

해양 천연 방오물질 laurinterol에 관한 연구

유건식* · 윤오섭†

*한밭대학교 환경개선형신소재개발센터, 한밭대학교 환경공학과

Studies on Marine Natural Antifoulant Laurinterol

Geonseek Ryu* · Oh Sub Yoon†

*Regional Research Center, Hanbat National University

Department of Environmental Engineering, Hanbat National University

(Received March 26, 2003; Accepted May 15, 2003)

ABSTRACT

The development of environmentally nontoxic or non-polluting antifouling additives that can be formulated in practical coating requires assay involving target organisms. Described here are the simple laboratory assays that have been developed using the barnacle, *Balanus amphitrite*, a common fouling organism found throughout temperate and tropical seas. One of the assays depends on synchronous year-round mass culture, the procedure for which is described, of nauplii larvae and cyprids larvae. The laboratory assays provided quantitative estimates of toxicity and settlement inhibition of the test compounds. Laurinterol (1), isolaurinterol (2), alpinsin (3), and aplysin (4) have been isolated from the Korean red alga *Laurencia okamurae*. Their structures were identified by spectral data in comparison with the literature data. Compounds 1-4 inhibited larval settlement of the barnacle *B. amphitrite* with EC_{50} values of 0.18-36 $\mu\text{g/ml}$. Compounds 2-4 showed larval toxicity against nauplii of the barnacle *B. amphitrite* with 5-10 $\mu\text{g/ml}$, while laurinterol (1) exhibited no toxicity at even 100 $\mu\text{g/ml}$. Therefore, laurinterol was expected as a promising natural antifoulant.

Keywords: Antifoulant, Larval toxicity, Settlement inhibition, *Laurencia okamurae*, Laurinterol

I. 서 론

바다 오염물질의 약 80%는 육상으로부터 비롯된다. 육상에서 버리는 생활 오수나 공장의 폐수가 결국에는 바다로 유입된다. 비료와 농약이 물에 섞여 바다로 들어가거나 대기 중의 오염물질이 비와 더불어 바다로 들어간다. 굴뚝이나 자동차 배기통, 소각장에서 나오는 다이옥신, 납 등 독성물질의 상당량이 대기에서 강물로, 다시 바다로 유입된다. 또 직접적으로 바다 한가운데에 버려지는 각종 폐기물, 폐유, 어민들의 폐그물, 유기 독성물질 등 다양한 오염물질들이 바다의 순환을 조이고 있다. 1970년대에 들어서 철선 밀창의 녹을 방지하거나 파래 등의 부착생물들이 들러붙지 못하게 하기 위해 유기독성물질 TBT(tributyltin)를 사용하기 시작하였다. 최근에는 목선, 유조선, 가두리 양식용 어망 등에 생물의

부착 방지용으로 TBT를 함유한 도료가 광범위하게 이용되고 있다. 한 번 칠하면 반년 이상 배 밑창이나 그물에 생물의 부착을 막을 수 있어서 보수의 번거로움이나 비용을 크게 줄일 수 있는 장점을 가지고 있다. 그러나 이런 유기주석 합성화합물[TBT, TBTO (tributyltin oxide), DBT (dibutyltin)]은 생물에 대한 독성이 매우 강하기 때문에 물 속에서 방오 페인트로부터 서서히 녹아 나와 부착생물 뿐만 아니라 다른 생물이나 사람에게도 직접적인 해를 초래한다. TBT는 농도에 따라 수정억제, 세포분열 억제, 기형 담류자 형성, 먹이 섭취 장애, 임포섹스(imposex, 복족류의 암컷에서 수컷의 생식 기관인 페니스가 생겨나는 것) 등과 같은 현상을 나타낼 뿐만 아니라 성전환, 성기능 저하, 난자 감소 등의 원인인 환경호르몬으로 주목받고 있다. 또한 홍합의 성장 속도를 감소시키거나 유생의 높은 사망률의 원인이 되기도 하며, 굴이나 피조개 양식의 양을 급감시키는 주범으로 밝혀지고 있다. 이런 상황에서 우리나라에서도 서둘러 관련법을 제정하여 해양 선진국에서처럼 소형 선박에 TBT 사용을 금하게

†Corresponding author : Department of Environmental Engineering, Hanbat National University
Tel: 82-42-821-1257, Fax: 82-42-821-1257
E-mail : yoseep@hanbat.ac.kr

하고 어망이나 어구에 칠하는 방오제에도 TBT가 사용되지 못하도록 규제할 필요가 있다. 국제해사기구(IMO, International Maritime Organization)에서는 이들 물질의 사용 금지 규제 안을 2003년에 발효한 뒤 2008년부터 전면 사용 금지에 들어갈 예정이다.

바다라는 닫힌계에서 활동하는 저서생물들은 다종의 생물 접근을 방해하기 위한 고유의 방어기구를 갖고 있다. 특히 바다의 부착생물이란 해양 환경에 있어서 자연 상태의 기질로 또는 인위적으로 설치된 구조물에 부착(attachment)하여 서식하는 모든 생물을 말하는데 서식처의 기질 선택, 적응, 경쟁성이 다른 생물에 비해 독특한 편이다. 부착생물의 군집 형성은 일련의 천이과정을 통하여 이루어지는데 유기물 피막 형성은 다음 단계인 착생(着生, 부착(attachment)과 변태(metamorphosis)의 통합적 의미]과 군집 발달을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 천이과정은 해양 환경의 물리적·화학적 특성과 관련된 생물 군집의 생태학적 특성에 의해 영향을 받는다. 예를 들면 바다의 바위나 기타 다른 경성기질(硬性基質)에 착생하거나, 동작을 매우 느리게 하거나, 또는 눈에 잘 띄지 않는 습성을 나타내 보임으로써 포식동물들이 먹이를 발견하기 어렵게 만든다. 이러한 생물들은 적을 피하기 위한 “화학방어(化學防禦)” 기구도 잘 발달되어 있다. 어떤 생물들은 입에 넣었다가도 영겁결에 토해 내야 할 정도로 “맛없는 물질”을 분비하기도 하며, 또 어떤 생물은 적이 자신에 부착하려고 접근할 때 자신을 방어하기 위해 체내에서 독특한 대사물질(metabolite)을 분비하여 부착을 못하게 하는 방어 능력을 가지고 있다. 이처럼 일부 생물들이 착생억제 대사산물(settlement inhibitory metabolites)을 생산한다는 점에 착안하여 1900년대부터 해양생물을 대상으로 미 해군 ONR이 중심이 되어 해양생물의 착생억제 물질의 연구에 관심을 기울여 왔다. 주로 따개비(barnacle)와 홍합(mussel)을 표적생물(target organism)로 설정하여 착생억제 활성 실험을 진행하였는데,¹⁾ 지난 세기 말에는 Duke 대학의 해양연구 실험이 최초로 대량 생육(mass-rearing) 따개비 *B. amphitrite*를 이용한 착생억제 물질 탐색 실험을 착수할 수 있었다. TBT와 같은 독성의 유기합성 방오제에 대응하는 유망한 환경친화적 무독성 대체물질로서 해양생물들의 대사산물이 큰 기대를 모으면서 1996년 Clare 연구팀이 그 간의 천연 착생억제 물질을 리뷰하여 발표하였는데²⁾ 그 중 몇 가지 유망한 물질을 소개하면 다음과 같다: 해면 *Acanthrilla cavernosa*로부터의 cyanoterpenoids,³⁾ 해면 *Callyspongia truncata*로부터의 polyacetylenes,⁴⁾ *Agelas mauritana*가 생산하는 orodion

dimer mauritiamine,⁵⁾ 해면 *Pseudoceratina purpurea*로부터의 dibromotyrosine 유도체 pseudoceratidine⁶⁾ 등이 있으며, 팔방산호 *Dendronephthya* sp.로부터의 trigonelline,⁷⁾ 산호 *Sinularia* sp.로부터의 polyhydroxysterol,⁸⁾ 그리고 이끼벌레 *Zoobotryon peluvidum*로부터의 2,5,6-tribromo-1-methylgramine⁹⁾ 등.

본 연구에서는 따개비 *Balanus amphitrite*를 표적생물로 설정하고 그 유생(larvae)을 일년 내내 배양하여 착생억제 활성(settlement-inhibitory activity) 검정에 사용하였다. 제주도 해조류 50여 종의 메탄올 추출물에 대한 예비활성(prescreening assay) 실험에서 활성이 인정한 쌍발이서실 *Laurencia okamurae*를 실험 시료로 선정하였다. 이 시료의 메탄올 추출물로부터 활성을 추적하면서 분리·정제를 행하고 최종적으로 역상 크로마토그래피에서 방오용 부착억제 활성 성분을 분리하였다. 이들 물질에 대한 분광학적 스펙트럼을 해석하여 구조를 동정하였으며, 이들의 생물활성에 대한 연구를 행하였다.

II. 연구방법

1. 실험 기기 및 재료

저분해능 질량(MS) 스펙트럼은 JEOL JMX-SX 102 spectrometer로 측정하였으며, 고분해능 질량은 JEOL AX-505H로 분석하였다. 자외선(UV, ultraviolet) 스펙트럼은 HP8453 UV/VIS spectrophotometer로 측정하였다. 적외선(IR, infrared) 스펙트럼은 Perkin-Elmer model 1750 FT-IR spectrophotometer를 사용하여 측정하였다. 또한 수소 및 탄소 핵자기공명(¹H- 및 ¹³C-NMR) 스펙트럼은 시료를 CDCl₃에 녹여 상온에서 Bruker ARX-400 spectrometer로 측정하였다. NMR 스펙트럼의 화학이동(chemical shift, δ) 값은 용매 피크 [CDCl₃(δ_H 7.26; δ_C 77.1)]를 기준으로 하여 읽었다. 박층 크로마토그래피(TLC)는 Kiesel gel 60 F₂₅₄ plate (Merck)를 사용하였으며 관 크로마토그래피용 실리카 충전제는 Kiesel gel 60(70~230 mesh, Merck)를 사용하였다.

2. 해수

실험에 필요한 해수는 충남 태안항 부근 인적이 드문 곳에서 떠온 물을 UV로 살균하고 여과하여 사용하였다.

3. 따개비 유생의 배양

따개비는 새우나 게 등과 같은 절지동물문, 갑각강에

속한다. 따개비는 전형적인 해양 부착생물로서 다른 부착생물과 같이 2개의 라이프스타일, 즉 유영형(遊泳型)의 유생기(幼生期)와 부착 생활하는 성체기(成體期)를 갖는다. 성숙한 개체 간에 교미한 후 수정란은 외투강(外套腔)에서 발생이 시작되어 갑각류 특유의 노플리스 유생(nauplii larvae)이 되고 부출(孵出)하여 플랑크톤 생활을 시작하게 된다. 노플리스 유생은 6회 탈피를 행하며 6회째 탈피와 동시에 키프리스 유생(cypris larvae)으로 변하게 된다. 키프리스 유생은 따개비 부착을 위해 특수화된 소화기계(消化器系)를 가지나 섭취하지는 않는다. 이 유생이 부착 가능한 상태가 되면 행동 패턴이 변하기 시작하고, 유생의 손이라 할 수 있는 부착기관(器官)의 끝을 이용하여 부착 장소를 찾는 탐색 행동을 해 나간다. 결국에는 외부 정보를 수용하고 인지하여 부착 장소를 선택하여 고착하게 된다.

성체 따개비는 서해 보령화력발전소 부근 선착장에서 직접 채집하였으며, 22°C에서 통기(通氣)하면서 1 µm 필터로 여과한 바닷물에 보존하였다. 바닷물은 하루걸러 교환해 주었으며, 성숙 따개비에게는 매일 *Dunaliella tertiolecta* (대략 2×10^6 cells/ml)를 먹이로 주었다. 28°C에서 통기한 바닷물에서 16h/8h(L:D) 주기로 1 ml당 5000 유생 배지에서 노플리스 유생을 배양하였다. 이 노플리스 유생에게는 *Skeletonema costatum* (대략 2×10^5 cells/ml), 1 l를 매일 먹이로 주었다. 한편 항생제 streptomycin과 penicillin을 Rittschof *et al.*의 방법에 따라 첨가한 후,¹⁰⁾ 28°C에서 통기하면서 15h/9h(L:D) 주기로 4-5일 동안 배양하여 키프리스 유생이 태어났다. 100 kDa 필터로 여과한 후, 유리 배양 접시에 넣어 6°C에서 보존하였다. 보통 0-3일된 키프리스 유생을 부착억제 실험에 사용하는 것이 통례이지만 약 11일 된 것까지 사용이 가능하였다.

4. 실험 시료의 준비

홍조류 *Laurencia okamurae*는 2000년 봄 제주도 귀덕에서 채집하였고, 건본시료(GD007)는 한밭대학교 천연물화학연구실에 보관되어 있다. 부착억제를 위한 유생 검정(larval assay) 실험은 유기용매에 극히 민감하기 때문에 검정 부피(5 ml)에 4 µl 이하의 메탄올을 사용하였다. 생물검정 전에 테스트 시료의 유기용매를 제거하였고 분산을 최소화하기 위해서 유기용매에 녹인 테스트 시료를 유리 저장 용기의 밑바닥 위에 얇은 필름(thin film)에 전개해 놓았다. 감압 하에서 용매를 제거한 후, 100 kDa보다 큰 분자 입자를 여과하고 제거한 바닷물을 첨가하고 매 30분마다 2분 동안 Pasteur 피펫으로 혼합하였다. 2시간이 지난 후 생물검정 실험을 수행하였다.

5. 시료의 추출과 분리·정제

음건한 해조류 시료(50 g)의 메탄올 추출물(6.4 g)을 90% 메탄올-물 용매계와 *n*-헥산으로 3회 용매 분배하여 두 층으로 나누었다. 하층을 감압 하에서 농축한 후, 30% 메탄올-물 용매계와 클로로포름으로 다시 분배하였다. 클로로포름 층을 C₁₈ 및 SiO₂ 플래시 관 크로마토그래피에서 분획하고, 또 분취용 TLC[전개용매 MeOH/CHCl₃(2:98)]로 분획하여 최종적으로 화합물 1(320 mg)을 얻었다. 한편, 상층(*n*-헥산)도 하층과 같은 방법의 실리카 관 컬럼 및 분취용 TLC에서 정제하여 각각의 화합물 2(28 mg), 3(17 mg), 그리고 4(40 mg)를 얻었다.

Laurinterol (1): colorless oil; $[\alpha]_D^{25} +14.5^\circ$ (c 2.4, CHCl₃); UV λ_{max} (log ϵ) 225 nm (3.8), 283 (4.3); IR (film) ν_{max} cm⁻¹ 3450 (OH), 1580 (aromatic), and 1150 (C-O); EIMS m/z 294 [M]⁺, 296 [M+2]⁺; HREIMS m/z 294.0614 [M]⁺, calcd for C₁₅H₁₉BrO, 295.0619; ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.67 (1H, s, H-12), 6.62 (1H, s, H-9), 2.32 (3H, s, 15-Me), 2.14 (1H, dd, 13.2, 8.0 Hz, Ha-2), 2.031.94 (1H, m, Ha-1), 1.70 (1H, dd, 12.4, 8.0 Hz, Hb-1), 1.45 (3H, s, 13-Me), 1.36 (3H, s, 14-Me), 1.33 (1H, m, Hb-2), 1.19 (1H, m, H-3), 0.63~0.57 (2H, H-5); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) see Table 1.

Isolaurinterol (2): colorless oil; UV λ_{max} (log ϵ) 285 nm (3.3); IR (film) ν_{max} cm⁻¹ 2950 (Csp³-H), 1640 (aromatic); EIMS m/z 294 [M]⁺, 296 [M+2]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.37 (1H, s, H-11), 6.65 (1H, s, H-8), 5.03 (1H, d, 2.0 Hz, Ha-14), 4.86 (1H, d, 2.0 Hz, Hb-14), 2.76 (1H, m, H-3), 2.23 (3H, s, 15-Me), 2.14 (1H, m, Ha-1), 1.97 (1H, m, Ha-2), 1.51 (1H, m, Hb-1), 1.38 (3H, s, 13-Me), 1.38~1.28 (1H, m, Hb-2), 1.13 (3H, d, 7.0 Hz, 12-Me); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) see Table 1.

Aplysinal (3): colorless solid; UV λ_{max} (log ϵ) 296 nm (3.5), 234 (3.7); IR (film) ν_{max} cm⁻¹ 2950 (aliphatic C-H), 1730 (carbonyl) and 1610 (aromatic); EIMS m/z 308 [M]⁺, 310 [M+2]⁺, 281 [M-CHO]⁺, 239; ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 9.68 (1H, s, aldehyde), 7.09 (1H, s, H-11), 6.72 (1H, s, H-8), 2.28 (3H, s, 15-Me), 1.85~1.65 (4H, m, H-1 and H-2), 1.42~1.18 (1H, m, H-3), 1.22 (3H, s, 13-Me), 0.94 (3H, d, 6.7 Hz, 12-Me); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) see Table 1.

Aplysin (4): colorless solid; UV λ_{max} (log ϵ) 296 nm (3.5), 234 (3.7); IR (film) ν_{max} cm⁻¹ 2950 (aliphatic C-H), 1580 (aromatic); EIMS m/z 294 [M]⁺, 296 [M+2]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.06 (1H, s, H-11), 6.55 (1H,

Table 1. ^{13}C -NMR data of compounds 1-5 in CDCl_3 (100 MHz)

Position	laurinterol (1)	isolaurinterol (2)	aplysinal (3)	aplysin (4)	acetylaurinterol (5)
1	25.4	31.7	31.8	31.5	25.7
2	36.1	39.5	43.0	42.9	36.2
3	24.6	38.1	42.4	46.4	24.2
4	29.7	165.4	103.9	100.1	29.9
5	16.4	50.2	58.8	54.6	16.6
6	48.2	133.1	134.3	136.5	48.3
7	134.3	153.4	158.5	158.5	136.5
8	153.4	120.8	111.5	111.2	148.6
9	119.0	137.5	138.0	137.3	126.3
10	136.1	115.9	115.5	114.3	140.0
11	115.1	131.7	126.4	126.8	121.6
12	132.5	21.5	13.0	13.4	132.8
13	23.6	28.1	24.0	23.5	22.7
14	18.8	107.3	202.8	23.7	19.0
15	16.4	22.6	23.0	20.3	21.9
COCH_3					169.7
COCH_3					24.1

s, H-8), 2.23 (3H, s, 15-Me), 1.801.48 (4H, m, H-1 and H-2), 1.23 (3H, s, 13-Me), 1.20 (3H, s, 14-Me), 1.11~1.06 (1H, m, H-3), 1.03 (3H, d, 6.8 Hz, 12-Me); ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100 MHz) see Table 1.

Acetylation of Laurinterol (1): laurinterol(16 mg)과 Ac_2O (1.0 ml), pyridine(1.0 ml)의 혼합물을 밤새 상온에서 교반하였다. 반응 용매를 감압 하에서 제거하고 잔여 혼합물을 SiO_2 관컬럼 크로마토그래피에서 클로로포름으로 정제하여 acetyl laurinterol (5, 14 mg)을 얻었다.

Acetyl laurinterol (5): colorless oil; EIMS m/z 336 $[\text{M}]^+$, 338 $[\text{M}+2]^+$, 321, 323; ^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.82 (1H, s, H-12), 6.88 (1H, s, H-9), 2.34 (3H, s, OCH_3), 2.30 (3H, s, 15-Me), 2.14 (3H, s, COCH_3), 1.96~1.63 (4H, m, H-1 and H-2), 1.43 (3H, s, 13-Me), 1.33 (3H, s, 14-Me), 1.14 (1H, m, H-3), 0.88~0.49 (2H, m, H-5); ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100 MHz) see Table 1.

6. 따개비 유생의 독성 실험(Toxicity Assay)

예비실험을 통해 노플리스 유생과 키프리스 유생은 여러 독성물질에 대해 비슷한 반응 농도를 나타내었는데 전자의 유생은 계속해서 수영하기 때문에 이 실험에서는 노플리스 유생을 사용하는 것이 더 편리하였다. 결과적으로 물 컬럼 안에 정착하는 능력이 있는가 없는가를 독성 반응으로 계산할 수밖에 없었다.¹⁰⁾ 노플리스 유생은 독성 검정 실험을 시작하기 2~4시간 전에 채취하였다. 테스트할 일련의 희석물을 100 kDa로 여과된 물로 만들어 놓은 후 어떤 시료도 첨가하지 않은

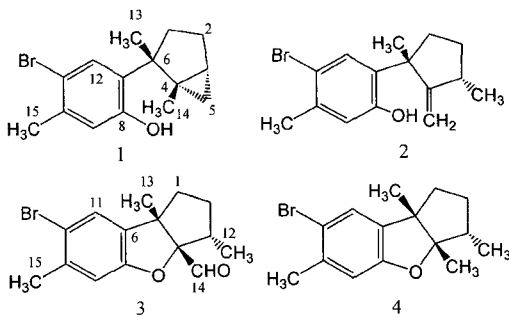
바닷물을 컨트롤(control)로 삼았다. 각 희석물은 테스트 튜브 안에 5 ml씩 피펫을 이용하여 배분하였다. 그 테스트 튜브는 28°C, 배양기에 보존하였으며 24시간 후, 그 검정 시료를 카운트하였다(노플리스, 유생이 조그만 광원에 몰려들어 최소 부피의 물 안으로 모이게 됨). 추가로 20~80마리 노플리스가 함유된 물 100 μl 를 첨가하고 28°C에서 24시간 배양 후, 튜브를 광원 쪽으로 들어올려 노플리스 유생이 수영을 멈춘 희석물을 선정하였다. 물 컬럼 안에 존재하는 노플리스 유생이 있는 모든 튜브에 대해 수영하는 수를 세고, 또 죽어거나/죽은 수를 세었다. 데이터는 50% 감응, 즉 50%의 유생이 수영하지 않는(non-swimming) 농도로 표시하였다. 수영하지 않는 유생은 죽은 것으로 간주하였으며 데이터는 LC_{50} (50% lethal concentration)로 표현하였다.

7. 따개비 유생의 부착억제 실험(Settlement Inhibitory Assay)

시료의 부착억제 활성 검정은 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 행하였다. 25~30마리의 키프리스 유생을 3개의 control과, 5 ml 용액을 포함하는 3개의 실험용 접시(Falcon #1006)에 나누어 넣고 이 접시를 28°C, 15h/9h(L:D) 주기에서 22시간 동안 배양하였다(검정 실험은 항상 light cycle 중 중간의 여러 시간에 행함). 배양 후, 키프리스 유생의 수를 세게 되는데(움직이지 않으면 죽은 것으로 간주하며 가벼운 금속 탐침으로 가볍게 두드려도 응답하지 않으면 죽은 수에 포함), 만약

죽은 키프리스 유생수가 우세하면 100% 죽일 수 있는 가장 낮은 농도에 주목하였다. 그러면서 각 접시에 10% 포르말린을 넣어 검정을 멈추었다. 끌려오지 않은 유생은 이온화되지 않은 바닷물(deionized water)로 접시를 씻어서 흡입 필터기 속에 빨려 들어가게 하였다. 영원히 붙어있거나 혹은 자유로운 유생은 해부현미경(dissecting microscope)을 이용하여 계수하였는데, 부착하는 키프리스와 변태하는 키프리스 사이에는 분명한 구분이 있었다. 어떤 시료의 첨가도 없이 100 kDa 필터 바닷물(즉 control)에서 영원히 부착하는 유생과 결코 부착하지 않는 유생의 빈도수를, 시료를 첨가한 바닷물에서 부착하는 유생과 부착하지 않는 유생의 빈도수와 비교 테스트하였다. 강력한 억제 효과(control 바닷물 속에 부착하는 빈도수와 시료를 첨가한 바닷물에 부착하는 빈도수를 비교하여 $P < 0.05$ 일 때)를 보이는 화합물은 보다 세심한 검정을 행하였다. 이 경우, 부착을 50% 억제(50% 최대 감응을 보이는 효율적인 농도를 EC_{50} 로 함)시키는 화합물의 양을 결정하였다. EC_{50} 결정을 위한 실험에서는 희석물과 control에 대해 살균한 폴리스틸렌 Petri dish(Falcon #1006)로 3회씩 실시하였다. 부착억제에 대한 EC_{50} 값은 희석물의 log 값으로 나타내었다. 시험 화합물에 대해 예비 결정된 EC_{50} 영역의 5개 희석물이 필요한데 그 희석물 5 ml 양의 triplicate는 Falcon 1006 폴리스틸렌 Petri dish를 사용하였다. 15분 동안 접시(donor)안에 그 용액을 놓아두고, 그 다음 새로운 접시(receiver)에 부었다. Donor dish를 바닷물로 씻고 그 다음 5 ml의 100 kDa로 여과한 바닷물로 채웠다. 따라서 각 희석물에 대해 6개 접시, 3개의 donor dish, 3개의 receiver dish를 준비하였다. 20~30의 키프리스 유생을 모든 접시에 첨가한 다음 배양하고 상기(上記)처럼 계수하였다.

III. 결과 및 고찰



화합물 1은 무색 오일로 얻어졌다. 1의 분자식은 고

분해능 MS(m/z 294.0614 $[M^+]$, $\Delta - 0.5$ mmu)와 ^{13}C -NMR 데이터로부터 $C_{15}H_{19}BrO$ 로 결정하였다. 적외선(IR) 스펙트럼은 히드록시기(3450 cm^{-1}), 방향족 $C=C$ ($1610, 1580$), $C-O$ 결합(1150)의 흡수 띠를 보였다. 1H -NMR 스펙트럼은 두 개의 단일선 방향족 수소

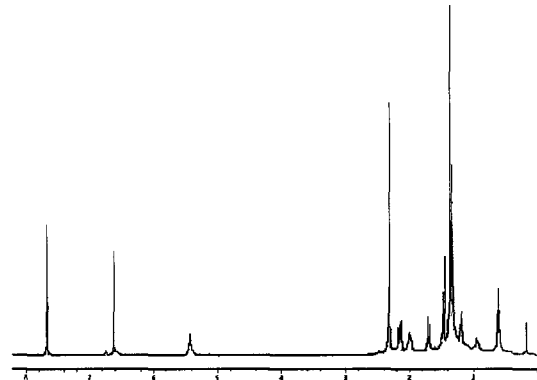


Fig. 1. 1H -NMR spectrum of Laurinterol ($CDCl_3$).

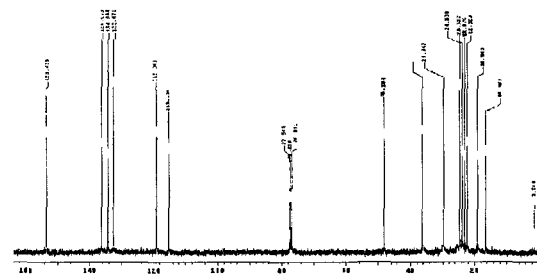


Fig. 2. ^{13}C -NMR spectrum of Laurinterol ($CDCl_3$).

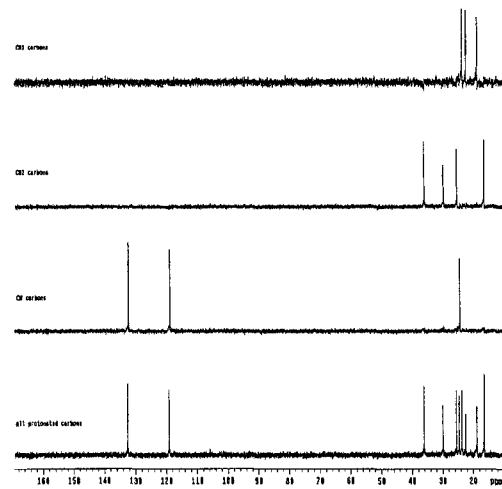


Fig. 3. DEPT spectrum of Laurinterol ($CDCl_3$).

(δ 7.67, 6.62), 3개의 단일선 메틸 수소(δ 2.32, 1.45, 1.36), 그리고 3고리 수소(δ 0.63-0.57)의 특징을 보였다 (Fig. 1). ^{13}C 및 DEPT(Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) NMR 스펙트럼은 4개의 4차환 올레핀 탄소, 2개의 올레핀 메틴 탄소, 2개의 4차환 sp^3 -탄소, 한 개의 메틴, 3개의 sp^3 -메틸렌, 그리고 3개의 메틸을 나타내었다(Table 1 및 Fig. 2, 3). 화합물 1을 무수 초산(Ac_2O)과 피리딘(pyridine)에서 아세틸화하여 모노아세틸화된 화합물 5를 얻음으로써 화합물 1에는 히드록시기 한 개가 존재함을 확인하였다. EIMS 스펙트럼에 같은 크기의 M^+ 와 $(\text{M}+2)^+$ 이온 피크(m/z 294 및 296)가 있는 것으로부터 화합물 1에는 한 개의 브롬 원자의 존재가 더욱 확실해 졌다. 다양한 2차원 NMR 실험을 통해 화합물 1의 골격이 드러났다. H-H

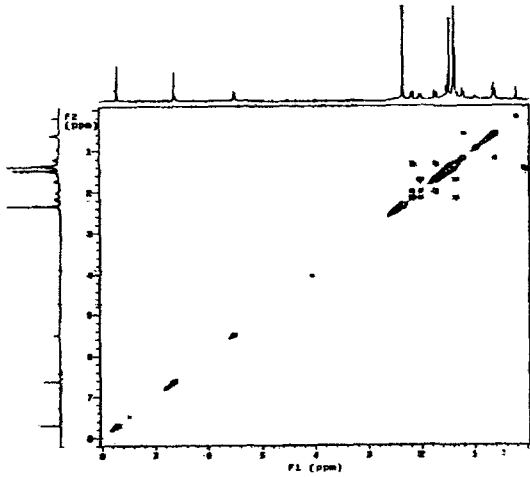


Fig. 4. H-H COSY spectrum of Laurinterol (CDCl_3).

COSY 실험으로부터 수소공명계 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ 의 존재가 확인되었으며(Fig. 4), 각 수소와 $^1J_{\text{HC}}$ 커플링하고 있는 탄소 상관을 HMQC(Heteronuclear correlation through Multiple Quantum Coherence) 실험을 통해 규명하였다(Fig. 5). 또한 화합물 1의 HMBC¹¹ (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity) 실험에서는 13-메틸 수소와 HMBC 상관하고 있는 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ 계와 4차환 벤젠계를 서로 연결할 수 있었다(Fig. 6). 또한 H-13과 H-14, H-13과 Ha-2, Hb-2와 H-5, H-14와 H-3간의 NOESY¹²(Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy) 상관이 13-메틸과 14-메틸간의 *cis*-배열(configuration)을 명확히 하였다(Fig. 7). 결국 화합물 1은 laurinterol로 동정되었다.¹³

이하 화합물 2-4는 화합물 1에서의 같은 방법으로 다양한 2D NMR 데이터를 해석하여 구조를 동정하였다.

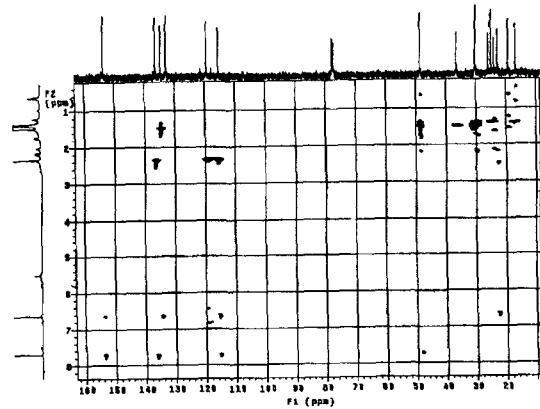


Fig. 6. HMBC spectrum of Laurinterol (CDCl_3).

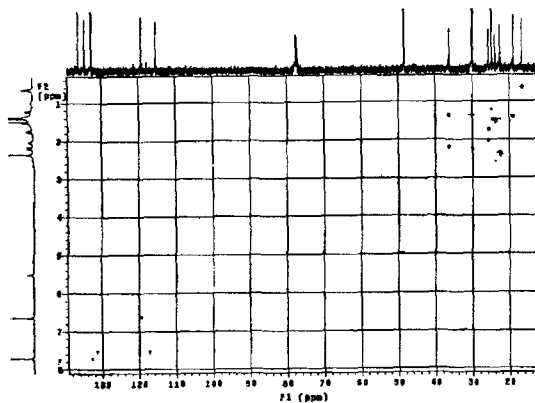


Fig. 5. HMQC spectrum of Laurinterol (CDCl_3).

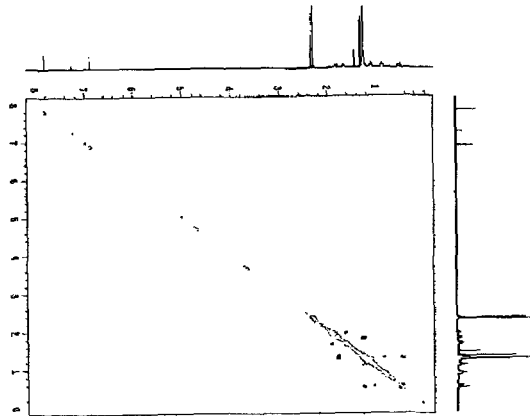


Fig. 7. NOESY spectrum of Laurinterol (CDCl_3).

화합물 2는 무색 오일로 얻어졌으며 화합물 1에서처럼 화합물 2의 EIMS 스펙트럼에서도 두 개의 동위원소 이온 피크(m/z 294, 296)를 드러냈다. 화합물 2의 ^1H - 및 ^{13}C -NMR 스펙트럼은 화합물 1의 한 개 단일선 메틸 대신에 이중선 메틸(δ 1.13), 또 *exo*-메틸렌(δ 4.86, 5.03; 107.3)의 출현을 제외하고는 거의 1의 스펙트럼과 유사함을 보였다. 화합물 2의 NMR 스펙트럼의 데이터는 문헌과 잘 일치하였다. 화합물 2를 isolaurinterol로 동정하였다.¹⁴⁾ 한편, 화합물 3은 무색 고체로 얻어졌으며 EIMS의 m/z 308과 310에서 두 개의 동위원소 이온 피크를 보였다. 화합물 3의 적외선(IR) 스펙트럼은 카르보닐기의 존재를 암시하는 긴 밴드(1730 cm^{-1})를 보였다. 기대했던 바와 같이 화합물 3의 ^1H - 및 ^{13}C -NMR 스펙트럼에서 알데히드 수소(δ 9.86) 및 카르보닐 탄소(δ 202.8)가 각각 드러났다. 결국 화합물 3은 문헌치와 비교하여 *aplysinal*로 동정하였다.¹⁵⁾ 화합물 4는 무색 고체로 얻었으며 EIMS에서 m/z 294와 296에 두 이온 피크를 보였다. 이 화합물의 ^1H -NMR 스펙트럼은 3개의 단일선 메틸(δ 2.23, 1.23, 1.20), 한 개의 이중선 메틸(δ 1.03)을 보였다. 또한 DEPT 실험을 통해 4개의 메틸 탄소, 2개의 메틸렌 탄소가 드러났다. 문헌치와 비교하여 화합물 4를 *aplysinal*으로 동정하였다.¹⁶⁾ 화합물 1-4는 따개비 *Balanus amphitrite*의 키프리스

유생에 대해 부착억제 활성을 보였다(EC_{50} , 0.18~36 $\mu\text{g/ml}$; Fig. 8). 이 중에서 laurinterol (1)은 그 활성이 가장 강력하였다(EC_{50} , 0.18 $\mu\text{g/ml}$). 또한 isolaurinterol (2)는 LC_{50} , 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서, *aplysinal* (3)와 *aplysinal* (4)은 각각 LC_{50} , 5 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유생에 치명적인 독성을 나타내었다(Fig. 9). 반면에 laurinterol (1)은 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서도 독성을 나타내지 아니하였다. 따라서 laurinterol은 아주 유망한 방오제가 될 수 있다.

IV. 결 론

Ceramiales목(目) 해조류는 할로겐을 함유하는 다양한 생물활성 대사산물의 보고(寶庫)로서, 세포독성, 항균 및 항진균 활성을 나타낸다. 그러나 쌍발이서실 *Laurencia okamurae*로부터의 방오 활성은 최초의 보고(report)이다. 비록 화합물 2와 3은 적당한(moderate) 항균작용을 보이지만, 화합물 1과 4는 전혀 항균 활성이 없는 것으로 보아 이들의 부착억제 활성은 항균 작용과는 아무런 관련이 없는 것으로 사려된다. 합성 방오제나 일부 천연 착생억제 물질처럼 화합물 1-4는 할로겐을 함유하였다. Laurinterol (1)은 키프리스 유생에 대한 부착억제 능력이 낮은 농도까지 나타나며, 또한 100 $\mu\text{g/ml}$ 이상 농도에서조차 노플리스 유생에 대한 독성이 없는 것으로 판단되는 바 환경친화적 무독성 방오제로서의 가능성이 기대된다.

이상의 유생 검정 실험에서 LC_{50} 값은 화합물의 독성을 알기 위해 사용되었다. 실험실에서 유생을 대상으로 실험할 때, 무독성 방오제는 따개비 유생을 억제하는 그들의 능력 면에서 독성 물질에 비해 보다 가변적이다. 이러한 무독성 방오제 효율의 가변성은 다양한 방오 메커니즘을 커버할 수 있는 여러 화합물의 혼합물을 사용함으로써 극복할 수 있을 것이다.

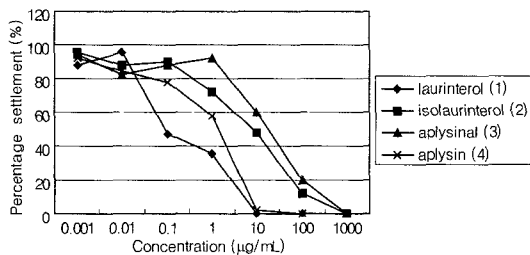


Fig. 8. Settlement percentage of the barnacle larvae cyprids for compounds 1-4.

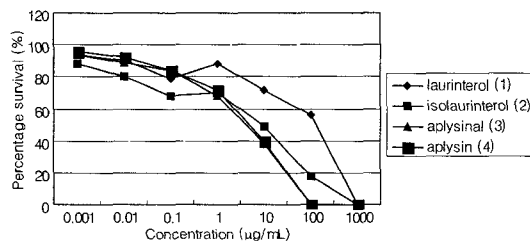


Fig. 9. Survival percentage of the barnacle larvae nauplii for compounds 1-4.

감사의 글

본 연구는 산업자원부에서 주관하는 한국전력의 전력 산업연구개발사업 연구과제 수행의 결과로서 이에 감사를 표합니다. 또한 해조류의 분류 및 동정에 대해 제주대학교의 이용필 교수님, NMR 측정에 (주)KT&G 분석실의 이운철박사님께 감사를 표합니다.

참고문헌

1. Alberte, R. S., Snyder, S., Zahuranec, B. J. and Whetstone, M. : Biofouling research needs for United States Navy: program history and goals. *Biofouling* 6,

- 91-95, 1992.
2. Clare, A. S. : Marine natural product antifoulant: status and potential. *Biofouling* **10**, 141-159, 1996.
 3. Fusetani, N., Hirota, H., Okino, T., Tomono, Y. and Yoshimura, E. : Antifouling activity of isocyanoterpenoids and related compounds isolated from a marine sponge and nudibranchs. *J. Nat. Toxins*, **5**, 249-259, 1996.
 4. Tsukamoto, S., Kato, H., Hirota, H. and Fusetani, N. : Seven new polyacetylene derivatives, showing both potent metamorphosis-inducing activity in ascidian larvae and antifouling activity against barnacle, from the marine sponge *Callyspongia truncata*. *J. Nat. Prod.*, **60**, 126-130, 1997.
 5. Tsukamoto, S., Kato, H., Hirota, H. and Fusetani, N. : Mauritiamine, a new antifouling oroidin dimer from the marine sponge *Agelas mauritiana*. *J. Nat. Prod.*, **59**, 501-503, 1996.
 6. Tsukamoto, S., Kato, H., Hirota, H. and Fusetani, N. : Pseudoceratide: a new antifouling spermidine derivative from the marine sponge *Pseudoceratina purpurea*. *Tetrahedron Lett.*, **37**, 1439-1440, 1996.
 7. Kawamata, M., Kon-ya, K. and Miki, W. : Trigone-line, an antifouling substance isolated from an octocoral *Dendronephthya* sp. *Fish Sci(Tokyo)*, **60**, 485-486, 1994.
 8. Mizobuchi, S., Adachi, K. and Miki, W. : Antifouling polyhydroxysterols isolated from a Palauan octocoral of *Sinularia* sp. *Fish Sci(Tokyo)*, **62**, 98-100, 1996.
 9. Kon-ya, K. and Miki, W. : Effects of environmental factors on larval settlement of the barnacle *Balanus amphitrite* reared in the laboratory. *Fish Sci(Tokyo)*, **60**, 563-565, 1994.
 10. Rittschof, D., Clare, A. S., Gerhart, D. J., Mary, S. A. and Bonaventura, J. : Barnacle in vitro assays for biologically active substances: toxicity and settlement inhibition assays using mass cultured *Balanus amphitrite* amphitrite darwin, *Biofouling*, **6**, 115-122, 1992.
 11. Bax, A., Azolos, A., Dinya, Z. and Sudo, K. : Structure elucidation of the antibiotic desertomycin through the use of new two-dimensional NMR techniques. *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 8056-8053, 1986.
 12. Bodenhausen, G., Kogeler, H. and Ernst, R. R. : Selection of coherence transfer pathway in NMR pulse experiments. *J. Magn. Reson.*, **58**, 370-388, 1984.
 13. Irie, T., Suzuki, M., Kurosawa, E. and Masamune, T. : Laurinterol and debromolaurinterol, constituents from *Laurencia intermedia*. *Tetrahedron Lett.*, **17**, 1837-1840, 1966.
 14. Irie, T., Suzuki, M., Kurosawa, E. and Masamune, T. : Constituents from marine plants. XVI. Laurinterol, debromolaurinterol, and isolaurinterol, constituents of *Laurencia saitoi*. *Phytochem.*, **47**, 3271-3277, 1970.
 15. Otha, K. and Tagaki, M. : Halogenated sesquiterpenes from the marine red alga *Marginisporium aberrans*. *Phytochem.*, **16**, 1062-1063, 1977.
 16. Winkler, L. R., Tilton, B. E. and Hardinge, M. G. : A choligernic agent extracted from sea hares. *Arch. Intern. Pharmacodyn.*, **137**, 76-83, 1962.
 17. Vairappan, C. S., SuzukiAbe, T. and Masuda, M. : Halogenated metabolites with antibacterial activity from the Okinawa *Laurencia* species. *Phytochemistry*, **58**, 517-523, 2001.
 18. Harrowven, D. C., Lucas, M. C. and Howes, P. D. : The synthesis of a natural product family: from debromoisolaureterol to the aplysins. *Tetrahedron*, **57**, 791-804, 2001.
 19. Keifer, P. A., Rinehart, L. K. Jr. and Hooper, I. P. : Renillafoulins, antifouling diterpenes from the sea pansy *Renilla reniformis* (Octocorallia). *J. Org. Chem.*, **51**, 4450-4454, 1986.
 20. Rittschof, D., Kaki, J., Mitchell, R. and Costlow, J. D. : Ion and neuropharmacological studies of barnacle settlement. *Neth. J. Sea Res.*, **20**, 269-275, 1986.