하였다. 유기물질의 추출 및 분리에 이용한 모든 용매와 시약은 GR 등급을 사용하거나 EP급을 재증류하여 사용하였다.

분리 및 정제

실험에 사용된 개불(*Urechis unicinctus*)은 1993년 3월 충청남도 서해안 몽산포 갯벌에서 채집하였으며 총 704(42±3.85 g)마리를 실험 동물로 사용하였다. 채집한 개불을 체벽(body wall), 내장(viscera), 계강액(coelomic fluid)으로 분리한 후 체벽 및 내장은 이 물질 제거를 위하여 증류수로 1차 세척한 다음 잘게 썰어 methanol로 추출하여 40°C에서 감압 농축하였다. methanol로 추출한 감압 농축액을 물로 현탁시킨 후 petroleum ether로 추출하여 40°C에서 감압 농축하였다. 이 농축액을 다시 dichloromethane으로 추출하여 40°C에서 감압 농축하였다.

개불 체벽에서 dichloromethane에 의해 추출된 시료 12 g에 물 50 mL를 넣어 현탁시킨 후 3회에 걸쳐 50 mL의 hexane을 넣어 추출하여 원심 분리(20분 동안 10,000 rpm)하고 상층액을 취하여 감압 농축한 후, 물층(하층액)을 취하여 50 mL의 ethyl acetate로 3회 추출하여 원심 분리 (20분 동안 5,000 rpm)하고 상층액은 감압 농축시켰다. 다시 물층액을 35% HCl과 30% NH_4OH 로 pH를 2.0, 7.0, 10.0으로 조절 한 후 n-butanol로 추출한 후 상층액을 감압 농축하였다.

추출된 시료 1.5 g(hexane extract)을 일반적인 분리 방법 즉, silica gel(70-230 mesh) column chromatography, Preparative TLC, 분취용 고성능 액체 크로마

토그래피등으로 분리 정제하여 1-o-methyl-2-methoxychrysophanol(1), chrysophanol(2) 및 physcion(3)을 얻었다(Fig. 1).

1-o-methyl-2-methoxychrysophanol은 이번에 처음 발견된 새로운 천연물이고, chrysophanol과 physcion은 육지 식물에서는 발견된 적은 있지만 해양 생물에서 발견된 것은 이번이 처음이다. 이 성분들은 생리 활성 검색에서 심장 혈관 작용과 관련이 있는 Na^+ , K^+ -ATPase 및 cyclic AMP phosphodiesterase에 대하여 상당히 높은 활성 수치를 보여주었다.

한편 개불 내장을 dichloromethane으로 추출한 시료 2 g을 취하여 chloroform으로 용해시켜 분취용 얇은 막 크로마토그래피(20 cm×20 cm×0.7 mm)를 이용하여 10 μ L를 점적한 후, benzene:ethyl acetate(4:1) 혼합 전개 용매로 2번 전개하고 Liebermann-Burchard 시약을 분사하여 steroid계 물질의 Rf 값 영역인 0.47에서 ultraviolet lamp(spectroline사 Model CM-10, USA)를 이용하여 붉은색 띠를 확인하고 이 부분을 분취하여 methanol로 추출하여 glass filter (Pyrex사 3G3, USA)로 여과한 여액을 농축한 후 methanol로 재결정하여 흰색 침상 결정을 얻었다. 이것을 trimethylsilyl화 한 다음에 GC-MS를 통하여 cholesterol, 24-methylene cholesterol(4), 24-ethylidene cholesterol(5)임을 확인하였다(Fig. 1). 이들은 모

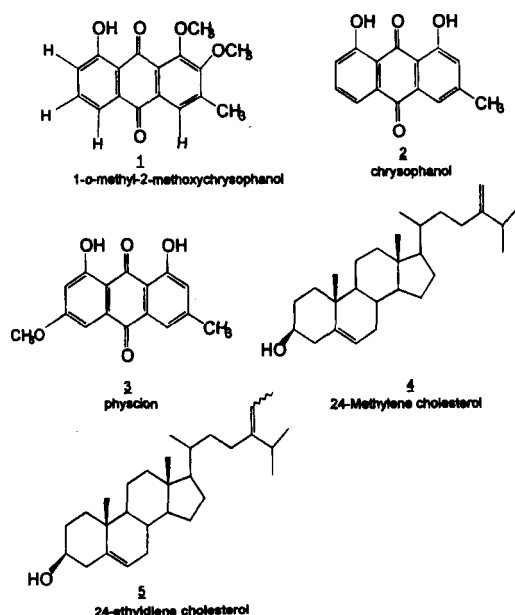


Fig. 1. Compounds (1)-(5) from the *Urechis unicinctus*.

두 알려진 물질들로서 표준 물질의 retention time 및 mass data와 완전히 일치하였다.

1-*o*-Methyl-2-methoxychrysophanol (1). HRMS, obs. 298.0834, C₁₇H₁₄O₅, cal. 298.0837; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 12.91(1H, s, OH-8), 7.96(1H, brs, H-4), 7.76(1H, dd, 7.4, 1.4, H-5), 7.61(1H, dd, 8.4, 7.4, H-6), 7.26(1H, dd, 8.4, 1.4, H-7), 3.98(3H, s, 2-OMe), 3.96(3H, s, 1-OMe), 2.39(3H, s, 3-Me); ¹³C NMR(CDCl₃, 125MHz) δ 188.80(C-9), 182.08(C-10), 162.52(C-8), 158.25(C-2), 153.99(C-1), 140.17(C-3), 136.10(C-6), 132.90(C-11), 129.73(C-13), 126.28(C-4), 124.90(C-14), 124.47(C-7), 118.93(C-5), 61.38(1-OMe), 60.80(2-OHMe), 16.86(3-Me).

Chrysophanol (2). ¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 12.10(1H, s, OH-8), 11.99(1H, s, 1-OH(Me)), 7.80(1H, dd, 7.6, 1.2, H-5), 7.65(1H, dd, 8.3, 7.6, H-6), 7.63(1H, brs, H-4), 7.27(1H, dd, 8.3, 1.0, H-7), 7.08(1H, q, 1.0, H-2), 2.45(3H, s, 3-Me); ¹³C NMR(CDCl₃, 125 MHz) δ 192.54(C-9), 182.00(C-10), 162.41(C-8), 123.36(C-2), 162.56(C-1), 149.39(C-3), 136.94(C-6), 133.64(C-11), 113.73(C-13), 121.36(C-4), 133.28(C-14), 124.55(C-7), 119.93(C-5), 22.27(3-Me).

Physcion (3). ¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 12.31(1H, s, 8-OH), 12.11(1H, s, 1-OH(Me)), 7.35(1H, d, 2.4, H-5), 7.62(1H, brs, H-4), 6.67(1H, d, 2.4, H-7), 7.07(1H, s, H-2), 3.92(3H, s, 6-OMe), 2.43(3H, s, 3-Me); ¹³C NMR(CDCl₃, 125 MHz) δ 190.81(C-9), 182.05(C-10), 165.19(C-8), 124.51(C-2), 162.50(C-1), 148.41(C-3), 166.55(C-6), 135.26(C-11), 113.68(C-13), 121.29(C-4), 133.28(C-14), 106.78(C-7), 108.23(C-5), 22.16(3-Me), 56.08(6-OMe).

Na⁺, K⁺-ATPase와 cyclicAMP phosphodiesterase 활성 측정

Na⁺, K⁺-ATPase(Porcine cerebral Cortex, Sigma)는 최종 농도가 0.02 units/mL로 하여 130 mM NaCl, 20 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl 완충 용액 (pH 7.4) 445 μL를 넣어 5분간 37°C에서 incubation 하였다. 5분 후에 시료 5 μL를 넣고 다시 5분 후에 2 mM ATP 50 μL를 넣어 15분간 반응한 후 5% trichloroacetic acid 500 μL로 효소반응을 정지하였다. 그리고, cyclicAMP phosphodiesterase(Bovine Heart,

Sigma)는 최종농도가 0.015 units/mL로 하여, 0.7 units/mL 5'-nucleotidase(Snake Venom, Sigma), 2 mM MgCl₂, 40 mM Tris-HCl 완충 용액(pH 7.4) 890 μL를 넣어 5분간 37°C에서 incubation하였다. 5분 후에 시료 10 μL를 넣고, 다시 5분 후에 2 mM cyclicAMP 100 μL를 넣어 20분간 반응한 후 5% trichloroacetic acid 100 μL로 반응을 정지시켰다. 정지된 각 효소반응액의 인산은 Martin-Doty법에 따라 720 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 효소 활성의 inhibition %는 다음의 식과 같이 구했다. Na⁺, K⁺이 없는 Na⁺, K⁺-ATPase 완충 용액과 5분간 열탕한 cyclicAMP phosphodiesterase를 각각 back ground로 하였다.

$$\text{Inhibition\%} = \frac{C - S}{C - BG} \times 100$$

C: contol 흡광도

BG: back ground 흡광도

S: sample의 흡광도

결과 및 고찰

서해안 몽산포에서 채집한 개불의 내장의 dichloromethane 추출물을 분취용 TLC로 분리하고 methanol로 재결정하여 흰색 침상 결정을 얻었다. 이것을 trimethylsilyl 유도체로 만든 다음 이들의 GC-MS spectra를 mass library spectra와 비교한 결과 이것은 cholesterol, 24-methylenecholesterol 및 24-ethylidenecholesterol의 혼합물로 판명되었다.

한편 개불의 채벽의 dichloromethane 추출물(12 g)을 solvent partitioning, column chromatography 등으로 분리 정제하고 최종적으로 분취용 HPLC로 노란색의 고체 (1), (2), (3)를 얻었다.

노란색의 (2)화합물은 ¹H-NMR의 δ 7.0-7.8 흡수 띠로부터 aromatic hydrogen의 존재와 δ 2.45(3H, singlet)의 벤젠에 치환된 methyl기, δ 12 부근에서 두 개의 phenolic proton 및 ¹³C-NMR상의 δ 192.5와 182.0 peak로 부터 2개의 C=O group의 존재들로 미루어 methyl기가 있는 diphenolic anthraquinone화합물임을 예측케 하였다. 또 splitting pattern으로 보아 A 고리에는 한 개의 치환기가 있고 C 고리에는 meta 위치에 두 개의 치환기가 있음을 알 수 있었다. 문헌³에 알려진 chrysophanol ¹H 및 ¹³C-NMR 값과 (2)의 값이 일치하여 이 물질이 chrysophanol임을 확인하였다.

(3)의 ^1H 및 ^{13}C -NMR은 (2)와 매우 유사하였다. ^1H -NMR로 보아 두 개의 phenolic -OH(δ 12.11 및 δ 12.31), 벤젠고리의 methyl기(δ 2.43, 3H, singlet) 및 -OCH₃(δ 3.92, 3H, singlet)가 있는 anthraquinone 화합물임을 알 수 있었다. 그리고 splitting pattern으로 보아 A 및 C 고리 모두 meta 위치에 두 개의 치환기가 있음을 알 수 있었다. 최종으로 이들의 ^1H 및 ^{13}C -NMR 값이 Physcion의 문헌치³와 완전히 일치함을 보아 (3)이 physcion임을 확인하였다. (2)와 (3)은 육상 식물에서는 발견된 적이 있지만 해양 생물에서 발견된 것은 이번이 처음이다.

HMBC (J=7Hz)

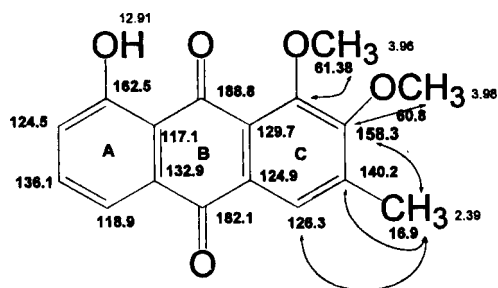


Fig. 2. Selected HMBC correlation in compound (1).

(1)의 ^1H 및 ^{13}C -NMR은 (2)와 매우 유사하였다. (1)화합물은 ^1H -NMR로 보아 한 개의 phenolic -OH(δ 12.91), 두 개의 -OCH₃(δ 3.98 및 δ 3.96), 한 개의 벤젠고리의 methyl기(δ 2.39)가 있는 anthraquinone 화합물임을 알 수 있었다. 그리고 splitting pattern으로 보아 A 고리에는 한 개의 -OH가 C-8위치에, 그리고 C 고리에는 C-1, C-2에 각각 -OCH₃, C3에 methyl가 있음을 결론지었다. 이것은 HMQC, HMBC 및 NOE⁴에 의한 것으로 HMBC (J=7Hz) spectrum으로

HH NOE

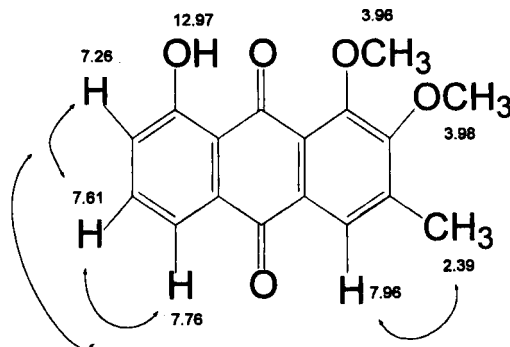


Fig. 3. Selected HH NOE difference correlation in compound (1).

Table 1. NMR Data for 1-o-methyl-2-methoxychrysophanol^a

position	δ ^{13}C (multi) ^b	δ ^1H (multi, J inHz)	HMBC (CNo.) ^c	HH NOE ^d
1	153.99 (s)		1-OMe	
2	158.25 (s)		2-OMe	
3	140.17 (s)			
4	126.28 (d)	7.96, 1H, brs		3-Me
5	118.93 (d)	7.76, 1H, dd, 7.4, 1.4		6, 7
6	136.10 (d)	7.61, 1H, dd, 8.4, 7.4		5, 7
7	124.47 (d)	7.26, 1H, dd, 8.4, 1.4		5, 6
8	162.52 (s)			
9	188.80 (s)			
10	182.08 (s)			
11	132.90 (s)			
12	117.05 (s)			
13	129.73 (s)			
14	124.90 (s)			
3-Me	16.86 (q)	2.39, 3H, brs	2, 3, 4	4
1-OMe	61.38 (q)	3.96, 3H, s	1	
2-OMe	60.80 (q)	3.98, 3H, s	2	
8-OH		12.91, 1H, s		

^a All ^{13}C resonances have been assigned through direct correlation to hydrogens via HMQC and HMBC experiments.

^b ^{13}C -NMR at 125 MHz in CDCl₃, multiplicities determined by DEPT experiment ^c Assignments via HMBC experiment are shown. ^d Assignments through HH NOE difference experiments are shown only.

Table 2. NMR Data for the compounds 2 and 3^a

position	(2)		(3)	
	δ ¹³ C (multi) ^b	δ ¹ H (multi, J inHz)	δ ¹³ C (multi) ^b	δ ¹ H (multi, J inHz)
1	162.56		162.50	
2	124.36	7.08, 1H, q, 1.0	124.51	7.07, 1H, s
3	149.33		148.41	
4	121.36	7.63, 1H, brs	121.29	7.62, 1H, brs
5	119.93	7.80, 1H, dd, 7.6, 1.2	108.23	7.35, 1H, d, 2.4
6	136.94	7.65, 1H, dd, 8.3, 7.6	166.55	
7	124.55	7.27, 1H, dd, 8.3, 1.0	106.78	6.67, 1H, d, 2.4
8	162.41		165.19	
9	192.54		190.81	
10	182.00		182.05	
11	133.64		135.26	
12	115.87		110.27	
13	113.64		113.68	
14	133.28		133.28	
3-Me	22.27	2.45, 3H, brs	22.16	2.43, 3H, s
1-OH (Me)		11.99, 1H, s		12.11, 1H, s
6-OMe			56.08	3.92, 3H, s
8-OH		12.10, 1H, s		12.31, 1H, s

¹H NMR at 500 MHz in CDCl₃ and ¹³C NMR at 125 MHz in CDCl₃. ^b¹³C-NMR at 125 MHz in CDCl₃, multiplicities determined by DEPT experiment.

부터 2.39 ppm의 벤젠고리에 있는 methyl proton과 방향족 탄소 140.2(C-3), 126.3(C-4) 및 158.3 ppm(C-2)사이의 연관성을, 또 3.96 ppm에 있는 수소와 154.0 ppm(C-1)의 탄소와의 연관성, 3.98 ppm에 있는 2-OCH₃ 수소와 158.3 ppm의 탄소(C-2)와의 관련성을 알게 되었다(Fig. 2). 이로부터 methyl기가 C-3에 그리고 수소가 C-4에 있음을 알게 되었다. 이것은 H-11와 H-4사이의 HH NOE difference correlation spectrum (Fig. 3)으로 재확인 할 수 있다.

(1)-(3) 물질의 심장 혈관 작용을 보기 위하여 Na⁺, K⁺-ATPase 저해 작용과 cyclic AMP phosphodiesterase 저해 작용을 검사한 결과 높은 활성 지수를 나타내었다(Table 3).

이와 유사한 구조의 anthraquinone이 포함되어 있는 약초(Polygonum cuspidatum Sieb. et zucc.)가 중국에서는 cholesterol 저해제, 만성 기관지염 치료제 등으로 쓰이고 있다.⁵

(1)-(3)의 ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR값의 assignment를 Table 1과 2에 수록하였다.

참고로 새 천연물 (1)의 ¹H, ¹³C-NMR, HMQC, HMBC, NOE, DEPT 및 EI Mass spectra는 독자들의 요구가 있을 시 제공할 수 있다.

Table 3. (1)-(3)의 생리활성 검색

compound	cAMP phosphodiesterase (PDE) 저해율(%) (100 μ g/mL)	Na ⁺ , K ⁺ -ATPase 저해율(%) (100 μ g/mL)
	(1)	56
(2)	11	19
(3)	-	46

본 논문은 1995년도 한국과학재단 특정기초연구비(과제 번호: 95-0403-21-01-3)와 교육부 기초과학연구소 학술연구 조성비(BSRI 96-3447)와 성균관대학교의 1994년도 성균학술 연구비 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

인 용 문 헌

- Hall, R. E et al, *Comp. Biochem physic.* **1981**, *70B*, 353.
- Garey, J. R. et al, *Arch Biochem Biophys.* **1983**, *22B*, 320.
- Danielsen, K.; Aksnes, D. W.; Francis, G. W. *Magn. Reson. Chem.* **1991**, *29*, 264.
- Pibljaja, K.; Kleinpeter, K. *Carbon-13 NMR Chemical Shifts in Structures and stereochemical Analysis*; VCH: New York, 1994; p 19.
- Huang, K. C. *The Pharmacology of Chinese Herbs*; CRC Press: Florida, 1993; p 106.