

## 갈조류 지층이로부터 분리한 3개의 Norisoprenoids 화합물

박기의 · 김유아 · 정현아<sup>1</sup> · 이희정<sup>1</sup> · 안종웅 · 이범중<sup>2</sup> · 서영완\*

한국해양대학교 해양과학부

<sup>1</sup>한국해양대학교 해양과학기술연구소

<sup>2</sup>인제대학교 화학과

(2004. 1. 26 접수)

### Three Norisoprenoids from the Brown Alga *Sargassum thunbergii*

Ki Eui Park, You Ah Kim, Hyun Ah Jung<sup>1</sup>, Hee Jung Lee<sup>1</sup>, Jong-Woong Ahn,  
Burm-Jong Lee<sup>2</sup>, and Youngwan Seo\*

Division of Ocean Science, Korea Maritime University, Busan 606-791, Korea

<sup>1</sup>Research Institute of Marine Science and Technology (RIMST), Korea Maritime University, Busan 606-791, Korea

<sup>2</sup>Department of Chemistry, Inje University, Gimhae 621-749, Korea

(Received January 26, 2004)

**요 약.** 우리나라 연안에 널리 분포하고 있는 갈조류로부터 3개의 norisoprenoid 화합물들인 (+)-epiloliolide (1), (-)-loliolide (2), apo-9'-fucoxanthinone (3)을 칼럼크로마토그래피와 역상 HPLC를 사용하여 분리·정제하였다. 이들 분리한 화합물 1, 2 및 3은 갈조류인 지층이로부터 처음 분리되어 보고하는 것이다. 특히 화합물 1은 미생 육상식물에서 분리된 바 있으나, 해양생물로부터는 처음 분리되어 보고하는 것이다. 분리된 화합물의 구조는 <sup>1</sup>H COSY, NOESY, HMQC 그리고 HMBC와 같은 이차원적인 NMR 분광학적인 실험을 이용하여 문헌치와 비교하여 확인하였다.

**주제어:** 갈조류, 지층이, 노르이소프레노이드.

**ABSTRACT.** From *Sargassum thunbergii* which is widely distributed in coastal area of Korea, three norisoprenoids, (+)-epiloliolide (1), (-)-loliolide (2), and apo-9'-fucoxanthinone (3) were isolated by using column chromatography and reverse-phase HPLC. Compound 1, 2 and 3 were for the first time isolated from the Brown Alga *Sargassum thunbergii*. Particularly, Compound 1 was for the first time isolated the marine organism although it was reported from the terrestrial plant. Their structures have been determined by extensive 2-D NMR experiments such as <sup>1</sup>H COSY, NOESY, HMQC, and HMBC and by comparison with the reported data in the literature.

**Keywords:** Brown Alga, *Sargassum thunbergii*, Norisoprenoid

## 서 론

갈조식물(Phaeophyta) 모자반과(Sargassaceae)에 속하는 지층이(*Sargassum thunbergii*)는 우리나라 전 연안에서 흔히 볼 수 있는 해조류로서 조간대 하부에서 뚜렷한 군락을 이루고 있다. 어린 식물은 흔히 사료로 사용되고 있으나 크게 주목받지 못하고 있던 해조류로서 이 생물에 대한 화학적인 연구는 매우 드물어 이 등에

의한 지층이를 이용한 중금속의 흡착제를 개발,<sup>1</sup> 2종류의 glyceroglycolipids 분리,<sup>2</sup> 추출물 분획에 대한 약간의 생리활성도에 대한 보고가 거의 전부이다.<sup>3</sup> 그러므로 본 연구에서는 최근 다양한 해조류의 산업적 이용을 위해 이루어지고 있는 신규 기능성 물질개발에 부응하여 우리나라 전 해안에 걸쳐 풍부하게 자생하고 있는 지층이로부터 다양한 화합물을 분리하고자 하였다.

## 실험방법

### 시약 및 기기

Column packing materials은 RP 18 (YMC-GEL ODS-A, 12 nm, S-75  $\mu\text{m}$ )을 사용하였으며, TLC plate는 RP 18 F254s(Merck)를 사용하였으며, spray reagent는 5%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 를 사용하였다. 추출 및 분획, column chromatography에 사용한 모든 용매는 1급 시약을 사용하였다. Varian RI detector와 high performed liquid chromatography (HPLC, Dionex P580)을 사용하여 화합물을 정제·분리하였다. 사용한 HPLC column은 YMC pack ODS-A (250 $\times$ 10 mm, S 5  $\mu\text{m}$ , 12 mm)을 사용하였고 guard column(7.5 $\times$ 4.6 mm, Alltech)을 사용하였다. 선광도기는  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  용매로 polarimeter(ATAGO, POLAX-2L)를 사용하여 측정하였다.

분리한 화합물의 구조를 동정하기 위하여 Varian NMR 300 spectrometer를 사용하였으며 NMR 측정시 용매는  $\text{CD}_3\text{OD}$ 와  $\text{CDCl}_3$ (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., USA, deuterium degree 99.8%)를 사용하였다.

### 해조시료

실험에 사용한 지충이는 2002년 10월 부산 기장에서 직접 채집하였으며 응달에서 건조한 후 추출하기 전까지  $-25^\circ\text{C}$ 에서 보관하였다가 추출할 때는 잘게 잘라서 사용하였다.

### 지충이의 추출물 및 각 분획물 제조

채집한 지충이는  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :acetone(1:1, v/v) 용매로 2회 추출하고 난 이후 MeOH로 2회 추출하여 각각 29.382 g과 23.011 g의 추출물을 얻었으며 1/2을 덜어 vial에 보관하였다.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :acetone 추출물과 MeOH 추출물을 1:1로 혼합한 조추출물 24.9382 g을 극성순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane, 15% MeOH, *n*-BuOH,  $\text{H}_2\text{O}$  fractions을 얻었으며 감압농축기(EYELA, N-N series)를 사용하여 농축하여 각각 3.602 g, 8.783 g, 1.240 g, 8.054 g을 얻었다.

### 화합물의 분리

지충이의 15% MeOH fraction의 1/2(4.32 g, w/w)을 덜어 RP flash column chromatography를 실행하여 각각 50% (rfc 1, 223.8 mg), 40% (rfc 2, 62.8 mg), 30% (rfc 3, 93.0 mg), 20% (rfc 4, 194.9 mg), 10% aqueous

MeOH (rfc 5, 634.0 mg) subfraction과 100% MeOH (rfc 6, 1.586 g) 그리고 100% EtOAc fraction (rfc 7, 1.323 g)을 얻었다. 그 중 rfc 2 fraction을 1/2 (37.3 mg, w/w)을 덜어 43% aqueous MeOH 용매로 역상 HPLC하이 14개의 subfractions (rfc2-1~14)을 얻었으며, 그중 subfraction 4 (rfc2-4, 9.0 mg)와 5 (rfc2-4, 5.2 mg)를 NMR 측정된 결과 각각 (+)-epiloliolide (1)와 (-)-loliolide (2)로 구조를 확인할 수 있었다. 또한 rfc 3 fraction의 1/2 (93.0 mg, w/w)을 덜어 38% aqueous MeOH 용매로 HPLC하이 11개의 subfractions (rfc3-1~11)을 얻었으며, 그 중 subfraction 8 (rfc3-8, 5.8 mg)을 NMR 측정하여 구조분석한 결과, apo-9'-fucoxanthinone (3)임을 확인할 수 있었다.

**(6*S*,7*aS*)-6-hydroxy-4,4,7*a*-trimethyl-5,6,7,7*a*-tetrahydrobenzofuran-2(4*H*)-one, (+)-Epiloliolide (1)**, a colorless gum;  $[\alpha]_D^{25} +82.5^\circ$  (c 0.01,  $\text{CHCl}_3$ ); LRFABMS  $m/z$  ( $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_3 + \text{H}$ )<sup>+</sup> 197;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.26 (3H, s, H-10), 1.31 (3H, s, H-9), 1.33 (1H, t,  $J = 12.1$  Hz, H-5), 1.51 (1H, t,  $J = 11.8$  Hz, H-7), 1.58 (3H, s, H-8), 1.583 (s, OH), 2.00 (1H, ddd,  $J = 2.2, 4.2$  and  $11.7$  Hz, H-5), 2.53 (1H, ddd,  $J = 2.2, 4.2$  and  $11.2$  Hz, H-7), 4.12 (1H, t,  $J = 4.1$  and  $12.3$  Hz, H-6), 5.70 (1H, s, H-3);  $^{13}\text{C-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 1.28 (3H, s, axial, H-10), 1.28 (1H, dd,  $J = 9.8$  and  $9.8$  Hz, H-5), 1.31 (3H, s, H-9), 1.42 (1H, dd,  $J = 11.7$  and  $11.7$  Hz, H-7), 1.59 (3H, s, axial, H-8), 2.00 (1H, ddd,  $J = 2.2, 4.3$  and  $13.0$  Hz, H-5), 2.46 (ddd,  $J = 2.2, 3.9$  and  $11.7$  Hz, H-7), 4.09 (1H, m, H-6), 5.77 (1H, s, H-3);  $^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 25.34 (C-10), 25.82 (C-9), 30.33 (C-8), 36.18 (C-4), 49.81 (C-7), 50.69 (C-5), 65.21 (C-6), 88.49 (C-7*a*), 113.59 (C-3), 173.77 (C-2), 183.67 (C-3*a*).

**(6*S*,7*aS*)-6-hydroxy-4,4,7*a*-trimethyl-5,6,7,7*a*-tetrahydrobenzofuran-2(4*H*)-one, (-)-Loliolide (2)**, a colorless gum;  $[\alpha]_D^{25} -100.5^\circ$  (c 0.01,  $\text{CHCl}_3$ ); LRFABMS  $m/z$  ( $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_3 - \text{H}$ )<sup>+</sup> 197;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.27 (3H, s, H-9), 1.47 (3H, s, H-8), 1.52 (dd,  $J = 13.7$  and  $3.9$  Hz, H-7), 1.76 (dd,  $J = 13.7$  and  $4.1$  Hz, H-5), 1.78 (3H, s, H-10), 1.98 (dt,  $J = 2.4$  and  $14.0$  Hz, H-7), 2.54 (dt,  $J = 2.8$  and  $14.0$  Hz, H-5), 4.30 (m, H-6), 5.69 (s, H-3);  $^{13}\text{C-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 1.26 (3H, s, H-9), 1.47 (3H, s, axial, H-8), 1.50 (1H, dd,  $J = 14.3$

and 3.6 Hz, H-7), 1.75 (1H, dd,  $J = 13.8$  and 3.9 Hz, H-5), 1.78 (3H, s, equatorial, H-10), 2.01 (dt,  $J = 14.3$  and 2.6 Hz, axial, H-7), 2.48 (1H, dt,  $J = 13.8$  and 2.6 Hz, axial, H-5), 4.30 (1H, brq,  $J = 3.4$  Hz, H-6), 5.67 (1H, s, H-3);  $^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 26.86 (C-10), 26.36 (C-9), 30.57 (C-8), 36.00 (C-4), 45.42 (C-7), 47.03 (C-5), 66.28 (C-6), 87.13 (C-7a), 112.36 (C-3), 172.15 (C-2), 183.00 (C-3a).

(3*R*)-4-[(2*R*,4*S*)-4-acetoxy-2-hydroxy-2,6,6-trimethylcyclohexylidene]but-3-en-2-one, apo-9'-fucosanthinone (3), a colorless gum; negative FABMS  $m/z$  ( $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_5$ -H) 265;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 1.16 (3H, s, H-12), 1.43 (6H, s, H-11 and 13), 1.44 (1H, m, H-2a), 1.52 (dd,  $J = 12.9$  and 11.3 Hz, H-4b), 2.03 (1H, m, H-2b), 2.04 (3H, s, H-15), 2.18 (3H, s, H-10), 2.33 (ddd,  $J = 2.2, 4.4$  and 13.1 Hz, H-4a), 5.37 (1H, tt,  $J = 11.4$  and 4.3 Hz, H-3), 5.86 (1H, s, H-8);  $^{13}\text{C-NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 21.42 (C-15), 26.49 (C-10), 28.99 (C-11), 30.87 (C-13), 31.68 (C-12), 36.08 (C-1), 45.02 (C-2), 45.07 (C-4), 67.44 (C-3), 72.02 (C-5), 100.83 (C-8), 118.33 (C-6), 170.25 (C-14), 197.87 (C-9), 209.27 (C-7).

## 결과 및 고찰

지층이 15% aqueous MeOH fraction을 RP-18 column chromatography와 역상 HPLC를 수행하여 3개의 화합물을 분리하였으며 분리한 화합물은 각각  $\text{CD}_3\text{OD}$ 를 용매로 하여 NOESY, HMQC 그리고 HMBC와 같은 이차원적인 NMR 실험방법을 통해 그 구조를 확인하였다(Fig. 1). 지층으로부터 분리된 3개의 화합물은 이미 분리된 물질의 문헌치와 비교하여 그 구조를 최종 확인하였다.

화합물 1은 무색의 gum으로 분리되었으며,  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 측정 결과,  $\delta$  1.28 (3H, s, axial), 1.31 (3H, s) 그리고 1.59 (3H, s, axial)에서 3개의 methyl peak와  $\delta$  1.28 (1H, dd,  $J = 9.8$  and 9.8 Hz, H-5), 1.42 (1H, dd,  $J = 11.7$  and 11.7 Hz, H-7), 2.00 (1H, ddd,  $J = 2.2, 4.3$  and 13.0 Hz, H-5), 2.46 (ddd,  $J = 2.2, 3.9$  and 11.7 Hz, H-7), 4.09 (1H, m, H-6)에서 하나의 carbinol proton과 그에 인접한 두개의 methylene peaks의 존재를,  $\delta$  5.77 (1H, s, H-3)에서 한 개의 이중결합

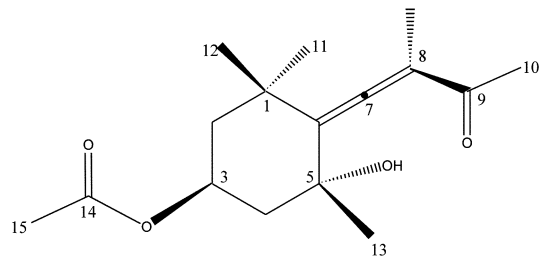
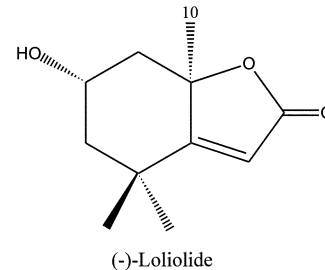
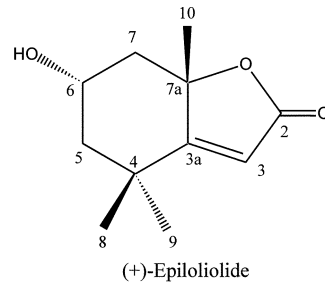


Fig. 1. Structures of isolated compounds from *Sargassum thunbergii*.

에 관여하는 proton peak를 확인할 수 있었다. 또한  $^{13}\text{C NMR}$  (75.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )에서  $\delta$  113.59 (C-3), 173.77 (C-2) 그리고 183.67 (C-3a)에서  $\alpha, \beta$ -unsaturated- $\gamma$ -lactone group에 해당되는 특징적인 peak를 확인할 수 있었고  $\delta$  65.21 (C-6)과 88.49 (C-7a)에서 oxygenated carbon의 peak가 나타나는 것으로 보아 이 화합물이  $\alpha, \beta$ -unsaturated- $\gamma$ -lactone group과 carbinol carbon과 2개의 methylene carbon 그리고 3개의 tertiary methyl group으로 구성된 2환 구조임을 추정할 수 있었다. 특히 NOESY spectrum 결과 (Fig. 2), H-6 ( $\delta$  4.12, 1H, tt,  $J = 4.1$  and 12.3 Hz), H-10 ( $\delta$  1.26, 3H, s, axial), H-8 ( $\delta$  1.59, 3H, s, axial)이 correlation하고 있는 것으로 보아 이 화합물이 (-)-(6*S*, 7*aS*)-epiloliolide임을 추정할 수 있었다. 화합물 1을 문헌치<sup>5,6</sup>와 비교하기 위하여

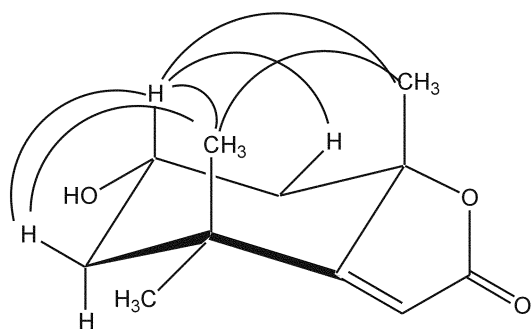


Fig. 2. NOESY Correlation of key protons for epiloliolide (1).

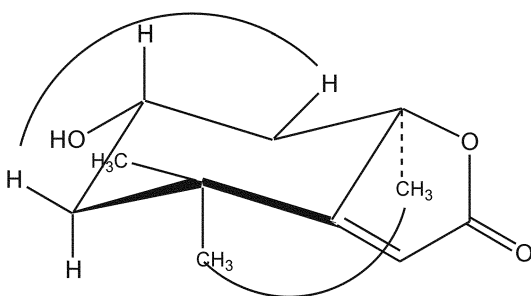


Fig. 3. NOESY Correlation of key protons for loliolide (2).

$CDCl_3$  용매를 이용하여 다시  $^1H$ -NMR를 측정하였으며 구조가 동일함을 재확인할 수 있었다.

화합물 2 역시 무색의 gum으로 분리되었으며,  $^1H$  NMR (300 MHz,  $CD_3OD$ ) 측정 결과, 화합물 1과 유사한 peak pattern을 보이는 것으로보아 이 화합물 역시  $\alpha, \beta$ -unsaturated- $\gamma$ -lactone group과 carbinol carbon과 2개의 methylene carbon 그리고 3개의 tertiary methyl group으로 구성된 2환 구조임을 추정할 수 있었다. 정확한 구조를 확인하기 위해 이차원적 NMR 실험을 수행하였으며 그 결과 화합물 1과는 다른 NOESY correlation을 나타내었다(Fig. 3). 특히 화합물 1에서 나타났던 H-6 ( $\delta$  4.30, 1H, br quin,  $J$  = 3.4 Hz)의 methyl groups [H-10 ( $\delta$  1.78, 3H, s, equatorial), H-8 ( $\delta$  1.47, 3H, s, axial)]과의 특징적인 correlation은 사라진 것으로 보아, 이 화합물은 (-)-(6R,7aS)-loliolide임을 추정할 수 있었다. 화합물 2를 문헌치<sup>5,8</sup>와 비교하기 위하여  $CDCl_3$  용매를 이용하여 다시  $^1H$ -NMR를 측정하였으며 구조가 동일함을 재확인할 수 있었다.

화합물 3은 무색의 gum으로 분리되었으며,  $^1H$  NMR (300 MHz,  $CD_3OD$ ) 측정 결과,  $\delta$  1.26 (3H, s, H-9), 1.47 (3H, s, axial, H-8), 1.50 (1H, dd,  $J$  = 14.3 and 3.6

Hz, H-7), 1.75 (1H, dd,  $J$  = 13.8 and 3.9 Hz, H-5), 1.78 (3H, s, equatorial, H-10)에서 5개의 methyl group의 peak를 확인할 수 있었으며,  $\delta$  5.86 (1H, s, H-8)에서 1개의 이중결합에 관여하는 특징적인 proton peak를 확인할 수 있었다. 또한  $^{13}C$  NMR (75.5 MHz,  $CD_3OD$ )에서  $\delta$  100.8 (C-8), 209.3 (C-7) 및 118.3 (C-6)에서 특징적인 allene group의 존재도 확인할 수 있었고,  $\delta$  197.9 (C-9)과 170.3 (C-14)에서 carbonyl group의 peak를 확인할 수 있었으며 2개의 methylene peaks ( $\delta$  45.2 & 45.1)를 확인할 수 있었다. 측정치를 문헌치<sup>9</sup>와 비교한 결과 화합물 3의 구조가 apo-9'-fucoxanthinone임을 확인할 수 있었다.

화합물 1과 2는 육상식물에서 몇 번 발견되었으나 해양생물에서는 발견된 예가 매우 드물어 갈조류 *Cystophora moniliformis*와 해양연체동물에서 각각 한 번 분리되었다.<sup>5,7</sup> 또한 화합물 3은 특이한 allene group을 가지고 있는 대사물질로서 해양 미세조류에서 한 번 분리된 경우를 제외하고<sup>9</sup> 이번에 처음으로 부산 연안에서 채집한 갈조류 지층이에서 발견되었다. 이와 같이 화합물 1, 2 및 3은 해양 천연물로는 매우 드물게 발견된다고 할 수 있으나 이 화합물을 함유하고 있는 갈조류인 지층이는 우리나라 연안에 풍부하게 존재하는 종이기 때문에 이 화합물들을 손쉽게 분리, 정제할 수 있을 것이다. 화합물 중 2와 3은 각각 천연역치활성과 세포독성이 보고된 바 있으며<sup>10</sup> 해양에서 드물게 발견되는 생태학적인 특성을 감안할 때 매우 흥미있는 활성이 기대된다. 따라서 추후 추가적으로 나량의 화합물을 분리한 후 이들에 대한 다양한 활성을 검색할 예정이다.

이 논문은 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었습니다(KRF-2002-005-C00005). 그리고 시료를 분류해주신 유종수 박사님께 감사드립니다.

## 인용문헌

1. Suh, K.H.; Lee, H.S.; Suh, J.H. *Bull. Kor. Fisher. Soc.*, **2000**, *33*, 60.
2. Son, B.W.; Cho, Y.J.; Kim, N.K.; Choi, H.D. *Bull. Kor. Chem. Soc.*, **1992**, *16*, 584.
3. Itoh, H.; Noda, H.; Amamo, H.; Zhuang, C. *Anticancer res.*, **1993**, *13*, 2045.
4. Tsukamoto, S.; Hirota, H.; Kato, H.; Fusetani, N. *Fisher. sci.*, **1994**, *60*, 319.
5. Mori, K.; Khlebnoikov. *Liebigs Ann. Chem.*, **1993**, *77*.

6. Chung, A.K.; Kwon, H.C.; Choi, S.Z.; Min, Y.D.; Lee, S.O.; Lee, W.B.; Yang, M.C.; Lee, K.H.; Nam, J.H.; Kwak, J.H.; Lee, K.R. *Kor. J. Pharmacogn.*, **2002**, *33*, 81.
  7. Ravi, B.N.; Murphy, P.T.; Lidgard, R.O.; Warren, R.G.; Wells, R.J. *Aust. J. Chem.* **1982**, *35*, 171.
  8. Machida, K.; Kikuchi, M., *Phytochem.* **1996**, *41*, 1333.
  9. Doi, Y.; Ishibashi, M.; Yamaguchi, N.; Kobayashi, J. *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 1097.
  10. Okada, N.; Shirata, K.; Niwano, M.; Koshino, H.; Uramoto, M. *Phytochem.* **1994**, *37*, 281.
-