

해양 해면 *Luffariella sp.*의 화학적 성분에 대한 연구

박선구* · 김택재 · 조현우†

*국립환경연구원 영산강수질검사소

†경기대학교 이과대학 화학과

(1996. 8. 14. 접수)

A study on Chemical Constituents from Marine Sponge *Luffariella sp.*

Sun Ku Park*, Taek Jae Kim and Hyun-Woo Cho†

*Youngsan River Water Resource Research Institute National Institute of Environmental Research 813 Woosan-Ri
Songkwang-Myon Seun Chun-City, Jeunranam-Do, Korea

†Department of Chemistry, Kyonggi University San 94-6, Yiui-dong, Paldal-ku, Suwon, Kyonggi-do, 442-760,
Korea

(Received Aug. 14, 1996)

요약: 인도네시아 Manado만의 Sulawesi에서 채집한 KB cancer cell line에 대해 in vitro로 활성을 가지고 있는 것으로 추정되는 해면 *Luffariella sp.*로부터 Aaptamine(1) 및 Demethyl(oxy)aaptamine(2)을 분리하였다. 이들 화합물의 화학구조는 ^1H -, ^{13}C -NMR, ^1H - ^{13}C (1 bond) heteronuclear multiple quantum coherence spectroscopy(HMQC), electron ionization mass spectroscopy(EIMS), UV 및 IR에 의해 밝혔다.

Abstract: The two metabolites, Aaptamine(1) and Demethyl(oxy)aaptamine(2) were isolated from marine Sponge *Luffariella sp.*, collected in October 1992, Manado Bay, Sulawesi in Indonesia showed in vitro activity against KB cancer cell line. Their structures were elucidated by ^1H -, ^{13}C -NMR, ^1H - ^{13}C (1 bond) heteronuclear multiple quantum coherence spectroscopy(HMQC), electron ionization mass spectroscopy(EIMS), ultra-violet spectroscopy(UV) and infrared spectroscopy(IR).

Key words: *Luffariella sp.*, Aaptamine, Demethyl(oxy)aaptamine, Spectroscopic method, Flash Column Chromatography

1. 서론

천연물의 의약품 자원에 대한 연구가 주로 육상 식물에 치우쳐 왔지만 근래에는 해양 자원으로 부터 새로

운 의약품 자원의 개발에 관심이 집중되고 있다. 또한 새로운 질병들이 발생됨에 따라 이에 대한 치료제 개발이 절실히 요구되면서 해양생물로부터 항암, 항박테리아, 항바이러스 효과를 갖는 화합물들이 발견되고

있어 해양 생물에 대한 관심이 크게 고조되고 있다.

한 예로서 해면 Jaspis종에서 Jaspamide 성분이 발견되었는데, 이는 살균, 항생, 항암 등 매우 특이한 약리작용이 있어 최근에 주목을 받고 있는 depsipeptide의 하나이다.¹

본 연구에서는 SCUBA Diver에 의해 Indonesia Manado만 Sulawesi의 깊이 3m에서 채집한 해면 *Luffariella* sp.의 methanol 추출물로부터 생리활성이 있는 물질을 분리하여 그 화학구조를 밝히고자 하였다. 이 해면의 추출물을 in vitro로 KB cancer cell line²에 대해 시험한 결과, 활성을 갖게 되어 실험을 수행하게 되었다.

2. 실험

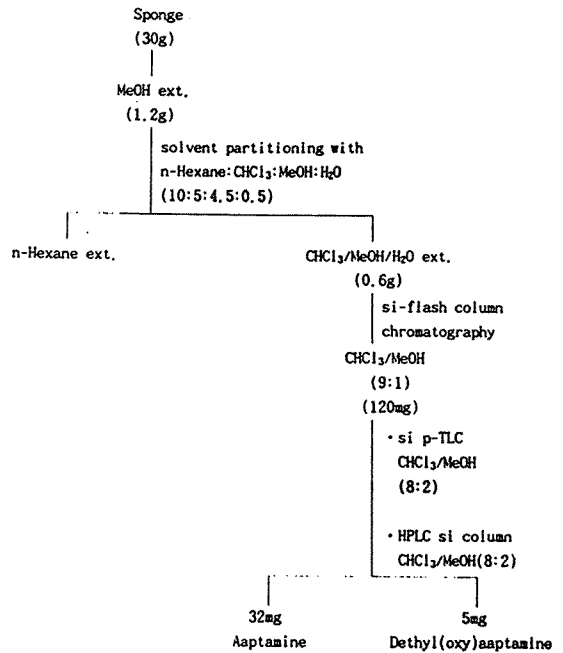
2.1. 측정 기기 및 시약

¹H-NMR(500MHz) 및 ¹³C-NMR(125MHz) 스펙트럼은 General Electric GN500(CA, U. S. A.)을 사용하여 측정하였으며, 용매로는 CDCl₃(δ 7.2)을 사용하였다.

IR spectrometer는 Perkin-Elmer사의 Model 1420(Norwalk, CT06859-0012, U. S. A.)를, UV-Vis spectrometer는 Hewlett-Packard사의 Model 88452A(Palo Alto, CA94304, U. S. A.)를 사용하였다. Mass spectra는 VG-70SE magnetic sector mass spectrometer(Cheshire, U. K.)로부터 얻었으며, 시료의 분리를 위하여 사용한 HPLC는 Water사 Model 441(Milford, MA 01757, U. S. A.)이었고, column은 YMC-guardpack ODS-A(30cm×10mm I.D., S-5 μ m, 120A)과 microsorb Si 80-199-C₅, G9 10041(山村化學, 日本)을 사용하였다. HPLC로 분리하기 전 시료의 정제를 위한 Bond Elute로는 Varian C₁₈ 1210-2028, Si 1210-2037(Sugar Land, TX 77478, U. S. A.)을 사용하였으며, TLC는 Merck RP-C₁₈F₂₅₄S(D-6100 Darmstadt, Germany)와 Sigma T-6270 Lot 21H0126(Louis, MO 63178, U. S. A.)을 사용하였다. 점적은 UV lamp, vanillin 용액 및 진한 황산 spray 등으로 확인하였다. 본 연구에서 사용한 모든 시약은 GR급으로 정제하지 않고 그대로 사용하였다.

2.2. 시료의 채취와 추출

시료는 1992년 10월 SCUBA Diver에 의해 인도네시아 Manado만 Sulawesi의 깊이 3m에서 채집된 젖은(fresh) 해면 30g을 사용하였다. 깨끗한 플라스틱 자루에 젖은 해면을 넣고, 2일 동안 냉동시킨 후 이들을 성글게 자르고 4일 동안 냉동건조시켰다. 건조된 해면을 잘게 부수고 시료를 유리병에 넣고 메탄올을 첨가한 후 2일간 담가 놓았다. 메탄올 추출액을 Bucher funnel을 이용하여 거른 다음, rotary evaporator로 용매를 제거하였다. 건조된 추출물을 n-hexane : CHCl₃ : MeOH : H₂O(10.0 : 5.0 : 4.5 : 0.5)로 solvent partitioning을 실시하였으며, 분별 깔때기로 유기층과 물층을 분리하였다. 물층을 vacuum 감압하에서 rotary evaporator로 용매를 제거하여 0.6g의 추출물을 얻었다.



Scheme 1.

3. 결과 및 고찰

3.1. HPLC에 의한 분리

시료를 추출하여 얻은 물층의 추출물(0.6g)을 용리 용매로 CHCl₃ : MeOH(9 : 1)를 사용하고 silica-gel flash column chromatograph로 용리시켜 분획물(120mg, 용출 부피 250mL)을 얻었다. 분획물을 CHCl₃ : MeOH(8 : 2)의 전개용매로서 TLC로 분리

시킨 다음 Rf치가 0.3인 약간 불순한 점적을 분취하였다.

이것을 정제하기 위해 silica-gel column, CHCl₃ : MeOH(8 : 2)의 용리용매(유속 1.6mL/min)와 굴절을 검출기/UV 검출기(분석파장 254nm)로 된 고성능 액체 크로마토그래프(HPLC)로 분리하고 분획물을 분취한 결과 머무름 시간이 10.5분인 노란색의 고체 화합물(1)(32mg, m.p. 111~115°C)과 머무름시간이 11.5분인 노란색의 고체 화합물(2)(5mg, m.p. 197~201°C)을 각각 얻었다.

3.2. 분광학적 방법에 의한 구조 확인

화합물 (1)과 (2)의 NMR 결과에서 분자내의 양성자와 탄소원자와의 화학구조에 대한 상관관계는 Fig. 1에 나타낸 HMQC 특성 Spectra로부터 구조를 해석하였다.³ 먼저 Fig. 2 및 Table 1에 나타낸 화합물(1)의 ¹H-NMR Spectrum(CDCl₃ 용매)과 화학구조와의 관계를 살펴보면 방향족성 양성자로서 4개의 chemical shift가 δ 7.67(d, 1H, J=7.04Hz), 7.12(d, 1H, J=7.

25Hz), 6.74(d, 1H, J=7.25Hz) 및 6.35(d, 1H, J=7.04Hz)에서 확인되었다.

또한 방향족성 양성자로서 1개의 chemical shift가 δ 6.87(s, 1H), 그리고 2개의 methoxy 양성자로서 chemical shift가 각각 δ 3.77(s, 3H)과 3.66(s, 3H)에서 나타났다. 다음 Table 1 및 Fig. 3에 나타낸 ¹³C-NMR Spectrum(CDCl₃ 용매)을 보면 방향족성 탄소원자로서 11개의 chemical shift가 δ 156.42, 149.95, 139.97, 133.43, 132.36, 131.17, 129.70, 116.47, 112.40, 99.61 및 98.11에서 확인되었고, 2개의 methoxy 탄소원자로서 chemical shift가 각각 δ 59.78과 55.47에서 각각 나타났다.

한편, CD₃OD+CDCl₃(3 : 1)를 사용한 화합물(1)의 ¹H- 및 ¹³C-NMR을 살펴보면 Table 1 및 Fig. 4와 같이 H-NMR의 경우 방향족 양성자 δ 7.34(d, 1H, J=6.3Hz), 6.93(d, 1H, J=7.2Hz), 6.44(d, 1H, J=6.3Hz), 5.79(d, 1H, J=7.2Hz) 및 6.23(s, 3H), methoxy 양성자 δ 3.78(s, 3H), 3.67(s, 3H)에서 특정 스펙트럼이 각각 나타났고, ¹³C-NMR을 보면 Fig. 5와 같이 방

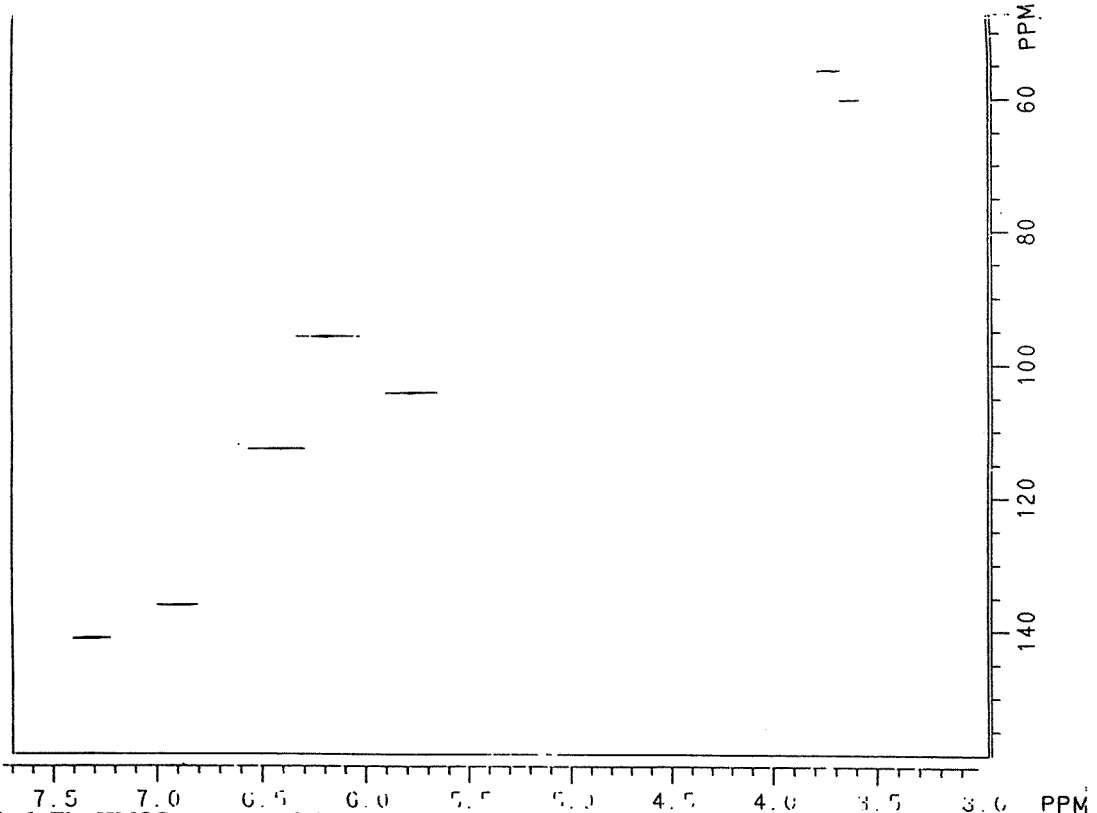


Fig. 1. The HMQC spectrum of the compound (1).

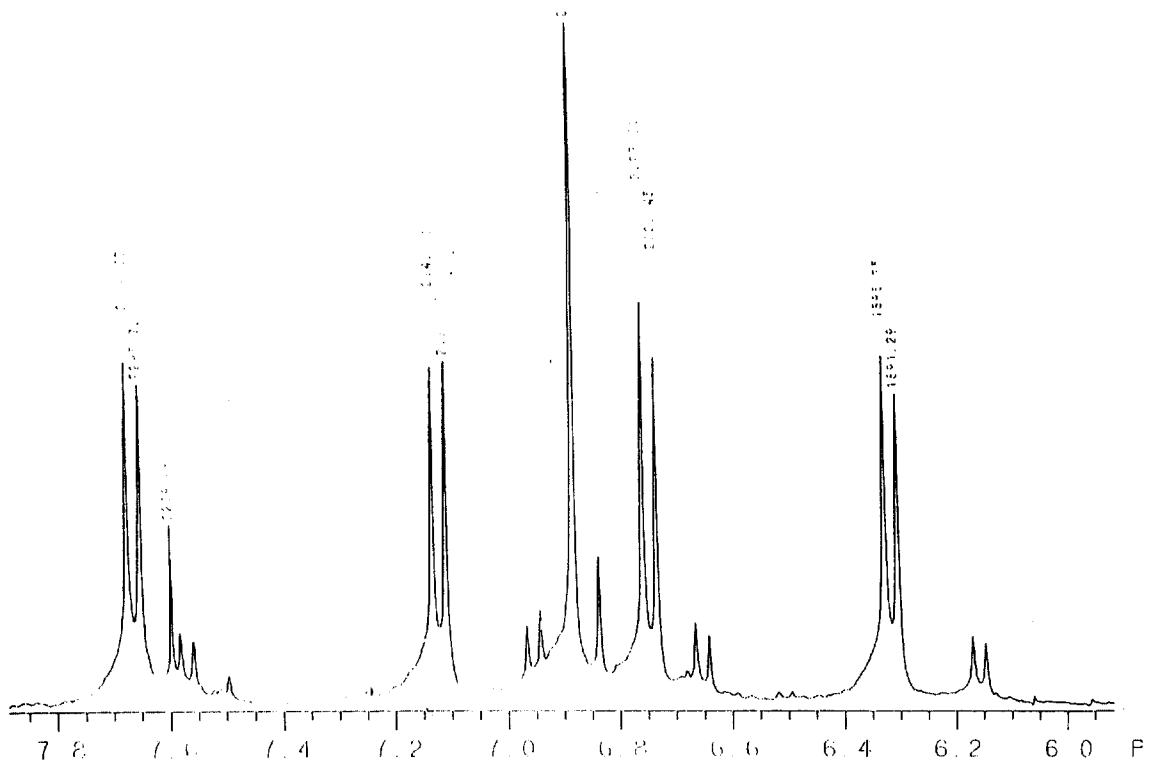


Fig. 2. The $^1\text{H-NMR}$ spectrum of the compound (1) (in CDCl_3).

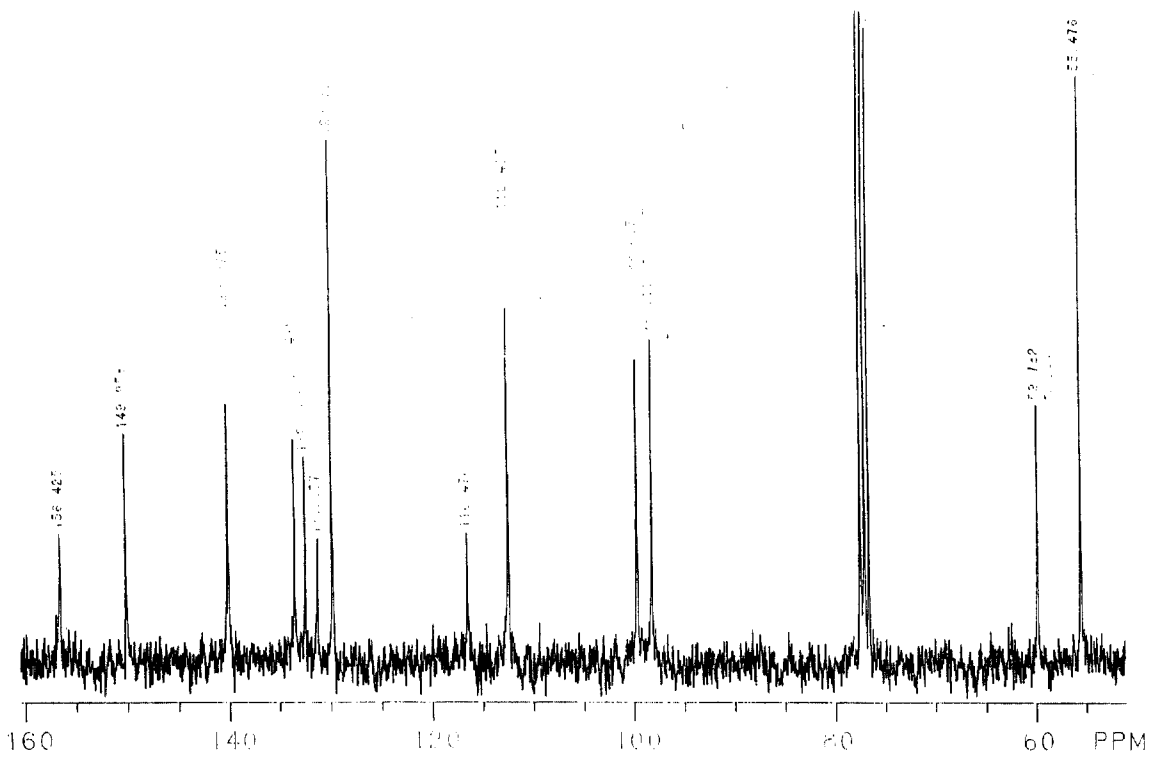


Fig. 3. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of the compound (1) (in CDCl_3).

Table 1. NMR data for compound (1) and compound (2)

position	¹ H-NMR of (1) (in CDCl ₃)	¹³ C-NMR of (1) (in CDCl ₃)	¹ H-NMR of (1) [in CDCl ₃ +CD ₃ OD(1 : 3)]	¹ H-NMR of (2) (in CDCl ₃)
2	7.67(d, 1H, J=7.04Hz)	139.77	7.34(d, 1H, J=6.3Hz)	8.75(d, 1H, J=5.6Hz)
3	6.35(d, 1H, J=7.04Hz)	98.11	6.44(d, 1H, J=6.3Hz)	7.85(d, 1H, J=5.6Hz)
3a		149.95		
5	7.12(d, 1H, J=7.25Hz)	129.70	6.93(d, 1H, J=7.2Hz)	8.75(d, 1H, J=4.5Hz)
6	6.74(d, 1H, J=7.25Hz)	99.61	5.79(d, 1H, J=7.2Hz)	7.40(d, 1H, J=4.5Hz)
6a		132.36		
7	6.87(s, 1H)	112.40	6.23(s, 3H)	6.65(s, 1H)
8		156.42		
9		131.17		
9a		133.43		
9b		116.47		
8-OMe	3.77(s, 3H)	55.47	3.78(s, 3H)	3.72(s, 3H)
9-OMe	3.66(s, 3H)	59.78	3.67(s, 3H)	

s : singlet, d : doublet

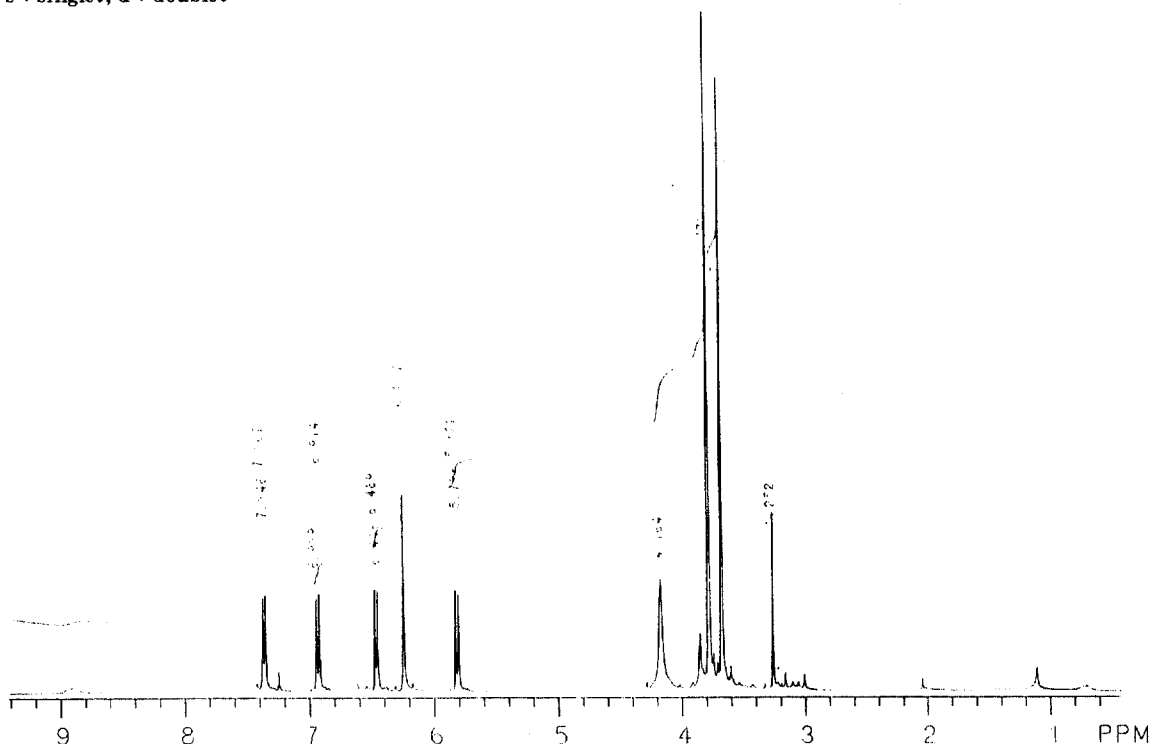


Fig. 4. The ¹H-NMR spectrum of the compound (1) (in CD₃OD + CDCl₃, 3 : 1).

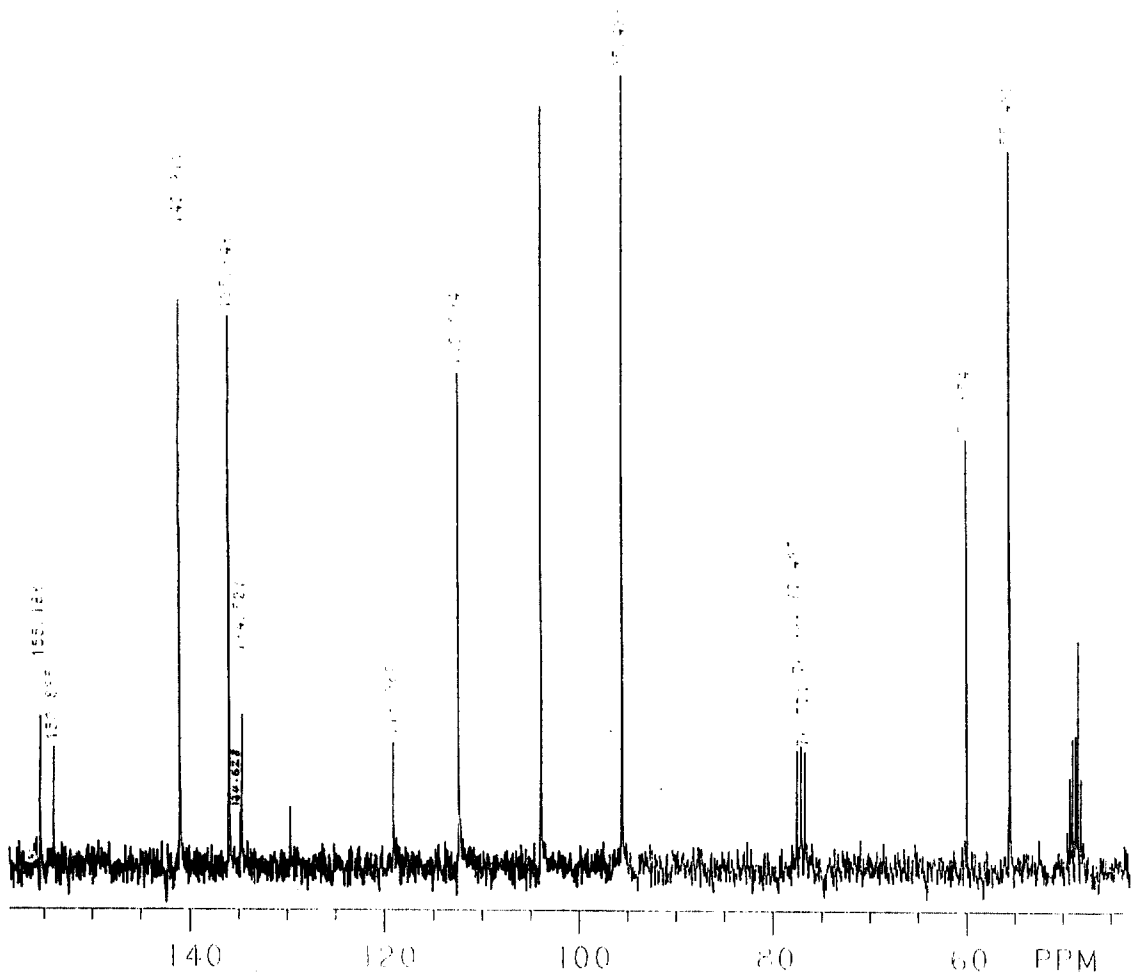


Fig. 5. The ^{13}C -NMR spectrum of the compound (1)(in $\text{CD}_3\text{OD} + \text{CDCl}_3$, 3 : 1).

항쪽 탄소원자에 의한 δ 155.19, 153.84, 140.91, 135.85, 134.63, 134.53, 129.80, 118.96, 112.29, 103.81 및 95.44의 흡수 피크와, 그리고 2개의 methoxy 양성자에 의한 δ 59.85 및 55.43의 특성 스펙트럼이 나타났다.

한편, Table 2에 수록한 전자 이온화(EI) 방식의 특성 mass spectrum을 보면 분자이온이 m/z 228(M^+ , RA(relative abundance)21)과 토막이온이 197($\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{O}$, RA 32), 166($\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{O}$, RA 19) 및 77(RA 52) 등임을 확인할 수 있었다. 또한 IR Spectrum(KBr pellet)에서 중요한 특성 흡수 피크와 화학구조와의 관계를 살펴보면 N-H 신축진동의 흡수 피크로서 3350cm^{-1} , 방향족 C-H 흡수 피크로서 3080cm^{-1} , C=C 흡수 피크로서 1610cm^{-1} 및 C-O 흡수 피크로서

1240cm^{-1} 가 각각 나타나는 것을 확인하였다.

그리고 Table 2에 수록한 UV Spectrum(H_2O 용매)의 결과에서 최대 흡수파장 및 몰 흡수계수는 381nm($\epsilon=5010$), 350nm($\epsilon=3760$), 310nm($\epsilon=3640$), 255nm($\epsilon=17900$), 236nm($\epsilon=14720$) 및 214nm($\epsilon=13700$)였다. 이상과 같은 NMR, MS, IR 및 UV에 의한 특성 스펙트럼은 이미 알려진 문헌값³과 비교적 잘 일치하였다. 따라서 화합물(1)의 화학구조는 아래와 같은 구조를 갖는 aaptamine으로 확인할 수 있었다.

다음 화합물(2)의 분광학적인 Spectra와의 관계를 살펴보면 Table 1과 Fig. 6에 나타낸 바와 같이 ^1H -NMR spectrum(CDCl_3 용매)로부터 방향족성 양성자로서 4개의 chemical shift가 δ 8.75(d, 1H, $J=5$.

Table 2. MS, IR, and UV data for compound (1) and compound (2)

Compound	MS	IR	UV
(1)	$m/z : 228(M^+, RA21)$	$3350\text{cm}^{-1}(\nu_{N-H})$	$381\text{nm}(\epsilon 5010)$
	$197(M^+-CH_3O, RA32)$	$3080\text{cm}^{-1}(\nu_{C-H})$	$350\text{nm}(\epsilon 3760)$
	$166(M^+-CH_3O, RA19)$	$1610\text{cm}^{-1}(\nu_{C=C})$	$310\text{nm}(\epsilon 3640)$
	$77(RA52)$	$1240\text{cm}^{-1}(\nu_{C-O})$	$255\text{nm}(\epsilon 17900)$
			$236\text{nm}(\epsilon 14720)$
(2)	$m/z : 213(M^+, RA25)$	$3340\text{cm}^{-1}(\nu_{N-H})$	$370\text{nm}(\epsilon 5035)$
	$181(M^+-CH_3O, RA31)$	$3080\text{cm}^{-1}(\nu_{C-H})$	$355\text{nm}(\epsilon 5520)$
	$77(RA57)$	$1660\text{cm}^{-1}(\nu_{C=O})$	$303\text{nm}(\epsilon 1730)$
		$1610\text{cm}^{-1}(\nu_{C=C})$	$232\text{nm}(\epsilon 1050)$
		$1240\text{cm}^{-1}(\nu_{C-O})$	

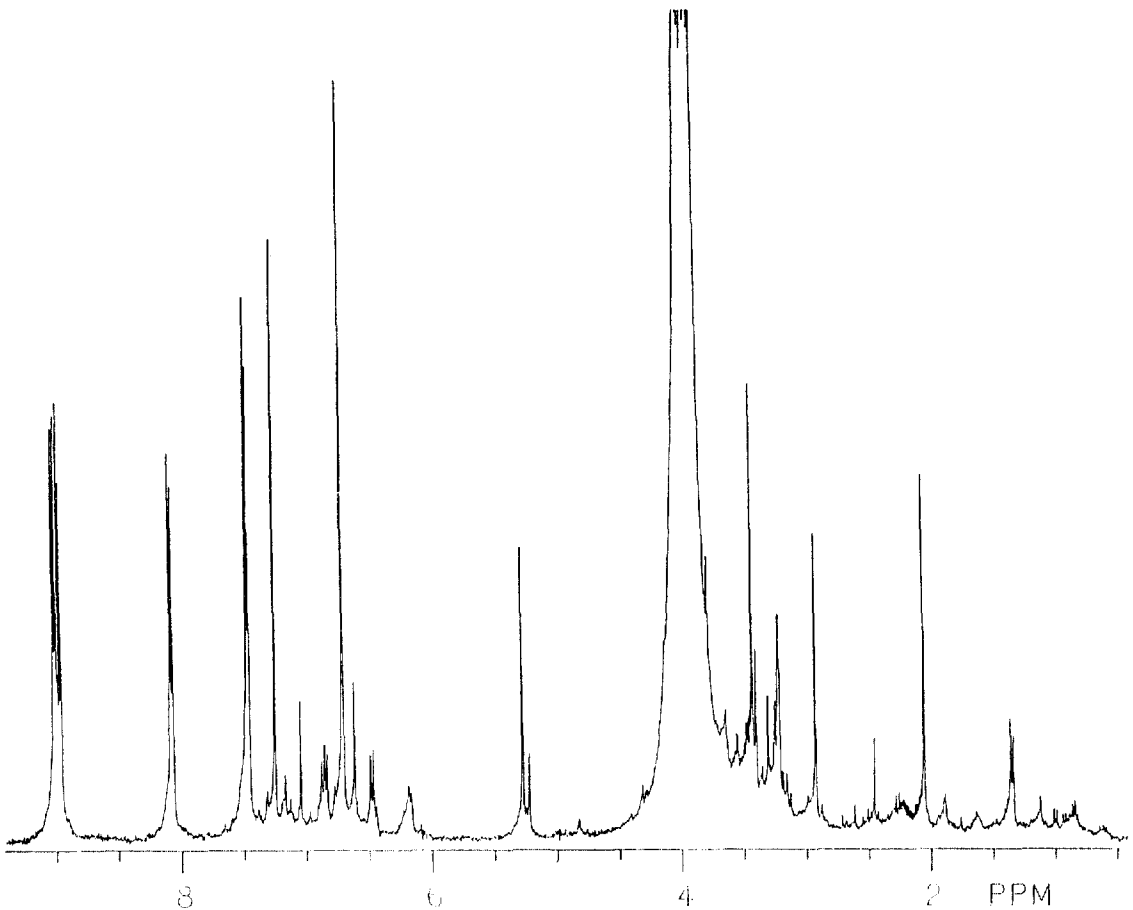
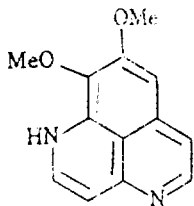


Fig. 6. The $^1\text{H-NMR}$ spectrum of the compound (2) (in CDCl_3).

64Hz), 7.85(d, 1H, J=5.60Hz) 및 7.40(d, 1H, J=4.50Hz)에서 나타나는 것을 확인할 수 있었다.



Aaptamine(1)



Demethoxy(oxy)aaptamine(2)

또한 방향족성 양성자로서 1개의 chemical shift가 δ 6.65(s, 1H), 그리고 1개의 methoxy 양성자로서 δ 3.72(s, 3H)에서 나타났다.

그리고 Table 2에 수록한 Mass spectrum에서 분자 이온이 213(M^+ , RA 25), 181($M^+ - CH_3O$, RA 31) 및 77(RA 57) 등임을 확인할 수 있었다. 또한 IR spectrum(KBr Pellet)에서 중요한 흡수 피크를 살펴보면 N-H 신축진동의 흡수 피크로서 3340cm^{-1} , 방향족성 C-H 흡수 피크로서 3080cm^{-1} , 방향족성 C=O 진동 피크로서 1660cm^{-1} , C=C 진동 피크로서 1610cm^{-1} 및 C-O 진동 피크로서 1240cm^{-1} 에서 나타났다. 아울러 UV spectrum(H_2O 용매)의 결과에서 최대 흡수파장 및 몰흡수계수는 $370\text{nm}(\epsilon=5035)$, $355\text{nm}(\epsilon=5520)$, $303\text{nm}(\epsilon=1730)$ 및 $232\text{nm}(\epsilon=10500)$ 였다.

위에서 기술된 분광학적인 결과($^{13}\text{C-NMR}$ spectrum은 없음)와 화합물(1)의 분광학적인 자료와 비교하고 문헌⁴과의 일치된 결과로부터 화합물(2)의 화학구조는 위에서 나타난 구조를 갖는 demethyl(oxy)aaptamine임을 확인할 수 있었다.

본 연구와 문헌³에서 수행된 시료는 해양 해면동물이라는 점은 같으나 학명이 다름을 알 수 있으며, yield에 대해 살펴보면 본 연구에서는 젖은 해면 30g으로부터 화합물 (1)과 (2)를 32mg, 5mg을 얻어 각각 0.11%, 0.017%의 yield를 나타냈고, 문헌⁴에서는 젖은 해면 986g으로부터 aaptamine hydrochloride(1.72g, 0.17%)과 화합물 (2)(235mg, 0.024%)가 얻어졌다.

3.3. 약리적인 효과

1987년 H. Nakamura 등⁴은 Okinawa 해안에서 채집한 A. aaptos 해면으로부터 aaptamine을 분리하였는데, 이것은 강력한 약리적인 활성을 갖는 새로운 형

태의 alkaloid이며, 특히 부드러운 근육관에 대하여 가장 강력한 α -adrenoceptor blocking 활성을 가졌으며, demethyl(oxy)aaptamine은 Hela cell에 대한 cytotoxic dose $0.87\mu\text{g}/\text{mL}$ 에 50% 효과가 있었고, Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis와 Proteus Vulgaris와 같은 박테리아에 대한 항균활성은 각각 minimum inhibitory concentration(MIC) $3.13\mu\text{g}/\text{mL}$, $6.25\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 $12.5\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 지닌 것으로 알려져 있다.

본 연구에서는 H. Nakamura 등이 생물활성 시험을 하지 않는 KB(human nasal cancer)⁵에 대해 활성 시험한 결과, 화합물 (1)은 minimum inhibitory concentration $5\mu\text{g}/\text{mL}$, 3^+ , 그리고 화합물 (2)는 활성을 보여 주지 못하였다.

4. 결론

종래에는 해양천연물의 의약품 연구가 단순히 새로운 대사산물 개발에 치중하였으나 최근에는 해양생물로부터 항암, 항박테리아, 항바이러스 효과를 갖는 화합물이 발견되어 이에 대한 관심이 크게 고조되고 있다.

본 연구에서 인도네시아 Manado만의 Sulawesi에서 채집한 해면 *Luffariella sp.*으로부터 KB 활성(human nasal cancer, MIC of $5\mu\text{g}/\text{mL}$, 3^+)을 갖는 Aaptamine (1), 그리고 KB 활성이 없는 Demethyl(oxy)aaptamine (2)를 분리하였으며, 이들의 구조는 ^1H , $^{13}\text{C-NMR}$, $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ (1 bond) heteronuclear multiple quantum coherence spectroscopy(HMQC)⁵, electron ionization mass spectroscopy(EI MS), UV 및 IR법에 의해 확인하였다.

참고문헌

1. (a) P. J. Scheuer, "Bioorganic Marine Chemistry", Vol. 3, p. 10. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 1989; (b) T. M. Zabriskie, J. A. Klocke, C. M. Ireland, T. F. Molinski, D. J. Faulkner, C. Xu, and J. C. Clardy, *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 3123(1986).
2. K. M. Cook, and E. C. Friedberg, *Biochemistry*, **117**, 850(1978).
3. G. Ottig, and K. Wuthrich, *J. Magn. Reson.*, **76**, 569(1988).

4. (a) H. Nakamura, J. Kobayashi, and Y. Ohizumi, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 173(1987). (b) H. Nakamura, J. Kobayashi, and Y. Ohizumi, *Tetrahedron Letters*, **23**, 5555-5558(1982).
5. F. Caplan, L. K. Larsen, and P. Mar, Department of Biology, University of Hawaii at Manoa, Honolulu, Hawaii 96822.